Myrothecium verrucaria によるショウガ根茎暗斑病 (新称)

山崎 睦子^{1,2*}・森田 泰彰¹・有江 力³

ABSTRACT

YAMAZAKI, M.^{1,2*}, MORITA, Y.¹ and ARIE, T.³ (2014). First report of myrothecium rhizome spot of ginger (*Zingiber officinale*) caused by *Myrothecium verrucaria* in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 80: 11–15.

In 2007, black spots that appeared on the surface of the rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) during storage caused serious losses in Kochi Prefecture, Japan. Most of the black spots formed at the joints of the rhizomes. A fungus was frequently isolated from the symptomatic rhizomes. The isolate caused the same symptoms on artificially inoculated ginger rhizomes and was reisolated. The fungus formed white stellate colonies with a greenish black spore mass on PDA. Mycelia grew on PDA from 10°C to 35°C with maximum growth at 30°C. Sporangia were fusiform, monocellular, and 7.5–5.0×2.0–3.0 (average 6.4×2.5) µm. The morphology of the fungus agreed with that of *Myrothecium verrucaria* (Albertini et Schweinitz) Ditmar. The nucleotide sequence of the r-DNA ITS regions agreed well with those of *M. verrucaria*. In conclusion, the isolate was identified as *M. verrucaria*. This is the first report of a disease of ginger caused by *M. verrucaria*, and we propose to designate the disease as myrothecium rhizome spot of ginger.

(Received 8 February, 2013; Accepted 17 May, 2013)

Key words: *Myrothecium verrucaria*, *Zingiber officinale*, disease, myrothecium rhizome spot

2007年5月に高知県高知市および土佐市をはじめとする県内の露地ショウガ (*Zingiber officinale* Rosc.) 栽培地域において、貯蔵中のショウガ根茎の表面に黒色で不整形の斑紋を生じる症状が発生した。本症状は、ショウガ根茎の外観を損ね、商品価値を著しく低下させることから、産地での大きな問題となった。

ショウガ根茎表面に黒色の病斑を生じる病害として、*Pyricularia zingiberi* によるいもち病がすでに報告されている (古谷, 1995)。しかし、今回発生した症状は、いもち病のように生育期の葉、茎および根茎に病斑を形成することではなく、収穫した根茎を予冷貯蔵した後の出荷・調製時に確認されること、また、いもち病に罹病した根茎で特徴的にみられる褐色の病斑やその上に輪生する黒色の菌核様構造物、根茎内部の腐敗を伴わないことなどから、いもち病とは異なると考えられた。そこで、根茎罹病部から病原の分

離を試み、高頻度で分離された糸状菌のショウガに対する病原性と分類学的所属について調査を行った。

本症状は、高知県内の露地栽培地域で10月下旬から11月中旬の間に収穫され、15°Cの予冷庫で貯蔵されたショウガ根茎に発生した。根茎表面に約1～3 cmの大型で不整形の黒色の斑紋が形成される (Fig. 1A)。斑紋は、健全部との境界が明瞭で、根茎の節と節の間に形成される。変色は根茎表面下約1 mmまでの表層しか生じておらず、ピンセット等で軽く擦ると容易に除去でき、根茎内部の腐敗は認められない。なお、光学顕微鏡観察では、病斑直下のごく浅い表皮組織に菌糸が確認されるが、深部には侵入していない。

2007年6月に高知県土佐市のお荷場で採集した罹病ショウガ根茎の罹病部と健全部の境界部分から小片を取り、70%エタノールに30秒間、2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に60秒間浸漬して表面殺菌した後、2%素寒天培地に置

¹ 高知県農業技術センター (〒783-0023 高知県南国市廿枝 1100) Kochi Agricultural Research Center, 1100 Hataeda, Nankoku, Kochi 783-0023, Japan

² 東京農工大学大学院連合農学研究科 (〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8) United Graduate School of Agricultural Science Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT), 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan

³ 東京農工大学農学部植物病理学研究室 (〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8) Laboratory of Plant Pathology, Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT), 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan

* Corresponding author (E-mail: mutsuko_yamasaki@ken3.pref.kochi.lg.jp)

本研究で明らかとなった DNA 塩基配列は DDBJ/EMBL/GeneBankDNA データベースに Accession No. AB778924 として登録した。

Fig. 1. Symptoms of myrothecium rhizome spot on ginger and morphological characteristics of isolate D2 of *Myrothecium verrucaria* on PDA.

Black spots on rhizome A: under natural conditions, B: 10 d after inoculation with a mycelial disk and stored at 15°C; C: 105 d after inoculation with mycelial homogenate and stored at 15°C for 63 d. D: Colony after 21 d in the dark at 25°C (left: surface side; right: reverse side); E: colorless to pale olive green conidia on sporodochia bearing greenish-black spore mass; F: conidia produced from phialides on branched conidiophores; and G: fusiform and monocellular conidia.

Scale bars: 100 μm (E); 10 μm (F); and 10 μm (G).

き、生育したコロニーから単孢子分離株 (D2) を得た後、以下の試験に供試した。

D2 株のショウガに対する病原性を確認するために、菌叢ディスクによる貼付接種および菌叢磨砕液による灌注接種を行った。菌叢ディスクを用いた貼付接種では、ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 平板培地に供試菌株を移植し、25°C、暗黒下で 10 日間培養後、菌叢の周縁部を直径 3 mm のコルクボーラーで打ち抜いて菌叢ディスクを得た。接種に用いるショウガ根茎は、あらかじめ 30°C の恒温器内で萌芽させたショウガ根茎を萌芽部を含む約 3 cm 角に切り分けて、滅菌土を詰めた直径 9 cm のポリエチレンポットに 1 つずつ植え付け、ガラス室で約 3 カ月間栽培した後に掘り上げたものを用いた。根と偽茎を除去して調製した根茎を水道水で洗浄後、70% エタノールに 1 分間浸漬して表面を殺菌し、滅菌水で洗浄した。この根茎表面に菌叢ディスクを 1 枚ずつ、菌叢面が根茎に密着するように貼り付け、密閉容器 (20 × 13 × 8 cm) 中で、15°C、多湿条件下に 10 日間置いた。なお、対照として、ショウガ根茎に PDA 培地ディスクのみを貼り付けた。その結果、供試菌株を接種したショウガ根茎は、菌叢ディスクの貼付下およびその周辺に黒変を生じた (Fig. 1B)。この黒変部の内部には腐敗はみられなかった。なお、黒変部からは供試菌株と同一の糸状菌が再分離された。対照区では病変は認められなかった。

菌叢磨砕液による灌注接種では、供試菌株を直径 9 cm のシャーレ中の PDA 平板培地上で 25°C、暗黒下、14 日間培養した後、シャーレ 1 枚につき滅菌水 200 ml を加え、培地ごとホモジナイザーで磨砕して得た菌叢磨砕液を接種源として用いた。ショウガは、滅菌土を詰めた 1/5000 a ワグネルポットに、1 ポットにつき無病のショウガ根茎 (約 150 g) 1 個を植え付け、屋外で約 6 カ月間栽培して 3 次茎の発生を確認した後、試験に用いた。2010 年 10 月に南国市内で、1 ポット当たり菌叢磨砕液 170 ml を灌注し、引き続き屋外で管理した。対照として、菌叢の代わりに PDA 培地磨砕液を用いた。接種 105 日後にショウガ根茎を掘り上げ、根と偽茎を除去して調製した根茎を水道水で洗浄し、表面の黒変の有無を観察した後、さらに 0.02 mm 厚のビニール袋に入れて密閉して、暗黒下、15°C で 63 日間貯蔵した。その結果、供試菌株を接種したショウガは、掘り取り直後には葉や茎および根茎表面に異常が見られなかったが、根茎を多湿状態で 15°C に 63 日置いた後には表面に不整形の黒変病斑を形成した (Fig. 1C)。黒変部の根茎内部の腐敗はみられなかった。なお、黒変部からは、接種菌と同一の糸状菌が再分離された。

いずれの接種法による症状も原症状と一致し、罹病組織から接種菌が再分離されたことから、供試菌株が本症状の

病原であることが明らかになった。

供試菌株は、PDA 平板培地上で、白色、綿毛状の菌叢を形成し、25°C 暗黒下で培養すると、約 10 日後に黒色の分生子塊を形成した (Fig. 1D)。培養後 30 日後に形態的特徴を調べたところ、菌叢上に形成された分生子座の直径は 114 ~ 954 μm 、高さは 165 ~ 305 μm であり、凸型の隆起部に暗緑色~黒色の分生子塊が形成された。分生子座内の分生子柄は分岐し、各分枝上のフィアライド上に分生子を形成した (Fig. 1E, F)。分生子は、大きさ 5.0 ~ 7.5 × 2.0 ~ 3.0 μm 、無色~淡緑色、紡錘形、単胞、一端が切断状で他方の一端がやや突出していた (Fig. 1G)。

PDA 平板培地上で 25°C、暗黒条件下で 14 日間、前培養し、菌叢の周縁部を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いた含菌寒天を PDA 平板培地の中央に置床した後、5、10、15、20、23、25、28、30、33、35、40°C、暗黒下で培養し、10 日後に菌叢の直径を測定して 3 反復の平均値から 1 日当たりの菌糸伸長量を算出した。その結果、各菌株とも 10 ~ 35°C で菌糸の伸長がみられ、30°C が生育適温であった (Fig. 2)。

供試菌株は、Tulloch (1972) および Murakami *et al.* (2005) が報告した *Myrothecium verrucaria* (Albertini et Schweinitz) Ditmar の分生子座、分生子柄、分生子および菌叢の形態的特徴とよく一致した (Table 1)。なお、Tulloch (1972) が報告した同じ *Myrothecium* 属菌である *M. roridum* の分生子は棒状または幅の狭い楕円形であり、供試菌株とは異なった。

供試菌株を PDA 平板培地上で 25°C、暗黒条件下で 30 日間培養後、Saitoh *et al.* (2006) の手法を一部改編してゲノム DNA を抽出した。まず、PDA 平板培地上の菌叢の一部を滅菌済みの爪楊枝でかき取り、500 μl の lysis buffer (400 mM Tris-HCl・pH 8.0, 60 mM EDTA・pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% ラウリル硫酸ナトリウム) の入った 1.5 ml チューブに入れてよく懸濁させ、これを 10 分間室温に置いた後、150 μl の 3 M

Fig. 2. Mycelial growth of *Myrothecium verrucaria* the isolate D2 at various temperatures on PDA.

Table 1. Morphological characteristics of isolate D2 obtained from ginger and of reference isolates of *Myrothecium verrucaria*

Structure		D2 ^{a)}	<i>Myrothecium verrucaria</i> ^{b)}	<i>Myrothecium verrucaria</i> ^{c)}
Spore mass	Shape	Convex surrounded by white hyphal margin	Flattened or convex; white, sessile, marginal hyphae	Convex surrounded by a white, floccose margin
	Color	Greenish black	Greenish black	— ^{d)}
	Size (μm)	114–953 in diameter 165–305 in depth	110–250 in diameter	150–750 in diameter 50–150 in depth
Conidiogenous cell	Shape	Conidia in false heads on phialides in conidiphores	—	—
	Size (μm)	11.0–17.5 × 1.5–2.5	10.5–15.0 × 1.5–2.0	10.5–14.5 × 1.5–2.0
Conidia	Shape	Fusiform and monocellular	Broadly ellipsoid to lemon-shaped; smooth surface	Broadly fusiform
	Color	Colorless to pale olive green	Colorless to light green	—
	Size (μm)	5.0–7.5 × 2.0–3.0	7.5–9.0 × 2.5–3.0	6.5–8.0 × 2.0–3.5
Mycelial colony on PDA		White colonies with a greenish-black convex spore mass	White colonies containing sporodochia with a flattened or convex spore mass	—

a) at 25°C for 30 d on PDA in the dark

b) Murakami *et al.* (2005), on PDA

c) Tulloch (1972), on host

d) No description

酢酸ナトリウム (pH 4.8) を加えて混和した。4°C で 18,000 × *g*, (15,000 rpm, T15AP21 ローター, 日立工機) で 5 分間遠心分離した後, 上清 300 μl を新しいチューブに移し, 750 μl の 100% エタノールを加えて DNA を沈殿させた。4°C で 18,000 × *g*, で 2 分間遠心分離した後, 上清を捨て, 250 μl の 70% エタノールを加えて沈殿を洗浄し, 4°C で 18,000 × *g*, 5 分間遠心分離して DNA 沈殿を回収し, 吸引減圧乾燥機械 (CVE-2000, 東京理化器械) でエタノールを除き, TE に溶解して, DNA 溶液を得た。さらに, White *et al.* (1990) の方法に従って, プライマー ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') および ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いて rDNA internal transcribed spacer (ITS) 領域を PCR (TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, タカラバイオ) で増幅した。得られた PCR 産物を精製し, 約 560 bp の DNA 断片の塩基配列を 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析し, DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている塩基配列との同源性検索を行った。その結果, D2 株の rDNA の ITS 領域の塩基配列は, 既報の *M. verrucaria* の配列 (GQ 131886 ; Manici and Caputo, 2010) と 100% の同源性が認められた。

以上の形態的特徴と rDNA の ITS 領域の塩基配列から, D2 株を *M. verrucaria* と同定した。 *M. verrucaria* D2 株は農業

生物資源研究所ジーンバンク (つくば市) に MAFF 243658 として寄託するとともに, 本研究で明らかになった DNA 塩基配列は DDBJ/EMBL/GeneBank DNA データベースに Accession No. AB778924 として登録した。

わが国において *M. verrucaria* は, クワ暗斑病の病原としての報告 (Murakami *et al.*, 2005) があり, また, 海外ではトウダイグサ類, メロン, スイカ, キュウリ等の葉などに病斑や壊死症状を引き起こす病原として報告されている (Belisario *et al.*, 1999, 2006; Raymond *et al.*, 1959; Yang and Jong, 1995a, 1995b) が, ショウガでの報告はない。

このように, *M. verrucaria* によるショウガの病害は初めての報告であることから, 本病をショウガ根茎暗斑病 (英名 *Myrothecium rhizome spot*) と提唱する。

引用文献

- Belisario, E., Forti, E. and Corazza, L. (1999). First report of *Myrothecium verrucaria* from muskmelon seeds. Plant Dis. 83: 589. (Abstract)
- Belisario, B.G., Lokesh, S., Raghavendra, V.B., Prakash, H.S. and Shetty, H.S. (2006). First report of the occurrence of *Myrothecium verrucaria* in watermelon seeds from India. Australasian Plant Pathology Society 1: 3–4.

- 古谷眞二 (1995). ショウガのいもち病に関する研究. 高知農技セ特報 2: 1–69.
- Manici, L.M. and Caputo, F. (2010). Soil fungal communities as indicators for replanting new peach orchards in intensively cultivated areas. *European Journal of Agronomy* 33: 188–196.
- Murakami, R., Kobayashi, T. and Takahashi, K. (2005). *Myrothecium* leaf spot of mulberry caused by *Myrothecium verrucaria*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 153–155.
- Raymond, F.L., Etchells, J.L., Bell, T.A. and Masley, P.M. (1959). Filamentous fungi from blossoms, ovaries, and fruit of pickling cucumbers. *Mycologia* 51: 492–511.
- Saitoh, K., Togashi, K., Arie, T. and Teraoka, T. (2006). A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 348–350.
- Tulloch, M. (1972). The genus *Myrothecium* Tode ex Fr. *Myco. Papers* 130: 1–42.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR Protocols. (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., eds.). pp. 315–322, Academic Press, San Diego.
- Yang, S. and Jong, S.C. (1995a). Host range determination of *Myrothecium verrucaria* isolated from leafy spurge. *Plant Dis.* 79: 994–997.
- Yang, S. and Jong, S.C. (1995b). Factors influencing pathogenicity of *Myrothecium verrucaria* isolated from *Euphorbia esula* on species of *Euphorbia*. *Plant Dis.* 79: 998–1002.