

Phlyctema vagabunda Desm. によるリンゴ果実の小黑斑症状の
発生に関する研究

Dark-colored spot on apple fruits caused by
Phlyctema vagabunda Desm.

2022 年 3 月

佐藤 裕

Yutaka Sato

目次

緒言	1
I. 研究史	
1. 黄腐病	3
2. リンゴの bull's-eye rot 病	3
3. <i>P. vagabunda</i> の寄主範囲と感受性の品種間差	6
4. 防除技術	7
II. 小黒斑症状発生の主因究明	
1. 材料と方法	9
1) 小黒斑からの糸状菌の分離	
2) 小黒斑から分離された白色糸状菌の収穫後のリンゴ果実に対する病原性試験 (有傷接種)	
3) 小黒斑から分離された白色糸状菌のリンゴ樹上果に対する病原性試験	
(1) 有傷接種試験	
(2) 無傷接種試験	
4) 白色糸状菌の形態観察	
5) 分子生物学的特徴による白色糸状菌の同定	
(1) 供試菌株	
(2) DNA 抽出と PCR	
(3) BLAST 検索ならびに分子系統解析	
2. 結果	14
1) 小黒斑症状	
2) 小黒斑からの糸状菌の分離	
3) 小黒斑から分離された白色糸状菌の収穫後のリンゴ果実に対する病原性	
4) 小黒斑から分離された白色糸状菌の樹上果に対する病原性	
(1) 有傷接種	
(2) 無傷接種	
5) 白色糸状菌の形態的特徴	
6) 分子生物学的特徴による白色糸状菌の同定	
3. 考察	29
III. Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) 法によるリンゴ果実の小黒斑からの病原糸状菌の検出	
1. 材料と方法	32
1) 小黒斑組織及び分離菌の菌糸体からの DNA 抽出	
2) Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)法	
3) 特異的プライマーを使用した PCR 法による検出	
4) PCR 増幅産物の塩基配列の決定	
2. 結果	34

1) リンゴ果実に発生する各種病原菌の ARISA	
2) 小黒斑組織の ARISA	
3. 考察	40

IV. 防除技術の開発

1. <i>P. vagabunda</i> の生育を阻止する殺菌剤の選定 (<i>in vitro</i> におけるスクリーニング試験)	43
1) 材料と方法	
(1) 含菌寒天円盤の浸漬処理による菌糸生育阻止効果	
(2) 各種薬剤に対する <i>P. vagabunda</i> の感受性	
(3) MBC 剤に対する <i>P. vagabunda</i> の感受性	
2) 結果	
(1) 含菌寒天円盤の薬液浸漬処理による殺菌剤の効果比較試験	
(2) 各種薬剤に対する <i>P. vagabunda</i> の感受性	
(3) MBC 剤に対する <i>P. vagabunda</i> 15 菌株の感受性	
3) 考察	
2. 発病果を用いた各種薬剤の感染阻止効果の判定	48
1) 材料と方法	
(1) 収穫果を用いた室内試験	
(2) 樹上果を用いたイミノクタジン酢酸塩液剤による感染阻止効果	
2) 結果	
(1) 各種薬剤の感染阻止効果 (収穫果を用いた室内試験)	
(2) 樹上果を用いたイミノクタジン酢酸塩液剤による感染阻止効果	
3) 考察	
3. リンゴ果実の黄腐病 (小黒斑症状) に対するイミノクタジン酢酸塩液剤の防除効果	53
1) 材料と方法	
2) 結果	
3) 考察	

V. 総合考察	58
摘要	66
謝辞	68
Abstract	69
引用文献	73
補足図	82

緒言

秋田県の果樹栽培は、リンゴ等の寒冷地果樹を主体に栽培されており、栽培面積はリンゴ 1,350ha、ブドウ 199ha、ナシ 179ha、モモ 117ha、オウトウ 94ha となっている（令和元年農林水産統計、秋田県農林水産部調べ）。果樹栽培が最も盛んな地域は県南部の横手盆地に位置する横手市で、栽培面積はリンゴ 701ha(全県比 52%)、ブドウ 120ha（同 60%）、ナシ 42ha（同 23%）、モモ 48ha（同 41%）、オウトウ 42ha（同 45%）を占めている（令和元年秋田県農林部調べ）。横手市の果樹の農業産出額は果樹全体で 40.7 億円（全県比 48%）で、その内リンゴは 29.3 億円（同 56%）となっている（令和元年農林水産統計、市町村別農業算出額（推計））。

2011 年 10 月中旬から横手盆地の中央に位置する横手市で、秋田県の主力品種‘ふじ’や同県が育成した‘秋田紅あかり’の果面に、褐色から黒褐色で直径が 5 mm 以下の斑点を生じる障害果が多発した。これに類似した障害果は 2011 年以前にも観察されたことはあったものの発生頻度が低く、程度も軽微であったことから重要視されなかった。以下、本症状を「小黑斑」と呼ぶこととする。この小黑斑は、多くが果点や毛耳痕に生じていた。最も被害が大きかった‘ふじ’では収穫の 1 ヶ月ほど前から見え始め、収穫期に近づくほど斑点数、発生果数が増加した。斑点数は適熟果に多い傾向が見られ、未熟果ではまったく見られないものが多かった。小黑斑の発生部位には偏りがあり、陰向面よりも陽向面に、また果頂部に比較し赤道部から果柄側に多く見られた。本症は収穫後の貯蔵果にも新たに発生した。小黑斑は‘ふじ’の他に晩生品種でも見られるが、早生種では見られず、中生品種では一部の品種で見られた。晩生品種でも‘ふじ’と収穫期が同時期となる‘王林’での発生は見られなかった。小黑斑はリンゴ果実病害の炭疽病や輪紋病、褐斑病や黒星病の初期病斑とよく似ており、生産現場ではこれらの病害診断にも苦慮した。

発生当初、小黑斑の発生地域は横手市に集中していると思われたが、その後、隣接する湯沢市及び沿岸部の由利本荘市でも認められ、発生地域は秋田県全体のリンゴ栽培面積の 2/3 に相当する約 1000 ha（その内‘ふじ’の植栽面積は 600 ha、平成 23 年度特産果樹生産動態等調査より）で確認された。2011 年以降は、県北部の鹿角市、隣県の山形県（佐藤健治氏 私信）や青森県（平山ら 2018）にも同様の斑点症状が確認され、北日本のリンゴ産地で広域に発生していると考えられた。

収穫された果実の多くは選果場に持ち込まれるが、斑点症状を呈した果実は外観が劣り、これらが著しい場合には市場に流通すると産地の評価に影響を与える恐れがあることから、各選果場では斑点症状を呈したリンゴは主にジュースや缶詰用途となる低価格の加工用果実として扱われるか廃棄される。特に、2011 年以降に急増した小黑斑は市場評価の高い適熟果に生じることが多く、JA 秋田ふるさとへの聞き取り調査によると、被害果は良食味にもかかわらず加工用果実として出荷され、良品果に比較し 7 割程度安い取引額となり、生産者の収益を大きく損ねる要因となった（JA 秋田ふるさと果樹課）。筆者らは、2015 年に JA 秋田ふるさと管内の共同選果場に出荷された果実から、加工用として選別された果実を調査し、小黑斑を原因とした 2015 年産リンゴの被害額を 5700 万円と試算した。小黑斑が 2011 年から発生し続けていることから、小黑斑による被害

額の累計は数億円規模になると推定された。県内のリンゴ栽培面積の6割強が‘ふじ’であり、小黑斑がその主力品種に発生したことから経済的影響も大きく、生産現場からは発生原因と被害軽減技術の開発が強く求められた。

小黑斑の発生原因として、当初はビターピットや、国外での発生が知られている *lenticel breakdown* などの生理障害の可能性も指摘された。しかし、発生の状況などから生理障害とは考え難かった。筆者は小黑斑が伝染性の病原菌による可能性があると考え、発生当初から、病斑部からの糸状菌の分離を試みていたが、リンゴの主要な空気伝染性病原菌が高率で分離されることはなかった。しかし繰り返し分離実験を行ったところ、ある種の糸状菌が多くの小黑斑組織から分離されることから、これによる伝染性病害である可能性を考え、この側面から検討を行った。その結果、2011年以降多発する小黑斑は糸状菌による伝染性病害であることが明らかとなった。また、その検討過程でこの糸状菌が、貯蔵病害として知られるリンゴ黄腐病と酷似する腐敗病斑を形成することから、黄腐病との関係についても検討した。さらに、黄腐病の腐敗症状は諸外国で *bull's-eye rot* と呼ばれる貯蔵病害と酷似することから、両病害の関係についても検討した。また、1940年に福井によって初めて報告された黄腐病は、古くから貯蔵病害として知られているものの先行研究は極めて少なく、発生生態や防除法についても不明な点が多い。そこで、生産現場での要望が強かった防除対策について取り組み、有効薬剤を見いだすためのスクリーニング及び圃場での防除試験を実施した。

小黑斑及び小黒斑に酷似する斑点症状は、多くのリンゴ果実病害の初期病斑や生理障害によって発生し、これらの正確な診断は容易ではない。特に、肉眼観察のみによる各種の病害の診断には高い習熟度が必要で、生産者や選果場の検査員や指導機関の職員が正確に診断するのは困難であった。そこで、迅速かつ簡易で精度の高い診断技術が必要と考え、遺伝子解析の手法を取り入れた診断法について検討した。ここにこれらを取りまとめて報告する。本研究の一部は日本植物病理学会で公表した。

I. 研究史

本研究は、秋田県において、リンゴ果実に 2011 年から多発する小黑斑（褐色から黒褐色の小さな斑点症状）の主因解明、同症状と既報のリンゴ貯蔵病害である黄腐病、及び国外で発生しているリンゴ貯蔵病害 *bull's-eye rot* との関係、収穫期から貯蔵中にかけて発生する小黑斑からの病原菌検出技術、さらに本症状の防除技術の開発を行った。本章では我が国で発生が認められた *bull's-eye rot* の主因の一つである *Phlyctema vagabunda* に関する既往の研究を中心に取りまとめた。

1. リンゴ黄腐病

我が国におけるリンゴ黄腐病の最初の報告は 1939 年まで遡る。この年の 3 月、福井 (1940) は、貯蔵中の‘国光’において炭疽病と異なる腐敗症状の発生を認めた。聞き取り調査によると、これによる被害は 10% に至ったとされる。本症で形成される病斑は、中央部が鮮黄色又は帯褐黄色で、周囲が褐色を呈するというもので貯蔵中に拡大した。本症から分離された糸状菌について、有傷接種を行い病徴が再現されたことから、本症を「黄腐病」(仮称)として報告した。その後、富樫 (1950) は、この病原菌を *Gloeosporium sp.* として記載し、これ以降、黄腐病は *Gloeosporium sp.* によって冷蔵庫内で発生する貯蔵病害として長く扱われてきた (岸 1998)。しかし、富樫 (1950) の報告には、同菌を *Gloeosporium sp.* と同定した根拠についての記載は見当たらない。

このように黄腐病は古くから知られた病害であるが、これに関する報告は極めて少ない。秋田県においては、高橋ら (1974) が貯蔵中の腐敗果において *Gloeosporium sp.* による黄腐病について、少発生ではあるが被害を報告している。また田中 (1981) は本病の発生状況について、「青森県における発生量は少なく、あまり問題ではない。‘紅玉’や‘スターキング・デリシャス’で比較的発生が多い」と述べるにとどまっている。黄腐病に関する耕種的あるいは薬剤を用いた防除技術に関する研究記録は見られない。

2. リンゴの *bull's-eye rot* 病

本病は、リンゴやナシ (セイヨウナシ) で世界各地に広く発生し、一部の国では *Bitter rot*、*Gloeosporium rot*、*Lenticel rot* とともに称されている (CICEOI ら 2019)。リンゴの果実で見られる病斑は円形で平坦かややくぼみ、ほとんどの場合、茶色で、中心部は明るい茶色または褐色を呈している (Suton ら 2014)。果実では、収穫後の貯蔵果においてのみ発生することが知られており、収穫前の樹上にある果実での発生は知られていない。この症状は前節で述べた黄腐病の症状に酷似するが、これまで両者の関係について検討された報告は見当たらない。今日、*bull's-eye rot* の病原菌として、*P. vagabunda*、*Neofabraea malicorticis*、*N. perennans*、*N. kienholzii* の 4 種が知られている。感染したリンゴ果実はいずれの菌によっても同様の病斑を形成する (Cao ら 2013、Suton ら 2014)。

Phlyctema 属は Desmazieres, J. B. H. J. によって、大分生子と小分生子を形成する不完全菌類として 1847 年に創設された (Desmazières 1847)。*P. vagabunda* は同属

のタイプ種として同年に報告された。その後の本種の扱いに関する変遷は Verkley (1999) のモノグラフに詳説されている。1870年代から1920年代にかけて、*Gloeosporium* 属菌あるいは *Cylindrosporium* 属菌として本菌のシノニムが数多く報告された。本菌は、暖地から寒冷地にかけて多くの国で栽培されていたリンゴやナシに寄生することから、冷蔵貯蔵が普及していない条件で長期間保存されていた当時、貯蔵病害として各地で発生し、多くのシノニムが報告されたとも推察される。その中の一つ、*Gloeosporium albam* Osterw. はリンゴ及びナシの貯蔵腐敗の病原菌として1907年にスイスの Osterwalder によって初めて記述され、その後、ベルギー (1921年)、イギリス (1935年)、チェコスロバキア (1937年) 及びスウェーデン (1941年) で報告された。Guthrie (1959年) は本種の完全世代は *Pezicula alba* Guthrie であるとし、不完全世代は *P. vagabunda* とすることが適当であるとした。この意見は von Arx (1970) によっても支持された。

Verkley (1999) は *Pezicula* 属について形態学的特徴と分子生物学的特徴をもとに、*Pe. malicorticis*、*Pe. alba*、*Pe. perennans* 及び *Pe. krawtzevii* の4種は *Pezicula* 属とは異なるとし、*Neofabraea* 属にこれら4種を移した。*Pe. alba* は *N. alba* (E. J. Guthrie) Verkley とし、そのアナモルフを *P. vagabunda* Desm. とすることが適当とした。Abeln ら (2000) は、ITS のほかいくつかの遺伝子領域を用いた分子系統解析を行い、*Neofabraea* 属と *Pezicula* 属は進化的に別系統であるとして Verkley (1999) の考えを支持した。

その後 Johnston ら (2014) は、国際藻類・菌類・植物命名規約 (International Code of Nomenclature for algae fungi and plants) (McNeill ら 2012) の改訂に伴い、同根関係にある *Neofabraea* 属と *Phlyctema* 属について、系統学的に検討が進んでいる *Neofabraea* (Verkley 1999, Abeln ら 2000, de Jong ら 2001) を属名として保護することが適切であるとした。これに伴って、*N. alba* は、本菌の最も古い記載である *P. vagabunda* の種小名を維持して *N. vagabunda* (Desm.) P.R. Johnst. とすることを提案した。これに対して Chen ら (2016) は、*Neofabraea* 属菌は分生子層を、一方 *Phlyctema* 属菌は分生子座を形成することから形態的に区別できること、また分子系統解析により *N. alba* と *P. vincetoxici* が *Neofabraea* 属の他の多くの種と異なるクレードを形成したことから *Phlyctema* の属名を復活させ、*N. vagabunda* については *P. vagabunda* Desm. の名称を維持することを提唱した。その上で *N. alba* 及び *G. album* はいずれもそのシノニムであるとした。

N. malicorticis は最初、apple tree anthracnose の病原菌 *Gloeosporium malicorticis* Cordley をとして報告された (Cordley 1900)。その後、Jackson (1913) によって完全世代が初めて報告されるとともに、その特徴をもとに *Neofabraea* 属に移された。*Neofabraea* 属は、*N. malicorticis* H. S. Jacks. をタイプ種をとして Jackson (1913) によって創設された属である。その後、Nannfeldt (1932) は、*Neofabraea* は *Pezicula* のシノニムであるとして、*N. malicorticis* は *Pe. malicorticis* (H. Jackson) Nannf. とすることが適当とされたが、さらに、前述のように、Verkley (1999) によって *Neofabraea* 属に移された。

N. perennans は、当初、Zeller ら (1925) によってリンゴにかいようを生じる病原菌 *Gloeosporium perennans* Zeller & Childs として報告された。その後、Kienholzii (1939) によって完全世代が発見され、Jackson (1913) が創設した *Neofabraea* 属に移され、*N. perennans* Kienholz とされた。同年に Wollenweber (1939) は本菌の不完全世代を *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw. とした。Dugan ら (1993) は本菌を *Pezicula* 属に移し *Pe. perennans* (Kienholz) FM. Dugan, R.G. Roberts and G.G. Grove としたが、Verkley (1999) によって再び *Neofabraea* 属に移された。

Neofabraea kienholzii は、de Jong ら (2001) によって bull's-eye rot の新たな病原菌、*Neofabraea* species として報告された。その後 Spotts ら (2009) により既知の bull's-eye rot の病原菌 3 種の分生子との形態比較から *Cryptosporiopsis kienholzii* Seifert, Spotts & Lévesque として報告され、さらに Seifert (2013) によって *C. kienholzii* から *N. kienholzii* (Seifert, Spotts & Levesque) Spotts, Lévesque & Seifert とされた。

P. vagabunda によるリンゴの bull's-eye rot は、イギリス (Wilkinson 1944)、フィンランド (Talvia 1960)、ポーランド (Michalecka ら 2016)、チェコ共和国 (Hortova ら 2014)、セルビア共和国 (Vico ら 2016)、カナダ (de Jong ら 2001)、アメリカ (Spotts ら 2009)、チリ (Soto-Alvear ら 2013)、オーストラリア (Cunnington 2004) それにニュージーランド (Brook 1957) など世界各地で発生している。本菌はリンゴの粗皮組織や果実のほか、枝及び葉に感染、発病する (Verkley 1999)。枝にはかいよう症状を起こす (Wilkinson 1944, Rooney-Latham ら 2016) ことが、接種実験によって繰り返し確認されている (Corke 1956, Lockhart ら 1961, Henriquez ら 2006, Rooney-Latham ら 2016)。Corke (1956) は 1 年を通して枝への無傷接種を行い、枝の感染は 7~9 月に限られ、接種の成功率は最大で 20% だったと述べた。その病斑はいずれも 1 インチに満たず、病斑において分生子の形成は見られず、枝への寄生性はないとした。Lockhart ら (1961) は温室内における *G. album* による接種試験によって枝にかいよう症状が発生することを確認したが、屋外における接種試験では病斑の形成は見られなかったとした。しかし、Rooney-Latham ら (2016) はコンテナ栽培された 'Newtown Pippin' の枝に生じた褐色のかいようと枯れ込みから *N. alba* を分離し、分離菌を用いた接種試験によってこれらの症状が再現され、病斑部から接種に用いた菌が再分離されたことを報告した。これらのことから本菌は、条件によっては枝に寄生性あるいは病原性を有するものと考えられた。

P. vagabunda によってリンゴの葉に病気が発生したとの報告は見られない。しかし、Tan ら (1972) は、5 月から 11 月までの間、'Cox's Orange Pippin' の葉に生じた Cox-spot と呼ばれる障害を生じた葉の褐変部から、*G. album* が継続して分離されたとし、また、この菌を Cox-spot を生じた葉に接種したところ分生子層 (acervuli) が生じたと述べた。Köhl ら (2018) は PCR によってリンゴの落葉組織から *N. alba* を検出しており、健全な葉では病斑を形成しないが、葉の組織で腐生的に増殖する可能性が考えられる。

果実への侵入は、lenticel (皮目) 及び亀裂を通してなされることが考えられている (Edney 1958, Giraud ら 2019, Nybom ら 2020)。2004 年にチリで *N. alba* によって生じた

bull's-eye rot について調査した Henriquez (2005)は、病斑が果点または傷から発生したと述べた。Cameldi (2015)は病原菌が侵入した後、約3ヶ月間は発病しないことについて、果実内のリンゴ酸含量が関与し、収穫期以降リンゴ酸が減少することによって発病する可能性があるとして述べた。また Dugan (1993)によると、貯蔵中に発病した bull's-eye rot は果実から果実に広がることはないといわれる。

Edney ら (1977) は、*G. album* 及び *G. perennans* を用いた接種試験において、リンゴ果実を接種前に水で洗浄すると発病が激しくなるとした。洗浄により lenticel から化学物質あるいは微生物による阻害物質が流され、感染が起こる可能性があるとして述べた。Everett ら (2017) は、孢子懸濁液を用いた果実への無傷接種によって、果面の濡れが、最短で5日間必要であり、2日間では感染が見られなかったとした。発病と収穫時期の関係について Cameldi ら (2016) は'Cripps Pink'を10~12月に4回に分けて収穫し、収穫時期が遅くなるとともに bull's-eye rot の発生量が多くなることを明らかにした。Köhl ら (2018) はPCRによる *P. alba* の検出技術を開発し、これによって、リンゴの小枝のかいよう部やミイラ果、園内の枯れ草、リンゴの落葉組織、剪定した枝などから同菌が検出されたとし、果樹園床のリンゴ葉面、ミイラ果や剪定枝上での検出量は4月から8月まで減少し、9月から12月にかけて増加したと述べた。

Cameldi (2015) は本菌が人工培地で分生子を形成しにくいと述べている。Soto-Alvear ら (2013) は *N. alba* の409菌株をPDA培地で20日間培養したが、分生子を形成した菌株は見られなかったとした。また、Romero ら (2018) は、*P. vagabunda* 19菌株をPDAの他5種の寒天培地で培養したが、いずれの培地でも分生子形成が見られなかったとした。Trouillas ら (2019) は *P. vagabunda* 2菌株をオートミール寒天培地、PDA及びトマト寒天培地を用いて培養試験を行ったが分生子は得られなかった。一方で、Clarkson (1945) はPDA培地において、また Cameldi ら (2017) はトマト寒天培地で、いずれも分生子が豊富に形成されたとした。このように、菌株間での孢子形成に差があり、さらに培養基質が同じでも孢子形成に関して差異が見られる。

3. *P. vagabunda* の寄主範囲と感受性の品種間差

P. vagabunda はリンゴ、セイヨウナシの病原菌として知られており、果樹類ではこのほかに、オリーブ、マルメロ、キイチゴ類に寄生する (Verkley 1999, Henriquez 2004, Romero ら 2018)。その他、草本類ではトリカブト属 (*Aconitum*)、ムカシヨモギ (*Erigeron*)、木本類ではニワトコ属 (*Sambucus*)、ニシキギ属 (*Euonymus*)、クサボケ (*Chaenomeles japonica*)、ホワイトアッシュ (*Fraxinus americana*) やグリーンアッシュ (*Fraxinus pennsylvanica*) に寄生することが知られている (Verkley 1999, Rossman ら 2002, Norin ら 2003, Henriquez 2004)。Putnam ら (2005) はアッシュに発生する coin canker がリンゴやナシへの感染源となる可能性を示唆した。これらの宿主について、我が国における観察の記録はない。なお、本菌は植物体以外の組織で増殖した事例があり、Tan ら (1972) は殺ダニ剤「ケルセン」が処理された葉に *G. album* と *G. perennans* の分生子懸濁液を噴霧したところ、葉上に付着していた *Panonychus ulmi* (リンゴハダニ) の死骸上に acervuli が認められたと報告している。

P. vagabunda に対しては果実及び枝に品種間で感受性に差がみられる。Blažek ら (2006) はチェコ国内における貯蔵病害の発生調査をもとに *G. album* に対する各品種の感受性を検討し、‘Topaz’、‘Golden Delicious’、‘Rubinstep’、‘Jonagold’、‘Rucla’は感受性が高く、‘Angold’、‘Gala’、‘Florina’、‘Melodie’、‘Meteor’、‘Zuzana’は中程度、‘Gala’、‘Melrose’は低いとした。また、Hortova ら (2014) は *N. alba* を用いた接種試験によって‘Golden Delicious’、‘Florina’、‘Rubin’、‘Rubinola’、‘Sampion’の感受性を比較し、‘Rubin’は最も感受性が高く、‘Sampion’が最も抵抗力が強いとした。さらに‘Rubin’と‘Rubinola’の2品種について枝のかいよう症状の形成程度を比較し、‘Rubin’の抵抗力がまさるとし、品種によって果実感受性と枝の感受性が異なる場合があると述べた。

4. 防除技術

黄腐病に対し国内で防除試験を行った報告は見当たらない。しかし国外では、bull's-eye rot に対する防除技術として殺菌剤を利用する方法が開発され、実用化されている。Giraud ら (2012) によると、西ヨーロッパでは *N. alba* による bull's-eye rot の予防防除として、fludioxonil、pyrimethanil、boscalid・pyraclostrobin 混合剤及び thiophanate-methyl が、北ドイツでは trifloxystrobin 及び captan が本病害の防除薬剤として使われている (Weber 2010)。

Cameldi ら (2016) は、thiophanete-methyl 剤を収穫 14 日及び 7 日前の 1 回または 2 回散布すると bull's-eye rot の発生抑制効果が高いことを明らかにした。また Wood ら (2017) は *P. vagabunda* による bull's-eye rot に対して、収穫果への有傷接種試験によって carbendazim が高い防除効果を示したと述べた。これら MBC 剤は病原菌の細胞分裂を阻害する働きを持ち、多様な病原糸状菌に高い防除効果を示す一方、耐性菌の出現リスクが高いことも知られている (田辺 2013)。Weber ら (2010) はドイツ北部のリンゴ産地において *N. alba* 及び *N. perennans* に MBC 剤耐性菌の発生を報告している。Minář (2006) は、QoI 剤の 2 剤 (trifloxystrobin、kresoxim-methyl) を収穫の 3~4 週間前に 1 回散布したところ、冷蔵貯蔵後における *G. album* 及び *G. perennans* による Gloeosporium rot の発病が有意に減少したと述べた。Wood ら (2017) は QoI 剤 trifloxystrobin が bull's-eye rot に対し防除効果が高いとした。そのほか、アニリノピリミジン剤の cyprodinil (Wood ら 2017) や SDHI 剤の isopyrazam (Wood ら 2017)、フェニルピロール剤の fludioxonil (Lolas ら 2015、Cameldi ら 2016) で bull's-eye rot の発生抑制効果があるとされ、一部の殺菌剤については西ヨーロッパで実用化されている (Giraud 2012)。bull's-eye rot に対する防除法として MBC 剤や QoI 剤の収穫 1~4 週間前散布は高い防除効果が見込まれるが、これらの系統剤は多くの病原菌に対して耐性菌出現リスクが高い。既に MBC 剤では耐性菌が検出されている地域もあるため、利用する場合にはそれぞれの地域で防除効果を確認するとともに、これらの薬剤に対する感受性の推移についての定期的なモニタリングが必要と考える。

一方、殺菌剤以外でも bull's-eye rot の発生抑制効果を示す資材あるいは方法が見出されている。Bryk ら (2012) は、収穫翌日の果実に温湯浸漬処理 (48~49°C、2 分間) によって、bull's-eye rot の発生を阻止できるとした。温湯処理技術については国内のリ

ンゴ果実では実用化された例はないが、Maxin ら (2012) はリンゴ果実の温水洗浄装置を作製し、50~58°C の温水を果実に一定時間浸漬あるいは噴霧することで、*N. alba* や *N. perennans* ほか数種の貯蔵病害による腐敗を有意に低減できたと述べた。環境負荷を低減できる技術の一つとして、今後、実用化が期待される。また、鮮度保持資材である 1-methylcyclopropene (1-MCP) も bull's-eye rot の発生抑制効果があるとされる (Cameldi ら 2016)。本剤は果実の貯蔵性や品質を長く維持できることから、秋田県でも利用が進んでいるが、これまで貯蔵病害の腐敗防止について検討されたことはない。

II. 小黒斑症状発生の主因究明

生産現場での発生状況から、小黒斑の発生は伝染性の病害である可能性が強く示唆されたことから、本章では、コッホの条件に準拠して小黒斑の主因究明を行った。

1. 材料と方法

1) 小黒斑からの糸状菌の分離

最初に、果実に発生した小黒斑とその周辺に 75 %エタノールを噴霧して表面殺菌し、10 分ほど風乾して、クリーンベンチ内で黒変境界部の果皮と果肉の小片を滅菌したメスで切り出した。切り出した小片を 2 %素寒天平板培地に置床し、20 °C、暗黒下で約 1 週間培養し、この間に生育した菌糸を BD Difco™ ポテトデキストロース寒天（以下 PDA）平板培地に移植した。分離された菌株の中で分生子を形成した菌株については単孢子分離を行い、分生子の形成が見られなかった菌株については PDA 平板培地を用いて単菌糸分離を行った。分離された菌株は、いずれも PDA 斜面培地で保存した。単孢子分離は、先ず供試菌株を PDA 平板培地で 7~10 日間、20 °C、暗黒下で前培養した。その後、生育した菌叢を滅菌試験管に入れ、少量の滅菌水を加えてよく攪拌し、孢子懸濁液を得た。得られた孢子懸濁液 100 µl 滅菌水を PDA 平板培地に滴下し、先端を L 字に加工した滅菌ニクロム線を用いて、培地表面に画線した。20 °C、暗黒下で 1~2 日間培養した後、実体顕微鏡下で単一のコロニーを、滅菌針で PDA 斜面培地に移植し、これを単孢子分離株とした。

2) 小黒斑から分離された白色糸状菌の収穫後のリンゴ果実に対する病原性試験（有傷接種）

前項により、小黒斑から分離された糸状菌 8 菌株、すなわち 2012-1、2012-7、13J-5、STD、15MO2、0123-18、AITC-KH92 及び AITC-KH54 株を用いて、‘ふじ’の果実に対する病原性を有傷接種により調査した。供試果実は、2018 年に場内圃場で適期収穫された果実とした。供試菌株のうち分生子を形成した 2 菌株（2012-1 株、STD 株）は、分生子懸濁液を用いて接種し、形成しなかった菌株については、含菌寒天円盤を果面に貼り付ける方法で接種した。接種に先立って、供試果実に、幅 0.2 mm 長さ 1~3 mm、深さ約 2 mm の傷を平行に 3 本付けた。付傷にあたっては、調理用具を加工した器具を常に用い、できるだけ均一な傷を付けることができるように配慮した。分生子を形成した菌株は、まず PDA 平板培地で 5 日間、20 °C、12 時間光照射（白色蛍光灯）下で培養した後、生育した菌叢を滅菌メスで約 5 mm 角に細断してポリプロピレン製遠沈管（50 ml 容量）に取った。これに、平板培地（直径 90 mm ペトリ皿）1 枚あたり 10 ml の滅菌水を加えてよく攪拌した後、2 重のガーゼで濾過して分生子を回収した。その後、トーマ血球計算盤を用いて分生子の濃度を調整した。分生子懸濁液の濃度は、2012-1 株が 1.0×10^4 個/ml、STD 株が 1.5×10^5 個/ml とした。接種は、得られた懸濁液 200 µl を染み込ませた 2 cm 角のガーゼで付傷部を覆う方法で行った。

分生子を十分得られなかった菌株については、上記と同じ方法で付傷した後、この部分に 50 μ l の滅菌水を滴下し、その水滴上に、あらかじめ PDA 平板培地で約 10 日間培養 (20 °C、12 時間光照射) して得た菌叢の辺縁部からコルクボーラーで得た直径 5 mm の含菌寒天円盤を、菌叢面が付傷部に接するように貼り付けた。いずれの場合も接種後は、滅菌蒸留水で湿らせた濾紙を敷いた円筒形の容器 (800 ml 容量) 「unix ware (PS-30) :ASVEL 製」に接種した果実を入れて密封し、15 °C の暗黒下で 2~3 週間保存し、発病の有無を観察した。無接種区として、滅菌水を含ませたガーゼまたは無菌の寒天円盤部を付傷部に貼り付けた他は同様に処理した区を設けた。いずれの区でも病斑を生じた場合は、表面にエタノール (75 %) を塗布し、風乾後に、滅菌メスを用いて果肉部の病斑組織を掻き取り、PDA 培地に置床して接種菌の分離を試みた。

3) 小黒斑から分離された白色糸状菌のリンゴ樹上果に対する病原性試験

(1) 有傷接種試験

2019 年に秋田県果樹試験場場内圃場に植栽された収穫前の ‘ふじ’ の樹上果を対象として、有傷での接種試験を行った。10 月 8 日に同じ樹の 6 果を対象として、1 果あたり 2 か所 (合計 12 か所) に付傷し、STD 株の分生子懸濁液 (2.2×10^5 個/ml) 50 μ l を染み込ませた 2 cm 角の滅菌ガーゼを、付傷部分に貼り付けて接種とした。懸濁液の作製及び果実の付傷は II 章 1 節 2 項に示した方法と同様に行った。接種後は直ちにポリエチレン製の袋で果実を密封して保湿し、さらに遮光するためにアルミホイル箔で 5 日間覆った。その後は、供試果実の病虫害被害を防ぐため、ブドウ用果実袋 (小林製袋社製、グレープ T15) に交換し、収穫期まで供試果実を被袋した。また、同じ樹の別の 6 果に、同様に付傷した後、滅菌水を同量染み込ませたガーゼを貼り付け、その後も同様の管理を行い、無処理区とした。接種から 23 日後の 10 月 31 日に収穫し、発病調査を行った。いずれの区でも病斑を生じた場合は、本節 2) に示した方法により、接種菌の分離を試みた。

(2) 無傷接種試験

小黒斑から分離された糸状菌を用いて、場内圃場に植栽されたリンゴの樹上果に対する病原性試験を実施した。試験 1 及び 2 は ‘ふじ’、試験 3 は ‘ふじ’ と黄色系品種 ‘秋田 19 号’ について実施し、いずれの試験においても、病虫害防除が慣行法に従って実施された成木を用いた。供試菌株は、STD 株と GM3 株とした。前者は 2013 年に収穫後の ‘ふじ’ で見られた小黒斑から、また後者は 2018 年に収穫前の樹上にある ‘ぐんま名月’ に生じた小黒斑から分離された白色糸状菌の単孢子分離株である。

‘ふじ’ を対象として、試験 1 では 2015 年 9 月 5 日に STD 株の菌糸懸濁液を用いて 5 果に、試験 2 では 2018 年 9 月 21 日に STD 株の分生子懸濁液を用いて 5 果に、また試験 3 では 2019 年 9 月 12 日に STD 株、同年 10 月 18 日に GM3 株の孢子懸濁液を用いてそれぞれ 4 果及び 6 果に接種した。菌糸懸濁液は、供試菌株を PDA 平板培地 (直径 90 mm ペトリ皿) により 2 週間培養 (20 °C 暗黒下) し、生育した菌叢から滅菌針でかき取った菌糸片を、平板培地 1 枚あたり 10 ml の滅菌水に懸濁し、これを 2

重のガーゼで濾過して得た。分生子懸濁液については、前節の有傷接種試験において行った調整法に準じた。接種は、菌糸懸濁液あるいは分生子懸濁液 50 μ l を染み込ませた 2 cm 角の滅菌ガーゼを、果実の赤道面へ 1 果あたり 2 か所に貼り付けて行った。接種後は直ちにポリエチレン製の袋で果実を密封して保湿し、さらにアルミホイル箔で果実を覆って、遮光した。試験 1 では接種時の状態を収穫時まで維持し、試験 2 及び 3 では、それぞれ接種 7 日及び 5 日後にポリエチレン製の袋とアルミホイル箔を除去した。その後は、本章 1 節 3 項の (1) に示した有傷接種試験と同様に管理し、収穫日に発病調査を行った。

‘秋田 19 号’の樹上果に対する接種試験は、試験 3 において、GM3 株を用いて 6 果を対象として、果面全体に分生子懸濁液を噴霧接種する方法で実施した。接種は‘ふじ’の接種試験と同日の 2019 年 10 月 18 日に同一の胞子懸濁液を用いて実施した。接種後、直ちにポリエチレン製の袋で果実を密封し、アルミホイル箔で 5 日間、果実を覆った。それ以外は、分生子懸濁液の調整、接種後の維持、管理は同日に接種した‘ふじ’を対象とした試験方法と同様とした。

各試験とも胞子懸濁液あるいは菌糸懸濁液の代わりに滅菌水を用いて同様の処理を行った区を設け、無処理区とした。接種によって発病が見られた場合は、病斑部とその周辺に 75 %エタノールを噴霧して風乾し、クリーンベンチ内で病斑境界部の果皮と果肉、または果皮直下の褐変した果肉を滅菌したメスで切り出し、PDA 平板培地に置床して接種菌の再分離を試みた。本試験の詳細を表 II-1 に記した。

Table II-1. Method for pathogenicity test for isolates of whitish slow-growing fungi obtained from DCSs^{a)} on apple fruits: the test was conducted by inoculation on intact fruits on the tree

Isolate used	Inoculum ^{b)} (no. of spores/ ml)	Inoculated apples		Inoculation	Harvest & observation
		Cultivar	No. of fruits		
Test 1					
STD	— ^{c)}	Fuji	5	2022/9/5	11/11
Test 2					
STD	1.0×10^4	Fuji	5	2021/9/21	11/12
Test 3					
STD	1.7×10^5	Fuji	4	2021/9/12	11/14
Test 4					
GM3	6.0×10^4	Fuji	6	2022/10/18	11/14
		Akita No. 19	6	2021/10/18	11/28

a) Dark-colored spots

b) Conidial suspension was used as inoculum.

c) Mycelium suspension was used in this test. The isolate was grown on PDA plates for 14 d at 25 °C. The mycelia on the surface were harvested with 10 mL sterile water per plate. The mycelial suspension was filtered through double gauze, and used as inoculum.

4) 白色糸状菌の形態観察

小黑斑から分離された2菌株(STD株、GM3株)について、培養菌叢及び分生子の形状を観察した。両菌株はPDA平板培地を用いて、20 °C、蛍光灯照射(明期12時間/暗期12時間)下において培養され、分生子の観察を7~14日間、菌叢性状の観察を7~36日間行った。この間に生育あるいは形成された菌叢は肉眼観察により、分生子は光学顕微鏡(オリンパス社製BH-2)により200倍~400倍で形状を観察し、長径と短径を計測した。

5) 分子生物学的特徴による白色糸状菌の同定

(1) 供試菌株

秋田県内で収穫されたリンゴ(品種‘ふじ’あるいは‘ぐんま名月’)に小黑斑が発生した果実の表面から分離された12菌株、及び青森県内で収穫後の‘ふじ’に小黑斑が発生した果実の表面から分離された1菌株(塩基配列データと共に青森県産業技術センターりんご研究所から分譲)の合計13菌株を供試した(表II-2)。

Table II-2. Isolates of whitish slow-growing fungi obtained from DCSs and used for molecular phylogenetic analysis

Isolate	Isolation		
	Apple cultivar	Location	Year,Month
2011-6	Fuji	Hiraka, Akita	2011,12
2012-1	Fuji	Hiraka, Akita	2012,12
13J2	Fuji	Hiraka, Akita	2013,3
STD	Fuji	Hiraka, Akita	2013,11
15MO2	Fuji	Omori, Akita	2015,12
15NAG-1	Fuji	Jumonji, Akita	2015,12
AITC KH92 ^{a)}	Fuji	Soma, Aomori	2015,12
0123-18	Fuji	Hiraka, Akita	2018,1
0123-2-31	Fuji	Hiraka, Akita	2018,1
0123-2-32	Fuji	Hiraka, Akita	2018,1
0123-23	Fuji	Hiraka, Akita	2018,1
0423-14	Fuji	Hiraka, Akita	2018,4
GM3	Gunma Meigetsu	Hiraka, Akita	2018,11

a) The isolate was provided by Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center.

(2) DNA 抽出と PCR

遺伝子解析に用いる塩基配列は、リボソーム DNA の 5.8S を含む ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域、LSU (Large Subunit) 領域及びβチューブリン遺伝子の *tub2* 領域とした。供試菌株を BD Difco™ ポテトデキストロース液体培地で 20 °C の暗黒下に 1 週間程度培養した後、メンブレンフィルターを用いた吸引濾過によって菌体を得た。この培養菌体から PEX 法 (Nakahara ら 1999) により DNA を粗抽出した。抽出後の DNA を鋳型とし ITS 領域、LSU 領域及び *tub2* 領域を PCR により増幅した。プライマーは ITS 領域の増幅に ITS1/ITS4: TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATTGATATG、LSU 領域に LR0R / LR5:ACCCGCTGAACTTAAGC/TCCTGAGGGAAACTTCG、*tub2* 領域に Bt-T2M-Up/Bt-LEV-Lo1:CAACTGGGCTAAGGGTCATT/GTGAACCTCCATCTCGTCCATA をそれぞれ使用した。PCR 混合液は 1 サンプルあたり、抽出後の 1 ng/μl DNA 溶液 1 μl に滅菌水 12.5 μl、1 mg/ml 牛血清アルブミン 2 μl、GeneAmp10X PCR Buffer (Applied Biosystems 社製) 2 μl、2 mM GeneAmp dNTP Mix (Applied Biosystems 社製) 2 μl、20 μM プライマー2種類をそれぞれ 0.2 μl、及び 5U/ μl AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems 社製) 0.1 μl を加えて合計 20 μl に調整した。PCR はサーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient : タカラバイオ (株)) を使用し、95 °C、10 分間を 1 サイクル、95 °C で 1 分間、55 °C で 1 分間、72 °C で 2 分間を 35 サイクル、72 °C で 7 分間を 1 サイクルの反応条件とした。

PCR 後の増幅産物の有無は、PCR 反応液を電気泳動 (2.0 %アガロースゲル、泳動量 5 μl、4 分間、100 V) することで確認した。電気泳動には 100bp DNA Ladder (タカラバイオ (株)) を分子量マーカーとして使用した。

電気泳動後のゲルはエチジウムブロマイド溶液 (臭化エチジウム 10 μl + TAE (Tris-Acetic acid EDTA 溶液) 100 ml) で 10 分間染色し、UV イルミネーター上で紫外線照射 (302 nm) した。増幅産物が確認された DNA 溶液 15 μl は Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences) を使用して精製した。

(3) BLAST 検索ならびに分子系統解析

精製後の PCR 産物の塩基配列は ABI PRISM Genetic Analyzer 3700XL を用いて解析した。決定した塩基配列を用いて NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/>) による相同性検索を行った。また、塩基配列解析に使用した全ての菌株において決定した ITS 領域、LSU 及び *tub2* 遺伝子の塩基配列を繋げてアライメントに使用し、そのデータをもとに最大節約法、近隣結合法及び最尤法によって系統樹を作成した。系統樹の作成には、比較として白色糸状菌と近縁と考えられる *P. vagabunda* に加え、同属の *P. vincetoxici* 及び *Neofabraea* 属菌 7 種の Genbank database の登録菌株を使用した。アウトグループとして *Parafabraea eucalypti* の登録菌株を使用した。いずれもブートストラップ値を 1000 回計算して分岐の信頼性を評価した。解析は、系統学的解析ソフトウェア MEGA 5.2 によった。

2. 結果

1) 小黒斑症状

果樹試験場の圃場で発生した小黒斑症状及び横手市増田の選果場（2018年12月）及び同市大屋寺内の農家所有の冷蔵庫（2019年2月）に保存されていたリンゴに発生した小黒斑症状を詳細に観察した。これらはいずれも‘ふじ’で発生したものであった。斑点は、輪郭が明瞭な褐色から黒褐色の円形または楕円形で、中央部がわずかに凹んだものも多く、長径は0.4 mmから3.7 mm、平均は1.5 mmであった(図 II-1a)。中心部に果点または毛耳痕がみられることが多く、観察した小黒斑の約70~80%で見られた(表 II-3)。小黒斑の表皮を切り取ると、その下の果肉はスポンジ状で淡褐色を呈していた(図 II-1b)。2021年春までの観察で、小黒斑上に分生子が形成された例は見られなかった。果実に発生する斑点数は、1果あたり数個~数百個と幅が大きかった。これらの小黒斑は10月中旬頃から見え始め、陽光面に多く発生する傾向が認められ、さらに着色が良好な完熟果に多発し、未熟果では斑点数が少なかった。小黒斑が生じている果実を1ヶ月ほど室温条件下に保っても、小黒斑の多くがやや凹んだほかに変化は見られなかったが、ごくまれに大型の腐敗症状となった(図 II-1d)。この腐敗症状はリンゴ黄腐病(福井 1940)と酷似していた(図 II-3a)。

果樹試験場の圃場に植栽された黄色系品種‘秋田19号’について、適期(2018年11月18日)に収穫された果実に発生した小黒斑を観察した。本品種に発生した小黒斑も、褐色~黒褐色で、円形または楕円形でやや凹むものが多かった。長径は0.3~2.2 mm(平均1.0 mm、n=90)で、小黒斑の中心部に毛耳痕あるいは果点のいずれかが見られた。調査した斑点では、約7割で中心部に毛耳痕が見られた。形状、色及び大きさは‘ふじ’で見られた小黒斑とよく似ていたが、多くは病斑の周囲に赤色のハローを伴っており、この点で異なっていた(図 II-1c)。

また、2019年11月14日に果樹試験場で適期収穫された‘ふじ’137果を冷蔵保温し(2℃)、その後の小黒斑の発消長を調査した。11月17日に合計589個の小黒斑と1個の腐敗病斑を確認した。2020年2月27日には、新たに177個の小黒斑と1個の腐敗病斑が確認され、3月12日にはさらに76個の新たな小黒斑と1個の腐敗病斑が見られた。11月及び2月の腐敗病斑は、観察から傷口からの発病と見られ、3月の腐敗病斑は小黒斑から進展したと見られた。これ以外の小黒斑に変化は見られなかった。

Table II-3. Characteristics of DCSs on apples found at three locations in Akita Prefecture since 2011

Location	Apple cultivar	No. of fruits examined	No. of lesions examined	Length of lesions (mm)	Site of lesion development (%)		
					Trichome base	Lenticel	Wound
Masuda sorting facility	Fuji	25	39	0.8 - 3.7 (1.54)*	84.6	15.4	0
Oyaterauchi, Yokote (farmer's field)	Fuji	5	100	0.4 - 3.1 (1.43)	79.0	19.0	2.0
Akita Fruit-Tree Experiment Station	Akita No.19	3	90	0.3 - 2.2 (1.03)	70.0	30.0	0

* Mean length of lesions.

2) 小黒斑からの糸状菌の分離

2018年11～12月に増田選果場及び2019年2月に横手市栄選果場で採取したで採取した‘ふじ’、及び2018年11月に秋田県果樹試験場で採取した黄色系品種‘ぐんま名月’の収穫果に発生した小黒斑から糸状菌を分離した。最も高率で分離されたのは、PDA平板培地において白色から黄色みを帯びたクリーム色を呈し、炭疽病菌や斑点落葉病菌に比較して明らかに生育が遅い糸状菌（以後、白色糸状菌と呼ぶ）であった。2か所の選果場及び果樹試験場の圃場で採取したいずれの果実の小黒斑からも、この白色糸状菌が最も高い頻度（45.5～60.4%）で分離された。次いで、*Aureobasidium* sp.、*Alternaria* sp.、*Cladosporium* sp.、*Fusarium* sp.が分離されたが、分離率はいずれも11%以下であった（表 II-4）。

白色糸状菌は、菌叢が緻密で短い気中菌糸を持ち、中央部は少し盛り上がっていた。多くの菌株では菌叢が大きくなるにつれ、中央部から放射状に数本のしわが形成された（図 II-4b、4c）。まれに PDA 培地が褐色となる色素を産生する菌株も認められた。菌株によっては、菌叢表面がオレンジ色を呈し、白色または褐色の不均一な球状でやや堅い菌糸塊が形成されたが、この部分においても孢子形成は見られなかった（図 II-4d）。

Table II-4. Isolation of fungi from DCS lesions on apple fruits obtained at sorting facilities in Akita Prefecture

No. of DCLs	Fruits from which the DCSs obtained				Isolation of fungi (Percentage DCSs each fungus appeared)						DCSs no fungus appeared (%)
	No. of the fruits	Cultivar	Sampling location	Sampling *	WSGF ^{b)}	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	others	
118	20	Fuji	Masuda sorting facility	2018	50.8	12.7	10.2	5.9	5.9	13.6	0.9
99	99	Fuji	Sakae sorting facility	2018	45.5	5.1	10.1	5.1	2.0	4.0	28.2
96	5	Gunma Meigetsu	Akita Fruit-Tree Experiment Station	2019	60.4	8.3	11.5	9.4	2.1	7.3	1.0

a) Sampling of fruits was conducted in November and December.

b) The isolated colonies were whitish slow-growing fungus.

3) 小黒斑から分離された白色糸状菌の収穫後のリンゴ果実に対する病原性

小黒斑から分離された糸状菌 8 菌株を用いて行った接種試験において、いずれの菌株を接種した箇所でも小黒斑の発生は見られず、接種 7～10 日後から接種部位が褐変し始め、2～3 週間後には直径 3～5 cm の大型の腐敗病斑となった（図 II-2e）。これらの病斑は円形から楕円形でやや凹み、中央部が淡褐色から黄褐色、まれに褐色で、外側に向かって徐々に濃くなり褐色から暗褐色を呈した。本症状は、収穫後の果実が貯蔵中に発病するリンゴ黄腐病の症状に酷似していた。接種部位に形成された腐敗病斑からは、いずれも接種に用いたものと同様の糸状菌が容易に分離された。また、無接種区とした滅菌水処理では発病は認められなかった。

4) 小黒斑から分離された白色糸状菌の樹上果に対する病原性

(1) 有傷接種

小黒斑から分離された白色糸状菌を樹上の果実に対して行った有傷での接種試験では、接種した12か所(6果)のうち11か所において、中央部が褐色から黄褐色で、外側に向かい徐々に色調が濃くなり暗褐色となる円形から楕円形の大型の腐敗病斑が、収穫時に認められた(図 II-2f)。これらの症状は貯蔵中に発生するリンゴ黄腐病の症状に酷似していた。これらのうち10か所の腐敗病斑の果肉組織から、接種に用いたものと同じ培養形態の糸状菌が分離された。いずれの接種試験においても、小黒斑は見られず、滅菌水を処理した無処理区では腐敗症状の発生は見られなかった。

(2) 無傷接種

‘ふじ’を用いて樹上果を対象として実施した3回の接種試験のいずれにおいても、接種部位において赤褐色から黒褐色の直径1mm程度の小さな病斑が形成された(表 II-5、図 II-2a、2b、2c)。これらの病斑の中央部には毛耳痕や果点が見られた。同様に、‘秋田19号’の樹上果を対象とした接種試験(試験3)では、供試した6果のうち1果で小さな病斑が形成された。この病斑は、直径3mm前後の赤褐色から黒褐色の斑点で、中心部に毛耳痕や果点が見られた(図 II-2d)。また、一部の斑点にはその周囲に赤色のハローを伴っていた。‘ふじ’及び‘秋田19号’を用いて行ったこれらの接種試験で見られた小黒斑症状は、いずれも原病徴に類似していた。また、接種部位に生じた病斑から糸状菌の分離を試みたところ、接種に用いたものと同じ培養形態の糸状菌が容易に分離された(表 II-5)。滅菌水を処理した無処理区では、病斑の形成は見られなかった。

また、GM3株を接種して小黒斑を形成した試験3の果実(‘ふじ’)6果を、2℃で約2ヶ月間、保ったところ、1果において腐敗病斑となるものがみられ(図 II-3c)、この病斑からも、接種したのと同じ菌が容易に分離された。

Table II-5. Pathogenicity of whitish slow-growing fungus isolated from DCS on apple fruits

Isolate used	Inoculated apple fruits			No. of diseased sites ^{b)} (%)	Re-isolation (%) ^{c)}
	Cultivar	No. of fruits	No. of inoculations		
Test 1 (2015)					
STD	Fuji	5	10	6 (60.0)	100
Test 2 (2018)					
STD	Fuji	5	10	6 (60.0)	100
Test 3 (2019)					
STD	Fuji	4	8	3 (37.5)	100
GM3	Fuji	5	12	12 (100)	100
GM3	Akita No. 19	6	6 ^{a)}	1 (16.7)	100

a) The entire surface of the fruit was inoculated with a spray.

b) DCS developed at the inoculation site.

c) Rate of re-isolation of the inoculated fungus from the diseased sites.

5) 白色糸状菌の形態的特徴

リンゴ果実の小黑斑から分離された多くの白色糸状菌について、顕微鏡観察等によって分生子の形成を調査したが、ほとんどの菌株で分生子の形成は極めて少ないか観察されなかった。分生子が多量に形成された菌株は STD 及び GM3 の 2 株のみであった。そこで、これらの菌株について PDA 平板培地上に形成された分生子を観察したところ、いずれも単細胞で、形は中央部から湾曲するソーセージ型あるいは長楕円形～紡錘形で、両端はいずれも丸みを帯びており、細胞内に顆粒状の油滴が認められるものもあった (図 II-4a)。長径の平均値は STD 株が 18.3 μm で GM3 株が 14.9 μm 、短径はそれぞれ 4.1、3.3 μm で、2 菌株で大きさには多少差が見られた (表 II-6)。

Table II-6. Comparison of morphological characteristics of conidia of whitish slow-growing fungus isolated from DCSs

Isolate/taxon	Macroconidia ^{a)}			Microconidia Length \times Width(μm)	Reference
	Length \times Width ^{b)} (μm)	Septum	Shape		
STD ^{c)} (WSGF)	14.3 - 22.8(18.3) \times 2.9 - 5.0(4.1)	aseptate	allantoid, fusiform, curved	- ^{f)}	
GM3 ^{c)} (WSGF)	9.8 - 23.3(14.9) \times 2.3 - 5.5(3.3)	aseptate	allantoid, fusiform, curved	- ^{f)}	
<i>Gloeosporium</i> sp. ^{d)}	5-16 \times 3-5	aseptate	oblong to fusiform	ND ^{g)}	Togashi(1950)
<i>G. album</i> ^{e)}	13.8 - 28.0(20.75) \times 2.1 - 4.5(2.86)	aseptate	cylindrical, usually curved	ND ^{g)}	Talvia(1960)
<i>Neofabraea alba</i> ^{e)}	17 - 30 \times 2.5 - 3.5	aseptate	cylindrical to fusiform- allantoid, weakly to strongly curved	15 - 18 \times 0.5 - 1.0	Verckley (1999)
<i>N. alba</i> ^{e)}	17 - 25 \times 3 - 5	aseptate	curved	ND	Garipey <i>et al.</i> (2005)
<i>N. malicorticis</i>	16 - 31 \times 4.5 - 6	aseptate, becoming 1 - 3 septate	long ellipsoid to usiform, slightly curved	6.5 - 10.0 \times 2 - 2.5	Chen <i>et al.</i> (2016)
<i>N. perennans</i>	12 - 25 \times 3 - 6	aseptate, becoming 1 - 2 septate	straight or weakly curved	6 - 10 \times 1.5 - 3	Verckley(1999)
<i>N. kienholzii</i>	12 - 17.5 \times 2.5 - 3.5	aseptate, becoming 1 - 2 septate	oblong-ellipsoidal, sometimes weakly to strong curved	2.5 - 6.5 \times 1.5 - 2.5	Spotts <i>et al.</i> (2009)

a) Morphological characteristics were investigated by culture of each isolate on a PDA plate for 7-14 d at 20 °C under fluorescent lights for 12 h per day.

b) Means are presented in parentheses.

c) Single spore isolate.

d) Pathogenic fungus of Kigusare-byo reported by Togashi (1950).

e) Synonym of *Phlyctema vagabunda*.

f) Not observed.

g) No description.

6) 分子生物学的特徴による白色糸状菌の同定

供試した 13 菌株の ITS 領域の塩基配列はいずれも *Phlyctema vagabunda* Desmaziere と最も相同性が高く (99.59~100%)、次いで *Neofabraea kienholzii* (Seifert, Spotts and Levesque)Spotts, Lévesque and Seifert (98.19~98.67%)、*Neofabraea perennans* Kienholz (97.37~98.37%)、*Neofabraea malicorticis* H. S. Jacks. (97.17~98.17%) の順であった (表 II-7)。孢子形態の比較に用いた STD 株及び GM3 株において、最も高い相同性を示した *P. vagabunda* の分離源はリンゴ、セイヨウトネリコあるいはオリーブであった (表 II-8)。*tub2* 領域でも同様に、*P. vagabunda* (95.91~99.84%) と最も高い相同性を示し、次いで、*N. malicorticis* (90.55~92.49%)、*N. perennans* (89.84~91.76%)、*N. kienholzii* (88.08~89.81%) の順であった (表 II-9)。STD 株及び GM3 株について、最も相同性の高い *P. vagabunda* の分離源はリンゴ、オリーブ、クラブアップルであった (表 II-10)。LSU 領域においては供試した全ての菌株が *P. vagabunda* と 100% の相同性が見られた

が、*Neofabraea* 属の 3 種とも高い相同性 (99.23~99.31 %) を示した (表 II-11)。STD 株については最も相同性の高い *P. vagabunda* の分離源はオリーブ、セイヨウナシ、クラブアップル、セイヨウトネリコであった、一方、GM3 株は *P. vagabunda* の他、*Rhabdospora lupini* や *Neofabraea brunneipila* など、bull's-eye rot の病原菌とは異なる糸状菌とも高い相同性が見られた (表 II-12)。相同性検索において比較された *P. vagabunda* 分離株の採集地は北アメリカ、南アメリカ、欧州やアフリカと広範囲に分布していた。

これらの菌株の ITS、LSU 及び *tub2* の 3 つの領域の塩基配列をもとに系統樹を作成したところ、供試菌株はいずれも *P. vagabunda* に最も近いクレードを形成した (図 II-5、6、7)。しかし、これらは 2 つのサブクレードに別れ、一方 (クレード 1) に *P. vagabunda* 菌株が含まれたが、もう一つのクレード (クレード 2) には含まれなかった。孢子形態の観察に用いた STD 株及び GM3 株はいずれもクレード 2 に含まれ、クレード 1 に含まれた菌株は、いずれも孢子形成が認められなかった。供試菌株及び *P. vagabunda* が含まれるクレードに最も近かったのは *P. vincetxici* で、次いで *Neofabraea* 属の各種であった。

Table II-7. Homology with *P. vagabunda* and three species of *Neofabraea* in the ITS region of whitish slow-growing fungi isolated from DCS

Isolate	Number of bases	<i>P. vagabunda</i> (AF281369)*	<i>N. malicorticis</i> (AF281379)*	<i>N. perennans</i> (AF281389)*	<i>N. kienholzii</i> (NR_155471)*
STD	497	99.59	97.17	97.37	98.19
13J2	497	99.59	97.17	97.37	98.19
15MO2	497	99.59	97.17	97.37	98.19
15NAG-1	497	99.80	97.37	97.57	98.39
2011-6	497	99.59	97.17	97.37	98.19
2012-1	497	99.59	97.17	97.37	98.19
GM3	535	99.59	98.17	98.37	98.32
0123-18	521	100	97.57	97.77	98.66
0123-2-31	524	100	97.57	97.77	98.67
0123-2-32	521	99.80	97.37	97.57	98.47
0123-23	523	100	97.57	97.77	98.66
0423-14	524	100	97.57	97.77	98.67
AITC KH92	497	99.80	97.37	97.57	98.51

*:Accession No.

Table II-8. BLAST search of ITS region of whitish slow-growing fungi (STD, GM3) isolated from DCS

Isolate	Accession No.	Taxon	Homology(%)	Source	Country
STD(LC594621)*					
	AF281374	<i>Phlyctema vagabunda</i>	99.80	Apple	Canada
	MK174720	<i>P. vagabunda</i>	99.60	Olive	America
	MG969998	<i>P. vagabunda</i>	99.60	Apple	America
	KT923785	<i>P. vagabunda</i>	99.60	Apple	Latvia
	KY367507	<i>P. vagabunda</i>	99.60	Ash	Switzerland
GM3(LC594622)*					
	KT923785	<i>P. vagabunda</i>	99.63	Apple	Latvia
	KR859276	<i>P. vagabunda</i>	99.63	Crab apple	West Africa
	KJ396077	<i>P. vagabunda</i>	99.63	Apple	Italy
	MZ493002	<i>P. vagabunda</i>	99.63	Ash	Poland
	MG970000	<i>P. vagabunda</i>	99.43	Appple	Chile

* : Accession No.

Table II-9. Homology with *P. vagabunda* and three species of *Neofabraea* in the *tub2* region of whitish slow-growing fungi isolated from DCS

Isolate	Number of bases	<i>P. vagabunda</i> (AF281452)*	<i>N. malicorticis</i> (KR859290)*	<i>N. perennans</i> (KM262219)*	<i>N. kienholzii</i> (AF281462)*
STD	562	95.91	90.55	89.84	88.08
13J2	562	95.91	90.55	89.84	88.08
15MO2	562	95.91	90.55	89.84	88.08
15NAG-1	562	95.91	90.55	89.84	88.08
2011-6	562	95.91	90.55	89.84	88.08
2012-1	562	95.91	90.55	89.84	88.08
GM3	939	96.14	91.86	91.42	88.53
0123-18	888	98.87	91.94	91.64	89.48
0123-2-31	888	98.87	91.94	91.64	89.48
0123-2-32	944	99.84	92.49	91.76	89.81
0123-23	916	99.36	92.46	91.75	89.81
0423-14	918	99.84	92.34	91.75	89.81
AITC KH92	562	96.09	90.73	90.02	88.26

*:Accession No.

Table II-10. BLAST search of *tub2* region of whitish slow-growing fungi (STD, GM3) isolated from DCS

Isolate	Accession No.	Taxon	Homology(%)	Source	Country
STD(LC594623)*					
	KT963914	<i>Phlyctema vagabunda</i>	96.26	Olive	Spain
	KX670868	<i>P.vagabunda</i>	96.10	Apple	Italy
	KR866098	<i>P.vagabunda</i>	96.09	Apple	France
	AF281458	<i>P.vagabunda</i>	96.09	Apple	Yugoslavia
	MK174829	<i>P.vagabunda</i>	95.91	Olive	America
GM3(LC594624)*					
	KR866098	<i>P.vagabunda</i>	96.68	Apple	France
	KR866089	<i>P.vagabunda</i>	96.58	Apple	Canada
	MK174829	<i>P.vagabunda</i>	96.48	Olive	America
	KM253739	<i>P.vagabunda</i>	96.27	Apple	Poland
	KR859310	<i>P.vagabunda</i>	96.25	Crab apple	West Africa

* : Accession No.

Table II-11. Homology with *P. vagabunda* and 3 species of *Neofabraea* in the LSU region of whitish slow-growing fungi isolated from DCS

Isolate	Number of bases	<i>P. vagabunda</i> (KR859069)*	<i>N. malicorticis</i> (KR858876)*	<i>N. perennans</i> (KR858878)*	<i>N. kienholzii</i> (KR858873)*
STD	775	100	99.23	99.23	99.23
13J2	775	100	99.23	99.23	99.23
15MO2	775	100	99.23	99.23	99.23
15NAG-1	775	100	99.23	99.23	99.23
2011-6	775	100	99.23	99.23	99.23
2012-1	775	100	99.23	99.23	99.23
GM3	894	100	99.27	99.29	99.31
0123-18	867	100	99.27	99.29	99.31
0123-2-31	810	100	99.24	99.24	99.26
0123-2-32	869	100	99.27	99.29	99.31
0123-23	868	100	99.27	99.29	99.31
0423-14	870	100	99.27	99.29	99.31
AITC KH92	777	100	99.23	99.23	99.23

*:Accession No.

Table II-12. BLAST search of LSU region of whitish slow-growing fungi (STD, GM3) isolated from DCS

Isolate*	Accession No.	Taxon	Homology(%)	Source	Country
STD(LC595231)*					
	MK160187	<i>Phlyctema vagabunda</i>	100	Olive	America
	KX768550	<i>P. vagabunda</i>	100	Pear	Netherlands
	KR859070	<i>P. vagabunda</i>	100	Crab apple	South Africa
	KX768550	<i>P. vagabunda</i>	100	Pear	Netherlands
	AY064705	<i>P. vagabunda</i>	100	Ash	America
GM3(LC595232)*					
	MT156268	<i>P. vagabunda</i>	100	Plum	Germany
	AY064705	<i>P. vagabunda</i>	100	Ash	America
	MK160187	<i>P. vagabunda</i>	100	Olive	America
	MH871119	<i>Rhabdospora lupini</i>	99.66	No description	Netherlands
	MK592004	<i>Neofabraea brunneipila</i>	99.09	No description	Thailand

* : Accession No.

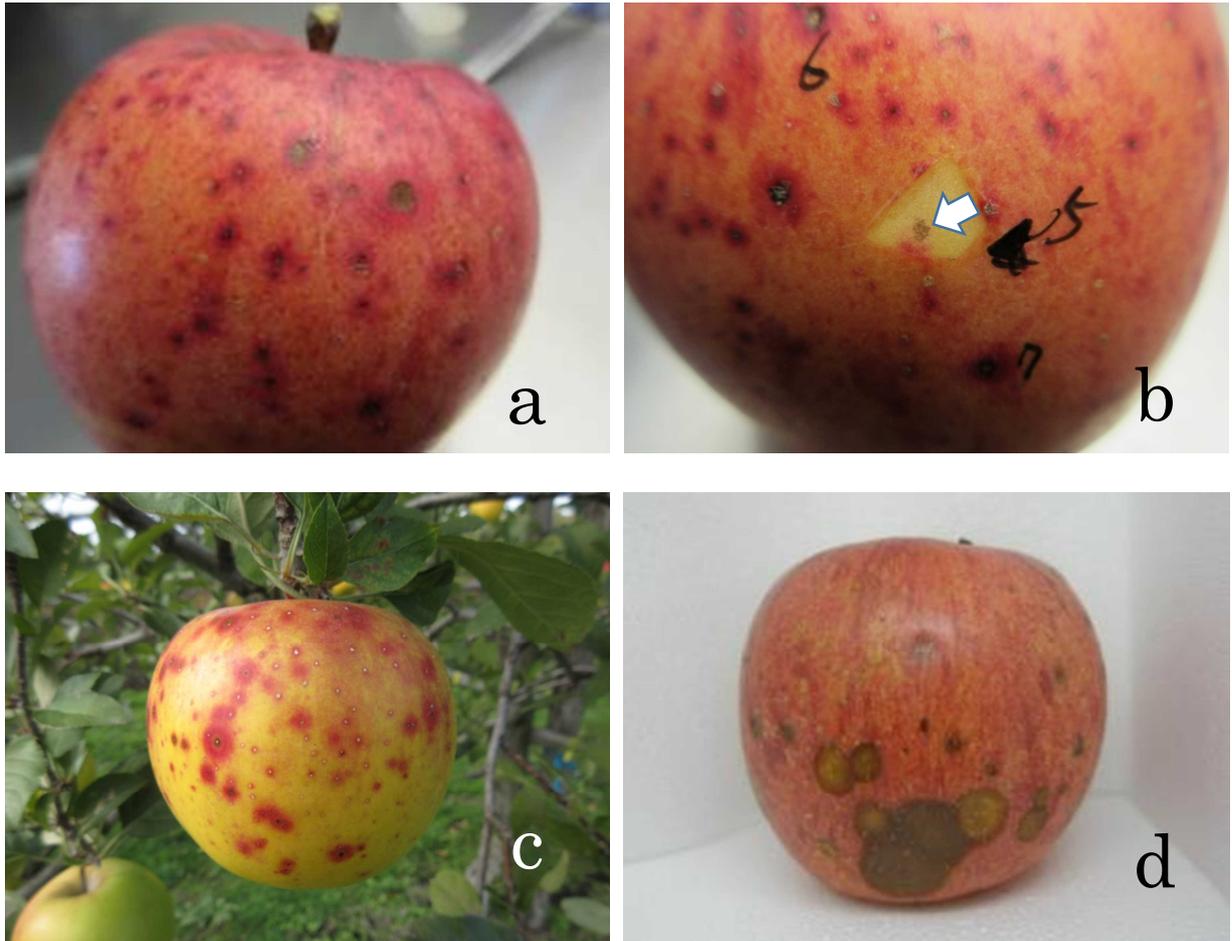


Fig. II-1 Dark-colored spot (DCS) lesions developed on apple fruits and soft rot lesions developed on stored fruits.

a, b: DCSs on stored apple fruits of cv. Fuji (Dec. 2018).

c: DCSs with red halo on a fruit of cv. Akita No. 19 (Nov. 2018).

d: Soft rot lesions on a fruit of cv. Fuji that were presumed to have developed from DCSs during storage (Feb. 2018).

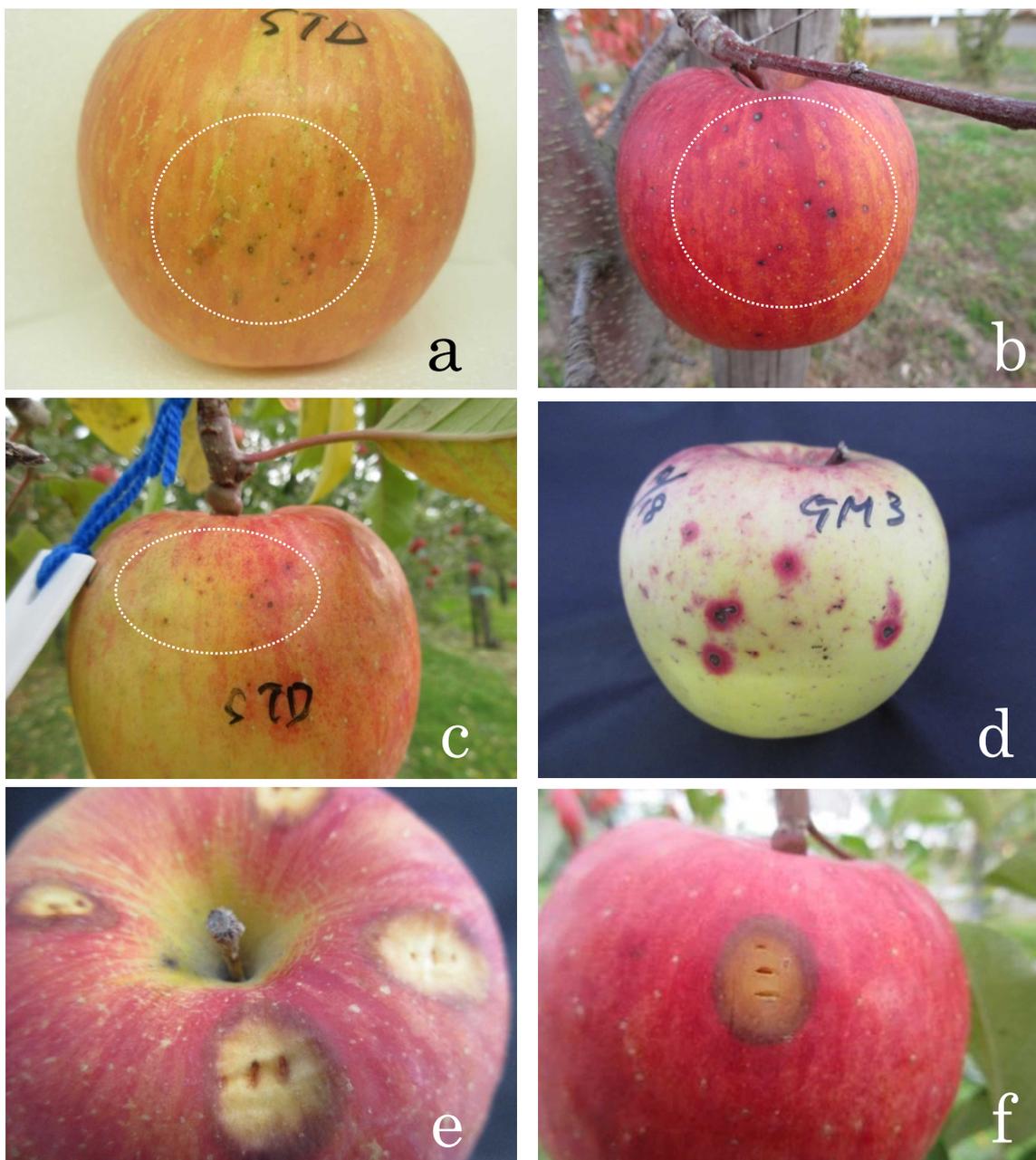


Fig. II-2 Symptoms developed on apple fruits caused by whitish slow-growing fungus isolated from DCSs.

a, b, c: DCS lesions developed on a fruit of cv. Fuji on a tree inoculated with the isolate STD.

d: DCS lesions with red halo developed on a fruit of cv. Akita No. 19 on a tree inoculated with the isolate GM3. Inoculation was conducted on the fruit without artificially wounding.

e: DCS lesions developed on a stored fruit of cv. Fuji inoculated with the isolate STD on an artificially made wound.

f: Soft rot lesions developed on a fruit of cv. Fuji on a tree inoculated with the isolate STD. Inoculation was conducted on artificially wounded sites of the fruit.

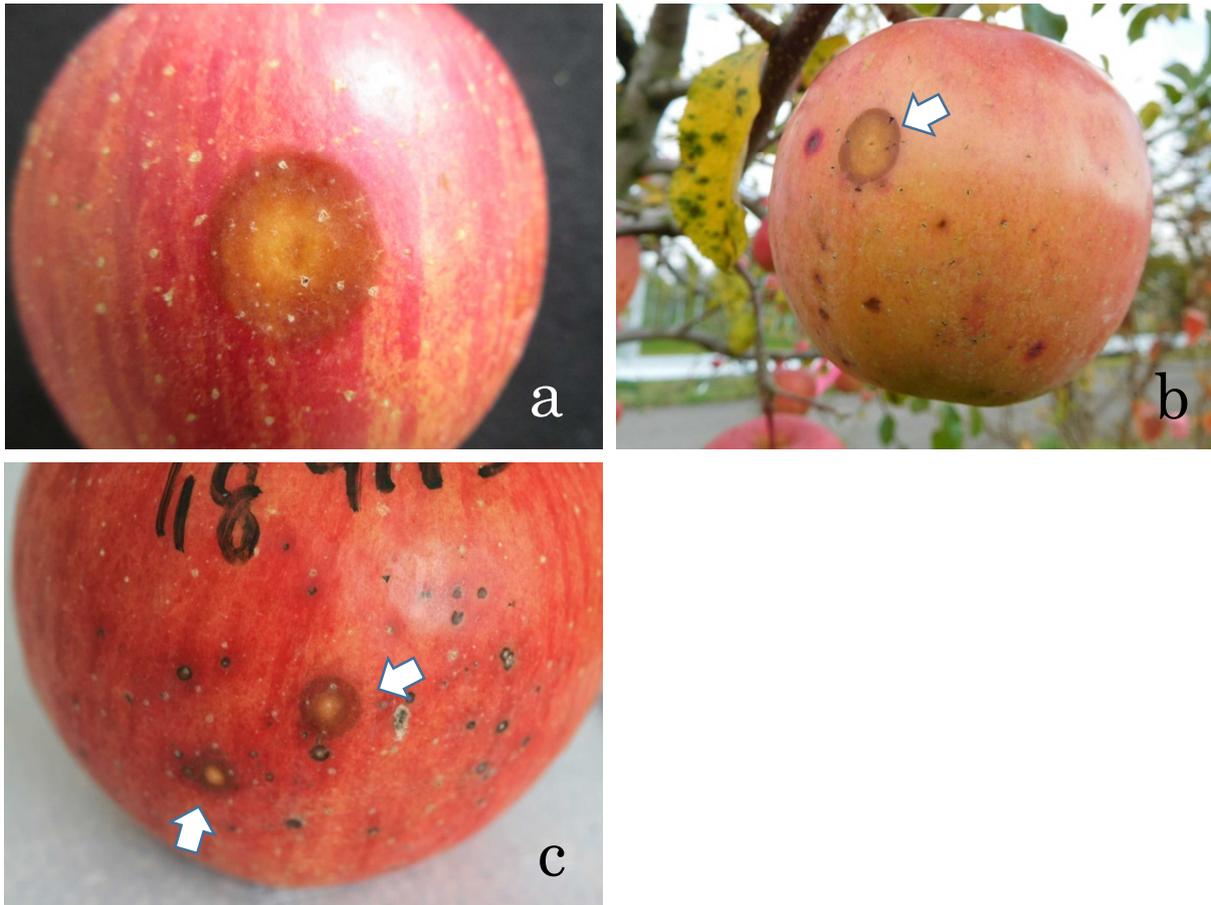


Fig. II-3. Soft rot lesions of Kigusare-byo disease developed on apple fruits of cv. Fuji.

- a: A soft rot lesion of Kigusare-byo developed on a fruit stored at 2 °C.
- b: A soft rot lesion (arrow) of Kigusare-byo developed on a fruit on a tree.
- c: Soft rot lesions (arrows) developed from DCSs 57 d after inoculation of the fruit with whitish slow-growing fungus (GM3 isolate).

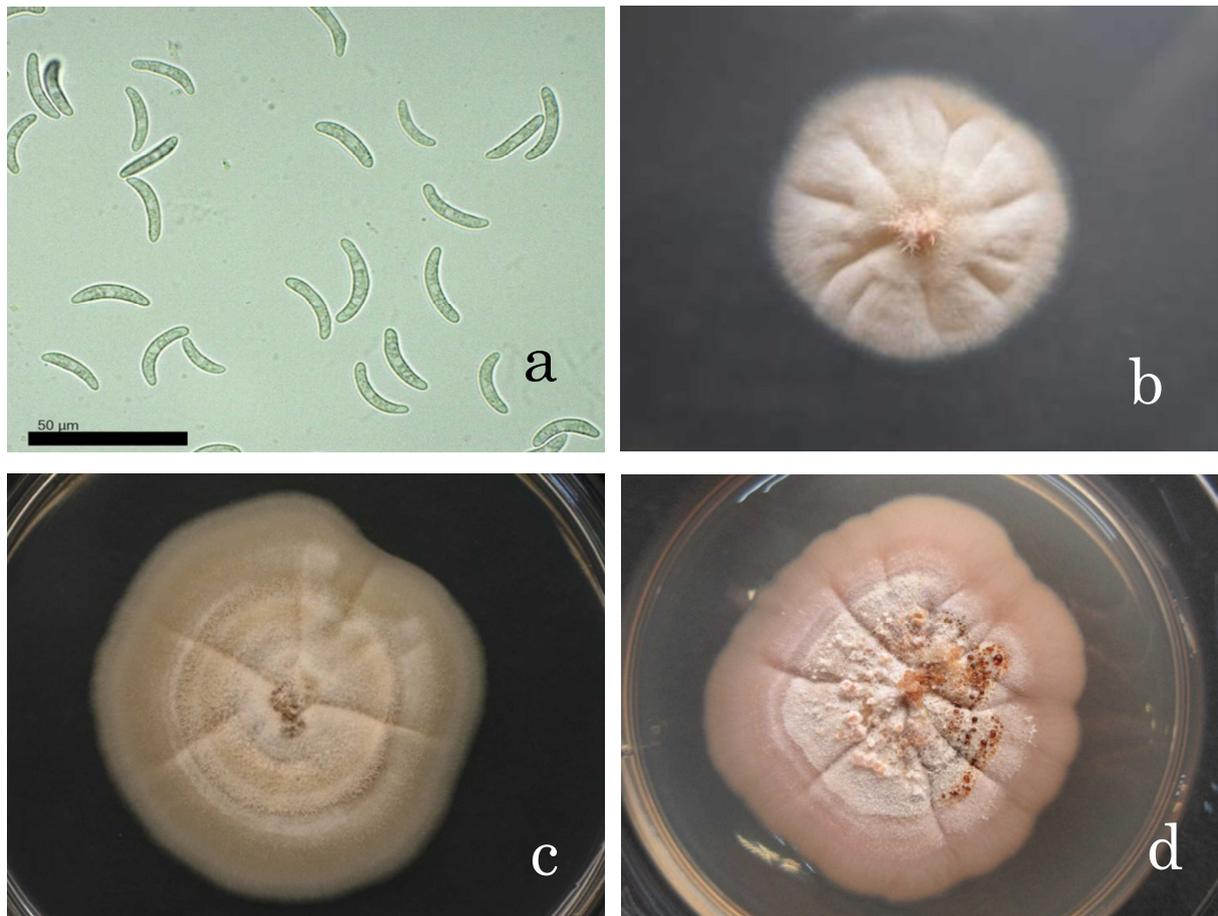


Fig. II-4 Colony morphology on potato dextrose agar (PDA) plates and macroconidia of whitish slow-growing fungus (STD isolate) isolated from a DCS.

a: Macroconidia (scale bar 50 µm).

b, c, d: Colony of the isolate grown on a PDA plate at 20 °C under fluorescent light with 12 h day for 14 d (b), 23 d (c), and 36 d (d). No conidia were found on the white or brown mycelial masses in photo d.

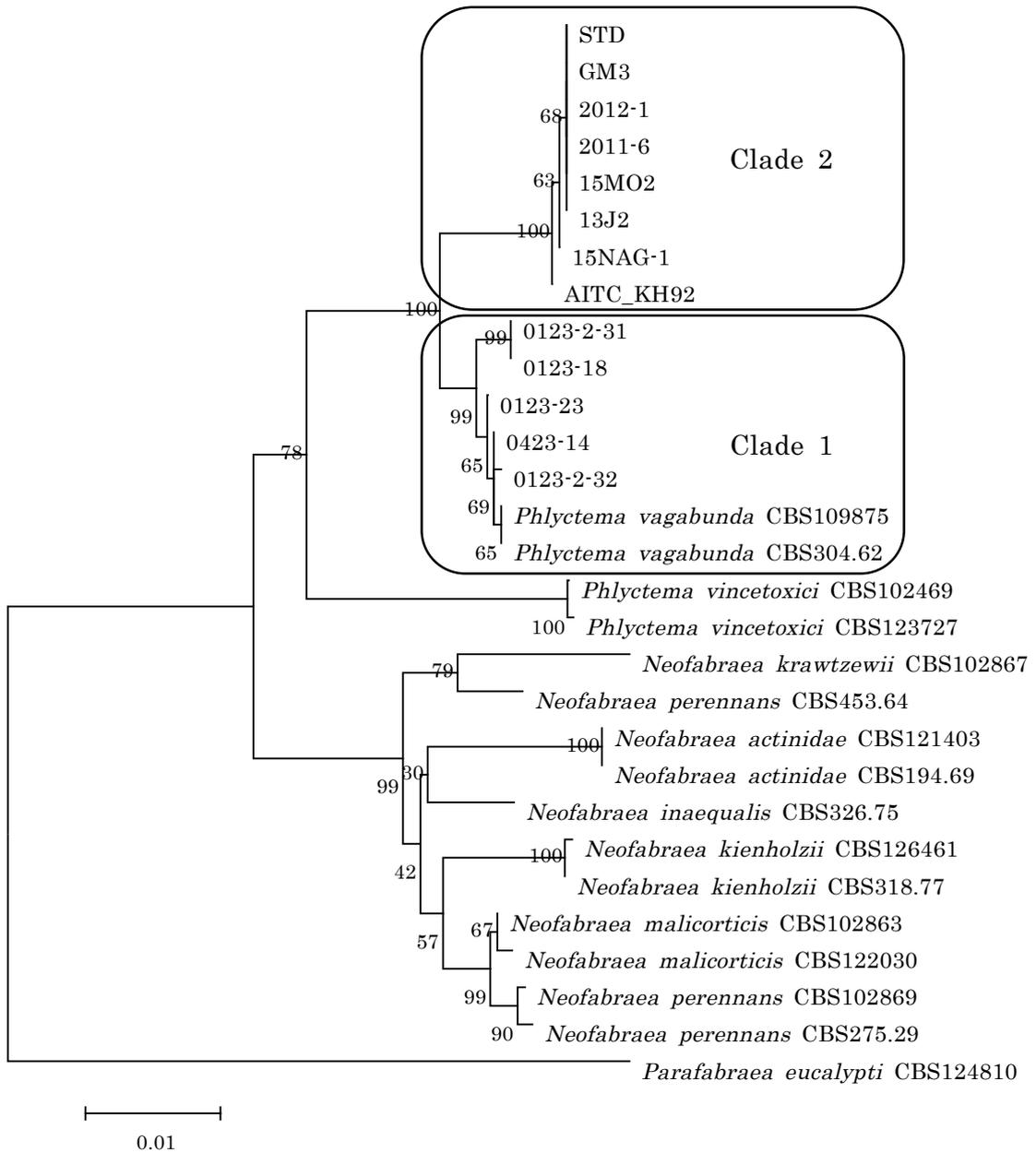


Fig II-5. Neighbor-joining phylogenetic tree based on the sequences of internal transcribed spacer, large subunit, and *tub2* regions of the isolates obtained from DCSs.

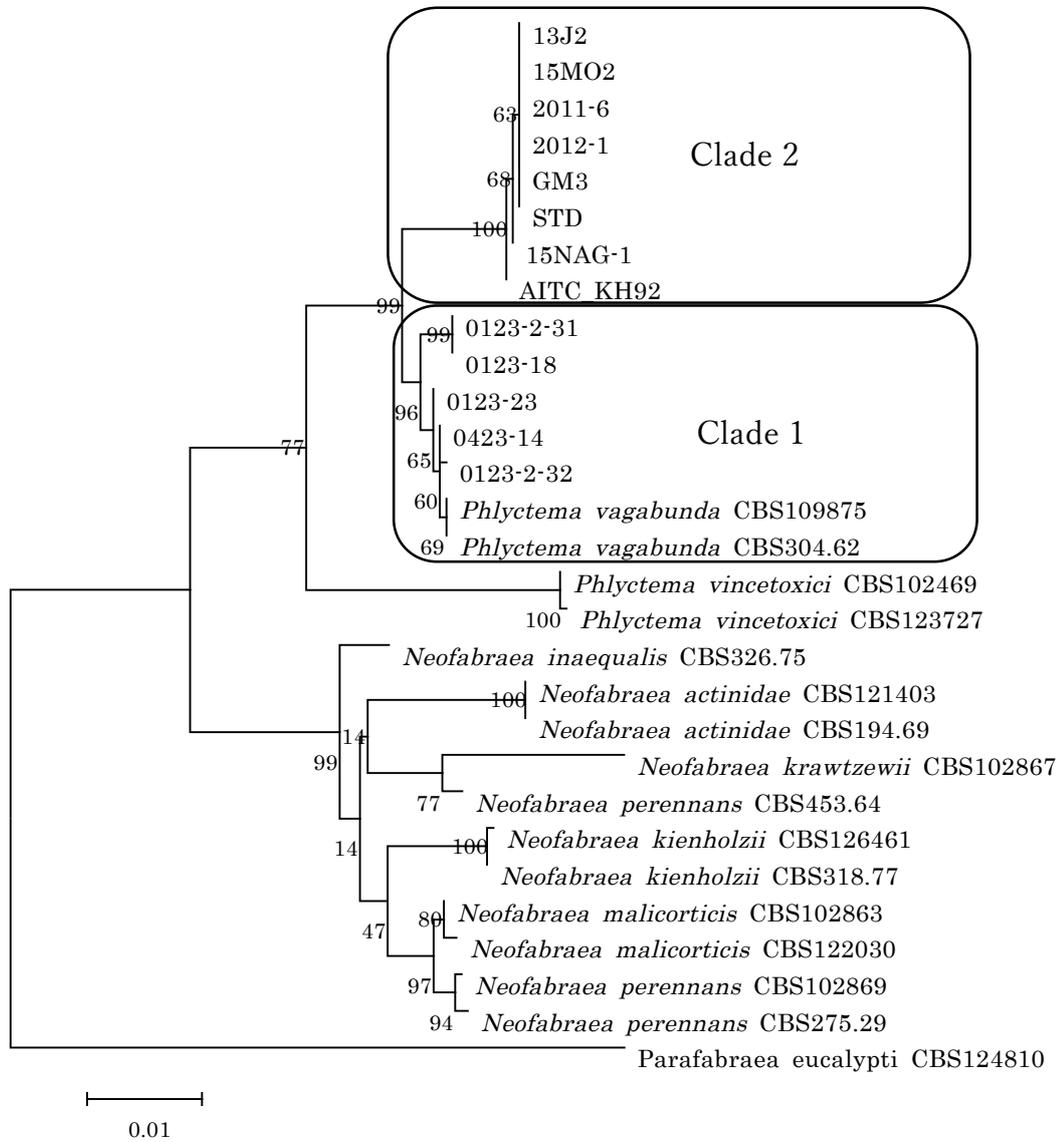


Fig. II-6. Maximum likelihood phylogenetic tree based on the sequences of internal transcribed spacer, large subunit, and *tub2* regions of the isolates obtained from DCSs.

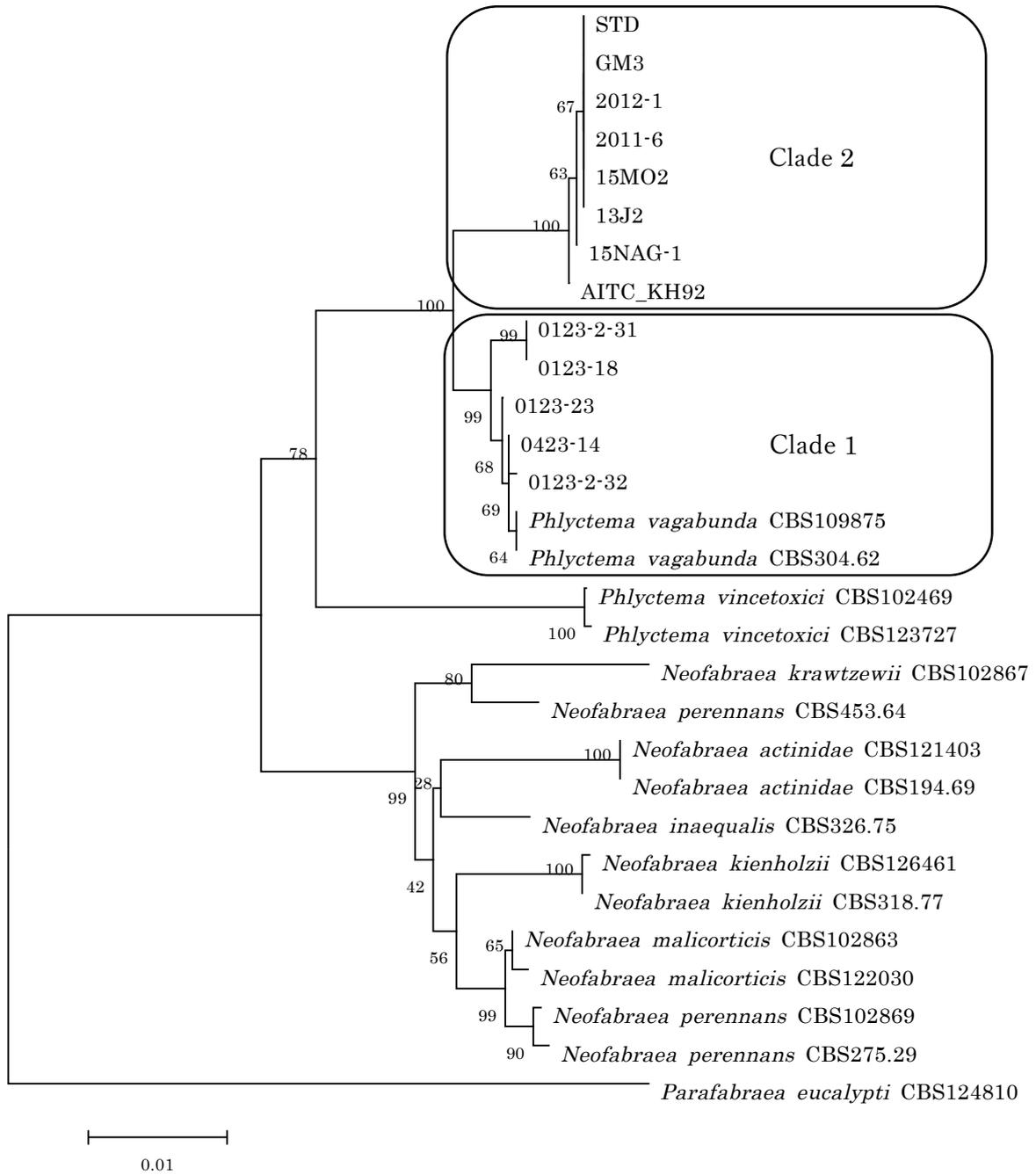


Fig. II-7. Maximum parsimony phylogenetic tree based on the sequences of internal transcribed spacer, large subunit, and *tub2* regions of the isolates obtained from DCSs.

3. 考察

本章では、2011年の秋季から秋田県で多発し、その後も継続して被害が見られるリンゴの小黑斑症状の原因を究明した。リンゴの空気伝染性病害の多くでは、果実における初期症状として褐色から黒色で円形を呈した病斑の形成が見られる。同年以降多発する小黑斑症状を詳細に観察したが、この小黑斑と、これらの伝染性病害の初期症状を肉眼症状で区別することは容易ではなかった。特に炭疽病、輪紋病、褐斑病、黒星病、斑点落葉病の初期症状はよく似ており、区別は困難であった。これらの小黑斑から糸状菌を分離したところ、分離率が最も高かったのは白色からクリーム色を呈し、放射状に数本のしわを生じる糸状菌であり、これを白色糸状菌と仮称した。これまで我が国で報告されているリンゴ病原菌のなかに、本菌に類似する形態的特徴を持つ菌は見当たらなかった。2018年に実施した調査においても、この白色糸状菌の分離率が最も高かった(表II-4)。次いで高率で分離されたのは *Alternaria* sp. であったが、分離率は12.7~5.1%に留まった。同属にもリンゴに病原性を有する種(斑点落葉病菌 *Alternaria mali* Roberts)があり、小黑斑の主因となった可能性はあったが、小黑斑が多発した地域あるいは圃場において、同病に感受性が高い‘王林’(鈴木ら1985)で小黑斑の発生が見られなかった(現地聞き取り調査)ことから、多発した小黑斑の主因となっている可能性は低いと考えられた。これより分離率が低かった他の病原菌が、広い範囲に発生した小黑斑の主因とは考え難い。これらのことから、2011年以降多発する小黑斑は、リンゴの果実に類似の病斑を生じる既知の病害によるものとは考え難かった。

小黑斑からの分離率が最も高かった白色糸状菌を樹上果に接種したところ、無傷接種によって小黑斑に酷似する斑点が形成された。さらに、接種によって生じた病斑から、接種に用いた白色糸状菌が高率で分離されたことから、本菌は小黑斑症状の主因となり得るものと考えられた。また、2018年における調査においても本菌の分離率が高かったことから、2011年以降、秋田県において多発する本症状の主因となっていたものと推察された。

白色糸状菌を収穫後の果実に有傷接種を行ったところ、接種部位に大型の腐敗病斑が形成された。この病斑はリンゴ黄腐病に酷似していた。リンゴ黄腐病の病斑は、鮮黄色から帯褐黄色であることが特徴で、周辺は褐色から栗褐色となる(富樫1950)。本病の病原菌は *Gloeosporium* sp. とされる(富樫1950)。しかし、本研究で接種によって黄腐病に酷似する病斑を形成した菌株が形成した分生子は、同菌の分生子より明らかに大きく、形状も異なっていた(表II-6、図II-4a)ことから、同菌はこれまで黄腐病菌として報告されている糸状菌 *Gloeosporium* sp. とは異なると考えられた。一方、この症状は、諸外国において bull's-eye rot と呼ばれる貯蔵病害と酷似していたことから、黄腐病と何らかの関係があることが示唆された。現在、bull's-eye rot の病原菌は *P. vagabunda* 及び *Neofabraea malicorticis*、*N. perennans*、*N. kienholzii* の4種に整理されるとする報告が多い。これらは、いずれも bull's-eye と呼ばれる腐敗病斑を形成し、その形状や色調には違いが見られない。

Phlyctema 属と *Neofabraea* 属は、I章II節で述べたように、無性子実体によって区別され、前者は分生子座(eustromatic conidiomata)を形成するのに対し、後者では分

生子層 (acervular conidiomata) を形成する (Chen ら 2016)。また、*Neofabraea* 属菌の大分生子は、はじめ単細胞であるが後に隔壁を 1~2 (~3) 個生じ (Verkley 1999、Spotts ら 2009)、古くなると褐変するとされる (Verkley 1999) が、*Phlyctema* 属菌ではこのような記載は見当たらない。本研究で分離された白色糸状菌では、PDA 培地上でオレンジ色の球形あるいは不定形の組織を菌叢上に数個形成したが、この組織では分生子の形成は見られなかった (図 II-4d)。また白色糸状菌の一部の菌株で形成された分生子はその大きさから大分生子と考えられるが、これらの形状と大きさは、bull's-eye rot の病原菌とされる 4 種のいずれとも大差なかった (表 II-6)。

白色糸状菌では小分生子の形成は見られなかった。bull's-eye rot の病原菌では 4 種のいずれにおいても形成されるが、全ての菌株で形成されるのではない。アメリカ西海岸のナシ果実及びセルビア共和国のベルグラードのリンゴ果実に発生した bull's-eye rot から分離された *P. vagabunda* はいずれも小分生子の形成が見られなかった (Henriquez ら 2004、Vico ら 2016)。これらの種の同定にあたって小分生子の形成や形態的特徴が重視された報告は見当たらない。

bull's-eye rot の 4 種の病原菌を形態的特徴によって正確に同定することが困難であることは繰り返し報告されている。Garipey ら (2005) は bull's-eye rot のこれらの病原菌について、種間での形態的な違いはわずかで従来の形態的な基準による識別は困難とした。また、Michalecka ら (2015) は、*N. alba* (*P. vagabunda* のシノニム) と *N. malicorticis*、また *N. perennans* と *N. kienholzii* の間では、分生子の形状と大きさに顕著な差異はなく、これによって区別することはできないとし、正確な同定のためには分子生物学的な特徴を利用する必要があるとした。Chen ら (2016) は *Neofabraea* 属や *Pezicula* 属の再定義を行う中で、これらの菌については培養形態の変異が大きいこと、また孢子形成が見られない菌株が多いことから形態的特徴による同定は困難で、分子生物学的な検討が不可欠であるとした。これらのことから白色糸状菌の種の同定には分子生物学的特徴の検討が必要と考えられた。

本研究の供試菌株について、比較に用いた遺伝子領域は、LSU 領域、ITS 領域及び *tub2* 領域とした。これらの領域は、Chen ら (2016) が *Neofabraea* 属菌及び *Pezicula* 属菌の再編成を行った際に用いたものである。これらの領域の塩基配列について BLAST による相同性検索を行ったところ、いずれの領域においても供試菌株は *P. vagabunda* と最も高い相同性を示した。ITS 領域は、種間や近縁な属間の比較に用いられ (高松 2005)、病原菌の種レベルの同定において重要な根拠としてしばしば利用される (堀江 2014)。相同性が 99~100% のときには多くの場合、同一種であると考えて良いが、種によっては他の遺伝子を解析することも考慮に入れておきたいとの指摘もある (堀江 2014)。Rooney-Latham・Soriano ら (2016) は、カリフォルニア州で発生したリンゴの枝枯れ症の病原菌について、分生子の形成が見られないことから、本領域を用いた相同性検索のみで *N. alba* (*P. vagabunda* のシノニム) と同定している。一方、ITS 領域のみによる同定は必ずしも適当でないとの報告もあり、Cameldi ら (2017) は *tub2* 領域を同定に利用した。また、Kingsnorth ら (2017) はイギリス国内のリンゴに発生した bull's-eye rot について、ITS 領域及び *tub2* 領域の両方の塩基配列の相同性解析によ

って種の同定を行った。本研究においては、上述のように、ITS 領域と *tub2* 領域のいずれの相同性検索によっても、全ての供試菌が *P. vagabunda* と最も高い相同性を示した (表 II-7、9)。

また、系統樹解析においては、白色糸状菌のいずれの菌株も *Neofabraea* 属菌より *Phlyctema* 属菌に近かった。ただし、供試した菌株は 2 つのサブクレードに分かれた。しかし、これらのクレードに属する菌株間では、有傷接種による腐敗症状にも差は見られなかった。またクレード 1 に属する菌株の中には分生子を形成する菌株が見られなかったことから、分生子やその子実体による形態的特徴についての比較はできなかった。これらのことから、本研究では、クレード 1 と 2 に属するいずれの菌株も、*P. vagabunda* Desm. と同定することが適当と考えられた。今後、他の遺伝子領域での相同性、培養特性やリンゴ以外の植物への病原性等について知見を蓄積し、2 つのクレードの関係等について検討する必要がある。

以上のことから、秋田県において 2011 年から多発するリンゴの小黒斑症状は、樹上及び貯蔵中の果実に発生した小黒斑から高頻度で分離された白色糸状菌によることが明らかとなった。本菌は、上述の通り、形態的及び分子生物学的特徴をもとに *P. vagabunda* と同定された。本菌を樹上あるいは収穫後の果実に有傷接種したところ、リンゴ黄腐病に酷似する腐敗病斑を形成した。リンゴ黄腐病の病原菌としてはすでに *Gloeosporium* sp. が報告されている (富樫 1950) が、この菌は分生子の形態が *P. vagabunda* とは大きく異なっていたことから、*P. vagabunda* を黄腐病の新病原として加えることが適切と考えられた。従って、2011 年から秋田県で多発するリンゴの小黒斑は、リンゴ黄腐病の症状の一つと考えられる。本菌は、世界各地のリンゴ生産地で bull's-eye rot として知られている貯蔵病害の主因の一つである。本菌によって‘ゴールデンデリシャス’に赤色の小さな斑点症状が発生するとの報告はある (Kennel ら 1984) が、小黒斑を生じるとの報告はこれまで見当たらず、本研究が国内外で最初である。

2020 年の果実調査では、‘ふじ’の普通冷蔵 (2 °C) の可食期限界 (概ね 2 月下旬) の果実 137 果を調査したが、小黒斑には変化が見られず、可食期を過ぎた 3 月に入り、1 個が腐敗病斑となった。この調査の通り、小黒斑は、低温貯蔵しても腐敗性病斑となることはほとんどなかった。従って、小黒斑は、これまでリンゴ黄腐病の症状とされてきた腐敗病斑 (以下、進展性腐敗病斑と呼ぶ) とは異なる病徴であり、進展性腐敗病斑の初期症状とは言えない。ただし、低温貯蔵する間に、ごく低率であるが進展性腐敗病斑に転じた例が観察された。この病斑は接触する他の果実に広がることはないと言われる (Dugan ら 1993) が、貯蔵あるいは輸送中に発生すると著しく商品価値が低下することから注意が必要である。

さらに、黄腐病に酷似した腐敗病斑は樹上の果実で観察されることもあった (図 II-3b)。これらの腐敗組織からは *P. vagabunda* が分離され、黄腐病の進展性腐敗病斑は貯蔵中に発病する他に、収穫前の樹上果にも同様な病斑を生じることが明らかとなった (佐藤ら 2018)。樹上果に生じるこの腐敗病斑は、同時期に樹上果で発生する炭疽病、輪紋病、疫病、心かび病の初期症状と類似していることから、今後、樹上果の病害診断において、黄腐病の本症状についても注意する必要がある。

III. Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) 法によるリンゴ果実の 小黒斑組織からの病原糸状菌の検出

リンゴの果実に、収穫期以降に発生する糸状菌病害の中には、発生初期に暗褐色から黒色で円形から楕円形の病斑を形成するものが多い。*P. vagabunda* による小黒斑をこれらと区別して正確に診断するのは容易ではない。そこで本研究では、この時期に発生する暗褐色から黒色の小型病斑の正確かつ迅速な診断に利用することを目的として、分子生物学的手法を用いた病原性糸状菌の検出技術を開発した。対象とした病害は、*P. vagabunda* によるリンゴ黄腐病のほか、炭疽病 (*Colletotrichum* spp.)、輪紋病 (*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. and De Not. 及び *Botryosphaeria kuwatsukai* (Hara) G.Y. Sun & E. Tanaka)、褐斑病 (*Diplocarpon mali* Harada and Sawamura)、黒星病 (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter)、黒点病 (*Mycosphaerella pomi* (Pass.) Lindau)、斑点落葉病 (*Alternaria mali* Roberts)、がんしゅ病菌 (*Neonectria galligena*、*Nectria galligena* のシノニム) である。このうちがんしゅ病を除く 7 病害はいずれも秋田県において発生することが知られている。

1. 材料と方法

1) 小黒斑及び分離菌の菌糸体からの DNA 抽出

病原菌の検出に用いた小黒斑のあるリンゴ果実は、2017 年 11 月後半から 2021 年 3 月にかけて、秋田県果樹試験場の農薬無散布の圃場、横手市栄、増田、醍醐の各地区にある選果施設で採取した。1 果 (品種: 'ふじ') から 1~7 個の病斑を得て、合計で 337 個の果実から 490 個の小黒斑を採取した。分析に用いた試料は、果皮と果肉を含む病斑部の全組織 (直径 5 mm 以下、深さ 3 mm 以下)、あるいは病斑部の果肉組織のみとした。全組織は 197 個、果肉組織は 293 個採取した。これらの組織は滅菌したナイフを用いて切り出した 50~100 mg を 2 ml のプラスチックチューブに入れて冷蔵庫 (4 °C) で保存し、1 週間以内に DNA 抽出を行った。抽出にあたっては、まず各試料を入れた 2 ml チューブに金属製のコーンを入れ、液体窒素に浸漬して凍結させた後、マルチビーズショッカー (安井機械株式会社) によって試料を粉砕した。その後、粉末化した試料から、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) によって DNA 抽出した。

果実に小黒斑を生ずるリンゴの各種空気伝染性病原菌 (表 III-1) の培養菌体からの DNA 抽出も、DNeasy Plant Mini Kit によって行った。供試菌を、直径 6 cm のペトリ皿に入れた 5 ml のジャガイモ煎汁培地で 2~3 日間、25 °C の暗所で培養した。生育した菌体を、滅菌濾紙を用いてブフナー漏斗で吸引ろ過して回収した後、滅菌蒸留水で洗浄し、滅菌濾紙で水分を除いた。得られた菌体は 2 ml チューブに入れ、DNA 抽出するまでは -30 °C で保存した。保存は長くても 3 週間程度であった。DNA 抽出の前に、菌体 0.5 g をジルコニアビーズ (ザルスタット株式会社) を入れた 2 ml チューブにとり、BugCrasher GM-01 (タイテック株式会社) を用いて粉砕した。

2) Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) 法

リンゴ果実の小黑斑組織及び分離菌の菌糸から抽出した DNA について、ARISA 法による検出を試みた。ARISA におけるプライマー 1406f / 3126T: TGYACACCGCCCGT/ATGCTTAAGTTCAGCGGGT (Hansgate ら 2005) は 18S リボソーム DNA の 3'末端側の一部、2つの ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域、及び 5.8S rDNA 遺伝子を含む領域を増幅し、プライマー3126T は、5'末を VIC (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) で蛍光標識して使用した。

PCR 混合液は、0.2 ml マイクロチューブに、200 μ M の dNTP 混合液、0.2 μ M のオリゴヌクレオチドプライマー1406f、0.1 μ M のオリゴヌクレオチドプライマー3126T 及び蛍光 3126T、1 \times PCR 緩衝液、及び 0.05 U/ μ l の AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems 社製) を含む 20 μ l の反応混合液を調製した。PCR 反応は DNA サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice R Standard; タカラバイオ株式会社) を、95 $^{\circ}$ C で 10 分を 1 サイクル、95 $^{\circ}$ C で 1 分、55 $^{\circ}$ C で 1 分、72 $^{\circ}$ C で 3 分を 35 サイクル、その後 72 $^{\circ}$ C で 10 分を 1 サイクルに設定した。

増幅産物の有無は PCR 反応液 5 μ l を用いて、Tris-acetate-EDTA 緩衝液を含んだ 2% アガロースゲルによる電気泳動に使用した後、エチジウムブロマイド (10 mg/ml) で染色及び UV 透過照明下で可視して確認した。その後、PCR で得られた増幅産物 1 μ l を 0.15 μ l の GeneScanTM1200LIZ[®] サイズスタンダード (Applied Biosystems) 及び 9.85 μ l の HiDiTMFormamide (Applied Biosystems) と混合し、140 \times g で 30 秒間遠心分離 (日立 CF16RX II、工機ホールディングス(株)) した。増幅産物のフラグメントサイズ及び蛍光強度 (蛍光単位) は ABI 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社、米国) によって解析した。このフラグメントサイズは、蛍光染色した標準試料との相対値として求められるものであり、実際の塩基数とは必ずしも一致しない。植物病原菌のこの領域のフラグメントサイズは、ほとんどが 600 bp 以上であることが知られていることから、サイズ値が 100 未満のピークは無視した。Genetic analyzer による解析は秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに委託した。Genetic analyzer によって得られるピークのフラグメントサイズの解析実験による変動を知るため、いずれの Genetic analyzer による解析においても *P. vagabunda* AITC-KH54 株の培養菌体からの DNA を、標準試料として使用した。また、蛍光強度のバックグラウンドは 10 ~ 20 であること、さらにわずかなコンタミネーションでもピークが検出されることがあることから、蛍光強度 50 未満のピークは信頼性が十分でないと考え、これ以上の蛍光強度のピークを検出されたものとした。

3) 特異的プライマーを使用した PCR 法による検出

ARISA においてピークサイズが近接する病原糸状菌を区別して検出するために、種あるいは属特異的プライマーを用いた PCR を行った。PCR 混合液は、0.2 μ M のプライマーペア以外は ARISA と同様の方法で準備し、PCR 条件も ARISA と同じ方法で実施した。

特異的プライマーとして、*Colletotrichum* 属特異的プライマーは、Coll1F / 3Rb :

AACCGCGGAGGGATCATTA/TCCCTBCGRRTCCCRRTGCG (Mosca ら 2014)、*B. dothidea* 特異的プライマーは、FaF / Bt2b : CATCCGCAGCGTGGGAGAACAT/ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC (Chengnan ら 2016)、*A. alternata* (*A. mali*) 特異的プライマーは、LinF1 / LinR : TATCGCCTGGCCACCTACGC/TGGCCACGACAACCCACATA) for *A. alternata* (Johnson ら 2000)、*D. mali* 特異的プライマーは、MC forward/ MC reverse : GCCTACCCTACCTCTGTTGC/CAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG (Oberhänsli ら 2014) を使用した。

Colletotrichum 属特異的プライマー Coll1F / Coll3Rb を使用して増幅された産物は、滅菌蒸留水で 100 倍に希釈した後、1 μ l の希釈液を再度特異的プライマー Coll1F / Coll3Rb を用いて PCR を行った。得られた増幅産物は、前述のように 2% アガロースゲルを用いた電気泳動によって観察し、増幅産物を確認した。

4) PCR 増幅産物の塩基配列の決定

ARISA において、検出されたピークに相当する PCR の増幅産物の塩基配列を、ダイレクトシーケンス法によって決定した。増幅産物を単離するために 2% アガロースゲルによる電気泳動によって分離し、解析対象とするピークに相当する増幅産物の断片を滅菌カミソリによって切りとり、1.5 ml チューブに入れた。単離された増幅産物を、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare UK (株)) によって精製した。精製した DNA 断片は、ARISA に使用したプライマー 1406f 及び 3126T による PCR によって III 章 1 節 2 項に示した方法で再度増幅した後、Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems(株))、及び ABI 3700 DNA シーケンサー (Applied Biosystems(株)) を用いて塩基配列を解析した。得られた塩基配列は、4 peaks ver 1.7 (<http://staden.sourceforge.net/>) を使用して検証し、プライマー 1406f 及び 3126T によって決定された塩基配列を GENETYX-Mac ver.20 (Genetyx Science、東京) を用いて統合した。得られた塩基配列をもとに、GenBank データベース (NCBI : National Center for Biotechnology Information) で BLAST 検索を行った。シーケンス解析は、蛍光強度レベルが 1,000 以上で、アガロースゲル上でコンタミネーションせずに切除できる程度に離れていた増幅産物のみを対象として実施した。

2. 結果

1) リンゴ果実に発生する各種病原菌の ARISA

リンゴの空気伝染性病原菌のうち、果実に 2011 年以降多発する小黒斑に類似する病斑を生じる 13 種の病原菌のフラグメントサイズを 3 回に分けて ARISA によって調査した。その結果、11 種の菌のフラグメントサイズは 650 から約 700 までで、他の 2 種は 1000 を超えた (表 III-1)。各種の菌株のフラグメントサイズは、*V. inaequalis* を除いて、解析実験によって 1 から 3 塩基の違いがあった。*V. inaequalis* では実験によって 4 塩基の差があった。

調査した 13 種のうち、*M. pomi*、*Ne. galligena*、*P. vagabunda*、*D. mali*、*V.*

inaequalis, *B. kuwatsukai* のフラグメントサイズは、他の 12 種と 4 以上の差があった。他の 7 種は、それぞれの解析実験において、他の複数の種とサイズ値の差が 3 以内であった。その中にはフラグメントサイズ 689~692 のピークを持つものが 4 種、フラグメントサイズ 698~702 のピークを持つものが 3 種あった。前者は、*Colletotrichum aenigma*, *C. siamense*, *C. fructicola* の 3 種と *A. mali* であり、後者は、*C. fioriniae* と *C. nymphaeae* と *B. dothidea* であった。これら 13 種について、ARISA において用いたプライマー 1406f/3126T による PCR の増幅産物を切り出してシーケンス解析を行い、塩基数を調査した。この方法で求めた塩基数は、ARISA で得られたピークのフラグメントサイズより、病原菌によって 17~31 少なかった (表 III-1)。

Table III-1. Fragment sizes of major PCR products (peaks) assessed by genetic analyzer in automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) with DNA samples of pathogenic fungi that might be involved in the formation of dark-colored spots on apple fruits in Yokote region, Akita

Taxon	Isolate	Disease	No. of bp ^{b)}	Fragment sizes in ARISA		
				Trial 1	Trial 2	Trial 3
<i>Mycosphaerella pomi</i>	MAFF 645022	Brooks fruit spot	627	652	650	650
<i>Neonectria galligena</i>	MAFF 410257	Nectria canker	635	659	658	-
<i>Phlyctema vagabunda</i>	AITC KH54 ^{a)}	Bull's-eye rot	639	667	-	668
<i>Diplocarpon mali</i>	MAFF 645015	Marssonina blotch	659	686	685	685
<i>Colletotrichum aenigma</i>	MAFF 244310	Bitter rot	664	690	689	689
<i>C. siamense</i>	MAFF 244307	Bitter rot	664	691	691	691
<i>C. fructicola</i>	MAFF 244311	Bitter rot	665	691	692	692
<i>Alternaria mali</i>	HBA1	Alternaria blotch	661	692	-	-
<i>C. fioriniae</i>	MAFF 306630	Bitter rot	674	699	702	702
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	25-192A	Botryosphaeria rot	673	698	700	698
<i>C. nymphaeae</i>	MAFF 306546	Bitter rot	674	701	700	701
<i>Venturia inaequalis</i>	MAFF 237305	Apple scab	1029	1046	1042	1044
<i>B. kuwatsukai</i>	YTK-1	White rot	1072	1095	1096	1097

a) Pathogenic fungi causing DCS in apple fruit.

b) The numbers were calculated from sequence data of each pathogen.

2) 小黒斑の ARISA

リンゴの果面に生じた小黒斑組織から ARISA 法によって病原菌の検出を試みた。解析実験は 8 回実施し、そのうちの 4 回は、病斑部の果肉のみから抽出した DNA を用い、他の 4 回では果皮を含む全組織から抽出した DNA サンプルを用いた。解析に用いた小黒斑は 490 個で、このうちピークが検出されたのは 452 個 (92.2%) であった。最も多く検出されたのはサイズ値が 667~671 のピークで、全供試組織の 68.4%、あるいはピークが検出された小黒斑の 74.1% で検出された。このピークに対応する増幅産物のシーケンスを解析し、その結果をもとに BLAST 検索を行ったところ、全て *P. vagabunda* に由来することが明らかとなった (表 III-3、4)。標準サンプルとした *P.*

vagabunda 分離菌株 (AITC KH54) から得られた DNA のフラグメントサイズは、8 回行った解析で 667~669 であった (表Ⅲ-2)。

小黒斑の果肉組織のみから抽出した DNA サンプルを用いた ARISA は、秋田県果樹試験場の無散布樹及び 3 つの選果場より 62 果を採取し、これらから得られた 197 個の病斑について 4 回に分けて実施した。その結果、164 個のサンプルで 1 個以上のピークが検出され、このうち 154 個のサンプル (93.9%) で 1 個のピーク、他の 10 個で複数のピークが検出された (表Ⅲ-2)。

果肉組織から得られた DNA サンプルで最も多く検出されたのは、サイズ値が 667~671 のピークであった。これらのピークに相当する DNA 産物の塩基配列は BLAST 検索の結果、*P. vagabunda* に最も相同性が高かった (表Ⅲ-3、4)。果肉から検出されたピークで 2 番目に多かったのはサイズ値 686~687 のピークであった。このピークに対応する増幅産物の塩基配列は、*D. mali* と最も相同性が高かった (表Ⅲ-3、4)。2019 年 1 月に増田選果場で得られた小黒斑の調査で検出されたサイズ値 1096 のピークに対応する増幅産物の塩基配列は、*Botryosphaeria* sp. と最も相同性が高かった。また 2018 年 12 月に採取した栄選果場の小黒斑で検出されサイズ値 702~703 のピーク、及び 2021 年 3 月に増田選果場で採取した小黒斑で検出されたサイズ値 697~699 のピークに対応する増幅産物の塩基配列は、それぞれ *Aureobasidium* spp.、*Penicillium* sp. 及び *B. dothidea* あるいは *Colletotrichum* spp. と相同性が高かった。ピークが検出された 164 個の小黒斑のうち 156 個で一種の病原菌が検出され、4 個から腐生菌のみが検出された。残り 4 個のピークについては、蛍光強度が低い、あるいは近接するピークが存在したために、対応する増幅産物の塩基配列を決めることができなかった。

小黒斑の表皮と果肉組織を含む病斑の全組織を用いて ARISA を行った。解析は、275 個のリンゴ果実から得られた 293 個の小黒斑を用い、5 回に分けて行った。その結果、98.3% の小黒斑でピークが検出され (1.7% がピークなし)、そのうちの 71.6% (210/293) で単一のピーク、26.6% (78/293) で複数のピークが検出された (表Ⅲ-2)。最も多く検出されたのはフラグメントサイズが 667~671 のピークで、67.6% (198/293) で検出された。次いで 699~703 (21.2%)、689~693 (11.9%)、685~686 (5.5%)、658~660 (4.1%) の順であった。サイズ値が 685~686 と 658~660 のピークに対応する増幅産物の塩基配列は、それぞれ *D. mali*、*Neonectria* sp. と最も相同性が高かった (表Ⅲ-3、4)。

フラグメントサイズが 699~703 のピークは 62 個の小黒斑で検出された。これらのピークに対応する増幅産物の塩基配列は、*Aureobasidium* spp. または *C. acutatum* 種複合体のいずれかに最も類似していた (表Ⅲ-3、4)。そこで、これらのピークを持つ 45 個の DNA サンプルを、*B. dothidea* または *Colletotrichum* 属に特異的なプライマー (Mosca ら 2014、Cheng-nan ら 2016) を用いて、それぞれ PCR を行った。その結果、前者のプライマーでは 9 サンプル、また後者では 4 サンプルにおいて増幅産物が検出された (補助図-1A、B)。

また、35 個の小黒斑でサイズ値が 689~693 のピークが見られた。これらのピーク

に対応する増幅産物の塩基配列は、*Alternaria* spp. または *C. gloeosporioides* 種複合体のいずれかと最も相同性が高かった（表Ⅲ-3、4）。そこで、これらのピークを持つ33個のDNAサンプルを、*A. alternata* (*A. mali*) に特異的なプライマーと *Colletotrichum* 属に特異的なプライマーを用いて、それぞれPCRを行った（Moscaら2014、Johnsonら2000）。その結果、前者のプライマーを用いたPCRでは増幅産物は見られず、後者のプライマーを用いたPCRにおいて6個のサンプルで増幅産物が検出された（補助図-2A、B）。本節においてARISAで検出された病原菌はすべて、本研究実施期間中にリンゴの小黑斑から純粋分離された（データ未記載）。

Table III-2. ARISA-using DNA samples extracted independently from sarcocarp and whole tissues with DCSs on apple fruits

ARISA trial no.	Apple collection	DCS sampling	No. of apples	No. of DCSs obtained	No. of DCSs with peaks detected	Ratio of DCSs with a single peak (%)	Fragment sizes of standard DNA sample ^{a)}	Fragment sizes of peaks detected in 10% or more of DCSs having peaks(%)	Fragment sizes of peaks detected less frequently than 10% (number of DCSs in which the peak was detected)
sarcocarp tissues ^{b)}									
1	Sakae sorting facility	2018年12月15日	6	29	23	73.9	669	669-670 (87.0) 702-703 (20.4)	632, 660, 689, 693, 709, 713, 711, 752
2	Masuda sorting facility	2019年1月9日	26	26	20	95.0	667	667-668 (85.0)	658, 1094, 1095, 1096
3	Masuda sorting facility	2021年3月29日	10	47	37	97.3	668	667-669 (62.2) 686 (18.9)	681 (2), 697 (4), 699, 761
3	Daigo sorting facility	2021年3月29日	10	47	40	100.0	668	668-669 (90.0)	649, 687, 701, 1095
4	Nonchemical sprayed orchard ^{c)}	2021年3月29日	10	48	44	95.5	668	668-669 (90.9)	683, 687, 691, 697, 700, 749
whole tissues ^{b)}									
5	Nonchemical sprayed orchard	2017年11月26日	26	44	42	83.3	667	667-668 (55) 658-659 (19) 700-701 (15) 691 (15)	680, 681, 696 (2), 709, 728, 748, 1095
6	Nonchemical sprayed orchard	2019年1月9,10日	88	88	88	78.4	667	667-668 (36) 699-701 (28) 685-686 (18) 689-691 (15)	616, 629 (4), 648, 650-652 (8), 660, 665, 672, 673, 676, 681, 694, 696, 705, 708, 709, 712, 722, 723, 738, 1045, 1093-1095 (8)
6	Masuda sorting facility	2019年1月9,10日	44	44	41	73.2	667	667-668 (90) 700-701 (17)	629, 658, 690, 691, 692, 722, 723, 1094, 1095 (2)
7	Sakae sorting facility	2020年1月10日	57	57	57	59.6	669	668-670 (83) 702 (19) 690-693 (19) 630 (11)	658, 659, 660, 664, 665, 674-675 (5), 698 (3), 705, 709, 853-854 (4), 1096
8	Daigo sorting facility	2020年1月10日	60	60	60	70.0	669	669-671 (98) 702-703 (22)	630 (3), 652, 653, 675, 692-693 (3), 708, 710, 723, 725, 739, 749

a) The DNA was prepared from mycelia of an isolate of *Phlyctema vagabunda*.

b) The materials used in the analysis were whole tissues (skin and sarcocarp) of DCSs or only sarcocarp tissues.

c) Collected from orchards at Akita Fruits-tree Experiment Station.

Table III-3. Molecular identification of amplicons corresponding to peaks detected by ARISA using DNA samples extracted from fresh tissues of cv. Fuji fruits, independently of DCSs

Trial no.,	Sample ID of DCS	Fragment sizes in ARISA	Fluorescence intensity	Determined nucleotide length ^{a)} (nts)	Nucleotide sequence identity (%)	E value	Closest organism(Accession No.)
No. 1							
	E01B	669	4442	116	95.69	1.00E-43	<i>P. vagabunda</i> (LC171685.1)
	E26B	669	7417	536	99.81	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KT923785.1), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	E71B	669	2826	475	95.76	1.00E-169	<i>P. vagabunda</i> (MH855316.1), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	E85B	669	2597	523	99.24	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KY367507.2), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	E28B	702	3214	450	100	0.0	<i>Au. pullulans</i> (MT573468.1), <i>Kabatiella microsticta</i> (MT107050.1), <i>Metschnikowia</i> sp. (MG906980.1)
	E38B	702	1659	568	100	0.0	<i>Au. pullulans</i> (MT573468.1), <i>Au. protea</i> (JN712492.1), <i>Dothideomyces</i> sp. (FN868453.1), <i>K. microsticta</i> (MT107050.1)
	E50B	702	6596	456	100	0.0	<i>Penicillium corylophilum</i> (MK450687.1), <i>Penicillium</i> spp. (MH865722.1, MH858652.1, MH855058.1, MF475914.1)
No. 2							
	M42B	667	4461	535	99.63	0.0	Identical to E26B
	M61B	667	2015	535	99.63	0.0	Identical to E26B
	M64B	667	3454	535	99.63	0.0	Identical to E26B
	M85B	1096	697	401	99.75	0.0	<i>Botryosphaeria</i> sp. (KJ80760.1), <i>B. berengeriana</i> (FJ441665.1)
No. 3							
	MF9	668	2590	536	99.81	0.0	Identical to KJA16
	MJ1	668	2209	480	99.79	0.0	<i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	MM5	668	2062	406	99.75	0.0	Identical to MJ1
	MI1	686	2987	556	99.81	0.0	<i>D. mali</i> (AB609191.1)
	MI2	686	3581	528	99.60	0.0	Identical to MI1
	ML4	686	1582	490	100	0.0	Identical to MI1
	ML5	686	471	555	98.56	0.0	<i>Ma. coronaria</i> (HM368521.1)
	MM1	697	1167	211	99.63	2.00E-84	<i>B. dothidea</i> (MT611222.1), <i>Botryosphaeria</i> sp. (MT587332.1)
	MM3	697	988	258	100	8.00E-124	Identical to MM1
	MM4	697	707	325	96.00	1.00E-157	<i>B. dothidea</i> (KC527826.1)
	MG9	699	288	570	100	0.0	<i>C. nymphaeae</i> (MN744277.1), <i>C. acutatum</i> (KU933355.1), <i>C. guajavae</i> (KJ813590.1), <i>C. simmondsii</i> (JN121202.1), <i>Colletotrichum</i> sp. (LC435466.1), <i>Glomerella acutata</i> (AY266405.1)
No. 3							
	DH6	649	2567	411	99.03	0.0	<i>Ascomycota</i> sp. (HQ166343.1)
	DI1	668	2957	481	99.00	0.0	<i>P. vagabunda</i> (LC171685.1a)
	DL1	668	7023	535	100	0.0	Identical to KJA16
	DO1	668	2500	535	100	0.0	Identical to KJA16
	DM6	687	1813	245	100	6.00E-120	<i>D. mali</i> (AB609191.1), <i>Ma. coronaria</i> (MN535182.1)
No. 4							
	KJA16	668	3447	535	99.63	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KT923785.1), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	KJB10	668	2742	326	100	3.00E-168	<i>P. vagabunda</i> (LC171685.1)
	KJG1	668	2671	369	100	0.0	Identical to KJB10
	KJA7	687	2739	452	100	0.0	<i>Ma. coronaria</i> (MG984759.1)

a) Number of bases in the part of the sequence that could be analyzed.

Table III-4. Molecular identification of amplicons corresponding to peaks detected by ARISA using DNA samples extracted from whole tissues of cv. Fuji fruits, independently of DCSs

Trial no.	Sample ID of DCS	Fragment sizes in ARISA	Fluorescence intensity	Determined nucleotide length ^{a)} (nts)	Nucleotide sequence identity (%)	E value	Closest organism(Accession No.)
No. 5							
	17SD-A	658	2433	480	100	0.0	<i>Ne. galligena</i> (JQ434582.1), <i>Ne. major</i> (NR 121496.1), <i>Neonectria</i> sp. (HQ166303.1)
	17SD-C	658	4103	486	100	0.0	Identical to 17SD-A
	17JO-C	668	6354	480	100	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KY367507.2), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	17JO-E	667	7360	529	99.81	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KT923785.1), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	25-1-9-P	691	1100	371	78.25	3.00E-77	<i>Alternaria</i> sp. (KM454902.1)
	25-11-1	691	2413	500	100	0.0	<i>Alternaria</i> spp. (MF602685.1, MK311341.1, MK311298.1, MK303973.1, MH237662.1, MG589272.1, LC206592.1)
	25-1-9-N	701	1991	509	100	0.0	<i>Aureobasidium</i> spp. (MK460317.1, MK460806.1, KT6925262.1), <i>K. microsticta</i> (MH858817.1), <i>Metschnikowia</i> sp. (MG906980.1), <i>Dothideomyces</i> sp. (FN868453.1)
No. 6							
	AK-20	667	1756	479	100	0.0	<i>P. vagabunda</i> (LC171685.1)
	AK-35	667	2268	535	99.81	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KR859275.1), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	AK-81	668	3475	535	99.63	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KT923785.1)
	AK-1	685	4346	248	96.75	6.00E-112	<i>D. mali</i> (AB609191.1)
	AK-2	686	7217	547	100	0.0	Identical to AK-1
	AK-14	686	4256	545	99.62	0.0	Identical to AK-1
	AK-30	686	3375	536	99.81	0.0	Identical to AK-1
	AK-69	686	3223	557	100	0.0	Identical to AK-1
	AK-74	686	4306	556	98.20	0.0	<i>Ma. coronaria</i> (HM36852.1)
	AK-36	689	3185	315	92.74	5.00E-134	<i>A. tenuissima</i> (MG569636.1), <i>A. alternata</i> (JQ625592.1)
	AK-45	689	745	422	97.16	0.0	<i>C. siamense</i> (MG751903.1), <i>C. gloeosporioides</i> (KR704206.1)
	AK-65	689	932	374	99.73	0.0	<i>C. siamense</i> (MK141761.1), <i>C. gloeosporioides</i> (KR704206.1)
	AK-94	689	1127	557	100	0.0	<i>C. siamense</i> (LC260490.1), <i>C. gloeosporioides</i> (KR704206.1)
	AK-33	699	3448	558	100	0.0	<i>C. fioriniae</i> (MN077457.1), <i>C. acutatum</i> (MH931266.1), <i>C. lupini</i> (LC206489.1), <i>G. acutata</i> (JF288551.1), <i>G. fioriniae</i> (JN943453.1)
	AK-40	700	259	567	99.65	0.0	<i>Aureobasidium</i> spp. (MN077446.1, KX100335.1, JN712492.1), <i>K. microsticta</i> (MH858817.1), <i>Dothideomyces</i> sp. (FN868453.1)
	AK-92	701	1003	459	98.47	0.0	<i>Aureobasidium</i> spp. (MK937952.1, KY436128.1), <i>Kwonilella</i> sp. (MK613238.1), <i>K. microsticta</i> (MH858817.1), <i>Metschnikowia</i> sp. (MG906980.1)
	AK-47	1045	217	888	99.32	0.0	<i>V. inaequalis</i> (DQ887774.1)
No. 6							
	M91A	667	5584	487	99.79	0.0	Identical to 17JO-E
	M59A	668	3363	481	100	0.0	<i>N. kienholzii</i> (KR859083.1), <i>Neofabraea</i> sp. (KU712233.1)
	M72A	667	4375	487	100	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KT923785.1), <i>N. alba</i> (KJ396076.1)
	M65A	692	471	557	100	0.0	<i>A. alternata</i> (MH844771.1),
No. 7							
	S12	669	2325	536	99.81	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KT923785.1), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	S35	669	2128	535	100	0.0	Identical to S12
	S49	669	5635	535	99.81	0.0	Identical to S12
	S55	669	2955	535	100	0.0	Identical to S12
	S2	692	5018	556	100	0.0	<i>A. alternata</i> (MN944587.1), <i>A. tenuissima</i> (MH-824257.1), <i>Alternaria</i> sp. (MT035960.1)
	S14	692	1214	556	100	0.0	Identical to S2
	S19	692	1122	556	99.82	0.0	Identical to S2
	S20	693	236	557	100	0.0	<i>A. alternata</i> (KY026591.1), <i>A. tenuissima</i> (MF405157.1), <i>A. brassicola</i> (KF542.557.1), <i>A. mali</i> (AB470849.1), <i>Alternaria</i> sp. (KT264732.1)
	S30	691	1370	554	97.82	0.0	<i>A. alternata</i> (KY026591.1)
	S32	693	1886	558	99.82	0.0	<i>A. alternata</i> (KY026591.1), <i>A. tenuissima</i> (MF405157.1), <i>A. brassicola</i> (KF542.557.1), <i>Alternaria</i> sp. (KJ527009.1)
	S42	692	1370	554	100	0.0	<i>A. alternata</i> (MN822657.1), <i>A. tenuissima</i> (MN559435.1), <i>A. yaliinficiens</i> (MK659955.1), <i>Alternaria</i> sp. (MN856304.1)
No. 8							
	D6	669	4101	535	99.63	0.0	<i>P. vagabunda</i> (KT923785.1), <i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	D26	670	2938	535	99.63	0.0	Identical to D6
	D35	670	4696	535	99.81	0.0	Identical to D6
	D30	692	2069	561	99.82	0.0	<i>C. siamense</i> (LC260490.1), <i>C. gloeosporioides</i> (KR704204.1)
	D11	702	661	902	99.86	0.0	<i>Au. pullulans</i> (MH9312627.1), <i>K. microsticta</i> (EU167608.1)
	D46	703	1272	823	99.86	0.0	<i>Au. protea</i> (JN712492.1), <i>K. microsticta</i> (EU167608.1)

a) Number of bases in the part of the sequence that could be analyzed.

3. 考察

ARISA 法を利用して、リンゴ果実に小黑斑を形成する 8 病害の 13 種の病原菌を正確かつ迅速に検出する技術の開発を試みた。最初に、これらの病原菌のフラグメントサイズを調査したところ、6 種の病原菌 (*B. kuwatsukai*, *D. mali*, *M. pomi*, *Ne. galligena*, *P. vagabunda*, *V. inaequalis*) は他の 7 種と 4 塩基以上異なっており、他の 7 種の違いは 3 塩基以下であった (表 III-1)。ARISA 法では 1 塩基だけ異なるピークも区別して検出されることから、4 塩基以上異なるピークを持つ病原菌は、他の病原菌と区別して検出できる可能性があると考えられた。本研究において選果場あるいは果樹試験場圃場で採取したリンゴ果実の小黑斑を対象として ARISA を用いて調べたところ、これら 6 種のうち *M. pomi* を除く 5 種に相当するフラグメントサイズのピークが検出された。これらのピークについて、対応する増幅産物が由来する菌の種類を、シーケンス解析と BLAST 検索によって調査したところ、全てのピークがこれらの種との相同性が高いことが明らかとなった。以上の結果から、ARISA において 4 塩基以上の違いがあるこれらの 6 種は、本解析によって識別が可能と考えられた。

ARISA におけるフラグメントサイズの違いが 3 以下であった 7 種は、サイズ値が 689~692 (以下 690 付近) のピークを示した 4 種すなわち *A. mali*、*C. fructicola*、*C. siamense* 及び *C. aenigma* と、サイズ値 697~702 (以下、700 付近) のピークを示した 3 種すなわち *B. dothidea*、*C. fioriniae* 及び *C. nymphaeae* の 2 つに分かれた (表 III-1)。これらのピークが由来する糸状菌を明らかにするためには、他の方法を用いる必要があった。ここでは、それぞれのサイズ値のピークに近いピークを示す種あるいは属に特異的なプライマーを用いた PCR 法を利用した。690 付近のサイズ値のピークに対応する増幅産物を対象とした PCR では、*A. mali* 及び *Colletotrichum* 属に特異的なプライマーを、またサイズ値が 700 付近のピークに対応する増幅産物を対象とした PCR では *B. dothidea* 及び *Colletotrichum* 属に特異的なプライマーを用いた。これによって、690 あるいは 700 付近のサイズ値を示すピークについて、由来する病原菌を推定することが可能であった。なお、690 付近のサイズ値を示す *Colletotrichum* 属菌は、いずれも *C. acutatum* 種複合体に、また 700 付近のサイズ値を示す *Colletotrichum* 属菌は、いずれも *C. gloeosporioides* 種複合体、後者がいずれも属した。すなわち *Colletotrichum* 属の 5 種については、ARISA とその後、属特異的なプライマーによる PCR によって、複合種として検出することが可能であった。2012 年以前、我が国においてリンゴ炭疽病は *C. acutatum* と *C. gloeosporioides* によることが知られていた。2012 年、Damm ら (2012) は、*C. acutatum* 種複合体について rDNA-ITS 領域を含む 6 遺伝子の部分塩基配列に基づき系統解析を行い、30 種に分割することを提案した。また Weir ら (2012) は、*C. gloeosporioides* 種複合体を、rDNA-ITS 領域を含む 8 つの遺伝子を用いて、22 種 1 亜種に再分類した。リンゴ炭疽病では、前者には *C. fioriniae*、*C. nymphaeae* 及び *C. godetiae*、後者には *C. fructicola*、*C. siamense* 及び *C. aenigma* の 3 種が含まれることが報告された (Cannon ら 2012、Damm ら 2012、佐藤ら 2013a、2013b、横澤ら 2015)。しかし基本的な防除技術については、これら全ての炭疽病菌に対して同じ技術を利用することが可能であり、種複合体としての検出技術も有用である。

ARISA で得られるリンゴの各種の空気伝染性病原菌のフラグメントサイズは、解析実験の反復によって多少異なった。前述のように、3 回行った実験で、調査した 13 種の多くは、反復による塩基数の違いは 2 塩基以下であった（表Ⅲ-1）。サイズ値が 800 程度までは、繰り返し実験による塩基数の変動は 1 塩基以内で再現性は高いが、これを超えると変動幅はやや高くなることが知られており（Fisher ら 1999）、本研究の結果はこれと符合した。また本研究で、リンゴの小黒斑を用いた ARISA において、標準試料として用いた *P. vagabunda* のピークは、8 回行った解析でサイズ値は 667~669 であり、大きな変動は見られなかった（表Ⅲ-2）。しかし、わずかとは言え解析実験によってサイズ値に変動が見られたことから、ARISA による解析においては、サイズ値がよく知られている種（菌株）から抽出した DNA サンプルを標準試料として使用することが望ましいと考えられた。

リンゴ果実に生じた小黒斑を対象とした ARISA において、解析試料として病斑部の果肉のみを用いた場合と表皮を含めた全組織を用いた場合で、検出されたピーク数に違いが見られた。果肉を用いた解析では、供試した全小黒斑（197 個）の 83% で 1 つ以上のピークが検出され、その 94%（154 個）が単一のピークであった。これに対して、全組織を用いたときには、全供試小黒斑（293 個）の 98% で 1 つ以上のピークが検出され、単一のピークが検出されたのはその約 73%（210 個）であり、果肉のみを用いたときよりかなり低かった。寄生性を発揮して組織内に侵入する病原菌は、組織の深部まで侵入し得るのに対し、寄生性を持たない菌類は、単独で健全な組織の内部に侵入することはできない。このことから、表皮を除いて果肉のみを小黒斑から採取して ARISA を行った場合、検出される病原菌はその病斑の主因であることが強く示唆された。また、果肉のみを用いた解析では、病斑に二次的に着生した菌類によって主因の検出が阻害されない利点もある。これらは、多くの病害で病原菌を純粋分離する際に行われる表面殺菌と同じ効果である。小黒斑からの主因の検出にあたっては、表皮を除いて果肉のみを対象として検出を行うことが必要と考えられた。

本研究で実施したリンゴ果面に生じた小黒斑の ARISA によって、*Ne. galligena* が検出された。本菌はリンゴがんしゅ病の病原体である（日本植物病理学会編集病名目録）が、この地域のリンゴで検出されたのは初めてのことであった。本研究において、本菌は、別途、小黒斑から純粋分離され、リンゴへの病原性も確認された（未発表）。ARISA は網羅的な検出技術であることから、このように過去に報告のない糸状菌も検出可能である。病害診断において、検出される菌類をあらかじめ推定する必要がないことは、本解析技術の大きな利点である。

上述のように、ARISA と特異的プライマーを用いた PCR を組み合わせて利用することによって、リンゴ小黒斑症状の主因となり得る 8 種の病原菌と 2 つの種複合体を効率的に検出可能であることが明らかとなった。この方法によって、リンゴ果実に発生した 197 個の小黒斑を対象として、果肉のみを用いて解析したところ、80%（156 個）で主因が明らかとなった。ピークが 1 つも検出されなかった小黒斑は生理障害であった可能性もあることから、これを除くと、極めて高率（95%）で小黒斑の主因を検出することができた。ARISA 法は検出対象を限定することなく（non-specific detection）、また 1

回の解析で複数の種を検出できる技術であり、正確で再現性がある。さらには、特異的プライマーを用いた PCR 法による病原菌の検出に比べ、より多くの試料を短時間で解析できる利点もある。本研究において、この技術によって、秋田県南部において発生するリンゴ果実の小黑斑症状は、黄腐病菌 (*P. vagabunda*)、褐斑病菌 (*D. mali*)、輪紋病菌 (*B. dothidea*、*B. kuwatsukai*) 及び炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) によることが改めて明らかとなった。加えて、リンゴがんしゅ病菌 *Ne. galligena* が既にこの地域に存在し、同菌が果実に小黑斑症状を生ずることも明らかになった。これらのことから、本技術は、収穫期からそれ以降にかけてリンゴ果実に発生する暗褐色から黒色の小型の病斑において、主因である病原菌を正確かつ迅速に検出可能な技術と言える。

一方、果肉を用いて検査した 197 個の小黑斑のうち 33 個で、病原糸状菌が検出されなかった。これらは、病原菌の検出に失敗した可能性とともに、ビターピットやレンティセルブロッチピットなどの生理障害による可能性が考えられる (Ferguson ら 1990、Raese ら 2002)。生理障害により発生する病斑の診断も必ずしも容易ではない。病害診断同様、一部の技術者や指導者によって診断されることが多く、診断結果と栄養分析の結果が一致しないことも少なくない。これについても、今後、正確かつ迅速な診断技術が開発されることが望まれる。

IV. 防除技術の開発

P. vagabunda によってリンゴ果実に発生する小黑斑症状に対する防除技術の開発を試みた。同菌による本症状の発生はこれまで国内外で報告がないことから、有効な防除薬剤についての知見は皆無であった。そのため最初に、国内でリンゴ病害に農薬登録のある殺菌剤を対象として *in vitro* におけるスクリーニング試験を行い、この試験で効果が見られた薬剤を中心として、さらにいくつかの殺菌剤についてリンゴ果実を用いた感染阻止効果を調査した。これらの試験結果をもとに選抜された殺菌剤を用い、本病が自然発生する果樹園において防除試験を行い、小黑斑の発生抑制効果について実用性を検討した。

1. *P. vagabunda* の生育を阻止する殺菌剤の選定 (*in vitro* におけるスクリーニング試験)

1) 材料と方法

(1) 含菌寒天円盤の浸漬処理による殺菌剤の菌糸生育阻止効果

本菌は II 章 2 節 5 項で述べたように、寒天培地状で容易に分生子を形成しない菌株がほとんどであることから、*in vitro* における殺菌剤の効果判定はいずれも菌糸生育を対象とした。供試薬剤はリンゴ病害に農薬登録があり、葉や果実に発生する病害に適用のある殺菌剤から 34 剤を選んだ。希釈倍数については秋田県南部の JA や共同防除組織が実際の散布において使用している倍数、また使用実績の無い殺菌剤については登録の範囲で低倍数（以下、常用濃度）及びその 1/10、1/100 希釈液を作製した。PDA 平板培地で約 2 週間、20 °C の暗黒下で培養した供試菌株の菌叢の辺縁部から、コルクボーラーを用いて直径 5 mm の含菌寒天円盤 3 片を取り、直ちに各供試薬液に 1 分間浸漬した。薬液から取り出し、クリーンベンチ内で風乾したのち、PDA 平板培地に菌叢面が接するように置床した。この状態で 20 °C、暗黒下で培養し、5 日後、菌糸生育を調査した。実体顕微鏡下で菌糸生育の有無を観察し、PDA 培地上に菌糸生育が少しでも認められた場合は「+」、菌糸生育がまったく認められなかった場合は「-」とした。含菌寒天円盤を滅菌水に 1 分間浸漬させた区を対照とし、試験はそれぞれの殺菌剤で 3 回繰り返し行い、1 片でも「+」があれば、その濃度で菌糸生育を認めたとした。供試菌株は小黑斑から分離された 3 菌株 (STD 株、0123-18 株、0123-2-32 株)、貯蔵果に生じた進展性腐敗病斑から分離された 3 菌株 (AITC KH63 株、CHO-1 株、KuF-16 株) 及び樹上果で発生した進展性腐敗病斑から分離された 2 菌株 (5-3-B 株、25-1-9-L 株) とした。

(2) 各種殺菌剤に対する *P. vagabunda* の感受性

殺菌剤に対する *P. vagabunda* の感受性を、薬剤添加培地における菌糸生育を調査する方法で検討した。各供試薬剤の有効成分濃度が 0.01、0.1、1、10、100 ppm となるよう調整した PDA 平板培地を作製した。これに、あらかじめ前培養 (20°C、暗黒下で約 2 週間) した供試菌の菌叢辺縁部を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いて得た含菌寒天円盤を、菌叢面が接するように置床した。この状態で 5 日間、20 °C、暗黒

下で培養し、菌糸生育の有無を前項と同じ方法で調査し、各薬剤における最小生育阻止濃度（MIC 値）を求めた。供試薬剤は、本項（1）で供試した中から、異なる作用点を持つ殺菌剤を 1～2 剤ずつ、すなわちビスグアニジン剤のイノクタジン酢酸塩液剤、クロロニトリル剤の TPN 水和剤、無機化合物の有機銅水和剤、フタルイミド剤のキャプタン水和剤、マレイミド剤のフルオリミド水和剤、キノン剤のジチアノン水和剤、ジチオカーバメート剤のマンゼブ水和剤、DMI 剤のテブコナゾール水和剤及びジフェノコナゾール水和剤、ジカルボキシイミド剤のイプロジオン水和剤、アニリノピリミジン剤のシプロジニル水和剤、SDHI 剤のペンチオピラド水和剤、さらに MBC 剤のベノミル水和剤を加え、計 13 剤とした。供試菌株は、収穫果に生じていた小黑斑から分離された 2012-1 菌株とし、試験は 3 回繰り返した。

（3）MBC 剤に対する *P. vagabunda* の感受性

国外において bull's-eye rot の防除に効果があるとされる MBC 剤（Cameldi ら 2016、Wood ら 2017）であるチオファネートメチル水和剤に対する *P. vagabunda* の感受性を、収穫果に生じた小黑斑から分離された 8 菌株、貯蔵果実に生じた進展性腐敗病斑から分離された 4 菌株、樹上果に生じた進展性腐敗病斑から分離された 3 菌株の、計 15 菌株を用いて調査した。その内訳は、小黑斑からの分離株が秋田県果樹試験場で採取した 3 菌株、横手市内の農家果樹園で採取した 4 菌株、青森県板柳町で採取された 1 菌株の計 8 菌株、進展性腐敗病斑からの分離株は青森県黒石市及び秋田県内の貯蔵果から分離された 4 菌株、さらに、秋田県果樹試験場内圃場において樹上果に観察された進展性腐敗病斑から分離された 3 菌株である。チオファネートメチル水和剤に対する感受性は、異なる薬剤濃度を添加した培地上で菌糸生育を調査し、各菌株の MIC 値を求めた。PDA 平板培地中のチオファネートメチル濃度が 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 ppm になるよう調整し、あらかじめ培養（20 °C、暗黒下で約 2 週間）した供試菌の菌叢辺縁部を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いて得た含菌寒天円盤を、供試培地に菌叢面が接するように置床した。この状態で 5 日間、20 °C の暗黒下で培養し、菌糸生育の有無を調査した。試験は 3 回繰り返した。なお、チオファネートメチル添加培地は高圧蒸気滅菌（121 °C、20 分）され、所定濃度に調整されたものを用いた。

また、小黑斑から分離された菌株については、2 章 1 節 5 項に示した方法により系統樹解析を行った結果、いずれの供試菌株も *Neofabraea* 属菌より *Phlyctema* 属菌に近かった。ただし、供試した菌株は 2 つのサブクレードに分かれ、この一方に *P. vagabunda* が含まれていた（クレード 1）。そこで、本項で用いた進展性腐敗病斑から分離された菌株についても同様の方法により遺伝子解析を行い、系統樹を作成してチオファネートメチル感受性と二つのクレードとの関係の有無を検討した。

2) 結果

（1）含菌寒天円盤の薬液浸漬処理による殺菌剤の効果比較試験

供試菌が生育する寒天円盤を薬液に浸漬する方法で、34 種の殺菌剤に対する *P.*

vagabunda の感受性を調査したところ、イミノクタジン酢酸塩液剤に対して、極めて高い感受性を示した（表 IV-1）。供試した 8 菌株はいずれも、同剤の常用濃度である 1,500 倍液及びその 1/10 希釈の 15,000 倍液において全く菌糸生育が見られず、さらに 150,000 倍液においても 6 菌株で菌糸生育が全く見られなかった。イミノクタジン剤酢酸塩液剤と同じ作用機作を示すビスグアニジン剤のイミノクタジンアルベシル酸塩水和剤においても、散布時の常用濃度である 1,000 倍液及び 10,000 倍液で 8 菌株すべて、また 100,000 倍液でも 1 菌株の菌糸生育が阻害された。イミノクタジンアルベシル酸塩・キャプタン水和剤は常用濃度の 1,000 倍液及び 10,000 倍液で 8 菌株すべて、また 100,000 倍液でも 3 菌株の菌糸生育が見られなかった。キャプタン水和剤は常用濃度の 800 倍希釈液で、0123-18 株のみの菌糸生育が阻害された。他の殺菌剤では、常用濃度で菌糸生育が阻害されたものはなかった。

Table IV-1. Effect of various fungicides on mycelial growth of *P. vagabunda*^{a)}

Fungicide	Dilution multiples (× 100)	Mycelial growth of each isolate on PDA plates ^{b)}								
		STD*	0123-18*	0123-2-32*	AITC KH63**	CHO-1**	KuF-16**	25-5-3-B***	25-1-9-L***	
basic copper sulfate mixture(58.0%)	5	+	+	+	+	+	+	+	+	
sulfur(52.0%)	5	+	+	+	+	+	+	+	+	
kresoxim-methyl(50.0%)WP ^{d)}	20	+	+	+	+	+	+	+	+	
azoxystrobin(10.0%)WP	10	+	+	+	+	+	+	+	+	
pyribencarb WP	30	+	+	+	+	+	+	+	+	
trifloxystrobin WP	20	+	+	+	+	+	+	+	+	
pyraclostrobin · boscalid WP	20	+	+	+	+	+	+	+	+	
fluopyram WP	40	+	+	+	+	+	+	+	+	
isopyrazam WP	15	+	+	+	+	+	+	+	+	
penthiopyrad WP	30	+	+	+	+	+	+	+	+	
hexaconazole WP	10	+	+	+	+	+	+	+	+	
tebuconazole WP	20	+	+	+	+	+	+	+	+	
myclobutanil WP	30	+	+	+	+	+	+	+	+	
fenarimol WP	30	+	+	+	+	+	+	+	+	
difenoconazole WP	30	+	+	+	+	+	+	+	+	
imibenconazole WP(30.0%)	40	+	+	+	+	+	+	+	+	
mancozeb WP	6	+	+	+	+	+	+	+	+	
propineb WP	5	+	+	+	+	+	+	+	+	
thiuram WP	5	+	+	+	+	+	+	+	+	
mepanipirim WP	20	+	+	+	+	+	+	+	+	
cyprodinil WP	10	+	+	+	+	+	+	+	+	
cyprodinil · fludioxonil WP	20	+	+	+	+	+	+	+	+	
TPN WP(72.0%)	10	+	+	+	+	+	+	+	+	
fluoroimide WP	15	+	+	+	+	+	+	+	+	
dithianon WP	10	+	+	+	+	+	+	+	+	
fluazinam WP(39.5%)	20	+	+	+	+	+	+	+	+	
iprodione WP(40.0%)	15	+	+	+	+	+	+	+	+	
oxyn copper WP(35.0%)	8	+	+	+	+	+	+	+	+	
oxyn copper · CA ^{e)} WP	6	+	+	+	+	+	+	+	+	
CA · fosetyl WP	8	+	+	+	+	+	+	+	+	
CA WP	8	+	-	+	+	+	+	+	+	
CA WP	80	+	+	+	+	+	+	+	+	
IMA ^{g)} · CA WP	10	-	-	-	-	-	-	-	-	
IMA · CA WP	100	-	-	-	-	-	-	-	-	
IMA · CA WP	1000	+	+	-	+	-	+	-	-	
IMA WP	10	-	-	-	-	-	-	-	-	
IMA WP	100	-	-	-	-	-	-	-	-	
IMA WP	1000	+	+	+	+	-	+	+	+	
IM ^{g)} L ^{h)}	15	-	-	-	-	-	-	-	-	
IM L	150	-	-	-	-	-	-	-	-	
IM L	1500	-	-	+	+	-	-	-	-	
sterile water	-	+	+	+	+	+	+	+	+	

a) The agar discs with each isolate were immersed in the fungicide solution for 1 min, air-dried, placed on a PDA plate, and incubated at 20°C.

Mycelial growth was observed after 5 d.

b) * : Isolate obtained from DCSs on storage apples, ** : Isolate obtained from *Kigusare-byo* lesions on storage apples, *** : Isolates of *Kigusare-byo* lesions on preharvest fruits.

c) + : Mycelial growth, even a single filantent of hyphae, was observed. - : No mycelial growth was observed. The test was repeated three times.

d) WP : wettable powder

e) CA : captan

g) IMA : iminoctadine tris(albesilate)

g) IM : iminoctadine triacetate

h) L : liquid

(2) 各種殺菌剤に対する *P. vagabunda* の感受性

殺菌剤添加培地における生育を調査する方法で、リンゴの主要病害防除に用いられる殺菌剤 13 剤に対する *P. vagabunda* の感受性を調査した。その結果、イミノクタジン酢酸塩液剤の MIC 値は 0.1 ppm で、極めて高い感受性が見られた (表 IV-2)。次いでテブコナゾール水和剤とジフェノコナゾール水和剤の MIC 値は 10 ppm、さらに TPN 水和剤及び有機銅水和剤は 100 ppm で、他の 8 剤の MIC 値は 100 ppm より高かった。

Table IV-2. Sensitivity of *P. vagabunda* to several fungicides ^{a)} used in commercial orchards in Akita Prefecture

Fungicide	Concentration of fungicide in PDA plate (ppm)					
	0	0.01	0.1	1	10	100
iminocadine triacetate L	+ ^{b)}	+	-	-	-	-
tebuconazole WP	+	+	+	+	-	-
difenoconazole WP	+	+	+	+	-	-
TPN WP(72.0%)	+	+	+	+	+	-
oxyn copper WP(35.0%)	+	+	+	+	+	-
captan WP	+	+	+	+	+	+
benomyl WP	+	+	+	+	+	+
fluoroimide WP	+	+	+	+	+	+
iprodione WP(40.0%)	+	+	+	+	+	+
cyprodinil WP	+	+	+	+	+	+
penthopyrad WP	+	+	+	+	+	+
dithianon WP	+	+	+	+	+	+
mancozeb WP	+	+	+	+	+	+

a) A PDA disk with a colony of the isolate 2012-1 of *P. vagabunda* was placed upside down on a PDA plate in which each fungicide was dissolved at the concentration indicated, and incubated at 20 °C. Mycelium growth was observed after 5 d.

b) + : Mycelial growth was clearly observed. - : No mycelial growth observed.

(3) MBC 剤に対する *P. vagabunda* 15 菌株の感受性

チオファネートメチル剤に対する感受性を、小黑斑から分離された *P. vagabunda* 8 菌株を用いて調査した。その結果、供試した 15 菌株は、0.5 ないし 1.0 ppm 以上の濃度で菌糸生育が阻止される感受性菌株 (4 菌株) と阻止されない低感受性菌株 (4 菌株) に分かれた (表 IV-3)。低感受性菌は、小黑斑と進展性腐敗病斑のいずれから分離された菌株でも見られた。菌株の採集地別では、青森県から分離された 3 菌株はいずれも感受性菌であり、横手市内の農家圃場から採集された 4 菌株はいずれも低感受性菌であった。また果樹試験場内の圃場のリンゴから分離された 7 菌株には、感受性菌と低感受性菌が混在していた。チオファネートメチル感受性検定を行った 15 菌株中、小黑斑から分離された 6 菌株及び進展性腐敗病斑から分離された 5 菌株を系統樹解析に供した。その結果、8 菌株の感受性菌のうち 7 菌株が *P. vagabunda* が含まれているクレード 1 に、1 菌株がクレード 2 に含まれた。一方、3 菌株の感受性低下菌はいずれもクレード 2 に含まれた (表 IV-3)。

Table IV-3. Sensitivity of *P. vagabunda* isolates to thiophanate-methyl¹⁾

Isolate of <i>P. vagabunda</i>	Lesion from which the isolate obtained ^{b)}	Sampling loation of apples with the lesion	Concentration of thiophanate-methyl (ppm) ^{c)}											Clade No.	
			0	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	100			
0123-18	DCS*	AFTES ^{f)}	+ ^{e)}	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
0123-2-31	DCS*	AFTES	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
0423-14	DCS*	AFTES	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1
AITC KH54	DCS*	Itayanagi, Aomori	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND ^{d)}
15NAG-1	DCS*	Yokote, Akita	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
2011-6	DCS*	Yokote, Akita	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
2012-8	DCS*	Yokote, Akita	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
STD	DCS*	Yokote, Akita	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2
AITC KH61	Soft rot lesion*	Kuroishi, Aomori	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
AITC KH63	Soft rot lesion*	Kuroishi, Aomori	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
KuF-16	Soft rot lesion*	AFTES	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1
CHO-1	Soft rot lesion*	Yurihonjo, Akita	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
25-1-9-L	Soft rot lesion**	AFTES	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
25-1-9-C	Soft rot lesion**	AFTES	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
25-5-3-B	Soft rot lesion**	AFTES	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND

a) A PDA disk with a colony of each isolate of *P. vagabunda* was placed upside down on a PDA plate in which thiophanate-methyl was dissolved at the concentration indicated, and incubated at 20 °C. Mycelium growth was observed after 5 d.

b) * : Lesion on the fruit after harvest. ** : Lesion on the fruit before harvest.

c) Thiophanate-methyl was added to PDA after autoclave treatment (121 °C, 20 min).

d) Phylogenetic analysis was not carried out with the isolate.

e) + : Mycelial growth was clearly observed. - : No mycelial growth observed.

f) Akita Fruit-Tree Experiment Station

3) 考察

含菌寒天円盤の浸漬処理による *P. vagabunda* の菌糸生育阻止効果の調査において、イミノクタジン酢酸塩液剤、イミノクタジンアルベシル酸塩水和剤及びイミノクタジンアルベシル酸塩・キャプタン水和剤は強い阻止効果を示した。中でもイミノクタジン酢酸塩液剤では極めて強い阻止効果が認められた。イミノクタジン酢酸塩液剤及びイミノクタジンアルベシル酸塩水和剤はいずれもビスグアニジン剤であることから、この系統剤は本菌の菌糸生育抑制効果が高いものと考えられた。ビスグアニジン系剤は、FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) 注) コードにおいて多作用点接触活性化化合物として M7 に分類され (藤井 2021)、耐性菌が発生するリスクは低いとみなされている。次に、殺菌剤添加培地における生育を調査した試験においても、供試した 13 剤の中でビスグアニジン剤のイミノクタジン酢酸塩液剤の MIC 値が 0.1 ppm と最も低かった。この方法では、DMI 剤であるテブコナゾール水和剤及びジフェノコナゾール水和剤も低濃度で菌糸生育阻害効果 (MIC 値は 10 ppm) が認められた。これら DMI 剤は、現在、秋田県のリンゴ病害防除体系の中で主に黒星病を対象として開花期前後の 2 回の使用が推奨されている。これらの殺菌剤を、開花期前後以外の時期に利用すると、DMI 剤の年間使用回数が増え、DMI 剤耐性菌が発生するリスクが高まる。以上のことを考慮すると、DMI 剤に比べてビスグアニジン剤が防除剤として、より有望と考えられた。

MBC 剤は、国外で *P. vagabunda* 等による bull's-eye rot の防除に用いられ、高い効果が示されている。Weber ら (2010) はドイツ北部のリンゴ産地では 1969 年に導

注) FRAC は病原菌の耐性リスクを低減して殺菌剤の防除効果を安定化することを目的に、世界の農業化学品製造会社によって設立された。FRAC コード表は殺菌剤の作用機構分類を英数字で表したものである。コード表の日本版は日本農薬工業会のウェブサイトで開催されている。

入された MBC 剤の benomyl によって、*N. alba* 及び *N. perennans* による果実腐敗が大幅に減少したと述べた。Cameldi ら (2016) は thiophanate-methyl の収穫前散布に、また、Wood ら (2017) は carbendazim について腐敗の抑制効果が高いとし、MBC 剤の bull's-eye rot に対する有効性を述べている。しかし、一方で MBC 剤については、耐性菌の発生も知られており、Bryk (1997) は、ポーランド国内の bull's-eye rot から分離された *P. vagabunda* について、MBC 剤耐性菌を検出し、Weber ら (2010) はドイツ北部のリンゴ産地で、benomyl に対する高度耐性菌が約 34.8% の菌株から検出されたと述べた。薬剤添加培地における菌糸生育を調査した試験で供試した小黒斑から分離された 2012-1 菌株はベノミル剤 (MBC 剤) に対する感受性が著しく低く (表 IV-2)、同剤の感受性低下菌である可能性が示唆された。また、貯蔵果で発病した黄腐病の進展性腐敗病斑から分離された菌株の中にも感受性が著しく低い菌株が見つかった (表 IV-3)。さらに、同じ樹の果実から分離された菌株の中に、感受性が高い菌株と著しく低い菌株が見つかり、同一樹に感受性の異なる菌株が混在する例が見られた。我が国においては、すでに MBC 剤に対する感受性が低下した *P. vagabunda* が存在していると考えられた。MBC 剤の一つであるチオファネートメチル水和剤は秋田県内のリンゴ産地でモニリア病や褐斑病防除剤として 30 年以上使われており、この間に感受性の低下が進んだものと考えられる。本剤は、少なくとも秋田県においては既に感受性菌低下菌が発生しており、小黒斑の防除剤として期待する効果が得られない可能性が高いと考えられた。

分子系統解析によってクレード 1 (*P. vagabunda* を含むクレード) に属した菌株は全てチオファネートメチルに対する感受性が高く、クレード 2 の菌株では多くが感受性低下菌であったが、感受性の菌株も見られた (表 IV-3)。チオファネートメチルに対する感受性差と二つのクレードとは必ずしも一致しなかったが、この点については、さらに供試菌株を増やして検討する必要がある。

2. 発病果を用いた各種殺菌剤の感染阻止効果の判定

防除試験に用いる殺菌剤を選定することを目的として IV 章 1 節において、*P. vagabunda* に対し強い生育阻止効果を示したイミノクタジン酢酸塩液剤を主体とし、さらにこれと作用性が異なる数種の殺菌剤について、リンゴの果実に同菌を接種して発病させる実験系によって感染阻止効果を調査した。

1) 材料と方法

接種実験において殺菌剤の感染阻止効果を調べる試験は 3 回行い、うち 2 回 (試験 1、2) は収穫果、他の 1 回は圃場の樹上果を対象とした。いずれも有傷接種とし、II 章 1 節 2 項において分離菌株の病原性の試験で行った方法に準じて付傷した。これらの試験は、秋田県果樹試験場の圃場で慣行防除が実施された樹あるいはそれから適期に収穫された果実を用いて実施した。

(1) 収穫果実を用いた室内試験

試験 1

2017年10月2日に収穫し、ただちに冷蔵保存(2℃)したリンゴの果実(品種‘やたか’)を、10月12日冷蔵庫からとり出して室温条件下に置いた。翌日、1果あたり4か所にII章1節2項に示した器具を用いて付傷した後、ハンドスプレーを用いて供試薬剤を果実全体に十分量噴霧した。室内に静置して薬液を乾燥させた後、この付傷部に、別に準備したSTD株の分生子懸濁液(1.0×10⁴/ml)を、滅菌ピペットで0.1mlずつ滴下した。分生子懸濁液はII章1節3項において無傷接種試験の試験2で行った方法で準備した。接種後は大型のプラスチック容器に入れ、保湿した状態で果樹試験場内の冷暗所に1週間静置し、その後は同所に保存した。供試薬剤は、*in vitro*試験において高い菌糸生育阻止効果を示したイミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍及びテブコナゾール水和剤2,000倍、国外でbull's-eye rotの防除に有効とされるQoI剤のアゾキシストロビン水和剤(10%)1,000倍とピリベンカルブ水和剤3,000倍及びSDHI剤のペンチオピラド水和剤(15%)2,000倍とした(以下、接種・薬剤散布区)。対照として、同様に、付傷部位に蒸留水を噴霧した後、STD株を有傷接種した果実(以下、接種・薬剤無散布区)、さらに付傷部に滅菌水を滴下した果実(以下、無接種・薬剤無散布区)を設けた。供試果実はそれぞれの薬剤散布区によって6~11果、接種か所数は24~44とした。接種から約3ヶ月後(2018年1月5日)、接種部における進展性腐敗病斑の有無を調査し、発病率を算出した。また、接種・薬剤散布区における発病率と接種・薬剤無散布区の発病率をもとに、次式による感染阻止率を算出した。この値は防除価として、農薬の効果判定に広く用いられている算出法と同じである。

$$\text{感染阻止率} = 100 - (\text{接種・薬剤散布区の発病率} / \text{接種・薬剤無散布区の発病率}) \times 100$$

試験 2

2018年10月10日に収穫した果実(品種‘ふじ’)に、1果あたり4か所に試験1と同様の方法で付傷した後、ハンドスプレーを用いて供試薬剤を果実全体に十分量を噴霧した。室内に数時間、静置して薬液を乾燥させた後、付傷部に、別に準備したSTD株の分生子懸濁液(1.8×10⁵/ml)を、滅菌ピペットで20μlずつ滴下し、直ちに密閉容器に入れ、20℃で暗黒下に保った。分生子懸濁液はIII章1節3項において無傷接種試験の試験2で行った方法で準備した。供試薬剤は、イミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍とヨーロッパでbull's-eye rotの防除剤として使用されている(Giraudら2012、Weberら2010)キャプタン水和剤800倍、チオファネートメチル水和剤1,000倍とし、対照として、STD株を有傷接種し、試験1と同様に、接種・薬剤無散布区と無接種・薬剤無散布区を設けた。供試果実はそれぞれの薬剤散布区によって14あるいは15個、接種か所数は56あるいは60か所とした。接種から20日後に接種部における進展性腐敗病斑の有無を調査し、発病率を算出した。各薬剤の効果の判定は試験1と同じ方法で行った。

(2) 樹上果を用いたイミノクタジン酢酸塩液剤による感染阻止効果

2020年10月9日に、‘ふじ’（2樹、10年生、わい性台）の36個の果実に、1果あたり1か所ずつ、II章1節2項に示した器具を用いて付傷した。同日、動力噴霧器を用いてイミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍液を供試樹全体に散布した。供試薬剤は単用し、展着剤は使用せず、散布量は1樹あたり約10Lとした。散布液が風乾したことを確認した後、STD株の孢子懸濁液（孢子濃度： 1.0×10^5 個/ml）を1果あたり約2mlの割合で、付傷部及びその周辺にハンドスプレーを用いて噴霧接種した。その後5日間、ポリエチレン製のラップで果実全体を覆い、さらに遮光のためにアルミホイルで覆った。対照として同様に有傷接種を行い、薬剤を散布しなかった区を設け、接種・無散布区とした。接種・薬剤散布区処と接種薬剤無散布区でそれぞれ2樹について、1樹あたり16～21果を供試した。そのほか、1樹の10果に、付傷後に滅菌水を噴霧し、無接種・薬剤無散布区とした。

接種から35日後（11月13日）に供試果実を収穫し、各接種部について進展性腐敗病斑の有無を調査した。効果の判定は、発病果率の平均値をもとに算出した感染阻止率によって行った。収穫後は冷暗所に保存し、未発病果については継続して2ヶ月間観察した。また、腐敗病斑の果肉組織から接種に用いた菌の再分離を試みた。

2) 結果

(1) 各種殺菌剤の感染阻止効果（収穫果を用いた室内試験）

試験1

P. vagabunda を有傷接種した区で、接種から1か月後まで腐敗等の症状は見られなかったが、84日後には、接種・薬剤無散布区の果実のすべての接種部位で進展性腐敗病斑が認められた。これに対して、イミノクタジンアルベシル酸塩液剤1,500倍液、テブコナゾール水和剤2,000倍液及びアゾキシストロビン水和剤1,000倍液の各散布区では全く発病が認められず、ピリベンカルブ水和剤3,000倍液散布区はわずかに発病が認められた（表IV-4）。ペンチオピラド水和剤2,000倍液散布区は全ての接種部で発病が見られた。無接種・薬剤無散布区では発病が見られなかった。

試験2

接種・薬剤無散布区では、進展性腐敗病斑の発病果率は55.4%であった。これに対してイミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍液散布区では全く発病がみられず、感染阻止率は100%であった。キャプタン水和剤800倍液散布区では同阻止率が51.6%で効果が見られたが、チオファネートメチル水和剤1,000倍液散布区ではほとんど阻止効果が見られなかった（表IV-4）。無接種・薬剤無散布区では発病が見られなかった。

Table IV-4. Control effect of various fungicides on the development of soft rot on apple fruits after wounded inoculation of *P. vagabunda*

Fungicide application ^{a)}	Dilution multiples	No. of fruits used	No. of inoculated sites	No. of the sites, a soft rot lesion developed (%)
Test 1 ^{b)}				
iminoctadine triacetate Liquid	1,500	6	24	0 (0)
tebuconazole WP	2,000	11	44	0 (0)
azoxystrobin(10.0 %)WP	1,000	10	40	0 (0)
pyribencarb WP	3,000	9	36	2 (5.6)
penthiopyrad(15.0 %) WP	2,000	9	36	36 (100)
inoculated, but no fungicide application	—	5	20	20 (100)
neither inoculation nor fungicide application	—	7	28	0 (0)
Test 2 ^{c)}				
iminoctadine triacetate Liquid	1,500	14	56	0 (0)
captan WP	800	14	56	15 (26.8)
thiophanate-methyl WP	1,000	15	60	33 (55.0)
inoculated, no fungicide application	—	14	56	31 (55.4)
neither inoculation nor fungicide application	—	15	60	0 (0)

a)Harvested fruits were wounded with a small knife-like tool, and sprayed with each fungicide. The next day, spore suspensions of the fungus were dropped on the wounded sites.

b) Apple fruits of cv. Yataka harvested in 2017 were inoculated: 100 μ L spore suspension (1.0×10^4 /ml) of isolate STD was dropped on each wounded site.

c) Apple fruits of cv. Fuji harvested in 2018 were inoculated: 20 μ L spore suspension (1.8×10^5 /ml) of isolate STD was dropped on each wounded site.

(2) 樹上果を用いたイミノクタジン酢酸塩液剤による感染阻止効果

接種・薬剤無散布区の進展性腐敗病斑の発生果率は95.3%と甚発生であった。これに対し、イミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍液散布区ではこの病斑の発生は全く見られなかった(表IV-5)。さらに、収穫後2ヶ月を経過しても新たな発病は見られなかった。発病した部位からは、接種菌が高率で分離された。無接種・薬剤無散布区は発病が見られなかった。

Table IV-5. Effects of iminoctadine triacetate liquid on the development of soft rot on apple fruits inoculated with *P. vagabunda* ^{a)}

Iminoctadine triacetate liquid application	Inoculation of <i>P. vagabunda</i>	No. of fruits used ^{b)}	No. of fruits diseased (soft rot)
+	+	16, 21	0, 0
-	+	20, 21	19, 20
-	-	10	0

a) Wounded apple fruits cv. Fuji were sprayed with fungicide diluted at 1/1500, and then inoculated with 2 mL conidial suspension (1.0×10^5 /mL) of isolate STD. Effects on soft rot were examined 35 d after inoculation (Nov 2020).

b) Number of fruits per tree.

3) 考察

IV 章 1 節で実施した *in vitro* における試験で菌糸生育の抑制効果が高かったイミノクタジン酢酸塩液剤は、収穫後の貯蔵果実（試験 1 と 2）及び樹上の果実を対象とした試験のいずれにおいても、*P. vagabunda* による腐敗の発生を強く阻止した。収穫果を用いた試験においては、テブコナゾール水和剤、アゾキシストロビン水和剤、ピリベンカルブ水和剤も高い抑制効果が見られた。テブコナゾールは DMI 剤、アゾキシストロビン及びピリベンカルブはともに QoI 剤であり、広範な病害に高い防除効果を有することから果樹病害を含め様々な農産物で使用されている。QoI 剤は bull's-eye rot の防除剤として有効とする報告があり (Wood ら 2017)、アゾキシストロビン水和剤及びピリベンカルブ水和剤は、*P. vagabunda* の果実感染に対する阻止効果があると考えられた。また DMI 剤テブコナゾール水和剤も同様に本菌による果実感染を阻止する効果があると考えられた。なお、テブコナゾール水和剤を含む DMI 剤については国外で bull's-eye rot に対する防除試験の報告は見当たらない。DMI 剤は使用回数の増加によって耐性菌の発生リスクが高まることが知られており (石井 2012、稲田 2018) 国外の多くのリンゴ栽培地においては、日本と同様に DMI 剤が開花期前後の主としてリンゴ黒星病防除剤として位置づけられているためと考えられる。現在、秋田県で実施されている防除体系においても、既に DMI 剤及び QoI 剤が使用されており、リンゴ斑点落葉病では QoI 剤耐性菌の発生が秋田県内で確認されている (佐藤 2013)。また、2018 年にはリンゴ黒星病菌の DMI 剤耐性菌が秋田県内で確認され (平成 30 年度 農作物発生予察情報 注意報第 1 号 秋田県病害虫防除所発表)、その後、県内各地で本耐性菌が検出されている。DMI 剤、QoI 剤の使用回数がさらに増えると、黒星病を含め様々な病原菌の耐性菌発現リスクを高める事になり、これら 2 つの系統剤は現在の秋田県のリンゴ防除体系では普及性が低いと考えられた。またキャプタン水和剤は *P. vagabunda* の果実感染阻止効果は認められるが、その程度は低かった。生産者の減収、減益に直結する果実病害では高い防除効果が求められることから、同剤は普及性が低いと考えられた。これらのことから、*P. vagabunda* による果実感染を抑制する防

除薬剤としては、イミノクタジン酢酸塩液剤 1,500 倍液が最も有望と考えられた。

3. リンゴ果実の黄腐病（小黑斑症状）に対するイミノクタジン酢酸塩液剤の防除効果

IV 章 2 節までの試験において、イミノクタジン酢酸塩液剤によって、*P. vagabunda* による進展性腐敗病斑の発生が強く阻止されることが明らかとなった。本節では、自然発生条件下において同菌による小黑斑症状の発生を阻止する効果（防除効果）について調査した。

1) 材料と方法

イミノクタジン酢酸塩液剤の防除試験を、2014 年から 2020 年まで、7 年実施した。2014 年から 2018 年までは、横手市平鹿町農家圃場のマルバカイドウ台の‘ふじ’（2014 年で樹齢 40 年超）で、また 2019 年と 2020 年には秋田県果樹試験場場に植栽されたわい性台の‘ふじ’（2019 年で 39 年生、2020 年度で 7 年生）を用いた。いずれの圃場でも、試験の前年度まで、数年にわたって小黑斑が多発していた。2014 年から 2019 年までの試験では、イミノクタジン酢酸塩液剤 1,500 倍液を 1 樹あたり約 15 L 散布した。2020 年の試験では供試樹の樹齢が若く、樹形も細型であったことから、同液剤を 1 樹当たり約 5 L 散布した。供試薬剤は単用し、展着剤は使用せず、動力噴霧器を用いて散布した。薬剤散布は年により 9 月下旬の 1 回のみ、あるいは 9 月上、中、下旬の 3 回実施した。供試樹数は年また試験区によって 2~5 樹で、1 樹あたり、15~170 果を調査した。

圃場内に処理区と対照区を設け、病害虫管理のため、イミノクタジン酢酸塩液剤を散布する前まで、農家圃場では両区ともに地域の慣行防除を、また果樹試験場の圃場では病害虫の発生状況を観察しながら随時、両区に同じ薬剤を散布した。2014 年から 2020 年まで、慣行防除における最終散布以降は供試薬剤以外の防除剤は使用しなかった。供試薬剤を散布しないほかは、同じ病害虫管理を行った区を対照区（2~5 樹）とした。その他の試験方法の詳細は表 IV-6 に記した。

収穫は適期（11 月 4~18 日）に行い、調査は収穫直後あるいは果樹試験場内の冷暗所、冷蔵保温（2 °C）、または冷蔵保温（2 °C）後に室温（17 °C）に静置した後、供試果実の小黑斑の有無を観察した（表 IV-6）。2018 年は台風（10 月）の影響により供試果実の多くが落果、損傷したことから、収穫時のみ調査を行った。また、小黑斑の発病果率から防除価を求め、これによって防除効果を判定した。防除価の算出法は下記の通りとした。さらに、2015~2017 年及び 2019、2020 年の 5 年の試験データを用いて、統計解析ソフト EZR ver 1.54（Konda 2013）を用い、メタアナリシスによって散布時期別の効果を統合評価した。

防除価 = $100 - (\text{供試薬剤散布区の発病果率} / \text{対照区の発病果率}) \times 100$

Table IV-6. Experiments conducted to examine the effect of iminoctadine triacetate on DCS development

Experiment no.	Year, experiment conducted ^{a)}	Fungicide spray ^{b)}	Harvest	Post-harvest storage	Observation of soft rot development
1	2014	Sep. 22	Nov. 7	cool dark place	Dec. 8
2	2015	Sep. 10, 17, 25	Nov. 11	2 °C	Dec. 2
3	2016	Sep. 4, 15, 26	Nov. 14, 15	2 °C(until Dec. 22) 17 °C(until Jan. 5)	Jan. 5
4	2017	Sep. 5, 14, 25	Nov. 15	cool dark place	Nov. 24
5	2018	Sep. 30	Nov. 18	— ^{c)}	Nov. 18
6	2019	Sep. 5, 15, 25	Nov. 4	2 °C	Nov. 19
7	2020	Sep. 6, 15, 26	Nov. 18	2 °C	Nov. 20

a) Experiments 1 to 5 were conducted at an orchard in Hiraka, Yokote City, where DCSs occurred severely in 2013. Experiment 6 and 7 were at Akita Fruit Tree Experiment Station.

b) Approximately 5–15 L of iminoctadine triacetate liquid (1/1500) was sprayed per tree. No spreading agent was used.

c) Harvest was not conducted because of Typhoon Trami (Oct. 1).

2) 結果

2014～2020年までの7年間、小黑斑の自然発生条件下でイミノクタジン酢酸塩液剤の防除効果を調査した。この間、2018年における対照区の発病果率は4.9%と著しく低く、薬剤散布の効果を判定することはできなかった(表IV-7)。そのほかの6年では対照区の平均発病果率が20.4～76.8%で、各年で最も高かった薬剤散布区の防除率は82.4～97.0%と、いずれも防除効果が認められた。防除効果は散布時期により異なり、2016、2019、2020年の試験では9月中旬散布で最も高く、2015年では下旬、2017年では上旬で最も高かった。

これらのうち、試験散布を9月上旬、中旬、下旬の3回実施できた2015～2017年、2019、2020年の5例の試験結果を用いてメタアナリシス解析を行った。その結果、9月上旬、中旬、下旬に散布した区のリスク比の平均値は、それぞれ0.21、0.16、0.21 ($p < 0.01$)であり(図IV-1～3)、いずれの時期の散布においても、イミノクタジン酢酸塩液剤散布は防除効果があると示された。また、9月上旬及び下旬散布でのリスク比に比較し、9月中旬散布でのリスク比はやや低かった。

Table IV-7. Effects of iminoctadine triacetate liquid (IM) on DCS development on apple fruits (field experiments)

Experiment no.	Year	Fungicide ^{a)}	Date sprayed	Number of fruits used per tree	Mean percentage of fruits with DCSs on	Standard deviation	Disease control effect (%) ^{b)}
1	2014	IM spray	Sep. 22	20, 30	10.0 * ^{c)}	14.1	82.4
		no spray		30, 33, 50	56.9	26.0	–
2	2015	IM spray 1	Sep. 10	30, 30, 30	8.9 *	2.3	85.6
		IM spray 2	Sep. 17	30, 30	13.4 *	18.9	78.4
		IM spray 3	Sep. 25	30, 30, 30, 30	5.0 *	8.0	91.9
		no spray		20, 30, 30, 30, 30	62.0	13.9	–
3	2016	IM spray 1	Sep. 4	51, 52	3.9 *	5.4	88.2
		IM spray 2	Sep. 15	51, 52	1.0 *	1.3	97.0
		IM spray 3	Sep. 26	50, 52, 52	3.9 *	4.0	88.2
		no spray	–	49, 51, 52, 52	33.1	13.9	–
4	2017	IM spray 1	Sep. 5	54, 65	1.6	2.2	92.5
		IM spray 2	Sep. 14	57, 67	6.8	5.3	67.9
		IM spray 3	Sep. 25	68, 62	8.6	3.8	59.4
		no spray	–	59, 59	21.2	13.2	–
5	2018	IM spray	Sep. 30	15, 15	0.0	0.0	100
		no spray		66, 65	4.9	4.3	–
6	2019	IM spray 1	Sep. 5	76, 84	11.5	6.2	43.6
		IM spray 2	Sep. 15	108, 43, 96	1.0	1.2	95.1
		IM spray 3	Sep. 25	83, 44	10.4	7.8	49.0
		no spray	–	152, 127	20.4	11.2	–
7	2020	IM spray 1	Sep. 6	113, 170	18.9 *	0.9	75.4
		IM spray 2	Sep. 15	90, 175	16.2 *	14.8	78.9
		IM spray 3	Sep. 26	69, 90	13.5 *	10.8	82.4
		no spray	–	54, 92	76.8	4.0	–

a) IM (1/1500) was applied at 5 L per tree in experiment 7 and 15 L in others.

b) Disease control effect = 100 – (mean percentage of fruits with DCSs in the fungicide sprayed plots / percentage of fruits with DCSs in an untreated plot)

c) * : Welch's t-test shows a significant difference from non-treatment (P < 0.05).

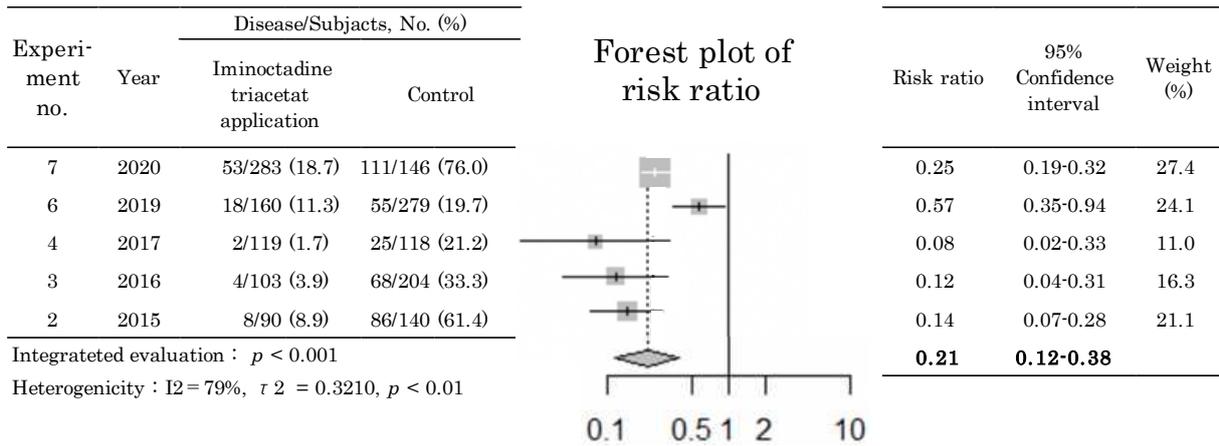


Fig. IV-1. Integrated evaluation based on meta-analysis of the effect of Iminoctadine triacetate liquid(1/1500sprayed in early Sep) on DCSs on apple fruits in field trials. The center and width of the diamond shape indicate the value of the integrated risk ratio and 95% confidence interval, respectively.

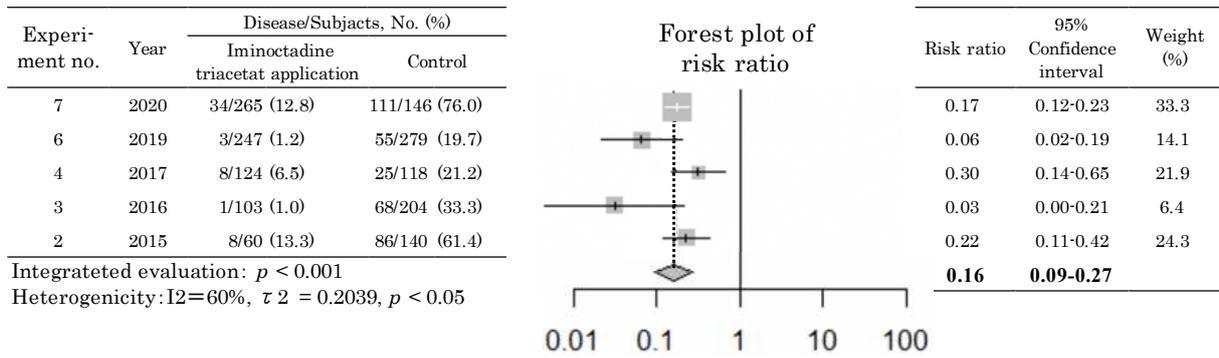


Fig. IV-2. Integrated evaluation based on meta-analysis of the effect of Iminoctadine triacetate liquid(1/1500 sprayed in mid Sep) on DCSs on apple fruits in field trials. The center and width of the diamond shape indicate the value of the integrated risk ratio and 95% confidence interval, respectively.

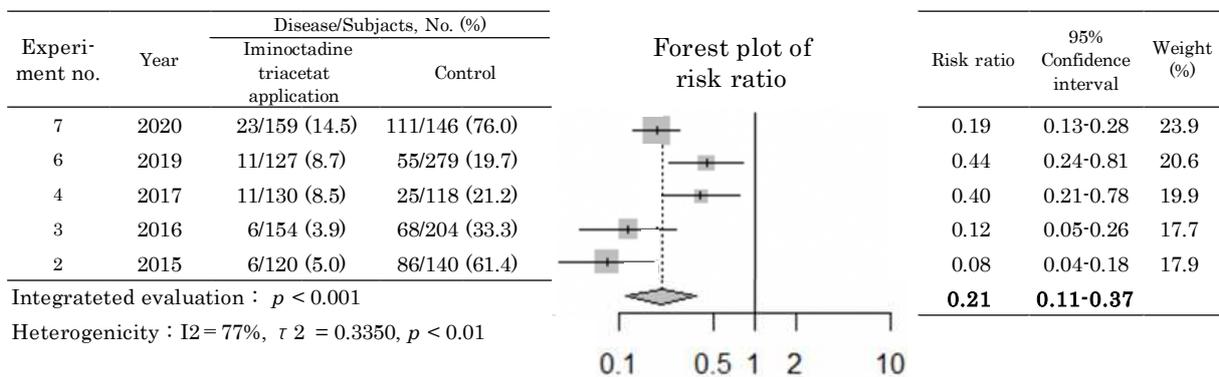


Fig. IV-3. Integrated evaluation based on meta-analysis of the effect of Iminoctadine triacetate liquid(1/1500 sprayed in late Sep) on DCSs on apple fruits in field trials. The center and width of the diamond shape indicate the value of the integrated risk ratio and 95% confidence interval, respectively.

3) 考察

秋田県においては多くの果樹園で、斑点落葉病、褐斑病、炭疽病や黒星病などの防除を目的として8月中旬にグアニジン系剤の混合剤（イミノクタジンアルベシル酸塩・キャプタン水和剤）が散布されているが、これらの果樹園においても小黒斑は多発している。果樹試験場における観察で、小黒斑の発生は10月中旬から見られていたことから、本病の主要な感染時期は8月下旬から10月初旬までの間にあると推定し、9月散布における防除効果を調査した。その結果、7年実施した試験において、イミノクタジン酢酸塩液剤を9月に散布した時の防除価は約44以上であり、中程度から強い防除効果が認められた。この間、対照区の発病果率が60%を越えた年が2度（2015年、2020年）あり、その年の同剤散布区の防除価はそれぞれ78.4～91.9及び80.5～82.3と、いずれも高かった。しかし、これら散布区においてもまだ防除価は100に達してはいないことから、イミノクタジン酢酸塩液剤を1回散布しただけでは本病の果実感染を完全には阻止できていないと考えられる。今後、胞子の飛散消長や果実への感染時期などの解明により、9月に2回散布することも含めて、イミノクタジン剤酢酸塩液剤のより効果的な使用方法を検討する必要がある。

また、5回の試験例をもとにメタアナリシス解析を行ったところ、9月中旬散布でのリスク比が9月上旬及び下旬散布より低い傾向が認められた。現在、秋田県南部の一般的な病害防除体系では9月上旬にその年の最後の散布が行われている。9月に入ると生産者の多くは赤色系のリンゴ品種の着色管理を目的として樹の下に反射資材（白色あるいは銀色のシート）を設置する。この資材は防除作業の妨げになることが多く、最終防除後に施設されることが多い。秋田県南部においてこれは例年9月中～下旬頃に行われる。本研究の結果から、9月中旬に小黒斑対策として殺菌剤散布を行うことが望ましいと考えられたが、これは反射資材の施設作業と競合せず実施可能である。リンゴの成熟が早まり、敷設時期が早まった場合でも、9月以降に殺菌剤散布をすれば被害を十分軽減することが可能である。

以上のことから、*P. vagabunda* を病原菌とした小黒斑症状に対し、イミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍液を9月に散布することによって効果的に防除できるものと考えられた。散布時期は9月中旬が好ましいが、上旬であっても軽減効果は高い。本剤は耐性菌発現リスクが低い系統であり、この時期の防除作業はリンゴ栽培管理作業との競合も少ないことから、*P. vagabunda* によって小黒斑が発生する地域での普及性は高いと考えられた。

V. 総合考察

本研究は、2011年に秋田県で多発し、その後も発生が続いているリンゴ果実の小黒斑の原因究明と多様な要因によって生じる小黒斑症状の迅速診断技術の開発及び防除方法の検討を行ったものである。小黒斑症状はそれ以前にも収穫期に毎年、発生していた。一般に、病斑や障害が発生した果実は出荷時に生産者によって除去され、その後、地域ごとの選果場に集められた果実はさらに厳しく選別される。この過程で除去される果実の中に、本研究で対象とした小黒斑症状が見られることは秋田県果樹試験場において認識されていたが、発生が広域に及ぶ、あるいは被害が大きくなることは無かった。しかし2011年には、収穫時さらにはその後の貯蔵中に、小黒斑が見られる果実が大量に発生し、大きな問題となった。

本障害の原因について、当初、病害虫による被害と生理障害の可能性がそれぞれ指摘された。生理障害では、ビターピットと lenticel breakdown が類似する症状を呈することが知られていた。ビターピットは、果実の成熟期から貯蔵中に、直径 5 mm 以下の褐色の斑点（福田 1986）が、主に果実の赤道部からがくあ側にかけて発生する（岩谷ら 1999）。本症はカルシウム欠乏によるもので、土壌条件や肥培管理と深い関係がある。2011年に多発した小黒斑は土壌の種類や肥培管理が異なる広い範囲で発生したこと、また発生部位が果面全体に散在していたことから、これが主要な要因とは考え難かった。一方 lenticel breakdown は皮目を中心として暗褐色で円形壊死斑を生じる障害で、この壊死斑が秋田県で多発している小黒斑に酷似する。ブラジル、南アフリカ、アメリカ、チリにおいて‘Fuji’、‘Gala’、‘Loyal Gala’、‘Granny Smith’など多様な品種で発生している（Tessmer ら 2016）が、我が国で発生したとの記録はない。原因については不明な点が多いが、収穫時以降に発生すること、また選果場で行われる水への果実の浸漬や洗浄と関係があるとされる（Curry ら 2008）点で、本研究が対象としている小黒斑とは異なっていた。

以上のことから、2011年以降多発する小黒斑の主要な要因が生理障害であるとは考え難く、伝染性病害による可能性が高いと推察された。しかし、既知の病原菌の中には、これらの小黒斑から高率で分離あるいは検出される菌はなかった（表 II-4）ことから、病斑から高頻度で分離された白色糸状菌について病原学的検討を行った。その結果、同菌が、小黒斑症状を発生させる病原性を有することが明らかとなった。さらに、近年多発する小黒斑から本菌がほぼ常に高率で分離された（表 II-4）こと、また ARISA 法によって病斑部から繰り返し同菌が高率で検出された（表 III-2）ことから、秋田県南部で 2011年以降多発する小黒斑の主因となっているものと結論された。

本菌の同定にあたっては、類似する病斑を形成する病害を参考にした。国内で発生するリンゴ黄腐病と国外でのみ発生する bull's-eye rot である。本菌を用いて病原性試験を実施する過程で、有傷接種によって生じた病斑がリンゴ黄腐病の病斑と酷似していたことから、まずは同病の病原菌との異同を検討した。黄腐病は 1940年に国内で初めて報告された後、富樫（1950）によって病原菌は *Gloeosporium* sp. とされたが、同定の根拠は記載されていない。秋田県においては、高橋ら（1974）が、秋田県横手市で 1971

年に集荷された‘ゴールドデリシャス’を対象に冷蔵庫内で発生する腐敗果を調査し、被害果率が 1.5 % と少発生ながら、*Gloeosporium sp.*による黄腐病の発生を認めた。しかし、この時も病原菌に関する詳細な記載はされなかった。この他、今日まで、本病の発生や病原菌に関する報告は見当たらない。本研究で調査した白色糸状菌は、分生子の形状と大きさにおいて、富樫（1950）が記載した菌と明らかに異なっており（表 II-6）、*Gloeosporium sp.*とは同定できないと考えられた。

一方 bull’s-eye rot の病原菌としては、前述のように *Phlyctema vagabunda*、*Neofabraea malicorticts*、*N. perennans*、*N. kienholzii* の 4 種が知られている。小黒斑組織から高率に分離される白色糸状菌は、分生子の形状と分子生物学的特徴をもとに *P. vagabunda* と同定された。分生子の形状だけでなく、分子生物学的特徴を重視して同定される例は、bull’s-eye rot の病原菌においては、少なくない（Kingsnorth ら 2017、Rooney-Latham ら 2016、Michalecka ら 2015、Gariepy ら 2005）。

2011 年以降、多発する小黒斑症状は‘ふじ’のほか、‘秋田 19 号’、‘ぐんま名月’、にも発生し、いずれも *P. vagabunda* によることが明らかとなった。このうち、‘ふじ’、‘秋田 19 号’は晩生種、‘ぐんま名月’は中生種である。早生品種について小黒斑症状は確認されていない。小黒斑の発生が見られなかった‘王林’は晩生種であり、同品種と‘ふじ’は相互に交配樹となることから農家圃場ではこれら 2 品種が混植されていることが多い。また両品種は収穫期もほぼ同じである。しかし小黒斑の発生程度は大きく異なり、小黒斑が多発している圃場内でも‘王林’では発生が見られなかった。これらのことから、両品種における発生の違いは気象要因や収穫期等の違いではなく、品種抵抗性の差による可能性が考えられる。

秋田県では、‘ふじ’の栽培面積がリンゴ栽培面積の 60.3 % であり、青森県（47.7 %）や岩手県（48.1 %）に比べて高いことも、本症の被害によって生産者の経済的な損失が大きくなった要因と考えられる。栽培品種が偏ると交配樹の不足による果形の不良が生じやすくなり、摘果や収穫作業の時期が集中し労働力不足から果実品質への悪影響があるため、秋田県では‘ふじ’偏重の状況改善を目的として早生、中生種への品種更新を勧めている。*P. vagabunda* による小黒斑の発生に対し、‘ふじ’は感受性品種と考えられ、今後、各品種の感受性程度が明らかになれば、本症状による被害リスク回避の観点からも、品種構成の見直しを検討する材料となり得るだろう。

小黒斑から分離された *P. vogaubunda* を、収穫後のリンゴ果実に有傷接種したところ、黄腐病に酷似する病斑が形成され、これから接種に用いた菌が容易に再分離された。一方、秋田県と青森県で採取した貯蔵中のリンゴ果実に発生した黄腐病の病斑組織から *P. vogaubunda* が容易に分離され、この菌をリンゴ果実に有傷接種したところ黄腐病の典型的な病斑が形成され、接種菌が容易に再分離された。これらのことから、少なくとも秋田県と青森県において、*P. vogaubunda* による黄腐病が発生していることが明らかであった。本研究で分離された糸状菌の分生子の形態的特徴は富樫（1950）が報告した病原菌 *Gloeosporium sp.* と明らかに異なっていた。これらの結果をもとに、黄腐病の病原として *P. vogaubunda* を追加することが適当と考えられ、日本植物病理学会に提案した（佐藤ら 2021）。本病は、国外で bull’s-eye rot とされる病害と少なくとも 1 種は同

じ病原菌により、症状も酷似する。黄腐病には英名が定められていなかったことから、英名を *bull's-eye rot* とすることも併せて提案した（佐藤ら 2021）。

小黑斑から分離された *P. vagabunda* を果実に有傷接種しても進展性腐敗病斑が形成される。一方、黄腐病の病斑から分離された *P. vagabunda* の接種によって小黑斑症状が再現され、接種菌も再分離された（未発表）。したがって、*P. vagabunda* は、従来、黄腐病の病斑とされてきた進展性腐敗病斑と小黑斑症状の両方を起こすものと考えられ、小黑斑はリンゴ黄腐病の症状の一つと言って良い。しかし、II章2節2項で述べたように、生産現場で観察された小黑斑のほとんどはその後、拡大して進展性腐敗病斑となることはなかった。このことから小黑斑症状は、黄腐病の進展性腐敗病斑の初期症状とは言い難い。*P. vagabunda* に感染することによって小黑斑、進展性腐敗病斑のいずれになるかは、本菌の病原力、感染時期、感染条件、果実の感受性、侵入門戸などが影響していると考えられるが詳細については不明である。本研究の接種試験により有傷接種では進展性腐敗病斑のみが見られることから、傷口からの侵入の場合は進展性腐敗病斑となる可能性は高いと考えられる。収穫果には外観上無傷でも微細な傷が存在し、Konarska (2014) はリンゴが貯蔵中に亀裂が拡大することを報告している。また、カルシウム欠乏によるビターピットも成熟期及び貯蔵中に発生することが知られており（福田 1986）、この様な微細な傷が樹上果あるいは貯蔵中に生じ、果実内への侵入門戸となって進展性腐敗病斑となる可能性が考えられる。

小黑斑の中心部にはほぼ常に毛耳痕あるいは果点が見られたことから、多くの小黑斑では、この部分が本菌の侵入部位であったことが考えられる。また、小黑斑は樹上果に無傷接種を行った時のみ形成され、収穫果に無傷接種した時にはいずれの病斑も形成されなかった。このことから、無傷の果実表面に *P. vagabunda* が侵入可能な期間は限られている可能性が考えられる。侵入した後は、果実の抵抗性によって病斑の拡大が阻止され、小型の暗色病斑が形成されたと考えられる。*Botryosphaeria berengeriana* によるリンゴ輪紋病では果点及び毛耳痕が侵入門戸と述べている（尾形 1995）。尾形（1995）によると、本病の感染は6~7月に起きており、8月頃以降は、毛耳痕の褐変コルク化に伴い感受性が低下するためとされる。このような、果実表面構造の変化と小黑斑症状の発生につながる感染時期について、今後、明らかにする必要がある。

P. vagabunda によるリンゴの *bull's-eye rot* の主な伝染源は、リンゴの枯れた樹皮組織や枝のかいよう症状、あるいは罹病した落葉組織の他、周辺の多年生の栽培植物や野生植物（セイヨウナシ、オリーブ、セイヨウトネリコ等）に寄生して越冬することが知られている（Köhlら 2018）。Burchillら（1961）は、胞子は一年を通して飛散し、飛散量は秋に最大となるとした。感染は降雨によって助長され、秋雨の長期化は本病の多発要因とされる（Edneyら 1977）。国内で発生する黄腐病の圃場における発生生態や病原菌の伝染環についての報告は見当たらない。本研究の過程で、果樹試験場内に植栽された小黑斑発生樹の着果痕や葉柄痕の組織片を調査したところ *P. vagabunda* が検出された（未報告）。また、ARISAによる調査で、降雨直後に樹上の着果痕に溜まった水滴から *P. vagabunda* が検出されており（未報告）、樹上の葉柄痕や着果痕が越冬場所となっている可能性が示唆された。国内での本病原菌の伝染環や病気の発生生態については

不明な点が多く、今後の研究が必要である。さらに II 章 3 節に記したとおり、黄腐病の進展性腐敗病斑は収穫前の樹上果でも発生することが観察された。これまで黄腐病と bull's-eye rot はいずれも収穫後の病害 (postharvest diseases) とされ、収穫前の樹上にある果実で発生するとの報告は見られない。今後、収穫期の病害診断にあたって、本病も考慮する必要がある。

III 章の冒頭で述べた通り、2011 年以降、秋田県においてリンゴ果実で多発する小黒斑と酷似する病斑を形成する伝染性あるいは非伝染性要因は多数あり、短時間で正確に診断することは極めて難しい。そこで本研究において、ARISA 法を用いて病斑部から病原性糸状菌を迅速かつ正確に検出する技術を開発した。ARISA は、最初、湖水を対象とした淡水環境における細菌群の多様性と群集構造を迅速に解析するために主に利用された (Fisher ら 1999)。その後、土壌 (Ranjard ら 2001、Lerner ら 2006)、分解中の有機物 (Ciesielski ら 2013)、水生環境 (Danovaro ら 2006)、哺乳類の腸内 (Jami ら 2014) など、多様な環境の細菌群の構造分析に広く用いられてきた。本法は解像度が高く、再現性の高いプロファイリングが得られるとされる (Fisher ら 1999、Ranjard ら 2001)。Hewson ら (2004) は本法を用いて河口に生息する最近プランクトンの多様性を明らかにし、Feligini ら (2014) は牛の生乳及びチーズに含まれる微生物集団の経時的な変動調査に本法を用い、品質管理に利用できることを示した。Panther ら (2012) は、ARISA を用いてブドウの茎の内生菌類の群集構造を解析した。本法を植物病原菌の検出に用いた例は多くない。Ikeda ら (2007) は、精米された市販品を標本として微生物群集構造を RISA により解析し、その過程で植物病原糸状菌が検出されることを示した。また古屋ら (2015) は秋田県のアスパラガス産地で問題となっていた生育不良に *Phytophthora* sp. が関与していることを、ARISA による解析結果をもとに明らかにした。

ARISA 法では PCR によって得られた増幅産物は蛍光標識され、増幅産物のキャピラリーの移動速度が、増幅断片の塩基数の違いによって異なることから、これをもとに増幅産物が由来する生物種の推定が可能である (Panther ら 2012)。Genetic analyzer で検出されたそれぞれのピークのフラグメントサイズは、電気泳動の移動位置をもとに、サイズ値が知られている標準サンプルとの比較によって相対値で示される。本法を特定の微生物検出に利用するときには課題となるのは、近接するピークを識別する解像度、重複あるいは近接するサイズ値を持つ他の微生物との識別及び検出されるサイズ値の解析実験による変動である。解像度について Fisher ら (1999) は、1 塩基の違いがあれば区別することができるとした。本研究においても、*P. vagabunda* と同定されたサイズ値 668 付近を示すピークは分析ごとに変動の範囲は 1 ないし 2 塩基であった。わずかな違い、例えば 2 あるいは 3 塩基程度の違いであってもピークの違いを区別することは可能であり、4 塩基の違いがあれば、異なるピークとして区別することが可能と考えられた。

重複あるいは近接するピークは、小黒斑の病原菌の間でも見られた。*Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体と *Alternaria mali*、及び *C. acutatum* 種複合体と *Botryosphaeria dothidea* である。これらについては、さらに別の方法でピークが由来

する微生物を同定する必要があった。本研究では、特異的プライマーによる PCR によって、これを同定することができた。ARISA によってこれらの菌の可能性のあるピークが検出されたときには、その属あるいは種特異的プライマーを用いて PCR を行うことで、これらを検出することができる。この情報がないときには、それぞれの種の特異的プライマーを用いた PCR を、順次行う必要があることに比べると、検出時間とコストを大きく削減することが可能である。言い換えると、重複する病原菌がある場合でも、ARISA 法による病原期の検出技術は有用である。

検出されるピークのフラグメントサイズは、同じ DNA 試料を解析したときにも、解析実験によって変動する可能性がある。PCR で得られた増幅産物は、ホルムアルデヒドで変性させた後、キャピラリー電気泳動によって検出される。この電気泳動は均一な温度に保たれており、検出されるフラグメントサイズには高い再現性が得られる (Fisher ら 1999、Ranjard ら 2001)。これが変動する要因としては、キャピラリーの劣化が指摘されている。これらのメンテナンスが重要であるが、完全に避けることは難しい。本研究では常に *P. vagabunda* (AITC-KH54 株) の菌体から抽出した DNA を標準サンプルとして、全ての解析で使用した。その結果、ほとんどの解析において本サンプルのピークサイズは 667~669 で安定していたが、しかしこの間、予備解析において一回だけ、塩基数 664~665 を示したことがあった。このような場合には、この値を参考にして供試試料のピークが由来する菌を推定することが可能であった。このようなことから、Genetic analyzer による解析にあたっては、常に既知の微生物から抽出した DNA を標準サンプルとして使用することが必要と考えられる。

表皮には、腐生菌や各種の病原菌が付着あるいは生育していることもあり得ることから、小黑斑の主因の検出にあたっては、果肉組織のみを解析試料として用いることが重要であった。果肉組織のみを試料とすることで、小黑斑の主因である病原菌を検出できる可能性が高くなるとともに、検出を阻害する他の微生物を排除することができる。対象病害から主因を検出する際に、供試する試料の選択が重要であることは、病原菌を分離する場合と同様である。

ARISA 法の特徴は、検出する糸状菌をあらかじめ限定する必要がないこと、また網羅的に検出できる (comprehensive detection) ことである。本研究において 2017 年に採集したリンゴの小黑斑組織から、ARISA によって、リンゴがんしゅ病菌 *Neonectria galligena* が検出された。本菌は主に枝の剪定痕や摘果痕、葉柄痕から侵入し、樹皮が暗褐色に変色した後、求心円状の病斑を形成する。果実では果点や傷を中心に円形に果皮が変色する病害の病原菌である。国外では European canker (Xu ら 2010) あるいは *Neonectria*-canker (Talgoslash ら 2011) と呼ばれ、リンゴの木質部にかいようを、さらに果実に腐敗を生じる病害として知られている。岸 (1998) によると、1903 年に最初に報告されて以降、我が国で発生の記録はない。その後も含めて秋田県で本病原菌が検出されたとの記録はない。そこで、ARISA の結果をもとに調査したところ、小黑斑から分離された糸状菌の中のがんしゅ病菌を認めた。この菌の分生子懸濁液をリンゴ果実に無傷接種したところ、接種部に腐敗を生じ、同菌がリンゴに病原性も有することも確認された (未報告)。ARISA による検出では、予め検出対象を決める必要がないことか

ら、我が国で未報告の病原菌を検出することも可能である。このことは、本技術の大きな利点である。また本研究において、ARISA で検出されたピークに相当する増幅産物のシーケンス解析と BLAST 検索によって *Neofabraea kienholzii* が検出された。本菌も我が国未報告である。今後、これらの病原菌による病気の発生について精査する必要がある。

フラグメントサイズが 689~693 及び 699~703 のピークは、小黑斑の全組織から抽出した DNA の方が、果肉組織だけから得た DNA より多く検出された。これらのピークは、対応する増幅産物の塩基配列解析及び特定のプライマーを用いた PCR 法により、その 30% 及び 20% が、*Alternaria* spp. や *Aureobasidium* spp. など、腐生性糸状菌に由来するものであった。これらの糸状菌は、リンゴ園の葉圏（地上部）でよく検出される菌類である（Andrews ら 2002、Woody ら 2003）。*Au. pullulans* は、核果類のポストハーベスト病のバイオコントロール剤の有用な候補でもある（Mari ら 2012、Vero ら 2009）。果肉組織からは *Alternaria* spp. と *Penicillium* sp. が検出されたが、同属には、収穫後の腐敗の原因となる種、あるいはリンゴ果実にマイコトキシンを生成する種が含まれている（Escrivá ら 2017、Moslem ら 2013、Sutton ら 2014、Wenneker ら 2014）。このように、ARISA 法は微生物群集のプロファイリングに有用であることから、葉面あるいは葉圏の菌類相の研究にも役立つものと考えられる（Shen ら 2017）。

小黑斑と類似する症状を呈する病害として、最近になって、国外で報告された病害がある。Hou ら（2019）は、*Acremonium mali* G. Y. Sun and Yanmin Hou, sp. nov.、*Sarocladium liquanensis* G. Y. Sun and Yanmin Hou, sp. nov. 及び *Sarocladium mali* G. Y. Sun and Yanmin Hou, sp. nov. の 3 種によって Brown spot と呼ばれる新病害を報告した。本病は有袋果のみで発生し、果実に直径 1~6mm の黒色や褐色の斑点を生じる。‘ふじ’の感受性が非常に高いとされ、同品種の栽培面積の多い秋田県でも警戒の必要がある。また、*Fibulorhizoctonia psychrophila* によってリンゴとナシの果実に発生する斑点性の病斑は lenticel spot と呼ばれ、小黑斑に類似する（Wenneker ら 2017）。オランダでは、リンゴやナシの主力品種に多発し、被害が大きい。これらの病害はいずれも日本では未報告であるが、対象病害を予め決める必要がない ARISA 法では、これらの病原菌についても検出可能である。検出される菌類に関する仮説を一切必要としない本検出技術では新種や国内未報告の糸状菌の検出も可能である。このことは、網羅的な解析技術の大きな利点である。

本研究における解析の結果、この地域の小黒斑の主因として *P. vagabunda* が特に重要であることが明らかとなった。しかし、2021 年 3 月に増田選果場で採取された小黑斑の解析では、調査した小黑斑の 38% から *P. vagabunda* 以外の病原菌が検出された（表 III-2）。このことから、この地域の全ての果樹園において本菌が小黑斑の主因となっているとは限らないことが示唆される。地域あるいは果樹園ごとに適切な病害管理を実施するためには、対象となる果樹園での正確な病害診断がなされることが必要である。ARISA では迅速な解析が可能であり、200 個以上の小黑斑を 3~4 日間で検査することができる。これまで、発生する病害を果樹園ごとに網羅的に検出する手法は、我が国に限らず、国外においても実施されていない。現在のリンゴ防除は、例年発生が懸念され

る病害防除を、防除期間を通して体系化した「防除暦」を基本とし、さらに前年に発生が問題となった病害防除を重要視し、部分的に防除圧を加えて行っている。しかし、果樹園における空気伝染性病害の被害を減少させるためには、それぞれの果樹園における発生の正確な診断が必要であり、本技術を有効に利用することにより病害個別に防除の重要度を考慮に入れた防除体系の構築ができると考えられる。

植物病原菌の検出を目的として ARISA を用い、主因を診断する技術の開発は本研究が最初である。この技術は、類似する症状を示す病害の診断に利用できる。例えば、ウリ科植物の地下部は、10 種類以上の病原性糸状菌によって、それぞれ致命的な病害あるいは複合病害に感染する (Keinath ら 2017)。それらの症状は、専門的な知識や経験がある専門家によっても、目視や顕微鏡観察では正確な診断が極めて難しい。これらの診断において、ARISA は正確で信頼性の高い検出を行うのに有効であった (Furuya ら 2021)。

本研究で開発した防除技術は、すでに一部のリンゴ産地で実際に使われている。これによってこの地域での小黑斑の発生は著しく低下した。*P. vagabunda* を原因とした小黑斑は、我が国において初めて発生が知られた病害であったにも関わらず、短期間で病原菌が明らかとなり、防除技術を構築できたことには、分子生物学的技術を利用できたことが大きく貢献した。主因の重要な候補であった白色糸状菌は、形態的特徴による同定が困難であったが、シーケンス解析と BLAST 検索によって早い段階 (2015 年) で種名を推定することができた。その後、短期間で特異的プライマー (未報告) を用いた PCR と ARISA による検出技術が開発された。これによって繰り返し、小黑斑から同菌が検出されたことから、これが秋田県のリンゴ産地で多発する小黑斑の主因であるとの仮説を迅速に検証することが可能であった。これらの知見は、防除技術の開発を早期に開始する上で大きく貢献した。本研究で開発した防除技術は 2015 年には農家の果樹園で試験的に導入され、2016 年度には、秋田県南部で広く実施されるようになった。これ以降、2011 年の様な規模の多発は見られなくなり、本研究で開発した防除技術が普及したことも寄与したものと推察される。

2011 年以降、秋田県で多発した小黑斑に対し高い防除効果が認められたイミノクタジン酢酸塩液剤 (以下、IM 液剤) は、本研究の結果から秋季に散布すると防除効果が高いと考えられるが、一般に、秋季における薬剤散布には、注意すべき点が二つある。一つは、農薬ごとに、最終散布日から収穫日までに散布を避けなければならない日数が決められている。果樹園によっては複数の品種が栽培される、あるいは同一品種でも環境条件や着果位置や樹勢によって異なる収穫期の果実があることから、そのいずれにおいても、散布を避けなければならない日数に農薬が散布されないように注意する必要がある。もう一つは、秋季の薬剤散布は収穫期までに間もないことから果面の汚染が生じやすい点である。水和剤や一部のフロアブル剤では散布した薬液が風乾した際に、薬斑として残る場合がある。薬剤による果面の汚染は外観が劣るだけでなく、消費者の安全、安心を求める声に対応するため、特に注意する必要がある。IM 液剤は収穫前日まで使用可能であることから、散布時期がほとんど制限されない。さらに、本剤は無色であることから果面に薬斑を生じることはない。このように、IM 剤は秋季防除剤として極め

て普及性が高い剤であり、小黑斑の発生が確認されている全地域、あるいは本症状の予防剤として早期の普及、定着が期待される。

2021年5月、農林水産省は政策方針「みどりの食料システム戦略」を策定し、化学農薬使用量（農薬による環境的・人的リスクを考慮した「リスク換算」での数値）の50%低減を2050年までに目指すとした。今日、多くのリンゴ園における病害虫防除は地域ごとに策定された防除暦に従っている。本技術は、当年に発生が想定される病害虫の発生消長に合わせ、有効な防除剤を概ね10～15日間隔で散布する体系で、特に前年多発する病害虫については重点的に防除を行うなど、各地域の事情に合わせた対応が可能な極めて優れた防除技術であり、広く利用されている。しかし、同じ地域あるいは同じ防除体系でも発生する病害虫には種類や発生量に差があり、必ずしもそれぞれの果樹園における病害虫の発生実態を踏まえてはいない。防除暦に従った防除においても散布間隔を延長する、あるいは散布薬量を減らすことで1～2割程度の減農薬は可能であるが、それによってむしろ病害虫の発生リスクが高まることも考えられる。このようなことから、現在の主流となっている防除暦をもとにした防除体系では、化学農薬使用量の50%低減を目指すことは難しい。これを達成するためには、的確な早期の診断と病気の発生状況のモニタリングに基づいて、環境や人体への影響がより少ない農薬を、効果的に使用して防除を行う必要がある。そのためには、AIやIoTを利用した診断技術、微生物資材や環境の負荷低減が図られる新しい農薬の開発に加えて、病害抵抗性品種の栽培を拡大する、耕種的防除や圃場衛生を徹底して伝染源を減らすなど、IPM（総合的病害虫・雑草管理）をさらに推進する必要がある。本研究で開発したARISA法を用いる検出技術では、短期間で多数の試料を検査することができる。これを用いて、各果樹園あるいは防除組合単位で的確な診断を行い、現行の防除暦を越えた防除体系の構築とその実用化が期待される。

摘要

2011年10月中旬から、秋田県横手市及びその周辺地域のリンゴ園で、果面に褐色～黒褐色で直径5 mm以下の斑点（以下、小黑斑と呼ぶ）が多数生じる障害果が多発した。これらの症状に類似する既知の病害あるいは生理障害とは異なる点があり、原因が不明であった。本症状は翌年以降も発生したことから、伝染性病害によるものとの仮説のもとに、小黑斑の主因の解明に取り組んだ。小黑斑の組織から高頻度で分離される菌叢が白色の糸状菌（以下、白色糸状菌と仮称）の病原性を検討したところ、リンゴの樹上果に無傷接種によって小黑斑症状が発生し、これから接種に用いた菌が容易に分離された。本菌を、樹上あるいは収穫後の果実に有傷接種すると、既知の貯蔵病害である黄腐病に酷似していた。そこで、白色糸状菌と黄腐病の病原菌 *Gloeosporium* sp. との異同を検討したが、孢子形態において、両者は大きく異なっており、別種であると考えられた。一方、黄腐病の病斑は、国外でリンゴ、ナシに発生する bull's-eye rot と良く似ていることから、その病原菌との異同を検討した。その結果、形成される分生子の形態及び ITS、*tub2*、LSU 各遺伝子領域について相同性検索及び系統樹解析の結果から、白色糸状菌は *Phlyctema vagabunda* Desmazieres と同定された。系統樹解析によって本菌は2つのクレードに分かれたが、両者の間には形態的にも生理的にも差異が見られず、いずれも *P. vagabunda* に最も近かったことから、現時点においては双方とも同菌と同定することが適当と考えられた。我が国における本種の記録は本研究が最初である。上述のように、本種は有傷接種によって黄腐病と区別できない病斑を形成し、これから容易に再分離されること、また貯蔵中のリンゴに発生した黄腐病の病斑から容易に分離され、その分離株によっても黄腐病が発生することなどから、*P. vagabunda* はリンゴ黄腐病の主因の一つであることが明らかとなった。この結果に基づいて、本種を同病の病原菌とすることが適当であると、日本植物病理学会において提案した。また、本種は諸外国において bull's-eye rot の病原菌であることを踏まえて、未記載であったリンゴ黄腐病の英名を bull's-eye rot とすることも提案した。

リンゴ果面には多くの空気伝染性病原菌によって斑点症状や腐敗が発生し、大きな経済的被害を与えている。これらの病気の初期症状は類似しており、肉眼診断が困難なことから、果樹園あるいは地域ごとの正確な診断ができないことから、的確な防除が行われていないこともある。そこで、2011年以降多発する小黑斑を含めて、10の分類群（8種と2複合種）の病原糸状菌によるこれらの病気の初期症状の診断技術の開発を試みた。その結果、6種（リンゴ黄腐病菌のほか、輪紋病菌、褐斑病菌、黒点病菌、黒星病菌、がんしゅ病菌）のについては1回の Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis（ARISA）法によって検出が可能であり、残り2種（リンゴ斑点落葉病菌、同輪紋病菌）と2複合群（*Colletotricum acutatum* 複合種、*C. gloeosporioides* 複合種）については、ARISAの後、それぞれの特異的プライマーを用いてPCRを行うことで検出可能であった。ARISA法では検出する糸状菌を限定せず、網羅的に検出可能であり、特異的プライマーを用いたPCR法と組み合わせることで、従来の方法よりも短期間での検出が可能であった。

2011年以降、多発する小黑斑の主因はこれまで我が国未報告の病原菌であったことから、本症防除技術は皆無であった。そこで、防除技術を開発するため、秋田県で利用可能

な34種の殺菌剤から効果的な薬剤を選抜した。スクリーニング試験において、ビスグアニジン系殺菌剤が本菌に高い抗菌活性を有していることが明らかとなった。次いで、同系統のイミノクタジン酢酸塩液剤を用いて、圃場での防除試験を行ったところ、9月に本殺菌剤1500倍液を10a当たり500Lの薬液を1回散布することによって、小黑斑の発生を効果的に防除することが可能であった。本技術は過去に小黑斑が多発した地域では、既に使われ始めており、発病果は見られるものの、2011年の様な多発は生産現場で見られなくなっている。本研究で開発した防除技術が県内産地で普及され、その効果が現れているものと推察される。

謝辞

本研究の実施及び論文作成に取り組むにあたり、指導教官である公立大学法人秋田県立大学名誉教授の古屋廣光博士には、数多くの有意義なご指導、貴重なご助言をいただき、常に暖かい激励をいただきました。さらには本稿のご高閲の労を執っていただきました。心から感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、公立大学法人秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科の藤晋一博士、戸田武博士及び櫻井健二博士には多岐にわたる多くの貴重なご助言をいただきました。同学科植物保護研究室の奈良知春氏には試料調整や遺伝子解析に多大なるご協力をいただきました。地方独立行政法人青森県産業技術センターりんご研究所の平山和幸博士からは菌株の分譲や塩基配列データの提供をいただきました。地方独立行政法人北海道立総合研究機構法人本部研究事業部の三澤知央博士にはメタアナリシスについて多くのご助言をいただきました。

本研究の一部は、秋田県果樹試験場の研究課題として行われ、同職員の多大なる協力を得て行われました。特に、場長の上田仁悦氏、品種開発部部長の佐藤善政氏、上席研究員の照井真氏、中澤みどり博士、元果樹試験場場長の森田泉氏には研究の遂行にあたり特段のご配慮と栽培技術に関する有益なご助言を賜りました。また、生産技術部の舟山健博士、主任研究員の上村大策氏、技師の高橋友樹氏には実験を進めるにあたり多くのご協力をいただきました。織田昭和氏、竹本義基氏、細川留美氏には、供試樹の一般管理業務、室内実験にあたって多大なご協力をいただきました。秋田県内の各地域振興局農林部の普及指導員には発病標本の採集にご協力をいただきました。JA 秋田ふるさと果樹課、増田選果場、栄選果場、醍醐中央選果場の職員には供試果実の提供に特段のご配慮をいただきました。JA 秋田ふるさとリンゴ部会の会員からは現地調査や、聞き取り調査に多大なる協力をいただきました。特に横手市平鹿町のリンゴ生産者佐藤清氏からは、現地での防除試験を実施するにあたり氏所有のリンゴ園を5年間にわたり提供いただきました。

以上の方々に、心から感謝申し上げます。

Acknowledgments

I thank Huw Tyson, PhD, from Edanz (<https://jp.edanz.com/ac>) for editing parts of the English text of a draft of this dissertation.

Abstract

The incidence of dark-colored spot lesions on apple fruits increased significantly, compared with previous seasons, around harvest time in 2011 in apple orchards in and around Yokote City, Akita Prefecture, Japan. The economic damage caused by the lesions continued since then, considerably reducing the commercial value of apples with the lesions. The lesions (DCS for dark-colored spot, hereafter) were black to brown in color, circular or subcircular in shape with a diameter of 5 mm or less. The lesions caused significant damage especially to cv. Fuji, which was the major cultivar grown in the region. DCSs were very similar to the initial lesions that developed in several air-borne diseases and physiological disorders of fruits, so that it was difficult to diagnose and differentiate the disorders. A fungus was frequently isolated from DCS lesions; its colonies on potato dextrose agar (PDA) plates were white or brown in color, producing radial wrinkles on the surface, and grew slowly, attaining a diameter of 16–28 mm in 10 d at 20 °C. The fungus is referred to hereafter as WSGF for whitish slow-growing fungus.

When inoculated without wounding on fruits of cv. Fuji and cv. Akita No. 19 on trees, isolates of WSGF caused small reddish-brown to blackish-brown lesions with a diameter of ca. 1 mm that were very similar to DCSs as described above. A red halo was produced around some parts of lesions developed on fruits of cv. Akita No. 19. Lesions with a red halo have been found on fruits of cv. Akita No. 19 in many commercial orchards in the region since 2011. Isolates inoculated were readily re-isolated from the lesions that developed in these tests. When WSGF was inoculated on a wounded part of apple fruits on trees, soft rot lesions 3–5 cm in diameter developed over several days. Lesions like DCSs never developed. Inoculated fungal isolates were re-isolated from these soft rot lesions. These lesions closely resembled lesions called Kigusare-byo, which means yellow rot-disease in Japanese. The disease has been known since 1939 as a post-harvest disease of apples in Japan.

The spores were oblong-fusiform and 5–16 μm \times 3–5 μm in size. The conidia of WSGF were fusiform and curved, with size 9.8–23.3 μm \times 2.3–5.5 μm . Togashi (1950) reported that Kigusare-byo was caused by *Gloeosporium* sp. Togashi (1950) reported that Kigusare-byo was caused by *Gloeosporium* sp., conidia of which were apparently smaller than those of WSGF. This suggests that WSGF could not be identified as *Gloeosporium* sp.

On the other hand the soft rot lesions were similar to bull's-eye rot lesions that have been reported as post-harvest diseases of pome fruits in most apple growing regions of the world. The morphology and genetic characteristics were compared between WSGF and the causal fungi of bull's-eye rot. Conidia of both WSGF and *Phlyctema vagabunda* Desm., one of the causal fungi of bull's-eye rot, were allantoid

in shape and aseptate. The sizes of conidia were almost the same, or those of WSGF were slightly larger than those of *P. vagabunda*. The base sequences of the internal transcribed spacer, large subunit and *tub2* regions of isolates of WSGF showed the highest homology with *P. vagabunda*. In phylogenetic tree analysis, isolates of WSGF tested were divided into two subclades (clades 1 and 2), and both subclades were most closely related to *Phlyctema* spp.

The isolates belonging to clade 1 did not produce conidia on agar plates. It was known that some strains of *P. vagabunda* did not produce conidia. Since we could not find typical differences in morphological characteristics in conidia, in conidial production structure, nor in mycelium and cultural morphology, we considered it is appropriate that both clades belonged to *P. vagabunda* Desm. On the basis of these results, we identified WSGF as *P. vagabunda*, and proposed to the Phytopathological Society of Japan that DCSs were caused by the fungus, and that it also causes Kigusare-byo disease, i.e., bull's eye-rot, the causal fungus of which has not been identified since it was first reported in 1945.

Dark-colored spots on apple fruits caused by *P. vagabunda* at harvest time are very similar to those found in several infectious or non-infectious diseases. The infectious fungi, all found in the northern part of Honshu Island, Japan, include bitter rot caused by the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex or the *Colletotrichum acutatum* species complex, Botryosphaeria rot caused by *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. and *Botryosphaeria kuwatsukai* (Hara) G.Y. Sun & E. Tanaka, Marssonina blotch caused by *Diplocarpon mali* Y. Harada and Sawamura [anamorph *Marssonina coronaria* (Ellis & Davis) Davis, syn. *Ma. mali* (Henn.) Ito], apple scab caused by *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, Brooks fruit spot caused by *Mycosphaerella pomi* (Pass.) Lindau, and Alternaria blotch caused by *Alternaria mali* Roberts, non-infectious physiological diseases include lenticel blotch pit (Casero *et al.* 2009), lenticel spot (Brook 1968), and lenticel breakdown (Singh *et al.* 2016).

Because it is difficult to diagnose correctly such lesions and diseases, we conducted an Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) to reliably detect fungal pathogens in the lesions. The fragment sizes of peaks for eight species and two species complexes that can cause DCSs on apples in the northern part of Honshu Island were determined on the basis of ARISA. The fragment sizes for *B. kuwatsukai*, *D. mali*, *M. pomi*, *Ne. galligena*, *P. vagabunda*, and *V. inaequalis* were 1095–1097, 685–686, 650–652, 658–659, 667–668 and 1042–1046, respectively. These peaks sizes were unique, enabling their detection in a single ARISA trial. However, *C. acutatum* species complex, including *Colletotrichum aenigma*, *C. siamense* and *C. fructicola*, and *A. mali*, had similar fragment sizes between 689 and 692. Likewise *C. gloeosporioides* species complex, including *C. fioriniae* and *C. nymphaeae*, and *B. dothidea* had similar fragment sizes between 698 and 702. To identify these fungi, it

was necessary to use PCR amplifications using species- or genus-specific primers for each PCR product corresponding to the peak obtained in ARISA as a target DNA fragment.

By this method we examined 490 pieces of fresh tissue with DCSs, obtained after removing the epidermis, on 337 commercially produced apples collected at three sorting facilities in Yokote City and an orchard at the Akita Fruit-Tree Experiment Station. Five fungal species (*P. vagabunda*, *D. mali*, *B. dothidea*, *B. kuwatsukai* and *Ne. galligena*) and two *Colletotrichum* species complexes were detected in these DCSs. These results were confirmed by sequence analysis and BLAST search of the PCR products in ARISA corresponding to the peaks, and/or by PCR with the PCR products corresponding to the peaks using primers specific to each species. Among the species detected by ARISA(fragment sizes), *P. vagabunda* was by far the most frequently detected fungus. From these results it was found that the increase of DCS incidence since 2011 in the prefecture was most likely caused by this fungus. *Ne galligena* was detected in the Akita prefecture for the first time. Thus, it was demonstrated that the ARISA-based technique developed in the present study was useful for the accurate, reliable, and comprehensive detection of pathogens causing DCSs on apple fruits.

The effectiveness against DCS symptoms of 34 fungicides that were already used as pesticides to control fungal diseases of apples in Japan was investigated. Potato dextrose agar discs of eight isolates of *P. vagabunda* were dipped in solutions of each fungicide for 1 minute at 1/10 and 1/100 dilutions of the concentrations that were sprayed for apple disease control in Akita prefecture. The discs were placed on PDA plates and cultured for 5 d at 20 °C, and mycelial growth was measured. Iminocutazine acetate solution (IM) showed the highest inhibition of mycelial growth of all isolates at the lowest fungicide concentration, 1/100 dilution.

Tests to control DCS development were conducted with IM at the orchards of farmers in Yokote City (cv. Fuji, 15 L/tree) and the Akita Fruit-Tree Experiment Station (cv. Fuji, 5–15 L/tree). A single spray of IM (666 mL/L) was applied in either early, mid or late September, and DCS development was assessed at harvest time. The tests were conducted every year during 7 consecutive years. In every test, the incidence of lesions on apples on trees that were sprayed with IM was lower than on trees without fungicide spray. Integrated evaluation based on meta-analysis of the 5-year trials results showed that IM treatment reduced the incidence of DCSs to about 20 % of that with no fungicide treatment.

These results indicated that a single spray of IM (at the concentration of 1/1500) in September significantly reduced the DCS development caused by *P. vagabunda*. Thiophanate methyl (TM) has been reported to be effective for controlling bull's-eye rot caused by *P. vagabunda*, the incidence of which has not been reported in Japan. But it was reported that strains resistant to the fungicide have also been detected.

We confirmed with *in vitro* tests that susceptibility of some Japanese isolates of *P. vagabunda* to TM was much less than to IM. Considering this situation, it seems that TM would not efficiently control DCS development in orchards.

引用文献

- Abeln, E. C., de Pagter, M. A., and Verkley, G. J. (2000). Phylogeny of *Pezicula*, *Dermea* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. *Mycologia* 92: 685-693.
- Andrews, J. H., Spear, R N., and Nordheim, E. V. (2002). Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 500–513.
- Blažek, J., Kloutvorová, J., and Křelinová, J. (2006). Incidence of storage diseases on apples of selected cultivars and advanced selections grown with and without fungicide treatments. *Horticultural Science* 33: 87-94.
- Brook, P. J. (1957). Ripe spot of apples in New Zealand. *New Zealand Journal of Science and Technology*, A, 38, 735-741.
- Burchill, R. T., and Edney, K. L. (1961). The assessment of spore production by *Gloeosporium album* and its relation to fruit infection. *EastMalling Annual Report 1960*, III, 90-94.
- Bryk, H. (1997). Appearance and stability of *Pezicula alba* Gunth. resistant to benzimidazole fungicides. *Journal of fruit and ornamental plant research*, 5(2).
- Bryk, H., and Rutkowski, K. P.(2012). The influence of hot water treatment on the incidence of postharvest diseases and quality of apples. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 57(3): 26-30.
- Cameldi, I. (2015). Apple latent infection caused by *Neofabraea alba*: host-pathogen interaction and disease management (Doctoral dissertation, alma).
- Cameldi, I., Neri, F., Ventrucci, D., Ceredi, G., Muzzi, E., and Mari, M. (2016). Influence of harvest date on bull's eye rot of ‘Cripps Pink’ apple and control chemical strategies. *Plant disease*. 100: 2287-2293.
- Cameldi, I., Neri, F., Menghini, M., Pirondi, A., Nanni, I. M., Collina, M., and Mari, M. (2017). Characterization of *Neofabraea vagabunda* isolates causing apple bull's-eye rot in Italy (Emilia Romagna region). *Plant Pathology* 66: 1432-1444.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P.R., and Weir, B.S. (2012). *Colletotrichum* –current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181-213.
- Cao, D., Li, X., Cao, J. and Wang, W. (2013). PCR detection of the three *Neofabraea* pathogenic species responsible for apple bull's eye rot. *Advances in Microbiology* 3: 61-64.
- Chen, C., Verkley, G. J., Sun, G., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. (2016). Redefining common endophytes and pant pathogens in *Neofabraea*, *Pezicula*, and related genera. *Fungal Biology* 120: 1291-1322.
- Cheng-nan, X., Hong-jun, Z., Fu-mei, C., Zhi-rui, J., Qing-long, D., Ke-qiang, C, and Zong-shan, Z. (2016). Species-specific PCR-based assays for identification and

- detection of *Botryosporiaceae* species causing stem blight on blueberry in China. *Journal of Integrative Agriculture* 15: 573-579.
- CICEOI, R., and IACOMI, B. (2019). Lenticel rot, *Neofabraea* spp. in Romania. New reports infographic. *Scientific Papers-Series B, Horticulture* 63: 161-166.
- Ciesielski, S., Bulkowska, K., Dabrowska, D. Kaczmarczyk, D., Kowal, P., and Możejko, J. (2013). Ribosomal Intergenic Spacer Analysis as a tool for monitoring methanogenic *Archaea* and changes in an anaerobic digester. *Current microbiology* 67: 240-248.
- Clarkson, S. F. (1945). A Storage Rot of Apples Due to *Gloeosporium Album* Osterw (Doctoral dissertation, McGill University Libraries).
- Cordley, A. B (1900). Apple Tree anthracnose; A New Fungous Disease. Oregon Experiment Station Bulletins 60, 8p.,illus.
- Corke, A. T. K. (1956). Bitter rot of apples: II. Seasonal variations in the development and sporulation of cankers of *Gloeosporium* spp. inoculated into apple branches. *Journal of Horticultural Science* 31: 272-283.
- Cunnington, J. H. (2004). Three *Neofabraea* species on pome fruit in Australia. *Australasian Plant Pathology* 33: 453-454.
- Curry, E. A., Torres, C., and Neubauer, L. (2008). Preharvest lipophilic coatings reduce lenticel breakdown disorder in 'Gala' apples. *HortTechnology* 18: 690-696.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., and Crous, P.W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37-113
- Danovaro, R., Luna, G. M., Dell'Amno, A., and Pietrangeli, B. (2006). Comparison of two fingerprinting techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Applied and environmental microbiology* 72: 5982-5989.
- de Jong, S. N., Levesque, C. A., Verkley, G. J., Abeln, E. C., Rahe, J. E. and Braun, P. G. (2001). Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. *Mycological Research* 6: 658-669.
- Desmazière, J.B.H.J.(1847). Quatorzième notice sur les plantes cryptogames récemment découvertes en France. *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 8: 16-17.
- Dugan, F.M., Grove, G.G. and Rogers, J.D. (1993). Comparative studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *C. perennans*. I. Morphology and pathogenic behaviour. *Mycologia* 85: 551-564.
- Edney, K. L. (1958). Observations on the infection of Cox's Orange Pippin apples by *Gloeosporium perennans* Zeller and Childs. *Annals of Applied Biology* 46: 622-629.
- Edney, K. L., Tan, A. M., and Burchill, R. T. (1977). Susceptibility of apples to infection

- by *Gloeosporium album*. *Annals of Applied Biology* 86: 129-132.
- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G., and Manyes, L. (2017). *Alternaria* mycotoxins in food and feed: An overview. *Journal of Food Quality* 40: 1–20.
- Everett, K. R., Pushparajah, I. P. S., Fisher, B. M., and Wood, P. N. (2017). A simple method for conidial production and establishing latent infections of apples by *Phlyctema vagabunda* (syn: *Neofabraea alba*). *New Zealand Plant Protection* 70: 106-111.
- Felgini, M., Brambati, E., Panelli, S., Ghitti, M., Sacchi, R., Capelli, E., and Bonacina, C. (2014). One-year investigation of *Clostridium* spp. occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Food Control* 42: 71-77.
- Ferguson, I. B., and C. M. Triggs. (1990). Sampling factors affecting the use of mineral analysis of apple fruit for the prediction of bitter pit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 18: 147-152.
- Fisher, M. M., and Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and ITS application to freshwater bacterial communities. *Applied and environmental microbiology* 65: 4630-4636.
- 藤井孝行 (2021) リンゴ黒星病菌に対するベフラン液剤 25 治療活性について. *農業新時代* (2): 31-14.
- 福田博之 (1986). リンゴ果実のコルク・スポット及びビター・ピットの形態的差異. *園芸學會雑誌* 54: 416-423.
- 福井白志 (1940). 苹果黄腐病(仮称)に関する調査 (予報). 昭和 13 年輸移出入植物検査統計病菌害虫調査研究成績概要 15. *農林省農改資* 152: 186-189.
- 古屋廣光・藤井直哉・福田秀樹・奈良知春・戸田武・篠田光江・佐山玲・藤晋一・齋藤隆明(2015). 秋田県でみられるアスパラガス生育不良の原因究明 疫病の発生確認並びに発生分布の予備的調査. *秋田県立大学ウェブジャーナル B (研究成果部門)*, 2, 176-180.
- FURUYA, H., Sato, Y., Nara, C., Shinichi, F., and Toda, T. (2021). Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis to Detect Pathogenic Fungi in Dark-colored Spots on Apple Fruits. *PhytoFrontiers*, (DOI: 101094/PHYTOFR-09-21-0060-R).
- Garipey, T. D., Rahe, J. E., Lévesque, C. A., Spotts, R. A., Sugar, D. L., and Henriquez, J. L. (2005). *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. *Canadian journal of plant pathology* 27: 118-124.
- Giraud, M., and Bompeix, G. (2012). Postharvest diseases of pome fruits in Europe: Perspective for integrated control. *IOBC WPRS Bulletin* 84: 257-263.
- Giraud, M., Coureau, C., Perrin, J., and Westercamp, P. (2019). Apple lenticel rots: state of knowledge on the epidemiology of *Neofabraea vagabunda*. V International Symposium on Postharvest Pathology: From Consumer to Laboratory-Sustainable Approaches to Managing Postharvest 1325: 59-66.
- Guthrie, E. J. (1959). The occurrence of *Pezicula alba* sp. nov. and *P. malicorticis*, the

- perfect states of *Gloeosporium album* and *G. perennans*, in England. Transactions of the British Mycological Society 42: 502-506.
- Hansgate, A. M., Schloss, P. D., Hay, A. G., and Walker, L. P. (2005). Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stage of composting. FEMS Microbiology Ecology 51: 209-214.
- Henriquez, J. L., Sugar, D. and Spotts, R. A. (2004). Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. Plant Disease 88: 1134-1138.
- Henriquez, J. L. (2005). First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. Plant disease 89: 1360
- Henriquez, J. L., Sugar, D., and Spotts, R. A. (2006). Induction of cankers on pear tree branches by *Neofabraea alba* and *N. perennans*, and fungicide effects on conidial production on cankers. Plant disease 90: 481-486.
- Hewson, I., and Fuhrman, J. A. (2004). Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. Applied and environmental microbiology 70: 3425-3433.
- 平山和幸・佐藤裕・赤平知也・古屋廣光(2018). 低温貯蔵リンゴ果実に発生する小黑斑症状. 日本植物病理学会報 84: 53. (講要)
- 堀江博道 (2014). カラー図版 植物病原菌の見分け方 (下巻). pp. 328-331, 大誠社, 東京.
- Hortova, B., Novotny, D., and Erban, T. (2014). Physiological characteristics and pathogenicity of eight *Neofabraea* isolates from apples in Czechia. European Journal of Horticultural Science 79: 327-334.
- Hou, Y. M., Zhang, X., Zhang, N. N., Naklumpa, W., Zhao, W. Y., Liang, X. F., Zhang, R., Sun, G. Y., and Gleason, M. L. (2019). Genera *Acremonium* and *Sarocladium* cause brown spot on bagged apple fruit in China. Plant Disease 103: 1889-1901.
- Ikeda, S., Fuji, S. Sato, T., Furuya, H., Naito, H., Ytow, N., Ezura, H., Minamisawa, K., and Fujimura, T. (2007). Microbial diversity in milled rice as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis. Microbes Environ 22: 165-174.
- 稲田稔. (2018). DMI 剤耐性菌と薬剤使用ガイドライン. 植物防疫 72: 379-385.
- 石井英夫. (2012). QoI 剤及び SDHI 剤耐性菌の現状と薬剤使用ガイドライン. 植物防疫 66: 481-487
- 岩谷齊・坂本康純 (1999). 硝酸カルシウム散布によるリンゴの薬害 (2). 東北農業研究 52: 185-186.
- Jackson, H. S. (1913). Apple-tree anthracnose: A preliminary report. Oregon State Agricultural Experiment Station Biennial Crop Pest and Horticultural Report 12: 178-197.
- Jami, E., Shterzer, N., and Mizrahi, I. (2014). Evaluation of Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis for bacterial fingerprinting of rumen microbiome compared to pyrosequencing technology. Pathogens 3: 109-120.

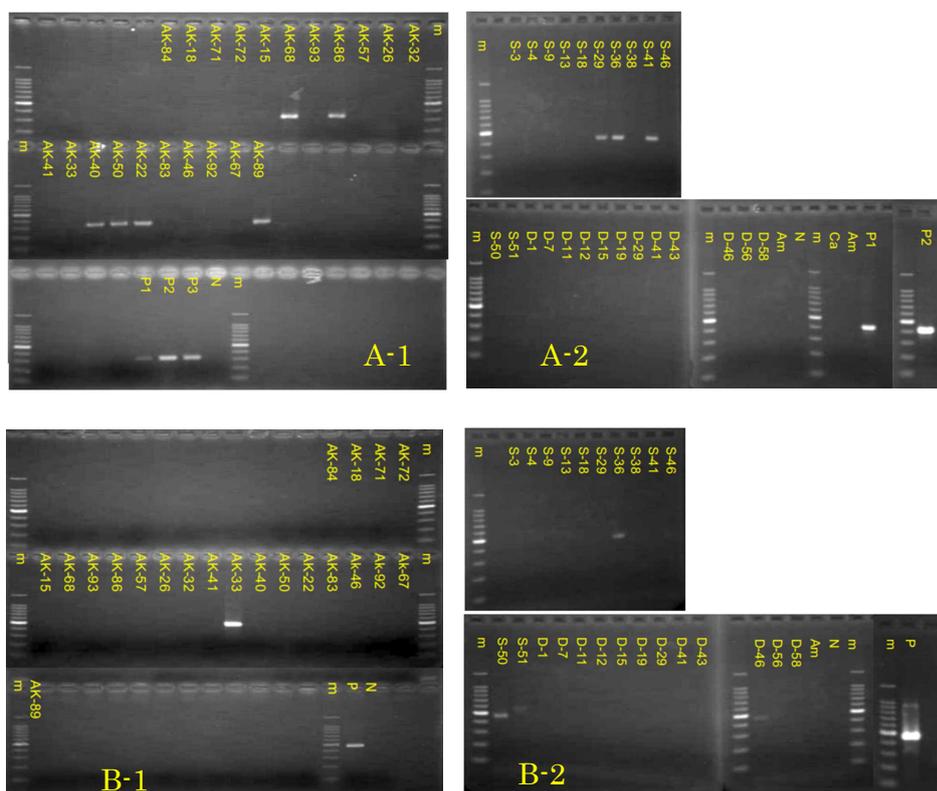
- Johnson, R. D., Johnson, L., Kohmoto, K., Otani, H., Lane, C. R., and Kodama, M. (2000). A polymerase chain reaction-based method to specifically detect *Alternaria alternata* apple pathotype (*A. mali*), the causal agent of Alternaria blotch of apple. *Phytopathology* 90: 973-976.
- Johnston, P. R., Seifert, K. A., Stone, J. K., Rossman, A. Y., and Marvanová, L. (2014). Recommendations on generic names competing for use in *Leotiomycetes* (*Ascomycota*). *IMA fungus* 5: 91-120.
- Kanda, Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48 : 452-458
- Kienholz, J. R. (1939). Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi. *Journal of Agricultural Reserch.* 59: 635-665.
- Keinath, A. P., Wintermantel, W. M., and Zitter, T. A. (eds.). (2017). Compendium of cucurbit diseases and pests. 2nd ed. pp. 220. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA.
- Kennel, W. and Weiler, R. (1984). A study on the cause of the red lenticel disease in apples. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 91: 552-555.
- Kingsnorth, J., Perrine, J., Berrie, A., and Saville, R. (2017). First report of *Neofabraea kienholzii* causing bull's eye rot of apple in the UK. *New Disease Reports* 36: 15
- 岸国平 (1998). 日本植物病害大辞典. pp. 831-835, 全国農村教育協会, 東京.
- Konarska, A. (2014). Morphological, histological and ultrastructural changes in fruit epidermis of apple *Malus domestica* cv. Ligol (Rosaceae) at fruit set, maturity and storage. *Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica* 56: 35-48.
- Köhl, J., Wenneker, M., Groenenboom-de Haas, B. H., Anbergen, R., Goossen-van de Geijn, H. M., Lombaers-van der Plas, C. H., Pinto.F.A.M.F., and Kastelein, P. (2018). Dynamics of post-harvest pathogens *Neofabraea* spp. and *Cadophora* spp. in plant residues in Dutch apple and pear orchards. *Plant pathology* 67: 1264-1277.
- Lerner, A., Herschkovits, Y., Baudoin, E., Nazaret, S., Moenne-Leocoz, Y., Okon, Y., and Jurkevitch e. (2006). Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal inter genic spacer analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1212-1218.
- Lockhart, C. L., and Ross, R. G. (1961). *Gloeosporium album* and *G. malicorticis* on apples in Nova Scotia. *Canadian Plant Disease Survey* 41: 280-285.
- Lolas, M., Díaz, G., Mendez, R., Caceres, M., and Neubauer, L. (2015). Evaluation of the efficacy of fungicide fludioxonil in the postharvest control of bull's eye rot (*Neofabraea alba*) in Chile. In III International Symposium on Postharvest Pathology: Using Science to Increase Food Availability 1144: 461-464.
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., and Bertolini, P. (2012). Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and*

- Technology 73: 56–62.
- Maxin, P., Weber, R. W., Pedersen, H. L., and Williams, M. (2012). Control of a wide range of storage rots in naturally infected apples by hot-water dipping and rinsing. *Postharvest Biology and Technology* 70: 25-31.
- McNeill J., Barrie F. R., Buck W. R., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D. L., Herendeen P. S., Knapp S., Marhold K., Prado J., Prud'homme van Reine W. F., Smith G. F., Wiersema J. H. and Turland N. J. (2012) International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). [Regnum vegetabile no. 154.] Koeltz Scientific Books. Königstein.
- Michalecka, M., Bryk, H., Poniatowska, A. Seliga, P., and Puławska, J. (2015). Identification and characterization of *Neofabraea* fungi causing bull's eye rot on apple in Poland. *Acta Horticulture* 1144: 183-188.
- Michalecka, M., Bryk, H., Poniatowska, A., and Pulawska, J. (2016). Identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR. *Plant Pathology* 65: 643-654.
- Minář, P. (2006). Effect of late summer treatments by strobilurines on storage diseases of apples. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 54.4: 39-44.
- Mosca, S., Nicosia¹, M. G., Li, D., Cacciola, S. O., and Schena, L. (2014). Molecular Analysis of *Colletotrichum* Species in the Carposphere and Phyllosphere of Olive. *PLoS ONE* 9: e114031.
- Moslem, M. A., Yassin, M. A., El-Samawaty, A. E. M. A., Sayed, S. R. M., and Amer, O. E. (2013). Mycotoxin-producing *penicillium* species involved in apple blue mold. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 7: 187-193.
- Nakahara, K., Hataya, T. and Uyeda, I. (1999). A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridization and RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 77: 47-58.
- Nannfeldt, J.A. (1932) . Morphologi und Systematik der nichtlichenisierten inoperculaten Discomyceten. *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis* ser 4, 8(2): 1-368.
- Norin, I. and Rumpunen, K. (2003). Pathogens on Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) plants. I/In: Japanese quince - Potential fruit crop for Northern Europe. Sid./p. 37-58.
- Nybom, H., Ahmadi-Afzadi, M., Rumpunen, K., and Tahir, I. (2020). Review of the impact of apple fruit ripening, texture and chemical contents on genetically determined susceptibility to storage rots. *Plants* 9: 831.
- Oberhänsli, T., Vorley, T., Tamm, L. and Schare, H. J. (2014). Development of a quantitative PCR for improved detection of *Marssonina coronaria* in field samples. *Ecofruit*. 16th International Conference on Organic-Fruit Growing: 17–19

- Hohenheim, Germany, Proceedings: 187-190.
- 尾形正 (1995). リンゴの果点及び毛茸痕の経時的変化と輪紋病菌に対する果実感受性について. 日本植物病理学会報 61: 229-230. (講要)
- Osterwalder, A. 1907. Zur *Gloeosporium* fäule des Kernobstes. Zentbl. Bakt. P. 2: 825-827.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., and Pertot, I. (2012). Campisano A. Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. Applied and environmental Microbiology 78: 4308-4317.
- Putnam, M. L., and Adams, G. C. (2005). *Phlyctema vagabunda* causes coin canker of ash (*Fraxinus* spp.) in North America. Plant Disease 89: 773-773.
- Raese, J. T., and S. R. Drake. (2002). Calcium spray materials and fruit calcium concentrations influence apple quality. Journal of the American Pomological Society 56: 136-143.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J. C., Mougél, C., Thioulouse, J., and Nazaret, S. (2001). Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. Applied and Environmental Microbiology 67: 4479-4487.
- Romero, J., Raya, M. C., Roca, L. F., Agustí-Brisach, C., Moral, J. and Trapero, A. (2018). Phenotypic, molecular and pathogenic characterization of *Phlyctema vagabunda*, causal agent of olive leprosy. Plant pathology, 67: 277-294.
- Rooney-Latham, S. and Soriano, M. C. (2016). First report of *Neofabraea aba* causing branch canker dieback of apple in California. Plant disease 100: 1011.
- Rossmann, A. Y., Castlebury, L. A., Adams, G. C., and Putnam, M. L. (2002). *Phlyctema vagabunda* isolated from coin canker of ash trees in Michigan. Plant disease 86: 442-442.
- 佐藤豊三・森脇丈治 (2013a). 広義 *Colletotrichum acutatum* の種分割と炭疽病の病原再同定. 植物防疫 67: 113-120.
- 佐藤豊三・森脇丈治 (2013b). *Colletotrichum acutatum* 系統群 A2 及び A4 の再分類と同系統群の国内産菌株の再同定. 植物防疫 67: 367-372.
- 佐藤裕. (2013). 秋田県で初確認されたクレソキシムメチル剤耐性リンゴ斑点落葉病菌. 北日本病害虫研究会報 64: 118-120
- 佐藤裕・平山和幸・赤平知也・戸田武・古屋廣光(2018). *Phlyctema* sp.によるリンゴ黄腐病の樹上発病について. 日本植物病理学会報 85: 43. (講要)
- 佐藤裕・平山和幸・戸田武・奈良知春・古屋廣光 (2021). *Phlyctema vagabunda* によるリンゴ果実の黒斑症状ならびに黄腐病の発生 (病原追加). 日本植物病理学会報 87: 133-145.
- Seifert, K. A. (2013). *Neofabraea kienholzii* (Seifert, Spotts and L é vesque), Nomenclatural novelties. Index Fungorum (28) 01: (ISSN 2049-2375).

- Shen, Y., Nie, J., Li, Z., Li, H., Wu, Y., Don, Y., and Zhang, J. (2017). Differentiated surface fungal communities at point of harvest on apple fruits from rural and peri-urban orchards. *Scientific Reports* 8: 2165.
- Soto-Alvear, S., Lolas, M., Rosales, I. M., Chávez, E. R., and Latorre, B. A. (2013). Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. *Plant disease* 97: 485-490.
- Spotts, R. A., Seifert, K. A., Wallis, K. M., Sugar, D., Xiao, C. L., Serdani, M., and Henriquez, J. L. (2009). Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. *Mycological research* 113: 1301-1311.
- Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Agnello, A. M., and Walgenbach, J. F. (eds.) (2014). *Compendium of apple and pear diseases and pests*. 2nd ed. (pp. 218). American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA.
- 鈴木宣建・荒井茂充・長内敬明・福島千万男 (1985). リンゴ新品種の斑点落葉病に対する罹病性. 北日本病害虫研究会報 36: 163-165.
- 高橋俊作・水野昇(1974)リンゴ貯蔵病害の実態調査. 東北農業研究 15: 324-325.
- 高松進 (2005). 植物防疫基礎講座 分子生物学の基礎. 植物防疫 59: 64-68.
- Talgoslash, V., Brurberg, M. B., and Stensv, A. (2011). *Neonectria*-canker on trees in Norway. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development* 4: 252-255.
- Talvia, P. (1960). Various species of *Gloeosporium* in stored apples in Finland. *Agricultural and Food Science* 32: 239-246.
- Tan, A. M., and Burchill, R. T. (1972). The infection and perennation of the bitter rot fungus, *Gloeosporium album*, on apple leaves. *Annals of Applied Biology* 70: 199-206.
- Tessmer, M. A., Appezzato-da-Glória, B., & Antonioli, L. R. (2016). Influence of growing sites and physicochemical features on the incidence of lenticel breakdown in 'Gala' and 'Galaxy' apples. *Scientia horticulturae*, 205, 119-126.
- 田辺憲太郎 (2013). 殺菌剤の耐性菌発生リスク評価. 農薬時代 195: 18-24.
- 田中弥平(1981). 原色リンゴ病害図説 (病害編) pp. 56. 青森県りんご協会, 青森.
- 富樫浩吾 (1950). 果樹病学. pp. 60. 朝倉書店, 東京.
- Trouillas, F. P., Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Moral, J., Travadon, R., Aegerter, B. J., and Lightle, D. (2019). Identification and characterization of *Neofabraea kienholzii* and *Phlyctema vagabunda* causing leaf and shoot lesions of olive in California. *Plant disease* 103: 3018-3030.
- Verkley, G. J. (1999). A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. *Studies in Mycology* 44: 125-136.
- Vero, S., Garmendia, G., Gonzalez, M. B., Garat, M. F., and Wisniewski, M. (2009). *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Biocontrol Science and Technology* 19: 1033-1049.

- Vico, I., Duduk, N., Vasic, M., Zebeljan, A. and Radivojevic, D. (2016). Bull's eye rot of apple fruit caused by *Neofabraea alba*. *Acta Horticulturae* 1139: 733-738.
- von Arx, J. A. (1970). A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. *Bibliotheca Mycologica* 24: 1-203
- Weber, R. W. S., and Palm, G. (2010). Resistance of storage rot fungi *Neofabraea perennans*, *N. alba*, *Glomerella acutata* and *Neonectria galligena* against thiophanate-methyl in Northern German apple production. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117: 185-191.
- Wenneker, M., and Köhl, J. (2014). Postharvest decay of apples and pears in the Netherlands. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Discovery and Development of Innovative Strategies for Postharvest Disease Management Acta Horticulturae* 1053: 107-111.
- Wenneker, M., de Jong, P. F., Joosten, N. N., Goedhart, P. W., and Thomma, B. P. H. J. (2017). Development of a method for detection of latent European fruit tree canker (*Neonectria ditissima*) infections in apple and pear nurseries. *European Journal of Plant Pathology* 148: 631-635.
- Wenneker, M., Pham, K. T. K., Lemmers, M. E. C., de Boer, F. A., van Leeuwen, P. J., Hollinger, T. C., van de Geijn, F. G., and Thomma, B. P. H. J. (2017). *Fibulorhizoctonia psychrophila* is the causal agent of lenticel spot on apple and pear fruit in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 148: 213-217.
- Wilkinson, E. H. (1944). Bitter rot of Apples caused by *Gloeosporium album* Osterw., with special reference to the variety Allington Pippin. *Annual Report Long Ashton Agricultural Horticultural Research Station* 81-89.
- Wollenweber, Von H. W. (1939). Diskomyzetenstudien *Pezicula* Tul. und *Ocellaria* Tul.). *Arb Biol Reichsanst Land Forstwirtschaft Berlin Dahlem*. 22:521-570.
- Wood, P. N., and Fisher, B. M. (2017). The effect of fungicides on spore germination, mycelial growth and lesion development of *Phlyctema vagabunda* (syn: *Neofabraea alba*) (bull's eye rot of apples). *New Zealand Plant Protection* 70: 112-119.
- Woody, S. T., Spear, R. N., Nordheim, E. V., Ives, A. R., and Andrews, J. H. (2003). Single-leaf resolution of the temporal population dynamics of *Aureobasidium pullulans* on apple leaves. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4892-4900.
- Xu, X. M., and Robinson, J. D. (2010). Effects of fruit maturity and wetness on the infection of apple fruit by *Neonectria galligena*. *Plant pathology* 59: 542-547.
- 横澤志織・佐藤豊三・近藤賢一 (2015). 長野県のリンゴとブドウより分離された *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体菌株の同定と特性. *日本植物病理会報* 81: 206.
- Zeller, S. M., and Childs, L. (1925). Perennial canker of Apple trees (A preliminary report). *Bulletin of the Oregon Agricultural Research Station* 217.



Supplementary Fig. 1. PCR with specific primers using as template a DNA sample in which a peak of 699–703 bases was detected by ARISA using whole tissue of DCSs. Lane m: 100 bp ladder marker, lane N: negative control (distilled water). DNA was extracted from samples as listed.

A. PCR with primers (FaF/Bt2b) specific for *Botryosphaeria dothidea*

A-1: Field at Akita Fruit-Tree Experiment Station

Lanes Ak-84 to Ak-89: DCS collected from non-pesticide treated field. Lanes P1, P2, and P3: *Botryosphaeria* sp. (YTK12), *B. dothidea* (25-192A), and *B. dothidea* (AP8-1), respectively.

A-2: Sakae and Masuda sorting facility

Lanes S-3 to S-51 and D-1 to D-58: DCSs collected from the Sakae and Masuda sorting facility. Lanes Am and Ca: *A. mali* (AL-NASA-3) and *C. aenigma* (MAFF244310); lanes P1 and P2: *B. dothidea* (AP8-1) and *B. dothidea* (25-192A), respectively.

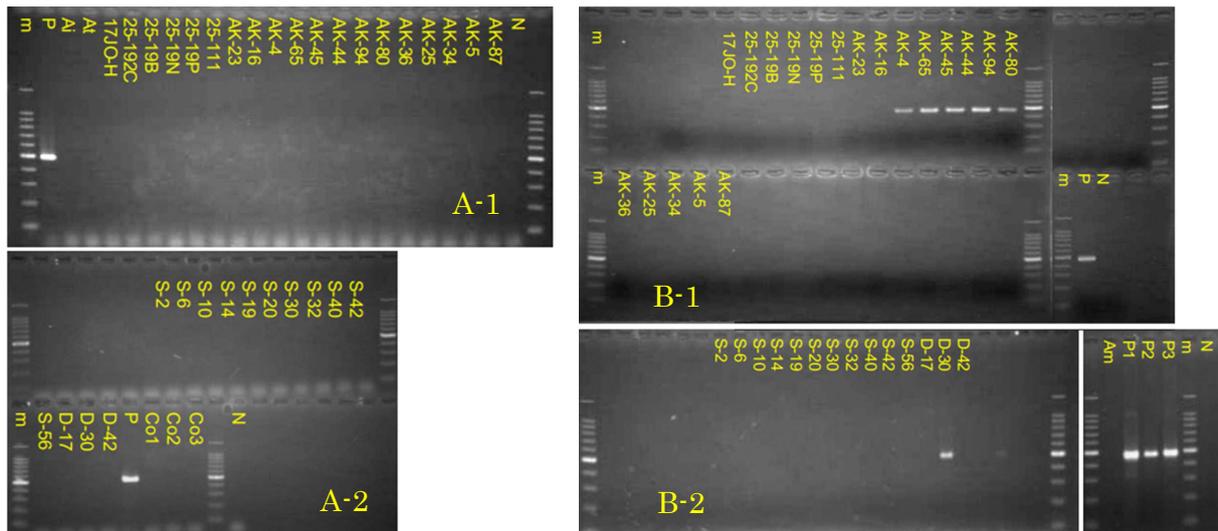
B. PCR with primers (Coll1F/Coll3Rb) specific for *Colletotrichum* sp.

B-1: Field at Akita Fruit-Tree Experiment Station

Lanes Ak-84 to Ak-89: DCSs collected from non-pesticide field. Lane P: *C. aenigma* (MAFF244310).

B-2: Sakae and Masuda sorting facility

Lanes S-3 to S-51 and D-1 to D-58: DCSs collected from Sakae and Masuda sorting facility. Lane Am: *A. mali* (HBA1); lane P: *C. aenigma* (MAFF244310).



Supplementary Fig. 2. PCR with specific primers using as template a DNA sample in which a peak of 689–693 bases was detected by ARISA using whole tissues of DCSs (Lane m: 100 bp ladder marker, lane N: negative control (distilled water)). DNA was extracted from samples as listed.

A. PCR with primers (LinF1/LinR) specific for *Alternaria mali*

A-1: Field at Akita Fruit-Tree Experiment Station

Lane P: *A. mali* (AL-NASA-3); lane Ai and At: *A. infectoria* and *A. tenuissima*.

Lanes 17JO-H to AK-87: DCS collected from non-pesticide treated field.

A-2: Sakae and Daigo sorting facilities

Lanes S-2 to S-56 and D-17 to D-42: DCS collected from Sakae and Daigo. Lane

P: *A. mali* (AL-NASA-3); lanes Co1, Co2, and Co3: *C. aenigma* (MAFF244310), *Colletotricum* sp. (AK-94), and *Colletotricum* sp. (AK-33), respectively.

B. PCR with primers (Coll1F/Coll3Rb) specific for *Colletotrichum* sp.

B-1: Field at Akita Fruit-Tree Experiment Station

Lane 17JO-H ~ AK-87: DCS collected from non-pesticide treated field. Lane P: *C. aenigma* (MAFF244310).

B-2) Sakae and Daigo sorting facilities

Lanes S-2 to S-56 and D-17 to D-42: DCS collected from Sakae and Daigo, respectively. Lane Am: *A. mali* (AL-NASA-3), lanes P1, P2, and P3: *C. aenigma* (MAFF244310), *Colletotricum* sp. (AK-94), and *Colletotricum* sp. (AK-33), respectively.