

19. オーチャードグラスうどんこ病抵抗性の細胞レベルでの簡易検定法		分類	研究
草地試験場 環境部 作物病害研究室		連絡先	作物病害研
適用地域	全 国		0287-36-0111
[要約] うどんこ病菌に対するオーチャードグラス葉身の抵抗性反応を、接種2～6日後に <u>蛍光顕微鏡</u> によって容易に検出できる <u>抵抗性の簡易検定法</u> を開発した。また、この方法では試料の保存も可能なため、多量の系統を同時に検定できる。			

背景・ねらい

オーチャードグラスうどんこ病は、全国的に発生する重要病害であるため、抵抗性系統の育成が要望されている。本病に対する抵抗性系統の的確な検定を行うために、うどんこ病菌の感染に対する宿主の抵抗性反応を細胞レベルで明らかにするとともに、本病の簡易抵抗性検定法の開発を行う。

成果の内容・特徴

本病抵抗性発現と密接に関連した細胞反応は過敏感壊死反応であり、この反応は蛍光顕微鏡下で蛍光化細胞として容易に観察することができる。このため、蛍光顕微鏡による観察手法は本病の簡易抵抗性検定法として応用できる。

- (1) 播種60日後のオーチャードグラス幼植物の最上完全展開葉にうどんこ病菌を人工接種し接種2～6日後にサンプリングした。この葉片を約2cmに細断した後、オオムギうどんこ病で確立された方法（古賀，1988）にしたがって、葉片をラクトフェノール中で煮沸して、葉緑素を除去した。この試料をアニリンブルーで染色して、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察した（図1）。
- (2) 光学顕微鏡による観察の結果、うどんこ病菌は罹病性品種アキミドリでは成熟吸器を高率で形成し、菌糸をよく伸展させている（図2）のに対し、病徴を発現しない高度抵抗性選抜系統 ER 571では吸器形成率および菌糸生長が著しく阻害されていた（表1）。
- (3) 高度抵抗性系統 ER 571やER 8801では、過敏感壊死細胞で吸器形成および菌糸伸展が阻害されていた（図3）が、感受性品種アキミドリや Potomacではこの過敏感壊死細胞は認められなかった。
- (4) 過敏感壊死細胞は、光学顕微鏡では観察しにくい（図3）が、この方法で蛍光顕微鏡で観察すると、自家蛍光化細胞を図4のように明瞭に検出することができた。
- (5) この自家蛍光化細胞は接種2日後に抵抗性系統に特異的に観察されることから、この反応を本病の簡易抵抗性検定に応用した。

成果の活用面・留意点

- (1) うどんこ病菌接種葉の蛍光顕微鏡観察により、接種2日後に本病抵抗性反応である過敏感壊死を容易に検出することができるため、本病の早期簡易検定法として極めて有用である。また、試料はラクトフェノール・アルコールでの脱色の段階で保存しておけば、数ヶ月は使用できるため、多くの系統の観察が可能である。
- (2) 本方法は病徴を発現しない高度抵抗性系統の抵抗性反応の検出に有効であり、中度抵抗性系統の検出には不適である。

[具体的データ]

播種60日後のオーチャードグラス苗に人工接種
 ↓ (20~25℃の温室)
 接種2~6日後に最上完全展開葉をサンプリング
 ↓
 ラクトフェノール・アルコール中で煮沸
 ↓
 アニリンブルーで染色
 ↓
 蛍光顕微鏡下で試料を観察

図1. 抵抗性反応の蛍光顕微鏡観察による検出方法

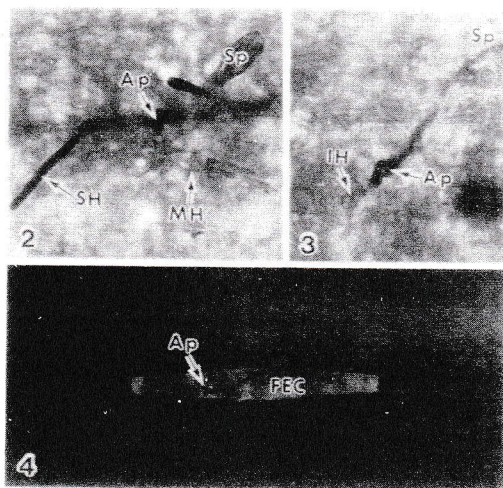


図2-4. 接種2日後のオーチャードグラスうどんこ病感染場面の光学顕微鏡写真(図1-2)および蛍光顕微鏡(図3)写真.

図2. アキミドリの表皮細胞内に成熟吸器(MH)を形成し、菌糸(SH)を伸展させている菌。Sp:胞子, Ap:付着器

図3. ER 571の表皮細胞内に未成熟の吸器(IH)を形成途中で、伸展を停止している菌。表皮細胞は過敏感壊死している。

図4. ER 571の過敏感壊死した表皮細胞の自家蛍光化(FEC)。

表1. 抵抗性選抜系統 ER 571 および罹病性品種アキミドリにおけるオーチャードグラスうどんこ病菌の吸器形成と菌糸伸展の経時的変化

接種後 の日数	ER 571 ^{a)}		アキミドリ	
	吸器形成率(%) ^{b)}	菌糸長(μm)	吸器形成率(%)	菌糸長(μm)
2	0.9	3.7	87.3	194
3	2.8	24.2	>80	677
6	2.2	31.7	--	2400

a) ER 571の約3%の株ではアキミドリの場合とほぼ同様に吸器形成および菌糸伸展が見られたが、この表ではこれらの株の値は除外した。

b) 成熟吸器形成率 = 成熟吸器を形成した付着器数 / 観察した全付着器数 × 100

研究課題名: オーチャードグラスうどんこ病抵抗性の細胞レベルでの検定

研究期間: 平成8年

予算区分: 経常

研究担当者: 古賀博則、神戸三智雄、月星隆雄、植松 勉、藤本文弘