

ISSN 1882-9481

**BULLETIN
OF
THE OKINAWA PREFECTURAL
AGRICULTURAL RESEARCH
CENTER**

No.16

March, 2023

沖縄県農業研究センター研究報告

第 16 号

令和 5 年 3 月

OKINAWA PREFECTURAL AGRICULTURAL RESEARCH CENTER

820,MAKABE,ITOMAN-city,OKINAWA901-0336,JAPAN

沖縄県農研セ研報
Bull.OKINAWA
Agric.Res.Cent.
No.16 2023

沖縄県農業研究センター

沖縄県糸満市真壁 820

沖縄県農業研究センター 研究報告
第16号

目 次

【原著論文】

1. 沖縄県におけるトルコギキョウの保温長日処理による開花前進化と
2度切り栽培の可能性
……………亀山健太・座喜味利将・儀間直哉・関塚史朗・田場奏美・石垣新・島袋正明 1
2. ニガウリ種子由来のDNAを用いたマーカー選抜
……………伊礼彩夏・儀間康造・宮城牧・太郎良和彦 11

【論文抄録】

1. 未硬化葉を用いたマンゴー炭疽病の簡易病原性検定法と
マンゴー遺伝資源における抵抗性品種の選抜
……………澤岨哲也・與儀喜代政・仲村昌剛・松村まさと 17
2. マンゴー軸腐病の果房における発病推移と病原菌の生息分布，分生子飛散消長
およびハウス内の枯れ枝残渣除去による耕種的防除効果
……………澤岨哲也・比嘉 淳・伊山和彦・伊志嶺弘勝・手登根正 17
3. Characterization of *Erwinia* sp. causing black rot of papaya (*Carica papaya*) first recorded
in Okinawa Main Island, Japan
……………Takashi Hanagasaki, Maki Yamashiro, Kozo Gima, Tetsuya Takushi,
and Shinji Kawano 18
4. Development of a male specific genetic marker for *Garcinia subelliptica* Merr. Tree
……………Ayaka Irei, Matin Miryeganeh, Masanori Tamashiro, Hidetoshi Saze, Naoya Urasaki
& Kazuhiko Tarora 18

原著論文

沖縄県におけるトルコギキョウの保温長日処理による
開花前進化と2度切り栽培の可能性

亀山健太¹・座喜味利将²・儀間直哉³・関塚史朗¹
田場奏美⁴・石垣新¹・島袋正明¹

1 沖縄県農業研究センター 2 沖縄県中部農業改良普及センター

3 沖縄県農業大学校 4 沖縄県病害虫防除技術センター

要約

沖縄県におけるトルコギキョウの作期拡大を目的に、早生～中生系品種を10月中旬に定植し、ハウス管理および白熱電球を用いた保温長日処理が草丈および開花に及ぼす影響を検討した結果、草丈伸長および開花促進が認められ、従来の3～5月出荷中心の作型から1月出荷への前進化が図られることを明らかにできた。また消費電力の少ない遠赤色光LEDを用いることで、白熱電球と同等の草丈伸長および開花促進効果を認め、低コストで出荷前進できる可能性を示せた。さらに本研究では、1番花収穫後の切り下株を利用した2番花が、保温長日処理を行うことにより、高単価が期待できる母の日を中心とした5月需要期に収穫できることを明らかにし、また2度切り栽培に適する品種を選定した。以上のことから、保温長日処理により、開花の前進化が図られ、また品種によっては2度切り栽培が可能となることから、冬春期をとおした作期拡大技術として有効な結果が得られた。

キーワード：保温長日、白熱電球、遠赤色光LED、2度切り栽培

緒言

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) は北アメリカ大陸原産、リンドウ科の宿根草である(大川, 1987)。切り花として冠婚葬祭から花束などのカジュアルアレンジまで幅広く使われるなど、周年をとおして需要が高く、高冷地の夏秋期出荷と暖地の冬春期出荷の産地リレーによる周年生産が行われている。

そのような中、沖縄県のトルコギキョウは近年、県外市場の高い需要と冬春期の温暖な栽培環境の利点から、生産農家戸数および栽培面積が増加し、東京都中央卸売市場の市場統計情報によると、沖縄県産トルコギキョウの取扱数量は2014年産が164千本であったのに対し、2020年産は996千本と著しく伸びている。主な作型は、定植が10月から11月上旬、収穫が3月から4月となっている。順調な生産拡大を背景に、生産者は冬春期をとおして安定した高単価を確保するため、1月から2月の収穫作型への前進化を図っているが、定植が高温・長日期である9月になるため、デバーナリによるロゼット化や着果節位の低下、草丈伸長不足等の問題があり、栽培上の課題が存在する。また3月から4月開花作型では、1月から2月の日照不足や低温などの影響により、計画出荷が不安定となり、労働負荷の大きい摘蕾作業などの栽培管理と出荷作業が集中し、管理作業の遅れによる出荷ロスの課題がある。今後、産地形成・拡大を図る上で、作期前進化と冬春期安定生産に向けた技術確立が求めら

れている。

トルコギキョウは長日条件下では短日条件下と比較して花芽形成が促進し、開花が早くなることが報告(大川, 2003)されており、福田ら(2012)は暖房による高昼温・低夜温管理と白熱電球を用いた長日処理を組み合わせることにより、開花の前進化と計画的な生産が可能であるとし、冬季計画生産マニュアルを作成した。これらの知見をもとに、秋植え作型の主産地である熊本、福岡県等では暖房変温管理による高昼温・低夜温管理と夜間電照による長日処理との組み合わせが実用化技術として定着している。

本研究では、沖縄県におけるトルコギキョウの作期前進化技術の確立を目的に、沖縄県の温暖な気候を活かした無加温ハウス管理栽培環境下において、高昼温を実現するハウス保温管理と、夜間電照による長日処理を検討した。試験1では、ハウス保温管理と白熱電球による長日処理の組み合わせがトルコギキョウの草丈伸長および開花促進に及ぼす影響を調査した。一方で、白熱電球による長日処理は消費電力が大きく、電気料金コストの負担増が課題となる。竹村ら(2014)は明期終了時の短時間遠赤色光照射処理と短時間昇温処理の併用で茎伸長と生育促進が可能であることを明らかにしている。そこで、試験2では、消費電力が小さいLEDを用いて、ハウス保温管理と遠赤色光LED(以下、FR電球)による電照の組み合わせがトルコギキョウの草丈伸長および開花促進に及ぼす影響を調査した。また保温・長日処理により、1

月から2月収穫が可能となれば、収穫後に切り下株より萌芽してくる芽を利用して、高単価である5月の母の日までに収穫できる2度切り栽培の可能性がある。本県の定植苗は県外の民間種苗会社から購入するため、経営費にかかる種苗費の占める割合が高く、2度切り栽培による種苗の有効利用は農家所得向上に繋がる。工藤(2015)は熊本県の栽培環境下において、8月に定植し、年内に1番花収穫後、切り下株のトンネル被覆処理、萌芽整理をすることで5月中旬から下旬に品質の高い切り花を生産できる2度切り技術を報告している。試験3では、2度切りによる高収益栽培体系の構築を図るため、保温長日管理下で開花前進化した1番花を収穫後、引き続き保温長日管理を行い、切り下株から萌芽した2番花の生育および切り花品質を調査した。

材料および方法

試験1. 白熱電球を用いた保温長日処理が草丈伸長および開花促進に及ぼす影響

沖縄県農業研究センター(糸満市真壁)内の雨よけハウス(間口6.0m×奥行24m, 土壌:ジャーガル)において、2017年10月16日にトルコギキョウの購入苗(種子冷蔵, 高冷地またはクーラー育苗)を2.5対葉の苗サイズ, シルバーマルチで被覆した幅130cm, 長さ15mの畝幅に12cm×12cmの6目フラワーネットを利用して中央2条を空けた4条植えで定植した。供試品種は早生品種「ボレロホワイト」、中生品種「エンドレスラブ」で、試験区の構成は保温長日, 保温, 長日, 慣行の4処理区を設け、各試験区とも品種あたり32本の2反復とした。保温管理は温度センサー(誠和, くるファミACEⅢ)を畝面から1.5mの高さに設置し, 35℃上限換気の自動巻き上げ機(誠和, くるファミACEⅢ)による側窓の自動閉開を行った(図1)。長日処理は, 福田ら(2012)の手法に従い, 白熱電球(東



図1 自動巻き上げ機による保温管理
A: 温度センサー B: 自動巻き上げ機

芝ライテック製75W)を12㎡あたりに1球, 畝面から1.8mの高さに設置し, 17時~22時と2時~7時に電照を行い, 自然日長と合わせて20時間長日処理を行った。また慣行は農家従来の施設管理を基に, 無電照, 常時側窓開放とした。各試験区の温度管理および長日処理期間は, 定植直後から収穫時期までとした。肥培管理は基肥で10aあたり牛ふん完熟堆肥2t, 緩効性肥料(CDU化成S555, N:P₂O₅:K₂O=15:15:15)をN成分7kg施用した。追肥は液肥(ポリフィード, N:P₂O₅:K₂O=19:19:19)を500倍で週2回, 発蕾期までかん注した。仕立て方法は頂花摘蕾後, 頂花節位から1段下までの側枝を残し, それより下位節から発生する側枝はすべて除去し, 順次発生する小花を3~4回摘蕾を行い, 1枝に1花1蕾で調整し, 小花の開花揃い時に収穫した。施設内温湿度は畝面から1mの高さに通風筒(イノチオアグリ)を設置し, 温度とりデータロガー(ティアンドデイ, RTR503)を用いて測定した。調査項目は発蕾日, 草丈調査, 主茎節数, 主茎長, 収穫日, 切り花長, 茎径, 有効花蕾数とした。

試験2. 保温管理下における長日処理方法の違いが草丈伸長, 開花促進に及ぼす影響

沖縄県農業研究センター(糸満市真壁)内の雨よけハウス(間口6.5m×奥行18m, 土壌:ジャーガル)において、2018年10月24日にトルコギキョウの購入苗(種子冷蔵, 高冷地またはクーラー育苗)を試験1と同じ条件の下, 定植した。供試品種は中早生品種「エンゲージホワイト」、中生品種「エンドレスラブ」で、試験区の構成は白熱電球による20時間長日処理(以下, 20H-白熱電球), 遠赤色光LED(津力, 9W, 745nm)による20時間長日処理(以下, 20H-FR電球), 遠赤色光LEDによる日没後4時間長日処理(以下, EOD-FR電球), 無電照の4処理区を設け, 各処理とも試験1と同様に保温管理, 肥培管理および仕立てを行った。各試験区とも品種あたり12本の3反復とした。また分光放射照度計(栄弘, MS-720)を用いた白熱電球およびFR電球の分光分布は図2のように分布し, 放射照度は白熱電球が0.485~0.545 W・m⁻², FR電球が

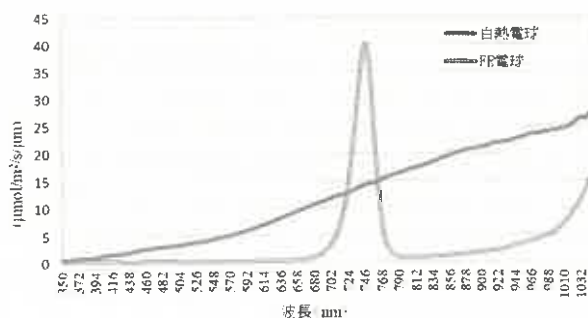


図2 白熱電球とFR電球の分光分布

表1 白熱電球およびFR電球の放射照度

資材	測定位置	放射照度 (W/m ²)
白熱電球	① (電球直下)	0.545
	② (2点間の真中)	0.498
	③ (2点对角線間の真中)	0.485
FR電球	① (電球直下)	0.253
	② (2点間の真中)	0.148
	③ (2点对角線間の真中)	0.120

注) 波長(400~800nm)の放射照度

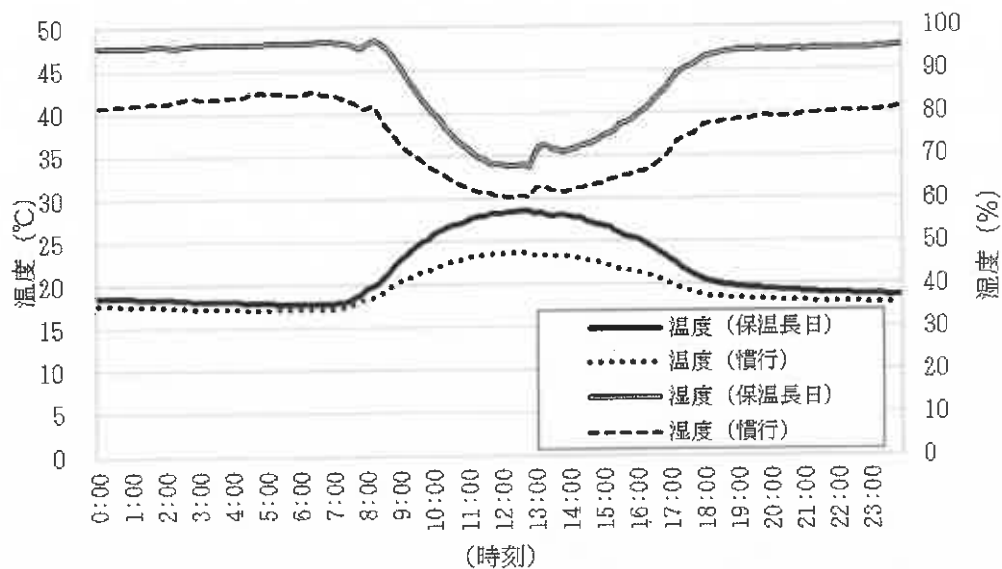


図3 栽培期間中における施設内温度および湿度の推移
(2017年10月16日~2018年2月9日)

0.120~0.253 W・m⁻²であった(表1)。調査項目は発蕾日、草丈調査、主茎節数、主茎長、収穫日、切り花長、茎径、下垂度、有効花蕾数、花径、花卉数とした。

試験3. 保温長日管理下における2度切り栽培の切り花品質

試験2で用いた「エンゲージホワイト」、「エンドレスラブ」に加えて、早生品種「ボレロホワイト」、中早生品種「ボレロマリン」、中生品種「ロベラピンク」、中生品種「冬のマリア」を供試し、試験2と同じ条件の下、定植した。1番花を収穫後、切り戻し管理を2019年2月3日に行い、1本に仕立て、12本/区の3区制とした。1番花収穫後から2番花収穫まで、試験1と同様に保温長日処理、肥培管理および仕立てを行った。調査項目は発蕾日、収穫日、主茎長、切り花長、茎径、有効花蕾数、花径、花卉数、ロゼット発生率とした。

結果

試験1. 白熱電球を用いた保温長日処理が草丈伸長および開花促進に及ぼす影響

保温管理下における栽培期間中の施設内温度は、日中(7時~17時)の平均温度と平均湿度は保温区が慣行区に比べて、それぞれ3.6°C、11.7%上昇し、夜間(17時~7時)はそれぞれ1.0°C、13.9%上昇した(図3)。草丈は、定植後43日目の11月28日から差が認められ、保温長日区で最も長くなり、定植後63日目の12月18日に他の処理区との差が最も大きくなり、定植後85日目の1月9日は保温長日区および保温区が長く、慣行区が最も短かった(図4)。保温および長日処理の違いが切り花品質に及ぼす影響をみると、いずれの品種とも発蕾日は保温長日区が最も早くなった(表2)。主茎節数は、「ボレロホワイト」で保温長日区および長日区が保温区および慣行区に比べて有意に少なく、「エンドレスラブ」では保温長日

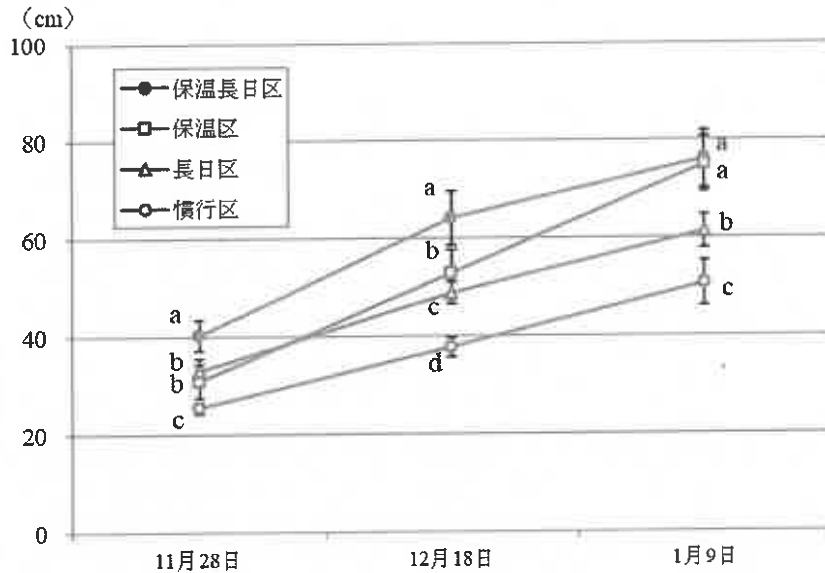


図4 草丈伸長の推移 (品種: ポレロホワイト)

- 1) 定植時における苗の大きさは、各試験区とも2.5対葉である
- 2) 異なる英小文字間には Tukey の多重比較により、1%水準で有意差あり
- 3) エラーバーは標準偏差

表2 保温および長日処理の違いがトルコギキョウの切り花品質に及ぼす影響

品種名 (早晩生)	試験区	発蕾日 (月/日)	主茎 ² 節数	主茎長 ³ (cm)	収穫日 (月/日)	到花 ⁴ 日数	切り花長 (cm)	茎径 (mm)	有効 花蕾数
ポレロホワイト (早生)	保温長日	11/15	10.1 b ⁵	28.3 a	1/11	87 d	76.1 a	5.1 c	9.1 a
	保温	11/20	11.6 a	26.8 a	1/24	100 c	77.1 a	5.5 b	8.9 a
	長日	11/16	10.2 b	23.9 b	2/9	116 b	65.2 b	5.4 bc	6.9 b
	慣行	11/22	11.5 a	22.4 b	2/28	135 a	63.8 b	6.0 a	7.2 b
	有意性 ⁶	-	*	*	-	*	*	*	*
エンドレスラブ (中生)	保温長日	11/30	13.0 d	53.1 b	1/18	94 d	95.7 b	5.7 b	7.1
	保温	12/19	16.2 b	61.0 a	2/6	113 c	103.2 a	6.2 ab	7.2
	長日	12/10	14.2 c	49.5 b	2/19	126 b	83.7 c	6.3 a	6.6
	慣行	1/3	18.0 a	52.3 b	3/7	142 a	84.6 c	6.3 a	7.5
	有意性	-	*	*	-	*	*	*	NS

² 発蕾した節位

³ 発蕾時における地際から頂花基部までの長さ

⁴ 定植から平均収穫日 (植付株数の50%収穫) までの日数

⁵ *は5%水準で有意差あり、NSは有意差なしを示す (n=3)

⁶ 表中の異なる英小文字は同じ品種、項目において、Bonferroni法により、5%水準で有意差がありを示す (n=3)

区が最も少なく、慣行区で最も多かった (表2)。主茎長は、「ポレロホワイト」で保温長日および保温区が長日および慣行区に比べて有意に長く、「エンドレスラブ」では保温区が他の3処理区に比べて有意に長かった (表2)。収穫日は、いずれの品種とも保温長日区が最も早く、到花日数をみると、慣行区に比べて48日前進化し、1月収穫が可能となった。切り花長は、いずれの品種とも保温長日および保温区が長日および慣行区に比べて有意に長くなった (表2)。茎径は、「ポレロホワイト」で保温長日、保温および長日区が慣行に比べて有意に細く、「エンドレ

スラブ」では保温長日区が他の3処理区に比べて細い傾向にあった (表2)。有効花蕾数は、「ポレロホワイト」で保温長日および保温区が長日および慣行区に比べて有意に多く、「エンドレスラブ」では各処理とも有意差はみられなかった (表2)。

試験2. 保温管理下における長日処理方法の違いが草丈伸長および開花促進に及ぼす影響

保温管理下における栽培期間中の施設内温度は、日中 (7~17時) の平均温度と平均湿度は保温長日区が慣行

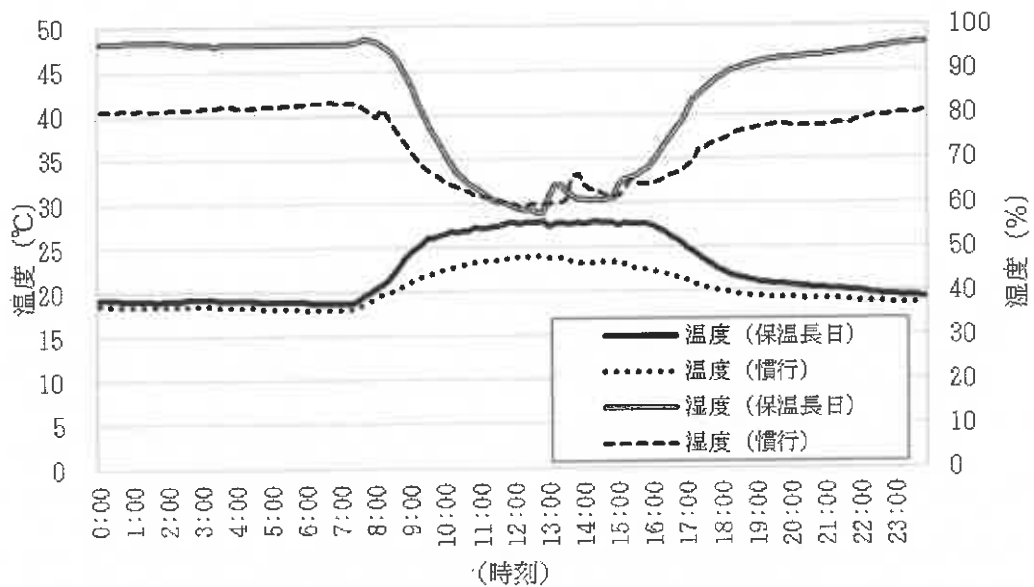


図5 栽培期間中における施設内温度および湿度の推移
(2018年10月27日～2019年1月31日)

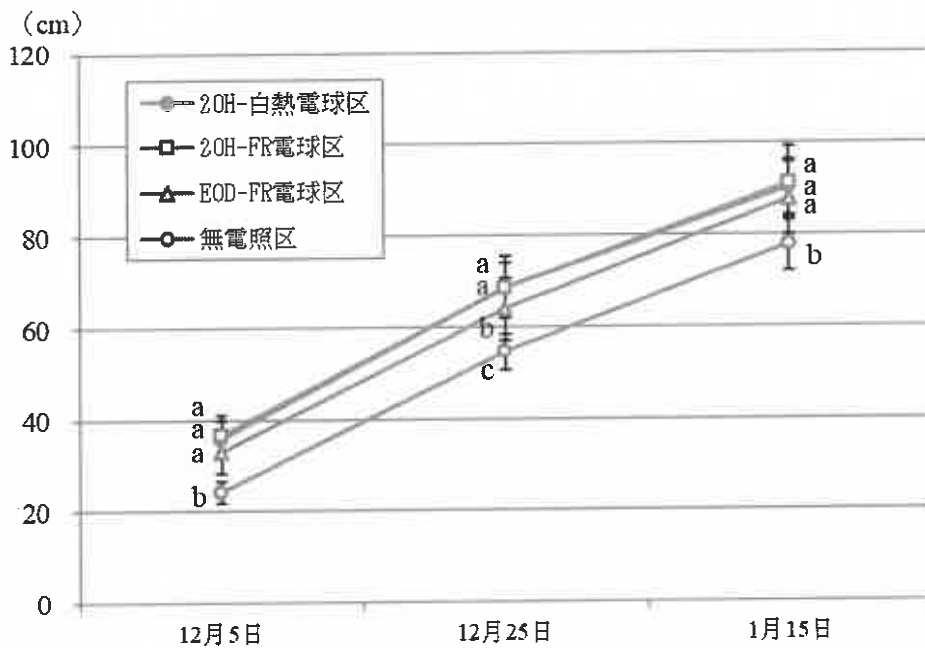


図6 草丈伸長の推移 (品種: エンドレスラブ)

- 1) 定植時における苗の大きさは、各試験区とも2.5対葉である
- 2) 異なる英小文字間には tukey の多重比較により、1%水準で有意差あり
- 3) エラーバーは標準偏差

区に比べて、それぞれ3.6℃、5.3%上昇し、夜間(17～7時)がそれぞれ1.2℃、14.9%で推移した(図5)。草丈は、定植後42日目の12月5日から差が認められ、20H-白熱電球、20H-FR電球およびEOD-FR電球区が無電照区に比べて長く、定植後62日目の12月25日は20H-白熱電球および20H-FR電球区がEOD-FR電球区および無電照区に比べて長く、定植後84日目の1月15日は20H-白熱電球、20H-FR電球およびEOD-FR電球区が無電照区に比べて長かった(図6)。長日処理方法の違いが発蓄に及ぼす影響

をみると、発蓄日は、「エンゲージホワイト」で20H-白熱電球区が最も早く、「エンドレスラブ」では20H-白熱電球および20H-FR電球区がEOD-FR電球区および無電照区に比べて早かった(表3)。発蓄日数は、いずれの品種とも20H-白熱電球および20H-FR電球区が無電照区に比べて短かった(表3)。主茎節数は、いずれの品種とも20H-白熱電球、20H-FR電球およびEOD-FR電球区が無電照区に比べて少なく、主茎長は20H-FR電球およびEOD-FR電球区が20H-白熱電球および無電照区に比べて

表3 長日処理方法の違いが発蕾に及ぼす影響

品種名 (早晩性)	試験区	発蕾日 (月/日)	発蕾 ^z 日数	主茎 ^y 節数	主茎長 ^x (cm)
エンゲージホワイト (中早生)	20H-白熱電球	11/26	33.2 c ^w	11.4 c	31.4 b
	20H-FR電球	11/30	36.6 b	12.0 b	37.9 a
	EOD-FR電球	12/1	38.0 ab	12.2 b	39.6 a
	無電照	12/2	39.2 a	12.6 a	31.4 b
エンドレスラブ (中生)	20H-白熱電球	12/5	41.6 b	12.9 b	49.1 b
	20H-FR電球	12/5	41.7 b	13.0 b	54.5 a
	EOD-FR電球	12/8	45.0 ab	13.1 b	53.8 a
	無電照	12/10	47.3 a	13.8 a	44.0 c

^z 発蕾した節位^y 発蕾時における地際から頂花基部までの長さ^x 収穫時の主茎長から発蕾時の主茎長を引いた差^w 表中の異なる英小文字は同じ品種、項目において、Tukey法により、5%水準で有意差があることを示す (n=3)

表4 長日処理方法の違いが切り花品質に及ぼす影響

品種名 (早晩性)	試験区	収穫日 (月/日)	到花 ^z 日数	切り花長 (cm)	茎径 (mm)	下垂度 ^y (°)	有効 花蕾数	花径 ^x (mm)	花弁数 ^w
エンゲージホワイト (中早生)	20H-白熱電球	1/22	90 b ^u	80.1 b	4.2	7.1	4.5	69.7	12.3
	20H-FR電球	1/28	96 b	84.9 ab	4.0	10.2	4.6	74.6	13.8
	EOD-FR電球	2/1	100 ab	88.2 a	4.0	9.9	4.5	73.2	14.0
	無電照	2/4	103 a	86.4 a	4.4	7.9	5.3	71.4	14.5
	有意性 ^v	-	*	*	NS	NS	NS	NS	NS
エンドレスラブ (中生)	20H-白熱電球	1/24	92 b	88.8 b	4.3	6.9	4.7	79.4	12.6
	20H-FR電球	1/30	98 b	96.2 a	4.3	8.5	4.6	79.6	13.6
	EOD-FR電球	2/2	101 a	96.2 a	4.2	8.5	4.9	76.5	12.6
	無電照	2/5	104 a	87.1 b	4.6	6.1	5.1	77.2	13.2
	有意性	-	*	*	NS	NS	NS	NS	NS

^z 定植日から平均収穫日までの日数^y 切り花長70cmに調整した切り花の基部を水平に持ったときの水平面からの角度^x 最大分枝の第1小花の最大径^w 最大分枝の第1小花の花弁数^v *は5%水準で有意差あり、NSは有意差なしを示す(n=3)^u 表中の異なる英小文字は同じ品種、項目において、Tukey法により、5%水準で有意差ありを示す(n=3)

長かった(表3)。また長日処理方法の違いが切り花品質に及ぼす影響をみると、いずれの品種とも到花日数は20H-白熱電球および20H-FR電球区が無電照区に比べて有意に短かった。切り花長は、「エンゲージホワイト」でEOD-FR電球区が最も長く、「エンドレスラブ」では20H-FR電球およびEOD-FR電球区が20H-白熱電球および無電照区に比べて長かった。茎径、下垂度、有効花蕾数、花径および花弁数はいずれの処理も差がみられなかった(表4)。一方で、下垂度はいずれの品種とも20H-FRおよびEOD-FRが慣行に比べて大きい傾向にあり、軟弱徒長気味であった(表4)。また長日処理方法のコスト比較は20H-白熱電球区を100とした場合、20H-FR電球区は69.4、EOD-FR電球区は64.5であり、約3割程度のコス

ト低減が可能であった(表5)。

試験3. 保温管理下における2度切り栽培の切り花品質

保温管理下における1番花収穫後の切り戻し管理から2番花収穫までの施設内温度は12.8~33.1℃で推移した(図7)。「ボレロホワイト」および「ロベラピンク」は5月上旬に収穫が可能で、出荷基準である切り花長70cm以上を確保し、5月の母の日需要向け品種に適した(表6)。また「エンゲージホワイト」および「冬のマリア」は生育が遅れたが、5月向け品種に適した(表6)。「ボレロマリン」および「エンドレスラブ」は1番花収穫後における切り下株のロゼット発生率が高く、草丈が伸長せず、生育が大幅に遅れたため、2度切り栽培には適さな

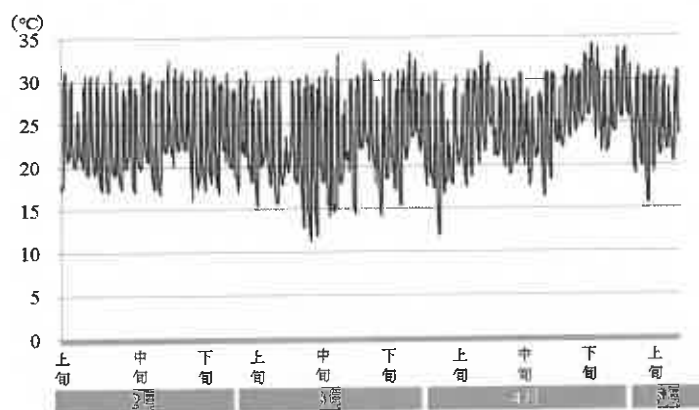


図7 栽培期間中における施設内温度の推移

表5 長日処理方法のコスト比

試験区	1球あたりの 電球代 ² (円)	1球あたりの 電気代 ³ (円)	計	コスト比較 ⁴	備考
20H-白熱電球	468	939	1,407	100	白熱電球: 単価468円(税込)
20H-FR電球	858	119	977	69.4	FR電球: 単価4,290(税込)
EOD-FR電球	858	50	908	64.5	電気料金単価: 13.91円/kWh

注) 品種「エンゲージホワイト」で算定

² 白熱電球の耐用年数を1年、FR電球の耐用年数を5年で算定

³ 処理時間×到花日数で消費電力を算定

⁴ 20H-白熱電球を100とした割合

表6 保温長日処理下での2度切り栽培における各品種の切り花品質

品種名 (早晩性)	発蕾日 (月/日)	収穫日 (月/日)	主茎長 (cm)	切り花長 (cm)	茎径 (mm)	有効 花蕾数	花径 (mm)	花弁数	ロゼット ¹ 発生率(%)
ボレロホワイト (早生)	3/9	5/8	25.6 ±1.3 ³	77.1 ±1.0	5.7 ±0.2	6.0 ±0.3	62.1 ±2.9	10.7 ±0.4	0.0
ロベラピンク (中生)	3/22	5/15	23.8 ±2.3	78.1 ±1.5	5.4 ±0.2	5.6 ±0.3	64.1 ±3.0	15.8 ±0.7	2.8
エンゲージ ホワイト (中早生)	3/24	5/22	20.3 ±1.2	70.7 ±2.5	5.5 ±0.2	5.6 ±0.6	60.7 ±2.2	12.1 ±0.5	5.6
冬のマリア (中生)	3/23	5/24	16.9 ±1.9	68.9 ±3.0	4.9 ±0.2	5.8 ±0.7	61.7 ±2.4	10.4 ±0.4	13.9
ボレロマリン (中早生)	-	-	-	-	-	-	-	-	19.4
エンドレスラブ (中生)	-	-	-	-	-	-	-	-	72.2

注) 「ボレロマリン」、「エンドレスラブ」はロゼット発生率が高かったため、データ省略

¹ 植付本数に対するロゼットおよび半ロゼットの発生割合

³ 標準誤差

かった(表6)。

考察

沖縄県におけるトルコギキョウ作期前進化を目的に、温暖な気候を活かしたハウスの保温管理と、白熱電球、FR電球による電照を組み合わせた保温長日処理が草丈伸長および開花促進に及ぼす影響を明らかにした。さらに、

収穫の前進化が図られることにより、2度切り栽培の可能性を検討した。

試験1において、側窓自動巻き上げ機を用いた35℃上限換気による保温管理と17時～22時、2時～7時に白熱電球で明期延長した20時間日長を組み合わせた保温長日処理は、初期生育が促進され、発蕾が早くなるとともに、主茎長が伸長した。また慣行区と比べて収穫日は保温長

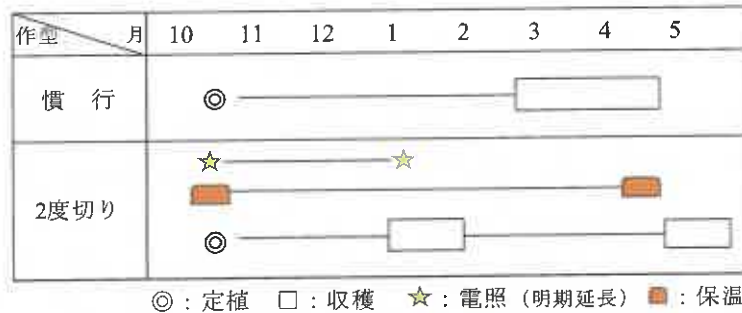


図8 保温長日処理を利用した2度切り栽培作型

日区が最も早く。切り花長は保温長日および保温区で長くなり、草丈伸長および開花促進効果が認められた。これは生育初期の高昼温管理によって、定植から発蕾までの草丈伸長と節数の増加が早くなり、発蕾日と収穫日が早くなること（工藤ら，2012），また白熱電球で明期延長した20時間日長により，花芽分化と開花促進効果がある（農研機構花き研究所，2012）ことが，本県の栽培環境下でも同様に発現することが明らかとなった。しかし，茎径は，保温長日，保温および長日区が慣行区に比べて有意に細く，その中で，保温長日区が最も細かった。工藤ら（2012）は茎の肥大は収穫時まで成長し，昼温の影響は小さいことを報告している。このことから収穫の前進化により，栽培期間が最も短い保温長日区において，茎の肥大成長が十分でなかったことが大きく影響していると考えられた。また冬出し栽培では，花蕾の発達が途中で停止するプラスチック現象（竹崎，2008）の発生が問題となるが，本試験では「ボレロホワイト」の有効花蕾数は保温長日および保温が長日および慣行に比べて有意に多くなった。工藤ら（2012）は主茎頂花の発蕾期からの白熱電球を用いた明期延長により，プラスチックの発生が少なく，正常花蕾に発達する蕾の数が増えたと報告している。しかし，本試験の結果では，有効花蕾数は，いずれの品種とも長日区が少ない傾向にあることから，温度と長日の組み合わせによる影響が大きいと考えられるが，その要因解析については，さらなる調査が必要である。試験2では，FR電球を用いた長日処理を組み合わせた保温長日が草丈伸長および開花促進に及ぼす影響を調査した。その結果，20H-白熱電球区は発蕾日が早く，主茎節数が少ない傾向にあった。20H-FR電球およびEOD-FR電球区は20H-白熱電球および無電照区に比べて，主茎長が長く，また草丈の推移は20H-FR電球，EOD-FR電球および20H-白熱電球区で差はみられず，FR電球の長日処理は白熱電球と同等以上の草丈伸長効果が認められた。竹村ら（2014）は遠赤色蛍光灯を用いた照射処理を日没直前（EOD-FR）から放射照度0.143W/m²で3時間行うことで，非照射区に比べて主茎伸長が促進されると報告しており，FR照射処理を日没直前から放射照度0.120～0.253W/m²

で4時間行った本試験結果とはほぼ一致した。また20H-FR電球区は無電照区と比べて，到花日数が短く，開花促進効果はみられたが，20H-白熱電球区に比べて効果は劣る傾向にあった。ただし，20H-FR電球およびEOD-FR電球区は20H-白熱電球区より切り花長が長くなる傾向があるため，摘蕾回数を減らし，仕立てによって収穫を早くすることで，白熱電球と同等の開花促進の可能性がある。一方で，山田（2010）は，遠赤色光量の多い光源により収穫期まで電照した場合，側枝や花柄の徒長・軟弱化を引き起こし，品種によっては切り花品質を低下させると指摘している。今回の試験においても，FR電球の長日処理で軟弱徒長の傾向がみられるため，今後，FR電球における長日処理に適した品種選定，また栽培全期間のFR照射ではなく，生育ステージ別のFR照射による草丈伸長および開花促進効果のある長日処理方法を検討する必要があると考える。

試験1および試験2により，保温長日処理は大幅に収穫を前進化させ，1月収穫が可能であることが示されたことから，高単価が期待できる5月の母の日需要に向けた2度切り栽培の可能性が示唆された。試験3では，保温長日管理下における2度切り栽培の切り花品質を調査した。その結果，「ボレロホワイト」，「ロベラピンク」は5月上中旬に収穫が可能で，切り花品質が出荷基準を十分に満たし，2度切り栽培に適する品種であることがわかった。長崎県（2017）では，頂花発蕾までの日中蒸し込み（35℃換気）と開花期までのEOD-heatingにより，頂花発蕾日，収穫日が早くなり，5月末までの採花率は慣行と比べて高いと報告している。試験3の結果から，本県においても，適品種を用いれば，温暖な気候を活かしたハウス管理により，母の日需要までの2番花収穫は可能であり，図8に2度切り栽培の作型をまとめた。一方で，一部の品種で1番花の切り下株のロゼット化により，大幅に生育が遅れることがあることも示された。なおトルコギキョウのロゼット打破には一定期間の低温が必要と報告されているが，2度切り栽培における切り下株でのロゼット打破の方法に関する知見は報告されていない。今後は1番花収穫後のロゼット化要因の解明とロゼット

打破方法の検討および 2 度切り栽培向け適品種を選定する課題が残る。

促進のための長日処理方法, 園学研, 7(3):p407-412
山田明日香 (2010) 光形態形成反応を活用したトルコギキョウの開花調節および切り花品質の向上に関する研究, 福岡農試特報, 30:p35-44.

謝 辞

本研究の推進にあたり, 沖縄県農業研究センター野菜花き班の皆様のご協力をいただきまして心より感謝申します。本研究は「野菜花き類の施設管理高度化技術開発事業 (沖縄振興特別推進交付金事業)」および「先端技術を結集した園芸品目競争力強化事業 (沖縄振興特別推進交付金事業)」の一課題として実施された。

引用文献

- 福田直子 (2013) 冬季の低コスト計画生産, 農業技術体系 第 8 巻, 追録 15 号, p. 452 の 31
- 福田直子・牛尾亜由子・川勝恭子・福島啓吾・工藤陽史・内田智子・駒形智幸・原坦利 (2012) トルコギキョウの低コスト冬季計画生産技術の考え方と基本マニュアル, (独) 農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所, p4-5
- 工藤陽史 (2015) トルコギキョウ切り花における二度切りでの 5 月出し栽培技術, 熊本県農林水産部農業の新しい技術, No. 679:p1-2
- 工藤陽史・山口 茂・福田直子・菊池竜也・佐渡 旭・深井誠一 (2012) トルコギキョウの冬出し栽培における生育初期の昼温が生育速度と主茎伸長および花芽分化に及ぼす影響, 園学研, 11(3):p343-349
- 工藤陽史・山口 茂・佐渡 旭・栗山孝浩・深井誠一 (2012) 熊本県のトルコギキョウ冬出し栽培における電照が開花と花蕾のプラスチックおよび茎伸長に及ぼす影響, 園学研, 11(3):p363-369
- 長崎県農林技術開発センター (2017) トルコギキョウ「レイナホワイト」の 2 度切り作型における早期開花温度管理技術
- 大川 清 (1987) トルコギキョウの自生地における生育状況, 園学要旨, 昭和 62 春:p456-457
- 大川 清 (2003) トルコギキョウ栽培管理と開花調節, 誠文堂新光社, P. 133-134
- 竹村圭弘・黒木克翁・間 奈月・前田香那子・岸本真幸・田村文男 (2014) 明期終了時の遠赤色光照射処理および昇温処理がトルコギキョウの生育に及ぼす影響, 園学研, 13(3):p255-260
- 竹崎あかね (2008) すぐに役立つハウス栽培新技術, 農業電化協会, p213
- 山田明日香・谷川孝弘・巢山拓郎・松野孝敏・園武利浩 (2008) トルコギキョウの冬春出し栽培における開花

Flowering advance and possibility of double-cut cultivation by heat insulation long-day treatment of *Eustoma grandiflorum* in Okinawa Prefecture

Kenta Kameyama¹, Toshiyuki Zakimi², Naoya Gima³, Humiaki Sekizuka¹, Kanami Taba⁴, Arata Ishigaki¹ and Masaaki Shimabukuro¹

1 Okinawa Prefectural Agricultural Research Center

2 Okinawa Prefectural Chubu Agricultural Development Center

3 Okinawa Prefectural Agricultural College

4 Okinawa Prefectural Plant Protection Center

Abstract

For the purpose of having an earlier cropping season of *Eustoma grandiflorum* in Okinawa Prefecture, early to middle varieties were planted in mid-October, and the effects of house management and long-day heat retention treatment using incandescent light bulbs on plant height growth and flowering promotion were investigated. The plant height growth and flowering promotion effects were achieved, and it became possible to advance from the conventional cropping type, which is usually mainly shipped from March to May, to January shipping. In addition, by using a far-red light LED with low power consumption, we were able to obtain the same effect of growing plant height and promoting flowering as incandescent light bulbs, suggesting the possibility of earlier, lower-cost shipping.

We also investigated a second flower, using the cut-off strain after the first flower was harvested. It can be harvested during the May demand period centered on Mother's Day - where high unit prices can be expected - by performing heat retention long-day treatment. We selected varieties suitable for double-cut cultivation. We found that the long-day heat insulation treatment allowed for earlier shipments, depending on the variety, and it could be cultivated twice, which is effective as a cropping season expansion technology throughout the winter and spring.

Keywords: Long-day heat retention, Incandescent light bulb, Far-red light LED, Double-cut cultivation

原著論文

ニガウリ種子由来の DNA を用いたマーカー選抜

伊礼彩夏・儀間康造・宮城牧・太郎良和彦

沖縄県農業研究センター

要約

ニガウリ (*Momordica charantia* L.) の DNA マーカー選抜育種法 (Marker assisted selection, MAS) の効率化を目的として、ニガウリ種子から抽出した DNA を用いた遺伝子型判定を実施した。種子は、突起部分に胚軸および幼根があり、大部分を胚が占める無胚乳種子であった。雌性型遺伝子座連鎖マーカーを用いて種皮、胚およびその表皮の遺伝子型を調べた結果、種皮は母親由来で、胚およびその表皮は胚由来であった。雌性型系統 OHB61-5 と混性型系統 OHB95-1A の F₂ 種子 (96 個体) の胚の一部 (2 ~ 3 mm) から DNA を抽出し、同マーカーを用いて DNA を実施した。その結果、供試した全個体で遺伝子型を決定することができ、遺伝子型は発芽個体の本葉から抽出した DNA を用いた遺伝子型と 100% 一致した。一部を切除した胚の発芽率は、対照区と有意な差は認められず、少なくとも切除後 3 ヶ月は 85% 以上を示し、その後の生育にも影響はなかった。本手法は、ニガウリの MAS を実施する際、播種前に遺伝子型を判定することが可能なため、多検体を取り扱うことができる。加えて、求められる遺伝子型を持つ種子のみを選抜し播種することで、育苗コストを軽減することができる。

キーワード: 種子, DNA マーカー, MAS

緒言

ニガウリ (*Momordica charantia* L.) は沖縄県の主要な品目で、おきなブランドの確立と生産供給体制の強化が図られている。沖縄県における 2018 年の産出額は 20 億円、収穫量が 7,346 t で、国内シェアは 40.6% で 1 位であるものの、宮崎県や鹿児島県の台頭が著しく産地間競争が激化している (沖縄県農林水産部, 2021)。そのため、沖縄県農業研究センターでは、県独自の優良品種の育成や栽培技術の開発が行われている。しかし、育種には数年 ~ 10 年以上の長い年月を必要とする。そこで、農業研究センターでは育種効率化のために幼苗の段階でそれぞれの重要形質について選抜を行える DNA マーカーの開発に取り組んでいる。Urasaki *et al.* (2017) は、農業研究センターが保有するニガウリ混性型系統 OHB3-1 のゲノムを解読し、遺伝子同定や DNA マーカー開発のための基盤を整備した。また、沖縄県育成 F1 品種の母本として用いられている雌性型系統 OHB61-5 については、雌花節率を制御する量的遺伝子座が見いだされ、雌性型遺伝子座領域が特定されている (Matsumura *et al.*, 2014, 2020)。このように、本県が保有するニガウリ系統を用いたゲノム解析が急速に進展し、現在、一塩基多型や塩基の挿入または欠失 (Indel) などのゲノム多型情報が容易に利用できる環境が整っている。

すでに沖縄県では、ニガウリ雌性型や耐病性などの重要形質について、実際の育種において DNA マーカー選抜

育種法 (Marker assisted selection, MAS) による個体選抜を実施している。現在、幼苗期に葉から DNA を抽出し、温室への定植までの 2 週間以内に MAS を実施している。しかし DNA 抽出が律速作業となっており、一人で遺伝子型判定をする場合、当センターの実験機器などの環境下では、検体数は約 300 個体と限られている。更なる MAS の推進のためには、発芽から定植までの限られた時間内に処理できる検体数を増やす必要がある。MAS を実施するタイミングは、定植前、定植後、収穫後の 3 つに分けられる。定植前に実施する場合、目的の遺伝子型を持つ個体のみを選んで圃場に移植できるが、定植適期までに MAS を完了させるという時間的制約が問題となる (林ら, 2014)。

この問題を解決するためには、二つの方法が考えられる。一つ目は簡易な DNA 抽出法の開発である。イネ (*Oryza sativa* L.) (Chen and Ronald, 1999) や レタス (*Lactuca sativa* L.) (関, 2019) で MAS に利用可能な DNA の抽出方法が報告されている。これらの方法は、ガラス繊維濾紙を入れたマイクロチップと DNA 抽出バッファーを用いて、ピペッティング操作のみで葉から DNA を抽出する方法で迅速かつ簡易な DNA 抽出方法であるため、検体数の増加が期待できる。しかし作業期間が発芽から定植までの期間に限られ、育苗コストは低減できない。二つ目は、種子の一部組織から DNA を抽出する方法で、イネとコムギ (*Triticum aestivum* L.) で種子の半分の組織から抽出する方法 (Chunwongse *et al.*, 1993)、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) で種子をドリルで穿孔し、その

際に出てくる粉から抽出する方法 (Kamiya and Kiguchi, 2003) が報告されている。これらの DNA 抽出法は、発芽前に遺伝子型を判定することが可能となるため、定植までの時間に制約されずに検体数を増加させることができる。さらに、求められる遺伝子型を持つ種子のみを選抜し、播種することで育苗コストを低減することができるため、非常に有効な方法と考えられる。しかしながら、ニガウリにおいてこれまでに種子から DNA を抽出し遺伝子型を判定した報告はない。

本研究では、はじめにニガウリの種子の構造を観察し、種子の各組織から DNA を抽出後、遺伝子型の判定を行い、遺伝子型判定に活用できる組織を確認した。その後、F₂ 種子の遺伝子型を調査し、DNA マーカーの分離比が期待値に適合するか調査した。さらに、胚の一部を採取した種子の発芽率を調べるとともに本葉から抽出した DNA を用いた遺伝子型と種子の遺伝子型を比較した。最後に本手法を用いた MAS の活用方法について考察した。

材料および方法

供試材料

ニガウリ種子は雌性型系統 OHB61-5 (雌花節率 100%) と混性型系統 OHB95-1A (雌花節率 3%) との F₂ 乾燥種子を用いた。

種子の構造および発芽の観察

種皮を除去した種子 (以降、胚) の外観を観察後、プラスチックシャーレ上で 3 日間吸水させた後、幼根の様子と胚の断面を観察して胚軸の位置を調べた。

DNA 抽出および PCR

DNA 抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて実施した。DNA マーカーは、雌性型遺伝子座連鎖マーカー chr1_23944108a を用いた (太郎良ら, 2022)。即ち、OHB61-5 の雌性型遺伝子座領域について、OHB95-1A との塩基配列比較を行い、Indel を含むようにプライマー chr1_23944108aF (5'-TCTCACAATTCAATCTTCGAAG-3') と chr1_23944108aR (5'-GTGTTGAGCTCTATAACAATGG-3') を設計し PCR に供試した。PCR は 25 μ L の容量で、DNA ポリメラーゼは KOD FX (TOYOBO LIFE SCIENCE, Osaka, Japan) を用いた。PCR の増幅条件は 94°C 2 分、続いて 98°C 10 秒、アニーリング 56°C 30 秒、伸長反応 68°C 1 分を 35 サイクル、最終伸長反応 68°C 5 分で実施した。PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下でバンドパターンを検出することで遺伝子型を判定した。

種子の各組織の遺伝子型判別

種子の各組織が母親または胚由来であるかを確認するため、無作為に選んだ 8 個の F₂ 種子 (No. 1-No. 8) を用いて、それぞれ種皮、胚、そして胚の表皮からゲノム DNA を抽出し、PCR に供試した。

F₂ 種子および発芽苗の遺伝子型判別

胚の一部から抽出した DNA を用いて正しく遺伝子型判定ができることを確認するため、96 個体の F₂ 種子を用いて遺伝子型判別を行い、アガロースゲル電気泳動パターンから雌性型ホモ、ヘテロ、そして混性型ホモの分離比を調査した。その後、発芽苗の本葉から抽出した DNA を用いて同様に遺伝子型判定を行い、種子の遺伝子型と比較した。

種子 (胚) の発芽能力

一部を切除した胚の発芽能力を調べるため、一部を切除した F₂ 種子 (96 個体)、対照区として無切除の F₂ 種子 (96 個体) を個別にマイクロチューブに入れ、冷蔵 (4°C) 保存した。冷蔵保存 1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後にセルトレイに播種し、発芽率を比較するとともにその後の生育を観察した。

結果

種子の構造および発芽

成熟した乾燥種子は、長さ約 1.5 cm、幅約 0.8 cm の楕円形で表面には網目状の模様があり種子の片側に突起が観察された (図 1 a)。種子の側面には溝があり、ペンチでこの部分を軽く挟むことで種皮が割れ、種皮を容易に除去することができた。胚は、濃青緑の表皮に包まれており、種皮の突起部分と同じ場所に突起が観察された (図 1 b)。吸水 3 日後には胚の突起部分から、初根およ

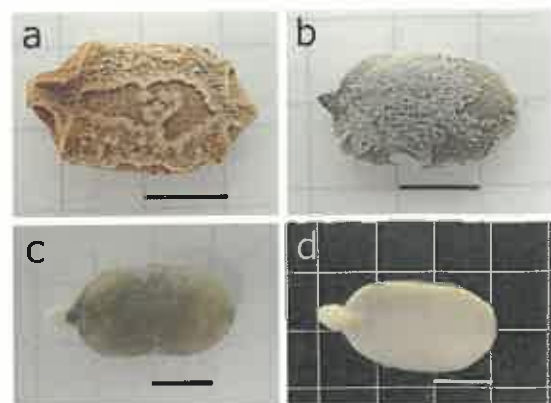


図 1 ニガウリ種子の構造と発芽。a: 種子の外観, b: 種皮を除去した種子 (胚), c: 吸水 3 日後の種子 (胚) の発根, d: c の水平断面の様子。スケールは 5 mm を示す。

表1 F₂種子(胚)の雌性型遺伝子座連鎖マーカー chr1_23944108a の遺伝子型

交配組合せ	個体数	遺伝子型 ^b			カイ二乗検定 ^a
		雌性型	ヘテロ	混性型	
		ホモ		ホモ	
F ₂ (OHB61-5 ×OHB95-1A)	96	22	49	25	0.91

^a P 値。期待値は雌性型ホモ：ヘテロ：混性型ホモ=1:2:1として検定した。

^b 雌性型ホモは250 bp付近に1本のバンド，混性型ホモは，350 bp付近に1本のバンド，ヘテロはこれらの2本のバンドが観察される。

び胚軸の伸長が確認できた(図1 c)。水平断面を観察した結果，根，胚軸，そして幼芽の部分は約5 mmの大きさで，種子の大部分は胚が占めており，胚乳は観察されなかった(図1 d)。

種皮，胚の表皮，表皮を除去した胚組織の遺伝子型判別
雌性型遺伝子座連鎖マーカー chr1_23944108a は，OHB61-5 の雌性型遺伝子座領域をホモに保持する個体は

A DNA抽出に供試した部位



B 各部位の遺伝子型判別

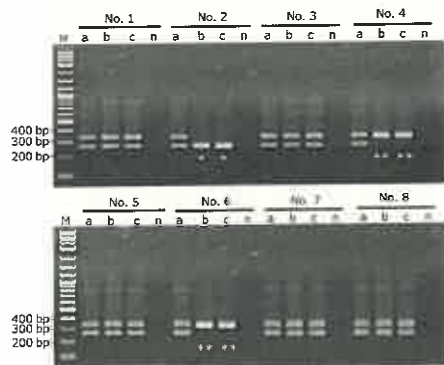


図2 ニガウリ乾燥種子のDNA抽出に供試した部位(A)とF₂種子(No. 1～No. 8)を用いた遺伝子型判別(B)。a: 種皮，b: 胚の表皮，c: 表皮を除去した胚，黒枠はDNA抽出に供試した部分を示す。*は雌性型遺伝子座由来の約250 bp，**は混性型遺伝子座由来の約350 bpのDNAを示す。2本のバンドはこれらをヘテロに保持する。スケールは5 mmを示す。n: H₂O，M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolab社)である。

250 bp付近に1本のバンド(雌性型ホモ)，保持しない個体(混性型ホモ)は，350 bp付近に1本のバンド，そしてヘテロに保持する個体はこれらの2本のバンドが観察される InDel マーカーである。F₂種子(No. 1～No. 8)それぞれについて，異なる部位(図2 A)から抽出したDNAを用いて遺伝子型判別を実施した。種皮は全個体で250 bp付近と350 bp付近の2本のバンド(ヘテロ)が観察された。胚の表皮と表皮を除去した胚は，同一個体内では同じバンドパターンを示し，No. 1，No. 3，No. 5，No. 7，そしてNo. 8は2本(ヘテロ)，No. 2は，250 bp付近に1本(雌性型ホモ)，No. 4とNo. 6は350 bp付近に1本のバンド(混性型ホモ)が観察された(図2 B)。

F₂集団の遺伝子型判別

胚の表皮と表皮を除去した胚の遺伝子型は，同一であることが明らかとなったため，96個体のF₂種子から胚の一部から抽出したDNAを用いて，遺伝子型判別を行った(図3)。その結果，雌性型ホモが22個体，ヘテロが49個体，混性型ホモ個体が25個体であり，期待される分離比(雌性型ホモ：ヘテロ：混性型ホモ=1:2:1)と

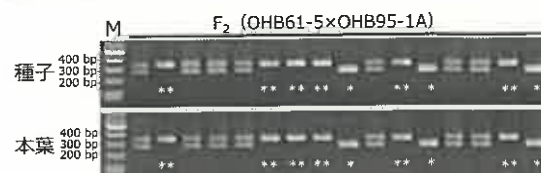


図3 アガロースゲル電気泳動による遺伝子型判別の比較

同一レーンと同じ個体で上段は種子，下段は発芽後の本葉の判定結果を示す。

*は雌性型遺伝子座由来の約250 bp，**は混性型遺伝子座由来の約350 bpのDNAを示す。2本のバンドはこれらをヘテロに保持する。Mは1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs社)である。

有意な差は認められなかった (表 1)。次に、本葉から抽出した DNA を用いて遺伝子型を比較した結果、同一個体では種子と本葉のバンドパターンに差は認められず (図 3) 遺伝子型は 100%一致した。

胚の一部を切除した種子 (切除胚) の発芽能力

冷蔵 (4℃) 保存 1 週間後の発芽率は、無切除胚 (対照区) が 91%, 切除胚が 93%, 保存 1 ヶ月後は、それぞれ 88%と 86%, 保存 3 ヶ月後は、それぞれ 82%と 89%あり、いずれの保存期間においても有意な差は認められず 85%以上の発芽能力を示した (図 4)。発芽苗の子葉の先端には胚の切除跡が観察された (図 5)。発芽後の生育を定植適期である本葉展開時まで観察したが、無切除胚と切除

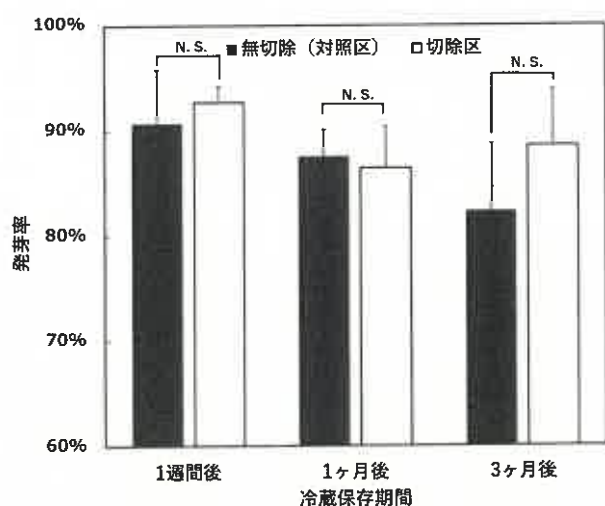


図 4 一部を切除した種子 (胚) の冷蔵 (4℃) 保存後の発芽率

それぞれの試験区は 32 種子の 3 反復 (合計 96 種子) で実施した。バーは標準偏差を示す。n. s. は、GLMM (binominal、logit リンク、ランダム効果: 反復) による検定で有意差なしを示す。

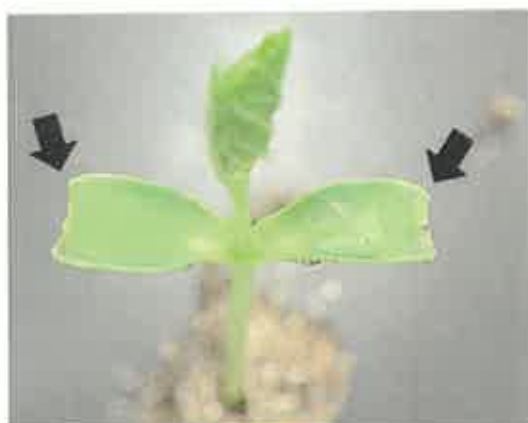


図 5 一部を切除した種子 (胚) の幼苗の様子
矢印は子葉の先端に観察される胚の切除跡を示す。

胚間で生育の違いは認められなかった。

考 察

種子から抽出した DNA を用いた遺伝子型判定の課題は、母親由来の細胞 (種皮) の混在により、遺伝子型を誤判別する可能性があることと、組織を除去、採取することにより、種子が発芽能力を失ってしまう可能性があることが挙げられる。

ニガウリの乾燥種子の種皮はペンチを用いて容易に除去でき、種子の大部分は子葉が占める無胚乳種子であった。しかし、胚の表面は濃青緑の表皮に包まれていた (図 1)。Giuliani *et al.* (2016) は、ニガウリの形態学的分類のため、種皮構造を走査電子顕微鏡を用いて観察し、5 層の組織からなることを報告している。胚の表皮細胞が、種皮由来なのか、それとも胚由来であるのか不明であった。そのため、8 個の F₂ 種子を用いて、それぞれ種皮、胚の表皮、表皮を除去した胚組織の遺伝子型を判別した。その結果、種皮の遺伝子型は母親、即ち F₁ 植物由来でヘテロであった。胚の表皮、表皮を除去した胚組織は、同一の遺伝子型を示し、雌性型ホモが 1 個体、ヘテロが 5 個体、そして混性型ホモが 2 個体の遺伝的分離が確認された (図 2)。以上のことから、胚の表皮細胞は胚由来であると考えられた。そこで、96 個体の F₂ 種子から表皮を含む胚の一部から抽出した DNA を用いて遺伝子型を調べたところ、期待される分離比を示し (表 1)、発芽苗の本葉から抽出した DNA を用いた遺伝子型と 100%一致した (図 3)。即ち、種子から抽出した DNA を用いて遺伝子型判定が可能であることが示された。そして、切除胚は 4℃で冷蔵保存した場合、3 ヶ月後においても 85%以上の発芽能力を有しており対照区と有意な差はなく (図 4)、その後の成長に影響はなかった (図 5)。

MAS の推進のためには、発芽から定植までの限られた時間内に処理できる検体数を増やすことが課題であった。特に、複数の遺伝子に制御される量的形質の MAS では、多くの個体を制限時間内に処理する必要がある。例えば、独立の染色体に座乗する 3 つの DNA マーカーを用いて、1,000 個体の F₂ 種子から MAS を実施し、各遺伝子型をホモに保持する個体が選抜される確率は 64 分の 1 であり、わずかに 15 ~ 16 個体である。これまで、幼苗期に葉から DNA を抽出し、温室への定植までの 2 週間内に一人で遺伝子型判定をする場合、検体数は約 300 個体であり、多検体は供試できなかった。本研究の結果は、収穫期 (乾燥種子の獲得) から次回の播種時期までの期間に、多検体から DNA を抽出することが可能で、あらかじめ目的の遺伝子型を持つ種子のみ播種することができる上、育苗コストを大幅に低減することができる。本手法を活用することによりニガウリの MAS の効率が大きく向上するこ

とが期待される。さらに、沖縄県では、無胚乳種子を持つサイインゲン、トウガン、マンゴーの交雑育種と DNA マーカーの開発も行っており、これらの作物においても本手法の適用が期待される。

謝 辞

本研究は沖縄振興特別推進交付金事業を活用した「先端技術を結集した園芸品目競争力強化事業」により得られた成果である。関係者に感謝申し上げる。また、本研究の実施にあたり、沖縄県農業研究センターの浦崎直也博士に貴重なご助言をいただいた。心より感謝申し上げます。

引用文献

- Chen D. H., and Ronald P. C. (1999) A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Mol. Biol. Report.*, 17: 53–57.
- Chunwongse J., Martin G. B., and Tanksley S. D. (1993). Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. *Theor. Appl. Genet.* 86 (6): 694-698.
- Giuliani C., Tani C., and Maleci Bini L. (2016) Micromorphology and anatomy of fruits and seeds of bitter melon (*Momordica charantia* L., Cucurbitaceae). *Acta Soc. Bot. Pol.*, 85: 1–7.
- 林猛, 小林麻子, 田野井真, 富田桂 (2014). DNA マーカー選抜に用いる籾殻付きイネ種子からの DNA 抽出法. *育種学研究*, 16 (3) : 121–124.
- Kamiya M., and Kiguchi T. (2003) Rapid DNA extraction method from soybean seeds. *Breed. Sci.*, 53: 277–279.
- Matsumura H., Miyagi N., Taniai N., Fukushima M., Tarora K., Shudo A., and Urasaki N. (2014) Mapping of the gynoecey in bitter melon (*Momordica charantia*) using RAD-seq analysis. *PLoS ONE*, 9: e87138.
- Matsumura H., Hsiao M. C., Lin Y. P., Toyoda A., Taniai N., Tarora K., Urasaki N., Anand S. S., Dhillone N. P. S., Schafleitner R., and Lee C. R. (2020) Long-read bitter melon (*Momordica charantia*) genome and the genomic architecture of nonclassic domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 117 (25): 14543–14551.
- 沖縄県農林水産部 (2021) 沖縄の農林水産業. 沖縄県農林水産部農林水産総務課, p21-22.
- 関功介 (2019) DNA マーカー選抜に利用可能なレタスからの簡易なゲノム抽出方法の確立. *東京農大農学集報*, 64: 29-31.
- 太郎良和彦, 谷合直樹, 伊礼彩夏, 松村英生 (2022) 雌花節率が高いニガウリを判別できる DNA マーカーの活用. 令和 3 年度年度普及に移す技術, 沖縄県農林水産部, 印刷中.
- Urasaki N., Takagi H., Natsume S., Uemura A., Taniai N., Miyagi N., Fukushima M., Suzuki S., Tarora K., Tamaki M., Sakamoto M., Terauchi R., and Matsumura H. (2017) Draft genome sequence of bitter melon (*Momordica charantia*), a vegetable and medicinal plant in tropical and subtropical regions. *DNA Research*, 24: 51–58.

Marker assisted selection for bitter gourd (*Momordica charantia* L.) using DNA extracted from a dried seed

Ayaka Irei, Kozo Gima, Maki Miyagi, and Kazuhiko Tarora

Okinawa Prefectural Agricultural Research Center

Abstract

In order to perform efficient DNA marker-assisted selection (MAS) in bitter gourd (*Momordica charantia* L.), DNA extracted from seeds was genotyped. For genotyping, we used a DNA marker associated with gynoecey and F2 (OHB61-5 x OHB95-1A) seeds segregated with gynoecey and monoecy. Using the genotypes of the DNA marker, bitter gourd seed was exalbuminous, its seed coat was derived from the maternal plant, and its embryonic epidermis was embryonic. We applied the DNA from cotyledons with epidermis for genotyping of F2 seeds (n = 96) and successfully obtained their genotypes. Furthermore, after germination of the same 96 F2 seeds, we also applied the DNAs from leaves for genotyping. The genotypes from cotyledons were identical to those of leaves. These results suggest that DNA from seeds can be used for genotyping. To investigate the vitality of the excised embryo, germination tests were carried out with the excised embryos stored at 4°C. After 3 months storage, we found no significant difference between the germination rate of excised embryos and non-excised embryos that were used as a control. Because the excised embryo is vital for at least 3 months, we can increase the number of samples for MAS by using DNA from seed and only sow the desirable seeds, which saves space and labor cost.

Keywords: Seed, DNA marker, MAS

未硬化葉を用いたマンゴー炭疽病の簡易病原性検定法と マンゴー遺伝資源における抵抗性品種の選抜

澤岨哲也・與儀喜代政・仲村昌剛・松村まさと

我が国のマンゴーの主要品種‘アーウィン’は炭疽病に弱いため、収穫までに年数回の薬剤防除が行われるが、労力・コストの負担軽減と安心・安全な食料要求の高まりから、炭疽病に強い抵抗性品種の開発が求められている。そこで、本研究では簡易で正確な本病の病原性検定法を確立し、本検定法を用いたマンゴー遺伝資源の炭疽病抵抗性を評価し、本病に強い育種素材の選抜を行った。その結果、マンゴー未硬化葉 (SPAD 値: 9.5 ~ 24.3) を接種葉とし、病原菌接種時の分生子濃度は 10^4 個/ml 以上、培養温度を 25 ~ 30°C に設定して、暗条件下で 5 日間培養することで、安定した病斑の形成を示した。そこで、遺伝資源 27 品種について本検定法と果実接種による評価を比較した結果、両接種間の発病度に正の相関が認められ、本病に強い抵抗性品種として‘ゴールデンナゲット’が明らかになった。以上より、本検定法を用いることでマンゴーの遺伝資源や雑種後代の中から効率よく炭疽病抵抗性を評価・選抜できると考えられる。

出展: 日本植物病理学会報 85: 345-352, 2019.

マンゴー軸腐病の果房における発病推移と病原菌の生息分布、分生子飛散消長および ハウス内の枯れ枝残渣除去による耕種的防除効果

澤岨哲也・比嘉 淳・伊山和彦・伊志嶺弘勝・手登根正

沖縄県のマンゴー出荷果実で輸送中に果実腐敗を引き起こすマンゴー軸腐病の感染過程における伝染源を明らかにするために、ハウス内の果房での発病推移と病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* の生息分布、病斑からの分生子飛散消長について調査した。その結果、3 月の開花期以降から果房での発病が増加しながら、7 月の収穫期に最も高い発病率を示した。分生子飛散消長では 5 ~ 7 月にかけて激しく増減しながら推移し、特に 6 月中 ~ 下旬に活発な飛散がみられた。また、*L. theobromae* は花や果梗、着果枝、結果母枝から高率に分離され、あらゆる植物部位に潜在的に広く生息していた。このことから、本病は果房での発病とその病斑上の分生子が主要な伝染源となっており、分生子が活発に飛散しながら、ハウス内で蔓延して果実に感染すると考えられた。そこで、2002 ~ 2004 年においてハウス内の枯れ枝残渣除去による防除効果を検討した結果、いずれの年においても無処理区と比べて残渣除去区で有意に果房での発病率は低くなり、開花期では無処理区の 31.1 ~ 56.0%、収穫期では 32.5 ~ 38.8% まで発病を抑えることが明らかになった。以上より、ハウス内の枯れ枝残渣除去は本病の耕種的防除法として有効であると考えられた。

出展: 九州病害虫研究会報 65: 18-23, 2019.

Characterization of *Erwinia* sp. causing black rot of papaya (*Carica papaya*) first recorded in Okinawa Main Island, Japan

Takashi Hanagasaki, Maki Yamashiro, Kozo Gima, Tetsuya Takushi, and Shinji Kawano

Since 2002, papaya black rot has been spreading over several islands of Okinawa Prefecture, Japan. To devise a prevention strategy for the disease, microbiological research on the pathogen was conducted. Twelve strains were isolated from papaya infected with black rot showing symptoms such as water-soaked lesions on stems and petioles, black spots on fruits, and rotted leaves turning yellow with necrotic spots. Through Koch's postulates, we confirmed that the isolated strains caused papaya black rot. Bacteriological assays showed that the strains have characteristics different from the type strains of *Erwinia mallotivora*, *E. papayae*, and *E. psidii*. Moreover, 16S rDNA sequence similarity searches showed that the isolated strains had less than 98.6% similarity with type strains. Additionally, phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences suggested that the isolated strains were possibly a novel species belonging to the genus *Erwinia*, as the strains formed an independent cluster and had low sequence similarity with the type strains. Earlier studies indicated that papaya black rot is caused by *E. cypripedii*. Therefore, we propose to add the *Erwinia* sp. isolated in this study to the list of papaya black rot pathogens.

出展 : Plant Pathology vol.70 : 932-942
2021 ; 70:932-942

Development of a male specific genetic marker for *Garcinia subelliptica* Merr. tree

Ayaka Irei, Matin Miryeganeh, Masanori Tamashiro, Hidetoshi Saze,
Naoya Urasaki & Kazuhiko Tarora

Garcinia subelliptica Merr. (called “fukugi” in Japanese) is a dioecious tree species, which has traditionally been planted as windbreak forests in the coast of Ryukyu islands. Although effective afforestation and maintenance of *G. subelliptica* would greatly be assisted by early sex diagnosis and selection at the seedling stage, the genome and the sex-determination system of *G. subelliptica* are still poorly understood. In this study, we estimated the genome size of *G. subelliptica* to be approximately ~ 12 Gb for female and male, based on k-mer analysis. Furthermore, we developed a male-specific DNA marker for *G. subelliptica*, using the restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) method. The 660 bp marker fragment, named FSDM (“fukugi” sex determination marker), was amplified in all males but not in the female *G. subelliptica* genome analyzed so far. In addition, the segregation ratio of the marker was 1:1 among the tested population. The DNA sequence of FSDM showed a significant similarity to the antifungal protein ginkbilobin-2 gene. The development of the sex-specific genetic marker of *G. subelliptica* may allow more effective conservation of traditional landscape and future design of villages around the northern part of the main island of Okinawa, a promising candidate site for World Natural Heritage.

出展 : Journal of Forest Research 26 (3): 222-229 (2021)

沖縄県農業研究センター研究報告
第16号

編集・発行

沖縄県農業研究センター

〒901-0336 沖縄県糸満市真壁 820 番地

電話 098-840-8500 (代表) Fax 098-840-8510

ホームページ: <http://www.pref.okinawa.jp/site/norin/noken/>

代表 E-mail: xx049400@pref.okinawa.lg.jp

印刷

印刷センターテル

〒901-0211 沖縄県豊見城市字饒波 500-1

電話 098-856-5512 Fax 098-856-4330

**BULLETIN OF THE OKINAWA PREFECTURAL AGRICULTURAL
RESEARCH CENTER**

..... Number16 March, 2023

Contents

Original paper

**01-10 Kenta KAMEYAMA, Toshiyuki ZAKIMI, Naoya GIMA,
Humiaki SEKIZUKA, Kanami TABA, Arata ISHIGAKI
and Masaaki SHIMABUKURO:**

Flowering advance and possibility of double-cut cultivation by
heat insulation long-day treatment of *Eustoma grandiflorum* in
Okinawa Prefecture

11-16 Ayaka IREI, Kozo GIMA, Maki MIYAGI, and Kazuhiko TARORA :
Marker assisted selection for bitter melon (*Momordica charantia* L.)
using DNA extracted from a dried seed