施設マンゴー果実における炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* の潜在感染とその感染時期

澤 岬 哲也^{1*}・田 場 聡²・諸見里善一²

ABSTRACT

TAKUSHI, T.^{1*}, TABA, S.² and MOROMIZATO, Z.² (2013). Latent infection on fruits and infection period of mango anthracnose fungi, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* in a rainout shelter. Jpn. J. Phytopathol. 79: 142–149.

To clarify the existence of latent infection and infection stages of the pathogens causing anthracnose on mangos grown in rainout shelters during bud formation, flowering, and the early stages of fruit set, we collected healthy-looking apical buds, flower buds, inflorescences and fruitlets and attempted to isolate the pathogens using an ethanol immersion treatment. We observed salmon-colored conidial masses on all organs sampled and isolated 34 isolates. Based on polymerase chain reaction analysis using species-specific primers, 23 isolates were identified as *Colletotrichum gloeosporioides* and the remaining 11 as *C. acutatum*; both were shown to be pathogenic to mango fruit (cv. Irwin). We generated a nitrate non-utilizing (*nit*) mutant of anthracnose fungus *C. gloeosporioides* isolate S754 (*nit1*) and used it in inoculation tests at various early stages of fruit set in an orchard to determine the time of infection. The *nit1* isolate was recovered from lesions on fruit with latent infections that were inoculated at each stage: apical bud (inoculated in January), flower bud (February), inflorescence (April) and fruitlet (May). The isolate was recovered in greatest quantity from fruit inoculated at the fruitlet stage and in lowest quantity from fruit inoculated at the apical bud stage. These results show that these two species of *Colletotrichum* may both be present in healthy-looking apical buds, flower buds, inflorescences, and fruitlets and that infection during flowering, fruit set or fruit enlargement may remain latent within plant tissues for long periods, only causing lesions in the fruit peel after harvest.

(Received August 22, 2012; Accepted January 28, 2013)

Key words: anthracnose, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, latent infection, mango, nitrate nonutilizing mutant

緒 言

わが国におけるマンゴー栽培は、当初、露地において開花期以降の降雨と湿度による炭疽病の発生で着果率が著しく低下し、経済的栽培が困難であった（安富ら、1982）。しかし、1975年以降に、1月の出蕾期から7月の収穫期にかけてビニール被覆による雨よけ栽培が導入されるようになり、九州、沖縄地域でマンゴーの施設栽培が急速に発展した（米本、2008）。主要品種アークマンは、独特の甘い香りと果皮の鮮紅色、柔らかい肉質など、外観、品質ともに市場の人气が高く、高値で取引されている。しかし、近年、出荷後の果実における炭疽病の発生が深刻な問題となっている。炭疽病は輸送過程で黒色円状の病斑が発症、進行するため、経済的損失

だけでなく市場や消費者の信頼、さらには産地ブランドの評価にも大きく影響を与える。そのため、生育期の圃場における防除対策が急務となっている。

マンゴー炭疽病は、*Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo（中村ら、1979）および *C. acutatum* J. H. Simmonds（田場ら、2004）の2種の糸状菌によって引き起こされるが、本病の主たる原因菌は *C. gloeosporioides* であると考えられている（澤岬ら、2012）。一般に、露地栽培における炭疽病菌の感染は、開花から着果期の降雨に伴う分生子の雨滴伝搬と植物表面の濡れ時間および温度が重要な要因とされている（Fitzell *et al.*, 1984）。一方、沖縄県の一般的なマンゴー栽培は、出蕾期の1月以降から収穫期の7月まで、ビニール被覆による雨よけ栽培が行われているため、分生子

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

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

の雨滴伝搬が起こる可能性は低い。それにもかかわらず、収穫後の果実で本病が多発しているため(澤岬ら, 2012), 雨よけ栽培下における炭疽病菌の伝染環はいまだ不明な点が多い。また, 果実では収穫時に外観上健全であっても, 保存中の迫熟にともない発病する潜在感染の特性が知られており(Arauz, 2000), その特性はマンゴー以外にモモ(Zaitlin *et al.*, 2000), アボカド(Binyamini and Schiffman-Nadel, 1972), パパイア(Dickman and Alvarez, 1983)およびカンキツ(Tokunaga and Ohira, 1973)など多くの果樹類で報告されている。潜在感染の形態は, マンゴー未熟果実の果皮上で病原菌の分生子発芽後に形成される付着器の感染糸(infection peg)から, クチクラ層に侵入する感染器官の角皮下菌糸(subcuticular hypha)によって成立していることが解剖学的研究によって報告されている(Simmonds, 1941)。しかし, それ以前の生育ステージ, すなわち出蕾から開花, 結実に至る過程における炭疽病菌の潜在感染の有無, 感染部位および感染時期については不明であり, 雨よけ条件下における適切な防除時期はいまだ解明されていない。本病に対する効果的な防除スケジュールを確立する上で, 圃場における潜在感染の実態ならびに感染時期を明らかにすることは極めて重要である。

そこで, 本研究ではイチゴ苗親株の炭疽病菌潜在感染株の診断で広く普及しているエタノール浸漬簡易検定法(Ishikawa, 2003)を用いて, 施設マンゴーの出蕾から開花, 結実に至る過程で潜在感染している炭疽病菌の検出と感染部位について調査した。また, イチゴの萎黄病菌(後藤ら, 2004)や炭疽病菌(石川ら, 1993)の動態解析の手法として確立されている硝酸塩利用能欠損変異株(*nit* 変異株)をマンゴー炭疽病の重要種とされる *C. gloeosporioides* から作出し, その変異株を用いた圃場接種(時期別)による病原菌の感染時期について調査を行ったので, その結果を報告する。

材料および方法

潜在感染している炭疽病菌の検出とその病原性 2007年1

月の出蕾期から4月の結実期にかけて, 沖縄県うるま市および糸満市の施設マンゴー各1圃場(品種:アーウィン)の樹上から, 外観上健全な頂芽(1月), 花芽(2月), 花序(3月)および幼果(4月)を採取した(第1図)。なお, 両圃場ともに1~4月にかけて葉, 枝および果房を含めた各部位での炭疽病の病徴は認められず, 試験期間中の殺菌剤の散布は行っていない。エタノール浸漬簡易検定はIshikawa(2003)の方法にしたがって行った。すなわち, 試料を水道水で洗浄し, 70%エタノールに60秒間浸漬後, 滅菌水で2回洗浄した。その後, 湿らせた濾紙を敷いた9 cm ガラスシャーレ内に試料を収め, 25°Cの暗室で12日間培養して試料表面に形成した鮭肉色の分生子塊の有無を調査した。各部位につき1樹2試料ずつ5樹より10試料を採取し, これを3反復行って計15樹の30試料を供試した。形成された分生子塊から分生子を白金耳で掻き取り, 画線培養により単胞子分離を行った。1試料に出現する複数の分生子塊から任意に1個を選び, 1分生子塊あたり1株の合計34菌株を分離した。分離菌の同定は以下の方法で行った。すなわち, ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天(PDA)培地を10 ml 分注した9 cm シャーレで分離菌を前培養し, 生育した菌叢先端を直径5 mm のコルクボーラーで打ち抜き, 新たに作製したPDA培地上の中央に置床した。これを25°Cの暗室で5日間培養し, 佐藤(1997)の同定法にしたがい, 分生子形態, 菌叢の色調, 菌叢直径を観察および計測した。また, 種特異的プライマーを用いたPCR検定による同定は, 稲田・山口(2006)の方法にしたがい以下の手順で行った。DNA抽出はPDA培地で5日間培養し, 各菌株の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 (Sreenivasaprasad *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 μ l を鋳型として, 各プライマー濃度 0.5 μ M,

第1図 炭疽病菌の潜在感染の有無を調査した外観上健全なマンゴー各部位
a: 頂芽(採取日: 2007年1月25日), b: 花芽(2月7日), c: 花序(3月13日), d: 幼果(4月13日)
図中の矢尻は採取部位, バーは1 cmを示す。

dNTP Mixture 0.2 mM, *Taq* DNA Polymelase 1U になるように混合し、反応量を 20 μ l 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 μ g/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、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 (澤舩ら, 2012)。

次に分離菌のマンゴー果実 (品種: アーウィン) 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 34 菌株を用いた。PDA 培地で 5 日間培養して得られた各菌株の菌叢を直径 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。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 $\times$ 31 cm $\times$ 29 cm) 内で保湿し 27°C の暗室内に静置して、接種 7 日後に病斑形成の有無を確認した。無菌の PDA 培地寒天片を置床したものを対照区とし、接種は 1 菌株あたり 1 果の 5 反復で行った。

nit 変異株の作出 *nit* 変異株の作出は、Puhalla (1985) の方法にしたがって行った。供試菌株として沖縄県名護市マンゴー圃場の罹病果実から分離した炭疽病菌 *C. gloeosporioides* S754 (MAFF243421) を用いた。最小培地 (ショ糖 30 g, 硝酸ナトリウム 2 g, リン酸 2 水素カリウム 1 g, 硫酸マグネシウム 7 水和物 0.5 g, 塩化カリウム 0.5 g, 寒天 20 g, trace elements solution 0.2 ml, 蒸留水 1 l) を基本培地とし、これに塩素酸カリウム (15 g/l) と L- アスパラギン (1.6 g/l) を加えた MMC 培地上に、25°C 暗黒下の PDA 培地で 5 日間培養した供試菌株の菌叢片を 4 シャーレに 20 個 (5 個/シャーレ) 置床した。置床 10 日後に生育した菌叢先端を滅菌した直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いて最小培地に置床し、気中菌糸がなく薄い菌叢を形成する株を *nit* 変異株とした。得られた変異株は Brooker *et al.* (1991) の方法にしたがい硝酸塩、亜硝酸塩、ヒポキサンチン、アンモニウム塩、尿酸の利用能により *nit1*, *nit2*, Nit3 および NitM の 4 種の表現型 (Phenotype) に分類した。すなわち、硝酸塩ナトリウムを含む最小培地を基本とし、窒素源として硝酸塩ナトリウムの代わりに亜硝酸塩ナトリウム (0.5 g/l), ヒポキサンチン (0.2 g/l), 酒石酸アンモニウム (1 g/l) または尿酸 (0.2 g/l) をそれ

ぞれ添加して作製した 5 種類の各培地上に、25°C 暗黒下の PDA 培地で 5 日間培養した *nit* 変異株の菌叢片を置床し、硝酸塩ナトリウムのみ利用できない (菌叢が生育しない) ものを *nit1*, 硝酸塩ナトリウム、亜硝酸塩ナトリウム、ヒポキサンチンおよび尿酸を利用できないものを *nit2*, 硝酸塩ナトリウムと亜硝酸塩ナトリウムを利用できないものを Nit3, 硝酸塩ナトリウムとヒポキサンチンを利用できないものを NitM として類別した。

nit 変異株の圃場接種による感染時期の検討 沖縄県農業研究センター内の施設マンゴー 10 年生樹 (品種: アーウィン) の出蕾から開花および結実期において、炭疽病菌の *nit* 変異株を用いた圃場接種による感染時期の調査を行った。供試菌株は前述の S754 株由来の *nit1* 株を用いた。あらかじめ *nit1* 株を Freeman *et al.* (2001) の Mathur's 培地 (酵母エキス 0.1%, バクトペプトン 0.1%, ショ糖 1%, 硫酸マグネシウム 7 水和物 0.25%, リン酸 2 水素カリウム 0.27%, 寒天 2%, イプロジオン 2.5 μ g, 乳酸 0.1%, 蒸留水 1 l) で 25°C の暗黒下に 7 日間培養後、培地上に形成した菌糸上の分生子塊に滅菌水を加え、分生子懸濁液 (1×10^3 個/ml) を作製した。雨よけ期間中である 2010 年 1 ~ 5 月の生育期に頂芽 (接種日: 1 月 13 日), 花芽 (2 月 15 日), 花序 (3 月 26 日) および幼果 (5 月 7 日) に対して 1 箇所につき約 20 μ l ~ 20 ml の分生子懸濁液を 1 樹あたり 5 箇所の計 4 樹 20 箇所にそれぞれ噴霧接種し、ビニールで覆い 48 時間多湿条件にして潜在感染を促した。その後は沖縄県果樹栽培要領 (沖縄県農林水産部園芸振興課編, 2003) にしたがって、着果、結実させ、収穫まで通常管理により栽培した。なお、圃場では 1 ~ 5 月にかけて葉、枝および果房を含めた各部位での炭疽病の病徴は認められず、試験期間中の殺菌剤の散布は行っていない。6 月 16 日 ~ 7 月 28 日に果実を収穫して 27°C の暗室内で保存、追熟させた。その結果、1 つの果実表面に発生した複数の黒色病斑から任意に 1 病斑を選び、病斑部から大きさ 3 $\times$ 3 mm 程度の果皮組織を切り取り、MMC 培地上に 1 シャーレあたり切片 5 個を置床した。25°C の暗黒下で 10 日間培養後、均一の白色菌糸の伸長が認められたものから 1 シャーレあたり 1 菌株を分離した。分離菌の *nit* 変異株の判定は、上記の最小培地に菌叢片を再度置床し、25°C の暗黒下で 5 日間培養後に薄い菌叢生育を示すことを確認した。また、表現型 (*nit1*) は上記の表現型類別用培地において硝酸塩ナトリウム、亜硝酸塩ナトリウム、ヒポキサンチン、酒石酸アンモニウムまたは尿酸の利用能を確認した。併せて上記 *C. gloeosporioides* の種特異的プライマーを用いた PCR 検定 (稲田・山口, 2006) により、遺伝子増幅 (約 450 bp 付近) の確認を行った。

第2図 エタノール浸漬簡易検定による炭疽病菌の分生子塊形成
a: 頂芽, b: 花芽, c: 花序, d: 幼果
図中の矢尻は鮭肉色の分生子塊, パーは5 mm を示す.

結 果

潜在感染している炭疽病菌の検出と分離菌の病原性

エタノール浸漬簡易検定により, 採取時期の異なる頂芽, 花芽, 花序および幼果の全ての部位で粒状, 鮭肉色の分生子塊の誘導形成が認められた (第2図). 分生子塊の形成については, 糸満市圃場では全ての部位で分生子塊の形成が確認され, 約10~17%の形成率を示した. また, うるま市圃場では頂芽での検出は認められなかったが, それ以外の部位では約17~20%の形成率で分生子塊の形成が認められた (第3図). 2圃場の各部位間における分生子塊の形成率について Kruskal-Wallis 検定を行ったが有意差は認められず, うるま市圃場での頂芽を除いた各部位では概ね同頻度に分生子塊が形成された. 2圃場において分生子塊より任意に分離した34菌株は分生子の形態, 培養性状および2種炭疽病菌の種特異的プライマーによるPCR検定により, 23菌株は *C. gloeosporioides*, 11菌株は *C. acutatum* と同定された (第1表). 両菌種の分離菌数について, 糸満市圃場ではほぼ同分離頻度

第3図 マンゴー各部位におけるエタノール浸漬簡易検定による炭疽病菌の分生子塊形成
図中のバーは標準誤差を示す.

であったが, うるま市圃場では Mann-Whitney's *U* 検定で有意差 ($p < 0.01$) が認められ, *C. gloeosporioides* がより多く分離された. 果実への接種試験において, 34菌株はいずれも接種部位に黒色円形の病斑を形成し, 病斑上には粒状, 鮭肉色の分生子塊が多数形成され, 果実に対する病原性を示した. 一方, 対照区では発病は認められなかった.

生育時期別に接種した *nit* 変異株の再分離

供試菌株の *C. gloeosporioides* S754 からは15菌株の *nit* 変異株が作出され, その表現型は, *nit1* が1菌株, *Nit3* が14菌株であった. このうち, *nit1* 株を用いて時期別の圃場接種を行った結果, 頂芽, 花芽, 花序および幼果に接種した枝で着果, 結実し, 無病徴の果実を収穫した. 収穫後の保存中において, 各接種時期の果実の果皮上には典型的な黒色円状の炭疽病の病斑が形成された. *nit* 変異株は全ての接種時期の果

第1表 潜在感染していた分生子塊から分離された炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* の分離菌数

供試部位	糸満市圃場		うるま市圃場	
	<i>C.g</i> ^{a)}	<i>C.a</i> ^{b)}	<i>C.g</i>	<i>C.a</i>
頂芽	1/3 ^{c)}	2/3	0/0	0/0
花芽	3/4	1/4	4/6	2/6
花序	2/5	3/5	6/6	0/6
幼果	3/5	2/5	4/5	1/5
計	9/17	8/17	14*/17 ^{d)}	3/17

a) *C.g* : *C. gloeosporioides*

b) *C.a* : *C. acutatum*

c) 分離菌数/分生子塊を形成した試料数

d) アスタリスクは *C.g* および *C.a* 間における Mann-Whitney's *U* 検定による有意差 ($p < 0.01$) があることを示す.

第 2 表 *Colletotrichum gloeosporioides* nit1 株の圃場接種による成熟果実の発病と再分離頻度

接種月日	接種部位	接種数	着果数	発病 果実数	nit1 株 分離果実数
1 月 13 日	頂芽	20	15	6	1 ^{a)}
2 月 15 日	花芽	20	20	16	1
3 月 26 日	花序	20	20	11	2
5 月 7 日	幼果	20	20	11	8

a) MMC 選択培地で病斑から nit1 株が再分離された果実数

実病斑部から再分離され、その分離果実数は頂芽接種では発病 6 果中 1 果、花芽接種では発病 16 果中 1 果、花序接種では発病 11 果中 2 果、幼果接種では発病 11 果中 8 果であった (第 2 表)。なお、再分離された 12 菌株は全て最小培地上で薄い菌叢生育を示し、表現型類別用培地では硝酸塩ナトリウムのみ利用できないことが確認された。また、いずれも *C. gloeosporioides* の種特異的プライマーによる PCR 検定で遺伝子の増幅 (約 450 bp 付近) が認められた。これらの結果から、分離菌は接種菌と同一の nit1 株であることが確認された。各接種時期の接種日から 2 日後までの施設内温度および湿度は、1 月 13 ~ 15 日の間でそれぞれ平均 13.0°C (最高 29.4°C, 最低 6.2°C) および平均 71.5% (最高 99.0%, 最低 26.0%,)、2 月 15 ~ 17 日で平均 16.5°C (最高 26.7°C, 最低 11.8°C) および平均 90.4% (最高 99.0%, 最低 59.0%), 3 月 26 ~ 28 日で平均 18.5°C (最高 33.4°C, 最低 9.0°C) および平均 62.9% (最高 99.0%, 最低 21.0%), 5 月 7 ~ 9 日で平均 24.6°C (最高 32.1°C, 最低 21.8°C) および平均 93.9% (最高 99.0%, 最低 59.0%) であった。

考 察

本研究では、マンゴー未熟果実以外の部位として新たに頂芽、花芽、花序および幼果でも 2 種の炭疽病菌 *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* が潜在感染していることを初めて明らかにした。これにより、2 種のマンゴー炭疽病菌の潜在感染は、外観上健全な頂芽、花芽、花序および幼果で既に混在して成立し、感染後は開花、結実、果実肥大から収穫に至る過程において長期間、植物組織内で潜伏し、収穫後の果皮上に病斑を形成することが示された。未熟果実における潜在感染は、果皮に含まれる抗菌成分である Resorcinols によって病徴の発現が抑制され、収穫後には果実熟度の進行とともに本物質が減少するため、完熟果実で発病が増加すると考えられている (Hassan *et al.*, 2007; Prusky and Keen, 1993)。本研究で供試した頂芽、花芽および花序においても潜在感染が認められたことから、これらの部位でも抗菌物質の関与が推察

されるが、未熟果実以外の部位における Resorcinols 含有の有無はいまだ明らかではない。今後、マンゴーの様々な植物部位における抗菌物質の有無と潜在感染との関連性について調査する必要がある。

イチゴの無病苗検定で普及しているエタノール浸漬簡易検定法 (Ishikawa, 2003) は、潜在感染しているマンゴー炭疽病菌の検出にも有効であることが本研究により初めて示された。これまでに、マンゴー病害における潜在感染した病原菌の検出は、Black Spot Disease の病原である *Alternaria alternata* で試みられている (Prusky *et al.*, 1981)。これは外観健全な果皮組織を 1% 次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌し、PDA 培地 (20 µg/ml チアベンダゾール含有) に置床して分離する方法であるが、著者らはマンゴー幼果を供試して、本法による潜在感染しているマンゴー炭疽病菌の検出を試みた結果、他の葉圏微生物が多く出現し、検出は困難であった (データ省略)。次亜塩素酸ナトリウムのみでは、マンゴー組織表面は親水性が低いために表面殺菌が不十分となり、結果として多くの雑菌が残存していたものと推察される。一方、エタノール浸漬簡易検定法は組織分離と比較して、検出を困難にする雑菌の影響が少なく、肉眼で識別可能な鮭肉色の分生子塊の形成を高率に誘導し、観察および分離も容易であった。また、本法は処理時間も短く、作業性も簡便であることから、生産現場におけるマンゴー炭疽病の発生予察ならびに無病苗検定に活用できると考えられた。現在のところ、エタノール浸漬による分生子塊の形成誘導機作については不明である。バナナ炭疽病では、潜在感染菌による発病が果実組織に侵入した菌糸によるものではなく、追熟時に付着器から再発芽して侵入した菌糸によることが知られている。また、バナナ炭疽病菌の付着器は、昇汞に耐性を示すことから耐久器官としての役割をもつと考えられている (Muirhead and Deverall, 1981)。白田 (1993) は、クワ炭疽病菌が潜在感染した葉の裏面に紫外線 (UV) を照射したところ、円形灰褐色の病斑が誘発されることを観察した。このように、炭疽病菌の付着器は物理的および化学的ストレスに耐性を示すことが考えられる。本研究においても、エタノール浸漬により分生子塊の形成が誘導されたことから、マンゴー炭疽病菌の付着器がエタノールに耐性を有していることが推察されるが、植物組織内で無病的に感染している菌糸による潜在の可能性もあり、潜在感染の形態については今後の研究課題と考えられる。

沖縄県内 2 圃場のマンゴー頂芽、花芽、花序および幼果に潜在感染していた 2 種の炭疽病菌分離株 (計 34 菌株) のうち *C. gloeosporioides* (23 菌株) が *C. acutatum* (11 菌株) より多く分離された。澤舩ら (2012) は、沖縄県全域のマンゴー圃場より採取した罹病果実から炭疽病菌を 150 菌株分離し、

そのうち約9割が *C. gloeosporioides* であったことから、*C. gloeosporioides* が圃場での優占種であり、炭疽病の原因菌として *C. acutatum* よりも重要種であると推察した。しかし、本研究では圃場別でみた場合、うるま市圃場では *C. gloeosporioides* が *C. acutatum* よりも有意に優占しているものの、糸満市圃場では2種の炭疽病菌がほぼ同頻度で分離されており、圃場によっては必ずしも *C. gloeosporioides* だけが重要種ではないことが示された。圃場間で2種病原菌の分離頻度が異なった要因の詳細は不明であるが、露地ビワの炭疽病菌では、*C. gloeosporioides* よりも *C. acutatum* が優占しており、その原因のひとつとして防除で使用されているベンズイミダゾール系薬剤に対する *C. acutatum* の感受性が低いことが考えられている（古賀，1999）。このことから、マンゴーにおいても登録農薬に対する2種病原菌間の薬剤感受性の違いと分離頻度との関連について検討する必要がある。

マンゴー果実における炭疽病菌の潜在感染がいずれの時期に成立したのか特定することは防除適期を明らかにする上で重要である。本研究ではマーカーとなるマンゴー炭疽病菌の *nit* 変異株を作出し、それを用いた時期別の圃場接種により検証を行った。その結果、頂芽、花芽、花序および幼果の各生育ステージ別に接種した全ての枝から潜在感染果実が収穫され、保存、追熟中に形成された黒色病斑から分離頻度には差があったものの接種菌である *nit1* 株が再分離された。本研究では接種された幼果由来の果実で最も高率に *nit1* 株が分離され、比較的早い生育ステージに接種された頂芽や花芽由来の果実からの分離頻度は低かった。寺本ら（2010）は、マンゴーの加温栽培において夜温管理（21℃）を行った5月から収穫までの期間が炭疽病の感染時期に相当し、その要因は外部気温の上昇により夜間の施設内湿度が高まり、炭疽病の発生に好適な環境条件となったためと推察している。本研究においても5月は沖縄では梅雨期にあたり、感染に好適な温湿度が十分に保持されていたことから、病原菌の潜在化の割合が高まったと推察される。一方、それ以前の接種時期で分離頻度が低下した要因として、接種日から2日後まで接種部位をビニールで覆うことにより湿度は十分確保されていたが、施設内の2日間の温度が平均 13.0℃（最高 29.4℃、最低 6.2℃）と、5月の平均気温と比較して明らかに低く、感染の適温に満たなかったことが考えられる。また、他の要因として、早いステージでの接種では、接種菌以外の多くの自然感染した炭疽病菌に *nit1* 株がマスクされてしまい、さらには接種後の生理落果や摘果によって、残る果実に対する *nit1* 株の優占頻度が低くなってしまったことが推察される。しかし、低率ながらも1月の圃場接種で収穫後の果

実に病斑形成が認められたことから、外部環境条件が整えば1月の出蕾期においても病原菌の潜在感染は十分可能であることが示唆された。以上より、圃場における炭疽病の防除対策は出蕾前の12月から予防的に行うことが重要であると考えられた。宮崎県におけるマンゴー農家の栽培実態から、薬剤散布回数が多いほど、また、殺菌剤の最終散布から収穫までの日数が短いほど炭疽病の発病果率が低い傾向であることが認められている（寺本ら，2009）。そのため、本病を圃場で効率的に防除するためには、国内における数種登録農薬を利用した出蕾前（12月）から収穫前（6月下旬の袋かけ）までのローテーション散布体系技術を確立する必要がある。

本研究の結果から、マンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* の *nit* 変異株を作出し、マーカーとして利用する実験手法は、病原菌の生態を解明する上で有効な方法であることが示された。なお、*nit* 変異株をマンゴー炭疽病菌のマーカーとした生態的研究は、本研究が初めてとなる。イチゴ炭疽病では病原菌の越冬形態の解明に *nit* 変異株が利用され、圃場内の罹病残渣が重要な1次伝染源であることが立証された（石川，2005）。本研究ではマンゴー炭疽病菌が頂芽、花芽および花序に潜在感染していることが明らかとなったが、雨よけ条件下における病原菌の1次伝染源ならびに伝搬経路や伝搬方法については、いまだ不明である。イチゴ炭疽病では発病していない潜在感染株からも降雨と灌水によって分生子が飛散することが確認されており（稲田・古田，2011）、マンゴー炭疽病においても、雨よけが実施されていない期間（8月～12月）の降雨によって、潜在感染葉および罹病残渣から頂芽が形成される着果枝先端部へ分生子が伝搬している可能性が考えられる。この点については、今後上記の *nit* 変異株を活用することにより、実験的に検証できると考えられる。また、イチゴ炭疽病菌およびリンゴ炭疽病菌の完全世代の子のう胞子は、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）。マンゴー炭疽病菌の完全世代 *Glomerella cingulata* は培地上では確認されている（澤嵜ら，2013）が、圃場ではいまだ発見されていないため、今後も完全世代の探索を行う必要がある。さらに、リンゴやモモでは圃場近隣のニセアカシアが炭疽病の伝染源になることが明らかにされ（工藤，1970; 小野ら，1996）、イチゴでは圃場周辺のヒユ科、キク科およびアブラナ科などの多くの雑草種から炭疽病菌（*G. cingulata*）が分離されるなど、病原菌が無病徴で多種の雑草に定着して伝染源になる可能性が示されており（平山ら，2007）、マンゴー圃場周辺の炭疽病罹病植物の探索および伝染源の可能性についても併せて検証する必要がある。

摘 要

施設マンゴーの出蕾から開花、着果初期における炭疽病菌の潜在感染の有無および感染部位を明らかにするために、外見上健全な頂芽、花芽、花序および幼果を採取し、エタノール浸漬簡易診断法によって病原菌の検出と分離を試みた。その結果、全ての部位において鮭肉色の分生子塊形成が認められ、それらから計34菌株を分離した。これらの分離株は種特異的プライマーを用いたPCR検定により、23菌株が *Colletotrichum gloeosporioides*、11菌株が *C. acutatum* と同定され、いずれもマンゴー果実（品種：アーウィン）に対して病原性を示した。炭疽病菌 *C. gloeosporioides* S754 の *nit* 変異株 (*nit1* 株) を作出し、圃場レベルで接種を行い感染時期の特定を試みた。その結果、接種された頂芽（接種時期：1月）、花芽（2月）、花序（4月）および幼果（5月）由来の各潜在感染果実に出現した病斑部から *nit1* 株が再分離され、幼果への接種において最も高い分離頻度を示し、頂芽への接種では低頻度であった。以上の結果から、2種のマンゴー炭疽病菌の潜在感染は、外観上健全な頂芽、花芽、花序および幼果で既に混在して成立し、感染後は開花、結実、果実肥大から7月の収穫に至る過程において長期間、植物組織内で潜伏し、収穫後の果皮上に病斑を形成することが示された。

引 用 文 献

- Arauz, L.F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Dis.* 84: 600–611.
- Binyamini, N. and Schiffmann-Nadel, M. (1972). Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 62: 592–594.
- Brooker, N.L., Leslie, J.F. and Dickman, M.B. (1991). Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology* 81: 672–677.
- Dickman, M.B. and Alvarez, A.M. (1983). Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis.* 67: 748–750.
- Fitzell, R.D., Peak, C.M. and Darnell, R.E. (1984). A model for estimating infection levels of anthracnose disease of mango. *Ann. Appl. Biol.* 104: 451–458.
- Freeman, S., Horowitz, S. and Sharon, A. (2001). Pathogenic and Nonpathogenic Lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from Strawberry and Other Plants. *Phytopathology* 91: 986–992.
- 後藤知昭・小山田浩一・中山喜一 (2004). イチゴ萎黄病菌の *nit* 変異菌株の作出とその諸性質. 関東病虫研報 51: 29–32.
- Hassan, M.K., Dann, E.K., Irving, D.E. and Coates, L.M. (2007). Concentrations of constitutive alk(en)ylresorcinols in peel of commercial mango varieties and resistance to postharvest anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71: 158–165.
- 平山喜彦・岡山健夫・西崎仁博・吉村あみ (2007). イチゴ炭疽病菌の各種雑草への定着と感染源としての可能性. 日植病報 73: 64–65. (講要)
- 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.
- Ishikawa, S. (2003). Method to diagnose latent infection by *Glomerella cingulata* in strawberry plants using ethanol. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 372–377.
- 石川成寿 (2005). イチゴ炭疽病の病原菌、生態ならびに環境に配慮した防除技術開発. 栃木農試研報 54: 1–187.
- 石川成寿・上野巨一・中山喜一 (1993). イチゴ炭そ病菌の *nit* 変異株の作出とその病原性. 関東病虫研報 40: 59–61.
- 古賀敬一 (1999). 長崎県の露地ビワに発生した果実腐敗の原因と分離されたビワ灰斑病菌の薬剤感受性. 九病虫研会報 45: 38–44.
- 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: 137–143.
- Muirhead, I.F. and Deverall, B.J. (1981). Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. *Physiol. Plant Pathol.* 19: 77–84.
- 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1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: 545–546. (講要)
- 沖縄県農林水産部園芸振興課編 (2003). 沖縄県果樹栽培要領. pp. 143–162, 沖縄県農林水産部, 沖縄.
- 小野光明・手塚裕裕・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.
- Prusky, D., Fuchs, Y. and Zauberman, G. (1981). A method for pre-harvest assessment of latent infection in fruits. *Ann. Appl. Biol.* 98: 79–85.
- Prusky, D. and Keen, N.T. (1993). Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Dis.* 77: 114–119.
- Puhalla, J.E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63: 179–183.
- 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.
- 白田 昭 (1993). 紫外線照射によるクワ葉でのクワ炭そ病の病斑誘発. 日植病報 59: 259–262.
- Simmonds, J.H. (1941). Latent infection in tropical fruits discussed in relation to the part played by species of *Gloeosporium* and *Colletotrichum*. *Proc. R. Soc. Queensl.* 52: 92–120.
- 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.
- Sutton, T.B. and Shane, W.W. (1983). Epidemiology of the Perfect Stage of *Glomerella cingulata* on Apples. *Phytopathology* 73: 1179–1183.
- 田場 聡・高江洲和子・大城 篤・諸見里善一・澤岬哲也 (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.
- 澤岬哲也・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. 熱帯農業研究 5: 20–24.
- 澤岬哲也・佐藤豊三・亀川 藍・田場 聡・諸見里善一 (2013). 国産マンゴー炭疽病菌の完全世代 *Glomerella cingulata* の初確認. 日植病報 79: 10–14.
- 寺本 敏・今村幸久・江尻径史 (2010). マンゴーハウスの温度管理がマンゴー果面への結露と炭疽病の発生に及ぼす影響. 九病虫研会報 56: 13–19.
- 寺本 敏・本山 宏・今村幸久 (2009). 栽培管理の異なる宮崎県のマンゴー農家ハウスにおける炭疽病の発生実態調査. 九病虫研会報 55: 57–61.
- Tokunaga, Y. and Ohira, I. (1973). Latent infection of anthracnose on *Citrus* in Japan. Rept. Tottori. Mycol. Inst. 10: 693–702.
- 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.
- 安富徳光・宮城光則・大城正市 (1982). マンゴーの生理・生態に関する研究 1. 発芽・開花調査および着果促進試験. 沖縄農試研報 7: 51–55.
- 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. 93–107, 農文協, 東京.
- Zaitlin, B., Zehr, E.I. and Dean, R.A. (2000). Latent infection of peach caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*. Can. J. Plant. Pathol. 22: 224–228.