Fusarium ananatum によるパイナップル小果腐敗病 (新称)

山城 麻希^{1*}・新崎千江美^{2*}・澤岨 哲也³・大城 篤⁴・
安次富 厚⁵・竹内 誠人³・諸見里知絵⁶・青木 孝之⁷

ABSTRACT

YAMASHIRO, M.^{1*}, ARASAKI, C.^{2*}, TAKUSHI, T.³, OOSHIRO, A.⁴, AJITOMI, A.⁵, TAKEUCHI, M.³, MOROMIZATO, C.⁶ and AOKI, T.⁷ (2019). Fruitlet core rot of pineapple (*Ananas comosus*) caused by *Fusarium ananatum* in Japan. Jpn. J. Phytopathol. 85: 25–29.

Fruitlet core rot of pineapple (*Ananas comosus*) has been found in Okinawa Prefecture, Japan since a few decades ago. A fungus frequently isolated from the diseased fruits was identified as *Fusarium ananatum* based on morphological and cultural characteristics and molecular analyses of EF-1 α , β -tubulin and histone H3 DNA sequences. The isolates reproduced the symptoms on pineapple fruits after inoculation using toothpicks and were reisolated from the inoculated symptomatic fruits. This is the first report of fruitlet core rot of pineapple caused by *F. ananatum* in Japan, and we propose the Japanese name “shoka-fuhai-byo” of pineapple.

(Received June 20, 2018; Accepted August 30, 2018)

Key words: fruitlet core rot, *Fusarium ananatum*, pineapple

パイナップル (パイナップル) [*Ananas comosus* (L.) Merr.] は、南アメリカ原産のパイナップル科に属する多年生草本植物で、熱帯および亜熱帯地域の世界各地で広く栽培されている (大東, 1997)。我が国で亜熱帯地域に位置する沖縄県では、沖縄本島北部や八重山地域において栽培されており、2015 年の収穫量が 7660 トンであることから、本県で栽培される果樹のなかで生産量が最も多い重要品目である (沖縄県農林水産部園芸振興課, 2018)。その一方で、数十年前より本県で栽培されるパイナップルの果肉内部の一部

が茶色～黒色の腐敗を呈する症状が発生し、商品価値が低下するため、生産現場では‘黒目 (症)’と呼ばれ問題となっている (沖縄県植物防疫協会, 2010)。本症状は収穫・出荷時に外観から発病の有無を判別できず、消費者が購入後、果実を切って初めて発覚するため、クレームの対象となり産地ブランドのイメージ低下をもたらす農家の経済的損失にもつながる。そのため、早急な原因解明が求められている。本症状は、海外で報告されている *Penicillium funiculosum* Thom, *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (Rohrbach

¹ 沖縄県農業研究センター (〒 901-0336 沖縄県糸満市真壁 820) Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, 820 Makabe, Itoman, Okinawa 901-0336, Japan

² 沖縄県南部農業改良普及センター (〒 901-1115 沖縄県島尻郡南風原町山川 517) Okinawa Prefectural Nanbu Agricultural Development Center, 517 Yamakawa, Haeburu, Okinawa 901-1115, Japan

³ 沖縄県農業研究センター名護支所 (〒 905-0012 沖縄県名護市名護 4605-3) Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Nago Branch, 4605-3 Nago, Nago, Okinawa 905-0012, Japan

⁴ 沖縄県八重山農林水産振興センター (〒 907-0002 沖縄県石垣市真栄里 438-1) Okinawa Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Yaeyama Agriculture, Forestry and Fisheries Promotion Center, 438-1 Maezato, Ishigaki, Okinawa 907-0002, Japan

⁵ 沖縄県農業研究センター石垣支所 (〒 907-0003 沖縄県石垣市平得地底原 1178-6) Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Ishigaki Branch, 1178-6 Hirae-chisokobaru, Ishigaki, Okinawa 907-0003, Japan

⁶ 沖縄県立農業大学校 (〒 905-0019 沖縄県名護市大北 1-15-9) Okinawa Prefectural Agricultural College, 1-15-9 Ookita, Nago, Okinawa 905-0019, Japan

⁷ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源センター (〒 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2) Genetic Resources Center, National Agriculture and Food Research Organization, Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

* Corresponding authors (E-mail: yamasmki@pref.okinawa.lg.jp, arasakic@pref.okinawa.lg.jp)

本研究で明らかになった塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した (それぞれの登録番号は、菌株 KF1 の EF-1 α 領域: LC386033, β -tubulin 領域: LC386035, Histone H3 領域: LC386037, 菌株 KF2 の EF-1 α 領域: LC386034, β -tubulin 領域: LC386036, Histone H3 領域: LC386038)。

et al., 2003) および *F. ananatum* A. Jacobs, Marasas & van Wyk, sp. nov. (Gu *et al.*, 2015; Jacobs *et al.*, 2010) による Fruitlet core rot (小果腐敗症状) に酷似しており, 本県においても発病果の病斑からは同一性状の糸状菌が分離されていた。しかし, 分離菌の果実内部への有効な接種方法が確立されておらず, 症状の再現ができていなかったため, これまで病原菌の特定には至っていない。そこで, 今回病斑から高率に分離された *Fusarium* 属菌について, 爪楊枝を用いた有傷接種による果実内部の病徴再現を確認するとともに, 形態的特徴および複数の遺伝子領域の塩基配列に基づく同定を行った結果, 本病害は我が国で初確認の病原菌によって引き起こされることが明らかとなったので報告する。なお, 本報告の一部は, 平成 27 年度日本植物病理学会大会において口頭発表した (新崎ら, 2015)。

本症状は収穫当日の果実を切開した時に, 果実内部, 特に小果の花腔壁および子房が褐色化し, 楕円形で水浸状の病斑が確認される。病斑中央部は褐色～茶色で, その周辺は水浸状であった (Fig. 1a)。外観からは症状が観察されな

いので発病果実と健全果実を識別することは極めて困難である。2013 年, 沖縄県農業研究センター名護支所 (沖縄県名護市) の栽培圃場で, 異なる生育ステージにおける発病調査を行ったところ, 出蕾期および開花期の未熟な幼果では発病は見られず, 収穫期の成熟した果実内部でのみ病斑が観察された。収穫期の発病果率は 72.7% で, 発病果実 1 果のうち病斑数は平均 2.4 個であった。病斑の大きさは直径数 mm 程度のものから, 長さ 2~3 cm × 幅 1~2 cm の楕円形のものが確認された。また, 本県で栽培される主要 3 品種の発病率は, ‘ソフトタッチ’ および ‘ボゴール’ でともに 20%, ‘N67-10’ で 7.8% であった。この結果は, 同一条件下で接種試験を行ったものではなく沖縄県農業研究センター名護支所圃場内での自然発病の結果であり, 条件はほぼ一致していると判断されることから, 発病率の差は品種間の感受性差異に基づく可能性が考えられる。

2012 年 8 月, 沖縄県名護市の 1 圃場で収穫された品種 ‘ソフトタッチ’ の果実を切開し, その病斑から菌の分離を行った。罹病部と健全部の境界を含めた 2 mm 角の切片を切り

Fig. 1. Symptoms of fruitlet core rot of pineapple fruit and morphology of pathogen, *Fusarium ananatum*.

a: Natural symptoms on fruit. b: Symptoms on fruit after inoculation with *F. ananatum* conidia grown on synthetic low nutrient agar (SNA) using sterilized toothpicks (arrowheads) (top: control, middle: isolate KF1, below: isolate KF2). c: Aerial conidia on SNA (scale bar = 100 μm). d: Microconidia in false heads (scale bar = 20 μm). e: Macroconidia on a conidiophore (scale bar = 20 μm). f: Microconidia (left) and macroconidia (right) of isolate KF1 (scale bar = 20 μm). g, h: Colonies of isolate KF1 (g) and KF2 (h) grown on potato dextrose agar at 25°C in the dark for 7 days.

取り、70%エタノールおよび0.1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で表面殺菌した。切片は、滅菌水で2回洗浄し、滅菌濾紙上で表面の水分を除去した後、300 ppm クロラムフェニコールを添加した素寒天培地に置床し、25°Cの暗黒条件下で7日間培養した。培養後の切片から伸長した単一の菌糸先端部を切り取り、ジャガイモ・ブドウ糖寒天平板培地(PDA)に移植した。その後、暗黒下25°Cで5日間培養し、形成された分生子を用いて単胞子分離を行った。その結果、同一果実の異なる病斑から菌叢形状の異なる2種類の菌株が得られた。これらをKF1およびKF2株とし、以降の同定および病原性の試験に供試した。

分離2菌株の病原性は、藤永ら(2002)の方法を一部改変し爪楊枝を用いた果実(‘ソフトタッチ’)への有傷接種で確認した。すなわち、合成低栄養寒天培地(Synthetic low nutrient agar, SNA)上25°C、7日間培養した分離菌株の菌糸および分生子を、長さ約1 cmに切断した滅菌爪楊枝の先端でかき取り、直ちにその爪楊枝全体を果実の小果間に挿入し、接種とした。各試験区3果を供試し、1果あたり果実上部、中央部、下部の3カ所に接種した。接種果実は、25°C、暗室内で7日間静置した後切開し、接種部位の爪楊枝周辺に形成される病斑の有無を確認した。その結果、KF1およびKF2株を接種した全ての果実において、爪楊枝を中心に腐敗し、褐色～茶色を呈する水浸状の病斑が観察された。これらの症状は原病徴とほぼ一致し(Fig. 1b)、病斑からは接種菌と同一性状の菌が再分離された。一方、滅菌爪楊枝のみを挿入した対照区では病斑は認められなかった。このことから、分離2菌株は本病害の病原であることが明らかになった。

分離2菌株を顕微鏡下で観察すると、2種類の分生子が認められ、その形状や大きさから*Fusarium*属菌の小型分生子および大型分生子と考えられた。両菌株の形態的特徴を明らかにするため、対照菌株として*F. ananatum* [NRRL53131 (Agricultural Research Service Culture Collection at the National Center for Agricultural Utilization Research, USDA/ARS, Peoria,

IL, USA) = MRC8165 ex-type, タイプ標本由来株 (Culture collection of the Medical Research Council, Tygerberg, Cape Town, South Africa), NRRL22945] および*F. guttiforme* (NRRL25295 = MRC7539 ex-type, タイプ標本由来株)とともに、SNA培地で7日間培養後、Jacobs *et al.* (2010) および駒田ら(2011)を参考に、分生子形成構造および厚壁胞子の有無を光学顕微鏡で観察した。なお、小型分生子は暗黒条件下で、大型分生子はBLB照射下で形成させたものを用いた。分離2菌株の小型分生子は、培地表面上や培地表面から気中に立ち上がった菌糸から生じた分生子柄上に形成された。分生子柄は直立し、非分岐あるいは分岐した。分生子形成細胞はモノー、あるいはポリフィアライドで、フィアロ型、擬頭状に分生子を形成した。小型分生子は無色、倒卵、楕円形～長楕円形で、0から1隔壁であった(Fig. 1c, d, e)。0隔壁の小型分生子の大きさは、KF1株で $5.8\sim19.5\times2.5\sim4.3\text{ }\mu\text{m}$ 、KF2株で $5.8\sim16.5\times2.5\sim4.3\text{ }\mu\text{m}$ であった(Table 1)。大型分生子は培地表面上や培地中の菌糸から生じた分生子柄上に形成された。分生子柄は直立、非分岐あるいは分岐した。分生子形成細胞はモノー、あるいはポリフィアライドで、フィアロ型で分生子を形成した。大型分生子は基部に柄足細胞を有し、無色、鎌形で、3から5隔壁であった(Fig. 1e)。3隔壁の大型分生子の大きさは、KF1株で $27.4\sim52.4\times2.9\sim4.7\text{ }\mu\text{m}$ 、KF2株で $26.9\sim54.7\times2.8\sim4.6\text{ }\mu\text{m}$ であった(Table 1)。*F. ananatum*が含まれる*F. fujikuroi*種複合体の菌群の中では両菌ともSNAおよびPDA培養下では分生子座を形成しないことが特徴である。また、厚壁胞子も形成しなかった。分離菌の生育温度を調査するために、PDA平板培地で、25°Cの暗黒条件下で5日間前培養した分離菌の菌叢周縁部を直径5 mmのコルクボーラーで打ち抜き、得られた含菌寒天片を新たなPDA平板培地に置床し、5～40°C(5°C間隔)の各温度帯で7日間培養後の菌叢直径を測定した。その結果、両菌株とも白色の綿毛状の菌叢を示し、生育適温は25°Cであったが、菌叢生育速度がKF1株で12 mm/day、KF2株で3～4 mm/dayと異なっていた(Fig. 1f, g)。これら

Table 1. Morphological comparison of Okinawa isolates from the present study with those of *F. guttiforme* and *F. ananatum*

Structure	Trait	<i>F. guttiforme</i>	<i>F. ananatum</i>		Okinawa isolates	
		NRRL25295 ex-type	NRRL53131 ex-type	NRRL22945	KF1	KF2
Microconidia (0-septate)	Size (μm)	4.5–15.0 $\times$ 2.3–3.5	5.0–19.8 $\times$ 2.5–4.5	5.8–20.8 $\times$ 2.5–4.5	5.8–19.5 $\times$ 2.5–4.3	5.8–16.5 $\times$ 2.5–4.3
	Shape	falcate	falcate	falcate	falcate	falcate
Macroconidia (3-septate)	Size (μm)	30.5–57.0 $\times$ 3.0–4.8	33.5–67.3 $\times$ 2.8–4.8	34.3–47.8 $\times$ 2.8–4.3	27.4–52.4 $\times$ 2.9–4.7	26.9–54.7 $\times$ 2.8–4.6
	Shape	falcate	falcate	falcate	falcate	falcate
Sporodochia		absent	absent	absent	absent	absent
Chlamydospores		absent	absent	absent	absent	absent

Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on the combined data sets for EF-1α and β-tubulin sequences from *Fusarium* species. Values at branches indicate percentage bootstrap support for 1000 resamplings. *Fusarium oxysporum* NRRL22902 was used as the outgroup.

の形態および培養特性は *F. ananatum* NRRL53131 ex-type と NRRL22945 ならびに *F. guttiiforme* NRRL25295 ex-type のいずれにも類似しており、形態では種の絞り込みは困難であった。

そこで、分離 2 菌株の種を特定するため、Jacobs *et al.* (2010) の方法に準じて Translation elongation factor 1-α (EF-1α) 遺伝子、β-tubulin 遺伝子および Histone H3 遺伝子領域を、それぞれプライマー EF1 と EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998)、プライマー T1 と T22 (O'Donnell *et al.*, 2000) およびプライマー H3-1a と H3-1b (Glass and Donaldson, 1995) で増幅した。β-tubulin 遺伝子は上記のプライマー以外に、内部プライマーとして SP1 (5'-GCCAGACTAGTTGTG-3') と SP2 (5'-GTACCATGGACGCCGTTC-3') を新規に作製し解析に用いた。*F. ananatum* および *F. guttiiforme* を含む近縁菌種の各遺伝子領域の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースより取得した。それらの塩基配列と本分離 2 菌株の塩基配列は、ソフトウェア Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) でアライメントを行い、MEGA version 7 (Kumar *et al.*, 2016) を用いて、近隣結合法により系統解析を行った。分離 2 菌株と *Fusarium* 属 12 種 13 菌株とアウトグループ 1 菌株の合計 16 菌株のデータを用いた EF-1α と β-tubulin の 2 領域の塩基配列データによる統合解析の結果、KF1 および KF2 株は *F. guttiiforme* のタイプ標本由来株 (NRRL25295) とは異なり、*F. ananatum* のタイプ標本由来株 (NRRL53131) および関連対照株 (NRRL22945) と同一のクレードに属す

ることが明らかとなった (Fig. 2)。Histone H3 領域についても、KF1 と KF2 株は *F. guttiiforme* のタイプ標本由来株 (NRRL25295) とは分かれ、*F. ananatum* のタイプ標本由来株 (NRRL53131) および関連対照株 (NRRL22945) と同一のクレードにまとまった (データ略)。

以上の形態的特徴、培養特性および各遺伝子領域の塩基配列に基づく分子系統解析による既知種との比較により、分離 2 菌株を *Fusarium ananatum* と同定した。なお、本研究で明らかにした DNA 塩基配列は DDBJ に登録・公開し、両分離株とも農業生物資源データベースに MAFF245791 (= KF1 株) および MAFF245792 (= KF2 株) として寄託した。

以上のことから、パイナップル果実内部の腐敗症状は、*F. ananatum* による病害であることが明らかになった。我が国では本菌によるパイナップル病害は未報告であることから、新病害としてパイナップル小果腐敗病 (英名: Fruitlet core rot) と呼ぶことを提案する。

謝 辞

本研究を行うにあたり、分離菌株の接種方法についてご助言いただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源センター 佐藤豊三博士に感謝の意を表す。本研究は沖縄振興特別推進交付金「気候変動対応型果樹農業技術開発事業」の一環として行われたものである。

引用文献

- 新崎千江美・澤岨哲也・大城 篤・竹内誠人・諸見里知絵・青木孝之 (2015). *Fusarium ananatum* によるパイナップル小果腐敗病 (新称). 日植病報 81: 266. (講要)
- 大東 宏 (1997). パイナップルー (熱帯農業シリーズ/熱帯作物要覧 No. 23). pp. 1-21, 社団法人国際農林業協力協会, 東京.
- 藤永真史・清水時哉・小木曾秀紀・齋藤英毅・小林正信・佐藤豊三 (2002). スイカ炭腐病 (新称) とその病原菌, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. の数種植物に対する病原性. 日植病報 68: 148-152.
- Glass, N.L. and Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1323-1330.
- Gu, H., Zhan, R.L., Zhang, L.B., Gong, D.Q. and Jia, Z.W. (2015). First report of *Fusarium ananatum* causing pineapple fruitlet core rot in China. Plant Dis. 99: 1653.
- Jacobs, A., Van Wyk, P.S., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. and Coutinho, T.A. (2010). *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. Fungal Biol. 114: 515-527.
- 駒田 旦・小川 奎・青木孝之 (2011). フザリウムー分類と生態・防除一. pp. 35-41, 全国農村教育協会, 東京.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. and Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95: 2044-2049.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T. and Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. Mycoscience 41: 61-78.
- 沖縄県農林水産部園芸振興課 (2018). 沖縄の農林水産業 (沖縄県農林水産部農林水産総務課編). pp. 25-26, 沖縄県農林水産部農林水産総務課, 沖縄.
- 沖縄県植物防疫協会 (2010). 写真による農作物病害虫診断ハンドブック増補版. pp. 228, 沖縄県植物防疫協会, 沖縄.
- Rohrbach, K.G. and Schmitt, D. (2003). Diseases of Pineapple. In Diseases of Tropical Fruit Crops (Ploetz, R.C., eds.). pp. 443-464, CABI Publishing, Oxford.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.