

Rhizoctonia solani AG-2-1によるブロッコリー苗立枯病

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	三澤,知央 山崎,和也 高田,一直
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	64号
巻号補足	
掲載ページ	p. 60-64
発行年月	2013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 によるブロッコリー苗立枯病

三澤 知央*・山崎 和也**・高田 一直*

Damping-off of Broccoli Caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-1

Tomoo MISAWA*, Kazuya YAMAZAKI** and Kazunao TAKADA*

Damping-off of broccoli was observed in Hokkaido, Japan in late-May 2012. An isolate obtained from diseased tissues was identified as *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG) -2-1 on the basis of hyphal anastomosis and the result of PCR analysis with specific primers. The cultural appearance of the isolate from broccoli was light brown, whereas that of typical AG-2-1 culture type II was brown. Also the mycelial growth of the isolate was slower than that of typical culture type II. The AG-2-1 isolate and six reference isolates, belonging to culture type II obtained from various *Brassica* plants, caused basal stem rot in broccoli seedlings in inoculation tests, indicating that pathogenicity to broccoli seedlings is the universal characteristic of AG-2-1 isolates as well as of the light-brown and slow-growing isolate. As no damping-off of broccoli caused by *R. solani* AG-2-1 has not been reported in Japan, we hereby propose including it as one of the pathogens of the disease.

Key words: AG-2-1, broccoli, damping-off, *Rhizoctonia solani*

2012年5月下旬、北海道今金町のブロッコリー栽培圃場で定植後の苗に立枯れ症状が発生した。罹病植物からの菌の分離、分離菌の同定および病原性試験の結果、本症状が *Rhizoctonia solani* 菌糸融合群：anastomosis group (AG) -2-1 によるブロッコリー苗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同病の病原として AG-1 I C (3)、AG-2 II B (4) および AG-4 HG-I (12) が報告されているが、AG-2-1 は未報告であるため、試験結果を報告する。

材料および方法

1. 発生状況および病徴

2012年5月下旬に北海道今金町の定植1ヶ月後のブロッコリー（品種：ピクセル）栽培圃場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

症状を呈した胚軸の表面を約5mm四方に切断した断片を分離に使用した。断片は水道水で洗浄後、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てストレプトマイシン約300ppm含有の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4日間培養後に生育した菌叢先端部を2%素寒天（WA）平板培地に移植し、さらに25℃で3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（9）で保存した。

3. 異なる温度条件での病原性

検定植物は、園芸培土を充填した2.5号ポリポット（直径7.5cm）で1週間栽培したブロッコリー苗（品種：ハイツSP）を供試した。検定植物を各ポットに1株ずつ栽培し、1区5株で試験を実施した。分離菌をフスマ培地で25℃・10日間培養した菌体を接種源とし、これを1ポットあたり1gずつ株元土壤に設置し、その上に滅菌培土を約1cm（ポットあたり35g）充填した。接種株は15℃、20℃および25℃・16時間日長でそれぞれ制御した人工気象器内で栽培し、接種10日後に発病状況を調査した。また、発病個体から菌の再分離を試みた。

*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

**松山農業改良普及センター 檜山北部支所

4. 各種作物から分離した AG-2-1・培養型 II 菌株の病原性

接種試験にはブロッコリー分離菌の他、対照菌株として 2007～2011 年に北海道内の各種アブラナ科作物から分離した *R. solani* AG-2-1・培養型 II に属する 6 菌株を供試した (Table 2)。接種は前述と同様の方法で行い、接種後は 20℃・16 時間日長で制御した人工気象器内で栽培し、接種 8 日後に発病状況を調査した。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。

5. 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℃・4 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 (7) 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：分離菌株および対照菌株として *R. solani* AG-2-1・培養型 II に属する TRR1 株 (カブ根腐病菌) 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。

6. 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・培養型 II), C-96 (AG-2-2 III B), RI-64 (AG-2-2 IV), ST9710HK (AG-3 PT), AH-1 (AG-4 HG-I) および ST9710HN (AG-5) と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 3～6 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.* (10) の方法に準じて菌糸融合頻度を判定した。低頻度：30% 未満、中頻度：30～50%、高頻度：50% 以上。また、Carling (1) の方法に準じて、融合反応のタイプを C0～C3 の 4 種類に分類した。

7. PCR 法による菌糸融合群の同定

分離菌を PDA 平板培地で 25℃・14 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、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 (6) 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 (6) 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

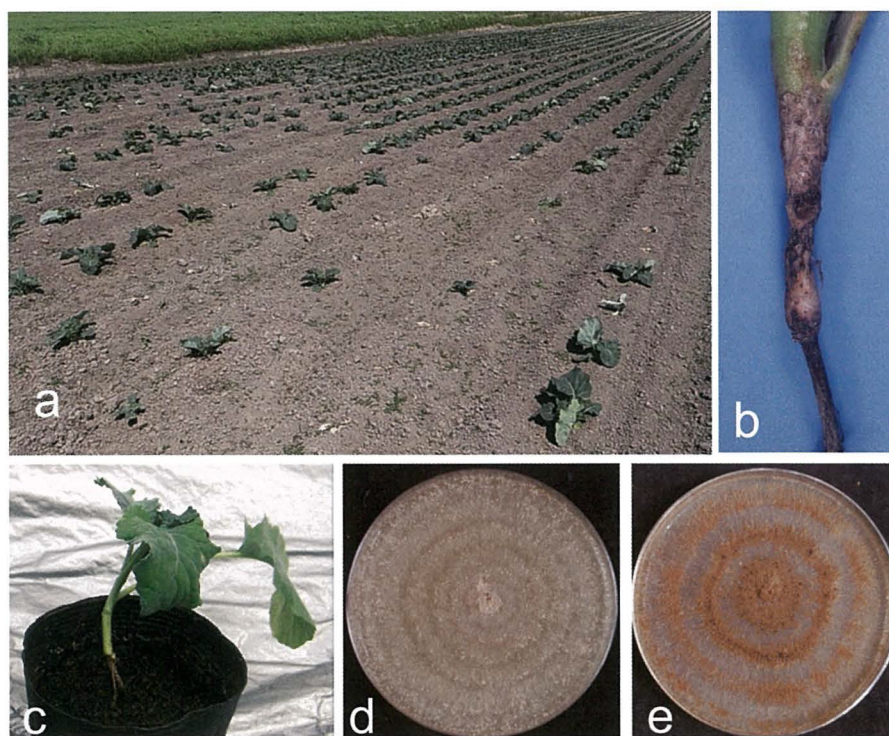


Fig. 1 Damping-off of broccoli, and cultural appearance of the pathogen, *Rhizoctonia solani*.

a: damping-off of broccoli in the field

b: basal stem rot of broccoli seedling

c: damping-off of broccoli seedling inoculated with isolate IBD1 10 days after inoculation at 25℃

d, e: Three-week-old PDA culture of isolate IBD1 (d) and reference isolate TRR1 belonging to culture type II within AG-2-1 (e) incubated at 25℃

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

発病株の胚軸部は褐変し、生育が遅延し、重症株では株全体が萎凋・枯死した (Fig. 1a, b). 10a の圃場の約 3% の株で発病が認められた。発生は圃場内でムラがあり、水はけの悪い部分でまとまって発生していた。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、分離菌 IBD1 株を以降の試験に供試した。

3. 異なる温度条件での病原性

いずれの接種温度においても IBD1 株を接種した 5 株すべての茎地際部に褐変・腐敗症状が認められた。接種温度 15℃ では萎凋症状は認められず、20℃ および 25℃

では 5 株中 1 株で萎凋症状が認められた (Fig. 1c; Table 1). 無接種株はいずれも病徴を示さなかった。また、発病株からは接種菌が再分離された。

4. 各種作物から分離した AG-2-1・培養型 II 菌株の病原性

各種アブラナ科作物から分離した *R. solani* AG-2-1・培養型 II・6 菌株はいずれも、IBD1 株と同様にブロッコリー苗の茎地際部を褐変・腐敗させた (Table 2). 供試したいずれの接種株においても萎凋症状の発生は認められなかった。IBD1 株および対照菌株のいずれの発病株からも接種菌が再分離された。

4. 分離菌株の性状

形態観察・核数：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。分離菌の菌糸幅は 6.2~10.2 (平均 8.2) μm , 1 細胞あたりの核数は 4~18 (平均 8.4) 個であった。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：分離菌 IBD1 株の菌叢ははじめ白色で培養 3 週間後には淡褐色で明瞭な輪紋を形成した (Fig. 1d). 菌叢の色は典型的な培養型 II である TRR1 株 (Fig. 1e) と比較して薄かった。

温度反応：分離菌の菌糸生育適温は 20~25℃ であり、30℃ でも生育し、35℃ での生育は認められなかった (Fig. 2). 25℃ における菌糸生育は 6.0mm/24 時間であり、渡辺・松田 (11) の培養型 II (10~13mm/24 時間) と比較して生育が遅かった。

5. 菌糸融合反応

分離菌株は、*R. solani* の標準菌株のうち AG-2-1 に属する RPS-9 株と高頻度で C2 反応により融合し、AG-2-2 に属する 2 菌株 (C-96, RI-64) とは低頻度で C1 反応により融合し、その他の菌株とは融合しなかったことから、AG-2-1 と同定した。

Table 1 Virulence of isolate IBD1 to broccoli seedlings at different temperatures

Temperature	Isolate	Virulence ^{a)}
15℃	IBD1	(0) 5/5 ^{b)}
	Control	0/5
20℃	IBD1	(1) 5/5
	Control	0/5
25℃	IBD1	(1) 5/5
	Control	0/5

a : Virulence was determined 10 days after inoculation

b : Number of diseased plants/number of plants tested. Parentheses indicates the number of wilted plants.

Table 2 Virulence of isolate IBD1 obtained from broccoli showing damping-off and six reference isolates belonging to *Rhizoctonia solani* AG-2-1・culture type II to broccoli seedlings

Isolate	MAFF ^{a)}	Origin			Virulence ^{c)}
		Host	Symptom	Location ^{b)}	
IBD1	243797	broccoli	damping off	Imakane	(0) 5/5 ^{d)}
TRR1	241952	turnip	root rot	Hokuto	(0) 5/5
CCH1	242978	Chinese cabbage	foot rot	Hokuto	(0) 5/5
CFeR1	242307	cabbage	head rot	Hokuto	(0) 5/5
JRLS1	242981	Japanese radish	leaf blight	Hokuto	(0) 5/5
MLB1	242982	potherb mustard	leaf blight	Hokuto	(0) 5/5
KD1	242986	komatsuna	damping off	Nanae	(0) 5/5
Control					(0) 0/5

a : All seven isolates used in this study were deposited in the NIAS Genebank under the accession numbers shown above.

b : All three cities are located in Hokkaido, Japan

c : Virulence was determined 8 days after inoculation

d : Number of diseased plants/number of plants tested. Parentheses indicate the number of wilted plants.

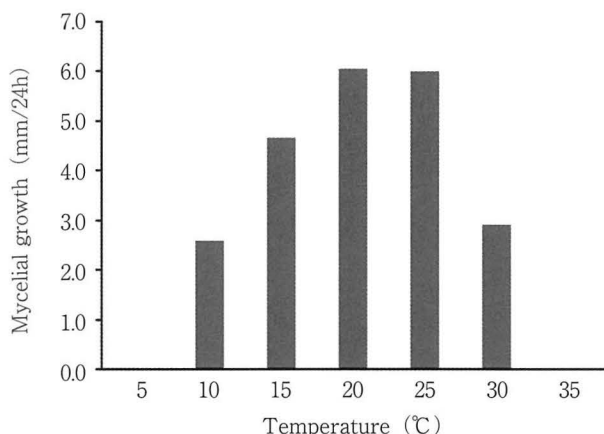


Fig. 2 Mycelial growth of *Rhizoctonia solani* isolate IBD1, obtained from broccoli showing damping-off, on potato dextrose agar at different temperatures for 24h.

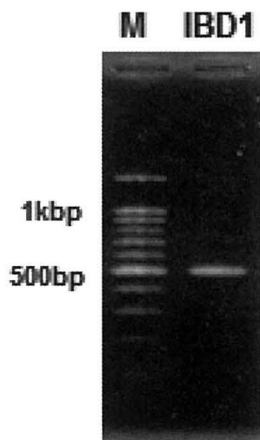


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified from fungal DNA of *Rhizoctonia solani* isolate IBD1.

Amplification was carried out using primer pairs designed for the specific detection of *R. solani* AG-2-1.

Lane M : 100-bp ladder.

6. PCR 法による菌糸融合群の同定

AG-2-1 を特異的に検出するプライマーを用いた PCR 反応において、分離菌株は 480bp 付近に増幅産物が認められ (Fig. 3), 菌糸融合反応による同定結果を裏付ける結果であった。

考 察

我が国では、これまでにブロッコリー苗立枯病の病原として *R. solani* AG-1 I C (3), AG-2-2 III B (4) および AG-4 HG-1 (12) が報告されており、本研究では AG-2-1 による本病の発生を確認した。

窪田・我孫子 (4) は培養型 II (菌糸融合群は未記載) が接種試験でブロッコリー苗に立枯れ症状を起こすことを確認している。本研究では、IBD1 株だけでなく各種アブラナ科野菜から分離した AG-2-1・培養型 II 菌株もブロッコリー苗に病原性を示すことを明らかにした。本研究における AG-2-1・培養型 II 菌株の接種では地際部の褐変・腐敗は認められたが、萎凋症状の発生には至らなかった。これは検定期間が短かったためであり、十分な検定期間を設定すれば、いずれの菌株も立枯れ症状を起こすと推察された。

R. solani AG-2-1 は、遺伝的に多様な菌株を内包する菌群であり (2), 我が国に分布する AG-2-1 の多くは培養型 II である (8)。培養型 II は、低温期に主にアブラナ科野菜に感染する菌群であり (11), 本研究に供試した対照菌株も 2~5 月の低温期にアブラナ科野菜から分離した。AG-2-1・培養型 II は、国内に普遍的に分布している菌群であることから (11), 本菌群によるブロッコリー苗立枯病が今金町以外においても発生する可能性が示唆された。IBD1 株の分離源および病害の発生時期は、培養型 II と同様であった。

IBD1 株は培養菌叢の色および菌糸伸長速度において、典型的な培養型 II と異なったが、菌糸融合反応においては、AG-2-1・培養型 II に属する RPS-9 株と高頻度に C2 反応で融合した。*R. solani* の遺伝的類縁関係の解析には、リボゾーマル DNA-ITS 領域の塩基配列の解読が必要であるが (5), IBD1 株は病原性および菌糸融合反応の結果より、培養型 II に近縁の菌株であると推察された。

ブロッコリー苗立枯病の病原として、これまで AG-2-1 は未報告であるため、AG-2-1 を病原として追加することを提案する。なお分離菌株 IBD1 は、農業生物資源データベースに MAFF243797 として寄託・登録した。

引用文献

- 1) Carling, D.E. (1996) Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G (eds) *Rhizoctonia* species taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer, Dordrecht, pp37-47.
- 2) Carling, D.E., Kuninaga, S. and Brainard, K.A. (2002) Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology* 92: 43-50.
- 3) 窪田昌春・富岡啓介・佐藤豊三 (2009) *Rhizoctonia solani* 菌糸融合群 AG-1 亜群 IC によるブロッコリー苗立枯病. 関西病虫研報 51: 27-28.
- 4) 窪田昌春・我孫子雄 (1997) *Rhizoctonia solani* Kühn によるブロッコリーの苗立枯病 (新称). 関

- 西病虫研報 39 : 33-34.
- 5) Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T. and Yokosawa, R. (1997) Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. Curr. Genet. 32 : 237-243.
 - 6) 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.
 - 7) Martin, B. (1987) Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. Plant Dis. 71 : 47-49.
 - 8) Misawa, T. and Kuninaga, S. (2010) The first report of tomato foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-3 PT and AG-2-Nt and its host range and molecular characterization. J. Gen. Plant Pathol. 76 : 310- 319.
 - 9) 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.
 - 10) Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul, pp 17-18.
 - 11) 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.
 - 12) 山内智史・三浦吉則・白川 隆 (2009) *Rhizoctonia solani* AG-4 HG-I によるブロッコリー苗立枯病. 北日本病虫研報 60 : 105-107.