

ダッチ・アイリス (*Iris hollandica hort*) 黄化腐敗病病組織からの*Aphanomyces iridis* の選択分離培地

堀本圭一・小玉孝司

A Selective Medium for Isolation of *Aphanomyces iridis*from Infected Dutch Iris (*Iris hollandica hort*).

Keiichi HORIMOTO and Takashi KODAMA

## 緒 言

筆者らは、奈良県のダッチ・アイリス栽培地域において発生している病害が、*Aphanomyces iridis* によって引き起こされる新病害であり<sup>6)</sup>、病名を黄化腐敗病と呼称することを報告した<sup>5)</sup>。さらに前報によって、本病の発生生態<sup>7)</sup>ならびに本病原菌の遊走子形成とその侵入過程<sup>4)</sup>について報告した。一般に *Aphanomyces* 属菌は生育速度が遅く、その純粋分離には他の糸状菌や細菌が混在し困難な場合が多い。また土壤中の菌量を定量する方法として、現在では指標植物法があるのみで、定量的分離ができる選択培地の開発が望まれている。ここでは本病原菌の選択分離培地の作成を目標に、本菌の栄養要求性、抗菌性物質の検索を行い、病組織からの選択分離が可能となったので、その概要を報告したい。

## 実験 1. 窒素源の検索

## 実験材料および方法

本菌の利用できる窒素源の検索として、無機窒素化合物7種（硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸カルシウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸2アンモニウム、塩化アンモニウム）、有機窒素化合物4種（シュウ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、尿素）、アミノ酸18種（アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシン、バリン、リジン、アルギニン、スレオニン、プロリン、フェニルアラニン、アラニン、セリン、チロシン、オルニチン、シトルリン、ヒスチジン、トリプトファン、メチオニン、システイン）を試験に供した。あらかじめPDA培地で10日間培養した本菌を、直径5mmのコルクボーラーで打

ち抜き、グルコース2%に上記の各種窒素源を加え滅菌した液体培地で、25°C、2週間培養し菌糸伸長の有無を調査した。無機、有機窒素化合物は硝酸カリウム0.2%、アミノ酸類はアスパラギン0.2%と当量になるよう窒素量を調整した。

## 実験結果

試験に供した無機および有機窒素化合物の中には、本菌が利用できるものはなかった（第1表）。アミノ酸類では、スレオニン、プロリン、オルニチン、シトルリンが菌糸の伸長を促進したが、その他のものには菌糸の伸長は認められなかった（第2表）。上記4種のアミノ酸における菌糸の伸長は、ジャガイモ煎汁液体培地、ペプトン2%液体培地と比較すると格段に少く、これら単体では選択培地の窒素源としては不十分であった。

第1表 *A. iridis* の菌糸伸長に及ぼす無機、有機窒素化合物の影響

	含窒素化合物	分子式	菌糸a)伸長
無	硝酸カリウム	KNO <sub>3</sub>	±
	硝酸ナトリウム	NaNO <sub>3</sub>	±
	硝酸カルシウム	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-
	硝酸アンモニウム	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-
機	硫酸アンモニウム	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
	リン酸2アンモニウム	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-
	塩化アンモニウム	NH <sub>4</sub> Cl	-
有	シュウ酸アンモニウム	C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	-
	酢酸アンモニウム	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	-
	クエン酸アンモニウム	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	-
機	尿 素	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	±
	対 照		±

a) 菌糸伸長 - : 0 ± : 0 ~ 2 mm

第2表 *A. iridis* の菌糸伸長に及ぼす  
 アミノ酸類の影響

アミノ酸	分子式	菌糸a) 伸長
アスパラギン	$C_4 H_8 O_3 N_2$	-
アスパラギン酸	$C_4 H_7 O_4 N$	-
グルタミン酸	$C_5 H_9 O_4 N$	-
ロイシン	$C_6 H_{13} O_2 N$	-
バリン	$C_5 H_{11} O_2 N$	-
リジン	$C_6 H_{14} O_2 N_2$	-
アルギニン	$C_6 H_{14} O_2 N_4$	-
スレオニン	$C_4 H_9 O_3 N$	+
プロリン	$C_5 H_9 O_2 N$	+
フェニルアラニン	$C_9 H_{11} O_2 N$	-
アラニン	$C_3 H_7 O_2 N$	-
セリン	$C_6 H_{13} O_2 N$	-
チロシン	$C_9 H_{11} O_3 N$	-
オルニチン	$C_5 H_{12} O_2 N_2$	+
シトルリン	$C_6 H_{13} O_3 N_3$	+
ヒスチジン	$C_6 H_9 O_2 N_3$	-
トリプトファン	$C_{11} H_{12} O_2 N_2$	-
メチオニン	$C_5 H_{11} O_2 N_2 S$	-
システイン	$C_3 H_7 O_2 NS$	-
対 照		

a) 菌糸伸長

- : 0 ± : 0~2mm + : 2mm以上

供試した単糖類、複糖類は、キシロースを除いてほぼ同程度の菌糸伸長を示した。デンプンは他の糖類と比較してやや菌糸の伸長は良かったが、ジャガイモ煎汁液体培地、ペプトン2%液体培地と比較すると格段に遅かった(第3表)。

第3表 *A. iridis* の菌糸伸長に及ぼす  
 糖類の影響

	炭 素 源	分子式	菌糸伸長a)
単糖類	キシロース	$C_5 H_{10} O_5$	-
	ガラクトース	$C_6 H_{12} O_6$	±
	グルコース	$C_6 H_{12} O_6$	±
	フラクトース	$C_6 H_{12} O_6$	±
	デキストロース	$C_6 H_{12} O_6$	±
複糖類	マンノース	$C_6 H_{12} O_6$	±
	サッカロース	$C_{12} H_{22} O_{11}$	±
	マルトース	$C_{12} H_{22} O_{11}$	±
多糖類	ラクトース	$C_{12} H_{22} O_{11}$	±
	デンプン ( $C_6 H_{10} O_5$ ) <sub>n</sub>		+
	対 照		-

a) 菌糸伸長

- : 0 ± : 0~2mm + : 2mm以上

## 実験2. 炭素源の検索

### 実験および方法

本菌の利用できる炭素源の検索として、単糖類6種(キシロース, ガラクトース, グルコース, フラクトース, デキストロース, マンノース) 複糖類3種(サッカロース, マルトース, ラクトース), 多糖類1種(デンプン)を試験に供した。あらかじめPDA培地で10日間培養した本菌を, 直径5mmのコルクボーラーで打ち抜き, 硝酸カリウム0.2%に上記の各種炭素源を2%加え滅菌した液体培地で, 25℃, 2週間培養して菌糸伸長の有無を調査した。

### 実験結果

## 実験3. ビタミン類の検索

### 実験材料および方法

本菌の利用できるビタミン類の検索として6種(チアミン, イノシトール, パントテン酸, ニコチン酸, 葉酸, アスコルビン酸)を試験に供した。あらかじめPDA培地で10日間培養した本菌を, 直径5mmのコルクボーラーで打ち抜き, 硝酸カリウム0.2%, グルコース2%に上記のビタミン類をそれぞれ $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ M加え滅菌した液体培地で, 25℃, 2週間培養して菌糸伸長の有無を調査した。

### 実験結果

供試したビタミン類では, チアミンがやや菌糸の伸長を促進したが, 特異的なものではなかった。その他のビタミン類は菌糸の伸長を促進しなかった(第4表)。

第4表 *A. ididis* の菌糸伸長に及ぼす  
ビタミン類の影響

ビタミン類	分子式	菌糸伸長a)	
		10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-5</sup> M
チアミン	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ON <sub>4</sub>	+	+
イノシトール	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	-
パントテン酸	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	-	-
ニコチン酸	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	-	-
葉酸	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> N <sub>7</sub>	-	-
アスコルビン酸	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	-	-
ビオチン	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>33</sub> N <sub>2</sub> S	-	-
対照		±	

a) 菌糸伸長

- : 0    ± : 0~2mm    + : 2mm以上

培地に使用できると思われた(第5表)。畑地土壌を希釈平板した結果、ペニシリンGとリファンピシンを加えたものが、広範囲の細菌に対し抗菌力を示した。抗糸状

第5表 *A. ididis* の菌糸伸長に及ぼす  
抗細菌性物質の影響

薬剤名	濃度ppm	菌糸伸長
ストレプトマイシン	30	+
ペニシリンG	30	+++
リファンピシン	10	+++
アンピシリン	30	+++
アクロマイシン	30	-
エアロタイシン	30	+++
アモリン	30	+++
カナマイシン	30	+
リンコシン	30	+++
ミノマイシン	30	-
センセファリン	30	+++
ソリシリン	30	+++
バスティシリン	30	+++
オクスゴール	300	++
ローズベンガル	50	+++
対照		+++

7日後の菌そう直径

- : 0    + : 0~2cm

++ : 2~4cm    +++ : 4~6cm

第6表 *A. ididis* の菌糸伸長に及ぼす  
抗糸状菌性物質の影響

薬剤名	濃度ppm	菌糸伸長
ベノミル	20	++
ナイスタチン	50	+++
P C N B	20	++
メタラキシル	20	+++
ダイホルタン	10	-
スルフェン酸	20	-
キャプタン	20	-
メプロニル	20	+
T P N	20	-
ジネブ	20	-
エクロメゾール	20	-
ヒドロキシソキサゾール	50	-
対照	-	+++

7日後の菌そう直径

- : 0    + : 0~2cm

++ : 2~4cm    +++ : 4~6cm

## 実験4. 抗菌性物質の検索

### 実験材料および方法

本菌の生育を阻止することなく、これと混在する細菌、糸状菌の生育を抑制する薬剤の検討をおこなった。供試した抗菌性物質は、抗細菌性物質15種(ストレプトマイシン、ペニシリンG、リファンピシン、アンピシリン、アクロマイシン、エアロタイシン、アモリン、カナマイシン、リンコシン、ミノマイシン、センセファリン、ソリシリン、バスティシリン、オクスゴール、ローズベンガル)、抗糸状菌性物質12種(ベノミル、ナイスタチン、PCNB、メタラキシル、ダイホルタン、スルフェン酸、キャプタン、メプロニル、TPN、ジネブ、エクロメゾール、ヒドロキシソキサゾール)である。あらかじめPDA培地で10日間培養した本菌を、直径5mmのコルクボーラーで打ち抜き、上記の各種抗菌性物質を添加したPDA培地に接種し、25℃、7日間培養し菌糸伸長を調査した。抗菌性物質はすべて滅菌水に溶解して原液を作製し、無菌的に各所定濃度を混和した。さらに畑地土壌を希釈平板することにより、抗菌性物質の評価をおこなった。

### 実験結果

抗細菌性物質として、ストレプトマイシン、カナマイシン、ミノマイシンは本菌の菌糸伸長を阻害した。しかしながらそれ以外の物質は阻害せず、これらは選択分離

菌性物質として、ペノミル、ナイスタチン、PCNB、メタラキシルが本菌の菌糸伸長に対し阻害が少なかった(第6表)。ペノミル、PCNBは20ppmで菌糸伸長阻害が認められたが、10ppmでは阻害されなくなった。したがって本菌の選択分離培地の抗菌性物質として、細菌にはペニシリン30ppm、リファピシン10ppm、糸状菌のそう菌類にはメタラキシル20ppm、子のう菌類にはペノミル10ppm、またその他としてナイスタンチン50ppmの6薬剤が有効であると思われる。

## 実験 5. 選択分離培地の作成

### 実験材料および方法

これまでの結果から選択分離培地の基本培地に使用できる、窒素源、炭素源は発見できなかった。したがって本菌が良く生育するPDA培地、ペプトン2%寒天培地、麦芽エキス1%寒天培地、カゼイン1%寒天培地を基本培地として、上記の抗菌性物質を添加し、本病の病根と病土から本菌の再分離を試みた。

直径15cm、深さ13cmの素焼鉢に畑土壌を充填し、ダッチ・アイリス(品種アイデアル)を10球植え付けた。14日後、PDA培地で14日間培養した本菌を水道水200mlとともにワーリング・ブレンダーで粉碎し、鉢当たり1シャーレ(直径9cm)の菌そうを接種した。接種14日後根を掘り上げ、よく水洗した後5~10mmの長さに切断し、上記の選択分離培地上に置床した。25℃、4日間培養後

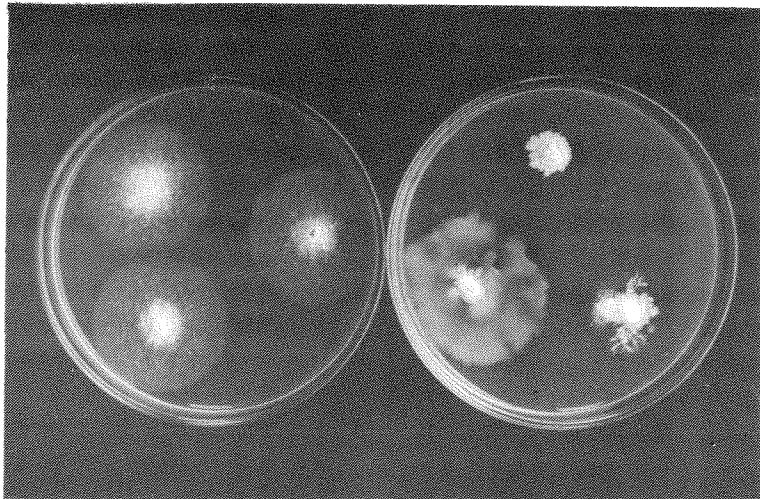
伸長してきた菌そうをPDA斜面培地に分離し、他の雑菌混在の有無を確認後、ダッチ・アイリス(品種アイデアル)の幼苗に接種して本菌の再分離を確認した。病土は上記の病原菌接種30日後の鉢土を用い、希釈平板法により出現したコロニーをPDA斜面培地に再分離し、菌そう形態で確認した。

## 実験結果

り病根からの分離は4種の基本培地ともほぼ同程度に高い頻度で検出され、かつそのほとんどが純粋分離された(第1図)。ペプトン2%寒天培地、PDA培地では、形成された菌そうの形態からほぼ本菌であることを確認し再分離できる利点があるが、再分離においてやや細菌が混在する傾向があった。病土から希釈平板法により本菌の分離を試みたが、2種のそう菌類と思われる菌が分離されるのみで、4種の基本培地とも本菌は分離されなかった。

## 考 察

*Aphanomyces* 属菌の生態を研究しその防除対策を講ずる上で、土壤中の生存器官と思われる卵胞子や、伝染器官と思われる遊走子を分離定量する選択培地のないことが、大きな障害となっている。また一般に *Aphanomyces* 属菌は生育速度が遅いため、り病組織からの分離には他の糸状菌や細菌が混在し、純粋分離の困難な菌



の1つである。従来 *Aphanomyces* 属菌を病組織から分離する方法として、Van Thiegem cell 法や、病組織を1日滅菌水に浸漬し、伸長してきた菌そうを分離に供する方法が用いられてきたが、そのいずれも不十分であった。

筆者らはダッチ・アイリス黄化腐敗病の病原菌 *Aphanomyces iridis* の栄養要求性、抗菌性物質の検索を行い、選択分離培地を作成した。その組成はPDA培地にペニシリンG30ppm、リファンピシン10ppm、メタラキシル20ppm、ベノミル10ppm、PCNB10ppm、ナイスタチン50ppmを加用したものである。本培地は正子らの疫病菌選択分離培地の、ヒドロキシイソキサゾールをメタラキシルに、PCNB25ppmを10ppmに改変したものととなった。黄化腐敗病にり病したダッチ・アイリスの根から、素寒天を用いて本菌を分離した場合、*Fusarium* spp. や細菌類が混在して純粋分離の妨げとなるが、本選択培地ではこれらはほとんど出現せず、純粋分離がきわめて容易となった。

近年エンドウ、インゲンのり病組織より *A. euteiches* を<sup>8)</sup>、またテンサイから *A. cochlioides* を<sup>2)</sup>を分離する選択培地が開発された。これらの培地と本報告の培地はともに、ベノミル、メタラキシルを使用する点で類似するが、他の薬剤は異なる。また上記の培地は基本培地としてCMAを使用しているが、これは罹病組織から病原菌の純粋分離を目的としているため、細菌類の混入の少ないCMAにしたものと思われる。選択分離培地の基本培地には、目的とする菌の生育に必要な物質、しかも他の微生物には利用しにくい物質のみで構成された合成培地が望ましい。しかしながら本報告において、本菌の利用できる有効な栄養源は認められなかった。したがって基本培地として、本菌が良く生育しかつ特徴的な菌そう形態を示すPDA培地を使用した。本培地を用い病土から本菌の分離を試みたが、他のそう菌類と思われる2種の菌が分離されたのみで、本菌は分離されなかった。PDA培地は成分の複雑な有機物を含有しており、それらが他の微生物の利用するところとなり、抗菌性物質を添加してもそれにはおのずから限界があると思われる。土壤中から本菌が分離されない原因として、土壤中での生存器官と考えられる卵胞子の不発芽と、仮に発芽しても他菌との拮抗により菌そうを形成するに至らない点が考えられた。*Aphanomyces* 属菌の必要とする栄養物質は古くから研究されているが<sup>1,3)</sup>、卵胞子発芽を促進する物質の検索を含め、選択分離培地の基本培地には今後さらに検討が必要である。

## 摘 要

ダッチ・アイリス黄化腐敗病菌 *Aphanomyces iridis* の選択分離培地を検討した。その組成は、PDA培地にペニシリンG30ppm、リファンピシン10ppm、メタラキシル20ppm、ベノミル10ppm、PCNB10ppm、ナイスタチン50ppmを加用したものである。本選択培地を用いり病組織から病原菌の分離を試みたところ、*Fusarium* spp. や細菌類の混入が少く、純粋分離がきわめて容易になされた。しかしながら土壤中からの分離はできなかった。

## 引用文献

1. ABDUL GHAFOOR 1964. Radish black—root fungus: Host range nutrition and oospore production and germination. *Phytopathology* 54: 1167—1171.
2. 築尾嘉章・杉本利哉 1985. テンサイ苗立枯病罹病組織からの *Aphanomyces cochlioides* の選択分離培地. *日植病報* 51: 16—21.
3. HAGLUND, W. A., T. H. KING 1962. Sulfur nutrition of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 52: 315—317.
4. 堀本圭一・小玉孝司 1985. ダッチ・アイリス黄化腐敗病の病原菌 *Aphanomyces* sp. の遊走子形成とその侵入過程. *奈良農試研報* 16: 82—85.
5. 一谷多喜郎・小玉孝司・福井俊男・堀本圭一・池田彰弘 1983. *Aphanomyces* sp. によるアイリスの新病害黄化腐敗病 (仮称) *日植病報* 49: 100. (講要)
6. 一谷多喜郎・小玉孝司・堀本圭一・池田彰弘 1985. ダッチ・アイリス黄化腐敗病 *Aphanomyces iridis* Ichitani et Kodama について. *日植病報* 51: 331. (講要)
7. 小玉孝司・堀本圭一・福井俊男・岡山健夫・大辻純一. 1985. *Aphanomyces* sp. に起因するダッチ・アイリスの新病害黄化腐敗病の発生. *奈良農試研報* 16: 77—81.
8. PFENDER, W. F., P. A. DELWICHE, C. R. GRAU and D. J. HAGEDORN 1984. A medium to enhance recovery of *Aphanomyces* from infected plant tissue. *Plant Disease* 68: 845—847.

### Summary

A selective medium was developed for the isolation of *Aphanomyces iridis* from the yellow rot roots of the Dutch iris. The medium consisted of the following ingredients per liter of water: potato dextrose agar (potato 200g; dextrose 20g; agar 20g); penicillin G, 30mg; rifampicin, 10mg; metalaxyl, 20mg; benomyl, 10mg; PCNB, 10mg; and nystatin, 50mg. Recovery of *A. iridis* from infected root tissue was easy, because there was no development of associating organisms such as *Fusarium* spp. and bacterium. However, recovery from diseased soil was not able to be achieved.