

アルファルファにおける菌核病抵抗性育種に関する研究

表現型循環選抜による抵抗性の向上および育苗環境と抵抗性発現

誌名	草地試験場研究報告 : s ō chi shikenj ō kenky ū h ō koku = Bulletin of the National Grassland Research Institute
ISSN	03850196
著者名	神戸,三智雄
発行元	農林省草地試験場
巻/号	57号
巻号補足	
掲載ページ	p. 79-125
発行年月	1999年2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



草 地 試 験 場 研 究 報 告

特 別 報 告 第 9 号

アルファルファにおける菌核病抵抗性育種に関する研究

—表現型循環選抜による抵抗性の向上および育苗環境と抵抗性発現—

平成 11 年 2 月

目 次

緒 論	82	第4章 表現型循環選抜による抵抗性系統の育成	104
第1章 既往の研究	84	第1節 表現型循環選抜による抵抗性の向上と遺伝率	104
第1節 アルファルファの植物学的記載及び品種群の分化	84	第2節 自然発病下での選抜系統の抵抗性	111
第2節 菌核病菌 <i>Sclerotinia trifoliorum</i> Eriks. に関する研究	84	第5章 総合考察	114
第2章 抵抗性の発現と環境条件	85	第1節 菌核病抵抗性の選抜環境	114
第1節 自然発病における品種間差異	85	第2節 表現型循環選抜に対する他殖性・同質倍数体集団の選抜反応	115
第2節 人工接種法の開発と品種間差異	89	第6章 摘 要	118
第3節 育苗環境と抵抗性	93	謝 辞	119
第3章 菌核病菌の病原性と抵抗性の機作	96	引用文献	119
第1節 収集菌株による病原性の差異	97	ABSTRACT	123
第2節 抵抗性の病理解剖学的解析	100		

アルファルファにおける菌核病抵抗性育種に関する研究 —表現型循環選抜による抵抗性の向上および育苗環境と抵抗性発現—

神戸 三智雄

育種部 育種第1研究室

現在：愛知県農業総合試験場作物研究所飼料作物研究室

(平成10年6月4日受理)

要 旨

アルファルファ菌核病 (*Sclerotinia trifoliorum* Eriks.) の被害は北海道から九州に及び、中でも積雪地域で大きな被害を与える重要病害である。この病害は多くの草種を侵す多犯性病害であることから抵抗性の遺伝的な品種間差異は存在しないとされ、抵抗性育種は難しいと考えられてきた。しかし、集団選抜を繰り返した系統は既存品種に比べ著しく高い抵抗性を示すことが認められ、多犯性病害においても抵抗性育種が可能なことを明らかにした。さらに、これらの育種材料を用いて抵抗性の機作について検討するとともに、表現型循環選抜による育種効果について考察した。

育苗環境と抵抗性発現との関係を明らかにするため、自然条件で初期発病が観察される冬期(12月)に培養菌を株元に接種した。断熱性の高い銀色寒冷紗で被覆することにより、発病が斉一になり、生存率に有意な品種間差異を認めた。この生存率と自然条件下での発病程度との間に $r = -0.798$ (1% 有意) の高い相関関係があり、自然条件でのハードニング、培養菌接種、被覆処理を組み合わせる方法により、人工接種による抵抗性検定を可能にした。

品種の抵抗性反応についてみると、Moapa, Haymaker など非休眠性タイプの品種は菌核病にきわめて弱く、休眠性が高く寒冷地適応性をもつ品種はやや強い傾向を示した。これらの中にはフランスの Flamande 系統群に由来する品種・系統が多く含まれたことから、この抵抗性は遺伝的であると推察した。

さらに、幼苗検定に適した条件を明らかにするため、病菌接種に適したエイジと育苗環境について検討した。低温・短日条件で育苗した場合、10週苗において品種間差異が明瞭になり、8葉展開期が検定に適した生育ステージとみられた。検定のための育苗環境についてみると、生育適温下限温度(16℃)・短日(9時間日長)条件で最も生存個体率が高くなった。この条件は個体の充実とハードニングが並行して進むことにより、抵抗性が高まり、系統及び個体の変異が拡大することから、検定に適した育苗環境と考えられた。

病菌接種後の病徴を観察すると、罹病性品種の Moapa では病斑は根部にまで拡大し、菌糸が地際のクラウン部全体に及ぶため、すべての幼芽を枯死させる。一方、抵抗性選抜系統 SR58-6Y では菌糸の伸展をクラウン部で阻止する 경우가多く、菌糸の侵入を免れた健全な幼芽が再生し、草勢を徐々に回復するものとみられた。罹病性個体の走査電顕観察では、侵入菌糸は維管束や厚膜細胞組織など、ほとんどの細胞内に伸展し、柔細胞で最も増殖していた。しかし、抵抗性個体に侵入した菌糸は表皮細胞内で伸展を停止する典型的な抵抗性反応が観察されたことから、感染部位では顕著な菌糸伸展の阻害反応が起きていることが示唆された。

表現型循環選抜による効果を明らかにするため、フランス及び愛知農総試育成品種等、10品種・系統による約3,000個体を基礎集団として、1983年から集団選抜と母系選抜を9世代繰り返した。ほ場検定における1~5世代系統の生存率についてみると SR58-1, SR58-2 ではごく低く、基礎集団の一部としたナツワカバと差がなかった。3世代系統から高くなり、5世代系統の SR58-5 は高い生存率を示した。5~9世代系統の検定では SR58-5 に比べ SR58-9 は明らかに高い生存率を

示した。ファルコナーの方法による累積選抜圧と選抜反応との関係から実現ヘリタビリティを求めると初期世代は $h^2=0.078$ と低かったが、3~9 世代では $h^2=0.364$ と高い値を示した。このことから、基礎集団では菌核病の抵抗性に関する遺伝子の働きは小さく、その頻度も低いため、1, 2 世代の選抜ではほとんど抵抗性の向上が認められなかった。しかし、選抜を繰り返すことによって集団内の抵抗性遺伝子の頻度が徐々に高くなり、9 世代系統の SR58-9 では大きな選抜反応が得られたと考えられた。

この選抜反応と同質倍数体の理論的な選抜モデルとを対比した。無優性で初期の遺伝子頻度を低くしたモデルでは、エスケープを少なくして選抜世代を繰り返せば目的とする遺伝子頻度を徐々に高めることが可能になり、菌核病抵抗性の選抜反応と同様な傾向を示すとみられた。このことから、遺伝子の働きが小さく、その頻度が低い集団においても遺伝的な差が表現型として発現する環境が設定できれば表現型循環選抜はきわめて有効な育種手法であると推論した。

神戸三智雄 (1999) : アルファルファにおける菌核病抵抗性育種に関する研究—表現型循環選抜による抵抗性の向上および育苗環境と抵抗性発現—。草地試研報 57 : 79~125.

キーワード: アルファルファ, *Medicago sativa*, 菌核病, 病害抵抗性, 表現型循環選抜, 遺伝率, 育苗条件

緒 論

アルファルファ (*Medicago Sativa* L.) は飼料作物として最も古い栽培記録をもち、古代から現代にいたるまで、家畜の良質飼料として世界で最も広く栽培されているマメ科牧草である。永年性牧草として多年にわたり高い栄養収量が得られ、しかも泌乳性や健康増進にも効果が高い飼料である。「牧草の女王」とも呼ばれており、わが国でも乾草、ヘイキューブ等として多量に輸入されている (杉信 1983, 藤本 1982, 鈴木 1992)。日本ではアルファルファの栽培が定着したとはいえないが、質を重視する酪農経営の時代に入ってアルファルファの生産を見直す農家が増えている。

栽培の記録では 1874 年にアメリカから導入され、北海道を中心に試作が行われたのが始まりで、導入品種の中から奨励品種の選定が進められてきた。日本での育種は 1964 年に愛知県農業総合試験場 (牧草育種指定試験地) において暖地向品種の育種が開始され、1967 年からは北海道農業試験場で寒地向品種の育成が進められてきた。北海道では収量性向上と耐病性、越冬性、永続性の強化が主な育種目標であった (杉信 1975)。寒地向き品種キタワカバの育成と良質粗飼料栽培の需要の高まりにつれて 10,000 ha を越える栽培面積になったが、1980 年頃からのバーティシウム萎凋病の発生により停滞した。しかし、1990 年には抵抗性品種マキワカバ、ヒサワカバが育成され、現在、アルファルファの栽培面積を倍増する計画が出されている。

愛知農総試では暖地向きの早期繁茂性 (非休眠性)、耐

倒伏性、耐湿性、耐病虫性 (白絹病, アブラムシ, 菌核病) を育種目標とし、1964 年には高い収量性と永続性を示すナツワカバを、1982 年には耐倒伏性が高いタチワカバを育成した。これらの品種はそれぞれ 32 と 37 の県で奨励品種に選定され、暖地におけるアルファルファ栽培を可能にした (鈴木 1978, 藤本 1984)。また、水田転換畑を利用した循環選抜により 1995 年には耐湿性品種「ツウワカバ」を育成した (神戸 1996 年, 稲波 1997 年)。このように育種目標を明確にしながら障害克服にむけて育種を進めてきた。今後、さらに克服を要する問題としては多湿条件で発生しやすい病害に対する抵抗性品種の育成が必要とされている。特に、晩秋から春にかけて、菌核病 (*Sclerotinia trifoliorum* Eriks.) の発病による株枯れが各地でみられ、しばしば壊滅的被害をもたらす事例が報告された。この病害は寒冷積雪地だけでなく、温暖地・暖地においても早春に降雨が続くころ、発病が進行する重要な病害であるとみられている (西原 1976, 1981, 1990, 鈴木 1986)。アルファルファの育成系統の特性及び生産力検定を行う系統適応性検定試験地においても、試験の続行ができなくなるほどの発病が各地で認められた (神戸 1986)。

菌核病は多くのマメ科植物を侵す病害であり、水田裏作としてレンゲ作が奨励された 1920 年~70 年代には大発生がみられ、菌核病防除の取組みがなされ、湛水処理による耕種的な防除法などが検討されてきた (松浦 1954)。しかし、抵抗性育種は難しく、実用的な抵抗性品種の育成には到らなかった (橋本 1952, 末次 1960)。多湿なわが国におけるアルファルファの栽培安定にとっ

てレンゲと同様に菌核病防除に対する取組みが必要であり、特に畑条件で多年にわたって収穫利用するアルファルファでは湛水処理など耕種的な防除は難しく、抵抗性品種の開発が不可欠と考えられた。そこで、菌核病抵抗性品種育成を目標とした検定法の開発と育種の基本である集団改良理論に基づく育種研究に取組んだ。

アルファルファの栽培利用は乾燥地帯を中心に発展してきたが、最近、米国では東部の多湿地帯向き品種も育成され、菌核病抵抗性育種への取組みも始められている (Pierson *et al.* 1994, Pratt *et al.* 1996)。諸外国のアルファルファ育種は、その地域にすでに適応している既存品種の改良が目的とされており、優れた生態型などの組み合わせ能力に基づく合成品種法が一般的な育種法である。しかし、日本の暖地のように新作物としてアルファルファの導入を行う場合、多雨多湿環境に適応した育種母材をみつけることは難しく、これら先進地での育種方法を利用することは必ずしも効果の高い方法ではないと考えられた。

アルファルファの育種研究において Hill(1971) は同質 4 倍体の選抜反応のモデルから、遺伝子の働きが小さな無優性形質において、集団内の初期頻度が極めて低い場合にもエスケープ（遺伝的な目標形質とは異なる個体を選び、選抜集団に混入させること）を少なくして、選抜を繰り返せば集団内の遺伝子頻度を徐々に向上させることが可能であるとした。しかし、低頻度の抵抗性個体を見出すには抵抗性の発現環境が問題である。イネ耐冷性育種の成功が示すように、遺伝的な差が発現する環境条件を明確に設定できるかどうかは選抜の有効性を決定する (佐々木 1994, 1996)。その意味で、本研究では遺伝的な抵抗性の発現環境を明らかにすることを重視した。菌核病の抵抗性遺伝子が存在すると仮定した場合、明確な抵抗性を示す品種または系統などが認められない状況から、その抵抗性は量的抵抗性で、かつ集団内の遺伝子の頻度は極く低いと考えられる。低頻度の集団から抵抗性の差を明確にできる集団を育成するには、集団の遺伝的構成を変えていくことが必要である。こうしたことから、育種方法としては表現型循環選抜を実施することが適当と判断された (神戸 1993)。

本研究では第 1 章においてアルファルファに関する植物学的記載と品種群の分化及び菌核病菌の分類、その分布と感染について、既往の研究を概説した。

第 2 章では遺伝的な差が発現する環境を明確にするため、ほ場条件でハードニングを行い、寒冷紗被覆下で人工接種することにより再現性の高い検定法を明らかにした。この検定法により、抵抗性の個体間及び系統間差異

を判別するとともに、エスケープの少ない状態での選抜を可能にした。また、抵抗性の発現に関与する植物体の育苗環境（植物齢・温度・日長条件）について検討し、アルファルファの生育下限適温（16℃）、短日条件で 10 週間育苗することにより、幼苗期においても検定が可能になることを明らかにした。

第 3 章では菌株の病原性について検討し、北海道、山形の寒冷地の菌株は温暖地の菌株に比べ強い病原性を示すことを明らかにしたが、レースとしての分化はないものと推察した。また、菌核病に対する抵抗性の機作について病理解剖学的な解析を行い、選抜系統の抵抗性は侵入菌糸の拡大を阻害する抵抗性反応であることを認めた。

第 4 章では選抜世代を繰り返し育成した系統は人工接種による抵抗性検定において既存品種に比べ明らかに高い生存率を示すことを認めた。また、ほ場条件での自然発病下において高い生存率と収量性を示したことから、実用的な抵抗性系統であることを確認した。この選抜効果について、Falconer (1960) による選抜強度と選抜反応との関係から初期選抜世代の遺伝率は低いが、3 世代目以降になると高くなることを明らかにした。

さらに、この菌核病の選抜反応と同質 4 倍体の理論的なモデル (Hill 1971, Busubice 1972) とを対比した。実際の選抜反応と理論値の設定では前提条件が異なるが、無優性で初期の遺伝子頻度を低くしたモデルでは、エスケープを少なくして選抜世代を繰り返せば目的とする遺伝子を徐々に集積することが可能になり、菌核病抵抗性選抜反応と同様な傾向を示すとみられた。このことから、遺伝子の働きが小さく、その頻度が低い集団においても遺伝的な差が表現型に発現する環境が設定できれば表現型循環選抜が極めて有効な育種手法であると推論した。

表現型循環選抜は古代において作物の栽培化に効果を示した育種方法と基本的に同じ考え方に立つ。本研究結果から、環境が大きく異なる地域から新しい作物を導入する場合、新しい環境に対する適応性を高めるために効果的な方法であることが実証された。なお、蛋白質、油脂などの成分含量、収量性、耐倒伏性、耐湿性などの形質について育種母材を改良するためにも有効な方法であることが明らかにされている (Cooper 1954, 1959, Dudley 1977, 神戸 1988, 藤本 1993)。さらに、本研究で明らかになった菌核病抵抗性の循環選抜による成果は、今まで遺伝質の存在が確認できず育種効果が否定的であった形質（多犯性病虫害、ストレス耐性など）についても、変異が発現する適切な環境設定を行い、その環

境下で選抜を繰り返してから、選抜効果を判断することの重要性を示唆するものといえよう。

第1章 既往の研究

第1節 アルファルファの植物学的記載及び品種群の分化

1. 一般性状

アルファルファは *Medicago* 属の多年生のマメ科草本である。*Medicago* 属の染色体基本数は8で、アルファルファは $2n=32$ の同質4倍体である。栽培種はムラサキウマゴヤシという和名が示すように花色が紫色であり、蝶形花の総状花序をなしており、花房は葉腋から生じた花梗に着生する。葉は3小葉の複葉であり、先端の小葉は小葉柄をもち側面の小葉より長い。草丈は開花期には80~100 cmになる。刈取りによる再生力も強く、年間の生育量も多い。干魃に強く、生産性が高く、蛋白質、ビタミン及びミネラル含量が高いことから牧草の女王と称される極めて重要な牧草である(藤本 1985, 1989, 鈴木 1992)。

紫花の *Medicago sativa* は直根で、これから生ずる支根は概して細いが、移植などにより直根が傷を受けた場合には充実した多くの支根を生じる。地際部に冠部(クラウン)を生じてこれから直立した多くの茎を出す。これらの茎は刈取りにより、再生するが、冠部は刈り残され長期間維持されるので徐々に木質化する。このほか、黄花の *Medicago sativa* spp. *falcata*、紫~白~黄の変異に富んだ花色を示す *Medicago sativa* spp. *varia* がある。これらは、耐寒性に強く、匍匐性を示すものもみられ、草型、生育量ともに変異に富んでいる。

2. 地理的分布と品種群の分化

アルファルファの栽培は南北アメリカ、ユーラシア大陸、アフリカ、大洋州に広がり、その栽培面積は約3,200万 haである。1970年~1984年の統計では、最も栽培面積の多いアメリカでは1,056万 ha、次いでアルゼンチンの750万 ha、ロシア共和国の450万 ha、カナダの250万 ha、ハンガリーの130万 haである。アジアでは中国の96万 ha、アフリカ大陸では南アフリカにおいて30万 haの作付け面積がある(Michaud 1988)。

世界の栽培種についての調査結果からアルファルファの原産地は近東のトランスコーカシアと中央アジアであると推定されている(Sinskaya 1950, Bolton 1962)。アルファルファは原産地から古代世界に入って栽培化され、B.C.200年にはローマ帝国にまで伝わり、さらに、イタリアからスペインに輸入され、A.D.800年には回教徒がアフリカに伝えている。品種分化で重要な意義をもつ

のはこの地域への導入である。数百年の間に、高温に強く再生力おう盛な品種群が分化し、これがヨーロッパへ再導入されてフランスなどでアルファルファの在来種群が成立した。フランスの在来種には5つの集団があるが、これらの中でも Flamande 群は直立型で、生産性が高く、耐寒性もかなり強い特徴を持っており、フランスのみならずアメリカ、カナダなど世界で広く栽培され、育種材料としても用いられてきた(鈴木 1961, 真木 1975, 藤本 1989)。本研究においても Flamande 群に由来する品種が供試材料のかかなりの部分を占める。

ヨーロッパに入ったアルファルファは18世紀には低温地域に栽培を拡大した。これには *Medicago sativa* ssp. *falcata* との交雑が重要な役割を果たし、雑色の耐寒性品種群が分化し、これが北米に導入されてアメリカの冷湿地帯にも広がった。この中北部への導入はドイツ人 Wedelin Grimm による34年間もの忍耐強い選抜が有名であるが(真木 1975)、このように、アルファルファは大きく異なる地域にも適応する遺伝的能力の高い牧草であり、世界各地への伝播は人間活動と環境の相互作用による選抜と淘汰によるものであり、集団改良の果たしてきた役割が高く評価されている(藤本 1978, 1984)。

第2節 菌核病菌 *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. に関する研究

1. 病原菌の分類及び性状

菌核病菌は菌核綱、碗菌目、菌核病菌科(*Sclerotiniaceae*)に属する菌類であり、ナタネの菌核病菌に代表される *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary、レンゲの菌核病菌 *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. リング及びナシの菌核病菌 *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey など11属が含まれる(青木ら 1995)。アルファルファ菌核病菌はレンゲの菌核病菌と同じ *Sclerotinia trifoliorum* である。菌核は楕円形、円筒形、球形の不整形であり、表面は粗で黒色であり、内部は乳白色または淡紅色を帯びる。菌核は地際部の茎の表面や内部に形成することが多く、形成条件によって大きさに3~10 mmの変異がある。低温・短日期になると菌核から長い柄を生じ、淡褐色で皿形・漏斗状の子のう盤を形成する。子のう盤の内部には多数の棍棒状の子のうがあり、このなかに8個の無色、単胞、楕円形の子のう胞子(大きさ $14\sim20\ \mu\times8\sim10\ \mu$)がある。この胞子は子のうから強い力で射出され風によって飛散する。子のう胞子の発芽適温は20℃であるが0℃でも感染能力をもつとされている(北原 1964, 樋浦 1964, 西原 1996)。

2. 寄主植物

Sclerotinia trifoliorum Eriks. は自然条件ではアルファルファのほか、レンゲ、シロクロバ、アカクロバ、クリムソクローバ、ベッチ、ミヤコグサなどマメ科植物に大きな被害を与える（斉藤 1960, 成田 1963, 本田ら 1973）、また、ハハコグサ、ジシバリ、タネツケバなど各種の耕地雑草にも寄生する。松浦（1946）は積雪下で人工接種を行い 30 科 103 種が感染すると報告している。

3. 分布

春と秋に 13~18℃ の気温になり、湿潤になる地域で発病が多くみられ、北アメリカ、ヨーロッパの各地で重要な病害とされている（Leath 1985）。わが国での菌核病は 1900 年に山口県においてレンゲの病害として最初の確認がされている。その後レンゲ栽培の北陸、東北地方への振興とともに積雪地帯での被害が激甚化し、1922 年に富山県農試に、1941 年には山形県農試に指定防除試験地が設立された。一方、クロバ類では北海道（成田 1963, 西原 1981, 松浦 1982）、東北、関東（西原 1961）、中国（山本 1963）、四国（木谷 1970）、南九州（新留 1970）での発生が報告されている。アルファルファ菌核病はレンゲ菌核病と同じ病原菌によって起こる病気であり、レンゲ菌核病の多いわが国ではアルファルファにも菌核病の発生が多く、その発生はほとんど全国に及んでいるものと思われる。

4. 発生の時期

子のう盤は春と秋に形成して孢子を飛散させるが、一般に春の形成は少なく、秋に多い。発生開始期は東北地方では 9 月下旬、盛期は 10 月中旬である。本田ら（1973）、Sproston（1957）は子のう盤形成と温度との関係を解析し、25℃ 以上では子のう盤の形成が阻害されたが、15~10℃ の昼夜変温によって形成が多くなることから、クロバ菌核病菌の子のう盤形成は秋季の温度低下によって誘発されるとした。また、子のう盤の成熟には光の影響が大きく、有効な波長は 300~390 nm の近紫外光であり、それより波長の長い可視光は有効でないとされている。

5. 感染の経過

菌核病菌の感染は菌核そのものを植物体に接触させても感染しない場合が多く、初期感染は子のう孢子による寄主植物への感染であるとされている。感染部位やその後の病勢の伸展は菌核病菌の種類によって異なっている。ナタネ菌核病、インゲン菌核病、桑枝枯菌核病など、*Sclerotinia sclerotiorum* による菌核病は花弁や新梢などの若齢な組織や枯死し始めた子葉や下位葉など抵抗力の弱い部位を侵入門戸とし、そこで菌糸をまん延させて

侵入力を高め、他の部位へ病斑を伸展させていく。本田ら（1977）はアルファルファと同じ病原菌であるラジノクロバ菌核病 *Sclerotinia trifoliorum* の感染経過を観察し、寄主体の弱い特定部分から侵害し、そこを起点として病斑を拡大するという経過は必ずしも一般的でなく、地上部のすべての部分に感染し、褐点病斑を形成し、積雪下でこの病斑が拡大すると報告している。アルファルファにおける発生生態はクロバとは若干異なり、積雪下で腐敗枯死する株はまれであり、融雪後病勢が進む場合が多い。南九州でも菌核病は積雪のあった年、融雪後に大発生するといわれている（新留 1967）。

第 2 章 抵抗性の発現と環境条件

菌核病は、1849 年、イギリスにおけるクロバでの発見を始めとし、アルファルファなどマメ科牧草でヨーロッパ各地や北アメリカで発病がみられ、しばしば大きな被害を与える重要な病害として報告されている（Gilbert 1917, Carroll and Lukezic 1970, Frame and Newbould 1986, Elgin *et al.* 1988）。日本では、積雪地での被害が顕著であったレンゲについて抵抗性品種の育成が試みられてきた。しかし、品種間の抵抗性の差は少なく、実用的な抵抗性品種が育成されるには到っていない（松浦 1946, 橋本 1954, 飯田 1956）。一方、アルファルファやクロバにおいても、多くの草種を侵す多犯性病害であることから抵抗性の遺伝的な品種間差異は存在しないとされ、抵抗性品種の育成はほとんど行われてこなかった（Hanson and Graham 1955, Graham *et al.* 1972, Welty and Busbice 1978, Scott 1984, Leath 1985, Elgin *et al.* 1988）。

しかし、これらの草種においても、品種間に差があるとする報告もあり（Raynal 1981, Matsuura 1985, Frame 1986）、僅かな差であっても遺伝的な差であれば、抵抗性育種が可能であると考えられた。本章ではアルファルファの菌核病抵抗性選抜を始めるに当たって、自然発病における品種間差異の有無と人工接種による検定法開発、すなわち、遺伝的抵抗性が発現する環境設定について検討することとした。

第 1 節 自然発病における品種間差異

愛知農総試のアルファルファ育種は、わが国の温暖地と暖地を対象地域としており、育成品種及び系統は低温短日期の生育が比較的早く、概して暖地における湿潤環境での適応性が高い。これらの育成系統に、寒冷地での適応性が高い品種を加え、自然発病による発病の推移及びその品種間差異の有無について検討した。

材料及び方法

愛知農総試は場で 1983 年～1985 年に育成系統の特性と生産力検定を実施した（実験 1-1）。

供試品種は暖地での適応性が高い愛系の 17 号, 18 号, 19 号, 20 号, 21 号及び, 22 号, ナツワカバ, タチワカバ, Moapa と, 寒冷地における適応性が高いキタワカバ, du Puits, williamsburg の合計 12 品種・系統とした。これら供試品種・系統の来歴は Table 1-1 に示した。

実験は 1 区 6.0 m², 無作為配列ブロック法 4 反復で実施し, 1983 年 9 月 27 日に播種した。播種法は畦間 30 cm の密条で, 播種量は 150 g/a とした。施肥は N : P₂

O₅ : K₂O の成分量で, 利用 1 年目はそれぞれ 1.7 : 3.4 : 3.4 kg/a, 利用 2 年目には 1.5 : 2.4 : 2.4 kg/a を 4 回に分けて施用した。

なお, 菌核病の発病程度は目視観察により, 枯死率は枯死畦長の測定（枯死畦長／全畦長×100）により求めた。

実験結果

菌核病の発病は 1983 年の晩秋から始まり, 当初は極く部分的な萎凋であったが, 徐々に進行した。進展期に当たる 3 月上旬から 4 月中旬にかけては萎凋部分が拡大し, 地際部が腐敗し, 倒伏が目立った (Fig. 1-1)。1 年目

Table 1-1. Varieties and strains used in the three experiments

Variety or strain	Country	Origin of breeding stock and dormant type (in parentheses)	Used in Exp.		
			1	2	3
Natsuwakaba	Japan	du Puits, USA common, Moapa, etc.	○	○	○
Tachiwakaba	Japan	Europe, Varieties of Italy	○	○	○
Moapa	USA	African (Nondormant type)	○	○	○
Williamsburg	USA	Kansas common	○	○	○
du Puits	France	Flamande group	○	○	○
Aikei-21	Japan	Natsuwakaba, Arizona C., Moapa	○	○	○
Aikei-17	Japan	LR strain, Natsuwakaba, Moapa	○	○	
Aikei-18	Japan	LR strain, Natsuwakaba, CR488-3	○	○	
Aikei-19	Japan	Natsuwakaba, LR strain, CR strain	○	○	
Aikei-20	Japan	LR strain, Natsuwakaba, CR strain	○	○	
Aikei-22	Japan	Natsuwakaba, LR strain, Arizona com., Moapa	○	○	
Kitawakaba	Japan	Ecotypes of northern Japan, Narragansett, etc.	○		
CR488-3	Japan	Natsuwakaba, Sabina, Moapa		○	○
CRSY 541	Japan	Natsuwakaba, Sabina, Moapa		○	○
Delta	USA	Dakota 12		○	○
Everest	France	Flamande group		○	○
Derby	France	Flamande group		○	○
Furez 507	Italy	(Semidormant type)		○	○
Aikei-16	Japan	Natsuwakaba, LR strain, CR strain		○	
LR43112	Japan	Europe, Varieties of Italy		○	
Europe	France	Flamande group		○	
Verneuil	France	Flamande group		○	
Furez 521	Italy	(Dormant type)		○	
ICO-2	USA	(Semidormant type)			○
ICO-7	USA	(Semidormant type)			○
Belfeuil	France	Flamande group			○
Euver	France	Europe			○
Lutece	France	Flamande group			○
Jade	France	Flamande group, Varieties of USA			○
Hongroise	France	(Semidormant type)			○
P 344	France	(Semidormant type)			○
Prosementi Bologna	Italy	(Semidormant type)			○
Resis	Denmark	Europe			○
Rhizoma	Canada	Don, Grimm			○
Haymaker	Australia	(Nondormant type)			○

Note LR strain : Selected strain for resistance to lodging.

CR strain : Selected strain for resistance to *Corticium rolfsii*.

の発病程度は Table 1-2 に示すように Moapa, ナツワカバなど早春の生育が早い品種の発病率が高かった。2年目の発病程度はやや低かったが1年目とほぼ同様な傾向がみられた。2か年平均の発病程度には、品種間に有意差が認められ、キタワカバ, du Puits, タチワカバが低く、Moapa, 愛系 21 号, ナツワカバで高かった。鈴木ら (1972) による生育型群別指数 (低温短日期における草丈伸長性が高い非休眠性の品種群を I 群から、草丈伸長性が低い短日休眠性の品種群を V 群までの五つの群とする) と発病程度との関係を見ると、I, II 群品種はいずれも発病程度が高く、III, IV 群品種は低かった。すなわち、低温短日期の繁茂性が高く生育型群別指数の低い

品種は菌核病に対して感受性が高いことが認められた。

考察

菌核病に対するマメ科牧草の品種レベルでの抵抗性の差異についてみると、わが国で研究蓄積の多いレンゲについては、菌核病に対する抵抗性の品種間差異は極くわずかとされている (橋本 1952, 飯田 1956, 末次 1960)。シロクロバでは抵抗性品種は明らかにされていないが、自然発病において比較的強い品種が存在することが知られている (Frame and Newbould 1986)。アカクロバにおいても、枯死率に品種間差異があり (松浦 1987)、一般に 2 倍体品種に比べ 4 倍体品種の枯死率がやや低く、優れた 2 倍体品種を倍加することによ

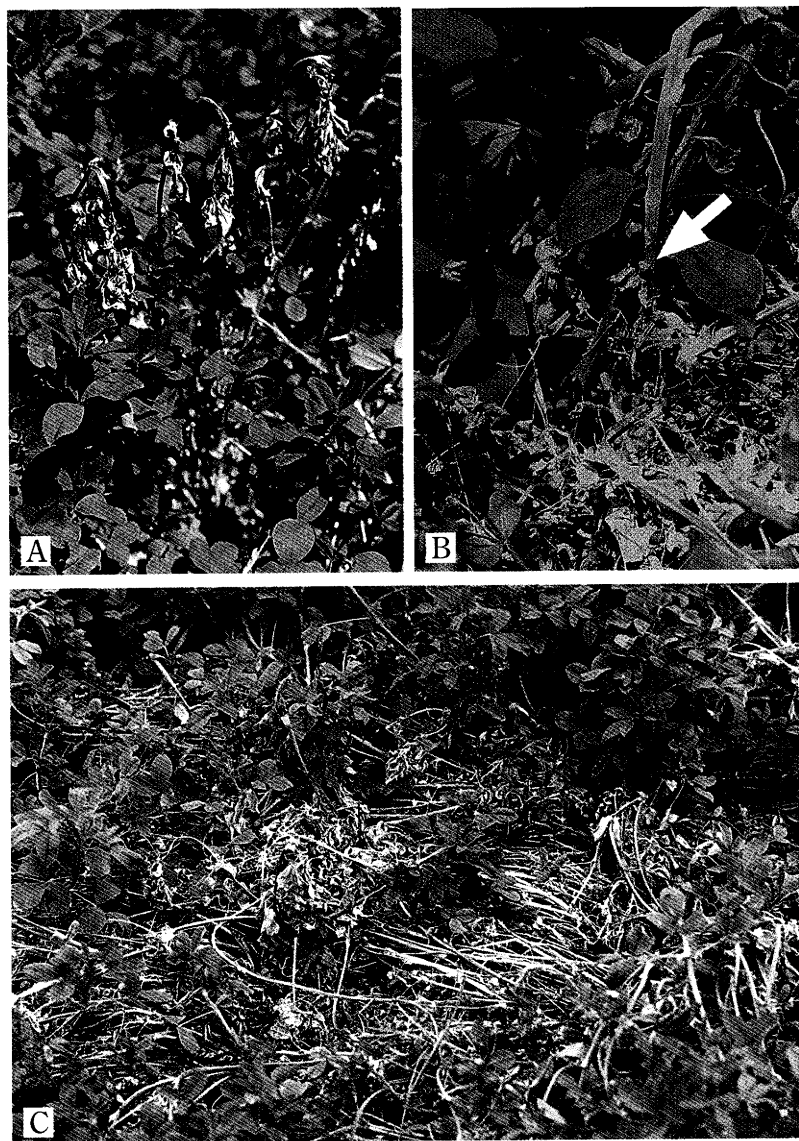


Fig. 1-1. Infected plants showing diagnostic stem eilt (A), fungal resting structures (sclerotia) found in stems and on the soil surface adjacent to dead plants (B) and typical appearance of Moapa plot with sclerotinia crown and stem rot (C).

Table 1-2. Varietal differences in susceptibility under natural infection (Exp. 1-1)

Variety or strain	Disease severity ¹⁾			Dead plants (%) ²⁾ '85.5.1	Growth rate index ³⁾
	'84.4.22	'85.3.28	Average		
Kitawakaba	1.0	0.5	0.8 a	5.5	IV
du Puits	1.0	0.5	0.8 a	7.0	III
Tachiwakaba	1.0	0.5	0.8 a	4.0	II~III
Aikei-17	1.0	1.0	1.0 ab	5.5	II
Aikei-18	1.8	1.0	1.4 ab	6.5	II
Williamsburg	2.3	0.8	1.6 ab	7.5	III
Aikei-20	1.3	1.8	1.6 ab	7.8	II
Aikei-19	1.5	1.8	1.7 ab	6.8	II
Aikei-22	1.8	1.8	1.8 ab	6.5	I
Natsuwakaba	2.5	1.5	2.0 b	6.0	II
Aikei-21	1.8	2.3	2.1 b	7.5	I
Moapa	3.5	3.0	3.3 c	8.5	I

¹⁾ Disease severity: 0=no symptoms~5=severe, Figures with different letters are significantly different at 5% level of Duncan's multiple range test.

²⁾ Length of withered parts/row length (1.5 m)×100.

³⁾ Index for classification of growth rate indicates growth of plants under short day condition: I=good ~ V=poor.

Table 1-3. Disease severity¹⁾ under natural infection in local adaptability test

Variety or strain	Yamagata	Tottori	Ishikawa	Nagasaki	Average ³⁾
Natsuwakaba	4.9	4.5	0.8	1.3	2.9 b
Tachiwakaba	4.5	4.1	1.0	0.8	2.6 ab
du Puits	4.3	3.4	1.0	0.3	2.3 a
Aikei-17	5.0	4.5	1.0	1.5	3.0 b
Aikei-18	4.8	4.6	1.0	1.0	2.9 b
Aikei-19	4.9	4.7	0.8	1.3	2.9 b
Aikei-20	5.0	4.4	1.0	1.0	2.9 b
Aikei-21	5.0	4.7	0.8	1.0	2.9 b
Aikei-22	5.0	4.4	0.5	0.8	2.7 b

¹⁾ Disease severity is recorded in 1984: 0=no symptoms~5=severe.

²⁾ Prefectural Animal Industry Experiment Station respectively.

³⁾ Figures with different letters are significantly different at 5% level of Duncan's multiple range test.

て、抵抗性が高まると報告されている (Hanson and Graham 1955, Raynal 1981, Arseniuk 1989)。アルファルファの既存品種について抵抗性の差異を認める報告は少ないが、Raynal (1981) はアカクロバに比べアルファルファの抵抗性が強く、品種間の発病程度に差があると報告している。

本実験の結果、菌核病の発病程度に僅かではあるが品種間差異があり、Moapa, ナツワカバの発病程度が高く、キタワカバ, du Puits, タチワカバが比較的強く、有意差が認められた。愛知農総試におけるアルファルファ育種は、わが国の温暖地と暖地を対象地域としており、山形県から沖縄県までの広い地域で育成系統の適応性検定試験を行っている。1983年に開始した第4次系統適応性検定試験において菌核病の発生がみられた各試験地の発

病調査の結果 (Table 1-3), 発病程度は山形, 鳥取で著しく高く, 石川, 長崎では低かった。各試験地の品種間の差は僅かであったが, 石川を除く, 山形, 鳥取, 長崎では du Puits, タチワカバの発病程度がやや低く, ナツワカバや愛系の各系統が高かった。この傾向は, 愛知でみられた品種間差異とほぼ同様であった。

このことから, 既存品種には抵抗性の品種間差異が存在すると考えられた。しかし, 晩秋から春の繁茂性の高い品種ほど発病程度が高くなる傾向がみられ, 品種の生育型群別指数と愛知での発病程度との間には $r = -0.721^{**}$ の高い相関関係が認められた。一般的に繁茂性が進んだ状態ほど叢内は過湿状態となり, 病害の発病環境に好適となるものと考えられる。逆に, 低温短日照の生育が緩慢な生育型群別指数の高い品種の発病程度は低

くなる。この生育型によって示される抵抗性は本質的な抵抗性ではなく、生育状態による罹病性の回避と考えられるので、さらに多くの品種を用いて初期生育と感受性との関係について検討する必要がある。

第2節 人工接種法の開発と品種間差異

自然発病による品種間差異から、抵抗性に遺伝的な差があり、選抜の可能性が示唆された。しかし、自然発病による検定だけでは年次による気象条件や栽培環境、区による変動が大きく精度の高い検定を実施することが難しい。特に選抜条件としては、エスケープの混入をできるだけ避けることが望ましく、均一な感染を可能にする再現性の高い検定環境、すなわち、遺伝変異が発現する環境条件を明らかにする必要があるとみられた。そこで、接種時の環境を齊一にし、発病を助長する条件を整えるため、寒冷紗被覆による検定法について検討した。

材料及び方法

愛知農総試において1983年～1984年に実験1-2及び実験1-3を実施した。

実験1-2は、ほ場において品種・系統の発病程度を安定して評価できる発病条件を見いだすため、菌核病菌接種直後の被覆方法を変えた3処理を主実験区とした。さらに、22品種・系統を副実験区に配し、分割区法2反復で行った。

主実験区の処理

A：菌接種した後、無被覆

B： “ 黒色寒冷紗被覆（遮光率58%）

C： “ 黒色寒冷紗と透明ビニール被覆

1983年9月13日に1品種当たり1.0gを畦長1.5mに条播した。培養菌は播種後約3か月目の12月15日に接種し、その後41日間被覆処理を行った。施肥は基肥として $N:P_2O_5:K_2O$ の成分で、それぞれ0.6:1.2:1.2kg/aを施用した。

実験1-3は、検定法の確認と抵抗性品種の探索を行った。被覆資材は実験1-2のC区に用いた黒色寒冷紗に比べ断熱性が高く、遮光率も85%と高い銀色寒冷紗を用いた。実験区は1品種34個体、乱塊法3反復で実施し、1984年9月26日に畦長1.5mに条播、11月上旬に間引きを行い、株間を4～5cmにした。培養菌は12月19日に接種、同日から17日間、寒冷紗被覆を行った。施肥は実験1-2と同様にした。

培養菌としては実験1-2、1-3ともに、愛知農総試のほ場において菌核病の発病が認められたアルファルファの茎から菌核を収集し、これを愛知菌株として分離培養し供試した。菌株はふすまともみ殻を1:1に混ぜた培地を用いて、10℃で10～14日間培養した。培養菌は培地

ごと1.0～1.3l/m²を株元に接種した。なお、接種前日には土壤水分を保持するため十分な灌水を行った。

菌核病の発病調査はアルファルファの株元に菌糸または菌核を確認してから行った。なお、実験1-2の生存率は目視観察により、実験1-3の生存率は個体単位で計数し求めた。

実験結果

1. 培養菌接種後の被覆法による発病の差異

実験1-2における接種41日後の生存率及び培養菌接種時の草丈をTable 1-4に示した。培養菌接種による菌核病の発病は、無被覆（A区）では少なく、90～100%の高い生存率であった。被覆処理では生存率が大きく減少し、高い処理効果が認められた。黒色寒冷紗被覆（B区）では系統平均で65.2%の生存率となり、ビニール被覆の併用（C区）ではさらに顕著な発病を示し、24.5%の低い生存率となった。

2. 品種・系統の抵抗性評価

発病が僅かであった無被覆区を除き、被覆処理BとC区の生存率について分散分析を行った結果（Table 1-5）、処理間に有意差を示しただけでなく、品種間に1%水準の有意差がみられた。また、処理と品種の間には交互作用は認められず、品種の抵抗性反応はB、C区とも同様な傾向を示すと判断された。そこで両処理区の生存率の平均値により品種評価を行った。この結果、耐倒伏性選抜系統LR43112とフランス品種Derbyはともに63%と最も高い生存率を示し、ついでEurope, Everest, Furez507, Verneuilの55～60%であった。これらはFurez507を除くと、いずれもFlamande系統群に由来するフランス品種であった。一方、Moapaをはじめナツワカバ、愛系19号、20号、21号、22号は、23～35%の低い生存率であったが、これらの品種・系統の生育型はいずれも低温短日期の草丈が高い、I、II群であった。

実験1-3の結果をTable 1-6に示した。銀色寒冷紗を使用することにより、発病が早まり、接種後17日目には発病率が50%に達したので被覆を取除いた。接種後28日目、1月16日の各品種の生存率は、フランスのLuteceが26.8%と最も高く、次いでEuver, CR488-3, Furez507、タチワカバの21～24%となり、実験1-2で高い生存率を示したDerby, Everestも比較的高い生存率を示した。また、Haymaker、愛系21号、Moapaは4.6～10.2%の低い生存率となり、低温短日期の草丈と生存率の間には $r = -0.459^*$ の相関関係があり繁茂性の高い品種は高い罹病性を示す傾向が認められた（Fig. 1-2）。しかし、これらの品種は草丈の高いグループとその他の2つのグループに分かれたが、それぞれのグループ

Table 1-4. Effects of shading on survival rate of plants after inoculation (Exp. 1-2)

Variety or strain	Survival rate (%) ¹⁾				Plant height (cm) '83.12.15
	A	B	C	Average ²⁾	
LR 43112	100	90	35	63 a	7.8
Derby	100	85	40	63 a	6.2
Europe	90	85	35	60 ab	6.3
Everest	100	80	30	55 abc	6.1
Furez 507	100	70	40	55 abc	5.9
Verneuil	100	80	30	55 abc	6.7
Delta	100	80	20	50 abcd	8.2
CR488-3	100	70	25	48 abcd	9.8
Furez 521	100	60	35	48 abcd	4.6
Aikei-16	100	65	25	45 abcde	9.3
Aikei-18	100	65	25	45 abcde	8.8
Aikei-17	100	70	20	45 abcde	11.0
Williamsburg	100	70	20	45 abcde	7.0
Tachiwakaba	90	60	25	43 abcde	8.3
CRSY 541	100	65	15	40 abcde	10.8
du Puits	100	60	15	38 bcde	6.9
Aikei-19	100	55	15	35 cde	10.1
Aikei-20	100	50	20	35 cde	10.0
Aikei-22	100	55	15	35 cde	11.0
Aikei-21	100	40	20	30 de	13.1
Natsuwakaba	100	40	20	30 de	9.5
Moapa	100	30	15	23 e	13.5
Average	99.1	65.2	24.5	44.9	8.6

¹⁾ Survival rate : Observed on '84.1.25, Treatment A ; no cover, B ; covered with cheese cloth (58 % shade), C ; covered with cheese cloth and vinylplastic film after inoculation ('83.12.15).

²⁾ Average and Duncan's multiple range test (at 5 % level) is calculated from the results of treatments B and C.

³⁾ Early vigor : 1=good~5=poor.

Table 1-5. Analysis of variance for survival rate (Exp. 1-2)

Source of variation	d.f.	m.s.	F
Treatment (T : B vs C)	1	35,601.10	639.12*
Block	1	192.03	3.45 n.s.
Error (1)	1	55.70	
Varieties (V)	21	479.28	2.48**
T×V	21	151.14	0.78 n.s.
Error (2)	42	192.91	

*** Significant at the 5 % and 1 % levels, respectively.

内では、低温短日期の草丈と生存率との間には明らかな関係は認められなかった。

抵抗性の品種間差についてみると、実験 1-1 と 1-2 において共通に供試した 11 品種の自然発病による年次平均発病程度 (Table 1-2) と人工接種による処理平均生存率 (Table 1-4) には $r=-0.798^{**}$ の高い相関関係を示した (Fig. 1-3)。このことから人工接種により、自然発病と同じ傾向の抵抗性品種間差を認めることができると

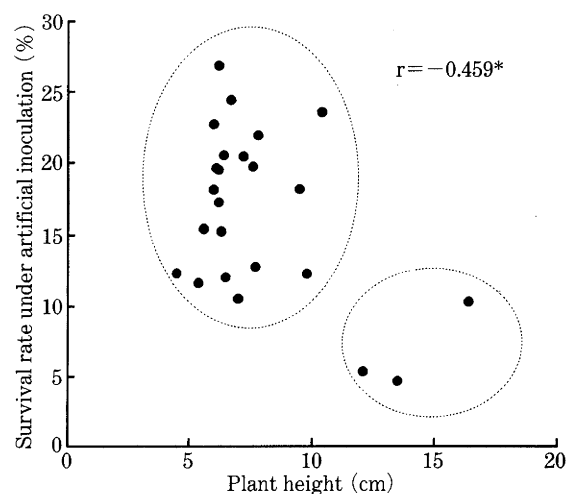
**Fig. 1-2.** Relationship between plant height and survival rate under artificial inoculation.

Table 1-6. Varietal difference in survival rate after inoculation (Exp. 1-3)

Variety or strain	Survival rate (%) ²⁾ '85.1.16	Plant height (cm) '84.12.13
Lutece	26.8 a	6.2
Euver	24.4 a b	6.7
CR488-3	23.5 a b c	10.4
Furez 507	22.7 a b c d	6.0
Tachiwakaba	21.9 a b c d	7.8
Everest	20.5 a b c d	6.4
du Puits	20.4 a b c d	7.2
Delta	19.7 a b c d	7.6
Derby	19.6 a b c d	6.1
Hongroise	19.5 a b c d	6.2
Belfeuil	18.1 a b c d	6.0
CRSY 541	18.1 a b c d	9.5
Resis	17.2 a b c d e	6.2
Jade	15.4 a b c d e	5.6
P 344	15.2 a b c d e	6.3
Prosemeti B.	12.7 b c d e	7.7
Rhizoma	12.3 b c d e	4.5
Natsuwakaba	12.2 b c d e	9.8
ICO-2	12.0 b c d e	6.5
ICO-7	11.6 c d e	5.4
Williamsburg	10.5 d e	7.0
Moapa	10.2 d e	16.4
Aikei-21	5.3 e	12.1
Haymaker	4.6 e	13.5
Average	16.4	7.8

¹⁾ Number of survival plants / number of original plants × 100.

Duncan's multiple range test at 5% level.

考えられた。また、検定年次が異なる場合においても、実験 1-2 と実験 1-3 の共通に供試した 12 品種の生存率 (Table 1-4, 1-5) には $r=0.668^*$ の有意な相関関係があり、年次による反復性は高かった (Fig. 1-4)。これらのことから、本検定法を用いることにより抵抗性の品種間差異を判別することができるとみられた。

考察

1. 遺伝的変異が発現する環境の設定

菌核病抵抗性の検定方法は、アカクロバやアルファルファで多くの研究が行われてきたが、幼植物への人工接種による方法は、植物の生育状態や再生力などにより発病程度が大きく変化するので、再現性の高い検定は難しいとされてきた (Scott 1984)。筆者らも当初は幼苗検定を試みたが、病勢の制御が困難で大部分の個体が枯死したため品種間差の判定ができなかった。

そこで、ほ場に秋播きし、自然条件で初期発病を観察できる時期 (12 月) に培養菌を接種した。その結果、生存率に有意な品種間差を検出することができた。

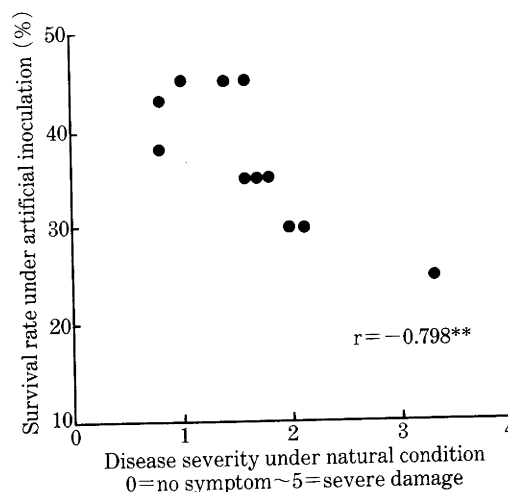


Fig. 1-3. Relationship between disease severity under natural condition and survival rate under artificial inoculation.

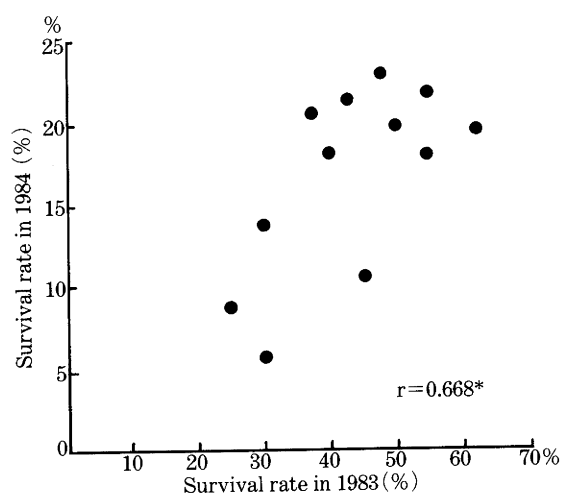


Fig. 1-4. Relationship between survival rates under inoculation in two years 1983 and 1984.

Arseniuk (1989) はアカクロバを 8 週令からハードニングすると、発病程度の品種間差異が拡大したと報告しており、昼/夜温を 15℃/10℃ から 5℃/0℃ まで 2 週間間隔で徐々に低くした処理が有効であったとしている。この温度条件は本実験における接種前 6 週間の平均気温の変化、12℃~4℃ と近似していた。すなわち、品種間差を検出可能にした理由の一つは、秋から冬にかけてハードニングさせた後、培養菌を接種したことによると考えられる。

発病環境についてみると自然発病による検定では、年次による気象条件や栽培環境による変動が大きくなり不

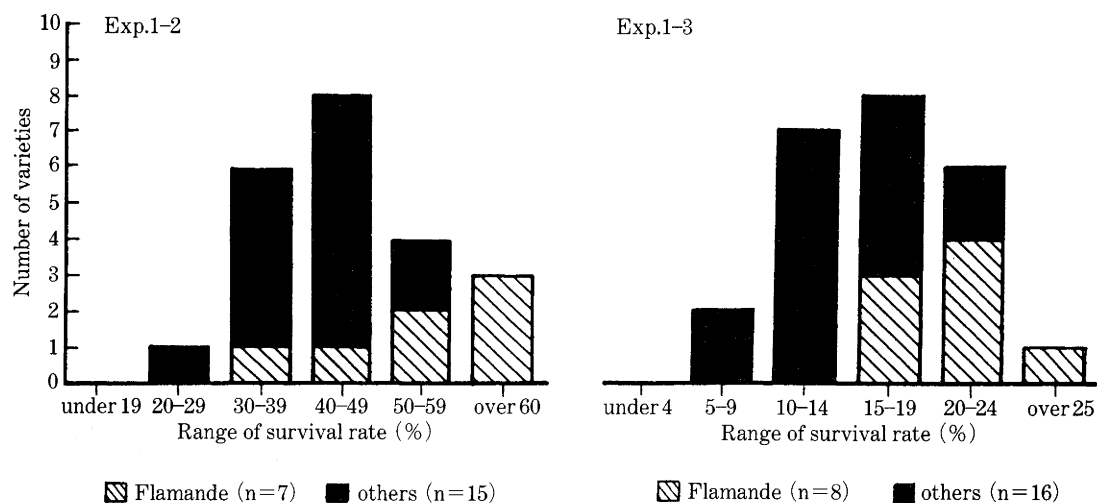


Fig. 1-5. Distribution of survival rates of Flamande group and other groups.

十分であり、とくに選抜環境としては均一な感染を可能にする人工接種が必要である。また、本実験の結果、培養菌の接種だけでは発病がほとんど認められず検定条件としては不十分であり、発病を斉一に進展させる被覆処理が必要であることが明かとなった。被覆用資材としては、黒色寒冷紗とビニールの併用が黒色寒冷紗単独より有効で顕著な発病を示した。しかし、ビニール被覆の場合、湿度を高く維持する効果は高いが温度の日格差が大きく、12月においても25℃を超える場合もあり、病原菌の活力を低下させる不安定さが残された。実験1-3では銀色寒冷紗を用いた結果、病徴の進行がさらに速やかになった。黒色寒冷紗とビニール併用との直接の比較は年次を異にするためできないが、遮光率、断熱性が高く、保湿効果をもつ銀色寒冷紗は病原菌接種後の被覆資材に適するとみられた。

本田・柚木(1978)は寒冷多雪地帯のシロクロバ菌核病の病勢伸展について、晩秋に子のう胞子感染した褐点病斑は、積雪前は拡大せず、根雪下で伸展型となり、発病腐敗が拡大することを詳細に観察している。本実験では積雪のほとんどない温暖地で、培養菌糸を接種したが、銀色寒冷紗による被覆は積雪下での条件に近い、遮光、低温、湿潤の環境条件をつくりだし、その結果、発病環境が整い、斉一に病勢が進行したと推察される。

以上のように、菌核病抵抗性検定には、ハードニング、人工接種、被覆処理の3つを組合せることが有効であり、本検定法によって抵抗性の品種間差を発現させる環境、すなわち僅かな抵抗性の遺伝的変異を発現させる選抜の場を整えることが可能になったと考えられる。

2. 抵抗性の品種間差異と育成地の環境条件

アルファルファ品種・系統の抵抗性を比較すると、自然発病ではMoapaやナツワカバが罹病しやすく、キタワカバやタチワカバ、du Puitsが比較的強いことが認められ(Table 1-2, 3)、生育型群別指数と発病程度の間には -0.721^{**} の高い相関関係が認められた。人工接種でもMoapa, Haymaker, 愛系21号など生育型でI群(非休眠性)を示す品種の生存率が低く、これらは菌核病に対して罹病性とみられた(Table 1-4, 6)。しかし、これらの3品種を除くと生育型と抵抗性の間には明かな関係は認められず、生育型だけでは抵抗性を評価することはできなかった。

一方、実験1-2において生存率の高かったLR43112(Europeとイタリー品種を母材とする耐倒伏性選抜系統)とDerby、実験1-3で生存率の高かったLutece, EuverはいずれもFlamande系統群に由来する品種であった(INRA 1984)。そこで、Flamande系統群由来の品種とその他の品種とに分けて生存率による頻度分布を比較すると(Fig. 1-5)、Flamande系統群由来の品種は、生存率の高い範囲での分布が多く、菌核病に対する抵抗性遺伝子を持つグループと考えられる。この系統群は、北フランスの在来種である。この地帯は秋から冬にかけての日照が少なく湿潤な地域も多く、菌核病の発病が多いとされており(Gilbert and Bennett 1917, Leath 1985)、Flamande系統群の抵抗性は、自然発病による罹病性個体の淘汰が北フランスの環境である程度進むことによってもたらされたと推察される。

は場条件で人工接種によって検定したアルファルファ

Table 2-1. Alfalfa varieties and strains used in Exp. 2-1, 2

Variety or strain	Breeding procedure and objective
SR58-3	Selected strain for resistance to <i>S. trifoliorum</i> for three generations in field inoculation tests
SR58-5	Strain advanced to two selection generations from SR58-3 in field inoculation test
SR58-6 Y	Strain advanced to one selection generation from SR58-5 in a nursery inoculation test (Growth condition : 16°C・9 hr daylength)
Natsuwakaba	Japanese variety adapted to warm southern regions in Japan
Tachiwakaba	Japanese variety with lodging resistance
Kitawakaba	Japanese variety adapted to the conditions of northern Japan
Moapa	USA variety resistant to spotted alfalfa aphid
du Puits	French variety of Flamande type
Thor	USA variety resistant to bacterial wilt

の菌核病抵抗性には品種間差異があり，導入品種，育成系統ともに，品種の由来を反映した差が認められた。したがって，菌核病への抵抗性で認められた品種間差異は大部分遺伝的であると考えられる。しかし，既存品種の抵抗性程度は実用レベルの抵抗性としては極めて低く，不十分であり，今後は世代を重ねた選抜実験により，抵抗性を強化した品種育成に結び付ける必要がある。この抵抗性選抜には，本実験で得られたほ場検定法が有効な方法になると考えられる。

第3節 育苗環境と抵抗性

植物のもつ病害抵抗性は，生理・生化学的な機作，形態的あるいは組織学的な機作と，これらの複合によって発現する。したがって，植物が生育する環境条件，生育ステージと抵抗性の発現には密接な関連がある（中根1987, 古賀 1990）。一般に植物は加齢により抵抗性が高まるといわれているが，金子（1983）は抵抗性が微動遺伝子によるトウモロコシのベト病を例にとり，できるだけ早期に選抜の目的を達成するためには発病条件を厳しくして選抜強度を高めればよいが，収量その他の優良な形質が失われたり，遺伝的変異性が狭められおそれがあると指摘した。そのため，適正な選抜強度を保持することが大切であり，発病条件を意のままに作り出しうる接種技術の開発が必要であると述べている。アルファルファの菌核病においても抵抗性育種を進めるためには，育種目標の達成までに必要とされる選抜世代を予測し，近交弱勢がでないような交配集団の大きさを決定し，エスケープの少ない選抜を行うことが求められる。このためには，検定精度を高めるとともに，生存可能な抵抗性個体数を制御できるような検定条件，すなわち植物齢・育苗環境と抵抗性発現との関係について明らかにする必要があると考えられる。

材料及び方法

草地試験場において1991年～1992年に実験2-1及び

Table 2-2. Growth conditions of seedlings in Exp. 2-2

Temperature	Daylength	Growth period (Mon. & Date)	Photoperiodic control
23°C	16.0 hr	9.11-11.26	Artificial lighting
23	10.3	do.	Natural condition
16	16.0	4.8 - 6.17	Artificial lighting
16	9.0	do.	do.
6	16.0	10.15-12.24	do.
6	9.0	do.	do.

実験2-2を実施した。供試品種・系統はTable 2-1に示す菌核病抵抗性選抜系統と日本育成及び代表的な外国育成品種とした。抵抗性選抜系統SR58-3, SR58-5は第4章で詳述する選抜研究（神戸ら 1987）により得られた系統の一部であり，ほ場での抵抗性選抜をそれぞれ3世代と5世代加えたものである。各実験の処理及び調査方法は次のとおりである。

実験2-1. 品種・系統の育苗期間と抵抗性の発現

アルファルファは選抜1系統SR58-6Yを除く8品種・系統を供試した。ガラス温室（16°C/10°Cの昼夜変温，自然日長）で1991年10月11日から12月8日まで2週間間隔で5回にわたって播種し，2週令から10週令まで生育ステージの異なる幼苗を育てた。育苗は供試品種・系統を40×60 cmの苗箱に6 cm間隔で条播し，系統当たり35個体を養成した。菌核病菌は愛知農総試と草地試のアルファルファから分離した各1菌株（愛知菌株と栃木菌株）を用いた。それぞれふすまともみ殻を1:3に混ぜた培地を用いて10°Cで14日間培養し，苗箱当たり600 ccを培地ごと接種した。接種後は10～16°Cの室内でビニールと寒冷紗で3日間，さらに約50%個体が萎凋するまでの5日間，寒冷紗で被覆した。その後，約25°Cの温室に搬入し，接種20日後に生存率を調査した。実験区は分割区法2反復とした。

実験2-2. 育苗期の温度・日長条件と抵抗性の発現

Table 2-3. Survival rate of varieties and strains of alfalfa inoculated at different growing stages (Exp.2-1)

Variety or strain	Weeks age after sowing ¹⁾				
	2	4	6	8	10
Tochigi isolate					
SR 58-5	0.0	1.7	0.0	7.3	27.5 a ²⁾
SR 58-3	0.0	3.2	2.7	3.4	23.2 a
Natsuwakaba	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0 b
Tochigi isolate	0.0 ns	4.0 ns	0.0 ns	3.6 ns	5.6 b
Kitawakaba	0.0	0.0	1.5	1.6	4.7 b
Moapa	0.0	1.5	0.0	0.0	6.4 b
du Puits	0.0	0.0	1.9	0.0	7.3 b
Thor	0.0	1.4	0.0	0.0	9.1 b
Average	0.0	1.7	0.8	2.0	10.5
Aichi isolate					
SR58-5	0.0	1.6	3.0	11.7 a ²⁾	34.9 a ²⁾
SR58-3	0.0	8.6	1.4	7.0 ab	30.7 a
Natsuwakaba	0.0	3.0	0.0	0.0 c	5.6 b
Tachiwakaba	0.0 ns	4.1 ns	1.5 ns	8.5 ab	12.5 b
Kitawakaba	0.0	4.4	1.6	3.2 bc	11.8 b
Moapa	0.0	1.6	5.0	0.0 c	7.8 b
du Puits	0.0	5.4	0.0	3.0 bc	9.8 b
Thor	0.0	5.0	0.0	0.0 c	3.2 b
Average	0.0	4.2	1.6	4.2	14.5
Average of :					
Plant height (cm)	2.8	3.7	6.1	10.2	12.6
Leaf number	1.0	2.3	4.3	6.8	8.7

¹⁾ Growth conditions : 16/10°C, natural day-length (9.7-11.5hr).²⁾ Duncan's multiple range test at the 5% level.**Table 2-4.** Analysis of variance for survival rate of 4 stages excluding 2 weeks shown in Table 2-3

Source of variation	df	ms	F
Growing stages (S)	3	841.37	29.56**
Block	1	176.25	6.19*
Error (1)	3	28.46	
Isolate (I)	1	182.88	4.28
S×I	3	14.54	0.34
Error (2)	4	42.76	
Varieties (V)	7	207.89	16.46**
S×V	21	97.32	7.71*
I×V	7	8.64	0.68
S×I×V	21	9.48	0.75
Error (3)	56	12.63	
Total	127		

*, ** Significant at the 5% and 1% levels, respectively.

供試材料は実験 2-1 の 8 品種に SR58-6Y (SR58-5 を材料として幼苗選抜を 1 世代行った系統) を加えた 9 品種・系統とした。育苗期間の温度条件と日長条件を変え

て実験を行った。温度条件は 1992 年に人工気象室とガラス室で平均温度 23°C, 16°C, 6°C の 3 段階で育苗し、それぞれに長日と短日区を設けた。各処理区の温度及び日長条件は Table 2-2 に示した。播種後 10 週目に愛知菌株を接種した。育苗及び培養菌の接種方法は実験 2-1 に準じた。調査は接種 14 日後の生存率について行った。実験区は無作為配列ブロック法で 23°C 区は 3 反復、16°C, 6°C 区は 4 反復とした。

実験結果

実験 2-1. 品種・系統の育苗期間と抵抗性の発現

病徴進展が停止した接種後 20 日目の生存率を Table 2-3 に示した。栃木菌株、愛知菌株とも 2 週苗区では供試系統の全個体が枯死し、4 週～8 週苗区においても品種・系統の平均生存率は 0.8～4.2% と低かった。さらに生育が進み品種・系統平均の草丈が 12.6 cm, 葉齢は 8.7 に達した時期に接種した 10 週苗区では、生存率は栃木菌株の平均 10.5%, 愛知菌株は平均 14.5% になった。

それぞれの育苗期間における品種・系統の生存率の多重検定では、栃木菌株を接種した場合は 10 週苗区にお

いて、愛知菌株を接種した場合は8週区と10週苗区において有意差が認められた。特に10週苗区では両菌株とも選抜系統SR58-5、SR58-3の生存率が大きく向上し、他の品種に比べ有意に高い生存率を示した。選抜系統を除く既存品種間では明らかな差は認められないが、タチワカバ及びキタワカバはナツワカバに比べやや高い生存率を示した。

全個体が枯死した2週苗区を除く4～8週苗区について分散分析を行った結果、育苗期間と品種・系統にはそれぞれ1%レベルの有意差があり、交互作用にも5%レベルの有意差が認められた (Table 2-4)。また、菌株間には有意差が認められなかったが、栃木菌株は愛知菌株よりやや強い病原力を示した。しかし、品種・系統の生存率における栃木菌株と愛知菌株の相関関係は高く、8週苗で $r=0.958^{**}$ 、10週苗で $r=0.924^{**}$ となり、両菌株に対する品種・系統間の抵抗性強弱反応の差は認められなかった。

実験 2-3. 育苗期の温度・日長条件と抵抗性の発現

アルファルファの生育状況は Table 2-5 に示すように、温度と日長の組合せにより異なり、草丈伸長は $6^{\circ}\text{C} \cdot 9$ 時間日長では品種・系統平均で5.6 cmと低かったが、 $23^{\circ}\text{C} \cdot 16$ 時間日長では32.7 cmと約6倍の草丈を示した。この育苗環境と病原菌接種後の生存率との関係についてみると、 23°C の長日及び短日区ではともに生存率が低く、品種・系統間に有意差はなかったが、 16°C 、 6°C の温度条件ではそれぞれ長日区、短日区ともに品種間差異が認められた。 16°C では短日区での生存率が高かったのに対し、 6°C では逆に長日区での生存率が高かった。

Table 2-5 の処理区ごとの分散分析を Table 2-6 に示した。 $16^{\circ}\text{C} \cdot 9$ 時間日長は他の処理区に比べ明らかにF値が大きく、品種・系統間の差異が明瞭であることを示した。すなわち、本実験での6条件の中では $16^{\circ}\text{C} \cdot 9$ 時間日長が抵抗性検定に最も有効な育苗環境とみられた。

考察

Welty and Busbice (1978) は菌核病抵抗性のほ場検

Table 2-5. Survival rate of varieties and strains under different growth regimes for ten weeks (Exp. 2-2)

Variety or strain	23°C		16°C		6°C	
	16 hrDL ¹⁾	10 hrDL	16 hrDL	9 hrDL	16 hrDL	9 hrDL
SR 58-6 Y	—	—	24.1 a ²⁾	39.8 a	32.6 a	9.1 a
SR 58-5	4.2	16.7	17.6 ab	24.1 b	15.2 b	6.7 ab
SR 58-3	2.8	5.6	—	—	—	—
Natsuwakaba	1.4	8.3	3.7 c	6.5 cd	0.8 c	0.0 c
Tachiwakaba	0.0 ns	2.8 ns	4.6 c	6.5 cd	1.5 c	0.0 c
Kitawakaba	2.8	8.3	8.3 c	13.0 c	10.6 bc	1.5 c
Moapa	0.0	0.0	1.9 c	3.7 d	0.8 c	0.0 c
du Puits	2.8	1.4	10.2 bc	8.3 cd	6.6 bc	3.0 bc
Thor	0.0	0.0	4.6 c	1.9 d	3.0 c	0.0 c
Average	1.8	5.4	9.4	13.0	8.9	2.5
Plant height (cm)	32.7	19.7	30.4	15.8	11.6	5.6
Leaf number	10.7	9.3	10.0	8.9	6.4	5.2

¹⁾ Photoperiod (day-length). ²⁾ Duncan's multiple range test at the 5% level.

Table 2-6. F value in analysis of variance for survival rate in each treatment shown in Table 2-5

Source of variation	23°C			16°C			6°C		
	16 hrDL ¹⁾		10 hrDL	16 hrDL		9 hrDL	16 hrDL		9 hrDL
	df	F	F	df	F	F	df	F	F
Variety	7	2.45	2.56	7	7.03**	25.62**	7	9.63**	5.65**
Block	2	0.23	1.73	3	8.54	1.03	3	0.62	1.48
Error	14	—	—	21	—	—	21	—	—
Total	23	—	—	31	—	—	31	—	—

¹⁾ Photoperiod (day-length).

** Significant at the 1% level.

定において系統間差異があることを認めた。しかし人工環境下での検定では同様な結果を認めることができなかった。このことから、栽培環境への適応性の差が発病程度の差として発現したのであって、抵抗性の遺伝的な品種間差異は存在しないと推論した。抵抗性選抜系統を用いて育苗環境を異にする条件で抵抗性検定を行った本実験の結果、抵抗性選抜を行った SR 系統には高い選抜効果が認められ、中でも 6 世代の抵抗性選抜を行った SR58-6 は 16°C 以下の育苗条件で既存品種に比べ有意に高い抵抗性を示した (Table 2-5)。既存品種では寒冷地適応性の高いキタワカバ, du Puits が低温短日期の繁茂性が高い Moapa, ナツワカバに比べやや高い抵抗性を示すものの、有意差は認められなかった。このことから従来の品種だけでは抵抗性の有無について明らかにすることができないが、高い抵抗性を示す選抜系統を用いることにより、抵抗性の発現要因、その機作及び遺伝性を解明することができると考えられる。

アルファルファは温暖地では通常秋播きされるが、これらの地域では播種年に菌核病が発生すると、罹病株の大部分が枯死する。アルファルファの株が十分成熟した播種後 2 年日以降の発病では枯死にいたる株は少なく、とくに若令期に被害が大きいことが知られている (Elgin *et al.* 1988)。抵抗性選抜系統と市販品種を用いて病原菌接種検定を行った本研究では、2 週令から 8 週令における接種では生存率が低く、10 週令まで生育を進めることによって生存率が高くなった。生存率の向上は抵抗性選抜系統で大きく、分散分析の結果、育苗期間と品種・系統の主効果及び育苗期間と品種・系統間の交互作用に有意差が認められた。このことから、抵抗性選抜系統は 10 週前後 (8 葉展開期) まで育苗することにより、抵抗性の発現が顕著になると推察された。

抵抗性選抜系統は愛知と栃木の菌株に対してともに生存率が高く、菌株間には高い相関関係が認められたことから、両菌株に対する品種・系統の抵抗性反応は同じであると考えられる。菌株の病原性の差異についてはさらに多くの地域からの菌株を収集して検討する必要があるが、愛知菌株は発病の進行が緩やかで病徴の差異をとらえやすいことから、菌核病抵抗性検定により適した菌株とみることができた。

Arseniuk (1989) は、アカクローバの菌核病抵抗性検定について 6 週間にわたって徐々に育苗温度を下げることによって抵抗性が発現することを報告している。アルファルファ菌核病においても、本実験の結果、16°C・短日 (9 時間日長) 条件は最も生存率が高く、系統間差異が明らかとなった。

アルファルファの幼苗期の生育適温は 15°C から 25°C であり (Garza *et al.* 1965, Cameron 1973) 温度が低下するに従って徐々に生育が減少し、5°C では葉の伸展も停止する (Harding and Sheehy 1980)。日長条件については、15 時間から 18 時間の長日条件で生育が促進すると報告されている (Sato 1971, 神戸ら 1979)。また、菌核病に対する抵抗性はエイジの進展に伴い高まることから、抵抗性を発現させるためには、ある程度の生育量の確保も必要である。このため、アルファルファの生育下限温度域に当たる設定温度 6°C では、短日 (9 時間日長) より、むしろ生育量が増加する長日 (16 時間日長) 条件が有効に作用したとみられる。一方、16°C・短日条件では個体の充実とハードニングが並行して進むことにより、高い抵抗性発現効果を示したと推察される。

また、この温度条件における各系統の生存率について長日区に対する短日区の増加量を比較すると、抵抗性選抜が行われていない市販品種では増加量は低く、-2.7~4.7% であったが、選抜系統 SR58-5 では 6.5%, SR58-6 Y では 15.7% の増加がみられた。このことから選抜系統では抵抗性の発現効果が高くあらわれ、特に 16°C・短日条件で幼苗選抜した SR58-6Y が高い効果を示したことから、抵抗性の発現に適した育苗環境の設定が選抜効果を高めるために不可欠であると考えられる。

第 3 章 菌核病菌の病原性と抵抗性の機作

植物は、その進化の過程で、共進化の形で病原菌や害虫に対する抵抗性機構を獲得してきた。植物が病原菌の感染を受けると、寄主と病原菌の間に栄養関係が成立する。その後、病原菌が寄主体内に蔓延して寄主細胞が死滅すると、肉眼的に病徴があらわれるが、病勢進展はしばらくすると停止する場合が多い。すなわち、生体はあらかじめ外敵の侵害に対して抵抗する仕組みをもっており、それによって病勢の進展を衰えさせる機構を保持している (松本 1991)。アルファルファの菌核病についても茎葉が枯死した後、自然回復する個体がみうけられる。発病状態によって、回復の程度は大きく異なるが、そこには何らかの抵抗性機構が関与しているものと考えられる。

植物の病害抵抗性は遺伝的には質的な抵抗性を示す主動遺伝子抵抗性、量的な抵抗性を示す微動遺伝子抵抗性及びこれらの複合によってあらわれる。主動遺伝子抵抗性による場合はそれに対応した病原性遺伝子の相互反応関係が成り立ち、レースが出現する可能性が高いが、微動遺伝子抵抗性の場合にはイネいもち病のほか抵抗性に代表されるように一般的にレースは認められない場合が多

い(横尾 1983)。また、抵抗性の機構を基準にすると化学的抵抗性と物理的抵抗性とに分けることができる。化学的抵抗性はファイトアレキシンのような抗菌性物質により病原菌を殺す働きであり、アルファルファでは、クメステロール、メジカルピンなどが知られている(谷利一 1990)。一方、物理的抵抗性は植物表層のワックスやクチンが病原菌の侵入を阻止する、あるいは感染後に起こる寄主細胞の反応には細胞壁のリグニン化、細胞壁への物質付着などにより、病原菌のある程度以上の伸展を抑える働きである(Dickinson and Lucas 1982)。本章では各地で収集した菌株の病原性について比較するとともに、選抜系統と感受性系統の病理解剖学的観察により抵抗性の機作について検討を行った。

第1節 収集菌株による病原性の差異

菌核病は自然条件ではほとんどのマメ科牧草に被害を与えるほか、耕地雑草を侵す多犯性病害であり(松浦 1946)、この病原菌の寄生性の分化についての報告はみられない。しかし、レンゲの菌核病では、病原性の異なる菌株があり、寒冷積雪地の菌株は強い病原性を示すと報告されている(橋岡 1954)。筆者は第1章に示した愛知農総試及び系統適応性検定試験地におけるアルファルファの自然発病の結果(Table 2-3)から、山形、鳥取では発病程度が高く、石川、長崎、愛知では低い傾向を認めた。そこで、国内の各試験地から菌核を収集し、菌を分離しその温度反応と病原性の差異を比較した。

材料及び方法

アルファルファほ場において菌核病の発病がみられた系統適応性検定試験地及び北海道農業試験場から収集された菌株を供試、温度条件による菌糸の伸長、ほ場及び幼苗検定における病原性の差異を比較するため、次の3実験を行った。このうち、実験3-1と3-2は愛知農総試で1985～86年に、実験3-3は1990年に草地試験場において行った。菌株収集地及び気象条件をTable 3-1に示した。

実験3-1 菌株による菌糸伸長の温度反応

山形、新潟、鳥取、愛知、長崎の試験地で収集された菌核から菌を分離しそれぞれを25℃、15℃、5℃の3段階の温度条件で培養し、菌叢の広がる速さを調査した。調査方法は直径90 mmのシャーレを用い、PDA培地を流し込み、固化後、培地の中央に伸長おう盛な菌糸3 mm角を移植し、菌叢の直径を毎日、定時に測定した。実験区は4反復とした。

実験3-2 ほ場検定による菌株の病原性の差異

5種類の菌株をナツワカバ、タチワカバ、キタワカバの3品種と育成9系統の合計12品種・系統に接種し、発病推移を調査した。実験区は1品種30個体、分割区法2反復で実施した。1986年10月5日に畦長1.5 mに条播、11月上旬に間引きを行い、株間を5 cmにした。培養菌はふすまともみ殻を1:3に混ぜた培地を用いて培養し、3月11日に区当たり600 ccを地際部に接種した。同日から3週間、寒冷紗(遮光率85%)で被覆を行った。

実験3-3 幼苗検定による菌株の病原性の差異

新たに収集した北海道と栃木の菌株を加えた6菌株を用いて、実験2-1とほぼ同じ方法で接種した。アルファルファは菌核病で5世代選抜したSR58-5と市販の6品種、合計7品種・系統とした。1990年の2月17日に50×40 cmのコンテナに7 cm間隔で各品種・系統を条播し、1品種・系統当たり34個体を養成し、5反復で実施した。これらを15～18℃のガラス温室において自然日長で10週間育苗し供試した。

実験結果

実験3-1 菌株による菌糸伸長の温度反応

菌糸の伸長はFig. 3-1に示すように、15℃が最も早く、ついで25℃、5℃の順であった。15℃では5日目には菌叢が90 mmのシャーレ全面に広がった。各菌株とも伸長が早かったので菌株間に差を認めることができなかった。25℃では初期の菌糸伸長は早かったが、4日目以降、菌株による伸長の差が明瞭になった。長崎、愛知

Table 3-1. Collection sites of isolates of *Sclerotinia trifoliorum*

Isolate	Sites	Ave. air temperature (°C)		Snow coverage days
		Sept. to Nov.	Jan.	
Hok-89	Hokkaidou Natl. Agri. Exp. Sta., Sapporo	9.7	-6.2	110
Yam-86	Yamagata Animal Industry Exp. Sta., Higashine	12.7	-1.8	98
Toc-89	Nati. Grassl. Res. Inst., Nishinasuno	14.5	-0.9	—
Nig-86	Nigata Agric. Exp. Sta., Nagaoka	15.2	0.2	89
Tot-86	Tottori Animal Industry Exo. Sta., Akasaka	17.1	4.0	—
Aic-86	Aichi Agric. Res. Center, Nagakute	17.4	3.9	—
Nag-86	Nagasaki Animal Industry Exp. Sta., Isahaya	17.4	4.4	—

Data from Nati. Grassl. Res. Inst. (1983)⁽⁸³⁾

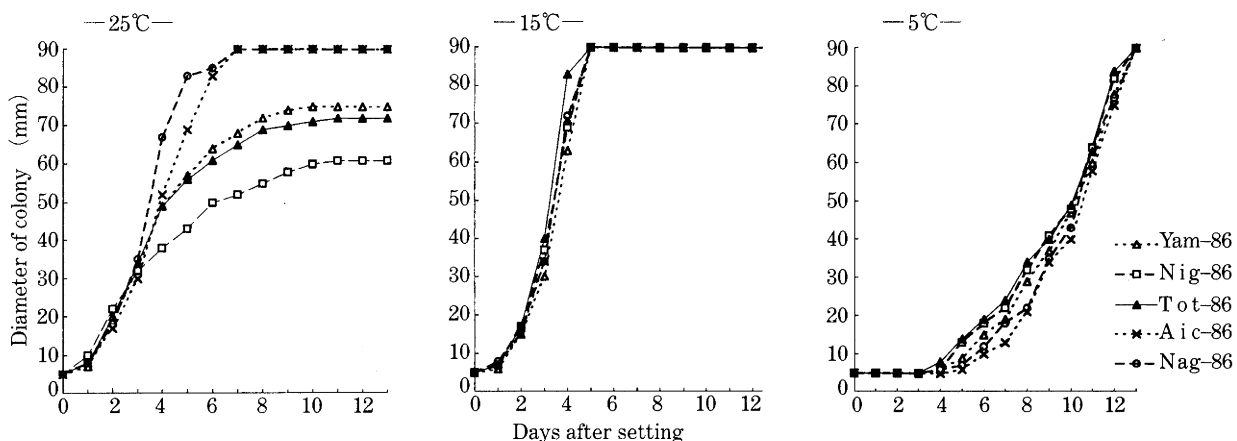


Fig. 3-1. Extent of mycelial colony of each isolate in different temperature conditions.

の菌株は引き続き伸長が進み、7日目には90 mmに達したが、山形、鳥取、新潟の菌株は伸長が緩慢になり、9日目以降、伸長が停止した。特に新潟の菌株の伸長が緩慢になった。5°Cでは各菌株とも菌糸伸長が遅くなったが13日目には全菌株とも90 mmに達した。菌株間の差は少なかったが、愛知、長崎の菌株は鳥取、新潟、山形の菌株に比べ、やや伸長が遅れる傾向がみられた。これらのことから、菌糸伸長の温度反応は菌株によって異なり、山形、鳥取、新潟の菌株は愛知、長崎の菌株に比べ、高温条件での伸長が劣り、低温条件での伸長がやや優るとみられた。

実験 3-2 は場検定による菌株の病原性の差異

発病率には菌株により差がみられ、Fig. 3-2に示すように、接種後20日目では愛知、長崎の菌株は約15%の発病率であったが、山形、鳥取、新潟の菌株では39～49%の発病がみられた。接種後25日目以降も愛知、長崎の菌株に比べ山形、鳥取、新潟の菌株は高く推移し、45日目には山形、鳥取の菌株は90%を越える発病率を示した。この頃には愛知、長崎の菌株の病勢も進み77～78%の発病率に達した。新潟菌株の発病率はやや低下し、愛知の菌株と同程度の75%であった。このことから、山形、鳥取の菌株は愛知、長崎の菌株に比べ強い病原性を示すことが認められた。また、新潟の菌株は山形、鳥取の菌株に比べ初期の発病率は同程度かやや高いが後半の勢いは劣る傾向が見られた。

接種後25日目の品種・系統の発病程度をTable 3-2に示した。各菌株とも耐湿性選抜系統HR533-4の発病程度が最も低く、菌株平均で3.2であった。次いで、菌核病抵抗性で2世代の選抜をおこなったSR581-2、SR582-2がそれぞれ3.7、4.3であった。選抜を1世代行った

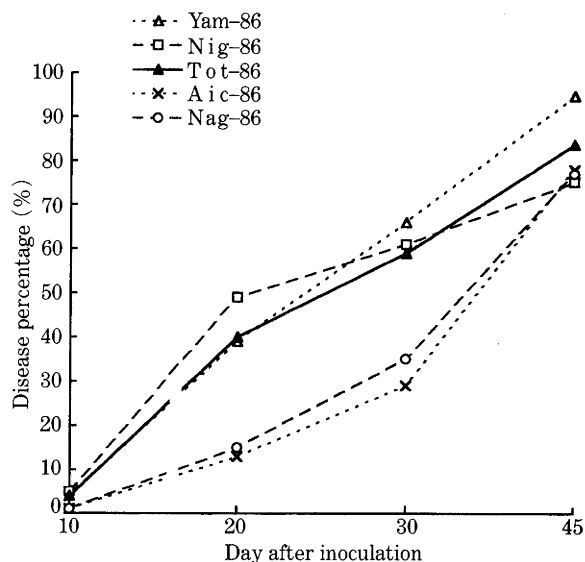


Fig. 3-2. Increase of disease percentage of isolates in field test.

SR591-1～SR595-1の5系統は4.5～7.0とバラツキが大きかった。この発病程度について菌株間の相関関係をみると、Table 3-5に示すように10組合せ中4組合せについて5%水準の有意差が認められ、愛知の菌株と積雪の多い山形、新潟、鳥取菌株との間に、それぞれ5%水準の有意な相関関係がみられた。

実験 3-3 幼苗検定による菌株の病原性の差異

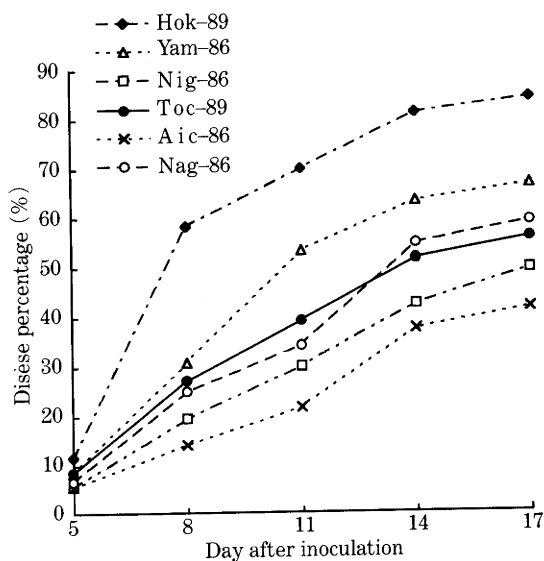
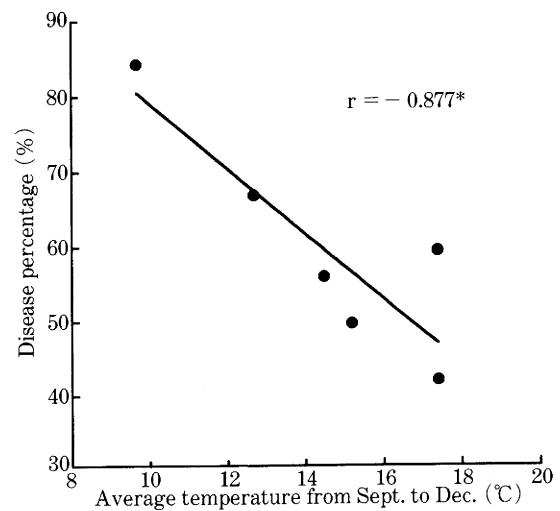
さらに6種類の菌株について、発病率の推移をみると、Fig. 3-3に示すように北海道の菌株が最も高く推移した。次いで山形の菌株であり、これらの菌株は長崎、栃木、新潟、愛知の菌株に比べ高い発病率を示し、菌株間に有意差が認められた。また、菌株収集地の9月から

Table 3-2. Disease intensity of isolates found on disease severity after inoculation in field test (Exp. 3-2)

Variety	Isolate of <i>Sclerotinia trifoliorum</i>					
	Yam-86	Nig-86	Tot-86	Aic-86	Nag-86	Average ¹⁾
SR 591-1	9.0	7.0	6.0	4.0	2.0	5.6 cde
SR 592-1	7.0	6.0	5.5	2.5	2.0	4.6 abc
SR 593-1	8.0	8.5	8.0	5.5	5.0	7.0 e
SR 594-1	8.0	6.0	6.0	2.0	5.0	5.4 cd
SR 595-1	6.5	5.0	5.0	2.5	3.5	4.5 abc
SR 581-2	4.0	6.5	3.0	2.0	3.0	3.7 ab
SR 582-2	5.5	6.5	3.5	3.0	3.0	4.3 abc
Natsuwakaba	7.5	7.0	7.5	4.0	6.5	6.5 de
Tachiwakaba	7.5	7.0	7.5	3.0	3.0	5.6 cde
Kitawakaba	6.0	4.5	7.5	3.5	4.5	5.2 bcd
CR488-3	6.0	5.5	8.0	3.0	2.0	4.9 bc
HR533-4	4.0	4.0	3.5	2.0	2.5	3.2 a
average ¹⁾	6.6 ^a	6.1 ^a	5.9 ^a	3.1 ^b	3.5 ^b	5.0

¹⁾ Duncan's multiple range test at the 5% level.

²⁾ SR591-1~595-1 and SR581-2,582-2 : Selected strain for resistance to *S. trifoliorum* and numbers after hyphon(-) indicate generations at which strains were selected. CR 488-3,HR 533-4 : Selected strain for resistance to *Corticium rolfsii* and humid soil, respectively.

**Fig. 3-3.** Increase of disease percentage of isolate in seedling test.**Fig. 3-4.** Correlation between autumn temperature and disease percentage in each isolate.

11月の気温と、発病率との間には $r = -0.877^*$ の高い相関関係があり (Fig. 3-4), 第1次感染期にあたる秋の気温が低い地域で収集した菌株ほど強い発病を示す傾向が認められた。さらに、生存率についてみると、Table 3-3示すように供試品種・系統平均の各菌株の生存率は発病率の高かった、北海道、山形の菌株で低く、他の温暖地菌株との間に有意差が認められた。これらのことから、菌株の病原性には差がみられ、寒冷地域の菌株は温

暖地域の菌株に比べ強い病原性を示すと考えられた。

菌株に対する抵抗性の系統間差異についてみると、抵抗性選抜系統 SR58-5 は菌株平均で 62.5% の高い生存率となり、いずれの菌株に対しても強い抵抗性を示した。また、市販品種の抵抗性はタチワカバ、キタワカバ>Thor, ナツワカバ, du Puits>Moapa の順となった。菌株と品種との関係では分散分析の結果 (Table 3-4), それぞれの主要因である、菌株間及び品種間には高い有意差が認められたが、菌株と品種による交互作用には有意

Table 3-3. Differences of disease intensity of isolates in young plant test judged by survival rate of plants after inoculation (Exp. 3-3)

Variety	Isolate of <i>Sclerotinia trifoliorum</i>						Average ¹⁾
	Hok-89	Yam-86	Nig-86	Toc-89	Aic-86	Nag-86	
SR58-5	62.4	52.4	62.9	65.9	63.5	67.6	62.5 a
Tachiwakaba	32.4	42.4	51.8	48.2	51.8	38.2	44.1 b
Kitawakaba	26.5	36.5	48.2	61.2	45.3	40.6	43.0 b
Thor	24.7	28.2	40.0	43.5	39.4	26.5	33.7 c
Natsuwakaba	15.3	18.8	31.8	38.2	48.2	30.6	30.5 c
du Puits	20.6	21.8	39.4	32.9	38.8	28.8	30.4 c
Moapa	4.1	7.6	21.2	14.1	37.1	6.5	15.1 d
average ¹⁾	26.6 ^a	29.7 ^a	42.2 ^c	43.4 ^{cd}	46.3 ^d	34.1 ^b	37.0

¹⁾ Duncan's multiple range test at the 5% level.

Table 3-4. Analysis of variance for survival rate in Table 3-3

Source of variation	df	ms	F
Isolate (I)	5	2284.10	15.39**
Varieties (V)	6	6559.91	44.20**
Block	4	270.35	1.82 ns
I×V	30	172.07	1.16 ns
Error	164	148.43	
Total	209		

*** Significant at the 5% and 1% levels, respectively.

差が認められなかった。また、菌株間の相関関係をみると15組合せ中、11組合せが1%水準で有意であり、3組合せが5%水準で有意になった (Table 3-5)。

考察

自然条件での菌核病は秋から初冬にかけて初期感染がみられるが、子のう胞子の発芽適温は20℃付近にあり、最高は30℃、最低は0℃よりやや低いとされている (松浦 1946)。温度条件と菌株を変えて菌糸の伸長をみた本実験においても15℃での伸長が最もおう盛であり、次いで25℃、5℃の順となったが、25℃では一部の菌株に生育停滞がみられたことから、15～20℃が最適温度であると推察された。また、菌糸伸長の早さは菌株により異なり、山形、鳥取、新潟の菌株は愛知、長崎の菌株に比べ高温条件での伸長が劣り、低温条件での伸長がやや優る傾向が見られた。この菌糸伸長の特性は植物体に対する病原性とも密接に関係しており、ほ場での接種実験、幼苗検定実験における植物体に対する枯殺力の差となってあらわれた。すなわち、寒冷地域の菌株は温暖地域の菌株に比べ強い病原性を示すことが認められた。この病原性の違いはレンゲの菌核病では新潟、鳥取などの積雪地の菌株が強い病原性を示すことが知られている (西原 1961)。また、橋岡 (1954) はこれらの菌株より

岩手、秋田、山形の菌株が低温下で早い生育を示すことを認めた。しかし、病原性の強弱については検討されておらず、その病原性の強弱については必ずしも対応するものではないと推論されている。本実験はアルファルファにおける結果であり草種は異なるが、山形、さらに北海道の菌株は温暖地の菌株に比べ病原性が強く、生存率を低下させることを認めた。すなわち、温暖地の菌株に比べ、積雪地、さらに寒冷積雪地の菌株ほど強い病原性を示すことが明らかになった。

一方、菌株による品種・系統の生存率について分散分析を行った結果から、それぞれの要因には高い有意差が認められたが、菌株と品種による交互作用には有意差が認められなかった。また、発病の品種反応について菌株間の相関関係をみると (Table 3-5)、実験3-2のは場検定では10組合せ中の4組合せに5%水準の有意差がみられ、実験3-3の幼苗検定では15組合せ中14組合せに有意な相関関係を認めた。このことから、病原性の強弱には大きな差があるが、レースとしての分化はないものと考えられる。

第2節 抵抗性の病理解剖学的解析

菌核病の罹病個体は茎葉が萎凋し、株枯れへと進行するが、これらの中には地上部のみが枯れ、やがて新芽を再生させる個体を認めることができる。このような個体を対象として抵抗性選抜が繰返されてきた。これらの選抜系統は条件によって回復の程度も様々であり、病徴が激しいと回復できないで枯死する場合もある。菌核病抵抗性は、このように抵抗性程度を明確に判別できない量的抵抗性である。同様な抵抗性を示すベト病の抵抗性の機作について、松本ら (1991) は植物体の防御反応として、病原菌のある程度以上の伸展を抑える防壁 (バリアー) の果たす役割が大きいのとしている。そこでアルファルファ菌核病について、その抵抗性の病理学的機作

Table 3-5. Correlation coefficient between isolates of *Sclerotinia trifoliorum*

Isolate	Hok-89	Yam-86	Nig-86	Toc-89	Tot-86	Aic-86	Nag-86
Field test							
Yam-86	0.934**		0.577*	—	0.641*	0.568*	0.281
Nig-86	0.944**	0.989**		—	0.322	0.658*	0.278
Toc-89	0.842*	0.923**	0.918**		—	—	—
Tot-86	—	—	—	—		0.643*	0.384
Aic-86	0.877**	0.829*	0.804*	0.750	—		0.393
Nag-86	0.958**	0.924**	0.939**	0.913**	—	0.905**	
Seedling test							

*,** Significant at the 5% and 1% levels, respectively.

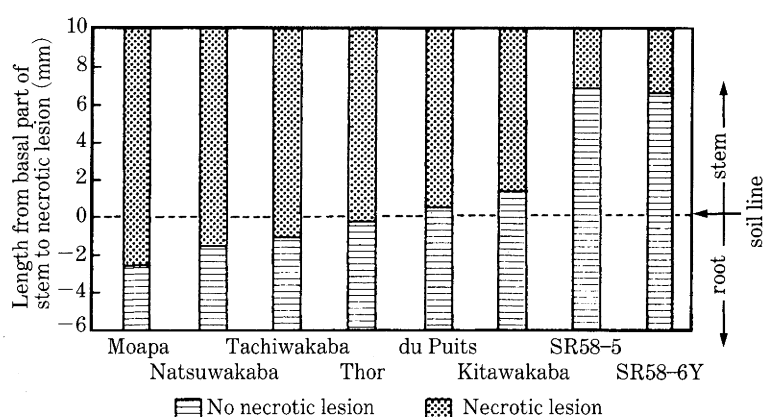


Fig. 3-5. Necrotic lesions caused on alfalfa stems developed in the 14 days after inoculation of *Sclerotinia trifoliorum*.

を解析する手がかりとして、病態組織の顕微鏡等による観察を行い、選抜系統の抵抗性には侵入菌糸の拡大を阻害するバリアーによる抵抗性反応が存在する可能性を検討することとした。

材料及び方法

実験 3-4 病斑の発現程度

供試材料は SR58-6Y を始めとする 8 品種・系統とした。人工気象室において 16℃・9 時間日長で育苗し、10 週間後に愛知菌株を接種し、実験 2-1 に準じた方法で接種を行った。接種 14 日後に株を掘取り、茎の地際部から病斑部までの距離を測定した。測定値は病斑が茎部で止まり地際部より上位にある場合はプラス、根部まで侵入した場合はマイナスで示した。また、クラウン部（茎の基部）の幼芽の生存状態を観察し、全幼芽のうち 0～20% の幼芽が生存している場合を (1)、20～40% を (2)、40～60% を (3)、60～80% を (4)、80% 以上の生存を (5) とする評点により抵抗性程度を示した。

実験 3-5 病理解剖学的解析

光学顕微鏡と走査電子顕微鏡を用いて、菌核病菌を人工接種した抵抗性選抜系統 SR58-6Y と罹病性品種

Thor の感染部位の観察を行った。実験 3-3 の接種 11 日目の両品種のクラウン部を、グルタルアルデヒド (0.05 M カコジル酸緩衝液, pH 7.2) で固定した。その試料の一部から徒手切片を作製し、光学顕微鏡で検鏡及び写真撮影を行った。残りの試料を、さらに 1% 四酸化オスミウム（同緩衝液）で固定し、アルコールシリーズで脱水後、試料を 100% エタノール溶液とともにゼラチンカプセル中に入れ、液体窒素で固化して切断した（田中・永谷 1980）。切断した試料を再び 100% エタノールに戻し、100% エタノールから酢酸イソアミルへと置換後、臨界点乾燥を行った。乾燥した試料に白金蒸着した後、電界放射型走査電子顕微鏡（日立 S 800）で検鏡及び写真撮影を行った。

実験結果

実験 3-4 病斑の発現程度

菌核病の培養菌接種による病徴は葉の萎凋に始まり、全身萎凋へと進んだ。茎の病斑は感染部から徐々に地際部に広がり灰緑色から黄褐色に変わった。茎の病斑下部と地際部の距離を接種 14 日後に測定すると Fig. 3-5 に示すように、SR58-6Y、SR58-5 は個体平均で 6～7 mm

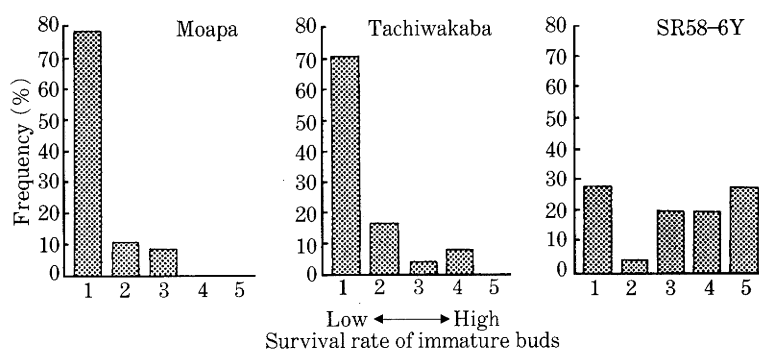


Fig. 3-6. Survival rates of immature buds on the crown of alfalfa inoculated with *Sclerotinia trifoliorum*. Resistance of individual seedling was rated by a visual scale of 1 (0-20% survival) to 5 (80-100% survival).

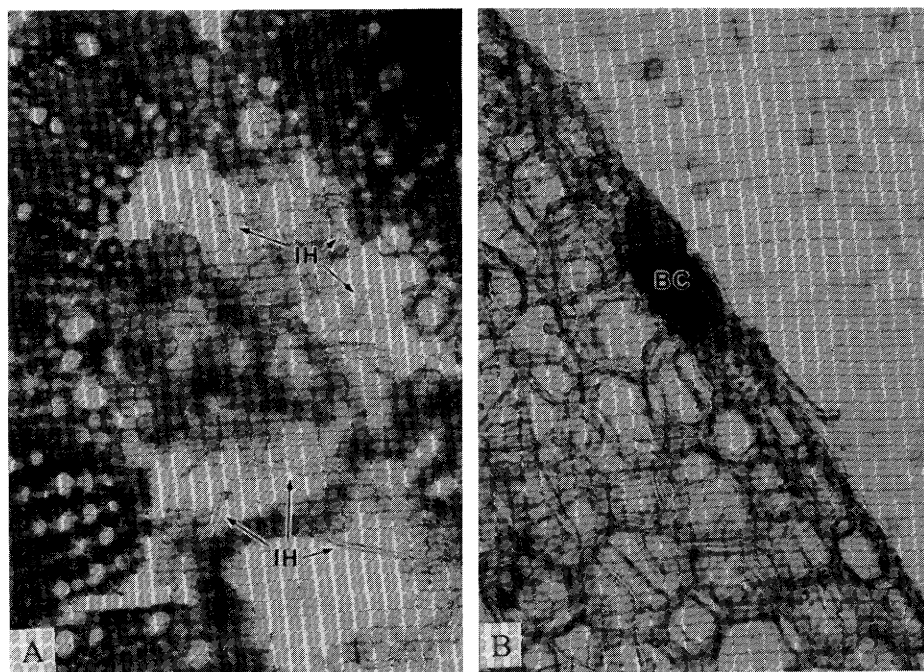


Fig. 3-7. Microphotographs of alfalfa stems of a susceptible Thor (A) and a resistant SR 58-6 Y (B) in the 11 days after inoculation with *Sclerotinia trifoliorum*. Note that invading hyphae (IH) developed extensively in the susceptible, but not in the resistant one. A cell browning (BC) was observed in the epidermis (B).

であり、地際部よりやや高い部位で病斑の伸展が止まる個体が多く観察された。一方、Thor、タチワカバ、ナツワカバ、Moapaでは病斑から地際部への距離は0～3 mmとなり、根部にまで病斑が伸展している個体がみられた。また、茎の基部（クラウン）には3～5個の幼芽が認められたが、これらの幼芽の生存状態による個体頻度分布をみると Fig. 3-6 に示すように、SR58-6Yは評点4以上（60%以上の幼芽が生存）の個体が48%を占めた。根部への病斑の伸展が著しかった Moapaでは、評点4以上の個体は0%であり、タチワカバでは8%で

あった。

実験 3-5 病理解剖学的解析

接種 11 日後の試料を光学顕微鏡で観察した結果、罹病性個体 (Thor) では、菌核病菌が茎の内部組織に伸展しており、維管束や厚膜組織は比較的形が残っていたが、菌糸が著しく蔓延している柔組織は崩壊していた (Fig. 3-7A)。それに対し、抵抗性個体 (SR58-6Y) では罹病性個体に見られるような変性は柔組織にも認められなかった。これらの中には表皮細胞としばしばその下の細胞を伴って褐変しているのが観察された。しかし、こ

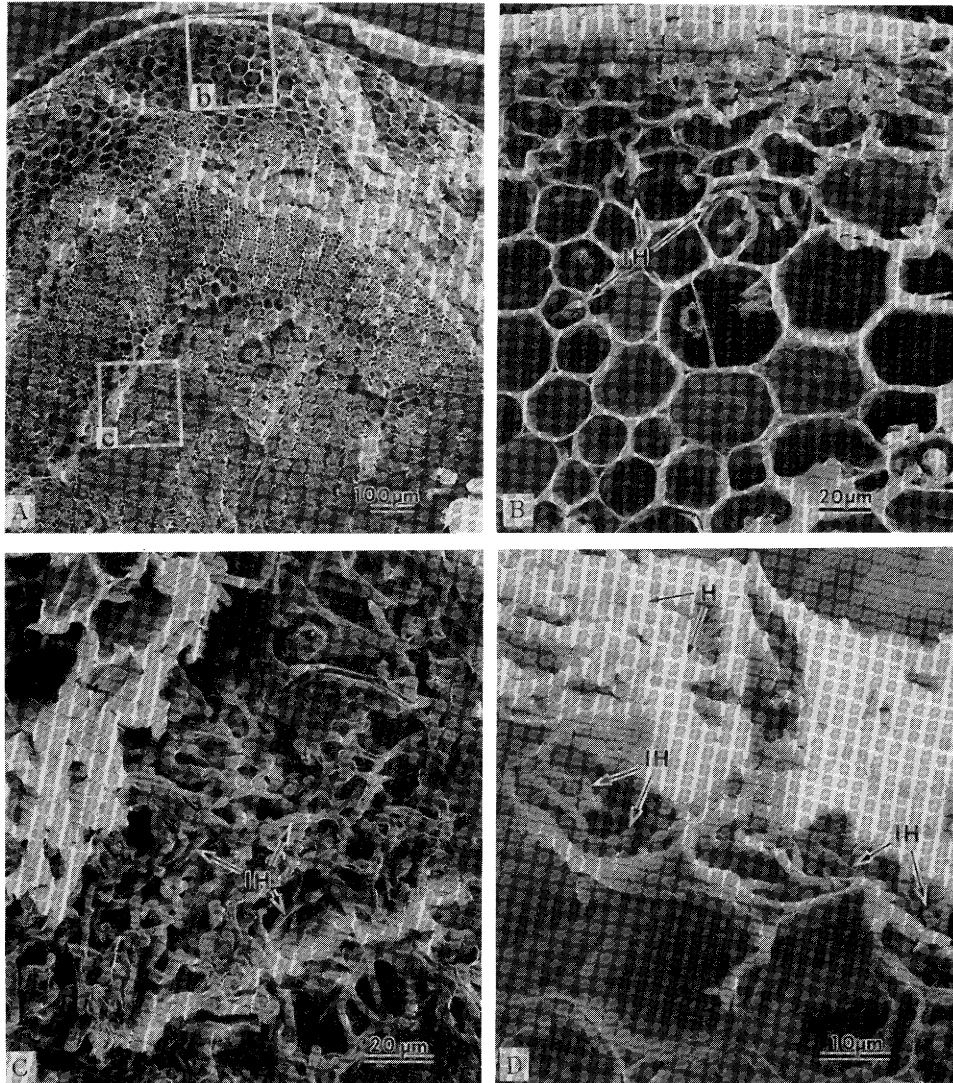


Fig. 3-8. Scanning electron microphotographs of alfalfa stems of a susceptible Thor (A, B and C) and a resistant SR58-6Y (D) in the 11 days after inoculation with *Sclerotinia trifoliorum*. Enclosed portions b and c in A were magnified B and C, respectively. Invading hyphae (IH) growing intracellularly (B) and parenchymatous tissue degenerated and partly collapsed (C). However, invading hyphae were restricted within the epidermal cells in a resistant (D). Inoculated hyphae (H) invaded the epidermal cells but did not develop further (D).

の褐変部位内で菌核病菌の菌糸が侵入・伸展を停止しているか否かは、この光学顕微鏡観察では明かにできなかった (Fig. 3-7B)。

走査電子顕微鏡で接種 11 日後に観察した結果、罹病性個体 (Thor) の感染部位では、菌核病菌の菌糸は茎の内部組織に侵入し、伸展しているのが認められた (Figs. 3-8A and 8B)。光学顕微鏡観察の結果と同様に、維管束、厚膜細胞組織などの細胞壁はほとんど変性を受けていないが、柔組織細胞はほとんど崩壊・消失しており、その部位には侵入菌糸が蔓延していた (Fig. 3-8C)。一方、抵抗性個体 (SR58-6Y) では菌糸の侵入は表皮細胞

のみに限定され、その内部組織への伸展は認められなかった (Fig. 3-8D)。菌糸の侵入を受けた表皮細胞は崩壊していたが、それ以外の細胞は健全組織とほとんど差異が認められなかった。

考察

培養菌糸を接種した幼苗検定では、数日で地上部が萎凋し始め、2 週間後にはほとんどの個体の地上部が枯死する。株を掘取り、この時期の病徴を観察すると、病斑は罹病性品種の Moapa では根部にまで拡大し、地際クラウン部にみられる幼芽が枯死している個体が多い。一方、抵抗性選抜系統 SR58-6Y では地際部近くで病斑

の伸展が止まり、幼芽が生存する個体が多く認められた。このことから、罹病性系統では菌糸がクラウン部全体に及び、ほとんどの幼芽を枯死させるため、回復できないが、抵抗性系統では菌糸の伸展がクラウン部で阻止され、地際部で菌糸の侵入を免れた健全な幼芽の再生に伴い草勢を徐々に回復するものと考えられる。

菌核病菌のアルファルファへの感染については、気孔から侵入することは極めて稀で、主にクチクラ侵入することが報告されている (Prior and Owen 1964)。抵抗性個体の走査電顕観察で、茎では表皮細胞にのみ侵入菌糸が観察されたことは、表皮上の菌糸がクチクラ侵入することを示唆している。しかし、接種 11 日目の罹病性品種の茎部の走査電顕観察では、侵入菌糸は維管束や厚膜細胞組織など、ほとんどの細胞内に伸展し、柔細胞で最も増殖していた (Fig. 3-7C)。抵抗性個体の光学顕微鏡と走査電顕の観察結果を総合すると、抵抗性個体に侵入した菌糸は表皮細胞内のみで伸展を停止する典型的な抵抗性反応が観察されているため、感染部位では顕著な菌糸伸展の阻害反応が起きていることが示唆される。イネいもち病 (高坂 1988)、ジャガイモ疫病 (富山 1973)、サツマイモ紋羽病 (鈴木 1957) では病害抵抗性反応として抗菌物質の集積、パーオキシダーゼやフェニルアラニン脱アンモニア酵素活性の急増、リグニン化などの宿主の防御反応が起きていると報告されている。また、松本ら (1991) は病勢が徐々に停止し、自然治癒するような植物の病害抵抗性に関する要因については、寄生体内に生成するファイトアレキシンのみによって病勢の伸展を停止させるとは考え難く、病原菌のある程度以上の伸展を抑える防壁 (バリアー) の果たす役割が大きいとしている。アルファルファはクローバ類など他のマメ科牧草に比べ菌核病に強いことが知られているが、マメ科牧草の中ではリグニンが集積し易い草種でもあり、木化誘導による防壁の作り易さが抵抗性反応と関係している可能性も高いと考えられる。今後、菌核病抵抗性を解析する手がかりとして、これらの防御反応について組織化学的な解析が必要である。

第4章 表現型循環選抜による抵抗性系統の育成

菌核病菌のように多くの植物に感染する病害では、一般的に抵抗性品種の育成は難しいとされてきた (金田 1987)。Elgin (1968) はアルファルファ菌核病で選抜した個体及びその後代は自然発病による生存率が高くなることを認めたが、選抜系統は栽培地域での環境適応性が高まり、植物体の草勢が良くなり、結果として生存率が高くなったと推論している。このことから遺伝的に有効

な抵抗性品種の育成は困難としている。しかし、筆者らはアルファルファの生産力検定試験において自然発病した菌核病の発病程度に品種・系統間差異を認め、その差異は遺伝的であることから、抵抗性育種の可能性を示唆した。さらに、自然環境での発病の品種間差異を再現できる人工接種による場合検定法を開発し、表現型循環選抜を実施してきた (神戸ら 1992, 1996)。本章では、この選抜による抵抗性向上効果について明らかにするとともに、実用的な側面から自然発病条件において選抜系統の評価を行った。

なお、本章で用いる「表現型循環選抜」とは後代検定・組合せ能力検定を伴う、循環選抜に対比して用いられた言葉であり、後代検定を行わずに表現型での選抜と選抜個体の無作為交配を数世代のサイクルにわたり行うことをいう。他殖性植物では表現型の選抜と自然交配の繰り返しによる集団選抜によって遺伝的組換えと集積が進むのでこの言葉が用いられる。

第1節 表現型循環選抜による抵抗性の向上と遺伝率

これまで愛知農総試ではアメリカやフランスの品種を母材に 4~5 世代の集団選抜や母系選抜により、西南暖地で多収を示す「ナツワカバ」と耐倒伏性で寒さにも強い「タチワカバ」を育成した。これらの品種は外国品種に比べると収量性が優れ、永続性が高まっており、表現型循環選抜により多湿な暖地への適応性が向上したと考えられた (藤本 1984, 1993, 神戸 1996)。また、湿潤な転換畑などを利用して母系選抜を繰り返した耐湿性選抜においても、徐々に抵抗性を高めることができた (神戸 1988)。耐病性の育種では Hanson (1972) や Hill (1987) はアルファルファの各種の耐病性選抜において 3~5 世代の選抜を繰り返すと、ほぼ満足のできる抵抗性を得ることができるとしている。また、Sjodin (1990) はアルファルファのパーティシリウム萎凋病抵抗性において表現型循環選抜の効果を報告している。しかし、これらの病害はいずれも抵抗性反応 (抵抗性と罹病性の差) が比較的明瞭にあらわれる質的抵抗性を示す病害である。一方、菌核病抵抗性は初期の段階では抵抗性の表現型を示す個体がほとんど認められず、抵抗性程度も極く低い量的抵抗性を示すことから、従来から育種の取組みがほとんどなされてこなかった。したがって、このような菌核病抵抗性の選抜反応を明らかにすることは、本病害だけでなく、いままで育種が不可能とされてきた多犯性病害に対しても育種への道を開くものと考えられる。

材料及び方法

1. 抵抗性選抜集団の母材及び選抜経過

1983年から1993年にかけて菌核病抵抗性選抜を愛知農総試で実施した。抵抗性選抜集団の母材には寒冷地での適応性が高いヨーロッパから導入した品種、Everest, Derby, Lutece, Delta, Furez507, 愛知農総試で選抜された耐倒伏性選抜系統：LR43112-7, 白絹病抵抗性選抜系統：CR488-3, CRSY541-1及び育成品種：ナツワカバ, タチワカバの合計10品種・系統を選定した。

選抜実験における抵抗性検定は各世代とも9月下旬に播種, 12月下旬に人工培養した病菌を接種し, 供試個体の中から, 再生草勢の優れた個体を翌年の5月に選抜した。選抜方法は集団選抜を基本としたが, 母株当たり十分な採種量が確保できた第3世代と第5世代では母系選抜を行った。各選抜世代における選抜率は2.0~7.0%とし, それぞれ55~100個体を選抜, 隔離条件で放任交配により採種し, 次世代の選抜集団とした (Table 4-1)。

上記の選抜世代系統の他に, 耐倒伏性系統だけを母材として, 菌核病抵抗性で強選抜を1, 2世代行った SLR 61-1, SLR61-2 と耐湿性系統を母材に菌核病幼苗選抜

を1, 2世代行った SHR61-1, SHR61-2 の選抜系統を育成した (Table 4-2)。

2. 菌核病抵抗性の検定

抵抗性検定は選抜1世代から5世代 (SR58-1~SR58-5) を比較した実験4-1と5世代から9世代 (SR58-5~SR58-9) までは比較した実験4-2に分けて実施した。さらに, 実験4-3では親子回帰により抵抗性の遺伝率を推定した。これらの実験のうち実験4-1, 4-3は草地試験場で行った。

実験4-1 選抜1~5世代系統及び既存品種の抵抗性

抵抗性選抜系統, 育成品種及び代表的な外国品種を比較品種として加えた19品種・系統を供試した。1989年8月23日に播種, 10月2日に品種当たり25個体を畦長1.5m (畦間0.8m) に移植した。実験区は乱塊法5反復とし, 区当たり50個体とした。菌核病菌は翌年の4月11日に接種, 7日間寒冷紗遮光 (遮光率85%) をした。施肥は基肥として $N : P_2O_5 : K_2O = 0.6 : 2.4 : 2.4 \text{ kg/a}$ を施用した。

Table 4-1. Intensity of selection for *Sclerotinia trifoliorum* in each generation

	Generation Selection method	No. of plants (M. lines) ¹⁾	No. of selected plants (M. lines) ¹⁾	Selection rate ²⁾ (%)	Developed strain
1	Mass select.	2,736	90	3.3	SR 58-1
2	Mass select.	3,960	90	2.3	SR 58-2
3	Maternal-line select.	2,430 (90)	70 (7)	2.9	SR 58-3
4	Mass select.	1,960	62	3.2	SR 58-4
5	Maternal-line select.	3,952 (52)	80 (8)	2.0	SR 58-5
6	Mass select.	2,880	60	2.1	SR 58-6
7	Mass select.	960	55	5.7	SR 58-7
8	Mass select.	1,634	60	3.7	SR 58-8
9	Mass select.	1,435	100	7.0	SR 58-9

¹⁾ M. line : maternal lines, within which individual plants were selected.

²⁾ Selection rate was calculated by (number of plants selected/number of all plants)×100.

Table 4-2. Selected strains used in the Exp. 4-1 and 4-2

Strain ¹⁾	Objectives	Origin of breeding stock
Selected for SR 58-1~9	<i>Sclerotinia trifoliorum</i> from 1 to 9 generations Resistance for <i>S. trifoliorum</i>	Natsuwakaba, Tachiwakaba, LR 43112-7 CRSY 541-1, CR 488-3, Delta, Everest Derby, Lutece, Furez 507
Selected for SHR 61-1~2 SLR 61-1~2	<i>Sclerotinia trifoliorum</i> from 1 to 2 generations Resistance for <i>S. trifoliorum</i> do.	HR 533-4, HT 61-1, TH 61-1, HR 581-1 Tachiwakaba
Selection for CR 488-3 HR 533-5 Aikei 23	<i>Corticium rolfsii</i> and humid-soil Resistance for <i>Corticium rolfsii</i> Tolerance for humid-soil do.	Natsuwakaba, Sabina, Moapa Aikei 16, B 13-AL 4 Aikei 16

¹⁾ Numbers after hyphen (-) indicate generations at which strains were selected.

実験 4-2 選抜 5~9 世代系統の抵抗性

抵抗性選抜系統及び比較品種による 9 品種・系統を供試, 1994 年 9 月 29 日に畦長 1.5 m (畦間 0.6 m) を 1 区とし, 乱塊法 8 反復で実施した。区当たり 0.7 g を条播, 30~35 日後, 間引きにより 30 個体を養成した。施肥は基肥として $N : P_2O_5 : K_2O$ の成分量で, それぞれ 0.5 : 0.8 : 0.8 kg/a を施用した。

実験 4-3 抵抗性遺伝率の推定

抵抗性の遺伝率を推定するため選抜系統 SR58-5 の 15 個体をナツワカバ, タチワカバ, du Puits の各 5 個体 (計 15 個体) とベアクロスし, 15 組の F_1 系統を育成した。それぞれの F_1 について 30 個体を養成し, 自由交配により F_2 系統を集団採種した。これらの F_1 と F_2 系統を 1992 年 1 月 28 日にシードリングケースに播種し, $16^\circ\text{C} \cdot 9$ 時間日長の温室で 10 週間育苗した。4 月 16 日に菌核病菌を接種し, 46 日後に生存率を調査した。試験規模は各系統ともケース当たり 10 個体を養成し, 6 反復とした。

菌核病菌の接種: 選抜実験では愛知農総試のアルファルファから採取した菌株を用いたが, 選抜系統の抵抗性検定 (実験 4-1~4-3) には草地試験場内のアルファルファから採取した菌株を用いた。これらの菌株をふすまともみ殻を 1 : 3 に混ぜた培地を用いて培養し, 1.0~1.3

1/m² を株元に接種した。

実験結果

実験 4-1 選抜 1~5 世代系統及び既存品種の抵抗性
病原菌接種による菌核病の発生は急速に進展し, 接種後 2 週間で各系統とも大部分の個体の茎葉が萎凋した。地上部の生存率は Table 4-3 に示すように接種後 18 日目 (9 月 29 日調査) では抵抗性選抜系統とキタワカバに 0.4~3.6% の僅かな生存率が認められたが, 他の比較品種・系統はいずれも 0% であった。冠部・地下部からの再生は 5 月になって認められ, その後再生する個体が徐々に増加したが, 7 月にはほぼ上限に達した。

既存品種の生存率はナツワカバの 16.0% が最も高く, CUF101 は 3.2%, Orca は 4.0% と低かった。5 世代の選抜を行った SR58-5 はナツワカバの約 4 倍に当たる 57.6% の高い生存率を示した。次いで SR58-4, SR58-3 の順となり, 3 世代以上の抵抗性選抜系統の生存率はナツワカバ, タチワカバに対して有意に高かった。2 世代の選抜系統 SHR61-2, SR58-2 についてもナツワカバをやや上回ったが, ナツワカバとの間に有意差は認められなかった。1 世代選抜系統 SR58-1, SHR61-1, SLR61-1 の生存率はいずれもナツワカバとタチワカバの中間であった。

SR58-1 から SR58-5 の系統について選抜世代による

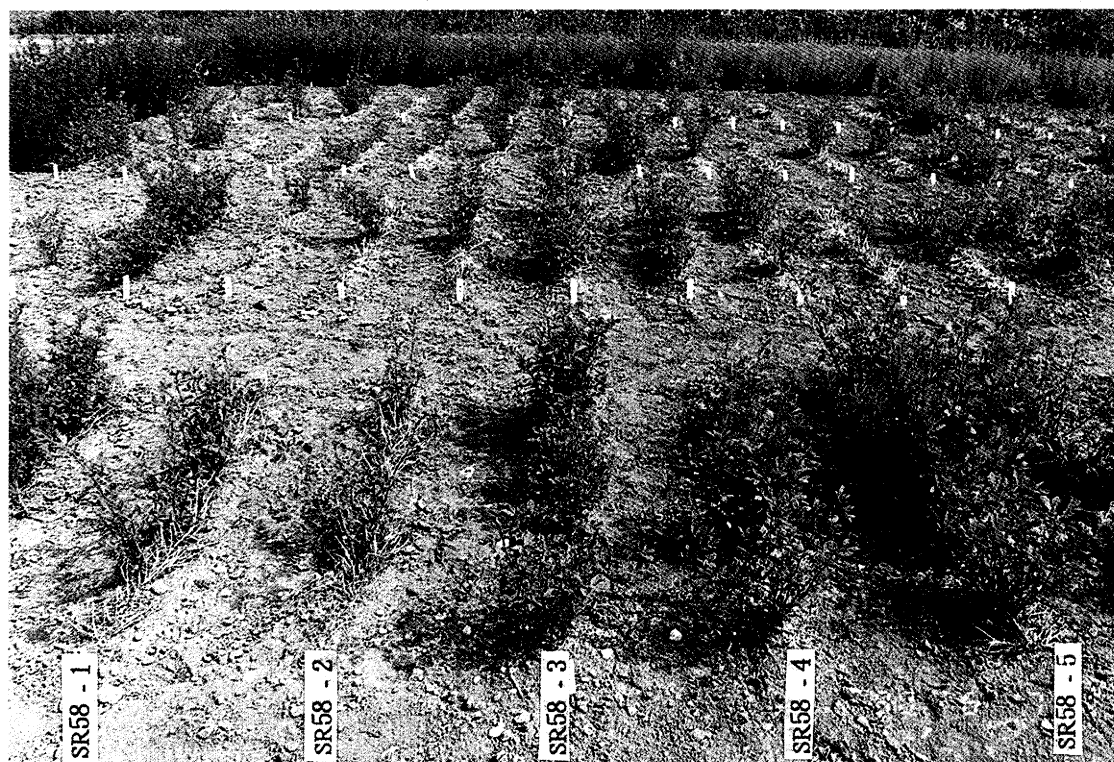


Fig. 4-1. Regrowth vigor of selected strains from the 1st to 5th generations.

Table 4-3. Differences of resistance among populations as judged by percentage of plant which survived in plots inoculated against *Sclerotinia trifoliorum* (Exp. 4-1)

Variety or strain	Percentage of survived plants			Multiple range test ¹⁾
	Apr. 29 th	May 14 th	Jul. 6 th	
SR 58-5	3.6	24.8	57.6	a
SR 58-4	1.6	19.6	35.2	b
SR 58-3	2.4	15.6	31.2	b
SHR 61-2	2.4	9.6	20.8	c
SR 58-2	0.8	8.0	17.6	c d
Natsuwakaba	0.0	4.0	16.0	c d e
HR 533-5	0.0	8.0	15.2	c d e f
SR 58-1	0.0	4.4	12.4	c d e f g
CR 488-3	0.4	7.2	11.8	d e f g
SLR 61-1	0.0	7.2	9.6	d e f g
Williamsburg	0.0	4.8	9.6	d e f g
Tachiwakaba	0.0	4.0	7.2	e f g
Thor	0.0	0.8	6.4	e f g
Aikei23	0.0	2.4	6.4	e f g
Vertace	0.0	2.4	5.6	f g
Kitawakaba	0.8	3.2	4.8	g
Du Puits	0.0	6.4	4.8	g
Orca	0.0	2.4	4.0	g
CUF101	0.0	4.0	3.2	g

¹⁾ Duncan's multiple range test at 5% level.

生存率の変化を Fig. 4-1, 4-2 に示した。選抜率の向上は 1 世代, 2 世代の選抜では僅かであったが, 3 世代から 5 世代にかけて高い生存率の向上と草勢の回復がみられた。このことから, 菌核病抵抗性の選抜効果は初期世代では極く低い, 選抜世代を繰り返すことにより高くなることが認められた。

実験 4-2 選抜 5~9 世代系統の抵抗性

抵抗性選抜系統・比較品種の生存率を Table 4-4 に示した。選抜 5 世代 (SR58-5) から 9 世代 (SR58-9) 系統の生存率は 42.4~62.9% となり, ナツワカバの 9.4%, タチワカバの 23.2% に比べ高い抵抗性を示した。一方, 選抜世代数の少ない SLR92-1, SHR611-2, SLR61-2, SLR87-3 の 1~3 世代系統は 20.5~34.8% であり, 生存率の向上は僅かであった。

選抜世代に伴う生存率の変化を Fig. 4-3 に示した。各選抜世代系統の生存率は 5 世代 42.4% に対し 6 世代は 50.4% と増加した, 7, 8 世代では 48.2%, 51.3% と停滞したものの 9 世代では 62.9% と大きく増大し, 選抜世代に伴う生存率の向上が認められた。

病原菌接種後の生草収量はタチワカバ, ナツワカバとも著しく減収したが, 選抜 5~9 世代系統はタチワカバの 2.5~3.9 倍であり, 実用的な選抜効果が明らかになっ

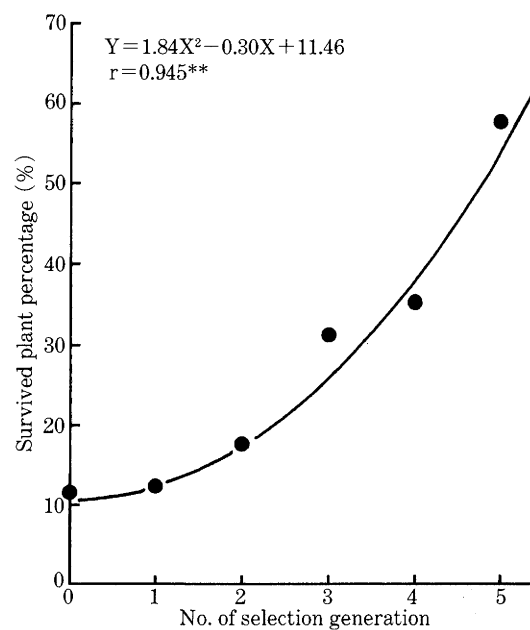


Fig. 4-2. Increase in resistance to *Sclerotinia trifoliorum* in relation to the number of selection generations.

Table 4-4. Differences of resistance among populations against *Sclerotinia trifoliorum* (Exp. 4-2)

Variety or strain	Jan. 27th	Apr. 30th	Multiple range test ¹⁾	Fresh yield on May 30th ratio to Tachiwakaba (%)
SR 58-9	41.5	62.9	a	388
SR 58-8	34.8	51.3	b	308
SR 58-6	35.3	50.4	b	359
SR 58-7	28.6	48.2	b	307
SR 58-5	21.4	42.4	b c	251
SLR 61-2	8.5	34.8	c	135
SHR 611-2	13.8	32.6	c d	190
Tachiwakaba	8.0	23.2	d	100
Natsuwakaba	3.1	9.4	e	53

¹⁾ Duncan's multiple range test at 5% level.

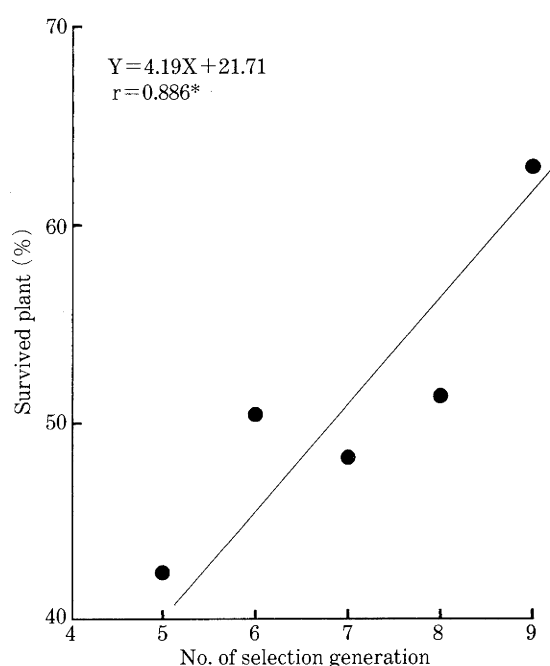


Fig. 4-3. Increase in resistance to *Sclerotinia trifoliorum* in relation to the number of selection generations.

た。

実験 4-3 抵抗性遺伝率の推定

抵抗性選抜系統 SR58-5 とナツワカバ、タチワカバ、du Puits との F₁, F₂ 系統の生存率を Fig. 4-4 に示した。SR58-5 の生存率は 53% であったが交雑親品種ナツワカバ、タチワカバ、du Puits の生存率はそれぞれ 5, 10, 8% と低かった。F₁ 系統の生存率はナツワカバ群では 16% と低くあったがタチワカバ群では 23%, du Puits 群で 26% となった。平均親 (MP) と F₁ 系統を比較すると各群とも MP に比べ F₁, F₂ とともに低くあった。ナツワカバ群 F₁ の MP 比は 55% であり、タチワカバ、du

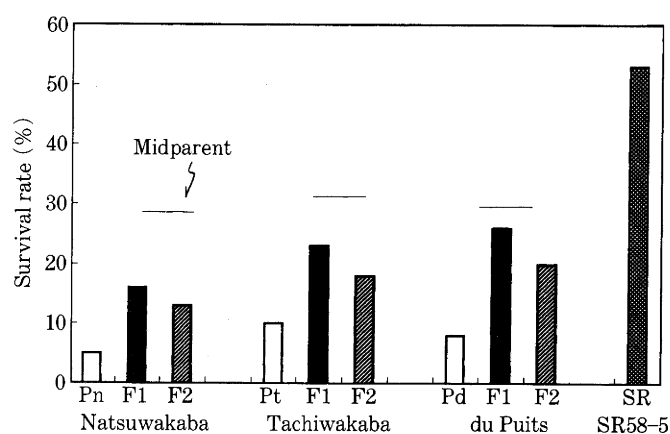


Fig. 4-4. Survival rate of parents and F₁, F₂ lines.

Puits 群はそれぞれ 73%, 84% であった。すなわち交雑系統の菌核病の抵抗性発現は両親の平均値より低くなり、親品種の抵抗性程度が低いほど、F₁ の抵抗性の程度も低くなる傾向が認められた。F₂ についても同様な傾向がみられたが、F₂ の生存率は F₁ よりさらに、5% 程度低く、MP 比は 41~66% であった。

F₁ と F₂ 系統の関係についてみると Fig. 4-5 に示すように、F₁ 系統の生存率が高いほど F₂ 系統の生存率も高くなる傾向がみられ、0.696** の有意な相関関係が認められた。また、その F₂ の F₁ への回帰係数から F₁ における遺伝率 (h²) は 0.323 と推定された。

考察

1. 表現型循環選抜による抵抗性の向上

表現型循環選抜法は集団から優れた表現型を示す個体の選抜と交雑を繰返すことにより望ましい遺伝子型の頻度を高める育種法であり、アメリカにおけるトウモロコシの蛋白質・油脂含油量の選抜実験では 76 世代もの持続的な選抜効果が認められている (Dudley 1977)。トウ

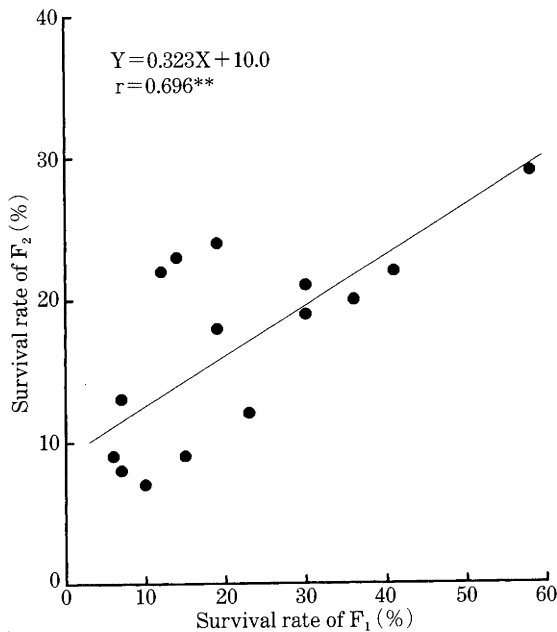


Fig. 4-5. Relationship of survival rates between F_1 and F_2 lines.

モロコシの多収性育種では次代系統間の相互交配のサイクルを重ねる方法により、生育おう盛で耐倒伏性に優れた自殖集団の改良を図るとともに、高いヘテロシスを発現する育種集団が育成されている。トウモロコシの主要病害であるごま葉枯病は、その抵抗性に微動遺伝子と劣性単一主動遺伝子が知られ、すす紋病には微動遺伝子と優性単一主動遺伝子が関与しており、これら葉枯性病害では微動遺伝子とその抵抗性に重要な役割を果たしている。金子 (1964, 1983) はこれらの抵抗性品種育成には、抵抗性遺伝子を集積する循環選抜が有効であるとしている。また、アルファルファ細菌性萎凋病の選抜試験では優性遺伝子を持つ集団は2世代の選抜で高い抵抗性を示したが、優性遺伝子を持たない集団においても循環選抜を進めることによって徐々に抵抗性が高くなることが報告されている (Viand 1979, 1980)。菌核病の抵抗性選抜において表現型循環選抜を行った本研究においても、実験4-1から1, 2世代では選抜効果が低いが3世代から5世代にかけて選抜効果が高まることを認めた (Fig. 4-1)。表現型に遺伝的変異が大きく発現する環境を設定できたことが表現型循環選抜の効果を高めてきたと考えられ、さらに実験4-2では5世代から9世代にかけて選抜効果が継続して向上することが明らかになった (Table 4-4)。

抵抗性の遺伝性について実験1-3において、Flamande系統群がやや強い抵抗性を示すことを認め、

極く低い頻度ではあるが抵抗性遺伝子が存在すると考えた。また、本章の交雑実験においても F_1 系統の生存率が両親の平均親 (MP) 対比で 55~84% と低いことから抵抗性は優性効果をもつ主動遺伝子に支配される可能性は少なく、無優性または働きの小さな遺伝子の集積によると思われる。すなわち、菌核病抵抗性の発現は量的抵抗性を示す複数の遺伝子によるものであり、既存品種の抵抗性遺伝子頻度が極く低い場合、初期世代では遺伝子の集積が少なく選抜効果が低いが、選抜世代を繰り返すことによって有効な遺伝子の頻度が高くなるとともに、遺伝子間の相互作用も加わり大きな抵抗性反応があらわれたと考えられる。

2. 抵抗性の遺伝率の推定

対象とする形質が質的形質の場合、形質の発現は環境の影響が少なく、遺伝子型と表現型の対応が直接的であり、望ましい個体または系統を確実に選抜できる。しかし、一般の育種の対象形質は量的形質に属する場合が多く、表現型は測定によって得られた観測値であり、遺伝子型の効果と環境効果 (遺伝子と環境との交互作用を含む) の和で表される。すなわち $P = G + E + GE$ で表され、表現型の分散は $Vp = Vg + Ve + 2Cov(g, e)$ となる。遺伝率は表現型分散 Vp に対する遺伝分散 Vg の割合であり、遺伝子型の効果はさらに相加的遺伝子の効果、優性効果、エピスタシス効果から成り立っているため $Vp = Va + Vd + Vi + Ve + 2Cov(g, e)$ として表される。広義の遺伝率は $h^2_B = Vg/Vp$ で示されるが、狭義の遺伝率は $h^2_N = Va/Vp$ で定義される。山田 (1974a, 1974b) は量的形質の遺伝分析に用いられる遺伝率は相加的遺伝子型値 (育種価) の表現型値に対する回帰係数として定義すべきものであり、狭義の遺伝率として位置づけており、 $h^2 = b_{a \cdot p} = Cov(a, p) / Vp = Va/Vp$ としている。遺伝率は集団及び世代によって変わるが、本実験ではこの考え方に従い、菌核病の抵抗性を F_1 集団について推定すると F_2 の F_1 への回帰係数から遺伝率 $h^2 = 0.323$ の推定値を得た。一般に耐病性の遺伝率は 40~60% と高い場合が多いが、 F_1 で推定された遺伝率は低く、このことから、菌核病の抵抗性は微動遺伝子の集積による量的抵抗性と考えられる。

さらに、この菌核病抵抗性の選抜効果は選抜世代により変化するとみられたので、選抜世代による、より有効な実現遺伝率を推定するため、Falconer (1960) による累積選抜圧と選抜反応との関係についてみた。このため、Fig. 4-6 に示すように菌核病の抵抗性を生存と枯死によって判別される閾値形質と考え、この形質の変異が正規分布するという仮定のもとに、原集団及び各系統集

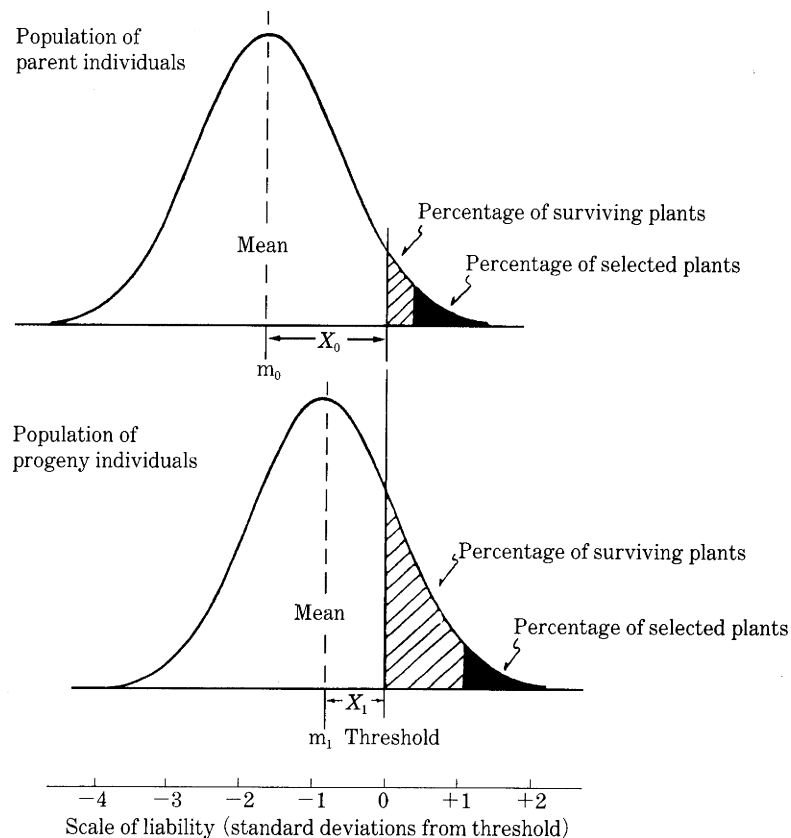


Fig. 4-6. Frequency distribution in populations with different degree of *Sclerotinia trifoliorum* resistance, and threshold for percentage of surviving plants (revised figure from Falconer 1960).

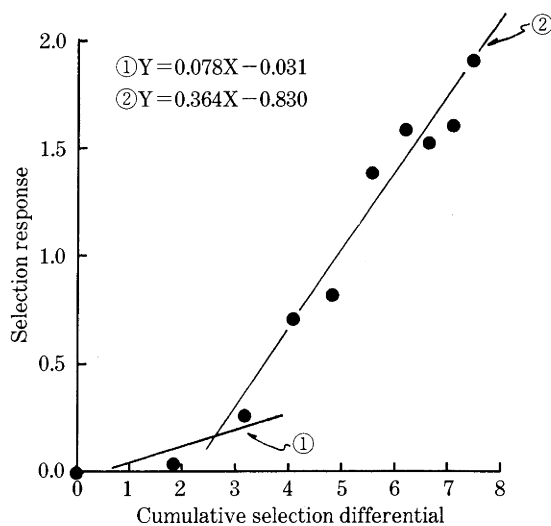


Fig. 4-7. Realised heritability by regression of response to selection on the cumulative selection differential.

団の平均値を閾値からの偏りであらわし、原集団からの平均値の差 ($R = X_0 - X_1$) を選抜反応とした。また、各世代ごとの選抜圧についても同様に考え、原集団からの累

積選抜圧を求め、実現遺伝率を選抜圧 (S) と選抜反応 (R) との関係から $h^2 = R/S$ として求めるための選抜反応を Table 4-5 に示した。ただし、実験 4-2 の 6~9 世代は実験 4-1 の 5 世代系統 SR58-5 の値を基準とした。累積選抜差と選抜反応との関係を見ると、Fig. 4-7 に示すように、選抜反応は 1, 2 世代では低かった。しかし、3 世代から 9 世代にかけては直線的な増加がみられ、 $r = 0.958^{**}$ の高い相関関係が認められた。このことから、選抜反応による実現遺伝率は 2 段階に分けて求めることが適当とみられた。実現遺伝率は選抜反応の累積選抜差への回帰によって表される。その推定値として初期の 1, 2 世代では $h^2 = 0.078$ 、3 世代から 9 世代では $h^2 = 0.364$ と初期世代に比べ高くなることが明らかになった。この遺伝率は数世代にわたる選抜反応の結果によるものであり、誤差による変動も少なく、実現した変化量と選抜圧から得られた値であるから有効な遺伝率であるが、 F_1 の遺伝率 $h^2 = 0.323$ と大きく変わっていないことは 3~9 世代にわたる選抜で遺伝変異が固定にまで至っていないことを示す。このように遺伝変異が容易に固定しないことからアルファ菌核病抵抗性は多数の遺伝子の

Table 4-5. Cumulative selection differential and selection response indicated by the deviation of the threshold from the mean

Strain	Cumulative selection differential ¹⁾	selection response ²⁾	
		x_i	$x_o - x_i$
Evaluation 1			
parents (x_o) ³⁾	0	1.19	0
SR 58-1	1.84	1.15	0.04
SR 58-2	3.18	0.93	0.26
SR 58-3	4.09	0.49	0.70
SR 58-4	4.83	0.38	0.81
SR 58-5	5.57	-0.19	1.38
Evaluation 2			
(SR 58-5 ⁴⁾	5.57	0.19	1.38)
SR 58-6	6.20	-0.01	1.58
SR 58-7	6.64	0.05	1.52
SR 58-8	7.10	-0.03	1.60
SR 58-9	7.48	-0.33	1.90

¹⁾ The cumulative selection differential was calculated by the product of selection rate of preceding generations.

²⁾ x_i : Deviation from the population mean of survived plant percentage threshold value of each selection generation, $x_o - x_i$: Selection response from the population mean of parents.

³⁾ Parents data was substituted 3 cultivars average; Natsuwakaba, Tachiwakaba, CR 488-3

⁴⁾ SR 58-5 was used as common strain to connect from first to ninth generation.

相互作用によると推定できる。

第2節 自然発病下での選抜系統の抵抗性

菌核病の自然発病における感染経路としては、菌核からの菌糸による感染、植物遺体残渣からの感染、子のう胞子感染などが考えられるが、松浦 (1987)、本田ら (1973) は菌核病の感染経路として菌核、遺体残渣が関与する菌糸からの感染の可能性は極めて低く、菌核から発芽した子のう盤から飛散した胞子感染によると考えている。子のう胞子感染についてはレンゲ菌核病やクローバ菌核病の他いくつかの菌核病で確認されており、レンゲやクローバの葉に子のう胞子を接種すると多数の微小な褐点病斑が形成され、この病斑が積雪下の湿潤な条件のもとで伸展し、菌核病の典型的な症状となることが確認されている。

本実験のアルファルファ菌核病の抵抗性検定及び選抜は、菌核から PDA 培地に広げた菌糸をもみ殻培地で大量増殖し、これを感染源としアルファルファの地際茎部に接種しており、茎への菌糸接種により直接発病させており、その後の回復状態により抵抗性の評価をするともに個体選抜を行ってきた。すなわち、胞子を初期感染

源とする自然発病とは感染源、感染部位とも異なる培養菌糸による検定・選抜法を適用してきた。このため、この選抜が自然条件における胞子感染による発病環境においても有効であることを明確にする必要がある。本節では、このような問題意識から、選抜系統の胞子接種及び自然発病下における抵抗性について検討し、抵抗性選抜の効果を確認する。

材料及び方法

1992 年に草地試験場において次の試験を行った。

実験 4-4 胞子接種による抵抗性検定

子のう果から飛散する胞子を葉に接種し、品種・系統間における発病の差異を比較した。抵抗性系統として SR58-5, SR58-6Y と比較品種としてナツワカバ、タチワカバ、キタワカバを供試した。各品種・系統を 5×12 cm のシードリングケースに 10 個体ずつ仕立て、これらを室温 14℃、自然日長のガラス室で育苗し、8 週齢から 10 週齢まで胞子接種を行った。実験区はランダム配置 4 反復とした。

胞子接種は、水を浅く張った礫耕用水槽の上にアルファルファを育苗したシードリングケースを置き、その上部 60 cm に子のう果を移植した 1/5000 ポット、6 個を配置した。なお、子のう果はほ場で収集し、ポット当たり 10 個体を移植した。これらをビニール枠で覆い、子のう盤から飛散する胞子を茎葉に自然落下させた。接種後、葉部における病斑の伸展を観察し、罹病葉面積の推移を調査した。

実験 4-5 自然発病下での選抜系統の抵抗性

前年度、抵抗性検定に供試した菌核病汚染ほ場に、抵抗性選抜系統 SR58-3, SR58-5 及び比較系統としてナツワカバ、タチワカバ、キタワカバ、CUF101, Moapa, du Puits, Thor の 9 品種・系統を播種した。播種期は 9 月 12 日、9 月 26 日、10 月 6 日の 3 段階として、発病経過を調査した。

実験結果

実験 4-4 胞子接種による抵抗性検定

胞子接種後 5 日目に葉の表面に小さな褐点病斑が多数観察された。Table 4-6 に示すようにこの病斑にはほとんど品種・系統による差は見られなかった。その後、病斑はほとんど拡大せず静止した状態がつづいたが、3 週目に入り病斑部位が水浸状になり、肉眼で菌糸を認めることができるようになった。さらに Fig. 4-8 に示すように 4 週以降に病斑の伸展が早くなった。5 週目の病斑面積は Moapa, Thor, タチワカバで大きく、SR58-6Y, SR58-5, du Puits, キタワカバで小さかった。さらに病徴が茎部に進行した 12 週目の生存率は病斑面積の伸展

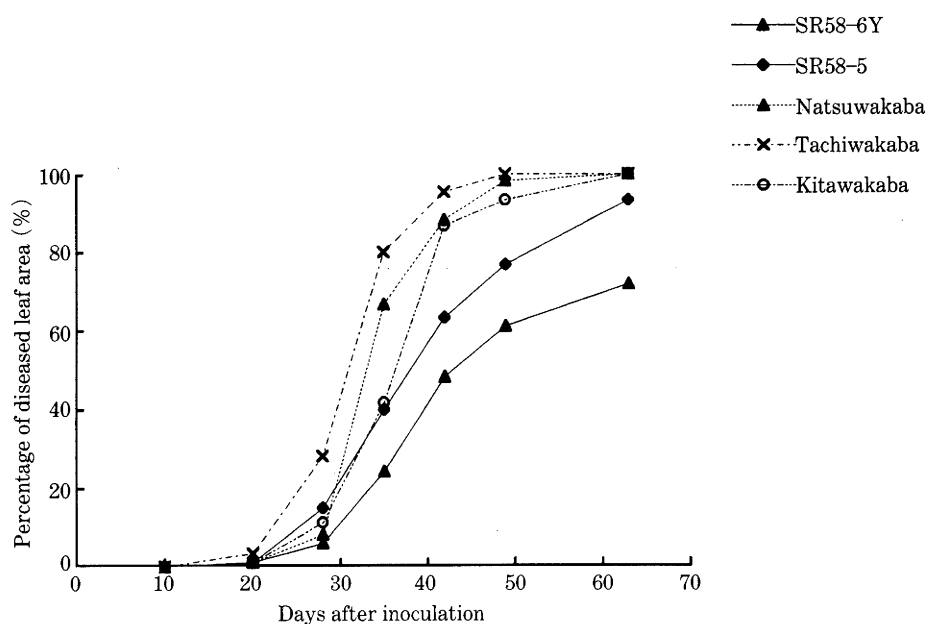


Fig. 4-8. Increase of percentage of diseased leaf area under inoculation of spore of *Sclerotinia trifoliorum*.

Table 4-6. Survival rate of varieties and strains of alfalfa due to spore infection of *Sclerotinia trifoliorum* (Exp. 4-4)

Variety or strain	Degree of brown lesion ¹⁾ 5 days ²⁾	Diseased leaf area % 35 days	Survived plant % 82 days
SR 58-6 Y	2.0	24.3	57.4
SR 58-5	2.6	40.0	51.0
Kitawakaba	2.6	41.7	41.5
Tachiwakaba	3.4	80.0	5.0
Du Puits	2.0	40.0	43.5
Natsuwakaba	3.4	66.7	11.3
Moapa	2.6	100.0	16.7
Thor	2.6	83.3	3.3

¹⁾ Degree of brown lesion : 0=no symptoms~5=many.

²⁾ From days after inoculation.

が緩やかであった SR58-6Y, SR58-5 で高く, Thor, タチワカバ, ナツワカバで低かった。この生存率は培養菌糸を接種した幼苗検定の生存率 (Table 2-10) とほぼ同様な傾向を示した。しかし, 胞子の飛散が必ずしも均一でなかったため, シードリングケースの置床場所による発病状態の変動が大きく品種・系統間に有意差はみられなかった。

実験 4-5 自然発病下での選抜系統の抵抗性

ほ場での菌核病子のう果の形成は Fig. 4-9 に示すように 9 月 12 日, 9 月 26 日の播種では 10 月上旬から認められ, 10 月 25 日から 11 月 8 日にかけて平均 25 個/m²

と多く, その後, 徐々に少なくなった。10 月 9 日播ではやや少な目に経過したが 11 月 8 日には 23 個/m² の子のう果が認められ, 各播種期とも大量の胞子が飛散したと考えられた。

菌核病の病徴は 3 月以降病勢が進み, 枯死個体が多くなった。播種期による生存率は Table 4-7 に示すように, 9 月 12 日播は系統平均で 76%, 変異幅 61.4%~90.4% の高い生存率であったが, 播種期が遅くなるほど生存率は低くなり 10 月 9 日播では 51%, 変異幅 39.4%~88.6% であった。晩播では生存率が低くなり, かつ品種・系統間差異が拡大された。選抜系統 SR58-3, SR58-5 はいずれの播種期においても生存率が高く既存品種との間に有意差が認められた。特に 10 月 9 日播では既存品種は 35%~47% の生存率であったが, SR 系統はそれぞれ 76.7%, 88.6% の高い生存率を示し抵抗性の発現が顕著であった。

SR58-5 とナツワカバ, タチワカバとの収量を比較すると Fig. 4-10 に示すように, 早播では 3 回の刈取りで 519~619 kg/a の生草収量があったが, 10 月 9 日播では 120~398 kg/a となり, 播種期が遅くなるほど収量は低下した。各播種期とも SR58-5 が最も多収であり, 晩播になるほどナツワカバ, タチワカバとの収量差が大きくなった。早播区に対する晩播区の収量は, 発病が進展したナツワカバ, タチワカバでは 77~78% の大幅な減収となった。一方, SR58-5 は 36% の減収にとどまった。晩播条件でも生存率が高く, 収量の低下が少ない SR58-

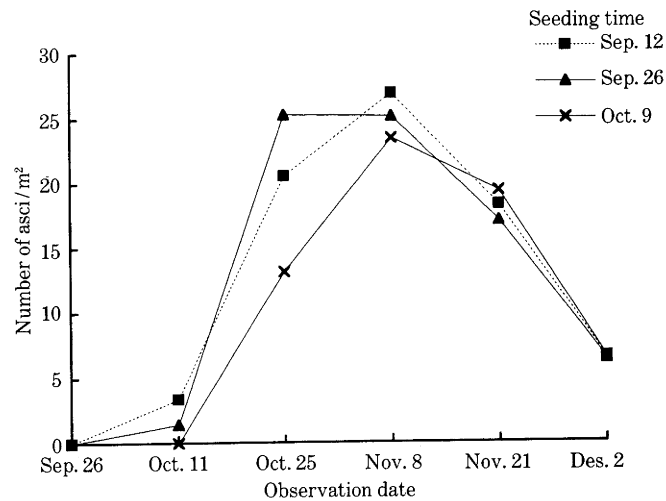
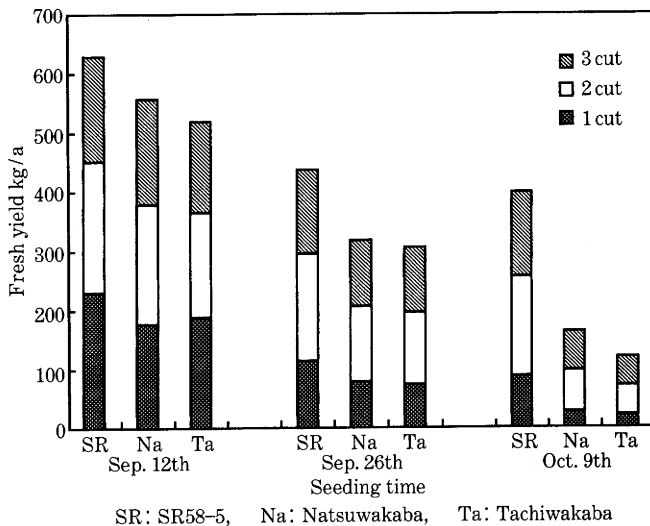


Fig. 4-9. Number of the asci observed at the field of different seeding time.

Fig. 4-10. Comparison of fresh yield under the natural infection of *Sclerotinia trifoliorum* among the three seeding times.

5 はナツワカバ， タチワカバに比べ顕著な有利性を示すことが明らかになった。

考察

1. 菌核病の感染経路

菌核病の初期感染について，本田ら（1973）はクローバの菌核（*Sclerotinia trifoliorum*）をそのまま，または半分に切断してクローバの各部位に接触させて室温に保っても発病は全く認められなかったが，土壌中ではグルコースを混入して有機含量を高めた場合のみ菌糸発芽するとしている。また，杉本（1956）は菌核（*Sclerotinia sclerotiorum*）をハクサイ，チシャ，シュンギクの稚苗に接触させ，その発病は低いと報告している。したがって

Table 4-7. Survival rate of varieties and strains of alfalfa due to natural infection of *Sclerotinia trifoliorum* at different seeding time in the field (Exp. 4-5)

Variety or strain	Seeding time		
	Sept. 12 th	Sept. 26 th	Oct. 9 th
SR 58-5	90.4 a ¹⁾	87.1 a	88.6 a
SR 58-3	84.9 ab	81.9 a	76.7 a
Kitawakaba	75.5 b	66.4 b	45.4 b
Tachiwakaba	77.6 b	54.4 c	44.0 b
Du Puits	83.1 c	50.6 c	46.8 b
Natsuwakaba	79.0 b	52.3 c	44.2 b
CUF 101	66.2 c	50.9 c	38.3 b
Moapa	65.3 c	44.1 cd	35.3 b
Thor	61.8 c	35.1 d	39.4 b
Average	76.0	58.1	51.0

¹⁾ Duncan's multiple range test at the 5% level.

菌核から生ずる菌糸による菌核病感染の可能性を全く否定してしまうことはできないが，自然ほ場での条件ではその可能性は極めて低いものと考えられている。一方，子のう胞子感染についてはレンゲ菌核病やクローバ菌核病の他いくつかの菌核病で確認されている。松浦（1987）はレンゲの葉に子のう胞子を接種する多数の微少な褐点病斑が形成され，この病斑が積雪下で進展し菌核病の典型的な症状となるとしている。アルファルファの菌核病においても胞子接種後褐点病斑が観察され，この褐点部分から気中菌糸を発生させ病斑が進展したことから，自然条件での一次感染は胞子によるものと考えられる。その発生生態はレンゲやクローバとほぼ同様であるが，佐久間・荒木（1975）らによる北海道での観察では積雪下

で腐敗枯死する株はまれで、主に融雪後病勢が進むと報告している。また、病斑の拡大は必ずしも積雪下の様な条件でなくても湿潤条件を保つことにより、菌糸の伸長が活性化することを認めた。このことは、アルファルファ菌核病が積雪のない暖地・温暖地でも早春に降雨が続くと大きな被害が発生することとも合致すると考えられる。

菌核病の孢子接種による抵抗性検定に関する研究は少なく、検定による品種間差異は認められていないが、本実験では孢子を植物体に自然落下させる方法により主に葉部に初期の感染が認められ、その症状の進行程度から抵抗性検定の可能性が認められた。すなわち抵抗性系統では孢子からの直接感染による褐色斑点は既存品種と同程度認められたが、病斑の進展は既存品種に比べ明らかに遅く、系統による差異がみられることから、孢子接種による葉部検定が可能とみられた。しかし、本実験では孢子の自然落下にまかせたため、設置場所による変動が大きかった。接種による変動を小さくする工夫を行えば孢子接種は初期感染の病原力が小さく、わずかな品種間の差を病斑の伸長量の差として捉えることができることから、病原力の強い菌糸接種より精密な検定に適した方法として利用できると考えられた。水上ら(1997)は菌核病抵抗性系統のDNAマーカー検定により、数個のマーカーが抵抗性に関与すると推察しているが、抵抗性DNAマーカーを特定するためには、抵抗性の程度を明確に判定する精度の高い生体検定が必要であり、孢子接種も重要な検定手法になると考えられる。

2. 抵抗性系統の実用的な評価

わが国での菌核病は、レンゲについて長年にわたり多くの研究がなされてきた。それと同じ病害がクローバにも発生し惨害を与えることは一部には注目されていたが、多くの人々に知られるようになったのは1960年代に入ってからである。菌核病は、積雪地帯で最も大きな被害を与える病害であるが、積雪をみない宮崎、香川、鳥取、愛知にも発生する。その被害について、レンゲでは北陸、東北地方へのレンゲ作の奨励普及とともに急激に発病が増加し、1918年の富山県では壊滅的であったことが記録されている(西原 1990)。クローバではパッチ状に病徴が広がり、発病面積分だけ収量が減少する(Leath 1985)とされている。また、本田ら(1973, 1978)は、積雪下で病徴の伸長が大きく、根雪期間が長くなるにつれ枯死株が増加し、根雪期間116日では42%の個体が消失したと報告している。アルファルファ菌核病に関する報告は少ないが、鈴木(1992)は栃木県で約1haの草地在4月下旬に菌核病により収穫皆無の状態になっ

たことから、ほとんど積雪がみられない地域においても、大きな被害を受けることがあり、温暖地での重要な病害とみなしている。本実験で供試した抵抗性選抜系統SR58-5は自然発病において既存品種に比べて明らかに発病程度が低く、自然発病の比較的少ない早播区でも他の品種より優れるが、特にこれらの品種の生存率が低くなった晩播において高い生存率と高い収量を維持した。これらのことから抵抗性系統の育成はアルファルファの生産安定性に重要な役割を果たすことが確認された。選抜9世代系統はさらに高い抵抗性を示すことから、暖地・温暖地では本抵抗性系統を実用品種として育種利用することによって菌核病の克服が可能であると推察される。

第5章 総合考察

菌核病は秋から春にかけ各地で発病がみられ、アルファルファの株枯れの原因となる。特に秋播をする東北以南の地域では、初年目越冬株のほとんどが早春に消失するような事例もあり、この地域でアルファルファ栽培を定着させるためには抵抗性品種の育成が極めて重要である。しかし、菌核病は多くのマメ科牧草に発病がみられる多犯性の病害であり、その抵抗性品種の育成は難しいとされ、抵抗性育種への取組みはほとんどなされてこなかった。筆者は抵抗性検定法を確立し、多くの品種について検定を実施し、抵抗性に僅かな品種間差異を認めた。さらに、この検定法により選抜を繰り返すことによって徐々に抵抗性を高めることが可能になり、実用的な抵抗性系統を育種することができた。本章では、以上の育種過程で明らかにされた事実をもとに、第1節では、育苗環境と抵抗性の発現についての考察から検定条件の精度を高めることの重要性を論ずるとともに、抵抗性の機作について考察する。第2節では抵抗性の選抜反応について同質4倍体の選抜理論との対比において考察し、得られた結論と今後の問題点について言及したい。

第1節 菌核病抵抗性の選抜環境

アルファルファの秋播地帯における菌核病の自然発病において僅かであるが品種間差異が認められた。この場合、抵抗性の差は茎葉の発病程度または発病率の多少によって示される。一方、培養菌を接種した場合、地上部の茎葉はほとんど枯れあがるが、1か月ほどしてから徐々に再生が認められるようになり、抵抗性は罹病後の再生個体数であらわすことができる。このように、菌核病の抵抗性の差異は、発病程度の大小、発病後の回復程度及び再生によって明らかになる個体数(生存率)の差によってあらわされる。すなわち、菌核病の抵抗性は植

物体に働きかける病原菌の状態によって、発現段階が異なる量的な抵抗性と推察される。

佐々木ら(1996)はイネの耐冷性品種の育成において、既存の良食味品種の中から耐冷性に強い品種を育成しているが、この困難視されていた耐冷・良質性の育種を成功させた要因の一つとして精度の高い検定法の開発をあげている。また、藤本(1974)はイタリアンライグラスにおける変異と選抜に関する研究において他殖性集団は一般に集団内に多くの遺伝的変異を内在しているが、適応条件では平衡または安定状態で潜在的変異になっている部分が多く、環境の変化によって大きな変異をあらわすことがある。これらの集団から育種目標に合った変異を引き出し、選抜によって新しい品種集団を育成していくには、環境に対する反応から遺伝的変異を拡大し、選抜を可能にする必要があると述べている。

アルファルファの菌核病のように、発現する抵抗性の差が僅かであり、環境条件によって大きく変動する形質の育種では、いかに遺伝的な変異を顕在化させ、その抵抗性の遺伝的差を捉えるかが重要である。このため、抵抗性の系統及び個体間変異を拡大し、検定精度を高くするための環境条件の設定が必要である。

当初、通常の温室で行った幼苗検定(20℃～25℃・長日)では品種間の差を見いだすことができなかったが、自然発病による品種間差異が見られたことから、ほ場検定の可能性が示唆された。ほ場検定では、秋播をおこない自然条件でのハードニングを経過した後に培養菌を接種した。発病環境としては寒冷紗被覆によって遮光・低温・湿潤の条件を充たすことによって、遺伝的な抵抗性の品種・系統間差異を見いだすことが可能になった(Table 1-5, 6, Fig. 1-4)。また、抵抗性が発現する育苗条件を明らかにするため、播種後10週間の育苗期の環境条件を変えて抵抗性の品種間差異を検定した場合、23℃・16時間日長での育苗条件で生育はおう盛であったが生存率は低く品種間差異を認めることができなかった。一方、16℃・9時間日長の育苗条件では、最も高い生存率を示し品種間差異が明瞭になった(Table 2-5)。この育苗環境で選抜を加えたSR58-6Yは高い選抜効果を示したことから、抵抗性の発現に適した育苗環境は選抜の場としても有効であるとみられる。

こうした環境条件で育苗された苗は、草丈の伸長が緩慢になり、地際部の分枝が多く、クラウン部が発達することが知られている(Sato 1971, 神戸 1979)。菌核病に罹病した抵抗性個体の観察ではクラウン部分で菌糸の侵入が止まり、壊死を免れた幼芽が再生することによって個体の維持が保たれることを認めたが、この育苗環境に

おけるクラウン部分の発達が抵抗性の強弱に関与する要因の一つになるとみられる。このことは暖地向きの品種に比べ寒冷地向きの品種はクラウンの発達が早く、菌核病に対する感受性が低いことから推察される。さらに顕微鏡による観察から抵抗性個体では菌糸の伸展を阻害する抵抗性反応が生じていることが認められた(Fig. 3-7, 8)。アルファルファはマメ科牧草の中ではリグニンが集積し易い草種でもあり、木化誘導による防壁の作り易さが抵抗性反応に関係している可能性も高い、今後これらの抵抗性反応について組織化学的な解析を進めることが、抵抗性の機作を解析するうえに必要であろう。

菌核病の抵抗性反応は、前述のように量的な抵抗性を示し、その抵抗性程度は加齢・育苗環境によって異なることを明らかにしてきた。一般に表現型は遺伝と環境及びそれらの交互作用の和であらわされるが、菌核病抵抗性の場合、従来ほとんど認められなかった変異が育苗環境を変えることによって遺伝的な変異として顕在化させることが可能になったと考えられる。第4章の第1節では、表現型循環選抜によって菌核病抵抗性系統の育成が可能であることを明らかにしたが、選抜の場として潜在的な能力を引き出した環境条件の設定が選抜を有効かつ持続させる重要な役割を果たしたと考えることができる。

第2節 表現型循環選抜に対する他殖性・同質倍数体集団の選抜反応

菌核病抵抗性について表現型循環選抜を行ってきた本研究において、その選抜反応は初期世代では遺伝力が低く、選抜を繰り返すことによって大きな選抜反応となつてあらわれることを明らかにしてきた(Fig. 4-1, 2, Table 4-4)。牧草類では他殖性・倍数体の草種が多く、わが国で育種が行われている14草種のうち12草種は他殖性であり、オーチャードグラス、アルファルファの栽培種は同質四倍体とされている。また、イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、アカクロバでは倍数性育種法が取り入れられ、二倍体品種と共に人為四倍体品種が多数育成されている。一般に倍数体の農業上有利な特徴は、器官の増大や細胞内含有成分、例えば、ビタミン・アルカロイド・蛋白質・糖分・脂肪などの増加である(渡辺 1986)。特に茎葉を利用する牧草では利点が多い。すなわち、倍数体品種は二倍体品種に比べ生育がおう盛となり収量性や環境耐性などの優れた特性を示すものが多い。ライグラス類では四倍体品種の中に越冬性や冠さび病に強い品種が多く(安達 1976)、アカクロバでは二倍体の菌核病抵抗性選抜系統を倍加することによって、抵抗性が高まるとする報告もみられる

Table 5-1. Coefficient of each genotype for escape values of selection against different genetic models

Genetic model	AAAA	AAaA	AAaa	Aaaa	aaaa
Selection against :					
Complete dominant character	1	1	1	1	e
No dominant character	1	$3/4 + e/4$	$1/2 + e/2$	$1/4 + 3e/4$	e
Recessive character	e	e	e	e	1

e : escape values.

(Arseniuk 1989)。このように倍数体は有用な形質の遺伝的変異を拡大する可能性が高いことから、倍数体育種の位置づけを明らかにすることが重要である。同質倍数体の育種理論的な研究は Busbice (1972) らによってなされているが、藤本 (1983, 1992) は、この選抜反応のモデルから循環選抜の重要性を指摘している。ここでは、菌核病抵抗性の選抜反応にこれらの考え方が適用できるかどうか検討した。

育種目標を定め、望ましい個体を選抜すると、集団内の望ましい遺伝子頻度が変化する。集団選抜により世代を進めた場合の選抜反応について、Hill (1971) による同質四倍体のモデルを基に推定すると次のとおりになる。ただしモデル集団は次の前提で検討した。

- ① 移入・突然変異がなく、無作為交配が行われる。
- ② 1 遺伝子座について 2 対立遺伝子があり、配偶子形成では染色体分体分離は無視できる。

初期集団の優性遺伝子 A の頻度を p_0 、劣性遺伝子 a の頻度を q_0 とすると、平衡状態にある遺伝子型配列は同質 4 倍体の場合は次のようになる。

$$(p_0 A + q_0 a)^4$$

$$= p_0^4 AAAA + 4p_0^3 q_0 AAaA + 6p_0^2 q_0^2 AAaa + 4p_0 q_0^3 Aaaa + q_0^4 aaaa$$

また、遺伝子型の選抜は、現実には表現型をみて選ぶので、目的とする遺伝子型を持つ個体を 100% 選抜できるわけではなく、エスケープ個体が含まれる。例えば菌核病抵抗性選抜についてみると、病原菌による感染を万遍なく受けた個体の中から、抵抗性を示す個体を選抜することが望ましいが、実際の選抜場面では感染むらが生じることが多く、罹病性個体が抵抗性として選抜個体の中に含まれてしまう。このように誤って選抜される個体の比率をエスケープ率 (e) とする。

選抜反応は次の 3 つのモデルについて検討した。

- ① 完全優性モデル：優性遺伝子 A が劣性遺伝子 a に対して完全優性を示す (A を持つ 4 遺伝子型, AAAA, AAaA, AAaa, Aaaa を同じように選抜)。
- ② 無優性モデル：A が a に対して無優性を示す (同質倍数体では A の数に従って形質の強さが変わるので選

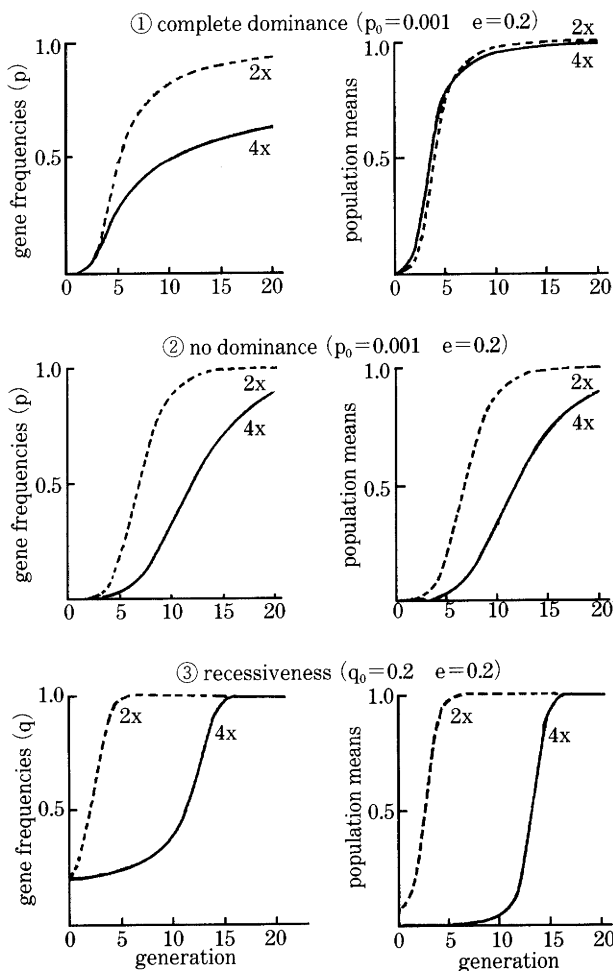


Fig. 5-1. Change in gene frequency (p or q) and population mean of phenotype with successive generations of selection in indicated diploid and autotetraploid population. Value of p_0 and q_0 are given in the legend with original population.

抜圧は A の数に比例する)。

- ③ 劣性モデル：aaaa のみ選抜。

それぞれのモデルにおいてエスケープ率が e のとき個々の遺伝子型にかかる選抜圧の係数は Table 5-1 のとおりである。

選抜を繰り返すことにより、遺伝子頻度及び集団の表現型平均値（以下集団平均値）がどのように変化するかを Fig. 5-1 に示した。なお、初期の遺伝子頻度は同質四倍体の原集団において、1000 個体の中に 2~4 個体が選抜可能な表現型として存在する範囲として定め、エスケープ率は 20% とした。

優性形質（モデルⅠ）の選抜において A の遺伝子頻度は二倍体では初期世代から高まるが、四倍体での増加は緩やかであった。しかし、集団平均値は二倍体と四倍体ともほとんど差がなく、いずれも高い選抜反応を示した。

無優性形質（モデルⅡ）の選抜では、二倍体、四倍体とも遺伝子頻度は初期世代で低く推移するが、5~6 世代以後大きく上昇し、世代が進むと優性形質の場合よりも遺伝子頻度は高くなった。無優性では遺伝子型値が遺伝子の数で決まるので、集団平均値は遺伝子頻度と同じ値を示すが、四倍体は二倍体に比べ緩やかな選抜反応を示した。

劣性形質（モデルⅢ）の選抜では、二倍体は初期世代から遺伝子頻度、集団平均値とも高い増加を示した。四倍体は遺伝子頻度があるレベルに到達するまで、その増加は著しく遅く、高次世代に達してから遺伝子頻度、集団平均値ともに急激に向上した。

循環選抜を 9 世代進めた菌核病抵抗性の選抜反応は 1, 2 世代では低く、3~9 世代にかけて高まる傾向を示し、累積選抜圧と選抜反応との関係から、それぞれの実現遺伝率を求めると、初期の 1, 2 世代は $h^2=0.078$, 3~9 世代では $h^2=0.368$ と高くなることが認められた (Fig. 4-7)。このことは菌核病の抵抗性遺伝子は初期世代は低い頻度で推移するが、選抜の世代を繰り返すことによって徐々にその頻度を高めてきたとみられた。菌核病抵抗性は微動遺伝子の集積により発現すると考えられることから、多くの遺伝子が抵抗性に関与しているので、このモデルとは直接的な対比はできない。しかし、個々の抵抗性遺伝子の働きは小さく、相加的であると仮定し、集団内における初期の遺伝子頻度が小さいとすると、選抜集団の抵抗性遺伝子の集積は、本モデルにおける無優勢形質の遺伝子頻度の変化と類似する傾向を示すと考えられる。すなわち、初期世代では高度な抵抗性を示す表現型が認められず、選抜個体は抵抗性レベルが低く、抵抗性を持たない個体を選抜する確率も高い。このため、選抜集団の遺伝子頻度の増加も低い、ある程度循環選抜が進んだ段階（菌核病では 3 世代以降）になれば集団内の遺伝子頻度が高くなり、抵抗性の変異も大きくなるので効率の高い選抜が可能になる。結果として、

集団における抵抗性遺伝子の集積が加速されることになる。

作物が改良されてきた歴史の中では、意識的あるいは無意識的に集団選抜が繰り返され（すなわち、表現型循環選抜が行われ）ており、その結果、野生種や祖先種からは想像しにくいような多様な変異と、大きな特徴をもつ作物品種が開発されてきた。植物個体の表現型循環選抜による顕著な改良効果をあげた例として、Dudley, J. W (1977) によるトウモロコシのタンパク質・油脂含量の改良がある。この実験では成分含量の個体選抜と集団内の無作為交配を 76 世代繰り返すことによって、油脂含有率は 4.7% から 19.0% まで高めており、他殖性植物集団の中に潜む大きな遺伝的変異を持続的に引き出すことに成功している。また、菌核病抵抗性の選抜反応と同じように、Sjodin (1990) はアルファルファパーティシリウム萎凋病選抜では初期の選抜反応は低いが、世代を進めるに従って選抜反応が高まると報告している。また、アルファルファの多雨環境への適応性向上のための耐湿性選抜（神戸 1988）、カラードギニアグラスの初期生育を高めるための低温発芽性選抜（神戸 1981）、てん菜の根重と根中糖分との負の相関関係を打破し産糖量を高めるための選抜（藤本 1971）においても同様な選抜反応が示されている。これらの選抜反応は集団内の無作為な交配によって、連鎖した遺伝子が徐々に組換えを起こし、新しい遺伝変異を持続的に生じた結果と考えられている（藤本 1974, 藤巻ら 1992）。第 3 章の菌核病抵抗性の機作について、抵抗性個体には病原菌の伸展を抑制する物質による防壁が発達している可能性が高いことを顕微鏡等の観察によって示唆したが、これら菌糸の伸展を阻害する抵抗性反応に関与する遺伝子の頻度が高まり、その組換えと集積が進んだことにより、今まで不可能とされていた大きな抵抗性反応を生み出すことができたと考えられる。

育種場面では新しく導入された作物に対して、新しい栽培環境への適応が要望されることが多い。このため原産地や栽培地帯で培われてきた植物の特性とは大きくかけ離れた形質の改良を育種目標とすることがしばしばである。これらの育種学的な対応として本章では目的とする選抜形質に関与する遺伝子の存在が不明、あるいはその頻度が低く、改良が難しい育種目標について表現型循環選抜の有利性を明らかにした。また、育種の解決が難しいとされてきた多犯性病害である菌核病に対する高度抵抗性系統の開発は遺伝子の集積と組換えを重視した育種法によって、既存の形質にない新たな表現型をもつ遺伝的分化が始まることを示す根拠になるものと考えられ

る。

第6章 摘 要

晩秋から早春にかけて発病がみられるアルファルファ菌核病 (*Sclerotinia trifoliorum* Eriks.) の被害は北海道から九州に及び、中でも積雪地域では大きな被害を与える重要病害である。この病害はレンゲ、クローバなど多くの草種に罹病する多犯性病害であることから抵抗性の遺伝的な品種間差異は存在しないとされ、抵抗性育種は難しいと考えられてきた。しかし、アルファルファの安定栽培にとって菌核病抵抗性品種の育成が不可欠と考え、育種研究に取組んだ。育種を始めるにあたり、抵抗性の遺伝的な差を発現させる環境を明らかにすることを重視した。また、選抜は新しい環境への適応性や場抵抗性を高めるために有効な表現型循環選抜法を用いることとした。検定法の開発と集団選抜を繰り返した系統は既存品種に比べ著しく高い抵抗性を示すことが認められ、多犯性病害においても抵抗性育種が可能であることを明らかにした。さらにこれらの育種材料を用いて抵抗性の機作について検討するとともに、表現型循環選抜がアルファルファ菌核病抵抗性の育種法として優れた方法であるのは、どのような育種学的基礎によるかについて明らかにしようとした。

1. 抵抗性の発現と環境条件

1) アルファルファ品種の生産力検定試験において菌核病の自然発病に僅かな品種間差異があることを観察した。しかし、自然発病だけの比較では年次による気象条件や栽培環境、試験区による変動が大きいことから不安定であると判断されたので、均一な感染を可能にする精度の高い検定環境を設定し、これらの差異が遺伝的であるかどうかを確認することとした。そこで、アルファルファをほ場に秋播きし、自然条件で初期発病が観察される冬期 (12月) に培養菌を株元に接種、ただちに断熱性の高い銀色寒冷紗で被覆することにより、発病の進展が斉一になり、生存率に有意な品種間差異を認めた (Table 1-6)。

2) この生存率と自然条件下での発病程度との間に $r = -0.798$ (1% 有意) の高い相関関係があり (Fig. 1-2)、自然条件下でのハードニング、培養菌接種、被覆処理の3つを組合せにより、人工接種による抵抗性検定が可能になった。品種の抵抗性反応についてみると、Moapa, Haymaker など非休眠性型の品種は菌核病に極めて弱く、休眠性が高く寒冷地適応性をもつ品種はやや強い傾向を示した。これらの中にはフランスの Flamande 系統群に由来する品種・系統が多く含まれた (Fig. 1-4) こ

とから、この抵抗性は遺伝的であると推察された。

3) アルファルファ菌核病抵抗性検定に適した育苗環境を明らかにするため、抵抗性選抜系統と既存のアルファルファ品種を供試し、抵抗性検定に適した発育時期と環境条件について検討した。低温・短日条件で育苗した2, 4, 6週苗に接種した場合には、アルファルファの生存率はいずれの品種・系統でも極く低く、品種・系統間に差異は認められなかった。10週苗 (8葉展開期) では抵抗性選抜系統は既存品種に比べ明らかに高い生存率を示した (Table 2-3)。愛知菌株による生存率は栃木菌株に比べやや高く、8週, 10週苗ともに系統間差異が認められた。育苗環境についてみると、高温 (23℃), 長日 (16時間日長) 条件での生存率が低かったが、生育適温下限温度域 (16℃) で・短日 (9時間日長) 条件で最も生存率が高くなった (Table 2-5)。この条件は個体の充実とハードニングが並行して進むことにより、抵抗性発現と系統及び個体の変異が拡大することから、検定に適した育苗環境と考えられた。

2. 菌株の病原性と抵抗性の機作

1) 菌核病菌の生育は菌株により異なり、山形、鳥取の菌株は愛知、長崎の菌株に比べ高温条件での伸長は遅いが低温条件ではやや優る傾向がみられた。その病原性を比較すると、北海道、山形の寒冷地菌株は温暖地菌株に比べ発病率が高く推移し、生存率を低下させることを認めた (Table 3-3)。一方、菌株による品種・系統の生存率について分散分析を行った結果、主要因には高い有意差が認められたが、菌株と品種による交互作用には有意差が認められなかった (Table 3-4)。また、発病の品種反応について菌株間の相関関係をみると15組み合わせ中14組合せに有意な相関関係が認められた (Table 3-5)。これらのことから、菌核の病原性には差がみられ、寒冷地の菌株は温暖地域の菌株に比べ強い病原性を示すことが明らかになった。しかし、レースとしての分化はないもの判断される。

2) 幼苗検定では、数日で地上部が萎凋し始め、2週間後にはほとんどの個体の地上部が枯死する。この時期の病徴を観察すると、罹病性品種の Moapa では根部にまで病斑が拡大し、菌糸がクラウン部全体に及ぶため、地際の大部分の幼芽を枯死させるので回復できない (Fig. 3-5, 6)、抵抗性選抜系統 SR58-6Y では菌糸の伸展がクラウン部で阻止され、菌糸の侵入を免れた健全な幼芽の再生に伴い草勢を徐々に回復するものとみられた。

3) 接種11日目の茎部の走査電顕観察では、罹病性個体への侵入菌糸は維管束や厚膜細胞組織など、ほとんどの細胞内に伸展し、柔細胞で最も増殖していた。しか

し、抵抗性個体に侵入した菌糸は表皮細胞内で伸展を停止する典型的な抵抗性反応が観察された (Fig. 3-7, 8)。このことから、感染部位では顕著な菌糸伸展の阻害反応が起きていることが示唆される。

3. 表現型循環選抜による抵抗性系統の育成

1) 愛知育成のナツワカバ、タチワカバ及びフランス、アメリカから導入した 10 品種・系統による約 3,000 個体を基礎集団として、1983 年から集団選抜と母系選抜を 9 世代繰り返した。各世代の選抜強度は 2.0~7.0%、集団の大きさは 55~100 個体としてランダム交雑し、選抜 1 世代から 9 世代に当たる SR58-1~SR58-9 について抵抗性検定を実施した (Table 4-1)。ほ場検定における 1~5 世代系統の生存率についてみると SR58-1, SR58-2 では極く低く、基礎集団の一部としたナツワカバと差がなかった。3 世代系統から高くなり、5 世代系統の SR58-5 は高い生存率を示した (Fig. 4-1, 2)。5~9 世代系統の検定では SR58-5 に比べ SR58-9 は明らかに高い生存率を示した (Table 4-4)。

2) Falconer の方法による累積選抜圧と選抜反応との関係から実現遺伝率を求めると初期世代は $h^2=0.078$ と低かったが、3~9 世代では $h^2=0.364$ と高い値を示した (Fig. 4-7)。このことから、基礎集団では菌核病の抵抗性に関与する遺伝子の働きは小さく、その頻度も低い。ため、1, 2 世代の選抜ではほとんど抵抗性の向上が認められなかった。しかし、選抜を繰り返すことによって集団内の抵抗性遺伝子の頻度が高くなり、9 世代系統の SR58-9 では大きな選抜反応が得られたと考えられた。

3) 自然発病条件での選抜系統の抵抗性を確認した。既存品種は播種期が遅くなるほど生存率が低くなり、収量が低下した。選抜系統 SR58-5 は各播種期とも高い生存率を示したが、特に発病程度が大きくなった晩播で、高い生存率と収量を維持することが可能であった (Fig. 4-10)。選抜系統はナツワカバ、タチワカバに比べ高い有利性を示すことが明らかになった。

4) 表現型循環選抜による菌核病の選抜反応と同質倍数体の理論的な選抜モデルを対比した。無優性で初期の遺伝子頻度を低くしたモデルでは、エスケープを少なくして選抜世代を繰り返せば目的とする遺伝子頻度を徐々に高めることが可能になり (Fig. 5-1)、菌核病抵抗性の選抜反応と同様な傾向を示すとみられた。このことから、遺伝子の働きが小さく、その頻度が低い集団においても遺伝的な差が表現型として発現する環境が設定できれば表現型循環選抜は極めて有効な育種手法であると推論した。

謝 辞

本研究におけるアルファルファ菌核病抵抗性の表現型循環選抜は愛知県農業総合試験場作物研究所飼料作物研究室 (牧草育種指定試験地) において、抵抗性検定のための育苗環境の解明、病理学的解析及び選抜反応の解析については、農林水産省草地試験場育種第一研究室において実施した。

1983 年の本研究開始時から藤本文弘博士 (現岐阜大学農学部教授) には、愛知農総試、草地試験場において研究室長としてご指導とご鞭撻をいただき本研究推進の大きな力になった。本論文作成にあたっては、ご校閲の労をも賜った。

研究の実施にあたって、電頭観察では草地試験場環境部病害研究室古賀博則博士 (現石川県農業短期大学教授) の協力を賜った。筆者が草地試験場在任中の抵抗性選抜 (6 世代から 9 世代) とその採種は、愛知農総試作物研究所において稲波進前飼料作物研究室長のもとで主に水上優子研究員と深谷勝正主任が行った。また、草地試験場育種部山田実元部長、長谷川寿保元部長、寺田康道前部長、中嶋紘一育種部長、杉信賢一前育種工学室長、但見明俊前環境部長、杉田紳一牧草育種研究室長、水野和彦前主任研究官 (現北海道農業試験場イネ科牧草育種研究室)、奥村健治博士 (現沖縄県畜産試験場牧草育種指定試験地主任)、北海道農業試験場山口秀和前マメ科牧草育種室長、我有満マメ科牧草育種研究室長ならびに愛知農総試では加藤満研究員、加藤虎治元作物研究所長、井上隆雄元所長、小島元所長、法邑勲飼料作物研究室長から本研究に対して有益なご助言と激励を賜った。

ほ場試験の遂行にあたっては作物研究所飼料作物研究室の臨時職員、草地試験場業務 1 科の各職員ならびに臨時職員の方々の尽力に負うところが大きい。ここに上記の各位に心から感謝申し上げる。

引用文献

- 安達 篤・宮下淑郎・荒木 博 (1976) ベレニアルライグラスにおける越冬性の品種間差異について。北農試研報 114, 173-193.
- 赤井 純 (1970) : インゲン菌核病の発生予察と防除。植物防疫 24, 373-377.
- 青木孝之・大久保博人・鬼木正臣・小林享夫・佐藤豊三・松本直幸 (1995) : 菌類の分類。岸国平編。植物病理学辞典。第 1 版 pp. 19-64. 養賢堂。東京。
- Arseniuk, E. (1989) : Effect of induced autotetraploidy on response to Sclerotinia clover rot in *Trifolium pratense* L. Plant Breeding 103, 310-318.
- Bolton, J. L. (1962) : Alfalfa botany, cultivation and utiliza-

- tion. World Crops Book. pp. 474. Leonard Hill, London.
- Bolton, J.L., Goplen, B.P. and Baenziger, H. (1972): World distribution and historical developments. In: Hanson, A. A. Barnes, D.K. Hill, Jr, R.R. (eds.) Alfalfa and alfalfa improvement. pp. 1-34. Amer. Soc. Agron. Madison.
- Busbice, T.H., Hill, Jr, R.R. and Carnahan, H.L. (1972): Genetics and breeding procedures. In: Hanson, C.H. (ed.) Alfalfa science and technology. pp. 283-318. Amer. Soc. Agron. Madison.
- Cameron, D.G. (1973): Lucerne in wet soils — the effect of stage of regrowth, cultivar, air temperature, and root temperature —. Aust. J. Agric. Res. 24, 851-861.
- Carroll, R.B. Lukezic, F.L. and Skelly, J.M. (1970): Evidence that isolates of *Sclerotinia trifoliorum* from crownvetch and alfalfa are not specific for either host. Plant Disease Reprtr. 54, 811-814.
- Cooper, J.P. (1954): Studies on growth and development in *Lolium*. IV Genetic control of heading responses in local populations. J. Ecol. 42, 521-526.
- Cooper, J.P. (1959): Selection and population structure in *Lolium*. III. Selection for date of ear emergence. Heredity 13, 461-479.
- Dickinson, C.H. and Lucas, J.A. (1982): 寄主一病原の特異性. 寺中理明訳. 植物病理学—植物の病害とその病原—. 基礎微生物学 6 pp. 181-232. 培風館. 東京.
- Dudley, J.W. (1977): 76 Generations of selection for oil and protein percentage in maize. In: Pollak, E., Kempthorne, O., and Bailey Jr, T.B. Proceeding of the international conference on quantitative genetics, 459-473.
- Elgin, J.H. and Beyer, E.H. (1968): Evaluation of selected alfalfa clones for resistance to *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. Crop science 8, 265-266.
- Elgin, R.E. Welty and Gilchrist, D.B. (1988): Breeding for disease and nematode resistance. In: Hanson, A.A. Barnes, D.K. Hill, R.R. (eds.) Alfalfa and alfalfa improvement, pp. 827-858. Amer. Soc. Agron. Madison.
- Falconer, D.S. (1960): Threshold characters. In: Introduction to quantitative genetics. pp. 270-280. New York. Longman.
- Frame, J. and Newbould P. (1986): Agronomy of white clover. Adv. Agron. 40, 1-88.
- 藤巻 宏・鶴飼保雄・山本皓二・藤本文弘 (1992): 他殖性作物の集団改良. 植物育種学 基礎編 pp. 127-137, 応用編 pp. 21-38. 培風館. 東京.
- 藤本文弘 (1971): てん菜育種における母系選抜法の評価に関する研究—組合せ能力の向上ならびに形質間相関打破の選抜法として—. てん菜研究報告 10, 1-136.
- 藤本文弘 (1974): 他殖性作物における集団構造と選抜. 育種学最近の進歩 14, 43-48.
- 藤本文弘 (1978): 牧草育種における適応と選抜 2. 農業技術 33, 108-110.
- 藤本文弘 (1985): Medicago 属の分類とアルファルファの品種分化. 育種学最近の進歩 26, 55-61.
- 藤本文弘・稲波進・神戸三智雄 (1982): 牧草の新しい品種. 愛知農総試農業の新技术 14, 2-44.
- 藤本文弘・大角忠雄・有沢道雄・鈴木信治・稲波進・神戸三智雄・深谷勝正 (1983): アルファルファの新品種「タチワカバ」の育成. 愛知農総試研報 15, 110-121.
- 藤本文弘 (1989): アルファルファ. 松尾孝嶺監修・植物遺伝資源集成 II pp. 607-612. 講談社. 東京.
- 藤本文弘 (1993): 牧草におけるエコタイプ集団の分化要因と育種効果. 育種学最近の進歩 34, 107-114.
- Garza, R.T., Barnes, R.F., Mott, G.O. and Rhykerd, C.L. (1965): Influence of light intensity, temperature and growing period on the growth and chemical composition and digestibility of Culver and Tanverde alfalfa seedings. Agron. J. 57, 417-420.
- Gilbert, A.H. and Bennett, C.W. (1917): *Sclerotinia trifoliorum* the cause of stem rot of clovers and alfalfa. Phytopathology 7, 432-442.
- Graham, J.H., Kreitlow, K.W. and Faulkner, L.R. (1972): Diseases. In: Hanson, C.H. (ed.) Alfalfa science and technology, pp. 497-526. Amer. Soc. Agron. Madison.
- Hanson, A.A. and Graham, J.H. (1955): A comparison of greenhouse and field inoculation of Ladino clover with *Sclerotinia trifoliorum*. Agron. J. 47, 280-281.
- Hanson, C.H., Busbice, T.H., Hill, Jr, R.R., Hunt, O.J. and Oakes, A.J. (1972): Directed mass selection for developing multiple pest resistance and conserving germplasm in alfalfa. J. Environ. Quality. 1, 106-111.
- Harding, S.C. and Sheehy, J.E. (1980): Influence of shoot and root temperature on leaf growth, photosynthesis and nitrogen fixation of lucerne. Ann. Bot. 45, 229-233.
- 橋岡良夫 (1952): レンゲ作の安定と病害. 農業技術. 7 (11), 24-26.
- 橋岡良夫 (1954): 紫雲英病害の生態と防除 (1): 農及園 29, 1015-1018.
- Hill, Jr, R.R. (1971): Selection in autotetraploids. Theor. Appl. Gene. 41, 181-186.
- Hill, Jr, R.R. (1987): Principles of cultivar development. Macmillan, New York, 11-39.
- 本田雄一・柚木利文 (1973): ラジノクロバ菌核病に関する研究. 第1報 ラジノクロバ菌核病の被害および感染経路. 東北農試研報 46, 143-160.
- 本田雄一・柚木利文 (1978): ラジノクロバ菌核病に関する研究. 第2報 積雪下におけるラジノクロバ菌核病の病勢伸長. 東北農試研報 50, 87-97.
- 飯田 格 (1956): レンゲの病害とその防除法. 農及園 31, 1381-1384.
- Inami, S (1988): Breeding of new alfalfa cultivars for high quality forage production in warm regions of Japan. JARQ 22, 206-213.
- 稲波 進・神戸三智雄・水上優子・坂井三千治 (1997): アルファルファの新品種「ツウワカバ」の育成と栽培法及び乳牛への給与効果. 愛知農総試農業の新技术 65, 1-26.
- INRA (1984): *Laluzerne Medicago sativa*. Bulletin des Varietes Plant Fourrageres Perennes, 299-393.
- 神戸三智雄・藤本文弘・稲波 進・深谷勝正 (1979): アルファルファの採種に関する研究 (1) 開花に及ぼす日長の影響. 愛知農総試研報 11, 49-55.
- 神戸三智雄・藤本文弘・稲波 進・深谷勝正・山下和己

- (1981): カラーダギニアグラスにおける低温発芽性の選抜効果. 愛知農総試研報 **13**, 108-115.
- 神戸三智雄・稲波 進・藤本文弘 (1986): アルファルファ菌核病抵抗性品種の育成 (1) 品種系統の抵抗性評価と検定法. 日草誌 **32** (別), 134-135.
- 神戸三智雄・稲波 進・藤本文弘・山下和己 (1988): アルファルファ耐湿性品種の育成—選抜による多雨環境への適応— 愛知農総試研報 **20**, 136-143.
- 神戸三智雄・藤本文弘・稲波 進 (1993): アルファルファにおける菌核病抵抗性人工接種による圃場検定法の開発と既存品種の抵抗性評価. 育種学雑誌 **43**, 277-287.
- 神戸三智雄 (1993): 他殖性作物の選抜反応—同質倍数体における選抜反応を実例として—. 育種学最近の進歩 **34**, 103-108.
- 神戸三智雄・古賀博則・藤本文弘・奥村健治・水野和彦 (1996): アルファルファ菌核病抵抗性検定のための育苗条件設定と抵抗性の病理解剖学的解析. 育種学雑誌 **46**, 261-268.
- 神戸三智雄 (1996): 循環選抜によるアルファルファの多雨環境への適応性向上. 指定試験 70 周年記念誌, 141-143.
- Kanbe, M., Fujimoto, F., Mizukami, Y., Inami, S., and Fukaya, K. (1997): Increase of resistance to Sclerotinia crown and stem rot of alfalfa through recurrent selection. Breeding Science **47**, 347-351.
- 金子幸司 (1964): 牧草の耐病性育種. 育種学最近の進歩 **5**, 85-64.
- 金子幸司 (1983): トウモロコシの耐病性育種. 村上寛一監修, 作物育種の理論と方法. pp. 82-86. 養賢堂. 東京.
- 木谷清美・国安克人 (1970): 四国地域における牧草・飼料作物病害の種類および発生状況. 四国農試報告 **22**, 119-153.
- 北島 博・梶原敏宏 (1964): 飼料作物の病害. 作物病害図説. pp. 396-417. 養賢堂. 東京.
- 古賀博則・三浦清之 (1990): 出穂後の経過日数と穂もち抵抗性. 日植病報 **56**, 360.
- 高坂卓爾 (1988): 抵抗性の機構. イネもち病と抵抗性育種. pp. 321-340. 博友社. 東京.
- Kreitlow, K. W. (1951): Infection studies with dried grain inoculum of *Sclerotinia trifoliorum*. Phytopathology **41**, 553-559.
- Leath, K. T. (1985): General disease. In: Taylor, N. L. (ed.), Clover Science and Technology pp. 205-233. Amer. Soc. Agron. Madison.
- 真木芳助 (1975): アルファルファの栽培史と研究の進展. 北農試研究資料 **6**, 1-11.
- 松浦 義 (1946): 紫雲英菌核病に関する研究. 山形農事試験場報告 **1**-156.
- M, Matsuura, N. Matsumoto, A. Sawai, M. Gau and S. Ueda (1985): Resistance of red clover cultivars to clover rot in pure and mixed stands with reference to breeding work. Proc. 15th Intl. Grassld. Congr., 288-290.
- 松本勲・浅田泰次 (1991): 誘導抵抗性と木化誘導. 植物感染生理学最近の進歩 125-133.
- Michaud, R., Lehman, W. F. and M. D. Rumbaugh (1988): World distribution and historical development. In: Hanson, A. A. Barnes, D. K. Hill, R. R. (eds.), Alfalfa and alfalfa improvement. pp. 25-91. Amer. Soc. Agron. Madison.
- 水上優子・奥村健二・神戸三智雄・稲波 進 (1996): RAPD 分析によるアルファルファ循環選抜系統の集団解析・育種学会中部地区談話会第 4 回講演要旨.
- 中根 晃・金田忠吉 (1987): 糸状菌病. 中島哲夫監修, 新しい植物育種技術. pp. 258-270. 養賢堂. 東京.
- 成田武四 (1963): 牧草・飼料作物の病害. 植物防疫 **17**, 397-402.
- 西原夏樹 (1961): 牧草の病害. I. クローバーとアルファルファ. 千葉農試資料 **1**, 1-124.
- 西原夏樹 (1981): レンゲ菌核病, クローバ菌核病, アルファルファ菌核病. 農林水産研究文献解題 **8**, 13-51.
- 西原夏樹 (1990): 原色 牧草の病害. pp. 164-165 雪印種苗. 札幌.
- Pierson, P. E. et al (1994): Selection for resistance to sclerotinia crown and stem rot in the field and greenhouse. 34th North Amer. Alfalfa Impr. Conf. 29.
- Pratt, R. G. and Rowe, D. E. (1996): Development and evaluation of Mississippi sclerotinia-resistance (MSR) alfalfa germplasm. 36th North Amer. Alfalfa Improvement Conf. 14.
- Prior, G. D. and Owen, J. H. (1964): Pathological anatomy of *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. on clover and alfalfa. Phytopathology **54**, 784-787.
- Raynal, G. (1981): Red clover and alfalfa crown rot caused by *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. 2. Agronomie **1**, 573-578.
- 斉藤 正 (1960): 牧草病害の種類と発生の概要 —とくに北陸地方の主要病害について—. 農業技術 **15**, 204-208.
- 佐久間勉・荒木隆男 (1975): 北海道に発生するマメ科牧草菌核病の発消長と病原菌について. 日植病報 **41**, 125.
- 佐々木武彦 (1994): 水稻の耐冷性遺伝資源と品種の育成・冷害とバイオテクノロジー. 生研報告 **36**, 162-186.
- 佐々木武彦 (1996): 耐冷性育種—近年の発展—. 育種学最近の進歩 **38**, 7-10.
- Sato, K. (1971): Growth and development of lucerne plants in a controlled environment. 1. The effects of daylength and temperature on growth and chemical composition. Proc. Crop Sci. Soc. Jpn. **40**, 120-126.
- Scott, S. W. (1984): Clover Rot. Bot. Rev. **50**, 491-504.
- 新留伊俊 (1967): ルーサン菌核病の防除法. 日草誌 **13**, 264.
- 新留伊俊 (1970): 牧草の病害虫とその対策. 鹿児島農試創立 70 周年記念報告, 238-242.
- Sjodin J. (1990): Achievements in fodder crops breeding in nordic Europe. In: Nijs A. P. M. and A. Elgersma (eds) Fodder crop breeding. Proc. 16th meeting of the Fodder Crop Section of Eucarpia. pp. 7-12. Netherlands.
- 草地試験場 (1983): 全国草地飼料作物育種関係試験研究機関の気象等環境データ一覧. 草地試験場資料 **57**, 1-47.
- Sproston, T. and Pease, D. C. (1957): Influence of thermoperiods on production of the sexual stage of the fungus *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. Trans. New York Academy of Science **20**, 199-204.
- 末次 勲・山崎信蔵・斉藤喜助・土屋 茂・金田忠吉 (1960): 耐雪飼料—レンゲ北陸 1 号. 農及園 **35**, 706-708.
- 杉本利哉 (1959): 豆類菌核病の発生と病原菌の菌糸伸長との関係について. 北大農紀 **3**, 114-120.
- 杉信賢一 (1975): アルファルファの品種. 北農試研究資料 **6**,

- 13-58.
- 杉信賢一 (1983) : わが国におけるアルファルファの現状と問題点. 加里研究 **33**, 28-37.
- 鈴木直治 (1957) : 甘藷紫紋羽病に関する研究 VI. 感染部位の組織化学的研究. 農技研報 **C8**, 69-83.
- 鈴木信治・稲波 進 (1971) : アルファルファ (ルーサン) の品種解説. 農林水産技術会議事務局 指定試験育種第4号 9-88.
- 鈴木信治・稲波 進・桜井康夫 (1972) : アルファルファの生育特性による品種群別. 日草誌 **15**, 33-41.
- 鈴木信治・稲波 進 (1974) : アルファルファの新品種「ナツワカバ」の育成. 愛知農総試報 **A6**, 21-31.
- 鈴木信治 (1986) : アルファルファの品種と栽培・利用 (10) : 畜産の研究 **40**, 1217-1223.
- 鈴木信治・藤本文弘・稲波 進・神戸三智雄 (1990) : アルファルファ温暖地・暖地向き品種「ナツワカバ」・「タチワカバ」の育成とその適応性の解析. 日草誌 **36** (別), 5-8.
- 鈴木信治 (1992) : マメ科牧草アルファルファその品種・栽培・利用— pp. 158-159. 雪印種苗. 札幌.
- 田中敬一・永谷隆 (1980) : 図説 走査電子顕微鏡. 生物試料作製法. pp 282. 朝倉書店. 東京.
- 谷 利一・山本弘幸 ((1990) : 病害抵抗性に関する寄主の生理活性物質. 西村正暘・大内成志編, 植物感染生理学. pp. 99-132. 文永堂. 東京.
- 富山宏平 (1973) : ジャガイモ細胞の疫病菌に対する過敏感反応. 植物病害研究 **8**, 115-132.
- Viands, D.R., Barnes, D.K., Stucker R.E. and Frosheiser, F. I. (1979) : Inheritance of resistance to bacterial wilt in two alfalfa gene pools: Respose to selection and quantitative analysis. Crop Science **19**, 711-714.
- Viands, D.R. and Barnes, D.K. (1980) : Inheritance of resistance to bacterial wilt in two alfalfa gene pools : qualitative analysis. Crop Science **20**, 48-54.
- Welty, R.E. and Busbice, T.H. (1978) : Field tolerance in alfalfa to *Sclerotinia crown and stem rot*. Crop Science **18**, 508-509.
- Williams, G.H. and Western, J.H. (1965) : The biology of *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. and other species of sclerotium forming funngi. Ann. Appl. Biol. **56**, 253-260.
- 山田行雄 (1974a) : 量的形質の遺伝学 (5) ・遺伝 **28** (10), 106-111.
- 山田行雄 (1974b) : 量的形質の遺伝学 (6) ・遺伝 **28** (11), 105-111.
- 山本 勉・江塚昭典・岡本 弘・桜井義郎 (1963) : 中国地域における牧草, 飼料作物の病害について. 中国農試報告 **A9**, 135-149.
- 横尾政雄 (1983) : イネの耐病性育種. 村上寛一監修, 作物育種の理論と方法. pp. 77-82. 養賢堂. 東京.

Studies on Breeding for Sclerotinia Crown and Stem Rot Resistance of Alfalfa

Increase of Resistance through
Phenotypic Recurrent Selection

Michio KANBE

*Department of Plant Breeding, National Grassland Research Institute,
Nishinasuno, Tochigi 329-2793, Japan*

*Present address : Crop Institute, Forage Crop Laboratory, Aichi-ken Agricultural Research Center,
Nagahisate-Machi Aichi 480-1193, Japan*

(Received June 4, 1998)

ABSTRACT

Sclerotinia crown and stem rot (SCR: *Sclerotinia trifoliorum* Eriks) is one of the serious problems leading to failure of stand establishment in alfalfa and in other legumes in the Northern part of Europe, humid area of America and all over Japan, especially in areas with heavy snow. Alfalfa plants of all ages are susceptible to this disease but the damage is most severe at the seedling stage under cool and moist conditions. The damage may be extensive in late winter and early spring following the fall seeding of alfalfa. Breeding of cultivars resistant to SCR was considered to be difficult because of the non-specific character of the host-pathogen relationship reported in several pathological and breeding studies. However, differences in the degree of disease severity were observed among alfalfa cultivars under artificial inoculation in the test field of Aichi Agric. Res. Cent. (AARC) which is located in the warmer region of Japan. It was suggested that the inoculation method which employed hardening under natural conditions enabled to distinguish the genetic differences in the resistance to SCR. We have initiated breeding work for resistance of alfalfa to SCR, and studies based on long-term selection for SCR resistance have been carried out in artificially inoculated field plots from 1983 to 1993. In this report, The author elucidated the environmental conditions which enabled expression of the genetic difference, and the genetic basis of population improvement which was realized in the advanced generations by phenotypic recurrent selection for SCR resistance.

1. Environmental conditions required for the expression of genetic differences of resistance

Three experiments were carried out, one under field natural conditions for the infection and two under artificial inoculation in test fields. For the tests under artificial inoculation, all the varieties and strains were sown in the field in September and were inoculated with cultured hyphae of SCR on the basal part of the plants in December. The symptoms of the disease were enhanced by the use of covering treatments after inoculation, and varietal differences in the severity of the disease were recognized based on the percentages of the plants which survived.

A high correlation coefficient ($r = -0.798^{**}$) was obtained between the survival rate under artificial inoculation and the disease severity under natural infection. It was suggested that this inoculation method which used hardening under natural conditions enabled to evaluate the differences of resistance to SCR among varieties and strains. The nondormant varieties showed a high susceptibility to the disease. On the other hand, varieties of the Flamande group were found to be more resistant than the others. Based on these results it was considered that the varieties and strains originating from the Flamande group represented a source of resistance genes to SCR, and

that the inoculation method could be applied for the breeding for resistance to SCR.

The degree of SCR damage differs by ages, but is most severe at the seedling stage. Two experiments were carried out to determine the critical seedling stage and growth conditions under which the resistance was expressed most strongly among varieties and strains of alfalfa. Infected tissues were observed cytologically in individuals of selected SR-strains and commercial varieties. They were inoculated with the cultured hyphae of two isolates, one from the Aichi field and the other from the Tochigi field. When alfalfa varieties and strains grown under the low temperature / short day regime were inoculated with SCR, all of them showed low survival rates in younger plants less than 6-wk-old, but variable survival rates in 10-wk-old plants, and the 10-wk-old plants of selected strains survived better than commercial varieties. The Aichi isolate was less virulent than the Tochigi isolate at all ages, and in the former the degree of resistance among the selected strains was clear in 8 to 10-wk-old stages. The degree of virulence of the Aichi isolate was considered to be suitable for detecting differences in resistance by the seedling test. Although most of the growth condition of seedlings did not enable to detect differences in the resistance level due to the low plant survival, growth conditions at 16°C under 9 hr daylength was optimum to reveal significant differences among varieties and strains.

2. Pathogenicity of the isolates and cytological mechanism of the resistance to SCR

The isolates of SCR were collected from 7 sites in Japan. The isolates of the cold region of Hokkaido and Yamagata indicated severe disease symptoms compared with the isolates of the warm region. The result of analysis of variance for the survival rate of varieties showed that there were significant differences in each of the main effects, but there was no significant interaction between the isolate and the variety, them. Moreover correlation coefficient of survival rate of varieties between different isolates were significant in 14 of 15 combinations. They indicate that the isolate of cold region have more strong pathogenicity but there is no specialization of parasitism.

In nursery test, top parts of the plant were wilt in a couple of days and withered after two weeks from inoculation. The lesion development from stem to root was minimal in most of the resistant plants and the immature buds on the crown survived better. Hyphae growth of the pathogen and host cellular responses in alfalfa stems were compared between a susceptible variety Thor and a resistant strain SR58-6Y under a light microscope and a scanning electron microscope. In the susceptible variety, invading hyphae developed extensively in most of the host cells, and parenchymatous tissues degenerated and partly collapsed 11 days after inoculation. In the resistant strain, on the other hand, invading hyphae were restricted within the epidermal cells, which became brown. These results suggested that the growth of the invading hyphae was inhibited in the resistant strain by the browning of the host cells. Genes controlling expression of the resistance should be identified in the future.

3. Breeding of resistance strains of alfalfa to SCR through phenotypic recurrent selection

The following 10 cultivars and strains were used as the original population for SCR selection : Natsuwakaba, Tachiwakaba, LR43112-7, CRSY541-1, CR488-3, Everest, Derby, Lutece, Furez507 and Delta. Selection of surviving plants was repeated for 9 generations in artificially inoculated fields from 1983. The selection method was phenotypic recurrent selection, which for each generation consisted basically of mass selection in each generation. The selection rate was 2.0-7.0% and 55 to 100 plants were selected depending on the generations. Evaluation for resistance of selected strains from the 1st to 9th generations were carried out in two evaluation groups. The effectiveness of selection was low in the 1st and the 2nd generations, but the strain SR58-5 selected for five generations was the most resistant among all the selected strains and commercial cultivars in the evaluation 1. The strain SR58-9 selected for nine generations was more resistant than SR58-5 in evaluation 2. In order to combine the results of the evaluation in two experiments, the heritability

estimates of SCR resistance were calculated by Falconer's method (1960). The heritability was estimated separately for the first two generations and later seven generations by fitting two regression coefficients. The regression coefficient of the selection response on the cumulative selection was designated as "realized heritability" by Falconer. In our results, the heritability of SCR resistance was low ($h^2=0.078$) in the early generations but relatively high ($h^2=0.368$) in the later generations. The response to selection was very low in the 1st and 2nd generations, and distinctly high from the 3rd to the 9th generations.

Selected strains of resistance and cultivars were tested in natural infection field under different seeding times. As the seeding time became later, survival rate of the cultivars became lower and the forage yield decreased. Selected strain SR58-5 displayed the highest survival rate, especially in the latest seeding. It proved directly that these selected strains can be used as a profitable variety for practical use. The theoretical studies on directional selection in autotetraploids indicate that the rate of response is low in the early generations and increases as selection proceeds when a low frequency of desirable genes was assumed in the initial generation in which the selection was performed, since the rate of changes of the gene frequency is dependent on the gene frequency in the population. Response to the selection increases with the repetition of the selection in advanced generations, which results in the increase of the frequency of useful genes. When these theoretical studies were applied to the change of heritability of SCR resistance in our results of selection to the 9th generations, it appeared that the frequency of occurrence of useful genes responsible for SCR resistance was low in the original population but increased in the later generations. If we can establish the environments in which the genotypic difference can be expressed as the phenotypic difference, phenotypic recurrent selection is very effective. The result of this research can be a contribution to the demonstration that recurrent selection is effective for the accumulation of resistance genes with minor polygenic action, especially in the case of breeding work for the improvement of characters which had been considered almost impossible by the short-term selection trials.

Kanbe, M. (1999) : Studies on Breeding for Sclerotinia Crown and Stem Rot Resistance of Alfalfa ; Increase of Resistance through Phenotypic Recurrent Selection Bull.Natl. Grassl. Res. Inst. 57 : 79~125.

Key words : alfalfa, *Medicago sativa*, *Sclerotinia trifoliorum*, disease resistance, growth conditions, microscopy, phenotypic recurrent selection, heritability, disease resistance