

## 対峙培養及び rDNA ITS 領域の PCR-RFLP 解析によるカンキツ樹脂病菌の同定

梶谷裕二・平島敬太・松本和紀・松本幸子<sup>1)</sup> (福岡県農業総合試験場・<sup>1)</sup>福岡県病害虫防除所)Yuji KAJITANI, Keita HIRASHIMA, Kazunori MATSUMOTO and Sachiko MATSUMOTO :  
Identification of phomopsis sp., the Fungus Causing Gummosis of Citrus by Dual Culture Method  
and PCR-RFLP Analysis of rDNA ITS Region.

近年、福岡県内の加温栽培の温州ミカンでカンキツ樹脂病が多発し問題となっている。本病の病原菌については、*Phomopsis* 属菌の一種とされている<sup>1)</sup>が、現在までのところ種名は未確定である。そこで、今回、病原菌の形態的特徴や病原性の検討に加え、胞子形態が酷似している黒点病菌との対峙培養および病原菌の rDNA ITS 領域の PCR-RFLP 解析により、本菌の分類学的所属について検討したので報告する。

## 1. 試験方法

1) 病原菌の分離: ハウス内で萎ちょう、枯死したカンキツ枝の枯死部と健全部との境界付近から、常法により PDA 培地を用いて分離した。2) 病原性の確認: 分離菌を PDA 培地で7日間、25℃、明条件で培養後、菌そう先端を直径6mmのコルクボーラーで打ち抜き、1998年1月13日に現地加温ハウス栽培のカンキツ樹の結果母枝に有傷接種した。3) 病原菌の形態的特徴: 病原性の確認された菌について、柄胞子の形態や大きさおよび培養性状について調査した。4) カンキツ幼果に対する病原性: ハウス栽培のカンキツ幼果に、 $\alpha$  胞子の濃度を約  $10^8$  個/ml に調整した分離菌の胞子懸濁液をガーゼにしみ込ませ、無傷接種した。5) 分離菌とカンキツ黒点病菌との対峙培養: 殺菌したカンキツの切り枝上で、交配型の異なるカンキツ黒点病菌2菌株と現地の萎ちょう、枯死症状の樹より分離した菌との間で対峙培養を行った。6) 分離菌の rDNA ITS 領域の PCR-RFLP 解析: 現地の萎ちょう、枯死症状の樹より分離した6菌株と黒点病菌2菌株から DNA を抽出し、WHITE et al.<sup>2)</sup> の設計したプライマー ITS1 と ITS4 を用いて、菌の 5.8SrDNA とその両側の ITS 領域を含む約 550bp の断片を PCR で増幅した。これらの増幅産物を4種の制限酵素 (Hae III, Taq I, Msp I, Cfr13 I) で切断後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して RFLP パターンを比較した。

## 2. 結果および考察

カンキツ枝の萎ちょう・枯死部と健全部との境からは

第1表 カンキツ樹脂病菌と黒点病菌との対峙培養

	カンキツ樹脂病菌					カンキツ黒点病菌				
	FCPS		FCPS		FCPS	FCDC		FCDC		FCDC
	9501	9502	9503	9503	9402	9402	9406	9406	9406	
カンキツ黒点病菌 (FCDC9402)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
カンキツ黒点病菌 (FCDC9406)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

注) +: 有性世代 (子のう殻及び子のう胞子) 形成  
-: 形成せず

黒点病菌に酷似した *Phomopsis* 属菌が高率 (分離率 84.0%) に分離された。また、樹脂病菌を接種した約1カ月後、現地で発生しているものと同様の萎ちょう・枯死症状が再現され、接種部からは接種菌と思われる *Phomopsis* 属菌が高率 (分離率: 66.7%) に再分離された。このことから、最近、現地で発生しているカンキツ樹の萎ちょう・枯死症状は、カンキツ樹脂病と考えられた。なお、樹脂病菌の  $\alpha$  柄胞子は、紡錘形、無色、単胞で大きさは平均  $8.1 \times 3.5 \mu\text{m}$  で、コロニー形態は最初白色で、のちに暗緑色となった。これらの形態や大きさおよび培養性状は、カンキツ黒点病菌に酷似していた (データ省略)。また、樹脂病菌は、カンキツ幼果に対して黒点病菌と同様の病原性が認められ、黒点症状からは *Phomopsis* 属菌が再分離された (分離率: 64.9%)。次に、カンキツ樹脂病菌と黒点病菌を約6カ月間対峙培養したところ、両菌が対峙した部分を中心に有性世代 (子のう殻および子のう胞子) が形成された (第1表)。また、PCR の増幅産物を上記4種の制限酵素で切断後の RFLP パターンを比較したところ、樹脂病菌と黒点病菌のパターンはすべての制限酵素で一致した。これに対して、制限酵素 Cfr13 I で切断したナシ胴枯病菌 (*Diaporthe medusaea*) の RFLP パターンは、樹脂病菌や黒点病菌のパターンとは異なっていた (第2表)。

以上のことから、カンキツ樹脂病の病原菌をカンキツ黒点病菌と同一の *Diaporthe citri* と同定した。

## 引用文献

- 1) 田中寛康 (1988) 作物病害辞典 (岸 国平編) 全国農村教育協会: 646p.
- 2) WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. (INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. and WHITE, T.J. eds.) Academic Press, San Diego, pp. 315-322.

第2表 カンキツ樹脂病菌と黒点病菌およびナシ胴枯病菌の rDNA ITS 領域の比較

病原菌	菌株番号	制限酵素				
		Cfr13 I	Hae III	Taq I	Msp I	
カンキツ黒点病菌 (D.citri)	FCDC9402	A	C	D	E	
"	FCDC9406	A	C	D	E	
カンキツ樹脂病菌	FCPS9501	A	C	D	E	
"	FCPS9502	A	C	D	E	
"	FCPS9503	A	C	D	E	
"	FCPS9701	A	C	D	E	
"	FCPS9702	A	C	D	E	
"	FCPS9704	A	C	D	E	
ナシ胴枯病菌 (D.medusaea)	FPeDM9410	B	C	D	E	

注) 同一アルファベットは同一パターンであることを示す。