Rhizoctonia solani AG-1 IB によるシマオオタニワタリ葉腐病 (新称)

吉田 政博^{1*}・山口 武夫²・田中 孝幸¹

ABSTRACT

YOSHIDA, M.^{1*}, YAMAGUCHI, T.² and TANAKA, T.¹ (2016). First occurrence of leaf blight of bird's-nest fern, *Asplenium nidus*, caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IB. Jpn. J. Phytopathol. 82: 318–322.

A new disease of bird's-nest fern (*Asplenium nidus*, cv. Emerald) with dark-green, water-soaked lesions on the leaves has been found in Fukuoka Prefecture, Japan since approximately 1996. The lesions gradually extended from the lower part of the leaves near the soil to the tip of the leaves under high humidity. Affected leaves and petioles softened, turned dark-brown and dry. When severely infected, plants had rotted petioles and withered. A causal fungus was isolated from the infected tissues, and these isolates caused the same symptoms on cvs. Abis and Emerald of bird's-nest fern in inoculation tests. The pathogen was identified as *Rhizoctonia solani* based on the morphological and cultural characteristics, and the hyphal anastomosis group and the cultural type were determined as AG-1 IB, confirmed with PCR analysis using specific DNA primer sets for the anastomosis groups. The name leaf blight was proposed for this disease on bird's-nest fern.

(Received December 8, 2015; Accepted March 7, 2016)

Key words: *Rhizoctonia solani*, bird's-nest fern, leaf blight

シマオオタニワタリ (*Asplenium nidus* L.) は、チャセンシダ科チャセンシダ属の常緑性シダ植物である。同属のオオタニワタリとよく似ているが、葉裏でのソーラス（胞子のう群）の付き方で区別される。本植物は高温多湿で半日陰の場所でよく生育し、耐寒性があり比較的乾燥にも強く、古くから鉢物観葉植物として栽培されている。特に、福岡県みやま市（旧山門郡瀬高町）では、園芸品種である‘エメラルド’が生け花やフラワーアレンジメント用の切り葉として生産出荷されており、同市の特産物としての産地化が進められている。現在では、約 7400 m² の栽培面積で年間約 34 万本が出荷されており、さらには鉢植えの観葉植物としても国内外で流通している。

一方、この‘エメラルド’に、葉が水浸状に褐変し腐敗する葉腐症状の発生が認められはじめ、1996 年頃から栽培温室で問題となっていた。この原因の究明を行った結果、*Rhizoctonia solani* による新病害であることが判明したため、本報では本病の初発生時の状況および病原菌確認の詳細について報告し、新病名の提案を行う。

病徴 病斑の多くは地際部の葉身から発生し、幼植物で

は葉柄も腐敗して株全体にまん延する。高さ 30~40 cm 程度の大きい株では、葉身の下部に出た病斑の進展とともに徐々に葉柄が折れ、病勢が進展すると罹病葉は枯死する。症状は株の周囲葉から順次中心部に進行し、やがて株全体が枯死に至る。希に病斑が葉の先端部から発生する場合もあるが、この場合は病斑の地際部への伸展は少ない。病斑は初め水浸状、暗緑色で、特に多湿条件では葉身が茹でたようになり、葉全体が軟化する。水浸状になった病斑部は乾燥すると茶褐色、または灰褐色となってもろくなり、病斑部分は容易に崩壊する (Fig. 1-A~C)。標徴としての罹病株におけるくもの巣状の気中菌糸形成は乏しく、自然病徴では病斑上の菌糸塊や菌核の形成もほとんど見られない。

発生は比較的高温多湿時期に多いが、さらに温室の出入り口付近では比較的冷たい外気が温室内に流れ込み、葉表面が結露した後に特に多いようである。

病原菌の分離 みやま市瀬高町の栽培温室で 1996~2000 年に発生した罹病株から、病原菌の分離を行った。罹病葉から病斑組織を切り出し、常法により表面殺菌後（長谷ら、1995）、1.5% 素寒天培地上に置床し、25℃、2~5 日間培養

¹ 東海大学農学部（〒 869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽） School of Agriculture, Tokai University, Minamiaso, Aso, Kumamoto 869-1404, Japan

² 元九州東海大学農学部 Formerly, School of Agriculture, Kyushu Tokai University

* Corresponding author (E-mail: yoshida@agri.u-tokai.ac.jp)

Fig. 1. Leaf blight of bird's-nest fern.

A–C. Typical symptoms on naturally infected plants cv. Emerald. A, withered young seedling plant; B, leaf blight on lower parts of leaves; C, severe leaf blight and rotted petioles.

D–G. Symptoms after inoculation of cvs. Abis (D, E) and Emerald (F, G) inoculated with *Rhizoctonia solani* isolate P-51-1 (D, 7 days after inoculation (dai); E–G, 14 dai).

した。組織から生育してきた菌そうは先端部を単菌糸分離し、これをショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天（以下 PSA）培地に移植した。また、罹病葉を切り取りビニール袋に入れ、約 15°C の湿室に 7 日間静置後、病斑上に形成された菌核から同様に菌の分離を行った。

その結果、罹病組織より 22 菌株、菌核より 8 菌株の合計 30 菌株の同一性状を示す糸状菌が得られた。

接種試験 分離菌のうち、罹病組織からの 4 菌株（P-1-1, P-28-1, P-31-5, P-51-1）と菌核からの 1 菌株（S-4-1）の合計 5 菌株を供試して、シマオオタニワタリの品種：アビスに対する接種試験を行った。供試菌はオオムギ粒培地で 25°C、7 日間培養して接種源とした。接種は、4 号鉢栽培の健全植物（草丈約 40 cm）の栽培土壌（深さ約 2 cm）を滅菌土壌と入れ替え、その土壌中と株間に接種源のオオムギ粒を 1 鉢当たり 15 粒埋設した。接種後、鉢は 5 日間ビニールで覆い湿室とし、昼間 27°C、夜間 22°C、14 時間照明の陽光定温器内で栽培し、随時発病状況（－：病斑が認められない、＋：斑点状の病斑、++：葉腐れを伴う大型病斑、+++：葉柄部の腐敗を伴う大型病斑）を調べた。さらに、P-51-1 を供試菌株としてシマオオタニワタリの品種：エメラルドへの接種試験を同様に行った。‘エメラルド’は 7 号鉢栽培（草丈約 35 cm）の健全株を用い、接種後 10 日間ビニールで覆

い湿室とし、発病状況を観察した。1 区 2 鉢の植物を供試し、両品種の対照無接種区にはオオムギ粒のみを接種した。

その結果（Table 1）, ‘アビス’では、接種後 2～3 日目には菌糸が地際部に広がっていたが、病斑は認められなかった。しかし、5 日目から S-4-1 を除く菌株のすべての接種植物体において葉の下部に水浸状の病斑の形成が見られ、S-4-1 でも 10 日目には 1 株の植物体に発病が認められた。その後病勢は伸展し、病斑が葉全体に広がり、葉柄が腐敗して折れる症状も認められた。特に、P-51-1 接種では激しく発病した（Fig. 1-D, E）。

さらに、P-51-1 の‘エメラルド’に対する病原性は、‘アビス’と同様に接種後 5 日目から水浸状病斑の形成が確認された。しかし、その後の病勢の伸展は‘アビス’ほど顕著ではなく、形成病斑は乾燥した状態となった（Fig. 1-F, G）。

このように、分離菌接種により病徴を再現することができ、また、再現された病斑組織からはいずれも接種菌と同様の糸状菌が再分離された（Table 1）。

病原菌の同定 分離菌株はすべて PSA 培地上において淡褐色の菌糸で、菌核を形成し、分生子は形成しなかった。菌糸は先端細胞の隔壁近くで概ね直角に分岐し、分岐点には狭窄があり、隔壁はドリポア隔壁であった。また、かすがい連結はみられなかった。このように、分離菌は

Table 1. Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from bird's-nest fern cv. Emerald infected with leaf blight in inoculation tests of two cultivars of bird's-nest fern

Cultivar of bird's-nest fern inoculated	Isolates	Days after inoculation							Reisolation ^{c)}
		3	5	7	10	14	21	28	
Abis	P-1-1	0/2 ^{a)} - ^{b)}	2/2 +	2/2 ++	2/2 ++	2/2 +++	2/2 +++	2/2 +++	+
	P-28-1	0/2 -	2/2 +	2/2 ++	2/2 ++	2/2 +++	2/2 +++	2/2 +++	+
	P-31-5	0/2 -	2/2 +	2/2 ++	2/2 ++	2/2 ++	2/2 ++	2/2 ++	+
	P-51-1	0/2 -	2/2 +	2/2 ++	2/2 +++	2/2 +++	2/2 +++	2/2 +++	+
	S-4-1	0/2 -	0/2 -	0/2 -	1/2 +	1/2 +	1/2 ++	1/2 ++	+
	Control	0/2 -	0/2 -	0/2 -	0/2 -	0/2 -	0/2 -	0/2 -	-
Emerald	P-51-1	0/2 ^{a)} - ^{b)}	2/2 +	2/2 +	2/2 ++	2/2 ++	2/2 ++	2/2 ++	+
	Control	0/2 -	0/2 -	0/2 -	0/2 -	0/2 -	0/2 -	0/2 -	-

a) Number of plants with symptoms/number of plants inoculated.

b) +++, severe symptoms with rotted petiole; ++, moderate symptoms with leaf blight; +, weak symptoms with leaf spots; -, no symptoms.

c) +, Detected; -, not detected.

Fig. 2. Geimsa-stained nuclei in vegetative hyphal cells of *Rhizoctonia* sp. (P-51-1) isolated from a diseased leaf of bird's-nest fern. Bar = 10 μ m.

Rhizoctonia 属菌の特徴 (生越, 1995) を呈していた。さらに, シマオオタニワタリに病原性が確認された分離菌 5 株について, 主軸栄養菌糸の幅を測定し (鬼木, 1976), また, HCl-Giemsa 法 (Herr, 1979) により菌糸細胞の核数を調べた。その結果, 分離菌の菌糸は, 幅が平均 5.9~7.5 μ m で, 1 細胞当りの平均核数は 5.8~7.2 個であった (Fig. 2)。

よって, 本病原菌は多核の *Rhizoctonia* 属菌であり, 菌糸の特徴から *R. solani* Kühn と同定した。

菌糸融合群 (AG) の類別 供試 5 菌株について, 菌糸融合 (生越, 1976, 1995) による類別を行った。菌糸融合は, PSA 培地で 25°C, 2 日間平板培養した菌そうの先端部をスライドガラス上に広げた 1.5% 素寒天培地上で対峙培養し, 約 30 ヶ所の菌糸接触点を観察して, その菌糸融合の割合を融合頻度とした。試験はまず, P-51-1 を基準菌株とした分離菌株間での融合試験の後, P-51-1 と *R. solani* の菌糸融合

群 (AG-1~AG-7) の標準菌株との間で融合を調べた。

分離菌株間の融合頻度は 6.7~60.0% を示し, 組み合わせにおいて著しい差はあったが, すべての菌株間で菌糸融合が認められ, 分離菌株は同一菌糸融合群に属すると判定した。さらに, *R. solani* AG の標準菌株との菌糸融合では, P-51-1 は AG-1 に属する供試した 3 亜群 (IA, Cs-Ka; IB, B-19; IC, BV-7) 標準菌株とのみ融合し, その頻度は 23.3~33.3% であり, 亜群間で著しい差は認められなかった。

よって, P-51-1 をはじめとする分離病原菌 5 菌株は *R. solani* AG-1 に属することが明らかになった。

亜群 (培養型) の類別 菌糸融合頻度は, AG-2 の亜群識別には有効であるが, それ以外の菌群では識別に利用できない (国永, 2003)。そこで, 分離病原菌 5 菌株と *R. solani* AG-1 の 3 亜群の標準菌株について, PSA 培地上での生育温度および 25°C, 14 日間培養の培養性状を比較した。

その結果, P-1-1 (Fig. 3A) と P-28-1 (Fig. 3B) では, 菌糸の色は淡褐色で, 菌核は大きさ 1~8 mm の淡褐色~乳褐色で, 球形~扁球形, あるいは不整形で, 表面には短毛を有し, 菌糸が毛羽立っていた。P-31-5 (Fig. 3C) と P-51-1 (Fig. 3D) では, 菌糸は褐色で, 菌糸の厚い層を部分的に有する菌そうで, 菌核は扁球形~盤状, 表面は毛羽立っていた。S-4-1 (Fig. 2E) ではこれら 2 つの中間的な菌そうであった。また, 3 つの亜群の標準菌株と比較しても全く同様の培養菌そうは見られなかった。一方, これらの培養型の原記載 (渡

Fig. 3. Colonies of five pathogenic isolates and AG-1 IB standard strain of *Rhizoctonia solani* grown on potato sucrose agar (PSA) at 25°C for 14 days.

A–E. Pathogenic isolates (A, P-1-1; B, P-28-1; C, P-31-5; D, P-51-1; E, S-4-1).

F. AG-1 IB standard strain (B-19).

Fig. 4. Mycelial growth of five pathogenic isolates (P-1-1, P-28-1, P-31-5, P-51-1, S-4-1) and AG-1 standard strains (AG-1 IA, Ls-Ka; AG-1 IB, B-19; AG-1 IC, BV-7) of *Rhizoctonia solani* after 1 day at different temperatures on PSA.

辺・松田, 1966) とその特徴を比較したところ, 形成菌核が扁球形～盤状で, 大きさが不揃いで表面は毛羽立ち著しく粗剛であることから, 培養型 IB に類似すると考えられた。そこで, これらの菌株の温度反応を調べたが, 本試験結果では 15～35°C で生育し, 適温は 25～35°C であり, 35°C での生育の有無や温度反応において, 培養型を決定するための顕著な違いは認められなかった (Fig. 4)。

PCR 特異的プライマーによる同定 rDNA-ITS 領域の塩基配列における菌糸融合群特異的プライマー (AG-1 IA: (F)5'-CCTTAATTTGGCAGGAGGG-3', (R)5'-GACTATTAGAAGCG GTTCA-3'; IB: (F)5'-TG TAGCTGGCCTTTTAAC-3', (R)5'-GG ACTATTAGAAGCGGTTCG-3'; IC: (F)5'-GAGTTGTTGCTGG CCTCTGG-3', (R)5'-CCAAGTCAATGGACTATTG-3') (国永, 2003) を用いた PCR によって, 分離病原菌株の菌糸融合群

Fig. 5. PCR amplification of total genomic DNA from *Rhizoctonia solani* isolated from diseased leaf of bird's-nest fern, using *R. solani* subgroup-specific primer sets for AG-1 IA (A), AG-1 IB (B) and AG-1 IC (C). M: molecular marker (100-bp ladder marker), lanes 1–3: standard strains (1, Cs-Ka of AG-1 IA; 2, B-19 of AG-1 IB; 3, BV-7 of AG-1 IC), lanes 4–8: pathogenic isolates of *R. solani* (4, P-1-1; 5, P-28-1; 6, P-31-5; 7, P-51-1; 8, S-4-1).

亜群の同定の検証を行った。供試菌株は素寒天培地で培養した菌そう片をグルコース加用ジャガイモ煎汁液体培地に移植し, 25°C, 7 日間静置培養した。培養菌糸体は集菌後, 滅菌蒸留水で洗浄し, 凍結乾燥後粉碎して DNA 抽出用試料を調製し (Kanematsu and Naito, 1995; Matsumoto *et al.*, 1996), DNA を抽出した (Lee and Taylor, 1991)。PCR の反応条件は Kuninaga *et al.* (1997) と国永 (2003) の報告に準じた。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動後, エチジウムブロマ イドで染色してトランスイルミネーター下で DNA 増幅の有無を確認した。

その結果 (Fig. 5), 供試病原菌 5 菌株とも, AG-1 群の亜群 IA 特異的プライマー, あるいは IC 特異的プライマーを用いた PCR 産物中には増幅された DNA は検出されなかった。しかし, IB 特異的プライマーではすべての供試菌株から増幅された約 580 bp の DNA (国永, 2003) が検出された。一方, 標準菌株の DNA では, それぞれの亜群特異的プライマーとの組み合わせのみで DNA 増幅が確認された。

よって, これらの病原菌は *R. solani* AG-1 群の亜群 IB に属することが明らかになった。

病原菌と病名 *R. solani* の菌糸融合群は現在まで、AG-1～AG-13 の 13 種類が報告されており、我が国には AG-1～AG-7 が存在している (内藤, 2003). AG-1 は IA, IB, IC および ID (Priyatmojo *et al.*, 2001) の 4 つの亜群から構成されている. AG-1 IB による病害は主に植物体の地際部および地上部を侵し、多湿時に植物体上に綿毛状の菌糸を生じ、マメ科植物のくもの巣病に代表される葉腐れ、枝枯れの症状を起こす (竹内・堀江, 1995). 本試験においても、分離病原菌の接種試験の結果、シマオオタニワタリの地際部、地上部に典型的な葉腐症状を再現することができた.

シマオオタニワタリの病害としては、「Compendium of Ornamental Foliage Plant Diseases」(Chase, 1997) において Bacterial leaf spot (*Pseudomonas asplenii*, *P. gladioli*) と Foliar nematode (*Aphelenchoides fragariae*) の 2 種類が記述されている. また, Benson and Cartwright (1996) は観葉植物における *R. solani* の宿主として *Asplenium* を記載しているが、その病名や症状については言及されていない. 一方、「日本植物病名目録」(日本植物病理学会, 2015) においてはシダ植物の病害として、チャセンシダ類くもの巣病の他、レザーファンの黒枯病 (病原菌 *Phoma* sp.), 葉枯病 (*Cylindrocladium* sp.), 葉腐病 (*R. solani* AG-2-2 IIIB), 変形菌病 (*Diderma effusum*), さび病 (病原菌未同定), 並びにアディアンタム, オオバイノモトソウ, およびプテリスの葉枯線虫病 (*A. fragariae*), ベニシダ, マルハチ, およびヘゴの各種キノコによる病名未記載の病害等が掲載されている. また, オオタニワタリ (*Asplenium antiquum*) の病害としては、褐色葉枯病 (*P. gladioli* pv. *gladioli*, *Xanthomonas campestris*) の報告 (畔上・上原, 1993) があるが、本目録には掲載されていない. *R. solani* による病名については、内藤 (2003) は、芝草病害の「葉腐病」との関係から、亜群 IB によって起こる新発生の地上部病害には「くもの巣病」を充てる方が理解しやすいとしている. したがって、筆者らは先に病名を「くもの巣病」としたが (吉田ら, 2004), 本報において病徴を精査した結果、くもの巣症状は確認されなかったため、その特徴から「葉腐病」の病名が適当であると考えられた.

よって、シマオオタニワタリに葉腐症状を引き起こす病原糸状菌を *R. solani* Kühn 菌糸融合群 (AG) 1 群、亜群 IB と同定し、病名を「シマオオタニワタリ葉腐病 (Leaf blight of bird's-nest fern)」と提案する.

謝 辞

本実験を行うに当たり、*R. solani* の標準菌株 (IA, Cs-Ka; IB, B-19; IC, BV-7 を含む 14 菌株) を分譲頂いた元北海道大学教授生越明博士、*R. solani* AG-2-2 LP 菌株を分譲頂いた元

岐阜大学教授百町満朗博士、並びにシマオオタニワタリ「エメラルド」を提供して頂いた杉本神籠園杉本健康氏にお礼申し上げる.

引用文献

- 畔上耕児・上原勝江 (1993). 沖縄県のオオタニワタリ及び熊本県のアカメガシワに発生した新細菌病. 日植病報 59: 720. (講要)
- Benson, D.M. and Cartwright, D.K. (1996). Ornamental disease incited by *Rhizoctonia* spp. In *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control (Sneh, B., *et al.*, eds.). pp. 303–314, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Chase, A.R. (1997). Compendium of ornamental foliage plant diseases, pp. 9–70, APS Press, St. Paul.
- 長谷 修・羽柴輝良・柄澤 明 (1995). 植物生産農学実験マニュアル (日向康吉・羽柴輝良編). pp. 348–351, ソフトサイエンス社, 東京.
- Herr, L.J. (1979). Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia*like fungi. Phytopathology 69: 958–961.
- Kanematsu, S. and Naito, S. (1995). Genetic characterization of *Rhizoctonia solani* AG-2-3 by analyzing restriction fragment length polymorphisms of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 61: 18–21.
- Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T. and Yokosawa, R. (1997). Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis group in *Rhizoctonia solani*. Curr. Genet. 32: 237–243.
- 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.
- Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1991). PCR 実験マニュアル (Innis, M.A. ほか編, 斉藤 隆監訳). pp. 245–247, HBJ 出版局, 東京.
- Matsumoto, M., Furuya, N., Takanami, Y. and Matsuyama, N. (1996). RFLP analysis of the PCR-amplified 28S rDNA in *Rhizoctonia solani*. Mycoscience 37: 351–356.
- 内藤繁男 (2003). リゾクトニア菌による病害. 植物防疫 57: 32–36.
- 日本植物病理学会 (2015). 日本植物病名目録 1584 p, 日本植物病理学会, 東京.
- 生越 明 (1976). *Rhizoctonia solani* Kühn の菌糸融合による類別と各群の完全時代に関する研究. 農技研報告 C30: 1–63.
- 生越 明 (1995). 植物病理学事典 (日本植物病理学会編). pp. 226–228, 養賢堂, 東京.
- 鬼木正臣 (1976). イグサ紋枯病の発生および防除に関する研究. 福岡県立農業場試験場特別報告 23: 4–12.
- Priyatmojo, A., Escopalao, V.E., Tangonan, N.G., Pascual, C.B., Suga, H., Kageyama, K. and Hyakumachi, M. (2001). Characterization of a new subgroup of *Rhizoctonia solani* anastomosis Group 1 (AG-1-ID), causal agent of a necrotic leaf spot on coffee. Phytopathology 91: 1054–1061.
- 竹内 純・堀江博道 (1995). *Rhizoctonia solani* による園芸作物の新病害. 植物防疫 49: 12–14.
- 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: 1–53.
- 吉田政博・山口武夫・田中孝幸 (2004). シマオオタニワタリに発生したくもの巣病 (新称). 九病虫研報 50: 97–98. (講要)