

沖縄県の施設マンゴー栽培における炭疽病の  
発生生態および防除に関する研究

**Studies on the ecology and control of mango anthracnose in  
greenhouse cultivation in Okinawa Prefecture**

鹿児島大学大学院連合農学研究科

澤岷 哲也

2025 年

# 目 次

I. 序 論 .....	4
II. 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	
1. 材料および方法 .....	9
1. 1 東京大田市場における発生実態調査 .....	9
1. 2. 罹病果実における 2 種病原菌の分離頻度 .....	9
2. 結果 .....	10
2. 1 東京大田市場における発生実態調査 .....	10
2. 2 罹病果実における 2 種病原菌の分離頻度 .....	10
3. 考察 .....	13
III. 施設マンゴー果実における炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> および <i>C. acutatum</i> の潜在感染とその感染時期	
1. 材料および方法 .....	15
1. 1 潜在感染している炭疽病菌の検出とその病原性 .....	15
1. 2 <i>nit</i> 変異株の作出 .....	16
1. 3 <i>nit</i> 変異株の圃場接種による感染時期の検討 .....	17
2. 結果 .....	18
2. 1 潜在感染している炭疽病菌の検出と分離菌の病原性 .....	18
2. 2 生育時期別に接種した <i>nit</i> 変異株の再分離 .....	19
3. 考察 .....	20

#### IV. マンゴー炭疽病菌の薬剤感受性および薬剤体系散布 (ver. 1) の防除効果

1. 材料および方法	24
1. 1 炭疽病菌の薬剤感受性	24
1. 2 果実肥大期の薬剤散布による防除効果と薬害	24
1. 3 薬剤体系散布 (ver. 1) による防除効果	25
2. 結果	27
2. 1 炭疽病菌の薬剤感受性	27
2. 2 果実肥大期の薬剤散布による防除効果と薬害	27
2. 3 薬剤体系散布 (ver. 1) による防除効果	29
3. 考察	30

#### V. マンゴー炭疽病および軸腐病の同時防除のための数種有効殺菌剤を用いた体系散布技術 (ver. 2) の確立

1. 材料および方法	34
1. 1 病原菌の薬剤感受性	34
1. 2 同時防除のための薬剤体系散布 (ver. 2) による防除効果	35
2. 結果	36
2. 1 病原菌の薬剤感受性	36
2. 2 同時防除のための薬剤体系散布 (ver. 2) による防除効果	38
3. 考察	40

#### VI. 未硬化葉を用いたマンゴー炭疽病の簡易病原性検定法とマンゴー遺伝資源における抵抗性品種の選抜

1. 材料および方法	44
------------	----

1. 1	未硬化葉を用いた簡易病原性検定法の検討	44
1. 2	簡易病原性検定法による炭疽病抵抗性品種の選抜	45
2.	結果	46
2. 1	未硬化葉を用いた簡易病原性検定法の検討	46
2. 2	簡易病原性検定法による炭疽病抵抗性品種の選抜	48
3.	考察	50
VII. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> および <i>C. acutatum</i> 両種複合体に所属する沖縄産マンゴー炭疽病菌の種構成と諸特性		
1.	材料および方法	54
1. 1	供試菌株および分子系統解析	54
1. 2	形態観察	54
1. 3	病原性試験	57
1. 4	薬剤感受性試験 (MIC 値調査)	57
2.	結果	58
2. 1	沖縄産マンゴー炭疽病菌種複合体の種構成および形態的特性	58
2. 2	沖縄産マンゴー炭疽病菌種複合体の病原性および薬剤感受性	62
3.	考察	64
VIII. 総合考察		
IX. 引用文献		
X. 謝辞		
XI. 要約		
XII. 要約 (英文)		

## I. 序 論

わが国におけるマンゴー (*Mangifera indica* L.) 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 ‘アーウィン’ 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気が高く、高値で取引されている。その一方で、市場や消費者へ果実を届ける過程において深刻な問題となっているのが炭疽病である。2019~2021 年度の東京市場における沖縄県産出荷果実の品質調査においても、本病の発生率は平均 12.4~20.4%となっており、依然として品質低下の大きな要因の 1 つとなっている (沖縄県農林水産部流通・加工推進課編, 2022)。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。しかし、沖縄県で栽培されるマンゴーにおいて、果実の収穫から輸送、販売に至る過程における本病の発病時期や被害状況については、これまで調べられていない。また、本病はこれまで広義の分類とされる *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo および *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds の 2 種の糸状菌が発症の原因とされていたが (中村ら, 1979 ; 田場ら, 2004)、沖縄県におけるこれら 2 種病原菌の分離頻度も不明である。これらの発病実態を明らかにすることは、生産者の炭疽病対策に対する意識を高めるだけでなく、防除技術の確立のための重要な基礎資料となる。そこで、本研究では最初の取り組みとして「II. 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」において、東京大田市場に出荷された沖縄県産マンゴー果実における炭疽病の発病推移について調査を行うとともに、沖縄全域の栽培圃場から採集したマンゴー果実で発病を引き起こす 2 種病原菌の分離頻度の調査を行ったので、その結果を記述する。

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、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

における潜在感染の特性は (Arauz, 2000), 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「III. 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」において、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 (澤岬ら, 2013b), 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、その結果を併せて記述する。

本病に対する収穫後の防除法として、これまでに温熱処理 (広瀬ら, 2008) および温湯処理 (照屋ら, 2012) が確立されているが、高い防除効果を示す一方で、加熱後の果皮の黄化ならびに光沢が弱くなる現象が確認されており、いまだ生産現場での普及には至っておらず、さらなる改良が必要とされている。そのため、沖縄県では本病に対して収穫前の圃場における根本的な防除技術の確立が急務となっていた。令和 7 年 1 月現在、我が国において本病に対する登録薬剤は 6 剤あるが、マイナー作物であるために他の果樹類に比べて登録数は明らかに少ない (日本植物防疫協会, 2023)。また、これら登録薬剤は当然のことながら炭疽病に対して実用的な防除効果を示すことが考えられるが、登録のために過去実施された農薬実用化試験では、実際には発病率による判定結果をもとに登録されたもの (日本植物防疫協会編, 2003), あるいは判定結果が非公開で詳細不明なものがほとんどであり、圃場散布後の収穫果実における本病の発病に対する防除効果や散布時期ならびに薬害の有無に関する報告はない。さらに、本病原菌に対する各種登録薬剤の感受性やその菌種間差についても未検討であ

る。一方、他国では露地マンゴーにおける本病に対するベノミルやプロクロラズなど数種薬剤による防除効果の報告はある (Dodd *et al.*, 1991 ; Estrada *et al.*, 1996) が、我が国とは登録薬剤の種類が異なるため使用できない。また、本病の発生生態を考慮すると、圃場における防除は出蕾以降から開花、結実および収穫期までの生育ステージにおいて、予防的かつ長期的な防除スケジュールの確立が重要であるが、先行研究では個々の薬剤の効果を判定しているものが多く、複数薬剤を用いたローテーションによる体系散布の防除に関する研究は、マンゴーではほとんど行われていない。そのため、沖縄県ではこれまで生産現場で活用できる本病に有効な防除歴が策定されていなかった。こうした背景から、マンゴーの生育ステージを考慮した適切な薬剤の選択と効果的な散布スケジュールの策定を行うには、病原菌に対する各種薬剤の作用特性を明らかにし、有効な薬剤を組み合わせた体系散布による収穫後の防除効果ならびに薬害の有無について検討する必要がある。そこで、「IV. マンゴー炭疽病菌の薬剤感受性および薬剤体系散布 (ver. 1) の防除効果」において、施設マンゴーにおける炭疽病に有効な 5 種登録薬剤に対する 2 種炭疽病菌の薬剤感受性および果実肥大期の薬剤散布による収穫後の防除効果と薬害の発生の有無について評価を行うとともに、出蕾前 (12 月下旬) から収穫前 (6 月下旬の袋かけ前) までのこれら薬剤を用いた体系散布 (ver. 1) の防除効果について検討したので、その結果を記述する。

本病の登録薬剤では、本病原菌について耐性菌が発達しやすいストロビルリン系殺菌剤 (QoI 剤) が複数登録されており、本県では低頻度ではあるが既に QoI 剤耐性マンゴー炭疽病菌が離島地域の 1 地点で確認されている (澤岬ら, 2014)。先に本病については 5 種登録殺菌剤を用いた体系散布 (ver. 1) により、実用的な防除効果が確認されていたが (澤岬ら, 2013c)、本体系では着果期以降に QoI 剤のクレソキシムメチルドライフロアブルおよびアゾキシストロビンフロアブルを連用散布することから、将来的に薬剤耐性菌の発生を助長することが危惧されていた。また、生産現場からはもう一つの重要な果実病害であるマンゴー軸腐病 (澤岬ら, 2013e) を含めた両病害の共通防除体系の構築が強く求められていたが、本病については国内の登録薬剤を用いた圃場における防除効果を確認した事例はなかった。そのため、これら両病害の病原菌に対する各種薬剤の作用特性を明らかにし、作用点の異なる複数の有効薬剤をローテーションで組み入れながら QoI 剤の使用を制限した耐性菌の発達しにくい体系散布の再策定ならびに、本体系の収穫後の防除効果や薬害の有無について検討する必要がある。そこで、本研究では「V. マンゴー炭疽病および軸腐病の同時防除のための数種有効殺菌剤を用いた体系散布技術 (ver. 2) の確立」において、数種登録薬剤に対する炭疽病菌および軸腐病菌の薬

剤感受性および果実肥大期の薬剤散布による収穫後の防除効果と薬害の発生の有無について評価を行うとともに、出蕾前（12月下旬）から収穫前（6月下旬の袋かけ前）までの数種薬剤を用いた両病害に対する体系散布（ver. 2）の防除効果について検討したので、その結果を記述する。

我が国のマンゴー栽培における主要品種‘アーウィン’は、マンゴー炭疽病への感受性が高い（Nishijima, 1993）。現在、本病の防除対策として果実の収穫までに年数回の薬剤散布が行われており、一定の効果は認められるものの、多くの労力・費用を必要とし、生産面での負担が大きい。さらに、近年の安心・安全な食料要求の高まりから、殺菌剤の使用量低減を望む消費者の声も強い。こうした背景から、炭疽病に強い抵抗性品種の開発は重要である。一方、沖縄県農業研究センター名護支所ではマンゴー新品種の育種研究を進めているが、これまでに本病に対する抵抗性を評価した事例はなく、育種現場で活用できる抵抗性の検定方法は未確立であった。海外では一般的に自然発病条件下での果実による抵抗性の評価が行われているが（Bhagwat *et al.*, 2015 ; Gupta *et al.*, 2017）、年次間の圃場の環境条件に結果が左右されることから、正確に抵抗性を判定するのが難しい場合が多い。また、実際の育種作業では多数の個体を扱うため、より早い生育段階での評価が求められるが、果実での評価は実生から収穫までに4～5年以上の時間を要するため作業効率が悪い。そのため、遺伝資源や雑種後代の中から効率よく短期間で本病に強い品種・系統を評価・選抜するためには、簡易で安定的に抵抗性を検定できる方法を確立する必要がある。そこで、本研究では「VI. 未硬化葉を用いたマンゴー炭疽病の簡易病原性検定法とマンゴー遺伝資源における抵抗性品種の選抜」において、マンゴーの未硬化葉を活用した本病の病原性検定法を開発するとともに、本検定法を用いた名護支所保存のマンゴー遺伝資源 29 品種の炭疽病抵抗性を評価し、同病害に強い育種素材の選抜を行ったので、その結果を記述する。

本病の病原として、上述のように広義 2 種の *Colletotrichum* 属菌が報告されていたが、近年の複数遺伝子座による分子系統解析（MLSA: multi-locus sequence analysis）を用いた病原菌の再同定にともない、これら 2 種が複数の種で構成される種複合体（*C. gloeosporioides*=50 種, *C. acutatum*=40 種）であることが明らかになり、それぞれ *C. gloeosporioides* species complex, *C. acutatum* species complex として一括りにまとめられた（Damm *et al.*, 2012 ; Weir *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2023）。しかし、MLSA に基づいた沖縄産マンゴー炭疽病菌の種構成や菌種間の諸特性の違いは未だ明らかではない。それらを明らかにすることは、本病の生態解明や、薬剤を主体とした効果的な防除戦略を確立する上で重要である。そこで、本研究では「VII. *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体に所属

する沖縄産マンゴー炭疽病菌の種構成と諸特性」において、過去複数年にかけて沖縄県全域の罹病果実から採集したマンゴー炭疽病菌菌株について、単一または複数遺伝子・DNA 領域の塩基配列に基づく分子系統解析による種構成を解明するとともに、その菌種間における形態的特性、病原性および薬剤感受性等の差異を明らかにしたので、その結果を記述する。

以上より、本論文は著者が2012年から2024年にかけて実施した沖縄県の施設マンゴーにおける炭疽病に関する研究成果のうち、本病の発生生態および防除技術について取りまとめたものである。上記のII～VII章の中で、市場での発生実態調査、施設における病原菌の潜在感染と感染時期、有効薬剤による体系散布技術、病原性検定法の開発と抵抗性品種の探索ならびに沖縄産マンゴー炭疽病菌種複合体の解明について、複数の有用な知見を得て総合的に考察した。これらの総合的な発生生態と防除技術に関する知見は、現在、沖縄県だけでなく九州各地域における本病の防除対策のための有効な基礎情報ならびに防除暦として反映され、マンゴー産地の生産現場において普及している。

なお、本論文は「日本植物病理学会報」および「熱帯農業研究」で公表した成果を中心に、取りまとめたものである。

## II. 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

### 1. 材料および方法

#### 1. 1 東京大田市場における発生実態調査

東京都中央卸売市場大田市場に出荷された沖縄県産マンゴー（‘アーウィン’）果実における炭疽病の発病果率および発病度の経時的変化を、2009年7月28日から8月3日にかけて調べた。調査は、宮古島、豊見城市以外の沖縄本島南部地域（南風原町、南城市、糸満市および八重瀬町）および沖縄本島の豊見城市で生産され、沖縄県農業協同組合（JA おきなわ）をとおして集荷された果実を対象に行った。豊見城市からの出荷分については、大田市場到着前日の出荷場（豊見城市与根）における調査から行い、他地域からの出荷分については大田市場到着当日から調査した。市場到着から3日目までは大田市場ヤード内（常温）で調査を行い、3日目以降は、沖縄県農業研究センターに輸送し、インキュベーター（27℃条件下）で保存して調査を継続した。調査した農家数および合計果実数は、宮古島が4件12果、豊見城市以外の沖縄本島南部地域が14件48果、沖縄本島の豊見城市が18件18果の計36件78果であった。発病度の算出は、広瀬ら（2008）の方法に従い、以下のとおりに行った。指数0：発病なし、指数1：2mm以下の病斑が2個以下、指数2：2mm以下の病斑が3～6個または2～5mmの病斑が1個、指数3：指数2以上、発病度＝ $\{\sum(\text{指数別発病果数} \times \text{指数}) / (3 \times \text{調査果数})\} \times 100$ 。

#### 1. 2. 罹病果実における2種病原菌の分離頻度

マンゴー罹病果実における *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* の分離頻度は、2009年7～8月にかけて沖縄本島、宮古島、石垣島、伊是名島および久米島の合計62地点のハウスで生産された果実（‘アーウィン’）を採集して調査した。果実は1地点あたり1～26果採集し、1果あたりの分離菌株数は1株とした。採集した果実は25℃下で3～7日間追熟させ、発病を促したあと黒色病斑上に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1病斑あたり1個の単孢子分離菌株を得た。分離菌株は、あらかじめ作製したPDA培地（ジャガイモ角片200g、ブドウ糖20g、寒天20g、蒸留水1L）を10mL分注した9mmシャーレ上で前培養し、生育した菌叢先端を直径5mmのコルクボーラーで打ち抜き、新たに作製したPDA培地上の中央に打ち抜いた菌叢片を置床した。これをインキュベーター（25℃）で5日間培養し、分生子形態、菌叢の色調、分生子塊形成の有無を観察し、菌

菌叢直径を計測した(佐藤, 1997). 分離菌の種特異的プライマーを用いた種の同定は, 稲田・山口(2006)のPCR検定法に従って以下のように行った. DNAの抽出はPDA培地で5日間前培養した各菌株の菌叢から滅菌した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(500W)で6分間熱処理した後, Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いてDNAを抽出した. 上流プライマーにはCaInt 2 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996) またはCgInt (Mills *et al.*, 1992), 下流プライマーにITS4 (White *et al.*, 1990) を用い, 抽出DNA 1  $\mu$ L を鋳型として, 20  $\mu$ L のPCR反応液(各プライマー濃度 0.5  $\mu$ M, 0.2 mM dNTP Mixture, 1 U *Taq* DNA Polymelase, 10 $\times$ *Taq* buffer) でPCRを行った. PCR反応液は94 $^{\circ}$ Cで4分間の変性後, 94 $^{\circ}$ C1分間, 59 $^{\circ}$ C2分間, 72 $^{\circ}$ C2分間のサイクルを40回繰り返し, 最後に72 $^{\circ}$ C7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  $\mu$ g/mL 添加)で電気泳動した後, 紫外線照射下でバンドの有無を確認した. ここで, *C. acutatum* はCaInt 2 とITS4の組み合わせで500 bp前後のバンドが観察され, *C. gloeosporioides* はCgInt とITS4の組み合わせで450 bp前後のバンドが観察される(第3図).

## 2. 結果

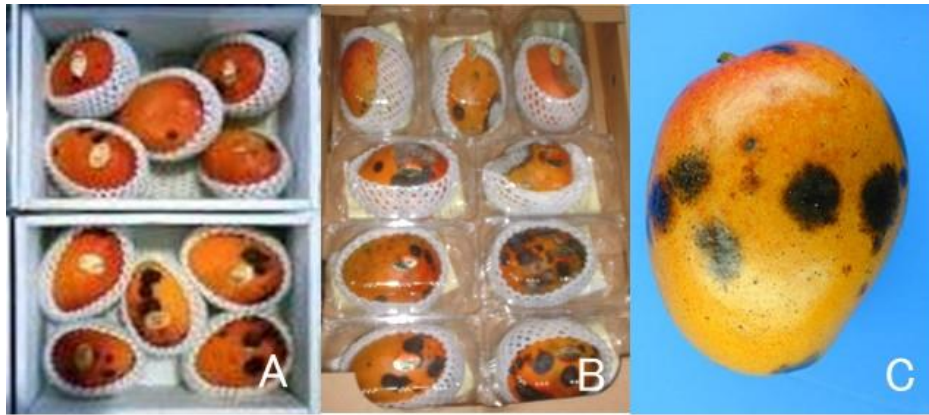
### 2. 1 東京大田市場における発生実態調査

全産地の果実において, 市場到着後から炭疽病の発病がみられ, 日数経過とともに発病果率および発病度ともに高まった(第1, 2図). このように, 沖縄から東京大田市場へ出荷後, 早いものでは翌日(1日目)から炭疽病の発病が確認され, 3日目以降から被害が著しく増加していくことが本調査によって初めて示された. 包装形態の違いによる発病状況を比較すると, 宮古島と沖縄本島の産地間では, プラスチック製パックの方が紙製の出荷箱よりも発病果率および発病度が高く推移する傾向を示した. しかし, 豊見城市を除いた沖縄本島南部地域の果実でみると, 必ずしもプラスチック製パックで炭疽病の被害が大きいわけではなく, 紙製の出荷箱における発病果率と発病度が高く推移する場合も認められた(第2図). また, 調査した36農家のうち, 6農家では出荷7日後においても炭疽病の発病が認められなかった.

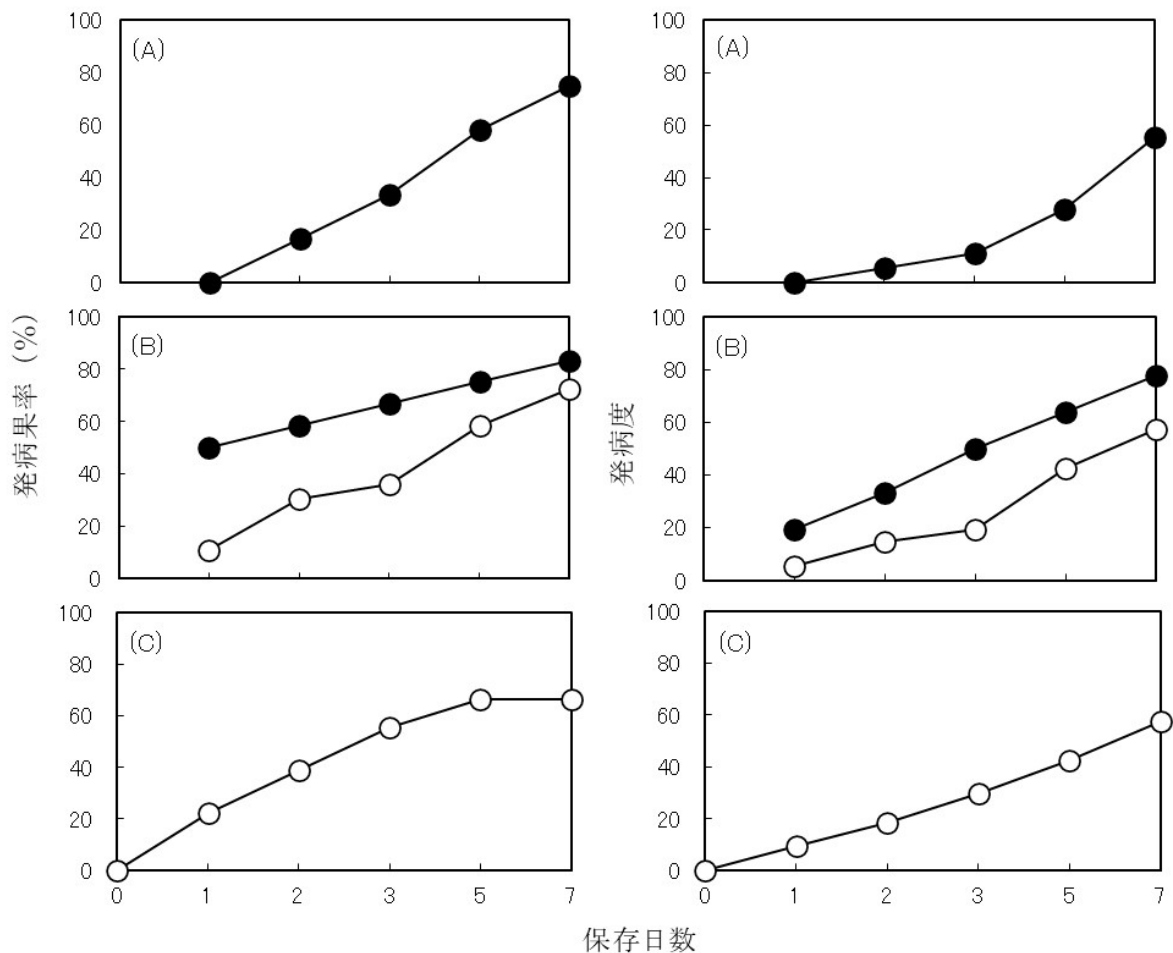
### 2. 2 罹病果実における2種病原菌の分離頻度

沖縄全域から採集した果実における2種病原菌の分離頻度においては, 病斑から分離した150菌株のうち, 133菌株(88.6%)が*C. gloeosporioides*, 17菌株(11.4%)が*C. acutatum*と同定された(第1表). 分離菌株の形態による同定の結果とPCRによる同定結果に相異は認められなかった(第3図).

調査した 62 地点のうち 4 地点で同一圃場から 2 種類の炭疽病菌が分離された。 *C. gloeosporioides* は、調べた全ての島から分離されたが、 *C. acutatum* は沖縄本島の 4 地点のみから分離された (第 1 表)。



第1図 出荷果実におけるマンゴー炭疽病の被害の様子  
紙製の出荷箱 (A) , プラスチック製パック (B) , 典型的な症状 (C) .

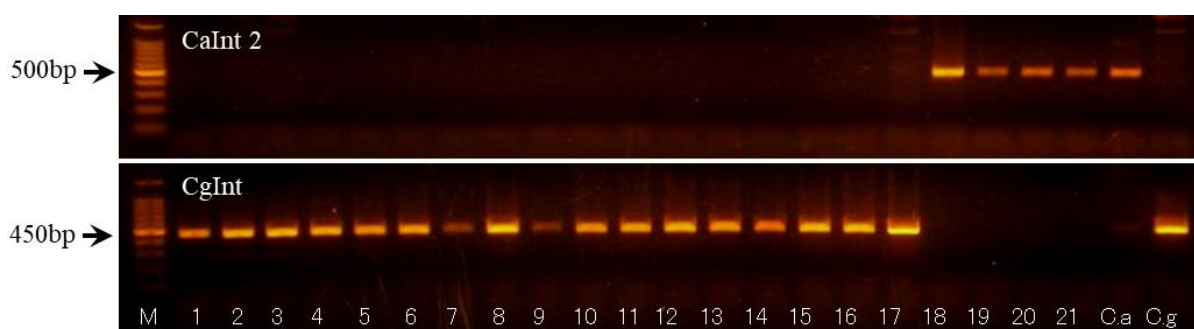


第2図 大田市場におけるマンゴー炭疽病の発病推移。

黒丸および白丸はそれぞれ、紙製の出荷箱およびプラスチック製パックを示す。(A) 宮古島 (N=12) , (B) 豊見城市を除く南部地域 (N=12: 紙製出荷箱, N=36: プラスチック製パック) , (C) 豊見城市 (N=18) , 発病度の算出は広瀬ら (2008) の方法にしたがった。

第1表 マンゴー罹病果実より分離した*Colletotrichum gloeosporioides*および*C. acutatum*の分離頻度

地域	市町村	地点数	各菌種が同定された地点数 (調査した分離株数)	
			<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. acutatum</i>
沖縄本島	国頭村	3	3 (8)	0 (0)
	東村	2	2 (3)	0 (0)
	名護市	4	4 (7)	0 (0)
	今帰仁村	4	4 (11)	0 (0)
	宜野座村	5	3 (8)	2 (3)
	大宜味村	2	2 (4)	0 (0)
	うるま市	3	3 (29)	2 (3)
	沖縄市	1	1 (3)	1 (2)
	嘉手納町	1	1 (2)	0 (0)
	北中城村	1	1 (1)	0 (0)
	豊見城村	8	8 (10)	0 (0)
	南風原町	2	2 (5)	0 (0)
	八重瀬町	1	1 (1)	0 (0)
	南城市	1	1 (1)	0 (0)
	糸満市	4	4 (16)	1 (9)
	那覇市	2	2 (2)	0 (0)
	石垣島	石垣市	11	11 (12)
宮古島	宮古島市	3	3 (4)	0 (0)
伊是名島	伊是名村	1	1 (1)	0 (0)
久米島	久米島町	3	3 (5)	0 (0)
合計		62	60 (133)	6 (17)



第3図 マンゴー罹病果実から分離した*C. gloeosporioides*および*C. acutatum*のPCR解析による電気泳動画像  
 使用したプライマーはCgInt, CaInt 2およびITS4. 分離菌株は東村 (レーン1), 名護市 (レーン2), 今帰仁村 (レーン3), 嘉手納村 (レーン4), 北中城村 (レーン5), うるま市 (レーン6), 豊見城市 (レーン7), 南風原町 (レーン8), 八重瀬町 (レーン9), 糸満市-1 (レーン10), 石垣市-1 (レーン11), 石垣市-2 (レーン12), 石垣市-3 (レーン13), 宮古島市-1 (レーン14), 宮古島市-2 (レーン15), 久米島町-1 (レーン16), 久米島町-2 (レーン17), 宜野座村-1 (レーン18), 宜野座村-2 (レーン19), 沖縄市 (レーン20), 糸満市-2 (レーン20), C.a: *C. acutatum* (MAFF306409), C.g: *C. gloeosporioides* (MAFF240188).

### 3. 考察

沖縄から東京大田市場へ出荷後、全産地の果実において日数経過とともに発病果率および発病度ともに高まり、早いものでは1日目から炭疽病の発病が確認され、3日目以降から被害が著しく増加した。炭疽病の発病は、圃場での病原菌の付着器による潜在感染が主要因とされており、果実熟度が発病に影響するとされている (Arauz, 2000)。その一因として、未熟果実の果皮に含まれる抗菌成分であるレゾルシノールが収穫後の果実熟度の進行とともに減少するため、完熟果実で発病が増加すると考えられている (Prusky and Keen, 1993)。このことから、本病の進行と発病は、出荷環境における湿度や結露などの外部要因以上に、果実熟度の進行に伴う果実内部の生理的要因に影響されるものと考えられる。例えば、包装形態の違いでは、宮古島と沖縄本島の産地間では、プラスチック製パックの方が紙製の出荷箱よりも発病果率および発病度が高く推移する傾向を示しており、プラスチック製パック内部の高い湿度と結露が発病に好適な条件となっていることが推察される。しかし、豊見城市を除いた沖縄本島南部地域の果実でみると、必ずしもプラスチック製パックで炭疽病の被害が大きいわけではなく、紙製の出荷箱における発病果率と発病度が高く推移する場合も認められている(第2図)。このことから、出荷果実の発病に及ぼす要因は、包装素材の違いによる湿度や結露などの環境要因以外に、産地間における果実の熟度進行の差異や各生産農家の圃場における病原菌の感染密度の差異も影響しているものと考えられる。

出荷後から発病が認められたことから、出荷前あるいは収穫前の圃場における本病に対する予防対策が重要となるが、これまでに出荷前の対策として温湯処理 (安富ら, 1991) および温熱処理 (広瀬ら, 2008) による防除効果が確かめられている。しかし、加熱後に完熟果特有の光沢のある鮮紅色が失われる等の品質への影響が懸念され、さらなる熱処理法の改良が必要である。現在、収穫前の対策として雨滴による果実への病原菌 (分生子) の伝搬を抑えるために、1月の出蕾から7月の収穫にかけてプラスチックビニール被覆による雨よけ栽培が行われている。しかし、いまだ収穫後に炭疽病が多発していることから、雨よけ条件下における病原菌の感染時期や感染経路等の発生生態について不明な点が多く、効果的な圃場防除技術は確立されていない。このため、施設内での病原菌の詳細な発生生態に関する調査が今後の大きな課題である。また、調査した生産農家のうち、6農家では出荷7日後においても炭疽病の発病が認められなかった。寺本ら (2009) の報告では、圃場管理と炭疽病の発病との関連性について、剪定枝葉等の残渣が少なく、農薬の散布回数の多い圃場で、収穫後の果実

発病は低い傾向にあったとされている。このことから、今後は本県においても発病が認められなかった農家の圃場条件、薬剤散布履歴、栽培管理等の特徴を明らかにすることが必要と考えられた。

沖縄全域の罹病果実の病斑から分離した 2 種病原菌の分離頻度では、88.6%が *C. gloeosporioides*、11.4%が *C. acutatum* と同定され、*C. gloeosporioides* は調べた全ての島から分離されたが、*C. acutatum* の分離は沖縄本島の 4 地点のみであった（第 1 表）。このように *C. acutatum* の分布は局所的であったが *C. gloeosporioides* は沖縄全域に分布しており、かつ 2 種が分布する地域では *C. gloeosporioides* のほうが *C. acutatum* よりも分離頻度が高く、沖縄県において *C. gloeosporioides* が本病の優占種であることが明らかになった。このことから、東京大田市場の出荷果実で問題となる炭疽病の発病においても *C. gloeosporioides* が優占している可能性が推察された。フロリダおよびプエルトリコにおける分離頻度の調査では、93%が *C. gloeosporioides*、5%が *C. acutatum*、2%は *Colletotrichum* spp. であることが報告されており（Lydia *et al.*, 2006）、本調査と同様な結果となっている。このことから、一般的にマンゴー炭疽病の原因菌として *C. acutatum* より *C. gloeosporioides* のほうで重要度が高いと考えられる。しかし、長崎県の露地ビワにおける炭疽病菌では、*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 *C. acutatum* が有するベンズイミダゾール系薬剤に対する耐性が考えられている（古賀, 1999）。マンゴーにおいて *C. acutatum* の分離率が低い原因の詳細は不明であるが、ビワの例とは逆に *C. gloeosporioides* は特定の農薬に対して耐性があるが、*C. acutatum* は感受性であるという可能性も考えられる。このことから、2 種病原菌間における薬剤感受性の違いについても検討する必要がある。

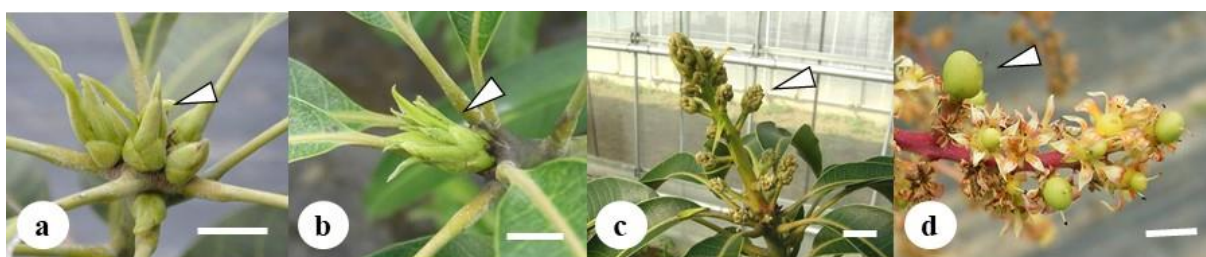
### III. 施設マンゴー果実における炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* の潜在感染とその感染時期

#### 1. 材料および方法

##### 1. 1 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（‘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4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）の方法に従って行った。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9cmガラスシャーレ内に試料を収め、25℃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、画線培養により単孢子分離を行った。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10mL分注した9cmシャーレで分離菌を前培養し、生育した菌叢先端を直径5mm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℃の暗室で5日間培養し、佐藤（1997）の同定法に従い、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）の方法に従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、1.5mLマイクロチューブに入れ、電子レンジ（500W）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CaInt2（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は前章に準じた方法で行い、紫外線照射下で*C. acutatum*はCaInt2とITS4の組み合わせで約500bp付近、*C. gloeosporioides*はCgIntとITS4の組み合わせで約450bp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500bp、450bp付近でバンドを示すことが確認されている（澤岬ら，2012）。次に分離菌のマンゴー果

実（‘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×31 cm×29 cm）内で保湿し 27℃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。



第4図 調査したマンゴー健全部位（採集月日）  
a：頂芽（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）  
図中の矢印は採集部位，バーは1 cmを示す。

## 1. 2 *nit* 変異株の作出

*nit* 変異株の作出は、Puhalla (1985) の方法に従って行った。供試菌株として沖縄県名護市マンゴー園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（シヨ糖 30g, 硝酸ナトリウム 2g, リン酸 2 水素カリウム 1g, 硫酸マグネシウム 7 水和物 0.5g, 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℃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 ら (1991) の方法に従い硝酸塩、亜硝酸塩、ヒポキサンチン、アンモニウム塩、尿酸の利用の可否による菌叢生育の有無で *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℃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。

### 1. 3 *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(‘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ら(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2.5μg、乳酸0.1%、蒸留水1L)で25℃の暗黒下にて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<sup>3</sup>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20μL~20mL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)に従い、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℃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3×3mm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℃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℃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450bp付近)の確認を行った。

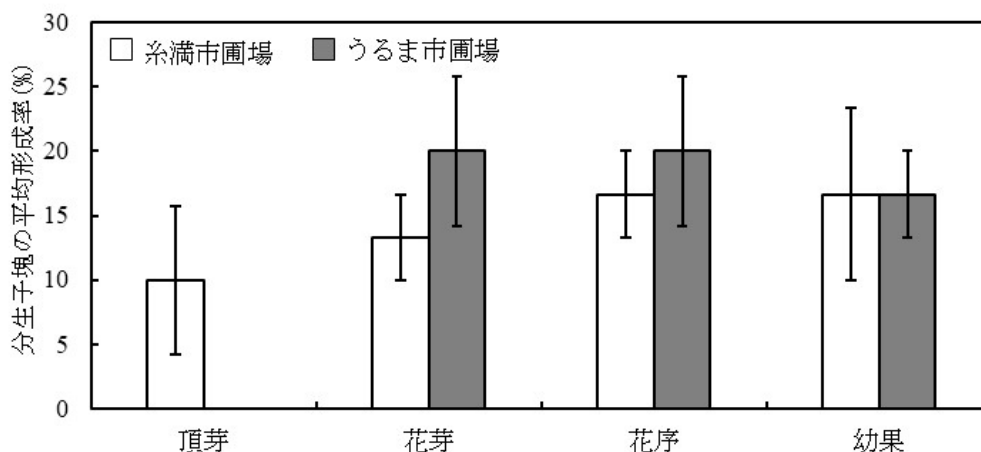
## 2. 結果

### 2. 1 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5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6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2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。



第5図 エタノール浸漬簡易検定による炭疽病菌潜在感染株の分生子塊形成  
a: 頂芽, b: 花芽, c: 花序, d: 幼果, 図中の矢印は鮭肉色の分生子塊, バーは5 mmを示す.



第6図 2圃場の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潜在感染株の分生子形成  
図中のバーは標準誤差を示す。

第2表 潜在感染していた分生子塊から分離されたマンゴー炭疽病菌 *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> <sup>a)</sup>	<i>C.a</i> <sup>b)</sup>	<i>C.g</i>	<i>C.a</i>
頂芽	1/3 <sup>c)</sup>	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 <sup>*</sup> /17 <sup>d)</sup>	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。

## 2. 2 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 3 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。

第3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	<i>nit1</i> 株 分離果実数
1月13日	頂芽	20	15	6	1 <sup>a)</sup>
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

### 3. 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 (第 6 図, 第 2 表)。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レゾルシノール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レゾルシノール含有の有無はは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 (第 2 表)。澤岬ら (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はいるもの

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 *nit1* 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 (第 3 表)。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、外部環境条件を整えば 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の確立が重要であると考えられた。

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* は培地上での形成は確認されている（澤岬ら，2013a）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。

## IV. マンゴー炭疽病菌の薬剤感受性および薬剤体系散布 (ver. 1) の防除効果

### 1. 材料および方法

#### 1. 1 炭疽病菌の薬剤感受性

国内でマンゴーに登録のある 5 薬剤について、培地上での病原菌の菌叢生育および分生子発芽に及ぼす効果について検討した。供試菌株として沖縄県名護市の農家圃場より採集したマンゴー罹病果実（‘アーウィン’）から分離した炭疽病菌 *C. gloeosporioides* S754 (MAFF243421) および *C. acutatum* S001 (MAFF243490) の計 2 菌株を使用した。供試菌株をあらかじめブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 培地で 25 °C の暗黒条件下にて 5 日間前培養し、菌叢先端を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いて得られた含菌寒天片を、各薬剤の常用濃度になるように調整した薬剤加用 PDA 培地の中央に置床した。25 °C の暗黒条件下で 5 日間培養後に伸長した菌叢の直径を測定した。薬剤が添加されていない PDA 培地に供試菌株の含菌寒天片を置床したものを対照とした。常用濃度として、キャプタン水和剤 600 倍 (有効成分 1,333 ppm, アリスタライフサイエンス), マンゼブ水和剤 800 倍 (有効成分 938 ppm, ダウ・ケミカル日本), イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤 1,000 倍 (有効成分 400 ppm, 日本曹達), アゾキシストロビンフロアブル 1,000 倍 (有効成分 100 ppm, シンジェンタ), クレソキシムメチルドライフロアブル 2,000 倍 (有効成分 235 ppm, 日産化学工業) にそれぞれ濃度を設定した。また、上記と同様に常用濃度になるように薬剤を添加した素寒天培地に供試菌株の分生子懸濁液 ( $1 \times 10^3$  個/mL) を 20  $\mu$ L 滴下し、滅菌したガラス棒で均一に塗抹した。薬剤が添加されていない素寒天培地に上記と同濃度の供試菌株の分生子懸濁液を塗抹したものを対照とした。25 °C の暗黒条件下にて 48 時間静置し、分生子 100 個あたりの発芽数を調査した。各試験ともに 1 薬剤につき 9 反復で行った。なお、ストロビルリン系薬剤 (以下 QoI 剤) であるアゾキシストロビンフロアブルおよびクレソキシムメチルドライフロアブルについては、稲田ら (2010) の方法に従ってシアン耐性呼吸阻害剤の salicylhydroxamic acid (SHAM, MP Biomedicals) が最終濃度 1,000 ppm になるように各培地に添加して評価を行った。

#### 1. 2 果実肥大期の薬剤散布による防除効果と薬害

試験は 2008 年に沖縄県うるま市の施設マンゴー圃場で実施した。供試樹は樹齢 14 年生の品種 ‘アーウィン’ を用いた。なお、試験圃場の供試樹において、外見上健全な頂芽、花芽、花序および幼果からエタノール浸漬簡易診断法 (Ishikawa, 2003) および種特異的プライマーによる PCR (稲田・山口,

2006) によって2種炭疽病菌の分離と同定を試みたところ, *C. gloeosporioides* が約 82%, *C. acutatum* が約 12%の割合で分離され, 2種病原菌が混在して分布していたことが確認されている(澤岨ら, 2013d). 薬剤はキャプタン水和剤 600 倍 (1,333 ppm), クレソキシムメチルドライフロアブルは 2,000 倍 (235 ppm) およびアゾキシストロビンフロアブルは 1,000 倍 (100 ppm) の3薬剤を供試して, 果実肥大期にあたる6月下旬から7月上旬の雨よけ期間内での散布を実施した. 散布回数は登録適用基準に従い, キャプタン水和剤およびクレソキシムメチルドライフロアブルは6月25日, 6月30日および7月4日の計3回, アゾキシストロビンフロアブルは7月4日の計1回で散布を行った. 薬液は動力噴霧器を用いて樹全体に約 260 L/10 a の割合で十分量散布した. なお, 散布時の薬液には展着剤(有効成分ポリアルキレングリコールアルキルエーテル 27.0%, 日本農薬) 5,000 倍を添加し, 殺虫剤等との混用は行わなかった. 薬剤散布後は直ちに果実の袋かけを行い, 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)に従い, 収穫まで一般管理により栽培した. 収穫は2008年7月16日~8月5日の期間に行った. 収穫した果実は27℃下の室内で追熟させ, 効果の判定は沖縄などの島嶼県から出荷して市場流通後, 店頭までの日数を考慮して, 収穫から保存5日目の発病果率および発病度を調査した. なお, 試験は1区1樹10果の3反復で行った. 発病度は以下の広瀬ら(2008)の基準に従って算出した. 指数0: 発病なし, 指数1: 2 mm 以下の病斑が2個以下, 指数2: 2 mm 以下の病斑が3~6個また2~5 mm の病斑が1個, 指数3: 指数2以上, 発病度 =  $\{ \sum (\text{指数別発病果数} \times \text{指数}) / (3 \times \text{調査果数}) \} \times 100$ . また, 果実の薬害調査は収穫当日に薬液による斑点状の症状を目視で確認し, 30果あたりの薬害の発生率を算出した.

### 1. 3 薬剤体系散布 (ver. 1) による防除効果

薬剤感受性試験で2種炭疽病菌に対して高い感受性を示した薬剤を主体に2009年から2010年まで沖縄県うるま市および糸満市の施設マンゴー圃場で試験を実施した. 供試樹はうるま市が樹齢15~16年生, 糸満市が樹齢10~11年生でいずれも品種は‘アーウィン’を用いた. なお, 両試験圃場の供試樹において, 上述の検定法(稲田・山口, 2006; Ishikawa, 2003)によって2種炭疽病菌の分離と同定を試みたところ, うるま市では*C. gloeosporioides* が約 82%, *C. acutatum* が約 12%の割合で, 糸満市では*C. gloeosporioides* が約 53%, *C. acutatum* が約 47%の割合で分離され, 2種病原菌が混在して分布していたことが確認されている(澤岨ら, 2013d). 試験区は第4表に示すように4種薬剤を供試して出蕾前の12月下旬から散布を開始し, 収穫前の袋かけ直前まで計8回の体系散布を実施した. す

なわち、出蕾前の12月は施設天井のビニール被覆がないため、一般的に耐雨性の高いマンゼブ水和剤（田代，2007b；田代ら，2004）を最初の薬剤として2回散布し、天井ビニール被覆以降、開花期にキャプタン水和剤2回、結実期から果実肥大期にかけてクレソキシムメチルドライフフロアブル3回、果実肥大期の後半（袋かけの直前）にアズキシストロビンフロアブル1回の順序で散布を行った。キャプタン水和剤では果実で薬液による斑点状の症状が生ずること、マンゼブ水和剤については黄褐色の薬液による果実の汚れが明瞭であることから、この2薬剤の散布時期は着果前に限定した。一方、薬液による汚れや薬害が少なく、収穫前日でも散布が可能であるクレソキシムメチルドライフフロアブルおよびアズキシストロビンフロアブルの散布は着果期以降に実施した。各薬剤の散布回数は登録適用基準の回数以内になるように設定した。散布間隔は2009年のうるま市が18～31日、糸満市が14～31日、2010年のうるま市では14～33日、糸満市は14～28日であった。薬液は動力噴霧器を用いて樹全体に約260～410L/10aの割合で十分量散布した。なお、散布時の薬液には展着剤（有効成分ポリアルキレングリコールアルキルエーテル27.0%、日本農薬）5,000倍を添加し、殺虫剤等との混用は行わなかった。薬剤散布後は直ちに果実の袋かけを行い、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）に従い、収穫まで一般管理により栽培した。収穫は2009年のうるま市では7月13日～8月12日、糸満市では6月17日～7月19日、2010年のうるま市では7月5日～8月15日、糸満市では6月16日～7月28日の期間に行った。収穫した果実は27℃下の室内で追熟させ、効果の判定は上記と同様に保存5日目の発病果率および発病度を調査した。発病度は上述の広瀬ら（2008）の基準に従って算出した。また、薬害調査は収穫当日に薬液による果実の斑点症状の有無を目視で確認した。試験は2009年のうるま市は1区1樹10果の3反復、糸満市は1区1樹15果の3反復、2010年はうるま市および糸満市ともに1区1樹20果の3反復で行った。体系散布の有効性については、複数の独立した試験結果を定量的・統計学的に統合して解析するメタ・アナリシス（田代，2007a）によって無散布区に対する防除効果を評価した。すなわち、第6表に示す2009年と2010年の2圃場4試験事例の結果を解析に用いた。メタ・アナリシスはDerSimonian-Laired methodにより統計解析ソフトウェアStatsDirect Version 2.7.9（StatsDirect Ltd）を用い、体系散布区と無散布区の保存5日後の発病果率の割合（リスク比と95%信頼区間：C.I.）を求めて防除効果を評価した。リスク比の値が1.0未満であれば、その値分の比率だけ無散布に比べて有意に発病果率が低いことを示す（リスク比0.1は無散布区に比べて発病果率が10%であることを示す）。

第4表 2009～2010年の圃場試験における薬剤体系散布（ver.1）スケジュール

年度	処理区	試験地	雨よけなし ←				→ 雨よけ				
			花芽分化期	出蕾期	開花期	着果期	果実肥大期	収穫期			
2009		うるま市	12/24	1/24	2/24	3/24	4/24	5/24	6/11	7/2	7/13～8/12
		糸満市	12/24	1/24	2/24	3/24	4/24	5/9	5/23	6/6	6/17～7/19
	体系散布（ver.1）		Ma <sup>a)</sup>	Ma	Ca	Ca	Kr	Kr	Kr	Az	袋かけ
	無散布		-	-	-	-	-	-	-	-	
2010		うるま市	12/28	1/25	2/22	3/8	3/23	4/12	5/7	6/9	7/5～8/15
		糸満市	12/28	1/25	2/22	3/8	3/23	4/12	5/7	5/28	6/16～7/28
	体系散布（ver.1）		Ma	Ma	Ca	Ca	Kr	Kr	Kr	Az	袋かけ
	無散布		-	-	-	-	-	-	-	-	

a) Ma, マンゼブ水和剤（938 ppm）；Ca, キャプタン水和剤（1,333 ppm）；Kr, クレソキシムメチルドライフロアブル（235 ppm）；Az, アゾキシストロビンフロアブル（100 ppm）

## 2. 結果

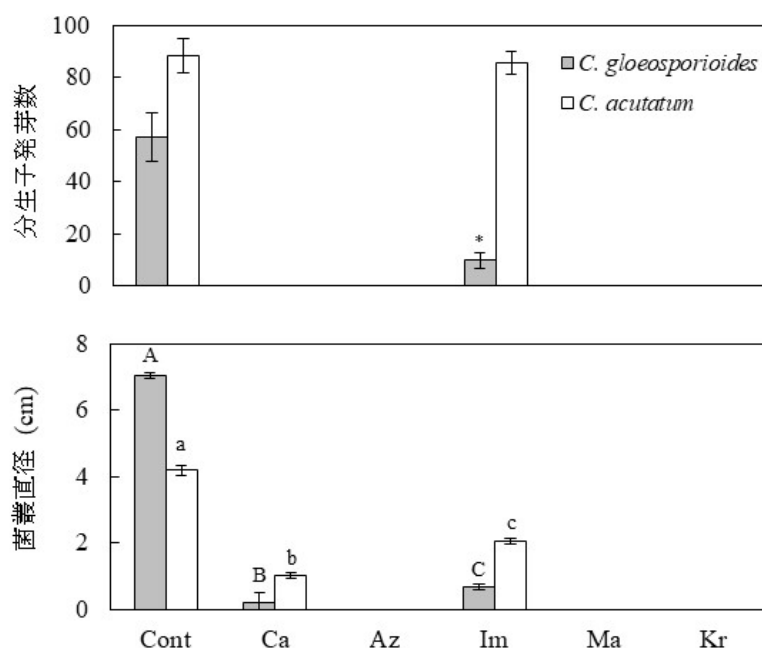
### 2. 1 炭疽病菌の薬剤感受性

第7図に各種薬剤の2種炭疽病菌の菌叢生育および分生子発芽に対する感受性の結果を示した。全ての供試薬剤で2種炭疽病菌の菌叢生育が抑制され、完全に抑制した薬剤はアゾキシストロビンフロアブル、マンゼブ水和剤およびクレソキシムメチルドライフロアブルの3薬剤であった。次いでキャプタン水和剤、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤の順となり、2剤ともに2種炭疽病菌の菌叢はやや生育したが、有意に菌叢生育を抑制した。イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤では *C. gloeosporioides* と比較して *C. acutatum* に対する菌叢生育の抑制効果は低い傾向であった。分生子発芽をみると、完全に発芽を抑制した薬剤はキャプタン水和剤、アゾキシストロビンフロアブル、マンゼブ水和剤およびクレソキシムメチルドライフロアブルの4薬剤であった。一方、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤は、*C. gloeosporioides* に対して有意に発芽抑制を示すが、*C. acutatum* に対する発芽抑制は認められなかった。

### 2. 2 果実肥大期の薬剤散布による防除効果と薬害

第5表に果実肥大期の3薬剤による防除効果および薬害の発生率を示した。無散布区の発病果率および発病度はそれぞれ50.9%、34.6で概ね中発生条件下での試験となった。キャプタン水和剤区では発病果率59.0%、発病度38.6と無散布区よりも高い値となり、防除効果は認められなかった。一方、クレソキシムメチルドライフロアブル区では発病果率30%および発病度13.3、アゾキシストロビンフロアブル区は発病果率23.4%および発病度6.7と無散布区と比較して発病の抑制効果が認められた。クレソキシムメチルドライフロアブル区およびアゾキシストロビンフロアブル区間における防除効

果に統計的な有意差は認められず、効果はほぼ同等であった。果実の薬害の発生については、キャプタン水和剤区で薬液による斑点症状が確認され（第8図）、その発生率は43.3%であった。一方、無散布区、クレソキシムメチルドライフロアブル区およびアゾキシストロビンフロアブル区では薬液による果実の斑点症状は認められなかった。



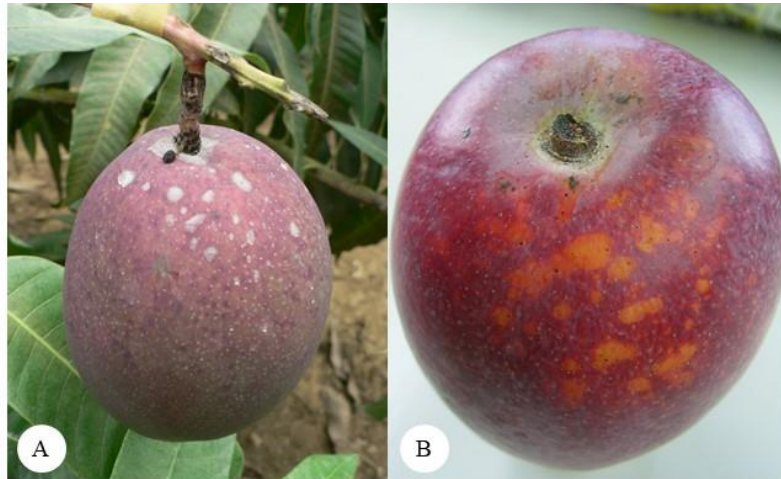
第7図 マンゴー炭疽病菌*Colletotrichum gloeosporioides*および*C. acutatum*の分生子発芽と菌叢生育に対する各種薬剤の影響。Ca, キャプタン水和剤；Az, アゾキシストロビンフロアブル；Im, イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤；Ma, マンゼブ水和剤；Kr, クレソキシムメチルドライフロアブル。アスタリスクは薬剤間におけるWelch's *t* testによる有意差 ( $p < 0.01$ ) を示す。異なる大小アルファベットは薬剤間におけるTukey-Kramer HSD testによる有意差 ( $p < 0.01$ ) を示す。バーは標準偏差(±)を示す。

第5表 果実肥大期におけるマンゴー炭疽病に対する各種薬剤の防除効果および果皮の薬害

処理区	総果実数 (個)	発病果率 (%)	発病度 <sup>a)</sup>	薬害 (%)
キャプタン水和剤	30	59.0 a <sup>b)</sup>	38.6 a	43.3
クレソキシムメチルドライフロアブル	30	30.0 bc	13.3 b	0.0
アゾキシストロビンフロアブル	30	23.4 c	6.7 b	0.0
無散布	30	50.9 ab	34.6 a	0.0

a) 発病度は広瀬ら (2008) の方法に従って算出した。

b) 異なるアルファベットはアークサイン変換後のTukey-Kramer HSD testによる有意差 ( $p < 0.01$ ) を示す。



第8図 マンゴー果皮に発生したキャプタン水和剤（1,333 ppm）による薬害。  
A：圃場における散布5日後の果皮に発生した薬液の汚れ。  
B：収穫時の薬液による斑点症状。

### 2. 3 薬剤体系散布（ver. 1）による防除効果

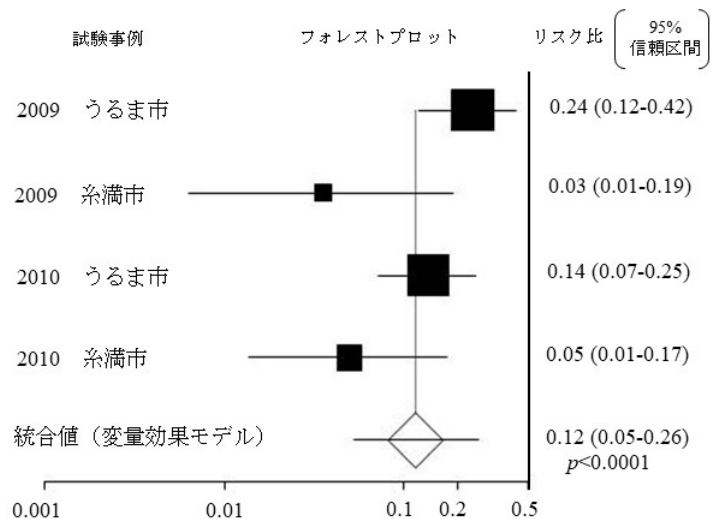
第6表に薬剤体系散布（ver. 1）の防除効果の結果を示した。2009年のうるま市および糸満市における無散布区の発病果率はそれぞれ96.7%と62.2%，発病度は81.1と32.6で概ね多発生条件下での試験となった。一方，うるま市および糸満市における体系散布区の発病果率はそれぞれ23.3%と2.2%，発病度は14.4と1.5で無散布区と比較して有意に発病を抑制した。また，2010年のうるま市および糸満市における無散布区の発病果率はそれぞれ95.0%と66.7%，発病度は60.0と35.6で前年同様に多発生条件となった。これに対し，うるま市および糸満市における体系散布区の発病果率はそれぞれ13.3%と3.3%，発病度は5.6と1.1で無散布区と比較して有意に発病が抑制された。2009および2010年ともに，体系散布区の果実では薬液による斑点症状は認められなかった（データ省略）。これら2圃場4試験の結果をメタ・アナリシス解析によって統合評価したところ，体系散布区からみた無散布区に対する統合リスク比は，0.12（95%信頼区間：0.05～0.26）で誤差の範囲を含めて1.0未満であり，体系散布は有意に発病を抑制した（第9図）。

第6表 マンゴー炭疽病に対する薬剤体系散布（ver.1）の防除効果

試験地	処理区	2009			2010		
		総果実数 (個)	発病果率 (%)	発病度 <sup>a)</sup>	総果実数 (個)	発病果率 (%)	発病度
うるま市	体系散布（ver.1）	30	23.3 * <sup>b)</sup>	14.4 *	60	13.3 *	5.6 *
	無散布	30	96.7	81.1	60	95.0	60.0
糸満市	体系散布（ver.1）	45	2.2 *	1.5 *	60	3.3 *	1.1 *
	無散布	45	62.2	32.6	60	66.7	35.6

a) 発病度は広瀬ら（2008）の方法に従って算出した。

b) アスタリスクはMann-Whitney U testによる有意差（ $p < 0.01$ ）を示す。



第9図 マンゴー炭疽病に対する薬剤体系散布 (ver.1) による防除効果のメタ・アナリシス解析. 2圃場4試験事例 (第6表) のデータを統合解析した. ■: 4試験の体系散布と無散布の発病果率の割合 (リスク比) を示し, サイズは重みづけの値の大きさを示す. ◇: 4試験の統合リスク比を示す. 各マーカーの両側の水平線は95%信頼区間を示す (C.I.).

### 3. 考察

本研究の結果から, 我が国のマンゴー炭疽病の5種登録薬剤のうち2種病原菌の菌叢生育と分生子発芽に対して高い感受性を示した薬剤は, キャプタン水和剤, マンゼブ水和剤, アゾキシストロビンフロアブルおよびクレソキシムメチルドライフロアブルの4薬剤であることが明らかになった (第7図). このことから, 施設マンゴーにおける本病に対する有効な薬剤防除体系は, この4薬剤を中心に体系化することが効果的であると考えられた. 一方, イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤では特に分生子発芽において2種菌間で著しい感受性の差異が認められ, *C. gloeosporioides* に対する発芽抑制は示すが, *C. acutatum* に対する発芽抑制はみられなかった. 本剤は細胞膜機能および脂質生合成に作用し, 分生子発芽, 発芽管伸長, 付着器形成および侵入系形成等を阻害する (坂本, 1992). これまでにイチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & H. Schrenk に対して予防と治療効果を有する薬剤としても報告されている (平山ら, 2008b). *C. acutatum* の分生子発芽に対するイミノクタジンアルベシル酸塩水和剤の感受性に関する報告はほとんどなく, 本研究で分生子発芽抑制がみられなかった原因の詳細は不明であるが, 今後は供試菌株数を増やして詳しく調べる必要がある. また, アゾキシストロビンフロアブルとクレソキシムメチルドライフロアブルについては, PDA 培地にシアン耐性呼吸阻害剤の SHAM を添加して評価を行った. QoI 剤の検定は通常の PDA 培地上では病原菌のバイパス呼吸経路であるシアン耐性呼吸系の活性化により菌叢生育の抑制が低下して正確な感受性の評価ができない. そのため, 1,000 ppm の SHAM を培地に添加する必要がある (稲田ら, 2010).

本研究においても本法を用いた検定でアゾキシストロビンフロアブルとクレソキシムメチルドライフロアブルの 2 種マンゴー炭疽病菌に対する高い菌叢生育および分生子発芽の抑制効果が認められた。

果実肥大期の薬剤散布による防除効果試験の結果から、クレソキシムメチルドライフロアブル3回およびアゾキシストロビンフロアブル1回散布により防除効果が認められ、マンゴー果皮上の薬液による汚れや薬害は認められなかったことから、2 薬剤ともに着果期以降での散布剤として有効であることが示された (第 5 表)。これまでもブドウ晩腐病の防除において、クレソキシムメチルおよびアゾキシストロビン水和剤が高い防除効果を示し、ブドウ果房での薬害や薬液による汚れは認められなかったことが確認されている (深谷・高橋, 1999)。一方、キャプタン水和剤は3回散布にもかかわらず顕著な防除効果は認められず、マンゴー果皮上では薬液による斑点症状が高率に発生することがはじめて確認された (第 8 図)。これに類似する事例として、モモではキャプタン水和剤を成熟期に使用した場合、果実に油焼け状の斑点が現れ、のちに亀裂を生じることが確認されており (矢野, 1975)、スモモでは本剤の散布により特定の品種‘スタンレイ’で果実に胴さび状の症状が発生することが報告されている (飯島・徳永, 1992)。また、ブドウ晩腐病の防除におけるマンゼブ水和剤の散布は、ブドウ果房で薬液による汚れが目立ち、果実肥大期での使用は困難であることが報告されている (深谷・高橋, 1999)。このことから、施設マンゴー栽培においては、キャプタンおよびマンゼブ水和剤の使用は着果前までが望ましいと考えられた。キャプタン水和剤は 2 種病原菌の菌叢生育および分生子の発芽を有意に抑制したが、圃場散布では防除効果がほとんど認められなかった。しかし、*in vitro* では高い抗菌活性が確認されたこと、殺菌機作は多作用点接触活性である (田口ら, 2012) ことから、本剤に対する炭疽病菌の薬剤耐性獲得の可能性は低いと考えられる。おそらく雨よけ期間中の果実肥大期では、果皮上で既に病原菌の潜在感染が成立しており、浸透移行性に乏しく、予防剤としての作用が強い本剤の特性から、病原菌の感染成立後の散布は防除時期として適していなかったためと考えられる。これに対しクレソキシムメチルドライフロアブルおよびアゾキシストロビンフロアブルで認められた防除効果は、病原菌の菌叢生育および分生子発芽阻害に加え、分生子発芽後に形成される付着器の感染および付着器から果皮組織に侵入する角皮下菌糸に浸達して治療効果を示したためではないかと考えられた。

これまでに澤岬ら (2013d) は、マンゴー炭疽病菌の感染時期は 1 月の出蕾期には既に成立しており、5 月の幼果期に最も潜在化の割合が高くなることを明らかにした。このことから、本病の薬剤防

除は出蕾前の 12 月から予防的に散布を開始し、収穫前まで体系的に散布を継続することが重要であると考察した。しかし、圃場における病原菌の詳細な感染開始の時期については未だ不明である。クワ炭疽病菌 *C. acutatum* が桑樹上に表生あるいは浅く内生して越冬することが確認されている (Yoshida and Shirata, 1999) ように、マンゴー樹上または樹体内で病原菌が通年無病徴的に潜在感染しながら、これが翌年の発病を引き起こしている可能性も考えられる。そのため、体系防除の策定には、新たに感染が起こる場合と既に感染が成立している場合の 2 つの感染パターンを想定して薬剤を選択する必要がある。 *in vitro* で 2 種炭疽病菌に効果を示した 4 種薬剤のうち、キャプタンおよびマンゼブ水和剤は菌体内の SH 酵素の働きや ATP 形成を阻害することによって感染時に効果を示す予防剤 (田口ら, 2012) として、クレソキシムメチルドライフロアブルおよびアゾキシストロビンフロアブルはミトコンドリア内のチトクローム電子伝達系阻害による呼吸阻害によって感染成立後にも効果を示す治療剤 (井手・田代, 2004) として作用することが知られている。キャプタン水和剤は果実肥大期における散布試験では顕著な防除効果はみられなかったが、 *in vitro* での抗菌活性が認められていることから、適切な散布時期では高い予防効果を示すものと考えられる。また、QoI 剤であるクレソキシムメチルドライフロアブルおよびアゾキシストロビンフロアブルのみによる適所散布でも防除効果は期待できるが、同系統薬剤のみに依存した連年散布は耐性菌の発生リスクが高まることが推察されるため、体系防除には作用点の異なる系統の薬剤を組み入れる必要がある。そこで、本研究ではこれら QoI 剤とあわせて、 *in vitro* で高い抗菌活性を示した予防剤のキャプタンおよびマンゼブ水和剤を追加して、4 種薬剤を組み合わせた体系散布スケジュール (第 4 表) を策定し、その防除効果を検討した。その結果、2009 および 2010 年ともに体系散布区で高い防除効果が認められ、収穫 5 日後の炭疽病の発病果率は無散布区と比較して約 76~96%まで抑制された。また、薬液による果実の斑点症状は認められなかった。さらに 2 ヶ年 4 試験事例によるメタ・アナリシス解析により、体系散布区の炭疽病の発病は無散布区に比べて有意に少なく、無散布区の発病果率の約 12%にまで抑制されることが示された (第 9 図)。以上より、施設マンゴーにおける 4 種薬剤を組み合わせた体系散布 (ver. 1) は、炭疽病の薬剤防除体系として有効であることが明らかとなった。

本項で策定した体系散布 (ver. 1) は、着果期以降 QoI 剤であるクレソキシムメチルドライフロアブルおよびアゾキシストロビンフロアブルの連続散布となっている。着果以降は果実に薬害を生じない薬剤を選択することが必須であるが、マンゴーはマイナー作物であるために薬剤の登録数が少なく、やむを得ず第 4 表に示す散布の順序となった。しかしながら、茨城県 (菊池ら, 2010)、佐賀県 (稲田

ら, 2008) および奈良県 (平山ら, 2008a) において QoI 剤耐性イチゴ炭疽病菌が既に確認されており, 防除歴における散布回数の削減を余儀なくされている. こうした背景から, 今後は QoI 剤耐性炭疽病菌の発生実態調査を行うとともに, 体系散布については QoI 剤の散布回数削減の検討ならびに代替殺菌剤の登録等に取り組む必要がある. また, 薬剤防除による効果を補完するために, 耕種的防除法を積極的に取り入れながら QoI 剤のみに依存しない総合防除体系の構築が重要であると考えられる.

## V. マンゴー炭疽病および軸腐病の同時防除のための数種有効殺菌剤を用いた体系散布技術 (ver. 2) の確立

### 1. 材料および方法

#### 1. 1 病原菌の薬剤感受性

沖縄県名護市の農家圃場より採集した罹病果実（‘アーウィン’）から分離した炭疽病菌 *C. siamense* S754 株（旧分類の広義 *C. gloeosporioides* MAFF243421）および *C. fioriniae* S001 株（広義 *C. acutatum* MAFF243490）、沖縄県豊見城市および宮古島市の農家圃場より採集したマンゴー罹病果実（‘アーウィン’ および ‘キーツ’）から分離した軸腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae* Tof 株（MAFF243289：豊見城市由来）および Mif 株（MAFF243288：宮古島市由来）の計 4 菌株を使用した。供試薬剤として国内でマンゴーに登録のある以下の 10 種殺菌剤を使用した。アゾキシストロビンフロアブル 1,000 倍（有効成分 100 ppm）、イプロジオン水和剤 1,000 倍（有効成分 500 ppm）、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤 1,000 倍（有効成分 400 ppm）、塩基性硫酸銅水和剤 50 倍（有効成分 740 ppm）、キャプタン水和剤 600 倍（有効成分 1,333 ppm）、クレソキシムメチルドライフロアブル 2,000 倍（有効成分 235 ppm）、トリフルミゾール水和剤 2,000 倍（有効成分 150 ppm）、プロシミドン水和剤 1,000 倍（有効成分 500 ppm）、マンゼブ水和剤 800 倍（有効成分 938 ppm）およびメパニピリムフロアブル 2,000 倍（有効成分 200 ppm）。また、各薬剤の濃度は登録適用基準に従って設定した。供試菌株をあらかじめブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天（PDA）培地で 25℃の暗黒条件下にて 3～5 日間前培養し、菌叢先端を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いて得られた含菌寒天片を、各薬剤の常用濃度になるように薬液を培地と混和して作成した薬剤加用 PDA 培地の中央に置床し、25℃の暗黒条件下で 3～5 日間培養後に伸長した菌叢直径を測定した。また、薬剤が添加されていない PDA 培地に供試菌株の含菌寒天片を置床したものを対照とした。これら試験に加え、分生子発芽による感受性検定も行った。上記と同様に薬剤を添加した素寒天培地に各供試菌株の分生子懸濁液（ $1 \times 10^3$  個/mL）を 20  $\mu$ L 滴下し、滅菌したコンラージ棒で均一に塗抹した。また、薬剤が添加されていない素寒天培地に上記と同濃度の供試菌株の分生子懸濁液を塗抹したものを対照とした。25℃の暗黒条件下にて 48 時間静置し、炭疽病菌は分生子 100 個あたり、軸腐病菌は分生子 30 個あたりの発芽数を調査した。各試験は 1 薬剤につき 3 反復行った。なお、ストロビルリン系薬剤（QoI 剤）であるアゾキシストロビンフロアブルおよびクレソキシムメチルドライフロアブルについては、稲田ら（2010）の方法に従ってシアン耐性

呼吸阻害剤の salicylhydroxamic acid (SHAM, MP Biomedicals) が最終濃度 1,000 ppm になるように各培地に添加して評価を行った。

## 1. 2 同時防除のための薬剤体系散布 (ver. 2) による防除効果

2012 年から 2014 年にかけて、沖縄県うるま市および糸満市の 2 ヲ所の施設マンゴー圃場で体系散布による防除効果試験を実施した。供試樹はうるま市が樹齢 20 年生、糸満市が樹齢 14 年生でいずれも品種は‘アーウィン’を用いた。薬剤感受性試験でマンゴー炭疽病菌および軸腐病菌に対して高い感受性を示したマンゼブ水和剤、アゾキシストロビンフロアブル、塩基性硫酸銅水和剤、キャプタン水和剤の 4 薬剤に、軸腐病の唯一の登録薬剤であるプロシミドン水和剤を加えた計 5 薬剤を用いて、第 7 表に示すようにローテーションで計 8 回の体系散布を実施した。すなわち、出蕾前あるいは出蕾時に塩基性硫酸銅水和剤 1 回、出蕾期から開花初期にかけてマンゼブ水和剤 2 回、開花期から着果初期にかけてキャプタン水和剤 2 回、着果期から果実肥大期にかけてプロシミドン水和剤 2 回、果実肥大期の後半（袋かけの直前）にアゾキシストロビンフロアブル 1 回の順序で散布した。キャプタン水和剤では果実で薬液による斑点状の症状が生ずること（澤岬ら、2013c）、塩基性硫酸銅およびマンゼブ水和剤については褐色の薬液による果実の汚れが明瞭であることから、この 3 薬剤の散布時期は前半の着果初期前までに限定した。一方、薬液による汚れや薬害が比較的少ないプロシミドン水和剤および収穫前日でも散布が可能であるアゾキシストロビンフロアブルの散布は後半の着果期以降に実施した。各薬剤の散布回数は登録適用基準の回数以内になるように設定した。薬液は動力噴霧器を用いて樹全体に約 250~400L/10a の割合で十分量散布した。なお、散布時の薬液には展着剤（有効成分ポリアルキレングリコールアルキルエーテル 27.0%）5,000 倍を添加し、殺虫剤等との混用は行わなかった。薬剤散布後は直ちに果実の袋かけを行い、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、2011）に従い、収穫まで一般管理により栽培した。収穫は 2012 年試験のうるま市では 7 月 11 日~8 月 16 日、糸満市では 6 月 21 日~7 月 26 日、2013 年試験のうるま市では 7 月 13 日~8 月 2 日、2014 年試験のうるま市では 7 月 13 日~8 月 12 日、糸満市では 6 月 17 日~7 月 7 日の期間に行った。防除効果の判定は、27℃下の室内で果実を 7 日間保存した後に両病害の発病果率および発病度を調査した。炭疽病の発病度は上述と同様に広瀬ら（2008）の基準に従って算出した。また、軸腐病の発病度は以下の澤岬・比嘉（2014）の基準に従って算出した。指数 0：発病なし、指数 1：果梗周辺の軟化、指数 2：病斑が果面の 12.5%に達するもの、指数 3：病斑が 12.5%以上に達するもの、発病度

= {Σ (指数別発病果数×指数) / (3×調査果数)} ×100. 薬害調査は収穫当日に薬液による果実の斑点症状の有無を目視で確認した. 試験は2012年のうるま市は1区1樹20果の3反復, 糸満市は1区1樹30果の3反復, 2013年のうるま市は1区1樹21果の3反復, 2014年のうるま市は1区1樹25果の3反復, 糸満市は1区1樹23果の3反復で行った. なお, 2013年試験では前年の台風15, 16および17号の襲来により, 糸満市のマンゴー樹で著しい樹勢低下がみられ試験実施が困難であったため, うるま市のみでの試験を行った. 体系散布の有効性については, 上述と同様にメタ・アナリシス (田代, 2007a) によって無散布区に対する防除効果を評価した. すなわち, 第7表に示す2012年~2014年の2圃場5試験事例の結果を解析に用いた. メタ・アナリシスはDerSimonian-Laired methodにより統計解析ソフトウェア StatsDirect Version 2 (StatsDirect Ltd) を用い, 体系散布区と無散布区の保存7日後の炭疽病および軸腐病の発病果率の割合 (リスク比と 95%信頼区間: C.I.) を求めて防除効果を評価した.

第7表 2012~2014年の圃場試験における薬剤体系散布 (ver.2) スケジュール

年度	試験地	雨よけなし ←—————→ 雨よけ																						
		花芽分化			出蕾期			開花期			着果期			果実肥大期			収穫期							
		12月			1月			2月			3月			4月			5月			6月			7月	
		上 <sup>a</sup>	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	
2012	うるま市										Co <sup>b</sup>	Ma		Ma	Ca		Ca	Pr	Pr				Az	(袋かけ) 収穫
	糸満市										Co	Ma		Ma	Ca	Ca	Pr	Pr				Az	(袋かけ) 収穫	
2013	うるま市										Co	Ma		Ma	Ca		Ca	Pr		Pr	Az	(袋かけ) 収穫		
2014	うるま市	Co	Ma		Ma			Ca	Ca		Pr			Pr								Az	(袋かけ) 収穫	
	糸満市	Co	Ma		Ma			Ca	Ca	Pr	Pr											Az	(袋かけ) 収穫	

a) 上: 月上旬, 中: 月中旬, 下: 月下旬.

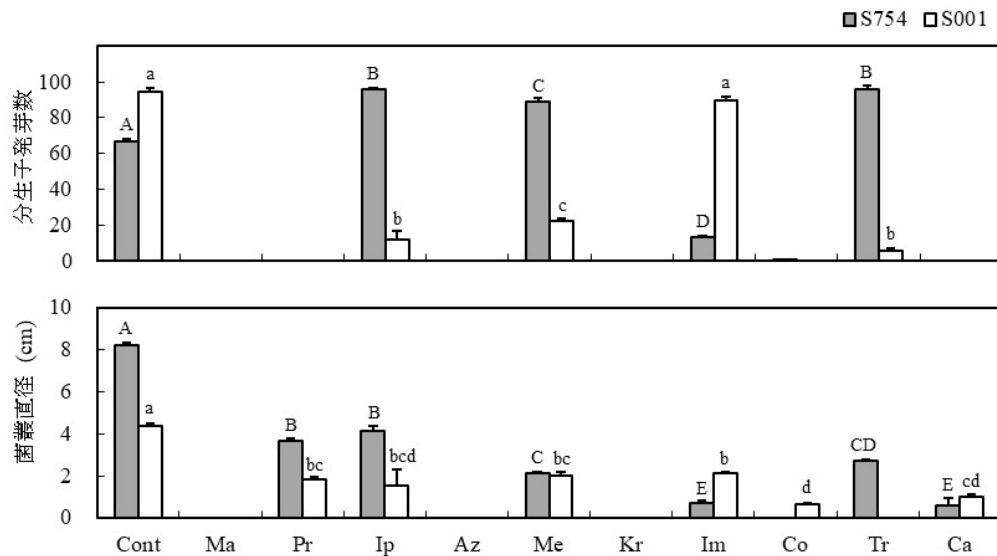
b) Co, 塩基性硫酸銅水和剤 (740 ppm); Ma, マンゼブ水和剤 (938 ppm); Ca, キャプタン水和剤 (1,333 ppm); Pr, プロシミドン水和剤 (500 ppm); Az, アゾキシストロビンフロアブル (100 ppm).

## 2. 結果

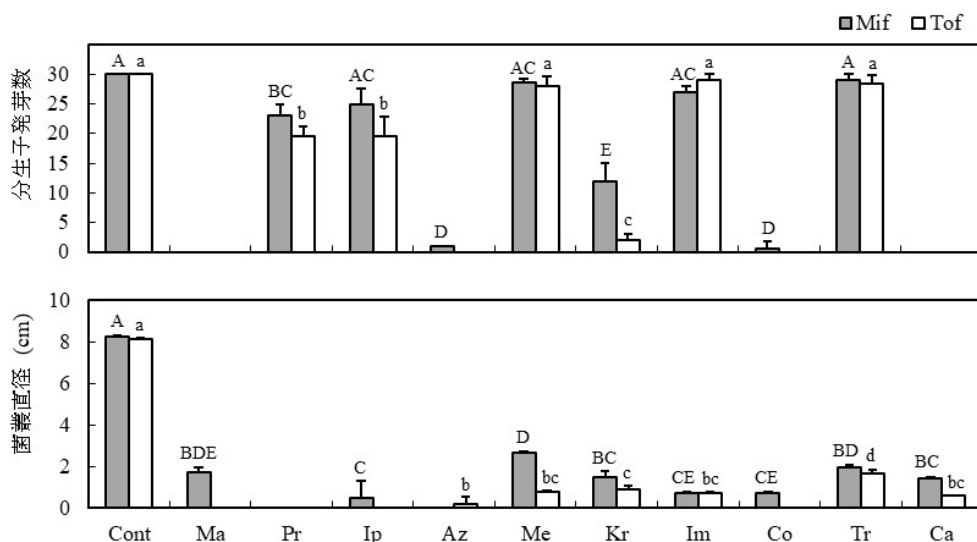
### 2. 1 病原菌の薬剤感受性

各種薬剤のマンゴー炭疽病菌および軸腐病菌の菌糸伸長および分生子発芽に対する感受性の結果を第10, 11図に示した. 2種炭疽病菌の菌糸伸長に対する各薬剤の影響を調べた結果, 全ての薬剤で有意に抑制効果が認められ, 特にマンゼブ水和剤, アゾキシストロビンフロアブルおよびクレソキシムメチルドライフロアブルは菌糸伸長を完全に抑制した. 分生子発芽に対する影響では, マンゼブ水和剤, プロシミドン水和剤, アゾキシストロビンフロアブル, クレソキシムメチルドライフロアブル, 塩基性硫酸銅水和剤およびキャプタン水和剤で完全に抑制された. 一方, イプロジオン水和剤, メバ

ニピリムフロアブルおよびトリフルミゾール水和剤では2種菌間で感受性に差異が認められ、*C. fioriniae* (S001株) に対して有意に発芽抑制を示したが、*C. siamense* (S754株) に対する発芽抑制は認められなかった。また、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤では上記3剤とは逆に、*C. siamense* (S754株) に対して有意に発芽抑制を示したが、*C. fioriniae* (S001株) に対する発芽抑制は認められなかった。軸腐病菌2菌株の菌糸伸長に対する各薬剤の感受性は、全ての薬剤で有意に抑制効果が認められ、特にプロシミドン水和剤は菌糸伸長を完全に抑制した。分生子発芽に対する感受性では、マンゼブ水和剤、アゾキシストロビンフロアブル、塩基性硫酸銅水和剤およびキャプタン水和剤で有意に高い抑制効果が認められた。また、プロシミドン水和剤、イプロジオン水和剤およびクレソキシムメチルドライフロアブルではやや抑制効果を示すが、その程度は低かった。一方、メパニピリムフロアブル、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤およびトリフルミゾール水和剤では抑制効果は認められなかった。以上の結果より、全ての供試菌株の菌糸伸長および分生子発芽に対して共通して強い生育阻害を示した薬剤は、マンゼブ水和剤、アゾキシストロビンフロアブル、クレソキシムメチルドライフロアブル、塩基性硫酸銅水和剤およびキャプタン水和剤の5つであった。



第10図 マンゴー炭疽病菌の分生子発芽および菌叢生育に及ぼす各種薬剤の影響。病原菌は*Colletotrichum siamense* (S754:MAFF243421)および*C. fioriniae*(S001:MAFF243490)。Ma, マンゼブ水和剤; Pr, プロシミドン水和剤; Ip, イプロジオン水和剤; Az, アゾキシストロビンフロアブル; Me, メパニピリムフロアブル; Kr, クレソキシムドライフロアブル; Im, イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤; Co, 塩基性硫酸銅水和剤; Tr, トリフルミゾール水和剤; Ca, キャプタン水和剤。異なる大小アルファベットは薬剤間におけるTukey-Kramer HSD testによる有意差 ( $p < 0.01$ )を示す。バーは標準偏差(±)を示す。



第11図 マンゴー軸腐病菌の分生子発芽および菌叢生育に及ぼす各種薬剤の影響。病原菌は*Lasiodiplodia theobromae*, Mif(MAFF243288):宮古島市分離株, Tof(MAFF243289):豊見城市分離。Ma, マンゼブ水和剤; Pr, プロシミドン水和剤; Ip, イプロジオン水和剤; Az, アゾキシストロビンフロアブル; Me, メパニピリムフロアブル; Kr, クレソキシムドライフロアブル; Im, イミノクタジナルベシル酸塩水和剤; Co, 塩基性硫酸銅水和剤; Tr, トリフルミゾール水和剤; Ca, キャプタン水和剤。異なる大小アルファベットは薬剤間におけるTukey-Kramer HSD testによる有意差 ( $p < 0.01$ )を示す。バーは標準偏差(±)を示す。

## 2. 2 同時防除のための薬剤体系散布 (ver. 2) による防除効果

薬剤体系散布 (ver. 2) の防除効果の結果を第 8 表に示した。2012 年試験の炭疽病に対する防除効果では、無散布区の発病果率はうるま市が 95.0%, 糸満市が 58.9%, 発病度はそれぞれ 68.9 と 33.7 で概ね中～多発生条件下での試験となった。一方、体系散布区の発病果率はうるま市が 23.3%, 糸満市が 10.0%, 発病度はそれぞれ 11.7 と 6.3 で無散布区と比較して有意に発病を抑制した。軸腐病に対する防除効果では、無散布区の発病果率はうるま市が 41.3%, 糸満市が 24.4%, 発病度はそれぞれ 33.9 と 17.0 で概ね少～中発生条件下での試験となった。一方、体系散布区の発病果率はうるま市が 18.3%, 糸満市が 5.6%, 発病度はそれぞれ 8.3 と 3.3 で無散布区と比較して有意に発病を抑制した。2013 年試験の炭疽病に対する防除効果では、うるま市における無散布区の発病果率は 100%, 発病度は 83.6 で多発生条件となった。一方、体系散布区の発病果率は 33.3%, 発病度は 17.5 で無散布区と比較して有意に発病を抑制した。軸腐病に対する防除効果では、うるま市における無散布区の発病果率は 63.5%, 発病度は 53.4 で中発生条件となった。これに対し、体系散布区の発病果率は 3.2%, 発病度は 1.1 で無散布区と比較して有意に発病を抑制した。

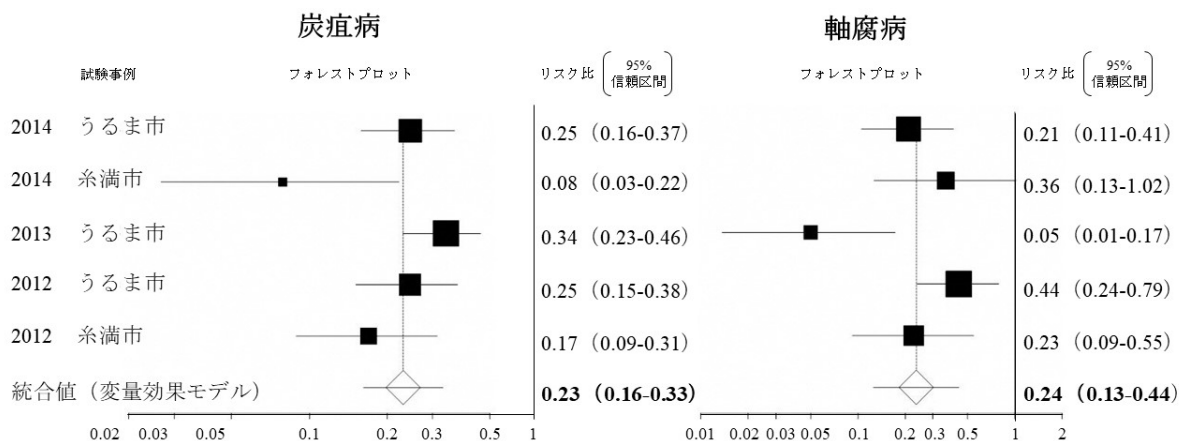
2014 年試験の炭疽病に対する防除効果では、無散布区の発病果率はうるま市が 92.0%, 糸満市が 55.1%, 発病度はそれぞれ 79.1 と 35.7 で概ね中～多発生条件下での試験となった。これに対し、体系散布区の発病果率はうるま市が 22.7%, 糸満市が 4.3%, 発病度はそれぞれ 15.6 と 1.9 で無散布区と比

較して有意に発病を抑制した。軸腐病に対する防除効果では、無散布区の発病果率はうるま市が 50.7%、糸満市が 15.9%、発病度はそれぞれ 41.3 と 11.1 で概ね少～中発生条件下での試験となった。一方、体系散布区の発病果率はうるま市が 10.7%、糸満市が 5.8%、発病度はそれぞれ 8.0 と 2.9 で無散布区と比較して有意に発病を抑制した。また、2012 と 2014 年試験では、体系散布区の果実で薬害症状は認められなかったが、2013 年試験の果実で薬液による斑点症状（果色ムラ）の発生が 3.2%確認された。これら 2 圃場 3 年 5 試験の結果をメタ・アナリシス解析によって統合評価したところ、体系散布区からみた無散布区に対する統合リスク比は、炭疽病が 0.23（95%信頼区間：0.16～0.33）、軸腐病が 0.24（95%信頼区間：0.13～0.44）でいずれも誤差の範囲を含めて 1.0 未満であり、体系散布区の両病害の発生は無散布区に比べて有意に少なく、炭疽病では無散布区の発病果率の 23%、軸腐病では 24%にまで発病が抑制されることが示された（第 12 図）。

第8表 マンゴー炭疽病および軸腐病に対する薬剤体系散布（ver.2）の防除効果

年度	試験地	処理区	炭疽病			軸腐病			薬害 (%)
			総果実数 (個)	発病果率 (%)	発病度 <sup>a</sup>	総果実数 (個)	発病果率 (%)	発病度 <sup>b</sup>	
2012	うるま市	体系散布 (ver.2)	60	23.3* <sup>c</sup>	11.7** <sup>d</sup>	60	18.3*	8.3**	0.0
		無散布	60	95.0	68.9	60	41.3	33.9	0.0
	糸満市	体系散布 (ver.2)	90	10.0*	6.3**	90	5.6*	3.3**	0.0
		無散布	90	58.9	33.7	90	24.4	17.0	0.0
2013	うるま市	体系散布 (ver.2)	63	33.3*	17.5**	63	3.2*	1.1**	3.2
		無散布	63	100	83.6	63	63.5	53.4	0.0
2014	うるま市	体系散布 (ver.2)	75	22.7*	15.6**	75	10.7*	8.0**	0.0
		無散布	75	92.0	79.1	75	50.7	41.3	0.0
	糸満市	体系散布 (ver.2)	69	4.3*	1.9**	69	5.8*	2.9**	0.0
		無散布	69	55.1	35.7	69	15.9	11.1	0.0

- a) 発病度は広瀬ら（2008）の方法に従って算出した。  
b) 発病度は澤岬・比嘉（2014）の方法に従って算出した。  
c) アスタリスクはフィッシャーの正確確率検定による有意差（ $p < 0.05$ ）を示す。  
d) アスタリスクはMann-Whitney  $U$  testによる有意差（ $p < 0.05$ ）を示す。



第12図 マンゴー炭疽病および軸腐病に対する薬剤体系散布（ver.2）による防除効果のメタ・アナリシス解析。2圃場5試験事例（第8表）のデータを統合解析した。■：5試験の体系散布と無散布の発病果率の割合（リスク比）を示し、サイズは重みづけの値の大きさを示す。◇：5試験の統合リスク比を示す。各マーカーの両側の水平線は95%信頼区間を示す（C.I.）。

### 3. 考察

2種炭疽病菌に対するマンゼブ水和剤、アゾキシストロビンフロアブル、クレソキシムメチルドライフロアブル、キャプタン水和剤およびイミノクタジンアルベシル酸塩水和剤の感受性については既に検討済であるため(澤岨ら, 2013c), 本研究では供試菌株に軸腐病菌を加え, さらに上記5剤にイプロジオン水和剤, 塩基性硫酸銅水和剤, トリフルミゾール水和剤, プロシドン水和剤およびメパニピリムフロアブルの5剤を追加し, 計10剤の薬剤感受性の再評価を行った. その結果, マンゴー炭疽病菌および軸腐病菌の菌糸伸長と分生子発芽に対して共通して高い感受性を示した薬剤は, マンゼブ水和剤, アゾキシストロビンフロアブル, クレソキシムメチルドライフロアブル, 塩基性硫酸銅水和剤およびキャプタン水和剤の5薬剤であった(第10, 11図). マンゼブ, アゾキシストロビン, クレソキシムメチルおよびキャプタン剤の有効性については, マンゴーの他にイチゴ, ブドウおよびナシの炭疽病に対して室内および野外の散布試験により抑制効果を示すことが既に報告されており(深谷・高橋, 1999; 深谷, 2004; 田口ら, 2012), 本研究の結果はこれらの先行研究の結果を支持するものであった. また, 塩基性硫酸銅は海外の露地マンゴーで古くから炭疽病の防除剤として利用されているように(McMillan, 1972; McMillan, 1984), 本研究においても同様に高い抑制効果が認められた. 海外ではマンゴー由来の *C. gloeosporioides* species complex に属する1菌種に対するアゾキシストロビン剤の抑制効果は確認されているが(Sundravadana *et al.*, 2007), それ以外の薬剤の評価に関する知見はなく, *C. acutatum* species complex を含めた2つの種複合体に属するマンゴー炭疽病菌に対する10種以上の殺菌剤の感受性を明らかにしたのは本研究が初めてである. 一方, マンゴー軸腐病菌では, これまでにキャプタンおよびアゾキシストロビン剤が本菌の生育に対して抑制効果を示すことが報告されており(Shahbaz *et al.*, 2009; Syed *et al.*, 2014), 本研究においても同様に2剤の有効性が示された. しかし, 本菌に対する殺菌剤評価の知見は少なく, 上記2剤以外の薬剤の有効性については本研究が初めての知見となる. また, メパニピリムフロアブル, イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤およびトリフルミゾール水和剤では軸腐病菌に対して抑制作用は全く認められず, イプロジオン水和剤, メパニピリムフロアブル, トリフルミゾール水和剤およびイミノクタジンアルベシル酸塩水和剤では, 特に2種炭疽病菌の分生子発芽において菌種間で著しい感受性の差異が認められた(第10, 11図). こうした菌種間差異の原因については不明であるが, 今後はこれが普遍的な現象であるか供試菌株数を増やし再度検証する必要がある. 以上の結果から, 施設マンゴーにおける2病害の病原菌に

対して有効な共通防除体系は、マンゼブ水和剤、アゾキシストロビンフロアブル、クレソキシムメチルドライフロアブル、塩基性硫酸銅水和剤およびキャプタン水和剤の5薬剤を主体に体系化することが効果的であると考えられた。

これまでに、キャプタン水和剤が培地評価ではマンゴー炭疽病菌に対し高い抑制効果を示すが、圃場散布試験では他剤と比べて防除効果が低くなることが報告されており（澤岨ら, 2013c）、室内試験の結果が必ずしも圃場試験の結果と一致しない事例も確認されている。圃場や自然環境下ではシャレー内と比較して水、熱および日光等の影響で薬剤の分解が速やかに進むため、薬剤に含まれる成分の種類によって薬効に違いを生じると推察される。そのため、室内試験で選抜した薬剤については、自然環境条件下において植物（苗など）を用いた菌接種による薬剤散布の再評価を追加で行うことが望まれる。しかし、特に炭疽病では接種した病原菌が植物体上（葉など）で潜在感染して病徴がうまく再現できず（澤岨ら, 2013d）、薬剤効果の判定が困難になることから、本研究ではマンゴー苗等を用いた散布試験による選抜評価には至っていない。今後、マンゴー苗上で安定して両病害の病徴が再現できるような簡易な薬剤評価法についても検討する必要がある。また、近年、炭疽病菌は分子系統解析による再分類が行われ、これまでの病原菌であった広義の *C. gloeosporioides* と *C. acutatum* が一部の形態に基づいて一括りにされた複数種の集合体（種複合体=species complex）であることが明らかとなった（Damm *et al.*, 2012 ; Weir *et al.*, 2012）。そのため、マンゴー炭疽病菌についても同複合体のさらなる再分類の進展に伴い、新たな構成種が明らかになることが想定されており、今後は本研究で使用した *C. siamense* と *C. fioriniae* 以外の新たな構成種についても随時、薬剤感受性を調べていく必要がある。

本研究では、*in vitro* で両病害の病原菌に高い抗菌活性を示した4薬剤に、プロシミドン水和剤を加えた5種薬剤を組み合わせ、マンゴーの出蕾または開花期から袋かけ直前までの生育期における体系散布スケジュール（ver. 2 ; 第7表）を策定し、その防除効果を検討した。使用した5薬剤のうち、塩基性硫酸銅、キャプタンおよびマンゼブ水和剤は菌体内のSH酵素の働きやATP形成の阻害により病原菌の感染時に効果を示す予防剤として、プロシミドン水和剤およびアゾキシストロビンフロアブルは菌体内の細胞膜、細胞壁の合成阻害やミトコンドリア内のチトクローム電子伝達系阻害による呼吸阻害によって感染成立後にも効果を示す治療剤として作用することが知られている（日本植物防疫協会編, 2013）。本体系散布（ver. 2）ではこうした各薬剤の作用特性ならびに登録適用基準である使用回数、使用時期（収穫前日数）および薬液の汚れ程度を考慮して薬剤のローテーション散布を実施

した。その結果、2012～2014年の試験地2カ所のいずれの年においても体系散布区で両病害の果実での発病に対し、安定した防除効果が認められ、無散布区と比べて炭疽病では約67～92%、軸腐病では約56～95%まで発病が抑制された（第8表）。さらにメタ・アナリシスによる3ヵ年5試験事例の統合解析の結果より、体系散布区の両病害の発病は無散布区に比べて有意に少なく、炭疽病では無散布区の発病果率の23%、軸腐病では無散布区の発病果率の24%にまで抑制されることが示された（第12図）。これまでにオーストラリアの露地マンゴーにおいて、開花から着果期にかけて塩基性塩化銅とマンゼブ剤を組み合わせた計13回の薬剤散布を行うことにより、炭疽病への防除効果が確認されている（Fitzell and Peak, 1986）。この結果と同様に、本研究では我が国の登録薬剤においてもマンゴーの生育期に8回散布することで、収穫後の果実における炭疽病および軸腐病に対して高い防除効果を示すことが確認され、先行研究よりも少ない散布回数で安定的に防除できることが示された。これは、マンゴー生育期の前半（出蕾期～着果初期）に散布した3種類の予防剤が病原菌の分生子発芽や菌糸伸長を強力に阻害して初期感染を防ぐとともに、生育後半（着果後期～果実肥大期）に散布した2種類の治療剤が病原菌の感染後に形成される付着器や果皮組織内に侵入する角皮下菌糸にも浸達して抗菌作用を示したためであると考えられる。また、沖縄県の5～6月の降雨量が多く湿度の高い梅雨時期では、雨よけ施設内でもマンゴー植物上では長時間の濡れが頻繁に生ずることによって炭疽病菌の感染が成立すること、同時期の摘果作業時のハサミによる枝切口から軸腐病菌の感染が増加すること（澤岨, 2014; 澤岨ら, 2019）が明らかになっているが、本体系散布（ver.2）では予防的に梅雨時期前から病原菌への薬剤による防除圧が加わるため、梅雨時期の病原菌の感染・拡大を抑え、効果的かつ安定的に両病害に対し防除効果を発揮すると考えられる。

本体系散布（ver.2）による果実の薬害（果色ムラ）は2013年試験のうるま市で低頻度ではあるが3.2%発生が認められた（第8表）。これは6月中旬の果実肥大期後半に散布したプロシミドン水和剤が強く影響したものと考えられたが、2014年試験の体系散布スケジュールのように散布開始時期を出蕾前の12月下旬に早めて、本剤の散布を着果期の4月下旬頃までに終了すれば、薬害の発生は容易に回避できるものと考えられた。また、2012～2013年試験の体系散布区の散布開始時期は出蕾確認後の2月中旬以降から、2014年試験では出蕾前の12月下旬からであり、散布開始時期が各年度で異なっている。これは炭疽病菌が1月の出蕾時の頂芽部位で既に潜在感染している（澤岨ら, 2013d）ことから、2014年試験ではそれよりも前の時期から早めに薬剤を散布するよう試験設計を組むことで、より高い防除効果を示すものと推察した。しかし、結果的に散布開始時期の違いによる両病害の

抑制に大きな差はみられず、体系散布区のリスク比をみても 2014 年試験の炭疽病が 0.08～0.25、軸腐病が 0.21～0.36 の範囲であるのに対し、2012 年試験の炭疽病が 0.17～0.25、軸腐病は 0.23～0.44 の範囲となり、概ね同等の防除効果であった（第 12 図）。おそらく出蕾前の 12 月から 3 月初旬の開花初期頃までは、病原菌は主として分生子の状態で植物体上に付着して潜伏しており、この期間が分生子発芽時の付着器形成による初期感染を防除できる適期であったためと推察される。このことから、遅くとも 3 月初旬頃までに 1 回目の薬剤散布を開始することで両病害に対する防除効果は十分期待できるが、上記の果実での薬害の発生を回避することを考慮すると、やはり 2014 年試験のように出蕾前から早めに薬剤散布を開始することが望ましいと判断した。

上述の最初に提案した薬剤体系散布（ver. 1）については、着果期以降に耐性菌が発達しやすい QoI 剤が複数回の連続散布となっていたこと、本県では低頻度ではあるが QoI 剤耐性マンゴー炭疽病菌も石垣島の 1 地点で確認されている（澤岬ら、2014）ことなどから、その散布スケジュールの見直しが必要であった。そのため、本研究では日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会が提示する殺菌剤使用ガイドライン（日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会編、2012）に沿って、作用点の異なる複数の薬剤をローテーションで組み入れながら QoI 剤の使用を年 1 回に制限し、かつ防除効果を維持できる薬剤散布体系に改善することができた。このことから、耐性菌の発達しにくい新たな体系散布スケジュールとして本県の防除暦にも十分活用できると思われる。以上のように、今回行った施設マンゴーにおける 5 種殺菌剤を組み合わせた本体系散布技術（ver. 2）は、マンゴー軸腐病および炭疽病の共通防除体系として有効であることが明らかとなった。

本体系散布（ver. 2）で使用する殺菌剤 5 剤のうち、我が国のマンゴーでは塩基性硫酸銅水和剤は、細菌性病害であるマンゴーかいよう病の防除剤として登録されており、炭疽病と軸腐病に対しては現在未登録である。そのため、本剤を防除暦で活用する場合は、冬春期のかいよう病の発生と合わせて同時防除を狙った薬剤散布を実施する必要がある。今後は本剤が両病害に対して効率的に利用できるよう登録の適用拡大を図る必要がある。また、炭疽病と軸腐病の病原菌は、剪定後の果房や緑枝、葉などの残渣上で長期間生存することが確認されているため（澤岬、2015；澤岬ら、2019）、圃場では剪定残渣が重要な伝染源になっていると考えられる。本体系散布による防除効果をより効果的に発揮させるためにも、残渣除去による耕種的防除法を積極的に行うことで、薬剤のみに依存しない総合的な防除管理を実施することが重要である。

## VI. 未硬化葉を用いたマンゴー炭疽病の簡易病原性検定法とマンゴー遺伝資源における抵抗性品種の選抜

### 1. 材料および方法

#### 1. 1 未硬化葉を用いた簡易病原性検定法の検討

(1) 接種源 供試菌株は2016年4月に名護支所内の露地マンゴー（‘アーウィン’）の罹病葉より単孢子分離で得られた *Colletotrichum asianum* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde (Nga-02, 04 および 05 株：広義 *C. gloeosporioides*) の計3菌株を用いた。本種は近年のマンゴー炭疽病菌の再分類により明らかにされた *C. gloeosporioides* 種複合体6種の中で果実に最も病原力が強い菌種である(安次富ら, 2017)。分生子懸濁液は以下のとおりに作成した。供試菌株を PDA 平板培地にて明条件下、25 °Cで10日間培養して菌叢上に分生子塊を形成させ、滅菌した柄付き針で培地上の分生子塊をかき取り、2 mL 滅菌水の入ったマイクロチューブ内で分生子塊を懸濁させた。その後、トーマ血球計算盤(A106:Thoma)にて懸濁液の分生子濃度を調整して、各試験に供試した。

(2) 葉緑素含量値 (SPAD 値) の測定 名護支所内の施設マンゴー（‘アーウィン’）の成木（樹齢10年生）より、未硬化葉（茶褐色または赤褐色の柔らかい葉）、若葉（硬化しているが葉色が淡緑色の葉）および成葉（硬化して葉色が濃緑色の葉）の3パターン（第13図）の葉をそれぞれ75~98枚採集した。葉緑素含量値の計測は葉緑素計 (SPAD-502Plus : KONICAMINOLTA) を用いて行い、1葉につき3カ所の平均値を測定した。

(3) 葉への接種法 採集したマンゴー葉を水道水で軽く洗浄し、7×5 cm 程度の大きさに切り取り、70%エタノールで20秒間浸漬した後、滅菌水で洗浄し、室内にて1時間程度風乾させた。その後、湿らせたろ紙を敷いた9 cm シャーレ内に葉を収め、葉表3カ所に供試菌株の分生子懸濁液 ( $10^5$  個/mL) を25  $\mu$ L ずつ滴下した。なお、接種は無傷で行った。接種葉は25 °C暗条件下の恒温培養器内で5日間培養し、接種箇所に形成された黒色病斑の直径（長径および短径の平均）を測定した。対照区として蒸留水を同様に処理した。

(4) 葉齢の影響 名護支所内の施設マンゴー（‘アーウィン’）の成木（樹齢10年生）より未硬化葉、若葉および成葉の3パターン（第13図）の葉を採集し、供試3菌株の分生子懸濁液 ( $5.6 \times 10^5$  個/mL) を上記と同様な方法で接種し、病斑の直径を測定した。なお、採集した葉のそれぞれの SPAD 値を測定したところ、未硬化葉は15.3~21.2、若葉は32.3~40.4 および成葉は53.9~59.7 の範囲であった。試験は各

葉につき5反復で行った。

(5) 分生子濃度の影響 上記試験で他の菌株と同等の病原性を認めた供試菌株 (Nga-05 株) の分生子懸濁液を7段階の濃度 ( $1 \times 10^0 \sim 10^6$  個/mL) で調整して作成した。名護支所内の施設マンゴー (‘アーウィン’) の成木 (樹齢10年生) より採集した未硬化葉 (SPAD値: 14.3~22.8) に各濃度の分生子懸濁液を上記と同様な方法で接種し、病斑の直径を測定した。試験は各濃度につき9反復で行った。

(6) 培養温度の影響 供試菌株 (Nga-05 株) の分生子懸濁液 ( $6.5 \times 10^5$  個/mL) を、名護支所内の施設マンゴー (‘アーウィン’) の成木 (樹齢10年生) より採集した未硬化葉 (SPAD値: 11.8~19.0) に上記と同様な方法で接種し、15~40°C (5°C間隔) の6段階の温度に調整した恒温培養器内でそれぞれ培養し、5日後の病斑の直径を測定した。試験は各温度区につき9反復で行った。



第13図 各葉齢のマンゴー葉 (品種: ‘アーウィン’) 。  
左: 未硬化葉, 中: 若葉, 右: 成葉, 数字は各葉のSPAD値

## 1. 2 簡易病原性検定法による炭疽病抵抗性品種の選抜

(1) 葉検定法 2016年6~10月にかけて、名護支所内の施設に保存している海外から導入されたマンゴー遺伝資源 (28品種, 第1表) の各成木 (樹齢15年生) より未硬化葉 (SPAD値: 8.7~23.3) を採集し、上記と同様な方法で供試菌株 (Nga-05 株) の分生子懸濁液 ( $6.5 \times 10^5$  個/ml) を接種し、病斑の直径を測定した。試験は各品種ともに3反復で行った。発病度は以下の基準に従って算出した。指

数0：病斑なし，指数1：病斑の直径が1.5 cm 以下，指数2：病斑の直径が1.6～2.4 cm，指数3：病斑の直径が2.5 cm 以上，発病度 =  $\{\sum (\text{指数別病斑数} \times \text{指数}) \div (3 \times \text{調査病斑数})\} \times 100$ 。また，各品種の抵抗性の程度は，葉検定法では病斑の直径 (cm) と発病度，果実接種では発病指数と発病度の値をもとにソフトウェア (エクセル統計：BellCurve) を用いてユークリッド平方距離を求め，群平均法による階層的クラスター分析を行い，その結果から，抵抗性・強 (R)，抵抗性・中 (MR)，抵抗性・弱 (S) および抵抗性・極弱 (HS) の4グループに分類して評価した。

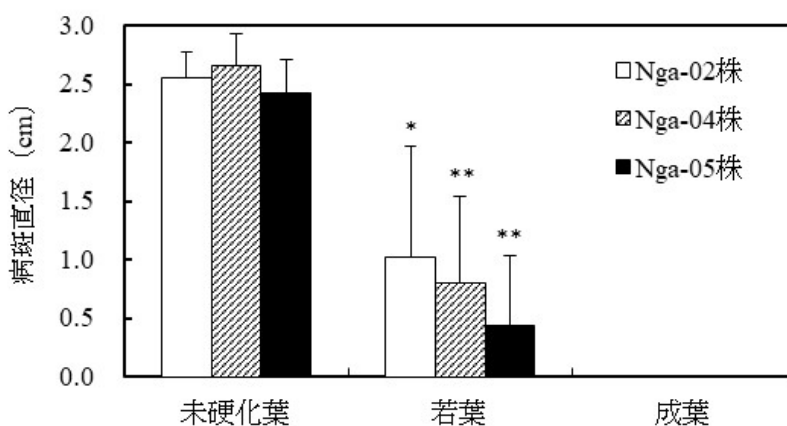
(2) 果実への接種法 2016 および2017年の6～9月にかけて，名護支所内の施設に保存しているマンゴー遺伝資源 (28品種，第1表) の各成木 (樹齢15年生) より収穫適期の果実 (果皮色が黄色や赤色に鮮明に発色し始め，触手で果肉の軟化が確認されたもの，または離層形成後に袋内で自然落果したもの) を収穫した。果実を70%エタノールに20秒間浸漬した後，滅菌水で洗浄し，室内で風乾させた。その後，上記の方法で作成した供試菌株 (Nga-05株) の分生子懸濁液 ( $2.4 \times 10^5$  個/mL) を1果につき約2.3 mL ずつ果実全体に噴霧接種した。なお，1品種につき5～21個の果実を使用した。接種果実は加湿した密閉容器内で概ね27°Cの室温下にて48時間保存し，その後容器から取り出して室内で追熟させた。収穫から保存10日後の発病果数と発病度を調査した。発病度は以下の澤岬ら (2018) の基準に従って算出した。指数0：発病なし，指数1：2 mm 以下の病斑が2個以下，指数2：2 mm 以下の病斑が3～6個また2～5 mm の病斑が1個，指数3：直径5 mm 以上の病斑が1個以上または指数2以上，発病度 =  $\{\sum (\text{指数別発病果数} \times \text{指数}) \div (3 \times \text{調査果数})\} \times 100$ 。また，各品種の抵抗性の程度は，上記の葉検定法と同様に群平均法を用いた階層的クラスター分析により，4グループに分類して評価した。

## 2. 結果

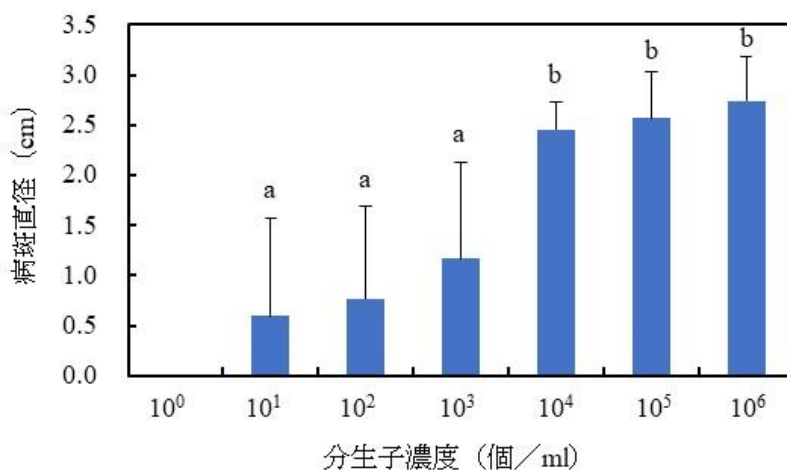
### 2. 1 未硬化葉を用いた簡易病原性検定法の検討

マンゴーの各葉齢における SPAD 値は，未硬化葉 (n=98) が9.5～24.3 で平均値は17.1 (SD±2.5)，若葉 (n=75) は23.8～42.8 で平均値は34.3 (SD±3.9)，成葉 (n=75) は44.5～66.0 で平均値は55.2 (SD±4.4) であり，未硬化葉の値は他の葉齢の葉と比べて有意に低かった ( $p < 0.01$ , Tukey-Kramer 法)。未硬化葉では病斑の直径が平均2.4～2.7 cm と若葉と比べて有意に大きく ( $p < 0.05$ )，安定した病斑の形成を示した。一方，若葉の病斑の直径は平均0.4～1 cm と有意に小さく，偏差も大きく病斑の形成は不安定であった。成葉では病斑の形成は全くみられなかった。また，3菌株間に病原力の違いは認

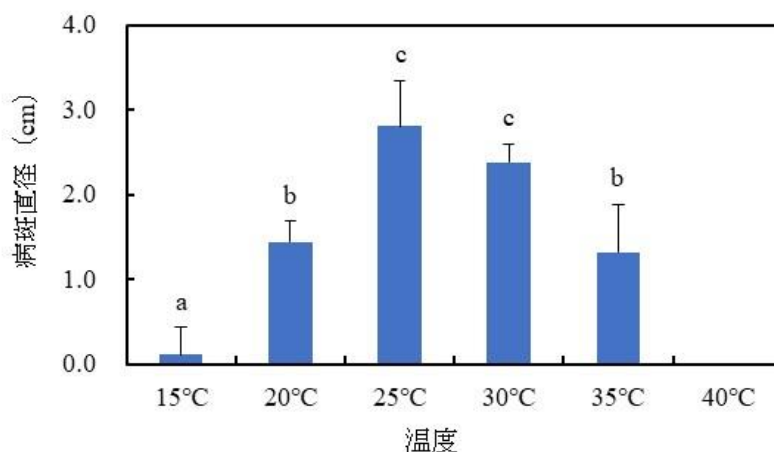
められなかった (第 14 図). 分生子濃度の影響では,  $10^4$  個/mL 以上で病斑の直径は平均 2.5 cm と有意に大きく ( $p<0.01$ , Tukey-Kramer 法), 安定した病斑の形成を示した. 一方,  $10^3$  個/mL 以下で病斑の直径は平均 1.2 cm 以下と有意に小さく ( $p<0.01$ ), 偏差も大きく病斑の形成は不安定であった (第 15 図). 培養温度の影響では,  $25\sim 30^\circ\text{C}$  の範囲で病斑の直径は平均  $2.4\sim 2.8$  cm と最も大きくなった. 一方,  $20^\circ\text{C}$  以下および  $35^\circ\text{C}$  以上では, 病斑の直径は平均 1.4 cm 以下と有意に小さくなり ( $p<0.01$ ),  $40^\circ\text{C}$  では病斑の形成は全くみられなかった (第 16 図).



第14図 マンゴー葉の葉齢の違いが炭疽病の病斑の形成に及ぼす影響. アスタリスクは葉齢間における有意差を示す. 若葉の値は未硬化葉に比べ有意に低い (Welch's  $t$  test,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ). バーは標準偏差を示す.



第15図 炭疽病菌の分生子濃度の違いが病斑の形成に及ぼす影響. アルファベットが異なれば濃度間で有意差あり (Tukey-Kramer法,  $p<0.01$ ). バーは標準偏差を示す.



第16図 培養温度の違いが炭疽病の病斑の形成に及ぼす影響。アルファベットが異なれば温度間で有意差あり (Tukey-Kramer法,  $p < 0.01$ )。バーは標準偏差を示す。

## 2. 2 簡易病原性検定法による炭疽病抵抗性品種の選抜

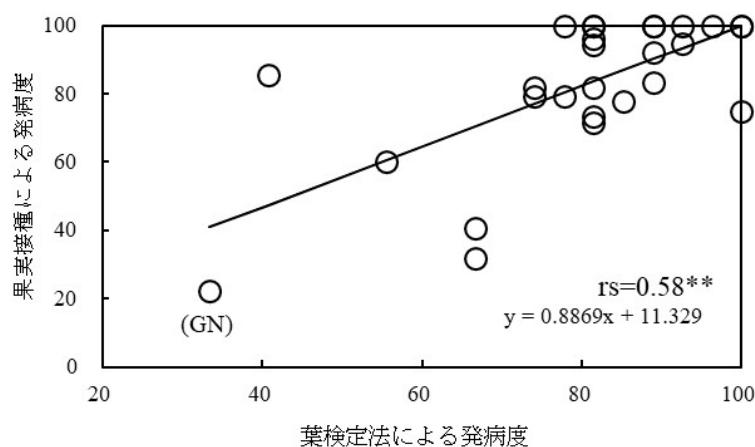
未硬化葉への菌接種による簡易病原性検定法 (以下, 葉検定法) では, 群平均法によるクラスター分析の結果, 分類距離を 18.5 で括ると 4 つの抵抗性程度のグループに類別され, 炭疽病に対し ‘アーウィン’ を含む 28 品種中 11 品種が病斑の直径 2.5~3.1 cm (平均), 発病度 88.9~100 の範囲で抵抗性・極弱 (HS), 12 品種が病斑の直径 2.2~2.5 cm (平均), 発病度 74.1~85.2 の範囲で抵抗性・弱 (S), 3 品種が病斑の直径 1.7~2.1 cm (平均), 発病度 55.6~66.7 の範囲で抵抗性・中 (MR), 2 品種が病斑の直径 1.1~1.4 cm (平均), 発病度 33.3~40.7 で抵抗性・強 (R) であった。抵抗性・強の品種は ‘ゴールデンナゲット’ および ‘カットトラング’ であった (第 9 表, 第 18 図)。果実への菌接種による検定 (以下, 果実接種) では, クラスター分析により分類距離を 14.4 で括ると葉検定法と同様に 4 グループの抵抗性程度に類別され, 炭疽病に対し ‘アーウィン’ を含む 28 品種中 13 品種が発病指数 2.8~3.0 (平均), 発病度 92.2~100 の範囲で抵抗性・極弱 (HS), 11 品種が発病指数 2.1~2.6 (平均), 発病度 71.4~85.7 の範囲で抵抗性・弱 (S), 1 品種が発病指数 1.8 (平均), 発病度 60 で抵抗性・中 (MR), 3 品種が発病指数 0.7~1.2 (平均), 発病度 22.2~40.7 の範囲で抵抗性・強 (R) であった。抵抗性・強の品種は ‘オースティン’, ‘フェアチャイルド’ および ‘ゴールデンナゲット’ であった (第 9 表, 第 18 図)。葉検定法と果実接種の両検定法で抵抗性・強 (R) と評価されたのは, ‘ゴールデンナゲット’ のみであった。一方, ‘カットトラング’ は両検定法による抵抗性の評価が逆転し, 一致しなかった (第 9 表)。また, 供試 27 品種の葉検定法による発病度と果実接種による発病度との間に, 正の相関関係 (スピアマンの順位相関係数:  $r_s = 0.58$ ,  $p < 0.01$ ) が認められた (第 17 図)。

第9表 葉検定法および果実接種によるマンゴー炭疽病抵抗性の品種間差異

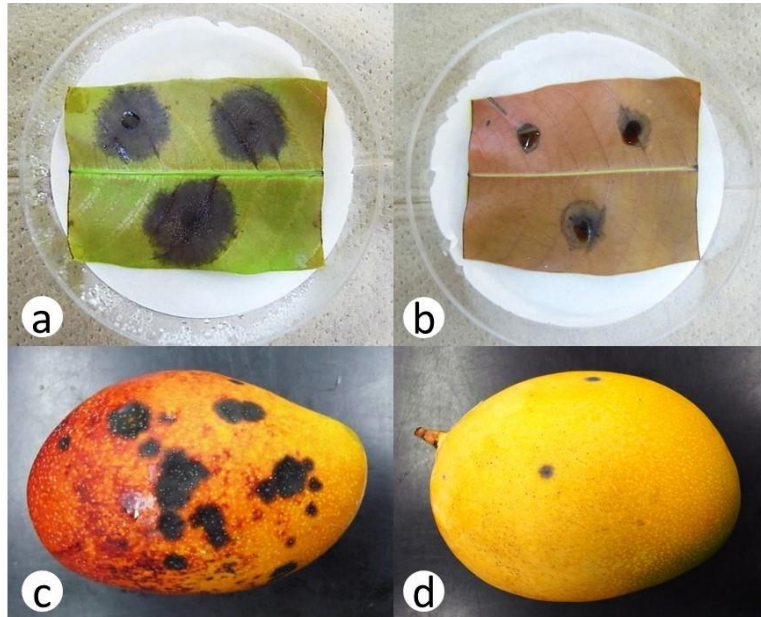
品種	葉検定法			果実接種		
	病斑直径 (cm)	発病度	抵抗性 の程度	発病指数	発病度	抵抗性 の程度
アーウィン	3.0 <sup>a)</sup>	92.6	HS <sup>b)</sup>	2.8 <sup>1)</sup>	94.9	HS <sup>2)</sup>
紅龍	2.4	81.5	S	3.0	100.0	HS
バレンシアプライド	2.4	77.8	S	3.0	100.0	HS
エドワード	3.0	100.0	HS	3.0	100.0	HS
グレン	2.7	96.3	HS	3.0	100.0	HS
ターペンティン	2.4	81.5	S	3.0	100.0	HS
ヘーデン	3.0	100.0	HS	3.0	100.0	HS
スピリット of '76	2.7	100.0	HS	-	-	-
金煌	2.6	88.9	HS	3.0	100.0	HS
クシュマン	2.5	92.6	HS	3.0	100.0	HS
リリー	2.3	81.5	S	2.9	96.3	HS
マヤ	2.5	81.5	S	2.8	94.4	HS
スプリングフェルズ	2.8	88.9	HS	3.0	100.0	HS
ゴールデンリペンス	2.5	88.9	HS	2.8	92.2	HS
紅キーツ	2.6	88.9	HS	2.5	83.3	S
ナムドクマイ	-	-	-	2.5	83.3	S
台農1号	2.2	74.1	S	2.5	81.8	S
リペンス	2.5	81.5	S	2.5	81.8	S
フクダ	2.3	74.1	S	2.4	79.2	S
キーツ	2.3	77.8	S	2.4	79.2	S
ベッキー	2.5	85.2	S	2.3	77.8	S
バンダイク	3.1	100.0	HS	2.3	75.0	S
パール	2.4	81.5	S	2.2	73.3	S
ドット	2.4	81.5	S	2.1	71.4	S
カットトラング	1.4	40.7	R	2.6	85.7	S
パルビン	1.7	55.6	MR	1.8	60.0	MR
オースティン	2.1	66.7	MR	1.2	40.7	R
フェアチャイルド	2.0	66.7	MR	1.0	31.7	R
ゴールデンナゲット	1.1	33.3	R	0.7	22.2	R

a) 平均値を示す。

b) クラスター分析（群平均法）により、次の4グループに分類した。HS：抵抗性・極弱，S：抵抗性・弱，MR：抵抗性・中，R：抵抗性・強，-：データなし



第17図 マンゴー品種における炭疽病菌の果実接種による発病度と葉検定法による発病度との相関。両接種法のデータがそろった27品種での解析結果を示す。図中の○は実測値，(GN)は‘ゴールデンナゲット’の値を示す。rsはスピアマンの順位相関係数を示し，\*\*は1%水準で有意であることを示す。



第18図 葉検定法および果実接種によるマンゴー炭疽病の発病状況. a, c: ‘アーウィン’, b, d: ‘ゴールデンナゲット’, 葉: 接種後5日目, 果実: 接種後10日目.

### 3. 考察

本研究では、マンゴー炭疽病の抵抗性育種の研究で活用できる簡易で安定的な病原性検定法の開発とその適正な検定条件を明らかにし、マンゴー遺伝資源 29 品種を供試して葉検定法による評価と果実接種による発病程度との関係を比較しながら、その有効性について検討した。その結果、マンゴー未硬化葉 (SPAD 値: 9.5~24.3) を接種葉とし、接種時の分生子濃度を  $10^4$  個/mL 以上、培養温度を 25~30 °C に設定して、暗条件下で 5 日間培養することで安定して病原性を評価できることが明らかになった。宿主の葉齢については、未硬化葉、若葉および成葉の各葉齢間で SPAD 値に明瞭な差が認められ、生育が進むほど葉内のクロロフィル濃度が増加することが確認された。これまで現地での葉齢の区別は、葉の触感と葉色で判断したが、採集者によって差異が大きく、検定に適する葉の基準を統一するのが難しかった。しかし、本研究の結果から、葉緑素計を用いることで容易に葉齢を判別して未硬化葉を採集できると考えられる。また、多くの植物で葉齢が進むほど病害に対する抵抗性が增大する事例が報告されており (Roumen *et al.*, 1992 ; Turechek and Stevenson, 1998), 本研究においても硬化した若葉と比べて未硬化葉で炭疽病の病斑が安定して大きくなり、葉齢により病斑の拡大に差があることが示された (第 14 図)。これまでにブドウべと病では、ブドウ成葉と比べて若葉で旺盛に病斑を形成し、成葉内にはファイトアレキシンとなる過酸化水素や抗菌性のフェノール成分が若葉よりも多く蓄積することが報告されている (Steimetz *et al.*, 2012)。マンゴー葉でも同様に葉齢によって表皮細胞の物理的強度の違いや葉内の抗菌成分の変化が関連している可能性がある。葉齢については、

菌株間の病原力の違いを確認するために同一種で分離源が異なる *C. asianum* の 3 菌株を供試菌株として接種に用いたが、いずれの葉齢でも菌株間で病原力に差は認められなかった (第 14 図)。分生子濃度については、一般に地上部病害の接種時の場合、例えばイチゴ葉に対する炭疽病菌の接種では  $10^4$  個/mL に調整して行うが (大畑, 1995)、マンゴー未硬化葉においても同様に  $10^4$  個/mL 以上の分生子濃度で安定した病斑の形成が認められた (第 15 図)。一方、 $10^3$  個/mL 以下の低濃度の分生子懸濁液で接種を行うと、安定した病斑の形成は得られなかったことから、未硬化葉を用いた病原性検定では  $10^4$  個/mL 以上の高濃度の分生子が必要になると考えられる。温度については、 $15\sim 25^\circ\text{C}$  の範囲では温度の上昇とともに未硬化葉上の病斑の直径も有意に大きくなり、 $35^\circ\text{C}$  以上では高温により逆に小さくなることから、発病適温は  $25\sim 30^\circ\text{C}$  の範囲であると考えられた (第 16 図)。接種に用いた *C. asianum* の生育適温は  $28^\circ\text{C}$  であり (Prihastuti *et al.*, 2009)、未硬化葉上の発病適温 ( $25\sim 30^\circ\text{C}$ ) と生育適温が概ね一致することが確認された。以上のことから、葉検定法の最適な検定条件 (分生子濃度:  $10^4$  個/mL 以上, 培養温度:  $25\sim 30^\circ\text{C}$ ) は、マンゴーにおいて高度な抵抗性を有する育種素材だけを選抜したい時や抵抗性の有無を早期に判断したい場合には、効率的な条件であると考えられた。

マンゴー遺伝資源 27 品種について、未硬化葉を用いた葉検定法による発病度と果実接種による発病度を比較すると、両接種法による発病程度間に正の相関関係 (スピアマンの順位相関係数:  $r_s=0.58$ ,  $p<0.01$ ) が認められ、葉検定法によりマンゴー炭疽病抵抗性の品種間差異を判定できることが示された (第 17 図)。これまでに、イネいもち病では一部の品種・系統を除き、葉いもちと穂いもちの発病程度には高い相関があり、葉いもちの検定によって穂いもちの圃場抵抗性が推定できる事例が報告されているが (浅賀, 1981)、一般に異なる植物部位間で病害抵抗性に相関を示す報告は少なく、本研究では相関係数は高い値ではないが、マンゴーの葉と果実で抵抗性程度に相関が認められたのは初めての事例である。本法を用いることで、年次間の圃場環境に左右されることなく、抵抗性が判定できるだけでなく、マンゴー幼苗時の未硬化葉での評価が可能となり、遺伝資源や雑種後代の中から抵抗性を持つ多数の個体を効率よく短期間で評価・選抜できる。育種現場では実生段階での 1 次選抜で本法による評価を行い、2 次選抜から系適試験にかけては果実接種による評価を併用する 2 段階評価を行うことで、効率的に精度の高い抵抗性個体の選抜が可能になると考えられる。以上のことから、本検定法が育種現場で活用できるマンゴー炭疽病の病原性検定法として有効であると判断した。しかし、沖縄県におけるマンゴー育種では、供試したほとんどの品種で過去に炭疽病に対する圃場抵抗性を調べた事例はなく、本研究では品種間の抵抗性を裏付けるための葉検定法の結果と実際の圃場抵抗性と

の相関を検証することができなかった。これまでに、ブドウ炭疽病抵抗性を評価するための葉を用いた室内検定の結果が、圃場での葉の発病程度と高い相関（相関係数：0.71～0.72）を示すことが報告されており（Poolsawat *et al.*, 2012）、マンゴーにおいても今後は各品種の圃場抵抗性についてデータを蓄積し、葉検定法による結果との相関に基づいた評価を行う必要がある。また、果実接種による評価と葉検定法による評価が必ずしも一致しない品種‘カットラング’も確認されており、これは未硬化葉と果実で病原菌の接種方法が異なることや植物から切り離れた未硬化葉の生理状態が、保存時間の経過とともに完熟に向かって常に熟度が変化する果実とは異なることから、抵抗性の判定結果に違いが生じる場合もあると考えられる。これらの品種については、今後サンプル数を増やして再度、抵抗性を検証するとともに、圃場抵抗性の結果とも併せて比較する必要がある。

今回供試した 29 品種の抵抗性評価では、‘ゴールデンナゲット’が炭疽病に最も強い抵抗性品種であると判定された（第 9 表、第 18 図）。本品種はフロリダで育成され、果実重が約 420g、果皮色は黄橙で糖度は約 17°Bx、酸度は約 0.3%の特性を有しており（国際農林水産業研究センター、2017）、本品種の炭疽病抵抗性を明らかにしたのは本研究が初めてである。本品種の食味はテルペン臭が強く、クセがあるため、一般向けの品種としてそのまま利用するにはやや問題があるが、炭疽病抵抗性を有する品種開発のための育種素材として今後、有望であると考えられる。一方、本研究で抵抗性・極弱（HS）または弱（S）と判定された多くの品種は圃場で炭疽病に罹病しやすい品種であり、主に沖縄県で栽培される‘アーウィン’、‘キーツ’、‘リペンス’および‘バレンシアプライド’の 4 品種はいずれも罹病性であることが確認された。これらの品種を育種素材として利用する場合は‘ゴールデンナゲット’のような抵抗性を持つ品種との交配を考慮する必要がある。また、Hassan ら（2007）が行ったマンゴー炭疽病の発病機構に関する研究では、マンゴー未熟果皮にはフェノール類の抗菌成分であるレゾルシノールが含まれており、本病に比較的強い抵抗性を有する品種‘ケンジントンプライド’の果皮には、弱い品種‘ケント’および‘ナムドクマイ’と比べて本成分がより多く含まれていること、未熟果ではレゾルシノールによって病徴の発現が抑制され、収穫後の追熟の進行とともに本成分が減少することによって、完熟果実で病徴が発現することが明らかになっている。本研究で強い抵抗性が判明した‘ゴールデンナゲット’についても、今後は果皮や未硬化葉にレゾルシノールが多く含まれているか検証するとともに、その他の供試品種についても抗菌成分の検出と成分含量の比較を検討する必要がある。

我が国では近年の分子系統解析を用いた病原菌の再同定により、*C. gloeosporioides* 種複合体のうち

マンゴー炭疽病の病原菌として *C. aenigma*, *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides sensu strict*, *C. siamense* および *C. tropicale* の 6 種が明らかにされており (安次富ら, 2017), それぞれの種の全国的な分布や種構成は不明であるが, 本研究ではこの中で果実に最も強い病原性を有する *C. asianum* を代表の供試菌株として使用した. しかし, これまでにイチゴ品種において *C. gloeosporioides* 種複合体の構成種によって異なる抵抗性程度を示す品種 (‘恋みのり’) も確認されている (遠藤, 2018). このことから, マンゴーにおいても特に抵抗性が明らかになった ‘ゴールデンナゲット’ については菌種別での炭疽病抵抗性の検討も必要である. また, 今後はこのような多様な病原菌の種複合体に対して安定的な抵抗性を有する品種を開発するために, 抵抗性についてさらなる知見を集積するとともに, 迅速な抵抗性品種の選抜を可能にする遺伝子マーカーの開発や適正な病原性検定のための接種用菌株の選定なども行う必要があると考えられる.

## VII. *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体に所属する 沖縄産マンゴー炭疽病菌の種構成と諸特性

### 1. 材料および方法

#### 1. 1 供試菌株および分子系統解析

2007～2012 年にかけて沖縄県内の 17 市町村 45 園地の罹病果実の黒色斑点部に形成された鮭肉色の分生子塊から単胞子分離し、マンゴー品種‘アーウィン’果実へ菌叢片接種による病原性試験と、種特異的プライマーを用いた PCR 増幅 (White *et al.*, 1990 ; Mills *et al.*, 1992 ; Sreenivasaprasade *et al.*, 1996) により *C. gloeosporioides* 種複合体 (73 菌株) または *C. acutatum* 種複合体 (10 菌株) に類別した計 83 菌株を解析に供試した (第 10, 11 表 ; 澤岬ら, 2012). 供試菌株の種を同定するために, *C. gloeosporioides* 種複合体は Silva ら (2012) の方法に従い *ApMat* 領域について, *C. acutatum* 種複合体は Damm ら (2012) の方法に従い ITS, *GAPDH*, *ACT*, *CHS-1*, *HIS3* および *TUB2* 領域について分子系統解析を行った. 各領域のプライマー (第 12 表) により DNA 断片を増幅し, 得られた PCR 産物を ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) により精製した後 3130xl Genetic Analyzers (Thermo Fisher Scientific) にてそれぞれの塩基配列を決定し, BLAST 検索を行った. なお, PCR 反応液の酵素は TaKaRa *Taq* DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ, 滋賀) を使用し, PCR 条件は各領域の塩基配列ともに既報に従って伸長反応させた (第 12 表). 次に, *Colletotrichum* 属菌の *ex-type* 株を含む各領域で登録されている塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースより取得し, それらの塩基配列と供試菌株の塩基配列を統合して, ソフトウェア Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) でアライメントを行い, ソフトウェア MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) を用いて, Kimura のパラメータ法 (Kimura, 1980) に基づく近隣結合法にて系統関係を推定した. 近隣結合法で得られた系統樹の各枝の支持率は, ブートストラップ検定 (Felsenstein, 1985) を 1,000 回反復し, 評価を行った.

#### 1. 2 形態観察

供試菌株は *C. gloeosporioides* 種複合体のうち代表菌株として c10 (*Colletotrichum aenigma* B. S. Weir & P. R. Johnston) , s12 (*Colletotrichum asianum* Prihastuti, L. Cai & K. D. Hyde) , c02 (*Colletotrichum fruticola* Prihastuti, L. Cai & K. D. Hyde) , n06 (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo) , s10 (*Colletotrichum queenslandicum* B. S. Weir & P. R. Johnston) , n12 (*Colletotrichum siamense* Prihastuti, L. Cai & K. D. Hyde) , n18 (*Colletotrichum theobromicola* Delacroix) , c08 (*Colletotrichum tropicale* E. I.

第10表 沖縄産マンゴー炭疽病菌*Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体分離株の菌種, 分離菌株, 採集地, 地域, 品種およびApMat領域のGenBank登録アクセッション番号

菌種	分離菌株	市町村 (採集圃場No.)	地域	品種	GenBank
					アクセッション番号
					ApMat
<i>C. aenigma</i>	c10	うるま市 (3)	中部	アーウィン	LC777809
	s21	那覇市 (1)	南部	アーウィン	LC777820
<i>C. asianum</i>	n04	名護市 (1)	北部	アーウィン	LC777796
	n16	今帰仁村 (2)	北部	アーウィン	LC777804
	n24	国頭村 (2)	北部	アーウィン	LC777769
	n26	国頭村 (2)	北部	アーウィン	LC777771
	n27	大宜味村 (1)	北部	アーウィン	LC777812
	n29	宜野座村 (1)	北部	アーウィン	LC777814
	n30	宜野座村 (2)	北部	アーウィン	LC777815
	n31	宜野座村 (2)	北部	アーウィン	LC777816
	n32	宜野座村 (3)	北部	アーウィン	LC777817
	s11	南風原町 (1)	南部	アーウィン	LC777784
	s12	南風原町 (2)	南部	アーウィン	LC777785
	s13	南風原町 (2)	南部	アーウィン	LC777786
	s16	糸満市 (1)	南部	アーウィン	LC777789
	s18	糸満市 (2)	南部	アーウィン	LC777791
<i>C. fructicola</i>	n02	東村 (1)	北部	アーウィン	LC777795
	n03	東村 (1)	北部	アーウィン	LC777810
	n05	名護市 (1)	北部	アーウィン	LC777797
	n07	名護市 (2)	北部	アーウィン	LC777799
	n08	名護市 (3)	北部	アーウィン	LC777811
	n09	名護市 (4)	北部	アーウィン	LC777802
	n10	名護市 (4)	北部	アーウィン	LC777803
	n14	今帰仁村 (1)	北部	アーウィン	LC777800
	n15	今帰仁村 (1)	北部	アーウィン	LC777801
	n19	今帰仁村 (3)	北部	アーウィン	LC777767
	n20	今帰仁村 (3)	北部	アーウィン	LC777768
	n21	国頭村 (1)	北部	アーウィン	LC777806
	n22	国頭村 (1)	北部	アーウィン	LC777807
	n23	国頭村 (1)	北部	アーウィン	LC777808
	n25	国頭村 (2)	北部	アーウィン	LC777770
	n28	宜野座村 (1)	北部	アーウィン	LC777813
	c01	沖縄市 (1)	中部	アーウィン	LC777759
	c02	沖縄市 (1)	中部	アーウィン	LC777760
	c05	うるま市 (1)	中部	アーウィン	LC777761
	c06	うるま市 (2)	中部	アーウィン	LC777762
	c07	うるま市 (2)	中部	アーウィン	LC777792
	c11	うるま市 (3)	中部	アーウィン	LC777821
	c12	うるま市 (3)	中部	アーウィン	LC777822
	c17	嘉手納町 (1)	中部	アーウィン	LC777764
	s05	豊見城市 (3)	南部	アーウィン	LC777778
	s06	豊見城市 (4)	南部	アーウィン	LC777779
	s14	南城市 (1)	南部	アーウィン	LC777787
	s19	糸満市 (3)	南部	アーウィン	LC777772
	s22	那覇市 (1)	南部	アーウィン	LC777819
	r01	石垣市 (1)	離島	アーウィン	LC777753
	r02	石垣市 (2)	離島	アーウィン	LC777754
	r06	石垣市 (6)	離島	アーウィン	LC777758
	r07	宮古島市 (1)	離島	アーウィン	LC777750
	r08	宮古島市 (1)	離島	アーウィン	LC777751
	r09	宮古島市 (2)	離島	アーウィン	LC777752
<i>C. gloeosporioides</i> s.s	n06	名護市 (2)	北部	アーウィン	LC777798
<i>C. queenslandicum</i>	s10	南風原町 (1)	南部	アーウィン	LC777783
<i>C. siamense</i>	n11	名護市 (5)	北部	アーウィン	LC777773
	n12	名護市 (6)	北部	アーウィン	LC777818
	n17	今帰仁村 (2)	北部	アーウィン	LC777805
	s03	豊見城市 (2)	南部	アーウィン	LC777776
	s04	豊見城市 (2)	南部	アーウィン	LC777777
	s07	豊見城市 (5)	南部	アーウィン	LC777780
	s08	豊見城市 (5)	南部	アーウィン	LC777781
	s15	八重瀬町 (1)	南部	アーウィン	LC777788
	s17	糸満市 (1)	南部	アーウィン	LC777790
<i>Colletotrichum</i> sp. Clade Q	n01	東村 (1)	北部	アーウィン	LC777794
	r03	石垣市 (3)	離島	アーウィン	LC777755
	r05	石垣市 (5)	離島	アーウィン	LC777757
<i>C. theobromicola</i>	n18	今帰仁村 (3)	北部	アーウィン	LC777766
<i>C. tropicale</i>	c08	うるま市 (2)	中部	アーウィン	LC777793
	c09	うるま市 (2)	中部	アーウィン	LC777765
	c16	嘉手納町 (1)	中部	アーウィン	LC777763
	s01	豊見城市 (1)	南部	アーウィン	LC777774
	s02	豊見城市 (1)	南部	アーウィン	LC777775
	s09	南風原町 (1)	南部	アーウィン	LC777782
	r04	石垣市 (4)	離島	アーウィン	LC777756

第11表 沖縄産マンゴー炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum* 種複合体分離株の菌種, 分離菌株, 採集地, 地域, 品種およびITS, *GAPDH*, *ACT*, *CHS-1*, *HIS3*, *TUB2* 領域のGenBank登録アクセッション番号

菌種	分離菌株	市町村 (採集圃場No.)	地域	品種	GenBankアクセッション番号					
					ITS	<i>GAPDH</i>	<i>ACT</i>	<i>CHS-1</i>	<i>HIS3</i>	<i>TUB2</i>
<i>C. fioriniae</i>	n13	名護市 (7)	北部	アーウィン	LC778040	LC778050	LC778060	LC778070	LC778080	LC778090
	c13	うるま市 (3)	中部	アーウィン	LC778037	LC778047	LC778057	LC778067	LC778077	LC778087
	c14	うるま市 (3)	中部	アーウィン	LC778038	LC778048	LC778058	LC778068	LC778078	LC778088
	c15	うるま市 (3)	中部	アーウィン	LC778039	LC778049	LC778059	LC778069	LC778079	LC778089
<i>C. miaoliense</i>	s20	糸満市 (4)	南部	アーウィン	LC778044	LC778054	LC778064	LC778074	LC778084	LC778094
<i>C. pedunculii</i>	n35	宜野座村 (4)	北部	アーウィン	LC778043	LC778053	LC778063	LC778073	LC778083	LC778093
	c03	沖縄市 (1)	中部	アーウィン	LC778035	LC778045	LC778055	LC778065	LC778075	LC778085
<i>Colletotrichum</i> sp.	n33	宜野座村 (3)	北部	アーウィン	LC778041	LC778051	LC778061	LC778071	LC778081	LC778091
	n34	宜野座村 (3)	北部	アーウィン	LC778042	LC778052	LC778062	LC778072	LC778082	LC778092
	c04	沖縄市 (1)	中部	アーウィン	LC778036	LC778046	LC778056	LC778066	LC778076	LC778086

第12表 本研究における使用プライマー, PCR条件および参考文献

遺伝子	プライマー名	シーケンス配列	PCR条件	参考文献
<i>ACT</i>	ACT-512F	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	5 min at 94°C, 40 cycle of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C, 30 s at 72°C, and 7 min at 72°C	Carbone and Kohn., 1999
	ACT-783R	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT		Carbone and Kohn., 1999
<i>ApMat</i>	AM-F	TCA TTC TAC GTA TGT GCC CG	3 min at 94°C, 30 cycle of 45 s at 94°C, 45 s at 54°C, 1 min at 72°C, and 7 min at 72°C	Silva et al., 2012
	AM-R	CCA GAA ATA CAC CGA ACT TGC		Silva et al., 2012
<i>CHS-1</i>	CHS-79F	TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG	5 min at 94°C, 40 cycle of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C, 30 s at 72°C, and 7 min at 72°C	Carbone and Kohn., 1999
	CHS-345R	TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG		Carbone and Kohn., 1999
<i>GAPDH</i>	GDF1	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA	5 min at 94°C, 40 cycle of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C, 30 s at 72°C, and 7 min at 72°C	Guerber et al., 2003
	GDR1	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT		Guerber et al., 2003
<i>HIS3</i>	CYLH3F	AGG TCC ACT GGT GGC AAG	5 min at 94°C, 40 cycle of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C, 30 s at 72°C, and 7 min at 72°C	Crous et al., 2004
	CYLH3R	AGC TGG ATG TCC TTG GAC TG		Crous et al., 2004
ITS	ITS-1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	4 min at 95°C, 35 cycle of 30 s at 95°C, 30 s at 52°C, 45 s 72°C, and 7 min at 72°C	Gardes and Bruns., 1993
	ITS-4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		White et al., 1990
<i>TUB2</i>	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	5 min at 94°C, 40 cycle of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C, 30 s at 72°C, and 7 min at 72°C	O'Donnell and Cigelnik., 1997
	Bt-2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC		Glass and Donaldson., 1995

Rojas, S. A. Rehner & Samuels) および n01 (*Colletotrichum* sp. Clade Q) の9種 (8種・1未知種) を使用した。また, *C. acutatum* 種複合体の代表菌株として n13 (*Colletotrichum fioriniae* (Marcelino & Gouli Pennycook), s20 (*Colletotrichum miaoliense* sp. nov. P. C. Chung & H. Y. Wu), c03 (*Colletotrichum pedunculii* C. L. Wang & W. L. Lin, sp. nov.) および n33 (*Colletotrichum* sp.) の4種 (3種・1未知種) を使用した。佐藤 (2022) の手法に従い, 光学顕微鏡下 (NIKON ECLIPSE Ni) において供試菌株の分生子の形状および大きさ (PDA 培地上), 付着器の形状および大きさ (SNA 培地上), 培養特性として 25°C 暗黒下で PDA 培地にて 5 日間培養した菌叢の形態観察と直径を計測した。なお, 分生子および付着器の大きさについては, 30 個の長・短径を測定した。また, 生育温度範囲を調べるために, 供試菌株を PDA 平板培地 (Difco) 上で 25°C 暗黒下で 7 日間培養した後, 菌叢の周縁部をコルクボーラー (直径 5 mm) で打ち抜いた菌叢片を PDA 平板培地の中央に置床し, 暗黒下, 5~40 °C (5 °C 間隔) の 8 段階の温度範囲で 5 日間培養し, その菌叢直径を調査した。なお, 試験は 1 温度区あたりシャーレ 1 枚につき 1 菌叢を供試し, 3 反復で行った。

### 1. 3 病原性試験

上記の *C. gloeosporioides* 種複合体 9 種および *C. acutatum* 種複合体 4 種の代表菌株を供試した。供試菌株を PDA 平板培地で 25 °C 暗黒下にて 5 日間培養して得られた菌叢を直径 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。量販店で購入した‘アーウィン’成熟果実（果皮は鮮紅色を呈し、光沢が出ていない状態）の果皮表面を 70%エタノール浸漬（1 分間）により殺菌し、ピーカー内の蒸留水で数十秒間洗浄後に滅菌した柄付き針で 1 mm 程度の傷を数カ所付傷し、その上に供試菌株の含菌寒天片を菌叢面が傷に接するように貼り付けた。接種果実は、ただちにプラスチック製密閉容器（48 cm × 31 cm × 29 cm）内で保湿し 27 °C の暗室内に静置し、接種 7 日後に出現する黒色病斑の直径を計測した。なお、無菌の PDA 寒天片を貼り付けたものを対照区とした。また、接種により生じたすべての黒色病斑部位から、定法（佐藤，2022）に従い接種菌の再分離を行った。1 菌株あたり 10~11 果に接種を行った。

### 1. 4 薬剤感受性試験（MIC 値調査）

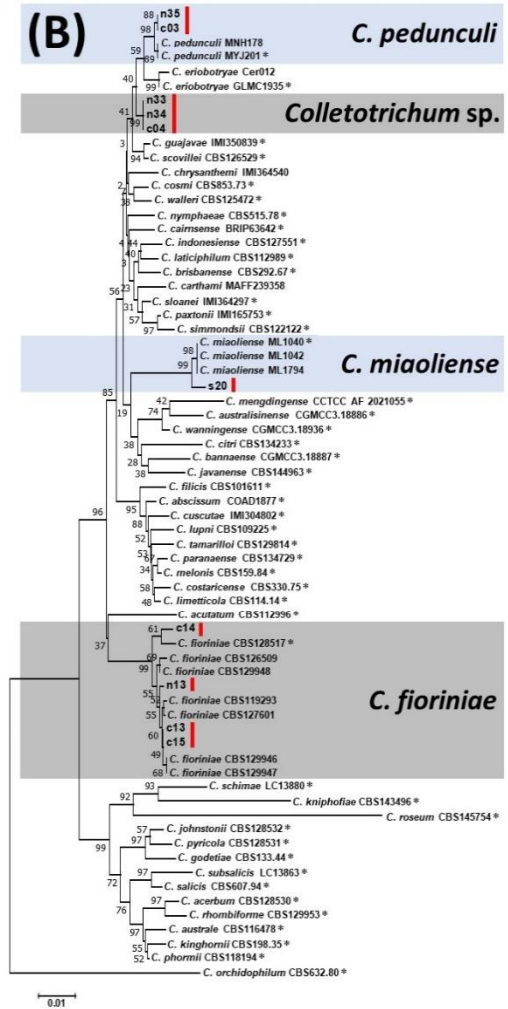
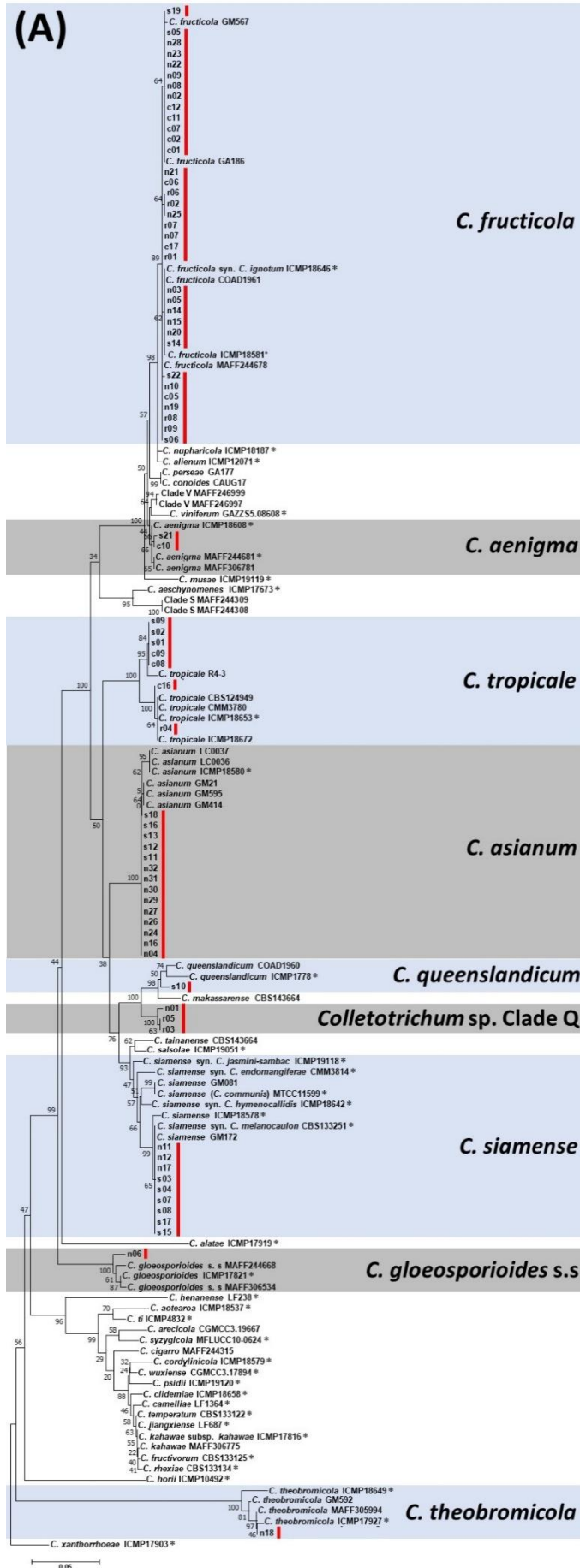
病原性試験と同じ 13 菌株を供試した。供試殺菌剤として国内でマンゴー炭疽病に登録のあるアゾキシストロビン水和剤（シンジェンタジャパン，商品名：アミスター10 フロアブル），イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤（日本曹達，商品名：ベルコート水和剤），キャプタン水和剤（アリストライフサイエンス，商品名：オーソサイド水和剤 80），クレソキシムメチル水和剤（日産化学，商品名：ストロビードライフロアブル），マンゼブ水和剤（日産化学，商品名：ジマンダイセン水和剤）およびフルジオキシニル水和剤（シンジェンタジャパン，商品名：セイビアーフロアブル 20）の 6 剤を使用した。各殺菌剤の最終濃度が所定濃度（0, 0.1, 0.39, 1.56, 6.25, 25, 100, 400, 1,600 ppm ; 4 倍希釈 9 段階）になるように調製して添加した PDA 平板培地に、あらかじめ PDA 平板培地で 25 °C の暗黒下にて 3~5 日間前培養し、菌叢周辺部を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いて得られた含菌寒天片を菌叢面が培地中央に接するように置床した。その後、25 °C 暗黒下で 4 日間培養し生育した菌叢の直径を測定し、MIC 値（最小生育阻止濃度）を調査した。なお、ストロビルリン系薬剤（QoI 剤）であるアゾキシストロビンおよびクレソキシムメチル水和剤については、稲田ら（2010）の方法に従ってシアン耐性呼吸阻害剤の salicylhydroxamic acid（SHAM, MP Biomedicals）を最終濃度 1,000 ppm になるように各培地に添加して評価を行った。試験は 1 菌株につきシャーレ 1 枚に 1 移植片を供試し、3 反復で行った。

## 2. 結果

### 2. 1 沖縄産マンゴー炭疽病菌種複合体の種構成および形態的特性

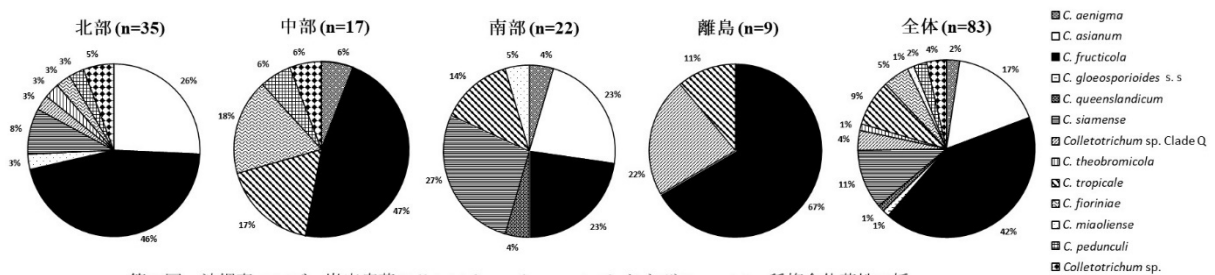
供試 83 菌株の *ApMat* 領域あるいは ITS, *GAPDH*, *ACT*, *CHS-1*, *HIS3* および *TUB2* の登録配列アクセションは第 10, 11 表に示した. *C.gloeosporioides* 種複合体 73 菌株の *ApMat* 領域の配列は, 既報の *C.aenigma* の同領域塩基配列と 99% (KM360143 等; Liu *et al.*, 2015), *C.asianum* の同領域塩基配列と 99% (JQ894573 等; Sharma *et al.*, 2013), *C.fruticola* の同領域塩基配列と 100% (KX620181 等; Sharma *et al.*, 2017), *C.gloeosporioides* s.s の同領域塩基配列と 98% (JQ807843 等; Sharma *et al.*, 2013), *C.queenslandicum* の同領域塩基配列と 98% (KC888928 等; Sharma *et al.*, 2013), *C.siamense* の同領域塩基配列と 100% (JQ894562 等; Sharma *et al.*, 2013), *C.theobromicola* の同領域塩基配列と 99% (LC217788 等; Yokosawa *et al.*, 2017) および *C.tropicale* の同領域塩基配列と 99% (LC361462 等; 澤岬ら, 2018b) の同一性がそれぞれ認められた. また, *Colletotrichum* sp. Clade Q では高い同一性を示す既知種は見当たらなかった. 供試 73 菌株とそれらに近縁と考えられた *C.gloeosporioides* 種複合体 40 種 143 菌株およびアウトグループ 1 種 1 菌株の合計 41 種 144 菌株の塩基配列データ (2023 年 12 月時点, *ApMat* 領域の塩基配列で DDBJ/EMBL/GenBank DNA データベースに登録されている種数) を用いた分子系統解析の結果, 高いブートストラップ値で単系統群を形成した *C.aenigma*, *C.asianum*, *C.fruticola*, *C.gloeosporioides* s.s, *C.queenslandicum*, *C.siamense*, *C.theobromicola*, *C.tropicale* および *Colletotrichum* sp. Clade Q の 9 種 (8 種・1 未知種) それぞれの所属するクレードに類別され, *Colletotrichum* sp. Clade Q は既知種に属さなかった (第 19 図 A) .

同様に, *C.acutatum* 種複合体 10 菌株の ITS, *GAPDH*, *ACT*, *CHS-1*, *HIS3* および *TUB2* の配列は, 既報の *C.florinae* の同 6 領域塩基配列と 99~100% (ITS : MH865005 等, *GAPDH* : JQ948622 等, *ACT* : JQ949613 等, *CHS-1* : JQ948953 等, *HIS3* : JQ949283 等, *TUB2* : JQ949943 等; Damm *et al.*, 2012, Vu *et al.*, 2019), 既報の *C.miaoliense* の同 5 領域塩基配列と 99~100% (ITS : NR\_171190 等, *GAPDH* : MK908470 等, *ACT* : MK908573 等, *CHS-1* : MK908522 等, *HIS3* : データ登録なし, *TUB2* : MK908624 等; Chung *et al.*, 2020), 既報の *C.pedunculii* の同 6 領域塩基配列と 99~100% (ITS : MN809388 等, *GAPDH* : MN820684 等, *ACT* : MN820668 等, *CHS-1* : MN820676 等, *HIS3* : MN820692 等, *TUB2* : MN810342 等; Lin *et al.*, 2023) の同一性がそれぞれ認められた. また, *Colletotrichum* sp. では 6 領域全てにおいて高い同一性を示す既知種は見当たらなかった. 供試 10 菌株とそれらに近縁と考えられた



第19図 沖縄産マンゴー炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (A) および *C. acutatum* (B) 種複合体菌株の *ApMat* (A) と ITS, *GAPDH*, *ACT*, *CHS-1*, *HIS3*, *TUB2* (B) 領域の塩基配列を連結した近隣接合法 (NJ) に基づく分子系統樹。枝上の数値はブートストラップ検定 (1000反復) によって得られた支持率を示す。アスタリスクはタイプ標本株を示す。縦の太線は沖縄産分離菌株を示す。

*C. acutatum* 種複合体 48 種 67 菌株およびアウトグループ 1 種 1 菌株の合計 49 種 68 菌株のデータを用いた分子系統解析の結果、高いブートストラップ値で単系統群を形成した *C. fioriniae*, *C. miaoliense*, *C. pedunculi* および *Colletotrichum* sp. の 4 種それぞれのクレードに類別され、*Colletotrichum* sp. は既知種のクレードに属さなかった (第 19 図 B)。供試菌株の構成種の割合は、沖縄地域全体では *C. fructicola* が 42.2% で最も優占率が高く、次いで *C. asianum* が 16.9%, *C. siamense* が 10.8% であった (第 20 図)。また、南部を除く北部、中部および離島 (石垣島と宮古島) においても、*C. fructicola* が最優占種であった (第 20 図)。



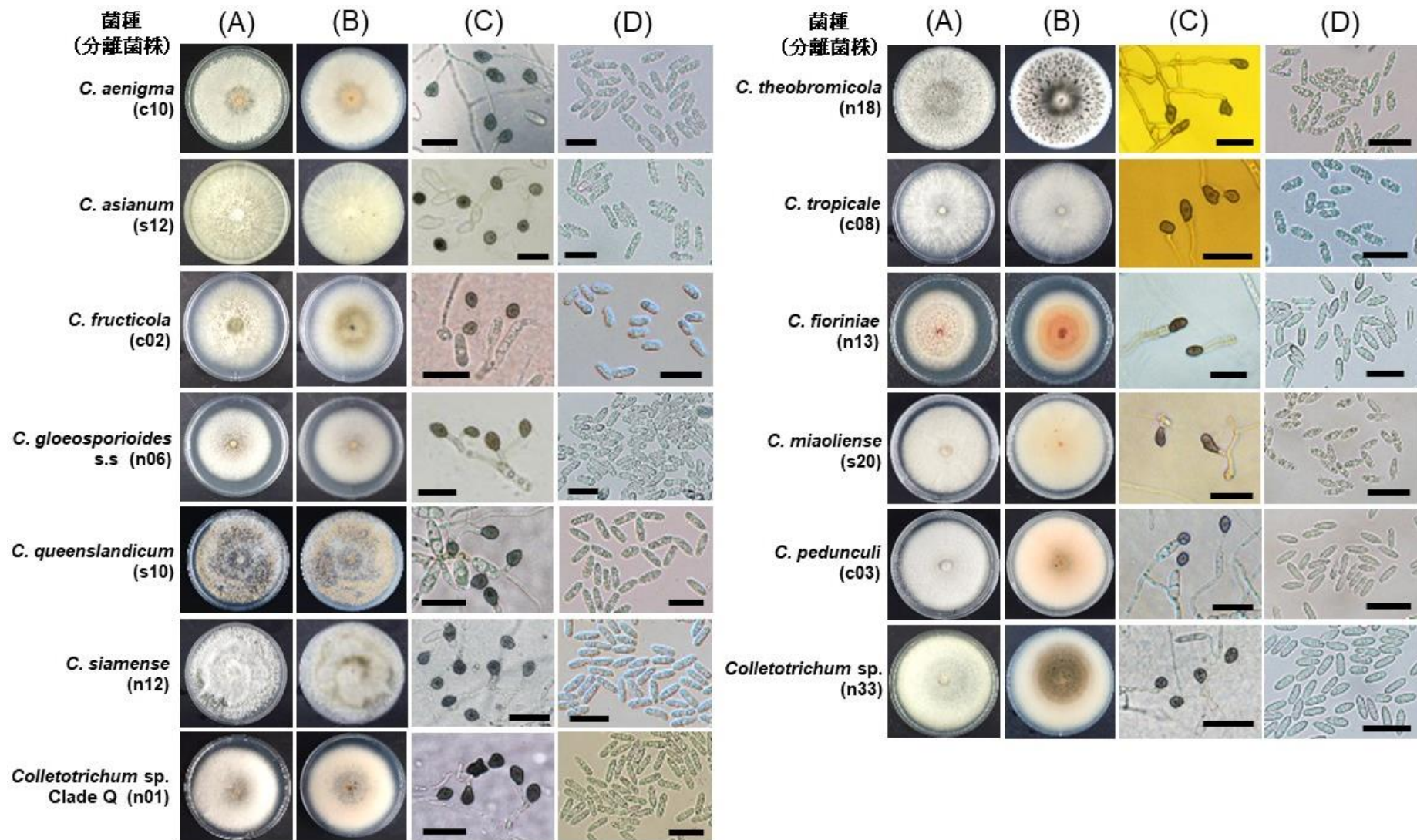
第20図 沖縄産マンゴー炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* 種複合体菌株の採集地域における分離割合。円内は各菌株の分離頻度、n は各採集地域の総分離菌株数を示す。

*C. gloeosporioides* 種複合体 9 種の各菌株 (菌種) の PDA 平板培地上の菌叢は、初め白色から 5~7 日後に灰白色で綿毛状またはフェルト状を呈し、分生子の L/W 比は 2.8~3.9, 付着器の L/W 比は 1.2~1.6, 菌叢の直径は 5.3~7.5 cm の範囲となり、共通して分生子は円筒形、付着器は球形~卵形または棍棒形であった。なお、菌株 n18 (*C. theobromnicola*) の PDA 平板培地による培養菌叢裏面はまだら状に黒褐色となる特徴を示した。また、培養 5 日後の菌叢の直径では、c02 (*C. fructicola*) は他の菌株が 5.8~6.6 cm であったのに対し、5.3 cm と最も小さくなった。しかし、c02 (*C. fructicola*) および n18 (*C. theobromnicola*) 以外の菌株は形態的特徴による差異は認められず、種の識別は困難であった (第 13 表, 第 21 図)。

第13表 沖縄産マンゴー炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* 種複合体菌株の形態的特徴

種複合体	菌種	分離菌株	分生子		付着器		菌叢直径 (cm) / 5日
			大きさ (μm)	L/W比	大きさ (μm)	L/W比	
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. fructicola</i>	c02	12.4-17.7×3.1-5.5	3.4 <sup>a</sup>	5.7-8.8×4.7-6.6	1.3 <sup>a</sup>	5.3 <sup>a</sup>
	<i>C. asianum</i>	s12	15.7-23.8×4.0-6.6	3.9 <sup>b</sup>	6.1-8.2×5.2-7.7	1.2 <sup>b</sup>	5.8 <sup>b</sup>
	<i>C. siamense</i>	n12	11.0-17.0×3.5-5.0	3.3 <sup>a</sup>	6.5-10.0×5.0-8.0	1.3 <sup>a</sup>	7.5 <sup>c</sup>
	<i>C. tropicale</i>	c08	12.7-19.7×3.7-6.7	3.2 <sup>ac</sup>	6.7-10.3×5.2-7.2	1.4 <sup>a</sup>	7.4 <sup>c</sup>
	<i>C. aenigma</i>	c10	15.2-17.9×4.9-6.8	2.8 <sup>cd</sup>	6.9-10.6×5.3-7.8	1.4 <sup>a</sup>	6.0 <sup>b</sup>
	<i>C. gloeosporioides</i> s.s	n06	12.8-18.0×4.0-7.4	2.9 <sup>cc</sup>	5.3-11.3×4.9-7.1	1.4 <sup>a</sup>	6.5 <sup>d</sup>
	<i>C. theobromnicola</i>	n18	15.6-21.6×4.5-6.0	3.4 <sup>a</sup>	7.9-12.7×5.3-7.0	1.6 <sup>c</sup>	6.0 <sup>b</sup>
	<i>C. queenslandicum</i>	s10	14.2-18.3×4.9-6.6	3.0 <sup>adc</sup>	7.1-10.9×5.8-7.6	1.3 <sup>a</sup>	6.6 <sup>d</sup>
	<i>Colletotrichum</i> sp. Clade Q	n01	16.5-21.1×5.2-7.0	3.0 <sup>adc</sup>	7.1-11.3×5.8-8.2	1.3 <sup>a</sup>	7.4 <sup>c</sup>
<i>C. acutatum</i>	<i>C. fioriniae</i>	n13	11.1-17.0×3.3-6.2	3.0 <sup>a</sup>	6.4-8.5×4.1-5.8	1.5 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>
	<i>C. miaoliense</i>	s20	8.6-15.5×2.5-5.6	3.0 <sup>a</sup>	4.8-7.4×3.7-6.3	1.2 <sup>b</sup>	5.3 <sup>b</sup>
	<i>C. pedunculi</i>	c03	9.3-15.2×2.8-6.0	3.1 <sup>a</sup>	4.2-8.3×3.1-6.6	1.1 <sup>b</sup>	5.2 <sup>b</sup>
	<i>Colletotrichum</i> sp.	n33	9.2-14.7×3.0-6.3	3.1 <sup>a</sup>	5.0-7.5×4.6-6.9	1.1 <sup>b</sup>	5.2 <sup>b</sup>

a) 異なるアルファベットは菌種間における Tukey-Kramer HSD test による有意差 ( $p < 0.05$ ) を示す。



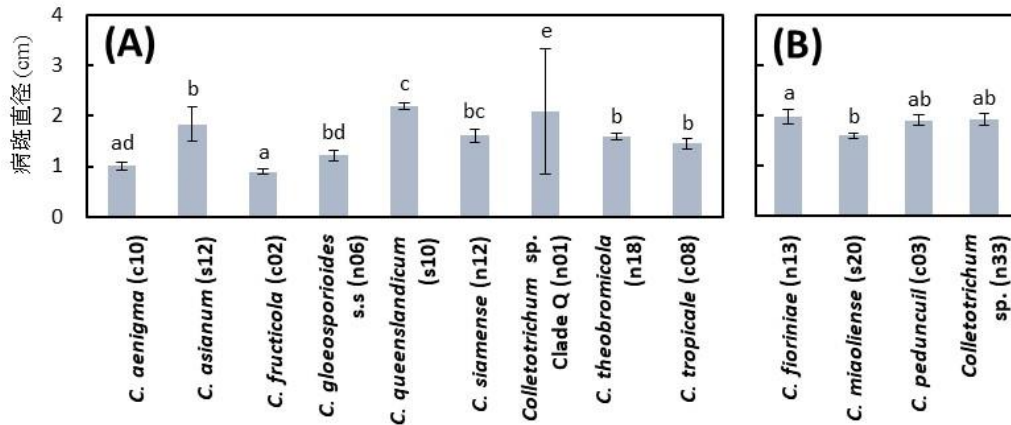
第21図 沖縄産マンゴー炭疽病菌*Colletotrichum gloeosporioides*および*C. acutatum*種複合体菌株の形態および培養特性。  
 (A) PDA培地表面の菌叢 (25°C7日目) ; (B) PDA培地裏面の菌叢 (25°C7日目) ; (C) 付着器 ; (D) 分生子. Scale bar = 25μm.

*C. acutatum* 種複合体 4 種の各菌株の PDA 平板培地上の菌叢は、主に白色から灰白色で綿毛状を呈し、分生子の L/W 比は 3.0~3.1, 付着器の L/W 比は 1.1~1.5, 菌叢の直径は 4.5~5.3 cm の範囲となった。n13 (*C. fioriniae*) は分生子の形状は紡錘形から円筒形, 付着器は楕円形から棍棒形で他菌株と比べて付着器は最も大きく, 菌叢の直径値は最も小さくなり, PDA 平板培地裏面が赤みを帯びる特徴を示すことから, 形態的特徴による他菌株との識別が可能であった。その他 3 種の菌株については, 共通して分生子の形状は紡錘形から円筒形, 付着器は球形から卵形または棍棒形で菌叢の直径が 5.2~5.3 cm となり形態的特徴による差異は認められず, 種の識別は困難であった (第 13 表, 第 21 図)。生育温度範囲については, *C. gloeosporioides* 種複合体 9 種の各菌株では c10 (*C. aenigma*), s12 (*C. asianum*), n06 (*C. gloeosporioides* s.s), n12 (*C. siamense*) および c08 (*C. tropicale*) は 10~35 °C, c02 (*C. fructicola*), s10 (*C. queenslandicum*), n18 (*C. theobromicola*) および n01 (*Colletotrichum* sp. Clade Q) は 15~35 °C で生育し, 生育適温は s10 (*C. queenslandicum*) と n18 (*C. theobromicola*) で 30 °C 付近, その他 7 種の菌株は 25 °C 付近であった (データ省略)。 *C. acutatum* 種複合体 4 種の各菌株の生育温度範囲については, n13 (*C. fioriniae*), c03 (*C. pedunculii*) および n33 (*Colletotrichum* sp.) は 10~30 °C, s20 (*C. miaoliens*) は 15~30 °C で生育し, いずれの菌種の菌株も生育適温は 25 °C であった (データ省略)。

## 2. 2. 沖縄産マンゴー炭疽病菌種複合体の病原性および薬剤感受性

*C. gloeosporioides* 種複合体 9 種では菌株 (菌種) 間で ‘アーウィン’ 果実への病原性に差があり, 菌株 n01 (*Colletotrichum* sp. Clade Q) および s10 (*C. queenslandicum*) は他種と比べて黒色の病斑直径が平均 2 cm 以上と有意に大きい値を示した。一方, 構成種の中で最優占種の c02 (*C. fructicola*) または c10 (*C. aenigma*) は, 他種と比べて病斑直径は平均 1 cm 以下と有意に小さい傾向を示した (第 22 図 A)。 *C. acutatum* 種複合体 4 種では, 全ての菌種の菌株が平均直径 1.6~1.9 cm の病斑を形成し, 概ね同等の病原性であった (第 22 図 B)。なお, 形成された黒色の病斑部位からは, いずれも接種菌株と同様の菌株が再分離され, 無菌の PDA 寒天片を貼り付けた対照区では病斑形成は認められなかった。

供試菌株の薬剤感受性試験では, *C. gloeosporioides* 種複合体 9 種の各菌株に対してアズキシストロビンおよびクレソキシムメチル水和剤は他剤と比較して MIC 値が 0.39 ppm 以下で低く, 9 菌株の同 2 剤に対する感受性が共通して高い傾向が認められた。また, キャプタン水和剤およびマンゼ



第22図 沖縄産マンゴー炭疽病菌*Colletotrichum gloeosporioides* (A) および*C. acutatum* (B) 種複合体菌株の病斑直径 (cm)。アーウィン果皮に菌叢片を有傷接種し、7日後の平均の病斑直径を示す。括弧内は分離菌株、バーは標準偏差を示す。異なるアルファベットはSteel-Dwass法の多重比較検定による有意差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

第14表 沖縄産マンゴー炭疽病菌*Colletotrichum gloeosporioides*および*C. acutatum*種複合体菌株に対する6種登録薬剤の最小生育阻止濃度 (MIC値) の比較

薬剤	MIC (ppm)												
	<i>C. gloeosporioides</i> 種複合体									<i>C. acutatum</i> 種複合体			
	<i>C. ae</i> <sup>a)</sup>	<i>C. as</i>	<i>C. fr</i>	<i>C. gl</i>	<i>C. qu</i>	<i>C. si</i>	CladeQ	<i>C. th</i>	<i>C. tr</i>	<i>C. fi</i>	<i>C. mi</i>	<i>C. pe</i>	<i>C. sp.</i>
アゾキシストロビンフロアブル	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
クレソキシムメチルドライフロアブル	<0.1	0.1	0.39	0.39	<0.1	<0.1	0.39	<0.1	0.39	<0.1	<0.1	<0.1	0.39
イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤	400	6.25	1.56	1.56	6.25	6.25	1.56	1.56	6.25	6.25	1600<	1600<	1600<
フルジオキシニル水和剤	1600	1600	1600<	1600<	1600<	1600<	1600<	1600<	1600<	1600<	6.25	<0.1	1600<
キャプタン水和剤	400	1600<	1600	25	25	400	1600<	400	1600	25	1600<	400	100
マンゼブ水和剤	25	1600	400	400	400	25	1600<	1600	100	400	1600<	400	100

a) *C. ae*: *C. aenigma* (分離菌株: c10), *C. as*: *C. asianum* (s12), *C. fr*: *C. fructicola* (c02), *C. gl*: *C. gloeosporioides* s.s (n06), *C. qu*: *C. queenslandicum* (s10), *C. si*: *C. siamense* (n12), CladeQ: *Colletotrichum* sp. Clade Q (n01), *C. th*: *C. theobromicola* (n18), *C. tr*: *C. tropicale* (c08), *C. fi*: *C. fioriniae* (n13), *C. mi*: *C. miaoliense* (s20), *C. pe*: *C. pedunculii* (c03), *C. sp.*: *Colletotrichum* sp. (n33).

ブ水和剤では菌株によってMIC値にそれぞれ差異が認められ、例えばマンゼブ水和剤では菌株c10 (*C. aenigma*) や n12 (*C. siamense*) のようにMIC値が25 ppmと感受性が高い種もあれば、n01 (*Colletotrichum* sp. Clade Q) のようにMIC値が1,600 ppm以上と感受性が低い菌株もあることが確認された。一方、同9菌株はフルジオキシニル水和剤に対してMIC値が1,600 ppmかそれ以上の濃度となり感受性が低い傾向が認められた (第14表)。 *C. acutatum* 種複合体4種の各菌株はいずれもアゾキシストロビンおよびクレソキシムメチル水和剤に対するMIC値が0.39 ppm以下と最も低く、高い薬剤感受性が認められた。一方、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤に対してはn13 (*C. fioriniae*) を除くその他3種の菌株でMIC値が1,600 ppm以上と高く、感受性は低い傾向であった。また、キャプタン水和剤、マンゼブ水和剤およびフルジオキシニル水和剤の3剤に対しては菌株間でMIC値の差異が認められ、例えばフルジオキシニル水和剤に対してはc03 (*C. pedunculii*) のMIC

値が 0.1 ppm 以下と感受性が高かったのに対し, n13 (*C. fioriniae*) は MIC 値が 1,600 ppm 以上と感受性が低く, 菌株間に薬剤感受性の差が確認された (第 14 表).

### 3. 考察

本研究では, 沖縄産マンゴー果実に炭疽病を引き起こす *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体 83 菌株について, その種構成と菌種の形態的特徴, 病原性および薬剤感受性について調査を行った. その結果, 単一または複数領域の塩基配列を用いた分子系統解析と菌の形態的特徴から *C. gloeosporioides* 種複合体は 9 種 (8 種・1 未知種), *C. acutatum* 種複合体は 4 種 (3 種・1 未知種) に同定され, 計 13 種で構成されていることが明らかになった (第 19 図 A,B). そのうち, *C. acutatum* 種複合体に属する *C. fioriniae* および *C. miaoliense* はイチゴ, トルコギキョウおよびリンゴ等の炭疽病の病原として既に確認されているが (Chung *et al.*, 2020 ; 日本植物病理学会編, 2023) , マンゴーの病原としては国内外で未報告である. また, *C. pedunculii* はマンゴーの病原として既に台湾から報告されているが (Lin *et al.*, 2023) , 我が国のマンゴーでは初確認となる. 両種複合体に属する *Colletotrichum* sp. Clade Q および *Colletotrichum* sp. は, 解析した全ての遺伝子・DNA 領域において高い同一性を示す既知種はなく, 新種の可能性がある. *ApMat* 領域は従来の複数領域と比べて高い精度で遺伝子変異を識別できる優れた領域として多くの *C. gloeosporioides* 種複合体の遺伝子解析で使用されており (Silva *et al.*, 2012 ; Sharma *et al.*, 2013 ; Yokosawa *et al.*, 2017 ; Tovar-Pedraza *et al.*, 2020 ; Yokosawa *et al.*, 2020), マンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 種複合体においても構成種を明確に識別できることが明らかになっている (Liu *et al.*, 2015). 海外におけるマンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 種複合体の構成種では, メキシコおよびインドで 5 種, ブラジルでは 7 種が明らかになっているが (Sharma *et al.*, 2013 ; Vieira *et al.*, 2014 ; Tovar-Pedraza *et al.*, 2020), いずれも本研究で明らかになった 9 種より構成種数が少ない. 沖縄県が位置する亜熱帯は熱帯と温帯の中間域であり, 本県北部における常緑樹葉に生息するクロサイワイタケ科内生菌に関する多様性評価の報告 (池田ら, 2011) にもあるように, 気温などの物理的環境が熱帯より変化に富み, 南北の植物種が混在する多様な生物的環境のため, 菌種も多様に存在することが推察された. メキシコでは構成種の *C. asianum* および *C. siamense*, インドでは *C. fructicola*, *C. asianum* および *C. siamense* が上位の優占種となっており, 本県における優占種と概ね一致していることから, これらの菌種がマンゴーの主要な病原菌であると考えられた (第 20 図). 一方, *C. acutatum* 種複合体のマンゴー炭疽病菌に関する報告は, *C.*

*gloeosporioides* 種複合体の報告数よりも少なく、これまで台湾での調査結果のみとなっている (Wu *et al.*, 2020 ; Lin *et al.*, 2023). Wu ら (2020) の報告では、台湾で分離された 10 菌株のうち、2 菌株が *C. acutatum* 種複合体に属する *C. scovillei* と同定されたが、本県の構成種とは一致するものはなかった。しかし、Lin ら (2023) の報告では台湾分離 6 菌株のうち、5 菌株が *C. pedunculii* と同定され、本県の構成種にも含まれていた。国内ではトウガラシ・ピーマン炭疽病の病原として *C. scovillei* が報告されており (Kanto *et al.*, 2014), 本種は今回のマンゴー炭疽病の構成種に含まれてはいないが、本県南部地区においてもピーマン生産地があることから、マンゴーにも本種が炭疽病を引き起こしている可能性が推察される。今後もマンゴー罹病果のサンプル数を増やして継続して調査を行う必要がある。また、澤岬ら (2012) は、沖縄県のマンゴー罹病果実より採集した炭疽病菌 150 株のうち、89%が *C. gloeosporioides* 種複合体、11%が *C. acutatum* 種複合体であることを報告しており、*C. acutatum* 種複合体のほうが *C. gloeosporioides* 種複合体よりも分離頻度が低いことが明らかになっている。フロリダおよびプエルトリコにおけるマンゴー炭疽病菌の種別分離頻度の調査でも *C. acutatum* 種複合体のほうが低いことから (Lydia *et al.*, 2006), 一般的に *C. acutatum* 種複合体よりも *C. gloeosporioides* 種複合体の方がマンゴー炭疽病菌として重要度が高いと考えられる。本県ではこれまでに木本植物から *C. acutatum* 種複合体に属する *C. sloanei* が分離された報告はあるが (Sato and Moriwaki, 2013), マンゴー以外のパッションフルーツ、バナナ、パパイヤおよびピタヤ等の多くの熱帯果樹類では未だ *C. acutatum* 種複合体による炭疽病の報告はないことから (日本植物病理学会編, 2023), 本県では、そもそも自然界において本種複合体の存在自体が少ないのかもしれない。このことから、*C. acutatum* 種複合体については、今後もマンゴー罹病果のサンプル数を増やししながら、他種の存在についても継続して調査を行う必要がある。

*C. gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体の計 13 種 (11 既知種・2 未知種) に同定された供試菌株の形態的特徴のうち、菌株 n18 (*C. theobromnicola*) の PDA による培養菌叢裏面がまだら状に黒褐色となる特徴を示すこと、n13 (*C. fioriniae*) は分生子が主に紡錘形を示し、種複合体内の他種と比べて付着器が大きく、PDA による培養菌叢裏面が赤みを帯びることから、これらの種は普及員や営農指導員が顕微鏡観察や病原菌の分離培養を行うことにより、概ね他種との識別が可能と考えられる。しかし、その他の菌種では分生子および付着器の大きさ、PDA 平板培地上の菌叢形態等に明瞭な差異はみられず、生産現場での形態的特徴による菌種の識別は困難であると判断した (第 13 表, 第 21 図)。そのため、現状では本病の診断における正確な菌種の識別には、遺伝子検定が

必要になると考えられる。Gan ら (2017) は、千葉県におけるイチゴ炭疽病の主要種である *C. fructicola*, *C. aenigma* および *C. siamense* について PCR が可能な遺伝子マーカーを開発していることから、生産現場における簡易診断法として有効と考えられる。今後、本マーカーが本県のマンゴー炭疽病菌の PCR 診断でも適用可能かどうか、検証を進める必要がある。

*C. gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体の計 13 種菌株の‘アーウィン’果実への病原性の比較では、*C. gloeosporioides* 種複合体 9 種間で病原性の強弱に差異が認められ、菌株 n01 (*Colletotrichum* sp. Clade Q) および s10 (*C. queenslandicum*) は平均直径 2 cm 以上の病斑を形成し、他種と比べて病原性が強い傾向を示した。一方、全病原菌の最優占種である c02 (*C. fructicola*) は平均直径 1 cm 以下の病斑を形成し、他種の菌株と比べて病原性は弱かった (第 22 図 A)。メキシコからの報告によれば、マンゴー品種‘Manila’の果実に対する *C. gloeosporioides* 種複合体 4 種のうち、*C. asianum* および *C. siamense* は直径 1.6 cm 以上の病斑を形成し比較的病原性が強く、*C. fructicola* は直径 0.9 cm 以下の病斑を形成し病原性は最も弱かった (Tovar-Pedraza *et al.*, 2020)。また、インドでも同様に、マンゴー果実 (品種不明) に対する *C. gloeosporioides* 種複合体 4 種間の病原性の比較においても、*C. asianum* および *C. siamense* による病斑が比較的大きく、*C. fructicola* による病斑が最も小さく病原性は弱い傾向を示した (Sharma *et al.*, 2013)。これらの結果から、沖縄県における最優占種の *C. fructicola* は、マンゴーにとって世界的に主要な炭疽病菌ではあるものの、品種の違いに関わらず他種と比べて病原性は弱いことが推察された。しかし、中国からのマンゴー品種‘Tainong’果実に対する病原性の報告 (Mo *et al.*, 2018) によれば、*C. fructicola* の複数菌株を用いた接種では、菌株により病斑直径が 0.5~1.3 cm の間で異なり、病原性に差異が認められた。本研究では代表菌株 (c02) のみによる接種の結果であることから、今後は分離された各菌種の菌株数を増やして、病原性を再検証する必要があると考えられた。一方、*C. acutatum* 種複合体 4 種の菌株全てが、平均直径 1.6~1.9 cm 程度の病斑を形成しほぼ同等の強い病原性が認められ、*C. gloeosporioides* 種複合体のような菌種間での大きな差異は認められなかった (第 22 図 B)。上述のように *C. acutatum* 種複合体は、本県におけるマンゴーの病原として分離頻度が低いことから重要度は低いと考えられるが、病原性は比較的強いことから、出荷後の本種複合体による果実腐敗の見目の被害程度は大きいことが推察された。また、台湾からマンゴー炭疽病菌として報告された *C. acutatum* 種複合体の *C. scovillei* および *C. pedunculii* では、品種‘アーウィン’果実に対して *C. scovillei* では直径 0.6~1.4 cm, *C. pedunculii* では直径 5 mm 程度の病斑を形成することが確認されており (Wu *et al.*, 2020 ; Lin *et al.*,

2023), 本県の *C. acutatum* 種複合体 4 種の方が両種よりも病原性は強い可能性が考えられた。

*C. gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体の計 13 種菌株に対する薬剤感受性試験では、アゾキシストロビンおよびクレソキシムメチル水和剤が他剤と比較して MIC 値が低く、全菌種が共通して高い薬剤感受性を示すことが明らかになった (第 14 表)。このことから、これらストロビルリン系薬剤 (QoI 剤) が本病の最も効果的な防除薬剤として有望と考えられた。Ishii ら (2022) は、国内のイチゴやクルミ等の野菜・果樹類から分離された *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体に属する 5 種炭疽病菌に対する複数殺菌剤の薬剤感受性を調査し、いずれの菌種もアゾキシストロビン剤に対して高い感受性を示すことを報告しており、本研究の結果とも概ね一致した。しかし、マンゴー炭疽病においては国内外で既に本剤に対する薬剤耐性菌が確認されており (澤岬ら, 2014 ; Kongtragoul *et al.*, 2020), 本県においては 2014 年に石垣島の園地から採集された炭疽病菌について MIC 値, 生物検定および PCR-RFLP によるチトクローム *b* 遺伝子変異により耐性菌の初発が確認されている (澤岬ら, 2014)。現在のところ, 生産現場における耐性菌の分布頻度は非常に低いものの, 今後の発生拡大を考慮して本剤の使用を年 1 回に制限した薬剤体系散布による防除暦が指導されている (澤岬ら, 2018a)。また, Schnabel ら (2021) は, 国内外のイチゴやリンゴ等から分離された *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体に属する 4 種炭疽病菌に対するフルジオキシニル水和剤の薬剤感受性を調査し, *C. siamense* や *C. fructicola* に対する本剤の MIC 値は 100 ppm 以上であり両種の感受性は低い傾向を示すが, *C. fioriniae* に対する MIC 値は 1 ppm 以下と低く, 同種は高い感受性を示した。一方, 本研究で供試した *C. fioriniae* の菌株 n13 は, 本剤に対する MIC 値が 1,600 ppm 以上であり同菌株の感受性は低く, 上記の報告とは一致しなかった (第 14 表)。本剤は比較的最近国内のマンゴーに対して農薬登録がなされ, 本県の防除暦の殺菌剤ローテーションには含まれておらず, 生産現場での使用頻度はまだ低いことから, 耐性菌発生の可能性は低いことが想定される。本剤に対する感受性が低い原因は明らかではないが, 元々温暖な亜熱帯地域では, 本菌が異なる地域の環境や宿主の違いに適応して, 薬剤感受性等も変化している可能性が示唆された (Zadoks, 1982)。しかし, 本研究では代表菌株のみを用いた薬剤感受性試験の結果であることから, 今後, 本菌を含めて各菌種の菌株数を増やして, 感受性について再検証する必要がある。また, 予防的殺菌剤として多くの作物で農薬登録されているキャプタンおよびマンゼブ水和剤では, 菌株 (菌種) によって薬剤感受性に差異があることが確認された。これらの剤は病原菌に対し, 複数の作用点に効果を示す多作用点接触活性による機作をもつことから (日本植物防疫協会編, 2013),

感受性の低い菌種については薬剤耐性菌の可能性は低いと考えられる。これまでに、イチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) において、QoI 剤耐性菌と同じチトクローム *b* 遺伝子変異を持つ菌が QoI 剤の農薬登録前に採集された事例があることから (石井, 2002), これらの菌種も元々薬剤に対して低い感受性を持つ病原菌として、一定の密度で本県の自然界に存在していた可能性が考えられた。

以上より、沖縄県におけるマンゴー炭疽病菌 *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体の 13 種とその諸特性が明らかになった。この結果に基づき、日本植物病名目録 (日本植物病理学会編, 2023) におけるマンゴー炭疽病の病原に *C. gloeosporioides* 種複合体の *C. theobromicola* および *C. acutatum* 種複合体の *C. miaoliense*, *C. pedunculii*, *Colletotrichum* sp. を追加したい。本県には多様な菌種のマンゴー炭疽病菌が存在し、これらの菌種の間には病原性や登録殺菌剤に対する感受性に差違があることが明らかになった。これらの知見は、本病の発生生態や防除対策の基礎として、普及員や営農指導員が生産者を指導する際に活用できるものと思われる。しかし、現在の防除対策で活用されている薬剤体系散布 (ver. 2; 澤岬ら, 2018a) による防除暦は、*Colletotrichum* 属の種複合体が提唱される以前の広義 *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* の 2 種の病原菌 (後に *C. siamense* および *C. fioriniae* と判明) のみに対する複数登録殺菌剤の薬剤感受性に基づいて作成されたものであり、本研究で明らかになった計 13 種全ての病原菌に対応した防除暦ではない。そのため、今後は本研究の結果に基づき、関係機関と連携して防除暦の見直しと改訂を進めて行く必要がある。

## VIII. 総合考察

本論文は、わが国における施設マンゴー栽培の発展とともに深刻な問題となっている炭疽病について、沖縄県における本病の発生生態の解明と効果的な防除技術の確立を目的に、2012年から2024年にかけて得られた研究成果を取りまとめたものである。マンゴー栽培は、1975年以降にビニール被覆による雨よけ栽培が導入されて以降、九州や沖縄地域で急速に拡大し、高い市場価値を持つ‘アーウィン’種を中心に発展してきた(米本, 2008)。しかし、東京市場での調査によると、2019~2021年度に出荷された沖縄県産マンゴーの炭疽病発生率は平均12.4~20.4%であり、依然として経済的損失やブランド評価の低下につながる深刻な課題となっている(沖縄県農林水産部流通・加工推進課編, 2022)。こうした現状を踏まえ、著者は、市場における炭疽病の発生実態の詳細な調査、病原菌の潜在感染と感染時期の特定、有効な薬剤を用いた体系的な防除技術の開発、病原性検定法の開発と抵抗性品種の探索、そして沖縄産マンゴー炭疽病菌の種複合体の解明という、多角的なアプローチによる研究を進めてきた。

大田市場における炭疽病の発生実態調査から、本県から出荷後の果実における炭疽病は、日数経過とともに発病果率と発病度が増加し、それは単に出荷環境の湿度や結露などの外部要因だけでなく、果実の熟度やその産地間の差異、そして各生産農家の圃場における病原菌の感染密度に大きく影響されることが推察された。例えば、包装形態の違いでは、プラスチック製パックの方が紙製の出荷箱よりも発病果率および発病度が高くなる傾向がみられる一方で、豊見城市を除いた沖縄本島南部地域の果実では、紙製の出荷箱の方で被害が大きい場合も認められている(第2図)。このことから、出荷果実の発病には、包装素材の違いによる湿度や結露などの環境要因以外に、産地間における果実の熟度進行の差異や各生産農家の圃場における病原菌の感染密度の差異も影響していることが示唆された。

マンゴーの施設内における炭疽病菌の感染時期と感染経路の特定を目的に、生育期間中の調査を実施した結果、頂芽や花芽、花序および幼果においても病原菌の潜在感染が確認された(第2表, 第6図)。これは、病原菌が開花、結実、果実肥大、収穫に至るまで植物体内で長期間潜伏し、収穫後の適切な条件下で追熟の進行に伴い発病することを示唆している。また、イチゴ炭疽病で実用化となっているエタノール浸漬法(Ishikawa, 2003)による簡易検定技術をマンゴーに適用することで、生産現場における本病の発病予察や無病苗の選抜に活用できる可能性が示された。さらに、病原菌

の感染時期について、マーカーとして *nit* 変異株を作出し圃場接種試験を行った結果、1月の出蕾期から感染が成立していることが明らかになり（第3表）、5月に病原菌の潜在化の割合が最も高まった。沖縄では5～6月は梅雨期にあたり、この時期に葉濡れ時間の増加とともに病原菌の付着形成率も増加することが確認されていることから（澤岬，2014）、感染に好適な温湿度が十分に保持されていたと推察される。これにより、出蕾前の12月から防除を開始し、収穫前（6月の袋かけ前）までの長期的な薬剤防除を継続することが重要であることが示唆された。

これらの知見を基に防除技術の開発について、炭疽病菌の分生子発芽および菌叢生育に対する有効殺菌剤の選抜結果から、本病の効果的な薬剤防除体系を構築した。すなわち、キャプタン水和剤、マンゼブ水和剤、アズキシストロビンフロアブル、クレソキシムメチルドライフロアブルを中心とした薬剤体系散布（ver.1）を提案した（第4表）。これにより、収穫後における発病果率を無散布区と比較して76～96%抑制できることが確認され、実用的な防除体系としての有用性が示された（第6表，第9図）。また、本病とマンゴー軸腐病との同時防除を目的とした薬剤体系散布（ver.2）を策定し（第7表）、これら両病害の病原菌の分生子発芽および菌叢生育に有効な5種の薬剤を組み合わせさせた体系散布により、両病害の発生を無散布区と比べて炭疽病では約67～92%、軸腐病では約56～95%まで抑制されることを明らかにした（第8表）。特に本県においては、2014年に石垣島の園地から採集された炭疽病菌についてQoI剤耐性菌の初発が確認されていることから（澤岬ら，2014）、今後の耐性菌発生の拡大を考慮して、本剤の使用を年1回に制限した異なる作用機作の薬剤を用いたローテーションによる体系散布（ver.2）実施の重要性が示された。

また、マンゴー炭疽病に対する病害抵抗性品種の選抜を目的に、未硬化葉を用いた簡易病原性検定法を開発し、マンゴー遺伝資源29品種の抵抗性評価を実施した。その結果、‘ゴールドエンナゲット’が本病に対し最も高い抵抗性を示す品種であることが判明し、今後の育種素材としての有望性が示された（第9表，第18図）。また、未硬化葉を用いた葉検定法による発病度と果実接種による発病度との間に正の相関関係が認められたことから、本検定法がマンゴー育種分野における抵抗性評価に有効であることが示された（第17図）。

さらに、分子系統解析および病原菌の形態観察の調査から、沖縄産マンゴー炭疽病菌の種分類について再同定を行い、*Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体が9種（8種・1未知種）、*C. acutatum* 種複合体が4種（3種・1未知種）の合計13種で構成されていることが明らかになり（第19図）、そのうち、*C. fructicola* が沖縄全域に分布し、最も主要な病原菌であることが示された。一方、一部

地域では低頻度ではあるが *C. acutatum* 種複合体に属する菌種が分布していることも確認された(第 20 図)。また、それら菌種によって果実への病原性の強弱に差異があることが示され、*C. gloeosporioides* 種複合体の 9 種間では *Colletotrichum* sp. Clade Q および *C. queenslandicum* は平均直径 2 cm 以上の病斑を形成し、他種と比べて病原性が強い傾向を示すとともに、*C. acutatum* 種複合体 4 種では、全ての菌種で平均直径 1.6~1.9 cm の病斑を形成し、概ね同等の病原性を示すことが明らかになった(第 22 図)。これら菌種に対する登録 6 殺菌剤の MIC 値を調べた結果、全菌種(菌株)でアゾキシストロビンとクレソキシムメチル水和剤に対して感受性が高いが、キャプタンやマンゼブ水和剤のように菌種間で感受性に差異を示す剤も確認された(第 14 表)。これにより、従来の広義の *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* に対する薬剤感受性に基づいて作成された現行の防除暦の見直しの必要性があることが示唆された。

これらの結果を踏まえ、沖縄県では 2019~2021 年にかけてマンゴー出荷モデル構築事業において、出荷果実の本病による被害と圃場防除との関係性を検証し、薬剤体系散布(ver.2)を実施した生産者の果実では、未実施の生産者の果実よりも発病果率が減少することが証明され(沖縄県農林水産部流通・加工推進課編, 2022)、その結果を基に JA おきなわ発行のマンゴー基本栽培マニュアルの中で本体系が防除暦として掲載された(沖縄県農業協同組合編, 2019)。現在、本県全地域のマンゴー生産現場において、本防除暦が広く普及している。

これらの多方面からのアプローチによる包括的な研究成果は、沖縄県のみならず九州地域におけるマンゴー炭疽病の防除対策の基礎情報として活用されており、今後のマンゴー栽培における防除対策の指針となるとともに、持続可能な防除体系の構築に大きく貢献するものと考えられる。また、他の熱帯果樹類の病害防除にも応用可能な技術開発の基盤として重要な意味を持つものと思われる。

今後の課題として、本県における QoI 剤耐性菌の発生実態調査のモニタリング、より効果的な代替殺菌剤の開発と登録、耕種的防除法との組み合わせによる総合防除体系の構築、炭疽病菌の種複合体の多様性を考慮した防除暦の見直し、そして抵抗性品種の育種に向けた研究などが挙げられる。本研究において、病原菌が頂芽、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、それ以前の 1 次伝染源ならびに伝搬方法については、いまだ不明である。その後の著者の継続研究において、マンゴー施設周辺の台風時の風除けのための暴風樹等の葉上に炭疽病菌が複数種潜在していることが確認され、それが 1 次伝染源になっている可能性が示唆されていることから(澤岨ら, 2022)、これらの施設周辺の植物のうち、どのような植物種が伝染源として機能しているのかという

情報を事前に得ることは、耕種的防除を含めた効果的な総合防除体系を構築するうえで非常に重要であり、継続して調査を実施する必要がある。また、本県では現在の防除対策で活用されている薬剤体系散布（ver. 2）による防除暦は、*Colletotrichum* 属の種複合体が提唱される以前の広義 *C. gloeosporioides* および *C. acutatum* の2種の病原菌のみに対する複数登録殺菌剤の薬剤感受性に基づいて作成されたものであることから、今後は関係機関と連携して、沖縄産マンゴー炭疽病菌の種構成に対応させた防除暦の見直しと最適化を進めて行く必要がある。

## IX. 引用文献

- 安次富厚・澤岬哲也・大城 篤・山城麻希・佐藤豊三 (2017). マンゴー炭疽病を引き起こす *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体の再同定. 日植病報 **83**: 81 (講要).
- Arauz, L. F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. Plant Dis. **84**: 600-611.
- 浅賀宏一 (1981). イネ品種のいもち病に対する圃場抵抗性の検定方法に関する研究. 農事試験場研究報告 35: 51-138.
- Bhagwat, R. G., Mehta, B. P., Patil, V. A. and Sharma, H. (2015). Screening of cultivars/varieties against mango anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Int J. Env. Agri. Res. **1**: 21-23.
- 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.
- Carbone, I. and Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia **91**: 553-556.
- Chung, P. C., Wu, H. Y., Wang, Y. W., Ariyawansa, H. A., Hu, H. P., Hung, T. H. and Chung, C. L. (2020). Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species, *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. Sci. Rep. **10**: 14664.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J. M., Simoneau, P. and Hywel-Jones, N. L. (2004). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. Stud. Mycol. **50**: 415-430.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C. and Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. Stud. Mycol. **73**: 37-113.

- Dickman, M. B. and Alvarez, A. M. (1983). Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Dis. **67**: 748-750.
- Dodd, J. C., Estrada, A. B., Matcham, J., Jeffries, P. and Jeger, M. J. (1991). The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. Plant Pathol. **40**: 568-575.
- 遠藤（飛川）みのり（2018）. イチゴ新品種‘恋みのり’が有する炭疽病抵抗性. *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体の菌種による差異の一例. 植物防疫 **72**: 236-240.
- Estrada, A. B., Jeffries, P. and Dodd, J. C. (1996). Field evaluation of a predictive model to control anthracnose disease of mango in the Philippines. Plant Pathol. **45** : 294-301
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783-791.
- 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.
- Fitzell, R. D. and Peak, C. M. (1986). Management strategies for control of anthracnose and bacterial black spot of mango in Northern New South Wales. In Proceedings CSIRO First Australian Mango Research Workshop. Cairns: 253-257.
- Freeman, S., Horowitz, S. and Sharon, A. (2001). Pathogenic and Nonpathogenic Lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from Strawberry and Other Plants. Phytopathology **91**: 986-992.
- 深谷雅子（2004）. *Colletotrichum acutatum* によるナシ炭疽病の発生と防除薬剤の検索. 日植病報 **70**: 184-189.
- 深谷雅子・高橋 功（1999）. ブドウ晩腐病に対するストロビルリン系薬剤の防除効果と使用時期. 北日本病虫研報 **50**: 100-103.

- Gan, P., Nakata, N., Suzuki, T. and Shirasu, K. (2017). Markers to differentiate species of anthracnose fungi identify *Colletotrichum fructicola* as the predominant virulent species in strawberry plants in Chiba Prefecture of Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **83**: 14-22.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**: 113-118.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. (1995). Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1323-1330.
- 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.
- Guerber, J. C., Liu, B., Correll, J. C. and Johnston, P. R. (2003). Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* **95**: 872-895.
- Gupta, S., Singh, K. P. and Singh, A. K. (2017). Sources of multiple Resistances to foliar diseases of mango. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* **6**: 148-151.
- 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・川本優理子・松谷幸子・西崎仁博・岡山健夫 (2008a). 奈良県における薬剤耐性イチゴ炭疽病菌の発生状況. 関西病虫研報 **50**: 93-94.
- 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)
- 平山喜彦・吉村あみ・西崎仁博 (2008b). リーフディスクと選択培地を用いたイチゴ炭疽病の有効殺菌剤の検索および展着剤の影響. 奈良農総セ研報 **39**: 25-30.

- 広瀬直人・澤岷哲也・照屋 亮・吉武 均・秋永孝義 (2008). 温熱処理によるマンゴー (アーウィ  
ン) 炭疽病の防除. 日食保存会報 **34**: 267-273.
- 井手洋一・田代暢哉 (2004). ナシ炭疽病の効率的な防除体系の確立を目的とした各種殺菌剤の耐  
雨性, 残効性および病原菌接種後の散布による発病抑止性の評価. 日植病報 **70**: 1-6
- 飯島章彦・徳永 聡 (1992). スモモ炭そ病の果実感染時期別の発病推移と数種薬剤の防除効果.  
関東病虫研報 **39**: 145-148.
- 池田あんず・広瀬 大・松岡俊将・大園享司 (2011). 国内亜熱帯林におけるクロサイワイタケ科内  
生菌の多様性—気候帯間比較による評価. 日本菌学会第55回大会講演要旨集: 23.
- 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.
- 稲田 稔・石井英夫・Chung Wen-Hsin・山田智子・山口純一郎・古田明子 (2008). ストロビルリン  
系薬剤耐性イチゴ炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*)] の発生. 日  
植病報 **74**: 114-117.
- 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・山口純一郎・古田明子 (2010). 寒天平板希釈法によるイチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*)  
のアゾキシストロビン剤に対する感受性検定. 日植病報 **76**: 1-6.
- 石井英夫 (2002). 薬剤耐性菌の最近の話題と病害抵抗性誘導に関する研究. 茨城病虫研報. **41**: 1-  
7.
- Ishii, H., Watanabe, H., Yamaoka, Y. and Schnabel, G. (2022). Sensitivity to fungicides in isolates of  
*Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* species complexes and efficacy against anthracnose  
diseases. Pestic. Biochem. Physiol. **182**: 105049.
- 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・上野臣一・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.
- Kanto, T., Uematsu, S., Tsukamoto, T., Moriwaki, J., Yamagishi, N., Usami, T. and Sato, T. (2014). Anthracnose of sweet pepper caused by *Colletotrichum scovillei* in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **80**: 73-78.
- 菊地麻里・小河原孝司・橋本由美・宮本拓也・金田真人・富田恭範 (2010) . 茨城県におけるイチゴ炭疽病菌の菌種および数種薬剤に対する耐性菌の発生状況. 茨城県農総セ園研報 **17**: 35-42.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- 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.
- 国際農林水産業研究センター (2017) . JIRCAS マンゴー遺伝資源サイト [Online] <https://www.jircas.go.jp/ja/database/mango/mango-top> (2025年4月アクセス確認).
- Kongtragoul, P., Imamoto, K. and Ishii, H. (2020). Resistance to quinone-oxidase inhibitor (QoI) fungicides in *Colletotrichum* species isolated from anthracnose disease occurring in Thailand. *Curr. Appl. Sci Technol.* **20**: 79-89.
- 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.
- Lin, W. L., Duan, C. H. and Wang, C. L. (2023). Identification and virulence of *Colletotrichum* species causing anthracnose on mango. *Plant Pathol.* **72**: 623-635.
- Liu, F., Weir, B. S., Damm, U., Crous, P. W., Wang, Y., Liu, B., Wang, M., Zhang, M. and Cai, L. (2015). Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia* **35**: 63-86.

- Lydia, I. R. V., Yanaliz, L. N., Robert, J. M., Teresa, S. and Michael, J. D. (2006). Occurrence and distribution of *Colletotrichum* spp. on mango (*Mangifera indica* L.) in Puerto Rico and Florida, USA. *Plant Pathol. J.* **5**: 191-198.
- McMillan, R. T. (1972). Enhancement of anthracnose control by combining copper with Nu-Film-17. *Florida State Hort. Soc.* **85**: 268-270.
- McMillan, R. T. (1984). Control of mango anthracnose with foliar sprays. *Proc. Florida State Hort. Soc.* **97**: 344-345.
- 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.
- Mo, J., Zhao, G., Li, Q., Solangi, G. S., Tang, L., Guo, T. and Hsiang, T. (2018). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China. *Plant dis.* **102**: 1283-1289.
- 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)
- 日本植物防疫協会編 (2003). 新農薬実用化試験成績 (常緑果樹) 第40集. 日本植物防疫協会 (東京). p. 30.
- 日本植物防疫協会編 (2013). 農薬作用機構分類一覧. 日本植物防疫協会 (東京). p.117.
- 日本植物防疫協会編 (2023). 農薬適用一覧表. 日本植物防疫協会 (東京). p.1095.
- 日本植物病理学会編 (2023). 日本植物病名目録. 日本植物病理学会 (東京). p.2554.
- 日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会編 (2012). 野菜・果樹・茶における QoI 剤及び SDHI 剤使用ガイドライン. [Online] <https://www.taiseikin.jp> (2025年3月確認).
- Nishijima, W. (1993). Mango diseases and their control. *In Proceedings: Conference on Mango in Hawaii.* : 20–24.

- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**: 103-116.
- 大畑貫一 (1995). 作物病原菌研究技法の基礎. 日本植物防疫協会 (東京). pp.211-212.
- 沖縄県農業協同組合 (JA おきなわ) 編 (2019). 沖縄県産マンゴー (アーウィン種・無加温) 基本栽培マニュアル. JA おきなわ (沖縄). p.36.
- 沖縄県農林水産部園芸振興課編 (2003). 沖縄県果樹栽培要領. 沖縄県農林水産部 (沖縄). pp.143-162.
- 沖縄県農林水産部園芸振興課編 (2011). 沖縄県果樹栽培要領. 沖縄県農林水産部 (沖縄). pp.123-146.
- 沖縄県農林水産部流通・加工推進課編 (2022). 県産農産物品質改善に向けた出荷モデル構築事業報告書. 沖縄県農林水産部 (沖縄). pp.1-53.
- 小野光明・手塚誉裕・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.
- Poolsawat, O., Tharapreuksapong, A., Wongkaew, S., Chaowiset, W. and Tantasawat, P. (2012). Laboratory and field evaluations of resistance to *Sphaceloma ampelinum* causing anthracnose in grapevine. *Australasian Plant Pathology*. **41**: 263-269.
- Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C. and Hyde, K. D. (2009). Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers.* **39**: 89-109.
- 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.

- Roumen, E. C., Bonman, J. M. and Parlevliet, J. E. (1992). Leaf age related partial resistance to *Pyricularia oryzae* in tropical lowland rice cultivars as measured by the number of sporulating lesions. *Phytopathology*. **82**: 1414-1417.
- 坂本 尚 (1992) . 農業総覧 病虫害防除・資材編 第10巻 防除資材便覧. 農文協 (東京) . p. 206-2.
- 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.
- 佐藤豊三 (2022). 微生物遺伝資源マニュアル 植物炭疽病菌 *Colletotrichum* species. 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構. 遺伝資源研究センター (茨城) p.51.
- Sato, T. and Moriwaki, J. (2013). Molecular re-identification of strains in NIAS Genebank belonging to phylogenetic groups A2 and A4 of the *Colletotrichum acutatum* species complex. *Microb. Res. Syst.* **29**: 13-23.
- Schnabel, G., Tan, Q., Schneider, V. and Ishii, H. (2021). Inherent tolerance of *Colletotrichum gloeosporioides* to fludioxonil. *Pestic. Biochem. Physiol.* **172**: 104767.
- Shahbaz, M., Iqbal, Z., Saleem, A. and Anjum, M. A. (2009). Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in Mango (*Mangifera indica* L.). *Pak. J. Bot.* **41**: 359-368.
- Sharma, G., Kumar, N., Weir, B. S., Hyde, K. D. and Shenoy, B. D. (2013). The *ApMat* marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Divers.* **61**: 117-138.
- Sharma, G., Maymon, M. and Freeman, S. (2017). Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Sci. Rep.* **7**: 15839.
- 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.
- Silva, D. N., Talhinas, P., Várzea, V., Cai, L., Paulo, O. S. and Batista, D. (2012). Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia* **104**: 396-409.

- 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.
- Steimetz, E., Trouvelot, S., Gindro, K., Bordier, A., Poinssot, B., Adrian, M. and Daire, X. (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. Physiol. Mol. Plant Pathol. **79**: 89-96.
- Sundravadana, S., Alice, D., Kuttalam, S. and Samiyappan, R. (2007). Efficacy of azoxystrobin in *Colletotrichum gloeosporioides* growth and on controlling mango anthracnose. J. Agric. Biol. Sci. **2**: 10-15.
- Sutton, T. B. and Shane, W. W. (1983). Epidemiology of the Perfect Stage of *Glomerella cingulata* on Apples. Phytopathology **73**: 1179-1183.
- Syed, R. N., Mansha, N., Khaskheli, M. A., Khanzada, M. A. and Lodhi, A. M. (2014). Chemical control of stem end rot of mango caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Pak. J. Phytopathol. **26**: 201-206.
- 田場 聡・高江洲和子・大城 篤・諸見里善一・澤岨哲也 (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.
- 田口裕美・鈴木啓史・黒田克利 (2012). イチゴ炭疽病に対する各種殺菌剤の残効期間と防除体系. 関西病虫研報 **54**: 53-59.
- 澤岨哲也 (2014). 施設マンゴーにおける炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の感染に及ぼす付着器形成と葉濡れ時間との関係. 沖縄農研セ報告 **8**: 25-29.
- 澤岨哲也 (2015). 異なる温度条件下における罹病枯死葉上のマンゴー炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の生存期間. 九病虫研会報 **61**: 16-19.
- 澤岨哲也・安次富厚・新崎千江美・大城 篤・田場 聡 (2018a). マンゴー軸腐病および炭疽病の同時防除のための数種有効殺菌剤を用いた体系散布技術の確立. 熱帯農業 **11**:43-52.
- 澤岨哲也・安次富厚・河野伸二・花ヶ崎敬資 (2022). ハウス外周辺植物に潜在するマンゴー炭疽病菌の種構成およびそれら植物の伝染源としての可能性. 日植病報 **88**: 232-233 (講要).

- 澤岨哲也・新崎千江美・大城 篤・佐藤豊三 (2015). マンゴー炭疽病を引き起こす *Colletotrichum acutatum* 種複合体菌株の再同定. 日植病報 **81**: 206 (講要).
- 澤岨哲也・嘉手苺佳太・新崎千江美・田場 聡 (2014). ストロビルリン系薬剤耐性マンゴー炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の発生. 日植病報 **80**: 119-123.
- 澤岨哲也・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 **5**: 20-24.
- 澤岨哲也・比嘉 淳 (2014). 果梗部熱処理法によるマンゴー軸腐病の防除. 九病虫研会報 **60**: 48-52.
- 澤岨哲也・比嘉 淳・伊山和彦・伊志嶺弘勝・手登根正 (2019). マンゴー軸腐病の果房における発病推移と病原菌の生息分布, 分生子飛散消長およびハウス内の枯れ枝残渣除去による耕種的防除効果. 九病虫研会報 **65**: 18-23.
- 澤岨哲也・光部史将・宜保永堅・小波津明彦 (2018b). *Colletotrichum tropicale* によるアセロラ炭疽病 (新称). 日植病報 **84**: 282-286.
- 澤岨哲也・佐藤豊三・亀川 藍・田場 聡・諸見里善一 (2013a). 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.
- 澤岨哲也・田場 聡・嘉手苺佳太 (2013b). マンゴー炭疽病菌の硝酸塩利用能欠損変異株の作出とその諸性質. 熱帯農業 **6**: 13-16.
- 澤岨哲也・田場 聡・諸見里善一 (2013c). マンゴー炭疽病菌の薬剤感受性および薬剤体系散布の防除効果. 熱帯農業 **6**: 81-88.
- 澤岨哲也・田場 聡・諸見里善一 (2013d). 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. 日植病報 **79**: 142-149.
- 澤岨哲也・田場 聡・諸見里善一・佐藤豊三 (2013e). 狭義の *Lasiodiplodia theobromae* によるマンゴー軸腐病 (新称). 日植病報 **79**: 15-19.

- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **38**: 3022-3027.
- 田代暢哉 (2007a). EBC (Evidence-based Control) の必要性. 今, 病害虫防除技術開発研究者に求められていること. *北日本病虫研報* **58**: 1-15.
- 田代暢哉 (2007b). だれでもできる果樹の病害虫防除. 農文協 (東京). pp. 95-107.
- 田代暢哉・井手洋一・納富麻子 (2004). カンキツ褐色腐敗病防除薬剤の耐雨性および降雨条件が防除効果に及ぼす影響. *日植病報* **70**: 254-255. (講要)
- 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.
- 照屋 亮・澤岬哲也・広瀬直人・牧志佑子・大城良計 (2012). 短時間温湯処理によるマンゴー炭疽病の防除. *園学研* **11**: 265-271.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Tokunaga, Y. and Ohira, I. (1973). Latent infection of anthracnose on *Citrus* in Japan. Rept. Tottori. Mycol. Inst. **10**: 693-702.
- Tovar-Pedraza, J. M., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Diaz, C., Lima, N. B., Michereff, S. J., Sandoval-Islas, J. S. and Leyva-Mir, S. G. (2020). Distribution and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Mexico. *Plant dis.* **104**: 137-146.
- Turechek, W. W. and Stevenson, K. L. (1998). Effects of host resistance, temperature, leaf wetness, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. *Phytopathology.* **88**: 1294-1301.

- Vieira, W. A., Michereff, S. J., de Morais, M. A., Hyde, K. D. and Câmara, M. P. (2014). Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Divers.* **67**: 181-202.
- Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U. and Verkley, G. J. M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.* **92**: 135-154.
- Weir, B. S., Johnston, P. R. and Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* **73**: 115-180.
- 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.
- Wu, C. J., Chen, H. K. and Ni, H. F. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Taiwan. *Eur. J. Plant Pathol.* **157**: 1-15.
- 矢野 龍 (1975). モモにおけるキャプタン剤の薬害. 関東病虫研報 **22**: 143.
- 安富徳光・宮城光則・大城正市 (1982). マンゴの生理・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.
- 安富徳光・小那覇安優・玉城 聡 (1991). マンゴの温湯処理による貯蔵病害防止効果. 九農研 **53**: 221.
- Yokosawa, S., Eguchi, N., Kondo, K. I. and Sato, T. (2017). Phylogenetic relationship and fungicide sensitivity of members of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex from apple. *J. Gen. Plant Pathol.* **83**: 291-298.
- Yokosawa, S., Eguchi, N. and Sato, T. (2020). Characterization of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing grape ripe rot in Nagano Prefecture, Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **86**: 163-172.
- 米本仁巳 (2008). 新特産シリーズ マンゴ 完熟果栽培の実際. 農文協 (東京). pp. 93-107.

- Yoshida, S. and Shirata, A. (1999). The Mulberry Anthracnose Fungus, *Colletotrichum acutatum*, Overwinters on a Mulberry Tree. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **65**: 274-280.
- Zadoks, J. C. (1982). Can we use models describing the population dynamics of fungicide-resistant strains? *Fungicide resistance in crop protection*: 149-160.
- 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.
- Zhang, Q., Nizamani, M. M., Feng, Y., Yang, Y. Q., Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., Wang, Y. and Li, C. (2023). Genome-scale and multi-gene phylogenetic analyses of *Colletotrichum* spp. host preference and associated with medicinal plants. *Mycosphere* **14**: 1-106.

## X. 謝辞

本研究を遂行しまとめるにあたり、終始温かい激励とご指導を賜りました琉球大学農学部教授 田場 聡博士には心より感謝申し上げます。博士論文の審査において琉球大学農学部教授 嬉野健次博士，同教授 平良英三博士，同教授 赤嶺 光博士，同准教授 関根健太郎博士には副査として多大なるご指導を受け賜り，心より感謝申し上げます。また，本研究において元新潟食料農業大学教授 佐藤豊三博士には多大なるご指導，ご助言を受け賜り心から感謝申し上げます。

沖縄県での本研究の遂行にあたり，沖縄県農業研究センター所長 比嘉 淳氏，同センター班長大城 篤博士，上席主任研究員 大野 豪博士，主任研究員 安次富厚氏および農林水産技能員の山田義智氏には試験設計や圃場の設置・管理において懇意なるご指導，ご助言を賜り，心から感謝いたします。また，各地区の農業改良普及課，県庁園芸振興課，営農支援課，流通・加工推進課およびJAおきなわ等の果樹担当の方々には多大なるご支援を頂き，ここに厚くお礼申し上げます。

元琉球農学部教授 諸見里善一博士には，研究や技術面だけでなく精神面でも常に心温まるご指導とご支援を頂き，心よりお礼申し上げます。

最後に，いつも私のことを心から支援して頂いた両親に，また，どのような状況においても常に応援してくれた妻，子供たちに対して心より感謝いたします。

## XI. 要約

### II. 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

沖縄県におけるマンゴー生産は、雨よけ施設栽培にもかかわらず、出荷果実で炭疽病が多発し問題となっている。沖縄本島南部および離島地域から大田市場（東京）に出荷されたマンゴー果実における炭疽病の発病追跡調査を行ったところ、南部地域 18 農家の追跡調査では、出荷前の発病は確認されなかったが、翌日の市場到着時から発病が認められ、3 日目には発病果率は 55.6%となった。離島出荷果実では、市場到着時には炭疽病の発生は認められなかったが、2 日目以降から発生し、日数経過とともに発病果率が増加した。このように沖縄産マンゴーの炭疽病は、出荷後以降に発生するため、出荷場での選果は極めて困難であることが明らかになった。また、出荷箱の形態の違いによる炭疽病の発生を比較すると、紙製の出荷箱と比較してプラスチック製パックで発病果率および発病度ともに高く推移することが明らかとなった。次に、県内栽培 76 地点の罹病果実および葉より採取した炭疽病菌 163 菌株をマンゴー炭疽病菌の種特異的プライマーによる PCR 検定（稲田ら、2006）によって調査した結果、広義 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo および *C. acutatum* Simmonds et Simmonds が分離され、その分離率は、それぞれ 89.6 および 10.4%であった。このことから、沖縄県におけるマンゴー炭疽病は、広義の *C. gloeosporioides* によって優占的に引き起こされることが明らかとなった。

### III. 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

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 菌株が広義 *Colletotrichum gloeosporioides*、11 菌株が広義 *C. acutatum* と同定され、いずれもマンゴー果実（‘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。

#### IV. マンゴー炭疽病菌の薬剤感受性および薬剤体系散布（ver. 1）の防除効果

マンゴー炭疽病に有効な薬剤防除体系の確立を目的に、病原菌に対する登録薬剤の感受性および果実肥大期の薬剤散布による防除効果と薬害の有無を評価するとともに、数種薬剤を組み合わせた体系散布の防除効果について検討した。広義の2種炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* の分生子発芽および菌叢生育に対する5種登録薬剤の感受性を調べた結果、マンゼブ水和剤、キャプタン水和剤、クレスキシムメチルドライフロアブルおよびアゾキシストロビンフロアブルの4薬剤で高い抑制効果が認められた。一方、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤では2種菌株間で感受性の差異が認められ、*C. gloeosporioides* に対する分生子発芽抑制は示すが、*C. acutatum* に対する発芽抑制はみられなかった。2008年に果実肥大期の薬剤散布による防除試験を行った結果、クレスキシムメチルドライフロアブルおよびアゾキシストロビンフロアブルで防除効果が認められ、収穫5日後の炭疽病の発病果率は無散布と比較して約41～54%まで抑制された。また、2薬剤ともに果実の薬害はみられなかった。一方、キャプタン水和剤の防除効果は認められず、果皮には薬液による斑点症状が確認された。2009年と2010年に出蕾前（12月下旬）から収穫前（6月下旬の袋かけ前）にかけて4薬剤を組み合わせた体系散布を2圃場で実施したところ、高い防除効果が認められ、収穫5日後の炭疽病の発病果率は無散布と比較して約76～96%まで抑制された。また、体系散布による果実の薬害は認められなかった。2ヵ年4試験事例のメタ・アナリシス解析により、体系散布区の炭疽病の発生は無散布区に比べて有意に減少し、無散布区の発病果率の約12%に抑制された。以上の結果より、本体系散布はマンゴー炭疽病の防除法として有効であると考えられる。

#### V. マンゴー炭疽病および軸腐病の同時防除のための数種有効殺菌剤を用いた体系散布技術（ver. 2）の確立

マンゴー軸腐病および炭疽病に有効な薬剤による共通防除体系の確立を目的に、病原菌に対する

登録薬剤の感受性とマンゴー生育期における数種薬剤を組み合わせた体系散布の防除効果について検討した。2種炭疽病菌 *Colletotrichum siamense*, *C. fioriniae* および軸腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae* の分生子発芽および菌糸伸長に対する10種登録薬剤の感受性を調べた結果、マンゼブ水和剤、アゾキシストロピンフロアブル、クレソキシムメチルドライフロアブル、塩基性硫酸銅水和剤、キャプタン水和剤の5薬剤で高い抑制効果が認められた。一方、イプロジオン水和剤、メパニピリムフロアブル、トリフルミゾール水和剤およびイミノクタジンアルベシル酸塩水和剤では、2種炭疽病菌の分生子発芽において菌種間で著しい感受性の差異が認められ、メパニピリムフロアブル、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、トリフルミゾール水和剤では軸腐病菌に対して抑制作用は認められなかった。2012～2014年に出蕾期または開花期から収穫前（袋かけ前）にかけて、*in vitro* で各病原菌に高い抗菌活性を示した5薬剤を組み合わせた体系散布を2圃場で実施したところ、いずれの年においても両病害の収穫後の果実において、安定した防除効果が認められた。また、体系散布による果実の薬害は、2013年試験において3.2%の発生がみられたが、2012年と2014年には認められなかった。3ヵ年5試験事例のメタ・アナリシス解析では、体系散布区の両病害の発生は無散布区に比べて有意に減少し、炭疽病では無散布区の発病果率の約23%、軸腐病では無散布区の発病果率の約24%にまで抑制された。以上の結果より、本体系散布はマンゴー軸腐病および炭疽病の防除法として有効であると考えられた。

## VI. 未硬化葉を用いたマンゴー炭疽病の簡易病原性検定法とマンゴー遺伝資源における抵抗性品種の選抜

我が国のマンゴーの主要品種‘アーウィン’は炭疽病に弱いため、収穫までに年数回の薬剤防除が行われるが、労力・コストの負担軽減と安心・安全な食料要求の高まりから、炭疽病に強い抵抗性品種の開発が求められている。そこで、本研究では簡易で正確な本病の病原性検定法を確立し、本検定法を用いたマンゴー遺伝資源の炭疽病抵抗性を評価し、本病に強い育種素材の選抜を行った。その結果、マンゴー未硬化葉（SPAD 値：9.5～24.3）を接種葉とし、病原菌接種時の分生子濃度は $10^4$ 個/mL以上、培養温度を25～30℃に設定して、暗条件下で5日間培養することで、安定した病斑の形成を示した。そこで、遺伝資源27品種について本検定法と果実接種による評価を比較した結果、両接種間の発病度に正の相関が認められ、本病に強い抵抗性品種として‘ゴールデンナゲット’

が明らかになった。以上より、本検定法を用いることでマンゴーの遺伝資源や雑種後代の中から効率よく炭疽病抵抗性を評価・選抜できると考えられる。

## VII. *Colletotrichum gloeosporioides* および *C. acutatum* 両種複合体に所属する沖縄産マンゴー炭疽病菌の種構成と諸特性

新分類に基づく沖縄産マンゴー炭疽病菌種複合体の種構成と菌種の諸性質は明らかではない。そこで、沖縄県全域の罹病果実から採集した炭疽病菌 83 菌株について、単一または複数領域の塩基配列による分子系統解析を行うとともに、菌種の形態、病原性と薬剤感受性を調査した。分子系統解析では *C. gloeosporioides* (*C.g*) 種複合体菌株で *C. fructicola*, *C. asianum*, *C. siamense* 他 8 種, *C. acutatum* (*C.a*) 種複合体菌株でマンゴーの病原として国内外で初確認となる *C. fiorinae*, *C. miaoliense* を含む 3 種の計 11 種が同定され、2 クレードを形成した 6 菌株は新種の可能性が示唆された。全体の種構成の割合は *C. fructicola* が 42.2% と最も高く、次いで *C. asianum* が 16.9% であった。 *C.g* 種複合体 9 種間で分生子と付着器に形態的差異はなかったが、 *C.a* 種複合体 4 種間では *C. fiorinae* は分生子が紡錘形で他種よりも付着器が大きく、PDA 培地裏面が赤みを帯びる点で形態による識別が可能であった。マンゴー果実への病原性では *C.g* 種複合体 9 種間で *Colletotrichum* sp. Clade Q が他種と比べて有意に病斑が大きく、優占種の *C. fructicola* の病斑は小さかった。 *C.a* 種複合体 4 種間の病原性はほぼ同等であった。登録 6 殺菌剤の MIC 値を調べた結果、全菌種（菌株）でアゾキシストロビンとクレソキシムメチル水和剤が共通して MIC 値が低かった。一方、キャプタンとマンゼブ水和剤のように菌種間で MIC 値に差異を示す剤も確認された。

## XII. 要約 (英文)

II. Temporal change in the occurrence of anthracnose on mango fruits shipped from Okinawa Prefecture and isolation frequency of two species of pathogens on the fruits in the field.

Mango anthracnose is a problem for fruit shipped from Okinawa Prefecture even though the fruits are cultivated in rain-out shelters. Therefore, we investigated the incidence of mango anthracnose in fruit shipped to the Ota Market (Tokyo) from an isolated island and two locations in the southern area of Okinawa main island. In a survey of 18 farms in the area, mango anthracnose was not detected prior to shipment; however, the day after arrival in the market the disease was confirmed and affected nearly 55.6% of the fruit by three days after arrival. For fruit shipped from an isolated island, mango anthracnose was not evident when the fruit was delivered to the market; however, two days later symptoms appeared and became more prominent with the passage of time. It was very difficult to distinguish healthy fruits from diseased fruits in the field. A comparison of packaging types suggested that plastic packs increased the disease incidence or severity of anthracnose on mangoes compared with paper boxes. In addition, we investigated 163 isolates of pathogens isolated from anthracnose fruit rots at 76 sites in Okinawa Prefecture by PCR assays using species-specific primers (Inada *et al.*, 2006). Nearly 89.6% of the samples collected were identified as *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo with the remaining 10.4% of the isolates identified as *C. acutatum* Simmonds et Simmonds. Therefore, *C. gloeosporioides* is the dominant species of mango anthracnose in Okinawa Prefecture.

III. Latent infection on fruits and infection period of mango anthracnose fungi, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* in a rainout shelter.

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.

IV. Sensitivity of causal pathogens of mango anthracnose to several fungicides and control effect of systematic application (ver. 1) of fungicides.

In order to establish a systematic fungicide application that is effective against mango anthracnose, we evaluated the sensitivity of the pathogen to the registered fungicides, the control efficacy of fungicide application during the fruit enlargement period, the presence or absence of phytotoxicity, as well as the control efficacy of the systematic application (ver. 1) of a combination of different fungicides. We investigated the sensitivity of five types of registered fungicides against the conidial germination and mycelial growth of two pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum*. Mancozeb wettable powder, captan wettable powder, kresoxim-methyl dry flowable and azoxystrobin flowable were found to have high suppressive efficacy on both fungi. In contrast, sensitivity to iminoctadine albesilate acid chloride wettable powder differed between two pathogens, with conidial germination being suppressed in *C. gloeosporioides*, but not in *C. acutatum*. In 2008, we conducted a test to investigate the control efficacy of fungicide application during the fruit enlargement period. Kresoxim-methyl dry flowable and azoxystrobin flowable showed control efficacy and reduced the incidence of anthracnose by approximately 41% to 54%, compared to areas with no application, 5 days after harvest. In addition, neither fungicide caused phytotoxicity to the fruit. In contrast, the application of captan wettable powder showed no control efficacy and the fungicide solution caused flecks on the peel. In 2009 and 2010, we conducted a trial on the systematic application (ver. 1) of a combination of four fungicides on two fields that were treated prior to apical bud formation (late December) up until the start of harvest (before bagging in late June). The results revealed that a high control efficacy of the treatment and the incidence of anthracnose was reduced by approximately 76% to 96%, compared to areas with no application, 5 days after harvest. In addition, the

systematic application of fungicides caused no phytotoxicity to the fruit. Meta-analysis of the four tests conducted over 2 years showed that the incidence of anthracnose in areas with systematic fungicide application (ver. 1) was significantly reduced to about 12% of that in the non-treated areas. These results show that our systematic application of fungicides (ver. 1) is effective as a control measure against mango anthracnose.

V. Systematic application technique (ver. 2) using several effective fungicides for simultaneous control of anthracnose and stem-end rot disease of mango.

In order to develop an effective common control management for anthracnose and stem-end rot disease of mango based on fungicides, we evaluated the sensitivity of registered fungicides to the causal fungi of two diseases, and the efficacy of a systematic application of fungicide combinations during the active growth period of mango. Of the 10 registered fungicides tested, five (mancozeb wettable powder, azoxystrobin flowable, kresoxim-methyl dry flowable, basic copper sulfate wettable powder, and captan wettable powder) were found to have a high inhibitory effect on the conidial germination and mycelial growth of two causal fungi of anthracnose, *Colletotrichum siamense* and *C. fioriniae* and causal fungus of stem-end rot, *Lasiodiplodia theobromae*. In contrast, two causal fungi of anthracnose showed different sensitivity to iprodione wettable powder, mepanipyrim flowable, triflumizole wettable powder and iminoctadine albesilate acid chloride wettable powder in the inhibition of conidial germination, while mepanipyrim flowable, iminoctadine albesilate acid chloride wettable powder and triflumizole wettable powder had no inhibitory effects on causal fungi of stem-end rot. In the field trials conducted in two fields between 2012 and 2014, various combinations of the five fungicides that exhibited high *in vitro* antifungal activity against all three causal fungi were systematically applied (ver. 2) between apical bud formation or flowering and pre-harvest (prior to bagging). During those years, these fungicide combinations exhibited stable protection against post-harvest fruit damage caused by either disease. Although phytotoxicity due to the systematic application of fungicides (ver. 2) was observed in 3.2% of fruit in the 2013 trial, it was not observed in either 2012 or 2014. The meta-analysis of the five trials conducted over the three-year period revealed that the incidence of both diseases decreased significantly in mango fruit, receiving systematic fungicide application (ver. 2) compared to untreated mango fruit, to approximately 23% and 24% of the incidence in untreated fruit for anthracnose and stem-end rot, respectively. The results above demonstrate that

the systematic application of fungicide (ver. 2) combinations is an effective means for controlling anthracnose and stem-end rot disease of mango.

VI. Simple evaluation method for testing mango anthracnose virulence using uncured mango leaves and for screening anthracnose-resistant genetic resources of mango (*Mangifera indica* L.).

The main mango cultivar grown in Japan, 'cv. Irwin', is susceptible to mango anthracnose and requires the application of fungicides several times a year prior to harvest. Increased consumer demand for safe and secure foodstuffs combined with the desire to reduce labor and costs are driving the development of mango cultivars (genetic resources) that exhibit strong resistance to mango anthracnose. Therefore, in this study, we developed a simple and accurate method for evaluating anthracnose virulence by estimating the susceptibility of mango cultivars to anthracnose to identify anthracnose-resistant breeding stock. Uncured mango leaves with leaf SPAD values of 9.5~24.3 were inoculated with conidial suspensions containing a minimum of  $10^4$  conidia/mL and incubated at 25 to 30°C for 5 days under dark condition to ensure adequate lesion formation. Disease severity in each of the 27 cultivars inoculated using this method was positively correlated with disease severity resulting from fruit inoculation. 'Golden Nugget' was identified as being the most resistant cultivar to mango anthracnose. Based on these findings, we concluded that the developed method can be used to efficiently evaluate disease resistance and to identify disease-resistant varieties from genetic resources of mango and mango hybrid progeny.

VII. Species composition and characterization of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* species complexes associated with mango anthracnose in Okinawa Prefecture, Japan.

Molecular phylogenetic analysis with 83 isolates of *Colletotrichum*, collected from diseased fruit using the *ApMat* marker and a multi-locus gene (ITS, *GAPDH*, *ACT*, *CHS-1*, *HIS3* and *TUB2*), was performed to determine the species composition and characteristics of the causal agents of mango anthracnose in Okinawa Prefecture. Morphological characteristics, pathogenicity, and fungicide sensitivity of representative isolates of each species were also investigated. A total of 11 species and 2 unknown were identified by phylogenetic analysis. 9 belonged to the *C. gloeosporioides* (*C.g*) species complex including *C. fructicola*, *C. asianum* and *C. siamense*, and 4 to the *C. acutatum* (*C.a*) species complex including *C. fioriniae*, *C. miaoliense* and *C. pedunculii*, which were not previously associated with mango disease anywhere in the world. The 2 unknown clades comprising

of 6 isolates, may represent new species. The dominant species was *C. fructicola* (42.2%), followed by *C. asianum* (16.9%). Only a few differences were observed in the L/W ratio of conidia and appressoria among the 9 species. However, within the *C.a* species complex, *C. fiorinae* could be distinguished from the 3 other species based on its fusiform conidia, large appressoria, and the reddish color of reverse colony on the PDA medium. Among the 9, *Colletotrichum* sp. Clade Q caused significantly larger lesions, while the dominant species, *C. fructicola*, caused smaller ones. Similar pathogenicity was observed for all 4 species of the *C.a* species complex. All isolates of the 13 species belonging to both complexes, exhibited high sensitivity with low minimum inhibitory concentration (MIC) values to azoxystrobin flowable and kresoxim-methyl dry flowable. Sensitivity to other fungicides such as captan and mancozeb wettable powder varied substantially, depending on the species with various MIC values.