

Botrytis cinereaによるブプレウルム灰色かび病(新称)の発生

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	菅原,敬 五十嵐,美穂 長谷,修 佐藤,衛
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	68号
掲載ページ	p. 10-12
発行年月	2017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



*Botrytis cinerea*によるブプレウルム灰色かび病（新称）の発生

菅原 敬^{1,2,*}・五十嵐美穂¹・長谷 修³・佐藤 衛⁴

Mold on Thorough-wax Caused by *Botrytis cinerea*

Kei SUGAWARA^{1,2,*}, Miho IGARASHI¹, Shu HASE³ and Mamoru SATOU⁴

2003～2015年にかけて山形県内でブプレウルム (*Bupleurum rotundifolium*) の茎葉、花梗、苞に暗緑色～淡褐色の病斑が現れ、罹病部から *Botrytis* 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* と同定された。本菌によるブプレウルムの病害は未報告であるため、病名を灰色かび病と提唱する。

Key words: *Botrytis cinerea*, *Bupleurum rotundifolium*, Gray mold

ブプレウルム (*Bupleurum rotundifolium*) は、ヨーロッパ原産のセリ科の一年草で、草丈は1 m以上となり、分岐した枝の先端に黄緑色で花弁状の苞片に囲まれた小花を多数つけ、主として添え花として利用される。山形県内では無加温の施設栽培で初夏から晩秋に収穫され、多くは6～7月に市場出荷される。県内で2003～2015年にかけて *Botrytis* 属菌によると思われる病害が発生した。ブプレウルムでは本菌による病害が国内未報告(4)であったため、病原菌の分離、病原性の確認および分類・同定を行ったので報告する。

材料および方法

1. 病徴の観察

2003年12月、2010年5月および2015年5月に発生した病害を観察し病徴を記録した。

2. 病原菌の分離および病原性の確認

2010年に発病した株から上位葉の患部を選び、その周縁部から5 mm角の組織片を切り取り、70%エタノール中に30秒間浸漬して表面殺菌を行い、素寒天(WA)平板培地上に置床した。20°Cで数日間培養後、組織片から伸長してきた菌糸の先端部を掻き取りジャガイモ・

ブドウ糖寒天(PDA)平板培地に置床した。20°Cで培養後、単孢子分離により菌株を得た。また、2015年は罹病株の患部に形成した分生子を白金耳で掻き取ってWA平板培地上に画線し、単孢子分離により菌株を得た。接種試験は、Ya735株(2010年分離)およびYa862株(2015年分離)を代表菌株として供試し、分生子懸濁液の噴霧接種(無傷)によって行った。分生子の形成は岸(2,3)の手法を改変して行った。すなわち、分離菌株をWA平板培地で約1週間培養し、これに数十秒間煮沸滅菌し水分を取り去ったアジサイ葉片を置床し、20°C、BLB照射下(12時間明/12時間暗)で7～10日間培養して形成させた。これを滅菌水に懸濁し、 1×10^5 個/mlとなるよう調製し、Tween20を添加して供試植物に約5 mlを噴霧した。対照区は滅菌水を噴霧した。ブプレウルムは直径9 cmポットに定植した草丈10 cm程度の株を1菌株あたり4個体供試し、接種後は20°Cの恒温器内でポリ袋に入れて多湿状態を4日保ち、5日後および14日後に発病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。

3. 分離菌株の生育温度、形態および同定

Ya735株およびYa862株を供試した。菌糸の生育温度

1) 山形県病害虫防除所庄内支所

Yamagata Prefectural Plant Protection Office, Shonai Branch, Yamanomae, Fujishima, Tsuruoka, Yamagata 999-7601, Japan

2) 現在：山形県最上総合支庁農業技術普及課産地研究室

3) 山形大学農学部

4) 農研機構 野菜花き研究部門

*) 責任著者 (Corresponding Author)

受理日：2017年7月12日 (Accepted : July 12, 2017)

は20°Cで1~3日間前培養（PDA平板培地）した菌叢先端部から直径5 mmの含菌寒天片を打ち抜き、直径9 cmのPDA平板培地中央に置床した。これを5, 10, 15, 20, 25, 30および35°Cの恒温器内で5日間培養し、菌糸の伸長量（菌叢直径）を計測した。分離菌の形態観察は、20°Cで培養したPDA平板の菌叢と菌核の形成を肉眼で観察し、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、PDAで14日間培養した菌叢から滅菌した柄付き針で少量の菌体をかき取り、PrepMan Ultra (Life Technologies) を用いてDNAを抽出し、プライマーペアITS5/ITS4 (6) を用いてrDNAのITS領域を増幅した。増幅産物はHigh Pure PCR Product Purification Kit (Roche) により精製した後、委託（株式会社ファスマック）により塩基配列を解析しDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のBLAST検索により相同性を調査した。

結果および考察

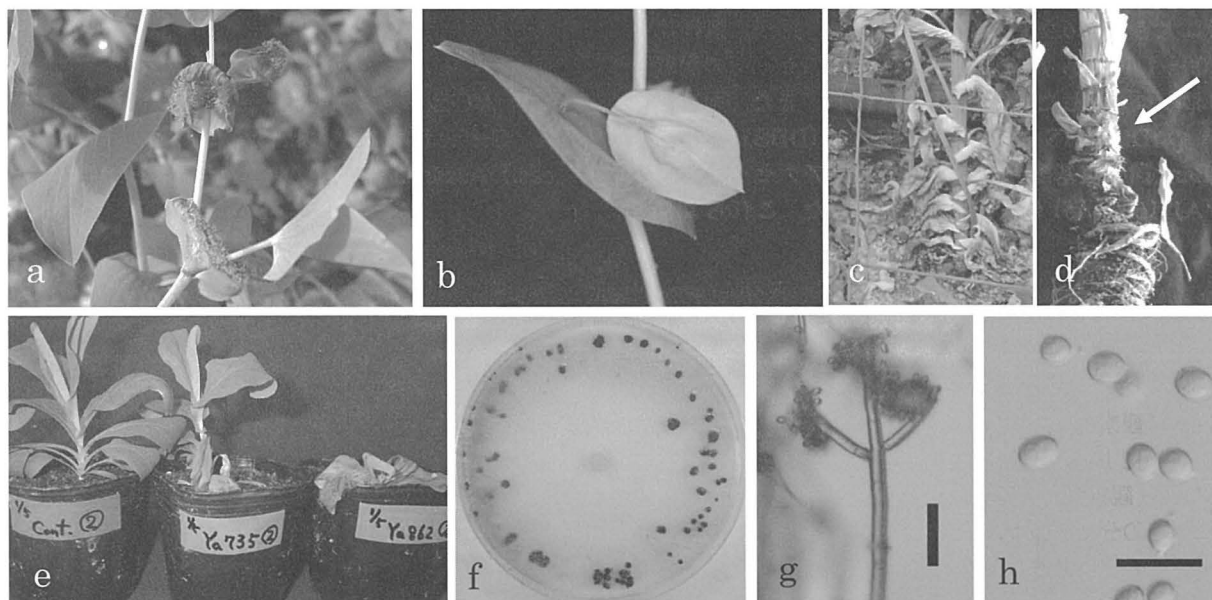
1. 病徴の観察

2003年12月、庄内地域において収穫終了後に残った株の葉身に暗緑色~淡褐色で水浸状の不整形病斑が現

れ、病勢が進むと患部に灰褐色の分生子を大量に形成する症状が発生した（第1図a）。発病は約半数の株に見られたが実害はなかった。罹病株から病原の分離は行わなかったが、症状から2010年、2015年と同一の病害と考えられた。2010年5月には、同地域で開花期の株の約1割に葉身、花硬、苞に暗緑色~褐色で水浸状の病斑が現れ、商品価値が低下した（第1図b）。2015年5月には村山地域の約3aの施設内で、収穫直前の約3割の株に地際付近の茎が褐変し、灰褐色の分生子を生じて立枯れる症状が発生した。これは、古くなって黄化枯死した下葉から病勢が伸展し、病斑が茎を取り囲んでその上部が枯死したものと考えられた（第1図c, d）。

2. 分離菌の病原性

分離菌株Ya735およびYa862の分生子を噴霧接種した結果、5日後に葉身に暗緑色水浸状の病斑が現れた。14日後には接種したすべての株が発病し、葉身が軟化腐敗した（第1図e）。また、茎に病斑が伸展すると立枯れ症状となり、自然発病株と同様の病徴が再現された。いずれも表面には大量の分生子が形成された。罹病部からは接種菌と同一菌が再分離された。対照区では発病が認められなかった。



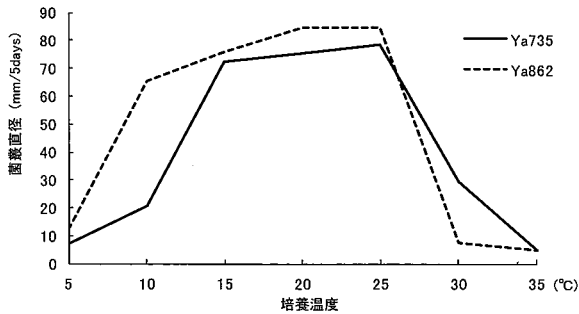
第1図 ブレウルムに発生した灰色かび病

a 葉身に生じた病斑. b 花梗に生じた病斑. c, d 立枯れ症状を呈した株および患部（矢印）. e 接種試験による病徴再現（左：対照（滅菌水接種）、中央：Ya735株接種個体、右：Ya862株接種個体）. f PDA平板培地20°Cで14日間培養した分離菌株Ya735の菌叢. g 分離菌株Ya735の分生子柄（スケール50 μm）. h 分離菌株Ya862の分生子（スケール20 μm）.

第1表 ブレウルムから分離された*Botrytis*属菌と既報の*Botrytis cinerea*との分生子の形態比較

	長径×短径 (μm)	長径/短径比	分生子の形態	分生子の色
Ya735	8.0-11.9×5.4-8.6	1.04-1.79	円~倒卵~長楕円	無色
Ya862	6.9-11.4×5.5-9.4	1.00-1.40	円~倒卵~楕円	無色
<i>B. cinerea</i> ^{a)}	6-18×4-11	1.35-1.5	楕円~倒卵形	無色~淡褐色

a) Ellis (1971) (1).



第2図 ププレウムから分離された*Botrytis*属菌の各培養温度における生育 (PDA平板培地)

3. 分離菌株の生育温度, 形態および同定

分離菌株 Ya735 および Ya862 は 5~30°C で生育し, 35°C では菌糸の伸長が認められなかった. 生育適温は 20~25°C で (第2図), 20°C で培養した菌叢ははじめ白色のちに灰白色で, 黒色で球形~盤状~不整形の菌核を形成した (第1図f). 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g). 分生子は円形~倒卵形~長楕円形で, 大きさは Ya735 株で 8.0~11.9×5.4~8.6 μm, 長径/短径比は 1.04~1.79, Ya862 株では大きさが 6.9~11.4×5.5~9.4 μm, 長径/短径比が 1.00~1.40 であり, Ellis (1) による *B. cinerea* の記載とおおむね一致した (第1図h, 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 (5) 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. 本菌による ププレウムの病害は未報告のため (4), 病名を灰色かび病 (英名 gray mold) とすることを提案する. なお, 分離菌株 Ya735, Ya862 はそれぞれ MAFF7124089, MAFF712408 として農業生物資源ジェンバンクに寄託した.

引用文献

- 1) Ellis, M. B. (1971) Dematiaceous Hypomycetes. C. M.I. (IMI), Kew, pp. 178-184.
- 2) 岸 國平 (1994) 寒天-葉片培養法による柄子殻及び分生子の形成. 日植病報 60 : 345 (講要).
- 3) 岸 國平 (1995) 寒天葉片法による柄子殻, 柄胞子の大量形成について. 植物防疫 49 : 129-130.
- 4) 日本植物病理学会編 (2016) 日本植物病名目録 2016年版, 日本植物病理学会, 1591 pp.
- 5) Staats, M., van Baarlen, P. and van Kan, J. A. L. (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. Mol. Biol. Evol. 22 : 333-346.
- 6) 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, San Diego, pp. 315-322.