



| | |
|------------------|---|
| Title | 培養系を利用したアスパラガス茎枯病抵抗性株の育成に関する研究：（第1報）毒素抵抗性カルスの選抜と選抜カルスの特性 |
| Author(s) | 溝延, 学; 荒木, 肇; 八鍬, 利郎; 市原, 耿民 |
| Citation | 北海道大学農学部邦文紀要, 16(3), 245-255 |
| Issue Date | 1989-03-30 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/12100 |
| Type | bulletin (article) |
| File Information | 16(3)_p245-255.pdf |



[Instructions for use](#)

培養系を利用したアスパラガス茎枯病 抵抗性株の育成に関する研究

(第1報) 毒素抵抗性カルスの選抜と選抜カルスの特性*

溝延 学・荒木 肇・八 鍬 利 郎

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学講座)

市 原 耿 民

(北海道大学農学部農産物利用学講座)

(昭和63年10月31日受理)

Studies on the Selection of Resistance to Asparagus Stem Blight with Tissue Culture

I. Selection of callus for resistance to phytotoxin and characteristics of selected calli

Gaku MIZONobe, Hajime ARAKI, Toshiro YAKUWA

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

Akitami ICHIHARA

(Utilization of Agricultural Products, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

緒 言

アスパラガス茎枯病はアスパラガス茎枯病菌 *Phoma asparagi* Sacc. によって起こる病害である。この病原菌は残存する茎上で柄子殻の形態で越冬し、翌年初夏の降雨によって殻内の柄胞子が放出され成茎に感染する。現在のところ、防除法としては、農薬の茎葉散布や罹病茎の焼却などが行われているが、完全な防除法が確立したとはいえず、年によって極めて大きな被害をうけている。また、茎枯病抵抗性品種の育成については、交雑すべき抵抗性系統が見出されていないため、研究は停滞しているのが実状である。すでにジャガイモ^{1,2,3)}、トウモロコシ^{6,7)}、アルファルファ⁸⁾、サトウキビ⁹⁾、ナタネ¹⁶⁾で病原菌毒素を用いて病害抵抗性株の育成が試みられているが、アスパラガスに関してはそれに関する報告はみられない。しかし、アスパラガス茎枯病菌からいくつかの毒素の抽出が成功しており、そのうち特定の単離物質

によるアスパラガスの幼苗の伸長阻害作用が確認されている¹¹⁾。そこで、こうした病原菌毒素をカルスの増殖培地に加えて培養して抵抗性を示すカルスを選抜し、それから個体を再生させることによって茎枯病抵抗性株を作出する目的で本研究に着手した。本報では、アスパラガス茎枯病抵抗性カルス作出のための基礎的な条件、すなわち、毒素添加培地に置床する際のカルスの大きさ、カルス増殖培地中の毒素の影響、カルス増殖培地中の毒素に対する品種間差および毒素抵抗性カルスの特性について検討した結果を報告する。

材料および方法

1. 供試カルスの誘導

北海道大学農学部附属農場に栽植してある 'Mary Washington 500 W' 'New Jersey' 'Grün Krone' 'Goldschatz' 'L'Argenteuil' '瑞洋' 'Eden' 'Viking' の8品種の若茎(長さ15~20 cm)を採取し、70% エチル

* 文部省科学研究費補助金(一般A)、課題番号61440010による研究成果

アルコールで30秒、アンチホルミン(有効塩素1%)で15分浸漬して滅菌した後、滅菌水で2回すすいで滅菌剤を洗い流した。滅菌後、厚さ1~2mmの節間部輪切り切片をカルス誘導培地(MS培地を基本とし、2,4-DあるいはNAA 1ppm, BA 0.1ppm, しょ糖 20g/l, 寒天 6g/lを含み、pHは5.8に調整)に置床した。25°C、暗黒条件下で約30日間培養して得たカルスを同培地に移植し、さらに同条件下で約30日間継代培養した直径約10mmの大きさのカルスを供試した。

2. 供試毒素の作成過程

アスパラガス茎枯病菌 *Phoma asparagi* Sacc. ADL-9をブドウ糖 35g/lを含むジャガイモ煮汁(以下PG培

地)で35日間、26°Cで培養し、その培養液を3枚重ねのガーゼでろ過した。得られた培養ろ液 15ℓを酢酸エチルで3回抽出を繰り返した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮すると酢酸エチル抽出物 2.92gが得られた。また、減圧濃縮の過程で、ジヒドログラジオール酸(以下DGA)の結晶が析出した。なお、酢酸エチル抽出物にはDGA、アルチロキシンA、アルチロキシンBが成分として含まれていることが明らかになっている¹²⁾。以上のうち、本研究では、DGA、培養ろ液、酢酸エチル抽出物の3種および、アルチロキシンAを合成する過程で得られる合成中間体の α -ケト¹⁰⁾を毒素として供試した(Fig. 1)。

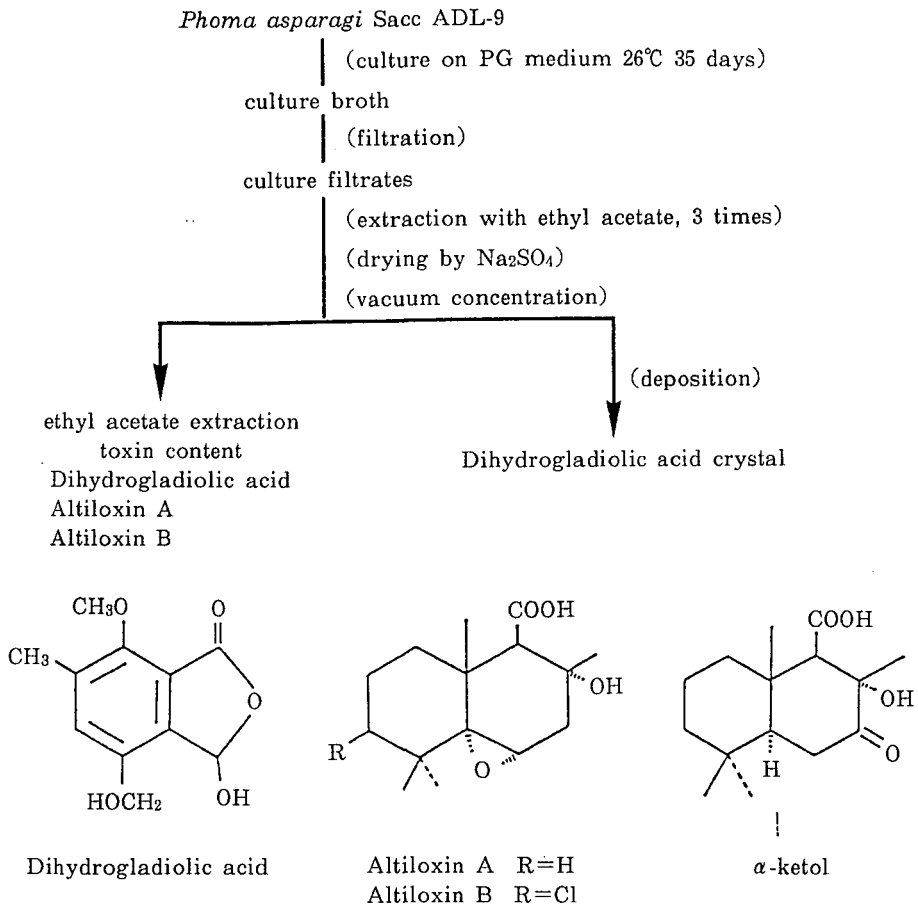


Fig. 1. Preparation of toxins utilized in this study.

Culture filtrates, ethyl acetate extraction, Dihydrogladiolic acid and α -ketol which is an intermediate product of the synthesis of Altiloxin A. These were added in callus growth medium as toxin.

3. 抵抗性カルスの選抜

実験1 カルス増殖に及ぼす DGA およびカルスの大きさの影響

実験材料として 'Mary Washington 500 W' の若茎由来のカルスを用いた。置床カルスは直径約 10 mm の大きさに生長したカルス塊を直径約 2 mm (約 10 mg) と約 5 mm (約 50 mg) の小塊に分割して用いた。培地はカルス増殖培地 (前出のカルス誘導培地と同じ組成) に DGA 0, 1, 10, 100 ppm を添加した 4 区を設定した。毒素添加後培地を径 4.5 cm シャーレに 6 ml ずつ分注し、1 処理区当り 64 個のカルスを置床した。培養条件は、白色蛍光灯 2,500 lx, 16 時間日長, 25°C とした。調査は、培養開始後 30, 60 日目にカルスの生重量を測定し、増加指数を算出した。増加指数は最初に植え込んだカルスの生重量を 1 とした場合の調査時のカルス生重量の指数とした。

実験2 カルス増殖に及ぼす培養ろ液および PG 培地の影響

実験材料は実験 1 と同様に 'Mary Washington 500 W' の若茎由来のカルスで、カルスの大きさは直径約 2 mm の小塊に分割したものをを用いた。培地はカルス増殖培地の組成成分を培養ろ液 1 l に溶解した濃度を 1 倍とし、その培養ろ液を 10 倍, 100 倍に希釈した溶液で 1 l に定量した濃度をそれぞれ 0.1, 0.01 倍として対照区 (培養ろ液無添加区) を含む 4 区を設定した。培養ろ液濃度 1, 0.1, 0.01 倍の区には、それぞれ 91.5%, 9.15%, 0.915% の培養ろ液が含まれている。また、培養ろ液でカルスの生長阻害がみられた場合、それが培養ろ液中の菌の代謝産物によるものか、培養ろ液に含まれる PG 培地自体によるものかを明確にするため、培養ろ液と同様にして PG 培地 1, 0.1, 0.01 倍の濃度区も作成した。そのほか培養法、培養条件、調査などについては実験 1 と同様とした。

実験3 カルス増殖に及ぼす酢酸エチル抽出物、 α -ケトールの影響および品種間差

実験材料として 'Mary Washington 500 W' 'New Jersey' 'Grün Krone' 'Goldschatz' 'L'Argenteuil' '瑞洋' 'Eden' 'Viking' の 8 品種の若茎由来のカルスを用いた。置床カルスの大きさは直径約 2 mm (約 10 mg) とした。酢酸エチル抽出物添加培地は、濃縮酢酸エチル抽出物 2.92 g を水で 1,500 ml に定量した濃度を基準 (1 倍) としてカルス増殖培地に添加することにより、酢酸エチル抽出物濃度 0, 0.5, 1, 2 倍の 4 区を設定した。酢酸エチル抽出物濃度 0.5, 1, 2 倍の区には、それぞれ、

97 ppm, 194 ppm, 388 ppm の酢酸エチル抽出物が含まれている。また α -ケトール添加培地は、カルス増殖培地に、 α -ケトール 0, 1, 10, 100 ppm を添加した 4 区を設定した。それぞれの毒素添加培地は径 6 cm シャーレに 10 ml ずつ分注し、1 処理区当り 50~75 個のカルスを置床した。培養は白色蛍光灯 2,500 lx, 16 時間日長, 25°C の条件下で行った。培養開始後 60 日目に、それぞれの品種の対照区に対する各濃度区のカルスの増殖状態を調査した。すなわち、対照区と同様な増殖状態を示すものを増殖良好、培地との接地面が褐変しているカルスを増殖不良、カルス全体が褐変してしまっているものを枯死として、それぞれの個体数を調査した。

実験4 カルス増殖に及ぼす高濃度毒素添加培地への移植の影響

実験 3 の調査時において、酢酸エチル抽出物を含む培地上で増殖良好を示した 'L'Argenteuil' '瑞洋' のカルスを、それぞれ初期選抜時と同濃度の酢酸エチル抽出物添加培地に移植して約 30 日間培養した。こうした選抜を 4 回繰り返した後に得られた抵抗性カルスを直径約 2 mm に調整して、それぞれ選抜時の酢酸エチル抽出物濃度およびそれらの 2 倍の酢酸エチル抽出物濃度区に置床した。培養は白色蛍光灯 2,500 lx, 16 時間日長, 25°C の条件下で行った。30 日後、増殖したカルスの個体数を調査した。

実験5 毒素無添加培地への移植がカルスの抵抗性の維持に及ぼす影響

実験 4 で得られた抵抗性カルスを酢酸エチル抽出物無添加培地 (カルス誘導培地) に移植して約 90 日間培養し、増殖したカルスを約 2 mm に調整して、再び酢酸エチル抽出物無添加培地移植前と同濃度の酢酸エチル抽出物添加培地に置床した。培養は白色蛍光灯 2,500 lx, 16 時間日長, 25°C の条件下で行った。移植 30 日後、増殖したカルスの個体数を調査した。

実験結果

実験1 カルス増殖に及ぼす DGA の濃度およびカルスの大きさの影響

各区における培養 30 日および 60 日後のカルス増殖状態を Fig. 2 および 3 に示した。増殖指数は直径約 5 mm のカルスでは 2~10 であり (Fig. 2), 直径約 2 mm のカルスでは 5~50 で (Fig. 3), 小さいカルス片の方が増殖指数が大きい。両者とも DGA 濃度により増殖程度には大きな差が認められた。すなわち、DGA 濃度が 100 ppm の区が最も増殖指数が小さく、カルスの生長が阻害

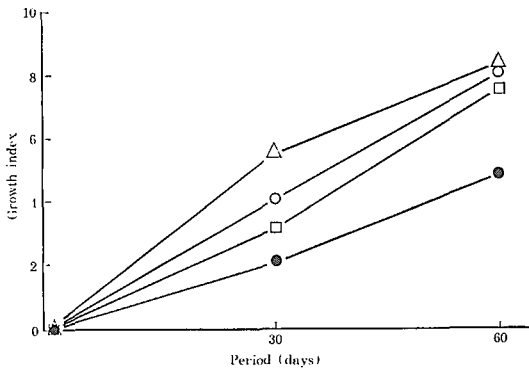


Fig. 2. Effect of DGA on the growth of callus from asparagus stems. Approximately 5 mm callus in size.

Concentration of DGA, 0 ppm (○), 1 ppm (△), 10 ppm (□), 100 ppm (●).

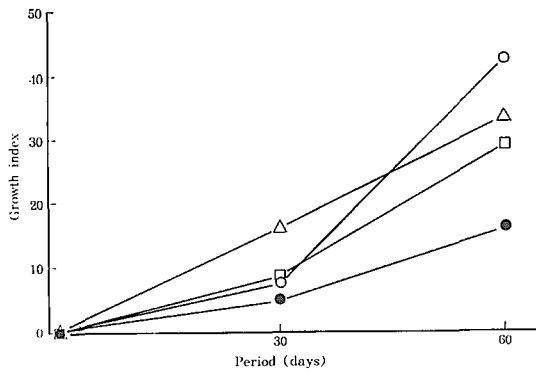


Fig. 3. Effect of DGA on the growth of callus from asparagus stems. Approximately 2 mm callus in size.

Concentration of DGA, 0 ppm (○), 1 ppm (△), 10 ppm (□), 100 ppm (●).

されており、10 ppmの区はこれについて小さかった。1 ppmの区は30日後では対照区より生長が良かったが60日後には対照区と同等かやや小さい程度であった。このことからDGAの濃度が100 ppmであるとカルの生長を明らかに阻害することが認められた。

実験2 カルス増殖に及ぼす培養ろ液およびPG培地の影響

各区におけるカルの増殖状態はFig. 4に示すとおりであった。まず、培養ろ液の試験では、対照区と比較して、培養ろ液添加区ではいずれも増殖指数は低く抑えられ、毒素濃度が0.01, 0.1, 1倍と高くなるに従い、増殖指数は低くなった。特に1倍区では増殖指数が他区よ

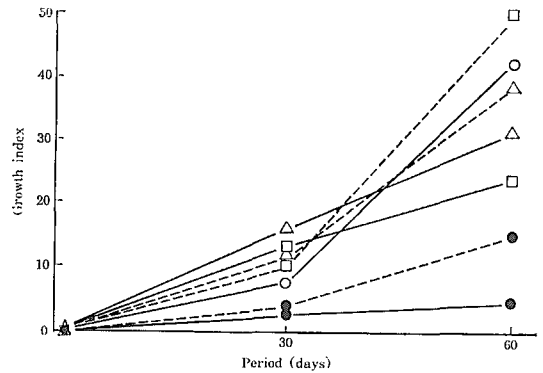


Fig. 4. Effect of culture filtrate and PG medium on the growth of callus from asparagus stems. Approximately 2 mm callus in size.

The culture filtration was diluted by 0.01 to 1-fold by using distilled water. 0.01-fold (---△---), 0.1-fold (---□---), 1-fold (---●---), PG medium was diluted by 0.01 to 1-fold by using distilled water. 0.01 fold (---△---), 0.1-fold (---□---), 1-fold (---●---) control (---○---).

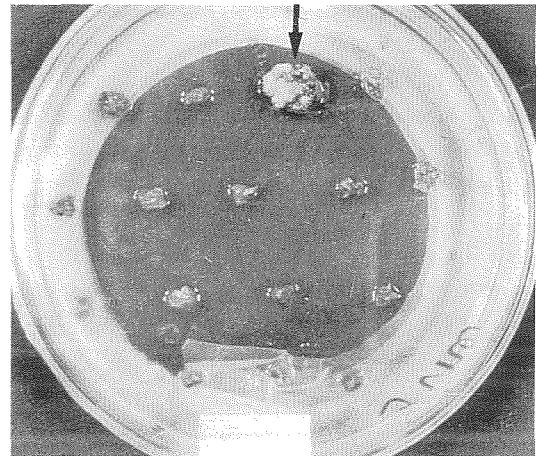


Fig. 5. Asparagus callus on medium containing culture filtrate.

Only one callus is growing (→).

り著しく低く、わずかのカルスしか存在しなかった(Fig. 5)。また、PG培地上でも類似の傾向が認められた。この場合、それぞれの濃度では培養ろ液の方がPG培地より増殖指数は低下していたことにより、明らかに培養ろ液中に存在した毒物がカルの増殖を抑制していたと言える。

Table 1. Effect of ethyl acetate extract on the growth of callus from stems of 8 varieties of asparagus

| Varieties | Toxin concentration ^Z | Number of callus used | Callus growth | | |
|-----------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|------|------|
| | | | vigorous | poor | dead |
| L'Argenteuil | 0 | 64 | 64 (100.0) ^Y | 0 | 0 |
| | 0.5 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 1 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 2 | 64 | 47 (73.4) | 16 | 1 |
| Goldschatz | 0 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 0.5 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 1 | 64 | 62 (96.9) | 2 | 0 |
| | 2 | 64 | 48 (75.0) | 16 | 0 |
| Zuiyo | 0 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 0.5 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 1 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 2 | 64 | 32 (50.0) | 31 | 2 |
| Grün Krone | 0 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 0.5 | 64 | 0 (0) | 63 | 1 |
| | 1 | 64 | 13 (20.3) | 49 | 2 |
| | 2 | 64 | 0 (0) | 60 | 4 |
| New Jersey | 0 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 0.5 | 64 | 17 (26.6) | 47 | 0 |
| | 1 | 64 | 15 (23.4) | 47 | 2 |
| | 2 | 64 | 0 (0) | 55 | 9 |
| Mary Washington | 0 | 64 | 61 (95.3) | 3 | 0 |
| | 0.5 | 64 | 16 (25.0) | 42 | 6 |
| | 1 | 64 | 54 (84.4) | 10 | 0 |
| | 2 | 64 | 2 (3.0) | 28 | 34 |
| Eden | 0 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 0.5 | 64 | 56 (87.5) | 8 | 0 |
| | 1 | 64 | 39 (60.9) | 24 | 8 |
| | 2 | 64 | 9 (14.1) | 49 | 6 |
| Viking | 0 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 0.5 | 64 | 64 (100.0) | 0 | 0 |
| | 1 | 64 | 36 (56.3) | 19 | 9 |
| | 2 | 64 | 3 (4.9) | 59 | 2 |

Z: Concentrations were expressed in values relative to a standard. Purified ethyl acetate extract (2.92 g) were diluted with 1.5 liter distilled water for standard solution.

Y: Figures in parentheses are percentages of used calli.

Table 2. Effect of α -ketol on the growth of callus from stems of 8 varieties of asparagus

| Varieties | Toxin concentration (ppm) | Number of callus used | Callus growth | | |
|-----------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|------|------|
| | | | vigorous | poor | dead |
| L'Argenteuil | 0 | 75 | 72 (96.0) ^z | 3 | 0 |
| | 1 | 75 | 73 (97.3) | 1 | 1 |
| | 10 | 75 | 63 (96.7) | 8 | 2 |
| | 100 | 75 | 11 (14.7) | 52 | 12 |
| Goldschatz | 0 | 75 | 57 (76.0) | 17 | 1 |
| | 1 | 75 | 54 (72.0) | 17 | 4 |
| | 10 | 75 | 54 (72.0) | 14 | 7 |
| | 100 | 50 | 8 (16.0) | 25 | 17 |
| Zuiyo | 0 | 75 | 75 (100.0) | 0 | 0 |
| | 1 | 75 | 75 (100.0) | 0 | 0 |
| | 10 | 75 | 75 (100.0) | 0 | 0 |
| | 100 | 75 | 9 (12.0) | 61 | 5 |
| Grün Krone | 0 | 75 | 70 (93.3) | 5 | 0 |
| | 1 | 75 | 71 (94.7) | 3 | 0 |
| | 10 | 75 | 41 (54.7) | 10 | 24 |
| | 100 | 75 | 1 (1.3) | 0 | 74 |
| New Jersey | 0 | 75 | 74 (98.7) | 1 | 0 |
| | 1 | 75 | 70 (93.3) | 3 | 0 |
| | 10 | 75 | 51 (68.0) | 14 | 10 |
| | 100 | 75 | 0 (0) | 12 | 63 |
| Mary Washington | 0 | 75 | 40 (53.3) | 26 | 9 |
| | 1 | 75 | 36 (48.0) | 23 | 16 |
| | 10 | 75 | 0 (0) | 14 | 61 |
| | 100 | 75 | 0 (0) | 1 | 74 |
| Eden | 0 | 75 | 67 (89.3) | 6 | 2 |
| | 1 | 75 | 69 (92.0) | 6 | 0 |
| | 10 | 75 | 40 (53.3) | 21 | 14 |
| | 100 | 75 | 3 (4.0) | 60 | 12 |
| Viking | 0 | 75 | 71 (94.7) | 4 | 0 |
| | 1 | 75 | 69 (92.0) | 1 | 5 |
| | 10 | 75 | 26 (34.7) | 8 | 44 |
| | 100 | 75 | 4 (5.3) | 39 | 32 |

Z: Figures in parentheses are percentages of used calli.

実験3 カルス増殖に及ぼす酢酸エチル抽出物、

α-ケトールの影響および品種間差

酢酸エチル抽出物の影響については Table 1 に示すとおりで 'L'Argenteuil' 'Goldschatz' の2品種は酢酸エチル抽出物濃度が1倍より低濃度ではほとんどすべてが増殖良好を示し、処理区のうち最も濃厚な2倍区において、約75%のカルスが増殖良好を示した。また、'瑞洋'も1倍区までは100%のカルスが増殖良好で、2倍区においても50%のカルスが増殖良好を示した。一方'Mary Washington 500 W' 'New Jersey' 'Grün Krone' の3品種は酢酸エチル抽出物濃度0.5倍以上の区でカルス増殖は抑制される傾向があり、2倍区においては'Mary Washington 500 W' で旺盛に生育したカルスはわずか3%で、'New Jersey' 'Grün Krone' では増殖良好なカルスは全く認められなかった。また、'Eden' と 'Viking' の2品種は酢酸エチル抽出物添加濃度が高くなるにしたがい、順次増殖良好なカルスの割合は低下して2倍区で 'Eden' は14%、'Viking' は4.9%が増殖良好を示した。この結果から、カルスレベルで抵抗性の強い品種と弱い品種の存在することが明らかになった。α-ケトールに対する抵抗性は Table 2 に示すとおりで、この場合も品種間差が認められ、'Goldschatz' 'L'Argenteuil' '瑞洋' の3品種は、α-ケトール濃度100 ppmの区においても、12~16%のカルスが増殖良好を示したのに対し'Mary Washington 500 W' 'New Jersey' 'Grün Krone' の3品種はα-ケトール濃度100

ppmの区では増殖良好を示したのは品種'Grün Krone'の1個体だけで、その他のカルスは枯死した。'Eden' と 'Viking' の2品種はその中間的数字を示した。

実験4 カルス増殖に及ぼす高濃度毒素添加培地への移植の影響

高濃度酢酸エチル抽出物添加培地への移植後30日におけるカルスの増殖個体数および率を Table 3 に示した。'L'Argenteuil' において酢酸エチル抽出物濃度0.5倍~2倍の区で選抜された増殖良好を示すカルスを初期選抜時と同じ濃度区へ移植するとはほぼ90~100%のカルスが増殖した。また、同様に選抜されたカルスを初期選抜時の2倍の濃度区へ移植した場合をみると0.5倍区から1倍区への移植ではすべてのカルスが増殖したのに対し、1倍区から2倍区や2倍区から4倍区への移植では増殖したカルスの割合は77~78%であった。'瑞洋'についても同様の傾向があり、2倍区から4倍区に移植したカルスでも84%が増殖した。酢酸エチル抽出物濃度0.5倍で選抜して酢酸エチル抽出物濃度1倍の区へ移植した'L'Argenteuil' のカルスおよび酢酸エチル抽出物濃度1倍で選抜して酢酸エチル抽出物濃度2倍の区へ移植した'瑞洋'のカルスでは100%のカルスが増殖した。しかし、初期選抜時の2倍の濃度区へ移植した場合の方が初期選抜時と同じ濃度区へ移植した場合に比べ、カルスの増殖個体数は、わずかに低下する傾向がみられた。また、'L'Argenteuil' '瑞洋' のカルスとも移植培地中の酢酸エチル抽出物濃度が濃くなるにしたがい、カル

Table 3. Effect of the transferring callus to the medium with higher concentration of toxin

| Varieties | Concentration of phytotoxin ^Z | | Number of callus transferred | Number of callus grown | Percent of grown callus (%) |
|--------------|--|---------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | first medium | second medium | | | |
| L'Argenteuil | 0.5 | → 0.5 | 36 | 36 | 100.0 |
| | 0.5 | → 1 | 44 | 44 | 100.0 |
| | 1 | → 1 | 192 | 176 | 91.7 |
| | 1 | → 2 | 246 | 192 | 78.5 |
| | 2 | → 2 | 108 | 106 | 98.1 |
| | 2 | → 4 | 45 | 35 | 77.8 |
| Zuiyo | 1 | → 1 | 49 | 48 | 98.0 |
| | 1 | → 2 | 44 | 44 | 100.0 |
| | 2 | → 2 | 66 | 66 | 100.0 |
| | 2 | → 4 | 71 | 60 | 84.5 |

Z: Concentrations were expressed in values relative to a standard. Purified ethyl acetate extract (2.92 g) were diluted with 1.5 liter distilled water for standard solution.

Table 4. Growth capacity of resistant callus cultured on toxin-free medium in the medium with toxin^Z

| Varieties | Toxin concentration | Number of total callus | Number of callus grown | Number of grown callus (%) |
|--------------|---------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| L'Argenteuil | 0 | 157 | 157 | 100.0 |
| | 1 | 47 | 47 | 100.0 |
| | 2 | 278 | 240 | 86.3 |
| | 4 | 245 | 96 | 39.2 |
| Zuiyo | 0 | — ^Y | — | — |
| | 1 | 219 | 210 | 95.9 |
| | 2 | 240 | 232 | 96.7 |
| | 4 | — | — | — |

Z: The callus resistant to ethyl acetate extract was cultured on a toxin free medium for 90 days. Then grown callus were transferred and cultured on a toxin medium with the same concentration as the medium in which the callus were originally cultured for 30 days.
Y: No test.

ス増殖個体率が低下する傾向を示したが、酢酸エチル抽出物濃度4倍の高濃度毒素添加培地上でも'L'Argenteuil'で77.8%、'瑞洋'で84.5%のカルスが増殖した。これらの結果から、毒素選抜されたカルスの中には、初期選抜時の2倍の酢酸エチル抽出物濃度にも耐えられるカルスが多く存在することが明らかになった。

実験5 毒素無添加培地への移植がカルスの抵抗性の維持に及ぼす影響

酢酸エチル抽出物無添加培地上で増殖し、酢酸エチル抽出物添加培地への移植後30日におけるカルスの増殖個体数および率をTable 4に示した。'L'Argenteuil'のカルスの増殖個体率は酢酸エチル抽出物濃度1倍で100%、酢酸エチル抽出物濃度2倍で86.3%、酢酸エチル抽出物濃度4倍で39.2%と、酢酸エチル抽出物濃度が濃くなるにしたがい低下した。また、'瑞洋'のカルスの増殖個体率は酢酸エチル抽出物濃度1, 2倍で約95%であった。これらの結果から、毒素抵抗性カルスの中には、ストレス(毒素)が解除されても抵抗性を失わずに維持しているカルスの存在が明らかになった。なお、増殖したカルスは再分化培地(MS培地を基本とし、IBA 0.1 ppm, しょ糖 20 g/l, 寒天 6 g/lを含み、pHは5.8に調整)に移植し、目下幼植物を再生させつつある(Fig. 6)。

考 察

アスパラガス茎枯病から抽出、作成したDGA、培養ろ液、酢酸エチル抽出物および α -ケトールの4種の毒



Fig. 6. Regenerated plant from ethyl acetate extract-resistant 'Zuiyo' callus.

素を種々の濃度で添加した培地を用いてカルス塊の培養を行ったところ、結果の項で述べた通りいろいろの程度の生長阻害が認められた。生長阻害は毒素の濃度が低い区では極めて小さく、ある程度以上の濃度で明瞭に現れることから、培地中に含まれる毒素の影響によるものと考えられるが、かなり苦しい生長阻害が起こる区においても生長を続けるカルスの存在が認められたため、これらのカルスを選抜することによる茎枯病抵抗性品種育成の可能性も考えられる。次に各項目について若干の考察を試みることにする。

まず、この種の実験を行う場合のカルスの大きさについてであるが、実験1にみられたように直径2 mmと5 mmの大きさでの比較では2 mmの小塊を用いた方が

一般に増殖指数が明らかに大きく、毒素の濃度による差も明瞭に現れた。このことから直径2 mm くらいの小塊に分割して用いるのが適当と思われる。なお、カルスの大きさが大きいと同一カルス内で、培地との接触部分とその上部とに毒素の濃度勾配ができ、毒素濃度の薄い部分が増殖を続けるため、毒素に対するカルスの反応が一樣でなくなることも考えられる。そのような条件下では毒素抵抗性カルスの選抜は不適当であるため、毒素添加培地に置床する際は培地中の毒素成分をカルス塊全体に均等に接種させることが望まれる。この観点からもカルスの大きさは増殖に差し支えない範囲でできる限り小さく調整するのが妥当であると考えられる。

次に毒素の種類と濃度についてみると、供試毒素濃度が高すぎるとすべてのカルスが枯死し、低すぎると毒素に対する抵抗性を持たないカルスまで選抜してしまう場合が起こり得るため、カルスの選抜には毒素濃度は極めて重要な要因となる。一般には選抜剤の濃度は供試細胞の10% くらいが生き残る濃度が適当とされている。本実験で供試した毒素 DGA 1 ppm, 10 ppm 及び培養ろ液 0.01, 0.1 倍の増加指数は対照区の増加指数と近似しており、カルスの生長阻害効果は見られなかったが、対照区の増加指数より有意に低かった DGA 濃度 100 ppm, 培養ろ液 1 倍の濃度は、毒素抵抗性カルスの選抜には適当であると思われる。また、培養ろ液の増殖指数が PG 培地の増加指数より低かったことから、培養ろ液に含まれる菌の代謝産物がカルスの生長を阻害しているものと考えられた。酢酸エチル抽出物、 α -ケトールでは増殖良好のカルス数から酢酸エチル抽出物 2 倍、 α -ケトール 100 ppm が毒素抵抗性カルスの選抜に適当であると考えられる。

本実験において、酢酸エチル抽出物、 α -ケトールに対する抵抗性に、カルスレベルではあるが品種間差が認められたこと、そして、その二つの毒素に対する反応（品種特性）が一致したことは極めて興味深い。すなわち 'Goldschatz' 'L'Argenteuil' '瑞洋' の3品種は、酢酸エチル抽出物、 α -ケトールに対する抵抗性が強く、'Mary Washington 500 W' 'New Jersey' 'Grün Krone' の3品種は抵抗性が弱く 'Eden' 'Viking' はその中間の反応を示した。このことから、トマト培養細胞のアルミニウム耐性¹⁴⁾ に品種間差がみられるのと同様に、茎枯病菌毒素に対する反応の品種間差も遺伝的変異によるものではないかと考えられ、今後、こうしたカルスレベルでの反応と植物体レベルでの反応が一致するものか否か確認する必要がある。

野性トマト培養細胞のカドミウム耐性⁴⁾、*Nicotiana sylvestris* およびトウガラシ培養細胞の NaCl 耐性⁵⁾ の実験においては、選抜剤を段階的に上昇させることにより、より強い耐性カルスを選抜することができたことと報じられている。また、*Nicotiana sylvestris*、トウガラシおよびタバコ培養細胞の NaCl 耐性^{5,15)}、トウモロコシ培養細胞のごま葉枯病毒素抵抗性⁶⁾、ニンジン培養細胞のカドミウム耐性¹³⁾ は、それぞれ選抜剤無添加培地での培養を経過した後も、獲得した耐性は維持されていることが示めされた。一方、病原菌毒素を選抜剤として用いてのカルス特性の報告は見あたらないが、'L'Argenteuil' '瑞洋' のように毒素抵抗性の大きい品種のカルスは選抜時の2倍の毒素濃度でも高い生存率を示した。また、一度獲得された抵抗性は毒素無添加培地に移植されても保持されていることが認められたが、この程度は初期選抜時の毒素濃度により異なるものと思われる。以上のことからアスパラガスのカルスレベルでの毒素抵抗性選抜では、毒素濃度を上昇させながらの選抜の可能性が示唆され、病原菌毒素抵抗性は毒素無添加培地上でも維持されることが明らかになった。

今後、毒素により選抜したカルスから再生した個体を用い、個体レベルでも茎枯病抵抗性あるいは病原菌毒素抵抗性が示されるか否かを検討する予定である。

摘 要

アスパラガス茎枯病菌から得られた培養ろ液、DGA、酢酸エチル抽出物および合成中間体 α -ケトールを用いて、茎枯病抵抗性カルスの作出を試みた。

毒素添加培地に置床するカルスの大きさは、直径約 2 mm (約 10 mg) に調整するのが、培地中の毒素をほぼ均一に接種させるため適当と思われた。

毒素抵抗性カルスの選抜に用いる毒素濃度は、カルスの生長阻害の割合、およびカルスの増殖状態から判断して DGA 100 ppm, 培養ろ液 1 倍, 酢酸エチル抽出物 2 倍, α -ケトール 100 ppm が適当であった。

カルスレベルで酢酸エチル抽出物に対する抵抗性に品種間差が認められた。すなわち、'L'Argenteuil' 'Goldschatz' '瑞洋' は強く、'Mary Washington 500 W' 'Grün Krone' 'New Jersey' は弱く、'Eden' 'Viking' はその中間の反応を示した。また、同じ傾向が α -ケトールを用いた場合にも見られた。

酢酸エチル抽出物で選抜された 'L'Argenteuil' '瑞洋' のカルスを初期選抜の2倍の酢酸エチル抽出物濃度区へ移植しても増殖を続けたことから、毒素濃度を上昇

させながらの選抜の可能なことが示唆された。

酢酸エチル抽出物で選抜された 'L'Argenteuil' '瑞洋' のカルスの抵抗性は、毒素無添加培地上での培養を経ても維持された。

引用文献

1. BEHNKE, M.: Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theor. Appl. Genet.* **55**: 69-71. 1979
2. BEHNKE, M.: General resistance to Late Blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.* **56**: 151-152. 1980
3. BEHNKE, M.: Selection of dihaploid potato callus for resistance to the culture filtrate of *Fusarium oxysporum*. *Z. Pflanzenzuchtg.* **85**: 254-258. 1980
4. BENNETZEN, J. L. and T. L. ADAMS.: Selection and characterization of cadmium-resistant suspension cultures of the wild tomato *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Cell Reports* **3**: 258-261. 1984
5. DIX, P. J., H. E. STREET.: Sodium chloride-resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* and *Capsicum annum*. *Plant Science Letters.* **5**: 231-237. 1975
6. GENGENBACH, B. G. and C. E. GREEN.: Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T pathotoxin. *Crop Sci.* **15**: 645-649. 1975
7. GENGENBACH, B. G., C. E. GREEN and C. M. DONOVAN.: Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5113-5117. 1977
8. HARTMAN, C. L., T. J. MCCOY and T. R. KNOUS.: Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicaginis*. *Plant Science Letters.* **34**: 183-194. 1984
9. HEIZ, D. J., M. KRISHNAMURTHI, L. G. NICKELL and A. MARETZKI.: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. 3-17. Spriger. Berlin. Heidelberg. New York, 1977
10. ICHIHARA, A., Y. KAWAKAMI. and S. SAKAMURA.: Stereoselective synthesis and stereochemistry of Altioxin A. *Tetrahedron Letters*, **27**: 61-64. 1986
11. ICHIHARA, A., S. SAWAMURA, Y. KAWASAKI and S. SAKAMURA.: Dihydrogladiolic acid, another phytotoxin from *Phoma asparagi* Sacc. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1891-1892. 1985
12. ICHIHARA, A., S. SAWAMURA and S. SAKAMURA.: Structures of altioxins A and B, phytotoxins from *Phoma asparagi* Sacc. *Tetrahedron Letters*, **25**: 3209-3212. 1984
13. JACKSON, P. J., E. JILL ROTH, P. R. MCCLURE and C. M. NARANJO.: Selection, isolation, and characterization of cadmium-resistant *Datura innoxia* suspension cultures. *Plant Physiol.* **75**: 914-918. 1984
14. MEREDITH, C. P.: Response of cultured tomato cells to aluminum. *Plant Science Letters.* **12**: 17-24. 1978
15. NABORS, M. W. and T. A. DYKES.: Biotechnology in International Agricultural Research, International Rice Research Institute. 121-138. 1985
16. SACRISTAN, M. D.: Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* **61**: 193-200. 1982

Summary

Calli with resistance to asparagus stem blight were selected on the medium with phytotoxin such as culture filtrate of *Phoma asparagi* Sacc., ethyl acetate extract, dihydrogladiolic acid (DGA) and α -ketol. α -ketol is an analog of altioxin A which has strong toxicity.

The most suitable size of callus for selection was 2 mm in diameter and concentration of phytotoxin was 100 ppm in DGA and α -ketol, 1-fold of standard in culture filtrate and 2-folds in ethyl acetate extract.

There was remarkable difference among callus induced from 8 varieties in resistance to ethyl acetate extract and α -ketol. Calli induced from 'L'Argenteuil', 'Goldschatz', and 'Zuiyo' had a higher resistance, while 'Mary Washington 500 W', 'Grün krone' and 'New Jersey' had lesser resistance.

In 'L'Argenteuil' and 'Zuiyo', selected calli grew in the medium with two fold ethyl acetate extract of initial selection.

'L'Argenteuil' and 'Zuiyo', selected calli retained their capacity to grow in ethyl acetate extract after being grown in its absence for 90 days.