

バラ根頭がんしゅ病抵抗性

岐阜大学応用生物科学部園芸植物生産学研究室 福井博一

はじめに

根頭がんしゅ病 (*Agrobacterium tumefaciens*) はイネ科植物を除くほとんどの木本植物および草本植物に発生し、花き類では特にバラ、キクで重要病害となっている。本病に罹病すると地際部および根部にがんしゅ (crown gall) が形成され、地上部への養水分の移動が阻害されるため生育が衰え、収量が低下するため、特に切花生産で大きな被害が発生している。現在、本病は世界の至る所に分布しているが、19世紀中期にフランスで報告されたのが最初で、1880年にアメリカ・カリフォルニア州に広がり、日本では1890年に和歌山県で確認されたのが最初といわれている (農商務省農務局, 1923)。

根頭がんしゅ病の発病過程は詳細に研究されている (図-1)。本病の発病は、菌が寄主の負傷細胞から侵入し、寄主細胞壁に付着することから始まる。細胞壁に付着した *A. tumefaciens* では、植物細胞内で癒傷反応として生成される Acetosyringone などのフェノール化合物によって Tumor inducing (Ti) プラスミド内の Virulence (*vir*) 領域が活性化された後、*Vir D* 遺伝子群により Transferred DNA (T-DNA) 領域が切断され、寄主細胞への転移が行われる。この性質を利用して本菌は遺伝子組換えのベクターとして用いられている。T-DNA が植物細胞内の染色体上に組み込まれると、T-DNA 上にコードされた Tumor morphology shoot (*tms*) や Tumor morphology root (*tmr*) 遺伝子によってオーキシン、サイトカイニンが合成され、がんしゅが形成される。

根頭がんしゅ病は有効な防除方法がないため、その防除は極めて困難であるといわれている。しかし、オーストラリアの New and Kerr (1972) は *A. radiobacter* strain 84 を利用することで根頭がんしゅ病を予防できることを見だし、「バクテローズ」として商品化されたが、その作用が感染予防効果であることや効果が安定していないなどの問題点 (Moore, 1979) から、依然とし

て防除困難な病害とされている。抵抗性品種の育成は根頭がんしゅ病を防除するための有効な方法であり、これまでも種々の研究が行われてきた。

バラ根頭がんしゅ病抵抗性は、古くは Brown (1923) の報告があり、桃色品種が感受性で赤色品種は抵抗性を示したとの報告がある。また、Boelema (1969) は7種類の台木の抵抗性を検討し、*Rosa multiflora* (ノイバラ) や 'Manettii' は感受性で、*R. multiflora* から育成された ISU 60-5, Brooks 48, Clarke 1957 が抵抗性を示したと報告している。しかし、太田 (1993) の試験では ISU 60-5 は抵抗性が弱かったとされており、同様に *R. multiflora* 'K2' も研究者によって抵抗性の判定が異なっている (太田, 1993; Reynnders et al., 1998)。

このように抵抗性の判定結果が異なる原因として、抵抗性検定法が気候、土壌あるいは植物体の生育などの影響を受けやすく、検定精度に難点があったものと考えられる。本研究では自然環境条件の影響が少なく、検定材料の生育差による変動を最小限に抑え、精度、再現性を備えた簡易検定法の確立を検討し、抵抗性を示した品種を用いて抵抗性の発現機構を検討した。

I *in vitro* 検定法の確立と抵抗性の検定 (図-2)

岐阜県内のバラ生産施設から採取したがんしゅを 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌後水洗し、0.1% ペプトン水中で磨砕して細菌懸濁液を作り、Brisbane and Kerr (1983) の選択培地で画線培養した。形成された白色集落を YEB 培地で培養して分離した後、Haas et al. (1995), Sachadyn and Kur (1997) および Sawada et al. (1995) の方法に基づいて *A. tumefaciens* であることを確認し、各種判定法 (西山, 1978) を用いて *A. tumefaciens* の biovar 2 型と同定された分離菌を接種菌とした。

接種植物体として、莖頂培養後 Murashige & Skoog 培地 (MS 培地) に BAP と GA₃ を添加した培地で6週間ごとに継代培養したバラのシュート切片を用い、シュート切片の節間中央部に病原菌を塗布した針で接種する『針刺接種法』を用いて接種を行った。その結果、接種

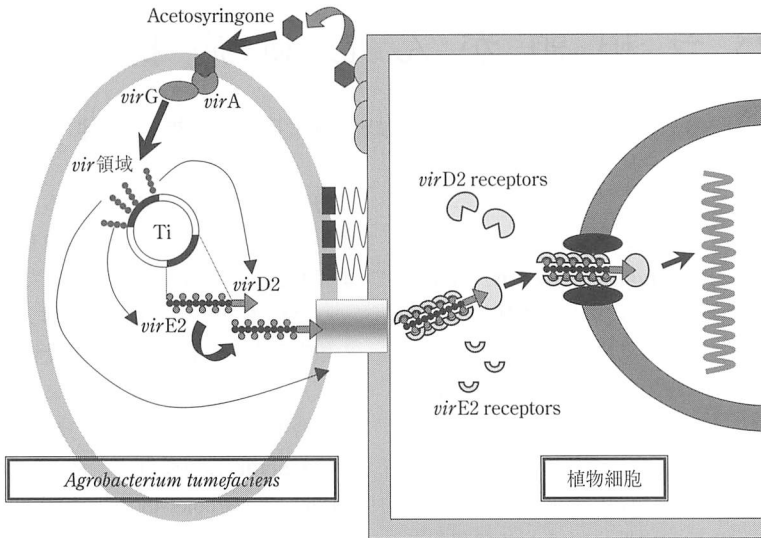


図-1 根頭がんしゅ病の発病過程

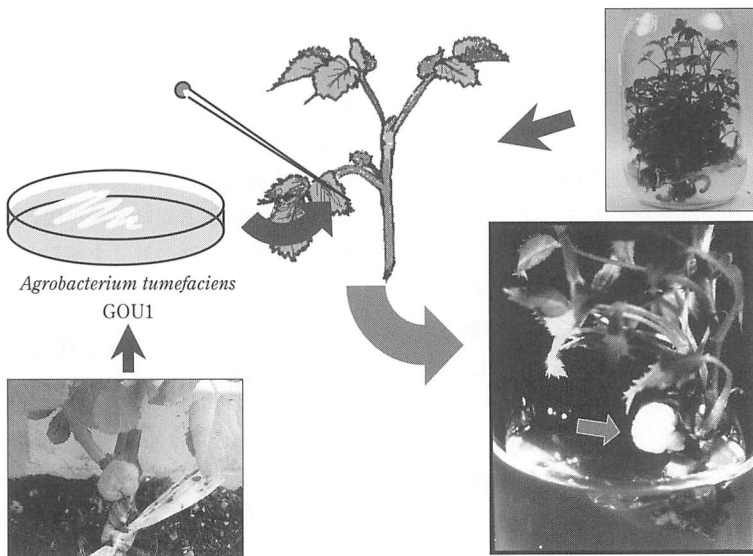


図-2 in vitro 検定法の手順

2週間後には発病がみられ、接種4週間後の発病率が70%に達した。また、反復実験においても同様の結果が得られたことから、高い再現性が認められ、有効な検定法であると判断した。

切花22品種および台木14品種を用い、抵抗性検定を行った結果(表-1)、切花品種は発病率が100%の‘White dream’から0.5%の‘PEKcougel’までばらつき、台木品種ではすべてが65%以上であった。また、がん

しゅの大きさは最大が *Rosa multiflora* の6.6 mmで、最小は‘Charming’の0.2 mmであった。*R. canina* の6系統についてみると、発病率はいずれも65%以上と高かったが、がんしゅの大きさは0.7 mm以下と小さかった。

根頭がんしゅ病の発病過程は、*A. tumefaciens* の侵入からT-DNAの植物細胞への移行と植物ゲノム内への組み込みまでの過程と、植物ゲノム内に組み込まれたT-

表-1 供試したバラ品種における *in vitro* 検定法での gall 形成

品種名	タイプ	発病率	gall の 大きさ
White Dream	切花	100	1.5
<i>Rosa multiflora</i>	台木	95	6.6
Purple Rain	切花	95	1.5
Madame Violet	切花	90	1.1
R. canina 'Inermis'	台木	90	0.7
<i>R. coriifolia froebelii</i>	台木	90	0.5
R. canina 'Pfänder'	台木	90	0.3
Dukat	切花	87	3.6
Fashion Parade	切花	85	1.0
<i>R. rugosa</i>	台木	85	0.8
R. canina 'Heinsohns Rekord'	台木	85	0.7
R. canina 'Superbe'	台木	85	0.4
Kuiper	台木	80	0.7
<i>R. eglanteria</i>	台木	80	0.5
Uniform	台木	80	0.3
Pasadena	切花	75	0.9
Veendam	台木	75	0.5
<i>R. canina</i>	台木	75	0.4
<i>R. virginiana</i>	台木	73	0.8
Golden Emblem	切花	65	2.4
R. canina 'Brögs Stachellose'	台木	65	0.5
Alba Meilandina	切花	55	1.1
Little Marvel	切花	53	0.9
Evelien	切花	47	2.1
Livia	切花	47	0.9
Bridal Pink	切花	45	2.8
Charming	切花	45	0.2
Concerto	切花	35	0.4
Tineke	切花	33	2.4
Joy	切花	33	1.2
Dolores	切花	30	0.8
Roulette	切花	30	0.7
Rote Rose	切花	25	1.6
Pink Wonder	切花	15	1.4
Lifrane	切花	7	4.8
PEKcoulgel	切花	0.5	0.0

表-2 *in vitro* 検定法を用いたバラ品種の抵抗性分類結果

病徴形成 抵抗性	品 種	病徴形成 抵抗性	品 種
Low > 50% ^z	White Dream	Middle High	Lifrane
	Purple Rain		Dukat
	Madame Violet		Charming
	Dukat		Golden Emblem
	Fashion Parade		Tineke
	Pasadena		<i>Rosa multiflora</i>
	Golden Emblem		
	Sonia		Evelien
	Alba Meilandina		White Dream
	Little Marvel		Purple Rain
	<i>Rosa multiflora</i>		Madame Violet
	R. canina 'Inermis'		Fashion Parade
	<i>R. coriifolia froebelii</i>		Pasadena
	R. canina 'Pfänder'		Sonia
	<i>R. rugosa</i>		Alba Meilandina
	R. canina 'Heinsohns Rekord'		Little Marvel
	R. canina 'Superbe'		Livia
	Kuiper		Joy
	<i>R. eglanteria</i>		Rise 'n' Shine
	Middle 25 ~ 50%		Uniform
Veendam		Dolores	
<i>R. canina</i>		Rote Rose	
<i>R. virginiana</i>		Pink Wonder	
R. canina 'Brögs Stachellose'		<i>R. virginiana</i>	
		<i>R. rugosa</i>	
		R. canina 'Inermis'	
		R. canina 'Heinsohns Rekord'	
		Kuiper	
High < 25%	Pink Wonder	Concerto	
	Lifrane	Bridal Pink	
	PEKcoulgel	PEKcoulgel	
		<i>R. eglanteria</i>	
		R. canina 'Brögs Stachellose'	
		<i>R. coriifolia froebelii</i>	
		Veendam	
		R. canina 'Superbe'	
		<i>R. canina</i>	
		Uniform	
	R. canina 'Pfänder'		

^z : 発病率

DNA にコードされている *tms* や *tmr* などの植物ホルモン合成酵素遺伝子群の発現によってホルモンバランスが崩れてがんしゅが形成される過程に大きく分けられる。抵抗性と発病過程との関係を見ると、前者の過程には病徴形成抵抗性 (Resistance to tumor formation) が関係し、発病率で示すことができ、後者の過程には病徴発達抵抗性 (Resistance to tumor development) が関係し、がんしゅの大きさで示すことができる。このようにして供試した品種を両抵抗性の強弱に基づき分類した (表-2)。

II 病徴形成抵抗性の遺伝

in vitro 検定法を用いた抵抗性の検定結果から、病徴形成抵抗性の強い品種として 'PEKcoulgel' を選択し、弱い品種として 'Dukat' を選択した。両品種の正逆交雑を

表-3 'PEKcougel' (P) と 'Dukat' (D) の交雑後代; P×P, D×D, P×D, D×P における発病率

S1 of D×D	Disease incidence (%)	S1 of P×P	Disease incidence (%)	F1 of P×D	Disease incidence (%)	F1 of D×P	Disease incidence (%)
DD20-1	18.8	PP24-10	1.7	PD21-2	5.0	DP17-1	10.8
DD2-2	19.3	PP34-1	5.6	PD40-7	5.6	DP18-1	24.5
DD4-1	22.2	PP23-6	7.4	PD40-4	10.3	DP6-1	25.5
DD2-1	32.5	PP23-2	11.3	PD14-1	14.8	DP7-2	28.3
DD12-1	35.9	PP3-1	15.6	PD27-1	23.5	DP9-2	30.0
DD20-2	37.2	PP33-1	20.9	PD40-2	24.5	DP28-4	31.1
DD24-1	50.0	PP24-3	25.7	PD40-8	28.3	DP7-1	34.7
DD24-2	55.0	PP24-11	26.2	PD21-5	28.8	DP21-1	35.0
DD24-3	81.7	PP23-5	30.6	PD40-1	32.1	DP18-3	39.2
				PD21-1	35.2	DP30-1	42.9
				PD29-1	35.8	DP18-2	48.2
				PD26-3	40.5	DP9-1	50.0
				PD28-4	40.8	DP7-3	60.0
				PD26-2	43.8		
				PD40-6	43.8		
				PD28-1	44.5		
				PD27-2	50.2		
				PD28-3	52.6		
				PD31-10	58.7		
				PD28-5	71.7		
Average	39.2b	Average	16.1a	Average	34.5b	Average	35.4b

行い、その S1 と F1 に *A. tumefaciens* を接種し、抵抗性の検定を行った (表-3)。

'PEKcougel' の自家交雑後代 S1 の平均発病率は 16.1% で、'Dukat' 自家交雑後代 S1 (39.2%) および 'PEKcougel' と 'Dukat' の正逆交雑によって得られた F1 の平均発病率 (34.5% と 35.4%) と比較して有意に低く、'PEKcougel' の病徴発現抵抗性が遺伝する形質であることを推察させた。また、'Dukat' 自家交雑後代 S1 の発病率についても、親品種 'Dukat' の発病率が 86.7% であったのに対して、すべての系統の発病率が親品種より低く、最も低い DD20-1 では 18.8%、最大でも DD24-3 の 81.7% であり、平均発病率は 39.2% であった。また、'PEKcougel' と 'Dukat' の正逆交雑によって得られた F1 個体はいずれも発病率が 'Dukat' より低く、'Dukat' の自家交雑後代 S1 の発病率と比較しても発病率の低いものが多く 'PEKcougel' の自家交雑後代 S1 の発病率に匹敵する個体もみられた。

'PEKcougel' の自家交雑 S1 のうち 5 系統で発病率が 20% 以下と低く、また F1 のなかにも 5 系統の病徴形成抵抗性が強い個体がみられたことから、'PEKcougel' の

病徴形成抵抗性が後代に発現されたと考えた。しかし、S1 および F1 のいずれにおいても発病率は連続的に変化したことから、病徴形成抵抗性は量的形質であると推定でき、'PEKcougel' の抵抗性が複数の遺伝子によって発現している形質であると考えた。

III 'PEKcougel' の病徴形成抵抗性機構の解明

根頭がんしゅ病菌は、植物の負傷細胞が分泌する Acetosyringone をマーカーとして負傷細胞に近づき、植物細胞に付着した後、T-DNA を植物細胞内に組み込む。'PEKcougel' の病徴形成抵抗性の発現機作として、① Acetosyringone 生合成能の欠損、② 植物細胞への付着阻害が考えられる。

1 植物細胞への付着阻害

根頭がんしゅ病に対する病徴形成抵抗性の強い 'PEKcougel' と弱い 'Dukat' を使い、菌を接種して走査型電子顕微鏡で観察した。

菌と植物細胞との間には、菌由来と推定される繊維状構造体と植物細胞由来と推定される顆粒状物質が観察さ

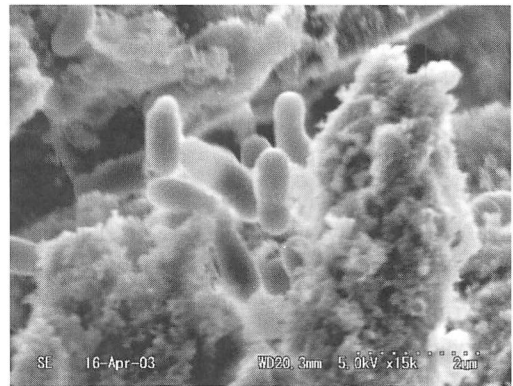
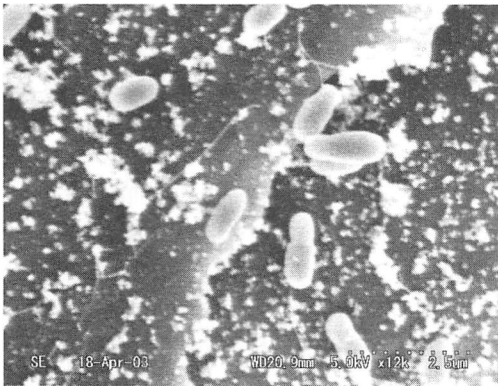
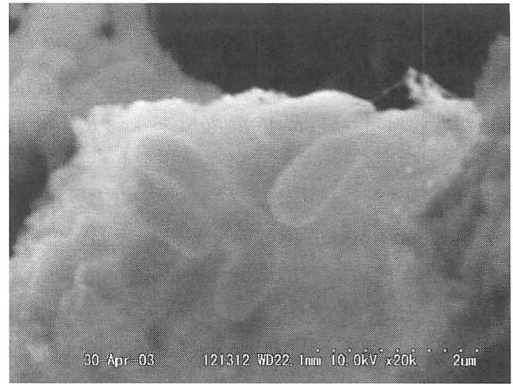
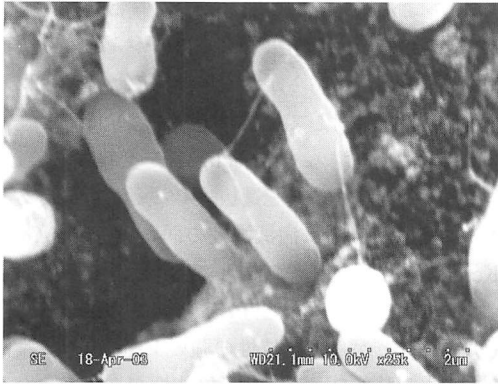


図-3 'Dukat'の接種72時間後

図-4 'PEKcoughel'の接種72時間後

表-4 病徴形成抵抗性の高低と Acetosyringone 誘導体含量との関係

病徴形成抵抗性	強い品種		弱い品種		
	PEKcoughel	Lifirane	Dukat	<i>R. multiflora</i>	<i>R. canina</i>
4-hydroxyacetophenone & vanilline	0.20	0.16	1.46	0.66	2.62
syringic acid	0.06	N.D.	0.03	0.09	0.05
syringaldehyde & p-coumaric acid	0.09	N.D.	1.47	N.D.	N.D.
acetovanillone	0.62	N.D.	0.53	N.D.	2.81
ferulic acid & acetosyringone	N.D.	0.92	N.D.	N.D.	1.51
sinapic acid	N.D.	N.D.	1.14	0.91	N.D.

N.D. : No detected

れた。抵抗性の弱い 'Dukat' の接種 48 時間後では、菌が繊維状構造体を出して集団を形成しているものや植物細胞に付着しているものが観察され、接種 72 時間では (図-3)、植物細胞表面の至る所で菌が繊維状構造体で繋がり合っ て集団を形成し、植物細胞に付着していた。植物細胞への付着は菌が垂直に立った状態で行われており、植物細胞表面と直接接して付着していた。植物細胞由来の顆粒状物質は極めて少なかった。抵抗性の強い 'PEKcoughel' における接種 48 時間後では 'Dukat' と比較

して植物細胞表面に多くの顆粒状物質が存在し、菌から分泌された繊維状構造体と顆粒状物質が繋がっている状態が多く観察された。植物細胞への菌の付着は 'Dukat' のように植物細胞表面に直接付着するものがみられず、菌は顆粒状物質に付着しているものが多く、なかには顆粒状物質で取り囲まれ始めている菌も存在した。接種 72 時間後では (図-4)、さらに顆粒状物質が多くなり、植物細胞の表面を顆粒状物質が覆って菌が植物細胞に付着するのを阻害するものや、顆粒状物質に取り囲まれて

不動化されている菌も観察された。

2 Acetosyringone 生合成能の欠損

病徴形成抵抗性が強い 'PEKcougel' および 'Lifirane' と抵抗性が弱い 'Dukat', *R. multiflora* および *R. canina* を用いて、若葉からリーフディスクを採取し、周辺切口から分泌される水溶性抽出物をクロロホルムで分画したのから Acetosyringone 誘導体を HPLC で同定・定量した。バラの葉からは 4-hydroxyacetophenone, syringic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid), syringaldehyde (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde), acetovanillone (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone), ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid), sinapic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid), vanilline (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), p-coumaric acid (4-hydroxycinnamic acid), acetosyringone (3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone) の 9 種類の Acetosyringone 誘導体が同定された。病徴形成抵抗性が強い 'PEKcougel' および 'Lifirane' と抵抗性が弱い 'Dukat', *R. multiflora* および *R. canina* の Acetosyringone 誘導体含量を比較すると (表-4), 4-hydroxyacetophenone & vanilline は明らかに 'PEKcougel' および 'Lifirane' で低く、同様に syringaldehyde & p-coumaric acid においても 'Dukat' の $1.47 \mu\text{g}$ に対して 'PEKcougel' では $0.09 \mu\text{g}$ と著しく少なかった。また、Acetovanillone および ferulic acid & acetosyringone においても病徴形成抵抗性の弱い品種に対して強い品種の含量が高く、'PEKcougel' および 'Lifirane' では sinapic acid が検出されなかった。

このように病徴形成抵抗性品種の Acetosyringone 誘導体含量は抵抗性が弱い品種の含量と比較して明らかに低く、病徴形成抵抗性品種では Acetosyringone 生合成能が欠損している可能性が推定された。

IV 根頭がんしゅ病抵抗性台木の育成

'PEKcougel' の病徴形成抵抗性の発現機構を調査した結果、菌の植物細胞への付着、Acetosyringone 生合成の欠損のいずれもが関係することが明らかとなり、'PEKcougel' と 'Dukat' との正逆交雑結果から 'PEKcougel' の病徴形成抵抗性が複数の遺伝子に支配されていることを実証できた。

日本国内でバラ台木として使用されているのは *R. multiflora* で、それらのなかからトゲなしなどの形質を中心として 'K1', 'K2', '松島3号' などの系統が選抜さ

れている。これらの *R. multiflora* の系統は、過去の試験結果や本研究での検定結果から、根頭がんしゅ病に抵抗性をもたないことが明らかとなっている。前述のように根頭がんしゅ病に対して抵抗性の弱い 'Dukat' と強い病徴形成抵抗性を有する 'PEKcougel' を交雑することで、その後代から抵抗性系統を選抜することが可能であることから、根頭がんしゅ病抵抗性の弱い *R. multiflora* と 'PEKcougel' とを交雑することで F1 の中に抵抗性を示す個体が現れること、また 'PEKcougel' の自殖後代は抵抗性が強いことから、抵抗性の強い F1 同士の交雑によって抵抗性の形質を固定できる可能性が推定できた。

病徴形成抵抗性の強い 'PEKcougel' と台木特性が高い *R. multiflora* とを交雑を行ううえで問題となる点として、*R. multiflora* が $2n = 2x = 14$ であり、切りバラ品種の 'PEKcougel' が $2n = 4x = 28$ であるため、両者を交雑した場合には次世代の交雑が困難となる。そこで、コルヒチンを用いて *R. multiflora* の 4 倍体化を行った。発芽直後の種子をコルヒチン溶液に浸漬した結果、処理した 2,400 個体のなかから 2 個体の 4 倍性個体を作成することができた。*R. multiflora* は根腐病 (*Pythium helicooids*) に対する抵抗性を有することが明らかとなり、'PEKcougel' との交雑によって根頭がんしゅ病と根腐病の両病害に対する複合抵抗性を有するバラ台木を育成することが可能となるものと考えられる。

現在、'PEKcougel' と 4 倍性 *R. multiflora* の正逆交雑を実施しており、この F1 から栄養繁殖性の複合抵抗性を有するバラ台木品種が選抜されるものと考えられる。また、選抜された F1 品種同士の交雑から、将来的には種子繁殖性のバラ台木品種も育成することが可能になるものと考えられる。

引用文献

- 1) BOELEMA, B. H. (1969) : Neth. J. Pl. Path. 75: 147 ~ 150.
- 2) BRISBANE, P. G. and A. KERR (1983) : J. Appl. Bacteriol. 54: 425 ~ 431.
- 3) BROWN, N. A. (1923) : Phytopathology 13: 87 ~ 99.
- 4) HAAS, J. H. et al. (1995) : Appl. Environ. Microbiol. 61: 2879 ~ 2884.
- 5) MOORE, L. W. (1979) : Ann. Rev. Phytopathol. 17: 163 ~ 179.
- 6) NEW, P. B. and A. KERR (1972) : J. Appl. Bacteriol. 35: 279 ~ 287.
- 7) 西山幸司 (1978) : 植物防疫 32: 283 ~ 288.
- 8) 農商務省農務局 (1923) : 病菌害虫彙報 9: 1 ~ 18.
- 9) 太田光輝 (1993) : 静岡県農業試験場, 特別報告 16: 1 ~ 63.
- 10) REYNDERS-ALOISI, S. et al. (1998) : HortScience 33: 296 ~ 297.
- 11) SACHADYN, P. and J. KUR (1997) : Acta. Microbiol. Pol. 46: 145 ~ 156.
- 12) SAWADA, H. et al. (1995) : Appl. Environ. Microbiol. 61: 828 ~ 831.