

[成果情報名]簡便で高精度なダイズ茎疫病菌真性抵抗性検定法(菌そう埋込接種法)

[要約]本接種法は播種と接種を同時に行うため、従来法の接種作業に要する多くの時間、労力、技能を必要としない。播種後 14 日以内に茎疫病菌レースあるいは茎疫病菌に対する真性抵抗性の有無を容易に判定でき、胚軸接種法に比べて簡便かつ高精度な検定結果が得られる。

[キーワード]ダイズ茎疫病菌、抵抗性、レース、*Phytophthora sojae*、ダイズ、検定法

[担当]兵庫農総セ・農産園芸部

[代表連絡先]電話 0790-47-2414

[区分]近畿中国四国農業・作物生産

[分類]研究・普及

[背景・ねらい]

ダイズ茎疫病菌に感染した株は完全に枯死するため全国各地の大豆栽培圃場で問題となっており、本病原菌のレース（系統）の把握と抵抗性品種の育成が求められている。これまで国内のレース検定あるいは真性抵抗性の有無を判定する手法として胚軸接種法等があったが、接種時の有傷作業と菌の貼付作業には多くの時間、労力、技能を要し、検定法の改良が必要であった。そこで既知の茎疫病菌レースを用いて、より簡便で高精度な検定手法を検討する。また本接種法による生物検定の結果と DNA マーカー解析による結果との整合性を確認する。

[成果の内容・特徴]

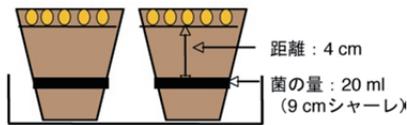
1. 茎疫病菌を市販 V8 ジュースを用いて作成した培地上（容量：20 ml、大きさ：9 cm シャーレ大）で 14 日間培養して、検鏡により卵胞子の形成（20 個以上/mm²）を確認する。
2. 市販のポリポットあるいは素焼き鉢（円筒 3 寸大）に水受け用プラスチックバット（以下、水受け皿）（高さ 4 cm 程度）を敷き、鉢底から内径 9 cm の位置までパーミキュライトを入れる。次に上記 1 の茎疫病菌の菌そう全体を注意深くシャーレから取り出し、鉢との間に隙間ができないように置床する。この上にパーミキュライトをさらに 4 cm 敷き詰めて播種（接種）床とする（図 1）。
3. ダイズ種子を接種床に 10～12 粒播種し、パーミキュライトを被覆して灌水を行い、23℃の培養容器内において既報の条件下〔杉本ら（兵庫農総セ）、平成 16 年度成果情報素材〕で発芽させる。初生葉確認直前（播種後 4 日、胚軸長 3 cm 程度）に水受け皿に水が 3～4 cm 溜まるまで灌水を行い、直ちに食品包装用ラップフィルム等で植物全体を覆い、多湿条件下で管理する。その 2 日後に再度同様の灌水を行う（図 1）。
4. 発病調査は播種後 10～14 日目に枯死または根部及び地際部の水浸状の病斑形成により肉眼で判定し、発病株率が 20%未満のものを抵抗性(R)、20%以上のものを罹病性(S)と判定する（図 2）。
5. 国産レース判別ダイズ 6 品種、茎疫病菌抵抗性遺伝子を保有するアメリカ農務省(USDA) 保存ダイズ 13 品種を用いて、5 菌株（Race 1, 4, 7, 25, A）の病原性の検定を行うと胚軸接種法（従来法）の結果と合致する。また本接種法は有傷処理を必要とする従来法と比較して真性抵抗性の判定が正確になり、より簡便で高精度な判定ができる（表 1）。
6. 本接種法を用いて茎疫病菌真性抵抗性戻し交配後代系統（10 個体）の検定を行った結果と DNA マーカー〔杉本ら（兵庫農総セ）、平成 20 年度成果情報素材〕による判定結果は一致する（図 3）。

[成果の活用面・留意点]

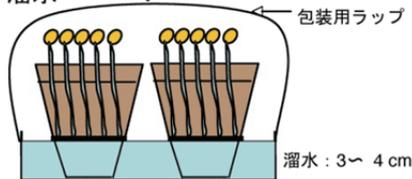
1. パーミキュライトは無肥料で中～大粒のものを用いる。
2. 病原性が著しく低下した菌は発病株率が低下するため、本接種法により罹病性品種に有傷接種した後に再分離して検定に使用する。
3. ポリポット、素焼き鉢、水受け皿を再度検定に利用する際には 121℃、15 分間加圧蒸気滅菌処理あるいは 70%アルコールで 5 分間の殺菌処理を行う。

[具体的データ]

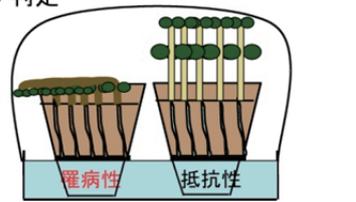
① 播種(接種)



② 溜水



③ 判定



罹病性反応



抵抗性反応



図1 新しい茎疫病真性抵抗性検定方法(菌そう埋込接種法)の手順

図2 病原性判定の様子

表1 菌そう埋込接種法と従来法(胚軸接種法)による茎疫病菌の病原性の判定

レース判別品種	抵抗性遺伝子	菌そう埋込接種法			胚軸接種法*		
		Race 1	Race 7	Race A	Race 1	Race 7	Race A
イスズ	未確認	R (0)	S (100)	S (100)	R (5)	S (100)	S (100)
中生光黒	未確認	R (0)	S (100)	R (0)	R (10)	S (100)	R (0)
キタムスメ	未確認	R (0)	S (85)	S (100)	R (10)	S (85)	S (100)
トヨスズ	未確認	R (0)	R (0)	R (0)	R (10)	R (5)	R (5)
ゲデンシラズ1号	未確認	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (5)	R (5)
黄宝珠	未確認	R (0)	R (0)	R (5)	R (10)	R (5)	R (5)
L88-8470	<i>Rps1a</i>	R (0)	S (98)	R (0)	R (15)	S (100)	R (0)
L77-1863	<i>Rps1b</i>	R (0)	R (0)	S (100)	R (10)	R (5)	S (100)
L75-3735	<i>Rps1c</i>	R (0)	R (0)	S (100)	R (0)	R (10)	S (100)
L93-3312	<i>Rps1d</i>	R (0)	R (5)	R (0)	R (15)	R (15)	R (5)
L77-1794	<i>Rps1k</i>	R (0)	R (0)	R (0)	R (15)	R (15)	R (5)
L76-1988	<i>Rps2</i>	R (0)	S (100)	S (95)	R (15)	S (100)	S (100)
L83-570	<i>Rps3a</i>	R (0)	S (100)	S (100)	R (10)	S (100)	S (100)
L91-8347	<i>Rps3b</i>	R (0)	S (85)	S (95)	R (15)	S (100)	S (100)
L92-7857	<i>Rps3c</i>	R (0)	S (95)	S (100)	R (10)	S (100)	S (100)
L85-2352	<i>Rps4</i>	R (0)	S (100)	S (95)	R (5)	S (100)	S (100)
L85-3059	<i>Rps5</i>	R (0)	S (98)	S (100)	R (5)	S (100)	S (100)
L89-1581	<i>Rps6</i>	R (0)	S (95)	S (95)	R (15)	S (100)	S (100)
L93-3258	<i>Rps7</i>	S (98)	S (100)				

R, 抵抗性、S, 罹病性、発病率は2～3反復の結果を示す。Race 4, 25を用いた時も2種類の接種法で同様な結果となった。



図3 菌そう埋込接種法で検定した茎疫病真性抵抗性戻し交配後代系統のDNAマーカー解析

矢印はSSRマーカー(Satt009)による増幅断片(214 bp)を示す。M, サイズマーカー、T, 丹波黒(罹病性) 248 bp、W, ワセシログ(抵抗性) 214 bp、1-5, 抵抗性、6-10, 罹病性

(杉本琢真)

[その他]

研究課題名：ダイズ茎疫病抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーと育種素材の開発

予算区分：県単及び国庫(新農業展開ゲノム)

研究期間：2007～2010年度

研究担当者：杉本琢真、吉田晋弥、相野公孝、入江和己、松本功