
初版

養液栽培における 高温性水媒伝染病害の 安全性診断マニュアル

Pythium Countermeasure

農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業(2011-2013)

参画機関：岐阜大学 愛知県 岐阜県 三重県 静岡県

はじめに

野菜・花き類の養液栽培では、地球温暖化の影響により、これまでなかった高温性水媒伝染病害（高温性ピシウム病）が発生するようになってきました。これらの病原菌は培養液を介して瞬く間に施設全体に広がるため、発見が遅れると防除が難しいのが現状です。このような高温性ピシウム病による被害軽減のためには、早期診断が極めて重要です。

しかし、植物病原菌を検出するためには、土や水・植物からの病原菌の分離培養・同定といった熟練や労力および時間が必要なことから、農業生産現場ですぐに利用することは、これまでできませんでした。そのため、養液栽培の圃場衛生管理において、病徴発現の観察などによる経験的な診断に頼る以外になく、早期に確実な病害診断を行うことはできませんでした。

そこで、本研究において、高温性ピシウム病の簡易検出法を開発し、その技術を活用した安全性診断手法の確立とマニュアル策定を行いました。

本研究では、施設内外の時空間的な病原菌のモニタリング結果と、その後の発病株の推移や被害程度を比較検討することにより、安全性評価法を確立しました。すなわち、「いつ」・「どこで」・「どの」病原菌が検出されれば「どの程度」の被害を受けられるかを予測することのできる評価法です。さらに、このような安全性診断に、既存の病害防除技術や培養液の殺菌技術を組み合わせることにより、「安全性診断マニュアル」としました。これにより、発病後の対処療法ではなく、発病前の早期診断と被害予測から最適な防除法を選択することができる科学的根拠に基づいた病害管理を可能にします。

本マニュアルを活用いただき、安全・安心な農産物を安定生産していただくとともに、消費者に信頼されるクリーンな付加価値の高い農産物が届くことを期待します。

国立大学法人 岐阜大学 景山幸二

第1章 養液栽培で発生する水媒伝染病害	3
---------------------	---

第2章 ピシウム菌について

セクション1 ピシウム菌とは	26
----------------	----

セクション2 高温性ピシウム菌とは	29
-------------------	----

1. 培養性質
2. 繁殖器官の観察法
3. ピシウム菌の分類に用いる器官
4. 高温性ピシウム菌の形態

第3章 高温性ピシウム菌の簡易検出法

セクション1 ベイト法・メンブレン法によるピシウム菌の検出方法	37
---------------------------------	----

1. ベイト法
2. メンブレン法

セクション2 LAMP法による簡易検出法	51
----------------------	----

1. LAMP法とは
2. LAMP反応の進め方
3. *P. aphanidermatum*、*P. helicoides*、*P. myriotylum* の簡易検出法
4. LAMP法の注意点

セクション3 リアルタイムPCR法による定量法	74
-------------------------	----

第4章 安全性評価法

セクション1 病原菌密度と病害の発消長	80
---------------------	----

1. 高温性ピシウム菌の多発条件（温度、培養液成分等）
2. 経時的な菌密度の推移と病害の発消長

セクション2 総合的な防除対策	88
-----------------	----

1. 雨水・土砂の培養液への混入防止
2. 消毒剤によるタンク・ベッド・資材殺菌
3. 温湯・蒸気によるパネル殺菌
4. 培養液の適温管理
5. 植物体の見取り調査による発病株の早期除去
6. 金属銀剤による培養液殺菌
7. 培養液殺菌装置の導入
8. 培養液の更新
9. 培養液の高EC管理
10. 手かん水

セクション3 高温性ピシウム菌に対する安全性評価法	110
---------------------------	-----

1. いつ、何を、どんな方法で調べるか
2. 安全性評価法

第5章 各作物編	120
----------	-----

参考文献	160
------	-----

養液栽培で発生する 水媒伝染病害

本マニュアルでは高温性ピシウム病を中心に紹介します。しかし、実際は高温性ピシウム病以外の病害の発生も見られます。ここでは、養液栽培で発生する水媒伝染病害を紹介します。

ピシウム菌による病害

トマト



図1-1 トマト根腐病の萎凋症状



図1-2 トマト根腐病菌により水浸状に腐敗した根

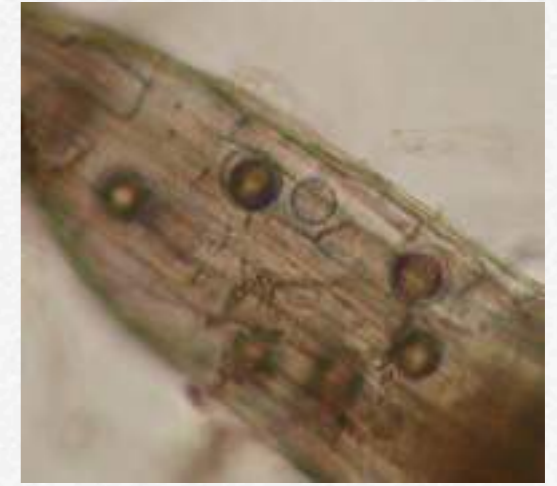


図1-3 トマト根の褐変部に形成されたトマト根腐病菌の卵胞子

1. 菌名 ・ 2. 病名

<i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzpatrick	トマト根腐病
<i>Pythium myriotylum</i> Drechsler	トマト根腐病
<i>Pythium dissotocum</i> Drechsler	トマト根腐病
<i>Pythium vexans</i> de Bary	トマト苗立枯病

3. 病徴

初め根の一部が褐変します。病勢がすすむと根全体が褐変し、やがて腐敗黒変します。地上部は初め日中に茎頂部が萎凋

し、夜間回復します。後に株全体が萎凋しますが回復する場合もあります。

4. 伝染

病原菌は苗や用水等から施設内に持ち込まれ、トマトの根に感染します。前作の被害残渣やパネル内に伸長した感染根が最も重要な伝染源です。

5. 診断法

萎凋枯死株の根を検鏡し卵胞子を確認することで診断できますが（第2章）、卵胞子が確認できない場合もあります。その場合は、高温性ピシウム菌の簡易検出法（第3章）を用いて診断してください。

ミツバ



図1-4 ミツバ根腐病の萎凋症状



図1-5 ミツバ根腐病菌により水浸状に腐敗した根

1. 菌名

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzpatrick

Pythium group F

Pythium apleroticum Tokunaga

2. 病名

ミツバ根腐病

3. 病徴

根は水浸状に腐敗し、生育が不良となるとともに萎凋症状を示して、病徴が進むと葉が黄化し、枯死します。発生時期は6月～9月の高温期となります。

4. 伝染

病原菌は原水や周辺土壌からの土ぼこりなどでベッド内に持ち込まれ、ミツバの根に感染して発病します。前作のミツバの被害残渣や、パネル内に伸長した根に感染していた病原菌が最も重要な伝染源です。

5. 診断法

萎凋枯死株の根を検鏡し卵胞子を確認することで診断できますが（第2章）、卵胞子が確認できない場合もあります。その場合は、高温性ピシウム菌の簡易検出法（第3章）を用いて診断してください。

ネギ



図1-6 ネギ根腐病の萎凋症状



図1-7 ネギ根腐病菌により水浸状に腐敗した根

1. 菌名

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzpatrick

Pythium myriotylum Drechsler

Pythium group F

2. 病名

ネギ根腐病

3. 病徴

根は水浸状に腐敗し、葉先枯をおこし、生育不良となります。病徴が進むと萎凋症状を示し、枯死します。発生時期は*P. aphanidermatum*、*P. myriotylum*は6月～9月の高温期に、*Pythium* group F は周年で発生します。

4. 伝染

病原菌は原水や周辺土壌からの土ぼこりなどでベッド内に持ち込まれ、ネギの根に感染して発病します。前作のネギの被害残渣や、パネル内に伸長した根に感染していた病原菌が最も重要な伝染源です。

5. 診断法

萎凋枯死株の根を検鏡し卵胞子を確認することで診断できますが（第2章）、卵胞子が確認できない場合もあります。その場合は、高温性ピシウム菌の簡易検出法（第3章）を用いて診断してください。

ホウレンソウ



図1-8 ホウレンソウ立枯病による被害



図1-9 ホウレンソウ立枯病菌により水浸状に腐敗した根

1. 菌名

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzpatrick

Pythium myriotylum Drechsler

Pythium paroecandrum Drechsler

Pythium ultimum Trow var. *ultimum*

2. 病名

ハウレンソウ立枯病

3. 病徴

セル苗では地際部の胚軸が水浸状に腐敗します。多くの場合、被害は周囲へ坪状に広がります。本圃では、はじめ一部の株に萎凋が認められ、病徴が進むと枯死します。このような株の根は暗褐色水浸状に腐敗しています。培養液の温度が25°C以上の場合には、急速に被害が拡大し、全滅に至ることもあります。*Pythium aphanidermatum*、*P. myriotylum* は6月～9月の高温期に、その他の場合は高温期以外にも被害が発生します。

4. 伝染

病原菌は原水や苗、周辺土壌からの土ぼこりなどでベッド内に持ち込まれます。前作の被害残渣やパネル内に伸長した感染根が最も重要な伝染源です。

5. 診断法

多湿時には発病株の地際部に白色綿毛状の菌糸が確認できます。リゾクトニアの場合にも菌糸が確認できますが、顕微鏡で菌糸を観察して隔膜がなければ立枯病、隔膜が確認できる場合はリゾクトニアによる株腐病の可能性ががあります。萎凋枯死株の根を検鏡し卵胞子を確認することで診断できますが（第2章）、卵胞子が確認できない場合もあります。その場合は、高温性ピシウム菌の簡易検出法（第3章）を用いて診断してください。

バラ



図1-12 定植直後に発生したバラ根腐病の萎凋症状



図1-13 バラ根腐病菌により水浸状に腐敗した根

1. 菌名

Pythium helicoides Drechsler

2. 病名

バラ根腐病

3. 病徴

根が水浸状に腐敗し、黒変します。このため葉が黄化し、株は萎凋症状を示して、やがて枯死します。発生時期は主に5月～9月の高温期になり、特に定植直後に発生しやすいです。また本病の発生は初発株から水の流れに沿って連続して発生していきます。

4. 伝染

病原菌は感染苗の定植や、原水や周辺土壌からの土ぼこりなどで栽培ベッド内に持ち込まれて発病します。前作のバラの被

害残渣や培地内に伸長した根に感染していた根腐病菌も重要な伝染源です。

5. 診断法

萎凋枯死株の根を検鏡し卵胞子を確認することで診断できますが（第2章）、卵胞子が確認できない場合もあります。その場合は、高温性ピシウム菌の簡易検出法（第3章）を用いて診断してください。

ポインセチア



図1-10 ポインセチア根腐病の萎凋症状



図1-11 ポインセチア根腐病菌により水浸状に腐敗した根

1. 菌名

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzpatrick

Pythium helicoides Drechsler

Pythium myriotylum Drechsler

2. 病名

ポインセチア根腐病

3. 病徴

地際茎および根は水浸状に腐敗し、最初は萎凋症状を示すが、病徴が進むと枯死します。発生時期は6月～9月頃で、特に7月～8月の高温期は被害が多くなります。

4. 伝染

病原菌は苗などで施設内に持ち込まれ、ポインセチアの根に感染して発病します。ミニバラなどの前作物に感染していた病原菌も重要な伝染源です。

5. 断法

萎凋枯死株の根を検鏡し卵胞子を確認することで診断できますが（第2章）、卵胞子が確認できない場合もあります。その場合は、高温性ピシウム菌の簡易検出法（第3章）を用いて診断してください。

フザリウム菌による 病害

トマト



図1-14 トマト根腐萎凋病の萎凋症状



図1-15 トマト根腐萎凋病菌により維管束が褐変した主茎基部

1. 菌名

Fusarium oxysporum Schlechtendal f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker

2. 病名

トマト根腐萎凋病

3. 病徴

低温、寡日照環境で経過する晩秋から早春にかけて発生します。養液栽培での発生は、ロックウール栽培で多く、水耕栽培では少ない傾向にあります。初め、茎葉が晴天の日中にしおれ、夜間は回復を繰り返し、やがて黄化、褐変枯死に至ります。根は主根および側根が黒褐変、腐敗して脱落し、維管束は褐変、木化します。主茎の維管束褐変は普通、基部から15～20cm程度にとどまります。

4. 伝染

病原菌は、感染種子や施設の周辺土壌からの土ぼこりなどで、施設内に持ち込まれてトマトの根に感染すると考えられます。前作で根腐萎凋病が発病したロックウールの栽培床は、次作の重要な伝染源になります。また、トマト土耕栽培施設を養液栽培施設に転換すると、根腐萎凋病菌が施設内外に生存している可能性が高くなります。

5. 診断法

発生時期が低温期であること、病徴の特徴として根部の褐変症状が激しく、主茎の維管束褐変が基部から15～20cm程度にとどまることから診断します。

ミツバ



図1-16 ミツバ株枯病菌により水浸状に腐敗した根

1. 菌名

Fusarium oxysporum Schlechtendahl f. sp. *apii* (Nelson & sherbakoff) W. C. Snyder & H. N. Hansen

2. 病名

ミツバ株枯病

3. 病徴

茎葉が萎凋、黄化し、根は淡褐色～褐色に褐変します。地際を切断すると維管束が褐変しており、根腐病と区別できます。主に5月～10月に発生し、6月～9月の夏場の高温期に多発します。

4. 伝染

病原菌は感染種子や周辺土壌からの土ぼこりなどでベッド内に持ち込まれて、ミツバの根に感染して発病すると考えられます。前作のミツバの被害残渣やパネル内に伸長した根に感染していた病原菌が最も重要な伝染源です。

5. 診断法

萎凋株の地際部を切断すると維管束が褐変しています。また根を検鏡して、分生子を確認することでも診断できます。

ネギ



図1-17 ネギ萎凋病の葉先枯れ症状



図1-18 ネギ萎凋病菌により褐変した根

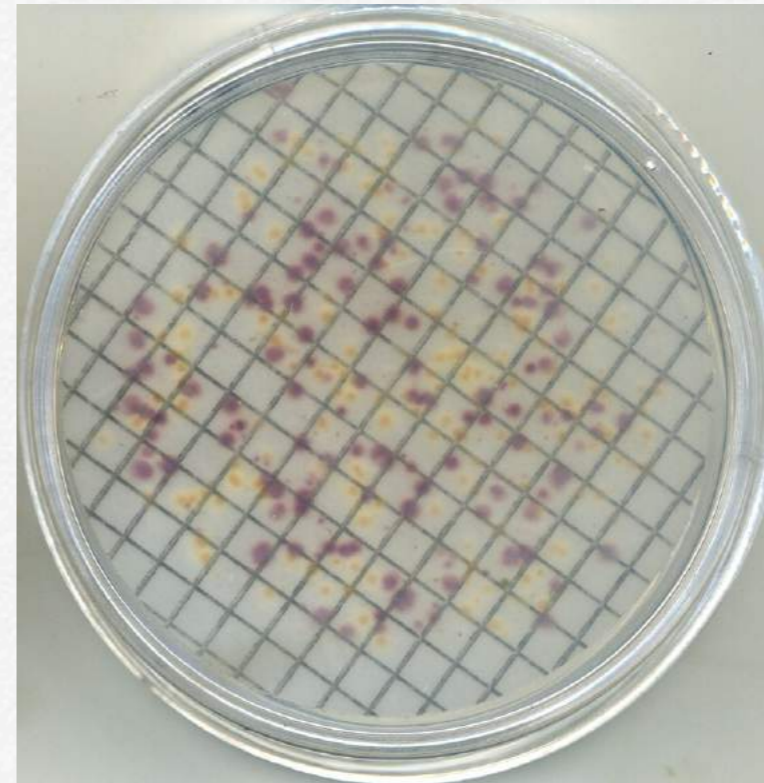


図1-19 ネギ萎凋病と根腐萎凋病の混発したほ場の培養液からメンブレン培養法（FoG2培地使用）を用いて分離した病原菌。
赤紫：ネギ萎凋病菌、
黄～橙：ネギ根腐萎凋病菌

1. 菌名 ・ 2. 病名

<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl f. sp. <i>cepae</i> (Hanzawa) W. C. Snyder & H. N. Hansen	ネギ萎凋病
<i>Fusarium redolens</i> Wollenweber	ネギ根腐萎凋病

3. 病徴

ともに地上部の生育が劣り、葉先枯れをおこす。両者の違いは、ネギ萎凋病の場合に茎盤部が褐変しますが、ネギ根腐萎凋病は根の褐変のみとなります。主に5月～10月に発生し、6月～9月の高温期に多発します。

4. 伝染

病原菌は感染種子や周辺土壌からの土ぼこりなどでベッド内に持ち込まれて、ネギの根に感染して発病すると考えられます。前作のネギの被害残渣やパネル内に伸長した根に感染していた病原菌が最も重要な伝染源です。

5. 診断法

萎凋したネギの根を検鏡して、分生子を確認することで診断できますが、ネギ萎凋病とネギ根腐萎凋病を区別するには根や培養液から病原菌を分離します。PSA培地またはFoG2培地（フザリウム選択培地）で培養すると、萎凋病菌は紫またはピンク～赤色コロニーを形成し、根腐萎凋病菌は黄～橙色のコロニーを形成することで診断できます。

リゾクトニア菌による病害

ミツバ



図1-20 ミツバ立枯病の育苗期被害

1. 菌名

Rhizoctonia solani J. G. Kühn

2. 病名

ミツバ立枯病

3. 病徴

育苗時より発生し、地際の葉柄から葉が水浸状に腐敗して枯れ上がり、表面上にクモの巣状の菌糸が確認できます。

4. 伝染

育苗期では感染種子により持ち込まれるものと考えられています。本圃では、苗による持込と前作のミツバの被害残渣やパネル内に伸長した根に感染していた病原菌が重要な伝染源になります。

5. 診断法

表面上にクモの巣状の菌糸が確認され、立枯症状がパッチ状に広がることから他病害と区別できます。顕微鏡で根を観察して、リゾクトニア属菌の特徴である主軸菌糸から直角に分岐する菌糸や分岐近くの隔壁、くびれが確認されると本病と診断できます（図1-21）。



図1-21 ミツバ立枯病菌の菌糸

ホウレンソウ



図1-22 ホウレンソウ株腐病の育苗期被害

1. 菌名

Rhizoctonia solani J. G. Kühn

2. 病名

ホウレンソウ株腐病

3. 病徴

幼苗期には、地際部の胚軸がくびれて黒褐色に腐敗します。被害はセルトレイ内で坪状に広がり、症状が進むと発病株は腐敗消失します。本圃では、はじめ日中に生気を失い下葉から次第に黄化し、症状が進むと地際部の葉柄は黒褐色に腐敗することが多くなります。被害は6月～9月の高温期に多くなります。

4. 伝染

病原菌は主に苗を通じてベッド内に持ち込まれます。前作の被害残渣やパネル内に伸長した根に感染した病原菌が最も重要な伝染源です。ピシウム菌による立枯病と異なり、培養液を介して全滅することはなく、同一ベンチ内でも散発的に被害が認められます。

5. 診断法

多湿時には発病株の地際部に白色綿毛状の菌糸が確認できます。ピシウム菌の場合にも菌糸が確認できますが、顕微鏡で菌糸を観察して隔壁がなければピシウム菌による立枯病、隔壁が

確認できる場合はリゾクトニアによる株腐病の可能性がります。その特徴である主軸菌糸から直角に分岐する菌糸や分岐近くの隔壁、くびれが確認されると本病と診断できます。

バラ



図1-23 バラ苗立枯病の下葉黄化症状



図1-24 バラ苗立枯病菌により黒褐変した苗の根

1. 菌名

Rhizoctonia solani J. G. Kühn AG-2-2 IIIB、AG4 HG-I
binucleate *Rhizoctonia* AG-G、AG-T、AG-U

2. 病名

バラ苗立枯病

3. 病徴

切花では主に定植後、株が50cm程度に生長した時に発病します。発病株は折り曲げたシュートから葉が黄化しはじめ、その後落葉します。この時、根は黒変しています。発病すると新しいシュートの発生が少なく、切り花シュートの立ちあがり貧弱となり収量が低下します。罹病株は徐々に衰弱して、夏には回復が見られますが、秋から再び衰弱し、枯死します。

4. 伝染

苗による持込や、前作の被害残渣から感染、定植後の飛び込みが重要な伝染源になります。

5. 診断法

根腐病と比較して根が黒色になる場合が多くなりますが、肉眼では診断が困難です。顕微鏡で根を観察して、リゾクトニア属菌の特徴である主軸菌糸から直角に分岐する菌糸や分岐近くの隔壁、くびれが確認されると本病と診断できます。

コレトリカム菌による病害

トマト



図1-25 トマト黒点根腐病菌により根に形成された小黑点（分生子層）

1. 菌名

Colletotrichum atramentarium (Berkeley et Broome) Taubenhous

2. 病名

トマト黒点根腐病

3. 病徴

下葉が黄化し、やがて全身に及びます。発病株の生育は遅れ、着果数が減ります。地上部は初め日中に茎頂部が萎凋し、夜間回復します。根は褐変、腐敗し、細根は脱落します。根部表面に多数の小黑点（分生子層）を作ります。

4. 伝染

被害残渣とともに栽培槽に残り、トマトが定植されると根から感染します。特に、液温が低く根の活性が弱まった時に感染しやすくなります。

5. 診断法

根部表面の小黑点を確認することで診断できます。

オルピディウム菌による被害

ホウレンソウ



図1-26 ホウレンソウオルピディウム症の根の褐変症状

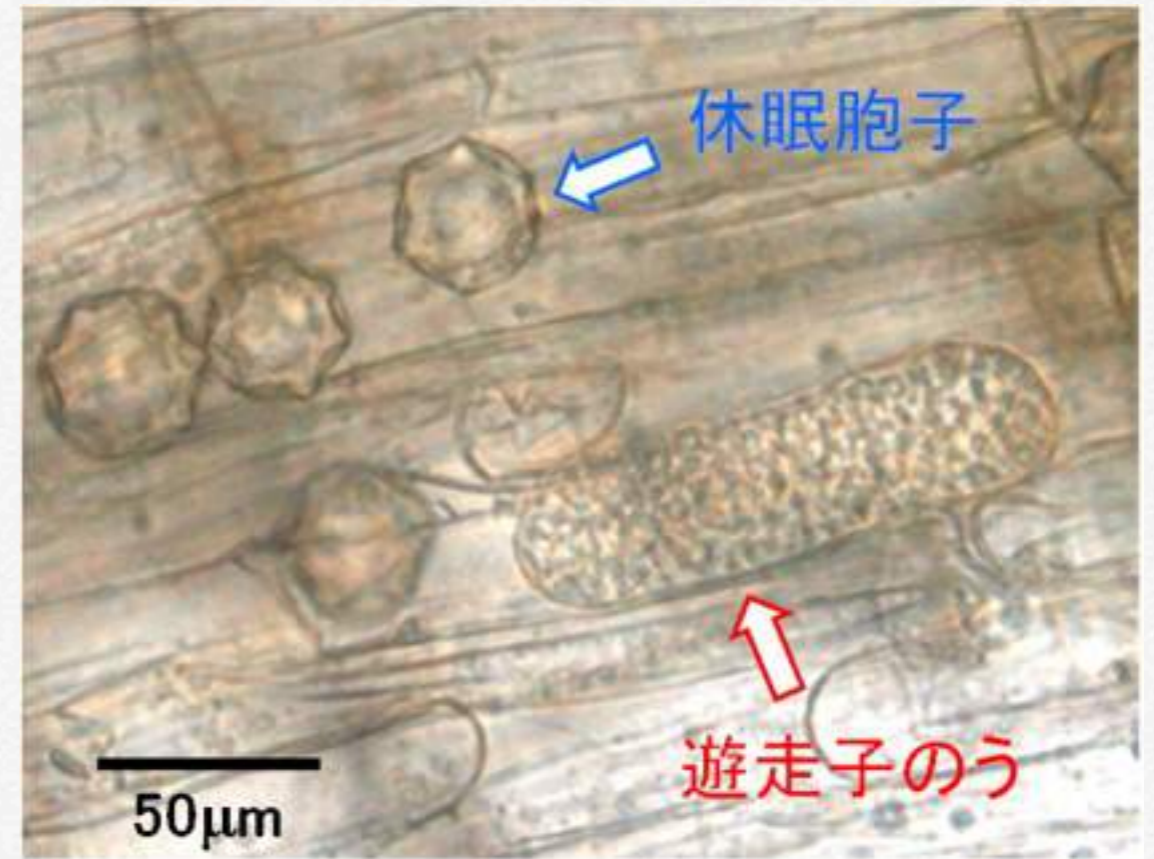


図1-27 オルピディウム菌によりホウレンソウ根に形成された休眠孢子と遊走子のう

1. 菌名

Ospidium birulentus (Sahtiy.) Karling

2. 病名

ホウレンソウオルピディウム症 (仮称)

3. 病徴

初めは一部の根が褐変し、健全な根と褐変した根が混在した状態になります。病勢が進むと根部が均一に黒変し、地上部の生育遅延や萎れが見られ、枯死に至ることがあります。

4. 伝染

病原菌は原水や苗、周辺土壌からの土ぼこりなどでベッド内に持ち込まれます。前作の被害残渣やパネル内で伸長した感染根にいる病原菌が最も重要な伝染源です。

5. 診断法

褐変した根を検鏡して、休眠胞子を確認することで診断できます。

青枯病菌による病害

トマト



図1-28 トマト青枯病の萎凋症状



図1-29 トマト青枯病菌による導管の褐変



図1-30 トマト地際部を水浸し確認された青枯病菌の菌泥

1. 菌名

Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta and Nishiushi 1996

2. 病名

トマト青枯病

3. 病徴

初期は、日中に萎れ、夜間や雨の日などに回復します。やがて、株全体が萎凋し、青枯症状となります。

4. 伝染

被害残渣とともに栽培槽に残り、トマトが定植されると根から感染します。また、用水を伝っても運ばれます。液温が30℃以上の高温時に発生しやすいです。

5. 診断法

萎れが進んだ株では、地際部の茎の導管が褐変しています。また、この部分の切り口を水中に入れて静置すると、青枯病菌の菌泥が、白色のすじ状となって流れてきます。病徴と、これら青枯病特有の症状から診断できます。

ピシウム菌について



高温性ピシウム菌の伝染環から種の見分け方について紹介します。セクション1では、ピシウム菌について、セクション2では、高温性ピシウム菌について紹介します。

ピシウム菌とは

1. ピシウム菌の特徴

ピシウム菌による病気の発生の特徴は、水との関連です。湿潤条件を大変好み、水中で胞子のうから形成された球のう中に遊走子を多数形成し、水により伝播します（図2-1）。また、放出された遊走子は、根から浸出する糖やアミノ酸に反応して根の周辺に集まります（図2-2）。

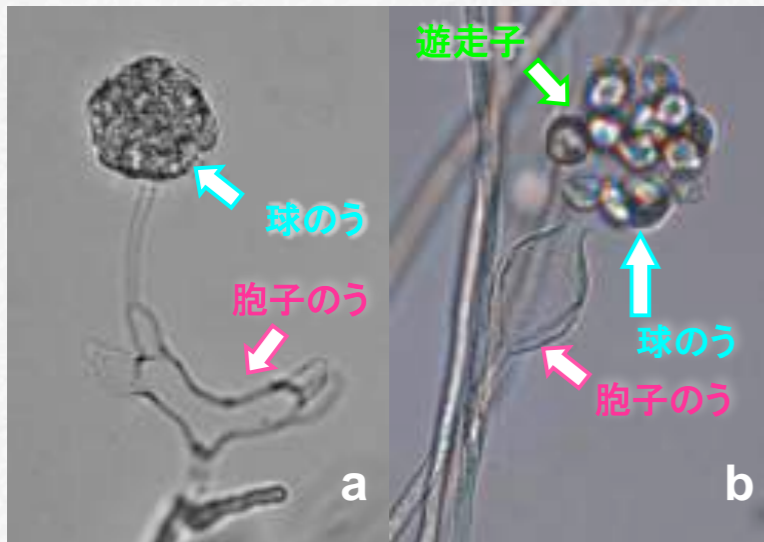


図2-1 胞子のうから形成された *P. aphanidermatum* の球のう (a) および球のう中に形成された *P. helicoides* の遊走子 (b)



図2-2 ポインセチア根の先端に集まる *P. myriotylum* の遊走子

この性質から養液栽培では短時間で急速に拡散し、重大な被害をもたらします。根や地際部の病徴は、水浸状で褐色に腐敗するのが特徴です。発病が進みすぎると植物組織全体が黒くなってしまいますので、診断には気をつける必要があります。病斑部をピンセットで薄く剥いでプレパラートを作って200倍程度で

顕微鏡観察すると、染色することなく比較的幅広の無隔壁菌糸が観察できます（図2-3）。

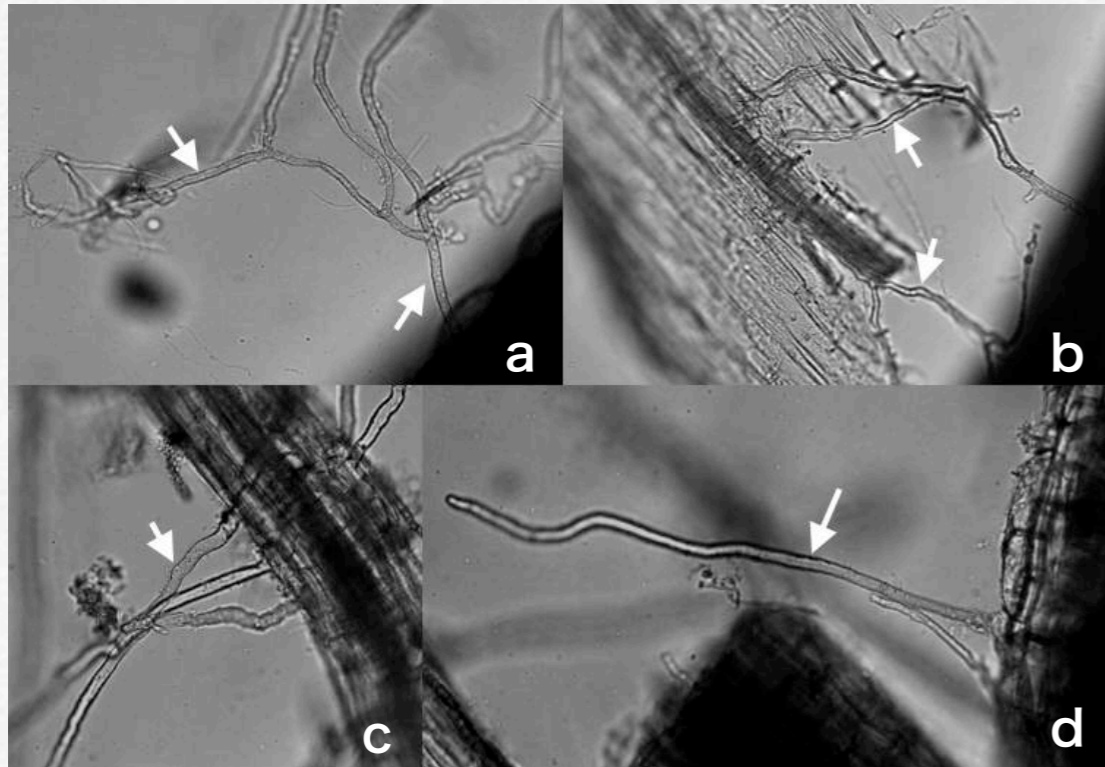


図2-3 *P. aphanidermatum* によるベントグラス赤焼病発病株の観察（200倍） a, b: 根の組織から外に生えだした菌糸; c, d: 根毛

無隔壁菌糸は、植物の根毛と似ていますが（図2-3c, d）、根毛は分岐しないこと、基部は根の表皮細胞から分化していることから区別できます（図2-3a, b）。また、卵胞子が表皮細胞中に観察される場合もあります（図2-4）。

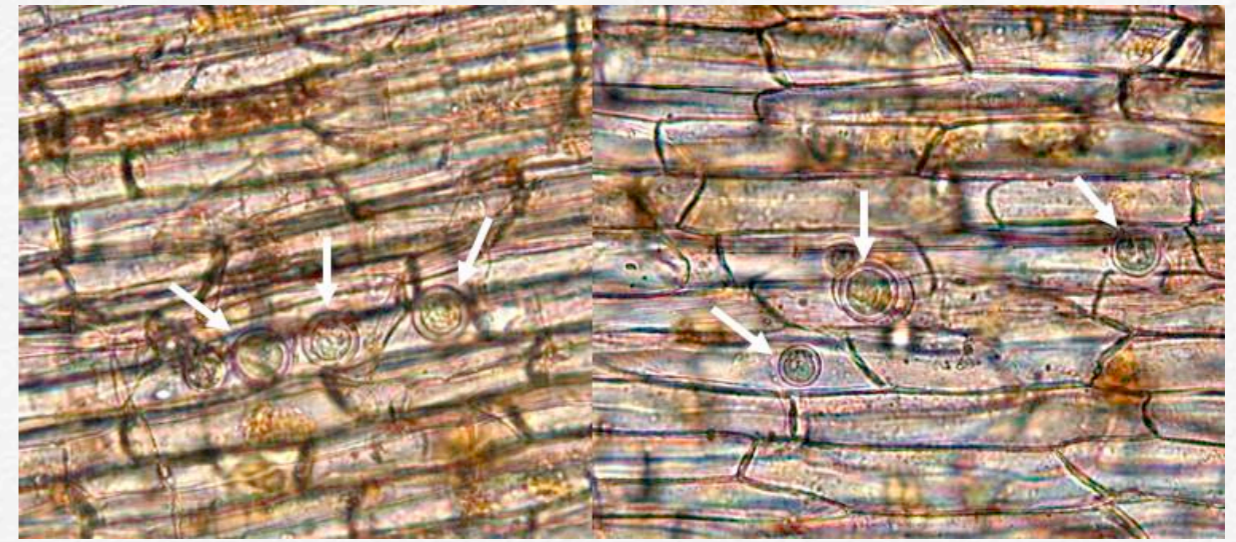


図2-4 *P. aphanidermatum* によるポインセチア根腐病発病株の観察（200倍） 矢印: 根の表皮細胞に形成された卵胞子

病斑部を水の入ったシャーレに1日水に浮かべておくと菌糸や胞子のう、遊走子が観察できます。

2. ピシウム菌の一生（生活環）

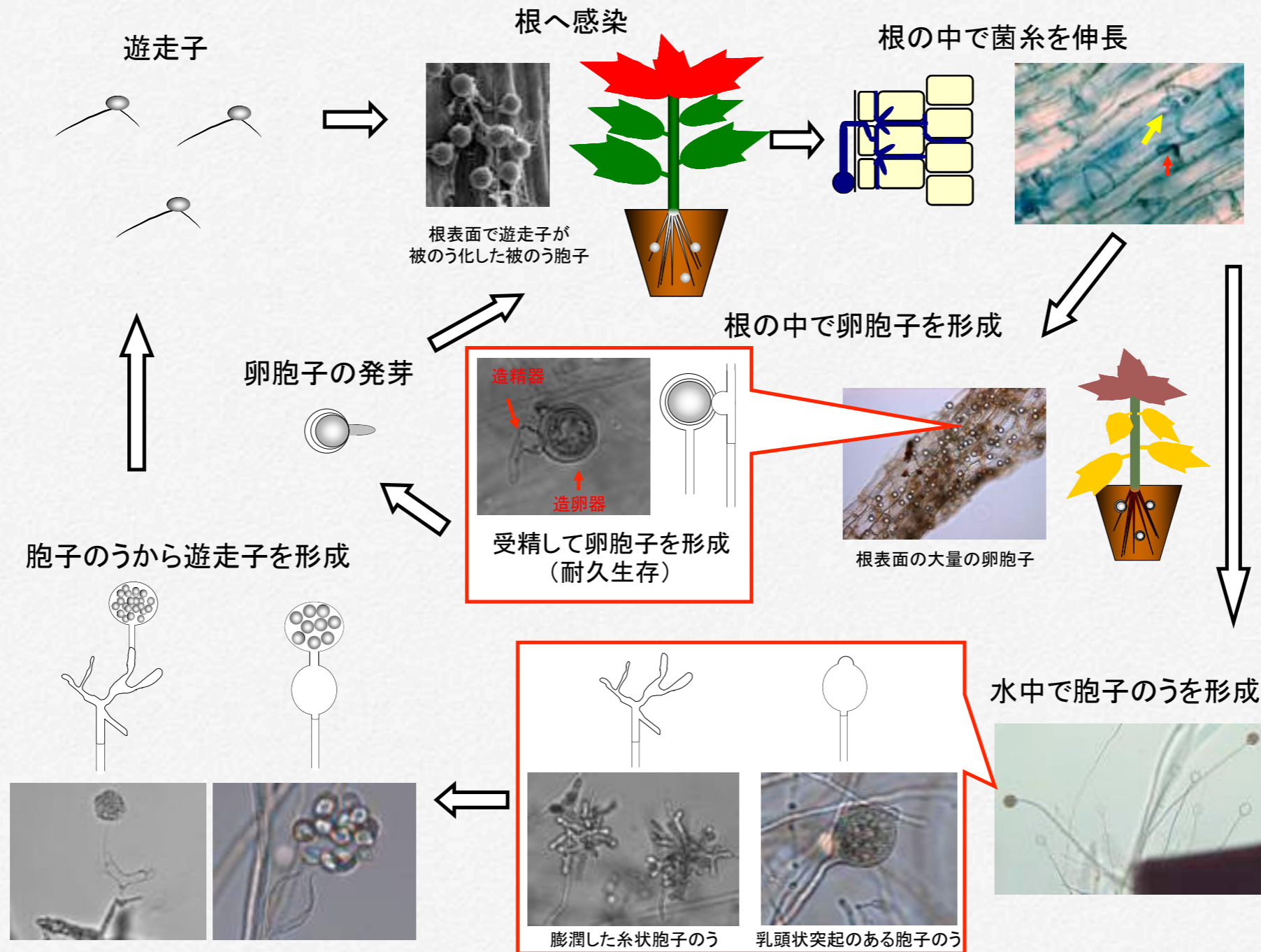


図2-4 ピシウム菌の生活環

高温性ピシウム菌 とは

項目

1. 高温性ピシウム菌とは
2. 培養性質
3. 繁殖器官の観察法
4. ピシウム菌の分類に用いる器官
5. 高温性ピシウム菌の形態

1. 高温性ピシウム菌とは

38°Cで生育できるピシウム菌を高温性ピシウム菌と呼んでいます（図2-5）。高温性ピシウム菌による病害は多数報告されています（表2-1）。本マニュアルでは、*P. aphanidermatum*、*P. helicoides*、*P. myriotylum* を高温性ピシウム菌としています。

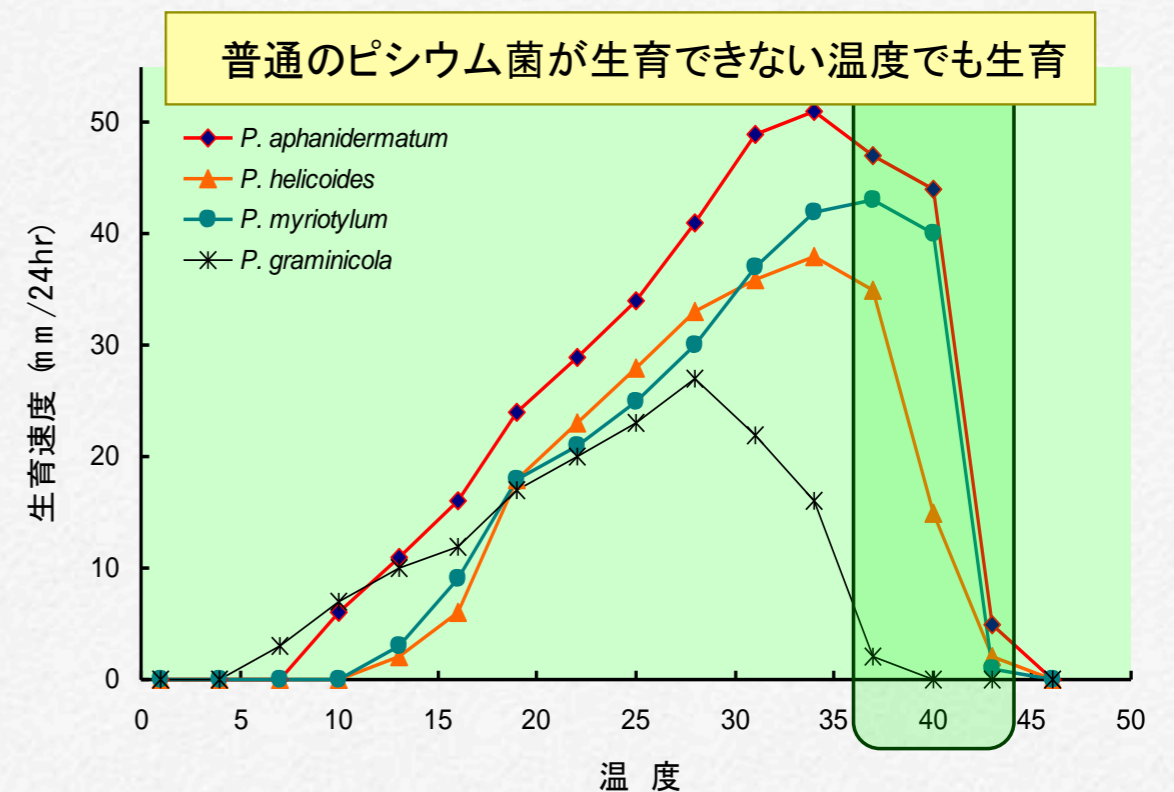


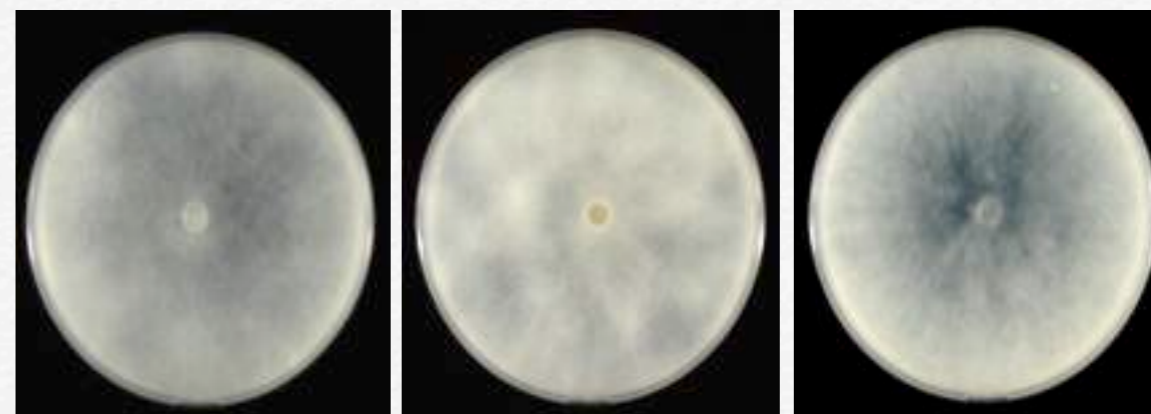
図2-5 高温性ピシウム菌の温度別菌糸生育速度

表2-1 1996年以降に報告された高温性ピシウム菌による病害一覧

宿主	病名	発生県	栽培法
<i>Pythium aphanidermatum</i>			
キャベツ	ピシウム腐敗病	香川	森 充隆ら (1996) : 関東病虫研報 43: 63.
トリトマ	苗立枯病	三重	庄内玲子ら (1999) : 関西病虫研報 41: 67~68.
アルストロメリア	根茎腐敗病	東京	鉢物 竹内 純・堀江博道 (1999) : 日植病報 65: 410.
オユコ	腰折病	香川	富岡啓介ら (2000) : 日植病報 66: 301.
スイカ	綿腐病	三重	窪田昌春・我孫子和雄 (2000) : 関西病虫研報 42: 89~90.
スイートピー	立枯病	宮崎	松浦 明ら (2001) : 日植病報 67: 162.
ウルクス	腰折病	香川	Tomioka, K. et al. (2002) : J. Gen. Plant Pathol. 68:189~190.
デルフィニウム	苗立枯病	宮崎	鉢物 泥谷公子ら (2002) : 日植病報 68:186.
タイサイ類(チンゲンサイ)	ピシウム腐敗病	岡山	谷名光治ら (2002) : 日植病報 68:187.
ハクサイ	ピシウム腐敗病	茨城	重松辰郎ら (2005) : 日植病報 71: 211.
マツバギク	ピシウム腐敗病	静岡	河原崎秀志ら (2005) : 日植病報 71: 210.
ツルムラサキ	腐敗病	徳島	東條元昭ら (2006) : 日植病報 72: 206.
ヘニバナインゲン	綿腐病	茨城	青木一美ら (2007) : 日植病報 73:182.
ポインセチア	根腐病	岐阜	鉢物 渡辺秀樹ら (2008) : 日植病報 74: 178.
キク	ピシウム立枯病	鹿児島	築尾嘉章ら (2008) : 日植病報 74:177
センニチコウ	立枯病	福岡県	梶谷祐二ら (2009) : 九州病虫研報 55:186
カンゾウ	苗立枯病	鹿児島	鉢物 景山幸二ら (2012) : 日植病報 78: 184.
<hr/>			
宿主	病名	発生県	栽培法
<i>Pythium helicoides</i>			
バラ類	根腐病	岐阜	鉢物 景山幸二ら (1998) : 日植病報 64: 629.
カラコエ	根腐病	岐阜	鉢物 渡辺秀樹ら (2002) : 日植病報 68: 77.
キウイフルーツ	根腐病	愛媛	清水伸一ら (2005) : 日植病報 71: 210.
イチゴ	ピシウム根腐病	静岡	鈴木幹彦ら (2005) : 日植病報 71: 209.
キク	根腐病	香川	Tsukiboshi et al. (2007) : J Gen Plant Path 73:293~296.
エリカ類 (スズランエリカ)	根腐病	山梨	鉢物 舟久保太一ら (2009) : 日植病報 75:186.
ペゴニア	根腐病	岐阜	鉢物 宮崎暁喜ら (2009) : 関西病虫研報 51: 53.
ガーベラ	ピシウム根腐病	静岡	鉢物 鈴木幹彦ら (2009) : 日植病報 75: 237.
アルストロメリア	根茎腐敗病	山形	鉢物 菅原 敬ら (2010) : 日植病報 76: 44.
ポインセチア	根腐病	岐阜	鉢物 三宅律幸ら (2012) : 日植病報 78: 183.
<hr/>			
宿主	病名	発生県	栽培法
<i>Pythium myriotylum</i>			
スイートピー	立枯病	宮崎	松浦 明ら (2001) : 日植病報 67: 162.
ベルゲランツス	腐敗病	香川	鉢物 富岡啓介・佐藤豊三 (2001) : 日植病報 67: 162.
シュンギク	立枯病	大阪	水耕 瓦谷光男ら (2002) : 日植病報 68: 313~317.
カラコエ	根腐病	岐阜	鉢物 渡辺秀樹ら (2002) : 日植病報 68:77.
アズキ	ピシウム苗立枯病	北海道	岡田 貴ら (2003) : 日植病報 69: 75.
インゲンマメ	苗立枯病	北海道	的場百合香ら (2004) : 日植病報 70: 214.
ヘニバナインゲン	茎根腐病	茨城	渡邊 健・東條元昭 (2006) : 日植病報 72: 52.
ムラサキオモト	株腐病	静岡	鉢物 鈴木幹彦ら (2008) : 関東病虫研報 55: 85.
クルクマ	立枯病	静岡	鈴木幹彦ら (2008) : 日植病報 74: 178.
ネメシア	立枯病	福岡	鉢物 梶谷祐二・景山幸二 (2008) : 日植病報 74: 27.
パチュニア	立枯病	大阪	岡田清嗣ら (2008) : 日植病報 74: 177.
カーネーション	根腐病	千葉	植松清次ら (2008) : 関東病虫研報 55: 191.
ナス	根腐病	大阪	水耕 岡田清嗣ら (2009) : 関西病虫研報 51: 69.
ブーバルジア	根腐病	東京	鉢物 竹内 純ら (2009) : 日植病報 75: 51.
アルストロメリア	根茎腐敗病	山形	鉢物 菅原 敬ら (2010) : 日植病報 76: 44.
ウツギ	立枯病	愛知	鉢物 三宅律幸ら (2010) : 日植病報 76: 65.
キョウオウ (春ウコン)	立枯病	東京都	小野剛ら (2011) : 関東病虫研報 58: 61.
ポインセチア	根腐病	愛知	鉢物 三宅律幸ら (2012) : 日植病報 78: 183.
カンゾウ	苗立枯病	鹿児島	鉢物 景山幸二ら (2012) : 日植病報 78: 184.

2. 培養性質

高温性ピシウム菌は培地上では生育旺盛で多くの気中菌糸を形成します (図2-6)。



P. aphanidermatum

P. helicoides

P. myriotylum

図2-6 高温性ピシウム菌の菌叢

3. 繁殖器官の観察法

1) ピシウム菌選択培地 (NARM培地: 第3章セクション1) に出現したピシウム菌をNARM培地に移植し、25°Cで24時間培養します (図2-7)。

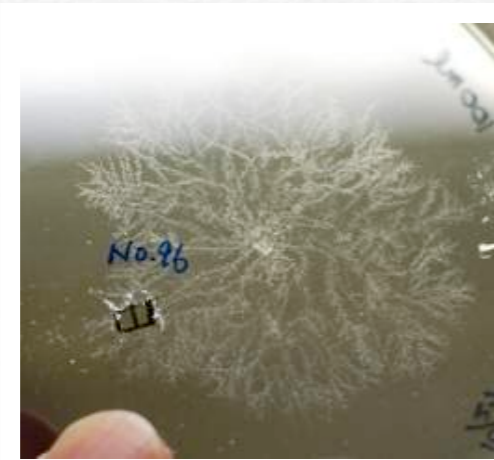


図2-7 単菌糸分離したコロニー（培養24時間後）

2) 形状によりコロニーをグルーピングし、代表コロニーを菌株として保存し、以下の形態観察に用います（図2-8）。

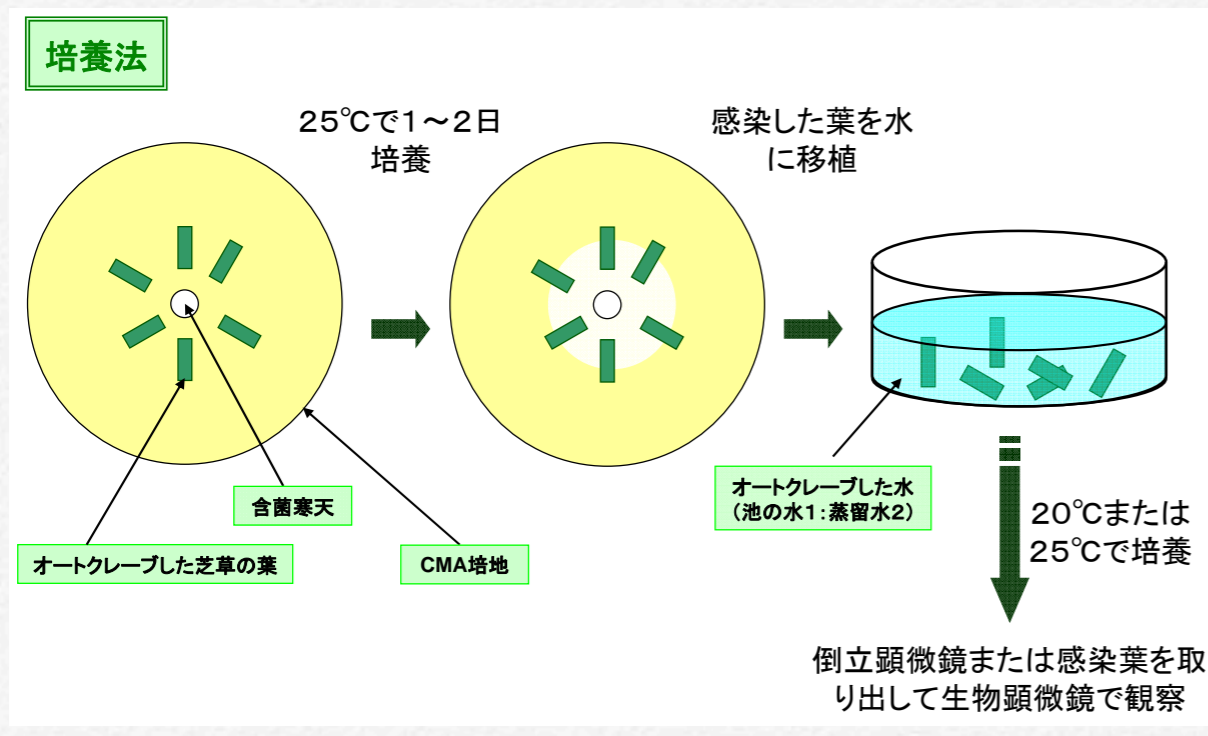


図2-8 芝を用いたピシウム菌形態観察法

3) 1 cm程度の芝草（オートクレーブ済）2~4片をCMA培地（原料：乾燥トウモロコシ）に放射線状に配置し、中心に菌を置床し25°Cで培養します（図2-9）。

4) 3~4日後、24ウェルプレート（IWAKI 3820-024等）にオートクレーブした水（池の水1：蒸留水2）0.6 mLを入れ、菌の感染した芝草を1~2片浮かべます（図2-10）。



図2-9 芝草への菌感染（培養4日後）

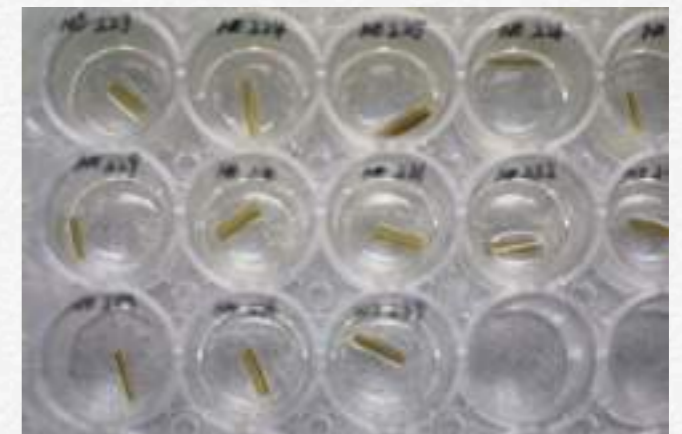


図2-10 24ウェルプレートに浮かべた芝片



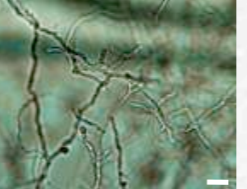

5) 25°C（必要に応じて20°C）で培養し、倒立顕微鏡でウェルプレートのまま観察するか、感染葉を取り出しスライドガラスにのせて光学顕微鏡で観察します。

6) 無性繁殖器官（胞子のう）、有性繁殖器官（造卵器、造精器、卵孢子）の特徴から、高温性ピシウム菌（*P. aphanidermatum*、*P. myriotylum*、*P. helicoides*）の種を特定します。

4. ピシウム菌の分類に用いる器官

ピシウム菌の種の分類は、無性繁殖器官および有性繁殖器官を形成させ、それを顕微鏡で観察することで行います。以下に特徴的な繁殖器官を紹介します。

(1) 無性繁殖器官： 胞子のう

球形	乳頭状突起のある球形	糸状	膨状、耳たぶ状
			
Bars=20μm	Bars=20μm	Bars=20μm	Bars=20μm
<i>P. ultimum</i> <i>P. vexans</i> etc.	<i>P. helicoides</i> <i>P. oedoehilum</i> <i>P. graminicola</i> etc.	<i>P. dissotocum</i> <i>P. monospermum</i> <i>P. perniciosum</i> etc.	<i>P. aphanidermatum</i> <i>P. arrhenomanes</i> <i>P. graminicola</i> <i>P. myriotylum</i> <i>P. torulosum</i> etc.

※赤字は高温性ピシウム菌 以下同様

(2) 有性繁殖器官： 造精器

造精器

同菌糸性



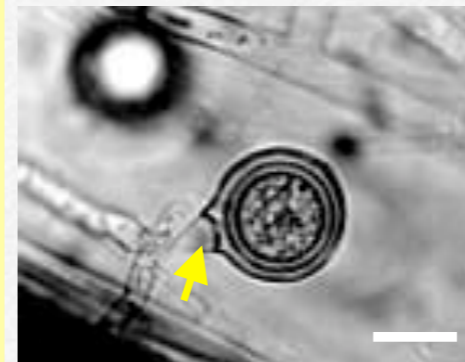
P. aphanidermatum
P. irregulare
etc.

異菌糸性



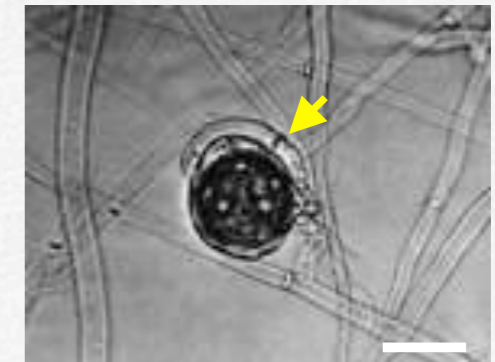
P. aphanidermatum
P. myriotylum
etc.

直下性



P. hydnosporum
P. hypogynum
etc.

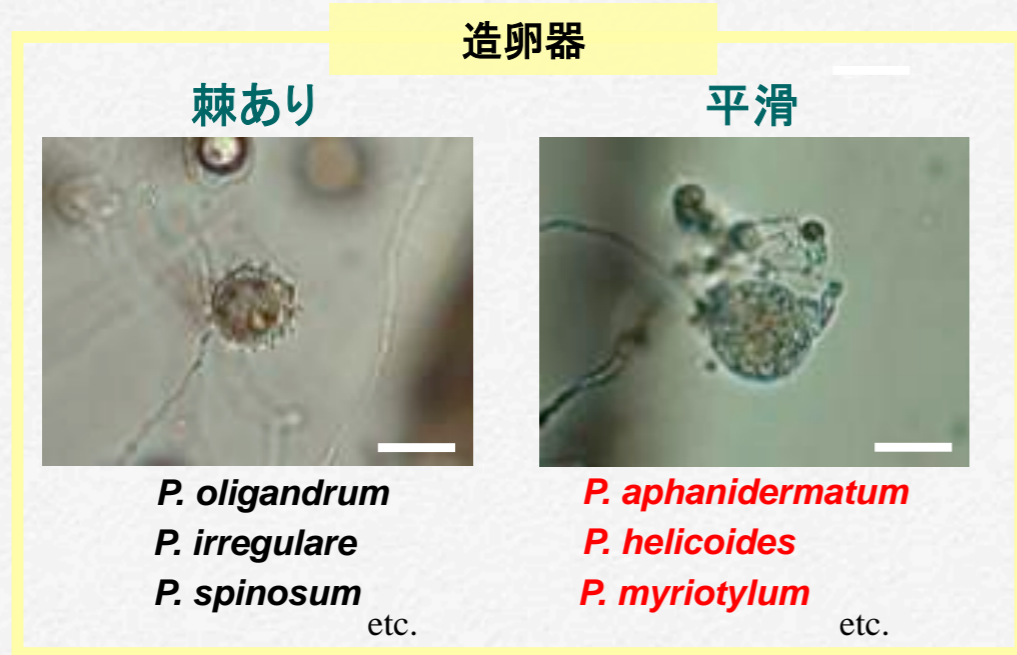
長い造精器



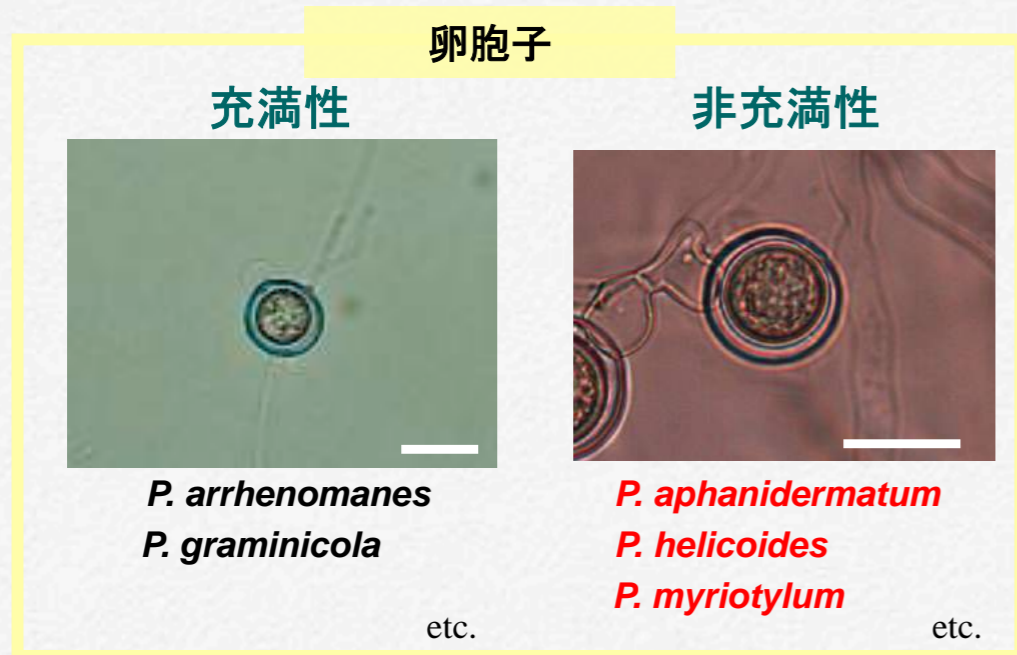
P. helicoides
P. oedoehilum
etc.

Bars=20μm

(3) 有性繁殖器官： 造卵器

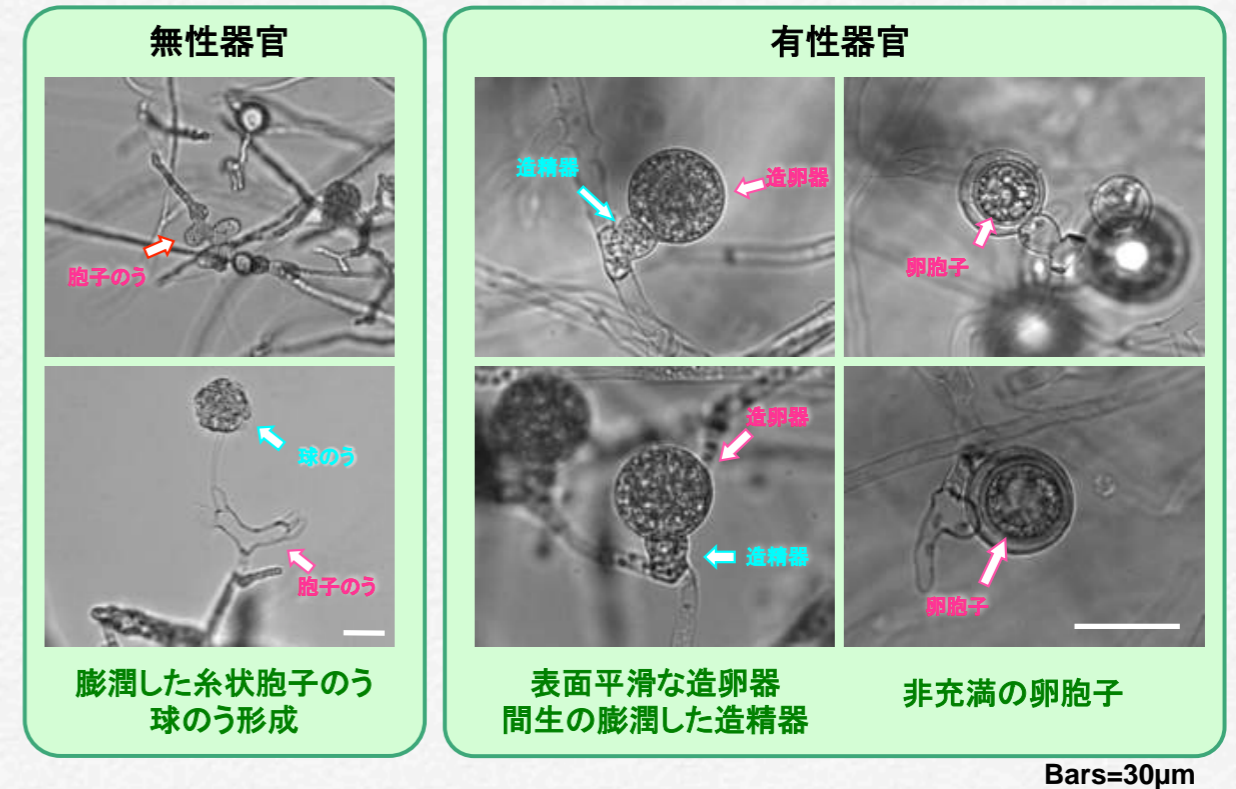


(4) 有性繁殖器官： 卵胞子



5. 高温性ピシウム菌の形態

(1) *Pythium aphanidermatum*

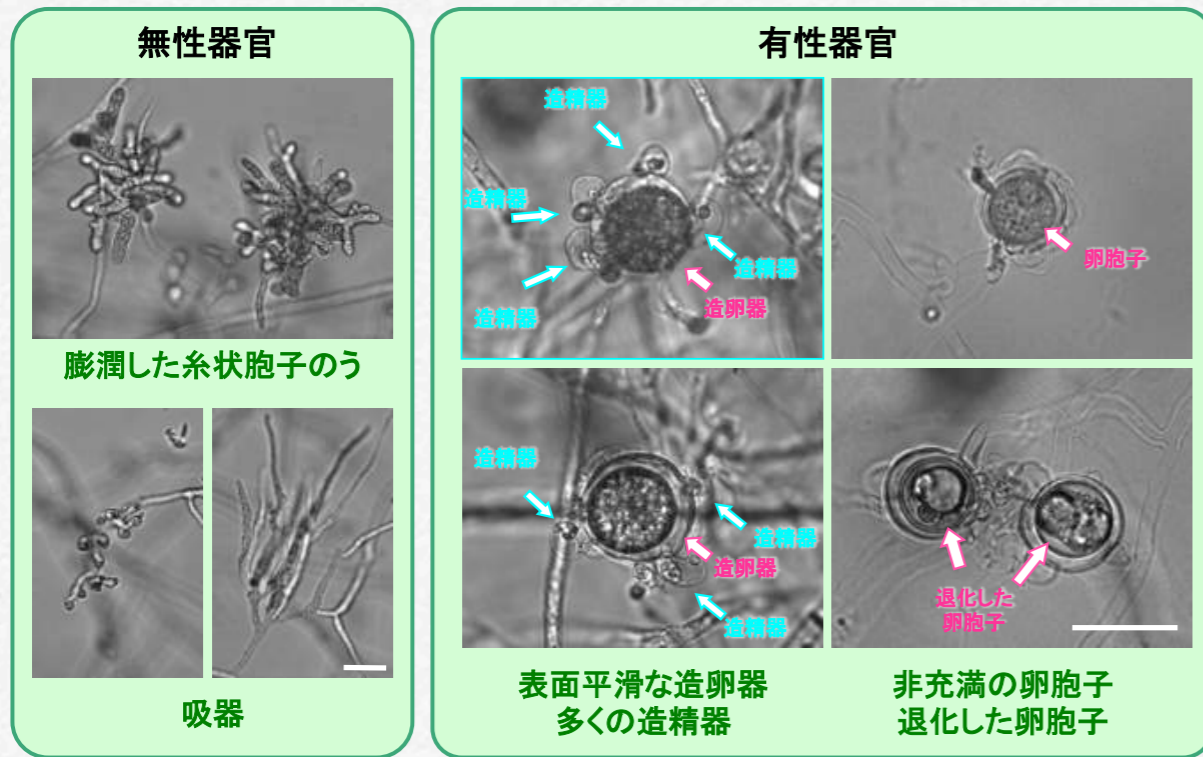


本菌は、古くから知られており、養液栽培だけでなく土耕栽培においても多くの植物で苗立枯れや根腐れを引き起こす病原菌としてピシウム菌の中でも重要な病原菌です。

伝染方法は、水だけでなく土でも伝染します。本菌は施設周辺の土にも生息しており、土とともに施設内に持ち込まれる可能性があり、注意が必要です。本菌は菌糸が膨潤した胞子のうを形成してそこから遊走子を放出します。また、宿主の栄養を

吸い尽くすと、造精器と造卵器ができ、受精して耐久性の卵胞子をつくって次の植物がくるまで土の中でじっとしています。

(2) *Pythium myriotylum*

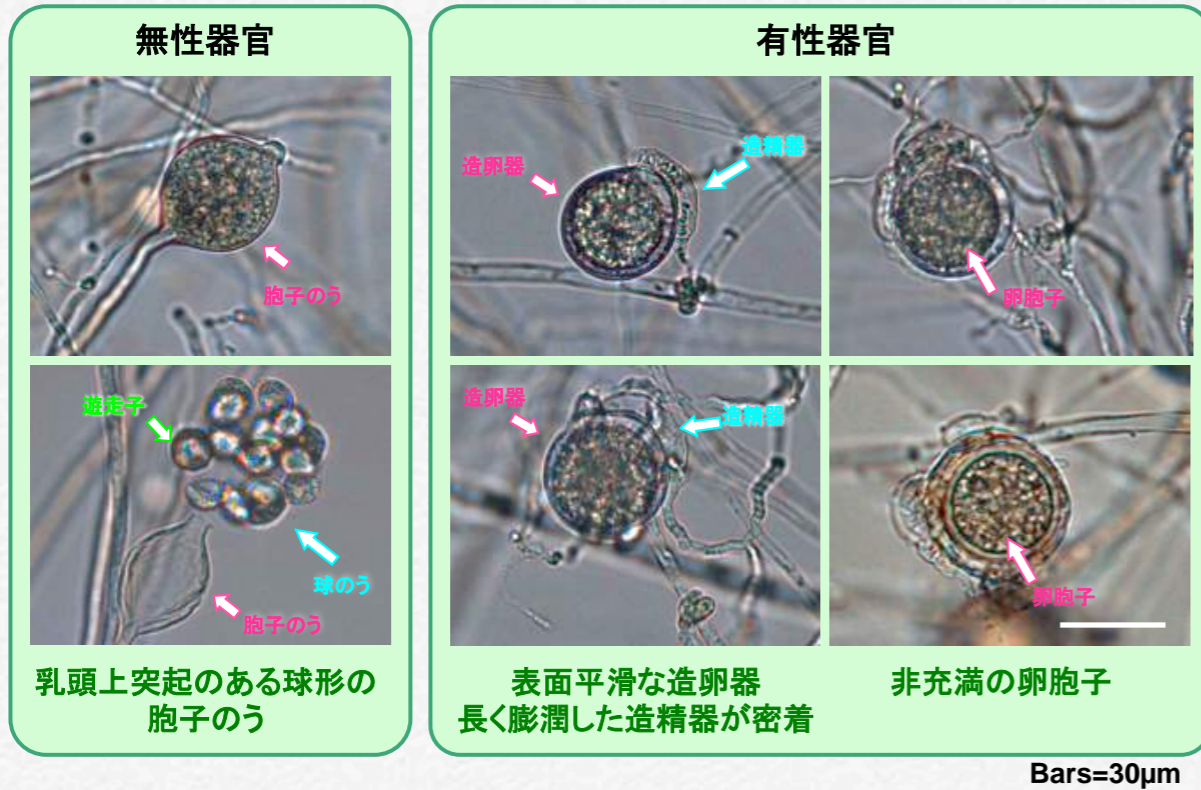


本菌も養液栽培だけでなく土耕栽培でも苗立枯れや根腐れを引き起こします。特に最近、ポインセチア、アルストロメリア等の花き類やキョウオウやカンゾウなどの薬草類での病害の報告が多くなってきています。伝染方法は、*P. aphanidermatum*と同様、水だけでなく土でも伝染します。土の中では10年以上

も生存し続けるとの報告があり、いったん持ち込むと完全に除去しない限り、しつこく残っています。この性質が、連作障害の原因菌としても報告があることに関係しているかもしれません。さらには、河川水や用水にも見つかっており、これらを使った養液栽培では要注意です。

本菌も菌糸が膨潤した胞子のうを形成してそこから遊走子を放出します。また、宿主の栄養を吸い尽くすと、造精器と造卵器ができ、受精して耐久性の卵胞子をつくって次の植物がくるまで土の中でじっとしています。

(3) *Pythium helicoides*



本菌も養液栽培だけでなく土耕栽培でも苗立枯れや根腐れを引き起こします。この菌は日本では比較的最近に見つかった菌で、1996年にミニバラの根腐病を引き起こす菌として報告されました。それ以来、ポインセチア、バラを含む花き類で次々に報告されています。まさに、地球温暖化とともに病気を起こすようになった菌のように思われます。

伝染方法は、他の菌と同様、水だけでなく土でも伝染します。河川水や用水にも見つかることから、土だけでなく水から施設内に持ち込まれることに注意しないといけません。

本菌は、楕円の孢子のうを形成して多くの遊走子を放出します。また、宿主の栄養を吸い尽くすと、造精子と造卵器ができ、受精して耐久性の卵孢子をつくらせて次の植物がくるまで土の中でじっとしています。

(4) まとめ

- 1) 高温で生育可能 → 38°C培養で選択的に分離可能
- 2) 菌糸伸長速い → 38°C培養で30 mm以上 / 24時間生育

※ 高温性+高速伸長は、上記3種と *P. deliense* が知られています。

※ 乳頭状突起のある孢子のうが疫病菌に似ていますが、遊走子形成を球のう内で発達させるのが *P. helicoides* です。

※ 3種とも水だけでなく土でも伝染します。施設への侵入についてはこれら両面から注意が必要です。

※ 3種とも遊走子放出の最適温度は生育最適温度より低いことから、注意が必要なのは高温期だけではありません。

高温性ピシウム菌の 簡易検出法



ベイト法やメンブレン法などを組み合わせ、効率的に集菌できる検出法を紹介します（セクション1）。

また、LAMP法による簡易検出法を紹介します（セクション2）。

さらに、リアルタイムPCRによる定量法についても紹介します（セクション3）。

ベイト法・メンブレン法によるピシウム菌の検出方法

項目

1. ベイト法

植物の種子、葉、果実などの餌（ベイト）を土壌や水に一定期間設置してピシウム菌を捕捉する方法で、ピシウム菌の分離によく使用されます。

2. メンブレン法

原水や培養液等をメンブレンフィルターでろ過して、ピシウム菌の遊走子などをフィルター上に捕捉する方法です。

1. ベイト法

(1) ベイト法のしくみ

ピシウム菌は多くの種が、胞子の1種である遊走子を水中で多量に形成します。遊走子は2本のべん毛を持ち、水中に放出されると、自ら泳ぎながら、植物の種子が発芽したり、根を伸長させたりする際に出る糖分やアミノ酸を認識して、植物にたどり着き感染します（走化性、図3-1）。ベイト法は、遊走子の走化性を利用した方法で、植物の種子、葉、果実などの餌（ベイト）を土壌や水に一定期間設置してピシウム菌を捕捉する方法です（図3-2）。



図3-1 ポインセチア根の先端に集まる *P. myriotylum* の遊走子

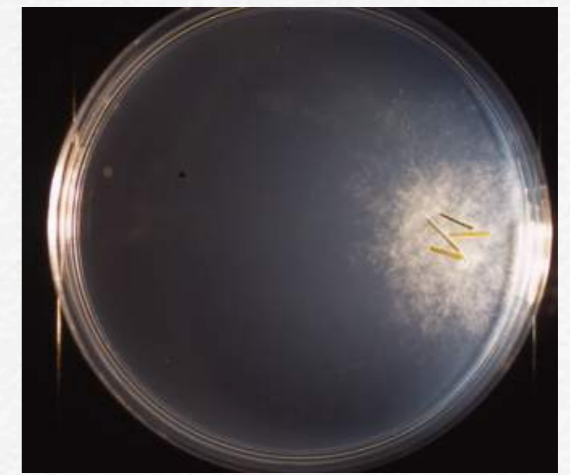


図3-2 ベントグラス葉に捕捉されたピシウム菌

(2) ベイト法の特徴

ベイト法は、特別な機材を必要とせず、非常に簡便な方法です。エゴマトラップを現地の培養液等に設置し、数日後（3日程度）に回収してピシウム菌が捕捉されているかどうかを、LAMP法あるいは選択培地を使用して確認します。このため、設置してから結果が出るまでに3～5日が必要になります。培養液だけではなく、土壌からの検出にも利用できます。

(3) エゴマトラップの作り方

ここでは、取り扱いが容易なエゴマ種子を利用したエゴマトラップの作り方を紹介します。

準備するもの

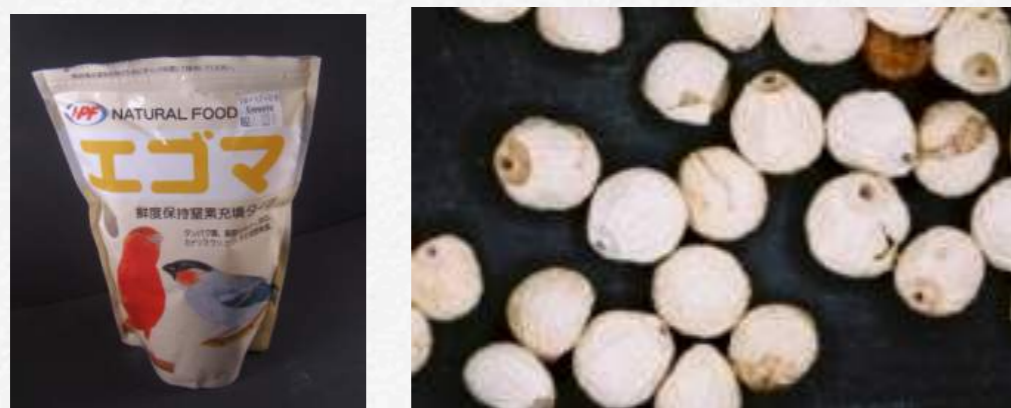


図3-3 エゴマ種子

表3-1 エゴマトラップの準備するもの一覧

No	準備物	備考
1	エゴマ種子	小鳥用のエサ、ホームセンター等で購入できます
2	お茶パック	95 × 70 mm 程度のもの
3	クリップ	特大サイズ
4	ビニルひも	幅 6 mm 程度の荷造りひもがよい
5	ホッチキス	

作り方

1) エゴマ種子の滅菌

エゴマ種子を電子レンジまたはオートクレーブで滅菌します。電子レンジの場合は、600 Wで5分間の処理により滅菌可能です。オートクレーブがある場合は、お茶パックに詰め、重り、ひも付けを行い、アルミホイルで包んでから滅菌しておくのが便利です。

2) 滅菌エゴマ種子のお茶パック詰め

お茶パックに滅菌エゴマ種子を50粒入れます（図3-4）。

<簡単な計量の例>

シャープペンシルの消しゴムキャップ（写真の商品）にエゴマ種子を満杯に入ると大体50粒になります。他にも身近なモノで試してみてください。



図3-4 三菱鉛筆(株) VERYシャ楽 M5-100Z

3) 重り付け

滅菌エゴマ種子を入れたお茶パックに、重りとしてクリップをつけることで、水中に沈みやすくします（図3-5）。

4) ひも付け

クリップを付けたお茶パックに、ビニルひもをホッチキスで留めます（図3-5）。

※ひもの長さは、使用する場所によって適宜調節します。

※大きな培養液タンク等の場合は、複数のエゴマトラップを設置することをお勧めします（図3-6）。



図3-5 完成したエゴマトラップ



図3-6 3連のエゴマトラップ

（4）設置場所

1) 鉢物（エブ・アンド・フロー方式）の場合

【栽培開始前の安全性診断】

鉢上げ用の培養土に高温性ピシウム菌が混入していないかを確認したり、洗浄後の栽培ベンチの清浄度を確認したりすることができます。

○培養土

土を複数個所からサンプリングし、広口ボトル（1L程度）に体積比で2倍量程度の水道水とエゴマトラップとともに入れ、夏期は日陰の涼しい場所に置きます（図3-8）。実験室等

では、20～25℃で培養します。培養土に肥料が混和されている場合は、希釈水量を多くすると検出感度の低下を抑制できます（EC 0.5 dS / m以下が目安）。



図3-7 鉢上げ用の培養土



図3-8 培養土からの検出の様子

○資材

適当な大きさの清浄な容器に水道水を張り、資材とエゴマトラップを入れます（図3-10）。夏期は日陰の涼しい場所に置きます。



図3-9 再利用される資材は要注意



図3-10 資材からの検出の様子

○洗浄後のベンチ

洗浄後のベンチの排水口を塞ぎ、エゴマトラップを設置して水を溜めます（図3-12）。



図3-11 ベンチの洗浄作業



図3-12 ベンチの排水口に設置

【栽培中の安全性診断】

エゴマトラップを培養液の循環タンクに設置し、系統全体について高温性ピシウム菌の有無をチェックします（図3-13）。エゴマトラップのヒモの長さを調節し、タンク内の底に近いところに設置します。また、必要に応じて、複数のプールベンチの排水集積場所や、ベンチごとの排水口に設置することにより、ブロック単位、ベンチ単位のチェックも可能です（図3-14, 15）。



図3-13 循環タンクへの設置



図3-14 ベンチ排水口への設置



図3-15 複数のベンチの排水集積場所への設置

【病害発生時の要因診断】

病害が発生した場合、まず罹病植物を良く観察し、ピシウム病の可能性がある場合は、植物体から直接LAMP法で診断します（第3章セクション2）。原因が高温性ピシウム菌であった場

合、同一ロットの未使用培養土や資材などを調査して伝染源を推定します。

2) NFT方式、DFT方式、ロックウール方式等の場合

【栽培開始前、開始時の安全性診断】

栽培システムを洗浄、殺菌して栽培を開始する前に循環培養液にエゴマトラップを設置して、高温性ピシウム菌の有無をチェックします（図3-17）。土壌や資材については「1) 鉢物（エブ・アンド・フロー方式）の場合」を参照してください。



図3-16 システムを洗浄・殺菌



図3-17 循環タンク内に設置

【栽培中の安全性診断】

培養液の循環タンクに設置し、系統全体について高温性ピシウム菌の有無をチェックします（図3-18, 19）。また、原水タンクや育苗用の循環タンクがある場合は、これらについても定期的に安全性を診断します（図3-20, 21, 22）。



図3-18 循環タンク内に設置（煉瓦を入れて流されにくくしている例）

図3-19 各系統の循環タンク内に設置

タンク内の流速が速い場所では、トラップが流されることがあります。そのような場合には煉瓦等を入れた洗濯ネットの中に設置しましょう。



図3-20 原水タンク内に設置



図3-21 栽培ベッド内に設置



図3-22 育苗用循環タンク内に設置

【病害発生時の要因診断】

病害が発生した場合、まず罹病植物を良く観察し、ピシウム病の可能性がある場合は、植物体から直接LAMP法で診断します（第3章セクション2）。原因が高温性ピシウム菌であった場合、システムを洗浄、殺菌して栽培開始前に、前述のとおり安全性を診断します。

(5) エゴマトラップの設置期間について

エゴマトラップを設置したら、3～7日後に回収します。設置期間を長くするほど検出率が高くなりますが、種子自体の腐敗が進行する場合がありますので、通常は3日程度が適当です。

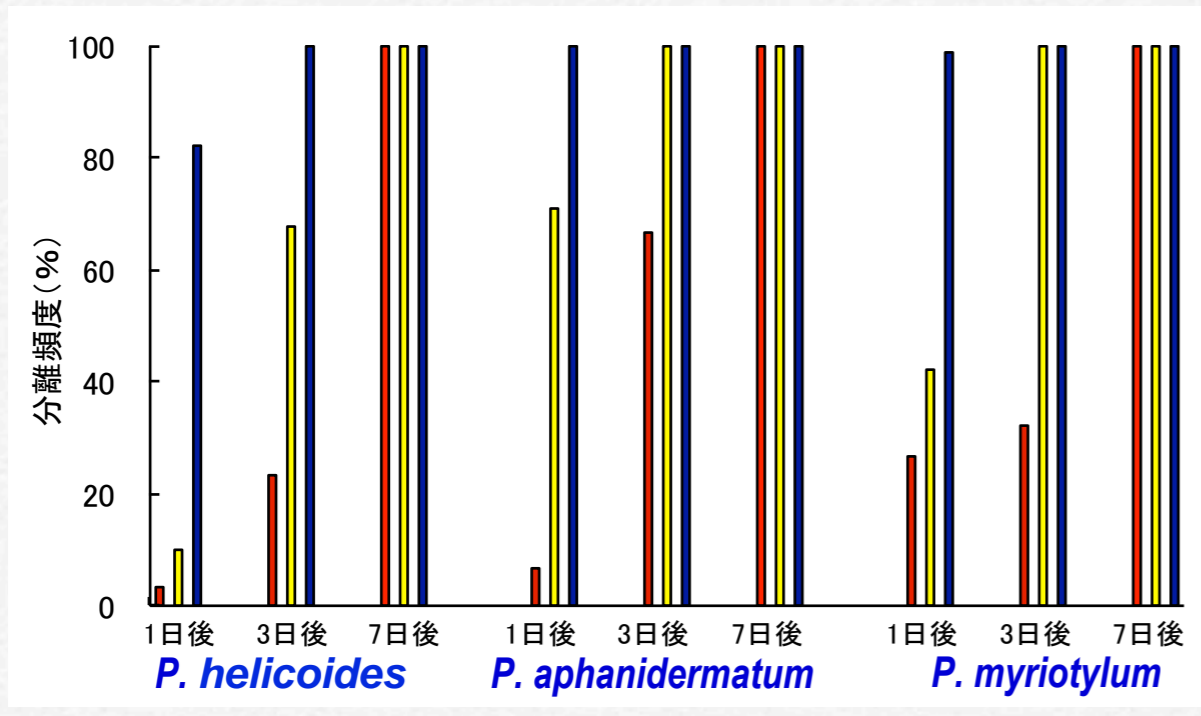


図3-23 遊走子密度とトラップ設置期間の関係（ベントグラス葉によるトラップの事例）

■ 40 ■ 400 ■ 4000 遊走子数 / L

(6) 回収後の検出法および安全性診断

回収したエゴマを用いてLAMP法を行うか、エゴマを培養するかで二通りの方法があります。

ベイト-LAMP法

回収したエゴマトラップは、LAMP法により迅速に診断することができます（第3章セクション2）。



ベイト-LAMP法により検出（第3章セクション2）

図3-24 エゴマトラップからエゴマを取り出す

前述の期間設置したエゴマから、高温性ピシウム菌が検出されれば、何らかの対応をする必要があります。品目ごとの具体的な対応策は、各作物編（第5章）を参照してください。

ベイト培養法

ピシウム菌選択培地（NARM培地）が作製可能な場合は、培養法でも確認することができます。エゴマ種子を1～2日間、38°Cで培養することにより、生存している高温性ピシウム菌の有無を確認します。伸長した菌糸はLAMP法により種を同定することが可能です（第3章セクション2）



図3-25 NARM培地にエゴマを置き、38°Cで1～2日間培養



図3-26 高温性ピシウム菌の培養開始1日後の菌糸生育

2. メンブレン培養法

(1) 準備するもの

表3-2 メンブレン培養法の準備物一覧

No	準備物	備考
1	ボトル容器	原水や培養液を採水するのに使用します
2	メンブレンフィルター	ミリポア社 デュラポア (Durapore®) 孔径5 μm、47 mm径 品番: SVWG04700
3	濾過装置	ミリポア社 ステリフィル無菌濾過システム (250 mL以下の水処理向け) 品番: XX1104700 サーモフィッシャー社 フィルターユニット (1000 mL以下の水処理向け) 品番: 300-4100
4	吸引器具	シリンジポンプ(現地向け) ミリポア社 品番: XKEM00107 小型真空ポンプ(実験室向け)
5	NARM培地	次項参照
6	卓上恒温器	38°Cで培養するために使用
7	ピンセット	
8	70%エタノール	
9	ハイフロスーパーセル (焼成珪藻土)	培養液の汚濁性が高く、メンブレン濾過がしにくい場合に、濾過補助剤として使用します



図3-27 メンブレン培養法の準備物 左から、メンブレンフィルター、濾過装置、シリンジポンプ

(2) ピシウム菌選択培地 (NARM培地) の作製法

Morita and Tojo 2007

1) 試薬

・ コーンミールアガー	BBL Corn Meal Agar	
	Becton, Dickman and Company	REF211132
・ Bacto Agar		
	Becton, Dickinson and Company	REF 214010
・ Nystatin	シグマ	N3503-5MU
・ Ampicillin Sodium	和光	016-23301
・ Rifampicin	和光	189-01001
・ Miconazole Nitrate	和光	134-12661

・ Dimethylformamide 和光 049-02914

2) 組成

Cornmeal agar	3.4 g	
Agar	1.0 g	
Nystatin (10 mg / ml)	200 μ l	(10ppm)
Ampicillin (250 mg / ml)	200 μ l	(250ppm)
Rifampicin (10 mg / ml)	200 μ l	(10ppm)
Miconazole (1 mg / ml)	200 μ l	(1ppm)

H ₂ O	200 ml	

3) ストック液作製

○ストック液A

Ampicillin 1000 mg

H₂O 4 ml

○ストック液NRM

Nystatin 40 mg

Rifampicin 40 mg

Miconazole 4 mg

Dimethylformamide 4 ml

それぞれ200 μ lずつチューブに分注、冷凍保存

4) 作り方

Cornmeal agar 3.4g

Agar 1.0g

H₂O 200ml

↓

オートクレーブ

↓

50°Cまで冷ます

↓

↓ ←ストック液A 200 μ l

↓ ←ストック液NRM 200 μ l

↓

手早く攪拌

10ml / plate 駒込ピペットで分注

(3) 採水場所・採水量

培養液の循環タンクから採水し、系統全体について高温性ピシウム菌の有無をチェックします。また、原水タンクや育苗用の循環タンクがある場合は、これらについても定期的にチェックが必要です。



図3-28 原水タンクから採水



図3-29 循環タンクから採水



図3-30 育苗用循環タンクから採水

表3-3 品目別の発病菌量と要検出密度および採取量の目安

植物名	作型	感染拡大期		発病期			要検出密度*	サンプル量のめやす
		時期	液温	時期	液温	発病菌量		
トマト	周年	6月～10月		7月～9月		100個/L	10個/L	100 mL
	抑制	7月～10月	20℃～	8月～9月				
ホウレンソウ		5月～8月				50個/L	5個/L	200 mL
ミツバ	周年	5月～10月	25℃～	6月～9月	25℃～	100個/L	10個/L	100 mL
ネギ								
切りバラ		3月～11月	20℃～	5月～9月				
ポインセチア	春-秋	6月～9月	25℃～	6月～9月 (7月～8月が多い)		1個/L	-	-

* 要検出密度：発病を早期に抑制するため、検出に必要な最低密度を発病菌量の1/10としました。

(4) 採水後の集菌および培養



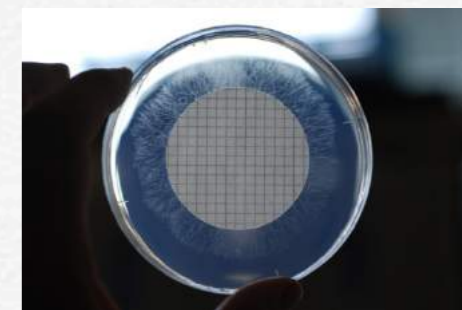
1) ろ過装置にメンブレンフィルターをセット



2) 採水したサンプルを吸引ろ過



3) メンブレンフィルターを取り出し、表面を下にしてNARM培地に置床



4) 38℃1～2日後、生育旺盛な菌糸生育の有無を確認

図3-31 メンブレンフィルターを使用した集菌と培養方法

高温性ピシウム菌が確認された場合は、培地から菌糸片を採取し、LAMP法により高温性ピシウム菌の種類を診断できます（第3章セクション2）

※同時に複数のサンプルを扱う場合、ピンセット、フィルターファネル、ホルダーを流水で十分洗浄し、熱湯または70%エタノールで殺菌、乾燥させてから次のサンプルを処理します。

※現地からサンプリングした培養液等は、できる限り当日に集菌・培養を行います。都合により処理できない場合は、常温（25°C前後）で保存して翌日中に処理します。7日以上保存すると生存菌量は1/10以下に低下し、特に冷蔵庫（5°C）で保存すると死滅しやすくなります（図3-32）。

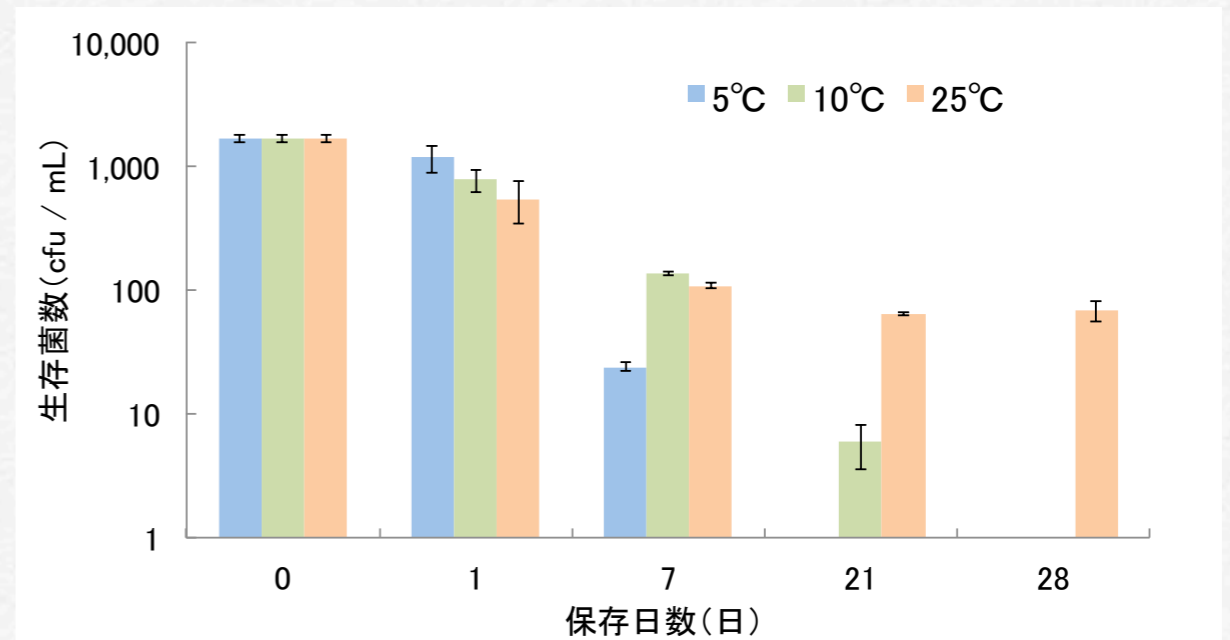


図3-32 水サンプルの保存日数と温度が遊走子の検出率に及ぼす影響

病原菌： *P. aphanidermatum* バーは標準偏差

汚濁度の高い培養液等を処理する場合の対策

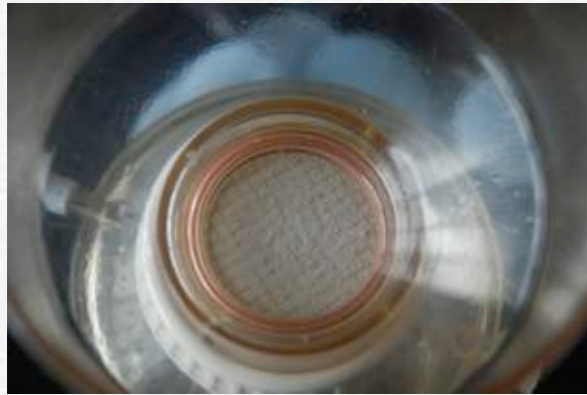
培養液等の汚濁度が高い場合、メンブレンフィルターがすぐ目詰まりして、1枚でろ過できないことがあります。その場合は、図3-33のような手順で処理すると改善できます（図3-34）。



1) メンブレン上にハイフロスーパーセルを添加 (0.05~0.1g)



2) 滅菌水または培養液等の一部を添加 (10 mL程度)



3) ポンプで吸引し、濾過層を形成



4) ポンプで吸引しながら、濾過層を壊さないように、ファネルの壁面から培養液等を流し込むと良い

図3-33 ハイフロスーパーセルの利用方法

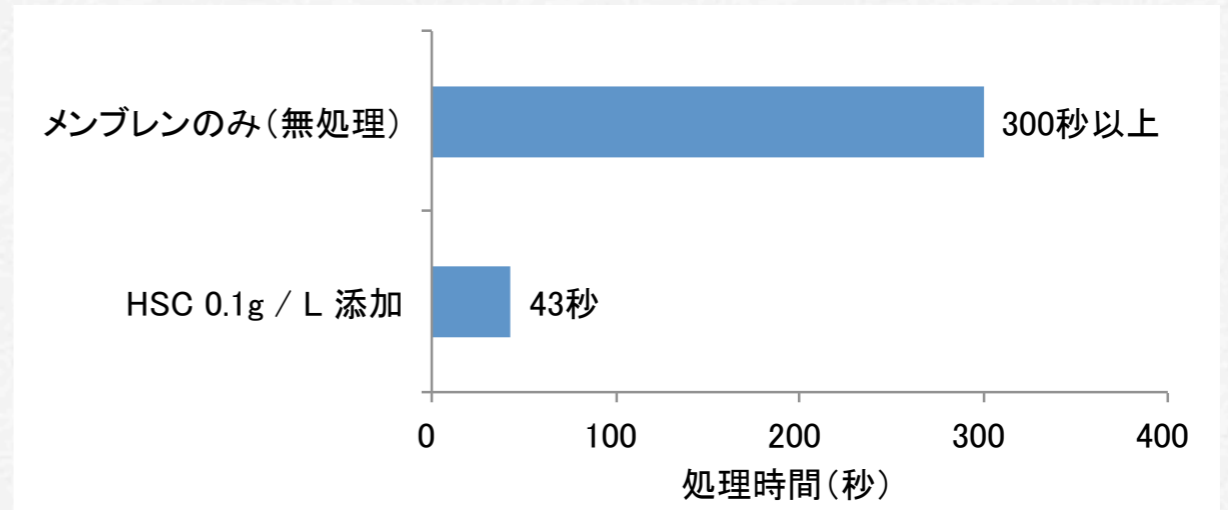


図3-34 ハイフロスーパーセル (HSC) の添加が汚濁度の高い培養液のろ過速度に及ぼす影響 (培養液 1 L)

注) 培養液等の汚濁度が高い場合は、ハイフロスーパーセルの添加量を増量する必要があります。

(5) 定量および安全性診断

メンブレン培養法は、培養液等の高温性ピシウム菌の菌密度を定量的に評価することが可能です。

< 定量評価の手順（検出限界値 1個 / Lの例） >

- 1) 培養液等を1.3 L程度採水します。
- 2) 培養液等をよく混ぜてから、マイクロピペットで1 mL、10 mLをそれぞれNARM培地に流して、培地表面に広げます。
- 3) 100 mLおよび1000 mLをメンブレンフィルターで吸引ろ過し、このメンブレンフィルターの表面をNARM培地に置きます。
- 4) 38°Cで培養1日後に、1 mL及び10 mL処理区は余剰液を捨て、100 mLおよび1000 mL処理区はメンブレンフィルターを取り除きます。
- 5) 高温性ピシウム菌のコロニー数を数え、単位水量あたりの菌密度を算出します。

正確な定量はできませんが、処理する培養液の量を変えることにより培養液中の菌量がある程度推定できます（表3-4）。

表3-4 メンブレン培養-LAMP法の培養液の濾過量とリアルタイムPCR法で測定した遊走子数との関係

メンブレン培養-LAMP法			リアルタイムPCR法	
10 mL	100 mL	1 L	遊走子数 / L	検出種
-	-	-	0	-
-	-	-	0	-
-	-	-	2	aph
-	-	aph	7	aph
-	-	aph	9	aph
-	-	aph	10	aph
-	-	aph	16	aph
-	aph	aph	9	aph
-	aph	aph	13	aph
-	aph	aph	31	aph
-	aph	aph	72	aph
-	aph	aph	112	aph
aph	aph	aph	82	aph
aph	aph	aph	103	aph
aph	aph	aph	135	aph
aph	aph	aph	333	aph
aph	aph	aph	935	aph
aph	aph	aph	1652	aph
aph	aph	aph	7307	aph

— : 非検出 *aph:Pythium aphanidermatum*

LAMP法による簡易 検出法

項目

1. LAMP法とは

2. LAMP反応の進め方

3. *P. aphanidermatum*、*P. helicoides*、*P. myriotylum* の簡易検出法

(1) 植物体-LAMP法 . . . 58

(2) ベイト-LAMP法 . . . 61

(3) ベイト培養-LAMP法 . . . 65

(4) メンブレン培養-LAMP法 . . . 68

4. LAMP法の注意点

1. LAMP法とは

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法はNotomiら(2000)によって報告された新しいDNA増幅法です。LAMP法では、図3-35に示したように、増幅のターゲットとする配列からそれぞれ20 bp程度の領域を6カ所選び、4種類のプライマー（外側のF3とB3プライマー及び内側のFIPとBIPプライマー）を設計します。さらに、2種のプライマーF-loopとB-loopプライマーを加えると、DNA増幅反応を早めることができます。

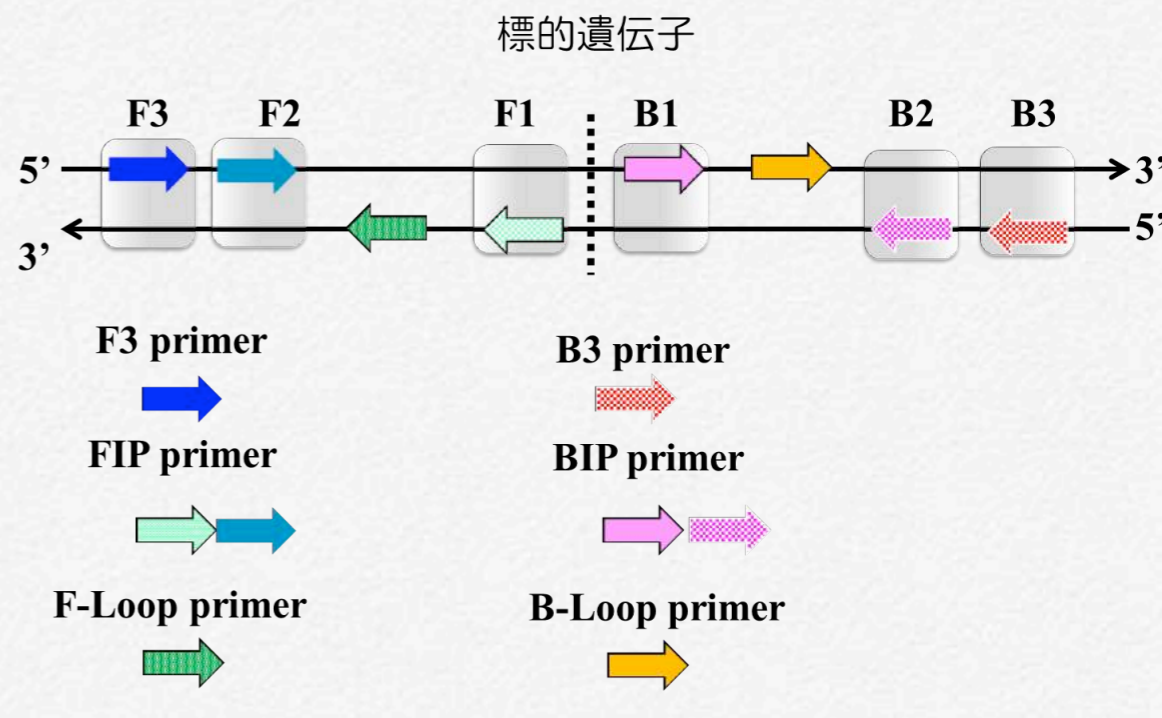


図3-35 DNA上の各プライマーの位置

これらの4種のプライマーに、検定したいサンプルDNAやDNA合成を行う酵素*Bst* DNA polymeraseなどを加え、60°C～68°Cの一定温度で、1時間反応させることで多量のDNAを増幅することができます。

LAMP法の長所を以下に挙げます。

①60～68°Cの一定温度で、1時間反応させることによってDNAを増幅することができます。そのため、PCRで使用するサーマルサイクラーなど高額な機器は不要で、恒温器や恒温水槽などの簡易な機器、または電気ポットや保温性の高いジャーなども利用することができます。

②増幅の有無を確認するための電気泳動は必要なく、保温終了後に反応液が白く濁っているか否か、または色素を使用することにより色相の変化でDNA増幅を判定できます。そのため、電気泳動に必要な技術や機器は必要ありません。

③LAMP反応は植物や昆虫などに含まれている反応阻害物質による影響を受けにくいことがわかっています。そのため、鋳型の精製度が低くてもDNA増幅反応が可能です。

このような特徴から、LAMP法は農業現場のような環境でも病害診断に利用することができます。

2. LAMP反応の進め方

高温性ピシウム菌を検出するためのLAMP反応に必要な試薬や、それらの試薬を使った一般的な反応の進め方を以下に記載します。

(1) 準備するもの

10項目あります。

1) 表に示した各プライマー

プライマーは、表3-5に示した配列のオリゴDNAを業者に合成依頼し、購入します。このようなオリゴDNAは、シグマ・アルドリッチジャパン、インビトロジェン、ロシュ、オペロンなど様々な業者から購入することができます。プライマーは、100 μMの濃度に調整し、-20～-30 °Cで保存してください。

表3-5 3種の高温性ピシウム菌を検出するための

LAMPプライマーの塩基配列

ピシウム菌検出プライマー	塩基配列
<i>P. aphanidermatum</i>	F3 5'-GCGACTTCGGTTAGGACATT-3'
	B3 5'-TGCCTCCTTTACCTATCCG-3'
	FIP 5'-ACCACACTCTGTCAGCTGCAAC-GAAGCA ACCTCTATTGGCGG-3'
	BIP 5'-TTGTGTGAGGCAATGGTCTGG-GTCCAAGAGCAGCAAAACC-3'
	FLoop 5'-CCGGGCCGAAGCCTAACAT-3'
	BLoop 5'-GGTTGCTGTGTAGTAGGG-3'
<i>P. helicoides</i>	F3 5'-GACGAGTCTGGCGACCTT-3'
	B3 5'-CCACGCACGAAACAGAACA-3'
	FIP 5'-CATTGTCAAAGCCGCGCAA-CATGCTTGGGCACTGTGT-3'
	BIP 5'-TGTGTTTGGGCTGTCTGTGCT-AACAGACACGCGAAACGC-3'
	FLoop 5'-CGCAGCCTAACATACCGCCA-3'
	BLoop 5'-TGAACCGGATGGTTCGATG-3'
<i>P. myriotylum</i>	F3 5'-GGCGGTATGTTAGGCTTCG-3'
	B3 5'-TGATATGCTTAAGTCAGCGG-3'
	FIP 5'-GCCCCACACAAGACAGGTACAC-TTGCAGCTGACGGGGTG-3'
	BIP 5'-GTGAGAGTTTCGGCTCCTGCAGG-TCTTATCTTGATATCCAGGTCC-3'
BLoop 5'-CAGGCGGCTTTTCAATTG-3'	

2) 滅菌水

3) DNA増幅試薬キット (冷凍保存)

LAMP反応を行うための試薬を含むキットです (図3-36)。
DNA増幅試薬キットにはプライマー以外の試薬が含まれています。
このキットはE Genome Order (<http://genome.e-mp.jp/>)から購入することができます。



図3-36 DNA増幅試薬キット

4) 反応用チューブ

LAMP反応を行うための200 μLのチューブです (図3-37)。チューブ間のコンタミネーションやサンプルの誤添加を防止するため、チューブ1本ずつにキャップができるスナップキャップ付きチューブを利用してください。8連チューブを利用する場合は、キャップを切り離して利用するなどの工夫が必要です。



図3-37 スナップキャップ付きの反応チューブ

- 5) マイクロピペッター (200 μ L用、20 μ L用、各1本) と、
ピペッターに使用するフィルターチップ (図3-38)

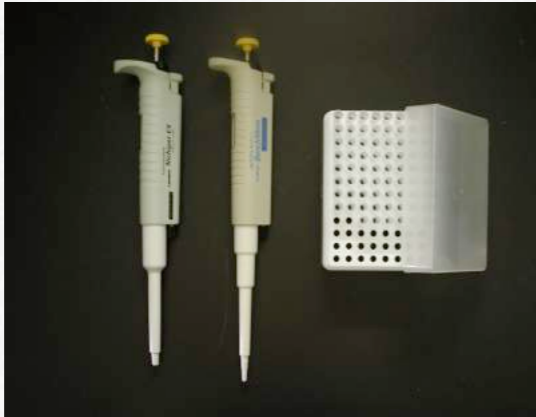


図3-38 マイクロピペッターとチップ

- 6) Hydroxy Naphthol Blue (HNB) (DOJINDO, 製品コード:
H007) LAMP反応後の判定を容易にするための色素です。

- 7) 陽性コントロール液 高温性ピシウム菌から抽出した
DNAです。LAMP反応で必ず陽性を示し、反応結果の成否を
判定する指標となります。陽性コントロール液は、下記宛先
からから入手できます。なお、陰性コントロールには、1)
の滅菌水を使います。

岐阜大学流域圏科学研究センター植物資源研究部門
植生管理学研究分野 (菌類生態学) 景山研究室
所在地: 〒501-1193 岐阜市柳戸1-1

E-mail :

diagnosis_gifu_university_2014@green.gifu-u.ac.jp

- 8) 1.5 mLマイクロチューブ 試薬を混合する際に使います
(図3-39)。



図3-39 1.5 mL チューブ

- 9) 氷 (クラッシュアイス)

試薬を低温に保持するために使います。

- 10) 恒温器や恒温水槽、保温性の高いジャーなど約65°Cで温
度を維持できるもの

実験室であれば、ヒートブロックや恒温器・恒温水槽など
65°C一定にできる器具を使ってください (図3-40)。現地ほ場
で反応を行う場合は、電気ポット (図3-41)、350 mL以上の
保温性の高いジャー (図3-42) などが利用できます。恒温水槽

や電気ポット・ジャーなどを利用する場合はチューブを水面に浮かべるためのフロートが必要です。



図3-40 卓上恒温器



図3-41 電気ポット (65~70°C 程度の設定がある機種)



図3-42 保温性の高いジャー (350 mL以上)

(2) LAMP試薬の調整

LAMP試薬の調整は以下の7つの手順で行います。

1) 100 μ Mに調整した各プライマーを、以下のように混合し、プライマー液を作製します。

F3	2.5 μ L
B3	2.5 μ L
FIP	20.0 μ L
BIP	20.0 μ L
FLoop	10.0 μ L (0 μ L) *1
BLoop	10.0 μ L
滅菌水	135.0 μ L (145 μ L) *1
計	200.0 μ L

*1 *P. myriotylum* の検出では、FLoopプライマーが必要ないので、滅菌水を145 μ Lにして調整してください。

*2 *P. aphanidermatum*と*P. helicoides*については、検出プライマーを混合することによるマルチプレックス化が可能です。この2種を同時検出したい場合は、*P. aphanidermatum*用と*P. helicoides*用のF3からBLoopまでの各プライマーを2種類とも添加し、滅菌水を70 μ Lにしたマルチプレックス用のLAMPプライマー液の組成を利用してください。

2) HNBを滅菌水で0.15 g / Lに調整します。

3) 1.5 mLマイクロチューブを用意し、高温性ピシウム菌ごとに、必要テスト分の反応液をまとめて作製します。試薬は氷で冷やしながら調整してください（図3-43）。



図3-43 1.5 mLマイクロチューブを使って試薬を混合

滅菌水	1.25 μ L	×	テスト数
HNB	1.25 μ L	×	テスト数
2×反応液	12.5 μ L	×	テスト数
プライマー液	4.0 μ L	×	テスト数
酵素液	1.0 μ L	×	テスト数
	20.0 μ L	×	テスト数

4) 3) で作製した反応液を1テスト分20 μ L ずつチューブに分注します（図3-44）。

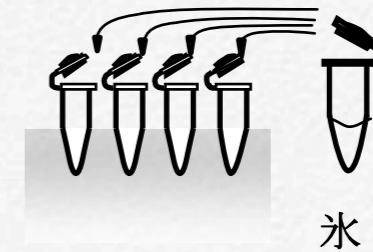


図3-44 作成した反応液を反应用チューブに分注

5) 各チューブに抽出DNAと陽性コントロール液及び陰性コントロール液（滅菌水）を5 μ L加えしっかりふたをします（図3-45）。

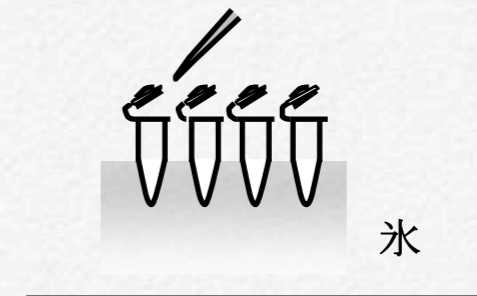


図3-45 抽出DNAを添加

6) 65°Cに調整した恒温器または約65°Cに調整した湯を入れた保温ジャーにチューブを入れて1時間保温します（図3-46）。



図3-46 反応チューブを恒温器や保温性の高いジャーなどで保温

7) チューブを恒温器やジャーから出し、ふたを開けずに反応液の色を観察します。DNAが増幅された反応液は、反応前の紫色から空色に変わっています（図3-48）。この色の変化を確認することでDNA増幅の有無を判定することができます。



図3-47 白濁によるLAMP反応の判定
左が陽性

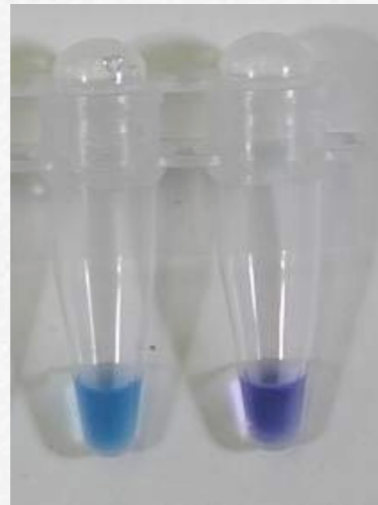


図3-48 HNBの色相によるLAMP反応の判定
左が陽性

3. *P. aphanidermatum*、*P. helicoides*、*P. myriotylum*の簡易検出法

養液栽培の現場での高温性ピシウム菌検出には様々な対象が想定されます。例えば、農作物や周辺雑草などの植物サンプル、培養液や用水などの水のサンプル、育苗に用いる土壌やエブ・アンド・フロー栽培でのポット土壌などの土サンプル、栽培前や終了後の資材の表面などです。資材からの検出は、第3章セクション1の「1-4 設置場所・設置期間」の項に記載したように、水をはった容器に資材を入れ、水に出てくる高温性ピシウム菌を検出することで可能となります。そのため、大きく分けると、植物・土・水の3種類が高温性ピシウム菌検定の対象となると考えられます。このマニュアルでは、植物を対象とする場合に用いる「植物体-LAMP法」、水や土を対象とする「ベイト-LAMP法」や「ベイト培養-LAMP法」、水からの定量も可能な「メンブレン培養-LAMP法」の4種類の方法を紹介します（表3-6）。

「植物体-LAMP法」は、植物の根や茎などからピシウム菌を直接検出することができます。また、「ベイト-LAMP法」は、

ベイトとして用いたエゴマ種子からピシウム菌を検出する方法です。これらの2種類の方法は、現地圃場でのピシウム菌検出に利用できます。また、「ベイト培養-LAMP法」、「メンブレン培養-LAMP法」は、エゴマ種子や培養液等を濾過したフィルターを選択培地上で培養し、生育した菌糸を用いてピシウム菌を検出する方法です。

表3-6 サンプルと検出法の組合せ

	植物体-LAMP法	ベイト-LAMP法	ベイト培養-LAMP法	メンブレン培養-LAMP法
サンプル	植物	培養液、土壌	培養液、土壌	培養液
検出に必要な時間	LAMP法:1時間	ベイト設置一回収: 3日 LAMP法:1時間	ベイト設置一回収: 3日 培養期間:1日 LAMP法:1時間	培養期間:1日 LAMP法:1時間
作業性	簡易	簡易	やや難	やや難
コスト	500円程度	500円程度	800円程度	800円程度

(1) 植物体-LAMP法

農作物や周辺雑草など植物体に感染した高温性ピシウム菌を検出するために「植物体-LAMP法」を利用します。植物の根や茎などから直性ピシウム菌を検出することができます。

準備するもの

13項目あります。

- 1) 滅菌水
- 2) 15 mL コニカルチューブ (遠沈管)
予め5 mLの滅菌水を入れておいてください。
- 3) ピンセット
植物体のサンプリングや、採集した植物片をコニカルチューブに入れる際に使います。
- 4) DNA増幅試薬キット (栄研化学)
- 5) LAMP反应用チューブ
- 6) Hydroxy Naphthol Blue (HNB)

7) プライマー液

「2. LAMP反応の進め方」で作成したプライマーの混合液

8) 陽性コントロール液

9) マイクロピペッター (200 μ L、20 μ L用、各1本) と、ピペッターに合うフィルターチップ

10) 1.5 mLマイクロチューブ

11) 氷 (クラッシュアイス)

12) 65°C程度を保持できる保温容器 (保温性の高いジャーなど) と温度計

13) フロート

LAMP反応チューブを保温容器の湯に浮かべる際に用います。

方法

「植物体-LAMP法」は以下の8つの手順で行います。

1) 1.5 mLマイクロチューブを用意し、高温性ピシウム菌の種類ごとに必要テスト分の反応液をまとめて作製します。その際、必ず陽性コントロールと陰性コントロールを加えてください。試薬は氷で冷やししながら調整してください。

滅菌水	1.25 μ L	×	テスト数
HNB	1.25 μ L	×	テスト数
2×反応液	12.5 μ L	×	テスト数
プライマー液	4.0 μ L	×	テスト数
酵素液	1.0 μ L	×	テスト数
<hr/>			
	20.0 μ L	×	テスト数

2) 1) で作製した反応液を1テスト分20 μ L ずつチューブに分注し、氷に入れて圃場に移動します。

3) 現地で植物体を採集します。根であれば2~3 cmの長さのものを2~3本、茎は1cm程度のものをサンプリングします。サンプリングの際、病気で枯れてしまっている植物を使うと、感染植物でも高温性ピシウム菌が検出されないことがあります。できるだけ枯死していない株から採集するようにしてください*。

* 今回紹介した簡易なLAMP法では、病気で枯れてしまった根や茎からは高温性ピシウム菌を検出できないことがあります。表3-7に示したように、枯死していないポインセチアやトマトではすべてのサンプルから高温性ピシウム菌が検出できましたが、完全に枯死したミニバラでは、3検体の内1検体でしか検出できませんでした。

表3-7 検定に利用した植物体による「植物体-LAMP法」の高温性ピシウム菌検出効率

検定に使った植物		植物体-LAMP法	培養法
ポインセチア	生存	3 / 3 ^a <i>P. helicoides</i>	3 / 3 ^b <i>P. helicoides</i>
トマト	生存	4 / 4 <i>P. aphanidermatum</i>	4 / 4 <i>P. aphanidermatum</i>
ミニバラ	枯死	1 / 3 <i>P. helicoides</i>	3 / 3 <i>P. helicoides</i>

a: ピシウム菌が検出された検体数 / 植物体-LAMP法に供試した検体数,

b: ピシウム菌が検出された検体数 / 培養法に供試した検体数.

4) 採集した植物を、予め5 mLの滅菌水を入れておいたコニカルチューブに入れます (図3-49、50)。



図3-49 コニカルチューブ (遠沈管)



図3-50 採集した根を入れます

- 5) ふたをして1分間手で振り混ぜます。
- 6) 2) で作製したLAMP反応チューブに、5) で植物体を振り混ぜた液を5 μ L加え、しっかりふたをします。
- 7) 約65°Cに調整した湯を入れた保温性ジャーにチューブを浮かべ、1時間保温します。
- 8) チューブを取り出し、ふたを開けずに色を観察します。反応液の色が空色に変わっているものを陽性とします (図3-51)。色の変化はわかりにくいことがあるので、陽性・陰性のコントロールと比較して判定してください。

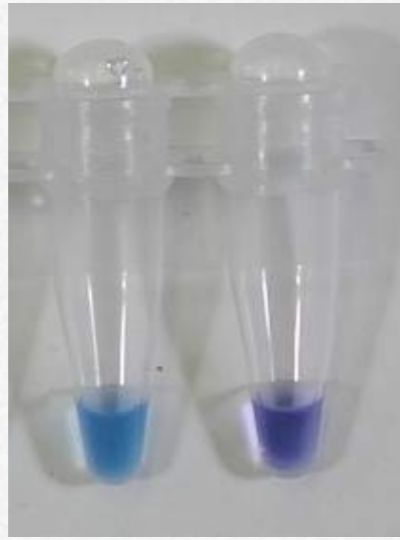


図3-51 HNBの色相による
LAMP反応の判定 左が陽性

(2) ベイト-LAMP法

培養液や土壌中の高温性ピシウム菌を検出するために「ベイト-LAMP法」を利用することができます。高温性ピシウム菌がエゴマ種子や芝の葉片に感染しやすいことを利用し、エゴマ種子を餌（ベイト）として培養液や土壌中に生息する高温性ピシウム菌をおびき寄せることができます。エゴマ種子を用いた

「ベイト法」の詳細については、第3章セクション1を参照してください。その感染したエゴマ種子からは、LAMP法を利用して容易に高温性ピシウム菌の検出を行うことができます（図3-52）。

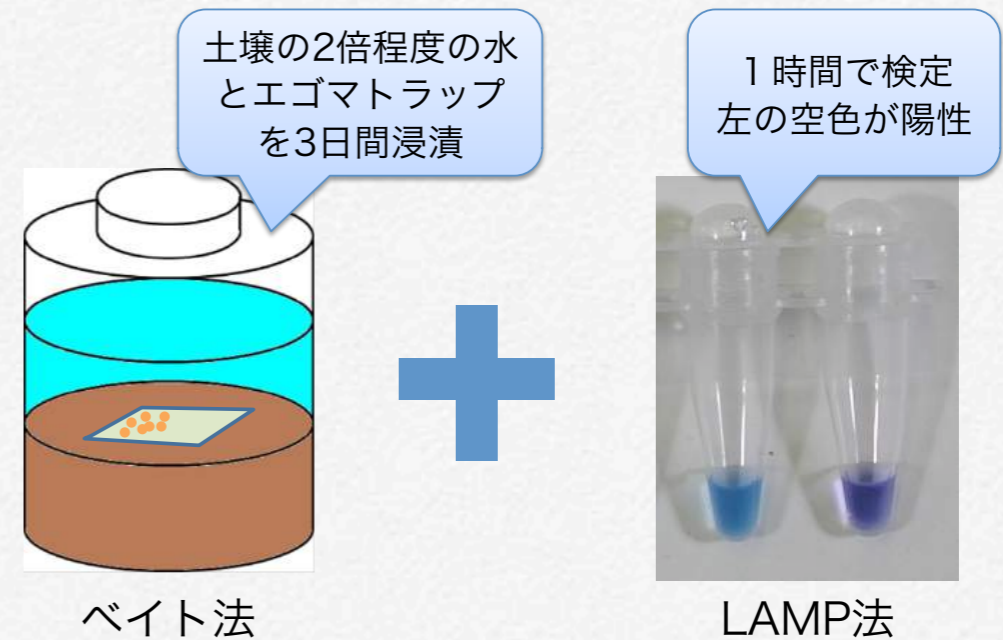


図3-52 ベイト法にLAMP法を組み合わせた技術

準備するもの

15項目あります。

1) エゴマ種子

小鳥の餌用、ホームセンターで購入できます。

2) お茶パック

お茶パック（図3-53）の中に、エゴマ種子を入れ、滅菌後、常温保存します。



図3-53 お茶パック

3) 滅菌水

4) 15 mLコニカルチューブ（遠沈管）

予め5 mLの滅菌水を入れておいてください。

5) ピンセットまたは薬さじ

エゴマ種子をコニカルチューブに入れる際に使います。

6) DNA増幅試薬キット（栄研化学）

7) LAMP反应用チューブ

8) Hydroxy Naphthol Blue (HNB)

9) プライマー液

「2. LAMP反応の進め方」で作成したプライマーの混合液

10) 陽性コントロール液

11) マイクロピペッター（200 μ L、20 μ L用、各1本）と、ピペッターに合うフィルターチップ

12) 1.5 mLマイクロチューブ

13) 氷（クラッシュアイス）

14) 65°C程度を保持できる保温容器（保温性の高いジャーなど）と温度計

15) フロート

LAMP反応チューブを保温容器の湯に浮かべる際に使います。

方法

「ベイト-LAMP法」は以下の8つの手順で行います。

1) 培養液または土壌中にエゴマ種子を入れ、高温性ピシウム菌を感染させます。

2) 1.5 mLマイクロチューブを用意し、高温性ピシウム菌の種類ごとに、必要テスト分の反応液をまとめて作製します。その際、必ず陽性コントロールと陰性コントロールを加えてください。試薬は氷で冷やしながらか調整してください。

滅菌水	1.25 μ L	×	テスト数
HNB	1.25 μ L	×	テスト数
2×反応液	12.5 μ L	×	テスト数
プライマー液	4.0 μ L	×	テスト数
酵素液	1.0 μ L	×	テスト数
	<hr/>		
	20.0 μ L	×	テスト数

3) 2) で作製した反応液を1テスト分20 μ L ずつチューブに分注し、氷に入れて圃場に移動します。

4) 現地でエゴマ種子を回収します。お茶パックの中のエゴマ種子を、ピンセットや薬さじなどを使って、予め5 mLの滅菌水を入れておいたコニカルチューブに入れます（図3-54）。ピンセットや薬さじはサンプルごとに取り替えるか、しっかり水洗いなどしてから再利用してください。

※ エゴマの入ったコニカルチューブを常温（25°C前後）で12時間以上静置すると、検出感度を上げることができます。



図3-54 お茶パック中のエゴマ種子を
コニカルチューブに入れます。

- 5) ふたをして1分間手で振り混ぜます。
- 6) 3) で作製したLAMP反応チューブに、5) でエゴマを振り混ぜた液と陽性コントロール液及び陰性コントロール液（滅菌水）を5 μ L加え、しっかりふたをします。
- 7) 約65°Cに調整した湯を入れた保温性ジャーにチューブを浮かべ、1時間保温します。
- 8) チューブを取り出し、ふたを開けずに色を観察します。反応液の色が空色に変わっているものを陽性とします（図3-55）。色の変化はわかりにくいことがあるので、陽性・陰性のコントロールと比較して判定してください。



図3-55 HNBの色相による
LAMP反応の判定 左が陽性

(3) ベイト培養- LAMP法

3-2 で利用したエゴマの種子を培養し、得られた菌糸を LAMP法によって検出することが可能です。この「ベイト培養- LAMP法」は、第3章セクション1で紹介した「ベイト培養法」と「LAMP法」を組み合わせた手法で、菌密度の低い培養液や土壌中からのピシウム菌検出に適しています。

準備するもの

17項目あります。

1) エゴマ種子

小鳥の餌用、ホームセンターで購入できます。

2) お茶パック

お茶パックの中に、エゴマ種子を入れ、滅菌後、常温保存します。

3) ピンセット

エゴマ種子を培地に置床する際に使います。

4) NARM培地 (第3章セクション1)

5) 卓上恒温器 38°Cで培養できるもの

6) ナイフや薬さじなど

菌糸が生育した部分を培地から切り出せるもの。

7) 滅菌水

8) 1.5 mLマイクロチューブ

9) DNA増幅試薬キット (栄研化学)

10) LAMP反应用チューブ

11) Hydroxy Naphthol Blue (HNB)

12) プライマー液

「2. LAMP 反応の進め方」で作成したプライマーの混合液

13) 陽性コントロール液

14) マイクロピペッター (200 μ L、20 μ L用、各1本) と、ピペッターに合うフィルターチップ

15) 氷 (クラッシュアイス)

16) 65°C程度を保持できる保温容器（保温性の高いジャーなど）と温度計

17) フロート

LAMP反応チューブを保温容器の湯に浮かべる際に使います。

方法

「ベイト培養-LAMP法」は以下の9つの手順で行います。

1) 培養液または土壌中にエゴマ種子を入れ、高温性ピシウム菌を感染させます。

2) エゴマを取り出し、NARM培地に置き、38°Cで1~2日培養します（図3-56）。



図3-56 エゴマ種子をNARM培地に置きます。

3) 生育盛な菌糸を2 mm角くらいになるように培地と一緒に取り出し、まとめて1.5 mLチューブに入れます（図3-57）。同じプレートの生育している5個程度のコロニーを切り出して同じチューブに入れてください。



図3-57 生育旺盛な菌糸を2mm角くらいになるように培地と一緒に取り出します。

4) 100 μL の滅菌水を入れ、ボルテックスで1分間混ぜます (図3-58)。

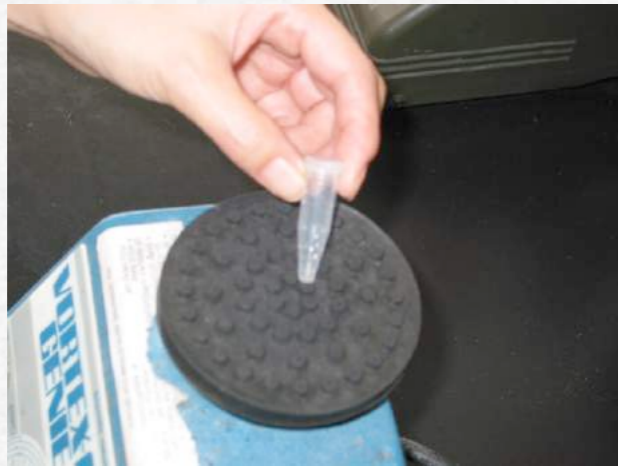


図3-58 ボルテックスで攪拌します。

5) 1.5 mLマイクロチューブを用意し、高温性ピシウム菌の種類ごとに、必要テスト分の反応液をまとめて作製します。その際、必ず陽性コントロールと陰性コントロールを加えてください。試薬は氷で冷やしながら調整してください。

滅菌水	5.25 μL	×	テスト数
HNB	1.25 μL	×	テスト数
2×反応液	12.5 μL	×	テスト数
プライマー液	4.0 μL	×	テスト数
酵素液	1.0 μL	×	テスト数
	24.0 μL	×	テスト数

6) 5) で作製した反応液を1テスト分24 μL ずつチューブに分注します。

7) 6) で作製したLAMP反応チューブに、4) の菌糸を混濁した液と陽性コントロール液及び陰性コントロール液 (滅菌水) を1 μL 加え、しっかりふたをします。

8) 約65°Cに調整した湯を入れた保温性ジャーにチューブを浮かべ、1時間保温します。

9) チューブを取り出し、ふたを開けずに色を観察します。反応液の色が空色に変わっているものを陽性とします (図3-59) 。色の変化はわかりにくいことがあるので、陽性・陰性のコントロールと比較して判定してください。

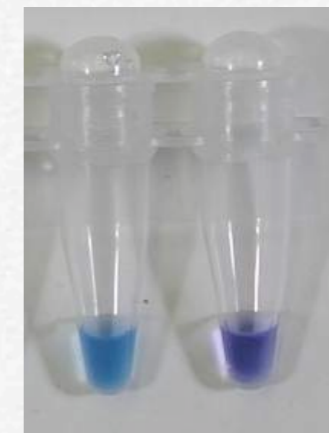


図3-59 HNBの色相によるLAMP反応の判定 左が陽性

(4) メンブレン培養- LAMP法

培養液中などから、精度よく高温性ピシウム菌を検出するために「メンブレン培養- LAMP法」を利用することができます。

「メンブレン培養- LAMP法」は「メンブレン培養法」と

「LAMP法」の2つの手法を組み合わせたもので、菌密度の低いサンプルからも高温性ピシウム菌を検出することができます。「メンブレン培養法」の詳細は、第3章セクション1を参照してください。

準備するもの

18項目あります。

1) ボトル容器

培養液などを採取するのに使用します。

2) メンブレンフィルター

ミリポア社 デュラポア (Durapore®) 孔径5 µm、47 mm径
品番: SVWG04700

3) 濾過装置

ミリポア社 ステリフィル無菌濾過システム(250 mL以下の水処理向け)

4) 吸引器具

現地向け-シリンジポンプミリポア社 品番: XKEM00107
実験室向け-小型真空ポンプ

5) NARM培地 (第3章セクション1)

6) 卓上恒温器 38°Cで培養できるもの

7) ナイフや薬さじなど

菌糸が生育した部分を培地から切り出せるもの。

8) 滅菌水

9) 1.5 mLマイクロチューブ

10) DNA増幅試薬キット (栄研化学)

11) LAMP反应用チューブ

12) Hydroxy Naphthol Blue (HNB)

13) プライマー液

「2. LAMP反応の進め方」で作成したプライマーの混合液

14) 陽性コントロール液

15) マイクロピペッター (200 μ L、20 μ L用、各1本) と、ピペッターに合うフィルターチップ

16) 氷 (クラッシュアイス)

17) 65°C程度を保持できる保温容器 (保温性の高いジャーなど) と温度計

18) フロート

LAMP反応チューブを保温容器の湯に浮かべる際に使います。

方法

「メンブレン培養- LAMP法」は以下の9つの手順で行います。

1) 検定したい培養液や用水を
採集し、メンブレンフィルタ
ーで濾過することにより、そ
の中に含まれている高温性ピ
シウム菌をフィルター上に集
めます (図3-60)。



図3-60 メンブレンフィル
ターによる集菌

2) メンブレンフィルターを取り出し、NARM培地に表面を下にして置き、38°Cで1~2日培養します。

3) 生育旺盛な菌糸を2 mm角くらいになるように培地と一緒に取り出し、まとめて1.5 mLチューブに入れます (図3-61)。複数のコロニーを切り出して同じチューブに入れることも可能ですが、1サンプルは5コロニー程度までに行ってください。

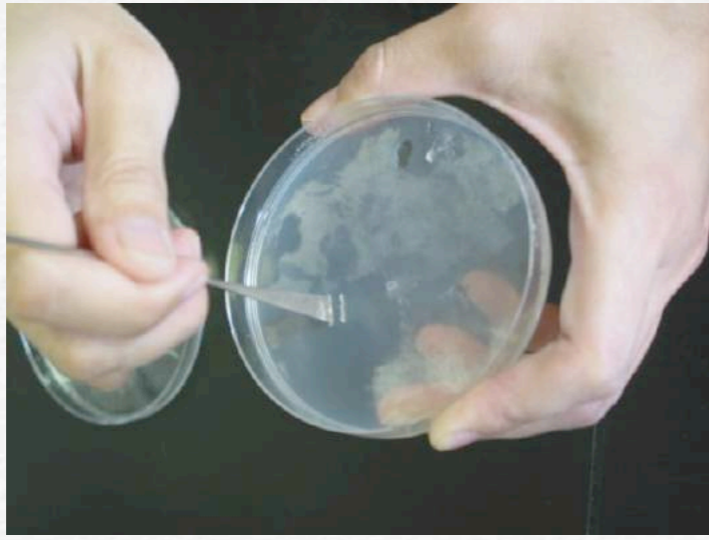


図3-61 生育旺盛な菌糸を2 mm角くらいになるように培地と一緒に取り出します

4) 100 μL の滅菌水を入れ、ボルテックスで1分間混ぜます (図3-62)。

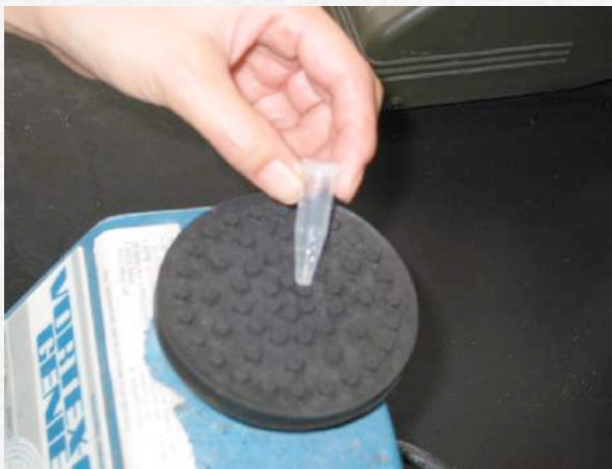


図3-62 ボルテックスで攪拌します

5) 1.5 mLマイクロチューブを用意し、高温性ピシウム菌ごとに、必要テスト分の反応液をまとめて作製します。その際、必ず陽性コントロールと陰性コントロールを加えてください。試薬は氷で冷やしながら調整してください。

滅菌水	5.25 μL × テスト数
HNB	1.25 μL × テスト数
2×反応液	12.5 μL × テスト数
プライマー液	4.0 μL × テスト数
酵素液	1.0 μL × テスト数
	24.0 μL × テスト数

6) 5) で作製した反応液を1テスト分24 μL ずつチューブに分注します。

7) 6) で作製したLAMP反応チューブに、4) の菌糸を混濁した液と陽性コントロール液及び陰性コントロール液 (滅菌水) を1 μL 加え、しっかりふたをします。

8) 約65°Cに調整した湯を入れた保温性ジャーにチューブを浮かべ、1時間保温します。

9) チューブを取り出し、ふたを開けずに色を観察します。反応液の色が空色に変わっているものを陽性とします (図3-63)。色の変化はわかりにくいことがあるので、陽性・陰性のコントロールと比較して判定してください。

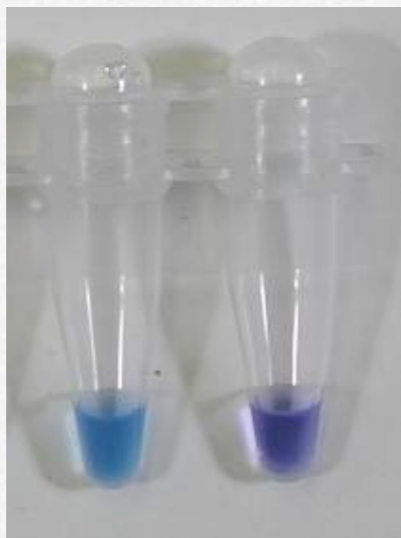


図3-63 HNBの色相による
LAMP反応の判定 左が陽性

4. LAMP法の注意点

LAMP反応は短時間に多量のDNAを増幅することができる極めて有用な技術です。一方、増幅効率が高いことによる注意点が重要です。

- 1) サンプル間で高温性ピシウム菌が交じり合わないよう、サンプルごとに採集する際のピンセットを取り替えるか、水などでよく洗ってから使わなければなりません。また、抽出液を扱う際にも、サンプルごとにチップを取り替えてください。チップはフィルター付きをお勧めします。
- 2) LAMP反応において最も問題となるのが増幅産物のコンタミネーションです。増幅したDNAが反応試薬に混入してしまうと、すべての反応チューブで極めて短時間にDNAが増幅されます。鑄型DNAを入れていない反応液で陽性と判定される色相になるようであれば、まずコンタミネーションを疑わなければなりません。コンタミネーションを防ぐための最も有効な方法は、場所と器具を分けることにあります。試薬調整、サンプル調整、反応終了後の反応液などはそれぞれ別の器具、別の空間で取り扱うようにしてください。反応後のチューブは蓋を絶対開けずに廃棄してください。

3) 現地での病害検出を行う際には、予め必要本数分の試薬を分注して現地に移動します。現地でのサンプル調整についてもなるべく落ち着いて作業できる管理舎などを使うとよいでしょう。また、LAMP反応の作業を複数人で行うと、サンプルの入れ忘れや順番の間違いなどの誤操作が起きやすくなります。作業に慣れない内は、一連の作業は一人で行うことをお勧めします。4) 診断を行う際には必ず陽性コントロールと陰性コントロールを加えて、これらの色相の変化と対比させることによってそれぞれのサンプルの判定を行ってください。陽性・陰性のコントロールは、現地に行く前に予め作成しておくこと、コンタミネーションの影響が少なくなります。

各種トラブルに対する原因と対応の仕方

トラブル (例)	原因と対応の仕方
現地でのLAMP反応の結果がおかしいように感じます。	LAMP反応は短時間に多量のDNAを増幅することができる極めて有用な技術です。一方、増幅効率が高いことによる増幅産物のコンタミネーションが起りやすく注意が必要です。 LAMP法の注意点を参照してください (P. 71)。
試料が混入してLAMP反応の結果がうまくいかないように感じます。	チューブ間のコンタミネーションやサンプルの誤添加を防止するため、チューブ1本ずつにキャップができるスナップキャップ付きチューブを利用してください (P. 53)。 ほ場や自動車の荷台等で実施すると混入の可能性があります。また落ち着いて作業できない等の弊害があるので、最寄りの実験室 (農業改良普及課の土壌診断室等) や室内で作業は行いましょう。 LAMP法の注意点を参照してください (P. 71)。
LAMP反応の陽性コントロールが陽性になりません。	陽性コントロールは正しく入っていますか (P. 64、P. 67、P. 70)。 陽性コントロールは現地に行く前にあらかじめ作成しましたか (P. 71)。
LAMP反応の陰性コントロールが陽性になりました。	陰性コントロールは正しく入っていますか (P. 64、P. 67、P. 70)。 陰性コントロールは現地に行く前にあらかじめ作成しましたか (P. 71)。

トラブル (例)	原因と対応の仕方
お湯を利用した保温容器の温度がすぐに低下してしまい、LAMP反応がうまくいきません。	保温性の高いジャー (350ml以上) を使用してください (P. 54)。 反応中の温度は、温度計を使い約65°Cに保ってください (P. 54)。
LAMP反応がうまくいかないのは、試料の入れ忘れや順番を間違っているように感じます。	LAMP反応の作業を複数人で行うと、サンプルの入れ忘れや順番の間違いなどの誤操作が起きやすくなります。作業に慣れない内は、一連の作業は一人で行うことをお勧めします (P. 72)。
ひもでつるしてエゴマを設置する場合、タンクの流速が早く流されてしまいそうです。	タンク内の流速が速い場所では、トラップが流されることがあります。そのような場合には煉瓦等を入れた洗濯ネットの中に設置するとよいでしょう (P. 42)。
培養液中でなくても十分な水分があればベイト法により検出は可能でしょうか。	エゴマトラップを育苗マットの下に設置しても検出は可能です。
トマトは、ベイト-LAMP反応で非特異的反応 (ピシウム菌がいなくても陽性反応を示すこと) が起こります。どうすればいいでしょうか。	メンブレン培養-LAMP法で安全診断を行ってください (P. 68-71)。

リアルタイムPCR法 による定量法

1. DNAの抽出

準備するもの

- 1) メスなどのメンブレンフィルターを細断するもの
- 2) ガラスビーズ：直径0.6 mm、約0.2 g
- 3) スキムミルク
- 4) 抽出バッファー：
 - 100 mM Tris-HCl pH 9.0 10 mL
 - 40 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 8 mL
 - 蒸留水82 mL
 - 以上を混合し、高圧滅菌後室温で保存
- 5) 10% SDS
- 6) 塩化ベンジル

7) 攪拌機の例：

- Micro Smash™ MS100 (トミー精工、図3-64)
- Vortex-Genie® Mixers
(サイエンティフィック・インダストリー)

8) ウォーターバス 60°C設定できるもの

9) ウォーターフロート

10) 3 M酢酸ナトリウム

11) 氷

12) 遠心分離機 15,000 rpmできるもの



図3-64 Micro Smash™ MS100

方法

- 1) メンブレン法により集菌したフィルターを5 mm×25 mm以下に細断し、ガラスビーズの入った2 mLのエッペンドルフチューブに入れる。
- 2) スキムミルク (0.2 g/mL) 10 μ L、抽出バッファー 250 μ L、10%SDS 50 μ L、塩化ベンジル 150 μ Lを加え、攪拌機にセットし、激しく攪拌する。
- 3) 60°Cで15分間静置する。
- 4) 3 M酢酸ナトリウム150 μ Lを加えて攪拌する。
- 5) 氷上で15分間静置する。
- 6) 15,000 rpmで10分間遠心分離し、新しいチューブに上清を残さず採取する (塩化ベンジルの層もある程度とっても構わない)。
- 7) 再度、15,000 rpmで10分間遠心分離し、上清のみを新しいチューブに採取する。これをMagExtractor™ -Plant Genome - (東洋紡) を用いて精製する。

2. MagExtractor™ -Plant Genome- (東洋紡)を用いた精製

準備するもの

- 1) MagExtractor™ -Plant Genome - (東洋紡)
 - 吸着液
 - 磁性ビーズ
 - 洗浄液
- 2) マグネチックスタンド (Magical Trapper™) 東洋紡 MGS-101 (図3-65)



図3-65 マグネチックスタンド (Magical Trapper™)
東洋紡 MGS-101

- 3) 70%エタノール
- 4) 遠心分離機 15,000 rpmできるもの
- 5) TEバッファー

方法

- 1) 上清に吸着液600 μL と磁性ビーズ40 μL を加えチューブミキサーで攪拌する。
- 2) マグネチックスタンドにセットし30秒間静置し、溶液を除去する。
- 3) 洗浄液900 μL を加えて軽く攪拌し、再度マグネチックスタンドにセットして30秒間静置した後、溶液を除去する。
- 4) 70%エタノール900 μL を加えて軽く攪拌し、マグネチックスタンドにセットして30秒間静置した後、溶液を除去する。
- 5) 15,000 rpmで1分間遠心分離し、マグネチックスタンドで30秒間静置した後、エタノールを除去する。
- 6) 5分間吸引乾燥を行いエタノールを完全に除去する。
- 7) TEバッファを50 μL 加え軽く攪拌する。
- 8) マグネチックスタンドで30秒間静置後、上清を採取する。これをリアルタイムPCRの鋳型に用いる。

3. リアルタイムPCR (Taq Man法) での 定量

プライマーおよびプローブ

1) *Pythium aphanidermatum*

Forward primer : PyF (CTGTTCTTTTCCTTGAGGTG)

Reverse primer : APH2B (GCGCGTTGTTTACAATAAATTGC)

Probe : kk_aph-Pr2 (5'- CATTgCCCAgACCATTgCCTC)

プローブの標識 : レポーター ; FAM,
クエンチャー; Eclips Dark Quencher

2) *P.helicoides*

Forward primer : kkhel F1mod2 (TTGTGACATGGTTGGGCTTG)

Reverse primer : kkhel R2 (CCCACAGTATGTTTCAGTTATC)

Probe : kk_hel-Pr1 (5'- AgCTCgCACgCATCCCCTCCC)

プローブの標識 : レポーター ; TET,
クエンチャー; Eclips Dark Quencher

3) *P.myriotylum*

Forward primer : PyF (CTGTTCTTTTCCTTGAGGTG)

Reverse primer : kkMYRR (GGAGCCGAAACTCTCACAAGAC)

Probe : kk_myri-Pr2 (5'- TCCCAAATTGGTGTGCTTCTTTACCC - 3')

プローブの標識 : レポーター ; NED,
クエンチャー; Eclips Dark Quencher

・PCR溶液

Roche mix*	12.5 μ L
BSA	2.5 μ L
Probe(25 μ M)	0.25 μ L
Forward primer (25 μ M)	0.5 μ L
Reverse primer (25 μ M)	0.5 μ L
滅菌蒸留水	7.75 μ L
鋳型DNA	1.0 μ L
<hr/>	
Total	25 μ L

*FastStart Universal TaqMan Probe Master (Rox)

・反応条件

95°C 10分
↓
95°C 15秒 } 45
↓ サイクル
62°C 1分 }



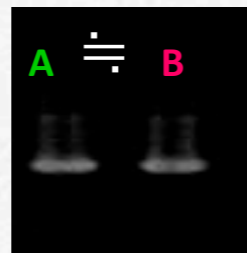
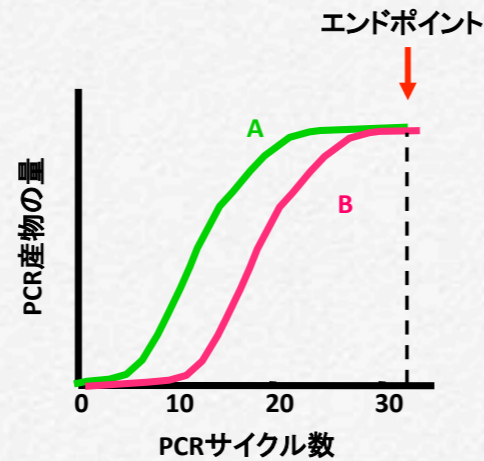
図3-66 リアルタイムPCR装置

リアルタイムPCRって何??

リアルタイムPCRはPCR 増幅産物の増加をリアルタイムでモニタリングする技術です。

と言われても・・・???

PCRでは右図のようにサイクル数の増加に伴い指数関数的にPCR産物が増えています。通常のPCRではエンドポイントでのPCR産物を電気泳動するため増幅速度の異なるAとBをバンドの濃さで区別することはできません。リアルタイムPCRではPCR産物を蛍光ラベルし、蛍光強度を測定することでPCR産物の増加をモニタリングすることができます。つまり、エンドポイントのバンドの濃さでは同じに見えるAとBの増幅のしかたの違いがわかります。

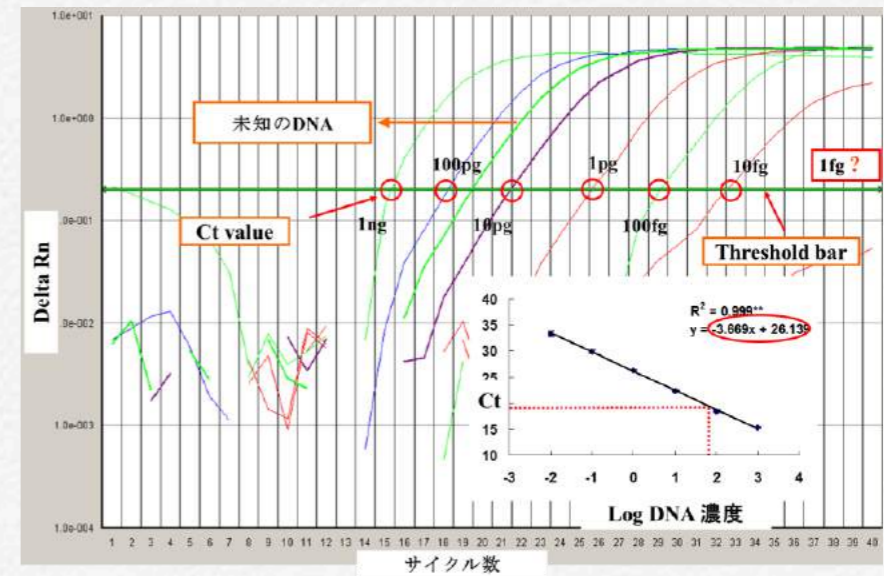


リアルタイムPCRで何が出来るの???

リアルタイムPCRの特徴は電気泳動が必要なく、迅速で容易に解析できることや増幅および検出を同一の密封されたチューブ内で行なうためコンタミネーションの危険性も小さいことなどがあります。しかし、**何といてもリアルタイムPCRの一番の特徴は正確な定量ができることです。**上でも説明した通りリアルタイムPCRではPCR産物を蛍光ラベルし、蛍光強度を測定します。蛍光がある一定の強さに到達するまでのPCRのサイクル数を、比較することによりDNAの量を求めることができます。

リアルタイムPCRでの定量の仕組み

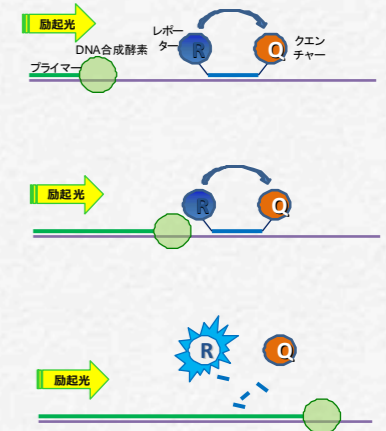
段階希釈した既知量のDNAをスタンダードとして定量したいサンプルDNAとともにPCRを行います。PCR反応中の増幅が指数関数的に起こる領域中で一定のPCR産物の量になるサイクル数(Ct値; threshold cycle)を横軸に、初期のDNA濃度を縦軸にして、検量線を作成します。定量したいサンプルDNAについても同様に、Ct値を求めます。この値と検量線から、定量したいサンプルの目的のDNA量を測定します。



補足) 蛍光モニター法について

リアルタイムPCRでは蛍光色素を検出し、この蛍光シグナルを反応中のPCR産物量と相関させます。一般的に使用される蛍光モニター法は配列に依存しないインターカレーター法と配列特異的プローブによるTaq Manプローブ法の2種類ありますが、このマニュアルでは特異性が高いTaq Manプローブ法を使っています。

TaqManプローブによるリアルタイムPCR



安全性評価法

施設内外の診断ポイント、最適な診断時期および危険水準を明らかにするとともに、既存の防除技術と組み合わせた最適な活用方法を紹介します。



病原菌密度と 病害の発消長

項目

1. 高温性ピシウム菌の多発条件

(1) 温度と遊走子形成の関係

(2) EC（電気伝導度）と遊走子形成の関係

(3) pHと遊走子形成の関係

(4) 各作物の生育好適条件

2. 経時的な菌密度の推移と病害の発消長

1. 高温性ピシウム菌の多発条件

(1) 温度と遊走子形成の関係

遊走子形成は図4-1に示すように液温20～25℃で最も多く、発病適温より低い温度の時に感染拡大します。従って、液温が20℃以上の時に安全性診断が必要と考えられます。

また、液温32℃以上では胞子のう内で遊走子が放出前に発芽してしまい（図4-2）、遊走子形成数は減少します。さらに、高温条件下では遊走子の鞭毛が取れて、泳がなくなる被のう化も早くなりました。従って、高温条件下では遊走子の拡散による感染拡大は少なくなりますが、菌糸伸長が活発になるため菌糸伸長による近距離の感染が増えると考えられます。さらに、高温条件下では植物体の抵抗力も弱くなるので注意が必要です。

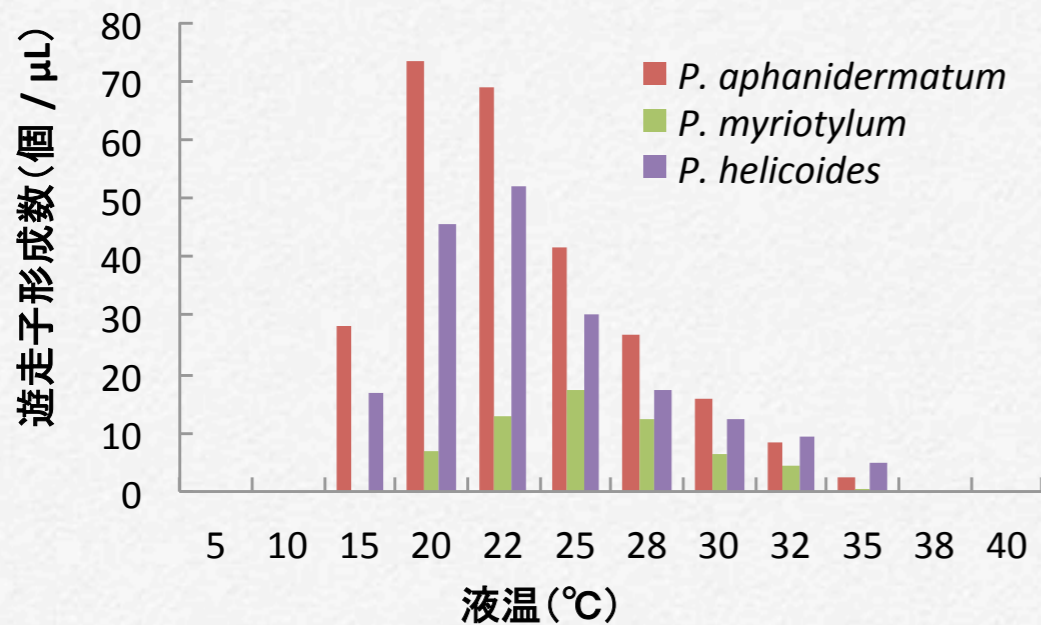


図4-1 液温が高温性ピシウムの遊走子形成に与える影響

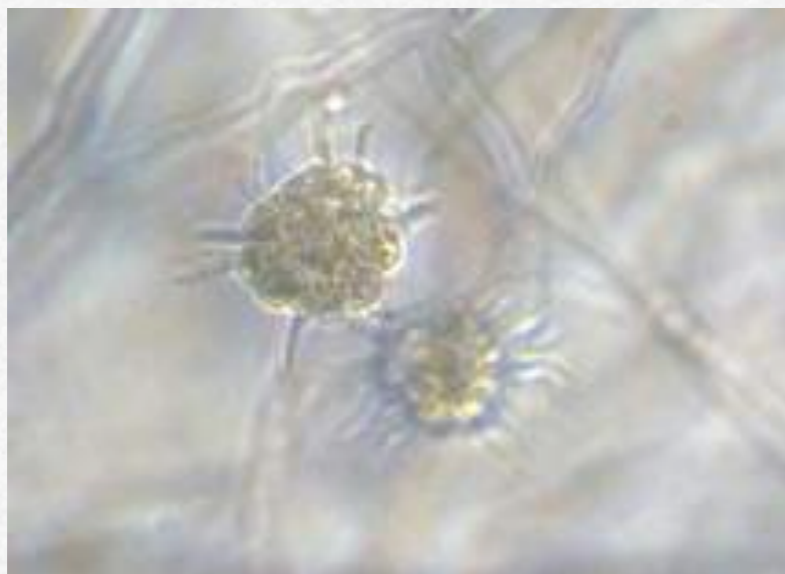


図4-2 球のう内で放出前に発芽した遊走子 (*P. aphanidermatum* 32°C)

(2) EC (電気伝導度) と遊走子形成の関係

1) 高温性ピシウム菌とECの関係

培養液の肥料濃度の指標としてEC (電気伝導度) が使用されますが、ECを高めることで遊走子放出が抑止されます (図4-3)。しかし、胞子のうは形成され (図4-4)、培養液の更新時などにECが低下すると遊走子が放出されられるので注意が必要です (図4-5)。

また、液温とECの組み合わせで遊走子形成量の変動を確認したところ、液温とECそれぞれ単独での試験結果とほぼ一致しました (図4-6)。

しかし、この試験では培養液に滅菌した池の水を使用したためか、高いECでも遊走子形成が確認されました。

従ってEC制御による遊走子数の抑制については注意が必要です。

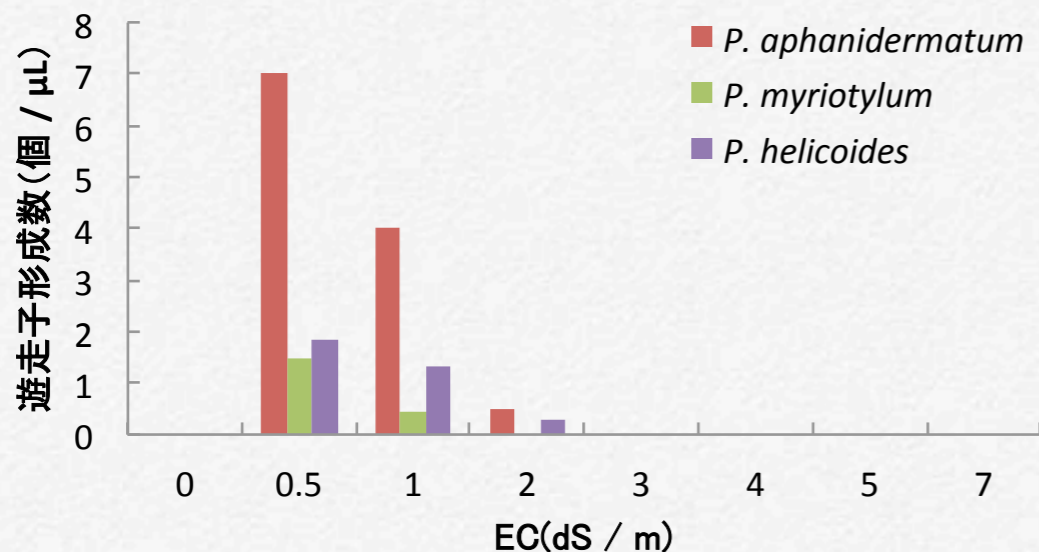


図4-3 培養液のECが高温性ピシウムの遊走子形成に与える影響

ECを0~7 dS / mに調整した各培養液（大塚処方により滅菌蒸留水で調整）に、感染芝葉を浸漬し、24時間後に計測しました。



図4-4 ECの高い培養液中で形成された胞子のう

ECを7 dS / mに調整した培養液（大塚処方により滅菌蒸留水で調整）に、感染芝葉を浸漬し、24時間後に観察しました。

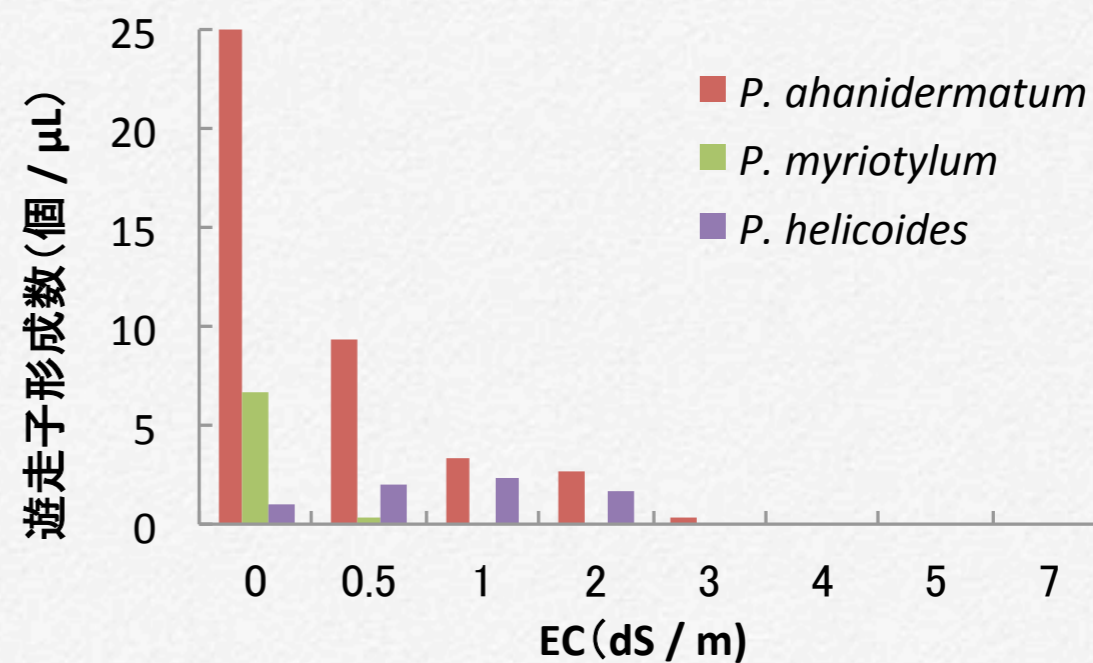


図4-5 ECの低下が高温性ピシウム菌の遊走子形成数に及ぼす影響

感染芝葉を24時間、5 dS / mの培養液（大塚処方により滅菌蒸留水で調整）に浸漬後、同時に0~7 dS / mの各ECに調整した培養液中に移し、さらに24時間後に遊走子数を計測しました。

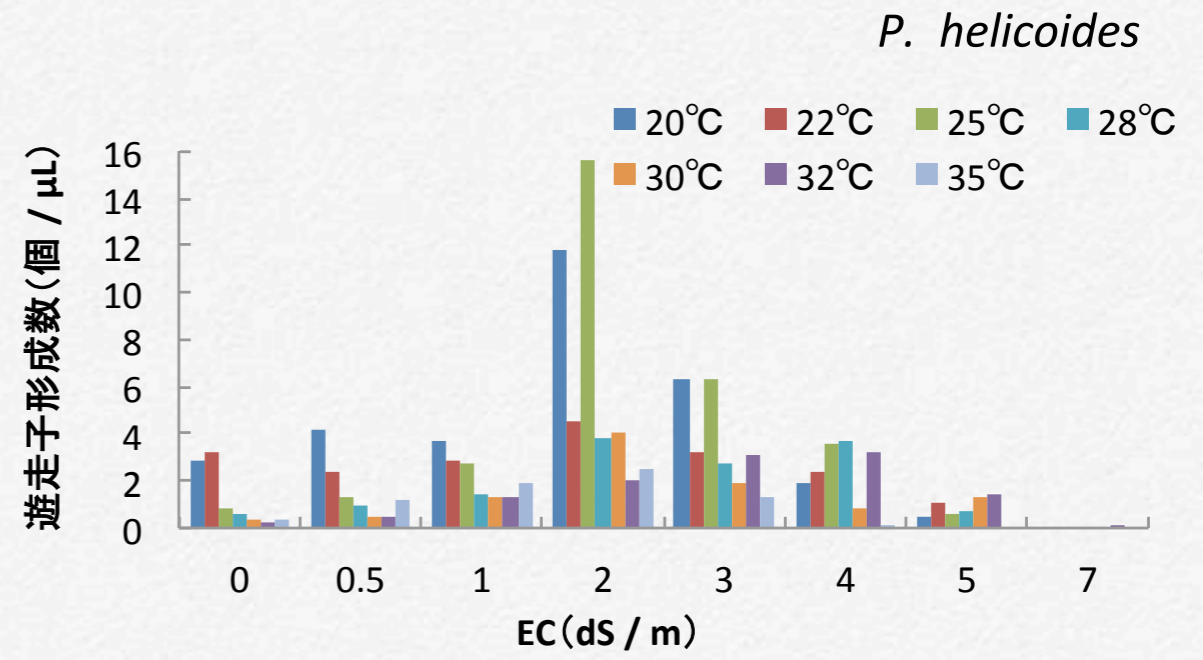
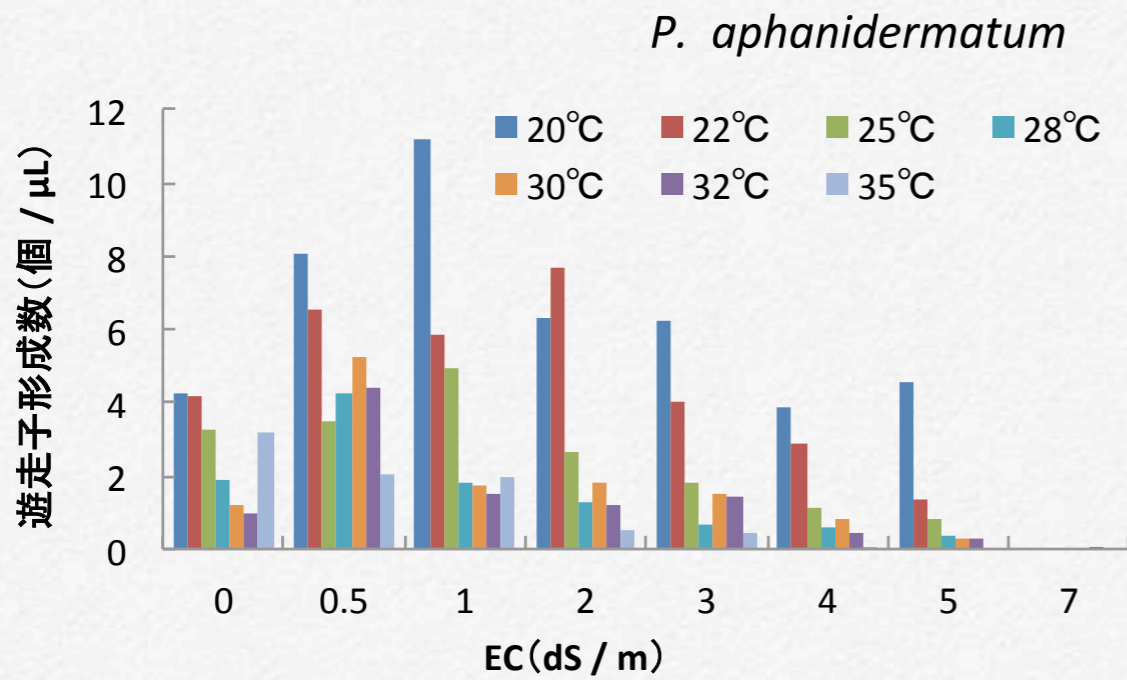
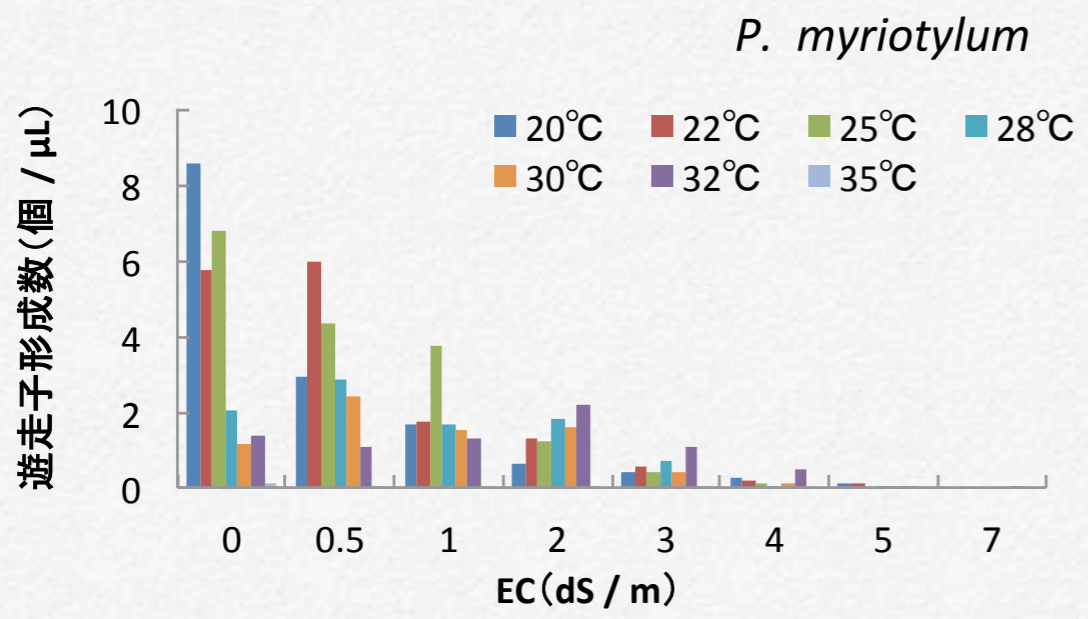


図4-6 液温とECの組み合わせが遊走子形成に及ぼす影響

滅菌した池の水を用いて、大塚処方により0~7 dS / mの各ECに調整した培養液に、感染芝葉を浸漬し、24時間後に遊走子数を計測しました。



2) 液温とECの関係（ミツバ根腐病）

植物体（ミツバ）において液温とECを組み合わせて、発病がどのように変動するか確認しました。液温が低い場合は、ECが高いと発病が少なくなりました。しかし、液温が高い場合はECが高くても発病が多くなりました（表4-1）。

圃場試験の結果でも同様にECが高いと発病が減少し、根の褐変程度も軽くなりました（図4-7）。また、栽培途中で培養液の更新等でECが低くなると遊走子形成数が増加しました（図4-8）。

表4-1 液温と培養液ECが根腐病の発病株率に及ぼす影響

培養液EC (dS / m)	温度(°C)					
	20.0	22.5	25.0	27.5	30.0	32.5
0.0	22.2	22.2	33.3	44.4	44.4	55.6
1.0	0.0	11.1	0.0	22.2	55.6	44.4
2.0	0.0	11.1	0.0	11.1	55.6	55.6
3.0	0.0	11.1	0.0	11.1	33.3	44.4
4.0	11.1	0.0	0.0	11.1	33.3	66.7
5.0	11.1	0.0	0.0	33.3	33.3	66.7

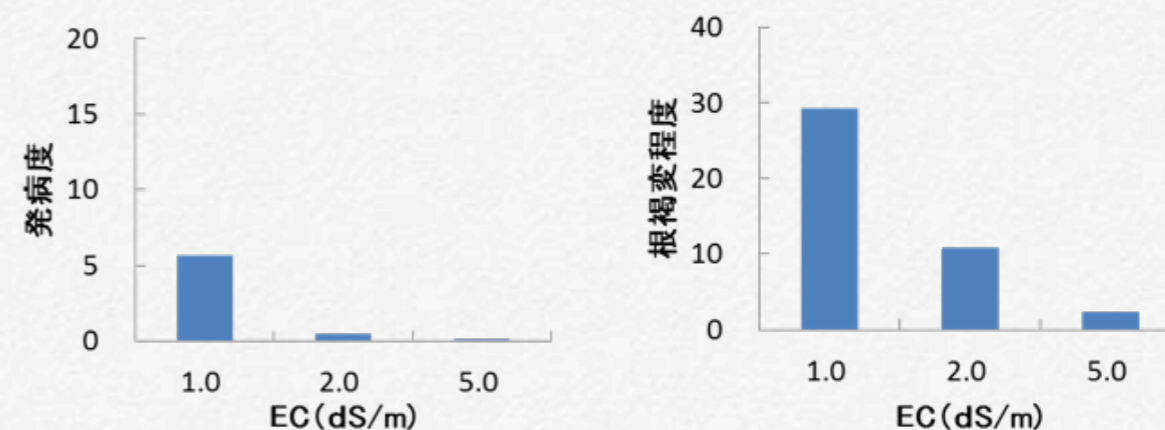


図4-7 ECの違いがミツバ根腐病の発病に及ぼす影響（圃場試験）

発病指数 0:発病なし 1:葉の萎れ 2:株の萎凋(軽) 3:株の萎凋(甚) 4:株の黄化、枯死

発病度 = $(\sum (\text{発病指数} \times \text{指数別株数}) / (4 \times \text{調査株数})) \times 100$

根褐変指数 0:なし 1:わずか 2: ~1/4 3: 1/4~1/2 4: 1/2~3/4 5:すべての根

根褐変度 = $(\sum (\text{根褐変指数} \times \text{指数別株数}) / (5 \times \text{調査株数})) \times 100$

試験条件：液温25°C、M式水耕装置（3.24㎡）320株定植 試験

期間：H25 / 5 / 10~5 / 27

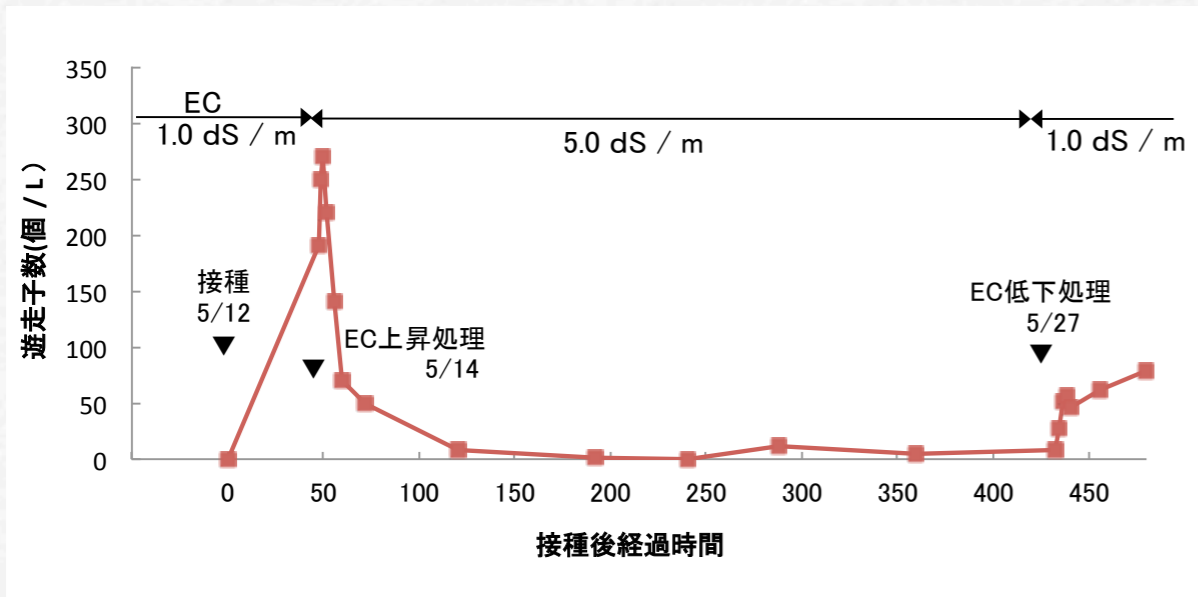


図4-8 ECの変動が培養液中の遊走子数に与える影響（圃場試験）

試験条件：液温25°C、M式水耕装置（3.24 m²）320株定植 試験期間 H25 / 5 / 10～5 / 30 5 / 27（EC低下処理前）時点の発病状況：発病度4.2、根褐変程度6.3

（3）pHと遊走子形成の関係

高温性ピシウム菌の遊走子形成は、pH 4.0で抑えられました（図4-9）。ただし、低pHは作物の生育に影響をおよぼし、フザリウム菌等による病害が増加するため、安易にpHを下げることはお勧めできません。

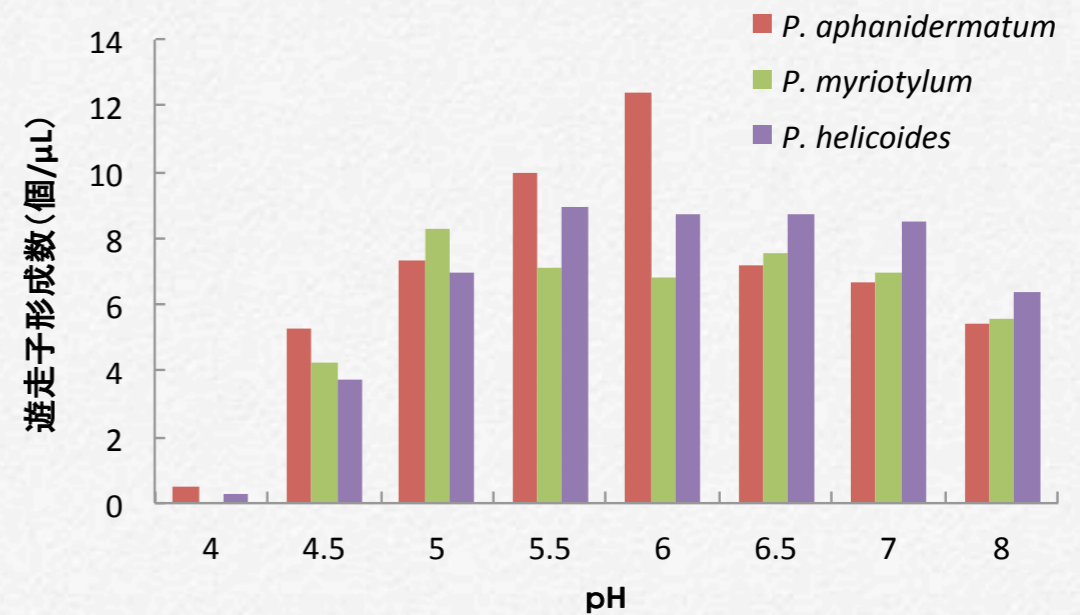


図4-9 培養液pHが高温性ピシウム菌の遊走子形成に及ぼす影響

(4) 各作物の生育好適条件

各作物別の生育好適条件を表4-2に示しました。根腐病の発生を抑制するためには健全な生育を重視し、根傷みをおこさないように、これらの条件下で栽培することが重要です。

表4-2 各作物別の生育条件

植物名	培養液温度(°C)			pH			培養液EC(dS / m)
	最低	適温	最高	最低	好適	最高	好適
トマト	13	15-23	25		5.5-6.5		1.0-3.0
ハウレンソウ	13	16-20	23		5.0-7.0		1.2-2.4
ミツバ	13	18-22	25		5.5-6.5		1.8-2.0
ネギ	13	16-22	25	4.0	5.5-6.5	7.5	2.4-3.6
ポインセチア	10	20-30	35		-		-
バラ		21-24		5.0	5.5-6.0	7.0	高温期 0.8 低温期 1.5

※「養液栽培の新マニュアル」、「農林技術体系花き編」及び「バラの生産と流通」より

2. 経時的な菌密度の推移と病害の発消長

感染と菌密度の関係（圃場試験 ミツバ）

6月定植のミツバに遊走子濃度を変えて接種を行い、その後の菌密度の推移と発病状況を調査したところ、 1×10^5 個 / L と高濃度で接種した場合には、接種後すぐに発病が確認され、 10^3 、 10^4 個 / L では作の後半に発病株率が増加しました（図4-10）。

また、遊走子数は、接種濃度が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個 / L で、増加が確認されました（図4-11）。初期の菌密度がポイントで、初期の菌密度を減らすことで発病を遅らせることが可能です。このことから定植時の菌量を把握することが重要です。

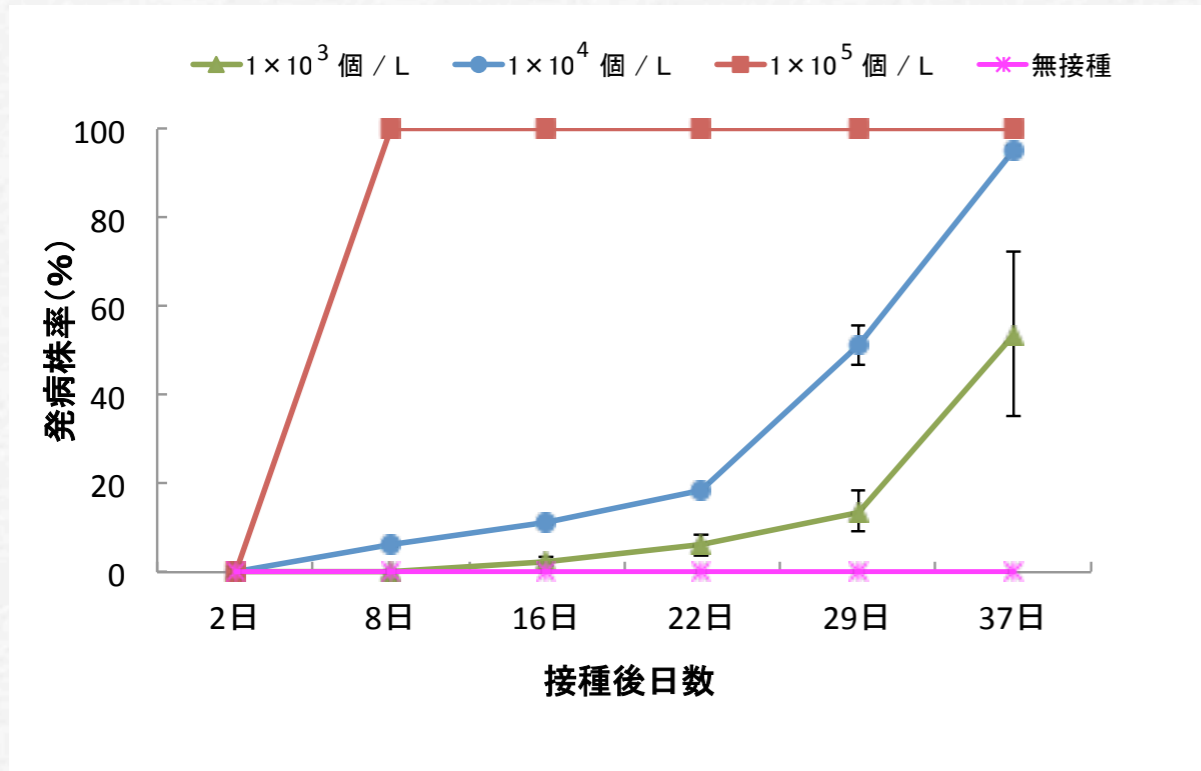


図4-10 *P. aphanidermatum* の遊走子を $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 個/L接種した場合の発病株率の推移

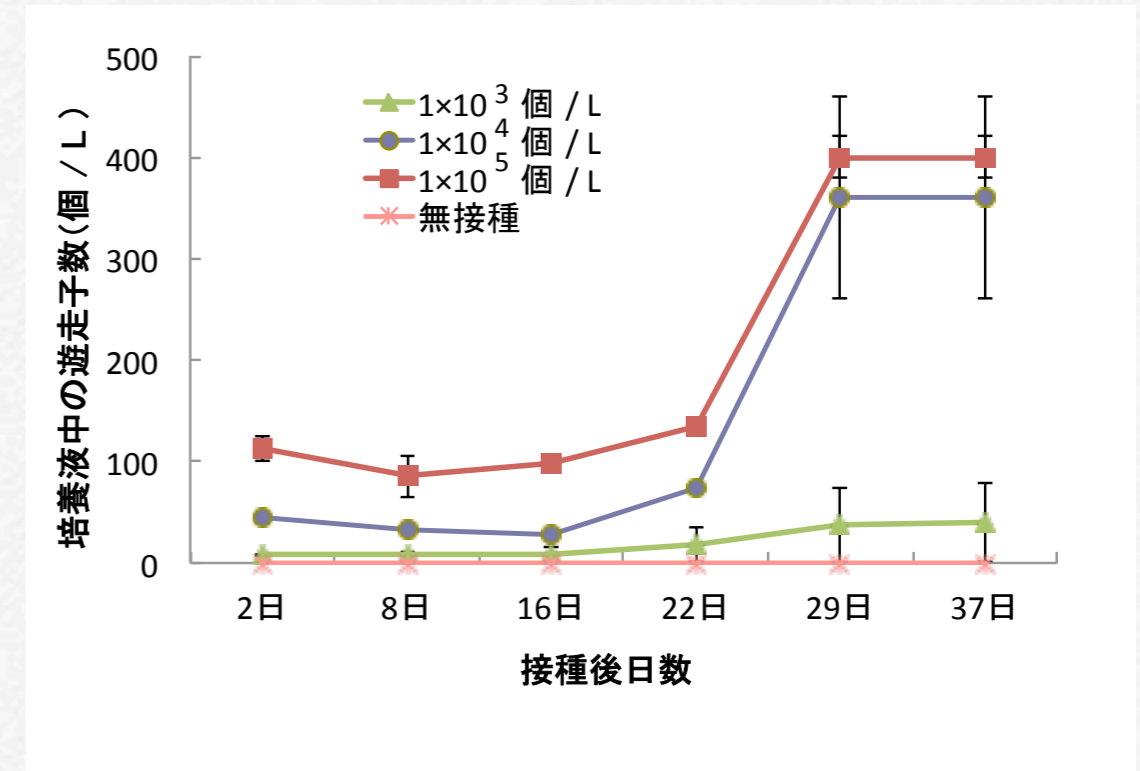


図4-11 *P. aphanidermatum* の遊走子を $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 個/L接種した場合の培養液中の菌量の推移

総合的な防除対策

項目

1. 雨水・土砂の培養液への混入防止
2. 消毒剤によるタンク・ベッド・資材殺菌
3. 温湯・蒸気によるパネル殺菌
4. 培養液の適温管理
5. 植物体の見取り調査による発病株の早期除去
6. 金属銀剤による培養液殺菌
7. 培養液殺菌装置の導入
8. 培養液の更新
9. 培養液の高EC管理
10. 手灌水

病害の発生程度や使用状況、資材・装置の殺菌後の管理により、完全な病害防除が出来ないこともありますが、菌密度を低下させ病害の発生を低減する方法として有効な防除対策の一例を紹介します。

1. 雨水・土砂の培養液への混入防止

ピシウム菌の養液栽培施設内栽培槽への持ち込み原因のひとつとして、雨水の流入や舞い上がった土砂が考えられます。培養液タンクが低い位置にある場合には、雨水が流入しないようにタンクを囲うなどの対策をしてください。また、施設の周辺や施設内部について、コンクリートやシートで床を覆うことで、土砂の舞い上がりを防ぎ、リスクを低減できると考えられます。施設内外で履物を替えることで、施設内への土の持ち込みを防いでください。



図4-12 施設の周辺やタンク周辺をシートで覆うことで、土砂の侵入を防ぐ

2. 消毒剤によるタンク・ベッド・資材殺菌

栽培を始める前に、伝染源となる可能性がある資材に付着した前作の植物残渣や汚れを洗浄し除去してから、殺菌してください。伝染源の除去は、病害発生リスクの低減につながります。

消毒剤は必ず使用法を確認してから使用してください。また、資材殺菌を目的としており、農薬とは異なるので注意してください。

(1) ケミクロンG (次亜塩素酸カルシウム)

日本曹達株式会社 (<http://www.nippon-soda.co.jp/nougyo/>)

資材殺菌には、10分間浸漬の場合1,000倍、瞬間浸漬またはジョウロ散布の場合は500倍に希釈して使用します。礫耕栽培

の礫消毒は礫中の有機物を取り除き、水を礫面上3 cmにし、全体の水量に対し、1,000～2,000倍で浸漬します。

強力酸化剤で、金属腐食性（サビ）があります。金属製のものにかからないように注意が必要です。

次亜塩素酸カルシウムは、光によって分解することから、礫耕栽培の場合、夜間に処理します。処理中は黒マルチフィルムで覆い、分解を防いでください。価格は、500 g 650円前後です。

塩素製剤による殺菌では、有機質が多いと塩素が有機質に消費され殺菌効果が十分得られません。そのため、ブラシ等で付着した残根、藻、肥料成分等を除去してから殺菌します。また、汚れに塩素が残って薬害の原因になることもあるので、十分に洗浄してください。

<残液の処理>

亜硫酸ソーダ（日曹ノクロエース）で、有効成分が残らないように中和してから徐々に排水してください。排水が養魚池等に入らないよう十分注意してください。

(2) イチバン (2-ベンゾチアゾール)

大塚アグリテクノ株式会社 (<http://www.agritechno.jp/>)

資材殺菌には、瞬時浸漬またはジョウロ散布（500～1,000倍）で使します。

発泡スチロール、ポリスチレン、軟質塩化ビニル等は材質が劣化するおそれがあるので使用を避けてください。価格は、500 mL 2,300円前後です。

<残液の処理>

残液100 L 当り消石灰をスコップ1杯分（約3 kg）投入し、数日間直射日光にさらし、有効成分の分解を危険のない場所で行い、安全に処理してください。廃液が養魚池、河川等に入らないよう十分注意してください。

「イチバン」のご使用でご不明、ご質問等がある場合はコールセンター（0120-210-928）まで連絡をお願いします。

3. 温湯・蒸気によるパネル殺菌

生育した植物根は、発泡スチロール製パネルの内部へ侵入し残ります。この根が病原菌に感染していた場合、伝染源となり病害発生リスクが高まります。

次亜塩素酸カルシウムなどは資材の表面を殺菌することはできますが、パネル内に侵入した病原菌の殺菌は困難です。そこで、熱を利用することで資材内部まで殺菌する方法が有効です。

ミツバ根腐病菌（ピシウム菌）は50～55℃で10分、60～65℃で5分間の処理で死滅することが確認されています（竹内1995）。また、*P. aphanidermatum*を感染させたトマトの根を、60℃で5分間温湯処理することで死滅することを確認しています（図4-13）。

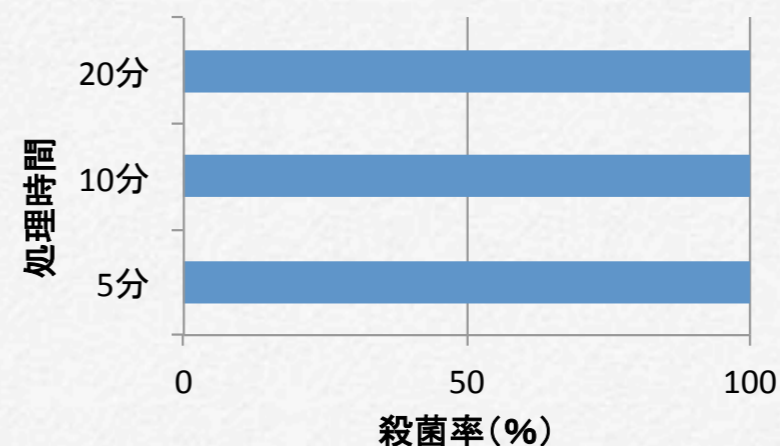


図4-13 ピシウム菌に感染した根を用いた温湯殺菌（60℃）の効果

パネルフレッシャー

ネポン株式会社 (<http://www.nepon.co.jp/>)

養液栽培用の定植パネルに付着した病原菌を、お湯を使って加熱殺菌します。

処理能力は66枚 / 回、60～100分 / 回（給水温度により変化）、殺菌方法は温水55℃、20分、燃料は灯油4.3 L / hです。本体価格は、194万円（税別、送料別）です（図4-14）。



図4-14 パネルフレッシャー
ネポン株式会社のホームページより

4. 培養液の適温管理

根圏の生育適温

好適な根温は作物によって違いはありますが（表 4-3）、夏期に培養液を25℃程度に冷却することは、根痛みを回避できます。

表4-3 根圏温度に関する生育適温と限界温度（養液栽培研究会 1997）

植物名	低温限界 根温	好適 根温	高温限界 根温
トマト	13℃	15～23℃	25℃
ホウレンソウ	13℃	16～20℃	23℃
ミツバ	13℃	18～22℃	25℃
ネギ	13℃	16～22℃	25℃

液温は作物の生育にとって重要であると同時に、高温性ピシウム菌の植物への感染・発病にも影響します。菌種によって感染・発病温度は異なりますが、適温管理に努めてください。

液温が高温性ピシウム菌の感染と発病に及ぼす影響

トマトの養液栽培において、高温性ピシウム菌の菌密度が 10^2 個/Lでは、低温ほど感染が減少します(図4-15,16)。

発病の適温は高温性ピシウム菌の種類によって異なり、

P. myriotylum では 20°C でも発病しますが、

P. aphanidermatum では、 25°C より低いと感染しても発病が少なくなります。

P. aphanidermatum の場合、液温を低温に管理することが有効です。

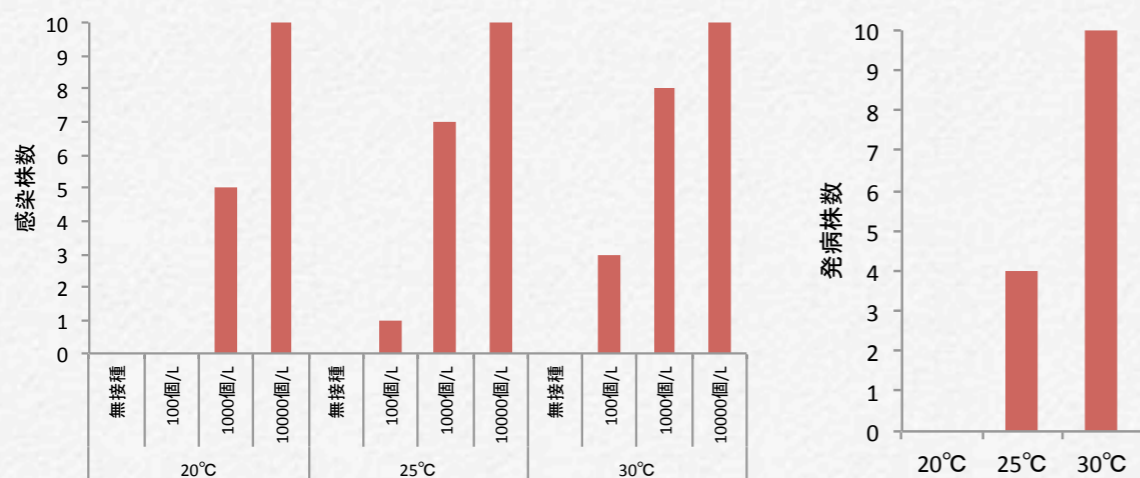


図4-15 液温が*P. aphanidermatum*の感染と発病に及ぼす影響

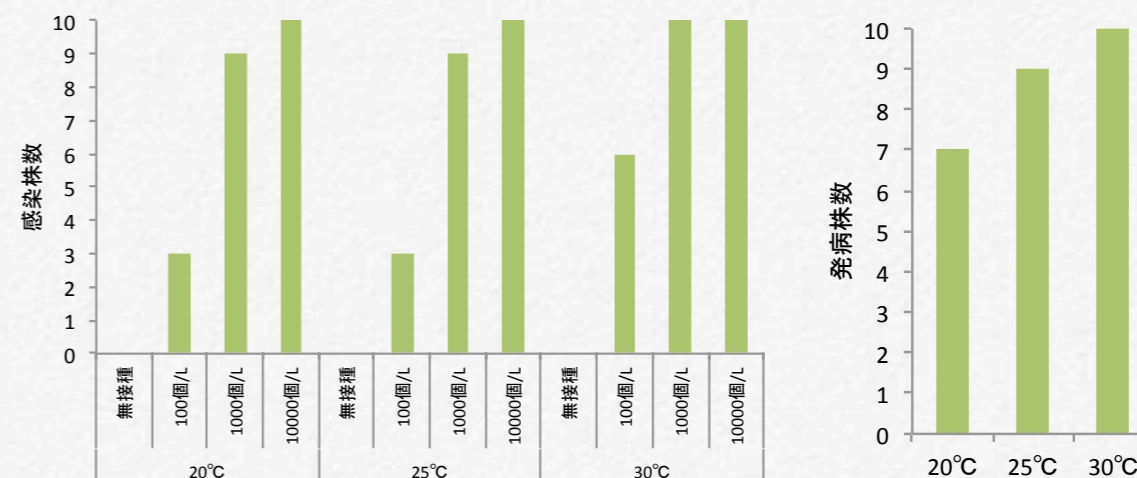


図4-16 液温が*P. myriotylum*の感染と発病に及ぼす影響

液温および菌密度が感染におよぼす影響を調べるため、蒸留水を入れた50 mL遠沈管に播種後9日のトマト苗(品種:ハウス桃太郎)を全部で10株移植し、遊走子を 10^2 、 10^3 、 10^4 個/Lになるように接種した。20、25、 30°C で3日間静置後、NARM培地に置床し、 38°C 48時間後の生育の有無により感染を調査した。また、発病におよぼす影響は、 10^4 個/Lになるように遊走子を接種後、 20°C 3日静置し感染させた苗を20、25、 30°C で14日間静置し、萎れの有無で調査した。

液温の管理方法

培養液の温度管理として、根圏の水温を測定し現状を把握することが重要です。温度データロガー（おんどとりなど）を用いれば、液温を測定・記録できます（図4-17）。

夏の高温対策として、栽培槽上に、熱遮断性フィルムでマルチを行い、栽培槽の温度上昇を抑制します。また、強日射時は遮光カーテンを利用して、ハウス内温度の上昇および栽培槽への直射日光を抑制します。

夏の培養液の温度上昇を抑える方法としてチラーが利用できます（図4-18）。チラー導入のコストについて、株式会社M式水耕研究所のプラントの事例を紹介します（表4-4）。

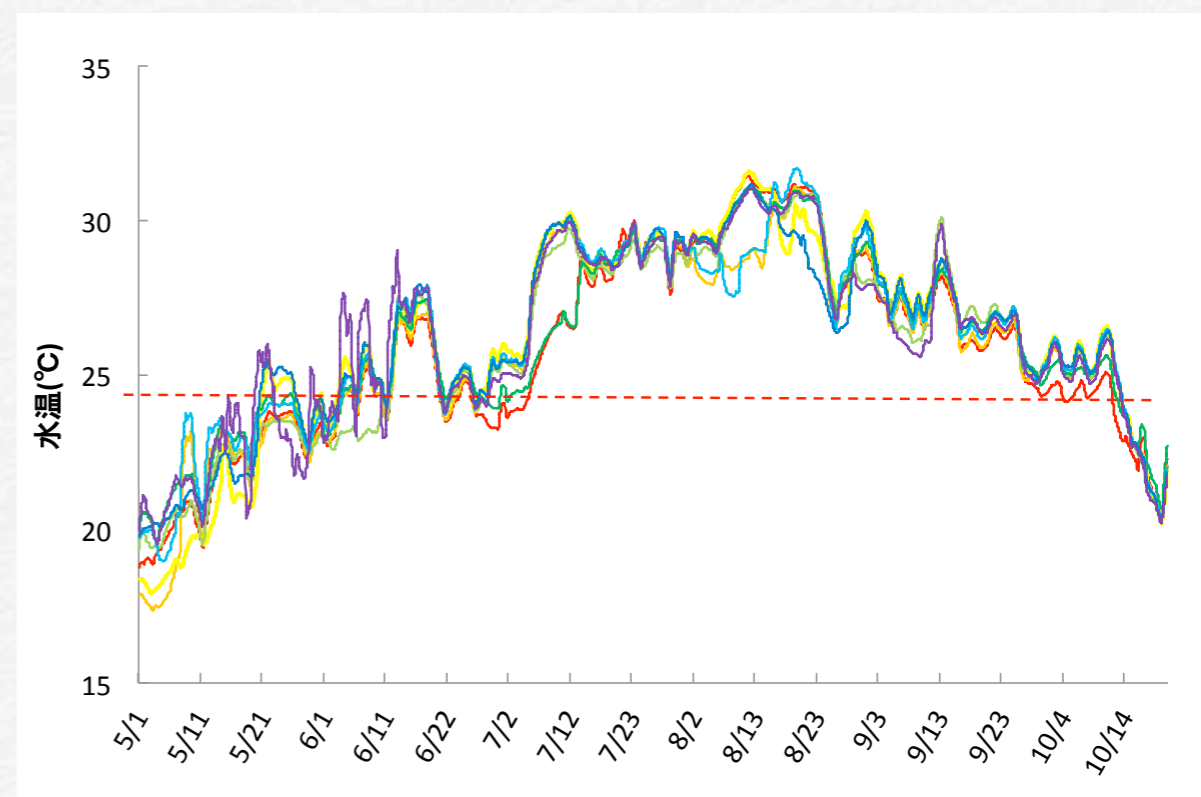
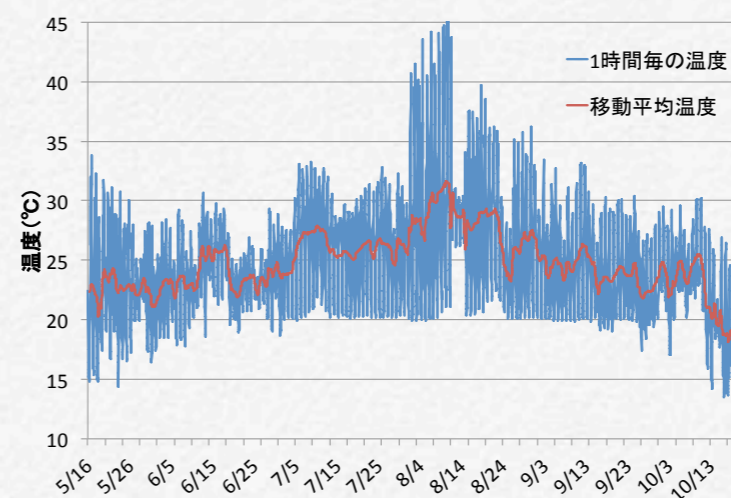


図4-17 培養液タンク液温の推移

トマトロックウール栽培、タンク容量250 L、8タンクの推移



<参考>

ロックウールの温度の推移 5月中旬に培養液の水温が25°C未満のとき、ロックウールの温度は25°Cを超えています。



図4-18 チラーの写真

表4-4 チラー導入事例

水耕プラント	M式水耕研究所プラント「えむ」120B
施設規模	600坪(1,980 m ²)
栽培作物	リーフレタス類
管理温度	23～25℃
チラー	冷専チラー
参考形式	東芝RCUNP375AV(15馬力) 定価 515万円
推定稼働日数	90日程度
推定稼働時間	5～6時間/日
年間推定電力	4,680～5,616 kw

※水耕プラントにチラーを設置する際は、ストレージタンク、温調水循環ポンプ、水耕ベッド内の熱交換パイプなどの付属資材と工事費用が別途必要です。

5. 植物体の見取り調査による発病株の早期除去

発病した株は、伝染源となるため、栽培槽から除去し適切に廃棄する必要があります。見取り調査により、萎凋等の異常を発見した場合は除去してください。また、ピシウム菌による病徴かその他の要因か判断できない場合は、植物体-LAMP法（第3章セクション2）により診断し、対策を講じてください。

6. 金属銀剤による培養液殺菌

金属銀剤（商品名：オクトクロス）

三島光産株式会社 (<http://www.mishimakosan.com/>)

金属銀剤は銀を担持した資材で、培養液に浸漬し使用します（図4-19）。野菜類の養液栽培で培養液に処理できる唯一の殺菌剤です。高温性ピシウム菌だけでなく、フザリウム菌や、青枯病菌に対しても有効です（表4-5、図4-20）。

金属銀剤3,000 cm²を1 tの培養液（園試標準処方1単位、pH 6.0）に16時間浸漬することで、培養液中に30 ppbの銀イオンを徐放します(40 ppb程度で安定)（図4-21）。培養液に浸漬すると徐々に銀濃度が高まり、殺菌効果も高まります。また、培養液にアンモニアが含まれる場合やpHが5.0以下の場合、温度が40°C以上の場合では、銀の溶出量が増加するので、使用量を1/3～1/5量とします。逆に、pH 7.5以上、2単位以上では銀の溶解量が減少します。

子葉展開～本葉2葉程度の幼苗では障害を発生することがあり、苗の生長に合わせて1/3～1/5量の分割投与をしてください。

い。茎葉の萎凋、根の褐変等の銀の薬害が発症した場合は、すみやかに金属銀剤を除去し、培養液を半量程度交換しましょう。

また、塩素に対する注意が必要です。水道水と井戸水で銀の溶出が異なります（図4-22）。濃度の高い塩素が存在する場合、布が変色する（淡褐色になる）ことがあり、銀が溶出しなくなる可能性があります。

さらに、Ag 40 ppbの銀イオン濃度を確保するには、水温25°Cで3日間、20°Cで7日間、15°Cで10日間程度浸漬が必要になります（図4-23）。水温が25°C以上では溶出量が80 ppbを超えています。

強い太陽光線下にさらすと、変色して銀の溶出量に影響が生じますので、黒いビニル袋に入れて保存してください。価格は、1箱（10枚入）39,000円前後です。



図4-19 銀を担持した不織布

表4-5 ピシウム菌、フザリウム菌に対する金属銀剤
の殺菌効果（黒田 2007）

処理	浸漬 日数	銀濃度 (ppb)	ピシウム菌 遊走子の遊泳	フザリウム菌 殺菌率(%)
金属銀剤	2	22	なし	68.1
	5	53	なし	98.6
	7	112	なし	99.1
無処理			あり	0

ピシウム菌：トマト根腐病菌 (*Pythium aphanidermatum*)

フザリウム菌：トマト根腐萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum*)

金属銀剤を培養液（大塚液肥1号、同2号の標準濃度）に3,000 cm²/t 浸漬し、浸漬 2、5、7 日後の培養液の殺菌効果をトマト根腐病菌（遊走子）とトマト根腐萎凋病菌（分生子）を対象に調べました。

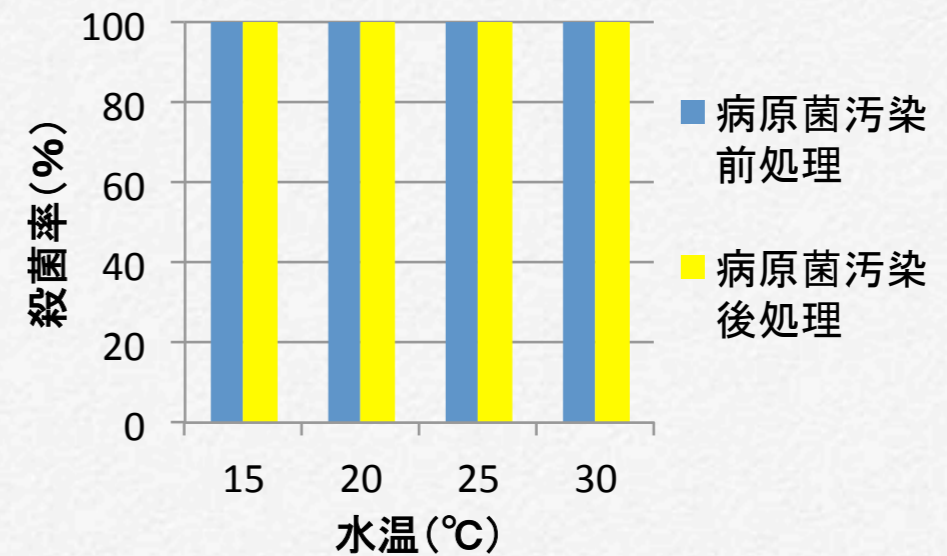


図4-20 青枯病菌に対する金属銀剤の殺菌効果

トマト青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) を対象に、金属銀剤を26日間浸漬した培養液に青枯病菌を接種 (10³ cfu / mL) した場合と、同菌を培養液に接種 (同) した後に金属銀剤を浸漬し24時間経過した場合について、液温を15、20、25、30°Cに設定し、殺菌効果を調べました。

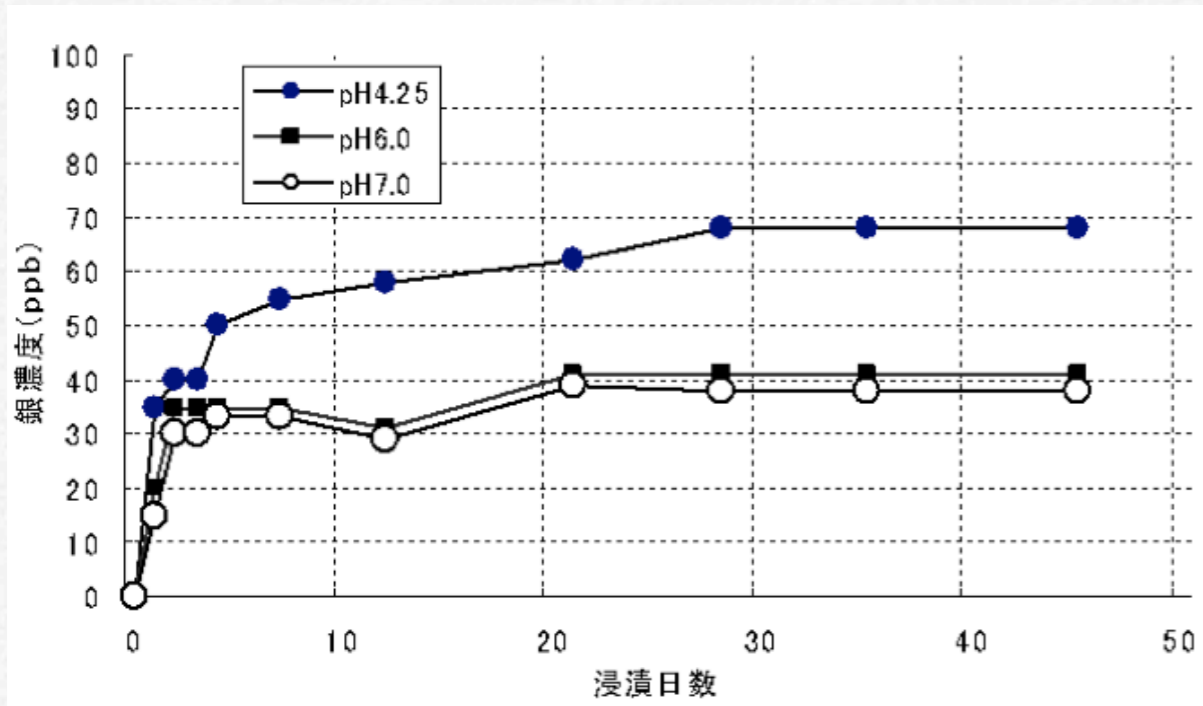


図4-21 水耕栽培の培養液のpHと銀の徐放量

1 Lの培養液（園試標準処方1単位）に金属銀剤3 cm³を浸漬し、培養液中に徐放される銀濃度を測定しました（三島光産株式会社）。

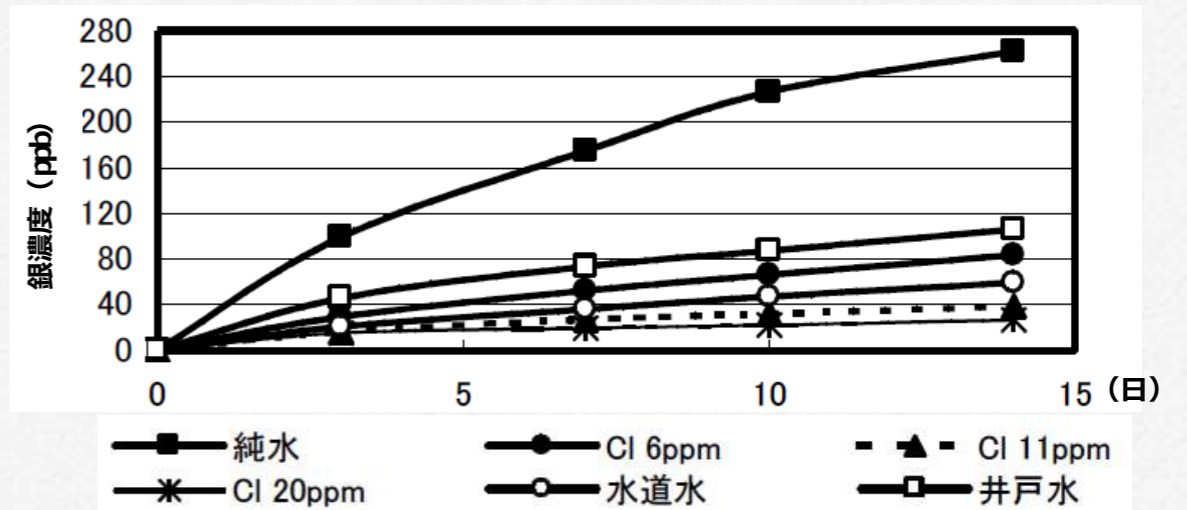


図4-22 塩素濃度が銀溶出に与える影響（山田ら 2006）

純水、井戸水、水道水を原水として、山崎トマト処方2単位の培養液を調整。原水の塩化物イオン濃度は、純水1 ppm、井戸水4 ppm、水道水12 ppm。純水で作製した培養液に塩化ナトリウム（NaCl）を添加し、Clイオン濃度6、11、20 ppmを作製。これらの培養液を水酸化ナトリウムでpH 6.0に調整し、金属銀剤を浸漬し25°Cに静置しました（山田ら 2006）。

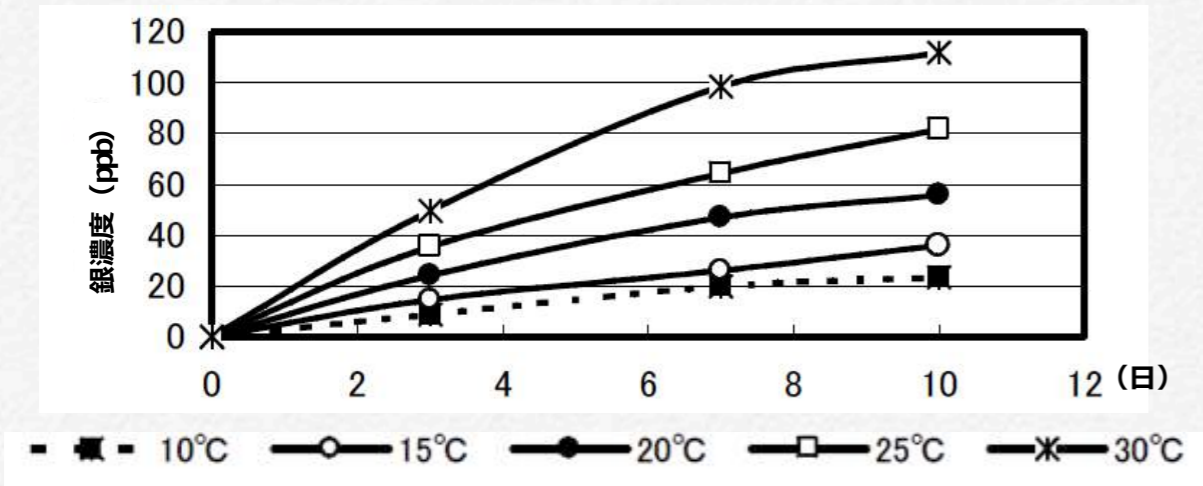


図4-23 液温が銀溶出に与える影響（山田ら 2006）

純水を原水として山崎トマト処方2単位の培養液を調整。その培養液に塩化ナトリウム（NaCl）をClイオン濃度5 ppmになるように添加。水酸化ナトリウムでpH 6.0に調整し、金属銀剤を浸漬し各温度で静置しました（山田ら 2006）。

<防除効果試験>

トマト養液栽培において、*P. aphanidermatum* の遊走子を 10^2 個/L接種すると菌密度が2日後に約10倍、7日後に約100倍に増加しました。接種21日後には1区7株、3反復のうち20株が発病しました（図4-24）。一方、遊走子の接種24時間後に金属銀

剤を処理することで、処理しない場合に比べ菌濃度の増加や発病が抑制されました（図4-25）。

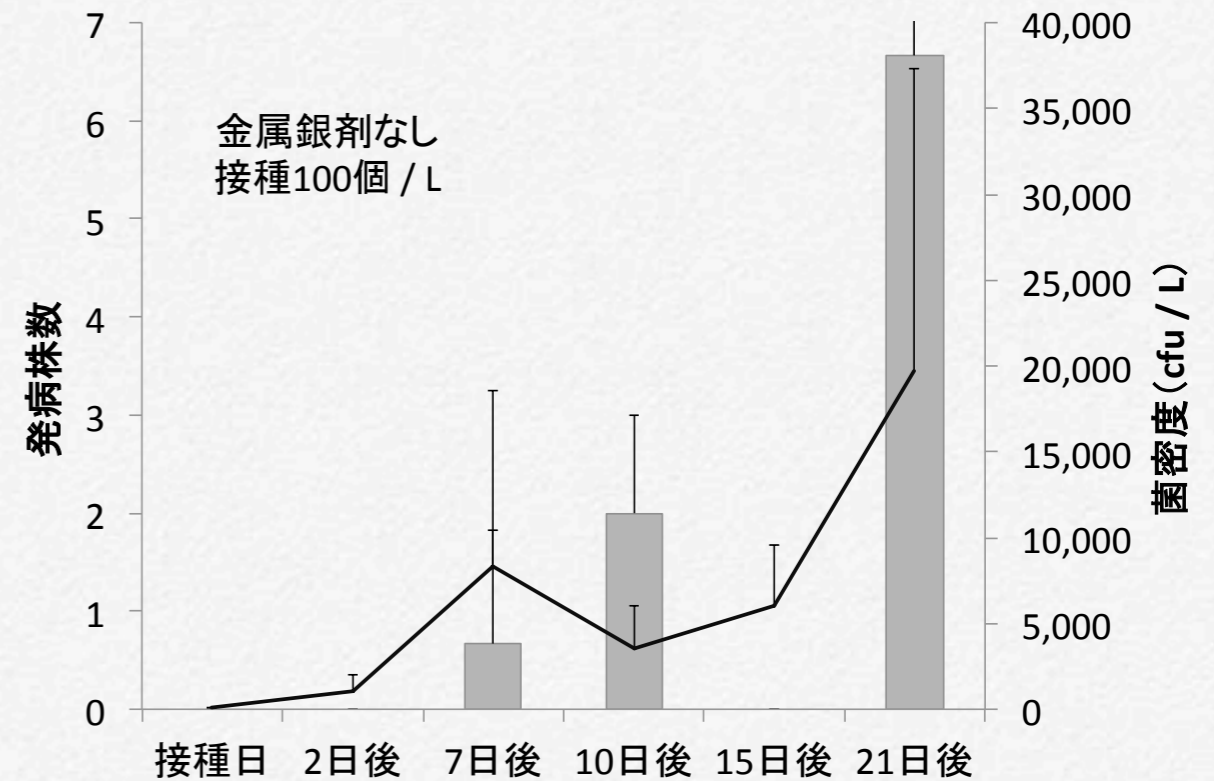


図4-24 遊走子接種（濃度 10^2 個/L）後の菌密度と発病株数

折れ線グラフ：菌密度 棒グラフ：発病株数

3反復の平均値 バーは標準偏差

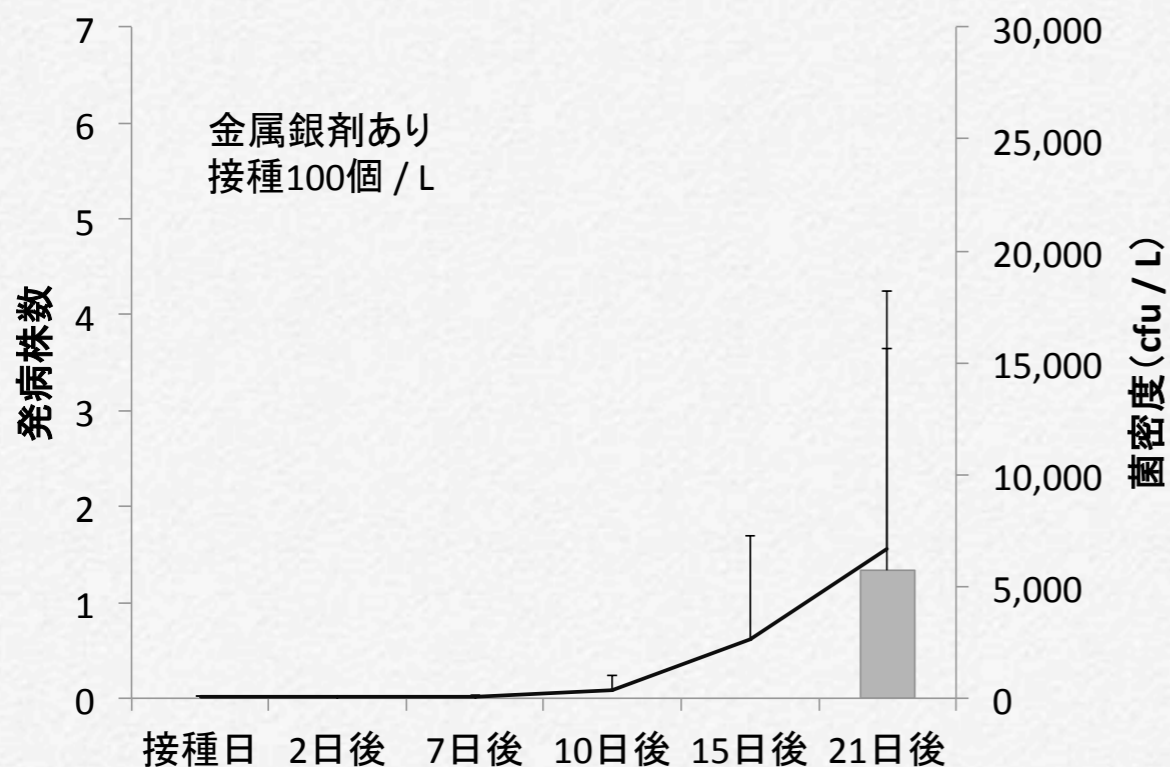


図4-25 遊走子接種（濃度 10^2 個/L）後24時間後に金属銀剤を処理した菌密度と発病株数
折れ線グラフ：菌密度
棒グラフ：発病株数 3反復の平均値 バーは標準偏差

播種後10日のトマト苗（品種：ハウス桃太郎、播種：平成24年6月11日、区制：7株/区、3反復）を、50L栽培システムに移植（6月21日）し、4日後に*P.aplanidematum*（菌株：AiPo1）の遊走子を 10^2 個/L濃度になるように接種しました。金属銀剤処理は、接種翌日に処理しました。培養液はハイポニカ液肥（A液、B液）を供試し、EC1.2 dS/mに調整しました。試験中の平均水温は27.8°Cでした。

<金属銀剤に対する原水および培養液の適応性簡易検定>

金属銀剤の銀イオンの溶出量は、原水および培養液のpH、塩素濃度、塩類濃度、温度などの影響により変化します。このため、施設によっては十分な利用効果が得られない場合があります。水質や銀イオンの溶出量を分析することが困難な場合は、以下の方法により金属銀剤の適応性について簡易に検定することが可能です（表4-6）。

- 1) 検定したい水に金属銀剤を入れ、25°Cで一定期間培養します。ブランクとして金属銀剤を入れない水も準備します。
- 2) 培養後に水を採取し、メンブレンフィルター（孔径0.45 μm ）で微生物等を取り除きます。
- 3) ウェルプレートに濾過液を入れ、別途作成しておいた遊走子懸濁液を混和します（濾過液量の1/100以下）。
- 4) 25°Cで24時間培養後に濾過液を採取し、ピシウム菌選択培地（NARM培地）に塗布します。
- 5) 培地を38°Cで24時間培養した後に菌の生存の有無を確認します。

表4-6 金属銀剤に対する原水および培養液の適応性簡易検定

	0日	3日	7日	14日	21日
蒸留水	+++	----	----	----	----
A施設 原水	+++	----	----	----	----
A施設 培養液	+++	----	----	----	----
B施設 原水	+++	+++	----	----	----
B施設 培養液	+++	+++	++-	++-	+++

注) 金属銀剤の処理量: 3,000 cm² / t、供試菌: *P. aphanidermatum*
 +は、NARM培地上で生存を確認、-は生育しなかったことを示す。3反復。

7. 培養液殺菌装置の導入

(1) オゾン水生成装置による培養液の殺菌

オゾン (O₃) は不安定で酸素分子に変化しやすい分子ですが、酸素分子に変化するとき周りにある物質を酸化させる作用があります。その酸化作用は強力で、殺菌、脱臭、脱色などに利用されています。一方、高濃度のオゾンガスを人が吸収すると人体への悪影響があるため、わが国では労働衛生上のオゾン許容濃度は0.1 ppm以下と定めています。

オゾンによる培養液の殺菌は、オゾンガスとオゾン水の利用があります。オゾンガスを利用した培養液殺菌装置が開発されていますが、オゾン水に比べて殺菌効率が劣ることと、殺菌槽からオゾンガスが漏れないようにする排オゾンガス対策が必要です (黒田ら 2001、特許第3396686号)。

オゾン水を利用した培養液殺菌は、オゾン水生成装置を利用する方法があります (黒田ら 特許第5238970号)。

オゾン水生成装置

株式会社ハマネツ (<http://www.hamanetsu.co.jp>)

同社の装置（図4-26）は、水道水を装置に直結し、オゾンガスを溶解させることで最大5 mg / Lのオゾン水を毎分20 Lの排出量で生成でき、オゾンが水に溶解しているため、排オゾンガス対策が不要です。また、水道水以外に培養液を装置に取り込むことも可能であり、培養液にオゾンガスを溶解させることで、培養液中の病原菌を殺菌することができます。オゾン水生成装置の本体価格は248万円（税別）です。さらに、養液栽培施設に殺菌装置として設置する場合は、殺菌槽の設置や配管工事などに別途費用が必要です。



図4-26 オゾン水生成装置 (HOW-2005)

培養液中の病原菌の殺菌効果を評価したところ、300 Lの殺菌タンクに250 Lの培養液を入れ、オゾン水生成装置により循環殺菌を行う方法（図4-27）では、トマト根腐病菌（*P. aphanidermatum*）、トマト根腐萎凋病菌（*F. oxysporum*）を含む培養液は4分間で100%殺菌できました。また、トマト青枯病菌（*R. solanacearum*）を含む培養液は2分間で100%殺菌できました（表4-7）。

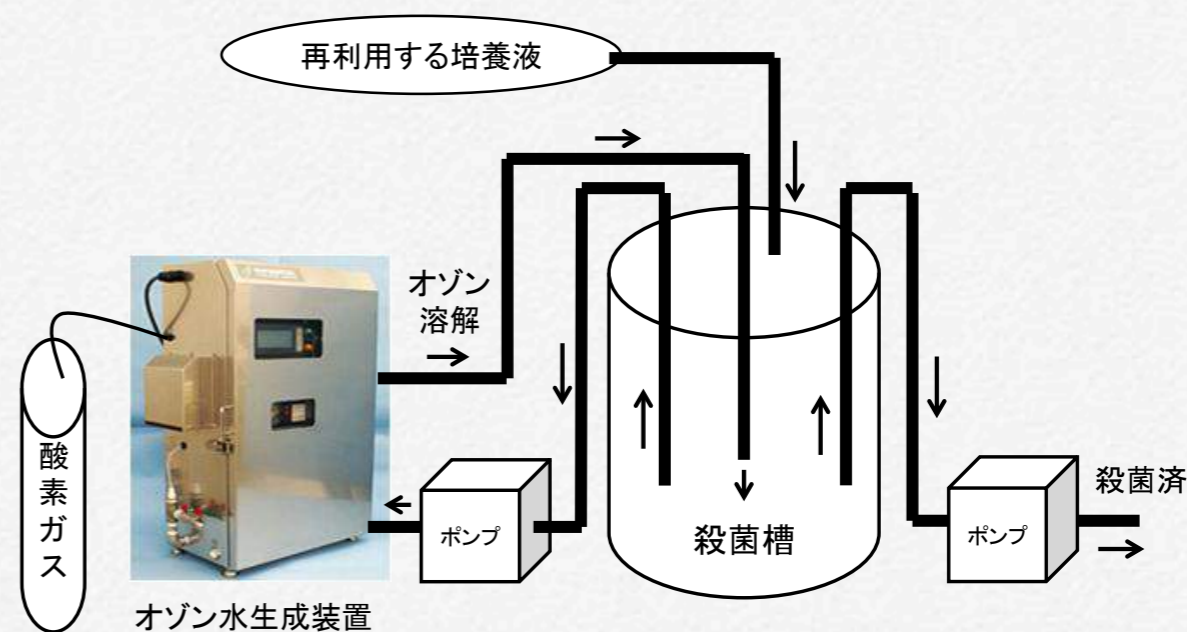


図4-27 オゾン水生成装置の培養液殺菌の概略図

表4-7 排水250 L中の病原菌に対するオゾン水生成装置による循環殺菌の効果

菌の種類	処理時間(分)と殺菌率(%)				
	1	2	3	4	5
トマト根腐病菌	<100	<100	<100	100	100
トマト根腐萎凋病菌	61.6	92.4	97.1	100	100
トマト青枯病菌	40.3	100	100	100	100

<100：病原菌を100%殺菌できなかったことを示す

300 Lの殺菌槽にトマトの養液栽培で使用済の排水を250 L入れ、トマト根腐病菌の遊走子を100個/mL、トマト根腐萎凋病菌を242 cfu/mL およびトマト青枯病菌を 2.6×10^3 cfu/mLの菌密度になるように接種し、各菌別々に試験を実施しました。排水をオゾン水生成装置（図4-27）に取り込み、オゾンガスを5 mg/Lの濃度で溶解し、毎分20 Lの排出量で殺菌槽に戻す循環殺菌を行いました。

トマトのロックウール栽培にオゾン水生成装置を組み込み、排水を殺菌後に再利用する実証試験では、慣行の養液かけ流し栽培と同等の収量・品質を確保できました。なお、培養液

へのオゾン溶解は、マンガンがオゾンにより酸化され濃度の著しい低下を起こします（図4-28）。マンガン濃度が低下した培養液を使用すると、作物にマンガン欠乏症を発生する恐れがあります。なお、本試験ではマンガンの追加を実施しなくても、トマトにマンガン欠乏症の発生は認められませんでした。理由として、ロックウール栽培は、殺菌の対象となる排水の再利用率が約30%であり、未使用の培養液を約70%と混ぜて再利用することから、マンガンが欠乏した培養液にならないと考えられます（黒田 2009）。

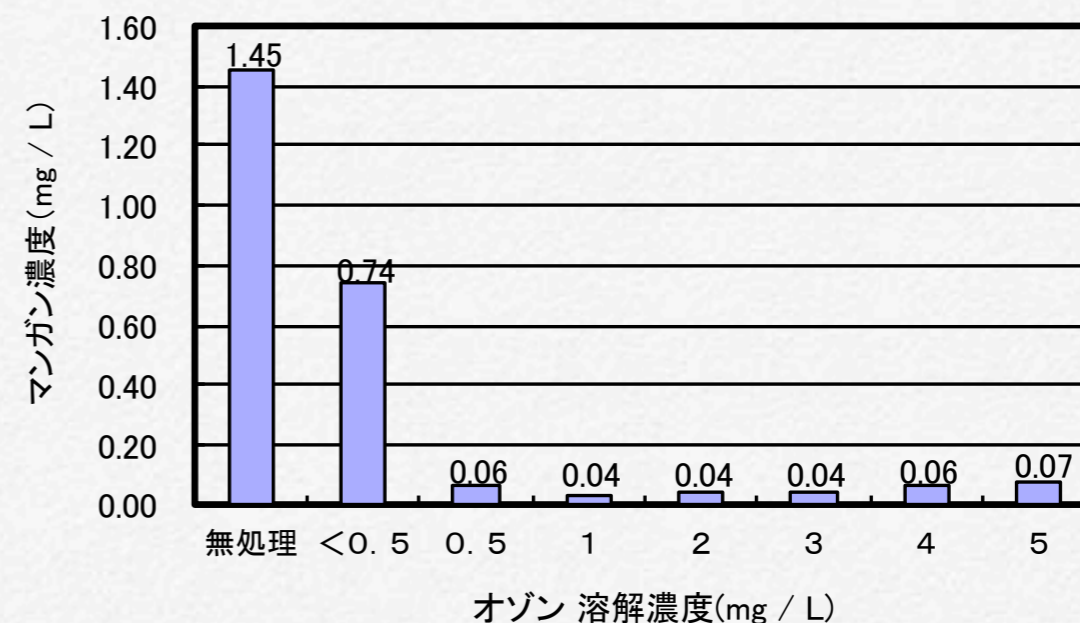


図4-28 未使用培養液のオゾン溶解濃度とマンガン濃度の変化

注) 大塚液肥1号、2号標準濃度使用

また、ロックウール栽培トマトにおいて、排液再利用による肥料コストの削減効果は、慣行の養液かけ流しの排液率が約30%で、1年間の廃棄培養液量が181 m³ / 10 aであり、肥料代はかけ流しで22.7万円 / 10 aであったのに対して、排液再利用では15.2万円 / 10 aで、約33%の削減効果があると試算しています（磯崎 2006）。

高温性ピシウム菌の伝染経路の一つに原水からの侵入が考えられることから、原水に含まれる病原菌をオゾン水生成装置で殺菌することを想定した試験を行いました。病原菌としてトマト根腐病菌（*P. aphanidermatum*）、トマト根腐萎凋病菌（*F. oxysporum*）を混入させた地下水をオゾン水生成装置に取り込み、オゾン濃度を5 mg / L溶解させました。毎分20 Lで排出するワンパス処理において、これらの菌を100%殺菌できることを確認しました（図4-29）。

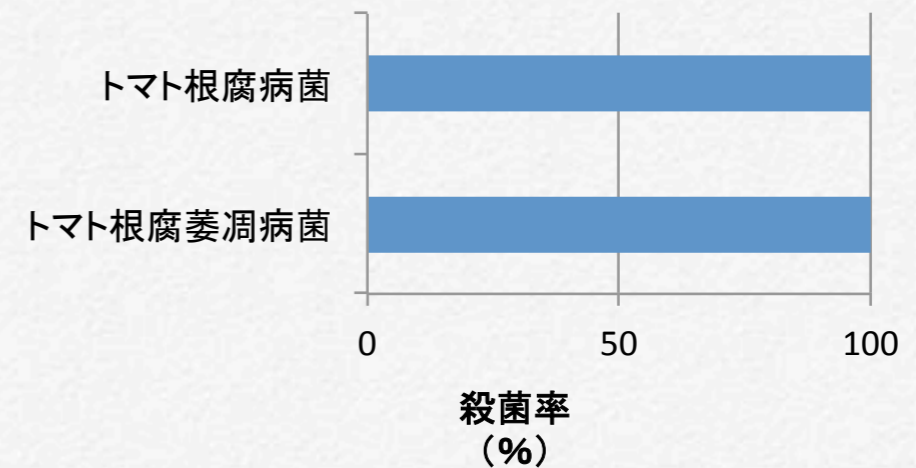


図4-29 オゾン水生成装置のワンパス殺菌の効果

地下水にトマト根腐病菌の遊走子を100個 / mL、トマト根腐萎凋病菌を172 cfu / mLになるように接種し、各菌別々に試験を実施しました。地下水をオゾン水生成装置（図4-27）に取り込み、オゾンガスを5 mg / Lの濃度で溶解し、毎分20 Lで排出するワンパス殺菌を行いました。

注) オゾンガスやオゾン水は、農薬登録や特定農薬に認定されていません。したがって、作物を栽培中の栽培槽の培養液に、病害防除目的でオゾン溶解することはできません。このことから、オゾンガスやオゾン水を培養液の殺菌を目的に使用する場合は、栽培槽以外の場所で殺菌を完結し、培養液を栽培槽に供給する段階ではオゾンが残留しないようにします。なお、オ

ゾンが溶解した培養液を作物に供給すると、オゾンによる障害が発生する恐れがあります。

(2) 光触媒式病害防除装置

酸化チタンを担持したガラス繊維を、紫外線を効率よく通す樹脂製チューブ内に設置し、培養液を循環させながら外から紫外線ランプを照射する構造です（図4-30）。この殺菌装置の効果は、光触媒による水分解で発生する活性酸素ヒドロキシラジカルによるところが大きいと考えられています。

本殺菌装置で培養液100 Lに対し、毎日1回毎分8 Lで給液時に光触媒装置を通過させました。その結果、接種したバラ根腐病（*P. helicoides*）の接種株以外の感染を50日後まで阻害できました（平野 2008）。

農家の1例として、培養液10 t当たり光触媒装置3台、循環用ポンプ1台、毎日10時間稼働条件でのランニングコストは、電気代が年間約1万5千円で、これに光触媒、樹脂パイプ、UVランプなどの消耗資材が必要となります。

光触媒式病害防除装置「すこや花」（株式会社マツケン）の1台当たりの培養液処理量の目安は最大5 m³。本体（ポンプ含む、操作盤含まず）の価格は25万円です。また、取付けには配管、配線工事が必要です。



図4-30 光触媒式病害防除装置「すこや花」

(3) 銀メッキ繊維フィルター

バクテクリーンAGフィルター (株)金井重要工業

銀フィルターはポリエステル繊維に銀を無電解メッキにより担持した銀担持繊維とポリプロピレン繊維を調合した撚糸により作製した液体濾過フィルターです(図4-31)。ゴミ除去のためのプレフィルターとして通常のポリプロピレン撚糸によるフィルターと併せて設置します。本フィルターの特徴として、積層濾過で、孔径が大きく比較的厚みのある濾過層で濾過することから、流量40 L / 分で差圧が2 kPaと少なく、現状の養液栽培システムへの組み込みが容易であることがあげられます。このため培養液槽から栽培槽へつながる給液パイプ上や、培養液槽内の循環ろ過装置、原水ろ過装置として使用できます。

本フィルターは銀の殺菌効果により、液中の糸状菌・細菌に繊維を通過、接触する際に高い殺菌活性を示します。また本フィルターからの銀の溶出は非常に低いため、銀イオンによる薬害を生じることはありません。

本フィルターには治療効果はありませんので、予防として栽培初期からの設置が必要です。また水耕栽培では銀フィルター

の使用とともに、栽培ベンチ等の消毒も併せて実施する必要があります。ただし、次亜塩素酸はフィルターの殺菌効果をなくしますので消毒時には取り外すなどし、次亜塩素酸と接触しないように注意してください。

本装置によりハウレンソウ萎凋病に対する防除効果を調べたところ、無処理区で発病率100%、発病度で89.5と甚発生条件の中、発病度28.6と高い防除効果が認められました（図4-32）。

装置は銀フィルター、市販糸状フィルター（プレフィルター用）とこれを納める市販フィルターハウジングとで1セットとなり、このうち銀フィルターは約7万円です。販売元：トヨハシ種苗株式会社（<http://www.toyotane.co.jp>）



図4-31 銀メッキ繊維フィルター

右：銀担持繊維フィルター 左：目詰まり防止用プレフィルター

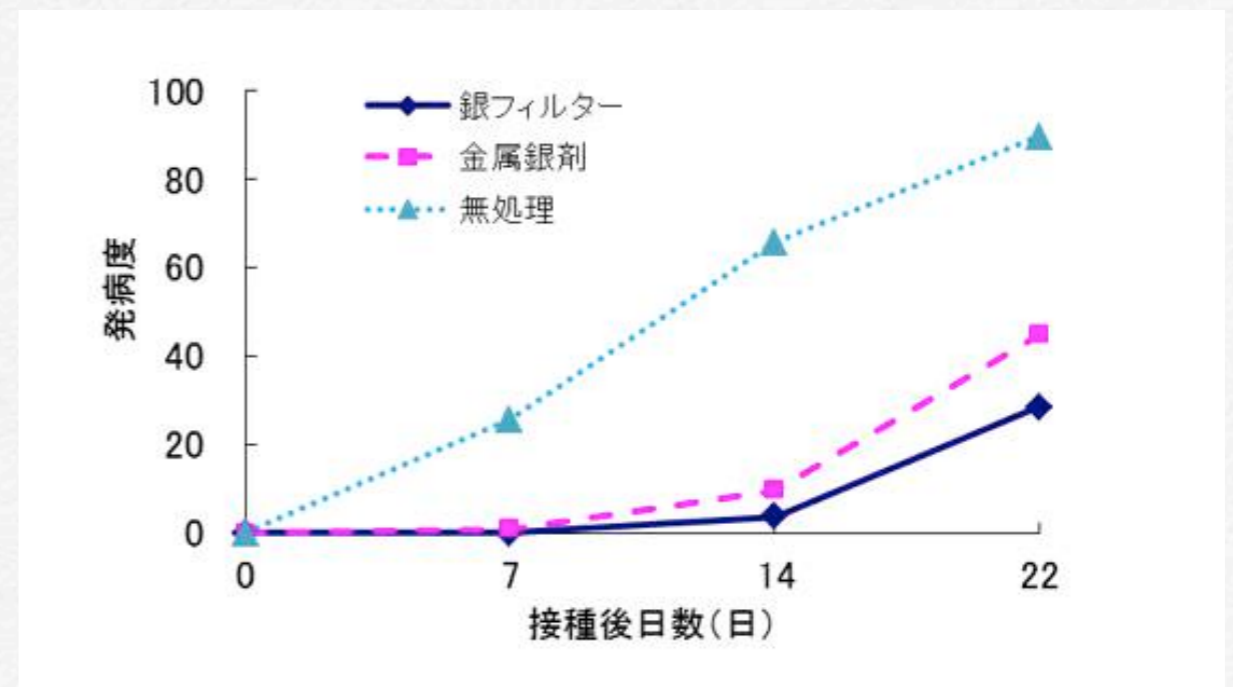


図4-32 ホウレンソウ萎凋病に対する銀担持繊維フィルターの防除効果（発病度の経時的推移）

(4) 培養液除菌装置

株式会社TYK (<http://www.tyk.co.jp>)

銀セラミックスは、無機銀系抗菌剤をセラミックスに担持させたものです。本抗菌剤は燐酸塩系結晶化ガラスを担体とし、銀は強固にイオン結合しているため、熱や酸・アルカリに対して安定しておりほとんど溶出しません。このため、植物体への薬害もなく、培養液組成への影響も認められていません。

鉢花のエブ・アンド・ロー栽培など大規模な施設向けに開発した除菌装置（図4-33）は、時間当たり処理量が200 L/分と大量の処理が可能で、培土等の汚れが蓄積しても、自動で逆洗浄が可能です。本装置は、*P. aphanidermatum* および *Phytophthora nicotianae* の遊走子に対し、10サイクルで99%以上の除菌率が得られます（図4-35）。

本装置は、既に感染発病した株に対する治療効果はありません。このため、エブ・アンド・フロー栽培では、ベンチ内に発病株がある場合、隣接株への伝染を抑制することはできないので発病株は早期に除去する必要があります。

また、原水の除菌や小～中規模施設の培養液除菌を目的に開発した簡易設置型の除菌装置（図4-34）は、時間当たり処理量が40～60 Lで、大きな設置工事を必要とせず、洗浄などのメンテナンスも容易です。

これらの装置で使用している抗菌剤は病原菌と接触することではじめて効果が発現するため、病害抑制効果は接触効率に大きく左右されます。このため、セラミックス表面に汚れが付着すると除菌効果が低下します。その際には、洗浄や交換が必要になります。



図4-33 除菌タン君



図4-34 除菌タン君III号

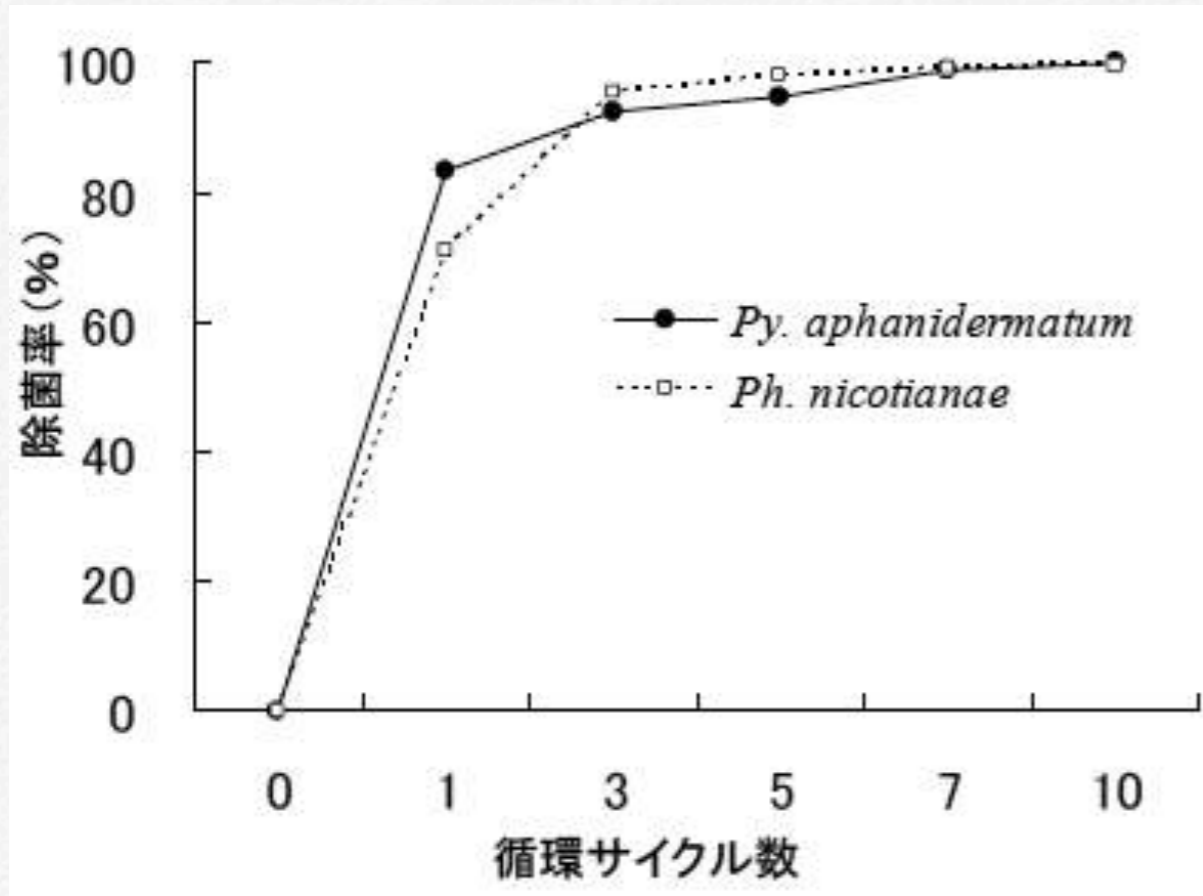


図4-35 遊走子の除菌効果 (渡辺 2007)

8. 培養液の更新

培養液中のピシウム菌密度が高い場合は、発病のリスクが高まります。そのため、培養液の更新により一時的に菌密度を低下させ、同時に本章に記載された菌密度を高めない対策（発病株の除去、培養液の適温管理など）を行い、菌密度を低く保つことで、発病のリスクが低減します。

なお、培養液を排水する場合は、各自治体の排出基準以下（リン酸、硝酸態窒素など）になるように加水するなど、肥料濃度を薄めてから行ってください。

9. 培養液の高EC管理

培養液をpH 4程度まで下げること、培養液中の遊走子数を減らすことができます。また、ECを3 dS / m まで高めることでも遊走子数を減らせます（第4章セクション1）。

ただし、作物には最適pHおよび最適ECがあり、適正な栽培管理を心掛けてください。

10. 手灌水

ピシウム菌は培養液を通じて感染が広がります。鉢物の栽培等では手灌水に切り替えることで、停滞水が少なくなり感染の拡大を防ぐことができます。また、エブ・アンド・フロー方式をはじめとした底面給水方式による鉢物生産では頭上灌水を行わないため、緩効性固形肥料を施肥した場合、塩類集積が発生しやすくなります。その結果、植物体の抵抗力を低下させるとともに、根からの水や養分の正常な吸収を阻害し病害を助長させることがあります。このような場合、手灌水に切り替えることで塩類集積を回避できます（渡辺 2011）。

高温性ピシウム菌に対する安全性評価法

項目

1. いつ、何を、どんな方法で調べるか

- (1) いつ調査するのがよいか
- (2) 何を調査するのがよいか
- (3) どんな方法で調査したらよいか

2. 安全性評価法

- (1) 衛生度点検
- (2) 育苗期診断
- (3) 定植期診断
- (4) 安全性評価に基づく発病リスク別防除対策

1. いつ、何を、どんな方法で調べるか

高温性ピシウム菌は「卵孢子」と呼ばれる第一次伝染源が存在します。また、「遊走子」と呼ばれる第二次伝染源が培養液を介して拡散します。植物体に感染すると「菌糸」となって植物体を病気にしたり、さらに「遊走子」を作って伝染源を増やします（図4-34）。そこで、培養液中の「遊走子」を調査します。また、植物体が生育不良の場合、植物体の根部（菌糸）や培養土を調査します。

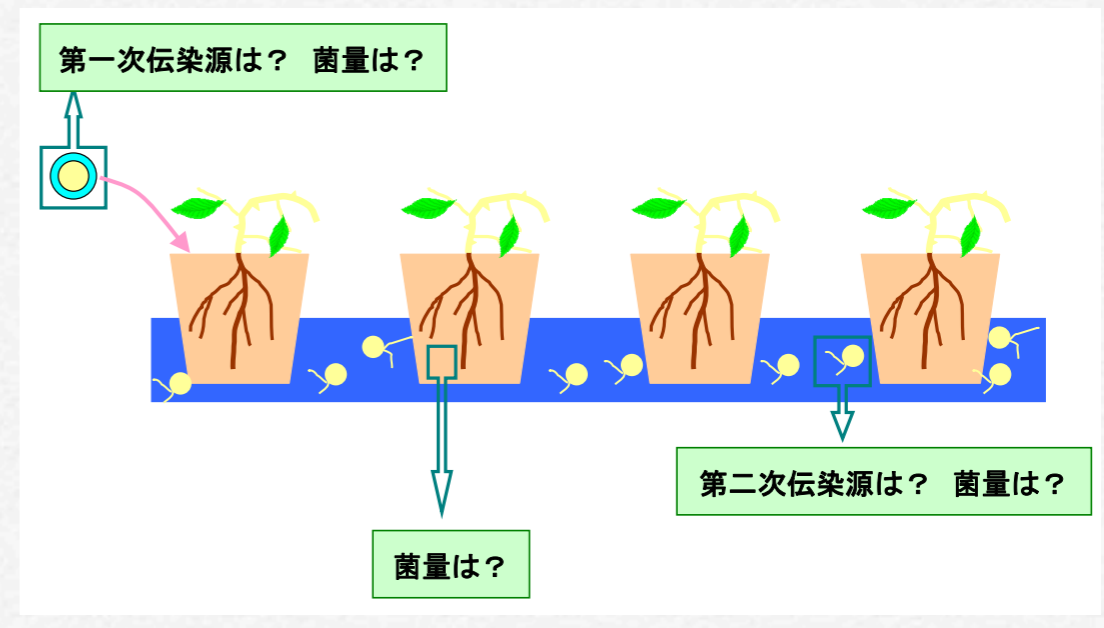


図4-36 安全性診断のために調べること

(1) いつ調査するのがよいか

調査頻度を上げれば、安全性は高まりますが、毎週、毎月行うことは現実的ではありません。いつ調査し、安全性診断するかがポイントになります。

資材に塩素殺菌が行えるのは作付け前になります。このことから、育苗前、定植前に資材を殺菌し、殺菌効果を確認する必要があります。特に前作で発病があった場合、殺菌効果の確認調査は有効だと考えられます。この場合、施設内に伝染源が存在しているかどうかを検出します。

一方、伝染源は原水から入ることも想定されます。原水に存在するようでは、施設を殺菌した苦勞が報われないので、原水の殺菌装置を導入するか、水道水を用いる等の対策が必要になります。また、検出されなくても安全ではなく、川の水等では降雨時に汚染水が流れ込むことも考えられるので注意が必要です。

さらに、苗での持ち込みも考えられます。この場合は、定植後に培養液を調査することで感染拡大リスクを早期に知ることができます。

栽培中は、闇雲に診断を行うより、液温を参考に行うことが効率的です。液温が20～25°Cの時に診断することが重要です（第4章セクション1）。病害が発生し防除対策を行った後には特に診断が必要です。発病がなかった場合にも、栽培終了時に病原菌の有無を調べるとさらに的確な防除対策が行えます。

(2) 何を調査するのがよいか

○苗（根）

苗に高温性ピシウム菌がすでに感染しているかもしれません。トマトでは苗の時から発病がみられる場合があります（図4-35）。



図4-37 育苗中のトマトでの発病

○原水

河川水や用水が汚染している場合があります。また、地下水でもタンクが汚染している場合があります。

○土壌

高温性ピシウム菌はいたるところに生息しています。培養土、施設内外の土壌が汚染しているかもしれません。カランコエでは施設入り口周辺で病原菌が検出されています（図4-36）。

*P. helicoides*は、循環養液だけでなく施設内外に生息している

排水溝からも検出されている



図4-38 高温性ピシウム菌が存在した各土壌採取地

○農業資材

栽培ベンチ、シート、パネル等、一度、高温性ピシウム菌が発生すると完全に消毒することは困難です。洗浄、滅菌により菌密度の低下に成功しているかどうかを調べましょう。ミツバではパネルが汚染していたことがあります。

○培養液

高温性ピシウム菌は水の中で活発に泳いで拡散します。遊走子をモニタリングする必要があります。多くの作目で発病前に培養液中で高温性ピシウム菌が検出されています。

○残渣

何気なく捨てている生育不良株にも高温性ピシウム菌が感染していることがありますので、注意が必要です。トマトでは、外に捨てられていたトマト残渣から高温性ピシウム菌がみつかっています。

(3) どんな方法で調査したらよいか

迅速に病原菌を検出する技術を開発しました。診断対象により、方法を選択できます（表4-8）。

表4-8 サンプルと検出法の組合せ

	植物体-LAMP法	ベイト-LAMP法	ベイト培養-LAMP法	メンブレン培養-LAMP法
サンプル	植物	培養液、土壌	培養液、土壌	培養液
検出に必要な時間	LAMP法:1時間	ベイト設置一回収: 3日 LAMP法:1時間	ベイト設置一回収: 3日 培養期間:1日 LAMP法:1時間	培養期間:1日 LAMP法:1時間
作業性	簡易	簡易	やや難	やや難
コスト	500円程度	500円程度	800円程度	800円程度

植物（根）の場合、2～3 cmの長さのものを2～3本用いて、植物体-LAMP法を行います。

土壌の場合、土壌を複数個所からサンプリングし、広口ボトル（1 L程度）に入れ、体積比で2倍量程度の水とエゴマトラップを入れ、3日後にベイト-LAMP法を行います。

農業資材の場合、適当な容器に水を張り、資材とエゴマトラップを入れます。このエゴマを用いてベイト-LAMP法を行

います。または、資材を浸した水から、メンブレン培養-LAMP法で検出を行います。

いずれの方法も、詳細については、第3章セクション2を参照してください。

2. 安全性評価法

どの検出方法で、いつ調査した時に、どのような結果になったかで、発病リスクを評価します。その安全性評価に基づき、防除対策の判断を行います。

(1) 衛生度点検

まず、対象施設の衛生度を点検しましょう（表4-9）。

表4-9 衛生度点検の調査項目

調査項目	発病リスク		大
	小 ←	→	
前作の発病の有無	発病なし		発病あり
前作後の資材洗浄	資材殺菌	洗浄	洗浄せず
施設内床面（コンクリート・土）	コンクリート	土壌被覆あり	土
雨水の流入	なし		あり
水源（用水・地下水・水道水）	殺菌設備あり	水道水	用水・地下水

収穫用ケース等の資材、履き物は施設の外から中に移動しないよう区別することや、培養液の殺菌の有無でも発病リスクは変わります。

(2) 育苗期診断

育苗期に実施すべき調査項目を、作目毎に紹介します（表4-10）。

表4-10 栽培前診断の調査項目

調査項目	ポインセチア	ホウレンソウ	トマト	ミツバ	ネギ	バラ
施設内土壌（ベッド付近等）	△	△	△	△	△	△
施設外土壌（培養土保管庫・施設付近）	△	△	△	△	△	△
対象作目以外の鉢花の根	○	×	×	×	×	×
対象作目以外の鉢花の鉢土	○	×	×	×	×	×
栽培ベッド資材（有機質資材の場合）	×	×	×	×	×	○
種苗	○	○	○	○	○	○
用水	○	○	○	○	○	○
培養液	○	○	○	○	○	○
殺菌後の装置・資材	○	○	○	○	○	○

○：実施 △：実施を薦めます ×：必要なし

(3) 定植期診断

定植期に実施すべき調査項目を、作目毎に紹介します（表4-11）。

表4-11 栽培中診断の調査項目

調査項目	ポインセチア	ハウレンソウ	トマト	ミツバ	ネギ	バラ
養液	○	○*	○	○*	○*	○
萎凋株	○	○	○	○	○	○

*定植直後

培養液の液温・pH・ECおよび、植物の生育ステージによって発病リスクは変わります。

最適な調査時期は、感染拡大期前から発病期に月に2回程度実施します（表4-12）。

表4-12 安全性評価のために最適な調査時期とサンプル量

植物名	作型	感染拡大期		発病期			要検出密度*	サンプル量のめやす
		時期	液温	時期	液温	発病菌量		
トマト	周年	6月～10月		7月～9月		100個/L	10個/L	100 mL
	抑制	7月～10月	20℃～	8月～9月				
ハウレンソウ		5月～8月				50個/L	5個/L	200 mL
ミツバ				6月～9月				
ネギ	周年	5月～10月	25℃～		25℃～	100個/L	10個/L	100 mL
切りバラ		3月～11月	20℃～	5月～9月				
ポインセチア	春～秋	6月～9月	25℃～	6月～9月 (7月～8月が多い)		1個/L	—	—

1) 要検出密度：発病を早期に抑制するため、検出に必要な最低密度を発病菌量の1/10としました。

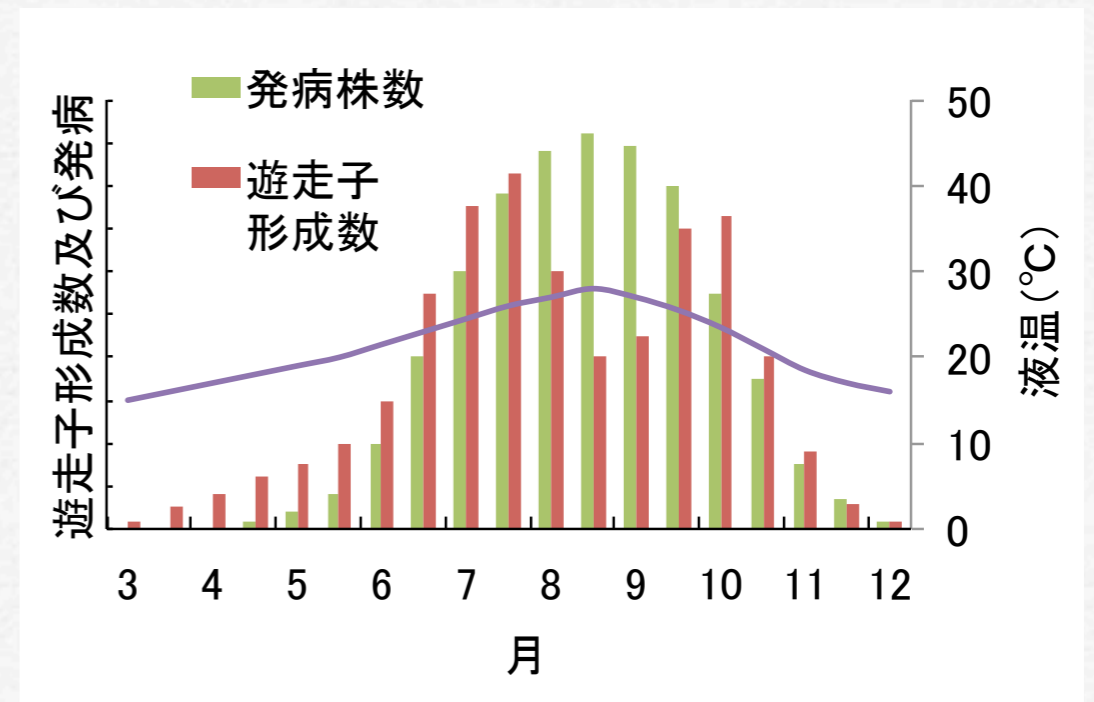


図4-39 液温と病原菌の遊走子形成量および発病との関係（概念図）

液温と病原菌の遊走子形成量および発病との関係についての概念図を示しました（図4-39）。高温性ピシウム菌は気温がそれほど高くない6～7月に遊走子を大量に形成して感染を拡げます。気温が上がり植物体が弱る時期（7月後半～9月前半）に菌糸伸長が盛んになるため、発病します。そして気温が下がって9月～10月に再度、遊走子を形成して感染を拡げます。

（4）安全性評価に基づく発病リスク別防除対策

診断をいつ、何を、どんな方法で行うか、診断結果から推定される発病リスクやその防除対策は作目によって様々です。ここでは各対象作目について栽培前と栽培中での安全診断に基づく発病リスクとそれに対応した対策を表にまとめました（表4-13～24）。詳細な診断フローと病害管理ポイントについては、各作物編（第5章）をご覧ください。

トマト

表4-13 トマト育苗期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【原水槽】 原水	ベイト-LAMP法	随時 (1ヶ月に1回程度)	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	原水槽の洗浄殺菌 雨水、土砂の混入確認、防止 消毒剤の投入 オゾン水生成装置による原水の殺菌 対応後の安全診断
【苗生産施設】 培養液	メンブレン培養 -LAMP法	随時	未検出	低	メンブレン培養-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	培養液タンクの洗浄殺菌 培養液の適温管理(25℃未満) 金属銀剤の浸漬 オゾン水生成装置による培養液の殺菌 対応後の安全診断
【苗生産施設】 苗	見取り ※萎凋株は 植物体-LAMP法	随時	未検出	低	見取り調査の継続
			検出	高	苗の廃棄、再播種 育苗装置・資材の洗浄・殺菌 本ば対応(培養液温度25℃未満、 定植直後の培養液調査)
【本圃】 培養液	メンブレン培養 -LAMP法	随時(特に前作で発 病があった場合の洗 浄・殺菌直後)	未検出	低	通常の管理
			検出	高	装置・資材、培養液タンクの洗浄殺菌 培養液更新 対応後の再調査

表4-14 トマト定植期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【本圃】 定植苗	見取り ※萎凋株は 植物体-LAMP法	随時	未検出	低	見取り調査の継続
			検出	高	発病株の廃棄 根域の適温管理(25℃未満) 金属銀剤の浸漬 オゾン水生成装置による培養液の殺菌 作終了後の洗浄・殺菌
【本圃】 培養液	メンブレン培養 -LAMP法	根域温度25℃以上 の時(5～10月頃)	未検出	低	通常の管理
			検出 (10 cfu/L未満)	中	根域の適温管理(25℃未満) 作終了後の洗浄・殺菌
			検出 (10 cfu/L以上 または発病有)	高	根域の適温管理(25℃未満) 金属銀剤の浸漬 オゾン水生成装置による培養液の殺菌 萎凋株の早期発見・除去 作終了後の洗浄・殺菌

ミツバ

表4-15 ミツバ育苗期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【原水槽】 原水	ベイト-LAMP法	5~10月 随時（1ヶ月に1回程度）	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	原水槽の洗浄・殺菌 周辺環境の確認と対応（雨水、土砂の浸入等） 消毒剤の投入 対応後の安全診断
【苗生産施設】 培養液	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養-LAMP法※	5~10月 随時（1ヶ月に1回程度）	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	苗発病の慎重な確認 培養液タンクの洗浄・殺菌 オクトクロス投入または交換 対応後の安全診断
【苗生産施設】 セル苗	見取り ※萎凋株は植物体-LAMP法	5~10月 随時（1ヶ月に1回程度）	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	苗の廃棄、育苗トレイ洗浄・殺菌、再播種 本ば対応（培養液温度20℃以下、定植直後の培養液調査）
【本ば】 培溶液 （洗浄・殺菌直後）	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養-LAMP法※	5~10月 随時（特に前作で発病があった場合の洗浄・殺菌直後）	未検出	低	特になし（通常の管理）
			検出	高	栽培装置の再洗浄、殺菌 対応後の再調査

表4-16 ミツバ定植期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【本ば】 循環培養液	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養-LAMP法※	5~10月 随時（定植日）	未検出	低	特になし（通常の管理）
			検出	高	培養液温度管理（20℃以下） 培養液EC濃度管理 終了後の洗浄・殺菌

※メンブレン培養-LAMP法は検出後、菌濃度を確認する場合に使用する。

ネギ

表4-17 ネギ育苗期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【原水槽】 原水	ベイト-LAMP法	5~10月 随時（1ヶ月に1回程度）	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	原水槽の洗浄・殺菌 周辺環境の確認と対応（雨水、土砂の浸入等） 消毒剤の投入 対応後の安全診断
【苗生産施設】 循環培養液	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養-LAMP法※	5~10月 随時（1ヶ月に1回程度）	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	苗発病の慎重な確認 培養液タンクの洗浄・殺菌 オクトクロス投入または交換 対応後の安全診断
【苗生産施設】 セル苗	見取り ※萎凋株は植物体-LAMP法	5~10月 随時（1ヶ月に1回程度）	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	苗の廃棄、育苗トレイ洗浄・殺菌、再播種 本ば対応（培養液温度20℃以下、定植直後の培養液調査）
【本ば】 培溶液 （洗浄・殺菌直後）	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養-LAMP法※	5~10月 随時（特に前作で発病があった場合の洗浄・殺菌直後）	未検出	低	特になし（通常の管理）
			検出	高	栽培装置の再洗浄、殺菌 対応後の再調査

表4-18 ネギ定植期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【本ば】 循環培養液	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養-LAMP法※	5~10月 随時（定植日）	未検出	低	特になし（通常の管理）
			検出	高	培養液温度管理（20℃以下） 培養液EC濃度管理 終了後の洗浄・殺菌

ハウレンソウ

表4-19 ハウレンソウ育苗期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【原水槽】 原水	ベイト-LAMP法	5~10月 随時（1ヶ月 に1回程度）	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	原水槽の洗浄・殺菌 周辺環境の確認と対応（雨水、土砂の浸入等） 除菌、殺菌処理（除菌装置、消毒剤の投入等） 対応後の安全診断
【苗生産施設】 循環培養液	ベイト-LAMP法	5~10月 随時（1ヶ月 に1回程度）	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	苗発病の慎重な確認 培養液タンクの洗浄・殺菌 金属銀剤の投入または交換 培養液温度管理（20℃以下） 対応後の安全診断
【苗生産施設】 セル苗	見取り ※萎凋株は植物 体-LAMP法	5~10月 随時	未検出	低	見取り調査の継続
			検出	高	苗の廃棄、育苗トレイ洗浄・殺菌、再播種 本圃対応（培養液温度20℃以下、定植直後の 培養液調査）

表4-20 ハウレンソウ定植期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【本ぽ】 循環培養液	ベイト-LAMP法	5~10月 定植直後（特 に育苗期の苗 感染が疑われ る場合）	未検出	低	特になし（通常の管理）
			検出	高	培養液温度管理（20℃以下） 培養液EC濃度管理 金属銀剤の投入または交換 終了後の洗浄・殺菌
【本ぽ】 定植苗	見取り ※萎凋株は植物 体-LAMP法	5~10月 随時	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	発病株の廃棄 培養液温度管理（20℃以下） 培養液EC濃度管理 終了後の洗浄・殺菌
【本ぽ】 水 (洗浄・殺菌直後)	ベイト-LAMP法	5~10月 発病があった 場合の洗浄・ 殺菌直後	未検出	低	特になし（通常の管理）
			検出	高	栽培装置の再洗浄・殺菌 対応後の再調査

切りバラ

表4-21 切りバラ育苗期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【原水槽】 原水	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養- LAMP法※	4~10月 随時(1ヶ月 に1回程度)	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	原水槽の洗浄・殺菌 周辺環境の確認と対応(雨水、土砂の浸入等) 消毒剤の投入 対応後の安全診断
【購入苗】	ベイト-LAMP法 及び 植物体-LAMP法	3~6月 苗搬入時	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	苗発病の慎重な確認 発病株の除去 対応後の安全診断
【本ぽ】 培溶液 (洗浄・殺菌 直後)	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養- LAMP法※		未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	培養液タンク・栽培ベッドの洗浄・消毒 消毒後の培養-LAMP法によるモニタリング
【本ぽ】 栽培ベッド下 など	ベイト-LAMP法 (土壌)		未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	栽培ベッド周辺の清掃・消毒 消毒後のベイト-LAMP法によるモニタリング

表4-22 切りバラ定植期の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【本ぽ】 循環培養液	ベイト-LAMP法 及び メンブレン培養- LAMP法※	4~10月 随時	未検出 ・萎凋株なし	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出 ・萎凋株なし	高	循環式の場合は培養液タンクの洗浄 洗浄後のベイト-LAMP法によるモニタリング 萎凋株の早期発見 萎凋株の植物体-LAMP法による診断
			検出	極めて高い	萎凋株の植物体-LAMP法による診断 高温性ピシウム属菌が検出された場合は、発病 株を直ちに廃棄 循環式の場合は培養液タンクの洗浄 洗浄後のベイト-LAMP法によるモニタリング

※メンブレン培養-LAMP法は検出後、菌濃度を確認する場合に使用する。

ポインセチア

表4-23 ポインセチア栽培前の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【本圃】 前作物	(鉢土) ベイト-LAMP 法 (根) 植物体-LAMP法	栽培前	未検出	低	特になし(通常の管理)
			検出	高	培養液タンク・栽培ベッドの洗浄・殺菌 ベイト-LAMP法による殺菌の確認
【本圃】 循環培養液 (洗浄殺菌直 後)	ベイト-LAMP法	栽培前	未検出	低	ベイト-LAMP法による定期的なモニタリング
			検出	高	培養液タンク・栽培ベッドの洗浄・殺菌 ベイト-LAMP法による殺菌の確認

表4-24 ポインセチア栽培中の安全診断票

調査項目	調査方法	調査時期・間隔	結果	発病リスク	対策
【本圃】 循環培養液	ベイト-LAMP法	5~9月 栽培開始時 から 随時 (栽培開始時 から8月までは 最低月2回)	未検出 ・萎凋株なし	低	特になし(通常の管理)
			検出 ・萎凋株なし	高	培養液タンクの洗浄・殺菌 ベイト-LAMP法による殺菌の確認 萎凋株の早期発見 萎凋株の植物体-LAMP法による診断
			検出 ・萎凋株あり 又は 未検出 ・萎凋株あり	極めて高い	萎凋株の植物体-LAMP法による診断 高温性ピシウム属菌が検出された場合は、発病 株(萎凋株)を直ちに廃棄 手かん水への変更 培養液タンクの洗浄・殺菌 ベイト-LAMP法による殺菌の確認