

香川県農業試験場研究報告 第 60 号(2010 年 3 月)

1. キウイフルーツ果実軟腐病菌 *Diaporthe* sp. および *Botryosphaeria dothidea* による枝枯症状

1) 近年、香川県で樹齢が約 10 年以上のキウイフルーツ樹に枝枯れの発生が目立つようになった。枝枯れは、枝の大きな切断痕や日焼け部から枯れ込みが進み、側枝、亜主枝が枯れる場合が多い。病勢進展が著しい場合は、亜主枝、主枝まで枝枯れが進み胴枯れ症状を呈し、樹全体が枯れる場合がある。

2) 枝枯れと健全の境界部から菌の分離を行ったところ、*Phomopsis* 属菌、*Dothiorella* 属菌等が検出された。

3) 枝枯病菌として代表的な両属菌に着目し、それぞれキウイフルーツ枝に接種したところ、明らかにいずれも枝枯れ症状が見られ、両属菌が再分離された。この内、*Phomopsis* 属菌については、子のう胞子、子のう、子のう殻、分生子及び分生子殻の形態、培養上の諸性質、並びにキウイフルーツ、ミカン及びリンゴの果実とモモ及びナンの枝に対する接種試験の結果から、キウイフルーツ果実軟腐病菌の *Diaporthe* 属菌と同一の菌であることが明らかになった。

4) また、*Dothiorella* 属菌については、子のう胞子、子のう、子のう殻、分生子及び分生子殻の形態、培養上の諸性質、並びにキウイフルーツ果実への接種試験の結果からキウイフルーツ果実軟腐病菌の *B.dothidea* と同一の菌であることが明らかになった。

2. 枝枯病菌 *Diaporthe* sp.接種キウイフルーツ枝における抗菌性物質の生成

1) *Diaporthe* sp.接種、傷処理および無処理枝からの抗菌性物質の生産検定

*Diaporthe* sp.接種枝のアセトン浸漬液からのクロロホルム抽出液中には 6 種類の抗菌性物質がバイオオートグラム法により検出された。*Diaporthe* sp.は枝への有傷部に接種するため、菌接種以外はすべて同じにした傷処理区における抗菌物質の生産を検定し、傷処理の抗菌物質生産誘導を検定したところ、*Diaporthe* sp.接種区で見られた抗菌物質の一つと同じく抗菌性阻止帯が 1 つのみ検出された。また無処理区には、これらの抗菌性物質のいずれも検出されなかったが、抗菌性物質の存在を示す幅の広い阻止帯が認められた。

2) 灰色かび病罹病葉および無処理葉からの抗菌性物質の抽出

灰色かび病罹病葉からは、5 種類の抗菌性物質が検出された。無処理葉においては灰色かび病罹病葉と同じ 1 つのみに鮮明な阻止帯が見られた。無処理の葉および枝から抽出された抗菌性物質はいずれも 1 つのみであるが、Rf は大きく異なった。

3) 抗菌性物質の希釈倍数と *Diaporthe* sp.分生子発芽阻害率との相関

抗菌性物質の希釈倍数と孢子発芽率との関係について検定した。*Diaporthe* sp.接種枝のアセトン浸漬液からのクロロホルム抽出液を様々な濃度に希釈してスライドグラス上で風乾させ、*Diaporthe* sp.の分生子懸濁液を静置して 48 時間後の発芽率を検定した結果、濃度依存の孢子発芽阻害による抗菌活性が認められた。

4) *Diaporthe* sp.接種後の時間経過と抗菌性物質生成の推移

*Diaporthe* sp.接種後の静置時間と抗菌性物質生成の推移について検定した。接種枝のアセトン浸漬液からのクロロホルム抽出液を様々な濃度に希釈してスライドグラス上で風乾させ、*Diaporthe* sp.の分生

子懸濁液を静置して48時間後の発芽率を検定した結果、分生子発芽抑制率は、接種30日後には最高値となり、その後同40~50日後にはやや減少傾向が見られた。病斑形成は、接種30日頃にほぼ終了しその後顕著な進展は見られなかった。

#### 5) 接種1, 3, 6年生枝における抗菌性物質の生成量の比較

抗菌性物質の生成量は1年生枝では最も高く、3年生枝ではやや低下し、6年生枝では大幅に低下した。樹齢を経るほど明らかに抗菌性物質の生成量は低下した。

### 3. *Colletotrichum acutatum* Simonds ex Simonds によるオリーブ新梢枯死症

#### 1) 病徴

本病発生の初期には、苗木や成木の新梢先端の葉・枝が枯死する症状が見られ、やがて病徴は梢の先端から基部に向かって進展して枯れ込み症状を呈する。新梢の先端が枯死した症状が枯れ込み症状にまで進展するのは、水平方向に伸長している梢に比べて、垂直に伸長している梢の方が多い。病勢が進むと枝全体が枯れて、これが重症になると樹全体が枯れる場合もある。本症状は一般に、密植や混んだ枝により風通しの悪い圃場に発生が多い。発生は梅雨時に最も多く、次いで秋雨時に多い。

#### 2) 病原菌の分離

4オリーブ圃場で栽培されていた‘ミッション’、‘マンザニロ’および‘ルッカ’のオリーブ主要3品種から、先端枯死症状を呈する梢を採取し、健全部と枝枯部の境界部から菌の分離培養を行った。供試した大部分の梢から *Colletotrichum* 属菌が分離されたが、同一切片から *Phomopsis* 属菌を含む複数の糸状菌が分離される場合も多かった。

#### 3) 分離菌の形態

分離した菌株の中から3菌株を用いて、より詳細な形態観察を行った。この結果を Sutton (1980) が示した *C. acutatum* と *C. gloeosporioides* の分生子・付着器の形態および大きさと比較すると、これらの分離菌株は前者にほぼ一致した。

#### 4) 生育温度

分離菌株をPDA培地上で、5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40°Cの各温度下で5日間培養した結果、菌株最適生育適温は25°Cであった。

#### 5) 薬剤感受性

分離菌株は、ベノミル剤添加(1,250 ppm)およびジエトフェンカルブ剤添加(625ppm)PDA培地、25°C下5日間培養で生育が認められた。分離した菌株はベノミル剤とジエトフェンカルブ剤の双方に耐性を示したため、*C. acutatum* であると推定された。

#### 6) 分子系統学的手法による分類

分子系統学的知見を加えるために、ITS領域配列(Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1), 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene および ITS2 を含む領域)を用いた系統解析を試みた。AAAAGTCGTAACAAGG-3' (White *et al.*, 1990))でPCR反応を行った。PCR反応終了後のPCR産物は、pGEMR-T EASY Vector (Promega, USA)にサブクローニングし、プライマーSP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATA-3')とT7 (5'-TAATACGACTCACTATA-3')を用いてジデオキシ法(Sanger *et al.*, 1997)で配列を決定した。系統樹を作成した結果、供試菌株は *C. acutatum* と同一のグループとなった。また、もう一方の菌株は、シクラメン (*Cyclamen* sp.) に感染することが報告されている *Glomerella acutata* (*C. acutatum* の有性世代)のITS配列AJ301982 (Nirenberg *et al.*, 2002)と高い相同性を示した。なお、供試菌株のITS配列を、

B-1 株は DDBJ/EMBL/GenBank accession 番号 AB305160, B-2 株は AB305161, B-3 株は AB305162, Op-2 株は AB305163, Op-3 株は AB305164 および T-1 株は AB305165 として登録した。

#### 7) 接種試験

圃場病徴部位から優占的に分離された *C. acutatum* 菌株を用いた接種試験を行った。供試オリーブ品種‘ミッション’には有傷および無傷接種を, ‘マンザニロ’, ‘ルッカ’には有傷接種のみを行い, 何れの品種も 5, 6 年生の新梢からそれぞれランダムに選んだ 25 梢を供試した。対照区として, 有傷または無傷の無接種区を設けた。供試したいずれの品種でも, 有傷接種区では接種後 7~10 日で, 接種した梢の全てに枯死症状が見られた。無傷接種では接種後約 14 日で, 接種梢のわずかに先端枯死症状が見られた。また, 接種 4~5 週間後には接種垂直梢の大部分において, 先端枯死から枯れ込み症状にまで病徴が進展し, 原病徴を再現した。接種した梢の新梢枯死症状および枯れ込み症状を呈した部位から, 接種菌が再分離された。なお, 有傷および無傷の無接種区では病徴は見られなかった。

### 4. *Phomopsis* spp.によるブドウ脱粒病

#### 1) 病徴

脱粒は, ブドウ果実の酸が抜け, 糖度が上がる収穫開始時期から始まり, 収穫終期まで続く。最初は果梗部に小さな黒褐変点が見られ, これが拡大して果梗全体を取り巻き, 枯れ込みが進み, やがて果粒が脱落する。脱粒は主として果房の中央部から発生する。被害が著しい場合は穂軸の一部まで枯れ込みが進む。脱落した果粒に著しい萎凋や退色は見られない。

#### 2) 病原菌の分離

供試菌は, 1999 年から 2004 年に香川県下で発生したブドウ脱粒症状が進展して枯れ込んだ果梗(‘ピオーネ’, ‘マスカットベリーA’, ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’)から分離した。同部位からは, *Phomopsis* 属菌, *Aspergillus* 属菌, *Cladosporium* 属菌, *Botryosphaeria* 属菌, *Colletotrichum* 属菌等が分離された。

分離された *Phomopsis* 属菌を単孢子分離し PDA 培地上で培養すると, 特徴のある 2 種類の菌株に分けられた。一つは, ‘ピオーネ’, ‘マスカットベリーA’のいずれの品種からも検出され, 菌叢は始め白色で培養期間が長くなると基底部分が赤紫色に着色し, 子座は綿毛状気中菌糸に埋もれてあまり発達せず, 培地上に不規則に分生子殻を形成する菌株で, もう一方の菌種は, 主として‘マスカットベリーA’から分離され, 菌叢は密度の高い綿毛状で, 培養初期は白色であるが 2~3 週間経過するとうすく灰黒色を帯び, 発達した子座内に分生子殻を形成し, さらに培養期間が 1 ヶ月以上経過すると分生子殻の下に 1~数個の子のう殻を形成するホモトリックな特徴を有する菌株であった。

#### 3) 菌叢生育温度

2 分離菌株とも, 10~35°C の範囲で生育し, 27°C で最も生育は良好であった。しかし, 菌叢の生育速度は明らかに異なり, 菌叢の先端がシャーレの壁面に到達したのは, ホモトリックな特徴を有する菌株はほぼ処理 3 日後であったのに対して, 一方の菌株は処理 5 日後であった。

#### 4) リボソーム DNA (rDNA) ITS 領域を用いた系統解析

分離株を PDB 培地で培養し, Kanematsu *et al.* (2000) の方法で DNA を抽出した。rDNA ITS 領域を White *et al.* (1990) のプライマー ITS1 と ITS4 を用いて, Takara Taq (タカラバイオ) により PCR で増幅した。PCR 産物は Mag Extracter (東洋紡) でアガロースゲルから精製した後に, BigDye ver.1.1 (アプライドバイオシステムズ) を用いてシーケンス反応を行い, ABI310 ジェネティックアナライザで塩基

配列を解析した。分離菌株は、Kanematsu ら(2000) の定義した *Phomopsis* W 型株と単系統となり、その中には、*Phomopsis* sp.によるキウイフルーツ果実軟腐病菌(衣川・佐藤, 2003) も含まれた。もう一方の分離菌株はイタリアのヒマワリから分離された *D. helianthi*, メロン陥没病の病原菌の一つである *D. melonis* var. *brevistylospora*, ダイズから分離された *D. phaseolorum* var. *meridionalis* と同定された菌と単系統群であることが支持された。近隣結合法により推定された単系統群は、MrBayes ver 3.12 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) を用いたベイズ法による系統解析によってもそれぞれ単系統群となった。

#### 5) 分離菌の病原性

分離菌株の病原性は、収穫近くの‘ピオーネ’および‘マスカットベリーA’両品種の果梗および果粒に有傷と無傷で、菌叢または分生子懸濁液を接種して調査した。菌株の菌叢を‘ピオーネ’の果梗に有傷接種した結果、接種果梗の果粒が落下した。また、同菌株を同部位に分生子懸濁液で有傷接種した結果、接種果梗の果粒が落下した。果梗および果粒に対する無傷接種では落果はなかった。‘マスカットベリーA’に対しては、菌叢を用いて有傷、無傷接種を行った。菌株を果梗に有傷接種した結果、接種果梗の果粒が落下した。これら両菌株の果梗および果粒に対する無傷接種では落果はなかった。果梗または果粒に対する対照無接種では落果はなかった。菌株に対する罹病性は、‘ピオーネ’の方が‘マスカットベリーA’より高かった。ホモタリックな菌株の方が病原力は強い傾向が見られた。

分離菌株は、有傷接種でミカン、リンゴ、キウイフルーツの果実に対して病原性が認められた。しかし、ブドウの新葉に対する病原性は認められなかった。

#### 6) 病原菌の同定および病名

ブドウ脱粒症状を呈した果梗部から分離された *Phomopsis* 属菌2種は、一方の  $\beta$  胞子の長さが短いこと、ホモタリックなこと、菌叢生育が速く、病原性もより強い傾向があることから、別種と考えられる。現在、本邦で報告がある *Phomopsis* 属菌によるブドウ4病害の中で、脱粒症状が報告されているのはつる割病のみである。つる割病は、新葉の縮れ、新梢の萎縮や枝に木質部に達する裂け目が縦に入るつる割れ症状が見られ、果実面に黒色小粒点を生じ、果梗や房軸なども侵されると成熟間際に落果する(田中,1998)。これに対して、今回報告する脱粒症状は、葉や枝の異常は観察されず、果実に黒色小粒点を生じず、ブドウの新葉に対して病原性を示さない。さらに、両菌株ともに、つる割病菌 *P. viticola* より  $\alpha$  型分生子の長さが短かく、また rDNA ITS 領域の系統解析で別系統となることから、つる割れ病菌とは異なる菌と考えられる。

rDNA ITS 領域の系統解析の結果から、1分離株は *Phomopsis* W 型株と分生子、子のう胞子およびコロニーの形態が類似していること、リンゴ等果実への病原性があることなどから同種と考えられる。本菌の正式な種名決定については、今後の研究進展を待ちたい。もう一方の分離株は rDNA ITS 領域の系統解析結果で、*D. helianthi*I-1 株(アクセッション No.AJ312357)、*D. phaseolorum* var. *meridionalis* 10-99 株(アクセッション No.AJ312359)(Rekab *et al.*, 2004)、メロン陥没病の病原菌の一つである *D. melonis* var. *brevistylospora* (Ohsawa and Kobayashi,1989) と同定された菌株(アクセッション No.AB105147 と AB10518)と単系統群であることが明らかとなった。