

Rhizoctonia solani AG-1 ICによるニンジン苗立枯病

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	三澤,知央 小松,勉 辻,英敏
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. 76-80
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-1 I C によるニンジン苗立枯病

三澤 知央*・小松 勉**・辻 英敏***

Damping-off of Carrot Caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 I C

Tomoo MISAWA*, Tsutomu KOMATSU** and Hidetoshi TSUJI***

Damping-off of carrots was observed in Hokkaido, Japan in May 2011. An isolate obtained from diseased tissues was identified as *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG)-1 I C on the basis of cultural appearance, mycelial growth temperature, hyphal anastomosis and the result of specific PCR analysis. The AG-1 I C isolate caused damping-off in carrot seedlings, but did not induce root rot in carrots in inoculation tests. The reference isolate NCRR1 (*R. solani* AG-2-2 IV) known, as the carrot root rot pathogen, caused damping-off and root rot in carrots. We confirmed that the AG-1 I C isolate differed from the AG-2-2 IV isolate in terms of pathogenicity in carrot roots. Damping-off of carrot caused by *R. solani* AG-1 I C has not been reported in Japan; therefore, we hereby propose including it as one of the pathogens of the disease.

Key words: AG-1 I C, carrot, damping-off, *Rhizoctonia solani*, root rot

2011年5月、北海道中富良野町のニンジン栽培圃場で播種1ヶ月後の株が立枯れる症状が発生した。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)-1・亜群 I C によって引き起こされる病害であることが明らかとなった。

我が国では *R. solani* によるニンジン病害として AG-2-2 IV による根腐病 (10) および AG-4 HG-II による苗立枯病 (17) が報告されているが、AG-1 I C による病害は未報告である。また、根腐病と苗立枯病の原記載論文ではそれぞれ接種により原病徴は再現されているものの、両病原菌の病原性の比較は行われていない。そこで本研究では、苗立枯れ症状の原因解明および分離菌と根腐病菌の異なる生育ステージのニンジンの異なる部位に対する病原性比較を実施したので、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

2011年5月に北海道中富良野町のニンジン栽培圃場 (品種：向陽二号) において発生状況および病徴を調査・

観察した。また、その後も適宜発生状況を観察した。

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、1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で約 1 分間表面殺菌し、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 (11) で保存した。

3. 接種試験

接種試験には立枯れ症状からの分離菌および 2010 年 7 月に北海道七飯町で採取したニンジン根腐病菌 NCRR1 株 (*R. solani* AG-2-2 IV) を供試し、ニンジンの苗地際部および生育した個体の根部に対する病原性を調査した。

苗地際部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 10.5cm) で 3 週間栽培したニンジン (品種：向陽二号) を供試した。供試植物は 1 ポツ

*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 中央農業試験場

***上川農業改良普及センター富良野支所

トあたり3個体栽培し、1区3ポット（9個体）で試験を実施した。

生育した個体の根部に対する病原性試験には、1/5000a ワグネルポットで3ヶ月間栽培したニンジン（品種：向陽二号）を供試した。供試植物は1ポットあたり1個体栽培し、1区3ポット（3個体）で試験を実施した。

いずれの試験もフスマ培地で25℃・10日間培養した各菌株を接種源とした。接種源は苗地際部に対する病原性試験では1ポットあたり1gずつ、生育した個体の根部に対する病原性試験では1ポットあたり5gずつ株元土壌に混和した。

苗地際部に対する病原性試験では接種株を平均気温19.7℃のガラス温室内で栽培し、接種11日後に以下に示す4段階に分けて発病を調査した。指数0：発病せず、指数1：地際部が褐変、指数2：地際部が褐変し地上部が萎凋、指数3：株全体が枯死。

生育した個体の根部に対する病原性試験では接種株を平均気温25.8℃のガラス温室内で栽培し、接種14日後に発病状況を調査した。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（9）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℃・20日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 IA）、B-19（AG-1 IB）、BV-7（AG-1 IC）、RPS-9（AG-2-1）、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2～3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.*（14）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。

6. PCR法による菌糸融合群・亜群の同定

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、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-1の亜群

IA、IB、ICをそれぞれ特異的に増幅するプライマー（7）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（7）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

立枯れ症状発生圃場では、播種後保温のため圃場全面を不織布で被覆していた。播種1ヶ月後に不織布を除去したところ立枯れ症状の発生が確認された。発病個体の

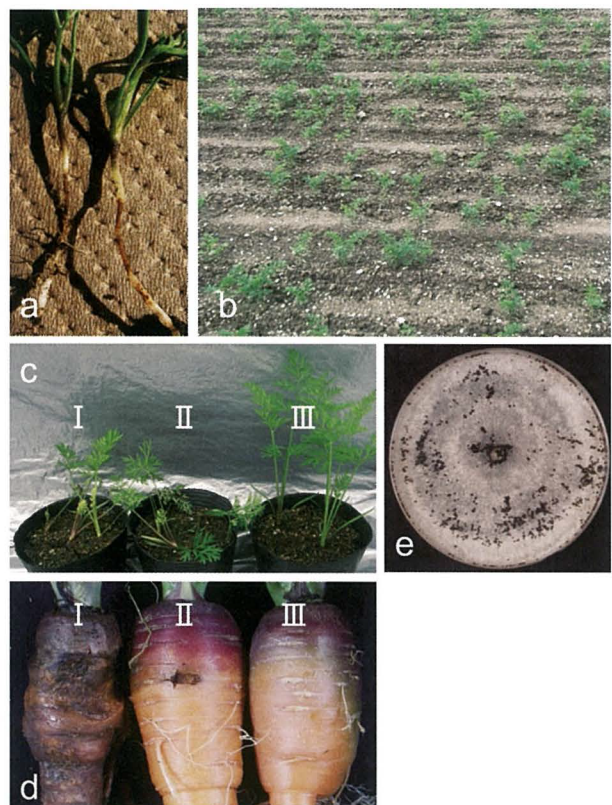


Fig.1 Symptoms, pathogenicity and cultural appearance of the carrot damping-off pathogen, *Rhizoctonia solani*

a-b: basal stem rot (a), damping-off and death of carrot seedlings in the field (b)

b-d: damping-off of carrot seedling 11 days after inoculation (c), and root symptoms of carrot plants 14 days after inoculation (d) with *Rhizoctonia solani* AG-2-2 IV isolate NCRR1 (left: I), isolate RD1 (center: II). Right uninoculated control (III).

c: I and II, damping-off; III, no symptom

d: I, rot; II, caved lesion; III, no symptom

e: cultural appearance of isolate RD1 grown on PDA at 25°C for 20 days.

地際部は軟化・褐変しやや細くくびれた (Fig.1a). 地上部は萎れ、重症株では枯死に至り、欠株となった (Fig.1b). 発病は 0.9ha の圃場の約 50% の株で認められ、このうち約 70% は地際部が褐変するものの生育し、約 30% が枯死し欠株となった。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。その後、立枯れ症状の発生拡大は認められなかった。また、収穫株の根部には根腐病の発生は認められなかった。

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 RD1 株を以降の試験に供試した。

3. 接種試験

RD1 株を接種したニンジン苗は立ち枯れ症状を起こした。生育したニンジン根部には陥没した病斑を形成し、根腐症状は起こさなかった (Fig.1c, d; 写真中央)。いずれの発病部位からも接種菌が再分離された。一方、

根腐病菌 NCRR1 株を接種した場合、苗では立枯れ症状を起こし、生育したニンジン根部では根腐れ症状を起こした (Fig.1c, d; 写真左)。苗地際部に対する病原性においては、RD1 株および NCRR1 株はともに接種 9 個体中 7 個体に萎凋または枯死を起こし、明瞭な病原性の差異は認められなかった (Table 1)。

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。各菌株の菌糸幅は 6.9~11.8 (平均 8.8) μm 、1 細胞あたりの核数は 5~15 (平均 9.6) 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・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 20 日後には淡褐色となった。培地上には大きさ 0.4~1mm、黒褐色で表面平滑な菌核を多数形成した (Fig.1e)。分離菌は 10~35℃ で生育し、生育適温は 25℃ であった。25℃ における生育は 22.8mm/24 時間であった (Fig.2)。分離菌の培養菌叢および温度反応は、既報の AG-1 I C の記載とほぼ一致した (Table 2)。

5. 菌糸融合反応

RD1 菌は、*R. solani* の標準菌株のうち AG-1 I C に属する BV-7 株と高頻度で、AG-1 I A および I B に属する CS-Gi 株、B-19 株と中頻度で菌糸融合し、融合タイプはいずれも C2 であった。AG-1 以外の菌株とは融合しなかった。以上の結果から、分離菌の菌糸融合群を AG-1 と同定した。

6. PCR 法による菌糸融合群・亜群の同定

亜群特異的 PCR 反応において、AG-1 I C 特異的プライマーによってのみ 580bp 付近に増幅産物が認められ (Fig. 3)、PCR 反応の結果は、分離菌が AG-1 I C 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。

Table 1 Comparison of pathogenicity of the isolate obtained from damping-off (isolate RD1) with that of root rot pathogen (isolate NCRR1) in carrot seedlings and roots

Isolate	Three-week-old seedlings ^{a)}				Root ^{b)}	
	Disease index ^{c)}				Caved lesion	Rot
	0	1	2	3		
RD1	0	2	4	3	3/3 ^{d)}	0/3
NCRR1	0	2	2	5	0/3	3/3
Control	9	0	0	0	0/3	0/3

a, b) Virulence was determined 11 days (a) and 14 days (b) after inoculation

c) 0 : no symptom, 1: stem base became brown, 2 : stem base became brown and the plants fell down, 3 : plants died

d) Number of diseased plants/number of plants tested

Table 2 Comparison of cultural appearance and mycelial growth temperature of isolate RD1 with those of *Rhizoctonia solani* AG-1 I C reported previously

	Isolate RD1	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 I C		
		Hyakumachi · Sumino (1984)	Kawaradani et al. (2007)	Kubota et al. (2009)
Colony color	light brown	light brown	colorless-light brown	light brown
Sclerotium				
color	blackish brown	dark brown-black	dark brown	brown-blackish brown
surface	smooth	smooth	smooth	smooth
shape	spherical	spherical	spherical	spherical-shaped flat board
size	0.4-1mm	0.2-0.8mm	0.2-1.2mm	less than 1mm
Mycelial growth at 25℃ (/24h)	22.8mm	ca.29mm	— a)	23.5mm
Optimal temperature	25℃	30℃	28.5 - 29.5℃	25℃

a) Not examined

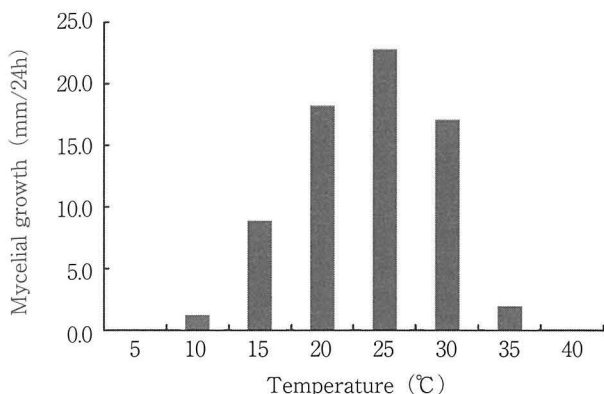


Fig 2 Mycelial growth of *Rhizoctonia solani* isolate RD1 on potato dextrose agar at different temperatures for 24 h.

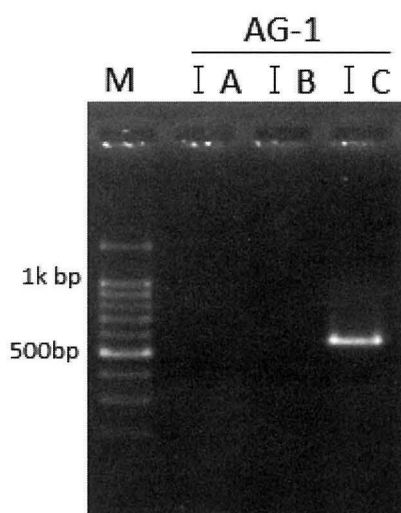


Fig.3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from fungal DNA of *Rhizoctonia solani* isolate RD1.

Amplification was carried out using isolate RD1 with specific primer pairs for *R. solani* AG-1 I A (Lane I A), I B (Lane I B) and I C (Lane I C). Lane M : 100-bp ladder.

考 察

R. solani AG-1 は I A, I B, I C, I D, I E, I F の 6 つの亜群に分類され (3), 我が国には I A, I B, I C の 3 つの亜群が分布している (7). I C に属する菌株同士の菌糸融合頻度は, I C と I A および I C と I B の間の菌糸融合頻度より高いものの, その差は小さいため菌糸融合頻度の違いから AG-1 内の亜群を識別することは困難であるとされている (8). そのため, 本研究においては分離菌は I A, I B の標準菌株より I C

の標準菌株と高頻度で菌糸が融合したものの, これを亜群同定の根拠とせず, 温度反応・培養菌叢・PCR 反応により亜群を同定した.

R. solani AG-1 I C は, 我が国では 1984 年に百町・角野 (8) により北海道のテンサイ工場排出土壌から分離・同定され報告された菌群である. 百町・角野 (8) は本亜群菌が各種作物の苗に病原性を示すことおよび北海道のみならず本州および九州にも分布していることを確認し, 重要病原となる可能性を示唆している. しかし, 本亜群による病害の発生が国内で初めて確認されたのは 2000 年に香川県で発生したブロッコリー苗立枯病 (6) であり, 百町・角野 (8) の報告の 16 年後である. その後も, 2005 年に大阪府でベビーリーフとして栽培されていたカラシナ, ミズナ, コマツナ, レタスで同時に発生した苗立枯れ症状 (5) および 2008~2010 年に北海道でチコリーの葉枯れ症状および苗立枯れ症状 (16) の発生が報告されているのみで, 本亜群による病害の報告は極めて少ない. 本亜群による病害はチコリーの葉枯れ症状を除きいずれも苗立枯れ症状である. 無病の培土を用いた育苗が普及したことが, 本亜群による病害の被害が少ない要因の 1 つであると推察している.

米本ら (17) は, 徳島県で発生したニンジン苗立枯れ症状の病原が *R. solani* AG-4 HG-II であることを確認し, 新病害「苗立枯病」と命名した. しかし, 分離菌のニンジン根部に対する病原性およびニンジン根腐病菌 *R. solani* AG-2-2 IV との病原性の差異は未検討であった. *R. solani* によるダイコン病害では, 以前は根腐病 (13), 葉腐病 (15) など各症状に対応した病名が与えられていたが, 様々な症状の発生が報告されたことから (2), 近年リゾクトニア病に病名が変更されている (12). 本研究においては, ニンジン苗立枯病菌と根腐病菌のニンジン根部に対する病原性が異なることを明らかにし, 両症状に対して別病名を与えることの妥当性を証明した. また, 苗立枯病発生圃場において根腐病が発生していなかったことも確認している.

中富良野町における本病発生圃場では, 播種 1 ヶ月後の不織布被覆除去時に発病が確認されたが, その後の発病の進展は認められなかった. このことから, 本事例では不織布被覆期間中の高湿度条件下でのみ感染・発病したと判断した. *R. solani* AG-4 HG-II によるニンジン苗立枯病は, トンネル栽培で発生が確認された病害であり (17), 本病は病原菌の菌糸融合群・亜群を問わず不織布やビニールフィルムなどで作物を被覆した高湿度条件下で特異的に発生する可能性が示唆された.

Grisham and Anderson (4) は米国ミネソタ州において, 各種の病徴を示したニンジンから採取した *R. solani* のニンジン各部位に対する病原性を検討し, AG-1 および AG-4 菌株 (いずれも亜群未同定) は苗立枯れ症状を起こすが, 生育した作物の根部に対する病原性は弱く,

AG-2-2 菌株は苗立枯症状と根腐症状の両方を起こすとしており、我が国と同様の結果を得ている。本研究および米本ら (17) は、AG-4 菌株のニンジン根部に対する病原性は未検討であるが、Grisham and Anderson (4) の結果から我が国で分離された AG-4 HG-II 菌株もニンジンに根腐れ症状を起こさない可能性が高いと考えられる。

我が国では、ニンジン苗立枯病の病原として *R. solani* AG-1 IC は未報告であるため、本菌群を病原として追加することを提案する。なお分離菌株 RD1 は、農業生物資源データベースに MAFF243448 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, pp 37-47.
- 2) 柴森弘己・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.
- 3) Godoy-Lutz, G., Kuninaga, S., Steadman, J. R. and Powers, K. (2008) Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA. J. Gen. Plant Pathol. 74 : 32-40.
- 4) Grisham, M.P. and Anderson, N.A. (1983) Pathogenicity and host specificity of *Rhizoctonia solani* isolated from carrot. Phytopathology 73 : 1564-1569.
- 5) 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 IC による苗立枯れ症状。日植病報 73 : 21-24.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 百町満朗・角野晶大 (1984) テンサイ工場排出土壌から分離された *Rhizoctonia solani* の新しい培養型 IC とその諸特性。日植病報 50 : 507-514.
- 9) Martin, B. (1987) Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turf-grasses. Plant Dis. 71 : 47-49.
- 10) 長井雄治・深江量栄 (1971) *Rhizoctonia solani* によるニンジン根腐症状。日植病報 37 : 369 (講要).
- 11) 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.
- 12) 日本植物病理学会 (2011) 日本植物病名目録追録. pp218.
- 13) 新留伊俊・糸賀繁人 (1956) *Pellicularia filamentosa* (PAT.) ROGERS. による大根根腐病 (新称) について第 1 報。九州病虫研報 2 : 68-69.
- 14) Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul, pp 17-18.
- 15) 高野喜八郎・豊田久正 (1985) ハウス栽培におけるダイコン葉腐病の発生。北陸病虫研報 33 : 96-99.
- 16) 上杉浩子・蘭巍巍・近藤則夫・内野浩克 (2011) チコリー葉枯症および苗立枯症に関わる *Rhizoctonia solani* の同定と病原性。日植病報 77 : 202 (講要).
- 17) 米本謙悟・広田恵介・百町満朗 (2008) *Rhizoctonia solani* AG-4 HG II によるニンジン苗立枯病 (新称) 日植病報 74 : 20-23.