ダイズ茎疫病抵抗性の簡便な幼苗接種検定法および同法を用いたレースＪ抵抗性の遺伝解析

田澤　暁子

ダイズ茎疫病は*Phytophthora sojae*（Kauffmann and Gerdemann）を病原とする土壌病害で，近年転換畑等で問題となっている。著者は，本病害の研究において北海道で従来用いられてきた爪楊枝穿刺接種法より簡便な，培地挿芽接種法を開発した。同法は出芽させたダイズ幼苗を根から切りとり，その胚軸をシャーレ内の菌糸を含んだ培地に直接挿す接種方法であり，判定の精度も高い。また同接種法を用いて，「はや銀１」の持つレースＪ抵抗性が優性の単一遺伝子支配であると推定した。

緒　　言

ダイズ茎疫病（以下，茎疫病と略）は，*Phytophthora sojae*（Kauffmann and Gerdemann）による土壌病害で，転換畑等の排水不良土壌で大きな被害を引き起こす事から，近年北海道の上川，空知および石狩地方等において多発し，重要な病害となっている[4),8)]。

本病は米国では古くから重要病害として認識され[3),7)]，病理学的研究と抵抗性育種が積極的に進められているが，レースの分化が著しく，米国では現在まで55のレースが確認されている[5)]。日本では1977年に十勝地方の池田町で最初の発生が認められ[9)]，その後，土屋（1982）は，北海道内で採集された菌株について，米国とは異なるダイズ６品種を判別品種に用いてＡからＪの10レースに分類した[10)]。

北海道立農業試験場では1980年代から同病害抵抗性に関する研究に取り組み，幼苗接種検定と激発圃場での選抜を行ってきた[1),4),6),8),9),10)]。幼苗接種検定は，爪楊枝でダイズの胚軸に培養菌株を穿刺接種する手法であるが，煩雑で作業効率が低い。そこで，著者は病原菌を培養した培地にダイズ胚軸を直接挿す簡便な接種検定方法である，培地挿芽接種法を考案したので，報告する。加えて，本接種法を用いて行ったレースＪ抵抗性の遺伝解析についても報告する。

試験方法

１．培地挿芽接種法による幼苗接種検定

ダイズ茎疫病菌を培養した寒天培地に大豆の幼苗胚軸を直接挿し込むことによって，抵抗性の幼苗検定が可能であるかを検討した。茎疫病菌はレースJ（Pm6菌株）を用い，ダイズ品種は茎疫病のレース判別品種のうち，レースＪ感受性の「キタムスメ」「トヨスズ」「中生光黒」，同抵抗性の「はや銀１」の４品種を供試した[10)]。

接種方法は，まずトウモロコシ煎汁培地（CMA）を直径90mmのプラスチックシャーレに10mm程度の厚さになるように分注し，やや厚めの平板培地を作成した。その中央に供試菌株の含菌寒天を置床し，25℃で培養した。一方，検定に用いるダイズはあらかじめ滅菌砂に播種し，出芽後に胚軸を３cm程度に切りそろえ（写真１），これをCMA培地上の茎疫病菌の菌叢周縁部に挿しこんだ（写真２）。その後ただちに蒸留水をシャーレ内に10ml程度注ぎ，培地挿芽接種とした。

慣行の爪楊枝穿刺接種は，土屋[8)]の手法を一部改変して行った。すなわち，滅菌砂にダイズを播種し，出芽したダイズの胚軸に爪楊枝を用いて培養した茎疫病菌の菌糸を数mm角に切り取った培地ごと穿刺接種し，接種部位を濡らした脱脂綿で包んだ（写真３）。

両接種法とも，接種後はポリプロピレン製透明コンテナーに入れて密閉し乾燥を防ぎ，25℃のインキュベーター内に１週間置いた後に病斑の形成を観察し，個体ごとに抵抗性の判定を行った。

２．培地挿芽接種法によるレースJ抵抗性の遺伝解析

「トヨコマチ」（レースJ感受性）と「はや銀１」（同抵抗性）を交配したF_2世代143個体を供試して，培地挿芽接種法によりレースJ抵抗性の遺伝解析を行った。供試菌株と接種検定方法については上記１．に同じ。

2008年11月11日受理

北海道立十勝農業試験場，082-0071　河西郡芽室町
E-mail: atazawa@agri.pref.hokkaido.jp

結　果

１．培地挿芽接種法による幼苗接種検定

爪楊枝穿刺接種では，抵抗性の「はや銀１」は全個体が抵抗性と判定されたが，感受性の「キタムスメ」「トヨスズ」で半数以上，「中生光黒」でも約三分の一の個体で病斑が形成されず，抵抗性と判定され（図１），個体単位では誤判定の可能性が高いことが示された。これに対して培地挿芽接種法では，感受性の３品種は全個体が感受性と判定され（図２），誤判定は認められなかった。

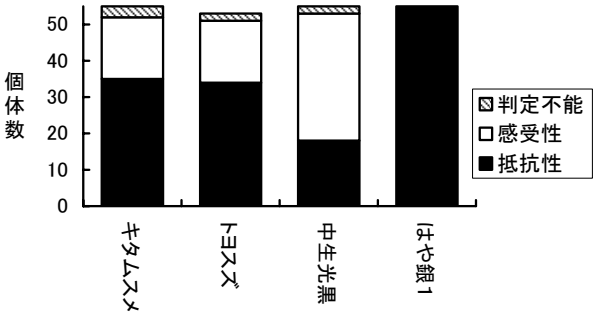

図１　爪楊枝穿刺接種によるレースＪ接種検定結果
（５反復　計53～55個体）

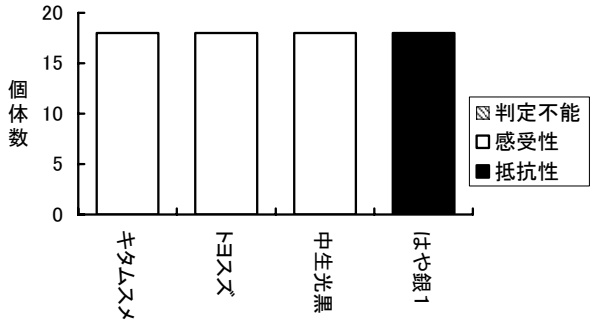

図２　培地挿芽法によるレースＪ接種検定結果
（２反復　計18個体）

２．培地挿芽接種法によるレースＪ抵抗性の遺伝解析

供試した143個体のうち，109個体がレースJ抵抗性，34個体が感受性と判定された。これをレースJ抵抗性が優性の単一遺伝子支配である場合の期待値（抵抗性個体：感受性個体＝3:1）と比較した場合，χ^2値は0.1142，P値は0.735であり，適合した（表１）。

表１　「トヨコマチ」×「はや銀１」F_2におけるレースＪ抵抗性の遺伝解析

	計	抵抗性個体数	感受性個体数	χ^2値	P値（df＝１）
実験値	143	109	34		
期待値	143	107.25	35.75	0.1142	0.735

考　察

ダイズ茎疫病抵抗性の幼苗接種検定においては，米国では様々な手法が用いられているが，ダイズの胚軸に傷を付けて菌糸を培地ごと接種する手法が用いられている場合が多く[2)]，北海道でも爪楊枝を用いて菌糸を胚軸に穿刺接種する手法を用いてきた[8)]。しかし同法は作業が細かく複雑なため効率が悪い。また本稿でも示したように，感受性個体が抵抗性と誤判定される場合が多い。このため，著者は簡便で高精度な接種手法として培地挿芽接種法を考案した。

本法は，寒天培地の柔軟さとダイズ幼苗の旺盛な発根に着目したもので，出芽したダイズを根部から切り離し，胚軸を培地に挿すだけであり，非常に簡便で多数の個体を同時に供試できる。また病原菌を培養したシャーレから出さずに接種を行うため，複数の菌株を同時に扱う場合でも菌株ごとに接種個体を隔離するのが容易である。加えて誤判定の可能性が非常に低いため，個体単位での抵抗性判定が可能であり，抵抗性個体は旺盛に発根し生育を続けるため，接種後に鉢上げして採種する事も可能である。本接種法により，ダイズ新品種のレース抵抗性検定や，分離菌株のレース判定の効率化，また抵抗性の遺伝解析やマーカー探索などへの利用も期待される。なお，本法の実際の手順については付表のようにまとめた。

今回抵抗性の遺伝解析を行ったレースＪは，10レース中最も多くの判別品種を侵す，最も病原性が強いレースであり，抵抗性を持つダイズ品種は育成されていない。本研究において，既報のレースＡ，Ｄと同様に[1)]「はや銀１」由来のレースＪ抵抗性も優性単一遺伝子支配であることが推定されたことにより，DNAマーカー開発等によるレースJ抵抗性品種育成の効率化が期待される。

付表．培地挿芽接種法によるダイズ茎疫病抵抗性検定

①菌株の培養

Difco社製トウモロコシ煎汁培地（CMA）を直径90mmのシャーレに約10mm以上の厚さになるように分注する。この平板培地の中央に供試する茎疫病菌の含菌寒天を置床し，25℃で培養する。

②ダイズの準備

滅菌砂や育苗培土等にダイズを播種して25℃で斉一に出芽させ，育苗する。出芽後のダイズ幼苗の胚軸を子葉から約３cmの長さに切りそろえる（写真１）。

③接種作業

②で切りそろえたダイズ胚軸を，①の培地の茎疫病菌叢周縁部に挿す（写真２）。シャーレ内に蒸留水を10ml程度注いで培地の表面を水で覆い，ポリプロピレン製透明コンテナー等に入れて乾燥を防ぎ（写真４），25℃で１週間おく。

④抵抗性の判定

個体ごとに，病斑の形成・進展により抵抗性を判定する。感受性の場合は胚軸の全体または大部分が病斑により腐敗する（写真５）。抵抗性の場合は病斑が形成されず，旺盛な発根が認められる（写真６）。

謝　辞　本研究で用いた菌株は，北海道立上川農業試験場が分離・レース同定した後に北海道病害虫防除所が保存していたものを分譲いただいた。また本研究の遂行および本報の執筆にあたって多大なるご助力をいただいた，道立農業試験場の病害部門および育種部門，遺伝子工学部門各位に心からの感謝を表する。

引用文献

1）足立大山，土屋貞夫，番場宏治，鈴木和織．“ダイズ茎疫病抵抗性品種の探索と抵抗性の遺伝解析”．北農．58, 376-380（1991）

2）Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. *Phytophthora* Diseases Worldwide. 200-201（1996）

3）Hidebrand, A. A. A root and stalk rot of soybeans caused by *Phytophthora megasperma* Drechsler var. *sojae*. Can. J. Bot. 37, 927-957（1959）

4）北海道農政部．ダイズ茎疫病菌のレースの分布と品種の抵抗性（転換畑におけるダイズ茎疫病の防除対策確立試験）．平成元年普及奨励並びに指導参考事項, 193-196（1989）

5）Leits, R. A., Hartman, G. L., Pedersen, W. L. and Nickell, C. D. Races of *Phytophthora sojae* on soybean in Illinois. Plant Dis. 84, 487（2000）

6）松川勲，番場宏治，土屋貞夫．ダイズ茎疫病抵抗性の品種間差異．育種・作物学会北海道談話会会報．27, 49（1987）

7）Morgan, F. L. and Hartwig, E. E. Physiologic specialization in *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Phytopathology. 55, 1277-1279（1965）

8）土屋貞夫．*Phytophthora megasperma* var. *sojae* Hildebrandによるダイズの茎疫病．北海道立農業試験場集報．48, 46-55（1982）

9）土屋貞夫，児玉不二雄，赤井純，松村洋一．*Phytophthora megasperma* var. *sojae*によるダイズの茎疫病（新称）．日植病報．44, 351（1978）

10）土屋貞夫，田中文夫，足立大山．日本産品種によるダイズ茎疫病菌のレースの類別と抵抗性品種の探索．日植病報. 56, 144（1990）

写真１　出芽した大豆の胚軸を切りそろえる

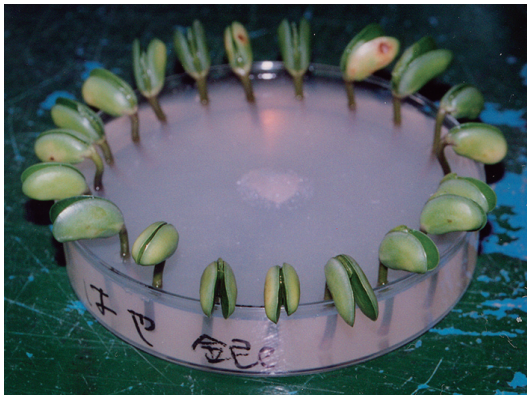

写真２　大豆胚軸を培地の菌叢周縁部に挿す

写真３　爪楊枝を用いた穿刺接種

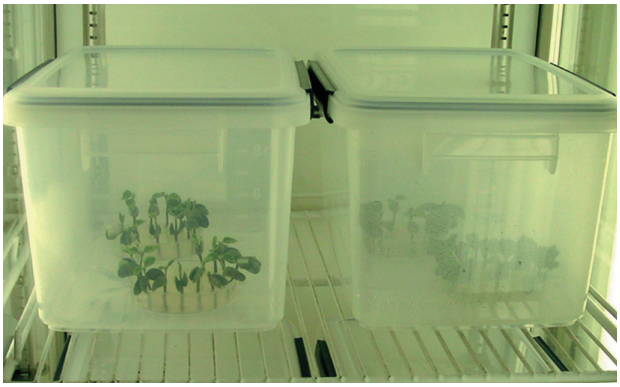

写真４　接種後はポリプロピレン製コンテナー等で密閉し，乾燥を防ぐ

写真５　感受性と判定された個体

写真６　抵抗性と判定された個体

Simple Method for Seedling Test of Phytophthora Stem Rot of Soybean, and Genetic Analysis of Resistance to Race J using This Method.

Akiko TAZAWA

Summary

Phythophthora stem rot of soybean is caused by *Phytophthora sojae* (Kauffmann and Gerdemann), and its critical damage has been recognized in converted fields from paddy these years. "Seedling inset method" that is a new simple method for seedling test to evaluate the race specific resistance to Phytophthora stem rot was created in this research.

When soybean seedlings were cut out their roots and their hypocotyls were attached to a corn meal agar plate that was covered with the mycelium of *P.sojae*, the evaluating the race specific resistance was correct and easier than the usual toothpick method.

It was estimated that the resistance to race J in "Hayagin 1" is controlled by major single-gene, in this method.

Hokkaido Tokachi Agricultural Experiment Station, Memuro, 082-0081
E-mail: atazawa@agri.pref.hokkaido.jp