

培養変異を利用したナス青枯病抵抗性個体の選抜

誌名	山梨県総合農業試験場研究報告 = Bulletin of the Yamanashi Agricultural Research Center
ISSN	09108335
巻/号	6
掲載ページ	p. 31-42
発行年月	1994年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



培養変異を利用したナス青枯病抵抗性個体の選抜

雨宮圭一・八木聡明*・岡部 健*

キーワード：ナス、培養変異、選抜、青枯病抵抗性

I 緒 言

これまで、病害抵抗性植物を育種していくには、抵抗性をもった野生種と栽培種の交配を行い、圃場でその抵抗性を確認した後、選抜していく方法が中心であった。野菜においてもこのような交配育種により過去に多くの病害抵抗性品種や接ぎ木用の台木品種が育成されてきた。しかし、従来の方法では新しい品種を育成するのに多くの労力と時間がかかるとともに、交配可能な組合せのみの範囲でしか植物体が得られないという問題があった。

近年、組織培養を用いた育種法が行われるようになり、細胞選抜をはじめ、胚及び蒴培養、細胞融合、形質転換、遺伝子組換えなどの技術が培養の過程で応用されてきている。このうち、細胞選抜を用いた手法では、タバコのTMV²¹⁾、イチゴの炭そ病²⁴⁾、トマトの青枯病²²⁾、ナスの半身萎凋病⁹⁾などの抵抗性植物を選抜した研究例がある。また、培養変異を用いれば同時に多くの個体を処理できるとともに変異幅が拡大して交雑では得られない形質の獲得も可能であり、目的とする形質が固定されている個体が得られやすい。そのため、農林水産省助成の「地域バイオテクノロジー研究開発事業」(昭和61～平成2年)では多くの作目についてこの手法による実用化レベルの研究が進められてきた¹⁹⁾。

一方、ナス (*Solanum melongena* L.) は山梨県の野菜生産額第1位の作目であるが、産地での連作の影響で栽培上、致命的な青枯病が多発して

おり現地では大きな問題となっている。この病気に対しては、これまで抵抗性台木の利用や耕種的防除などの手段がとられてきた⁵⁻⁷⁾。しかし、菌群の種類により台木品種の抵抗性が異なること、病原菌 (*Pseudomonas solanacearum*) が地表下1 mまで生息できることなどから決定的な防除対策とはなっていない。

青枯病の菌群については、ツノナス、ヒラナス、トルバム・ビガーの抵抗性台木と病原菌との特性からI群～V群の菌群に分けられている¹⁷⁾。このうち、IV群菌はすべての台木品種を高率に発病させる病原性の幅の広い菌群である。そのため、他の菌群に抵抗性のあるトルバム・ビガーをも侵してしまう。県内で使用されている主な台木はトルバム・ビガーであるが、産地で発病している青枯病はIV群菌が主体であることが判明した¹⁶⁾。また、抵抗性台木の利用において、台木自体が生存していても穂木が枯死してしまう現象もみられる。このため、産地では従来の台木以上に抵抗性を示す新しい台木の育成が望まれている。

以上のような背景から、培養変異を利用してまだ交雑育種では得られていない青枯病のIV群菌に対する抵抗性を獲得すること、また、有望個体の選抜を *in vitro* で行うことにより育種の効率化を図ることを目的に、ナスのカルスに放射線や化学物質を用いた変異誘導処理を行った後、得られた幼植物を病原菌培養ろ液で選抜する方法について検討した。

なお、この報告は、バイオテクノロジー等技術

* 現在、(株)ミヨシハツ岳農場メリクロン研究所

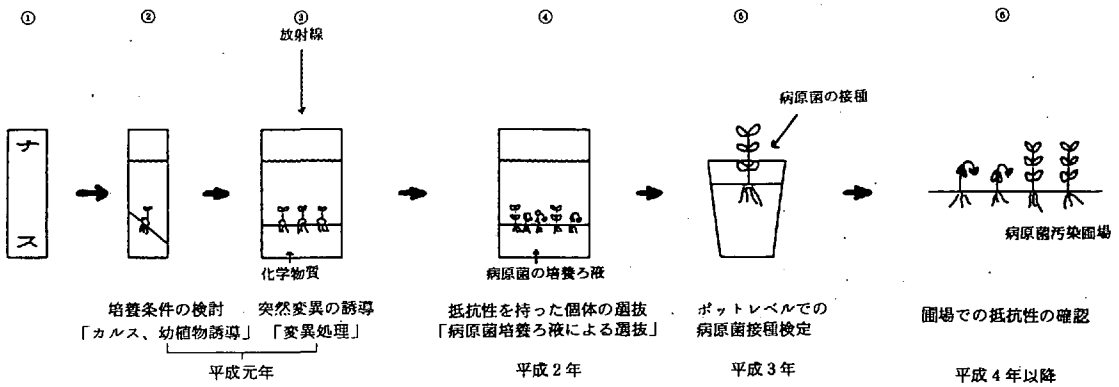
開発費事業（山梨県）の一環で平成元年から3年までの3カ年間に㈱ミヨシの「八ヶ岳農場メロン研究所」との間で行われた共同研究の成果の一部である。

Ⅱ 材料と方法

供試材料は、㈱タキイ種苗より購入した「千両二号（*S. melongena*）」及び「トルバム・ピガ

時間/日照明とした。

また、カルスからの不定芽誘導は、MS培地にNAAとBAを各0.2mg/l加えた培地で形成されたカルスを径5mmの塊に調整した後、カルス誘導のときと同じ組合せのNAAとBAを添加したMS培地に置床し、1ヶ月間培養して不定芽形成の有無について調査した。なお、このときの培養中の環境条件はカルス誘導の場合と同じである。



第1図 試験実施における概略の手順

（*S. torvum*）」の2品種で、これらの種子を無菌は種することにより得られた植物体を用いた。また、選抜個体の圃場における抵抗性確認のための対照品種としてトルバム・ピガ以外に「カレヘン（*S. sanitwongsei* Craib）」¹⁴⁾も用いた。試験の実験における概略の手順は第1図に示したが、その過程の詳細な方法は以下のとおりである。

(1) カルス誘導と再分化系の検討

無菌は種により得られた幼植物の胚軸を5mmの長さに切断して次の培地に置床し、カルス誘導させた。供試培地は、Murashige & Skoog (MS:1965)培地に植物生育調節物質として α -ナフチル酢酸(NAA)を0, 0.2, 2mg/lと6-ベンジルアミノプリン(BA)を0, 0.2, 2mg/l、それぞれ組み合わせ添加したものをを用いた。培養期間中の温度は25℃、照度は約2000Luxで18

(2) 変異誘導のための変異源の比較

胚軸から得られたカルスに変異を誘導させるため、変異源としてカルスへの γ 線の急照射、変異誘導物質の培地への添加、または一定時間のカルスの浸漬、高濃度の植物生育調節物質の培地への添加を行い、培地に置床後1ヶ月間培養した。その後、それぞれのカルスをMS基本培地に移して温度25℃、光2500Lux下で培養し、不定芽を誘導させた。

なお、 γ 線の照射は生物資源研究所放射線育種場（茨城県大宮市）に依頼し、カルスが入っている試験管ごとガンマールームに置いた状態で⁶⁰Coを線源とした急照射（10時間/日）を行った。その他、使用した変異源の種類、濃度及び処理方法は第1表のとおりである。

第1表 変異源とその処理方法

種類	変異源名	処理方法	強度
放射線	γ 線	カルスへの急照射	5, 10 krd
化学物質	エチル・メタン・スルホネート (EMS)	カルスを浸せき後、培養	0.3%, 1, 2, 3時間
	コルヒチン	〃	0.3%, 2, 4, 6日間
	アクリジン・オレンジ	培地への添加	1, 5, 10, 20, 30, 50mg/L
	ニトロフラゾン	〃	0.5, 1, 3, 5, 10mg/L
	アクチノマイシジンD	〃	0.5, 1, 3, 5, 10mg/L
	カフェイン	〃	10, 100, 300, 500mg/L
	P-フルオロフェニルアラニン (PFP)	〃	5, 10, 30, 50, 100mg/L
植物生育調節物質	2, 4-D	培地への添加	5, 10 mg/L
	BA	〃	5, 10 mg/L
	2, 4-D, BA	〃	各 10 mg/L

z 培養期間は、それぞれ1ヶ月間

(3) 変異個体の青枯病抵抗性の検討

豊田²²⁾の報告に従って病原菌の侵入や病徴の発現に毒素が関与しているものと想定し、次の二段階法による選抜方法で検討した。

1) 病原菌を培養したろ液による一次選抜

県内の青枯病菌汚染圃場から分離したIV群菌 (*Pseudomonas solanacearum*) 22菌株の内、病原性が最も強いと思われる1菌株、(No 03)について片山⁸⁾の方法により得た単独コロニーをアーサー・ケルマン改変培地²⁾で暗黒下、30°C、3日間培養した。菌密度の測定はThomaの血球測定盤 (Depth 1/10 mm, Sq mm 1/400) により顕微鏡下で計測した。培養ろ液の濃度はこの測定結果に基づいて培地で培養液を希釈することにより調整した。菌密度を一定にした培養液の菌体を除去するために10000 rpmで10分間、遠心分離し、その上澄み液をニトロセルロース製メンブラン・フィルター (0.2 μ m) で除菌ろ過した。以後、この液をIV群菌培養ろ液として変異個体の選抜に用いた (写真1)。選抜方法は、培養ろ液を管ピン (長さ90mm×内径19mm) に1 ml入れ、変異処理後、再分化させた幼植物の先端部 (約3 cm) の基部を培養ろ液培地に挿し、25°C、2000 Lux 下で21日間

培養した。最後まで生存した個体を選抜個体としてその元株を馴化に移した。

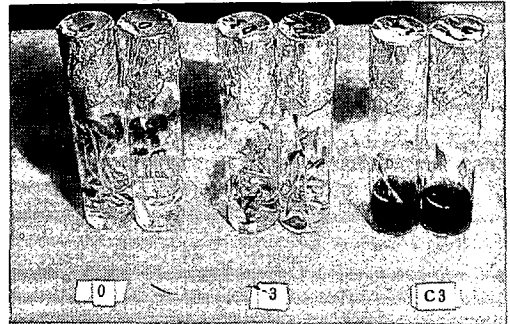


写真1 病原菌培養ろ液による選抜状況

注) 処理14日後

- 0…対照区 (滅菌水のみ)
- 3…培養ろ液区 (菌体は含まない)
- C3…培養液区 (菌体を含む)

2) 病原菌の接種による二次選抜

1) の試験で選抜した元株について、さらにフラスコを用いてMS基本培地で培養し、馴化後、鉢上げ養成した植物 (25系統で各系統に12個体) と対照として用いた「千両二号」, 「トルバム・ビガー」のさし芽培養苗 (草丈約10cm, 葉数5枚の苗で両品種各30個体) を尾崎ら¹⁸⁾の断根接種法に準じて接種、検定した。すなわち、発根したさ

し芽苗を3号ビニールポット(培土はパーミキュライト)に移植し、パーミキュライトを敷いたバット(40cm×28cm×5cm)の上に置いた。それぞれの株の根がポットの穴を突き抜けて伸長した後、これらの根を切断した。すべての株がこの状態になった時点で菌原菌(№03)の培養液(菌体を含む)をバットに灌注し接種した。菌濃度は、約 5×10^8 個/1ml、灌注量は株当たり25mlである。供試個体数は各系統12個体、処理期間は1カ月間、処理時期は9月～11月、光条件は白熱電球を用いた夜間4時間照射の光中断による長日とした。検定は加温した温室で行い、処理期間中の温度は最低 $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ 、最高 $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ で行った。また、処理中の灌水はハイポネックス(10-30-20)の2000倍液を1週間に1回、バット当たり1リットル(株当たり40ml)加えることによる。処理1ヶ月後に尾崎ら¹⁸⁾に従って発病程度の調査を行った。調査基準は次のとおりである。

発病程度調査基準

- 0 : 外部病徴が認められない株
- 1 : 1～2葉が萎ちょうした株
- 2 : 3～5葉が萎ちょうした株
- 3 : 大部分の葉が萎ちょうした株
- 4 : 枯死株

また、この調査結果をもとに次のような計算式で発病指数(DI)の値を得てこれを抵抗性の判定の目安とした。

$$\text{発病指数(DI)} = \frac{\sum(\text{各階級の評点}) \times (\text{各階級の株数})}{4 \times \text{供試株数}} \times 100$$

DI=0(抵抗性あり)～100(抵抗性なし)

さらに、それぞれの株について地際茎部の横断切口の維管束褐変程度を調査するとともに地際茎部の横断切片(厚さ約3mm)を塩化2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム(TTC)を添加したア-サー・ケルマン改変寒天培地上で 30°C 2日間、培養し、病原菌の単独コロニーの多少による株の

感染状況を判定した。

(4) 選抜個体のほ場での抵抗性検定

選抜した2個体(№12,13)について病原菌汚染圃場における抵抗性を確認した。使用した圃場は、いずれも前年度、IV群菌を主体とした青枯病が多発したところである。供試した苗は、千両二号を穂木として接木した選抜個体及び対照としてトルバム・ビガー、及びIV群菌にトルバム・ビガーより強い抵抗性を持つカレヘンで、両圃場とも各個体10株を定植した。定植日は7月8日で収穫期間は7月下旬～11月中旬であった。調査方法は、茎葉の萎凋枯死株を経時的に調べ、枯死株数を求めた。枯死株と最終調査日(11月20日)の生存株は、台木及び穂木の褐変と細菌の流出を確認して感染株と判定し、尾崎ら¹⁸⁾の方法により褐変度を求めた。

Ⅲ 結 果

(1) カルス誘導と再分化系の検討

カルスは2品種とも生育調節物質の有無に関係なく胚軸から誘導することができたが、生育調節物質とカルス誘導との関係には若干の差異がみられた(第2表)。千両二号ではMS培地にNAA

第2表 植物生育調節物質の濃度がカルス形成に及ぼす影響

NAA	BA	供試 個体数	生存個体数		カルスの大きさ	
			千両 二号	トルバム ・ビガー	千両 二号	トルバム ・ビガー
0 mg/l	0 mg/l	25	25	25	4 ^z	1
0	0.2	25	25	25	4	2
0	2.0	25	25	25	4	3
0.2	0	25	25	25	3	3
0.2	0.2	25	25	25	4	4
0.2	2.0	25	25	25	4	1
2.0	0	25	25	25	2	3
2.0	0.2	25	25	25	3	3
2.0	2.0	25	25	25	4	2

z 1 径0.5 mm以下、2 径0.5～1.0 mm
3 径1.0～1.5 mm、4 径1.5 mm以上

とBAをそれぞれ0~2 mg/l の範囲で添加したどの組合せでもカルスは誘導された。しかし、NAAを添加するとカルス形成が悪くなり、BAが共存すると回復する傾向がみられた。これらを全処理区でみると植物調節物質が無添加か、NAA 0.2 mg/l にBA 0.2~2 mg/l 添加した区で良好なカルスを形成した。これに対して、トルバム・ビガーのカルス形成にはBAを添加すると効果があり、NAA 0.2~2 mg/l にBA 0.2 mg/l の添加でもよくカルスを形成した。これらの結果から千両二号の場合は植物調整物質が無添加であってもカルス形成するが、両品種ともBA 2 mg/l の単独添加か、NAA 0.2 mg/l にBA 0.2 mg/l の添加で安定的にカルス形成するものと考えられた。

次に、カルスからの不定芽の形成率は40%以下で全体的に悪かった。ただし、植物調節物質の無添加かあるいはBA 0.2 mg/l の単独添加では両品種とも、また、トルバム・ビガーではBA 2 mg/l 単独添加で比較的良好に形成された。不定根の形成は千両二号ではNAA 0~0.2 mg/l の単独添加で、トルバム・ビガーはNAA及びBAを各0.2 mg/l 添加すると最もよかった(第3表)。これらの結果、カ

第3表 植物生育調節物質の濃度がカルスからの再分化に及ぼす影響

NAA	BA	供試 個体数	不定芽の形成		不定根の形成	
			千両 二号	トルバム ・ビガ	千両 二号	トルバム ・ビガ
0	0	25	++ ^z	++	+ ^z	+
0	0.2	25	++	++	-	+
0	2.0	25	-	++	-	+
0.2	0	25	+	-	+	++
0.2	0.2	25	-	+	-	+++
0.2	2.0	25	-	-	-	-
2.0	0	25	-	-	-	-
2.0	0.2	25	-	-	-	-
2.0	2.0	25	-	-	-	-

z + 0~5 個体 ++ 6~10 個体
+++ 11 個体以上

ルスから不定芽を得るには両品種ともMS培地のみ、またはBA 0.2 mg/l を加えた培地に移植すればよく、発根を促進させるには千両二号ではMS培地のみ、トルバム・ビガーではNAA及びBAを各0.2 mg/l を添加するとよく発根することがわかった。

なお、品種間差異については、カルスは千両二号のほうがトルバム・ビガーより誘導しやすく、不定芽はトルバム・ビガーのほうが誘導しやすかった。

(2) 変異誘導のための変異源の比較

千両二号及びトルバム・ビガーのカルスにそれぞれ第1表のような変異源を用いて変異誘導処理を行った結果、処理後のカルスの生存個体数は両品種ともカフェイン、PFP、BA区を除いて減少する傾向がみられた(第4表)。また、これらのカルスから再分化した個体数は、両品種ともBA区が最も多く、千両二号ではニトロフラゾン、アクチノマイシンD区がトルバム・ビガーでは2,4-D区が最も少なかった。全体的にカルスの供試個体数に対する生存個体数の割合は両品種ともほぼ同じ割合であったが、カルスからの再分化個体数の割合は千両二号の13%に対して、トルバム・ビガーは40%と高かった。最終的には変異誘導処理後のカルスから千両二号由来の156個体、トルバム・ビガー由来の473個体、合計629個体が得られた。

(3) 変異個体の青枯病抵抗性の検討

1) 病原菌を培養したろ液による一次選抜

① 培養ろ液での選抜方法の検討

カルスから再分化した幼植物の先端部(頂芽から3cm)を各濃度の病原菌培養ろ液に浸せき処理したところ、菌密度 5×10^{10} 個/mlでは14日目では約半数の個体が枯死し、21日目ではすべての個体が枯死した(第5表)。また、 5×10^6 個/mlの濃度でも28日目ではすべての個体が枯死したことが

第4表 変異処理後のカルスからの再分化と培養ろ液による一次選抜結果

変異源名	各供試 個体数 (カルス)	千両二号由来				トルバム・ビガー由来			
		生 存 個体数	再分化 個体数	培養ろ液 選抜個体数	順 化 個体数	生 存 個体数	再分化 個体数	培養ろ液 選抜個体数	順 化 個体数
γ線	60	60 (100) ^z	11 (18)	0	—	60 (100)	30 (50)	5 (8)	5 (8)
EMS	90	79 (88)	7 (8)	0	—	79 (88)	41 (46)	3 (3)	1 (1)
コルヒチン	90	85 (94)	7 (8)	0	—	87 (97)	33 (37)	1 (1)	1 (1)
アクリジン・オレンジ	180	171 (95)	33 (18)	0	—	175 (97)	93 (52)	7 (4)	4 (2)
ニトロフラゾン	150	74 (49)	11 (7)	0	—	90 (60)	29 (19)	5 (3)	3 (2)
アクチノマイシンD	150	91 (61)	11 (7)	0	—	109 (73)	49 (32)	6 (4)	4 (3)
カフェイン	120	120 (100)	22 (18)	0	—	120 (100)	68 (57)	3 (3)	2 (2)
PFP	150	149 (99)	25 (17)	0	—	150 (100)	73 (49)	4 (3)	3 (2)
2,4-D	60	59 (98)	10 (17)	0	—	59 (98)	9 (15)	1 (2)	1 (2)
BA	60	60 (100)	13 (22)	0	—	60 (100)	38 (63)	2 (3)	1 (2)
2,4-D+BA	30	18 (60)	6 (20)	0	—	18 (60)	10 (33)	0 (0)	0 (0)
[合計]	1140	966 (85)	156 (13)	0 (0)		1007 (86)	473 (40)	37 (3)	25 (2)

z ()内は、供試個体数に対する%

第5表 培養ろ液の培養液中の菌濃度と
幼苗の生存個体数の関係

品種名	菌濃度 (個/ml)	供試 個体 数	生存個体数(個)			
			7	14	21	28日
千両二号	5×10^6	30	29	19	11	0
	5×10^8	30	23	16	7	0
	5×10^{10}	30	24	14	0	0
	無処理	30	30	30	30	30
トルバム ・ビガー	5×10^6	30	30	24	17	0
	5×10^8	30	29	23	9	0
	5×10^{10}	30	27	17	0	0
	無処理	30	30	30	30	30

z 処理は、10個体 3反復
y 葉がすべて落葉し、生育が止まったものを
枯死個体とした

ら、供試したどの培養ろ液濃度でも選抜圧として
使用できると考えられた。しかし、実際に選抜を
行う場合は、培養中の環境など他の要因の影響を
できるだけ少なくすること、選抜圧が弱い、すな
わち培養ろ液の濃度が低いと処理段階で明確な選
抜ができないことから、選抜のための処理期間は

できるだけ短く、しかも強い選抜圧（この場合は、
濃い菌濃度）の処理がよいと思われた。このよう
な理由から、培養ろ液による抵抗性個体の選抜は、
菌密度 5×10^{10} 個/ml で14日から21日間の浸せき
処理により生存個体を選ぶことにした。

② 培養ろ液による選抜

①の結果を受け、(2)において変異処理後、2品
種のカルスから再分化した幼植物 629 個体につい
て、菌濃度 5×10^{10} 個/ml の培養ろ液中で21日間
培養して生存個体を検定したところ（第4表）、
検定過程で千両二号由来の再分化した 156 個体中
生存した個体はなかった。しかし、トルバム・ビ
ガーでは再分化した 473 個体中の37個体（3%）
が選抜個体として得られた。しかし、これらの生
存個体の中には奇形の個体などが含まれており、
馴化途中で枯死する個体もあって、選抜した37個
体中、鉢上げまでに至った株は25個体（供試個体数
に対して2%）となった。この25個体を接種試験
に供試した。

なお、再分化個体は千両二号、トルバム・ビガ

一同に処理した変異源すべての区から得られたが、培養ろ液で選抜した個体では、2,4-D+BA区は得られなかった。培養ろ液による選抜個体が最も多く得られた変異源はガンマ線照射区の8%で、その他の区では0~4%の範囲内であった。

2) 病原菌の接種による二次選抜

培養ろ液により選抜し、馴化、鉢上げまでに至った25個体それぞれのさし芽による増殖株につい

て温室内で病原菌の断根接種を行った。その結果、接種1カ月後では、対照区の変異処理をしない個体からの株は、千両二号及びトルバム・ビガーとも大部分が枯死した。しかし、選抜個体からの株は青枯病の症状がすべての選抜個体について認められたものの、いずれの個体からの株も4分の3以上が生存していた(第6表)。各株について地際部の茎の切口を調べたところ、どの株にも病原

第6表 一次選抜個体の病原菌接種後の発病状況

供試 個体名	変異源	強度	供試 個体数	枯死 個体数	発病指数 (DI)	導管部褐変個体数			病原菌 密度 ^y	総合評価 ^x
						-	+	++ ^z		
1	EMS	0.3% 2h	12	1	67	2	4	6	++	△
2	コルヒチン	0.3% 4日	12	2	75	1	3	8	+	×
3	アクリジン	1 mg/L	12	0	71	2	3	7	++	×
4	アクリジン	10 mg/L	12	2	73	2	5	5	+	×
5	アクリジン	20 mg/L	12	3	81	0	3	9	++	×
6	アクリジン	20 mg/L	12	3	77	2	4	6	++	×
7	ニトロフラゾン	0.5 mg/L	12	3	81	0	3	9	++	×
8	ニトロフラゾン	3 mg/L	12	0	69	3	3	6	++	△
9	ニトロフラゾン	3 mg/L	12	1	69	3	4	5	++	△
10	γ線	5krd	12	1	71	2	4	6	++	×
11	γ線	5krd	12	2	79	1	2	9	+	×
12	γ線	5krd	12	0	42	7	2	3	+	○
13	γ線	5krd	12	0	42	6	3	3	+	○
14	γ線	10krd	12	0	71	1	3	8	++	×
15	アクチノマイシン	0.5 mg/L	12	1	73	2	5	5	+	×
16	アクチノマイシン	1 mg/L	12	1	71	1	5	6	++	×
17	アクチノマイシン	1 mg/L	12	2	65	3	3	6	++	△
18	アクチノマイシン	1 mg/L	12	0	71	1	5	6	++	×
19	カフェイン	10 mg/L	12	2	73	1	2	9	++	×
20	カフェイン	500 mg/L	12	3	81	1	2	9	++	×
21	PFP	10 mg/L	12	2	71	1	3	8	+	×
22	PFP	30 mg/L	12	3	77	0	3	9	+	×
23	PFP	50 mg/L	12	1	71	3	3	6	+	×
24	2,4-D	10 mg/L	12	2	73	1	3	8	+	×
25	BA	10 mg/L	12	2	73	2	4	6	+	×
千両二号			30	28	98	0	2	28	++	-
トルバム・ビガー			30	22	93	1	9	19	++	-

z - 褐変なし + 褐変部位が50%以下 ++ 褐変部位が50%以上

y 地際部切口の菌の密度 - なし、+ 少、++ 多

x ×: DI値70以上、△: DI値69~50、○: DI値50以下(有望系統)

菌の進入がみられた。導管部の褐変程度は、萎凋の激しい個体ほど褐変がひどく、萎凋の軽い個体には、褐変していないものが多かった。

これらの結果、フラスコ内で選抜した個体は、鉢上げ植物の段階で対照区の千両二号及びトルバム・ビガーよりは病害抵抗性があるように思われ、青枯病抵抗性個体選抜において、カルス由来の変異誘導-病原菌培養ろ液選抜-病原菌接種選抜による培養レベルでの二段階の選抜方法がある程度の有効性をもつことが示唆された。また、選抜した個体の中で発病指数を基準とすると、№12と№13の2個体(DI=50以下)は、少なくとも対照区の個体より抵抗性があると思われた。これら2個体は、いずれもトルバム・ビガーに由来し、ガンマ線照射(5krd)を変異源としたものであった。

(4) 選抜個体のほ場での抵抗性検定

本年の青枯病の発生は、全体的に例年より少なく、試験を行ったA、B二つの圃場においても同様であった。選抜2個体の圃場における発病は、対照であるトルバム・ビガーを台木にした区に比べて、ともに枯死株数、感染株数、地ぎわ部の茎の褐変程度はどちらの圃場でもやや少なかった(第7表)。ただし、台木への菌の進入は圃場Aで各選抜個体とも40%、圃場Bでは№12が10%、№13が20%確認された。また、カレヘンでは、枯死、感染株は見られなかった。

IV 考 察

組織の培養変異を利用して目的とする形質をもつ植物個体を育成するためには、組織の培養系や変異拡大の方法とともに目標とする個体の効率的選抜方法が問題になる。本報は、ナス青枯病菌のうち、病原性の幅が広いIV群菌に対して抵抗性のナス台木を育成することを目標にしてこれらの点について検討した。

ナスの培養系については、代表的な品種でプロ

第7表 二次選抜系統のIV群菌汚染圃場における青枯病発病程度

圃場A

系 統	調 査 個体数	枯死 株数	感染 株数	褐変程度 ²	
				台木	穂木
№12	10	3	4	27.5	32.5
№13	10	4	4	27.5	37.5
トルバム・ビガー	10	6	6	42.5	57.5
カレヘン	10	0	0	0	0

圃場B

系 統	調 査 個体数	枯死 株数	感染 株数	褐変程度 ²	
				台木	穂木
№12	10	0	1	2.5	2.5
№13	10	0	2	5.0	15.0
トルバム・ビガー	10	2	2	15.0	20.0
カレヘン	10	0	0	0	0

z 褐変程度は、台木と穂木の褐変と細菌の流出を確認し、感染株率を求め、導管褐変度を算出したもの。また、数値は調査個体の合計値。褐変程度の基準は、次のとおりである。

健全	0
1/4以下の褐変	1
1/4~1/2褐変	2
1/2~3/4褐変	3
3/4以上の褐変	4

トプラストやカルスから不定芽または不定胚により再分化が可能となっている¹⁾⁴⁾¹²⁾¹⁵⁾。本試験でもカルスから不定芽の誘導を試みたが、変異源の種類や濃度によっては変異処理後に再分化率が低下する傾向がみられた。

これまで培養変異を利用して有用な形質を獲得するために多くの植物に対して人為的突然変異が誘導され、いくつかの植物で有望個体が得られている¹⁰⁾¹¹⁾²⁵⁾。この場合、変異誘導のための変異源としては、放射線、化学物質、植物生育調節物質が主に使用されてきた。しかし、病害抵抗性と変異源における変異の方向性についてはまだ、ほと

んど説明されていない。そのため、本試験では有用な変異を得るにはできるだけ多くの変異源を用い、変異幅を広げようと考えた。変異誘導処理後に得られた植物が抵抗性についてどのくらいの変異幅を持っているかを判定するのは難しいが、不定芽由来の幼植物にⅣ群菌の培養ろ液で選抜圧をかけた結果、個体ごとに抵抗性の差がみられたことから幅が広がったことが推測された。これに対して、特に変異誘導処理しなくても培養中の体細胞変異によって病害抵抗性が得られた例も多い¹⁵⁾。抵抗性を持った選抜のための素材を多数得るのに、ほんとうに変異誘導処理が必要なのかは変異誘導処理後の変異幅を調査するなどして今後、さらに検討していく必要がある。

病原菌の生産する毒素やその培養ろ液に対するカルスや幼植物の耐性を一次選抜として病害抵抗性の個体を得ようとする試みは多い^{2) 3) 11) 15) 22)}。ナス青枯病菌の発病における本菌代謝産物の役割は明確でないが、培養ろ液中の細胞外多糖性物質が植物体の萎凋に関与していることは確かとされる²⁵⁾。したがって、培養ろ液や萎凋物質による選抜によって少なくとも萎凋症状がでにくい個体が得られる可能性は高い。

本試験では、変異誘導したカルスより再分化した629個体について幼植物レベルでの培養液処理に耐性を示した25個体を選抜した。これら25個体に幼苗レベルで病原菌を接種したところ、いずれも発病したが、萎凋程度が少ないだけでなく、導管部の褐変や褐変部の病原菌密度が対照のトルバム・ビガーより明らかに低いものがいくつか見られた。つまり、培養ろ液の処理によっても病原菌による組織の侵害を抑えるという本来的意味での抵抗性反応を示す個体を選抜できたわけである。ただし、これらのうち、最も発病程度が少なかった2個体を汚染圃場に定植したところ、ともに発病したが、その程度はトルバム・ビガーよりは軽

かった。したがって、本報の手法によっても今後、青枯病の発病機構や培養ろ液中の毒素成分の作用性の解明とともに選抜方法の改良を行えば、培養ろ液による幼植物レベルの選抜も有望個体を得るための手段の一つになりうると考える。

謝辞：本研究の遂行にあたり、カルスへのガンマ線照射を行っていただいた農水省生物資源研究所放射線育種場および、青枯病病原菌の菌の提供とその取扱いについて指導していただいた当試験場栽培部作物病害虫科の方々に厚くお礼申し上げます。

V 摘 要

培養変異を利用してナス青枯病(Ⅳ群菌)に対する抵抗性台木を育成することを目標にして、胚軸からのカルスと不定芽の誘導条件を明らかにするとともに、ガンマ線や化学物質、植物生育調節物質で変異処理したカルスからの再生個体について、幼植物レベルにおける病原菌培養ろ液に対する耐性や幼苗以後における本病抵抗性を検討した。結果は次の通りである。

1. カルス誘導条件としては、千両二号、トルバム・ビガーともにMS培地にNAA、BAともそれぞれ0.2 mg/l、またはBAを2 mg/l添加したものでよく誘導された。
2. 不定芽の誘導条件としては、千両二号、トルバム・ビガーともにMS培地のみ、または千両二号はBAを0.2 mg/l、トルバム・ビガーはBAを2 mg/l添加したものがよかった。
3. 培養ろ液による抵抗性個体の選抜は、 5×10^{10} 個/mlで14日から21日間の浸せき処理により生存個体を選ぶのが有効な方法と思われた。
4. 変異誘導処理後得られた629個体について、試験管内での培養ろ液及び馴化後の接種試験の二段階による検定を行った結果、供試品種であ

る千両二号及びトルバム・ビガーよりやや抵抗性があると思われるものが2個体得られた。

5. 選抜した2個体を青枯病(Ⅳ群菌)汚染圃場で栽培したところ、抵抗性はトルバム・ビガーと同程度か、やや勝ったが実用性は乏しかった。

Ⅵ 引用文献

- 1) 浅尾治史・荒井 滋(1988):ナス及び近縁野生種の葉肉プロトプラストからの莖葉分化. 園学雑. 47(別1):204-205.
- 2) 浅尾治史・谷川元一・岡山健夫・荒井 滋(1990):ナス科作物の青枯病抵抗性選抜法に関する研究. 園学雑. 59(別1):210-211.
- 3) ——・——・——・——(1992):青枯病萎凋誘導物質を用いた細胞選抜法による耐病性ナス科個体の作出. 奈良農試研報. 23:7-12.
- 4) Gleddie S.・W.A.Kellere・G.Setterfield(1986):Somatic embryogenesis and plant regeneration of cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena* L. (egg plant). Can.J.Bot. 64:355-360.
- 5) 伊達寛敬・那須英夫・畑本 求(1990):促成栽培ナスの青枯病に対する太陽熱消毒および抵抗性台木などの組合せ効果. 岡山農試研報 8:25-30.
- 6) 伊達寛敬・那須英夫・畑本 求・川合貴雄(1993):岡山県の促成栽培ナスにおける青枯病細菌の菌群とそれに対応した抵抗性台木の選定. 岡山農試研報 11:35-40.
- 7) 伊達寛敬・那須英夫・畑本 求(1993):促成栽培ナスの青枯病に対する寒冷しゃ被覆の発病抑制効果. 岡山農試研報 11:41-45.
- 8) 片山克己(1990):ナス科野菜の萎ちょう性病害の見分け方Ⅲ 青枯病. 植物防疫 44(5):245-246.
- 9) 小池正徳・村上隆起・勝又亨祥・雨宮良幹・嶋田 徹(1993):ナス半身萎ちょう病抵抗性スクリーニングのための *Verticillium dahliae* の培養濾液の利用. Plant tissue culture letters. 10(1):71-74.
- 10) 久木村 久(1974):栄養繁殖性作物の突然変異育種と組織培養. Iotope news 12.
- 11) 松原尚生(1972):試験管培養の放射線育種への利用. Iotope news 3. 10-11.
- 12) Matsuoka H.・K. Hinata(1979):NAA-Induced Organogenesis and Embryogenesis in Hypocotyl Callus of *Solanum melongena* L.. Jof. Exp. Bot.. 30(116):363-370.
- 13) 真山滋志(1990):植物培養系での変異体選抜による病害抵抗性植物の作出. 植物細胞工学(2)6:704-712.
- 14) 峰岸正好・内藤 潔・位田晴久・野村寿志・宮本重信(1991):ナス青枯病抵抗性台木「カレヘン」の育成. 園学雑. 60(別1):178-179.
- 15) モハメド アリ・藤枝国光(1989):ナス及びその種間雑種の体細胞胚形成について. 園学雑. 58(別2):228-229.
- 16) 小野光明・市川和規・土屋重文(1992):山梨県における夏秋ナス青枯病の発生実態. 関東東山病害虫研年報. 39:77-79.
- 17) 尾崎克己・木村俊彦(1985):ナス科野菜の青枯病菌の系統について. 日植病報 51:339-340.
- 18) ——・——(1989):ナス属植物の青枯病抵抗性検定法. 中国農研報. 4:103-117.
- 19) 澤田紀一・大野清春(1992):「培養幼植物体レベルにおける特性検定及び選抜技術の開発」研究成果の概要. 生物研究資料 4:39-52.
- 20) 谷川元一・浅尾治史・岡山健夫(1991):ナス科青枯病菌が生産する細胞外多糖物質の萎凋誘導活性と構成成分. 奈良農試研報 22:23-

27. Plant cell Rept. 8: 317-320.
- 21) 豊田秀吉・反保宏行・岡田経仁・平井篤造 (1983) : タバコモザイクウイルスに対する植物培養細胞の抵抗性発現機作 (第1報). 近畿大農紀要 16: 31-40.
- 22) Toyoda H. (1989) : Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture.
- 23) 豊田秀吉 (1990) : 培養カルス系による耐病性植物の選抜. 化学と生物. 28 (1) : 12-19.
- 24) —— (1991) : 野菜の培養変異と育種への利用. バイオホルテイ. 4. 9-14.
- 25) 渡辺好郎・山口彦之 (1983) : 突然変異育種. 養賢堂.

Selection in Eggplant Resist of Bacterial Wilt by Culture Mutation.

Keiichi AMEMIYA, T. YAGI and T. OKABE

Summary

Research was carried out raising root stock of eggplant resistant to bacterial wilt by culture mutation. 2 cultivars, *Solanum melongena* L. ("Senryo 2.") and *Solanum torvum* were used as materials. These are : determination of condition in inducing callus from hypocotyl and adventitious bud. extending range of variation by γ -ray, chemical components and plant growth regulator. resistant plant selection by the bacterial culture filtrate. inoculation test in young plants. resist test of selected plants by infected field test of bacterial wilt. Finally, the results were identified *S. melonena* L. and *S. torvum* as follows.

1. Callus is induced on M.S. media containing NAA 0.2 mg/l and BA 0.2 mg/l or M.S. media containing BA 2 mg/l for both cultivars.
2. Shoots were developed on basic M.S. media containing BA 0.2 mg/l for *S. melongena* L. and *S. melongena* L. and M.S. media containing BA 2 mg/l for *S. truvum*.
3. The selection of resistant explant was by bacterial culture filtrate of *Pseudomonas solanacearum* on 5×10^{10} /ml in vitro. It seems that the optimum period is 14~21 days.
4. 2 plants were selected from 629 plants. They seemed to have been more resistant than *S. melongena* L. or *S. torvum* as the result of the 2 step selection method through the bacterial culture filtrate and inoculation test in vitro.

5. The resistant of 2 selected plants seemed to be the same as *S. torvum* or be a little superiority by infected field test of bacterial wilt (IV group). However, the resistant wasn't practicable for cultivation.

Key Words: eggplant (*Solanum melongena* L.), culture mutation, selection, bacterial wilt.