

*Colletotrichum*属菌 2 種によるリンドウ炭疽病 (新称)

中山喜一・後藤知昭・野沢英之¹・石川成寿
(栃木県農業試験場)

First Report of Anthracnose of Gentian Caused by Two Species of *Colletotrichum*

Kiichi NAKAYAMA², Tomoaki GOTO, Hideyuki NOZAWA and Seiju ISHIKAWA

摘 要

栃木県のリンドウ産地において、茎葉に斑点を生じ、病勢が進展すると激しい株枯れ症状を呈する病害が発生した。病斑部から2種の*Colletotrichum*属菌が高率に分離された。分離菌接種により、原病徴が再現され、接種菌が再分離された。分離菌は形態調査、種特異的プライマーによるPCR検定等により、それぞれ*C. gloeosporioides*, *C. acutatum*と同定された。両種によるリンドウ病害は我が国では未報告であり、本病をリンドウ炭疽病(新称)とすることを提案する。

栃木県のリンドウは、県北部から県西部にかけて栽培されており、花き類の重要な品目のひとつとなっている。数年前から栃木県那須町のリンドウ(エゾ系)圃場において、夏期(特に8月下旬以降)に激しい株枯れ症状が発生し問題となった。また、その病斑部からは*Colletotrichum*属菌が高率に分離された。そこで、今後の防除対策を講じるため、病原菌の分離、接種による病徴再現および病原菌の同定を行った。

材料および方法

1. 病原菌の分離

2001年および2002年に那須町のリンドウ圃場から発病株を採取し、常法により病原菌を分離したのち、分生子を単孢子分離して供試菌株を得た。以下の試験では、2001年分離菌株01R-A2および01R-B, 2002年分離菌株02R-3Aおよび02R-3Cの計4菌株を供試した。

2. 接種試験

分離菌をブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天(PDA)平板培地で、25℃, 暗黒下で8~9日間培養後、それぞれ殺菌蒸留水で $10^4 \sim 10^6$ 個/mlに調整した分生子懸濁液をペーパークロマトグラフ用噴霧器でリンドウ、イチゴ等へ噴霧接種した。接種後2日間は湿室下に置

き、その後は人工気象器(30℃, 湿度80%, 24時間照明)またはガラス温室で管理し、発病の有無を調査した。

3. 病原菌の同定

分離菌をPDA平板培地で、25℃, 暗黒下で5~8日間培養し、形成された分生子の形態を調査した。さらに、分離菌の付着器の形態をジャガイモ・ニンジン煎汁寒天(PCA)平板培地(Sutton, 1980)または素寒天(WA)平板培地上で調査した。

ベノミル添加培地での生育度(佐藤, 1996)は、PDA培地にベノミル、ジエトフェンカルブがそれぞれ1,250ppm, 625ppmになるよう添加し、25℃ PDA平板培地で前培養した分離菌をコルクボーラー(直径4mm)で打ち抜き、菌叢面を検定培地上に置床し、25℃, 暗黒下で5日間培養後の菌叢直径を調査し、次式により算出した。生育度=(25℃ 5日間ベノミル添加PDA平板培地上で生育した菌叢直径/同無添加PDA平板培地上での菌叢直径)×100

また、供試菌株をブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体(PDB)培地で25℃, 暗黒下で5日間振とう培養し、DNA抽出キット(QIAGEN社製)を用いて全DNAを抽

1 現在、栃木県農業環境指導センター

2 Address: Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station, 1080 Kawayara-cho, Utsunomiya, Tochigi 320-0002, Japan
2004年4月30日受領

出後, Peter R. et al. (1992) および Sreenivasaprasad S. et al. (1996) の方法に準じて, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* をそれぞれ特異的に識別するプライマーを用いてPCR検定を行った。

4. 菌系の生育温度

分離菌を25℃, 暗黒下, PDA平板培地で前培養した後, コルクボーラー(直径4mm)で打ち抜いた菌叢片をPDA平板培地上に置床し, 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 28℃, 30℃, 35℃ および37℃の各温度で暗黒下, 5日間培養後の菌叢直径を調査した。1処理あたりペトリ皿は3枚供した。

結果および考察

1. 2001年分離菌の病原性および所属

2001年にリンドウ発病株から分離した*Colletotrichum* sp.は, その分生子懸濁液の噴霧接種により, 接種2週間後頃から茎に褐色の壊死斑が形成され, リンドウに対する病原性が認められ病原徴を再現できた(表1)。また, その病斑部から接種菌が再分離された。

イチゴ品種「とちおとめ」および「女峰」には病原性が認められなかったが, シクラメンのパステル系品種「シュトラウス」では葉縁からやや円形で褐色を帯びた壊死斑および花柄の軟化腐敗が認められた(表2)。さらに, 発病株から接種菌が再分離された。

分離菌株01R-A2の分生子は, 無色, 単胞で両端が丸い円筒形で, 大きさ11.3~19.5×5~7.5(平均14.0×5.8)μmであった。PCA培地上での付着器は, 暗褐色, 不整形で, 大きさ7.5~15×5~10(11.5×7.6)μmであった(表3)。

菌系の生育は, 10~37℃で認められ, 適温は28~30℃であった(図1)。

さらに, *C. gloeosporioides*に特異的なプライマー(CgInt, ITS4)を用いたPCR検定の結果, 本菌に特異的な増幅断片が認められた(図2)。

2001年分離菌は, 以上の特徴をSutton(1992)の検索表および形態数値と比較し, PCR検定の結果から, *Colletotrichum gloeosporioides*(Penzig) Penzig &

第1表 2001年分離菌のリンドウに対する病原性

供試菌株	リンドウ(99D02-5S)		リンドウ(99D02-7M)	
	有傷	無傷	有傷	無傷
01R - A2	4 / 4 ^{a)}	4 / 4	4 / 4	1 / 4
01R - B	0 / 4	1 / 4	4 / 4	1 / 4
無接種	-	0 / 5	-	0 / 5

a) 発病株数 / 供試株数。 - は試験していない

第2表 2001年分離菌のイチゴ, シクラメンに対する病原性

供試菌株	イチゴ		シクラメン
	「とちおとめ」	「女峰」	「シュトラウス」
01R - A2	0 / 3 ^{a)}	0 / 3	3 / 3
01R - B	0 / 3	0 / 3	3 / 3
無接種	0 / 3	0 / 3	0 / 3

a) 発病株数 / 供試株数

第3表 2001年分離菌および既知種の形態

菌株または既知種	分生子の形態	分生子の大きさ(μm)	付着器の大きさ(μm) ^{a)}
01R - A2	円筒形	11.3~19.5×5~7.5 ^{b)} (14.0×5.8)	7.5~15×5~10 (11.5×7.6)
01R - B	円筒形	10~17.5×4.8~7 ^{b)} (14.6×5.8)	8~17.5×5~10 (11.7×6.9)
<i>C. gloeosporioides</i> ^{c)}	円筒形	12~17×3.5~6	6~20×4~12

a) PCA培地上の測定値。()は平均値

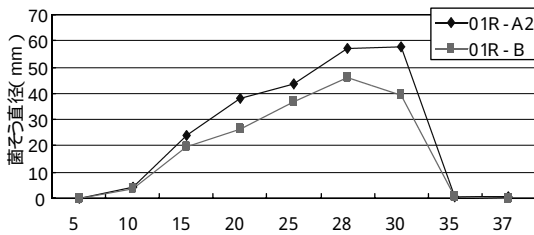
b) PDA培地上の測定値。()は平均値

c) Sutton(1992)

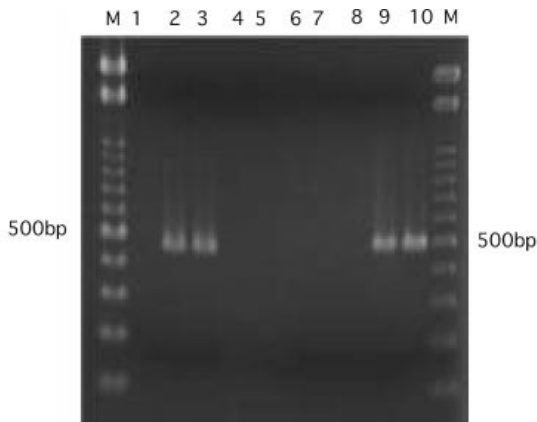
Saccardoと同定した。

2. 2002年分離菌の病原性および所属

2002年にリンドウ発病株から分離した*Colletotrichum* sp.は、その分生子懸濁液の噴霧接種により、接種2週間後頃から茎に褐色の壊死斑が形成され、リンドウ



第1図 2001年分離菌の菌糸生育と温度との関係



第2図 種特異的プライマーによる各分離菌のPCR増幅

M: 100bpラダー

1~5: CgInt/ITS4 (450bp)

6~10: CaInt2/ITS4 (490bp)

1, 6: H₂O

2, 7: 01R-A2 4, 9: 02R-3A

3, 8: 01R-B 5, 10: 02R-3C

に対する病原性が認められ原病徴を再現できた(表4)。また、その病斑部から接種菌が再分離された。

分離菌はイチゴ品種「とちおとめ」に葉縁から赤褐色で不整形の病斑を形成し、石川ら(1992)がイチゴで報告した病徴に類似していた。築尾ら(1993)は、*Gromerella cingulata*と*C. acutatum*の判別にトマト品種「桃太郎」に対する病原性の差を利用しているが、今回の試験ではトマト品種「マイロック」茎葉での明瞭な病徴は認められなかった(表5)。また、発病株から接種菌が再分離された。

分離菌株02R-3Cの分生子は、無色、単胞で紡錘形～両端が尖った長楕円形で、大きさ10~17.5×3.8~6.5(13.5×5.1)μmであった。PCA培地上での付着器は、暗褐色、棍棒形で、大きさ7.5~12.5×5~8.8(9.2×6.2)μmであった(表6)。

ベノミル添加培地での生育度は、分離菌株02R-3A, 02R-3Cがそれぞれ30.3%, 28.7%であり、*C. acutatum*の特徴とされるベノミル無添加PDA平板培地の20%以上の生育(佐藤, 1996)を示した。また、両菌株ともジエトフェンカルブ添加PDA平板培地での生育が認められ、ベノミルおよびジエトフェンカルブに低感受性であった(表7)。

菌糸の生育は、10~35℃で認められ、適温は25~28℃であった(図3)。

第5表 2002年分離菌のイチゴ、トマトに対する病原性

供試菌株	イチゴ	トマト ^{a)}
	「とちおとめ」	「マイロック」
02R-3A	3/3 ^{b)}	0/3
02R-3C	1/3	0/3
無接種	0/3	0/3

a) がんばる根3号に接ぎ木

b) 発病株数/供試株数

第4表 2002年分離菌のリンドウに対する病原性

供試菌株	リンドウ (99D02-7S)		リンドウ (99D02-6S)		リンドウ (02D05-S)	
	有傷	無傷	有傷	無傷	有傷	無傷
02R-3A	1/3 ^{a)}	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3
02R-3C	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>C. acutatum</i>						
No.361 ^{b)}	2/3	0/3	2/3	0/3	-	-
無接種	-	0/3	-	0/3	-	0/3

a) 発病株数/供試株数。-は試験していない

b) イチゴ炭疽病菌(石川ら, 1992)

第6表 2002年分離菌および既知種の形態

菌株または既知種	分生子の形態	分生子の大きさ(μm)	付着器の大きさ(μm) ^{a)}
02R - 3A	紡錘形	10.5 ~ 17.5 × 4.3 ~ 6.3 ^{c)} (13.2 × 5.0)	5 ~ 12.5 × 4.3 ~ 6.5 ^{d)} (8.5 × 5.1)
02R - 3C	紡錘形	10 ~ 17.5 × 3.8 ~ 6.5 ^{c)} (13.5 × 5.1)	7.5 ~ 12.5 × 5 ~ 8.8 ^{e)} (9.2 × 6.2)
<i>C. acutatum</i> ^{a)}	紡錘形	8.3 ~ 14.4 × 2.5 ~ 4	-
<i>C. acutatum</i> ^{b)}	紡錘形	8.5 ~ 16.5 × 2.5 ~ 4	8.5 ~ 10 × 4.5 ~ 6

a) Simmonds (1965)

b) Sutton (1980)

c) PDA培地上の測定値。()は平均値

d) WA培地上の測定値。()は平均値

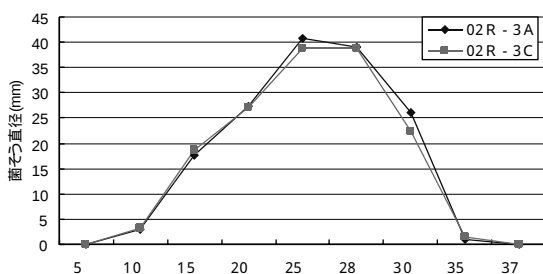
e) PCA培地上の測定値。()は平均値

第7表 2002年分離菌の性状

供試菌株	生育度 ^{a)} (%)	ジエトフェンカルブ添加 培地上での生育
02R - 3A	30.3	+
02R - 3C	28.7	+
<i>C. acutatum</i> No.361 ^{b)}	29.7	+

a) 佐藤 (1996)

b) イチゴ炭疽病菌 (石川ら, 1992)



第3図 2002年分離菌の菌糸生育と温度との関係

さらに*C. acutatum* に特異的なプライマー (CaInt2, ITS4) を用いたPCR検定の結果, 本菌に特異的な増幅断片が認められた (図2)。

2002年分離菌は, 以上の特徴をSimmonds (1965), Sutton (1980) の検索表および形態数値と比較し, ペノミル添加培地での生育度およびPCR検定結果から, *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmondsと同定した。

以上より, 2001年分離菌は*C. gloeosporioides*, 2002年分離菌は*C. acutatum* と同定し, 現地のリンドウ株枯

れ症状の病原菌と判断した。リンドウ株枯れ症状については, 赤坂 (1993) により「炭そ病 (病名, 病原菌とも未報告)」として紹介されているが, *Colletotrichum* 属菌 によるリンドウ病害に関する正式な報告はない。そこで, 病名をリンドウ炭疽病 (英名: Anthracnose) と呼称し, 病原菌に*Colletotrichum gloeosporioides*および*C. acutatum* を併記することを提案する。

なお, 本試験を行うにあたり, 専門技術員をはじめ, ご協力いただいた栃木県那須農業振興事務所経営普及部ならびに栃木県農業試験場黒磯分場の各位にお礼申し上げる。

引用文献

- 赤坂安盛 (1993) 日本植物防疫協会「平成5年度野菜病害虫防除研究会現地検討会」講演要旨 11 - 18.
- 石川成寿ら (1992) 関東病虫研報 39 : 129 - 133.
- Peter R. et al. (1992) FEMS Microbiology Letters 98 : 137 - 144.
- 佐藤豊三 (1996) 植物防疫 50 : 273 - 280.
- Simmonds, J. H. (1965) A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Qd. J. Agric. Anim. Sci. 22 : 437 - 459.
- Sreenivasaprasad, S. et al. (1996) Plant Pathology 45 : 650 - 655.
- Sutton, B. C. (1980) The Coelomycetes. Commonwealth Mycol. Inst., Kew. pp. 523 - 537.
- Sutton, B. C. (1992) *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford, 1 - 26.
- 築尾嘉章ら (1993) 九病虫研会報 39 : 32 - 35