

切離葉片への病原菌接種によるトウモロコシ南方 さび病抵抗性の簡易検定法

宮川 久義・井上 興 (山口県農業試験場)

A simple method for identifying resistance of corn varieties against southern corn rust by inoculation of excised leaf tissue. Hisayoshi MIYAGAWA and Takashi INOUE (Yamaguchi Agricultural Experiment Station, Yamaguchi 753-02)

トウモロコシ南方さび病は *Puccinia polysora* UNDERWOOD に起因する病害である。本菌は1891年米国アラバマ州でトウモロコシの近縁種 *Tripusacum dactyloides* 上で採集されたのが最初でありトウモロコシの病原菌として記載されたのは1940年にペルーで採取されたのが最初である¹⁾。日本では但見²⁾により1982年に沖縄本島における発生が最初に報告された。その後、九州各県、中国及び四国地方の一部で二期作目のトウモロコシを中心に発生が広がっており、その被害が問題視されている重要病害である^{3,7)}。

牧草・飼料作物では一般に経済性、安全性の観点から農薬による防除は行わないため、病害防除は抵抗性品種の利用に頼らざるを得ない。従って各品種の抵抗性を簡便に検定できる方法を開発することが重要である。本病抵抗性について著者ら⁵⁾は5～6葉期の幼苗に南方さび病菌夏胞子を散粉接種して検定する方法を報告した。しかしこの検定法では比較的多量の夏胞子を必要とし、また恒温接種箱等の装置や接種後の栽培管理に留意することが必要であるため、切離葉を用いた簡易検定法について検討し、2, 3の知見が得られたのでここに報告する。

材料及び方法

1. 供試菌株：1991年に九州農業試験場飼料作物育種研究室から分譲を受けた菌株(都城)、1993年に長崎、大分、熊本各県畜産試験場及び九州農業試験場飼料作物研究室から送付された罹病葉から分離した菌株(長崎、大分、熊本、九農試)、1994年に鹿児島県内で採取した罹病葉から分離した菌株(鹿児島)を供試した。各菌は単胞子堆分離後に葉片接種法で継代培養した。但し都城菌については分譲直後に単胞子堆分離したものを通常の継代培養により増殖し著者らの圃場検定等⁵⁾で供試していたが、1994年に改めて単胞子堆分離して葉片接種法で継代培養した。菌株名末尾の○数字は同一標本から単胞子堆分離した各菌株を示す。

2. 供試品種：著者ら⁵⁾及び伊東ら⁴⁾の報告で用いた抵抗性が異なる5品種(P3470, P3282, P3286, G4743, P3358)を含む市販品種及び国公立農試で試験栽培している民間種苗会社が育成中の品種(第4表に*印で示す。以下試作品種という)を用いた。上記5品種を用いた検定では原則として第5葉を供試した。また試作品種の検定は2回実施し、試験Ⅰでは第5葉に、試験Ⅱでは第5, 6, 7葉が展開頂葉の時期に各々3回に分けて接種した。結果は感受性品種P3358に出現した夏胞子堆数を100とし、これに対する指数で表示した。

3. 葉片接種法：予備試験として夏胞子懸濁液に加える Tween 20 の濃度を100～1,000ppm に変えて接種する試験、5～6葉期に葉位別の抵抗性を調べる試験を実施した。また品種 SH2914, SH2918, W9401, P3358, P3470 を対象にカイネチン濃度を0, 20, 50, 100, 200 µg/ml (但しシヨ糖濃度5 mg/ml)、シヨ糖濃度を0, 2.5, 5, 25, 50mg/ml (但しカイネチン濃度20 µg/ml) に変えて葉片を置床し、葉片の緑色維持程度を調査した。

本試験では滅菌水にカイネチン20 µg/ml、シヨ糖5 mg/ml を溶かし、培養液とした。これを吸収パット入りプラスチックシャーレ(アドバンテック東洋製、直径47mm)に約2 ml分注した。一方、イチゴパックにトウモロコシを1パック当たり6～7本植えとなるように播種し、5～6葉期まで栽培した。下葉から数えて5枚目の展開葉を採取し、水道水で洗浄後滅菌水中ですすいだ。余分な水分を吸い取った後、葉身中央部の中肋部を除去して半葉部から概ね幅1.5cm、長さ4cmの葉片を切り出し、裏面を下にして上記シャーレに置床した。シャーレ1枚につき葉片を2枚置床した。なお同時に複数の菌株を用いた接種検定では個体間差をなくすため、各葉から検定菌株数だけ葉片を切り出し各菌種を接種した。

事前にこの葉片接種法により本菌夏胞子堆が充分形成された葉片から滅菌綿棒により夏胞子を擦り取り、最終濃度100 ppm となるように Tween 20 を加えた滅菌水に

懸濁した。夏孢子懸濁液を $10^4 \sim 10^5$ 個/mlとなるように調整し、綿棒にて葉片表面全体に塗抹接種した。シャーレはプラスチック容器内に積み重ね、湿ったティッシュペーパーで覆った後、ポリ袋で包み約 25°C で1日間保湿した。

保湿後は蛍光灯付きの木製陽光定温培養器内に並べ、扉を開放した状態で培養した。培養温度は $25 \sim 29^\circ\text{C}$ 、光強度は $20 \mu\text{mole}$ 、1日17時間照明とした。約12日後葉片表面に夏孢子が充分形成された時期に、夏孢子堆数を实体顕微鏡下で調査した。

結 果

1. 葉片接種法に影響を及ぼす諸条件の検討

当初、文献^{2,3,9)}に従い培養液をカイネチン $20 \mu\text{g/ml}$ 、ショ糖 50mg/ml としたが、特に品種 P3470 において葉片が約1週間で紫変した。しかしショ糖濃度を 5mg/ml に変更した試験では葉片の紫変が起こらなかったため、以下の試験では全てショ糖 5mg/ml とした。この条件では抵抗性が異なる5品種 (P3470, P3282, P3286, G4743, P3358) の葉片は接種後20日程度緑色を保つことができた。なおその後の試験で品種 SH2914, SH2918では葉片の緑色維持が悪い場合があったので、これらを含む5品種について条件を再検討した結果、どの品種もカイネチンを加えない場合には葉片が速やかに枯死し、また $100, 200 \mu\text{g/ml}$ に加えると約1週間後に水浸状になって

第1表 葉片接種法で形成された夏孢子堆数と懸濁液に添加した Tween 20 の濃度との関係

濃 度	夏孢子堆数
1000ppm	477
500	942
300	1273
200	1312
100	1693

注) 表中の数字は6葉片上に出現した夏孢子堆数の合計を示す。
供試品種: P3358; 供試菌株: 都城④

第2表 接種葉位別の夏孢子堆数

菌株名	品 種 名	第4葉	第5葉	第6葉
都城②	R(P3470)	60	27	0
	S(P3358)	595	927	291
都城②	R(P3470)	260	57	4
	S(P3358)	539	1408	642
大分⑩	R(P3470)	693	123	0
	S(P3358)	1589	1897	450

注) 表中の数字は12葉片上に出現した夏孢子堆数の合計を示す。

脱色した。またショ糖濃度が 25mg/ml では葉片が紫色に変色する場合が多く、 50mg/ml では全て紫変した。品種 SH2914, SH2918 ではショ糖を加えない方が 2.5 及び 5mg/ml よりも緑色維持がやや良好であった。

試験した範囲内では夏孢子懸濁液に加える Tween 20 の濃度が 100ppm のときに、形成される夏孢子堆数は最も多く、濃度が高まるにつれて形成される夏孢子堆数は減少した (第1表)。

接種葉位別に夏孢子堆形成数を調べた結果、第4葉では抵抗性品種 P3470 と感受性品種 P3358 の夏孢子堆形成数の差は小さかったが、第5葉、第6葉では差が増大した。特に P3470 の6葉では殆ど夏孢子堆が形成されなかった (第2表)。

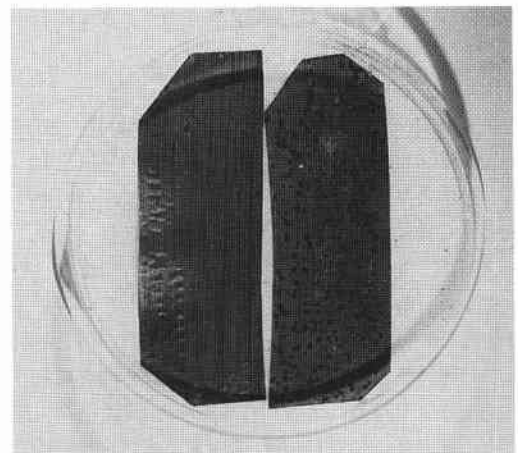
これらの結果をもとに、培養液は原則としてカイネチン $20 \mu\text{g/ml}$ 、ショ糖 5mg/ml 、Tween 20 は 100ppm とし、第5または6葉を検定した。

2. 葉片接種法による抵抗性検定

1) 抵抗性の程度が異なる5品種に対する抵抗性検定
葉片接種法による南方さび病抵抗性の品種間差異を第1図に示した。抵抗性の異なる5品種を用いて、葉片接種法及び従来の接種法による抵抗性検定の結果を比較した (第3表)。夏孢子堆数は品種 P3470 が最少で以下 P3282, P3286, G4743 の順に増加し、P3358 が最大であった。この結果は5~6葉期に接種し、イメージスキャナーを用いて孢子量を測定した検定結果⁵⁾と一致した。いずれの菌株でも同様の結果が得られた。

2) 市販品種及び試作品種の抵抗性検定

各試験とも P3470 は指数が $0.06 \sim 0.12$ で検定品種中最小であった。次いで E7720, SH2914 が小さかった。



第1図 葉片接種法による抵抗性検定結果
右: 感受性品種 (P3358), 左: 抵抗性品種 (P3470)

第3表 葉片接種法及び従来の接種法による品種抵抗性検定との比較

品 種 名	葉片接種法 ^{a)} /菌株名			幼苗検定法 (cm ^{b)})	圃場接種検定 ^{c)}
	大分②	大分⑩	熊本⑥		
P3470	408 (11)	320 (10)	157 (5)	0.056 (9)	5.3 (1)
P3282	1043 (29)	981 (31)	1131 (37)	0.159 (25)	10.8 (2)
P3286	2576 (72)	2071 (65)	1157 (38)	0.285 (45)	22.1 (5)
G4743	2707 (76)	2643 (84)	2489 (82)	0.510 (80)	191.4 (40)
P3358	3585 (100)	3164 (100)	3046 (100)	0.635 (100)	473.3 (100)

注) () 内の数字は P3358 を100とした指数

a) 16葉片上に形成された夏孢子堆数

b) 宮川ら⁵⁾の方法で測定した葉面積40cm²当たりの夏孢子堆画像の面積。第5～第6葉期接種

c) 止葉から数えて6枚目の葉の夏孢子堆数 (宮川ら⁵⁾)。b, c) は都城菌を接種した。

第4表 葉片接種法による市販品種及び試作品種の抵抗性検定結果

品種名	試験Ⅰ		試験Ⅱ		平均値
	5葉	5葉	6葉	7葉	
P3470	6	12	9	8	9
*E7720	28	37	12	16	23
*SH2914	26	29	23		26
G5431	42	54	56	49	50
DK801	56	63	28	68	54
WR9401	34	57	90	50	58
*SH2918			87	47	67
*WR9402	70	52	81	69	68
*KD772	86	100	58	119	91
P3358	100	100	100	100	100
**TX128	92	78	97	150	104
**GX0816	77	107	111	153	112

注) *印は試作品種、**印は試験当時試作品種でその後市販された品種を示す。数字は P3358 の夏孢子堆数を100とした場合の各品種の指数を示す。各々6葉片供試。接種菌株 試験Ⅰ：熊本⑥ 試験Ⅱ：都城④
空欄は葉片の枯死等で調査できなかった。

G5431, DK801 はこれらの品種より抵抗性が劣った。試験Ⅱの5, 6, 7葉接種では同一菌株を接種したが、品種によっては検定結果の変動幅が大きい場合があった(第4表)。

3) 抵抗性品種 P3470 の各菌株に対する抵抗性

結果を第5表に示した。P3470 ではどの菌株も1葉片当たり0～12.2個の夏孢子堆しかできず、同時に接種した対照の感受性品種 P3358 との抵抗性の差は明らかだった。

考 察

HOOKER and YARWOOD³⁾ はカイネチン・シヨ糖液に浮遊させたトウモロコシの切離葉上でさび病菌 (*Puccinia sorghi* SCHW.) の夏孢子, 冬孢子を形成させた。HOLLIER and KING²⁾ は種々の条件で保存した南方さび病夏

第5表 抵抗性品種 P3470 と感受性品種 P3358 の抵抗性検定結果

菌株名	P3470	P3358	接種区分 ^{a)}
長崎②	2.1	74.5	I
長崎⑤	1.3	75.3	IV
九農試⑦	0	48.5	IV
九農試⑩	0.3	9.4	II
都城②	1.6	76.5	II
都城④	0.3	88.5	IV
大分②	1.3	127.9	II
大分⑨	0.8	116.9	II
大分⑩	12.2	278.0	III
熊本②	0.4	57.8	IV
熊本⑥	7.0	133.9	I
鹿児島④	1.8	145.2	III
鹿児島⑥	1.6	215.4	III

注) 数字は葉片1枚当たりの夏孢子堆数を示す。

a) : 4回に分けて接種した。

供試葉片数は I から IV の順に 8, 8, 5, 4枚

孢子の感染能力を検定するのにこの方法を用いた。これに対し YEH⁹⁾ は HOOKER and YARWOOD の方法³⁾ を一部改良した。すなわち、シャーレ内に薄く裂いた脱脂綿を敷き、その上にろ紙を置いた。培養液を分注し、ろ紙の上に葉片を置いて、トウモロコシのさび病菌, 南方さび病菌のレース検定を実施した。著者らは YEH の方法⁹⁾ をもとに葉片を市販の吸収パット入りシャーレに置床して抵抗性を検定した。

HOOKER and YARWOOD³⁾ はシヨ糖濃度が25～100mg/ml の範囲では濃度が高い方が葉片の寿命が長い、実用上は50mg/ml で充分であるとしている。また HOLLIER and KING²⁾, YEH⁹⁾ も50mg/ml としている。しかしこの濃度では葉片が数日で紫変するなどの問題があったため著者らはシヨ糖濃度を5mg/ml として実施した。最適なシヨ糖濃度が異なることについては試験方法および供試品種の

違いが関係していることも考えられた。YEH⁹⁾は夏孢子懸濁液に添加する Tween 20 濃度を100 ppmとしている。著者らは100~1,000 ppmの濃度で試験したが、100ppm以下については葉表面への塗抹適性を考え試験しなかった。

抵抗性の程度が異なる5品種を用いて本法と従来の幼苗接種による方法とを比較したところ、接種菌株は異なるものの抵抗性の品種間差が一致した。また、圃場で雄穂出穂後に調査した結果とも抵抗性の順序は一致した。しかし葉片接種法及び幼苗検定では、品種 P3282, P3286 に形成された夏孢子堆数は圃場試験に比べ多かった。但見⁸⁾は500以上の品種・系統の2~3葉期の植物にさび病菌及び南方さび病菌を接種した結果、南方さび病に関しては全く無病徴の個体はなかったと報告している。著者らの試験でも全く夏孢子堆が形成されない品種はなかったが、品種 P3470 では接種葉位が第4葉から第6葉になるにつれて夏孢子堆数が大きく減少した。抵抗性発現には葉位及び葉齢の差や播種後日数等が関係していることが考えられ、今後これらの点を検討する必要がある。

今回の九州6ヵ所から分離した菌株を用いた試験結果では、P3470 は P3358 に比較するとどの菌株に対しても抵抗性であった。P3470 は1993年から発売された南方さび病抵抗性の新品種であり、これが罹病化したとい

う報告はないが、この品種がどの菌株に対しても抵抗性を有しているのか検討する必要がある。なお九農試¹⁰⁾では P3358 で夏孢子堆数が9.4と少なかったが、この原因については不明である。

更に本法の利点として幼苗接種で用いた散粉接種に比べ接種に必要な夏孢子量がごく少量で済むこと、少ないスペースで同時に多数の菌株を用いた接種検定が可能であること、更に恒温接種箱等の機械が不要であることが挙げられる。また多数の菌株の継代保存にも適用できる。著者らは九州各地から収集した菌株を概ね15日ごとに継代移植して保存している。

引用文献

- 1) CUMMINS, G. B. (1941) *Phytopathology* **31** : 856-857.
- 2) HOLLIER, C. A. and KING, S. B. (1985) *Plant Dis.* **69** : 937-939.
- 3) HOOKER, A. L. and YARWOOD, C. E. (1966) *Phytopathology* **56** : 536-539.
- 4) 伊東栄作・池谷文夫・濃沼圭一 (1992) *日草誌* **39**別 : 119-120.
- 5) 宮川久義・井上興・矢野彰吾・村本和之 : 山口県農試報告 (投稿中)
- 6) 西和文・栢村鶴雄・並木史郎 (1994) *九病虫研会報* **40** : 22-24.
- 7) 杉山正樹 (1988) 原色新しい病害虫 (全国病害虫専門技術員協議会編) 全国農村教育協会 : 8802.
- 8) 但見明俊 (1985) *北海道農試研報* **143** : 85-94.
- 9) YEH, C. C. (1986) *J. Agric. Res. China.* **35** : 81-93.

(1995年4月20日 受領)