

チャバネアオカメムシの加害部から感染した

Erwinia chrysanthemi によるナシ果実腐敗症の発生

唐津 達彦*・殿河内 寿子**・岡崎 仁・堀田 光生***

Occurrence of Bacterial Fruit Rot of Japanese Pear Caused by *Erwinia chrysanthemi* :
Infection via the Feeding Holes of *Plautia stali*

KARATSU Tatsuhiko, TONOGOUCHI Hisako, OKAZAKI Hitoshi and HORITA Mitsuo

Abstract: In August 2014, severe fruit rot of the Japanese pears “Hosui” and “Shinko” was found in a pear orchard using the non-bagging method in Yamaguchi prefecture. Many bacterial colonies with the same morphology were isolated from the diseased tissue, and wound-inoculation with the isolate induced the original sign of disease. Since many individuals of *Plautia stali*, a type of fruit-piercing stink bug, were observed in the diseased orchard, it was suspected that the bugs were responsible for the disease. The rot sign was replicated by releasing the stink bugs and spraying the bacterial suspension on the fruit. Therefore, it was suggested that the bacteria invaded the fruit through the feeding holes made by the stink bugs. Based on inoculation test results on pear fruit and branches, investigation of bacteriological properties, PCR assays, and phylogenetic analysis based on 16S ribosomal RNA gene sequences, the bacterium was identified as *Erwinia chrysanthemi*, which is known as the pathogen responsible for Erwinia rusty canker of the Japanese pear tree.

Key Words: Erwinia rusty canker, fruit-piercing stink bug

キーワード：さび色胴枯病、果樹カメムシ類

緒言

2014年8月に下関市の赤ナシ無袋栽培園において、チャバネアオカメムシの大量寄生が認められた樹上の果実に軟化、腐敗する症状が発生した。発生園地 50a における被害は、着果があった「豊水」と「新興」の全ての樹に認められ、大半の果実が腐敗するほど甚大であった。

著者らは、同果実からの分離細菌を、刺針接種またはチャバネアオカメムシを放飼して加害させると同時に噴霧接種することで腐敗症状を再現できたこと。さらに、分離細菌はナシさび色胴枯病菌と同一種であったことを学会報告している(唐津ら, 2019)。今回その概要をまとめるとともに、分離細菌についてナシ枝への接種試験および 16S リボソーム RNA 遺伝子シーケンスに基づく系統解析を行い、新たな知見を得たので、これらの結果と併せて報告する。

* 山口農林水産事務所、** 下関農林事務所、

*** 農研機構農業環境変動研究センター

材料および方法

1 発生状況と病徴

ナシ果実腐敗症を呈した果実の症状を観察するとともに、本症状の発生時期、発生程度、発生品種、発生経過および果樹カメムシ類の発生経過について、ナシ園と農林事務所の関係者への聞き取り調査を 2014 年と 2018 年に行った。

2 病原菌の分離

分離部位は、本症状の発生初期の「豊水」果実の果肉罹病組織と健全組織の境界部付近とした。2014年9月1日に、細菌は King's B 平板培地を用いて画線培養法により、糸状菌はクロラムフェニコール (100ppm) 含有 Potato Dextrose Agar 平板培地を用いて組織分離法により分離した。

3 接種試験

1) ナシ果実への付傷接種

分離細菌を King's B 平板培地を用いて 25°C 条件下で培養後、菌体を付着させた針で健全なナシ果実に付傷接種し、ポリエチレン袋に入れて室内 (約 25°C) に 7 日間静置し、腐敗の状況を観察した。接種は、2014 年 9 月 5 日に「豊水」果実に、9 月 30 日に「二十世紀」果実にそれぞれ行った。

2) ナシ枝への付傷接種

2018 年 7 月に「豊水」と「二十世紀」の長さ約 10 cm の切り枝 (1 年生枝) に対して、King's B 平板培地で培養した菌体を付着させたメスを用いて、木質部まで届くように切れ目を入れ、パラフィルムで覆った。この切り枝を蒸留水が入ったビーカーに挿し、25°C 条件下に 2 日間静置して接種部の変化を観察した。

3) 分離細菌噴霧とチャバネアオカメムシ放飼とを組み合わせたナシ果実への接種

山口市内の果樹園に設置した集合フェロモントラップ周辺で採集したチャバネアオカメムシ成虫を供試した。試験区は、①分離細菌噴霧+カメムシ 40 頭放飼区、②分離細菌噴霧+カメムシ 5 頭放飼区、③分離細菌噴霧区、④カメムシ 40 頭放飼区、⑤無処理区とした。2014 年 9 月 6 日に、昆虫飼育箱 (40×30×30 cm) に「新興」果実 4 果を静置した後、所定数のチャバネアオカメムシを放飼した。その後、分離細菌懸濁液 (約 10^8 cfu/ml) を果実にハンドスプレーで噴霧した。分離細菌懸濁液の噴霧は 9 月 6 日と 7 日の午前中に約 1 時間間隔で各 3 回、合計 6 回実施した。9 月 7 日の一回目に噴霧した時の果実 4 果上のカメムシ虫数は、分離細菌噴霧+カメムシ 40 頭放飼区は 5 頭、分離細菌噴霧+カメムシ 5 頭放飼区では 1 頭であった。

昆虫飼育箱は 25°C、昼 16 時間/夜 8 時間に設定した室内に置いた。9 月 11 日に腐敗果数の調査と腐敗状況の観察を行った。

4 分離細菌の同定

1) 細菌学的性質の調査

分離細菌については、西山ら (2004) の方法に基づいて細菌学的性質を調査し、簡易同定 96-MUC (<http://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/bact/Ent-new.html>) を用いて同定した。

2) PCR 検定

分離細菌を King's B 液体培地を用いて、28°C 条件下で 2 日間振とう培養後、抽出キット (DNA Plant Mini Kit, キ

アゲン) を用いて DNA を抽出し、Nassar ら (1996) の方法に基づき PCR を行った。増幅 DNA を 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド中で染色することによって、種特異的なバンドの有無を調査した。

3) 16S リボソーム RNA シーケンスに基づく系統解析

上記抽出 DNA、DNA シーケンシングキット (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, サーマフィッシャーサイエンティフィック) および DNA シーケンサー (ABI3100, サーマフィッシャーサイエンティフィック) を用いて、Sawada ら (1996) の方法に基づき、16S リボソーム RNA 遺伝子のシーケンス情報を解読した。得られたシーケンス情報について、DNA 解析ソフト (MEGA, <https://www.megasoftware.net/>) でアライメントを行い、相同性検索 (BLAST, DDBJ, <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index.html>) して種を推定するとともに、既報の近縁種のシーケンス情報、近隣結合法およびブーツストラップ解析を用いて分子系統樹を作成した。また、得られたシーケンス情報を DDBJ/EMBL/GenBank データ登録システムに登録した。

結果

1 発生状況と病徴

1) 発生状況

ナシ果実腐敗症 (第 1 図) が発生した下関市の園地では、赤ナシ 8.7ha が無袋で栽培されていた。このうち、「豊水」、「新興」および「愛甘水」の混植園 50a において、2014 年 8 月上旬に収穫された「愛甘水」を除く、「豊水」と「新興」果実にチャバネアオカメムシの大量寄生が 8 月 19 日に確認されたため、ジノテフラン水溶剤を散布して防除が行われた。

同日、「豊水」と「新興」に本症状のわずかな発生が確認され、その数日後には本症状が急増した。8 月 28 日時点において、「豊水」9 樹、「新興」20 樹のそれぞれ全樹で本症状が確認され、発生果率は「豊水」で 50~100%、「新興」ではほぼ 100% であった。

チャバネアオカメムシの被害が少なかった周辺の園地では、本症状は確認されなかった。

本症状が発生した 2 品種ともに、幹および枝に異常は認められなかった。なお、発生の翌年の 2015 年から 2018 年まで、本症状の発生は確認されなかった。

2) 病徴

本症状の発生初期は、果皮がほぼ円形に褐変（第2図）して果肉は軟化し（第3図）、果実からの甘い香りが確認された。さらに、症状が進行すると、果皮は暗褐色ないし黒褐色になり、果肉は軟化して悪臭を発した。本症状の発生初期には、円形に褐変した果皮の中央に、微細な穴が認められ、穴から果汁が溢出していた。

2 病原菌の分離

本症状の発生初期の「豊水」果実2果から病原菌を分離した結果、King's B 平板培地上に白色、円形、平滑で光沢を有するコロニーの細菌が均一に分離された。それぞれの果実から細菌4菌株、合計8菌株を分離、保存して各種試験に供試するとともに、農業生物資源 (MAFF) ジーンバンクに菌株登録 (MAFF 311828 ~ 311835) した。なお糸状菌は分離されなかった。

3 接種試験

1) ナシ果実への付傷接種

試験には、分離細菌8菌株 (MAFF 311828 ~ 311835) を供試した。接種2日後、「豊水」と「二十世紀」いずれの果実も、直径数 cm の円形状に果皮が褐変し、果実を入れたポリエチレン袋には果実から溢出した果汁が溜まっていた（第4図）。腐敗果からは、甘い香りが確認された。さらに数日後には、果皮は暗褐色ないし黒褐色になり、果肉は著しく軟化して悪臭を発した。本試験により発生した腐敗果の症状は、園地のものと同様であった。

2) ナシ枝への付傷接種

試験には、ナシ果実に病原性を示した8菌株のうち1菌株 (MAFF 311828) を供試した。接種2日後には、「豊水」と「二十世紀」いずれの切り枝も、接種部付近が長さ2 cm 程度黒褐色になった。



第1図 ナシ「豊水」に発生した果実腐敗症
撮影：2014年9月1日、原図：原田 直



第2図 果皮が褐変したナシ「豊水」果実
撮影：2014年8月28日、原図：村上哲一



第3図 果肉が軟化、腐敗したナシ「豊水」果実
撮影：2014年9月1日



第4図 ナシ「豊水」果実に対する分離細菌の病原性

3) 分離細菌噴霧とチャバネアオカメムシ放飼とを組み合わせたナシ果実への接種

試験には、ナシ果実に病原性を示した8菌株のうちの1菌株(MAFF311833)を供試した。試験開始5日後、分離細菌噴霧+カメムシ40頭放飼区では4果すべてが、分離細菌噴霧+カメムシ5頭放飼区では4果中1果が腐敗した(第1表)。その他の区では腐敗果は発生しなかった。本試験により発生した腐敗果の症状は、園地のものと同様であった。腐敗部の果皮に微細な穴が認められ、穴からの果汁溢出も園地の症状と同様に再現された(第5図)。

第1表 分離細菌噴霧とチャバネアオカメムシ放飼が腐敗果の発生に及ぼす影響

試験区	調査果数	腐敗果数
分離細菌噴霧+カメムシ40頭放飼	4	4
分離細菌噴霧+カメムシ5頭放飼	4	1
分離細菌噴霧	4	0
カメムシ40頭放飼	4	0
無処理	4	0

2014年9月6日に昆虫飼育箱内のナシ「新興」果実にチャバネアオカメムシ成虫を放飼、9月6、7日に分離細菌懸濁液を噴霧接種、9月11日に腐敗果数を調査。



第5図 分離細菌噴霧とチャバネアオカメムシ放飼とを組み合わせた接種によるナシ「新興」果実の腐敗

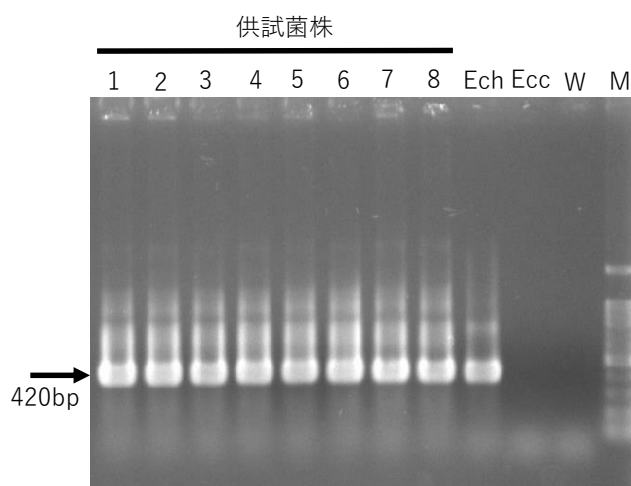
4 分離細菌の同定

1) 細菌学的性質の調査

供試した分離細菌8菌株は、King's B 平板培地上における25°C条件下で培養2日目に直径2mm程度のコロニーを形成し、その形態は白色、円形、平滑で光沢を有していた。分離細菌は短桿状で運動性を有し、O-F試験はF型を示した。カタラーゼ、硝酸塩の還元、ジャガイモ腐敗および40°C下の生育は陽性で、グラム反応、オキシダーゼ活性および緑色蛍光色素の生産は陰性であった。簡易同定96-MUCで用いる炭素源の利用能(培養2日目に判定)では、スクロース、イノシトールおよび酒石酸を利用し、トレハロース、ラクトース、ソルビトールおよびダルシトールは利用しなかった。なお、ラクトースを培養3~4日目に利用した。簡易同定96-MUCによる分離細菌のプロフィールインデックスは1211になり、分離細菌は*Erwinia chrysanthemi*と同定された。

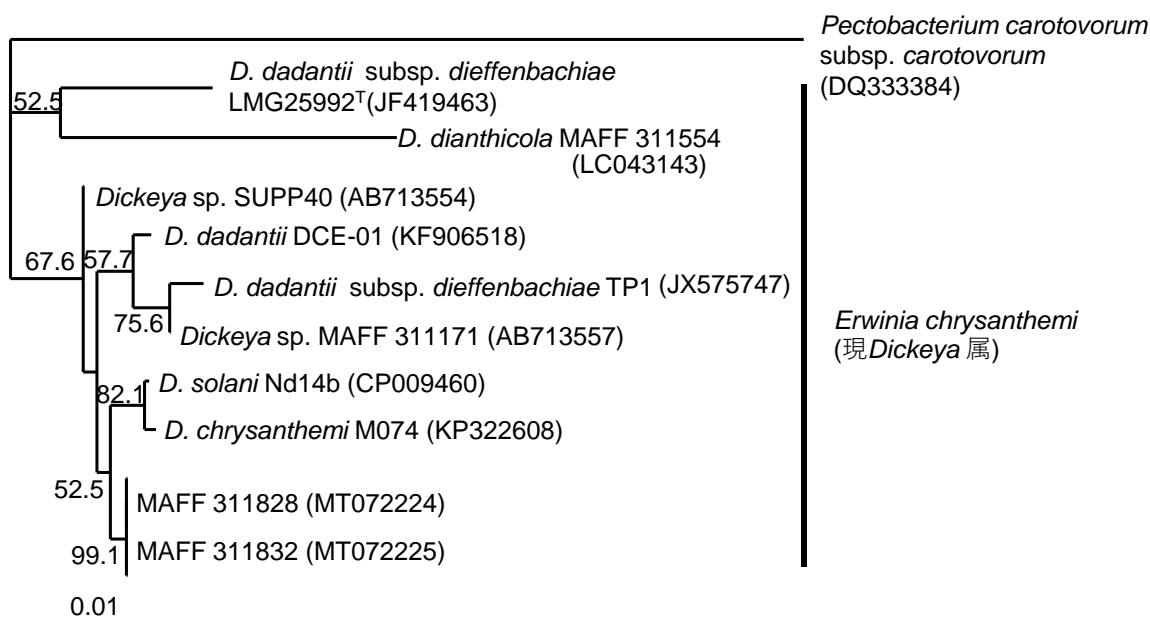
2) PCR検定

Nassarら(1996)の報告に基づき、抽出DNAを用いてPCRを行った結果、供試した分離細菌8菌株全てにおいて*E. chrysanthemi*に特異的なバンド(約420bp)が、対照株*E. chrysanthemi* MAFF301677と同様に増幅されており、近縁種*E. carotovora* subsp. *carotovora* MAFF301618では増幅されなかった(第6図)。以上、PCR検定でも分離細菌は*E. chrysanthemi*と同定された。



第6図 PCR検定による供試菌株の同定

レーン1-8: 分離細菌(MAFF311828-311835); Ech: *E. chrysanthemi* MAFF301677; Ecc: *E. carotovora* subsp. *carotovora* MAFF301618; W: Water control; M: 100bp DNA Ladder



第7図 16S リボソーム RNA 遺伝子シーケンスに基づく系統解析 (近隣結合法)
下の横軸は遺伝距離を、分岐値はブーツストラップ解析による確率を示す。() 内はシーケンス登録番号を示す。

3) 16S リボソーム RNA 遺伝子シーケンスに基づく系統解析

供試した分離細菌 2 菌株 (MAFF 311828, MAFF 311832) の 16S リボソーム RNA 遺伝子情報を解読し (シーケンス登録番号: MT072224, MT072225)、近縁種の塩基配列情報と比較した結果、これらはいずれも既報の *E. chrysanthemi* [本細菌種は現在 *Dickeya* 属に学名変更 (Samson ら, 2005)] に属する菌株の配列と相同または類似していた (第7図)。以上、16S リボソーム RNA 遺伝子シーケンスに基づく系統解析でも分離細菌は *E. chrysanthemi* と同定された。

考 察

2014 年に山口県内のナシ園で発生した果実腐敗症の原因について調査した結果、同果実からの分離細菌を付傷接種することによって腐敗症状を再現することができた。したがって、本細菌の感染が主な原因となって引き起こされたものと考えられる。

また、本症状は、果実に大量のチャバネアオカメムシの寄生が認められた園地のみで発生していることから、本症状の発生にはチャバネアオカメムシの加害が関与していることが推察される。そこで、分離細菌噴霧とチャバネアオカメムシ放飼とを組み合わせた条件下でナシ果実への接種試験を行ったところ、被害発生園地のものと同様の腐敗果が発生したと、分離細菌

菌噴霧条件下ではチャバネアオカメムシの放飼数が多いほど腐敗果数が多かったことから、チャバネアオカメムシの加害が本症状の発生に密接に関与していると推測される。本試験では、褐変した果皮に微細な穴が生じており、穴からの果汁溢出が被害発生園地のものと同様に再現されたが、この穴はチャバネアオカメムシの口針による加害により形成されたものと考えられる。したがって、被害発生園地でも、この穴を介して病原細菌が侵入することで本症状が生じたものと推測される。

細菌学的性質の調査、PCR 検定および 16S リボソーム RNA 遺伝子シーケンスに基づく系統解析の結果より、分離細菌は、*Erwinia chrysanthemi* (現 *Dickeya* 属) と同定された。本細菌種はナシにさび色胴枯病 (枝、幹が罹病) を引き起こすことが知られている (梅本・長井, 1984、陶山ら, 1987)。今回、著者らが分離した細菌も、果実腐敗だけでなくナシの切り枝を腐敗させたことから、さび色胴枯病の病原体が果実にも感染して本症状を発生させた可能性が考えられる。

本症状が園地の一部で発生し、発生程度が甚大であった原因としては、チャバネアオカメムシが園地の一部に集中的に飛来して加害したことが考えられる。また、2014 年 8 月に記録的な降雨 (被害発生園地に直近のアメダス観測地点である豊田で、平年値の 2.7 倍にあたる 431 mm もの降水量が記録された) に見舞われ、高温高湿な状態が長時間続いたために、病原細菌の感

染に好適な環境がもたらされたことも、被害助長原因の一つと考えられる。

果樹カメムシ類によるナシの被害は加害部の凹み(変形果)や果肉のスポンジ状の変質などで、果実が腐敗するとの記録はない(長谷川・梅谷, 1974、梅谷, 1976)。また、果樹カメムシ類の被害は過去に幾度も発生しているが、今まで本症状が発生することはなかった。したがって、本症状は果樹カメムシ類の加害が一因となった新たな被害と考えられる。本細菌種は、果樹カメムシ類の発生と対応して収穫前のナシ果実に甚大な被害を引き起こす可能性があるため、今後、本細菌種の発生生態等について更に明らかにする必要がありと考えられる。

摘 要

2014年8月、山口県内の赤ナシ無袋栽培園において、ナシ「豊水」と「新興」の果実が激しく腐敗する症状が発生した。

罹病組織からは均一なコロニーの細菌が分離され、分離細菌を果実に付傷接種することによって腐敗症状が再現されたことから、本細菌が本症状を引き起こす病原体であると考えられた。

被害発生園地では、チャバネアオカメムシが多発していることから、カメムシの加害の関与が推測された。カメムシ放飼と細菌噴霧とを組み合わせると腐敗症状が再現されたことから、カメムシの口針による加害によって果皮に生じた微細な穴から本細菌が感染し、本症状が生じたものと推測された。

ナシ果実と枝への接種試験、細菌学的性質の調査、PCR検定および16SリボソームRNA遺伝子シーケンスに基づく系統解析の結果から、本細菌はナシさび色胴枯病の病原細菌として報告されている *Erwinia chrysanthemi* (現 *Dickeya* 属) と同定された。

引用文献

唐津達彦・殿河内寿子・岡崎 仁・堀田光生. 2019. 山口県のナシ栽培園で発生した果実腐敗症と病原細菌の同定. 日植病報. 85: 71.

長谷川 仁・梅谷献二. 1974. 果樹におけるカメムシ類の多発被害. 植物防疫. 28: 279-286.

Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R. and Bertheau, Y. 1996.

Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2228-2235.

西山幸司・高橋幸吉・高梨和雄. 2004. 作物の細菌病 追補3版 社団法人日本植物防疫協会 (CD-ROM) .

Samson, R., Legendre, JB., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W. and Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1415-1427.

Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H. and Matsumoto, S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 694-702.

陶山一雄・那須陽一・藤井 薄・梅本清作・青野信男. 1987. ナシさび色胴枯病の病原細菌. 日植病報. 53: 71.

梅本清作・長井雄治. 1984. ナシさび色胴枯病 (仮称) について. 日植病報. 50: 83.

梅谷献二. 1976. 果樹におけるカメムシ類の多発被害 (続報). 植物防疫. 30: 133-141.