

ハクサイ亜種  
根こぶ病抵抗性  
(グループ 1, 2, 3 及び 4)  
特性調査マニュアル



(第 3 版)

令和 7 年 3 月 18 日 改正

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

種苗管理センター

アブラナ科野菜根こぶ病は、根こぶ病菌（学名：*Plasmodiophora brassicae* Wor.）によって引き起こされ、ハクサイ、キャベツ、ブロッコリー、カブ、ナタネ、つけ菜類などアブラナ科野菜に激しい被害をもたらす土壌伝染性病害の一つである。土壌中に存在する休眠胞子が、宿主植物の根に感染すると、そこから次第に根が肥大してこぶとなり、最終的に地上部の萎凋や枯死に至る。

本菌は絶対寄生菌であり、単一ほ場の複数または単一の根こぶから得た根こぶ病菌（休眠胞子集団）を「個体群」として取り扱っている。これは単離が難しく、各ほ場の根こぶ病菌はしばしば複数の菌が混在する遺伝的に不均一な集団であるためである。そのため、根こぶ病菌には地域によって病原性を異にする多様なほ場個体群の存在が報告されている（田中秀平，2015）。

個体群の判別のため、判別宿主の多様な組み合わせを用いた多くのレース（または病原型）判別法が提案されており、このうち Williams 法（Williams, 1966）と欧州判別品種（ECD）法（Buczacki et al., 1975）が世界で広く用いられている。

しかし、これらのレース判別法では、日本のハクサイ根こぶ病抵抗性（以降 CR）品種を侵す根こぶ病菌個体群と侵さない個体群を判別できないという新たな問題が生じた（Hatakeyama et al., 2004; Kuginuki et al., 1999; 田中ら，1998; Yano et al., 1996, 1997）。

そこで、新たな個体群の判別方法として、判別品種として二つのハクサイ CR 品種「CR 隆徳」と「スーパーCR ひろ黄」を用いて、それらの反応結果に基づき根こぶ病菌個体群を 4 群のグループに分類する方法が提案された（Hatakeyama et al., 2004）。現在の日本ではこの方法が広く用いられている。

本マニュアルではこの方法を用いて各グループの抵抗性検定を行っている。

## 1. 準備する器具及び試薬等

植物体の育成：7.5 cm ポリポット、市販園芸培土、無調整ピートモス、パーライト（小粒）、酸性白土、炭酸カルシウム、農業用ビニールフィルム、自記温度記録計、イレクターベンチ、フラワーラベル、プラ舟、電照器具、結束バンド

接種源の調製：【接種用胞子懸濁液の作成】三角フラスコ、ビーカー、ガーゼ、滅菌蒸留水、50mL 遠沈管、15mL 遠沈管、顕微鏡、血球計算盤、数取器、マイクロピペット、各種ピペットチップ、遠心分離機、ハサミ、ピンセット、バット、ミキサー、手袋、ビニールバッグ

【長期保存用の精製胞子懸濁液の作成】65%シヨ糖水溶液 500mL、滅菌蒸留水、洗い桶、各種ピペット（100 $\mu$ L、1000 $\mu$ L、10mL）、50mL 遠沈管、1.5mL マイクロチューブ、各種ピペットチップ、遠沈管ラック、チューブラック、ビーカー、ガーゼ、すり鉢、乳棒、メス、手袋、秤、各種滅菌ピペットチップ、遠心分離機、血球計算盤、数取器、クリーンベンチ

廃棄及び清掃：オートクレーブ、オートクレーブバッグ、乾熱滅菌器、70%エタノール、塩化ベンザルコニウム、次亜塩素酸塩（ナトリウム・カルシウム）等

## 2. 供試病原菌株

アブラナ科根こぶ病菌（学名：*Plasmodiophora brassicae* Wor.）のグループ 1、グループ 2、グループ 3 及びグループ 4 を供試する。

種苗管理センターでは、アブラナ科根こぶ病菌グループ 1「No.5 菌」、グループ 2「No.37 菌」、グループ 3「No.14 菌」及びグループ 4「Ano-1 菌」を供試している。

病原菌は各農業試験場等で保存されている場合があるため、分譲について問い合わせること。または、グループ分類の判明している菌株の手持ちがあれば、それを用いても良い。

なお、調査を行う前に供試病原菌株の病原性を確認する。また、増殖を行った場合は、必ずグループ判別品種を供試して菌株のグループを確認する。

## 3. 供試品種等及び供試個体数

### (1) 標準品種

標準品種の各グループに対する反応を表 1 に示した。

グループごとに罹病性品種と高度抵抗性品種を最低 1 品種ずつ必ず供試する。

表 1. 標準品種及びグループに対する反応

標準品種	グループに対する反応			
	1	2	3	4
スーパーCR ひろ黄 (ハクサイ亜種)	-	R	-	R
CR 隆徳・秋理想 (ハクサイ 亜種)	-	-	R	R
あきめき (ハクサイ亜種)	R	R	R	R
無双 (ハクサイ亜種)	S	S	S	S

※S：罹病性、R：高度抵抗性、-：標準品種の設定なし

### (2) 判別品種

菌株のグループの確認は Hatakeyama et al. (2004) の方法に準じて行う。

各グループに対する反応を表 2 に示した。

譲渡菌株のグループや増殖後の菌株のグループ確認を行う際は、必ず全判別品種を供試する。

出願品種を供試する接種試験（栽培試験）の際は、判別品種の供試は必須ではないが、「スーパーCR ひろ黄」並びに「CR 隆徳」の両方の供試を推奨する。

表 2. 判別品種及びグループに対する反応

判別品種	グループに対する反応			
	1	2	3	4
スーパーCR ひろ黄 (ハクサイ亜種)	S	R	S	R
CR 隆徳・秋理想 (ハクサイ 亜種)	S	S	R	R
あきめき (ハクサイ亜種)	R	R	R	R
無双 (ハクサイ亜種)	S	S	S	S

※S：罹病性、R：中度抵抗性または高度抵抗性

(3) 最低供試個体数

接種区：20 個体、無接種区：10 個体

(4) 反復

2 反復

4. 調査方法

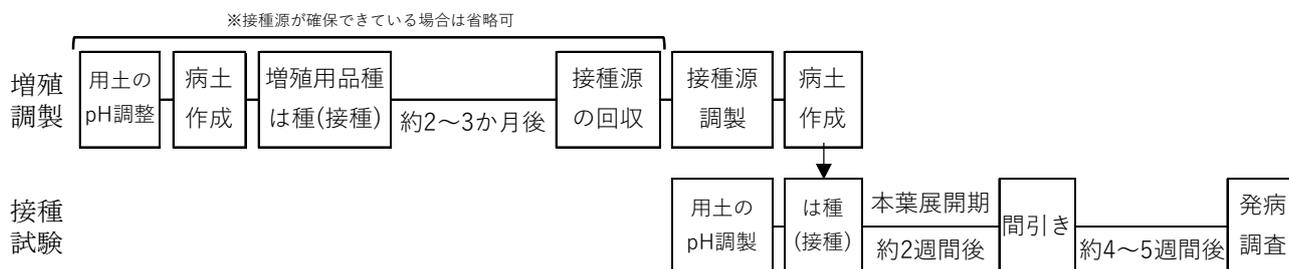


図 1. 接種試験の流れ (目安)

(1) 接種源の増殖

本病原菌は絶対寄生菌であり、増殖用品種への接種により根こぶを得て、胞子を増殖・継代する。後述の (3) ~ (6) のとおり、病土 (各グループの休眠胞子懸濁液の濃度： $1.0 \times 10^4 \sim 10^6$  個/mL) と床土を作成し、増殖用品種 (表 3) と判別品種 (表 2) をは種して接種する。

増殖用品種の発病を確認したら、接種から約 2~3 か月後に根こぶを回収する。根こぶは可能な限り土の付着がないよう、きれいに洗浄する。

同時に判別品種も供試し、反応を確認する。想定どおりの結果とならなかった場合は、後述の 4. 調査方法の (5) 接種方法及び (6) 接種後の管理条件等を精査した後、根こぶ胞子の再増殖を行う (必要に応じて菌株を再入手する)。

収穫した根こぶを  $4^{\circ}\text{C}$  の冷蔵庫内で保存し、供試する (冷蔵保存は約 1 か月を限度とする)。長期間保存する場合は、小分けにして①根こぶのまま保存、もしくは②精製胞子懸濁液を作成する。①②はどちらも  $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫内で保存する (①は約 2~3 年、②は約 10 年間保存ができる)。

表 3. 増殖用品種の例

	増殖用品種
グループ 1	黄福 65
グループ 2	秋理想
グループ 3	スーパーCR ひろ黄
グループ 4	無双

※病原性の変化を回避するため、必ずそれぞれの増殖用品種を使用すること（最初に根こぶを採取した品種での増殖が望ましい）。

※コンタミネーションのリスクがあるため、作業は 1 グループごとに消毒を徹底しながら行う。

## (2) 接種源の作製と孢子濃度の測定・調製

### 【接種用の孢子懸濁液を作成する場合の手順例】

冷蔵保存もしくは冷凍保存した根こぶを用意する（根こぶ 1g に含まれる休眠孢子の量は約  $1.0 \times 10^8$  個程度と仮定し、大まかに接種源の必要量を算出するとよい）。

根こぶを冷凍している場合は、室温で解凍しておく。

- ① 器具類をオートクレーブや乾熱滅菌器等にかけて滅菌しておく。
- ② 根こぶ組織に対し滅菌蒸留水を 1 : 1 の割合で加えミキサー等で磨砕する。
- ③ 磨砕液を三～四重のガーゼでろ過し、ろ液を 50mL 遠沈管に分注する。
- ④ ろ液を遠心分離（630G/20 分）し、上澄みを廃棄する。
- ⑤ 沈殿物（ペレット）に滅菌蒸留水を少量（5～10mL 程度）加え、よく攪拌し懸濁させる。この時、50mL 遠沈管が複数本ある場合は一本にまとめることもできる。
- ⑥ 遠心分離（20G/5 分）を行い、休眠孢子を含有する上澄み液を新しい 50mL 遠沈管に回収する。
- ⑦ 遠心分離（400G/15 分）を行い、上澄みを廃棄する。水を 5～10mL 加えてよく攪拌し、懸濁させてから、懸濁液を全量新しい 15mL 遠沈管に移す。
- ⑧ 遠心分離（440G/15 分）を行い、上澄みを廃棄する。
- ⑨ 二層になった沈殿物（上層：休眠孢子層、下層：でんぷん層）（図 3 参照）に少量（5～10mL 程度）の滅菌蒸留水を加え、上層の休眠孢子層のみを混和し（下層のでんぷん層を壊さないように手のひらの上でタッピングして少しずつ休眠孢子を含む沈殿物を懸濁させる）、懸濁液を新しい 15mL 遠沈管に移す。
- ⑩ 再度遠心分離（440G/15 分）を行い、上澄みを廃棄する。

※遠心分離直後の上澄みがきれいになり、分離してくる沈殿物下層のでんぷん層が少なくなるまで⑧⑨の操作を繰り返す（1～2 回程度が目安）。

- ⑪ 沈殿物に少量（5～10mL 程度）の滅菌蒸留水を加え、良く懸濁させ、血球計算盤を使用して孢子数の計測を行う。保存容器には作製日、孢子数、液量、グループ名（菌株名）を記載して、冷蔵庫に保管し、接種源とする。

※孢子懸濁液は 4℃の冷蔵庫で 1 か月程度の貯蔵が可能。ただし、日数が経過するほど活性が落ちていくため、使用の 2 週間前までの作製を推奨する。

※血球計算盤を使用して孢子を計測する場合は、適度に希釈する（目安は 200～400 倍希釈）。

【長期保存用の精製孢子懸濁液を作製する場合】

冷蔵保存もしくは冷凍保存した根こぶを用意する。根こぶを冷凍している場合は、室温で解凍しておく。作製しやすい分量として根こぶを約 50g 用意する。

- ① 器具類をオートクレーブや乾熱滅菌器等にかけて滅菌しておく。
- ② 手袋を着用し、すり鉢内で根こぶをメスで切り刻み、乳棒で押しつぶすようにして軽くペースト状にする。
- ③ ②に滅菌蒸留水を約 35mL 加え、乳棒でかき混ぜ、三〜四重のガーゼをセットしたビーカーに注ぎ入れる。この時、残渣をできるだけ加える。ガーゼをビーカーから持ち上げ、軽く絞る。
- ④ ビーカーのろ液を 50mL 遠沈管に移す。
- ⑤ 残渣をすり鉢に戻し、③、④の操作をもう一度繰り返す。
- ⑥ 秤で遠沈管の重さを計量しバランスを取り、遠心分離機にかける (1000G/5 分)。
- ⑦ 50mL 遠沈管内の沈殿物を崩さないよう、ピペットを使用して上澄みを捨てる。
- ⑧ クリーンベンチに移動し、ピペットで 65%ショ糖水溶液を 10mL、沈殿物の入った遠沈管に分注する。
- ⑨ 沈殿をほぐしてよく攪拌し、遠心機にかける (440G/10 分)。
- ⑩ 休眠孢子を含有する上澄み液を新しい 50mL 遠沈管に移し、全部で 50mL になるように滅菌蒸留水を加える。
- ⑪ よく攪拌し、遠心分離機にかける (1000G/5 分)。
- ⑫ 遠心後、沈殿物を崩さないよう、ピペットを使用して上澄みを捨てる。
- ⑬ 10mL の滅菌水を加え、良く攪拌して沈殿物を溶かす。
- ⑭ 血球計算盤を使用して孢子数の計測を行い、原液の濃度を測定する。
- ⑮ 滅菌蒸留水を加え、目的の濃度となるように調製する。
- ⑯ 濃度調整が終わったものを 1mL ずつ、1.5mL マイクロチューブにピペッティングしながら分注する。休眠孢子濃度  $1.0 \times 10^9$  個/mL の場合、こぶ 50g から約 20 本の精製孢子懸濁液が作製できる。
- ⑰ 保存容器に作製日、菌株名、濃度を記入し、 $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保管する。  
使用の際は、必要な分量を室温で解凍し、接種源とする。

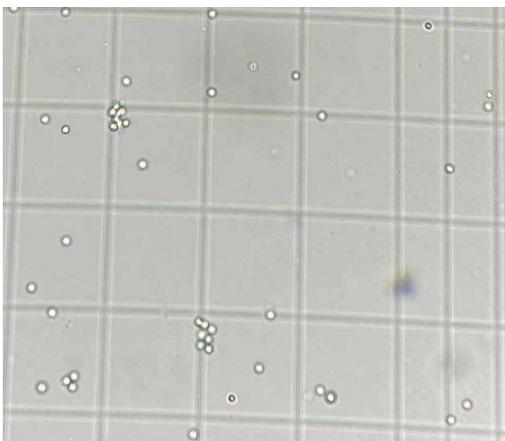


図 2. 血球計算版上の根こぶ病菌孢子 (球状)

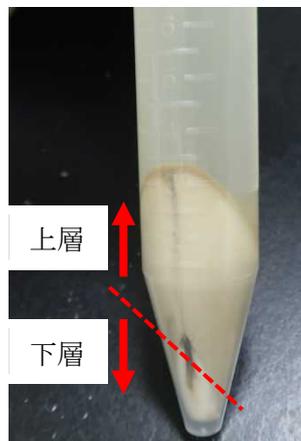


図 3. 二層に分離した沈殿物 (上層: 休眠孢子層、下層: でんぷん層)



図 4. 長期保存用の精製孢子懸濁液 (1mL ごと小分け)

### (3) 各種用土の準備

病土挿入接種法（吉川，1993）で行う。

床土用と病土用の計 2 種類の土を準備し、pH は 5.5～6.0 の範囲に収まるよう調整する。

【床土用土】市販園芸培土：無調整ピートモス＝10：1 の割合で混合したものを準備する。1 ポット（7.5cm）あたり約 300g 使用する。

【病土用土】酸性白土（もしくは市販園芸培土）：無調整ピートモス：パーライト＝1：1：3 の割合で混合したものを準備する（1 ポットあたり乾土 10g）。オートクレーブ等で、滅菌する。

※培養土は病原線虫等に汚染されていないものを使用する。調査時に根を洗浄するため、使用する市販園芸培土は根との分離性の良い土を推奨する。

※特に無調整ピートモスは、5mm のふるいにかけて、夾雑物を除いておくと良い。

### (4) 病土の作製と床土への充填

#### 【接種区】

- ① 病土用土は 1 ポットあたり乾土 10g として、必要量を計量する。
- ② 接種源が病土 1g 当たり  $1.0 \times 10^4 \sim 10^6$  個/mL 入るように接種源の必要量を計算する。
- ③ 滅菌蒸留水を 1 ポットあたり約 10～15mL 準備し、その中に計量した接種源を懸濁する。
- ④ 計量済みの病土用土に③を全量加えて、よく混合する。
- ⑤ 土を軽く握って形が崩れない程度になるよう、必要に応じて滅菌蒸留水を加えて水分量を調整する。なお、攪拌はしっかり行うこと。これを病土として使用する。

#### 【無接種区】

- ① 病土用土は 1 ポットあたり乾土 10g として、必要量を計量する。
- ② 滅菌蒸留水を 1 ポットあたり約 10～15mL 準備する。
- ③ 計量済みの病土用土に②を全量加えて、よく混合する。
- ④ 土を軽く握って形が崩れない程度になるよう、必要に応じて滅菌蒸留水を加えて水分量を調整する。なお、攪拌はしっかりと行うこと。これを病土（無菌）として使用する。

ポットには、床土用土を充填して湿らせておき、深さ 3～4cm、幅 3～4cm 程度の穴をあける。

その穴に接種区、無接種区、それぞれ各区用に作成した病土を挿入する。



図 5. 病土の挿入写真例

（赤丸内：病土、赤丸外：床土）

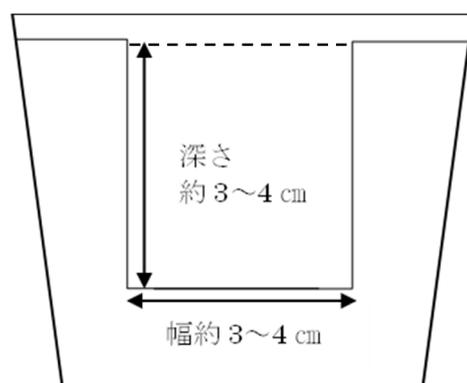


図 6. 7.5cm ポットの横断面模式図

## (5) 接種方法

病土上に、は種を行い接種とする。

基本は1ポットあたり2粒まきとし、種子を2~3mm程埋め込み、本葉展開時に間引きし、一本立てとする。

※種子の発芽勢が弱い場合、発病による枯死かの判断が困難であるため、極力発芽勢が弱い種子をは種しない。発芽時点で欠株が発生しないよう留意する。

※栽培スペースに制限がある場合は、1ポットあたり2~8粒は種し、複数個体の供試も可とする。

## (6) 接種後の管理

【温度管理】室温を20~24℃に調整できる環境（ガラス温室内やインキュベーター等）で、40~50日間栽培管理する。なお、発病適温は20~24℃。開放条件では18℃以下、26℃以上にならないよう遮光等の工夫により温度管理に注意する。

【日長制御】日長が14~16時間となるよう、必要に応じて電照を行い制御する。

【水管理】は種後、初期の3週間は根こぶ病菌の活性を上げるため、根腐れに注意しながら土壤水分を高めに維持する。以後は植物体の生育のため、一般栽培の管理に従って管理し、生育に応じて液肥を適宜施用する。

※高温条件下で発病が助長され、判定に影響する可能性があるため、最高気温が28℃を超えることがないように留意する。

※長日条件下で発病が助長され、短日条件下で発病程度が低くなる傾向がある。マニュアルどおりの日長時間となるよう留意する。

## (7) 調査

接種（は種）から40~50日後に、供試株の根を丁寧に掘り取って水洗いし、各株の発病評点から、発病個体率、発病指数を算出する。

## 5. 評価方法

### (1) 調査結果の整理

以下の算出式により発病個体率\*及び発病指数\*\*を算出し、調査結果を表4のように取りまとめる。

$$* \text{ 発病個体率} = \frac{\text{発病個体数}}{\text{調査個体数}} \times 100$$

注) 発病個体数：調査個体数の内、下記の発病評点が1~3と判定された個体を合計した数。

$$** \text{ 発病指数} = \frac{\sum (\text{発病評点} \times \text{発病評点別の個体数})}{\text{調査個体数} \times 3} \times 100$$

発病評点

発病評点	根こぶ着生程度
3	主根あるいは側根または両方に大きな根こぶが着生
2	主根あるいは側根または両方に中程度の根こぶが着生
1	側根にのみ小さな根こぶが着生
0	根こぶの着生が見られない

参考：発病評点例（根こぶ着生程度）



発病評点 0  
根こぶ着生なし



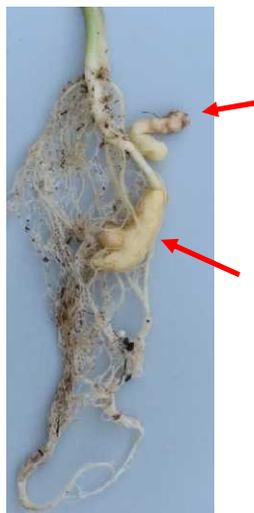
発病評点 1  
側根にのみ小さな根こぶ



発病評点 2  
主根に中程度の根こぶ



発病評点 2  
側根に中程度の根こぶ



発病評点 2  
主根及び側根に中程度の根こぶ



発病評点 3  
主根及び側根に大きな根こぶ

表 4. 調査結果

	供試 個体数	調査 個体数	発病評点別個体数				発病 個体率	発病 指数
			0	1	2	3		
出願品種								
対照品種								
標準品種等								

## (2) 抵抗性の判定

各標準品種の発病指数と比較して評価する。

なお、標準品種等の発病指数が以下のいずれかの結果となった場合は、試験成立の妥当性が疑われるため、再試験を検討する。

1. 罹病性標準品種の発病指数が 66.7 を下回った場合。
2. 高度抵抗性標準品種の発病指数が 33.3 を上回った場合。

※接種試験がマニュアル記載の 4. 調査方法の (5) 接種方法及び (6) 接種後の管理と異なる条件となっていなかったかを点検する。

## 6. 注意事項

汚染土壌の飛散防止に留意する。

接種後及び調査終了後は、汚染土の付着した器具、植物体、使用済み培養土等をオートクレーブもしくは熱湯に 30 分ほど浸漬して滅菌処理する。調査に用いた大型の器具やプラスチック製品等オートクレーブ不可なものは、次亜塩素酸ナトリウム等（有効塩素を 1%含有する溶液）に 24 時間以上浸漬する。もしくは乾熱滅菌器を使用し 80°C で 1~2 時間、又は 65°C で 24 時間以上加熱して滅菌処理を行う。

## 7. 参考文献

- Hatakeyama et al. (2004) New classification method for *Plasmodiophora brassicae* field isolates in Japan based on resistance of F1 cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) to clubroot. *Breed. Sci.*, 54, pp. 197-201.
- 吉川宏昭 (1993) アブラナ科野菜の根こぶ病抵抗性育種に関する研究. 野菜茶試研報, A7, pp. 1-165.
- 松元哲 (2012) DNA マーカー選抜による根こぶ病と黄化病に抵抗性のハクサイ新品種「あきめき」の育成. 農林水産技術研究ジャーナル, 35 (5), pp. 61-64.
- Sharma, K. et al. (2011) Effect of temperature on primary infection by *Plasmodiophora brassicae* and initiation of clubroot symptoms. *Plant Pathol.*, 60, pp. 830-838.
- 田中秀平・伊藤真一 (2014) 日本に分布するアブラナ科植物根こぶ病菌 (*Plasmodiophora brassicae*) の病原性の多様性と遺伝的多様性. 日植病報, 80 特集号, pp. 1-7.
- 田中秀平 (2015) アブラナ科植物根こぶ病菌の病原性と病原力の多様性. 植物防疫, 第 69 巻, 第 10 号, pp. 625-629.