

ナス青枯病に対する台木の抵抗性検定法としての 茎切断接種法の評価

岸本 直樹・谷名 光治・伊達 寛敬

The Evaluation of Stem-cutting Inoculation Method for Screening
of Resistant Rootstocks of Eggplant to Bacterial Wilt

Naoki Kishimoto, Koji Tanina and Hiroataka Date

緒 言

ナス青枯病は土壌伝染性の細菌病であり、時としてナスの栽培農家に甚大な被害を与える重要病害である。その対策として、青枯病抵抗性台木を利用することは極めて有効な手段であり（伊達, 1996）、青枯病に対する抵抗性はナス台木にとって重要な形質の一つである。これまで、岡山農試ではナス台木の青枯病抵抗性の検定方法として、青枯病汚染圃場に定植する検定法（以下、汚染圃場定植法）（伊達ら, 2004）や幼植物を用いた断根灌注接種法（尾崎・木村, 1989）などを用いてきた。しかし、これらの方法では胚培養で交配した個体を選抜にかける場合など、多くの系統を迅速かつ簡便に検定することは困難であり、それらより簡便な方法として地上部へ接種する方法が考えられる。トマトではその有用性が示唆されている（伊達, 2006）が、ナスでは検定法として適切でないとの意見（堀田・土屋, 2002）があるものの詳細な報告は見られない。

今回、青枯病汚染圃場で安定して抵抗性を示しているナス台木品種の‘台太郎’に、青枯病菌（Ⅲ群菌, IV群菌）を茎切断接種すると、従来の接種法（汚染圃場定植法, 断根灌注接種法）より発病株率が高まる現象を確認したので、今後ナス青枯病抵抗性品種を育成する場合の参考に資するため、ここに報告する。

本試験を実施するに当たりご協力を賜った岡山県農業総合センター農業試験場病虫研究室川口章氏に厚くお礼申し上げる。

材料および方法

試験1. 汚染圃場での台木の発病

(1) 供試台木および順化苗の準備

ナス青枯病抵抗性台木のヒラナス (*Solanum integrifolium*)、‘トレロ’ (*S. torvum*) および ‘台太郎’ (*S. melongena*) を供試した。各々単一種子由来の組織培養クローン個体苗をバーミキュライト単用の6cm ポリポットに鉢上げし、ミスト下で21~31日間順化した。上記苗を育苗土をつめた6cm ポリポットに植え替え、ガラス室（天窓35℃開, 加温20℃設定）で1か月間栽培した。

(2) 供試菌株

ナス青枯病菌として、岡山県内産地の罹病ナスから分離し、西山の凍結法（西山, 1977）に従い岡山農試で保存している ‘OE1-1’（Ⅲ群菌；伊達, 1996）、‘30-2’（IV群菌；伊達ら, 2004）および ‘19’（菌群不詳；伊達ら, 2004）を供試した。

(3) 接種源の調製および汚染圃場の作製

凍結保存している青枯病菌を融解後、1白金耳取り、選択培地（原・小野, 1983）に塗抹して30℃, 48時間培養し、増殖した流動性の単コロニーを釣菌して供試した。釣菌した青枯病菌はジャガイモ半合成培地（脇本, 1965）の斜面培地で30℃, 48時間培養し、増殖したコロニーを滅菌水に懸濁して、菌株ごとに約 10^8 個/mlになるように菌液を調製した。菌液の調製は接種当日に行い、1菌株当たり約50ml用意した。

岡山農試場内の青枯病汚染圃場（雨除けビニルハウス）にトマト ‘桃太郎’ を定植し、1か月後に青枯病菌

液に浸漬したハサミで茎上部を切断して接種した。接種は、圃場全体に3菌株が偏りなく広がるように、トマトの株数の1/3ずつに行った。接種1か月後に全株の萎凋を確認し、耕耘機で株を土中にすき込んだ。

試験を行った5年間を通して同じ圃場を使用し、トマトへの接種およびすき込みは試験前に毎回行った。なお、2006年は接種前にトマトが全株萎凋したため、接種を行わずにすき込みのみを行った。

(4) 接種法および調査

準備した順化苗をトマトのすき込み2～9日後の汚染圃場へ定植した。なお、2004年の2回目の試験は、1回目の試験終了後、試験株の残渣をすき込んで立て直した畝で実施した。定植本数は2004年は1区10本1反復、2006年と2008年は1区10本2反復とした。定植後はビニルハウス内の気温を概ね30～40℃に保つように換気を行った。なお、断根等の人為的感染助長作業は行わず、地上部からの感染が生じないように管理した。

発病株の調査は定植約2か月後に行った。供試植物の茎を地際付近で切断し、切断部から上方向へ10cm程度皮層を剥離し、肉眼で維管束部に褐変の見られた株を発病株とした。

試験2: 接種法がⅣ群菌による台木の発病に及ぼす影響

(1) 供試台木および供試苗の準備

ヒラナス、‘トレロ’および‘台太郎’を供試した。各々単一種子由来の組織培養クローン個体苗をパーミキュライト単用の6cmポリポットに鉢上げし、ミスト下で21～31日間順化した。同時に実生苗として、‘トレロ’は播種28日後、ヒラナスと‘台太郎’は播種14日後の苗を準備した。

茎切断接種法では上記苗をパーライトをつめたシードリングケース(60×155×100mm)に2本当て定植し、適宜液肥を施用し、ガラス室(天窓35℃開、加温20℃設定)で80～82日間栽培した。

断根灌注接種法および汚染圃場定植法では上記苗を育苗土をつめた6cmポリポットに植え替え、ガラス室(天窓35℃開、加温20℃設定)で断根灌注接種法は23日間、汚染圃場定植法は1か月間栽培した。

(2) 供試菌株

ナス青枯病菌として、‘OE1-1’(Ⅲ群菌)‘30-2’(Ⅳ群菌)および‘19’(菌群不詳)を供試した。

(3) 接種源の調製および汚染圃場の作製

茎切断接種法には‘30-2’のみを用い、試験1と同様に菌液を調製した。菌液の調製は接種当日に行い、1菌株当たり約50ml用意した。

断根灌注接種法には‘30-2’のみを用い、試験1に準じて斜面培地で増殖させたコロニーを1白金耳取り、ジャガイモ半合成培地の液体培地20mlに攪拌し、30℃、2日間培養したものを100倍希釈し、菌液を1,300ml用意した。

汚染圃場の作製には3菌株(‘OE1-1’‘30-2’‘19’)を用い、試験1と同様に行った。

(4) 接種法および調査

1) 茎切断接種法

青枯病菌の接種は、接種源に浸漬したハサミで供試植物の茎を高さ5～10cmで切断して行った。1試験区につき供試植物10本を供試した。ハサミは供試植物を1個体切断する毎に菌液に浸漬し、接種した供試植物は引き続きガラス室で管理した。

発病株の調査は接種2か月後に行い、切断接種下部の腋芽から側枝の伸長が見られない株およびすべての側枝が萎凋した株を発病株とし、発病株率を求めた。

2) 断根灌注接種法

青枯病菌の接種は、ポットの表土の2か所からハサミを開いて挿し込み、土中で根を切断するように刃を閉じて引き上げ、菌液を1株当たり20ml流し込んだ。1試験区につき供試植物10本を供試し、接種した供試植物は引き続きガラス室で管理した。

発病株の調査は接種約2か月後に試験1と同様に行った。

3) 汚染圃場定植法

準備した苗をトマトのすき込み9日後の汚染圃場へ1区10本1反復定植し、2回目の試験は1回目の試験とは異なる畝に定植した。定植後の管理および発病株の調査は試験1と同様に行った。

試験3. 茎切断接種法での‘台太郎’のⅢ群菌・Ⅳ群菌による発病

‘トレロ’および‘台太郎’を供試し、試験2の茎切断接種法と同様に順化苗を準備した。

ナス青枯病菌として、‘OE1-1’(Ⅲ群菌)‘30-2’(Ⅳ群菌)および‘19’(菌群不詳)を供試し、試験1と同様に菌液を調製した。

接種および調査は試験2の茎切断接種法と同様に行った。

結 果

試験1. 汚染圃場での台木の発病

‘OE1-1’(Ⅲ群菌)‘30-2’(Ⅳ群菌)および‘19’(菌群不明)の3菌株が混在する汚染圃場へ台木を7～8月に

定植し、発病株率を調査した。その結果、4回の試験で発病株率はヒラナスで80~90%、‘トレロ’で75~100%といずれも高く、‘台太郎’は5~10%と低かった(表1)。なお、調査時に萎凋が見られた株の維管束部にはすべて褐変が認められた。

試験2. 接種法がIV群菌による台木の発病に及ぼす影響

ヒラナス、‘トレロ’および‘台太郎’に対して、断根灌注接種法、茎切断接種法および汚染圃場定植法の3種の接種法で青枯病菌(‘30-2’:IV群菌)を接種し、発病株率を調査した(表2)。ヒラナスの汚染圃場定植法での発病株率は90%と高く、茎切断接種法での発病株率も90~100%と高かった。しかし、断根灌注接種法での発病株率は実生苗で60%とやや高い場合もあったが、その

他は10%と低かった。‘トレロ’の汚染圃場定植法での発病株率は80~90%と高く、茎切断接種法での発病株率も100%と高かった。しかし、断根灌注接種法での発病株率は50~100%と不安定であった。‘台太郎’の汚染圃場定植法での発病株率は0~30%と低く、断根灌注接種法での発病株率も0%と低かった。しかし、茎切断接種法での発病株率は50~80%と高かった。

培養苗と実生苗の発病株率の比較では、7月13日断根灌注接種法のヒラナスの発病株率が実生苗(60%)より培養苗(10%)が低かったが、それ以外では大きな差は認められなかった(表2)。

表1 汚染圃場でのナス用台木の発病株率

汚染用菌株	定植日	青枯病発病株率 ² (%)		
		ヒラナス [*]	トレロ [*]	台太郎 [*]
3種 ^y	2004. 7. 9	90	100	10
3種	2004. 8. 10	90	100	10
(なし)	2006. 8. 17	80	75	5
3種	2008. 7. 16	90	95	5

² 定植2か月後に維管束部の褐変が見られた株

^y ‘OE1-1’(Ⅲ群菌)、『30-2’(IV群菌)及び‘19’(菌群不明)をそれぞれトマト株に接種し、発病したトマト株を台木の定植前に土中にすき込んだ。

^{*} 供試材料は培養苗を用いた。

表2 接種法及び供試材料の比較(2005年)

品種	接種日 または 定植日	供試材料	各接種法での青枯病発病株率(%)		
			断根接種 ^z	茎切断接種 ^z	汚染圃場 ^y
ヒラナス	7月13日	培養苗	10 ^x	100 ^w	90 ^x
		実生苗	60	100	90
	8月9日	培養苗	10	90	90
		実生苗	10	100	90
トレロ	7月13日	培養苗	70	100	90
		実生苗	100	100	90
	8月9日	培養苗	50	100	90
		実生苗	80	100	80
台太郎	7月13日	培養苗	0	80	0
		実生苗	0	80	30
	8月9日	培養苗	0	60	10
		実生苗	0	50	30

^z 上記日に‘30-2’(IV群菌)を接種した。

^y 上記日に‘OE1-1’(Ⅲ群菌)、『30-2’(IV群菌)及び‘19’(菌群不明)の3菌株混合汚染圃場に定植した。

^x 定植2か月後に維管束部の褐変が見られた株

^w 接種2か月後に側枝の伸長が見られなかった株とすべての側枝が萎凋した株

試験3. 茎切断接種法での‘台太郎’のⅢ群菌・Ⅳ群菌による発病

‘OE1-1’ (Ⅲ群菌), ‘30-2’ (Ⅳ群菌) および ‘19’ (菌群不明) の3菌株を‘台太郎’および‘トレロ’に茎切断接種し、発病株率を調査した。‘台太郎’の発病株率は、‘30-2’ (Ⅳ群菌) の2004年6月および2005年8月の接種 (発病株率40, 60%) を除き、80~100%と高かった。一方、‘トレロ’の発病株率は‘OE1-1’ (Ⅲ群菌) および ‘19’ (菌群不明) の接種で40%以下と低く、‘30-2’ (Ⅳ群菌) の接種では90%以上と高かった (表3)。

考 察

青枯病に対する抵抗性の検定法を評価する場合、いかに自然感染による発病様相を再現しているかが重要である。青枯病菌は主として根の傷口から植物体内に侵入するとされている。そのため、本病原細菌の人工接種には根部付傷接種が多く利用され、接種時の環境条件についても検討が加えられて抵抗性の検定が行われてきた (尾崎・木村, 1989)。

これまで岡山県内のナス産地では、ヒラナスまたは‘トレロ’を台木として使用すると青枯病が多発する圃場には、‘台太郎’を導入することで被害を抑制してきた。これを再現する目的で青枯病菌のⅢ群菌、Ⅳ群菌が混在した人工汚染圃場に台木を定植して発病株率を比較してみると、これらの菌群に対して抵抗性を持たないヒラナスおよび‘トレロ’の発病株率は高かったのに対し、‘台太郎’は抵抗性を示し、生産現場における発病状況をよく反映していた。しかしながら、汚染圃場定植法は、多くの台木系統および青枯病菌菌群に対する検定を効率的に行うことが困難である。

一方、尾崎・木村 (1989) の断根灌注接種法は、汚染

圃場定植法よりも格段に効率的で、病原細菌の病原性の分化の判定に必要な質的抵抗性以外に量的抵抗性の強弱および菌株に対する特異的な反応の判定が可能とされている。このため、岡山農試でも青枯病の抵抗性検定に断根灌注接種法を用いてきた (伊達ら, 2004) が、断根灌注接種法は接種に多くの労力を要する欠点が指摘されている (尾崎・木村, 1989)。優良な抵抗性品種育成のためには、できるだけ多くの素材から選抜することが必要であり、これまで以上に多くの検定を行うために、断根灌注接種法よりもさらに省力的な検定法として茎切断接種法を検討した。

汚染圃場定植法、断根灌注接種法および茎切断接種法を比較するためⅣ群菌に対する発病株率をみると、汚染圃場定植法で発病株率の高かったヒラナスおよび‘トレロ’の茎切断接種法の発病株率は、断根灌注接種法と比較して同等以上に高かった。一方、汚染圃場定植法で抵抗性を示した‘台太郎’は、断根灌注接種法では抵抗性を示したものの、茎切断接種法では発病株率が高く、汚染圃場に定植した結果と一致しなかった。

供試菌群を拡げて再検討したところ、‘トレロ’では茎切断接種法と汚染圃場定植法の結果は一致し、従来の知見どおりⅢ群菌接種では発病株率が低かったが、‘台太郎’では汚染圃場定植法と大きく異なり、Ⅲ群菌および菌群不明菌に対して発病株率が高く抵抗性が認められなかった。

以上のことから、茎切断接種法による検定結果は、接種菌群 (Ⅲ, Ⅳおよび菌群不明菌) に対して抵抗性を持たないヒラナスおよび‘トレロ’では自然発病条件下での抵抗性をよく再現したが、‘台太郎’では自然発病条件下における抵抗性と明らかに異なった。このため、各菌群に対して最も高い抵抗性を示す‘台太郎’を対照として、抵抗性台木を選抜するための検定法は、これまで通り断根灌注接種法または汚染圃場定植法が望ましいと考えられた。

これまで行われてきた青枯病抵抗性検定法に関する研究の多くは、トマト青枯病やタバコ立枯病についてであり、ナスでは少ない。鈴木ら (1964) は、数種の人工接種法に関する試験の結果、ナスおよびトマトの耐病性検定の標準的方法として、一定の汚染圃場に被験植物を定植して行う圃場接種法を採用している。宇梶ら (1975) は、パーライトで養液育苗した5葉期のナスに対して立毛のまま断根し、細菌懸濁液を灌注接種するナス青枯病抵抗性の簡便な幼苗検定法を考案し、その結果を包括するナスの青枯病抵抗性・早期検定技術についての研究成果が取りまとめられている (農林水産技術会議, 1976)。

表3 茎切断接種での台太郎及びトレロの発病株率

接種菌株 (菌群)	接種日	青枯病発病株率 ² (%)	
		台太郎 ³	トレロ ³
OE1-1 (Ⅲ群菌)	2004. 4. 23	80	0
	2004. 7. 26	90	40
	2004. 11. 1	90	0
30-2 (Ⅳ群菌)	2004. 4. 12	90	90
	2004. 6. 24	40	90
	2005. 8. 17	60	100
19 (菌群不明)	2004. 3. 9	80	0
	2004. 10. 5	100	20

² 接種2か月後に側枝の伸長が見られなかった株とすべての側枝が萎凋した株

³ 供試材料は培養苗を用いた。

その中では、抵抗性品種育成のための検定方法として根部浸漬灌注接種、茎部維管束付傷接種および断根灌注接種を比較し、総合的に断根灌注接種がよいとしているが、茎維管束付傷接種について、接種と移植を同時に行ったために接種に手間がかかりすぎる難点を指摘しているものの否定はしていない。尾崎ら（1989）は、ナス属植物の青枯病抵抗性検定法として断根灌注接種法を確立し、地上部からの接種方法については、その後検討されていない。

トマトでは、植物体内での青枯病菌の移行、増殖の抑制が抵抗性に関連し（中保，1994）、茎接種した台木でも断根接種と同様の抵抗性機構が働いているとされ（中保，1995）、伊達（2006）は、トマト台木の簡便な青枯病抵抗性検定法として、地上部へ接種する方法が有効としている。ナスでは、中曾根（2009）が、ナス青枯病抵抗性台木を利用した栽培で、発病した青枯病菌の‘トレロ’に対する病原性を確認するために、地上部からの接種を採用している。本試験の結果では、‘トレロ’に対するⅢ、Ⅳ群菌の地上部接種は、汚染圃場定植法の結果とよく一致したが、根圏からのⅣ群菌の感染に抵抗性を示す台太郎は、地上部に直接Ⅳ群菌を接種すると抵抗性が発揮されなかったことから、ナスにおける抵抗性発現の機構については、トマトの場合と異なる可能性が示唆された。これまで、詳細なデータは示されていないものの青枯病抵抗性品種でも地上部感染で発病することがトマトおよびナスで報告されており（Winsteadら，1952；鈴木ら，1989）、本試験の‘台太郎’における結果はこの報告と一致する。

今回、汚染圃場への定植試験に供した圃場は、Ⅲ群菌、Ⅳ群菌および菌群不明菌の3菌株が混在しているが、複数の菌株を混合接種した場合、病原性の強い菌株を接種した場合の発病株率に近い数値が得られるとされており（鈴木ら，1964）、著者らの試験でもその報告と矛盾しなかった。また、今回の試験で断根灌注接種法の発病株率は、汚染圃場定植法の発病株率より低い傾向が認められたが、伊達らの報告（2004）でも断根灌注接種法において罹病性であるはずの品種で発病株率が低い場合が認められており、その要因は特定されていない。

本試験で実生苗と組織培養苗の抵抗性の発現を比較したところ、いずれの品種・接種法においても発病株率に大きな差は見られなかった。このことから、順化期間と育苗期間を合わせて70日以上経過した培養苗は、尾崎・木村（1989）が提唱している抵抗性を発揮する齢に達した実生苗と同等であると考えられた。したがって、胚培養等で得られた雑種などの培養苗を検定の材料として用

いることは、効率的な検定試験を行うために有効であると考えられた。

摘 要

ナス青枯病抵抗性検定の簡便な方法について検討した。台木のヒラナス（Ⅲ、Ⅳ群菌に罹病性）、‘トレロ’（Ⅲ群菌に抵抗性）、‘台太郎’（Ⅲ、Ⅳ群菌に抵抗性）の3品種に対し、茎切断接種法、断根灌注接種法、汚染圃場定植法の3種の方法で、岡山県内産地の罹病ナスから分離した青枯病菌3菌株（Ⅲ群菌、Ⅳ群菌、菌群不明菌）を接種した。その結果、茎切断接種法はヒラナス、‘トレロ’では自然発病条件下での抵抗性を再現したが、‘台太郎’では自然発病条件における抵抗性と明らかに異なり、抵抗性台木を選抜するための接種法はこれまで通り断根灌注接種法および汚染圃場定植法が望ましいと考えられた。

引用文献

- 伊達寛敬（1996）促成栽培ナスの青枯病の発生生態と防除に関する研究。岡山農試臨時報告，83：1-73。
- 伊達寛敬・飛川光治・那須英夫・粕山新二（2004）岡山県の促成栽培ナスの青枯病に対する台木‘台太郎’の防除効果。岡山農試研報，22：43-48
- 伊達寛敬（2006）トマト台木の青枯病抵抗性検定法。岡山農試研報，24：29-41。
- 原秀紀・小野邦明（1983）タバコ立枯病菌の発生生態に関する研究 第1報 病原細菌の検出・定量用培地。岡山たばこ試報，42：127-138。
- 堀田光生・土屋健一（2002）微生物遺伝資源利用マニュアル（12）。農業生物資源研究所資料：35p。
- 中保一浩・高屋茂雄（1994）抵抗性を異にするトマト品種の植物体内における青枯病菌の移行・増殖と病徴進展。Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 60：775。
- 中保一浩・高屋茂雄（1995）トマト抵抗性台木品種”LS-89”における病徴進展，病原の分布および増殖。Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 61：623。
- 中曾根渡（2009）ナスの青枯病抵抗性台木品種を利用した栽培で発病した青枯病菌のトレロに対する病原性。関西病虫研報，51：65-66。
- 西山幸司（1977）凍結法による植物病原細菌の保存。植物防疫，31：465-467。
- 農林水産技術会議（1976）野菜の土壌伝染性病害抵抗性の早期検定技術に関する研究。研究成果，90：104-155。
- 尾崎克己・木村俊彦（1989）ナス属植物の青枯病抵抗性

- 検定法. 中国農試研報, 4: 103-117.
- 鈴木一平・菅原祐幸・小谷晃・戸高重信・島田英雄 (1964) ナスおよびトマトの青枯病耐病性育種に関する研究. 園試報, A3: 77-106.
- 宇梶広・江塚昭典・駒田旦 (1975) ナス青枯病抵抗性の幼苗検定法並びに病原細菌のナス品種に対する病原性について. 日植病報, 41: 278 (講要).
- 脇本哲 (1965) OP 1 phage (*Xanthomonas oryzae* bacteriophage) の増殖に関する研究 第1報 種々の条件下の一段増殖実験. 九大農学芸誌, 15: 151-160.
- Winstead, N. N. and Kelman, A. (1952) Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 42: 628-634.