

ニホンナシおよびカキに発生した
数種新病害の病原菌に関する研究

(Studies on the Causal Pathogens of New Diseases
on Japanese Pear and Persimmon)

安田文俊

2009

目 次

第1章	序 論	1
第2章	担子菌系酵母様菌によるナシ汚果病	6
第1節	研 究 史	6
第2節	病 徴	7
第3節	罹病果実の走査型電子顕微鏡観察	7
第4節	分離菌の同定	10
1.	罹病果実からの菌の分離	10
2.	形態観察および生化学的性状調査	12
3.	DNA 塩基配列解析	19
4.	同定結果のまとめ	25
第5節	新種酵母様菌の命名記載	25
1.	形態観察および生化学的性状調査	25
2.	分子生物学的系統解析	26
3.	新種記載	28
第6節	分離菌の病原性	32
第7節	特異的プライマーを用いた PCR 検出	34
第8節	感染様式の解析	43
1.	罹病果実果皮切片の光学顕微鏡観察	43
2.	罹病果実果皮切片の透過型電子顕微鏡観察	43
第9節	考 察	45
第3章	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> によるナシ黒かび病	52
第1節	研 究 史	52
第2節	病 徴	52
第3節	分離菌の同定	54
1.	罹病果実からの菌の分離	54
2.	形態観察および菌の同定	54
第4節	分離菌の病原性	56
第5節	発生生態	58
1.	菌糸生育に及ぼす温度の影響	58
2.	発病に及ぼす果実の貯蔵温度の影響	58
3.	品種による発病差異	61
第6節	考 察	61

第4章	<i>Pestalotiopsis</i> spp.によるカキ葉枯病	66
第1節	研究史	66
第2節	病徴	67
第3節	分離菌の同定	69
1.	病斑部からの菌の分離	69
2.	形態観察および菌の同定	69
第4節	分離菌の病原性	71
1.	分離菌株の病原性	74
2.	品種による発病差異	74
第5節	防除対策	76
1.	有効薬剤の探索	76
2.	分離菌株のチオファネートメチル感受性検定	79
第6節	考察	79
第5章	<i>Nectria cinnabarina</i> によるカキ紅粒がんしゅ病	83
第1節	研究史	83
第2節	病徴	84
第3節	分離菌の同定	84
1.	病斑部からの菌の分離	84
2.	形態観察および菌の同定	86
第4節	分離菌の病原性	88
第5節	考察	93
第6章	総合考察	96
摘要		107
謝辞		110
引用文献		112
Summary		120
学術論文目録		124
参考論文目録		125

第1章 序 論

ナシはバラ科ナシ亜科に属するナシ属植物 (*Pyrus* spp.) であり, 約 20 種の基本種があるといわれているが, 温帯地方を中心に栽培されている主要なナシは, ニホンナシ (*P. pyrifolia* Nakai var. *culta* Nakai, syn. *P. serotina* Rehd. var. *culta* Rehd.), チュウゴクナシ (*P. ussuriensis* Maxim. var. *sinensis* Kikuchi, syn. *P. bretschneideri* Rehd.) およびセイヨウナシ (*P. communis* L. var. *sativa* DC.) の 3 種である。我が国では, これらのすべてが栽培されているが, その栽培面積のうち 98%以上をニホンナシが占めている (平田, 1987)。ナシ属植物は約 7000 万年前に中国西部~南西部で発生し, 白亜紀~暁新世に分布地域を拡大したと推定される (米山, 2001)。ヨーロッパを中心に栽培されているセイヨウナシは, ヨーロッパ中部からアジア西部にかけて野生分布する *P. communis* の改良種であり, 地中海沿岸などの乾燥した気象条件に適し, 我が国には明治以降に導入された。現在では東北地方などの寒冷地を中心に ‘バートレット’, ‘ラ・フランス’, ‘ル・レクチュ’ などの品種が栽培されている。チュウゴクナシはホクシヤマナシ (*P. ussuriensis*) を基本種として品種改良が行われ, 我が国では ‘鴨梨 (ヤーリー)’ や ‘慈梨 (ツーリー)’ が栽培されている。ニホンナシの基本種はニホンヤマナシ (*P. pyrifolia*) であり, 日本の中部以南および朝鮮半島南部から長江沿岸を中心とした中国中央部に原生している。ニホンナシの栽培品種の多くはその改良種であり, 外観の違いによって果皮色が緑色を呈する青ナシ, 果皮がコルク層に覆われて褐色を呈する赤ナシ, さらにコルク化の発達が不完全なため, 緑色と褐色がモザイク状になる中間色ナシ (不完全赤ナシ) に大別される (平田, 1987)。

我が国では明治時代に品種登録された青ナシの ‘二十世紀’ と赤ナシの ‘長十郎’ が栽培品種として歴史的に重要であり, これらを交雑親として育種が進められてきた。現在, 我が国で栽培されているニホンナシ品種の栽培面積のうち, 約 85%は ‘二十世紀’ の血縁品種で占められ, その優良な形質は育種母本としても重要である (米山, 2001)。「二十世紀」は千葉県松戸市で発見された偶発実生の青ナシであり, 品種登録されて以来, 全国的に栽培が広がったが, *Alternaria alternata* (Fries:Fries) Keissler Japanese pear pathotype, syn. *A. kikuchiana* Tanaka によって引き起こされるナシ黒斑病に罹病性の品種であるため, その甚大な被害によって栽培面積が徐々に減少し, ‘幸水’ や ‘豊水’ などの黒斑病抵抗性品種に更新されてきた。こうしたなかで, 鳥取県では ‘二十世紀’ を主力品種としてナシ産地を維持し, 黒斑病耐病性の ‘ゴールド二十世紀’ などの放射線育種を進めてきた (壽

ら, 1992 ; 村田ら, 1994)。さらに, ‘二十世紀’ や, その枝変わり品種で自家和合性の形質を持つ ‘おさ二十世紀’ を母本とした青ナシ新品種の交雑育種が行われ, 近年, ‘夏さやか’, ‘なつひめ’, ‘夏そよか’, ‘えみり’, ‘涼月’ などが品種登録され, ‘二十世紀’ の後継品種として期待されている。ニホンナシの栽培面積の推移は全国的にはほぼ横ばいであり, 2007 年の全国での結果樹面積は 14,600 ha, 生産量は 296,800 t となっている。しかし, 鳥取県においては 1985 年の 3,810 ha をピークに栽培面積が減少しており, 2007 年の結果樹面積は 1,180 ha, 生産量は 24,700 t であり, 現在では全国第 3 位のナシ産地となっている。

一方, カキはカキノキ科に属するカキ属植物 (*Diospyros* spp.) であり, 世界に約 190 種あるといわれ, その大部分は熱帯から亜熱帯に分布している (新居, 1991)。このうち, 果樹作物としては, カキ (*D. kaki* Thunb.), マメガキ (*D. lotus* L.), アメリカガキ (*D. virginiana* L.) およびアブラガキ (*D. oleifera* Cheng.) の 4 種があるが, 我が国で食用に供されているのはカキのみである。カキは甘ガキと渋ガキに大別されるが, 渋ガキ品種は収穫後に, 渋味の原因となる水溶性タンニンを不溶化する脱渋処理を施され, 食用に供される。カキは中国が原産地であり, 紀元前から栽培されていたと推定され, 我が国へは奈良時代に中国あるいは韓国から渡来し, 10 世紀頃から全国的に栽培されはじめた (中村, 1987)。明治末期になると, 現在の主要品種である ‘富有’, ‘次郎’, ‘平核無’ などが品種として確立されたが, 当時は山野の散在樹や屋敷内栽植が多く, 果実の商品化率は低かったと考えられている。戦後になると栽培技術が格段に進歩したため, 収量が飛躍的に増加したが, 1960 年代をピークに生産量は減少に転じ, 2007 年の全国での結果樹面積は 23,200 ha, 生産量は 244,800 t となっている。このうち, 2007 年の鳥取県での結果樹面積は 360 ha, 生産量は 3,240 t で, 全国第 12 位のカキ産地であり, ニホンナシに次ぐ重要な果樹作物である。

鳥取県では古くからこれらのニホンナシおよびカキなどの落葉果樹栽培を基幹産業とし, 経済性の高い園芸作物として戦後以降に栽培面積を拡大してきた。しかし, 1960 年代には全国的に果実の供給過剰傾向が進み, 高度経済成長期以降は消費の多様化や高級志向が強まる反面, 我が国における果実の消費量は減少ないし停滞傾向が続いており, 全国の果樹産地ではさらなる果実製品の高品质, 高付加価値化が求められている。一方で, 近年では地球規模の温暖化が進み, 気象の変動によって果樹作物の生理やそれを加害する病害虫の発生生態にも大きな影響を及ぼし始めている。このような社会背景や自然環境の変化に平

行して、さまざまな農作物において生育不良、収量減収、品質低下といった被害事例が多く報告されるようになった（富岡, 2005）。こうした問題が発生した場合、農作物の生産および流通現場では発生原因の解明を迅速に行うことが、適切な対策を講じるうえで重要であり、果実生産上の作物保護的な観点ならびにポストハーベスト障害防止の面から、これに関与する病原の同定および診断作業は極めて重要な基礎的農業研究分野の一つである。農作物に限らず、植物の病害を引き起こす病原は、生物的病原と非生物的病原に大別されるが、生物的病原のなかでも糸状菌、放線菌、細菌、ファイトプラズマなどの微生物およびウイルス、ウイロイドなどに起因する病害が圧倒的に多い。このため、農作物の生育不良、収量減収、品質低下といった障害の原因を探るうえで植物病学的な見地から調査を始めることが問題解決のための一つの方策である。植物の病害を立証するためには、コッホの原則（Koch's postulates）に従い、罹病植物から病原菌を分離、純粋培養し、その形態や培養特性に基づいて同定を行い、健全植物体への接種、病徴の再現、さらに病徴の再現された植物体からの病原体の再分離を行う必要がある。

現在知られている植物病害のうち約 80%は菌類病であり、約 10%は細菌病、さらに残りの約 10%がウイルス、ウイロイド、ファイトプラズマなどが主因と考えられている（久能, 1998）。植物病害の大多数を占める菌類には、糸状菌、きのこ、酵母などが含まれ、これらは細菌や変形菌と区別するために真菌とも呼ばれる。こうした植物に病害を引き起こす各種の微生物の形状や性質、生態などを把握することが植物病害の診断を行ううえで必要であるが、それと同時に生物界で占める位置を把握しておくことも重要である。これまでの生物分類観では、主に細胞壁の有無によって、生物全体が植物界と動物界に二分されていた。しかし、研究手法が進むにつれ、生物の器官、組織、細胞、あるいは遺伝子などが形態学、細胞学、系統進化学、分子生物学的に詳細に解析されるようになり、Linné の定めた 2 界説の見直しが進められた（久能, 1998）。Heackel によって提唱された 3 界説では原生生物界（プロティスタ）が創設されたが、菌類の取り扱いが 2 界説と全く同じであった。Whittaker（1969）の 5 界説では生物の体制や栄養摂取に基づいた分類がなされ、細菌などの原核生物をモネラ界として設立されるとともに、はじめて菌界が設立された。さらに、Cavalier-Smith（1981）は、生物の系統進化を強く考慮した 8 界説を提唱し、その後、新たな見解を加えて改訂を重ねた（Cavalier-Smith, 1993 ; Cavalier-Smith, 2002）。この説に従うと、5 界説で菌界に位置づけられていた菌類は、*Phytophthora* 属菌や *Pythium* 属菌などの卵菌類を含むクロミスタ界（ストラメノパイル）、菌界、粘菌類や変形菌類などを

含む原生動物界に分散されることとなる（柿畷, 2001）。近年, 一般的には 5 界説が広く受け入れられていたが, 最近では 8 界説について様々な分野から議論が行われつつある（小林, 2006）。このような生物分類観の変遷とともに菌類の多様性が明らかとなっているが, いずれにしてもこれらの微生物が巨大な生物群を構成していることに変わりはない。8 界説では, 菌界はさらにツボカビ門, 接合菌門, 子のう菌門, 担子菌門に分類される。また, 菌類のうち有性世代が不明であり, 無性世代の形態（アナモルフ）しか知られていないものが極めて多い。菌類の種名は原則的には有性世代の形態（テレオモルフ）に基づくことになっているが, アナモルフに基づいた種名を使うことも国際命名規約で認められている。従来, 不完全菌類と呼ばれていた分類群は, 8 界説では *Mitosporic fungi* としてまとめられ, 系統が明らかになれば, いずれかのテレオモルフ分類群のアナモルフとして位置づけられている。

ところで, 植物病害の診断はその病原を明らかにするだけでなく, 病害が発生するに至った栽培条件や環境条件を明らかにすることも含んでいる。こうした診断の理論と病害の実例を研究する学問を診断学といい, 農業生産現場で必要とされる植物病理学の最も重要な研究分野の一角を担っている（富岡, 2005）。また, 近年, 植物病害の診断から防除までの臨床システム構築を目指した植物医科学の教育研究が推進され（難波ら, 2008）, 農業現場のニーズに対応可能な幅広い診断技法の修得が重要視されている。植物病害を診断するためには, まず圃場診断を行い, 実際の圃場の被害状況を詳細に把握することが重要である。そのうえで, 罹病植物体そのものを診断する植物診断を行うことが理想的であるが, 実際には植物診断だけで病害診断を行わざるを得ない場合も多い。その場合は, 診断の依頼者に対する詳細な問診によって情報収集することが必要である。植物診断を行う場合, 病原によって引き起こされる植物体の形態的な変化が重要な手がかりであり, その細胞, 組織, 器官に異常を起こした状態が病徴であり, 全身病徴または局部病徴に分けられる。一方, 罹病植物の外部に病原菌の器官が露出して肉眼で観察されるような場合を標徴と呼び, 特に菌類病の重要な診断の指標となる。また, 農業現場においては病害の発生が問題となった場合, 早期の診断によってはじめて有効な防除対策を講じることが可能となるため, 迅速な対応が必要である。病害診断の中心となるのは病原体の同定であるが, 病原菌の純粋培養や検定植物への接種などを行うと, 相当な日数がかかる場合が少なくない。

こうした問題を解決する手段として, 近年では各種の遺伝子診断技術が開発され, 植物病理学分野でも広く応用されている。全ての生物の遺伝情報の発現は, DNA から RNA への

転写, RNA からタンパク質への翻訳へと進むセントラルドグマに従っており, 植物病原菌の多彩な活動や形質の情報源はすべてゲノム DNA に由来している。近年, 耐熱性の DNA ポリメラーゼを利用した Polymerase chain reaction (PCR) 法の進歩により, 遺伝子診断技術が植物病原菌の同定や病害診断の臨床場面でも実用化されている。それぞれの植物病原菌に固有の DNA 塩基配列が明らかになれば, それに相補的な配列の DNA 断片 (Primer) を用いることにより, 鋳型となる微量のゲノム DNA から特定の DNA 領域が増幅される。こうして得られた PCR 産物を電気泳動法などで解析することにより, 植物病原菌の遺伝子レベルでの検出が可能となる。植物病原菌を分子生物学的な系統解析や種レベルで同定する場合, リボソーム RNA 遺伝子の DNA 塩基配列やリボソーム RNA 遺伝子間のスペーサー (ITS および IGS) 領域を比較検討することが一般的である。ITS 領域は塩基置換の速度が速いため, 属レベルの種間やさらには同種の集団間で違いがみられる。また, IGS 領域は同一種内の変種間あるいは株レベルでの変異がみられるため, 個体群の識別に有用である (Sugita *et al.*, 1999 ; 杉田・西川, 2004)。

現在, 植物病原菌に限らず既知の生物の遺伝情報は, 次々に解析が進められ, その膨大な遺伝情報は各国の DNA データベースに蓄積されている。こうして蓄積された遺伝情報はインターネットを介して公開されているため, 罹病植物体から分離された未知の微生物種も遺伝子解析した塩基配列データを検索することで遺伝子レベルでの同定が可能になりつつある。このような遺伝子診断技術は, 高度な知識や技術をほとんど必要としないため, 熟練や経験を要する従来の形態学的な微生物同定と比べると汎用性が高い。

筆者はこれまで, 植物病害の診断業務において各種の診断技法を用い, 様々な農作物において発生した植物病害や生育不良などの原因究明を行ってきた。本論文では, そのなかでもニホンナシとカキにおいて発生を認めた数種新病害に関する研究を論述する。すなわち, ナシ汚果病, ナシ黒かび病 (新称), カキ葉枯病およびカキ紅粒がんしゅ病 (新称) の 4 病害について, 病害の立証および新病原の同定を行い, 病原菌の発生生態や防除方法について考察する。各病害の研究史は各章で述べるが, いずれの新病害および新病原も近年, 鳥取県内を中心に発生したものであり, 農業生産現場からの要望に基づいて試験研究に取り組んだ結果得られた成果である。一部の研究成果は既に発表しているが (安田ら, 1999a ; 安田ら, 1999b ; Yasuda *et al.*, 2003 ; 安田ら, 2005a ; Yasuda *et al.*, 2006 ; 安田ら, 2007a ; Yasuda and Izawa, 2007b), ここにこれらを取りまとめて報告する。

第2章 担子菌系酵母様菌によるナシ汚果病

第1節 研究史

‘二十世紀’に代表される青ナシ品種は、果面に赤～黒色の汚れを生じて商品価値が低下する障害がしばしば発生し、果実生産上の減収要因の一つとして問題視されてきた。1950年代には既に長野県などで‘二十世紀’の汚れ果の発生が確認されており、果実袋の殺菌剤処理によって一時的に発生が減少したが、1970年代になると、それまで果実袋に処理していた有機水銀剤の使用が規制され、再び汚れ果の発生が認められるようになった。その後、‘二十世紀’ナシの汚れ果は全国的な問題となり、1970年代後半にはナシ主産県を中心に汚れ果の原因究明や防除対策に関する試験研究が実施された。この当時まで、汚れ果の症状の分類や名称が各産地で異なっていたため、田中（1977）によって、汚れ果の症状は赤アザ型、尻黒型および黒点型に分類、整理された。これにより、黒点型は生理的原因、赤アザ型は病害、尻黒型は病害あるいは生理的原因によるものと大別された。その後の詳細な研究によって、これらの症状の発生原因として、糸状菌による病害（大崎ら、1956；大崎・松尾、1958；松尾、1958）、降雨などによる湿害（桃沢、1954；三浦ら、1974）、凍害（桃沢、1954）、薬害（大崎ら、1956；大崎・松尾、1958）およびナミハダニの吸汁被害（伊澤、1999）などが次々と明らかとなった。糸状菌による病害と考えられた症状については、各種調査研究の結果、汚れ果の赤アザ型病斑から複数種の糸状菌などが分離され、菌の同定や分離菌の病原性の立証が試みられた。その結果、貞松・実松（1983）は、‘二十世紀’ナシの汚れ果から分離した *Alternaria* sp. と *Phomopsis* sp. の病原性を立証し、赤アザ型の汚れ果に病名を与えてナシ汚果病と記録した（日本植物病理学会編、2000）。その後、那須・中桐（1997）は、*Hyalodendron* sp. および *Stenella* sp. を同様の病徴を示す病原菌として報告し、ナシ汚果病の新病原として追加した（日本植物病理学会編、2000）。こうした研究成果から、これらの病原菌による青ナシの赤アザ型汚れ果症状を軽減するため、果実袋に数種の殺菌剤を処理する技術が実用化され、汚れ果の発生は減少した。ところが近年、再び鳥取県内において‘二十世紀’および‘ゴールド二十世紀’などの青ナシ果実に特徴的なカビ臭と赤アザ型病斑を伴う症状が一部の地域で多発して問題となった（安田ら、2005a；安田ら、2007a）。この汚れ果症状を示す果実は果面から特徴的なカビ臭を発することから、生産現場においてカビ梨症と呼ばれ、既報のナシ汚果病の病徴とほぼ一致したが、特徴的なカビ臭を伴う点などが既報のものと異なっており、この発生原因を究明するため、詳細な

調査研究が必要と考えられた。

第2節 病徴

2001年頃から、鳥取県内の現地圃場に栽植されているニホンナシ‘二十世紀’および‘ゴールド二十世紀’の収穫果実に淡褐色～茶褐色の赤アザを伴う汚れ果症状が認められた(Figs. 1a-c)。赤アザの程度はまだら模様にも果面全面に及ぶ激しい症状から一部分のみに症状を示す軽微なものまで多岐にわたったが、症状の激しいものは、特徴的なカビ臭を伴い、果面に艶が無く、白っぽく粉をふいたように観察された(Fig. 1d)。褐色のアザの部分と健全部の境界は不明瞭であり、尻黒症状や黒点症状は認められなかった。赤アザ症状の病斑部直下の果肉部分に腐敗や変色は認められなかったが、外観が著しく悪くなるため、商品価値が損なわれた。また、症状の激しい果実を数日間室内に放置しておくと赤アザの病斑部に黴が生じ、果実がしぼむ症状がしばしば観察された(Fig. 1e)。

第3節 罹病果実の走査型電子顕微鏡観察

1. 材料および方法

2001年と2002年のそれぞれ9月に鳥取県東伯郡東伯町および赤碕町(現在の琴浦町)の現地圃場から罹病果実を採取し、走査型電子顕微鏡(以下、SEM)観察の試料とした。また、対照として本病の発生の認められない近隣の圃場から採取した健全果実を供試した。SEMの試料は、果皮の切片(7×7 mm)を切り出し、試料台にカーボン製の両面テープで固定した後、2%オスミウム酸溶液で蒸気固定(4℃, 24時間)し、ドラフトチャンバー内で風乾させ、イオンコーター(日立E-1010)により白金蒸着した。そして、罹病果実の果皮および病原菌の形態をSEM(日立S-3500)を用い、15 kVの加速電圧で観察した。

2. 結果

SEMによる罹病果実の果面の観察を行った結果、病斑上には紡錘形の分生子を連鎖して形成する複数種の酵母様菌が観察された(Figs. 2a-c)。また、長円体～楕円体の酵母様細胞が出芽によって増殖する酵母様菌も観察された(Figs. 2d-e)。これらの酵母様菌は、罹病果実の果皮のワックス層やクチクラ層に亀裂が入っている周辺に繁殖している様子が高頻



Fig. 1. Natural symptoms of Japanese pear fruit stain on mature fruits.

- a. Severe symptom on harvested fruit of cv. Gold Nijisseiki with fusty smell.
- b. Moderate symptom on harvested fruit of cv. Nijisseiki.
- c. Light symptom on harvested fruit of cv. Gold Nijisseiki.
- d. Typical symptom with reddish stain and fusty smell on the mealy surface of harvested fruits called “Kabi-nashi”.
- e. Wilted fruits of “Kabi-nashi” stored at room temperature for 7 days after harvesting (forward), and healthy fruit (backward)

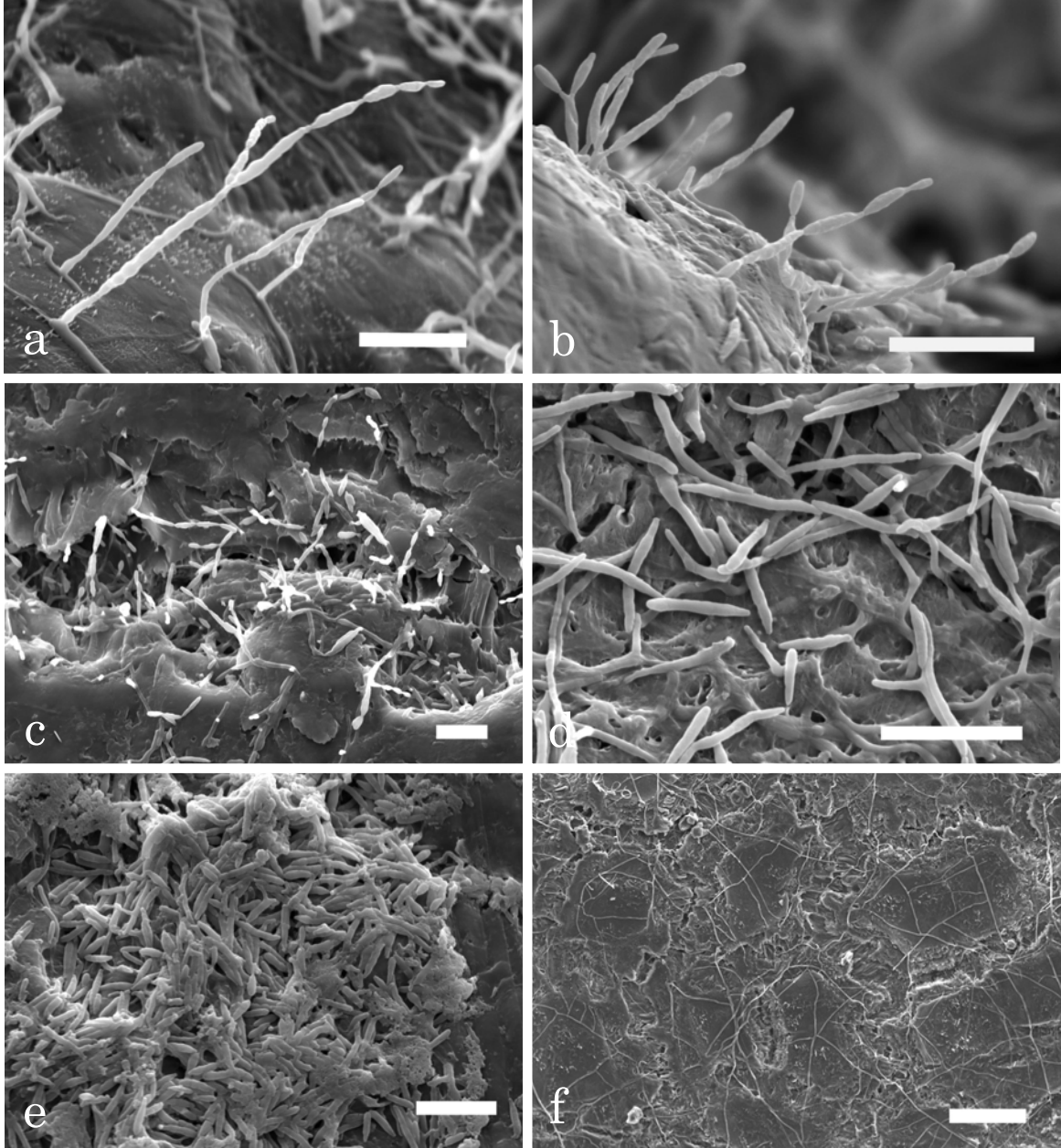


Fig. 2. Blastoconidia (a-c) and vegetative cells (d-e) of yeastlike fungi, and mycelia of filamentous fungus (f) observed on lesions of Japanese pear fruit stain. Scale bars, 10 μm (a-e) or 200 μm (f).

度に観察された (Fig. 2c)。さらに、果面には糸状菌の菌糸が果面に繁殖している様子も低頻度ながら観察されたが、分生子の形成は認められなかった (Fig. 2f)。一方、健全果実の果面は比較的平滑であり、著しいクチクラ亀裂や酵母様菌などの微生物の繁殖はほとんど観察されなかった。

第4節 分離菌の同定

1. 罹病果実からの菌の分離

(1) 材料および方法

2001年と2002年のそれぞれ9月に、鳥取県東伯郡東伯町および赤碕町（現在の琴浦町）の現地圃場から採取した罹病果実を合計約50果採取し、菌の分離を行った。すなわち、罹病果実の果皮から5mm角の切片を切り出し、これらを次亜鉛塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度0.1%）に1分間浸漬した後、直ちに Potato Dextrose Agar (PDA, Becton Dickinson) 平板培地に置床し、25°C（暗黒下）で10日間培養して分離菌株を得た（以下、表面殺菌法）。また、罹病果実の病斑部から5mm角の切片を切り出し、これらを10mlの滅菌蒸留水に加えて激しく攪拌し、懸濁液を調製した。この懸濁液を白金耳で僅かにすくい取り、PDA 平板培地上に画線し、25°C（暗黒下）で5日間培養した。形成されたコロニーのうち、酵母様菌と思われるコロニーを白金耳で釣り上げ、これを新しいPDA 平板培地に移植して分離菌株を得た（以下、懸濁法）。なお、得られた酵母様菌は、PDA 平板培地上で単コロニー分離を数回繰り返して、分離菌株とした。

(2) 結果

汚れ果症状を呈する果実から表面殺菌法によって菌の分離を行った結果、*Alternaria* 属菌、*Botryosphaeria* 属菌および *Penicillium* 属菌など複数種の糸状菌に加えて、数種類の酵母様菌が高率に分離された (Table 1)。また、懸濁法によって菌の分離を行った結果、主要な分離菌はコロニーの色調が白色および赤褐色の2種類の酵母様菌であったが、これらとはコロニー形態の異なる数種類の酵母様菌がやや低率ながら分離された。なお、懸濁法では酵母様菌が高率に分離されたのに対し、*Alternaria* 属菌などの糸状菌は全く分離されなかった。糸状菌の分離率に対して酵母様菌の分離率が高頻度であったため、得られた酵母様菌の分離菌株のうち、培養形態の異なる PFS 007 (=MAFF 230027)、PFS 002 (=

Table 1. Percentages of yeastlike and filamentous fungi isolated from lesions of Japanese pear fruit stain on cvs. Nijisseiki and Gold Nijisseiki using two methods

Isolate ^{a)}	Surface-sterilization method ^{b)}	Suspension method ^{c)}
Yeastlike fungi		
White colony type	16.4 (%)	35.3 (%)
Umber colony type	19.2	50.0
Others	4.1	14.7
Filamentous fungi		
<i>Alternaria</i> spp.	16.4	0
<i>Botryosphaeria</i> spp.	11.0	0
<i>Penicillium</i> spp.	5.5	0
<i>Phomopsis</i> spp.	4.1	0
<i>Colletotrichum</i> spp.	1.4	0
Others	21.9	0

a) Samples were taken from ca. 50 diseased fruits.

b) The tissues were cut from lesions, sterilized with 0.1 % (v/v) sodium hypochlorite solution for 1 minute and put on PDA plates.

c) The tissues were cut from lesions and suspended in sterilized distilled water. The suspension was streaked onto PDA plates.

MAFF 230028 (=CBS 117161), PFS 014 (=MAFF 230029) および PFS 037 (=MAFF 230030) の 4 菌株を選び、詳細な同定および病原性の検定を行った。

2. 形態観察および生化学的性状調査

(1) 材料および方法

分離菌の形態を観察するため、分離菌株を PDA 平板培地、YPGA (yeast extract 10 g, ペプトン 5 g, グルコース 40 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml) 平板培地または Yeast Mold Agar (YMA, Becton Dickinson) 平板培地上に画線培養 (25°C, 3-14 日間) し、分離菌の培養形態について既報 (那須・中桐, 1997 ; Boekhout *et al.*, 2003) のものと比較した。また、分離菌株の生化学的性状を Boekhout (1991) および Yarrow (1998) の方法に従って調査した。なお、炭素源の同化性については、10 倍濃度の Yeast Nitrogen Base (Becton Dickinson) 100 ml に各炭素源 10 g を加え、フィルター濾過滅菌した溶液 0.5 ml を滅菌蒸留水 4.5 ml に加えて検定用液体培地とした。これに 25°C で 48 時間前培養して滅菌蒸留水に懸濁した菌懸濁液を少量接種し、25°C (暗黒下) で 3 週間まで培養して生育の有無を観察した。また、窒素源の同化性については、10 倍濃度の Yeast Carbon Base (Becton Dickinson) 100 ml に各窒素源を所定量 (硝酸カリウム 0.78 g, 亜硝酸ナトリウム 0.26 g, エチルアミン塩酸塩 0.64 g, L-リジン 0.56 g) 加え、フィルター濾過滅菌した溶液 0.5 ml を滅菌蒸留水 4.5 ml に加えて検定用液体培地とした。これに 48 時間前培養して滅菌蒸留水に懸濁した菌懸濁液を少量接種し、25°C で 5 日間培養した。その後、各検定用培地中で生育した菌体懸濁液を 1 白金耳分すくい取り、同じ窒素源を含む新しい検定用液体培地に接種し、25°C (暗黒下) で 3 週間まで培養して生育の有無を観察した。

(2) 結果

分離菌株 PFS 007 は、PDA 培地上で 14 日間培養 (25°C, 暗黒下) 後、光沢がなく、白色~やや灰色がかかった白色、平滑~中央にいぼ状の隆起を伴い、気中菌糸のない、堅い、表面が細粉状~ビロード状の微小なコロニーを形成した (Fig. 3a)。このコロニーは時間の経過とともに拡大したが、生育は遅く、周縁部に円筒形~針状で黄色の溢出物が認められた。また、YPGA 培地上では 14 日間培養 (25°C, 暗黒下) 後、光沢がなく、乳白色~やや赤みがかかった白色の、気中菌糸のない、全縁の、堅い、表面がいぼ状に隆起~大脳状にしわが寄ったコロニーを形成した (Fig. 3a)。そして、培地はコロニーが古くなると、赤みが

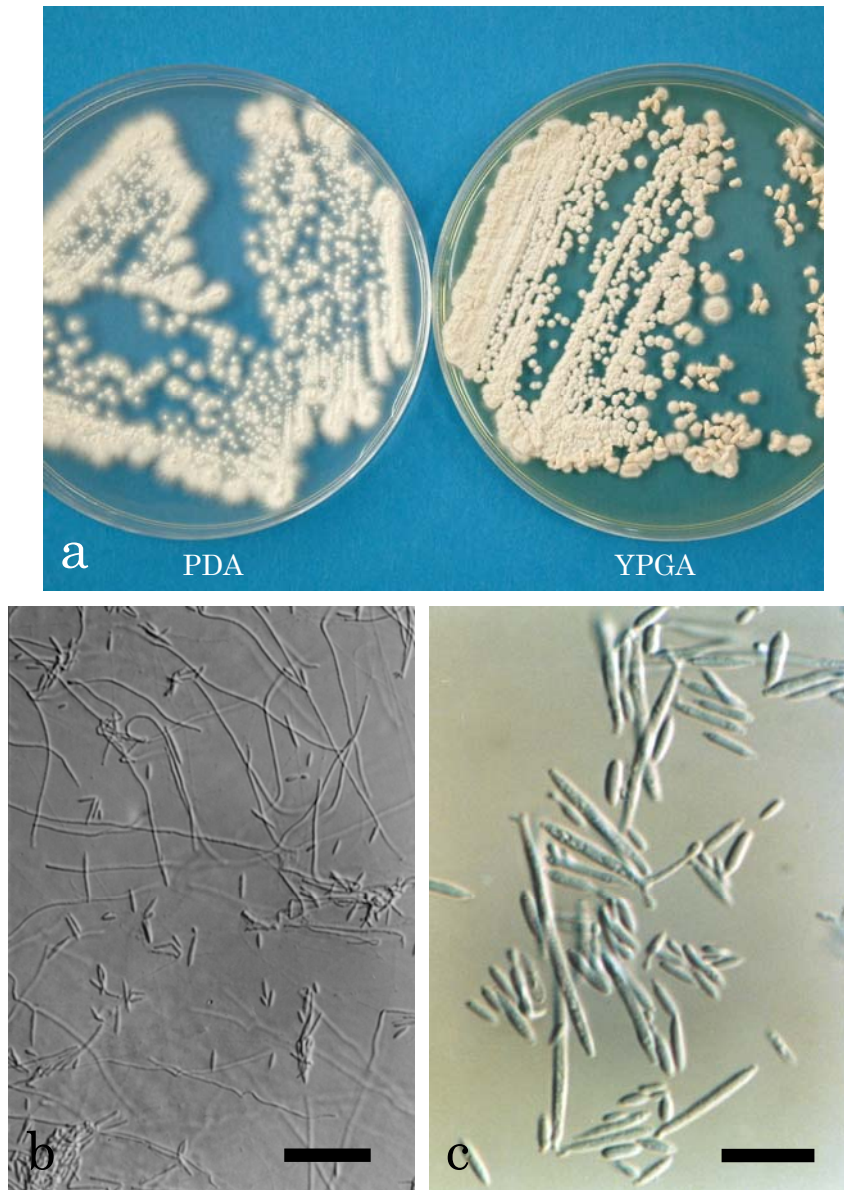


Fig. 3. Colony characteristics and light micrographs of the isolate PFS 007. a. Cultures on potato dextrose agar (PDA) (left) and 1% yeast extract / 0.5% peptone / 4% glucose / agar (YPGA) (right), after 14 days at 25°C. b. Mycelia and fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 20 μm . c. Fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10 μm .

かった茶色～暗褐色に変色した。菌糸は直径 1-2 μm 、無色で、隔壁があり、隔壁付近に形成された小柄状の構造物の先端には連鎖した紡錘状の出芽型孢子 (3-27 \times 1.5-3 μm) が形成された (Figs. 3b-c)。この孢子は鎖上の先端部ほど小型であった。以上の形態的特徴から、本菌株は、すでにナシ汚果病菌として記録されている *Hyalodendron* 属の記載 (Diddens, 1934 ; Barron, 1968 ; de Hoog, 1979 ; 那須・中桐, 1997) とほぼ一致したが, Boekhout *et al.* (2003) によって創設された *Acaromyces* 属の形態的特徴ともよく一致した (Table 2)。さらに、分離菌株 PFS 007 の生化学的性状は *A. ingoldii* Boekhout, Scorzetti, Gerson & Sztejnberg の記載 (Boekhout *et al.*, 2003) と概ね一致した (Table 3)。

分離菌株 PFS 002 は、PDA 培地上で 14 日間培養 (25 $^{\circ}\text{C}$, 暗黒下) 後、光沢のない、桃色がかったクリーム色～赤みがかった茶色、平滑～中央にいぼ状の隆起を伴い、気中菌糸のない、柔らかい、ビロード状のコロニーを形成した (Fig. 4a)。このコロニーは時間の経過とともに拡大したが、生育は遅く、ひだ状に隆起し、湿り気を帯びた。また、このコロニーは古くなると、暗褐色～灰色がかった紫色となり、培地は暗褐色～茶色に変色した。また、YPGA 培地上では 14 日間培養 (25 $^{\circ}\text{C}$, 暗黒下) 後、光沢がなく、肌色がかったクリーム色～白色で、気中菌糸のない、クッション状に隆起した表面が細粉状～ビロード状のコロニーを形成した (Fig. 4a)。分離菌株 PFS 002 は培養初期には長円体の酵母細胞 (6-12 \times 2-3 μm) で増殖したが、やがて菌糸を伸長した (Fig. 4b)。菌糸は、直径 1.5-3 μm 、無色、隔壁があり、隔壁付近に形成された小柄状の構造物の先端に紡錘状の出芽型孢子 (5-15 \times 2-3 μm) を形成した (Fig. 4c)。以上の形態的特徴から、本菌株は *Meira* 属の記載 (Boekhout *et al.*, 2003) と一致した (Table 2)。しかし、分離菌株 PFS 002 の生化学的性状は、これまでに記載されている *Meira* 属の 2 種のいずれとも完全には一致せず (Table 3)、これらとは別種である可能性が示唆された。

分離菌株 PFS 014 は、PDA 平板培地上で 7 日間培養 (25 $^{\circ}\text{C}$, 暗黒下) 後、わずかに光沢のある、黄白色～硫黄色、平滑または中央がいぼ状に隆起した微小なコロニーを形成した (Fig. 5a)。コロニーの中央は分生子柄束で覆われ、周縁部はビロード状～細紛状で、放射状に菌糸が広がった。また、YMA 平板培地上で 7 日間培養 (25 $^{\circ}\text{C}$, 暗黒下) 後、光沢のない、淡黄色～白黄色、中央がいぼ状に隆起したコロニーを形成した (Fig. 5a)。コロニーの表面は細紛状であり、周縁部は放射状に菌糸が広がった。これらコロニーが古くなると、培地は茶褐色～黄褐色に変色した。本菌株ではこれらの培地上で長円体の酵母細胞 (4-18 \times 2-3 μm) が出芽して増殖し (Fig. 5b)、やがて菌糸を伸長した。菌糸は無色、隔壁があり、

Table 2. Morphological characteristics of isolates from Japanese pear fruit stain and related type strains

Fungus species	Isolate	Young cell		Blastoconidium	
		Morph	Size (μm)	Morph	Size (μm)
<i>Acaromyces ingoldii</i> ^{a)}	PFS 007 (=MAFF 230027)			fusiform	3-27 × 1.5-3
<i>Hyalodendron</i> sp. ^{b)}	AS 001 ^T (=CBS 110050 ^T =NRRRL Y-27484 ^T)			fusiform to lanceolate	(6-)20-35 × (1.5-)2-3
<i>Trichosporon lignicola</i> ^{c)} (= <i>Hyalodendron lignicola</i> ^{d)})	OK 001 CBS 219.34 ^T (=ATCC 44978 ^T)			ellipsoidal	4-25 × 1.5-4
				ellipsoidal to subcylindrical	5-15 × 1.6-3
	PFS 002 (=MAFF 230028 =CBS 117161)	ellipsoidal	6-12 × 2-3	fusiform	5-15 × 2-3
	PFS 014 (=MAFF 230029)	ellipsoidal	4-18 × 2-3	fusiform	3-16 × 2-3
<i>Meira geulakonigii</i> ^{a)}	AS 004 ^T (=CBS 110052 ^T =NRRRL Y-27483 ^T)	ellipsoidal	7-17 × 2-3	ellipsoidal to fusiform	5-17 × 2-4
<i>Meira argovae</i> ^{a)}	AS 005 ^T (=CBS 110053 ^T =NRRRL Y-27482 ^T)	fusiform	7-20 × 1.5-2.5	fusiform	(3-)8-25 × 1-2.5
	PFS 037 (=MAFF 230030)	ellipsoidal	3.5-12.5 × 1.5-3.5	fusiform	2-12 × 2-3
<i>Pseudozyma aphidis</i> ^{e)} (= <i>Sterigmatomyces aphidis</i> ^{f)})	DSM 70725 ^T (=CBS 517.83 ^T =NBRC 10182 ^T)		4.3-11.5(-40) × 1.4-3.6		

a) Boekhout *et al.* (2003).

b) Nasu and Nakagiri (1997).

c) Fell and Scorzetti (2004).

d) de Hoog (1979).

e) Boekhout (1995).

f) Henninger and Windisch (1975).

T) Type strain.

Table 3. Physiological characteristics of the isolates PFS 007 and PFS 002 from Japanese pear fruit stain and related strains

Characteristic ^{a)}	PFS 007	<i>A. ingoldii</i> AS 001 ^{b)}	PFS 002	<i>M. geulakonigii</i> AS 004 ^{b)}	<i>M. argovae</i> AS 005 ^{b)}
Assimilation of carbon compounds					
D-Galactose	+	D	+	+, D	+
D-Ribose	+	D	+	+	+
L-Arabinose	+	D	+	+	+
D-Arabinose	+	W	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	W	+
Salicin	W	+	—	D	D
Arbutin	+	—, W	W	D	—, W, D
Melibiose	W	—, W	+	+	+, —
Lactose	W	D	—	D	—
Melezitose	+	+	+	—	+
Inulin	—	—, W	—	D	D, W
Soluble starch	W	—, W	W	D	D, +
Glycerol	+	—	—	D	D, W
<i>meso</i> -Erythritol	+	D, W	W	+	+
Ribitol	+	—, W	—	D, +	D, +
Xylitol	+	—, W	—	D	D, +
L-Arabinitol	+	—, W	—	+	D, +
Galactitol	—	—	—	D	D, +
<i>myo</i> -Inositol	W	+	—	—	—
Glucono- δ -lactone	—	—	—	D	+
D-Gluconate	W	D	—	D	—
D-Glucuronate	W	—, W	—	D	—
DL-Lactate	—	—	—	D	D, W
Citrate	+	—, W	—	D	+
Ethanol	W	D, W	—	D	D
Quinic acid	W	D	+	D	+
Assimilation of nitrogen compounds					
Nitrate	+	+	+	—	+
Nitrite	+	+	+	—	+
Ethylamine	+	W	+	D	+
L-Lysine	+	—	+	+	—
Other tests					
Growth without vitamins	+	+	+	+	+, —
Growth in 0.01% cycloheximide	+	D	+	+	—
Growth in 0.1% cycloheximide	—	—	—	+	—
Growth at 35 and 37°C	W	—	—	+	—

a) Characteristics were scored as: +, growth; —, no growth; W, weak growth; and D, delayed growth (after 2 or more weeks).

b) Boekhout *et al.* (2003).

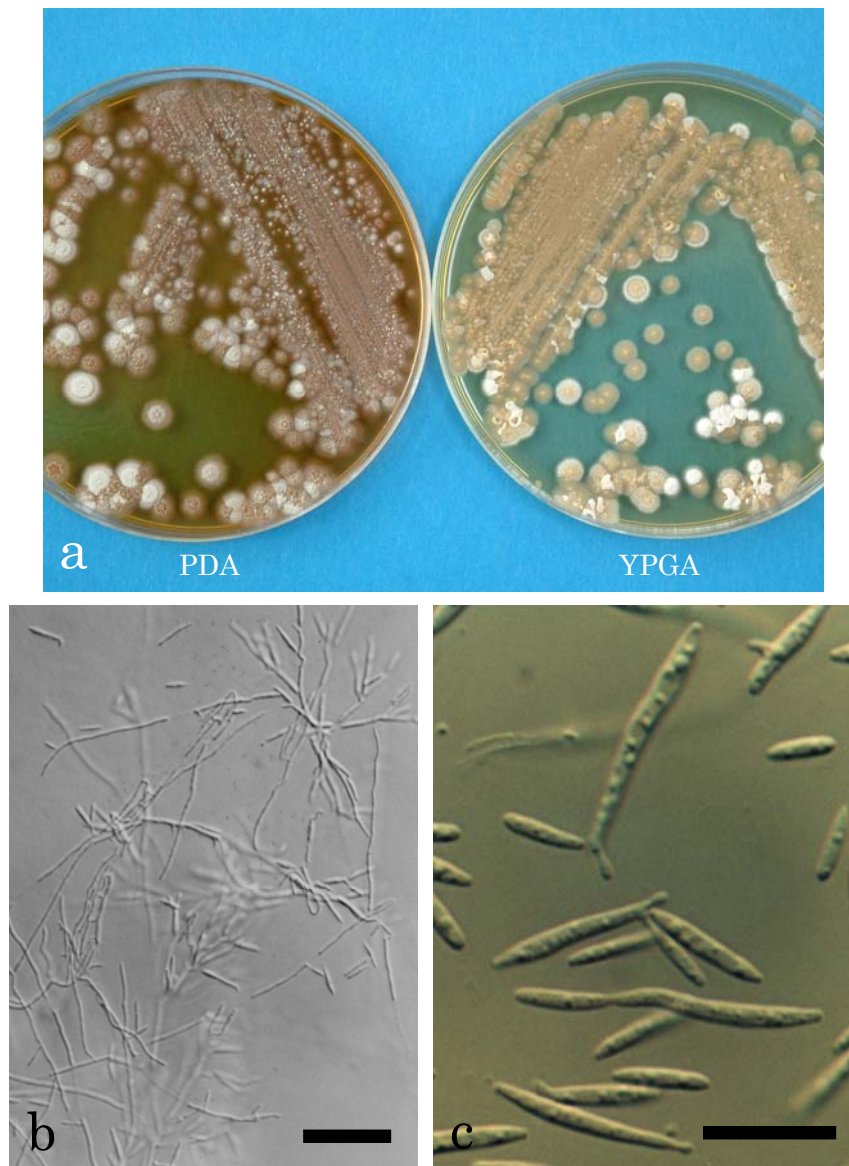


Fig. 4. Colony characteristics and light micrographs of the isolate PFS 002.
a. Cultures on potato dextrose agar (PDA) (left) and 1% yeast extract / 0.5% peptone / 4% glucose / agar (YPGA) (right), after 14 days at 25°C.
b. Mycelia and fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 20 µm.
c. Fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10 µm.

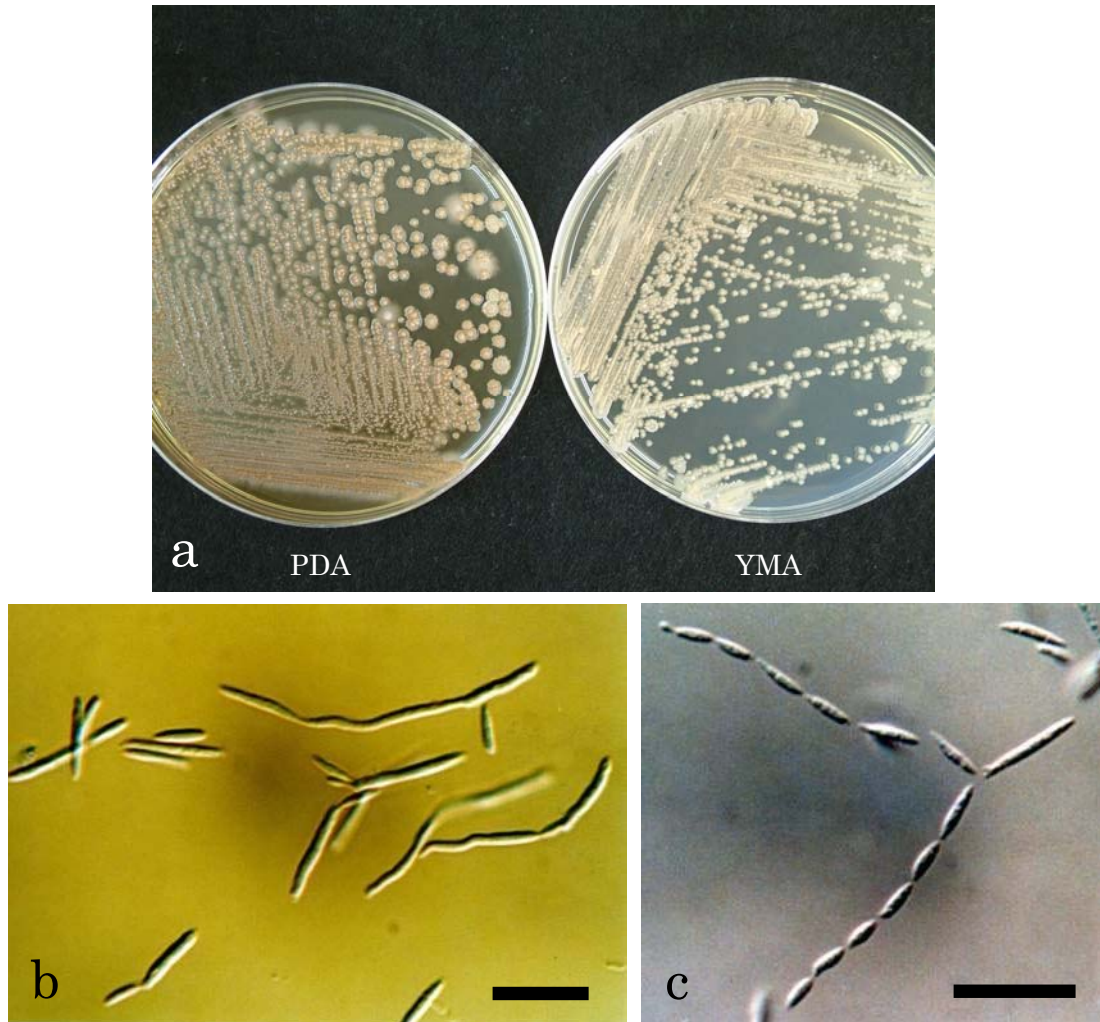


Fig. 5. Colony characteristics and light micrographs of the isolate PFS 014.
a. Cultures on potato dextrose agar (PDA) (left) and yeast mold agar (YMA) (right), after 14 days at 25°C.
b. Vegetative cells produced on YMA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10 µm.
c. Fusiform blastoconidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10 µm.

隔壁付近に形成された小柄状の構造物の先端に紡錘状の出芽型分生子 ($3\text{-}16 \times 2\text{-}3 \mu\text{m}$) を形成した (Fig. 5c)。以上の形態的特徴から、本菌株は, Boekhout *et al.* (2003) によって記載された *Meira* 属の形態的特徴と一致し (Table 2), 本菌株の生化学的性状は *M. geulakonigii* Boekhout, Scorzetti, Gerson & Sztejnberg (Boekhout *et al.*, 2003) とほぼ一致した (Table 4)。

分離菌株 PFS 037 は, PDA 平板培地上で 7 日間培養 (25°C , 暗黒下) 後, 光沢のある, ピンク色~白色, 湿り気を帯びた, 柔らかい, ビロード状のコロニーを形成した (Fig. 6a)。コロニーの周縁部は全縁または放射状に広がった。また, YMA 平板培地上で 7 日間培養 (25°C , 暗黒下) 後, 光沢のない, ピンク色がかった肌色~白色, 湿り気を帯びた, 柔らかい, ビロード状のコロニーを形成した (Fig. 6a)。コロニーの周縁部は全縁または放射状に広がった。培養初期には長円体の酵母細胞 ($3.5\text{-}12.5 \times 1.5\text{-}3.5 \mu\text{m}$) が出芽して増殖し (Fig. 6b), わずかに菌糸の伸長が認められた。菌糸は無色, 隔壁があり, 隔壁付近に形成された小柄状の構造物の先端に紡錘状の出芽型分生子 ($2\text{-}12 \times 2\text{-}3 \mu\text{m}$) を形成した (Fig. 6c)。以上の形態的特徴から, 本菌株は *Pseudozyma* 属の記載 (Boekhout, 1995) と一致し (Table 2), 本菌株の生化学的性状は *P. aphidis* (Henninger & Windisch) Boekhout (= *Sterigmatomyces aphidis*) の記載 (Henninger and Windisch, 1975) とほぼ一致した (Table 4)。

3. DNA 塩基配列解析

(1) 材料および方法

酵母様菌の各分離菌株をブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地 (ブドウ糖 20 g, 乾燥マッシュポテト 34 g の煮汁 1,000 ml) で 25°C (暗黒下), 8-10 日間振とう培養後, 培養液を遠心分離 ($12,000 \times g$) し, 上清を除去して 15-20 mg の菌体を回収した。DNA の抽出は, FastDNA Kit (BIO101) を用い, 添付されたプロトコールに従った。抽出した DNA 溶液は 50 倍に希釈した後, 分光光度計 (日立ハイテクノロジー U-2800) によって OD_{260} 値を測定して DNA 濃度を算出し, $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ に調製して PCR テンプレートとした。25 μl の PCR 反応液には, 10 ng のテンプレート DNA, $0.4 \mu\text{M}$ の各プライマー, 0.625 ユニットの TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ), $200 \mu\text{M}$ の各 dNTP および $1 \times \text{Ex Taq reaction buffer}$ を加えた。PCR 反応は, RoboCycler (STRATAGENE) を用いて, 94°C 2.5 分 1 回, 94°C 30 秒・ 56°C 45 秒・ 72°C 90 秒 30 回, 72°C 7 分 1 回の条件で行った。26S rDNA の

Table 4. Physiological characteristics of the isolates PFS 014 and PFS 037 from Japanese pear fruit stain and related strains

Characteristic ^{a)}	PFS 014	<i>M. geulakonigii</i> AS 004 ^{b)}	PFS 037	<i>P. aphidis</i> (= <i>Sterigmatomyces aphidis</i>) DSM 70725 ^{c)}
Assimilation of carbon compounds:				
D-Glucose	+		+	+
D-Galactose	+	+, D	+	+
L-Sorbose	—		+	+
D-Ribose	+	+	W	+
D-Xylose	+		+	+
L-Arabinose	+	+	+	+
D-Arabinose	W	+	+	+
L-Rhamnose	—		+	+
α -Methyl-D-glucoside	—		W	+
D-Cellobiose	+	W	W	+
Salicin	+	D	W	+
Melibiose	W	+	+	+
Lactose	—	D	+	+
Melezitose	W	—	+	
Inulin	—	D	—	—
Soluble starch	D	D	W	+
Glycerol	D	D	W	+
<i>meso</i> -Erythritol	+	+	W	+
Ribitol	+	D, +	+	+
Xylitol	D	D	—	
L-Arabinitol	+	+	—	
Galactitol	W	D	W	+
<i>myo</i> -Inositol	—	—	+	+
Glucono- δ -lactone	D	D	—	
D-Gluconate	W	D	—	
D-Glucuronate	—	D	W	
DL-Lactate	W	D	+	+
Citrate	+	D	+	+
Ethanol	D	D	+	+
Quinic acid	+	D	W	
Assimilation of nitrogen compounds:				
Nitrate	W	—	+	+
Nitrite	W	—	+	
Ethylamine	+	D	+	
L-Lysine	+	+	+	
Other tests				
Growth without vitamins	+	+	W	W
Growth in 0.01 % cycloheximide	W	+	—	
Growth in 0.1 % cycloheximide	W	+	—	
Growth with 50 % (w/v) D-Glucose	+		+	—
Growth at 37 °C	—	+	+	+
DBB reaction	+	+	+	
Urease activity	+	+	+	

a) Characteristics are scored as: +, growth; —, no growth; W, weak growth; and D, delayed growth (after 2 or more weeks).

b) Boekhout *et al.* (2003).

c) Henninger and Windisch (1975).

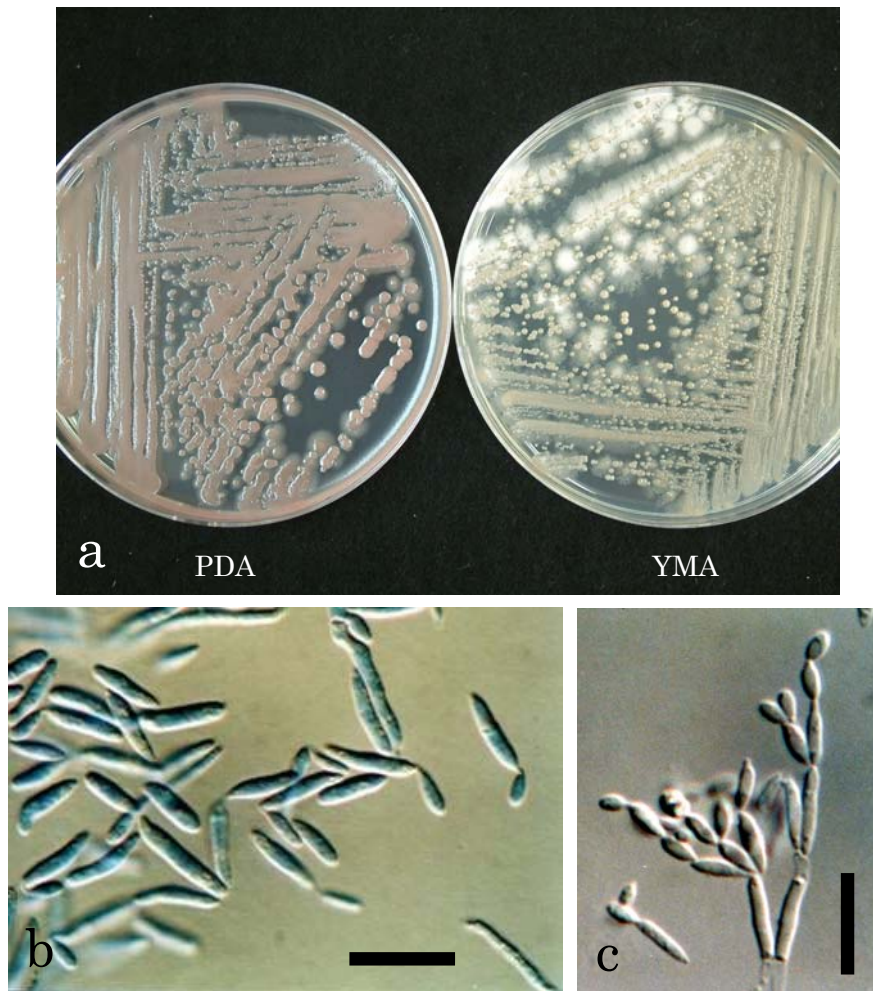


Fig. 6. Colony characteristics and light micrographs of the isolate PFS 037.
a. Cultures on potato dextrose agar (PDA) (left) and yeast mold agar (YMA) (right), after 14 days at 25°C.
b. Vegetative cells produced on YMA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10 µm.
c. Fusiform blastoconidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10 µm.

D1/D2 領域の PCR プライマーには、NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG³) と NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG³) (O'Donnell, 1993) を用いた。また、5.8S rDNA を含む ITS 領域の PCR プライマーには、ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG³) と ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC³) (White *et al.*, 1990) を用いた。得られた PCR 産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製し、PCR に用いた各プライマーと ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定した。サイクルシーケンス反応は、RoboCycler (STRATAGENE) を用いて、標準のプロトコールに従った。サイクルシーケンス反応産物を DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) で精製した後、ABI 310 キャピラリーシーケンサーによって塩基配列データを回収した。分離菌株の 26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列は、アクセッション番号によって Table 5 に示した。なお、関連菌の 26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列は GenBank/EMBL/DDBJ DNA データベースから得られたものを使用した。各塩基配列は、DNASIS-Mac v.3.2 (日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いてアライメント解析を行った。

(2) 結果

分離菌株 PFS 007 は、26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列から、*A. ingoldii* AS 001 株および *Hyalodendron* sp. OK 001 株と 99%以上の相同性を示した (Table 6)。また、*Hyalodendron* sp. OK 001 株と *H. lignicola* CBS 219.34 株は塩基配列の相同性が低く、26S rDNA の D1/D2 領域で 77%、5.8S rDNA を含む ITS 領域で 68%の相同性であった。分離菌株 PFS 002 は、26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列が *M. geulakonigii* AS 004 株および *M. argovae* AS 005 株と 98%の高い相同性を示し、*Meira* 属菌であることが推定されたが、5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列ではこれらの *Meira* 属菌との塩基配列の相同性は 83-87%とやや低く、複数の配列でギャップが認められた。なお、*Meira* 属に記載されている *M. geulakonigii* と *M. argovae* との塩基配列の相同性は 26S rDNA の D1/D2 領域で 99%、5.8S rDNA を含む ITS 領域で 87%の相同性であった。分離菌株 PFS 014 の 26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列は *M. geulakonigii* AS 004 株と 99%以上の高い相同性を示した。分離菌株 PFS 037 は、26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列が *P. aphidis*

Table 5. Accession numbers of the partial sequences of D1/D2 domains of 26S rDNA and ITS regions including 5.8S rDNA of the isolates from Japanese pear fruit stain and the related strains

Fungus species	Isolate	The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers	
		D1/D2 of 26S rDNA	ITS & 5.8S rDNA
	PFS 007	AB185158	AB185160
<i>Acaromyces ingoldii</i> ^{a)}	AS 001 ^T (=CBS 110050 ^T =NRRRL Y-27484 ^T)	AY158665	AY158671
<i>Hyalodendron</i> sp. ^{b)}	OK 001		
<i>Trichosporon lignicola</i> ^{c)} (= <i>Hyalodendron lignicola</i> ^{d)})	CBS 219.34 ^T (=ATCC 44978 ^T)	AY370685	AY370684
	PFS 002	AB185157	AB185159
	PFS 014	AB204893	AB204894
<i>Meira geulakonigii</i> ^{a)}	AS 004 ^T (=CBS 110052 ^T =NRRRL Y-27483 ^T)	AY158668	AY158674
<i>Meira argovae</i> ^{a)}	AS 005 ^T (=CBS 110053 ^T =NRRRL Y-27482 ^T)	AY158669	AY158675
	PFS 037	AB204895	AB204896
<i>Pseudozyma aphidis</i> ^{e)} (= <i>Sterigmatomyces aphidis</i> ^{f)})	DSM 70725 ^T (=CBS 517.83 ^T =NBRC 10182 ^T)	AJ235303	AF294699

a) Boekhout *et al.* (2003).

b) Nasu and Nakagiri (1997).

c) Fell and Scorzetti (2004).

d) de Hoog (1979).

e) Boekhout (1995).

f) Henninger and Windisch (1975).

T) Type strain.

Table 6. Sequence similarity (%) of D1/D2 domains of 26S rDNA and ITS regions including 5.8S rDNA among the isolates from Japanese pear fruit stain and the related strains^{a)}

Fungus species	Isolate	PFS 007	AS 001	OK 001	CBS 219.34	PFS 002	PFS 014	AS 004	AS 005	PFS 037	DSM 70725
<i>Acaromyces ingoldii</i>	PFS 007	—	99	100	68	—	—	—	—	—	—
	AS 001	99	—	99	68	—	—	—	—	—	—
	OK 001	99	99	—	68	—	—	—	—	—	—
<i>Hyalodendron lignicola</i>	CBS 219.34	77	78	77	—	—	—	—	—	—	—
	PFS 002	—	—	—	—	—	86	83	87	—	—
<i>Meira geulakonigii</i>	PFS 014	—	—	—	—	97	—	99	88	—	—
	AS 004	—	—	—	—	98	99	—	87	—	—
<i>Meira argovae</i>	AS 005	—	—	—	—	98	98	99	—	—	—
<i>Pseudozyma aphidis</i>	PFS 037	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
	DSM 70725	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a) Lower left shows D1/D2 similarity, and upper right shows ITS similarity. The sequences were aligned including gaps.

DSM 70725 株と完全に一致した。

4. 同定結果のまとめ

鳥取県で発生したナシ汚果病の罹病果実から分離された酵母様菌の各菌株の培養形態、生化学的性状調査、26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列解析の結果などから、分離菌株 PFS 007 は、担子菌系酵母様菌の *Acaromyces ingoldii* であると同定した。一方、分離菌株 PFS 002 は、担子菌系酵母様菌の *Meira* 属菌であると同定されたが、本菌株はこれまでに Boekhout *et al.* (2003) によって記載されている 2 種の *Meira* 属菌のいずれにも該当しないため、本属の新種の可能性が示唆された。また、分離菌株 PFS 014 は、*Meira* 属の基準種である *M. geulakonigii* であると同定した。さらに、分離菌株 PFS 037 は担子菌系酵母様菌の *Pseudozyma aphidis* であると同定した。

第 5 節 新種酵母様菌の命名記載

前節で *Meira* 属菌と推定された PFS 002 株は、これまでに本属に記載されている *M. geulakonigii* および *M. argovae* のいずれとも一致しないと考えられたため、さらに詳細な同定を行った。

1. 形態観察および生化学的性状調査

(1) 材料および方法

供試菌株として赤アザ症状を示す果実から分離された PFS 002 に加えて、これと同様のコロニー形態を示す PFS 023 および PFS 034 を以下の実験に用いた。これら 3 菌株を第 4 節の方法に従って、形態観察および生化学的性状調査を行った。また、デンプン類似物質の形成、Diazonium Blue B (DBB) 反応およびウレアーゼ活性を Yarrow (1998) の方法に従って調査した。すなわち、デンプン類似物質の形成は、供試菌株を 3% グルコース加用 Yeast Nitrogen Base 液体培地 (pH 5.6) で 28 日間培養 (25°C, 暗黒下) 後、ルゴール液 (ヨウ素 1 g, ヨウ化カリウム 2 g, 蒸留水 300 ml) を 1-2 滴加え、濃青色を呈した場合を陽性とした。DBB 反応は、供試菌株を YMA 平板培地上で 7 日間培養 (25°C, 暗黒下) 後、60°C で 16 時間インキュベートした菌体に 0.25 M Tris buffer (pH 7.0) に溶解した 0.1% DBB 反応液を加え、2 分以内に濃赤～赤紫色を呈した場合を陽性とした。ウレアーゼ活性

は、Christensen 培地（ペプトン 1 g, グルコース 1 g, 塩化ナトリウム 5 g, リン酸二水素カリウム 2 g, フェノールレッド 12 µg, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 6.8) 4.5 ml に濾過滅菌した 20%尿素液 0.5 ml を加えた検定用培地で供試菌株を培養（25°C, 4 日間）し、培地が橙紅色を呈した場合を陽性とした。

(2) 結果

供試した 3 菌株（PFS 002, PFS 023 および PFS 034）はいずれも類似した培養形態および同一の生化学的性状を示し、PDA 培地上で 14 日間培養（25°C, 暗黒下）後、光沢のない、桃色がかったクリーム色～赤みがかった茶色、平滑～中央にいぼ状の隆起を伴い、気中菌糸のない、柔らかい、ビロード状のコロニーを形成した（Fig. 7）。また、YPGA および YMA 培地上では 14 日間培養（25°C, 暗黒下）後、光沢がなく、赤みがかった茶色～白色で、気中菌糸のない、堅い、クッション状～いぼ状に隆起した表面が細粉状のコロニーを形成した（Fig. 7）。いずれの菌株も、PDA 培地および YMA 培地上で褐色の色素を産生し、培地の裏面が褐色となったが、その程度はやや異なった。培養初期には長円体の酵母細胞 [(4-)6-12(-17)×2-3 µm] が両極出芽し（Fig. 8a）、やがて菌糸を伸長した。菌糸は直径 1.5-3 µm, 無色, 隔壁があり, 隔壁付近に形成された小柄状の構造物の先端に紡錘状～糸状の出芽型孢子 [(4-)5-15×2-3 µm] を形成した（Fig. 8b）。これらの菌株は、寒天培地上ではテレオモルフの形成は認められなかった。また、*myo*-イノシトールを同化せず、デンプン類似物質の形成は認められなかった。さらに、DBB 反応およびウレアーゼ活性は陽性であった。以上の結果から、供試した 3 菌株（PFS 002, PFS 023 および PFS 034）は担子菌系の酵母様菌の特性を示し、*Meira* 属の記載 (Boekhout *et al.*, 2003) に一致した。しかし、これらの分離菌の生化学的性状は、これまでに記載されている *Meira* 属の 2 種のいずれとも完全には一致しなかった。

2. 分子生物学的系統解析

(1) 材料および方法

各菌株（PFS 002, PFS 023 および PFS 034）の 26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列は、前節の方法に従ってシーケンス解析を行った。得られた塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のホームページ（URL <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>）上で公開されている Clustal W version 1.83 プログラム



Fig. 7. Cultures of *Meira* sp. isolates PFS 002, PFS 023 and PFS 034 (left to right) on PDA (upper) and YMA (lower) after 14 days at 25°C.

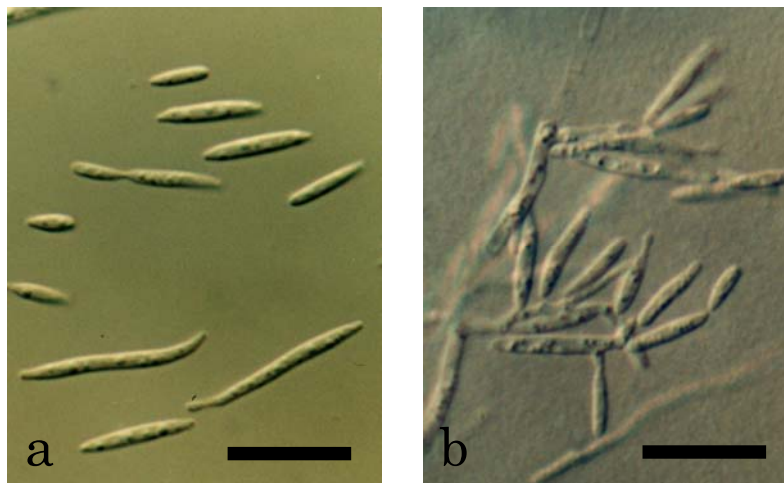


Fig. 8. Light micrographs of *Meira* sp. PFS 002.
 a. Vegetative cells produced on PDA after 3 days at 25°C.
 Scale bar, 10 µm.
 b. Fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C.
 Scale bar, 10 µm.

(Thompson *et al.*, 1994) を用いてアライメント解析を行った。系統解析に用いるため、近縁と推定される菌群の 26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列は、GenBank/EMBL/DDBJ DNA データベースによって検索した。系統樹は Kimura (1980) の進化距離のモデルに基づき、近隣接合法 (Saitou and Nei, 1987) によって作成した。ブートストラップ解析 (Felsenstein, 1985) は 1,000 回の繰り返しによって行い、推定された系統樹は TREEVIEW プログラム (Page, 1996) によって表示した。

(2) 結果

26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列は 5'側および 3'側の両方向から完全にシーケンス解析を行った。各菌株 (PFS 002, PFS 023 および PFS 034) の 26S rDNA の D1/D2 領域は完全に一致したか、1 塩基のみの違いが認められた。これらの菌株と推定される近縁の菌群の D1/D2 領域は 519-633 bp の鎖長でアライメントを行い、655 塩基のトータルアライメント (364 塩基の可変領域) を行った。この結果から作成された系統樹では、PFS 002, PFS 023 および PFS 034 の 3 菌株は *Meira* 属のクラスターに含まれた (Fig. 9)。また、これらの菌株と *Meira* 属の関連種の ITS 1 領域は 173-184 bp, また ITS2 領域は 227-256 bp の鎖長であり、ギャップを含めてアライメント解析した結果、PFS 002, PFS 023 および PFS 034 の 3 菌株と *Meira* 属の関連種の ITS1 および ITS2 領域の相同性は、74-76% および 79-85% と低い結果であった (Table 7)。なお、PFS 002, PFS 023 および PFS 034 の 3 菌株の ITS 領域の塩基配列は完全に一致した。

3. 新種記載

供試菌株の形態観察、生化学的性状調査、および分子生物学的系統解析などの結果から、分離菌株 PFS 002, PFS 023 および PFS 034 は同一種であり、かつ *Meira* 属の新種であると結論した。そこで、PFS 002 菌株を基準標本とし、本種を *Meira nashicola* として新種記載した (Yasuda *et al.*, 2006)。

***Meira nashicola* F. Yasuda & H. Otani, sp. nov.**

Coloniae in YPGA post 14 dies ad 25°C valde convexae, cremeo-albae, superficie venosa vel cerebriformi, synnematis obtegentes, margine integra. Coloniae in PDA post 14 dies ad 25°C rigidae, planae, centro nitide cinereo-brunneae, sulcatae vel reticulatae,

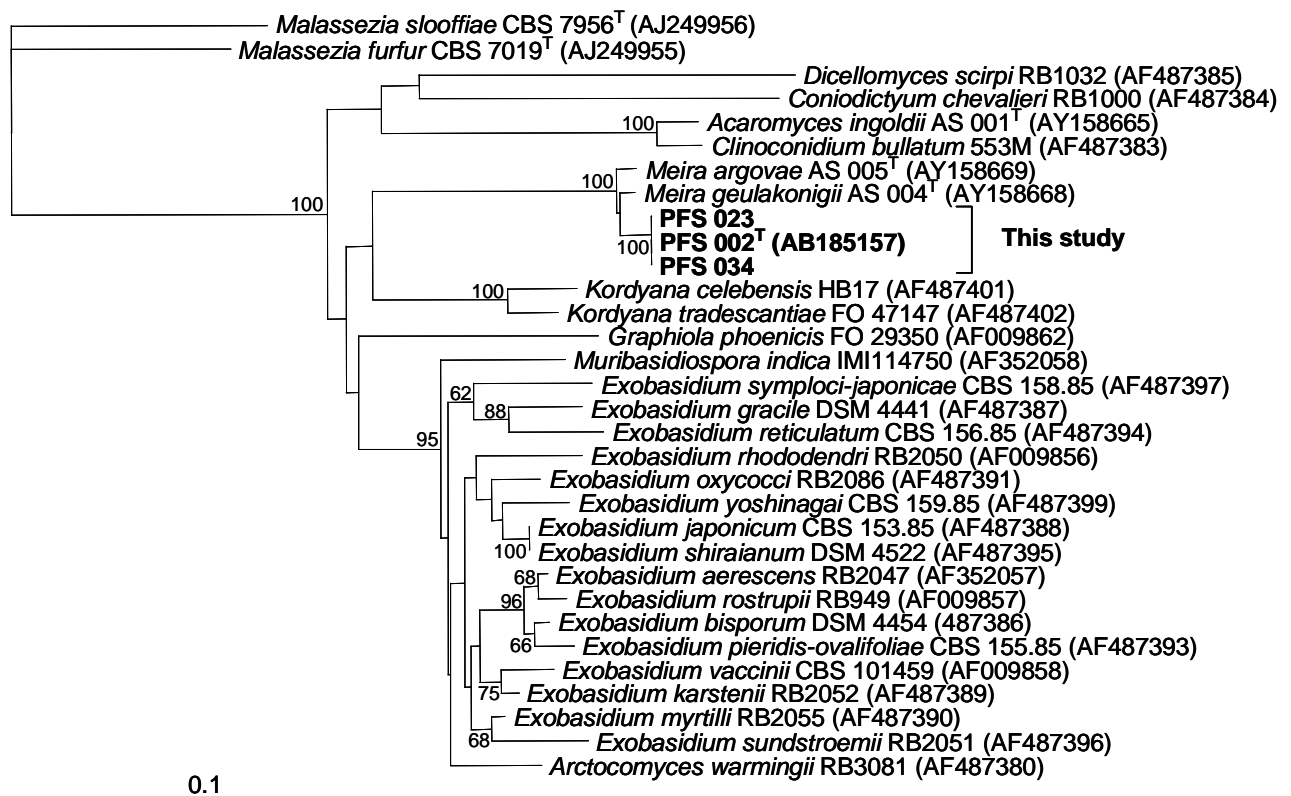


Fig. 9. Phylogenetic tree drawn from neighbor-joining analysis of 26S rDNA D1/D2 domain sequences, depicting the relationship of the strains of *Meira* spp. with closely related species. *Malassezia slooffiae* CBS 7956^T (AJ249956) and *Malassezia furfur* CBS 7019^T (AJ249955) are the relevant outgroup species. Numbers represent percentages from 1000 replicate bootstrap sampling (frequencies of less than 50% are not shown). Bar, 0.1 substitutions per site.

Table 7. Sequence similarity (%) of ITS regions of rDNA among *Meira* spp.^a

Scientific name	Strain	PFS 002 ^T	PFS 023	PFS 034	AS 004 ^T	AS 005 ^T
<i>Meira</i> sp.	PFS 002 ^T	—	100	100	79	85
	PFS 023	100	—	100	79	85
	PFS 034	100	100	—	79	85
<i>M. geulakonigii</i>	AS 004 ^T	76	76	76	—	82
<i>M. argovae</i>	AS 005 ^T	74	74	74	80	—

a) Lower left triangle shows ITS1 similarity, and upper right triangle shows ITS2 similarity. The sequences were aligned including gaps.

T) Type strain.

cum synnematis sursum attenuatis versus margo prostratis obtegentes. Reversum in YPGA et PDA brunneum, pigmento brunneo in agaros diffuenti. Cellulae initiae zymoideae, ellipsoideae, (4-)6-12(-17) × 2-3 μm, blastosporis acrogenis pullulantibus formantes. Hyphae ~ 1.5-3 μm latae, plerumque partim strictura cytoplasmatis orientes, ad septum aliquot constrictae; protuberantiones sterigmatoideae, sympodialiter ramificantes, plerumque juxta septum hyphae formatae, catenas conidiorum proferentes; blastoconidia fusiformia, (4-)5-15 × 2-3 μm. Fermentatio pro glucosum nulla. Assimilatio melezitiosum, potassium nitratum, sodium nitritum et L-lysinum positiva; assimilatio inulinum, glycerolum, ribitolum, citratum et glucono-δ-lactonum negativa.

Holotypus: MAFF 230028 (originaliter ut PFS 002), cultura viva ex fructu *Pyri pyrifoliae* Nakai var. *cultae* Nakai, Tohaku-cho, Tottori Pref. in Japonia, Sept. 2001, a F. Yasuda leg. et isolata et ea in Herbario “Genebank, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan” conservatus. Isotypus: CBS 117161.

YPGA で 14 日培養 (25°C) 後のコロニーは、凸形、乳白色、ひだ状～大脳のしわ様の表面で分生子柄束に覆われ、全縁である。PDA で 14 日間培養 (25°C) 後のコロニーは、表面がなめらかで、冠毛があり、中央に光沢があり、灰褐色、縦うねのある～網目状、外縁に向かって先細りで分生子柄束に覆われる。YPGA と PDA では褐色の色素を産生し、培地の裏面が褐色となる。培養初期には楕円体の酵母細胞で増殖し、大きさは(4-)6-12(-17) × 2-3 μm で、両極出芽する。菌糸は直径 1.5-3 μm で、隔壁付近の小柄状の構造物の先端に大きさが(4-)5-15 × 2-3 μm の紡錘形の出芽型胞子を形成し、仮軸分岐する。グルコースの発酵性は陰性である。メレジトース、硝酸カリウム、亜硝酸ナトリウム、L-リジンは同化される。イヌリン、グリセロール、リビトール、クエン酸、グルコノ-δ-ラク톤は同化されない。

Meira nashicola の正基準標本 (Holotype) である PFS 002 株は、2001 年 9 月に鳥取県のナシ園から採取した汚れ果症状を示す果実から分離された。本菌株は、農業生物資源ジーンバンク (茨城県つくば市) に MAFF 230028 として寄託された。副基準菌株 (Isotype) は、Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS ; オランダ Utrecht) に CBS 117161 として寄託された。

第6節 分離菌の病原性

(1) 材料および方法

実験1－鳥取県園芸試験場内圃場に栽植された‘ゴールド二十世紀’16年生樹を供試し、2003年5月26日、6月23日、7月30日および8月21日の4回、供試菌株 (*A. ingoldii* PFS 007 株, *M. nashicola* PFS 002 株および *Hyalorendron* sp. OK 001 株) を PDA 平板培地で10日間培養し、滅菌蒸留水で調製した分生子懸濁液 (10^8 conidia/ml 以上) を健全幼果の果面に噴霧接種した。接種後の幼果は、直ちにポリエチレン袋で被覆し、24時間温室条件とした。その後、ポリエチレン袋を除去し、慣行栽培に用いられる果実袋によって果実を被覆して、収穫期まで慣行栽培を行った。幼果への接種は菌株あたり10果ずつ行い、試験に供試した果実は、2003年9月8日に発病調査を行った。接種によって発病が認められた果実からは、第4節の方法により接種菌の再分離を行った。

実験2－鳥取県東伯郡琴浦町現地圃場に栽植された‘ゴールド二十世紀’5年生樹を供試し、供試菌株 (*M. geulakonigii* PFS 014 株および *P. aphidis* PFS 037 株) を PDA 平板培地で10日間培養し、滅菌蒸留水で調製した分生子懸濁液 (10^8 conidia/ml 以上) を、2005年6月29日および7月26日に健全幼果の果面に噴霧接種した。接種後直ちに、慣行栽培で用いられる果実袋によって接種後の幼果を被覆し、収穫期まで慣行栽培を行った。幼果への接種は菌株あたり10果ずつ行い、試験に供試した果実は、2005年9月5日に発病調査を行った。接種によって発病が認められた果実からは、第4節の方法により接種菌の再分離を行った。

(2) 結果

実験1－*A. ingoldii* PFS 007 株, *M. nashicola* PFS 002 株および *Hyalodendron* sp. OK 001 株を健全な‘ゴールド二十世紀’幼果に噴霧接種すると、収穫期の成熟した果実に赤褐色のアザが再現された (Fig. 10)。また、これらの菌を接種して再現された果実の病徴は類似しており、病斑の大きさや褐変程度に違いは認められなかった。しかし、病徴が再現されたのは、2003年6月23日に接種した場合のみであり、その前後の時期の接種では病徴は再現されなかった (Table 8)。なお、分離菌の接種により発病した果実の果面から



Fig. 10. Stain symptoms on mature fruits of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki, artificially inoculated with conidial suspensions of *Acaromyces ingoldii* PFS 007 (left) and *Meira nashicola* PFS 002 (middle). The fruits on the right are the control (non-inoculated).

Table 8. Disease incidence on fruits of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki after inoculation with *Acaromyces ingoldii*, *Meira nashicola*, *Hyalodendron* sp. or distilled water

Isolate	Number of diseased fruits ^{a)}			
	Inoculation date			
	26 May	23 Jun.	30 Jul.	21 Aug.
<i>A. ingoldii</i> PFS 007	0/10	8/10	0/10	0/10
<i>M. nashicola</i> PFS 002	0/10	7/10	0/10	0/10
<i>Hyalodendron</i> sp. OK 001	0/10	9/10	0/10	0/10
Control (D.W.)	0/10	0/10	0/10	0/10

a) Conidial suspension $>1 \times 10^8$ conidia/ml of *A. ingoldii* PFS 007, *M. nashicola* PFS 002, *Hyalodendron* sp. OK 001, or D.W. (control) was inoculated onto young fruit surface of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki on 26 May, 23 June, 30 July, or 21 August, 2003. The number of diseased fruits in the 10 fruits was counted on 8 September, 2003.

は、接種菌が再分離された。

実験 2 – *M. geulakonigii* PFS 014 株および *P. aphidis* PFS 037 株を健全な ‘ゴールド二十世紀’ 幼果に噴霧接種した結果、収穫期の成熟した果実に赤褐色のアザが再現され (Fig. 11), 2005 年 6 月 29 日および 7 月 26 日のいずれの接種時期においても高い発病率を示した (Table 9)。なお、分離菌の接種により発病した果実の果面からは、接種菌が再分離された。

本試験に供試した担子菌系酵母様菌の各菌株は、ナシ果実に対して汚れ果症状を引き起こす病原性が立証され、特に 6-7 月の高温多湿条件の続く梅雨期の感染によって、病徴を引き起こすことが明らかとなった。また、再現された汚れ果症状は、既報 (貞松・実松, 1983 ; 那須・中桐, 1997) の *Alternaria* sp., *Hyalodendron* sp., *Phomopsis* sp. および *Stenella* sp. などの糸状菌による汚れ果症状と極めて類似した。新たに病原性が立証された担子菌系酵母様菌の *A. ingoldii*, *M. nashicola*, *M. geulakonigii* および *P. aphidis* による病徴は、既報の病原菌による病徴と区別が困難であるため、これらの酵母様菌をナシ汚果病 (英名: fruit stain of Japanese pear) の病原に追加した (安田ら, 2005a; ; Yasuda *et al.*, 2006 ; 安田ら, 2007a)。なお、分子生物学的系統解析の結果などから、本病の病原に記録されている *Hyalodendron* sp. は *A. ingoldii* と同一種であると考えられた (安田ら, 2005a)。

第 7 節 特異的プライマーを用いた PCR 検出

酵母様菌を含む酵母類の同定には、第 4 節で述べたように、形態的特徴、生化学的性状および rDNA 部分塩基配列などを比較して行われる。しかし、酵母様菌の形態的特徴や生化学的性状の種間差異はわずかであり、生化学的性状調査の基準となる培養的性質は実験者の技量に左右され、結果判定に主観が入りやすいという欠点がある。また、判定に至るまでに多大な時間と労力を要するため、日常的な病害診断には不向きである。しかし、各微生物種に特有の塩基配列をもとに設計された特異的プライマーを用いた PCR によって、目的の病原菌の DNA を高感度に検出可能であり、簡便で迅速な病原菌の同定が可能となる。そこで、本節では第 4 節で得られたナシ汚果病の病原菌である担子菌系酵母様菌を PCR 検出するための種特異的プライマーを設計し、病原菌の簡易同定への応用を検討した。



Fig. 11. Stain symptoms on mature fruits of cv. Gold Nijisseiki, artificially inoculated with conidial suspension of *Meira geulakonigii* PFS 014 (a) and *Pseudozyma aphidis* PFS 037 (b). The fruit on the right (c) is the control (distilled water).

Table 9. Disease incidence on fruits of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki after inoculation with *Meira geulakonigii*, *Pseudozyma aphidis*, or distilled water

Isolate	Number of diseased fruits ^{a)}	
	Inoculation date	
	29 Jun.	26 Jul.
<i>M. geulakonigii</i> PFS 014	10/10	10/10
<i>P. aphidis</i> PFS 037	10/10	8/10
Control (D.W.)	0/10	0/10

a) Conidial suspension $>1 \times 10^8$ conidia/ml of *M. geulakonigii* PFS 014, *P. aphidis* PFS 037, or D.W. (control) was inoculated onto young fruit surface of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki on 29 June or 26 July, 2005. The number of diseased fruits in the 10 fruits was counted on 5 September, 2005.

(1) 材料および方法

第 4 節で明らかとなったナシ汚果病の罹病果実から得られた担子菌系酵母様菌の各分離菌株および各菌種の基準菌株の rDNA ITS 領域の塩基配列は、DNASIS-Mac v.3.2 (日立ソフウェアエンジニアリング) を用いてアライメント解析を行い、それぞれに特異的な塩基配列から特異的プライマーセット (AIF50/AIR295, MNF70/MNR453, MGF361/MGR531, PAF38/PAR720) を設計した (Figs. 12-15, Table 10)。各菌株をブドウ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地で 25°C (暗黒下)、8-10 日間振とう培養後、培養液を遠心分離 (12,000×g) し、上清を除去して 15-20 mg の菌体を回収した。DNA の抽出は、FastDNA Kit (BIO101) を用い、添付されたプロトコールに従った。抽出した DNA 溶液は 50 倍に希釈した後、分光光度計 (日立ハイテクノロジーズ U-2800) によって OD₂₆₀ 値を測定して DNA 濃度を算出し、10 ng/μl に調製して PCR テンプレートとした。25 μl の PCR 反応液には、10 ng のテンプレート DNA、0.4 μM の各プライマー、0.625 ユニットの TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)、200 μM の各 dNTP および 1×Ex Taq reaction buffer を加えた。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) を用いて、94°C 2.5 分 1 回、94°C 30 秒・56°C 30 秒・72°C 60 秒 30 回、72°C 7 分 1 回の条件で行った。得られた PCR 産物 25 μl のうち 6 μl を 1×TAE buffer で溶解した 2%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色を行った後、イメージアナライザー (タカラバイオ FMBIO II) で画像解析を行った。

(2) 結果

担子菌系酵母様菌 *A. ingoldii*, *M. nashicola*, *M. geulakonigii* および *P. aphidis* にそれぞれ特異的なプライマーセット (AIF50/AIR295, MNF70/MNR453, MGF361/MGR531, PAF38/PAR720) を用いて PCR 反応を行った結果、ナシ汚果病の罹病果実から得られた担子菌系酵母様菌の各分離菌株および各基準菌株のうち、それぞれの組み合わせで特異的に想定分子量の DNA 断片が増幅された (Fig. 16)。増幅された DNA 断片の分子量は、AIF50/AIR295 では 265 bp, MNF70/MNR453 では 404 bp, MGF361/MGR531 では 191 bp, PAF38/PAR720 では 703 bp と推定された。なお、各プライマーと異なる菌種間の組み合わせでの PCR では、DNA 断片の増幅が認められなかったため、設計したプライマーの特異性が確認された。また、*A. ingoldii* 特異的プライマーセット (AIF50/AIR295) を用いた PCR では、*Hyalodendron* sp. OK 001 株の DNA 断片の増幅が認められたため (Fig. 16),

```

1  AAGGATCATT AGGGAATTAT AAAATCGGCT TGCCCCTCTC GAGGGTGCTC
                                     AIF50
51  GCCGTAATTT CTATCCACAA AACACCGTGA ACCCTCGAAA GAGGCGTAAT
101 TTTTTCTATA AAAACACAAA GTCTATGAAA GTAACAAACA TACAAAACAA
151 AATAAAACTT TTGACAACGG ATCTCTTGGT TCTCCCATCG ATGAAGAACG
201 CAGCGAAACG CGATAGGTAT TGTGAATTGC AGAATCAGGG AATCATCGAA
251 TTTTGAACG CACCTTGCGC TCCCTGGTAT TCCTAGGAGC ATGCCTGTTT
301 GAGTGTTGAT AGCCTCTCCA AACCTTGGTT TTTTATTAAA TCGAGTGCTT
      AIR295
351 TGGGTCCCTG GGCCTGTAGC GGCGACGTTA CTTGCCTTAA AAGGATCAAA
401 GAAGACCCAA TCGGATGTTA AGCATGATAT CCTTTGGGGT CTTTGAACGA
451 CTATAAACTA TACATACAAC CTCAAATCAG GTAGGACTAC CCGCTGAACT
501 TAA

```

Fig. 12. Partial sequence of the complete internal transcribed spacer (ITS) regions including 5.8S rDNA of *Acaromyces ingoldii* strain PFS 007 (accession number: AB185160, Yasuda *et al.*, 2005a). Arrows indicate the relative priming positions primers AIF50 and AIR295 designed for the specific PCR.


```

1  AAGGATCATT AGAGAATTTT TAGGGATTGA TTTCGATCTT CCCGAACCTT
51  TTTTCTTAT  CCTAACACCC TGTGCATCGT GGAGTGTATG TAATAGTACG
      MNF70
101 CTCCACAATT CTTATCACAC AAACCTCTATG TTTTTTTGAA CGTAAAACAA
151 GTGTTAATTT TATTTAACCA AATAACAAAT TAATAACTTT TGACAACGGA
201 TCTCTTGGTT CTCCCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAACGC GATAGGTAAT
251 GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG CATCTTGCGC
301 TCCTTGGTAT TCCTCGGAGC ATGCCTGTTT GAGTGTCGTG AATATCTCCA
351 TTAAAAGGTT TTTTTTTATG AAAAATTCTT TTAACGGGTC CTGGGGCTTG
401 GTGATGAGAT TAGCCTCTTT GTATCACCTT GCCTTAAAAG TATGAGTGGA
451 TGAGTGTGAG CCATAGATTT TTGTTAAGGC AAACCCATAA AAATCTTGTG
      MNR453
501 CTTTTGTCAT CTGCTACCAA ACAAACACAC ACATACATAA TTCTTTATGT
551 ATTCCTTTCT GGCCTCAAAT CAGGTAAGAT TACCCGCTGA ACTTAA

```

Fig. 13. Partial sequence of the complete internal transcribed spacer (ITS) regions including 5.8S rDNA of *Meira nashicola* strain PFS 002^T (accession number: AB185159, Yasuda *et al.*, 2005a). Arrows indicate the relative priming positions primers MNF70 and MNR453 designed for the specific PCR.

```

1  AAGGATCATT AGAGAATTTT TAGGGATTGA TTTCGATCTT CCCGAACCTT
51  CTTTTTCATC CTAAACACCT GTGCATTTGT TTGTTTGTGC GAAAAAACAC
101 AAACAAACAA ACAATTTTAA ACACACAAAC ACTATGTTTT TTTGAACGTA
151 AAAAAATATTT TAACAAATAT ACAACTTTTG ACAACGGATC TCTTGGTTCT
201 CCCATCGATG AAGAACGCAG CGAAACGCGA TAGGTAATGT GAATTGCAGA
251 ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA TCTTGCCTC CTTGGTATTC
301 CTCGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCGTGAA TTTCTCCAAA AAGAAGTTTT
351 TTTTTTATGA AATCCTTCTT TGCGGGTCCT TGGGCTTGGT GATTACATAG
      MGF361
401 CCTCTTTGTA TCACCTTGCC TTAAATGTAT GAGTGGATGA GTGTCAGCCA
451 TAGATTTTTG TTAAGGCAAA CCCATAAAAA TCTTGTGCTT TTGTCATCTG
501 CTTCCTAACA ACCAAAATAC ACACACACTA TTTTCGGATA GAGTGAGTTT
      MGR531
551 ATCATTCTTT CTGGCCTCAA ATCAGGTAAG ATTACCCGCG AATTAA
      MGR531

```

Fig. 14. Partial sequence of the complete internal transcribed spacer (ITS) regions including 5.8S rDNA of *Meira geulakonigii* strain PFS 014 (accession number: AB204894, Yasuda *et al.*, 2007a). Arrows indicate the relative priming positions primers MGF361 and MGR531 designed for the specific PCR.

```

1  ATGGATCATT TCGATGAAAA CCTTTTTTCT TGAGGTGTGG CTCGCACCTG
                                     PAF38
51  TCTAACTAAA TCGAGCTACC ACATTTTAAC ACGGTTGCAT CGGTTGGCTG
    TCTAACTAAA
101 TCAAACAGTG CGCGCGGCGA TTTATTTTCGC CTCCCCGCGC ATTGCCGAGA
151 CGGTTCGACAT TTACCAAAAA CACTGTTGAT ACCATAGGAT TTGAACGTAG
201 ATGAAACTCG ACTGGTAATG CGGTCGTCTA AAATCTAAAA ACAACTTTTG
251 GCAACGGATC TCTTGGTTCT CCCATCGATG AAGAACGCAG CGAATTGCGA
301 TAAGTAATGT GAATTGCAGA AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACCTT
351 GCGCTCCCGG CAGATCTAAT CTGGGGAGCA TGCCTGTTTG AGGGCCGCGA
401 ATTGTTTCGA ACGACAGCTT TCTTATTTAG TTGAGAAAGC TGGCGGATCG
451 GTATTGAGGG TCTTGCCATC TTCCACGGTG GCTCCCTCGA AATGCATTAG
501 CGCATCCATT CGATAGGCAA GACGGACGAA AGCTCGTTAT TTCGCCACG
551 TCTTTCCCTG CCGGGTTTTG ATAATATCAG GACTTCGGAG AGGAGAGGCG
601 CAGGGTCGAG GAGCTGGACG CGACGTTTTG CTGGTTGGAG TGCTTCTGAA
651 CCCC GCCCAT GCCTCGCTTC TTTGGAAGAG AGGAAGGGAT TTAATTTCAA
701 TTCATCGGCC TCAGATTGGT AGGACTACCC GCTGAACTTA AGCATATCA
                                     PAR720

```

Fig. 15. Partial sequence of the complete internal transcribed spacer (ITS) regions including 5.8S rDNA of *Pseudozyma aphidis* strain PFS 037 (accession number: AB204896, Yasuda *et al.*, 2007a). Arrows indicate the relative priming positions primers PAF38 and PAR720 designed for the specific PCR.

Table 10. Oligonucleotides designed for species specific PCR

Primer	T _m	5'-3' nucleotide sequence	Target fungus	Fragment length
AIF50	63.3	CGCCGTAATTTCTATCCACA	<i>A. ingoldii</i>	265 bp
AIR295	56.7	GGCTATCAAACTCAAACAG		
MNF70	59.8	CTGTGCATCGTGGAGTGTAT	<i>M. nashicola</i>	404 bp
MNR453	59.1	CAAAAATCTATGGCTGACACT		
MGF361	69.1	AATCCTTCTTTGCGGGTCCTT	<i>M. geulakonigii</i>	191 bp
MGR531	56.9	TAAACTCACTCTATCCGAAAA		
PAF38	65.3	TGGCTCGCACCTGTCTAACTA	<i>P. aphidis</i>	703 bp
PAR720	61.8	TAAGTTCAGCGGGTAGTCCTA		

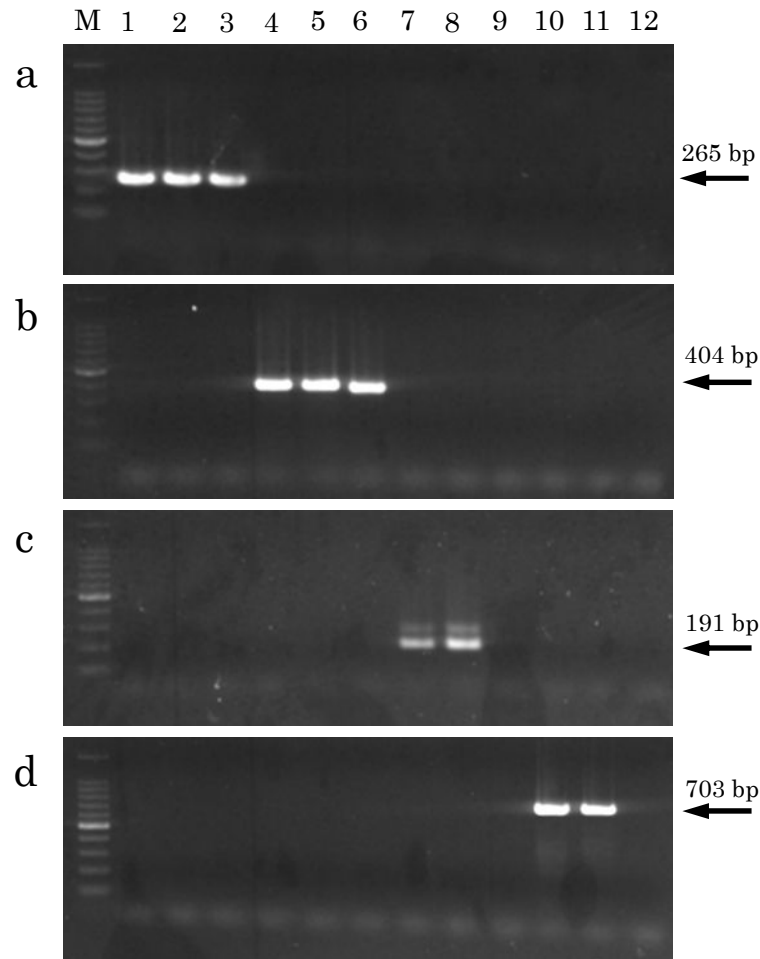


Fig. 16. PCR amplification using species specific primer pairs AIF50/AIR295 for *Acaromyces ingoldii* (a), MNF70/MNR453 for *Meira nashicola* (b), MGF361/MGR531 for *Meira geulakonigii* (c), and PAF38/PAR720 for *Pseudozyma aphidis* (d). Lane 1, *A. ingoldii* PFS 007; Lane 2, *A. ingoldii* AS 001^T; Lane 3, *Hyalodendron* sp. OK 001; Lane 4, *Meira nashicola* PFS 002^T; Lane 5, *M. nashicola* PFS 023; Lane 6, *M. nashicola* PFS 034; Lane 7, *M. geulakonigii* PFS 014; Lane 8, *M. geulakonigii* AS 004^T; Lane 9, *M. argovae* AS 005^T, Lane 10, *Pseudozyma aphidis* PFS 037; Lane 11, *P. aphidis* DSM 70725^T, Lane 12, Negative control.

本実験からも *Hyalodendron* sp.は *A. ingoldii* と同一種である可能性が強く示唆された。

第8節 感染様式の解析

1. 罹病果実果皮切片の光学顕微鏡観察

(1) 材料および方法

2004年9月に鳥取県東伯郡琴浦町の現地圃場から採取したナシ汚果病に罹病した‘ゴールド二十世紀’の果実を採取し、光学顕微鏡 (Olympus BX51) による果皮の切片観察の試料とした。また、対照として本病の発生の認められない隣接圃場から採取した‘二十世紀’および‘ゴールド二十世紀’の健全果実を供試した。試料は、果皮の切片 (7×7×7 mm) を切り出し、FAA固定液で固定した後、上昇エタノール系列で脱水し、テクノビッド 7100 (Heraeus Kulzer) によって樹脂包埋した。樹脂包埋した試料はマイクロトーム (大和光機工業 NS-31) を用いて 2-3 μm の薄片に切り出した。この薄片をスライドガラス上に伸展し、0.03% トルイジンブルー染色液で染色して、光学顕微鏡観察を行った。

(2) 結果

健全な‘二十世紀’および‘ゴールド二十世紀’の収穫果実の果皮はクチクラ層、表皮細胞、亜表皮細胞および皮層などで構成されており、表皮の外側はクチクラ層でほぼ完全に覆われていたのに対し、汚果病症状を示す罹病果実の果皮は、果皮の階層構造が不明瞭であり、一部に壊死していると思われる細胞が観察された (Fig. 17)。また、クチクラ層の一部に亀裂 (クチクラ亀裂)、または部分的に欠損している状態が観察された。罹病果実の表皮には酵母様菌などの病原菌は観察されなかった。

2. 罹病果実の果皮切片の透過型電子顕微鏡観察

光学顕微鏡による罹病果実の果皮を観察した結果、微細な果皮構造や病原菌の存在が確認できなかったため、果皮の超薄切片による透過型電子顕微鏡 (以下、TEM) 観察を行った。

(1) 材料および方法

2005年9月に鳥取県東伯郡琴浦町の現地圃場から採取したナシ汚果病に罹病した‘ゴールド二十世紀’の果実を採取し、TEM観察の試料とした。また、対照として本病の発生が

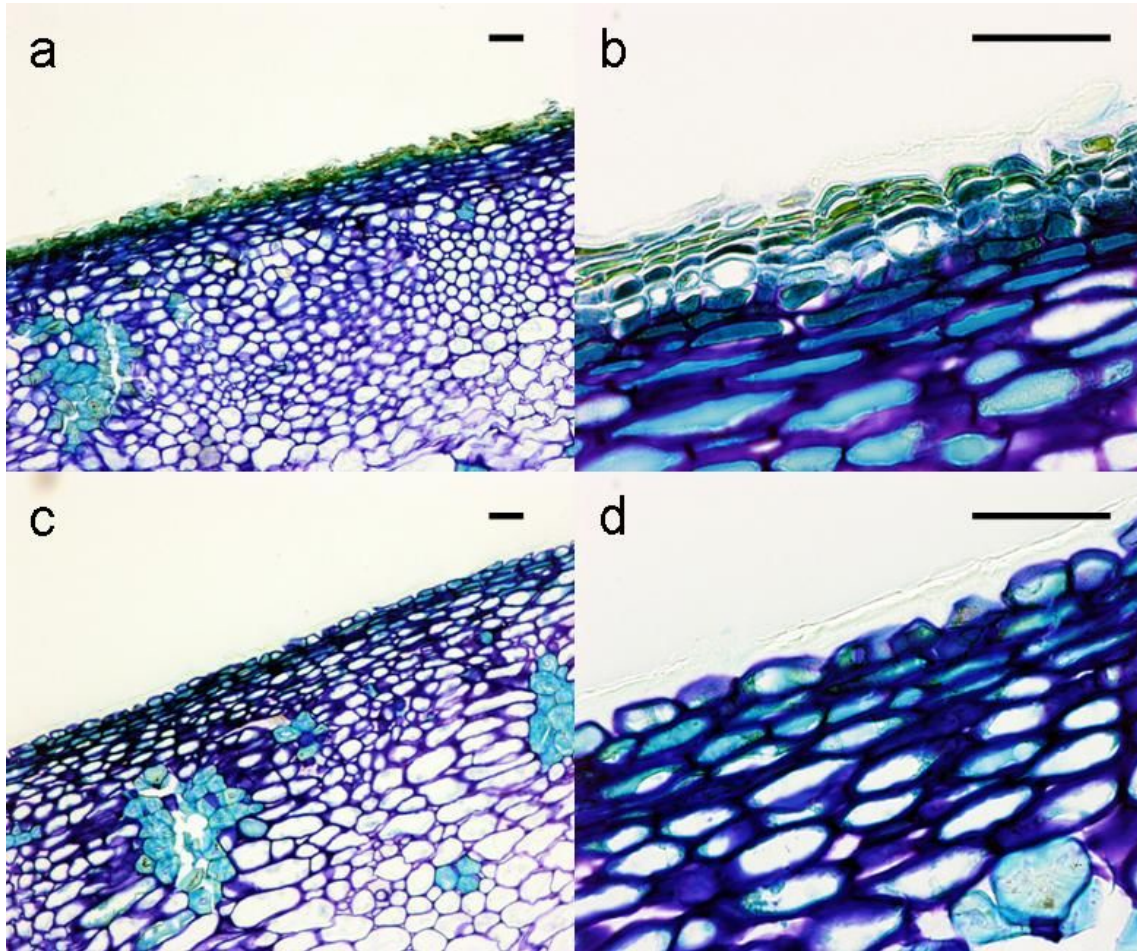


Fig. 17. Epidermal structure of mature fruits of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki.

a. Cross section of severe fruit stain. Scale bar, 100 μm .

b. Macrograph of cross section of severe fruit stain. Scale bar, 100 μm .

c. Cross section of healthy fruit (control). Scale bar, 100 μm .

d. Macrograph of cross section of healthy fruit (control). Scale bar, 100 μm .

認められない隣接圃場から採取した‘ゴールド二十世紀’の健全果実を供試した。TEM 観察の試料は、果皮の切片 (2×1×1 mm) を切り出し、2.5%グルタルアルデヒド固定液および 1%オスミウム酸固定液で固定した。0.9%塩化ナトリウム溶液に浸漬してリン酸を除去した後、上昇エタノール系列で脱水し、Spurr 樹脂 (Polysciences) によって樹脂包埋した。樹脂包埋した試料はダイヤモンドナイフを取り付けたウルトラマイクロトーム (Porter-Blum MT-1) を用いて超薄切片を切り出した。これをフォルムバル膜を張ったグリッドに伸展し、4%酢酸ウラン溶液および 0.4%クエン酸鉛溶液で染色した後、TEM (日立 H-7100) を用いて観察した。

(2) 結果

健全果実の果皮表面は電子密度の違いにより、外側からワックス層、クチクラ層、ペクチン層、セルロース層に分かれており、その直下に表皮細胞が観察された (Fig. 18)。一方、汚れ果症状を示す罹病果実の果皮には、ペクチン層まで達する亀裂がしばしば観察され、一部はセルロース層に達して表皮細胞が露出しており、この部分の表皮細胞は変性または壊死して、汚果病の病原酵母様菌の菌糸が観察された (Figs. 19a-b)。また、壊死した表皮細胞内には病原酵母様菌の菌糸が観察された (Fig. 19c)。病原酵母様菌の付着器および貫入菌糸などの形成は認められなかったため、本菌の感染様式はクチクラ感染によるものではなく、傷口感染によるものであると考えられた。

第9節 考 察

ニホンナシの‘二十世紀’など青ナシ品種では以前から収穫果実の汚れ果が発生しており、果実品質を著しく低下させるため、減収要因の一つとして生産上の問題であった。特に、1960年代後半に果実袋に防菌剤として処理されてきた有機水銀剤が使用中止になった後に、糸状菌によると思われる赤～黒色の果面の汚れ症状が多発して全国的な問題となった。田中 (1977) は、青ナシの果面の汚れ症状を赤アザ型、尻黒型および黒点型に分類し、それぞれの発病果実から分離される糸状菌について、赤アザ型病斑からは *Penicillium* 属菌、尻黒型病斑からは *Penicillium* 属菌に加えて *Alternaria* 属菌や *Phomopsis* 属菌などの分離率が高い傾向であることを示した。その後の調査研究によって、貞松・実松 (1983) は、‘二十世紀’ナシの汚れ果から分離した *Alternaria* sp. と *Phomopsis* sp. の病原性を立証し、

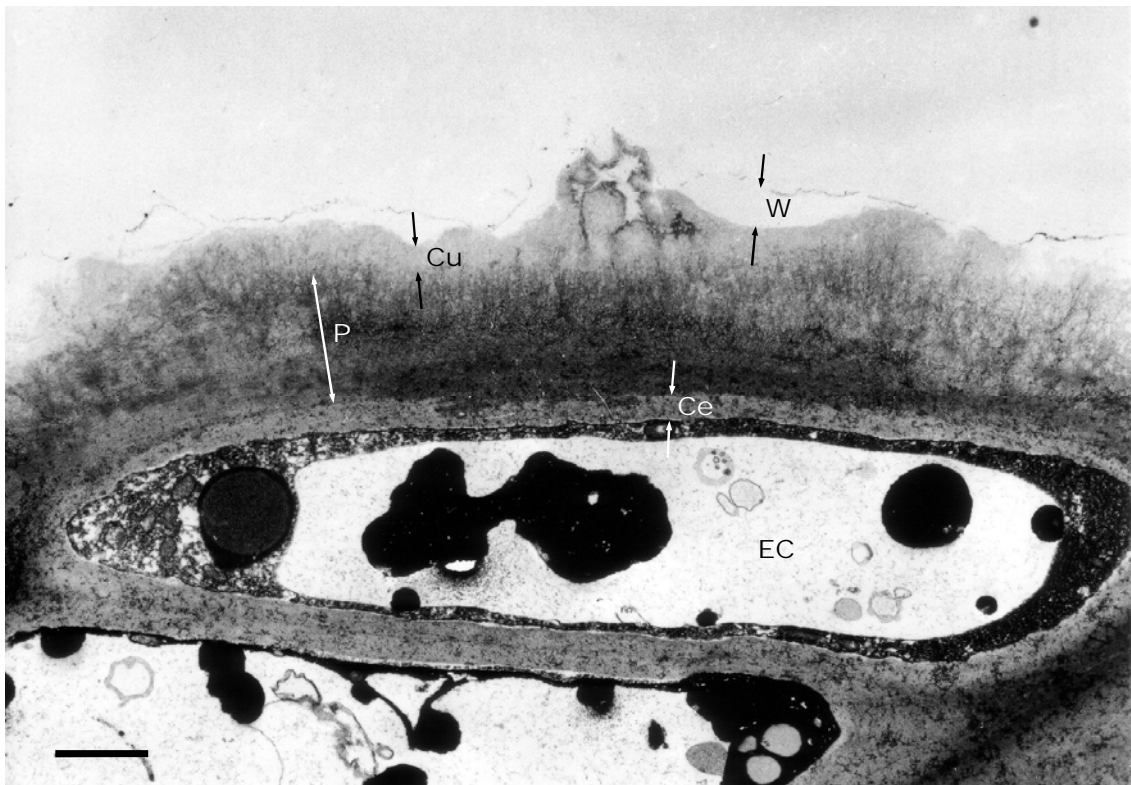


Fig. 18. Ultrastructure of epidermis of healthy mature fruit of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki showing a wax layer (W), a cuticle layer (Cu), a pectin layer (P), a cellulose layer (Ce), and epidermal cells (EC). Scale bar, 2 μ m.

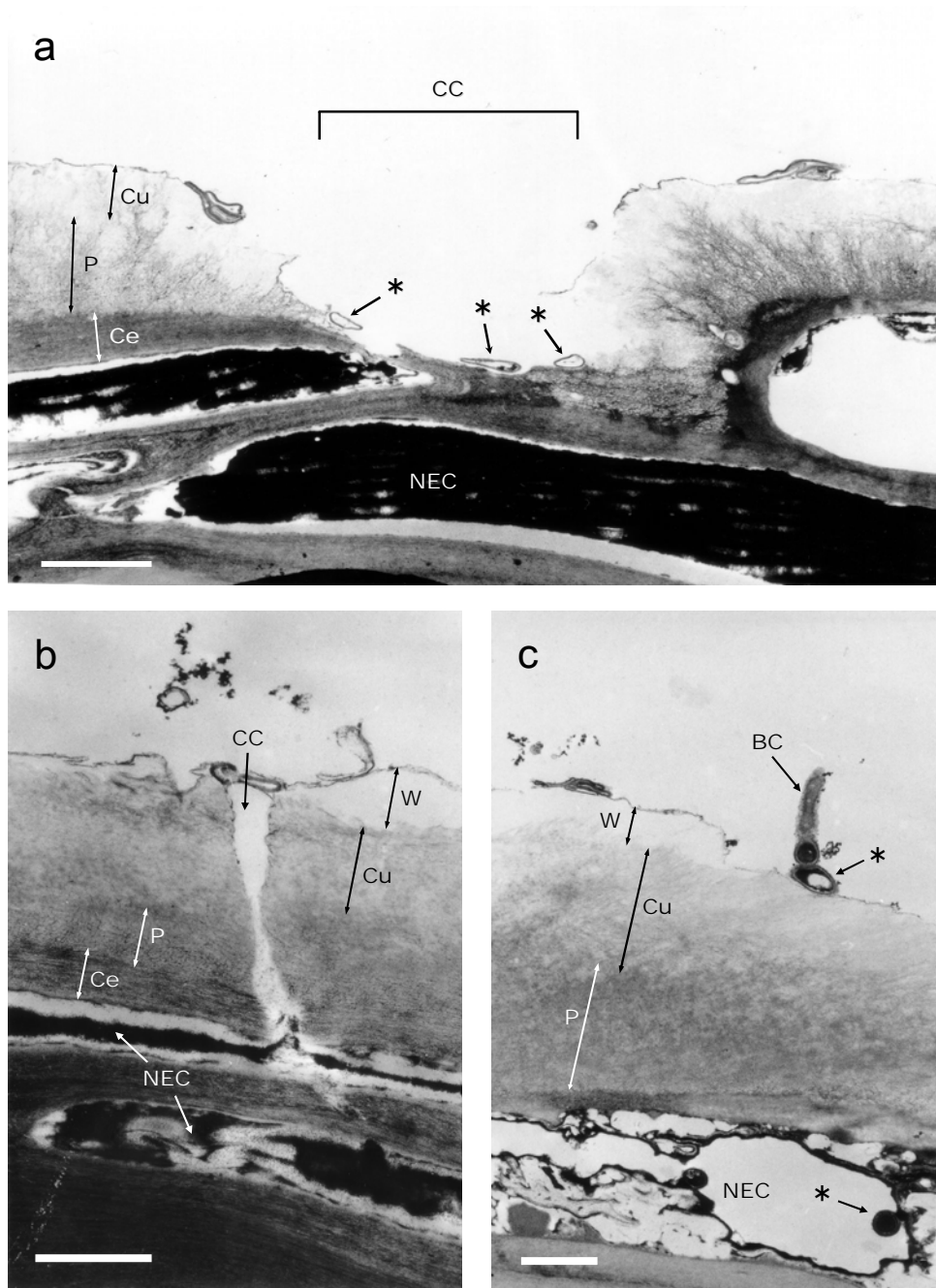


Fig. 19. Ultrastructure of epidermis of severe fruit stain of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki showing a wax layer (W), a cuticle layer (Cu), a pectin layer (P), a cellulose layer (Ce), and necrotic epidermal cells (NEC).

a. Hyphae (asterisk) of yeastlike fungus on a cuticle cracking (CC) from a wax layer down to a cellulose layer (Ce). Scale bar, 2 μm .

b. A cuticle cracking (CC) down to a necrotic epidermal cell (NEC). Scale bar, 1 μm .

c. Blastoconidia (BC) of yeastlike fungus produced on a cuticle layer (Cu) and hyphae (asterisk) observed on a cuticle layer (Cu) and in a necrotic epidermal cell (NEC). Scale bar, 1 μm .

赤アザ型の汚れ果に病名を与えてナシ汚果病と記録した（日本植物病理学会編，2000）。また，那須・中桐（1997）は，青ナシの赤アザ型病斑より分離した *Hyalodendron* sp. と *Stenella* sp. の病原性を確認し，本病の病原として追加した。なお，田中（1977）によると，黒点型の果面の汚れ症状からは雑菌的な菌しか分離されず，生理障害が原因であると指摘している。

近年，鳥取県内においてニホンナシ‘二十世紀’および‘ゴールド二十世紀’の青ナシ品種に特徴的なカビ臭と赤アザ症状をともなうカビ梨症と呼ばれる汚れ果症状が一部地域で多発し，問題となった。カビ梨症果実には，糸状菌によって引き起こされるナシ汚果病に類似した赤アザ様の汚れ果症状が認められるため，カビ梨症はナシ汚果病の一症状であると推定し，既に報告されている本病の病原菌との関係について調査を行った。カビ梨症果実から菌を分離した結果，ナシ汚果病の病原であることが明らかとなった担子菌系酵母様菌の *A. ingoldii*, *M. nashicola*, *M. geulakonigii*, および *P. aphidis* が高率に分離されたが，それ以外にも *Alternaria* 属菌，*Botryosphaeria* 属菌，*Penicillium* 属菌などの糸状菌も多く分離され，田中（1977），貞松・実松（1983）および那須・中桐（1997）の結果とほぼ一致した。

本研究では，鳥取県内のカビ梨症果実から分離した菌株 PFS 007 の形態，生化学的性状，26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列などの調査から，PFS 007 株を担子菌系酵母様菌の *A. ingoldii* であると同定した。本菌は Boekhout *et al.*（2003）によって創設された属および種であり，本種が *Acaromyces* 属の基準種として記載されている。これまでに，那須・中桐（1997）は，岡山県で発生したナシ汚果病から分離した菌を *Hyalodendron* sp. と同定し，本病の病原として記録した（日本植物病理学会編，2000）が，鳥取県で発生したカビ梨症果実から得られた分離菌株 PFS 007 は，形態的には *Hyalodendron* 属の記載（Diddens, 1934; Barron, 1968; de Hoog, 1979; 那須・中桐, 1997）とほぼ一致した。また，PFS 007 株は岡山県のナシ汚果病罹病果実から分離された *Hyalodendron* sp. OK 001 株と形態的特徴が類似し，26S rDNA の D1/D2 領域および 5.8S rDNA を含む ITS 領域の塩基配列が 99% 以上一致した。これは PFS 007 株と *Hyalodendron* sp. OK 001 株が近縁種または同一種であることを示唆している。しかし，近年，Boekhout *et al.*（2003）は，*Hyalodendron* 属菌と形態的に極めて類似する *Acaromyces* 属を創設し，これらは出芽型胞子を連鎖して形成する点などで形態的に類似するため両者の外観的な区別は極めて困難としたうえで，分子系統解析の結果から，*Acaromyces* 属はクロボキン綱

(Ustilaginomycetes) に属すると考えられるが、*Hyalodendron* 属は菌蕈綱 (Hymenomycetes) に分類されるため (Guého *et al.*, 1993), 両者を明確に区別すべきであると指摘した。したがって、ナシ汚果病の罹病果実から分離された PFS 007 株と *Hyalodendron* sp. OK 001 株は、Boekhout *et al.* (2003) に従い、*Acaromyces* 属菌として取り扱うことが妥当であると考えられた。また、*A. ingoldii* と *Hyalodendron* 属の基準種 *H. lignicola* は 26S rDNA の D1/D2 領域および ITS 領域における塩基配列の相同性が低い点からも両者は系統分類学的に近縁ではないことが明らかである。なお、Fell and Scorzetti(2004)は、菌蕈綱 (Hymenomycetes) に属する酵母類の分子系統解析の結果から、*Hyalodendron* 属の基準種 *H. lignicola* を *Trichosporon* 属へ転属処理を行い、*Trichosporon lignicola* (Diddens) Fell & Scorzetti を記載している。

また、本研究で本病の病原菌であることが明らかとなった *M. nashicola* および *M. geulakonigii* は *A. ingoldii* と同様に Boekhout *et al.* (2003) が創設した担子菌系酵母様菌の *Meira* 属菌であり、クロボキン綱 (Ustilaginomycetes) に属すると考えられる。なお、*M. nashicola* は本研究によって記載された新種であり (Yasuda *et al.*, 2006), ナシ汚果病の罹病果実から高率に分離されたため、種名を *nashi* (ニホンナシ) -*cola* (棲息者) と命名した。

本研究でナシ汚果病菌であることが明らかとなった *A. ingoldii*, *M. nashicola* および *M. geulakonigii* はともにクロボキン綱 (Ustilaginomycetes) のモチビョウキン亜綱 (Exobasidiomycetidae) に属すると考えられ、*P. aphidis* はクロボキン綱 (Ustilaginomycetes) のクロボキン科 (Ustilaginaceae) に属する担子菌系酵母様菌のアナモルフであり、多くの共通点を持つ点で大変興味深い。クロボキン綱 (Ustilaginomycetes) に属する担子菌系酵母様菌の生活環は複雑であり、これらの菌の多くは酵母細胞世代と菌糸形態を有し、さらに完全世代と不完全世代の二形性を示す場合も認められる。このため、最近では形態学的な分類に加えて 26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列情報を基にした担子菌系酵母および酵母様菌の分子生物学的な系統分類が進められている (Begerow *et al.*, 2000 ; Begerow *et al.*, 2002 ; Fell *et al.*, 2000)。

ところで、ナシ汚果病の病原菌であることが明らかとなった担子菌系酵母様菌は、PDA や YPGA などの寒天培地上で暗褐色～茶色の色素を出し、培地を変色させる性質を有する。おそらく、ナシの果面上においてもこれらの菌は色素を放出すると考えられ、これが果面に発生する赤アザ型病斑の原因となっている可能性が高い。また、Boekhout *et al.* (2003)

によると、*A. ingoldii*, *M. geulakonigii* および *M. argovae* はいずれも植物葉面上のハダニ類の死骸から分離されていることから、これらの担子菌系酵母様菌はハダニ類の天敵病原糸状菌である可能性が高いことが指摘されており、カンキツのハダニ類およびサビダニ類に対する天敵資材としての利用が試みられている (Paz *et al.*, 2007a ; Paz *et al.*, 2007b)。さらに、本菌は人工接種によって植物葉面上に定着し、うどんこ病菌に対する拮抗作用も示すことが明らかとなっており、植物病原菌とダニ類に対する dual biocontrol agent としての活用が検討されている (Sztejnberg *et al.*, 2004)。なお、*M. nashicola* および *M. geulakonigii* に近縁な *M. argovae* は、愛媛県で採取された *Aciculosporium take* Miyake によって引き起こされるタケ類てんぐ巢病に罹病したマダケの新梢組織からも分離されている (Tanaka *et al.*, 2008) が、本菌のマダケおよびてんぐ巢病菌との関係については不明な点が多い。このように、これらの担子菌系酵母様菌は、日本およびイスラエルから採取した各種植物体およびダニ類から分離されていることが報告されており (Boekhout *et al.*, 2003 ; 安田ら, 2005a ; Yasuda *et al.*, 2006 ; 安田ら, 2007a ; Tanaka *et al.*, 2008), 環境や生態系に適応して広い宿主範囲を有する可能性が考えられる。これらの酵母様菌の有性世代との関連を含む生活環の解明を行うため、今後さらなる調査研究が必要である。

ところで、鳥取県において問題となったカビ梨症果実は、数日間放置しておくとおアザの部分萎縮し、果面に皺が生じる場合が認められる。カビ梨症果実の果面を SEM で観察した場合、‘二十世紀’など青ナシに特有の生理障害である著しいクチクラ亀裂がしばしば観察される。クチクラ亀裂は、収穫前の果実が急激な後期肥大などによって引き起こされる生理障害であり (林, 1960), クチクラ亀裂の生じた果実は果面に無数のひび割れが生じているため、果面には艶が無く、くすんだような果実となる (林・田辺, 1991)。那須 (1998) は、*Stenella* sp. によるセイヨウナシ汚果病の発生原因を解明するため、セイヨウナシ ‘パス・クラサン’ およびニホンナシ ‘二十世紀’ の健全果実を SEM で詳細に観察した結果、汚果病が発生しやすい ‘パス・クラサン’ では果面の構造が立体的で粗造であるのに対し、‘二十世紀’ の場合は比較的平滑であったとしている。さらに、モモなどのように果面に毛茸が発達している果実では病原菌が果面を匍匐して増殖し、菌糸が部分的に密集しやすい現象などを観察した。これらの結果から、那須 (1998) は、果実の表面構造が異なることで同一の病原菌であっても、発病の有無や病徴までもが異なることを指摘している。‘二十世紀’ の場合は、那須 (1998) が観察しているように、健全な果実の果面は平滑で、クチクラ亀裂やひび割れはほとんど認められない。しかし、生理的な原因で果面にクチクラ

亀裂が生じた場合、その様相は一変し、亀裂は表皮細胞層まで達する。このため、ナシ汚果病菌である酵母様菌の繁殖を助長し、結果的に果面の汚果症状を引き起こすものと考えられる。さらに、果面のクチクラ亀裂の度合いが激しい場合は、果実の内部から水分が蒸発するため、果面が萎縮し、皺が生じてしまうと考えられる。また、カビ梨症果実は表面が白っぽく粉をふいた様に観察されるが、これは果面に繁殖した酵母様菌が、無数の出芽型胞子を連鎖して形成するためであることが SEM の観察結果などから推察された。

ナシ汚果病は、本研究で病原性が立証された担子菌系酵母様菌などの病原菌が果面から傷口感染するため、日和見的に発生するコスメティック病害であると考えられ、耕種的防除が防除対策として重要と考えられた。特に収穫直前に果実が急激に肥大すると、クチクラ亀裂の発生が助長されるため（林，1960），収穫直前に肥料が遅効きしてしまわないような肥培管理や灌水管管理を行う必要がある。また，果実袋内で病原菌の増殖を抑制することで，本病の防除が可能であると考えられることから，果実袋に処理される殺菌剤および果実袋の構造などを改善することも重要である。さらに，井上ら（2007）は，幼果期に曇雨天日や高湿度条件が連続することが本病の多発条件であり，小袋掛け前の薬剤散布から袋掛けまでの日数が長くなるほど，本病の発生が多くなることを明らかにした。このことから，幼果期の小袋掛け直前の殺菌剤散布は数回に分けて実施し，散布した薬液が乾き次第，速やかに小袋掛け作業を完了することも重要である。

第3章 *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*によるナシ黒かび病

第1節 研究史

収穫から輸送、貯蔵、販売、さらに家庭で食卓にのぼるまでの全期間にわたり発生する青果物の病害は、一般にポストハーベスト病害と呼ばれ、生育期間中に栽培圃場で発生する病害とは発生環境や防除対策が異なるため、区別して考えられている (Snowdon, 1990 ; 田中, 1995)。ナシでは、*Botryosphaeria berengeriana* de Notaris f. sp. *piricola* (Nose) Koganezawa & Sakuma による輪紋病や *Monilinia fructigena* (Aderhold & Ruhland) Honey による灰星病などがポストハーベスト病害として重要であり、一部の品種では生理的要因が原因と考えられる内部褐変や水ナシ (みつ症) 果なども発生して問題になっている。しかし、これらのポストハーベスト病害以外にも古くからボタ腐れ症と呼ばれる果実腐敗が突発的に発生していたが、発生原因が不明であったため、ナシ産地では対策に苦慮してきた。この果実腐敗は 1940 年代には全国的に発生が確認されており、鳥取県では 1952 年頃を中心に一部地域で大発生して問題となった (鳥取農試果樹分場, 1952)。ボタ腐れ症は、果実が腐敗臭を伴った果汁を漏出しながら軟化腐敗するため、発病果は商品価値が全く無くなるばかりでなく、出荷箱内で健全な果実にも短期間のうちに感染してしまうため、市場や販売店で発生した場合は産地の評価を著しく低下させてしまう。1997 年はナシの収穫期に当たる 9 月中～下旬に降雨日が連続し、この期間に‘二十世紀’や‘豊水’などを収穫したナシ園の一部で、本症状を呈する果実腐敗が多発して問題となった。そこで、この収穫後に発生する果実腐敗の発生原因を究明し、防除対策を確立するため、本研究において病原同定を行い、発病助長要因について解析を行った。

第2節 病 徴

1997 年 9 月に京都府熊野郡久美浜町 (現在の京丹後市) の現地圃場に栽植されているニホンナシ‘二十世紀’を収穫した後、倉庫内で貯蔵中の果実にボタ腐れ症状の発生が認められた。ボタ腐れ症状を示した発病果には、はじめ果皮に褐色を帯びた水浸状病斑が認められ (Figs. 20a-b), 病斑上には白色の菌糸がまん延し、やがて病斑上の白色菌糸の表面には黒色小粒が多数観察された (Fig. 20c)。25°C前後では 3-4 日程度で水浸状病斑が果実全

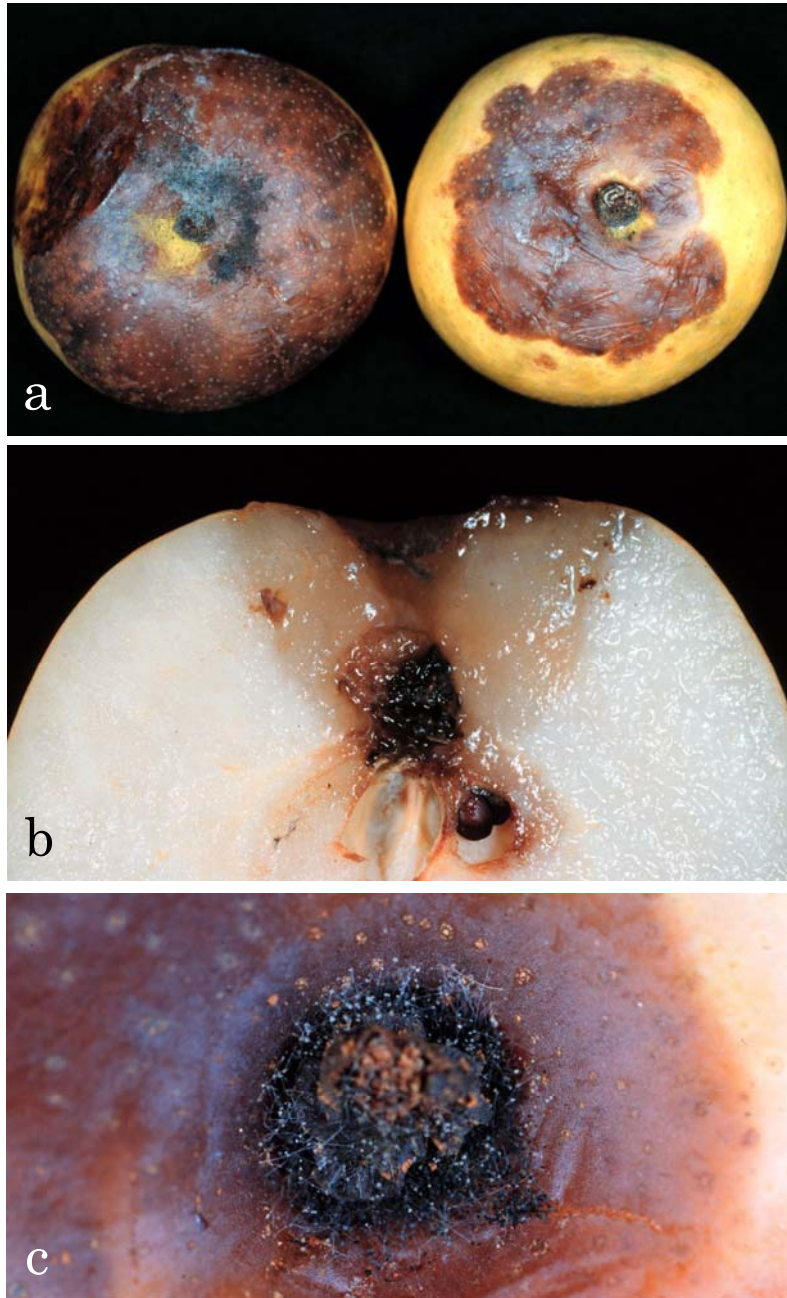


Fig. 20. Natural symptoms of *Rhizopus* rot of Japanese pear cv. Nijisseiki on mature fruits.

a. Typical soft rot symptom with a brown lesion.

b. Cross section of a lesion.

c. Sporangia and sporangiophores produced on a lesion.

面に拡大し、果実の軟化腐敗が認められ、果皮が破れると酸味のある臭いの汁液が大量に漏出した。本病は栽培期間中に発生することはなく、収穫後の貯蔵中に果皮が損傷した果実、水ナシ（みつ症）果、過熟果などで発生が多い傾向であった。

第3節 分離菌の同定

1. 罹病果実からの菌の分離

(1) 材料および方法

1997年9月に京都府熊野郡久美浜町（現在の京丹後市）の現地圃場で収穫された‘二十世紀’のうち、貯蔵中に発病した果実から菌の分離を行った。すなわち、罹病果実の病斑部と健全部の境界から5 mm角の切片を切り出し、これらを70%エタノールに10秒間、次亜鉛塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1%）に1分間浸漬した後、滅菌蒸留水で2回洗浄した。この切片をPDA平板培地に置床し、25℃（暗黒下）で3日間培養して分離菌株を得た。

(2) 結果

罹病果実の病斑部からは白色～灰黒色の菌叢で気中菌糸に富み、やがて黒点状の胞子のうを多数形成する糸状菌が高率に分離された（Fig. 21a）。分離された糸状菌は菌糸生育速度が速く、移植から数日で直径90 mmのPDA平板培地の全面が菌糸で覆われた。分離した3菌株（Rh-9701, Rh-9702 および Rh-9703）の培養菌叢などの形態的特徴から、これらはいずれも *Rhizopus* 属菌と考えられた。

2. 形態観察および菌の同定

(1) 材料および方法

組織分離によって得られた *Rhizopus* 属菌の1菌株をブラックライトブルー（以下、BLB）照射下で25℃、7日間培養し、形成された分生子を2%素寒天培地に画線し、光学顕微鏡（Nikon Labophot）下で単胞子を素寒天ごと切り出し、PDA斜面培地に置床した。得られた単胞子分離株（Rh-9701s）をPDA平板培地に移植し、BLB照射下で25℃、7日間培養し、菌の同定を行った。

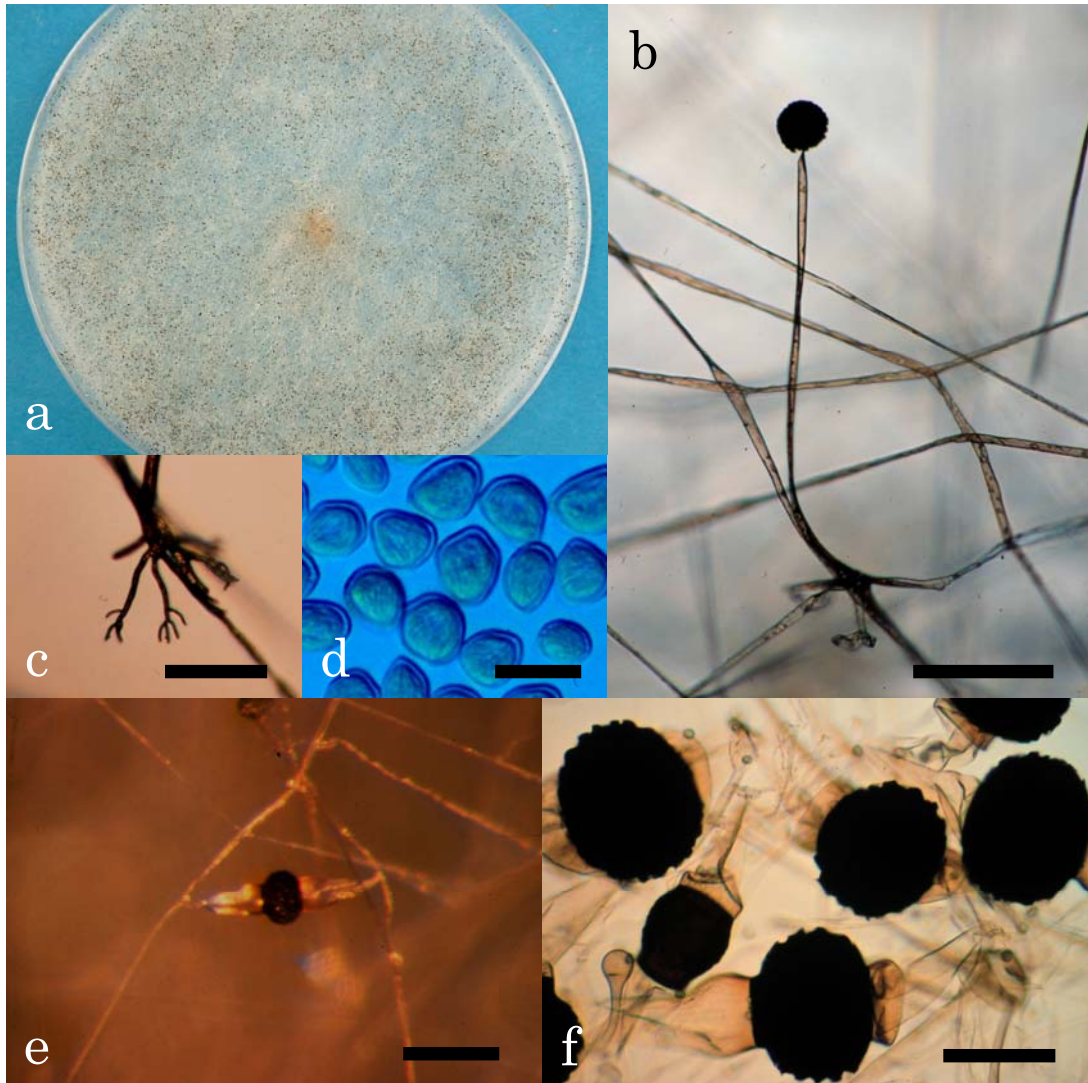


Fig. 21. Cultural and morphological characteristics of *Rhizopus* sp. Rh-9701s isolated from soft rotted Japanese pear fruit.

a. A colony formed on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 7 days.

b. A sporangium and a sporangiophore produced on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 500 µm.

c. A rhizoid produced on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 300 µm.

d. Sporangiospores produced on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 10 µm.

e. A zygospore formed between Rh-9701s and *R. stolonifer* var. *stolonifer* MAFF 305786 on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 200 µm.

f. Zygospores formed between Rh-9701s and *R. stolonifer* var. *stolonifer* MAFF 305786 on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 100 µm.

(2) 結果

単孢子分離菌株 Rh-9701s は PDA 培地上で空中を伸びる無隔壁のほふく菌糸と一定間隔に形成される仮根を形成しながら、迅速に生育した (Figs. 21b-c)。仮根の反対側には複数の胞子のう柄が真直に伸長し、分岐せず、褐色で無隔壁、幅 10-20 μm 、長さ 600-3800 μm であった (Fig. 21b)。胞子のうは胞子のう柄の先端部に形成され、はじめ無色だが、成熟すると黒色になり、球～垂球形で平均直径 124 μm であった。胞子のうが成熟すると容易に破れ、内部に形成された無数の胞子のう胞子が離脱分散した。胞子のう胞子は有角垂球～広楕円形、褐色、単細胞で表皮全体には細い稜線状隆起が並んでおり、大きさ 6-15(-20) \times 4-10(-14) μm であった (Fig. 21d)。単孢子分離菌株 Rh-9701s と *R. stolonifer* (Ehrenberg:Fries) Vuillemin var. *stolonifer* の保存菌株 MAFF 305786 との対峙培養で得られた接合胞子は、菌糸間で対峙する接合支持柄の間に形成され、黒色、垂球～偏球形、大いぼに覆われ、直径 96-152 μm であった (Figs. 21e-f)。以上の形態等と既報 (Domsch and Gams, 1980 ; Schipper, 1984 ; 三浦, 1978) の *R. stolonifer* var. *stolonifer* の記載値との比較などから (Table 11), 本菌株を *R. stolonifer* var. *stolonifer* と同定した。

第4節 分離菌の病原性

(1) 材料および方法

第3節で得られた3菌株 (Rh-9701, Rh-9702 および Rh-9703) を供試して分離菌の病原性を調査した。これらの3菌株を 25°C (BLB 照射下) で7日間培養し、形成された分生子を 1.2×10^6 conidia/ml の濃度の胞子懸濁液に調製し、接種源とした。接種試験は1998年6月5日、8月4日、9月8日の3回にわたって採取した露地栽培の‘ゴールド二十世紀’の幼果および成熟果実に有傷または無傷で分生子懸濁液を果面に滴下接種した。なお、有傷接種では、火炎滅菌した柄付針で試験供試果実の赤道面の果皮を4か所ずつ穿孔した部分に接種を行った。接種した果実は25°Cで温室条件に置き、発病調査は接種2日後に行った。試験は1菌株あたり5果ずつ供試した。

(2) 結果

6月5日に採取した交配後約50日の幼果に対する接種では、有傷および無傷のいずれの場合も発病は全く認められなかった。しかし、交配後約110日(収穫前約30日)の8月4日および

Table 11. Morphological comparison of the isolate of *Rhizopus* sp. from Japanese pear and *R. stolonifer* var. *stolonifer* previously reported

Isolate or fungus species	Sporangiophore	Sporangium	Sporangiospore	Zygospore ^{a)}
Rh-9701s	Fasciculate from rhizoid, brown, aseptate, mostly 0.6-3.8 mm tall, 10-20 µm wide	Globose to subglobose blackish, powdery 124 µm in average diameter	One celled, brown, angular subglobose to oval, ridged, 6-15(-20)×4-10(-14) µm	Subglobose to prolate-spheroid black, warted, 96-152 µm heterothallic
<i>R. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> ^{b)}	Pale to dark brown, usually straight, mostly 1.5-3 mm tall (13-)20-25(-29) µm wide	Black, mostly 100-200 µm	Subglobose, biconical to oval, ridged, (5.5-)7-12(-14)×(4.5-)6-8.5(-12) µm	Black, warted, 150-200 µm
<i>R. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> ^{c)}	In groups of 1-3, (occasionally more) brown, up to 2.0 mm × 20 µm	Blackish, powdery up to 275 µm	Angular globose to ellipsoidal, up to 13 µm in length, distinctly striate	—
<i>R. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> ^{d)}	Fasciculate from rhizoid, in groups of 2-5(6) brown, aseptate, mostly 0.5-4.0 mm tall, 10-30 µm wide	Subglobose, black, 100-350 µm	One celled, dark brown, angular globose to oval, ridged, 7-20×5-12 µm	Subglobose, black, warted, 100-200 µm heterothallic

a) Zygospores were formed between compatible isolates.

b) Domsch and Gams (1980).

c) Schipper (1984).

d) Miura (1978).

収穫期の9月8日に採取した果実に対する接種では、いずれの菌株の場合も有傷接種した場合に自然発病に類似した病徴が再現され(Table 12)、形成された病斑部からは接種菌が高率に再分離された。本研究によって病原性が立証された *R. stolonifer* var. *stolonifer* によるナン病害は本邦未記録であったため、病名をナン黒かび病(英名:Rhizopus rot of Japanese pear)と提唱した(安田ら, 1999a ; 安田ら, 1999b)。

第5節 発生生態

1. 菌糸生育に及ぼす温度の影響

(1) 材料および方法

第3節で得られた3菌株(Rh-9701, Rh-9702 および Rh-9703)を供試して分離菌のPDA培地上での菌糸生育に及ぼす温度の影響を調査した。これらの3菌株をPDA平板培地で25°C(BLB照射下), 30時間培養した後に直径4mmのコルクボーラーで菌叢を打ち抜き、含菌寒天ディスクとした。これを新しいPDA平板培地の中央に置床し、5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°Cで30時間培養した後、生育した菌叢の最大直径を計測した。

(2) 結果

分離菌株Rh-9701, Rh-9702およびRh-9703は15-30°Cで菌糸伸長が認められたが、5°C, 10°Cおよび35°Cでは菌糸伸長は完全に抑制された(Fig. 22)。これらの分離菌株の生育適温は20-25°C付近と考えられた。

2. 発病に及ぼす果実の貯蔵温度の影響

(1) 材料および方法

1998年8月18日に収穫して5°Cで一時低温貯蔵した‘秋栄’を供試し、発病に及ぼす貯蔵温度の影響を調査した。1998年8月23日に、火炎滅菌した柄付針で試験供試果実の赤道面の果皮を4か所ずつ穿孔した。滅菌蒸留水で 1×10^6 conidia/mlの濃度に調製した分離菌株Rh-9701の孢子懸濁液を有傷部位に滴下接種した後、5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°Cの温度条件で温室としたコンテナに入れて2日間貯蔵し、形成された病斑の直径を計測した。なお、試験は1区24果を供試した。

Table 12. Pathogenicity of the isolates of *R. stolonifer* var. *stolonifer* on wounded or intact fruits of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki in each growing stage^{a)}

Isolate	Inoculation date					
	5 Jun., 1998		4 Aug., 1998		8 Sept., 1998	
	Young fruit stage	Intact- inoculation ^{c)}	Before harvesting stage	Intact- inoculation	Harvesting stage	Intact- inoculation
	Wounded- inoculation ^{b)}	Wounded- inoculation ^{c)}	Wounded- inoculation	Wounded- inoculation	Wounded- inoculation	Intact- inoculation
Rh-9701	-	-	+	-	+	-
Rh-9702	-	-	+	-	+	-
Rh-9703	-	-	+	-	+	-
Distilled water (control)	-	-	-	-	-	-

a) Disease incidence was evaluated two days after inoculation. +, pathogenic; -, non pathogenic. Inoculation tests were replicated in five fruits.

b) Dropping conidial suspension (1.2×10^6 conidia /ml) onto fruits picked with a sterilized needle.

c) Dropping conidial suspension (1.2×10^6 conidia /ml) onto intact fruits.

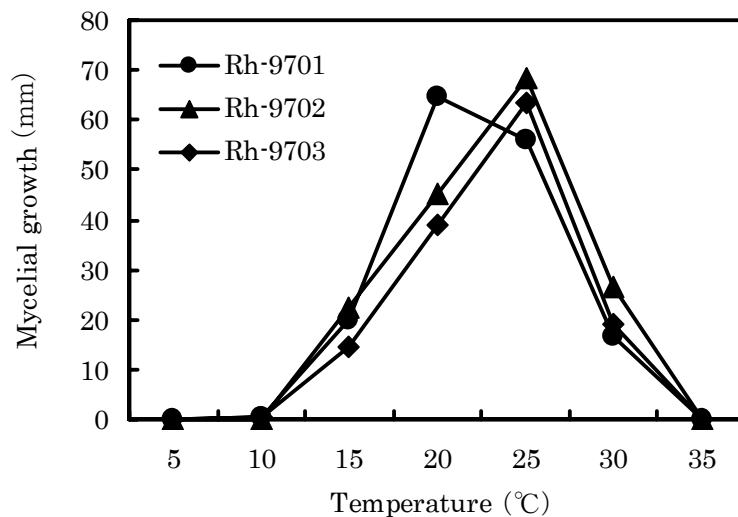


Fig. 22. Influence of temperature on mycelial growth of *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* isolated from diseased Japanese pear fruit. An agar disk (4 mm diameter) from each isolate (Rh-9701, Rh-9702 and Rh-9703) grown on PDA at 25°C under black light blue irradiation for 30 hours was transferred to unused PDA plates. After incubation at various temperatures in the dark for 30 hours, colony diameters were measured.

(2) 結果

病原菌を有傷接種した果実を各温度下で貯蔵した結果、20-30℃で病斑の拡大が速く、15℃および35℃では発病は認められたが、病斑の拡大は遅い傾向であった (Fig. 23)。また、10℃以下の低温条件で貯蔵した場合、発病は全く認められなかった。

3. 品種による発病差異

(1) 材料および方法

ニホンナシの主要品種‘二十世紀’、‘ゴールド二十世紀’、‘幸水’、‘豊水’および‘秋栄’を供試し、本病の品種間発病差異について調査した。各品種とも収穫適期が異なるため、収穫した果実を5℃で一時低温貯蔵した後、試験に供試した。すわなち、‘幸水’および‘秋栄’は1998年8月18日に、‘二十世紀’は1998年8月28日、‘ゴールド二十世紀’および‘豊水’は1998年9月7日にそれぞれ収穫した。

1998年9月10日に、火炎滅菌した柄付針で各品種の試験供試果実の赤道面の果皮を4か所ずつ穿孔し、滅菌蒸留水で 1×10^6 conidia/mlの濃度に調製した分離菌株Rh-9701の孢子懸濁液を有傷部位に滴下接種した。その後、23℃の温度条件で温室としたコンテナに入れて2日間貯蔵し、形成された病斑直径を調査した。なお、試験は1区24果を供試した。

(2) 結果

試験に供試した5品種は、いずれも有傷部への病原菌接種によって発病が認められたが、果皮の薄い‘二十世紀’および‘幸水’で病斑の進展が早く、果皮の厚い‘豊水’および‘秋栄’は、病斑の伸展がやや遅い傾向が認められた (Fig. 24, Table 13)。

第6節 考 察

ニホンナシに発生するポストハーベスト病害では、ナシ輪紋病やナシ灰星病が古くから重要病害とされており、これ以外にも内部褐変や水ナシ(みつ症)果などの生理障害に加え、発生原因が不明であったボタ腐れ症と呼ばれる腐敗症状の突発的な発生が認められてきた。これらの障害は、生育期間中に発生する病害と異なり、収穫後または出荷後に発生する場合が多いため、発生状況の把握や原因の解析が困難な場合が多かった。1997年に京都府熊野郡久美浜町(現在の京丹後市)で発生した‘二十世紀’ナシにおけるボタ腐れ症

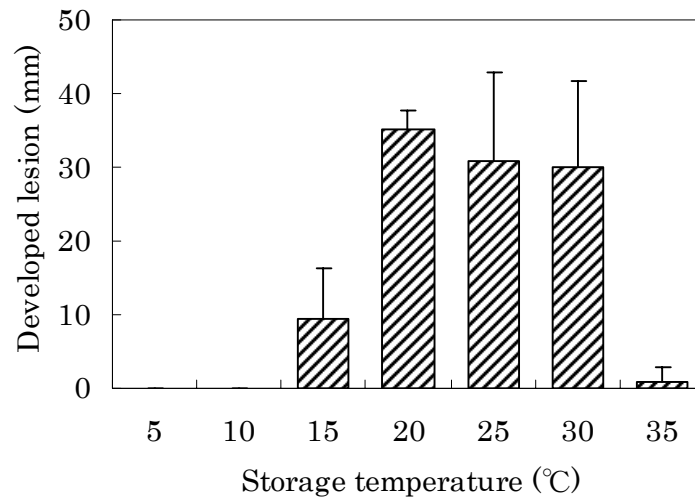


Fig. 23. Influence of storage temperature of harvested fruits to disease incidence of Rhizopus rot. Conidial suspension 1×10^6 conidia/ml of *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* Rh-9701 was inoculated to wounded region of healthy mature fruits of Japanese pear cv. Akibae. After incubation at various temperatures in the dark for 2 days, developed lesions were measured. Twenty four fruits were used in each experimental temperature. Vertical bars represent standard deviation.

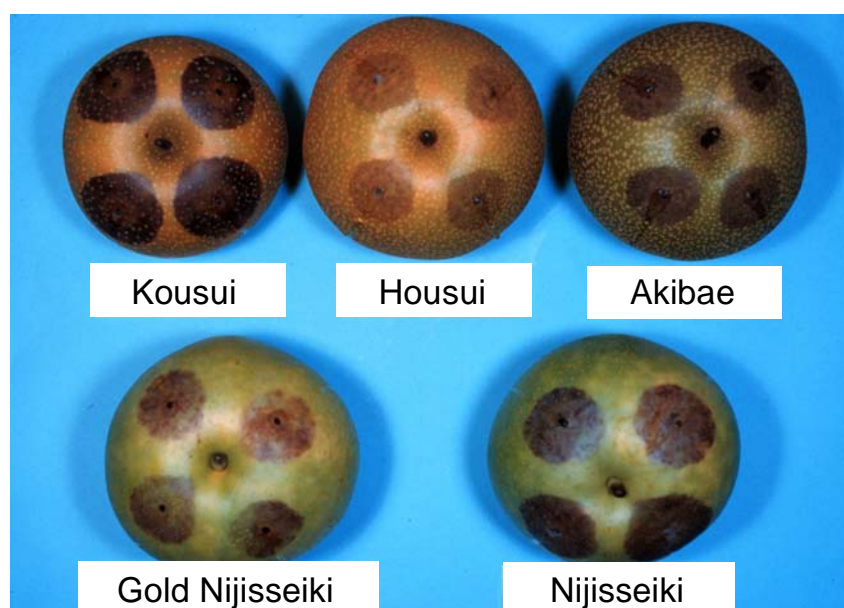


Fig. 24. Symptoms of harvested mature fruits on each cultivar of Japanese pear reproduced 2 days after inoculation with *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* Rh-9701.

Table 13. Comparison of disease incidence of *Rhizopus* rot on matured fruits among the cultivars of Japanese pear

Cultivar	Developed lesion diameter (mm) ^{a)}
Kousui	33.9 a
Nijisseiki	33.3 a
Gold Nijisseiki	28.9 b
Akibae	25.7 c
Housui	25.6 c

a) Conidial suspension 1×10^6 conidia/ml of *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* Rh-9701 was inoculated to wounded region of healthy mature fruits of each cultivar of Japanese pear. After incubation at 23°C in the dark for 2 days, developed lesions were measured. Twenty four fruits of each cultivar were used. Numbers in a column followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ in Duncan's multiple range test.

状は、分離菌の形態観察や分離菌接種による病原性の確認などにより、*R. stolonifer* var. *stolonifer*によって引き起こされる病害であることが立証されたため、本病をナシ黒かび病（英名：Rhizopus rot）と命名した（安田ら、1999a；安田ら、1999b）。

本病の病原菌である *R. stolonifer* var. *stolonifer* は、無性世代において、果実等の傷口に付着した胞子のう胞子が発芽して無隔壁の匍匐菌糸が組織内をまん延し、軟化腐敗を引き起こす。菌体はさらに発育して菌糸の一部に仮根を生じ、仮根の生じた部分から胞子のう柄が何本か伸長する。胞子のう柄の頂端には胞子のうを生じ、この中には多くの内生胞子を形成し、成熟して胞子のう胞子となる。また、本菌は有性世代において、ヘテロタリックな菌群の菌糸が H 型に接着して、接合胞子を形成する。本菌は、無性世代と有性世代を繰り返し、胞子のう胞子と接合胞子のいずれも越冬して、翌年の第一次伝染源になりうると考えられる（池上、1983）。

R. stolonifer var. *stolonifer* によって引き起こされる果樹類および果菜類のポストハーベスト病害は経済上重要な病害であり、オウトウ、イチジク、メロン、パパイヤ、モモ、イチゴなどの我が国の代表的な園芸作物で共通の問題となっている（田中、1995）。本菌は宿主範囲が広く、また腐生性が強いため、普遍的に存在する糸状菌と考えられる。病原菌の胞子のう胞子は空中を飛散し、果実の表面に生じた傷口から侵入して、極めて短期間に軟化腐敗を引き起こすが、過熟果では傷口の有無に関係なく発病することがあり、出荷途中で発病果と接触した健全果が出荷箱内で腐敗する事例も認められている。オウトウやモモにおける黒かび病の発生は、降雨直後に収穫した場合や輸送時の温湿度が高い場合に発病が多い傾向である（工藤・青木、1990）。京都府においてナシ黒かび病（新称）の発生を確認した 1997 年は‘二十世紀’ナシの収穫期にあたる 9 月中～下旬に降雨日が連続し、本病の発生に好適な条件であったものと考えられる。また、本病の発生を確認した京都府内の果樹園では完熟果実の出荷を栽培目標としており、罹病した収穫果実がやや過熟傾向であったことも発生要因の一因と考えられる。

本病の病原菌である *R. stolonifer* var. *stolonifer* は PDA 培地上における菌糸生育が 20-25℃で極めて旺盛であるが、10℃以下の低温条件下では菌糸生育は認められず、接種試験による果実発病もほとんど認められなかった。このため、ナシの収穫後に 10℃以下で低温貯蔵すれば、物理的に本病の防除は可能である。しかし、現在の貯蔵施設や輸送手段を考慮すると出荷時の一貫した低温管理は現実的には困難である。一方、温度以外の重要な発病要因の一つに湿度が考えられるが、新田（1997）は、同一病原によるイチジク黒かび病の場合、湿度と発病との間には有意な相関が認められ、湿度の上昇に伴って発病果率が

高くなったことを報告している。ナシでも同様の傾向が認められるため、果実が降雨や結露などで長時間多湿に保たれるような貯蔵方法は避ける必要がある。

さらに、本菌は腐生性の強い菌であるため、栽培圃場だけでなく選果場や市場など至る所で自活繁殖していると考えられる。栽培圃場においては、他の病害虫の加害などによって故損落下した果実や選果場における廃棄果実などが本病の第一次伝染源となりうるため、これらをこまめに除去するなど生産および出荷過程での衛生環境に配慮することが必要である。また、生産現場では、降雨直後の収穫による果実のむれや過熟果の収穫などは発病を助長するため、適期収穫を行うことも耕種的防除として重要である（池上, 1983）。

なお、果樹類の黒かび病に対する薬剤防除については、CNA（2,6-ジクロル-4-ニトロアニリン）水和剤の防除効果が高いことが報告されている（松尾ら, 1970; 新田, 1997; Obenauf *et al.*, 1982 ; Ogawa *et al.*, 1963 ; Wells and Harvey, 1970）が、本剤は我が国では既に登録失効しており、新たな防除薬剤の実用化が急務となっている。新田（1997）によると、イチジク黒かび病に対して、室内検定ではチオファネートメチル水和剤の効果を認めているが、露地栽培での圃場試験では本剤の防除効果は低い結果であった。このことから、イチジクにおいては有袋栽培や雨よけ栽培などの耕種的防除が防除対策の中心となっているが、降雨の影響の少ない施設栽培においてのみ TPN 剤、イプロジオン剤およびキャプタン剤などの薬剤防除の有効性を認めている（新田, 1997）。ニホンナシの場合は、ほとんどが露地栽培であり、鳥取県内においては有袋栽培が積極的に取り入れられているため、本病の発生はほとんど問題になっていない。しかし、無袋栽培の場合や有袋栽培であっても収穫期に多雨で経過した場合は本病の発生が懸念されるため、補完的な薬剤防除の検討は必要であると考えられる。ただし、ポストハーベスト病害を対象とした収穫期直前の薬剤防除は、果実の残留農薬など食品衛生上の観点から、本病防除のためには耕種的および物理的防除が、今後も中心となると考えられる。

第4章 *Pestalotiopsis* spp.によるカキ葉枯病

第1節 研究史

1996年6月に鳥取県東～中部の現地圃場で栽植されているカキ‘富有’および‘西条’において、幼葉および幼果のへたに斑点性の病害が多発して問題となった。本病の病徴は、カキの生育初期の主要病害である *Botrytis cinerea* Persoon:Fries によるカキ灰色かび病や *Fusicladium levieri* Magnus によるカキ黒星病とは病徴がやや異なっており、早急に発生原因について調査する必要があると考えられた。当初の調査において、発生圃場から罹病果および罹病葉を採取し、病斑部から菌を分離した結果、*Pestalotiopsis* 属菌が高率に分離されたため、本病は既報のカキ葉枯病によるものであると推察された (Yasuda *et al.*, 2003)。

我が国においてカキに寄生する *Pestalotiopsis* 属 (以下, *Ps.*) および *Pestalotia* 属 (以下, *Pa.*) 菌は、カキ葉枯病の病原として、*Pa. diospyri* H. & P. Sydow, *Ps. breviseta* (Saccardo) Steyaert, *Ps. guepini* (Desmazières) Steyaert および *Ps. longiseta* (Spegazzini) Dai & Kobayashi が、また、カキ輪紋葉枯病の病原として、*Ps. theae* (Sawada) Steyaert が記録されている (日本植物病理学会編, 2000)。また、岐阜県で発生したカキ軟化腐敗病の病原として、*Ps. foedans* (Saccardo & Ellis) Steyaert および *Ps. longiseta* が報告され (渡辺ら, 2000; 田口ら, 2001; 渡辺・田口, 2001), 新潟県で発生したカキの果実の果頂部くぼみ果および芯黒果の病原として数種の *Pestalotiopsis* 属菌の関与が報告されている (棚橋ら, 2000)。さらに、島根県では収穫果実の汚染果の原因として *Pestalotiopsis* 属菌が高率に分離されており (山本, 2002), 山口県では汚染果の一種と考えられる果実黒すじ症を *Pestalotiopsis* 属菌が引き起こすことが報告されている (唐津, 2003)。

Pestalotiopsis 属および *Pestalotia* 属菌によって引き起こされるカキ葉枯病は、我が国では古くから発生が認められており、村田 (1915) によって *Pa. kaki* Ellis & Everhart による病害として記録されたが、野島 (1928) は病原菌の再吟味を行い、本学名は無効な学名であるため、本病の病原として *Pa. diospyri* を提案した。それと同時に、野島 (1928) は、*Pa. diospyri* とは形態的特徴の異なる *Ps. theae* の病原性を立証し、病徴からカキ葉枯病と区別してカキ輪紋葉枯病として記録した。しかし、日野 (1962) は、輪紋葉枯症状を示す病斑部から菌を分離した場合、*Pa. diospyri* が分離される場合もあり、これらを病徴のみで明確に区別することは困難な場合があるとしている。さらに、日野 (1962) は、採取した

カキ葉枯病の標本から得られた *Pestalotiopsis* 属菌を詳細に同定し、*Ps. breviseta*, *Ps. guepini*, *Ps. longiseta* の 3 種を新たにカキ葉枯病の病原として追加した。一方、近年では海外においても *Pestalotiopsis* 属菌によるカキ病害は問題となっており、*Ps. theae* の初発生が韓国 (Chang *et al.*, 1996) やスペイン (Tuset *et al.*, 1999) などで報告されている。

ところで、*Ps. theae* および *Ps. longiseta* はともにチャ輪斑病菌として農業場面における重要な病原菌であり (江塚・安藤, 1994), 1973 年頃から静岡県では主要品種 ‘やぶきた’ で本病の被害が増加し、大きな問題となった。浜屋・堀川 (1982) は、その病原について詳細に検討した結果、*Ps. longiseta* であると同定したが、従来から散発的に発生していた *Ps. longiseta* と比べて病原性が明らかに異なるため、‘やぶきた’ に対して強い病原性を示す系統が新たに出現したと推察した。その後、チャにおいては、発生助長要因の解明や防除対策の検討が進められ、現在では本病の被害は軽減されている (江塚・安藤, 1994)。また、マツ類などの針葉樹においては、各種の *Pestalotiopsis* 属菌によるペスタロチア葉枯病として記録されており (日本植物病理学会編, 2000), 林業分野でも重要な病害である (高橋・小林, 1998 ; 高橋・小林, 1999)。

本研究では、1996 年に鳥取県東～中部において突発的に発生したカキ葉枯病の病斑部から分離された *Pestalotiopsis* 属菌について既報の病原菌との比較検討を行うとともに、本病の発生助長要因および防除対策について検討を行った。

第 2 節 病 徴

主要な病徴は、幼果のへたと硬化した葉における斑点病斑であり、はじめ 1-3 mm の小黒点病斑が認められ、やがて周縁が黒褐色で中央が赤褐色の小型病斑となり (Figs. 25a-b), 次第に拡大して不正円形～多角形で赤褐色の大型病斑が形成された (Fig. 25c)。病斑が拡大すると、赤褐色の病斑中央部には表面に黒色小粒点 (分生子層) を生じた。病斑は通常単独で形成されたが、葉や幼果のへたに 2-3 個の小型病斑が形成される場合も認められた。罹病葉の病勢が進むと、葉面積の半分以上まで赤褐色の病斑が進展し (Fig. 25d), 早期落葉を引き起こした (Fig. 25e)。幼果の果面や枝には病斑は形成されず、へた部の病斑の進展は葉の病斑に比べて緩慢であった。発生圃場では、ほぼ圃場全体にわたって発病がみられたが、防風樹や障害物のない風当たりの強い部分の発病程度が高い傾向であった。



Fig. 25. Natural symptoms of leaf spot on Japanese persimmon.
a. Initial ring spot symptom of calyxes on young fruits (cv. Fuyu).
b. Initial ring spot symptom on a leaf (cv. Fuyu).
c. Developed lesion on a leaf (cv. Saijyo).
d. Severe symptom on leaves (cv. Saijyo).
e. Defoliation of leaves at the late state of the disease.

第3節 分離菌の同定

1. 病斑部からの菌の分離

(1) 材料および方法

1996年6月に、鳥取県八頭郡河原町（現在の鳥取市河原町）、八頭郡郡家町（現在の八頭町）、東伯郡東郷町（現在の湯梨浜町）および東伯郡大栄町（現在の北栄町）のカキ栽培圃場（計7圃場）から採取した罹病幼果へた部および罹病葉の病斑部と健全部の境界から5mm角の切片を切り出し、これらを70%エタノールに10秒間、次亜鉛塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1%）に1分間浸漬した後、滅菌蒸留水で2回洗浄した。この切片をショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天（ショ糖20g、粉末寒天15g、乾燥マッシュポテト34gの煮汁1,000ml；以下、PSA）平板培地に置床し、23℃（暗黒下）で7日間培養して分離菌株を得た。

(2) 結果

罹病幼果へた部および病葉の病斑部からは灰白色の菌叢の糸状菌が高率に分離され、やがて黒色小粒点状の分生子層を生じた（Fig. 26a）。分生子層内には倒卵状紡錘形で5細胞から成り、中央3細胞が有色で頂部に付属糸を持つ分生子が形成された。分離菌株の分生子の形態的特徴から、得られた59菌株は全て *Pestalotiopsis* 属菌と考えられた。なお、分離された *Pestalotiopsis* 属菌は全て中央有色3細胞が異色系であり、中央3細胞が同色系の菌株は全く認められなかった（Figs. 26b-e）。

2. 形態観察および菌の同定

(1) 材料および方法

組織分離によって得られた分離菌のうち、異なる培養菌叢を示す5菌株を選び、BLB照射下で23℃、7日間PSA平板培地上で培養した。形成された分生子を2%素寒天培地に画線して、光学顕微鏡(Nikon Labophot)下で単胞子を素寒天ごと切り出し、PSA斜面培地に置床した。得られた単胞子分離株5菌株（KOL-10, KDL-8, ES-1, KH-1およびTN-3）をPSA平板培地に移植し、BLB照射下で23℃、7日間培養して菌の同定を行った。

また、各分離菌株のPSA培地上での菌糸生育に及ぼす温度の影響を調査した。各菌株をPSA平板培地で25℃（暗黒下）、7日間培養した後に直径4mmのコルクボーラーで菌叢

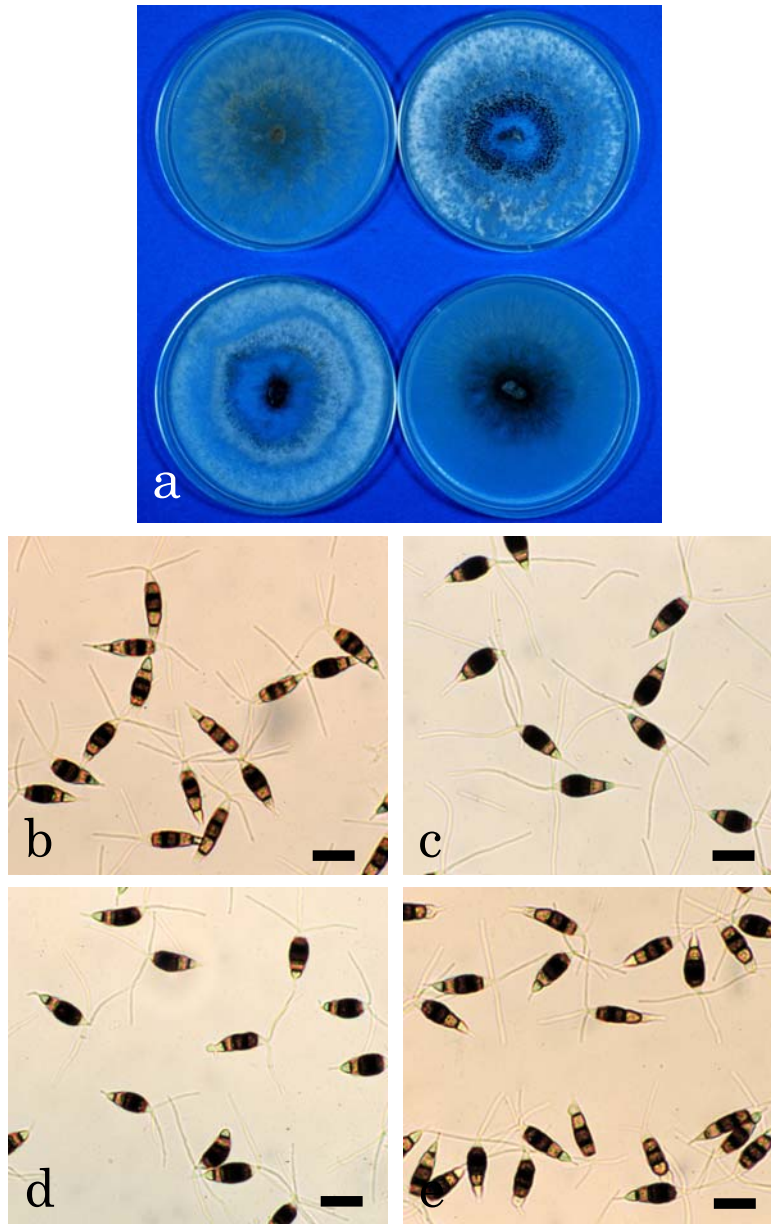


Fig. 26. Cultural and morphological characteristics of *Pestalotiopsis* spp., the pathogens of leaf spot of Japanese persimmon.

a. Colonies formed on potato sucrose agar (PSA) at 25°C in the dark for 10 days. *P. longiseta* KOL-10 (top, left), *P. glandicola* KDL-8 (top, right), *P. acaciae* KH-1 (bottom, left), and *P. crassiuscula* TN-3 (bottom, right).

b. Conidia of *P. longiseta* KOL-10, Scale bar, 20 μm.

c. Conidia of *P. glandicola* KDL-8, Scale bar, 20 μm.

d. Conidia of *P. acaciae* KH-1, Scale bar, 20 μm.

e. Conidia of *P. crassiuscula* TN-3, Scale bar, 20 μm.

を打ち抜き、含菌寒天ディスクとした。これを新しい PSA 平板培地の中央に置床し、5、10、15、20、25、28、30、35°C で 5 日間培養（暗黒下）した後、生育した菌叢の最大直径を計測した。

(2) 結果

単孢子分離菌株（KOL-10, KDL-8, ES-1, KH-1 および TN-3）の培養菌叢および分生子の形態観察を行った結果、分生子の大きさ、付属糸の長さおよび太さ、中央有色 3 細胞の色調などに違いが認められた。

分離菌株 KOL-10 (=MAFF 237680) は、分生子の大きさが 25-28×7-9 μm で、中央 3 細胞が淡褐色異色系、頂部付属糸が 3 本で太く、付属糸の長さが 22-33 μm であった (Fig. 26b, Table 14)。分離菌株 KDL-8 は、分生子の大きさが 21-25×7.5-9 μm で、中央 3 細胞が濃褐色異色系、頂部付属糸が 3 本で太く、付属糸の長さが 25-33 μm であった (Fig. 26c, Table 14)。分離菌株 ES-1 (=MAFF 237679) は、分生子の大きさが 22-25×7.5-9 μm で、中央 3 細胞が濃褐色異色系、頂部付属糸が 3 本で太く、付属糸の長さが 30-38 μm であった。分離菌株 KH-1 (=MAFF 237681) は、分生子の大きさが 20-23×7.5-9 μm で、中央 3 細胞が淡褐色異色系、頂部付属糸が 3 本で細く、付属糸の長さが 15-23 μm であった (Fig. 26d, Table 14)。分離菌株 TN-3 (=MAFF 237682) は、分生子の大きさが 22-25×7-8 μm で、中央 3 細胞が淡褐色異色系、頂部付属糸が 3 本で細く、付属糸の長さが 22-30 μm であった (Fig. 26e, Table 14)。

また、各分離菌株を異なる温度条件下で 5 日間培養した結果、5-30°C で菌糸伸長が認められたが、いずれの菌株も 25-28°C が生育至適温度と考えられた (Fig. 27)。なお、いずれの菌株も BLB 照射によって分生子層および分生子の形成が促進される傾向であった。

以上の形態等と既報（臺ら, 1990 ; Guba, 1961 ; 日野, 1962 ; 野島, 1928 ; Suto and Kobayashi, 1993）の *Pestalotiopsis* 属菌各種の記載値との比較などから (Table 14) , 各菌株を *Ps. longiseta* (KOL-10), *Ps. glandicola* (Castagne) Steyaert (KDL-8 および ES-1), *Ps. acaciae* (Thümen) Yokoyama & Kaneko (KH-1) および *Ps. crassiuscula* Steyaert (TN-3) と同定した。

第 4 節 分離菌の病原性

Table 14. Morphological comparison of conidia of *Pestalotiopsis* spp. isolates from Japanese persimmon and those reported previously

Isolate or fungus species	Conidium		Three median cells		Apical appendage			Basal appendage length (μm)	Reference
	Length (μm)	Width (μm)	Cell color	Length (μm)	Number	Thickness	Length (μm)		
KOL-10 (=MAFF 237680)	25-28	7-9	Brown	15-18	3	Thick	22-33	2.5-5	
KDL-8 (=MAFF 237678)	21-25	7.5-9	Umber	14-16	3	Thick	25-33	2.5-8	
ES-1 (=MAFF 237679)	22-25	7.5-9	Umber	15-18	3	Thick	30-38	2.5-5	
KH-1 (=MAFF 237681)	20-23	7.5-9	Brown	14-16	3	Thin	15-23	2.5-4	
TN-3 (=MAFF 237682)	22-25	7-8	Brown	15-18	3	Thin	22-30	4-8	
<i>P. diospyri</i>	17-22	7-8.5	Umber		2-3		10-17		Nojima (1928)
	17-20	7-8	Umber		3		10-18		Hino (1962)
	19-23	8-10	Umber	13-16	3	Thick	16-24	2.5-6	Guba (1961)
<i>P. longiseta</i>	19-30	7.5-12	Umber		3		19-38	2-10	Hino (1962)
	20-28	6-8.5	Umber	12-18	3	Thick	19-35	5-11	Dai <i>et al.</i> (1990)
	22-25	7.5-9	Dark brown	13-18	3	Thick	18-38	4-11	Guba (1961)
<i>P. glandicola</i>	18-25	7-9	Umber	13-17	3	Thick	15-34	2-8	Suto and Kobayashi (1993)
	22-27	7.5-9.5	Umber	14-19	3	Thick	17-29	4-7	Guba (1961)
<i>P. acaciae</i>	19-23	7-8.5	Brown	14-19	3	Thin	12-22	3-6	Guba (1961)
<i>P. crassiuscula</i>	22-26	7-9	Brown	14-18	3	Thin	13-32		Guba (1961)

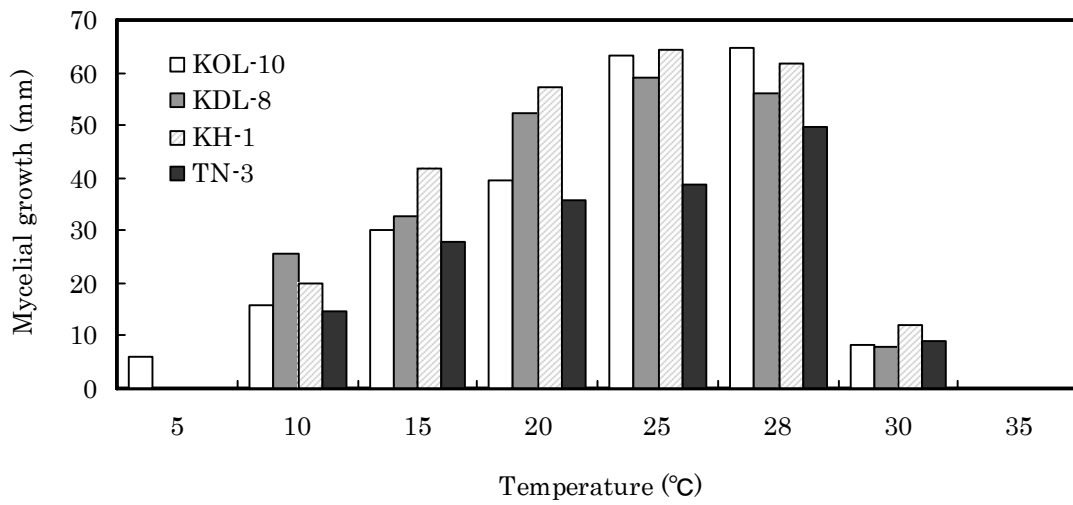


Fig. 27. Influence of temperature on mycelial growth of *Pestalotiopsis* spp. An agar disk (4 mm diameter) of the isolates grown on potato sucrose agar (PSA) at 25°C in the dark for 7 days was transferred to unused PSA plates. After incubation at various temperatures in the dark for 5 days, colony diameters were measured.

1. 分離菌株の病原性

(1) 材料および方法

第3節で得られた分離菌株 (*Ps. longiseta* KOL-10, *Ps. glandicola* KDL-8, *Ps. acaciae* KH-1 および *Ps. crassiuscula* TN-3) と、対照菌株として *Ps. longiseta* MAFF752001 および *Ps. theae* MAFF752002 を供試して分離菌株の病原性を調査した。これらの6菌株を23°C (BLB 照射下) で7日間培養し、形成された分生子を滅菌蒸留水に懸濁して 1×10^5 conidia/ml の濃度に調製し、接種源とした。接種試験は1997年6月7日に行い、鳥取県園芸試験場内に栽植された‘富有’24年生樹の成葉にプラスチックドライバーを押し当てて付傷し、各菌株の孢子懸濁液を噴霧接種した。接種15日後の1997年6月22日に、有傷部および無傷部での発病の有無を調査した。

(2) 結果

供試した分離4菌株 (*Ps. longiseta* KOL-10, *Ps. glandicola* KDL-8, *Ps. acaciae* KH-1 および *Ps. crassiuscula* TN-3) および対照菌株 (*Ps. longiseta* MAFF75200 および *Ps. theae* MAFF752002) は、いずれも有傷部位から自然発病に類似した病斑の形成が認められ、高い発病率を示した (Table 15)。また、発病部位からは接種菌がそれぞれ再分離可能であった。なお、対照菌株の *Ps. theae* MAFF752002 の接種試験によって再現された病徴は、他の *Pestalotiopsis* 属菌と類似しており、接種15日後の初期病徴による明確な区別は困難であった。

前述のとおり、*Pestalotiopsis* 属および *Pestalotia* 属菌によるカキ病害は、*Pa. diospyri*, *Ps. breviseta*, *Ps. guepini* および *Ps. longiseta* によるカキ葉枯病と *Ps. theae* によるカキ輪紋葉枯病が記録されている。本研究で新たに *Ps. glandicola*, *Ps. acaciae* および *Ps. crassiuscula* の病原性が立証されたが、これらの病原菌によるカキの病徴は既報のカキ葉枯病の病徴と区別は困難であったため、これらをカキ葉枯病 (英名: leaf spot of Japanese persimmon) の病原に追加した (Yasuda *et al.*, 2003)。

2. 品種による発病差異

(1) 材料および方法

1997年8月23日に鳥取県園芸試験場内に栽植されたカキ主要品種‘富有’、‘西条’、‘平核無’、‘伊豆’および‘刀根早生’の成葉を採取し、流水中で約30分間洗浄した後に風乾

Table 15. Pathogenicity of *Pestalotiopsis* spp. isolates to mature leaves of Japanese persimmon cv. Fuyu inoculated by spraying with conidial suspension

Isolate	Pathogenicity ^{a)}		Reisolation ^{b)}
	Wounded	Intact	
<i>Ps. longiseta</i> KOL-10	+	-	+
<i>Ps. glandicola</i> KDL-8	++	-	+
<i>Ps. acaciae</i> KH-1	++	-	+
<i>Ps. crassiuscula</i> TN-3	+	-	+
<i>Ps. longiseta</i> MAFF 752001	++	-	+
<i>Ps. theae</i> MAFF 752002	++	-	+

a) ++, Strongly pathogenic with large lesions; +, Moderately pathogenic with small lesions; -, No pathogenic without lesions.

b) +, Successful; -, Unsuccessful.

した。カキ葉枯病菌の *Ps. longiseta* KOL-10 を PSA 平板培地上に移植し、23℃（BLB 照射下）で 7 日間培養し、形成された分生子を 1×10^5 conidia/ml の濃度に調製し、プラスチックの先端をこの孢子懸濁液に浸漬した後、各品種の成葉に 1 葉当たり 6 か所押しつけて病原菌を有傷接種した。接種試験は、1 品種当たり 5 葉を用いて、合計 30 か所に接種した。接種葉は湿室（23℃，暗黒下）に置き、接種 10 日後に、形成された病斑の直径を計測した。

(2) 結果

供試したカキ主要品種は、カキ葉枯病菌 *Ps. longiseta* KOL-10 に対して、いずれの品種も罹病性であったが（Fig. 28），病斑の進展には有意な差がみられ、‘伊豆’で病斑の拡大が最も速く、次いで‘富有’，‘平核無’，‘禅寺丸’の順であった（Table 16）。供試した品種の中では‘西条’の病斑の拡大が最も遅かった。

第 5 節 防除対策

1. 有効薬剤の探索

(1) 材料および方法

第 3 節で得られた *Ps. longiseta* KOL-10 を代表菌株として各種薬剤を添加した PSA 培地上での菌糸生育を平板希釈法によって比較した。検定用培地は、約 60℃に保った PSA 培地に Table 17 に示した各種薬剤の有効成分が 100, 10, 1, 0 ppm になるように添加して調製した。供試菌株を PSA 培地で 7 日間培養（25℃，暗黒下）した後に直径 4 mm のコルクボーラーで菌叢を打ち抜き、薬剤検定用培地の中央に置床して 5 日間培養（25℃，暗黒下）した後、生育した最大菌叢直径を計測した。なお、試験は 3 反復で行った。

(2) 結果

平板希釈法によって、カキに登録のある殺菌剤をスクリーニングした結果、フルアジナム、イミノクタジンアルベシル酸塩、有機銅は 1 ppm の添加量でも菌糸伸長を完全に抑制した（Table 17）。また、イプロジオン、キャプタン、マンゼブなども比較的高い菌糸伸長抑制効果を示した。これらの薬剤は他のカキ病害で既登録であり、カキ葉枯病の防除薬剤としても有望であると考えられた。

なお、本病の発生が問題となったカキの開花期前後で主に使用されていたのは、灰色かび病の



Fig. 28. Symptoms on various cultivar leaves of Japanese persimmon reproduced 7 days after inoculation with *Pestalotiopsis longiseta* KOL-10. Conidial suspension 1×10^5 conidia/ml was inoculated to wounded region of healthy leaves.

Table 16. Comparison of disease incidence of leaf spot on leaves among the cultivars of Japanese persimmon

Cultivar	Developed lesion diameter (mm) ^{a)}
Izu	23.8 a
Fuyu	17.1 b
Hiratanenashi	16.1 b
Tonewase	15.8 b
Saijyo	10.3 c

a) Conidial suspension 1×10^5 conidia/ml of *Pestalotiopsis longiseta* KOL-10 was inoculated onto wounded leaves of each cultivar of Japanese persimmon. After incubation at 23°C in the dark for 7 days, developed lesion diameter was measured. Thirty regions were inoculated for each cultivar. Numbers in a column followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ in Duncan's multiple range test.

Table 17. Susceptibility of *Pestalotiopsis longiseta* KOL-10 to fungicides applied by plate dilution method^{a)}

Fungicide (formulation ^{b)} , content%)	Mycelial growth (mm)			
	100 ppm	10 ppm	1 ppm	0 ppm
Iminoctadine albesilate (WP, 40%)	0.0	0.0	0.0	
Fluazinam (FL, 39.5%)	0.0	0.0	0.0	
Oxine-copper (FL, 35%)	0.0	0.0	0.0	
Iprodione (WP, 50%)	0.0	0.0	37.4	
Dichlofluanid (WP, 50%)	0.0	9.4	33.5	
Captan (WP, 80%)	0.0	14.3	50.4	
Mancozeb (WP, 75%)	0.0	16.0	41.1	
Propineb (WP, 70%)	0.0	33.8	59.5	
Thiadiazin (WP, 70%)	0.0	36.3	54.8	
Triflumizole (WP, 30%)	6.6	26.7	45.3	
Fenarimol (WP, 12%)	11.0	28.0	40.0	
Mepanipyrim (FL, 40%)	19.6	32.7	54.0	
Dithianon (FL, 40%)	14.9	34.6	51.4	
Polyoxins (WP, 10%)	22.9	45.9	44.4	
Fluoroimide (WP, 75%)	36.9	57.9	61.1	
Kresoxim-methyl (DF, 47%)	35.4	40.6	38.5	
Azoxystrobin (FL, 10%)	21.6	36.9	37.4	
Thiophanate-methyl (WP, 70%)	49.9	59.7	61.5	
Benomyl (WP, 50%)	47.8	57.5	60.3	
Control				62.1

a) Each fungicide was suspended in PSA medium. Mycelial agar disks were inoculated on the center of test plates, and those were incubated at 25°C in the dark. Developed colony diameter was measured 7 days after inoculation.

b) WP, wettable powder; FL, flowable; DF, dryflowable.

防除薬剤として登録されているチオファネートメチル水和剤であったが、本剤は 100 ppm でも菌糸伸長をほとんど抑制しておらず、ベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌の発生によって防除効果がほとんど認められない可能性が示唆された。

2. 分離菌株のチオファネートメチル感受性検定

(1) 材料および方法

第3節で得られた *Pestalotiopsis* 属分離菌の 59 菌株を供試して、チオファネートメチルに対する感受性検定を行った。チオファネートメチル検定用培地は木曾（1994）の方法に従い、PSA 培地にチオファネートメチル水和剤の有効成分が 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0 ppm になるように添加して、121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌した後、シャーレに分注して調製した。供試菌株を PSA 培地で 7 日間培養（25℃, 暗黒下）した後直径 4 mm のコルクボーラーで菌叢を打ち抜き、薬剤検定用培地の中央に置床して 5 日間培養（25℃, 暗黒下）した後、生育した菌叢の最大直径を計測した。なお、試験は 3 反復で行い、各菌株の最小生育阻止濃度（MIC）によって薬剤感受性を評価した。

(2) 結果

鳥取県内のカキ栽培圃場 7 園地から分離した *Pestalotiopsis* 属菌 59 菌株のチオファネートメチル感受性検定を行った結果、本剤に対する薬剤感受性は高度耐性、中等度耐性、感受性に分布したが、59 菌株中 36 菌株（61%）は高度耐性菌であり、カキ葉枯病を引き起こす *Pestalotiopsis* 属菌の多くは、ベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌であると考えられ、本剤散布によるカキ葉枯病に対する防除効果は低い可能性が示唆された（Table 18）。

第6節 考察

カキ葉枯病は、我が国でカキに発生する病害のなかでも古くから知られている病害の一つであり、その発生程度は年次間差異が大きく、多発生することは稀である。本研究により、1996 年に鳥取県内に栽植されたカキで突発的に発生した斑点性病害は、カキではこれまで病原として未記録であった *Ps. glandicola*, *Ps. acaciae* および *Ps. crassiuscula* の 3 種を含む *Pestalotiopsis* 属菌による病害であることが立証されたため、これらをカキ葉枯病の新病原として追加した (Yasuda *et al.*, 2003)。

Table 18. Sensitivity to thiophanate-methyl of *Pestalotiopsis* spp. isolated from diseased leaves of Japanese persimmon in Tottori prefecture (1996)

Locality	Isolate number	MIC (mg/ml thiophanate-methyl)												
		≤0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	>800	
Kawahara-town	18	7				2								9
Koge-town	12						5							7
Tougou-town	10				5	1	2	1						1
Daier-town	19													19
Total	59	7			5	1	2	7	1					36

Pestalotiopsis 属菌は条件的寄生菌であることが知られており、本来腐生性が強いが、環境要因などによって宿主植物が傷ついたり、樹勢が弱ったりした場合に斑点性や枝枯性の病害を引き起こすと考えられる (Keith *et al*, 2006)。鳥取県において、カキ葉枯病の突発的な発生が問題となった 1996 年は、春先に強風害が多発し、その前年にも台風による強風害や連続降雨に伴う根傷みが発生していたことにより樹体が弱まっていた可能性が考えられた。

ところで、*Pestalotiopsis* 属は従来 *Pestalotia* 属として分類されていたが、Steyaert (1949) によって *Pestalotia* 属から独立させる分類体系が提唱され、現在ではこの考え方が主流に成りつつある。*Pestalotia* 属は、de Notaris (1839) によって設立された後、Saccardo (1884) により、菌の形態的特徴として、分生子が紡錘形～楕円形、4 細胞以上から成り、両端細胞が無色、中央の 2～4 細胞が有色、頂部に複数の長い付属糸を持ち、尾部に短い 1 本の付属糸をもって、分生子層上に並列して形成される糸状菌と定義され、1,000 種を超える多数の種が記載された。しかし、Steyaert (1949) は *Pestalotia* 属を、本属の基準種である *Pa. pezizoides* de Notaris が中間有色 4 細胞であることから、これと同一の形態的特徴を有するものを *Pestalotia* 属と限定し、中間有色細胞が 3 細胞のものを *Pestalotiopsis* 属、中央有色 2 細胞のものを *Truncatella* 属として創設し、転属処理を行った。この考え方は、いったんは Guba (1961) によって否定され、全てもとの *Pestalotia* 属に戻されたが、近年 Sutton (1980) や Nag Raj (1993) らが Steyaert (1949) の考えを支持し、現在は 3 属分割が菌学および植物病理学の分野でも広く受け入れられている (周藤・小林, 1995)。なお、Guba (1961) は、形態を主に宿主範囲を広くとり、広義の *Pestalotia* 属を 222 種にまで縮小整理した。我が国においても、Steyaert (1949) の *Pestalotia* 属の 3 属分割に従って日本産既知種を整理し、*Pestalotia* 属の針葉樹寄生種については転属処理が進められている (Suto and Kobayashi, 1993; 周藤・小林, 1995) が、広葉樹寄生種については個々に取り上げられているに過ぎず、未検討の種が多く残されている (高橋・小林, 1998)。カキ葉枯病の病原として記録されている *Pa. diospyri* も中間有色細胞が 3 細胞の種に該当するため、今後転属処理を行う必要がある。

本研究により、鳥取県内の東～中部のカキ栽培圃場から分離した *Pestalotiopsis* 属菌の多くは、*Ps. longiseta* であり、新病原として追加された *Ps. glandicola*, *Ps. acaciae* および *Ps. crassiuscula* は、特定の圃場から集中して分離される傾向であった。本来、*Pestalotiopsis* 属菌は任意寄生性で主に傷痕寄生者として多犯性の性質をもつこと、腐生者としても植物遺体の早い時期の分解者となっていることが知られてきた (高橋・小林, 1999)。また、*Ps. glandicola*, *Ps.*

acaciae および *Ps. crassiuscula* は広葉樹および針葉樹の病原菌として報告されている (Steyaert, 1953; Suto and Kobayashi, 1993)。これらのことから、カキ圃場周辺の植生が各圃場における *Pestalotiopsis* 属菌の優占種に影響を及ぼしているものと考えられた。なお、今回分離された *Pestalotiopsis* 属菌のなかにはカキ葉枯病の病原菌として記録されている *Pa. diospyri*, *Ps. breviseta*, *Ps. guepini* および *Ps. theae* は全く認められなかった。

また、本研究では、カキ葉枯病に対する有効薬剤を選抜するため、カキから分離された *Pestalotiopsis* 属菌のうち、鳥取県内の優占種と考えられた *Ps. longiseta* を代表菌株として、各種薬剤の菌糸伸長抑制効果をスクリーニングした。その結果、フルアジナム、イミノクタジンアルベシル酸塩、有機銅などの菌糸伸長抑制効果が高く、イプロジオン、キャプタン、マンゼブなども比較的高い菌糸伸長抑制効果を示した。これらの有効成分の殺菌剤は、カキ炭疽病やカキ落葉病などの主要病害防除の目的で、果実肥大期である 6 月以降に多く使用されており、これらの薬剤の同時防除作用によって、梅雨期以降のカキ葉枯病の発生は抑制されていると考えられる。しかし、本病の発生が問題となった 6 月までは、春期に発生が多いカキ灰色かび病の防除の目的でチオファネートメチル水和剤が主に使用されてきた。ところが、果菜類の灰色かび病などではベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌の発生が報告されており (木曾, 1994)、カキ葉枯病菌に対してもベンゾイミダゾール系薬剤感受性の低下が懸念されたため、チオファネートメチルに対する感受性検定を行った。その結果、鳥取県内のカキから分離された *Pestalotiopsis* 属菌の多くは、チオファネートメチルに対して高度耐性を獲得しており、本剤の防除効果はほとんど期待できないものと考えられた。

一方、本病多発の誘因として、強風害などによる葉や幼果へタ部の擦れや破損などの影響も大きいことが考えられた。先に述べたとおり、*Pestalotiopsis* 属菌は傷痕寄生者として多犯性の性質をもつため、1996 年の突発的な発生要因としては、春期の強風害の影響があげられる。また、その前年には秋期の長雨などにより、根傷みが多く発生していたと推察されたため、発芽期以降の樹体生理機能も低下していたことも本病の突発的な発生に影響していると考えられた。このようなことから、圃場における防風対策や排水対策も本病に対する重要な耕種的防除と考えられる。

第5章 *Nectria cinnabarina* によるカキ紅粒がんしゅ病

第1節 研究史

子のう菌類に分類される *Nectria* 属は，果樹類などの永年性の樹木類に寄生し，胴枯れ性病害を引き起こすものが多い。世界的にみると，*Nectria* 属のなかで最も重要な植物病原菌は，*Nectria galligena* Bresadola である。本菌は，欧州や北米などにおいてリンゴやセイヨウナシの枝幹部に寄生し，海外では *Nectria canker* または *European canker* と呼ばれている。本菌による病害は，我が国においては，富樫（1950）がリンゴ癌腫病として記載しているが，本病の発生例については具体性を欠いており，再検討が必要と指摘されている（工藤，1978）。

一方，同じ *Nectria* 属に属する *Nectria cinnabarina* (Tode:Fries) Fries は，紅粒がんしゅ病の病原菌として知られ，世界中に広く分布している（Cunningham, 1922; 富樫, 1950）。海外においては，*N. galligena* による病害と区別して，*coral spot*, *twig canker*, あるいは *Nectria twig blight* と呼ばれている。ただし，*N. galligena* による病害と比較して，*N. cinnabarina* による病害の被害程度は低く，海外においては本病の発生は，経済上あまり重要視されてこなかった。しかし，米国におけるリンゴの‘Rome’での発生事例のように，特定の圃場で突発的に発生し，かなりの被害を生じる場合がある（Thomas and Burrell, 1929）。

N. cinnabarina による紅粒がんしゅ病は，我が国においてはナシ，リンゴ，クリ，クルミ，クワ，チャ，カエデ，ケヤキ，トネリコ類，ナラ類，ニレ類，ツバキ，ブナなどに発生することが知られている（日本植物病理学会編，2000）が，このうち，遠藤（1929）がクワの紅粒がんしゅ病として，本邦で初めて記載した。その後，富樫（1950）は，リンゴの紅斑性がんしゅ病として記載し，ナシやスグリへの寄生性についても観察している。ナシで本病の発生が顕在化したのは1972年頃からで，秋田県のニホンナシ栽培地帯において多発生した後，山形県，富山県，千葉県，長野県などでも本病による被害が報告されるようになった（加藤ら，1976; 工藤，1978）。また，近年，鳥取県においても本病が散発的に発生しており，一部のナシ園では枝枯れや胴枯れによってかなりの被害が認められている。工藤（1978）は，ナシ紅粒がんしゅ病の病斑部から得られた分離菌株の病原性について詳細に調査し，接種試験によるとナシでは‘幸水’および‘長十郎’で本病の典型的な病徴

が再現されたが、‘二十世紀’では明瞭な症状を示さなかったとしている。また、リンゴ、クリ、カキなどに接種して分生子褥の形成を実験的に観察している。

こうしたなか、2005年1月に鳥取県内のカキ栽培圃場に栽植されている‘西条’において、枝幹部に鮮やかな紅色の小粒を無数に形成し、枝枯れや胴枯れなどを引き起こす病害が発生した (Yasuda and Izawa, 2007b)。本病の病徴は、ナシやクリに発生する紅粒がんしゅ病の病徴に類似していたが、これまでカキでは本病の自然発生は報告されていなかったため、本研究において詳細な調査を行った。

第2節 病徴

本病の発生は、2005年1月に鳥取県東伯郡北条町（現在の北栄町）の現地圃場で確認された。枝幹部の病斑はやや不明瞭であったが、発病部位は剪定箇所を中心とした枯れ込み部分に多い傾向であった。病斑上には冬期に鮮やかな紅色の小粒が出現した (Fig. 29a)。これは分生子褥上に形成された分生子の塊であり、乾燥している場合は、やや白色がかったが、降雨などによって水分を含んだ場合は、鮮やかな淡紅色となり、雨水などによって分生子が樹皮表面を流下した。分生子褥の形成は、晩秋から翌年の早春にかけて観察されたが、4月頃にはほとんどが消失した。また、分生子褥の周辺に赤褐色で球状の子のう殻が形成される場合が認められた (Fig. 29b)。これらの特徴的な標徴から、本病は *Nectria* 属菌による病害であると考えられた。なお、発芽後の生育期においては、病斑部より先端の枝幹部では枝枯れや胴枯れなどの症状が認められたが (Fig. 29c)、本病による被害程度は比較的低いものと考えられた。

第3節 分離菌の同定

1. 病斑部からの菌の分離

(1) 材料および方法

2005年1月に、鳥取県東伯郡北条町（現在の北栄町）の現地圃場から子のう殻を多数形成したカキ罹病枝を採取した。これを流水中でよく洗った後、水道水で膨潤させ、子のう殻から溢出した子のう胞子を少量の滅菌蒸留水で懸濁した。この懸濁液を白金耳で僅かにすくい取り、2%素寒天平板培地に画線し、光学顕微鏡 (Nikon Labophot) 下で単子のう胞子



a



b



c

Fig. 29. Natural symptoms of *Nectria* twig canker of Japanese persimmon cv. Saijyo.
a. Sporodochia formed on a pruning stub.
b. Perithecia and sporodochia, formed on a pruning stub.
c. Twig blight on a diseased branch.

を素寒天ごと切り出して、PDA 平板培地に置床した。

(2) 結果

単孢子分離によって、やや肌色がかかった白色の菌叢の糸状菌が得られ (Fig. 30a), 異なる罹病枝から同一性状の菌が高率に分離された。PDA 平板培地で 25°C (暗黒下), 7 日間培養した結果, 培養菌叢上には分生子などの形成は認められなかった。得られた単孢子分離菌株のうち, SA001 株 (=MAFF 239776) を供試して, 以下の実験を行った。

2. 形態観察および菌の同定

(1) 材料および方法

菌の形態観察は, 罹病枝上に形成された子とう殻内の子とう胞子および分生子褥上の分生子の形態を詳細に観察し, 既報 (Hickey, 1990 ; 工藤, 1978 ; 富樫, 1950) のものと比較した。

また, 分離菌株の PDA 培地上での菌糸生育に及ぼす温度の影響を調査した。菌株を PDA 平板培地で 25°C (暗黒下), 7 日間培養した後に直径 4 mm のコルクボーラーで菌叢を打ち抜き, 含菌寒天ディスクとした。これを新しい PDA 平板培地の中央に置床し, 5, 10, 15, 20, 22.5, 25, 30, 35°C で 5 日間培養 (暗黒下) した後, 生育した菌叢の最大直径を計測した。

(2) 結果

罹病枝上の子とう殻の形成は晩秋から認められ, その後翌年の早春にかけて発達した。子とう殻は, 暗赤色, 球状, 直径 300-400 μm , 数個~数十個が群生して, カキ枝幹部の樹皮表面に外生した (Fig. 30b)。子とう殻内には, 多数の子とうと糸状体が充満しており (Fig. 30c), 降雨などで膨潤すると子とう殻頂部の殻孔より, これらが溢出した。子とうは一重壁, 円筒形~棍棒状, 大きさ 75-90 \times 10 μm , 通常 8 個の子とう胞子を 1 列または 2 列に内包した (Fig. 30d)。子とう胞子は, 楕円形, 無色, 中央の横隔壁より 2 室に分かれ, 大きさ 12-20 \times 4-6 μm であった。

また, 罹病枝上には晩秋から翌年の早春にかけて鮮やかな紅色の分生子褥の形成が認められ (Fig. 30e), 直径 1-3 mm, 表面に分生子を豊富に形成した。分生子柄は分岐し, 隔膜を有し, フィアロ型分生子形成細胞より分生子を形成した。分生子は, 楕円形, 無色, 単

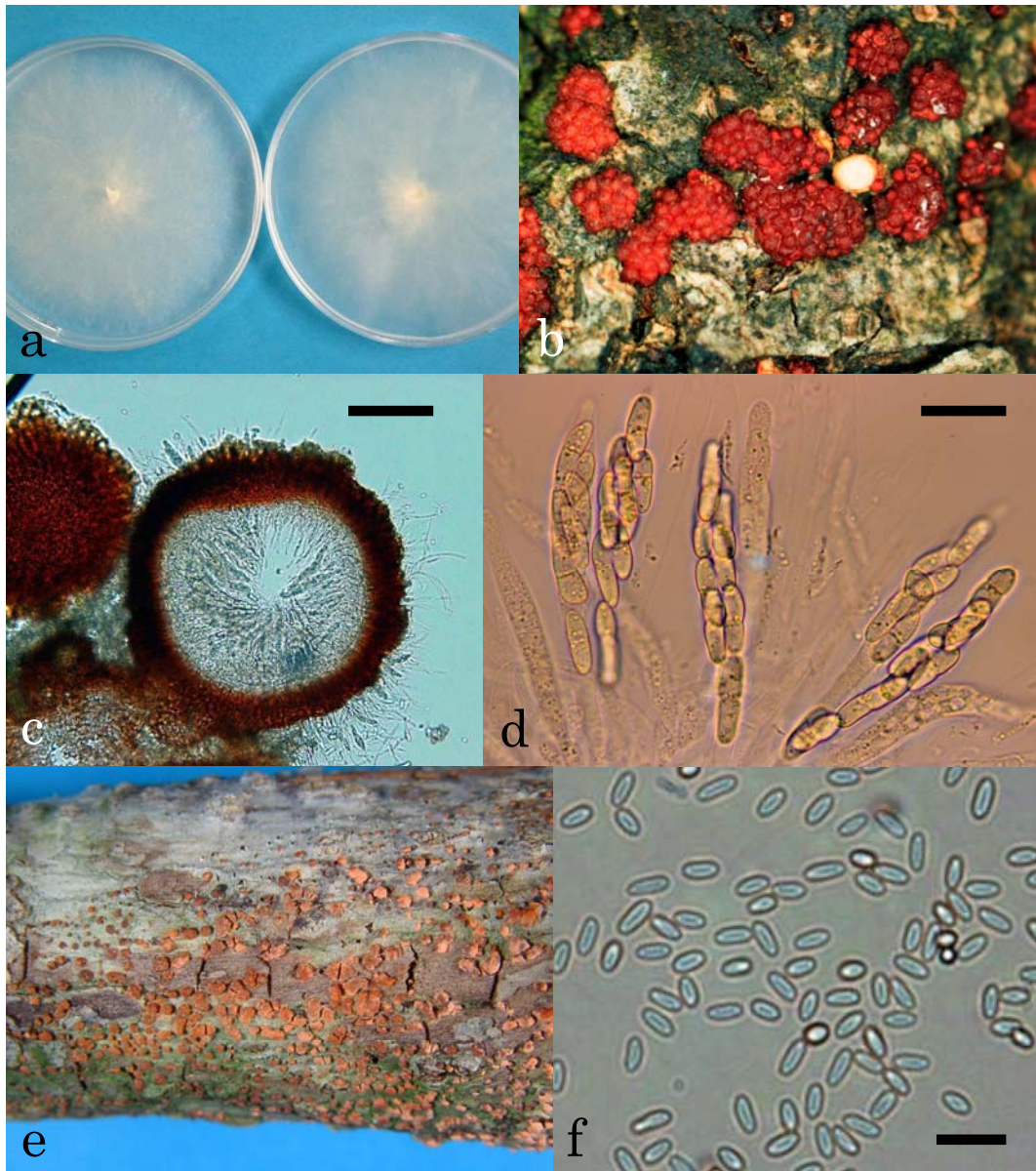


Fig. 30. Cultural and morphological characteristics of *Nectria cinnabarina*, the pathogen of Nectria twig blight of Japanese persimmon.

a. Colonies formed on potato dextrose agar (PDA) at 25°C in the dark for 7 days. (left, surface view; right, reverse view)

b. Perithecia formed on a diseased branch of Japanese persimmon.

c. Cross section of perithecium. Scale bar, 100 µm.

d. Asci and ascospores. Scale bar, 20 µm.

e. Sporodochia formed on a diseased branch of Japanese persimmon.

f. Conidia formed on Sporodochia. Scale bar, 10 µm.

胞，大きさは $4.5\text{-}6.5 \times 2.0\text{-}2.5 \mu\text{m}$ であった (Fig. 30f)。

また，各分離菌株を異なる温度条件下で 5 日間培養した結果， $5\text{-}30^\circ\text{C}$ で菌糸伸長が認められたが， $22.5\text{-}25^\circ\text{C}$ 付近が生育至適温度と考えられた (Fig. 31)。なお，暗黒条件下で培養した場合，PDA 培地上には分生子褥の形成は認められなかった。

以上の形態等と既報 (Hickey, 1990 ; 工藤, 1978 ; 富樫, 1950) の記載値との比較などから (Table 19) ，カキ罹病枝上の糸状菌および分離菌株 SA001 を *N. cinnabarina* と同定した。

第 4 節 分離菌の病原性

(1) 材料および方法

第 3 節で得られた分離菌株 SA001 を供試して，カキ樹に対する病原性を調査した。ポット栽培のカキ ‘富有’ および ‘西条’ の枝の表皮を約 1 cm の長さに削り，十分に熱したはんたごてで有傷部を軽く焼いた後に，PDA 平板培地で 14 日間前培養 (25°C ，暗黒下) した接種菌の含菌寒天を接種し，接ぎ木用のパラフィンテープで被覆した。パラフィンテープは 14 日後に除去し，その後は慣行栽培に従って管理した。接種箇所はポット当たり 5 箇所とし，各品種当たり 2 反復で試験を行った。分離菌の接種は 2005 年 3 月に行い，その後，約 1 年間にわたって発病の有無を調査した。

(2) 結果

2005 年 3 月に，分離菌株 SA001 を接種したポット栽培のカキ ‘富有’ および ‘西条’ は，接種後約 1 か月経過した時点で接種部位の周辺の樹皮に亀裂が生じ，やや陥没した病斑が形成されたが，病斑と健全部との境界は不明瞭であり，接種部位付近から発生した新梢の枝枯れは認められなかった。接種後約 7 か月が経過した 2005 年 10 月には，接種部位の周辺に分生子褥の形成が認められ，やがて気温の低下とともに発達した (Fig. 32a)。分生子褥の形成は，翌年の 3 月頃まで認められたが，5 月頃になると消失した。また，病斑上の一部には 2005 年 12 月頃から子のう殻の形成が認められた (Fig. 32b)。これらの病斑部からは接種菌が高率に再分離された (Table 20)。本研究によって，*N. cinnabarina* の病原性が立証されたが，本菌によるカキ病害は本邦未記録であったため，病名をカキ紅粒がんしゅ病 (英名 : coral spot, twig canker, または *Nectria twig blight*) と提唱した (Yasuda and Izawa, 2007b)。

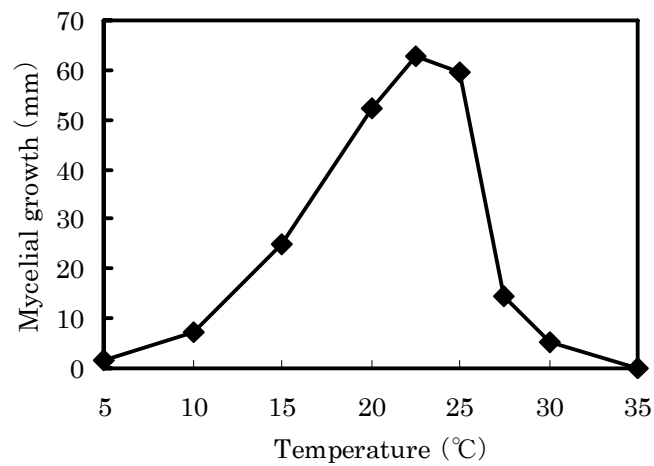


Fig. 31. Influence of temperature on mycelial growth of *Nectria cinnabarina*. An agar disk (4 mm diameter) of the isolate SA001 grown on PDA at 25°C in the dark for 7 days was transferred to unused PDA plates. After incubation at various temperatures in the dark for 5 days, colony diameters were measured.

Table 19. Morphological comparison of *Nectria cinnabarina* on different host plants

Host plant	Sporodochium	Conidium	Perithecium	Ascus	Ascospore
Japanese persimmon (the present study)	Bright pink, 1-3 mm in diameter	Single, ellipsoidal, hyaline, 4.5-6.5 × 2-2.5 μm	Globose, dark-red, 300-400 μm in diameter	Cylindrical to clavate, 75-90 × 10 μm	Eight, two-celled, colorless, elliptical, elongate, with obtuse end, 12-20 × 4-6 μm
Japanese pear ¹⁾	Coral red, 1-3 mm in diameter	Single, ellipsoidal, hyaline, 3-8 × 3 μm	Umber to burned umber	75-90 × 10 μm	Eight, two-celled, colorless, 13-20 × 5 μm
Apple ²⁾	Bright coral red, 1-3 mm in diameter	Single, ellipsoidal, hyaline, 6 × 2.5 μm	Globose, 250-400 μm in diameter	Cylindrical to clavate, 70-90 × 10 μm	Ellipsoidal, two-celled, colorless
Apple ³⁾	Bright pink or coral red, spherical, cushion-shaped, 2 mm in diameter	Single, ellipsoidal, hyaline, 4-6 × 2 μm	Globose, granular, bright cinnabar red, 375-400 μm in diameter	Clavate, 50-90 × 7-12 μm	Eight, two-celled, colorless, elliptical, elongate, with obtuse end, 12-20 × 4-6 μm

1) Kudo (1978).

2) Togashi (1950).

3) Hickey (1990).



Fig. 32. Symptoms reproduced on potted trees of Japanese persimmon cv. Fuyu in 8 months after inoculation with *Nectria cinnabarina* SA-001.

a. Sporodochia formed on epidermis.

b. Perithecia formed on barks.

Table 20. Pathogenicity of *N. cinnabarina* SA001 to Japanese persimmon^{a)}

Cultivar	Treatment ^{b)}	Disease incidence	Reisolation of inoculum
Fuyu	Inoculation	10/10	10/10
	Control	0/10	-
Saijyo	Inoculation	10/10	10/10
	Control	0/10	-

a) Disease incidence was evaluated by twig blight and emergent of sporodochia on barks. +, pathogenic; -, non pathogenic. Inoculation tests were replicated in ten pruning stubs.

b) Small mycelium plugs after cultivation on PDA plates at 25°C for 14 days were applied on fresh pruning stubs of potted trees of Japanese persimmon cvs. Fuyu and Saijyo after scorching by a soldering iron. Small plugs of PDA media were applied as control treatment.

第5節 考 察

紅粒がんしゅ病を引き起こす *N. cinnabarina* は、世界中に分布する糸状菌であり、多くの宿主植物に対する寄生菌、または枯死した枝幹部や地表面に残された剪定残さ上における腐生菌として生活している。本菌の宿主範囲は、ナラ、クヌギ、ケヤキ、ブナ、スグリなどの広葉樹をはじめ、ナシ、リンゴ、クリ、クルミなどの果樹作物が知られている（日本植物病理学会編, 2000）。また、工藤（1978）は、本菌のカキに対する病原性を室内接種試験によって観察したが、自然発病によるカキでの発生は本研究によって初めて明らかとなった（Yasuda and Izawa, 2007b）。

世界的にみると、果樹作物の本病による被害は、同じ *Nectria* 属に属する *N. galligena* のがんしゅ病と比較してほとんど問題にならないとされ、経済上あまり重要視されてこなかった。しかし、米国においては、過去にアンズやリンゴなどでかなりの被害を生じた事例が報告されており（Cunningham, 1922 ; Thomas and Burrell, 1929）、我が国においても 1970 年代に日本海側の各県を中心にニホンナシでの本病の多発が報告されている（工藤, 1978）。工藤（1978）は、ニホンナシで本病が突発的に多発した背景には、防除体系の変遷に伴う病原菌密度の増大と栽培品種の罹病性によるところが大きいとしている。本菌は広い宿主範囲を有するため、果樹園の周辺の広葉樹で普遍的に発病している可能性が十分にあり、好適な気象条件などの環境要因が整えば、近隣の果樹作物に感染し、突発的に本病が多発するものと考えられる。また、本病の多発地域が日本海側に集中することは、その病徴が厳冬期を除く低温期に明瞭になることに関連し、気象要因に大きく影響されているためと思われる（工藤, 1978）。本菌は、冬期の低温条件であっても菌糸生育が認められ、樹体内に侵入した菌糸は木質部内を進展する。また、雪害による折損部や凍霜害による被害部、さらに栽培管理で生じる剪定切り口は好適な侵入部位と考えられる。本研究で調査を行ったカキ紅粒がんしゅ病の発生圃場では、分生子褥および子のう殻の形成は、そのほとんどが剪定切り口周辺に観察されており、露出した剪定切り口が主たる感染部位であったと考えられる。カキの場合、品種による罹病性の差は、今回試験に供試した‘富有’と‘西条’ではほとんど同程度と考えられたが、その他の品種については不明である。しかし、これらのカキ品種は、全国的に古くから栽培されている品種であるため、鳥取県内で本病の発生が認められた事例は、栽培品種の罹病性よりも、むしろ気象条件や果樹園周辺

の植生など環境的な要因に因るところが大きいと思われる。本病の発生が認められたカキ園は谷間の水田転換園であり、周辺をナシ園や広葉樹の雑木林に囲まれていた。近隣のナシ園では、本病の発生は観察されなかったため、周辺の広葉樹の雑木林で寄生または腐生生活をしている病原菌が、第一次伝染源であったと推察された。

また、本病の伝染源は分生子と子のう胞子であるが、それぞれの胞子の役割はやや異なっていると考えられる。分生子は分生子褥上に塊状に形成され、乾燥条件下では乾固してほとんど分散しない。しかし、降雨などによって十分水分を含むと胞子塊が軟化し、病斑部から樹皮の表面を伝わって流下、または雨水とともに近距離に高濃度で伝搬される。一方、子のう胞子は十分な水分を含むと子のう殻の殻孔から放出され、風雨によって比較的広い範囲に分散するとされている（工藤，1978）。さらに、病原菌の感染時期については、各胞子の形成が認められる晩秋期から早春期までと考えられる。罹病樹の病斑部では、晩秋期から分生子褥が発達し、3月頃まで分生子の形成が認められ、子のう殻は冬期に成熟し、早春期にかけて子のう胞子の飛散が認められる。しかし、これらの病原菌の活動時期と宿主植物の感染可能部位との関連から推論すると、晩秋期には雪害による折損部や凍霜害による被害部や剪定切り口が存在せず、分生子褥状に分生子の形成は認められるものの、子のう胞子は未成熟の状態であり、病原菌の感染の機会にはあまり多くないものと考えられる。一方、早春期には、冬期に生じた雪害による折損部や凍霜害による被害部や剪定切り口によって生じた感染可能部位が樹上に多数存在し、分生子に加えて、子のう胞子も十分に成熟しているため、病原菌の感染の可能性が高いと考えられる。なお、近年は暖冬化傾向が強く、鳥取県内では雪害や凍霜害はほとんど認められないため、実際には剪定切り口からの病原菌の感染が多いものと推察された。

本病の防除対策を行うためには、病原菌の発生生態などから耕種的防除が最も効果的であると考えられる。分生子褥や子のう殻の形成が認められる病斑部は樹皮表面を削っても、病原菌が内部の木質部に残るため、可能な限り罹病枝は剪除して病原菌密度を低減する必要がある。また、本菌は腐生性も強いため、枯死した枝などは全て除去しておき、地表面に剪定残さを長期間放置しないことが重要である。これまでに、ナシなどで本病が多発した場合、地表面に長期間放置された剪定残さ上に本菌の分生子褥が多数形成され、その剪定残さが置かれた上方棚面の枝幹部に、本病の発生がしばしば観察されている。また、剪定作業の終了したカキ樹の剪定切り口には、チオファネートメチルペースト剤などを塗布し、カルス形成による癒合促進を図ることが有効な防除対策と考えられる。また、雪害な

どで大きく裂けた枝幹部は粗くなった傷口を削り，ペースト剤や樹脂などで傷口をふさぐ外科的治療を行うことが有効と考えられる。

第6章 総合考察

本研究では、ニホンナシおよびカキにおいて発生を認めたナシ汚果病、ナシ黒かび病（新称）、カキ葉枯病およびカキ紅粒がんしゅ病（新称）の4病害について、コッホの原則（Koch's postulates）に基づき病害を実証し、形態学的、生理生化学的および分子生物学的手法によって新病原の同定を行うことを研究の目的とした。本研究によって、ナシ汚果病の新病原として *Acaromyces ingoldii*, *Meira nashicola*, *Meira geulakonigii* および *Pseudozyma aphidis*, ナシ黒かび病（新称）の病原として *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*, カキ葉枯病の新病原として *Pestalotiopsis glandicola*, *Pestalotiopsis acaciae* および *Pestalotiopsis crassiuscula*, カキ紅粒がんしゅ病（新称）の病原として *Nectria cinnabarina* が明らかとなった。なお、ナシ汚果病の新病原として記録した *M. nashicola* は、本研究により新種記載された担子菌系酵母様菌であり、その種名は本病の宿主植物であるニホンナシにちなんで命名した。

植物病原菌の多くは作物の様々な部位に障害を与えて、生産物の減収や品質低下などによって直接的に経済的な被害を及ぼすものが多いが、なかには農産物の外観のみを汚損するコスメティック病害と呼ばれるものもあり、本研究で取り扱ったナシ汚果病、*Zygothia jamaicensis* Mason によるブドウすす点病、*Diaporthe citri* Wolf によるカンキツ黒点病などがこれにあたる。これらは発生しても果実の収量には直接影響せず、可食部の果肉部分の品質にもほとんど影響がない。こうしたコスメティック病害に対する防除の要否は議論のあるところであるが、実際にはこれらの病害による果実品質の低下は生産者にとっては大きな減収要因となる。この背景として、果実類は特に嗜好性の高い園芸作物であるため、食味はもとより外観が商品性の重要な要素となっている理由があげられる。消費者からは品質の高い農産物の供給が求められる一方で、生産者からは多大な労力やコストのともなう防除作業の軽減が求められているため、今後、コスメティック病害の発生生態を解明し、よりの確な防除対策に結びつけていくことが重要である。

本研究において、鳥取県内の現地圃場に栽植された青ナシ品種の‘二十世紀’および‘ゴールド二十世紀’に発生したナシ汚果病の新病原として *A. ingoldii*, *M. nashicola*, *M. geulakonigii* および *P. aphidis* の4種の担子菌系酵母様菌が関与していることが明らかとなった。これらの酵母様菌の感染様式は傷口感染によるものであり、本来これらの菌のナシに対する病原性は低いものと考えられる。しかし、収穫前にナシの果面に発生したクチ

クラ亀裂などの微細な傷口から感染し、果面で病原菌が増殖することで果面のアザなどの障害を引き起こすコスメティック病害の一種であり、青ナシ品種においては大きな減収要因となりうるため、今後とも注意が必要である。これらの酵母様菌は、ハダニ類に対する病原性や各種うどんこ病菌に対する拮抗作用を有することも報告されており (Boekhout *et al.*, 2003 ; Sztejnberg *et al.*, 2004 ; Paz *et al.*, 2007a ; Paz *et al.*, 2007b), 自然界でどのような役割を果たしているのか大変興味深い。また、これらの酵母様菌は、各種寒天培地上で暗褐色～茶色の色素を出し、比較的短期間のうちに培地を変色させる性質を有する。ナシの果面上においてもこれらの酵母様菌は色素を放出すると考えられ、これが果面に発生する赤アザ型病斑の直接的な原因となっているものと推察される。

ところで、本病に関する研究の発端となった青ナシ品種に特有のカビ梨症は、まだら模様の汚れ果症状と特有のカビ臭が特徴的な果面障害であるが、発生地域が鳥取県東伯郡東伯町および赤碕町（現在の琴浦町）にほぼ限定されている。この地域では、カビ梨症の発生が比較的多く認められた‘ゴールド二十世紀’への品種更新が早期から積極的に進められており、さらに他地域に比べて多肥栽培の傾向が強い。‘ゴールド二十世紀’は、‘二十世紀’を放射線育種することによって、ナシ黒斑病に対する耐病性品種として選抜された系統であるが (壽ら, 1992 ; 村田ら, 1994), ‘二十世紀’に比べて樹勢がやや強く、果実が収穫直前に後期肥大しやすい傾向が認められる。圃場診断による聞き取り調査の結果では、早期成園化および早期多収をねらった多肥栽培や過剰な堆肥の連年施用によって、夏期の肥効による果実の後期肥大が助長され、表皮細胞層まで達するクチクラ亀裂の発生を招いている可能性が示唆された。このため、本病に対する耕種的防除対策として、適正な樹勢となるように剪定方法や肥培管理を改善し、収穫直前の急激な果実肥大を避けるために梅雨明け後のかん水を適宜行うことが重要と考えられる。

また、いわゆる赤アザ症状を示すナシ汚果病の場合は、果実袋によって被袋された果実に発病するため、被袋後の殺菌剤散布による防除効果はほとんど期待できないと推察される。ナシに使用する果実袋は、従来から黒斑病や汚果病（アザ果）対策のために数種類の殺菌剤をパラフィン紙に処理したものを加工して製造されてきた。今後は、ナシの主要品種が‘二十世紀’から黒斑病抵抗性の青ナシ新品種に移行することが予想されるため、果実袋においては汚果病（アザ果）対策のための殺菌剤処理の重要性がより高まると考えられる。しかし、果実袋の殺菌剤処理は、農薬取締法および食品衛生法上の観点から、新規薬剤を実用化するのが困難な状況にあるため、天然物由来の抗菌性物質などのスクリーニ

ングや果実袋への既存の殺菌剤の処理技術の改良なども早急に着手する必要がある。

次に、ナシ黒かび病はポストハーベスト病害として突発的な発生が問題となった新病害である。現在の農産物の流通は複雑多岐にわたり、従来は生産地で集荷された農産物が市場に出荷され、仲卸業者や小売業者を経て、消費者の手元に届くというものであったが、近年は、市場や量販店の規模拡大に伴い、農産物の流通ルートは多様化している。さらに、‘二十世紀’などの日持ち性に優れる青ナシ品種では、海外への輸出展開が積極的であり、当初は国内販売向けの安定供給のための出荷調整の意味合いが大きかったが、現在では利益性を追求して極東アジア地域などの富裕層をターゲットにした販路拡大を画策している。このように、流通過程が多様化、複雑化、長期化することにより、ポストハーベスト病害などの障害が発生しても病原菌の特定が困難な場合や、従来考えられなかった新病害の発生が懸念される。

ポストハーベスト病害は、生育期間中に発生する病害と異なり、収穫後または出荷後に発生が認められる病害の総称であるが、病原菌の感染時期の違いなどから、便宜上いくつかのグループに分類される（田中, 1990）。まず、*Monilinia fructicola* (Winter) Honey によるモモ灰星病や *Phytophthora citrophthora* (R. E. & E. H. Smith) Leonian によるカンキツ褐色腐敗病などのように、収穫前から病原菌が既に感染しており、潜伏期間中に外観上無病徴の果実が収穫、出荷された後に発病に至るものである。次に、*Phomopsis* sp. によるナシ心腐病およびリンゴ心かび病などのように、収穫前に既に感染しているが、内部病徴のため、外観上健全なものとして収穫、出荷されるものである。さらに、*Botryosphaeria* sp. および *Phomopsis* sp. によるキウイフルーツ軟腐病などのように、収穫前に既に感染しているが、栽培期間中は全く発病せず、収穫後の追熟中に果実の生理的変化に伴って始めて発病するものである。そして、*R. stolonifer* var. *stolonifer* による果実類の黒かび病のように、健全な果実が収穫された後に病原菌に感染して発病するものであり、病原菌は多犯性で腐生的性質も強く、分生子が空中に浮遊している機会の多い糸状菌に多い。いずれにしても、これらのポストハーベスト病害は、生産地から消費者の手元に届くまでの期間、貯蔵温湿度、収穫から流通期間中に生じた果実の物理的損傷などによって被害状況は大きく異なると考えられる。ナシ黒かび病の場合は、成熟果のみに発生が認められ、収穫期に樹上で過熟となった果実での発病が稀に認められるが、通常は収穫後のコンテナもしくは出荷箱内での発病である。京都府において本病の発生が確認された 1997 年は、ナシの収穫期に降雨日が続き、収穫した果実がコンテナ内で多湿条件となったまま数日間放置された後、本病の発生が確認されている。

また、本病の発生が確認された圃場では、完熟収穫を出荷目標としており、通常よりも 2 週間以上も収穫時期を遅らせていたため、果実が過熟傾向であり、収穫作業などによって果皮に擦れや傷が生じやすかったことも本病発生の誘因となっていた可能性が高いと推察される。さらに、本病の発生は貯蔵温度によるところが大きく、20-25℃が病原菌の生育至適温度であるため、収穫後の貯蔵はできるだけ涼しい場所で行い、輸送時の庫内温度にも留意する必要がある。同一病原による黒かび病の発生が問題となるモモやオウトウの場合は、収穫直前に灰星病との同時防除をかねてイプロジオン水和剤などによる薬剤散布を行う場合が多いが、ナシの場合、有袋栽培が多いことや、イプロジオン剤を含めて収穫直前に使用可能な殺菌剤の登録が少ないため、本病防除のために薬剤防除に頼ることは現実的には困難であり、圃場衛生に努めるなどの耕種的防除や収穫後の貯蔵および流通時の温湿度管理などの物理的防除の徹底が重要である。

次に、カキ葉枯病は *Pa. diospyri*, *Ps. breviseta*, *Ps. guepini* および *Ps. longiseta* などの *Pestalotiopsis* 属および *Pestalotia* 属菌が既に病原として記録されていた（日本植物病理学会編，2000）が、本研究によってさらに、*Ps. glandicola*, *Ps. acaciae* および *Ps. crassiuscula* の 3 種の *Pestalotiopsis* 属菌が本病の新病原として追加された。鳥取県でカキ葉枯病が問題となったのは 1996 年であり、本県の主要品種である‘富有’や‘西条’の幼果のへたや葉に斑点性の病害として生産現場で問題となった。1996 年は、春期に強風害による葉や幼果へた部の擦れや破損などがの被害が多かったこと、5 月下旬以降がやや高温で経過したこと、前年の秋期の長雨による根傷みによって樹勢が弱まっていたことなどが、本病の発生を助長したと推察されたが、それ以降、本県において本病による大きな被害は発生していない。しかし、全国的にみると、*Pestalotiopsis* 属菌によるカキでの被害はむしろ増加しており、特に西日本の各産地において、果実での各種症状による被害が顕在化している。岐阜県では、*Ps. foedans* および *Ps. longiseta* によるカキ軟化腐敗病の被害が‘松本早生’、‘前川次郎’および‘太秋’などで発生しており（渡辺ら，2000；田口ら，2001；渡辺・田口，2001）、新潟県でもカキ‘平核無’や‘刀根早生’の果実の果頂部くぼみ果および芯黒果が発生し、数種の *Pestalotiopsis* 属菌の関与が報告されている（棚橋ら，2000）。さらに、島根県では‘西条’の果実黒すじ症状を呈する汚損果から *Pestalotiopsis* 属菌が高率に分離されており（山本，2002）、山口県では果実黒すじ症の原因菌として *Ps. glandicola* の病原性が立証されている（唐津，2003）。このように、全国的には、*Pestalotiopsis* 属菌によるカキ果実の被害は各地で認められているが、品種、発生部位、発生時期の違いなどによって、その症状は多岐にわたっている。

世界的にみても、本属菌によるカキでの病害の発生は増加しており、韓国 (Chang *et al.*, 1996) やスペイン (Tuset *et al.*, 1999) などでは *Ps. theae* の新発生が報告されている。なお、*Ps. theae* によるカキ病害は我が国においては、カキ葉枯病と区別してカキ輪紋葉枯病として記録されているが、日野 (1962) は、輪紋葉枯症状を示す病斑部から菌を分離した場合、*Pa. diospyri* が分離される場合もあり、これらを病徴のみで明確に区別することは困難な場合があると指摘している。また、本研究において、鳥取県内の複数のカキ圃場からカキ葉枯病の罹病葉を採取し、多数の分離菌株を得たが、分離されたのは *Ps. longiseta*, *Ps. glandicola*, *Ps. acaciae* および *Ps. crassiuscula* の 4 種のみであり、既報の *Pa. diospyri*, *Ps. breviseta*, *Ps. guepini*, *Ps. theae* などは分離されなかった。本来、*Pestalotiopsis* 属菌は任意寄生性で主に傷痕寄生者として多犯性の性質をもち (高橋・小林, 1999), 腐生的性質が強く、*Ps. glandicola*, *Ps. acaciae* および *Ps. crassiuscula* は広葉樹および針葉樹など広い宿主範囲を有する (Steyaert, 1953; Suto and Kobayashi, 1993) ことなどから、周辺の植生が各圃場における *Pestalotiopsis* 属菌の優占種に影響を及ぼしているものと考えられた。さらに、気象的誘因およびカキの生理的な素因が加わって、1996 年には本病の突発的な発生をみたと思われる。また、本病の発生が問題となった 6 月までは、春期に発生が多いカキ灰色かび病の防除の目的でチオファネートメチル水和剤が防除薬剤として主に使用されてきたが、鳥取県内のカキから分離された *Pestalotiopsis* 属菌の多くは、チオファネートメチルに対して高度耐性を獲得しており、本剤による防除効果はほとんど期待できないものと考えられた。本研究で行ったスクリーニングによって、*Pestalotiopsis* 属菌に対する高い菌糸伸長抑制効果を示したフルアジナム水和剤、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤、有機銅水和剤などが、現在ではカキの防除体型に取り入れられており、カキの主要病害に加えてカキ葉枯病に対しても高い防除効果を示しているものと考えられる。

最後に、カキ紅粒がんしゅ病は、2005 年 1 月に鳥取県内のカキ圃場で発生が確認された新病害である。本病は、子のう菌類に属する *Nectria cinnabarina* によって引き起こされる枝幹性病害であり、本菌は世界中に広く分布している。同一病原による紅粒がんしゅ病は、我が国においてはナシ、リンゴ、クリ、クルミ、クワ、チャ、カエデ、ケヤキ、トネリコ類、ナラ類、ニレ類、ツバキ、ブナなどに発生することが知られている (日本植物病理学会編, 2000)。本菌のカキに対する病原性は、工藤 (1978) による人工接種試験によって観察されていたが、自然発病によるカキでの発生は、本研究によって初めて確認された。本菌は比較的広い宿主範囲を有するため、果樹園の周辺の広葉樹などの植生で普遍的に発病

している可能性が十分にあり、好適な気象条件などの環境要因が整えば、本病が突発的に多発するものと考えられる。罹病樹の病斑上には、晩秋から翌年の早春にかけて淡紅色で小粒点様の分生子褥が認められ、この表面に分生子が塊状に形成される。また、分生子褥とは別の子座上に暗赤色で粟粒状の子のう殻が形成される。こうした特徴的な標徴から、本病の診断は比較的容易であり、剪定などの作業中に本病の発生に気づくことが多いものと思われる。本病による果樹作物の被害は、1920年代に米国でのアンズやリンゴで多発した事例（Cunningham, 1922 ; Thomas and Burrell, 1929）や、我が国においても1970年代に日本海側の各県を中心にニホンナシでの発生が報告されており（工藤, 1978）、突発的に大きな被害をもたらしている。近年、鳥取県内において、ニホンナシでの本病の発生は散発的に確認される程度であるが、一度圃場内で発生をみると、数年間にわたって本病の発生が継続的に認められるため、被害が拡大しないように圃場内での発生動向に注意する必要がある。また、カキ紅粒がんしゅ病の発生圃場で調査を行った結果、分生子褥および子のう殻の形成は、ほとんどが剪定切り口周辺に観察されており、剪定によって露出した切り口が主たる感染部位であると推察された。さらに、発生圃場では、分生子褥を形成した病斑を含む剪定残さをカキ樹の株元に長期間放置していたため、これが越冬伝染源となっていた可能性が高いと考えられた。これらのことから、剪定作業によって生じた切り口は、ペースト剤塗布による癒合促進を図り、病原菌の感染の機会を減らすことが重要である。また、本菌は腐生的性質も強いため、樹上の病斑部だけでなく、剪定残さ上でも長期間生存可能であり、長期間の剪定残さの放置は避けるべきである。また、近年は暖冬化傾向が強いため、日本海側の各県は積雪量が減少しているものの、気象的には冬期に曇雨天日が多く、太平洋側に比較すると、本病の発病には好適な条件が続くことが考えられるため、今後、カキのみならず他の果樹作物も含めて本病の発生には注意が必要である。

果樹に限らず、野菜および花き類などを含む園芸作物の生産栽培では、収量性のみならず生産物の品質向上も重要な栽培目標であり、病虫害による品質低下を最小限にとどめるため、迅速で的確な防除対策が必要である。特に、果樹作物の場合、高品質な果実を安定生産するため、年々薬剤の散布回数が増加し、高い防除圧によって病害防除の徹底が図られていることから、現行の防除体系を維持する限り、新規に発生する病害のリスクは比較的少ないと考えられてきた。しかし、近年は、消費者の減農薬志向による薬剤防除体系の見直しや地球規模の温暖化による大きな気象変動などの影響を受けて、*Candidatus Liberibacter asiaticus* によって引き起こされるカンキツグリーンング病などをはじめとす

る海外からの侵入病害や新しい栽培体系や品種の導入などによる新病害発生のリスクは次第に高まっている。

他方、ナシえそ斑点病やナシ萎縮病など古くから発生が確認されているが、未だに病原が特定されず、的確な防除対策が図られていない重要病害も少なくない。ナシえそ斑点病は接ぎ木伝染性が確認されているため、ウイルス病害である可能性が極めて高いと考えられているが、これまで多くの研究者によって調査研究が行われてきたにもかかわらず、病原ウイルス粒子は確認されていないため、病原不明のままとなっている。また、ナシ萎縮病は近年、全国的に‘幸水’などで発生が急激に増加している病害であり、早期の病原特定および防除対策の確立が強く望まれている病害である。本病は、当初ウイルス病害である可能性が示唆されていたが、佐久間ら（1993）は、接ぎ木伝染性は認められず、材質腐朽菌による病害であるであるとし、*Phellinus igniarius* (Linnaeus:Fries) Quélet を病原として推定した。近年、安田ら（2005b）は、全国のナシ萎縮病罹病樹から分離した糸状菌のrDNA部分塩基配列解析を行った結果、分離菌は材質腐朽菌の*Phellinus* spp.であることを報告し、一部の分離菌についてはナシ樹への人工接種によって、病徴の再現が可能であった（塩田ら、2008）。本病は分離菌の分子生物学的な系統解析などによって病原菌の同定がさらに進められており、病原菌の種レベルでの同定および発生生態の解明が進むものと期待される。

以上述べてきたように、農作物の生育不良、収量減少、品質低下といった農業生産現場での被害には、糸状菌、放線菌、細菌、ファイトプラズマなどの微生物およびウイルス、ウイロイドなどによるものが多く、そのなかでも糸状菌による病害が多数を占めている。これらの生物的病原に起因する植物病害を正確に診断することは、農業の生産現場において、的確な防除対策を迅速に打ち立てるために最も基本的で重要なことであり、発病初期の正しい診断によって、病害の進展や被害の見通し、防除の要否および防除方法の選択の判断材料になりうる。こうした病害診断は、発生圃場の被害状況の確認による圃場診断と、罹病植物の検鏡や各種の鑑定手法を用いた植物診断とで成り立つが、実際には持ち込まれた罹病植物の限られた材料のみで正確な診断を求められることも少なくない。

圃場診断では、実際に病害が発生している圃場で、作物の病徴から病気の種類を推定するとともに被害状況を把握し、その病害に対する適切な防除方法を探ることが重要である。そのためには、作物上の発生部位、圃場内における病害発生の位置関係、病害が発生するまでの栽培管理や環境条件などを分析する必要がある。多くの病害は、罹病植物の病徴や

標徴によって病原を推定することが可能であるが、こうした肉眼観察のみによる鑑定法は経験を積んで習得せざるを得ない。また、病徴は常に典型的に現れるとは限らず、栽培品種、作型、気象条件、作物の生育状況、耕種管理などによっても変動しうるものである。もし、診断者が直接圃場診断できない場合は、依頼者から出来るかぎり詳細に発生状況の聞き取りを行うことが必要である。

また、植物診断では、病徴診断だけでなく検鏡や各種の鑑定手法を用いて行われるが、想定される病原の種類によって、その手法を選択する必要がある。まず、病徴診断として、肉眼で病徴および標徴を詳細に観察し、典型的な病徴や標徴、罹病植物が発しているアルコール臭などの特徴的な臭気、打診による異常音の有無などを確認する。もし、最初の植物診断の時点で病原菌の典型的な標徴が形成されていない場合でも、病患部の一部を20-25℃の温室条件下に1-2日置いておけば、糸状菌病害の場合、孢子などの何らかの標徴を形成することが多いため、早期の診断が可能となる。また、細菌病の場合、病患部からの細菌粘塊の溢出や、導管からの細菌泥の噴出など肉眼による診断が容易であるが、正確な診断を期する場合は血清学的な診断等を併用する必要がある。そして、肉眼的な観察で病原を特定することが困難な場合は、病患部の切片や罹病植物上に形成された標徴の一部などを顕微鏡観察することによって診断を進める。糸状菌の場合、光学顕微鏡を用いて、菌糸の隔壁の有無、孢子の形状などによって、ある程度の診断が可能になる。ウイルス、ウイロイド、ファイトプラズマは光学顕微鏡では観察できないほど微小であるため、TEMに頼らざるを得ない。ウイルスなどの観察をするためには、植物の病患部の一部を化学固定し、超薄切片を作成するのが最も確実な方法であるが、試料調製のためには、特殊な装置だけでなく、習熟した技術や多大な時間が必要となるため、日常的な診断に用いることは困難である。このため、ウイルスなどの観察には、病患部の汁液と2%リタングテン酸溶液との混合液をグリッド上の支持膜に付着させて風乾後に観察するネガティブ染色法が一般的に行われている。しかし、ウイルスや細菌などは、肉眼および顕微鏡観察などによってその存在が確認できたとしても、その種類の正確な同定は不可能であるため、血清学的診断によってさらに診断を正確に行う必要がある。血清学的手法として、免疫沈降反応法、ラテックス凝集反応法、DIBA法(Dot immunobinding assay)、ELISA法(Enzyme-linked immunosorbent assay)、RIPA法(Rapid immunofilter paper assay)、免疫電顕法などがある。これらは、診断に要する時間や検体当たりのコストがそれぞれ異なるため、検体数や求められる精度などに応じて手法を選択する必要がある。さらに、ウ

ウイルス病などの場合は想定される宿主植物に罹病植物の汁液を接種して病徴発現を確認する生物的診断も併用することで診断の精度はより高められる。

こうした診断技法を組み合わせ、農業生産現場において問題となっている病害を出来るかぎり早急に診断することにより、適切な防除対策を講じることが可能となるが、病徴観察や標徴のみによる植物診断は熟練を要し、病原菌の純粋培養や検定植物への接種などは相当な日数を要するため、早期に病原を特定することは困難な場合が多い。このような問題を解決する手段として、植物病学の分野でも各種の遺伝子診断技術が実用化され、植物病原の同定、病害診断にも応用されつつある。なかでも、PCR法はDNAポリメラーゼと特異的な領域を含むDNA断片（プライマー）とを用いることで罹病植物体内にわずかに混在する病原体のDNAを高感度に検出可能である。この遺伝子診断技術は、高度な知識や技術をあまり必要としないため、従来の形態学的な微生物同定と比べると汎用性が高く、経験の少ない研究者でも、正確で迅速な病害診断が可能である。また、分子生物学的手法によって、微生物学における分類学や系統進化学の分野で新たな情報が次々と集積されており、分子系統学的知見からの分類体系の再編が進められていくものと思われる。本研究において、ナシ汚果病の罹病果実から分離された *M. nashicola* は、従来の形態学的観察、生化学的性状調査に加えて、分子生物学的な系統解析によって、新種の担子菌系酵母様菌であることが明らかとなった。また、本病の病原として記録されていた *Hyalodendron* sp. についても、rDNA部分塩基配列解析などから、担子菌系酵母様菌の *A. ingoldii* と再同定された。そもそも、*Hyalodendron* 属は菌蕈綱 (Hymenomycetes) に分類されるのに対し、*Acaromyces* 属はクロボキン綱 (Ustilaginomycetes) に属すると考えられるため、両者の遺伝的な近縁関係は離れているが、形態的には極めて類似しており、これらの形態的特徴による識別は困難とされている (Boekhout *et al.*, 2003)。こうした事例からも、分子レベルでの遺伝的解析は、今後ますます重要度を増すことがうかがわれる。したがって、これまで報告された菌種等を代表する菌株がその再同定や他の菌株の同定、分類に際して供試可能であるかどうかはこれまで以上に重要になってくるとと思われる (富岡, 2005)。微生物の標本や保存菌株の集積を行っていくことは、微生物分類学の研究材料の蓄積として、貴重な財産になるものと考えられるため、ジーンバンクなどのカルチャーコレクションのさらなる整備、拡張も重要であろう。

農作物の病害診断は第一義的には病名と病原を明らかにすることである。しかし、農業生産現場での診断は単にそれにとどまらず、診断依頼者に対して、その病害に対する防除

対策を明示することも重要である。このため、病名や病原の確定はできるだけ迅速に行うだけでなく、発生現場での発生状況の確認、今後の被害の見通し、現時点での防除対策や次作に向けての予防対策の提示などを包括したものが診断の対象となる。また、こうした診断作業の過程では、本研究で示したとおり、過去に発生報告のない病害（新病害）の発生や、既知の病害と同一症状の病徴を示す場合でも、過去に発生報告のない病原（新病原）の発生が確認される場合がある。これらのうち、農業生産上重要と考えられるものは、できるだけ速やかに病原菌の同定や病原性の立証を行い、新病害（新病原）として日本植物病理学会に報告し、本学会に設置された日本植物病名委員会の審査を受ける必要がある。ここで、新病名（新病原）の提案に対して、新病名の妥当性や病原同定の根拠などについて審議がなされた後、日本植物病名目録に記録されることとなる。正式に新病害（新病原）を報告することは、産地や生産者ごとに呼ばれている俗称による混乱を避けるために名称を統一することや、農薬適用拡大や防除対策の広報普及のために重要な作業である。また、異なる都道府県で同一の新病害（新病原）が発生していた場合、病原の同定や病原性の立証などに関する研究業務の無駄な重複を避けることにもなる。

近年、難波ら（2008）は、植物病全般の診断から防除に至る臨床技術を扱う学問分野として植物医科学を設立し、植物病に対応する臨床技術の専門家たる植物医師の育成および植物医師が活動するための植物病院の設置とそのネットワークの構築を提唱している。これまで植物病学の分野では、大学や独立行政法人研究機関あるいは民間企業などで病原別、作物別に専門性を分化して研究がなされてきた。一方で、各都道府県の公設試験研究機関などでは農業生産現場からの要望や依頼に対応して、総合的に病害診断業務を行っている状況にあり、それぞれの研究機関の専門性を生かした植物病害診断のネットワーク構築が強く求められている。このなかで、病害診断のデータベースやカルテを共有し、実際の病徴写真、病原の形態、圃場および植物診断、防除対策までを網羅した幅広いネットワークを構築し、多くの情報を共有することにより、特に各都道府県の公設試験研究機関における病害診断業務の精度向上、迅速化、効率化を図ることが可能と思われる。こうしたデータベースの構築は一部で実用化されつつあり、今後の展開が期待される。

我が国におけるナシやカキなどの果樹作物の栽培を取り巻く環境として、これまでも増して、消費者からのニーズが多様化するとともに、地球温暖化の影響を受けて、さらなる暖冬化や局地的集中豪雨の発生など気象環境の変化がもたらされるものと推察される。また、鳥取県だけでなく、各都道府県では各産地のブランドを確立して有利販売するため

に新品種の育成や新たな技術普及が進められている。こうした社会的背景および気象的環境の変化から、果樹作物においては、今後ますます新病害の発生が増加するものと予測される。したがって、植物病の病原同定と病害診断に関する研究は、安定した農業生産を支えるための基盤研究分野として今後とも継続的に取り組む必要があると考える。

摘 要

鳥取県では古くから果樹作物の栽培が盛んであり、特にニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai var. *culta* Nakai, syn. *P. serotina* Rehd. var. *culta* Rehd.) およびカキ (*Diospyros kaki* Thunb.) が主要な品目として広く栽培されている。近年、これらの果樹作物において新たに発生を認めた数種新病害について、病害の実証および病原菌の同定を行い、以下の結論を得た。

1. 担子菌系酵母様菌によるナシ汚果病

2001年頃から、鳥取県内の圃場に栽植されたニホンナシ‘二十世紀’および‘ゴールド二十世紀’の収穫果実に赤アザを伴う汚れ果症状の発生が認められた。症状の激しいものは特徴的なカビ臭を伴い、数日後には病斑部に皺が生じ、果実が萎縮した。病斑上には酵母様菌の紡錘形分生子の連鎖や出芽によって増殖する長円体～楕円体の酵母様細胞が観察された。汚れ果症状を呈する果実の果面から菌を分離した結果、複数種の糸状菌に加えて、4種の酵母様菌が高率に分離された。これらの酵母様菌の形態的特徴、生化学的性状、rDNA部分塩基配列解析の結果などから、各分離菌株を *Acaromyces ingoldii* Boekhout, Scorzetti, Gerson & Szejnberg (PFS 007), *Meira* sp. (PFS 002), *M. geulakonigii* Boekhout, Scorzetti, Gerson & Szejnberg (PFS 014), *Pseudozyma aphidis* (Henninger & Windisch) Boekhout (PFS 037) と同定した。また、分離菌株 PFS 002 はこれまでに記載されている *Meira* 属のいずれの種にも該当しないため、分子系統解析の結果などから本属の新種であると結論し、*Meira nashicola* F. Yasuda & H. Otani, sp. nov.として新種記載した(基準菌株 PFS 002 =MAFF 230028 =CBS 117161)。これらの担子菌系酵母様菌の各菌株を健全な‘ゴールド二十世紀’幼果に噴霧接種した結果、収穫果実に赤褐色のアザを伴う汚れ果症状が再現され、発病した果実の病斑部からは接種菌が再分離された。本研究により、ニホンナシの汚れ果症状の病原であることが立証された担子菌系酵母様菌の *A. ingoldii*, *M. nashicola*, *M. geulakonigii* および *P. aphidis* による汚れ果症状は、既報の *Alternaria* sp., *Hyalodendron* sp., *Phomopsis* sp. および *Stenella* sp. によるナシ汚果病(英名: fruit stain of Japanese pear)の病徴との区別が困難であると考えられたため、本病の病原に追加した。また、本病の病原として記録されている *Hyalodendron* sp. は分子系統解析などから *A. ingoldii* と同一種であると再同定されたため、病原学名変更を提案した。

2. *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*によるナシ黒かび病

1997年9月に、京都府内の圃場に栽植されたニホンナシ‘二十世紀’の収穫果実にボタ腐れ症状が発生した。罹病果実には、はじめ果皮に褐色を帯びた水浸状病斑が認められ、果皮が破れると酸味のある臭いの汁液が漏出した。病斑上には白色の菌糸がまん延し、やがて病斑上の白色菌糸の表面には黒色小粒状の胞子のうを多数形成した。罹病果実から得られた単孢子分離菌株 Rh-9701s は PDA 培地上で空中を伸びる無隔壁のほふく菌糸と分岐の多い仮根を形成しながら、迅速に生育した。仮根の反対側には数本の胞子のう柄が真直に伸長し、胞子のうは胞子のう柄の先端部に形成された。胞子のうが成熟すると容易に破れ、内部に形成された無数の胞子のう胞子が離脱分散した。胞子のう胞子は有角垂球～広楕円形、褐色、単細胞で表面全体に細い稜線状隆起が認められた。単孢子分離菌株 Rh-9701s と *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg:Fries) Vuillemin var. *stolonifer* の保存菌株 MAFF 305786 との対峙培養によって、黒色、垂球形の接合胞子の形成が認められた。以上の形態的特徴等から、本菌株を *R. stolonifer* var. *stolonifer* と同定した。分離菌株の病原性を確認するため、異なる生育ステージのナシ果実に対する接種試験を行った結果、未熟な幼果では、有傷および無傷接種のいずれの場合も発病は全く認められなかった。一方、成熟した果実では、無傷接種では発病は認められなかったが、有傷接種では病徴が再現され、病斑部から接種菌が再分離された。本菌によるナシ病害は本邦未記録であったため、病名をナシ黒かび病(英名: *Rhizopus rot of Japanese pear*)と命名した。

3. *Pestalotiopsis* spp.によるカキ葉枯病

1996年6月に、鳥取県内に栽植されたカキ‘富有’および‘西条’において、幼葉と幼果のへたに斑点病斑を生じる病害が発生した。はじめ硬化した葉と幼果のへたに小黒点病斑が認められ、病斑が次第に拡大して不正円形～多角形で赤褐色となり、周縁が黒褐色で健全部との境界が明瞭な病斑が形成された。病斑部の表面には黒色小粒状の分生子層を多数生じた。罹病葉の病勢が進むと、葉面積の半分以上まで赤褐色の病斑が拡大し、早期落葉を引き起こした。幼果の果面や枝に病徴は認められなかった。葉や幼果のへたの病斑部から得られた *Pestalotiopsis* 属(以下、*Ps.*)菌を単孢子分離し、分生子の形態観察を行った結果、分生子の大きさ、付属糸の長さおよび太さ、中央有色3細胞の色調などに違いが認められた。各分離菌株の分生子の形態的特徴等から、各菌株を *Ps. glandicola* (Castagne)

Steyaert (KDL-8 および ES-1), *Ps. longiseta* (Spegazzini) Dai & Kobayashi (KOL-10), *Ps. acaciae* (Thümen) Yokoyama & Kaneko (KH-1) および *Ps. crassiuscula* Steyaert (TN-3) と同定した。カキ ‘富有’ の成葉を付傷し、各菌株の孢子懸濁液を噴霧接種した結果、供試した各分離菌株は、いずれも有傷部位から病斑の形成が認められ、病斑部から接種菌が再分離された。*Pestalotiopsis* 属および *Pestalotia* 属(以下, *Pa.*) 菌によるカキ病害は、*Pa. diospyri* H. & P. Sydow, *Ps. breviseta* (Saccardo) Steyaert, *Ps. guepini* (Desmazières) Steyaert および *Ps. longiseta* によるカキ葉枯病, *Ps. theae* (Sawada) Steyaert によるカキ輪紋葉枯病が記録されている。本研究で新たに *Ps. glandicola*, *Ps. acaciae* および *Ps. crassiuscula* の病原性が立証されたが、これらの病原菌によるカキの病徴は既報の病原菌による病徴との区別が困難と考えられたため、これらをカキ葉枯病(英名: leaf spot of Japanese persimmon)の病原に追加した。

4. *Nectria cinnabarina* によるカキ紅粒がんしゅ病

2005年1月に、鳥取県内の圃場に栽植されたカキ ‘西条’ において、枝幹部に鮮やかな紅色の小粒を無数に形成し、枝枯れや胴枯れなどを引き起こす病害が発生した。枝幹部の病斑はやや不明瞭であったが、発病部位は剪定箇所を中心とした枯れ込み部分、枝の有傷部や裂け目などの周辺に認められた。病斑上には、晩秋期に気温が低下すると、紅色で小粒状の分生子褥上に形成された分生子の塊が形成され、時間の経過とともに鮮やかな紅色となった。分生子褥は子座と分生子柄から成り、無色、単胞、長楕円形の分生子を形成した。また、分生子褥の周辺に赤褐色で球状の子のう殻の形成が認められた。子のう殻内には、多数の子のうと糸状体が充満しており、降雨などで膨潤すると子のう殻頂部の殻孔より、これらが溢出した。子のうは一重壁、円筒形～棍棒状、通常8個の子のう胞子を内包した。子のう胞子は、楕円形、無色、2細胞であった。以上の形態的特徴等から、本菌を *Nectria cinnabarina* (Tode:Fries) Fries と同定した。ポット栽培のカキ ‘富有’ および ‘西条’ に本菌の単子のう胞子分離菌株 SA001 を有傷接種した結果、接種後約1か月経過した時点で接種部位の周辺の樹皮に亀裂が生じ、やや陥没した病斑を形成した。接種後約7か月経過すると、接種部位の周辺に自然発病のものと同一の分生子褥の形成が認められた。形成された病斑部からは接種菌が再分離された。本研究によって、*N. cinnabarina* の病原性が立証されたが、本菌によるカキ病害は本邦未記録であったため、病名をカキ紅粒がんしゅ病(英名: coral spot, twig canker, または *Nectria* twig blight)と命名した。

謝 辞

本研究の実施および本論文を草するにあたり、鳥取大学農学部教授 尾谷 浩博士には種々有意義な御指導、貴重な御助言と暖かい激励を賜り、かつ本稿の御校閲の労を執っていただいた。ここに謹んで深甚なる感謝の意を表す。

本研究を遂行するにあたり、島根大学生物資源科学部教授 荒瀬 榮博士、山口大学農学部教授 田中秀平博士、鳥取大学農学部教授 前川二太郎博士、鳥取大学農学部教授 児玉基一朗博士には有益な御助言と本稿の御校閲を賜った。ここに厚く御礼申し上げる。

また、酵母様菌の同定および新種報告のためのラテン語記載に関する御指導をいただいた元 山口大学農学部教授 勝本 謙博士および元 理化学研究所 中瀬 崇博士、*Rhizopus* 属菌の同定に関する御指導と御助言をいただいた独立行政法人 農業生物資源研究所 佐藤豊三博士および鳥取大学農学部教授 中島廣光博士、*Pestalotiopsis* 属菌の同定に関する御指導をいただいた元 東京農業大学嘱託教授 小林享夫博士、ナシ果実表皮構造の透過型電子顕微鏡観察を御指導いただいた神戸大学大学院農学研究科教授 朴 杓允博士、ナシ果実表皮構造の光学顕微鏡観察を御指導いただいた鳥取大学農学部教授 田村文男博士の上記各位に衷心より深謝の意を表す。

さらに、鳥取大学農学部教授 田辺賢二博士、独立行政法人 農業環境技術研究所 石井英夫博士、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所 中村 仁博士、三重大学生物資源学部准教授 中島千春博士、石川県立大学助教 田中栄爾博士には種々の実験手法に関する懇切丁寧な御指導と貴重な御助言をいただいた。鳥取大学農学部（現 独立行政法人 国際農林水産業研究センター）赤松 創博士、同（現 鳥取大学 産学・地域連携推進機構）山岸大輔博士には共同研究者として塩基配列解析に御協力いただいた。岡山県立農業総合研究センター農業試験場（現 J A全農岡山県本部）那須英夫博士、同 井上幸次博士には貴重な菌株を分譲していただき、本研究遂行の御助言を賜った。千葉県農林総合研究センター 梅本清作博士、長野県南信農業試験場 江口直樹氏、兵庫県立農林水産技術総合センター 神頭武嗣博士、岡山県農業総合センター 川口 章博士、鳥取県農林総合研究所園芸試験場 白岩裕隆博士には有益な御助言と学位取得に向けて終始激励をいただいた。上記の方々に対し、ここに記して深く拝謝する次第である。

本研究中に在任された元 鳥取県園芸試験場 場長 内田正人博士、同（現 J A全農鳥取県本部）井上耕介氏、鳥取県農林総合研究所園芸試験場 場長 齊藤 哲氏、同 次長 村田謙

司氏には研究の遂行にあたって特段の御配慮と御鞭撻を賜った。元 鳥取県果樹野菜試験場場長 宇田川英夫博士，元 鳥取県園芸試験場 環境研究室長 故谷口達雄氏，同（現 鳥取県中部総合事務所農林局東伯農業改良普及所）渡辺博幸氏，同（現 鳥取県農林総合研究所企画総務部）伊澤宏毅博士，鳥取県西部総合事務所農林局大山農業改良普及所 佐古 勇博士には試験成績の取りまとめや本論文の執筆などで御助言いただいた。また，鳥取県農林総合研究所園芸試験場 環境研究室長 岡山裕志氏には，本論文の取りまとめに際し，終始適切な御指導ならびに職務全般に御配慮をいただいた。さらに，鳥取県園芸試験場（現 鳥取県農林総合研究所園芸試験場）の各研究員，各農業技手および各非常勤職員，鳥取県内の各農業改良普及所職員，J A全農鳥取県本部職員，各J Aの営農指導員および現地試験を実施させていただいた園地の生産者には各種調査での御協力と御支援をいただいた。これら各位に改めて厚く感謝の意を表す。

引用文献

- 新居直祐 (1991). 新果樹園芸学. pp. 35-51, 朝倉書店, 東京.
- Barron, G.L. (1968). The Genera of Hyphomycetes from Soil. pp. 208-210, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Begerow, D., Bauer, R., and Boekhout, T. (2000). Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. Mycol. Res. 104: 53-60.
- Begerow, D., Bauer, R., and Oberwinkler, F. (2002). The Exobasidiales: an evolutionary hypothesis. Mycol. Prog. 1: 187-199.
- Boekhout, T. (1991). A revision of ballistoconidia-forming yeast and fungi. Stud. Mycol. 33: 1-194.
- Boekhout, T. (1995). *Pseudozyma* Bandoni emend. Boekhout, a genus for yeast-like anamorphs of Ustilaginales. J. Gen. Appl. Microbiol. 41: 359-366.
- Boekhout, T., Theelen, B., Houbraken, J., Robert, V., Scorzetti, G., Gafni, A., Gerson, U., and Sztejnberg, A. (2003). Novel anamorphic mite-associated fungi belonging to the Ustilaginomycetes: *Meira geulakonigii* gen. nov., sp. nov., *Meira argovae* sp. nov. and *Acaromyces ingoldii* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1655- 1664.
- Chang, T.H., Lim, T.H., Chung, B.K., Kim, B.S., and Shim, H.K. (1996). Occurrence of leaf blight on sweet persimmon tree by *Pestalotiopsis theae*. Korean J. Plant Pathol. 12: 377-379.
- Cunningham, G.H. (1922). Coral-spot, *Nectria cinnabarina* (Tode) Fries. A wound-parasite of fruit-trees. NZ Jour. Agric. 25: 354-359.
- Cavalier-Smith, T. (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? Biosystems 14: 461-481.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. Microbiol. Rev. 57: 953-994.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 297-354.
- 臺 喜吉・木村 茂・後藤正昭・小林享夫 (1990). 輸入検疫中の米国産キイチゴに発生した

- 枝枯症状とその病原菌. 植防研報 26: 1-6.
- de Hoog, G.S. (1979). The black yeasts, II *Moniliella* and allied genera. Taxonomic review of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *Hyalodendron*. Stud. Mycol. 19: 1-36.
- de Notaris, G. (1839). Micromycetes italici vel minus cogniti, Taurini. Dec. Secundas Mem. Reale Accad. Sci. Torino 3: 69-82.
- Diddens, H.A. (1934). Eine neue Pilzgattung, *Hyalodendron*. Zentbl. Bakt. ParasitKde. Abt. II 90: 315-319.
- Domsch, K.H. and Gams, W. (1980). Compendium of Soil Fungi. Vol. 1. pp. 707-709, IHW- Verlag, Eching.
- 江塚昭典・安藤康雄 (1994). チャの病害. pp. 210-239, 日本植物防疫協会, 東京.
- 遠藤保太郎 (1929). 桑樹病理学. pp. 139-143, 明文堂, 東京.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., and Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1351-1371.
- Fell, J.W. and Scorzetti, G. (2004). Reassignment of the basidiomycetous yeasts *Trichosporon pullulans* to *Guehomyces pullulans* gen. nov., comb. nov. and *Hyalodendron lignicola* to *Trichosporon lignicola* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 995-998.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Guba, E.F. (1961). Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia*. 342p, Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Guého, E., Improvisi, L., Christen, R., and de Hoog, G.S. (1993). Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. Antonie van Leeuwenhoek 63: 175-189.
- 浜屋悦次・堀川知廣 (1982). *Pestalotia longiseta* Spegazzini によるチャ輪斑病. 茶技研 62: 21-27.
- 林 真二 (1960). 果樹栽培生理新書 梨. pp. 237-256, 朝倉書店, 東京.

- 林 真二・田辺賢二 (1991). くだものつくりの基礎. pp. 150-164, 鳥取県果実農業協同組合, 鳥取.
- Henninger, W. and Windisch, S. (1975). A new yeast of *Sterigmatomyces*, *S. aphidis* sp. n. Arch. Microbiol. 105: 49-50.
- Hickey, K.D. (1990). Nectria twig blight. In Compendium of Apple and Pear Diseases. (Jones, A.L. and Aldwinckle, H.S., eds.), p. 35, APS Press, St. Paul, MN.
- 日野隆之 (1962). カキ葉枯病の病原菌. 植物防疫 16: 287-288.
- 平田尚美 (1987). 果樹園芸. pp. 91-114, 文永堂出版, 東京.
- 池上八郎 (1983). 植物糸状菌の防除(6). 農及園 58: 951-955.
- 井上幸次・安井淑彦・那須英夫 (2007). ナシ汚果病の発生環境と防除対策. 植物防疫 61: 508-510.
- 伊澤宏毅 (1999). ナミハダニによるナシ果面障害果の発生. 応動昆 43: 97-99.
- 柿寫 眞 (2001). 生物 8 界説にもとづく菌類の分類. 植物防疫 55: 376-381.
- 加藤作美・深谷富夫・山王丸雅子 (1976). ナシ紅粒がんしゅ病—秋田県における発生の概要と二, 三の知見. 東北農業研究 18: 205-207.
- 唐津達彦・福原宏行・野崎 匠 (2003). *Pestalotiopsis glandicola* (Castagne) Steyaert によるカキ果実黒すじ症状の発生. 近畿中国四国農研 2: 72-76.
- Keith, L.M., Velasquez, M.E., and Zee, F.T. (2006). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. Plant Dis. 90: 16-23.
- 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.
- 木曾 皓 (1994). 植物防疫基礎講座 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(6) 野菜類灰色かび病菌. 植物防疫 48: 42-46.
- 小林享夫 (2006). カラー版 植物病原アトラス 目でみるウイルス・細菌・菌類の世界(米山勝美ほか編). pp. 78-84, ソフトサイエンス社, 東京.
- 壽 和夫・真田哲朗・西田光夫・藤田晴彦・池田富喜夫 (1992). ニホンナシ新品種 ‘ゴールド二十世紀’. 生物研報 7: 105-120.
- 工藤 晟 (1978). ニホンナシの紅粒がんしゅ病. 果樹試報 A5: 73-90.
- 工藤 晟・青葉幸一 (1990). 市場病害ガイドブック(田中寛康 編). pp. 55-86, 日本植物防

- 疫協会, 東京.
- 久能 均 (1998). 新編 植物病理学概論. pp. 1-22, 養賢堂, 東京.
- 松尾綾男・神納 浄・宇津敏夫 (1970). イチジク黒かび病の発生と防除に関する試験. 兵庫農試研報 18: 103-106.
- 松尾 平 (1958). 梨「尻黒」の防除法. 農及園 33: 43-46.
- 三浦小四郎・宮下忠博・村石正夫 (1974). 二十世紀ナシの「雨やけ」(収穫期における果皮障害)に関する研究. 長農総南信試報 1: 20-36.
- 三浦宏一郎 (1978). 菌類図鑑(上). pp. 300-301, 講談社, 東京.
- 桃沢匡勝 (1954). 梨廿世紀の栽培に対する二三の問題(4). 農及園 29: 509-512.
- 村田謙司・北川健一・増田哲男・井上耕介・壽 和夫・内田正人・長柄 稔・吉岡藤治・田平弘基・渡辺博幸・吉田 亮 (1994). ガンマ線の急照射によるナシ黒斑病耐病性突然変異体の選抜. 園学雑 62: 701-706.
- 村田壽太郎 (1915). 柿の病害と防除法. 農業国 9(10): 30-35.
- Nag Raj, T.R. (1993). Coelomycetous Anamorphs with Appendage-Bearing Conidia, 1101p, Mycologue Publications, Waterloo.
- 中村三夫 (1987). 果樹園芸. pp. 114-132, 文永堂出版, 東京.
- 難波成任・堀江博道・西尾 健 (2008). 植物医科学 上. pp. 1-30, 養賢堂, 東京.
- 那須英夫・中桐 昭 (1997). 岡山県に発生したナシ汚果病の病原菌. 岡山農試研報 15: 25-30.
- 那須英夫 (1998). *Stenella* 属菌によるセイヨウナシ汚果病(新称). 岡山農試研報 16: 7-12.
- 日本植物病理学会編 (2000). 日本植物病名目録. 857p, 日本植物防疫協会, 東京.
- 新田浩通 (1997). イチジク成熟果の腐敗防止に関する研究. 第1報 水浸状腐敗果の発生における果実の熟度, 温度と湿度条件, 薬剤散布及び袋かけの影響. 広島農技セ研報 65: 17-26.
- 野島友雄 (1928). 柿の葉枯病を起因する「ペスタロッチア」菌の二種類に就いて (予報). 病虫雑 15: 85-91.
- Obenauf, G.L., Ogawa, J.M., Ler, M., and Frate, C.A. (1982). Fungicide control of molds that attack caprifigs. Plant Dis. 66: 566-567.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic, and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. (Reynolds, D.R. and Taylor, J.W., eds.), pp. 225-236, CAB International, Wallingford.

- Ogawa, J.M., Mathre, J.H., Weber, D.J., and Lyda, S.D. (1963). Effects of 2,6-dichloro-4-nitroaniline on rhizopus species and its comparison with other fungicides on control of rhizopus rot of peaches. *Phytopathology* 53: 950-955.
- 大崎 守・松尾 平・古賀次雄 (1956). 梨廿世紀の果皮の色沢に関する研究 (第1報). 九州農業研究 17: 94-95.
- 大崎 守・松尾 平 (1958). 梨廿世紀の果皮の色沢に関する研究 (第2報). 九州農業研究 20: 82-84.
- Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Paz, Z., Gerson, U., Sztejnberg, A. (2007a). Assaying three new fungi against citrus mites in the laboratory, and a field trial. *Biocontrol* 52: 855-862.
- Paz, Z., Burdman, S., Gerson, U., Sztejnberg, A. (2007b). Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2570-2579.
- Saccardo, P.A. (1884). *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum* III. 860p, Sumptibus auctoris, Patavii.
- 貞松光男・実松孝明 (1983). ナシの汚れ果病 (新称) の発生実態ならびに病原について. 佐賀果試報 8: 79-91.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- 佐久間勉・高村尚武・落合政文・小林 正・阿部恭久・田中寛康・高梨和雄 (1993). ニホンナシに発生するヒポキシロン幹腐病 (新称) と萎縮病. 果樹試報 24: 45-59.
- Schipper, M.A.A. (1984). A revision of the genus *Rhizopus*. The *Rh. stolonifer* group and *Rh. oryzae*. *Stud. Mycol.* 25: 1-19.
- 塩田あずさ・金子洋平・中村 仁・安田文俊・押田正義 (2008). ナシ萎縮病樹から分離された *Phellinus* 属菌の接種による萎縮症状の発生. 日植病報 74: 37 (講要).
- Snowdon, A.L. (1990). *A Color Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*, Vol. 1. 302p, Wolfe Scientific Ltd., London.
- Steyaert, R.L. (1949). Contribution a l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. *Bull. Jard. Bot. Brux.* 19: 285-358.

- Steyaert, R.L. (1953). New and old species of *Pestalotiopsis*. Trans. Br. Mycol. Soc. 36: 81-89.
- Sugita, T., Cañete-Gibas, C.F., Takashima, M., and Nakase, T. (1999). Three new species of *Bullera* isolated from leaves in the Ogasawara Islands. Mycoscience 40: 491-501.
- 杉田 隆・西川朱實 (2004). DNA 塩基配列解析による病原真菌の分類・同定. 真菌誌 45: 55-58.
- Suto, Y. and Kobayashi, T. (1993). Taxonomic studies on the species of *Pestalotiopsis*, parasitic on conifers in Japan. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 34: 323-344.
- 周藤靖雄・小林享夫 (1995). 針葉樹のペスタロチア病(I)病原菌の分類. 森林防疫 44: 70-78.
- Sutton, B.C. (1980). The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. 696p, Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Szteinberg, A., Paz, Z., Boekhout, T., Gafni, A., and Gerson, U. (2004). A new fungus with dual biocontrol capabilities: reducing the numbers of phytophagous mites and powdery mildew disease damage. Crop Protect. 23: 1125-1129.
- 田口義広・渡辺秀樹・秋田 滋・百町満朗 (2001). カキの軟化腐敗症の発生原因と防除. 日植病報 67: 33-41.
- 高橋幸吉・小林享夫 (1998). マツ類およびアカエゾマツの植木に発生したペスタロチア葉枯病. 樹木医学研究 2: 9-15.
- 高橋幸吉・小林享夫 (1999). マツ類の植木に発生したペスタロチア葉枯病 (続報). 樹木医学研究 3: 21-30.
- 棚橋 恵・根津 潔・山口吉博 (2000). カキ果実のくぼみ及び芯黒果 (通称) の発生とその原因. 日植病報 66: 98 (講要).
- Tanaka, E., Shimizu, K., Imanishi, Y., Yasuda, F., and Tanaka, C. (2008). Isolation of basidiomycetous anamorphic yeast-like fungus *Meira argovae* found on Japanese bamboo. Mycoscience 49: 329-333.
- 田中寛康 (1977). 青梨の汚れ果. 今月の農薬 21(6): 70-73.
- 田中寛康 (1990). 市場病害ガイドブック(田中寛康 編). pp. 1-3, 日本植物防疫協会, 東京.
- 田中寛康 (1995). 植物病理学事典 (日本植物病理学会 編). pp. 650-654, 養賢堂, 東京.
- Thomas, H.E. and Burrell, A.B. (1929). A twig canker of apple caused by *Nectria*

- cinnabarina*. *Phytopathology* 19: 1125-1128.
- 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. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680.
- 富樫浩吾 (1950). 果樹病害. pp. 39-40, 朝倉書店, 東京.
- 富岡啓介 (2005). 菌類による花卉・野菜の新病害の立証と診断. *近中四農研セ研報* 5: 91-187.
- 鳥取農試果樹分場 (1952). 二十世紀梨の所謂「空袋」と「ボタ腐れ」について. *因伯之果樹* 6(11): 7-10.
- Tuset, J.J., Hinarejos, C., and Mira, J.L. (1999). First report of leaf blight on sweet persimmon tree by *Pestalotiopsis theae* in Spain. *Plant Dis.* 83: 1070.
- 渡辺秀樹・田口義広・秋田 滋 (2000). カキの軟化腐敗から分離される *Pestalotiopsis* 属菌. *日植病報* 66: 98 (講要).
- 渡辺秀樹・田口義広 (2001). カキ果実軟腐病 (仮称) の発生と防除. *植物防疫* 55: 307-310.
- Wells, J.M. and Harvey, J.M. (1970). Combination heat and 2,6-dichloro-4-nitroaniline treatments for control of rhizopus rot and brown rot of peaches, plums and nectarines. *Phytopathology* 60: 116-120.
- Whittaker, R.H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* 163: 150-160.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, 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, San Diego.
- 山本 淳 (2002). *Pestalotiopsis*属菌によるカキの汚損果の発生. *日植病報*68: 80 (講要).
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *In The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th Edn. (Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., eds.), pp. 77-100, Elsevier, Amsterdam.
- 安田文俊・佐藤豊三・渡辺博幸 (1999a). *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*によるナシ

- 黒かび病 (新称). 日植病報 65: 376 (講要).
- 安田文俊・渡辺博幸・佐藤豊三 (1999b). ナシ黒かび病 (新称) の発生生態と防除対策. 植物防疫 53: 257-260.
- Yasuda, F., Kobayashi, T., Watanabe, H., and Izawa, H. (2003). Addition of *Pestalotiopsis* spp. to leaf spot pathogens of Japanese persimmon. J. Gen. Plant Pathol. 69: 29-32.
- 安田文俊・山岸大輔・赤松 創・伊澤宏毅・児玉基一郎・尾谷 浩 (2005a). 担子菌系酵母様菌 *Acaromyces ingoldii* および *Meira* sp.によるナシ汚果病 (病原追加). 日植病報 71: 156-165.
- 安田文俊・中村 仁・辻 雅人・押田正義・大谷 徹・伊澤宏毅 (2005b). ナシ萎縮病発病樹から分離された糸状菌の形態学的観察と rDNA 部分塩基配列を用いた系統解析. 日植病報 71: 220 (講要).
- Yasuda, F., Yamagishi, D., Akamatsu, H., Izawa, H., Kodama, M., and Otani, H. (2006). *Meira nashicola* sp. nov., a novel basidiomycetous, anamorphic yeastlike fungus isolated from Japanese pear fruit with reddish stain. Mycoscience 47: 36-40.
- 安田文俊・山岸大輔・伊澤宏毅・児玉基一郎・尾谷 浩 (2007a). 担子菌系酵母様菌 *Meira geulakonigii* および *Pseudozyma aphidis* によるナシ汚果病 (病原追加). 日植病報 73: 166-171.
- Yasuda, F. and Izawa, H. (2007b). The occurrence of coral spot of Japanese persimmon caused by *Nectria cinnabarina* (Tode:Fries) Fries. J. Gen. Plant Pathol. 73: 405-407.
- 米山寛一 (2001). 梨の来た道 アジア浪漫紀行. pp. 1-161, 鳥取県立二十世紀梨記念館, 鳥取.

Studies on the Causal Pathogens of New Diseases on Japanese Pear and Persimmon

Fumitoshi Yasuda

Summary

Fruit tree crops have been cultivated in whole area of Tottori Prefecture, Japan. Especially Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai var. *culta* Nakai, syn. *P. serotina* Rehder var. *culta* Rehder) and persimmon (*Diospyros kaki* Thunberg) are the most important agricultural products economically. In recent years, several kinds of new diseases occurred on these fruit tree crops. This study was undertaken to verify the new diseases occurred on Japanese pear and persimmon and identify the causal pathogens.

1. Fruit stain of Japanese pear caused by basidiomycetous yeastlike fungi

Since around 2001, fruit stain disease on Japanese pear cvs. Nijisseiki and Gold Nijisseiki has occurred frequently in Tottori Prefecture, Japan. The typical symptom of the disease was a reddish stain on the fruit surface accompanied by a fusty smell. In severe cases, the wilt of fruits appeared few days later harvesting. Several kinds of yeastlike fungi acropetally sporulating of blastoconidia or polar budding cells on an acropetal rachis were observed on the lesions of the diseased fruits. Morphologically different four species of yeastlike fungi were isolated from diseased fruits along with several kinds of filamentous fungi. Based on morphological and physiological characteristics and partial sequence analyses of rDNA, the isolates of basidiomycetous yeastlike fungi were identified as *Acaromyces ingoldii* Boekhout, Scorzetti, Gerson & Szejnberg (PFS 007), *Meira* sp. (PFS 002), *Meira geulakonigii* Boekhout, Scorzetti, Gerson & Szejnberg (PFS 014), and *Pseudozyma aphidis* (Henninger & Windisch) Boekhout (PFS 037), respectively. Moreover, based on conventional and chemo-

taxonomic studies and molecular phylogenetic analyses of rDNA, the isolate PFS 002 was speculated as a new species of the genus *Meira*, and the name *Meira nashicola* F. Yasuda & H. Otani, sp. nov. was proposed for the strain (type strain PFS 002 =MAFF 230028 =CBS 117161). These four species of the basidiomycetous yeastlike fungi produced reddish stain on the surface of matured fruits of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki by the inoculation of spore suspension in the young fruit stage, and were reisolated successfully from the diseased fruits. Because *Alternaria* sp., *Hyalodendron* sp., *Phomopsis* sp. and *Stenella* sp. have already been recorded as the causal pathogens of Japanese pear fruit stain, it was proposed to add current *A. ingoldii*, *M. nashicola*, *M. geulakonigii*, and *P. aphidis* in the pathogens of fruit stain of Japanese pear (*Yogoreka-byô* in Japanese). Besides, *Hyalodendron* sp. previously reported as the cause of Japanese fruit stain was correctly identified as *A. ingoldii* from the results of partial sequence analyses of rDNA in this study.

2. Rhizopus rot of Japanese pear caused by *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*

In September 1997, fruit rot of Japanese pear cv. Nijisseiki was found in Kyoto Prefecture, Japan. The typical symptom was a soft brown rot, and the lesion enlarged rapidly. When a skin covering the lesion was ruptured, juices with sour odour leaked out. White mould strands were formed on lesions and gave rise to white globular spore-heads which later turn black. The colony of the monoconidial isolate Rh-9701s grew rapidly on PDA media producing hyaline aseptate stolons and well developed rhizoids. Numbers of sporangiophores elongated straightly on the opposite side of a rhizoid. Sporangia were produced on the terminal of sporangiophores. Angular-globose to oval, pale brown, unicellular sporangiospores were formed on the face of sporangia. Black, warted zygosporangia were produced in the dual culture with the compatible isolate MAFF 305786 of *R. stolonifer* (Ehrenberg:Fries) Vuillemin var. *stolonifer*. Based on morphological characteristics, the isolate Rh-9701s was identified as *R. stolonifer* var. *stolonifer*. Pathogenicity of the isolates of *R. stolonifer* var. *stolonifer* against mature fruits of Japanese pear was confirmed by the wounded-inoculation, and the inoculated fungus was reisolated successfully from the diseased fruits. Because the disease of

Japanese pear caused by *R. stolonifer* var. *stolonifer* was unknown in Japan, Rhizopus rot of Japanese pear (*Kurokabi-byô* in Japanese) was proposed as the disease name.

3. Leaf spot of Japanese persimmon caused by *Pestalotiopsis* spp.

In June 1996, leaf spot disease on Japanese persimmon occurred in Tottori Prefecture, Japan. Early symptom was ring spot on the leaves and the calyxes of young fruits. Small black spots (1-3 mm in diameter) appeared initially and then gradually enlarged changing to auburn or grayish brown circular ring spots with a black border. Small, black acervular conidiomata were visible on the surface of the lesions. In severe cases, lesions developed on more than half area of the diseased leaf, resulting in early defoliation. No symptom was seen on the surface of young fruits and twigs. The monoconidial isolates of *Pestalotiopsis* (*Ps.*) spp. obtained from the lesions were different in terms of the size of conidia, length and thickness of the apical appendages, and color of three median cells. Based on morphological characteristics, the isolates were identified as *Ps. longiseta* (Spegazzini) Dai & Kobayashi (KOL-10), *Ps. glandicola* (Castagne) Steyaert (KDL-8 and ES-1), *Ps. acaciae* (Thümen) Yokoyama & Kaneko (KH-1) and *Ps. crassiuscula* Steyaert (TN-3). Pathogenicity of the each isolate of *Pestalotiopsis* spp. against mature leaves of Japanese persimmon was confirmed by the wounded-inoculation, and the each inoculated fungus was reisolated successfully from the developed lesions. Several species of the genus *Pestalotiopsis* and the genus *Pestalotia* (*Pa.*) have been already reported as the pathogens of Japanese persimmon in Japan. *Pa. diospyri* H. & P. Sydow, *Ps. breviseta* (Saccardo) Steyaert, *Ps. guepini* (Desmazières) Steyaert, and *Ps. longiseta* are known as pathogens of leaf spot of Japanese persimmon. In addition, *Ps. theae* (Sawada) Steyaert also has been reported to cause leaf blight of Japanese persimmon. Because symptoms of *Ps. glandicola*, *Ps. acaciae* and *Ps. crassiuscula* confirmed by the pathogenicity in this study was not able to distinguish from those of other *Pestalotiopsis* and *Pestalotia* spp. previously reported, *Pestalotiopsis* spp. identified in this study were proposed to add in the pathogens of leaf spot of Japanese persimmon (*Hagare-byô* in Japanese).

4. Coral spot of Japanese persimmon caused by *Nectria cinnabarina*

In January 2005, a twig canker disease on Japanese persimmon with characteristic coral spots was found in Tottori Prefecture, Japan. Early symptom of the disease was small sunken cankers around pruning stubs, wounds of twigs or crevices of branches. After development of the cankers, small bright pink pustules erupted through the bark or dead pruning stubs in the late autumn. They were pinkish at first, and then became darker with age. The pustules were spherical, cushion-shaped sporodochia, which produced conidia in profusion. Sporodochia consisted of stromata and conidiophores bearing single, ellipsoidal, hyaline conidia. On older cankers, small, globose, dark-red perithecia, which contained a mass of clavate asci were produced on the stromata densely. Each perithecium had a small pore (ostiole), and contained numerous clavate asci, immixed slender paraphyses. Each ascus contained eight, one-septate, colorless ascospores, which are elliptical and elongate, with obtuse ends. Based on morphological characteristics, the fungus observed on the lesions of a twig canker disease of Japanese persimmon was identified as *Nectria cinnabarina* (Tode:Fries) Fries. Mycelium plugs of the monoconidial isolate SA001 of *N. cinnabarina* obtained from the lesion were inoculated on fresh pruning stubs of potted trees of Japanese persimmon cvs. Fuyu and Saijyo. Sunken cankers with crack of the bark developed slowly in the growing season. A mass of bright colored sporodochia, similar to those occurred naturally on the cankers of diseased Japanese persimmon were observed on the inoculated regions after 7 months later. The inoculated fungus was reisolated successfully from the developed lesions. Because a twig canker disease of Japanese persimmon caused by *N. cinnabarina* was unknown in Japan, it was proposed to name coral spot (alternatively twig canker or *Nectria* twig blight) of Japanese persimmon (*Kôryûgansyu-byô* in Japanese).

学術論文目録

1. Addition of *Pestalotiopsis* spp. to leaf spot pathogens of Japanese persimmon
Yasuda, F., Kobayashi, T., Watanabe, H., and Izawa, H.
Journal of General Plant Pathology, Volume 69, Number 1, pp. 29-32 (2003)
(第4章に記載)

2. 担子菌系酵母様菌 *Acaromyces ingoldii* および *Meira* sp.によるナシ汚果病 (病原追加)
安田文俊・山岸大輔・赤松 創・伊澤宏毅・児玉基一朗・尾谷 浩
日本植物病理学会報 第71巻 第3号 156~165頁 (2005)
(第2章に記載)

3. *Meira nashicola* sp. nov., a novel basidiomycetous, anamorphic yeastlike fungus
isolated from Japanese pear fruit with reddish stain
Yasuda, F., Yamagishi, D., Akamatsu, H., Izawa, H., Kodama, M., and Otani, H.
Mycoscience, Volume 47, Number 1, pp. 36-40 (2006)
(第2章に記載)

4. 担子菌系酵母様菌 *Meira geulakonigii* および *Pseudozyma aphidis*によるナシ汚果病
(病原追加)
安田文俊・山岸大輔・伊澤宏毅・児玉基一朗・尾谷 浩
日本植物病理学会報 第73巻 第3号 166~171頁 (2007)
(第2章に記載)

5. The occurrence of coral spot of Japanese persimmon caused by *Nectria cinnabarina*
(Tode:Fries) Fries
Yasuda, F. and Izawa, H.
Journal of General Plant Pathology, Volume 73, Number 6, pp. 405-407 (2007)
(第5章に記載)

参考論文目録

1. 鳥取県におけるイプロジオン耐性ナシ黒斑病菌の発生推移と防除対策
安田文俊・渡辺博幸
近畿中国農業研究 第93号 85～89頁 (1997)
2. ナシ黒かび病（新称）の発生生態と防除対策
安田文俊・渡辺博幸・佐藤豊三
植物防疫 第53巻 第7号 257～260頁 (1999)
3. ナシ園における地面設置型防除用スプリンクラーの薬液散布特性と病害虫防除効果
安田文俊
農業技術 第56巻 第12号 558～562頁 (2001)
4. ナシ白紋羽病に対するフルアジナム水和剤の防除効果
安田文俊
鳥取県園芸試験場研究報告 第5号 31～41頁 (2001)
5. ナシのスプリンクラー防除における低濃度希釈薬液散布による病害虫防除効果
安田文俊・伊澤宏毅
関西病害虫研究会報 第44号 61～62頁 (2002)
6. Pest control of Japanese pear by ground stationary sprinkler systems
Yasuda, F., Yamamoto, K., Jinno, Y., Watanabe, H., and Izawa, H.
Acta Horticulturae, Number 587, pp. 675-683 (2002)
7. 鳥取県におけるナシ黒星病菌のフェナリモル感受性モニタリングとDMI剤の散布時期の違いによる防除効果
安田文俊・渡辺博幸・伊澤宏毅
関西病害虫研究会報 第45号 5～9頁 (2003)