

第8節 生物工学に関する試験研究

平成6年の生物工学に関する試験研究は、植物の組織培養や植物病害の生物防除に関する課題が中心であった。しかし、平成8年にいらで始まったDNAマーカーに関する試験研究は、その後いちごに重心を移して展開され、平成25年現在では大麦、今後はあじさいへと広がりを見せている。また、にらやいちごで開発されたDNAマーカーは育種選抜に利用されるとともに、いちご、水稲、にら、なし等の品目で品種識別が可能となっている。

にらやいちごではcDNAマイクロアレイを用いた大量遺伝子発現解析が行われ、有用遺伝子の検索が行われた。更にいちごに関しては得られた有用遺伝子について、野生種へ形質転換を行って機能解析が行われた。

1 DNAマーカーの開発

(1) 酵素多型を利用した育種法に関する試験

にらは単為生殖性を有するため、交配して得られた後代は数%しか交雑していない。そこで酵素多型を解析して、交雑個体を選抜した。また、りんどうでは、エゾリンドウとササリンドウの識別が可能であった。

栃木農試研報 44 : 49-54 (1996)

(2) 有用形質に連鎖するDNAマーカーの開発

ア にら育種におけるDNAマーカーの開発

酵素多型では利用できる品種・系統が少ないため、より汎用性の高い花粉親特異的DNAマーカーを用いた交雑個体の選抜法を開発した。その結果、多くの交雑個体が得られるようになり、その中から単為生殖性を有しない両性生殖性個体を獲得した。また、複相大胞子を形成する両性生殖性個体も得られたため、複相大胞子形成と単為発生が異なる遺伝子によっ

て制御されていることが明らかとなった。更に、単為発生性および複相大胞子形成性に関する分離集団を作成し、両形質とも単因子優性遺伝であることを解明するとともに、RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)マーカーによるバルクセグレガント分析を行い、両形質に連鎖したDNAマーカーを開発した。単為発生性に連鎖したマーカーは遺伝子を挟んで3.4 cMと1.1 cM、複相大胞子形成性に連鎖するマーカーは約10 cMの距離に位置付けられた。各マーカーをSCAR(Sequence Characterized Amplified Region)マーカー化し、それぞれPLM(Parthenogenesis Linked Marker)1、PLM3、PLM2とした。その後、単為発生因子とPLM3との間、遺伝子から0.9 cMの位置にマーカーが作出されPLM4とした。これらの結果から、両性生殖性系統を子房親として単為生殖性系統と交配し、得られた実生個体の生殖性をPLMマーカーで判定して、単為発生性個体は新品種候補、両性生殖性個体を中間母本候補とする育種システムを構築した。なお本研究の最初の6年間は、国庫補助事業として実施された。

栃木農試研報 55 : 27-32 (2005)

育種学研究 8 : 89-98 (2006)

育種学研究 12 : 73-80 (2010)

栃木農試成果集 19 : 5 (2000)

栃木農試成果集 24 : 9-10 (2006)

栃木農試成果集 29 : 47-48 (2011)

イ いちご育種におけるDNAマーカーの開発

a 炭疽病

いちごは8倍体(2n = 4x = 56)であり解析が難しいため取組が遅れていたが、平成15年からRAPD、AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)、SSR(Simple Sequence Repeat)の各マーカーを蓄積し、ゲノム全体での連鎖解析を行うための準備を開始した。最初は炭疽病耐病性を対象とし、とちおとめ×いちご中間母本農2号のF₁集団を用いて連鎖地図を作成し、QTL(Quantitative Trait Loci)解析により炭疽病耐病性に関わる3つの領域を検出し、選抜に有効な3マーカーを同定した。また、GMM(Genotype Matrix Mapping)法を用いた解析により、QTL解析より選抜精度が高い3マーカーの組合せが同定された。更に、他の形質についてQTL解析を行った結果、寄与率は低いが高果率、頂果房着果数、開花始期、糖度に関するQTLが検出された。更なる炭疽病耐病性QTLを検出するた

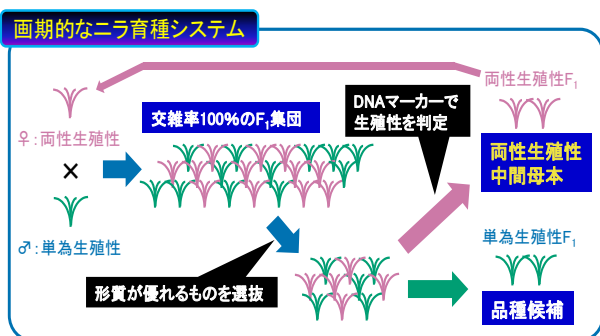


図 2-8-1 両性生殖性判別 DNAマーカーを活用した新たなにら育種システム

め、系統 91-21-7 の自殖集団を用いて GMM 法によりマーカー検索を行ったところ、罹病性連鎖マーカーが同定された。なお、炭疽病耐病性を安定して再現性良く検定する方法として、培養植物をセルトレイに養液栽培で順化し、炭疽病菌を接種してインキュベーター内で評価する方法を確立した。

b 萎黄病

次に萎黄病耐病性を対象とし、とちおとめ×アスカウェイブの F₁ 集団を用いて連鎖地図を作成し、QTL 解析を行った結果、極めて寄与率が高い 1 か所の QTL が検出された。LOD(Logarithm of the Odd)スコアが最大になる位置には 5 マーカーが座乗しており、それらのマーカーは耐病性遺伝子と 0 cM で連鎖していた。そのうちの 1 つの AFLP マーカー AA300 を STS(Sequence Tagged Site) 化し、Rf1(Resistance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* 1)とした。その後、マーカー周辺領域の塩基配列を解析して耐病性に特異的な 869 bp の挿入配列を明らかにし、検出安定性を向上させた Rf3 に改良した。

c 四季成り性

四季成り性は単因子優性の遺伝様式を示すとされていたため、他の形質に先立って連鎖マーカーの開発を行った(平 10-14)。四季成り性に関する分離集団を用いて 1,525 組のランダムプライマーを供試してバルクセグレガント分析を行った。しかし、四季成り性判定結果との適合率が最も高いマーカーでも 68.8 %であり、実用上は不十分であった。その後、SSR マーカーの蓄積や AFLP マーカー技術の導入で当研究室のマーカー開発力が向上したことや、四季成り性を有することが前提とされる次世代いちご品種の開発のため、四季成り性連鎖マーカーの必要性が高まったことにより、再び開発に着手した(平 24-27 予定)。なつおとめ×やよいひめの F₁ 集団を用いてバルクセグレガント分析を行い、四季成り性に連鎖した DNA マーカーの開発を行っている。これまでに、遺伝子から 2.9 cM の位置に AFLP マーカー、1.9 cM の位置に SSR マーカーを作出し、SSR マーカーは STS 化した。

d ゲノミックセレクション

いちごの主要な果実形質は、QTL によって支配されていると推察されるが、8 倍体であることから通常の QTL 解析では検出力が不十分と考えられる。そこで、6 品種・系統を親とした相互交配集団を用いて糖度、色、大きさ、硬さを対象形質とし、ゲノミックセレクション法の確立を目指して研究を開始した。本研究は、かずさ DNA 研究所を中心として本県と福岡県、千葉県、大阪大学で実施している。

育種学研究 15 : 90-97 (2013)

栃木農試成果集 29 : 51-52 (2011)

栃木農試成果集 31 : 63-64 (2013)

栃木農試成果集 32 : 37-38 (2014)

栃木農試成果集 32 : 39-40 (2014)

ウ 大麦育種における DNA マーカーの開発

平成 25 年度からムギ類萎縮病抵抗性を対象形質として、大麦の DNA マーカー開発を開始した。はるな二条×H602(大麦野生種)の半数体倍加系統集団およびスカイゴールデン×とちのいぶきの SSD(Single Seed Descent)集団を解析集団として用いた。

(3) DNA マーカーによる品種識別に関する試験

ア これらの品種・系統識別と遺伝的類縁関係

交配組合せの選定に資するため、19 プライマー165 個の RAPD マーカーを用いて、当场で保有する 52 品種・系統の遺伝的類縁関係を明らかにした。また、供試全品種・系統の識別が可能であった(平 10)。その後、遺伝資源の品種・系統数が増えたため、かずさ DNA 研究所と共同開発した SSR マーカーを用いて 93 品種・系統の遺伝資源について類縁関係を再調査中である。

栃木農試研報 46 : 29-35 (1997)

栃木農試成果集 16 : 7-8 (1997)

イ いちごの品種・系統識別

海外から輸入された農産物が国産に偽装される問題が頻発し、それを防ぐために国庫予算により技術開発が行われた(平 14-16)。当研究室では、本県育成いちご品種の識別を可能にして知的財産を保護するため、RAPD マーカーおよび AFLP マーカーを用いて、国内主要 25 品種を識別できる DNA マーカーを検索した。その結果、10 マーカーで全品種が識別可能であり、STS 化およびマルチプレックス化することで 3 回の PCR(Polymerase Chain Reaction)によって全 25 品種が識別可能となった。

その後、各県で新品種が多数育成され、将来育成される新品種にも対応可能とするため、SSR マーカーを用いた汎用性の高い品種識別法の開発を行った(平 22-23)。その結果、5 プライマーペアで 181 品種・系統を識別でき、マルチプレックス化により 2 回の PCR で全品種を識別可能となった。

更に、加工品(ジャムやジュース等)は DNA が断片化されており DNA マーカーの検出が難しいが、それらから検出可能なレトロトランスポゾンマーカーを用いた品種識別技術の開発

を、岡山大学が中心となり取り組んでいる(平 24-26)。

DNA 多型 16 : 119-128 (2008)

育種学研究 10 : 111-115 (2008)

栃木農試成果集 19 : 7-8 (2000)

栃木農試成果集 24 : 7-8 (2006)

栃木農試成果集 31 : 59-60 (2013)

ウ リンドウ属植物の種の識別

当場に保存されているエゾリンドウ 4 系統、エゾオヤマリンドウ 3 系統、ササリンドウ 1 系統について遺伝的類縁関係を明らかにするため、10 種類のランダムプライマーを用いて PCR を行い、得られた 162 個の RAPD マーカーを用いてクラスター分析を行った。その結果、ササリンドウのみが離れて位置付けられたが、他の系統は 1 つのクラスターを形成した。

エ うどの品種・系統識別

県内収集 16 系統、県外収集 20 系統について遺伝的類縁関係を明らかにするため、37 種類のランダムプライマーを用いて PCR を行った。その結果、127 個の RAPD マーカーが得られたが、そのうち多型が認められたのは 42 個のみで、供試した系統の遺伝的多様性は低いと考えられた。また、収集した地域と遺伝的類縁関係の関連は認められなかった。

栃木農試成果集 21 : 13-14 (2002)

オ 水稻の品種識別

栃木県が育成した品種の知的財産の保護および原種の安定生産を目的とし、本県や近県の奨励品種等 20 品種・系統について、品種識別技術の開発を行った(平 17)。23 種類のランダムプライマーを用いて PCR を行った結果、178 個の RAPD マーカーが得られたが、多型が認められたのは 13 プライマー 25 マーカーであった。そのうち 7 プライマー 9 マーカーで供試 20 品種・系統を識別可能であった。

その後、本県や近県の奨励品種が変更されたため、今後の品種の変更にも対応しやすい汎用性の高い品種識別法を開発するため、公開されている水稻の SSR マーカーの品種識別への適応性を検討した(平 22-23)。本県や近県の奨励品種等 15 品種について、97 プライマーペアを供試して PCR を行った結果、10 プライマーペアで多型が認められ、そのうち 5 プライマーペアで全 15 品種が識別可能であった。また、マルチプレックス化により 3 回の PCR で供試 15 品種の識別が可能であった。

日作紀 74 : 207-211 (2005)

栃木農試研報 71 : 55-61 (2013)

栃木農試成果集 31 : 61-62 (2013)

カ 麦類の品種識別

原種の安定生産を目的に、本県や近県の奨励品種等で小麦 17 品種、大麦 19 品種について、それぞれ品種識別技術を開発した。28 種類のランダムプライマーを供試し、小麦で 153 個、大麦で 156 個の RAPD マーカーが得られたが、品種間で多型が認められたのは小麦で 14 プライマー 37 マーカー、大麦で 16 プライマー 64 マーカーであった。また、小麦では 5 プライマー 6 マーカーで、大麦では 6 プライマー 9 マーカーでそれぞれの供試全品種の識別が可能であった。

日作紀 75 : 165-174 (2006)

日作紀 75 : 175-181 (2006)



写真 2-8-1 シーケンサーによる塩基配列の解読作業

(4) DNA マーカーによる選抜および遺伝子型判定

ア 雑交個体の選抜

交配によって得られた実生個体について、雑交した個体のみを圃場に定植するため、花粉親特異的 DNA マーカーを用いてセルトレイの段階で選抜を行った。野菜研究室と共同で実施し、10 年間で 6,681 個体の中から 804 個体の雑交個体を選抜した。(平 10-19)

イ 雑交実生個体の生殖性判定

両性生殖性系統を種子親とし、単為生殖性品種・系統の花粉を交配して得られた実生個体について、当研究室で開発した単為発生性を識別する PLM マーカーを用い、セルトレイの段階で生殖性の判定を行っている。単為生殖性と判定した個体は新品種候補、両性生殖性と判定した個体は中間母本候補とした。野菜研究室と共同で実施し、6 年間で 3,115 個体の中から 1,877 個体を単為生殖性と判定した。(平 17-21、平 25-)

ウ なし育成系統の S 遺伝子型の判定

なしは自家不和合性を有しており、種子親と同じ S 遺伝子型の花粉は不和合性となる。結実させるには和合性である他品種・系統の花粉を人工授粉させる必要があるため、S 遺伝子型を明らかにすることは重要である。なしの S 遺伝子は既に特定されており、突然変異によって自家不和合性を示さなくなった遺伝子型も明らかとなっている。また、遺伝子型を特定するマーカーも開発されているため、それを利用して S 遺伝子型を特定する必要がある当該育成系統について、果樹研究室と共同で判定を行っている。これまでに 95 系統の S 遺伝子型を判定した。(平 16-)

エ イチゴ萎黄病耐病性個体の選抜

萎黄病耐病性系統を片親として人工交配で得られた実生個体について、当研究室で開発した萎黄病耐病性を識別する Rf3 マーカーを用い、セルトレイの段階で耐病性の判定を行っている。いちご研究所と共同で実施し、平成 25 年は 1,642 個体の中から 785 個体を耐病性と判定した。(平 25-)

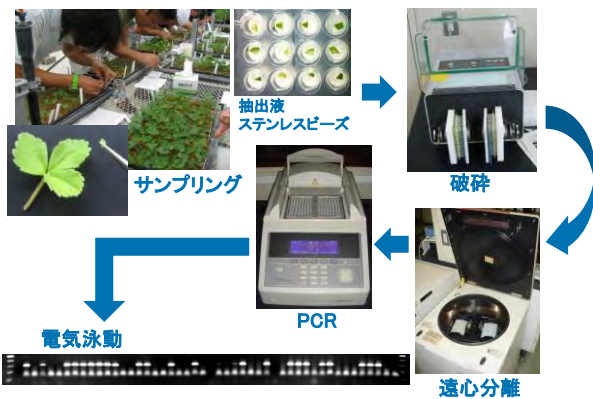


図 2-8-2 DNA マーカーによるイチゴ萎黄病耐病性実生苗の選抜

2 有用遺伝子の検索と機能解析

(1) にら単為生殖性に関連した遺伝子の検索

にらの単為生殖は、胚のう母細胞における減数分裂異常との関連が示唆されるため、減数分裂期特異的に発現する遺伝子を検索した。にら品種「きぬみどり」の未成熟の蕾と成熟期の蕾から cDNA ライブラリーを作製した。また、それらのライブラリーとユリ減数分裂期における特異的遺伝子(かずさ DNA 研究所より分譲)をハイブリダゼーションして候補遺伝子を検索する技術を確認し、39 個の候補遺伝子を選抜した。なお、本研究は国庫補助事業の一部として実施された。

(2) マイクロアレイを用いた有用遺伝子の検索

ア にらにおける単為生殖性関連遺伝子の検索

大量遺伝子の発現を同時に解析できるマイクロアレイに関する備品一式の導入に伴い、平成 14 年度からにらの単為生殖性関連遺伝子の検索を開始した。最初は技術確立を行うと同時に、にら品種きぬみどり(単為生殖性)の蕾から cDNA ライブラリーを作製して、4,800 クローンを単離した。

にらの単為生殖は複相大孢子形成と単為発生の 2 つの要因から成り、両要因とも極めて限定的な場所と時期に起こると考えられる。そこで、受粉した H12C2 系統(両性生殖性)胚珠で特異的に発現する遺伝子を濃縮したサブトラクションしたライブラリーを作製し、1,536 クローンを単離した。更に、首都大学東京から卵細胞単離と卵細胞からの RNA 抽出技術を導入し、H12C2×テンダーポール(単為生殖性)の F₁ 系統で単為生殖性と両性生殖性の各 1 系統を供試し、各々の卵細胞で特異的に発現する遺伝子を濃縮したサブトラクションライブラリーを作製した。それぞれのライブラリーから、2,913 個および 444 個の計 3,357 クローンを単離した。これらのクローンの中には、卵細胞分裂開始時に特異的に働く遺伝子が含まれ、更には単為発生に関連することが期待される。

それぞれの段階でアレイスライドを作製し、マイクロアレイ解析を実施した。最終的には卵細胞由来 3,357 クローンのスライドと胚珠由来 1,536 クローンのスライドを用いて、テンダーポールの開花 18 時間以内の花の卵細胞(未分裂)と開花 48 時間前後の卵細胞(分裂期)の RNA を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、未分裂と比較して分裂期に 2 倍以上発現上昇した遺伝子が 73 個、1/2 以下に発現低下した遺伝子が 94

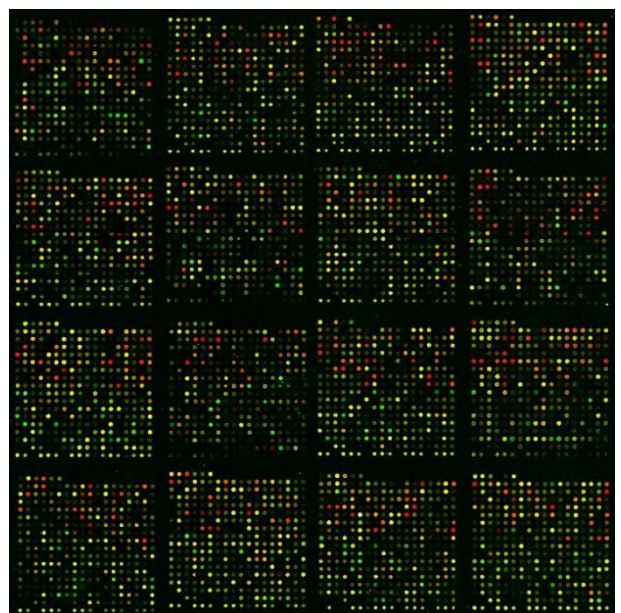


図 2-8-3 マイクロアレイを用いた大量遺伝子発現解析

個であった。それらのクローンは、塩基配列を決定して EST (Expressed Sequence Tag) 情報を取得し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) により相同性検索を行った。

イ いちごにおける有用遺伝子の検索

らのマイクロアレイ解析に1年遅れて、いちごでもアレイ解析の研究を開始した。最初はとちおとめの未成熟果実と成熟果実由来の cDNA クローンを蓄積し、塩基配列を解析して EST 情報を取得した。その情報を元に cDNA のグルーピングを行い、非重複の 4,521 クローンをスポットしたアレイスライドを作製した。果実の成熟に伴う遺伝子発現変動を解析した結果、未成熟の果実と比較して成熟した果実で2倍以上発現が高かった遺伝子が291個あり、香気成分やフラボノイドの生合成に関与する遺伝子が含まれていた。

炭疽病耐病性は複数の遺伝子が関与するが、8倍体のいちごでは QTL 解析は難しいため、遺伝子発現解析から耐病性に関与する遺伝子の検索を行った。とちおとめの葉や花由来の cDNA ライブラリーや、イチゴ中間母本農2号(以下、農2号：耐病性)ととちおとめ(罹病性)の両品種で、炭疽病菌接種時に特異的に発現する遺伝子を濃縮したライブラリーを作製した。各ライブラリーから得られたクローンの塩基配列を解析し、EST 情報を取得した。それにより cDNA クローンをグルーピングし、非重複の 8,056 クローンをスポットしたアレイスライド (Ver.2 アレイ) を作製した。農2号ととちおとめに炭疽病菌を接種し、経時的にサンプリングしてマイクロアレイ解析を行った。その結果から炭疽病応答性候補遺伝子448個を選抜し、更にとちおとめ×農2号の F₁ 系統で炭疽病耐病性および罹病性各5系統ずつを供試して44遺伝子を選抜した。それらの遺伝子について、リアルタイム RT-PCR 解析を行って12遺伝子を選抜し、機能解析に供試した。

農2号は強い耐病性を有し、通常栽培では枯死しないが、無菌培養植物は枯死する。順化することで徐々に耐病性が向上する現象が明らかとなったため、Ver.2 アレイを用いてマイクロアレイ解析を行った。農2号ととちおとめの培養植物と順化植物をそれぞれマイクロアレイ解析し、農2号のみが順化によって特異的に発現上昇する遺伝子を検索した。その結果、31遺伝子を選抜され、更にリアルタイム RT-PCR 解析によって5遺伝子を選抜された。そのうち4遺伝子はフラボノイド生合成に関わる遺伝子であった。そのため、アレイ解析の結果を再度検討すると、順化によってフラボノイド生合成経路が活性化することが明らかとなり、それは農2号で顕著であった。また、農2号のフラボノイド生合成経路の活性化は、温室植物でも持続

していることが確認され、耐病性との関連が示唆された。

萎黄病耐病性に関連する遺伝子を検索するため、萎黄病菌を接種してマイクロアレイ解析を行った。萎黄病菌は根から感染することから、根で働く遺伝子を蓄積するため、とちおとめ(罹病性)根由来の cDNA ライブラリーと、アスカウェイブ(耐病性)の根で萎黄病菌接種時に特異的に働く遺伝子を濃縮したサブトラクションしたライブラリーを作製した。両ライブラリーの計4,446クローンをスポットしたアレイスライド(根アレイ)と Ver.2 アレイを用い、アスカウェイブととちおとめに萎黄病菌を接種して経時的に採取したサンプルを供試し、マイクロアレイ解析を行った。萎黄病菌接種に応答する35遺伝子を選抜され、更に詳細に解析するためリアルタイム RT-PCR 解析を行った。その結果、萎黄病菌接種時にアスカウェイブで強く発現する3遺伝子、発現量が低下する1遺伝子を選抜した。

J. Gen. Plant Pathol.79 : 402-411 (2013)

栃木農試成果集 29 : 49-50 (2011)

栃木農試成果集 32 : 41-42 (2014)

(3) シロイヌナズナのリン酸吸収に関与する遺伝子の検索

黒ボク土壌に低リン酸要求性品種の育成や養分要求性を遺伝子発現レベルでモニタリングする指標の作成など、持続的農業生産技術の向上に資するため、シロイヌナズナのゲノム情報を利用してリン酸吸収に関与する遺伝子を明らかにすることを試みた。まず、突然変異処理した種子を低リン酸培地や難溶性リン酸培地に播種し、低リン酸耐性の2系統および難溶性リン酸利用可能な2系統を選抜した。同時に、リン酸飢餓処理に応答する遺伝子をマイクロアレイによって検索し、有望な2遺伝子を選抜した。しかし、他研究機関からより進んだ同様の研究成果が発表されたため中止とした。

The Plant Journal30 : 247-255 (2002)

(4) いちごにおける炭疽病菌接種に応答する遺伝子の機能解析

マイクロアレイで選抜した有用遺伝子の機能を解析するため、2倍体野生種を用いた形質転換系を確立した。最初に炭疽病耐病性に関連する遺伝子を機能解析の対象として想定したため、収集した2倍体野生種の炭疽病耐病性検定を行った。その結果から発病度が高く、遺伝的に固定が進んでいると推察される種子繁殖性である Alexandria、C3、Alba の3系統を形質転換系に供試する系統候補とした。そのうち、多芽体増殖で遺伝的に同一の個体が多数得られた Alexandria を供試し、GUS(β -glucuronidase)遺伝子をレポーター遺伝子として形質転

換系を確立した。形質転換効率は6.25%であった。

マイクロアレイ解析で選抜された炭疽病応答性遺伝子のうち9個のcDNAクローンを供試して、アミノ酸翻訳領域全長を取得した。cDNAクローンに全長が含まれていない場合は、5'RACE法または3'RACE法により未知配列を取得した。これらの9遺伝子を順次 Alexandria に形質転換したが、途中から形質転換効率が著しく低下し、6遺伝子を導入した形質転換体しか得られなかった。導入遺伝子の発現が非形質転換体より上昇した、5遺伝子が導入された系統について、炭疽病耐病性検定を実施したが、耐病性が向上した系統は認められなかった。

また、その後の予備試験で、培養容器を変更することで形質転換効率が20%程度に向上することが明らかとなった。

栃木農試成果集 31 : 67-68 (2013)

栃木農試成果集 31 : 69-70 (2013)

栃木農試成果集 32 : 35-36 (2014)

(5) いちごウイルスベクターを用いた遺伝子機能解析法の開発

2倍体いちご野生種形質転換系による機能解析は、長い時間と多くの労力を要するため、解析できる遺伝子の数は限られる。そこで、宇都宮大学で開発されたストロベリーマイルドイエローエッジウイルス(SMYEV)ベクターを用いた、遺伝子発現抑制法を用いて機能解析法の確立を試みた。SMYEVベクターを



写真 2-8-2 いちご 2倍体野生種を用いた形質転換体
左：非形質転換体、右：GUS 遺伝子導入形質転換体

増殖するための大腸菌内や、いちご組織内での安定性を向上するため、構造の異なる3種類のベクターを再構築した。安定性は向上したものの、いちご組織内での遺伝子発現抑制効果は認められず、試験を中止した。

3 組織培養に関する試験

(1) 組織培養による新品種育成

ア 半数体育種法を用いた早期固定法の確立

花粉や卵細胞の半数化した組織から植物体を再生して倍加することで、遺伝的に固定した系統が早期に獲得できる。そこで、りんどうの花粉や栃木市の地域特産である宮ねぎの半数体倍化系統の作出を試みた。また、稲では花粉培養における培地組成や光等の様々な条件を検討し、育種部門で交配したF₂やF₄系統を用いて、花粉培養によって得られた半数体倍化系統を作出した。

イ 組織培養系を用いたイチゴ萎黄病耐病性個体の選抜

突然変異を利用して、とちおとめに萎黄病耐病性を付与することを目的とした。変異原は培養変異と後にイオンビームを用いた。最初に再分化培地条件、供試組織や部位などを検討し、とちおとめの再分化系を確立した。また、多くの変異個体から簡易に耐病性個体を選抜する方法として、培地にフザリン酸を添加する方法やセルトレイに順化して萎黄病菌を接種する方法を検討したが、最終的にはセルトレイに養液栽培で順化し、萎黄病菌を接種する方法を採用した。イオンビームは、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所において、炭素イオン(¹²C⁶⁺)をとちおとめ葉片に照射した。適正照射線量は、2.5 Gy以下であった。簡易選抜した培養変異8個体、イオンビーム照射61個体について、通常の耐病性検定を行ったところ、それぞれ2個体ずつ計4個体が耐病性付与系統として選抜された。

栃木農試研報 63 : 9-16 (2008)

栃木農試成果集 26 : 8-9 (2008)

栃木農試成果集 31 : 65-66 (2013)

(2) 組織培養によるウイルスフリー化および大量増殖に関する研究

ア 栃木県育成品種の大量増殖法の確立

当场が育成したデルフィニウム培養3品種について、効率的な多芽体培養条件を確立するとともに、より増殖効率の高い葉柄からの不定胚誘導条件を明らかにした。また、花き部が交配

したオンシブプシス 13 系統について大量増殖を試み、9 系統が PLB(Protocorm Like Body)を形成し、うち 6 系統が良好な増殖を示した。

栃木農試研報 42 : 45-52 (1994)

栃木農試成果集 13 : 51-52 (1994)

イ 地域特産植物の大量増殖法の確立

地域特産植物を乱獲から保護するために組織培養技術を活用することを考え、サギソウ、イワタバコおよびセッコクの大量増殖法を確立した。また、サギソウの完熟種子は無菌播種すると著しく発芽率が悪いが、種皮を除去することで改善されることが明らかとなった。

ウ ウイルスフリー化および大量増殖

各種作物についてウイルスフリー化および大量増殖の技術確立を行った。やまのいもは優良系統を増殖するため培地条件を検討した。こんにゃくは優良系統をウイルスフリー化して増殖するため、培地条件および順化条件を検討した。バンダは優良系統を増殖するため、初代培地と継代培地の培地条件を検討した。うどは優良系統を効率的に増殖するため、多芽体培養系を確立し、より効率の高い不定胚培養系を検討した。

ねぎには野菜研究室で苗を増殖して現地に供給するため、ウイルスフリー化を行い、効率的な培地条件および順化条件を確立した。ウイルスフリー化はアカザで検定したが、後に RT-PCR での検定に変更した。

(3) 植物組織の凍結保存法に関する研究

組織培養による継代保存は労力が必要であるため、茎頂の凍結保存による効率化技術を検討した。にぎにら、デルフィニウム、いちごについて、ガラス化法による凍結保存で、ハードニング条件および凍結前処理条件を検討した。その結果、デルフィニウムで 10 %、ねぎにらおよびいちごで 25 %程度の生存率であった。

4 生物防除法の開発

(1) 共生微生物による病害防除法および生育制御技術の確立

微生物を利用した病害防除法の効果が安定ににくいのは、接種した微生物が安定して定着しないためと考え、胚軸を切断して細菌懸濁液に浸漬することで組織内に微生物を取り込ませることが可能となった。この胚軸切断接種法を用いた病害防除法を検討した。また、胚軸切断したトマトを萎凋病菌で汚染し

た培土に挿し木し、正常に生育した個体は組織内に有用な微生物を取り込んだと考え、組織内から細菌を分離した(胚軸切断補足法)。トマト萎凋病、トマト根腐萎凋病、ユウガオつる割病、レタスすそ枯病、メロンつる割病、ナス半身萎凋病、ハクサイ根こぶ病について、胚軸切断接種法を用いた防除法の検討を行ったが、圃場試験においての効果は判然としなかった。胚軸切断接種法を用いて育成した苗は、接種した細菌以外の細菌がより高密度に定着しており、防除効果が安定しない要因の 1 つであることが示唆された。また、胚軸切断補足法によって選抜した細菌の中には、ショ糖存在下で生育抑制物質を産生するものがあり、その物質は耐熱性の両性物質であった。

キク科のレタスや雑草のハルジオン根面から分離した蛍光性 *Pseudomonas* を、レタスに種子浸漬接種またはセル苗に灌注接種すると、セル苗の生育を促進する菌株が認められた。そのうちの 1 菌株はポット試験において、すそ枯病に対する防除効果が認められた。

栃木農試研報 43 : 47-86 (1995)

栃木農試研報 44 : 55-66 (1996)

栃木農試研報 46 : 37-41 (1997)

栃木農試成果集 16 : 25-26 (1997)

(2) ブドウ白紋羽病の総合防除法

白紋羽病菌の病原性を低下させるハイポウイルスを検索し、それを用いた防除法を核とした総合防除法を確立することを目的とした。県外(岡山県、千葉県)から 11 菌株の白紋羽病菌の分譲を受け、ハイポウイルスの検出を試みたが、検出された菌株は無かった。また、ハイポウイルスは菌糸融合により伝搬されるので、遺伝的類縁関係は重要であるため、県内の白紋羽病発病樹から分離した 14 菌株を加えて計 25 菌株について、RAPD マーカーを用いてクラスター解析して系統樹を作成した。しかし、組織改編に伴う課題見直しのため中止した。

栃木農試研報 47 : 37-46 (1998)

栃木農試成果集 16 : 25-26 (1997)

(3) 拮抗微生物を用いた農作物病害防除技術の確立

ア バイオトラスト水和剤を用いたいちご病害に対する生物防除技術の確立

バイオトラスト水和剤の有効成分系状菌である *Talaromyces flavus* の菌糸寄生範囲や寄生状況を明らかにするとともに、いちご葉上で起きている実際の菌糸寄生状況を詳細に明らかにした。また、誘導抵抗性の可能性を示唆するいちご葉へのリグニン沈着状況を明らかにし、作用機作の解明を行った。更に、

バイオトラスト散布時期と炭疽病菌感染時期との関係、温度による菌糸伸長や胞子発芽、耐熱性などを調査し、最適使用条件を明らかにした。

栃木農試成果集 21：23-24 (2002)

栃木農試成果集 21：25-26 (2002)



写真 2-8-3 バイオトラスト製剤および効果

イ 拮抗微生物を用いたいちご主要病害の生物防除技術の確立

在来の微生物を収集して有用な拮抗微生物を見つけ出し、生物防除技術を確立することを目的とした。各種供試資材から102菌株を収集し、イチゴ白絹病、萎黄病、根腐萎凋病に防除効果のある3菌株を選抜した。それら菌株の最適培養条件や吸着資

材の検討、保存試験を行うとともに、イソライトに吸着させた簡易製剤を作製し、萎黄病を対象に最適使用条件を検討した。しかし、防除効果が認められなかったため、生分解性ポットを利用して防除効果の底上げを図ったが、生分解性ポットの発病抑制効果は認められたものの、拮抗微生物の防除効果は認められなかった。また白絹病に対しては、菌糸が生分解性ポットのふちを乗り越えるため、ポットの防除効果は無く、拮抗微生物の防除効果も判然としなかった。

5 遺伝資源の保存

ねぎには培養植物および温室でポットに植えて保存されている。デルフィニウムは育成者権が切れるまで保存された。特許微生物は、特許が切れるまで特許生物寄託センターで保存された。いちごやにらの cDNA クローンは、グリセロールストックの状態でのディープフリーザーにおいて保存されている。



写真 2-8-4 生物工学実験棟

コラム3

退職直前の思い出

コラムに要望された業務期間は、退職直前の在任2か年である。

特筆は、黒磯分場の今後の方向であった。ここは、私の新任地で、担当した果樹は途中で廃止され、水田中心となり、その後野菜にシフトされた。さらになお、改変の対象となり、私にとっては、因縁めいたものを感じた。

主管課との話し合いでは、ここには記せないが、けっこう極端なことを申し上げた。

結局、野菜に加え花きを導入することとなった。この際、リンドウの育種試験を強く要望した。栽培試験だけでは特徴を出せず、これまでと変わらない。那須地方のリンドウ産地を背景に、今後の重要課題と思ったからである。育種は退職後平成12年から開始した。退職を一週間後に控え、驚いたことに、科学技術振興功績者受賞の内定の通知が入ってきた。業績名は、多目的防災網被覆による生産安定技術の開発である。

この課題は、坂本果樹部長（当時）の積年の思いによる発案で、私が試験担当者となった。試験遂行に当たって、防雹棚づくりは祖母井梨農家の棚づくりプロの人達のお世話になった。さらに技術員、パート職員の組織力によって、成果をあげたと思っている。

この試験は、農家のために、泥くさく、忍耐強くやり遂げたという思いが強かった。

なお後日、全国改良普及職員協議会から感謝状をいただいた。

松浦栄一郎