

Rhizoctonia solani AG-2-2IIIBによるミツバ立枯病

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	三澤,知央 黒川,太郎
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. 85-88
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



Rhizoctonia solani AG-2-2ⅢB によるミツバ立枯病

三澤 知央*・黒川 太郎**

Damping-off of Japanese Hornwort Caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2ⅢB

Tomoo MISAWA* and Taro KUROKAWA**

Damping-off of Japanese hornwort (*Cryptotaenia japonica*) was found in Hokkaido, Japan in July 2007. A *Rhizoctonia*-like fungus was frequently isolated from the diseased portion of the plant. We identified this isolate as *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG)-2-2ⅢB on the basis of cultural morphology, mycelial growth at different temperatures, hyphal anastomosis, and the result of PCR using subgroup-specific primers. An inoculation test with the isolate revealed that the fungus caused the same symptom on Japanese hornwort and was reisolated from the portion of the plant exhibiting the symptom. Because it has not been reported as a pathogen causing damping-off of Japanese hornwort in Japan, except for *R. solani* AG-1 I B and AG-4HG- I, we propose *R. solani* AG-2-2ⅢB as a new pathogen of Japanese hornwort.

Key words: damping-off, Japanese hornwort, *Rhizoctonia solani* AG-2-2ⅢB

2007年7月、北海道知内町の露地ミツバ(*Cryptotaenia japonica*) 養成株栽培圃場において、播種後約2ヶ月の株の茎地際部が褐変・軟化し、株全体が枯死する症状が発生した (Fig.1a-c)。罹病植物から単一の糸状菌が分離され、分離菌の病原性調査および同定の結果より、本症状が *Rhizoctonia solani* の菌糸融合群 (Anastomosis Group: AG) 2群2型・培養型ⅢBによるミツバ立枯病であることが明らかとなった。我が国ではこれまでに本病の病原として *R. solani* AG-1 I B と AG-4HG- I が報告されているが、AG-2-2ⅢBは未報告であるため、試験の概要を報告する。

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20年度日本植物病理学会北海道部会で発表した (5)。

材料および方法

1. 発生状況および病徴

2007年7月、北海道知内町の露地ミツバ (品種：柳川2号) 養成株栽培圃場で被害の発生状況および病徴を調

査・観察した。

2. 病原菌の分離

褐変した茎を長さ約1cmに切断し、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濃度を約300ppmに調整したブドウ糖加用ジャガイモゼン汁寒天 (PDA) 平板培地に置床し、25℃で2日間培養した。菌糸先端部を2%素寒天 (WA) 平板培地に移植し、25℃で2日間培養後、伸長した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 (6) 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℃・14日間培養し接種源とした。オートクレーブ滅菌 (121℃・60分) した園芸培土 (ポットエース：片岡チッカリン) を充填したミニプランター (26.5×14.5×高さ12cm) にミツバ種子 (品種：柳川2号) 1gを条まきし、ガラス温室内で40日間栽培し検定植物とした。接種は検定植物の株元付近の土壤にプランターあたり接種源を5g埋めて行なった。対照の無接種区には、接種区と同量のフスマ培地を株元に埋めた。接種区、無接種区とも、各1プランターを供試し、接種後は

*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

**渡島農業改良普及センター渡島南部支所

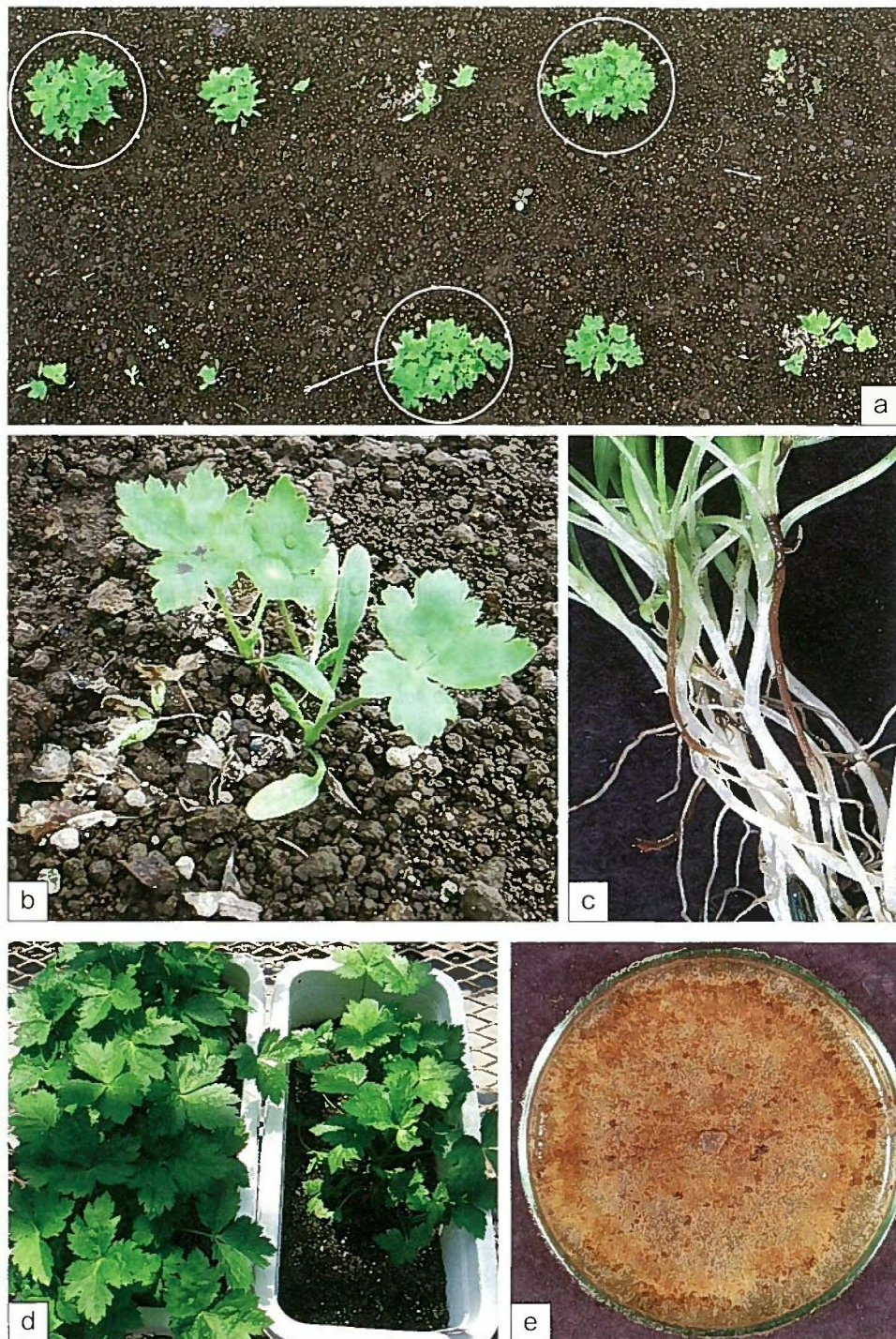


Fig 1 Symptoms, pathogenicity and cultural appearance of the Japanese hornwort damping-off pathogen *Rhizoctonia solani*.

a-b : damping-off of Japanese hornwort infected with *R. solani*. Healthy plants were surrounded by white circles.

c : browning and soft rot on stems of diseased plants.

d : damping-off of Japanese hornwort plants 14 days after inoculation (right) and uninoculated control (left).

e : cultural appearance of isolate JHS2 grown on PDA at 25 °C for 3 weeks.

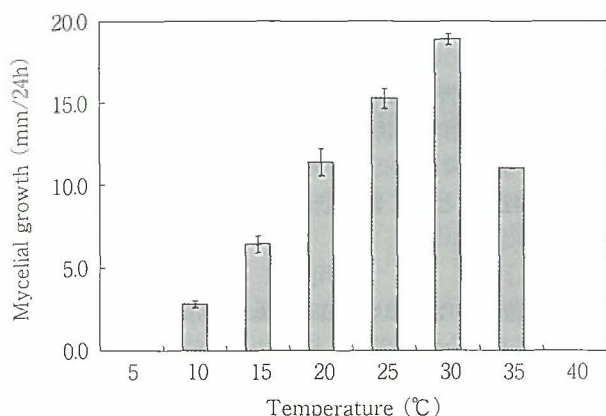


Fig 2 Mycelial growth of isolate JHS2 of *Rhizoctonia solani* on potato dextrose agar at different temperatures for 24 h.

Each value indicates the mean of three replicate determinations, and each bar indicates the standard error of the mean.

20～25℃に制御したガラス温室内で管理した。接種14日後に発病状況を調査し、発病個体から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℃・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そのままDAPI染色(4)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*のAG-1～AG-5の標準菌株CS-Gi株(AG-1IA), RPS-9株(AG-2-1), C-96株(AG-2-2ⅢB), RI-64株(AG-2-2Ⅳ), G-4株(AG-2-2LP), ST9710HK株(AG-3PT), AH-1株(AG-4HG-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、各対峙菌株における菌糸先端の接触を確認した後、光学顕微鏡下で菌糸融合反応を観察し、以下に示すSneh *et al.* (7)の方法に準じて菌糸融合頻度を判定した。融合頻度は、30%未満を低頻度、30～50%を中頻度、50%以上を高頻度とした。

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

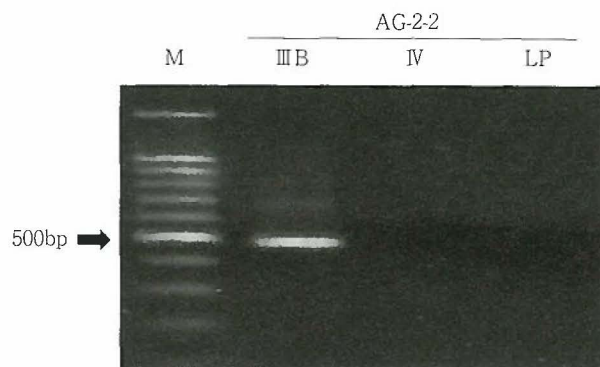


Fig 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from fungal DNA of *Rhizoctonia solani* AG-2-2ⅢB isolate JHS2.

Amplification was carried out using primer pairs designed for specific detection of *R. solani* AG-2-2ⅢB (laneⅢB), Ⅳ (laneⅣ) and LP (laneLP).

Lane M : 100-bp ladder.

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。抽出した核酸を*R. solani* AG-2-2の亜群ⅢB, Ⅳ, LPをそれぞれ特異的に検出するプライマー(1)を用いてPCR反応を行った。PCR反応液の組成および温度反応は国永(1)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

約2haのミツバ圃場の約20%の株で立枯れ症状が認められた。圃場内での発生の偏りは見られなかった。健全株は約20個体で1株をなし、株の幅は約10cmであったが、発病株では、株内の一部の個体が枯死することにより株のボリュームが減少し(Fig.1 a, b)。重症株では株全体が枯死し欠株となった。発病株は茎地際部が軟化・褐変し(Fig.1 c)、褐変部より先端はやがて倒伏・枯死した。病変部を光学顕微鏡下で観察したところ、*Rhizoctonia*様の菌糸が多数確認された。

2. 病原菌の分離

病変部からは単一の糸状菌が高率に分離された。分離した菌株からJHS2株を選抜し、以降の試験に供試した。

3. 分離菌の病原性

分離菌株を接種した株は、一部の個体が枯死し株全体のボリュームが無接種株より小さくなった。連続して枯死した部分は欠株状態となり、いずれも原病徴が再現された(Fig.1 d)。発病株からは接種菌と同様の菌が分離された。

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8.1~11.6(平均9.5) μm 。1細胞あたりの核数は4~14(平均8.3)であった。以上の形態的特徴より分離菌を *R. solani* と同定した。

培養菌叢・温度反応：分離菌のPDA平板培地上における培養菌叢ははじめ白色で培養3週間後には茶褐色となった。菌叢は輪帯状に菌糸が密となり平板状であった(Fig.1 e)。分離菌の生育適温は30℃であり、35℃でも生育した。25℃における生育は15.4mm/24時間であった(Fig.2)。分離菌の培養菌叢および温度反応の結果は、渡辺・松田(8)の培養型ⅢBと一致した。

5. 菌糸融合反応

分離菌は、*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に属するRPS-9株と低頻度で融合し、その他の菌株とは融合しなかったことから、AG-2-2と同定した。

6. PCR法による亜群の判別

亜群特異的PCR反応において、AG-2-2ⅢB特異的プライマーによってのみ増幅産物が認められ、ⅣおよびLP特異的プライマーでは増幅産物は認められなかった(Fig.3)。増幅産物のサイズは国永(1)が報告した500bpよりやや小さかったものの、AG-2-2ⅢB特異的プライマーによってのみ増幅産物が得られたことから、PCR反応の結果は分離菌がAG-2-2ⅢBに属することを示すと判断した。本PCRの結果は菌糸融合反応および培養型の観察結果と一致した。

以上の結果より本症状が *R. solani* AG-2-2ⅢBによる病害であることが明らかとなった。本病の病徴は、草刈ら(2)が報告した *R. solani* AG-1 I Bによるミツバ立枯病と

一致していることから、本病をミツバ立枯病と同定した。国内では本病の病原としてこれまでAG-1 I B、AG-4HG-I(2, 3)が報告されているが、AG-2-2ⅢBは未報告であるため病原として追加することを提案する。

なお、分離菌株JHS2を農業生物資源データベースにMAFF242305として寄託登録した。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 草刈真一・八田茂徳・津田盛也・上山昭則(1975) ミツバの溶液栽培と *Rhizoctonia solani* による立枯病の発生。農業および園芸 50: 1525-1526.
- 3) 藤田智美・百町満朗(2007) ミツバから分離される立枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) の菌糸融合群と培養型。日植病報 73: 184 (講要)
- 4) Martin, B. (1987) Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. Plant Dis. 71: 47-49.
- 5) 三澤知央・黒川太郎(2009) *Rhizoctonia solani* AG-2-2 ⅢBによるミツバ立枯病(病原追加)。日植病報 75: 87 (講要)
- 6) 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.
- 7) Sneh B., Burpee L. and Ogoshi A. (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul, pp 17-18.
- 8) 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.