

植物防疫基礎講座：

# フルアジナムとミコナゾールを用いた ピシウム菌選択培地の作製と病害診断への利用

大阪府立大学大学院 東 條 元 昭

## はじめに

ピシウム菌は世界中に分布する卵菌類であり、作物の苗立枯れや根腐れの病原として知られる。ピシウム菌の多くの種が複数の植物種に感染し、一般に高湿度環境を好む。そのため、輸入植物の増加や集約栽培の普及は、本菌による被害を拡大させていると考えられる。

ピシウム菌は植物体や土壌から素寒天培地などで分離することができるが、分離培地上で細菌などが同時に繁殖し、思うように分離されないことがある。選択培地を使うと、細菌などの繁殖が抑えられ効率的にピシウム菌を分離することができる。また、選択培地を使った希釈平板法で、土壌や水の中の菌量を推定することも可能である。そのため、ピシウム病害診断の有効な手段となっている。

一方、従来のほとんどのピシウム菌選択培地には殺菌剤のペンタクロロニトロベンゼン (PCNB) が添加されており、PCNBの製造中止に伴って作製が難しくなっている。また、バンコマイシンを含むピシウム菌選択培地もよく用いられるが (ALI-SHTAYEH et al., 1986)、バンコマイシン耐性菌の院内感染が問題になっており、安全面からできるだけ使用を避けたい。

筆者らは、最近、PCNBやバンコマイシンを含まない三つの新たなピシウム菌選択培地を開発した (MORITA and Tojo, 2007)。これらの培地は、現在、ピシウム菌選択培地として最も広く使われている PARF 培地 (JEFFERS and MARTIN, 1986) を改良したものであり、PARF 培地やバンコマイシン含有培地 (VP<sub>3</sub> 培地, ALI-SHTAYEH et al., 1986) と同等の選択性を示す。ここでは、その作製法と、病害診断での利用法を紹介したい。

## I 培地の組成

### 1 PARF 培地 (ピマリシン-アンピシリン-リファンピシン-フルアジナム培地)

コーンミールアガー (CMA, ベクトン・ディッキンソン) 17 g

デルボシッド® (ピマリシン 50%, DSM Food Specialties, 株式会社ロビン, 東京 より入手可能) 10 mg をエタノール 1 ml に溶解させたもの

アンピシリン (シグマ アルドリッチ) 250 mg を水 1 ml に溶解させたもの

リファンピシン (シグマ アルドリッチ) 10 mg を DMSO 1 ml に溶解させたもの

フロンサイド水和剤® (フルアジナム 50%, 石原産業) 1 mg を 0.1%の素寒天水溶液 1 ml にけん濁させたもの

### 2 NARF 培地 (ナイスタチン-アンピシリン-リファンピシン-フルアジナム培地)

CMA (ベクトン・ディッキンソン) 17 g

ナイスタチン (シグマ アルドリッチ) 50 mg をエタノール 1 ml に溶解させたもの

アンピシリン (シグマ アルドリッチ) 250 mg を水 1 ml に溶解させたもの

リファンピシン (シグマ アルドリッチ) 10 mg を DMSO 1 ml に溶解させたもの

フロンサイド水和剤® (フルアジナム 50%, 石原産業) 1 mg を 0.1%の素寒天水溶液 1 ml にけん濁させたもの

### 3 NARM 培地 (ナイスタチン-アンピシリン-リファンピシン-ミコナゾール培地)

CMA (ベクトン・ディッキンソン) 17 g

ナイスタチン (シグマ アルドリッチ) 50 mg をエタノール 1 ml に溶解させたもの

アンピシリン (シグマ アルドリッチ) 250 mg を水 1 ml に溶解させたもの

リファンピシン (シグマ アルドリッチ) 10 mg を DMSO 1 ml に溶解させたもの

ミコナゾール (シグマ アルドリッチ) 1 mg を DMSO 1 ml に溶解させたもの

*Pythium* Selective Media Using Fluazinam and Miconazole and Their Diagnostic Use. By Motoaki Tojo

(キーワード：ピシウム, 選択培地, フルアジナム, ミコナゾール, PCNB, 土壌診断)

## II 培地の作製手順

CMAを1lの蒸留水に溶かしてオートクレーブ滅菌し、50～55℃に冷ました後、各抗生物質を加える。抗生物質はあらかじめ所定の濃度になるように別々に溶かし（溶解後1か月間の冷蔵保存が可能）、CMAに加える直前に一つのチューブに入れてよく混ぜ合わせる。最初にDMSO溶性のものにエタノール溶性のものを加えて完全に溶解させた後、最後に水溶性のものを加えて懸濁させると混ぜやすい。これを、オートクレーブ後のCMAによく混ぜ合わせ、ペトリ皿に分注する。冷暗所に保存して1か月以内に使用する。土壤希釈平板法に使用する場合には、土壤塗布操作で培地が壊れないように、寒天粉末23g（水1l当たり）を加えて培地の強度を高める。

## III 罹病植物からの分離

感染初期の罹病植物体試料を5mm角程度に切り取り、水道水中で水洗後、ろ紙やティッシュペーパーで水分を除いて、試料を寒天中に埋め込むようにして置床する。エタノールなどでの表面殺菌は特に行わなくてもよい。培養温度は通常25℃だが、各ピシウム菌種の生育適温に応じて、高温生息性の菌種では34℃、低温生息性の菌種では4℃といったように変えると選択性が高まる。

野外でペトリ皿のふたを開けても選択培地上に雑菌がはびこることがないので、圃場に培地を持ち込み、現場で操作することができる。その場合、できるだけ新鮮な罹病組織をピンセットでつまみとって、ティッシュペーパーなどで水分を除いてから培地に置き、温度が40℃以上の高温にならないように発泡スチロール箱などに入れておく（20℃前後が理想的）。このようにしておけば、翌日には培地上にピシウム菌の菌糸が伸長してくる。発生圃場で選択培地を用いるメリットとして、罹病直後の新鮮で雑菌の少ない試料を用いるために分離率が上がることや、作業や移動中の時間を利用して培養できるので、結果が早く得られることが挙げられる。

## IV 菌数の推定

選択培地を使った平板法により、土壤や水の中の菌量を推定することができる。筆者らは、ALI-SHITAYEH et al. (1986)を改変した以下の方法で行っている。1l当たり寒天粉末23gを加えた各培地を用意する。次に、土壤を浮遊・懸濁させるための液として、寒天濃度が0.35%の水溶液を、粉末寒天をオートクレーブ溶解させることによって作る。この液を、被検土壤50gが入った三角

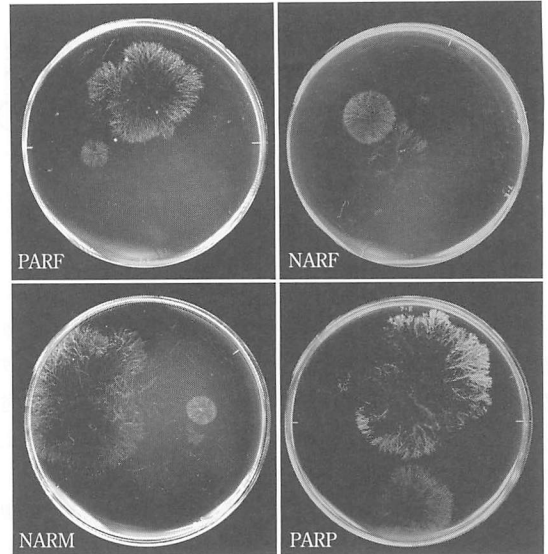


図-1 ピシウム菌選択性のPARF、NARF、NARM、およびPARPの各培地上に現れたピシウム菌の菌叢  
大阪府立大学教育研究フィールドの野菜畑土壌を用いて土壤希釈平板法を行い、土壤希釈液塗布後25℃、48時間培養後に撮影。培地間で菌叢の出現数に違いは見られないが、菌叢の伸長速度はNARMとPARPが、PARFとNARFよりも速い。

フラスコ（500ml容）に入れて、総体積で250mlになるようにし、ロータリーシェーカーでかくはんして（200rpm、約30分間）、土壤を5倍に希釈した液を得る。これを同様に希釈して100～500倍の土壤希釈液を作る。この液をペトリ皿1枚当たり1mlずつ滴下し、ガラス棒で培地の表面に均一に塗布する。一つの土壤試料で20枚のシャーレを使うと、統計的に安定したコロニー数が得られるとされる（ALI-SHITAYEH et al., 1986）。25℃で18～20時間培養後、培地表面の土壤希釈液を水道水で洗い流す。洗いは抗生物質上で増殖した細菌やピシウム菌の繁殖体を含むので、滅菌用容器に受けてオートクレーブしてから廃棄する。培地を約1時間風乾させて表面の水分を飛ばした後、現れた菌叢（図-1）を計数する。各菌叢から含菌寒天片を切り取って素寒天培地などに移植し、先の報告（東條, 2004）の手順で分離・同定を進めることができる。

## おわりに

ここで紹介したピシウム菌の新しい選択培地は、畑土壌からのピシウム菌の選択分離性がPARP培地（JEFFERS and MARTIN, 1986）やVP<sub>3</sub>培地（ALI-SHITAYEH et al., 1986）と同等に高い。また、PCNBやバンコマイシンを含まず、

作製費が安価で、特別な機器や施設を必要としない。そのため、病原の日常的な診断や野外調査に利用しやすい。

三つの選択培地は分離特性がそれぞれ異なり、それに合わせたより効果的な利用法が考えられる。PARF 培地と NARF 培地では、NARM 培地よりも生育が 3～7 割に抑制された緻密な菌叢が形成される (図-1)。一方、NARM 培地では PARF 培地や NARF 培地に比べて粗く大きな菌叢が現れる。そのため、PARF 培地と NARF 培地は土壌希釈平板法での菌数測定に適し、NARM 培地は罹病組織からの迅速な分離に適している。また、NARM 培地は、他の二つの培地に比べてフザリウム菌に対する抑制力が弱く、フザリウム菌が激しく繁殖して

いる試料からのピシウム菌の分離では、ピシウム菌の分離率が低下することがある。

三つの選択培地はいずれも、少なくとも一部の疫病菌 (*Phytophthora nicotianae* と *Ph. capsici*) の菌糸伸長を阻害しない。そのため疫病菌の選択分離にも利用できる可能性があり、現在、方法を検討している。

#### 引用文献

- 1) ALI-SHTAYEH, M. S. et al. (1986): Trans. Br. Mycol. Soc. 86: 39 ~ 47.
- 2) JEFFERS, S. N. and S. B. MARTIN (1986): Plant Dis. 70: 1038 ~ 1043.
- 3) MORITA, Y. and M. TOJO (2007): ibid. 91: 1591 ~ 1599.
- 4) 東條元昭 (2004): 植物防疫 58: 120 ~ 126.

！発行図書！

鳥獣害防止対策の決定版

## 鳥獣害対策の手引 2002

江口祐輔・三浦慎悟・藤岡正博 編著  
A4判 154頁オールカラー  
定価 3,780円税込み 送料 340円

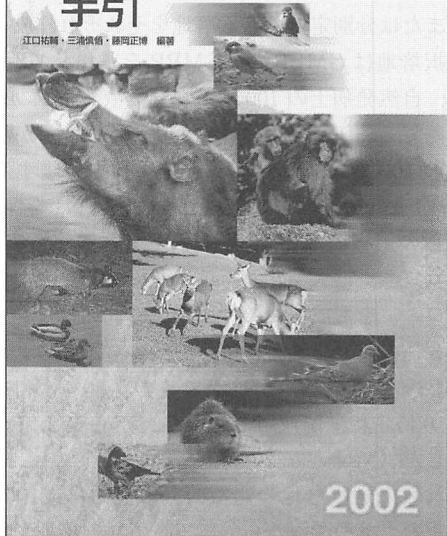
豊富なカラー写真を本文中にちりばめ、図・表・写真により一般農家の方にも分かりやすく解説した手引き書です。

内容項目は、農林業被害状況、獣害編 (ニホンザル、イノシシ、シカ、カモシカ、ツキノワグマ、タヌキ、ハクビシン、アライグマ、ヌートリア)、鳥害編 (被害防止対策の基本、主な農作物加害鳥の特徴、カラス、ヒヨドリ、ムクドリ、ハト、スズメ、カモ)、資料編 (行政対応、用語解説、文献資料)

資料提供：農林水産省植物防疫課・林野庁・環境省・文化庁

## 鳥獣害対策の手引

江口祐輔・三浦慎悟・藤岡正博 編著



お申し込みは直接当協会へ、前金 (現金書留・郵便振替) で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11

郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03) 3944-1561 (代) FAX (03) 3944-2103 メール: order@jppa.or.jp