

Fusarium oxysporum 用選択培地の選択性の向上

西村 範夫*・工藤 和一**

(九州農業試験場)

Improvement of a selective medium for *Fusarium oxysporum*. Norio
NISHIMURA* and Kazuichi KUDO** (Kyushu National Agricultural Experiment Station,
Miyakonojo, Miyazaki 885)

Key words: selective medium, Komada medium, *Fusarium oxysporum* f. sp. *colocasiae*

多くの選択培地が *Fusarium* 菌の分離や生態解明のために考案された^{1-3, 5-8, 10, 12, 13, 15}。中でも改変ペプトン-PCNB 培地²⁾および駒田培地⁹⁾は *Fusarium* 菌に対する選択性が高く、特に後者はコロニー裏面の色で種を判定できる優れた選択培地であり、多くの研究者に利用されている。また最近では詳細な生態研究が硝酸塩代謝能欠損変異菌株 (*nit* 菌)⁴⁾や DNA 分析の利用によって可能になり、それに伴って高い選択性をもつ選択培地が要求されている。

著者らは未同定であったサトイモ萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *colocasiae* を罹病組織および発病圃場の土壌から分離するため駒田培地を用いたが、土壌からの分離がほとんどできなかった。原因が PCNB と四ホウ酸ナトリウムの過多にあることが明らかになり、駒田基本培地に改変ペプトン-PCNB 培地の抗菌物質を加えた K-pp 培地¹⁰⁾を調製して萎凋病菌を分離した¹¹⁾。

しかし、K-pp 培地では、細菌コロニーが繁殖し *Fusarium* 菌のコロニーが生育できない場合があり、また *Trichoderma* 菌に対する抑制力を強化するために、これらの生育抑制を目的に改良を継続した。本論文では K-pp 培地の改良による選択性の向上について報告する。

なおサトイモ萎凋病は従来乾腐病とよばれていたが 1995年に改名された⁹⁾。また供試病土の一部は奈良県農業試験場小玉孝司氏、茨城県農業試験場渡辺 健氏、岐阜県病害虫防除所飛騨支所渡辺 勇氏、京都府農業総合研究所福西 努氏および兵庫県淡路路農業技術センター田

中 敬氏から、また PCNB は北海三共株式会社青木 篤氏から提供していただいた。厚くお礼を申し上げる。

材料および方法

培地の調製

駒田基本培地 (K_2HPO_4 1.0g, KCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, Fe-EDTA 10mg, L-asparagine 2.0g, D-galactose 20g, 業務用寒天 (台精株式会社製) 15g, 蒸留水 1ℓ) を 1 時間沸騰水中で溶解した後、培地温度が 60~70℃ に下がったところで PCNB (75%水和剤)、コール酸ナトリウムおよび四ホウ酸ナトリウム、次いで 45~50℃ に下がったところでテトラサイクリン (塩酸塩) およびストレプトマイシン (硫酸塩) を添加した。これに 10%リン酸を加えて pH を 3.8~4.0 に調整し、15ml を直径 9 cm のペトリ皿に分注した。その後、培地表面を乾かすため室内に 3 日間静置してから使用した。なお、改良のために調製した試験培地の抗菌物質量は結果の項に記載した。また K-pp 培地の抗菌物質の組成は 1ℓ 当たり PCNB 0.5g, コール酸ナトリウム 1.0g, テトラサイクリン 0.05g, ストレプトマイシン 0.1g である。

土壌懸濁液の調製および培養

風乾したサトイモ萎凋病土および 5 分化型の病土を 2 mm 目の篩でふるい、供試するまで冷蔵庫に保存した。また細菌に対する生育抑制力の検定では、採取したサトイモ萎凋病土をふるい、直後または冷蔵庫に保存して翌日に供試した。これらの病土 30g を滅菌した 0.01% 寒天液 270ml に加え、往復振とう機で 20 分間懸濁した。その 10ml を前記の寒天液 90ml に加え、手で 30 回振とうして 10² 希釈懸濁液、同様にして 10³ 希釈懸濁液を調製した。この 10³ 希釈懸濁液 0.5ml を培地表面に置き、ペトリ皿を

*現在 野菜・茶業試験場久留米支場

*Present address: Kurume Branch, National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Kurume, Fukuoka 839.

**現在 岩手県盛岡市在住

**Present address: Takamatu, Morioka, Iwate 020-01

左右に振って培地表面に拡げた。1土壌試料当たり5～10枚のペトリ皿を使用し、これらを20℃の蛍光灯をつけた室内の実験台上に並べて10～14日間培養した。

病原性の検定

種サトイモを1/2,000aポットに5個づつ植え付けた。土壌から分離した色素非生産生 *F. oxysporum* 10菌株をジャガイモ煎汁液体培地150ml中で3～5日間振とう培養し、サトイモが萌芽したポットに培養液とともに灌注接種し、温室内で管理した。80日後に芋を切断し、1株でも明瞭な維管束赤変が認められた場合に接種菌株を病原菌と判定した。

結 果

四ホウ酸ナトリウム添加の影響

K-pp 培地に四ホウ酸ナトリウム0.1～2.0g/ℓを添加し、*Fusarium* 菌、*Trichoderma* 菌および細菌の生育に対す

る影響を調査した。四ホウ酸ナトリウムが0.5g/ℓ以下の場合には *F. oxysporum* および *F. solani* のコロニー数に影響は認められなかったが、1.0g/ℓ以上ではコロニー数が減少した(第1表)。また、K-pp 培地上で細菌が繁殖し、*Fusarium* 菌の生育が阻害された場合にも、四ホウ酸ナトリウム0.5g/ℓをK-pp 培地に添加することにより、気中菌糸またはコロニー裏面の色素で *Fusarium* 菌の種を判定できる程度に、細菌の生育が抑制された(第2表)。しかし、*Trichoderma* 菌についてはコロニー数が少なく、効果を判定できなかった(第1表)。

テトラサイクリンおよびストレプトマイシンの細菌抑制効果

四ホウ酸ナトリウム0.5g/ℓを加えたK-pp 培地にテトラサイクリン0.05～0.3g/ℓとストレプトマイシン0.1または0.3g/ℓを添加し、*Fusarium* 菌および細菌の生育に対する抑制効果を調査した(第2表)。上記の範

第1表 K-pp 培地に加えられた四ホウ酸ナトリウムの量と *Fusarium* 菌および *Trichoderma* 菌のコロニー数の関係

四ホウ酸 ナトリウム (g/ℓ)	ペトリ皿当たりのコロニー数 ^{a)}					
	土 壌 1 ^{b)}			土 壌 2 ^{c)}		
	<i>F. oxy</i> ^{d)}	<i>F. sol</i> ^{e)}	<i>Tricho</i> ^{f)}	<i>F. oxy</i>	<i>F. sol</i>	<i>Tricho</i>
0.0	9.8±2.2	1.4±1.5	0.8	15.2±3.3	7.4±3.2	0.0
0.5	7.2±2.7	1.0±0.7	1.2	17.4±2.1	6.2±0.4	0.0
1.0	6.8±1.5	0.0	0.8	7.2±3.4	0.0	0.4
1.5	3.8±1.9	0.0	0.2	1.0±1.4	0.0	0.0
2.0	2.0±1.0	0.0	0.0	0.4±0.4	0.0	0.0

a) ペトリ皿5枚の平均値(±標準偏差)を示した。

b) サトイモ萎凋病菌接種圃場の土壌、c) サトイモ萎凋病自然発病圃場の土壌、

d) *F. oxysporum*, e) *F. solani*, f) *Trichoderma* 菌。

第2表 K-pp 培地に加えられた四ホウ酸ナトリウム、ストレプトマイシンおよびテトラサイクリンの量と *Fusarium* 菌および細菌のコロニー数の関係

四ホウ酸ナトリウム- テトラサイクリン- ストレプトマイシンの量 (g/ℓ) ^{a)}	ペトリ皿当たりのコロニー数 ^{b)}					
	土 壌 1 ^{c)}			土 壌 2 ^{c)}		
	<i>F. oxy</i> ^{d)}	<i>F. sol</i> ^{e)}	細 菌 ^{f)}	<i>F. oxy</i>	<i>F. sol</i>	細 菌
0.0-0.05-0.1 ^{d)}	4.8	1.6	14.2 ^{g)}	? ^{h)}	?	? ⁱ⁾
0.5-0.05-0.1	6.0	1.6	9.2	1.2	0.6	??
0.5-0.1-0.3	6.4	1.6	8.0	2.8	0.2	4.8
0.5-0.15-0.3	8.6	2.2	10.0	1.6	0.2	8.4
0.5-0.2-0.3	4.4	3.2	7.4	1.6	0.4	9.0
0.5-0.25-0.3	7.4	1.8	8.4	1.6	0.2	4.4
0.5-0.3-0.3	4.8	2.4	9.4	1.6	0.2	3.0

a) 順に四ホウ酸ナトリウム-テトラサイクリン-ストレプトマイシンの量を示した。

b) ペトリ皿5枚の平均値を示した。c) サトイモ萎凋病が発生した2農家圃場の土壌、d) *F. oxysporum*、

e) *F. solani*, f) 直径2mm以上の細菌コロニー数、g) 直径2mm未満の細菌コロニーが多数生育した。

h) 細菌の繁殖により計数不可、i) コロニーが融合したため計数不可。

第3表 *F. oxysporum* のコロニー数による駒田培地と改良培地の分離能の比較

供試土壌	土壌採取地	ペトリ皿当たりのコロニー数 ^{a)}		B/A
		駒田培地 (A)	改良培地 (B)	
サトイモ萎凋病土 ^{b)}	宮崎県都市	0.8	9.8	12.3
同上	同上	1.0	6.4	6.4
イチゴ萎黄病土	奈良県	0.6	4.0	6.7
ダイコン萎黄病土	三重県安濃町	0.2	2.4	12.0
同上	鹿児島県財部町	0.8	10.2	12.3
サツマイモつる割病土	茨城県出島村	1.0	3.8	3.8
同上	鹿児島県志布志町	3.2	8.4	2.6
ホウレンソウ萎凋病土	京都府亀岡市	1.6	3.6	2.3
同上	岐阜県高山町	0.0	0.2	—
タマネギ乾腐病土	兵庫県淡路島内	0.8	7.2	9.0

a) ペトリ皿5枚の平均値を示した。

b) 病土中の *F. oxysporum* はすべてサトイモ萎凋病菌であった。

囲でテトラサイクリンおよびストレプトマイシンは *Fusarium* 菌のコロニー数に影響しなかったが、テトラサイクリン 0.1g とストレプトマイシン 0.3g を添加することにより、細菌コロニー数が顕著に減少した。ただし、0.1g/ℓ 以上のテトラサイクリンを添加するとコロニー裏面の赤紫色の色素がやや不鮮明になった。

6分化型の病土からの分離

K-pp 培地 1ℓ に四ホウ酸ナトリウム 0.5g, テトラサイクリン 0.1g, ストレプトマイシン 0.3g を添加した培地 (以下、改良培地とよぶ) と駒田培地上に生育した *F. oxysporum* のコロニー数を比較した (第3表)。サトイモ萎凋病菌のコロニーは改良培地で多く、特に Vegetative compatibility 法⁴⁾により *F. oxysporum* のすべてが萎凋病菌であることが判明している病土において、コロニー数の改良培地/駒田培地の比は12.3と高かった。また、その比はダイコン萎黄病土においても高く、他の分化型の病土でも2以上を示した。

寒天の種類とコロニーの生育

業務用寒天、試薬1級寒天、または試薬1級寒天とイーストエキストラクト 0.5g/ℓ を加えた改良培地を調製し、サトイモ萎凋病土からの *F. oxysporum* の最大コロニー直径と気中菌糸の生育状況を比較した。ペトリ皿5枚の最大直径の平均値は順に13mm, 11mm, 15mmであったが、気中菌糸の生育はすべての培地で良好であった。次いで試薬1級寒天または Difco Bacto-Agar を加えた改良培地を調製し、サトイモ萎凋病菌コロニーの生育状況を比較した。前者ではコロニーの気中菌糸は良好であったが、後者では気中菌糸が貧弱なものが多くなった (第4表)。同様の結果はイチゴ萎黄病土、ダイコン萎黄病

第4表 改良培地に加えた寒天の種類が *F. oxysporum* コロニーの気中菌糸生育に及ぼす影響

寒天の種類	ペトリ皿当たりのコロニー数 ^{a)}	
	気中菌糸生育良好	気中菌糸貧弱
試薬1級	9.0	0.0
Difco Bacto-Agar	0.0	7.4

a) ペトリ皿5枚の平均値を示した。

土やタマネギ乾腐病土を供試した場合にも認められた。

F. oxysporum の形態および色素産生

改良培地上における典型的な *F. oxysporum* コロニーは、白色綿毛状の気中菌糸およびコロニー中央部にやや硬い凸部を形成し、裏面の色は赤紫または淡黄色であった (第1図)。サトイモ萎凋病土からの淡黄色菌は色素非産生であり、裏面は *F. moniliforme* に類似し、色による両種の識別は困難であった。接種試験では、これら10色素非産生菌株のうち9菌株に病原性が認められた。また少数ではあるが、小さいコロニーで、貧弱な気中菌糸をもち、コロニー裏面の色素が濃赤紫色を呈する *F. oxysporum* が生育した。

考 察

改良培地は駒田基本培地に PCNB 0.5g, コール酸ナトリウム 1.0g, ホウ酸ナトリウム 0.5g, テトラサイクリン 0.1g, ストレプトマイシン 0.3g を加えた培地である。本培地は K-pp 培地と同様にサトイモ萎凋病菌に対する分離能が高く、*F. oxysporum* の識別はコロニー裏面の色素と気中菌糸の形状によりほぼ可能であり、細



第1図 サトイモ萎凋病土から分離された色素産生および非産生の *F. oxysporum* のコロニー
1: 培地表面, 2: 培地裏面, F. o: *F. oxysporum*, F. m: *F. moniliforme*, F. s: *F. solani*

菌に対する抑制力が強いという特性を有した。その後、1991～1992年に本培地を通算67圃場の土壌からの分離試験に用い、本培地の *F. oxysporum* に対する分離能を確認した。しかし、 10^2 希釈懸濁液の場合には *Trichoderma* 菌のコロニー数が多くなり、*F. oxysporum* を分離できない場合があった。

その後、野生型の *Fusarium* 菌に対して高い選択性をもち、*nit* 菌の生育を阻害する GMBP 培地が考案された¹⁴⁾。この培地は 10^2 希釈懸濁液を試料にした時にもサトイモ萎凋病菌を選択的に分離できることを確認したが、*F. oxysporum* は GMBP 培地上で特定の色素を産生しないので、*F. solani* や *F. moniliforme* のコロニーが多い場合には *F. oxysporum* を簡易に識別することは困難であった。

このため、*F. oxysporum* の生態研究において目的に応じた選択培地の使い分けができるが、色素により容易に *Fusarium* 菌の種を判定できる培地は必要であり、 10^2 希釈懸濁液を試料にした場合にも *F. oxysporum* の分離と計数が可能になるように改良培地をさらに改良する必要があると考える。

また、改良培地では純度の高い寒天を加えることによりコロニーの生育や気中菌糸の形成量が明瞭に低下した。

その原因は寒天中の栄養量にあると考えられるので、改良培地には業務用寒天または試薬1級寒天を使用するのが良いと考える。また、今後考案あるいは改良された培地では寒天の規格を明示する必要があると考える。

引用文献

- 1) ABAWI, G. S. and LORBEER, J. W. (1971) *Phytopathology* 61: 1042-1048.
- 2) BANIHASHEMI, Z. and DEZEEUW, D. J. (1969) *Plant Dis. Repr.* 53: 589-591.
- 3) BOUHOT, D. and BILLOTTE, J. (1964) *Ann. Epiphyties* 15: 45-56.
- 4) CORRELL, J. C., KLITTICH, C. J. R. and LESLIE, J. F. *Phytopathology* 77: 1640-1646.
- 5) KERR, A. (1963) *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 55-69.
- 6) 駒田 且 (1969) 東海近畿農試研報 29: 132-269.
- 7) MARTIN, J. P. (1950) *Soil Sci.* 69: 215-232.
- 8) NASH, S. M. and SNYDER, W. C. (1962) *Phytopathology* 52: 567-572.
- 9) 日本植物病理学会病名委員会 (1995) 日植病報 62: 444.
- 10) 西村範夫・工藤和一 (1989) 九農研 51: 106.
- 11) NISHIMURA, N. and KUDO, K. (1994) 日植病報 60: 448-453.
- 12) PAPAIVIZAS, G. C. (1967) *Phytopathology* 57: 848-852.
- 13) SNYDER, W. C., NASH, S. M. and TRUJILLO, E. E. (1959) *Phytopathology* 49: 310-312.
- 14) 竹原利明・萩原 廣・国安克人 (1995) 日植病報 61: 606 (講要).
- 15) WENSLEY, R. N. and McKEEN, C. D. (1962) *Can. J. Microbiol.* 8: 57-64.

(1997年4月30日 受領)