国産マンゴー炭疽病菌の完全世代 *Glomerella cingulata* の初確認

澤 岨 哲也^{1*}・佐藤 豊三²・亀川 藍¹・田場 聡³・諸見里善一³

ABSTRACT

TAKUSHI, T.^{1*}, SATO, T.², KAMEKAWA, A.¹, TABA, S.³ and MOROMIZATO, Z.³ (2013). First report of the teleomorph of *Glomerella cingulata* causing mango anthracnose in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 79: 10–14.

Isolates of a fungus isolated from anthracnose lesions on mango fruits in Okinawa produced perithecia on potato dextrose agar and were identified as *Glomerella cingulata* Group A (anamorph: *Colletotrichum gloeosporioides*) based on cultural and morphological characteristics, PCR assay using specific primers and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) sequence homology. Pathogenicity of the isolates to mango was demonstrated by placing mycelial disks on wounded healthy leaves and fruits and reisolating the fungus from the diseased fruit. This is the first report of confirming the production of perithecia by *G. cingulata* causing anthracnose of mango fruits in Japan.

(Received February 17, 2012; Accepted June 26, 2012)

Key words: anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella cingulata*, GPDH, mango

わが国のマンゴー (*Mangifera indica* L.) は、沖縄、鹿児島および宮崎県などの西南暖地において、着果安定や冬季の低温回避を目的としてハウス内で栽培されており、都市部や首都圏への出荷が盛んに行われている。国内で栽培されている主要品種‘アーウィン’は、独特の甘い香りと鮮紅色の果皮、柔らかい肉質などの特徴を有し、外観、品質ともに市場での人気が高く、高値で取引されている。その一方で、流通過程において炭疽病が発生し、深刻な問題となっている。本病に感染した果実は収穫時では外観上健全であっても、多くの場合輸送過程で黒色斑点が生じるため(澤岨ら, 2012)、経済的損失だけでなく市場や消費者からの信頼、さらには産地ブランドの評価にも悪影響を与える。したがって、圃場における根本的な防除対策の確立が急務となっている。

国内におけるマンゴー炭疽病は、*Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo および *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds の2種の糸状菌によって引き起こされ(中村ら,

1979; 田場ら, 2004)、いずれも不完全世代のみが確認されている。一方、本病の完全世代は、台湾においてマンゴー葉から分離された *C. gloeosporioides* が罹病葉および分離培地上で完全世代 *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & H. Schrenk を形成することが確認されているが(Ann, 1995)、わが国においてはこれまで未確認である。

マンゴー炭疽病菌の感染は、主に開花期(4月頃)の降雨による病斑部からの分生子の飛散で拡大するとされている(Arauz, 2000)。そのため、国内の多くの産地で出蕾期から収穫期にかけて、ビニール被覆による雨よけを行っている(米本, 2008)。それにもかかわらず、収穫後の果実で炭疽病が発生することから、雨滴以外の伝搬様式による病原菌の感染も考えられる。イチゴ炭疽病菌およびリンゴ炭疽病菌の子のう胞子は、圃場で空気伝搬することが報告されている(稲田・古田, 2011; Sutton and Shane, 1983)ことから、マンゴーにおける完全世代の確認は、わが国の雨よけ栽培における炭

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 独立行政法人農業生物資源研究所 (〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2) National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

³ 国立大学法人琉球大学 (〒903-0213 沖縄県西原町字千原 1 番地) Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

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

本研究で明らかになった塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースにアクセッション番号 AB723516 (MAFF242706), AB723517 (MAFF242707), AB723518 (MAFF242708), AB723519 (MAFF242709), AB723520 (MAFF243421) として登録した。

疽病菌の伝染環や生態を解明する上で重要な知見となる。そこで、沖縄県中部および南部地域から採集した炭疽病罹病果実から *C. gloeosporioides* を分離し、培地上において観察を継続した結果、その完全世代を確認したので報告する。

分離菌株 2008年8月に沖縄県うるま市および那覇市のマンゴー圃場より、外観健全な果実（品種：‘アーウィン’）をそれぞれ3果ずつ計6果採集し、プラスチック製密閉容器（48 cm × 31 cm × 29 cm）に入れ、27°C 暗室内で5日間追熟させた。その結果、果実表面に発生した黒色病斑部から大きさ3 × 3 mm程度の果皮組織を切り取り、70%エタノールに30秒間浸漬、滅菌水で2回洗浄し、2%素寒天平板培地に

置床した。暗黒条件下で25°C 3日間培養後、伸長した菌糸先端部をジャガイモ・ブドウ糖寒天平板培地（PDA）に移植した。その後、明条件下で25°C 10日間培養し、形成された分生子を用いて単胞子分離を行った。分離菌株 UA-1 および UC-1（うるま市産果実由来）、SA-1 および SB-1（那覇市産果実由来）を接種および同定に供試した。

分離菌株の同定 4菌株をPDA平板培地上で25°C、暗黒条件下の恒温器内で10日間培養した結果、はじめ白色、のちに灰白色を呈する菌叢が生じ、菌叢表面には鮭肉色の分生子塊および黒色微粒状の子のう殻を多数形成した（Fig. 1a）。そこで、子のう殻、子のう、子のう胞子および分生子につい

Fig. 1. Morphology of *Glomerella cingulata* (isolate UA-1) isolated from anthracnose lesion on harvest mango fruit in Okinawa Prefecture, Japan. a. Perithecia and conidial masses produced on potato dextrose agar plate. b. Conidia. c. Crushed perithecial with asci emergine. d. Asci containing ascospores. e. Ascospores. f. Perithecia produced on inoculated mango leaf. Scale bars: b–e=10 μ m, f=1 mm.

Table 1. Dimensions of morphological structures of fungal isolates from mango fruit and reported values for isolates of *Glomerella cingulata*.

Isolate or species	host	Perithecia (μm)	Asci (μm)	Ascospores (μm)	Conidia (μm)
UA-1	mango	76–210 $\times$ 78–166 (123 $\times$ 108) ^{a)}	73–93 $\times$ 10–13 (82 $\times$ 11)	15–20 $\times$ 5–8 (17 $\times$ 6)	13–17 $\times$ 5–7 (15 $\times$ 6)
UC-1	mango	75–275 $\times$ 63–152 (112 $\times$ 95)	53–80 $\times$ 8–15 (67 $\times$ 10)	15–23 $\times$ 5–6 (19 $\times$ 5)	13–18 $\times$ 4–6 (15 $\times$ 6)
SA-1	mango	73–344 $\times$ 62–317 (180 $\times$ 156)	53–73 $\times$ 8–13 (59 $\times$ 10)	15–20 $\times$ 5–8 (17 $\times$ 6)	13–16 $\times$ 5–8 (14 $\times$ 6)
SB-1	mango	82–207 $\times$ 66–160 (119 $\times$ 108)	50–88 $\times$ 9–13 (64 $\times$ 11)	14–18 $\times$ 5–8 (16 $\times$ 6)	15–18 $\times$ 5–7 (16 $\times$ 6)
<i>G. cingulata</i> GC-1 ^{b)}	mango	87–183 $\times$ 88–144 (118 $\times$ 108)	49–65 $\times$ 10–18 (57 $\times$ 12)	12–19 $\times$ 5–8 (16 $\times$ 7)	—
<i>G. cingulata</i> Na-3 ^{c)}	strawberry	110 $\times$ 170 (128)	50–73 $\times$ 8–13 (59 $\times$ 9)	16–18 $\times$ 5–6 (17 $\times$ 6)	16–21 $\times$ 4–6 (17 $\times$ 5)
<i>G. cingulata</i> ^{d)}	—	85–300	35–80 $\times$ 8–14 (42–60 $\times$ 10–12)	9–30 $\times$ 3–8 (12–24 $\times$ 4–6)	12–19 $\times$ 4–6

a) Numbers in parentheses are means.

b) Ann (1995).

c) Okayama and Tsujimoto (1994).

d) von Arx and Müller (1954).

—, no description.

て、マイクロスコープ顕微鏡 (VH-8000C, KEYENCE) および光学顕微鏡 (E600, NIKON) 下で形態を観察し、それぞれ 50 個体について大きさを測定した。その結果、分生子層に剛毛はなく、分生子は円筒形で両端が丸く、大きさ 13 ~ 18 $\times$ 4 ~ 8 (平均 15 $\times$ 6) μm であった (Fig. 1b)。子のう殻は黒色、球形~垂球形で大きさ 73 ~ 344 $\times$ 62 ~ 317 (平均 134 $\times$ 117) μm であった (Fig. 1c)。子のうは無色、こん棒形で大きさ 53 ~ 93 $\times$ 8 ~ 15 (平均 69 $\times$ 11) μm 、8 個の子のう胞子を単列に内包した (Fig. 1d)。子のう胞子は無色、単胞、楕円~円筒形でやや湾曲し、大きさ 14 ~ 23 $\times$ 5 ~ 8 (平均 17 $\times$ 6) μm であった (Fig. 1e)。これらは Ann (1995)、岡山・辻本 (1994) および von Arx and Müller (1954) の *G. cingulata* の記載とはほぼ一致した (Table 1)。

分離 4 菌株の 5 ~ 40°C (5°C 間隔) の各温度における PDA 上での菌叢生育を調査した。分離菌をあらかじめ PDA 平板培地上で暗黒条件下 25°C 5 日間培養した後、菌叢の周縁部を直径 5 mm の滅菌したコルクボーラーで打ち抜き、得られた含菌寒天片を新たな PDA 平板培地中央部に移植した。試験は 1 区あたり直径 9 cm のプラスチックシャーレ 1 枚を供試し、3 反復で行い、培養 5 日後の菌叢直径を測定した。その結果、生育温度は 10 ~ 35°C、生育適温は 25°C 付近 (直径 6 ~ 7 cm) で、対照菌株のイチゴ炭疽病菌 96C-1 (*G. cingulata*: MAFF243422, 佐賀県農業試験研究センター分譲株) と同様の生育温度パターンを示した。

分離菌の種特異的プライマーを用いた種の同定は、稲田・

山口 (2006) の PCR 検定法により行った。DNA 抽出は PDA 平板培地で 5 日間培養し、生育した菌叢から滅菌爪楊枝で気中菌糸をかきとり、1.5 ml マイクロチューブに入れ、電子レンジ (500 W) で 6 分間熱処理した後、Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いた。PCR 反応に供試するプライマーは、上流に CaInt 2 (Sreenivasaprasade *et al.*, 1996) または CgInt (Mills *et al.*, 1992) を、下流に ITS4 (White *et al.*, 1990) を用いた。PCR 反応液は、抽出 DNA 1 μl を鋳型として、各プライマー 0.5 μM 、dNTP Mixture 0.2 mM、Taq DNA Polymerase 1U、反応量を 20 μl とした。PCR 反応は 94°C で 4 分間の熱変性後、94°C 1 分間、59°C 2 分間、72°C 2 分間を 40 サイクル行い、最後に 72°C 7 分間加熱した。得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加) で電気泳動し、紫外線照射下で *C. acutatum* は CaInt 2 と ITS4 の組み合わせで約 500 bp 付近、*C. gloeosporioides* は CgInt と ITS4 の組み合わせで約 450 bp 付近のバンドの有無を観察した。なお、PCR の対照菌株として用いた *C. acutatum* (MAFF306409) および *C. gloeosporioides* (MAFF204188) はそれぞれ 500 bp、450 bp 付近でバンドを示すことが確認されている (澤岬ら, 2012)。その結果、分離 4 菌株すべてにおいて、*C. gloeosporioides* の種特異的な遺伝子断片 (450 bp) の増幅が認められた。

Weir and Johnston (2010) は、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 遺伝子領域による分子系統解析に基づき、*C. gloeosporioides* 種複合体を広義の *C. gloeosporioides* (Group A) と *Colletotrichum*

kahawae J. M. Waller & Bridge (Group B), *C. gloeosporioides sensu stricto* (Group C) および *Colletotrichum horii* B. Weir & P.R. Johnston. (Group D) に類別し, Group D を新種とした. そこで, 沖縄県名護市マンゴー圃場の罹病果実から分離した無性世代の炭疽病菌 *C. gloeosporioides* S754 を対照菌株として, 分離 4 菌株の GPDH 遺伝子領域をプライマー GDF1 および GDR1 (Templeton *et al.*, 1992) で増幅し, それぞれの塩基配列 (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AB723520=S754, AB723516=SA-1, AB723517=SB-1, AB723518=UA-1, AB723519=UC-1) を解析した. その結果, 分離 4 菌株間の相同性は 95.8%~100% であり, S754 と分離 4 菌株の配列は 96.2%~98.3% の相同性を示した. また, これら 5 菌株の塩基配列による BLAST 検索を行った結果, *C. gloeosporioides* Group A の配列 (GU174557, GU174560) と 97.6%~99.6% の相同性を示した. 一方, 分離 4 菌株と Group B (GU174562), Group C (GU174561) および Group D (GQ329680) との相同性は 86.4~91.8% であり, Group A との相同性よりも明らかに低かった. 今後, *C. gloeosporioides* 種複合体のさらなる再分類に伴い, 広義の *C. gloeosporioides* の学名が変更になる可能性はあるが, 上記の形態および培養的性質, 種特異的プライマーを用いた PCR の結果および GPDH 領域の塩基配列の相同性から, 供試 4 菌株を *G. cingulata* Group A と同定した. なお, これら菌株は, MAFF242706 (=SA-1), MAFF242707 (=SB-1), MAFF242708 (=UA-1), MAFF242709 (=UC-1) および MAFF243421 (=S754) として農業生物資源研究所に寄託した.

分離菌株の病原性 分離 4 菌株のマンゴー葉および果実に対する病原性を, 含菌寒天片を用いた接種試験で確認した. 供試菌株は上記 4 菌株に加え, 対照菌株として S754 の計 5 菌株を用いた. これらを PDA で 5 日間培養して得られた菌叢を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き接種用の含菌寒天片とした. 国頭マージ土壌を入れた園芸ポット (210 号) に定植したマンゴー (品種: 'アーウィン') 2 年生接ぎ木苗の若い未硬化葉に滅菌した柄付き針で付傷し, その上に供試菌株の含菌寒天片を貼り付けた. 接種葉を含む苗全体をポリエチレン袋で覆い, 27℃ の暗室内で 7 日間静置した. その後ポリエチレン袋を除去し, ガラス室に移し, 自然条件下で接種 15 日後まで発病の有無を観察した. また, 収穫直後の成熟果実 (果皮は鮮紅色を呈し, 光沢が出ていない状態) の表面を滅菌した柄付き針で付傷し, その上に供試菌株の含菌寒天片を置床した. 接種果実は, ただちにプラスチック製密閉容器 (48 cm × 31 cm × 29 cm) 内で保湿し 27℃ の暗室内に静置して, 菌接種 7 日後に病斑形成の有無を確認した. 葉および果実ともに無菌の PDA 寒天片を置床したものを対照区

とした. 葉では 1 菌株あたり 4 葉の 3 反復, 果実では 1 菌株あたり 1 果の 3 反復で試験を行った. その結果, すべての葉および果実において, 接種した部位から黒色円形の病斑が形成され, 病斑上には鮭肉色の分生子塊および黒色微粒状の子のう殻が多数形成された (Fig. 1f). また, 対照菌株の S754 の接種葉および果実では, 黒色の円形病斑が形成され, 病斑上では子のう殻は認められず, 鮭肉色の分生子塊のみが形成された. 一方, 対照区では発病は認められなかった. 5 菌株を接種した葉および果実の病斑部からは接種菌が再分離された. 以上の結果より, 分離 4 菌株のマンゴー葉および果実に対する病原性が確認された.

以上のことから, 沖縄産マンゴーの炭疽病罹病果実から分離された子のう殻形成菌は, *G. cingulata* であり, 子のう殻形成能を示さない既知のマンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* S754 と同一の Group A (Weir and Johnston, 2010) に属することが明らかになった. わが国ではマンゴー炭疽病菌の 1 種である *C. gloeosporioides* の完全世代 *G. cingulata* が確認されたのは本報告が初めてであることから, 同病原学名を *G. cingulata* に更新することを提案する.

本研究で明らかとなった完全世代は, 培地上および接種植物上で確認したものであり, 圃場では宿主樹体や残渣等の上で完全世代はいまだ確認されていない. 一方, 沖縄県全域で広く自生するヤブツバキから *G. cingulata* が分離されており (佐藤ら, 2003), リンゴやモモでは近隣のニセアカシアが炭疽病の伝染源になっている例もあることから (工藤, 1970; 小野ら, 1996), 圃場周辺の炭疽病罹病植物が, マンゴー炭疽病の感染源になる可能性もあり, 注意が必要である. 今後も継続して圃場およびその周辺で完全世代の探索を行い, 雨よけ栽培におけるマンゴー炭疽病の空気伝搬の可能性を探る必要がある.

謝 辞

本研究を行うにあたり, 菌株をご提供頂いた佐賀県農業試験研究センターの稲田 稔氏に厚く御礼申し上げます.

引用文献

- Ann, P.J. (1995). The sexual stage (*Glomerella cingulate*) of *Colletotrichum gloeosporioides* from mango, and effect of temperature and light on its reproduction. *Plant Pathol. Bull.* 4: 173-179.
- Arauz, L.F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Dis.* 84: 600-611.
- 稲田 稔・山口純一郎 (2006). 促成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.
- 稲田 稔・古田明子 (2011). 潜在感染株からの降雨および灌水

- によるイチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) の飛散. 九病虫研会報 57: 45–50.
- 工藤哲男 (1970). リンゴ炭そ病の感染源について. 秋田果試研報 3: 93–103.
- 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.
- 中村重正・小野里敏美・木村 智 (1979). 熱帯果樹の炭疽病に関する研究 第一報 各種果実に対する分離系の病原性について. 日植病報 45: 545. (講要)
- 小野光明・手塚誉裕・佐藤豊三・寺井康夫・舟久保太一 (1996). 山梨県におけるモモ炭疽病の発生と感染源について. 関東病虫研報 43: 109–112.
- 岡山建夫・辻本 昭 (1994). *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et Schrenk によるイチゴ炭そ病の発生とその病原性. 日植病報 60: 617–623.
- 佐藤豊三 (2003). 沖縄県における園芸作物病原菌等の収集と特性評価. 微探集報 15: 1–20.
- Sreenivasaprasad, S., Sharada, K. and Brown, A.E. (1996). PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathol. 45: 650–655.
- Sutton, T.B. and Shane, W.W. (1983). Epidemiology of the perfect stage of *Glomerella cingulata* on apple. Am. Phytopathol. Soc. 73: 1179–1183.
- 澤岨哲也・亀川 藍・河野伸二・田場 聡・諸見里善一 (2012). 沖縄県から出荷したマンゴー果実における炭疽病の発病推移および圃場採集した果実における2種病原菌の分離頻度. 熱帯農業 5: 20–24.
- 田場 聡・高江洲和子・大城 篤・諸見里善一・澤岨哲也 (2004). *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds によるマンゴー炭疽病 (病原追加). 熱帯農業 48: 57–61.
- Templeton, M.D., Rikkerink, E.H.A., Solon, S.L. and Crowhurst, R.N. (1992). Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Gene 122: 225–230.
- von Arx, J.A. and Müller, E. (1954). Die amersporen Gattungen der Pyrenomyceten. Beitr. Kripl. Schw. 11: 1–434.
- Weir, B.S. and Johnston, P.R. (2010). Characterization and neotypification of *Gloeosporium kaki* Hori as *Colletotrichum horii* nom. nov. Mycotaxon 111: 209–219.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Talor, 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.
- 米本仁巳 (2008). 新特産シリーズ マンゴー 完熟果栽培の実際. pp. 94–107, 農文協, 東京.