

# バラの 根頭がん腫病 抵抗性機構の解明と 抵抗性台木の育成

## In vitro 検定法の確立

### 従来 of 検定方法の問題

- 自然環境に影響される
- 栽培環境の影響を受けやすい
- 接種方法が一定しない



再現性が低い



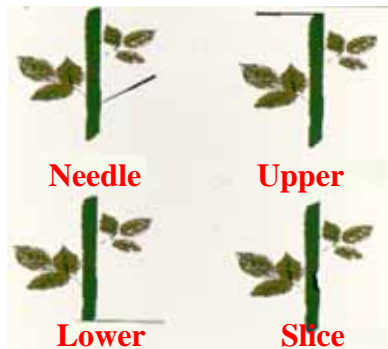
## In vitroへの導入

MS培地

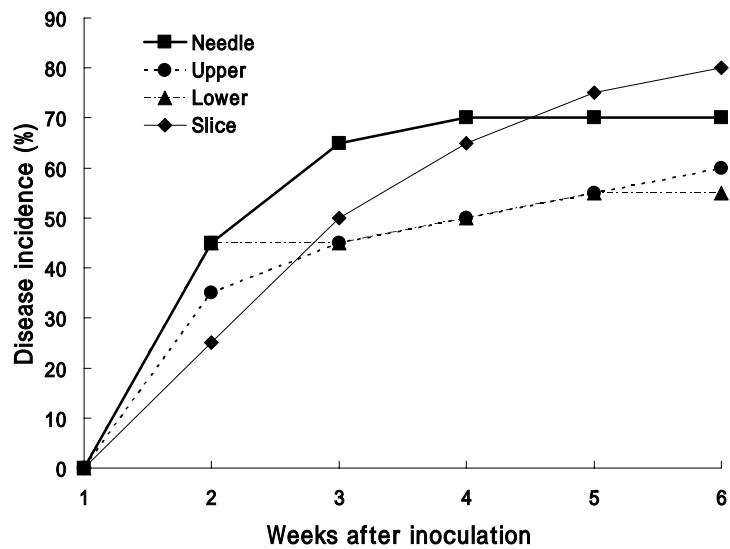
BAP $10^{-6}$  ~  $10^{-5}$  M

GA<sub>3</sub>  $10^{-7}$  ~  $10^{-6}$  M

## 接種方法

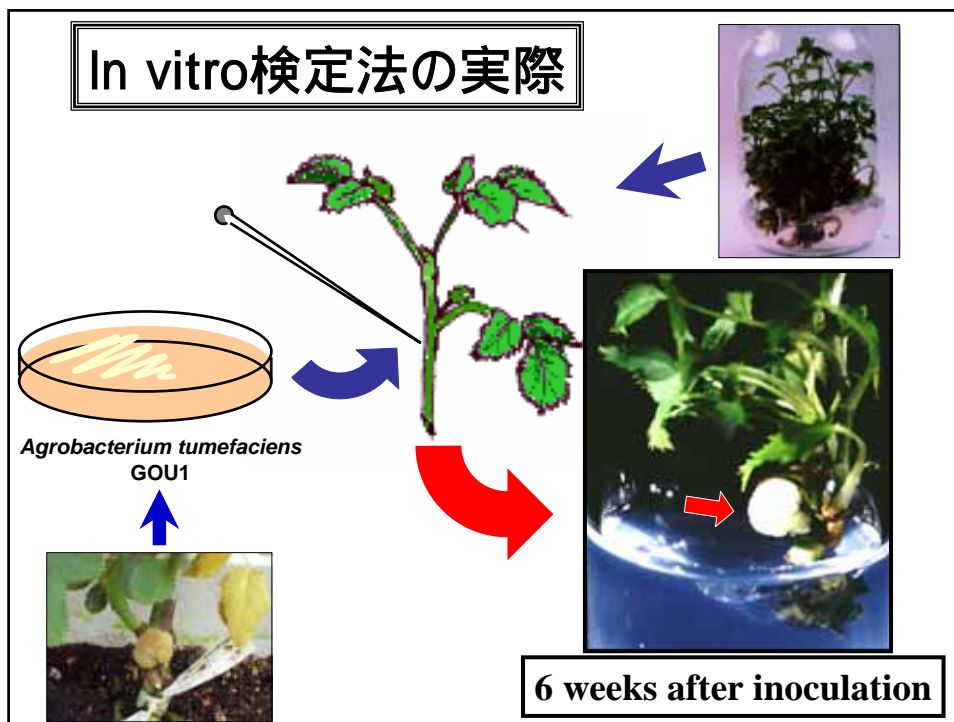


針刺し接種法(Needle)  
 上端塗布法(Upper)  
 下端塗布法(Lower)  
 そぎきり塗布法(Slice)



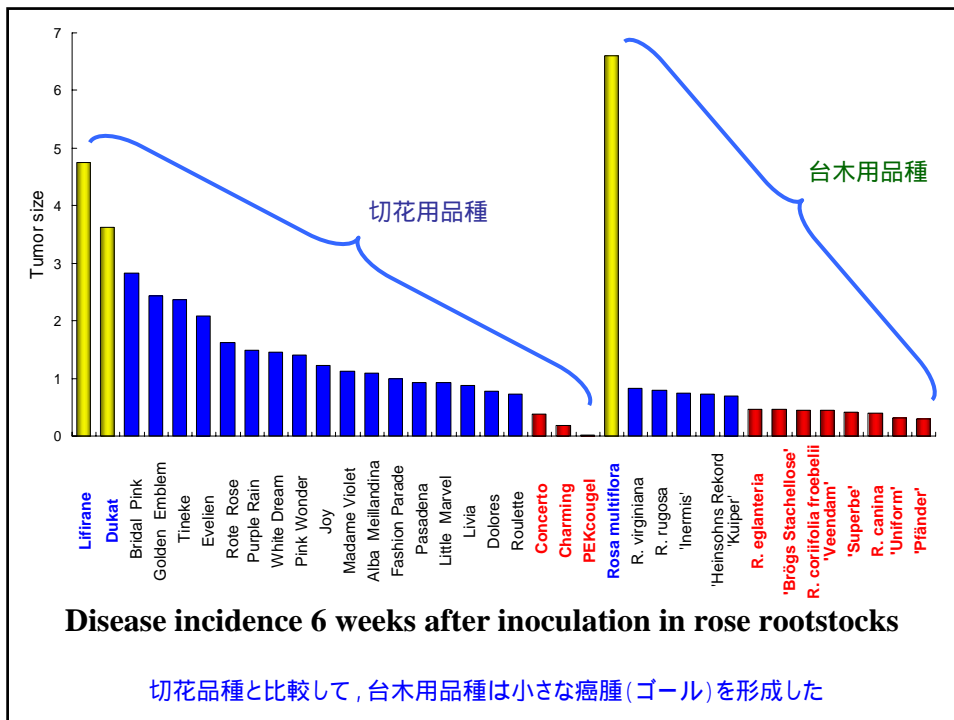
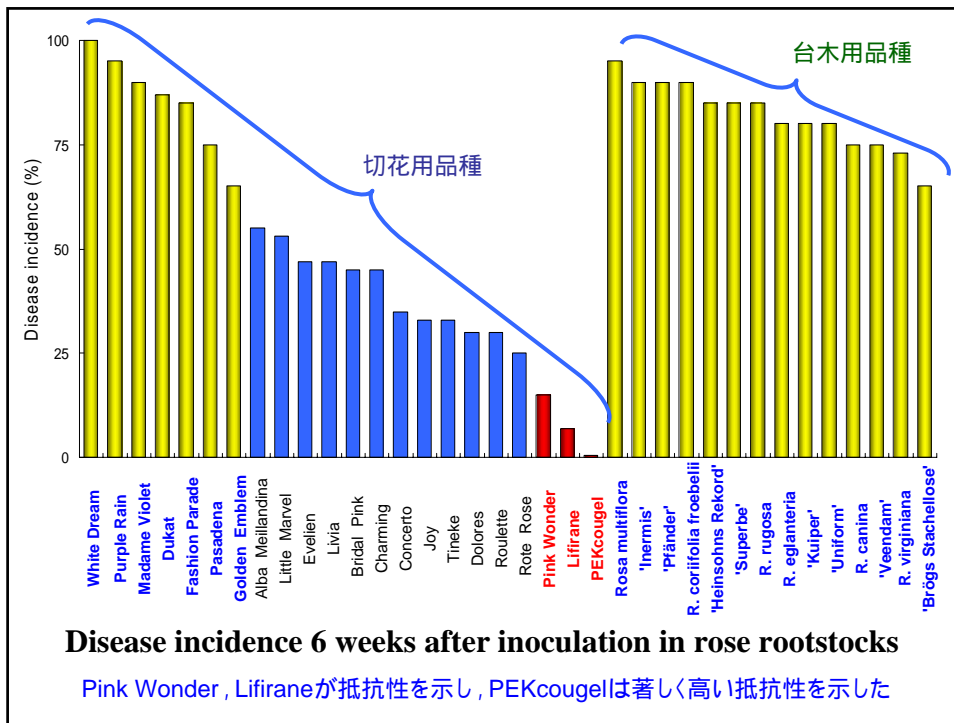
Comparison among four inoculation methods on disease incidence.

針刺し接種法が安定した発病率を示し、最も適している。

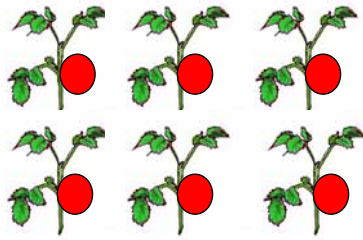


### In vitro検定法に供試した品種の一覧

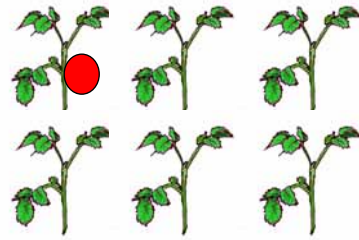
切り花および鉢花品種		台木用品種	
Alba Meillandina	Livia	<i>R. canina</i>	
Bridal Pink	Madame Violet	<i>R. canina</i> 'Brögs Stachellose'	
Charming	Pasadena	<i>R. canina</i> 'Inermis'	
Concerto	PEKcougel	<i>R. canina</i> 'Heinsohns Rekord'	
Dolores	Pink Wonder	<i>R. canina</i> 'Pfänder'	
Dukat	Purple Rain	<i>R. canina</i> 'Superbe'	
Evelien	Rise 'n' Shine	<i>R. coriifolia froebelii</i>	
Fashion Parade	Rote Rose	<i>R. eglanteria</i>	
Golden Emblem	Roulette	<i>R. 'Kuiper'</i>	
Joy	Sonia	<i>Rosa multiflora</i>	<i>R. 'Uniform'</i>
Lifirane	Tineke	<i>R. multiflora</i> 'K2'	<i>R. 'Veendam'</i>
Little Marvel	White Dream	<i>R. rugosa</i>	<i>R. virginiana</i>



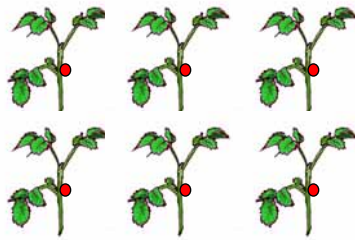
## 病徴形成抵抗性と病徴発達抵抗性



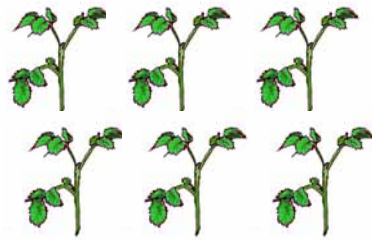
病徴形成抵抗性 弱い *Rosa multiflora*  
 病徴発達抵抗性 弱い Dukat



病徴形成抵抗性 強い Lifirane  
 病徴発達抵抗性 弱い



病徴形成抵抗性 弱い *R. canina*  
 病徴発達抵抗性 強い



病徴形成抵抗性 強い PEKcougel  
 病徴発達抵抗性 ?

### Classification of resistance to crown gall disease among rose cultivars

Resistance to tumor formation			Resistance to tumor development		
High	Middle	Low	High	Middle	Low
<b>PEKcougel</b>	Evelien	<b>Dukat</b>	<b>PEKcougel</b>	Evelien	<b>Dukat</b>
<b>Lifirane</b>	Livia	<b>Golden Emblem</b>	Concerto	Pink Wonder	<b>Golden Emblem</b>
Pink Wonder	Charming	White Dream	Bridal Pink	White Dream	<b>Lifirane</b>
	Bridal Pink	Purple Rain		Purple Rain	Tineke
	Concerto	Madame Violet		Madame Violet	Charming
	Joy	Fashion Parade		Fashion Parade	
	Tineke	Pasadena		Pasadena	
	Rise 'n' Shine	Sonia		Sonia	
	Roulette	Alba Meilandina		Alba Meilandina	
	Dolores	Little Marvel		Little Marvel	
	Rote Rose			Livia	
				Rise 'n' Shine	
				Joy	
				Roulette	
				Dolores	
				Rote Rose	

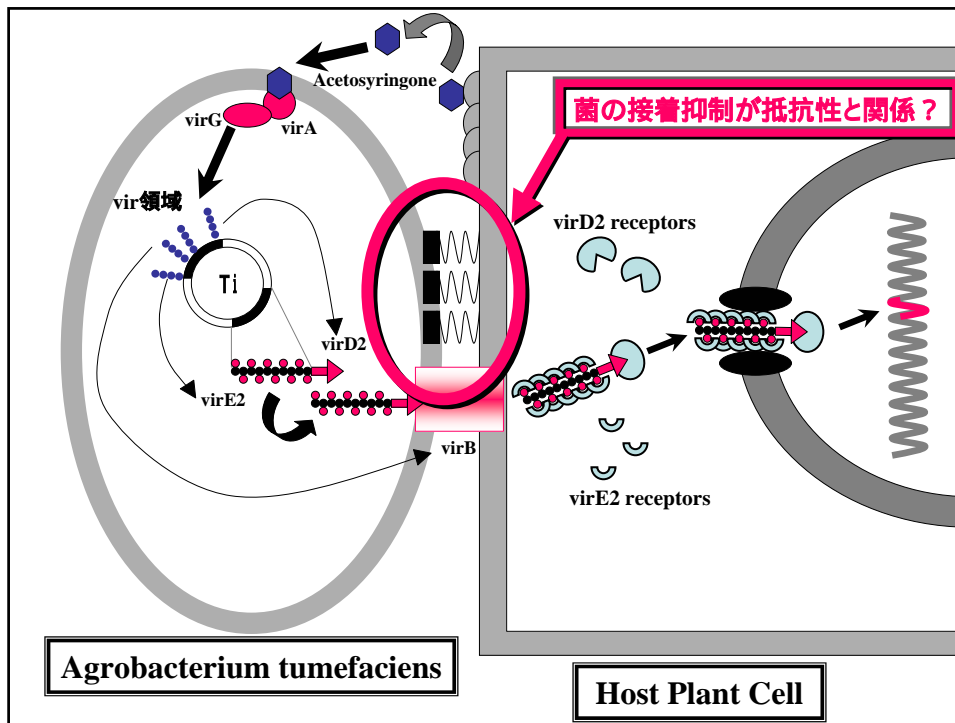
**Classification of resistance to crown gall disease  
among rose rootstocks**

Resistance to tumor formation	Resistance to tumor development	
	Low	Low Middle to High
<i>Rosa multiflora</i>	<b><i>Rosa multiflora</i></b>	<i>R. virginiana</i>
<i>R. multiflora</i> 'K2'	<b><i>R. multiflora</i> 'K2'</b>	<i>R. rugosa</i>
<i>R. canina</i> 'Pfänder'		<i>R. canina</i> 'Inermis'
<i>R. canina</i> 'Inermis'		<i>R. canina</i> 'Heinsohns Rekord'
<i>R. coriifolia froebelii</i>		<i>R. 'Kuiper'</i>
<i>R. canina</i> 'Heinsohns Rekord'		<i>R. canina</i> 'Brögs Stachellose'
<i>R. canina</i> 'Superbe'		<i>R. eglanteria</i>
<i>R. rugosa</i>		<i>R. 'Veendam'</i>
<i>R. eglanteria</i>		<i>R. coriifolia froebelii</i>
<i>R. 'Kuiper'</i>		<i>R. canina</i> 'Superbe'
<i>R. 'Uniform'</i>		<i>R. canina</i>
<i>R. 'Veendam'</i>		<i>R. 'Uniform'</i>
<i>R. canina</i>		<i>R. canina</i> 'Pfänder'
<i>R. virginiana</i>		
<i>R. canina</i> 'Brögs Stachellose'		

**Disease incidence 6 weeks after inoculation  
with four strains of *A. tumefaciens***

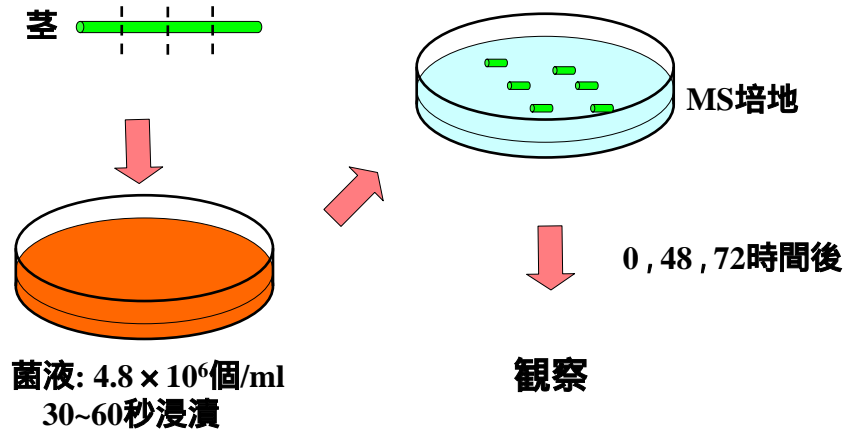
Rootstocks and cultivars	<i>A. tumefaciens</i> strains				Average	
	A208	GOU1	C58clrif-R	G-Ag-27		
<b><i>R. canina</i> 'Pfänder'</b>	90	90	70	90	<b>85</b>	NS
<b><i>R. canina</i></b>	60	75	40	70	<b>61</b>	NS
<b><i>R. virginiana</i></b>	53	73	47	53	<b>57</b>	NS
<b>Dukat</b>	60	87	53	27	<b>57</b>	*
<b>Fashion Parade</b>	45	85	50	30	<b>53</b>	*
<b><i>R. coriifolia froebelii</i></b>	40	90	30	50	<b>53</b>	*
<b>Bridal Pink</b>	50	45	40	30	<b>41</b>	NS
<b>Lifirane</b>	20	7	20	20	<b>17</b>	NS
<b>PEKcougel</b>	0	0	5	0	<b>1</b>	NS
<b>Average</b>	<b>46</b>	<b>61</b>	<b>39</b>	<b>41</b>		
	*	*	*	*		

菌の系統「GOU1」は高い病原性を示した

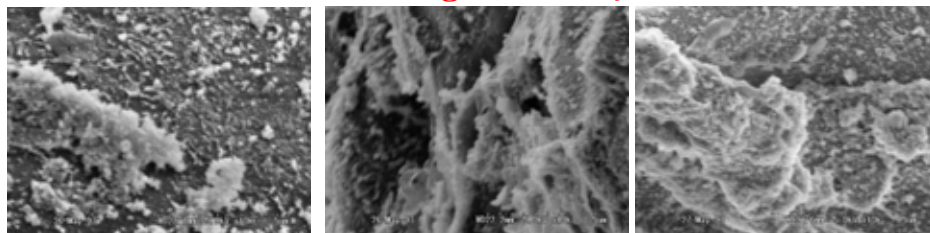


走査型電子顕微鏡による  
 Agrobacterium tumefaciensの  
 植物細胞への付着の観察

## 浸漬法を用いた接種



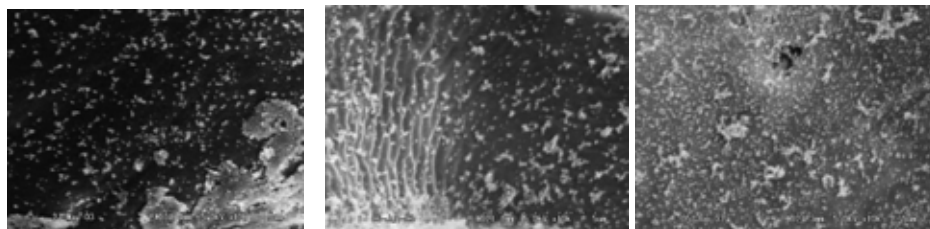
## PEKcougel(無接種)



0h

48h

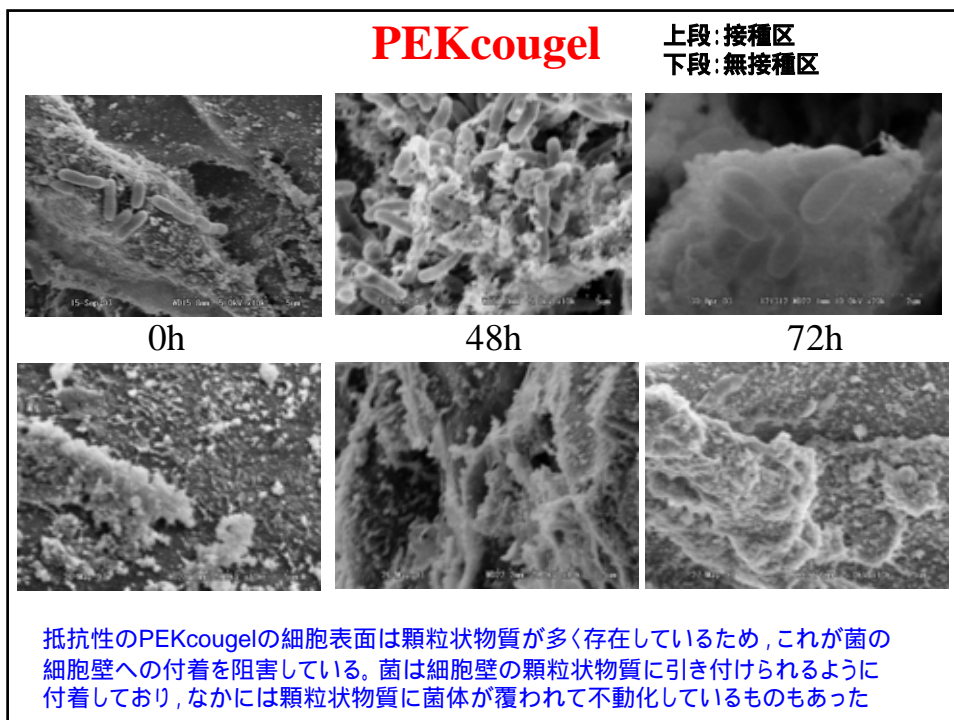
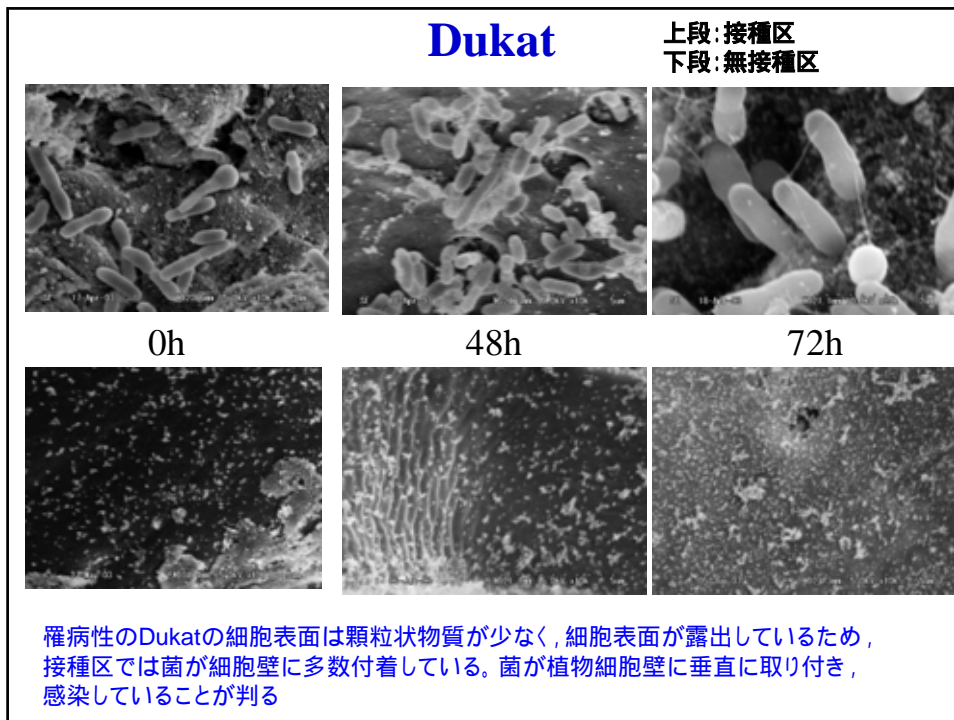
72h



## Dukat(無接種)

抵抗性のPEKcougelの細胞表面は顆粒状物質が多く存在しているが、罹病性のDukatの細胞表面は顆粒状物質が少なく、細胞表面が露出している

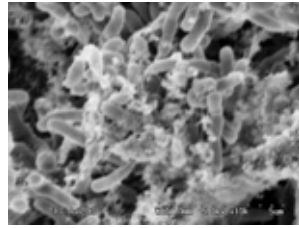




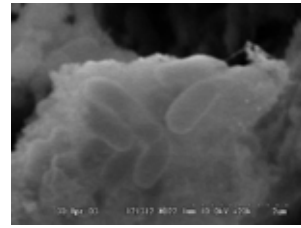
## PEKcougel (接種)



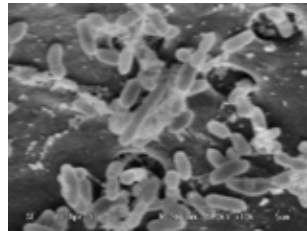
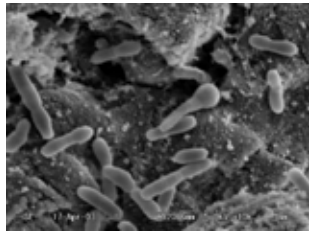
0h



48h



72h



## Dukat (接種)

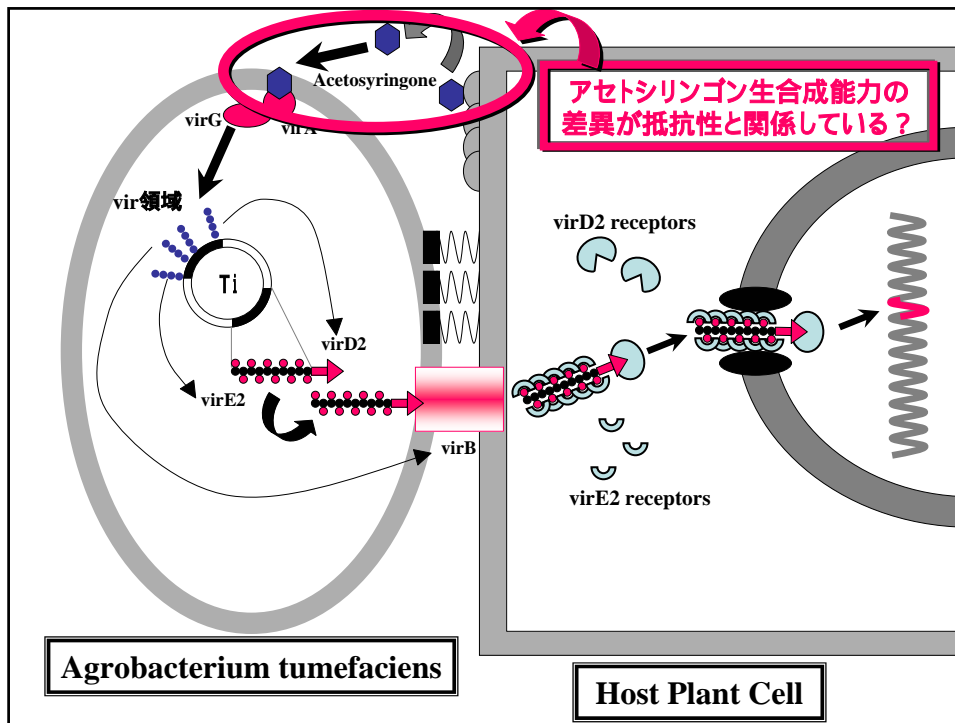
抵抗性のPEKcougelと罹病性のDukatを比べると、両者の違いが一目瞭然です。Dukatでは菌が細胞壁の露出部分に頭部を先にして垂直に付着して感染しているのに対して、PEKcougelでは顆粒状物質めがけて菌が集集し、感染が完了していない。また、顆粒状物質によって菌が捕捉されているものもみられた

## まとめ

1. 菌由来の繊維状構造体は植物体由来の顆粒状物質と結合しやすい
2. 抵抗性の強弱により顆粒状物質の形成量が異なる
3. 顆粒物質が多く存在する場合は顆粒物質と繊維状構造体により菌の付着阻害や不働化が起こる

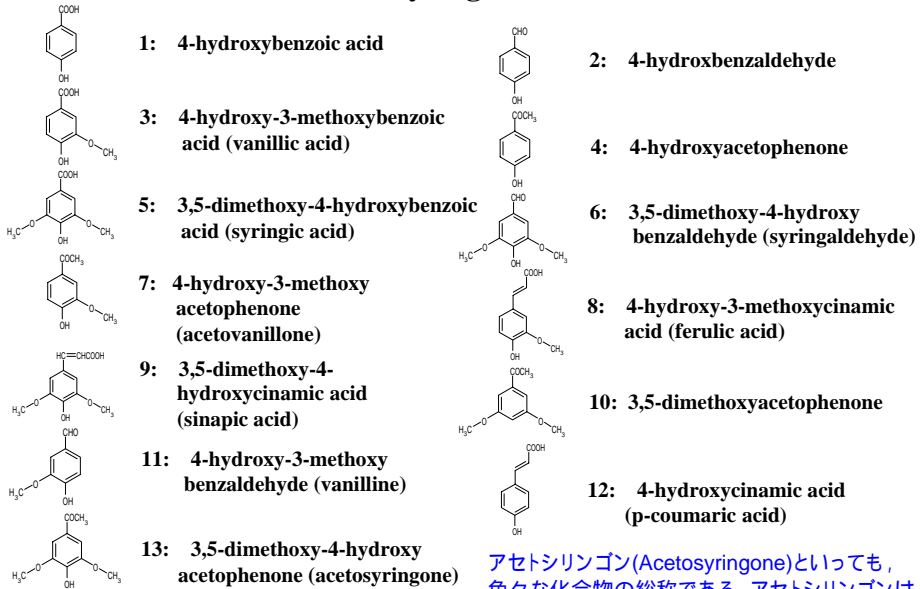
抵抗性のPEKcougelと罹病性のDukatとの間には、顆粒状物質の量的な差が認められ、バラ品種の顆粒状物質の生合成能力の違いが根頭がんしゅ病抵抗性と大きく関係していることが判る。

根頭がんしゅ病抵抗性機構には、顆粒状物質による菌の付着阻害が関係している。

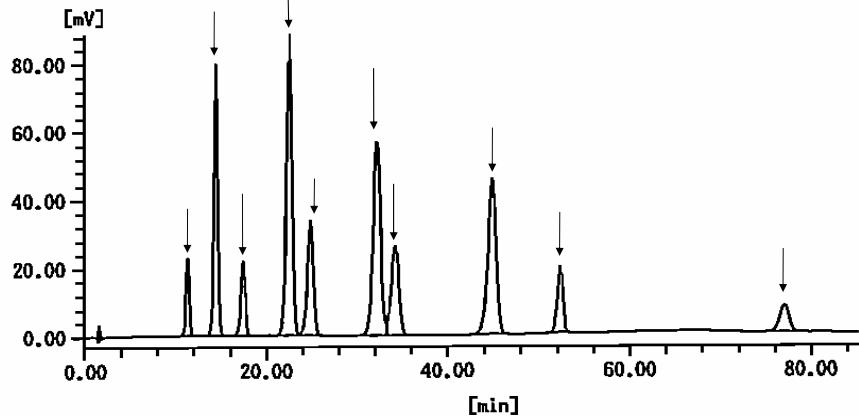


抵抗性と罹病性品種の葉から抽出した  
Acetosyringone誘導体のHPLCによる  
定性と定量

## Acetosyringone誘導体

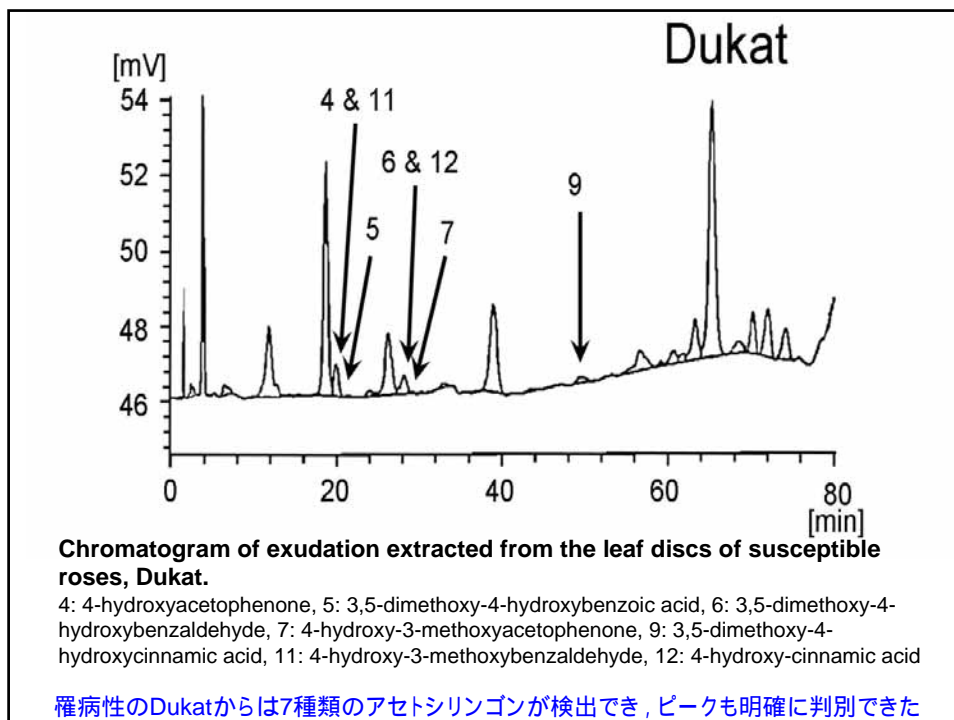
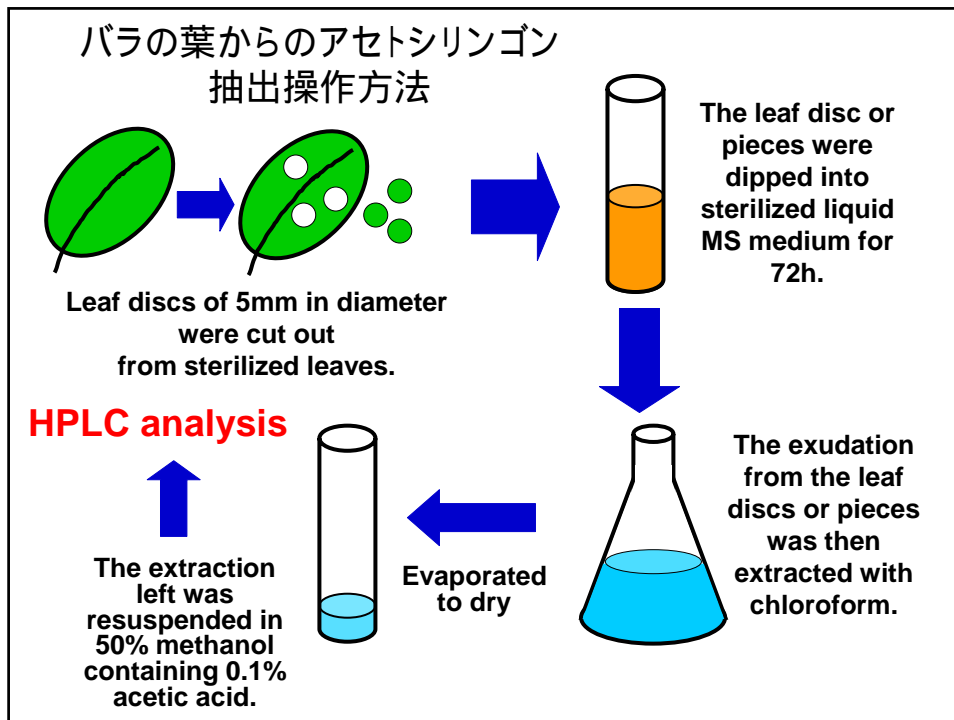


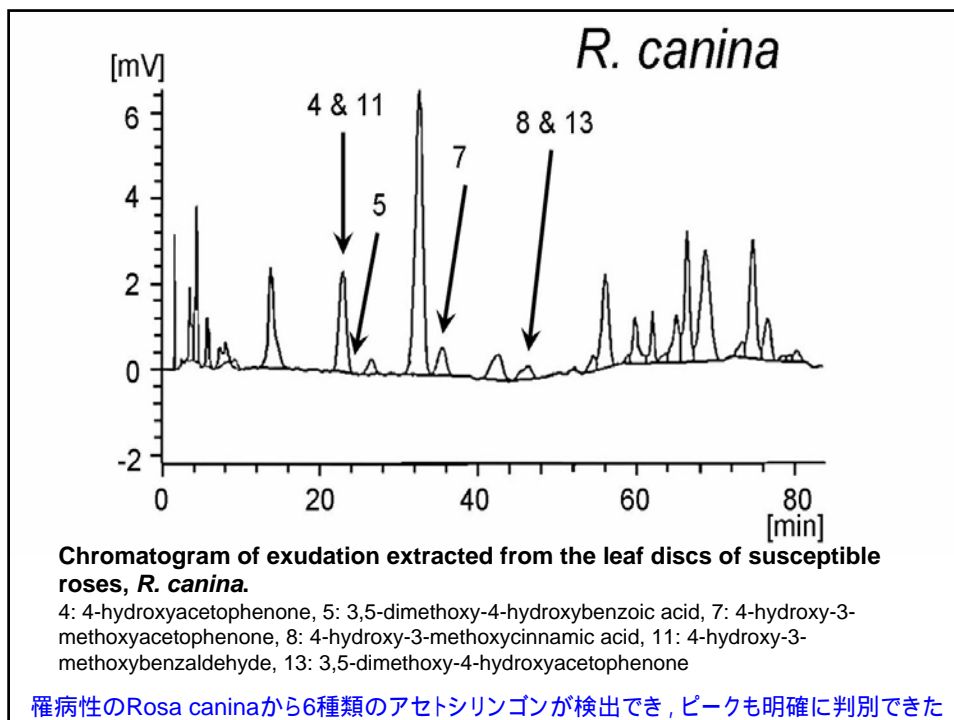
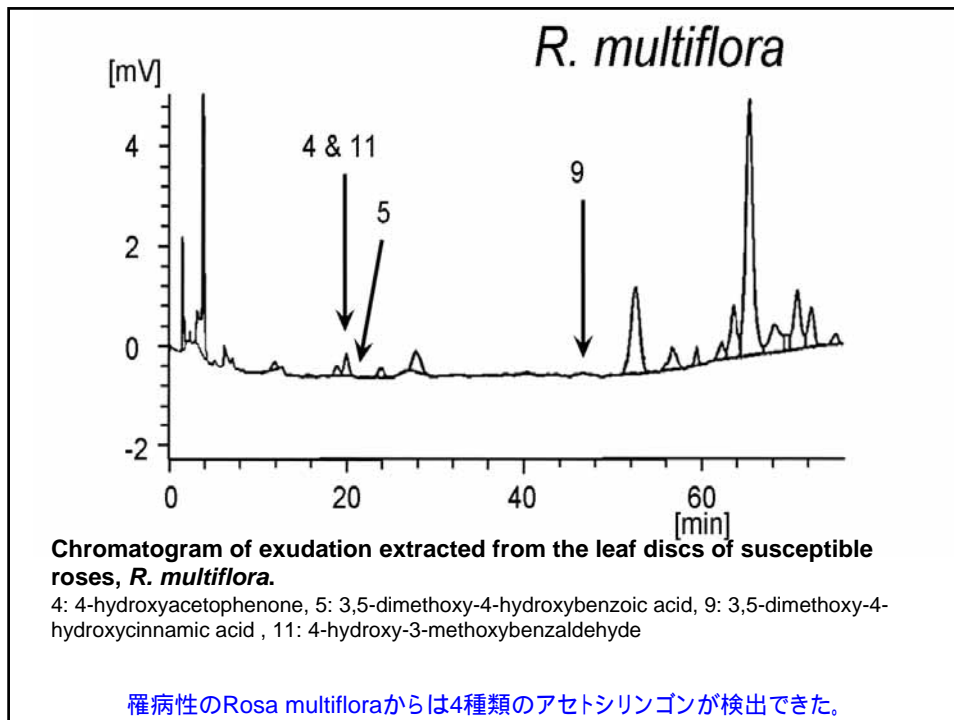
アセトシリンゴン(Acetosyringone)といっても、色々な化合物の総称である。アセトシリンゴンはバラの細胞が傷つけられると細胞壁修復物質として生合成される。菌はアセトシリンゴンを目印に植物細胞の傷を判断し、これを誘因物質として引き寄せられる。また、アセトシリンゴンは菌のプラスミドDNA内のT-DNAのvir領域の活性化作用も持つ。

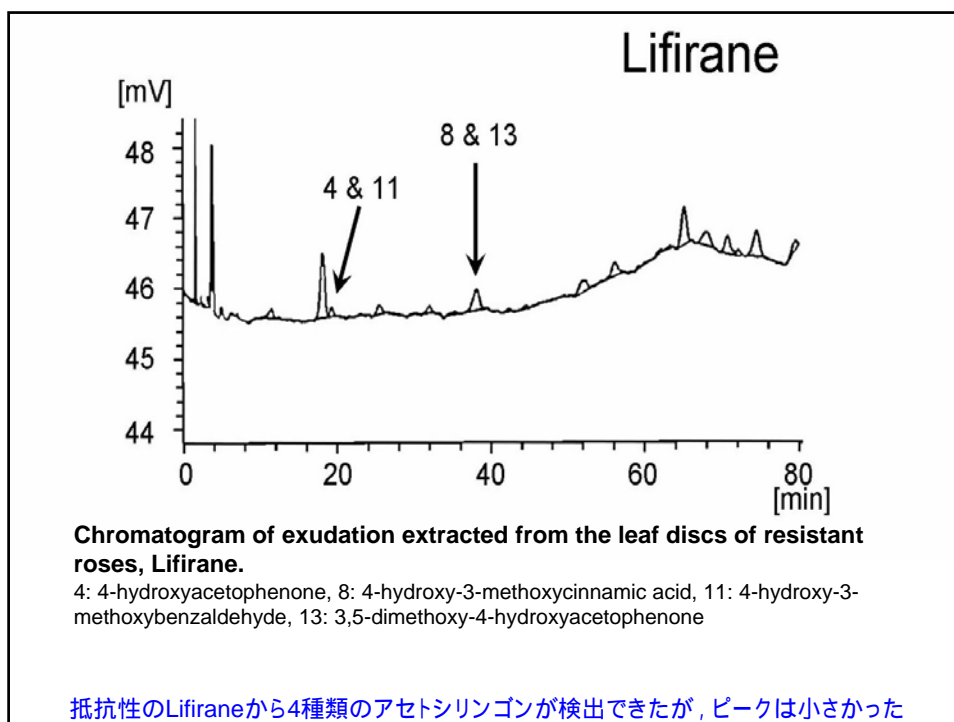
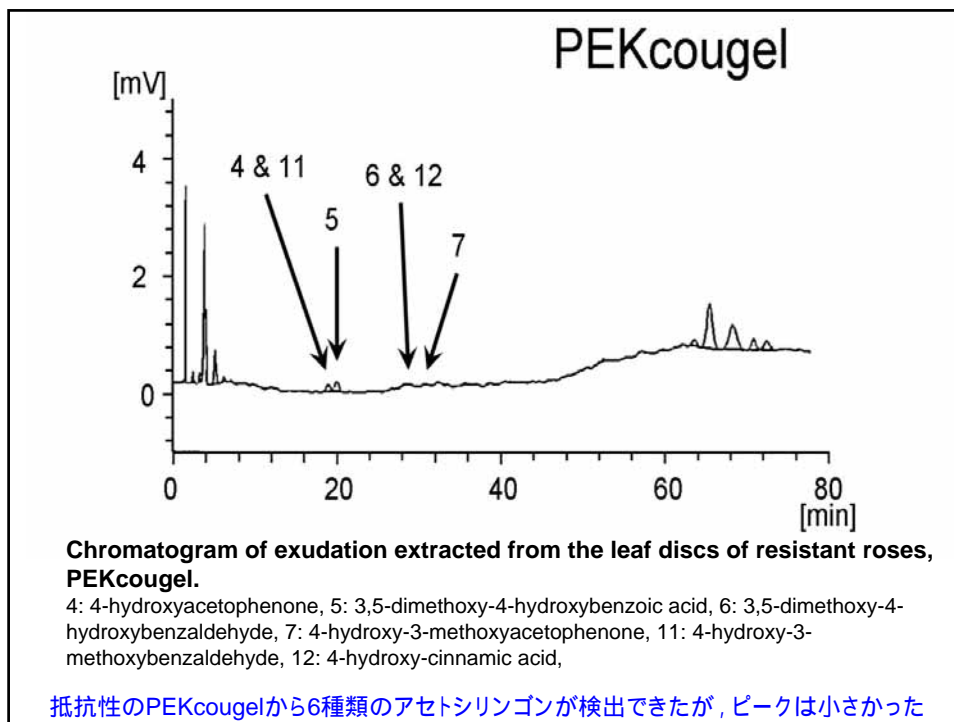


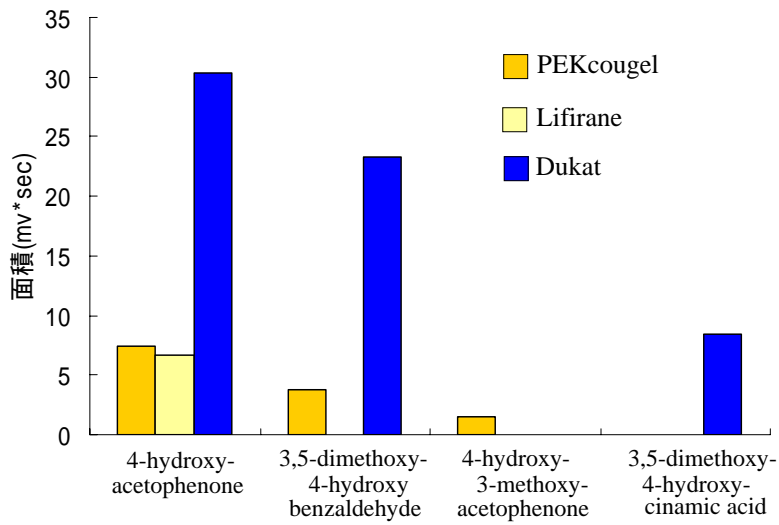
: 4-hydroxybenzoic acid, : 4-hydroxybenzaldehyde, : 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, : 4-hydroxyacetophenone + 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde  
 , : 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid, : 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde + 4-hydroxycinnamic acid, : 4-hydroxy-3-methoxyacetophenone, : 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid + 3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone, : 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, : 3,5-dimethoxyacetophenone

アセトシリンゴンはHPLCで分離し、定量することができる



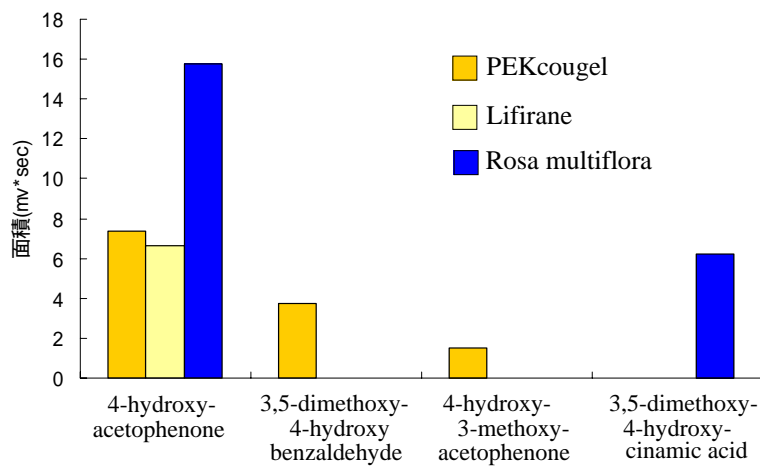






抵抗性品種PEKcougelおよびLifiraneと罹病性品種DukatにおけるAcetosyringone誘導体含量の比較

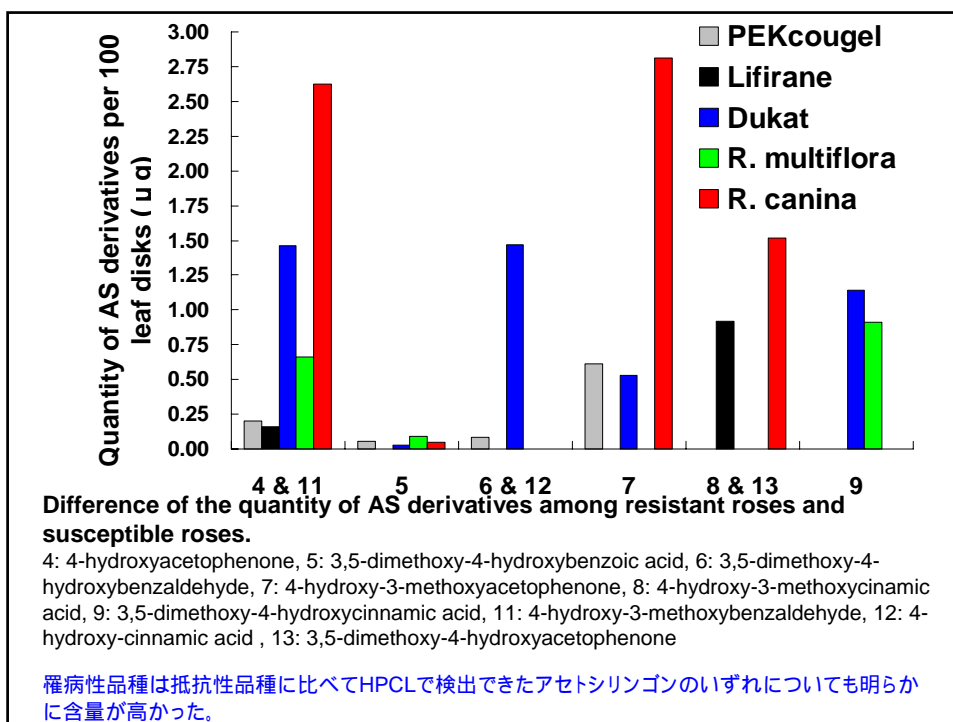
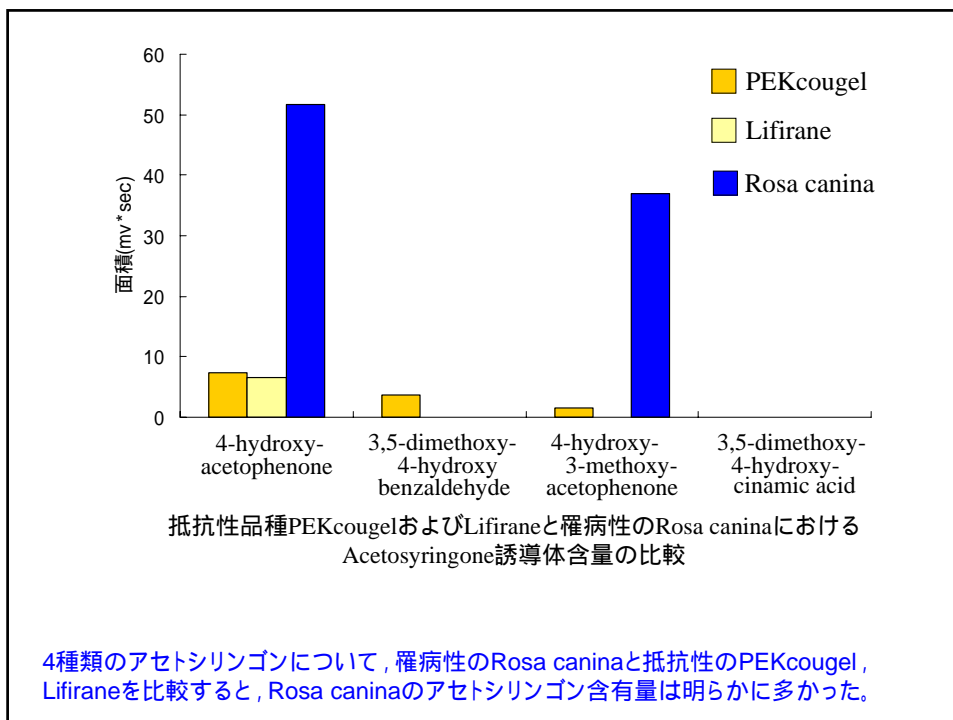
4種類のアセトシリンゴンについて、罹病性のDukatと抵抗性のPEKcougel, Lifiraneを比較すると、Dukatのアセトシリンゴン含有量は明らかに多かった。



抵抗性品種PEKcougelおよびLifiraneと罹病性のRosa multifloraにおけるAcetosyringone誘導体含量の比較

4種類のアセトシリンゴンについて、罹病性のRosa multifloraと抵抗性のPEKcougel, Lifiraneを比較すると、Rosa multifloraのアセトシリンゴン含有量は明らかに多かった。





## まとめ

1. バラからは9種類のアセトシリンゴン誘導体が検出できた
2. 抵抗性品種のアセトシリンゴン誘導体の含有量は罹病性品種に比べて明らかに少なかった
3. 抵抗性品種は罹病性品種に比べてアセトシリンゴン生合成能力が低く、特定のアセトシリンゴンでは検出できなかった

根頭がんしゅ病抵抗性はアセトシリンゴンの生合成能力と密接に関係しており、恐らくアセトシリンゴン生合成経路における欠失突然変異が発生した可能性が推定される。

# PEKcougelの 根頭がんしゅ病 抵抗性の遺伝

**PEKcougel : 抵抗性**



**Dukat : 罹病性**



抵抗性品種のPEKcougelと罹病性品種のDukatを交配親として、正逆交雑を実施した

**40 ~ 50 days after  
pollination**

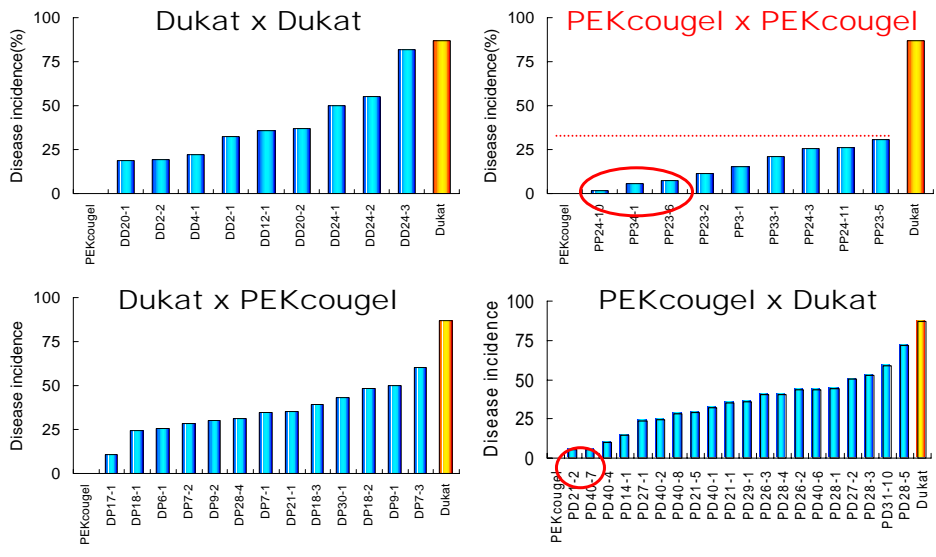


**embryos culture on  
MS medium**



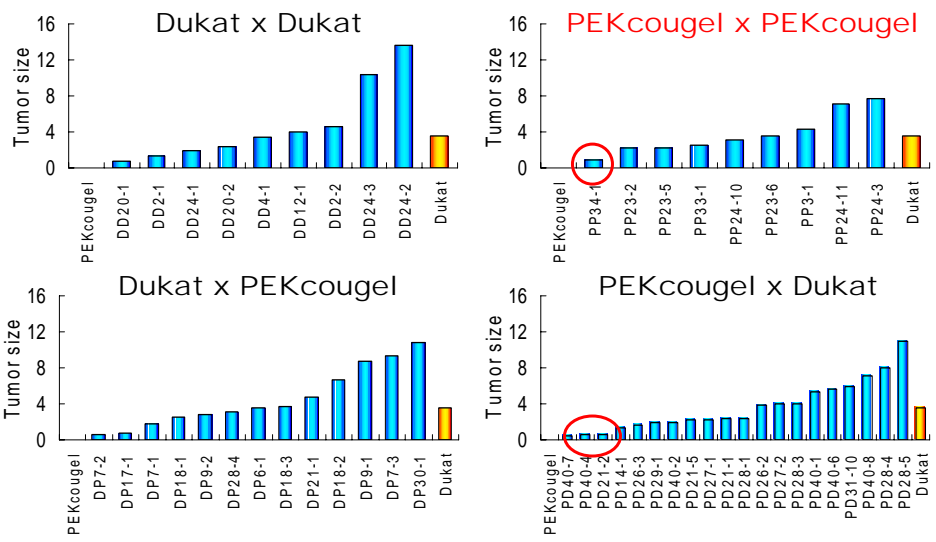
交配を行って40~50日目に果実を採取し、無菌条件下で種子を摘出して胚珠培養を行った  
シュートの伸長が認められた個体はシュートを増殖し、in vitro検定法で菌を接種して抵抗性の判別を行った。

## PEKcougelとDukatの交雑後代の病徴形成抵抗性



PEKcougel同士の交雑個体は著しく低い発病率を示し、3個体で高い抵抗性が認められた。  
PEKcougelを種子親とした交雑でも著しく低い発病率を示す個体が得られた。

## PEKcougelとDukatの交雑後代の病徴発達抵抗性



PEKcougel同士の交雑で得られたPP34-1は発病率が低く、形成される癌腫の大きさも小さかった。  
PEKcougelを種子親とした交雑で得られたPD-21-2, 40-7も発病率が低く、形成される癌腫も小さく、  
強い根頭がんしゅ病抵抗性を示した。

PEKcougelの  
根頭がんしゅ病抵抗性の遺伝

抵抗性に関与する因子は遺伝する

抵抗性因子は単一ではない