

トウモロコシ根腐病菌の収集・同定と特性評価

月星 隆雄^{a)}・菅原 幸哉^{b)}・増中 章^{a)}

農研機構 畜産草地研究所

[〒329-2793 栃木県那須塩原市千本松 768]

Collection and identification of isolates causing Pythium root rot of corn in Japan and their characteristics

Takao TSUKIBOSHI^{a)}, Koya SUGAWARA^{b)}, Akira MASUNAKA^{a)}

NARO Institute of Livestock and Grassland Science

1. 目的

飼料用トウモロコシは長大型飼料作物としてはわが国で最も生産量の多い作目で、2015年度の作付けは北海道を中心に全国で約92,000 haに及ぶ(農林水産省, 2015)。生産物の多くは黄熟期に青刈りされ、細断して主にロールバールとしてサイレージ発酵後、家畜に給与される。しかし、刈取適期の黄熟期頃に植物体全体が枯れ上がる「根腐病」が発生し、大きな問題となっている。

根腐病はピシウム(*Pythium*)属菌により引き起こされ、1980年代に神奈川県など関東地方を中心に飼料用トウモロコシで発生し、初め根が黒変ないし褐変し、黄熟期頃に一気に枯れ上がり、植物体全体が黄化する。また、植物体の水分吸収が困難になるため雌穂が垂れ下がるのが特徴の一つで(図1)、茎内部は病原菌が伸展、まん延することで空洞化し(図2)、軟化するため機械刈りがうまくできず、大きな減収につながる。この



図1. トウモロコシ根腐病
(垂れ下がった雌穂)



図2. 空洞化した茎内と病原菌による組織の褐変(下部)

a) (現所属) 農研機構 西日本農業研究センター Western Region Agricultural Research Center, NARO
[〒721-8514 広島県福山市西深津町 6-12-1]

b) (現所属) 農研機構 畜産研究部門 Institute of Livestock and Grassland Science, NARO
[〒329-2793 栃木県那須塩原市千本松 768]

病害は飼料用トウモロコシの「萎凋症」として報告されたが（佐藤ら，1984；井上ら，1984），後にスイートコーンで報告された「根腐病」が正式名となった（橋本ら，1985）。

1990年代は大規模な発生は見られなかったが，2010年代に入ってから各地で再び根腐病が多発するようになり，特に2011年にはこれまで大きな発生の報告がなかった北海道（十勝地方など）で大発生し，大きな問題となった（十勝毎日新聞，2011）．病原菌は *Pythium graminicola* Subramanian とされていたが，これまで報告のない地域での発生もあり，病原菌種を再確認する必要があったため，各地で採集を行い，分離菌の形態および分子系統から菌種を同定するとともに，菌糸伸長，病原性等の特性解明を行った．

2. 材料および方法

1) 菌株の収集

2009年から2012年にかけて，北海道十勝清水町，札幌市，山形県酒田市，栃木県那須塩原市，群馬県前橋市，長野県塩尻市，宮崎県都城市の6道県7市町で，7月下旬から9月にかけて飼料用トウモロコシ根腐病発病株，または部分的な根腐れなどが見られた個体の根および地際部の茎をサンプリングし，根は一晩流水中で洗浄後，茎は内部組織を長さ5mm程度の小片に細断した．これを70%エタノールに約30秒間，1%次亜塩素酸水溶液に約1分間浸漬後，蒸留滅菌水中で2度洗浄し，水分をふき取った上で，1.5%素寒天平板培地上に置き，1-2日間暗黒下25°Cで培養した．伸長した *Pythium* 属菌を単菌糸分離し，V8ジュース培地（Campbell V8ジュース200ml，CaCO₃ 3g，寒天15g，以下V8）上で3-4日培養後，V8斜面培地に移植して分離菌株とし，これを20-25°Cの恒温器内で保存した．

2) 菌種の同定および菌糸生育試験

遠心（3000rpm，3分）により固形分を除いたV8ジュースで作成した平板培地（以下V8平板）上で，分離菌

MAFF No. (菌株)	菌種	分離部位	採集地	採集年月	DDBJ Accession No.*
511547	<i>Pythium arrhenomanes</i>	茎内部	栃木県那須塩原市	2009/9	AB903904
511548	"	根	長野県塩尻市	2010/9	AB979109
511552	"	根	群馬県前橋市	2011/9	AB979113
511553	"	根	北海道札幌市	2011/9	AB979114
511554	"	根	北海道十勝清水町	2012/8	AB979115
511559	"	茎内部	宮崎県都城市	2011/7	AB979122
Arr1**	"	茎内部	栃木県那須塩原市	2009/9	-
511550	<i>P. graminicola</i>	根	長野県塩尻市	2010/9	AB979111
511551	"	根	群馬県前橋市	2011/9	AB979112
511557	"	根	宮崎県都城市	2012/7	AB979118
511558	"	茎内部	宮崎県都城市	2011/7	AB979119
511560	"	根	宮崎県都城市	2011/7	AB979120
511562	"	根	山形県酒田市	2012/8	AB979121
Gra1**	"	根	栃木県那須塩原市	2011/7	-
511561	<i>P. heterothallicum</i>	根	宮崎県都城市	2011/7	AB979123
511555	<i>P. inflatum</i>	根	北海道十勝清水町	2012/8	AB979116
511549	<i>P. ultimum var. ultimum</i>	根	長野県塩尻市	2010/9	AB979110

* rDNA-ITS配列，** MAFF非登録菌株．

の ribosomal RNA 遺伝子 (以下 rDNA) -ITS 領域の相同性解析を行うために、分離菌株を V8 平板上、25°C、暗黒下で約 7 日間培養し、形成された菌叢をかき取り、既報の方法により DNA の抽出を行った (Tsukiboshi et al., 2005)。これをテンプレートとして、ITS1 および ITS4 プライマー (White et al., 1990) を用いて PCR 増幅装置 (PCR Thermal Cycler Dice, タカラバイオ(株)) により 5.8S rDNA を含む rDNA-ITS 領域を増幅し、ダイレクトシーク

エンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列は BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>, DDBJ) により相同性検索を行った。形態観察および rDNA-ITS 領域の相同性検索結果に基づき、種を同定した。

菌糸生育試験は各菌株について、上記のように V8 平板上、5~40°C (5°C 毎) の温度範囲で行い、菌糸伸長速度を測定した (図 3)。

3) 接種試験

各菌種から 1 菌株ずつ (表 3) を、麦粒培地 (大麦粒に同量の蒸留水を加え高圧滅菌) 上、7-10 日間暗黒下 25°C で培養し、接種源とした。1 万分の 1 ワグネルポットに重量比 5% で上記接種源を混和した園芸培土 (クレハ(株)) を充填した。飼料用トウモロコシは KD720 (カネコ種苗(株)) を供試し、湿らせたろ紙を敷いたシャーレ内、暗黒下 25°C で種子を発芽させ、芽が 5mm 程度伸びたものを芽出し苗として、上記ポットに移植した。これを 25°C 光周期 12 時間の陽光定温室で育て、10-14 日後に調査した。調査は、根腐れ程度 (0: 発病無し, 1: 根の先端部分が黒変, 2: 根の半分程度が黒変, 3: 根全体が黒変), 草丈 (地際から最上位葉身先端までの長さ) および出芽率 (出芽し植物体となった植物個体の割合) について行った。無接種区として麦粒のみを混和した土壌を用い、同様に試験を行った。試験は 1 回につき 6-8 個体を用い、3 反復した。

3. 結果

1) 菌株の収集および同定

飼料用トウモロコシの根腐れ症状から菌を分離した結果、計 79 菌株を得た (表 2)。北海道、栃

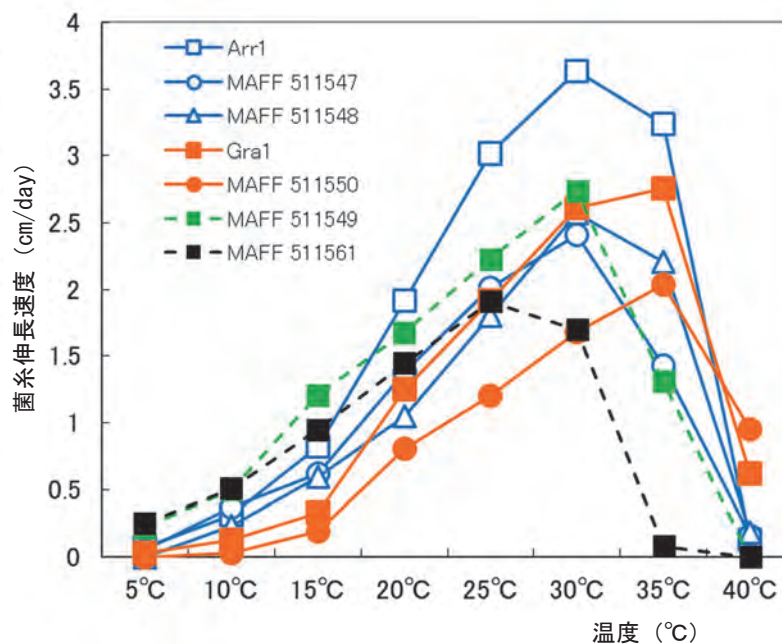


図 3. トウモロコシ根腐れ症状から分離される *Pythium* 属菌の生育温度

木, 群馬, 長野, 宮崎の各道県から採集した 42 菌株は, 造卵器は球形, 表面平滑, 大きさ 23.9 – 30.5 μm , 造精器 1–8 個が側着し, 内部に充満型卵胞子を 1 個形成. 卵胞子は淡黄褐色, 壁の厚さ 1.3–2.7 μm であった. 相同性解析の結果, MAFF

表2. 根腐症状を示したトウモロコシから分離した *Pythium* 属菌の各道県での分離菌株数*

菌種	<i>P. arrhenomanes</i>	<i>P. graminicola</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>P. heterothallicum</i>	<i>P. inflatum</i>
北海道	11 (92)	0	0	0	1 (8)
山形	0	6 (100)	0	0	0
栃木	4 (67)	2 (33)	0	0	0
群馬	2 (40)	3 (60)	0	0	0
長野	19 (63)	3 (10)	8 (27)	0	0
宮崎	6 (30)	13 (65)	0	1 (5)	0
計	42 (54)	27 (34)	8 (10)	1 (1)	1 (1)

* 分離菌株数 (各道県での分離頻度%)

登録株はすべて *Pythium arrhenomanes* (AY598628) と 99.1–99.9% の相同性を示した. 形態的にも記載 (Plaats-Niterink, 1981) と一致することから, これらの菌株を *P. arrhenomanes* Drechsler と同定した (Tsukiboshi et al., 2014). 表 1 に示した菌株以外については形態による同定を行った.

山形, 栃木, 群馬, 長野, 宮崎の各県から採集した 27 菌株は, 造卵器は球形, 表面平滑, 大きさ 21.5–29.6 μm , 造精器 1–8 個が側着し, 内部に充満型卵胞子を 1 個形成. 卵胞子は壁の厚さ 1.1–2.2 μm であった. 造卵器の大きさが *P. arrhenomanes* に比べやや小さいことが特徴であり, 形態的に *Pythium graminicola* の記載と一致した (Plaats-Niterink, 1981). 相同性解析の結果, MAFF 登録株はすべて *P. graminicola* (AY598625) と 99.7–100% の相同性を示した. 以上から, これらの菌株を *P. graminicola* Subramanian と同定した. 表 1 に示した菌株以外については形態による同定を行った.

長野県で採集した 8 菌株は, 造卵器は球形, 表面平滑, 大きさ約 26 μm , 造精器の形成は観察できず, 内部に非充満型卵胞子を 1 個形成した. 相同性解析の結果, MAFF 登録株は *Pythium ultimum* var. *ultimum* (AY598657) と 100% の相同性を示した. 以上から, この菌株を *P. ultimum* Trow var. *ultimum* と同定した. 表 1 に示した菌株以外については形態による同定を行った.

宮崎県で採集した 1 菌株は, 造卵器は球形, 表面平滑, 大きさ約 23 μm , 造精器 1 個が側着し, 内部に充満型卵胞子を 1 個形成したが, 成熟した卵胞子は少なかった. 相同性解析の結果, *Pythium heterothallicum* W.A. Campbell et F.F. Hendrix (AY598654) と 99.6% の相同性を示したことから, 同菌と同定した. また, 北海道で採集した 1 菌株は, 造卵器および造精器は観察できなかったが, rDNA-ITS 配列は *Pythium inflatum* V.D. Matthews (AY598626) と 100% の相同性を示し, 同菌と同定した. なお, MAFF 登録株の rDNA-ITS 配列は DDBJ に登録した (表 1).

2) 菌糸生育

菌糸生育試験の結果, *P. arrhenomanes* 3 菌株はいずれも生育適温が 30 $^{\circ}\text{C}$ となり, 菌糸伸長速度は 2.4–3.6 cm/日であった (図 3). これに対し, *P. graminicola* 2 菌株はいずれも生育適温が 35 $^{\circ}\text{C}$ であり, 伸長速度は 2.0–2.7 cm/日であった. *P. ultimum* var. *ultimum* および *P. heterothallicum* は, 生育適温がそれぞれ 30 $^{\circ}\text{C}$ および 25 $^{\circ}\text{C}$ であった.

3) 病原性

接種試験の結果、*P. arrhenomanes* はトウモロコシに激しい根腐れを引き起こし、草丈も無接種区に比べ大幅に抑制された（表 3）。*P. graminicola* 菌株も *P. arrhenomanes* に比べ草丈抑制はやや劣ったが、同程度の根腐れを引き起こし、明瞭な病原性を示した。接種土壌での出芽率は両者に大きな差はなく、70–80%程度であった。これに対し、*P. ultimum* var. *ultimum* は、ほとんど根腐れを引き起こさず、草丈も大きく抑制されることはなかったが、出芽率は平均 57.1%と *P. arrhenomanes* および *P. graminicola* よりも低くなった。*P. heterothallicum* は病原性を全く示さず、草丈も無接種区と同等であった。*P. inflatum* は接種を行っていない。

表3. トウモロコシ根腐れ症状から分離される *Pythium* 属菌の病原性

菌種	<i>P. arrhenomanes</i>	<i>P. graminicola</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>P. heterothallicum</i>	無接種
MAFF No.	511548	511550	511549	511561	
根腐れ程度*	3	3	1	0	0
草丈(cm)	16.3	20.9	26.9	33.4	31.8
出芽率(%)	71.4	85.7	57.1	85.7	92.9

*: 中央値, 0: 発病無し, 1: 根の先端部分が黒変, 2: 根の半分程度が黒変, 3: 根全体が黒変.

4. 考察

トウモロコシ根腐病については 1980 年代に神奈川、栃木、千葉県など関東を中心に発生し、*P. graminicola* が原因菌とされた。しかし、当時は東北以北での発生はなく、本調査で初めて北海道でも本病の発生を認めた。病原菌としても飼料用トウモロコシでは初めて *P. arrhenomanes* が分離され、明瞭な病原性を示した。この菌はすでにスイートコーンで根腐病菌として報告されており（舟久保, 2010）、水稻でも東北・北陸地方を中心に苗立枯病菌として問題になっている（戸田ら, 2011）。トウモロコシに明瞭な病原性を示した *P. arrhenomanes* と *P. graminicola* の地域ごとの分布を見ると、北海道、栃木、長野など比較的冷涼な地域では *P. arrhenomanes* が過半数～多数を占めたのに対し、群馬、宮崎などの比較的温暖な地域では *P. graminicola* が過半数を占めていた。菌糸生育試験の結果では、*P. graminicola* は生育適温が 35°C であったのに対し、*P. arrhenomanes* は 30°C であり、このことも両菌種の分布に関わるものと推定した。また、両菌とも高温性ピシウムであり、近年の気候温暖化に伴い分布を拡大したものと推測した。*P. ultimum* var. *ultimum* はトウモロコシのピシウム苗立枯病菌であり、出芽率を低下させたことから、幼苗での病原菌が生育後期でも残存して分離された可能性がある。*P. heterothallicum* は一般的に病原菌ではなく、森林土壌等から腐生的に分離されるが、本調査でもトウモロコシに全く病原性を示さず、腐生菌として付随して分離された可能性が高い。*P. inflatum* も同様に土壌から分離されることが多く、本調査では接種試験は行っていないが、腐生菌である可能性が高い。

本調査を通して、トウモロコシ根腐病菌は現在特に北日本で病原性の強い *P. arrhenomanes* の発生が多いことが明らかになった。著者らは、本調査で収集した菌株（主に MAFF 511548）を爪楊

枝穿刺法によるトウモロコシ根腐病抵抗性検定に用いており (Mitsuhashi et al., 2015), 本調査で採集した菌株の抵抗性育種での活用が今後も期待される。

5. 謝辞

長野県畜産試験場の三木一嘉氏には現地でのサンプル採集の際にご協力頂いた。ここに記して深謝の意を表する。

6. 参考文献

- 舟久保太一 (2010). *Pythium arrhenomanes* によるトウモロコシ根腐病 (病原追加). 関東東山病害虫研究会報 57: 15–17.
- 橋本光司・吉野正義・渡辺恒雄 (1985). スィートコーン根腐病 (新称) の発生生態と防除. 関東東山病虫研報 32: 56–58.
- 井上 登・島貫忠幸・佐藤 徹 (1984). トウモロコシ萎凋症 (立枯れ様症状) の発生経過について. 関東草飼研誌 8: 56–59.
- Mitsuhashi, S., Masunaka, A., Kikawada, T., Sugawara, K., Tsukiboshi, T., Tamaki, H. and Sato, H. (2015). Evaluation of resistance to *Pythium* root rot by *Pythium arrhenomanes* in corn by using a toothpick inoculation method. Grassl. Scie. 61: 181–184.
- 農林水産省 (2015). 農林水産作況調査. 飼料作物平成 27 年度, http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html. 農林水産省, 東京.
- 佐藤 徹・島貫忠幸・月星隆雄 (1984). トウモロコシ茎腐症状から分離された *Pythium* 菌について. 日植病報 50: 137. (講要)
- 戸田 武・岩佐昭紀・藤 晋一・古屋廣光 (2011). 東北および北陸地域 5 県におけるイネ苗立枯病を引き起こす *Pythium* 属菌の種について. 日植病報 77: 202. (講要)
- 十勝毎日新聞 (2011). 「根腐病」大発生. 十勝毎日新聞 9 月 30 日号
- Tsukiboshi, T., Chung, W. H. and Yoshida, S. (2005). *Cochliobolus heveicola* sp. nov. (*Bipolaris heveae*) causes brown stripe of bermuda grass and Zoysia grass. Mycoscience 46: 17-21.
- Tsukiboshi, T., Sugawara, K., Masunaka, A. and Mitsuhashi, S. (2014). First report of *Pythium* root and stalk rot of forage corn caused by *Pythium arrhenomanes* in Japan. Plant Disease 98: 1155.
- Van der Plaats-Niterink, A. J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Stud. Mycol. 21: 1–242.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand, M., Sninsky, D., White, T. (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California, pp.315–322.