温州ミカンの黒点病に関する研究

第2報 完全時代の存在と子のう胞子の病原力について

牛 山 欽 司*

Kinji USHIYAMA*: Studies on Citrus Melanose Disease of Satsuma Orange
II. Perfect stage of the causal fungus, *Diaporthe citri* (Fawc.) Wolf
and inoculations with ascospores

Abstract

In October 1969, the perithecia of citrus melanose fungus, *Diaporthe citri* (Fawc.) Wolf, were found in the orchard of Satsuma orange in Kanagawa Prefecture. The author conducted experiments to know the time and environmental conditions on perithecia formation, and also to ascertain the virulence of ascospores against citrus fruits comparing with that of pycnosporos. Results obtained are summarized as follows:

Perithecia of the fungus were found mainly on dead twigs left on the ground and also in some cases on the dead branches or twigs remained on trees. Its morphological characters were accordant with those of *Diaporthe citri* (Fawc.) Wolf and other workers. The fungus isolated from ascospores produced Phomopsis-type pycnosporos on potato dextrose agar and citrus twigs. The perithecia were formed on the twigs of Satsuma orange inoculated with pycnosporos. The melanose symptoms of the fruits were induced by the inoculation with ascospores of the fungus. On dead and pruned branches which had been left on the ground of citrus orchard in February to March, immature perithecia were formed in August and September. They became matured in September and October of the same year. In laboratory tests, perithecia of the fungus were formed on the inoculated dead twigs only under high relative humidity over 95%.

Symptoms on fruits appeared 6~11 days after the inoculation with ascospores. In the early stage of fruit development, they were quite similar to those caused by pycnosporos, however in September to October, some differences were recognized: that is melanose spots caused by the former were more circular and slightly larger. When the similar amount of ascospores and pycnosporos were inoculated on citrus fruits, the symptoms were severe in the former. From these results, it may be concluded that the virulence of ascospores on citrus fruits is higher than that of pycnosporos.

(Received, July 14, 1972)

緒 言

カンキツ黒点病菌 (*Phomopsis citri* Fawcett) について Wolf¹⁾ は、落下しているライムやグレープフルーツの枯枝上で完全時代を発見し、*Diaporthe citri* (Fawcett) Wolf としている。わが国では、1932年に福岡¹⁾ が各種カンキツの軸腐病果から分離した病原菌

を、枯枝上に混合培養して子のう殻を形成させたことを報告しているが、ミカン園内での子のう殻の存在については明らかにしていない。大和^{12,14)} は、1968年に徳島県のミカン園内の枯枝上に子のう殻の形成を認め、筆者もその翌年神奈川県内のミカン園にかなりの頻度で出現することを認めた。

黒点病の発生生態に関するこれまでの研究は、すべ

* 神奈川県園芸試験場根府川分場 Citrus Branch, Kanagawa Horticultural Experiment Station, Odawara, Japan.

て不完全時代の柄子殻や柄胞子について行なわれてきたが、前報における柄胞子の感染と発病時期に関する実験⁹⁾と対比し、子のう胞子による発病について2, 3の実験を行なったのでここに取りまとめて報告する。

本調査にあたり、種々助言いただいた徳島県果樹試験場大和浩国氏、本稿を記すにあたり種々御教示をいただいた農林省園芸試験場環境部長北島博博士に深謝する。

完 全 時 代

材料および方法 供試材料は1969年10～11月に小田原市根府川、同市石橋、湯河原町鍛冶屋および同町宮下の樹齢45～60年生のミカン園における樹上および地表面の比較的古い枯枝に形成されていた子のう殻である。子のう殻は枯枝の樹皮をナイフで削り、子のう殻内腔の直径を測定し、子のうおよび子のう胞子は摘出して大きさを測定し、既報の記載値と比較した。

実験結果 枯枝の表皮を削ると木質部に多くの子のう殻が見られる。柄子殻はこれとことなり皮層部に形成される。成熟した子のう殻内部には、乳白色の光沢

のある子のうおよび子のう胞子が充満し、古くなったものは周囲に黒い殻壁を残し、内部は空になる。子のう殻の形状は球状～偏球状で、皮層部を通して口孔が伸び、大きき270～520 μm 、Wolf¹¹⁾の測定値とは異なるが、福岡¹⁾、大和^{12, 14)}らの報告値とはほぼ一致した。子のうはこん棒状で6～8個の子のう胞子を内蔵し、長さ41～54 μm 。子のう胞子は無色2胞で、中央部がくびれ、大小4個の顆粒を含み、大ききは10～17 $\times$ 3.7～4.9 μm 、これらはすべて既報^{1, 11, 12)}の値とほぼ一致した(第1表)。子のう胞子をジャガイモ寒天培地に平板培養すると、柄子殻が形成され *Phomopsis* 型の柄胞子を生じた。また、子のう殻の切片をミカン果実に接種したところ、黒点病の病斑を生じた。以上のことから、本菌が黒点病菌の完全時代 *Diaporthe citri* (Fawc.) Wolf であることを認めた。

子のう殻は樹齢30年以上の比較的老木の多い古いミカン園で、地表面に落下した太い枯枝に多く形成され、樹上の枯枝にも認められた。温州ミカン以外にナツミカンや「日向夏」の枯枝にも形成されていた。

第1表 *Diaporthe citri* の子のう殻および子のう胞子の大きさ (1969)

採 取 場 所	カンキツの種類	子のう殻 (内径) (μm)	子のう (長さ) (μm)	子のう胞子 (長さ $\times$ 幅) (μm)
小田原市根府川	温州ミカン	419.5 $\pm$ 2.2 (330～520)	51.0 $\pm$ 1.95 (41～54)	12.9 $\pm$ 0.86 $\times$ 4.5 $\pm$ 0.02 (10～17 $\times$ 3.7～4.9)
湯河原町鍛冶屋	温州ミカン	399.0 $\pm$ 2.3 (300～450)	51.2 $\pm$ 1.36 (44～54)	12.6 $\pm$ 0.37 $\times$ 4.1 $\pm$ 0.17 (11～15 $\times$ 3.7～4.4)
湯河原町宮下	ナツミカン	386.5 $\pm$ 2.4 (270～510)	52.7 $\pm$ 0.99 (46～54)	11.8 $\pm$ 0.23 $\times$ 4.4 $\pm$ 0.18 (10～13 $\times$ 3.7～4.9)

子のう殻の形成、成熟時期と これに関与する条件

材料および方法 子のう殻の成熟時期：1970年8～12月に、神奈川県内数個所のミカン園内の地表面の枯枝に形成された、子のう殻について推定した。子のう胞子の形成量の多い子のう殻を成熟したものとした。

子のう殻の形成状況：1971年1月18日に太さ1.0～1.5 cmの温州ミカンの枝を長さ約15 cmに切り、同日、3月23日、6月16日にそれぞれ3本ずつを屋外の地表面、地表面から高さ15 cmおよび30 cmのところにおいた。さらにそれらの上に柄子殻および子のう殻を形成している枝を削って接種を行ない、7月31日、9月10日、10月12日に観察した。また、3月に枯死した枝をミカン園内の地表面において、9月13日、9

月28日、10月13日に同様の観察をした。

子のう殻の形成と成熟におよぼす湿度の影響：高圧滅菌したミカンの枝に、病原菌を1970年2月に接種して柄子殻を形成させたものについて調査した。この枝を6月から11月の間屋外につるして放置し、のち子のう殻の形成がないことを確かめ、所定の塩類飽和溶液で空気湿度を調節した容器に入れ、25℃で54日、87日、226日後に子のう殻の形成を調査した。また、ミカン園内に放置されていた当年のせん定枝で、小さい未熟な子のう殻の形成が認められた太さ1.0～1.5 cmの枝を、1970年10月5日に前記と同様に空気湿度を調節した容器に入れ、11月26日まで52日間25℃に保ち、子のう殻の成熟程度を調査した。

実験結果 子のう殻の成熟時期：ミカン園内の落下枝における子のう殻は、1970年8月13日には未熟であったが、9月8日、10月5日にはかなり成熟して

おり、11月17日、12月10日には完熟した。1971年3月に枯れた枝では、9月13日に未熟のものが、9月28日に成熟子のう胞子が多数形成され、10月13日には完熟した。両年ともほ場内で2～3月に枯れた枝には、5～6カ月後の8～9月に子のう殻の形成が認められた。

子のう殻の形成状況：温州ミカンのせん除した枝を1月、3月および6月に屋外の地表面、地上15、30 cmのところにおき、黒点病菌を接種したときの子のう殻の形成状況を第2表に示した。1月18日と3月23日に地表面においた枝には、7月31日に未熟な子のう殻が認められ、前者は10月12日に完熟したが、地表面から15 cmおよび30 cm離れたところにおいた枝では未熟であった。6月16日に地表面においた枝には9月10日子のう殻が形成された。地表面においた枝の子のう殻の形成および成熟は、地上15、30 cmにおいたものよりも概して早かった。

第2表 ミカン園内においたせん除枝上の *Diaporthe citri* 子のう殻の形成とその成熟 (1971)

時 期	高 さ (cm)	子のう殻を調査した時期		
		7月31日	9月10日	10月12日
	0 ^{a)}	± ^{b)} IP ^{c)}	++ ^{b)} IP ^{c)}	++ ^{b)} P ^{c)}
1月18日	15	—	± IP	+ IP
	30	—	+ IP	++ IP
3月23日	0	± IP	± IP	+ IP
	15	—	—	—
	30	—	± IP	+ IP
6月16日	0	—	+ IP	++ IP
	15	—	++ IP	++ IP
	30	—	—	+ IP

a) 地 表 面

b) 子のう殻の形成程度 —：ナシ、±：わずかに形成、+：点在、++：形成多

c) 子のう殻の成熟程度 IP：未熟、P：完熟

子のう殻の形成と成熟におよぼす湿度の影響：柄子殻を形成させた枝を1年間屋外におき、子のう殻が形成されなかったものを25Cの異なる湿度の下において、子のう殻形成までの期間を調査した。その結果は、湿度100%のとき226日目に子のう殻は完熟して子のう胞子が充満していた。98%以上のとき54日目に、95%のときには87日目に小さい未熟の子のう殻が認められた。さらに、未熟な子のう殻を形成してい

た枝を25Cで52日間各湿度に保ったとき、92%以上の湿度で子のう殻は成熟したが、完熟したものは98%以上のときに見られた。

子のう胞子による果実の発病と温度

材料および方法 子のう胞子による果実の接種試験は、柄胞子による接種と比較して検討した。接種源とした子のう胞子は、温州ミカン園で採取した枯枝上の子のう殻を木綿針で摘出し、殺菌水に懸濁したものである。接種源とした柄胞子は、子のう胞子からの分離

第3表 *D. citri* の子のう胞子、柄胞子による温州ミカン果実の発病
(胞子濃度がほぼ等しい場合)

接種源 種類と 濃 度	接種条件		発病日数 ^{c)}	8日目における	
	温度 (C)	時間 ^{b)} (hr)		発病程度	発病個 所数 ^{d)}
子のう 胞 子 92個 ^{a)}	20	8	発病なし	—	0
		16	5	—～±	1
		24	2	++	6
	25	8	7	—～+	1
		16	4	+～++	6
		24	2	++	6
	27	8	7	—～+	1
		16	4	+～++	6
		24	2	++	6
	30	8	7	—～±	1
		16	2	+～++	6
		24	1	++	6
柄胞子 105個 ^{a)}	20	8	発病なし	—	0
		16	"	—	0
		24	"	—	0
	25	8	発病なし	—	0
		16	"	—	0
		24	7	±～+	5
	27	8	発病なし	—	0
		16	"	—	0
		24	5	±～+	4
	30	8	発病なし	—	0
		16	"	—	0
		24	5	±～++	5

a) 150倍顕微鏡1視野あたりの胞子数

b) 胞子接種後多湿状態に保った期間

c) 接種してから発病までの日数

d) 6個所接種中の発病個所数

菌株の培養を温州ミカンの枝に接種し、形成した柄子殻から生じた胞子角を用いて調製した懸濁液である。接種源の胞子濃度は、1970年の試験には子のう胞子30個(150倍顕微鏡1視野あたり)、柄胞子200個で、1971年は両者はほぼ等しく、それぞれ92個、105個であった。接種方法は、各胞子の懸濁液に綿球を浸漬し、湿室内の温州ミカン果実3個のそれぞれ2個所ずつ計6個所に接種した。8, 16, 24時間後に綿球を除き、接種部を乾いた脱脂綿でふき取った。この間の時間を接種時間とした。1970年は9月8日に接種し、その後17, 20, 25Cに保ち、1971年は9月9日に接種し、20, 25, 27, 30Cに保った。

実験結果 子のう胞子と柄胞子をほぼ同じ胞子濃度で接種した1971年の実験で(第3表)、子のう胞子の

第4表 *D. citri* の子のう胞子、柄胞子による温州ミカン果実の発病(胞子濃度が異なる場合)

接種源 種類と 濃 度	接種条件		発病日数 ^{c)}	13日目における	
	温度 (C)	時間 ^{b)} (hr)		発病程度	発病個 所数 ^{d)}
子のう 胞 子 30 個 ^{a)}	17	8	発病なし	—	0
		16	6	+	3
		24	6	++~+	4
		48	3	++	6
	20	8	11	±	2
		16	6	+	4
		24	6	++	5
		48	2	++	6
	25	8	6	+	1
		16	4	++	6
		24	3	++	6
		48	2	++	6
	17	8	発病なし	—	0
		16	11	++~+	4
		24	11	++~+	4
		48	3	++~+	6
柄胞子 200個 ^{a)}	20	8	11	+	1
		16	11	+	2
		24	6	++~+	6
		48	2	++	6
	25	8	11	±	2
		16	6	±~+	6
		24	3	++~+	5
		48	2	++	5

a), b), c), d) 第3表に同じ

場合、20C接種時間8時間のとき8日後でも発病は認められなかったが、25C 8時間では7日後に発病した。これに対し柄胞子は、25C接種24時間のとき7日後に発病したにすぎない。子のう胞子と柄胞子の濃度をかえた接種実験では(第4表)、子のう胞子のほうが発病はやや多いが、発病の傾向は両者全く同じであった。すなわち、17Cでは、接種時間16時間のとき子のう胞子は6日後、柄胞子は11日後に感染をおこし、20Cでは接種時間8時間で両者ともに発病が見られた。さらに温度が高く、接種時間が長くなるといづれの胞子を接種しても発病程度は高く、発病までの日数も短くなった。

果実の生育時期と子のう胞子による発病

材料および方法 接種源は、前節と同様に調製した子のう胞子および柄胞子の懸濁液である。10果以上結果しているポットに植えた普通温州ミカンの果実に1971年6月21日、7月19日、8月16日、9月9日、10月4日に接種を行なった。方法は、ガラス製噴霧器で噴霧接種し、湿度100%とした恒温接種箱に20~30C、24~35時間保ったのち屋外に出した。11月19日に発生予察実施要領の基準⁵⁾にしたがって果実の発病程度を調査し、発病度を算出した。病徴は実体顕微鏡(10倍)下で観察した。

実験結果 子のう胞子および柄胞子の懸濁液を6~10月の間に接種した結果は第5表の通りである。7月19日接種区では、接種源とした子のう胞子数は柄胞子数の約3分の1であるにもかかわらず、果実の発病程度は両者ともほぼ同じであった。8月16日接種区は、子のう胞子による発病は、接種胞子数が柄胞子数の約1/7にすぎないのにむしろ激しかった。9月9日接種区は、両胞子数がほぼ同じであったが、子のう胞子接種果の発病が激しく、ほとんどが落果したが、柄胞子接種果の発病度は61.9にすぎなかった。10月4日接種区の接種源の濃度は、子のう胞子が1視野あたりわずか15個、柄胞子はその約20倍であったが、両者の発病はほぼ同じ程度で激しく、子のう胞子接種果は落果するものが多かった。

7, 8月に子のう胞子あるいは柄胞子を接種した果実の病徴は全く同じで区別できず、病斑部はいずれもより上り、周囲にカルスが形成された。9, 10月に接種したものの病斑部は滑めらかで凹み、いわゆる後期感染型病斑で周囲に緑色部がかなり多く残った。そのうち柄胞子による病斑はあめ色ないし黒紫色で、径約0.3~

第5表 *D. citri* 胞子の時期別接種と果実の発病程度 (1971)

接種月日	接種条件		胞子の種類	接種胞子濃度 ^{a)}	果実の発病度
	温度 (C)	時間 (hr)			
6月21日	20~25	26	子のう胞子	26	全部落果
			柄胞子	281	69.5
7月19日	25~28	24	子のう胞子	63	82.1
			柄胞子	198	87.8
8月16日	25~30	25	子のう胞子	31	88.6
			柄胞子	228	81.0
9月9日	25	24	子のう胞子	91	100 ^{b)}
			柄胞子	103	61.9
10月4日	25	30	子のう胞子	15	100 ^{c)}
			柄胞子	310	100

a) 150倍顕微鏡1視野あたりの胞子数 b) ほとんど落果 c) 落果多い

0.5 mm のやや不整形のものが多く、子のう胞子の場合はあめ色ないし紫紅色でやや赤味を帯び、やや大きく、径 0.5~0.8 mm のほぼ円形の病斑が多かった。

考 察

Wolf¹¹⁾ の報告した本病原菌の子のう殻の測定値は、他の報告者^{1,12)} の値よりもかなり小さく、この点検討を要するが、筆者の菌は福岡¹⁾、大和^{12,13)} らの報告とほぼ一致し、かなり大型である。子のうおよび子のう胞子の形態、大きさは既報告値^{1,11,12)} とほぼ一致している。子のう胞子から分離培養すると、培地および枯枝上に不完全時代の *Phomopsis* 型の柄胞子を形成すること、子のう殻の切片を果実に接種すると黒点病斑を生じたことなどから、この子のう殻は黒点病菌の完全時代であると考えられる。

ミカン園では、子のう殻は樹上の枯枝にも形成されるが、地表面の比較的太い枯枝に多い。本実験においても、地表面においた枝のほうが地上 15, 30 cm においたものより形成が早く、成熟したものも多かった。倉本⁴⁾ は、静岡県で殺菌した枝に接種し、これを温州ミカン樹下の地表面に4月末におき、約4カ月後の8月下旬に子のう殻の形成を認めている。本調査では、2~3月にせん定したり、枯死した枝をほ場内の地表面に放置した場合に、8~9月頃から未熟な子のう殻が形成され、9~10月には成熟した子のう殻を認めた。この間ほぼ6カ月であり、倉本の期間より約2カ月長い

が、8~9月が子のう殻形成に好適な時期と考えられる。柄胞子殻形成枝を 25C で種々の湿度においた試験から、子のう殻の形成には 92% 以上の高湿度が必要であり、また子のう殻の成熟までの期間も湿度により左右されることが明らかで、大和¹³⁾ が温室においた枝に子のう殻を認めたことと符合し、湿度の影響が大きいものと思われる。

子のう胞子の果実に対する感染、発病に必要な温度と時間は、柄胞子の場合と全く同じであり、発病には 17C のとき接種時間 16 時間以上を要し、20C では 8 時間であった。このことは前報⁹⁾ と全く同じで、本間ら²⁾ の柄胞子の発病には果面のぬれている時間が重要であるとの指摘は、子のう胞子の場合も同様である。

接種時間を異にした実験の結果から、8月までは子のう胞子、柄胞子いずれを用いても病徴はほとんど同じで、ともにもり上りが大きく周囲がコルク化した病斑を生じ、外観からの区別は困難である。これに対して 9, 10 月に接種したときは滑らかな凹陥した周囲に、緑色部を残す後期感染型病斑^{3,6,7,9)} となるが、子のう胞子のほうがやや赤味のある、やや大型の円形病斑を生ずる。

接種源とした子のう胞子と、柄胞子の濃度が同じ場合、明らかに子のう胞子のほうが発病が激しい。柄胞子よりも少ない子のう胞子を接種しても発病程度は同等かそれ以上で、子のう胞子の病原力は柄胞子よりも強いと認められる。

摘 要

神奈川県内の温州ミカン園において、1969年10月に黒点病菌の完全時代(*Diaporthe citri* (Fawc.) Wolf)を認め、この子のう殻の形成時期、条件、子のう胞子の病原力について柄胞子と比較して検討した。

1. 子のう殻は、地表に落下または樹上に残った比較的太い枯枝の木質部に形成される。子のう胞子からの分離菌は、ジャガイモ寒天培地上あるいは接種した枯枝に柄子殻を生じ、この枝を多湿条件下におくと子のう殻が形成された。子のう殻の切片を果実に接種すると黒点病斑を生じた。

2. 2~3月にせん定し、あるいは枯死した枝をミカン園内に放置すると、未熟な子のう殻が8~9月に形成され、9~10月には成熟した。地表面においた枯枝のほうが地表15, 30 cmのところにおいた場合よりも子のう殻の形成時期が早く、形成量も多い。実験室内において子のう殻の形成および成熟は、95%以上の高い湿度でのみ認められた。

3. 果実に子のう胞子と柄胞子を接種した結果、両者は全く同様の発病傾向を示した。温度が高く、接種時間が長くなるにつれて発病程度が激しくなり、発病も早まる傾向が認められた。7, 8月の果実に接種したとき、両者ともほとんど同じ病徴を示したが、9, 10月

に接種すると子のう胞子のほうがやや大型の円型の病斑を生じた。

ほぼ同じ胞子数を用い果実に接種した場合、子のう胞子のほうが柄胞子よりも発病程度が激しく、子のう胞子の病原力は柄胞子のそれよりも強いようである。

引用文献

- 1) 福岡正信 (1932). 日植病報 7: 32-33.
- 2) 本間保男・山田駿一 (1969). 園試報 B 9: 85-97.
- 3) 井上一男・西ヶ谷昭三 (1965). 関西病虫研報 7: 22-28.
- 4) 倉本 孟・山田駿一 (1971). 園試興津年報 (病・虫), 昭 45: 6-7.
- 5) 農林省農政局 (1971). 農作物有害動植物発生予察事業実施要綱ならびに同要領, p. 79.
- 6) 大森尚典・松本英紀 (1964). 愛媛果試報 4: 19-29.
- 7) 佐々木篤 (1965). 日植病報 30: 246-252.
- 8) 牛山欽司 (1970). 日植病報 36: 170 (講要).
- 9) 牛山欽司 (1971). 神奈川園研報 19: 29-37.
- 10) 牛山欽司 (1972). 日植病報 38: 188 (講要).
- 11) Wolf, F. A. (1926). Jour. Agric. Res. 33: 621-625.
- 12) 大和浩国 (1968). 日植病報 34: 390 (講要).
- 13) 大和浩国 (1971). 日植病報 37: 171-172 (講要).
- 14) Yamato, H. (1971). 日植病報 37: 355-356.

図 版 説 明

Plate I *Diaporthe citri* の子のう殻および子のう胞子と柄子殻

1. 枯枝上の子のう殻 (表皮を削ったところ) $\times 1.0$
2. 子のう殻の縦断面 (木質部に形成) $\times 50$
3. 子のう殻内の子のう $\times 300$
4. 子のう内の子のう胞子 $\times 670$
5. 子のうと子のう胞子 $\times 170$
6. 子のう胞子の発芽 $\times 350$
7. 柄子殻の縦断面 (皮層部分に形成) $\times 65$

Plate II *Diaporthe citri* の子のう胞子および柄胞子を接種した温州ミカン果実の病徴

1. 7月19日子のう胞子接種 約 $\times 4$
2. 7月19日柄胞子接種 約 $\times 4$
3. 9月9日子のう胞子接種 約 $\times 4$
4. 9月9日柄胞子接種 約 $\times 4$
5. 10月4日子のう胞子接種 約 $\times 4$
6. 10月4日柄胞子接種 約 $\times 4$
7. 子のう胞子の接種温度・時間と果実発病のちがい
8. 8月16日接種した果実の病徴 (左 子のう胞子, 右 柄胞子)

Plate II