

Rhizoctonia solani によるトマト株腐病の発生と 病原菌の宿主範囲および遺伝的諸特性

北海道立総合研究機構

道南農業試験場

み
三
くに
国さわ
澤
なが
永とも
知
し
史お
央
ろう
朗

北海道医療大学

はじめに

2004～07年に北海道内各地のトマト栽培ハウスにおいて、定植後の株の地際部が褐変・腐敗し、地上部が萎凋する症状が発生した。発生原因調査を実施した結果、本症状は *Rhizoctonia solani* AG-3 PT および AG-2-1 内の AG-2-Nt (AG-2-1/Nt) による新病害であることが明らかとなった (MISAWA and KUNINAGA, 2010)。そこで本稿では、本病の病徴、病原菌の宿主範囲、遺伝的諸特性ならびに本病原菌が所属する種内グループの分類に関する最近の知見について紹介する。

I *Rhizoctonia solani* の分類と同定

R. solani は生理・生態・遺伝的性質を異にする菌株群からなる種複合体である。それらは菌株同士の菌糸融合反応の有無によって菌糸融合群 (Anastomosis Group: AG) に類別され、現在 AG-1～13 に分けられている。同一の菌糸融合群内の菌株同士は、遺伝的に近縁な個体群であることが確認されている (KUNINAGA et al., 1997)。

また、いくつかの AG では、菌糸融合頻度、病原性、生化学的・遺伝的な性質で異なる個体群が認められ、それらは同一 AG 内の亜群 (subgroup) として類別されている。亜群は、DNA-DNA 分子交雑法、脂肪酸組成比較法、rDNA-ITS 領域の塩基配列の解析などの種々の手法により決定されるが、これらはどの研究施設でも実施できるほど簡便な方法ではない。そこで、国永 (2003) は AG-1～4 の 16 の亜群について、rDNA-ITS 領域の塩基配列に基づいて亜群特異的プライマーを設計し、PCR 法による亜群の識別法を開発した。同手法は、簡便かつ信頼性の高い方法である。

1 *R. solani* AG-3 の分類

AG-3 は古くからジャガイモ黒あざ病菌として知られていたが、近年新たな個体群が報告され、現在では AG-3 PT, TB, TM の三つの亜群に分割されている

(KUNINAGA et al., 2000 a; 国永ら, 2007)。

1) PT (ジャガイモ系): 我が国を含む温帯・冷帯地域におけるジャガイモ黒あざ病の主要な病原菌である (KUNINAGA et al., 2000 a)。本亜群はジャガイモに黒あざ病を引き起こすのみで、他作物での病害の発生事例は報告されていない。

2) TB (タバコ系): タバコの葉に斑点性の病害を起こす。北米および南アフリカに分布し、我が国では本亜群による病害は未発生である (KUNINAGA et al., 2000 a)。

3) TM (トマト系): トマト葉腐病の病原菌であり、岡山県、秋田県で発生事例がある (国永ら, 2007)。近年、アメリカにおいても本亜群によるトマトの病害が報告された (BARTZ et al., 2010)。

2 *R. solani* AG-2-1 菌株の遺伝的多様性と AG-2-Nt (AG-2-1/Nt)

AG-2-1 は遺伝的に多様な菌株を内包する集団である (CARLING et al., 2002)。しかし、その遺伝的な比較研究は十分に行われていない。我が国に分布する AG-2-1 は培養型 II と呼ばれ、主に低温期にアブラナ科野菜に様々な症状の病害を起こすことが知られている (渡辺・松田, 1966)。

一方、AG-2-Nt は NICOLETTI et al. (1999) によってイタリアでタバコ茎地際部 (MISAWA and KUNINAGA, 2010 では分離源をタバコ葉と記載したが正しくは茎地際部) から分離された菌株 (Nt-isolate) を含む菌株群の総称である。はじめ Nt-isolate は AG-2 BI (Bridging Isolates) と菌糸融合する一方、培養菌叢およびチアミン要求性は AG-2-1 に類似することから、所属不明の菌株として報告された。その後、KUNINAGA et al. (2000 b) は rDNA-ITS 領域の解析結果から、Nt-isolate が AG-2-1 に所属することを明らかにした。

近年、イギリスのジャガイモ (WOODHALL et al., 2007)、ベルギーのレタス (Van BENEDEN et al., 2009)・カリフラワー (PANNECOUCQUE et al., 2008) およびトルコのタバコ (GURKANLI et al., 2009) などからも次々と同様の菌株が分離されている。本菌株群は亜群として正式な名称が提案されていないため、これまで我々は AG-2-Nt と呼称してきた (MISAWA and KUNINAGA, 2010)。しかし、Nt-iso-

The Occurrence of Tomato Foot Rot Caused by *Rhizoctonia solani* and Its Host Range and Molecular Characterization. By Tomoo MISAWA and Shiro KUNINAGA

(キーワード: トマト, AG-3, AG-2-1, *Rhizoctonia solani*)

late の発見者である NICOLETTI 博士は、近年この菌株群を AG-2-1/Nt と呼称しており、ヨーロッパではこの名称が定着しつつあるため、我が国においても今後 AG-2-1/Nt と呼称することが望ましい。

II トマト株腐病の病徴および発生状況

2004 年 5 月、北海道北斗市のハウス栽培トマト（品種：‘招福パワー’）において、1 段目収穫期（定植 2 か月後）に株全体が青枯れる症状が発生した（口絵①）。発病株の地際部は、やや細くびれ褐色となり、軟化・腐敗していた（口絵②）。地上部に萎凋症状が発生していない株においても、地際部をていねいに観察すると褐変が認められる場合があり、そのような株はやがて萎凋した。根部での病徴は認められなかった。発病は最終的にハウス 1 棟（約 600 株）の 30% に達した。

同様の症状は 2007 年 3 月森町（品種：‘麗容’）、2007 年 5 月平取町（品種：‘ハウス桃太郎’）、2007 年 7 月深川市（品種：‘桃太郎ヨーク’）でも発生した。

III 分離菌の同定

罹病部位からはいずれも *R. solani* が高率に分離され、北斗市、平取町、深川市、森町より分離した菌株にそれぞれ O1-1, B1, F1, N1 の菌株名を付与した（表-1）。

1 培養菌叢

O1-1, B1, F1 株の PDA 培地上での培養菌叢は褐色で淡褐色の輪帯および菌核を形成した。N1 株の菌叢は淡褐色で白～濃褐色の菌核および輪帯を形成した（口絵③）。

2 温度反応

O1-1, B1, F1 の 3 菌株は 5～30℃ で生育し、生育適温は 20～25℃ であった。25℃ における菌糸伸長速度は 10.3～12.5 mm/24 h であった。N1 株は 5～35℃ で生育し、生育適温は 25℃ であった。25℃ における菌糸伸長速度は 15.7 mm/24 h であった（図-1）。

3 菌糸融合反応

O1-1, B1, F1 の 3 菌株を AG-1～8 の基準菌株と対峙培養した結果、3 菌株とも AG-3 PT・ST9710HK 株と高頻度で融合し、他の菌株とは融合しなかった。N1 株は AG-2-1 (AG-2-1/Nt)・RT23 株と高頻度で、AG-2-1・R123 株、AG-2-2 IIIB・C-96 株、AG-2-2 IV・RI-64 株、AG-2 BI・TE-2-4 株と低頻度で融合し、他の菌株とは融合しなかった（表-2）。

4 反応による亜群識別

O1-1, B1, F1 の 3 菌株は AG-3 PT, TB, TM 特異的プライマーを用いた PCR 反応（国永ら、2007）により、AG-3 PT 特異的プライマーのみで約 480 bp の DNA 断

表-1 トマト株腐病菌および基準菌株の来歴と宿主範囲

					病原性 ^{a)}			
					トマト		ジャガイモ	タバコ
					茎地際部 ^{b)}	葉 ^{c)}	幼茎 ^{d)}	葉 ^{c)}
供試 菌株	菌株	宿主	AG/亜群	分離地				
	O1-1	トマト	AG-3 PT	北海道北斗市	++	++	+	—
	B1	トマト	AG-3 PT	北海道平取町	++	+	+	—
	F1	トマト	AG-3 PT	北海道深川市	++	++	+	—
	N1	トマト	AG2-1 (AG-2-1/Nt)	北海道森町	+	++	+	++
基準 菌株	RPS-9	エンドウマメ	AG2-1	群馬県	±	±	—	—
	F56L	ジャガイモ	AG2-1	アメリカ	±	+	—	—
	RT23	タバコ	AG2-1 (AG-2-1/Nt)	イタリア	±	++	±	++
	ST9710HK	ジャガイモ	AG-3 PT	北海道	++	++	+	—
	1614	タバコ	AG-3 TB	アメリカ	—	±	—	+
	0285-2	トマト	AG-3 TM	秋田県	+	++	—	±

^{a)} トマト・ジャガイモの接種温度は 15℃、タバコは 25℃。

トマト茎地際部・ジャガイモ幼茎の接種源はフスマ培地、トマト葉およびタバコ葉の接種源は PDA 含菌寒天培地（直径 5 mm）を使用。

^{b)} 茎地際部に対する病原性：—，病徴なし；±，茎地際部の一部に褐色の病斑を形成；

＋，褐色の病斑が茎地際部外周を取り囲むが、地上部に萎凋症状は認められない；

++，褐色の病斑が茎地際部外周を取り囲み、地上部は萎凋する。

^{c)} 葉に対する病原性：—，病徴なし；±，直径 15 mm 未満（接種源を含む）の褐色病斑を形成；＋，直径 15～25 mm の褐色病斑を形成；++，直径 25 mm 以上の褐色病斑を形成。

^{d)} 幼茎に対する病原性：—，病徴なし；±，不明瞭な褐色病斑を形成；＋，明瞭な褐色病斑を形成。

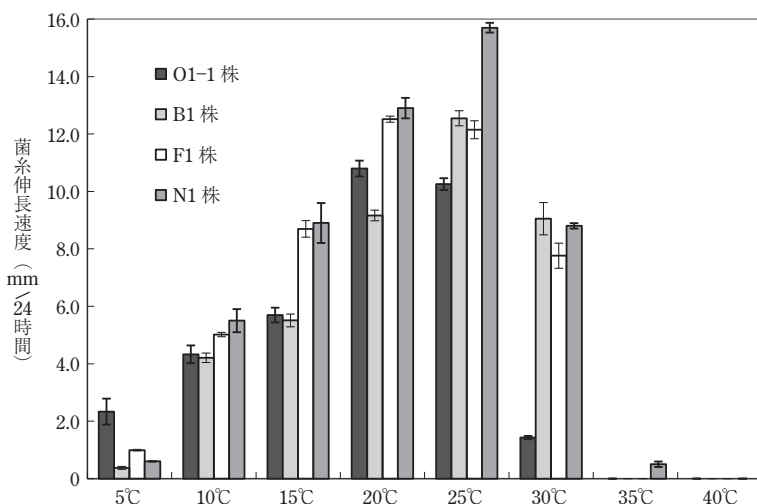


図-1 *Rhizoctonia solani* O1-1 株 (AG-3 PT), B1 株 (AG-3 PT), F1 株 (AG-3 PT) および N1 株 (AG-2-1/Nt) の PDA 培地上における温度別菌糸伸長速度
いずれも 3 反復の平均値。エラーバーは標準誤差を示す。

表-2 トマト株腐病菌と基準菌株 (AG-1 ~ 8) の菌糸融合頻度

AG	基準 菌株	供試菌株			
		O1-1	B1	F1	N1
AG-1	CS-Gi	— ^{a)}	—	—	—
AG-2-1	R123	—	—	—	L ^{c)}
AG-2-1 (AG-2-1/Nt)	RT23	NT ^{b)}	NT	NT	H
AG-2-2 III B	C-96	—	—	—	L
AG-2-2 IV	RI-64	—	—	—	L
AG-2 BI	TE-2-4	—	—	—	L
AG-3 PT	ST9710HK	H ^{d)}	H	H	—
AG-4	AH-1	—	—	—	—
AG-5	GM-10	—	—	—	—
AG-6	OHT1-1	—	—	—	—
AG-7	1556	—	—	—	—
AG-8	A-68	—	—	—	—

a) 菌糸融合せず。

b) 未検定。

c) d) 菌糸融合頻度, L: 低頻度 (<30%), H: 高頻度 (>50%)。

片の増幅が認められ (図-2), これらの分離菌は AG-3 PT に所属することが明らかとなった。N1 株では AG-2-1 特異的プライマーを用いた PCR 反応 (CARLING et al., 2002) により約 480 bp の DNA 断片が増幅され (データ省略), 本分離菌は AG-2-1 に所属することが明らかとなった。

IV 分離菌の病原性と宿主範囲

分離菌 4 菌株の接種によりいずれもトマト (品種: 桃

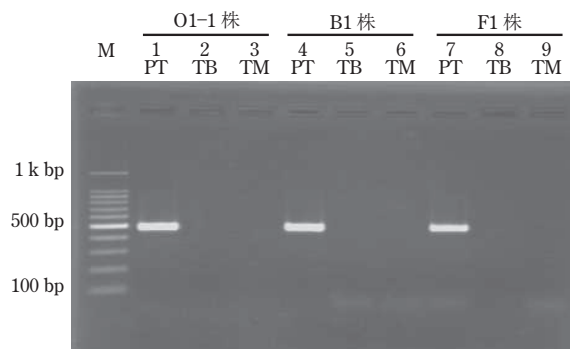


図-2 *Rhizoctonia solani* AG-3 トマト分離菌の AG-3 亜群 (PT, TB, TM) 特異的プライマーを用いた PCR 法による識別 (アガロースゲル電気泳動像)

特異プライマー: レーン 1, 4, 7: AG-3 PT,
レーン 2, 5, 8: AG-3 TB,
レーン 3, 6, 9: AG-3 TM.

ゲノム: O1-1 株 (レーン 1 ~ 3),
B1 株 (レーン 4 ~ 6),
F1 株 (レーン 7 ~ 9).

レーン M 100-bp ラダーマーカー。

フォワードプライマー: いずれも 3F (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA-3') を使用。

リバープライマー: AG-3 PT は PT-R (5'-CTTGATTAATGCAACTCCC-3'), AG-3 TB は TB-R (5'-CAACAACAATCTCCAAATCC-3'), AG-3 TM は TM-R (5'-TCATTCTTGATCCACTAGTC-3') の各プライマーを使用。

94°C・2分 + (94°C・40秒 + 50°C・1分 + 72°C・1分) × 30 サイクル + 72°C・5分。

太郎ファイト') 地際部の褐変および株の萎凋症状(株腐症状)が再現された(口絵④;表-1)。発病部位からは接種菌が再分離され,本症状が *R. solani* による病害であることが明らかとなった。我が国ではこれまで *R. solani* によるトマトの株腐症状の発生は未報告であったため,病名を「株腐病」とすることを提案した(MISAWA and KUNINAGA, 2010)。

また,分離菌はジャガイモ(品種:「男爵薯」)の幼茎にジャガイモ黒あざ病と類似の褐変症状を示した(図-3a;表-1)。AG-3 PT に所属する3菌株(O1-1, B1, F1)はタバコ(品種:「キサンチ NC」)の葉に病原性を示さなかった。N1株および基準菌株の AG-2-1(AG-2-1/Nt)・RT23株のみがタバコの葉に強い病原性を示した(図-3b)。

基準菌株の AG-3 PT・ST9710HK 株(ジャガイモ黒あざ病菌)はトマトに株腐症状,ジャガイモに黒あざ症状を示し,タバコの葉には病原性を示さず,これら作物に対する病原性はトマト株腐病菌 AG-3 PT 株と同一であった(表-1)。

基準菌株の AG-3 TM・0285-2 株(トマト葉腐病菌)はトマトの葉および茎地際部に病原性を示し,トマト株腐病菌と葉腐病菌は,トマトに対する病原性では明瞭な差が認められなかった。しかし,トマト葉腐病は葉に斑点を形成する病害であり,株腐病とは病徴が著しく異なるとともに,葉腐病菌はジャガイモ幼茎に病原性を示さない点でも異なった(表-1)。

V DNA 塩基配列の相同性と遺伝的系統解析

トマト株腐病菌4菌株の rDNA-ITS 領域および rDNA-IGS1 領域の塩基配列を解析し,世界中の様々な作物から分離した AG-2-1 および AG-3 菌株の配列と比較した。

トマト株腐病菌 AG-3 PT 株(O1-1, B1, F1)は DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている AG-3 PT 菌株(ジャガイモ黒あざ病菌)と rDNA-ITS 領域で 98 ~ 99%, rDNA-IGS1 領域では 96 ~ 99% の相同性を示し,トマト株腐病菌・AG-3 PT 株はジャガイモ黒あざ病菌と遺伝的に近縁であることが明らかとなった(表-3)。AG-3 PT は,これまでジャガイモに黒あざ病を起こす菌としてのみ報告されており,本亜群によるジャガイモ以外の作物における病害の発生は本事例が世界で初めてである。

様々な作物から分離した AG-2-1 菌株の rDNA-ITS 領域と rDNA-IGS1 領域の塩基配列のデータを基に最大節約法を用いて系統樹を作成した(図-4)。トマト株腐病

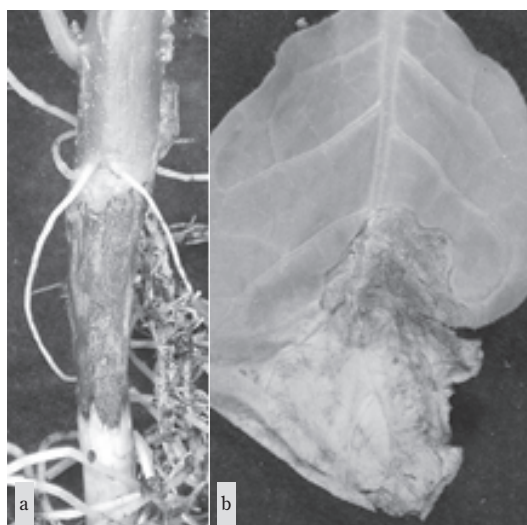


図-3 トマト株腐病の宿主範囲

- a: *R. solani* AG-3 PT・F1 株接種によるジャガイモ幼茎の褐変(接種3週間後).
b: *R. solani* AG-2-1/Nt・N1 株接種によるタバコ葉の褐変(接種9日後).

表-3 トマト株腐病菌 AG-3 菌株(O1-1 株, F1 株, B1 株)の rDNA-ITS および rDNA-IGS1 領域の塩基配列と既報の AG-3 PT, TB, TM 菌株との相同性

AG-3 トマト分 離菌	AG-3 PT (3 菌株) ^{a)}	AG-3 TB (3 菌株) ^{a)}	AG-3 TM (4 菌株) ^{a)}
O1-1	98 ~ 99 ^{b)} /97 ~ 99 ^{c)}	95/89 ~ 90	98/89 ~ 90
F1	99/97 ~ 99	95/89 ~ 90	97 ~ 98/89 ~ 90
B1	98 ~ 99/96 ~ 98	94/88 ~ 89	98/88 ~ 89

a) DDBJ に登録されている AG-3 PT, TB, TM 菌株の塩基配列.

b) rDNA-ITS 領域の相同性.

c) rDNA-IGS1 領域の相同性.

菌・N1 株は AG-2-1/Nt の基準菌株 RT23 株および R92.1 株, RP6 株と同一のクレードを形成し, N1 株は AG-2-1/Nt に属することが明らかとなった。AG-2-1/Nt による病害の発生は,本事例が我が国を含めアジアで初めてである。

おわりに

本病の発病株は葉が黄化せずに急激に株全体が萎凋する点で青枯病と類似しているが,本病発病株の地際部は褐変し,この部分を顕微鏡で観察すると *R. solani* の菌糸が確認できることから青枯病と識別できる。

本研究により, AG-3 PT による本病が道内各地で発

- 5) GURKANLI, C. T. et al. (2009): J. Phytopathol. **157**: 686 ~ 696.
- 6) KUNINAGA, S. et al. (1997): Curr. Genet. **32**: 237 ~ 243.
- 7) ——— et al. (2000 a): J. Gen. Plant Pathol. **66**: 2 ~ 11.
- 8) ——— et al. (2000 b): J. Plant Pathol. **82**: 61 ~ 64.
- 9) 国永史朗 (2003): 植物防疫 **57**: 219 ~ 222.
- 10) ———ら (2007): 日植病報 **73**: 184 (講要).
- 11) MISAWA, T. and S. KUNINAGA (2010): J. Gen. Plant Pathol. **76**: 310 ~ 319.
- 12) NICOLETTI, R. et al. (1999): J. Phytopathol. **147**: 71 ~ 77.
- 13) Pannecoucq, J. et al. (2008): Plant Pathol. **57**: 737 ~ 746.
- 14) Van BENEDEN, S. et al. (2009): Eur. J. Plant Pathol. **124**: 9 ~ 19.
- 15) 渡辺丈吉郎・松田 明 (1966): 指定試験 (病害虫) **7**: 1 ~ 131.
- 16) WOODHALL, J. H. et al. (2007): Plant Pathol. **56**: 286 ~ 295.

登録が失効した農薬 (24.11.1 ~ 11.30)

掲載は、**種類名**、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録失効年月日。

「殺虫殺菌剤」

- **オキシロニック酸・カスガマイシン・フサライド粉剤**
17971：ホクコーカスラプスターナ粉剤 DL（北興化学工業）
2012/11/01
- **PAP・フサライド・フルトラニル粉剤**
19766：日産モンカットラプサイドエルサン F 粉剤 DL（日産化学工業）2012/11/10
- **エトフェンブロックス・PAP・フサライド・フルトラニル粉剤**
19770：日産モンカットラプサイドイネメイト F 粉剤 DL（日産化学工業）2012/11/10

「殺虫剤」

- **NAC 水和剤**
4749：三共デナボン水和剤 50（ホクサン）2012/11/29
- **MPP 乳剤**
10856：三共バイジット乳剤（ホクサン）2012/11/29
- **CYAP 水和剤**
12092：三共サイアノックス水和剤（ホクサン）2012/11/29
- **エトフェンブロックス粉剤**
17272：三共トレボン粉剤 DL（ホクサン）2012/11/29
- **ダイアモルア剤**
18835：信越コナガコン（信越化学工業）2012/11/28
- **マラソン乳剤**
19599：家庭園芸用日農マラソン乳剤（日本農薬）2012/11/14
- **ジクロシメット粉剤**
20364：三共デラウス粉剤 DL（ホクサン）2012/11/29
- **ジクロシメット水和剤**
20367：三共デラウスフロアブル（ホクサン）2012/11/29
- **シラフルオフェン・テブフェノジド水和剤**
20482：ホクコーミミックジョーカーフロアブル（北興化学工業）2012/11/10
- **アセフェート・チオジカルブ水和剤**
21828：ホクコーオルトランラーピン水和剤（北興化学工業）
2012/11/01

「殺菌剤」

- **トルクロホスメチル・ヒドロキシイソキサゾール粉剤**
16889：三共リゾレックス H 粉剤（ホクサン）2012/11/29
- **フルアジナム水和剤**
17558：三共フロンサイド水和剤（ホクサン）2012/11/29
- **フルアジナム粉剤**
17561：三共フロンサイド粉剤（ホクサン）2012/11/29
- **オキシテトラサイクリン・ストレプトマイシン・銅水和剤**
18398：三共バクテサイド水和剤（ホクサン）2012/11/29
- **イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤**
18822：三共ベルカート水和剤（三井化学アグロ）2012/11/21
- **マンゼブ水和剤**
18852：クミアイベンコゼブ水和剤（クミアイ化学工業）
2012/11/28
- 22349：三共グリーンペンコゼブ水和剤（ホクサン）2012/11/29
- **シモキサニル・マンゼブ水和剤**
19778：三共カーゼート PZ 水和剤（三井化学アグロ）2012/11/17
- 19780：デュボンカーゼート PZ 水和剤（デュボン）2012/11/17
- **イブロジオン水和剤**
21976：協友ロブラール水和剤（協友アグロ）2012/11/06
- **ポリカーバメート・ミクロブタニル水和剤**
22512：リカバリー水和剤（ダウ・ケミカル日本）2012/11/18

「除草剤」

- **ピラゾスルフロニエチル粒剤**
19757：アグリグリーン粒剤（日産化学工業）2012/11/04
- **デスメディファム・フェンメディファム・メトラクロール乳剤**
20122：三共ベタダイア A 乳剤（ホクサン）2012/11/29
- **DBN 粒剤**
21827：草取り上手（グリーンカネショウ）2012/11/01