

Fusarium solani による トルコギキョウ立枯病に対する 抵抗性簡易検定法 標準作業手順書

公開版



改訂履歴

版数	発行日	改訂者	改訂内容
第1版	2022年4月12日	松元 哲	初版発行

2022年4月12日版

目次

はじめに	1
免責事項	3
I. 本検定法の概要と特徴、機材等の準備	5
1. 本検定法の概要と特徴	5
2. 使用する機材等の準備	7
II. 検定材料の育苗と水耕装置への苗定植	8
1. 播種	8
2. 種子冷蔵	9
3. 育苗	10
4. 水耕装置、液肥の準備と根腐病防止のための薬剤添加	11
5. 水耕装置への苗の定植	12
III. <i>Fusarium solani</i> 菌の増殖法	15
IV. 接種液の作製法	17
1. 菌液の濾過と遠心	17
2. 接種液の作製	19
コラム：菌濃度の調整法	20
V. 針刺し付傷処理による菌の接種法	21
1. 苗の針刺し付傷処理	21
2. 接種液の灌注	23
VI. 発病程度の調査と発病度、発病株率の算出法	24
1. 発病程度の調査	24
2. 発病指数の判定について	25
3. 調査結果の取りまとめ法	30

4. 試験終了後の作業	31
参考情報（ <i>F. solani</i> と花き病害図鑑について）	32
VII. 良好に発病を進行させるための条件	33
1. 検定に適した気温	33
2. 接種方法	33
参考情報（接種条件の検討結果）	34
参考資料	38
担当窓口、連絡先	40
付録：PD（Potato Dextrose）培地の作製法	付録-1

はじめに

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) は、我が国の主要な花き生產品目の一つである。農林水産省の統計資料によると、2019 年のトルコギキョウ切り花算出額は、キク (597 億円)、ユリ (190 億円)、バラ (156 億円) に次ぐ第 4 位 (116 億円)、2020 年のトルコギキョウ作付面積は 411 ha、出荷量は 8,800 万本であり、重要な花き品目となっている。他の主要品目の産出額が低下傾向の中、トルコギキョウは安定した需要が維持されている。

トルコギキョウは原産地の北アメリカから日本へ 1930 年代に導入され、それ以来、我が国の種苗会社や個人育種家が多く品種を開発してきた。1963 年に最初の固定品種「紫盃」が福花園種苗 (株) から発売され、1981 年には (株) サカタのタネが最初の F₁ 品種の峰シリーズを発表した。2022 年現在、我が国では 8 社の種苗会社がトルコギキョウの品種改良を行っており、また、長野県、千葉県などの生産者や個人育種家による育種も活発に行われ、毎年多くの品種が開発されている。日本はトルコギキョウの新品種開発をリードする世界的な育種中心地となっており、我が国で開発された品種が、オランダ、中国、ブラジル、ベトナム、台湾など世界各地で栽培されている。

トルコギキョウの重要病害の一つに、フザリウム属菌 (*Fusarium solani* および *F. oxysporum*) によるトルコギキョウ立枯病があり、近年、全国の生産地で頻発している。静岡県の生産者団体の被害額を基に算出した国内被害規模は、8.5 億円/年と推定されている。地床栽培のトルコギキョウでは、発生すると防除が極めて困難であるため、被害が急速に拡大する。本病害は、我が国だけでなく世界中の産地で発生し、問題となっている。

国内の生産現場では、本病害を回避するために、薬剤などによる土壌消毒を行っているが、その効果は完全ではない上、圃場回転率の低下を招くほか、生産者への費用的・身体的負担も大きい。このような状況から、抵抗性品種の開発が強く望まれている。

トルコギキョウ立枯病には、*F. solani* を原因菌とする場合と *F. oxysporum* を原因菌とする場合があるが、日本植物病名目録（日本植物病理学会，2022）において、両者は区別されておらず、今後の整理が必要である。このような中、トルコギキョウ立枯病に対する抵抗性品種が知られているものの、いずれの菌に対する抵抗性であるかは明らかでない場合が多く、栽培現場における混乱を招いている。これらの問題を解決するとともに、今後、抵抗性育種を効率的に進めるには、各菌に対する抵抗性を正確に判定できる評価系の確立が不可欠である。その評価系を用いれば、各菌に対する抵抗性の品種間差を明らかにできるほか、遺伝資源から抵抗性の育種素材を検索することができる。

そこで、農研機構生物系特定産業技術研究支援センター イノベーション創出強化研究推進事業（基礎研究ステージ）「トルコギキョウ立枯病害因子の探索と比較ゲノム解析を利用した抵抗性遺伝子座の同定」（課題番号 30004A；2018～2020 年）では、水耕装置を用いたトルコギキョウ立枯病（*F. solani*）抵抗性簡易検定法の開発に取り組み、多数の試験を繰り返し、接種方法や発病条件を明らかにしてきた。

本標準作業手順書では、開発した *F. solani* 抵抗性簡易検定法の実施方法について解説し、さらに、その検定法を用いて接種条件を検討した結果について紹介する。本標準作業手順書が、トルコギキョウ立枯病の抵抗性育種に携わる、民間種苗会社、都道府県、大学などの育種研究者、植物病理研究者の皆様や、抵抗性品種の情報を求める都道府県の普及指導センターなどの皆様のお役に立つことを願っている。

■ 免責事項

- 本手順書は発行時点での情報に基づいて作成しています。
- 農研機構は、利用者が本手順書に掲載された情報をご利用になったことにより損害が生じても、一切の責任を負いません。
- 本手順書に記載されたデータは、農研機構（つくば）において行った試験のデータであって、地域、気候条件、その他の条件などにより異なる場合があります。
- トルコギキョウ立枯病には、*Fusarium solani* を原因菌とする場合と *F. oxysporum* を原因菌とする場合がありますが、本手順書に掲載の検定法は *F. solani* に対する抵抗性を検定するためのものであり、*F. oxysporum* に対する抵抗性の検定には適用できません。
- フザリウム菌の中には、ヒトに有害な毒素を産出するものや、ヒトに感染する事例が報告されているものがあります。本手順書で取り扱う *F. solani* も、ヒトに全く害がないとは断定できないことから、作業の際には、必要に応じて植物病原菌の専門家の指導の下で作業をしていただくようにお願いします。
- フザリウム菌は角膜真菌症の原因菌となることが知られています。菌の調整、接種作業はゴム手袋、保護眼鏡などを着用して行い、作業終了後は十分な手洗いを励行してください。
- 本手順書の記載内容は、「私的使用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断での複製、転載、販売を禁じます。
- 本手順書に掲載の、図 II -12、IV-6、VI-6（右）は、以下の原著論文から転載しており、園芸学会から転載許可を得ています。

Onozaki, T., M. Satou, M. Azuma, M. Kawabe, K. Kawakatsu and N. Fukuta. 2020. Evaluation of 29 Lisianthus Cultivars (*Eustoma grandiflorum*) and One Inbred Line of *E. exaltatum* for

Resistance to Two Isolates of *Fusarium solani* by Using Hydroponic Equipment. The Horticulture Journal 89: 473–480.

- 本手順書に掲載された上記以外の図表は、すべて農研機構が著作権を保有しているか著作権が放棄されたものです。

I. 本検定法の概要と特徴、機材等の準備

1. 本検定法の概要と特徴

フザリウム属菌は代表的な土壌糸状菌の一種であり、不完全菌類に属する。鎌形から三日月型で数個の隔膜を持つ無色の大分生子を形成するのが本属の形態的特徴である。

Fusarium solani によるトルコギキョウ立枯病の症状としては、はじめは数株の地上部が日中に生気を失い、しだいに周辺の株に広がって生育が不揃いとなり、やがて萎凋・枯死する（築尾ら, 2003）。下葉の黄化、茎が細い、草丈不足など、地上部の生育不良が症状として現れることが多い（菅原, 2021）。発病株の地下部は、根の先端が細り、褐変していることが多い。その後、下葉から上葉に萎れが進行し、やがて全身萎凋、枯死などの症状が現れる。茎の腐敗が進むと、その表面に白褐色の分生子塊（スポロドキア）が形成される。

発生に大きく関係するのは気温と地温で、発病の最適気温は 20～30℃の温度域、最適地温は菌の生育適温の 27～28℃（吉松, 2008）である。

佐藤・福田（2016, 2019）の研究では、トルコギキョウ水耕栽培の安定生産を目的に、小型水耕装置を用いて *Pythium* 属菌によるトルコギキョウ根腐病の農薬による防除法を検討した。これらの水耕装置による試験方法にヒントを得て、水耕装置を利用したトルコギキョウの *F. solani* 抵抗性簡易検定法を開発した。本検定法は、根部の温度条件を均一にして、抵抗性検定を行うことが可能という特徴があり、*F. solani* によるトルコギキョウ立枯病を対象とする初めての抵抗性簡易検定法である。

本標準作業手順書は、トルコギキョウ立枯病の抵抗性育種に携わる、民間種苗会社、都道府県、大学などの育種研究者、植物病理研究者や、抵抗性品種の情報を求める都道府県の普及指導センターなどの普及指導員を対象としている。

以下に検定フロー図を示す（図 I -1）。

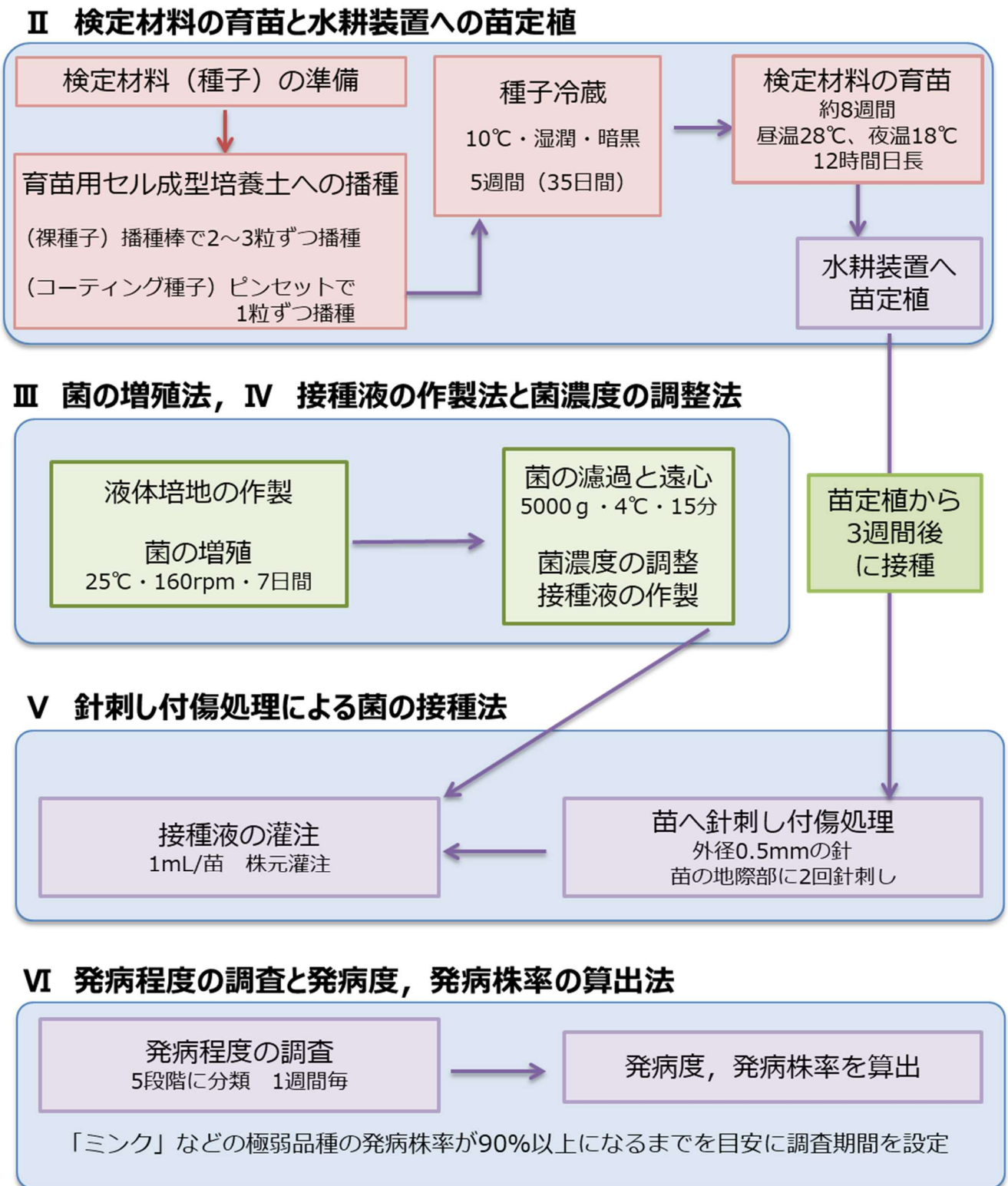


図 I -1 検定フロー図

図中のローマ数字は、章番号を示す。

2. 使用する機材等の準備

(1) 準備する器具、機器、施設等

クリーンベンチ、オートクレーブ、種子冷蔵用ばんじゅう、種子冷蔵用低温庫（10℃）、ピンセット、検定植物育苗用インキュベーター、菌培養用恒温器（25℃）、三角フラスコ（300mL）、ビーカー（1L）、ポリプロピレン製遠心瓶（250mL）、メスシリンダー（100mL、500mL など）、振とう培養器、冷却遠心機、天秤（比量計）、光学顕微鏡、血球計算盤、マイクロピペット、水耕装置一式、オートヒーター、温度記録計、液肥作成用ローリータンク、EC メーター、水耕装置を設置するハウスまたは温室が必要。

※消耗品については、各項目の本文をご参照ください。

なお、本 SOP では、検定法の開発、検証に使用した機材、器具等の商品名をメーカー名とともに記載していますが、これらの商品を推奨することを目的とするものではありません。

(2) 使用菌株

標準の使用菌株としては、農業生物資源ジーンバンクから購入可能な以下の菌株を推奨。

・MAFF 712411 (*Fusarium solani*) 採集地 福島（いわき市）

※ 菌株の入手方法は遺伝資源配布申し込みのページ (<https://www.gene.affrc.go.jp/distribution-micro.php>) をご参照ください。

Ⅱ. 検定材料の育苗と水耕装置への苗定植

1. 播種

定植の約 3 か月前に検定材料の播種を行う。トルコギキョウは、10mL 当たりの種子数が 16 万～17 万粒（八代, 1993）と種子が非常に微細であり、初期生育が緩慢であるため、育苗には 2 か月程度の期間が必要である。播種後に、ロゼット化防止と抽だい促進のための吸水種子湿潤低温処理（以下、種子冷蔵と略す）を 5 週間行う。

播種には、育苗用セル成型培養土プラントプラグ 200 穴（インチタイプ（542×278mm）, 溝なし, （株）サカタのタネ）を用いる。プラントプラグは苗の土崩れがないため、水耕装置への苗定植や接種時の針刺しが容易にできる利点がある。

裸種子は、水に湿らせた播種棒（竹串、爪楊枝などの細い棒）の先に種子を 2～3 粒付着させてから、プラントプラグのセル表面に種子の付着した棒の先を軽くこすって播種する（図Ⅱ-1）。市販のコーティング処理されている種子の場合は、ピンセットでつまみ取り、プラントプラグのセルに 1 粒ずつ播種する（図Ⅱ-2）。



図Ⅱ-1 裸種子の播種棒による播種



図Ⅱ-2 コーティング種子のピンセットによる播種

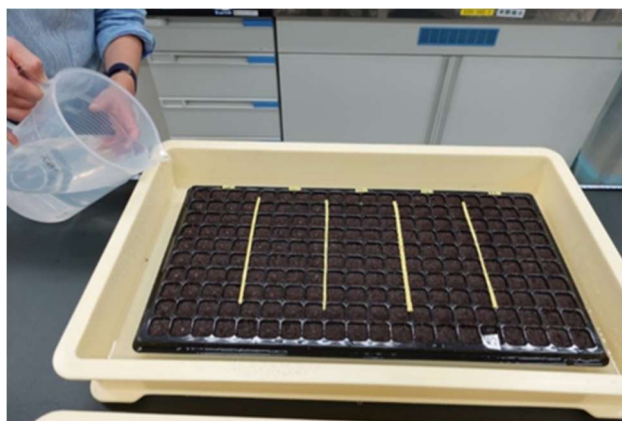
播種後、噴霧器で十分に灌水する。コーティング種子の場合は噴霧器で十分に灌水後、コーティングが崩れていることを確認する。種苗メーカーによってはコーティングが崩れにくい種子もあるので、崩れていない場合はピンセットの先でコーティングを崩す（図Ⅱ-3）。次の種子を崩す前にはキムワイブなどでピンセットの先を拭き取る。



図Ⅱ-3 噴霧器で灌水後、コーティングが崩れた状態のプラントプラグ

2. 種子冷蔵

トルコギキョウは高温に遭遇すると茎が伸長しないロゼットの状態になる。育苗中のロゼット化を防止し、抽だい率を向上させるために、播種後吸水させた種子に種子冷蔵を行う。播種したプラントプラグを 10℃の低温室に搬入し、10℃・湿潤・暗黒条件で、5 週間（35 日間）冷蔵する。種子冷蔵中に用土が乾燥すると発芽が不安定になるので、プラントプラグを入れたばんじゅうに約 1 L の水道水を入れて（図Ⅱ-4）、底面給水した状態で保温用シルバーフィルム（育苗用シルバーポリウ #90，東罐興産（株））で包んで密閉する（図Ⅱ-5、Ⅱ-6）。



図Ⅱ-4 プラントプラグを入れたばんじゅうに約 1L の水道水を注入



図Ⅱ-5 保温用シルバーフィルム
でばんじゅう全体を包む



図Ⅱ-6 シルバーフィルムの端をテープ
で止め 10℃の低温室に5週間入れる

3. 育苗

種子冷蔵が終了後、インキュベーター（KCLP-1400Ⅱ，日本医化器械；昼温 28℃，夜温 18℃，光合成有効光量子束密度 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，12 時間日長）に移し、約 2 ヶ月間育苗する。コーティングをしていない裸種子を播種したセルでは、育苗開始 2～3 週間後に、ピンセットで 1 本/セルになるように間引く。育苗開始から約 8 週間後に、定植適期の本葉 3 対前後に展開したステージの苗が仕上がる（図Ⅱ-8）。



図Ⅱ-7 発芽直後の幼苗



図Ⅱ-8 育苗約 8 週間後 定植適
期の本葉 3 対前後のステージの苗

育苗中に、チビクロバネキノコバエ (*Bradysia agrestis*) の幼虫が培養土に発生して、根を食害されることがあるので、インキュベーター内の衛生管理に気をつける。大量発生した場合には、園芸用コバエ退治殺虫剤（ムシクリンコバエ用スプレー、イカリ消毒（株）など）で防除を行う。

4. 水耕装置、液肥の準備と根腐病防止のための薬剤添加



図Ⅱ-9 循環ポンプとオートヒーターをセットしたホームハイポニカ Sarah の液肥槽

・水耕装置の準備： 抵抗性検定用の水耕装置として、ホームハイポニカ Sarah（協和(株)）を用いる。液肥槽に、液肥の水温を発病適温の 26℃前後に自動調節するためのオートヒーター（プリセットオートヒーター, 100 W; (株) エヴァリス または テトラ 26℃ミニヒーター-MHC-100; スペクトラム ブランズ ジャパン (株)) を設置する。水耕装置の取扱説明書に従い、循環ポンプ、オートヒーターなどをセットする（図Ⅱ-9）。

・液肥の準備： 水耕栽培用の液肥は、ローリータンク（YB 型 200L ローリータンク, ダイライト (株)）

であらかじめ約 200L を作製する。ハイテンポ Ar 液（住友化学 (株)）を 1,000 倍（水道水 200L に対し 200mL）、ハイテンポ Cu 液（住友化学 (株)）を 500 倍（水道水 200L に対し 400mL）の濃度で 200L の水道水に添加して良く混合する。EC メーターで EC が約 1.5 dS/m になっていることを確認する。

・液肥の水耕装置への注入と試運転： 作製した液肥を、水耕装置の液肥槽に約 30L ずつ注入する。液肥注入終了後、栽培槽、葉菜用マルチなどの部品を組み立て、循環ポンプとオートヒーターの電源を入れて試運転を行う。検定期間中の気温や栽培槽の液肥の水温は、温度記録計（Wireless Thermo Recorder RTR-502 おんどとり Jr., (株) ティアンドデイ）を用いて、定植から検定終了まで記録する。

夏季は本検定法による立枯病抵抗性評価には不適な時期である。液肥槽には冷却装置は備えられていないので、夏季の 6 月下旬～9 月上旬には、気温の上昇にしがって水温が上昇し、発病適温である 26℃前後への水温の制御ができず、試験を実施しても病徴の進行が止まる。したがって、夏季には本検定法を利用した検定試験を実施すべきではない。

トルコギキョウの水耕栽培では、*Pythium* 属菌による根腐病の発生がしばしばみられ、株の萎凋・枯死の被害を生じることがある（佐藤・福田, 2016, 2019）。本検定法の実施に際しては *Pythium* 属菌による根腐病の発生を予防するため、メタラキシル M 液剤をメタラキシル M の終濃度が 0.002%となる濃度で、苗の定植前に水耕装置の液肥槽へ添加する。なお、メタラキシル M 液剤は水耕栽培での農薬登録がないため、試験研究目的の場合以外では使用できない。メタラキシル M 液剤は、本検定法の実施に際して使用することは可能であるが栽培時には絶対に使用してはならない。

5. 水耕装置への苗の定植

以上の手順でのセッティング終了後、苗を水耕装置へ定植する。栽培槽の上部に設置する発泡スチロール製マルチには、22 穴入りの葉菜用マルチを使用する。苗の根元が液肥に浸るように、栽培槽の水位調節管を調節する（発泡スチロールマルチの下端と液面が接する位の

水位)。本葉が 3 対前後に展開したステージの苗をピンセットでトレーから抜き、栽培槽への苗の落下防止のため、厚さ 1cm のウレタンロールを 1cm × 8cm の大きさに切ったウレタン片を苗に巻き付けて、葉菜用マルチの植え穴に定植する（図 II -10）。その後 3 週間生育させた後に接種を行う。苗の供試数は、1 品種・系統当たり 10 株を標準とする。

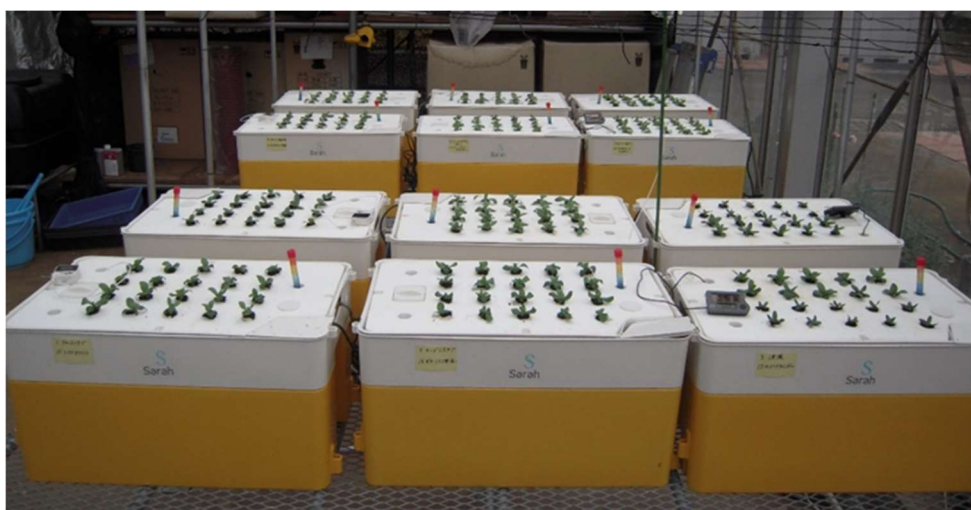


図 II -10 苗定植直後の水耕装置の様子

抵抗性程度が既知の標準品種を検定材料と同じ条件で育苗して、同時に供試することが望ましい。抵抗性の代表品種としては「パピオンピンクフラッシュ」、「アニーライトピンク」、感受性の代表品種としては「ミンク」、「渚 A」がある。対照区（無接種区）として、病原菌を接種しない水耕装置を 1 台以上設け、感受性の代表品種等を供試する。

水位計が下がり液肥槽内の液肥量が減少すれば、液肥を補給する。液肥濃度が過度に上昇することを避けるため、補給時には定植時の 1/2 濃度の液肥（ハイテンポ Ar 液を 2,000 倍希釈、ハイテンポ Cu 液を 1,000 倍希釈した混合液）をローリータンクに作製して、適宜液肥の補充を行う。

なお、水耕装置の稼働が2か月を越えると、水耕装置の循環ポンプ（特にインペラーユニット内のステンレスシャフト）に肥料成分が固着し、循環ポンプが停止することがある。稼働開始から2か月以降は、1～2日おきに葉菜用マルチの廃液部フタを開けて、循環ポンプが正常に作動していることを確認する。循環ポンプが停止していた場合は、取扱説明書に従って循環ポンプの分解・洗浄を行う。検定期間中に循環ポンプの分解・洗浄・再セットを行うのは手間と時間を要するので、あらかじめ予備の循環ポンプを購入しておき、ポンプの交換作業のみで復旧できるように準備しておくことが望ましい。

8月下旬～9月の高温期に定植する場合、長期冷蔵保存した苗を定植する場合は、定植から1週間程度、装置上部を黒寒冷紗で被覆することが望ましい（図Ⅱ-11）。



図Ⅱ-11 苗定植後に寒冷紗被覆した水耕装置

冬季に接種試験を行う場合には、装置全体を農業用保温フィルム（トーカーエースぬくもり，東罐興産（株）など）で被覆し、温室暖房用小型パネルヒーター（SPZ-250，SP-250，昭和精機工業（株））を内部に設置して、最低夜温15℃を維持し、日中の気温は20～30℃前後の発病適温域を保つように保温する（図Ⅱ-12）。水耕装置を設置する温室全体を温度制御する場合は、上記の発病適温域を維持するように温度管理する。



図Ⅱ-12 冬季接種試験での装置の保温被覆

Ⅲ. *Fusarium solani* 菌の増殖法

両手指に 70%エタノールを噴霧してよく消毒してから、クリーンベンチ内で作業を行い、作業終了後は十分な手洗いを行う。SNA (Synthetic low-Nutrient Agar) 斜面培地上で保存中の *F. solani* 菌株を培地ごと白金耳でごく少量切り取り、シャーレ上の PDA (Potato Dextrose Agar) 培地に置床し、25℃で 1 週間培養する。その培養済みの菌を、寒天ごと切り取り (培地 200mL 入りの 300mL フラスコ 1 本あたり 2~3 片) (図Ⅲ-1) 滅菌済みの PD (Potato Dextrose) 培地に入れる (図Ⅲ-2)。

※SNA 培地の組成は下記 URL を、PD 培地の作製法は巻末付録を参照してください。

https://www.gene.affrc.go.jp/manuals-micro_media.php



図Ⅲ-1 培養菌を寒天片ごと切り取る



図Ⅲ-2 PD 培地に入れる

25℃、160rpm~で振とう (本項ではロータリーでの振とう) する (図Ⅲ-3)。

※往復振とうの場合も同様であるが、フラスコの肩口から上に液が跳ねない程度に振とうする。



図Ⅲ-3 振とう機での培養
温度 25℃, 160rpm~, 7日~



図Ⅲ-4 培養後の培地

IV. 接種液の作製法

1. 菌液の濾過と遠心



図IV-1 PD 液体培地中で振とう培養した *F. solani* 菌液



図IV-2 菌液をガーゼで濾過

25℃、160rpm で 7 日間、PD 液体培地で振とう培養した *F. solani* 菌液（図IV-1）を準備する。用意する菌液の量は、22 本植えの水耕装置 1 台当たり、培地 200mL 入りの 300mL フラスコ 1 本を標準としている（つまり水耕装置 10 台分なら培地 2 L 分の菌液を準備する）。ガーゼ（白十字（株）、タイプ I 幅 30cm×長さ 10m）を適当な長さに切って、最初に 1 重、次に 3 重にしたガーゼで、培養した菌液を 1L ビーカーに濾過して、孢子の固まりや菌糸片を除去する（図IV-2）。最初から 3 重ガーゼで濾過すると、ガーゼがすぐに目詰まりし、濾過に時間がかかるので、① 1 重ガーゼ濾過、② 3 重ガーゼ濾過の順で、2 回濾過を行う。



図IV-3 遠心する検体のバランス調整

濾過した菌液を、250mL 容のポリプロピレン製遠心瓶に分注し、2 本の遠心瓶を 1 組として、天秤（比量計）でバランスを合わせる（図IV-3）。

遠心分離機（図IV-4, IV-5; KUBOTA 冷却遠心機 6500 型）に、バランスを取った 250mL 容遠心瓶が対になるようにセットし、遠心を行う（5000 g, 4℃, 15 分）。



図IV-4 250mL 用固定角ローターに遠心瓶 6 個をセットした遠心分離機



図IV-5 フタをして 5000g, 4℃, 15 分の遠心を行う

遠心後、上澄みを捨て、遠心瓶の底の外側壁に沈殿して付着した菌を少量の滅菌水で懸濁して回収し、すべての菌液を 1 本の容器に集める（図IV-6, IV-7）。



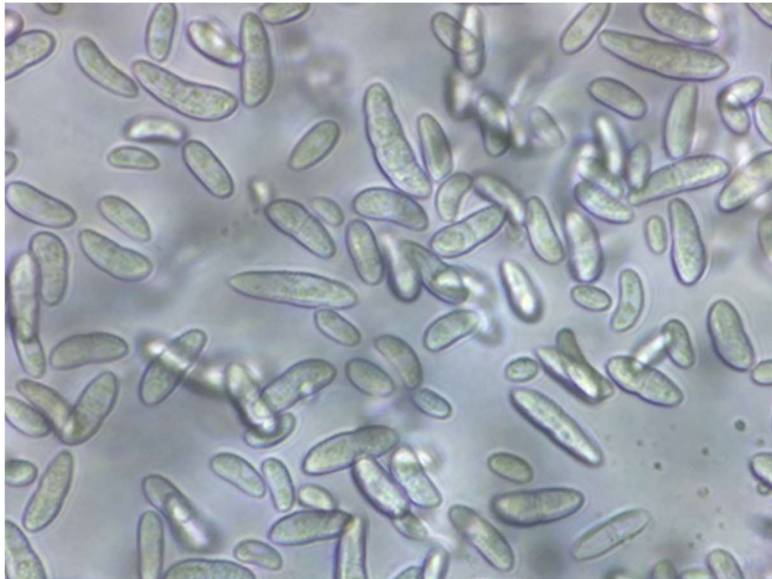
図IV-6 菌が底の外側壁に沈殿して付着する



図IV-7 沈殿した菌を少量の滅菌水に懸濁して集めた菌懸濁液（原液）

2. 接種液の作製

算出した菌懸濁液（原液）の濃度をもとに、希望する濃度（ $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ bud-cells/mL）に滅菌水で希釈して、接種液を作製する。完成した接種液（図IV-8）は、三角フラスコなどの容器に入れてプラスチックパラフィンフィルムなどでフタをして、実験室から水耕装置の設置場所へ運搬する。次項で解説する方法にしたがって、接種液を作製した当日に接種を行う。※菌濃度の調整法は、コラムを参照してください。



図IV-8 完成した *F. solani* の接種液
(5×10^7 bud-cells/mL)

コラム：菌濃度の調整法

3 個の 1.5 mL チューブに滅菌水を 900 μ L ずつ分注する。菌懸濁液（原液）100 μ L を 1 個目のチューブに入れ混合する（10 倍希釈区）。10 倍希釈区から 100 μ L を 2 個目のチューブに入れ混合する（100 倍希釈区）。100 倍希釈区から 100 μ L を 3 個目のチューブに入れ混合する（1000 倍希釈区）。

希釈した菌懸濁液をマイクロピペットで取り、トーマ（Thoma）血球計算盤（深さ 0.1mm、1 辺 1mm のセル内に格子が切っている）に 1～2 滴落とし、カバーガラスをかぶせる。血球計算盤を顕微鏡にセットして検鏡し（図IV-9）、血球計算盤の一番外側の正方形内の細胞数をカウンターで正確にカウントする。同じ作業を 3 回以上繰り返し、細胞数の平均値を 10^4 倍し、さらに希釈倍率をかけ合わせて菌濃度を計算する（例えば、血球計算盤の正方形内の平均細胞数が 100 個で 100 倍希釈区の場合だと、 $100 \times 10^4 \times 100 = 1 \times 10^8$ bud-cells/mL）。菌が問題なく増殖していれば、100 倍区が細胞数のカウント対象となるが、菌懸濁液（原液）の濃度により、10 区、1000 倍区も適宜使用する。

例： 100 倍希釈区で 68 個

→ 菌懸濁液（原液）の濃度は

$$68 \times 10^4 \times 100 = 6.8 \times 10^7 \text{ bud-cells/mL}$$

従って、菌懸濁液（原液）の量をメスシリンダーで測定し、滅菌水で 6.8 倍に希釈すれば 1×10^7 bud-cells/mL の接種液、滅菌水で $6.8/5 = 1.36$ 倍に希釈すれば 5×10^7 bud-cells/mL の接種液となる。



図IV-9 血球計算盤を使用し菌濃度を測定

V. 針刺し付傷処理による菌の接種法

1. 苗の針刺し付傷処理

F. solani による立枯病は、根や茎の外側の皮層から病原菌が侵入し、地際部の茎を腐敗させ、立ち枯れを引き起こす土壌病害である。研究開始時に、*F. solani* 菌液に室温条件で 30 分間浸漬する浸根接種法による接種を試みたが、浸根接種法は立枯病菌 (*F. solani*) の接種方法としては不適であり、苗を 3 週間程度生育させた後、針刺し付傷処理後に菌液を灌注する方法が適していた。これらの接種方法に関する予備試験の結果については、VIIで詳しく解説する。

IVまでの手順にしたがって菌液を調整し、以下の手順で接種を行えば、安定して感受性品種に発病を引き起こすことが可能である。

IIで解説した方法で育苗し、本葉が 3 対前後に展開したステージの苗を水耕装置へ定植する (図 V-1)。定植から 3 週間後に、図 V-2 のように生育した苗へ接種を行う。



図V-1 本葉3対前後の苗を定植した水耕装置の様子 (2015.10.1)



図V-2 定植3週間後の接種適期となった苗の状態 (2015.10.22)

接種当日に、ディスプレイ注射針 25G×1" (0.50×25mm) で供試株の地際部 2カ所に、図 V-3、V-4、V-5 の手順で針刺し付傷処理を行う。針は刺す方向を変えて、2回完全に苗の茎を貫通させる。注射針は繰り返して苗の針刺しに使用できるが、後述のように、再接種の際の硬い茎質の苗の場合は、1 苗毎に交換するとよい。

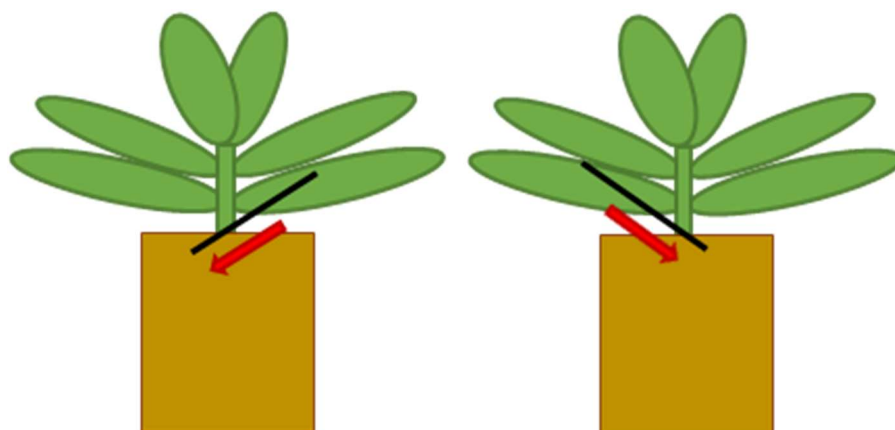


図 V-3 苗の地際部に刺す方向を変えて、2 回針刺しする



図 V-4 苗の地際部に 2 回針刺しする



図 V-5 針は苗の地際部の茎を完全に貫通させる

1 苗について外径 0.5mm の針を 2 回完全に苗の地際部に貫通させて針刺しを行うので、本葉 3 対前後の苗を定植から 3 週間程度生育させて、針刺しても折れない程度の基部茎径 (基部茎径 1.5mm 以上) に、苗を生育させておくことが重要である。

2. 接種液の灌注

前述の方法にしたがって、接種当日にあらかじめ地際部に 2 カ所の針刺し付傷処理を行った後、IVの方法にしたがって作製し、菌濃度 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ bud-cells/mL に調整した接種液を、苗の株元（針刺し部分）にマイクロピペットを用いて 1 苗当たり 1mL ずつ灌注する（図 V-6）。接種液は作製したその日のうちに使用する。

菌の接種作業中に接種液に菌の沈殿が生じないように、接種液の入った三角フラスコなどの容器の底を回すようにして軽く振って、攪拌しながら灌注を行う。

対照区（無接種区）の水耕装置に定植した対照品種の苗については、接種区と同様に地際部に 2 カ所の針刺し付傷処理を行った上で、接種液の代わりに、蒸留水を 1 苗当たり 1mL ずつ苗の株元（針刺し部分）に灌注する。

なお、*Fusarium* 属菌は角膜真菌症の原因菌となることが知られている。接種作業はゴム手袋、保護眼鏡などを着用して行い、接種終了後は十分な手洗いを励行する。



図 V-6 接種液を苗の株元（針刺し部分）に灌注している様子
マイクロピペットを用いて接種液を 1 苗当たり 1mL ずつ株元に灌注する

VI. 発病程度の調査と発病度、発病株率の算出法

1. 発病程度の調査

土壌病害の発病程度を示す数値として、1 株ごとに発病の有無を調査し、発病株の割合を算出する「発病株率」、1 株ごとの発病程度をある基準を設けて何段階かに階級分けして調査し、それぞれの階級に重みを付けて算出する「発病度」の 2 つが広く使われている。発病株率は病気の発生割合を単純に比較できる利点があり、発病度は発病程度別の調査による相対値なのでより詳細に発病の状態を把握できるという利点がある。そこで、これら 2 つの数値を算出して抵抗性評価を行う。

接種日から 1 週間毎に、地上部の病徴を観察して、供試全品種・系統の全個体毎の発病程度を評価する。佐藤・福田（2016, 2019）の評価法に基づき、発病程度を表 VI-1 に示したように、0：無発病、1：下位葉の萎れまたは生育不良、2：上位葉まで萎れ、3：株全体が青枯れまたは全身萎凋、4：枯死 の 5 段階に分類して評価を行う（Onozaki ら, 2020）。

表VI-1 発病指数と発病程度の基準

指 数	発 病 程 度
0	無発病
1	下位葉の萎れまたは生育不良
2	上位葉まで萎れ
3	株全体が青枯れまたは全身萎凋
4	枯死

発病度、発病株率は、以下の式で算出する。

$$\text{発病度} = \sum \{ (\text{発病程度別の株数} \times \text{指数}) / (\text{調査株数} \times 4) \} \times 100$$

$$\text{発病株率 (\%)} = \text{指数 1 以上の株数} / \text{調査株数} \times 100$$

フザリウム菌の生育適温は 27～28℃である（吉松，2008）。接種後の発病の進行には季節変動があり、発病には根部の水温を発病適温付近の 26℃前後に維持するだけでなく、地上部の気温も同様な温度に保つことが重要であること、夏季は高温のため立枯病の検定には適さないこと、発病の進行は春季が速く、秋季では中程度、冬季は遅いことが明らかになっている（Onozaki ら，2020）。

秋季や特に冬季の検定で発病が進行しない場合には、再接種を行う必要がある。「ミンク」などの感受性品種の発病の進行を参考にして再接種が必要か否かを判断する。最初の接種から 40 日目以降になると地際部の茎がかなり硬くなる品種があり、再接種時の針刺し付傷処理に長時間を要する。再接種する場合は、必要性を早めに見極め、40 日目以前に行うよう計画するのが望ましい。ディスポーザブル注射針の針表面には潤滑剤（シリコン油）が塗布してあるので、再接種の際に茎質が硬い苗に針刺しする場合は、注射針を 1 苗毎に交換するとよい。

2. 発病指数の判定について

発病指数 0～4 の判定については、写真を参考にされたい。発病指数 0 は無発病で地上部が健全な個体である（図 VI-1）。病原菌接種した植物体では過敏感細胞死で最下葉が壊死を起こし、溶けたような症状を示すことがある。この過敏感反応（HR）は植物の抵抗反応の一つであり、他の下位葉、上位葉がすべて健全であれば発病には含まないので、発病指数 0 とする。



図VI-1 発病指数 0 (無発病)



図VI-2 発病指数 1 (下位葉の萎れ)

発病指数 1, 2 の判定は、以下の通り行う。手で葉を触るとペラペラとした感触の水気を失った状態の葉や、萎れた葉が下位葉に 1 対以上あり、萎れた葉が株全体の 50%未満の個体を発病指数 1 とする (図VI-2)。接種後全く生長せず、生育が止まった個体についても 1

と判定する。上位葉を含む50%以上の葉が萎れたが、茎上部は水気を失っておらず、下を向いていない個体を発病指数 2 とする（図VI-3）。



図VI-3 発病指数 2（上位葉まで萎れ）

発病指数 1, 2 に該当する葉の萎れ症状は、天候や気温にも左右される。晴天で気温が高い日の調査では発病指数 1, 2 となった株でも、曇天や雨天で気温が低下した日の調査では発病指数 0 に戻ることがよく観察される。発病指数 0~2 の間は可逆性があり、天候や気温、時間帯により葉の萎れと一時的な回復を繰り返しながら病徴が進行することに注意す

る。発病指数が3以上になると天候や気温による萎凋症状の回復はなくなり、病徴は不可逆的となる。



**図VI-4 発病指数 3
(青枯れまたは全身萎凋)**



図VI-5 発病指数 4 (枯死)

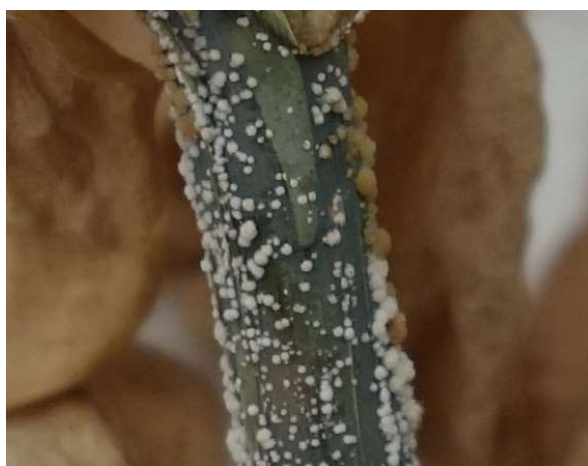
茎上部が水気を失って下を向き、株全体が青枯れまたは全身萎凋を示す個体を発病指数 3 (図VI-4)、茶色く変色して枯死した個体を発病指数 4 (図VI-5) と判定する。発

病指数 4 まで病徴が進行すると、基部の茎が完全に腐り、基部付近の茎表面に白褐色の分生子塊（スポロドキア）が観察される（図VI-6, 7）。



**図VI-6 立枯病 (*F. solani* MAFF712411 菌株) による
茎腐れと茎表面の分生子塊（スポロドキア）**

「ブルーフィズ」の茎（左）, 「バルカンマリ」の茎（右）



図VI-7 茎表面の分生子塊（スポロドキア）の拡大写真

3. 調査結果の取りまとめ法

表VI-2 に示したような調査台帳を表計算ソフトであらかじめ作成しておく。株ごとの発病指数を入力すると、発病指数別の個体数、発病度、発病株率が自動計算されるように計算式を設定しておき、毎週の調査後に入力する。

表VI-2 毎週の発病程度を調査・入力する調査台帳の例

		接種後〇〇日目			〇〇菌接種区				
品種 株番号	大川1号	紫盃	パピオンピンクフラッシュ	バルカンマリン	カクテルブルー	ニューリネーションピンクフラッシュ	アニーライトピンク	ボレロホワイト	
	1	0	3	0	4	4	4	1	4
2	0	0	0	4	1	4	0	4	
3	0	3	0	2	0	4	4	4	
4	0	0	0	3	3	4	0	4	
5	0	0	0	4	0	4	3	4	
6	0	3	0	0	4	4	4	4	
7	0	4	0	4	4	4	0	4	
8	0	4	0	0	4	4	2	4	
9	0	4	0	4	4	4	2	4	
10	0	4	0	4	2	4	0	4	
発病指数	0	10	3	10	2	2	0	4	0
	1	0	0	0	0	1	0	1	0
	2	0	0	0	1	1	0	2	0
	3	0	3	0	1	1	0	1	0
	4	0	4	0	6	5	10	2	10
発病度	0.0	62.5	0.0	72.5	65.0	100.0	40.0	100.0	
発病株率	0.0	70.0	0.0	80.0	80.0	100.0	60.0	100.0	

発病程度： 0:無発病, 1:下位葉の萎れまたは生育不良, 2:上位葉まで萎れ, 3:株全体が青枯れまたは全身萎凋, 4:枯死

		接種後〇〇日目			〇〇菌接種区		
品種 株番号	ボヤージュ2型ホワイト	ミンク	セシルパッションME	渚A	クレアピンク(手前)	渚B(奥)	
	1	4	4	4	4	0	4
2	0	4	4	4	2	4	
3	0	4	4	0	0	4	
4	4	4	3	0	0	4	
5	4	4	4	3	3	4	
6	0	4	4	4	4	0	
7	2	4	3	0			
8	4	4	3	4			
9	4	4	4	4			
10	4	4	0	4			
発病指数	0	3	0	1	3	3	1
	1	0	0	0	0	0	0
	2	1	0	0	0	1	0
	3	0	0	3	1	1	0
	4	6	10	6	6	1	5
発病度	65.0	100.0	82.5	67.5	37.5	83.3	
発病株率	70.0	100.0	90.0	70.0	50.0	83.3	

発病程度： 0:無発病, 1:下位葉の萎れまたは生育不良, 2:上位葉まで萎れ, 3:株全体が青枯れまたは全身萎凋, 4:枯死

調査期間については、「ミンク」などの極弱品種の発病株率が90%以上となるまでを目安に設定して、1週間毎に調査を行う。

4. 試験終了後の作業

試験終了後、病原菌を接種していない対照区（無接種区）の健全な植物体、液肥は、そのまま廃棄する。接種区の植物体は、地下部、地上部とも回収し、オートクレーブ滅菌をしてから廃棄する。接種区の水耕装置は、農業用資材・農業用水浄化剤のケミクロン G（日本曹達（株））約20gを液肥槽にいれ、半日程度液肥を装置内に循環させて装置全体を消毒し、液肥を浄化後、排水・洗浄する。液肥槽浄化後の液肥排水には、家庭用小型バスポンプ（ミニミニバスポンプ N-30P, Panasonic など）を使用すると楽にできる。試験終了の約1週間前からは、液肥の補充を止めて水耕装置内の液肥量を少なくしておく、消毒・排水作業を軽減できる。

参考情報（*F. solani* と花き病害図鑑について）

F. solani は一般的に広い宿主範囲を示し、多くの作物に立枯症状や腐敗症状を示す。*F. solani* の代表的な形態としては、大分生子と小分生子の形成、長い分生子柄上のモノ・フィアライドから擬頭状に形成される小型分生子、厚壁胞子の単生あるいは連鎖での形成などがあるが、現在も分類学的な見直しが進んでいる。*F. solani* によるトルコギキョウ立枯病被害の報告は、日本国内だけでなく、アルゼンチン、南アフリカ、韓国、中国など、国外での発生も多数報告されており（小野崎, 2021）、報告によって病徴も異なるので、診断に関して注意を要する。

農研機構 HP では、花き類病害の診断・防除の補助のための「花き病害図鑑」を下記の URL で公開している。トルコギキョウについては、植物名検索で 25 件のデータ画像を掲載しており、知りたい病害を選択すれば、その病害の病名、病原菌、病徴写真等の情報が得られるので、参照していただきたい。

<https://www.naro.go.jp/laboratory/nivfs/kakibyو/index.html>

Ⅶ. 良好に発病を進行させるための条件

水耕装置を用いたトルコギキョウ立枯病 (*F. solani*) 抵抗性簡易検定法について、発病を良好に進行させるための接種条件の概要を説明する。

1. 検定に適した気温

発病を良好に進行させるためには、水温を 26℃前後の発病適温域に維持するだけでなく、地上部の気温についても 20～30℃前後の発病適温域を保つことが重要である。水温や気温を発病適温域に維持できない夏季は、接種試験の実施時期として不適切であり、接種は 6 月下旬～9 月上旬以外の春、秋、冬に実施する。発病の進行は春季が速く、秋季では中程度、冬季は遅いことが明らかになっている (Onozaki ら, 2020)。

2. 接種方法

F. solani の接種方法としては、苗定植時の浸根接種は不適である。本葉 3 対前後の苗を水耕装置へ定植し 3 週間生育させたあと、針刺し付傷処理を行い、菌液を苗の株元（針刺し部分）に 1 苗当たり 1mL ずつ灌注する方法で接種を行う。

なお、トルコギキョウ立枯病には、*F. solani* を原因菌とする場合と *F. oxysporum* を原因菌とする場合がある。本標準作業手順書で解説したのは *F. solani* の接種検定法であり、もう一つの原因菌の *F. oxysporum* の接種検定法については、別途検討する必要がある。

参考情報（接種条件の検討結果）

試験 1. 菌接種法として、カーネーションの萎凋細菌病（*Burkholderia caryophylli*）抵抗性育種における抵抗性簡易検定法として有効であった浸根接種法（小野崎，2001）を用いた。2015年3月24日に、図VII-1に示した22品種各10株の苗の根2カ所にカミソリで縦傷をつけ、菌濃度 5×10^6 bud-cells/mL の *F. solani* MAFF712388 菌株（山形県内で発病したトルコギキョウから分離した菌株）菌液に室温条件で30分間浸漬する浸根接種を行い、水耕装置に定植した。しかしながら、接種45日後（5月8日）に至っても全品種で無発病であったため、5月8日に、Vで解説した針刺し付傷処理後に MAFF712388 菌株の菌濃度 1×10^7 bud-cells/mL の菌液を1株あたり1mLずつ灌注する方法で再接種を行った。再接種35日後（6月12日）までの発病程度を調査した。

試験 2. 2015年6月23日に、試験1と同一の図VII-1に示した22品種各5～10株の苗を、水耕装置に定植した。3週間後の7月14日に針刺し付傷処理後に菌濃度 1×10^7 bud-cells/mL の MAFF712388 菌株菌液を1mL/株ずつ灌注する方法で接種を行い、接種63日後（9月15日）までの発病程度を調査した。

水耕装置を用いて抵抗性評価を行う方法は、根部の温度条件を均一にして、抵抗性検定を行うことが可能であった。病原菌接種方法について、試験1の苗定植時の浸根接種では、接種から45日経過後でも全く発病がみられなかったのに対し、針刺し付傷後菌液灌注による再接種では、再接種1週間後から発病がみられた。この他にも、「レイナホワイト」に2つの方法（根・下部をハサミで切除，縦傷）で根に付傷処理後、 1×10^5 ， 10^6 ， 10^7 bud-cells/mL の MAFF712388 菌株菌液に室温条件で30

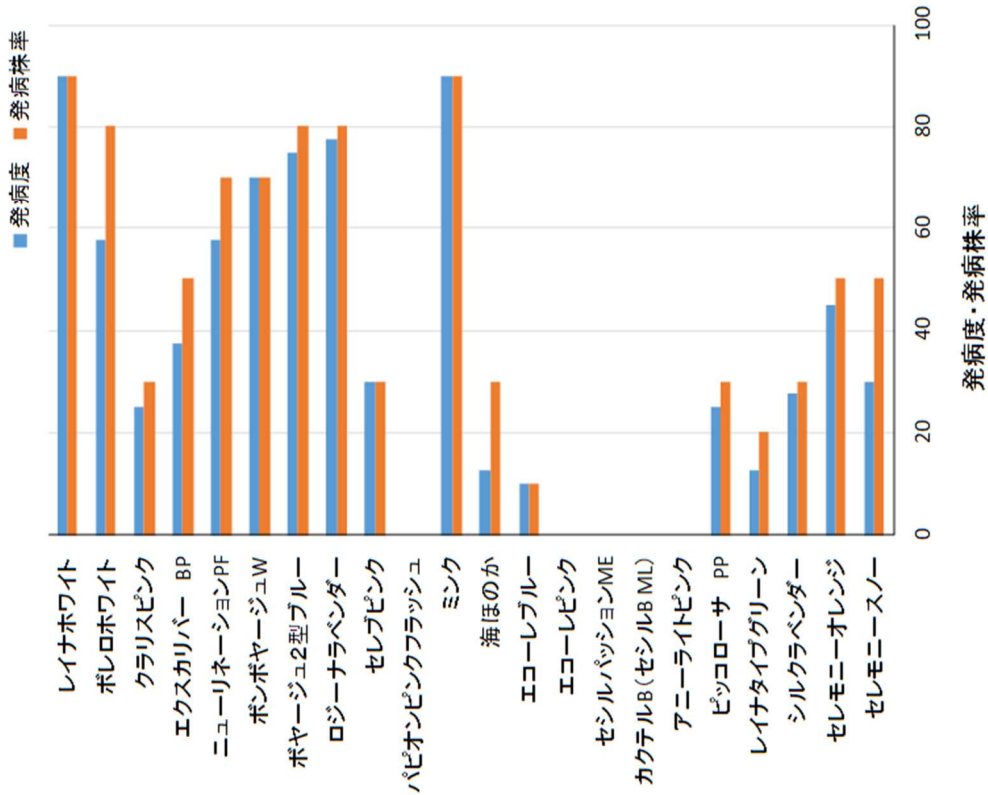
分間浸漬する浸根接種の予備試験（2014年10月実施）でも、浸根接種単独では全く発病を引き起こすことができず、接種から21日後に針刺し付傷処理による菌再接種後に発病がみられた（データ略）。これらの浸根接種による試験に対し、針刺し付傷処理による菌接種のみを行った試験2では、接種1週間後から発病が認められた。以上のように、*F. solani*の接種方法としては、苗定植時の浸根接種は不適であり、試験2のように、苗を水耕装置へ定植し3週間生育させた後、針刺し付傷処理を行い、菌液を株元（針刺し部分）に1苗当たり1mLずつ灌注する方法が適していた。

試験1、試験2に供試した、22品種の発病度、発病株率に大きな品種間差異が認められた（図VII-1）。「セシルパッションME」、「カクテルブルー（セシルブルーML）」、「アニーライトピンク」、「パピオンピンクフラッシュ」の4品種では、2回の試験とも無病徴（発病株率0%）であった。一方、「ニューリネーションピンクフラッシュ」、「ミンク」は2回の試験とも発病株率70%以上であった。

水耕装置には投げ込み式クーラーなどの冷却装置は備えていないため、夏季の高温条件下で行った試験2における接種日7月14日から試験終了9月15日までの根部の平均水温は、装置上部を遮光率60～65%の黒寒冷紗で遮光（図VII-2）したにもかかわらず30.1℃であった（図VII-4）。このため、平均水温が27.1℃と発病適温域で推移した試験1（図VII-3）に比較して、試験2では発病度、発病株率が低い傾向が認められた（図VII-1）。以上のように、夏季は*F. solani*の発病適温域を維持できないため、接種試験の実施時期として不適切であることがわかった。

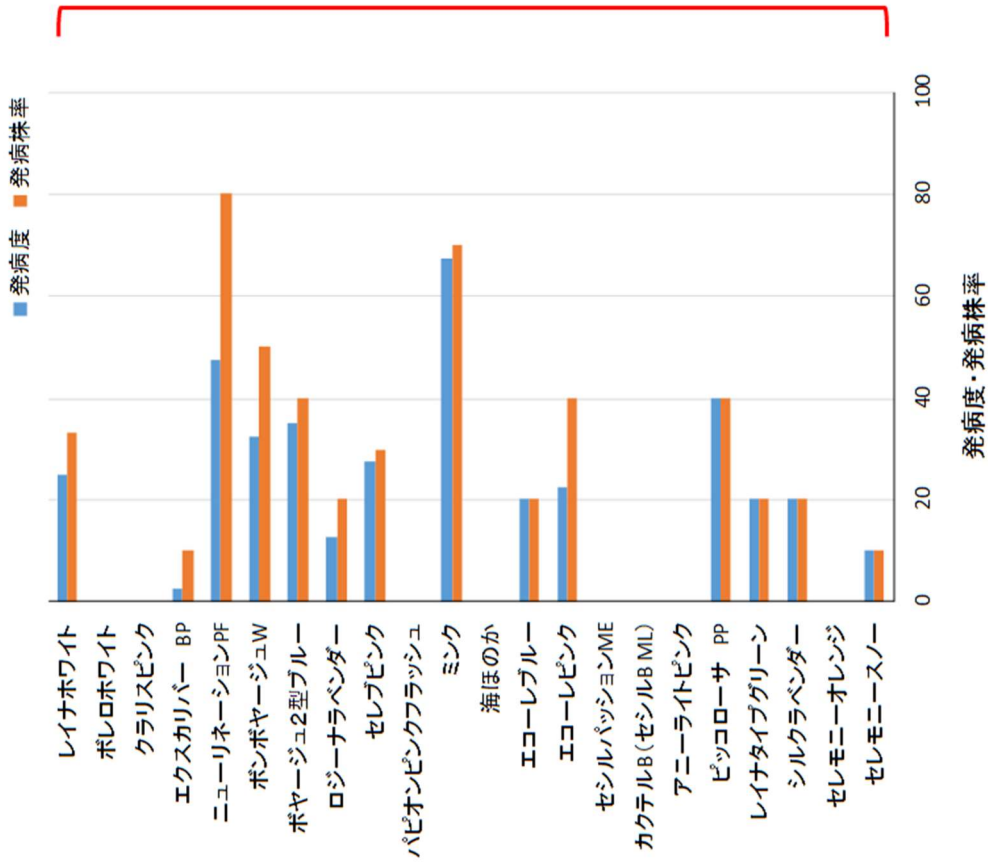
(試験1)

3月24日 浸根接種・定植 5×10^6 個/mL
5月8日 針刺し再接種 1×10^7 個/mL
6月12日 再接種35日目 試験終了



(試験2)

6月23日 冷蔵苗を定植
7月14日 針刺し接種 1×10^7 個/mL
9月15日 接種63日目 試験終了

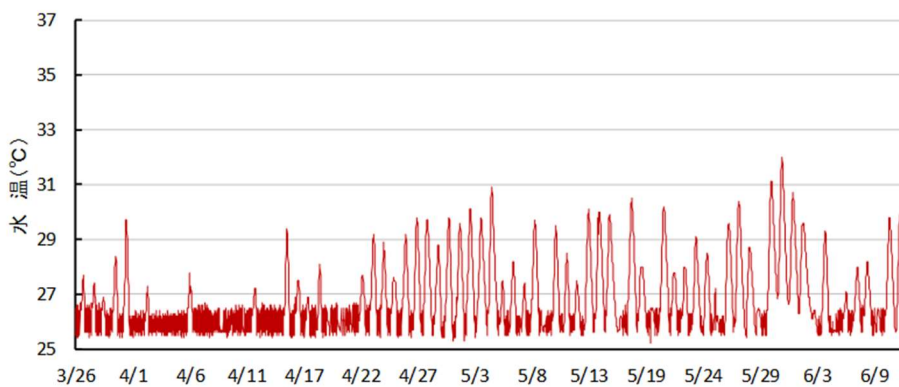


夏季の高温条件下の試験
発病度、発病株率が低い傾向

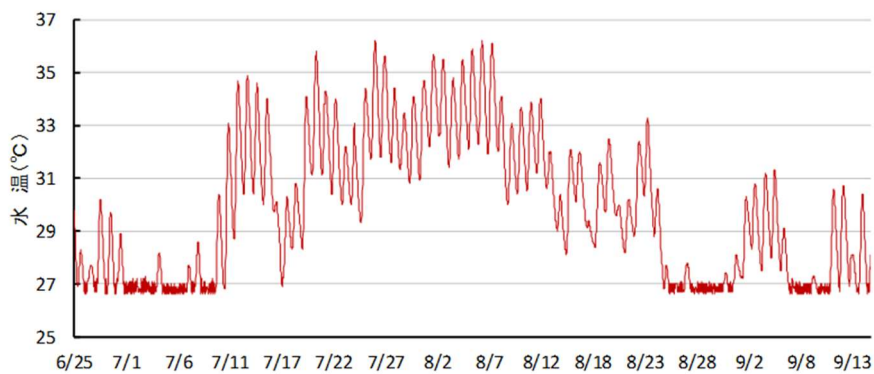
図Ⅵ-1 22品種における*F. solani* MAFF712388菌株に対する発病度・発病株率



図Ⅶ-2 試験 2
菌接種後に装置上部を黒寒冷紗被覆



図Ⅶ-3 水耕装置の水温の推移 (試験 1)



図Ⅶ-4 水耕装置の水温の推移 (試験 2)

参考資料

(1) 論文

1. 小野崎 隆. 2001. カーネーションの萎ちよう細菌病抵抗性育種と薬剤および交雑育種による花持ち性の向上. 花き研報告. 1: 1-85.
2. Onozaki, T., M. Satou, M. Azuma, M. Kawabe, K. Kawakatsu and N. Fukuta. 2020. Evaluation of 29 lisianthus cultivars (*Eustoma grandiflorum*) and one inbred line of *E. exaltatum* for resistance to two isolates of *Fusarium solani* by using hydroponic equipment. Hort. J. 89: 473-480.
3. 佐藤 衛, 福田直子. 2016. アゾキシストロビン・メタラキシル M 粒剤処理による水耕栽培におけるトルコギキョウ根腐病の防除. 日植病報. 82 : 93-100.
4. 佐藤 衛, 福田直子. 2019. 水耕栽培におけるトルコギキョウ立枯病のベノミル水和剤処理による防除. 日植病報. 85 : 18-24.
5. 築尾嘉章, 清水時哉, 伊藤陽子, 井 智史. 2003. トルコギキョウ立枯症状に
関与する *Fusarium solani*. 日植病報. 69: 49.

(2) 著書

1. 松尾卓見ら. 1980. p.472. 作物のフザリウム病. 全日本農村教育協会. 東京.
2. 日本植物病理学会. 2022. p.668. トルコギキョウ立枯病. 日本植物病名目録 (2022年2月版).
<https://www.ppsj.org/pdf/mokuroku/mokuroku202202.pdf>
3. 菅原 敬. 2021. p.33-41. 特集 トルコギキョウ新技術 土壌病害の原因とその対策. 最新農業技術 花卉 vol. 13. (社) 農山漁村文化協会. 東京.
4. 八代嘉昭. 1993. トルコギキョウをつくりこなす - 自生地に学ぶ高品質栽培 -. (社) 農山漁村文化協会. 東京.
5. 吉松英明. 2008. 立枯病. p.21-23. 農文協編. 原色花卉病害虫百科 <3>草花 3 (ト〜ワ) トルコギキョウ、ペゴニア、リンドウほか 31 種. (社) 農山漁村文化協会. 東京.

(3) 科学雑誌

1. 小野崎 隆. 2021. 水耕装置を用いたトルコギキョウ立枯病 (*Fusarium solani*) 抵抗性簡易検定法. 植物防疫. 75(8): 437-443.

(4) マニュアル

1. 農研機構. 2021. 水耕装置を用いたトルコギキョウ立枯病 (*Fusarium solani*) 抵抗性簡易検定法マニュアル
https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/torukogikyo_tachigarebyo_teikouseikentei_manual.pdf

(5) 普及成果情報

1. 小野崎 隆, 佐藤 衛, 東 未来, 川部眞登, 川勝恭子, 福田直子. 2021. *Fusarium solani* によるトルコギキョウ立枯病抵抗性の水耕装置を用いた検定法
https://www.naro.go.jp/project/results/4th_laboratory/nivfs/2020/20_030.html

担当窓口、連絡先

外部からの受付窓口：

農研機構 野菜花き研究部門 研究推進部 029-838-6574

付録：PD（Potato Dextrose）培地の作製法

PD（Potato Dextrose）培地（ジャガイモ煎汁・デキストロース加用液体培地）

材料：1リットル作製のために、ジャガイモ 200g、ブドウ糖 20g、蒸留水適量。

作製方法：以下は1リットルの作製例である。

既製品を使用しての作製も可能であるが、本項では、ジャガイモを煮出して作製する方法を写真で解説する。煮崩れにくいジャガイモ品種を使用すると培地にイモのかすが残らず、きれいな透明に出来上がる。※培地に煮崩れたイモが入っても、増殖には何ら影響はない。

まずは、ジャガイモの皮が残らないようにきれいにむき、厚さ5mm程度の大きさに切り、蒸留水に入れる。作製する培地量1Lあたり200gのジャガイモを計量し、使用する。



図-1 ジャガイモの皮をむく



図-2 厚さ5mm程度に切る



図-3 蒸留水1リットルに200g入れる

次に、大きめの鍋に蒸留水 1 L と小さく切ったジャガイモ 200g を入れ、中火で煮る。火が通り、煮崩れる前に火を止め、ガーゼで濾して、煮汁を集める。※やけどに注意して行う。



図-4 中火で煮る



図-5 ジャガイモが煮崩れる前に、ガーゼで濾す

1 L あたりブドウ糖 20g を濾した液に入れ、溶かす。ジャガイモを煮ることにより蒸留水は蒸発しているので、作製予定の量になるよう、蒸留水を加える。三角フラスコに適量※ずつ分注し、シリコン製の栓でフタをする。

※振とう培養の時に口から飛び出ない程度の量にする

(300mL 三角フラスコであれば、培地量は 200mL 程度)。



図-6 ブドウ糖 20g を計り、濾した液に入れ、溶かす



図-7 1リットルになるよう蒸留水を加えた後、適量分注する

三角フラスコへの分注を終えたら、オートクレーブ（120℃，20分以上）にて滅菌する。
滅菌後は、培地が十分に冷めてから次の作業に移る。

※培地は室温で半年程度は保管が出来るので、前もって作製しておくとも便利である。



オートクレーブ終了後
は、作製した培地が充
分に冷めてから、次の
作業を行う

図-8 オートクレーブで
滅菌する



図-9 培地作製については、
もちろん既製品（POTATO
DEXTROSE BROTH）を
利用しても構わない



「農研機構」は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネーム（通称）です。