

# ヒラナス (*Solanum integrifolium*) 細胞選抜系統の青枯病抵抗性

平島敬太・古賀正明<sup>1)</sup>・中原隆夫  
(生産環境研究所)

ナス青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) の培養ろ液および菌体成分に対して抵抗性を示したヒラナス (*Solanum integrifolium*) のプロトプラストより再生した系統のナス青枯病抵抗性を評価した。

ヒラナス実生に比較して最も発病度が低かった細胞選抜系統は、ナス青枯病菌の培養ろ液で選抜したものであった。また、組織内の青枯病菌密度も低い傾向にあった。しかし、これらの系統の発病度の差は、発生初期に大きいものの、その後次第に小さくなった。これらのことから、培養ろ液による細胞選抜は、萎凋抵抗性と菌の増殖抑制能を併せ持つ発病遅延型の抵抗性を示す系統の獲得に有効と推察される。

また、培養ろ液で選抜した系統の自殖第一代を台木として用いた接ぎ木ナスでも高い青枯病抵抗性を示す系統が得られた。

[キーワード: ヒラナス, 細胞選抜, 青枯病抵抗性, 発病遅延]

The Bacterial Wilt-Resistibility of a Regenerated Strain of *Solanum integrifolium* Obtained Through In Vitro Cell Selection. HIRASHIMA Keita, Masaaki KOGA and Takao NAKAHARA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 19 : 55 - 59 (2000)

An examination was made of the bacterial wilt resistibility of a strain of *Solanum integrifolium*, that was regenerated from protoplasts of those *S. integrifolium* which resisted both the culture filtrate and bacterial components of *Ralstonia solanacearum*. In comparison with *S. integrifolium* seedling plants, the lowest disease severity was reached by plants of that strain which was subjected to in vitro cell selection with the culture filtrate of *R. solanacearum*. Also, the density of *R. solanacearum* in their tissue tended to be lower. However, the differences in disease severity between such conditioned plants were significant at the initial time of wilting occurrence and then gradually decreased. These findings lead to a thought that the in vitro cell selection by means of the culture filtrate could produce some effect on obtaining strains with a pathogeny delayed type resistibility, that may be exhibited on the bases of the wilt resistibility as well as anti-proliferation ability against some bacteria.

With regard to those strains obtained through the selection with culture filtrate, their  $S_1$  were used as rootstocks for grafting, which could produce a highly wilt-resistant strain.

[ keyword : *Solanum integrifolium*, In vitro cell selection, Bacterial wilt-resistibility, pathogeny delayed type resistibility ]

## 緒 言

本県のナスは、主に施設を利用して栽培されていることから、連作の進行に伴い発生が増加する土壌病害の防除が重要な課題である。中でも *Ralstonia solanacearum* によって発生するナス青枯病は、土壌消毒でも十分な防除ができない難防除病害であり、有効な防除法の開発や高度な抵抗性台木の育成が望まれている。

青枯病抵抗性台木の育成は、強い抵抗性を示すナス近縁野生種を利用した交雑育種法でも行われてきた<sup>1)</sup> が、交雑不和合性や交雑種の稔性の低さ等から、実用的な抵抗性系統は得られていない。

一方で、宿主に対する毒素質が同定されているトマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* 等では、プロトプラストやカルス等の培養細胞に対し、毒素を添加した培地を用いて選抜圧を加える細胞選抜法により、抵抗性個体を

得ることに成功している<sup>3,11)</sup>。ナス青枯病菌の宿主に対する毒素質は同定されていないが、青枯病抵抗性系統の獲得を目的とした細胞選抜は、トマト<sup>13)</sup> やナス台木 'カレヘン'<sup>2)</sup> についてすでに報告されている。しかしながら、県内の主要なナス台木は、栽培管理や収量、果実品質の面からヒラナス (*Solanum integrifolium*) が多く、次いでトルバムビガー (*Solanum torvum*) が利用されていることから、ヒラナスやトルバムビガーの特性を維持したまま青枯病抵抗性を併せ持つ台木が強く望まれている。ヒラナスは、尾崎・木村<sup>9)</sup> によって5種の菌群に分類されたナス青枯病菌の中でⅢ、ⅣおよびⅤ菌群に、トルバムビガーはⅣ菌群に罹病性であることから、Ⅳ菌群や5種全ての菌群に抵抗性を示す台木の育成が求められる。

そこで我々は、ヒラナスのプロトプラストからの植物体再生法にナス青枯病菌Ⅳ菌群の菌体成分を選抜物質として組み合わせる細胞選抜法を検討した。その結果、KM8P培地を用いてプロトプラスト密度を  $1.25 \times 10^4$

1) 現福岡大学理学部

Cells/ml とし、青枯病菌の菌体外多糖質(Extracellular polysaccharides: EPS) やこれを含む菌培養ろ液を添加することにより、これらの選抜物質に抵抗性を示すプロトプラスト由来のカルスが効率的に得られることを明らかにした<sup>5)</sup>。

本報では、これらの細胞選抜処理がプロトプラストから再生した植物の青枯病抵抗性発現や再生植物の自殖第一代を台木として利用した接ぎ木苗の青枯病抵抗性におよぼす影響について報告する。

## 試験方法

### 1 細胞選抜系統

ヒラナス(タキイ種苗)のプロトプラストは、前報<sup>5)</sup>に従って基本培地として KM8P 培地を用い、細胞選抜物質添加後の培養密度が  $1.25 \times 10^4$  Cells/ml となるように調整した。これに尾崎・木村<sup>9)</sup> によって分離分類された IV 菌群の青枯病菌(菌株 No8103, 尾崎・木村<sup>10)</sup>) より調整した 3 種類の細胞選抜物質をそれぞれ個別に添加して細胞選抜を行った。すなわち、青枯病菌培養ろ液は 0.5, 1, 2, 5, 10% 濃度で、オートクレーブ処理(AC) 培養ろ液は 0.5, 1, 2, 5, 10% 濃度で、土屋の方法<sup>4)</sup> に基づいて供試菌より調整した EPS では  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-1}$  % 濃度になるように添加した。また、対照として選抜物質無添加区を設けた。

それぞれの選抜処理区で直径約 2mm 程度に生長したプロトプラスト由来のカルスを IAA 0.2mg/l, Zeatin 4mg/l および寒天 8g/l を添加した MS 培地に置床した。その後、グリーンスポットの形成が認められたカルスを同培地に置床してシュート形成を促した。形成されたシュートは、NAA を 0.01mg/l とゲランガムを 2g/l 含む MS 培地で発根を促した後、パーミキュライトを詰めた容積約 100ml のビニルポットに移植し、馴化後に園芸培土を詰めた同容積のポットへ移植した。

### 2 細胞選抜系統の青枯病抵抗性

接種に用いた青枯病菌菌株は、細胞選抜に用いた菌株と同一の株とした。菌株は 1/2 濃度の Potato Sucrose (PS) 培地で 25℃ の暗黒条件下、70rpm で 1~2 日間振とう培養した後、培養菌液を 3,000rpm で 15 分間遠心分離し、沈澱菌体を滅菌水で  $10^6$  cfu/ml の密度に再懸濁した。

ポットへ移植した青枯病菌培養ろ液選抜系統 64 株、培養ろ液選抜系統 60 株、EPS 選抜系統 67 株、選抜物質無添加系統では 58 株を青枯病菌接種に用いた。さらに、対照としてヒラナス実生を 76 株加えた。

接種は、移植後に頂芽および根の伸長が確認された株のビニルポットの底穴より伸長した根を切断し、青枯病菌の懸濁液 50ml をポット上面より注ぐことによって行った。接種時期は、1996 年 4 月 3 日(4 月上旬)、7 月 17 日(7 月中旬) および 1997 年 8 月 14 日(8 月中旬) の 3 時期とした。青枯病菌を接種した株は、滅菌水を入れたプランターに並べて底面吸水し、ガラス温室で栽培した。発病調査は、尾崎ら<sup>10)</sup> の調査基準に準じ発病程度を

5 段階評価とし、発病指数を算出した。統計検定は Mann-Whitney's U test を適用した。

### 3 青枯病抵抗性株の挿し木増殖と青枯病菌残存

1997 年 8 月に青枯病菌の接種を行い、発病程度 0 を示した株を容積約 500ml のビニルポットに移植した。これらの株の伸長した全ての分枝から 2 葉 3 節の挿し穂を調整し、基部に IBA 粉剤(オキシベロン)を粉衣して鹿沼土に挿し木した。発根した挿し木苗の上位腋芽より伸長した新梢を基部より約 2cm の位置で切断し、切断した新梢下部から長さ 3cm の切片を調整して 70% エタノールを含ませたワイピングクロス(キムワイプ<sup>®</sup>) で表面を除菌した。この切片を 10ml の滅菌水に一晩浸漬後、浸漬液を 5,000rpm で 15 分間遠心分離し、上清を 9ml 除いて残液を再懸濁した。懸濁液は希釈系列を調整し、50 μl を原・小野ら<sup>4)</sup> の選択培地に塗布し、特異的なコロニーの形成数を数え、青枯病菌の量を推定した。

### 4 接ぎ木苗の青枯病抵抗性

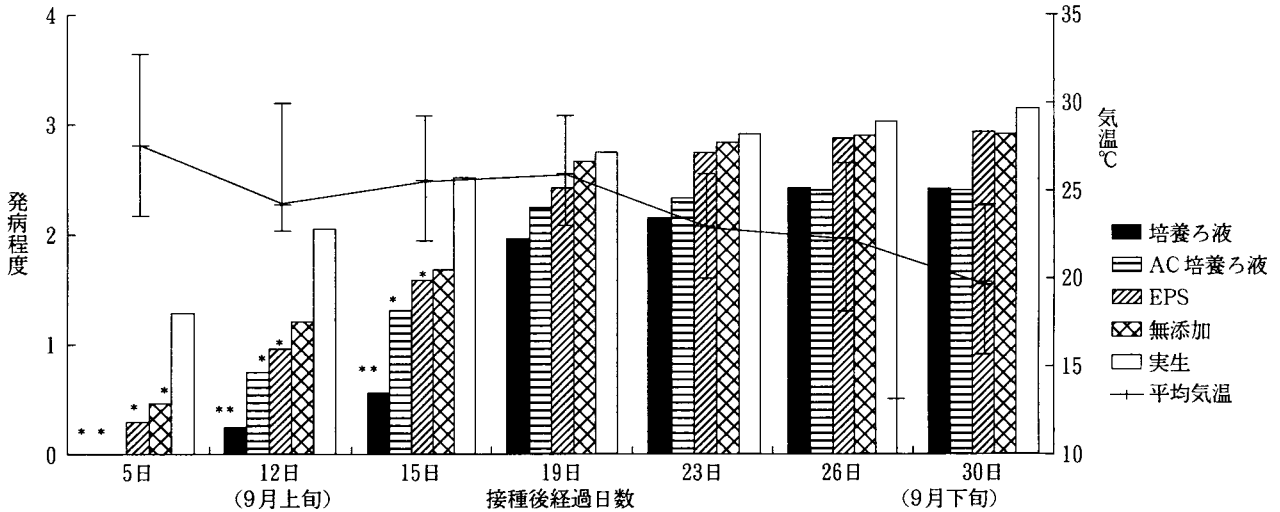
3 期の青枯病菌の接種において発病低度 0 を示した細胞選抜系統より自殖種子を得た。種子は、100mg/l 濃度のジベレリン(GA3) 溶液に一晩浸漬処理後、セル数 288 穴のトレーに播種した。発芽後にこれらを台木とし、穂木品種は「筑陽」を用いて幼苗接ぎ木を行った。接ぎ木活着後は、園芸培土を詰めた容積約 100ml のビニルポットに鉢上げし、頂芽および根の伸長を確認した後、1998 年 8 月下旬にポット底穴より伸長した根をハサミで切断するとともに、幅 20mm のステンレススパーテルをポット上面より 2 カ所挿入して断根した。調整した青枯病菌は、ポット当たり 10ml ずつスパーテル挿入位置に接種した。また、対照として、各区 2 株ずつ同様に滅菌水を注入した。接種株の栽培や発病調査は、前述同様に行った。統計検定は Mann-Whitney's U test または Fisher's exact probability test を適用した。

## 結果

### 1 細胞選抜系統の青枯病抵抗性

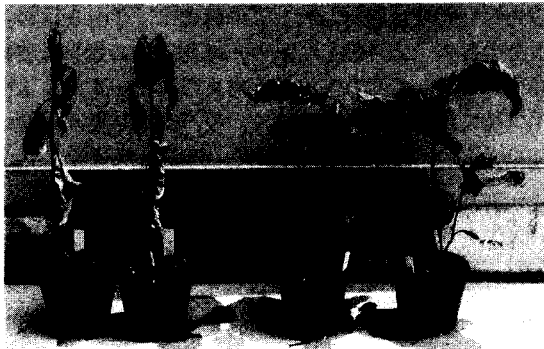
3 時期の青枯病菌接種における発病程度は、1996 年 7 月中旬 > 1997 年 8 月下旬 > 1996 年 4 月上旬接種の順に高く、しかも萎凋の進行速度も早かった。3 期の中で中間の日数で発病した 1997 年 8 月下旬接種後の発病程度の推移を第 1 図に示した。ヒラナス実生の発病程度は接種 15 日後まで急速に進行し、その後の進行は鈍化した。細胞選抜系統の発病程度は、接種 15 日後まで緩やかに進行し、19 日後に向けて急速に進行した後は鈍化したことから、細胞選抜処理による差が認められたのは接種処理 15 日後までであった(第 2 図)。接種 5 日後までの発病程度は、実生区に対し他の全ての区で有意に低かったものの、12 日後には無添加区で差がなくなり、19 日以降には全ての区間で差が認められなくなった。このような萎凋初期に認められた発病程度の差がその後次第に小さくなる傾向は、接種時期にかかわらず共通の傾向であった。

なお、発病程度 0 の無発病株は、1996 年 4 月上旬接種では培養ろ液選抜区で 4 株(13%)、オートクレーブ処



第1図 細胞選抜系統における青枯病菌接種 (1997年8月中旬) 後の発病の推移

- 1) \*, \*\*は実生に対し、Mann-Whitney's U testにて5%, 1%水準で有意差あり
- 2) 棒線は、最高、最低気温を示す



第2図 萎凋抵抗性を示す培養ろ液細胞選抜系統

- 1) 左：実生，右：培養ろ液細胞選抜系統
- 2) 接種1997年8月中旬，撮影：同年9月上旬

年8月下旬接種では、培養ろ液選抜区で5株 (31%)，オートクレープ処理培養ろ液区で4株 (33%)，選抜物質無添加区で5株 (13%) であり、実生区は1株 (5%) であった。

第1表 青枯病抵抗性細胞選抜ヒラナスの挿し木活着率と青枯病菌の樹体内残存

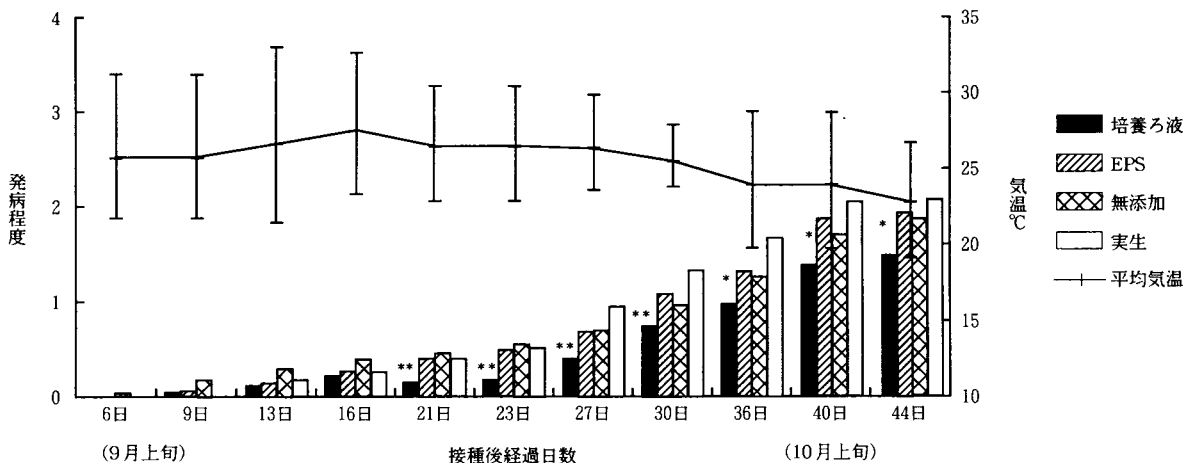
選抜処理物質	挿し木活着率	青枯病菌検出率	検出量
	%	%	CFU/ml
培養ろ液	84(69/82)	40(10/25)	$1.1 \times 10^3$
AC培養ろ液	57(13/23)	28(2/7)	$2.0 \times 10^3$
EPS	100(2/2)	66(6/9)	$2.7 \times 10^3$
無添加	85(40/47)	72(8/11)	$3.9 \times 10^3$

- 1) AC：オートクレープ処理
- 2) ( / )：(活着株/挿し木株)，(検出組織/供試組織)

理培養ろ液選抜区で4株 (12%)，選抜物質無添加区で1株 (12%) 得られたが、ヒラナス実生区では得られなかった。1996年7月中旬接種では、培養ろ液選抜区で2株 (10%) 得られ、他の区では得られなかった。1997

2 青枯病抵抗性株の挿し木増殖と青枯病菌残存

青枯病菌の接種において発病程度0を示した細胞選抜株の挿し木活着率および挿し木苗組織内の青枯病菌残存



第3図 細胞選抜系統を台木とした接ぎ木ナスにおける青枯病菌接種 (1998年8月下旬) 後の発病の推移

- 1) \*, \*\*は実生に対し、Mann-Whitney's U testにて5%, 1%水準で有意差あり
- 2) 棒線は、最高、最低気温を示す

調査の結果を第1表に示した。挿し木活着率は、オートクレーブ処理培養ろ液区で57%と他の区に比べて低かったものの、他の2区は80%以上であり挿し木増殖は可能であった。

これら、挿し木苗の伸長した新梢基部からは、青枯病菌が28~72%と高率で検出され、青枯病菌の挿し木苗組織内残存が認められた。また、菌の組織内の残存量は培養ろ液選抜系統で低い傾向にあった。

第2表 培養ろ液による細胞選抜ヒラナスの自殖第一代を台木とした接ぎ木苗(筑陽)の青枯病菌接種による発病

細胞選抜処理	系統	供試株	発病程度						発病指数	発病株率
			0	1	2	3	4	5		
培養ろ液	E	41	20	3	4	6	8	37	51.2%	
	F	27	12	1	3	6	5	41	55.6	
	G	22	16	2	0	2	2	18**	27.3*	
	I	15	5	0	2	3	5	55	66.7	
	M	2	0	0	0	0	2	100	100.0	
	P	3	3	0	0	0	0	0	0.0	
実生	W.X	64	26	1	5	8	24	51	59.3	

- 1) \*\*: 実生に対し1%レベル (Mann-Whitney's U test) で有意差あり
- 2) \*: 実生に対し5%レベル (Fisher's exact probability test) で有意差あり
- 3) 接種後44日 (調査日: 1998.10.9)



第4図 萎凋抵抗性を示す培養ろ液細胞選抜系統(G系統)の自殖第一代を台木とした接ぎ木ナス

- 1) 左: 実生台木, 右: G系統台木
- 2) 接種1998年8月下旬, 撮影: 同年10月上旬

### 3 接ぎ木苗の青枯病抵抗性

青枯病菌の接種において発病程度0を示した細胞選抜株の自殖第一代を台木とした接ぎ木苗の青枯病菌接種後の発病推移を第3図に示した。発病程度は、接種後日数の経過とともに高くなり、対照のヒラナス実生を台木とした接ぎ木苗では、接種27日以降に急激に増加して最終的な発病程度は2を上回った。これに対し、培養ろ液選抜6系統の自殖第一代を台木とした接ぎ木苗の接種21日以降の発病程度は、ヒラナス実生に比べて有意に低かった。

発病程度が有意に低い培養ろ液選抜6系統の接種後44日における系統別発病状況を第2表に、抵抗性発現状況を第4図に示した。培養ろ液選抜系統の自殖第一代の中でG系統は、供試株中27%の株で発病が認められたが、その発病指数は18であり、対照のヒラナス実生に比べて明らかに発病株率、発病指数ともに低かった。また、P系統は、供試数が3株と少ないものの発病は認められなかった。

## 考 察

病原菌に対する抵抗性個体の獲得を目的とした細胞選抜では、選抜物質として病原菌が産出する宿主特異的毒素を用いたり、毒素が同定されていない場合は病原菌の培養ろ液が利用されてきた<sup>3,6,7,11,13</sup>。ナス青枯病菌については、特定の毒素が同定されていないが、菌体構成成分が萎凋誘導活性を持つことが示されている<sup>12</sup>。細胞選抜においては、すでに浅尾<sup>2)</sup>や著者ら<sup>5)</sup>によって、青枯病菌の培養ろ液やそれに含まれるEPSが細胞選抜に有効なことが示されている。本報では、これらの物質で選抜したヒラナスプロトプラストからの再生系統について、青枯病菌に対する萎凋抵抗性を検討した。

気温の異なる3時期における青枯病菌の接種では、それぞれの時期で発病程度やその進行速度、さらに無発病株の発生率に違いはあるものの、ほぼ同様な傾向を示した。細胞選抜系統の発病程度は、対照のヒラナス実生と比較して、発生初期には軽微であるが、後期には差が認められない程度に進行した。この結果は、Toyodaのトマトでの報告<sup>13)</sup>と一致しており、細胞選抜の効果は萎凋の発生遅延として現れていると考えられる。また、この効果は特に培養ろ液選抜で高く、萎凋誘導活性が確認されているEPSでは予想に反して、培養ろ液よりも低かった。このことは、萎凋誘導要因がEPS以外にも存在していることを示唆している。

青枯病菌は、高温時に罹病性植物の根の表皮に侵入し、維管束柔組織より木部組織へと進展する<sup>15)</sup>。その後菌体およびEPS、病原関連タンパク質が木部組織の水分通導機能を弱め、宿主に萎凋症状を引き起こすと考えられている。このことから、青枯病抵抗性個体の獲得には、組織としての萎凋抵抗性ととも外部から侵入した菌の増殖抑制能力を指標として評価することが重要と考えられる。今回抵抗性を示した細胞選抜系統は、萎凋誘導活性をもつ菌体成分によって選抜した系統であることから、組織の萎凋抵抗性の面では期待できるものの、無病徴の挿し木苗に青枯病菌が残存していた(第1表)ことから、菌の増殖抑制能力の面での選抜は不十分と考えられる。このような青枯病菌の無病徴感染は、高い青枯病抵抗性を示すトマト品種においても観察される現象<sup>9)</sup>であり、萎凋誘導物質による細胞選抜系統では組織内部での菌の完全な増殖抑制は期待できないと考えられる。しかしながら、培養ろ液による選抜系統では、組織内より分離される青枯病菌の検出量が少ない傾向にあることから、萎凋抵抗性ととも青枯病菌の増殖を抑制する効果もわずかながら期待された。

以上のことから、青枯病菌の菌体成分を用いた細胞選抜は、菌の増殖抑制と萎凋遅延による発病遅延型の抵抗性を示す系統の獲得に有効と推察される。

挿し木による台木の増殖が可能であっても青枯病菌の組織内残存は、感受性品種の接ぎ木を困難にすると予想された。抵抗性台木の実用化のためには、抵抗性の遺伝解析と純系種子の採種が必要である。そこで、発病程度0を示した細胞選抜系統の自殖第一代について青枯病抵抗性を検定した。自殖第一代を台木とした接ぎ木ナスで

は、細胞選抜系統当代が示した萎凋遅延に比べてその効果は低かった。細胞選抜系統が萎凋抵抗性ととも、菌の組織内増殖を抑制していると仮定しても、接ぎ木ナスの場合には萎凋するのは台木でなく穂木であることから、菌の組織内増殖を台木部で完全に押さえ込まなければ上部の穂木に侵入、増殖して萎凋症状を引き起こすと思われる。このことは、穂木部のナスが萎凋枯死しても健全な新梢を持つ台木が多数観察されたことから推察される。Nakaho<sup>9)</sup> は、青枯病抵抗性トマトでは、病原菌が一次木部に閉じこめられて二次木部への移動を抑制され、茎の下部に比べて上部での検出率が減少することを報告している。したがって、得られた萎凋抵抗性系統を地際より高い位置で接ぎ木すれば、接ぎ木ナスでの萎凋をより以上に減らすことが可能と考えられる。

Toyoda<sup>13)</sup> は、初期萎凋抵抗性個体の自殖第一代の中から遺伝的に安定した抵抗性の強い系統を得ている。今回、我々は接ぎ木苗でも抵抗性を示す自殖第一代のG系統を得たのでToyodaと同様に、自殖による抵抗性遺伝子の集積を図る必要がある。また、P系統は萎凋が発生しなかったが、採種数が少なく十分な接ぎ木苗を供試できなかったため、有意差が判然としなかった。これらについては、人工授粉によって種子を確保するとともに、萎凋抵抗性の再確認が必要である。今後、さらに萎凋が発生しやすい着果期での抵抗性評価や青枯病の他の菌群に対する抵抗性の評価を行う必要がある。

## 引用文献

- 1) Ali, M., M. A. Quadir, H. Okubo and K. Fujieda (1990) Resistance of eggplant, its wild relatives and their hybrids to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Sci. Hort.* **45** : 1-9.
- 2) 浅尾浩史・谷川元一・岡山健夫・荒井滋 (1992) 青枯病萎凋誘導物質を用いた細胞選抜による耐病性ナス科個体の作出. 奈良農試研報 **23** : 7-12.
- 3) Carlson, P. S. (1973) Methionine sulfoximine - resist and mutants of tobacco. *Science* **180** : 1366-1368.
- 4) 原秀紀・小野邦明 (1984) タバコ立枯病菌の新しい選択培地による検出定量法. 植物防疫 **38** : 76-79.
- 5) 平島敬太・古賀正明・中原隆夫 (1997) 青枯病菌菌体成分によるヒラナス (*Solanum integrifolium*) の細胞選抜. 福岡農総試研報 **16** : 53-58.
- 6) Husain, A. and Kelman, A. (1958) The role of pectin and cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **48** : 377-386.
- 7) Monica, B. (1980) Selection of dihaploid potato callus for resistance to culture filtrate of *Fusarium oxysporum*. *Z. Pflanzenzuchtg.* **85** : 254-258.
- 8) Nakaho, K. (1997) Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants of resistant rootstock cultivar LS-89 and susceptible ponderosa. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **63** : 83-88.
- 9) 尾崎克美・木村俊彦 (1992) 病原性に基づくナス科野菜青枯病細菌の分類. 中国農研報 **10** : 49-58.
- 10) 尾崎克美・木村俊彦 (1989) ナス属植物の青枯病抵抗性検定法. 中国農研報 **4** : 103-117.
- 11) Shahin, E. A. and Spivey, R. (1986) A single dominant gene for *Fusarium* wilt resistance in protoplast-derived tomato plants. *Theor. Appl. Genet.* **73** : 164-169.
- 12) 谷川元一・浅尾浩史・岡山健夫 (1991) ナス科青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) が生産する細胞外多糖質の萎凋誘導活性と構成成分. 奈良農試研報 **22** : 23-27.
- 13) Toyoda, H. (1989) Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture. *Plant cell Rept.* **8** : 317-320.
- 14) 土屋健一 (1993) 生体成分研究法. 植物病原性微生物研究法 (脇本哲一監修). 東京: ソフトサイエンス社, pp90-97.
- 15) Vasse, J., P. Frey and Trigalet, A. (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 241-251.