

## 培養幼植物体レベルにおける特性検定及び選抜技術の開発

誌名	農業技術
ISSN	03888479
著者	藤岡, 唯志
巻/号	47巻2号
掲載ページ	p. 88-91
発行年月	1992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



# 培養幼植物体レベルにおける特性検定及び選抜技術の開発

—エンドウの茎えそ病抵抗性個体の選抜—

藤 岡 唯 志

和歌山県日高郡の沿岸地域は冬季温暖な気候に恵まれ、古くからのエンドウ栽培地帯である。エンドウは本県の重要な野菜であり、1990年の作付面積は全国第2位の696haで、そのうちハウス栽培は113haある。エンドウは一般的に連作を嫌う作物とされているが、当地では太陽熱処理等の土壌消毒を行って栽培が続けられている。

エンドウ茎えそ病は1973年に本県で初めて発生が確認されたウイルス病で、土壌中の *Olpidium* 菌で伝搬される<sup>1)</sup>。本病に感染すると開花期から急激に萎凋し、茎にえそを生じ、枯死を招く。発生圃場は当初水田裏作地帯であったが、近年は畑作地帯にも拡散し、露地、ハウス栽培をとわず発生が見られるようになった。本病はこの地域の産地の存続にかかわる最も重要な病害となっている。

茎えそ病に関する抵抗性の品種間差異については家村らの報告<sup>2)</sup>があり、「美笹」等の絹さや品種は比較的強いが、本県の実エンドウの主要品種「きしゅうすい」や大英エンドウの「オランダ」は弱いため、これらに替わる抵抗性品種の育成が望まれている。

近年、植物の組織・細胞培養技術が進展し、培養系を経て再生した植物体には突然変異が多く発生することが報告<sup>3)</sup>されている。培養系を用いて生じた優良な突然変異体を培養レベルで選抜できれば、順化の必要もなく、育種の時間、労力、面積等が縮小でき、育種の効率化を図ることができる。当场では、培養系での茎えそ病抵抗性変異の発生を検討して、培養幼植物体レベルにおける抵抗性検定技術の開発に取り組んだ。ここでは、培養幼植物体レベルにおける茎えそ病ウイルスの接種方法、抵抗性の検定方法、順化後の検定等について紹介する。なお、本研究は農林水産省の助成(地域バイオテクノロジー研究開発促進事業)を受けて行われたものである。

## 1. 培養幼植物体への茎えそ病ウイルスの接種方法

### 1) 接種源ウイルスの調整と滅菌法

接種源として用いるウイルス粗汁液を作るため、18℃の人工気象室内でエンドウに汁液接種を行った。発病した罹病茎葉に0.01M磷酸緩衝液(pH6.8)を加えて磨砕し、粗汁液を作成した。無菌的に接種するためにはウイルス粗汁液を滅菌する必要があるため、遠心分離とフィルターろ過を組み合わせ、粗汁液の滅菌法を検討した。その結果、ウイルス粗汁液は3,000rpmで15分間遠心分離後、上澄みを0.2μmフィルターで1回ろ過することにより、滅菌できた。しかし、3,000rpmで遠心分離した後、18,000rpmで15分間、1回の高速度遠心分離を加えることにより、フィルターでのろ過が容易となった。

### 2) 無菌的接種方法

茎えそウイルスは圃場では土壌中の *Olpidium* 菌によって媒介され、根から感染する。試験的には汁液接種によって感染することも知られている。ここでは、茎えそ病に弱い品種である「きしゅうすい」の種子を無菌的に発芽させ、発芽種子から切りとった幼芽に以下の5つの方法で接種を試み、試験管内のMS培地に置床し、18℃、2,000Luxの16時間照明で培養した。

a 汁液接種：カーボランダムを用い、常法により幼芽に接種

b 振盪接種：カーボランダムを入れた粗汁液に幼芽を浸漬し、約1分間振盪

c 浸漬接種：粗汁液に幼芽を30分間浸漬

d 培地添加：培地表層に粗汁液0.3ml/添加し、そのうえに置床

e 注入接種：粗汁液をマイクロシリンジにより胚軸部へ注入

汁液接種や振盪接種ではほとんどの個体が発病したが、浸漬接種では発病が極くわずかであり、培地添加や注入接種ではまったく発病が認められなかった。培養幼植物体における病徴は最初、茎葉全体が黄化し、茎にえそを生じ、やがて成長が止まり、枯死に至る。

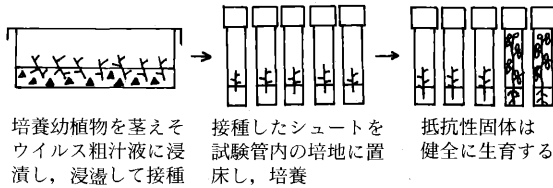
Tadashi FUJIOKA: Development of *in vitro* Techniques for Testing and Selecting Specific Character Using Cultured Plantlets. —Selection of Resistance to Pea Stem Necrosis Disease in Pea (*Pisum sativum* L.) 農業技術 47(2), 1992.

健全個体との識別は容易である。この結果、ウイルスの接種にはカーボランダムを用いる汁液接種や振盪接種が感染率が高く、中でも振盪接種法は一度に多数の個体を扱えるため、省力的で実用性があると考えられた。以下、振盪接種法を用いて諸条件を検討した。

3) ウイルス粗汁液の濃度、カーボランダムの粒径と発病率

罹病茎葉に0.01M磷酸緩衝液(pH6.8)を生重量の10倍、50倍、100倍、1,000倍加えて磨砕したウイルス粗汁液を無菌幼芽に振盪接種し、発病率を調査した結果、希釈倍率が、100倍以下の場合、発病率が95%以上となった。また、カーボランダムの粒径については、300メッシュ、600メッシュ、1,000メッシュを用いて発病率を比較したところ、600メッシュや1,000メッシュに比べて300メッシュが劣った。

以上の結果、生重量の100倍以下に希釈したウイルス粗汁液を3,000rpmで15分間、さらに18,000rpmで15分間遠心分離した後、上澄み液を口径0.2μmのフィルターで滅菌して接種源液とすればよいことがわかった。接種は、無菌植物を1,000メッシュのカーボランダムを加えた接種源液の入ったシャーレに入れ、約



第1図 培養幼植物体レベルにおける茎えそ病抵抗性の検定

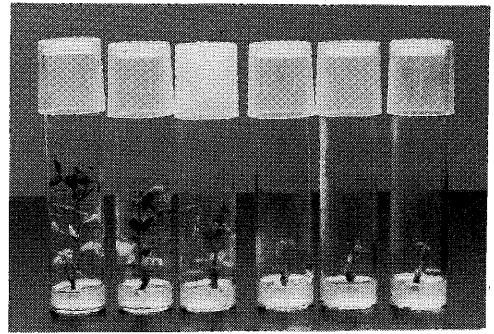
1分間振盪し、滅菌水で洗浄して培養する方法で、培養幼植物体に茎えそウイルスを効率よく感染させることができた。(第1図)。

2. 振盪接種法による培養幼植物体の抵抗性検定

1) 発病率の品種間差異

圃場で茎えそ病に強い品種「ニムラ丸莢1号」,「グリーントップ」,「美笹」,弱い品種「Pea Sprinter」,「ニムラサラグ大莢」,「ニムラ赤花きぬさや2号」,「きしゅうすい」,「はやせ」を供試した。各品種の無菌発芽種子の幼芽にウイルス粗汁液を振盪接種し、培養した。

発病率は置床45日目で「ニムラ丸莢1号」と「美笹」がそれぞれ0%と33.3%であったが、その他の品種では85~100%であった(第2図)。この結果は「グリー

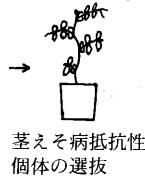


第2図 試験管内における茎えそ病抵抗性の検定  
 (左) 抵抗性個体 (右) 罹病性個体

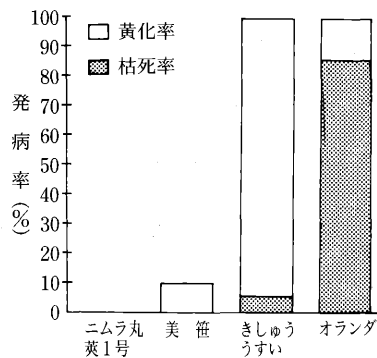
ントップ」を除いて圃場レベルにおける抵抗性の品種間差異と同じであった。また、ウイルス粗汁液の代わりに滅菌水を用いて接種した対照区は全て健全株であった。一方、ウイルスの検出を抗血清による簡易二重拡散法で行った結果、培養個体の枯死部や茎えそ症状部からのみウイルスが検出され、健全部からは検出されなかった。これらのことからこの試験の品種間差異はウイルスに起因していることが確かめられ、健全個体を抵抗性個体として選抜できるものと考えられた。

2) 培養幼植物体の種類と抵抗性の品種間差異

以下の3種類の培養幼植物体に無菌的に振盪接種した。



- a 幼芽：発芽種子から切りとった幼芽
- b 増殖シュート：幼芽が生育した培養植物体の腋芽を増殖したシュート
- c 再分化シュート：未熟小葉由来カルスから再分化したシュート



第3図 試験管内における茎えそ病抵抗性の品種間差異

注) 圃場レベルでの抵抗性  
 強：「ニムラ丸莢1号」,「美笹」  
 弱：「きしゅうすい」,「オランダ」

品種は、圃場で茎えそ病に強い品種として「ニムラ丸莢1号」と「美笹」、圃場で茎えそ病に弱い品種として「きしゅう

うすい」と「オランダ」を用いた。

幼芽を検定した場合の発病率(黄化率+枯死率)は、「ニムラ丸莢1号」と「美笹」は40日後、ともに0%であった。一方、「きしゅううすい」と「オランダ」は、それぞれ90%、100%であった。「オランダ」は「きしゅううすい」より枯死率が高かった(第3図)。増殖シュートを検定した場合の発病率は、「美笹」が0%であったが、「きしゅううすい」は94.4%と高かった。再分化シュートを検定した場合の発病率は「ニムラ丸莢1号」が0%、「美笹」が28.6%、「きしゅううすい」は33.3%、「オランダ」は83.3であった。

以上の結果、増殖シュート及び再分化シュートを検定した場合も幼芽と同様、圃場と同じ抵抗性の品種間差異を示すことがわかった。しかし、再分化シュートの場合は幼芽及び増殖シュートの場合に比べて品種間差が小さくなった。この結果に関して再分化シュートの水浸状(vitrification)が発病率に影響しているのではないかと考え検討したが、水浸状の有無と発病率の間には関係が認められなかった。その後の調査から、カルスを経由したことにより、抵抗性に変異を生じた可能性も考えられた。

### 3) 培養幼植物の検定部位と抵抗性

「ニムラ丸莢1号」と「きしゅううすい」の培養植物の以下の3部位に振盪接種し、発病率を調査した。

- a 茎頂：主枝の頂端1cm
- b 腋芽：側枝の頂端から1cm
- c 節：主枝の1節

圃場において抵抗性の強い「ニムラ丸莢1号」では黄化率は茎頂と腋芽が0%、節が15%であったが、枯死率は検定部位にかかわらず0%であった。圃場において抵抗性の弱い「きしゅううすい」では、枯死率が高く、茎頂と節が100%、腋芽が94.7%であった。すなわち、同一品種において、茎頂、腋芽、節による茎えそ病発病率の差は、ほとんどなく、培養幼植物体の一部を用いて茎えそ病の検定ができることがわかった。このことは、元の個体を保存して検定できることになり、選抜育種でのメリットは大きいと考えられる。

## 3. 抵抗性検定の簡易化、効率化

### 1) 粗汁液の保存

検定の省力化を図るため、ウイルス粗汁液の保存期間と病原性の関係を検討した。罹病茎葉に0.01M磷酸緩衝液(pH6.8)を生重量の10倍加えて磨砕したウイルス粗汁液を遠心分離後、上澄み液を0.2 $\mu$ mフィルタ

ーでろ過し、-35℃で冷凍保存した。定期的に取り出して、培養植物に振盪接種して病原性を調査した。その結果、400日までは100%の発病率を示し、病原性が保持されていることがわかった。なお、400日以降についても病原性があると思われ、現在検討中である。

### 2) 振盪機利用による機械的接種法

検定の規模を拡大し、省力化を図って、検定効率を上げるため、浸透接種法の機械化を検討した。シャーレにウイルス粗汁液とカーボラダム及び無菌幼芽を入れ、振盪機で130回/分の速度で振盪した。直径90mmと直径150mmの2種類のシャーレを用い、ウイルス粗汁液の量を2.5cc、5cc及び10ccの3水準、振盪時間を1分、2分、5分の3水準として発病率を調査した。

発病率は手振盪区が100%であったのに対し、機械振盪区は44.4~75.9%と低かった。機械振盪区の中では発病率は直径150mmシャーレ区が直径90mmシャーレ区よりも高く、粗汁液量は多いほうが、浸透時間は長い方が高かった。発病率は検定植物体と粗汁液やカーボラダムとの接触程度が大きいほど高くなると考えられ、今後、振盪機の振盪速度、振幅と合わせて接種条件の検討を進めることにより発病率が向上し、機械的な接種方法が開発できるものと思われる。

### 3) カルスレベルの抵抗性検定

培養系により生じる抵抗性変異を選抜しようとする場合、カルスレベルで検定できれば、育種効率が飛躍的に向上する。そこで培養幼植物体で開発した振盪接種法をカルスで試みた。検定用に用いるカルスを得るために、エンドウの種子を殺菌して、ろ紙を敷いた滅菌シャーレには種し、26℃、暗黒条件で3日間発芽させた。発芽した幼芽の小葉を約0.5mm角に切り、100cc三角フラスコ内のNAA 10 $\mu$ M、BA10 $\mu$ M、ショ糖3%を添加したMS(ビタミンB5)寒天培地に置床した。20℃、3,000lux、16時間照明で培養しカルスを誘導した。供試品種として「ニムラ丸莢1号」、「美笹」、「きしゅううすい」及び「オランダ」を用い、形成したカルスを培養幼植物と同様カーボラダムを加えたウイルス粗汁液に浸漬し、約1分間振盪した。対照区としてウイルス粗汁液の代わりに滅菌水を用い、接種した。接種後、再分化培地に置床し、18℃、2,000lux、16時間照明で培養し、70日後に褐変率、再分化率等を調査した。また、一部のカルスについて、抗血清による簡易二重拡散法で、ウイルスの検定を行った。

圃場において抵抗性の強い品種のカルスの褐変率は「美笹」が35.0%と低かったが、「ニムラ丸莢1号」

が66.7%と高かった。圃場において抵抗性の弱い品種の褐変率は「きしゅうすい」77.8%、「オランダ」が85.7%であり、「美笹」,「ニムラ丸莢1号」よりも高かった。再分化は美笹においてのみ認められた。「きしゅうすい」の対照区の褐変率は47.8%で接種区よりも低かった。また、接種カルスからの茎えそウイルスの検出を抗血清による簡易二重拡散法で行った結果、「ニムラ丸莢1号」の健全カルスと「美笹」の褐変カルスのみからウイルスが検出された。

以上の結果、ウイルスの接種によりカルスの褐変率が高くなり、また、圃場において抵抗性の弱い品種ほど褐変率が高くなる傾向が認められたが、培養幼植物体の検定ほど明確な品種間差異は得られなかった。また、カルスの褐変とウイルスの存在との関係は明らかでなかった。

#### 4. 培養幼植物体レベル選抜個体の順化後の検定

これまでに述べた振盪接種法を用いて培養幼植物体レベルで茎えそ病抵抗性を検定し、抵抗性と思われた個体を順化後検定した。材料として抵抗性品種と罹病性品種を交配したF<sub>2</sub>を用いた。

茎えそ病に強い品種「秋姫」、茎えそ病に弱い品種「オランダ」及び両者のF<sub>2</sub>個体の発芽種子の幼芽に茎えそウイルスを振盪接種した後、試験管内のMS培地で培養し、40日後に調査した。培養レベルで健全に生育した個体を抵抗性として順化後、育苗箱に移植し、葉に汁液接種を行って18°C、3,000lux、16時間照明の人工気象器内で検定した。

培養レベルの検定において健全であった個体は「秋姫」で94.7%、「オランダ」で0%そして「オランダ」×「秋姫」のF<sub>2</sub>で18.9%であった。培養レベルにおいて健全であった「秋姫」及び「オランダ」×「秋姫」のF<sub>2</sub>個体を順化後検定した結果、「秋姫」では87.5%が健全であり、「オランダ」×「秋姫」のF<sub>2</sub>では85.0%が健全であった。このことから、培養幼植物体レベルでの検定技術が有効であると考えられた。

#### 5. 問題点と今後の方向

培養幼植物体レベルにおける茎えそ病ウイルスの接種法として、培養幼植物体の一部をカーボランダムを含んだウイルス粗汁液の中に浸漬し、振盪する無菌的接種法(振盪接種法)が開発できた。接種後培養することにより、罹病性個体は発病し枯死するが、抵抗性個体は健全に成長するため、識別は容易であり、検定が可能であった。本法による検定結果は順化後の検定結果ともほぼ一致することから、これらの検定法はエンドウの茎えそ病抵抗性の選抜に利用でき、育種の効率化が図れるものと思われる。

カルスを用いて培養幼植物体と同様に振盪接種法を検討したところ、圃場において抵抗性の弱い品種ほど褐変率が高くなる傾向が認められたが、培養幼植物体の検定ほど明確な品種間差異は得られなかった。また、カルスの褐変とウイルスの存在との関係は明らかでなかった。カルスレベルの特性と再生植物の特性が一致しない報告が他の作物においても多く、カルスレベルでの選抜は難しいと思われる。

今後、本研究で開発した培養幼植物体レベルでの検定法を用い、本県の主要品種「きしゅうすい」や「オランダ」のカルスからの再分化シュートを多数検定し、抵抗性個体の選抜を進めたい。また、筆者ら(1987)が開発した試験管内世代促進法<sup>4)</sup>と組み合わせることで利用することにより、さらに育種の効率化が図れるものと思われる。

謝辞：本研究の実施にあたり貴重な助言をいただいた農業生物資源研究所、中国農業試験場の各位に対し、深くお礼を申し上げます。

(和歌山県農業試験場生物工学研究班)

#### 引用文献

- 1) 家村浩海 1983 和歌山農試研報 10: 33-40
- 2) 家村浩海 1986 和歌山農試研報 11: 29-34
- 3) 河合 武 1985 農及園 60(1): 99-104
- 4) 藤岡唯志・藤田政良・宮本芳城 1987 園学要旨 昭和62秋: 242-243.