

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

第1節 研究史

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

第2節 病 徴

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

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

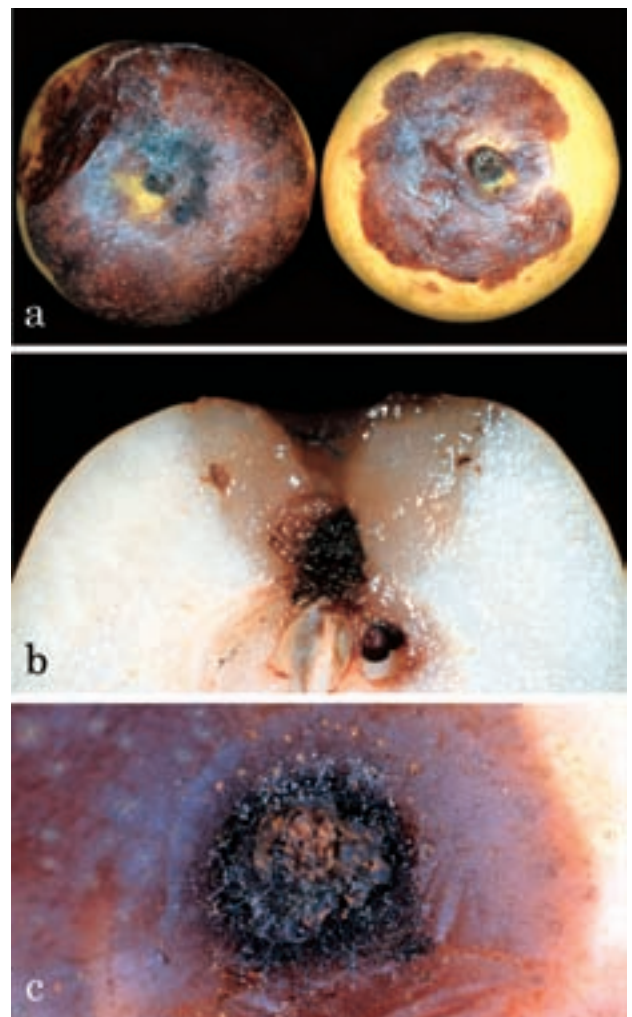


Fig. 20. Natural symptoms of *Rhizopus* rot of Japanese pear cv. Nijisseiki on mature fruits.

- Typical soft rot symptom with a brown lesion.
- Cross section of a lesion.
- Sporangia and sporangiophores produced on a lesion.

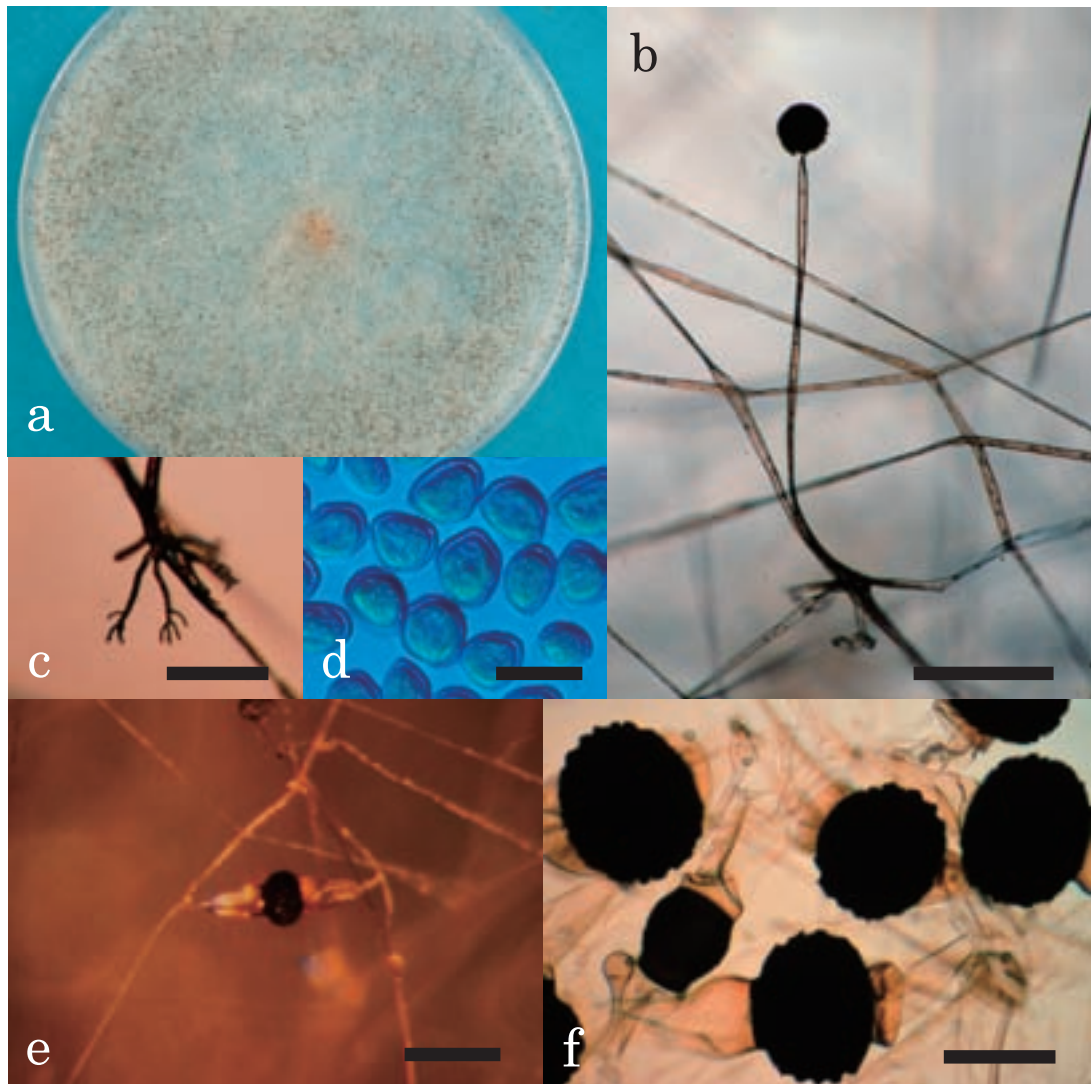


Fig. 21. Cultural and morphological characteristics of *Rhizopus* sp. Rh-9701s isolated from soft rotted Japanese pear fruit.

- a. A colony formed on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 7 days.
- b. A sporangium and a sporangiophore produced on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 500µm.
- c. A rhizoid produced on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 300µm.
- d. Sporangiospores produced on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 10µm.
- e. A zygospore formed between Rh-9701s and *R. stolonifer* var. *stolonifer* MAFF 305786 on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 200µm.
- f. Zygospores formed between Rh-9701s and *R. stolonifer* var. *stolonifer* MAFF 305786 on PDA at 25°C for 7 days. Scale bar, 100µm.

第3節 分離菌の同定

1. 罹病果実からの菌の分離

材料および方法

1997年9月に京都府熊野郡久美浜町(現在の京丹後市)の現地圃場で収穫された‘二十世紀’のうち、貯蔵中に発病した果実から菌の分離を行った。すなわち、罹病果実の病斑部と健全部の境界から5mm角の切片を切り出し、これらを70%エタノールに10秒間、次亜鉛塩素酸ナ

トリウム溶液(有効塩素濃度1%)に1分間浸漬した後、滅菌蒸留水で2回洗浄した。この切片をPDA平板培地に置床し、25°C(暗黒下)で3日間培養して分離菌株を得た。

結 果

罹病果実の病斑部からは白色～灰黒色の菌叢で気中菌糸に富み、やがて黒点状の胞子のうを多数形成する糸状菌が高率に分離された(Fig. 21a)。分離された糸状菌は

菌糸生育速度が速く、移植から数日で直径90mmのPDA平板培地の全面が菌糸で覆われた。分離した3菌株 (Rh-9701, Rh-9702およびRh-9703) の培養菌叢などの形態的特徴から、これらはいずれも*Rhizopus*属菌と考えられた。

2. 形態観察および菌の同定

材料および方法

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

結 果

単胞子分離菌株Rh-9701sはPDA培地上で空中を伸びる無隔壁のほふく菌糸と一定間隔に形成される仮根を形成しながら, 迅速に生育した (Figs. 21b-c)。仮根の反対側には複数の胞子のう柄が真直に伸長し, 分岐せず, 褐色で無隔壁, 幅10-20 μ m, 長さ600-3800 μ mであった (Fig. 21b)。胞子のうは胞子のう柄の先端部に形成され,

はじめ無色だが, 成熟すると黒色になり, 球~亜球形で平均直径124 μ mであった。胞子のうが成熟すると容易に破れ, 内部に形成された無数の胞子のう胞子が離脱分散した。胞子のう胞子は有角亜球~広楕円形, 褐色, 単細胞で表皮全体には細い稜線状隆起が並んでおり, 大きさ6-15(-20) \times 4-10(-14) μ mであった (Fig. 21d)。単胞子分離菌株Rh-9701sと*R. stolonifer* (Ehrenberg: Fries) Vuillemin var. *stolonifer*の保存菌株MAFF 305786との対峙培養で得られた接合胞子は, 菌糸間で対峙する接合支持柄の間に形成され, 黒色, 亜球~偏球形, 大いぼに覆われ, 直径96-152 μ mであった (Figs. 21e-f)。以上の形態等と既報 (Domsch and Gams, 1980; Schipper, 1984; 三浦, 1978) の*R. stolonifer* var. *stolonifer*の記載値との比較などから (Table 11), 本菌株を*R. stolonifer* var. *stolonifer*と同定した。

第4節 分離菌の病原性

材料および方法

第3節で得られた3菌株 (Rh-9701, Rh-9702およびRh-9703) を供試して分離菌の病原性を調査した。これらの3菌株を25°C (BLB照射下) で7日間培養し, 形成された分生子を 1.2×10^6 conidia/mlの濃度の胞子懸濁液

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

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

a) Zygospor^{a)} were formed between compatible isolates.

b) Domsch and Gams (1980).

c) Schipper (1984).

d) Miura (1978).

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

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

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

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

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

に調製し、接種源とした。接種試験は1998年6月5日、8月4日、9月8日の3回にわたって採取した露地栽培の‘ゴールド二十世紀’の幼果および成熟果実に有傷または無傷で分生子懸濁液を果面に滴下接種した。なお、有傷接種では、火炎滅菌した柄付針で試験供試果実の赤道面の果皮を4か所ずつ穿孔した部分に接種を行った。接種した果実は25℃で温室条件に置き、発病調査は接種2日後に行った。試験は1菌株あたり5果ずつ供試した。

結 果

6月5日に採取した交配後約50日の幼果に対する接種では、有傷および無傷のいずれの場合も発病は全く認められなかった。しかし、交配後約110日（収穫前約30日）の8月4日および収穫期の9月8日に採取した果実に対する接種では、いずれの菌株の場合も有傷接種した場合に自然発病に類似した病徴が再現され（Table 12）、形成された病斑部からは接種菌が高率に再分離された。本研究によって病原性が立証された*R. stolonifer* var. *stolonifer*によるナシ病害は本邦未記録であったため、病名をナシ黒かび病（英名：Rhizopus rot of Japanese pear）と提唱した（安田ら，1999a；安田ら，1999b）。

第5節 発生生態

1. 菌糸生育に及ぼす温度の影響

材料および方法

第3節で得られた3菌株（Rh-9701、Rh-9702およびRh-9703）を供試して分離菌のPDA培地上での菌糸生育に及ぼす温度の影響を調査した。これらの3菌株をPDA平板培地で25℃（BLB照射下）、30時間培養した後直径4mmのコルクボーラーで菌叢を打ち抜き、含菌

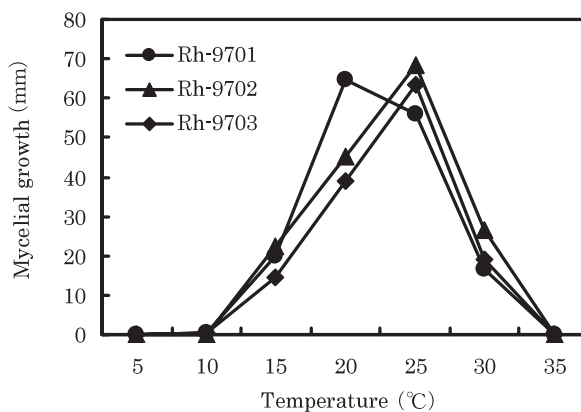


Fig. 22. Influence of temperature on mycelial growth of *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* isolated from diseased Japanese pear fruit. An agar disk (4mm diameter) from each isolate (Rh-9701, Rh-9702 and Rh-9703) grown on PDA at 25℃ under black light blue irradiation for 30 hours was transferred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

寒天ディスクとした。これを新しいPDA平板培地の中央に置床し、5、10、15、20、25、30、35℃で30時間培養した後、生育した菌叢の最大直径を計測した。

結 果

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

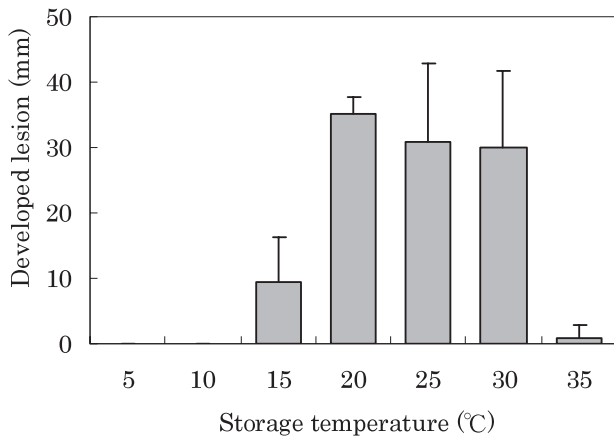


Fig. 23. Influence of storage temperature of harvested fruits to disease incidence of *Rhizopus rot*. Conidial suspension 1×10^6 conidia/ml of *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* Rh-9701 was inoculated to wounded region of healthy mature fruits of Japanese pear cv. Akibae. After incubation at various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

2. 発病に及ぼす果実の貯蔵温度の影響

材料および方法

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

結 果

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

3. 品種による発病差異

材料および方法

ニホンナシの主要品種‘二十世紀’、‘ゴールド二十世紀’、‘幸水’、‘豊水’および‘秋栄’を供試し、本病の

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

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

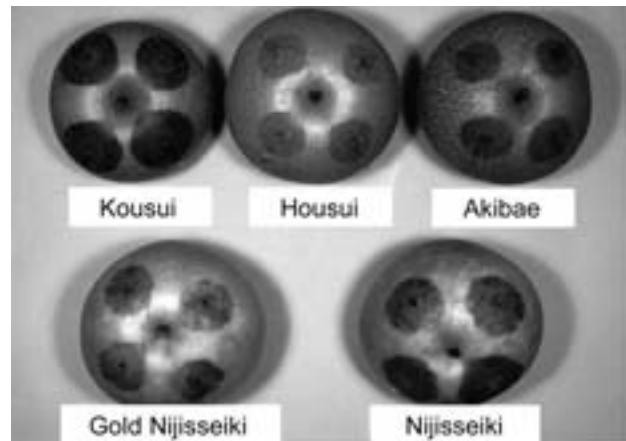


Fig. 24. Symptoms of harvested mature fruits on each cultivar of Japanese pear reproduced 2 days after inoculation with *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* Rh-9701.

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

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

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

結 果

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

第6節 考 察

ニホンナシに発生するポストハーベスト病害では、ナシ輪紋病やナシ灰星病が古くから重要病害とされており、これ以外にも内部褐変や水ナシ (みつ症) 果などの生理障害に加え、発生原因が不明であったボタ腐れ症と呼ばれる腐敗症状の突発的な発生が認められてきた。これらの障害は、生育期間中に発生する病害と異なり、収穫後または出荷後に発生する機会が多いため、発生状況の把握や原因の解析が困難な場合が多かった。1997年に京都府熊野郡久美浜町 (現在の京丹後市) で発生した‘二十世紀’ナシにおけるボタ腐れ症状は、分離菌の形態観察や分離菌接種による病原性の確認などにより、*R. stolonifer* var. *stolonifer*によって引き起こされる病害であることが立証されたため、本病をナシ黒かび病 (英名: *Rhizopus rot*) と命名した (安田ら, 1999a; 安田ら, 1999b)。

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

R. stolonifer var. *stolonifer*によって引き起こされる果樹類および果菜類のポストハーベスト病害は経済上重要な病害であり、オウトウ、イチジク、メロン、パパイヤ、モモ、イチゴなどの我が国の代表的な園芸作物で共通の問題となっている (田中, 1995)。本菌は宿主範囲が広く、また腐生性が強いので、普遍的に存在する糸状菌と考えられる。病原菌の胞子のう胞子は空中を飛散し、果実の表面に生じた傷口から侵入して、極めて短期間に軟化腐敗を引き起こすが、過熟果では傷口の有無に関係なく発病することがあり、出荷途中で発病果と接触した健全果

が出荷箱内で腐敗する事例も認められている。オウトウやモモにおける黒かび病の発生は、降雨直後に収穫した場合や輸送時の温湿度が高い場合に発病が多い傾向である (工藤・青木, 1990)。京都府においてナシ黒かび病 (新称) の発生を確認した1997年は‘二十世紀’ナシの収穫期にあたる9月中～下旬に降雨日が連続し、本病の発生に好適な条件であったものと考えられる。また、本病の発生を確認した京都府内の果樹園では完熟果実の出荷を栽培目標としており、罹病した収穫果実がやや過熟傾向であったことも発生要因の一因と考えられる。

本病の病原菌である*R. stolonifer* var. *stolonifer*はPDA培地上における菌糸生育が20-25℃で極めて旺盛であるが、10℃以下の低温条件下では菌糸生育は認められず、接種試験による果実発病もほとんど認められなかった。このため、ナシの収穫後に10℃以下で低温貯蔵すれば、物理的に本病の防除は可能である。しかし、現在の貯蔵施設や輸送手段を考慮すると出荷時の一貫した低温管理は現実的には困難である。一方、温度以外の重要な発病要因の一つに湿度が考えられるが、新田 (1997) は、同一病原によるイチジク黒かび病の場合、湿度と発病との間には有意な相関が認められ、湿度の上昇に伴って発病果率が高くなったことを報告している。ナシでも同様の傾向が認められるため、果実が降雨や結露などで長時間多湿に保たれるような貯蔵方法は避ける必要がある。

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

なお、果樹類の黒かび病に対する薬剤防除については、CNA (2,6-ジクロル-4-ニトロアニリン) 水和剤の防除効果が高いことが報告されている (松尾ら, 1970; 新田, 1997; Obenauf *et al.*, 1982; Ogawa *et al.*, 1963; Wells and Harvey, 1970) が、本剤は我が国では既に登録失効しており、新たな防除薬剤の実用化が急務となっている。新田 (1997) によると、イチジク黒かび病に対して、室内検定ではチオファネートメチル水和剤の効果を認めているが、露地栽培での圃場試験では本剤の防除効果は低い結果であった。このことから、イチジクにおいては有袋栽培や雨よけ栽培などの耕種的防除が防除対策の中心となっているが、降雨の影響の少ない施設栽培において

のみTPN剤、イプロジオン剤およびキャプタン剤などの薬剤防除の有効性を認めている（新田，1997）。ニホンナシの場合は、ほとんどが露地栽培であり、鳥取県内においては有袋栽培が積極的に取り入れられているため、本病の発生はほとんど問題になっていない。しかし、無袋栽培の場合や有袋栽培であっても収穫期に多雨で経

過した場合は本病の発生が懸念されるため、補完的な薬剤防除の検討は必要であると考え。ただし、ポストハーベスト病害を対象とした収穫期直前の薬剤防除は、果実の残留農薬など食品衛生上の観点から、本病防除のためには耕種的および物理的防除が、今後も中心となると考えられる。