

イメージスキャナー利用によるトウモロコシ南方さび病抵抗性の幼苗検定法

誌名	山口県農業試験場研究報告 = Bulletin of the Yamaguchi Agricultural Experiment Station
ISSN	03889327
著者名	宮川,久義 井上,興 矢野,彰吾 村本,和之
発行元	山口県農業試験場
巻/号	46号
巻号補足	
掲載ページ	p. 86-91
発行年月	1995年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



イメージスキャナー利用による トウモロコシ南方さび病抵抗性の幼苗検定法

宮川久義・井上 興・矢野彰吾*・村本和之

Seedling Test for Southern Rust Resistance of Maize Using Image Scanner

Hisayoshi MIYAGAWA, Takashi INOUE, Syougo YANO,
and Kazuyuki MURAMOTO

Abstract. Seedlings of corn varieties were tested for resistance to southern rust (*Puccinia polysola* Underw.) using the newly designed method.

1. Seedlings of 5 to 6 leaf stage were inoculated by dusting urediospores mixing with talcum powder. Urediospores mass produced on the leaf surface were stripped off by adhesive tape and these tapes were stucked on a white paper closely. Then, this paper was read out with an image scanner. Black dots, image components of urediospore mass, were counted by a personal computer and total urediospore mass area per unit leaf area was calculated using the area measuring program.
2. Resistance to southern rust of 5 to 6 leaf stage plants was clearer than 2 to 3 leaf stage.
3. Resistance was not clear when leaf greenness value of test plants measured by a green meter (SPAD502) was under 30.
4. Difference of resistance within varieties measured by this method was equal to the difference examined in the field.

緒 言

トウモロコシ南方さび病(*Puccinia polysola* Underw.) は1891年米国アラバマ州でとうもろこしの近縁種 *Tripsacum dactylodes* 上で採集され、とうもろこしの病原菌として認識されたのは1940年にペルーで採取されたとうもろこしのさび病が最初である。その後南北米大陸に分布することが知られるに至った¹⁾。日本では但見²⁾により1982年に沖縄本島において初発生が確認され、その後九州各県及び中国四国地方の一部で二期作目のとうもろこしを中心に発生が広がっている。本病は多発年にはその被害が問題になる重要病害である³⁾。なおその後本病は但見の報告以前の1979年に山口県農業試験場圃場内で発生していたことが確認された⁴⁾。

牧草・飼料作物では一般に抵抗性品種の栽培が病害防除の基本であるが、本病においては抵抗性検定法が未確立であったため筆者らは、幼苗を用いた抵抗性検定法の開発を開始した。一般にさび病の抵抗性検定では病斑の質的差異、夏胞子堆数や大きさ、その上に形成された夏胞子量等が調査対象となり、通常それらが増大するほど感受性品種と判定する。しかし個々の夏胞子堆ごとにこれらを調査していたのでは多大の労力がかかる上、胞子量の様な量的形質については調査者の主観に左右されがちである。一方近年コンピュータを用いた画像解析の農業分野への応用が盛んに行われており^{5,6)}、三枝ら⁷⁾は牧草根のコピー画像をイメージスキャナーで読みとり黒い画素数から牧草の根長及び表面積を算出する方法を発表した。この方法によれば市販のパソコンとスキャナーを

* 山口大学農学部

用いて不定形な画像面積を容易に測定できる。これを一定葉面積内に形成された夏胞子量の測定に応用した結果、この方法によって品種抵抗性が検定できることが明らかになったのでその概要を報告する。

なお本試験実施にあたり面積測定プログラムを快く使用させてくださった北海道立根釧農業試験場土壌肥料科三枝俊哉氏、イメージスキャナー等の使用に便宜をはかって下さった山口大学農学部植物病理学研究室の皆様、南方さび病菌株、各種抵抗性品種を分譲下さった農林水産省九州農業試験場飼料作物育種研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

材料及び方法

1. とうもろこしの栽培及び病原菌接種

底に穴をあけたイチゴバックに播種後、間引いて1パック6～7株植えとし、ガラス温室または屋外で栽培した。P3470、P3282、P3286、G4743、P3358の市販の5品種を供試し、1回の試験に各品種3パック供試した。なおこれらの品種は伊東ら²⁾が圃場検定で供試した品種と同じである。葉色の濃淡と発病との関係を調べる試験では多肥と少肥の2段階を設定した。多肥区の施肥量は配合肥料の燐加安44号(N:P:K=14:13:17)を概ね4g、少肥区はその半分程度であった。葉色は葉緑素計(SPAD 502、ミノルタ製)を用いて完全展開頂葉の葉身中央部の中肋部をはずした部分について接種時及び調査時に測定した。

接種には1991年に九州農業試験場飼料作物育種研究室より分譲を受け以後継代接種により保存中の菌株を供試した。人工気象器内で栽培したとうもろこしの葉上に形成させた夏胞子とタルクの混合粉体をスライドガラスに耳かき1杯程載せカバーガラスで上から軽く押さえ落射照明下で検鏡し150倍1視野(1.54mm²)内の夏胞子数を胞子濃度とし、これが約7個になるよう濃度を調整した。これを1イチゴバック当たり0.5g(2～3葉期接種のみ0.25g)手製のガラス製散粉器を用いて散粉接種した。接種した植物は25℃の接種箱に24時間静置し、以後調査時までガラス室内に置いた。室温は成りゆきで概ね20～35℃であった。また別途圃場で本病が甚発生したとうもろこし葉から絵筆でかき取って得た胞子をその重量の50～400倍のタルクと混合して150倍1視野胞子数を数え検量直線を求めた。

幼苗検定の比較対象として実施した圃場及びポット検定の概要は以下のとおりである。

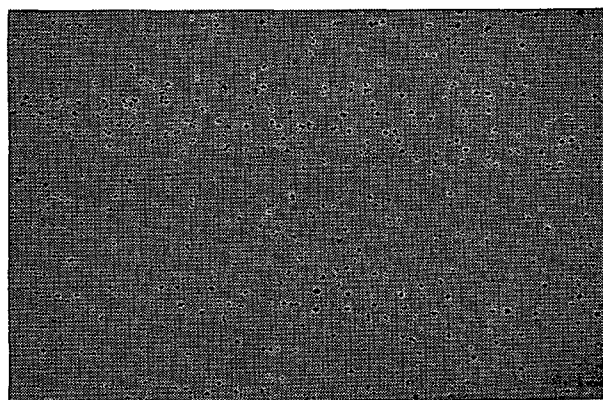
圃場検定; 1992年に前述の5品種を条間75cm、株間25c

m、1本仕立て1品種1条20本植えとした。これら5品種の間にP3358を摂種源として1条播種した。試験は4月播き(試験Ⅰ)と6月播き(試験Ⅱ)の2回で各々3連制とした。施肥、除草剤等は慣行に従った。播種約1カ月後タルクで増量した夏胞子(1視野約3個)をP3358に1本当たり約0.2gを葉巻部に絵筆で塗布し接種源とした。雄穂出穂後に各条中央の10本について止葉から数えて6、7枚目の葉の病斑数を調査した。1993年も同様に実施したが、病斑数の代わりに後述する胞子画像面積を測定した。

ポット検定; 1992年4月に1/5000アールポットに上記5品種を播種した。通常施肥区と倍量施肥区を設定し、各々1品種につきポット(1ポット3本仕立て)供試した。ポットの倒伏を防ぐため6月9日に植物調節剤(プロヘキサジオンカルシウム、500倍液)を散布し草丈を抑制した。なおP3358とP3470はこれとは別に無散布区を設定した。雄穂出穂後の7月14日に夏胞子(1視野約6個)を手回し小型散粉機で接種し、17日後に止葉から6葉目までの夏胞子堆数を調査した。なお接種前の発病はなかった。

2. 葉上の夏胞子測定方法

接種約12日後、葉上に夏胞子が十分形成された時期に、1葉につき1枚無色粘着テープ(住友3M社製のメンディングテープ、幅18mm、長さ6～8cm)を葉に貼って胞子をはぎ取り白紙に6～7枚揃えて張り付け第1図に示す約10cm四方の検定試料を作製した。1993年の圃場試験では止葉から数えて6枚目の葉を対象に幅24mmのテープを任意の3カ所に貼って胞子をはぎ取りそれらを張り合わせて試料を作製した。次にこれをイメージス



第1図 葉上の夏胞子をテープではぎとって作成した検定試料

キャナーによって白黒・単純2値で取り込み、画像中のドットを計数することにより単位面積あたりの目的画像の面積を算出した。イメージスキャナーはオムロン社製のHS60F-H（解像度300dpi）を供試した。スキャナーの読みとり条件は線密度200dpiとし、濃淡及びコントラストはこの器械の最小値に設定することで夏胞子塊の画像が最も良好に読み取れた。

1992年は北海道立根釧農試土壌肥料科三枝俊哉氏作成のプログラム⁶⁾を三枝氏が本研究用に一部改変したものを用いた。1993年は三枝氏より提供されたC言語ソースファイルを基に筆者の一人である矢野がクイックベシック（マイクロソフト社）にてソースを改変追記し、コンパイルして作成したプログラムを用いた。プログラムのサイズはソースファイルで13KB、コンパイル後で68KBであった。このプログラムではスキャナーの読みとりと面積測定プログラムのファイル形式（ST4形式、横640×縦400ドット、96KB）を合わせ、またファイルした画像の選択や操作手順が容易になるよう改良を加えた。

なおテープに付着した葉表面上の異物は市販の画像処理ソフト（Z's staff kid；Zeit社）により画像から消去した。

結 果

1. 胞子画像面積の測定

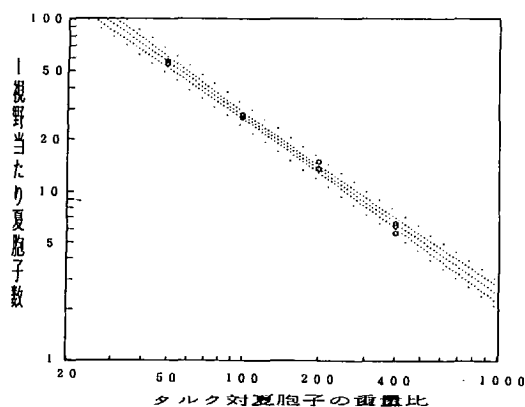
予備試験として白紙に転写した直径約7.8mmの黒色円（商品名；レトラセット）10個を供試スキャナーで読みとった結果、平均0.492cm²（最大0.499、最小0.483）であった。なお計算上は直径7.8mmの円の面積は約0.48cm²である。またこのサンプルを供試スキャナー及び別のスキャナー（GT-6000；エプソン社）で同一条件で読みとった。後者で測定した面積を100とした場合、前者では平均で99.4（最大100.8、最小98.2）であった。同一サンプルを繰り返して読みとっても面積は常に同一であった。次に供試5品種（各3パック供試）から得られた15枚の試料について各々別の2カ所を選び同一葉面積（約40cm²）内の胞子画像面積を測定した。2カ所の胞子画像面積の差異は平均で8.7%（最大14、最小3）であった。また少なくとも肉眼で見える胞子塊はスキャナーで読みとり可能であった。640×400ドットの画像は葉面積で約40cm²に相当した。この画像から面積を測定する時間はNEC PC-9801VXの場合で約55秒であった。以後の検定では原則として1試料1カ所について胞子画像面積を測定した。

メンディングテープで作成した試料は1年以上の長期

保存ができた。セロハンテープは光を反射するためスキャナーでの読みとりで支障がある、接着力が強くて葉の表皮もはぎ取る、長期保存すると変色する等の問題点があった。

2. 圃場及びポットにおける抵抗性検定

1) 胞子濃度の検量直線：第2図に検量直線を示した。今回の接種で用いた1視野胞子数7個とは概ね胞子重量の400倍のタルクで増量した濃度に相当した。



第2図 タルクと夏胞子を種々の重量比で混合した粉体を落射照明下150倍で観察した場合の1視野当たり夏胞子数

2) 圃場検定：両年とも接種後に適度の降雨があり、順調に発病した。結果は第1表に示した。1992年の試験では、試験I、IIとも葉上の夏胞子堆数はP3470が最小で最も抵抗性であり次いでP3282、P3286の順であった。G4743、P3358は夏胞子堆数が多く感受性と判定した。なお止葉出穂の約20日前の発病調査ではおおむねP3470、P3282、P3286、G4743、P3358の順に夏胞子堆数が多かったがP3470とP3358の差は出穂後の調査に比べて小さかった。1993年の試験では夏胞子堆数の代わりに胞子画像面積を測定したが品種抵抗性はP3470、P3282、P3286、G4743、P3358の順となり前年の結果と一致した。

3) ポット試験：接種後降雨があった。結果は第1表に示した。夏胞子堆数はP3470、P3282、P3286、G4743、P3358の順に多くなった。P3470、P3282ではどの葉位とも殆ど病斑が形成されず強い抵抗性を示した。特にP3358では他品種より胞子堆数が著しく多く感受性であった。通常施肥区と倍量施肥区ともほぼ同様の結果であった。また植物調節剤散布による影響はなかった。

3. 5～6葉期における抵抗性検定

1992年8月上旬から10月上旬にかけて5～6葉期に7

第1表 5～6葉期の幼苗、圃場及びポット栽培植物での検定結果

品 種	5～6葉期検定 (胞子画像面積)		圃場検定 (胞子画像面積)	圃場検定 (夏胞子堆数)		ポット検定 (夏胞子堆数)
	5葉	6葉		試験Ⅰ	試験Ⅱ	
P3470	0.056a)	0.052a)	0.005b)	5.1c)	5.3c)	0.1d)
P3282	0.159	0.143	0.014	11.4	10.8	0.6
P3286	0.285	0.248	0.066	37.3	22.1	5.7
G4743	0.510	0.307	0.227	114.3	191.4	16.6
P3358	0.635	0.459	0.639	403.9	473.3	237.8

a)葉面積40cm²当たりの胞子画像面積；cm²(1992年の試験の平均)

b)止葉から6枚目の葉の50cm²当たりの胞子画像面積；cm²(1993年の試験)

c)止葉から6枚目の葉の全夏胞子堆数(1992年の試験)

d)止葉から6枚目までの葉の夏胞子堆数の合計(倍量施肥区の数値)

回接種試験を実施した。1993年には葉齢との関係を見る試験の一部として8回、その他に施肥量との関係を見る試験として4回接種した。それらの結果を第1,2表に示した。5、6葉とも一定葉面積(40cm²)当たりの胞子画像面積はP3470が最小、P3358が最大で面積の小さい順に並べるとP3470、P3282、P3286、G4743、P3358であった。P3470とP3358の胞子面積には多くの場合10倍以上の大きな差があった。これらの品種間差は前述の圃場及びポット試験の結果と一致した。

4. 検定植物の葉齢と品種抵抗性

1992年は3～4葉期に2回、1993年は3～4葉期に2回、2～3葉期に4回接種試験を実施した。その他に2～3葉期に実施した接種胞子濃度を変えた試験も検討に加えた。

それらの結果と5～6葉期に接種した結果を比較すると、一定葉面積(40cm²)当たりの胞子画像面積の品種間差は2～3葉期でも認められたが、5～6葉期の方がより大きな品種間差が認められ、第2表に示すように良好な検

第2表 接種時の葉齢と抵抗性の品種間差の関係

接種時期	調査葉位	胞子画像面積の品種間差		
		最大	最小	平均 b)
2～3葉期	3葉	6.3b)	1.8	3.7
5～6葉期	5葉	18.0	4.6	12.3
	6葉	32.3	5.3	17.0

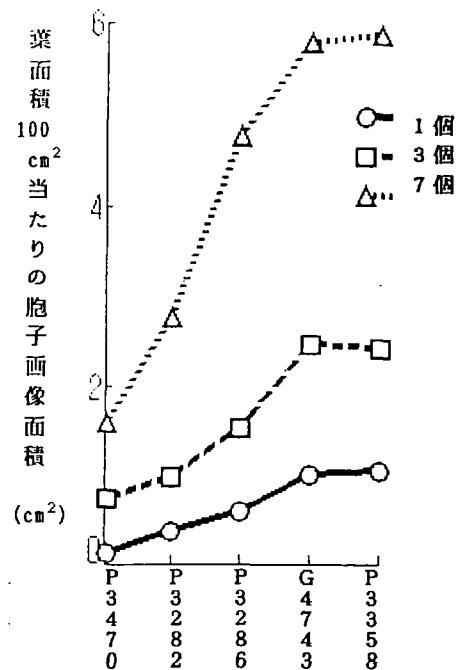
a)抵抗性品種P3470の胞子画像面積を1とした場合の感受性品種P3358の画像面積

b)6～7回の試験の平均

定結果が得られた。3～4葉期の試験でも品種間差は認められたが抵抗性・感受性の差は小さかった。

5. 接種胞子濃度と品種抵抗性

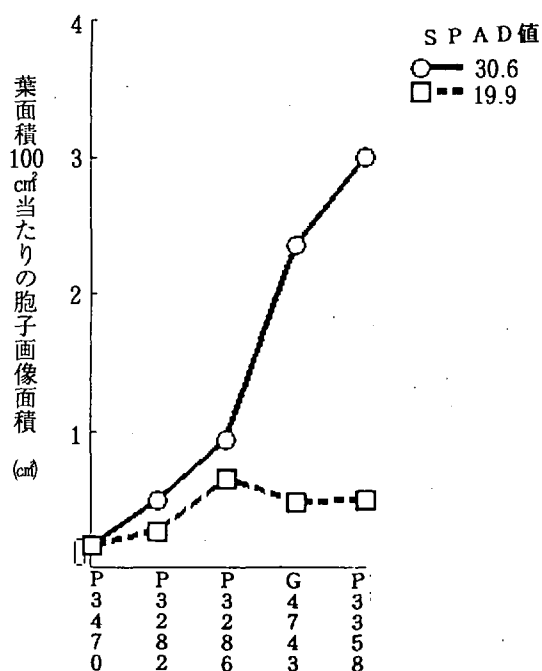
2～3葉期に確実に検定できれば、早期検定ができるため胞子濃度を1視野当たり1、3、7個に変えて接種し、2～3葉期接種の品種間差を明確にできないか検討した。この試験は3回実施した。その結果従来接種してきた胞子濃度(1視野7個)の場合に品種間差が最も明確に判定でき、第3図に示すように胞子濃度を下げるとかえって品種間差は不明確になった。



第3図 接種菌濃度を変えた場合の胞子画像面積(2～3葉期接種)

6. 検定植物の葉色と品種抵抗性

1993年に実施した5～6葉期の接種試験の一部では、最も感受性品種のP3358よりもP3286やG4743の方が多量の胞子を形成することがあり、検定に支障をきたした。その原因として施肥の方法を変えたため肥料が不足していることが考えられたため施肥量を変えて接種時に葉色の濃淡の差をつけた試験を3回、接種後に施肥量に差をつけた試験を1回実施した。その結果第4図に示すように、発病調査時において完全展開頂葉中央部でSPAD値で30以上の場合には、P3470、P3282、P3286、G4743、P3358の順に胞子形成量が増加し、品種間差が明確であったが30以下の場合には感受性品種での胞子画像面積が小さく品種間差が不明確であった。葉色を30以上に保つには配合肥料（燐加安44号）を1パック当たり4g程度施肥することが必要であった。



第3図 接種後に施肥量を変えて調査時の葉色に濃淡の差をつけた場合の胞子画像面積

7. 抵抗性品種の選抜

九州農業試験場飼料作物育種研究室分譲の抵抗性品種・系統、感受性品種計20種類について5～6葉期に本法で抵抗性検定した結果、胞子画像面積はP3470が最小で、ついでSH2914、WR9401、P3282等で少なかった。

考 察

トウモロコシ南方さび病に対する抵抗性は単一の抵抗性遺伝子によるものの他にSlow-rustingと称される抵抗

性が報告されている¹¹⁾¹²⁾。それらによればこの抵抗性の特徴は夏胞子堆は形成されるがその数、大きさが小さく形成される夏胞子量も少ないといわれている。Zumm¹⁰⁾は夏胞子堆の面積率、夏胞子堆の大きさ、夏胞子堆の盛り上がり程度、夏胞子形成程度の4指標を4～7段階に分けて抵抗性を調査している。筆者らも前述の5品種の発病状況の達観観察から夏胞子堆に形成された胞子量の重み付けを行って調査した方がより実状に近い数値が得られると考えた。そこで夏胞子を粘着テープではぎ取って白紙に貼り胞子塊の散在する試料を作成して、一定範囲内の胞子塊の面積を求めることを検討した。当初これを市販のCCDカメラを用いた画像解析装置で求めることを試みたが、解像度に難点があった。そこで三枝らのイメージスキャナーを用いた方法を試みたところ胞子塊の面積が容易に求められた。更にその正確さ、再現性について検討した結果本法は面積測定法として十分活用できると判断した。また本法では市販の安価なスキャナーを用い、高価な画像解析装置を必要としない。

5～6葉期の苗を用いて胞子画像面積から判定した品種抵抗性は圃場及びポット植え植物で出穂後に調査した夏胞子堆数や胞子画像面積からの判定結果と一致した。今回の試験では伊東ら⁹⁾が圃場で春播き接種及び秋播き自然発病により抵抗性検定した品種と同一品種を用い伊東らから分譲を受けた菌株を用いて検定したが、筆者らの結果は伊東らの結果とも一致した。従って本法により品種抵抗性が検定できると考えられた。

一方、2～3葉期接種では抵抗性の品種間差が5～6葉期に比べ小さかった。また圃場検定でも雄穂出穂20日前と出穂後での検定結果の比較及びポット栽培植物の雄穂出穂後の接種による検定結果から考えると抵抗性は植物の生育の進展とともに増強していくものと考えられる。従って検定は植物体の大きさなども考慮して5～6葉期に行うとよいと考えられた。なお但見は試作導入品種、育種母材、生食用品種等約500品種のとうもろこしについて2～3葉期接種により南方さび病に対する抵抗性を調べた結果、接種により全く夏胞子堆を形成しない品種はなかったと報告している⁹⁾。

次に本法による検定結果に大きな影響を及ぼす要因として葉の葉色が挙げられる。葉色が薄いとP3358の様な感受性品種では胞子が十分に形成されないまま葉が黄化することがある。その場合には当然胞子画像面積は小さくなり、数値のみでは誤った判定になってしまう。しかし施肥に注意して葉色をSPAD値で30以上の緑色に保つことにより圃場検定と同様の品種間差が検定できた。

本法の他病害への応用としては、エンバク、ソルガム等のさび病抵抗性検定の他に、リンゴ斑点落葉病 (*Alternaria alternata*) 発生予察のためリンゴの葉や枝の病斑に形成された分生孢子量の測定等が考えられる。

摘 要

1. トウモロコシ品種・系統の南方さび病に対する抵抗性検定が幼苗接種法と市販のイメージスキャナーを利用した孢子塊量測定法を併用することにより効率的に実施できた。
2. 抵抗性と感受性の品種間差は2～3葉期でも認められたが、5～6葉期の方がより大きな品種間差が認められた。
3. 検定植物の葉色は発病調査時においてSPAD値で30以上であることが必要であった。
4. 本法で検定した抵抗性の品種間差は人工接種による圃場及びポット試験の結果と一致した。

引 用 文 献

- 1) Bailey, B.A. et al : Identification of slow-rusting resistance to *Puccinia polysola* in maize inbreds and single crosses , Plant Disease, 71, 518～521, 1987.
- 2) 伊東栄作・池谷文夫・濃沼圭一 : トウモロコシ南方さび病抵抗性の接種検定法 2. 春播き条件下での抵抗性検定, 日草誌39別, 119～120, 1992.
- 3) 川島信彦 : 画像による水耕葉菜類の生育進度の計測, 近畿中国農業研究, 81, 25～29, 1991.
- 4) 西 和文・栢村鶴雄・並木史郎 : 熊本県におけるトウモロコシ南方さび病の発生実態, 九病虫会研報, 40, 22～24, 1994.
- 5) 農林水産省農業環境技術研究所編 : 第2回計測と情報解析研究会 (形をはかる) 講演要旨集, 1～71, 1993.
- 6) 三枝俊哉・宝示戸雅之・能代昌雄 : 画像処理による牧草根の長さおよび表面積の測定方法, 土壤肥料学会講演要旨集, 38, 261, 1992.
- 7) Scott, G. and N. Zummo : Effect of genes with slow-rusting characteristics on southern corn rust in Maize, Plant Disease, 73, 114～116, 1989.
- 8) 杉山正樹 : 南方さび病 (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, カード番号8802, 1988.
- 9) 但見明俊 : さび病及び南方さび病に対するとうもろこし品種の抵抗性の差異, 北海道農試研報, 143, 85～94, 1985.
- 10) Zummo, N. : Components contributing to partial resistance in maize to *Puccinia polysola*, Plant Disease, 72, 157～160, 1988.