

SPECIAL BULLETIN
OF THE
TOTTORI PREFECTURAL AGRICULTURE AND FOREST RESEARCH INSTITUTE
HORTICULTURAL EXPERIMENT CENTER

No. 2

June, 2009

鳥取県農林総合研究所園芸試験場特別報告

第 2 号

平成21年 6 月

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

安 田 文 俊

鳥取県農林総合研究所園芸試験場
(鳥取県東伯郡北栄町)

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

by Fumitoshi Yasuda

TOTTORI PREFECTURAL AGRICULTURE AND FOREST RESEARCH INSTITUTE
HORTICULTURAL EXPERIMENT CENTER
(HOKUEI, TOHAKU, TOTTORI, 689-2221 JAPAN)

鳥取農林総合研園試特報 2 : 1 - 61 (2009)

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

2 0 0 9

安 田 文 俊

鳥取県農林総合研究所園芸試験場

目 次

緒 言	1
第1章 担子菌系酵母様菌によるナシ汚果病	4
第1節 研究史	4
第2節 病 徴	4
第3節 罹病果実の走査型電子顕微鏡観察	5
第4節 分離菌の同定	5
第5節 新種酵母様菌の命名記載	13
第6節 分離菌の病原性	16
第7節 特異的プライマーを用いたPCR検出	17
第8節 感染様式の解析	20
第9節 考 察	22
第2章 <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> によるナシ黒かび病	25
第1節 研究史	25
第2節 病 徴	25
第3節 分離菌の同定	26
第4節 分離菌の病原性	27
第5節 発生生態	28
第6節 考 察	30
第3章 <i>Pestalotiopsis</i> spp.によるカキ葉枯病	32
第1節 研究史	32
第2節 病 徴	32
第3節 分離菌の同定	33
第4節 分離菌の病原性	34
第5節 防除対策	36
第6節 考 察	38
第4章 <i>Nectria cinnabarina</i> によるカキ紅粒がんしゅ病	40
第1節 研究史	40
第2節 病 徴	40
第3節 分離菌の同定	40
第4節 分離菌の病原性	42
第5節 考 察	43
総合考察	47
摘 要	53
謝 辞	55
引用文献	56
Summary	60

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

安 田 文 俊

諸 言

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・レクチェ’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14,600ha、生産量は296,800tとなっている。しかし、鳥取県においては1985年の3,810ha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1,180ha、生産量は24,700t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も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23,200ha、生産量は244,800tとなっている。このうち、2007年の鳥取県での結果樹面積は360ha、生産量は3,240t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質、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）。Heackell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、菌類の扱いは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1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は異なっており、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

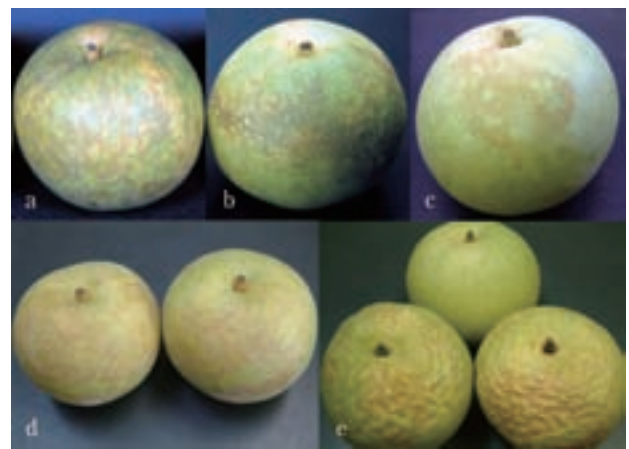


Fig. 1. Natural symptoms of Japanese pear fruit stain on mature fruits.

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

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皺が生じ、果実がしば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

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 (7×7mm) 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、15kVの加速電圧で観察した。

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

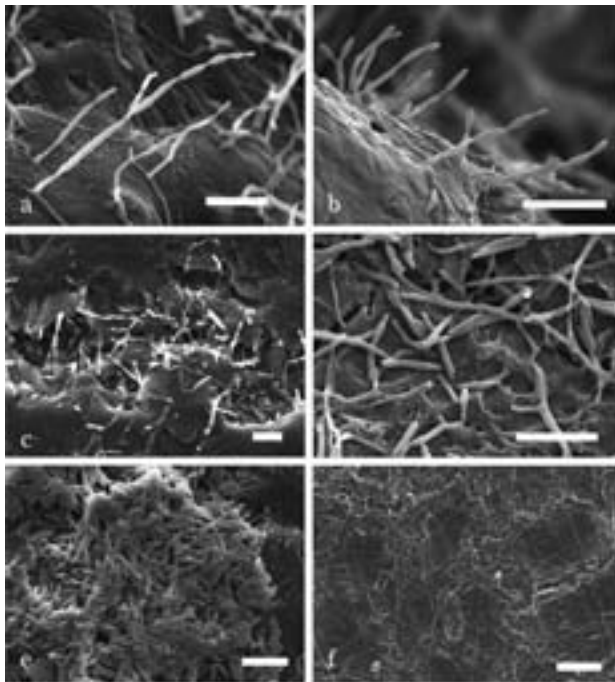


Fig. 2. Blastoconidia (a-c) and vegetative cells (d-e) of yeastlike fungi, and mycelia of filamentous fungus (f) observed on lesions of Japanese pear fruit stain. Scale bars, 10µm (a-e) or 200µm (f).

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

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℃ (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℃ (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。

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

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.

PFS 007 (= MAFF 230027), PFS 002 (= 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

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 10g, ペプトン 5g, グルコース 40g, 寒天 15g, 蒸留水 1,000ml) 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) 100ml に各炭素源 10g を加え、フィルター濾過滅菌した溶液 0.5ml を滅菌蒸留水 4.5ml 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) 100ml に各窒素源を所定量 (硝酸カリウム 0.78g, 亜硝酸ナトリウム 0.26g, エチルアミン塩酸塩 0.64g, L-リジン 0.56g) 加え、フィルター濾過滅菌した溶液 0.5ml を滅菌蒸留水 4.5ml 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。

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胞子 (3-27 × 1.5-3 μm) が形成された (Figs. 3b-c)。この胞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 & Szejnberg 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°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, ピ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°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~ピ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 ($6-12 \times 2-3 \mu\text{m}$) で増殖したが, やがて菌糸を伸ばした (Fig. 4b)。菌糸は, 直径 $1.5-3 \mu\text{m}$, 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 ($5-15 \times 2-3 \mu\text{m}$) 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

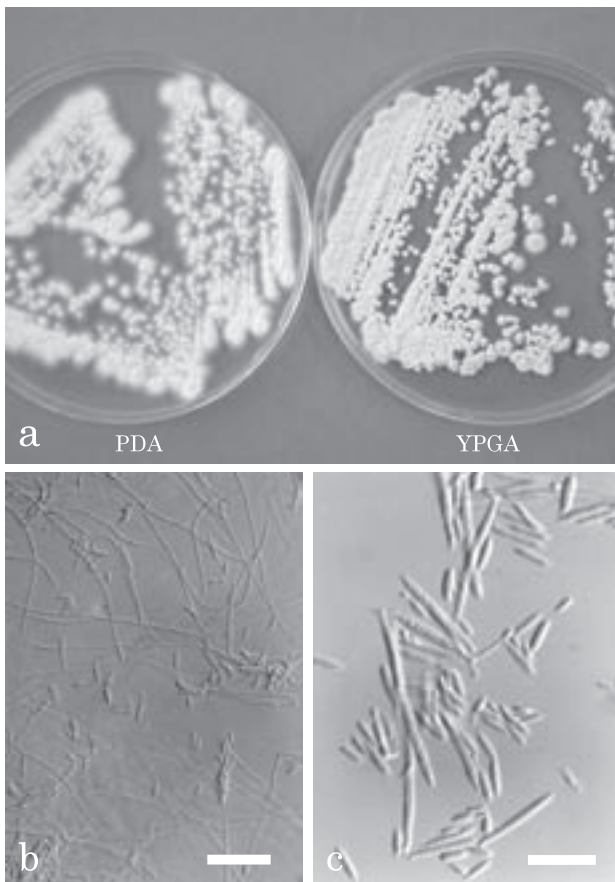


Fig. 3. Colony characteristics and light micrographs of the isolate PFS 007.

- 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.
- Mycelia and fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 20 μm .
- Fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10 μm .

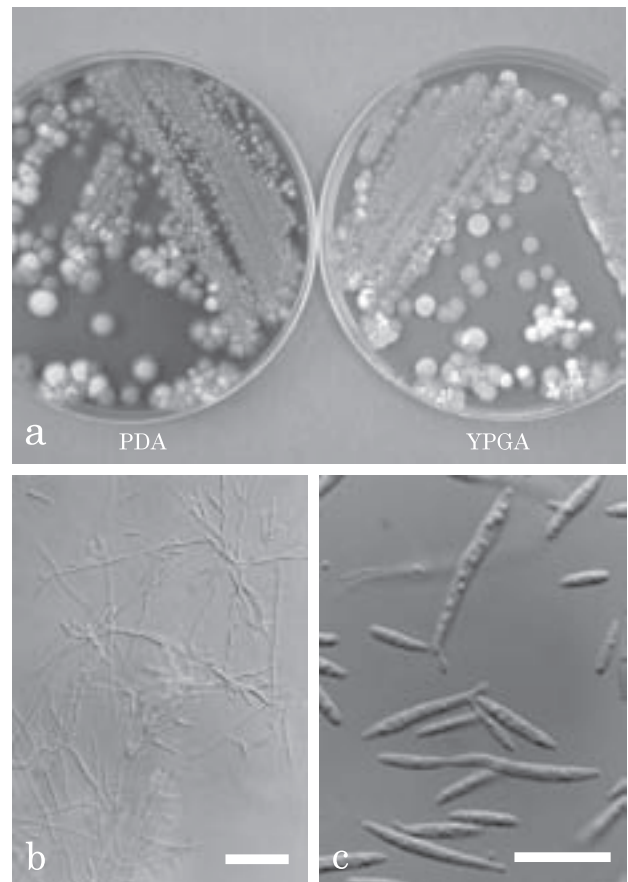


Fig. 4. Colony characteristics and light micrographs of the isolate PFS 002.

- 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.
- Mycelia and fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 20 μm .
- Fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10 μm .

Table 2. Morphological characteristics of the 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)} <i>Hyalodendron</i> sp. ^{b)}	PFS 007			fusiform	3-27×1.5-3
	AS 001 ^T			fusiform to lanceolate	(6-)20-35×(1.5-)2-3
	OK 001			ellipsoidal	4-25×1.5-4
<i>Trichosporon lignicola</i> ^{c)} (= <i>Hyalodendron lignicola</i> ^{d)})	CBS 219.34 ^T			ellipsoidal to subcylindrical	5-15×1.6-3
	PFS 002	ellipsoidal	6-12×2-3	fusiform	5-15×2-3
<i>Meira geulakonigii</i> ^{a)}	PFS 014	ellipsoidal	4-18×2-3	fusiform	3-16×2-3
	AS 004 ^T	ellipsoidal	7-17×2-3	ellipsoidal to fusiform	5-17×2-4
<i>Meira argovae</i> ^{a)}	AS 005 ^T	fusiform	7-20×1.5-2.5	fusiform	(3-)8-25×1-2.5
	PFS 037	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		4.3-11.5×1.4-3.6		

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.

(25°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°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 (4-18×2-3 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, 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 (3-16×2-3 μm) 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 & Szejnberg (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 (3.5-12.5×1.5-3.5 μm) 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 (2-12×2-3 μm) 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)。

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).

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	+
meso-Erythritol	+	+	W	+
Ribitol	+	D, +	+	+
Xylitol	D	D	-	
L-Arabinitol	+	+	-	
Galactitol	W	D	W	+
myo-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).

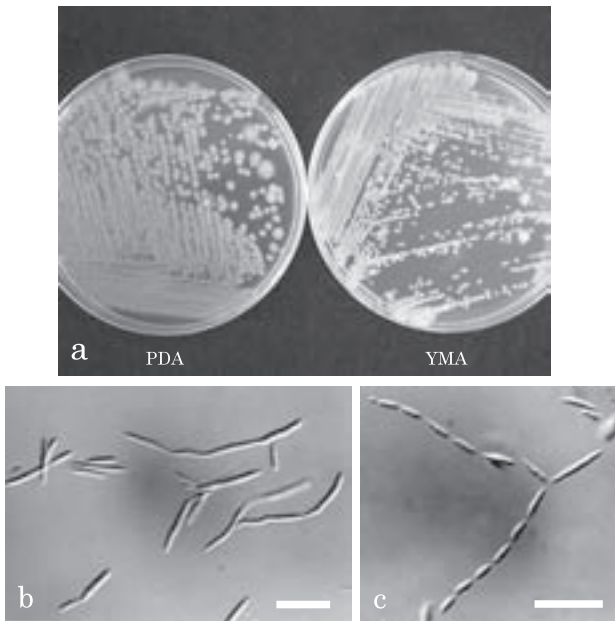


Fig. 5. Colony characteristics and light micrographs of the isolate PFS 014.

- Cultures on potato dextrose agar (PDA) (left) and yeast mold agar (YMA) (right), after 14 days at 25°C.
- Vegetative cells produced on YMA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10µm.
- Fusiform blastoconidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10µm.

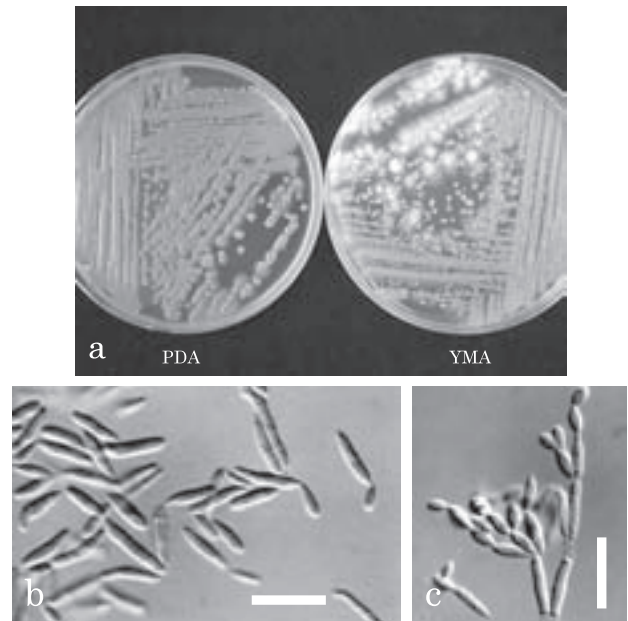


Fig. 6. Colony characteristics and light micrographs of the isolate PFS 037.

- Cultures on potato dextrose agar (PDA) (left) and yeast mold agar (YMA) (right), after 14 days at 25°C.
- Vegetative cells produced on YMA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10µm.
- Fusiform blastoconidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10µm.

3. DNA塩基配列解析

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20g, 乾燥マッシュポテト34gの煮汁1,000ml）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15-20mg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、10ng/µlに調製してPCRプレートとした。25µlのPCR反応液には、10ngのプレートDNA、0.4µMの各プライマー、0.625ユニットのTaKaRa Ex Taq（タカラバイオ）、200µMの各dNTPおよび1×Ex Taq reaction bufferを加えた。PCR反応は、RoboCycler (STRATAGENE)を用いて、94°C 25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D1/D2領域のPCRプライマーには、NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAG-GAAAAG³)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'TCCG-TAGGTGAACCTGCGG³)とITS4 (5'TCCTCCGCTT-ATTGATATGC³) (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。

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、

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 number	
		D1/D2 LSU rDNA	ITS & 5.8S rDNA
<i>Acaromyces ingoldii</i> ^{a)}	PFS 007	AB185158	AB185160
	AS 001 ^T (=CBS 110050 ^T =NRRL 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 =NRRL Y-27483 ^T)	AY158668	AY158674
<i>Meira argovae</i> ^{a)}	AS 005 ^T (=CBS 110053 ^T =NRRL 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
	PFS 007	—	99	100	68						
<i>Acaromyces ingoldii</i>	AS 001	99	—	99	68						
<i>Hyalodendron</i> sp.	OK 001	99	99	—	68						
<i>Hyalodendron lignicola</i>	CBS 219.34	77	78	77	—						
	PFS 002					—	86	83	87		
	PFS 014					97	—	99	88		
<i>Meira geulakonigii</i>	AS 004					98	99	—	87		
<i>Meira argovae</i>	AS 005					98	98	99	—		
	PFS 037									—	100
<i>Pseudozyma aphidis</i>	DSM 70725									100	—

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

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* 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

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1g, ヨウ化カリウム2g, 蒸留水300ml)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0.25M 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1g, グルコース1g, 塩化ナトリウム5g, リン酸二水素カリウム2g,

フェノールレッド12μg, 寒天15g, 蒸留水1,000ml, pH 6.8)4.5mlに濾過滅菌した20%尿素液0.5ml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。

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、桃色がかかったクリーム色~赤みがかかった茶色、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

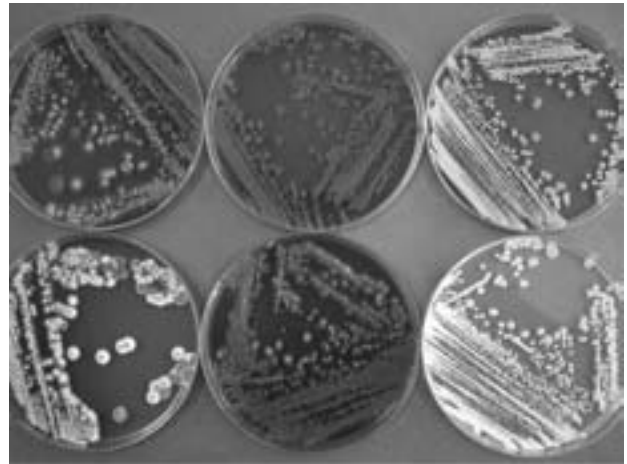


Fig. 7. Cultures of *Meira* sp. isolates PFS 002, PFS 023 and PFS 034 (left to right) on PDA (upper) and YMA (lower) after 14 days at 25°C.

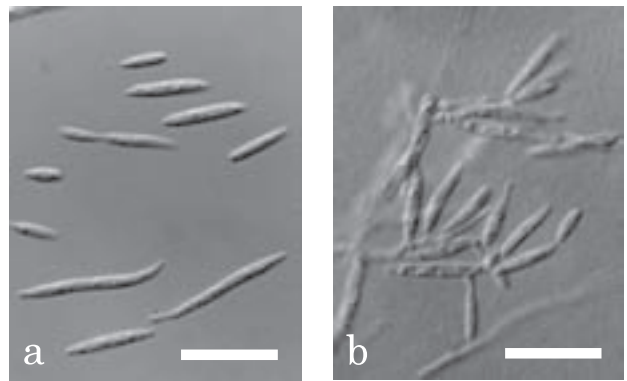


Fig. 8. Light micrographs of *Meira* sp. PFS 002.

- Vegetative cells produced on PDA after 3 days at 25°C. Scale bar, 10μm.
- Fusiform conidia produced on PDA after 7 days at 25°C. Scale bar, 10μm.

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

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 (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。

結果

26S rDNAのD1/D2領域および5.8S rDNAを含むITS

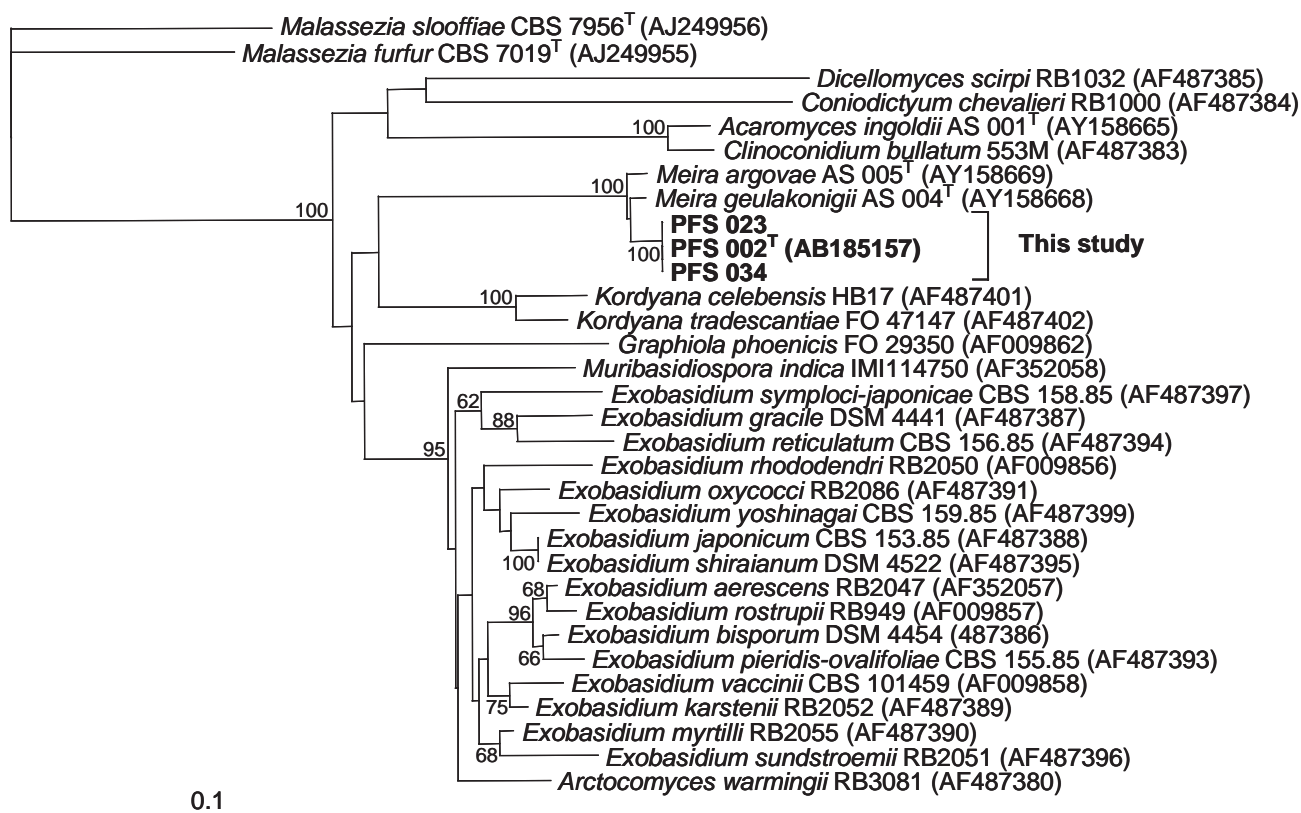


Fig. 9. Phylogenetic tree drawn from neighbor-joining analysis of 26S rDNA D1/D2 domain sequences, depicting the relationship of the strains of *Meira* spp. with closely related species. *Malassezia slooffiae* CBS 7956^T (AJ249956) and *Malassezia furfur* CBS 7019^T (AJ249955) are the relevant outgroup 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)}

Fungus species	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.

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519-633bp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ITS1領域は173-184bp、またITS2領域は227-256bp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, cum synnematis sursum attenuatis versus margo prostratis obtegentes. Reversum in YPGA et PDA brunneum, pigmento brunneo in agaros diffluenti. 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 melezitosis, 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 Agro-biological 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-ラクトンは同化されない。

*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

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*Hyalodendron* 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。

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



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.

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

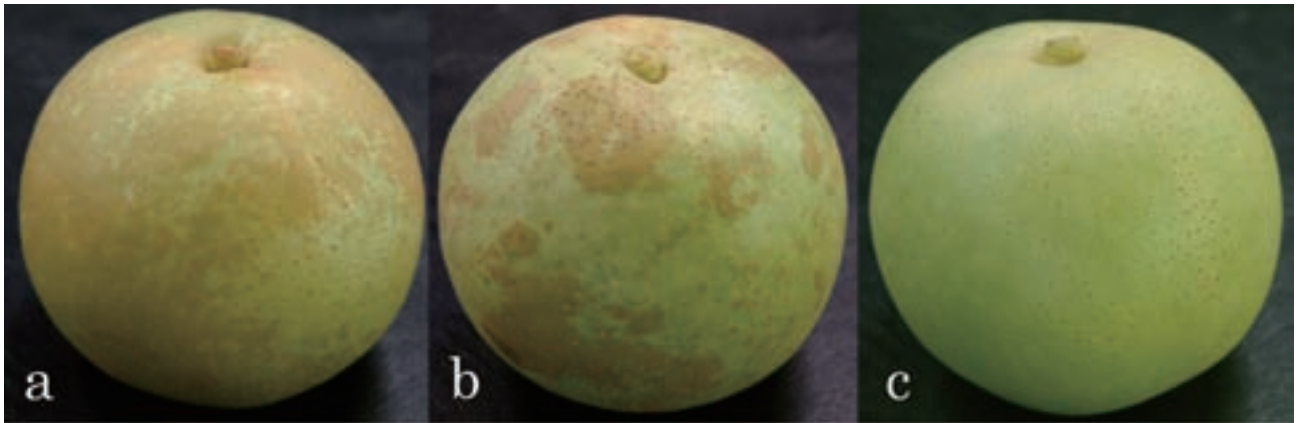


Fig. 11. Stain symptoms on mature fruits of cv. Gold Nijisseiki, artificially inoculated with conidial suspension of *Meira geulakonigii* PFS 014 (a) and *Pseudozyma aphidis* PFS 037 (b). The fruit on the right (c) is the control (distilled water).

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.

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の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。

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

```

1  AAGGATCATT AGGGAATTAT AAAATCGGCT TGCCCCTCTC GAGGGTGTCTC
                                     AIF50
51  GCCGTAATTT CTATCCACAA AACACCGTGA ACCCTCGAAA GAGGCGTAAT
    GCCGTAATTT CTATCCACAA
101 TTTTCTATA AAAACACAAA GTCTATGAAA GTAACAAACA TACAAAACAA
151 AATAAACTT TTGACAACGG ATCTCTTGGT TCTCCCATCG ATGAAGAACG
201 CAGCGAAACG CGATAGGTAT TGTGAATTGC AGAATCAGGG AATCATCGAA
251 TTTTGAACG CACCTTGCGC TCCCTGGTAT TCCTAGGAGC ATGCCTGTTT
                                     AIR295
301 GAGTGTGAT AGCCTCTCCA AACCTTGGTT TTTTATTAAT TCGAGTGCTT
    GAGTGTGAT AGCCTCTCCA
351 TGGGTCCCTG GGCCTGTAGC GCGGACGTTA 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 TTCGATCTT CCCGAACCTT
51  TTTTCTTAT CCTAAACACC TGTGCATCGT GGAGTGTATG TAATAGTACG
    TGTGCATCGT GGAGTGTATG
101 CTCCACAATT CTTATCACAC AAACCTATG TTTTTTTGAA CGTAAAACAA
151 GTGTTAATTT TATTTAACCA AATAACAAAT TAATACTTT TGACAACGGA
201 TCTCTTGGTT CTCCCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAACGC GATAGGTAAT
251 GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG CATCTTGCGC
301 TCCTTGGTAT TCCTCGGAGC ATGCCTGTTT GAGTGTCTG AATATCTCCA
351 TTA AAAAGTT TTTTTTATG AAAAATTCTT TTAACGGGTC CTTGGGCTTG
401 GTGATGAGAT TAGCCTCTTT GTATCACCTT GCCTTAAAAG TATGAGTGGA
451 TGAGTGTCTAG CCATAGATTT TTGTTAAGGC AAACCCATAA AAATCTTGTG
    TGAGTGTCTAG CCATAGATTT
501 CTTTTGTCAT CTGCTACCAA ACAAACACAC ACATACATAA TTCTTTATGT
551 ATTCCTTCTT 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.

去して15-20mg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、10ng/μlに調製してPCRテンプレートとした。25μlのPCR反応液には、

10ngのテンプレートDNA, 0.4μMの各プライマー, 0.625ユニットのTaKaRa Ex Taq(タカラバイオ), 200μM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℃ 2.5分 1回, 94℃ 30秒・56℃ 30秒・72℃ 60秒 30回, 72℃ 7分 1回の条件で行っ

```

1  AAGGATCATT AGAGAATTTT TAGGGATTGA TTTCGATCTT CCCGAACCTT
51  CTTTTTCATC CTAAACACCT GTGCATTTGT TTGTTTGTGC GAAAAAACAC
101 AAACAAACAA ACAATTTTAA ACACACAAAC ACTATGTTTT TTTGAACGTA
151 AAAAAATATT TAACAAATAT ACAACTTTTG ACAACGGATC TCTTGGTTCT
201 CCCATCGATG AAGAACGCAG CGAAACGCGA TAGGTAATGT GAATTGCAGA
251 ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA TCTTGGCTC CTGGTATTC
301 CTCGGAGCAT GCCTGTTTGA GTGTCGTGAA TTTCTCCAAA AAGAAGTTTT
351 TTTTTTATGA AATCCTTCTT TGCGGGTCCT TGGGCTTGGT GATTACATAG
      MGF361
401 CCTCTTTGTA TCACCTTGCC TTAATGTAT GAGTGGATGA GTGTCAGCCA
451 TAGATTTTTG TTAAGGCAAA CCCATAAAAA TCTTGTGCTT TTGTCATCTG
501 CTTCTAACA ACCAAAATAC ACACACACTA TTTTCGGATA GAGTGAGTTT
551 ATCATTCTTT CTGGCCTCAA ATCAGGTAAG ATTACCCGCG AATTA
      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 ACATTTAAC ACGGTTGCAT CGGTTGGCTG
101 TCAAACAGTG CGCGCGGCGA TTTATTTTCG CTCCCAGCGC ATTGCCGAGA
151 CGGTCGACAT TTACCATAAA CACTGTTGAT ACCATAGGAT TTGAACGTAG
201 ATGAAACTCG ACTGGTAATG CGGTCGTCTA AAATCTAAAA ACAACTTTTG
251 GCAACGGATC TCTTGGTTCT CCCATCGATG AAGAACGCAG CGAATTGCCA
301 TAAGTAATGT GAATTGCAGA AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACCTT
351 GCGCTCCCGG CAGATCTAAT CTGGGGAGCA TGCTGTTTG AGGGCCGCGA
401 ATTGTTTCGA ACGACAGCTT TCTTATTTAG TTGAGAAAAG TGGCGGATCG
451 GTATTGAGGG TCTTGCCATC TTCCACGGTG GCTCCCTCGA AATGCATTAG
501 CGCATCCATT CGATAGGCAA GACGGACGAA AGCTCGTTAT TTCGCCACG
551 TCTTCCCTG CCGGGTTTTG ATAATATCAG GACTTCGGAG AGGAGAGGCG
601 CAGGGTCGAG GAGCTGGACG CGACGTTTTG CTGGTTGGAG TGCTTCTGAA
651 CCCCGCCAT 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 (°C)	5'-3' nucleotide sequence	Target fungus	Fragment length
AIF50 AIR295	63.3 56.7	CGCCGTAATTTCTATCCACA GGCTATCAACACTCAAACAG	<i>A. ingoldii</i>	265 bp
MNF70 MNR453	59.8 59.1	CTGTGCATCGTGGAGTGTAT CAAAAATCTATGGCTGACACT	<i>M. nashicola</i>	404 bp
MGF361 MGR531	69.1 56.9	AATCCTTCTTTGCGGGTCCTT TAAACTCACTCTATCCGAAAA	<i>M. geulakonigii</i>	191 bp
PAF38 PAR720	65.3 61.8	TGGCTCGCACCTGTCTAACTA TAAGTTCAGCGGGTAGTCCTA	<i>P. aphidis</i>	703 bp

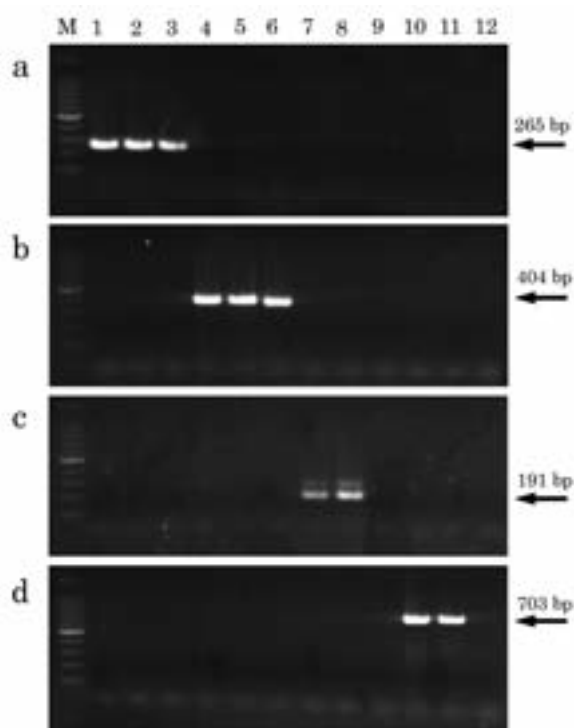


Fig. 16. PCR amplification using species specific primer pairs AIF50/AIR295 for *Acaromyces ingoldii* (a), MNF70/MNR453 for *Meira nashicola* (b), MGF361/MGR531 for *Meira geulakonigii* (c), and PAF38/PAR720 for *Pseudozyma aphidis* (d). Lane 1, *A. ingoldii* PFS 007; Lane 2, *A. ingoldii* AS 001^T; 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.

た。得られたPCR産物25μlのうち6μl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。

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265bp, MNF70/MNR453では404bp, MGF361/MGR531では191bp, PAF38/PAR720では703bp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）、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

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ミクロトーム (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% トルイジンプルー染色液で染色して、光学顕微鏡観察を行った。

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はほぼ完全に覆われていたのに対し、汚れ果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。

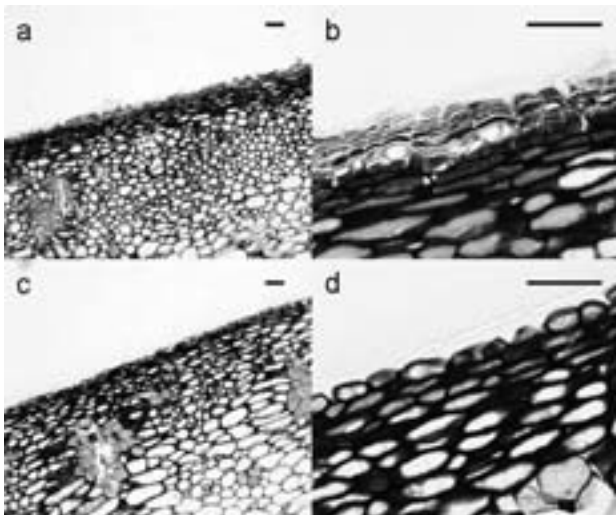


Fig. 17. Epidermal structure of mature fruits of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki.
 a. Cross section of severe fruit stain. Scale bar, 100 μm.
 b. Macrograph of cross section of severe fruit stain. Scale bar, 100 μm.
 c. Cross section of healthy fruit (control). Scale bar, 100 μm.
 d. Macrograph of cross section of healthy fruit (control). Scale bar, 100 μm.

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。

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ミクロトーム (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。

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.



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 μm.

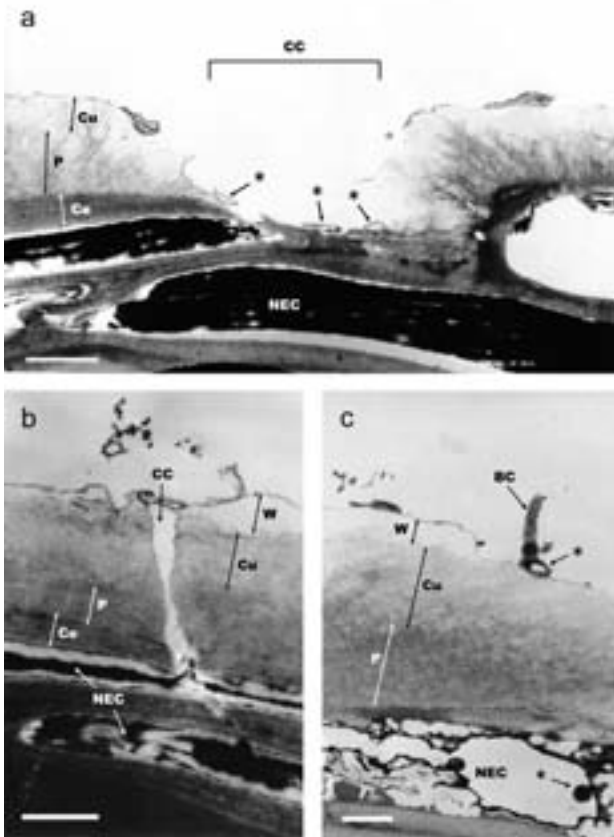


Fig. 19. Ultrastructure of epidermis of severe fruit stain of Japanese pear cv. Gold Nijisseiki showing a wax layer (W), a cuticle layer (Cu), a pectin layer (P), a cellulose layer (Ce), and necrotic epidermal cells (NEC).

- Hyphae (asterisk) of yeastlike fungus on a cuticle cracking (CC) from a wax layer down to a cellulose layer (Ce). Scale bar, 2 μ m.
- A cuticle cracking (CC) down to a necrotic epidermal cell (NEC). Scale bar, 1 μ m.
- 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 μ m.

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、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*属は菌草綱(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、菌草綱(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巣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巣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で萎縮し、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リ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。