

Gilbertella persicariaによるアセロラ実腐病(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	澤岷, 哲也 山城, 麻希 河野, 伸二 松村, まさと
発行元	日本植物病理學會
巻/号	86巻2号
掲載ページ	p. 102-107
発行年月	2020年5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



Gilbertella persicaria によるアセロラ実腐病 (新称)

澤岨 哲也^{1*}・山城 麻希¹・河野 伸二¹・松村まさと²

ABSTRACT

TAKUSHI, T.^{1*}, YAMASHIRO, M.¹, KAWANO, S.¹ and MATSUMURA, M.² (2020). First report of fruit rot caused by *Gilbertella persicaria* on Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 86: 102–107.

A severe postharvest rot of acerola (Barbados cherry) fruits (cv. Kanmikei) was found in Okinawa Prefecture, Japan in 2017. A fungus frequently isolated from the diseased fruits was identified as *Gilbertella persicaria* based on morphological, cultural characteristics and sequence similarity of rDNA-ITS regions. Symptoms were reproduced on acerola fruits after inoculation with the isolates, which were then reisolated. This is the first report of fruit rot of acerola caused by *G. persicaria* in Japan, and we propose the name “migusare-byo” in Japanese.

(Received November 28, 2019; Accepted January 6, 2020)

Key words: acerola, Barbados cherry, fruit rot, ITS

2017年9月、沖縄県本部町と糸満市の生産農家から本部町の集荷場へ出荷された露地アセロラ (*Malpighia glabra* L.: acerola) 果実において、加工処理前の赤みを着色させる追熟過程で原因不明の軟化・腐敗症状が発生した。本病は果面全体に灰黒色の菌糸が生じ、その先端が黒点状になり腐敗することから、これまでに国内で報告されているアセロラ炭疽病 (澤岨ら, 2018) とは明らかに病徴が異なる。そこで、著者らは罹病部位から同一性状の糸状菌株を複数分離し、これら分離菌株の病原性を確認するとともに、形態的特徴、培養特性およびrDNA-ITS領域の塩基配列に基づく同定を行った結果、国内外で未記録の果実病害であることを明らかにしたので報告する。なお、本報告の一部は、令和元年度日本植物病理学会九州部会において報告した (澤岨ら, 2020)。

本症状は収穫後の果実で発生し、常温下では保存3~5日後から病徴が確認された。初め白色の菌糸が果面に蔓延し、数日後には果実表面が褐色の水浸状となり、軟化・腐敗した。果実表面に白色から灰黒色でくもる巣状の菌糸が生じ、そ

の上に黒色小粒の胞子のうを多数形成した (Fig. 1a, b)。沖縄県本部町3圃場、名護市1圃場および糸満市2圃場の出荷果実 (1圃場につき22~132果あたり) における本病の発病率は、本部町で3.5%、名護市で18.1%、糸満市で3.4%であり、それら被害は甘味系在来種の他に‘レッドジャンボ’および‘レーンボルグ’の3品種で確認された。

分離菌株を得るために、2017年9月、沖縄県糸満市および名護市の現地アセロラ圃場で収穫された甘味系在来種の発病果実をそれぞれ3個ずつ採集した。罹病果実の腐敗部分から切片を切り取り、10%次亜塩素酸ナトリウム水溶液の20倍液で表面殺菌し、滅菌水で洗浄後、風乾して直ちに素寒天平板培地に置床した。25°Cで2日間培養し、組織片から伸長した菌糸先端から単菌糸分離を行い、ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) に移植して供試菌株 ItB-1 (糸満市由来) および C6-5 (名護市由来) の2菌株を取得した。

分離菌株の所属を明らかにするために、Möller *et al.* (1992) の方法に準じて、分離2菌株の麦芽エキス寒天培地 (MEA)

¹ 沖縄県農業研究センター (〒901-0336 沖縄県糸満市真壁820) Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, 820 Makabe, Itoman, Okinawa 901-0336, Japan

² 沖縄県農業研究センター名護支所 (〒905-0012 沖縄県名護市名護4605-3) Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Nago Branch, 4605-3 Nago, Nago, Okinawa 905-0012, Japan

* Corresponding author (E-mail: takushtt@pref.okinawa.lg.jp)

本研究で明らかになった ITS 領域の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した (菌株 ItB-1 : Accession No. LC496067, 菌株 C6-5 : LC496068)。

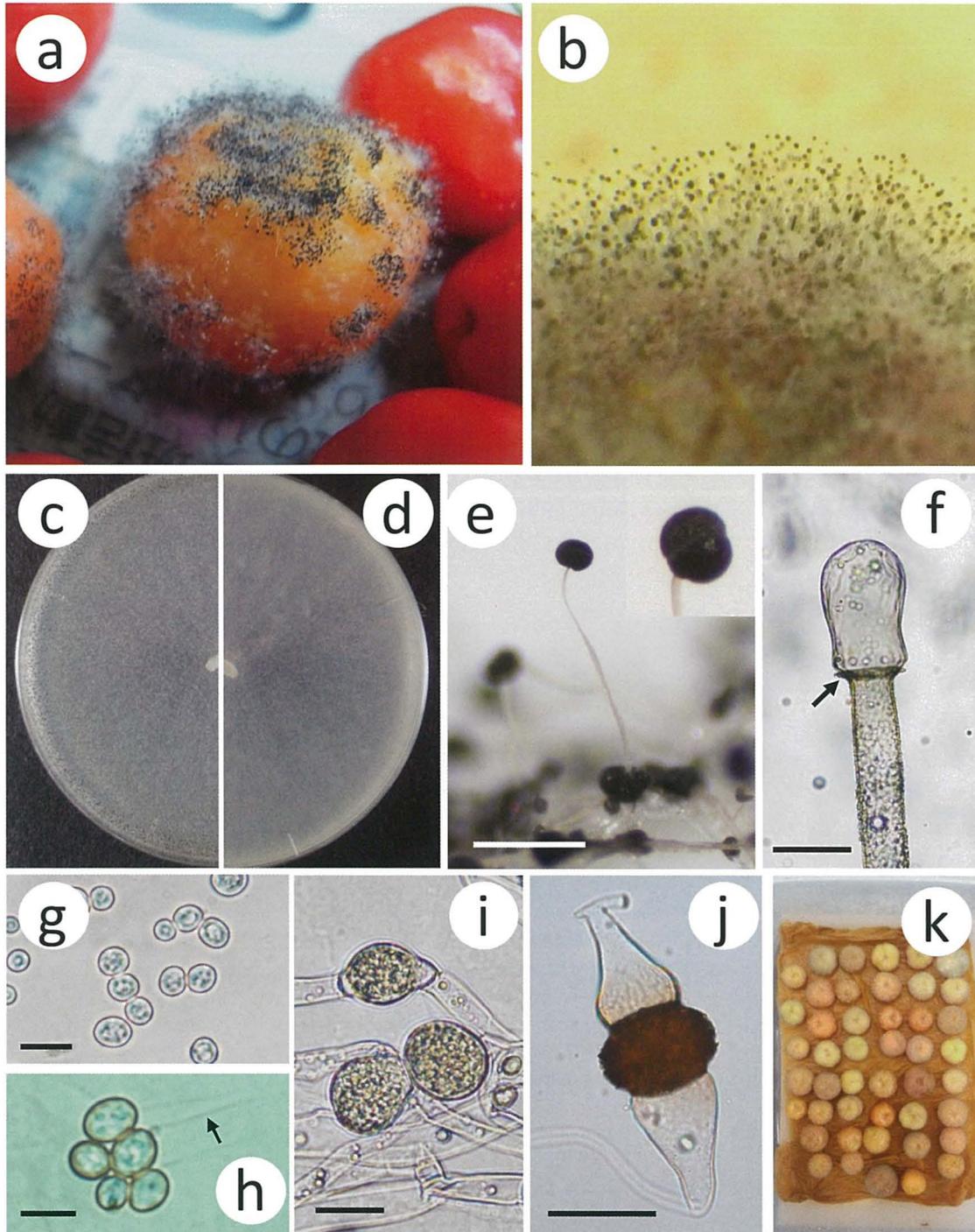


Fig. 1. Fruit rot on Barbados cherry (acerola) and morphology of causal pathogen, *Gilbertella persicaria*.
 a: Fruit rot after natural infection (cv. Kanmikei).
 b: Abundant mycelial and sporangia produced on diseased acerola fruit.
 c, d: Colonies of isolate ItB-1 grown on PDA at 25°C in the dark for 7 days (c: surface side, d: reverse side).
 e: Sporangiophore and sporangia of isolate ItB-1 (scale bar = 300 μ m).
 f: Columella and subtending collar (arrow) of isolate ItB-1 (scale bar = 40 μ m).
 g: Sporangiospores of isolate ItB-1 (scale bar = 10 μ m).
 h: Sporangiospores with appendages (arrow) of isolate ItB-1 (scale bar = 5 μ m).
 i: Chlamydospore of isolate ItB-1 (scale bar = 20 μ m).
 j: Zygospore of isolate ItB-1 (scale bar = 50 μ m).
 k: Reproduction of symptoms 5 days after inoculation with isolate ItB-1.

上の菌叢から DNA を抽出後、ITS 領域をプライマー ITS1 と ITS4 (White *et al.*, 1990) で増幅し、得られた PCR 産物を ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) で精製後に 3130xl Genetic Analyzers (Applied Biosystems) にて塩基配列を決定した。なお、PCR 反応は 94°C 5 分間の熱変性後、94°C 1 分間、53°C 1 分間、72°C 2 分間を 35 サイクルで行い、最後に 72°C で 7 分間加熱した (Walther *et al.*, 2013)。これらを DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている塩基配列と相同性検索を行った結果、分離 2 菌株の ITS 領域の配列は既報の *Gilbertella persicaria* の同領域塩基配列 (Accession No. HM999958, JN206222 等, Walther *et al.*, 2013) と 99~100% の相同性が認められた。次に、*Gilbertella* 属を含むコウガイケカビ科 (*Choanephoraceae*) の 4 属 (*Choanephora* 属, *Blakeslea* 属, *Poitrasia* 属) とその他近縁のケカビ科 (*Mucoraceae*) に属する *Mucor* 属菌他の ITS 領域の塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースより取得し、それらの塩基配列と分離 2 菌株の塩基配列を、ソフトウェア Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) でアライメントを行い、ソフトウェア MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) を用いて、Kimura の 2 パラメータ法 (Kimura, 1980) に基づく近隣結合法にて系統関係を推定した。近隣結合法で得られた系統樹の各枝の支持率は、ブートストラップ検定 (Felsenstein, 1985) を 1000 回反復し、評価を行った。その結果、分離 2 菌株とそれらに近縁と考えられたコウガイケカビ科とケカビ科に属する 15 種 16 菌

株およびアウトグループ 1 菌株の合計 19 菌株の塩基配列データを用いた分子系統解析により、ItB-1 株および C6-5 株は *G. persicaria* と同一のクレードに所属した (Fig. 2)。

分離 2 菌株の PDA 培地上の菌叢は、初め白色で後に灰黒色となり菌叢表面には多数の黒色小粒状の胞子のうを形成した (Fig. 1c, d)。胞子のう柄は無隔壁で、無色から淡褐色、大きさは ItB-1 株で 0.6~1.4 mm×18.6~43.3 μm (平均 0.9 mm×26.3 μm)、C6-5 株で 0.6~1.3 mm×19.5~40.0 μm (平均 0.9 mm×29.3 μm) であり、基部からまっすぐに伸びる場合や上部がわずかに湾曲する場合もみられた (Fig. 1e)。胞子のう柄は、胞子のう柄に頂生し、球形、茶褐色から黒色となり、大きさは ItB-1 株で直径 77.1~175.0 μm (平均 123.3 μm)、C6-5 株で直径 79.1~188.4 μm (平均 117.0 μm) であり、2 つに割れる溝を有する特徴が観察された (Fig. 1e)。柱軸は楕円形、円筒形、洋梨形で無色から淡褐色、大きさは ItB-1 株で 49.9~105.8 μm×32.3~72.7 μm (平均 80.7×51.0 μm)、C6-5 株で 52.5~133.0 μm×33.3~88.7 μm (平均 86.2×54.5 μm) であり、基部にはカラー (襟) が観察された (Fig. 1f)。胞子のう胞子は球形、卵形、楕円形ないし紡錘形で無色、大きさは ItB-1 株で 6.6~9.7 μm×5.6~8.5 μm (平均 8.2×7.3 μm)、C6-5 株で 6.8~9.8 μm×5.7~7.7 μm (平均 8.0×6.6 μm) であり、両端には複数本の付属糸を有し、細胞表面の綾線と細胞内の油胞 (Fig. 1g, h) が観察された。厚壁胞子は単生、まれに連鎖し、球形、卵形、樽形で淡褐色から褐色、粒状また

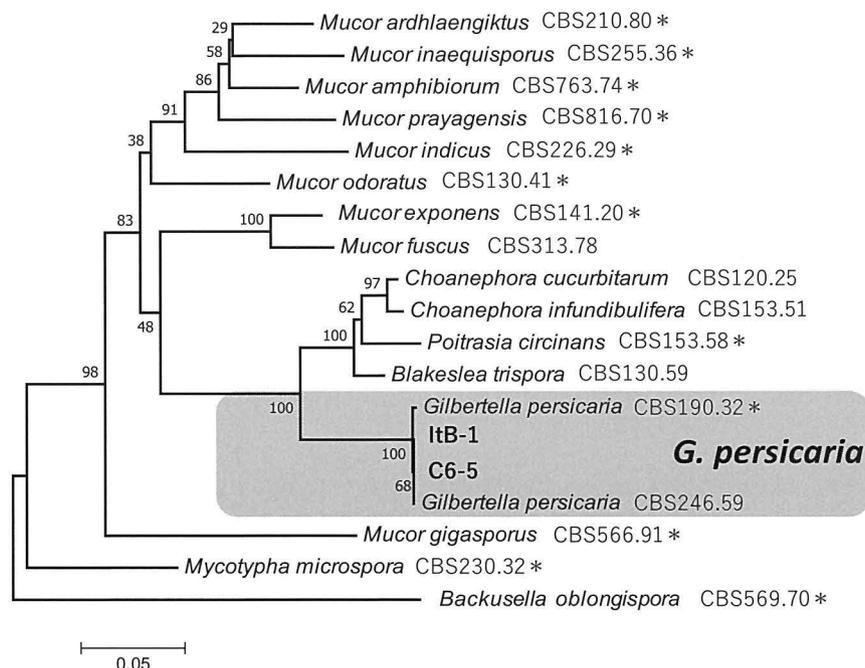


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on the ITS sequence for the *Choanephoraceae* and *Mucoraceae* groups. Values at the branches indicate percentage bootstrap support for 1000 resamplings. *Backusella oblongispora* (CBS569.70) was included as the outgroup (*ex-type strain).

Table 1. Comparison of morphological characters of isolate ItB-1 and C6-5 with previously reported characters of *Gilbertella persicaria*

Isolate or species	Sporangiophore	Sporangium	Columella	Sporangiospore	Chlamydospore	Zygospore
ItB-1	Typically unbranched, erect or sometimes curved, hyaline or light brown, not septate; 0.6–1.4 mm (ave. 0.9 mm) long, 18.6–43.3 µm (ave. 26.3 µm) in diameter	Globose, brown to black, generally erect, sometimes nodding, wall persistent, granular and minutely roughened, divided longitudinally; 77.1–175 µm (ave. 123.3 µm) in diameter	Oval or cylindrical, pyriform, hyaline or light brown, smooth walled, granular materials, with a slight basal collar; 49.9–105.8 × 32.3–72.7 µm (ave. 80.7 × 51 µm)	Globose, fusiform or ellipsoid to ovoid, hyaline, indistinct longitudinally striated, with hyaline droplets and appendages; 6.6–9.7 × 5.6–8.5 µm (ave. 8.2 × 7.3 µm)	Solitary or rarely in chains, Globose, ovoid, doliform, cylindrical, thick walled, light brown to brown, contents granular or with oil droplets; 19.7–32.1 × 19.2–28.9 µm (ave. 25.7 × 23.5 µm)	Globose or subglobose, compressed between suspensors, brown, covered with blunt or sometimes acute projections; 35.3–75.5 µm (ave. 54.3 µm)
C6-5	Typically unbranched, erect or sometimes curved, hyaline or light brown, not septate; 0.6–1.3 mm (ave. 0.9 mm) long, 19.5–40 µm (ave. 29.3 µm) in diameter	Globose, brown to black, generally erect, sometimes nodding, wall persistent, granular and minutely roughened, divided longitudinally; 79.1–188.4 µm (ave. 117 µm) in diameter	Oval or cylindrical, pyriform, hyaline or light brown, smooth walled, granular materials, with a slight basal collar; 52.5–133 × 33.3–88.7 µm (ave. 86.2 × 54.5 µm)	Globose, fusiform or ellipsoid to ovoid, hyaline, indistinct longitudinally striated, with hyaline droplets and appendages; 6.8–9.8 × 5.7–7.7 µm (ave. 8 × 6.6 µm)	Solitary or rarely in chains, Globose, ovoid, doliform, cylindrical, thick walled, light brown to brown, contents granular or with oil droplets; 18.2–31 × 14.9–24.7 µm (ave. 23.5 × 20.5 µm)	Globose or subglobose, compressed between suspensors, brown, covered with blunt or sometimes acute projections; 42.1–74.8 µm (ave. 56 µm)
<i>G. persicaria</i> ¹⁾	Typically unbranched, erect or sometimes curved, hyaline or light brown, not septate, enlarging above and reduced just below sporangia; 0.5–6.7 mm (ave. 3.3 mm) long, 10–50 µm (ave. 27.3 µm) in diameter	Globose, brown to black, generally erect, sometimes nodding, wall persistent, granular and minutely roughened, divided longitudinally; 50–150 µm (ave. 105.5 µm) in diameter	Oval or cylindrical, pyriform, hyaline or light brown, smooth walled, empty or granular materials, with a slight basal collar; 50–100 × 42.5–80 µm (ave. 73.4 × 60.4 µm)	Globose, fusiform or ellipsoid to ovoid, hyaline, indistinct longitudinally striated, with hyaline droplets and appendages; 6–12 × 4–11 µm (ave. 8.1 × 7 µm)	Solitary or rarely in chains, globose, ovoid, doliform, cylindrical, thick walled, light brown to brown, contents granular or with oil droplets; 10–35 × 10–30 µm (ave. 27.3 × 16.8 µm)	Globose or subglobose, compressed between suspensors, golden brown or brown, covered with blunt or sometimes acute projections. 42.5–92.5 µm (ave. 66.6 µm)
<i>G. persicaria</i> ²⁾	Typically unbranched, erect hyaline below, light brown to grayish blue above, not septate, enlarging gradually above to the region of the curvature and reduced just below sporangia; 3–4 mm long, 40–50 µm in diameter	Globose to somewhat dorsiventrally flattened or irregularly globose, light brown to bluish or purplish gray, erect or more typically circinate or nodding, wall persistent, granular and minutely roughened, breaking into two equal pieces; 40–260 µm in diameter	Variable in shape depending on size, oval or cylindrical pyriform, hyaline, light brown or bluish or purplish grey, smooth walled, empty or oil droplets or granular material, with collar; 40–119 × 20–170 µm	Globose, short oval and rather irregular in shape with a papilla at either end, hyaline, thin and smooth walled, with one or more colorless droplets inside, with appendages; 5–13 × 4.5–11 µm	Typically intercalary, solitary or in chains, cylindrical, oval, globose or irregular, thick-walled, hyaline or faintly yellow walls, contents granular or with oil droplets; 14–28 × 20–32 µm	Globose or compressed between the suspensors, golden brown or brown but singly never black, covered with blunt or sometimes acute projections; 35–90 µm (mostly 70–80 µm)

1) Taba *et al.* (2011).

2) Hesseltine (1960).

は油滴状の内容物を含み、大きさは ItB-1 株で $19.7\sim 32.1\times 19.2\sim 28.9\ \mu\text{m}$ (平均 $25.7\times 23.5\ \mu\text{m}$), C6-5 株で $18.2\sim 31.0\ \mu\text{m}\times 14.9\sim 24.7\ \mu\text{m}$ (平均 $23.5\times 20.5\ \mu\text{m}$) であった (Fig. 1i). 分離 2 菌株を海外で保存されている異なる交配型 (一) の菌株 (NBRC6666: 植物防疫所の輸入検疫有害菌譲受許可を得て入手) と交配実験 (20°C 条件下, PDA 培地で 3 日間対峙培養) を行ったところ, 接合孢子支持柄間に接合孢子が形成された. 接合孢子は球形または垂球形, 褐色から茶褐色で粗面, 鈍角ときに鋭角な突起物を有し, 大きさは ItB-1 株で $35.3\sim 75.5\ \mu\text{m}$ (平均 $54.3\ \mu\text{m}$), C6-5 株で $42.1\sim 74.8\ \mu\text{m}$ (平均 $56.0\ \mu\text{m}$) であった (Fig. 1j). 国内外でモモおよびピタヤの病原として既に報告があり, *Gilbertella* 属で 1 属 1 種の構成種である *G. persicaria* (Hesseltine, 1960; 田場ら, 2011) との形態比較を行った結果, 孢子のう柄の長さが分離 2 菌株でやや短い傾向を示したが, その他の項目の形態的特徴は概ね一致した (Table 1). さらに, 分離 2 菌株の生育温度を調べるために, PDA 培地上で 25°C, 暗条件で 7 日間培養した後, コルクボーラー (直径 4 mm) で打ち抜いた菌叢片を PDA 培地の中央に置床し, 5~40°C の 8 段階の温度区で暗条件下, 培養 2 日後の菌叢直径を調査した. その結果, 分離 2 菌株の菌糸は 15~35°C の範囲で生育し, 適温は 25~30°C 付近であったことから, これらの培養特性も既報の *G. persicaria* (Hesseltine, 1960; 田場ら, 2011) の特徴とほぼ一致した. 以上の形態的特徴, 培養特性ならびに ITS 領域の部分塩基配列に基づく分子系統解析による既知種との比較により, 分離 2 菌株を *Gilbertella persicaria* (E.D. Eddy) Hesseltine と同定した. なお, 本研究で明らかにした ITS 領域の塩基配列は DDBJ に登録・公開し (ItB-1 株: Accession No. LC496067, C6-5 株: LC496068), 今回供試した 2 菌株は農業生物資源ジーンバンクに MAFF247155 (=ItB-1 株) および MAFF247156 (=C6-5 株) として寄託した.

分離 2 菌株の病原性の有無を確認するために, アセロラ果実に対する接種試験を行った. 分離菌株を PDA 培地上に 25°C 暗黒下で 7 日間培養し, シャーレ内の培養菌叢に滅菌水を注ぎ, 滅菌した筆で培地表面をよく懸濁した. ピーカーにガーゼを二重に張り, 上記懸濁液中の菌糸片などを濾し取り, 1×10^5 個/ml の孢子のう孢子浮遊液を作製し, 展着剤として Tween 20 を 0.02% 添加したものを接種源とした. 接種は収穫当日のアセロラ成熟果 (甘味系在来種) の果皮表面に, 滅菌した柄付き針で 1 果につき 4 カ所付傷し, その上から分離菌株の孢子浮遊液を 1 果につき 0.7 ml 噴霧した. 供試果実は 1 菌株につき 45 果ずつ準備し, 各菌株をそれぞれに接種した. なお, 対照区は付傷後に同濃度の Tween 20 を添加した滅菌水のみを噴霧した. 接種果実は直

ちにプラスチック製密閉容器内で保湿し, 27°C に設定した暗室内で静置して病斑形成ならびに腐敗の有無を調査した. その結果, いずれの菌株についても接種した全ての果実において, 接種 3 日後から接種部位の果皮に褐色で水浸状の病斑が形成され, 接種 5 日後には果実全体が軟化・腐敗した (Fig. 1k). また, 腐敗部位は薄い白色菌糸がくもの巣状に覆い, その上に黒色小粒の孢子のうが豊富に形成された. これらの症状はいずれも原病徴と一致し, 病斑部からは接種菌が再分離された. 一方, 対照区では発病は認められなかった. 以上の結果より, 分離 2 菌株が本病害の病原であることが明らかになった. さらに, 宿主範囲を確かめるために, 我が国で *G. persicaria* の宿主として既に報告のあるピタヤ (田場ら, 2011) に対する含菌寒天ディスクを用いた接種試験を行った. 接種源は PDA 培地で 2 日間培養して得られた分離 2 菌株の菌叢を直径 4 mm のコルクボーラーで打ち抜き, 接種用のディスクとした. 接種はピタヤ (赤肉系統) の果実表面に滅菌した柄付き針で付傷し, その上に分離菌株の含菌寒天ディスクを貼り付けた. なお, 付傷後に無菌の PDA ディスクを貼り付けたものを対照区とした. 供試果実は 1 菌株につき 4 果を準備し, 各菌株をそれぞれに接種した. 接種果実はただちにプラスチック製密閉容器内で保湿し, 27°C に設定した恒温器内で静置して病斑形成の有無を調査した. その結果, 両菌株の全ての接種果実において, 接種 4 日後から接種部位に褐色円状の病斑が形成され, 接種 7 日後にはその病斑が拡大し, 果実全体が軟化・腐敗した. また, 病斑部からは接種菌が再分離された. これらの結果から, 野外におけるアセロラとピタヤ間の相互感染の可能性が示唆された.

以上の結果より, 出荷後のアセロラ果実に発生する腐敗症状は *G. persicaria* による病害であることが明らかになった. 本菌によるアセロラの病害は国内外共に未記録であることから, 新病害としてアセロラ実腐病 (英名: Fruit Rot) と命名することを提案する.

謝 辞

本研究を行うにあたり, 農業生産法人株式会社アセローラフレッシュの並里哲子氏, 並里康次郎氏には現地圃場の試料採集で多くのご助力をいただいた. また, 琉球大学農学部亜熱帯農林環境科学科の田場 聡教授には接合孢子の観察に関して有益なご助言をいただいた. ここに記して感謝の意を表す. 本研究は沖縄振興特別推進交付金「気候変動対応型果樹農業技術開発事業」の一環として行われたものである.

引用文献

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Hesseltine, C.W. (1960). *Gilbertella* Gen. Nov. (Mucorales). *Bull. Torrey Bot. Club.* 87: 21–30.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H. and Geiger, H.H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 22: 6115–6116.
- 田場 聡・仲里美音・那須奏美・澤岷哲也・諸見里善一 (2011). *Gilbertella persicaria* (Eddy) Hesseltine によるピタヤ茎腐病 (新称). *日植病報* 77: 291–294.
- 澤岷哲也・光部史将・宜保永堅・小波津明彦 (2018). *Colletotrichum tropicale* によるアセロラ炭疽病 (新称). *日植病報* 84: 282–286.
- 澤岷哲也・山城麻希・河野伸二・松村まさと (2020). *Gilbertella persicaria* によるアセロラ実腐病 (新称). *日植病報* 86: 77. (講要)
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Walther, G., Pawłowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodriguez-Tudela, J.L., Dolatabadi, S., Chakrabarti A. and de Hoog, G.S. (2013). DNA barcoding in *Mucorales*: an inventory of biodiversity. *Persoonia*. 30: 11–47.
- 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, New York.