

組織培養系を用いて作出した青枯病抵抗性トマト系統における 抵抗性の後代検定

豊田秀吉*・野村毅*・松田克礼**・道後充恵*・加藤靖也*・備後美紀*・大内成志***

Valuation of disease resistance expression in self-pollinated progenies of leaf callus-derived tomato regenerant resistant to bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum*

Hideyoshi TOYODA, Tsuyoshi NOMURA, Yoshinori MATSUDA, Mitsue DOGO,
Yasunari KATO, Miki BINGO and Seiji OUCHI

Synopsis

In the present study, the self-pollinated progenies of bacterial wilt-resistant line derived from tomato leaf-callus were examined for their resistance expression against infection by the pathogen *Ralstonia solanacearum*. The progenies (R5 to R8) of the selected line were transplanted in non-sterilized soil and cultivated for two months in a plastic house under normal conditions. These progeny plants showed the normal growth and fruit production without any wilting during the entire period of cultivation, while all of the susceptible mother tomato cultivars wilted completely. For the confirmation of the resistance of these lines, the progeny plants were transplanted to soil heavily inoculated with the pathogen. These plants grew normally in contrast to severe wilting of the control susceptible plants. These results suggest that the resistance to the bacterial wilt pathogen had been stably maintained in these self-pollinated resistant progenies of callus-derived regenerants.

植物の細胞は、全能性 (totipotency) を有するので、いずれの組織・器官であっても適切な培養条件が与えられれば、培養細胞から完全な植物体を再生することが可能であり、実際に多数の植物で個体再生系が確立されている。そのような培養の過程においては、遺伝子突然変異や染色体異常に起因する遺伝的変異など、いわゆる体細胞変異 (somaclonal variation) を生じることが知られており^{2,3)}、このような組織培養技術を用いて誘導された有用変異を選抜すれば、理論的に耐病性品種などの優良系統が育成できることになる。近年、組織培養技術の発達にともなって、それら手法を利用した様々な有用変異体の選抜・

育種が試みられるようになった^{1,3,6,7)}。

ナス科植物の青枯病は、*Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*) の感染によって引き起こされる細菌性導管病であり、有効な防除法が確立されておらず、また実用的な抵抗性品種も育成されていないために、農業上多大な被害を与えている。筆者らの研究室では、葉外植片由来の再生体後代を用いてトマト品種福寿2号の青枯病抵抗性系統を選抜し⁴⁾、神奈川県園芸試験場青枯病菌汚染圃場および本学実験圃場において後代検定を実施してきた。このような後代検定の一環として、本研究では、実際のトマト栽培を想定し、抵抗性選抜系統を通常の条件下で栽培した場合

* 農学部農学科 (Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631, Japan)

** 農学総合研究所 (Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, Nara 631, Japan)

*** 農学部農学科・農学総合研究所 (Department of Agronomy, Faculty of Agriculture and Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, Nara 631, Japan)

の自然感染度を検定することにした。なお、一部の選抜系統については、青枯病菌汚染圃場における抵抗性検定も行った。以下にそれらの結果を報告する。

1. 自然感染発病試験

本実験には、筆者らの研究室で選抜した自殖第5世代から自殖第8世代までの青枯病抵抗性22系統 (123株) とその親株であるトマト (*Lycopersicon esculentum*) の品種福寿2号 (21株) を対照個体として用いた (Table 1)。

これらトマトの幼苗を育成するにあたっては、ペトリ皿内の湿潤濾紙上に種子を播き、30℃の人工気象器内で発芽させた後、パーミキュライトを入れた丸形ビニールポットへ移植し、1ヶ月間、25℃に設定した本学実験農場ガラス温室内で育苗した。トマト苗は本学実験農場ビニールハウス内のトマト連作圃場 (畝の幅90cm、高さ30cm、畝間70cmとし、土壌は滅菌せず) に定植し、その後は慣行に従って栽培管理をした。第三花房が形成された時点で、その上位2葉を残して摘芯し、果

Table 1. Bacterial wilt resistant lines of tomato callus-derived regenerants used in the present study

| Generations of resistant lines | Resistant lines | Number of plants used for | |
|-----------------------------------|-----------------|---------------------------|------------------|
| | | Natural infection test | Inoculation test |
| 5 | R5 | 14 | Not tested |
| 6 | R6-05 | 2 | 2 |
| | 06 | 7 | 1 |
| | 12 | 9 | 3 |
| | 17 | 8 | Not tested |
| | 25 | 6 | 2 |
| | 32 | 2 | 3 |
| | 37 | 11 | Not tested |
| | 42 | 5 | 1 |
| | 53 | 4 | 1 |
| | 7 | R7-01 | 3 |
| 05 | | 5 | Not tested |
| 06 | | Not tested | 2 |
| 21 | | 7 | 4 |
| 31 | | 2 | 2 |
| 33 | | 1 | 1 |
| 45 | | Not tested | 3 |
| 52 | | 2 | Not tested |
| 57 | | Not tested | 2 |
| 60 | | 6 | 3 |
| 8 | 64 | 3 | Not tested |
| | R8-02 | 6 | 3 |
| | 19 | 7 | 2 |
| | 20 | 8 | 2 |
| | 23 | 5 | 2 |
| Control cultivars | | | |
| | Fukuju No. 2 | 21 | 5 |
| | K70 | Not tested | 10 |

実収穫期まで栽培した。肥料は基肥のみで追肥は施用しなかった。トマト連作圃場で栽培したトマト苗の青枯病自然感染程度については、健全、部分萎凋、完全萎凋、枯死の4段階とし、果実収穫まで調査した。

その結果をFig. 1に示す。それによると、対照個体である福寿2号は圃場定植10日後から一部の個体が萎凋し始め (Fig. 1B)、定植30日後で7割以上の個体 (Fig. 1C)、さらに、60日後 (果実収穫期) ではほぼ全株が萎凋、枯死した (Fig. 1D)。しかしながら、選抜系統については全く発病が認められず、栽培の全期間を通じて順調に生育した (Fig. 1A-D)。以上の結果から、選抜系統は青枯病抵抗性を安定して後代に継代していると判定された。

2. 青枯病菌汚染圃場での後代検定

前項の試験で用いた自殖第5世代から自殖第8世代までの青枯病抵抗性系統18系統 (41株) と対照個体としてその親株である福寿2号 (5株)、さらに罹病性品種である品種カゴメ70 (10株) を用いて、抵抗性検定を行った (Table 1)。

青枯病菌汚染栽培床を作製するにあたっては、本学実験農場ビニールハウス内の青枯病菌接種試験場に設けられたベット (Fig. 2) の土壌に 10^8 細菌/mlに調整した青枯病菌

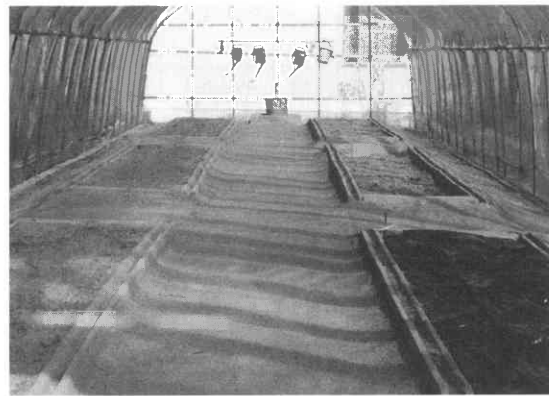


Fig. 2. Soil beds infested with *R. solanacearum* K-101 in a plastic house.

(K-101株⁸) の培養液 (10ℓ) を1日ごとに混和した。なお、青枯病菌はPCG液体培地 (10gのペプトン、1gのカザミノ酸および10gのグルコースを1ℓの水に溶解した培地) に植菌し、30℃で一夜振盪培養した。このような接種を約1ヶ月間連続して行い、定植した対照個体が完全に発病することを確認した。このような病原菌汚染栽培床で抵抗性検定を行う場合には、トマト幼苗を青枯病菌液に1分間浸根接種したのちに青枯病菌汚染栽培床に定植して、感染を確実にものとした。その後は慣行に従って栽培管理をし、1995年7月下旬から約2ヶ月間発病程度を調査した。

得られた検定結果をFig. 3に示す。それに

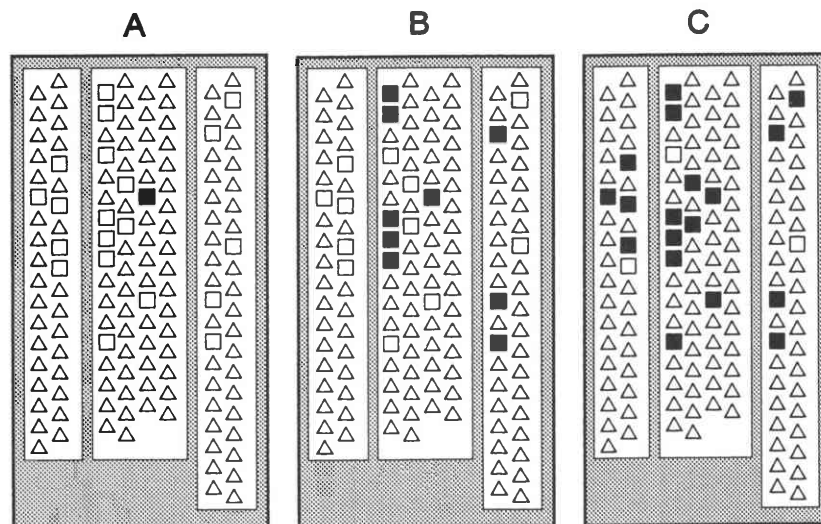


Fig. 1. Evaluation of resistance of selected tomato lines against the natural infection with the bacterial wilt pathogen. One-month-old seedlings of the resistant-lines (Δ) and parental cultivar (Fukuju No. 2) (\square) were transplanted to soil at random and cultivated under the normal condition for two months. A, B and C represent wilting appearance on 10, 30, and 60 days after transplanting, respectively. Dark triangles and squares represent wilted tomato plants.

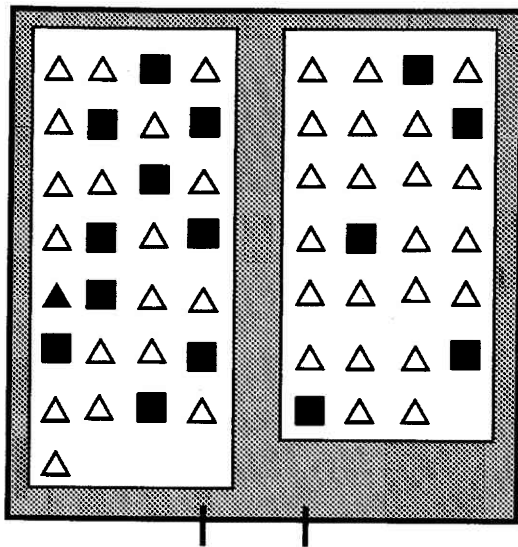


Fig. 3. Evaluation of resistance of selected tomato lines in heavily infested soil that had been repeatedly inoculated with the bacterial wilt pathogen. One-month-old seedlings of the resistant-lines (\triangle) and parental cultivar (Fukuju No. 2) (\square) were transplanted at random in soil infested with *R. solanacearum* K-101 and cultivated for 15 days. Dark triangle and squares represent wilted tomato plants.

よると、対照個体である親株の福寿2号と罹病性品種であるカゴメ70は移植5~15日後には全ての個体が枯死したのに対して、選抜系統はR7-33の1株以外は栽培の全期間を通じて全く発病が認められなかった。以上の結果から、選抜系統は青枯病抵抗性をほぼ確実に後代に継代していると考えられた。

以上のように、本研究では自殖後代植物を栽培し、自然条件下における自然感染発病試験を試みるとともに、高度汚染圃場におけるそれらの抵抗性検定を行った。今後は、本研究で選抜した優良候補系統の育成を進めることにより、有用なトマト品種の作出に貢献できるものと考えられる。

引用文献

- 1) Bajaj, Y. P. S. (1990). Somaclonal variation-origin, induction, cryopreservation, and implications in plant breeding. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. by Bajaj, Y. P. S.), vol. 11. pp. 3-48. Springer-Verlag, New York.
- 2) Evans, D. A. and R. W. Sharp. (1983). Single gene mutation in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* 221: 949-951.
- 3) Larkin, P. J. and R. W. Scowcroft. (1981). Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 62: 503-521.
- 4) Toyoda, H., K. Simizu, N. Kita, K. Chatani and S. Ouchi. (1989). Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue. *Plant Cell Rept.* 8: 317-320.
- 5) Toyoda, H., K. Kakutani, S. Ikeda, S. Goto, H. Tanaka and S. Ouchi. (1991). Characterization of deoxyribonucleic acid of virulent bacteriophage and its infectivity to host bacteria, *Pseudomonas solanacearum*. *J. Phytopathol.* 131: 11-21.
- 6) Toyoda, H. and S. Ouchi. (1991). The use of somaclonal variation for the breeding of disease-resistant plants. *In* Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants (ed. by Patil, S. S. et al.), pp. 229-239. Springer-Verlag, New York.
- 7) Toyoda, H. (1996). Somaclonal variation for resistance to Fusarium- and Glomerella-caused diseases in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. by Bajaj, Y. P. S.), vol. 36. pp. 197-209. Springer-Verlag, New York.