

Brassica 及び Raphanus 属の日本産在来品種の アブラナ科黒斑病菌 (*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、アブラナ科黒斑病菌 *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

アブラナ科植物は、*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、各種のアブ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ブラナ科野菜では、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)}。

アブラナ科植物では、これまでに野生種である *Sinapis alba*⁵⁾、*Camelina sativa*^{5,6)}、*Capsella bursa-pastoris*⁶⁾ 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、アブ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) を用いた。

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°C、16時間日長のインキュベーター内で約3~4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9cm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2~3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培地ごとコルクポラーで打ち抜き、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、先と同様にコルクポラーで打ち抜いた、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°C、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個体だけの供試であるが、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

属種名	品種名	病徴 ¹⁾		発病度 ²⁾
		無傷	有傷	
<i>B. rapa</i> 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
	オレンジクイン	-	+	3
	大和真菜	+	+	3
<i>B. rapa</i> 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
	新晩生小松菜	+	+	2
	改良黒葉小松菜	+	+	3
<i>B. rapa</i> 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)

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

表 1 (続き)

属種名	品種名	病徴 ¹⁾		発病度 ²⁾
		無傷	有傷	
	こうふくダイコン	-	+	3
	阿波晩生大根	+	+	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
貯蔵用仙台地大根	+	+	3
吸込二年子大根	+	+	3
白首夏大根	+	+	3
方領大根	+	+	3
万葉大根	+	+	3
葉大根	+	+	3
和歌山大根	+	+	3
高農聖護院大根	+	+	3
コメット赤丸 20 日大根	+	+	4
燕京赤長大根	+	+	4
大阪四十日大根	+	+	4
赤筋大根	n.d.	+	4
白長廿日大根	+	+	4

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

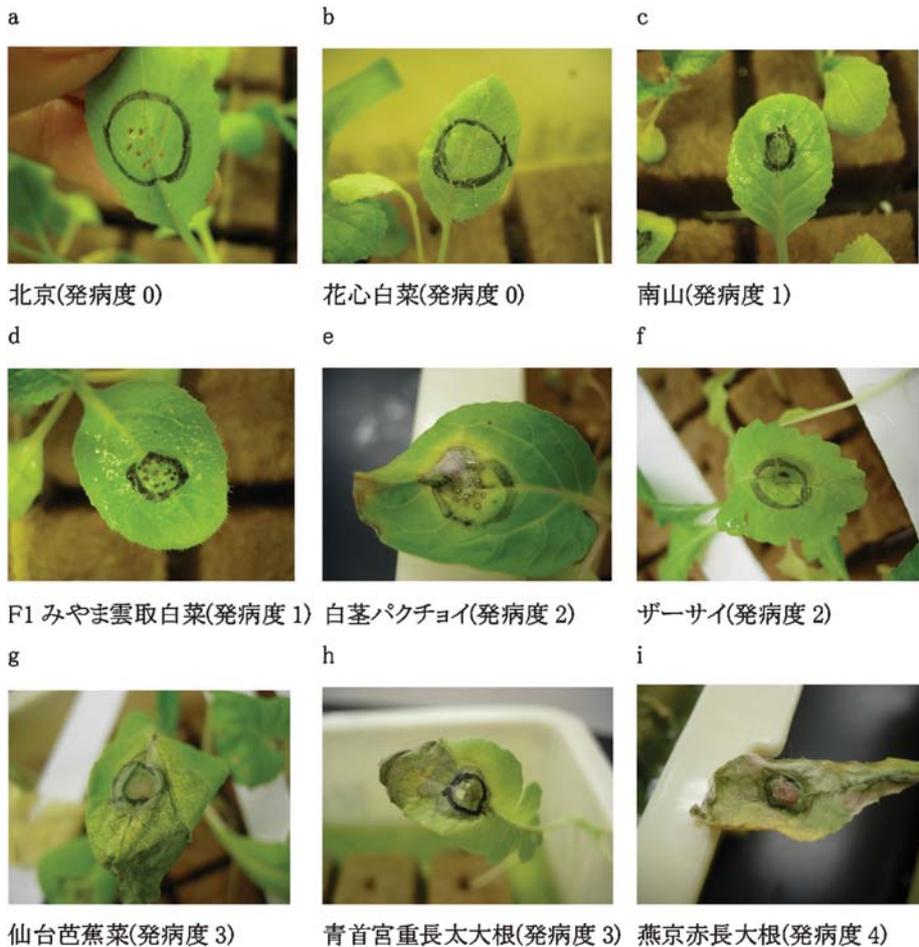


図 1 *A. brassicae* 接種による *Brassica* および *Raphanus* 属品種の黒斑病徴の例。接種 5 日後。a, b: 症状がみられない, c, d: 有傷部分のみに黒斑がみられる, e, f: 菌叢断片を載せたところのみに黒斑がみられる, g, h: 菌叢断片を載せた外側部分にも黒斑が広がってみられる, i: 葉全体に黒斑がみられる。

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

属種名	亜・変種名	作物名	各発病度 ¹⁾ の品種数					計
			0	1	2	3	4	
<i>B. rapa</i>	Pekinensis Group	ハクサイ	2	12	4	2	0	20
	Perviridis Group	コマツナ	0	1	3	1	0	5
	Rapifera Group	カブ	1	5	6	7	5	24
	Chinensis Group	タイサイ	0	0	3	1	3	7
	Japonica Group	キョウナ	0	1	3	2	0	6
	Narinosa Group	ヒサゴナ	0	0	0	2	0	2
	Oleifera Group	アブラナ	0	1	1	1	0	3
	小計		3	20	20	16	8	67
<i>B. oleracea</i>	Acephala Group	ケール	0	0	2	0	0	2
	Capitata Group	キャベツ	0	1	5	1	1	8
	Gongyloides Group	コールラビ	0	1	0	0	0	1
	Italica Group	ブロッコリー	0	1	0	3	0	4
	小計		0	3	7	4	1	15
<i>B. juncea</i>		カラシナ	0	1	7	1	0	9
<i>B. napus</i>		西洋ナタネ	0	0	3	3	0	6
<i>R. sativus</i>		ダイコン	1	1	6	28	5	41
	計		4	25	43	52	14	138

¹⁾各発病度の評価基準は、材料および方法を参照。

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、*Brassica* 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られる。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、孢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られる。

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

- 1) VERMA, P.R. and SAHARAN, G.S., (1994) Monograph on *Alternaria* diseases of crucifers, Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon, SK, Canada, 162.
- 2) 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 oil content of rapeseed-mustard. *Current Sci.*, **57**, 1023-1024.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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 death and overcoming the fungal invader. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 747-752.
- 11) 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, *Brassica*, *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