

## ‘印度’のリンゴ斑点落葉病耐病性突然変異体の in vitro 選抜

In vitro selection of a mutant resistant to Alternaria blotch disease in ‘Indo’ Apple.

リンゴ斑点落葉病は、黒星病とともに我が国のリンゴ栽培における重要病害の一つである。リンゴ斑点落葉病菌はAM毒素という代表的な宿主特異的毒素を生成する。この毒素に対するリンゴ品種の反応は、本病害に対する感受性とよく一致することが明らかになっている。そこで、リンゴ斑点落葉病に罹病性の品種‘印度’を用い、培養シュートにガンマ線 ( $^{60}\text{Co}$  線源) を照射して変異の誘発・固定をはかり、斑点落葉病菌の生成するAM毒素を用いた in vitro における選抜を行った。

斑点落葉病菌はAKI-3株を用いた。V-8ジュース培地とアンズ培地を用いて菌を培養し、AM毒素を含む培養濾液を採取した。この培養濾液を加えたシャーレに培養シュートから採取した葉切片を置床し、28℃暗所でインキュベートし、48及び72時間後に反応を観察した。まず、リンゴ数品種の培養シュートから採取した葉切片に斑点落葉病菌の培養濾液を処理した場合の反応を調査した(第1表)。AM毒素高感受性品種の‘印度’‘レッドゴールド’では著しい褐変が認められたが、低感受性の‘ふじ’‘ゴールドデンデリシャス’、抵抗性品種の‘ガラ’では反応が認められなかった。高感受性品種で

は培養濾液の10倍の希釈濃度まで褐変が認められたが、100倍に希釈した場合褐変は認められず、圃場の新梢の葉切片における毒素に対する反応(第2表)と比較すると明らかに反応が弱かった。次に、高感受性品種‘印度’の培養シュートに線量率2.5及び5.0Gy/h(総線量80Gy)でガンマ線の急照射を行い、VM<sub>3</sub>世代まで増殖した。VM<sub>3</sub>世代以降の各世代において、シュートの葉切片を採取し、培養濾液処理に対して明らかに反応して葉切片が褐変したものを淘汰し、残ったものをさらに各シュートごとに増殖するという方法で耐病性の選抜を行った。2.5Gy/h試験区でシュート数6492本、5.0Gy/h試験区でシュート数3602本について検定を行ったところ、線量率5.0Gy/h試験区のVM<sub>6</sub>世代において耐病性個体1系統を選抜した。選抜した突然変異系統の耐病性は、原品種‘印度’よりも明らかに強く、低感受性品種の‘ふじ’よりも強かった(第1図)。得られた耐病性突然変異系統を in vitro で発根させ、馴化後温室で養成した。伸長した新梢の葉を用いて耐病性を調査したところ、in vitro における結果と同様の結果が得られた(第2図)。

(増田哲男・吉岡藤治)



第1図 ‘印度’のリンゴ斑点落葉病耐病性突然変異体の培養シュート葉切片の粗毒素に対する反応(左より、耐病性突然変異体、高感受性品種‘印度’、低感受性品種‘ふじ’、抵抗性品種‘ガラ’)

Fig. 1 Response of AM-toxin on the in vitro leaves in the resistant mutant induced from ‘Indo’ apple to Alternaria blotch disease and control cultivars, ‘Indo’, ‘Fuji’ and ‘Gala’ (Left to right).



第2図 温室で育成した‘印度’のリンゴ斑点落葉病耐病性突然変異体の新梢葉切片の粗毒素に対する反応(左より、耐病性突然変異体、高感受性品種‘印度’、低感受性品種‘ふじ’、抵抗性品種‘ガラ’)

Fig. 2 Response of AM-toxin on the in vivo leaves in the resistant mutant induced from ‘Indo’ apple to Alternaria blotch disease and control cultivars, ‘Indo’, ‘Fuji’ and ‘Gala’ (Left to right).

第1表 斑点落葉病菌の培養濾液に対する培養シュート葉切片の反応 (48/72時間後)

Table 1 Response of AM-toxin on the in vitro leaves in the control cultivars, 'Indo', 'Redgold', 'Golden Delicious', 'Fuji' and 'Gala'. Data were shown 48 or 72 hour after treatment with crude AM-toxin in the darkness at 28°C.

品種 Cultivar	希釈倍率 Rate of dilution		
	× 1	× 10	× 100
Indo	+++~++++/++++	+~++/++~+++	-/-
Redgold	++~++++/+++~++++	+~++/++	-/-
Fuji	-/-	-/-	-/-
Golden Delicious	-/-	-/-	-/-
Gala	-/-	-/-	-/-

第2表 斑点落葉病菌の培養濾液に対する '印度' 新梢葉切片の反応 (48/72時間後)

Table 2 Response of AM-toxin on the in vivo leaves in the control cultivars, 'Indo'. Data were shown 48 or 72 hour after treatment with crude AM-toxin in the darkness at 28°C.

希釈倍率 Rate of dilution	葉位 Leaf position on the shoot tip				
	1	2	3	4	5
× 1	++/++++	+++/++++	+++/++++	++/++++	+/++++
× 10	++/++++	+++/++++	+++/++++	++/++	+/+
× 100	+/++	-/+	-/+	-/+	-/+

## In vitro selection of a mutant resistant to Alternaria blotch disease in 'Indo' Apple.

Alternaria blotch disease, caused by *Alternaria alternata* apple pathotype, is one of the most serious diseases of the susceptible cultivars of apple, 'Indo', 'Redgold' and 'Red Delicious'. Some fungal pathogens, including *A. alternata* apple pathotype, produce host-specific toxins. Such toxins are useful for quantitative detection of differences in susceptibility to the pathogen. By the use of acute irradiation of gamma-rays to in vitro cultured shoots, the selection of a resistant mutant to Alternaria blotch disease has been performed using crude AM-toxin.

In vitro cultured shoots were irradiated at 2.5 or 5.0 Gy/h to a total dose of 80 Gy. After micropropagation in VM<sub>1</sub>-VM<sub>3</sub> generation, screening tests using crude AM-toxin were conducted through each generation of shoot culture. A virulent strain (AKI-3) of *A. alternata* apple pathotype was used in the experiment. Harvested leaves from in vitro cultured shoots were kept for 48 or 72 hours in a moist condition and in darkness at 28 °C.

In susceptible 'Indo' and 'Redgold', which show typical symptoms with crude AM-toxin, necrotic lesions appeared on harvested in vi-

tro leaves. On the other hand, necrosis was not observed in half or full resistant 'Fuji', 'Golden Delicious' and 'Gala' (Table1). In susceptible 'Indo', the necrotic area was smaller on the in vitro leaves than on the in vivo leaves (Table 1 and Table 2).

6,492 in vitro shoots irradiated at 2.5 Gy/h and 3,602 in vitro shoots irradiated at 5.0 Gy/h were tested in the VM<sub>3</sub>-VM<sub>6</sub> generations. A resistant mutant to Alternaria blotch disease was selected from the treatment at 5.0 Gy/h. After treatment with crude AM-toxin on the in vitro and in vivo leaves, no necrotic areas were observed in the resistant mutant (Fig. 1 and Fig. 2). In these experiments, it is confirmed that resistance to Alternaria blotch disease in the resistant mutant is clearly higher than that of the original 'Indo' apple.

(Tetsuo MASUDA and Toji YOSHIOKA)