

輸入検疫で発見された *Cylindrocladium pauciramosum* による ハリアカシアの斑点性病害

大井明大・早川申祐¹⁾・大石盛伝・小林慶範

名古屋植物防疫所, ¹⁾ 名古屋植物防疫所清水支所

Leaf Spot Disease of *Acacia armata* Caused by *Cylindrocladium pauciramosum* Intercepted in Plant Quarantine. Akihiro OHI, Sinsuke HAYAKAWA¹⁾, Moritsugu OISHI, Yoshinori KOBAYASHI (Nagoya Plant Protection Station, 2-3-12 Irifune, Minato-ku, Nagoya 455-0032, Japan. ¹⁾ Shimizu Sub-station, Nagoya Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **45**: 49-52 (2009).

Abstract: In March 2007, *Acacia* seedlings (*Acacia armata*) imported from the Netherlands showing leaf spot lesions were found during plant quarantine inspection at Chubu Centrair International Airport in Japan. A *Cylindrocladium* species was isolated from the lesions. Based on the morphological characteristics, cardinal temperatures for growth and molecular analyses, this fungus was identified as *Cylindrocladium pauciramosum* C. L. Schoch & Crous. This is the first report of *C. pauciramosum* intercepted at plant quarantine inspection in Japan.

Key words: *Cylindrocladium pauciramosum*, *Acacia*, plant quarantine, identification

2007年3月、中部国際空港の輸入検査において、オランダ王国産ハリアカシア (*Acacia armata* R. Br.) 苗の葉及び茎に斑点性の病斑が観察された。罹病組織から菌の分離を行ったところ *Cylindrocladium* 属菌が高頻度で分離された。そこで本菌の病原性を確認するとともに菌種の調査をしたところ、本病害は我が国では未報告の *Cylindrocladium pauciramosum* C. L. Schoch & Crous によるものであることが判明したので報告する。

病徴

葉及び茎に褐色～暗褐色で円形～楕円形の小さな斑点を生じる。この病斑はその後拡大し暗褐色～灰褐色輪紋状となり中心部は灰褐色を呈す。また病斑が発生した葉は早期に落葉する (Fig. 1.a, b)。

病原菌の分離

病斑部の切片を70%アルコールに瞬時浸し、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で2分間表面消毒した。滅菌水で洗浄後、2%素寒天培地に置床した。これを暗黒下、25℃で4日間培養後、置床した切片上に生じた分生子塊から単胞子分離を行った。得られた菌株はジャガイモ・ブドウ糖寒天培地 (PDA) 上に移し、形態観察、生育試験及び病原性試験等に供試した。

菌の形態

分離菌株をPDA培地及びカーネーション葉片素寒天培地 (CLA) 上に移植し、25℃、ブラックライト照射下 (光周期12hr/12hr) で7～10日間培養した。PDA培地上での培養菌叢は白色の気中菌糸で覆われ黄赤褐色を呈し (Fig. 1.d)、さらに時間が経過すると培地上に褐色の厚壁胞子と微小菌核を豊富に形成した (Fig. 1.e, f)。分生子柄は2～3回分岐し、先端に樽形をした分生子形成細胞を生じた (Fig.

1.g)。また、分生子柄 (Macroconidiophores) の一部はまっすぐ上方に伸長し (長さ110～205 μm) 先端部に基部が細い逆洋なし型～楕円形をした頂のう (Vesicle) を生じた (Fig. 1.h, i, j)。一方、分生子形成細胞上に内生出芽した大型分生子は、箒状に分生子塊を形成した (Fig. 1.i)。大型分生子は無色、長円筒形、両端は丸く、1隔壁、大きさは39～56×4～5 μmであった (Fig. 1.k)。以上の形態的特徴はCROUS (2002) の記載とはほぼ一致した (Table 1)。

生育温度

PDA培地及び麦芽エキスを寒天培地 (MEA) の中心に供試菌株を置き、5、8、10、15、20、22.5、25、27.5、30、35℃の10段階の恒温器内で培養し、6日後の菌叢半径を測定して1日当たりの菌糸生育速度を算出した。その結果、いずれの培地においても8℃から30℃で生育が認められ、最適生育温度は25℃であった (Fig. 2)。

病原性

分離菌株をクチナシ葉による寒天葉片法 (岸國平、1995) で25℃、ブラックライト照射下で4日間培養した。得られた分生子を滅菌水で10³～10⁵個/mlに調製しハリアカシアの50cmポット苗に噴霧接種し、23℃のグロースチャンバー内で経過観察した。接種3日後、葉に褐色～暗褐色の小さな斑点を生じ、その後病斑は拡大し (Fig. 1.c)、病徴が進行した葉は早期に落葉した。さらに約2週間後、葉を落とした茎に褐色の病斑が確認され輸入検疫時に見られた同様の病徴が再現され、病徴部位から接種菌と同一の菌が再分離された。

β-tubulin領域の塩基配列の解析

分離菌を麦芽エキス (ME) 液体培地で培養し、GIRARDIN (1994) とLEE (1990) の方法に従いDNAを抽出した。

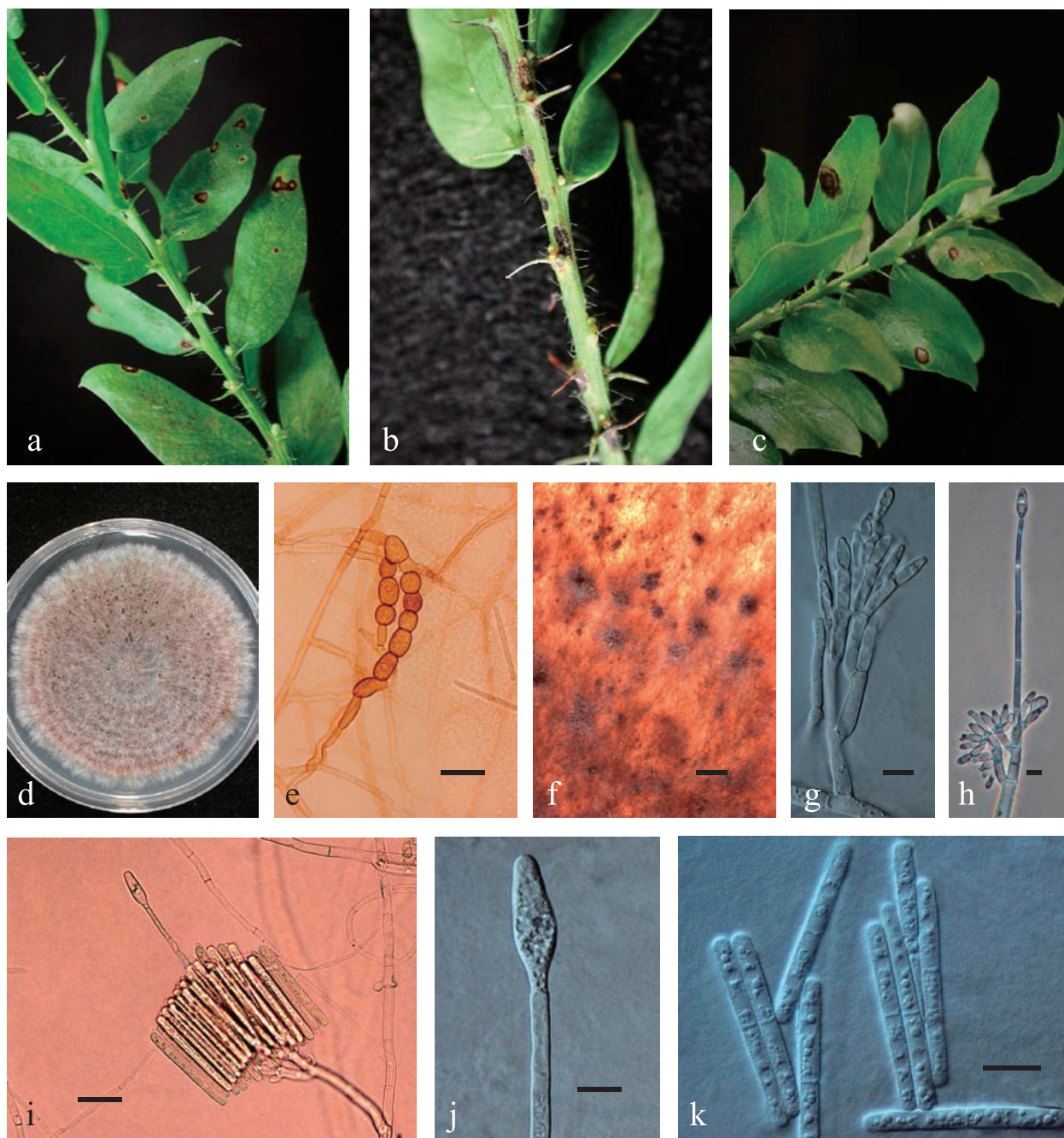


Fig. 1. a, b Symptoms on *Acacia armata* imported from The Netherlands.
 c Symptoms on *Acacia armata* reproduced by inoculation of a *Cylindrocladium* isolate.
 d Colony on PDA at 25°C for 10 days under near-ultraviolet light.
 e Chlamydospores in PDA at 25°C for 10 days; scale bar = 20 μ m.
 f Microsclerotia on PDA at 25°C for 10 days; scale bar = 500 μ m.
 g Conidiogenous cells; scale bar = 10 μ m.
 h Macroconidiophore with extending stipe and terminal vesicle; scale bar = 20 μ m.
 i Macroconidiophore with macroconidial cluster, extending stipe and terminal vesicle; scale bar = 20 μ m.
 j Vesicle; scale bar = 10 μ m.
 k Macroconidia; scale bar = 20 μ m.

抽出したDNAをHENRICOTとCULHAM (2002)の方法に従い、T1プライマー及びBt2bプライマーを使いPCR反応を行った。PCR反応の結果、約600 bpsの増幅産物が得られた。このPCR産物をダイレクトシーケンスし、得られた β -tubulin領域の塩基配列をGenBankの*C. pauciramosum*

*sum*の登録配列 (AY078119, AY162320, AY923867) と比較した。その結果、100%一致した。

病原菌の同定

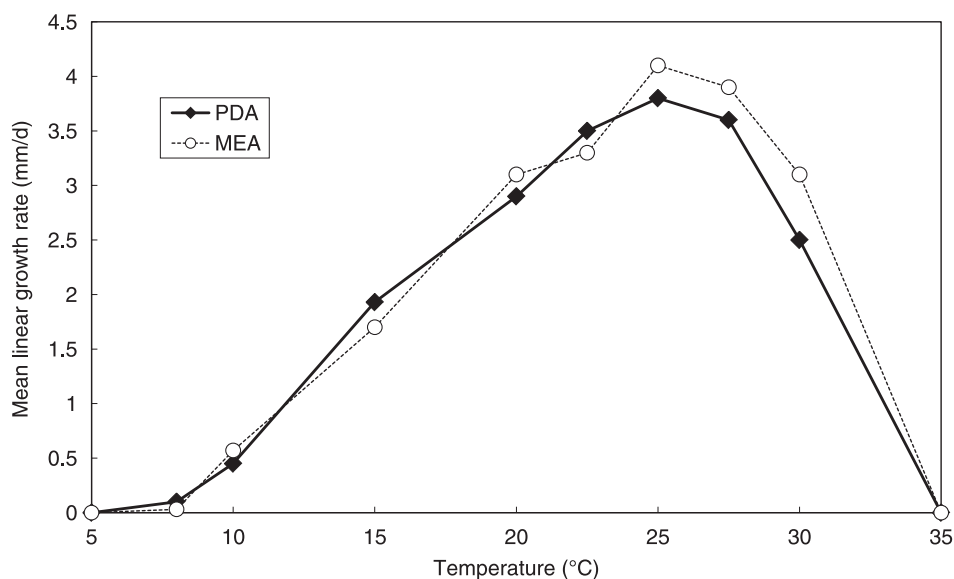
形態的特徴、培養的特徴さらに本菌の β -tubulin領域の塩基配列が、*C. pauciramosum*と一致したことから本菌を

Table 1. Comparison between the present fungus and the previously reported fungi on *Acacia* spp.

	Macroconidia		Macroconidiophore	
	size (μm)	septa	branches	
The present fungus	39~56 $\times$ 4~5	1	-3	
<i>C. pauciramosum</i> *	45~55 $\times$ 4~5	1	-3	
<i>C. insulare</i> *	40~50 $\times$ 3.5~4	1	-6	
<i>C. theae</i> *	70~88 $\times$ 5~6	(1-)3	-5	
<i>C. scoparium</i> *	42~50 $\times$ 3~4	1	-6	
<i>C. parasiticum</i> *	70~82 $\times$ 5~6.5	(1-)3	-3	
<i>C. reteaudii</i> *	75~95 $\times$ 6~7	(1-)5(-6)	-6	

	Vesicle		Temperatures for growth	
	shape	diam. (μm)	range ($^{\circ}\text{C}$)	optimum ($^{\circ}\text{C}$)
The present fungus	obpyriform~ellipsoidal	6~11	8~30	25
<i>C. pauciramosum</i> *	obpyriform~ellipsoidal	(5-)7~9(-11)	5~35	25
<i>C. insulare</i> *	obpyriform~broadly ellipsoidal	(4-)7~10(-13)	15~35	25~30
<i>C. theae</i> *	narrowly clavate	(3-)4(-6)	10~35	25
<i>C. scoparium</i> *	ellipsoidal~pyriform, clavate	6~8	5~35	25~30
<i>C. parasiticum</i> *	sphaeropedunculate	(6-)7~10(-12)	5~35	25
<i>C. reteaudii</i> *	clavate	(3-)5(-6)	10~35	25

*Crous (2002).

**Fig. 2.** Mean linear growth of *Cylindrocladium* isolate grown on PDA and MEA.

Cylindrocladium pauciramosum C. L. Schoch & Crous と同定した。本菌はオーストラリア、ニュージーランド、ドイツ、イタリア、ホンコン、アメリカ、メキシコ、ブラジル、コロンビア、南アフリカ共和国、ケニアに分布し、アカシア属をはじめユーカリ属、ツツジ属、サクラ属など19属の本木及び草本植物を広範囲に犯す多犯性菌である (CROUS, 2002)。近年、イギリスで *Ceanothus* 属 (クロウメモドキ科) から (LANE *et al.*, 2006)、また、スペインでは *Polygala myrtifolia* (ヒメハギ科) から発見されるな

ど (PEREZ-SIERRA *et al.*, 2006) 新たな宿主の報告が多くなされている重要な病原菌である。一方、我が国では本菌による病害は未報告である。アカシア属では *C. florida-num* Sobers & Seymour 及び *C. scoparium* Morgan によるアカシア茎枯病が、また *C. scoparium* Morgan による苗木枯病等が報告されているが (日本植物病理学会, 2000)、本菌による病徴は葉、茎に褐色の斑点を生じることから、これらの病徴とは異なる。したがって、本病をアカシア類斑点病 (*Cylindrocladium* leaf spot) と呼称することを提

案したい。

輸入検査における注意点

自然発病でも接種試験による発病においても本菌に感染し病斑が発生した葉は黄化を待たず早期に落葉したことから、輸入検疫に際しては、まずこの点に注意し外観を観察し、さらに葉、茎の斑点性病徴に気を付けて検査を実施したい。

謝 辞

本調査を行うにあたり、DNAのシーケンスにご協力頂いた横浜植物防疫所業務部種苗担当LMO分析チームの諸氏に厚くお礼申し上げます。

引用文献

CROUS, P. W. (2002) *Taxonomy and Pathology of Cylandrocladium* (Calonectria) *and Allied Genera*. APS, Minnesota: 278pp.
GIRARDIN, H. and J. P. LATGE (1994) DNA extraction and quantitation. In *Molecular Biology of Pathogenic Fungi: A Laboratory Manual*. Telos Press, New York: pp. 5-9.

HENRICOT, B. and A. CULHAM (2002) *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting *Buxus* spp., and its phylogenetic status. *Mycologia* **94**: 980-997.

岸 國平 (1995) 寒天葉片法による柄子殻、柄胞子の大量形成について. 植物防疫 **49**(3): 39-40.

LANE, C. R., P. A. BEALES, B. HENRICOT and A. HOLDEN (2006) First record of *Cylindrocladium pauciramosum* on *Ceanothus* in the U.K. *Plant Pathology* **55**: 582.

LEE, S. B. and J. W. TAYLOR (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single cells. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. Academic Press, San Diego: pp. 282-287.

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: 858 pp.

PEREZ-SIERRA, A., L. A. ALVAREZ, B. HENRICOT, J. GARCIA-JIMENEZ and J. ARMENGOL (2006) *Cylindrocladium pauciramosum* causes root and collar rot of *Polygala myrtifolia* in Spain. *Plant Pathology* **55**: 298.