

## ハウス栽培のイチゴ果実で発生した炭疽病の黒斑症状

奈尾雅浩

(愛媛県農林水産研究所 (病害虫防除所))

### Occurrence of black spot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on greenhouse-grown strawberry fruit

Masahiro NAO (Ehime Research Institute of Agriculture, Forestry and Fisheries, Plant Protection Office (Kaminanba-ko 311, Matsuyama, Ehime 799-2405))

In December 2009, a disease characterized by cavernous black spots was observed on strawberry fruit in a greenhouse in Ehime Prefecture, Japan. Conidia showing the typical characteristics of anthracnose formed on the lesions. In Ehime Prefecture, we had confirmed that the symptoms on leaves, petioles, stolons, or crowns were caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo. However, the development of this disease on the fruits of strawberry plants was unconfirmed. The pathogen was inoculated onto immature or mature fruit. Seven days after inoculation, the characteristic symptoms were reproduced on the immature fruit. The causal agent was identified as *C. gloeosporioides* on the basis of the morphological characters of the colonies, conidia, and appressoria on culture media. The morphological identification was supported by diagnostic PCR using primers specific to *C. gloeosporioides*.

### はじめに

2009年12月に愛媛県内のハウス栽培のイチゴ(品種: 紅ほっぺ)の果実表面または果梗に接したガク部分で黒変症状を示す被害が確認された。果実では陥没した黒斑を生じ、炭疽病菌の特徴を持つ分生子が多数形成されていた。愛媛県におけるイチゴ炭疽病の初発生は1973年に確認された(愛媛県, 1973)が、従来の病徴は、小葉、葉柄またはランナーの局部的症状や株全体の萎れを示し、果実での発病は未確認であった。

海外のイチゴは我が国とは異なり露地条件で栽培されることが多いため、本病による果実腐敗が発生し、被害はオーストラリア (Sturgess, 1958), アメリカ (Wright et al., 1960), インド (Singh, 1974) で確認されている。特に、フラン

スでの果実腐敗の発生は、経済上の大きなダメージを与えている (Denoyes-Rothan et al., 1999)。一方、国内では佐賀県で稲田・山口 (2006) が1998年10月下旬の促成栽培(ハウス栽培)で本病の果実被害の発生を確認している。佐賀県の発生はビニル被覆前に感染した炭疽病菌による果実腐敗として報告されていることから、愛媛県では発生時期や病徴が異なっている。このことから、愛媛県内の発生実態を明らかにし、現地の病徴再現と病原性の確認、分離菌の同定を行ったので、その結果を報告する。

本論に先立ち、現地圃場の発生調査にご協力いただいた愛媛県南予地方局産業経済部八幡浜支局産地育成室の伊藤博章氏、佐賀県における発生状況をご教示いただいた佐賀県農業試験研究センターの稲田稔氏に深謝する。

## 材料及び方法

### 1) 現地調査による病徴と発生条件の確認

2009年12月15日に現地調査を行い、園主からの発生状況の聞き取りを含め、果実、ガクに接した果梗の病徴把握、発生条件の解明につながる耕種概況を明らかにした。なお、発生圃場の品種は‘紅ほっぺ’、定植日は2009年9月27、28日、発生ハウスの面積は576m<sup>2</sup>であった。

### 2) 菌株の分離

採集した果実から組織分離を行った。すなわち、果実の病斑と健全部の境界を小切片状に切り出し、70%エタノール液と1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に順次30秒間ずつ浸漬し、表面殺菌を行った。分離用培地には、PDA培地（佐藤ら、1983、粉末寒天量：18g/l）にクロラムフェニコールを300mg/lとなるように添加し、上記の殺菌済み小切片を置床した。培養温度は28℃とした。培養5日後に生育した菌叢の一部を素寒天培地（粉末寒天量：18g/l）に移植し、形成された分生子を再び素寒天培地上で画線培養し、培養1日後に実体顕微鏡下で発芽菌糸を釣菌して単胞子分離株を得た。なお、以下の試験には対照菌株として1991年2月に愛媛県内で分離したAN-30菌株（MAFF241461）を供試した。

### 3) 分離菌の病原性と現地病徴の再現

接種に用いたイチゴ株は着果状態の品種‘紅ほっぺ’を直径15cmのポリポットに植え付け供試した。分離菌の接種は分生子懸濁液の噴霧で行った。すなわち、単胞子分離株のF2株、AN-30株を28℃で、PSA培地（佐藤ら、1983、粉末寒天量：18g/l）で5日間培養し、生育菌叢に傷を付けた含菌培地を切り出し、栄養成分のみを半量としたPSA培地に置床した。これを5日間培養して得た分生子を滅菌水で1×10<sup>5</sup>個/mlの分生子懸濁液を得た。接種後、25℃で1日間湿潤処理した後、人工気象室（小糸工業（株）製、2kKG-106SHLD-特）で気温25℃、光量子束密度281μmol/m<sup>2</sup>s（照度20000lux）、湿度80%、明条件16時間、暗条件8時間に設定した庫内に置いた。病徴は接種果実の熟度に分けて接種後

5、7、9日目に観察した。

### 4) 分離菌の同定

前培養したF2菌株を寒天培地ごと新たなPDA培地上（プラスチックシャーレ使用）に置床し、BLB蛍光灯（FL15 BL-B 15W ナショナル製）をシャーレ上蓋から約30cmの高さに設置し12時間日長で照射した。培養温度は25℃とし、培養5日後の菌叢の色調、菌核形成の有無、剛毛の形成の有無と分生子の形態特性を観察し、稲田・山口（2006）の調査結果と比較した。さらに、PCA培地（ジャガイモ・ニンジン各20g/l、煎汁1ℓ当たりの寒天粉末の量は15g）によるスライドカルチャーで形成された付着器の色調・形態・大きさを調査した。培養温度は25℃、培養期間は8日間とした。

### 5) PCRによる判別

単胞子分離株のF1、F2株、AN-30株をPD液体培地で5日間静置培養し、生育した菌叢をキムワイプで濾し取り、滅菌水で洗浄後、MagExtractor-Plant Genome-（東洋紡績（株）製）を用いてDNAを抽出した。PCRはタカラバイオ（株）製 TaKaRa Ex Taqを用い20μlスケールで反応させた。DNAテンプレート量は1μl（抽出DNAは500μlのミリQ水に溶解）とした。フォワードプライマーには、*Colletotrichum gloeosporioides*を特異検出できるCgIntプライマー（Mills et al., 1992）または、*Colletotrichum acutatum*を特異検出できるCaInt2プライマー（Sreenivasaprasad et al., 1996）を、リバープライマーにはITS4（White et al., 1990）を供試した。各プライマーは20pmol/μlに調整し0.5μlずつ添加した。PCR機器は日本バイオ・ラッドラボラトリーズ（株）社製のI Cycler（170-8720JA）を用いた。PCR反応は94℃・2分に続けて、94℃・30秒、62℃・30秒、72℃・30秒を35サイクル繰り返し、72℃・7分で最終伸長させた。PCR産物は1.5%アガロースゲルで100ボルト、45分間電気泳動し、目的の増幅産物を分画しCgIntとITS4では約450bp、CaInt2とITS4では約500bpに出現するバンドを確認し、上記の2菌株を判別した。

## 結 果

### 1) 現地調査による病徴と発生条件の確認

果実での症状は表面に窪みを伴う黒斑を示していた(第1図)。また、果実および果梗に接したガク部分にも黒変がみられていた。発生ハウスでは同時に灰色かび病の果実被害もみられていたが、灰色かび病とは、咲き終わった花びらの付着箇所から発病し、変色度合いは薄く、水浸状となることに注視すれば区別できた。果実、果梗の黒変箇所には炭疽病の特徴を示す分生子が多数形成されていた。発生農家の栽培ハウスは3棟あり、発生はハウス1棟に偏在していた。発生ハウスは他のハウスよりも排水性が悪く湿度の高い状態が続いていた。園主への聞き取りでは、果実被害に気が付いたのは12月であり冬期の間は発生が続き、発病果は収穫時に廃棄していたとのことであった。但し、累計の発生果率は数%であった。また、この圃場では、育苗中から炭疽病の発病がみられ、当該ハウスの本病被害による定植後の植え替え株数は300株(7.5%)であった。また、ハウスのビニル被覆は10月中下旬に、内張り被覆は11月下旬から行っていた。暖房機による加温は行っていなかった。

### 2) 分離菌の病原性と現地病徴の再現

第1表に示すように接種5日後には、未成熟、成熟果で発病し始め、未成熟果では、斑点状に薄く褐変した。成熟果は腐敗乾燥し、ミイラ状と

なっていた。果梗に接したガク部分にも黒変がみられていた。接種7日後には未成熟果で現地の病徴が再現された(第2図)。この症状は接種9日後も同様にみられていた。なお、対照菌株で供試したAN-30菌株の接種でも未成熟果の黒斑、成熟果の腐敗が発生した。なお、これらの発病果から組織分離を行ったところ、いずれの症状からも100%の分離率で他菌種が混在することなく接種菌が再分離された。

### 3) 分離菌の同定

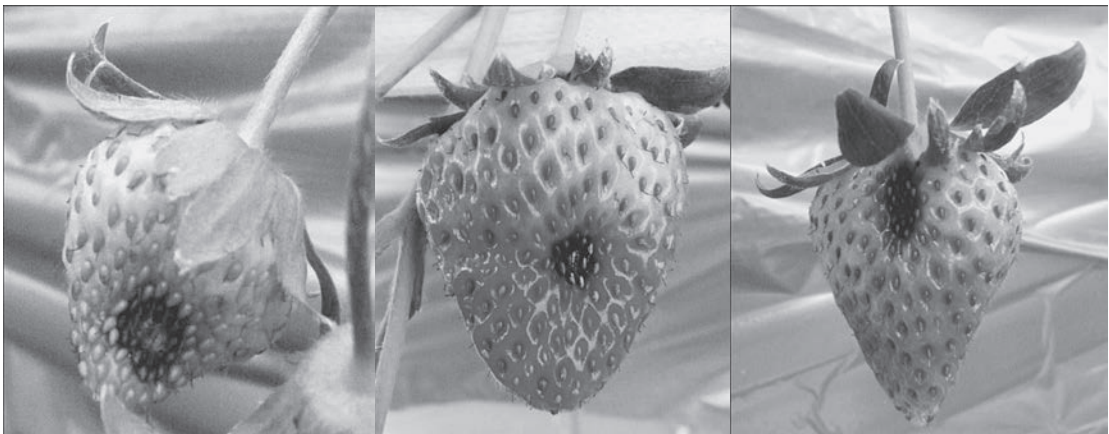
培養5日後には、培養菌叢の表側は灰白色、裏側は黒色を示し、剛毛は形成されなかった。F2菌株の分生子は無色単胞、円筒形で両端が丸く、大きさは $13.0\sim 17.0\times 4.0\sim 7.0\mu\text{m}$ であった(第2表, 第3図)。付着器は不整形、褐色で大きさは $6.0\sim 14.0\times 5.0\sim 10.0\mu\text{m}$ であった(第3表, 第3図)。これらの形態は、稲田・山口(2006)が同定した*C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardoとほぼ一致していた。

第1表 分離菌の接種により病徴発現した果実数

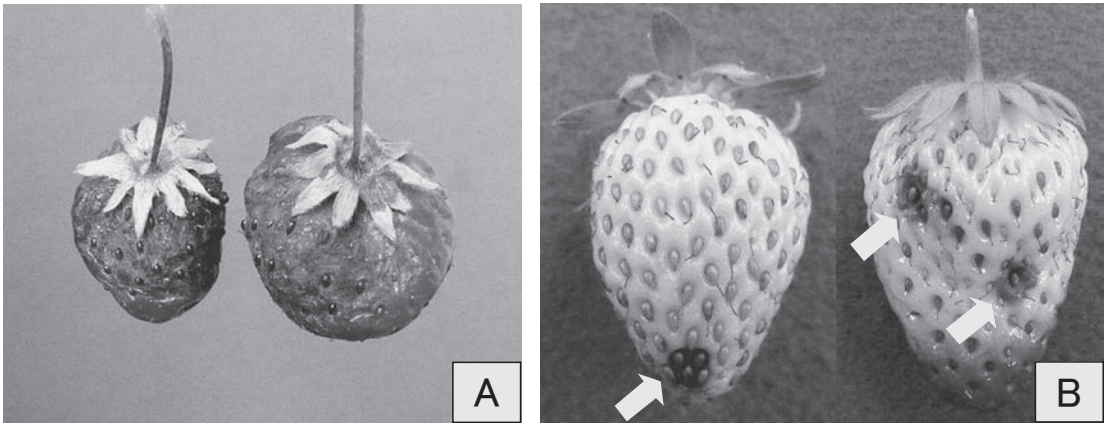
果実熟度	接種菌株	無発病	発病(少)	発病(多)
未成熟	F2	6	1	0
	AN-30	3	5	0
成熟	F2	0	3	5
	AN-30	0	1	5

接種5日後の結果。

成熟は、接種時には果実全体が赤熟していたことを示す。発病(少)は、果面の50%未満が発病。発病(多)は、果面の50%以上が発病。



第1図 現地で確認されたイチゴ果実の病徴  
発生確認:2009年12月15日, 品種:紅ほっぺ。



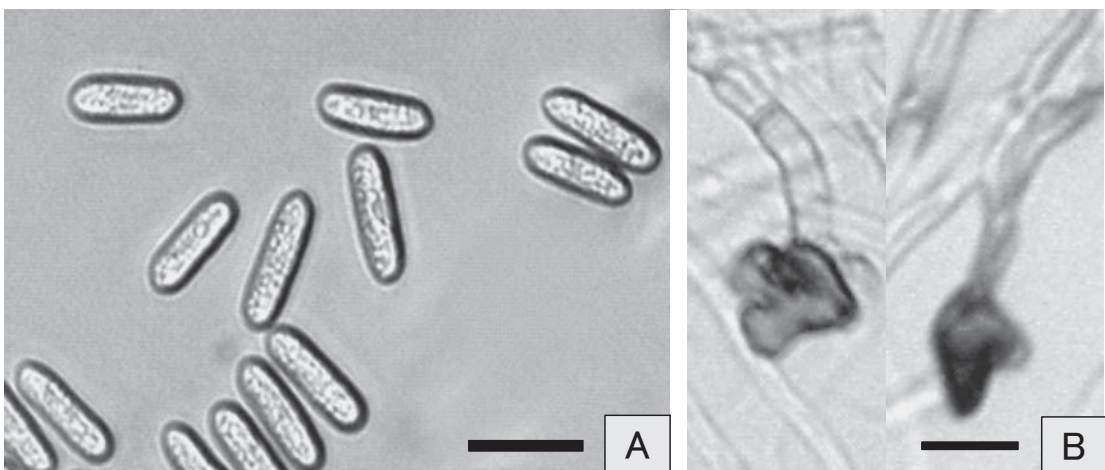
第2図 分離菌の接種によって発現した病徴

A：成熟果の発病（接種5日後），  
B：未成熟果の発病（接種7日後）。

第2表 分離菌と既報の*C. gloeosporioides*の分生子における形態比較

菌株名 (分離時期)	形態	大きさ ( $\mu\text{m}$ )	備考
F 2 (2009年12月)	無色，単胞， 円筒形	13.0～17.0×4.0～7.0 (平均：14.9×5.8)	PDA培地上で形成
AN-30 (MAFF241461) <sup>a)</sup> (1991年2月)	無色，単胞， 円筒形	14.0～24.0×4.0～6.0 (平均：16.2×5.6)	PDA培地上で形成
Cs-1 <sup>a)</sup> (1998年11月)	無色，1～2胞， 円筒形	13.8～17.5×5.0～5.8 (平均：15.1×5.5)	PDA培地上で形成 稲田・山口 (2006) の記載
Cs-3 <sup>a)</sup> (1998年11月)	無色，1～2胞， 円筒形	15.0～18.0×5.0～5.8 (平均：17.4×5.5)	PDA培地上で形成 稲田・山口 (2006) の記載

a) *C. gloeosporioides*と同定された菌株。



第3図 寒天培地上の分離菌の分生子と付着器の形態

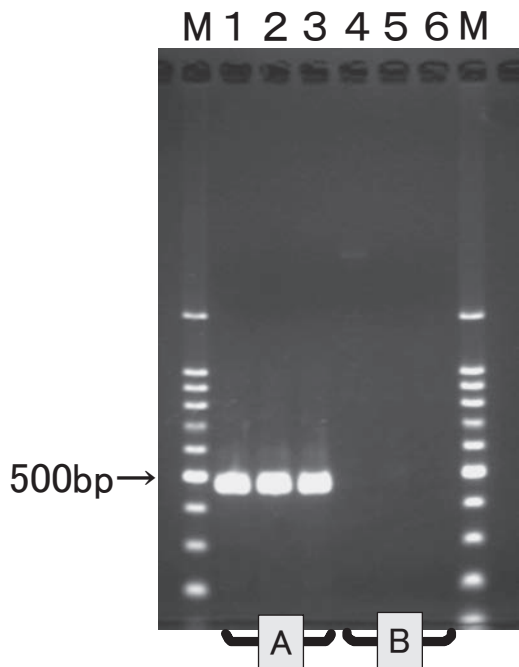
分生子 (A) はPDA培地，付着器 (B) はPCA培地上で形成。  
スケールは10 $\mu\text{m}$ 。



第3表 分離菌と既報の*C. gloeosporioides*の付着器における形態比較

菌株名 (分離時期)	形態	大きさ (μm)	備考
F2 (2009年12月)	不整形, 褐色	6.0~14.0×5.0~10.0 (平均:10.2×6.6)	PCA培地上で形成
AN-30 (MAFF241461) <sup>a)</sup> (1991年2月)	不整形, 褐色	7.0~14.0×6.0~10.0	PCA培地上で形成 1999年に大きさを計測
Cs-1 <sup>a)</sup> (1998年11月)	卵形~不整形, 暗褐色	6.7~16.1×4.7~10.5 (平均:10.7×7.6)	PCA培地上で形成 稲田・山口 (2006) の記載
Cs-3 <sup>a)</sup> (1998年11月)	卵形~不整形, 暗褐色	8.0~14.5×4.8~10.9 (平均:10.5×7.7)	PCA培地上で形成 稲田・山口 (2006) の記載

a) *C. gloeosporioides*と同定された菌株。



第4図 特異的なプライマーを用いたPCRによる  
*C. gloeosporioides*と*C. acutatum*の判別  
A :*C. gloeosporioides*の特異的プライマー供試。  
B :*C. acutatum*の特異的プライマー供試。  
M : サイズマーカー。  
1,4:F1, 2,5:F2, 3,6:AN-30各菌株のDNA供試。

#### 4) PCRによる判別

第4図に示すようにF1, F2株から抽出したDNAをPCRし、電気泳動を行ったところ、CgInt, ITS4の組み合わせ区で約450bpにバンドを生じ、両菌株は*C. gloeosporioides*と判別され、形態観察による同定結果が支持された。

#### 考 察

海外ではイチゴ炭疽病の果実被害はfruit rot (Denoyes-Rothan et al., 1999; Howard, 1972; Howard et al., 1992; Singh, 1974; Smith, 1998; Sturgess, 1958; Wright et al., 1960) と呼ばれている。また, Howard et al (1992) は品種'Pajaro', 'Irvine'のような炭疽病に感受性の高い品種では, 未成熟果も感染し, 暗茶色から黒色の病斑となることを報告している。1998年10月下旬に佐賀県で確認された症状は, 黒褐色で不整形の病斑を形成し, 症状が進んだものは果実全体が腐敗していたことが記録されている (稲田・山口, 2006)。愛媛県における炭疽病の果実症状は, 黒斑のみであり, 腐敗は認められなかった。分離菌株の接種を行った結果, 未熟果で現地の病徴が再現された。成熟果の病徴は腐敗しながら乾燥しミイラ状になりHoward et al. (1992) が示した病徴と一致したが, 本病徴は県内では確認されなかった。以上のことから, 愛媛県で確認された病徴から炭疽病菌の感染時期を判断すると果実が未成熟の状態に感染したことが推察された。なお, 佐賀県ではビニル被覆前の露地条件で炭疽病菌が果実に感染したとされているが, 愛媛県では, 発生時, ハウスは内張り被覆され, 第一果房となる果実の生育時には雨よけ状態であった。また, 愛媛県での発病果率は累計でも数%であったことも佐賀県での発病果率80%以上 (稲田・山口, 2006) と明らかに異なっていた。なお, 単孢子分離株のF2, AN-30を接種した結果, 成熟果の発病程度は高く感受性が高かった。このことは仮に愛媛県でも分生子が成熟果に飛散・感染していた場合, 更に発病果

率は高くなっていたものと思われる。一般に、炭疽病菌の分生子は粘着物質に覆われており、雨滴等の水しぶき等とともに飛散する (Fitt and McCartney, 1986) ため、雨よけ条件で分生子は飛散せず発病は抑制されるものとされている (秋田, 1993)。しかし、近年は森ら (2002)、稲田ら (2007) が雨よけ条件となるハウス内で本病の発病を確認している。稲田ら (2007) はハウス内の発病には子のう胞子の飛散が関与し、小葉に汚斑状病斑 (black leaf spot, Howard and Albrechts, 1983) が形成されたことを確認している。ところで、秋田 (1994) は雨よけ条件での発病抑制につながる原因には、イチゴ炭疽病菌がランナーを介して子株に伝染しないことを述べている。しかし、森ら (2002) は、この秋田 (1994) の見解では説明できないハウス環境下におけるランナー先端部の本病原菌の感染を確認している。今回、愛媛県内で果実発病を生じていたイチゴ株の小葉上に汚斑状病斑はみられなかったことから、本県内の果実発病は、子のう胞子の飛散によるものではなく、森ら (2002) の観察と類似する伝染法で引き起こされたものと推察した。

今回、愛媛県の寄生菌F2は分生子、付着器の形態的な特徴とF1、F2のPCR反応の結果から *C. gloeosporioides* と同定された。佐賀県では *C. acutatum* も発病果から検出され、病徴は両菌種で識別できなかったとされている (稲田・山口, 2006)。しかし、平子ら (2003) は、福島県で *C. acutatum* による果実被害は奇形のみであったと報告していることから、発生品種や環境条件によっては病徴が異なるものとみられる。

現在、愛媛県における果実発病は発生果率からみても被害果を収穫時に廃棄する耕種的防除で対応できるものと判断している。しかしながら、果実での被害は直接的な減収につながるため、今後も発生に注視する必要がある。また、今回の発生ハウスでも育苗中に炭疽病が多発していたことは看過できない。育苗時期の防除の重要性を再確認すべきである。

## 摘 要

1. 2009年12月に愛媛県内のハウス栽培のイチゴの果実で陥没した黒斑を生じる被害がみられ、

被害部には炭疽病菌の特徴を示す分生子が形成されていた。県内で確認されていた本病の病徴は、小葉、葉柄またはランナーの局部的症状や株全体の萎れであり、果実での発病は未確認であった。

2. 未成熟、成熟果に分離菌を接種したところ、7日後には現地の病徴が再現された。
3. 分離菌の培養コロニーの色調、分生子及び付着器の形態から *C. gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo と同定された。また、特異的プライマーを用いたPCR反応による判別によって、形態観察による同定結果が支持された。

## 引 用 文 献

- 秋田滋 (1993) : 雨よけ施設での底面給水によるイチゴ炭そ病の蔓延抑制効果. 関東東山病虫研報, 40:55~57.
- 秋田滋 (1994) : 防除技術セミナー いちご炭そ病 伝染経路がわかった. グリーンレポート No.207 ('94年5月1日号): 4~5.
- Denoyes-Rothan, B., Lafargue, M., Guerin, G. and Clerjeau, M. (1999) : Fruit Resistance to *Colletotrichum acutatum* in Strawberries. Plant Dis., 83:549~553.
- 愛媛県 (1973) : 昭和48年度病害虫の発生経過および原因解析, 昭和48年度病害虫発生予察事業年報 (普通作物) (愛媛県編):107~119.
- Fitt, B.D.L. and McCartney, H.A. (1986) : Spore dispersal in splash droplets. Water, fungi and plants (Ayres, P.G. and Boddy, L. ed.), CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge:87~104.
- Howard, C. M. (1972): A strawberry fruit rot caused by *Colletotrichum fragariae*. Phytopathology, 62:600~602.
- Howard, C. M. and Albrechts, E. E. (1983) : Black leaf spot phase of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (= *C. fragariae*). Plant Dis., 67:1144~1146.
- Howard, C. M., Maas, J.L., Chandler, C. K. and Albrechts, E. E. (1992) : Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum*

- complex in Florida. *Plant Dis.*,76:976~981.
- 稲田稔・古田明子・山口純一郎 (2007) : 子のう胞子によるイチゴ炭疽病 (*Glomerella cingulata*) の空気伝染. *日植病報*, 73:187.
- 稲田稔・山口純一郎 (2006) : 促成栽培イチゴにおけるイチゴ炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum* 及び *Colletotrichum gloeosporioides* による果実腐敗の発生. *九病虫研会報*, 52:11~17.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Brown, A.E. (1992) : Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.*, 98:137~144.
- 森充隆・十河和博・神余暢一 (2002) : イチゴ炭疽病菌の *nit* 変異菌株の作出とそれを利用した無病徴感染親株から子苗への伝染時期の把握. *日植病報*, 68:197.
- 佐藤昭二・後藤正夫・土居養二 (1983) : 培地の作製法. *植物病理学実験法*, 講談社サイエンスティフィク, 東京 :11~18.
- Singh, S. J. (1974) : A ripe fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*. *Indian Phytopathol.*, 27:433~434.
- Smith, B.J. (1998) : Anthracnose fruit rot (Black spot). *Compendium of strawberry diseases second edition* (Maas,J.L. ed.), APS PRESS, St. Paul:31~33.
- Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A.E., and Mills, P.R. (1996) : PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry, *Plant Pathol.*, 45:650~655.
- Sturgess, O. W. (1958) : A ripe fruit rot of the strawberry caused by a species of *Gloeosporium*. *Queensland J.Agr.Sci.*, 14:241~251.
- 平子喜一・堀越紀夫・吉田重信 (2003) : イチゴ花部に発生した *Colletotrichum acutatum* による被害, *北日本病虫研報*, 54:207.
- Wright, W.R., Smith,M.A.,Ramsey, G.B. and Beraha,L. (1960) : *Gloeosporium* rot of strawberry fruit. *Plant Dis. Repr.*, 44:212~213.
- White,T.J., Brus,T., Lee,S., and Taylor, J. (1990) : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR Protocols:a guide to methods and applications* (Innis,M.A., Gelfand, D.H., Sninsky,J.J.and White,T.J. ed.), Academic Press, San Diego:315~322.

