

Rhizoctonia solani AG-2-1によるキョウナとコマツナの葉腐れ症状および立枯れ症状

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	三澤,知央 泉,咲子
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	63号
巻号補足	
掲載ページ	p. 87-91
発行年月	2012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-2-1 によるキョウナとコマツナの葉腐れ症状 および立枯れ症状

三澤 知央*・泉 咲子**

Leaf Blight and Damping-Off of Potherb Mustard (*Brassica rapa* subsp. *lancinifolia*)
and Komatsuna (*Brassica rapa* var. *perviridis*) Caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-1

Tomoo MISAWA* and Sakiko IZUMI**

Leaf blight, damping-off and bottom rot of potherb mustard and komatsuna were found in Hokkaido, Japan in March 2010 and February 2011. *Rhizoctonia*-like fungi were isolated from diseased portions of both plants. We identified five isolates of the fungi as belonging to the *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG) -2-1 on the basis of cultural appearance, mycelial growth temperature, hyphal anastomosis and the result of PCR using an AG-specific primer pair. Each of the isolates obtained from leaf blight, damping-off and bottom rot induced all the symptoms on the original host by inoculation, indicating that all the symptoms are caused by the fungi. We propose that the name of potherb mustard disease caused by *R. solani* be changed from 'Shirigusare-byo' to 'Rhizoctonia-byo' in Japanese, because the occurrence of leaf blight and damping-off was confirmed. Sato et al. (1999) reported the occurrence of komatsuna leaf blight caused by *R. solani* AG-2-1, and they considered it as a new disease different from damping-off. However, we confirmed that both symptoms are typical of the same disease.

Key words: damping-off, komatsuna, leaf blight, potherb mustard, *Rhizoctonia solani* AG-2-1

2010年3月、北海道北斗市の同一ハウス内で栽培中の収穫期のキョウナ（ミズナ）およびコマツナで葉腐れ症状、2011年2月には七飯町で播種1ヶ月後の両作物で立枯れ症状が発生した（いずれも品種不明）。罹病植物からは単一の糸状菌が分離され、分離菌の同定および病原性試験の結果、我が国における *R. solani* によるキョウナおよびコマツナ病害の発生記録においていくつかの新知見が得られたため、試験結果を報告する。

なお、本報告の一部は平成23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

2010年3月に北斗市、2011年2月に七飯町のキョウナおよびコマツナ栽培ハウス（いずれも無加温）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

病変部を約5mm四方に切断し、水道水で洗浄後、70%エタノールで約20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加用したグルコース加用ジャガイモ煎汁寒天（PDA）平板培地に置床した。これを25℃で3日間培養し、菌糸先端部を2%素寒天（WA）平板培地に移植し、さらに25℃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（6）で保存した。

3. 接種試験

播種後1ヶ月の株の葉身部、葉柄基部および出芽直後の株の地際部に対する分離菌株の病原性を調査した。播種1ヶ月後の株に対する病原性試験には、園芸培土を充填したビニールポット（直径12cm）で1ヶ月間栽培したキョウナ（品種：京水菜）およびコマツナ（品種：楽

*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

天)を供試した。

葉身部に対する病原性試験では分離菌株をPDA培地で25℃・4日間培養した菌叢を直径6mmのコルクボーラで打ち抜き接種源とした。接種源を1株あたり2葉に1葉あたり1枚の割合で含菌寒天貼り付け接種を行った。接種株全体をビニールで被覆し温室状態とし20℃・16時間日長で制御した人工気象器内で管理し、接種3日後に発病状況を調査した。

葉柄基部に対する病原性試験では、フスマ培地で25℃・10日間培養した各菌株を接種源とした。接種源を1ポットあたり5gずつ株元土壌に混和した。接種株は15～20℃で管理したガラス温室内で栽培し、接種7日後に発病状況を調査した。葉身部および葉柄基部に対する病原性試験では、検定植物を各ポットに1株ずつ栽培し、1区2株で試験を実施した。

出芽直後の株の地際部に対する病原性試験では、園芸培土を充填したビニールポット(直径7cm)に1ポットあたり3粒ずつ播種し、播種8日後の2葉期の株を試験に供試した。各菌株のフスマ培地培養菌を接種源とし、これを1ポットあたり1gずつ株元に土壌混和した。接種株は18℃・16時間日長で制御した人工気象器内で管理し、接種9日後に発病状況を調査した。試験は1区3ポット(9株)で実施した。

いずれの部位に対する病原性試験もキョウナ分離菌はキョウナにのみ、コマツナ分離菌はコマツナにのみ接種した。また、いずれの試験においても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：分離菌株を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および35℃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(AG-1 I A)、RPS-9(AG-2-1)、C-96(AG-2-2 III B)、RI-64(AG-2-2 IV)、ST9710HK(AG-3PT)、AH-1(AG-4HG-I)、ST9710HN(AG-5)と各分離菌の含菌寒天ディスク(直径6mm)をWA平板培地上で約3cm離して置き、25℃で対峙培養した。培養2～4日後に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.(11)の方法に準じて菌糸融合頻度を判定した。融合頻度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法による菌糸融合群の同定

分離菌をPDA平板培地で25℃・10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碎後、DNA抽出キット(DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen)を用いて核酸を抽出した。抽出した核酸は*R. solani* AG-2-1特異プライマー(3)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(3)に従った。PCR産物を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の有無およびサイズを観察した。

結 果

1. 発生状況および病徴

両年の両圃場ともキョウナとコマツナを同一ハウスで栽培していた。北斗市では、ハウス内にトンネル被覆をして栽培し、両作物とも収穫期であった。キョウナでは接地した葉柄基部が軟化・腐敗し(尻腐れ症状)、葉脈を伝って腐敗が進展し、葉身を含め外葉全体が腐敗した。これとは別に葉身にのみ褐色楕円形の斑点を形成する葉腐れ症状の発生も認められた(Fig.1 a)。コマツナでも、葉柄基部の腐敗と葉身の斑点が認められた。葉身の斑点は1葉あたり最大20病斑程度形成し、やがてせん孔した(Fig.1 b)。キョウナ、コマツナとも栽培面積は約1aであった。発病率はキョウナの葉腐れ症状は約5%、尻腐れ症状は約30%であり、コマツナでは葉腐れ症状および尻

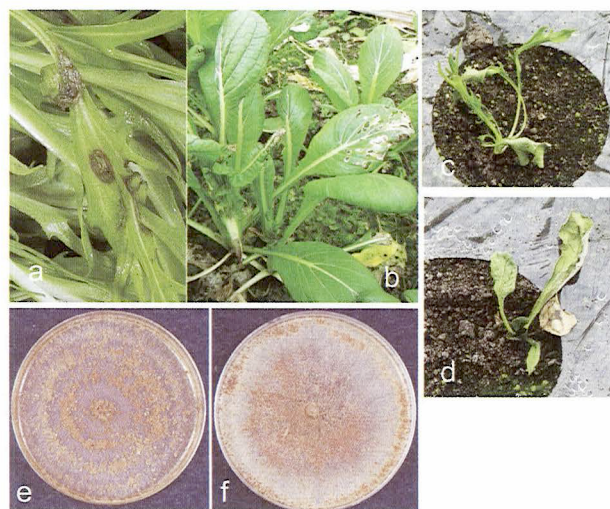


Fig.1 Leaf blight and damping-off of potherb mustard and komatsuna, and cultural appearance of the pathogen, *Rhizoctonia solani*.

a : leaf blight of potherb mustard
b : leaf blight and foot rot of komatsuna
c-d : damping-off of potherb mustard (c) and komatsuna (d)
e-f : cultural appearance of isolates grown on PDA at 25℃ for 3 weeks. e : isolate MD1 (potherb mustard damping-off pathogen), f : isolate KLS1 (komatsuna leaf blight pathogen)

腐れ症状とも約 30%であった。

七飯町ではトンネル無被覆で栽培しており、両作物とも健全株は6葉期であった。両作物とも葉柄基部が軟化・腐敗するが生育遅延が認められない尻腐れ症状を呈する株と、胚軸部および葉柄基部が軟化・腐敗し、株全体が萎凋・枯死し、立枯れ症状を呈する株が認められた (Fig.1 c, d)。立枯れ症状を呈した株は、4葉期で生育が停止し、顕著な生育遅延が認められた。葉腐れ症状の発生は認められなかった。キョウナ、コマツナとも栽培面積は約 1.5a であった。発病株率はキョウナ、コマツナとも立枯れ症状は約 5%、尻腐れ症状は約 10%であった。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。キョウナの葉腐れ症状から分離された菌株を MLB1 株、立枯れ症状から分離された菌株を MD1 株、コマツナの葉腐れ症状から分離された菌株を KLS1 株、尻腐れ症状から分離された菌株を KBR1 株、立枯れ症状から分離された菌株を KD1 株と命名し、以降の試験に供試した。

3. 接種試験

キョウナの葉腐れ症状および立枯れ症状から分離され

た MLB1 株および MD1 株は、両菌株とも接種によりキョウナに葉腐れ症状、尻腐れ症状および立枯れ症状を起こした。コマツナの各病徴から分離された 3 菌株 (KLS1 株, KBR1 株, KD1 株) の接種によっても各病徴が再現された (Table 1)。発病株からは接種菌が再分離された。

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。各菌株の菌糸幅は平均 8.1~8.9 μm 、1 細胞あたりの核数は平均 7.2~9.5 個であった (Table 2)。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 週間後には褐色で明瞭な輪紋を形成した (Fig.1 e, f)。

分離菌の生育適温はいずれも 25℃であり、30℃での生育は不良 (0.7~2.6mm/24 時間) で、35℃での生育は認められなかった。25℃における生育は 9.6~13.9mm/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 (12) の培養型 II と一致した (Table 2)。

5. 菌糸融合反応

分離 5 菌株は、*R. solani* の標準菌株のうち AG-2-1 に属

Table 1 Pathogenicities of five isolates obtained from plant parts showing various symptoms for potherb mustard and komatsuna

Isolate	Origin		Pathogenicity to original host		
	Host	Symptoms	Leaf	Basal petiole	Young seedling
MLB1 ^a	Potherb	Leaf blight	2/2 ^c (LB) ^d	2/2 (BR) ^e	9/9 (DO) ^f
MD1 ^b	mustard	Damping-off	2/2 (LB)	2/2 (BR)	9/9 (DO)
KLS1 ^a	Komatsuna	Leaf blight	2/2 (LB)	2/2 (BR)	9/9 (DO)
KBR1 ^a		Bottom rot	2/2 (LB)	2/2 (BR)	9/9 (DO)
KD1 ^b		Damping-off	2/2 (LB)	2/2 (BR)	9/9 (DO)

a : isolate collected from Hokuto City, in 2010

b : isolate collected from Nanae City, in 2011

c : number of plants diseased/number of plants tested

d : LB, leaf blight

e : BR, bottom rot

f : DO, damping-off

Table 2 Morphologies, anastomosis groups and culture types of potherb mustard and komatsuna isolates

Isolate	Origin		Width of hyphae	Number of nuclei	Anastomosis reaction	Culture type
	Host	Symptoms				
MLB1 ^a	Potherb	Leaf blight	5.7-10.0 (8.1) ^c	3-16 (9.5) ^c	AG-2-1	II
MD1 ^b	mustard	Damping-off	6.6-11.9 (8.6)	3-15 (7.2)	AG-2-1	II
KLS1 ^a	Komatsuna	Leaf blight	5.4-11.4 (8.9)	4-12 (7.2)	AG-2-1	II
KBR1 ^a		Bottom rot	6.1-11.1 (8.8)	4-14 (8.4)	AG-2-1	II
KD1 ^b		Damping-off	6.6-11.1 (8.9)	4-14 (7.7)	AG-2-1	II

a : isolate collected from Hokuto City in 2010

b : isolate collected from Nanae City in 2011

c : Minimum-maximum (Average)

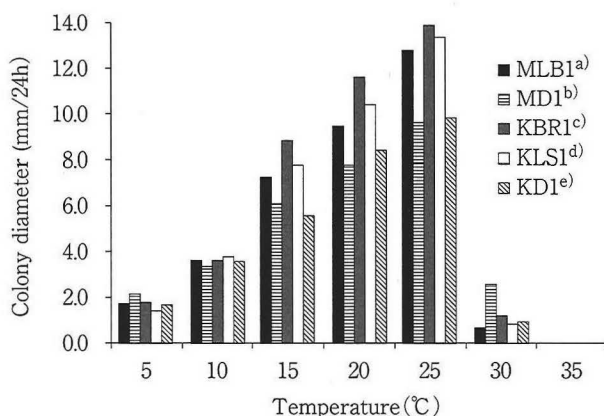


Fig 2 Mycelial growth of five isolates obtained from plant parts showing leaf blight, bottom rot and damping-off for potherb mustard and komatsuna, by culture on potato dextrose agar at different temperatures for 24h. a), b), c), d), e) : each isolate was obtained from potherb mustard leaf blight, potherb mustard damping-off, komatsuna bottom rot, komatsuna leaf blight and komatsuna damping-off regions.

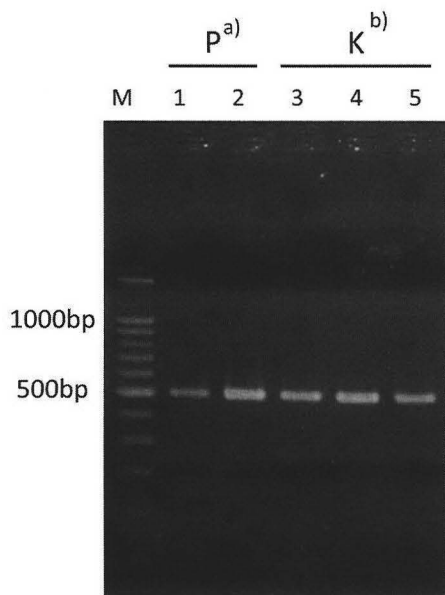


Fig.3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from fungal DNA of *Rhizoctonia solani* isolates.

Amplification was carried out using a primer pair designed for the specific detection of *R. solani* AG-2-1. Lane M : 100-bp ladder. Lanes 1, 2, 3, 4, 5 : isolates MLB1, MD1, KBR1, KLS1 and KD1.

- a) potherb mustard isolates
b) komatsuna isolates

する RPS-9 株と高頻度で、AG-2-2 に属する 2 菌株 (C-96, RI-64) 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、いずれも AG-2-1 と同定した (Table 2).

6. PCR 法による菌糸融合群の同定

AG-2-1 特異プライマーを用いた PCR 反応において、5 菌株とも増幅産物が得られ (Fig 3), PCR 反応の結果は、分離菌が AG-2-1 に属することを示し、菌糸融合反応の観察結果と一致した。

考 察

本研究の結果、キョウナおよびコマツナで発生した葉腐れ症状および立枯れ症状がいずれも *R. solani* AG-2-1 (培養型 II) による病害であることが明らかとなった。

R. solani によるキョウナの病害として、榮森・竹内 (9) が AG-2-1 による尻腐れ症状の発生を報告し「しり腐病」の病名を提案した。さらに、瓦谷ら (2) は AG-1 I C による立枯れ症状の発生を確認し、しり腐病の病原にこの菌群を追加したが、病名の変更は行わなかった。上記の 2 つの報告ではいずれも接種により尻腐れ症状と立枯れ症状が再現されているものの、両症状の関係については言及していない。本研究においては葉腐れ症状および立枯れ症状発生圃場において、同時に尻腐れ症状が発生していることを確認した。さらに、葉腐れ症状および立枯れ症状からそれぞれ分離された菌株の接種により葉腐れ症状、尻腐れ症状および立枯れ症状を起こすことを確認し、これらの症状が同一の病原菌によって引き起こされる同一病害であることを立証した。以上のことから、*R. solani* によるキョウナ病害の病名をリゾクトニア病に変更することを提案する。

R. solani によるコマツナの病害には、AG-1 I C および AG 未同定菌による立枯れ症状 (1,2), AG-2-1 による尻腐れ症状 (8) があり、病名はリゾクトニア病とされている。なお、上記の AG 未同定菌は生育適温が 30°C であり 35°C でも生育することから、AG-2-1 以外の菌群に属すると考えられる。また、日本植物病名目録 (7) には記載されていないものの、佐藤ら (10) は AG-2-1 による葉腐れ症状の発生を確認しており、これは我が国における *R. solani* によるコマツナの葉腐れ症状の初報告である。報告当時の *R. solani* によるコマツナの病害の病名が「苗立枯病」(1) であったことから、佐藤ら (10) は葉腐れ症状が苗立枯病とは別な病害であるとして「葉腐病」の病名を提案している。本研究によって、AG-2-1 が葉腐れ症状、尻腐れ症状、立枯れ症状のいずれの症状も起こすことが明らかとなったことから、「葉腐病」を「リゾクトニア病」に含めることを提案する。

本試験では、キョウナおよびコマツナの葉腐れ症状発生圃場において、担子胞子の形成状況を観察しなかったため、同症状の発生が担子胞子感染によるものであるか、菌糸感染によるものであるかは不明である。しかし、葉

への接種試験において接種源の周辺に拡大した病斑から2～3cm離れた部位においても病斑形成が認められた（データ省略）。このことから多湿条件下では菌糸感染によっても病斑の拡大とは別に数cm離れた部位への感染が可能であると推察された。葉腐れ症状発生ハウスはトンネル被覆により多湿条件であったことから、はじめに尻腐れ症状が発生し、その後菌糸感染により葉腐れ症状が発生したと考えられた。

なお分離菌株 MLB1, MD1, KBR1, KLS1, KD1 は、農業生物資源ジェノバンクにそれぞれ MAFF242982, 242983, 242984, 242985, 242986 として寄託・登録した。

引用文献

- 1) 堀江博道 (1990) コマツナの病害. 植物防疫 44 : 431-434.
- 2) 瓦谷光男・中曽根渡・岡田清嗣・田中 寛・西濱絢子 (2007) カラシナ, ミズナ, コマツナ, レタスに同時発生した *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 I C による苗立枯れ症状. 日植病報 73 : 21-24.
- 3) 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.
- 4) Martin, B. (1987) Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. Plant Dis. 71 : 47-49.
- 5) 三澤知央・泉 咲子 (2012) *Rhizoctonia solani* AG-2-1 によるキョウナとコマツナの葉腐症状および立枯症状. 日植病報 78 : 61 (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) 日本植物病理学会編 (2000) 日本植物病名目録, コマツナ. p207, 日本植物防疫協会, 東京.
- 8) 栄森弘己・嶋田竜太郎・竹内 純 (2005) 我が国における *Rhizoctonia solani* によるコマツナのしり腐れ症状およびダイコンの苗立枯れ症状の初発生. 関東東山病虫研報 52 : 35-38.
- 9) 栄森弘己・竹内 純 (2004) *Rhizoctonia solani* によるミズナしり腐病 (新称) の発生. 関東東山病虫研報 51 : 61-62.
- 10) 佐藤香織里・岩間俊太・桑田博隆・若宮通子 (1999) *Rhizoctonia solani* AG-2-1 によるコマツナ葉腐病 (新称) の発生. 北日本病虫研報 50 : 232 (講要).
- 11) Sneh B., Burpee L. and Ogoshi A. (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul, pp 17-18.
- 12) 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.