Brassica 及び Raphanus 属の日本産在来品種のアプラナ科黒斑病菌(Alternaria brassicae)に対する抵抗性評価

和久井健司*·三上孝治**·小山麻希**·倉林 樹*· 馬上有華*·藤垣順三*·夏秋啓子***

(平成 20 年 2 月 29 日受付/平成 20 年 6 月 6 日受理)

要約: Brassica および Raphanus 属 5 種 138 品種を用い、アプラナ科黒斑病菌 A. brassicae による接種試験を行った。実生葉へ A. brassicae を接種し、4 日後の接種部位あるいは接種葉の状態から、発病度を 5 段階 (0-4) で評価した。その結果、無病徴(発病度 0) から、極めて軽微な病徴(発病度 1)、接種部位における病斑(発病度 2)、接種部位を越えた病斑(発病度 3)、接種葉が枯れる(発病度 4)までの幅広い病徴発現の差が認められた。発病度 0 は B. rapa Pekinensis Group より 2 品種、B. rapa Rapifera Group および R. sativus よりそれぞれ 1 品種ずつの計 4 品種で見出された。

キーワード: Alternaria brassicae, 黒斑病, Brassica 属, Raphanus 属

緒 言

アプラナ科植物は、Brassica および Raphanus 属を含み、B. rapa Pekinensis Group (ハクサイ)、Perviridis Group (コマツナ)、Rapifera Group (カブ)、Chinensis Group (タイサイ)、Japonica Group (キョウナ)、Narinosa Group (ヒサゴナ)、B. napus (西洋ナタネ)、B. juncea (カラシナ)、B. oleracea (キャベツ、ブロッコリー)、及び R. sativus (ダイコン) など油料、飼料、野菜、香辛料として世界各地で広く栽培されている重要な作物を包含している。

Alternaria brassicae は、各種のアプラナ科植物に感染し、黒斑病の病原として葉、葉柄、茎、花序、莢及び種子などのあらゆる部位に、退緑や壊死といった病徴を引き起こす¹⁾。主として茎葉を食する多くのアプラナ科野菜では、収穫間際における上部葉での黒斑症状により著しく商品価値を落とすほか、西洋ナタネの莢における発病は、未熟莢の脱粒による種子数の減少と種子当りの油含量低下による油生産量の低下を招く²⁻⁴⁾。

アプラナ科植物では、これまでに野生種である Sinapis alba⁵、Camelina sativa^{5,6}、Capsellabursa-pastoris⁶)及び Eruca sativa^{7,8} において A. brassicae に対する強度の抵抗性が報告されているとともに、その機構解析が進められている⁹⁻¹²。Brassica 属においては、近年 B. carinata で比較的抵抗性程度の高い個体が見出されているものの¹³、他の Brassica および Raphanus 栽培種における報告はない。

BANSAL et al. (1990) は、Brassica 属 6 種 35 品種を用いた、A. brassicae による接種試験において、種に依存して各品種の示す病徴の程度に差があることを報告しており、アプラナ科内における抵抗性品種の存在の可能性を示唆している。

日本で栽培されるアブラナ科植物において、特にハクサイやカブ、ダイコンは、地方在来品種として多様な分化を果たしており、多様な遺伝変異を包含していることから、将来の育種素材としての利用に先立ち、各品種を遺伝資源として評価していく必要がある。そこで本研究では、Brassica および Raphanus 属の日本産在来品種を中心に広く、黒斑病菌への抵抗性程度を調査・評価するとともに、黒斑病抵抗性個体の獲得を視野に入れ、Brassica および Raphanus 属 5種 138 品種を用いた A. brassicae の接種試験を行った。

材料および方法

供試材料として、東京農業大学短期大学部生物生産技術 学科遺伝育種学研究室で保存の Brassica および Raphanus 属 5種 (B. rapa, B. napus, B. oleracea, B. juncea, R. sativus) 計 138 品種を用いた。接種には、東京農業大学国際食料情報学部国際開発学科熱帯作物保護学研究室で保存され、病原性が確認済みである(結果省略)黒斑病菌 Alternaria brassicae (Berkeley) Saccardo (MAFF 726548) を 田いた。

水に浸したロックウールに、 深さ約 1.5 cm の穴をあけ、

^{*} 東京農業大学短期大学部生物生産技術学科

^{**} みかど協和株式会社

^{***} 東京農業大学国際食料情報学部国際農業開発学科

種子を1 穴当たり2 粒ずつ、1 品種当たり5 穴に播種した。その後、25 $\mathbb C$ 、16 時間日長のインキュベーター内で約3 $\mathbb C$ 4 週間育成した。各ロックウールの2 個体のうち、育成途中において、生育の良い1 個体のみを残し、 $A.\ brassicae$ 接種個体とした。

接種のための A. brassicae 培養菌叢は、直径 9 cm のプラスチックシャーレに作成したポテトデキストロース (PDA) 寒天培地 (栄研) に種菌を移植後、シャーレにパラフィルムを巻き、 25° C、暗黒下で $2\sim3$ 週間培養することにより得た。

本葉が3~4 枚展開した個体を各品種5 個体用い,1 個体を無傷のまま、4 個体を有傷とし、各個体の葉一枚へA. brassicae を接種した。あらかじめ油性マジックで葉の接種部分に印を付け、有傷接種では針を輪ゴムで束ねたものを火炎滅菌し、滅菌水に浸して冷ました後、印部分に葉に軽く穴が開く程度刺して接種に供した。接種は、培養菌叢を直径約4mmにPDA 培地ごとコルクボーラーで打ち抜き、この菌叢断片の菌叢面を葉に密着するように載せることにより行った。また対照区には、先と同様にコルクボーラーで打ち抜いた、PDA 培地のみを各個体の菌叢接種葉とは異なる葉に載せた。その後、滅菌水を湿らせた脱脂綿で接種した菌叢断片を覆い、その上からパラフィルムを軽く巻いた。植物体は25℃、16 時間日長のインキュベーター内で管理し、菌叢断片が乾燥しないように、適宜脱脂綿にマイクロピペットで滅菌水を滴下した。

接種4日後に、A. brassicae 菌叢有傷接種に対する、各Brassica およびRaphanus 属個体の病徴発病程度を評価した。葉からパラフィルム、脱脂綿および菌叢断片を取り除いた後、接種部位あるいは接種葉の状態を肉眼で観察し、有傷接種4個体を平均して、発病度を5段階(0-4)で評価した。評価の基準は、発病度0:症状がみられない、発病度1:有傷部分のみに黒斑がみられる、発病度2:菌叢断片を載せたところ(直径約4mm)にのみ黒斑がみられる、発病度3:菌叢断片を載せた外側部分にも黒斑が広がってみられる、発病度4:葉全体に黒斑がみられるもしくは枯死している、とした。

結果および考察

Brassica および Raphanus 属植物 138 品種 690 個体の 幼植物体を供試し、A. brassicae 培養菌叢を接種源とする 検定によって、黒斑病徴の発病程度の差異を調査し、無病 徴あるいは病徴がほとんど進展しない A. brassicae 抵抗 性の素材となり得る有望な品種の探索を行った。

有傷の菌叢接種によって、ほとんどの品種では、接種2日後より黒斑病徴がみられたが、その後、菌叢断片を載せたところにのみ黒斑がみられるもの(発病度2)、さらに黒斑が菌叢断片の外側にも広がり(発病度3)、急速に進展して枯死にいたるもの(発病度4)がみられた一方、黒斑病徴がみられない(発病度0)、あるいは病徴がほとんど進展しないもの(発病度1)が見出され、品種によって病徴の進度に差がみられた(表1、図1)。一方、PDA 培地のみを葉に載せた対照区では、発病はみられなかった。また、各品種

の有傷接種 4 個体の間において病徴程度に著しい差異は見られなかった。

さらに、有傷接種において発病が見られなかった発病度 0と、発病が低度であった発病度1の品種では、無傷接種 において発病度2、3 および4 の品種と比較し、発病しない ものが多い傾向があると示唆された(表1)。無傷接種は有 傷接種と比べ病徴が示されにくく、各品種1個体のみの供 試であるが、無傷接種による病徴の有無の結果は、有傷接 種に基づく抵抗性評価と矛盾しないものであった。

有傷接種における各評価の品種数は、発病度 0 が 4 品種、 発病度 1 が 25 品種、発病度 2 が 43 品種、発病度 3 が 52 品種、 発病度 4 が 14 品種であり、138 品種中 134 品種(97%) で感染が認められ(表 2)、*Brassica* および *Raphanus* 属に

表 1 A. brassicae 接種による Brassica および Raphanus 属 5 種 138 品種の病徴の有無と抵抗性評価結果

	D 45 4	病律	-10tt- 0)	
属種名	品種名	無傷	有傷	発病度 2)
<i>B. rapa</i> F	Pekinensis Group ハクサイ			
	北京	-	-	0
	花心白菜	-	-	0
	松島新2号白菜	-	+	1
	松島新二号白菜	-	+	1
	ちりめん白菜	-	+	1
	新理想	-	+	1
	白秋白菜	-	+	1
	金沢大五結球白菜	-	+	1
	南山	-	+	1
	F1 みやま雲取白菜	-	+	1
	丸葉山東菜	-	+	1
	盛岡山東菜	-	+	1
	春蒔き新山東菜	-	+	1
	東京べかな	-	+	1
	ちりめん葉からし菜	-	+	2
	半結球山東菜	=	+	2
	四月しろ菜	+	+	2
	紹菜	+	+	2
	オレンジクィン	_	+	3
	大和真菜	+	+	3
<i>B. rapa</i> F	Perviridis Group コマツナ			
	丸葉小松菜	-	+	1
	みやま新晩生小松菜	_	+	2
	新黒水菜小松菜	+	+	2
	新晚生小松菜	+	+	2
	改良黒葉小松菜	+	+	3
<i>B. rapa</i> F	Rapifera Group カブ			
	聖護院大かぶ	-	-	0
	加茂酸茎菜	_	+	1
	今市かぶ	_	+	1

表 1 (続き)

表 1 (続き)			宮内菜	+	+	2		
属種名 品種名		病徴 ¹⁾ 		7% rt rt 9)	三陸つぼみ菜	+	+	2
				発病度 2)	春立ちなばな	_	+	2
	温海かぶ	-	+	1	仙台芭蕉菜	+	+	3
	樋ノロ小かぶ	_	+	1	のらぼう菜	+	+	3
	ゆるぎ赤かぶ	+	+	1	千宝菜2号	+	+	3
	稲こき菜	_	+	2	B. juncea カラシナ			
	女池菜	+	+	2	三池たか菜	+	+	1
	木曽紅かぶ	_	+	2	こぶ高菜	+	+	2
	天王寺かぶ	-	+	2	わさび菜	+	+	2
	東京長かぶ	+	+	2	結球高菜	_	+	2
	切葉天王寺かぶ	+	+	2	黄がらし菜	+	+	2
	長岡菜	+	+	3	ザーサイ	=	+	2
	目の菜かぶ	-	+	3	島菜	+	+	2
	改良早生大蕪	-	+	3	博多かつお菜	=	+	2
	白馬	+	+	3	青ちりめん高菜	-	+	3
	博多すわりかぶ	_	+	3	B. oleracea Acephala Group ケール			
	大崎菜	+	+	3	コラード エステ	n.d.	+	2
	仙台雪菜	+	+	3	CHOU FOURRAGER	n.d.	+	2
	大野紅かぶ	+	+	4	<i>B. oleracea</i> Capitata Group キャベツ			
	松ヶ崎浮菜かぶ	n.d.	+	4	グリーンボール	+	+	1
	暮坪かぶ	+	+	4	渡部早春	_	+	2
	野沢菜	+	+	4	みさき甘藍	_	+	2
	NAVET	-	+	4	F1 デリシャス	-	+	2
B. rapa C	Chinensis Group タイサイ				CHOU CABUS	+	+	2
	白茎パクチョイ	+	+	2	CHOU DE MILAN	+	+	2
	白茎高脚パクチョイ	+	+	2	渡辺成功	-	+	3
	体中菜	+	+	2	富士早生甘藍	n.d.	+	4
	中生チンゲンサイ	+	+	3	B. oleracea Gongylodes Group コーア	レラビ		
	杓子菜	+	+	4	CHOU RAVE	_	+	1
	金光菜	+	+	4	<i>B. oleracea</i> Italica Group ブロッコリー	-		
	タアサイ	-	+	4	スティックセニョール	+	+	1
<i>B. rapa</i> J	aponica Group キョウナ				ネオグリーン	n.d.	+	3
	中生千筋京水菜	-	+	1	ブロッコリーノドシコ	n.d.	+	3
	早生千筋京水菜	+	+	2	貝割用ブロッコリー	+	+	3
	早生京壬生菜	+	+	2	R. sativus ダイコン			
	晚生千筋京水菜	+	+	2	桜島大根	_	-	0
	中生京壬生菜	+	+	3	RADIS 黒	+	+	1
	晚生京壬生菜	+	+	3	たんしん	+	+	2
B. rapa N	Varinosa Group ヒサゴナ				黒葉みの早生大根	+	+	2
	ビタミン菜	+	+	3	春まさり	+	+	2
	ちぢみ菜	+	+	3	小瀬菜大根	+	+	2
B. rapa (Oleifera Group アブラナ				辛味大根	+	+	2
	早池峰菜	+	+	1	打木源助大根	+	+	2
	紅菜苔	+	+	2	RADIS チェリー	+	+	3
	食用早生油菜	+	+	3	RADIS 18 目タイプ	+	+	3
B. napus	西洋ナタネ				おふくろ	+	+	3

表 1 (続き)

見紙力	日任力	病征	7% rt rt 9)	
属種名	品種名	無傷	 有傷	発病度 2)
	こうふくダイコン	-	+	3
	阿波晚生大根	+	+	3
	貝割大根	+	+	3
	亀戸大根	-	+	3
	京都青味大根	+	+	3
	山田ねずみ大根	+	+	3
	時なし大根	-	+	3
	新三浦大根	-	+	3
	みやま新西町大根	+	+	3
	青首宮重丸尻大根	+	+	3
	宮重総太大根	-	+	3
	青首宮重長太大根	n.d.	+	3
	青首春陽大根	+	+	3
	赤丸 20 日大根	+	+	3
	赤長 20 日大根	+	+	3

早生すなし	聖護院	_	+	3
大蔵大根		-	+	3
貯蔵用仙台	计地大根	+	+	3
吸込二年子	大根	+	+	3
白首夏大槌	ŧ	+	+	3
方領大根		+	+	3
万葉大根		+	+	3
葉大根		+	+	3
和歌山大槌	ŧ	+	+	3
髙農聖護院	2大根	+	+	3
コメット赤丸	. 20 日大根	+	+	4
燕京赤長大	に根	+	+	4
大阪四十日	大根	+	+	4
赤筋大根		n.d.	+	4
白長廿日大	、根	+	+	4
mr. 岸海, 岸海大		水岸 庄 ツチチ	. 1177	2) 夕 彩 庄 庄 の

1)-:無病徴、+:病徴有り、病徴程度は発病度 ²⁾を参照. ²⁾各発病度の 評価基準は、材料および方法を参照. n.d.:未評価

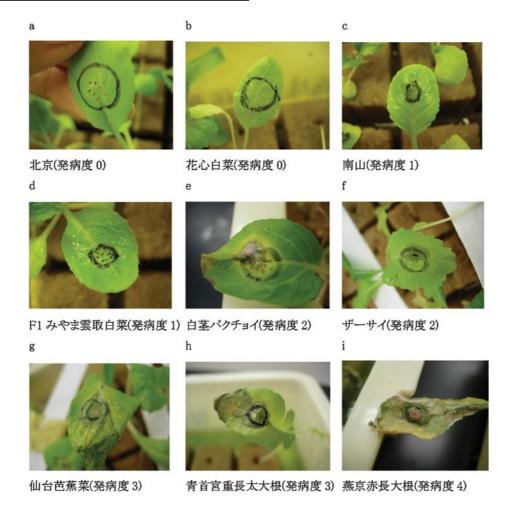


図 1 A. brassicae 接種による Brassica および Raphanus **属品種の黒斑病徴の例**。接種 5 日 後。 a, b:症状がみられない, c, d:有傷部分のみに黒斑がみられる, e, f: 菌叢断片を載せたところにのみに黒斑がみられる, g, h: 菌叢断片を載せた外側部分にも黒斑が広がってみられる, i:葉全体に黒斑がみられる。

各発病度 1) の品種数 属種名 亜・変種名 作物名 計 Pekinensis Group ハクサイ Perviridis Group コマツナ Rapifera Group カブ Chinensis Group タイサイ В. гара Japonica Group キョウナ ヒサゴナ Narinosa Group アブラナ Oleifera Group 小計 ケール Acephala Group Capitata Group キャベツ コールラビ B. oleracea Gongylodes Group ブロッコリー Italica Group 小計 カラシナ B. juncea B. nadus 西洋ナタネ ダイコン R. sativus 計

表 2 A. brassicae 接種による Brassica および Raphanus 属種および亜・変種別抵抗性評価

おける黒斑病に対する罹病性の高さが示された。その中で、発病度 0 は B. rapa Pekinensis Group より 2 品種、B. rapa Rapifera Group および R. sativus よりそれぞれ 1 品種ずつ見出された。BANSAL et al. (1990) は、Brasscia 属 6種に対する A. brassicae 接種試験において、病徴が軽微な B. rapa 品種を報告している。一方、本研究では A. brassicae 接種に対して無病徴を示す B. rapa および R. sativus 品種がみられたことから、日本産在来の Brassica および Raphanus 属品種中には、より高度な黒斑病菌抵抗性の存在が示された。

各属種内における発病度 1-4 の分布としては、総じて、 発病度 2 および 3 の病徴を示す品種が多数を占めた。 各種 内の総品種数当りの発病度 2 および 3 の品種数割合(発病 度 2 および 3 品種数/総品種数×100)は、 B. oleracea、B. juncea、B. napus および R. sativus でそれぞれ 73%、89%、 100% および 83% であったのに対して、 B. rapa は 54% と 他と比べてその割合は低かった。 その一方、各種内の総品 種数当りの発病度 0 および 1 の品種割合(発病度 0 および 1 品種数/総品種数×100)が、それぞれ 20%、11%、0% お よび 4.9% であったのに対して、B. rapa では 34% を占め、 B. rapa 内には、A. brassicae 抵抗性程度に、幅広い差異が みとめられた。この結果は、BAINS and TEWARI(1987)お よび BANSAL et al. (1990)による報告と一致するものであ り、日本産在来 Brassica および Raphanus 属中、特に B. rapa には黒斑病菌抵抗性を有する品種が多く存在してい

ることが示唆された。

本研究では、実験個体数が少ないとはいえ、培養菌叢を接種源とした接種試験により、日本産在来品種を中心とした Brassica および Raphanus 属品種において A. brassicae 抵抗性の有無を十分に評価できたものと考える。培養菌叢による接種は、分生子懸濁液による接種と比較し、胞子数を調整できないものの、確実に病原性を有する株を用いることで、より強い接種条件の設定が可能となる。本研究では、品種当たりの個体数を限りながらも培養菌叢を接種源とすることで、多数品種からより確実に抵抗性品種を選抜するための一次スクリーニングが可能となることを示した。

Brassica および Raphanus 属植物 138 品種において、抵抗性から罹病性と黒斑病徴の発病程度の異なる品種が認められたことは、両属日本産在来品種の遺伝資源としての有用性を示唆するものであるとともに、今後の黒斑病抵抗性品種の作出や病徴発現機構解析のための材料選択の一助となる。特に、本研究により見出された、菌叢有傷接種における発病度 0 および 1 の品種は、今後、黒斑病抵抗性素材として期待される。しかしながら、発病程度は温度や湿度などの植物体の生育環境、それに基づく病斑進展度合いの違い、個体の令や生育段階などの条件によって変動することが推察される。よって、今後、発病度 0 および 1 の品種の抵抗性程度を詳細に調査し、類別・確定することが必要とされる。また、実用上、圃場試験による検討が課題であると考える。

¹⁾各発病度の評価基準は、材料および方法を参照.

謝辞:本論文は、日本私立学校振興・共済事業団による学 術振興資金の支援により取りまとめた。また、病菌接種に ついては、東京農業大学大学院農学研究科国際農業開発学 専攻(当時)の廣岡裕吏博士よりご助言頂いた。ここに、 記して謝意を表する。

引用文献

- VERMA, P.R. and SAHARAN, G.S., (1994) Monograph on Alternaria diseases of crucifers, Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon, SK, Canada, 162.
- Bains, P.S. and Tewari, J.P., (1987) Purification, chemical characterization and host specificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 30, 259-271.
- 3) Ansari, A.N., Khan, M.W. and Muheet, A., (1988) Effect of *Alternaria* blight on oilcontent of rapeseed-mustard. *Current Sci.*, 57, 1023–1024.
- KOLTE, S.J., AWASTHI, R.P. and VISWANATH, (1988) Assessment of yield losses due to *Alternaria* blight in rapeseed-mustard. *Indian Phytopathol.*, 40, 209-211.
- Kolte, S.J., Bardoloi, D.K. and Awasthi, R.P., (1991) The search for resistance to major diseases of rapeseed mustard in India. Proc. GCJRC 8th Int. Rapeseed Cong., Saskatoon, Canada, 219–225.
- TEWARI, J.P., (1991) Structural and biochemical basis of the black spot disease of crucifers. Adv. Struct. Biol., 1,

325-349.

- 7) Conn, K.L. and Tewari, J.P., (1986) Hypersensitive reaction induced by *Alternaria brassicae* in *Eruca sativa*, an oil yielding crucifer. *Can. J. Plant Pathol.*, **8**. 348.
- 8) Conn, K.L., Tewari, J.P. and Dahiya, J.S., (1988) Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexin-elicitation in rapeseed and other crucifers. *Plant Sci.*, **56**. 21–25.
- 9) Pedras, M.S.C., Khan, A.Q. and Taylor, J.L., (1998) The phytoalexin camalexin is not metabolized by *Phoma lingam, Alternaria brassicae*, or phytopathogenic bacteria. *Plant Sci.*, **139**. 1–8.
- 10) Pedras, M.S.C., Zaharia, I.L., Gai, Y., Zhou, Y. and Ward, D.E., (2001) In planta sequential hydroxylation and glycosylation of a fungal phytotoxin: avoiding cell ceath and overcoming the fungal Invader. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 747–752.
- PEDRAS, M.S.C., ZAHARIA, I.L. and WARD, D.E., (2002) The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochem.*, 59, 579–596.
- 12) Pedras, M.S.C., Montaut, S., Zaharia, I.L., Gai, Y. and Ward, D.E., (2003) Transformation of the host-selective toxin destruxin B by wild crucifers: probing a detoxification pathway. *Phytochem.*, **64**, 957–963.
- 13) BANSAL, V.K., SEGUIN-SWARTZ, G., RAKOW, G.F.W. and PETRIE, G.A., (1990) Reaction of *Brassica* species to infection by *Alternaria brassicae*, Can. J. Plant Sci., 70. 1159– 1162.

Evaluation of Resistance to *Alternaria brassicae* in *Brassica* spp. and *Raphanus sativus* Genetic Resources of Japan

By

Kenji Wakui*, Takaharu Mikami**, Maki Oyama**, Miki Kurabayashi*, Yuka Moue*, Junzo Fujigaki* and Keiko T. Natsuaki***

(Received February 29, 2008/Accepted June 6, 2008)

Summary: A total of 138 cultivar seedlings of *Brassica* spp. and *Raphanus sativus* were inoculated with the fungal pathogen *Alternaria brassicae*. Four days after inoculation, disease severity on the seedlings was judged with five criteria (0-4) according to the incidence of lesions. Lesions of various levels, from undetectable (disease severity 0) until withering (disease severity 4), were shown on the seedling depending on the cultivars. As disease severity 0, two cultivars from *B. rapa* Pekinensis Group, and one cultivar each from *B. rapa* Rapifera Group and *R. sativus* were found.

Key words: Alternaria brassicae, blackspot, Brasscia, Raphanus

^{*} Department of Bioproduction Technology, Junior College of Tokyo University of Agriculture

^{**} Mikado Kyowa Seed Co., LTD.

^{***} Department of International Agricultural Development, Faculty of International Agriculture and Food Studies, Tokyo University of Agriculture