

ルリタマアザミに発生した灰色かび病（新称）、菌核病（新称）および葉腐病（新称）

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	菅原,敬 松館,綾子 佐藤,衛 生井,恒雄
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	60号
巻号補足	
掲載ページ	p. 112-117
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



ルリタマアザミに発生した灰色かび病 (新称), 菌核病 (新称) および葉腐病 (新称)

菅原 敬*・松館綾子**・佐藤 衛***・生井恒雄**

Occurrences of Gray Mold, Sclerotinia Rot and Leaf Rot on Small Globe Thistle

Kei SUGAWARA*, Ayako MATSUDATE**, Mamoru SATOU*** and Tsuneo NAMAI**

山形県内でルリタマアザミ (*Echinops ritro*) に国内未報告の病害が発生し、罹病部から *Botrytis* 属菌, *Sclerotinia* 属菌および *Rhizoctonia* 属菌が分離された。それぞれの分離菌株は接種試験により病原性が認められ、接種菌と同一菌が再分離された。分離菌は培養特性、形態的特長および分子生物学的手法により *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia* sp. および *Rhizoctonia solani* AG-1 IB と同定した。これらの病原菌によるルリタマアザミの病害を灰色かび病、菌核病および葉腐病と提唱する。

Key words: *Botrytis cinerea*, *Echinops ritro*, *Rhizoctonia solani* AG-1 IB, *Sclerotinia* sp. small globe thistle

ルリタマアザミ (*Echinops ritro*) は、東欧～西アジア原産のキク科エキノプス属の多年草で、草丈は 1m 以上となり、分岐した枝の先端に直径 5cm 程度の青色で球状の頭花をいくつも咲かせ、主に切り花として利用されている。山形県内では、転作田においての露地栽培または簡易な雨除け栽培が多く、6～7 月に出荷される。山形県庄内地域で、*Botrytis* 属菌, *Sclerotinia* 属菌および *Rhizoctonia* 属菌による病害がそれぞれ発生した。本植物にはこれらによる病害が国内未報告 (6) であったため、病原菌の分離、病原性の確認および分類・同定を行った。なお本研究は、農林水産省の新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「花き類病害の双方向型診断・防除システムの構築および公開」により行った。

材料および方法

1. 病原菌の分離

罹病組織周縁部から常法により分離し、得られた *Botrytis* 属菌は単孢子分離, *Sclerotinia* 属菌および *Rhizoctonia* 属菌は単菌糸分離を行って分離菌を得た。このうち分離菌株 Ya730, Ya734 (*Botrytis* 属菌), Ya261

(*Sclerotinia* 属菌), および Ya661, Ya663 (*Rhizoctonia* 属菌) を代表菌株としてその後の試験に供試した。

2. 病原性確認

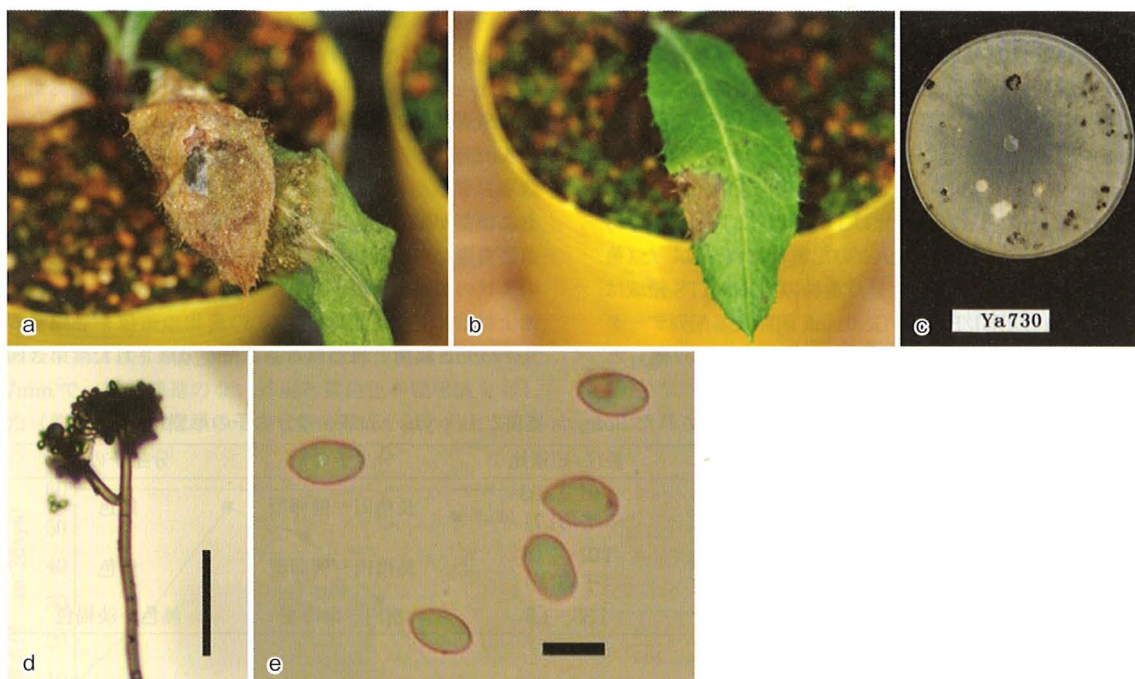
Botrytis 属菌 (Ya730, Ya734) では PDA 平板培地上で 20℃ で 10 日間培養して形成させた分生子の懸濁液を 1×10^5 個/mL に調製し、tween20 を添加して 1 株あたり 10mL を株全体に噴霧接種 (無傷) した。 *Sclerotinia* 属菌 (Ya261) は PDA 平板培地で 20℃, *Rhizoctonia* 属菌 (Ya661 および Ya663) は 25℃ で 3 日間培養し、菌叢先端部よりコルクボーラーで直径 5 mm の含菌寒天片を打ち抜いて葉身に貼り付けた後、滅菌水を湿した脱脂綿で覆い保湿した。いずれも接種後は容量約 70L のプラスチック製容器内に 1～3 日収納して多湿状態を保ち、15～20℃ に設定した温室内で管理した。その後ふたを取り去って同じ場所で管理し、3～10 日後に発病の有無を調査するとともに、罹病部から接種菌の再分離を試みた。供試植物は直径 9cm のプラスチックポットで育苗した本葉 5～6 枚程度の株をそれぞれ 3 個体供試した。対照区には同量の滅菌水を噴霧するか、PDA 平板培地片のみを貼り付けた。

*山形県庄内総合支庁農業技術普及課産地研究室 現在：庄内総合支庁酒田農業技術普及課

Agricultural Technique Improvement Research Office, Agricultural Technique Popularization Division, Shonai Area General Branch Administration, Yamagata Prefectural Government, Hamanaka, Sakata, Yamagata 998-0112, JAPAN

**山形大学農学部

***農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所



第1図 ルリタマアザミ灰色かび病

a : 葉身に生じた病斑 (自然病徴). b : 接種試験による病徴再現. c : PDA 平板培地 20℃で培養した分離菌株 Ya730 の菌叢. d : 分離菌株 Ya730 の分生子柄 (スケール 100μm). e : 分離菌株 Ya730 の分生子 (スケール 10μm).

3. 分離菌株の生育温度、形態および同定

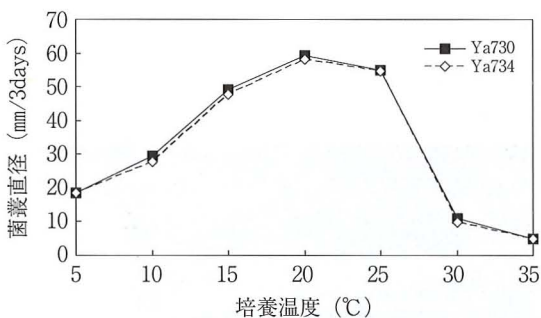
各分離菌株の菌糸の生育温度は PDA 平板培地で 20℃で 1~3 日間培養した菌そう先端部から直径 5mm の含菌寒天片を打抜き、直径 9cm の PDA 平板培地中央に置床して 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 および 40℃の恒温器内で 1~3 日間培養し、菌糸の伸長量を計測した。

分離菌の形態観察は、PDA 平板培地で 20℃または 25℃で培養し、肉眼で菌叢と菌核の形成を、光学顕微鏡で菌糸や分生子の形状、大きさを調査した。また、分離菌株 Ya730, Ya734 および Ya261 の ITS1, 5.8S および ITS2 領域 (rDNA-ITS) を White *et al.* (11) のプライマー ITS4, ITS5 を用いて増幅した後、塩基配列をそれぞれ決定し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の BLAST 検索から相同性を比較、または rDNA-ITS 領域の配列による関連属菌との系統解析を行った。分離菌株 Ya661 および Ya663 では DAPI 染色後、蛍光顕微鏡で核数の調査を行うとともに、標準菌株との対峙培養による菌糸融合の観察および国永 (5) の *R. solani* 亜群特異的のプライマーを用いた PCR を行い、菌糸融合群を決定した。

結果および考察

1. *Botrytis* 属菌による病害

2002~2008 年にかけて、切花用に露地栽培していた株および温室内で育苗中の苗の葉身に褐色の病斑が発生し



第2図 PDA 平板培地上での各培養温度におけるルリタマアザミから分離された *Botrytis* 属菌 (分離菌株 Ya730, Ya734) の生育

た。苗の葉身では、その後周囲が水浸状で中央部淡褐色の病斑となり、多湿条件下では病斑部に分生子を形成した (第1図 a)。罹病部からは *Botrytis* 属菌が分離された。

分離菌株 Ya730 および Ya734 の分生子を噴霧接種した結果、葉身にはじめ暗緑色水浸状の病斑が広がり、やがて自然病徴と同様の褐色病斑が再現され、表面に分生子を形成した (第1図 b)。罹病部からは接種菌と同一菌が再分離され、対照区では発病しなかった。

分離菌株 Ya730 および Ya734 の菌糸の生育適温は 20℃で (第2図)、20℃で培養した菌叢は、はじめ白色の

ちに灰白色で、盤状・不整形で黒色の菌核を形成した(第1図c). 分生子柄は淡褐色で先端が分岐し、多数の分生子を出芽的に形成した(第1図d). 分生子は楕円形~倒卵形で Ya730 では大きさは $9.4-15.5 \times 6.3-13.0 \mu\text{m}$ (平均 $12.8 \times 7.4 \mu\text{m}$), 長径/短径比は $1.01-2.03$ (平均 1.7), Ya734 では大きさは $9.3-15.3 \times 6.4-13.1 \mu\text{m}$ (平均 $12.2 \times 7.6 \mu\text{m}$), 長径/短径比は $1.01-2.06$ (平均 1.6) であり, Ellis (2) による *B. cinerea* の記載と概ね一致した(第1図e, 第1表). また, 両分離菌株の rDNA-ITS 領域は *B. cinerea* (DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベース アクセス番号 AJ716294; (8) 他) と

100%一致した. これらより両分離菌株を *Botrytis cinerea* Persoon:Fries と同定した. 本病を灰色かび病(英名 gray mold)と提唱する.

2. *Sclerotinia* 属菌による病害

2002年6~7月にかけて, 水田転作畑で切花用に露地栽培していた「ベッチーズブルー」の地際部付近の葉身および茎が暗緑色~あめ色に軟化腐敗し, 白色綿毛状の菌叢で覆われる症状が発生し, やがて罹病部に黒色, 鼠の糞状の菌核を形成した(第3図a). 罹病部からは, 培地上において白色の菌叢で鼠の糞状の菌核を形成する *Sclerotinia* 属菌と思われる糸状菌が分離された(第3図

第1表 ルリタマアザミから分離された *Botrytis* 属菌と *Botrytis cinerea* の分生子の形態比較

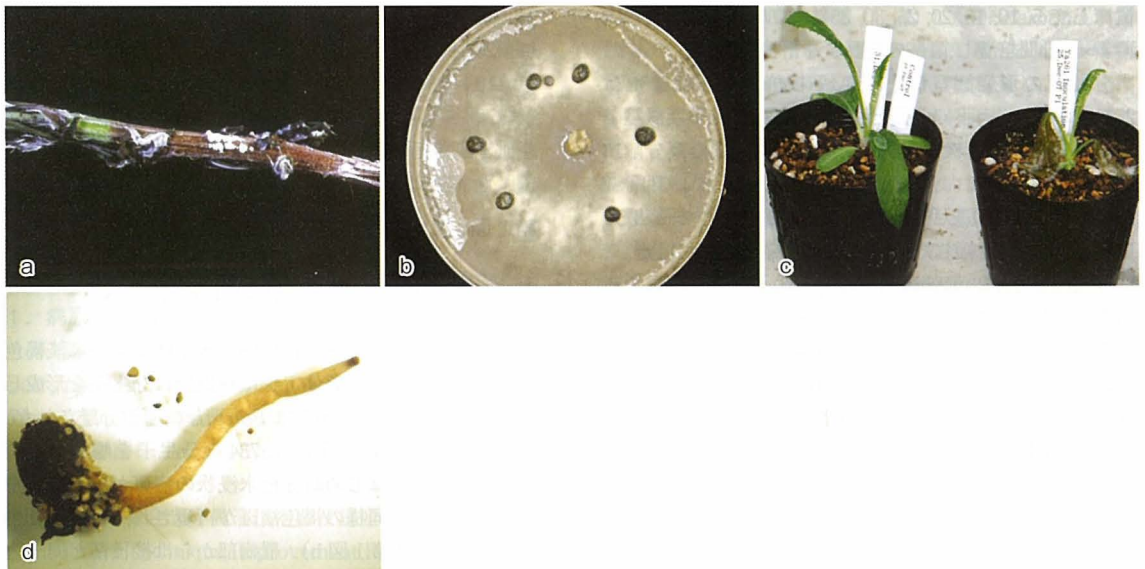
	長径×短径 (μm)	長径/短径比	分生子の形	分生子の色
Ya730	$9.4-15.5 \times 6.3-13.0$ (平均 12.8×7.4)	$1.01-2.03$ (平均 1.7)	長楕円~倒卵型	無色
Ya734	$9.3-15.3 \times 6.4-13.1$ (平均 12.2×7.6)	$1.01-2.06$ (平均 1.6)	長楕円~倒卵型	無色
<i>B. cinerea</i> a)	$6-18 \times 4-11$	$1.35-1.5$	楕円~倒卵型	無色~淡褐色

a) Ellis, M. B. (1971)

第2表 ルリタマアザミから分離された *Sclerotinia* 属菌(分離菌株 Ya261)と近縁の *Sclerotinia* 属菌の菌核の形態比較

	Ya261	<i>S. sclerotiorum</i> a)	<i>S. minor</i> a)
菌核の色・形状	黒色, 扁球形	黒色, 球形~円筒状	黒色, 不整形
培地上での形成	菌叢周辺部および菌叢上に形成	菌叢周辺部に形成	菌叢上に豊富に形成
菌核の大きさ (mm)	$4-9 \times 3-7$ (平均 6.1×5.1)	$5-15 \times 2-8$	$0.5-2$

a) Kohn, L. M. (1979)



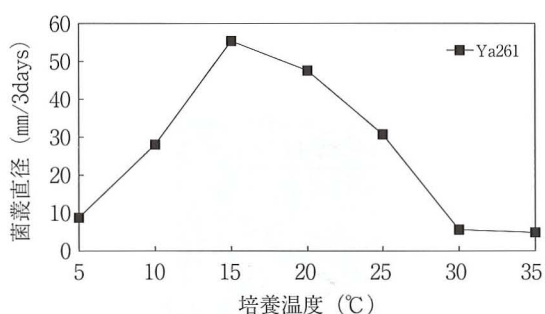
第3図 ルリタマアザミ菌核病

a: 茎葉に生じた病斑(自然病徴). b: PDA 平板培地に 20°C で培養した分離菌株 Ya261 の菌叢.
c: 分離菌株 Ya261 の接種試験による病徴(左: 対照). d: 菌核から生じた子のう盤.

b). ルリタマアザミには *S. minor* による茎腐小粒菌核病の報告があるが (1, 3), 本分離菌の菌核は大きく, これは異なった.

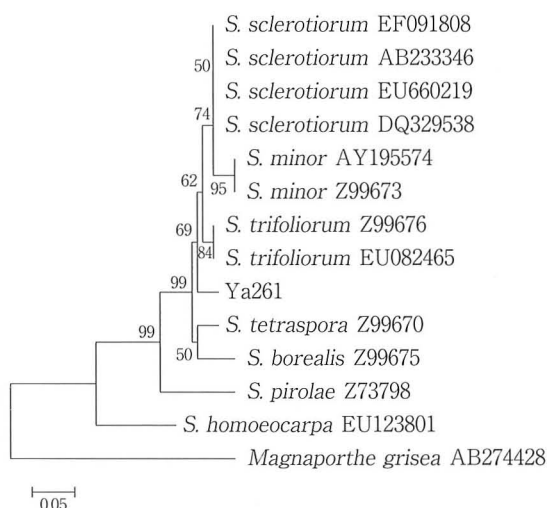
分離菌株 Ya261 の含菌寒天片を貼り付け接種した結果, 接種 3 日後から茎葉があめ色水浸状に軟化腐敗し (第 3 図 c), やがて枯死した. 罹病部には黒色の菌核を形成し, 自然病徴と同様の病徴が再現された. 罹病部からは接種菌と同一菌が再分離され, 対照区では発病しなかった.

分離菌株 Ya261 は 5~30℃ で生育し, 適温は 15℃ であった (第 4 図). 菌核は黒色で扁球形, 直径 4~9×3~7mm で, 毛状構造のない外皮と黄白色の髓組織を有した (第 2 表). 菌核から子実の形成を試みたところ,



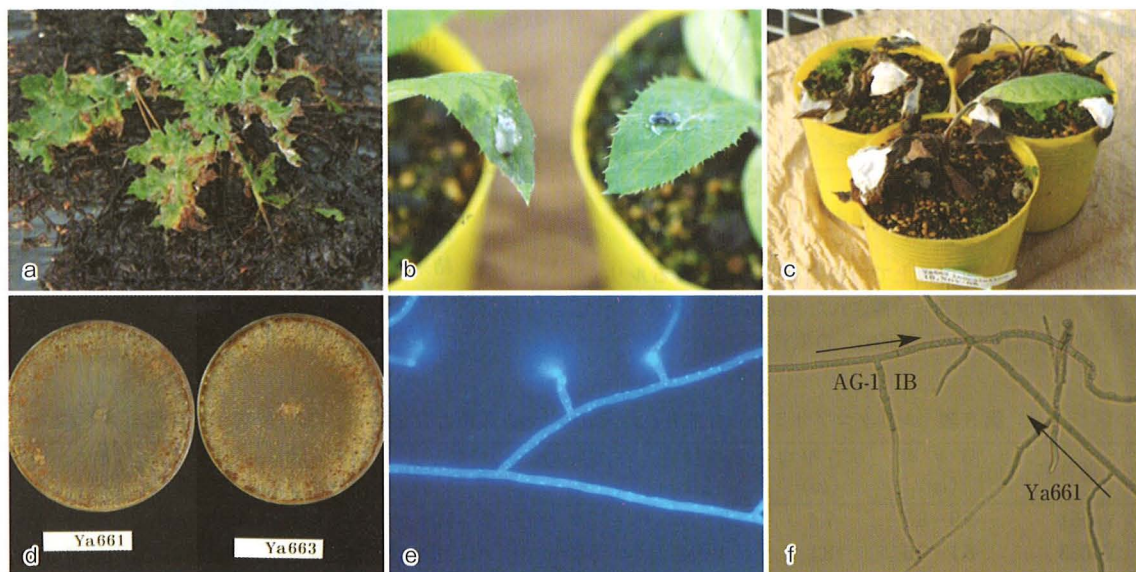
第 4 図 PDA 平板培地上での各培養温度におけるルリタマアザミから分離された *Sclerotinia* 属菌 (分離菌株 Ya261) の生育

子実の形成が形成され (第 3 図 d), Kohn (4) の記載より *Sclerotinia* 属菌と考えられたが, 正常に開盤せず子実の胞子を確認できなかった. 分離菌の rDNA-ITS 領域の相同



第 5 図 ルリタマアザミから分離された *Sclerotinia* 属菌 (分離菌株 Ya261) と近縁種との rDNA-ITS 領域の塩基配列に基づく系統樹 (近隣結合法)

分岐の数値は1000回の反復によるブートストラップ値 (%) を表す. 種名の後の英数字は DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベースのアクセッション番号を示す. bar = 5/100塩基.



第 6 図 ルリタマアザミ葉腐病

a : 葉身に生じた葉腐れ症状 (自然病徴). b : 分離菌株 Ya661 接種 3 日後の病徴 (右 : 対照). c : 分離菌株 Ya661 接種 10 日後の病徴. d : PDA 平板培地に 25℃ で培養した分離菌株の菌叢. e : 分離菌株 Ya661 の菌糸と核 (DAPI 染色). f : 分離菌株 Ya661 と標準菌株 (AG-1 IB) との対峙培養による菌糸融合.

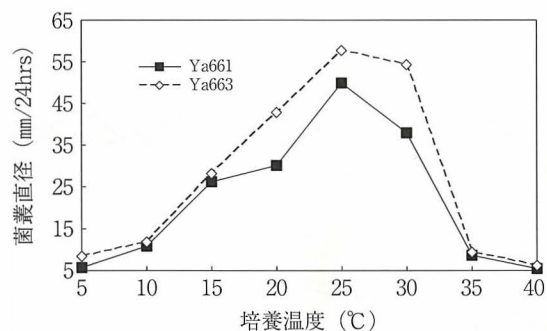
性は *S. sclerotiorum* (アクセッション番号 AB233346 ; (10)) と 99.1% であり, *S. sclerotiorum* と考えられた。しかし, 系統樹解析では *S. minor* とは明らかに異なったものの, 所属は判然としなかった (第 5 図)。以上より, 本報告では分離菌株 Ya261 の同定を *Sclerotinia* sp. にとどめ, 本病害を「菌核病」(英名 *sclerotinia rot*) と提唱する。

3. *Rhizoctonia* 属菌による病害

2008 年 6~10 月にかけて, 切花用に露地栽培していた株の地際部付近の葉身に褐色の病斑が現われ, 伸展して不整形の大型病斑となり, 病勢がさらに進むと葉腐れ症状となった (第 6 図 a)。症状は地際部の葉の込み合った箇所や, 地面と接した葉身にみられたが, 立枯れ症状や枯死する株はみられなかった。これら罹病部からは同一の *Rhizoctonia* 属菌が分離された。

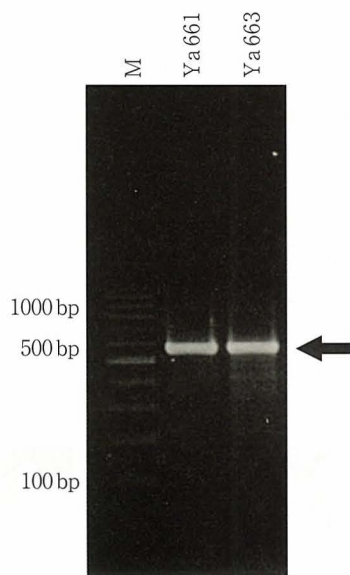
分離菌株 Ya661 および Ya663 の含菌寒天片を葉身に貼り付け接種したところ, 接種 3 日後から褐色水浸状の病斑が速やかに広がり (第 6 図 b), 10 日後には葉腐れ症状となり (第 6 図 c), 自然病徴と同様の病徴が再現された。罹病部からは接種菌が再分離され, 対照区では発病しなかった。

分離菌株 Ya661 および Ya663 の菌叢ははじめ淡褐色, 後に褐色となり輪紋はなく, 菌核は褐色, 直径 1~3mm の扁球状で表面が毛羽立ち, 褐色の液状物を作るものもみられた (第 6 図 d)。菌糸は先端細胞の隔壁の下で分岐



第 7 図 PDA 平板培地上での各培養温度におけるルリタマアザミから分離された *Rhizoctonia* 属菌 (分離菌株 Ya661, Ya663) の生育

し, 分岐点が狭窄して付近に隔壁を生じ, かすがい連結がなく, 着色した菌糸の幅は 5.9~9.6 μm (平均 7.4~8.0 μm), 核数は 3~12 個 (平均 7.4~8.0 個) であった (第 6 図 e, 第 3 表)。以上の特徴は Sneh *et al.* (7) の *R. solani* の記載と一致したため, 分離菌株を *Rhizoctonia solani* Kühn と同定した。また, 菌糸の伸長は 5~35°C でみられ適温は 25°C であったが, 35°C ではほとんど生育せず (第 7 図), *R. solani* AG-1 IB の特徴 (5) を有した。さらに, 両分離菌は AG-1 の標準菌株 (花き研究所より分譲) とのみ菌糸融合し (第 6 図 f), AG-1 IB 亜群特異的プライマー (5) により 580bp 付近に断片増幅を確認したため (第 8 図), 菌糸融合群を AG-1 IB と判断した。ルリタマアザミの *R. solani* による病害には AG-2-1 による立枯病の報告があるが (9), 今回の症状は葉腐れ症状であり, 菌糸融



第 8 図 ルリタマアザミから分離された *Rhizoctonia* 属菌 (分離菌株 Ya661 および Ya663) の *R. solani* AG-1 IB 亜群特異的プライマーによる PCR 結果

M: マーカー。

矢印: 580bp 付近に現れた分離菌株の増幅断片。

第 3 表 ルリタマアザミから分離された *Rhizoctonia* 属菌と *Rhizoctonia solani* の形態比較

菌株名	菌糸幅 (μm)	同左平均 (μm)	細胞核数 (個)	同左平均 (個)	菌糸融合群	菌糸分岐点 の狭窄	分岐点付 近の隔壁	かすがい 連結
Ya661	5.9~8.3	7.4	3~12	7.4	AG-1IB	有	有	無
Ya663	6.1~9.6	8.1	4~12	8.0	AG-1IB	有	有	無
<i>R. solani</i> a)	6.5~10	8.5	3~9	5.7	AG-2-1	有	有	無
<i>R. solani</i> b)	6~10	—	>4	—		有	有	無

a) 竹内・堀江 (1998)

b) Sneh *et al.* (1991)

合群も立枯病とは異なるため、本病を葉腐病（英名 leaf rot）と提唱する。

引用文献

- 1) 忠 英一・原田幸雄・佐野輝男・伊藤陽子・成田恵美子・杉山 悟(2007)ルリタマアザミ茎腐小粒菌核病(新称)の発生. 日植病報 73: 219. (講要)
- 2) Ellis, M. B. (1971) Dematiaceous Hypomycetes. C. M. I. (IMI), Kew, pp.178-184.
- 3) 原田幸雄・伊藤(川口)陽子・忠 英一・成田恵美子・杉山 悟・庄司俊彦・佐野輝男(2008)宿根アスターおよびルリタマアザミの茎腐小粒菌核病の病原としての *Sclerotinia minor*. 日植病報 74: 176. (講要)
- 4) Kohn, L. M. (1979) A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. Mycotaxon 9: 365-444.
- 5) 国永史朗(2003)*Rhizoctonia solani*における菌糸融合による分類の現状. 植物防疫 57: 219-222.
- 6) 日本植物病理学会編(2000)日本植物病名目録, 日本植物防疫協会, 東京, 857pp.
- 7) Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul, USA. pp.135.
- 8) Staats, M. van B. P. and Jan, A. L. van Kan (2005) Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. Mol. Biol. Evol. 22: 333-346.
- 9) 竹内 純・堀江博道(1998)*Rhizoctonia solani*によるペンステモン葉腐病, ペニバナおよびルリタマアザミ立枯病(新称)の発生. 関東東山病虫研報 45: 131-133.
- 10) Umemoto, S., Nagashima, K., Yoshida, S. and Tsuchishima, S. (2007) *Sclerotinia* rot of blueberry caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. J. Gen. Plant Pathol. 73: 290-292.
- 11) 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.). pp.315-322, Academic Press, San Diego, USA.