

数種アブラナ科植物に病原性を有する

Alternaria brassicicola の収集

窪田 昌春

農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所

[〒305-8666 つくば市観音台 3-1-1]

Collection of *Alternaria brassicicola* pathogenic to some cruciferous plants

Masaharu KUBOTA

National Institute of Vegetable and Tea Sciences,
National Agriculture and Food Research Organization

1. 目的

1990年代以降、我が国ではキャベツ栽培においてセル成型育苗法が広く導入され、これにより、各地の産地では育苗施設における集中育苗が行われている。しかし、その育苗過程で、これまで *Alternaria brassicicola* (Schweinitz) Wirtshire による黒すす病が多発してきた (窪田ら, 1998, 1999b, 2000, 2006; 黒田ら, 1998)。黒すす病では、最初、子葉に灰～黒色の小病斑が形成され、それが円形の病斑へと拡大する。病斑上には分生胞子が大量に形成され、それが灌水等によって流れ、茎にも病斑を形成して株全体が立ち枯れに至る場合もある。また、分生胞子は、苗同志の接触により周囲の株に伝染するほか、頭上灌水によってできる飛沫によっても二次伝染する。第一伝染源は汚染種子であるため (窪田ら, 2003; 黒田ら, 1998)、1984～2002年産に本国内で市販されたキャベツ種子ロットについて、同菌の汚染状況を調査した (Kubota ら, 2006)。この中で各ロットから分離した同菌の代表菌株と、既に農業生物資源研究所 (NIAS) ジーンバンクに登録されている同種菌株について、4種のアブラナ科作物に対する病原性の調査を行った。

2. 菌の分離と同定

1984～2002年産のキャベツ市販種子合計124ロットの種子各100粒を1.5%素寒天上 (WA) に置き、25℃で6日間培養する間に種子より生じた菌叢をショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PSA, 20% ジャガイモ煎汁, 2%ショ糖, 1.5%寒天) に植え継いだ。各種子ロットの代表菌叢について、PSA上で形成させた分生胞子をWAに画線し、25℃で一晩培養した後、発芽した単胞子をPSAに植え

表1. キャベツ種子から分離した*Alternaria brassicicola*菌株

菌株名	MAFF番号	MAFF登録年	種子産地	種子生産年	菌株名	MAFF番号	MAFF登録年	種子産地	種子生産年
ヒット84	726687	2007	長崎	1984	みさき	未登録		香川	1989
中早生富士	726688	2007	奈良	1985	YR早春	未登録		香川	1989
黄葉サクセション	726689	2007	福島	1989	豊峰2号	未登録		(九州)	1989
夏越	726690	2007	新潟	1989	ヒット89	未登録		長崎	1989
SE	726691	2007	長野	1989	天光	未登録		(九州)	1989
銀山	726692	2007	長野	1989	マイティ	未登録			1989
秋島	726693	2007	長野	1989	YR青春	未登録		宮城	1994
豊春	726694	2007	埼玉	1989	YRあおば	未登録		千葉	1994
ドライトボール	未登録		千葉	1989	YR錦秋	未登録		静岡	1994
玉盃	726695	2007	千葉	1989	松波97	未登録		静岡	1997
早取り錦秋	726696	2007	静岡	1989	松波98	未登録		静岡	1998
スイートボール	726697	2007	静岡	1989	おきな94	未登録		京都	1994
天竜	726698	2007	静岡	1989	セッター	未登録		京都	1994
さんすい	726699	2007	静岡	1989	秋徳94	未登録		京都	1994
あまだま	726701	2007	静岡	1989	初秋	未登録		京都	1998
しおさい	726702	2007	静岡	1989	彩ひかり	未登録		京都	1994
YR伊良子	726703	2007	静岡	1989	青空	未登録		香川	1994
寒取3号	726704	2007	愛知	1989	YR安寿1号	未登録		香川	1994
いしずえ	726700	2007	愛知	1989	サボイキング	未登録		香川	1994
涼風	726705	2008	愛知	1989	グリーンボール	未登録		香川	1994
初雁	726706	2008	愛知	1989	レッドボール	未登録		アメリカ	1994
四季取	726707	2008	奈良	1989	SE	未登録		長野	2001
金力	726708	2008	奈良	1989	Y R 錦秋強力152号	未登録		静岡	2001
三取	726709	2008	京都	1989	YR泰山	未登録		静岡	2001
夏玉	未登録		京都	1989	秋蒔き中早生	未登録		静岡	2001
YR晴徳	未登録		京都	1989	松波01-1	未登録		静岡	2001
エムスリー	未登録		京都	1989	松波01-2	未登録		静岡	2001
冬玉2号	未登録		京都	1989	味春	未登録		鳥取	2001
やよい	未登録		兵庫	1989	来陽	未登録		香川	2001
ふれあい	未登録		兵庫	1989	YCR多恵	未登録		香川	2001
大黒301号	未登録		兵庫	1989	金系201号01	未登録		香川	2001
早生秋宝	未登録		兵庫	1989	金春	未登録		香川	2001
幸徳	未登録		兵庫	1989	秋徳01	未登録		アメリカ	2001
E味	未登録		香川	1989	おきな01	未登録		イタリア	2001
中早生3号	未登録		香川	1989	松波02	未登録		静岡	2002
金系201号89	未登録		香川	1989					

継いで供試菌株とした。この単孢子分離菌株の分生孢子形成の形態について、Ellis (1971) の記載と比較して、*A. brassicicola* の同定を行った。その結果、124 種子ロット中、71 ロットより同種と同定される代表菌株が得られた (表 1)。この 71 菌株と併せて、NIAS ジーンバンクに既登録であった同種の 5 菌株も以下の接種試験に用いた (表 2)。キャベツの種子から分離された 23 菌株は NIAS ジーンバンクに登録した。他の菌株も、今後当ジーンバンクに登録予定である。

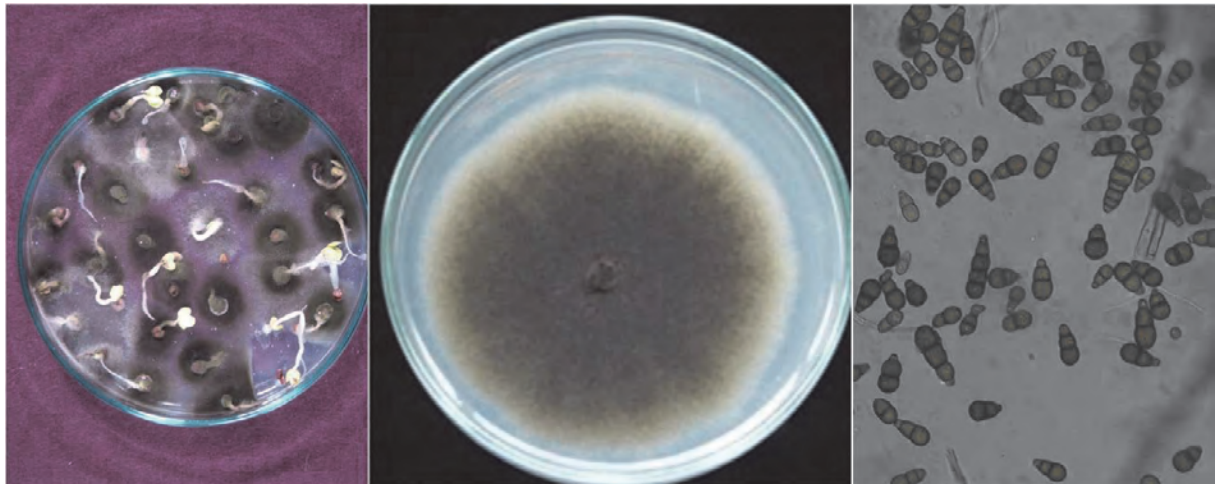


図 1. キャベツ種子から生育した黒すす病菌菌叢 (左; 窪田 (2010) 原図), MAFF 237450 の PDA 菌叢 (中) と分生孢子 (右)

表 2. NIAS ジーンバンク既登録 *Alternaria brassicicola* 菌株

MAFF 番号	MAFF 登録年	分離地	分離年
305011	1988	(九州)	不明
237450	1996	滋賀	1990
712079*	1990	三重	不明
712096*	1990	三重	1986
726527	1998	三重	1997

**A. alternata* に修正済み

3. 病原性の確認

キャベツ (*Brassica oleracea* L., 品種: 松波), カブ (*B. campestris* L., 品種: 金町小蕪), カラシナ (*B. juncea* (L.) Czern., 品種: 葉からしな), ダイコン (*Raphanus sativus* L., 品種: 夏みの早生 3 号) 種子を, セル成型育苗用培養土 (ナプラ培土, ヤンマー) を詰めた 128 穴セルトレイ (長 60 cm×幅 30 cm×深 4 cm) に播種し, 第 1 本葉期まで約 2 週間, ガラス温室内で育苗して接種試験に供試した。これらの植物の第 1, 2 葉に, PSA, 25°C, 4 日間培養で得た各菌株の菌叢片 (2 ~ 3 mm 角) を 2 個置き, 25°C の湿室に 4 日間保った後に病斑形成を観察した。

その結果, MAFF 712079, MAFF 712096 を除いたいずれの菌株においても, 4 種のアブラナ科

作物の葉に水浸状で灰または茶～黒色の拡大する病斑を形成した。ダイコンでは病斑の拡大が小さい場合もあったが、病斑サイズに菌株間での特段の差は認められなかった。MAFF 712079, MAFF 712096 については、いずれの作物においても拡大しない黒色小斑点をときに形成するのみであった。



図 2. 黒すす病菌接種によるキャベツ (左上), カブ (右上), カラシナ (左下), ダイコン (右下) における本葉の病徴

4. MAFF 712079 と MAFF 712096

病原性が弱かった MAFF 712079 と MAFF 712096 について、2%ブドウ糖で培養した菌叢から、Villa ら (2006) に従って全 DNA を抽出し、さらに、White ら (1990) に従って同菌株の核リボゾーム 5.8S 遺伝子を含む Internal Transcribed Spacers (ITS) 領域を PCR によって増幅し、その増幅断片を、マルチスクリーン PCR フィルタープレート (日本ミリポア) を用いて精製した。その精製断片を鋳型とした、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

による PCR 産物の塩基配列を、3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて決定した。両菌株の同塩基配列は互いに一致し、National Center of Biotechnology Information に既登録の塩基配列と BLAST 検索した結果、*A. alternata* (Fr.) Keissl. のものと一致した。また、分生孢子の形態でも、ペーグが *A. brassicicola* のものよりもやや細身であり、端細胞の丸みも弱く、*A. alternata* と同定するのが適当であった。本結果により、NIAS ジーンバンクにおける両菌株の種は *A. brassicicola* から、*A. alternata* に修正された。

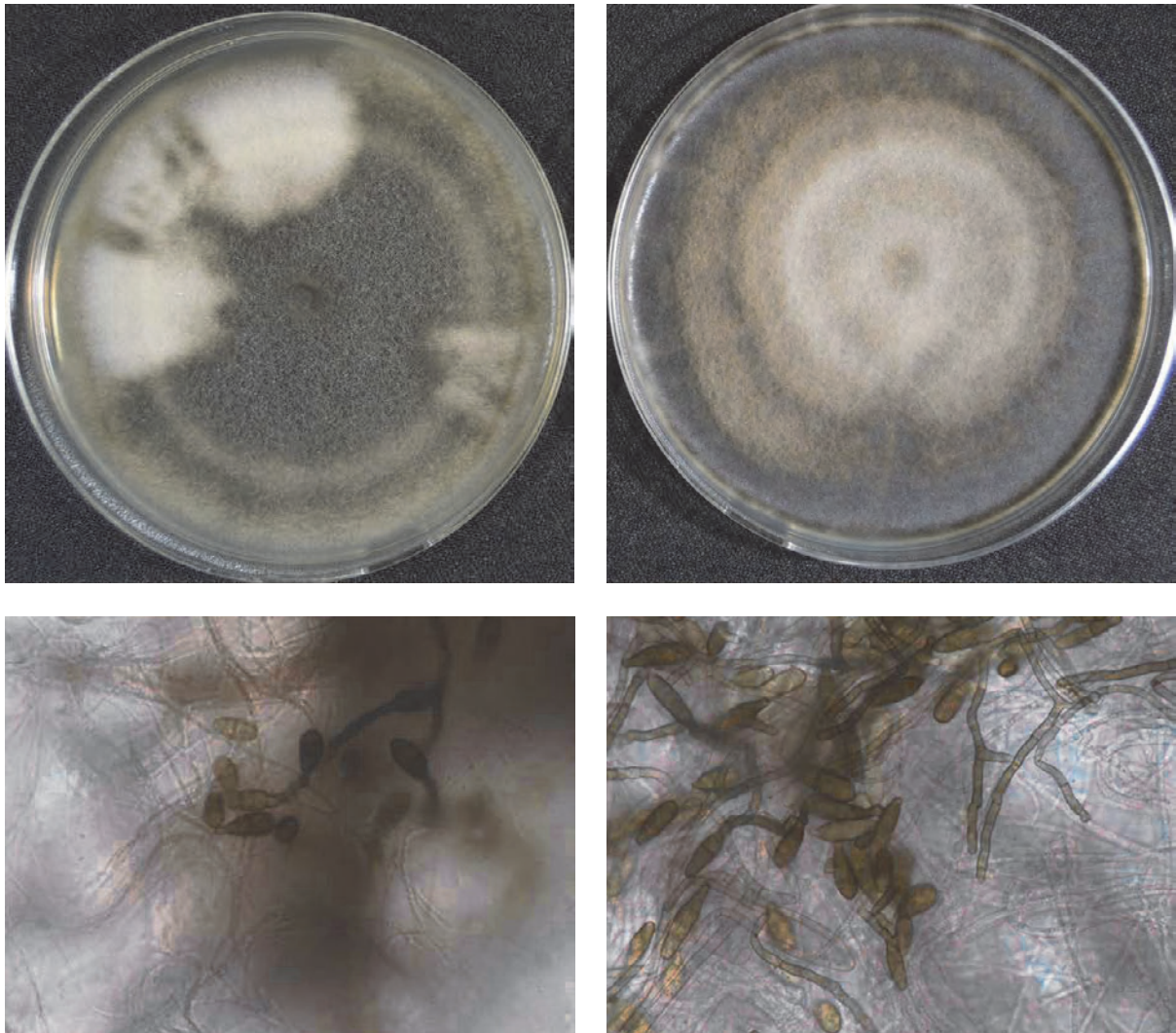


図 3. MAFF 712096 (左) と MAFF 712079 (右) の菌叢 (上) と分生孢子 (下)

5. キャベツ種子から分離した他の糸状菌病原菌

同時に種子から分離された糸状菌株のうちの 2 菌株について、WA 上に置いたカーネーション葉 (プロピレンオキシドでくん蒸殺菌済み) で 25°C で培養したときに形成される大型分生孢子形成の形態や、PSA に分泌される色素の色等を、Booth (1971) の記載と比較して *Fusarium avenaceum* (Corda: Fries) Saccardo と同定した。同種菌は、キャベツ先枯病菌として既報である (窪田ら, 1999a)。これらの菌株についても、同様の方法でキャベツ本葉に接種したところ、茶褐色で葉裏ま

で達する病斑が形成され、病原性が確認された。この2菌株も MAFF 726730, MAFF 726731 として NIAS ジーンバンクに登録した。

6. 参考文献

- Booth, C. (1971). The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycol. Inst. (CMI), Kew, Surrey.
- Ellis, M.B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. pp. 467-468, CMI, Kew, Surrey.
- 窪田昌春 (2010). *Alternaria* 属と *Phoma* 属の野菜類病原菌. 微生物遺伝資源マニュアル 30: 1-22.
- 窪田昌春・我孫子和雄 (1998). キャベツのセル成型苗に発生した病害. 関西病虫研報 40: 55-63.
- 窪田昌春・我孫子和雄 (1999a). キャベツのセル成型苗から分離された *Fusarium* 属菌. 関西病虫研報 41: 17-22.
- 窪田昌春・我孫子和雄 (1999b). 1~4月に育苗されたキャベツのセル成型苗に発生した病害. 関西病虫研報 41: 89-90.
- 窪田昌春・我孫子和雄 (2000). 育苗施設のキャベツのセル成型苗における病害の発生実態. 野茶試報 15: 1-10.
- 窪田昌春・我孫子和雄・西和文 (2003). キャベツセル成型苗の育苗条件が黒すす病の発生に及ぼす影響. 野茶研報 2: 1-8.
- Kubota, M., Abiko, K., Yanagisawa, Y. and Nishi, K. (2006). Frequency of *Alternaria brassicicola* from commercial cabbage seeds in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 72: 107-204.
- 窪田昌春・中筋智子・清水将文・西和文 (2006). 2004年8月~2005年3月に三重県内の育苗施設でキャベツセル成型苗に発生した病害. 関西病虫研報 48: 41-43.
- 黒田克利・富川明 (1998). キャベツのセル成型苗に新たに発生した黒すす病の種子消毒による防除. 関西病虫研報 40: 121-122.
- 日本植物病理学会編 (2000). 日本植物病名目録. 日本植物防疫協会, 東京.
- 日本植物病理学会編 (2011). 日本植物病名目録追録. <http://www.ppsj.org/pdf/mokuroku-tsuiroku101201.pdf>
- Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T. and Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin sequences. Mycologia 98: 410-422.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications (Gelfand, M., Sninsky, D. and White, T., eds.). pp. 315-322, Academic Press, San Diego.

Summary

Plug trays are widely used for cultivation of cabbage seedlings in Japan. In the cultivation using the trays, black spot caused by seed-borne *Alternaria brassicicola* have occurred frequently. Situation of infestation of commercial cabbage seeds with the pathogen was investigated, and the pathogen was isolated from each seed lot. When four cruciferous crops (cabbage; *Brassica oleracea*, turnip; *B. campestris*, leaf mustard; *B. juncea* and Japanese radish; *Raphanus sativus*) were inoculated with 71 isolates from cabbage seeds, all of the isolates made water-soaked and black stains on leaves of their crops. MAFF 305011, MAFF 237450, MAFF 712079, MAFF 712096 and MAFF 726527 of *A. brassicicola*, registered to the NIAS Genebank, were also inoculated to leaves of the crops as well. MAFF 712079 and MAFF 712096 did not make stains, but small black dots sometimes. The other isolates, MAFF 305011, MAFF 237450 and MAFF 726527, produced stains as like as the isolates from cabbage seeds. Finally, MAFF 712079 and MAFF 712096 were identified to *A. alternata* with the morphology and the sequences of internal transcribed spacers, including 5.8S gene of the nuclear ribosomes, and their information on the NIAS Genebank was renewed.