バラ品種およびノイバラにおけるうどんこ病ならびに 黒星病抵抗性検定

茶谷 和行*・豊田 秀吉**・緒方 陽子**・是枝 一春*・吉田 健二*
松田 克礼***・辻野恵一郎**・大内 成志**

Kazuyuki CHATANI*, Hideyoshi TOYODA**, Yoko OGATA**, Kazuharu KOREEDA*,
Kenji YOSHIDA*, Yoshinori MATSUDA***, Keiichiro TSUJINO** and Seiji OUCHI**:

Evaluation of Resistance of Rose Cultivars and Wild Rose to
Powdery Mildew and Black Spot

Abstract

In an attempt to produce the powdery mildew and black spot disease resistant rose plants (*Rosa hybrida*), we established an efficient inoculation system for precise evaluation of the resistance or susceptibility of rose cultivars to those diseases. In this system, the top leaflets of fourth trifoliate leaves generated from lateral buds of rose cuttings were used for inoculation with conidiospores of *Sphaerotheca pannosa* or *Diplocarpon rosae*. Two cultivars, "Paul's Pink" and "Magic", were found to be strongly resistant to the powdery mildew pathogen and the "C line" of wild rose (*R. multiflora*) was highly resistant to both powdery mildew and black spot pathogens. These results suggest that the wild rose would be a useful gene source for providing a true disease resistance to commercially valuable cultivars of rose.

Key words: *Sphaerotheca pannosa*, *Diplocarpon rosae*, rose cultivars, wild rose, inoculation methods.

バラのうどんこ病や黒星病はいずれも主に葉に発生するが、葉柄や茎、蕾などにも発生して外観損傷を与え、ときに、発病の激甚な場合には、茎葉の奇形、枯死をひきおこすことがある。これらの病害の防除には、伝染環を考慮した耕種的防除や殺菌剤による防除法が適用されてきたが、薬剤耐性うどんこ病菌の出現⁷⁾は、バラにおいても病害抵抗性系統の育成が必要であることを示唆する。筆者らの研究室では、これまでに遺伝子工学や細胞工学的手法を活用し、タバコ、トマト、イチゴなどの主要作物における病害抵抗性系統の育成を試みており¹²⁾、バラについても主要品種における細胞組織培養と個体再分化系を確立している^{13,14)}。このような背景から、上記病害に対するバラの抵抗性系統を育成することとしたが、これら病害については抵抗性もしくは感受性程度を正確に検定する方法が確立されておらず、統一した判定基準が定められていない。

そこで、本研究では、うどんこ病および黒星病について簡便かつ再現性の高い接種検定法を検討し、バラ品種およ

びノイバラにおける抵抗性検定を試みたので、それらの結果について報告する。

本研究には、Table 1 に示すバラ (*Rosa hybrida* Hort.) の18品種とノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) (第一園芸プランテック保有C系統) を用いた。また、病原菌として、近畿大学農学部植物病理学研究室で分離、継代しているバラうどんこ病菌 (*Sphaerotheca pannosa* Leveillé) のKS-pl 株⁴⁾と黒星病菌 (*Diplocarpon rosae* Wolf) のKD-r1 株⁵⁾を使用した。うどんこ病菌は、分生孢子をバラの感受性品種『ドロレス』(Doroless) に接種し、20°C、4000 ルックスの連続照明条件下で1週間培養して葉上に形成された分生孢子を、また、黒星病菌は菌糸をPDA培地に植えつけ¹⁰⁾、26°Cの暗所で約1カ月間培養して、形成された分生孢子を接種源とした。

うどんこ病抵抗性検定 自然感染実験に用いるバラ品種として、感受性品種の『ドロレス』と中度抵抗性品種の『ソフィアズソング』(Sophia's Song) を使用し、通常のビニ

* 第一園芸プランテック Plant Biotech Division, Fuji-Oyama Research Laboratory, Dai-ichi Engei Plantech, Shizuoka 410-13, Japan

** 近畿大学農学部 Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631, Japan

*** 近畿大学農学総合研究所 Institute for Comprehensive Agricultural Science, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631, Japan

Table 1. Development of *S. pannosa* KS-pl inoculated onto excised leaves of rose cultivars of *R. hybrida* and wild rose of (*R. multiflora*)^{a)}

Plants tested	Haustorial formation (%)	Pustule area (cm ²)	Disease index	Evaluation ^{c)}
<i>R. multiflora</i>				
C strain	0	—	0 (0) ^{b)}	HR
<i>R. hybrida</i>				
Paul's Pink	0	—	0 (0)	HR
Magic	0.8	0.02	0 (0)	HR
Kolibrie	20.2	0.09	33.4 (31.5)	MR
Sophia's Song	47.0	0.21	33.4 (24.9)	MR
Cascade	25.3	0.77	60.1 (36.5)	WR
Hot Spot	13.3	0.82	61.8 (41.5)	WR
Selster	42.8	0.66	61.8 (42.3)	WR
Amanda	47.8	0.66	63.5 (41.5)	WR
Little Cameo	72.5	0.51	70.1 (43.2)	S
Carl Red	55.8	0.78	70.1 (41.5)	S
Sizzule Pink	91.8	0.41	70.1 (43.2)	S
Devrouge	37.1	0.99	70.1 (44.8)	S
Hanae Mori	41.5	1.44	86.8 (69.7)	S
Misty Pink	53.1	1.20	88.5 (69.7)	S
Angel	57.6	1.21	88.5 (76.4)	S
Sparkling Orange	25.1	1.98	88.5 (69.7)	S
Holiday	53.3	1.33	95.1 (76.4)	S
Doroless	85.1	0.96	95.2 (73.9)	S

a) Conidiospores of the powdery mildew pathogen were dusted onto approximately 20 leaves of test plants and their haustorial formation was examined 2 days and their pustule development and disease severity 6 days after inoculation. Data were given as averages of three replications. Disease index was calculated by the formula shown in the text.

b) The disease indices in parenthesis were those assessed from the natural infection.

c) HR, highly resistant ; MR, moderately resistant ; WR, weakly resistant ; S, susceptible to the pathogen.

ールハウス内で約3カ月間栽培した。うどんこ病菌の自然感染が最初に観察された時点を実験の開始時期とし、検定植物ごとにあらかじめ定めた調査葉（実験開始時点で完全に展開した50～60枚の葉を任意に選択）の感染程度を1カ月後に判定した。発病指数（disease severity）は、以下の基準を設け、全菌叢の総面積が葉面に占める割合を肉眼観察によって判定した。すなわち、葉面に菌叢が全く形成されない場合を発病指数「0」、菌叢の占める面積が葉面積の50%以下を「1」、50%～75%を「2」、75%～100%を「3」とし、発病度（disease index）は、 $\sum(\text{程度別罹病葉数} \times \text{発病指数}) \times 100 / (\text{全調査葉数} \times 3)$ の計算式によって求めた。

うどんこ病菌を接種する場合には、バラおよびノイバラを通常ガラス温室で約3カ月間栽培した後、側芽を含む節間を切り出してロックウールに挿し木し、さらに1カ月間、26℃、4000ルクスの連続照明下で栽培して、新たに形成された展開葉を病原菌の接種実験に用いた。すなわち、挿し木で育成した検定植物の第4節位展開葉の頂葉が葉身長2.0 cmに達した段階で葉柄部から切離し、温室シャーレ内に葉の表が上になるように置き、その上にシャーレと同径の亚克力製透明シリンダー（高さ30 cm）およびシリンダー上部に取り付けたステンレス製メッシュを設置した。分生胞子を形成したドロレス葉（接種源）をメッシュ

上に置き、シリンダー部を軽く振動させて分生胞子を落下させた。接種葉は、20℃、4000ルクスの連続照明下で一定期間静置した。うどんこ病菌の吸器形成と二次菌糸伸長については接種2日後、また、各々の菌叢面積については接種6日後に調査した。うどんこ病菌の感染行動については、接種葉をラクトフェノール・アルコール混液（フェノール：乳酸：グリセリン：水：エタノール＝1：1：1：1：8, v/v）中で煮沸固定し、20 mg/ml のアニリンブルー液でうどんこ病菌を染色して光学顕微鏡で観察した。なお、付着器および吸器形成率については、それぞれ、（付着器形成分生胞子数/落下分生胞子数）×100、（吸器形成分生胞子数/付着器形成分生胞子数）×100 の計算式によって求めた。宿主植物がうどんこ病菌に抵抗性であると、吸器形成が抑制され二次菌糸が分化・伸長せず、菌の感染が阻止される^{2,4)}。そこで、吸器形成が完全に抑制され、接種葉面に菌叢形成が観察されない個体（発病指数「0」に相当）を強度抵抗性品種とした。一方、抵抗性強度が低いものでは、その程度に応じて吸器が形成され、さらに、二次菌糸が分化・伸長する。このような場合には、二次菌糸の伸長抑制が抵抗性指標となる。そこで、吸器形成率と菌叢伸展度の双方が低い値を示し、発病指数が「1」もしくはそれ以下の個体を中度抵抗性品種とした。それ以外は弱度抵抗性あるいは感受

Fig. 1. Disease severity on leaves of rose cultivars, "Dorolless" (A) (susceptible) and "Sophia's Song" (B) (moderately resistant) naturally infected (□) or artificially inoculated (■) with the pathogen. The disease severity was recorded using the following scale: '0', no pustule formation and '1' to '3', pustule formation on test leaves with less than 50, 50-75, 76-100% of leaf area, respectively.

性品種とした。

一般に、うどんこ病菌に対する殺菌剤の効力検定にはガラス温室やビニールハウスで栽培した植物を用い、自然感染条件下で発病抑制効果を判定する⁹⁾。そこで、まず、自然感染法がバラ品種の抵抗性検定に適用できるか否かを検討した。バラの2品種で得られた発病指数の分布を Fig. 1 に示す。図からも明らかなように、自然感染による検定法では、感受性品種 (Fig. 1 A) であっても発病指数が「0」(強度抵抗性品種に相応) や「1」の検定葉が多数観察され、感染葉であっても病斑形成に至っていない葉や未感染葉が存在することが明らかであった。一方、中度抵抗性品種 (Fig. 1 B) では、発病指数が「3」(感受性品種に相応) の検定葉が観察されたが、これは不均等な感染によって形成された菌叢が融合した結果であると考えた。したがって、厳密な感受性検定では、検定植物の生育段階を均一にし、接種する病原菌の量や接種方法について検討する必要がある。このような視点から、筆者らは以下に述べるうどんこ病菌接種法を考案した。

本法では検定植物の葉齢をそろえるため、挿し木法で育成した苗を使用し、接種に用いる葉の節位を特定した。また、検定用シャーレ内にはカバーガラスを置き、落下分生孢子数を顕微鏡下で計測して接種分生孢子数がほぼ一定に

なるように工夫した。また、落下させる分生孢子数は接種源葉数を加減することで調節した。まず、接種のための最適分生孢子密度の決定に感受性品種の『ドロレス』を使用し、落下分生孢子数を $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 孢子/cm² に調節して、接種後に形成された菌叢が接種葉全面を覆うのに必要な分生孢子の密度を求めた。その結果、 $2 \sim 3 \times 10^3$ 孢子/cm² を落下させた場合に、『ドロレス』葉の全面がうどんこ病菌の菌叢で覆われ発病指数「3」が得られたので、この孢子密度を以後の試験に用いた。なお、この条件で接種したうどんこ病菌の付着器および吸器形成率はそれぞれ 25.3 ± 2.5 , $85.1 \pm 2.2\%$ であったが、付着器形成率は実験に用いた19種類の品種または系統間で有意な差が認められなかった。そこで、以後の実験では、吸器形成と菌叢伸長を抵抗性の判定指標とした。Fig. 1 から明らかなように、本法を用いて接種孢子密度を調整すると、感受性品種の『ドロレス』ではほぼ90%の葉が発病指数「3」を示し、抵抗性品種の『ソフィアズソング』では発病指数が「1」であった。したがって、本接種法が抵抗性検定に有効であると考えた。Table 1 には、バラ品種とノイバラ C 系統における接種2日後の吸器形成率および接種6日後の各菌叢の面積と発病度を示す。ノイバラ C 系統とバラ品種の『ポールスピック』(Paul's Pink) では吸器形成が完全に抑制され、『マジック』(Magic) では、ごくわずかに(1%以下)吸器形成が観察されたものの、吸器はその後崩壊し、二次菌糸の伸長も停止して肉眼で識別できる菌叢はほとんど形成されなかった。このような結果から、ノイバラ C 系統およびバラ品種の『ポールスピック』と『マジック』はうどんこ病に対して強度抵抗性であると判定した。一方、その他の品種においては、機能的な吸器(二次菌糸伸長の認められる吸器)の形成は認められたが、その形成率は品種間で異なり、また、菌叢伸展度についても品種間で顕著な差異が認められた (Table 1)。このような機能的吸器の形成数は菌叢数に反映し、二次菌糸伸長の抑制程度は菌叢の大きさに影響を与えるので、それぞれの品種における最終的な抵抗性の強弱は両反応の複合作用によって決定されるものと考えてよい。供試品種の中では、特に、『コリブリー』(Kolibríe) で吸器形成率が低く、菌叢の伸展が抑制されており、『ソフィアズソング』がこれに続いた。そこで、これらを中度抵抗性品種と判定した。それ以外の品種については、吸器形成や二次菌糸伸長の抑制程度に明確な相関関係が認められなかったことから、発病度が60および70以上のものをそれぞれ弱度抵抗性および感受性品種と判定した。Table 1 には、自然感染法における発病度も併記したが、この方法では、特に中度抵抗性以下のバラ品種において発病度が実際よりも小さく判定される傾向が認められ、本研究で考案した接種法がより適正な抵抗性判定を可能にするものと考えた。

黒星病菌に対する抵抗性検定 *Rosa* 属植物の黒星病抵抗性については、*R. rugosa*^{1,8,11)}, *R. multiflora*⁸⁾, *R. carolina*, *R. kordessi*¹¹⁾ およびこれらの種間雑種を用いて研究されており、接種法として、挿し木増殖した個体の上位展開葉に菌液を直接滴下接種する方法¹⁾ や切離葉の葉脈上に菌液を滴下する方法⁸⁾ が用いられてきた。筆者らは、これらの方法に加えて、刺針接種法（葉の裏面から針で付傷させ、付傷部に病原菌孢子懸濁液をのせる接種法）や孢子懸濁液噴霧法について検討した。その結果、噴霧接種法が抵抗性検定に最も適していたので、本法によって、うどんこ病感受性品種の『ドロレス』、『カールレッド』と、強度抵抗性を示したノイバラ C 系統および『マジック』および『ポールスピンク』に黒星病菌を接種した。すなわち、PDA 培地上に形成された分生孢子菌を滅菌水に懸濁し、キムワイプで濾過したあと、濾過液中の孢子菌を遠心分離によって集め、最終孢子密度を 10^5 孢子/ml に調整して接種源とした。前項の方法で調製したバラ品種およびノイバラ C 系統の展開葉を 1 シャーレあたり 6 枚置き、5 ml の接種源を葉の上方 50 cm の位置から噴霧した。接種葉は湿室シャーレ内に置き、25°C で 15 日間静置した後、病斑形成を調べた。このような実験を 4 回繰り返したが、いずれの接種試験においても、すべてのバラ品種が葉のほぼ全面に黒褐色の壊死斑を形成し、黒星病に感受性と判定された。一方、ノイバラ C 系統では病斑がまったく形成されず、黒星病に強い抵抗性を示すことが明らかとなった。Palmer *et al.*^{8,9)} は、異なる地域や季節に分離した黒星病菌株を接種して、バラ植物の抵抗性や感受性が異なることを報告している。そこで、筆者らも地域的に異なる分離株（奈良県および静岡県からの分離株）を使用し、接種試験を試みたが、ノイバラ C 系統はいずれの分離株に対しても強い抵抗性を示した。Table 2 には、うどんこ病菌および黒星病菌の接種結果をまとめた。両菌に対して抵抗性を示す植物はノイバラ C 系統に限られており、我が国で最も生産量の高い『カールレッド』³⁾ はいずれの病害に対しても感受性であった。筆者らの予備試験では、他のほとんどの品種も黒星病に感受性であって、

黒星病抵抗性遺伝子の導入がバラの育種において極めて重要であることが示唆された。このような観点から、ノイバラ C 系統は、うどんこ病および黒星病に対する有効な抵抗性遺伝子源と考え、バラ品種との種間雑種を育成する研究を開始した。筆者らは、すでに、バラの組織培養系を確立しており^{13,14)}、また、バラおよびノイバラのプロトプラスト調製とその融合条件も明らかにしている⁵⁾、このような細胞工学技術を駆使し、有用な病害抵抗性バラ品種を育成することは可能と考える。

引用文献

- Bolton, A.T. and Svejda, F.J. (1979). A new race of *Diplocarpon rosae* capable of causing severe black spot on *Rosa rugosa* hybrids. Can. Plant Dis. Sur. 59 : 38-42.
- Hajlaoui, M.R., Benhamou, N. and Bélanger, R. (1991). Cytochemical aspects of fungal penetration, haustorium formation and interfacial material in rose leaves by *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39 : 341-355.
- 林 勇 (1990). 切り花栽培の新技术 バラ 上巻 (林 勇編), 誠文堂新光社, 東京, pp. 23-36.
- Ikeda, S., Toyoda, H., Yoshida, K., Koreeda, K., Chatani, K. and Ouchi, S. (1992). Digestion of haustoria of *Sphaerotheca* powdery mildew fungi by an exogenous chitinase. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 58 : 780-783.
- 緒方陽子・豊田秀吉・相賀みのり・松田克礼・是枝一春・茶谷和行・吉田健二・大内成志 (1994). 細胞融合法によるうどんこ病ならびに黒星病抵抗性バラ品種の育成 (II) バラおよびノイバラのうどんこ病, 黒星病に対する反応とプロトプラスト誘導のための基礎的条件. 日植病報 60 : 773 (講要).
- 岡本 弘 (1969). 植物病理実験法 (明日山秀文他編), 日本植物防疫協会, 東京, pp. 301-334.
- Ohtsuka, N., Sou, K., Amano, T., Ojima, M., Nakazawa, Y. and Yamada, Y. (1988). Decreased sensitivity of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) to ergosterol biosynthesis inhibitors. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 54 : 629-632.
- Palmer, J.G., Semeniuk, P. and Stewart, R.N. (1966). Roses and blackspot. I. Pathogenicity to excised leaflets of *Diplocarpon rosae* from seven geographic locations. Phytopathology 56 : 1277-1282.
- Palmer, J.G., Semeniuk, P. and Stewart, R.N. (1966). Roses and Blackspot. II. Seasonal variation in host susceptibility and decline of virulence in culture of conidia from *Diplocarpon rosae*. Phytopathology 56 : 1283-1286.
- Saunders, P.J.W. (1967). Host/parasite interaction in black spot disease of roses caused by *Diplocarpon rosae* Wolf. Ann. appl. Biol. 60 : 129-136.
- Svejda, F.J. and Bolton, A.T. (1980). Resistance of rose hybrids to three races of *Diplocarpon rosae*. Can. J. Plant Pathol. 2 : 23-25.
- Toyoda, H. and Ouchi, S. (1991). The use of somaclonal variation for the breeding of disease resistant plants. In Molecular Strategies of Pathogens and Host

Table 2. Responses of rose cultivars (*R. hybrida*) and wild rose (*R. multiflora*) against *S. pannosa* KS-pl and *D. rosae* KD-r1.

Test plants	Response	
	KS-pl	KD-r1
<i>R. multiflora</i>		
wild rose "C"	R	R
<i>R. hybrida</i> cv.		
Doroless	S	S
Carl Red	S	S
Paul's Pink	R	S
Magic	R	S

R, resistant ; S, susceptible.

- Plants (Patil, S.S., *et al.* eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 229-239.
13. 豊田秀吉・吉田健二・緒方陽子・森川芳恵・是枝一春・茶谷和行・大内成志 (1993). バラ葉外植片からのカルス誘導と個体再生系の確立. 植物組織培養 10: 293-297.
14. 豊田秀吉・是枝一春・吉田健二・茶谷和行・大内成志 (1994). バラの組織培養. 植物細胞工学 6: 154-157.
(平成7年7月17日受付; 平成7年12月18日受理)