

特集：青枯病

薬培養によるナス青枯病抵抗性育種

高知県農業技術センター 岡田昌久

はじめに

ナスは、高知県にとって最重要園芸品目である。高知県農業技術センターでは、産地振興のため県独自ナス品種の育成に取り組んでおり、品種育成には薬培養を積極的に利用している。薬培養は、減数分裂後の花粉細胞から植物体を再分化させるもので、得られた半数体植物の染色体を倍加させることによって完全なホモ接合体を誘導することができる。これまでに高知県では、薬培養系統間での交配による促成栽培用ナスF₁品種の‘土佐鷹’を育成している（岡田ら、2007）。

一方、青枯病はナスの重要な病害であり、抵抗性品種の育成が望まれている。青枯病抵抗性の遺伝についての知見は多くないが、既存の品種・系統の抵抗性には免疫抵抗性はないとされている（門馬ら、1997）。また、ナス品種‘台湾長’の抵抗性には多数の因子が関与している（山川、1978）など遺伝様式は複雑であり、効率的で有效的な抵抗性育種法は確立されていない。

既存の品種・系統に病害抵抗性などの遺伝子を導入するには、多くの場合戻し交配法が用いられる。しかし、青枯病抵抗性育種において、戻し交配により抵抗性を導入しようとする場合、次のような問題点があげられる。
①交配後、初期の分離世代でのヘテロ接合体の抵抗性は、その自殖後代の抵抗性とは異なる。
②抵抗性の表現型は環境の影響を受ける（環境変異）ことから、1個体のみの検定でその個体・系統の抵抗性の程度を判定することはできない。薬培養においては完全なホモ接合体が得られ、これの自殖により同一の遺伝子組成をもった、多数の種子が得られることから、上記の問題を解消することができる。本稿では、高知県での薬培養を利用したナス青枯病抵抗性育種の取り組みを紹介する。

I 薬 培 養 法

薬培養の材料となる花蕾は、その花粉が一核期後期と推定される、花弁とがくがほぼ同長のものを用いる。前処理として花蕾を暗黒下で4°C、10日間の低温処理を行

う。前処理後の花蕾は70%エタノールで数秒、ピューラックス5倍液（次亜塩素酸ナトリウムが1.2%）で15分間殺菌後、滅菌水ですすぎ無菌的に薬を取り出して置床する。培地は2,4-D 0.1 mg/l、カイネチン0.1 mg/l、ショ糖3%，寒天1%，粉末活性炭1 g/lを含むpH 5.8のMS培地を用いる。培養条件は培養開始後3日間が35°Cの暗黒、それ以後は25°C、16時間明期とする（武田ら、1990）。ナスの薬培養では比較的容易に、体細胞胚經由で半数体再分化植物が得られる（図-1）。

再分化植物は、ショ糖1%，寒天1%を含むpH 5.8のMS培地に移植して継代培養する。継代培養により発根した植物体は、順化後コルヒチン処理を行う。コルヒチン処理は、脱脂綿をのせた頂芽あるいは腋芽にツイン20を含んだ0.1%のコルヒチン水溶液を滴下して行い、処理期間は3日程度とする。コルヒチン処理後に染色体数の倍加した苗条から、自家受粉により採種を行う。

II 青枯病抵抗性ナス台木‘台太郎’の薬培養

青枯病抵抗性育種の素材とするため、台木品種‘台太郎’の薬培養を行い、青枯病抵抗性系統を選抜した。

‘台太郎’は、インドのナス固定系統‘WCGR112-8’と

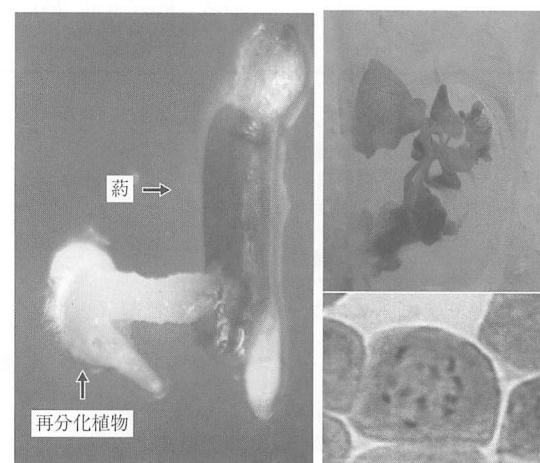


図-1 ナス薬培養

左：再分化、右上：再分化植物体、右下：半数体の染色体 ($2n = x = 12$)。

マレーシアのナス固定系統 ‘LS1934’ との交配による F_1 品種である。両親はいずれも青枯病抵抗性系統であるが, ‘LS1934’ が ‘WCGR112-8’ より強度の抵抗性をもつ (吉田ら, 2004)。

薬培養により, ‘台太郎’ 薬培養系統 ac-1 (台太郎 ac-1), ‘台太郎’ 薬培養系統 ac-3 (台太郎 ac-3), ‘台太郎’ 薬培養系統 ac-5 (台太郎 ac-5), ‘台太郎’ 薬培養系統 ac-9 (台太郎 ac-9) の 4 系統が得られた。これらの薬培養系統について、青枯病抵抗性の幼苗検定を行った。なお、検定は旧野菜・茶業試験場（以下、旧野菜・茶試）ナス科育種研究室で行われた。対照品種・系統には‘千両二号’, ‘台太郎’, ‘LS1934’, ‘WCGR112-8’, ‘中生真黒’, ‘橘田’ を用い、1997年6月13日に播種し7月9日に移植した。青枯病菌は旧野菜・茶試の汚染圃場で枯死したナスから単離した菌を用い、脇本液体培地で30°C, 48時間振とう培養後, 2×10^8 個/ml に調整し接種液とした。7月22日にナス苗を断根・洗浄後、浸根接種し土壌病害選抜装置に定植した。地温は30°Cとした。8月13日に0:健全～4:枯死の5段階で発病程度を調査し、発病株率と平均発病指数を求めた。各品種・系統とも15株前後を供試した。その結果、対照品種の‘中生真黒’, ‘橘田’, ‘千両二号’はすべての個体が発病し、ほとんどが枯死した。‘台太郎’の両親系統では, ‘WCGR112-8’ が ‘LS1934’ に比べ発病株率および平均発病指数が高かった。‘台太郎’は発病株率、発病指数ともに両親系統の間の値を示した。‘台太郎’ 薬培養系統は系統ごとに発病株率、平均発病指数が異なったが、いずれも‘千両二号’などよりも高い抵抗性を示した。これらのうち台太郎 ac-1 および台太郎 ac-3 が発病株率、平均発病指数ともに低く, ‘LS1934’ と同程度の抵抗性をもつ

ものと推察された。一方、台太郎 ac-5 および台太郎 ac-9 の抵抗性はやや低く, ‘WCGR112-8’ 程度であると考えられた（表-1）。

以上のように、強度の異なる青枯病抵抗性をもつ系統間の F_1 品種 ‘台太郎’ から得られた薬培養系統群では、青枯病抵抗性強度について遺伝的分離が見られた。同時に、強度抵抗性の親系統と同程度の抵抗性を示す薬培養系統が得られることが明らかになった。

III 台木品種 ‘台二郎’ の育成

‘台太郎’ 薬培養系統とヒラナスとの交雑により、ナス台木 F_1 品種の育成を試みた。‘台太郎’ 薬培養系統のうち、青枯病抵抗性の高かった台太郎 ac-1 および台太郎 ac-3 にヒラナスを受粉した。その結果、台太郎 ac-1 はほとんど結実しなかったのに対し、台太郎 ac-3 は良好な着果を示し、1果当たりの種子数は平均314粒であった。このため、台木の青枯病抵抗性素材として台太郎 ac-3 を選定し、ヒラナスとの交雑系統を試交3号とした。

試交3号について、青枯病抵抗性検定を行った。対照としてヒラナス, ‘台太郎’, 台太郎 ac-1, 台太郎 ac-3, ‘竜馬’ を用いた。1998年3月20日に播種し、4月1日に直径12cmのポットに鉢上げした。5月9日に断根し、青枯病IV群菌の接種液を各ポットに30mlずつ灌注接種した。各品種・系統とも15株を供試し、6月10日に5段階で発病程度を調査した。その結果、ヒラナスおよび‘竜馬’では100%発病し、ほとんどが枯死した。‘台太郎’, 台太郎 ac-1, 台太郎 ac-3 は全く発病しなかつた。試交3号では少数が発病したが、その程度は軽微であった（表-2, 図-2）。

試交3号の無加温ハウス促成栽培での生産性を検討するため、高知県安芸市、室戸市のナスハウス促成栽培地帯で1998～99年に現地試作を行った。材料は試交3号および対照として慣行台木のヒラナスを用い、穂木には‘竜馬’を用いた。いずれも7月中旬～8月上旬播種、8月中旬～8月下旬接木、8月下旬～9月中旬定植とした。また、いずれの圃場も無加温とし、栽培は現地の慣行法に準じた。その結果、試交3号台の初期収量は、ヒラナス台と同等あるいはヒラナス台より多かった。1～2月の収量はヒラナス台よりやや低い農家が多く、3月以降はヒラナス台と同等以上の農家が多かった。また、農業技術センターで行った生産力検定での試交3号台の総収量は、ヒラナス台と同程度であった（表-3）。

以上のように、試交3号は無加温ハウス促成栽培において、ヒラナスと同等の収量性を示した。また、ヒラナスより青枯病抵抗性が高いことから、ナス台木品種とし

表-1 ‘台太郎’ 薬培養系統の青枯病抵抗性幼苗検定

品種・系統名	発病指数別株数					供試株数	発病株率(%)	平均発病指数 ^{a)}
	0	1	2	3	4			
台太郎 ac-1	10	1	0	0	3	14	28.6	0.9
台太郎 ac-3	9	1	1	0	4	15	40.0	1.3
台太郎 ac-5	3	1	4	1	5	14	78.6	2.3
台太郎 ac-9	6	1	0	1	8	16	62.5	2.3
台太郎	8	2	0	0	5	15	46.7	1.5
WCGR112-8	4	0	0	0	8	12	66.7	2.7
LS1934	6	2	0	0	2	10	40.0	1.0
中生真黒	0	0	0	0	14	14	100.0	4.0
橘田	0	0	0	0	9	9	100.0	4.0
千両二号	0	1	0	0	15	16	100.0	3.8

a) 平均発病指数 = Σ (発病評点 × 個体数) / 全個体数, 発病評点は, 0:健全～4:枯死。

て有望と判断され、2004年3月に品種名‘台二郎’として品種登録された。‘台二郎’はヒラナスに代わりうる台木品種として、現在高知県内の約10haのナス促成栽培で利用されている。

表-2 試交3号の青枯病幼苗検定

品種・系統名	発病指數別株数				供試株数	発病率(%)	平均発病指數 ^{a)}	
	0	1	2	3				
竜馬	0	0	1	6	8	15	100.0	3.5
ヒラナス	0	2	0	4	9	15	100.0	3.3
台太郎	15	0	0	0	0	15	0.0	0.0
試交3号	14	1	0	0	0	15	7.0	0.1

^{a)} 平均発病指數 = Σ (発病評点 × 個体数) / 全個体数、発病評点は、0:健全～4:枯死。



図-2 青枯病抵抗性検定

手前3列はヒラナス、後3列は試交3号。

表-3 台木品種・系統別の‘竜馬’の収量および生育特性

台木品種・系統	可販果数 (個)	可販果重 (g)	収穫所要 日数	青ベタ 果率 (%)	茎長 (cm)
1998年度					
台太郎	74.9	5399.8	25.1	23.5	135.6
ヒラナス	79.5	5996.1	22.3	3.2	142.2
試交3号	84.3	6227.4	23.0	6.2	146.9
1999年度					
台太郎	79.1	5580.3	25.1	40.2	123.1
ヒラナス	81.8	5707.4	24.9	15.5	123.7
試交3号	89.3	6490.0	24.8	27.8	126.3

果数、果重は1株当たり、収穫所要日数は1月下旬の開花からAM果収穫まで、茎長は4本の主枝(無摘心)のうちの最長枝の接ぎ木部位から茎頂まで、1998年度は3月5日、99年度は2月16日に測定。

IV 戻し交配による青枯病抵抗性育種

‘台太郎’薬培養系統の台太郎ac-3を、青枯病抵抗性素材として用いた。また、戻し交配の反復親としては、日本のナス品種‘竜馬’の薬培養によって得られた固定系統の竜馬ac-13を用いた。なお、‘竜馬’は濃黒紫の果色とへたをもち、果実が長卵形の早生品種で、高知県のハウス促成ナス栽培における主力品種である。

台太郎ac-3と竜馬ac-13とのF₁植物から育成された薬培養系統の青枯病抵抗性検定により一次選抜を行った。青枯病菌は1×10⁸個/mlに調整したナスIV群菌を用い、浸根接種・養液栽培法(HIKICHI et al., 1999)を行った。5段階評価で発病程度を調査し、発病株率と平均発病指數を求めた。総計25系統を検定した。平均発病指數は系統によって異なり、すべての個体が枯死した系統や、ほとんどの個体が生存している系統などが見られた(データは省略)。これらの系統のうち、平均発病指數の低かった「台太郎ac-3×竜馬ac-13」(以下D3R13と略)ac-2, D3R13ac-5, D3R13ac-8, D3R13ac-20, D3R13ac-23, D3R13ac-40, D3R13ac-45の7系統を一次選抜した。

一次選抜された7系統について、浸根接種・養液栽培法で合計3回、ポットでの断根接種法(尾崎ら, 1989)で1回抵抗性検定を行い、二次選抜を行った。検定ごとに平均発病指數の変動が見られたが、選抜系統は各検定でおおむね低い平均発病指數を示した。これらのうち、平均発病指數の低かったD3R13ac-5を、次回の戻し交配親として選抜した(表-4)。

竜馬ac-13×D3R13ac-5の薬培養により12系統が

表-4 一次選抜系統の平均発病指數

品種・系統名	検定				平均
	1回目	2回目	3回目	4回目	
D3R13ac-2	0.9	1.6	3.2	3.5	2.3
D3R13ac-5	1.3	1.3	3.1	2.0	1.9
D3R13ac-8	1.2	2.2	0.0	2.4	1.5
D3R13ac-20	0.4	1.3	0.4	4.0	1.5
D3R13ac-23	1.5	2.4	—	3.6	2.5
D3R13ac-40	1.1	1.1	3.6	3.2	2.3
D3R13ac-45	—	1.4	1.2	2.8	1.8
竜馬	4.0	3.2	2.4	3.7	3.3
台太郎	1.7	0.8	0.0	2.4	1.2
台太郎ac-3	1.0	0.9	0.0	3.6	1.4
ヒラナス	—	—	3.6	3.4	3.5

D3R13ac:「台太郎ac-3×竜馬ac-13」の薬培養系統。1～3回目は養液栽培法、4回目はポットでの断根接種法。

表-5 「竜馬 ac-13 × D3R13ac-5」の薬培養系統の青枯病抵抗性検定

品種・系統名	1回目	2回目	3回目	4回目	平均
ac5ac1	3.7	3.2	4.0	4.0	3.7
ac5ac2	3.5	—	3.3	2.2	3.0
ac5ac3	3.7	1.8	3.0	3.1	2.9
ac5ac4	2.9	2.5	3.7	2.8	3.0
ac5ac5	3.5	2.8	2.7	2.8	2.9
ac5ac6	4.0	—	2.7	2.7	2.7
ac5ac8	—	2.1	3.0	2.7	2.6
ac5ac11	—	—	2.7	3.8	3.2
ac5ac13	3.5	2.6	3.3	4.0	3.4
ac5ac18	—	—	4.0	2.5	3.3
ac5ac19	—	0.2	3.3	2.6	2.0
ac5ac40	—	—	4.0	3.6	3.8
ヒラナス	4.0	0.7	3.3	3.6	2.5
竜馬	3.7	3.1	3.3	4.0	3.5
台太郎 ac-3	0.9	0.3	3.0	1.7	1.5
台太郎	3.9	0.6	2.0	2.0	2.1
D3R13ac-5	2.7	0.9	2.0	3.7	2.3
D3R13ac-8	1.7	1.4	4.0	4.0	2.8

ac5ac : 「竜馬 ac-13 × D3R13ac-5」の薬培養系統。各回の平均発病指数を表示。

得られた。これらについて、 1×10^8 個/ml に調整したナス青枯病 IV 群菌を用い、浸根接種・養液栽培法 (HIKICHI et al., 1999) で検定した。発病程度は 5 段階評価で行い、平均発病指数を求めた。合計 4 回の検定を行った（一部の系統は 2 ~ 3 回）結果、検定ごとに平均発病指数の変動が見られたが、「竜馬 ac-13 × D3R13ac-5」(以下 ac5 と略) ac1 は安定して平均発病指数が高く、ac5ac8 や ac5ac19 はおおむね平均発病指数が低かった（表-5）。

4 回の抵抗性検定で、ac5ac8 および ac5c19 と「竜馬」の発病指数の中央値について χ^2 検定を行った結果、0.001 の有意水準で、ac5ac8 および ac5c19 が低くなっ

た。このことから、薬培養系統から抵抗性の高い系統を選抜することにより、罹病性系統を 2 回交配しても青枯病抵抗性を保持することができると考えられた。一方、薬培養系統の果実形質などの特性は、系統間での差異はあるがいざれも F₁ 両親の中間的であった。すなわち、果実形質などは交配ごとに罹病性の反復親の形質に近づき、戻し交配の効果が認められた。

戻し交配育種は、目的の遺伝形質を既存の品種・系統に導入するためには非常に有効な手段である。しかし、その利用は主に少数の遺伝子による質的形質に限られていた。今後、薬培養を利用することで、青枯病抵抗性のような複数の遺伝子が関与する形質についても戻し交配育種が可能であると考えられた。現時点での問題点として、固定系統を使ってなお接種検定の結果が不安定であることがあげられ、より安定した結果が得られる検定方法の開発が求められる。なお、本課題は高知県大学等連携促進事業の一環として高知大学と共同で遂行された。

おわりに

青枯病抵抗性は遺伝様式が複雑で、抵抗性ナス品種育成の取り組みはごく少数である。一方ナスでは、ヘテロ接合体から青枯病抵抗性が固定された薬培養系統を、短期間で多数育成することが可能である。本稿で述べたように、薬培養は青枯病抵抗性育種における有効な手段となり得ると考えられる。今後、薬培養を利用することによって、より青枯病抵抗性の高い台木や穂木用品種の育成が期待される。

引用文献

- 1) HIKICHI, Y. et al. (1999) : Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65 : 597 ~ 603.
- 2) 門馬信二ら (1997) : 野菜茶試研報 12 : 73 ~ 83.
- 3) 岡田昌久ら (2007) : 高知農技セ研報 16 : 39 ~ 44.
- 4) 尾崎克己・木村俊彦 (1989) : 中国農研報 4 : 103 ~ 11.
- 5) 武田恭明ら (1990) : 園学雑誌 59 (別 1) : 244 ~ 245.
- 6) 山川邦夫 (1978) : 野菜/抵抗性品種とその利用, 全国農村教育協会, 東京, p. 67 ~ 103.
- 7) 吉田建実ら (2004) : 野菜茶研研報 3 : 199 ~ 211.

(新しく登録された農薬 13 ページからの続き)

メトコナゾール : 9.0%

小麦 : 赤かび病, うどんこ病, 赤さび病 : 収穫 14 日前まで
小麦 : 赤かび病 : 収穫 14 日前まで (無人ヘリコプター)

「除草剤」

- グリホサートイソプロピルアミン塩・MCPA イソプロピルアミン塩液剤
22069 : ラビッド液剤 (ニューファム) 07/12/12
22070 : ダブルインパクト (丸和ハイオ) 07/12/12
グリホサートイソプロピルアミン塩 : 33.2%, MCPA イソプロピルアミン塩 : 6.2%

樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, のり面, 鉄道等) : 一年生及び多年生雜草

- グリホサートイソプロピルアミン塩液剤
22075 : クサブローキャワー (丸善薬品) 07/12/12
グリホサートイソプロピルアミン塩 : 1.0%
- 樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, のり面等) : 一年生雜草
- フェントラザミド・ベンゾフェナップ・ベンフレセート水和剤
22076 : ホクコーパンチャーフロアブル (北興化学工業) 07/12/26

(30 ページに続く)