

レタスビッグベイン病抵抗性品種の育成と今後の展望

野菜茶業研究所 ^{かわ}川 ^ず頭 ^{よう}洋 ^{いち}一

はじめに

レタスビッグベイン病は土壌伝染性のウイルス病で、レタスが本病を発症すると葉脈付近が退緑化し、その結果、葉脈 (vein) が太く (big) 見えることからビッグベイン (big-vein) 病と呼ばれている (口絵①)。また、発症したレタスの玉は小さくなり、症状が重い場合には葉が波打ち、結球しないこともあり、収量が低下する。本病の病原ウイルスであるミラフィオリレタスビッグベインウイルス (MLBVV) は、土壌生息菌類 *Olpidium virulentus* によって媒介される (Lot et al., 2002 ; SASAYA et al., 2008)。ウイルスを保毒した *O. virulentus* は休眠胞子の形で土壤中に長年生存することができるため (CAMPBELL, 1985)、本病は一度発生すると根絶するのが困難な難防除病害である。

本病は世界各地のレタス産地で問題となっており、海外では米国をはじめ、南米諸国 (ブラジル、アルゼンチン、チリ)、ヨーロッパ諸国 (英国、ドイツ、オランダ、スペイン、イタリア、フランス、ギリシア、スロベニア)、オセアニア諸国 (オーストラリア、ニュージーランド) で発生が報告されている。日本国内では近年、発生地域が拡大しており、これまでに発生が報告された県は、千葉県、埼玉県、静岡県、長野県、和歌山県、兵庫県、岡山県、徳島県、香川県、高知県、沖縄県である。このような状況の中、本病の被害を受けているレタス生産者からは、抵抗性品種の育成が強く求められている。

I レタスビッグベイン病抵抗性育種の現状

筆者は 2003 年に本誌の第 57 巻第 6 号において、ビッグベイン病抵抗性育種の現状と課題について紹介した (川頭, 2003)。その中で、「これまでに育成された耐病性品種の問題点は、それほど強い抵抗性をもっているわけではないという点であり、汚染の程度が高い土壌においては感受性の品種と同程度の発病を示す場合もある。そのため、より抵抗性の強い品種の開発が望まれている。」と述べた。この状況は 2010 年現在においてもほと

んど変わっていない。その理由は、レタス栽培種 (*Lactuca sativa*) の中で新しい抵抗性素材が現在も見つかっていないためである。よって、現在最も現実的な育種は、既存の抵抗性品種を育種素材に用いて、ビッグベイン病が問題となっている各レタス産地に適した品種を育成することである。筆者らも既存の抵抗性品種を用いて交雑育種を行い、新品種「フユヒカリ」を育成したので以下に紹介する。

II ‘フユヒカリ’の育成過程と品種特性

1 ‘フユヒカリ’の育成過程

筆者らはレタスビッグベイン病抵抗性素材として、米国農務省 (USDA) で育成された ‘Thompson’ (RYDER, 1981) を用いた。‘Thompson’ はレタスの中でトップレベルのレタスビッグベイン病抵抗性を有するものの、葉縁が波打ち変形球率が高いなど実用形質に問題がある。そこで ‘Thompson’ に、秋まき厳寒期どり作型用の優良品種 ‘シスコ’ (タキイ種苗株式会社) を交雑し、レタスビッグベイン病抵抗性と優良形質を備えた実用的な品種の育成に取り組んだ。1999 年に育種を開始し、2003 年には F₃ 世代で選抜した系統から F₄ 種子を得たことを前稿で紹介した (川頭, 2003)。その後、汚染圃場での選抜と自殖採種を繰り返し、F₆ 世代でレタスビッグベイン病抵抗性を有し球品質が総合的に実用レベルに達したと判断される 1 系統を選抜し、レタス安濃 2 号と地方系統名を付けた。この系統について、2005 ~ 07 年度にわたり特性検定試験 (レタスビッグベイン病抵抗性検定試験) および系統適応性検定試験 (形態・収量特性試験) を実施した。その結果、レタス安濃 2 号は既存の抵抗性品種 ‘ロジック’ (横浜植木株式会社) に比べ強度のレタスビッグベイン病抵抗性を示し、非汚染圃場における収量および球の品質は ‘ロジック’ と同等であったことから、実用品種として有望と判断された。そこで、2008 年にレタス安濃 2 号を ‘フユヒカリ’ と命名し、品種登録出願した (品種登録出願番号第 22981 号; 口絵②, 図-1)。なお、‘フユヒカリ’ の種子については、2010 年 8 月ごろから株式会社フジイシードより販売される予定となっている。

2 ‘フユヒカリ’のレタスビッグベイン病抵抗性

‘フユヒカリ’の抵抗性を他の品種と比較した結果を

Development of Lettuce Cultivars with Resistance to Lettuce Big-Vein Disease. By Yoichi KAWAZU

(キーワード: レタス, ビッグベイン病, ウイルス病, 抵抗性, 育種)

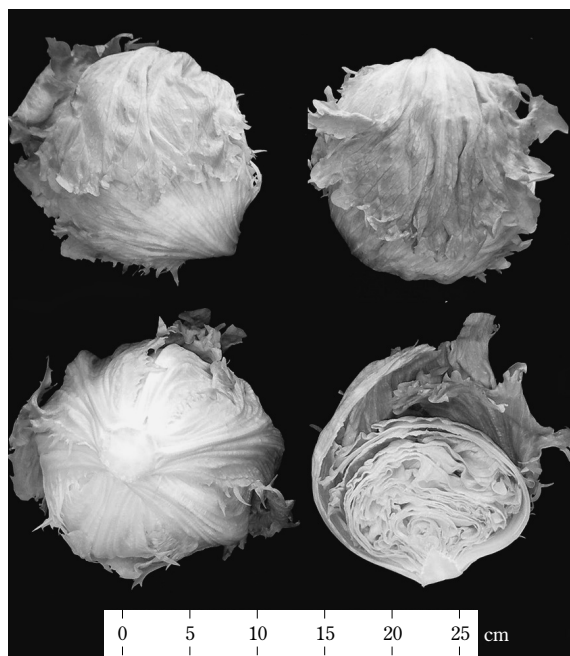


図-1 ‘フユヒカリ’収穫物

表-1 に示している。‘フユヒカリ’は病原ウイルス (MLBVV) に感染し、発病する株も見られたが、MLBVV 検出率は市販の抵抗性品種 ‘ロジック’ よりも低い値を示した。また、‘フユヒカリ’の発病株率および病徴の程度を表す発病度についても低い値を示した。同様の結果は、兵庫県の現地汚染圃場など他の地域の試験でも得られており、‘フユヒカリ’は既存の抵抗性品種 ‘ロジック’ よりも強いレタスビッグベイン病抵抗性を示すことがわかった。

3 ‘フユヒカリ’の形態特性・収量性

非汚染圃場で実施した形態・収量特性試験の結果を表-2 に示した。‘フユヒカリ’の地上部重および球重は ‘シスコ’ よりも高く、低温条件下での生育が優れていることがわかった。‘ロジック’ に比べると低い値だったが、他年度あるいは他の地域での試験によっては ‘フユヒカリ’ のほうが高い場合もあり、総合的に見ると ‘フユヒカリ’ の地上部重および球重は ‘ロジック’ と同等であった。‘フユヒカリ’ の球形指数は ‘ロジック’ や ‘シスコ’ に比べるとやや高く、丸に近い形状になる傾向が見られた。表-2 の試験における ‘フユヒカリ’ の秀品率は ‘ロジック’ よりも高かったが、他地域での結果を平均すると ‘ロジック’ と同等であった。‘フユヒカリ’ の収量は、‘ロジック’ と同等であり、‘シスコ’ よりも多かった。

以上をまとめると、‘フユヒカリ’の収量および球の品

表-1 ‘フユヒカリ’のビッグベイン病抵抗性検定結果

品種	MLBVV 検出率 (%)	発病株率 (%)	発病度
フユヒカリ	30	10	6
ロジック	56	22	21
シスコ	70	28	25

‘ロジック’は抵抗性品種、‘シスコ’は罹病性品種。発病指数：0（無病徴）～3（重度の病徴）の4段階。発病度： $\sum$ （発病指数×指数別株数）/（全株数×3）×100。

表-2 ‘フユヒカリ’の形態・収量特性試験結果

品種	地上部重 (g)	球重 (g)	球形指数	秀品率 (%)	収量 (kg/a)
フユヒカリ	485	302	0.91	66	164
ロジック	530	335	0.84	36	162
シスコ	397	241	0.85	37	124

球形指数：球高/球径。秀品：形状のゆがみや中肋突出等のないもの。

質は ‘ロジック’ と同等であり、冬どり用の代表品種 ‘シスコ’ よりも収量が多かった。

4 フユヒカリを栽培するにあたっての留意点

‘フユヒカリ’は、これまでの抵抗性品種よりも強い抵抗性を示すものの完全な抵抗性ではないため、汚染程度の高い圃場においては、MLBVV を媒介するオルピディウム菌 (*Olpidium virulentus*) に対して防除効果がある土壌消毒や薬剤（チオファネートメチルまたは TPN）灌注を併用することが望ましい（岩本・相野，2010）。また ‘フユヒカリ’の特性の一つとして、球がやや縦長になる傾向が見られる。市場のレタスはやや扁平になるのが標準であり、縦長の球は好まれない。‘フユヒカリ’は低温肥大性に優れ厳寒期どりの栽培に適している一方で、トンネルの裾を常に閉じた栽培では高温により生育が旺盛になりすぎて球が縦長になる欠点がある。そのため、朝夕にトンネルの開閉を行うか、トンネルの裾を少し開けておくことによりトンネル内の温度が上がりすぎないようにする必要がある。

III レタスビッグベイン病抵抗性育種の問題点と今後の展望

1 DNA マーカーを利用した抵抗性育種

‘フユヒカリ’を育成するための素材として用いた ‘Thompson’、あるいは ‘Pacific’ 等の抵抗性品種は、若干の抵抗性を示す品種・系統を 3～4 種類組合せ、抵抗性

を集積して育成された品種である (RYDER, 1981 ; RYDER and ROBINSON, 1991)。そのため、これまでに育成された抵抗性品種の抵抗性には、複数の遺伝子が関与していると考えられる。交配育種において、集積すべき遺伝子の数が多いほど、その遺伝子をすべてもっている個体が出現する確率は低くなるため、選抜に用いる個体数を大きくする必要が生じる。また、レタスビッグベイン病抵抗性は不完全優性なので (図-2)、例えば目的の遺伝子 A をもっていても、Aa 型個体の抵抗性は AA 型個体の抵抗性よりも弱いことから、Aa の個体は選抜されない可能性が高くなり、選抜効率が下がってしまう。さらに「フユヒカリ」を含め、これまでに育成された抵抗性品種の抵抗性は強度抵抗性とは言えず、環境の影響も受けやすい。そのため遺伝的に固定した品種であっても発病するのが早い個体と遅い個体が出てくるので、抵抗性の程度を 1 個体で評価することが難しく、集団を用いて MLBVV 検出率や発病株率を求めることによって抵抗性を評価する必要がある。すなわち育種を進めるにあたっては、個体選抜が難しいため、まず系統ごとに抵抗性を評価し、抵抗性が強い系統の中で発病していない株を選ぶ必要がある。

このように、レタスビッグベイン病抵抗性品種の抵抗性には複数の遺伝子が関与していると考えられ、抵抗性は不完全優性を示し、個体選抜も難しいため、育種において他の有用形質も取り入れながら、抵抗性素材と同等の抵抗性をもつ系統を得るためには、多大な労力を必要とする。

一方、最近では DNA マーカーを用いた選抜が、育種の新しい手法として注目されている。もし、目的の遺伝子と密接に連鎖した DNA マーカーが見つければ、抵抗性検定などを行わずに目的の個体を選抜することができる。これまでレタスビッグベイン病抵抗性に連鎖した

DNA マーカーに関する報告はないが、もしそのような DNA マーカーが開発されれば、汚染土壌を必要とせず、環境変動にも左右されないで、個体選抜が可能となり、目的遺伝子が AA 型だけでなく Aa 型の個体も選抜することができ、現在の育種に比べて非常に効率的な育種が可能になると思われる。

2 近縁種を利用した抵抗性育種

植物の育種において、栽培種の中に満足のいく育種素材が見つからない場合、近縁種の中から有用な育種素材を探すことがよく行われる。レタスビッグベイン病抵抗性に関しても、レタス栽培種 (*L. sativa*) の中に強度抵抗性のものがないため、レタス近縁種について抵抗性が調べられ、*L. virosa* の中に強度抵抗性のものがあることが報告された (CAMBELL, 1965 ; Bos and HUIJBERTS, 1990)。そこで *L. virosa* を育種素材にすれば、強度抵抗性のレタスを育成することが可能と考えられたため、国内外で *L. virosa* を利用した育種が行われてきた。*L. virosa* を利用するうえで問題となる点は、*L. virosa* と *L. sativa* を交配した F₁ 雑種が不稔になることである。交雑後代の種子を得るためには胚培養や *L. serriola* を橋渡しにした交配などを行う必要がある (EENINK et al., 1982 ; MAISONNEUVE et al., 1995)。野菜茶業研究所ではこれまでに、胚培養および *L. sativa* への連続戻し交配を行い、種間交雑後代と考えられる系統を得た。しかし、調査の結果、葉の形質が栽培種に近い系統ほど抵抗性が低く、*L. virosa* の強度抵抗性を栽培種に導入する試みは成功していない (川頭, 2003)。また、海外においても *L. virosa* を利用した育種が行われたが、部分的なレタスビッグベイン病抵抗性しか導入することができなかった (HAYES and RYDER, 2007)。

以前は、病徴を指標としてレタスビッグベイン病抵抗性が評価されていたが、近年、ビッグベイン病の病原ウ

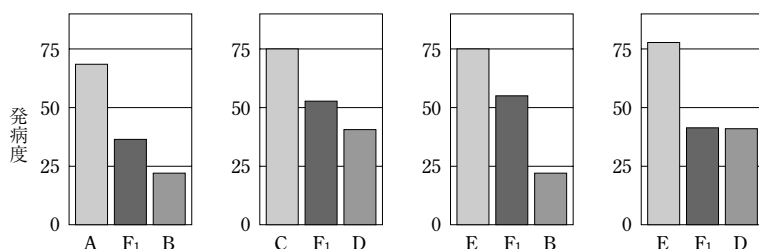


図-2 F₁ レタスのビッグベイン病抵抗性検定結果

各 F₁ の両側は F₁ の両親の結果を示している。A : Sea Green, B : Pacific, C : ウィッシュュ, D : Thompson, E : R154. 発病指数 : 0 (無病徴) ~ 2 (明確な病徴) の 3 段階評価。発病度 : $\{ \sum (\text{発病指数} \times \text{指数別株数}) / (\text{全株数} \times 2) \} \times 100$.

イルス (MLBVV) が明らかとなり (ROGGERO et al., 2000; LOT et al., 2002; SASAYA et al., 2008), ウイルスゲノムの塩基配列も明らかにされたことから (van der WILK et al., 2002; KAWAZU et al., 2003), ELISA 法や PCR 法あるいはハイブリダイゼーション法を用いてウイルスを検出することにより, 抵抗性を評価することができるようになった。HAYES らは, 7 点の *L. virosa* について発病株率と MLBVV 検出率を調査することにより, 抵抗性の程度を比較した (HAYES et al., 2008)。その結果, 発病が見られた系統と発病が全く見られない系統があったが, 発病が見られない系統でも, 検出率は低いものの MLBVV が検出された。これまで, MLBVV に全く感染しない *L. virosa* は報告されていないが, 系統によってはウイルスの増殖速度が非常に遅いため, それらは育種素材として有用と考えられる。今後, *L. virosa* を用いた抵抗性育種を実施する場合, 抵抗性を病徴ではなくウイルスの有無で評価することで, より厳密な選抜ができ, *L. virosa* の強度抵抗性を栽培種に導入することができるかもしれない。

3 遺伝子組換え技術を利用した抵抗性育種

現在のところ, レタス栽培種の中に強度抵抗性のものがなく, *L. virosa* を利用した強度抵抗性レタス育成の見込みも立っていない。そこで筆者らは, 他のアプローチとして遺伝子組換え技術が有用であると考え, この技術を用いた強度抵抗性レタスの開発に取り組んでいる。

一般的に, 病原ウイルスの遺伝子 (外被タンパク質遺伝子や複製酵素遺伝子等) を植物に導入すれば, そのウイルスに対する抵抗性を付与することが可能である (BAULCOMBE, 1996)。ウイルス遺伝子の導入によって抵抗性になるメカニズムの一つに RNA サイレンシングがある。RNA サイレンシングでは, 21 ~ 26 塩基の短い RNA を介して, 塩基配列特異的に RNA 分解やタンパク質合成阻害が起きる。RNA サイレンシングは二本鎖 RNA によって誘導することができるが, ウイルス遺伝子の逆位反復配列を導入して二本鎖 RNA を発現させることにより, 効率的にウイルス抵抗性の植物を作出することができることが報告されている (SMITH et al., 2000)。そこで筆者らは, MLBVV の外被タンパク質 (CP) 遺伝子の逆位反復配列を導入することにより, レタスビッグベイン病抵抗性レタスの作出を試みた (KAWAZU et al., 2009)。図-3 A に示したコンストラクトをアグロバクテリウム法によりレタスに導入し, 40 系統の組換えレタスを作成した。これらの系統について MLBVV 抵抗性を調査した結果, ほとんどの系統は MLBVV 感受性だったが, 2 系統が抵抗性を示し, このうち 1 系統は他方

よりも強い抵抗性を示した。そこで, この強い系統について詳細な解析を行った (KAWAZU et al., 2010)。本系統がビッグベイン病に対してどの程度の抵抗性があるのか, また, 付与された抵抗性が遺伝的に安定であるかを確かめるため, T₃ ~ T₅ 世代 (再分化個体は T₀ 世代) を用い, 特定網室 (遺伝子組換え植物を栽培するための非閉鎖系温室) において抵抗性検定を実施した (表-3)。対象品種として, 組換えレタスの元品種である ‘カイザー’ と, レタスの中でトップレベルの抵抗性がある ‘Pacific’ を用いた。抵抗性検定の結果, MLBVV 検出率と発病株率は共に ‘カイザー’ で 100%, 抵抗性品種の ‘Pacific’ でも 96% と, ほとんどの株が発病した。これに対して組換えレタスの MLBVV 検出率は, 最大で 15%, 発病株率は最大で 7% と, 既存の抵抗性品種に比べて非常に強い抵抗性を示した。また, T₅ 世代でも強い抵抗性が保持されていたことから, 付与された抵抗性は安定的に遺伝することがわかった。

以上の結果より, 遺伝子組換え技術を用いて MLBVV の CP 遺伝子の逆位反復配列を導入すれば強度抵抗性レタスの作出が可能であることが示された。筆者らは現在, 消費者により受け入れられやすい形の抵抗性組換えレタスを作成するため, 図-3 B に示したコンストラクトを作成し, 新たな組換えレタスの開発を進めている。これ

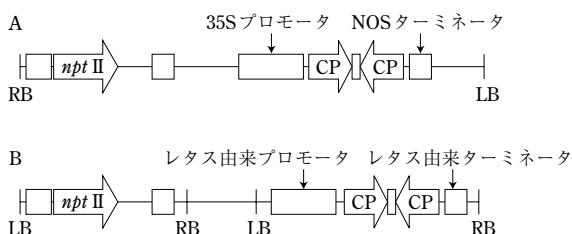


図-3 遺伝子導入に用いたコンストラクトの構造

LB: T-DNA の Left border, RB: T-DNA の Right border, CP: MLBVV の外被タンパク質遺伝子の一部 (0.5 kb)。

表-3 遺伝子組換えレタスのビッグベイン病抵抗性検定結果

品種・系統	MLBVV 検出率 (%)	発病株率 (%)
T ₃	15	0
T ₄	11	7
T ₅	4	4
Pacific	96	96
カイザー	100	100

‘Pacific’ は抵抗性品種, ‘カイザー’ は罹病性品種 (組換えレタスの元品種)。

までは図-3Aに示すように、カリフラワーモザイクウイルスのプロモータと細菌由来のターミネータを用いたが、新しいコンストラクトではレタス由来のプロモータ・ターミネータを用いている。また、抗生物質耐性遺伝子 (*npt II* 遺伝子) を含まないマーカーフリーの組換えレタスを作成するため、2 T-DNA 法 (DEPICKER et al., 1985) という方法を採用している。図-3Bに示しているように、ベクターから植物細胞の染色体に挿入される T-DNA 領域の片方に *npt II* 遺伝子、もう片方に目的遺伝子 (CP 遺伝子の逆位反復配列) を入れておくと、アグロバクテリウムによる形質転換において、ある確率で二つの T-DNA が異なる染色体に挿入される。そうすると二つの T-DNA は後代で分離し、目的遺伝子しかもたないマーカーフリーの個体が発現する。現在、2 T-DNA 法を使って形質転換したレタス系統について、抵抗性選抜およびマーカーフリー個体の選抜を実施しているところである。

お わ り に

レタスビッグベイン病抵抗性育種は、日本では横浜植木株式会社で最初に実施され、10 年ほど前に「ロジック」が育成された。その後、筆者らは「ロジック」よりも強い、国内産地用の品種育成を目指して育種を行い、「フユヒカリ」を育成した。「フユヒカリ」は「Thompson」や「Pacific」と同様、レタスの中でトップレベルの抵抗性を有するが、完全な抵抗性ではない。そのため、汚染程度の高い圃場では、土壤消毒や薬剤灌注など他の防除技術を併用することが望ましい (岩本・相野, 2010)。

一方、レタス生産者は、労力・コスト軽減の観点から、強度抵抗性の品種育成を強く望んでいる。しかしながら、交雑育種によってそれを実現するのは困難な状況である。筆者らの研究により、強度抵抗性のレタスを開発するという点では、遺伝子組換えが非常に有力な技術であることが明らかとなった。しかし遺伝子組換え作物は、生物多様性影響評価、食品安全性評価、そして消費者に受け入れられるか、というハードルがあり、実用化までにはしばらく年月を要すると思われる。今後は遺伝子組換えだけでなく DNA マーカーや人為的な突然変異等、他の様々な手法も考慮しながら、強度抵抗性品種の育成・実用化に向かって研究を進めていきたいと考えている。

引 用 文 献

- 1) BAULCOMBE, D. C. (1996): Plant Cell 8: 1833 ~ 1844.
- 2) BOS, L. and N. HUIJBERTS (1990): Crop Prot. 9: 446 ~ 452.
- 3) CAMPBELL, R. N. (1965): Can. J. Botany 43: 1141 ~ 1149.
- 4) ——— (1985): ibid. 63: 2288 ~ 2289.
- 5) DEPICKER, A. et al. (1985): Mol. Gen. Genet. 201: 477 ~ 484.
- 6) EENINK, A. H. et al. (1982): Euphytica 31: 291 ~ 300.
- 7) HAYES, R. J. and E. J. RYDER (2007): HortScience 42: 35 ~ 39.
- 8) ——— et al. (2008): Euphytica 164: 493 ~ 500.
- 9) 岩本 豊・相野公孝 (2010): 植物防疫 64: 229 ~ 238.
- 10) 川頭洋一 (2003): 同上 57: 258 ~ 261.
- 11) KAWAZU, Y. et al. (2003): J. Gen. Plant Pathol. 69: 55 ~ 60.
- 12) ——— et al. (2009): Transgenic Res. 18: 113 ~ 120.
- 13) ——— et al. (2010): ibid. 19: 211 ~ 220.
- 14) LOT, H. et al. (2002): Phytopathology 92: 288 ~ 293.
- 15) MAISONNEUVE, B. et al. (1995): Euphytica 85: 281 ~ 285.
- 16) ROGGERO, P. et al. (2000): Arch. Virol. 145: 2629 ~ 2642.
- 17) RYDER, E. J. (1981): HortScience 16: 687 ~ 688.
- 18) ——— and B. J. ROBINSON (1991): ibid. 26: 437 ~ 438.
- 19) SASAYA, T. et al. (2008): Phytopathology 98: 464 ~ 468.
- 20) SMITH, N. A. et al. (2000): Nature 403: 319 ~ 320.
- 21) van der WILK, F. et al. (2002): J. Gen. Virol. 83: 2869 ~ 2877.

(新しく登録された農薬 15 ページからの続き)

「除草剤」

●フェントラザミド・ベンスルフロンメチル水和剤 ※名称変更

22750: ホクサンイノーバフロアブル (北海三共) 10/07/07

フェントラザミド: 3.9%, ベンスルフロンメチル: 1.4%

三共イノーバフロアブル (No. 20540) から商品名のみ変更

●フェントラザミド・ベンスルフロンメチル粒剤 ※名称変更

22751: ホクサンイノーバ 1 キロ粒剤 75 (北海三共) 10/07/07

フェントラザミド: 2.0%, ベンスルフロンメチル: 0.75%

三共イノーバ 1 キロ粒剤 75 (No. 20524) から商品名のみ変更

●フェントラザミド・プロモブチド・ベンスルフロンメチル

粒剤 ※名称変更

22752: ホクサンイノーバ DX 1 キロ粒剤 75 (北海三共)

10/07/07

フェントラザミド: 2.0%, プロモブチド: 9.0%, ベンスルフロンメチル: 0.75%

三共イノーバ DX 1 キロ粒剤 75 (No. 21126) から商品名のみ変更

●オキサジアルギル粒剤 ※名称変更

22753: ホクサンキルクサ 1 キロ粒剤 (北海三共) 10/07/07

オキサジアルギル: 0.50%

三共キルクサ 1 キロ粒剤 (No. 22203) から商品名のみ変更

●オキサジアルギル・プロモブチド・ベンゾフェナップ粒剤 ※名称変更

22756: ホクサンバパール 1 キロ粒剤 (北海三共) 10/07/07

オキサジアルギル: 0.50%, プロモブチド: 6.0%, ベンゾフェナップ: 5.0%

三共バパール 1 キロ粒剤 (No. 22206) から商品名のみ変更