

栽培者と普及支援機関のための

トルコギキョウ水耕栽培における 水媒伝染性病害対策マニュアル

2018年3月

課題名「周年安定生産を可能とする花き栽培技術の実証研究」
大規模水耕栽培におけるトルコギキョウの高品質周年生産システムの構築
地域再生花き生産コンソーシアム

トルコギキョウの水耕栽培で発生する萎れ

トルコギキョウにおける土壌伝染性の病害はたくさんあります。

ウイルス病

えそ萎縮病: *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Lisianthus necrotic stunt virus* (LiNSV)
えそ病: *Lisianthus necrosis virus* (LNV)

細菌病

青枯病: *Ralstonia solanacearum*
萎凋細菌病: *Pseudomonas caryophylli*

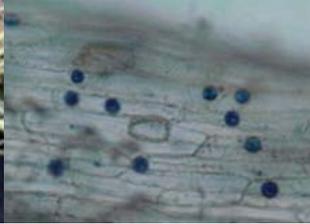
糸状菌病

疫病: *Phytophthora cinnamomi*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*
根腐病: *Pythium irregulare*, *P. spinosum*
株腐病: *Rhizoctonia solani* AG2-2, *R. solani* AG4
菌核病: *Sclerotinia sclerotiorum*
白絹病: *Sclerotium rolfsii*
茎腐病: *Fusarium avenaceum*
立枯病: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*
青かび根腐病: *Penicillium pinophilum*
褐色根腐病: *Subplenodomus drobnjacensis* (*Pyrenochaeta* sp.)

等々

トルコギキョウの水耕栽培で発生する萎れ

水耕栽培で発生した土壌伝染性病害(水媒伝染性病害)は、



小型分生子

根腐病：繰り返し発生・危険度：大

立枯病：頻度は低いものの繰り返し発生・危険度：中

根腐病：*Pythium irregulare*

立枯病：*Fusarium solani*

青かび根腐病：*Penicillium pinophilum*



青かび根腐病：1作のみ発生

・危険度：ほとんど無し

写真は花き病害図鑑より

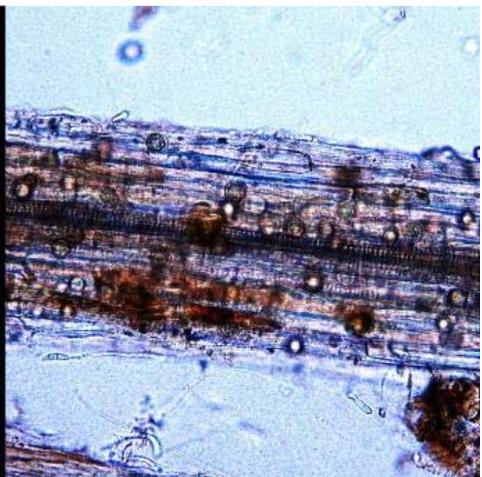
Pythium によるトルコギキョウの水耕栽培で発生する萎れ

トルコギキョウ水耕栽培(NFT栽培)

栽培1年目(2015年1月)から萎凋症状が発生 → 施設全体で約3万本廃棄



根は褐変



根に多くの卵胞子

トルコギキョウに萎れを引き起こす *Pythium* 菌

多犯性
中温性

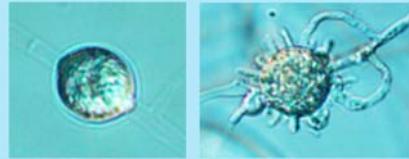
P. irregulare



(胞子のう) (造卵器・卵胞子)

生育温度: 1°C~35°C
生育適温: 25~30°C

P. spinosum



(Hyphal Swelling) (造卵器・造精器)

生育温度: 5°C~35°C
生育適温: 25°C

多犯性
高温性

P. aphanidermatum



(胞子のう) (造精器・造卵器)

生育温度: 10°C~42°C
生育適温: 37°C

Pythium 菌は150種以上含まれている仲間ですが、病原菌はその一部です。トルコギキョウの根腐れを引き起こす病原菌は3種知られていますが、水耕栽培での主要な病原菌は *Pythium irregulare* です。

温室内外は危険がいっぱい → 対策

温室外からの病原菌の持ち込み防止

調査前



病原菌が多く検出された場所を防草シートで被覆



現在



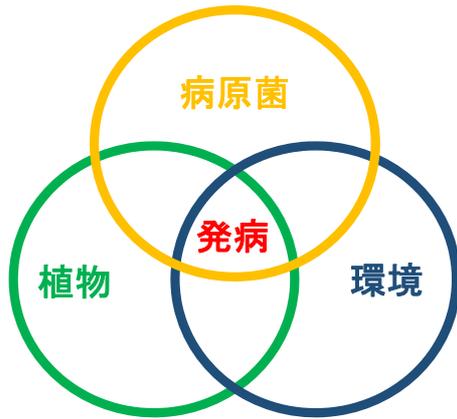
通路をコンクリートに



- ・病原菌の持ち込み防止措置の実施
- ・作付け終了後の水耕システム全体の消毒

⇒ 大きな被害は発生しなくなった

トルコギキョウに萎れ症状が発生する要因



植物の病気は植物(宿主)、
環境、病原菌3つの要因が重
なったときに発生

病原菌から見ると...

菌量多 幼苗期には萎れを起こす
菌量少 開花期までに徐々に感染が広
がり萎れを起こす

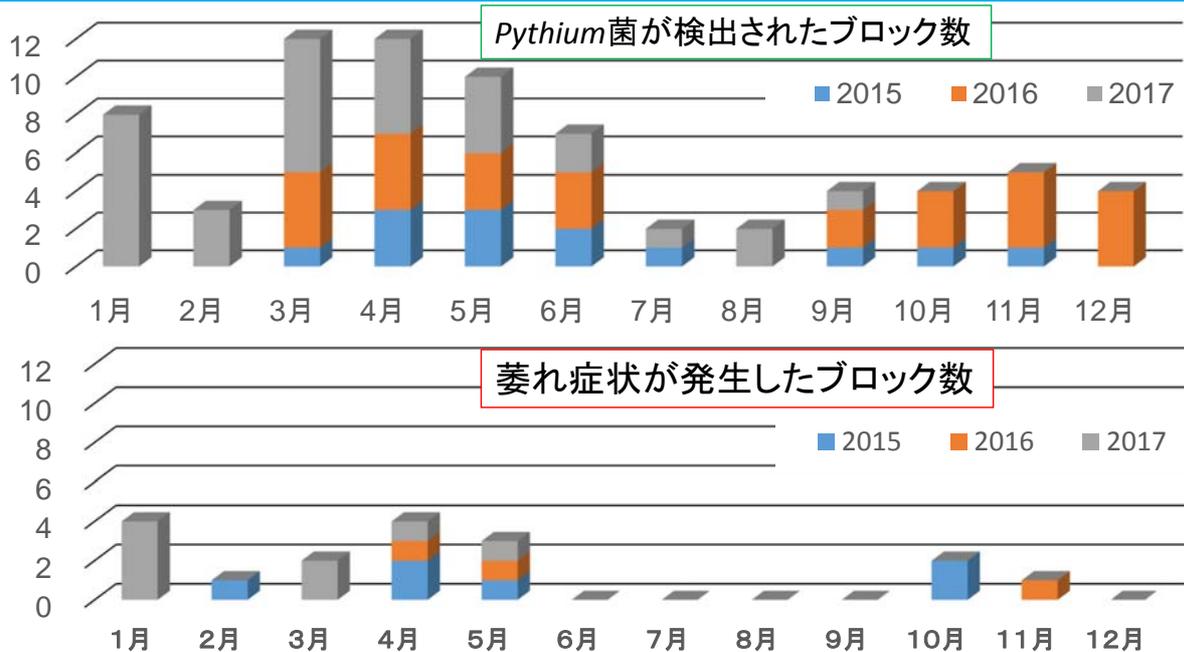
植物から見ると...

幼苗期 病気にかかりやすい
開花期 蒸散量が多く、根の障害が地
上部の生育に大きく影響する
ため発病しやすい

環境からみると...

夏季 病原菌の活動は低調なため菌
がいても発病しない
春・秋季 病原菌の活性は高く、菌の発
病能力だけでなく伝染能力も
高い

培養液中病原菌のモニタリングから分かったこと



- ・夏は菌が検出されることは少なく発病(萎れ)は見られない
- ・冬から春にかけて発病が増加する
- ・菌が検出されても発病しない場合もある
- ・発病ブロックは前月に菌が検出されている

培養液中のモニタリングから分かった対策

病原菌の汚染度が高いと滅菌が十分にできないことがある

定植パネルの洗浄

NFTベット、配管やタンクの消毒の徹底

定植作業中の持込の可能性はある

育苗装置から温室への苗の搬入法の点検

栽培終了後の根などの搬出、処理法の再検討

発病前に病原菌は根に既に感染している

無病徴での感染あり、根からの検出でモニタリングが可能

萎れ対策には病原菌の検出が重要

根や植物残渣

- 病気の原因がわかる
- 発病の予測ができる
- 病原菌の存在を把握できる

培養液

- 発病の予測ができる
- 滅菌効果(培養液の交換の効果、水耕栽培ベンチの滅菌効果)の確認ができる

土

- 病原菌の存在や分布状況を把握できる

病原菌の検出法

Pythium選択培地(NARM培地)と培地上に生えてきた菌叢(きんそう)の種判定(LAMP法)の組み合わせ

- Pythium菌は普通一つの検体に複数種がいることが多くNARM培地に出てくる菌叢すべてが病原菌ではありません。正確に判定するには生えてきた菌叢がどんな種かを判定する必要があります。
- ただ、LAMP法は費用と反応液をつくる少しの熟練が必要ですので過評価になってしまいますが、選択培地に菌叢が生えてきたらアウトという考え方もあります。

根からの検出

サンプリングした根を選択培地に置き、培養して生えてきた菌叢を目視で判定あるいはLAMP法で種の特定をします。

培養液からの検出

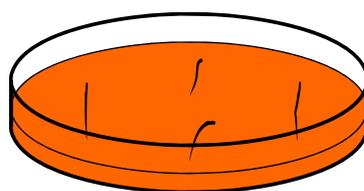
培養液を採取後、ポアサイズ5 μmのメンブレンフィルターを使って培養液をろ過して病原菌を回収します。ろ過したフィルターの上面を下側にして選択培地の表面上に置き培養します。生えてきた菌叢を根と同様に目視またはLAMP法で判定します。

土壌からの検出

ボトルに入れた土に水を混ぜ、そこにエゴマを入れて培養する。毎日ボトルを振って混ぜ1週間培養、エゴマを回収、選択培地の置いて培養します。その後は他と同じようにして判定します。

病原菌の検出法(根・植物残渣)

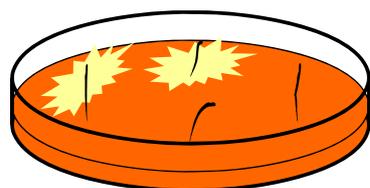
生産現場で
やってみよう!



植物体を罹病部位
Pythium 選択培地に置床

25°C 暗所

2日培養



Pythium選択培地上に菌叢が
現れる



出現してくる菌叢の生育
が速く薄い場合はPythium
菌として判断する。

正確な診断が必要な時には

LAMP反応

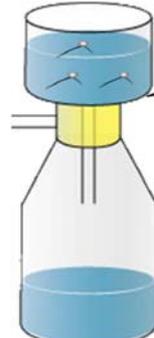
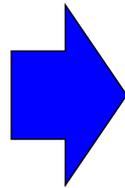
※ 培養期間が長すぎる(4日以上)とPythiumではない他の菌も生えてきてしまうので注意!

病原菌の検出法(培養液)

生産現場で
やってみよう!

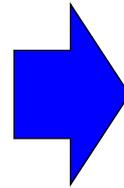


培養液 4L

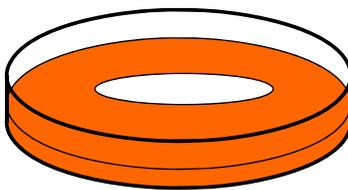


吸引濾過

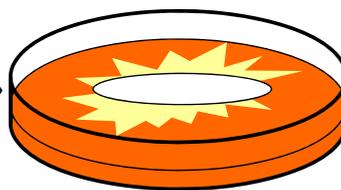
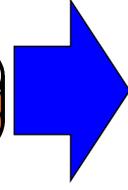
メンブレンフィルター
(デュラポア; ポアサイズ5 μ m)



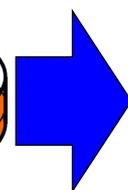
メンブレンフィルター上に
遊走子を捕集



遊走子を捕集した面を下向きにPythium選択培地へ置く



25°Cで2日間培養



出現してくる菌叢の生育が速く薄い場合はPythium菌として判断する。

正確な診断が必要な時には

LAMP反応

※ 培養期間が長すぎる(4日以上)とPythiumではない他の菌も生えてきてしまうので注意!

培養液の吸引ろ過と培養

生産現場で
やってみよう!

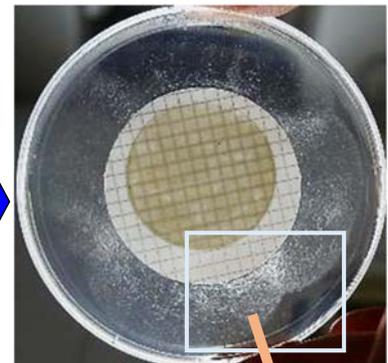


培養液採取

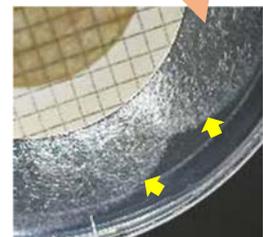


培養液ろ過

メンブレンを培養

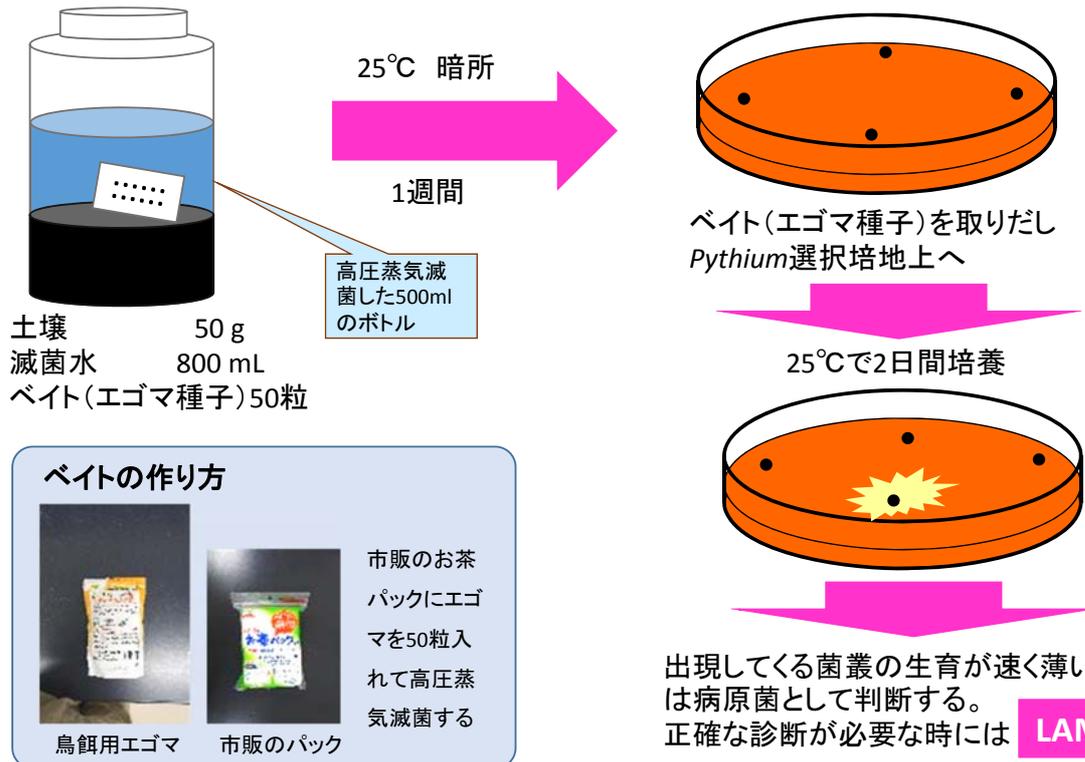


Pythiumのコロニー出現!



病原菌の検出法(土壌)

生産現場で
やってみよう!



ベイトの作り方

市販のお茶パックにエゴマを50粒入れて高圧蒸気滅菌する

鳥餌用エゴマ 市販のパック

※ 培養期間が長すぎる(4日以上)とPythiumではない他の菌も生えてきてしまうので注意!

Pythium 選択培地の作り方

生産現場で
やってみよう!

i) 材料

- ・コーンミールアガー 3.4 g 終濃度
- ・寒天 1.0 g (0.5%)
- ・抗生物質のストック
- Ampicillin (250 mg / ml) 200 ml (250 ppm)
- 三種混合
- ・Nystatin (10 mg / ml) 200 ml (10 ppm)
- ・Rifampicin (10 mg / ml) 200 ml (10 ppm)
- ・Miconazole (1 mg / ml) 200 ml (1 ppm)
-
- 水 200 ml

ii) 抗生物質 ストック (1000倍液)の作り方

三種混合			
Ampicillin	1000 mg	Nystatin	40 mg
		Rifampicin	40 mg
		Miconazole	4 mg
水	4 ml	-----	
		DMFA	4 ml

200 μl毎に小分けしてチューブに分注、冷凍保存

iii) つくり方

- コーンミールアガー 3.4 g
- 寒天 1.0 g
-
- 水 200 ml
- ↓
- オートクレーブまたは電子レンジで溶かす
- ↓
- 50°Cまで冷ます
- ↓
- ↓ ← Ampicillin (1000倍液) 200 μl
- ↓ ← 三種混合 (1000倍液) 200 μl
- ↓
- 手早く攪拌
- シャーレ1枚に10 ml分注

選択培地の作り方

生産現場で
やってみよう！

コーンミールアガーと寒天を耐熱ビンに入れる



水を入れ電子レンジで寒天を溶かす



培地を冷ましてから抗生物質を入れる



よく混ぜて10mlずつシャーレに分注する



選択培地作成に必要な試薬・器具・機器

選択培地シャーレ1枚当たり材料費: 約30円
価格は2017年11月時点での参考値です

必要となる試薬

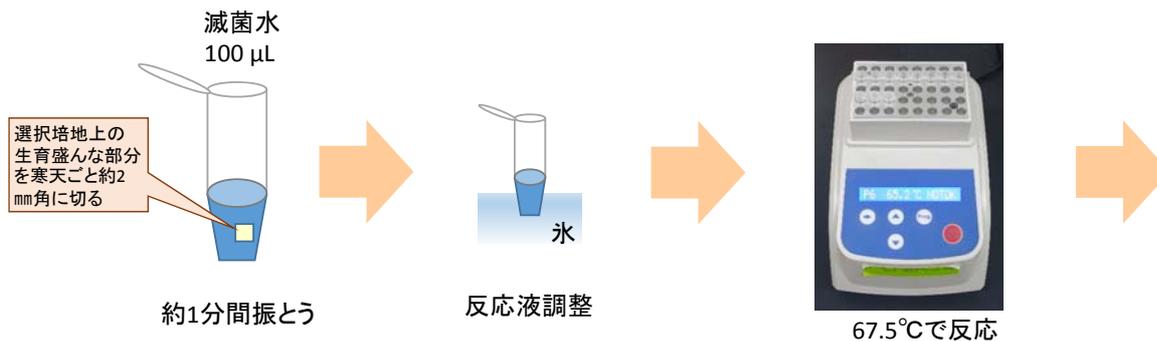
• コーンミールアガー				
BBL Corn Meal Agar:	Becton, Dickinson and Company	REF211132 (500g)		23,520円
• 寒天				
Bacto Agar:	Becton, Dickinson and Company	REF 214010 (450g)		31,900円
• Nystatin	シグマ	N3503-5MU		12,000円
• Ampicillin Sodium	和光	012-23303 (10g)		5,600円
• Rifampicin	和光	189-01001 (1g)		4,900円
• Miconazole Nitrate	和光	134-12661 (1g)		3,000円
• Dimethylformamide(DMFA)	和光	049-02914 (100ml)		1,500円

必要となる器具・機器

• シャーレ:	φ9cmアズノール滅菌シャーレ(500枚 アズワン1-7484-01)	7,000円
• 耐熱ビン:	DURAN ねじ口びん(250ml モノタロウ 017200-250A)	1,000円
• マイクロピペット:	ピペットマン(20~200μL ギルソン P200)	32,000円
• ピペットチップ:	200μL目盛付PPラッククリア(960本 ワトソン 1201-705C)	5,300円
• 遠心機:	ミニ遠心機(Cubee、アズワン 3-6092-01)	28,500円
• 天秤:	精密はかり((株)カスタム MS-50)	15,700円
• インキュベーター:	クールインキュベーター(三菱電機エンジニアリング CN-25C)	89,900円
• 電子レンジ		

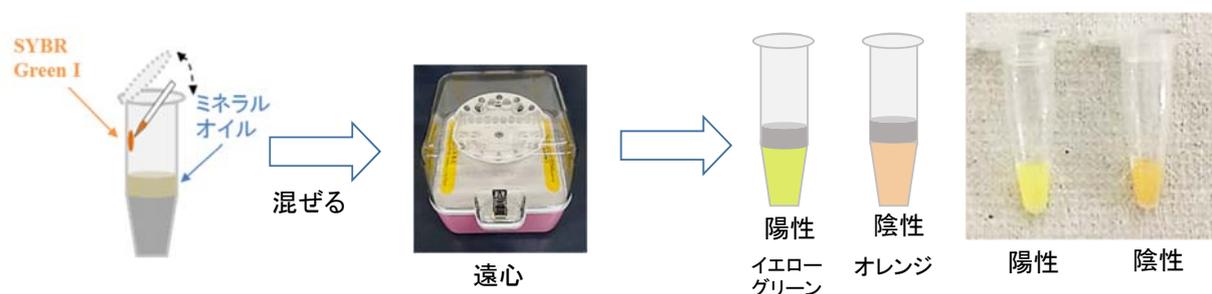
LAMP反応の方法

普及支援
機関向け



SYBR Green Iを用いた発色による検出

反応後、蓋を開けて、滅菌水で10倍希釈したSYBR Green I (×10,000濃度, Takara) 2 µL を壁面に滴下し、蓋を閉めて、タッピングで混和し、スピンドアウンする



LAMP反応の調整法

普及支援
機関向け

LAMP反応液の組成(1サンプルあたり):

低温下で調整

【LAMP 法用DNA 増幅試薬セット - 動物種・植物病検査専用B-】キットを使う場合:

ddWater	5.86 µL
10x 反応バッファーB	1.5 µL
5x 反応添加液	2.4 µL
dNTPs Mixture	0.84 µL
プライマー溶液	2.4 µL
増幅酵素	1.0 µL
鋳型核酸	1.0 µL
ミネラルオイル	10.0 µL
マスターミックス合計	25.0 µL

LAMPプライマーMIXの組成

F3 (100 µM)	1.25 µL
B3 (100 µM)	1.25 µL
FIP (100 µM)	10 µL
BIP (100 µM)	10 µL
1 × TE	77.5 µL
Total	100 µL

※プライマー溶液、鋳型核酸、ミネラルオイル以外は増幅試薬セットに入っている。
ポジティブコントロールとして *P. irregulare* 菌体抽出 DNA 100 pg を用いる



LAMP反応に必要な試薬

普及支援
機関向け

LAMPプライマーセット

サンプル1点当たりの経費約100円
試薬の価格は2017年11月時点での参考値です

プライマーセット		塩基数
Irre-F3	5'-CGTTTCTTCCTTCCGTGTAGT-3'	21
Irre-FIP	5'-GCAATCATTGCAAACAATACTCCGGTGGAGGAGAGTTGCAGAT-3'	45
Irre-B3	5'-ACCGCGAATCGAGGTCC-3'	17
Irre-BIP	5'-TCTTTTTTGTATGTGCGCGGTGCTCACCGAAGTCGCCGAC-3'	40

試薬

カタログ番号

LAMP 法用DNA 増幅試薬セット ー動物種・植物病検査専用Bー	NE6031 (ニッポンジーン) 約400テスト分	33,900円
ミネラルオイル	M5904-5ML (Sigma-Aldrich) 500テスト分	2,700円
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain	5761A (TaKaRa) 2,500テスト分	42,000円

LAMP反応に必要な器具・機器

普及支援
機関向け

- マイクロピペット: ピペットマン(0.5~10 μ L ギルソン P10) 37,300円
ピペットマン(20~100 μ L ギルソン P100) 32,000円
- ピペットチップ: 10 μ Lフィルターチップ システムラック(PP)
(960本 ワトソン124P-10S) 10,500円
100 μ Lフィルターチップ システムラック(PP)
(960本 ワトソン 124P-100S) 10,500円
- チューブ: 0.2ml チューブ(1,000本 イナ・オプティカ T-02F) 7,000円
1.5mlマイクロチューブハイシール平底
(1,000本 ワトソン 131-815C) 1,800円
- フィルター: デュラポアメンブレンフィルター 5 μ m \times ϕ 47mm
(100枚 メルク SVWG04700) 20,000円
- 遠心機: ミニ遠心機 Cubee (アズワン 3-6092-01) 28,500円
- インキュベーター: ブロックインキュベーター
(バイオメディカルサイエンス BSR-MiniTC) 37,800円
ブロック(バイオメディカルサイエンス BSR-004-01) 12,000円

Pythium による根腐病防除について

Pythium が検出されたときの対策



病原菌の検出ステージによって、対処方法が違います。

発病が特に注意される時期！

・3～5月、10～11月

(この時期に一部でも栽培が重なる場合には要注意)



萎れ発生！

防除について



定植までの時期

① 苗テラスで検出

② 定植時に検出 の時は...

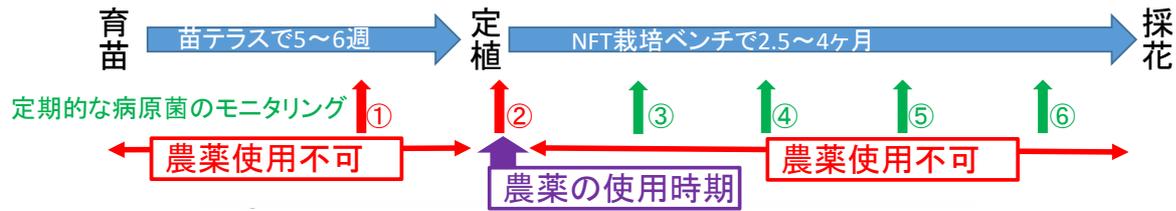
農薬の処理時期

どこかで Pythium 検出! した場合

アキシストロビン・
メタラキシル粒剤を処理



Pythiumによる根腐病防除について



アゾキシストロビン・メタラキシル粒剤を定植後、株元にサッと

名称: ユニフォーム粒剤
 種類: アゾキシストロビン・メタラキシルM粒剤

適用の範囲と使用方法

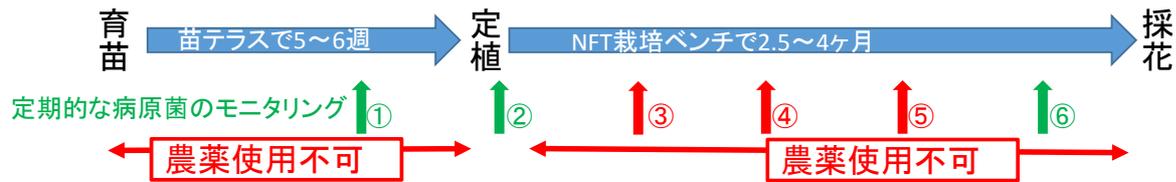
作物名	適用病害虫名	使用量	使用時期	本剤の使用回数	使用方法	アゾキシストロビンを含む農薬の総使用回数	メタラキシル及びメタラキシルMを含む農薬の総使用回数
ねぎ	白絹病	9kg/10a	土寄せ時 但し、収穫90日 前まで	1回	株元土壌温和	5回以内 (粒剤は1回以内、水和剤は4回以内)	5回以内 (種子への処理は1回以内、土壌温和は1回以内、散布は3回以内)
ごぼう	黒あざ病	18kg/10a	は種前		作業土壌温和	1回	1回
トルコギキョウ (水耕栽培)	根腐病	0.25g/株	定植時	3回以内	株元散布	5回以内	4回以内 (但し生育期は3回以内)
花き類・ 観葉植物	立枯病 (リゾクトニア菌)	18kg/10a	定植時 又は生育期		土壌表面散布		
たらのぎ	立枯疫病	20kg/10a	収穫終了後 (苗の場合は穂 付後)~播種前 但し、収穫60日 前まで	2回以内	土壌表面散布	2回以内	2回以内



効果・薬害等の注意

トルコギキョウ(水耕栽培)に使用する場合、NFT式循環型水耕栽培施設で行ってください。
 使用にあたっては普及指導センターの指導に従い、廃液は環境中に流出しないように適切に処理してください。

Pythiumによる根腐病防除について



定植からしばらくした
 ③~⑤栽培中期に検出

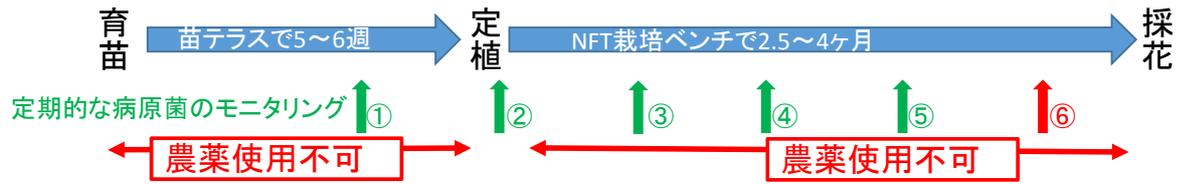
どこかでPythium 検出! した場合



アゾキシストロビン・メタラキシル粒剤は使用できない
 ↓
 ・養液交換によりPythium濃度を下げる
 ・養液温度を20~25°C (Pythiumの活動好適温度帯)
 から外すように管理を変更

次作は、
 アゾキシストロビン・メタラキシル粒剤の
 処理を検討

Pythium による根腐病防除について



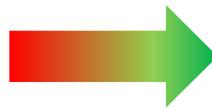
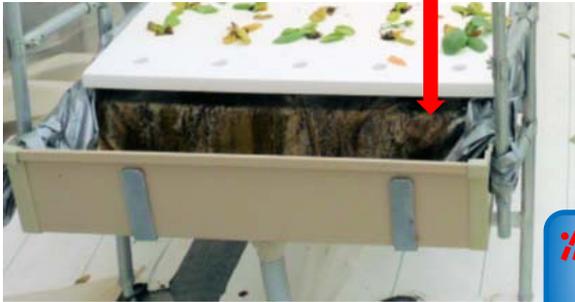
収穫の近い
⑥栽培後期に検出



どこかでPythium 検出!

アゾキシストロビン・メタラキシル粒剤は使用できない

↓
・養液交換、養液温度管理の変更、収穫の前倒し



次作には必ず、
アゾキシストロビン・メタラキシル粒剤を処理

付録1 Fusarium による立枯病防除について



原因は・・・

- 菌の
- ・感染苗での持ち込み
 - ・前作からの生き残り
 - ・風雨・土埃による飛び込みなど



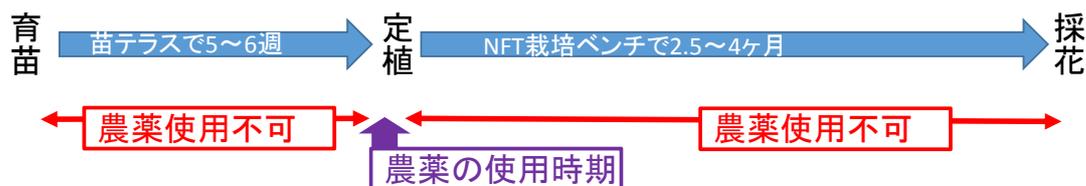
地際に白～ピンク色のかびが発生し、萎れる!

発病が特に注意される時期!

・11～4月

(この時期に栽培後期が重なる場合には要注意)

付録1 Fusariumによる立枯病防除について



防除対策

- ・株元の過湿を回避する。
- ・農薬は、今後適用拡大(現在:申請中)予定
 ……使用法 → 定植前に、セル苗に灌注処理



翌日



セル苗灌注

[1000倍液をセルトレイ1枚(60×30cm、
 使用土壌4~5L) 当り500ml]

定植

付録2 その他注意すべき病害について



灰色かび病

冬作で発生。地上部病害だが、地際部で感染すると立枯症状を示す。



青かび根腐病

極まれに発生。被害軽微。

- ・地上部病害である灰色かび病については、登録農薬があるので、使用方法に従って防除を行う。
- ・ただし、薬剤耐性菌の発生を招くことのないよう、作用機作の同じ薬剤の連用は避ける。
- ・また、耕種的防除法として、過湿とならないよう換気などを行う。

付録3

菌の拡大を防ぐために

栽培後の片付け: 菌で汚染されていることを前提に、慎重に行う!



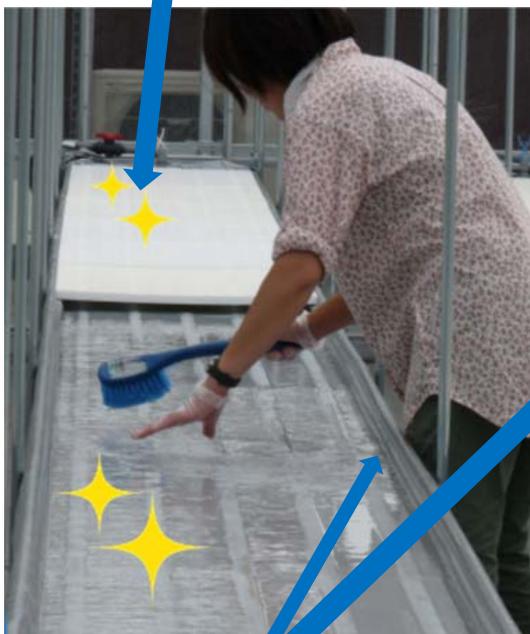
片付けは、
危険だらけ
↓
作業後は、
消毒!

付録3

菌の拡大を防ぐために

栽培後の掃除・消毒: すみずみまで、やり残し厳禁

栽培後の掃除: パネルに食い込んでいる残渣もしっかり除去・消毒



水が達するラインより上までしっかり洗浄



パイプの中まで消毒(十分時間をかける等)

付録3

菌の拡大を防ぐために

菌の持ち込みを防ぐ：面倒でも、こまめに！

靴の履き替え



台車のタイヤの出入り時の消毒



付録4

水耕栽培装置の消毒について

主な消毒方法には、以下の方法がありますが、
詳しくは栽培マニュアルや各種専門書等を参考にして下さい。

- ・塩素による消毒：
- ・温湯による消毒：



消毒後の栽培ベッド

執筆者

*Pythium*菌の動態と検出方法

岐阜大学流域圏科学研究センター
景山幸二

お問い合わせ先

TEL 058-293-2061

<http://www.green.gifu-u.ac.jp/access/>

根腐れ病防除対策

農研機構野菜花き研究部門
佐藤 衛

お問い合わせ先

TEL 029-838-6575

<http://www.naro.affrc.go.jp/index.html>

—無断転用を禁止します—
2018年3月