

イチゴ品種「エッチエス-138」における黒斑病の発生とその病原菌の形態

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	三澤,知央 西川,盾士 栢森,美如
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	63号
巻号補足	
掲載ページ	p. 92-96
発行年月	2012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



イチゴ品種「エッチェス-138」における黒斑病の発生と その病原菌の形態

三澤知央*・西川盾士**・栢森美如***

Occurrence of Black Leaf Spot in Strawberry Cultivar 'HS-138' and
Morphological Characteristics of Causal Fungus

Tomoo MISAWA*, Junji NISHIKAWA** and Miyuki KAYAMORI***

A leaf spot disease of strawberry plants (cv. 'HS-138') has been observed in southwest Hokkaido, Japan since 2003. An *Alternaria* species was isolated from diseased leaves. We studied the pathogenicity and morphology of the *Alternaria* isolate. Typical symptoms were reproduced in cv. 'HS-138' and 'Morioka-16' but not in the other three cultivars by inoculation. Conidia formed on PCA in chains of 4–9, and lateral branches were absent or uncommon. They were brown to olive brown, ovoid to ellipsoidal or obclavate, $12-65.5 \times 5.5-15.5 \mu\text{m}$ with 0–9 transverse and 0–6 longitudinal septa. False beaks were short in 1–2 cells. The conidiophores were $20-82.5 \times 3-4.5 \mu\text{m}$. The morphology and restrictive pathogenicity of the causal fungus were identical to those of the strawberry black leaf spot pathogen. However the causal fungus was clearly different from *A. alternata* sensu Simmons 1999 in having large conidia and short unbranched chains. This is the first report on the occurrence of black leaf spot in a strawberry cultivar other than cv. 'Morioka-16' in Japan.

Key words: *Alternaria*, black leaf spot, HS-138, Morioka-16, morphology, strawberry

2003年頃から北海道の南西部のイチゴ栽培地帯では、夏秋どり作型の主要品種「エッチェス-138」の葉に斑点を生じる症状が常発している。発生原因の解明試験を実施した結果、本症状がイチゴ黒斑病であることが明らかとなった。本病はこれまで1970年代～1990年代前半に北海道・東北地域において品種「盛岡16号」(厳密には品種登録されなかったが、本報告では品種と呼称する)でのみ発生していた病害であり(13)、同品種以外での発生を国内ではじめて確認した。また、本病の病原菌は *Alternaria alternata* とされているが(19)、本属の分類体系において近年重要視されている分生子の連鎖数と側鎖(lateral branches)の有無(9, 12)等の形態的特徴については、詳述されていない。そこで、本研究では分離菌の病原性および形態についての検討結果を報告する。

本研究を実施するにあたり、岡山大学山本幹博博士、秋田県立大学高橋春實博士、北海道立総合研究機構・花野菜技術センター川岸康司博士、同福川英司氏、ホクサン株式会社岡田貴博士にご指導とご助言を賜った。記して感謝申し上げる。

材料および方法

1. 発生状況および病徴

2007年8月、北海道松山管内江差町のイチゴ(品種:エッチェス-138)栽培ハウスにおいて病徴および発生状況を調査・観察した。

2. 病原菌の分離

葉身の病斑部を5mm四方に切断し、水道水で洗浄後、70%エタノールで30秒、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で1分間表面殺菌したのち、滅菌ろ紙上で水分を除去

*北海道立総合研究機構 農業研究本部 道南農業試験場

Donan Agricultural Experiment Station, Agricultural Research Department, Hokkaido Research Organization, Hokuto, Hokkaido 041-1201, Japan

** (株)サカタのタネ 掛川総合研究センター

***北海道立総合研究機構 農業研究本部 中央農業試験場

し、組織片をブドウ糖加用ジャガイモせん汁寒天 (PDA) 平板培地上に置床した。25℃・7日間培養後に菌叢先端を V-8 ジュース寒天 (V8) 培地に移植し、15℃・BLB ライト照射下で 4 週間培養し分生子を形成させ、希釈平板法により単孢子由来菌株を得た。

3. 分離菌の形態

分離菌をジャガイモ・ニンジン寒天 (PCA) 培地上 (直径 9cm) に移植後、20℃で 10 日間培養し、菌叢がシャーレの縁に到達する直前に気中菌糸を火炎滅菌したスパチュラで掻き取った (9,15)。その後、BLB ライトを 24 時間照射し、20℃・暗黒化で 7 日間培養し、実体顕微鏡下および生物顕微鏡下で分離菌の分生子形成様式と形態を観察した。対照菌株として「盛岡 16 号」から分離したイチゴ黒斑病菌 NAF8 株 (岡山大学 山本幹博博士より分譲) を供試し、同様の方法で形態観察を実施した。

4. 病原性

検定には園芸培土を充填したビニールポット (直径 12 cm) に鉢上げ後約 4 週間栽培したイチゴ苗を供試した。「エッチェス-138」分離菌については V8 培地上にて 15℃・BLB ライト照射下で 4 週間培養し分生子を形成させ、これを分生子濃度 10^4 個/ml, 10^5 個/ml, 10^6 個/ml に調整し (0.1% Tween20 加用) 接種源とし、イチゴ苗に噴霧接種した。試験には「エッチェス-138」, 「盛岡 16 号」, 「きたえくぼ」, 「けんたろう」および「なつじろう」の 5 品種を供試した。対照区には滅菌水を噴霧した。

NAF8 株については V8 培地で 25℃10 日間培養し、径 6mm のコルクボーラーで打ち抜いた含菌寒天片を接種源とした。接種源を 1 葉あたり 1 枚、1 株あたり 5 葉に有傷 (針で 5 カ所付傷) または無傷で貼り付け接種した。試験には「エッチェス-138」, 「盛岡 16 号」および「きたえくぼ」の 3 品種を供試した。対照区では V8 培地を葉に貼り付けた。

接種苗はビニール被覆により温室状態に保ち、25℃・16 時間日長で制御した人工気象器内で管理した。接種 5 日後に被覆を除去したのち、接種 11 日後に発病調査および接種菌の再分離を行った。試験はいずれも 1 区 2 株で行った。

結 果

1. 発生状況および病徴

はじめ葉身に径 3~5mm, 赤褐色~暗紫色で中心部が灰褐色の円形病斑を形成した (Fig. 1a)。病斑は次第に拡大し径約 20mm, 褐色輪紋状の長楕円形~不整形病斑となり、病斑の周辺部にはしばしば黄色のハローを生じた (Fig. 1b)。葉柄には、長さ 10~20mm の褐色条斑を形成した。本症状の発生は約 350m² のハウス内ではほぼ均一に認められ、発病株率は約 20%であった。1 小葉あたり 1~15 病斑、1 株あたり 2~3 複葉で発病が認められた。葉柄での発生は稀であった。

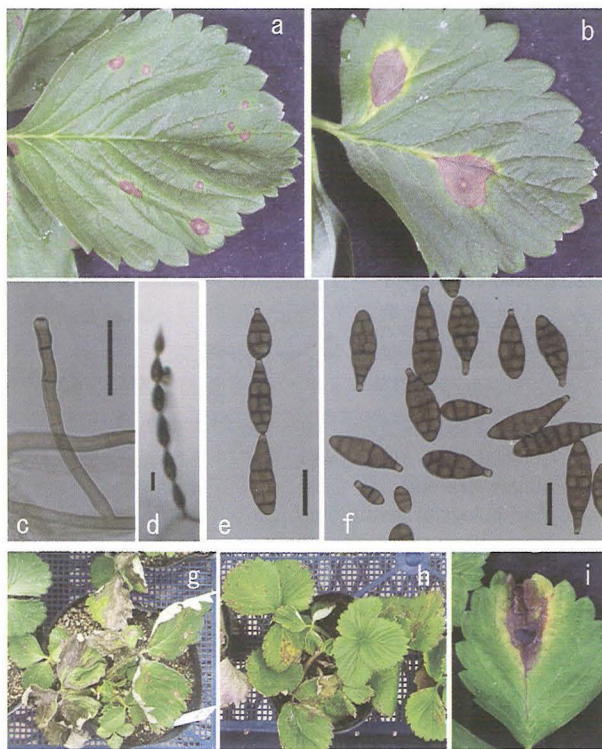


Fig. 1 Symptoms, morphological characteristics and pathogenicity of the strawberry black leaf spot pathogen, *Alternaria* sp.

a-b : Natural symptoms of cv. HS-138.

c : Conidiophore.

d-e : Conidia produced in a chain.

e-f : Conidia on potato carrot agar.

g-i : Leaf spots 11 days after inoculation with conidial suspension (1.0×10^5 spores/ml) of isolate E11 (g : cv. 'HS-138', h : cv. 'Morioka-16') and with mycelial discs of isolate NAF8 (i : cv. HS-138). Scale bars : 20 μ m

2. 病原菌の分離

病斑部からは PDA 培地上で暗緑色の菌叢を示す *Alternaria* 属菌の一種が高率に分離された。単孢子由来の E11 株を以降の試験に供試した。

3. 分離菌の形態

E11 株の分生子柄は淡褐色~褐色、大きさは $20 \sim 82.5 \times 3 \sim 4.5 \mu\text{m}$, 0~4 隔壁を有し (Fig. 1c), シンポジアルに再伸長した。分生子はボロ型に形成され、4~9 個連鎖した (Fig. 1d)。側鎖の形成は認められなかった。分生子は褐色~オリーブ褐色、卵形~楕円形・倒棍棒形で表面平滑、大きさ $12 \sim 65.5 \times 5.5 \sim 15.5 \mu\text{m}$ で 0~9 の横隔壁および 0~6 の縦隔壁を有した。明瞭な嘴部 (真正嘴部 true beak) の形成は認められず、偽嘴部 (false beak) は 1~2 細胞であった (Table 1 ; Fig. 1e, f)。「盛岡 16 号」由来の NAF8 株は分生子形成能を失っており、形態観察ができなかった。

Table 1 Morphological comparisons of the pathogens of black leaf spot in strawberry and *Alternaria alternata*

Isolate	Chain	Lateral branch	Size (μm)	Shape	Transverse septa	Longitudinal septa	Substrate
Present fungus	4-9	None	12-65.5 $\times$ 5.5-15.5 ^a	Ovate, ellipsoid, obclavate	0-9	0-6	PCA
<i>A. alternata</i> strawberry pathotype (Watanabe and Umekawa 1977)	Short	-	20-125 (+0-75) ^b $\times$ 7.5-15	-	6.2	1.5	Host
(Watanabe et al. 1978)	-	-	12.5-40 (+1-15) ^b $\times$ 5-19.5	Obclavate, fusiform	1-6	0-3	PSA
<i>A. alternata sensu stricto</i> (Simmons 1999)	15-20	Complex	25-30(-40) ^c $\times$ 5-9 ^d 7-25(-40) ^c $\times$ 5-12 ^e	Long-elliptical Ovate, ellipsoid, subsphaeroid	4-7 1-7	A few or none Very few or none	PCA

a : Conidial body including false beak

b : Conidial body (+false beak)

c : Mainly (rarely)

d : Morphology of matured conidia

e : Morphology of juvenile conidia

Table 2 Pathogenicities of isolate E11 obtained from cv. 'HS-138' and isolate NAF8 obtained from 'Morioka-16' against five strawberry cultivars

Isolate	Inoculation method	Cultivars of test strawberry plants					
		HS-138	Morioka-16	Kitaekubo	Kentaro	Natsujiro	
E11	Conidium concentration of inoculum (spores/ml)						
	Spray	1.0×10^4	2/2 ^a	2/2	0/2	0/2	
	inoculation	1.0×10^5	2/2	2/2	0/2	0/2	
		1.0×10^6	2/2	2/2	0/2	0/2	
		Control	0/2	0/2	0/2	0/2	
NAF8	Wound or non-wound						
	Agar disc	Wound inoculation	2/2 (10/10) ^b	2/2 (10/10)	0/2 (0/10)	NT ^c	NT
	inoculation	Non-wound inoculation	2/2 (6/10)	2/2 (7/10)	0/2 (0/10)	NT	NT
		Control	0/2 (0/10)	0/2 (0/10)	0/2 (0/10)	NT	NT

a : Number of diseased plants/number of tested plants

b : Number of diseased leaves/number of tested leaves

c : Not tested

4. 病原性

E11 株の接種により「エッチエス-138」および「盛岡 16 号」では接種 2 日後から葉身に褐色病斑を形成し始めた。接種 11 日後の観察において、分生子 10⁶ 個/ml 接種区では両品種とも半数以上の葉身が枯死するほど激しく発病した。分生子 10⁵ 個/ml 接種区ではほぼ全ての小葉に多数の円形病斑を形成し、一部の小葉は枯死した (Fig. 1g, h)。分生子 10⁴ 個/ml 接種区では株全体の約半分の小葉に円形病斑を形成し、小葉あたりの病斑数は 1~3 個程度であった。「エッチエス-138」と「盛岡 16 号」の間では顕著な感受性の差異は認められなかった。「きたえくぼ」、「けんたろう」および「なつじろう」の 3 品種はいずれの分生子濃度の接種区においても発病が認められなかった (Table 2)。

NAF8 株は有傷・無傷いずれの接種方法においても「エッチエス-138」および「盛岡 16 号」に褐色の病斑を形成し、原病徴が再現されたが (Fig. 1i)、「きたえくぼ」では発病が認められなかった。いずれの発病葉からも接種菌が再分離された。

考 察

「エッチエス-138」で認められた葉の斑点症状は、渡辺・梅川 (18) が報告したイチゴ黒斑病の病徴と一致し、分離菌 E11 株は黒斑病感受性品種「盛岡 16 号」に対して特異的な病原性を示した (Table 2)。また、分生子の形態は「盛岡 16 号」のイチゴ黒斑病菌の場合は倒棍棒状~紡錘形であり (18)、E11 株のものと類似していた。分生子の連鎖数も概ね一致していた (Table 1)。さらに、イチゴ

黒斑病菌は宿主特異的毒素である AF 毒素を産生することが知られているが(8), E11 株についても AF 毒素産生能が山本ら (16) によって確認されている。以上のことから, 2003 年以降に北海道南西部の「エッチェス-138」で発生している症状は, イチゴ黒斑病であると判断した。

黒斑病感受性は単一優性遺伝子支配であり, 「盛岡 16 号」の感受性遺伝子はヘテロである (13)。「エッチェス-138」の花粉親は「盛岡 16 号」であることから (2), 「エッチェス-138」の感受性は「盛岡 16 号」に由来すると考えられる。「なつじろう」の花粉親は「エッチェス-138」であり (3), その育成にあたっては黒斑病常発地帯である北海道北斗市の道南農業試験場において, 黒斑病発生が認められない系統を選抜したため (福川, 私信), 抵抗性品種を育成できたと推察された。「きたえくぼ」は 1999~2004 年頃の, 「けんたろう」は 2004 年以降の道内の春どり作型の主要品種であり (4), 種子親および花粉親とも「盛岡 16 号」, 「エッチェス-138」ではないため (5,6), 黒斑病に抵抗性を示したと考えられた。

「エッチェス-138」で発生している症状は, イチゴ黒斑病であると判断したが, E11 株および既報のイチゴ黒斑病菌の形態は, *A. alternata* sensu Simmons 1999 とは分生子の連鎖数と側鎖の有無および分生子サイズにおいて明らかに異なる。*A. alternata* は, *Alternaria* 属のタイプ種として記載されたが (10), その後集合種として認知され形態幅を広くとらえられたため, 1999 年に再定義された (11)。狭義 *A. alternata* は分生子が 15~20 個連鎖し, これらが分岐して複雑に側鎖を形成する (11) のに対して, 既報のイチゴ黒斑病菌の分生子は「比較的短く連鎖状に形成される」とされ (18), E11 株も分生子の連鎖数は 4~9 個であり, 側鎖の形成は認められなかった。また, 既報のイチゴ黒斑病菌および E11 株とも分生子サイズが狭義 *A. alternata* と比較して明らかに大きかった (Table 1)。

イチゴ黒斑病菌は, ナシ黒斑病菌やリング斑点落葉病菌などと互いに形態的に識別できず病原性のみが異なる *A. alternata* の病原性系統 (pathotype) のひとつ, イチゴ病原性系統とされる (14)。一方, Simmons (11) は, イチゴ黒斑病菌を除く 6 つの病原性系統について形態的な比較を行い, 分生子の連鎖様式および形態的特徴の差異を根拠にそれぞれを独立種として種名を与えている。しかしながら, Kusaba and Tsuge (7) は *A. alternata* の各病原性系統間では rDNA-ITS 領域の塩基配列の相同性が高いことから各病原性系統を *A. alternata* の種内群に位置付けた。イチゴ黒斑病菌を独立種と見なすか (11), *A. alternata* の種内群と見なすかは見解が分かれているため, 本研究では「エッチェス-138」分離菌の学名は *Alternaria* sp. とし, 形態を詳述するに止めた。今後, 「盛岡 16 号」由来の黒斑病菌の形態を詳述するとともに, *A. alternata* の種概念に関するさらなる分類学的検討が

必要である。

高橋 (13) は, 国内外で育成された 60 品種・系統のイチゴ黒斑病に対する感受性を検定し, 「盛岡 16 号」とアメリカで育成された品種「Robinson」のみが感受性であることを明らかにした。「Robinson」は我が国にも導入され 1970 年代前半まで福島県の主要品種であったが, 同品種において黒斑病の発生記録はない。イタリアでは品種「Cesena」, 「Dana」, 「Miss」で, ニュージーランドでは品種「Redgaunlet」, 「Talisman」で本病の発生記録があるものの (1,17), 我が国においては「盛岡 16 号」以外の品種で本病の発生が確認されたのは, 本事例が初めてである。

なお分離菌株 E11 は, 農業生物資源ジーンバンクに MAFF242310 として寄託登録した。

引用文献

- 1) Dingley J.M. (1970) Records of fungi parasitic on plants in New Zealand 1966-68. N. Z. J. Agric. Res. 13 : 325-337.
- 2) 福川英司・中住晴彦・川岸康司 (2001) イチゴ「エッチェス-138」の特性. 北海道立農試集報 81 : 41-44.
- 3) 福川英司・田中静幸・堀内優貴・大久保進一・荒木和哉・大宮 知・中住晴彦・阿部珠代 (2007) いちご新品種「道南 29 号」. 北農 74 : 171.
- 4) 川岸康司 (2006) 寒冷地一季成り性イチゴ品種の栽培と育種に関する研究. 北海道立農試報告 108 : 1-65.
- 5) 川岸康司・加藤俊介・生方雅男・阿部珠代・立川さやか・稲川 裕・福川英司 (2001) イチゴ新品種「けんたろう」の育成. 北海道立農試集報 81 : 11-20.
- 6) 今野 寛・稲川 裕・川岸康司・澤田一夫・塩澤耕二・加藤俊介・立川さやか (2001) イチゴ新品種「きたえくぼ」の育成. 北海道立農試集報 81 : 1-10.
- 7) Kusaba, M. and Tsuge, T. (1995) Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacer of ribosomal DNA. Curr. Genet. 28 : 491-498.
- 8) Maekawa, N., Yamamoto, M., Nishimura, S., Kohmoto, K., Kuwada, M. and Watanabe, Y. (1984) Studies on host-specific AF-toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing *Alternaria* black spot of strawberry (1) Production of host-specific toxins and their biological activities. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 50 : 600-609.
- 9) 西川盾士 (2010) *Alternaria* とその関連属菌の分類・同定, 現場で使える植物病原菌類解説 - 分類・同定から取り扱いまで -, 植物病原菌類談話会, つくば, pp.173-178.
- 10) Simmons, E.G. (1967) Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. Mycologia 59 : 67-92.
- 11) Simmons, E.G. (1999) *Alternaria* themes and variations

- (236-243) host-specific toxin producers. Mycotaxon 70 : 325-369.
- 12) Simmons, E.G. (2007) *Alternaria* an identification manual. CBS, Biodiversity series 6, Utrecht, 775pp.
- 13) 高橋春實 (1993) イチゴの黒斑病抵抗性株の育成に関する研究. 秋田農短大報 19 : 1-44.
- 14) 柘植尚志 (2003) *Alternaria alternata* の病原性遺伝子に関する研究. 日植病報 69 : 172-174.
- 15) 遠山 明 (1993) 真菌の分離と分類・同定 35, *Alternaria* 属. 防菌防黴 21 : 107-115.
- 16) 山本幹博・布野圭将・浅野 舞 (2012) 既報のイチゴ黒斑病とイチゴ品種エッチェス-138 上の黒斑病の宿主・病原菌間相互作用の比較. 日植病報 78 : 47 (講要).
- 17) Wada, H., Cavanni, P., Bugiani, R., Kodama, M., Otani, H. and Kohmoto, K. (1996) Occurrence of the strawberry pathotype of *Alternaria alternata* in Italy. Plant Dis. 80 : 372-374.
- 18) 渡辺康正・梅川 学 (1977) *Alternaria* 属菌によるイチゴの新病害について. 日植病報 43 : 82 (講要).
- 19) 渡辺康正・梅川 学・西村正暘 (1978) イチゴ黒斑病の病原菌について. 日植病報 44 : 363 (講要).