ツルマメのダイズ紫斑病抵抗性の遺伝子分析

藤田 佳克*・池田 良一*・鈴木 穂積**

Yoshikatsu FUJITA,* Ryoichi IKEDA* and Hozumi SUZUKI**:
Gene Analysis of Resistance in Wild Soybean (*Glycine soja*) to Purple Seed Stain
Caused by *Cercospora kikuchii*

Abstract

Resistance to purple seed stain in F_2 and B_1F_1 plants derived from the cross of Oshima-shirome with wild soybean were investigated. Resistance in wild soybeans seems to be controlled by two dominant genes having different degree of resistance. Even the F_2 or B_1F_1 plants with only one of the two genes for resistance were more resistant than Hanayome that was one of the most resistant varieties. No or little significant correlations between resistance and some other characters such as plant height, 100-seed-weight, seed color, and hard-coatedness were detected in F_2 and B_1F_1 populations. Therefore, it was considered that a highly resistant variety could be developed from an interspecific hybridization between soybean (*Glycine max*) and wild soybean (*G. soja*).

(Received June 19, 1987)

Key words: wild soybean, purple seed stain, resistance.

緒 言

有効な病害防除法の一つに抵抗性品種の利用がある。これはダイズ紫斑病においても例外ではなく、すでに育成された抵抗性品種も少なくない¹⁾。しかし、現在栽培されている品種には高度抵抗性の品種がなく、多発時には必ずしも十分な効果が期待できない²⁾。このためさらに高度な抵抗性をもつ品種の育成が望まれているが、抵抗性母本として利用可能な高度抵抗性品種は、既存品種にはみあたらない³⁾。これに対し、野外に自生し野生ダイズともいわれるツルマメ *Glycine soja* Sieb. et Zucc. には、いわゆる栽培ダイズ *G. max* (L.) Merrill との交配が容易で、かつ発病の著しく少ない系統のあることが知られている⁴⁾。

ツルマメの紫斑病抵抗性には、硬実によるものと莢での菌糸伸展抑制によるものとがある。硬実は菌の侵入を完全に阻止し、高い抵抗性を示すが、ツルマメ特

有の形質で栽培品種には導入できない。これに対し、莢の抵抗性は菌糸伸展を抑制し、ダイズの抵抗性と同一機作による⁵⁾ため、遺伝子源としての利用の可能性が考えられる。しかし、ツルマメはツル性で草丈が高く、種皮は黒色で硬実であるほか、100粒重が小さいなどの栽培上不利な形態の形質を有している。また、栽培品種とツルマメの単交雑では、莢が直立し、種子が中粒～大粒のいわゆるダイズ型の個体は得にくいとされている⁶⁾。したがって、ツルマメを交配母本として利用する場合には、ダイズの反復戻し交雑が必要とされている⁴⁾。この過程で抵抗性個体の選抜が容易であるためには、関与する抵抗性遺伝子の作用力が大きく、抵抗性個体が明確に識別できること、および抵抗性遺伝子の数が少なく、上記のツルマメ特有の栽培上不利な形質と連鎖していないことが必要である。

そこでツルマメの紫斑病抵抗性の遺伝子分析を行うとともに、抵抗性とツルマメ特有の形態との連鎖関係を調べ、遺伝子源としての利用の可能性について検討

* 東北農業試験場 Tohoku National Agricultural Experiment Station, Omagari, Akita 014-01, Japan

** 現在: 北陸農業試験場 Present address: Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Inada, Joetsu, Niigata 943-01, Japan

した。

本研究を行うにあたり、岩手大学農学部・海妻矩彦教授にはご指導とご助言を賜り、かつツルマメの種子を分譲いただいた。また前東北農業試験場栽培第一部・今野善一郎技官には交配方法をご指導いただいた。さらに、病害第2研究室長・八重樫博志博士にはご校閲を賜った。衷心より深謝の意を表する。

実験材料および方法

交配は、紫斑病抵抗性が弱いダイズ品種オシマシロメを母本とし、ツルマメ E-1 を父本として 1984 年に行った。E-1 は、海妻らが青森県で採集し、岩手大学農学部で保存中の抵抗性強系統である。交配後代の抵抗性の検定は、1985 年に、F₂ 個体、および F₁ 個体にオシマシロメを戻し交配して得た B₁F₁ 個体について行った。また両集団の抵抗性検定時には、比較として、交配親のオシマシロメとツルマメ、F₁ 個体、および既存のダイズ品種中もっとも抵抗性の強い「花嫁」を供試した。

紫斑病抵抗性の検定は F₂ 個体については圃場で、B₁F₁ 個体についてはハウス内で行った。いずれの場合もガラス室内の育苗箱 (30×60×3 cm) で育苗した苗を、第1複葉完全展開期の 6 月 14 日に移植した。なお、ツルマメおよびツルマメとオシマシロメの交配後代については、硬実による発芽遅延を防ぐため、種皮の一部にはさみで付傷したものを播種した。施肥量は圃場 10 a 当たり炭カル 200 kg、ならびに窒素 (N)、リン酸 (P₂O₅)、およびカリ (K₂O) を、成分でそれぞれ 1.8, 6.0, および 6.0 kg とした。ハウス内ではポット (1/5,000 a) を用い、肥料は N, P₂O₅, K₂O をそれぞれ 0.4 g ずつ施用した。圃場での栽植密度はダイズでは畦間 75 cm、株間 18 cm で 1 株 2 本立てとした。ツルマメおよびツルマメとダイズの交配後代には、ツル性や半ツル性の個体が多いため支柱を立てた。さらに畦間 150 cm、株間 120 cm の 1 株 1 本立てとし、畦間に 1 列、株間に 2 株ずつダイズを植え付け、個体同士が絡まるのを防いだ。ポットでは、検定個体を 1 ポット当たり 1 本ずつ植え付けた。

供試菌株は 1978 年に、当場栽培第一部圃場の自然発病種子から分離したダイズ紫斑病菌 *Cercospora kikuchii* (Matsumoto et Tomoyasu) Gardner である。接種源としては、ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地で 26 C、15 日間培養した菌叢に 4 日間光を照射した後、1 日暗黒下に置いて形成させた分生胞子を用いた⁶⁾。圃場での接種は、8 月 17 日と 8 月 29 日の 2 回、

分生胞子を形成させた培地を、培地ごと 1 株に 1 粒ずつ株元に置く方法で行った。ハウス内では、0.05% のTween 20 に懸濁させた分生胞子を植物体全体に噴霧接種した。接種時期は開花始期で、ダイズでは 8 月 8 日、B₁F₁ 個体と F₂ 個体およびツルマメでは 8 月 23 日であった。接種後は細霧処理 (16 mm/時間) を 48 時間連続して行い、さらにその後成熟期まで毎日午後 4 時から 1 時間ずつ処理した。

調査は成熟期に行い、草丈、硬実性の有無、種皮色および 100 粒重と子実の発病について行った。交配後代は、同一個体でも莢によって成熟期が著しく異なることが多いため、1 株の莢の 3 分の 2 が成熟した日を成熟期とした。

子実の発病は、紫斑面積によって 6 段階に分けた発病度で示した (Table 1)。圃場では成熟期の個体間差が大きく、早いものでは 9 月 20 日、遅いものでは 10 月 30 日であった。自然条件下では、この間の発病環境条件が異なることも予想されたので、成熟期の違いによる発病度の差を次の方法で補正した。すなわち同一個体内で莢の成熟期が著しく異なる 3 個体を選んで 9 月 20 日から 10 月 30 日までの発病度を経時的に調べ、時期別発病度の推移を推定した (Fig. 1)。これをもとに供試個体の発病度を次式によって算出した。

$$\text{供試個体の発病度} = \frac{0.61 \times \text{供試個体の実測発病度}}{\text{時期別の推定発病度}}$$

(0.61 は 10 月 17 日の推定発病度)

ハウス内での供試個体の成熟期は 10 月 9 日から 19 日までであった。この期間内のハウス内における発病度の変動は少なかったため、発病度は実測値で示した。

F₂ 個体と B₁F₁ 個体の硬実性は次の方法で検定した。すなわち蒸留水を入れたシャーレに各個体の子実を 10 粒ずつ入れ、26 C に 3 日間置いたとき、未発芽種子が 3 粒以上あるものを硬実個体と判定した。

Table 1. Disease indices used in this experiment

Disease index	Rate of lesion area (%)
0	0
1	1- 5
2	6- 30
3	31- 60
4	61- 90
5	91-100

Fig. 1. Changes in disease indices of purple seed stain in a field.

●—● Estimated changes in disease indices. ○—○ Disease indices of three F_2 plants.

Fig. 2. Frequency distribution for disease indices of purple seed stain in F_2 plants from the cross of Oshimashirome / wild soybean. Level bars indicate standard deviation.

実験結果

紫斑病抵抗性の遺伝子分析

F_2 個体の検定: 供試 217 個体のうち、成熟期が 11 月以降のため発病を調査できなかった 9 個体、種皮が黒色ないし茶色で病斑の確認が困難な 21 個体、および硬実で菌が侵入できない 44 個体を除く 143 個体について、子実の発病度別個体数を調べた。結果は Fig. 2 に示すとおりである。花嫁, F_1 個体およびオシマシロメの平均発病度は、それぞれ 1.26 (標準偏差 0.495), 0.22 (0.077) および 2.89 (0.647) であった。 F_2 個体は、発病度が 0~1.1 の個体と 1.2 以上の個体の 2 群に分けられたため、発病度が 0~0.1 の個体を抵抗性個体、1.2 以上の個体を罹病性個体とした。抵抗性個体と罹病性個体の比は 132:11 となり、二つの同義遺伝子の理論分離比 15:1 によく適

合した ($\chi^2=0.5077$, $P=0.3-0.5$)。このことから、ツルマメの紫斑病抵抗性には二つの優性遺伝子が関与していると推定された。

B_1F_1 個体の検定: 供試 38 個体中 35 個体の形態はオシマシロメとは異なり、わずかにツル性を残していたが、支柱がなくても直立でき、ツルマメほどの完全なツル性は示さなかった。また、いずれも硬実ではなかった。これに対し、残る 3 個体のうち 2 個体はツル性、1 個体は硬実で形態がオシマシロメとは著しく異なった。このように形態が著しく異なる個体は交配が行われず、自殖している可能性も考えられたため、3 個体を除外した 35 個体について、子実の発病度別個体数を調べた。結果は Fig. 3 に示すとおりである。花嫁, F_1 個体およびオシマシロメの平均発病度は、それぞれ 0.81 (標準偏差 0.314), 0.20 (0.116) および 1.47 (0.424) であった。 B_1F_1 個体は、発病

Fig. 3. Frequency distribution for disease indices of purple seed stain in B_1F_1 plants from the cross of Oshimashirome / wild soybean // Oshimashirome. Level bars indicate standard deviation.

Table 2. Segregation on plant height and its association with purple seed stain resistance in F_2 plants from the cross of Oshimashirome / wild soybean

Plant height	Reaction to purple seed stain		
	Resistant	Susceptible	Total
Over 210 cm	53	1	54
150 - 209 cm	37	5	42
Under 150 cm	38	5	43

度が 0~0.60 の抵抗性個体と、0.80~1.30 の罹病性個体に分かれた。抵抗性個体は、さらに発病度が 0~0.20 の個体と 0.21~0.60 の個体に分けられた。そこで発病度の範囲が 0~0.20 の個体を抵抗性強個体、0.21~0.61 の個体を抵抗性中個体とすると、抵抗性強個体、抵抗性中個体および罹病性個体の比は 17:10:8 となり、2:1:1 の分離比によく適合した ($\chi^2=0.2751$, $P=0.8-0.9$)。検定から除外した 3 個体のうち 1 個体は硬実で発病を調査できなかったが、ツル性の 2 個体は発病度が 0~0.20 の抵抗性強であり、この 2 個体を含めても抵抗性強個体、抵抗性中個体および罹病性個体の比は 19:10:8 となって 2:1:1 の分離比によく適合し ($\chi^2=0.2432$, $P=0.8-0.9$)、2 個体を除いた場合と同様の結果が得られた。このように B_1F_1 の結果からも F_2 の結果と同様、ツルマメの紫斑病抵抗性には二つの優性遺伝子の関与が示唆された。また、抵抗性強個体と抵抗性中個体の差は明瞭で、二つの抵抗性遺伝子の作用力には差のあることが明らかとなった。

紫斑病抵抗性とツルマメの形態的形質との連鎖関係

母本ダイズのオシマシロメは、茎が直立し、草丈は 60~70 cm、黄色種皮で 100 粒重は 24.30 g であった。一方、父本のツルマメは、ツル性で草丈が 210 cm 以上、黒色種皮で 100 粒重は 1.88 g であり、オシマシロメとは形態が著しく異なっていた。このようなツルマメ特有の形態的性質である高い草丈、黒色種皮および極小粒性と紫斑病抵抗性との連鎖関係については、 B_1F_1 個体または F_2 個体を用いて調べた。

草丈: B_1F_1 個体の草丈はオシマシロメと同等か、それよりやや高い程度で個体差が少なかった。このため抵抗性と草丈との連鎖関係は F_2 個体で調べた。 F_2 個体はいずれも半ツル性で、支柱なしには直立できない状態であった。草丈は株元から先端までの長さとし、これを 150 cm 未満、150~209 cm、210 cm 以上の 3 群に分け、各群ごとに抵抗性個体と罹病性個体の分離を調べた。結果は Table 2 に示すとおりである。草丈 150 cm 未満の群と 150~209 cm の群では、抵抗性個体と罹病性個体の比に差がなかったが、210 cm

以上の群では抵抗性 53 個体に対し罹病性個体は 1 個体と少なく、草丈によって抵抗性個体と罹病性個体の分離にかたよりのあることが認められた。

種皮の色: F_2 個体の種皮は黒色、黒褐色、茶色、緑色など多様であった。また、種皮が黒色や黒褐色の 21 個体は病斑確認が困難なため、これらを調査から除外したので、種皮の色と紫斑病抵抗性の連鎖関係は B_1F_1 個体で調べた。抵抗性検定に供試した 35 個体の種皮の色は黄色ないし黄褐色と、黄緑色ないし緑色の 2 群に大別された。種皮の色別に抵抗性の分離を調べた結果は、Table 3 に示すとおりである。種皮が黄色ないし黄褐色の群では、抵抗性強個体、抵抗性中個体および罹病性個体の比が 5:2:3 となった。また黄緑色ないし緑色の群でも、抵抗性強個体、抵抗性中個体および罹病性個体の比が 12:8:5 となり、いずれも 2:1:1 の分離比によく適合した。さらに 2×3 分割表における両形質の独立性の検定からも ($\chi^2 = 0.6783$, $P = 0.7-0.8$), 抵抗性と種皮色は互いに独立に遺伝することが明らかにされた。

検定から除外した 3 個体のうち、発病調査を行った

二つのツル性個体の種皮は、黄色ないし黄褐色であったが、この 2 個体を含めても、種皮が黄色ないし黄褐色の群は抵抗性強個体、抵抗性中個体および罹病性個体の比が 7:2:3 となり、2:1:1 の分離比によく適合した ($\chi^2 = 0.50$, $P = 0.7-0.8$)。このため、ツル性の 2 個体を除外しても上記の推察に問題はないと思われた。

100 粒重: B_1F_1 個体の 100 粒重は 5.4~15.1 g の範囲にあり、いずれもツルマメとオシマシロメの間に分布した。 B_1F_1 個体について抵抗性と 100 粒重の関係をみると、両者の相関係数は 0.2762* となり、有意な相関が認められた。しかし、相関係数は低く、さらに抵抗性強個体、抵抗性中個体、罹病性個体のいずれの個体群とも 100 粒重に大きな差はなく、抵抗性が強く、かつ 100 粒重の大きい個体も認められた (Fig. 4)。

考 察

ダイズの紫斑病抵抗性が遺伝的性質であることは高橋ら⁷⁾, Wilcox *et al.*⁸⁾, 山木⁹⁾ により報告されている

Table 3. Segregation on seed coat color and its association with purple seed stain resistance in B_1F_1 plants from the cross of Oshimashirome / wild soybean // Oshimashirome, with results of the χ^2 tests

Seed coat color	Reaction to purple seed stain				Goodness of fit			
	Highly resistant	Low resistant	Susceptible	Total	Ratio	d.f.	χ^2	P
Yellow~Yellow brown	5	2	3	10	2:1:1	2	0.0667	0.95-0.975
Yellow green~Green	12	8	5	25	2:1:1	2	0.2666	0.75-0.90

Fig. 4. Relationship between 100-seed-weight and disease indices of purple seed stain in B_1F_1 plants from the cross of Oshimashirome / wild soybean.

が、ダイズの抵抗性に関与する遺伝子数は比較的多数であると考えられていた³⁾。これに対し、ツルマメの紫斑病抵抗性は F_2 集団における抵抗性の分離から、二つの優性遺伝子によって支配されると推定され、さらに B_1F_1 集団における抵抗性の分離から、二つの抵抗性遺伝子は作用力が異なるが、いずれも1個で高い効果を発揮することが判明した。しかし、 F_2 の罹病性個体の発病度の変異幅は大きく、罹病性品種オシマシロメより抵抗性の弱い個体もみうけられることから、上記の2抵抗性遺伝子以外の遺伝子が関与している可能性も考えられる。

F_1 個体、および F_2 の抵抗性個体と B_1F_1 の抵抗性強個体の子実の発病度はほとんど同程度であったが、ツルマメは硬実性による抵抗性をもつため、子実の発病だけでツルマメとこれら交配後代との抵抗性程度を比較することはできない。しかし、ここで対象にしている紫斑病抵抗性は硬実とは無関係で、莢での菌糸伸展抑制によるものである。そこで莢の発病程度を比較すると、 F_1 個体、 F_2 の抵抗性個体および B_1F_1 の抵抗性強個体とツルマメはほとんど同程度であり、作用力が強いほうの抵抗性遺伝子は完全優性と考えられた。二つの抵抗性遺伝子は作用力が異なるが、弱いほうの抵抗性遺伝子をもつ個体であっても、既存のダイズ品種のなかでもっとも抵抗性強い品種花嫁より強く、圃場で人為的に多発させた状態で高度な抵抗性を示すことから、両遺伝子とも抵抗性品種の育成に利用できると考える。

次にツルマメの紫斑病抵抗性と硬実性、種皮色、草丈、100粒重との連鎖関係について考察する。硬実については、検定から除外した硬実個体が44個体と多く、抵抗性との連鎖関係を明らかにできなかった。しかし、 F_2 217個体中173個体は硬実ではなく、このなかにも抵抗性個体は多いことから、抵抗性が強く、

かつ硬実でない個体の選抜は容易である。種皮色は、 B_1F_1 個体の検定結果から抵抗性と連鎖していないと考えられた。100粒重と草丈は抵抗性との間に有意な相関が認められ、草丈が高く100粒重が小さい個体に抵抗性個体が多い傾向にあった。しかし、相関の程度は小さく、草丈が低くて100粒重が大きい個体にも抵抗性強個体は多く認められた。とくに100粒重は F_1 個体、 F_2 個体および B_1F_1 個体のいずれも両親の間に分布し、海妻ら⁴⁾も述べているように非常に多数の遺伝子の関与が示唆された。したがって、100粒重、草丈とも抵抗性個体の選抜を困難にするような不利な連鎖関係はないと考えられた。

以上のことから、ツルマメの紫斑病抵抗性遺伝子は1個でも高い効果を示すうえに、草丈、100粒重、硬実性、種皮色との連鎖関係がほとんどないか、あっても低く、戻し交雑の過程で抵抗性を導入することは容易であると考えられた。 B_1F_1 個体のなかには種皮が黄色で草丈は低く、高い抵抗性を示すものがあり、これにダイズを戻し交配することによって高度抵抗性の中間母本を育成すれば、品種育成に利用できるものと考ええる。

摘 要

ツルマメの紫斑病抵抗性の遺伝子分析を行った結果、抵抗性は作用力が異なる二つの優性遺伝子によって支配されると推定された。二つの抵抗性遺伝子は、単独でも栽培品種のなかでもっとも抵抗性強品種の花嫁より強い抵抗性を示し、硬実性、草丈、種皮色、100粒重とはほとんど連鎖していないと推察された。したがって、ツルマメの抵抗性遺伝子は、紫斑病に対し高度な抵抗性をもつダイズ品種の育成にとって有効と考えられた。

引 用 文 献

1. 藤田佳克・鈴木穂積 (1986). 日植病報 52: 115-116 (講演要旨).
2. 藤田佳克・鈴木穂積 (1986). 北日本病虫研報 37: 56-59.
3. 橋本剛二 (1980). 農及園 55: 863-868.
4. 海妻矩彦・木内 豊・小野富士人 (1980). 岩手大学農学部報告 15: 11-28.
5. 小山隆光・柚木利文 (1977). 東北農試研報 55: 235-239.
6. 鈴木穂積・藤田佳克 (1979). 植物防疫 33: 443-446.
7. 高橋信夫・重盛 勲・御子柴公人 (1983). 育種 (別 1) 33: 238-239.
8. Wilcox, J. R., Laviolette, F. A. and Martin, R. J. (1975). Crop Science 15: 525-526.
9. 山木鉄司 (1968). 大豆の育種. ラティス社, 東京, pp. 67-79.