

Diaporthe melonis var. brevistylosporaおよびPhomopsis sp.によるブドウ脱粒病(新称)

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	衣川,勝 兼松,聡子 加藤,寛
発行元	日本植物病理學會
巻/号	74巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 346-349
発行年月	2008年11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



Diaporthe melonis var. *brevistylispora* および *Phomopsis* sp. によるブドウ脱粒病 (新称)

衣川 勝^{1,2*}・兼松 聡子³・加藤 寛^{2,4}・秋光 和也²

ABSTRACT

KINUGAWA, M.^{1,2*}, KANEMATSU, S.³, KATOH, H.^{2,4} and AKIMITSU, K.² (2008). Berry drop of grape caused by *Diaporthe melonis* var. *brevistylispora* and *Phomopsis* sp. Jpn. J. Phytopathol. 74: 346–349.

Peduncle dieback following berry drop in the middle of grape clusters, primarily on cultivars Pione, Muscat Bailey A and Muscat of Alexandria, has been observed frequently at harvest time in Kagawa prefecture since 1999. On the basis of morphological and cultural characteristics and molecular phylogenies, the causal pathogens were identified as *Diaporthe melonis* var. *brevistylispora* and *Phomopsis* sp. Berry drop (Datsuryu-byou in Japanese) is proposed for the name of the disease. Both isolates caused grape berry drops and were also pathogenic to fruits of kiwifruit, satsuma mandarin and apple.

(Received November 7, 2007; Accepted May 21, 2008)

Key words: *Diaporthe melonis* var. *brevistylispora*, *Phomopsis* sp., grape, berry drop, peduncle dieback

1999 年以降、香川県下の加温ブドウ (*Vitis* spp.) で、収穫期に果房中央部を中心として果梗が枯れ込み、果粒が脱落する症状が見られた。この症状が見られた品種は、‘ピオーネ’、‘マスカットベリー A’ および ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’ であり、特に ‘ピオーネ’ に発生が多かった。この脱粒が生じた果梗部から *Diaporthe* および *Phomopsis* 属菌が高率で分離され、両種の菌とも接種により病徴を再現した。両菌によるブドウの脱粒症状は、未記載であるのでここに報告する。なお、本論文の一部は平成 16 年度日本植物病理学会大会で発表した (衣川・兼松, 2004)。

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、収穫終期まで続いた。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 (Fig. 1A)、やがて果粒が脱落した。被害が著しい場合は穂軸の一部まで枯れ込みが進んだ (Fig. 1B)。脱粒は主として果房の中央部から発生し、脱落した果粒に著しい萎凋や退色は見られなかった。

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’ 115 個, ‘マスカットベリー A’ 120 個, ‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’ 12 個) から分離した。同部位を約 5 mm の長さに切り取り、これを 70% アルコールに約 20 秒間浸漬し、次いで 3% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 1～2 分間表面殺菌し、殺菌水で洗浄後、殺菌ろ紙上で水分を十分に除去し、ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) 培地に置床して、25°C 下 12 時間照明 (蛍光管と近紫外線ランプを併用)・12 時間暗黒条件で 2～3 週間培養した。その結果、同部位からは *Phomopsis* 属菌が高率 (42.0%) で分離された。また、本属菌以外には、*Aspergillus* 属菌 (22.3%), *Cladosporium* 属菌 (21.7%), *Botryosphaeria* 属菌 (2.3%), *Colletotrichum* 属菌 (0.4%) 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 種類の菌株群に分けられた。一つは、‘ピオーネ’、‘マスカットベリー A’ のいずれの品種

¹ 香川県農業試験場病害虫防除所 (〒761-8078 香川県高松市仏生山町甲 220) Kagawa Prefecture Agricultural Experimental Station Plant Protection Office, Busshozan, Takamatsu, Kagawa 761-8087, Japan

² 香川大学農学部 (〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393) Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki-cho, Kida-District, Kagawa 761-0795, Japan

³ 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点 (〒020-0123 岩手県盛岡市下厨川字鍋屋敷 92-24) Apple Research Station, National Institute of Fruit Tree Science, NARO, Shimokuriyagawa, Morioka 020-0123, Japan

⁴ 現在：農業環境技術研究所 (〒305-8604 茨城県つくば市観音台 3 丁目 1 番地 3) Japan National Institute for Agro-Environment Sciences 3-1-3, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

* Corresponding author (E-mail: jp0510@pref.kagawa.lg.jp)

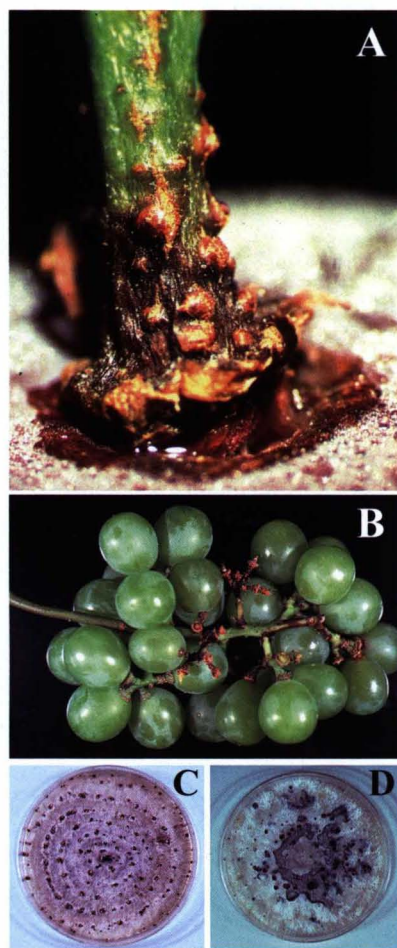


Fig. 1. Symptoms of berry drop of grape and colony of the causal fungi.

A) Peduncle dieback of grape. B) Diseased grape cluster. Colony of isolate C) GFP-1 and D) GFP-A2 from grape peduncle dieback on potato dextrose agar (PDA)

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種 (Fig. 1C) で、この菌種の代表株として分離された菌株 GFP-1 の分生子殻は $170\text{--}930 \times 120\text{--}590$ (平均 545×341) μm , α 型分生子は紡錘形または楕円形で主に2個の油球を含み大きさは $6.2\text{--}9.1 \times 2.1\text{--}2.6$ (平均 7.7×2.3) μm , β 型分生子は $18.2\text{--}28.6 \times 1.0\text{--}1.6$ (平均 23.6×1.2) μm であった。

もう一方の菌種は、主として‘マスカットペーリー 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タリクな特徴を有する菌株群であった (Fig. 1D)。この菌種の代表株として分離した菌株 GFP-A2 の α 型分生子は 6.3--

$9.3 \times 2.0\text{--}3.3$ (平均 7.5×2.5) μm , β 型分生子は $15.0\text{--}23.8 \times 1.0\text{--}1.5$ (平均 19.0×1.2) μm であり、GFP-1 株の β 型分生子より長さがやや短かった。子のう殻は球形や偏球形で、大きさは内径 $150\text{--}250 \times 150\text{--}247$ (平均 202×203) μm であった。子のうは、長こん棒状、頂部に apical ring を有し、8 個の子のう胞子を単列ないし複列で含み、大きさは $39.8\text{--}47.5 \times 4.5\text{--}7.5$ (平均 42.6×6.3) μm であり、子のう胞子は無色、2 細胞、長紡錘形や楕円形で、隔膜部でくびれ大きさは $9.3\text{--}11.3 \times 3.0\text{--}4.5$ (平均 10.1×3.7) μm であった。形成された子のう胞子を単胞子分離し、PDA 培地上で培養した結果、上記と同様の菌叢上に、分生子殻と分生子および子のう殻と子のう胞子が形成された。

これら2種類の菌株 (GFP-1 および GFP-A2) を、本邦におけるブドウの *Phomopsis* 属菌による4病害 (日本植物病理学会, 2000) の病原菌であるホモプシス腐敗病菌, つる割病菌, 芽枯病菌および枝膨病菌と比較した。ブドウホモプシス腐敗病菌 (粕山ほか, 1980; 畑本, 1989) は、PDA 培地上での分生子殻が $283\text{--}808$ (平均 545.4) μm , α 型分生子が $5.0\text{--}8.8 \times 2.5\text{--}3.1$ (平均 6.3×2.8) μm , β 型分生子が $15.0\text{--}35.0 \times 1.3\text{--}2.5$ (平均 24.7×1.9) μm であり、菌株 GFP-1 とほぼ同じ大きさであった。ブドウつる割病菌 (田中, 1998) は、 α 型分生子が $6.0\text{--}14.4 \times 2.0\text{--}5.4$ μm , β 型分生子が $18\text{--}35 \times 1$ μm で、分離2菌株より α 型分生子が大きかった。また、芽枯病菌 (深谷ほか, 1988) では、子のうは $47.5\text{--}60 \times 7.5\text{--}10$ (平均 54.6×8.1) μm , 子のう胞子は $10.5\text{--}13.8 \times 2.4\text{--}4.5$ (平均 12.2×3.3) μm , α 型分生子が $6.6\text{--}12.2 \times 2.3\text{--}3.3$ (平均 9.2×3.2) μm , β 型分生子が $19.8\text{--}44.6 \times 2.3\text{--}3.0$ (平均 29.8×2.6) μm であり、分離した2菌株に比べ、子のう, α 型分生子, β 型分生子がやや大きかった。枝膨病 (田代, 1988; Kajitani and Kanematsu, 2000) の分生子, 子のう胞子は、分離した菌に比べて明らかに大きかった。

菌叢生育温度 GFP-1 および GFP-A2 の両菌株とも、PDA 平板上において $10\text{--}35^\circ\text{C}$ 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、 27°C での培養において菌叢の直径が9 cm に到達したのは、ホモタリクな特徴を有する菌株 GFP-A2 ではほぼ処理3日後であったのに対して、菌株 GFP-1 は処理5日後であり、明らかに菌叢の生育速度が異なった。

リボソーム DNA (rDNA) ITS 領域を用いた系統解析 Kanematsu *et al.* (2000) の方法で、rDNA ITS 領域を White *et al.* (1990) のプライマー ITS1 と ITS4 を用いて解析した。得られた菌株 GFP-1 (AB302248) および GFP-A2 (AB302247) の塩基配列と、国内産果樹等から分離された菌株 (Kanematsu *et al.*, 2000), 海外産ブドウ等分離菌株 (Mostert *et al.*, 2001;

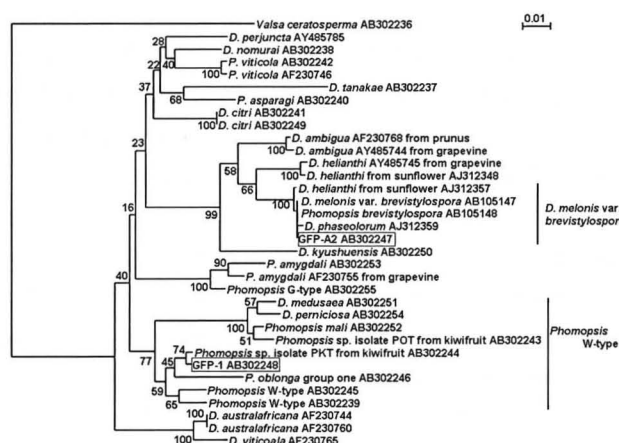


Fig. 2. Neighbour-joining tree of *Diaporthe* and *Phomopsis* isolates deduced from rDNA ITS sequence analysis. Bootstrap values, shown at the nodes, were calculated from 1000 replications. Isolates obtained in this study from peduncles with dieback and their accession numbers are boxed.

van Niekerk *et al.*, 2005) および Blast 検索により GFP-A2 と高い相同性を示した菌株 (Rekab *et al.*, 2004; Osawa and Kobayashi, 1989) の配列を加え, MAFFT ver. 5.8 を用いてマルチプルアラインメントを行った。アラインメントの微調整には SeaView (Galtier *et al.*, 1996) を用いて目視で行った。系統推定のため, Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) を用いて Kimura の 2 パラメータ法による近隣結合法で系統樹を作成し, ブートストラップ値を 1000 回計算して分岐の信頼性を評価した (Fig. 2)。その結果, 菌株 GFP-1 は, Kanematsu *et al.* (2000) の定義した *Phomopsis* W 型株と共に単系統を形成し, 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。GFP-A2 は, イタリアのヒマワリから分離された *D. helianthi* (AJ312357), メロン陥没病の病原菌の一つである *D. melonis* var. *brevistylispora* (AB105147), ダイズから分離された *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (AJ312359) と同定された菌と同じ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 GFP-1 を含む単系統群と, GFP-A2 を含む単系統群は, MrBayes ver 3.12 を用いたベイズ法による系統解析によってもそれぞれ異なる単系統群となった (データ省略)。

分離菌株の病原性 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。有傷接種では, 果梗部には針で 5 ~ 6 カ所刺して, また果粒にはカーボランダムで果粒表面をこすって傷を付けた。無傷接種では, 傷を付けない以外には有傷接種と同様に処理した。菌叢接種の接種源は, 分離菌を PDA 培地で 27°C

下約 14 日間培養した菌叢を用い, 菌叢を 5 mm 角に切断して付傷部に貼り付け, 果房全体をビニールの袋で 5 日間被覆して静置した。分生子懸濁液接種では, 約 4×10^6 個/ml の分生子懸濁液を含ませた脱脂綿を付傷部に巻きつけ, 菌叢接種処理と同様に静置した。対照無接種は, 菌叢接種では未培養の PDA 培地を, 分生子懸濁液接種では殺菌水を用いて上記と同様にして行った。

菌株 GFP-1 の菌叢を ‘ピオーネ’ の果梗に有傷接種した結果, 接種果梗の果粒の 73% が落下した。また, 同菌株の分生子懸濁液を同部位に有傷接種した結果, 接種果梗の果粒の 54% が落下した。果粒に対する同菌株の分生子懸濁液による有傷接種では, 6% が落果した。しかし, 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 GFP-1 を果梗に有傷接種した結果, 接種果梗の果粒の 32% が落下した。同菌株の果粒に対する接種では, 有傷接種で 2% の落果があった。また, 菌株 GFP-A2 を果梗に有傷接種した結果, 接種果梗の果粒の 84% が落下した。なお, これら両菌株の果梗および果粒に対する無傷接種と果梗または果粒に対する対照無接種では落果はなく, 落果からは接種菌が再分離された。

上記の試験で, 果粒接種により落下した果粒は, 水浸状に腐敗し触れると容易に落下したが, ホモプシス腐敗病に見られる円形の病斑や容易に剥皮する病徴は認められなかった。また, 果梗接種により落果した果粒は, 水浸状に腐敗せず大きな萎凋も見られなかった。菌株 GFP-1 に対する感受性は, ‘ピオーネ’ の方が ‘マスカットベリー A’ より高かった。また, 菌株 GFP-1 より, ホモタリックな菌株 GFP-A2 の方が病原力は強かった。

菌株 GFP-A2 の単子のう胞子由来菌株 As-GFP は, 菌叢を用いた有傷接種でミカン, リンゴ, キウイフルーツの果実に対して病原性を示した。しかし, いずれもブドウ (ピオーネ) の新葉に対する病原性を示さなかった。

病原菌の同定および病名の提案 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。これに対して, 今回報告する脱粒症状では, 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, 菌株 GFP-1 および GFP-A2 とともに, つる割病菌 *P. viticola* より α 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であった。以上のことから, 本病はつる

割病菌とは異なる菌による病害と考えられ、ブドウ脱粒病 (berry drop of grape) と提案したい。

rDNA ITS 領域の系統解析の結果から、菌株 GFP-1 は *Phomopsis* W 型株と単系統であった。*Phomopsis* W 型株は、モモ、ナシ、リンゴの胴枯症状および果実腐敗をおこす菌で、広範な植物種から分離され、ヘテロタリックな交配様式をもつ。コロニーは主に白色で、培養が進むと、所々に基底部の着色が見られる (Kanematsu *et al.*, 1999, 2000)。菌株 GFP-1 は、この *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。しかし、本菌の正式な種名決定については、今後の研究進展を待つこととし、ここでは種名を *Phomopsis* sp. にとどめておきたい。

菌株 GFP-A2 は rDNA ITS 領域の系統解析結果から、*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. *brevistylispora* (Ohsawa and Kobayashi, 1989) の菌株 (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。このうち I-1 株は、ヒマワリから分離された菌であるため、分離宿主に依存した分類体系により *D. helianthi* としているが、本菌は *D. helianthi* s. str. とは別系統であると述べられている (Rekab *et al.*, 2004)。さらに、10-99 株は Zhang *et al.* (1998) が定義する *D. phaseolorum* var. *meridionalis* との rDNA ITS 領域の相同性が低く (データ省略)、同種であるか疑いが残るため、現時点では菌株 GFP-A2 を *D. helianthi* および *D. phaseolorum* var. *meridionalis* と同定すべきではないと考える。Ohsawa and Kobayashi (1989) により記載された *D. melonis* var. *brevistylispora* の形態測定値は、菌株 GFP-A2 と比較すると約 75–80% 程度でやや小さいものの全体的に類似しており、 β 胞子が短いことや培地上でホモタリックに子のう殻を形成する性質は、菌株 GFP-A2 の特徴とよく合致している。以上の理由から、菌株 GFP-A2 を *D. melonis* Beraha & O'Brien var. *brevistylispora* Kobayashi & Ohsawa と同定する。なお、今回報告したブドウ脱粒病菌と、ブドウ芽枯病、ブドウホモプシス腐敗病の病原菌との異同については、同一条件下での病原性比較および形態比較により、さらに検討する必要がある。

引用文献

- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996). SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.* 12: 543–548.
- 深谷雅子・加藤作美・工藤 晟 (1988). ブドウ芽枯病に関する研究 第 1 報 秋田県におけるブドウ芽枯病の発生とその病原菌. 秋田県果樹試験場研究報告 19: 25–35.
- 畑本 求 (1989). ブドウの 4 新病害; 萎縮病, 輪紋病, 環紋葉枯病およびフォモプシス腐敗病に関する研究. 岡山県立農業試験場臨時報告 79: 1–81.
- Kajitani, Y. and Kanematsu, S. (2000). *Diaporthe kyushuensis* sp. nov., the teleomorph of the causal fungus of grapevine swelling arm in Japan, and its anamorph *Phomopsis vitimegaspora*. *Mycoscience* 41: 111–114.
- Kanematsu, S., Kobayashi, T., Kudo, A. and Ohtsu, Y. (1999). Conidial morphology, pathogenicity and cultural characteristics of *Phomopsis* isolates from peach, Japanese pear and apple in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65: 264–273.
- Kanematsu, S., Minaka, N., Kobayashi, T., Kudo, A. and Ohtsu, Y. (2000). Molecular phylogenetic analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacers and mating tests in *Phomopsis* isolates from fruit trees. *J. Gen. Plant Pathol.* 66: 191–201.
- 粕山新二・那須英夫・畑本 求・藤井新太郎 (1980). *Phomopsis* sp. によるフォモプシス腐敗病菌 (新称) について. 日植病報 46: 374 (講要).
- 衣川 勝・佐藤豊三 (2003). 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. 日植病報 69: 373–383.
- 衣川 勝・兼松聡子 (2004). 香川県で発生したブドウ脱粒症. 日植病報 70: 224 (講要).
- Mostert, L., Crous, P. W., Kang, J.-C. and Phillips, A. J. L. (2001). Species of *Phomopsis* and *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia* 93: 146–167.
- 日本植物病理学会編 (2000). 日本植物病名目録. pp. 427–454, 日本植物防疫協会, 東京.
- Ohsawa, T. and Kobayashi, T. (1989). Concave rot of melon fruit caused by two *Phomopsis* fungi. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 55: 410–419.
- 大家理哉 (2003). ブドウ房れ枯症の発生要因と防止対策. 農耕と園芸 10 月号: 167–170.
- Rekab, D., Del Sorbo, G., Reggio, C., Zoina, A. and Firrao, G. (2004). Polymorphisms in nuclear rDNA and mtDNA reveal the polyphyletic nature of isolates of *Phomopsis* pathogenic to sunflower and a tight monophyletic clade of defined geographic origin. *Mycol. Res.* 108: 393–402.
- 田中寛康 (1998). 日本植物病害大事典 (岸 国平編). 全国農村教育協会, 東京, p. 850.
- 田代暢哉 (1988). 日本植物病害大事典 (岸 国平編). 全国農村教育協会, 東京, pp. 845–846.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–4882.
- van Niekerk, J. M., Groenewald, J. Z., Farr, D. F., Fourie, P. H., Halleen, F. and Crous, P. W. (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathol.* 34: 27–39.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols, a guide to methods and amplifications (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. eds.). pp. 315–322, Academic Press, San Diego, CA.
- Zhang, A. W., Riccioni, L., Pedersen, W. L., Kollipara, K. P. and Hartman, G. L. (1998). Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. *Phytopathology* 88: 1306–1314.