

PCNB を用いない *Fusarium oxysporum* 用選択培地

九州沖縄農業研究センター ^{にし}西 ^{むら}村 ^{のり}範 ^お夫

はじめに

選択培地を用いた希釈平板法は、多数の土壤試料中の生菌密度を同時に調査できるので、病原菌や非病原菌の生態解明に適している。また、硝酸塩代謝能欠損菌株 (*nit* rate non-utilizing (*nit*) mutant) 用選択培地を使用すれば標的微生物密度の計数が容易である。このため、自然発病土からの分離に適した改変ペプトン-PCNB 培地 (PAPAVIZAS, 1967) や駒田培地 (駒田, 1976), *nit* 菌用の FMMCPA (HADER et al., 1989), 改変 FMMCPA (駒田ら, 1995), CGMBP (TAKEHARA et al., 2003), 野生菌用の GMBP (TAKEHARA et al., 2003) 等多くの選択培地が開発されている。

しかし、これらの選択培地は接合菌などの生育を抑制するため PCNB 水和剤を含んでおり、日本では同剤の登録が 2000 年までにすべて抹消された。また、*F. oxysporum* f. sp. *spinisiae* や f. sp. *apii* は 10 colony-forming units (CFU)/g 程度と非常に低密度で発病を引き起こす。このため、PCNB 水和剤を含まず、少なくとも 10CFU/g の *F. oxysporum* Schlechtendahl を検出できる、すなわち、10 倍希釈土壤懸濁液から病原菌を検出できる選択培地が必要であった。そこで野生菌と *nit* 菌を同時に、または分別定量できる培地をそれぞれ作成した。

選択培地は GMBP と CGMBP を基にして改良した。最初、自然発病土の 100 倍希釈懸濁液から *F. oxysporum* を分離できる Fo-G1 並びに野生菌と *nit* 菌が混在する土壤の 100 倍希釈懸濁液から野生菌を分離するための Fo-W1 と *nit* 菌を分離するための Fo-N1 を開発した。これらの選択培地に 10 倍希釈土壤懸濁液を広げると、雑菌コロニーは大型化し、*F. oxysporum* も大型のいびつなコロニーを形成したので、小さく丸いコロニーにするため 3 種の成分、硝酸エコナゾール、イミノクタジン酢酸塩 25% 液剤、トルクロホスメチル 50% 水和剤を増量し、10 倍希釈懸濁液用の Fo-G2, Fo-W2, Fo-N2 を開発した (NISHIMURA, 2007)。

これらの選択培地の選択的分離能力は、100 倍と 10 倍希釈の土壤懸濁液から分離できる対照培地がなかった

ので、自然発病土懸濁液からのコロニーの生育状況と殺菌土懸濁液に加えた分生胞子の回収率で評価した。

I 選択培地の組成と調製

選択培地と微量要素液の組成を表-1 に示した。調製は実験室内で以下の方法で行った。硝酸エコナゾールを小瓶に入れ、ジメチルスルフォキシドを加えて溶解しておく。三角フラスコをスターラーの上に置き、蒸留水を入れて攪拌しながら表-1 の KH_2PO_4 から寒天までを加える。寒天を溶解するため、オートクレーブで 121℃, 15 分間滅菌した後、ウオーターバスに入れてスターラーでかくはんする。塩素酸カリウムと L-ソルボースを加え、瞬間湯沸器の約 70℃ の湯で消毒した駒込ビペットで培地を吸い上げてフラスコの壁に付いた試薬を洗い落としてから、イミノクタジン酢酸塩 25% 液剤と少量の蒸留水で懸濁したトルクロホスメチル 50% 水和剤を加える。培地温度が約 60℃ に下がったところで、10% H_3PO_4 を添加して pH メーターで pH 3.7 ~ 3.9 に調整し、分注器で 15 ml を直径 9 cm のペトリ皿に分注して机上に並べる。固まったらペトリ皿を重ねて暗所に 3 ~ 7 日置き、土壤懸濁液試料の水分が選択培地に吸収されるように培地表面を乾燥させる。それらをビニル袋に入れて密封し暗所に置けば、少なくとも 1 か月間は使用できる。なお、塩素酸カリウムはオートクレーブのふたを開けたときの蒸気で喉を痛める、L-ソルボースは選択培地を変色させる、イミノクタジン酢酸塩 25% 溶液は添加量を多くした場合に沈殿したので、これらとトルクロホスメチル 50% 水和剤はオートクレーブ滅菌後に添加することにした。

II 供試病土、土壤懸濁液と培養

選択培地の汎用性を知るため、レタス根腐病レース 1 土 (黒ボク土)、サトイモ萎凋病土 (黒ボク土)、イチゴ萎黄病土 (客土のため不明)、キュウリつる割病土 (黄色土)、セルリー萎黄病土 (灰色低地土)、トマト萎凋病レース 2 病土 (灰色低地土) を 2 mm 目の篩を通して十分かくはんし、9℃ で保存したものを供試した。また、10 倍希釈土壤懸濁液から分離するには *F. oxysporum* コロニーが多すぎるので、これらの病土と 105℃, 12 時間の乾熱殺菌で糸状菌を死滅させた殺菌病土を 1 : 9

Selective Media without PCNB for *Fusarium oxysporum* from Soil.
By Norio NISHIMURA
(キーワード: 選択培地, *Fusarium oxysporum*)

表-1 *F. oxysporum* 用選択培地の組成

成分	野生菌株用		野生と <i>nit</i> 菌株用		<i>nit</i> 菌専用	
	Fo-G1	Fo-G2	Fo-W1	Fo-W2	Fo-N1	Fo-N2
蒸留水	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l
リン酸－カリウム	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
塩化カリウム	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
硫酸マグネシウム・7 水和物	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
硝酸ナトリウム	2 g	2 g	—	—	2 g	2 g
クエン酸水素二アンモニウム	—	—	2 g	2 g	2 g	2 g
ホウ酸	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
硝酸エコナゾール	5 mg	10 mg	5 mg	10 mg	5 mg	10 mg
微量要素液	0.2 ml	—	0.2 ml	—	0.2 ml	—
クロラムフェニコール	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g
寒天（試薬）	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
（以下は 15 分間のオートクレーブ後に添加）						
塩素酸カリウム	—	—	—	—	10 g	10 g
L-ソルボース	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
イミノクタジン酢酸塩 25%	0.05 ml	0.4 ml	0.05 ml	0.4 ml	0.05 ml	0.4 ml
溶液（和光純薬）						
トルクロホスメチル 50% 水和剤	1 mg	3 mg	1 mg	3 mg	1 mg	3 mg

注 1) Fo-G1, G2 培地は自然発病土からの分離用。

注 2) Fo-W1, W2 培地は野生菌（非 *nit*）と *nit* 菌分離用。

注 3) Fo-N1, N2 培地は *nit* 菌分離専用の培地。

注 4) 硝酸エコナゾールは 0.5 ml ジメチルスルフォキシドに溶解して添加する。

注 5) 微量要素液は、蒸留水 95 ml にクエン酸 5 g、硫酸第一鉄 5 g、硫酸亜鉛 7 水和物 1 g、硫酸銅 0.5 g、硫酸マンガン(2)5 水和物 0.05 g、モリブデン酸ナトリウム 0.05 g を加え、オートクレーブ後、冷蔵庫に保存する。

注 6) トルクロホスメチル 50% 水和剤は少量の蒸留水に懸濁してから添加する。

注 7) 培地温を 60℃に下げてから、10%リン酸を加えて pH 3.7～3.9 に調整する。

(v : v) に混合して 10 倍希釈用病土とした。実験室内で、滅菌した 0.05% 寒天液と 105℃で乾熱殺菌した 200 ml 三角フラスコとメスシリンダーを用いて、寒天液 99 ml に病土 1 g を加えて 100 倍希釈懸濁液、寒天液 90 ml に 10 倍希釈懸濁液用病土 10 g を加えて 10 倍希釈懸濁液を調製した。*nit* 菌の場合は、PDA 培養の分生胞子を蒸留水に懸濁し、二重のペーパータオルでろ過し、分生胞子濃度を 8,000 個/ml に調整して、それらの 0.5 ml を寒天液並びに生土の 10 倍と 100 倍希釈懸濁液に加えた。これらを往復振とう機を使用して 120 回/分で 20 分間振とうした後、かくはん子を入れてスターラーでかくはんしながら、0.5 ml または 1 ml を分注器で採取して選択培地にのせ、ガラスプレッダーで選択培地上に広げた。選択培地が水分を吸収しきれない場合は、クリーンベンチ内でふたを開けて風で余分の水を蒸発させた。これらを 25℃のインキュベータ内に置き暗黒下で 7～9 日間培養した。

分生胞子回収試験では、105℃殺菌土とそれに含まれていた病原菌と同じ分化型の野生菌株と *nit* 菌株の分生

胞子懸濁液を用いた。実際の菌密度調査では含水率 10～30% 程度の土壌を採取することが多いので、含水率 20% の殺菌土を用いる代わりに、100 倍希釈懸濁液は寒天液 99.2 ml に殺菌土 0.8 g、10 倍希釈懸濁液は寒天液 92 ml に殺菌土 8 g を加えて調製した。これらの土壌懸濁液と寒天液 99.5 ml に上記の方法で調製した分生胞子懸濁液 0.5 ml を加えて試料とした。選択培地の分生胞子回収能力は、クロラムフェニコール 0.25 g/l を加えた PDA 培地を対照培地（PDA + c）にして、回収率 = [(選択培地 5 枚の平均コロニー数/PDA + c 培地 5 枚の平均コロニー数) × 100 %] で評価した。

III 選択培地上のコロニー

1 Fo-G1 と Fo-G2

F. oxysporum は Fo-G1 上で優先的に生育した。気中菌糸は繊細で、コロニー表面はうすい赤、暗赤色、紫赤と変異に富み、裏面は赤紫～紫赤を呈し、色素を出さないコロニーも認められた。トマト萎凋病レース 2 病土からの *F. oxysporum* はやや小さく表面が紫赤色を呈する

コロニーが多く、それらから分離した菌株はトマトに病原性を示した。キュウリつる割病土からの *F. oxysporum* はやや大きいコロニーを形成し、それらはキュウリに病原性を示した。ほかの 4 土壌からの *F. oxysporum* コロニーは類似していた。そこで口絵 1 には、レタス根腐病土, *Cylindrocarpon* sp. を含むセルリー萎黄病土, トマト萎凋病土の事例を示した。*F. solani* は表面が白, 裏面は白～黄褐色で, *F. oxysporum* コロニーが多い場合は小コロニーを形成するものが多かった。*F. moniliforme* はコロニー数が少なく, 初期生育が劣り, *Trichoderma* はコロニー形成を抑えられた。セルリー萎黄病土から生育した *Cylindrocarpon* sp. は比較的大きなコロニーを形成し, 裏面が赤褐色や黄褐色で *F. oxysporum* と似ているものがあつた (口絵 1 中央)。ただしコロニー表面が粗く汚白色なので, 識別は可能であつた。*Paecilomyces* sp. と一部の *Aspergillus* がまれに比較的大きいコロニーを形成した。これらのほかに, 裏面または全体が赤紫を呈する小コロニーが生育した。それらは *F. oxysporum* または未同定の *Fusarium* 属菌であつたが, 前者は分離源の病土の当該宿主に病原性を示さなかつた。Fo-G2 培地上に 10 倍希釈懸濁液を広げた場合も, 生育するコロニーはほぼ同じであつた。

2 Fo-W1 と Fo-W2 上のコロニー

Fo-G1 と Fo-G2 に用いた土壤懸濁液を Fo-W1 と Fo-W2 上に広げた。生育する *F. oxysporum* と雑菌のコロニーはほぼ同じであつた。レタス根腐病菌のコロニーの中に表面中央部が青色を呈するものが少数あつたが, ほとんどの *F. oxysporum* コロニーは表面と裏面に色素を産生しなかつた (口絵 2)。

3 Fo-N1 と Fo-N2 上のコロニー

nit 菌は Fo-N1 と Fo-N2 上で優先的にコロニーを形

成した (口絵 3)。雑菌は Fo-N1 上では極めて少なく, Fo-N2 上に生土の 10 倍希釈懸濁液 1 ml を広げた場合も明瞭なコロニーをほとんど形成しなかつた。トマト萎凋病菌レース 3 の供試 *nit* 菌株は Fo-N2 上で赤紫の色素を産生しなかつたが, Fo-N1 上では産生し, 他の 5 *nit* 菌株は Fo-N1 と Fo-N2 上で色素を産生した。

IV 分生孢子懸濁液からの分離能力

Fo-G1 と Fo-G2 の分生孢子回収率は 6 菌株の分生孢子を加えた寒天液と土壤懸濁液全体で 83 ~ 120% (表-2), 同様に Fo-W1 と Fo-W2 の回収率は 84 ~ 113%であつた (表-3)。Fo-N 系選択培地の試験では, 寒天液中の分生孢子が硝酸エコナゾール 5 mg/l を含む Fo-N1 上で生育しない場合があつたので, 寒天液, 100 倍希釈懸濁液, 10 倍希釈懸濁液からの分離にそれぞれ硝酸エコナゾール 5 mg/l 含む Fo-N1, 同成分を 2 mg/l 含む Fo-N1, Fo-N2 を使用した。この場合の Fo-N1 と Fo-N2 の回収率は 81 ~ 120%であり, また, 同じ分生孢子懸濁液を殺菌土懸濁液と自然発病土懸濁液に加えた場合に, 両者から生育するコロニー数はほぼ同じであつた (NISHIMURA, 2007)。希釈平板法の誤差を考慮すれば, 以上の結果は選択培地がほぼ 100%の確率で *F. oxysporum* を分離できることを示唆した。Fo-N1 については, 100 倍を超える希釈倍率の場合は硝酸エコナゾール 2 mg/l 含む培地が適しているが, 希釈懸濁液に 1%の殺菌土を加えて同成分 5 mg/l を含む Fo-N1 を使うほうが実用である。

お わ り に

PCNB を含まない選択培地は, 6 自然発病土の 100 倍希釈懸濁液と試験のために調製した 10 倍希釈用病土の

表-2 寒天液並びに 100 倍と 10 倍の殺菌土懸濁液に加えた分生孢子に対する Fo-G1 と Fo-G2 の回収能力

野生菌株 (分化型とレース) ^{a)}	0.05 % 寒天液			殺菌土の希釈率					
				100 倍			10 倍		
	PDA + c ^{b)}	Fo-G1	% ^{c)}	PDA + c	Fo-G1	%	PDA + c	Fo-G2	%
Fol-96-7S (<i>lactucae</i> race 3)	14	14	100	18	18	100	27	25	93
Fo-25-2S (<i>colocasiae</i>)	19	17	89	21	20	95	26	23	88
Fof-96-2S (<i>fragariae</i>)	15	18	120	17	19	112	23	23	100
Focu-1S (<i>cucumerinum</i>)	18	19	106	24	21	88	26	24	92
Foa-2S (<i>apii</i>)	17	17	100	23	23	100	29	24	83
Foly2-A1S (<i>lycopersici</i> race 2)	14	14	100	18	17	94	22	21	95

^{a)} 分生孢子をベトリ皿当たり 20 コロニーになるように寒天液と殺菌土懸濁液に加えた。 ^{b)} クロラムフェニコール 0.25 g/l 添加 PDA。 ^{c)} 分生孢子回収率 = [(Fo-G1 または Fo-G2 上の平均コロニー数/PDA + c 上の平均コロニー数)] × 100% を示す。

表-3 寒天液並びに 100 倍と 10 倍の殺菌土懸濁液に加えた分生胞子に対する Fo-W1 と Fo-W2 の回収能力

野生菌株 (分化型とレース) ^{a)}	0.05 % 寒天液			殺菌土の希釈率					
				100 倍			10 倍		
	PDA + c ^{b)}	Fo-G1	% ^{c)}	PDA + c	Fo-G1	%	PDA + c	Fo-G2	%
Fol-96-7S (<i>lactucae</i> race 3)	14	14	100	18	18	100	27	25	93
Fo-25-2S (<i>colocasiae</i>)	19	17	89	21	20	95	26	23	88
Fof-96-2S (<i>fragariae</i>)	15	18	120	17	19	112	23	23	100
Focu-1S (<i>cucumerinum</i>)	18	19	106	24	21	88	26	24	92
Foa-2S (<i>apiti</i>)	17	17	100	23	23	100	29	24	83
Foly2-A1S (<i>lycopersici</i> race 2)	14	14	100	18	17	94	22	21	95

^{a)} 分生胞子をベトリ皿当たり 20 コロニーになるように寒天液と殺菌土懸濁液に加えた。^{b)} クロラムフェニコール 0.25 g/l を添加した PDA。^{c)} 分生胞子回収率 = [(Fo-W1 または Fo-W2 上の平均コロニー数/PDA + c 上の平均コロニー数)] × 100% を示す。

10 倍希釈懸濁液から *F. oxysporum* を分離できた。しかし、*Cylindrocarpon* sp. のように生育を抑制できない糸状菌の密度が高ければ、*F. oxysporum* の分離は阻害されることになると思われる。また、コロニーの生育は土壤栄養の影響を強く受けたので、土壤懸濁液 0.5 ml を 1 枚の選択培地上に広げることを前提にして選択培地成分の量を決めた。このため土壤の希釈倍率に合わせて選択培地を選択する必要がある。また、雑菌が繁殖しない限り、試料量を増やすことはできるが、試料量が少ない場合は *F. oxysporum* が生育できなくなるので、注意が必要である。各選択培地の特徴と使用上の注意を以下にまとめた。

(1) Fo-G1, Fo-G2 培地

自然発病土からの分離に適している。*F. oxysporum* が色素を産生し識別が容易であり、また、野生型と *nit* 菌の両方がコロニーを形成し、分離後に識別しなければならないためである。耕地に生息する *F. oxysporum* の密度は CHUANG and Ko (1981) によれば 200 CFU/g 以上であり、筆者がサトイモの輪作畑で調査した密度も 400 ~ 22,000 CFU/g であった。したがって、二つの培地を使うことにより *F. oxysporum* 密度は調査できると考えられる。*Cylindrocarpon* sp. のような糸状菌は Fo-G2 を使用する際に問題になるが、*F. oxysporum* 密度の低い農家圃場や土壤消毒で密度が低下した圃場の多くで Fo-G2 を使用できると思われる。また、供試した野生型病原菌株はこれらの培地上で比較的大きなコロニーを形成し、イチゴ、キュウリ、ホウレンソウの病土から分離した病原菌は比較的大きなコロニーから分離され、赤紫の色素を産生する小コロニーからは分離されなかった。これらのことから、病原菌は比較的大きなコロニーを形成すると推察される。

(2) Fo-W1, Fo-W2 培地

野生菌と *nit* 菌が混在する土壤から野生菌を分離するのに適している。*nit* 菌はコロニーを形成できないので野生菌コロニーのみの密度を測定できるため、また、*F. oxysporum* が色素を産生しないので自然発病土からの分離には適していないためである。しかし、例外的に *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 3 の 1 系統は Fo-W1 上で表面がねずみ色、裏面が青紫色のコロニーを形成するので、病原菌の識別に利用できた (西村, 2003)。

(3) Fo-N1, Fo-N2 培地

nit 菌分離用である。Fo-N2 上のトマト萎凋病菌レース 3 を除き、色素産生菌から分離した供試 *nit* 菌株は二つの培地上で色素を産生し、識別が容易であった。また、10 倍希釈土壤懸濁液 1 ml を培地上に広げても *nit* 菌を選択的に生育させることができたので、病原性 *nit* 菌株を使用すれば、10 CFU/g の病原菌の検出が可能である。また、サラダナ根腐病菌の *nit* 菌は圃場で十分増殖し厚壁胞子を形成した。したがって、*nit* 菌とこれらの培地を組み合わせることで、より詳細な発生生態の調査ができると推察される。

F. oxysporum には約 120 の分化型が報告されている。これらの選択培地が他の分化型に対応できるか否かは明らかではないので、あらかじめ分生胞子を分離できるかどうか確認しておくことが重要である。

引用文献

- 1) CHUANG T. Y. and W. H. Ko (1981): Soil Biol. & Biochem. 13: 185 ~ 190.
- 2) HADER, E. et al. (1989): Plant Disease 73: 800 ~ 803.
- 3) 駒田 旦 (1976): 東海近畿農試研究報告 29: 132 ~ 269.
- 4) ————ら (1995): 植物防疫 49: 163 ~ 166.
- 5) 西村範夫 (2003): 九病虫研会報 49: 37 ~ 40.
- 6) NISHIMURA, N. (2007): J. Gen. Plant Pathol. 73: 342 ~ 348.
- 7) PAPAIVAS, G. C. (1967): Phytopathology 57: 848 ~ 852.
- 8) TAKEHARA, T. et al. (2003): ibid. 93: 1173 ~ 1181.