Colletotrichum acutatum Simmonds ex Simmonds によるオリーブ新梢枯死症

衣川 勝^{1,2*}・加藤 寛²・秋光 和也²

ABSTRACT

KINUGAWA, M.^{1,2*}, KATO, H.² and AKIMITSU, K.² (2008). Olive shoot dieback caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds. Jpn. J. Phytopathol. 74: 157–161.

Dieback of young shoot tips of olive (*Olea europaea*) have been observed frequently in recent years in orchards on Shodoshima Island, Kagawa Prefecture. The symptoms often develop on the entire branch and cause branch dieback. The major microbes isolated from the symptoms were *Colletotrichum* species, and *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds was frequently isolated. Inoculation with *C. acutatum* reproduced the same symptoms on olive shoots, and the fungus was reisolated from the symptoms, indicating that the causal agent is *C. acutatum*.

(Received August 6, 2007; Accepted November 26, 2007)

Key words: Shoot dieback, *Colletotrichum acutatum*, *Olea europaea*, Olive

オリーブの代表的な産地である香川県小豆島のオリーブ園場で、新梢・樹勢の良好な枝・苗木等に、これまでに良く知られている梢枯病の症状とは異なる枝枯れ症状が多発した。先に、原 (1958) は梢枯病によるオリーブの枝枯れ症状の原因菌として *Macrophoma oleae* (de Candolle) Berlese & Voglino を報告している。*Macrophoma* 属菌は、*Botryosphaeria* 属菌の不完全時代とされているが (小林, 1992), *Macrophoma* 属菌による枝枯れ症状は、*Diaporthe* sp. および *Botryosphaeria dothidea* による枝枯れ症状の例のように、樹勢の低下に伴い病原菌が侵入し発生する場合が多い (衣川・佐藤, 2003)。しかしながら、本研究で報告するオリーブの枝枯れ症状は、先端枝の枯死を伴い、樹勢の強い新梢、枝、苗木等に発生が多いことから、既知の枝枯れ症状を引き起こす病害とは異なると考えた。また、新梢に先端枯死症状が発生した後、これが枯れ込み症状へと進展することが明らかとなったため、新梢先端の枯死症状部位から病原菌の分離を行った。その結果、*Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds が高頻度で分離され、さらに本菌の接種試験で病徴が再現され、同菌が再分離されたことから、本症状は *C. acutatum* により引き起こされるオリーブの新梢枯死症であることが判明したので報

告する。

病徴 2006 年 6 月に、香川県旧池田町内の香川県農業試験場小豆分場と現地園場、および旧内海町内の 2 現地園場の計 4 オリーブ園場から、樹勢の良好な新梢の先端が枯死する症状が認められた。本病発生の初期には、苗木や成木の新梢先端の葉・枝が枯死する症状が見られ (Fig. 1A)、やがて病徴は梢の先端から基部に向かって進展して枯れ込み症状を呈する (Fig. 1B)。新梢の先端が枯死した症状が枯れ込み症状にまで進展するのは、水平方向に伸長している梢に比べて、垂直に伸長している梢の方が多い。このため、新梢が垂直に伸長する品種で発生が多く、樹形が直立型である品種‘ミッシェン’は、枯れ込み症状に進展する頻度が高い。同品種で新梢枯死症状を示した 31 垂直梢を調査した結果、90.3% が枯れ込み症状にまで進展した。さらに、病勢が進むと枝全体が枯れて、これが重症になると樹全体が枯れる場合もある。本症状は一般に、密植や混んだ枝により風通しの悪い園場に発生が多い。発生は梅雨時に最も多く、次いで秋雨時に多い。

土壌条件や除草剤の薬害による樹勢の低下と発病について調査した結果、多発園場の葉中の窒素成分量と病徴発現頻度に、特に顕著な関係は認められなかった。また高濃度の除

¹ 香川県農業試験場病害虫防除所 (〒761-8078 香川県高松市仏生山町甲 220) Kagawa Prefecture Agricultural Experimental Station Plant Protection Office, Busshozan, Takamatsu, Kagawa 761-8087, Japan

² 香川大学農学部 (〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393) United Graduate School and Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki, Kagawa 761-0795, Japan

* Corresponding author (E-mail: jp0510@pref.kagawa.lg.jp)

Fig. 1. Typical symptoms and an enlarged lesion of shoot dieback on olive.

A. Dieback symptoms appear on newly developed or developing shoots at early stage of the disease. B. Lesion of the dieback enlarges from the tip to bottom of the infected shoot and causes complete dieback. C. Typical colonies of *C. gloeosporioides* (Left) and *C. acutatum* (Right) on PDA plates. D. Conidia of *C. acutatum* isolated from shoot tip dieback. Scale bar: 10 μ m.

草剤処理試験でも、樹勢の低下による発病の頻度上昇は見られなかった。

病原菌の分離 前述の4オリーブ圃場で栽培されていた‘ミッション’、‘マンザニロ’および‘ルッカ’のオリーブ

Fig. 2. Mycelial growth of two isolates (B-1 and T-1) of *C. acutatum* at different temperatures on PDA for 5 days. The mycelial growth was determined by measurement of colony diameters on respective plates. Each data represents the mean of three independent replicates.

主要3品種から、先端枯死症状を呈する梢86本を採取し、健全部と枝枯部の境界部から菌の分離培養を行った。供試した梢の87.1%から *Colletotrichum* 属菌が分離されたが、同一切片から *Phomopsis* 属菌を含む複数の糸状菌が分離される場合も多かった。品種による各分離菌の検出頻度の違いは認められなかった。

分離された *Colletotrichum* 属菌の94.6%は、紡錘形で両端がやや尖った円筒形の分生子を主に形成し、菌叢が赤色を帯びていた。単胞子分離により分離菌株B-1、T-1、Op-3、B-2、B-3、Op-2を得て以下の実験に供試した。

分離菌の形態 分離した菌株の中からB-1、T-1、Op-3株を用いて、より詳細な形態観察を行った。PDA平板での菌叢は綿毛状で、始め白色で、後に灰白色を呈し、やがて赤桃色の分生子粘塊が密生し、菌叢の基底部分は赤桃色に着色し、*C. gloeosporioides* とは明らかに異なっていた (Fig. 1C)。分生子は無色単胞で、先端がやや尖った円筒形または紡錘形であり、大きさは $8.8\text{--}19.8 \times 3.5\text{--}7.0 \mu\text{m}$ (平均 $13.9 \times 4.9 \mu\text{m}$) であった (Fig. 1D)。また、ジャガイモ・ニンジン寒天培地

Table 1. Morphological characterization of conidia and appressoria of *Colletotrichum acutatum* isolated from olive shoot dieback

Isolate	Conidia		Appressoria	
	Shape	Size ^a (μ m)	Shape	Size ^a (μ m)
B-1	fusiform	11.3–19.8 $\times$ 3.5–5.5 (14.8 $\times$ 4.8)	clavate or slightly irregular	5.5–11.3 $\times$ 4.5–7.5 (8.2 $\times$ 5.7)
T-1	fusiform	10.3–19.8 $\times$ 4.3–7.0 (14.0 $\times$ 5.0)	clavate or slightly irregular	6.8–15.8 $\times$ 5.3–8.8 (10.3 $\times$ 6.9)
OP-3	fusiform	8.8–17.3 $\times$ 4.5–5.8 (13.0 $\times$ 5.0)	clavate or slightly irregular	—
<i>C. acutatum</i> ^b	fusiform	8.5–16.5 $\times$ 2.5–4	clavate or slightly irregular	8.5–10.0 $\times$ 4.5–6.0
<i>C. gloeosporioides</i> ^b	cylindrical	9.0–25.0 $\times$ 3.0–4.5	clavate or irregular	6.0–20.0 $\times$ 4.0–12.0

^a Means are in parentheses.

^b Sutton (1980).

Fig. 3. Neighbor-joining tree inferred from sequences of partial region of rDNA ITS region sequences from different *Colletotrichum* spp. using CLUSTAL W. Values at the branches of the radial tree indicate the percentage bootstrap support for 1000 resamplings. Scientific name of origins (host plants) of each isolate and the DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers of each sequence used in this analysis are listed (Nirenberg *et al.*, 2002; Talhinhas *et al.*, 2005). Isolate names and accession numbers of *Colletotrichum* spp. obtained from olive shoot dieback symptoms in this study are underlined.

(PCA) を用いたスライドカルチャー上に形成された付着器を観察した結果、分離菌株 B-1 および T-1 は褐色、棍棒状、時に不整形で大きさは $5.5\text{--}15.8 \times 4.5\text{--}8.8 \mu\text{m}$ (平均 $9.3 \times 6.3 \mu\text{m}$) であった (Table 1)。

これらの結果を Sutton (1980) が示した *C. acutatum* と *C. gloeosporioides* の分生子・付着器の形態および大きさと比較すると、これらの分離菌株は前者にほぼ一致した (Fig. 1, Table 1)。

生育温度 分離菌株 B-1, T-1 を PDA 培地上で、5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40°C の各温度下で 5 日間培養した結果、菌株 B-1, T-1 の最適生育適温は 25°C であった (Fig. 2)。

薬剤感受性 B-1 および T-1 菌株は、ベノミル剤添加 (1,250 ppm) PDA 培地、25°C 下 5 日間培養で生育が認めら

れた。3 反復の平均値による菌叢直径は、ベノミル剤無添加 PDA 培地上での生育を 100% とすると、B-1 菌株は 22.3% で、T-1 菌株は 23.4% であった。

同様に、ジエトフェンカルブ剤添加 (625 ppm) PDA 培地、25°C 下 5 日間培養で、菌叢直径を比較した。ジエトフェンカルブ剤無添加 PDA 培地上での生育を 100% とすると、それぞれ B-1 菌株 58.2%、T-1 菌株 57.2% であった。

佐藤 (1996, 1997) は *C. acutatum* および *C. gloeosporioides* の識別方法として、形態的特徴の観察、分離菌の生育速度に加え、ベノミル剤とジエトフェンカルブ剤に対する感受性の違いを報告している。*C. acutatum* はベノミル剤とジエトフェンカルブ剤の双方に耐性、*C. gloeosporioides* はジエトフェン

カルブ剤にのみ耐性である (佐藤, 1996, 1997). これらの識別方法で判定すると, 分離した菌株はベノミル剤とジェットフェンカルブ剤の双方に耐性を示したため, *C. acutatum* であると推定される.

分子系統学的手法による分類 上記の形態学的分類にさらに分子系統学的知見を加えるために, ITS 領域配列 (Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1), 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene および ITS2 を含む領域) を用いた系統解析を試みた. 解析には, B-1, T-1, Op-3, B-2, B-3, Op-2 株を用いた.

それぞれの供試菌株から調製したゲノム DNA 溶液を用いて, P3 プライマー [5'-GCCGCTTCACTCGCCGTTAC-3'] (Kusaba and Tsuge, 1995) と ITS5 プライマー [5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'] (White *et al.*, 1990) で PCR 反応を行った. PCR 反応終了後の PCR 産物は, pGEM®-T EASY Vector (Promega, USA) にサブクローニングし, プライマー SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATA-3') と T7 (5'-TAATACGACTCACTATA-3') を用いてジデオキシ法 (Sanger *et al.*, 1997) で配列を決定した. 決定したそれぞれの菌株の ITS 領域配列に, データバンクから取得した 40 種の異なる *C. acutatum* (490–493 bp) または *C. gloeosporioides* (482–485 bp) の ITS 領域配列 (Nirenberg *et al.*, 2002; Talhinhos *et al.*, 2005) を加えて, Clustal W プログラム (Thompson *et al.*, 1994) により系統樹を作成した (Fig. 3). その結果, B-1, B-2, B-3, Op-2, Op-3 および T-1 株は *C. acutatum* と同一のグループとなった. また, B-1 株は, シクラメン (*Cyclamen* sp.) に感染することが報告されている *Glomerella acutata* (*C. acutatum* の有性世代) の ITS 配列 AJ301982 (Nirenberg *et al.*, 2002) と 99% の相同性を示した. なお, 供試菌株の ITS 配列を, B-1 株は DDBJ/EMBL/GenBank accession 番号 AB305160, B-2 株は AB305161, B-3 株は AB305162, Op-2 株は AB305163, Op-3 株は AB305164 および T-1 株は AB305165 として登録した.

以上の形態, 薬剤耐性および系統解析の結果から, オリーブ新梢枯死症の病原菌を *C. acutatum* と同定した.

接種試験 圃場病徴部位から優占的に分離された *C. acutatum* 菌株のうち B-1 菌株を用いた接種試験を行った. 供試オリーブ品種 ‘ミッション’ には, 有傷および無傷接種を, ‘マンザニロ’, ‘ルッカ’ には有傷接種のみを行い, 何れの品種も 5, 6 年生の新梢からそれぞれランダムに選んだ 25 梢を供試した. 対照区として, 有傷または無傷の無接種区を設けた. B-1 菌株を PDA 平板で 25°C 下 10 日間生育させた後, 菌叢上の分生子を滅菌水に懸濁し, その懸濁液 (約 10^5 個/ml) にガーゼを浸漬して, これを立木の新梢の先端部から 1 ~ 3 cm の部分に巻きつけて無傷接種を行った. ガーゼを巻きつけた菌接種部を, 両角を切り取ったポリ袋 (10 × 15 cm)

で 3 日間被覆した後, 病徴進展を観察した. 有傷接種は, 枝の先端部約 1 cm に 5 本束ねた針で 3 ヵ所に傷をつけ, その部分に分生子懸濁液を含んだガーゼを同様に巻きつけた.

供試したいずれの品種でも, 有傷接種区では接種後 7 ~ 10 日で, 接種した梢の 100% で枯死症状が見られた. 無傷接種では接種後約 14 日で, 接種梢の 12% に先端枯死症状が見られた. また, 接種 4 ~ 5 週間後には接種垂直梢の大部分において, 先端枯死から枯れ込み症状にまで病徴が進展し, 原病徴を再現した. 接種した梢の新梢枯死症状および枯れ込み症状を呈した部位から, 接種菌が再分離された. なお, 有傷および無傷の無接種区では病徴は見られなかった.

新梢枯死症状から分離される菌株は, *C. acutatum* の比率が圧倒的に高く, また本菌の再接種により同じ症状を再現できた. 都崎・川原 (2001) は *C. acutatum* によるオリーブ炭疽病の発生について, 果実の分生子層の形成および葉に褐変症状を生じると報告した. しかし, 本症状は梢の先端から基部が枯れ込み, 枝全体が枯れるため, 明らかにオリーブ炭疽病の病徴とは異なる. 従って, 本症状は既知の病害とは異なり, 樹勢の強いオリーブの新梢, 枝, 苗木等に発生が多いことから, *C. acutatum* によるオリーブ新梢枯死症と呼称することを提案する.

引用文献

- 原 摂祐 (1958). オリーブの病害ショウコ (梢枯) 病. 植物防疫 12: 369–370.
- 衣川 勝・佐藤豊三 (2003). キウイフルーツ果実軟腐病菌 *Diaporthe* sp. および *Botryosphaeria dothidea* による枝枯症状. 日植病報 69: 373–383.
- 小林享夫 (1992). 植物病原菌図説 (小林享夫・勝本 謙・我孫子和雄・阿部恭久・柿島 真編). pp. 360–361, 全国農村教育協会, 東京.
- Kusaba, M. and Tsuge, T. (1995). Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-selective toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Curr. Genet. 28: 491–498.
- Nirenberg, H. I., Feiler, U. and Hagendorn, G. (2002). Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. Mycologia 94: 307–320.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463–5467.
- 佐藤豊三 (1996). 炭疽病菌の分類の問題点と同定法. 植物防疫 50: 273–278.
- 佐藤豊三 (1997). 多犯性炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum* の諸特性と同定法. 四国植防 32: 1–19.
- Sutton, B. C. (ed) (1980). The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Talhinhos, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. and Oliveira, H. (2005). Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level

- of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2987–2998.
- 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. Nucl. Acids Res. 22: 4673–4680.
- 都崎芳久・川原精剛 (2001). *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds によるオリーブ炭疽病の発生について. 四国植防 36: 7–17.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds) PCR protocols: A guide to methods and applications. pp. 315–322, Academic Press, San Diego, USA.