

(講演要旨)

DNA 情報等を利用したダイズ茎疫病抵抗性付与に関する研究

杉本琢真

(兵庫県立農林水産技術総合センター)

はじめに

日本のダイズ作の約 80%は水田転換畑を中心に行われている。そのため、多雨後は湿害の影響を受けやすく、これに伴う立枯性病害の発生が深刻な問題となっている。その中でもダイズ茎疫病は糸状菌 *Phytophthora sojae* によって引き起こされる難防除病害で全国的に増加傾向にある。本病に感染したダイズは枯死して収穫皆無となるためダイズ安定生産の大きな障害となっている(図1)。兵庫県においては丹波黒栽培地域で発生が顕著に見られ、被害額 6.8 億円、防除費用 3.9 億円といわれており対策が急務である。栽培現場からは ①省力で防除効果が高く、②農薬使用を低減できる技術が要望されている。本研究では DNA 情報(茎疫病抵抗性遺伝子)及び亜リン酸や無機元素を活用して、ダイズに茎疫病への抵抗性を付与する技術について検討した。



図1 ダイズ茎疫病の病徴と罹病株の処分

矢印の褐変は茎疫病に感染した部位

1 抵抗性遺伝子を利用したダイズ茎疫病への抵抗性付与

茎疫病抵抗性品種の育成を効率的に行うには圃場に存在する茎疫病菌の系統判別と、これらに抵抗性を示す育種母本の選抜が不可欠である。また、DNA マーカーによる抵抗性の早期判別技術も有効である。

(1) 兵庫県における茎疫病菌の系統分布及び抵抗性育種母本の選抜

日本における茎疫病菌の系統判別手法として「爪楊枝接種法」などがあったが、熟

練した技能を要し再現性が低かった。そこで、病原菌以外の菌を排除した条件での接種法の検討を行った。当初、ダイズを植物組織培養用の B5 寒天培地上で生育させ密閉容器内で接種試験を行ったところ、その感染率は 40%と低かった。そこで栄養塩類を除いたショ糖のみを含む寒天培地上で菌を接種したところ、ほぼすべての植物体を感染させることができた。

この「寒天培地接種法」を用いて、兵庫県内の 77 圃場における茎疫病菌の系統分布を調査したところ、4 種類の新系統を含む 8 系統が存在し、なかでも E 系統が優勢であることが判明した(図2)。これらに抵抗性を示すダイズ遺伝資源を探索するため国内外からダイズ 30 品種を収集し、茎疫病菌への抵抗性を検討した。その結果、全 8 系統に対して抵抗性を示す「PI103091」と「ゲデンシラズ1号」を育種母本として選抜した(図3)。これらのダイズが持つ抵抗性遺伝子について、抵抗性遺伝子が既知の米国産ダイズにおける菌系との反応を比較した結果、「PI103091」と「ゲデンシラズ1号」は *Rps1d* を保有していると推定された。

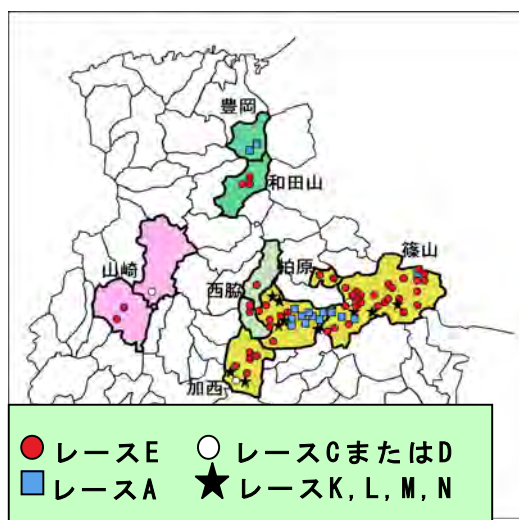


図2 兵庫県における茎疫病菌のレース分布 (Sugimoto et al., 2006)

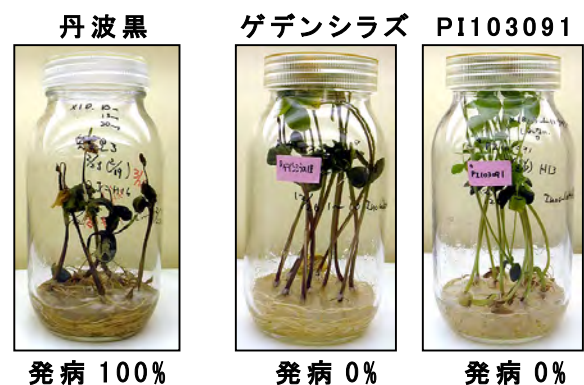


図3 寒天培地接種法による育種母本の選抜 (供試菌は E 系統) (杉本ら, 2004)

(2) 茎疫病抵抗性遺伝子に連鎖した DNA マーカーの探索と抵抗性育種素材の開発

PI103091 (*Rps1d*) と丹波黒の F₂ 交配集団 (123 系統) を作成し、ダイズ SSR (Simple Sequence Repeat) 情報を利用して、育種母本が持つ抵抗性遺伝子の連鎖解析とマッピングを実施した。その結果、*Rps1d* の近傍には Sat186 (5.7 cM) のマーカーが座乗していた。また、*Rps1d* 遺伝子の両端に座乗するマーカー (Sat186, Satt152) を用いた抵抗性個体の選抜効率は理論値で 99.1% となり、選抜手法として利用可能と考えられた(図4)。これらの DNA マーカーを用いて抵抗性黒大豆系統

を選抜して丹波黒との戻し交配を行い抵抗性系統を得た(図5)。

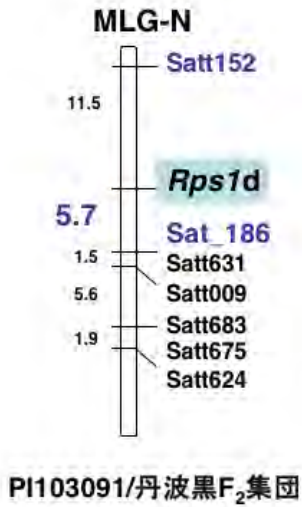


図4 茎疫病抵抗性遺伝子のマッピング
(Sugimoto et al., 2008a)

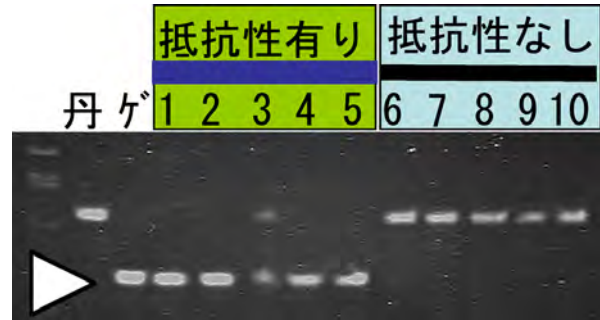


図5 DNA マーカーによる抵抗性系統の選抜
丹:丹波黒(抵抗性無し),ゲ:ゲデンシラズ(抵抗性有り)、番号1~10は戻し交配した系統

(3) 茎疫病抵抗性系統を用いた現地実証試験

農家圃場における現地実証試験を2007年に実施した。試験区は①罹病性品種である丹波黒、②DNA マーカーで選抜した全8菌系抵抗性系統を設定し、現地の茎疫病常発圃場に定植した。その結果、丹波黒(無処理区)の最終的な発病率は中発生であったが、全8菌系抵抗性系統は0%であった(図6)。以上のようにDNA マーカーで選抜した抵抗性系統は顕著な抵抗性を示した。現地試験で抵抗性が確認できた系統から栽培特性が良好な系統を選抜している(図7)。現在、これらの系統は世代促進を進めながら品種登録を目指した調査を継続している。

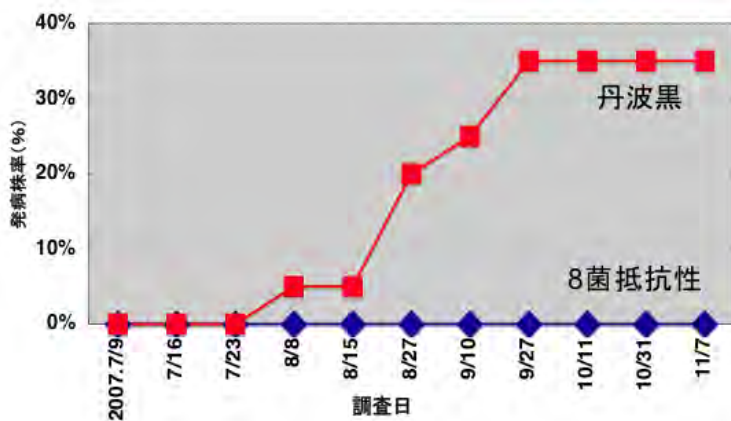


図6 茎疫病抵抗性系統を用いた現地の結果とその様子



	主茎長 (cm)	莢数 (個/株)	収量 (種子重量/株)	百粒重 (g)
KT1-2(抵抗性)	52	291	245	68
丹波黒(比較)	75	205	195	78

図7 茎疫病抵抗性系統の草姿と栽培特性

2 各種土壌改良資材のダイズ茎疫病の発病への影響

茎疫病真性抵抗性遺伝子は新系統の菌によって打破される危険性があり、抵抗性を長期間有効にするための補完対策も重要と考えられる。そこで耐病性向上作用を持つ資材として近年注目される亜リン酸及び寒天培地における接種試験で見いだした栄養塩類(特にカルシウム)による茎疫病の発病への影響について検討を行った。

(1) 亜リン酸がダイズ収量及び茎疫病の発生に及ぼす影響

一般に生育前半のダイズはリン酸が有効に効き、出芽向上、初期生育の促進、着莢数の増加などの作用がある。中でも亜リン酸はリン酸に比べて吸収性が良いといわれ、肥料的な効果だけでなくカンキツ疫病やピーマン疫病に対しては耐病性向上作用も報告されている。そこで亜リン酸液肥(N-P-K: 0-32-25、pH6.9、大塚化学)がダイズ収量及び茎疫病の発生に及ぼす影響について検討を行った。

1) 収量に及ぼす影響

農家圃場における現地試験を2006年に実施した。品種 丹波黒を対象に試験区は①6月28日の亜リン酸肥料33ml/株(500倍希釈)の1回散布区、②6月28日、7月12日の100ml/株(500倍希釈)の2回散布区、③無処理区の3区を設定した。収量は各区から健全株を選び、着莢数、粒径別子実重を調査した。その結果、液肥500倍、100ml・2回処理区では着莢数、1株あたりの子実重ともに無処理区に比べて増加し、2L以上率もやや向上した(図8)。

2) 茎疫病の発生に及ぼす影響

試験区は上記試験と同様とした。その結果、無処理区の丹波黒の発病株率は9.5%であったが、亜リン酸肥料33ml/株の1回散布区では1.4%の発生、100ml/株の2回

散布区の処理区では発病が認められなかった(図9)。

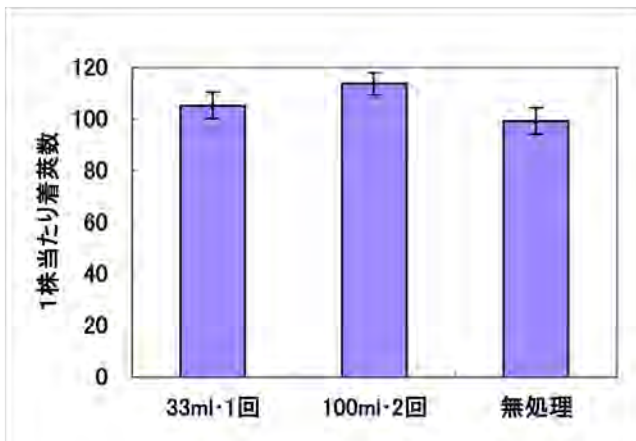


図8 亜リン酸液肥の施用がダイズ着莢数に及ぼす影響(前川, 2008)

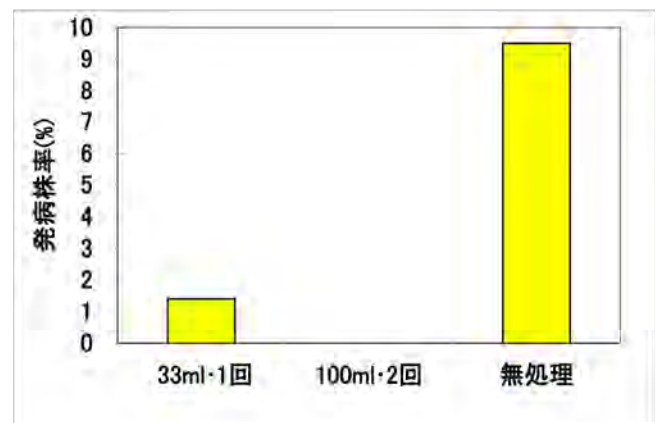


図9 亜リン酸液肥の施用時期・量・回数
がダイズ茎疫病発生に及ぼす影響(前川, 2008)
希釈倍率は500倍、1回目は6/28、2回目は7/12株元
散布、調査9/29)

(2)カルシウム添加によるダイズ茎疫病に対する抵抗性の強化

1)ダイズ茎疫病の発病抑制に関わる無機元素の選抜

先に述べたようにB5寒天培地上で生育させたダイズでは茎疫病の発病抑制が見られた。そこでB5培地中に含まれる無機塩類の内、どの要素が発病抑制に関与しているかを調査した結果、 CaCl_2 と KNO_3 を添加した場合に発病の抑制が見られた(図10)。これらの塩のどの成分が抑制効果を持つのかを調べるため、0.4~20mMの CaCl_2 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 KNO_3 を含む寒天培地上でダイズ2品種(中生光黒及びサチユタカ)を生育させて接種試験を行った。その結果、何れの処理区も無処理区に比べて有意な発病率の低下が見られたが、 KNO_3 処理区よりも CaCl_2 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ で発病抑制効果が高いことを見いだした。そこでカルシウムの発病抑制効果に着目して試験を行った。

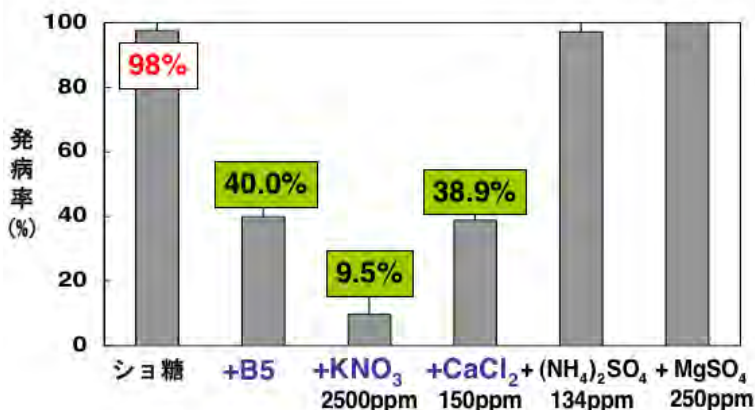


図10 B5寒天培地に含まれる発病抑制要因の解明
(Sugimoto et al., 2007)

B5培地の各成分をそれぞれ標準濃度で培地に添加し、接種試験を実施した。

2) 茎疫病の発病抑制に関わるカルシウム資材の選抜

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ は窒素を含むので圃場でのダイズへの施用には不適切な場合がある。そこでカルシウム含有率が高い市販のカルシウム資材として5種類の資材、すなわち3種類の $\text{Ca}(\text{HCOO})_2$ (スイカル、バイカルティール、ハイカルック)、 CaSO_4 (セルバイン) 及び CaCl_2 (カルクロン) を選び、比較として $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 及び CaCl_2 を同時に供試した。カルシウムイオン濃度を0~20 mMとした寒天培地 (pH 5.8) 上で発芽させたダイズ (中生光黒) への菌の接種によって各種資材の効果を比較した。その結果、いずれの区も無処理区と比較して有意な発病抑制効果が認められたが、中でも10 mM以上の $\text{Ca}(\text{HCOO})_2$ (スイカル) 処理区で抑制効果が最も高いことを見いだした (図11)。

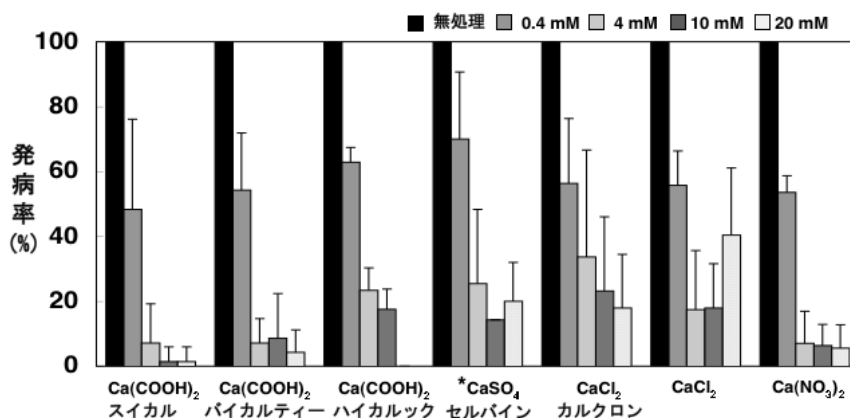


図11 カルシウム資材による茎疫病の発病抑制効果

(Sugimoto et al., 2005, 2008b)

各培地中のカルシウム濃度は0.4~20 mM、pH 5.8に設定した。

3) カルシウム処理による茎疫病発病抑制のメカニズム

カルシウムによる茎疫病発病抑制機構についてはこれまで研究がなされていなかった。そこで本試験では菌への影響と植物体への作用の観点から考察を行った。

①カルシウム処理が菌糸、遊走子へ及ぼす影響

室内試験において特に効果が高かったギ酸カルシウム (スイカル) のカルシウムイオン濃度を発病検定と同様の0.4~20 mM、pH 5.8に設定し、菌糸伸長への影響について検討した。その結果、10 mM以上で伸長抑制効果が高くなった (図12)。圃場での茎疫病発生拡大の主要因は遊走子であるため、スイカルが遊走子の放出に及ぼす影響について検討したところ、4 mM以上でその放出が顕著に抑制された。

②カルシウム処理が植物体に及ぼす影響

植物体中のカルシウム含有率と発病との関連性を検討した結果、カルシウム含有率の上昇にともなって発病が有意に減少した(図13)。ギ酸カルシウム(スイカル)処理をした植物体の走査型電子顕微鏡による観察では菌接種部位には菌糸の侵入は見られなかった。

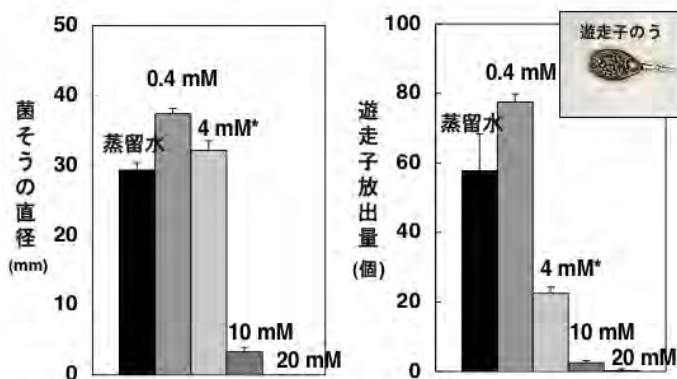


図12 カルシウム処理が菌糸及び遊走子放出に及ぼす影響

(Sugimoto et al., 2008b) * 4 mM はダイズ栽培の標準濃度

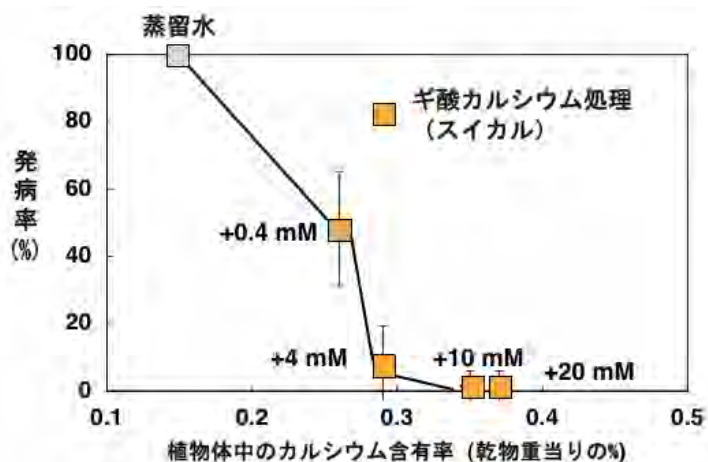


図13 植物体中のカルシウム含有率と発病との関係

(Sugimoto et al., 2008b; 杉本ら, 2009)

3. 今後の方針

- ・ 茎疫病抵抗性系統については丹波黒との戻し交配をさらにすすめ、品種登録を行うための特性調査を実施し、早期の現場普及を目指す。
- ・ 亜リン酸肥料については既に現場で利用が始まっており、今後も継続して普及を推進していく。
- ・ カルシウム資材については現地においてさらに検討を進める必要がある。

謝辞

本研究の一部は兵庫県企画管理部人事課主催「若手職員海外派遣研修」及び農林水産省の委託研究「新農業展開」プロジェクト（DD-3113）の支援のもとに実施しました。厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. 杉本ら（2004）ダイズ茎疫病菌のレース検定のための寒天培地接種法の開発，関西病虫害研究会報 45: 93-96.
2. Sugimoto et al. (2005) Reduction of Phytophthora Stem Rot Disease on Soybeans by the Application of CaCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Journal of Phytopathology 153: 536-543.
3. Sugimoto et al. (2006) Race distribution of *Phytophthora sojae* on soybean in Hyogo, Japan. Journal of General Plant Pathology 72: 92-97.
4. Sugimoto et al. (2007) The effects of inorganic elements on the reduction of Phytophthora stem rot disease of soybean, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. Journal of Phytopathology 155: 97-107.
5. Sugimoto et al. (2008a) Identification of SSR markers linked to the Phytophthora stem rot resistance gene *Rps1d*. Plant Breeding 127:154-159.
6. Sugimoto et al. (2008b) Select calcium compounds reduce the severity of Phytophthora stem rot of soybean. Plant Disease 92:1559-1565.
7. 杉本（2009）カルシウム施用によるダイズ茎疫病の発病低減効果，植物防疫 63:284-289.
8. 前川（2008）亜リン酸肥料がダイズ茎疫病の発生に及ぼす影響，植物防疫 62:691-289.