

輸入検疫で台湾産レイシ (*Litchi chinensis* SONN.) から

分離された *Peronophythora litchii*

CHEN *ex* KO *et al.* について*

小林 慶 範・君 島 悦 夫**

西 尾 健・長 尾 記 明

横浜植物防疫所

Peronophythora litchii Isolated from Litchi Fruit Imported from Taiwan. Yoshinori KOBAYASHI, Etsuo KIMISHIMA, Takeshi NISHIO and Noriaki NAGAO (Yokohama Plant Protection Station) *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 22: 55-60 (1986).

Abstract: It was found that some of litchi fruits (*Litchi chinensis* SONN.) imported from Taiwan, were infected with white cottony mold. The isolated fungus was aseptate hyphae, and the morphological characteristic of its sporangiophore was similar to *Peronospora*. But the isolated fungus reacted with an antibody against *Phytophthora erythroseptica* in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect fluorescence antibody method. The isolated fungus, as well as *Phytophthora*, required an exogenous source of thiamine or its moieties for mycelial growth.

The isolated fungus produced a number of sporangia on the aerial sporangiophores. The average sizes of sporangium, oogonium and oospore were $32.6 \times 19.6 \mu\text{m}$, $26.3 \times 27.9 \mu\text{m}$, $23.1 \mu\text{m}$ (Dia.), respectively. These result agreed with Ko's report (1978) and the isolated fungus was identified as *Peronophythora litchii* CHEN *ex* KO *et al.*

Optimum temperature for mycelial growth of *P. litchii* was 25°C. *P. litchii* caused fruit rot of cucumber, balsam pear (*Momordica charantia* L.), tomato, apple and pear by inoculation with wound.

結 言

台湾から輸入されたレイシ (*Litchi chinensis* SONN.) 果実の一部に白色綿毛状の菌糸に表面を覆われたものが発見された。本菌は無隔膜の菌糸で気中に多数の胞子のうを形成し、また、*Phytophthora* 属菌の抗血清を用いた血清学的診断法（西尾ら，1983；君島ら，1984）により、*Phytophthora* 属菌に近縁であることが分かった。

そこで、本菌を分離培養し、その各種性質を調べ、*Peronophythora litchii* CHEN *ex* KO *et al.* であると同定したのでここに報告する。また、本菌による病害はわが国では未記載であるので、この病名をレイシべと疫病とすることを提案する。

なお、本菌の同定を行うにあたり、有益な御助言ならびに菌株の分譲をいただいた財団法人発酵研究

所横山竜夫博士、大阪府立大学一谷多喜郎博士に深く感謝の意を表する。

材料および方法

病原菌の分離培養

罹病果実の果皮を2～3 mm角に切り、van Tieghem cell をセットした V-8 ジュース寒天培地（V-8 ジュース 200 g, CaCO_3 2.5 g, 寒天 15 g, pH 6.5）に置床し、25°C で培養した。3日後、Cell の外側に伸長した菌糸を2% 素寒天培地に移植し、単菌糸分離を行った分離菌を以下の試験に供試した。

血清学的診断法

血清学的診断は、西尾ら（1983）、君島ら（1984）が *Phytophthora* 属菌の検出に用いた ELISA 法および蛍光抗体法によった。使用した抗血清は、君島ら（1983）が作製した *Phytophthora erythroseptica* 抗血清を用いた。

罹病したレイシの果皮および V-8 培地で培養した分離菌の菌糸を Tween-20 を 0.05% になるよう加え

* 本報告の概要は昭和60年度日本植物病理学会夏季関東部会（1985年7月）において発表した。

** 現在、農林水産省農蚕園芸局植物防疫課

たリン酸緩衝生理食塩水(PBS-T)中でヒスコトロン(日音医理器械製作所社製)を用いて磨砕したものをELISA用の試料とした。対照菌には *P. erythroseptica** (CMI 181716)を用いた。またELISA法の手順はCLARK and ADAMSら(1977)の方法によった。蛍光抗体法は、培養菌糸片を用いて西尾ら(1983)の方法によった。

チアミン要求試験

RIDINGSら(1969)の方法に準じて行った。すなわち、ビタミン類を完全に除去した培地を基礎培地とし、基礎培地に $41 \mu\text{g/l}$ のピリミジン、または $100 \mu\text{g/l}$ のチアミンを添加した培地で各供試菌を 25°C 、10日間液体培養し、菌の生育を菌糸乾燥重で比較した。対照として *Phytophthora erythroseptica* および *Pythium irregulare* (177-1, 大阪府立大学より分譲)を用いた。

病原菌の形態および性状

分離菌をV-8培地で培養し、形成された菌糸および遊走子の形態を観察した。遊走子の間の接芽は、V-8培地で培養した菌そうを殺菌水で満たし、 5°C で30分間静置し、室温に戻した後観察した。有性器官は、V-8培地をやや厚め(約4mm)にした平板培地で暗黒下、 25°C で2週間培養し、培地の底部に形成されたものを観察した。菌糸伸長と温度の関係を調べる試験は、V-8培地であらかじめ培養し、径6mmのろ紙片が菌そうで覆われたものを接種源とした。平板培地の中央にその接種源を置き、一晚室温(約 25°C)で放置後、伸長した菌糸を $5-37^\circ\text{C}$ で7日間培養して菌糸の伸長を測定した。

接種試験

V-8培地で培養した菌そうを1cm角に切り、これらを接種源として供試植物に無傷および有傷で接種した。 25°C で3-4日間保管し、発病の有無を調査した。

結 果

病 徴

レイシ果実の表面に白色綿毛状の菌糸が付着し、実顕微鏡下で菌糸を検鏡すると気中に多数の胞子のうが形成されているのが観察された(Fig. 1)。果肉には褐変、腐敗は認められなかった。さらに罹病果を湿室



Fig. 1. Symptom of litchi fruit infected with *Peronophythora litchii*.

状態に保つと、果実全体が菌糸に覆われたが、レイシの枝には菌糸の伸長は見られなかった。

血清学的試験

培養菌糸を用いたELISA法による試験の結果は、Table 1に示したとおりである。分離菌のELISA値は、0.29であり、対照として用いた *P. erythroseptica* のELISA値の0.47に比べ低い値ではあるが、明らかに陽性反応を示した。また、罹病果の果皮を用いたELISA法でも陽性反応が認められた。さらに、間接蛍光抗体法による観察でも分離菌の菌糸は特異的に染色された。

これらのことから、分離菌は血清学的に *Phytophthora* 属に近縁であることが分かった。

Table 1. Serological reaction of *Peronophythora litchii* and *Phytophthora erythroseptica* in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using *P. erythroseptica* anti-serum

Samples ^{a)}	ELISA Values
<i>Peronophythora litchii</i>	0.29
<i>Phytophthora erythroseptica</i>	0.47
Control (PBS-T)	0.03

a) Each fungal mycelium was macerated in phosphate buffer saline plus 0.05% Tween-20 (PBS-T) for ELISA. ELISA tests were done by the procedure of Kimishima *et al.* (1984)

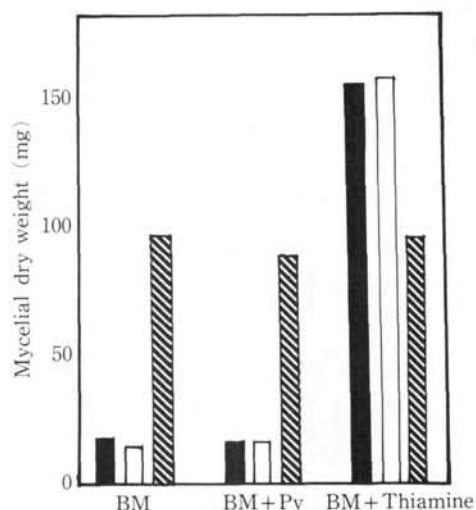
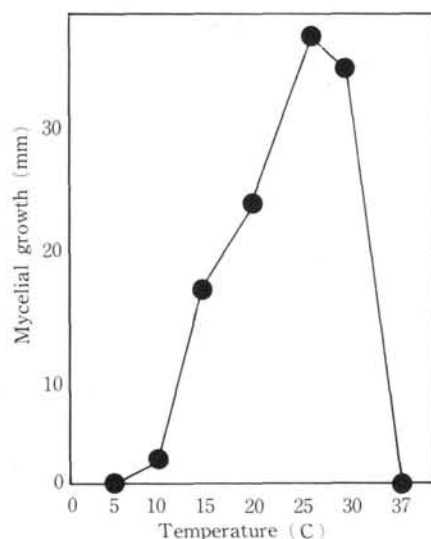
チアミン要求試験

Py. irregulare はいずれの試験区でも良く生育した。一方、分離菌と *P. erythroseptica* は、基礎培地区とピリ

* 許可番号 54 横植第 1431 号

Table 2. Morphological comparison of the fungus isolated from litchi fruit with description on *Peronophythora litchii* by Ko

Organs	Isolated fungus (μm)	Ko (μm)
Zoosporangium	26.3–40.0×15.0–23.8	27.7–33.3×18.5–22.2
Oogonium	20.0–40.0×17.5–25.0	27.8–33.3×24.1–29.1
Oospore	17.5–27.5	22.2–25.9
Antheridium	7.5–12.5	9.2–12.9

**Fig. 2.** Growth of *Peronophythora litchii* (■), *Phytophthora erythroseptica* (□) and *Pythium irregulare* (▨) in a glucose-asparagine basal medium (BM), and the BM supplemented with pyrimidine (Py) moieties and thiamine.**Fig. 4.** Mycelial growth of *Peronophythora litchii* cultured on V-8 agar medium under the temperature from 5 to 37°C.

ミジン添加区ではほとんど生育しなかったが、チアミン添加区では良く生育した。これらのことから、分離菌は *P. erythroseptica* と同様に菌の生育にチアミンを要求することが分かった (Fig. 2)。

病原菌の形態および性状

菌糸は無色で隔膜を持たず、気中に多数の胞子のうを形成した。胞子のうはレモン型で乳頭突起が顕著であり、容易に胞子のう柄から離脱し、大きさは $26.3 \sim 40.0 \times 15.0 \sim 23.8 \mu\text{m}$ であった (Table 2, Fig. 3-2)。胞子のう柄は叉状に分歧し、有限であった (Fig. 3-1)。藏卵器は球形で表面が平滑であり、卵胞子は厚膜であった。大きさはそれぞれ、 $20.0 \sim 32.5 \times 20.0 \sim 35.0 \mu\text{m}$, $17.5 \sim 27.5 \mu\text{m}$ であった (Table 2)。藏精器は藏卵器に1個付着し、底着型と側着型の両方が観察された

(Fig. 3-3, 4)。その大きさは $7.5 \sim 12.5 \mu\text{m}$ であった (Table 2)。また、菌糸の生育適温は 25°C 付近であった (Fig. 4)。

接種試験

レイシ果実には無傷接種で病原性を示した。キュウリ、ニガウリ、トマト、リンゴ、ナシなどの果実には無傷接種では病原性を示さなかったが有傷接種では病原性を示し、とくにキュウリ、ナシの果実には明瞭な褐変腐敗を生じた。しかし、ナス、カボチャ、レモン、バナナなどの果実、ダイコン、ニンジン根には病原性を示さなかった (Table 3, Fig. 5)。

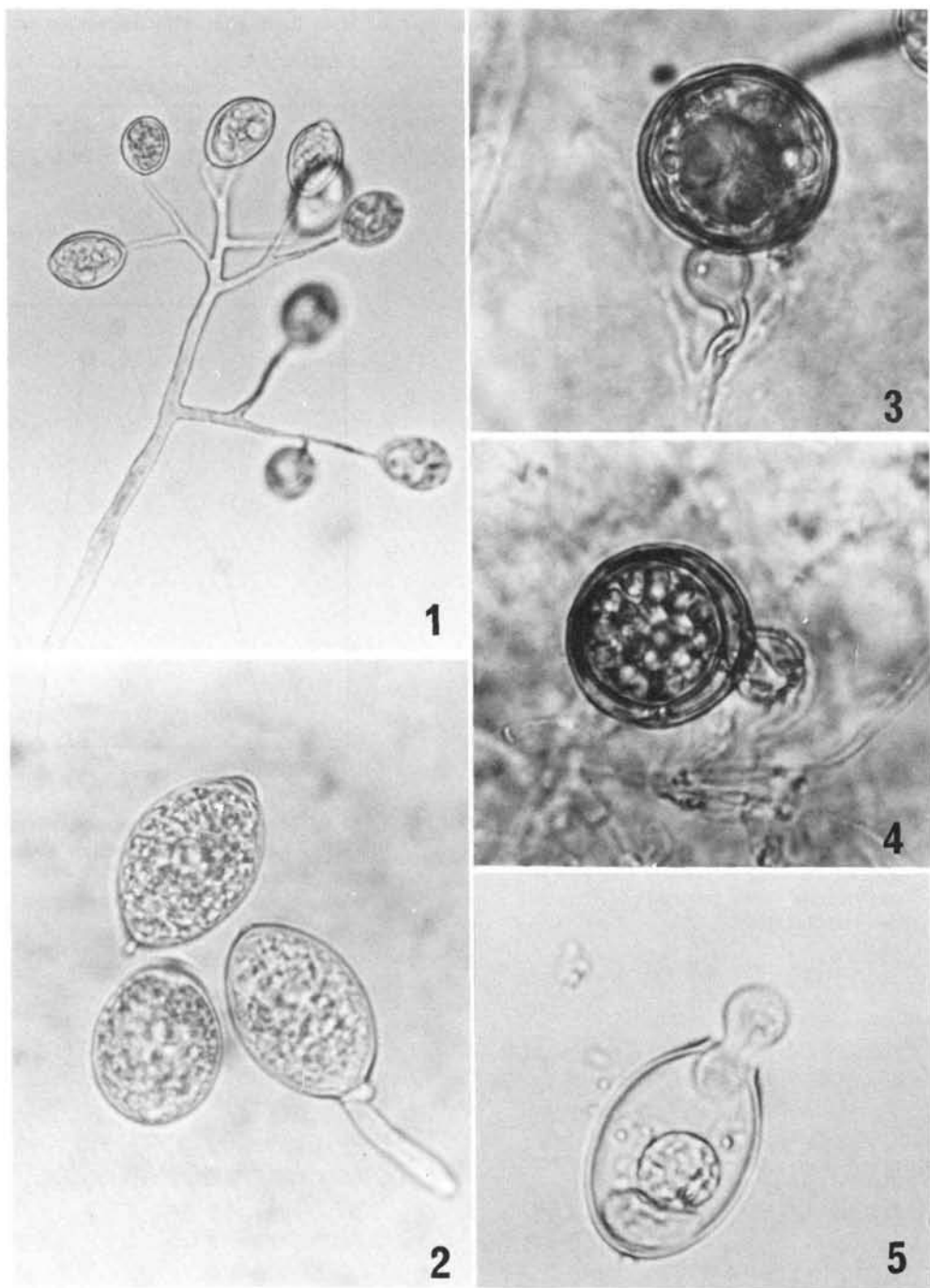


Fig. 3. *Peronophythora litchii* 1. Determinate growth of sporangiophores 2. Sporangia 3. Oogonium with paragynous antheridium 4. Oogonium with amphigynous antheridium 5. Indirect germination of sporangia.

Table 3. Pathogenicity of *Peronophythora litchii* to various plants

Plant tissues ^{a)}	Result
Tomato fruit	+
Sweet pepper fruit	—
Eggplant fruit	—
Cucumber fruit	+
Balsam pear fruit (<i>Momordica charantia</i> L.)	+
Pumpkin fruit	—
Onion bulb	—
Japanese radish root	—
Carrot root	—
Apple fruit	+
Pear fruit	+
Lemon fruit	—
Banana fruit	—
Grape fruit	—

^{a)} Inoculation with wound^{b)} +: Infected^{c)} —: Not infected

考 察

P. erythroseptica 抗血清を用いた血清学的診断法によって、*Phytophthora* 属菌に近縁であることが明らかにされた分離菌は形態的な試験の結果より、Ko ら (1978) がレイシの果実腐敗の病原菌として報告した *Peronophythora litchii* であると同定された。本菌は、気中に胞子のうを多数形成し、胞子のう柄が有限であることなどの点で *Peronospora* 属菌に類似するが、人工培養でき、胞子のうの間接発芽の様式が *Phytophth-*

ora 属菌の様式と類似するという特徴を有していた。さらにチアミン要求性の試験結果が示すように、本菌は *Phytophthora* 属菌と同様に菌糸の生育にチアミンを要求し、このことから *Phytophthora* 属菌に類似していた。しかし、Ko ら (1978) は、胞子のう柄が有限であるという特徴を重視し、べと病菌目 (*Peronosporales*) のなかに新たにペロノファイトラ菌科 (*Peronophythoraceae*) を設け、ピシウム菌科 (*Pythiaceae*) の *Phytophthora* 属菌とは別に分類することを提案した。

接種試験の結果、無傷接種ではレイシにのみ病原性を示したが、有傷接種では、キュウリ、ニガウリ、トマト、リンゴ、ナシなどの果実に病原性を示した。このことから本菌は、多汁な果実の組織に寄生するものと考えられた。また、ANN and Ko (1984) は、本菌がレイシの花を腐敗させることも報告している。

先に述べたように本菌は、分類上興味ある位置に分類されており、今後は *Peronophythora* 菌の抗血清を作製してべと病菌との血清学的な類縁関係についても検討したい。

わが国でのレイシの栽培は極くわずかで、今のところその病害はほとんど問題となっていないが、鹿児島、沖縄県を中心に栽培面積も増える傾向にあり、前述のようにレイシ以外の作物にも弱いながら病原性の認められることから、植物検疫上本菌の侵入に注意する必要があるだろう。

摘 要

台湾から輸入されたレイシ果実より、*Phytophthora* 属菌と血清学的類縁関係のある菌を分離し、さらに分離菌のチアミン要求性および各種植物への病原性を調べた。

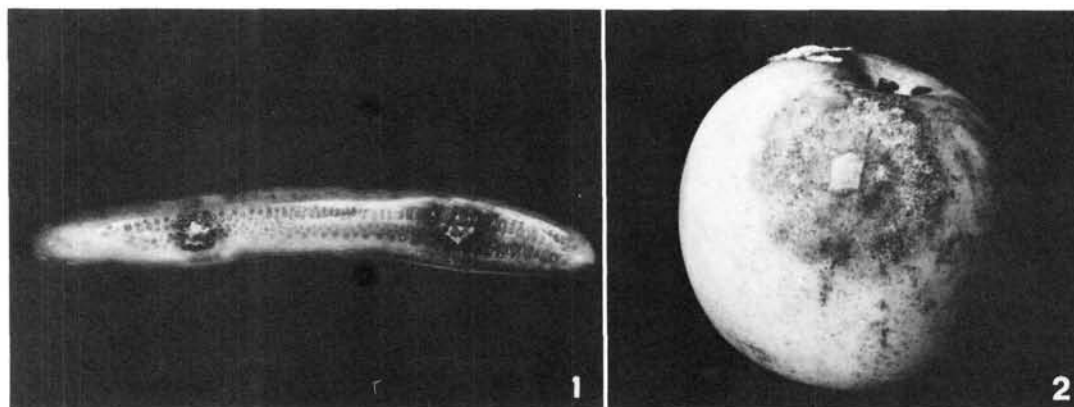


Fig. 5. Symptoms of cucumber (1), and pear (2) fruit inoculated with *Peronophythora litchii*.

1. *Phytophthora erythroseptica* 抗血清を用いた試験で、分離菌はELISA法および間接蛍光抗体法ともに陽性反応を示し、*Phytophthora* 属菌と血清学的に近縁であった。

2. 分離菌は、*Phytophthora* 属菌と同様に菌糸の生育にチアミンを要求した。

3. 分離菌の形態および各器官の大きさをKoらの報告(1978)と比較したところそれらは一致し、本菌を *Peronophythora litchii* と同定した。

4. 分離菌の生育適温は25℃付近にあり、有傷接種でキュウリ、ニガウリ、トマト、リンゴ、ナシなどの果実に病原性を示した。

本病害はわが国未記載であるので、病名をレイシベと疫病とすることを提案した。

引用文献

- ANN, P.J. and W.H. KO (1984) Blossom blight of litchi in Taiwan caused by *Peronophythora litchii*. *Plant Disease* **68**: 826.
- CLARK, M.F. and A.N. ADAMS (1977) Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* **34**: 475-483.
- 君島悦夫・西尾 健・高山睦雄・木村 茂 (1983) 我が国未発生の重要糸状菌病の診断技法に関する研究. IV. *Phytophthora* spp. 菌株間の血清学的類縁関係について. 日植病報 **49**: 391-392 (講要).
- 君島悦夫・西尾 健・高山睦雄・長尾記明 (1984) *Phytophthora* 属菌の血清学的検出法および同定法に関する研究. III. ELISAによる植物組織中の *Phytophthora syringae* KLEB. の検出. 植防研報 **20**: 1-6.
- KO, W.H., H.S. CHANG, H.J. SU and C.C. CHEN (1978) *Peronophythora*, a new family of Peronosporales. *Mycologia* **70**: 380-384.
- 西尾 健・川口嘉久・君島悦夫・高山睦雄・末次哲雄 (1983a) *Phytophthora* 属菌の血清学的検出法および同定法に関する研究. I. *Phytophthora syringae* 抗血清の作製とその寒天ゲル内拡散法における反応. 植防研報 **19**: 47-53.
- 西尾 健・君島悦夫・高山睦雄・末次哲雄 (1983b) *Phytophthora* 属菌の血清学的検出法および同定法に関する研究. II. *Phytophthora syringae* の蛍光抗体法による検出. 植防研報 **19**: 55-62.
- RIDINGS, W.H., M.E. GALLEGLY and V.G. LILLY (1969) Thiamine requirements helpful in distinguishing isolates of *Pythium* from those *Phytophthora*. *Phytopathology* **59**: 737-742.