

青枯病萎凋誘導物質を用いた細胞選抜法による 耐病性ナス科個体の作出

浅尾浩史・谷川元一・岡山健夫・荒井 滋

Breeding of Resistant *Solanum spp.* for Bacterial Wilt by Cell Selection using a Wilt-inducing Product

Hiroshi ASAO, Motokazu TANIGAWA, Ken'ō OKAYAMA and Shigeru ARAI

Summary

A wilt-inducing product(WIP) produced by a virulent *Pseudomonas solanacearum* was extracted. The selection method of the cells resistant to bacterial wilt was investigated by means of cell cultures using the WIP.

1. The growth of hypocotyl calli in *S. torvum* and *S. melongena* was repressed by the treatment of 1,000 ppm WIP.
2. FDA activity of isolated protoplasts was not affected by the WIP, but colony formation in *S. integrifolium* and *S. melongena* was repressed by the treatment of WIP in excess of 1,000 ppm in the first medium.
3. In *S. sanitwongsei*, the growth of hypocotyl calli and colony formation were not affected by the treatment of WIP, but protoplast derived calli became brownish and growth was repressed by it.
4. The difference of the sensitivity for WIP was due to materials and cell stages.
5. The resistant plant for bacterial wilt was obtained from regeneration plants.

Key words: *Solanum spp.*, *Pseudomonas solanacearum*, Wilt-inducing product, Cell selection

緒 言

ナスは本県の主要野菜の一つであり、土壌病害対策として耐病性台木を用いた接ぎ木栽培が行われている。しかし、近年、その効果もうすれ、青枯病の発生が増加しつつある。土壌中に生息する青枯病菌は、作物の根の傷口から侵入し、導管部で増殖して作物を萎凋させる。この萎凋症状には、菌が産出する細胞外多糖物質 (Exopolysaccharide: EPS)^{3) - 6)} が係っていると考えられている^{1 8)}。

そこで、著者らは、青枯病萎凋誘導物質を用いた細胞選抜技術による耐病性台木の育成に取り組んでいる。まず、培養系の確立のため、ナス科植物のプロトプラスト培養に取り組み、植物体の再分化に成功した^{1) 2)}。また、青枯病菌の培養濾液から青枯病萎凋誘導物質の分離・定

量法の確立やその構成成分に関する幾つかの知見を得た^{13) - 15)}。

本報では、カルスおよびプロトプラスト培養中にナス幼苗を萎凋させる青枯病萎凋誘導物質を選抜圧として用い、細胞選抜の有効性を検討したので、その結果を報告する。

材料および方法

供試材料として、台木のサニトワグセイ (*S. sanitwongsei*)、トルバム・ピガー (*S. torvum*)、およびヒラナス (*S. integrifolium*) と、栽培種の千両二号 (*S. melongena*) を用いた。

萎凋誘導物質の抽出は Gowda らの方法⁴⁾ を一部改変して以下のように行った。まず、青枯病菌を T Z C 培地 (0.5% グルコース、0.5% サッカロース、1% ペプトン、

0.1%カザミノ酸、pH7)で25°C、5日間振盪培養し、遠心分離(10,000 rpm、10分間)した後、上澄み液からアルコール沈殿法により沈殿物を得た。これをセロハンチューブを用いて水に一晩透析し、遠心分離した後、得られた上澄み液を凍結乾燥して萎凋誘導物質とした。なお、一部を除き萎凋誘導物質は濾過滅菌した後培地に添加した。

1. 萎凋誘導物質が種子発芽に及ぼす影響

前述供試種子を100 ppmジベレリンに1日浸漬した後、80%エチルアルコールに数秒間浸漬し、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素1%)溶液で30分滅菌処理を施した。さらに滅菌水で3回洗浄した後、萎凋誘導物質(0~2,000 ppm)を含んだ1/2 MS培地(0.2%ゲルライト)に各50粒ずつ播種し、25°C、16時間照明下で培養した。サニトワグセイとトルバム・ビガーは播種後21日目に、ヒラナスと千両二号は14日目に発芽率を調査した。

2. 萎凋誘導物質が胚軸カルスに及ぼす影響

無菌播種して育成した各植物体の胚軸切片をナフタレン酢酸(NAA)1 mg/lと6-ベンジルアミノプリン(BA)1 mg/lを含んだMS培地(3%サッカロース、0.2%ゲルライト、pH5.8)に置床し、胚軸由来カルスを得た。このカルスを2 mm角の大きさに切り、萎凋誘導物質(0~1,000 ppm)を含んだ上記と同じMS培地に置床した。各処理区におけるカルスの生育を培養14日目と28日目に調査した。

3. 萎凋誘導物質がプロトプラスト培養系に及ぼす影響

1) プロトプラストのFDA(二酢酸フルオレセイン)活性に及ぼす影響

無菌播種して育成した各植物体の子葉をCPW塩¹⁹⁾を含む0.5 Mマニトール液中で約1 mm幅に刻み、酵素液に浸漬し、25°C、暗黒下で16時間静置処理を行ってプロトプラストを単離した。なお、用いた酵素液は、0.3%セルラーゼオノズカR-10、0.06%マセロザイムR-10、10 mM MES(pH5.8)、CPW塩を含む0.5 Mマニトール液である。単離したプロトプラストに、萎凋誘導物質(0~1,000 ppm)を添加し、最終濃度が0.01%になるようにFDAを加え、その活性を蛍光顕微鏡で観察した。なお、調査はプロトプラスト単離3時間後と3日後に行った。

2) コロニー形成に及ぼす影響

プロトプラストの初代培地及び培養1週間後に萎凋誘導物質(0~1,000 ppm)を添加して、2週間後のコロニー形成率および4週間後のコロニー数を調査した。なお、初代培地は、2,4ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)0.5 mg/l、NAA1 mg/l、カイネチン(KIN)1 mg/l、0.45 Mグルコース(10 mM MES、pH5.8)を含むKM8p培地⁸⁾を用い、 5×10^4 個/mlの細胞密度で培養した。培養は7日目までは25°C、暗黒下で行い、それ以後は25°C、500 lux条件下で行った。

3) プロトプラスト由来小カルスの生育に及ぼす影響

サニトワグセイについては、プロトプラスト由来小カルスを濾過滅菌およびオートクレーブ滅菌した萎凋誘導物質(0~1,000 ppm)を添加したカルスグリーン化培地(C培地)¹²⁾で10日間培養し、カルスの生育を調査した。その後、それらのカルスをゼアチン(Zeatin)3 mg/lとインドール酢酸(IAA)0.2 mg/lを含むMS培地(再分化培地)に移植して、20日後と30日後にカルスの生育を調査した。

4. プロトプラスト由来サニトワグセイの汚染圃場での検討

第1表に示したような萎凋誘導物質処理をしたI~IVの個体群のプロトプラスト由来の植物体を順化し、千両二号を穂木として接ぎ木をした。それらの苗を1990年6月4日に青枯病汚染圃場に定植し、7月4日と10月1日に枯死株を調査した。

第1表 萎凋誘導物質の処理時期と濃度

Table 1. The treatment period and concentration of wilt-inducing product

個体群	萎凋誘導物質の添加 (ppm)	
	プロトプラスト培養時	カルス形成時
I	-	500
II・III・IV	1,000	100

結 果

1. 萎凋誘導物質が種子発芽に及ぼす影響

萎凋誘導物質の1,000 ppm以下の処理区では、千両二号以外の供試材料において90%以上の発芽率を示し、種子発芽において、萎凋誘導物質の影響はさほど認められなかった。しかし、2,000 ppm処理区において、サニトワグセイは56%、千両二号は64%の発芽率であり、

種子発芽は約 40 ~ 50 % 抑制された (第 2 表)。

2. 萎凋誘導物質が胚軸カルスに及ぼす影響

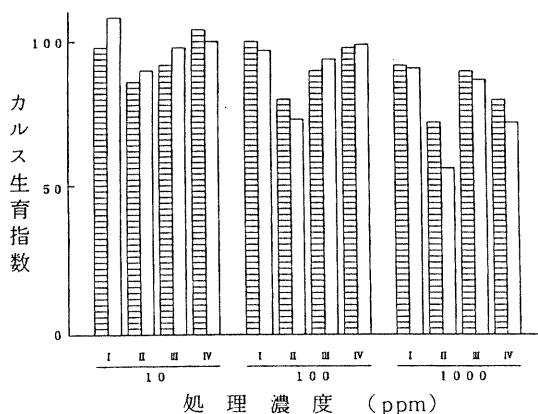
萎凋誘導物質の 10 ppm と 100 ppm の処理区ではトルバム・ビガー以外の供試材料において 90 以上のカルス生育指数を示し、萎凋誘導物質の影響は認められなかった。1,000 ppm 処理区において、培養 28 日目のカルス生育指数は、萎凋誘導物質の影響を受けたトルバム・ビガーと千両二号はそれぞれ 55.5 と 71.9 であり、さほど影響を受けなかったサニトワグセイとヒラナスはそれぞれ 91.2 と 86.7 であった。また、1,000 ppm の処理区は 10 ppm 及び 100 ppm 処理区とは異なり、全ての供試材料において培養 28 日目のカルス生育指数が培養 14 日目の値より小さくなり、培養期間を長くすることにより萎凋誘導物質の影響が顕著になった (第 1 図)。

第 2 表 萎凋誘導物質が種子発芽に及ぼす影響

Table 2. Effect of wilt-inducing product on germination

供 試 材 料	処 理 濃 度 (ppm)				
	0	10	100	1000	2000
サニトワグセイ	98	98	98	90	56
トルバム・ビガー	100	100	100	98	96
ヒラナス	100	100	98	98	88
千両二号	92	80	80	76	64

注) サニトワグセイとトルバム・ビガーは播種後 21 日目に、ヒラナスと千両二号は播種後 14 日目に調査した。データは発芽率 (%)



第 1 図 萎凋誘導物質が胚軸由来カルスに及ぼす影響
Fig. 1. Effect of wilt-inducing product on hypocotyl calli

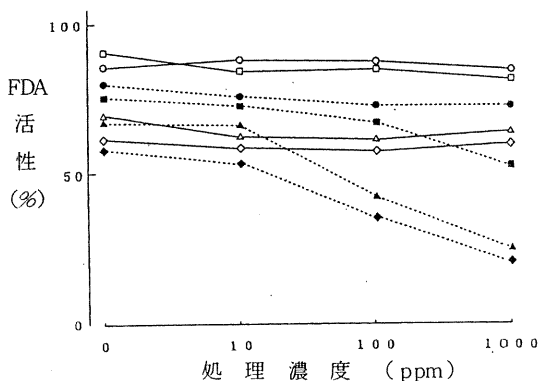
注) I: サニトワグセイ II: トルバム・ビガー
III: ヒラナス IV: 千両二号
□: 培養 14 日目 □: 培養 28 日目
カルス生育指数: 無処理区のカルス生育を 100 とした時の値

3. 萎凋誘導物質がプロトプラスト培養系に及ぼす影響

FDA 活性からみて、プロトプラスト単離 4 時間目では、全ての供試材料において萎凋誘導物質の影響は認められなかった。また、萎凋誘導物質処理後 3 日目では、10 ppm 処理での影響は認められなかったが、100 ppm 以上の処理ではヒラナスと千両二号、1,000 ppm の処理ではトルバム・ビガーの FDA 活性が低下し、萎凋誘導物質の影響が認められた (第 2 図)。

サニトワグセイのプロトプラスト培養において、萎凋誘導物質の処理はプロトプラスト培養 2 週間後のコロニー形成率と 4 週間後のコロニー数に全く影響を与えなかった。一方、ヒラナスのプロトプラスト培養においては、萎凋誘導物質を培養 1 週間後に 100 ppm 添加した区では、コントロールと変わらないコロニー形成を示したのに対して、初代培地に 100 ppm 添加した区では、非常に低いコロニー形成率 (0.11%) を示し、4 週間後のコロニー数も 1 シャーレあたり平均 60 個であった。なお 1,000 ppm 添加区では、4 週間後にコロニーは全く認められなかった。また、千両二号のプロトプラスト培養における萎凋誘導物質の影響はヒラナスと同様な結果が得られたが、初代培地に 1,000 ppm 添加した区で 1 シャーレあたり平均 1 個のコロニーが認められた (第 3 表)。

C 培地への濾過滅菌およびオートクレーブ滅菌した萎凋誘導物質の添加は、処理濃度に関係なくサニトワグセイのプロトプラスト由来小カルスの生育を抑制し、全ての



第 2 図 萎凋誘導物質がプロトプラストの FDA 活性に及ぼす影響

Fig. 2. Effect of wilt-inducing product on FDA activity of protoplasts

注) ○: サニトワグセイ □: トルバム・ビガー
△: ヒラナス ◇: 千両二号
白印: プロトプラスト単離 4 時間後の活性
黒印: プロトプラスト単離 3 日後の活性

第3表 萎凋誘導物質がコロニー形成に及ぼす影響

Table 3. Effect of wilt-inducing product on protoplast culture

萎凋誘導物質 (ppm)		2週間後のコロニー形成率 (%)			4週間後のコロニー数 ^{a)}		
初代培地	1週間後	サニトワグセイ	ヒラナス	千両二号	サニトワグセイ	ヒラナス	千両二号
0	0	40.55	6.73	0.56	+ ^{b)}	+	90
	100	35.42	6.41	0.24	+	+	72
	1000	37.80	0.35	0.00	+	0	0
100	0	35.05	0.11	0.05	+	60	43
	100	39.40	0.03	0.02	+	16	3
	1000	34.07	0.00	0.00	+	0	0
1000	0	37.20	0.01	0.01	+	0	1
	100	35.68	0.00	0.00	+	0	0
	1000	36.63	0.00	0.00	+	0	0

a) 1シャーレあたりのコロニー数

b) 500個以上のコロニー数

第4表 萎凋誘導物質がサニトワグセイのプロトプラスト由来小カルスの生育に及ぼす影響

Table 4. Effect of wilt-inducing product on protoplast derived calli of *S. sanitwongsei*

処理濃度 (ppm)	置床カルス数	C培地上のカルス ^{a)}			20日後 ^{b)}			30日後 ^{b)}		
		W-B ^{c)}	G ^{d)}	大きさ ^{e)}	W-B	G	大きさ	W-B	G	大きさ
0	20	0	20	1.5	0	20	6.2	0	20	8.7
濾過滅菌										
10	20	20	0	1.3	6	14	2.4	1	19	5.3
100	20	20	0	1.4	14	6	1.4	5	15	4.2
1000	20	20	0	1.2	18	2	1.4	8	12	3.0
オートクレーブ滅菌										
10	20	20	0	1.2	10	10	1.9	9	11	2.7
100	20	20	0	1.1	8	12	2.1	9	11	2.2
1000	20	20	0	1.1	13	7	1.4	11	9	2.7

a) C培地移植10日後

b) 再分化培地移植後日数

c) 白色～褐色のカルス数

d) 緑色のカルス数

e) カルス径 (mm)

第5表 汚染圃場におけるプロトプラスト由来サニトワグセイの検定

Table 5. Test of *S. sanitwongsei* from protoplasts in infected field

個体群	個体数	枯死株数	
		7月4日	10月1日
接ぎ木苗			
I	5	0	1 (20.0) ^{a)}
II	3	1	1 (33.3)
III	3	0	0 (0)
IV	2	0	0 (0)
合計	13	1	2 (15.4)
実生台	10	7	10 (100.0)
自根苗			
サニトワグセイ	5	0	0 (0)
ヒラナス	5	1	5 (100.0)
千両二号	5	5	5 (100.0)

a) 枯死株率

カルスを褐変させた。また、再分化培地において、濾過滅菌した萎凋誘導物質の処理区では処理濃度を高める程カルスの生育を抑制したが、オートクレーブ滅菌した萎凋誘導物質の処理区では処理濃度に関係なくカルスの生育を著しく抑制した (第4表)。

4. プロトプラスト由来サニトワグセイの汚染圃場での検討

10月1日に、サニトワグセイの実生苗に接いだ穂木が100%枯れたのに対し、選抜圧をかけたプロトプラスト由来サニトワグセイに接いだ穂木 (I～IV) の枯死率は15.4%だった (第5表)。

考 察

病原菌が産出する宿主特異的毒素を用いたり、毒素が同定できない場合、病原菌の培養濾液を用いて細胞を選抜し、耐病性個体を育成することについては、幾つか報告されている^{6) 10) 16) 17)}。

ナス青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) については、特定の毒素が関与しているかどうかはわかっていないが、青枯病菌が作出する EPS あるいは酵素によって作物の組織が破壊されるとの報告がある^{7) 11)}。著者らも青枯病菌の培養濾液から抽出したアミノ酸やガラクトサミンや N-アセチルガラクトサミンなどで構成される物質が、ナスの幼苗を萎凋させることを明らかにしており¹⁵⁾、今回、それぞれの萎凋誘導物質についてナスの種子および培養系での選抜圧としての有効性を検討した。種子の発芽においては、Gowda⁴⁾ らが 10 mg/ml の粗毒素が *S. melongena* の発芽を遅延させたのと比べているように、本実験でも 2,000 ppm の萎凋誘導物質処理が千両二号とサニトワグセイの発芽率を抑制した。また萎凋誘導物質は全ての供試材料で、単離直後のプロトプラストに対して全くダメージを与えなかった。しかし、ヒラナスと千両二号では、初代培地に萎凋誘導物質を添加して培養した場合と、培養 1 週間後に添加した場合とでは、前者のコロニー形成が顕著に劣った。このことから、萎凋誘導物質はプロトプラストの細胞膜を強くアタックし、死に至らしめるような物質ではないが、培養初期のプロトプラスト由来細胞に対してより強くダメージを与えると考えられる。また、サニトワグセイでは、胚軸カルスの生育やプロトプラストからのコロニー形成に萎凋誘導物質の影響をほとんど受けなかったが、プロトプラスト由来小カルスは敏感に反応して褐変し生育も抑制された。

以上の結果より、*in vitro* での選抜圧として萎凋誘導物質は有効と考えられるが、萎凋誘導物質に対する感受性は、供試材料の違いにより異なること、処理をする細胞の生育ステージにおいても微妙に異なることから、さらに、細胞選抜の最適条件を究明したい。また、青枯病汚染圃場で選抜カルスから再分化した個体の中に耐病性を有する個体を確認したので、今後、それらの後代について検討したい。

摘 要

Pseudomonas solanacearum の培養濾液から抽出した萎凋誘導物質をナス科作物の培養系に選抜圧として

用い、青枯病抵抗性細胞の選抜方法を検討した。

1. 胚軸カルスに萎凋誘導物質を 1,000 ppm 処理した結果、トルバム・ビガーと千両二号でカルスの生育が抑制された。
2. 全ての供試材料において、プロトプラスト単離直後の萎凋誘導物質処理は、それらの FDA 活性に影響をおよぼさなかった。しかし、ヒラナスと千両二号では、初代培地へ 100 ppm 以上の萎凋誘導物質を添加することにより、コロニー形成が顕著に抑制された。
3. サニトワグセイは、胚軸カルスおよびプロトプラストからのコロニー形成において、萎凋誘導物質の影響をほとんど受けなかったが、プロトプラスト由来小カルスは敏感に反応して、カルスは褐変し生育も抑制された。
4. 萎凋誘導物質に対する感受性は、供試材料および処理をする細胞の生育ステージにより異なった。
5. 再生個体の中から、青枯病に対して、耐病性の個体を得た。

謝 辞

本研究において、御指導・御助言いただきました協和発酵工業株式会社の清沢茂久博士に深く感謝の意を表します。

引 用 文 献

1. 浅尾浩史・荒井 滋・小島博文, 1988. ナス及び近縁野生種の葉肉プロトプラストからの茎葉分化. 園学要旨 63 春: 204 - 205.
2. ———・谷川元一・—————, 1989. 栽培ナスおよび近縁野生種の葉肉プロトプラストからの植物体再生. 奈良農試研報, 20: 73 - 78.
3. DUDMAN, W.F. 1959. Comparison of slime from tomato and banan strains *Pseudomonas solanacearum*. Nature 184:1969 - 1970.
4. GOWDA, S.S. and VITTAL, R.P. 1980. Phytotoxic glycopeptides produced by *pseudomonas solanacearum*. Phytopath. Z. 98:68 - 75.
5. ——— and ———, 1980. Phytotoxic glycopeptides produced by *Pseudomonas solanacearum* II. Phytopath. Z. 98:76 - 81.
6. HUSAIN, A. and KELMAN, A. 1958. Relation slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathol. 48:155 - 165.
7. ——— and ———, 1958. The role of pectin and cellulolytic enzymes in pathogene by *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathol. 48:377 - 386.

8. KAO, K.N. and M.R. MICHAYLUK. 1975. Nutritional requirements for growth of vicia hajastana cell and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*.126:105 - 110.
9. MARGARET, E.B. 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24:159 - 186.
10. MONIKA, B. 1980. Selection of dihaploid potato callus for resistance to culture filtrate of *Fusarium oxysporum*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 85:254 - 258.
11. SCHELL, M. 1987. Purification and characterization of an endoglucanase. *Appl Environ Microbiol.* 53:2237 - 2241
12. SHERARD, J.F. and R.E. TOTTEN 1977. Mesophyll cellprotoplasts of potato. *Plant Physiol.* 60:313 - 316.
13. 谷川元一・浅尾浩史・岡山健夫. 1988. ナス科作物青枯病の萎凋誘導物質の定量法. *関西病虫研報* .30:112.
14. ———— . 1988. ナス科青枯菌 (*Pseudomonas solanacearum*) が産出する萎凋誘導物質の性質. *日植病報* . 55:104.
15. ———— . 1991. ナス科青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) が生産する細胞外多糖物質の萎凋誘導活性と構成成分. *奈良農試研報* . 22:23 - 27.
16. 豊田秀吉. 1990. 培養カルス系による耐病性植物の選抜. *化学と生物* .28(1):12 - 19.
17. VARDI, A., E. EPSTEIN and A. BREIMAN. Is the Phyto - phthora citrophthora culture filtrate a reliable tool for the in vitro selection of resistant Citrus variants? *Theor Appl Genet.* 72:569 - 574.
18. WALLIS, F.M. and S.J. TRUTER. 1978. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. *Physiol Plant Pathol.* 13:307 - 317.
19. XU, Z.H., M.R. DAVEY and E.C. COOKING. 1981. Isolation and sustained division of *Phaseolus aureus* (mungbean) root protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:289 - 298.