

兵庫県におけるダイズ茎疫病抵抗性遺伝子の解析と 圃場における抵抗性系統の反応

杉本琢真*・加賀秋人***・吉田晋弥*・相野公孝*・羽鹿牧太**・石本政男***

要 約

兵庫県の丹波黒栽培地域ではダイズ茎疫病の被害が問題となっている。茎疫病抵抗性品種を効率的に育成するため、育種母本の抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーの開発を行った。このマーカーを用いて選抜・育成した系統は現地試験で高度な抵抗性を示した。

- 1 育種母本 (ゲデンシラズ1号, PI103091, ワセシロゲ) に存在する抵抗性遺伝子 (*Rps1d*; 10レース抵抗性, *Rps1?*; 8レース抵抗性) の遺伝様式を推定するため、交雑集団を作成し、各系統の抵抗性の分離を調査した。その結果、何れも優性1遺伝子支配であることが判明した。
- 2 連鎖解析により、抵抗性遺伝子近傍のDNAマーカー (Sat_186, Satt152, Satt009, T0003044871) を同定した。これらのマーカーを組み合わせた際の選抜精度は99.05~99.8%となった。
- 3 マーカーを利用し、10レース抵抗性 (*Rps1d*)、8レース抵抗性 (*Rps1?*) を有する茎疫病抵抗性系統を育成した。圃場試験の結果、10レース抵抗性系統は0%、8レース抵抗性系統は12.5%の発病株率となり、丹波黒 (発病株率36.7%) に比べて高度な抵抗性を示した。

Genetic analysis of *Phytophthora* resistance genes in soybeans and the survival of *Phytophthora*-resistant lines in the field

Takuma SUGIMOTO, Akito KAGA, Shinya YOSHIDA, Masataka AINO, Makita Hajika
and Masao Ishimoto

Summary

Phytophthora stem and root rot, which is caused by *Phytophthora sojae*, is one of the most destructive diseases affecting soybeans, and the incidence of the condition has been increasing in soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Tanbakuro) -producing areas in Hyogo. To breed new *Phytophthora*-resistant cultivars with the desirable characteristics of the Tanbakuro variety, molecular markers linked to *Rps* (resistance to *P. sojae*) genes were identified in the 'Gedenshirazu-1', 'PI103091', and 'Waseshiroge'. These markers were used to develop *Phytophthora*-resistant lines, which were then evaluated in the field. As a result, it was found that the *Phytophthora*-resistant lines exhibited strong resistance against *Phytophthora* stem and root rot.

- (1) To identify markers of *Rps1d* (in Gedenshirazu and PI103091) or *Rps1?* (in Waseshiroge), 123 F_{2,3} lines and 94 F_{7,8} lines were produced from crosses between Tanbakuro and PI103091 (*Rps1d*) or Waseshiroge (*Rps1?*, a new *Rps* gene), respectively. Virulence tests showed that the inheritance of *Rps1d* or *Rps1?* is controlled by a single dominant gene.

2014年10月31日受理

* 兵庫県立農林水産技術総合センター 農業技術センター

** 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所

*** 農業生物資源研究所 ダイズゲノム育種研究ユニット

- (2) The closest markers, Sat_186 and Satt152 for *Rps1d* and Satt009 and T0003044871 for *Rps1?*, were identified by genetic analysis. The selection efficiency of marker-assisted selection using these flanking markers was theoretically estimated to be 99.05-99.8%.
- (3) Black-seeded *Phytophthora*-resistant lines containing the *Rps1d* or *Rps1?* gene were developed using backcrossing. The incidence of disease in these lines was 0% (*Rps1d*) and 12.5% (*Rps1?*), respectively, whereas the control 'Tanbakuro' plants exhibited a disease incidence of 36.7%, showing that the resistance conferred by some *Rps* genes provides adequate protection against *Phytophthora* stem and root rot.

キーワード：ダイズ茎疫病，丹波黒，抵抗性遺伝子，*Phytophthora sojae*，*Rps*

緒 言

兵庫県の重要な地域特産物である「丹波黒大豆」は主として水田転換畑で栽培されているため，降雨が続く際には湿害や土壌病害による被害を受けやすい²²⁾。特にダイズ茎疫病¹³⁾ (*Phytophthora* stem and root rot disease) (以下，茎疫病) は1987年の初発以降，発生が増加傾向にある土壌伝染性の難防除病害の一つである^{14, 22)}。

茎疫病は茎疫病菌 (*Phytophthora sojae*) により引き起こされ，大豆の生育全般を通して発生が認められる¹⁹⁾。本病に感染した大豆は主茎の地際付近に赤褐色の病斑を生じ，感染後約1週間程度で萎凋あるいは枯死する。一般的に黄大豆では播種直後～生育初期，丹波黒大豆では生育中後期にかけて，発生が見られる。罹病部位には多数の遊走子のうが形成され，降雨や灌水によって，多数の遊走子が伝染源として放出されることにより感染が拡大するため，根本的な対策が求められている²⁹⁾。

県内における主な茎疫病対策としては高畦栽培や排水対策，罹病株の抜き取りと焼却処分，あるいは薬剤散布 (銅粉剤，マンゼブ・メタラキシル水和剤，ジメトモルフ・銅水和剤，ジアゾファミド水和剤，アミスルブロム水和剤等)²⁹⁾，亜リン酸肥料による耐病性強化¹⁴⁾，が挙げられる。しかし，農業従事者の高齢化が進んでいることから，省力で安定した防除効果が得られる方法，また減農薬・環境保全型農業に基づく対策の一つとして「抵抗性品種の利用」が重要と考えられる。

そこで，筆者らは兵庫県の丹波黒大豆栽培地域における茎疫病的発生状況と茎疫病菌レースの同定，及び抵抗性育種母本の選定を実施してきた²²⁾。2002～2008年にかけて県下7地域の丹波黒大豆栽培圃場164箇所から分離した菌株についてレース判別を行った。その結果，10レース (A, C, D, E, G, K, L, M, N, O) が存在し，主要レースはE, Aであることを明らかにした²⁶⁾。大豆24品種を用いて主要レース群 (E, A) に抵抗性を示す品種を探索した結果，「ゲデンシラズ1号」，「PI103091」，

「ワセシロゲ」が強い抵抗性を示したため，本県の抵抗性母本として選定した²⁵⁾。

これまでの抵抗性品種の育成手法としては生物検定によって，交配集団から抵抗性個体を選抜・育成する方法が主流であり，検定に要する時間や労力が多く必要であった。兵庫県では育種効率を上げるため，抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーの開発と個体選抜が有効であると考えた。しかし，育種母本であるゲデンシラズ1号，PI103091，ワセシロゲの抵抗性遺伝子の遺伝様式，抵抗性遺伝子の種類，抵抗性遺伝子に連鎖したマーカーについては知見がなかったため，これらについて解析する必要があった。

茎疫病真性抵抗性遺伝子は8遺伝子座 (*Rps1*～*Rps8*) で，対立遺伝子を含めると合計14種類 (表2参照) が報告されている³⁰⁾。近年，ダイズゲノム解析が米国を中心に精力的に実施されており，SSR (Simple Sequence Repeat) などを利用した詳細なダイズ分子連鎖地図の構築が進んでいる²¹⁾。2008年には米国エネルギー省とJoint Genome Instituteによって全ゲノム配列情報が公開された²⁰⁾。これらの情報を基にして *Rps1*，*Rps2*，*Rps3*，*Rps4*，*Rps5*，*Rps6*，*Rps7* 及び *Rps8* はそれぞれダイズ分子連鎖群 (MLG; Molecular Linkage Group) のN, J, F, G, G, N 及びF上に座乗していることが報告されている⁸⁾。

本稿では (1) ダイズゲノム情報等を利用した茎疫病抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーの開発，(2) DNAマーカーを利用して選抜した抵抗性系統の現地試験の結果について述べる。

1. ダイズ茎疫病抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーの開発

(1) 材料及び方法

1) ダイズ茎疫病抵抗性遺伝子の遺伝解析

①PI103091

国内外の様々な茎疫病菌レースを用いた接種検定の結果から、育種母本である「ゲデンシラズ1号」と「PI103091」は同一の抵抗性遺伝子 (*Rps1d*) を保有する可能性が示唆された²⁴⁾。そこで、ここではPI103091の抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーの開発について述べる。供試菌は兵庫県の主要レースE (PJ-H30) 及びレースA (PJ-H42) とした。遺伝解析集団はPI103091/兵系黒3号の交配集団F_{2:3}世代 (123系統) とした。抵抗性検定は寒天培地接種法²³⁾ を用い、各系統当たり20個体を接種し、10日目に罹病個体の数または生存個体の数を計数し、Gordonらの方法⁸⁾ によって抵抗性ホモ (R)、ヘテロ (Rs)、罹病性ホモ (S) の3区分で評価した。接種の際には親品種をコントロールとして供試した。

②ワセシロゲ

ワセシロゲの抵抗性遺伝子 (不明) を推定するため、国内外から合計12菌株 (国内菌: PJ-H65, PJ-H30, PJ-H5M, PJ-H42, PJ-H67, T4, 庄内3, 米国菌: R1, R4, R7, R17, R25) を導入し、寒天培地接種法を用いて、次の大豆15品種に対する抵抗性反応を比較した: L88-8470 (*Rps1a*), L77-1863 (*Rps1b*), L77-3735 (*Rps1c*), PI103091 (*Rps1d*), L77-1794 (*Rps1k*), L76-1988 (*Rps2*), L83-570 (*Rps3a*), L88-1479 (*Rps3b*), L92-7857 (*Rps3c*), L85-2352 (*Rps4*), L85-3059 (*Rps5*), L89-1581 (*Rps6*), L93-3258 (*Rps7*), PI399073 (*Rps8*), 'Harosoy 63' (*Rps1a+Rps7*)。

遺伝解析には兵庫県の主要レースA (PJ-H42)、レースL (PJ-H67) を用いた。遺伝解析集団はワセシロゲ/兵系黒3号の交配集団F₂世代 (98個体)、F₈世代 (94系統) とした。抵抗性検定、抵抗性評価の方法は上記①と同様に実施した。

2) 抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーの開発

①PI103091

Rps1 座は連鎖群N上に座乗することが報告されている⁴⁾。*Rps1d*は*Rps1*の対立遺伝子であるため連鎖群N上に座乗する41種類のSSRマーカーを遺伝子解析に用いた。DNAはPI103091/兵系黒3号F₂集団 (123個体) 及び親品種 (PI100391, 兵系黒3号) の生葉からCTAB法¹⁷⁾ により抽出した。SSRマーカーの塩基配列情報はSoyBase (<http://soybeanbreederstoolbox.org/>) から入手した。遺伝子解析におけるPCR条件は (94℃・30sec→47℃・30sec→67℃・1min) ×40cycles→72℃・10min とした。PCR産物は42% (W/V) 尿素を含む10% または6% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動しSYBER@Green2により染色し、DNAバンドを観察した。連鎖解析はMAPMAKER/EXP version 3.0 programを用いた。

②ワセシロゲ

ワセシロゲの抵抗性遺伝子については、上述1) で推定された抵抗性遺伝子が座乗する連鎖群上のSSRマーカーを用いた。DNAはワセシロゲ/兵系黒3号F₇集団 (94個体) 及び親品種の生葉からCTAB法により抽出した。DNA解析は前述①PI103091と同様の手法で行った。

3) DNAマーカーの高精度化

新規DNAマーカーの開発による高精度化は次の3つの方法で実施した。

- (1) 既報の*Rps1k* 遺伝子¹⁾ の塩基配列情報を参照
- (2) ダイズゲノム情報の利用 (<http://www.phytozome.net/soybean>)²⁰⁾
- (3) batchprimer 3アプリケーション (<http://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>) の利用

4) DNAマーカーの座乗位置の推定

開発したDNAマーカーのダイズゲノム上の座乗

表1 PI103091 x 兵系黒3号の交雑集団 (F3世代, 123系統) における茎疫病抵抗性に関する遺伝解析

交配集団又は品種	分離比			合計	理論値		
	R	Rs	S		R:Rs:S	χ^2	p値
PI103091 x 兵系黒3号	33	61	29	123	1:2:1	0.27	0.87
兵系黒3号	0	-	121	121	0:1	-	-
PI103091	101	-	0	101	1:0:0	-	-

R, 抵抗性ホモ; Rs, ヘテロ; S, 罹病性

表4 PI103091 x 兵系黒3号の交雑集団 (F3世代, 123系統) における8種類のマーカーの分離

マーカー	DNAバンド サイズ (bp)	各系統における SSR遺伝子型 ¹			理論値 (1:2:1) 又は (3:1)		マーカー遺伝子型 ²						
		AA	AB	BB	χ^2	P値	AA+AB		BB		理論値 (3:1)		組換え価
							R+Rs	S	R+Rs	S	χ^2	P値	
Satt152	230	37	49	37	5.08	0.08	82	4	12	25	1.69	0.19	0.13
Sat_186	310	94	-	29	0.13	0.72	89	5	5	24	0.13	0.72	0.08
Satt631	70, 100	35	59	29	0.78	0.67	89	5	5	24	0.13	0.72	0.08
Satt009	240	36	59	28	1.24	0.54	90	5	4	24	0.33	0.57	0.07
Satt675	110	36	57	30	1.24	0.54	86	7	8	22	0.02	0.88	0.12
Satt683	210	36	58	29	1.20	0.55	86	8	8	21	0.13	0.72	0.13
Satt624	90	37	55	31	1.96	0.38	83	9	11	20	0.02	0.96	0.16
Satt080	160	36	59	28	1.24	0.54	81	14	13	15	0.33	0.57	0.22

¹AA; PI103091型ホモ, AB;ヘテロ, BB; 兵系黒3号型ホモ

²R, 抵抗性ホモ; Rs, ヘテロ; S, 罹病性

の結果, 連鎖地図の全長は44.0cMとなった(図1)。抵抗性遺伝子に最も隣接するマーカーはSat_186であり, 遺伝子との距離はそれぞれ5.7cMと推定した。マーカーと形質(抵抗性・罹病性)との適合率は92.7%, 2マーカー(Satt009, Sat_186)を同時に利用した際の選抜効率は99.05%となった。

②ワセシログ

ワセシログの抵抗性遺伝子は*Rps1*座の新規遺伝子と推定されたため, 連鎖群N上に座乗する41種類のSSRマーカーを遺伝子解析に用いた。DNA解

析の結果, 親品種間で多型が見られる27種類の多型バンド(サイズ約100~600bp)を選抜した。このマーカーを用いてF_{7,8}集団(94系統)の解析を行った結果, 17種類のマーカー(Sct195, Sat_379, Satt631, Satt009, Sat_186, Satt530, Satt530, Satt675, Satt683, Satt624, Sat_084, Satt584, Satt485, Sat_166, Sat_208, Sat_275, Sat_280, Sat_266)が抵抗性ホモ型:ヘテロ型:罹病性ホモ型に関して63:2:63の分離比に適合した(表5)。マーカー間の連鎖解析の結果, 連鎖地図の全長は75.0cMとなった(図2-①)。抵抗性遺伝子に最も

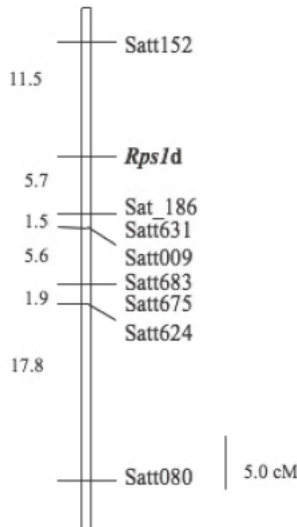


図1 PI103091 x 兵系黒3号の交雑集団 (F3世代, 123系統) における*Rps1d*遺伝子のマッピング
連鎖地図(連鎖群N)の右側にはマーカー名, 左側には遺伝的距離(cM)を明記した。遺伝的距離はKosambi unitsに基づいた。

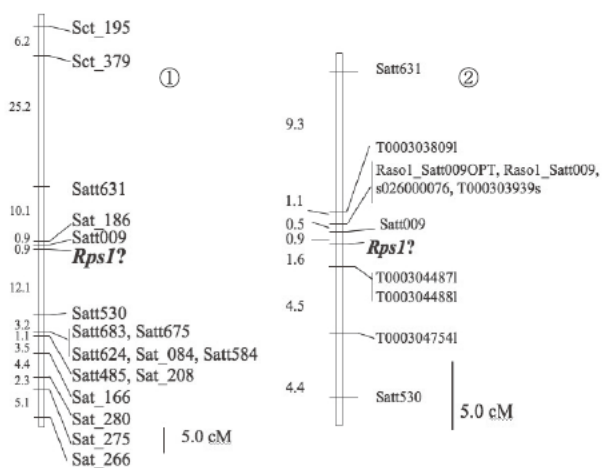


図2 ワセシログ x 兵系黒3号 交雑集団 (F7 世代, 94 系統) を用いた*Rps1?*のマッピング

①連鎖群N上のSSRマーカーを用いて作成した連鎖地図
②新たに開発したマーカーを追加して作成した連鎖地図
連鎖地図の右側にはマーカー名, 左側には遺伝的距離(cM)を明記した。遺伝的距離はKosambi unitsに基づいた。

表5 ワセシロゲ x 兵系黒3号の交雑集団 (F7世代, 94系統) における25種類のマーカーの分離

マーカー ¹	DNAバンド サイズ (bp)	各系統における			理論値		マーカー遺伝子型 ³				理論値		組換え価
		SSR遺伝子型 ¹			(63 : 2 : 63 又は 65 : 63)		AA+AB		BB		(65: 63)		
		AA	AB	BB	χ^2	P値	R+Rs	S	R+Rs	S	X2	P値	
Sct_195	160	48	0	46	0.003	0.96	37	11	16	30	0	0.96	0.29
Sat_379	260	51	0	43	0.45	0.50	40	11	13	30	0.45	0.50	0.26
Satt631	110, 150	51	3	40	2.93	0.23	49	5	4	36	1.67	0.20	0.10
Satt009	210	50	2	42	0.89	0.64	52	0	1	41	0.77	0.38	0.01
Sat_186	220, 260	53	0	41	1.18	0.28	52	1	1	40	1.18	0.28	0.02
Satt530	200	53	2	39	2.31	0.31	49	6	4	35	2.25	0.13	0.11
Satt683	210	50	2	42	0.89	0.64	46	6	7	35	0.77	0.38	0.14
Satt675	130	50	2	42	0.89	0.64	46	6	7	35	0.77	0.38	0.14
Satt624	150	50	2	42	0.89	0.64	46	6	7	35	0.77	0.38	0.14
Sat_084	100	50	2	42	0.89	0.64	46	6	7	35	0.77	0.38	0.14
Satt584	100	50	2	42	0.89	0.64	46	6	7	35	0.77	0.38	0.14
Satt485	180	49	2	43	0.58	0.75	45	6	8	35	0.45	0.50	0.15
Sat_166	280	46	2	46	0.20	0.91	41	7	12	34	0	0.96	0.20
Sat_208	250	49	2	43	0.58	0.75	45	6	8	35	0.45	0.50	0.15
Sat_275	100	47	2	45	0.24	0.89	41	8	12	33	0.07	0.79	0.21
Sat_280	210, 230	45	1	48	0.25	0.88	39	7	14	34	0.13	0.72	0.22
Sat_266	210	51	0	43	0.45	0.50	41	10	12	31	0.45	0.50	0.23
Raso1_Satt009OPT	280	50	3	41	2.50	0.29	52	1	1	40	1.18	0.28	0.02
Raso1_Satt009	280	50	3	41	2.50	0.29	52	1	1	40	1.18	0.28	0.02
T000303809I	293	53	3	40	2.93	0.23	52	2	1	39	1.67	0.20	0.03
s026000076	580	51	3	41	2.50	0.29	52	1	1	40	1.18	0.28	0.02
T000303939s	183	50	3	41	2.50	0.29	52	1	1	40	1.18	0.28	0.02
T000304754I	427	50	3	38	4.05	0.13	51	5	2	36	2.91	0.09	0.07
T000304487I	251	53	3	41	2.50	0.29	52	1	1	40	1.18	0.28	0.02
T000304488I	355	50	3	41	2.50	0.29	52	1	1	40	1.18	0.28	0.02

¹Raso1_Satt009OPT, Raso1_Satt009, T000303809I, s026000076, T000303939s, T000304754I, T000304487I, T000304488I は phytozome database (<http://www.phytozome.net>)を利用して設計した。

²AA, ワセシロゲ型ホモ; AB, ヘテロ; BB, 兵系黒3号型ホモ

³R, 抵抗性ホモ; Rs, ヘテロ; S, 罹病性

隣接するマーカーはSatt009であり、遺伝子との距離はそれぞれ0.9cMと推定した³⁰⁾。このマーカーと形質(抵抗性・罹病性)との適合率は98.9%となった。遺伝子を挟むもう一方のマーカーはSatt530であったが、遺伝子との距離は12.1cMでありやや距離があったため、マーカーの高精度化が必要と考えられた。

Cregan⁴⁾は*RpsI*遺伝子を挟むマーカーはSat_186(1.4cM)とSatt530(1.4cM)であると報告し、今回得られたマーカーの順序について若干の相違が認められた。この理由として、一つはCreganが使用した解析集団と我々が利用した集団が異なるため、Creganが使用した集団の系統数が少ないためと考えられた。このような結果は既に関連研究において報告されている^{3, 18, 24, 31)}。

3) DNAマーカーの高精度化

ワセシロゲの茎疫病抵抗性マーカーの高精度化

について述べる。上述の通り、Satt530は密接に抵抗性遺伝子に連鎖したマーカーではなかったため、新たに8種類のマーカー(Raso1_Satt009OPT, Raso1_Satt009, T000303809 I, s026000076, T000303939s, T000304754 I, T000304487 I, T000304488 I)を設計した(表5)。これらのマーカーで新たに全長22.4cMの連鎖地図を作成した(図2-②)。その結果、T000304487I, T000304488IがSatt530側に座乗しており、遺伝子から1.6cMの距

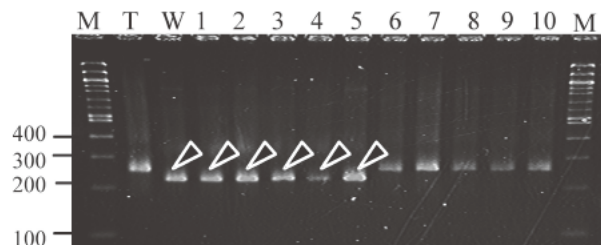


図3 ワセシロゲ x 丹波黒 交雑集団 (F7 世代, 10 系統) における Satt009マーカーを用いた DNA 解析

表6 連鎖群N上(第3番染色体)のSatt009とT0003044871の間に存在する*Rps1k*遺伝子(*Rps1k-1, Rps1k-2*)と相同性を示す遺伝子座名

遺伝子座名	位置	長さ (bp)	<i>Rps1k-1</i> との相同性の割合(%)	<i>Rps1k-2</i> との相同性の割合(%)
Glyma03g04030	3992594 - 3996230	3636	94.7	95.0
Glyma03g04080	4037251 - 4041010	3759	92.6	94.1
Glyma03g04100	4075161 - 4079483	4322	91.5	93.4
Glyma03g04140	4155095 - 4158838	3743	92.7	94.2
Glyma03g04180	4176524 - 4180146	3622	87.3	57.0
Glyma03g04200	4250529 - 4257697	7168	86.1	87.0
Glyma03g04260	4313656 - 4317802	4146	92.1	93.8
Glyma03g04300	4390063 - 4394399	4336	92.9	94.8

離と推定された。今回得られたマーカー (Satt009, T0003044871) を組み合わせて選抜に利用した場合の抵抗性及び罹病性個体の適合率は理論的に99.98%になった(図3)。

4) DNAマーカーの座乗位置の推定

BLAST検索による解析の結果、茎疫病抵抗性遺伝子に隣接する2マーカー (Satt009, T0003044871) は塩基の位置3,919,203と4,486,048の間に存在し、ワセシロゲの茎疫病抵抗性遺伝子は*Rps1*の対立遺伝子であることが再度確認できた。Phytozome databaseを用いて、この567kbの領域に存在する茎疫病抵抗性遺伝子候補を検索した結果、*Rps1k*に相同性のある遺伝子が8つ存在することが分かった(表6)。

*Rps1*座には少なくとも5つの複対立遺伝子(*Rps1a*, *Ib*, *Ic*, *Id*, *Ik*)が存在することが報告されている⁵⁾。各遺伝子に連鎖するSSRマーカーも同定され、連鎖群N上の28cM付近に座乗していることが報告されている(*Rps1*³⁾, *Rps1a*³¹⁾, *Rps1b*⁵⁾, *Rps1c*⁵⁾, *Rps1d*²⁴⁾, *Rps1k*^{1, 11)})。ワセシロゲの新規抵抗性遺伝子がどの対立遺伝子に相当するかについては、現時点では不明である。

Bhattacharyyaら¹⁾とGaoら⁷⁾は*Rps1k*近傍のゲノム領域には*Rps1k*と高い相同性を有する遺伝子座のクラスターが存在していることを報告している。これまでの研究で病害抵抗性遺伝子(R遺伝子)はクラスターを形成している場合が多い¹⁶⁾。すなわち、クラスターを形成することで、交雑などによって遺伝子の組換えが起こった際、R遺伝子座が拡大する点、また新たなR遺伝子が生み出される可能性が高くなるからである¹⁵⁾。

2. 茎疫病抵抗性系統の選抜と現地試験

(1) 材料及び方法

兵庫県内10レースの茎疫病菌に抵抗性を示す系統(以

下、10レース抵抗性系統)についてはゲデンシラズ1号/兵系黒3号F₃系統に兵系黒3号を3回戻し交雑を行った。8レースの茎疫病菌に抵抗性を示す系統(以下、8レース抵抗性系統)についてはワセシロゲ/兵系黒3号F₃系統に兵系黒3号を3回戻し交雑を行った。戻し交配系統からの抵抗性個体の選抜には、抵抗性遺伝子を挟み込むDNAマーカー (Satt009, Satt530, Sat186, T0003044871等)を用いた。

試験圃場は兵庫県K市内の農家圃場(K)とした。供試系統・品種及び株数は次の通りとした。10レース抵抗性系統、8レース抵抗性系統、圃場抵抗性を持つと報告されているConrad, 対照品種として丹波黒(兵系黒3号)を60株(1区20株, 計3反復)供試した。播種は6月14日、定植は6月26日に実施した。耕種概要、施肥、防除は現地の黒大豆栽培暦に準じた。ただし、茎疫病に対する防除は一切実施しなかった。茎疫病的発生調査は杉本ら²⁵⁾の方法に従い、7月9日から11月7日まで計11回実施した。

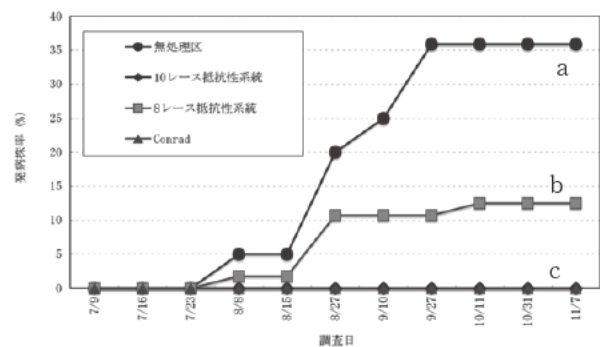


図4 茎疫病抵抗性系統を用いた現地試験の結果
10レース抵抗性系統はGH1-1A-15, 8レース抵抗性系統はWH42-1A-20を供試した。各品種, 系統ともに60株(20株, 3反復)用い、播種は6月14日、定植は6月26日に実施した。耕種概要、施肥、防除は現地の黒大豆栽培暦に準じ、茎疫病に対する防除は一切実施しなかった。異符号間には有意差(p<0.05)があることを示す。

（2）結果と考察

戻し交配により兵系黒3号の遺伝的背景93.8%となる10レース抵抗性系統（GH1-1A-15）と8レース抵抗性系統（WH42-1A-20）を選抜・育成した。現地試験の結果、K圃場における茎疫病の初発は8月8日であり、その後10月11日まで発病の上昇が認められ、罹病性品種である兵系黒3号の最終的な発病株率は36.7%となった（図4）。一方、10レース抵抗性系統（GH1-1A-15）の発病株率は0%、8レース抵抗性系統（WH42-1A-20）は12.5%となりDNAマーカーで選抜した抵抗性系統において発病抑制効果が見られた。茎疫病圃場抵抗性を有するとされるConradの発病株率は0%であり、圃場における発病抑制効果が認められた。試験圃場に存在する菌レースを判別した結果、レースEが9つ、レースAが1つ存在した。10レース抵抗性系統（GH1-1A-15）が圃場において高い抵抗性を発揮した理由はE、Aの両レースに対して真性抵抗性反応を示したためと考えられた。一方、8レース抵抗性系統（WH42-1A-20）の発病抑制効果が低かった理由は圃場には罹病性反応を示すレースEが多く存在（今回の調査では90%）するためと考えられた。

現在、現地試験で栽培した茎疫病抵抗性系統から丹波黒の特性に近い系統を選抜し、栽培特性の良好な系統を選抜している。また、兵系黒3号の戻し交配を進め、兵系黒3号の遺伝的背景を96.9%に高めた段階で固定を図る予定である。

3. 今後の展望

近年では茎疫病真性抵抗性に加えて、圃場抵抗性の研究が進展している⁶⁾。圃場抵抗性は真性抵抗性とは別の作用機構で抵抗性が発揮される。すなわち、菌レースに無関係で抵抗性が発揮され、この抵抗性を持ったダイズは茎疫病菌には感染するが大きな被害には致らず、収量についても影響が出にくいといわれている。圃場抵抗性は多数の遺伝子が関与する量的形質であり、これまでに2～3種類のQTLs（Quantative Trait Loci）が報告されている^{10, 30)}。今回の試験で、このQTLを保有するConradを現地試験に供試した結果、発病株率は0%と丹波黒に比べて高度な発病抑制効果を示した。このため圃場抵抗性は兵庫県においても有効であると考えられる。将来的には真性抵抗性遺伝子のみには頼るのではなく、圃場抵抗性も視野に入れた研究が重要である。この観点から、これまでは国庫受託研究「気候変動に適應した大豆品種・系統の開発」において課題「茎疫病圃場抵抗性マーカーの開発と育種母本の開発」を実施し、圃場

抵抗性を有する黒大豆系統を育成しつつある。今後は真性抵抗性遺伝子を持った系統と圃場抵抗性品種を交配し、真性抵抗性と圃場抵抗性を併せ持った品種育成を国庫受託研究「温暖化の進行に適應する品種、育株の育成」の「高度茎疫病抵抗性大豆育種育株の開発」で実施している。これらの系統が品種化されるまでにはさらに年月を要すが、将来的な品種対策として早期に取り組んでおく必要がある。

謝 辞

本試験を実施するにあたり、大西稔治氏、久保田誠三氏、森本幸作氏、市枝奈々子氏、峯山あつ子氏、宮本千穂氏には茎疫病発生調査などにおいて多大なご尽力をいただいた。富山県農業総合研究所・向島博之氏、オハイオ州立大学・Dorrance教授からは茎疫病菌を分譲いただいた。イリノイ大学のNelson教授からは、大豆検定品種の分譲をしていただいた。この場をかりて感謝の意を述べる。本研究の一部は国庫受託研究「新農業展開ゲノムプロジェクトDD3113」、[気候変動プロジェクトA1005]及び「温暖化プロジェクト（育株育成）3204」の支援により実施した。

引用文献

- (1) Bhattacharyya, M. K., N. N. Narayanan, H. Gao, D. K. Santra, S. S. Salimath, T. Kasuga, Y. Liu, B. Espinosa, L. Ellison, L. Marek et al. (2005) : Identification of a large cluster of coiled coil-nucleotide binding site-leucine rich repeat-type genes from the Rps1 region containing Phytophthora resistance genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 111, 75-86
- (2) Buzzell, R. I., and T. R. Anderson (1992) : Inheritance and race reaction of a new soybean Rps1 allele. *Plant Dis.* 76, 600-601.
- (3) Cregan, P. B., T. Jarvik, A. L. Bush, R. C. Shoemaker, K. G. Lark, A. L. Kahler, N. Kaya, T. T. VanToai, D. G. Lohnes, J. Chung et al. (1999) : An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39, 1464-1490
- (4) Cregan, P. B. (2003) : Soybean_Composite_Genetic_Map_2003 <http://soybeanbreederstoolbox.org/>
- (5) Demirbas, A., B. G. Rector, D. G. Lohnes, R. J. Fioritto, G. L. Graef, P. B. Cregan, R. C. Shoemaker and J. E. Specht (2001) : Simple sequence repeat markers linked to the soybean Rps genes for Phytophthora Resistance. *Crop Sci.* 41, 1220-1227

- (6) Dorrance, A. E., S. A. McClure, and S. K. St. Martin (2003) : Effect of partial resistance on Phytophthora stem rot incidence and yield of soybean in Ohio. *Plant Dis.* 87, 308-312
- (7) Gao H., Narayanan N. N., Ellison L., Bhattacharyya M. K. (2005) : Two classes of highly similar coiled coil-nucleotide binding-leucine rich repeat genes isolated from the Rps1-k locus encode Phytophthora resistance in soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 1035-1045
- (8) Gordon, S. G., S. K. St. Martin and A. E. Dorrance (2006) : Rps8 maps to a resistance gene rich region on soybean molecular linkage group F. *Crop Sci.* 46, 168-173
- (9) Gordon, S. G., K. Kowitwanich, W. Pipatpongpinoy, S. K. St. Martin and A. E. Dorrance (2007) : Molecular marker analysis of soybean plant introductions with resistance to Phytophthora sojae. *Phytopathology* 97, 113-118
- (10) Han, Y. P., W. L. Teng, K. F. Yu, V. Poysa, T. Anderson, L. J. Qiu, D. A. Lightfoot and W. B. Li (2008) : Mapping QTL tolerance to Phytophthora root rot in soybean using microsatellite and RAPD/ SCAR derived markers. *Euphytica* 162, 231-239
- (11) Kasuga, T., S. S. Salimath, J. Shi, M. Gijzen, R. I. Buzzell and M. K. Bhattacharyya (1997) : High resolution genetic and physical mapping of molecular markers linked to the Phytophthora resistance gene Rps1-k in soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 1035-1044
- (12) 加藤雅康 (2010) ダイズ茎疫病研究の現状と課題 64, 497-500
- (13) Kaufmann, M. J. and J. W. Gerdemann (1958) : Root and stem rot of soybean caused by Phytophthora sojae n. sp. *Phytopathology* 48, 201-208
- (14) 前川和正・佐藤 毅・来田康男・相野公孝 (2011) : 亜リン酸粒状肥料が黒ダイズの収量と茎疫病の発生に及ぼす影響 : 関西病虫研報53, 87-89
- (15) Michelmore R.W., Meyers B. C. (1998) : Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res* 8:1113-1130
- (16) Richly E., Kurth J., Leister D. (2002) : Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent Arabidopsis thaliana evolution. *Mol Biol Evol* 19, 76-84
- (17) Rowland L. J., B. Nguyen (1993) : Use of PEG for purification of DNA from leaf tissue of woody plants. *Bio Techniques* 14, 735-736
- (18) Sandhu, D., K. G. Schallock, N. Rivera-Velez, P. Lundeen, S. Cianzio and M. K. Bhattacharyya (2005) : Soybean Phytophthora resistance gene Rps8 maps closely to the Rps3 region. *J. Hered.* 96, 536-541
- (19) Schmitthenner, A. F. (1999) : Phytophthora Rot of Soybean. Pages 39-42 in: Compendium of soybean diseases. G. L. Hartman, J. B. Sinclair, and J. C. Rupe, eds. 4th ed., The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- (20) Schmutz, J., S. B. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, D. L. Hyten, Q. Song, J. J. Thelen, J. Cheng et al. (2010) : Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178-183
- (21) Song, Q. J., L. F. Marek, R. C. Shoemaker, K. G. Lark, V. C. Concibido, X. Delannay, J. E. Specht and P. B. Cregan (2004) : A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theor. Appl. Genet.* 109, 122-128
- (22) Sugimoto, T., S. Yoshida, M. Aino, K. Watanabe, K. Shiwaku and M. Sugimoto (2006) : Race distribution of Phytophthora sojae on soybean in Hyogo, Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 72, 92-97
- (23) Sugimoto, T., K. Watanabe, S. Yoshida, M. Aino, M. Matsuyama, K. Maekawa and K. Irie (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. *J. Phytopathology* 155, 97-107
- (24) Sugimoto, T., S. Yoshida, K. Watanabe, M. Aino, K. Maekawa, T. Kanto and K. Irie (2008) : Identification of SSR markers linked to the Phytophthora stem rot resistance gene Rps1d. *Plant Breed.* 127, 154-159
- (25) Sugimoto, T., K. Watanabe, S. Yoshida, M. Aino, M. Furiki, M. Shiono, T. Matoh and A.R. Biggs (2010a) Field application of calcium to reduce Phytophthora stem rot of soybean, and calcium distribution in plants. *Plant Dis.* 94, 812-819
- (26) 杉本琢真・吉田晋弥・相野公孝・渡辺和彦・入江和己 (2010a) : 兵庫県・丹波黒栽培地域におけるダイ

ズ茎疫病菌のレースの分布及び抵抗性育種母本の選
定：兵庫農技総七研報 58, 36-46

- (27) Sugimoto, T., S. Yoshida, M. Aino, K. Maekawa, T. Kanto, T. Matoh, Y. Koroda, K. Irie and K. Watanabe (2010b) : Pathogenic races of *Phytophthora sojae* in *Glycine max* cv. Tanbakuro producing areas in Hyogo