

北海道の農家圃場で発生したRhizoctonia solani AG-2-2IVによるダイズリゾクトニア根腐病およびR.solani AG-1IBによるアズキリゾクトニア根腐病

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	三澤,知央 小松,勉
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	62号
巻号補足	
掲載ページ	p. 50-54
発行年月	2011年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



北海道の農家圃場で発生した *Rhizoctonia solani* AG-2-2IV によるダイズリゾクトニア根腐病および *R. solani* AG-1 I B によるアズキリゾクトニア根腐病

三澤 知央*・小松 勉**

Occurrence of *Rhizoctonia* Root Rot of Soybean Caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2IV and Adzuki Bean Caused by *R. solani* AG-1 I B in Commercial Fields of Hokkaido

Tomoo MISAWA* and Tsutomu KOMATSU**

Hypocotyl rot of soybean and adzuki bean were observed in commercial fields of Hokkaido, Japan in June 2008. A *Rhizoctonia*-like fungus was frequently isolated from diseased portions of the plants. We identified the soybean isolate as *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG)-2-2IV and the adzuki bean isolate as *R. solani* AG-1 I B on the basis of cultural appearance, mycelial growth temperature, hyphal anastomosis, and the results of PCR using subgroup-specific primers. Inoculation tests with the isolates revealed that the fungus caused the same symptoms on the original hosts and were reisolated from portions of the host exhibiting the symptoms. We propose *R. solani* AG-2-2IV as another pathogen of root rot of soybean, because it has not been reported as a pathogen in Japan. This is the first report on adzuki bean root rot caused by *R. solani* in commercial fields in Japan.

Key words: adzuki bean, hypocotyl rot, *Rhizoctonia solani* AG-1, *Rhizoctonia solani* AG-2-2, soybean

2008年6月、北海道上富良野町のダイズ農家圃場および美瑛町のアズキ農家圃場において、出芽直後に胚軸部が褐変し立枯れる症状が発生した (Fig.1 a, b)。罹病植物からは単一の糸状菌が分離され、分離菌の病原性試験および同定の結果より、ダイズは *Rhizoctonia solani* の菌糸融合群 (Anastomosis Group: AG) 2-2・亜群 IV によるダイズリゾクトニア根腐病、アズキは *R. solani* AG-1 I B によるアズキリゾクトニア根腐病であることが明らかとなった。国内ではダイズリゾクトニア根腐病の病原として、これまで *R. solani* AG-1, AG-2-2 III B, AG-2-3, AG-4, AG-5 が報告されている (11, 12, 13) が、AG-2-2IV は未報告である。また、アズキリゾクトニア根腐病は、1975年に北海道大学の農場で発生した記録があるが、農家圃場での発生記録はないため、その結果を報告する。

本試験を実施するにあたり北海道医療大学・国永史朗博士には *R. solani* の標準菌株を分譲いただいた。記して感謝申し上げる。なお、本報告の一部は平成 22 年度日本

植物病理学会北海道部会で発表した (9)。

材料および方法

1. 発生状況および病徴

2008年6月、北海道上富良野町のダイズ農家1圃場 (品種: ユキホマレ) および美瑛町のアズキ農家1圃場 (品種: きたのおとめ) において発生状況および病徴を調査・観察した。

2. 病原菌の分離

ダイズ、アズキの発病株各4個体を採取し、褐変した胚軸部を長さ約1cmに切断し、1個体から4切片を得た。これを水道水で洗浄後、70%エタノールで約10秒間、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で約30秒間表面殺菌し、滅菌ろ紙上で水分を除去し、ストレプトマイシンを約300ppm加用したブドウ糖加用ジャガイモせん汁寒天 (PDA) 平板培地に置床した。これを25℃で2日間培養し、菌糸先端部を2%素寒天 (WA) 平板培地に移植し、

*北海道立総合研究機構 農業研究本部 道南農業試験場

Donan Agricultural Experiment Station, Agricultural Research Department, Hokkaido Research Organization, Hokuto, Hokkaido 041-1201, Japan

**北海道立総合研究機構 農業研究本部 上川農業試験場

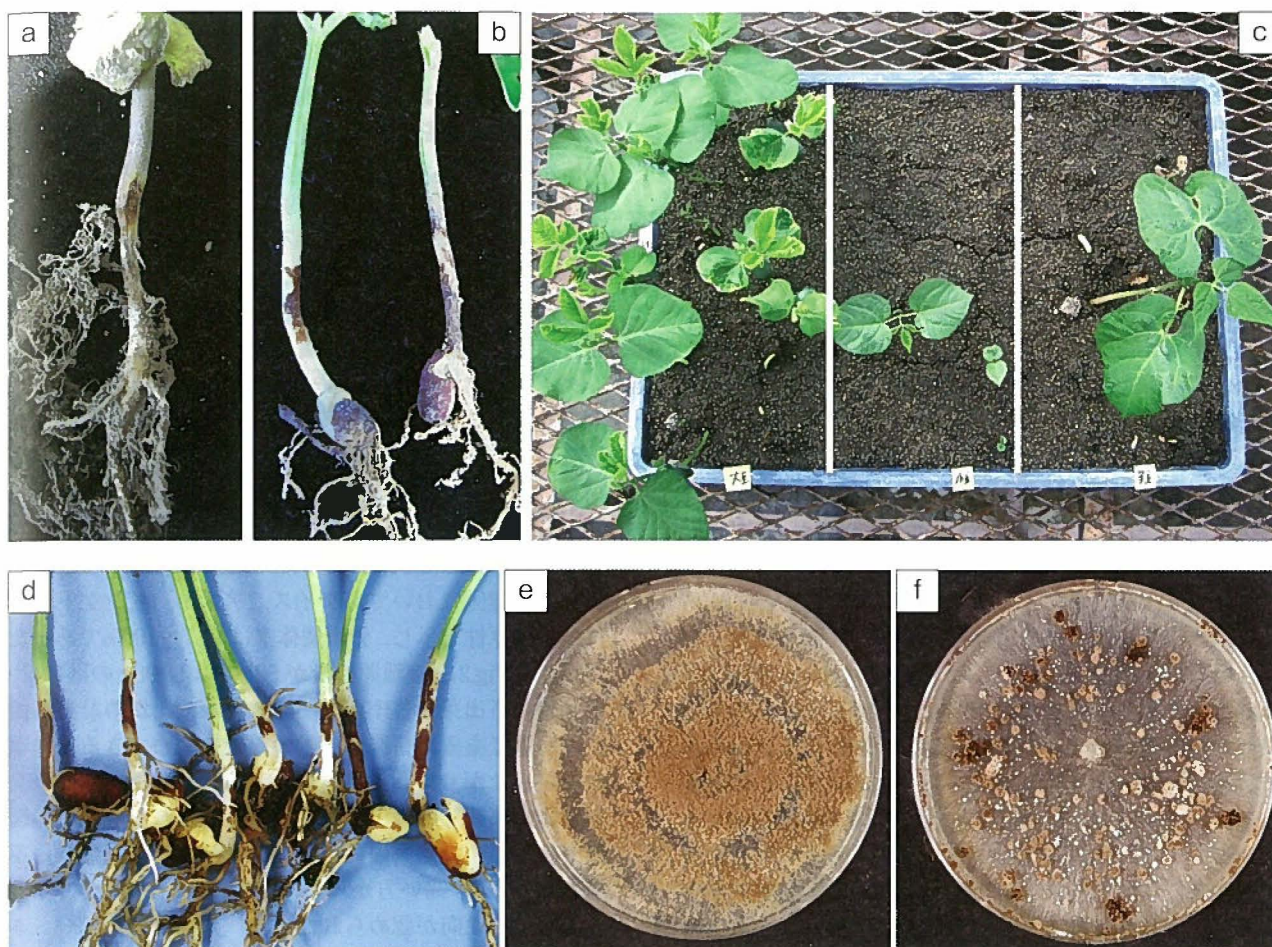


Fig 1 Symptoms, host range and cultural appearance of the soybean and adzuki bean hypocotyl rot pathogen, *Rhizoctonia solani*.

a-b : hypocotyl with browning of soybean (a) and adzuki bean (b) infected with *R. solani*.

c : damping-off of soybean (left), adzuki bean (center) and kidney bean (right) 16 days after inoculation with isolate SD1 (5 g of inoculum per container).

d : hypocotyl with browning of adzuki bean 16 days after inoculation with isolate AD1.

e-f : cultural appearance of isolates grown on PDA at 25°C for 3 weeks.

e : isolate SD1 (AG-2-2IV).

f : isolate AD1 (AG-1 I B).

25°Cで2日間培養し、菌糸先端部を切り取り分離菌株を得た。分離菌は、PDA 斜面培地および大麦粒培地 (15) で保存した。

3. 分離菌の病原性

分離菌株をフスマ培地で 25°C・14 日間培養し接種源とした。オートクレーブ滅菌 (121°C・60 分) した園芸培土 (ポットエース：片岡チッカリン) を充填したプラスチック製バット (47×32×深さ 6cm) にダイズ (品種：ユウヅル)、アズキ (品種不明)、インゲンマメ (品種：大正金時) を、ダイズおよびインゲンマメは 2 粒まきで 1 バットあたり 24 粒、アズキは 3 粒まき (1 バットあたり 36 粒) で同一のバットに播種した。接種源は播種直前

に園芸培土全体に混和した。ダイズ分離菌は、1 バットあたり 5g, 10g, 25g, 50g, 98g, アズキ分離菌は 1 バットあたり 91g を混和した。対照として無接種区を設定した。接種後は、23°C・16 時間日長の人工気象器内で管理し、接種 16 日後に発病状況を調査した。発病調査においては、不出芽個体率を調査後、全株を掘り上げ胚軸褐変個体率を調査し、この合計を発病個体率とした。また、発病個体からは菌の再分離を試みた。

4. 分離菌株の性状

形態観察・核数：分離菌株を WA 平板培地で 25°C・3 日間培養し、光学顕微鏡下で形態を観察した。形態観察後に菌糸を DAPI 染色 (8) し、蛍光顕微鏡下で 1 細胞あ

たりの核数を調査した。

培養菌叢：PDA 平板培地で 25℃・3 週間培養し培養菌叢を観察した。

温度反応：分離菌を PDA 平板培地上で 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 および 40℃ の恒温器内で培養し、24 時間後および 72 時間後に菌糸伸長を測定し、24 時間あたりの菌糸伸長を算出した。試験は 3 反復で実施した。

5. 菌糸融合反応

R. solani AG-1~AG-5 の標準菌株 CS-Gi 株 (AG-1 I A), RPS-9 株 (AG-2-1), C-96 株 (AG-2-2 III B), RI-64 株 (AG-2-2 IV), G-4 株 (AG-2-2 LP), ST9710HK 株 (AG-3 PT), AH-1 株 (AG-4 HG-I), ST9710HN 株 (AG-5) と分離菌の PDA 含菌ディスク (直径 6mm) を WA 培地上に約 3cm 離して置き、25℃ で対峙培養した。培養 2~3 日後に光学顕微鏡下で菌糸融合反応を観察した。

6. PCR 法による亜群の判別

分離菌を PDA 平板培地で 25℃・7 日間培養し、滅菌した爪楊枝で少量の培養菌体を掻き取り、液体窒素を加えて磨砕後、DNA 抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) を用いて核酸を抽出した。ダイズ分離菌から抽出した核酸は *R. solani* AG-2-2 の亜群 III B, IV, LP, アズキ分離菌から抽出した核酸は *R. solani* AG-1 の亜群 I A, I B, I C をそれぞれ特異的に検出するプライマー (4) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応液の組成および温度条件は国永 (4) に従った。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウムで染色し、紫外線を照射して増幅産物を観察した。

結果および考察

1. 発生状況および病徴

ダイズ圃場およびアズキ圃場ともに出芽不良が認められた。出芽個体を掘り上げると胚軸部が褐変し、初生葉が枯死していた。根部の腐敗・褐変は認められなかった。両作物とも、0.4ha の圃場の約 0.2% の個体でスポット状に発生が認められた。なお、不出芽個体については病徴観察および菌の分離を実施しなかったため、胚軸の褐変を原病徴と判断した。

2. 病原菌の分離

ダイズ、アズキとも供試 4 個体は、いずれの個体からも病変部から単一の糸状菌が高率に分離された。ダイズ分離菌 SD1 およびアズキ分離菌 AD1 を以降の試験に供試した。

3. 分離菌の病原性

ダイズ分離菌 SD1 の接種は、接種源の量 5~98g のいずれの処理区においてもダイズ、アズキ、インゲンマメに強い病原性を示し、発病個体率は 91.7~100% であった (Fig.1 c, Fig.2)。接種源の量が 50g および 98g の区では、ダイズの不出芽個体率が 87.5% と高かったため、典型的な原病徴である出芽後の胚軸の褐変を観察できる個体が少なかったが、接種源の量が 5~25g の区では 50% 以上の個体が出芽し胚軸の褐変症状が再現された。統計処理は実施していないものの、いずれの接種量においても、不出芽個体率は、高い方から順にアズキ、インゲンマメ、ダイズとなる傾向が認められた。

アズキ分離菌 AD1 の接種により、ダイズ、アズキおよびインゲンマメに対して病原性が認められた。各作物の

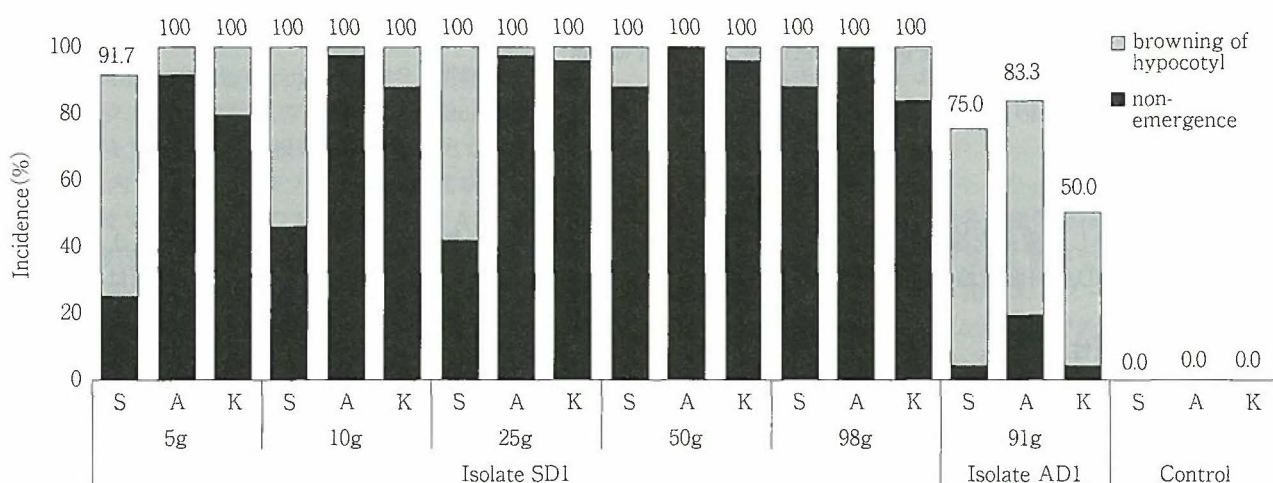


Fig 2 Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates SD1 and AD1 to soybean, adzuki bean and kidney bean.

- a) S, A, K indicate used plants for pathogenicity test. S : soybean, A : adzuki bean, K : kidney bean.
b) Values indicate inoculum weight per container in each pathogenicity test.

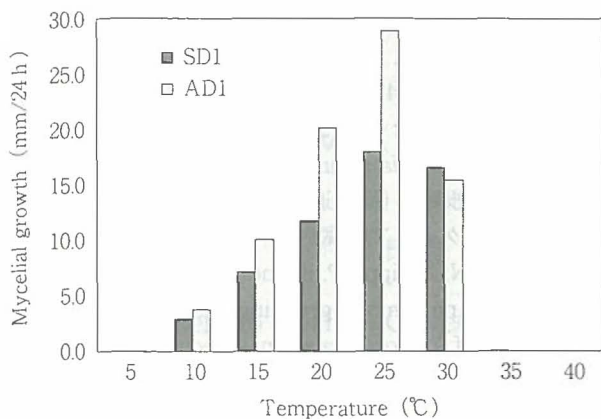


Fig 3 Mycelial growth of isolates SD1 and AD1 of *Rhizoctonia solani* on potato dextrose agar at different temperatures for 24h.

発病個体率は50.0～83.3%であり、SD1株より病原性が弱かった (Fig.2). 出芽個体の胚軸部には褐変が認められ (Fig.1 d) 原病徴が再現された。不出芽個体率および発病個体率ともにアズキが最も高かった。いずれの発病株からも接種菌が分離された。なお、無接種区では発病が認められなかった (Fig.2)。

4. 分離菌株の性状

分離菌は分岐部がくびれ、分岐部付近に隔壁を有した。また、菌糸先端の隔壁の直下で分岐した。菌糸幅はSD1株が6.3～11.7 (平均9.3) μm 、AD1株が6.8～10.9 (平均8.3) μm 、1細胞あたりの核数はSD1株が5～13 (平均7.8)、AD1株が4～14 (平均7.9) であった。以上の形態的特徴より両分離菌を *R. solani* と同定した。

培養菌叢・温度反応：SD1株のPDA平板培地上における培養菌叢ははじめ無色で培養3週間後には褐色となり、明瞭な輪帯状の菌糸が密な層を形成した (Fig.1 e)。AD1株は、はじめ無色で培養3週間後には淡褐色となった。菌叢表面には褐色または淡褐色、不整形で表面粗造の菌核を形成した (Fig.1 f)。

SD1株の生育適温は25℃であり、30℃でも生育したが、35℃ではほとんど生育しなかった (0.2mm/24時間)。25℃における生育は18.1mm/24時間であった (Fig.3)。AD1株の生育適温は25℃であり、30℃でも生育したが、35℃では生育しなかった。25℃における生育は29.0mm/24時間であった (Fig.3)。両分離菌の培養菌叢および温度反応の結果は、SD1株は渡辺・松田 (17) の培養型IV、AD1株は培養型IBと一致した。

5. 菌糸融合反応

SD1株は、*R. solani* の標準菌株のうちAG-2-2に属する3菌株 (C-96, RI-64, G-4) と高頻度で、AG-2-1に属す

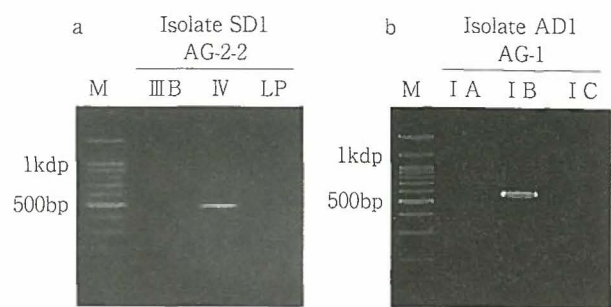


Fig 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from fungal DNA of *Rhizoctonia solani* isolates SD1 (a) and AD1 (b).

Amplifications were carried out using primer pairs designed for specific detection of *R. solani* AG-2-2 III B (lane III B), IV (lane IV) and LP (lane LP) (a) and *R. solani* AG-1 I A (lane I A), I B (lane I B) and I C (lane I C) (b). Lane M: 100-bp ladder.

るRPS-9株と低頻度で融合し、その他の菌群とは融合しなかったことから、AG-2-2と同定した。AD1株は、標準菌株のうちAG-1に属するCS-Gi株と高頻度で融合したが、その他の菌群とは融合しなかったことから、AG-1と同定した。

6. PCR法による亜群の判別

SD1株は、亜群特異的PCR反応において、AG-2-2IV特異的プライマーによってのみ500bp付近に増幅産物が認められた (Fig.4 a)。AD1株は、亜群特異的PCR反応において、AG-1 I B特異的プライマーによって500bp付近に増幅産物が認められた (Fig.4 b)。増幅産物のサイズはいずれも国永 (4) が報告したAG-2-2IVおよびAG-1 I Bのサイズと一致した。PCR反応の結果は、SD1株がAG-2-2IV、AD1株がAG-1 I Bに属することを示し、菌糸融合反応および培養型の観察結果と一致した。

以上の結果よりダイズは *R. solani* AG-2-2IV、アズキは *R. solani* AG-1 I Bによる病害であることが明らかとなった。両病害の病徴は、内記・宇井 (12) が報告したダイズおよびアズキのリゾクトニア根腐病と病徴が一致することから、同病であると同定した。なお、病名には「根腐」の文字が入るが、原記載においても本事例においても胚軸の褐変が主な病徴であり、根の腐敗は顕著ではなかった。原記載では、地下部の胚軸が腐敗することにより根が脱落する症状を「根腐症状」と表現している。

ダイズおよびアズキのリゾクトニア根腐病は、1975年に北海道大学の農場での発生が国内最初の発生事例である (12)。病原菌は *R. solani* AG-1, AG-4, AG-5であった。その後、ダイズリゾクトニア根腐病は、1996年に東北農業研究センター (岩手県) の圃場でAG-2-3 (13)、2003～2004年に富山県の農家圃場でAG-2-2 III Bによる発生が

確認されている (11). AG-2-2IVは本病の病原として、未報告であるため、病原として追加することを提案する。

国内ではこれまで農家圃場におけるダイズリゾクトニア根腐病の発生記録は、富山県のみであった。北海道においては農家圃場での正式な発生記録はなかったものの、以前から発生していたと考えられる (清水, 私信)。

一方、海外では多くの発生報告があり、アメリカ (6, 10, 16)、カナダ (1)、ブラジル (2, 3)、アルゼンチン、ボリビア、パラグアイ、イタリア (18)、中国 (19)、インドネシア (14) で発生が確認されており、世界の主要なダイズ産地で広く発生している病害である (7)。病原は、*R. solani* AG-1, AG-2-2III B, AG-4HG- I (亜群未同定の AG-2-2, AG-4 の報告を含む)、AG-5, AG-7 (3, 6, 10, 14, 16) および 2 核 *Rhizoctonia* の AG-A (19)、AG-E (14) が報告されているが、*R. solani* AG-2-2IV は、海外においても報告がない。

アズキリゾクトニア根腐病は、1975 年の北海道大学の農場での初発生以来、国内で発生記録がない病害であり、本事例が国内の農家圃場における初発生である。海外においても本病の発生記録はほとんど見当たらず、著者らが調べた限りでは、台湾において本病の生物防除に関する論文が発表されているのみであった (5)。

なお、分離菌株 SD1 および AD1 を農業生物資源ゲノムバンクにそれぞれ MAFF242303 および MAFF242304 として寄託登録した。

引用文献

- 1) Anderson, T.R., Olechowski, H. and Welacky, T. (1988) Incidence of *Rhizoctonia* and *Fusarium* root rot of soybean in Southwestern Ontario. Can. Plant Dis. Surv. 68 : 143-145.
- 2) Bolkan, H.A. and Ribeiro, W.R.C. (1985) Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. Plant Dis. 69 : 599-601.
- 3) Fenille, R.C., Souza, N.L. and Kuramae, E.E. (2002) Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. Eur. J. Plant Pathol. 108 : 783-792.
- 4) 国永史朗 (2003) *Rhizoctonia solani* における菌糸融合による分類の現状. 植物防疫 57 : 219-222.
- 5) Liu, S.D. (1991) Biological control of adzuki-bean root rot disease caused by *Rhizoctonia solani*. Plant Prot. Bull. 33 : 63-71.
- 6) Liu, Z., Sinclair, J.B. (1991) Isolate of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-2 pathogenic to soybean. Plant Dis. 75 : 682-687.
- 7) Liu, Z. (1989) *Rhizoctonia* disease (Sinclair, J. B. and Backman, P.A. eds) Compendium of soybean diseases. APS Press, St. Paul. pp.45-47.
- 8) Martin, B. (1987) Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. Plant Dis. 71 : 47-49.
- 9) 三澤知央・小松 勉 (2011) 北海道の農家圃場で発生した *Rhizoctonia solani* AG-2-2IV によるダイズリゾクトニア根腐病 (病原追加) および AG-1 I B によるアズキリゾクトニア根腐病. 日植病報 77 : 73 (講要).
- 10) Muyolo, N.G., Lipps, P. E. and Schmitthenner, A. F. (1993) Anastomosis grouping and virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with dry bean and soybean in Ohio and Zaire. Phytopathology 83 : 438-444.
- 11) 向島博行 (2008) 土壌伝染性病害のダイズの茎疫病およびリゾクトニア根腐病の発生生態と防除. 植物防疫 62 : 465-471.
- 12) 内記 隆・宇井格生 (1981) *Rhizoctonia solani* Kühn によるインゲン、ダイズおよびアズキの根腐病. 北大農邦文紀要 12 : 262-269.
- 13) 内藤繁男・伊藤信雄 (1999) *Rhizoctonia solani* AG-2-3 によるダイズリゾクトニア根腐病の発生. 北日本病虫研報 50 : 54-57.
- 14) Naito, S., Mohamad, D., Nasution, A. and Purwanti, H. (1993) Soil-borne diseases and ecology of pathogens on soybean roots in Indonesia. JARQ (Japan Agricultural Research Quarterly) 26 : 247-253.
- 15) 内藤繁男・山口武夫・杉本利哉・本間善久 (1993) *Rhizoctonia* 属菌の培養大麦粒による簡易長期保存法について. 北日本病虫研報 44 : 20-23.
- 16) Nelson, B., Helms, T., Christianson, T. and Kural, I. (1996) Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* from Soybean. Plant Dis. 80 : 74-80.
- 17) 渡辺丈吉郎・松田 明 (1966) 畑作物に寄生する *Rhizoctonia solani* Kühn の類別に関する研究. 指定試験 (病害虫) 7 : 1-131.
- 18) Wrather, J. A., Anderson, T. R., Arsyad, D. M., Gai, J., Ploper, L. D., Porta-Puglia, A., Ram, H. H. and Yorinori, J. T. (1997) Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. Plant Dis. 81 : 107-110.
- 19) Yang, G. H., Chen, H. R., Naito, S., Ogoshi, A. and Deng, Y. L. (2005) First report of AG-A of Binucleate *Rhizoctonia* in China, Pathogenic to soya bean, pea, snap bean and pak choy. J. Phytopathol. 153 : 333-336.