

特集：青枯病

細胞融合によるナス台木の青枯病抵抗性育種

岡山県農業総合センター た
田
むかい
向 むら
村
はら
原 なお
尚
たか
隆 ゆき
之
ふみ
文
岡山県生物科学総合研究所

はじめに

グラム陰性の土壌細菌 *Ralstonia solanacearum* (以下青枯病菌) は、タバコ、ナスやトマトなど多くの栽培植物に加害し、重大な被害を引き起こす青枯病の原因細菌である (HAYWARD, 1991)。青枯病菌が植物へ感染する際には、*hrp* クラスター遺伝子群 (VAN GIJSEGEN et al., 1995), 推定エフェクター遺伝子 (SALANOUBAT et al., 2002; CUNNAC et al., 2004; MUKAIHARA et al., 2004; TAMURA et al., 2005), あるいは菌体外多糖類や病原性関連酵素の遺伝子 (KAO et al., 1992; SCHELL, 2000) などが植物の防御応答の抑制や通導組織の閉塞に関わっていると考えられている。しかし、この植物病原菌の被害を防ぐ決定的な方法はまだ明らかになっておらず、その確立が急がれるところである。

一方、青枯病菌に対する抵抗性遺伝子を栽培品種に導入することは、被害回避の最も効果的な方法である。しかし、タバコやトマトではポリゾーン支配による抵抗性 (MANGIN et al., 1999; NISHI et al., 2003) が明らかになっているものの、実用品種の作出には至っていない。ナス属植物でも本病原菌に対して抵抗性を示す近縁野生種が存在し、これら抵抗性形質を導入した抵抗性品種の育成が望まれるが、強い他花不和合性により従来の交配育種では導入困難である。

岡山県では、1965年ごろから県南地域を中心にナス栽培が始まった。果実単価の高い秋から春を中心にビニールハウスなどで連続的に収穫されており、年間約10万トン程度が生産されている。青枯病の発生を抑制するため、土壤消毒などの耕種の防除が行われているが、耕作土壌中から病原菌を完全に除去することはできず、毎年被害が報告されている。また、青枯病抵抗性台木は有効な対策として導入されているものの、同一品種を連続使用すると新たな病原菌が出現して、その抵抗性が崩壊している (DATE and NASU, 2004)。

筆者らは、青枯病抵抗性形質が近縁野生種に存在するものの、ナス属植物が交配困難であることから、細胞融合により青枯病抵抗性の新規ナス台木品種を作成しようと考えた。試行錯誤の結果、既存のナス台木品種ヒラナスと青枯病耐性のナス近縁野生種を細胞融合させた27-14系統を育成した (TAMURA et al., 2002)。27-14系統は、両親植物の形態の特徴をあわせもち、既存の台木品種より高い青枯病耐性を有していることが明らかになった。しかしながら、この耐性形質は環境条件により変化することも明らかになった。本稿では27-14系統の育成経過、台木特性、および青枯病耐性について報告するとともに、細胞融合の有効性や問題点について考察する。

I 体細胞雑種植物体の育成

細胞融合とは、文字どおり二つの細胞を融合させて一つの細胞にすることである。一見単純そうではあるが、2種類の植物体の組織に細胞壁分解酵素を処理して裸の細胞 (プロトプラスト) を作成する。この際、分裂活性の高い細胞を得る必要がある。この細胞に電気的な刺激 (パルス) を与えて細胞を融合させる。融合処理した細胞は、培養して未分化の細胞塊 (カルス) を経由して植物体へ再分化させる。しかしカルスの多くは、融合していない親植物細胞由来の再生植物である。このため得られた植物体の形態観察、染色体数、および遺伝子解析を行い、両親植物の細胞が融合した個体の選抜が必要である。また、一連の操作の中で、プロトプラスト作成から再分化植物の作成には、それぞれの植物種や組み合わせに応じた至適条件が必要であり、必ずしも効率よく再分化個体が得られるわけではない。さらに再分化しても形態異常を示す、あるいは花粉稔性がないために後代が得られないなどの実用化に問題がある場合が多い (GLEDDIE et al., 1986; GURI and SINK, 1988)。

我々は、ナス台木品種ヒラナス (*Solanum integrifolium*) でプロトプラスト単離と培養条件を至適化し、この条件で数種類のナス台木品種と近縁野生種のプロトプラストを組み合わせる細胞融合処理し、再分化個体の作成を試みた。多くの組み合わせでは、植物体が再生しない、あるいは再生植物体が奇形で実用的ではないなど

Development of a Somatic Hybrid in Eggplant Rootstock That Resistant to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*.

By Naoyuki TAMURA and Takahumi MUKAIHARA

(キーワード：細胞融合、青枯病菌、ヒラナス、ナス近縁野生種)

の不具合が生じたが、南米産野生ナスの *S. violaceum* (以下ビオラセウム) との融合組み合わせでは、比較的 normally 生育することが明らかになった (図-1)。そこで我々はこの組み合わせに着目して、細胞融合処理由来のカルスから約 300 個体の再分化植物体を作成した。得られた植物体を試験管内で観察したものの、ヒラナスを単独で培養した植物体と違いがなかったため、これら植物体の葉からそれぞれゲノム DNA を抽出して、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法により雑種個

体の選抜を行った。その結果、3 個体が両親植物で特異的に増幅されるバンドをあわせもっており、細胞融合個体であることが強く示唆された。このうちの 2 系統 (27-14 および 29-20 系統) については、屋外で生育する植物体が得られたので rDNA をプローブとして RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism patterns) により雑種性を確認したところ、両系統は両親植物特有のバンドパターンをあわせもっており、遺伝子レベルで雑種であることが明らかになった (図-2)。

II 体細胞雑種植物の形態観察

形態的な特徴を確認するため、両雑種植物をガラス室内で育成して両親植物体と比較した。27-14 系統では、莖全体に暗赤色の色素沈着が観察され、ヒラナスの特徴と一致していた。本葉の全体的な形状はビオラセウムに類似しており、葉の“切れ込み”は、ヒラナス様であった。花はビオラセウムと同様なサイズであったが、花弁はやや肉厚で広く、中間的な色調の淡紫色であった。花粉粒は親植物のものよりもやや大きく、また、正常な花粉管の伸長が観察された。果実はビオラセウムより大きく、ヒラナスの果実表面に見られる溝が観察された。また、採取された種子はヒラナスよりもやや大きいサイズで (図-3)、ヒラナス種子と同様に発芽したので、種子繁殖可能であると判断された。根端組織の染色体数は、

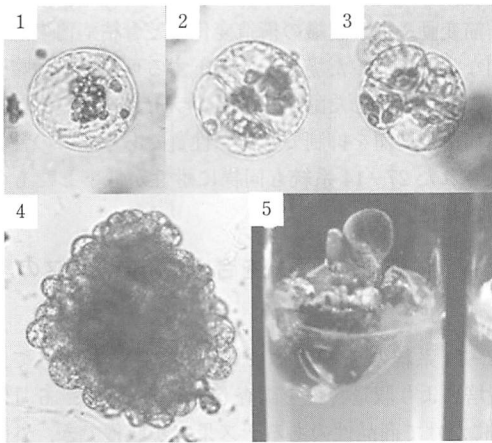


図-1 ナスプロトプラストの培養と植物体再生
1: プロトプラスト単離直後, 2: 2分裂期, 3: 4分裂期, 4: マイクロカルス, 5: カルスからの植物体再生.

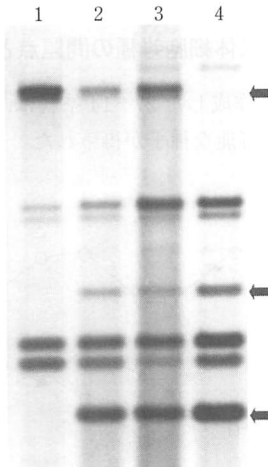


図-2 RFLP による細胞融合個体の識別
1: ヒラナス, 2: 29-20, 3: 27-14, 4: ビオラセウムの全 DNA を制限酵素で消化後に電気泳動し、rDNA をプローブとして多型を検出した。矢印は両親植物に特異的なバンドを示す。

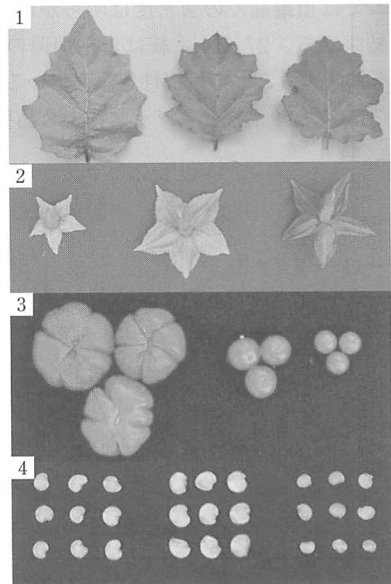


図-3 細胞融合植物 27-14 系統の形態
1: 本葉, 2: 花, 3: 果実, 4: 種子を示した。いずれも左: ヒラナス, 中央: 27-14, 右: ビオラセウム。

両親植物体の染色体数を合わせた48本であった。以上の結果から、27-14系統は形態的、細胞学的に両親植物の形態をあわせもち、種子繁殖が可能な細胞融合植物体であることが明らかになった。

一方29-20系統では、生育するものの肉厚で本葉が多く観察された。果実は結実するものの、種子は形成されなかった。27-14系統と同様に染色体数の観察を行ったが、根端組織が褐変するなど正常組織とは異なっており、分裂中期像を確認することはできなかった。これらのことから、29-20系統は、体細胞雑種植物体であるものの、何らかの理由により正常に生育しない個体であると推測された。

Ⅲ 27-14系統の青枯病耐性

青枯病耐性を明らかにするために、岡山県内のナス産地より分離した青枯病菌由来の菌株を27-14系統のポット植え植物に接種して、その耐病性を評価した。接種後、両親植物および27-14系統ともに接種後8日目ごろから葉の萎凋や黄化症状が観察され、徐々に進行していた。ヒラナスでは20日目までにすべての植物体が枯死したのに対して、27-14系統は調査した20日目まで枯死する個体はなかった(図-4)。また、植物体の地際部分の組織と頂端部の組織をそれぞれ回収して菌数を測定したところ、ヒラナスでは地際および頂端部ともに高密度の菌が存在していたのに対して、27-14系統とピオラセウムでは頂端部での菌密度は明らかに低かった。これらの結果から、27-14系統は青枯病菌の通導組織での移行を抑制することで耐病性を示していると推測された。さらに27-14系統とヒラナスにナス品種‘千両二

号’をそれぞれ接木して、同様の接種試験を行ったところ、27-14系統は、罹病性のヒラナスを台木とした植物体と比較して萎凋症状の進行が軽減されていた。

27-14系統後代の耐病性やその安定性を明らかにするため、得られていた種子を定期的に播種し、得られたS₁植物に青枯病菌を接種した。接種後20日目の病徴評価は、おおむねヒラナスより高い青枯病耐性を示していた。しかし1年間接種試験を継続したところ、特に6月から7月ごろに耐病性が低下することが明らかになった(図-5)。この結果から27-14系統の青枯病耐性は、後代に遺伝しているのは明らかであったが、日長や日射量の季節変動や通導組織の構造変化など青枯病菌の感染に有利な状況になった場合には低下する可能性が示唆された。これは供試した耐病性のピオラセウムが、完全には青枯病菌の増殖を抑制できない性質であり、この性質が導入された27-14系統も同様に耐性が低下したものと推測された。

Ⅳ 体細胞雑種系統を台木に用いたナスの収量および品質

27-14系統のS₁植物体に‘千両二号’を接木して、圃場栽培により収量特性を調査した。その結果、6月から9月にかけて商品性のあるナス果実が収穫でき、外観形質、収穫量、収穫時期および食味は、ヒラナスを台木として収穫されたナスとの間に違いはなかった。これらのことから、27-14系統を台木としてナス栽培を行っても台木品種ヒラナスと同等の収量、品質を確保できると考えられた。

Ⅴ ナス体細胞雑種の問題点と利用

本研究により作成した27-14系統は、親植物と同等に生育して発芽可能な種子が得られた。一部の時期を除

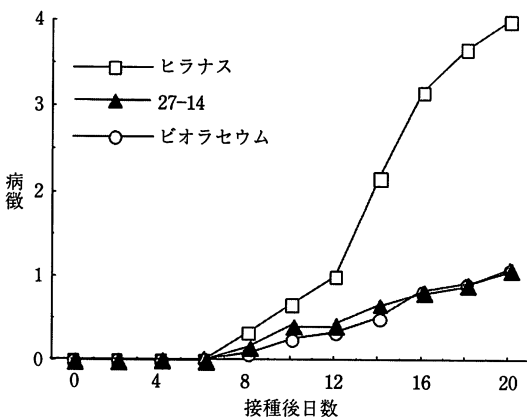


図-4 青枯病菌接種による27-14系統の病徴変化
病徴観察により、0：無病徴～4：枯死の5段階で評価した。

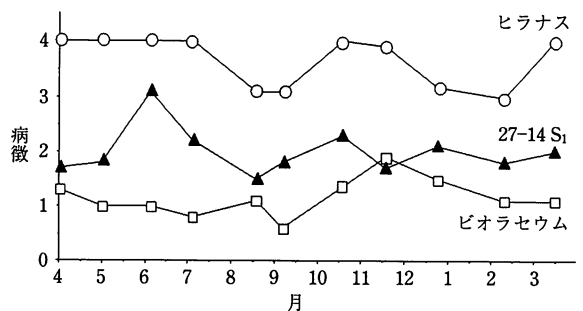


図-5 27-14 S₁個体における青枯病耐性の月次変化
青枯病菌接種20日後の各植物体を、病徴観察により、0：無病徴～4：枯死の5段階で評価した。

き優れた青枯病耐性を示した。また、食用品種を接木して栽培しても既存台木品種と同様の品質、収量性が確保できた。これらの結果から、青枯病抵抗性の不安定さを除けば、27-14系統は実用化可能な育種素材として見込まれた。

27-14系統は青枯病抵抗性の不安定さから台木品種として登録されなかったものの、ナスや近縁野生種を用いた細胞融合により作成された植物で食用品種として登録できた例もある。Asao et al. は、従来の交配では種子が得られにくく、繁殖が困難であった青枯病抵抗性の近縁野生種とナス食用品種を細胞融合することで実用的な品種を育成した (Asao et al., 1994)。また、Iwamoto et al. も台木品種と野生種の組み合わせで、青枯病抵抗性品種の作成に成功している (Iwamoto et al., 2007)。しかし好ましいことばかりではない。自殖を繰り返すと発芽の低下・不揃いなどが観察され、抵抗性が低下した植物体が少数ながら混在する。また、染色体の形態的な変化やRAPDのバンドパターンが変化することが観察される (田村, 私信)。27-14系統でもS₂植物体の一部には、葉の形状が異なる個体が含まれるようになる。これらのことから、正常に生育する細胞融合植物であっても遺伝子レベルではバランスを欠いており、形質が安定しにくいものかもしれない。これらを克服するには、親植物との戻し交配や形質の安定する自殖後代の選抜が必要となると考えられる。また、複2倍体である細胞融合植物を薬培養で2倍体に戻し、遺伝形質の安定化を図るのも有効であると考えられる。最近、稔性を有する体細胞雑種個体の薬を培養して再分化させ、得られた2倍体植物の中から、実用的な *Fusarium oxysporum* 抵抗性系統の選抜に成功したことが報告されている (Rizza et al., 2002)。

おわりに

細胞融合は、いかなる植物の組み合わせでも可能で、思いどおりの新規生物を作成できる技術であるかのようなイメージがある。しかし実際は、プロトプラストの調整、再分化条件の最適化、融合植物の選抜等の技術的な制約も多い。また、種の距離が遠くなればなるほど再分化植物体を得ることは困難となり、有用品種の育成にまでたどり着いた例は非常に少ない。しかしナス属植物のように類縁関係が近いにもかかわらず交雑親和性が低い組み合わせや、青枯病抵抗性のように近縁種にその抵抗性形質が存在するにもかかわらず遺伝子自身が不明な場合には、細胞融合は有効なツールとなる。細胞融合を既存の育種手法に加えることで、これまで作成し得なかった青枯病抵抗性品種が作成され、青枯病がナスの重要病害ではなくなる日が来ることを強く望んでいる。

引用文献

- 1) ASAO, H. et al. (1994): *Breeding Science* 44: 301 ~ 305.
- 2) CUNNAC, S. et al. (2004): *Mol. Microbiol.* 53: 115 ~ 128.
- 3) DATE, H. and H. NASU (2004): *Bull. Agric. Exp. Stat. Okayama* 22: 35 ~ 42.
- 4) VAN GUSEGEM, F. et al. (1995): *Mol. Microbiol.* 15: 1095 ~ 1114.
- 5) GLEDDIE, S. et al. (1986): *Theor. Appl. Genet.* 71: 613 ~ 621.
- 6) GURI, A. and K. C. SINK (1988): *Theor. Appl. Genet.* 76: 490 ~ 496.
- 7) HAYWARD, H. C. (1991): *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65 ~ 87.
- 8) IWAMOTO, Y. et al. (2007): *Plant Biotechnology* 24: 179 ~ 184.
- 9) KAO, C. C. et al. (1992): *J. Bacteriol.* 174: 1068 ~ 1071.
- 10) MANGIN, B. et al. (1999): *Genetics* 151: 1165 ~ 1172.
- 11) MUKAIHARA, T. et al. (2004): *Mol. Microbiol.* 54: 863 ~ 875.
- 12) NISHI, T. et al. (2003): *Theor. Appl. Genet.* 106: 765 ~ 770.
- 13) RIZZA, F. (2002): *Plant Cell Rep.* 20: 1022 ~ 1032.
- 14) SALANOUBAT, M. et al. (2002): *Nature* 415: 497 ~ 502.
- 15) SCHELL, M. A. (2000): *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 263 ~ 292.
- 16) TAMURA, N. et al. (2002): *Plant Cell Rep.* 21: 353 ~ 356.
- 17) ——— et al. (2005): *Microbiology* 151: 2873 ~ 2884.

(新しく登録された農薬4ページからの続き)

おうとう：ハダニ類：収穫前日まで
なし：ハダニ類：収穫前日まで
茶：カンザワハダニ：摘採7日前まで

「殺虫殺菌剤」

- ジノテフラン・メトミノストロピン粒剤
- 22071：イモチエーススタークル1キログラム粒剤 (三井化学) 07/12/12
- 22072：ホクコーイモチエーススタークル1キログラム粒剤 (北興化学工業) 07/12/12
- ジノテフラン：5.0%，メトミノストロピン：10.0%
- 稲：いもち病、カメムシ類：収穫35日前まで
- ジノテフラン・チアジニル粒剤
- 22073：日農ブイゲットスタークル粒剤 (日本農薬) 07/12/12
- 22074：ブイゲットスタークル粒剤 (三井化学) 07/12/12

ジノテフラン：2.0%，チアジニル：12.0%

稲 (箱育苗)：いもち病、イネミズゾウムシ、イネドロオウムシ、ウンカ類、ツマグロヨコバイ、フタオビコヤガ、イネクロカメムシ：移植3日前～移植当日

- エチプロール・メトミノストロピン粒剤
- 22078：イモチエースクラップ粒剤 (バイエルクロップサイエンス) 07/12/26
- エチプロール：2.0%，メトミノストロピン：4.0%
- 稲：いもち病、穂枯れ (ごま葉枯病菌)、ウンカ類、カメムシ類：収穫35日前まで

「殺菌剤」

- メトコナゾール乳剤
- 22085：ホクコーワークアップS乳剤 (北興化学工業) 07/12/26

(17ページに続く)