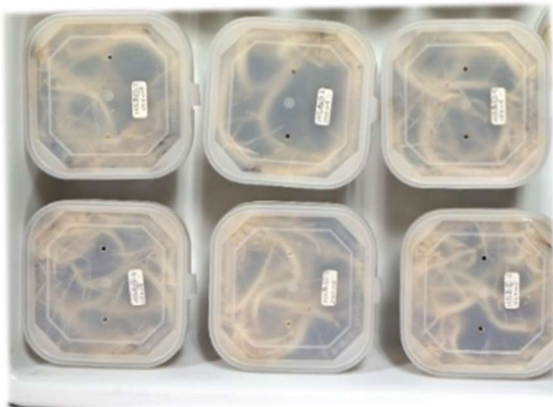


バレイショのジャガイモシロシストセンチュウ 抵抗性検定マニュアル



2020年3月

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）
北海道農業研究センター

目次

はじめに	1
1. Gp の取り扱いにおける注意事項	2
2. Gp 抵抗性検定法の概要	3
3. カップ検定法	4
3-1. 種イモの準備	4
3-2. 接種源の準備	4
3-2-1. 用意するもの	4
3-2-2. 手順	4
3-3. 植付・接種	5
3-3-1. 用意するもの	5
3-3-2. 手順	5
3-4. 調査	7
3-5. 留意事項	8
4. ポット検定法	10
4-1. 種イモの準備	10
4-2. 接種源の準備	10
4-3. 植付・接種	10
4-3-1. 用意するもの	10
4-3-2. 手順	10
4-4. 調査	11
4-5. 留意事項	12
参考文献	13
付録	14

はじめに

ジャガイモシロシストセンチュウ (*Globodera pallida*、以下 Gp と表記、図 1) はバレイシヨの重要害虫である。本種は南米原産であり、19 世紀後半にヨーロッパに侵入し、その後各国のバレイシヨ栽培地帯を中心に分布が広まったと考えられている。我が国では 2015 年に北海道網走市の一部圃場で発生が確認され、2018 年末時点での発生面積は 163 圃場 682ha である。本種は卵からふ化した幼虫が根に寄生し、養水分吸収や根の伸長を阻害することにより減収被害をもたらす。その後、雌成虫が自身の体内に卵を数百個産み、その体表がクチクラ化してシストとなる。シスト内の卵は乾燥・低温に非常に強く、土壤中で 10 年以上残存するため、殺線虫剤や輪作による密度低減効果が得られにくい。



図 1 : Gp の雌成虫 (白～クリーム色の粒) およびシスト (褐色の粒)

現在、ヨーロッパなどの Gp 発生国では Gp 抵抗性品種の開発・利用が進められている。そこで、我が国でも Gp 抵抗性バレイシヨ品種の開発が着手されたが、本線虫はこれまで日本未発生であったため、国内での抵抗性評価手法が確立されていなかった。

我が国では Gp に近縁のジャガイモシロシストセンチュウ (*G. rostochiensis* 以下、Gr と表記) が 1972 年に初確認されており、現在、Gp よりも広範囲に発生し (2018 年末時点での発生面積は約 11,000ha)、バレイシヨの減収被害を引き起こしている。Gr に対しては 1986 年に「トヨアカリ」が品種登録されて以降、国内で 50 品種以上の Gr 抵抗性品種が開発・導入されている。国内の Gr 抵抗性品種は抵抗性遺伝子 *H1* を持つものが大部分であり、その抵抗性は有／無の 2 通りで評価され、評価手法はすでに確立されている (参考文献 1)。

一方、Gp 抵抗性は複数の抵抗性遺伝子が関与していると考えられ、その程度は段階的である。このため、Gp 抵抗性を評価するためには、基準品種を選定し、それらに対する相対的な評価を行う必要がある。ヨーロッパの抵抗性評価で用いられているバレイシヨの基準品種や接種源となる Gp の標準系統は我が国では入手困難であるため、我が国で入手可能な品種や我が国で発生する Gp 系統を用いた評価手法を開発する必要があった。

本マニュアルは、ヨーロッパでの手法を参考にし、国内での実施を想定して開発した Gp 抵抗性評価手法について取りまとめたものである。本マニュアルの作成にかかる研究は、農研機構生研支援センターの「革新的技術開発・緊急展開事業」(うち先導プロジェクト) の支援を受けて実施した。

1. Gp の取り扱いにおける注意事項

Gp は植物防疫法に規定された検疫有害動植物である。本種を導入する前に、植物防疫所のホームページから「管理場所の基準」を確認してオートクレーブ等を整備し、その地域を管轄する植物防疫所を通じて Gp の移動・導入利用の許可を得る必要がある。また、Gp の散逸を防ぐために、検定施設では靴を履き替える、取扱い時には使い捨てゴム手袋を着用する等の対策を行う。栽培及び試験に使用した植物、土壌、器具類、ポットから流出した水及び不要となったシスト混入土壌は、その都度オートクレーブにより 120℃で 20 分間以上の高圧殺菌処理又は乾熱殺虫処理を行う。不要となった線虫及び器具洗浄水は、煮沸消毒する。

ジャガイモシロシストセンチュウの移動の制限について

https://www.maff.go.jp/pps/j/law/houki/shorei/shorei_266_html_266.html

管理場所の基準について

https://www.maff.go.jp/pps/j/law/daijinkyoka/kanribaSyo_kizyun/20090901.html

2. Gp 抵抗性検定法の概要

本マニュアルでは「カップ検定法」と「ポット検定法」の2種類の検定法を紹介する。

カップ検定法は、透明なプラスチック製カップに種イモを植付け、そこに Gp を接種し、一定期間栽培後に根に着生したシストをカップの側面・底面から計数する、という方法である（図 2）。Phillips ら（参考文献 2）によって開発された方法であり、ヨーロッパでも実施されている方法である。ポット検定法よりも簡便な方法であるため、供試系統数が多い一次スクリーニングに適している。

ポット検定法は、ポットに種イモを植付け、そこに Gp を接種し、一定期間栽培後に増殖したポット内のシストを計数する、という方法である（図 3）。カップ検定法よりも野外環境に近いため、より正確に抵抗性を判定できる。供試系統数がある程度絞られた段階で実施することが望ましい。また、卵数の計測も可能であるため、栽培前後の Gp 密度増減も比較可能である。

なお、Gp 抵抗性検定は基準となる感受性品種との比較によって相対的に行う。したがって、検定の成立には感受性品種で確実に線虫を増殖させることが不可欠である。



図 2：カップ検定の様子



図 3：ポット検定の様子

3. カップ検定法

3-1. 種イモの準備

検定には直径 3cm 程度 (20~30g 程度) の小さい種イモを用いる。抵抗性を評価したい品種・系統のほか、基準品種として Gp 感受性 (Gr 抵抗性) の「パールスターチ」もしくは「さんじゅう丸」を用意する。それ以外に、感受性コントロール品種として「男爵薯」もしくは「紅丸」もしくは「インカのめざめ」、抵抗性コントロール品種として「フリア」もしくは「Eden」の種イモも用意する (種イモの入手先は付録を参照)。



図 4 : 芽出させた種イモ

基準品種は抵抗性検定の基準として必須であり、感受性コントロール品種は、試験に供した Gp 卵の品質チェック (十分な寄生能力を持つこと、Gr のコンタミがないこと等の確認) に、抵抗性コントロール品種は試験精度の確認 (これらの品種の抵抗性が期待値通りか) に用いる。

種イモは試験に供する前に 20℃以下の温度条件で芽出しを行い、1~2 週間程度浴光する (図 4)。

3-2. 接種源の準備

3-2-1. 用意するもの

- ・ Gp 含有土壌 (Gp の移動・導入利用許可が下り次第、農研機構 北海道農業研究センター線虫害グループより Gp 汚染土を分与する。増殖させたい場合は付録を参照)
- ・ シスト分離用具 (目開き 200 μ m 程度の篩と目開き 750 μ m 程度の篩、フェンウィック缶、2~3L のポリビーカー、直径 150mm のろ紙、口径 75mm の漏斗、漏斗台等。詳細は参考文献 3 を参照)
- ・ ピンセット
- ・ ガラスビーカー
- ・ アルミホイル
- ・ ホモジナイザー (無くても可)
- ・ シラキューズ時計皿もしくはガラスシャーレ
- ・ 目開き 60~80 μ m のメッシュ
- ・ 実体顕微鏡

3-2-2. 手順

- ① Gp 含有土壌からシストを分離する (シストの分離法は参考文献 3 を参照)。
- ② ピンセットでシストを拾い出し、水道水を入れたビーカーに集め、アルミホイルでふた

をして 16~18℃で 2 週間以上静置する。この処理を行うことで Gp の卵がふ化しやすくなる。土壌から分離したシストはカビが生えやすいので、水道水が適する。

- ③ 静置後、シストをホモジナイザーで破碎して線虫懸濁液を作製する。ホモジナイザーが無い場合は、シラキース時計皿もしくはガラスシャーレ上にシストを集め、少量の水道水を滴下した上で、マジックペンの背側など平坦面を持つ棒先で押しつぶす。
- ④ 線虫懸濁液を目開き 60~80 μ m のメッシュに通し、シスト殻などの夾雑物を取り除く。メッシュの通過液をビーカーに受け、実体顕微鏡下で 1ml あたりの線虫個体数を計数する。このとき、生存卵と活動しているふ化幼虫のみを計数する。生存卵は内部に細胞あるいは幼虫が観察される。空の卵は透き通って内部構造が何も見えず、死んだ卵は全体に黒ずんで見える（詳細は参考文献 3 を参照）。その後、線虫懸濁液を 750~1000 個体/ml に調整する。すぐに使用しない場合は、スターラーで攪拌しながら 16~18℃で保管する。ただし、カビが生えやすいので 3 日以上保管は避ける。

3-3. 植付・接種

3-3-1. 用意するもの

- ・ 蓋付きの透明なプラスチックカップ(本体:エムケイテック製「MH-3 透明」(容量 250ml、外寸 91×91×57mm)、蓋:同社製「MH-1~3 PE 蓋」、あらかじめフタに直径 2mm 程度の小孔を 2 つあけておく。)
- ・ 種イモ
- ・ 園芸培土 (株ホクサン「くみあい園芸培土」)
- ・ 黒ボク土 (2mm の篩いを通し、滅菌・乾燥させておく)
- ・ 線虫懸濁液
- ・ ガラス製ピペット
- ・ 水道水
- ・ 新聞紙

3-3-2. 手順 (図 6 も参照)

- ① 園芸培土と黒ボク土を 1:1 (体積比) の割合で混和し (以下 混合土)、カップに 50ml 充填する。
- ② 頂芽が下になるように種イモを置く。
- ③ 線虫懸濁液をよくピペッティングして攪拌し、1ml 接種する。このとき、なるべくカップの縁に近いところに接種するが、線虫懸濁液がカップの内壁にかからないようにする (図 5)。
- ④ 種イモにかからないように水道水を 10ml 滴下する。

- ⑤ 混合土を 50ml 充填する。
- ⑥ 再び③と同様に線虫懸濁液を 1ml 接種する。③と合わせてカップあたり 1,500~2,000 卵を接種したことになる。
- ⑦ ④と同様に再び水道水を 10ml 滴下する。
- ⑧ 混合土を 25ml 充填する。
- ⑨ ④と同様に水道水を 6~10ml 滴下する。
- ⑩ 蓋を閉め、ばんじゅう等に並べた後、新聞紙をかぶせて 18~20°C程度で保温する。
- ⑪ 植え付けから約 30 日後に、種イモにかからないように小孔から水を 1 カップ当たり 10ml 注入する。

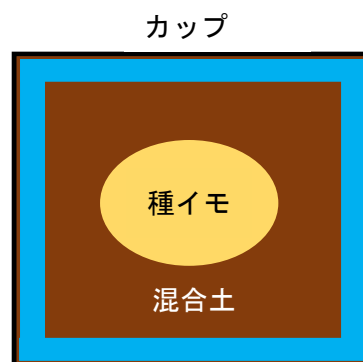


図 5 : カップ検定の接種時の模式図 (カップを上面から見たところ)。水色の部分に線虫懸濁液を接種する。

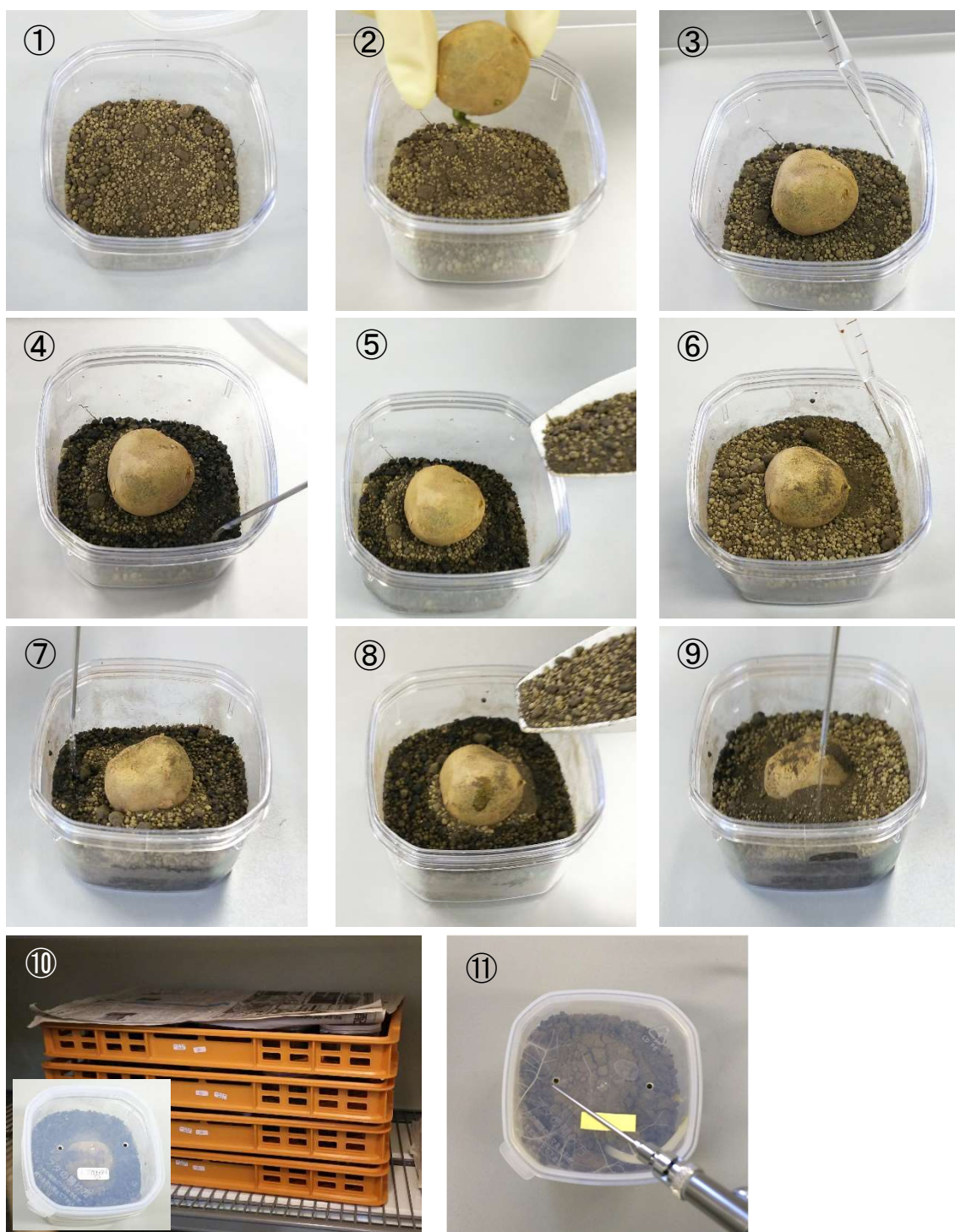


図6 カップ検定の植付・接種の手順図（写真中の番号が手順の番号に対応する）

3-4. 調査

- ① 植え付けから約70日後に、カップの側面・底面から着生したシストを計数する（図7）。このとき、雌成虫もシストとして計数する。ライト付きルーペ等（3x～5x）を使用するとシストが見えやすい。

- ② 各品種・系統の平均シスト数から、基準比 $\{(\text{調査品種} \cdot \text{系統の平均シスト数}) / (\text{基準品種の平均シスト数}) \times 100\}$ を算出する。基準比から 1~9 の 9 段階もしくは弱~強の 5 段階で抵抗性を判定する (表 1)。



図 7：接種から約 2 ヶ月後のカップ側面。感受性品種の根には多くの雌成虫（白~クリーム色の粒；緑丸）およびシスト（褐色の粒；ピンク丸）が着生している。

表 1 抵抗性の判定基準

基準比	1~9 の 9 段階	弱~強の 5 段階
<1	9	強
1. 1-3	8	
3. 1-5	7	やや強
5. 1-10	6	
10. 1-15	5	中
15. 1-25	4	
25. 1-50	3	やや弱
50. 1-100	2	弱
>100	1	

3-5. 留意事項

- ・ 原則として 1 系統・品種につき 4 反復以上実施する。
- ・ 生育が極端に悪い場合は必要に応じて調査対象から除外する。
- ・ 検定用のカップは株式会社ナカヤマ (<https://www.nakayama-pack.co.jp/>) から購入できる。他のメーカーのものを用いる場合は、容量 250ml 程度で、漬物用等の密閉構造で

蓋が頑丈なものを使用する。円筒形よりも角形の方が着生シストの計数がしやすい。

- ・ カップ試験に適する小イモが確保できない場合は、通常の高さの種イモを切断して用いる。腐敗しやすいため、断面を乾燥させてから用いるとともに、反復を多めに設定する。
- ・ 通気性を確保するため、植付後のカップを並べたばんじゅう等を2枚以上重ねる場合は、底面がメッシュ構造になっているばんじゅう等を使用する。
- ・ 土の種類によっては、微粒子がカップ底面に堆積し、底面のシストが見つらなくなることがある。3-3-2で園芸培土に黒ボク土を混和したのは、これを防ぐためである。他の園芸培土等を用いる場合は、事前に予備試験を行い、底面の根系やシストが正常に確認できることを確認しておくことが望ましい。
- ・ 線虫はプラスチック器具に張り付くので、卵懸濁液の作製や接種は必ずガラス製のピペットを用いる。
- ・ カップ検定では抵抗性コントロール品種は9段階で7~9(5段階で「やや強」~「強」)、感受性コントロール品種は9段階で1~2(5段階で「弱」)の評価値を示す。これらの品種の評価値に著しく異常がある場合は、再度検定を実施する。また、基準品種での平均シスト数が接種頭数の1/30以下だった場合も、再度検定を実施する。

4. ポット検定法

4-1. 種イモの準備

3-1 と同様。

4-2. 接種源の準備

3-2 と同様。

4-3. 植付・接種

4-3-1. 用意するもの

- ・ 直径 12cm のポリポット
- ・ ばんじゅう
- ・ 種イモ
- ・ 園芸培土（株ホクサン「くみあい園芸培土」、黒ボク土は混和しない）
- ・ 線虫懸濁液
- ・ ガラス製ピペット

4-3-2. 手順（図 8 も参照）

- ① 12 cm のポリポットをばんじゅうに並べ、種イモの大きさに合わせて 2~4 cm ほど園芸培土を充填する（種イモが大きい場合は土の量を少なく、小さい場合は土の量を多くする）。ポットの底には 4cm 角程度に切ったキムワイプを敷く。
- ② 頂芽が上になるように種イモを置く。
- ③ 頂芽が土壌表面にギリギリ隠れるまで、園芸培土を充填する。このとき、土がポットの 6~7 割ほどを満たすようにする。
- ④ 数日~2 週間程度栽培し、地上部が 1~2cm 程度に生育するまで栽培する。
- ⑤ 植物体の周囲に Gp の卵懸濁液（1,000 卵/ml）を 5~7ml かける（ポットあたり 5,000~7,000 卵接種）。
- ⑥ 園芸培土で覆土し、ポットの 8 割ほど満たすようにする。子イモの着生とともに土が盛り上がるので、土を入れすぎない。
- ⑦ 土壌の乾燥や過湿を避け、適切に灌水しながら 18~20℃ で栽培する。接種日を 0 日として 80~90 日間栽培後、灌水を停止する。

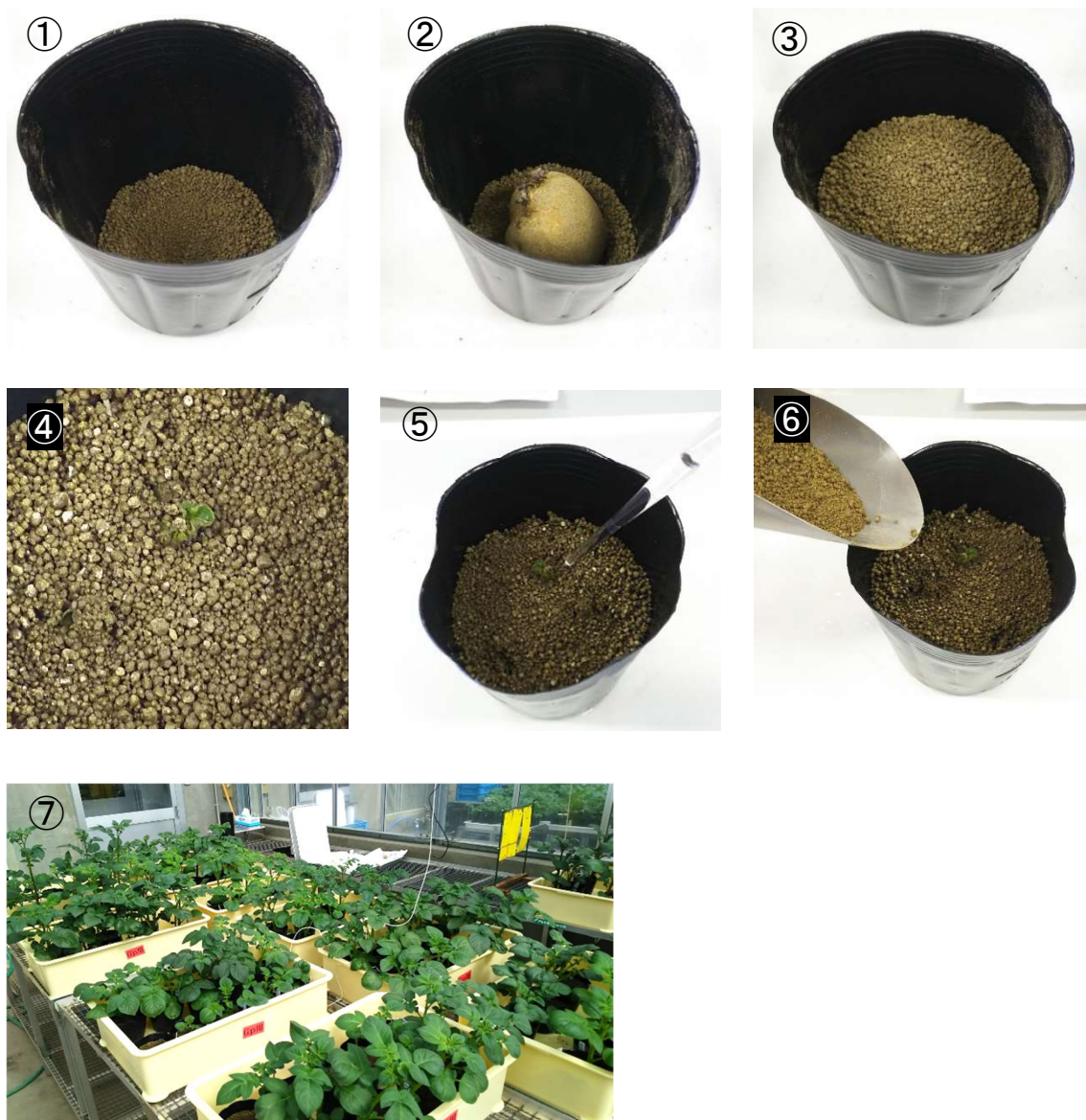


図8 ポット検定の植付・接種の手順図（写真中の番号が手順の番号に対応する）

4-4. 調査

- ① 灌水停止後植物体が完全に枯死したら、地上部を除去し、栽培後の土壌を乾燥させる。増殖後の Gp を次の試験の接種源等にする場合は、高温・直射日光を避けて乾燥させる。
- ② 各ポットの土壌を秤量し、よく混和したのちに土壌を 150g 取り出し、シストを分離する。実体顕微鏡下でシストを計数し（図9）、土壌 1g 当たりのシスト数を算出し、土壌重量をかけて各ポット内の全シスト数を算出する。栽培前後の Gp 密度を比較する場合は、3-2 と同様に線虫懸濁液を作製し、懸濁液の容量と懸濁液 1ml 当たりの個体数から栽培後の線虫密度を算出し、接種頭数と比較する。
- ③ 各品種・系統の平均シスト数から、カップ検定と同様に基準比を算出し、抵抗性を判定

する。



図9 ろ紙上に分離したGpのシスト（小さな突起物がある褐色～茶色の球体）。根の破片等の夾雑物も一緒に分離される。

4-5. 留意事項

- ・ 原則として1系統・品種につき4反復以上実施する。
- ・ 地上部の生育が極端に悪い場合は必要に応じて調査対象から除外する。
- ・ ポットからの線虫の流亡を防ぐため、接種後1～2週間は水のやりすぎに注意する。
- ・ 基準品種・感受性コントロール品種以外で増殖させたGpは、抵抗性検定の接種源として再利用しない。
- ・ Gpは高温に弱いため、気温計と地温計を設置して温度管理を行う。特に生育初期は植物体が小さく、直射日光が土壌表面に当たるため、地温が上がりやすい。必要に応じて寒紗等で日よけをし、地温が30℃を超えないようにする。
- ・ ポット検定では抵抗性コントロール品種は9段階で6～8（5段階で「やや強」～「強」）、感受性コントロール品種は9段階で1～2（5段階で「弱」）の評価値を示す。これらの品種の評価値に著しく異常がある場合は、再度検定を実施する。また、基準品種での平均シスト数が接種頭数の1/10以下だった場合も、再度検定を実施する。
- ・ 同じ品種・系統でもカップ検定とポット検定で抵抗性の程度に差が生じた場合は、ポット検定の結果を重視する。

参考文献

1. 農研機構 北海道農業研究センター (2002) プラスチックカップによるジャガイモシストセンチュウ抵抗性の新検定法
(<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/harc/2002/cryo02-46.html>)
2. Phillips, M. S., Forrest, J. M. S., & Wilson, L. A. (1980). Screening for resistance to potato cyst nematode using closed containers. *Annals of Applied Biology*, 96(3), 317-322.
3. 農研機構 九州沖縄農業研究センター (2013) 有害線虫総合防除技術マニュアル
(http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/archive/files/nematode.pdf)

付録

(1) 基準品種、コントロール品種の種イモの入手方法

本マニュアルに記載した基準品種、コントロール品種のうち、Eden 以外の種イモは農研機構 種苗管理センターから入手できる。詳細はホームページ (<http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/ncss/shubyoseisan/index.html>) を参照されたい。なお、申請には期限がある（春植用は前年の9月頃、秋植用は6月頃）ため、注意する。

「Eden」の種イモは農業生物資源ジーンバンクより入手できる。詳細はホームページ (https://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php) を参照されたい。ただし、1回の申請で種イモを数個しか入手できないので、検定に用いるには自家増殖させる必要がある。

(2) 接種用 Gp の増殖方法

接種用に Gp を増殖させたい場合は以下の方法で行う。ただし、増殖に3~4ヶ月程度かかるほか、接種前に低温処理が必要であるため（後述）、遅くとも検定を行う9ヶ月前には増殖を開始する。

- ・ ワグネルポットやコンテナに園芸培土を充填し、「パールスターチ」または「さんじゅう丸」を植え付ける。
- ・ ポット検定と同様に Gp を接種し、栽培管理をする。接種卵数は 1/5000a ワグネルポットの場合は 10,000~20,000 卵とし、ポットやコンテナの大きさに合わせて適宜調整する。
- ・ 栽培終了後、直射日光を避けて土壌を乾燥させる。
- ・ 乾燥後、土壌を丈夫なビニール袋に収納し、冷蔵庫で4ヶ月以上保管する。増殖直後の Gp は休眠に入るため、接種しても増殖しづらいが、この低温処理を加えることで、休眠を打破させることができる。また、この状態で長期間の保存が可能だが、徐々に死亡個体が増加するため、2~3年おきに再増殖させることが望ましい。

バレイショのジャガイモシロシストセンチュウ抵抗性検定マニュアル

編集：坂田 至、相場 聡、奈良部 孝、浅野 賢治

問い合わせ先：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）

北海道農業研究センター

TEL：011-857-9260／FAX：011-859-2178

●**禁無断転載** 本資料は、「私的利用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断で転載、複製、販売などの利用をすることはできません。

●**免責事項** 本マニュアルへの情報の掲載には注意を払っておりますが、本マニュアルを利用することにより生じたあらゆる損害等について、理由の如何にかかわらず一切責任を負いません。