HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アズキカルスに対するアズキ萎凋病菌出芽細胞培養液の毒性
Author(s)	藤根, 統; 秋野, 聖之; 近藤, 則夫; 内藤, 繁男
Citation	北海道大学大学院農学研究科邦文紀要, 25(2), 195-202
Issue Date	2003-12-10
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/5617
Type	bulletin (article)
File Information	25(2)_fujine.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大農研邦文紀要 25(2)：195～202，2003

アズキカルスに対するアズキ萎凋病菌出芽細胞培養液の毒性

藤根　統*・秋野聖之・近藤則夫・内藤繁男
（北海道大学大学院農学研究科植物病理学分野）

Toxic activities of bud cell culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola* to calli of adzuki bean cultivars

Osamu FUJINE*, Seishi AKINO, Norio KONDO and Shigeo NAITO
(Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 060-8589, Japan)

I．はじめに

Fusarium oxysporum f. sp. *adzukicola* はアズキ（*Vigna angularis*）の萎凋病の病原菌であり，アズキとその近縁種の植物に対して特異的な病原性を有している[12,13]。本病は主として北海道の石狩，空知，上川地方において発生が認められ，難防除性の土壌病害であることから，アズキ落葉病，アズキ茎疫病とならんでアズキ栽培における重要病害となっている。本病に罹病したアズキでは，葉脈の褐変や縮葉，維管束の褐変，発病後の急速な枯死といった特徴的な症状が見られる。これらの症状の発現過程を観察したところ，*F. oxysporum* f. sp. *adzukicola* は何らかの植物毒性物質を分泌していることが予想された。そこで，本病原菌の出芽細胞培養液をアズキの切離茎に対して与えたところ，葉脈や導管の褐変，伸長抑制といった実際の萎凋病とよく似た症状が認められ[6]，これにより病徴発現に関連する毒性物質の存在が示された。しかし，切離茎を用いた実験では，アズキ各品種の萎凋病抵抗性と培養液に対する耐性との関連性は必ずしも明らかとはならなかった。

Carlson[3] により植物培養細胞から病害抵抗性の植物が作り出されて以降，病原菌の作る毒性物質を培養細胞に処理して病害抵抗性を判別する研究と，さらにそこから病害抵抗性植物を選抜する試みが活発に行われるようになった[4,8]。*Fusarium* 属菌が原因として起こる植物病害においても毒性物質の関与が重要視されており，*in vitro* における毒性物質と宿主細胞の関係や毒素抵抗性の宿主細胞を利用した抵抗性植物の選抜に関して幾つもの研究が行われている[1,9~11]。本論文では，アズキ萎凋病菌の出芽細胞培養液に含まれる毒性物質が萎凋病感受性の異なるアズキ品種のカルスに及ぼす影響を調査し，毒性物質による萎凋病抵抗性アズキの選抜の可能性を検討することを目的とした。なお，本報告の一部は平成14年度日本植物病理学会（大阪市）において発表した[7]。

II．材料および方法

A．出芽細胞培養液の作製

本実験に供試したアズキ萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *adzukicola* は，1996年に北海道秩父別町の罹病アズキ（品種「エリモショウズ」）より分離された菌株96-3（レース3）を使用した。グリーンピース寒天培地（グリーンピース200 g を蒸留水で20分煮沸した後，煮汁に寒天15 g を加え，1,000 ml として加圧滅菌）上で培養した本菌株の直径5 mm の含菌寒天片を，100 ml のショ糖加用ジャガイモ凋汁液体培地（ジャガイモを200 g を蒸留水で20分煮沸した後，その煮汁にショ糖20 g を加え，1,000 ml として加圧滅菌）の入った容量500 ml の振盪フ

現住所　＊〒069-1395 北海道夕張郡長沼町東6線北15号
北海道立中央農業試験場クリーン農業部

ラスコに接種した後，25°Cで3日間振盪培養した。培養液を4重ガーゼに通し，2,500 rpmで遠心して出芽細胞を回収した。続いて出芽細胞を滅菌水に懸濁，2,500 rpmでの遠心を3回繰り返して出芽細胞を洗浄した。滅菌水で約1.2×10^7個/mlの濃度に調整した後，250 mlずつ容量500 mlの振盪フラスコに分注し，25°Cで振盪培養した。6時間後0.2 μm poresizeのメンブレンフィルター（セルロースアセテートタイプ，ADVANTEC社）により濾過して出芽細胞を完全に除去した出芽細胞培養液を得た。

この出芽細胞培養液を40°Cで200倍程度まで減圧濃縮し，20,000 rpmで15分間遠心した後，上清を透析膜（透過分子量約14,000，VISKASE社）を用いて蒸留水中4°Cで2日間透析した。その後，40°C減圧下で透析膜内液を蒸発乾固させ，内容物残渣を得た。

B．アズキカルスの作製

実験に用いるアズキ品種として，萎凋病感受性品種は「ハヤテショウズ」，「寿小豆」，「エリモショウズ」の3品種を，抵抗性品種は「きたのおとめ」，「しゅまり」の2品種を選択した。各品種の種子を70%エタノールに30秒間浸漬し，次いで有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間浸漬して表面殺菌し，滅菌水で2回洗浄した後，発芽培地の入ったカルチャーポットに播種した。発芽培地はホルモンフリーのムラシゲ・スクーグ培地[15]（MS培地；ショ糖30 g/l，寒天0.8%，pH 5.8）を使用した。無菌的に播種した種子を25°C暗所で10日間無菌的に培養した。十分に伸長した胚軸の中間を1 cm程度の長さの切片とし，切片を2,4-Dを2 mg/l添加したMS（+2,4-D）培地上に置いて25°C暗所で10日間培養した。胚軸切片の切断面に形成されたカルスをかき取り，新しいMS（+2,4-D）培地に移植して培養した。その後は3週間毎に増殖したカルス塊からカルス片をかき取り，新しいMS（+2,4-D）培地へ移植した。この継代を6回以上行ったカルスを実験に供試した。

C．カルスによる検定と評価

出芽細胞培養液の内容物残渣を蒸留水に再懸濁し，濾過滅菌した後，培地中の内容物の最終濃度が10 mg/l，50 mg/lおよび100 mg/lとなるようにMS（+2,4-D）培地に加えた。これらの培地を直径9 cmのペトリ皿に12.5 ml入れた。前述のように作出したカルスから約4 mgのカルス塊をかき取り，ペトリ皿一枚当たり5個ずつ移植して，25°C暗所で培養した。対照区としてMS（+2,4-D）培地を準備し，こちらにもペトリ皿一枚あたり5個のカルス塊を移植した。処理区，対照区とも各品種についてペトリ皿3枚ずつをそれぞれ準備し，実験は2回行った。

出芽細胞培養液のカルスに対する影響は，カルス表面の褐変程度とカルスの増殖程度により評価した。より正確に褐変程度を評価するために，目視による褐変程度の判断は行わず，カルス表面の明度を数値化することで評価した。明度の数値化は画像解析ソフトNIH Image 1.49（U. S. National Institute of Health）を用い，培養14日後のカルスの画像データから個々のカルス表面の明度を数値化した。褐変が激しいカルスほど表面の明度が下がるが，その画像をNIH Image 1.49により処理することで，明度の低いものほど大きな数値として表される。この数値を基にして各品種について処理区と対照区の比較を行ない，また，それぞれの品種の対照区の明度に対する処理区の明度の相対値である比明度を用いて品種間の褐変程度を比較した。さらに，各濃度処理区のうち50 mg/l処理区のカルスについては培養期間中3日ごとに褐変状況を調査した。ただし，無菌培養期間中の比明度測定は困難であることから，褐変の有無を対照区との比較により肉眼で判別し，全カルスに対する褐変カルスの割合を求めた。カルスの増殖に対する影響の評価については，培養14日後の各カルス塊の生重を比較することによりおこなった。各品種ごとに処理区と対照区の生重を比較した。また，品種の違いによりカルスの増殖速度に差が出る可能性があったことから，品種間差については，褐変程度の評価と同様に各品種の対照区に対する処理区の相対値を用いて検討した。

III. 結　　果

50 mg/l 処理区のカルスのうち，感受性品種のカルスでは培養開始から 2 ～ 3 日後には明らかに褐変しているものが認められ， 3 ～ 6 日後には 80%のカルスが褐変した。抵抗性品種では培養開始から 6 日後における褐変カルスの割合は 30%以下で，14 日後でも「きたのおとめ」で約 40%，「しゅまり」では 20%程度であった（Fig. 1）。

感受性品種と抵抗性品種のカルスの褐変程度は明確に異なっていた（Figs. 2 and 3）。100 mg/l 処理区では感受性品種のカルスのほとんど全てが褐色化したが，抵抗性品種では一部のカルスに褐変が認められたものの，目視で褐変が確認できないものが多く存在した（Fig. 2）。

感受性品種の比明度の値は抵抗性品種の値よりも高くなり（Fig. 3），100 mg/l 処理区では，感受性品種と抵抗性品種で有意な差が認められた。50 mg/l 処理区では，「エリモショウズ」と抵抗性品種との間では統計的に有意な差は認められなかったものの，「ハヤテショウズ」および「寿小豆」と抵抗性品種との間には比明度に差が認められた。10 mg/l 処理区では，各品種の比明度に差は認められなかった。

14 日培養後の感受性品種のカルスの生重は，処理区と対照区との間に明確な差が認められた。100 mg/l および 50 mg/l 処理区では「ハヤテショウズ」は対照区の 33.3%および 44.5%，「寿小豆」は対照区の 34.0%および 32.7%にそ

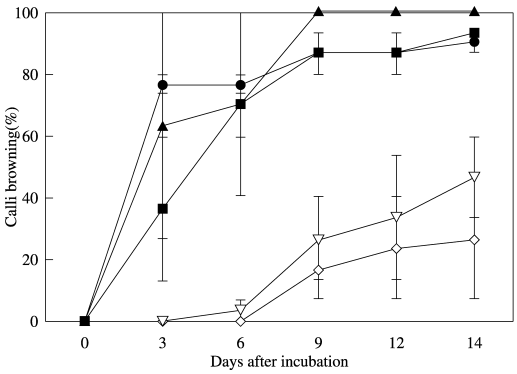

Figure 1. Browning induction on the calli of five adzuki bean cultivars by the bud cell culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*, causal agent of adzuki bean wilt. Cultivars Hayate-shozu (●), Kotobuki-shozu (▲), and Erimo-shozu (■) were susceptible, and cultivars Kita-no-otome (▽) and Syumari (◇)were resistant to the disease. The calli were grown on MS (+2,4-D) medium with a concentration of 50 mg/l crude substances obtained from the filtrate at 25°C in the dark. Error bars represent ±1.0 standard error.

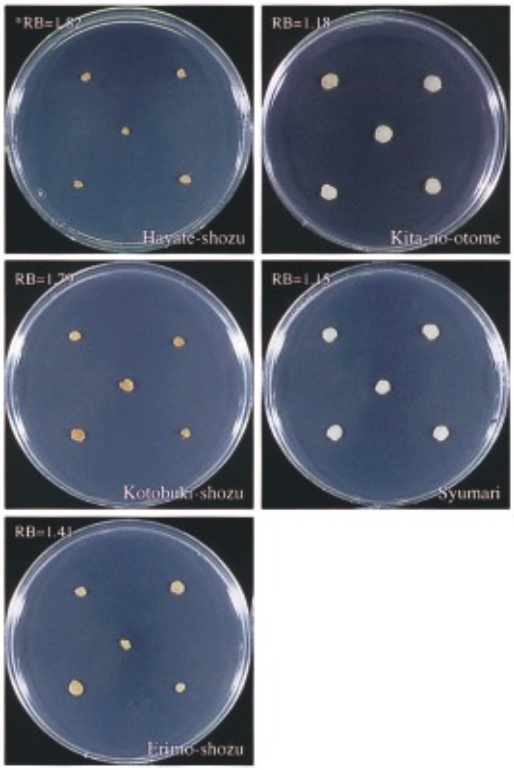

Figure 2. Calli of adzuki bean cultivars grown on MS (+2,4-D) medium amended with 100 mg/l substances of bud cell culture filtrates. The calli were incubated for 14 days at 25°C in the dark. Cultivars Hayate-shozu, Kotobuki-shozu and Erimo-shozu (left) and the other cultivars Kita-no-otome and Syumari (right) were susceptible and resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*, respectively. * RB: Relative Brightness

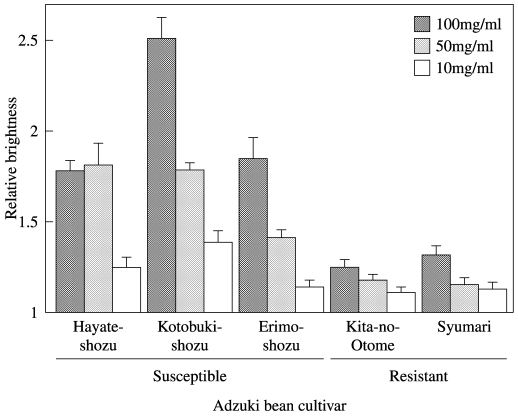

Figure 3. Relative brightness of calli treated with substances of bud cell culture filtrate. The calli were grown on MS (+2,4-D) medium with concentrations of 10, 50, and 100 mg/l substances obtained from the filtrate at 25°C in the dark. Rerative brightness was calculated by comparing the control brightness of each cultivar. Vertical bars represent ±1.0 standard error of the mean.

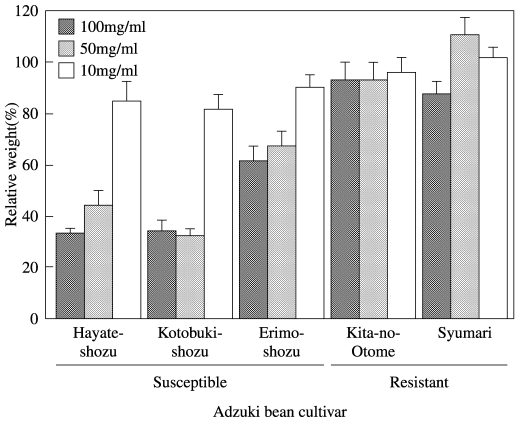

Figure 4. Relative weight of calli treated with substances of bud cell culture filtrate. The calli were grown on MS (+2,4-D) medium with concentrations of 10, 50, and 100 mg/l substaces obtained from the filtrate at 25°C in the dark. Relative weight (%) was calculated by comparing the control fresh weight of each cultivar. Vertical bars represent ±1.0 standard error of the mean.

れぞれ抑制された。「エリモショウズ」は，抑制の程度は他の品種より低かったものの，100 mg/l 処理区で対照区の 61.5%，50 mg/l 処理区で対照区の 67.2%となった（Fig. 4）。しかし，10 mg/l 処理区では「ハヤテショウズ」で対照区の 84.9%，「寿小豆」で 81.6%，「エリモショウズ」で 89.9%と，処理区と対照区との間に有意な差は認められなかった。抵抗性品種では「しゅまり」の 100 mg/l 処理区において，処理区のカルスの生重が対照区の 90%程度とわずかに抑制されたのみで，それ以外の濃度ではカルスの増殖抑制は認められなかった。「きたのおとめ」では全ての濃度処理においてカルスの増殖抑制は認められなかった（Fig. 4）。また，各品種の褐変程度を比明度により比較したところ，100 mg/l および 50 mg/l 処理区では感受性品種と抵抗性品種で有意差が認められた。しかし，10 mg/l 処理区ではいずれの品種の比明度も同程度であり，有意差は認められなかった（Fig. 4）。

IV. 考　　察

各アズキ品種カルスの出芽細胞培養液抽出物に対する反応は，Kondo and Kodama[12] の方法に従って行ったアズキ萎凋病菌接種による各品種のアズキ萎凋病感受性（Table. 1）と一致し

Table 1. Disease reactions of adzuki bean cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*

Cultivar	DSI[a]	Reaction Class[b]
Hayate-shozu	2.5 - 3.0	S
Kotobuki-shozu	2.4 - 3.0	S
Erimo-shozu	1.6 - 2.8	S
Kita-no-otome	0 - 0.2	R
Syumari	0 - 0.4	R

a) Disease severity indices (DSI) were determined by following the previous report[12].
Ranges of DSI values were obtained from three inoculation tests with isolate 96-3 (race 3).

b) Reaction class was based on the DSI scale: 1>=resistant (R), and 1<susceptible (S).

た。ただしこの反応は，抵抗性品種からのカルスが感受性品種のカルスよりこの抽出物の高濃度条件においても耐性を示すということであり，本抽出物は宿主特異的毒素とは異なり非特異的毒素を構成要素とすると考えられる。過去の研究[6]において，出芽細胞培養液を処理したアズキ切離茎では，葉脈褐変や胚軸の導管褐変等の萎凋病と類似した症状や胚軸の伸長抑制が認められた。このうち，葉脈褐変については感受性品種と抵抗性品種との間に差が認められたが，胚軸の導管褐変については品種間差は認められなかったことから，アズキ萎凋病菌の病原性の宿主特異性と毒性物質との関連性については疑問が持たれた。しかし，感受性品種のカルスは抵抗性品種のカルスよりも明らかに強く毒性物質の影響を受けるという結果は，アズキ萎凋病菌の病原性に毒性物質が関与していることを証明するものである。切離茎とカルスでは毒性物質に対する反応の鋭敏性が異なっていると考えられ，切離茎による検定よりもカルスでの検定を行なうことでより精密な結果が得られると考えられる。なお，アズキ萎凋病を含め *F. oxysporum* による病害の特徴の一つに宿主特異性が挙げられるが，本実験の結果からは，アズキ萎凋病菌の宿主特異性と毒性物質との関連性については不明な点が多い。今後さらに研究する必要がある。

本実験の結果は，カルスの褐変程度や増殖程度の比較により感受性品種と抵抗性品種の識別は十分可能であることを示した。従って，この毒性物質とカルスを利用することにより，*in vitro* でのアズキ各品種・系統の萎凋病抵抗性検定が可能であると思われる。ただし，そのためにはより多くの品種のカルスを用いて検証する必要がある。*F. oxysporum* f. sp. *melonis* の培養濾液とマスクメロンのカルスを用いた実験では，カルスの培養濾液に対する反応とマスクメロンの病害抵抗性が一致しないことが報告されており[14]，カルス等組織細胞の毒性物質に対する反応が成植物の病害抵抗性とは一致しない場合もある[16,18]。従って，毒性物質と宿主植物のカルスを用いて病害抵抗性を検定する場合には，人工接種試験での宿主植物の反応に十分注意する必要がある。しかし，今回用いたアズキ品種の萎凋病感受性とカルスの毒性物質に対する反応は一致しており，カルスと毒性物質による抵抗性検定と人工接種試験との併用でより精度の高い抵抗性検定が可能であると考えられる。また，毒性物質の存在下でも生育，増殖した感受性品種のカルスは，変異により抵抗性を獲得している可能性がある。実際に，毒性物質により選抜した病害感受性植物の組織細胞から病害抵抗性を有する植物体が再分化されること事例が報告されている[2,5,9,19]。アズキ萎凋病菌の毒性物質とアズキの植物体再分化系[17]を利用した，萎凋病感受性品種からの萎凋病抵抗性個体の選抜と育成の可能性がある。

V．摘　　要

アズキ萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola* の出芽細胞培養液中に含まれる毒性物質がアズキのカルスに及ぼす影響を調べた。アズキ萎凋病感受性品種「ハヤテショウズ」,「寿小豆」および「エリモショウズ」と抵抗性品種「きたのおとめ」,「しゅまり」の計 5 品種を供試し，出芽細胞培養液からの抽出物を 10 mg/l, 50 mg/l および 100 mg/l で混入したムラシゲ・スクーグ培地上でこれら各品種のカルスを培養した。

50 mg/l 処理区での継時的観察では，培養 14 日後には感受性品種の約 80％のカルスに褐変が認められたが，抵抗性品種では感受性品種より褐変したカルスは少なかった。また，各品種のカルスの褐変程度を抽出物無添加の対照区カルスに対する比明度により比較したところ，50 mg/l および 100 mg/l 処理区では感受性品種と抵抗性品種では明らかに差が認められた。また，培養後のカルスの重量から，カルスの増殖が毒性物質の影響を受けて抑制されることが確認された。50 mg/l および 100 mg/l 処理区では，感受性品種のカルス重量が対照の約 30～70％と抑制が顕著であったのに対し，抵抗性品種ではほぼ 90％以上であり，抑制はほとんど認められなかった。なお，10 mg/l 処理では褐変，重量に対する影響はほとんど認められなかった。また，出芽細胞培養液中の毒性物質に対する各品種カ

ルスの反応は，萎凋病菌を接種した各品種植物体の抵抗性・感受性と対応した。

引用文献

1）Ahmed, K. Z., Mesterhazy, A. and Sagi, F.: *In vitro* techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-resistance. I. Double-layer culture technique. Euphytica 57：251-257，1991

2）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

3）Carlson, P. S.: Methionine sulfoximine - resistant mutants of tobacco. Science 180：1366-1368，1973

4）Daub, M. E.: Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Annu. Rev. Phytopathol 24：159-186，1986

5）Deng, Z. N., Gentile, A., Domina, F., Nicolosi, E. and Tribulato, E.: Selecting lemon protoplasts for insensitivity to *Phoma tracheiphila* toxin and regenerating tolerant plants. J. Amer. Soc. Hort. Sci 120：902-905，1995

6）藤根統・近藤則夫・小林喜六・生越明：アズキに対するアズキ萎凋病菌胞子発芽液の毒素活性．北日本病虫研報 51：40-43，2000

7）藤根統・秋野聖之・近藤則夫・内藤繁男：アズキカルスに対するアズキ萎凋病菌出芽細胞培養液の毒性．日植病報 68：160(講要)，2002

8）Gengenbach, B. G. and Rines, H. W.: Use of phytotoxins in selection of disease resistant mutants in tissue culture. Iowa State Journal of Research 60：449-476，1986

9）Hartman, C. L., McCoy, T. J. and Knous, T. R.: 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

10）Hidalgo, O. B., Santos, R., Tussel, R. T., Pires de Matos, A., Cabral, R. S., Arzola, M. and Perez, M. C.: Phytotoxity of *Fusarium subglutinans* culture filtrates on *in vitro* plantlet and calli of resistant and susceptible pineapple (*Ananas comosus*). Plant Pathol 48：756-758，1999

11）Jin, H., Hartman, G. L., Huang, Y. H., Nickell, C. D. and Widholm, J. M.: Regeneration of soybean plants from embryogenic suspension cultures treated with toxic culture filtrate of *Fusarium solani* and regenerants for resistance. Phytopathology 86：714-718，1986

12）Kondo, N. and Kodama, F.: *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*, causal agent of adzuki bean wilt, and detection of three races of the fungus. Ann. Phytopath. Soc. Jpn 55：451-457，1989

13）近藤則夫：アズキ萎凋病に関する研究．北大農文紀要 19：411-472，1995

14）Megnegneau, B. and Branchard, M.: Effect of fungal culture filtrates on tissue from susceptible and resistant genotypes of muskmelon to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Plant Science 79：105-111，1991

15）Murashige, T. and Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15：473-497，1962

16）Remotti, P. C. and Loffler, H. J. M.: The involvement of fusaric acid in the bulb-rot of gladiolus. Phytopathology 144：405-411，1996

17）佐藤毅：アズキ（*Vigna angularis* Ohwi & Ohashi）の細胞育種に関する基礎研究．北海道立農業試験場報告 第87号 pp.74，

1995
18) Scala, A., Bettini, P., Buiatti, M., Bogani, P, Pellegrini, G. and Tognoni, F.: Tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* interaction: "*in vitro*" analysis of several possible pathogenic factors. Phytopath. Z　113：90-94，1985
19) Song, H. S., Lim, S. M. and Widholm, J. M.: Selection and regeneration of soybean resistant to the pathotoxic culture filtrates of *Septoria glycines*. Phytopathology　84：948-951，1994

（受付：2003.8.29　受理：2003.10.14）

Summary

The toxicity of the bud cell culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*, the causal agent of adzuki bean wilt, was examined using adzuki bean calli. Calli derived from susceptible (Hayate-shozu, Kotobuki-shozu, and Erimo-shozu) and resistant (Kita-no-otome and Syumari) cultivars were grown on Murashige-Skoog medium containing 10-, 50-, and 100-mg/L concentrations of the toxic substances obtained from the filtrate.

While at least 80% of the calli of susceptible cultivars grown on medium containing 50 mg/L browned within 14 days, fewer calli of the resistant cultivars browned. There was also a marked difference between susceptible and resistant cultivars in the relative brightness of calli grown on medium containing 50 or 100 mg/L of the toxic substances. In addition, the growth of calli of susceptible cultivars was obviously inhibited on the medium. While the calli of susceptible cultivars were 30 to 70% the weight of control calli, the resistant cultivars were more than 90% the weight of the controls, reflecting the reduced growth inhibition. There was no difference in the relative brightness or growth of calli grown on medium containing 10 mg/L of the substances. The reaction of calli to the toxic substances corresponded to the resistance or susceptibility of each adzuki bean cultivar to *F. oxysporum* f. sp. *adzukicola*.