

## ミニ特集：ダイズ茎疫病

## 日本産ダイズ茎疫病菌のレース判別体系の構築を目指して

中央農業総合研究センター <sup>もり</sup>森 <sup>わき</sup>脇 <sup>しょう</sup>丈 <sup>し</sup>治\*

## はじめに

ダイズ茎疫病は多湿条件で発生する立枯れ性の土壤病害である。ダイズ茎疫病菌 (*Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd.) は品種に対して病原性の異なる系統 (レース) の存在が知られている。米国ではダイズのもつ 14 の茎疫病抵抗性遺伝子が同定され (DORRANCE et al., 2004), これらの抵抗性遺伝子型に基づく 55 レースが分離されている (Lertz et al., 2000)。

一方、日本国内のレースは十分に明らかになっていない。北海道に分布している *P. sojae* は 6 品種 ('ゲデンシラズ 1 号', '黄宝珠', 'トヨスズ', '中生光黒', 'イイズ', 'キタムスメ') に対する病原性から 10 レース (A~J) に (土屋ら, 1990), さらに 10 レースは 4 品種 ('はや銀 1', 'ゲデンシラズ 1 号', '黄宝珠', 'キタムスメ') で 4 レース群 (I~IV) に類別されている (白井, 2002)。上記の 6 品種を用いて兵庫県では 51 菌株を検定して 8 レース (北海道のレースとは異なる 4 レースを含む) に類別し (SUGIMOTO et al., 2006), 福井県では 11 菌株のうち 7 菌株を北海道の 3 レースに, 4 菌株を既存レースとは異なるとしている (平成 17 年度福井県農業試験場業務年報)。また, ダイズ品種間では茎疫病抵抗性に差異があり, 北海道では, 'はや銀 1', 'KLS733-1' の 2 品種が道内に分布するレースすべてに抵抗性を示すことを明らかにし, 極抵抗性育種母材として利用している (土屋ら, 1990; 白井, 2002)。本研究では, 本病菌のレース判別体系を構築し, 国内のレース分布を明らかにすることを目的に, 農林水産省委託プロジェクト研究「低コストで質のよい加工・業務用農産物の安定供給技術の開発」により実施された。

北海道立中央農業試験場, 農業生物資源ジーンバンク (MAFF 235802 ~ 235804, 305922 ~ 305924), 福井県農業試験場, 兵庫県立農林水産技術総合センターからは

Aiming at the Construction of the Race Distinction System of Japanese *Phytophthora sojae*. By Jouji MORIWAKI

(キーワード: ダイズ茎疫病, レース, 分離・培養・保存法, 遊走子形成法)

\* 現所属: 富山県農林水産総合技術センター園芸研究所

貴重な菌株を配布していただいた。ダイズ茎疫病菌菌株の収集にご協力いただいた各県や独法職員の方々に深く感謝の意を申し上げます。

## I ダイズ茎疫病菌株の収集

2006 ~ 08 年にかけて北海道から山口県までの 14 道県からダイズ立枯れ株を収集し, *P. sojae* を分離した。主に転換畑で, 出芽期から茎葉展開期に立枯れた株や葉が黄化・萎凋し, 全身の活力が失われたようになり, 地際部が茶褐色から暗褐色の病斑を形成している株を収集した。

*P. sojae* の分離は以下の手順で行った。まず収集した立枯れ株を水道水で洗浄して土や汚れを落とし, ペーパータオルで挟んで水分を除去した。健全部と病斑部の境界を含む茎を 1 ~ 2 cm 大に切除し, これを 70% エタノールに 5 秒間浸漬して表面殺菌する。そのあと滅菌蒸留水で 3 度洗浄した組織片を滅菌ろ紙に挟んで室温に 1 時間程度おき, 乾燥させた。BNPRA-HMI 含有ダイズ粒平板培地 (MASAGO et al., 1977) に置床し, 25°C 暗黒下で 3 日程度静置した。組織片からサンゴ状に生育した疫病菌様の無隔壁菌糸の先端部を実体顕微鏡下で菌糸分離した。さらにその分離菌を滅菌した抗生物質検定用ろ紙 (ペーパーディスク薄手  $\phi$  6 mm, ADVANTEC 社) をのせたダイズ粒寒天培地で前培養し, ろ紙上に生育させた菌糸片をダイズ粒液体培地に移し, 25°C 暗黒下で 2 日間培養した。生育した菌叢を Chen & Zentmyer's salt solution (CHEN and ZENTMYER, 1970) で 2 回洗浄したのち滅菌水に浸し, 蛍光灯下で一晩培養して形成させた遊走子のうから放出された遊走子を単胞子分離した。単胞子分離は, 3 ml 遊走子懸濁液を 100 倍希釈したダイズ粒寒天培地 (9 cm シャーレ) 上に添加, 水平台で室温に 2 時間静置したのち遊走子懸濁液を廃棄した。25°C 暗黒下で一晩培養し, シャーレの裏側から光学顕微鏡で発芽した単独の被のう胞子を探し, 印をつけ, 実体顕微鏡下で分離した。標準的なダイズ粒液体培地はコーヒーミルで粉碎したダイズ粒 (品種エンレイ) 20 g を蒸留水で 30 分間煮出し, ガーゼろ過液を 1,000 ml に補正したのち, オートクレーブ滅菌した。分離や保存には 2% とな

るように、接種には1.5%となるように寒天（和光純薬）を添加した。

分離菌株は有性器官と遊走子のう等の形態観察（ERWIN and RIBEIRO, 1996）、種特異的プライマー（SOJ-FT：5'-GCCTGCTCTGTGTGGCTGT-3'；SOJ-R：5'-CGGTTCAAAAAGCCAAGCCTCA-3'）によるPCR診断（反応条件：95℃ 5秒→（94℃ 30秒-65℃ 30秒-72℃ 1分）40サイクル→72℃ 10秒、古河ら、2005；浅野ら、2005）、遊走子のサイズ（品種：エンレイ）幼苗への接種試験に基づき *P. sojae* と同定した。PCR診断のためのDNAはVILLA et al. (2006)の抽出方法またはQIAGEN社のDNeasy Plant Miki Kitを用いて抽出した。接種試験は、クレハ園芸培土で生育させた初生葉展開中のダイズを100 ml ビーカーに移し、上記の方法で形成させた遊走子の懸濁液を約10<sup>4</sup>個/mlとなるように、子葉下1 cmの高さまで加え、陽光恒温器（25℃, 14L10D）で1週間生育させた。ダイズ胚軸の褐変化や立枯れの有無により病原性を判定した。

*P. sojae* と同定された菌株は、含菌寒天片の-80℃での凍結保存（TOOLEY, 1982）と、スクリュウキャップ試験管を用い、滅菌水を斜面培地の半分程度まで分注して15℃で保存した（SCHMITTHENNER and BHAT, 1994）。凍結保存では、10%グリセリンを保護材に用いる方法が最も安定していたが、菌株によっては死滅する場合もあった。スクリュウキャップ試験管を用いる方法で4年以上生存し、病原性も安定していた。

*P. sojae* 306菌株を14道県（北海道、岩手、宮城、山

表-1 *Phytophthora sojae* の採集地と菌株数

採集地	菌株数
北海道	13 (10*)
岩手	27
宮城	49
山形	4
福島	3
茨城	17
栃木	3
新潟	88
富山	18
福井	66 (11*)
長野	4
静岡	3*
兵庫	9*
鳥取	2
計	306 (33*)

\*菌株保存機関などから入手。

表-2 日本産 *Phytophthora sojae* の病原性

No.	侵害可能な抵抗性遺伝子型	(数)*	菌株数
1	7	1	3
2	2, 7	2	1
3	5, 7	2	1
4	1a, 1c, 7	3	1
5	1b, 3c, 4, 6	4	2
6	4, 5, 6, 8	4	1
7	3a, 3c, 4, 5, 6	5	4
8	3c, 4, 5, 6, 7	5	3
9	1a, 1c, 2, 3c, 4, 6	6	2
10	1b, 2, 3c, 4, 5, 6	6	1
11	1b, 3a, 3c, 4, 5, 6	6	5
12	2, 3a, 3c, 4, 5, 6	6	1
13	2, 3c, 4, 5, 6, 7	6	1
14	3a, 3b, 3c, 4, 5, 6	6	1
15	3a, 3c, 4, 5, 6, 7	6	5
16	1a, 1c, 3a, 3c, 4, 5, 6	7	2
17	1b, 1d, 3a, 3c, 4, 5, 6	7	1
18	1b, 2, 3a, 3c, 4, 5, 6	7	3
19	1b, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6	7	5
20	1b, 3a, 3c, 4, 5, 6, 8	7	2
21	2, 3a, 3c, 4, 5, 6, 7	7	1
22	3a, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	7	1
23	1a, 1c, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6	8	3
24	1a, 1c, 3a, 3c, 4, 5, 6, 8	8	1
25	1b, 1d, 3a, 3c, 4, 5, 6, 8	8	3
26	1b, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6	8	4
27	1b, 2, 3a, 3c, 4, 5, 6, 7	8	2
28	1b, 2, 3a, 3c, 4, 5, 6, 8	8	1
29	1b, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	8	2
30	2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	8	1
31	2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 8	8	1
32	1a, 1b, 1c, 1k, 3a, 3c, 4, 5, 6	9	1
33	1a, 1c, 2, 3a, 3c, 4, 5, 6, 7	9	1
34	1a, 1c, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	9	1
35	1a, 1c, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 8	9	1
36	1b, 1d, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6	9	1
37	1b, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	9	4
38	2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	9	2
39	1a, 1b, 1c, 1k, 2, 3b, 3c, 4, 6, 7	10	1
40	1a, 1b, 1c, 1k, 3a, 3c, 4, 5, 6, 8	10	2
41	1a, 1c, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	10	1
42	1a, 1c, 2, 3a, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	10	1
43	1b, 1c, 1k, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6	10	1
44	1b, 1d, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	10	1
45	1b, 1d, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 8	10	2
46	1b, 1d, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	10	3
47	1b, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	10	1
48	1d, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	10	1
49	1a, 1b, 1c, 1k, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6	11	4
50	1a, 1b, 1c, 1k, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	11	2
51	1a, 1b, 1c, 1k, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 8	11	2
52	1a, 1c, 1d, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	11	1
53	1a, 1c, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	11	2
54	1b, 1d, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	11	1
55	1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 8	12	1
56	1a, 1b, 1c, 1k, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7	12	1
57	1a, 1b, 1c, 1k, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 8	12	1
58	1a, 1b, 1c, 1k, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7, 8	12	3
59	1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5, 6, 8	13	1

計109

\*侵害可能な抵抗性遺伝子型の数。

形, 福島, 茨城, 栃木, 長野, 静岡, 新潟, 富山, 福井, 兵庫, 鳥取) から分離・収集した(表-1)。鳥取ではダイズ茎疫病の発生が初めて確認された。広島, 山口で収集した立枯れ株(品種: サチユタカ)からは *P. sojae* は分離されなかった。

## II ダイズ茎疫病菌の侵害可能な抵抗性遺伝子型

収集した 109 菌株の侵害可能な抵抗性遺伝子型 (*Rps*) を SCHMITTHENNER and BHAT (1994) の接種試験法に準じて調査した。ダイズ種子は抵抗性遺伝子型が明らかでない 15 品種(表-3; DORRANCE et al., 2004) を米国農務省 (USDA) から取り寄せ, 中央農業総合研究センター北陸研究センター内圃場で増殖した。接種試験は, 1 品種当たり 10 粒を播種し, 生育した子葉または初生葉展開中のダイズ胚軸を注射器を用いて 1 cm 程度スリット状に付傷し, ダイズ粒寒天培地で 2 週間程度培養した菌体を注射器を通してスラリー状にして約 0.01 ml 塗抹した。温室に一晩おいたのち, 陽光恒温器 (25℃,

14L10D) で 1 週間生育させ, 7 割以上の株が枯死あるいは進展性病斑を示した品種を罹病性 (S), 3 ~ 7 割を中間型 (M), 3 割以下を抵抗性 (R) とした。

その結果, 病原性のパターンは 59 に分かれ, 77 菌株は抵抗性遺伝子型が異なる 7 品種以上に病原性を示した(表-2)。一方, *Rps1d*, *Rps1k*, *Rps8*, *Rps1a*, *Rps1c*, *Rps2*, *Rps7*, *Rps3b*, *Rps1b* のいずれかをもつ品種は 47 ~ 81% の *P. sojae* に抵抗性を示した(表-3)。これらの抵抗性遺伝子は, 茎疫病抵抗性品種の育成に有用であると考えられた。

## おわりに

日本における *P. sojae* のレース判別体系を構築するためには, まず, 日本産ダイズ品種の抵抗性遺伝子型を明らかにし, 整理した抵抗性遺伝子型の類別に有効な標準菌株を選定する必要がある。日本産ダイズ品種の抵抗性遺伝子型については, 今回得られた菌株を組合せて接種試験を進めることで整理できると考えている。一方, *P. sojae* はその保存法が確立しておらず, 菌体の乾燥や凍結により死滅したり, 病原性が失われる場合があった。今まで滅菌水と密閉する保存法により, 4 年以上保存後も病原性や生育が安定していた。しかし, 日本産ダイズ品種を整理するためには菌株の安定な保存法の開発, さらなる菌株の収集が必要であると考えられる。

## 引用文献

- 1) 浅野貴博ら (2005): 日植病報 71: 73 ~ 74.
- 2) CHEN, D. W. and G. A. ZENTMYER (1970): Mycologia 62: 397 ~ 402.
- 3) DORRANCE, A. E. et al. (2004): Plant Health Prog. doi: 10.1094/PHP-2004-0309-01-RS
- 4) ERWIN, D. C. and O. K. RIBEIRO (1996): Phytophthora Diseases World wide, APS press, St Paul.
- 5) 古河 衛ら (2005): 関東東海北陸農業研究成果情報平成 16 年度 III: 268 ~ 269.
- 6) LEITZ, R. A. et al. (2000): Plant Dis. 84: 487.
- 7) MASAGO, H. et al. (1977): Phytopathology 67: 425 ~ 428.
- 8) 森脇丈治ら (2008): 日植病報 74: 194.
- 9) SCHMITTHENNER, A. F. and R. G. BHAT (1994): Ohio Agric. Res. Dev. Cent. Spec. Circ. 143: 1 ~ 10.
- 10) 白井和栄 (2002): 農林水産研究文献解題 No. 27 大豆, 農林統計協会, 東京, p. 65 ~ 71.
- 11) SUGIMOTO, T. et al. (2006): JGPP. 72: 92 ~ 97.
- 12) TOOLEY, P. W. (1982): Plant Dis. 72: 680 ~ 682.
- 13) 土屋貞夫ら (1990): 日植病報 56: 144.
- 14) VILLA, N. O. et al. (2006): Mycologia 98: 410 ~ 422.

表-3 *Phytophthora sojae* の病原性 59 パターンに対する抵抗性遺伝子型別の抵抗性反応の割合

抵抗性 遺伝子型	品種	抵抗性反応 の割合
<i>Rps1d</i>	PI 103091	48/59 (81)*
<i>Rps1k</i>	L77-1794	47/59 (80)
<i>Rps8</i>	PI 399073	37/59 (63)
<i>Rps1a</i>	Union	36/59 (61)
<i>Rps1c</i>	L75-3735	35/59 (59)
<i>Rps7</i>	L93-3258	30/59 (51)
<i>Rps2</i>	L76-1988	28/59 (47)
<i>Rps3b</i>	L91-8347	28/59 (47)
<i>Rps1b</i>	L77-1863	28/59 (47)
<i>Rps3a</i>	L83-570	11/59 (19)
<i>Rps5</i>	L85-3059	6/59 (10)
<i>Rps3c</i>	L92-7857	5/59 (8)
<i>Rps4</i>	L85-2352	4/59 (7)
<i>Rps6</i>	L89-1581	4/59 (7)
<i>rps</i>	Williams	0/59 (0)

\*抵抗性反応を起こす病原性パターン/総病原性パターン, ( )内は%.