

北海道におけるGlomerella cingulata (Colletotrichum gloeosporioides) によるイチゴ炭疽病の発生

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	角野,晶大 新村,昭憲 成松,靖 松井,梨絵 西村,俊一
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	60号
掲載ページ	p. 82-87
発行年月	2009年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



北海道における *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) によるイチゴ炭疽病の発生

角野 晶大*・新村 昭憲**・成松 靖***・松井 梨絵***
西村 俊一****

Occurrence of Strawberry Anthracnose Caused by *Glomerella cingulata*
(*Colletotrichum gloeosporioides*) in Hokkaido

Akio SUMINO*, Akinori SHINMURA**, Yasushi NARIMATSU***, Rie MATSUI***
and Shunichi NISHIMURA****

2007年7月上旬に北海道空知支庁管内栗山町の露地栽培、同年9月下旬に同管内由仁町のハウス栽培のイチゴで株全体が萎凋する症状が発生した。クラウンを切断するとクラウンの外側から内側に向かって褐変しており、病変部からは単一の糸状菌が分離された。分離菌を接種すると原病徴が再現され、接種菌が再分離された。分離菌の培地上での形状、無性器官の形状、有性器官の形状、生育適温、ベノミルとジエトフェンカルブ添加培地上での生育率および *Colletotrichum gloeosporioides* の特異的プライマーによるPCR解析の結果などから、本病を *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & Schrenk (*C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo) によるイチゴ炭疽病と同定した。北海道における本菌による本病の発生は初めてである。

Key words: Anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella cingulata*, strawberry

2007年7月上旬に北海道空知支庁管内栗山町の露地栽培、および同年9月下旬に同管内由仁町のハウス栽培のイチゴで、株全体が萎凋する症状が発生した。萎凋株のクラウンを切断すると外側より内側に向かって褐変していた。また由仁町の発病株では、一部葉柄や葉に汚斑状の黒色斑点や紡錘状の病斑も認められた。これら罹病部からは単一の糸状菌が高率に分離され、分離培地の表面には *Colletotrichum* 属菌特有の鮭肉色の分生子塊を形成していた。病原菌の同定を行ったところ、これまでに北海道では発生の報告がない *Glomerella cingulata* (*C. gloeosporioides*) であることが判明したので、ここに報告する。

なお、本試験を実施するに当たり千葉県農業総合研究センター鈴木健氏および北海道立道南農業試験場三澤知

央氏にはイチゴ炭疽病菌を分譲いただくとともに多くのご助言をいただいた。住友化学株式会社にはジエトフェンカルブ水和剤を分譲いただいた。記して深く感謝申し上げる。

材料および方法

1. 栽培経過と発生状況調査

発生圃場において栽培経過、苗の由来、発病時期などを聞き取るとともに、病徴を観察した。

2. 病原菌の分離と病原性の確認

栗山町から採取した発病株では切断したクラウン部を、由仁町から採取した発病株では切断したクラウン部と葉の病斑部から、それぞれ病変部との境界の組織片を切り出し、表面殺菌後にストレプトマイシンを加えたブ

*北海道立中央農業試験場 Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido 069-1395, JAPAN
現在：北海道立花・野菜技術センター

**北海道立中央農業試験場

***北海道空知農業改良普及センター空知南東部支所

****南幌町農業協同組合

ドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) 平板培地により分離を行った。分離菌は PDA 斜面培地に移植した後、培地上に形成した分生子から単孢子分離を行い、以下の試験に供試した。分離菌の病原性の確認は、PDA 平板培地で 25℃、7 日間培養して形成させた分生子の懸濁液を 10⁶ 個/ml に調整し、15cm ビニルポットで栽培したイチゴ「とちおとめ」の株元 (1ml) と葉の中心 (3 枚に各 0.1ml) に滴下して接種した。ポットごとビニル袋で覆い 25℃ で 1 日間静置した後、ビニル袋をはがして 25℃ で 6 日間栽培を続けて病徴を観察した。

3. 病原菌の同定

1) 供試菌株

病原性を確認した SSAI6-2, SSAI76-3 (栗山町), YS-2, YS-3 (由仁町) の 4 菌株を供試した。比較のため、イチゴ炭疽病菌 *C. gloeosporioides* (菌株番号 S-1: 千葉県農業総合研究センターより分譲), と *C. acutatum* (菌株番号 K11: 北海道立道南農業試験場より分譲) も供試した。

2) 形態観察

各菌株を PDA 平板培地で BLB 照射下で 25℃、7 日間培養し、菌叢の色調、分生子塊、分生子、剛毛の有無などを調査した。さらに 14 日後まで培養を続け、子のう殻、子のう、子のう胞子の形態を観察した。また、同様の培養条件下で各菌株を PCA (ジャガイモ・ニンジン培地) にて 7 日間スライドカルチャーし、付着器の形態を観察した。

3) 生育温度

各菌株を PDA 平板培地で前培養し、直径 4mm のコルクボーラーで寒天ごと打ち抜いた菌叢先端部を、PDA 平板培地上中心に置床した。5, 10, 15, 20, 25, 27.5, 30, 35, 40℃ の恒温器内で 4~7 日間培養後、培地上に生育した菌叢の直径を測定し、4 日当りに換算した。試験は 3 反復で行った。

4) ベノミルおよびジエトフェンカルブ添加培地における生育率

佐藤 (9) の方法に従い、PDA 平板培地で前培養し、直径 4mm のコルクボーラーで寒天ごと打ち抜いた菌叢先端部を、ベノミル水和剤 (添加濃度 1,250ppm) およびジエトフェンカルブ水和剤 (添加濃度 625ppm) 添加 PDA 平板培地に置床した。25℃、5 日間培養後、培地上に生育した菌叢の直径を計測し、薬剤無添加培地に対する生育率を下記の式により算出した。試験は 3 反復で行った。

生育率 (%) = (薬剤添加培地での直径 (mm)) / (薬剤無添加培地での直径 (mm)) × 100

5) PCR 法による同定

各菌株の菌糸を爪楊枝で掻き取り、PCI (フェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール = 25: 24: 1) 溶液を用いて DNA を抽出した。上流プライマーには各々 *C. gloeosporioides* と *C. acutatum* を特異的に検出する CgInt (6) と CaInt2 (10) を、下流プライマーには ITS4

(12) を用い、抽出した DNA 1 μl を鋳型として AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems) により PCR を行った。

結 果

1. 栽培経過と発生状況

栗山町ではリレー育苗生産のため、2007 年 5 月下旬に栃木県より「とちおとめ」の苗 100 株を取り寄せて露地に定植した。6 月 26 日に日中生育不良になる株が観察され、7 月 2 日に 2 株で顕著な萎凋症状が認められた。クラウン部を切断すると外側より内側に向かって組織が褐変していた。その後一週間ほどで萎凋株は圃場全体で 10 株程度まで増えたため、直ちに全ての株を抜き取り廃棄した。この際、萎凋症状を示した株はいずれも葉には目立った症状は認められなかった。

由仁町では果実生産のため、同年 3 月下旬に静岡県より「草姫」の苗を取り寄せて、4 月上旬からハウスでのみ殻採苗により増殖させた。7 月 10 日に子苗をいったん鉢に仮植して夜冷育苗した後、9 月 3 日にハウス内に定植した。定植後から生育不良になる株が徐々に観察されていたが、9 月下旬には顕著な萎凋症状が認められ、枯死するものもあった。この時点でクラウン部を切断すると外側より内側に向かって組織が褐変していた。一部には、葉や葉柄に汚斑状の黒色斑点や紡錘状の病斑が認められた。

2. 病原菌の分離と病原性の確認

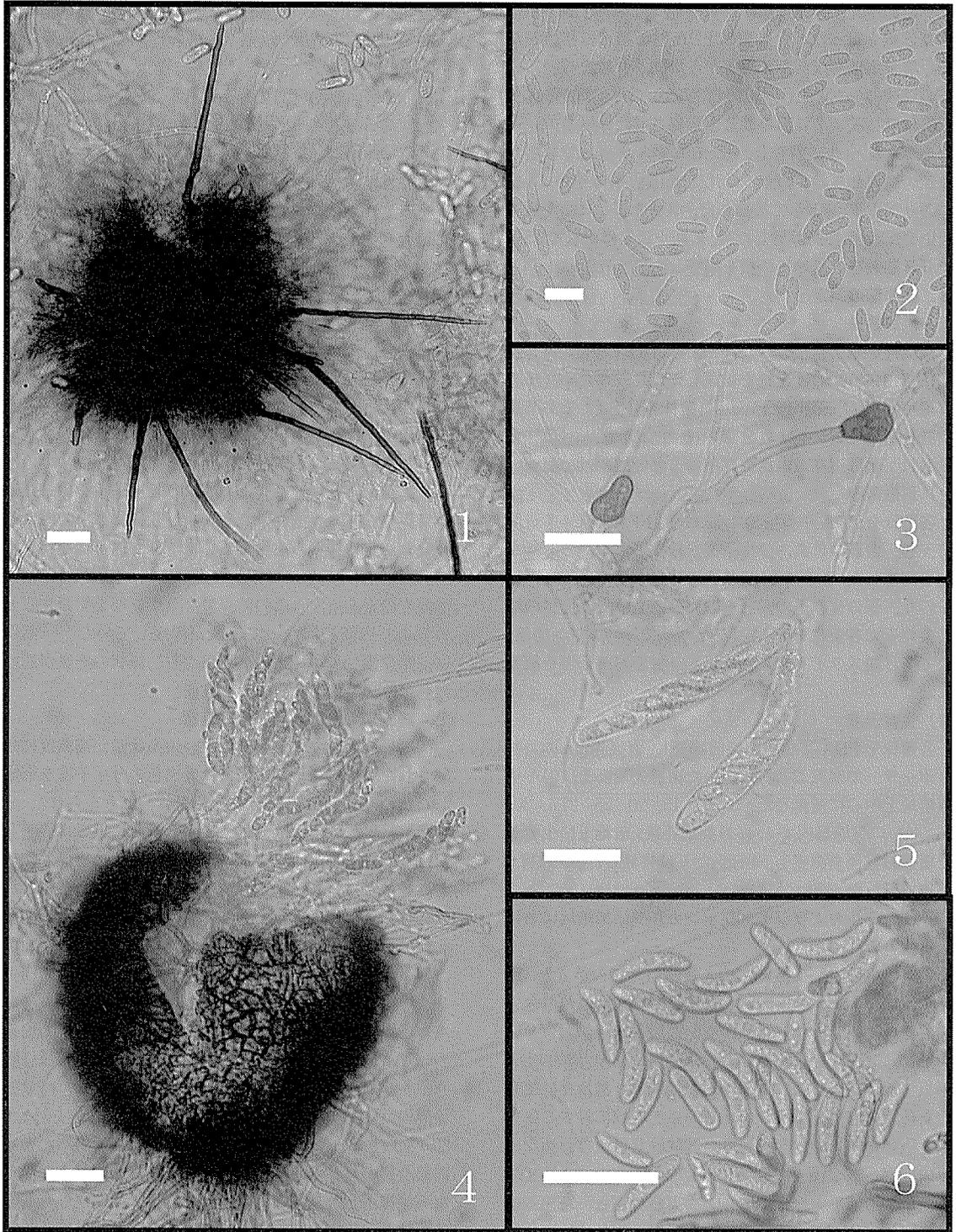
両圃場のサンプルからは、単一の糸状菌が高頻度に分離された。分離培地の表面には鮭肉色の分生子塊を形成したため、*Colletotrichum* 属菌の糸状菌と考えられた。分離菌の接種試験では、分生子接種 2 日後には葉に滴下した部位から黒色水浸状の病斑が現れ、その後病斑は速やかに進展し、接種 5 日後には接種葉は枯死した。接種 7 日後には株全体が顕著に萎凋してクラウン部が褐色に腐敗し、原病徴が再現された。葉やクラウン部からは接種菌と同一の糸状菌が再分離された。

3. 病原菌の同定

1) 各器官の形態

PDA 上での分離菌の菌叢はいずれも白色から後に暗灰色となり、表面に鮭肉色の分生子塊を形成した。分生子塊には剛毛が認められた (第 1 図-1)。分生子は 11.8~20.3×3.4~6.8 μm (平均値: 15.9×5.2 μm) で両端が丸い円筒形であり、先が尖った紡錘形の分生子は含まなかった (第 1 図-2)。付着器の形成は非常に稀で、形成しない菌株もあり大きさを計測できなかったが、形成されたものでは形状は卵形から不整形であった (第 1 図-3)。これらの形状は比較的用いたイチゴ炭疽病菌や既往の報告 (11) の *C. gloeosporioides* と一致した (第 1 表)。

いずれの分離菌も培養日数が進むと培地表面に子のう殻を形成した。子のう殻は直径が 54~203 μm (平均値:



第1図 病原菌の形態 (スケール: 20 μ m)

①分生子塊に形成した剛毛 ②分生子③附着器 ④子のう殻から逸出する子のう ⑤子のう ⑥子のう胞子

第1表 分離菌の無性器官の形状

供試菌株	菌叢	分生子			分生子塊での剛毛の有無	付着器の形	
		集塊の色	形	大きさ (μm)			
SSAI6-2	栗山町分離菌	白色～暗灰色	鮭肉色	円筒形で先端が丸い	14.4～19.4×4.2～5.4 (16.5×5.4)	有	卵形～不整形
SSAI76-3	栗山町分離菌	白色～暗灰色	鮭肉色	円筒形で先端が丸い	13.5～19.4×4.2～6.8 (16.3×5.2)	有	形成せず
YS-2	由仁町分離菌	白色～暗灰色	鮭肉色	円筒形で先端が丸い	11.8～20.3×3.4～5.9 (15.7×4.8)	有	形成せず
YS-3	栗山町分離菌	白色～暗灰色	鮭肉色	円筒形で先端が丸い	13.5～17.7×5.1～6.8 (15.2×5.2)	稀に有	卵形～不整形
4菌株の平均					15.9×5.2		
S-1	<i>C. gloeosporioides</i>	白色～暗灰色	鮭肉色	円筒形で先端が丸い	12.7～17.7×3.4～5.9 (14.8×4.4)	有	卵形～不整形
	既往の報告 ^{a)}				9.0～24.0×3.0～4.5		
K11	<i>C. acutatum</i>	白色～赤橙色	鮭肉色	円筒～紡錘形	8.5～15.2×2.5～5.1 (12.3×4.1)	無	卵形～棍棒形
	既往の報告 ^{a)}				8.5～16.5×2.5～4.0		

a) Sutton (1980).

第2表 分離菌の各有性器官の形

供試菌株	子のう殻			子のう (μm)	子のう胞子 (μm)		
	形	嘴状突起	大きさ (μm)				
SSAI6-2	栗山町分離菌	球形ないし洋梨形	有	61～203 (113)	50.9～81.4×8.5～15.3 (67.1×10.4)	11.8～22.0×3.4～6.8 (16.7×5.2)	
SSAI76-3	栗山町分離菌	球形ないし洋梨形	有	54～183 (114)	54.2～78.0×6.8～11.9 (67.6×9.8)	15.2～27.9×3.4～5.9 (19.7×4.3)	
YS-2	由仁町分離菌	球形ないし洋梨形	有	61～176 (114)	44.1～74.6×8.5～11.9 (62.4×10.3)	14.4～30.4×3.4～5.9 (19.4×4.6)	
YS-3	由仁町分離菌	球形ないし洋梨形	有	54～196 (108)	47.5～78.0×6.8～13.6 (61.6×9.9)	10.1～22.0×3.4～5.9 (15.5×4.7)	
4菌株の平均					112	17.8×4.7	
<i>G. cingulata</i> の Arx (1957)					85～300	35～80×8～14	9～30×3～8
既往の報告 岡山 (1988)					128	59×9.4	17.3×5.5
稲田・山口 (2006)					117.6	55.2×10.4	19.9×5.1

112 μm) で、黒色の球形ないし洋梨形で、頂部は嘴状に突出している (第1図-4)。子のうは 44.1～81.4×6.8～15.3 μm (平均値: 64.7×10.1 μm) で8個の子のう胞子が入っており (第1図-5)、子のう胞子は 10.1～30.4×3.4～6.8 μm (平均値 17.8×4.7 μm) であった (第1図-6)。これらの形状は既往の報告 (2, 4, 8) の *Glomerella cingulata* と一致した (第2表)。

2) 生育温度

分離菌は SSAI76-3 以外は 10～35℃ で生育し、生育適温は 25～30℃ 付近であり、5℃ や 40℃ では生育しなかった。生育適温において分離菌はいずれも 50mm 以上伸長し、比較に用いた *C. gloeosporioides* と同様であった。一方、*C. acutatum* では生育適温においても 40mm 程度の伸長であった (第2図)。

3) ベノミルおよびジエトフェンカルブ添加培地における生育率

分離菌はいずれもベノミル添加 PDA における生育率が 20% 以上であった。また、ジエトフェンカルブ添加培地においては 20% 以下の生育率に抑えられた。これは比較に用いた *C. gloeosporioides* と同様であり、これら両剤添加 PDA における生育率の結果より、分離菌はベノミル耐性の *C. gloeosporioides* であるものと考えられた。一方、*C. acutatum* では両剤いずれに対しても 20% 以上の生育率を示した (第3表)。

4) PCR 法による同定

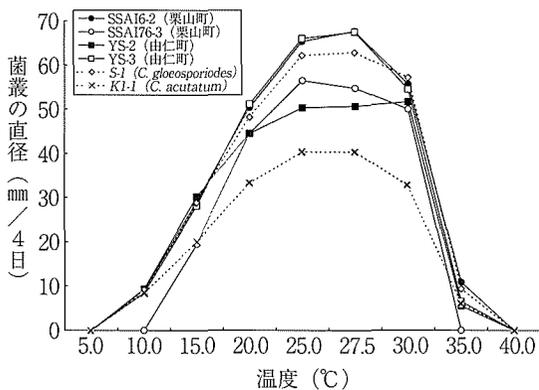
いずれの菌株も *C. gloeosporioides* に特異的なプライマーでのみ出現する 450bp 付近のバンドが検出された。一方、*C. acutatum* に特異的なプライマーでは、比較に用いた *C. acutatum* で期待される 500bp 付近のバンド

第3表 分離菌のベノミル及びジエトフェンカルブ添加 PDA 平板培地での菌糸生育^{a)}

供試菌株	無添加	ベノミル (1250ppm)	ジエトフェンカルブ (625ppm)
SSAI6-2 栗山町分離菌	62.7 mm	17.5mm (27.9%) ^{b)}	5.8mm (9.3%)
SSAI76-3 栗山町分離菌	51.2	15.5 (30.3%)	5.0 (9.8%)
YS-2 由仁町分離菌	48.2	13.0 (27.0%)	5.0 (10.4%)
YS-3 由仁町分離菌	61.5	14.0 (22.8%)	6.0 (9.8%)
S-1 <i>C. gloeosporioides</i>	60.0	16.7 (27.8%)	6.7 (11.1%)
K1-1 <i>C. acutatum</i>	37.3	10.3 (27.7%)	15.8 (42.4%)

a) 4 mmの含菌寒天片を移植し、25℃、4日間培養した。

b) ()内は無添加培地に対する生育率。



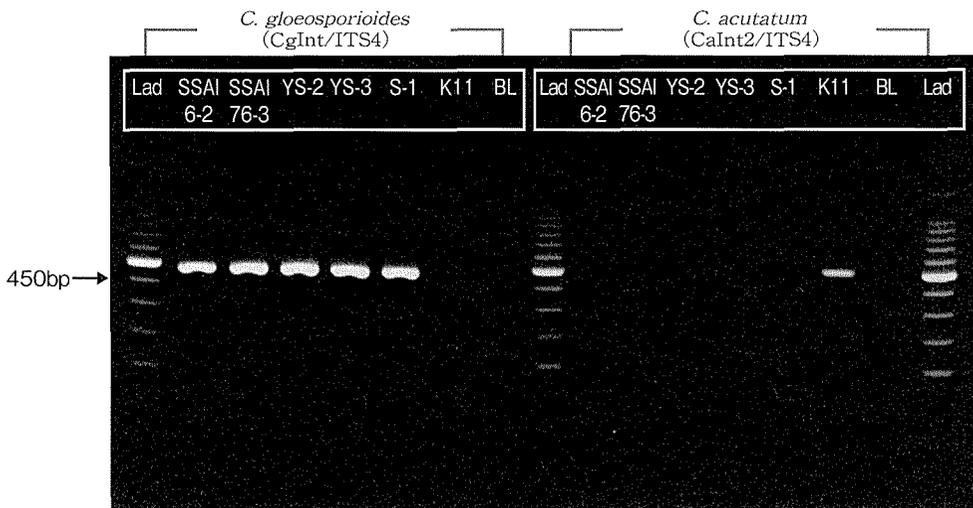
第2図 分離菌の各温度における菌糸生育

が検出されたのに対し、分離菌ではいずれもバンドは検出されなかった(第3図)。このことから分離菌は *C. gloeosporioides* であるものと考えられた。

考 察

以上の結果から、栗山町及び由仁町で発生したイチゴの萎凋症状は *G. cingulata* (Stoneman) Spaulding & Schrenk (*C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo) によるイチゴ炭疽病であることが明らかとなった。北海道ではこれまで *C. acutatum* による葉枯れ症状(13)、および同菌による萎凋症状(7)が確認されているが、*G. cingulata* による本病の発生は初確認である。本病が発生すると、発病株は萎凋・枯死に至るため、道外では大きな被害を生じており、本病原菌が道内で定着すればイチゴ生産を揺るがす大きな問題となる可能性が高い。

近年、北海道では加温促成栽培に適した苗を道外から導入したり、リレー苗生産の目的でその親株を道外から導入する場が増加している。今回発生を認めた2圃場



第3図 特異的プライマーを用いたPCR法による *C. gloeosporioides* と *C. acutatum* の識別 (Lad: 100bp ラダーマーカー, SSAI6-1, SSAI76-3: 栗山町分離菌, YS-2, YS-3: 由仁町分離菌, S-1: *C. gloeosporioides*, K11: *C. acutatum*, BL: ブランク)

においても、親株として道外から苗を導入していた。苗の導入元では本病原菌による炭疽病が発生していること(1, 5), これまで道内では本菌による炭疽病は発生していなかったことから、今回の発生は潜在感染していた苗が導入元より持ち込まれたことが原因である可能性が示唆される。特に栗山町における本病の発生については、導入後早々に発病が認められており、潜在感染株が持ち込まれた可能性が非常に高いものと考えられる。栗山町の圃場では、全株を抜き取り廃棄した後、土壤消毒を行ってすぐに水田に復元した。その後、近隣圃場も含め、病原菌が定着していないか厳重に警戒している。

一方、栗山町以外でも炭疽病回避の有効な手段として、夏期冷涼な北海道の各地において、道外から親株を導入し無病な苗を生産し導入元へ供給するリレー苗生産が取り組まれている(3)。このような生産方式は、今後も北海道各地で実施されると思われるが、今回、道内において、*G. cingulata*による炭疽病の発生が確認されたことから、今後の発生に全道的な警戒が必要であるものと考えられる。

引用文献

- 1) 秋田 滋(1995) 静岡県における本圃ハウスのイチゴ炭疽病の発生実態と健全苗補植の効果. 関東病虫研報 42巻: 59-61.
- 2) Arx, J. A. von (1957) Die Arten der Gattung *Colletotrichum*. Cda. Phytopath. Z. 29: 413-468.
- 3) 海老原克介・植松清次・宮原秀一・小林敏満・染谷肇・野宮左近・川村栄一・河名利幸・石川正美(2002) 北海道の田畑輪換圃場を利用したイチゴリレー苗生産による炭疽病・萎凋病の防除. 日本植物病理学会報 68巻: 201 (講要).
- 4) 稲田 稔・山口純一郎(2006) 促成栽培イチゴにおけるイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum* 及び *Colletotrichum gloeosporioides* による果実腐敗の発生. 九病虫研会報 52巻: 11-17
- 5) 石川成寿(2005) イチゴ炭疽病の病原菌, 生態ならびに環境に配慮した防除技術開発. 栃木県農業試験場研究報告 54巻: 1-187.
- 6) Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Brown, A. E. (1992) Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. FEMS Microbiol. Lett. 98: 137-144.
- 7) 三澤知央・栢森美如・堀田治邦(2008) *Colletotrichum acutatum* による萎凋性のイチゴ炭疽病の発生. 日本植物病理学会報 74巻: 82 (講要).
- 8) 岡山健夫(1988) イチゴ炭疽病の病原菌と発生生態. 植物防疫 42巻: 559-563.
- 9) 佐藤豊三(1997) 多犯性炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum* の諸特性と同定法. 四国植防 32巻: 1-19.
- 10) Sreenivasaprasad, S., Sharada, K. and Brown, A. E. (1996) PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathol. 45: 650-655.
- 11) Sutton, B. C.(1980) *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata* (Sutton B. C.ed). Commonwealth Mycological Institute (Kew, UK) pp.696.
- 12) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols, a guide to methods and applications (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. eds.) Academic Press, New York, pp.315-322.
- 13) 安岡眞二(2000) 北海道で発生した *Colletotrichum acutatum* によるイチゴ炭疽病について. 北日本病害虫研報 51巻: 295 (講要).