

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450031

研究課題名(和文)バラ根頭がんしゅ病抵抗性台木の育成と抵抗性形質に関するDNA多型解析

研究課題名(英文)DNA polymorphism analysis on resistance against crown gall disease of rose and breeding of resistant root stock.

研究代表者

福井 博一 (Fukui, Hiromasa)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20183585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：バラの根頭がんしゅ病抵抗性品種を用いて交雑を行い、F1系統を作出した。3個体のF1系統を用い、F2世代およびBC1世代を育成した。得られたF2世代およびBC1世代に対して根頭がんしゅ病抵抗性検定を行った。F2世代およびBC1世代の中から、抵抗性を示す個体を選抜した結果、根頭がんしゅ病に対して強い抵抗性を示すF2 1x1-46、F2 1x1-75を選抜することができ、BC1 Px6-4、BC1 Px1-13についても抵抗性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：PEKcoughel, which was crown gall resistance cultivar of cut rose. Three F1 plantlets were made by crossing PEKcoughel and Rosa multiflora 'Matsushima No.3'. Three F1 plants were used for breeding of F2 generations and BC1 generations. These F2 generations and BC1 generations were tested about resistance of crown gall disease by ex vitro method, and resistant plants were selected.

研究分野：花き園芸学

キーワード：抵抗性 根頭がんしゅ病 バラ

## 1. 研究開始当初の背景

### 【国内・国外の研究動向及び位置づけ】

申請者はバラの育種(1,4,5,10)及び栽培(6,7,9)に関する研究を長年実施してきており、バラ研究の第一人者の一人である。特に、バラ根頭がんしゅ病抵抗性に関しては国内外を通じて常に第一線で研究を遂行し(2,3,8,15,16)、申請者以外に根頭がんしゅ病抵抗性発現機構を詳細に明らかにした報告はない。

バラの根頭がんしゅ病は、日本国内の切り花生産において平成22年から急速に病害の報告が見られるようになり、平成24年に生産出荷された切りバラ苗の半数以上で発病がみられ、切りバラ生産農家において甚大な被害を及ぼした。このことを受けて、平成24年8月に全国のバラ苗生産業者を岐阜大学応用生物科学部に招集し、「バラ苗における根頭がんしゅ病対策会議」を開催し、バラ苗生産現場における防疫対策指針を周知した結果、平成25年に出荷されたバラ苗では20%程度の発病率に低下させることができた。

根頭がんしゅ病は切花生産段階での完全な治療がなく、苗の生産段階で徹底した病害の防除を行う以外に対応策がないため、国内はもとより世界の主要バラ生産国であるケニアやエクアドル、コロンビアなどでも極めて深刻な病害となっており、これらの諸国からの切りバラの輸入に伴って国内でのさらなる蔓延が危惧されている。

このように、バラ根頭がんしゅ病を根絶するためには苗の生産段階で徹底した病害の防除を行うことに加えて、抵抗性台木を育成し、新たな罹病を防ぐことが最も有効であると考えられる。

そこで本研究では、根頭がんしゅ病抵抗性台木を育成すると共に、育成過程における選抜の効率化を図るための選抜マーカーを開発して抵抗性台木育成を加速化させることを目指している。

## 2. 研究の目的

本研究では、前述の研究目的(概要)で示した項目ごとに以下のことを明らかにする。

### (1) 複合抵抗性台木の育成

- ・ F1 個体相互及び交配親との交配によって得られた F2 及び BC1 個体の種子(約 400 粒)を播種し、発芽した交雑個体の根頭がんしゅ病検定結果から、既に種苗登録した「岐阜大台木1号」を凌ぐ高度な根頭がんしゅ病抵抗性台木を育成し、種苗登録を行うと共に、切りバラ生産における台木の普及を目的とした生産検定等を実施する。

### (2) 根頭がんしゅ病抵抗性に関連する DNA 選抜マーカーの開発

- ・ 現有の 3 個体の F1 個体を相互に交雑して得られた F2 個体及び交配親との戻し交雑で得られた BC1 個体について、根頭が

んしゅ病抵抗性検定を実施し、抵抗性形質の分離を明らかにする。

- ・ F2 及び BC1 個体から核 DNA を抽出し、DNA 多型を解析して遺伝子地図を作成する。
- ・ 抵抗性に関連する DNA 断片を検索して DNA マーカーを開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) F2 及び BC1 個体の育成と根頭がんしゅ病抵抗性検定

根頭がんしゅ病抵抗性の PEKcougl と根腐病抵抗性の四倍性ノイバラとの交雑で得られた F1 の 3 個体 (F1-No.1、F1-No.5、F1-No.6) を用いて、3 個体の F1 相互および自殖交雑による F2 世代、3 個体の F1 と両親である PEKcougl と四倍性ノイバラとの戻し交雑を行い BC1 世代を育成する。

バラの種子は硬実による自発休眠を持つため、セルラーゼ処理を行って種皮の透水性を高めると共に、3 ヶ月以上の低温湿潤処理を行って休眠を打破し、播種する。

発芽個体は各個体ごとにポット育苗して育成を図り、生育個体からシュートを採取して根頭がんしゅ病抵抗性検定を行う。

### (2) 根頭がんしゅ病と根腐病抵抗性の F2 個体の形質調査と種苗登録

根頭がんしゅ病抵抗性検定は独自に開発した *in vivo* 検定法を用いる。

*In vivo* 検定法は、未展葉と展葉の中間節位から節間を切り取り、アンチホルミンで表面殺菌した後、クリーンベンチ内で厚さ 5mm の茎切片を切り取る。液体培養した根頭がんしゅ病菌 GOU1 の菌密度を計数して調整した培地中に茎切片を浸漬して感染させた後、固体培地上で共生培養を行う。抗生物質クラフォラン溶液で3回洗浄を行い、クラフォランを含む植物ホルモン・フリーの固体培地に置床して培養する。6週間後にクラウンゴールの形成を調査する。形成されたクラウンゴールを切り取り、カルスとの判別を行うために濾紙電気泳動を行ってオパイン活性を判別する。

F2 世代と BC1 世代の *in vivo* 検定にあたって、根頭がんしゅ病抵抗性の PEKcougl と罹病性の Dukat を対照品種として用いる。

F2 及び BC1 世代のなかから有望個体を選抜し、種苗登録を目指す。

## 4. 研究成果

根頭がんしゅ病抵抗性の PEKcougl と 4 倍性 *R. multiflora* の F1 の相互の交雑を行った。また、F1 と PEKcougl 及び 4 倍性 *R. multiflora* の交雑で得られた F2 と BC1 の種子を播種して個体を育成した。

(1) 根頭がんしゅ病抵抗性の PEKcougl と根腐病抵抗性の四倍性ノイバラとの交雑で得られた F1 の 3 個体を用いて、F2 世代および両親との戻し交雑を行い BC1 世代を育成した。

F1-No.1 × F1-No.1 (F2 1x1) の交配では 1294

花に対して交配を行い、144個の種子を得て、18個体を確保できた。

F1-No.5 × F1-No.5 (F2 5x5) の交配では69花に対して交配を行い、574個の種子を得て、15個体を確保できた。

F1-No.6 × F1-No.6 (F2 6x6) の交配では646花に対して交配を行い、957個の種子を得て、18個体を確保できた。

F1-No.1 × F1-No.5 (F2 1x5) の交配では320花に対して交配を行い、67個の種子を得て、1個体を確保できた。

F1-No.1 × F1-No.6 (F2 1x6) の交配では546花に対して交配を行い、231個の種子を得たが、F2個体を獲得できなかった。

F1-No.5 × F1-No.6 (F2 5x6) の交配では241花に対して交配を行い、177個の種子を得て、3個体を確保できた。

従って、F2集団においてはF2 1x1、F2 5x5、F2 6x6 において目標の20個体に近い18個体、15個体、18個体を確保出来た。しかし、F2 1x5、F2 1x6、F2 5x6においては、得られたF2集団は1個体、0個体、3個体と極めて少なく、今後、種子の発芽率の向上を含めた改善が必要であった。

BC1集団においては、PEKcougel × F1-No.1 (BC1 Px1) の交配では20花に対して交配を行い、40個の種子を得て、12個体を確保できた。

PEKcougel × F1-No.5 (BC1 Px5) の交配では19花に対して交配を行い、1個の種子を得たが、BC1個体を獲得できなかった。

PEKcougel × F1-No.6 (BC1 Px6) の交配では17花に対して交配を行い、30個の種子を得て、4個体を確保できた。

4倍性*R. multiflora* × F1-No.1 (BC1 Mx1) の交配では50花に対して交配を行い、111個の種子を得て、60個体を確保できた。

4倍性*R. multiflora* × F1-No.5 (BC1 Mx5) の交配では312花に対して交配を行い、560個の種子を得て、67個体を確保できた。

4倍性*R. multiflora* × F1-No.6 (BC1 Mx6) の交配では274花に対して交配を行い、966個の種子を得て、90個体を確保できた。

従って、PEKcougel に戻し交配を行ったBC1集団においては、BC1 Px1、BC1 Px5、BC1 Px6 においては12個体、0個体、4個体と得られた個体数が少なく、今後の交配の継続が必要であった。しかし、4倍性*R. multiflora* に戻し交配を行ったBC1集団においては、BC1 Mx1、BC1 Mx5、BC1 Mx6のいずれにおいても得られたBC1集団は60個体、67個体、90個体と極めて多くの目標を上回る個体数を確保出来た。

平成28年度において実施した交配花数は、F2 1x1 : 440花、F2 1x5 : 238花、F2 1x6 : 4521花、F2 5x5 : 13花、F2 6x5 : 113花、F2 6x6 : 136花、BC1 Px1 : 10花、BC1 Px5 : 3花、BC1 Px6 : 5花で、現在採種した種子について低温休眠打破処理を行っている。

(2)根頭がんしゅ病抵抗性: 根頭がんしゅ病

抵抗性系統と根腐病抵抗性系統の交雑は、世界で初めての試みであり、F1個体同士の交雑で得られたF2と、F1とPEKcougel及び4倍性*R. multiflora*との交雑で得られたBC1の若いシュートを用いたin vivo検定法を用いて抵抗性検定を行った。抵抗性検定にあたって、in vivo検定法の精度の確認を行うと共に、各系統の予備的な抵抗性検定を実施し、一定の制度が確認できた。得られたF2世代および両親との戻し交雑を行ったBC世代について根頭がんしゅ病検定を行った。抵抗性の‘PEKcougel’および罹病性の‘Dukat’との比較から、F2 1x1-46、F2 1x1-75は強い抵抗性を示し、次いでBC1 Px6-4、BC1 Px1-13が抵抗性であった。

F2 1x1-46、F2 1x1-75の2個体については、根頭がんしゅ病抵抗性の‘PEKcougel’に匹敵する強い抵抗性を示したが、現在、根頭がんしゅ病抵抗性を検定できたものの他、F2集団では55系統が未検定の状況であり、‘PEKcougel’に戻し交雑を行ったBC1系統では16系統が未検定である。同様に4倍性*R. multiflora*との戻し交雑で得られているBC1系統も217系統が未検定であることから、今後、これらのF2およびBC1系統についても根頭がんしゅ病抵抗性検定を行っていく。

また、強い抵抗性が確認できたF2 1x1-46、F2 1x1-75の2系統については台木としての特性や根腐病抵抗性を検定し、台木品種として品種登録を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

庄得鳳・馬策・船橋辰吾・落合正樹・福井博二: Pre-selection of rootstock with resistance against crown gall disease and root rot disease in chinese rose. Hubei Agricultural Sciences 査読有 55: 4960-4963. 2016. (in Chinese)

〔学会発表〕(計 1件)

山本竜明・村田強・落合正樹・福井博二: Rosa multiflora と R. ‘PEKcougel’ の交配後代のばら根頭がんしゅ病抵抗性. 園芸学会. 2016/9/10-11(名城大学)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 博一 (FUKUI Hirokazu)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：20183585

(2) 研究分担者

落合 正樹 (OCHIAI Masaki)  
岐阜大学・応用生物科学部・助教  
研究者番号：80755827

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者