

Fusarium 菌の硝酸塩利用能欠損変異株分離培地の選択性の向上

島根大学農学部 駒田 亘・上田 真也・山本 広基

はじめに

Fusarium 菌の硝酸塩利用能欠損変異株 (PUHALLA, 1985, 以下, nit 変異株) は, その生態学的研究や防除技術の研究において, 特定の菌株の土壤中や宿主植物体上からの検出, 定量に有用である。しかし, nit 変異株選択培地 (HARDAR et al., 1989, 以下, MMCPA 培地) の選択性が不十分なため, この培地を用いて希釈平板法を行った場合, 目的の菌株の密度が低いと, 多くの雑菌が出現し, 支障をきたすことが多い。そこで, MMCPA 培地の選択性の向上を試みた。

本稿の一部は, 平成6年度日本植物病理学会関西部会で講演した(上田ら, 1994)。

I 選択性の評価方法

この研究では, *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* の nit 変異株 (以下, FOR nit) を用い, 選択性評価の手順は図-1 に示した。1週間, 振とう培養して得られた FOR nit の bud cell を滅菌土壌に接種して, 25°Cの恒温室内で数週間培養して厚膜胞子を形成させ, 常に一定の菌密度の土壌希釈液を得られるようにした。この菌密度をあらかじめ PSA 培地で把握し, プレート当たり, 30~50 のコロニーが出現するよう希釈段階を決定した。PSA 培地上に出現したコロニー数は回収率評価の比較対照として用いた。

自然土壌からの本菌の選択分離性を, 島根大学内の圃場(沖積土壌, 以下, 川津土)と鳥取県西伯郡中山町の土壌(火山灰土壌, 以下, 中山土)の 10^2 倍希釈懸濁液を用いて検討した。両土壌の10倍希釈懸濁液と, 上記の方法に従って作成した nit 変異株を接種した滅菌土壌の希釈懸濁液とを1mlずつ, 8mlの滅菌水に加えて目的の希釈懸濁液を得, それをショ糖をガラクトースに置換した MMCPA 培地を基本培地として, H_3BO_3 のみを加えたもの, 草刈ら(1993)が用いた硝酸マイコナゾールのみを加えたもの, そして, この両物質を加えた培地の平板上に1mlずつ広げた。

PSA 培地は4日間, MMCPA 培地は10日間, 25°Cの恒温室内で培養した。

予備試験として, 硝酸マイコナゾールを10mg/l, 20mg/l, 50mg/l 添加した MMCPA 培地平板上に, 川津土, 中山土の 10^3 倍希釈懸濁液と, 滅菌土壌中の FOR nit を所定菌密度にした土壌懸濁液とを混合したものを1ml広げたところ, FOR nit の回収率及び雑菌のコロニー形成に対する抑制力, 共に50mg/lが優れていた。そこで, 硝酸マイコナゾールを50mg/lに絞り, H_3BO_3 の添加量を100mg/l, 300mg/l, 500mg/lにし, 本試験を行った。

II 改変 MMCPA 培地の選択性

両物質を加えて改変した MMCPA 培地の平板上に, FOR nit 変異株の懸濁液のみを広げたものを図-2 に示した。 H_3BO_3 とマイコナゾールの添加によって, コロニー数が抑えられることはなく, この両物質の添加は FOR nit の生育を阻害することはないと判断された。また, 両物質を組み合わせて添加した場合も同様であった。

川津土の 10^2 倍希釈懸濁液と FOR nit を所定菌密度にした土壌懸濁液とを混合したものを1mlずつ MMCPA 培地平板上に広げたものを図-3と口絵写真に示した。両物質を添加しない MMCPA 培地上では, 多数の雑菌のコロニーが出現し, ほとんど FOR nit のコロニーは識別できなかった。 H_3BO_3 の添加量が増加するにつれ, *Trichoderma* 菌などのように, コロニーが拡大しやすい菌のコロニー生長が抑えられたが, 他の雑菌のコロニー形成に対する抑制力は不十分であった。硝酸マイコナゾールの添加は, 大幅に雑菌を抑えることができたが, *Penicilium* 菌などのような, 孢子多産生の菌のコロニー形成を抑えることはできなかった。しかし, 両物質を添加した MMCPA 培地では, 雑菌に対する抑制力が相乗的に高くなり, それに伴い, FOR nit のコロニー数が増加して, PSA 培地上の菌数と変わらなくなった。中山土でも, 同様の傾向がみられた。

以上の結果から, 最も FOR nit の選択性の高かった H_3BO_3 500mg/l, マイコナゾール 50mg/l を添加した MMCPA 培地の処方を変更 MMCPA 培地として提唱する(表-1)。

III 他の *Fusarium* 菌の *nit* 変異株に対する 改変 MMCPA 培地の選択性

FOR *nit* 以外の *Fusarium* 菌の *nit* 変異株に対する、改変 MMCPA 培地の適用性を検討した。供試菌は表-2 に示すような 7 菌株を用いた。結果を図-4 に示した。ここで、*nit* 変異株のコロニー数は、PSA 培地に出現したコロニー数に対する割合で表現した。KA-3 N3 (カボチャ立枯病菌, *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*) は駒

田培地 (駒田, 1975) で分離できないことが、既に報告されている (渡辺ら, 1991) ので、改変 MMCPA 培地でも分離できないことが予想されたが、やはり、全くコロニーの形成はみられなかった。イ-1 N1 は *Fusarium oxysporum* であるが、なぜかコロニーの形成がみられなかった。それ以外の菌株では、図-4 にみられるように PSA 培地上とほぼ同等の菌数が得られた。また、雑菌のコロニー数が少なく、かつ、コロニー直径が小さく、雑菌に対する抑制力が高かった。しかし、KA-3 N3, イ

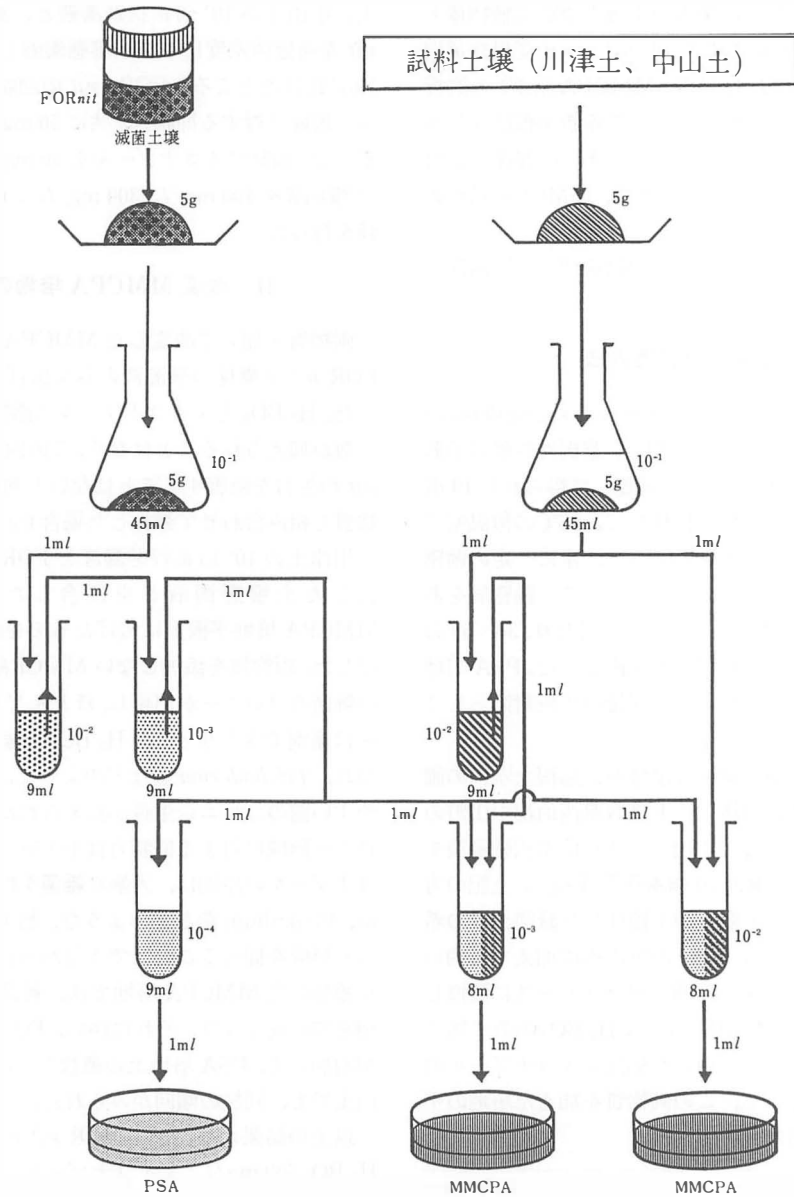


図-1 改変 (ガラクトース 30 g/l) MMCPA 培地の選択性評価の手順

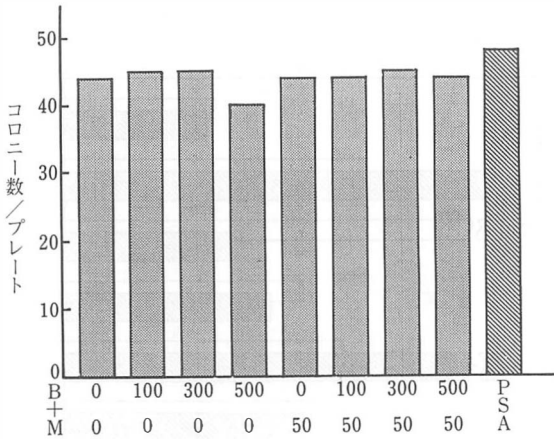


図-2 改変(ガラクトース 30 g/l) MMCPA 培地に硝酸マイコナゾール及び H₃ BO₃ を添加したときの FOR nit の回収

表-1 改変 MMCPA 培地の処方

ガラクトース	30 g	KClO ₃	10 g
NaNO ₃	2 g	PCNB(75%WP)	670 mg
L-アスパラギン	1.6 g	H ₃ BO ₃	500 mg
KH ₂ PO ₄	1 g	硝酸マイコナゾール	50 mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 g	クロラムフェニコール	250 mg
KCl	0.5 g	pH	3.8
微量要素液*	0.2 ml		
寒天	15 g		
蒸留水	1 l		

— : 改変箇所

*	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	250 mg	
クエン酸	5 g	MnSO ₄ · H ₂ O	50 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	5 g	H ₃ BO ₃	50 mg
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	4.75 g	Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	50 mg
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) · 7 H ₂ O	1 g	蒸留水	95 ml

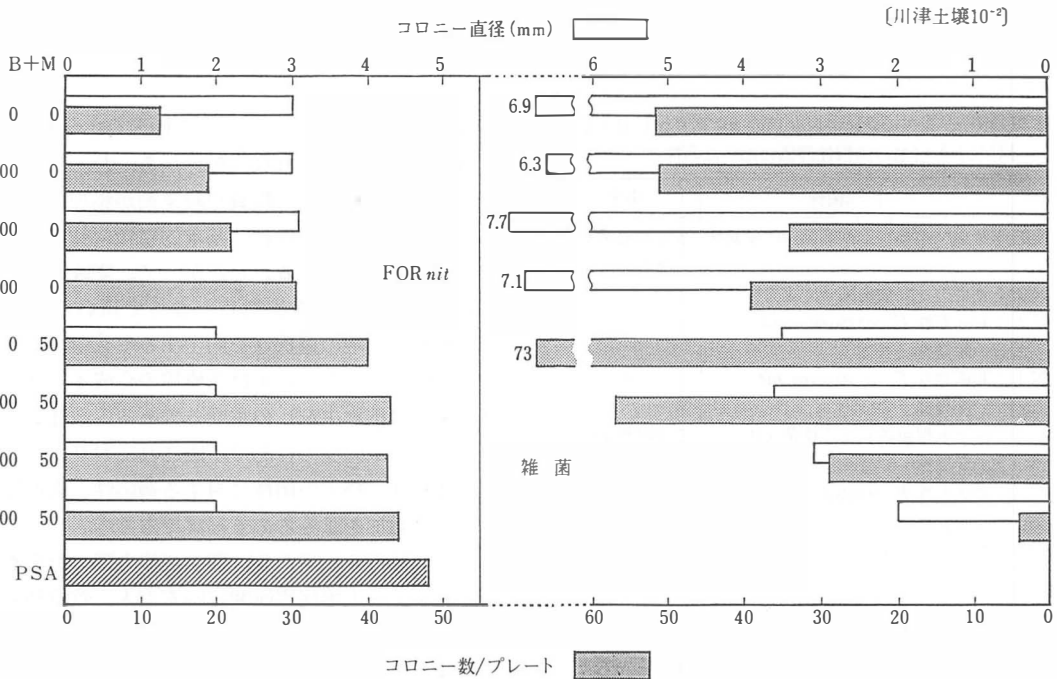


図-3 改変(ガラクトース 30 g/l) MMCPA 培地に対する、硝酸マイコナゾールと H₃ BO₃ 添加の効果

-1 N1 を接種したプレートでは、雑菌に対する抑制力が低かった。

この結果、Fusarium solani とイ-1 N1 以外の 5 菌株については、改変 MMCPA 培地は有効であることが示唆された。

おわりに

今日まで、Fusarium 菌の検出、定量のために様々な選択培地が考案され、開発されてきた。しかし、最も性能の優れている駒田培地を用いても、種の識別までしかできず、よほどの習練を重ねないと特定の分化型の識別は不可能である。そのため、特定の菌株の自然土壌におけ

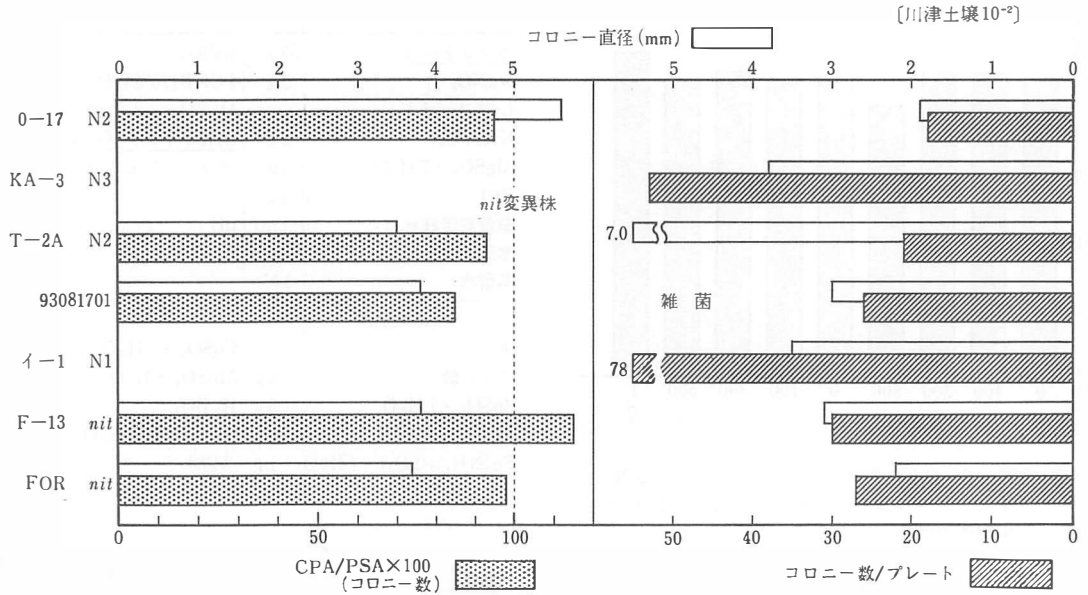


図-4 改良 MMCPA 培地の様々な nit 変異株に対する適用

表-2 FOR nit 以外の *Fusarium* 菌の nit 変異株に対する MMCPA 培地の選択性評価に用いた菌株

記号	供試菌株	由来
0-17 N2	: サツマイモつる割病菌 nit 変異株	茨城県農業総合センター
KA-3 N3	: カボチャ立枯病菌 nit 変異株	〃
T-2 A N2	: 非病原性 <i>F. oxysporum</i> nit 変異株	〃
イー-1 N1	: 非病原性 <i>F. oxysporum</i> nit 変異株	〃
93081701	: トマト根腐萎ちよう病菌 nit 変異株	三重県農業技術センター
F-13 nit	: 非病原性 <i>F. oxysporum</i> nit 変異株	島大耕地環境保全学研究室
FOR nit	: ダイコン萎黄病菌 nit 変異株	〃

る動態を把握しようとするときなど、もともと生息する *Fusarium* 菌をはるかに上回る高濃度の接種を行う。しかし、目的とする菌株の菌密度が低くなった場合、多数の雑菌と、もともと生息していた *Fusarium* 菌のコロニーが多数プレート上に出現し、特定の菌株のコロニーを識別して定量するのは不可能になってしまう。nit 変異株をマーカーとして用いれば、この問題は一度に解決する訳で、その生態、防除の研究に寄与するところはきわめて大きい。ところが、既報の nit 変異株用の選択培地の選択性は不満足で、この期待に十分にこたえられないので、その改良を行った。その結果、ほぼ満足すべきもの

が得られたが、*F. oxysporum* であっても、改良処方による培地で全く分離されない菌株があった。一般に、選択培地には、種々の抗生物質や殺菌剤が添加されるが、これら物質に対する耐性は、基本的には菌株によって異なると考えるべきである。したがって、実験に当たって、本培地への適合性を検討したうえで用いるべきであろう。なお本培地の選択性を向上するうえで、効果的であった硝酸マイコナゾールは医療用の合成イミダゾール系抗真菌剤 (抗水虫剤) の主成分である。数社から本剤の近縁化合物が同様の目的で市販されており、これらを本剤の代わりに特定の菌株に対する適応性と選択性の向上のために添加を試みるのも一案であろう。

本研究を行うに当たり、種々ご協力賜った農水省農業研究センター土壌病害研究室国安克人、竹原利明両氏ならびに菌株の分譲を賜った茨城県農業総合センター渡辺健氏、三重県農業技術センター黒田克利氏に深甚な謝意を表する。

引用文献

- 1) PUHALLA, J. E. (1985): Can. J. Bot. 63: 179~183.
- 2) 上田真也 (1994): 日植病報 60: 771.
- 3) HADAR, E. and J. KATAN (1989): Plant Disease Res. 73: 800~803.
- 4) 草刈真一・岡田清嗣 (1993): 日植病報 59: 75.
- 5) KOMADA, H. (1975): Rev. Plant Protec. Res. 8: 114~125.
- 6) 渡辺 健ら (1991): 日植病報 57: 3.