

# Quintozene 試薬を添加した駒田培地の調製法

タキイ種苗(株)研究農場  
同品質管理部

駒田 旦・草野新太郎・青野 昌彦  
駒場 雅彦

## はじめに

*Fusarium* 菌の選択分離培地「駒田培地」はその優れた選択性と利便性のゆえに、発表 (KOMADA, 1975; 駒田, 1976) 以来二十数年間に急速に、国内はもちろん世界中に普及して、数多くの人々により、フザリウム病の発生生態から防除にいたる様々な研究目的に使用されてきた。図-1はそのことを表す一例であり、アメリカ植物病理学会の二つの機関誌 *Phytopathology* と *Plant Disease* に登載された、駒田培地が引用 (利用) された年次別論文数を示す。発表後間もない1978年から最近まで、常に年間数編の引用論文が数えられている。また、微生物、植物病理学の実験法を記載した多くの書籍に紹介されている (松尾ら, 1980; BURGESS et al, 1988; SINGLETON et al, 1992; 脇本, 1993など) ほか、多くの国の大公的種子検査機関でも使用されている。

ところが近年、我が国では、駒田培地に *Fusarium* 菌選択性を發揮させる重要な成分である PCNB (quintozene (ISO名): Pentachloronitrobenzene) 75%水和剤 (農薬: 2000年3月26日失効) が入手困難となり、利用者は不便を感じてきた。その上、今回の農薬取締法改正 (03年3月10日施行) により、同剤が販売禁止農薬とされるに伴い入手は全く不可能になった。そこで、筆者らは水和剤に代えて PCNB 試薬を培地へ添加する方法を考案したので以下に紹介する。なお、従来から、粉剤を水和剤の代わりに用いる向きがあるやに聞いているが、粉剤は撥水性が強く、溶解した寒天培地への懸濁が極めて悪いので、仮に入手できたとしても使用すべきではない。なお、PCNB 剤あるいは PCNB 試薬の研究目的への使用は、農薬取締法に触れるものではないが、PCNB 剤が販売禁止農薬とされた理由に鑑みて、取り扱いには細心の注意が望ましい。

How to Prepare Komada's *Fusarium*-selective Medium Supplemented with PCNB Reagent Instead of Its Wettable Powder.  
By Hajimu KOMADA, Masahiko KOMABA, Shintaro KUSANO and Masahiko AONO

(キーワード: 駒田培地, PCNB 水和剤, 試薬)

## I PCNB 試薬の有機溶媒への溶解と培地への添加

PCNB は水にほとんど溶解しないので、培地に添加するには、何らかの有機溶媒にいったん溶解する必要がある。そこで、PCNB 試薬の 1-methyl-2-pyrrolidone (以下 MePy) 溶液と dimethyl sulfoxide (以下 DMSO) 溶液とを 75%水和剤の代わりに添加した培地上での各種フザリウム病菌の発育ならびにコロニー形成を、75%水和剤を加えた標準の駒田培地と比較した。

それぞれの培地の調整法は以下のとおりである。PCNB 試薬 (Sigma 社製) 0.75g (水和剤 1 g 中の成分相当量) を MePy 3 ml あるいは DMSO 15 ml に溶解し、寒天を加熱溶解させた後 60°C 程度に冷却した駒田培地 (PCNB 水和剤無添加, pH 3.8 に調整済み) 1 l に、それぞれ添加して混和した。いずれの溶媒に溶解させた場合も、添加した PCNB は瞬時に析出して培地は白濁し、ペトリ皿への分注に伴い培地中にはほぼ均一に懸濁して固化した。

## II PCNB 試薬の MePy と DMSO 溶液 添加培地上での *Fusarium* 菌の発育

PCNB 試薬を MePy あるいは DMSO に溶解して、PCNB 水和剤の代わりに添加した培地平板上での、*Fusarium oxysporum* の 3 分化型 (キュウリつる割病菌; f. sp. *cucumerinum*, トマト萎凋病菌; f. sp. *lycopersici*, トマト根腐萎凋病菌; f. sp. *radicis-lycopersici*) の発育 (常法に従って測定した菌そく直径) を、水和剤を添加した標準的な駒田培地平板上での発育と比較した。

結果は図-2 に示すとおりで、いずれの分化型も MePy 溶液添加の場合に、DMSO 溶液添加および標準と比べて、若干発育が劣った。このことは一見好ましくないことのようにもみえるが、もし培地上でのコロニー形成数 (例えば試料土壤からの回収率) に悪影響がなければ、個々のコロニーの発育が局限されることは、際限なく発育して癒合するよりも、コロニーのカウントにとってはかえって好ましいことといえる。なお DMSO 溶

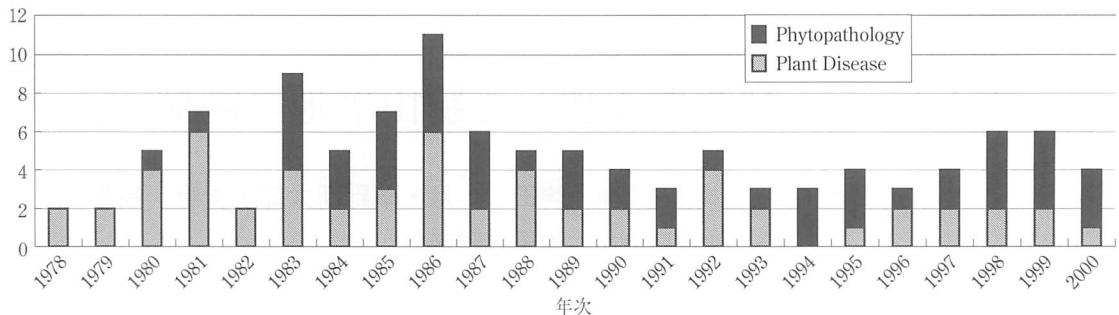


図-1 アメリカ植物病理学会の2種の機関誌において駒田培地が利用（引用）された論文数

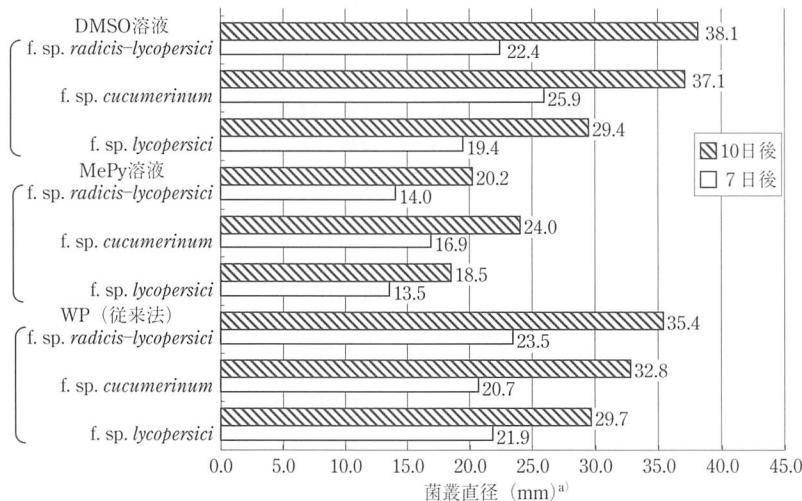


図-2 PCNB 試薬の2種有機溶媒溶液添加培地上におけるフザリウム菌の発育の比較

a) 各試験区5枚のペトリ皿から計測したコロニー直径 (mm) の平均値。WP：对照、駒田培地。PCNB 水和剤 (75%) を使用。MePy : 1-methyl-2-pyrrolidone 3 ml に PCNB 試薬 0.75 g を溶解。駒田培地 (-PCNB WP) に添加、懸濁。DMSO : dimethyl sulfoxide 15 ml に PCNB 試薬 0.75 g を溶解。駒田培地 (-PCNB WP) に添加、懸濁。

液添加培地の場合には、発育に特段の影響はみられないが、周縁がぼやけた感じのコロニーを形成する傾向がみられた。

### III PCNB 試薬の MePy と DMSO 溶液添加培地上での *Fusarium* 菌のコロニー形成

PCNB 試薬を MePy あるいは DMSO に溶解して、PCNB 水和剤の代わりに添加した平板培地上での、*Fusarium oxysporum* の4分化型（キュウリつる割病菌；*f. sp. cucumerinum*, キャベツ萎黄病菌；*f. sp. conglutinans*, トマト萎凋病菌；*f. sp. lycopersici*, ダイズ立枯病菌；*f. sp. tracheiphilum*）のコロニー形成数を、水和剤を添加した標準的な駒田培地平板上でのコロニー形成数と比較した。

しょ糖加用ジャガイモ煎汁培地で5日間振とう培養して得た、上記分化型の出芽菌体（bud-cell）の懸濁液の菌体濃度を血球計算板で  $3 \times 10^2 / \text{ml}$  に調整し、それをペトリ皿当たり  $100 \mu\text{l}$  ずつ培地表面に滴下し、コンラジ棒で均等に塗布して、形成されたコロニーを10日後に計数した。

結果は図-3に示すとおりで、いずれの分化型においても、培地の違いによるコロニー形成数の差は認められなかった。

結論：以上の結果より、PCNB 試薬 0.75 g を MePy 3 ml に溶解した溶液は、PCNB 75% 水和剤 1 g を除いた駒田培地に添加（数値はいずれも 1 l 当たり）した場合、コロニー形成に特段の悪影響がなく、コロニーが局限される利点が認められるところから、駒田培地の処方の

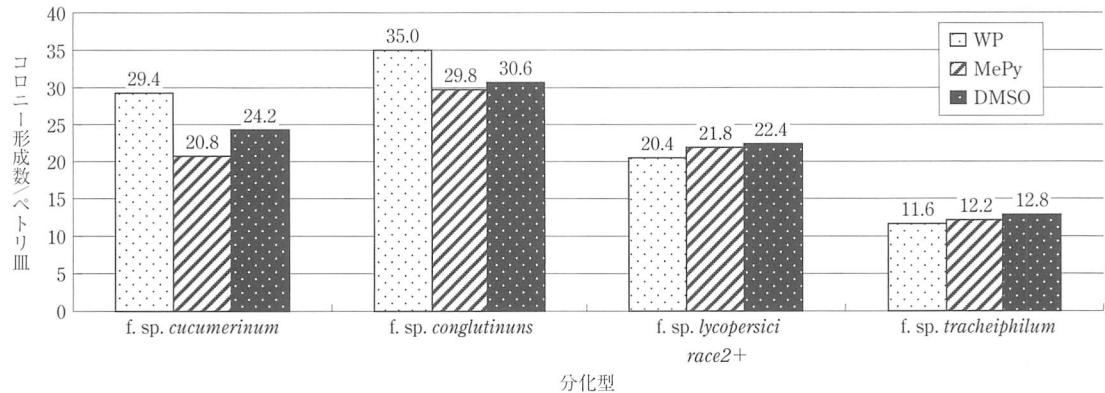


図-3 PCNB 試薬の 2 種有機溶媒溶液添加培地における *F. oxysporum* の 4 種分化型のコロニー形成数の比較  
培地上に出芽菌体濃度  $3 \times 10^2$  個/ml の懸濁液を滴下し、コンラジ棒にて塗布。

75% PCNB 水和剤の代替として推奨し得る。

留意事項：PCNB の MePy 溶液を添加する際、培地の温度が高かったり、室温が高くて固化までに時間を要すると、析出した微細な沈殿が凝集して、白色大型の沈殿となってペトリ皿の器底に沈んで固化する。それを避けるため、分注後、速やかに固化するよう、寒天はロット類にもよるが 1.3 ~ 1.5% 程度とやや硬めに調製する、培地はほぼ 60°C まで冷却してから PCNB 溶液を添加し、分注後のペトリ皿は積み重ねず机上に並べる、などの配慮を要する。

#### IV 駒田培地の簡易調製法

駒田培地は他の微生物に対する強い抑制力を示すので、その調製に当たり、加熱は寒天の溶解のためにのみ必要で、基本培地を保存する場合を除いては、滅菌は必要としない。ところで、選択性発現の一要因でもある酸度調整（10% リン酸で pH 3.8）は、加熱して寒天を溶解した培地をほぼ 60°C に冷ましたところで行うので、pH メータのガラス電極の洗浄不良（熱水洗ビンで洗浄すれば防げるが）による故障の原因ともなる作業である。

そこで、つぎのような簡易調製法を考案した。

① 寒天液の調製：1 l 分（13 ~ 15 g）の寒天を 500 ml の水に加え、加熱溶解する。

② 2 倍濃度の培地溶液の調製：1 l 分の培地成分（PCNB 水和剤を除く）を 500 ml の蒸留水に加えて溶解させる。これは加熱した寒天液と混合したとき、寒天が部分的に凝固するのを防ぐため、冬季は若干（室温程度まで）加温した方がよい。

③ 酸度調整：上記の培地溶液の酸度を、10% のリン酸溶液で、pH 3.4 に調整する。

④ 寒天液と、培地溶液との混合：加熱溶解した寒天液に、上記の 2 倍濃度の培地溶液を注いで、素早く混和する。

⑤ PCNB 溶液添加：上記の混合液がほぼ 60°C に冷めたところで、0.75 g の PCNB 試薬の MePy 溶液 3 ml を添加して混合、ペトリ皿に分注する。

#### V 実 証 試 験

PCNB 75% 水和剤の代わりに PCNB 試薬を有機溶媒 1-methyl-2-pyrrolidone に溶解して添加した駒田培地（簡易調製法による）は、03 年夏から秋にかけて、種子処理農薬の登録拡大のために、日本植物防疫協会の指導のもと、日本種苗協会傘下の種苗会社により行われた種子処理剤の薬効試験に際して、下記の *Fusarium* 菌を対象に供試されて、その有用性が立証された。

*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*（ダイズ立枯病菌）、f. sp. *lycopersici*（トマト萎凋病菌）、f. sp. *cucumerinum*（キュウリつる割病菌）、f. sp. *conglutinans*（キャベツ・ハボタン萎黄病菌）、f. sp. *spinaciae*（ホウレンソウ萎凋病菌）、f. sp. *callistephii*（アスター萎凋病菌）、*Fusarium solani* f. sp. *pisi*（エンドウ根腐病菌）、*Fusarium avenaceum*（トウモロコシ苗立枯病菌）。

#### 引 用 文 献

- BURGESS, L. W. et al. (1988) : Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Univ. Sydney, Sydney, Aust. : 9.
- KOMADA, H. (1975) : Rev. Plant Protection Res. 8 : 114 ~ 125.
- 駒田 旦 (1976) : 東海近畿農試研報 29 : 132 ~ 269.
- 松尾卓見ら編 (1980) : 作物のフザリウム病, 全国農村教育協会, 東京 : 201 ~ 220.
- SINGLETON, L. L. et al. ed. (1992) Method for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi, APS Press, St. Paul, Minn., USA : 122, 250.
- 脇本 哲編 (1993) 植物病原性微生物研究法, ソフトサイエンス社, 東京 : 5 ~ 13.