

氏名	佐藤 裕 ^{さとう ゆたか}
授与学位	博士 (生物資源科学)
学位授与年月日	令和4年3月23日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科専攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学位論文題目	<i>Phlyctema vagabunda</i> Desm. によるリンゴ果実の小黑斑 症状の発生に関する研究
指導教員	藤 晋一
論文審査委員	主査 藤 晋一 副査 櫻井 健二 戸田 武 特別 古屋 廣光

論文内容要旨

1. 研究結果の概要

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、果面に褐色から黒褐色で直径が5 mm以下の斑点（以下、小黑斑）が多数生じる障害果が、特に県の主力品種‘ふじ’に多発し、甚大な被害となった（図1-①）。その症状は既知の果実病害の初期病斑や生理障害とよく似ており、区別は困難だった。本症状は翌年以降も発生し、圃場での発生状況から病原菌が関与している可能性が強く疑われたため、この観点から主因解明に取り組んだ。小黑斑組織から糸状菌の分離を繰り返し試みたところ、既知のリンゴ病原菌とは異なり、寒天培地上での菌叢が放射状にしわを生じる白色の糸状菌（図1-②）が高率に分離された（以下、白色糸状菌）。この白色糸状菌が関与している可能性が考えられたことから、果実に対する病原性を検討した。‘ふじ’の樹上果を用いた無傷接種試験において、接種した部位には赤褐色から黒褐色で直径1mm程度の小さな病斑が形成された（図1-③）。また、黄色品種‘秋田19号’の樹上果への無傷接種試験では、赤褐色から黒褐色の小斑点が接種した部位に見られ、さらに一部の斑点の周囲に赤色のハローが観察された（図1-④）。無傷接種により生じたこれらの小黑斑症状は、いずれも原病徴に酷似していた。またこれらの病斑からは、接種に用いたものと同様の糸状菌が容易に再分離された。一方、有傷接種では、収穫果及び樹上果のいずれの場合でも小黑斑は発生せず、接種部位には直径3~5 cmの腐敗病斑（以下、進展性腐敗病斑）が形成された（図1-⑤）。この病斑はリンゴ黄腐病及び諸外国でbull's-eye rotとされる病気の症状に酷似していた。そこで、これらの病原菌と白色糸状菌の形態を比較した。その結果、白色糸状菌の分生子（図1-⑥）の大きさや形状は、黄腐病菌 *Gloeosporium* sp. とは異なっており、bull's-eye rotの病原菌とされる4種とは、いずれの種とも大差なかった（表1）。次いで白色糸状菌の遺伝子（LSU領域、ITS領域及び *tub2* 領域）の塩基配列について、相同性検索を行なったところ、いずれの領域においても白色糸状菌は

Phlyctema vagabunda Desmazièresと最も高い相同性を示した(表2)。また、系統樹解析においても、白色糸状菌のいずれの菌株も*Phlyctema*属菌に最も近かった(図2)。ただし、供試した菌株は2つのサブクレード(クレード1と2)に分かれた。しかし、クレード1に属する菌株はいずれも分生子を形成しなかったことから、分生子やその子実体の形態的な比較はできなかった。またこれらのクレードに属する菌株間では、リンゴ果実に対する病原性に差は全く見られなかった。以上のことから、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た。本菌を果実に有傷接種すると進展性腐敗病斑を形成し、これはリンゴ黄腐病及び諸外国でbull's-eye rotと呼ばれる貯蔵病害の症状と酷似していた。これらのことから、小黑斑はリンゴ黄腐病の症状の一つと考えられ、本菌を同病の病原菌の一つとして追加すること、さらに同病の英名をbull's-eye rotとすることを日本植物病理学会に提案した。

リンゴ果面には小黑斑に類似する多様な斑点症状が発生し、その原因は多岐にわたる。これらを肉眼のみで短時間に診断することは容易ではないことから、遺伝子検出法の一つであるAutomated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)法を用いて、迅速かつ信頼性の高い新たな診断技術の開発を試みた。リンゴ果実に小黑斑を生じる9病害の病原菌8種と2複合種(計13種)について、培養菌体から得たDNAを用いてARISAによってフラグメントサイズを調査した。次にこの結果をもとに、小黑斑組織からARISAによって病原菌の検出を試みた。解析に用いた試料は、小黑斑の表皮と果肉を含む全組織(293試料)及び表皮を除いた果肉組織のみ(197試料)とした。ARISA (Genetic analyzer)で検出されたピークに相当する増幅産物の一部は、シーケンス解析とBLAST検索によって、この増幅産物が由来する菌を同定した。その結果、13種の病原菌のうち6種(*Botryosphaeria kuwatsukai*、*Diplocarpon mali*、*Venturia inaequalis*、*Mycosphaerella pomi*、*Neonectria galligena*、*P. vagabunda*)は、ARISAで求めたフラグメントサイズの差が互いに4以上異なったことから、1回のARISAによって検出可能と考えられた(表3)。フラグメントサイズの差が4未満であった7種は、サイズ値が689~692のピークを示した4種と、697~702のピークを示した3種に分かれた。これらのピークについては、それぞれの分類群(*A. mali*、*B. dothidea*及び*Colletotrichum*属)の特異的プライマーを用いたPCRを行うことによって、各ピークが由来する病原菌を明らかにすることが可能であった。秋田県横手市内3か所の選果場及び秋田県果樹試験場内圃場から採集したリンゴ小黑斑組織のARISAによって、試料として果肉組織のみを用いた解析では、ピークが検出された小黑斑の93.4%で単一のピークが検出され、全組織を用いた解析では71.6%であった(表4)。果肉のみの組織で検出された病原菌は、その小黑斑の主因である可能性が高いことから、小黑斑からの病原菌の解析においては、表皮を除いて果肉のみを解析対象とすることが望ましいと考えられた。果肉組織のみを対象として行なった小黑斑組織のARISAにおいて最も高率で検出されたのは、サイズ値が667-669のピークであった(表5)。これらのピークに相当する増幅産物についてシーケンス解析とBLAST検索を行ったところ、全てが*P. vagabunda*と100~95.69%の高い相同性を示した(表5)。そのほ

か、本解析によって *D. mali*、*B. dothidea*、*Neonectria* sp. 及び *Colletotrichum* spp. が小黒斑組織から検出された。

本病による被害の軽減技術を開発するため、*in vitro* における薬剤スクリーニング試験及び病原菌接種実験系における効果判定試験を行った。その結果、イミノクタジン酢酸塩液剤が有望視された。これらとは別に、チオファネートメチル剤に対する *P. vagabunda* 15 菌株の薬剤感受性を調査した。本剤は *P. vagabunda* による bull's-eye rot の防除に有効とする報告が国外にあるが、本研究では感受性低下菌が複数株検出され、圃場において安定した防除効果を得ることは期待できないと考えられた (表 6)。防除剤として有望視されたイミノクタジン酢酸塩液剤を用い、小黒斑が例年発生する横手市内の農家圃場及び果樹試験場場内圃場 (供試品種はいずれも‘ふじ’) において、自然発生条件下で防除試験を行った。薬剤散布区では 9 月上旬、中旬、下旬のいずれかに 1 回供試薬剤を散布し、小黒斑の発病果率を無散布区と比較した試験を 7 年間行った。その結果、いずれの試験においても、同剤散布区の発病果率は無散布区と比べて明らかに少なく、防除価は 43.6~100 を示し防除効果が認められた (表 7)。このうち 5 か年の試験結果を統合解析したところ、9 月に 1 回散布することによって小黒斑の発病果率を 8 割程度減らすことが可能であることが明らかとなった (図 3、4、5)。

2. まとめ

2011 年から秋田県において多発しているリンゴ果実の小黒斑の主因について、病原糸状菌 *P. vagabunda* Desm. によることを明らかにし、本菌をリンゴ黄腐病の新病原として追加すること、さらに同病の英名を bull's-eye rot とすることを日本植物病理学会に提案した。本病原菌による小黒斑の発生は、イミノクタジン酢酸塩液剤 1,500 倍液を 9 月に 1 回散布することによって防除できることが明らかとなった。リンゴに生じる小黒斑症状は種々の病原菌によって発生し、肉眼のみによる迅速な診断は容易ではないことから、本研究において開発した ARISA 法等の遺伝子検出法を利用して、圃場あるいは地域単位における正確な病害診断をもとに、より効率的な防除がなされることが強く期待される。

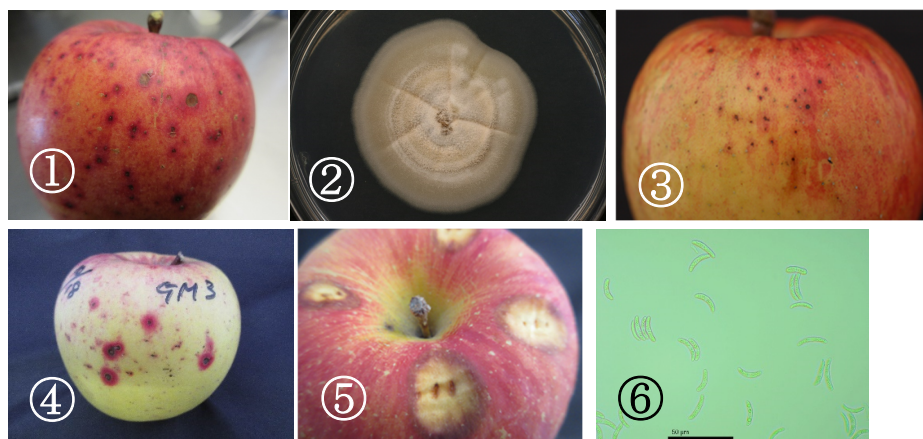


図 1. リンゴ果実に発生した小黒斑症状とその分離菌株及び接種により生じた病斑
①‘ふじ’に発生した小黒斑、②小黒斑から分離された白色糸状菌 (STD 株)、③‘ふじ’に STD 株を無傷接種して生じた小黒斑症状、④白色糸状菌 (GM3 株) を‘秋田 19 号’に無傷接種して生じた小黒斑、⑤‘ふじ’に STD 株を有傷接種して生じた進展性腐敗病斑、⑥白色糸状菌 (STD 株) が形成した分生子 (バーは 50µm)

表1. リンゴ果実に発生した小黑斑症状から分離された白色糸状菌と黄腐病菌及びbull's-eye rotの病原菌の分生子の形態

菌株名、病原菌名	大分生子 ^{a)}			小分生子 長径×短径(μm)	引用文献
	長径×短径 ^{b)} (μm)	隔壁数	形態的特徴		
STD ^{c)} (白色糸状菌)	14.3~22.8 (18.3) × 2.9~5.0 (4.1)	なし	ソーセージ型、紡錘形、湾曲	ND ^{d)}	
GM3 ^{c)} (白色糸状菌)	9.8~23.3 (14.9) × 2.3~5.5 (3.3)	なし	ソーセージ型、紡錘形、湾曲	ND ^{d)}	
<i>Gloeosporium</i> sp.	5~16 × 3~5	なし	長楕円形~紡錘形	ND ^{e)}	富樫(1950)
<i>Gloeosporium album</i> ^{e)}	13.8~28.0 (20.75) × 2.1~4.5 (2.86)	なし	円筒形、常に湾曲	ND ^{e)}	Talvia(1960)
<i>Neofabraea alba</i> ^{e)}	17~30 × 2.5~3.5	なし	円筒形~紡錘形、ソーセージ型、湾曲は強弱あり	15~18 × 0.5~1.0	Verkley (1999)
<i>N. alba</i> ^{e)}	17~25 × 3~5	なし	湾曲	ND ^{e)}	Garipeyら(2005)
<i>N. malicorticis</i>	16~31 × 4.5~6	なし、 後に1~3隔壁	長楕円形~紡錘形、 わずかに湾曲	6.5~10.0 × 2~2.5	Chenら(2016)
<i>N. perennans</i>	12~25 × 3~6	なし、 後に1~2隔壁	桿形またはやや湾曲	6~10 × 1.5~3	Verkley(1999)
<i>N. kienholzii</i>	12~17.5 × 2.5~3.5	なし、 後に1~2隔壁	桿形から楕円形、時に強弱の湾曲あり	2.5~6.5 × 1.5~2.5	Spottsら(2009)

a)形態的特徴は、各分離株をPDA平板培地状で20℃、12時間蛍光灯照射で7~14日培養して調べた。

b)括弧内は平均値

c)収穫時に観察されたリンゴ小黑斑から分離された単胞子分離株

e)*Phlyctema vagabunda*のシノニム

f)観察されなかった

g)記載がない

表2. 小黑斑から分離された白色糸状菌^{a)}とbull's-eye rotの病原菌4種との相同性比較

遺伝子領域	<i>P. vagabunda</i>	<i>N. malicorticis</i>	<i>N. perennans</i>	<i>N. kienholzii</i>
ITS	AF281369 ^{b)}	AF281379	AF281389	NR_155471
	100-99.59 ^{c)}	98.17-97.17	98.37-97.37	98.67-98.19
<i>tub2</i>	AF281452	KR859290	KM262219	AF281462
	99.84-95.91	92.49-90.55	91.76-89.84	89.81-88.08
LSU	KR859069	KR858876	KR858878	KR858873
	100.00	99.27-99.23	99.29-99.23	99.31-99.23

a)STD,13J2,15MO2,15NAG-1,2011-6,2012-1,GM3,0123-18,0123-2-31,0123-2-32,0123-2-3,0423-14及びAITC KH92の13菌株

b)相同性比較に用いた菌株のAccession No.

c)塩基配列の相同性(%)

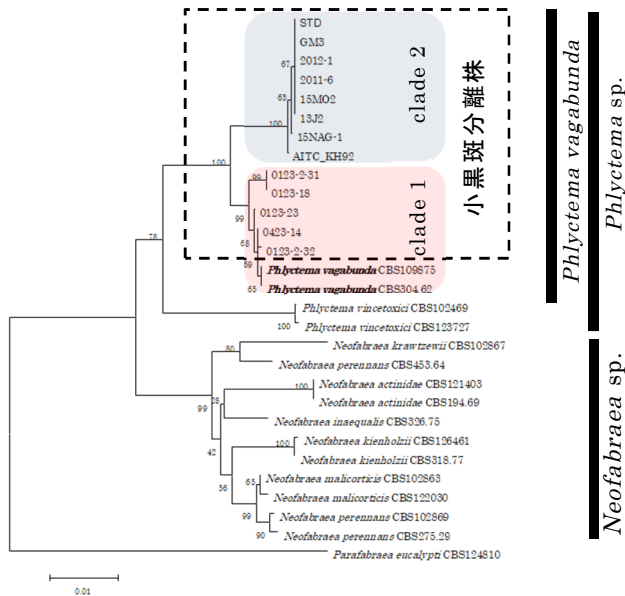


図2. 小黑斑から分離された白色糸状菌のITS、LSU及び*tub2*塩基配列解析に基づく近隣結合法による系統樹

表3. リンゴの各種空気伝染性病原菌^{a)}のARISAによるフラグメントサイズ

病原菌名	塩基数 ^{b)}	ARISAによるフラグメントサイズ		
		解析1	解析2	解析3
<i>Mycosphaerella pomii</i> (黒点病菌)	627	652	650	650
<i>Neonectria galligena</i> (かんしゅ病菌)	635	659	658	-
<i>Phlyctema vagabunda</i> (黄腐病菌)	639	667	-	668
<i>Diplocarpon mali</i> (褐斑病菌)	659	686	685	685
<i>Colletotrichum aenigma</i> (炭疽病菌)	664	690	689	689
<i>C. siamense</i> (炭疽病菌)	664	691	691	691
<i>C. fructicola</i> (炭疽病菌)	665	691	692	692
<i>Alternaria mali</i> (斑点落葉病菌)	661	692	-	-
<i>C. fioriniae</i> (炭疽病菌)	674	699	702	702
<i>Botryosphaeria dothidea</i> (輪紋病菌)	673	698	700	698
<i>C. nymphaeae</i> (炭疽病菌)	674	701	700	701
<i>Venturia inaequalis</i> (黒星病菌)	1029	1046	1042	1044
<i>B. kuwatsukai</i> (輪紋病菌)	1072	1095	1096	1097

a) 果実に小黑斑を生じる病原菌を対象とした。

b) シーケンス解析により求めた塩基数。

表4. リンゴ果実に発生した小黑斑の全組織あるいは果肉組織のARISA

ARISA解析 No.	果実採取地	果実数	小黑斑数	ピークが検出された小黑斑数	単一ピークの検出率 (%)	標準試料のフラグメントサイズ ^{a)}	検出率10%以上のピークのフラグメントサイズ (小黑斑数, %)	検出率10%未満のピークのフラグメントサイズ (検出された小黑斑数)
果肉組織 ^{b)}								
1	栄選果場	6	29	23	73.9	669	669-670 (87.0)	632, 660, 689, 693, 709, 713,
2	増田選果場	26	26	20	95.0	667	667-668 (85.0)	658, 1094, 1095, 1096
3	増田選果場	10	47	37	97.3	668	667-669 (62.2)	681 (2), 697 (4), 699, 761
3	醍醐選果場	10	47	40	100.0	668	668-669 (90.0)	649, 687, 701, 1095
4	秋田果樹試 ^{c)}	10	48	44	95.5	668	668-669 (90.9)	683, 687, 691, 697, 700, 749
全組織 ^{b)}								
5	秋田果樹試	26	44	42	83.3	667	667-668 (55) 700-701 (15)	658-659 (19) 691 (15) 1095
6	秋田果樹試	88	88	88	78.4	667	667-668 (36) 685-686 (18)	699-701 (28) 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	増田選果場	44	44	41	73.2	667	667-668 (90)	700-701 (17) 629, 658, 690, 691, 692, 722, 723, 1094, 1095 (2)
7	栄選果場	57	57	57	59.6	669	668-670 (83) 690-693 (19)	702 (19) 630 (11) 658, 659, 660, 664, 665, 674-675 (5), 698 (3), 705, 709, 853-854 (4), 1096
8	醍醐選果場	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) *P. vagabunda* の培養菌体から抽出したDNAを標準試料とした。

b) リンゴ果実の小黑斑部分の全組織 (果皮と果肉)、及び果肉組織のみを解析試料とした。

c) 同試験場の農業無散布圃場で生育したリンゴから採取した。

表5. リンゴ果実に発生した小黑斑の果肉組織からARISAで検出された各ピークに相当する増幅産物のシーケンス解析と相同性検索

解析 No.	試料番号	検出ピークのフラグメントサイズ (nts)	蛍光強度	検出ピークに相当する増幅産物の塩基数a) (nts)	塩基配列の相同性 (%)	E 値	最も相同性が高い糸状菌 (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>Dothideomycetes</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	E26Bと同じ
	M61B	667	2015	535	99.63	0.0	E26Bと同じ
	M64B	667	3454	535	99.63	0.0	E26Bと同じ
	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	KJA16と同じ
	MJ1	668	2209	480	99.79	0.0	<i>N. alba</i> (KJ396077.1)
	MM5	668	2062	406	99.75	0.0	MJ1と同じ
	MI1	686	2987	556	99.81	0.0	<i>D. mali</i> (AB609191.1)
	MI2	686	3581	528	99.60	0.0	MI1と同じ
	ML4	686	1582	490	100	0.0	MI1と同じ
	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	MM1と同じ
	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	Ascomycota sp. (HQ166343.1)
	DI1	668	2957	481	99.00	0.0	<i>P. vagabunda</i> (LC171685.1a)
	DL1	668	7023	535	100	0.0	KJA16と同じ
	DO1	668	2500	535	100	0.0	KJA16と同じ
	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	KJB10と同じ
	KJA7	687	2739	452	100	0.0	<i>Ma. coronaria</i> (MG984759.1)

a)シーケンス解析が可能であった部分の塩基数。

表6. チオファネートメチルに対する*P. vagabunda*の感受性^{a)}

菌株NO.	分離源 ^{b)}	採集地	チオファネートメチル濃度 (ppm) ^{c)}									
			0	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	100	
0123-18	小黑斑*	場内圃場	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0123-2-31	小黑斑*	場内圃場	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
0423-14	小黑斑*	場内圃場	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AITC KH54	小黑斑*	板柳町	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15NAG-1	小黑斑*	横手市	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2011-6	小黑斑*	横手市	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2012-8	小黑斑*	横手市	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
STD	小黑斑*	横手市	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AITC KH61	進展性腐敗病斑*	黒石市	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
AITC KH63	進展性腐敗病斑*	黒石市	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
KuF-16	進展性腐敗病斑*	場内圃場	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CHO-1	進展性腐敗病斑*	由利本荘市	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
25-1-9-L	進展性腐敗病斑**	場内圃場	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
25-1-9-C	進展性腐敗病斑**	場内圃場	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25-5-3-B	進展性腐敗病斑**	場内圃場	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

a)チオファネートメチル水和剤を所定濃度に調整したPDA平板培地に含菌寒天円盤を置床し、20°C暗黒下で5日間培養したのち、菌そう生育の有無を調査した。

b)*収穫後に分離された菌株、**収穫前の樹上果実から分離された菌株。

c)培地中のチオファネートメチルは高圧蒸気滅菌 (121°C、20分) 処理済み。

d)+培地上に菌糸伸長が見られた、-培地上に菌糸伸長が見られなかった。

表7. リンゴ果実における小黑斑の発生に対するイミノクタジン酢酸塩液剤の防除効果

試験年次	防除値 ^{a)}			無散布区の 発病果率(%)
	9月上旬散布	9月中旬散布	9月下旬散布	
2014	ND ^{b)}	ND	82.4	56.9
2015	85.6	78.4	91.9	62.0
2016	88.2	97.0	88.2	33.1
2017	92.5	67.9	59.4	21.2
2018	ND	ND	100	4.9
2019	43.6	95.1	49.0	20.4
2020	75.4	78.9	82.4	76.8

a)防除値=100- (薬剤散布区の発病果率/対照区の発病果率) × 100
b)試験区の設定なし

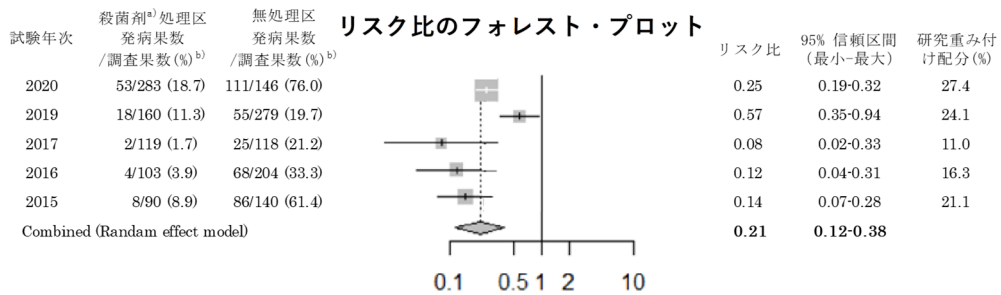


図3. 小黑斑に対するイミノクタジン酢酸塩液剤の防除効果 (9月上旬散布)

a)イミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍、b)括弧内は発病果率

Integrated evaluation : $p < 0.001$, Heterogeneity : $I^2 = 79\%$, $\tau^2 = 0.3210$, $p < 0.01$

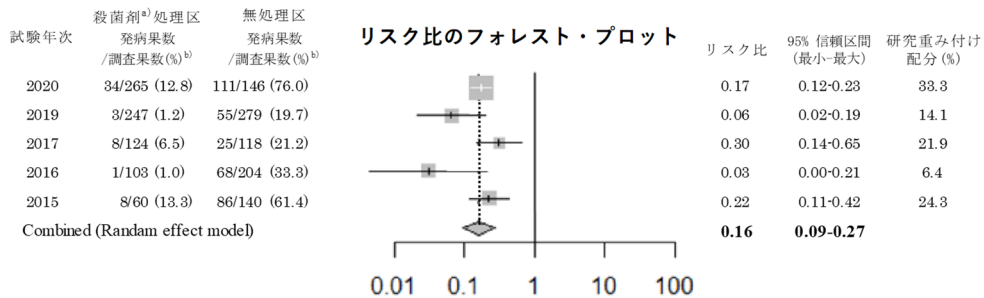


図4. 小黑斑に対するイミノクタジン酢酸塩液剤の防除効果 (9月中旬散布)

a)イミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍、b)括弧内は発病果率

Integrated evaluation : $p < 0.001$, Heterogeneity : $I^2 = 60\%$, $\tau^2 = 0.2039$, $p < 0.05$

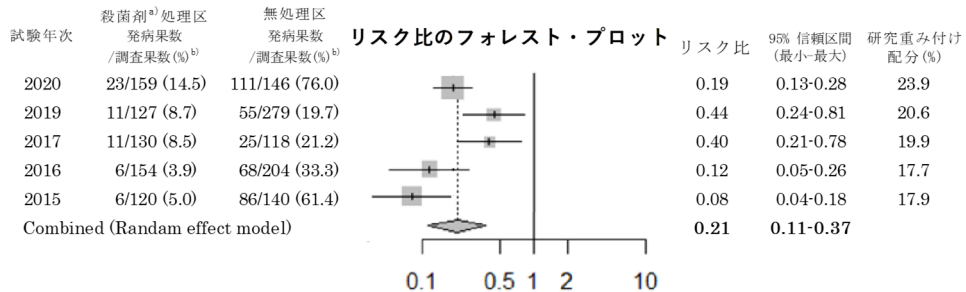


図5. 小黑斑に対するイミノクタジン酢酸塩液剤の防除効果 (9月下旬散布)

a)イミノクタジン酢酸塩液剤1,500倍、b)括弧内は発病果率

Integrated evaluation : $p < 0.001$, Heterogeneity : $I^2 = 77\%$, $\tau^2 = 0.3350$, $p < 0.01$

論文審査結果要旨

本論文は、2011年から秋田県横手市およびその周辺地域のリンゴ園で主力品種‘ふじ’を中心に発生した褐色から黒褐色の小黒斑が多数生じる障害果の原因究明とその防除対策に関する研究を中心として構成されており、研究成果の一部は日本植物病理学会報ならびに学術国際誌 (PhytoFrontiers) に掲載された。

この小黒斑症状は既報の果実病害や生理障害と酷似していたが、本症状から白色の糸状菌が高率で分離されることから、この白色糸状菌が本症状の原因であるものと仮説を立て様々な接種試験を行った。その結果、樹上果への無傷接種で原病徴が再現され、有傷接種では小黒斑ではなく腐敗性病斑となった。これら病斑からは接種した白色糸状菌が再分離されたことから、本病がこの白色糸状菌によって引き起こされることが明らかとなった。この白色糸状菌はその形態ならびに分子同定結果から *Phlyctema vagabunda* Desmazières と同定された。本菌を有傷接種での腐敗性病斑はリンゴ黄腐病及び諸外国の bull's-eye rot 酷似していることから、本菌を同病の新たな病原菌の一つとして追加すること、さらに同病の英名を bull's-eye rot とすることを日本植物病理学会に提案した。

一方、リンゴ果面には本病に類似する多様な斑点症状が発生し、肉眼のみで短時間にその原因を明らかにすることは容易ではない。そこで遺伝子検出法の一つである Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) を活用して、他の病原も含めた網羅的検出技術を構築した。さらに選果場および試験圃場から採集した小黒斑を呈した果実を用いて ARISA 解析を行ったところ、表皮を除いた果肉のみを解析対象とすることが望ましいことが明らかとなった。また、採集した果実の小黒斑症状からは *P. vagabunda* が効率的に検出されたほか、*Diplocarpon mali*、*Botryosphaeria dothidea*、*Neonectria* sp. 及び *Colletotrichum* spp. が検出され、ARISA による網羅的検出技術の有用性を明らかにすることができた。

本病による被害の軽減技術を開発するため、*in vitro* における薬剤スクリーニング試験及び病原菌接種実験系における効果判定試験を行い、イミノクタジン酢酸塩液剤が有望薬剤であることを見いだした。そこでイミノクタジン酢酸塩液剤を用いて圃場における薬剤効果試験を行い、9月に1回散布することで小黒斑の発病果率を8割程度減らすことができることを明らかにした。

博士学位論文発表は2月17日(木)9時40分からおよそ1時間にわたって行われた。発表は研究対象とした病気についての解説の後、病原菌の同定、網羅的検出技術の確立、有効薬剤の選定と圃場試験によるその有効性の評価について、順を追って専門外の参加者にもわかりやすいプレゼンテーションとなっていた。発表後の質疑応答についても的確でわかりやすい返答がなされていた。本論文でまとめられた研究成果は学術的な側面だけでなく、応用上、特にこれらを農業現場に速やかに普及し、本病を収束に導いたことは高く評価できる。

以上のことを踏まえ、博士の学位を授与するに妥当であると判定した。