ノート

苗断片および塊根切片を利用したサツマイモ立枯病抵抗性の簡易検定法

井内美砂¹⁾・川村泰史²⁾・小巻克巳³⁾¹⁾徳島県農業大学校, 名西郡石井町, 〒 779-3233²⁾徳島県立農林水産総合技術センター農業研究所, 名西郡石井町, 〒 779-3233³⁾作物研究所, つくば市, 〒 305-8518Rapid and Efficient Methods for Evaluation of Resistance to *Streptomyces ipomoea* Inoculating to Small Vine Cuttings and Storage Root Slices in SweetpotatoMisa Iuchi¹⁾, Hirofumi Kawamura²⁾ and Katsumi Komaki³⁾¹⁾ Tokushima Agricultural College, Ishii 779-3233, Japan²⁾ Agriculture Institute, Tokushima Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Center, Ishii 779-3233, Japan³⁾ National Institute of Crop Science, Tsukuba 305-8518, Japan

キーワード

サツマイモ, *Streptomyces ipomoea*, サツマイモ立枯病, 簡易検定, 苗断片, 塊根切片

1. はじめに

サツマイモ生産地帯, 特に青果用の生産地帯では, サツマイモ立枯病の被害が甚大になっている. わが国で本病害の発生が認められるようになった 1970 年代には「かいう病」と呼ばれ, *Fusarium solani* f. sp. *radicicola* によるものとされていたが, その病原性に疑問が持たれ, また米国で発生している Soil rot に症状が酷似しているところから, 現在では放線菌である *Streptomyces ipomoea* によることが明らかにされている (小川 1984).

サツマイモ立枯病は, 挿苗直後から苗表面や苗の節から出現する不定根を加害するため, 活着不良となって初期生育が遅延し, 甚だしい場合は苗が枯死し, 収量の低下をもたらす. また, 塊根肥大期には表面に黒いかさぶた状の病変を生じさせ, 塊根品質を著しく低下させる.

わが国での発生当初は, マルチ資材を利用した栽培を行う青果用サツマイモで大きな問題となっていたが, 最近では加工用 (蒸切干し用) サツマイモでもマルチ資材の普及に伴い発生が認められるばかりか, 露地栽培でも被害が報告されるようになってきている.

現在の主要な青果用および加工用品種は本病害に感受性であり, 抵抗性であるとされている「ベニアズマ」でも発生が認められることからクロロピクリンによる土壌消毒が行われている. しかし, 環境問題, 周辺地域の住民不安などにより, できる限り土壌消毒は行わないこと

が望まれている.

このため, 本病害の発生地帯では抵抗性を付与した高品質サツマイモの育成が求められ, 育種的な対応が行われているところである. 「ベニアズマ」は 1980 年に育成されたわが国初の抵抗性品種であるが (坂本ら 1980), 近年発病が目立つようになってきており, さらに抵抗性を強化した品種の育成が切望されている. 現在, 抵抗性の検定は独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所におけるサツマイモ育種プログラムの中で実施され, 激発圃場に苗を植え, 約 2 ヶ月後に現れる苗の萎凋および病斑の発現程度と塊根での黒い病変の出現程度を総合して発病程度を判定している. しかし, 気象条件, 土壌条件などが年次によって変動するため, 発病が安定せず, さらに夏季の高温時の調査であるため, 労力的な負担も大きい. そこで, 簡易検定法として, 苗への接種あるいは人工的に作成した汚染土による方法が検討されたがこれまでのところ実用的に利用可能な方法はない.

そこで, 本報では実用的に利用可能なサツマイモ立枯病の簡易でかつ精度の高い検定法の開発のために, 苗および塊根を用いて行った接種検定の結果をサツマイモ立枯病激発圃場で複数年栽培して得られた抵抗性検定結果と比較し, 育種における適用の可否について論じた.

2. サツマイモ立枯病菌に対する苗の反応の違いを利用した検定

サツマイモの苗の先端約 5 cm の細い部分を除いた後, はさみで長さ約 3 cm ずつに切り, 検定の対象とした.

サツマイモ立枯病菌は、徳島県鳴門市の激発圃場から1991年に分離したT-221株を用いた。菌の調製は、ISP-2液体培地（0.4% Yeast Extract, 1.0% Malt Extract, 0.4% Glucose, pH 7.3）で2～3日間140 rpmで振盪培養した菌体を、1 mm 目のふるいでろ過し、5000～6000 rpmで遠心分離後、菌体の重量を測定し、ISP-2液体培地で所定の濃度に希釈することによって行った。

接種から7日後に病斑数を調査し、発病度を病斑数が0個の時0、1～2個の時1、3～9個の時2、10個以上の時3、全体が黒変した時4とし、試験区ごとに平均値を算出した。

(1) 接種方法

感受性の「高系14号」と抵抗性の「ベニアズマ」を用いた。接種の方法としては、苗断片を培土に挿した後、菌体懸濁液を注ぐ方法および苗断片を菌体懸濁液に数秒間浸した後、培土に挿す方法の2種類を用い、接種する菌体の濃度は50および100 g/l、培土に接種する菌体懸濁液の量は1および2 ml、培土はパーミキュライトまたは砂とした。接種後は苗断片を挿した培土は128穴のセルトレイに詰め、ポリエチレンフィルムでおおった育苗箱をかぶせて湿度を保ち、温度を30℃、暗黒状態で培養した。試験区は各区8苗断片とした。

培土にパーミキュライトを用いた区では、接種の方法、菌体濃度および菌体懸濁液の量にかかわらず、発病度が高く、すべての区で「高系14号」が「ベニアズマ」を上回ったが、砂を用いた区では、全般に発病度が低くだけでなく、接種方法によっては抵抗性である「ベニアズマ」の方が発病度が高くなる場合があった（図1）。これは、砂の方が乾燥しやすかったため、水分のばらつきが大きかったことが原因の一つであると考えられた。

このように、発病の安定性、接種の簡便さおよび使用する菌体の量を総合して、パーミキュライトを培土に用い、苗断片を50 g/lの菌体懸濁液に数秒間つけて培土に挿す方法が適当と考えられた。

(2) 培養温度

培養温度を20、25、30および35℃とし、各区10苗断片を50 g/lの菌体懸濁液に数秒間つけてからパーミキュライトに挿す方法で接種した。

発病は25℃以上で認められた（表1）。発病株率は30℃まで増加し、35℃でも同程度であったが、発病度は35℃で最も高かった。また、発病度は激発圃場での抵抗性が低いもので高い傾向があった。最も感受性であると判定されている89SB-71での発病度が低かったのは苗がやや老化し、硬化していたことがその原因であると考えられる。一方、温度が高くなるにつれて培養中に腐敗する苗断片が増加した。35℃では品種によってはすべての苗断片が腐敗する場合もあることから（表1）、培養温度は、25℃から30℃が適当と判断された。

(3) サツマイモ立枯病抵抗性が異なる品種・系統への適用

サツマイモ立枯病激発圃場（千葉県佐原市および徳島県石井町）での検定により抵抗性が異なると判定された

図1. 苗断片へのサツマイモ立枯病菌の接種による発病度に対する接種方法と培土の影響。（接種方法）1：苗断片を培地に挿苗後、50 g/lのサツマイモ立枯病菌懸濁液を1 ml注入、2：同100 g/lを1 ml注入、3：同50 g/lを2 ml注入、4：苗断片を50 g/lの懸濁液に浸漬後培土に挿苗、5：同100 g/lに浸漬後挿苗。（培土の種類）V：パーミキュライト、S：砂。（品種）□：高系14号、■：ベニアズマ

表1. 苗断片におけるサツマイモ立枯病の発病株率、発病度及び腐敗に及ぼす培養温度の影響

品種 ¹⁾	発病株率(%) ²⁾				発病率 ^{2,3)}				腐敗率(%)			
	20℃	25℃	30℃	35℃	20℃	25℃	30℃	35℃	20℃	25℃	30℃	35℃
90IDN-47(強)	0	0	0	—	0.0	0.0	0.0	—	0	40	50	100
ベニアズマ(やや強)	0	0	0	—	0.0	0.0	0.0	—	0	40	70	100
ベニコマチ(やや弱～中)	0	80	100	100	0.0	1.1	2.6	3.0	0	0	0	80
高系14号(やや弱)	0	80	100	100	0.0	2.1	3.0	3.0	0	40	70	90
89SB-71(弱)	0	80	100	100	0.0	1.6	2.6	2.8	0	0	0	10

¹⁾ 括弧内は作物研究所の現地激発圃場（千葉県佐原市）で判定された抵抗性。

²⁾ 腐敗した苗断片は発病株率および発病度の算出では除外した。—はすべての苗断片が腐敗し発病の有無・程度を判定できなかったことを示す。

³⁾ 発病度を病斑数が0個の時0、1～2個の時1、3～9個の時2、10個以上の時3、全体が黒変した時4とし、平均値を算出した。

表 2. サツマイモ立枯病抵抗性が異なる品種・系統の苗断片における発病度

品種 ¹⁾	発病度 ²⁾
90IDN-47 (強)	0.3
ベニアズマ (やや強)	0.4
九州 112 号 (中)	2.0
ミナミユタカ (中)	2.2
春こがね (中)	3.6
ペニコマチ (やや弱～中)	3.0
高系 14 号 (やや弱)	2.8
ヘルシーレッド (やや弱)	3.4
シロサツマ (やや弱)	3.5
タマユタカ (やや弱)	3.7
89SB-71 (弱)	4.0

¹⁾括弧内は作物研究所および徳島県立農林水産総合技術センター農業研究所の激発圃場（千葉県佐原市および徳島県石井町）で判定された抵抗性。

²⁾表1に同じ。

11 品種・系統の苗断片を 50g/l の立枯病菌体懸濁液に数秒つけ、パーミキュライトに挿し、30°C で約 7 日間培養して発病させた。試験区は 1 区 10 苗断片、2 反復とした。発病度は、圃場検定による抵抗性が強いほど低かった。抵抗性の中である「春こがね」で発病度が高かったのは、苗が細く、腐敗と立枯病による黒変との区別が困難であったためである。

品種・系統による病斑の違いを図 2 に示す。感受性である「89SB-71」および「高系 14 号」では、病斑は形成層にまで達し、さらに内部へ広がったが、抵抗性である「90IDN-47」では、病斑は内部へ広がらず、かさぶた状になって表皮で止まっており、菌への防御反応を反映していると考えられる。

3. サツマイモ立枯病菌に対する塊根の反応の違いを利用した検定

サツマイモ立枯病抵抗性が異なる 6 品種（表 3）を用い、塊根を流水でよく洗浄し、両端を除いた後、5 mm 厚に切り、検定の対象とした。

サツマイモ立枯病菌は農業研究センター病害虫防除部マイコプラズマ病防除研究室が保存している No. 9 の菌株を用いた。菌の調整は、既述の方法で行った。まず予備試験として、Moyer *et al.* (1984) の手法を基本として、サツマイモ立枯病の菌体 2.3 g を 100 ml の ISP-2 培地に懸濁し、1,000 ml の滅菌砂に均一に散布した。この上に「ペニコマチ」を除く 5 品種の塊根を置床し、容器をポリエチレンラップで被覆して湿度を保つようにし、暗黒・室温条件下で 14 日間培養して、病斑の発現の有無を確認した（図 3）。その結果、この方法で病斑の発現の品種間差異を把握できると判断されたため、接種方法および培養温度について検討を加えた。

接種から 14 日後に塊根切片的の切り口に形成されたカ

図 2. 苗断片にサツマイモ立枯病菌を接種したとき発現する病斑の品種間差異。a: 89SB-71, b: 高系 14 号, c: 90IDN-47

ルスおよび菌体をナイロンネットで除去した後、病斑面積を調査し、発病度を塊根切断面の全体に対する病斑面積の比率に応じて 0（病斑がない）～9（全面が黒変または腐敗）とし、試験区ごとに平均値を算出した。

培養温度を 25.0, 27.5, 30.0 および 35.0°C の 4 水準、菌体量を 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 および 5.0g の 5 水準、菌体を懸濁する培地を蒸留水および ISP-2 培地の 2 種類、培地の量を 50 および 100 ml の 2 水準とし、これらを様々に組み合わせて発病度を検定した。総試験区数は 132 区で、塊根切片は試験区当たり 3～4 とした。培養容器は密閉可能なプラスチック容器とし、培養中は密閉し、暗黒条件とした。

病斑は接種菌体量が 0.5 g からいずれの条件でも発生し、腐敗は培養温度および培地の種類の影響が認められた（表 3）。病斑および腐敗はほとんどの条件で有意な正の相関を示し、「ベニアズマ」を除くとサツマイモ立枯病抵抗性が強いほど少なく、病斑のみならず腐敗にもサツマイモ立枯病菌が関与している可能性を強く示唆したが、他の糸状菌等の関与も否定できないため、検定を行う場合はできるだけ腐敗が起こりにくい条件で実施することが必要であると考えられた。蒸留水を培地に用いると全く腐敗しなかったが、蒸留水では抵抗性程度と発病度に相関関係は認められなかったため、ISP-2 培地が培地として適当であった。培養条件による品種ごとの腐敗率を表 4 に示すが、培養温度が 25.0°C では最も感受性で

表 3. 塊根切片にサツマイモ立枯病菌を接種したときの発病度、腐敗率および相互の相関係数

要因 ¹⁾		発病度 ²⁾	腐敗率(%)	相関係数 ³⁾		
				抵抗性×発病度	抵抗性×腐敗率	発病度×腐敗率
品種	90IDN-47 (強)	0.8	1.5			
	ベニアズマ (やや強)	3.5	14.0			
	コガネセンガン (中)	3.0	8.7			
	ベニコマチ (やや弱～中)	3.2	12.1	-0.308**	-0.213*	0.665**
	高系 14 号 (やや弱)	3.6	15.2			
	89SB-71 (弱)	4.0	22.7			
培養温度(°C)	25.0	2.3	2.4	-0.304*	-0.335*	0.420**
	27.5	4.5	8.3	-0.627*	-0.507	0.587*
	30.0	3.4	20.5	-0.360**	-0.250*	0.737**
	35.0	1.5	11.1	0.760	0.414	0.879*
菌体量(g)	0.0	0.0	0.0	—	—	—
	0.5	2.9	4.2	-0.422	-0.311	0.375
	1.0	3.5	13.2	-0.428**	-0.277*	0.769**
	2.0	2.7	18.6	-0.026	0.010	0.207
	5.0	5.0	12.5	-0.837*	-0.831*	0.573
培地の種類	蒸留水	2.4	0.0	-0.080	—	—
	ISP-2 培地	3.3	18.1	-0.406**	-0.299**	0.747**
培地の量(ml)	50	3.1	10.4	-0.416**	-0.318**	0.683**
	100	3.0	15.8	-0.065	0.004	0.610**

¹⁾括弧内は表1に同じ。

²⁾発病度を塊根切断面の全体に対する病斑面積の比率に応じて0 (病斑がない)～9 (全面が黒変または腐敗) とし、平均値を算出した。

³⁾抵抗性は強を6, やや強を5, 中を4, 中～やや弱を3, やや弱を2, 弱を1と数値化した。*および**はそれぞれ5および1%水準で有意。

90IDN-47 ベニアズマ コガネセンガン 高系14号 89SB-71

図 3. 塊根切片へのサツマイモ立枯病菌の接種による発病度の品種間差異

ある「89SB-71」以外では腐敗が認められず、接種菌体量も 0.5 g 以下であれば、「89SB-71」とやや感受性である「ベニコマチ」でわずかに認められるに過ぎなかった。

以上の結果から、培養温度は腐敗の発生を防ぐ意味で 25.0°C が望ましいが、30.0°C であっても接種菌体量を 0.5 g 程度にとどめることで、検定が可能であると考えられた。図 4 に、培養温度を 25.0°C、接種菌体量を 1.0 g としたとき、および培養温度を 30.0°C、接種菌体量を 0.5 g としたときの発病度と激発圃場で判定された抵抗性の関

係を示す。発病度は検定によって程度に差はあるものの、激発圃場で判定された抵抗性と高い負の相関を示し、統計的にも一例を除き有意であった。このことから、塊根への接種によって、サツマイモ立枯病抵抗性を判定することが可能であると判断された。

4. おわりに

放線菌が作物に被害を与える例は少なく、ジャガイモのそうか病とサツマイモ立枯病のみが報告されているに過ぎない。ジャガイモそうか病でも放線菌密度を高めた検定圃場での病変の発現程度を評価することで抵抗性を判定しているが、サツマイモ立枯病と同様に年次や気象条件によって検定結果が変動する。このため、安定した検定法が望まれているが、これまでのところ実用に耐えるものは開発されていない。

今回、サツマイモ立枯病抵抗性の検定が苗または塊根を用いることによって室内で簡易に行える可能性を示した。このことは安定的な抵抗性の評価に寄与するとともに、育種の早期世代からの選抜による育種効率の向上をもたらすことが期待される。また、苗切片で見られたサツマイモ立枯病菌に対する抵抗性品種の防御反応は抵抗性が少数の遺伝子によることをうかがわせており、今後の遺伝解析において有用な情報であると考えられた。

しかし、試験の過程でいくつかの問題点も明らかに

表 4. 塊根切片への接種により生じる腐敗率の品種間差異に及ぼす要因

要因		品種					
		90IDN-47	ベニアズマ	コガネセンガン	ベニコマチ	高系 14 号	89SB-71
培養温度 (°C)	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.8
	27.5	0.0	0.0	0.0	16.7	16.7	16.7
	30.0	3.0	25.0	14.0	21.2	27.3	31.8
	35.0	0.0	33.3	33.3	0.0	0.0	11.1
菌体量 (g)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0	0.0	12.5	0.0	4.2
	1.0	0.0	14.6	7.6	14.6	17.4	13.2
	2.0	6.7	26.7	20.0	13.3	20.0	18.6
	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	12.5

図 4. 塊根切片へのサツマイモ立枯病菌の接種による発病度と
 激発圃場で判定された抵抗性との関係. ◆: 培養温度
 25°C・接種菌体量 1.0 g ① $r=-.977^{**}$, □: 培養温度 25°C・
 接種菌体量 1.0 g ② $r=-.817^{*}$, △: 培養温度 25°C・接種
 菌体量 1.0 g ③ $r=-.775$, ●: 培養温度 30°C・接種菌体量
 0.5 g $r=-.913^{*}$. 激発圃場で判定された抵抗性の数値化は
 表 3 に同じ.

なった. まず, 苗および塊根のいずれにおいても培養中
 の腐敗が病斑の発現程度を評価する際の障害となった.
 塊根の場合はサツマイモ立枯病抵抗性との関連をうかが
 わせるが, 「ベニアズマ」での発現が顕著であることか
 ら, 他の要因が関与している可能性も高い. 腐敗の原因
 を明確にし, 簡易検定法の改善することが必要である.
 次いで, 菌の毒性の低下があげられる. 本研究の実施中
 にも液体振とう培養を数回繰り返すと病原性が低下し,
 場合によっては全く病斑を発現しなくなることが認めら
 れた. このため, 分離培養した元株を採取して試験に供

したが, 簡易検定法を実用化する場合には菌の毒性の低
 下について十分考慮することが必要である.

最近では, 抵抗性であるとされてきた「ベニアズマ」
 でも罹病が認められるようになってきた. これは気象や
 土壌条件の変化とともに, 菌のレース分化の可能性も否
 定できない. 今回報告した苗と塊根に分けたサツマイモ
 立枯病に対する反応の評価とともに, 現在, 作物研究所
 で開発している DNA マーカーを用いることによって,
 レース分化の有無の解析も容易となる. このようにサツ
 マイモ立枯病抵抗性の簡易検定法はサツマイモ育種にお
 ける選抜のみならず様々な場面での適用が可能であり,
 今後さらに改良を加えていく必要があると考えている.

謝 辞

本研究を行うに当たり, サツマイモ立枯病菌を提供さ
 れた農業研究センター病害虫防除部マイコプラズマ病防
 除研究室長塩見敏樹博士 (現独立行政法人農業環境技術
 研究所生物環境安全部微生物・小動物研究グループ長)
 および徳島県農業試験場病虫科金磯泰雄専門研究員兼科
 長 (現徳島農業改良普及センター次長) に御礼申し上げ
 る.

引用文献

- Moyer, J.W., C.L. Campbell, E. Echandi and W.W. Collins (1984)
 Phytopathology 74 (4): 493-497.
 小川 奎 (1984) 農業および園芸 59 (1): 67-72.
 志賀敏夫・坂本 敏・安藤隆夫・石川博美・加藤真次郎・竹股知
 久・梅原正道 (1985) 農業研究センター研究報告 3: 73-84.