

## *Rhizoctonia solani* AG - 4 HG - I によるユリ株腐病 (新称) の発生

森田泰彰・川田洋一・内藤繁男\*

(高知県農業技術センター・北海道大学大学院農学研究科\*)

Foot Rot of Lily Caused by *Rhizoctonia solani* AG-4 HG- I

By Yasuaki MORITA, Youichi KAWADA (Kochi Prefectural Agricultural Research Center, Hataeda Nankoku, Kochi 783-0023) and Shigeo NAITO (Graduate school of Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku Sapporo, Hokkaido 060-8589)

A fungal disease was found on lily (*Lilium* spp.) grown in greenhouses in Kochi Prefecture, Japan, in November 2000. Sprouts of the diseased plants rotted in black. Severe rot resulted in no sprouting. Sprouts with slight rot grew up with little advance of lesions, but sometimes had pale brownish lesions on stems and leaves later. Growth of these sprouts was also often hindered with inhibitory of differentiation of stem roots. The fungal isolates from the diseased plants were demonstrated to be pathogenic to lily, and identified as *Rhizoctonia solani* Kühn based on morphological and cultural characteristics. The anastomosis group and the subgroup of the isolates were determined as AG-4 and HG-I, respectively. We proposed foot rot of lily as a name of the disease.

### はじめに

高知県ではユリ (*Lilium* spp.) の切り花栽培が盛んで、その生産量は全国の10%以上を占めており、本県の重要な品目の一つとなっている。県中央部の高知市では、オリエンタルハイブリッドユリを中心に産地が形成されているが、2000年11月に、施設栽培されているオリエンタルハイブリッドユリに出芽時に芽が黒く腐敗する障害が発生した。芽の腐敗部分からは、*Rhizoctonia solani* Kühnが高頻度で分離され、接種試験の結果、本障害の病原菌であることが明らかとなった。本菌によるユリの病害はこれまで未記載であり、新病害と認められたので、ここに報告する。なお、本報告の一部は2001年度日本植物病理学会関西支部会で報告した(森田・川田, 2002)。

本文に先立ち、発病株の採取および発病状況の聞き取りに協力いただいた、高知県中央農業改良普及センターの花き担当者に感謝の意を表する。

### 材料および方法

#### 1. 糸状菌の分離

出芽直後の罹病したユリの株を採取し、芽の罹病組織をピンセットでつまみ取って、表面殺菌せずに、pH 4 に調整したショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天(PSA)平板培地上に置床した。28℃、暗黒条件下で2~3日間培養後、高頻度に生育してきた糸状菌を単菌糸分離した。得られた分離菌株のうち、Y1-m11, Y2-m12, Y2-m24, Y3-m15, Y4-m11, Y4-m22, Y4-m33の7菌株を供試菌株とした。

#### 2. 接種試験

##### 1) ユリにおける病徴再現試験

1/5000 a のワグネルポットの半分まで高圧蒸気滅菌土を入れ、ユリ(品種:マルコポーロ)の鱗茎を先端が出る程度に埋めた。この上に、各供試菌株を直径9 cmのシャーレ内のPSA平板培地上

で6日間、25℃、暗黒条件下で培養後その1枚分を培地ごと細断して高圧蒸気滅菌土に混和して作製した1.5ℓの汚染土を、それぞれ深さ10cmで覆土し、20~35℃に設定したガラス温室で管理した。なお、対照として、汚染土の代わりに高圧蒸気滅菌土を覆土した株を設けた。各菌株につきそれぞれ3ポットずつ接種し、接種後は、78日後(開花初期)まで、適宜発病状況を調査するとともに発病株では菌の再分離を試みた。

## 2) 数種作物に対する接種試験

本試験にはY1-m11, Y2-m24, Y3-m15, Y4-m11, Y4-m22の5菌株を供試し、内藤ら(1993)の方法に準じて培養した。すなわち、300mlのフラスコに大麦粒70gと水64mlを入れて高圧蒸気滅菌した大麦粒培地で、各供試菌株を12日間、25℃、暗黒条件下で培養した。3日目から毎日1回フラスコを振り、大麦粒が塊にならないようにした。培養後、培地ごと高圧蒸気滅菌土7ℓに混和して汚染土とした。これらの汚染土および無接種土をそれぞれプラスチック製育苗箱(49×34×深さ10cm)に詰め、ダイズ(品種:えんれい大豆)、エンドウ(品種:うすい豌豆)、オクラ(品種:アーリーファイブ)、メロン(品種:健脚)、キュウリ(品種:四葉)、トマト(品種:ハウス桃太郎)、ヒラナス(品種:イタリヤ赤茄子)、ブロッコリー(品種:チャレンジャー)、ダイコン(品種:赤丸20日大根)、シュンギク(品種:きわめ中葉新菊)の種子を第1表に示した一定数ずつ播種し、15~35℃に設定したガラス温室で管理した。調査は播種14日後まで適宜行い、延べ出芽数および播種14日後における健全苗数を計数するとともに、発病株の一部から菌の再分離を試みた。

## 3. 分離菌株の性状調査

### 1) 培養性状

各供試菌株をブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天(PDA)平板培地および素寒天(WA)平板培地で25℃、暗黒条件下で培養し、菌そうの性状、分岐菌糸の形態と隔膜構造、かすがい連結の有無を調査した。また、PDA平板培地上で25℃、暗黒条件下で2週間培養後に、着色した主軸菌糸の幅を100箇所測定した。

### 2) 細胞当りの核数

主軸菌糸から分岐した側枝菌糸の基部から第1および第2細胞の合計62~100細胞について、1細胞中の核数を調査した。なお、核の染色はTanaka *et al.* (1979)の方法に従ってHCl-ギムザ染色法により行った。

### 3) 菌そう生育速度

各供試菌株をあらかじめPDA平板培地上で25℃、1日間培養し、菌そうの周縁部を直径4mmのコルクボーラーで打ち抜いて得られた菌そう円盤をPDA平板培地上に置床して、5~40℃の範囲内で9段階に設定した恒温器内で培養し、24時間目および48時間目の菌そう半径から24時間当りの菌糸生育速度を測定した。いずれの設定温度においてもシャーレ2枚を供試し、それぞれにおいて菌そう半径を4箇所ずつ測定した。なお、試験は2回反復し、平均の菌糸生育速度を算出した。

## 4. 菌糸融合群の判定

各供試菌株を、北海道大学大学院農学研究科で保存されている*R. solani*の菌糸融合群AG-1~AG-6の標準菌株、すなわち、B-19(AG-1 I B), PS-4(AG-2-1), C-96(AG-2-2 III B), Pf28(AG-2-2 IV), H4-2(AG-2-3), TE2-4(AG-2 BI), ST11-6(AG-3), AH-1(AG-4 HG-I), Rh165(AG-4 HG-II), ST2-1(AG-5), OHT1-1(AG-6 HG-I), NKN2-1(AG-6 GV)と、WA平板培地上で対峙して20℃で培養し、菌そうの先端部が重なった時に、光学顕微鏡下で菌糸融合の有無を判定した。

## 5. サブグループの判定

サブグループの判定は、Priyatmojo *et al.* (2001)の方法に準じて、リボソームDNA internal transcribed spacerの制限断片長多型(rDNA-ITS RFLP)解析によって行った。すなわち、PDA平板培地上で4~6日間、25℃、暗黒条件下で培養した各供試菌株の菌そうから培地表面の菌糸をかき取り、Namba *et al.* (1993)の方法にしたがって全DNAを抽出し、100μlのTE緩衝液(10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0)に溶解した。これらのDNA検体1μlに、polymerase chain reaction(PCR)酵素*TaKaRaExTaq*<sup>TM</sup>(5U/μl, タカラバイオ株式会社製)0.5μl, 10×*ExTaq*<sup>TM</sup> Buffer 10μl, dNTP Mixture (2.5mM each)

8 $\mu$ lを加え、さらにプライマーITS 1およびITS 4 (Priyatmojo *et al.*, 2001)を最終濃度がそれぞれ0.4 $\mu$ Mとなるように混合して全量を100 $\mu$ lとし、PCRを実施した。なお、PCR反応にはTaKaRa PCR Thermal Cycler MP(宝酒造株式会社製)を用い、94 $^{\circ}$ Cで3分間の熱変成後、94 $^{\circ}$ C 1分間、50 $^{\circ}$ C 2分間、72 $^{\circ}$ C 1分間の増幅反応を40サイクル繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C 5分間の伸長反応を行った。次に、得られたPCR産物8.5 $\mu$ lに、制限酵素Hinc II (8U/ $\mu$ l, タカラバイオ株式会社製) 0.5 $\mu$ l, 10 $\times$ M Buffer 1 $\mu$ lを混合し、37 $^{\circ}$ Cで6時間反応させた。反応後は、2%アガロースゲルで電気泳動後エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射下で観察してAG-4 HG-IであるAH-1およびAG-4 HG-IIであるRh165の2菌株と切断パターンを比較した。

## 結 果

### 1. 病 徴

罹病株では、出芽時に芽の先端部が黒く腐敗し、枯死する場合もみられた(写真1~3)。重症の場合は土中で芽が腐敗して不出芽となった。軽症株ではその後の病勢の進展は少なく、茎は伸長して開花に至ったが、茎に淡褐色粗皮状の障害が生じたり(写真4)、下位葉の一部が黒変枯死する

場合がみられた。また、茎出根(上根)が腐敗、減少して(写真5)、草丈が低くなるといった生育不良を示す株も認められた。なお、芽の腐敗部分を光学顕微鏡下で観察すると、比較的太い菌糸が容易に認められた。

### 2. 糸状菌の分離および病原性

腐敗した芽の部分からは、比較的生育が速く、はじめ白色でのちに褐色を呈する糸状菌が高率に分離された。分離菌は分生子を形成しなかったことから、単菌糸分離を行い、供試菌株を得た。

いずれの供試菌株をユリに接種した場合も、接種約1週間後に、出芽と同時に病徴が再現され、罹病組織から接種菌が再分離された。一方、対照株では病徴は認められず、接種菌の再分離もされなかった。なお、軽症株における病徴も再現されたが、伸長した茎の表面に形成された病斑および黒変枯死した葉からは接種菌が再分離されることが多かった。

数種作物に対する病原性を調査した結果、供試したいずれの菌株も、トマトに対してはやや病原性が弱い傾向であったが、その他の作物に対しては不出芽や出芽後の萎凋枯死といった苗立枯れ症状を高率に引き起こした(第1表)。また、罹病組織からは接種菌が再分離された。

第1表 ユリ株腐病罹病組織から分離した菌株の数種作物に対する病原性

作物名	品 種 名	播種数	Y1-m11		Y2-m24		Y3-m15		Y4-m11		Y4-m22		無接種	
			出芽数 <sup>a)</sup>	健全苗数 <sup>b)</sup>	出芽数	健全苗数	出芽数	健全苗数	出芽数	健全苗数	出芽数	健全苗数	出芽数	健全苗数
ダイズ	えんれい大豆	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	12
エンドウ	うすい豌豆	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20
オクラ	アーリーファイブ	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21
メロン	健脚	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21
キュウリ	四葉	12	2	0	1	0	3	0	4	0	2	0	12	11
トマト	ハウス桃太郎	30	25	10	29	21	24	9	28	24	28	24	30	30
ヒラナス	イタリア赤茄子	36	1	0	7	0	0	0	1	0	1	0	36	36
ブロッコリー	チャレンジャー	36	2	0	1	0	2	0	2	1	3	0	35	34
ダイコン	赤丸20日大根	36	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	34	34
シュンギク	きわめ中葉新菊	36	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	14	14

a) 播種14日後までの延べ出芽数

b) 播種14日後の健全苗数

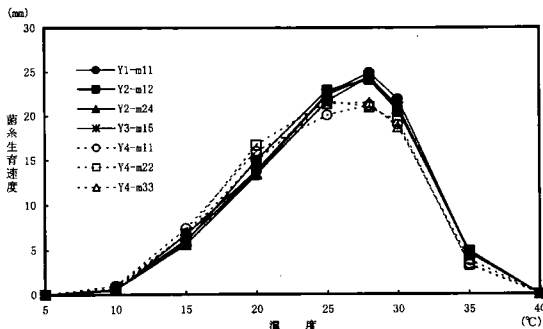
### 3. 分離菌株の培養特性

各供試菌株のPDA平板培地上での菌そうは、はじめ白色で濃い濃褐色となり、霜降り状を呈した(写真6,7)。菌糸束を形成する場合もあったが、褐色輪帯は形成しなかった。Y4-m11, Y4-m22, Y4-m33の3菌株は初期の菌そう表面がやや白い傾向であったが、培養期間が長くなるにつれて濃褐色となった。いずれの供試菌株も、WA平板培地上において菌糸先端の隔膜のすぐ下から分岐し、分岐後すぐに隔膜を形成した(写真8)。菌糸の分岐部はややくびれ、隔膜はドリポア構造であった。分生子の形成およびかすかい連結は認められなかった。着色した主軸菌糸の幅は5.0~10.0 $\mu\text{m}$ であり、菌株ごとの平均は7.3~8.0 $\mu\text{m}$ であった。Y4-m11, Y4-m22, Y4-m33の3菌株はやや菌糸幅が広がった(第2表)。

第2表 ユリ株腐病罹病株から分離した菌株の菌糸幅および細胞当りの核数

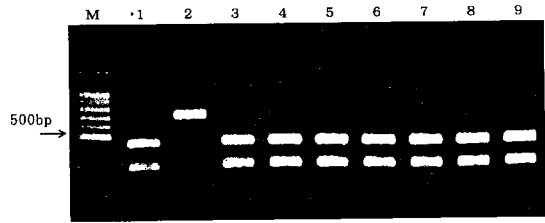
菌株名	菌糸幅 ( $\mu\text{m}$ )	核数 (個)
Y1-m11	5.0-10.0 (7.4) <sup>a)</sup>	3-8 (5.1)
Y2-m12	5.0-10.0 (7.4)	4-8 (5.6)
Y2-m24	5.0-9.4 (7.3)	3-8 (4.8)
Y3-m15	5.0-10.0 (7.4)	4-7 (5.2)
Y4-m11	5.6-10.0 (7.7)	3-7 (4.4)
Y4-m22	5.0-10.0 (7.7)	3-8 (5.8)
Y4-m33	5.0-10.0 (8.0)	3-8 (4.8)

a) 最小-最大 (平均)



第1図 ユリ株腐病罹病組織から分離した菌株の菌糸生育温度

各供試菌株のPDA平板培地における培養24時間目から48時間目までの24時間当たりの菌糸生育速度



第2図 ユリ株腐病罹病組織から分離した菌株のrDNA-ITS RFLP解析

各菌株のrDNAのITS領域を増幅したPCR産物を、制限酵素Hinc IIで処理した後の電気泳動像

- 1 : AH-1(*R. solani* AG-4 HG-I)
- 2 : Rh165(*R. solani* AG-4 HG-II)
- 3 : Y1-m11, 4 : Y2-m12, 5 : Y2-m24
- 6 : Y3-m15, 7 : Y4-m11, 8 : Y4-m22
- 9 : Y4-m33, M : 100bp DNA Ladder

1細胞当りの核数は3~8個であり(写真9)、菌株ごとの平均は4.4~5.8個であった(第2表)。

各供試菌株はいずれも10~35°Cで生育したが、5°Cおよび40°Cでは生育しなかった。生育適温は25~28°Cであった。Y4-m11, Y4-m22, Y4-m33の3菌株は、他の4菌株と比較して25~28°Cにおける生育がやや遅い傾向であった(第1図)。

これらの性状は、*R. solani*の培養型ⅢAとよく一致した(生越, 1984; 渡辺・松田, 1966)。

### 4. 分離菌株の菌糸融合群

いずれの供試菌株も、菌糸融合群AG-4であるAH-1およびRh165の両菌株との菌糸融合が認められたが、その他の菌糸融合群の菌株とは菌糸融合は認められなかった。

### 5. 分離菌株のサブグループ

いずれの供試菌株も、rDNA-ITS領域のPCR産物をHinc IIで処理したときの電気泳動像は、AG-4 HG-IであるAH-1のものと同一パターンを示した。一方、AG-4 HG-IIであるRh165の同PCR産物はHinc IIにより切断されず、その電気泳動像は供試菌株のものと異なった(第2図)。

## 考 察

今回、高知市で発生したユリの障害株からは、同一種と考えられる糸状菌が容易に分離され、接種によりユリに病徴が再現されるとともに、接種

菌が再分離されたことから、本分離菌による病害であることが明らかとなった。

本分離菌は、菌そうの特徴や菌糸の分岐様式、隔膜構造、菌糸幅、細胞当りの核数、生育温度特性、並びに分生子およびかすがい連結が認められない、などの培養特性から、いずれも*R. solani*と同定され、培養型はⅢA(生越, 1984: 渡辺・松田, 1966)に相当すると判断された。また、分離菌株はいずれもAG-4の標準菌株とのみ融合したことから菌糸融合群はAG-4であると同定した。培養型ⅢAの菌株はAG-4に属するとされており(生越, 1984), この点でもよく一致した。

*R. solani* AG-4は、脂肪酸組成の比較(Stevens and Jones, 2001)やDNA-DNA分子交雑(Kuninaga and Yokosawa, 1984)などで現在3つのサブグループ(HG-I, HG-II, HG-III)に類別されているが、これらは培養性状である程度識別可能とされている(Kuninaga and Yokosawa, 1984: 国永, 2003)。今回の分離菌株は濃褐色の菌そうを呈したことから、HG-Iに近く、菌そうが淡褐色～淡紫灰色になるとされているHG-IIおよびHG-IIIとは異なるのではないかと考えられた。しかし、一部の菌株は初期の菌そう表面がやや白く、生育温度などでもわずかに差が認められたことから、rDNA-ITS RFLP解析によりサブグループの識別が可能という報告(Priyatmojo *et al.*, 2001: 国永, 2003)に基づきサブグループの検討を行ったところ、いずれの菌株ともAG-4 HG-IであるAH-1と同一パターンを示し、AG-4 HG-IIであるRh165とは異なった。HG-IIIの菌株は対照に用いていないが、HG-IIIもHG-IIと同様、*Hinc II*により切断されないとされている(国永, 2003)ことから、今回の分離菌株はいずれもHG-Iと判断された。

以上のことから、今回ユリに発生した病害は、*R. solani* AG-4 HG-Iによる新病害であることが明らかとなった。なお、本病の症状は芽の腐敗が特徴的であるが、軽症株では芽の腐敗が認められなくても茎の表面に病斑が形成されたり、茎出根の腐敗が認められる場合があることから、病名については、これらを勘案して株腐病 (foot rot) とすることを提案する。

*R. solani* AG-4の菌株は、各種植物で出芽前および出芽後の苗立枯病を起こす特性を示すと

されており(国永, 2003)、今回の分離菌株も、多くの作物で苗立枯れ症状を引き起こした。ユリにおいては、軽症株では出芽後の病勢の進展はほとんど認められず、地上部の茎や葉では病原菌の分離率が低かったことから、感染時期は植え付け後から出芽時期までに限られ、地上部での感染はほとんどないものと推定される。

なお、今回発病を確認した品種は、オリエンタルハイブリッドユリの‘マルコポーロ’や‘ソルボンヌ’であったが、現地農家ではスカシユリやオリエンタルハイブリッドユリの多くの品種でも同様の症状が見られている。今後、それらについても同一の病原かどうか調査する必要がある。

## 摘 要

- 2000年11月、高知県内で施設栽培されているユリに、出芽時に芽の先端が黒く腐敗する病害が発生した。重症株では土中で芽が腐敗して不出芽となった。軽症の場合は、それ以降の病勢の進展はほとんど認められず、茎が伸長して開花に至ったが、茎の表面や葉に病斑が形成されたり、茎出根が腐敗、減少して草丈が低くなるといった障害が認められた。
- 出芽直後の罹病組織からは同一種と考えられる糸状菌が高率に分離され、接種試験などにより本病の病原菌であることが明らかとなった。また、本病原菌は、その形態・培養特性などから*Rhizoctonia solani* Kühn AG-4 HG-Iと同定された。
- 本菌によるユリの病害は、これまで未報告であるので、病名としてユリ株腐病 (foot rot) を提案した。

## 引用文献

- Kuninaga, S. and R. Yokosawa (1984): DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn IV. Genetic relatedness within AG-4. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 50: 322~330.
- 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.
- Priyatmojo, A., Y. Yotani, K. Hattori, K. Kageyama and M. Hyakumachi (2001):

- Characterization of *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of miniature rose. Plant Disease, 85 : 1200~1205.
- 森田泰彰・川田洋一(2002) : *Rhizoctonia solani* AG- 4 によるユリ株腐病 (新称). 日植病報, 68 : 78.
- 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.
- Namba, S., S. Kato, S. Iwanami, H. Oyaizu, H. Shiozawa and T. Tsuchizaki (1993) : Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. Phytopathology, 83 : 786~791.
- 生越 明(1984) : 新版土壤病害の手引き (新版土壤病害の手引き編集委員会編), 日本植物防疫協会, 東京 : 94~97.
- Stevens, J. and R. K. Jones (2001) : Differentiation of the homogeneous groups of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4 by analysis of fatty acids. Phytopathology, 91 : 821~830.
- Tanaka, Y., N. Murata and H. Kato (1979) : Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice - strain or weeping lovegrass - strain and ragi - strain of *Pyricularia*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 45 : 182~191.
- 渡辺文吉郎・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.

## 写 真 説 明

- 1 - 5 発病株の症状
- 1 出芽時の芽の腐敗
  - 2 出芽後に枯死した株
  - 3 軽症株
  - 4 茎に生じた病斑
  - 5 発病株における茎出根の減少 (右は健全株)
- 6 - 9 分離菌株の形態
- 6 菌株Na Y1 - m11の菌そう (PDA平板, 25°C, 14日間培養)
  - 7 菌株Na Y4 - m22の菌そう (PDA平板, 25°C, 14日間培養)
  - 8 菌糸の分岐様式 (スケールバー : 20  $\mu$ m)
  - 9 核染色による核の様相 (スケールバー : 20  $\mu$ m)

