

梨葉の異常斑點症に関する研究

南 菫 雄

1997



①

## 梨葉の異常斑点症に関する研究

南 基 雄

1997



## 目 次

第1章 序言	-----1
--------	--------

第2章 異常斑点症の発生状況	-----4
----------------	--------

1. 症状の発現様式
2. 発生の時期的消長
3. 韓国における発生分布
4. 発生が収量及び果実品質に及ぼす影響

第3章 環境要因と発生	-----22
-------------	---------

1. 土壌環境
  - a. 土壌水分
  - b. 土壌の理化学性
2. 地上部環境
  - a. 発生時期の気象環境
  - b. ビニール雨よけ栽培と発生
  - c. 袋の被覆と発生
  - d. 袋の種類別被覆と発生
  - e. 温度と発生との関係
  - f. 酸性雨と発生との関係
  - g. 農薬による葉害と発生との関係



第4章 樹体内部要因と発生 -----51

1. 無機成分含量
2. 徒長枝の水挿しによる発生

第5章 病原菌の分離と検定 -----57

1. 病原菌の分離
2. 病原性の検定
3. 薬剤防除効果試験

第6章 病原性の接ぎ木伝染 -----65

1. 切り接ぎと発生
2. 二重接ぎ木による伝染
3. 舌接ぎによる伝染
4. 高接ぎによる伝染

第7章 検定用指標植物の選抜と検定方法の開発 -----80

1. 指標植物の選抜
  - a. 二重接ぎ木による選抜
  - b. 黒斑病の抵抗性検定
  - c. 選抜した指標植物の能力検定
2. 検定方法の開発
  - a. 接ぎ木方法と発病
  - b. 接ぎ木時期と発病



c. 接触時間と発病

第8章 病原体の探索	-----104
------------	----------

1. 草本ウイルスの指標植物による検定
2. 電子顕微鏡による探索

第9章 異常斑点症の総合防除対策	-----118
------------------	----------

1. 指標植物検定による無毒樹選抜
2. 抵抗性品種の探索とそれによる高接ぎ更新

第10章 総合考察	-----131
-----------	----------

第11章 総 摘 要	-----139
------------	----------

Summary	-----142
---------	----------

謝 辞	-----145
-----	----------

参 考 文 献	-----146
---------	----------



## 第1章 序 言

梨は植物分類学上、薔薇科 (Rosaceae)、梨亜科 (Pomoideae)、梨属に属する代表的な温帯果樹で Asia、Europe、Africa 等世界的に広く栽培されている。韓国における梨は昔から人々の生活と密接な関係をもってきた。伝統的に、咳、利尿、消化、便秘等に効果があるとされ、ジュースや缶詰等いろいろな加工用製品に利用され、最近では梨酒まで開発され独特な味で人気が高い。また気候が梨栽培に適しており韓国全土で栽培ができ、リンゴの次いで消費量が多い果実である。

韓国では急激な高度経済成長によって国民所得が増大したため、国民の食生活パターンも変化し、米の消費が減少し、果実や野菜等の消費が急激に高まっている。ウルグアイラウンド妥結によって梨が農家所得面で国際競争力を持ち、かつ輸出も期待できる有望な作物の一つとして取り上げられ、そのために栽培面積は毎年増加しつつある。1995年現在、面積 12,649ha で、生産量は年間 17 万 M/T である (80)。韓国で栽培される品種の大部分は、1906 年園芸模範場が開設されてから近年までは、日本で育成され韓国に導入された品種の晩三吉、今村秋、長十郎等が主であった。最近、大果で品質が良く、輸出も有望視されている新高への高接更新及び新規開園が活発に行われ、現在では新高が栽培面積の約 65% を占めている。次いで韓国で育成された黄金梨、秀黄梨、甘川梨、秋黄梨、栄山梨、花山梨等が普及している。このように、梨は韓国を代表する果物として古くから国民に愛されてきた重要な果樹であるが、約 16 年前より一部の農家において梨葉に原因不明の黒色の斑点が発生し、問題になってきている。最近では全国の果樹園に広がり栽培農家に大きな被害をもたらしている (42、71)。

本症の発生時期は、年次により、品種によって若干の相違があるが、早いものは



5月下旬から発病し始める。通常は6月上旬頃から新梢下葉より症状が現れ、次第に上昇して、6月中旬頃発生が最高となり、斑点は小形の多角形または円形の黒褐色で後に灰白色に変わる。斑点を生ずるのは成葉に限られ、若葉に生ずることはない。また枝や果実には発症しない。本症と類似した病害として黒斑病があるが、黒斑病について抵抗性品種である新高でこの症状の発生が多い。黒斑病は主に新葉を侵す病害であり、その病斑は大小不規則で徐々に拡大する。成葉にある病斑は古い病斑であることなど本症と発生様式が異なっている。

本症について寄等(47)は既存の黒斑病菌 (*Alternaria kikuchiana* Tanaka) に病原性の分化が起こり、既存の抵抗性品種に罹病化が生じたのであろうと報告している。その後、洪等(34)は、薬剤防除効果がなく、病原菌の分離はできず、病気の原因が分からなかったため、原因不明の病害すなわち梨葉の異常斑点症状と命名した。いっぽう、Cheong等(11)は *Enterobacter pyrinus* によって発生する新種褐色斑紋病だとしている。また、一部の農家および研究者らは薬害、生理障害あるいは環境汚染等によって発生する病気ではないかと考えている。そのために、異常斑点症、類似黒斑病、化け物病、えそ斑点病などいろいろな名で呼ばれている。

本異常斑点症の特色として、1本の発生樹では必ずしも全樹に現れるのではなく、数本の枝だけに発生する場合が多いことがあげられる。発生枝と健全枝が互いに交叉していても伝染の様子が見受けられないこと、発生枝の発病葉は黄変し、1、2か月のうちに早期落葉してしまうことが多い。

本症と類似した病害が日本では1950年代初めに長野県、千葉県で二十世紀に発生し、当初には生理的な原因による障害ではないか考えられ、俗に生理的褐斑病と呼ばれていた(65、66)。その後野田(81、82、83、84)らによって接ぎ木伝染性病害であることが証明され、ウイルス病の一種であることが示唆された。しか



し、その病原ウイルスの粒子はまだ観察されていない。また、韓国に発生している異常斑点症と日本のえそ斑点病の病原が同じかどうかまだはっきりしていない。しかし、発生品種が違ふこと、たとえば日本では抵抗性品種とされる晩三吉で韓国では大発生していることなど不明な点が多い。

本研究は梨葉の異常斑点症の原因究明とその防除対策を確立するため、1991年から1996年にかけて韓国で実施したものである。まず、本症の発生と被害状況を明らかにし、次に発生要因について栽培学的、生理学的、生態学的、病理学的な側面から検討を行った。最後に実用的な総合防除対策についてまとめた。







認められた。しかし、その差はあまり大きいものではなく、同一品種でも年次、季節などによって異なった。初めに葉全体に、透かしてみると認められる黄色斑紋を多数生じ、後にこの黄色斑紋の表面が赤紫色となり、急速に黒褐色に変わった。この黒褐色斑点は主に最初は葉先や小葉脈に発生したが、すぐ葉全体に散在するようになった(図2)。黒褐色斑点が古くなると褐色から灰褐色に変わり、後に灰白化し、葉肉組織が壊死して陥没または穴があいた。また健全部との境はきわめてはっきりしていた。斑点の模様は主に初めには円形または楕円形、後期には不正多角形で大きさは直径0.9-2.9mmの範囲(平均1.47mm)であり、いったん発生した斑点はほとんど拡大しなかった。小型斑点が集合し、大型斑点になることもあった(図3)。春季に展開した葉は秋季には発生しなかった。夏季に出た葉が秋季に成葉がなればほとんどが発生した。またこの症状はほかの症状と違うため異常斑点症の葉は落葉した後でも判別できる。

## 2 発生の時期的消長

ここでは異常斑点症の発生の時期的消長について調査した。

### 材料及び方法

京畿道水原市の果樹園で、毎年異常斑点症が発生する新高16年生6樹を供試した。1991年と1993年に発生の消長を経時的に調査した。調査方法は5月下旬から9月下旬まで10日間隔に、各樹方位別に無作為に100葉を選び異常斑点症の発生した葉を百分比率で表わした。葉位別に発生程度を調査した。発生の最盛期である6月下旬に各樹毎に徒長枝12枝を選び、枝の基部葉から新梢先端葉まで異常



斑点症数を教えた。

## 結果

発生の経時的な変化は図 4 に示した。水原地方の場合、異常斑点症の発生が 5 月初めにはまったく認められなかったが、5 月下旬頃から発生が見られ始め、6 月上旬頃斑点数が急増し（発生葉率が 20-30% 程度）、その後 6 月中下旬頃には 80% 以上の発生葉率を示した。年次による変動が少しあったが、7 月中、下旬頃から高温の時期になると斑点の発生が停止し、この状態が 8 月末まで維持された。9 月頃気温が涼しくなると、夏に伸長した枝の成葉に再び症状が若干現れた。徒長枝について葉位毎の異常斑点症を調査したところ、調査した徒長枝の全体のうち約 74% に発生が見られた。新梢の基部から 3/4 の部位の葉に発生が見られたのに対し、先端の葉には発生が見られなかった。基部から 10 位葉までは斑点数が葉当り 30 個以上ものが 25% 以上あり、10 位葉から 17 位葉までは斑点数が 10 個以下であった。また、18 位葉以上では斑点数は少なかった（表 1）。すなわち、発生部位としては果叢葉と新梢基部の成葉に限られていること、葉の小葉脈周囲に斑点が発生することが明らかになった。結論として異常斑点症の発生状況は多小の差はあるが、原則的に基部葉 > 中部葉 > 上部葉 > 先端葉の順に大きく、場合によって基部葉と中部葉の順番が変わることもあった。

## 3 韓国における発生分布

韓国における異常斑点症の全国的な発生分布を調査した。

## 材料及び方法



羅州市を始めとして韓国の梨の栽培生産団地 11 地域を調査対象とした (図 5)。発生が最盛期である 6 月に各生産団地を訪ね、その地域の異常斑点症が平均的に発生した果樹園を任意に選定した。地域別、品種別、樹齢別に異常斑点症の発生樹率を調査した。その場合、発生葉率が 10% 以上の樹を発生樹とみなして百分率で表した。

### 結果

梨の生産団地別の発生状況を表 2 に示した。品種では新高が全国的に発生が最も多く、発生樹率が全国平均で 23% であった。晩三吉は全羅南北道地域で甚だしく発生しているのに対し、その他の地域には発生が認められなかった。長十郎はどの地域でも発生が見られなかった。地域別で見ると長十郎の生産団地である蔚山地域では新高の発生が少なかった。しかしながら、羅州地域は全国的に最も大きな被害を受け、新高、晩三吉、今村秋等で発生が最も著しかった。発生樹率も品種によって異っていた (29 - 100%)。その他の地域では発生樹率が同様の傾向で、安城、平澤、全州、鳥致遠、公州、龍仁、南陽州、華城でまんべんなく発生していた。樹齢と異常斑点症との相関は認められなかった。しかし、一般的に高接した果樹園に発生が多い傾向が見られた。

### 4 発生が収量及び果実品質に及ぼす影響

異常斑点症が発生した果樹園ではどのくらい収量と果実品質に被害を受けるかを平澤と水原 2 地域で調査した。

### 材料及び方法



京畿道平澤市の果樹園に植栽されている新高 15 年生樹と水原市の果樹園に植栽されている新高 25 年生樹で異常斑点症の発生葉率が 80% 以上の樹を 2 樹ずつ、発生が見られなかった樹を 2 樹ずつ選び実験に供試した。収量の調査は平澤では 1991 年 10 月 5 日、水原では 1991 年 10 月 8 日に行った。収穫した果実を任意に 10 個を選び、搾汁した後ガーゼで濾過してその液を混合して、酸含量は 0.1N NaOH で滴定して有機酸 (Malic acid) 濃度に換算表示した。糖度は上記の果汁液を Digital 濃度計 (TR-1, ATAGO) で可溶性固形物質含量を調べた。

### 結果

平澤と水原の 2 地域の果樹園で異常斑点症の発生葉率が 80% 以上の樹とまったく発生していない樹の収量と品質を調査した (表 3, 表 4, 図 5)。平均果重で異常斑点症の発生樹は無発生樹に比べて 36% 小さかった。樹当りの収量を見ても健全樹 100 に対して発生樹は、平澤の場合 44、水原の場合 58 であった。果実の品質面からみると、糖度は発生樹では、水原が 10.8%、平澤が 7.7%、健全樹では水原が 12.5%、平澤が 9.8% であり、健全樹より発生樹の方が低かった。反対に酸含量は健全樹より発生樹の果実の方が高かった。したがって、異常斑点症が発生した樹では商品価値の高い果実を収穫することは困難であると思われた。

### 考察

梨葉の異常斑点症は韓国で 1970 年代後期に初めて発生が認められ、現在まで全国的に蔓延しており、梨の生産における最も大きな問題の一つになっている。本症は当初洪等 (34) によって異常斑点症と呼ばれた。また、黒斑病と似ていることが



ら類似黒斑病とも呼ばれた(47)。その原因についてはこれまではっきりしておらず、いろいろな病名が使われてきた。

本症の発生様相を見ると、葉の初期の黄色斑点は赤紫色に変わり、ついで急速に黒褐色し、黒褐色から灰褐色に変わり、後に灰白色となり、中空となる。斑点の大きさは平均 1.47mm の楕円形または不正多角形をしており、生じた斑点はほとんど拡大せず、いくつかの斑点が集合して大型の斑点となることもあった。このような症状は洪ら(34)、寄ら(47)、Choung ら(11)の観察結果とほぼ同様の傾向であった。しかし、彼らはその原因については互いに違った意見を発表している。本異常斑点症について大部分の農家及び研究者らは黒斑病と混同している場合が多い。しかし、この両者には次のような相違点があるので区別ができる。すなわち、第一に、異常斑点症は主として楕円形、不正多角形の模様が多いのに対し、黒斑病は主に円形である。第二に、前者は主に成葉の硬化した葉に全面的に発生するのに対し、黒斑病は主に幼葉と幼果に発生し、その大きさは大小不均一でかつ分布が斉一でない。第三に、異常斑点症葉は葉脈間のみに生ずるが、黒斑病は葉脈上に生ずることも少なくない。したがって、異常斑点症の場合は斑点が発生した葉が変形することはないが、黒斑病の場合には斑点の周囲に黄色があると斑点中心部に葉が歪曲することがある。したがって異常斑点症と黒斑病とは異なるものであり、また、異常斑点症は黒斑病に抵抗性を有する新高に最も甚しく発生する点でも黒斑病とまったく違っているといえる(図6)。寄ら(47)は新高等の黒斑病の抵抗性品種に発生する異常斑点症は黒斑病菌の病原性分化が起こり抵抗性品種の罹病化した現象であると報告している。しかし、この点について朴ら(88)は実験をして、新高、晩三吉等の黒斑病に抵抗性品種はまだなお抵抗性であることを確認している。

本研究で本症は5月下旬から発生が始まり、発生最盛期は6月であることを明ら



かにした。日本のえそ斑点病は 1950 年代後期に初めて発生が確認され、その時には原因不明であり、生理的な原因による障害ではないかとして生理的褐斑病という病名が与えられた (81、82、83)。発生様相を見ると韓国の異常斑点症と似ている。しかし、日本のえそ斑点病は主に二十世紀に発生が甚だしく、晩三吉には発生が見られない。しかし、韓国の異常斑点症は新高が最も甚だしく、晩三吉にも症状が表れる。

異常斑点症は韓国の梨の生産団地の全地域に発生している。これまで主栽培品種であった晩三吉、長十郎、今村秋が最近高接ぎによって品質が優秀な新高に更新されるとともに、新規開園による新高の栽培面積が急激に増加しつつある。このような新高の 20% 以上が罹病している。その被害は今後増え続けるものと思われる。異常斑点症の発生は産地間や園地間による差異以外に、同一園内における樹による差異が目立つ。同一果樹園で毎年発生する樹、あるいは毎年発生しない樹がある。いったん発生した樹は毎年発生し、年毎にその症状はだんだん甚だしくなる傾向が見られる。蔚山地域では発生が少なかったが、その理由はこの地域が長十郎生産団地で高接ぎ更新した果樹園が少ないためと考えられる。果実品質を調査したところ、発生した樹では果重のみならず糖度も低く、酸含量が高く品質が健全な樹より劣った。異常斑点症が発生する樹は健全樹に比べて収量が 49% 程度減少した。

#### 摘要

1970 年代後期に初めて発生が認められた梨葉の異常斑点症は現在全国に蔓延しており、梨の生産における最も大きい問題の一つになっている。この症状は初めは直径 0.9 - 2.5mm の円形または不正多角形の赤紫色斑点が生じ、漸次黒褐色に変わり、生育後期には灰白化する。斑点症状は主に硬化した成熟葉の葉尖部またはきよ



菌に現れ、すぐに葉の全面に現れるようになる。いったん発生した斑点はほとんど拡大しなかった。小形斑点が集合して大型斑点になることもあり、後に中空となった。この症状は5月下旬頃に発生が始まり、6月中、下旬に発生の最盛期となった。その後高温期には現れなかった。9月頃涼しくなると再び斑点が少し現れた。発生した葉は早期落葉し、樹が衰弱した。本症は韓国の主品種である新高に甚だしい発生が見られ、全国の果樹園を調査したところ、発生樹率に4-100%の違いが見られた。しかし、長十郎は地域に関係なく症状は現れなかった。本症状が発生した樹は収量が減少した。果実の酸含量は高く、糖含量は低く品質は劣った。





Fig. 1. Symptom development of abnormal leaf spots in Niitaka trees.  
 A: No symptom on young leaves. B: Symptom on old leaves.  
 C: No symptom on fruit.



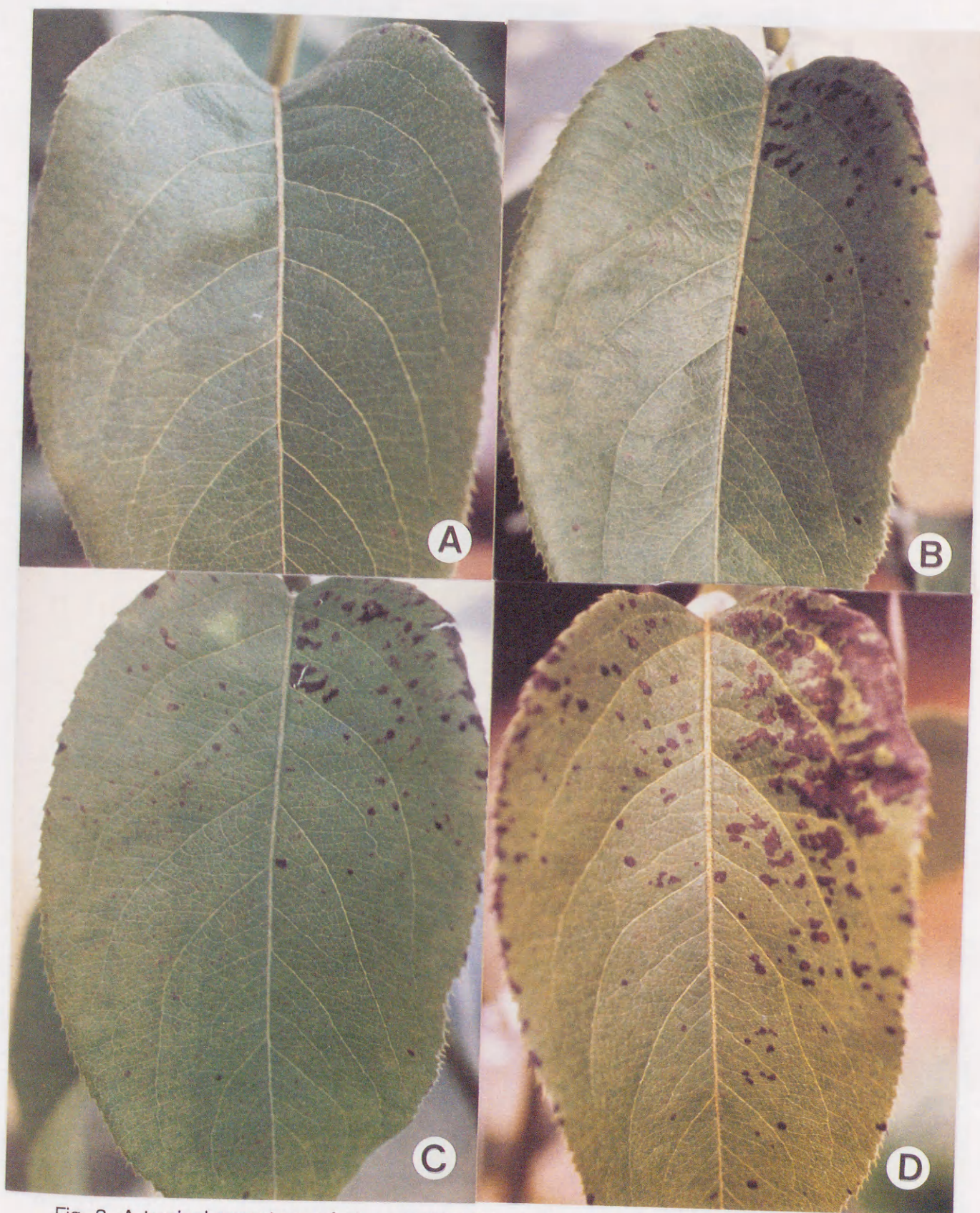


Fig. 2. A typical symptom of abnormal leaf spots that developed in Niitaka leaves in 1995.

A: First expanded leaf showing abnormal spots. B: Symptom 3 days after A.  
C: Symptom 6 days after A. D: Symptom 10 days after A.



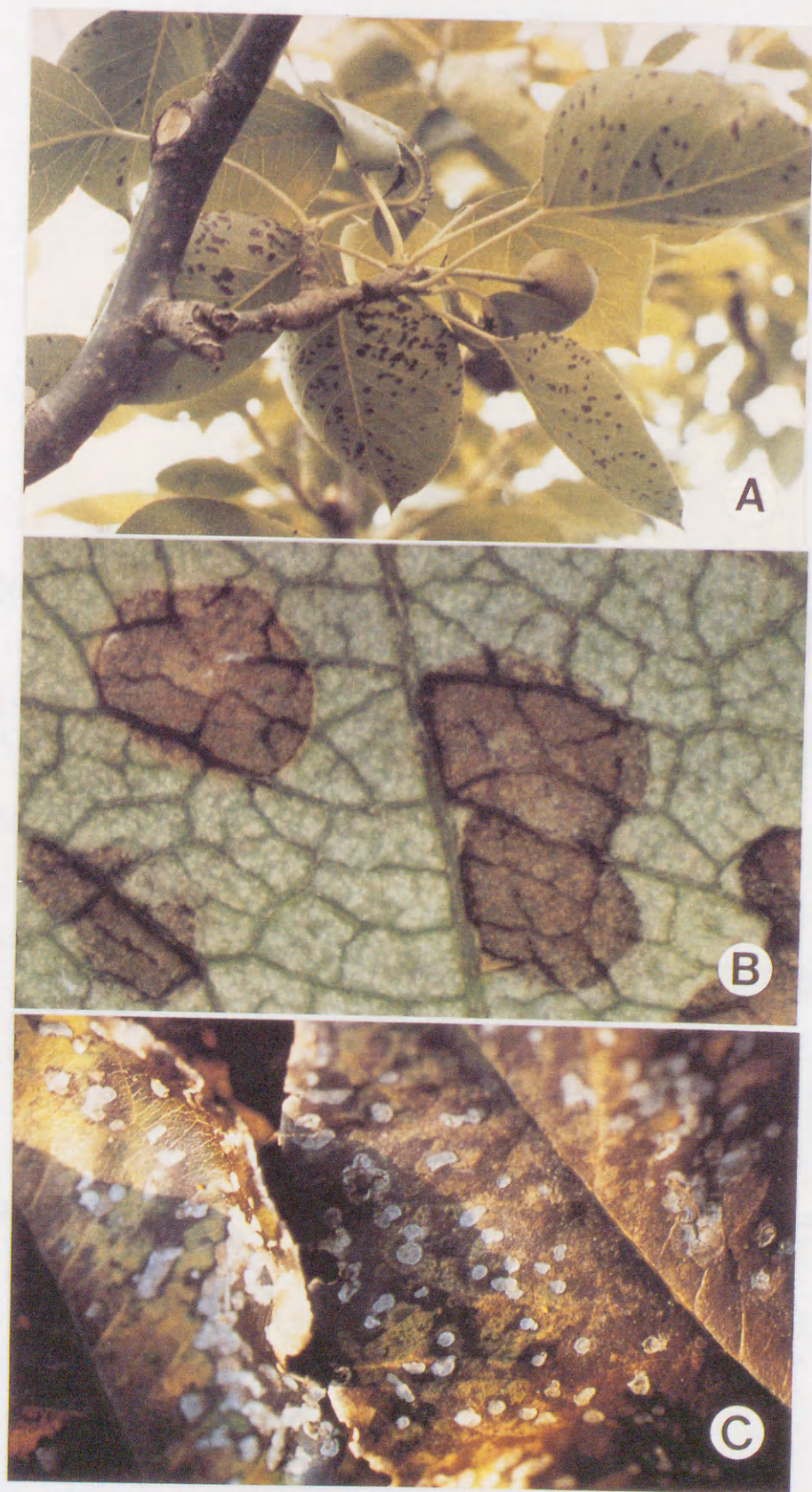


Fig. 3. A typical symptom of abnormal leaf spot development in leaves of Niitaka trees.  
 A: Symptom in the early phase. B: Shape of spot lesions 0.9 ~ 2.5mm in diameter. C: Symptom of defoliated leaves in the late phase.



Table 1. Development of abnormal leaf spots at different leaf positions on the current shoots of Niitaka pear in June 1993.

Leaf position (from the base)	No. of shoots examined	% shoots with lesion portion of			
		0	1-10	11-20	21+
1st	12	8.3	75.0	16.7	0.0
2nd	12	0.0	16.7	58.3	25.0
3rd	12	0.0	8.3	58.3	33.3
4th	12	16.7	58.3	16.7	8.3
5th	12	8.3	58.3	16.7	16.7
6th	12	8.3	58.3	16.7	16.7

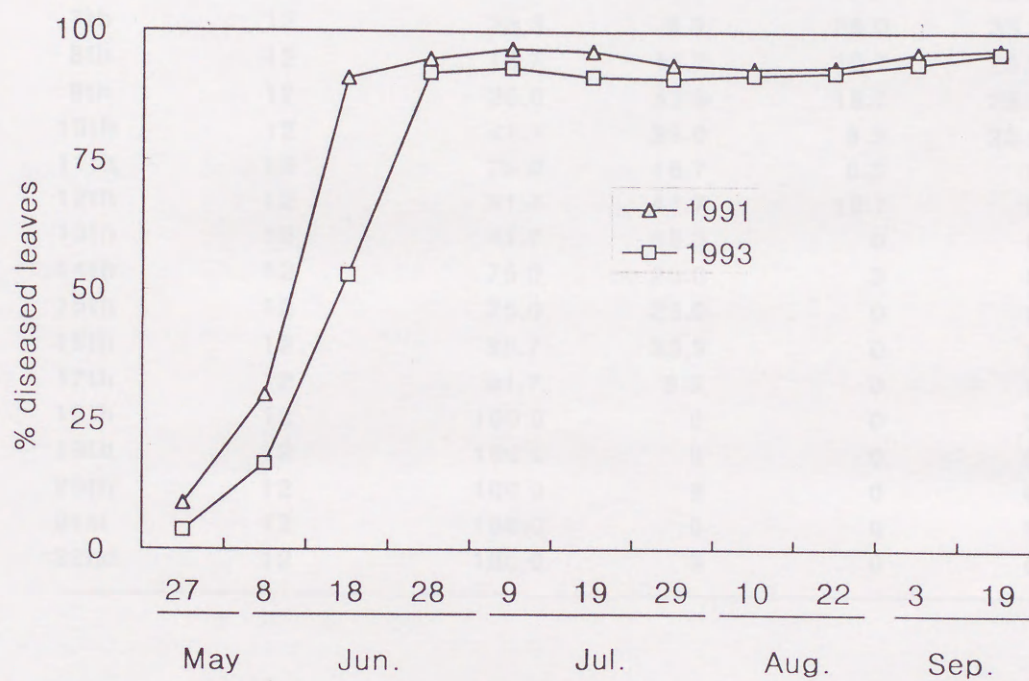


Fig. 4. Seasonal development of pear abnormal leaf spots in Niitaka trees.



Table 1. Development of abnormal leaf spots at different leaf positions on the current shoots of cultivar Niitaka in June, 1993.

Leaf position (from the base)	No. of shoots examined	% leaves with lesion number of			
		0	1-10	11-30	31<
1st	12	8.3	25.0	58.3	8.3
2nd	12	0	16.7	33.3	50.0
3rd	12	8.3	8.3	33.3	50.0
4th	12	16.7	16.7	8.3	58.3
5th	12	8.3	25.0	16.7	50.0
6th	12	25.0	33.3	8.3	33.3
7th	12	33.3	8.3	25.0	33.3
8th	12	16.7	41.7	16.7	25.0
9th	12	25.0	33.3	16.7	25.0
10th	12	41.7	25.0	8.3	25.0
11th	12	75.0	16.7	8.3	0
12th	12	41.7	41.7	16.7	0
13th	12	41.7	58.3	0	0
14th	12	75.0	25.0	0	0
15th	12	75.0	25.0	0	0
16th	12	66.7	33.3	0	0
17th	12	91.7	8.3	0	0
18th	12	100.0	0	0	0
19th	12	100.0	0	0	0
20th	12	100.0	0	0	0
21st	12	100.0	0	0	0
22nd	12	100.0	0	0	0



Table 2. Regional occurrence of abnormal leaf spots in major pear cultivation areas surveyed in June 1993.

Area	Cultivar	Tree age (years)	No. trees examined	% trees disease <sup>a</sup>	Other name of the cultivar
Ulsangun	Niitaka	25	1,100	2.3	Seosaengbae
	Chojuro	25	750	0.0	
Njushi	Niitak	25	60	41.7	Najubae
	"	20	590	20.9	
	"	18	95	52.6	
	Okusankichi	20	220	100.0	
	"	25	90	100.0	
	"	17	62	100.0	
	Imamuraaki	20	120	29.2	
Jeonjushi	Niitaka	30	150	66.7	Iseobae
	"	25	30	13.3	
	"	9	120	41.7	
	"	8	350	4.0	
	"	6	475	9.5	
Gongjushi	Niitaka	24	250	18.8	
	"	21	230	10.4	
Yeonkigun	Niitaka	25	160	50.0	
Cheonanshi	Niitaka	23	370	5.7	Seonghwanbae
	"	21	130	12.3	
	"	20	460	14.1	
Anseonggun	Niitaka	25	400	10.0	Anseonsbae
	"	20	950	11.1	
Pyeongtaegshi	Niitaka	20	650	1.8	
	"	18	107	23.8	
	Okusankichi	30	230	70.0	
Yonginshi	Niitaka	20	200	90.5	
Namyangjushi	Niitaka	25	400	12.5	Meoggolbae
	"	20	450	2.9	
	"	18	590	10.2	
	Chojuro	20	250	0.0	
Whaseonggun	Niitaka	20	500	4.0	
	"	26	270	26.3	

<sup>a</sup> The tree with more than 10% of leaves affected was considered as diseased tree.



Table 3. Comparison of yield components between diseased and healthy trees at two different areas in Korea in 1991.

Area sampled	Tree *	No. fruit / tree	Total fruit weight (kg)/ tree	Average fruit weight (g)	Yield index <sup>b</sup>
Pyeongtaeg	Diseased	172.0 $\pm$ 10.0	62.8 $\pm$ 1.3	365.0 $\pm$ 14.0	43.8
	Healthy	280.0 $\pm$ 7.0	143.5 $\pm$ 6.8	512.5 $\pm$ 11.5	100.0
Suwon	Diseased	236.5 $\pm$ 48.5	74.5 $\pm$ 16.5	313.5 $\pm$ 5.5	57.8
	Healthy	233.0 $\pm$ 53.0	129.2 $\pm$ 28.0	554.5 $\pm$ 6.5	100.0

\* Two Niitaka trees were selected and fruit were sampled.

<sup>b</sup> Total fruit weight per tree.



Table 4. Comparison of fruit quality between diseased and healthy trees growing in two orchards in Suwon and Pyeongtaeg.

Area sampled	Tree	Fruit quality <sup>a</sup>		
		Sugar content (Brix)	Acidity(%)	Overall grade
Pyeongtaeg	Diseased	7.7 ± 0.1	0.139 ± 0.001	Low
	Healthy	9.8 ± 0.2	0.134 ± 0.001	High
Suwon	Diseased	10.8 ± 0.3	0.132 ± 0.003	Low
	Healthy	12.5 ± 0.2	0.131 ± 0.005	High

<sup>a</sup> Ten pear fruit from each tree were evaluated.





Fig. 5. Symptom of abnormal leaf spot that developed in 12-year-old Niitaka trees in September 29, 1993.





Fig. 6. Symptom associated with pear leaf spot in Niitaka(A) and pear *Alternaria* black spot in Nijisseiki(B).



### 第3章 環境要因と発生

#### 1 土壌環境

梨葉の異常斑点症は本症状と類似した梨の黒斑病 (*Alternaria kikuchiana*) とは無関係であった。ここでは異常斑点症と果樹園の地下部環境との関係を検討した。

##### a 土壌水分

##### 材料及び方法

直径 30cm、深さ 60cm のプラスチック管を圃場に埋めてそれに土壌を入れた。健全な新高の 2 年生苗木をプラスチック管に植えた後、新高発生樹から採取した接穂を基部に削芽接ぎ木接種して、症状発生樹を作った。土壌水分測定には Tensiometer を用いた。溶存酸素をなくすために蒸留水をしや沸した後 40℃ 程度にして Tensiometer tube 内に入れ気泡がなくなるまで Pumping した。梨の樹が植えられているプラスチック管の中間地点に 20cm の深さに穴を掘って Tensiometer を垂直に挿入した。その後水を徐々に入れながら土を押しかため、感知部と土壌の間に気泡が発生しないようにした (図 7、86)。灌水処理は 5 月上旬から 6 月下旬まで行った。処理方法は灌水点 0.2bar で倍量灌水、灌水点 0.2bar で標準量灌水、灌水点 0.5bar で標準量灌水とし、処理当り発生樹、健全樹各々 8 株ずつ供試した。

##### 結果



土壌水分条件を過湿、定常、乾燥状態とした。健全樹と発生樹を用いたところ土壌水分と関係なく健全樹からの発生はまったくなく、発生樹では全てで症状が発生した(表5)。灌水点0.2barからの定量灌水の条件即ち梨果樹園の定常状態では最も早くから発生したため発生量も多くなった。次に乾燥した条件、過湿条件の順に発生率が多かった。しかし発生最盛期である6月15日頃には土壌水分には無関係に発生樹ではすべて100%発生し発生葉率も同様の傾向を認めた。したがって、土壌水分と発生の有無、程度等との間には関係がないと考えられた。

#### b 土壌の理化学性

##### 材料及び方法

京畿道安城郡に20年生新高が植栽されている果樹園と京畿道水原市に23年生新高が植栽されている果樹園において試験をした。試料を採取するために各果樹園で平均的に異常斑点症が発生している樹と健全な樹を各々5個体ずつ選定した。試料採取方法は供試樹の第一主枝の先端の結果母枝直下表土(0-20cm)と深土(20-60cm)を採取し、風乾、粉碎した後混合し分析標本に用いた。土壌分析は農村振興庁標準分析法によって行った(4、85、86)。pHはガラス電極法、有機物はTyurin法、置換性塩基は1N-NH<sub>4</sub>OAcで浸出した濾液を原子吸光光度法、有効リン酸はLancaster法を用いて分析した。

##### 結果

安城と水原の梨果樹園に異常斑点症状の発生樹及び健全樹の土壌の理化学性を分析した結果は表6に示した。pHは安城果樹園の発生樹土壌と健全樹土壌間の差異



は認められなかったが、水原果樹園では発生樹の土壌より健全樹の土壌で高かった。有機物含量も安城では両区間に差異がなかったが、水原では発生樹の土壌が2倍以上高かった。これらのことから pH も有機物含量も症状の発生に関係がないと思われた。有効リン酸含量は水原の発生樹の土壌が健全樹の土壌より2倍以上多かった。安城でも健全樹の土壌より発生樹の土壌の方が高く統計的に有意な差が認められた。置換性塩基は水原果樹園では発生樹及び健全樹土壌間に有意な差異がなかったが、安城果樹園では Ca のみ健全樹の土壌より発生樹の土壌で多かった。無機態窒素含量は水原果樹園の発生樹の土壌で高く、逆に安城では健全樹の土壌の方が高かった。

## 2 地上部環境

前項では土壌環境と異常斑点症との間には関係がないことを認めた。梨葉の異常斑点症は6月にほぼ一斉に斑点を生ずるのが特徴である。したがって、ここでは地上部環境と発生との関係を調査した。

### a 発生時期の気象環境

#### 材料及び方法

第2章において、京畿道水原市の果樹園で毎年異常斑点症が発生している新高品種について異常斑点の発生推移を示した(図4)。調査地点から3.5km離れた水原測候所の観測データを用いて異常斑点症状と梨樹生育期間中の気象要因との関係について検討した。

#### 結果



異常斑点症状の発生は梨生育期間中 6 月に 80% 以上発生している (図 4)。梨の生育期間中の気象データは表 7 に示した。異常斑点症が最も甚しく発生する 6 月の平均気温は 21.5℃、最高気温は 30.7℃、最低気温は 10.6℃であった。発生が少なかった 7 月の平均気温は 24.8℃、最高気温は 32.9℃、発生が停止した 8 月は平均気温が 26.4℃、最高気温は 34.1℃まで上がった。少し再発生の見られる 9 月では平均気温が 20.0℃であった。したがって、本症状の発現しやすい温度は 21℃内外と考えられる。湿度は斑点の発生とは関係がないと思われた。降水量も 5 月 104.7mm、6 月 112.5mm、7 月 169.5mm、8 月 275mm で、斑点の発生と関係ないものと考えられた。

#### b ビニール雨よけ栽培と発生

晩三吉品種で発生する異常斑点症はビニール雨よけ栽培すると異常斑点発生率が約 20 - 30% 低下したと洪らは報告している (34)。したがって、ここでは新高でも同様な現象が見られるのかどうかを調査した。

#### 材料及び方法

京畿道水原市の果樹園に毎年異常斑点症が発生する新高 13 年生 10 樹を供試した。1993 年 4 月にビニールパイプハウスを設け、厚さ 0.03mm ビニールで 5 樹を遮へいした。なお、被覆しない他の 5 樹を対照区とした。栽培管理は一般露地果樹園と同じ方法で行った。樹冠内の温度を調査するために、ビニール雨よけ内の樹冠内と露地の樹冠内に最高及び最低温度計を設置した。温度及び発生率調査は 6 月から 7 月まで晴天日に 4 回行った。



## 結果

ビニール雨よけ栽培下での異常斑点症状の発生率を調査した結果を表 8 に示している。雨よけ栽培では露地栽培より発生率が約 14 - 36% 程度少なかった。その原因を分析すると温度による影響が高いのではないかと考えられた。ビニール雨よけ栽培した所では露地より温度が 3 - 7℃ 以上高くなっていた (表 9)。したがって、ビニール被覆下では高温によって斑点症の発生が抑制されたと考えられる。また大気中の有害物質による被害がないか露地区と比較しながら調査したが、両者に異常斑点の違いは認められなかった。

### c 袋の被覆と発生

#### 材料及び方法

京畿道水原市の果樹園に植栽され、毎年異常斑点症が発生している新高 15 年生 3 樹を供試した。油酸紙で 60cm × 25cm の大きさの袋を作った。異常斑点症が発生する前の 5 月 7 日に樹当たり 9 枝ずつ選び油酸袋で被覆した。その後 6 月 12、18、30 日、8 月 12 日に油酸袋を除去して異常斑点の発生様相を調査した。油酸袋内の温度を最高・最低温度計で測定して露地温度と比較した。

## 結果

油酸袋を被覆した後、時期別に除袋して異常斑点発生率を調査した結果を表 10 に示した。油酸袋を被覆すると斑点の発生はほとんど認められないかまたは少なくなった。すなわち、6 月 12 日に油酸袋を除去した区では斑点の発生率が 6 月 30 日に 18.2%、7 月 18 日には 96%、8 月 12 日には 100% まで上がった。また 6



月 18 日に除去した区では 6 月 30 日に 4.4%、8 月 12 日に 14.2% となった。6 月 30 日に除去した区では 7 月 30 日に 0.9%、8 月 12 日には 5.9% だけしか発生しなかった。8 月 12 日に除去した区ではまったく発生が認められなかった。なお、無袋の枝では 100% 発生した。袋内の最高温度は 6 月 30 日では 42.6℃、8 月 12 日では 43.0℃ だったのに対し、露地の最高温度は 6 月 30 日で 31.1℃、8 月 12 日で 31.1℃ だった(表 11)。袋内の最低温度も露地比べて高く推移した。以上のことから高温によって異常斑点症状の発生が抑制されたと考えられる。

#### d 袋の種類別被覆と発生

先に枝に油酸袋を被覆すると高温によって斑点の発生が減少することを見た。ここでは温度と異常斑点症との関係をもう少し細密に知るために袋の種類を変えて枝を被覆し、発生様相と袋内の温度との関係を調査した。

#### 材料及び方法

京畿道水原市の果樹園に植栽され、毎年異常斑点症が発生している新高 15 年生樹を供試した。被覆袋は油酸紙、透明ビニール、黒色ビニール、レブ、マスキンタイプ及びアメリカ産新聞用紙の 6 種類を用い、縦と横 18 × 20cm の大きさに作って試験に供試した。被覆方法は異常斑点症状が発生する前の 5 月 10 日に 1 樹について袋種類別に各々方位当たり 5 葉ずつ総 20 葉を被覆した。発生調査は 7 月 10 日に袋を一切除去して斑点発生の程度を調査した。また袋内の温度変化は Multiplex data logger (Solac model MP-680 Eko co.) のセンサーを梨葉の裏面に付着させ、袋種類別に被覆した後、晴天日であった 6 月 4 日に 2 時間毎に 24 時間調査した。



## 結果

袋の種類と発生との関係を表 12 に示した。透明ビニールと黒色ビニールの袋では異常斑点がまったく発生しなかったが、その他の袋では一枚の葉または三枚だけに発生した。反対に無被覆では全部発生が認められた。葉に袋をかぶせると発生が見られなかったりいちじるしく発生が抑制される原因を明らかにするために袋内の温度変化を調査した。その結果は表 13 に示す通りである。各袋内の温度は露地より約 7-20℃ 高く、最高 47.9℃ まで上がった。しかしながら、夜間の温度は昼間より低く、袋内の温度は露地より 3-6℃ 高く推移した。したがって、袋被覆による発生の減少は袋内の高温によるものと考えられた。

### e 温度と発生との関係

以上の結果から梨葉の異常斑点症の発生が温度によって影響を受けることが明らかとなった。したがって、ここでは異常斑点の症状発現に適した温度条件を明らかにするための試験を行った。

## 材料及び方法

試験材料は直径 25cm 高さ 30cm のプラスチックのポットに移植した在来梨実生に 1991 年 3 月、それぞれ斑点が発生している新高を接ぎ木した苗を用いた。あらかじめ、新高苗木をガラス温室 (25 ± 3℃) で本葉が全開して成葉とさせた後、温度、湿度、光の調節ができる植物生育箱 (Vision VS-91GOP) に搬入して試験をした。温度条件は発生最盛期の 6 月平均温度である 23℃ / 18℃ (昼間温度 / 夜間温度以下同じ) とこれより高い温度の 28/23℃、低い温度の 18/13℃ の 3 処理区と



して処理当たり4樹ずつ単区で試験を行った。生育期間中の湿度は継続して65%に保った。昼間は9:00から18:00まで、夜間は18:00から翌日9:00までとし、昼間の光条件は35,000Luxに調節した。発生が初めて現れた6月10日から10日間隔に樹全体の葉を調査し、発生葉率を算出した。

## 結果

温度条件を異にした人工気象器での発生状況は表14に示している。23/18℃では処理15日後である6月10日に35.0%と高い発生率が認められ、6月20日には70.3%に増加し6月下旬では発生最高値に到達した。高温の28/23℃処理区では6月10日に2.0%と発生率が低く、6月30日でも27%の発生であった。低温の18/13℃区では6月10日に0.3%の発生であり、6月30日でも6.5%の発生と軽微であった。一方、樹の生育は18/13℃区では著しく劣る傾向が見られたが、28/23℃と23/18℃では生育が良かった。斑点の数は発生率と同様の傾向で23/18℃に最も多く、斑点の模様も鮮明な症状が現れた。本症状の特徴は成葉のみ発生するが、生育が劣った18/13℃では斑点の数も少なく、症状も鮮明でなかった。28/23℃では生育は良好で斑点の数は18/13℃より多く、23/18℃よりは少なかった。斑点の発生は全部基部より発現して次々と上方に及んだ。この結果から見て異常斑点症の発生をよく発現し、しかも樹の生育が比較的良好な温度条件は23/18℃であると思われた。

## f 酸性雨と発生との関係

最近活発な経済活動によって地球環境が悪化してきている。大気汚染や大気の



CO<sub>2</sub>濃度の増加による地球の温暖化が作物生産に大きな障害を及ぼすことが題念されている。特に酸性雨による被害が各地で報告されている(40、48、79)。したがって、ここでは梨葉の異常斑点症が酸性雨と関係がないかどうか調査を行った。

#### 材料及び方法

酸性雨によって異常斑点症が発生するかどうか知るために人工酸性雨を梨樹に散布して異常斑点の発現の有無を調査した。人工酸性雨は常法によって試薬用の硫酸と硝酸の比率を2:1にした混合液に蒸留水を添加し pH3.0, 4.0, 5.0, 6.0 に調整して人工酸性雨を作った(48、79)。人工酸性液を散布するため健全な新高樹を pH 別に各々2樹ずつ供試した。処理時期は異常斑点症の発生最盛期である6月20日から3日間隔で5回、背負式噴霧器で葉から水滴がしたたり落ちる程度の量を散布した。調査は最終散布後3、7、10日目に樹当り方位別に無作為で50葉を選び、可視的被害及び病班の模様を調査して自然発生した異常斑点症状とを比較した。

#### 結果

酸性雨による梨葉の異常斑点症発生の可能性を調査するために pH3.0, 4.0, 5.0, 6.0 に調整した人工酸性雨を散布したところ、処理したすべての区で葉に可視的な被害は認められなかった(表15)。したがって、本症状は最近問題となってい酸性雨とは関係がないものと考えられた。

#### g 農薬による薬害と発生との関係

##### 材料及び方法

京畿道水原市の果樹園に植栽されている健全な新高12年生樹を供試した。農薬



は梨の生産団地で主に使用されている Methidathin 等 17 種を選定して検討した。供試薬剤は単用または混用にして異常斑点症状の発生最盛期である 6 月に 10 日間隔で 2 回散布し、薬剤別に 2 樹ずつ単区で処理した。薬剤散布は噴霧器で樹全体に薬液が流れる程度の十分量を散布した。処理 2、10 日後の 1994 年 6 月 14 日と 22 日に薬害程度を肉眼で調査した。

### 結果

薬害によって異常斑点症状が発生するかどうかを調査した結果を表 16 に示した。供試した殺菌剤及び殺虫剤では Chlorpyrifos+Polyoxin B 混用散布で葉の裏面に褐色の不定型斑点の薬害症状が見られた。その他の薬剤では薬害の発生は見られなかった。しかしながら、除草剤の Dicamba は葉に散布した後 10 日目頃から新梢がねじれ、葉が奇形になる薬害症状が見られた。Paraquat dichloride は新梢、成葉すべてから黒褐色の不定型斑点が生じた (図 8)。

### 考察

梨葉の異常斑点症は同一果樹園において全樹に現れることもあり、部分的な数本の枝に限定される場合もある。しかしながら、部分的に数本の樹に限定して発生する場合が多い。

土壌水分の多少は果樹の生長と密接な関係を持っている。それが多過ぎたり、湛水状態になったりすると土壌通気が悪くなり根の呼吸が抑制されるばかりでなく、土壌中に種々還元性物質が生じて植物の生育を害する。土壌水分含量と生育との関係で梨葉が萎凋する時の水分含量は 9%、地上部の伸長の停止する時の水分含量は 15%、良好な生育を示す時の水分含量は 20 ~ 40% で、全体的にみて容水量の



40%前後が梨栽培における好適とされている(49、86)。本試験の結果を見ると灌水位 0.2barでの標準量灌水、倍量灌水、0.5barでの標準量灌水処理のいずれの区でも接種をしていない健全樹では異常斑点症が現れなかった。梨では、果実の水分不足による生理的障害とされているユズ肌病があるが、その場合、葉に症状が現れているとする報告はない。また、灌水位 0.5barでの標準量灌水は梨の栽培では土壌水分の過多であるが梨葉でまったく障害が現れなかった。したがって、土壌水分含量と異常斑点とは関係がないと考えられる。

土壌の理化学性と異常斑点症との関係を調査したが、特別な関係がないと思われた。本試験で発生樹及び健全樹の土壌を分析した結果、水原と安城の果樹園で統計的な差異があったのは pH、有機物、アンモニア態窒素、有効リン酸であった。これらのうち有効リン酸は2地域とも発生樹の土壌で多いことが認められた。したがって、有効リン酸と異常斑点症との関係については今後の研究が必要と思われる。

異常斑点症は6月に80%以上発生する(図4)。発生の推移と気象データを調べたところ、きわめて特徴的な傾向が見られた。症状が発生しはじめる5月の平均気温は16.6℃、発生の甚だしい6月の平均気温は21.5℃、発生が少ない7月の平均気温は24.8℃、発生が停止する8月では26.4℃であった。したがって、本症が最も発生しやすい温度は20℃内外と考えられる。これより高いまたは低い温度では異常斑点の発生が少ない傾向があった。しかし湿度と降水量は斑点の発生と関係がないと思われた。これらの結果はビニール雨よけ栽培した結果とほぼ同様の傾向であった。異常斑点症が発生する梨樹にビニール雨よけをすると斑点の発生は露地に比べて36%低下した(表8)。その場合、最高気温は雨よけ内の方が露地よりも7.3℃高く、34℃まで上がった(表9)。洪ら(34)は異常斑点症が発生した晩三吉品種にビニール雨よけ栽培すると斑点の発生率は約20-30%程度低下すること報



告しているが、その原因については明らかにしていない。本試験の結果から温度の影響が最も大きなものと考えられた。それで、温度そのものが直接異常斑点症状と関係しているかどうかを知るため、枝単位に油酸袋被覆を行った。その結果、異常斑点症状はまったく発生せず、油酸袋内の温度は露地の 31℃ より高く最高 43℃ まで上がった (表 11)。袋の種類を変えて被覆効果を見たところ、袋の種類に関係なく発生が全く認められないか 1-2 葉だけにとどまった。その際の袋内の温度は昼間 10 時頃最高 46.8℃ にまで上がった。したがって、異常斑点症の発生は温度に大きく支配されていると考えられる。果樹における温度の影響を受けて発生が抑制される場合ウイルス病の可能性の高いことが示されている (1、33、35、94)。本症も高温によって発生が抑制されることから、ウイルス病の一種だと推定される。果樹のウイルス病は一般的に春に生育した葉では病徴がよく現れるが、夏に生育した枝の葉では病徴が現れない場合が多い (1、43、94、104)。リンゴ Mosaic 病とモモの斑葉 Mosaic 病でこのような現象が示されている (1、94、112)。モモの斑葉 Mosaic 病では昼温 / 夜温 28/23℃ の条件では病徴が完全に隠蔽できるが、18/13℃ で展開した葉に鮮明な Mosaic 症状が、13/8℃ で展開した葉には Mosaic 症状と奇形葉が現れるとされている。したがって、23/18℃ 付近が病徴発現の限界温度と見られる。また、日本の梨のえそ斑点病の場合 23℃ / 18℃ で発病が最高値に到達し、これより高くても低くても発病するが病徴発現に時間が長くなる (43、104)。このような果樹ウイルスは種類によって病徴の発現に温度の影響の受けかたが異なっている。

梨葉の異常斑点症も他の果樹ウイルス病と同じく病徴が発現するには温度が最も重要な要因であると考えられる。本試験の結果でも葉が硬化した後昼間 23℃ / 夜間 18℃ の処理より病徴の発現が最もよく現れた。このより高い温度の 28/23℃ で



も病徴は現れたが量的に少なかった。また低い温度の 18/13℃では最も発生が少なかった(表 14)。現地果樹園での異常斑点症の発生は 6 月にピークとなり、この時の平均温度は 23/18℃付近であり、本試験の発生最適温度と一致している。これらの結果から本症状が発現する温度範囲は 13℃～28℃だと推測されたが、恒温条件における症状発現の限界温度を明確にする必要があると思われる。

最近、重化学工業の発達と生活の向上による大気汚染が甚だしくなり酸性雨による植物の被害が増加している。梨葉の異常斑点症が酸性雨による被害でないかどうか調べるため、人工酸性雨を調剤して散布したところ、pH3.0 の強酸性でも梨の葉に可視的な被害は見られなかった。一般的に針葉樹は pH2.0 で、広葉樹は pH3.0 で可視的な被害が見られるとされているが(48、79)、本試験では人工酸性雨による被害が認められなかった。したがって梨は酸性雨に比較的強い作物と判断された。

また、一部の農家では農薬を無分別に多く散布して異常斑点症を葉害だと誤認する場合があった。本試験では梨園に一般的に使用されている殺菌剤、殺虫剤、除草剤を単用または混用で散布したところ、異常斑点症と類似した葉害を示したのは Paraquat dichloride のみであった。しかし Paraquat dichloride は成葉や新梢すべてに葉害が生じ、成葉のみに発生する異常斑点症とははっきり区別できた。浸透移行性除草剤である Dicamba の葉害では樹がねじれ奇形になり全体的に障害が認められた。Chlorpyrifos と Polyoxin B を混用散布すると、成葉、新葉すべてに葉の裏面だけ褐色の不定型斑点が発生し、葉の表面では発生が認められなかった。斑点の境界がはっきりした異常斑点症の斑点と除草剤の葉害とは明らかに別のものであった。以上の結果から、本症状は酸性雨被害及び外部要因によるのではなく、原因は樹体内に存在すること、成熟した葉が硬化する時点で温度条件に大きな影響を受けるものと考えられた。農家果樹園でもその年の気象条件によって発生樹の発生程度が異なる



場合がある。

#### 摘要

梨葉の異常斑点症発生の原因を調査するため果樹園の土壌環境に関する調査をした。土壌水分を過湿、定常、乾燥の条件にして栽培したところ、各処理間に異常斑点の発生の差異は認められなかった。したがって、土壌水分含量は異常斑点発生に直接的な要因として関与しないものと考えられた。果樹園の土壌の化学性を調査した結果、発生樹の土壌では健全樹の土壌より有効リン酸の含量が高かったが、置換性塩基と無機態窒素等は発生との間に相関関係がなかった。気象要因における降水量と湿度は本症状の発現とは関係がないことが判明した。最も関係のあるものは温度であった。異常斑点が甚だしく発生する6月の平均気温は21.5℃であり、発生が少なかった7月と8月の温度は6月より高く、5月と9月は6月より低い。ビニール雨よけ栽培では異常斑点の発生率が露地より14-36%程度少なかった。その原因は高温による影響と考えられた。枝別に油酸袋を被覆した後、時期別に除去すると高温期の8月に除去した区ではまったく斑点の発生が認められなかった。しかし、無処理では100%発生したが、その時の油酸袋内の温度は露地より11.3℃高い42.6℃まで上がった。また袋の種類を変えて梨葉に被覆しても斑点の発生はほとんど認められなかったが、無被覆では全部発生した。袋内の温度は袋種類別に若干の差異があったが昼間では露地より22.3℃高い47.9℃まで上がったが、夜間では約3℃程度高かった。また新高の苗木を温度調節をした植物生育箱で生育させたところ、昼温23℃/夜温18℃の条件下で異常斑点症の発現が最も早く、多く発生した。これより高温の28/23℃と低温の18/13℃では斑点の発生は少なかった。また酸性雨による被害の可能性を調査したところ強酸性のpH3.0の人工酸性雨を散



布した時も異常斑点症と類似した症状は認められなかった。現在梨果樹園で使用している 17 種の農薬について薬害の程度を検討したところ薬害がないことが明らかとなった。本試験において発生した症状は現地果樹園に発生している症状と同じ症状であった。

Fig. 7. Different irrigation treatments for apple orchard in 1984.



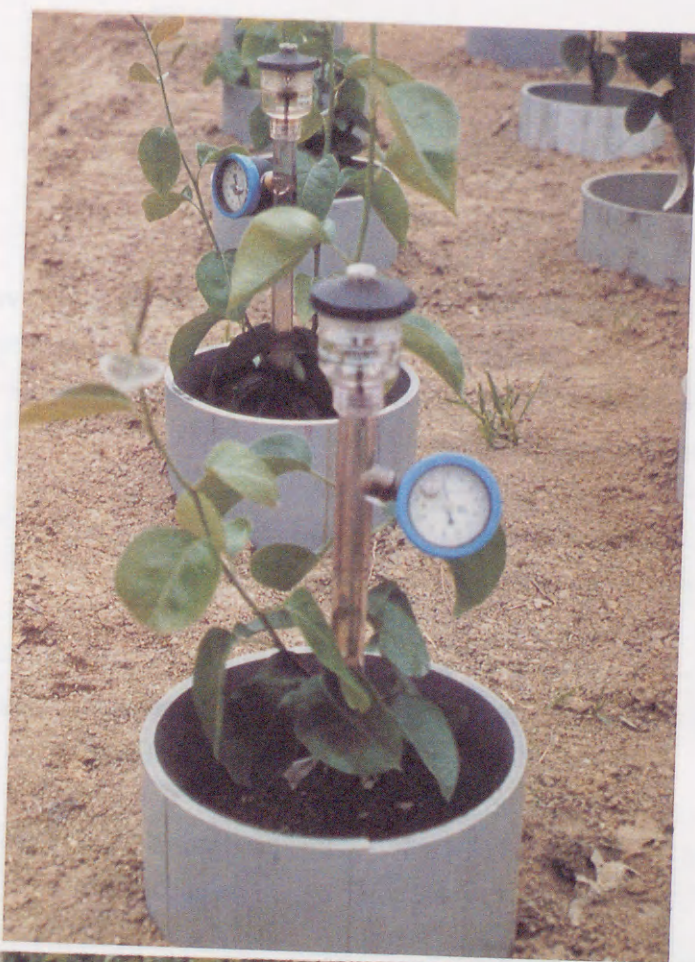


Fig. 7. Different irrigation treatments for Niitaka trees in 1994.



Table 5. Severities of abnormal leaf spots in 2-year-old Niitaka trees grown in pots under different irrigation treatments.

Irrigation treatment *	Tree status	No. trees tested	Disease severity							
			May 29		June 5		June 15		June 26	
			A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>	A	B	A	B	A	B
Excess watering	Inoculated	8	0	0	25	2.8	100	35.7	100	52.0
	Uninoculated	8	0	0	0	0	0	0	0	0
Standard watering	Inoculation	8	25	1.3	50	12.7	100	49.7	100	64.2
	Uninoculation	8	0	0	0	0	0	0	0	0
Reduced watering	Inoculation	8	0	0	50	9.9	100	42.4	100	56.6
	Uninoculation	8	0	0	0	0	0	0	0	0

a Excess; Start watering at 0.2 bar soil moisture level with double amount of standard amount.

Standard; Start watering at 0.2 bar soil moisture level with standard amount.

Reduced; Start watering at 0.5 bar soil moisture level with standard amount.

b % tree showing diseased symptoms.

c % leaves diseased.



Table 6. Chemical soil properties in healthy and diseased pear orchards at two different locations, Suwon and Anseong.

Location	Tree status	Organic			Exchangeable cations				NH <sub>4</sub> -N (ppm)
		pH	matter	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	( me/100g )				
		(%)	(ppm)	K	Ca	Mg	Na		
Suwon	Diseased	7.02	5.2 <sup>+</sup>	1,385 <sup>++</sup>	1.28	3.8	2.4	1.4	6 <sup>+</sup>
	Healt hy	7.17 <sup>+</sup>	2.1	618	2.72	3.9	2.7	1.6	2
Anseong	Diseased	5.97	2.3	1,050 <sup>+</sup>	3.12	5.5 <sup>++</sup>	3.6	1.4	10
	Healt hy	5.89	2.2	976	1.28	3.1	2.7	1.2	19 <sup>+</sup>

\* and \*\*: Values are significantly different from the corresponding ones in the T-test at 5% and 1% level, respectively.



Table 7. Monthly fluctuation in climatic factors during the pear growth period from 1993 to 1994.

Item	Apr.	May	June	July	Aug.	Sep.	Oct.
Average temp.( °C )	10.7	16.6	21.5	24.8	26.4	20.0	15.1
Max. temp.( °C )	25.6	28.3	30.7	32.9	34.1	29.6	26.0
Min. temp.( °C )	-2.4	4.6	10.6	16.0	19.6	10.3	3.5
Humidity ( % )	55	67	69	71	72	68	70
Rain fall (mm)	40.9	104.7	122.5	169.5	275.0	81.0	136.0



Table 8. Development of abnormal leaf spot in diseased Niitaka trees by the rain fall interception under vinyl covering structures in 1993.

Treatment	No. of trees treated	% leaves diseased			
		June 8	June 22	July 3	July 20
Vinyl covering	5	13.0	31.3	43.5	50.3
Control	5	28.5	68.2	71.5	79.0



Table 9. Maximum and minimum temperatures in the pear trees under vinyl covering conditions in 1993.

Treatment	June 8		June 22		July 3		July 20	
	Max. <sup>a</sup>	Min. <sup>b</sup>	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.
Vinyl covering	33.3	17.5	33.5	18.6	33.4	19.2	34.0	22.1
Control	30.3	15.0	29.0	16.7	27.3	18.2	26.7	15.5

<sup>a</sup> and <sup>b</sup> : °C



Table 10. Development of abnormal leaf spots on the pear twigs bagged with oil paper in diseased Niitaka trees in 1991 <sup>a</sup> .

Date of removal	% leaves diseased						
	May 30	June 12	June 30	July 11	July 18	July 30	Aug.12
June 12	0.0	0.0	18.2	74.9	96.2	100.0	100.0
June 18	0.0	0.0	4.4	4.4	4.4	13.2	14.2
June 30	0.0	0.0	0.9	4.0	4.0	5.0	5.9
Aug. 12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Control	11.4	43.5	83.3	100.0	100.0	100.0	100.0

<sup>a</sup> Twigs were bagged with oil paper on May 7, 1991.



Table 11. Temperature change on the leaf surface as affected by oil paper bagging in 1991.

Treatment		Temperature (°C )						
		May 27	June 12	June 30	July 11	July 18	July 30	Aug.12
Oil paper bag	Max	25.0	34.0	42.6	38.9	36.8	41.8	43.0
	Min	14.0	20.0	22.8	23.0	25.0	24.0	25.5
Control	Max	22.3	25.4	31.3	24.1	28.0	28.5	31.1
	Min	13.2	18.2	20.7	20.4	22.3	22.6	21.8



Table 12. Development of abnormal leaf spots on the pear leaves bagged or wrapped with different covering materials in diseased Niitaka trees.

Covering material <sup>a</sup>	No. of leaves treated	No. of leaves diseased <sup>b</sup>
Newspaper bag	20	1
Oil paper bag	20	2
Transparent P.E. film bag	20	0
Black P.E. film bag	20	0
Wrap film wrapping	20	2
Masking tape wrapping	20	3
Uncoverd control	20	20

<sup>a</sup> Date of covering : May 10, 1994.

<sup>b</sup> Date of removal : July 10, 1994.



Table 13. Daily temperature fluctuations on the leaf surface as affected by different leaf covering materials on June 4, 1994.

Covering treatment	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00	04:00	06:00	08:00
	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00	04:00	06:00	08:00	10:00
Newspaper bag	32.8	34.5	34.6	32.3	23.4	16.3	22.3	20.4	17.9	20.1	20.4	24.8
Oil paper bag	42.6	43.2	39.3	34.8	23.8	16.1	21.7	20.1	17.2	19.6	21.8	29.8
Transparent P.E.film bag	38.9	44.2	41.7	36.2	23.4	15.7	20.9	18.7	16.9	19.2	20.8	27.7
Black P.E. film bag	37.9	36.3	35.3	33.6	23.6	15.8	21.2	19.1	16.7	19.1	21.2	29.1
Wrap film wrapping	47.9	46.8	39.2	33.1	24.1	16.2	21.6	19.5	17.4	19.8	22.4	36.0
Masking tapewrapping	38.8	36.5	32.5	30.3	23.8	16.5	22.0	19.9	17.6	19.9	20.7	28.9
Uncoverd control	25.8	27.2	27.7	26.5	22.7	21.3	17.5	15.7	14.3	13.4	17.2	23.5



Table 14. Effect of day/night temperature regimes on the development of abnormal leaf spots in 3-year-old pear trees in the growth chambers.

Temperature regime (day/night) *	No. of trees treated	No. of trees diseased	% leaves diseased			
			June 10	June 20	June 30	July 10
28/23 °C	4	4	2.0	19.8	27.0	28.5
23/18 °C	4	4	35.0	70.3	80.0	81.8
18/13 °C	4	4	0.3	2.3	6.5	10.0

\* Day temperature was controlled between 9:00-18:00 and night temperature between 18:00-9:00.



Table 15. Development of injuries on pear leaves sprayed with acid solutions in a pear orchard to simulate acid rain in late July.

pH of solution	No. trees sprayed *	No. leaves examined	No. leaves with injury		
			After 3 days	7 days	10 days
6.0	2	100	0	0	0
5.0	2	100	0	0	0
4.0	2	100	0	0	0
3.0	2	100	0	0	0

a Acid solutions were sprayed 5 times at 3-day intervals in late July, 1991.



Table 16. Chemical injury on pear leaves after foliar spray with various agrochemicals currently used in pear orchards in Korea.

Agrochemicals	Dilution rate	Development of leaf injury after	
		2 days	10 days
Methidathion	1000	—	—
Dichlorvos	1000	—	—
Fenarimol	1000	—	—
Captan	500	—	—
Bifenthrin	1000	—	—
Bifenthrin + dichlorvos	(1000 + 1000)	—	—
Methidathion + dichlorvos	(1000 + 1000)	—	—
Iprodion + Captan	(1000 + 500)	—	—
Dichlorvos + Iprodione	(1000 + 1000)	—	—
Monocrotophos + Thiophanate-Methyl	(1000 + 1000)	—	—
Lambdacyhalothrin + Triadimefon	(1000 + 750)	—	—
Chlorpyrifos + Polyoxin B	(1000 + 1000)	+ (Brs)	+ (Brs)
Dicamba	650	—	+ (D)
Paraquat dichloride	500	+ (Brs)	+ (bls)

a — : None, + : Brs (brown spot), Bls (black spot), D (distortion of new shoot).





Chlorpyrifos+  
Polyosin B



Dicamb



Paraquat  
dichloride

Fig. 8. Symptoms that developed in Niitaka leaves by agrochemical sprays on June 22, 1994.



## 第4章 樹体内部要因と発生

梨葉異常斑点症は高温条件下で発生が少なくなることを明らかにした。しかしその原因は外部要因にあるものではなく樹体内に存在するものと推察された(第3章)。果樹の場合一部品種にのみ症状を現わすものとして、ウィルスの他にリンゴの Internal Bark Necrosis (IBN) という生理障害がある(17、18、87)。したがって、ここでは樹体内部要因との関係を調査した。

### 1 無機成分含量

#### 材料及び方法

黒斑病に抵抗性で異常斑点症が甚だしく発生する新高品種の発生葉、無発生葉と新梢、また、黒斑病に対し罹病性である二十世紀の罹病葉と健全葉を供試した。異常斑点発生最盛期である6月27日に試料を採取して Dry oven で乾燥した後、総 T-N の分析はケルダール法で、P は比色法で、K、Ca、Mg、Fe は原子吸光法を利用してその含量を測定した(4)。

#### 結果

品種別、症状別の梨樹の葉および枝内無機成分含量を表17に示した。新高の場合、窒素の含量は健全葉と発生葉間に差異はなかったが、標準値より若干少なかった。P も健全樹と発生樹間に差は見られず、新梢より成葉でやや少なかった。K、Ca、Mg は健全葉より発生葉で多かったが、K と Mg は標準値より若干少なかった。Fe は健全葉より発生葉が多く、また発生葉より新梢が多かった。しかしながら健



全葉も発生葉もこの場合も標準値より多かった。Mnは逆に健全葉と新梢で多かったが、発生葉、健全葉とも標準値より多かった。二十世紀ではMgを除くですべての成分で罹病葉より健全葉が多かった。したがって、無機成分の含量を異常斑点症の発生との関係は明らかではなかった。

## 2 徒長枝の水挿しによる発生

発生原因が梨樹体内に内在する場合は年中樹体内に存在することが考えられるので、徒長枝水挿しによる発生の有無を検討した。

### 材料及び方法

徒長枝への伝染性可否の検定するため毎年異常斑点症が甚だしく発生する15年生新高と発生しない15年生新高から長さ50cm以上の徒長枝を2月に採取した。採取した徒長枝を約30cmに切断し、プラスチックポット(直径18cm×高さ25cm)に水挿しした。水挿しの溶液には地下水に0.5%しよ糖を添加たものを利用し、円滑な溶液循環のためエアホッフ<sup>®</sup>を利用して空気を注入した。ガラス温室(26±2/20±2℃, 昼温/夜温)で本葉が十分展開した後、23/18℃の温度条件の植物生育箱に移し異常斑点症の発現の有無を調査した。

### 結果

毎年異常斑点症が発生する樹から採取した徒長枝では10枝中9枝から異常斑点が発生し、一方異常斑点の見られない樹から採取した徒長枝では10枝全部で斑点が現れなかった(表18)。温室から植物生育箱に移した後10日目頃より斑点が発現し始め次々にその数が増加し、最高9個となった。徒長枝より伸びた新梢は



10cm 程度で、斑点の発生葉数は 2-3 枚で少なかった。その原因は溶液の栄養分と樹自体の貯蔵養分が消失され、新梢の伸長が停止したためと考えられる。しかし樹体内の要因によって症状が発現することを検定するには十分であると思われた。

#### 考察

梨葉の栄養生理の障害が斑点の発現に関係しているかどうかを知るために無機成分の分析を行った。新高の異常斑点発生樹及び無発生樹と二十世紀品種の黒班病の罹病樹及び健全樹より各々葉を採取し分析した結果、発生樹と無発生樹間にはっきりした差異が認められなかった。リンゴの生理障害である IBN の発生には K、Ca、Mn が関与していることが知られている (17、18)。しかし本症発生葉と無発生葉を比較分析した結果、本症状と無機成分との間には相関関係がないと考えられた。毎年異常斑点症状が発生する樹と健全樹より徒長枝を休眠期である 2 月に採取して、温室で十分に発芽させた後、発生最盛期の 6 月の平均温度すなわち 23/18℃ (昼温 / 夜温) に設定した植物生育箱で水耕栽培した結果、異常斑点発生樹より採取した徒長枝のみ斑点が発生した。このような結果から見るとこの症状は全身性病原から起因し、徒長枝に転移していることが明らかである。また本症状は全身的で、その症状は他のカビ病、細菌病の症状とは明らかに異なっている。

#### 摘要

新高の異常斑点症の発生葉、無発生葉及び新梢を無機成分を分析した結果、無機成分含量に大きな差は見られなかった。二十世紀の罹病葉では健全葉より P、K、Ca、Mg が多かった。全体的に発生葉、無発生葉、新梢、標準値を比較すると異常斑点症の発生との相関関係は認められなかった。徒長枝水挿しによって樹体内に存



在する要因によって異常症が発現することが確認された。

Table 11. Comparison of total and short ranged carbon between diseased and healthy  
 leaves of two pear cultivars on July 27, 1994

Cultivar	Leaf status	Elemental content					
		Sampled	10%	20%	30%	40%	50%
Wase	Diseased	2.254	0.1325	0.1348	0.1365	0.1378	0.1385
	Healthy	2.024	0.1385	0.1420	0.1450	0.1475	0.1495
Natsuyag	Diseased	1.985	0.0985	0.0985	0.0985	0.0985	0.0985
	Healthy	1.875	0.0985	0.0985	0.0985	0.0985	0.0985
	Stunt	1.945	0.1075	0.1075	0.1075	0.1075	0.1075
	Standard *	2.48	0.138	0.145	0.150	0.155	0.160

In columns, means followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple comparison.

\* Standard column is given from pear leaf standard analysis.



Table 17. Comparison of leaf and shoot mineral content between diseased and healthy trees of two pear cultivars on June 27, 1991.

Cultivar	Tree status sampled	Mineral content						
		N(%)	P(%)	K(%)	Ca(%)	Mg(%)	Fe(ppm)	Mn(ppm)
Nijisseiki	Diseased	2.28A *	0.152A	2.138A	1.486A	0.274B	390.3B	280.7A
	Healthy	2.08AB	0.130B	1.424C	0.590E	0.285A	385.3B	224.7c
Niitaka	Diseased	1.89B	0.089C	1.288C	1.378B	0.215C	384.7B	203.7C
	Healthy	1.97B	0.094C	1.256E	1.361C	0.144D	317.7C	220.3C
	Shoot	1.98B	0.137B	1.842B	0.702D	0.210C	451.7A	254.3B
	Standard <sup>b</sup>	2.48	0.138	1.910	0.246	0.294	96.7	197.7

\* In columns, means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

<sup>b</sup> Standard content is given from Horticulture Research Institute ( 5 ) .



## 第5章 病徴の分類と検定

本頁の調査結果について一部の研究者及び農家はすなわち病徴が葉の病徴であると誤解しているために、誤解によって発生すると考えている。したがって、ここでは病徴の発生と病徴の発生を分類し、病徴の発生を明らかにするとともに、病徴の発生について病徴の発生を説明したい。

### 1. 病徴の発生

Table 18. Development of abnormal leaf spots in a growth chamber on shoots emerged from the cuttings from diseased and healthy Niitaka trees.

Origin of cutting	No. cuttings tested	No. cuttings with abnormal leaf spots *
Diseased tree	10	9
Healthy tree	10	0

\* Lesion development was examined 10 days after planting.



## 第5章 病原菌の分離と検定

梨葉の異常斑点症について一部の研究者及び農民はその症状が梨の黒斑病と類似しているために、病原菌によって発生すると考えている。したがって、ここでは異常斑点より病原菌を分離し、病原性の検定を行うとともに、既存の農薬について防除の可能性を検討した。

### 1 病原菌の分離

#### 材料及び方法

1991年に異常斑点症の発生最盛期である6月と発生後期に当たる8月に京畿道水原市の果樹園で試験した。異常斑点症の発生が最も甚だしく、黒斑病に対し抵抗性である新高と黒斑病に罹病性である二十世紀から異常斑点症と黒斑病と考えられる病班を採取した。採取した病班から水寒天培地(WA)またはジャガイモ寒天培地(PDA)で常法(36、72)により病原菌を分離した。この菌のうち分離頻度が最も多い *Alternaria* 菌は病班表面から単孢子を分離して試験に供試した。分離された菌株等は PDA 斜面培地に接種し 26℃ の恒温器で培養した後、8℃ の菌株保管室で保存しながら試験に供試した。

#### 結果

梨葉の異常斑点症の発生最盛期である6月に異常斑点から菌を分離し、同定したところ主に *Alternaria* 属菌が分離された。*Alternaria* 属以外では *Pestalotia* sp., *Epicoccum* sp., *Phoma* sp. が非常に低い頻度で分離されたが、すべて病原性は見ら



れなかった。*Alternaria*菌の場合、新高1番樹では25個の試料中1個だけ、2番樹では25個の試料中7個の試料から*Alternaria*菌が分離された(表19)。しかし、8月に同じ樹から同一方法で分離した結果、1番樹2番樹とも25個の試料中24個より*Alternaria*菌が分離された。一方、二十世紀では6月に25個の試料中22個から*Alternaria*菌が分離され、8月では25個の試料のすべてから分離された。

## 2 病原性の検定

### 材料及び方法

黒斑病に抵抗性であり異常斑点症が甚だしく発生している新高と黒斑病に罹病性である二十世紀を供試し、その病原性を検定した。単胞子を分離した菌株を30mlのPDA培地を入れた三角プラスコ(250ml)内に接種し、25℃の恒温器で8日間培養した。これを4枚をかさねたガーゼで濾過して孢子の濃度を $4 \times 10^6$ /mlに調整した後、接種源として利用した。接種は供試品種に各々処理当り25葉ずつ新梢葉を採取して分生孢子の培養液を葉裏面に均等に噴霧して接種した。湿度を保った箱(35×28×20cm)の中に入れ、25℃の恒温器で2-3日放置した後、その病徴の発生を調査した。また梨の樹から病原性を直接検定するため、新高と二十世紀2年生苗木をポット(直径26cm×深さ30cm)に移植した。梨の葉が展開した後1菌株当り1ポットずつ分生孢子培養液( $4 \times 10^6$ /ml)を十分湿めるほど散布した後Polyethylene vinylで被覆して48時間湿度を保った室内(24±2℃)に置いた。しかし被覆を除去して室外に放置した後、病症の発現の有無を調査した。

### 結果



異常斑点症状より分離した 15 個菌株を新高及び二十世紀に接種して病原性を検定した結果を表 20 に示した。新高から分離した *Alternaria* spp. 菌は新高及び二十世紀に対して室内の葉片試験でも屋外でのポット試験でも病原性が認められなかった。しかし二十世紀から分離した *Alternaria* spp. 菌株は新高では病原性が認められなかったが、二十世紀では室内の葉片検定で病原性が強く現れ、屋外のポット試験でも同一な病班を形成して病原性が認められた。したがって、新高から分離した *Alternaria* spp. は腐生菌であると考えられる。また二十世紀から分離した菌は黒斑病菌である *Alternaria kikuchiana* と同定された。黒斑病菌が新高で病班を形成しなかったことはこの品種が黒斑病に対して抵抗性であるためだと考えられる。

### 3 薬剤防除効果試験

#### 材料及び方法

京畿道水原市の果樹園に植栽されている 15 年生新高のうち、異常斑点症状が毎年発生する 12 樹とこれまで発生が認められなかった健全な 12 樹を供試した。農薬散布方法は輸出梨生産団地の慣行防除歴 (42) に準じて Lime sulfur, Thiophanate-methyl, Methomyl, Triadimefon Fenpropathrin, Trichlorfon, Omethoate, Mancozeb, Dicofol, Nuarimol+Mancozeb, Fenifrothion, Clofentezine の 12 薬剤を散布した。供試薬剤は単用及び混用とし 4 月から 7 月まで 7 回動力噴霧器で樹冠全体に薬液が十分ぬれて葉から流れる程度に散布した。8 月下旬にその異常斑点症の発生葉率を調査して防除効果を調査した。試験区配置は 12 樹単区とし樹当り方位別無作為で 100 葉ずつ調査して平均値を求めた。



## 結果

輸出梨生産団地の慣行防除歴に準じて4月から7月まで薬剤を散布し、その効果を調査した。その結果、異常斑点症が発生している樹に農薬散布した場合、異常斑点症状の発生率は84%で無処理と類似していた(表21)。しかし、健全な樹では薬剤処理の有無に関わらず異常斑点症と判断される発生葉はまったく認められなかった。無処理では赤星病、黒星病、黒点斑紋病の発生が認められ、樹に大きな被害をあたえた。したがって、本症状は使用した殺菌剤と殺虫剤で防除できる症状ではないことが判明した。

## 考察

梨葉の異常斑点症状は現在全国的に蔓延し、大きな被害を与えている。しかしながら、確実な原因究明はまだされておらず防除対策の樹立が困難な実情である。一部の農家ではこれを防除するために農薬を過剰に散布しているが、薬害、公害及び樹自体の生理障害等によるとの誤認から放置する農家も多く、今後梨園の被害が更に拡がると思われる。異常斑点症状の発生の最盛期である6月と後期である8月に斑点から菌の分離を試みたところ *Alternaria* 属菌が主に分離された。この菌以外では少数の腐生菌が分離されただけであった。*Alternaria* 属の場合6月は菌分離比率が低かったが、8月では高かった。しかし、黒斑病の罹病性である二十世紀の病斑からは新高とは違って6月、8月にまったく同じ *Alternaria* spp. の高い分離比率が現れた(表19)。*Alternaria* spp. を室内と屋外で新高と二十世紀品種に接種し、病原性を検定したところ、新高から分離した菌株には病原性がなかった。一方、二十世紀から分離した菌株は二十世紀に典型的な黒斑病の斑点を形成させた。この結果から新高から分離した菌は病原性がない腐生菌であると判断され、二十世紀から分



離した菌は梨黒斑病菌である *Alternaria kikuchiana* と同定された。また異常斑点症状の発生が甚だしい新高から *Alternaria* spp. 分離比率が低く、分離された菌も病原性がないことから見て本症状は *Alternaria kikuchiana* とは無関係であると思われる。これらの結果は Park らが報告した結果と一致している (88)。したがって、新高に蔓延している異常斑点症は *Alternaria* spp. と関係がないと考えられた。

大部分の農家では 6、7 月に黒斑病の農薬を撒布すると、異常斑点症の防除も可能だと考え、農薬を過剰に散布する場合が多い。本研究で薬剤防除効果試験を行ったところ梨葉の異常斑点症状に対し防除効果は全くないことが判明した (表 21)。洪らも晩三吉の異常斑点症には薬剤防除効果がなかったと報告している (34)。ごく一部農家は薬剤散布によってある程度の防除効果があると主張している。これは異常斑点症状発生が 6 月の 1 か月間に集中し、7 月から高温になって発生が自然に減少する現象を農薬による防除効果と誤解したためと考えられる。一部の研究者は本症状を細菌による新種病害だと報告しているが (11)、本試験では異常斑点部から特別なカビまたは細菌は検出されなかった。以上のことから本症状はカビ、細菌とは関係がないと考えられた。

#### 摘要

新高と二十世紀の梨葉の異常斑点症から *Alternaria* spp. が主に分離された。新高から分離した *Alternaria* 菌株は病原性がなかったが、二十世紀から分離した菌株は二十世紀品種に黒斑病の病斑を形成し *Alternaria kikuchiana* と同定された。したがって、本症は *A.kikuchiana* とは関係がないことが明らかとなった。石灰硫黄合剤等農薬を単用または混用して 4 月から 7 月まで 7 回茎葉に散布しても異常斑点症に対する防除効果はまったく認められなかった。



Table 19. Fungal species isolated and their isolation frequency from lesions of the pear abnormal leaf spot disease collected in June and August, 1991.

Cultivar	Fungal species isolated	Isolation frequency (No. isolates/ No. samples)	
		June	August
Niitaka 1	<i>Alternaria</i> spp.	2/ 25	24/ 25
Niitaka 2	<i>Alternaria</i> spp.	7/ 25	24/ 25
Nijisseiki	<i>Alternaria</i> spp.	22/ 25	25/ 25



Table 20. Pathogenicity of *Alternaria* isolates from the lesions in the leaves of two pear cultivars by testing with detached leaf and 2-year-old trees grown in pots.

Isolate	Origin of isolates	Pathogenicity *			
		Detached leaf test		Pot test	
		Niitaka	Nijisseiki	Niitaka	Nijisseiki
S-1	Niitaka	—	—	—	—
S-2	"	—	—	—	—
S-3	"	—	—	—	—
S-4	"	—	—	—	—
S-5	"	—	—	—	—
I-1	Nijisseiki	—	+	—	+
I-2	"	—	+	—	—
I-3	"	—	+	—	+
I-4	"	—	+	—	+
I-5	"	—	+	—	—
I-6	"	—	—	—	+
I-7	"	—	+	—	+
I-8	"	—	+	—	+
I-9	"	—	+	—	—
I-10	"	—	+	—	—

\* + : Lesion developed. — : No lesion formed.



Table 21. Effect of fungicide and insecticide sprays on the control of the abnormal leaf spot disease in Niitaka trees, in 1993

Treatment	% leaves with abnormal leaf spot	
	Healthy trees	Diseased trees
Sprayed *	0	84
Unsprayed	0	86

\* Spray schedule : Apr. 8 (lime sulfur), Apr. 21 (thiophanatemethyl + methomyl), May 7 (triadimefon + omethoate), May 20 (triadimefon + trichlorfon + fenpropathrin), May 29 (mancozeb + dicofol), June 19 (mancozeb + dicofol), July 9 (nuarimol + mancozeb + fenifrothion + clofentezine).



## 第6章 病原性の接ぎ木伝染

梨葉の異常斑点症の発生は局部的でなく全体的である。その症状は梨における他のカビ病、細菌病とは明らかに異なっている。また斑点より特別なカビ、細菌などの分離ができなかった（第5章）。本症の発生は温度によって大きな影響を受け、発生の原因がウイルスと推定された（第3、4章）。果樹のウイルス病は接ぎ木伝染することが知られており、接ぎ木伝染は果樹ウイルス病診断に利用されている場合がある。ここでは異常斑点症の確実な原因を究明するために接ぎ木伝染に関する検討を行った。

### 1 切り接ぎと発生

#### 材料及び方法

接ぎ穂を採取した母樹からの伝染を確認するために毎年異常斑点症状が甚だしく発生している新高と健全な新高の15年生樹を供試した。同一樹から1990年12月と1993年2月に発生枝及び健全枝を採取し、ビニールで包装して $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の低温室に保管し接ぎ穂として利用した。台木は在来梨（山梨、*Pyrus serotina*）とした。種子を収穫し露天埋蔵した後、春に播種し1年間生育させた。翌年に地際部の直径1cm程度の1年生の苗木を農業科学技術院の圃場に列間1m、樹間30cm間隔に定植して試験に利用した。あらかじめ準備した発生枝の接ぎ穂を1991年3月23日、1993年3月22日、4月10日、5月8日に各々10樹ずつ切り接ぎを行い、健全枝の接ぎ穂は1991年3月23日、1993年3月22日に各々15樹ずつ切り接ぎを行なった（図9-A）。接ぎ木後圃場管理は一般慣行に習って行なった（35）。病害虫



の防除は梨輸出生産団地の薬剤防除歴に準じた(42)。異常斑点の発生調査は1991年から毎年7月上旬に全体の葉数に対して発生葉数を調査し百分率で示した。

## 結果

健全な実生台木に接ぎ木した場合、接ぎ穂の感染の有無によって異常斑点症が発現するかどうかを確認するために試験を行った。異常斑点症発生樹から採取した接ぎ穂を梨の実生台木に接ぎ木した結果、発生樹から採取した接ぎ穂から伸長した枝には接ぎ木時期に関係なく100%症状が発生した。一方健全枝の接ぎ穂ではまったく発生しなかった。発生葉率は接ぎ初年度の1991年では48.9%、2年目では55.6%、3年目では86.8%であった。1993年3月22日と4月10日に接ぎ木した区では87.5%、85.8%発生したが、5月8日に接ぎ木した処理では76%であった(表22)。したがって、接ぎ木時期が早い程、接ぎ木後の年が経過する程発生率が高くなる傾向が見られた。発生様相を1樹でみると大体基部に発生が多く、先端部は非常に発生が少なかった。接ぎ穂に発生した斑点の模様は農家の果樹園で発生している異常斑点症と同じ症状を示した。

## 2 二重接ぎ木による伝染

二重接ぎ木によって接ぎ木伝染の確認がなされる場合が多い。ここでは健全樹と発生樹を用い伝染の有無を検討した。

### 材料及び方法

台木はプラスチックポット(直径25cm×深さ30cm)に移植した在来梨(山梨)1年生を供試した。1993年3月22日に新高発生枝の接ぎ穂を切り接ぎをした後、



その上に新高健全枝を二次の切り接ぎを行った。同年4月10日には新高発生枝と新高健全枝を二重切り接ぎと同時に、対照区として一次二次とも新高健全枝を接いだ区も作った。供試株数は各処理6株ずつとした(図9-B)。接ぎ木個体は $23 \pm 3$ ℃のガラス温室で慣行によって葉が完全に展開するまで栽培した後、30%遮光網が設置されたビニルハウスに移し、7月25日に2次健全接ぎ穂から発生した斑点葉を数えた。

### 結果

伝染方法を確認するために異常斑点症の発生枝と健全枝を用い二重切り接ぎ木したところ、1993年3月22日に接ぎ木した区では1次接ぎ穂である発生枝はもちろん、2次接ぎ穂の健全枝でも異常斑点症の斑点が発生して発生枝から健全枝に伝染罹病することが認められた。そのときの発生葉率は33.3%であった(表23, 図9-C)。また4月10日に接ぎ木した区では6樹中4樹が異常斑点症の斑点を形成し、発生率も30.4%であった。しかしながら、梨実生台木に無発生枝のみを二重接ぎ木した場合には異常斑点症はまったく発生しなかった。

### 3 舌接ぎによる伝染

接ぎ木伝染を証明する方法の一つである舌接ぎを用い検討した。

#### 材料及び方法

在来梨(山梨)台木に新高品種の異常斑点発生枝と健全枝を接ぎ木し育苗した異常斑点発生樹1年生苗と3年生苗、健全樹1年生苗と3年生苗を舌接ぎに用いた。処理方法は1年生の発生樹と健全樹、3年生の発生樹と健全樹を各々基部に舌接ぎ



してプラスチックポット（直径 25cm × 深さ 30cm）に植えた（図 9-D）。舌接ぎは 1993 年 3 月 25 日に行い、処理樹数は 1 年生は各々 8 樹ずつ、3 年生は各々 4 樹ずつとした。舌接ぎ後、 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$  のガラス温室で葉が完全に展開するまで栽培した後、30% 遮光の寒冷紗で覆ったビニルハウスに移し、7 月 27 日に発育新梢への伝染について調査した。

### 結果

発生樹と健全樹の基部を舌接ぎし、栽培した 1 年生苗及び 3 年生苗で、発生樹より健全樹に症状が伝染することが認められた（表 24）。すなわち、1 年生苗の発生樹 8 個体と健全樹 8 個体全部に異常斑点症状が甚だしく発生した。発生葉率は発生樹では 72.6% で、健全樹でも 73.7% となりほぼ同様の発生率を示した。また、3 年生苗では発生樹では 4 樹全部発生したが、健全樹に斑点が発生したものは 4 樹中 2 樹であった（図 9-E）。しかし、発生率では 3 年生発生樹では 44.7% であり健全樹では 16.1% で症状の伝染率は 1 年生苗より低かった。

### 4 高接ぎによる伝染

異常斑点症は高接ぎした果樹園に発生する場合が多い。新品種などを高接ぎ更新する場合接ぎ穂によって伝染する可能性が高い。また既存の樹が保毒している場合健全な接ぎ穂を高接ぎしても伝染する場合がある。したがって、ここで高接ぎによる伝染について検討した。

### 材料及び方法

異常斑点症が認められない健全な 16 年生新高 16 樹と長十郎 2 樹を供試した。



接種源の接ぎ穂としては異常斑点症が毎年著しく発生している今村秋の枝を1991年2月に採取し、ビニールで密封し $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の低温室に保管したものをを用いた。処理方法は供試した新高と長十郎に樹当たり各々任意に選択した亜主枝の2箇所に1991年4月10日にあらかじめ準備した今村秋接ぎ穂を高接ぎした(図9-F)。試験樹の一般管理及び病害虫の防除は輸出梨生産団地の防除歴に準じて実施した(42)。毎年9月下旬に異常斑点症の発生葉を調査した。

### 結果

高接ぎによる伝染方法を確認する目的で健全な新高と長十郎に、今村秋発生枝を樹当たり亜主枝の2箇所に高接ぎした(表25)。新高の場合は高接ぎ1年目の1991年には供試した16樹中発生したものは2樹であったが、次年度には11樹、高接ぎ3年目には16樹全部に発生が見られた。しかし、高接ぎした接ぎ穂の今村秋では接ぎ木当年から32枝全部に著しく発生が認められた。すなわち、新高の場合、今村秋と同様に6月下旬高接ぎ後3年目の1993年は供試した樹全部に6月上旬より短果枝及び徒長枝に異常斑点症が甚だしく発生した。また発生の生態は接ぎ穂の発生と同じく下位の葉ほど発生が多かった。新高とは異なり長十郎では接ぎ木当年から3年目まで異常斑点症が認められず、高接ぎした接ぎ穂今村秋にだけ異常斑点が形成された(図9-G,H)。

### 考察

梨葉の異常斑点症は枝別に発生し、発生樹と健全樹が互に交互していても健全樹に伝染の様子が見られないという特徴がある。発生園の大部分は、高接ぎによって新しく更新した果樹園である。本症の接ぎ木伝染の有無を検討するために、発芽前



に本症の発生枝を梨実生に接ぎ木すると発生枝から伸長した葉に斑点の症状が現れた。この症状は現地の果樹園で発生している梨葉の異常斑点症と同じであった。逆に健全枝を接ぎ木した場合は全く発生がなかった。健全枝と発生枝を実生に二重切り接ぎをすると一次接ぎ穂の発生枝に全部発生しただけではなく、二次接ぎ穂の健全枝にも伝染して症状の発生が認められた。これらの結果から梨葉の異常斑点症は発生原因が接ぎ木によって伝染されたと考えられる。果樹の場合、一般的に接ぎ木によって全身感染すればウイルス病だと考えられている(14、43、46、52、68)。台木と接ぎ穂のいずれかがウイルスに感染されていると接ぎ木部位の融合組織を通して他所に移行し伝染する(35、92、100)。草本の場合ウイルスの細胞内侵入は表皮細胞、柵状細胞、海綿細胞の順である。すなわち、ウイルス粒子は通常細胞壁が破損した部分に入り、無傷の原形質膜に吸着すると後で破損した原形質膜の修復部分に取り込まれると細胞膜内に入り込みそして液胞内部にまで達することが知られている(21)。しかし、果樹のウイルスの場合は主に接ぎ木によって伝染することが多い。本試験でも発生樹と健全樹を基部で舌接ぎした時、発生樹はもちろん健全樹にも異常斑点症が著しく発生し、発生樹の病原が健全樹に伝染され発病したと考えられた。落葉果樹のウイルス病は昆虫によって媒介されるより接ぎ木によって伝染する場合が多いことが知られている(92)。また接ぎ木伝染の有無がウイルス病の診断に利用されている(33)。本症状と類似した病害が日本において1950年代に発生し、初期には生理的褐斑性病害と報告されたが、1960年代には接ぎ木伝染性であるウイルス病害であることが明らかになり、えそ斑点病と命名された(43、44、81、82、83、84)。その後日本では木本指標植物であるHN-39を選抜し、これを利用してウイルスの感染有無を検定しているが、病原のウイルスは現在まだ同定がなされていない(43、44)。果樹は主に木本指標植物を利



用してウイルスの感染の有無を検定している。梨ウイルスの場合、木本指標植物である Burre hardy が Stony pit, Mosaic, Vein yellows virus の検定に利用されている。リンゴにおける高接ぎ病 (CLSV, SPV, SGV) の場合は *Malus scheideckeri* が指標植物とされ、接ぎ木検定によるウイルス罹病有無の早期検定が行われている (94)。また Virginia crab apple が利用される場合もある (97)。Kitajima ら (46) はモモのウイルスに対し指標植物を接ぎ木する方法で Peach dwarf virus 病を診断している。また Quince C7/1 の Latent viruses の罹病の有無が接ぎ木によって検定された (92)。

梨葉の異常斑点症は高接ぎ更新した果樹園で特に多く発生しているので、病原が接ぎ穂によって伝染しているかを確認するために試験を行った。その結果、健全な新高に今村秋の発生枝を高接ぎした時には高接ぎ初年度では接ぎ穂の今村秋にだけ斑点が著しく発生し、翌年度健全な新高に伝染し、数本の主枝に限られて発生されたが、3年目では樹全体に伝染伝播し異常斑点症が甚だしく発生した。一方、長十郎では高接ぎした接ぎ穂である今村秋の枝だけで発生し、長十郎では発生が認められなかった。この結果から見ると、本症は接ぎ木によって伝染される全身感染性の病気で長十郎は病徴が隠蔽される潜伏性品種であると思われる。果樹の高接ぎ更新とウイルス病保毒率とは密接な関係がある。むやみに新しい品種を高接ぎによって更新をし続けると、ウイルス病が蔓延することになる (51)。日本のえそ斑点病に関する限り、現に栽培中の既成品種の中にはこれを潜伏している品種がある。その樹に発現性の品種を高接ぎ更新すると、たとえウイルスフリーにしてもその品種は発病することが報告されている (43)。

一般的に果樹のウイルスは罹病した母樹から採取した接ぎ穂を接ぎ木した時にウイルス病が伝搬することが知られている (35、56、57、62、70)。したがって、繁殖用母樹のウイルス検定がきわめて重要である。植物のウイルス病を判断するに



はカビや細菌によって発病せず、伝染の方法が接ぎ木伝染、虫媒伝染、汁液伝染等で、発病は局部的でなく全身的であることが利用される。根本的にはウイルス粒子が確認されそのウイルス粒子を分離した樹に再接種し同じ症状が再現され、病徴に対してもウイルス病特有の症状が現れるかを証明する必要がある(30、33、35、43)。しかしながら、果樹においては草本植物とは違って汁液伝染が容易でなく前記の条件を全部満足させることは困難である。したがって、一般的に病徴においてウイルス病と類似しており、接ぎ木伝染性で、病斑からも病原性のあるカビや細菌が分離されない場合にウイルス病と推論するのが実際である。果樹ウイルスの中では Apple chlorotic leaf spot, Pear ring mosaic virus などでは *Chenopodium* に汁液接種し病原ウイルスの分離が可能である(4、10、47、48)。しかし大部分の果樹ウイルスは草本植物での増殖純化が困難なため木本指標植物による接ぎ木検定法が診断に用いられている(92)。梨のウイルス病としてこれまで報告されたものには Ring pattern mosaic, Vein yellows, Red mottle, Stony pit, Blister canker, Rough bark, Rosette, えそ斑点病などがあるが(44、92)、病原ウイルス粒子を確認したものは少ない。以上のことから、本異常斑点症は発生の原因が接ぎ木伝染することが証明され、ウイルス病の一種であることが考えられた。

#### 摘要

梨葉の異常斑点症が接ぎ木伝染するかどうかを温室と圃場で接ぎ木方法で試験した。発生枝と健全枝を2月に採取し、健全な実生台木に接ぎ木した結果発生枝を接ぎ木した処理のみで斑点が発生した。また発生枝と健全枝を二重接ぎ木すると健全枝の接ぎ穂からも症状の発生が確認された。発生樹と健全樹を基部に舌接ぎしても2樹とも斑点が発生した。現地果樹園で健全枝と発生枝を高接ぎすると高接ぎ当



年では接ぎ穂だけに発生するが、翌年では高接ぎした主枝に、3年目では梨樹全体で著しく症状が発生した。健全枝に伝染して発生する斑点は現地果樹園の異常斑点症と同じものであった。以上の結果より、梨葉の異常斑点症状の原因が接ぎ木伝染することから原因はウイルスと考えられた。

Table 2.4. Incidence of pear leaf spot in different years and in different parts of the tree.

Year	Part of the tree	1951	1952	1953
1951	Whole tree	100	100	100
1952	Whole tree	100	100	100
1953	Whole tree	100	100	100
1954	Whole tree	100	100	100
1955	Whole tree	100	100	100
1956	Whole tree	100	100	100
1957	Whole tree	100	100	100
1958	Whole tree	100	100	100
1959	Whole tree	100	100	100
1960	Whole tree	100	100	100
1961	Whole tree	100	100	100
1962	Whole tree	100	100	100
1963	Whole tree	100	100	100
1964	Whole tree	100	100	100
1965	Whole tree	100	100	100
1966	Whole tree	100	100	100
1967	Whole tree	100	100	100
1968	Whole tree	100	100	100
1969	Whole tree	100	100	100
1970	Whole tree	100	100	100
1971	Whole tree	100	100	100
1972	Whole tree	100	100	100
1973	Whole tree	100	100	100
1974	Whole tree	100	100	100
1975	Whole tree	100	100	100
1976	Whole tree	100	100	100
1977	Whole tree	100	100	100
1978	Whole tree	100	100	100
1979	Whole tree	100	100	100
1980	Whole tree	100	100	100
1981	Whole tree	100	100	100
1982	Whole tree	100	100	100
1983	Whole tree	100	100	100
1984	Whole tree	100	100	100
1985	Whole tree	100	100	100
1986	Whole tree	100	100	100
1987	Whole tree	100	100	100
1988	Whole tree	100	100	100
1989	Whole tree	100	100	100
1990	Whole tree	100	100	100
1991	Whole tree	100	100	100
1992	Whole tree	100	100	100
1993	Whole tree	100	100	100
1994	Whole tree	100	100	100
1995	Whole tree	100	100	100
1996	Whole tree	100	100	100
1997	Whole tree	100	100	100
1998	Whole tree	100	100	100
1999	Whole tree	100	100	100
2000	Whole tree	100	100	100
2001	Whole tree	100	100	100
2002	Whole tree	100	100	100
2003	Whole tree	100	100	100
2004	Whole tree	100	100	100
2005	Whole tree	100	100	100
2006	Whole tree	100	100	100
2007	Whole tree	100	100	100
2008	Whole tree	100	100	100
2009	Whole tree	100	100	100
2010	Whole tree	100	100	100
2011	Whole tree	100	100	100
2012	Whole tree	100	100	100
2013	Whole tree	100	100	100
2014	Whole tree	100	100	100
2015	Whole tree	100	100	100
2016	Whole tree	100	100	100
2017	Whole tree	100	100	100
2018	Whole tree	100	100	100
2019	Whole tree	100	100	100
2020	Whole tree	100	100	100
2021	Whole tree	100	100	100
2022	Whole tree	100	100	100
2023	Whole tree	100	100	100
2024	Whole tree	100	100	100
2025	Whole tree	100	100	100
2026	Whole tree	100	100	100
2027	Whole tree	100	100	100
2028	Whole tree	100	100	100
2029	Whole tree	100	100	100
2030	Whole tree	100	100	100



Table 22. Development of abnormal leaf spots when healthy or diseased Niitaka twigs were grafted onto healthy pear seedling rootstocks.

Scion used	Date of grafting	No. trees grafted	No. trees with lesion development	% leaves diseased		
				1991	1992	1993
Diseased twig	Mar. 23, 1991	10	10	48.9	55.6	86.8
	Mar. 22, 1993	10	10	—	—	87.5
	Apr. 10, 1993	10	10	—	—	85.8
	May 8, 1993	10	10	—	—	76.0
Healthy twig	Mar. 23, 1991	15	0	0	0	0
	Mar. 22, 1993	15	0	—	—	0





Fig. 9. Various graft methods used in this study and abnormal leaf spots that appeared in pear leaves. A: A common graft method to examine graft-transmission, B: Double-grafting method, C: Lesions of abnormal leaf spot that appeared on the 2nd scion 3 months after double-grafting, D: Tongue-grafting method, E: Abnormal leaf spot lesions that developed 3 months after tongue-grafting, F: Top-grafting method practiced in an orchard, G: Abnormal leaf spot lesions in the newly emerged twigs from top-grafted scion, H: Abnormal leaf spot lesions that developed 6 months after top-grafting.







Table 23. Graft transmission of the abnormal leaf spot disease by double grafting method in a vinyl house.

Date of grafting	Root stock	1st scion	2nd scion	No. trees grafted	No. trees diseased	% diseased leaves <sup>b</sup>
Mar. 22, 1993	SDL *	Diseased twig	Symptomless twig	6	6	33.3
Apr. 10, 1993	SDL	Diseased twig	Symptomless twig	6	4	30.4
Apr. 10, 1993	SDL	Symptomless twig	Symptomless twig	6	0	0

\* SDL : Seedling rootstocks ( *Pyrus serotina* ) .

<sup>b</sup> Data obtained from the 2nd scion.



Table 24. Development of the abnormal leaf spots by tongue-grafting between diseased and symptomless trees.

Tree age	Status of tree used for grafting	No. tree tested	No. trees diseased	% diseased leaves
1-year	Diseased Niitaka	8	8	76.2
	Symptomless Niitaka	8	8	73.7
3-year	Diseased Niitaka	4	4	44.7
	Symptomless Niitaka	4	2	16.1



Table 25. Graft transmission of abnormal leaf spot disease when diseased twigs of Imamuraaki trees were top-grafted onto Niitaka and Chojuro trees in an orchard in 1991.

Cultivar used		No. stocks tested	No. twigs grafted/ stock	No. stocks diseased			No. scions diseased		
Inter-stock	Scion			1st year *	2nd year	3rd year	1st year	2nd year	3rd year
Niitaka	Imamuraaki	16	2	2	11	16	32	32	32
Chojuro	Imamuraaki	2	2	0	0	0	4	4	4

\* Top-grafting was done in 1991.



## 第7章 検定用指標植物の選抜と検定方法の開発

### 1 指標植物の選抜

果樹のように永年生木本植物では、接ぎ木伝染性の病害はウイルス様の病気として実際認知され、ウイルス病と表現されている場合が多い(46、102、105、111)。もちろん、病理学的には病原ウイルスが確認される必要があるが、果樹では病原ウイルスの粒子を純化したとしても、その戻し接種が非常に困難なことが多い。本症もさきに接ぎ木伝染性ウイルス病の一種であることが推定された。本症は全国的に蔓延しており、特に高接ぎした梨園に発生が多い。今後新品種を高接ぎ更新によって増植する場合、中間台木となる既存品種が本病害を潜伏保毒しているか否かを知ることは、高接ぎ更新後の本症状による被害を未然に防ぐために重要である。これには早期に保毒の有無を検定できる指標植物の選抜が重要である。したがって、ウイルスを保毒せず、本症については高い発現性をもち、また本症と類似した黒斑病に対しては抵抗性である指標植物を選抜育成するために試験を行った。

#### a 二重接ぎ木による選抜

##### 材料及び方法

園芸研究所の果樹育種科において1986年と1988年に交配された表26に示す組合せから得た交配実生102個体を用いた。別に準備した梨実生1年生の苗木を農業科学技術院の圃場に樹間30cm, 列間1mの間隔に移植したものを台木に用いた。処理は1993年4月上旬に異常斑点症状に罹病した新高を台木の地面から5cm上



の所に削ぎ芽接ぎ木接種した後、その上に各交配実生を切り接ぎした（削ぎ芽切り接ぎ＋切り接ぎ）。また同じ台木を同時期に罹病した新高を切り接ぎした後、その上に各交配実生を切り接ぎした（切り接ぎ＋切り接ぎ）。処理数は交配実生 1 個体当たり接ぎ木方法別に 3 樹ずつ計 6 樹とした。調査は毎年交配実生の葉に現れた異常斑点症状の有無を調査して 1 次選抜した。1 次選抜した交配実生個体に対して上記の方法で 2 次調査した後、最終的に指標植物を選抜した。栽培管理及び病虫害の防除は慣行の栽培方法に準じて行った (42)。

### 結果

新高を母本、早生赤等 5 品種を父本とした交配組合わせから得られた 102 本実生うち、病原の接種によって典型的な異常斑点症が発生したものは 10 個体であった (表 26)。交配組み合せ別に発生の様相をみると本症状に最も発現性である母本の新高と父本の早生赤交配実生 60 個体中 10% である 6 個体の発現性の実生を得た。発現性新高母本と抵抗性の父本豊水交配組合では罹病性の実生は全く得られなかった。母本新高と抵抗性父本秀黄梨では 12 個体中 1 個体が罹病性であり、新高×今村秋、新高×水振早生の組み合わせでは各々 1 個体と 2 個体が罹病性として現れ、総計 10 個体を 1 次選抜した。指標植物として選抜されるには、典型的な異常斑点症が早期に発現し、正常な生育を示すことが必要である。1 次選抜した 10 個体中生育が定常な 7 個体に対して 1994 年から二重削ぎ芽切り接ぎの方法を通じて精密に調査を実施したところ (表 27)、典型的な異常斑点症が現れた。供試した全個体より 5 月下旬から主幹の下葉から発生を始め、激しく発生する系統では急速に症状が進行し、主幹の葉だけではなく 1 番枝または 2 番枝の葉まで樹全体に発生した。一方、発生の程度が軽い系統では主幹の下葉付近の葉だけで発生し、上部までは発生



が見られなかった。発生葉率、発生した葉の斑点数、斑点の大きさ、各発生葉の症状等が少しずつ違った。発生程度は調査時点における発生した葉数、発生葉の病徴等を総合的に判断して+、++、+++の3段階に区分した。その結果1994年では新高×早生赤86-2-2、86-2-30、86-2-20の3系統が、1995年では新高×早生赤86-2-2、86-2-30、86-7-20の3系統が最も良好であった。したがって、2年間異常斑点症がよく現れた系統は新高×早生赤86-2-2、86-2-30の2系統であったが、症状が甚だしく新高×早生赤86-2-2の育成系統を最終選抜した(表28、図10、図11)。

#### b 黒斑病の抵抗性検定

##### 材料及び方法

1次選抜された7個体に対し、異常斑点症状と類似した梨の黒斑病の抵抗性を検定を行った。黒斑病に罹病した二十世紀の葉から黒斑病原菌(*A. kikuchiana*)を単孢子分離してpotato dextrose broth(PDA)培地を30mlずつ入れた三角フラスコ(250ml)内に接種し、25℃の恒温器で8日間培養した。これを4枚をかさねたガーゼで濾過して孢子の濃度を $4 \times 10^6$ /mlに調整した後、接種源として利用した。接種は供試系統別に各処理当たり20葉ずつ新梢の葉を取って分生孢子の懸濁液を葉の裏面に均一に噴霧接種し、湿度を保った箱(35×28×20cm)の中に入れ、25℃の恒温器で2-3日放置した後その病徴の発生を調査した。また、試験圃場に栽植された各系統の苗木について発病の有無と病徴の軽重を概括的に調査した。

##### 結果



指標植物として実用化する為には異常斑点症に典型的である斑点がよく発生し、異常斑点症と類似した黒斑病に抵抗性で生育が正常であることが重要である。選抜された7系統に対し、梨の黒斑病の抵抗性の程度を調査したところ(表27)、新高×早生赤86-2-5系統が罹病性であって、新高×早生赤86-2-7系統は中度抵抗性であった。その他新高×早生赤86-2-2等5系統は全部黒斑病に抵抗性であった。圃場試験でも同じ傾向であった。

#### c 選抜した指標植物の能力検定

##### 材料及び方法

前述の結果から、本症状の検出に用い得る検定用指標植物(新高×早生赤86-2-2)を選抜したので、全国的規模の保毒の有無検定、母樹検疫、ウイルス無毒苗生産などを進めるための検討をした。京畿道平澤市の梨園で異常斑点症が毎年発生している新高18年生の8樹と健全な新高2樹を供試した。樹当たり主枝から発生した徒長枝2箇所指標植物を高接ぎをした。指標植物が完全に活着した後、指標植物から生育した葉で病徴の発生有無、発生程度等を含めて発病葉率を調査した。新高に現れる病徴と比較分析し、指標植物としての十分な価値を持っているかを検討をした。

##### 結果

典型的な異常斑点症がよく発現し、黒斑病に抵抗性であると確認された新高×早生赤86-2-2系統を指標植物に最終選抜し、農家での実証試験を行った。新高発生樹の徒長枝2箇所に指標植物を高接ぎし検定したところ、8樹のうち16枝から全



部斑点が発生した(表 28)。その症状は新高で発生している異常斑点症状と同じであった。また病徴もはっきりして発生時期も新高より最も早く現れ、発病葉率も 6 月 30 日に 89% に達した(表 28、図 11)。一方、新高健全樹に高接ぎ検定した所では病徴がまったく発生しなかった。したがって、新高×早生赤 86-2-2 は梨葉の異常斑点症状の指標植物として適当だと判断された。

## 2 検定方法の開発

ウイルスの検定方法には、病徴観察法、草本指標植物による検定法、木本指標植物による検定法、血清学的手法、電子顕微鏡の利用法等がある。病原ウイルスが純化され、抗血清の作製が可能なものについては酵素結合抗体法(ELISA)により短期間に、多数の検体が検定出来るようになった。しかしウイルスと考えられているが、病原ウイルスが明らかにされていないものについては、指標植物を利用した検定が唯一の検定方法となっている。したがって、大部分の果樹ウイルスは木本指標植物を利用した検定が行われている。この方法は接ぎ木により接種が確実に行われるため、検定結果についても信頼性が高く、広く利用されてきた。生物検定法は、現在もなお主要なウイルス病診断法として世界中で広く用いられている。前章では異常斑点症状の感染に敏感に反応する指標植物として梨の交配実生から PS-95 を選抜した。ここではこれを利用し、早期に判別できる検定方法を検討した。試験材料には京畿道水原市農業科学技術院の試験研究圃場に梨の実生台木を列間 1m、樹間 30cm の間隔で 320 樹移植したものを供試した。接種源は毎年異常斑点症が発生し



ている新高 15 年生の徒長枝を休眠期である 12 月に採取し、ビニールで包装して  $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$  の低温室に保管し、接ぎ穂として利用した。指標植物は前章で選抜した PS-95 を供試した。病虫害の防除及び管理は慣行の栽培方法に準じて行った (42)。

#### a 接ぎ木方法と発病

##### 材料及び方法

接ぎ木方法は図 12 に示すように五つ方法で行った。A は台木上に指標植物 PS-95 を切り接ぎし、指標植物に新高の罹病枝の接種源を削ぎ芽接ぎ木接種する方法、B は台木に接種源を削ぎ芽接ぎ木接種し、その台木の上に指標植物を切り接ぎする方法、C は台木の上に接種源を切り接ぎし、その上に指標植物を切り接ぎする方法、D は台木に接種源を削ぎ芽接ぎ木接種しその上の台木に指標植物を削ぎ芽接ぎ木接種する方法、E は D の方法を交互に接ぎ木接種する方法である。接ぎ木は 1995 年 4 月 10 日に行い、接ぎ木方法別に 10 樹ずつ単区で行った。発病調査は 6 月 20 日と 7 月 19 日に指標植物から生育した葉に現れた症状について発病樹数及び発病葉率を調査した。

#### 結果

保毒の有無を検定するための接ぎ木方法は簡便で、しかも病徴が早く発現することが必要である。本試験で用いた接ぎ木方法のすべてで典型的な異常斑点症状が発現したが、その五つの接ぎ木方法うち実生の台木の上に新高罹病枝を接ぎ木しその上に指標植物を接ぎ木する 2 重切り接ぎ方法 (図 12、図 13-B) が 100% の発病樹率と 51% の発病葉率で最もよい方法であることが分った (表 29)。次に、台木に



新高の罹病枝を削ぎ芽接ぎ木接種しその上に指標植物を切り接ぎする2重削ぎ芽切り接ぎ方法(12-B、13-A)は10樹のうち8樹が発病し、42%の発病葉率を示した。台木に指標植物を切り接ぎし、指標植物に新高罹病枝を削ぎ芽接ぎ木接種する方法(図12-A)と2重削ぎ芽接ぎ木方法(図12-D)、交互の2重削ぎ芽接ぎ木方法(図12-E)は各々34%、39%、31%の発病葉率を示した。接ぎ木に要する時間は $C > A > B > D > E$ 順であった。したがって、接ぎ木時間が短く病徴の発現率も優れたBの方法が本症状の検定に相当と考えられた。

#### b 接ぎ木時期と発病

##### 材料及び方法

早期検定に最も適した接ぎ木時期を検討するため試験を行った。接ぎ木は3月29日、4月10日、4月22日、5月4日に行った。接ぎ木方法は台木の地表面から5cm上の所にあらかじめ準備した新高罹病枝の接ぎ穂を削ぎ芽接ぎ木接種した後、その台木の上に指標植物PS-95を切り接ぎした(削ぎ芽接ぎ+切り接ぎ)。接ぎ木部位が完全に活着した後に接ぎ木テープをはずした。試験区は処理当たり10樹ずつ単区とした。調査は指標植物から生育した葉に現れた異常斑点症の発生樹数及び病徴を観察した。

##### 結果

異常斑点症を早期検定するためにはどの時期に接ぎ木するのが良いかを調査した。3月29日に接ぎ木した10樹のうち9樹が発病し、発病葉率も92%で高かった(表30)。4月10日の接ぎ木では9樹が発病し、78%の発病葉率を示した。時期



が遅い5月4日の処理では10樹のうち6樹の発病で34%の発病葉率を示し、接ぎ木時期が早いほど発病葉率が高かった。3月29日に接ぎ木した区では5月中旬に発症した。5月4日に接ぎ木した区では6月5日に初めて発生が見られた。斑点数も接ぎ木時期が早い処理区に多く、早い落葉が見られた。したがって、接ぎ木時期は早いほうが検定には良いと思われた。

#### c 接触時間と発病

梨葉の異常斑点症は接ぎ木によって伝染するが、接触部が活着せず接ぎ穂からの生長がない場合でも感染することが観察された。そこで、接ぎ木検定するとき感染に要する接触時間について検討をした。

#### 材料及び方法

実生台木に新高罹病枝を1995年4月10日に削ぎ芽接ぎ木接種し、その上に指標植物PS-95を切り接ぎした。処理は削ぎ芽接ぎ木接種した新高罹病枝の芽を接ぎ木後5時間～1日、5日、14日、21日、28日が経過した後に接種した新高の罹病枝の芽を取りはずした(図14)。除去した傷の部位は乾かないように再びテープをまいた。無処理は新高罹病枝の芽を除去しなかった。処理当たり10樹ずつ単区とし、指標植物に発現する症状を6月20日、7月19日2回に発病樹数及び発病葉率を観察した。

#### 結果



接ぎ木検定するとき、接種した保毒樹を一定時間ごとにはずしてゆくことによって、ウイルス感染に要する接種源の最短接触時間を求めた。台木に削ぎ芽接ぎ木接種してビニールテープでしばった後その台木の上に PS-95 を切り接ぎした。各処理別にテープをはずして接種源を取り去った後、病徴の発現の有無を調査した(表 31)。5 時間の接触では斑点症が現れないが、1 日間の接触では 10 樹のうち 1 本が斑点を発現した。5 日間接触させたものでは 2 本が反応を示した。接ぎ木部位のカルスが肉眼で観察される 14 日間接触区では 10 樹のうち 4 本に斑点の発現が見られた。接種後 21 日、28 日に接種源を除去した区では 10 樹のうちそれぞれ 7 本、8 本が発病した。しかし、接種源を除去しなかった区では 100% 発病した。また、発病葉率では 14 日間以降に除去した区でそれ以前に除去した区で比べて高い傾向を示した。以上の結果から、罹病芽を接種した後、少なくとも 1 日間の接触でウイルスが感染することが示唆された。

#### 考察

果樹ウイルス病は草本ウイルス病のような汁液伝染が容易に起こらないため(31、92)、分離同定に大きな労力と困難がともなう。大部分の果樹ウイルス病は木本の指標植物の接ぎ木によって検定が行われている(43、44、46、62、90、93、102)。1950 年代からリンゴのウイルス病を検定するために木本指標植物である Lord Lambourne M.139, Virginia Crab K6, Spy227, Belle de Boskoop 等の指標植物が利用されている(60、92)。最近ではリンゴの高接ぎ病として知られている apple chlorotic leaf spot virus(ACLSV), apple stem pitting virus(ASPV), 及び apple stem growing virus(ASGV) の 3 種のウイルス病を同時に早期の検定が可能な木本指標植物が選抜され広く利用されている(102、114)。梨のウイルス病の指標植物



では Beurre Hardy, Quince C7/1, Nouveau Poiteau, Williams Bon Chretien 等が利用されているが (92)、最近では日本でウイルス病として知られているナシえそ斑点病も木本指標植物である HN-39 が利用されている (43、44)。梨葉の異常斑点症は梨の栽培中最も重要な病気で現在新高に大発生し、大きな被害が出ている。本症を防除するには繁殖用母樹に対しウイルス検定を行い、無毒の接ぎ穂を普及すること、栽培されているの梨樹の保毒の有無を検定することが大切である。これらの検定をするために検定用指標植物が必要不可欠である。しかし、罹病しているが、発現しない保毒品種は将来罹病性である新品種を高接ぎの方法によって普及しようとする場合、大きな障害になると考えられる。したがって、本ウイルス病の保毒の有無を早期に検定できる指標植物の選抜は重要である。本研究の結果から、ウイルスを保毒せず本症状に対して典型的な病徴が早期に発現し、本病と類似した黒斑病に高度の抵抗性を有する交配実生の系統 (新高×早生赤 86-2-2) が育成選抜された。育成過程で両親が罹病性の組合では罹病性の獲得率が高く、片親が罹病性の品種では罹病性の実生の獲得率が低かった (表 26)。これらの結果から見て F1 が罹病性である場合は片親または両親が罹病性の品種であると考えられるが、本病の罹病性の有無に関する遺伝的關係はこらからの詳細な研究が必要である。

実際に農家の梨園で新高×早生赤 86-2-2 が梨葉の異常斑点症の保毒の有無を早期に検定できるかどうかを検討したところ、異常斑点症の病徴が早期に認められたので指標植物として使用できることが分った。したがって、本研究で選抜した新高×早生赤 86-2-2 は PS-95 と呼ぶことにした (図 11)。今後 PS-95 が本症の早期発見に広く利用されると思われる。

果樹ウイルス病の診断のための検定は年中いつでも短期間に実施できる方法が望ましい。植物ウイルスの検定方法では指標植物を用いる生物検定法、血清学的手法、



電子顕微鏡による検定法などが知られている。しかし、大部分の果樹ウイルス病は木本指標植物を利用した検定に依存しているためにその検定期間が制限されている。指標植物による検定方法にはいろいろがあるが、リンゴの場合2重切り接ぎ方法と2重削ぎ芽接ぎ木法が用いられている(94)。核果類では削ぎ芽接ぎ木接種方法が用られ、4月から10月まで検定が可能で、夏には検定期間の短縮が可能である(93、111)。また、カンキツウイルスの検定には実生に直接接ぎ木接種する場合と被検樹の組織を接ぎ木接種する場合があるが、主に一芽腹接が使われる(39)。梨葉の異常斑点症は現在保毒の有無を検定する適当な方法がないため防除に多くの困難があった。そのため指標植物の利用が実用上強く望まれている。本研究のなかで異常斑点症に感受性の高い指標植物 PS-95 を選抜した。これを利用し、接ぎ木時期別に試験したところ、接ぎ木時期が早い程症状が確実に大きく現れることが確認された。一般的に露地の接ぎ木時期は4月初めと考えられるが、検定するためにはこれより少し早い時期に接ぎ木するのが適していると考えられた。接ぎ木検定のための接ぎ木方法は簡単にだれでも容易に出来る作業でなければならない。これまでの検定は主に二重削ぎ芽接ぎ木方法が広く利用されてきた(92、94)。しかし、本研究の結果によると二重削ぎ芽接ぎ木方法より二重切り接ぎ方法の方が病徴の発現が良かった(表29)。しかしながら二重切り接ぎ方法は熟練した技術が必要であり時間も多く要するので、作業が簡単で、大量検定が可能な二重削ぎ芽切り接ぎ方法がより実用的な方法と考えられた。この方法は梨の台木に罹病枝の接種源を削ぎ芽接種し、この台木の上に指標植物を切り接ぎする方法である。この方法と類似した方法としてリンゴ高接ぎ病の検定がある。これは実生台木に指標植物を切り接ぎし、その指標植物に接種源を削ぎ芽接ぎ木接種する方法である(94)。

接ぎ木接種した後、活着及びカルスの形成前にウイルスが伝染し発病する場合が



ある。モモの場合 mosaic, yellow, rosette ウイルスの伝染が成立するには mosaic 症状は 2-3 日以上、yellow と rosette 症状は 8 日以上、接触が必要とされている。これは健全樹と罹病樹との原形質連絡体が接合してウイルスが移動するためある期間の接触時間が必要なためだとされている (25、52)。リンゴ高接ぎ病の場合ウイルス感染芽からマルバカイドウへのウイルスの移行は接ぎ木活着、カルス形成以前に systemic に行なわれ、2 日間接触させれば感染が成立すると報告されている (63)。モモの *Prunus necrotic ringspot virus* と *Prune dwarf virus* は 3 日以上接触するとウイルスが移行する (112)。また、12 種の核果類ウイルスについて接触によるウイルス伝染の速度が調べられ、その速さによって 3 つのグループに分けられている。すなわち、第 1 のグループは接触によって感染するのは 48 時間で 0%、74 時間で 100% のもの、第 2 のグループは 66 時間で 0%、106 時間で 100% のもの、第 3 のグループは 98 時間で 0%、152 時間で 100% 伝染するものである。このように、ウイルスの種類によって伝染が生じるための接触時間は異なっている。これらの原因はウイルスの細胞内の局在性によって説明されている (25)。篩部組織にあるウイルスは接ぎ木部位の篩部癒合に時間がかかるため、ウイルスの感染に時間がかかると考えられている (21、33、35)。本試験より異常斑点症の伝染が成立するには少なくとも 1 日以上接触していることが必要であることが明らかになった。本症状の病原と推定されるウイルスがどの部分に存在しているか明らかでない。接ぎ木後 1 日で木部組織が癒合することは困難であると考えられるので、接ぎ木部位の癒合が起こらずに病原がどのように移行するかについては今後の研究が必要である。

以上の結果から梨葉の異常斑点症の保毒の有無の検定方法としては指標植物 (PS-95) を利用して 3 月下旬頃に二重削ぎ芽切り接ぎをする方法が適当と考えられ



た。

#### 摘要

梨葉の異常斑点症の保毒有無を迅速正確に検定できる木本指標植物を選抜するために試験を行った。新高×早生赤等 5 品種の交配組み合わせ 102 個体を供試して 10 個体を一次選抜した。選抜された個体中では典型的な異常斑点症が早期に発現し、本症と類似した黒斑病に抵抗性である新高×早生赤 86-2-2 系統を最終選抜した。選抜された指標植物を利用して農家の梨園で異常斑点症の保毒有無を検定したところ、保毒の有無の早期判別が可能になった。最終選抜された新高×早生赤 86-2-2 系統を PS-95 と命名した。指標植物 PS-95 を利用して梨葉の異常斑点症の保毒の有無を短期間に検定できる方法を開発するための検討を行った。接ぎ木時期は各処理中最も早い 3 月 29 日に接ぎ木した区で典型的な異常斑点症が多く現れた。接ぎ木方法は二重切り接ぎ方法で発病率が高くなったが、接ぎ木に時間がかかるという欠点があるため、接ぎ木時間が短く比較的発病率も高い二重削ぎ芽切り接ぎ方法を検定方法として選んだ。接ぎ木後、本ウイルスが移行し感染の成立に要する接触時間は少なくとも 1 日間であった。



Table 27. Severity of abnormal leaf spots on pear seedlings that developed on several  
preparations obtained at a distance of 100 m from two parent trees

Table 26. Response of pear seedlings obtained from various cross combinations  
to double grafting inoculation.

Cross combination	No. of seedlings	
	Inoculated	Symptoms developed
Niitaka × Waseaka ( ' 86)	60	6
Niitaka × Housui ( ' 86)	8	-
Niitaka × Suhwangbae ( ' 86)	12	1
Niitaka × Imamuraaki ( ' 86)	16	1
Niitaka × Tama ( ' 86)	6	2
Total	102	10



Table 27. Severity of abnormal leaf spot symptoms that developed on seven progenies preselected as indicator plants from two parent cross combinations in 1994 and 1995, and level of resistance of the progenies to pear black spot disease caused by *Alternaria kikuchiana*.

Progeny No.	Severity of abnormal leaf spot *		Reaction to <i>A. kikuchiana</i>
	1994	1995	
Niitaka × Waseaka			
86-2-2	+++	+++	R <sup>b</sup>
86-2-30	+++	+++	R
86-2-7	+	+	M
86-2-5	+	+	S
86-2-20	+++	++	R
86-7-20	++	+++	R
Niitaka × Imamuraaki			
87-7-13	++	++	R

\* Observation was made on the basis of 6 plants.

+ : few    ++ : abundant    +++ : numerous.

<sup>b</sup> R : resistant    S : susceptible    M : moderate.



Table 28. Development of the abnormal leaf spot disease on a selected indicator plant 86-2-2, when top-grafted to Niitaka trees at an orchard on April 10, 1995.

Tree status	No. trees tested	No. twigs grafted/ tree	% diseased leaves	
			June 15	June 30
Diseased Niitaka	8	16	75.4	89.2
Healthy Niitaka	2	4	0	0



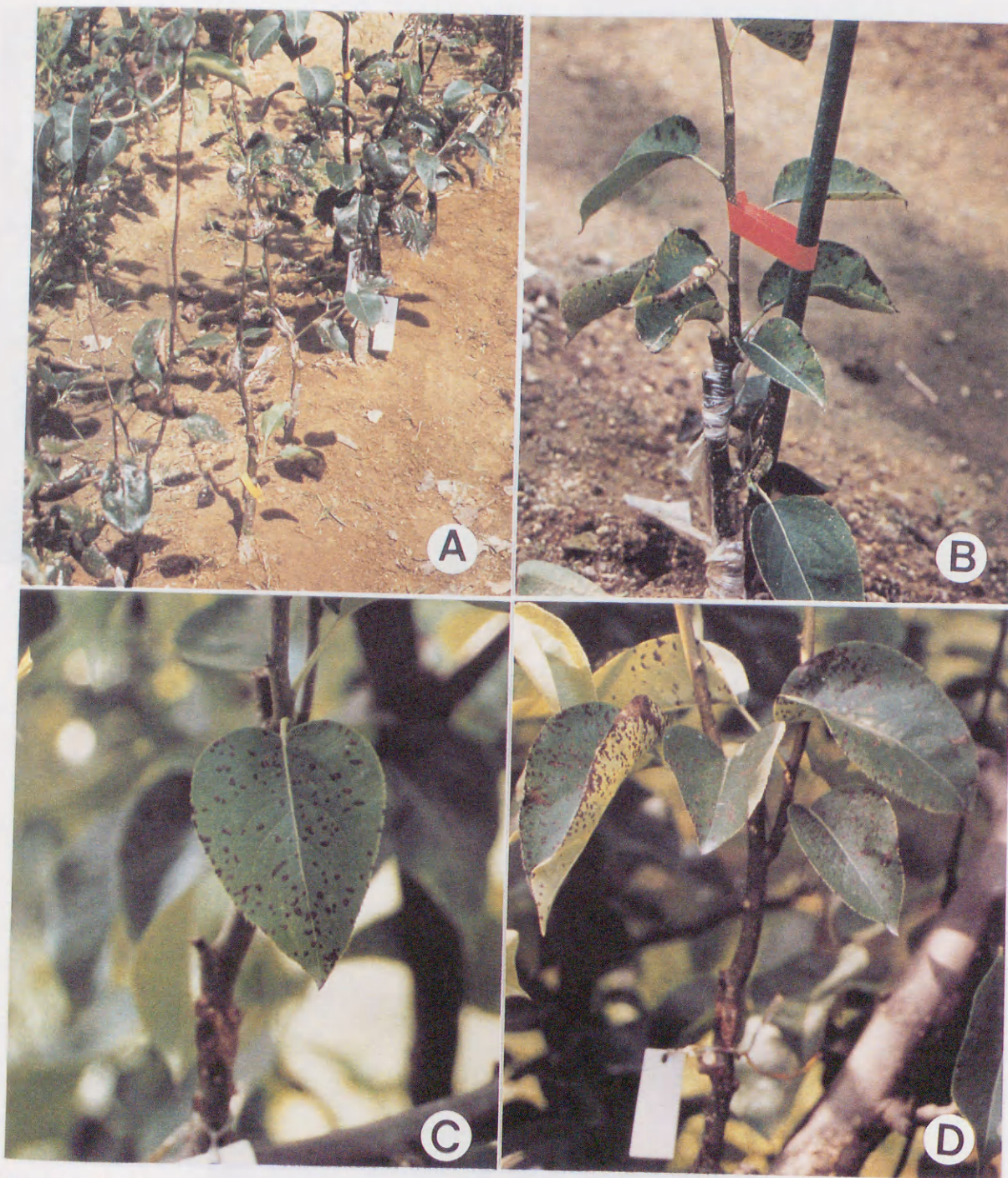


Fig. 10. Selection process of indicator plants for early detection of pear abnormal leaf spot disease. A: Evaluation of 7 preselected progenies by a double grafting inoculation method using seeding rootstocks and diseased Niitaka trees, B: Lesions of abnormal leaf spot that appeared in the leaves of the progeny 86-2-2 after double grafting inoculation, C: Development of abnormal leaf spot in progeny 86-2-2, two-months after top-grafting to a diseased Niitaka tree in a commercial orchard in 1995, D: Shape of the abnormal leaf spot lesions that appeared in 86-2-2, 6 months after top-grafting.





Fig. 11. Selected PS-95 as an indicator plant for pear abnormal leaf spot disease.  
A,B: A typical symptom of abnormal leaf spots that developed in PS-95, C:  
Shapes of the abnormal leaf spot lesions in PS-95 two months after  
top-grafting.



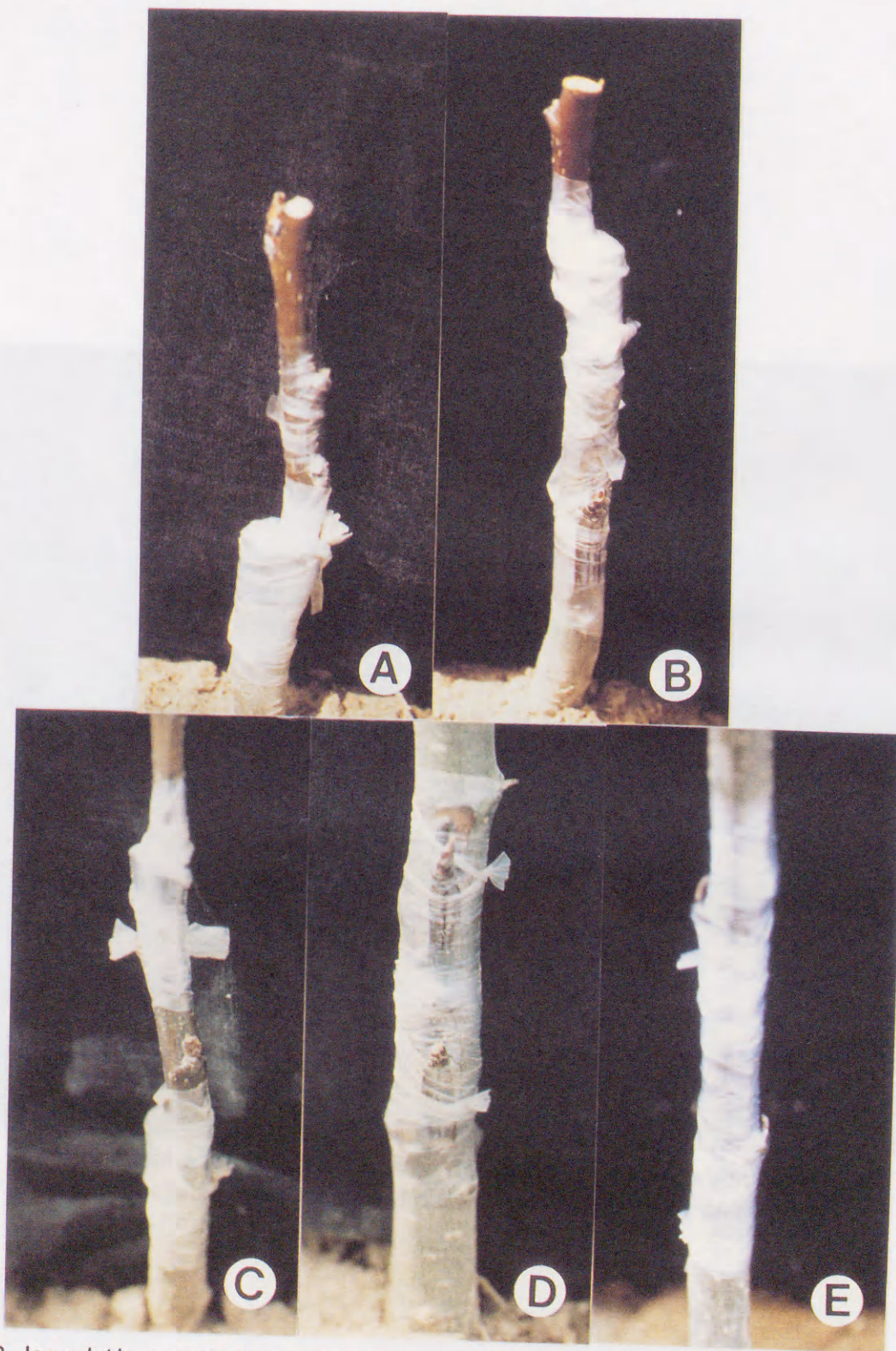


Fig. 12. Inoculation methods used in the study A: Double chip grafting where PS-95 was grafted on seedling rootstock, and then an infected bud was chip-grafted to PS-95, B: Double chip grafting method, the same as A except an infected bud being grafted on the rootstock, C: Double grafting where an infected was grafted on seedling rootstocks and then PS-95 was grafted on the scion, D: Double chip budding method where an infected bud was first chip-grafted, and then a bud of PS-95 was chip-grafted to the seedling rootstock, E: Alternate D double chip budding method, where the method D was alternated.





Fig. 13. Abnormal leaf spot symptoms that developed in PS-95 when inoculated with an infected bud or tree by a double chip grafting(A) and by a double grafting method(B).



Table 29. Symptom severity that developed in the indicator line PS-95 when inoculated with infected buds or trees by five different grafting methods.

Inoculation method	No. trees inoculated *	No. trees with the symptom		% leaves diseased
		June 20	July 19	July 19
A <sup>b</sup>	10	4	8	34
B	10	5	8	42
C	10	6	10	51
D	10	2	5	39
E	10	1	3	31

a Inoculated on April 10, 1995.

b See the legend in Fig. 12.



Table 30. Symptom severity that appeared in the indicator line PS-95 when inoculated with infected buds at different times by a double chip grafting method.

Time of grafting	No.trees inoculated	No.trees with the symptom		% leaves diseased
		June 20	July 19	July 19
Mar. 29	10	9	9	92
Apr. 10	10	8	9	78
Apr. 22	10	7	7	34
May 4	10	4	6	34

Fig. 14. The photograph showing a method to determine the time needed for graft infection by double chip grafting.





Fig. 14. The photograph showing a method to determine the time required for graft transmission by double chip grafting.



Table 31. Time required for graft-transmission of the causal agent as expressed by infections of the indicator line PS-95 that was inoculated with infected buds by a double chiap grafting method.

Contact period <sup>a</sup>	No.trees inoculated	No.trees with the symptom		% leaves diseased
		June 20	July 19	July 19
5 hours	10	0	0	0
1 day	10	0	1	10
5 days	10	0	2	8
14 days	10	2	4	39
21 days	10	3	7	55
28 days	10	4	8	62
Control <sup>b</sup>	10	5	10	85

<sup>a</sup> The period from grafting to removing the scion.

<sup>b</sup> The grafted scion was not removed from the stock.



## 第8章 病原体の探索

前章までの結果からナシ葉の異常斑点症は病徴から病原性のある糸状菌および細菌の分離はできず(第5章)、病原は樹体内に潜在していることと、接ぎ木によって伝搬することから発生の原因はウイルスではないかと推定された(第6章)。従って木本指標植物の選抜によって新しい検定法を開発した(第7章)。本章では草本指標植物の探索とともに透過型電子顕微鏡を用いて病原ウイルスの同定を試みた。

### 1 草本ウイルス指標植物による反応

梨異常斑点症は今まで汁液接種が出来ず、草本検定植物は知られていない。従って汁液接種によって草本植物への伝搬を試みると共に、草本検定植物の可能性を探索した。

#### 材料および方法

農業科学技術院果樹園に保存している異常斑点症に罹った新高罹病葉および花べんを採取し、マメ科、タバコ属、その他の草本植物21種について常法により汁液接種した。

#### 結果

草本指標植物の選抜の目的で21種の草本植物を用い汁液接種しその反応を調べたところ供試した全植物から病徴を観察することができなかった(表32)。



## 2 電子顕微鏡による観察

### 材料および方法

本症が毎年ひどく発生している新高20年生と健全な新高20年生、指標植物として選抜されたPS-95から休眠枝を採取し、8℃の低温室に保ちながら接ぎ穂として利用した。あらかじめ準備した梨実生台木に罹病新高および健全新高接ぎ穂を切り接ぎ罹病苗木を養成した。新高罹病および健全苗木に指標植物PS-95を接ぎ木した苗木を昼温23℃、夜温18℃と調整した人工気象器(8000 lux)に入れ、病徴発現を誘導し試験材料とした。上記苗木が人工気象器内で黒点の症状が現れた時点から病徴を3段階に区別し試料を採取した。1) 初期病徴として葉の先端から黄色の斑点が発生し黒色に変わる直前の状態、2) 中期の病徴として葉表面に発生した黄色の斑点が黒色に変わったのと黒色の大小の斑点の融合の少ない状態の試料、3) 典型的な病徴として黒色の斑点が多く発生し、また小さい斑点が癒合し大きい斑点となって葉の全体が黒くなった状態の試料を採取した。対照試料は健全樹の健全葉とした。

電子顕微鏡の試料調製は典型的な異常斑点症を示す葉と同じ大きさの健全葉を採取し1-2mmの大きさを試料を細切し2.5% glutaraldehyde 溶液 (pH 7.0, phosphate buffer) で常温に2時間固定した。その後bufferで3回洗って、2% osmium tetroxide 溶液 (pH 7.0, phosphate buffer) で2時間固定した後0.5% aqueous uranyl acetateで一晩染色した。その後試料を低濃度である50% ethanolから70%, 80%, 90%, 95% ethanolで各脱水し、propylene oxideで2回洗った。Epon 812で包埋した後diamond knifeで超薄切片を作成した。この試料を2%



uranyl と lead citrate で 2 重電子染色し透過電子顕微鏡 (Zeiz EM 902A) で検鏡した。

### 結果

罹病新高および指標植物 PS-95 葉を電子顕微鏡で検鏡したところ、葉肉細胞質内にひも状のウイルスが存在していることが確認された (図 15、16)。この粒子を横に切断して調査したところ直径が 12nm であった (図 17、18)。葉肉細胞質内には繊維糸を含有している小胞が存在している (図 19)。この小胞の大きさは 50 - 100nm で tonoplast に存在している。一般的に小胞は ssRNA genome をもっている植物ウイルスによって罹病した細胞のみに存在する。本ウイルスは篩部組織より葉肉細胞に多く存在することが明らかとなった (図 20)。3 段階の試料の中では初期の病徴が観察のためには最も良かった。

### 考察

本症は現在までのところ草本植物への伝搬は知られていない。本病原ウイルスの形態や諸性質を明らかにするためには種々の方法によって再度草本植物への伝搬を試みる必要がある。

ウイルスの同定には汁液による感染および感染植物の組織内のウイルスの性状に基づく方法と精製ウイルスの性状を基礎とする方法があるが本研究では前者を用いた。本症に罹病した新高と指標植物 PS-95 (圃場および人工気象器で生育した樹) の葉について電子顕微鏡を用い細胞内の微細構造を検鏡したところ、葉肉細胞質内に長型の屈曲性ひも状のウイルス様粒子が集団として蓄積し存在している状態が観察された (図 15、16)。このウイルスの粒子は核近くに大きいものと小さいもの



が集団として整列していた(図 15、17、19)。粒子集団を横に切断(cross section)したところ円形の小さい粒子の密集群として観察された。この粒子の直径を測定した結果直径は約 12nm であった。しかし、この粒子の長さはウイルス様粒子の精製ができなかったために測定できなかった。このウイルスを綿密に観察したところ一般的に知られている四つのグループのひも状ウイルスの形状とは異なっていた。

ひも状ウイルスとして全植物ウイルスの 30% を占める Potyvirus に感染した宿主はウイルスの粒子以外に風車型封入体の構造物を持っているのが細胞病理学的特徴である(23)。他の植物ウイルスにも封入体は生成されるが、管状の風車型封入体は Potyvirus の感染細胞のみで見られる。他のひも状ウイルスである Tobamovirus の細胞病理学的特徴は x-body の形成を誘導することで、また Potexvirus の特徴は細胞質内に鈴のような薄い層の封入体の形成を誘導することである。しかし、本研究で観察された梨葉の葉肉細胞内に存在しているウイルス様粒子の形状は上に列挙したひも状ウイルス粒子とは明らかに違っていた。他の屈曲性ひも状のウイルスである Carlavirus(3、5) は本研究で考察された梨葉葉肉細胞内に存在しているウイルス様粒子とはその形態が異なる。同じ梨罹病葉の細胞内に存在している屈曲性ひも状のウイルス様粒子および罹病細胞を形態学的面から観察してみると、このウイルスは屈曲性ひも状ウイルスグループのうち Closterovirus と最も似ていることからこのグループに属するウイルスと考えられた(54、59、116)。Closterovirus の粒子は直径が 12nm、長さが 600 - 2000nm の ssRNA genome 構造をもち他のひも状ウイルスに比べて外皮蛋白質の線状が緩やかに巻かれた構造をもっており、粒子の形状もしなやかなひも状粒子が特徴である。またこのグループに属する大部分のウイルスは篩部組織に存在するが(24) 本研究で確認されたウイルス様粒子は主に梨



葉肉細胞に存在していた。

梨葉の罹病細胞内にはウイルス様粒子外に直径 50 - 100nm 大きさの円形の小胞 (vesicles) が観察された。また小胞中央には密集した繊維糸を含有している (図 19)。この繊維糸を含有している小胞は梨葉異常斑点症がウイルスによることを証明する重要な証拠と考えられる。なぜならこの小胞は一般に ssRNA genome をもつ多くの植物ウイルスによって罹病した細胞の病理学的特徴として知られているからである (23)。小胞の有無は罹病植物の超微細構造の特徴を綿密に観察しウイルスを診断する場合の重要な糸口となされている (23、24、41)。多くの場合、このウイルスによって生成された小胞はウイルスを複製するときに出る dsRNA を含んでおり、小胞は細胞内におけるウイルスを複製する場所であることが知られている (2、53、106)。Closterovirus を判定する場合、繊維糸を含有している小胞と屈曲性ひも状ウイルス様粒子の存在、そしてその篩部局在性が重要な指標とされた (24)。Closterovirus は元の宿主から汁液伝染せず、罹病葉に現れる病徴と宿主範囲が必ずしも一定でないで、これらのみを判定に利用するのには限界があった (24、54、59)。

梨異常斑点症の病原の同定の一環として宿主範囲、病徴および伝染方法などを調査した結果、宿主範囲は梨属以外には認められなかった。また宿主植物からの汁液伝染も起らなかった (73)。そして病徴も一定せず不規則的であった (71、72)。このような現象は Closterovirus の特性と似ている。大部分の Closterovirus の感染によって生じる小胞は特徴的な現象をもっていて、Beet yellows virus (BYV) type と呼ばれている (20、24)。しかし、"BYV" type の小胞は現在まである特定の細胞器官 (organelle) との関連性が確認されていない (20)。この "BYV" type 以外の Closterovirus によって生じる小胞は mitochondria, endoplasmic reticulum または



tonoplast に生成されることが報告されている。即ち、Dendrobium vein necrosis virus と Grapevine leafroll virus は小胞が mitochondria に生成されて (41)、Lilac chlorotic leaf spot virus は endoplasmic reticulum に生じることが報告されている (6)。一方、Diodia vein chlorosis virus は tonoplast に小胞が形成されることが最近報告された (54)。

本研究で梨異常斑点症の黒点組織から観察された屈曲性ひも状ウイルス様粒子とこれらと関連する小胞は大部分の Closterovirus とはちがって篩部組織のみに局限されず、多くの葉肉細胞にも認められた (図 20)。現在まで知られている Closterovirus グループのうち、篩部局在性を示さないのは Dendrobium vein necrosis virus と Lilac chlorotic leaf spot virus だけである (6)。これらのウイルス粒子と小胞は本梨異常斑点症と同じ葉肉細胞にも生成されている。さらに興味深いことはこれらの小胞が篩部局在性ウイルスでは全部 "BYV" type であるが、その以外のウイルスによって生じる小胞は前述のように特定の細胞器官で生成された。ウイルス複製部位、小胞の存在など closterovirus は他のウイルスグループと比べて多様な性質をもっているウイルスの集合群である。

梨葉の異常斑点症については葉の病徴 (71)、接ぎ木伝染性 (73)、繊維系をもっている小胞 (ssRNA 感染の細胞病理学的特徴)、そして屈曲性ひも状ウイルス様粒子の存在から判断してこの病気は ssRNA ウイルスの感染によるものと考えられる。また他の屈曲性ひも状ウイルスである Potyvirus、Potexvirus および Carlavirus の細胞病理学的特徴と相違点からみて、このウイルスは Closterovirus の一種と考えられる。

梨に発生するウイルス病は世界的に 10 余種が報告されている (92)。日本には本病と類似した病害として 1957 年に梨えそ斑点病が報告され、1970 年代には接ぎ



木伝染性ウイルス病であることが明らかとなっているが病原は同定されていない(44)。しかし、柳瀬ら(115)は病原がひも状ウイルスで Pear vein yellow virus と Apple stem pitting virus とは strain が異なるウイルスとした。Pear vein yellow virus は血清学のおよび粒子の形態学的特徴から Clostero-like virus と報告された(32)。

以上の研究結果から梨葉異常斑点症を起こす病原ウイルスは病態学的、形態学的面から Closterovirus との共通的特性をもっているため Closterovirus による病害と考えられた。

#### 摘要

梨葉異常斑点症に罹病された新高と指標植物 PS-95 の葉を電子顕微鏡を用いて細胞内微細構造を検鏡したところ、屈曲性ひも状のウイルス様粒子が集団として存在していることが確認された。葉肉細胞質内にあるウイルス様粒子の直径は 12nm であったが粒子の長さは測定できなかった。繊維糸を含有している小胞は一般的に ssRNA genome をもっている植物ウイルスによって罹病した細胞で生成されるが、本研究ではこの小胞は tonoplast に形成された。梨葉異常斑点症の罹病葉を草本指標植物に汁液接種したが病徴は現れなかった。しかし、接ぎ木接種によっては感染し典型的な黒点が現れた。発病した葉にはウイルス様粒子が存在することが確認された。病徴、繊維糸を含有した小胞の存在、そして接ぎ木伝染などから判断して梨葉異常斑点症を起こすウイルス様粒子は Closterovirus の一つであると考えられる。



Table 32. Reaction of herbaceous indicator plants to sap inoculation prepared from affected pear leaves.

Indicator plants	Symptom expression
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-
<i>C. quinoa</i>	-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-
<i>N. occidentalis 37b</i>	-
<i>N. tabacum</i> sv. Samsun	-
<i>N. clevelandii</i>	-
<i>Benthamiana</i>	-
<i>Gomphrena globosa</i>	-
<i>Datura stramonium</i>	-
<i>D. metel</i>	-
<i>Cucumis sativus</i>	-
<i>Cucurbita pepo</i>	-
<i>Solanum melongena</i>	-
<i>Physalis horidana</i>	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-
<i>Cassia tora</i>	-
<i>Luffacy cylindrica</i>	-
<i>Vicia faba</i>	-
<i>Vigna unguiculata</i>	-
<i>Lagenaria leucantha</i> var.	-



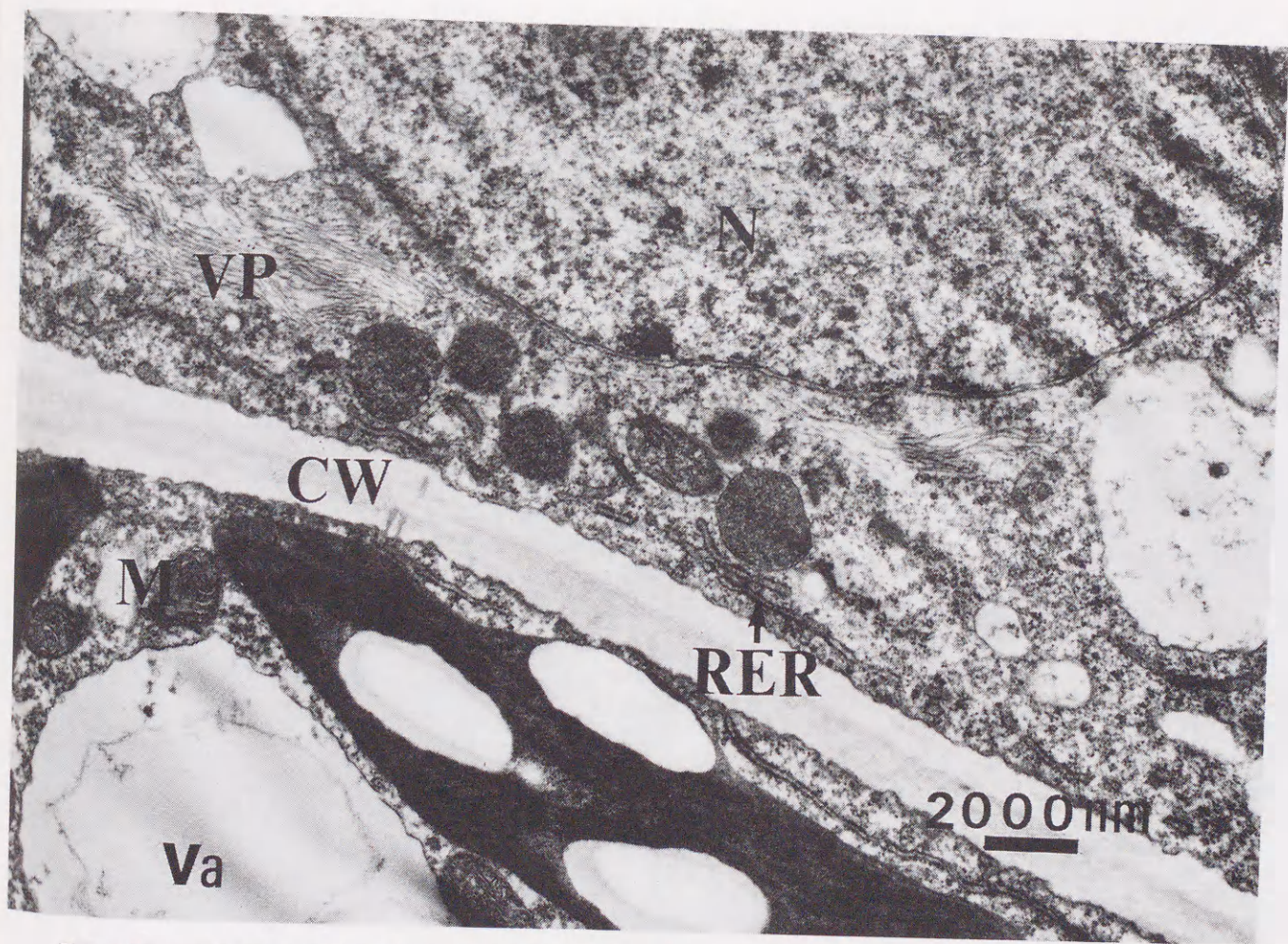


Fig. 15. Longitudinal section of viruslike particles (VP) near the nucleus (N). The particles appear as bundles. CW=Cell wall ; RER=Rough endoplasmic reticulum; M=Mitochondria ; Va=Vacuole.



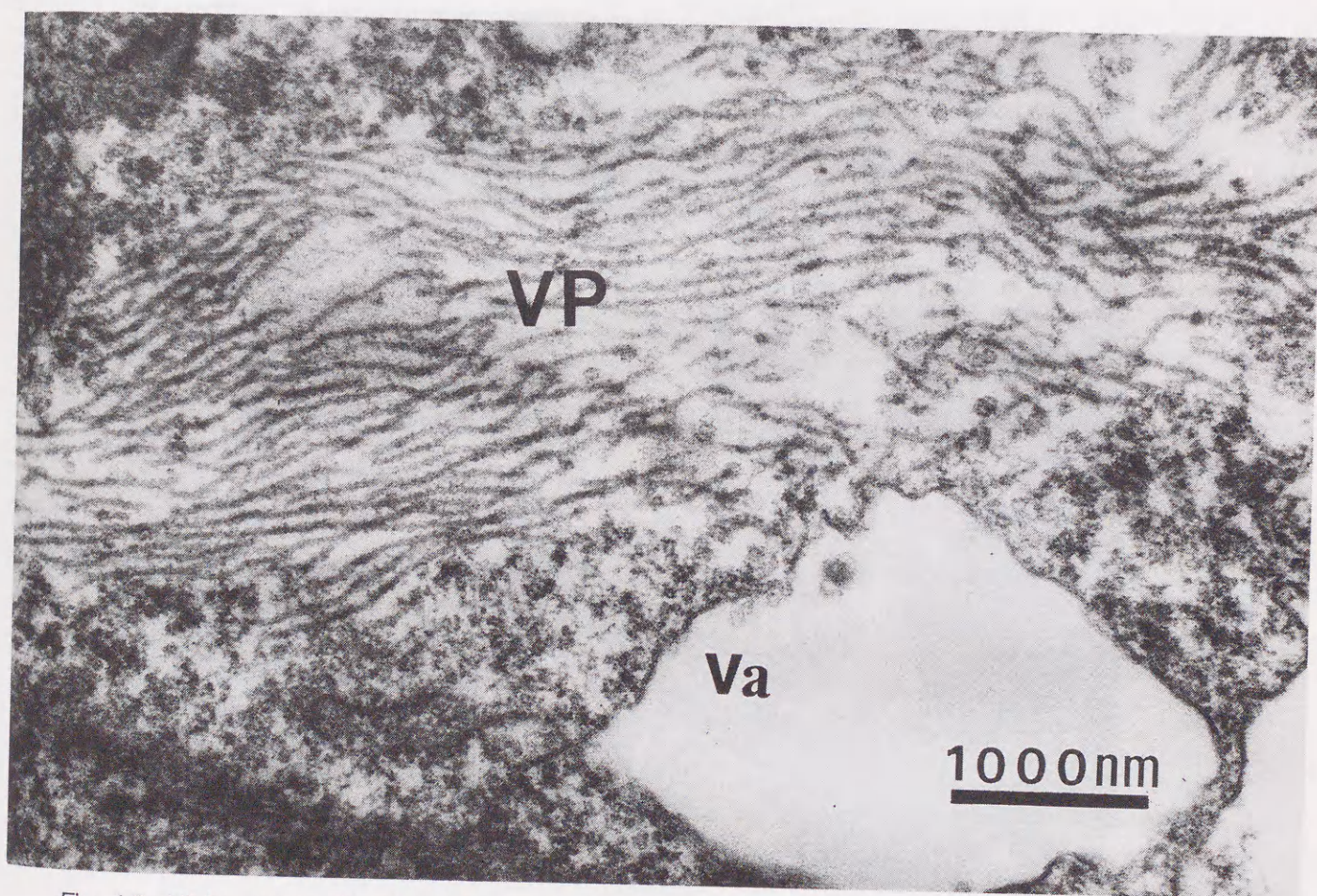


Fig. 16. Higher magnification of virus-like particles(VP) in Fig. 15 showing details of the particle structure. Va=Vacuole.



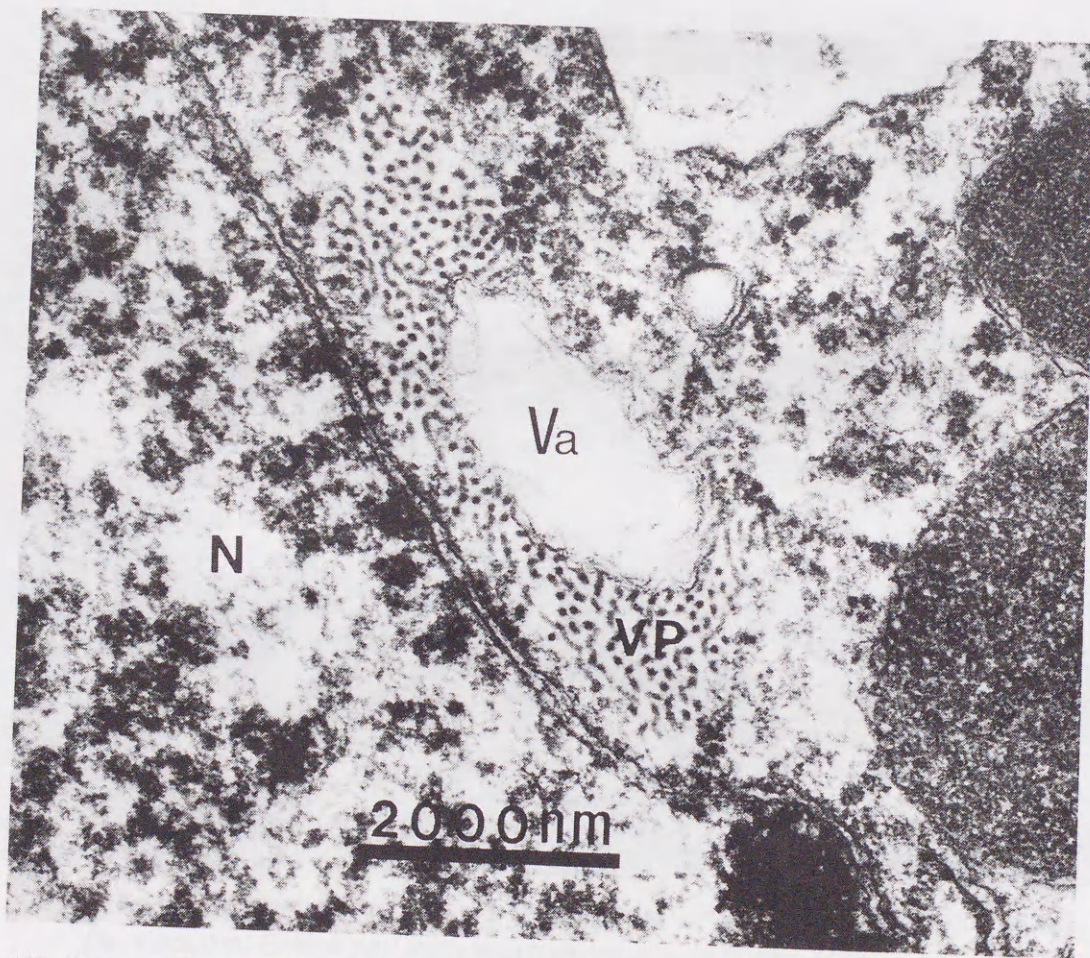


Fig. 17. Transverse section of virus-like particles(VP) which appeared as densely packed electron-dense spherical particles. N=Nucleus ; Va=Vacuole.



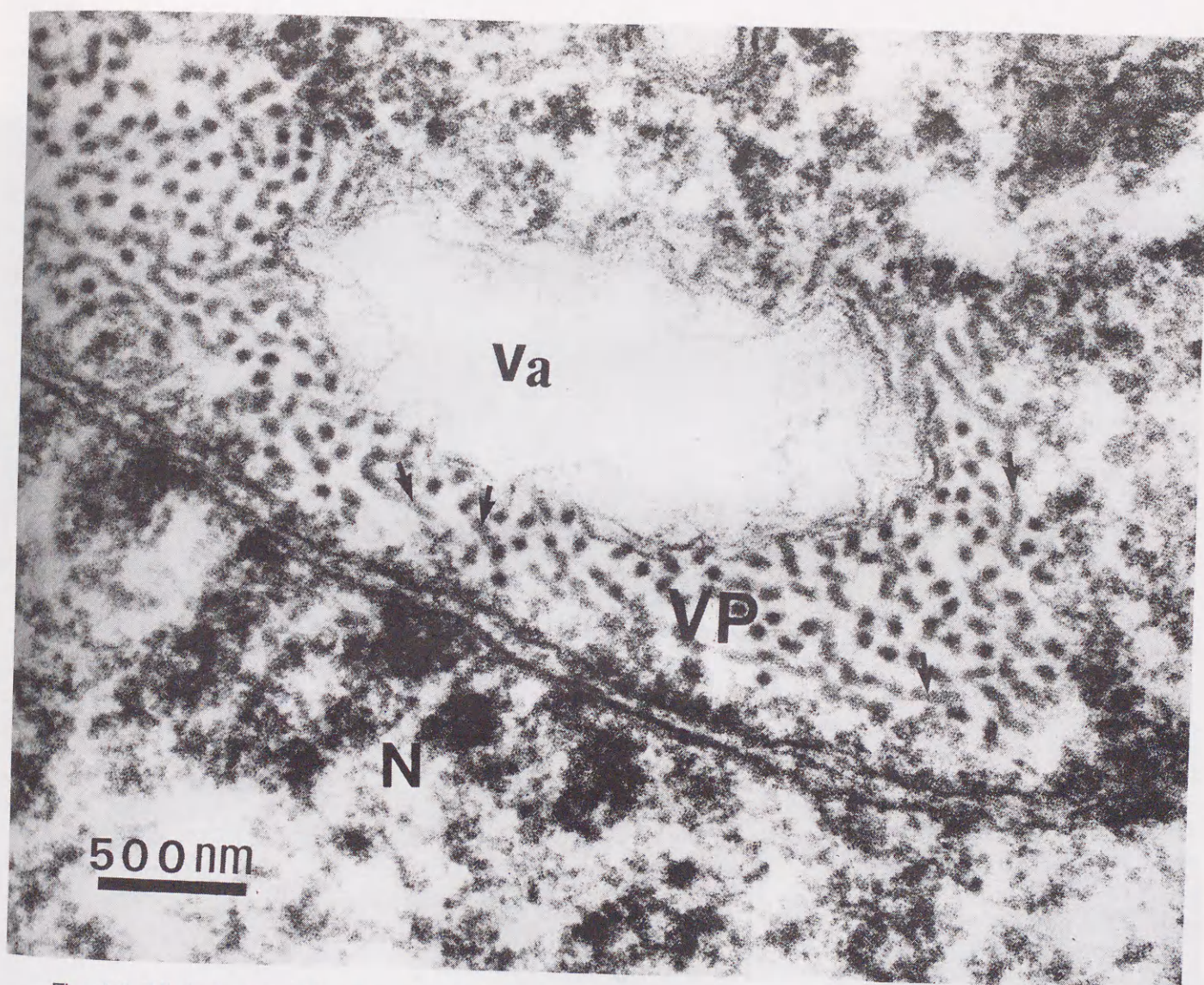


Fig. 18. Higher magnification of virus-like particles (VP) in Fig. 17 showing details.  
 Va=Vacuole. Some particles were obliquely sectioned (see arrows).



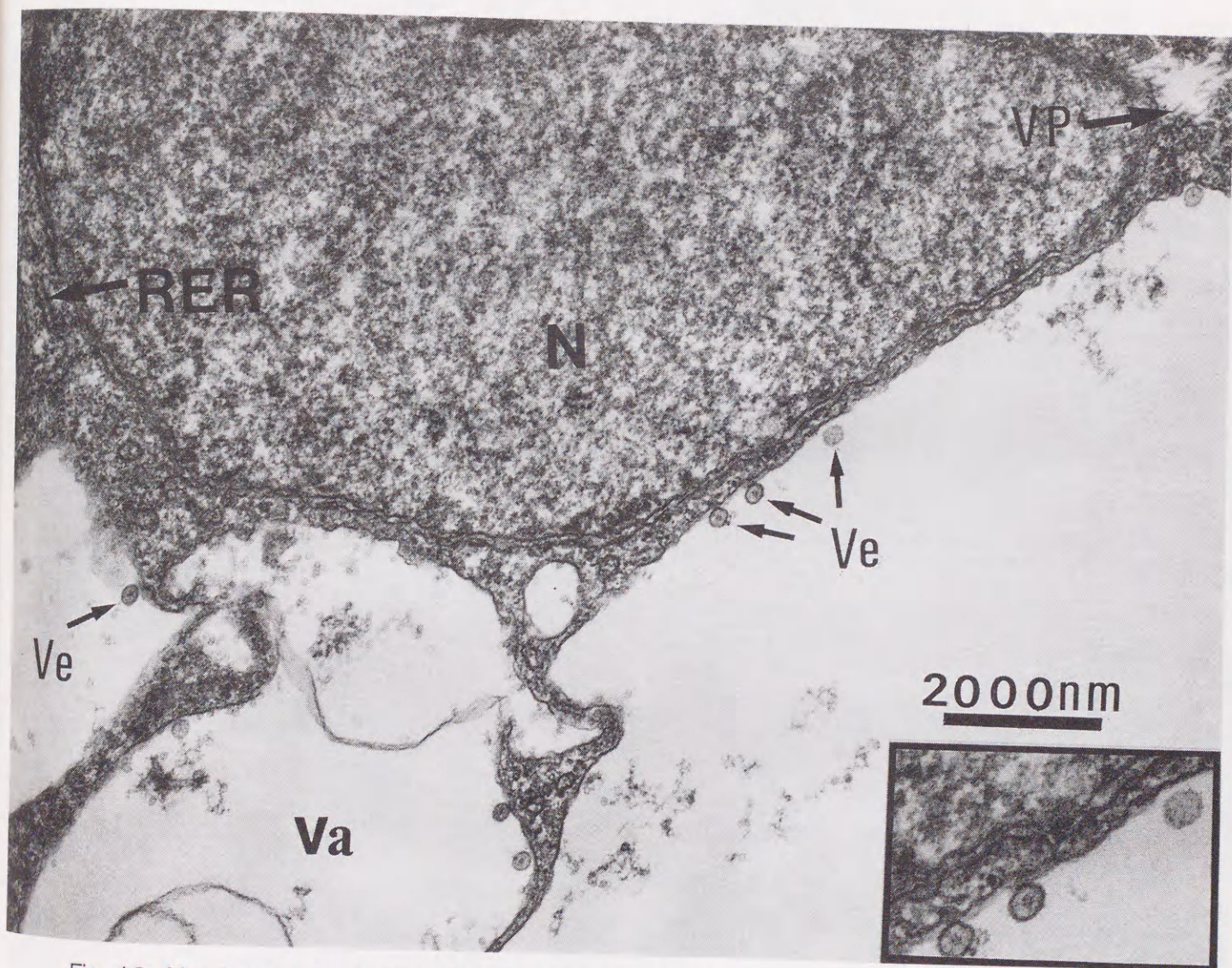


Fig. 19. Membraneous vesicles(Ve) containing electron-dense fibrils formed at the tonoplast of mesophyll cell are shown. Upper virus-like particles(VP) near the nucleus at the right corner are also shown. The insert shows higher magnification of three vesicles in Fig.19. N=Nucleus ; RER= Rough endoplasmic reticulum.



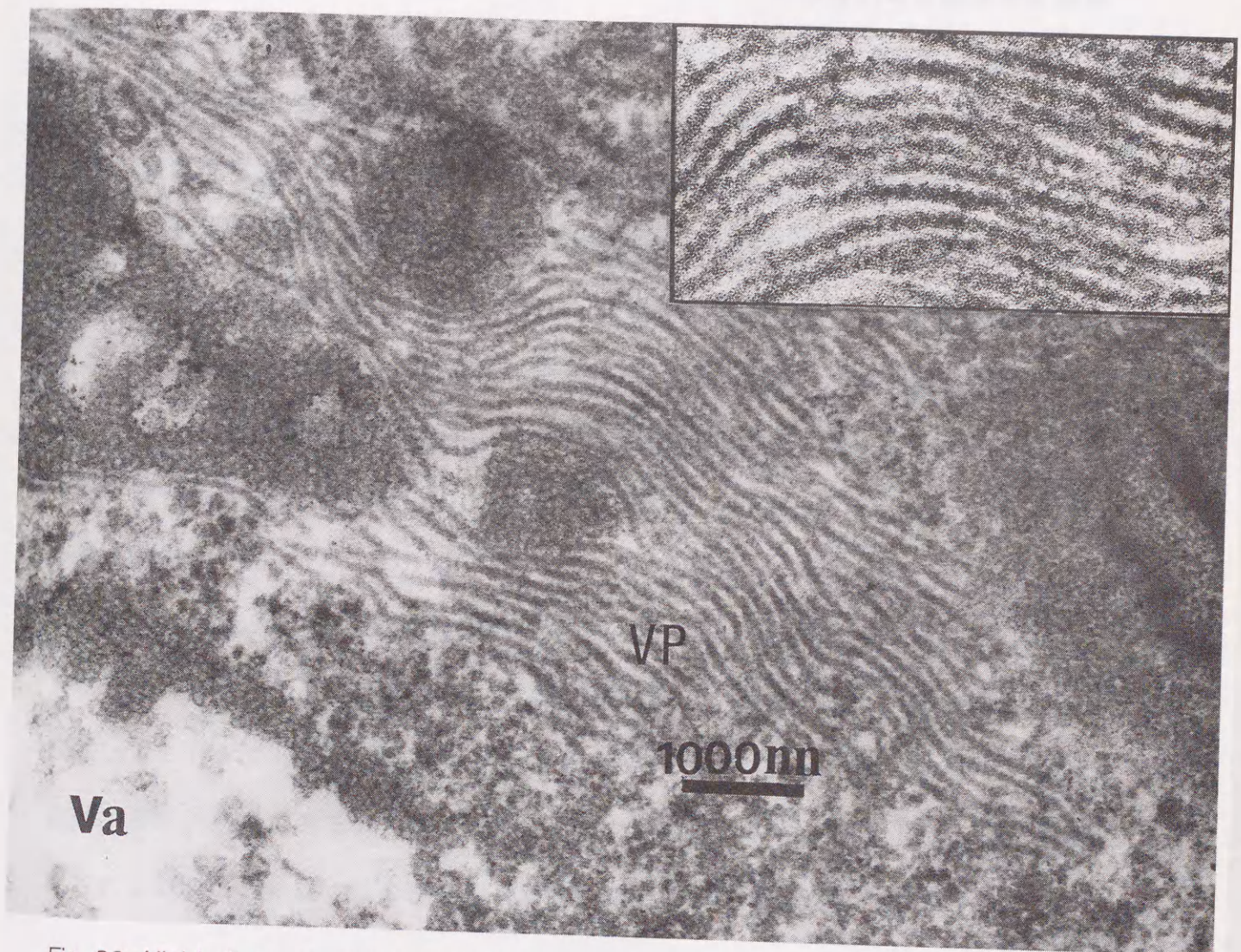


Fig. 20. Highly flexuous rod-shaped virus-like particles (VP) in another mesophyll cell. The insert shows higher magnification of virus-like particles (VP) showing details. Va=Vacuole.



## 第9章 異常斑点症の総合防除対策

果樹ウイルス病の症状はカビや細菌とは異なり、初めには樹が衰弱症状を示し、徐々にその症状が甚だしくなり、やがて大きな被害となる。近年、果樹のウイルス病が果実の品質や生産性の低下を引き起こしていることが次々と明らかにされている。リンゴの Mosaic virus では 30% の収量が減少するとされ、Rubbery wood virus では 25% の収量の減少を起こす。また、Star crack virus に罹病した樹はその被害が最も大きく収量が約 90% 減少するとされている (19、71、92)。梨における Vein yellows virus は 40% の樹勢衰弱を示し (110)、本異常斑点状は約 49% の収量減少と品質低下をもたらす (71、92)。果樹は接ぎ木による栄養繁殖が一般的である。したがって、採穂された母樹の持っているすべてウイルスが、すべての苗木に感染し、次代に伝搬されていく。いったん汚染された果樹園からウイルスを駆逐することは、薬剤散布のような治療手段をもってしては不可能であり、大きな問題となっている。栄養繁殖する作物のウイルス病防除の手段としては無毒個体を得て、これを繁殖させる方法が採られる。果樹の場合もウイルスの無毒苗木の獲得、普及が最も重要である。アメリカでは IR-2 計画と称して検疫、母樹検疫、ウイルスフリー樹の作成などを行っている (26)。またイギリスでは EMLA 計画としてウイルスフリー化の試験、ウイルスフリー樹の隔離保存、ウイルスフリー苗木の増殖を行っている。日本では母樹検疫制度の計画が進められているが (70)、韓国ではまだ計画すら無い状態である。したがって、ここでは接ぎ木伝染性ウイルス病として確認された梨葉の異常斑点症の総合的な防除対策についての検討を行った。

### 1 指標植物検定による無毒樹選抜



ウイルスを保毒した樹は樹勢が衰弱し、収量が減少するなど経済的に大きな被害を受けている。接ぎ木によって繁殖する果樹ウイルス病の防除方法としてウイルス保毒樹からウイルスフリーの個体を獲得して普及する方法がある(7、64、69、115)。これまで果樹のウイルスフリー化の有効な手段として、熱処理技術が用いられてきたが、近年では組織培養技術の進歩により、茎頂分裂組織培養によるウイルスフリー化が開発されている。リンゴでは高接ぎ病の病原ウイルスに関して、37～38℃の高温条件下で伸びた新梢の先端部1～2cmを切り取り無毒の台木に接ぎ木してウイルスフリー個体が得られることが報告されている(7、115)。梨ではナシASGVの病原ウイルスについては38～33℃の熱処理と茎頂培養を兼用して無毒の個体が作出されている(67)。また、えそ斑点病は自然光下の38～40/30℃の変温条件で無毒化が可能になった(43、67)。本試験では、先ず一般農家の果樹園で異常斑点症に感染していないものを選抜することを検討した。次いで、異常斑点症の無毒化のため、熱処理によって異常斑点症をひき起こすウイルスのフリー化が可能かどうかを検討した。

#### 材料及び方法

梨の主生産団地である安城と天安で異常斑点症が発生していない新高の老木(樹齢不詳)から徒長枝を採取し、本ウイルスの保毒の有無を検討した。検定樹は安城の果樹園で2樹、天安の果樹園で1樹を対象とした。1994年4月に2地域から採取した接ぎ穂を用い、実生台木に切り接ぎし、1年間苗木を養成した。このものに1995年4月にPS-95を切り接ぎして異常斑点症の発現の有無を観察した。また、PS-95の1年生苗木に2地域から採取した接ぎ穂を切り接ぎし、PS-95に発生する



異常斑点症を調査した。熱処理方法はプラスチックポット（直径 25cm × 深さ 30cm）に移植した 3 年生新高発生樹を温度 40 °C / 32 °C（昼温 / 夜温）、37/30 °C、35/30 °C の恒温状態で 3、4、5 週間処理をおこなった。処理後伸びた新梢を採取、PS-95 の 1 年生苗に接ぎ木した後、PS-95 に発現する症状を観察した。

### 結果

農家の果樹園の新高老木から穂木を採取検定した結果は表 33 に示す通りである。安城の 2 樹は指標植物への 2 重切り接ぎ法でも指標植物へ直接接ぐ方法でも、2 樹とも指標植物である PS-95 に異常斑点が発現しなかった。天安の 1 樹でも症状の発現が認められなかった。対照区である発生樹を接ぎ木した処理区は PS-95 に斑点の症状が甚だしく現れた。したがって、本試験に供試した 3 樹は異常斑点症に関しては無毒のものと考えられた。熱処理の温度条件と処理期間がウイルス無毒化に及ぼす効果について見た結果は表 34 に示す通りである。40/32 °C の恒温処理では処理 13 日頃から葉が黒変して新梢が枯死したものが多く、接ぎ木活着率も 12 樹のうち 2 樹と低かった。しかし、活着した 2 個体はいずれも無毒であった。37/30 °C の変温処理区も同じ傾向で、接ぎ木した 21 樹のうち 5 樹が活着し、その中で 1 樹が無毒の個体であった。35/30 °C 変温処理では接ぎ木の活着及び新梢の生育は比較的良かったが、ウイルスの無毒化はできなかった。以上の結果から異常斑点症の無毒化は 37/30 °C の変温処理を 4 週間以上することによって容易にできることが分かった。

## 2 抵抗性品種の探索とそれによる高接ぎ更新



果樹ではウイルスに感染していても発病しない抵抗性ものと、感染すれば発病する感受性のものがある。梨の品種更新は高接ぎによることが多い。その場合、ウイルスに感染しても発病しない抵抗性品種が保毒しておれば他の品種を高接ぎをするとその品種が感受性であればその品種が発病する。これを防止するため、既存の栽培品種について抵抗性の程度を知ることは重要な課題である。また、現在発病している品種に品質の優良な抵抗性品種を高接ぎして問題を解決する方法もある。ここでは、韓国に栽培されている重要な品種と育種材料として利用された品種を対象として検討をした。また果樹の繁殖は通常接ぎ木、挿し木など栄養繁殖によって行われるため、ウイルスの伝染も接ぎ木によることが多い。接ぎ木以外では虫媒伝染するものと花粉伝染するものがあるが、その数は多くはない。そして防除対策もウイルスフリーの穂木、台木または苗木を生産普及することが最も効果がある。本研究により梨葉の異常斑点症は接ぎ木伝染性ウイルス病であることが明らかにされた。現在、全国において広く発生して、大きな被害が出ているのでこの防除対策が急がれる。しかし現在成木として収穫できる樹のうち罹病樹を抜いて処分してしまうことは生産者に与える経済的打撃が大きい。したがって、ここでは本ウイルス病に抵抗性である品種のうち、品質が新高と同等のものによる高接ぎ更新の可能性を検討した。

#### 材料及び方法

梨の実生台木1年生の苗木を農業科学技術院の試験の圃場に定植し試験に用いた。接種源は異常斑点症が毎年発生する新高15年生の徒長枝を採取して利用した。被検定品種は甘川梨など19品種とし、その休眠の徒長枝を12月に採取して $8 \pm 2$ ℃の低温室に保存した後接ぎ穂として利用した。1993年4月上旬に台木の地表面



から5cmのところに接種源を削ぎ芽接ぎ木接種し、さらにその台木上に被検定用品種を切り接ぎした(削ぎ芽接ぎ+切り接ぎ)。同年同じ時期に二重削ぎ芽接ぎも行った。処理樹数は接ぎ木方法別3樹ずつ総6樹とし、単区で調査を行った。毎年被検定品種に発生する異常斑点症状の程度を観察した。そしてこれまでの試験の結果を検討して、新高品種に代替できる品種と思われる秀黄梨を接ぎ穂として供試した(51、113)。京畿道安城郡の果樹園で本病が毎年発生する新高20年生の12樹と京畿道平澤市の果樹園で罹病が確認されている新高21年生の21樹を用い、1993年4月に秀黄梨の接ぎ穂を樹当たり5個の主枝に高接ぎをした。高接ぎ当年から秀黄梨に発生する異常斑点の症状を観察した。

#### 結果

本ウイルス接種により病徴を発現した品種は表35、図21に示した。最も早く、甚だしく発現した品種は新高、早生赤、二十世紀、早生二十世紀、黄金梨であった。黄金梨は最近育成された新品种であるので、高接ぎ更新する場合は注意が必要である。また、接種をしても発病しなかった品種は秀黄梨、甘川梨、長十郎など12品種であった。発病時期は、年次により、品種によって若干の相違があるものの、5月下旬から発病しはじめ、6月上、中旬に発生のピークになった。発病した品種の症状は新高の異常斑点症状とほぼ同じものであるが、各品種に幾分の差が認められた。しかしその差はあまり大きいものではなかった。最も典型的な症状を発現する品種は、新高、早生赤、二十世紀であり、斑点の模様と発生推移は新高の異常斑点症と同様であった。

異常斑点症が毎年発生する新高に抵抗性品種である秀黄梨を高接ぎしたところ、高接ぎ当年から3年後まで秀黄梨の枝では異常斑点症がまったく認められなかった



(表 36)。中間台木の新高では異常斑点が甚だしく発生した。したがって、本病の対策の一つとして甚だしく発生する新高樹には品質的に新高に代替できる抵抗性の秀黄梨を高接ぎ更新することが考えられる。

#### 考察

果樹ウイルス病の防除についてはウイルスフリー母樹の探索、隔離及び保存、ウイルスフリー穂木の供給などが行われる。梨の各種病原ウイルスは、一般に 40 ~ 30 °C の変温処理を 3 ~ 4 週間行った後、伸びた枝の新梢を採取し接ぎ木すると無毒化ができることが報告されている (66、91、115)。リンゴの場合は 37 °C 前後の熱処理によって各種のウイルスの無毒化ができる (7、91、115)。モモではウイルスの無毒化するためには 38 ~ 35 °C で 4 ~ 5 週間の熱処理が必要である。しかしながら、このようなウイルスの無毒化には、時間と技術を要する。したがって、まず、本試験では梨生産団地うちより本病の対し無毒の樹を選抜し、母樹を選定することを試みた。本ウイルスの指標植物である PS-95 を用い、これまで異常斑点症が発生しないとされてきた樹を検定したところ、無病のものを確認した (表 33)。韓国では毎年約 120 万本の梨苗木が生産されているが、これらの母樹及び苗木に対してウイルス検定はまったく行なわれていない。したがって、ここで検定した樹を母樹として利用すれば健全な苗木の生産が可能である。また、ウイルス無毒化するため、40/32 °C、37/30 °C、35/30 °C の 3 ~ 5 週間の熱処理を行ったところ、無毒の個体が得られた。Moriguchi ら (67) は 38/33 °C の 10 週間の熱処理で梨の ASGV が無毒化されることを報告している。ウイルス種類によって熱処理温度と期間が異っている。本試験では 40/32 °C の処理から 2 樹、37/30 °C の処理から 4 樹、35/30 °C の処理から 1 樹のウイルスフリー個体を得られた。本ウイルスをフリー



にするためには 37/30℃ で 4 週間以上の処理が必要であると考えられる。本試験から異常斑点症を無毒にした植物体は他のウイルスについても無毒である可能性が高いので、本植物体は増殖母樹として活用が期待できると思われる。本病の予防あるいは根絶と防除対策を進めるためには、栽培品種の抵抗性の有無を明らかにする必要があると考えられた。重要な品種対して抵抗性の程度を検討したところ、新高など 6 品種が罹病性であることが明らかになった。また 13 品種は潜伏性であり、そのうち新品種である秀黄梨、甘川梨が含まれていた。これらの 2 新品種は現在発病している成木に高接ぎしても問題はないと考えられる。実際に農家の果樹園で試験したところ、現在異常斑点症が発生している新高樹に秀黄梨を高接ぎしても秀黄梨ではまったく発生しなかった。したがって、品質が新高に劣らない新しい抵抗性の品種を高接ぎ更新することも異常斑点症に対する一つの有効な対策と考えられる。

#### 摘要

梨葉の異常斑点症に対し総合的な防除対策を作るために試験を行った。梨の生産団地より無毒の母樹を選抜するための検定を行ったところ、異常斑点が発生しないものの 6 樹を確認した。本ウイルスは 40/32℃ で 3 週間、37/30℃ で 4 週間変温処理することによって無毒化が可能であった。本ウイルスの接種により病徴を示したものは新高など 6 品種、発病しないものは秀黄梨など 13 品種であった。品質の秀れた抵抗性品種である秀黄梨を異常斑点の発生している新高樹に高接ぎしたところ、異常斑点はまったく認められなかった。



Table 33. Severity of abnormal leaf spot symptoms in growing shoots on mature trees in commercial orchards.

Area sampled	Treatment stocks	Date of grafting			
		April 10, 1994 <sup>a</sup>		April 10, 1995 <sup>b</sup>	
		No.of setting	No.of trees without symptoms	No.of setting	No.of trees without symptoms
Anseong I	4	2	2	2	2
" II	4	2	2	2	2
Cheonan I	4	2	2	2	2
Control	10	5	0	5	0

<sup>a</sup> Seedling + Niitaka(sample) + PS-95 (indicator tree).

<sup>b</sup> PS-95 (indicator tree) + Niitaka(sample).



Table 34. Effect of heat treatment on abnormal leaf spot disease when treated shoot tips were grafted on indexing plants PS-95.

Heat treatment		No. of stocks grafted with shoot tips	No. of stocks with surviving shoot tips	No. of stocks inactivation
Temperature *	Weeks			
40/32 °C	3	12	2	2
37/30 °C	4	21	5	1
35/30 °C	5	19	8	0

\* Day/ night.



Table 35. Varietal differences in response to pear abnormal leaf spot diseases when examined by artificial inoculation with grafting method.

Symptom expression *	Pear cultivars
Positive	Niitaka, Imamuraaki, Waseaka, Nijisseiki, Wasenijisseiki, Hangkumbae
Negative	Suhwangbae, Gamcheanbae, Chojuro, Kumoi Hosui, Shinsui, Shinko, Kikusui Wasedama, Kimizukawase, Hakko, Yungsanbae

\* Determined by symptoms that developed on leaves during 2 years after inoculation by grafting method.



Table 36. Incidence of abnormal leaf spot disease in Suhwangbae when top-grafted to Niitaka stocks with severe symptoms.

Location of orchard investigated	No. of trees investigated	No. of tree showing symptoms in		
		1993	1994	1995
Pyeongtaeg	21	0	0	0
Anseong	12	0	0	0

\* Disease incidence was investigated in five scions per plant during 3 years after top-grafting in commercial orchards.



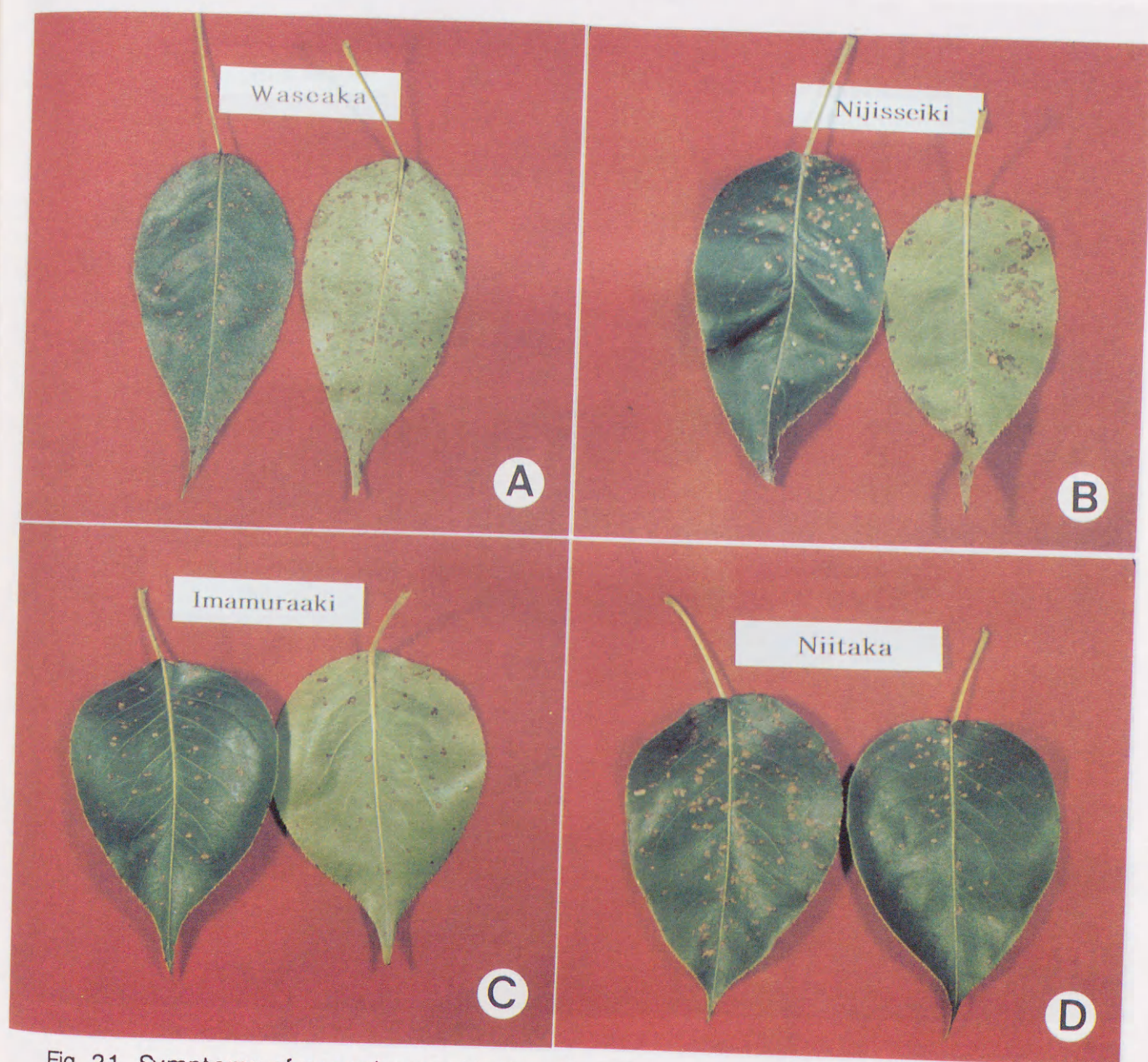
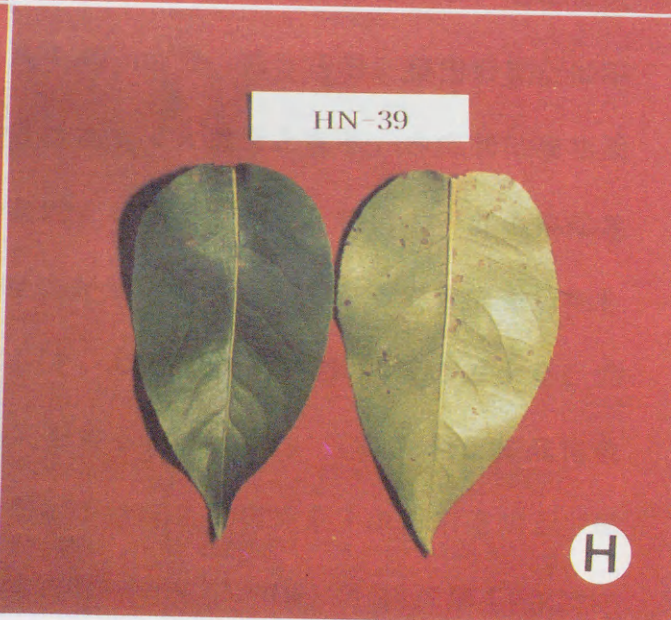
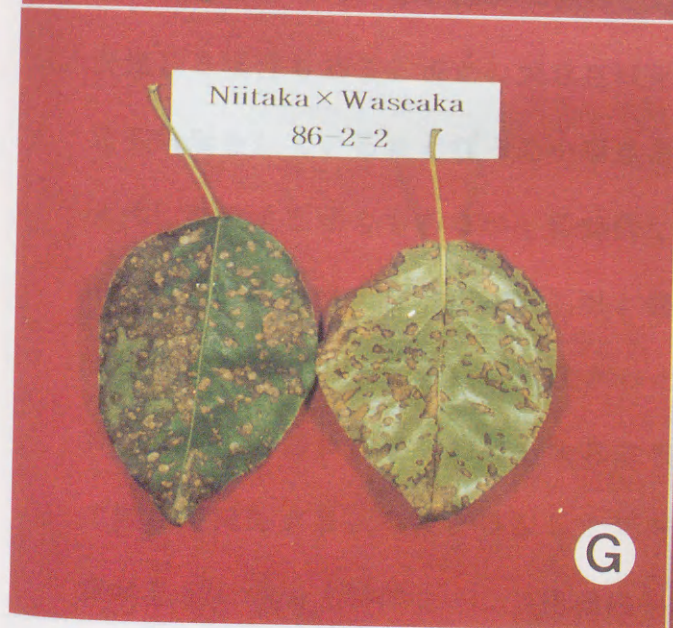
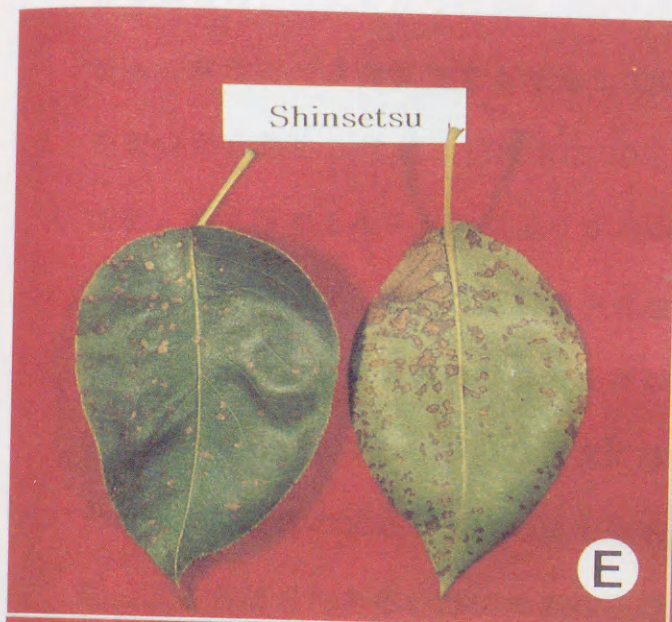


Fig. 21. Symptoms of pear abnormal leaf spots in leaves of various varieties after artificial inoculation(A-H).







## 第10章 総合考察

梨は韓国における主要な果樹であり、特に国際競争力があり、かつ輸出できる有望な品目の一つにあげられる。1970年代後半から梨葉で原因不明の異常斑点が発生し、産地に大きな被害をもたらしている(34、71、72)。本異常斑点症は5月中旬頃から発生し始め、6月中に30-80%の発生率を示して発生最盛期に至る。また、高温期である7月下旬より8月中にかけては発生が中断し、気温が涼しくなってくる9月になると再び夏期間中に生長した葉より若干発生する傾向を示す。症状は果叢葉および徒長枝の基部の成葉の硬化した葉だけに限って発生し、次々に上方に進展する。しかし、枝及び果実には症状がまったく認められない。最初、葉の先端部より黄色の斑点が出始め葉全体へと広がる。黄色の斑点は急速に赤紫色に変化し、さらに黒色あるいは灰褐色へと変色して行き、最後には灰白化し、そこに穴が生じる場合もある。斑点の大きさは平均1.47mmで、形は円形、楕円形または不正多角形をしている。それらの小斑点が合わさって大斑点となる。本症状は果樹園全体に発生する場合もあるが、局部的に発生することが多く、特に、一部の枝に集中して発生する傾向を示す。発生樹と健全樹が互いに混ざっている場合でも伝染しないのが特徴である。本症の発生がひどいと、収穫量の約40%程度の減少及び品質の低下が起こり、経済的にも大きな損失を被る(34、71、72)。梨葉に黒褐色の斑点が発生する。本症と類似した病害としては、えそ斑点病(病原未確認)、黒斑病(*Alternaria kikuchiana*)、褐斑病(*Mycosphaerella sentia*)、円星病(*Mycosphaerella* sp.)、白星病(*Phaeospora nashi*)などがある(38、45)。これらのうち、えそ斑点病以外の病気については病原菌が明らかにされている(38、45)。えそ斑点病は本症と最も類似した病害として、日本では1950年代後半からその発生が報



告されている。最初、生理的褐斑病として報告がなされたが、その後、接ぎ木伝染性ウイルス病であることが明らかになった(44、65、66、81、82、83、84)。しかし、いまだに、このウイルスの同定はなされていない。

梨の病害は品種より抵抗性の程度が異なる場合が多い。異常斑点症は黒斑病に抵抗性の新高品種において最も甚だしく発生する。異常斑点組織より菌の分離を試みたところ、主に *Alternaria* 属の菌が数多く分離された。分離菌の病原性検定を行ったところ、新高から分離した菌については新高と黒斑病に罹病性である二十世紀に対して病原性は認められなかった。しかし、二十世紀から分離された菌については新高では病原性がなく、二十世紀にだけ病原性を示した。したがって、新高から分離した菌は腐生性菌と判断されたが、黒斑病に罹病性を示す二十世紀より分離した菌は *Alternaria kikuchiana* と同定することができた(36、70)。本症について寄ら(47)は、既存の黒斑病菌の病原性が分化した結果として、抵抗性品種が罹病化した現象であると報告した。しかし、朴ら(88)は黒斑病に抵抗性である新高はいまでも、黒斑病に抵抗性であることを再確認している。また、晩三吉の異常斑点から細菌を分離し、*Enterobacter pyrinus* による新しい褐色斑点病であるとの報告もある(11)。しかし、これらは異常斑点とは異った斑点より分離された可能性もあり、本症は現在、市販の農薬では防除ができない。これらの結果から本症の原因はカビまたは細菌とは異なるものと考えられた。

梨葉に発生する異常斑点症の発生原因について調査をした。果樹の生理的障害の中には特定品種だけに発生するものがある。例えば、リンゴの生理的障害としての Internal bark necrosis (IBN) は主に "Delicious" 品種に発生し、接ぎ木伝染する場合もある。この発生に Ca、Mn、K などが主として影響を与えられている(17、18、87)。本症も品種によって発生の程度が異なるので、発生樹の成葉、幼葉、



健全樹の健全葉などを発生最盛期である6月に採取して無機分析を行ったところ、斑点の発生に直接関与すると思われる無機成分はなかった(72)。さらに、土壌水分の過多または乾燥も本症状の発生に影響及ぼさなかった。また、発生樹と健全樹の果樹園の土壌理化学性を分析した結果でも、発生に関与する要因は明らかにはなかった。従って、本症状の発生原因として、生理的な要因よりも、むしろ他に因するものがあると思われた(4、72、74)。最近重化学工業の発展によって地球環境の汚染が深刻になってきた。それに伴って作物の被害が多く出てきており、特に、酸性雨による被害が最も多い(40、48、79)。一般的に、針葉樹はpH2.0で、闊葉樹はpH3.0で可視的な被害が出るとされている(48、79)。しかし、梨の葉にpH3.0までの人工酸性雨を数回散布しても可視的被害は観察できなかった。この結果から、梨樹は酸性雨に強い樹種であると思われた。

異常斑点症は6月に発生が多いが、気象との関係を調査した。本症の発生最盛期である6月の気温は最高30.7℃最低10.6℃平均20.6-22.0℃の範囲の分布を示す(62)。つぎに、ビニールを用いた雨よけ栽培を行った。その結果、ビニールで被服することによって斑点発生率が14-36%にまで低下し、また梨樹の枝を油酸袋で被服すると発生率が顕著に下った。洪ら(28)は晩三吉に雨よけ栽培すると異常斑点症発生が20-30%低下することを報告している。さらに、梨の葉に数種類の袋を用いて被服処理を行っても同様な結果が得られた。雨よけ栽培、油酸袋の被服、袋の数種類別被服した内部の温度は高くなり最高49℃まで上昇した。一般露地の果樹園でも7月下旬頃の高温期から発生が中断するので、本症は温度の影響に大きく支配されられると思われた。反対に異常斑点症が最もよく発現する温度条件を調べたところ、6月の平均気温に当たる昼間23℃/夜間18℃が最もよく発生することが判明した。また、本症状が毎年発生する樹の徒長枝と健全樹の徒長枝を水挿し、



葉が完全に展開した段階で、昼間 23 °C / 夜間 18 °C で温度条件の恒温器で生育させたところ、外部からの刺激と侵入なしで、発生樹の徒長枝だけに本症が発現した (62、64)。以上の結果から、本症は樹体内にその原因が潜伏していて、条件が満たされたときには発現するのではないかと考えられた。果樹において、ある病斑から病原性のあるカビまたは、細菌が分離されず、発現が温度に影響を受ける場合、一般にウイルスが原因であると考えられている (27、29、39、36、100)。果樹のウイルス病は一般的に春に生育した葉では病徴がよく現れるが、夏の高温条件下においてウイルスが不活化され病徴が隠れて見えない場合が多い (1、36、81、93、100)。

果樹のウイルス病は例外なく接ぎ木伝染するとされ、接ぎ木法には切り接ぎ、芽接ぎ、削ぎ芽接ぎ、舌接ぎなどがある (27、29)。台木と接ぎ穂の片一方が、既に、ウイルスに感染している場合、接ぎ木部の癒合組織を通してウイルスが他所に移行して伝染する (29)。異常斑点症の接ぎ木伝染を検討する目的で、梨の実生台木に発生枝を接ぎ木すると、発生枝から伸長した葉に異常斑点が現れるのに対し、健全枝を接ぎ木するとまったくその症状は認められなかった。また、発生枝と健全枝を二重切り接ぎした場合においても発生枝はもちろん、健全枝でも異常斑点が発生した。発生樹と健全樹を基部で舌接ぎした場合においても、同様に、両方とも異常斑点が認められた。その場合、健全樹に発生した病徴は現地の果樹園に発生する症状と一致した。本症は高接ぎした果樹園で最も発生が多い。健全な新高樹に本症の発生している今村秋を高接ぎすると、接ぎ木 3 年後には健全な新高樹の全体へと斑点が発生するようになる。果樹ウイルスは罹病された母樹から採取した接ぎ穂を接ぎ木したときに伝搬される (18、29、37、39、44、47、48、52、58)。一般に、落葉果樹ウイルスは媒介昆虫によって伝染されるより、接ぎ木によって伝染



されることが多い。接ぎ木伝染の有無をもってウイルス病の診断がなされる時もある(33、39、58)。モモの Peach dwarf virus、ナシえそ斑点病、リンゴ高接ぎ病なども接ぎ木伝染によるウイルス病であると報告されている(37、39、81、83)。

植物において、ウイルス病として証明されるには、カビまたは細菌によっては伝染せず、接ぎ木伝染と汁液伝染と虫媒伝染をし、全身に発現し、ウイルス粒子の確認及びそれによる本来の症状の再現、ウイルス病の持つ特有な症状を示すなどの条件を満たさなければならない。しかし、果樹の場合は草本植物のように汁液伝染が容易に起こらないことから、上記の命題を満たすことが困難である場合が多い。したがって、現実には一般ウイルス病に類似し、病斑からカビまたは細菌が分離されず、実生に接ぎ木伝染する等の証明ができれば、ウイルス病として推論するのが普通である(36、48、81)。ブドウの Leaf roll virus は世界的に大きな被害をもたらし、関連報告も多いが、病原ウイルスの全容についてはいまだに明らかになっていない(94)。梨樹に発生するウイルス病としては Necrotic spot, Rosette, Rough bark, Blister canker, Stony pit, Red mottle, Vein yellows, Ring pattern mosaic、えそ斑点病などが報告されており、それらの始どは指標植物によって検定がなされている(11、20、31、37、38、81)。

以上のことから、本症は接ぎ木伝染性ウイルス病と考えられた。

果樹においてウイルス病と考えられるが、病原ウイルスが明らかにされていないものについては、指標植物を利用して検定する方法が一般にとられる。本症状に発現性のある品種を母本と父本とした交配実生のうちから本症を検定できる指標植物を選抜した。本症と同様の斑点がいつも確実に発現し、また、本症と類似した黒斑病に抵抗性である新高×早生赤 86-2-2 を最終的に選抜して "PS-95" と命名した。リンゴの Rubbery wood, Chat fruit, Mosaic のウイルスは指標植物を用いた検定



が可能になっている (81)。また、リンゴの高接ぎ病である ACLSV, ASPV, ASGV の 3 種のウイルスも最近では、選抜された *M. scheideckeri* によって早期検定が可能になり (83、91)。日本のナシえそ斑点病は指標植物である HN-39 を検定に用いている (36、37)。このように果樹ウイルス病は指標植物を利用して検定する場合が多い (33、50、54、79、81、83、89、91、94、96)。木本指標植物を利用した検定方法もウイルスの種類によって様々である。モモの Mosaic virus は 2-3 日間接触しただけで伝染が成立するが、Yellow, Rosett virus は 8 日間以上接触しないと伝染しない (45)。しかし、リンゴの高接ぎ病は 2 日間程度の接触だけで伝染が可能である (53)。このように接ぎ木接触時間に依存してウイルスが伝染されることをもって、ウイルスの区分がなされている (18)。これは、ウイルス粒子の細胞内での存在様式によっており、篩部局在性ウイルスは接ぎ木部位の癒合に時間がかかる為に移行に時間がかかる (18、16)。本異常斑点症状は PS-95 を用いると最低 1 日の接触で伝染の有無の判定が可能になった。接ぎ木の方法は二重削ぎ芽切り接ぎ方法で、3 月下旬頃に検定をすると、早期に罹病の有無の判断ができる。

本ウイルスを同定するために草本指標植物に汁液接種したところ伝搬しなかった。しかし、本症に罹病した木本指標植物 PS-95 の細胞内微細構造を検鏡したところ葉肉細胞内に長型の屈曲性ひも状のウイルス粒子が観察された。このウイルス粒子の直径は 12nm であった。罹病細胞内にはウイルス粒子以外に繊維糸を含有している直径 50-100nm 大きさの円形の小胞が存在していることが確認された。この小胞は ssRNA genome をもつ多くの植物ウイルスによって罹病した細胞の病理学的特徴として知られている (23)。このウイルスを観察したところ一般的に知られているひも状ウイルスグループである Potyvirus, Tobamovirus, Carlavirus の特徴とは明らかに違っていた (3、5、23)。しかし、ウイルス粒子、細胞病理学的特徴などを



みると Closterovirus と最も似ていることからこのグループに属するウイルスと考えられる (54、59、116)。本症と似ている日本のナシえそ斑点病の病原はひも状ウイルスとして Pear vein yellow virus と Apple stem pitting virus とは strain が異なるウイルスであることが報告された (115)。梨では約 10 種のウイルスが報告されているが (92)、本病と同様の葉の黒色斑点症状からウイルスを同定した報告はない。本研究で確認されたウイルスは梨では世界で初めて発見された Closterovirus と考えられる。

ウイルスにかかった果樹は、果実の収量と品質が大きく低下する (31、61、81、98)。サクランボの場合、ウイルスの複合感染によって、収量の約 60% が低下する (15、81)。リンゴの Star crack virus は 90%、Rubbery wood virus は 25% の収量の減少がみられる。そして、virus free 台木である EMLA 台木を利用すると、約 40% 以上の増収が見られる (15、61、81)。梨の Vein yellows virus は 40% の樹勢衰弱を示すが (98)、本異常斑点症状が罹病すると、最もひどいときには 49% の収量減少と品質低下が起こることが報告されている (61)。防除方法としては、根本的にはウイルス無毒苗木を生産し普及することである。一般に果樹ウイルスの無毒化の方法として熱処理がある。熱処理によるウイルスの無毒化は、技術と時間が必要である。各種果樹の病原ウイルスは一般的に 40-30℃ の変温条件で 3-5 週間処理すると無毒化ができることが報告されている (3、57、80、101)。梨の ASGV の場合、38/33℃ の 10 週間の熱処理でウイルスフリー個体を得られる (57)。本異常斑点症状では昼間 37℃ / 夜間 30℃ の熱処理で、無毒個体を得られた。また、現地果樹園でウイルス病徴がまったく発生せず、生育が良い樹に PS-95 を利用し検定して無病の新高を選抜した。以上の結果から得られたウイルスフリー個体及び無病樹は今後繁殖母樹として活用ができると思われる。



本症状の予防及び防除対策を進めるために、栽培品種に対して、抵抗性の程度を検討したところ、主栽培品種である新高など6品種が発現性、秀黄梨など13品種が潜伏性であることが明らかになった。これらの結果は、育種、品種更新などに利用できると考えられる。品質のすぐれた抵抗性の品種を現在発生している樹に高接ぎ更新する方法も本病に対する有効な一つの対策と考えられる。

以上のことから、梨葉の異常斑点症の発生原因は接ぎ木伝染性ウイルス病で梨では初めての Closterovirus と思われる。本ウイルス病の検定ができる木本指標植物 PS-95 を選抜した。これを利用して無毒樹の探索をするとともに、本ウイルス病に罹病した新高を熱処理して無毒個体を得た。今後、これらは繁殖用母樹として活用が期待できると思われる。



## 第11章 総摘要

梨葉の異常斑点症の発生状況と被害、発生要因を種々の角度から検討し、実用的な防除対策技術についてまとめた。

1. 梨葉の異常斑点症は5月中旬頃から短果枝では若い葉を除く成葉の硬化した葉に、徒長枝にも基部の硬化した葉にのみ発生し始め、6月中旬が最も発生最盛期であった。症状は最初は葉全体に黄色斑点を多数生じた後、赤紫色に変化し、急速に黒褐色に変わり、最後には灰白化し葉肉組織が壊死して陥没または穴があいた。
2. 発生による被害は最も栽培面積が多い新高品種において大きく、全国発生樹率は、平均23%であった。発生樹では健全樹に比べ、収量が49%減少し果実品質でも糖含量が低く、酸含量が高かった。
3. 異常斑点組織から主に *Alternaria* spp. が分離されたが、新高より分離した菌は病原性がなく、二十世紀より分離した菌は新高に対して病原性がなく、二十世紀で強い病原性を示した。従って、新高より分離した菌は腐生菌で、二十世紀から分離した菌は *A. kikuchiana* と同定できた。
4. 異常斑点症を起こす要因を調査のため、土壌水分を乾燥及び過多状態にして栽培し、また発生樹の土壌と健全樹の土壌の理化学性を分析したところ、土壌要因は発生とは無関係であることが分った。発生樹の発病葉と健全樹の健



全葉を無機分析した結果でも、両者間に差異は認められなかった。また、pH3.0-6.0の人工酸性雨の散布によっても被害が発生しなかった。

5. 本症は6月が発生最盛期で、7月中旬から高温期には発生が中断される。また、ビニール雨よけ栽培をすることによって異常斑点発生率が14-36%まで低下した。枝を袋で被服することによっても発生が低下した。袋の種類を変えて被服しても同様の結果が得られた。このとき、袋内の温度は露地より高く、43.3℃-47.9℃まで上昇した。
6. 本症が発現する好適温度を調査したところ、昼温23℃/夜温18℃で病徴が最も良く発生した。また発生樹の徒長枝からの切り枝を用いて水挿しにより葉を展開させた後、昼温23℃/夜温18℃の人工気象器にて培養することによって病徴が発現した。このとき、健全樹からの切り枝では発現しなかった。
7. 梨実生台木に異常斑点症の発生枝及び健全枝を二重接ぎ木すると発生樹はもちろん、健全樹においても異常斑点症が認められた。また、発生樹と健全樹の基部に舌接ぎを行った場合にも両方共に発病した。新高の健全樹に今村秋の罹病枝を高接ぎすると1年目には高接ぎした主枝だけに病徴が発生するが、3年後には樹の他の部分にも広がった。
8. 本症の指標植物を選抜するために、本症に罹病性の品種を両親として交配した。実生系統の中で、本症に最も敏感に反応し、しかも本症と類似した黒斑病に対しては抵抗性がある系統の育種選抜を試みた。その結果、新高×早生赤86-2-2系統を指標植物として選抜し、PS-95と命名した。



9. PS-95 を用い、異常斑点症の保毒の有無を判別できる検定方法を開発した。  
すなわち、3月下旬に二重削芽接ぎを行うと少なくとも1日以上接触時間で病徴が発現した。
10. 草本指標植物である *Chenopodium quinoa* などの21種に汁液接種しても病徴は現れなかった。したがって、草本植物への汁液伝搬はできなかった。本症を接ぎ木接種した PS-95 の葉を電子顕微鏡を用いて細胞を検鏡したところ、屈曲性ひも状のウイルス様粒子が集団として存在していることが確認された。その粒子の直径 12nm であった。罹病細胞内ではウイルス粒子以外に繊維糸を含有している小胞が tonoplast に形成している。このウイルスは細胞病理学的特徴から見て Closterovirus の一つであると考えられる。
11. 本異常斑点症に抵抗性であり品質も優秀な品種として秀黄梨と甘川梨を選抜した。新高罹病樹ではこれらの品種に高接ぎ更新することが望ましいと思われる。PS-95 を用いて現地農家の果樹園で本症状の無病樹を選抜した。また熱処理による本ウイルス病の無毒個体を得た。苗木生産にあたってはこれらを母樹として無病苗の生産システムを確立することが必要と思われた。



## Summary

The occurrence of abnormal leaf spot disease in pear, its characteristic symptoms and ecological factors affecting the disease were investigated and practical control measures were developed in this study.

- (1) Abnormal leaf spot disease began to occur in middle May and peaked in middle June. Symptoms appeared only in matured leaves on the spurs and basal parts of water sprouts. Many yellowish spots became visible first in the whole leaves and the color turned into purple, brown black and finally grey. Then the affected spots became necrotic and formed cavities or holes.
- (2) The most affected cultivar was Niitaka and the nation-wide average percentage of diseased trees was 23 %. The yield of affected trees was 49% lower than healthy trees. Fruit quality was also inferior to healthy trees: total soluble solids content lower and titratable acidity higher.
- (3) *Alternaria* spp. were isolated from the diseased spots of Niitaka but they were nonpathogenic. However, *Alternaria* spp. from Nijisseiki had strong virulence on Nijisseiki leaves but not Niitaka leaves and they were identified as *A. kikuchiana*, a causal pathogen of the pear black leaf spot disease.
- (4) Neither soil moisture content nor physical or chemical properties of soil were



associated with the occurrence of abnormal leaf spot disease. There was no significant difference in leaf mineral content between affected and healthy leaves.

Simulated acid rain adjusted from pH 3.0 to 6.0 caused no effect.

(5) During the hot summer season, the occurrence was interrupted. The disease was reduced by 14 to 36% under vinyl house conditions. Covering the shoots with various bags was also effective for reducing the disease. The temperatures inside the bags rose up to 43.3~47.9° C.

(6) The optimum temperature that the abnormal leaf spot disease develops was 23° C/18° C(day/night). When the shoots were collected and forced to bud at 23° C/18° C in a growth chamber, the symptoms appeared in the shoots from diseased trees but not from healthy trees.

(7) The disease was transmitted from affected twigs to healthy twigs by double grafting onto pear seedlings. Similar transmission occurred from diseased to healthy trees by tongue grafting at the base of the trunk. When affected Imamuraaki scions were top-grafted onto healthy Niitaka trees, development of symptoms in the first year was limited only on the scaffold that was grafted, but transmission to other parts of the trees was noted in the third year.

(8) By employing susceptible parents, cross-breeding was carried out to select indicator plants sensitive to this disease and tolerant to pear black leaf spot disease. Among the seedlings, we selected one strain, Niitaka x Waseaka 86-2-2, as an



indicator plant and named it as PS-95.

(9) Assay methods were developed for detecting latent infections by using PS-95. Time required for the graft transmission was evaluated by double-grafting onto pear seedlings with PS-95 scion and affected bud. At least one day contact of the affected bud caused transmission although the longer the contact duration, the greater the severity of symptoms.

(10) Sap of diseased leaves was inoculated to 21 herbaceous indicator plants including *Chenopodium quinoa* but symptoms did not appear. Under a transmission electron microscope, long, flexuous, filamentous virus-like particles were observed as clusters in the cell of diseased leaves. The size of the particle was 12 nm in diameter. In addition to virus-like particles, vesicles containing fibrils were also found in the tonoplasts. Based on the cellular pathological diagnosis, this is supposed to be one of closteroviruses.

(11) As a practical measure to overcome the disease problem, two resistant cultivars, Suwhang-bae and Kamcheon-bae, with good fruit quality, were selected. It is recommended that these cultivars should be top-grafted onto the infected Niitaka trees. Furthermore, by using PS-95 we selected virus-free Niitaka trees from commercial orchards. We also obtained virus-free plants by heat treatment. By these methods healthy trees can be provided to farmers and nation-wide systems for overcoming the disease should be installed.



## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤な指導を賜り、本論文の取りまとめに際しては、校閲の労を取って頂いた愛媛大学農学部教授水谷房雄博士に謹んで深謝の意を表する。さらに、研究の遂行に際して、御指導、御鞭撻を賜った韓国建国大学校大学院長金鐘天博士、高麗大学校李彰厚教授、援助と有益な御助言を頂いた韓国農業科学技術院長金康権博士、農村振興庁研究管理局長李銀鐘博士に深甚なる感謝の意を表する。また、研究途上において終始御激励を頂いた農業科学技術院柳華榮博士、金章圭博士、金虫会博士ならびに病理科の各位に厚く御礼を申し上げる。



## 参考文献

1. 我孫子和雄・高橋和雄. 1974. 斑紋モザイクの病徴発現に及ぼす温度の影響. 果樹試報 A 1 : 105~113.
2. Assink, A. M., Swaans, H. and Van Kammen, A. 1973. The localization of virus-specific double-stranded RNA of cowpea mosaic virus in subcellular fractions in infested *Vigna* leaves. *Virology* 53 : 384~391.
3. Atkinson, M. A. and Cooper, J. I. 1976. Ultrastructural changes in leaf cells of poplar naturally infected with poplar mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 83 : 395.
4. Bremner, J. M. and Mulvaney, C. S. 1982. Nitrogen-total. In : *Methods of soil analysis, Part 2 Chemical and microbiological properties. Second edition*, ed. by A. L. Page *et al.*, 595~624 pp. Am. Soc. of Agron., Inc., Madison, Wis.
5. Brunt, A. A., Stace-Smith, R. and Leung, E. 1976. Cytological evidence supporting the inclusions of poplar mosaic virus in the carlavirus group of plant viruses. *Intervirology* 7 : 303.
6. Brunt, A. A. and Stace-Smith, R. 1978. The intracellular location of lilac chlorotic leafspot virus. *J. Gen. Virol.* 39 : 63.
7. Campbell, A. I. and Best, M. W. 1964. The effect of heat therapy on several apple viruses. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta.* 1963 : 65~70.
8. Canova, A. and Faccioli, G. 1965. Characteristics of some viruses isolated mechanically from apple and pear. *Institut za Zastitu Bilja* : 251~254.
9. Chairez, R. and Lister, R. M. 1973. A comparison of two strains of apple chlorotic leaf spot virus. *Phytopathology* 63 : 1458~1464.



10. Chang, M. U., Baek, D. H. and Lee, J. Y. 1993. Use of doublestrain RNA for detection and indentification of plant virus. Korean J. Plant Pathol. 9(3) : 191 ~ 199.(in Korean)
11. Chung, Y. R., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Kim, B. S., Kim, H. T. and Cho, K. Y. 1993. *Enterbacter pyrinus* sp. nov., an orgaism associated with brown leaf spot disease of pear trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 43 : 157 ~ 161.
12. Cole, A., Mink, G. I. and Regev, S. 1982. Location of prunus necrotic ringspot virus on pollen grains from infected almond and cherry trees. Phytopathology 72 : 1542 ~ 1545.
13. Conti, M., Milne, R. G., Luisoni, E. and Boccard, G. 1980. A closterovirus from a stem pitting diseased grapevine in. Phytopathology 70 : 394 ~ 399.
14. Cropley, R. 1963. The association of sap-transmissible virus with apple chlorotic leaf spot. Plant Disease Reporter 47 (3) : 165 ~ 167.
15. Desvignes, J.C., Boye, R., Cornaggia, D. and Grassesu, N. 1992. Quick detection of the principal apple and pear virus diseases. Acta Horticulturae 390 : 377 ~ 384.
16. Dodds, J. A., Jarupat, T., Lee, J. G. and Roistacher, C. N. 1987. Effect of stran, host, time of harvest, and virus concentration on double-strained RNA analysis of citrus tristeza virus. Phytopathology 77 : 442 ~ 447.
17. Domoto, P. A. and Thompson, A. H. 1976. Effect of interaction of calcium, potassium and manganese supply on 'Delicious' apple tree as related to internal. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 101 : 44 ~ 47.
18. Ducroquet, J. P. 1987. Control of necrotic leaf blotch and premature leaf drop in



- "Golden Delicious" apples. Hort Science 22 : 574~575.
19. East Malling Research Station. 1979. Confidential to member and associates EMRS members day report. 6 pp.
20. Esau, K. and Hoefert, L. L. 1981. Beet yellows stunt virus in the phloem of *Aonchus oleraceus* L. J. Ultrastruct. Res. 75 : 326~338.
21. 江原淑夫. 1981. 植物ウイルスの感染部位と組織内伝播. 植物防疫 35(7) : 17~21.
22. Flegg, C. L. and Clack, M. F. 1979. The detection of apple chlorotic leafspot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Ann. Appl. Biol. 91 : 61~65.
23. Francki, R. I. B. 1987. Responses of plant cells to virus infection with special reference to the sites of RNA replication. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser. 54 : 423~436.
24. Francki, R. I. B., Milne, R. G. and Hatta, T. 1985. Closterovirus group. 219~234 In: Atlas of Plant Viruses. Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
25. Fridlund, P. R. 1967. The relationship of inoculum-receptor contact period to the rate of graft transmission of twelve *Prunus* viruses. Phytopathology 57 : 1296~1209.
26. Fridlund, P. R. 1980. The IR-2 program for obtaining virus-free fruit trees. Plant Disease 64 : 826~830.
27. Fridlund, P. R. and Drake, S. R. 1981. Effect of pear vein yellows virus and a nonviral factor on the performance of pear trees. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(4) : 412~414.



28. Fulton, R. W. 1967. Purification and some properties of tobacco streak and tular apple mosaic virus. *Virology* 32 : 53~162.
29. Fulton, R. W. 1968. Serology of viruses causing cherry necrotic ringspot, plum line pattern, rose mosaic, and apple mosaic. *Phytopathology* 58 : 635~638.
30. Gera, A., Loebenstein, G. and Pappas, B. 1978. Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay. *Virology* 86 : 542~545.
31. Gilmer, R. M. and Uyemoto, J. K. 1972. Sap transmission of chlorotic leaf spot and stem-grooving viruses to apple. *Phytopathology* 62 : 585~586.
32. Giunchedi, L. and Pollini, C. P. 1992. Cytopathological, negative staining and serological electron microscopy of a closterovirus-like virus associated with pear vein yellow disease. *J. Phytopathology* 134 : 329~335.
33. 平井篤造・四方英郎・高橋 壮・都丸敬一. 1987. 新編 植物ウイルス学. 養賢堂. 東京. 169~173 pp.
34. Hong, K. H., Kim, Y. S., Kim, W. C., Kim, J. B., Lee, U. J., Lee, E. J., Cho, W. D. and Cho, E. K. 1985. Studies on the abnormal spot disease in pear leaf. *Res. Rept. RDA(Hort.)* 27 : 46~55. (In Korean)
35. 福士貞吉・鈴木直治・四方英郎. 1986. 植物のウイルス病. 養賢堂. 東京. 60~76 pp.
36. 今村昭二. 1967. ナシ黒班病の最近の防除法. *農業および園芸* 42(6) : 71~74.
37. Jensen, D. D., Griggs, W. H., Gonzales, C. Q. and Schneider, H. 1964. Pear decline virus transmission by pear Psylla. *Phytopathology* 54 : 1346~1351.
38. Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S. 1990. Compendium of apple and pear disease. APS press, Minnesota 100 pp.



39. 加納 健. 1989. カキツウイルス病の検定方法. 植物防疫 43(6) : 344~348.
40. 環境庁地球環境部. 1995. 地球環境キートン. 東京. 175 pp.
41. Kim, K. G., Fonsalves, D., Teliz, D. and Lee, K. W. 1989. Ultrastructure and mitochondrial vesiculation associated with closteroviruslike particles in leafroll diseased grapevines. *Phytopathology* 79 : 357~360.
42. 金正浩 編著. 1994. 最新 梨 栽培. 五成出版社. 421 pp.
43. 岸 国平・高橋和雄・我孫子和雄. 1972. ナエソ斑点病に関する研究. 園試報告 A 11 : 139~147.
44. Kishi, K., Takanashi, K. and Abiko, K. 1976. Pear necrotic spot, A new virus disease in Japan. *Acta Horticulturae* 67 : 269~273.
45. 岸 国平. 1988. 作物病害事典. 全国農村教育協会. 486 pp.
46. Kitajima, H. and Kishi, K. 1975. 'Peach dwarf', a new viruslike disease of peach. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. Japan* A 2 : 115-121.
47. Ki, W. K., Park, S. K., Cho, B. H. and Kim, K. C. 1984. Differentiation in pathogenicity of *Alternaria kikuchiana* Tanaka, black spot fungus of pear, and conversion of resistant varieties into susceptible ones. *Korean J. Plant Prot.* 23(1) : 7~14. (In Korean)
48. 科学技術庁. 1988. 大気汚染と酸性雨が山林生態系に及ぶ影響. 特定研究開発事業研究報告書. 韓国. 191 pp.
49. 小林 章. 1975. 果樹環境論. 養賢堂. 232 pp.
50. Koganezawa, H. and Yanase, H. 1990. A new type of elongated virus isolated from apple tree containing the stem pitting agent. *Plant Dis.* 74 : 610~614.
51. 久原重松. 1981. 果樹の高接ぎ更新に伴うウイルス保毒率の増加. 植物防疫35(11)



- : 7~12.
52. Kunkel, L. O. 1938. Contact periods in graft transmission of peach viruses. *Phytopathology* 28 : 491~497.
  53. Lafleche, D., Bove, C., Dupant, G., Mouches, C., Astiev, T., Garnier, M. and Bove, J. M. 1972. Site of viral RNA replication in the cells of higher plants. TYMV(turnip yellow mosaic virus)-RNA synthesis on the chloroplast outer membrane system. *Proc. FEBS Meet* 72 : 43.
  54. Larsen, R. C., Kim, K. S. and Scott, H. A. 1991. Properties and cytopathology of Diodia vein chlorosis virus a new whitefly-transmitted virus. *Phytopathology* 81 : 227~232.
  55. Lemon, J. and Michelesi, J. C. 1990. Effect of three virus diseases on three pear cultivars. *Scientia Horticulturae* 44 : 69~81.
  56. Lister, R. M., Bancroft, J. B. and Shay, J. R. 1964. Chlorotic leaf spot from a mechanically transmissible virus from apple. *Phytopathology* 54 : 1300~1301.
  57. Lister, R. M., Bancroft, J. B. and Nadakavukaren, M. J. 1965. Some sap-transmissible virus from apple. *Phytopathology* 55 : 859~870.
  58. Lister, R. M. and Hadidi, A. F. 1971. Some properties of apple chlorotic leaf spot virus and their relation to purification problems. *Virology* 45 : 240~251.
  59. Lister, R. M. and Bar-Joseph, M. 1981. Closteroviruses. 809~844 pp. In; *Handbook of Plant Virus Infection and Comparative Diagnosis*. E. Kurstak, ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York.
  60. Luckwill, L. C. and Campbell, A. I. 1959. *Mallus platycarpa* as an apple virus indicator. *J. Hort. Sci.* 34 : 248~252.



61. Martin, E. M. and Kim, K. S. 1987. A new type of plant virus causing striped chlorosis of Mimosa. *Phytopathology* 77 : 935~940.
62. 町田邦夫・小金沢碩城. 1989. リンゴウイルス及びウイルス病の検定方法. 植物防疫 43(8) : 456~460.
63. 松中謙次郎・瀬川一衛. 1970. リンゴ高接病に関する研究 第1報 接木接種による感染成立時間について. 日植病報 36(5) : 349~350(講要).
64. Meer, F. A. van der. 1975. Plant species outside the genus *Mallus* as indicators for latent viruses of apple. *Acta Horticulturae* 44 : 213~220.
65. 三浦小四郎・丸山和雄. 1960. 梨葉に発生する褐斑性病害. 植物防疫. 14(2) : 57~60.
66. 三浦小四郎・丸山和雄. 1960. 梨葉に発生する一つの病害. 農業及び園芸 35(3) : 553~554.
67. Moriguchi, T., Ohtsu, Y. and Takanashi, K. 1989. Development of pear plant tree from apple stem grooving virus(ASGV). *Bull. Fruit Tree Res. Stn.* A16 : 25~30.
68. 宗形 隆. 1989. 核果類ウイルス病の検定方法. 植物防疫 43(9) : 511~515.
69. Murashiga, T., Bitters, W. P., Rangan, E. M., Nauer, E. M., Roistacher, C. N. and Holliday, P. B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus free *Citrus* clones. *Hort Science* 7 : 118~119.
70. 長尾記明. 1988. 植物防疫所が実施している果樹母樹検疫. 植物防疫 42(1) : 38~42.
71. Nam, K. W. and Kim, C. H. 1994. Studies on the pear abnormal leaf spot disease.  
1. Occurrence and damage. *Korean J. Plant Pathol.* 10(3) : 169~174. (In Korean)



72. Nam, K. W. and Kim, C. H. 1995. Studies on the pear abnormal leaf spot disease.  
2. Identification of causal agent. Korean J. Plant Pathol. 11(3) : 210~216.(In Korean)
73. Nam, K. W. and Kim, C. H. 1995. Studies on the pear abnormal leaf spot disease.  
3. Graft transmissibility of the causal agent. Korean J. Plant Pathol. 11(3) : 217~223.(In Korean)
74. Nam, K. W. and Kim, C. H. 1996. Studies on the pear abnormal leaf spot disease.  
4. Influence of temperature, soil moisture and chemical properties of soil. Korean J. Plant Pathol. 12(2) : 209~213.(In Korean)
75. Nam, K. W., Kim, C. H. and Hwang, H. S. 1996. Studies on the pear abnormal leaf spot disease. 5. Selection of indicator plants. Korean J. Plant Pathol. 12(2) : 214~218.(In Korean)
76. Nam, K. W., Kim, C. H. and Mizutani, F. 1996. Studies on the pear abnormal leaf spot disease. 6. Development of a simple detection method. Korean J. Plant Pathol. 12(3) : 363~367. (In Korean)
77. Nam, K. W., Kim, C. H. and Kim, K. S. 1996. Studies on the pear black necrotic leaf spot (former: abnormal leaf spot) disease. 7. Identification of causal virus. Korean J. Plant Pathol. 12(3) : 368~373.(In Korean)
78. 西尾 健・川合 昭・高橋 勤・難波成任・山下修一. 1989. カンキツタターリーフウイルスの純化ならびに諸性質. 日植病報 55 : 254~258.
79. 農村振興庁. 1993. 酸性雨による土壌および農作物被害様相と対策. 農業特定研究開発事業研究報告書. 145 pp.(韓国)
80. 農林水産部. 1995. 農林水産部統計年報.(韓国)



81. 野田健男・石渡英夫・丸島義信. 1957. 和梨の俗称褐班病に関する研究(第1報).  
農業及び園芸 32 : 1799~1800.
82. 野田健男・石渡英夫・丸島義信. 1958. 和梨の俗称褐班病に関する研究(第2報).  
農業及び園芸 33 : 381~382.
83. 野田健男・石渡英夫・丸島義信. 1958. 和梨の俗称褐班病に関する研究(第3報).  
農業及び園芸 34 : 1427~1428.
84. 野田健男・石渡英夫・丸島義信. 1959. 和梨の俗称褐班病に関する研究(第4報).  
農業及び園芸 33 : 1088~1099.
85. 農業技術研究所. 1988. 土壤化学分析法. 450 pp.
86. 吳王根・新建哲. 1986. 果樹園土壤管理と肥料. 354 pp.
87. Parish, C. L. 1981. Graft-transmission of blister bark and internal bark necrosis in Delicious apple. HortScience 16(1) : 52~54.
88. Park, J. S. and Yu, S. H. 1988. Evaluation of pear cultivar susceptibility to AK-toxin produced by *Alternaria kikuchiana*. Res. Rep. Agri. Sci. Tech. Chungnam Nat. Univ. 15(1) : 1~8. (In Korean)
89. Patrakosol, P. and Yanase, H. 1982. Detection of prunus necrotic ringspot virus and prune dwarf virus in peach by enzyme-like Immunosorbent assay(ELISA).  
Bull. Fruit Tree Res. Stn. A9 : 165~176.
90. Posnette, A. F. and Cropley, R. 1961 Indicator plants for latent virus infection in apple. J. Hort. Sci. 36:168~173.
91. Posnette, A. F. and Cropley, R. and Wolfswinkel, L. D. 1962. Heat inactivation of some apple and pear viruses. Ann. Rep. E. Malling 1961 : 94~96.
92. Posnette, A. E. 1963 Virus disease of apples and pears. Commonwealth



104. Agricultural Bureaux. 141 pp.
93. Refatij, E. and Osler, R. 1975. Possible relationships among pome fruit viruses detected in graft transmission trials. *Acta Horticulturae* 44 : 201~20.
95. Saksena, K. N. and Mink, G. I. 1969. Purification and properties of apple chlorotic leafspot virus. *Phytopathology* 59 : 84~88.
96. Schwinghamer, M. W. and Broadbent, P. 1987. Association of viroids with a grafting-transmissible dwarfing symptom in Australian orange trees. *Phytopathology* 77 : 205~209.
97. Sequeira, O. A. de, 1967. Studies on a virus causing stem grooving and graft-union abnormalities in Virginia crab apple. *Ann. Appl. Biol.* 60 : 59~66.
98. Sequeira, O. A. de, and Lister, R. M. 1969. Purification and relationships of some filamentous virus from apple. *Phytopathology* 59 : 1740~1749.
99. Spiegel, S. 1987. Double-stranded RNA in strawberry plants infected with strawberry mild yellow-edge virus. *Phytopathology* 77 : 1492~1494.
100. Sweet, J. B. 1980. Fruit tree virus infections of ornamental rosaceous trees and shrubs. *J. Hort. Sci.* 55 : 103~111.
101. 匠原監一郎. 1980. 寒天ゲル内散法による植物ウイルス病の診断. 植物防疫 34(3) : 106~110.
102. 高橋 勤・木村 茂・後藤正沼. 1988. 3種リンゴウイルス検定のためのミツバカイドウ MO-65について. 植防研報 24 : 39~43.
103. 高橋 勤・斉藤範彦・後藤正沼・川合 沼・難波成任・山下修一. 1990. 隔離検疫中の中国産ウレ苗木から分離されたapple stem grooving virus. 植防研報 26 : 15~21.

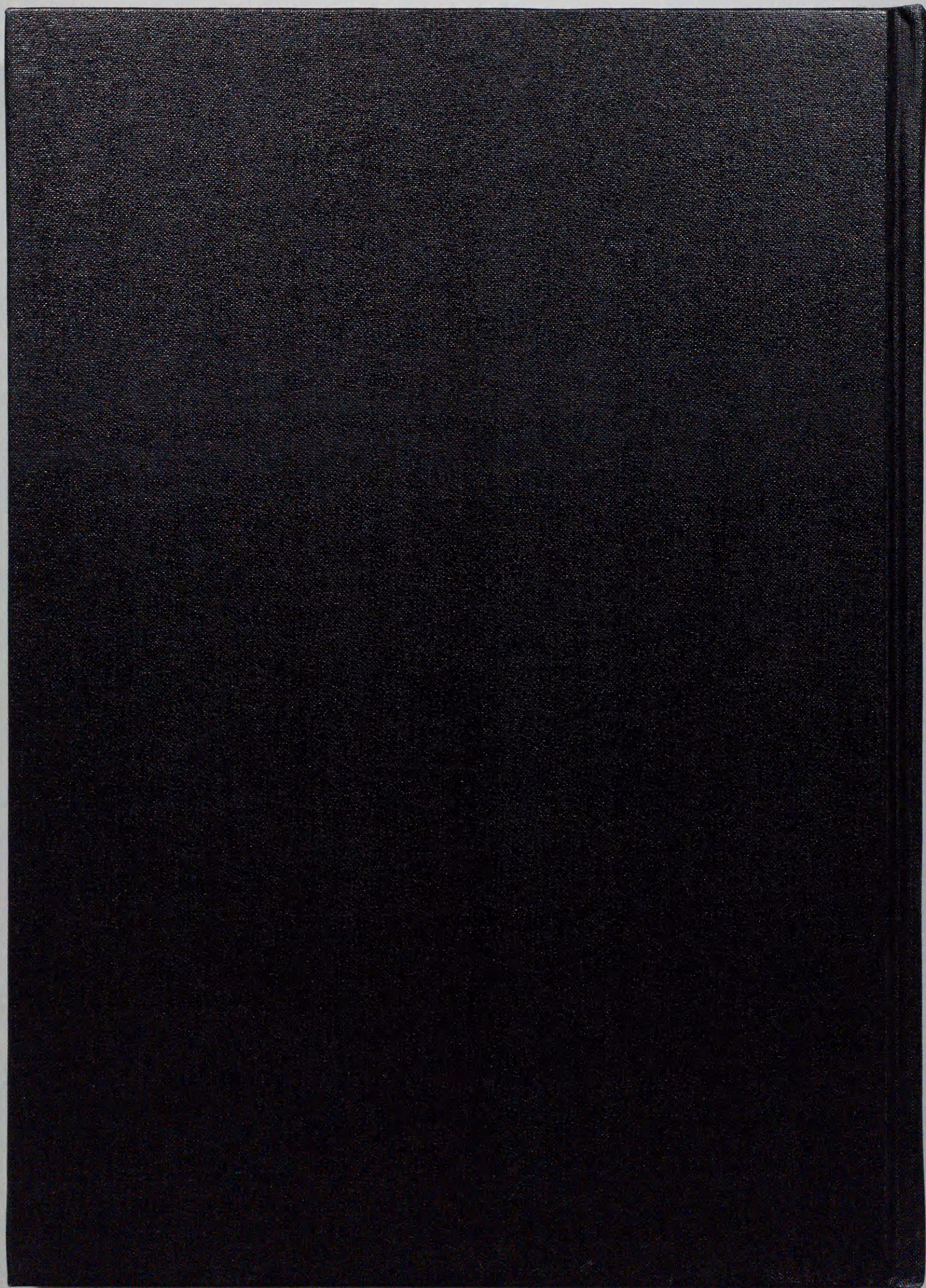


104. 高橋和雄・工藤 晟・田中寛康. 1983. ナエソ斑点病の病徴発現に及温度の影響. 果樹試報 A 10 : 115~121.
105. 寺井康夫. 1989. アドウイルス病の検定方法. 植物防疫 43(7) : 402~407.
106. Van Kammen, A. 1984. Expression of functions encoded on genomic RNAs of multiparticulate plant viruses. 301 p. In : Control of virus Disease. E. Kurstak, ed. Marcel Dekker Press, New York.
107. Waterworth, H. E. and Gilmer, R. M. 1969. Dark green epinasty of *Chenopodium quinoa*, a syndroma induced by a virus latent in apple and pear. Phytopathology 59 : 334~338.
108. Waterworth, H. E. and Uyemoto, J. K. 1980. Symptoms incited by apple type 2 virus isolates in virginia crab apple tree. Plant Disease 64 : 562~563.
109. Welsh, M. F. and Nyland, G. 1965. Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry heat. Can. J. Plant Sci. 45 : 443~454.
110. Wertheim, S. J. and Oosten, H. J. 1986. Comparison of virus-free and virus-infected clones of two pear cultivars. Acta Horticulturae 180 : 51~60.
111. 山口 昭・Patrakosol, P.・石井英夫. 1980. 核果類ウイルス白普賢検定法に関する二三の検討. 果樹試報 A 7 : 63~70.
112. 山口 昭・Patrakosol, P.・柳瀬春夫. 1982. 核果類ウイルスprunus necrotic ringspot virus 及び prune dwarf virusの熱処理による無毒化. 果樹試報 A 49 : 159~164.
113. Yanase, H. 1974. Studies on apple latent viruses in Japan. The association of apple topworking disease with apple latent viruses. Bull. Fruit Tree Res. Stn. Japan, Ser. C 1 : 47~109.
114. Yanase, H., Yamaguchi, A., Mink, G. I. and Sawamura, K. 1979. Back transmission

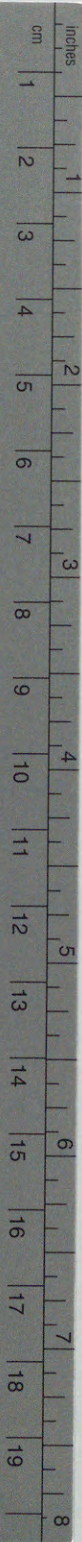


- of apple chlorotic leafspot virus (type strain) to apple and production of apple topworking disease symptoms in Marubakaido (*Malus Prunifolia* Borkh. var. ringo Asami). Ann. Phytopath. Soc. Japan 45:369~374.
115. Yanase, H., Koganezawa, H. and Fridlund, P. R. 1988. Correlation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting and a flexuous filamentous associated with them. Acta Horticulturae 235 : 157.
116. 吉田義雄・定盛昌助・土屋七郎・羽生田忠敬. 1970. リンゴの育種技術に関する研究. 第2報. 高つぎによる育種年限短縮と無毒穂木獲得について. 園試報告C 6 : 1~9.
117. Zee, F., Gonsalves, D., Goheen, A., Kim, S., Pool, R. and Lee, R. F. 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevine and the purification and serology of associated closterovirus-like particles. Phytopathology 77 : 1427~1434.





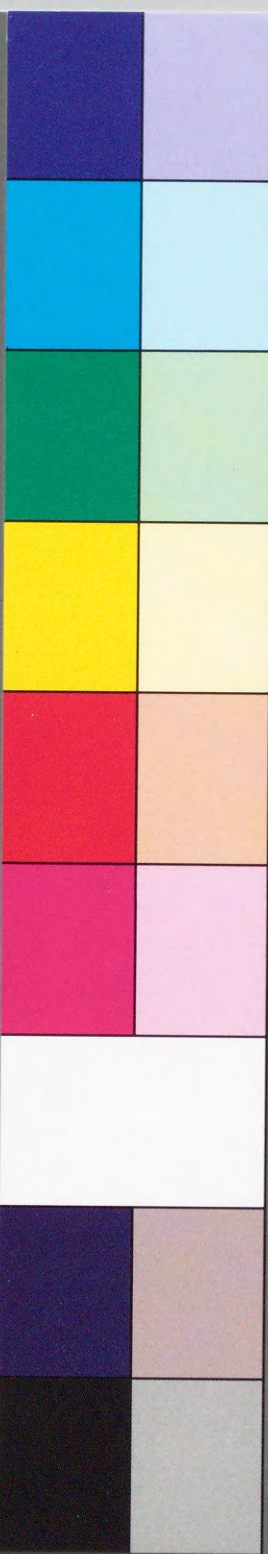




# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

