

一般報文

トマト葉外植片カルスからのフザリン酸抵抗性再生体の選抜

豊田秀吉・松田克礼・清水邦彦・大形 浩・橋本尚子・大内成志

近畿大学農学部

(〒577 東大阪市小若江 3-4-1)

(1987年10月21日受付)

(1988年1月22日受理)

トマト葉外植片から誘導したカルスを使用し、フザリン酸抵抗性再生体の選抜を試みた。外植片をカルス誘導培地で培養すると、増殖度の高いカルスが誘導され、同培地で継代すると、組織内に多数の緑色小斑が形成された。この小斑からは高率に茎葉が再分化されるので、1個の小斑が含まれるようにカルス組織を細断し、フリザン酸を添加した茎葉再分化培地に移植したところ、約1,000個の小斑が形成されたカルスから150個体のフザリン酸抵抗性再生体を分離することができた。これらの中にはフザリン酸添加ホルモンフリー培地で発根できない個体も存在したが、上記培地で根を伸長した個体については、土壤に移植して1カ月間栽培したあと、その最上位の分枝を切り取り、フザリン酸に浸漬処理しても強い抵抗性を示した。以上から、本法は、植物の組織培養系における各種薬剤抵抗性の *in vitro* 選抜系として有効であると考えられた。

1. 緒 言

培養細胞選抜法を用いて病原毒素や除草剤などの各種薬剤に対する抵抗性植物を育成する場合、効率よく植物体を再分化させうる培養系が必須となる¹⁾。筆者らがさきに報告したトマトカルス^{2,3)}やメロンカルス⁴⁾の培養法は、この点を満足するもので、高い再分化能を保持したカルス組織を選抜実験に利用できるものと考えられた。本論文では、実際にこの方法を使用し、トマトカルスからフザリン酸 (*fusaric acid*, FA) (植物病原菌の一種である *Fusarium* 属菌の生産する植物萎ちょう毒素⁵⁾) に抵抗性を示す再生植物体の選抜を試みた。

2. 材料および方法

本実験では、トマト (*Lycopersicon esculentum* MILL, 品種福寿2号) のカルス組織に緑色小斑 (GS) を形成させ、さらにその GS から茎葉を再分化させるため、葉外植片を前報²⁾の方法に従って培養した。すなわち、葉外植片を 0.01 mg/l の IAA と 0.1 mg/l の BAP を添加した Murashige-Skoog⁶⁾ (MS) 培地 (pH 5.6, 寒天濃度 0.8%) (カルス誘導培地) で培養し、誘導されたカルス組織を同培地に移植・継代した。カルス組織に GS が形成されたものについては、それぞれのカルス小塊に GS が1個ずつ含まれるようにカルス組織を細断し (直径 2~3 mm), 0.1 mg/l の IAA と 1.0 mg/l の

BAP を添加した MS 培地 (茎葉分化誘導培地) に移植した。FA 抵抗性再生体を選抜する場合は、無菌濾過した FA (米国 Sigma 社より購入) を使用し、それを茎葉分化誘導培地に添加した。また、発根誘導にはホルモンフリー MS 培地 (発根培地) を用いた。その他の培養条件は前報²⁾と同様である。

3. 結果および考察

筆者らはすでに、トマト品種福寿2号の葉外植片から friable なカルス組織を誘導し、その組織から調製した単細胞あるいはカルス小塊を使用して、フザリン酸抵抗性細胞系統を選抜した^{7,8)}。しかしながら、このカルス組織は約3年間当研究室で継代培養されたもので、再分化能は極端に低下し、最終的にそれらの細胞系統から抵抗性再生体を得るには至らなかった。そこで、今回は GS 形成カルスが高い再分化能を保持している点に注目し²⁾、そのようなカルスを利用した薬剤抵抗性選抜系の確立を試みた。

1) GS 形成と茎葉再分化

トマト葉外植片をカルス誘導培地で培養したところ、培養開始後7~10日目で外植片周縁部に増殖良好なカルス組織が誘導された。そこで、カルス組織のみを切り出し、同組成の培地で継代したところ、カルス組織はさらに増殖し、移植10~15日後には組織内部に多数の小形

Table 1. Shoot regeneration^a from tomato (*L. esculentum* cv. Fukuju No. 2) leaf-explant derived callus tissues producing small green spots and resistance of shoots to fusaric acid.

Experiments	No. of callus clumps			No. of SH	
	Small GS	Enlarged GS	SH	Rooting	FA-resistant
	A	B (100 B/A)	C (100 C/B)	E (100 D/C)	E (100 E/D)
1	345	235 (68.1)	208 (88.5)	197 (94.7)	8 (4.1)
2	428	377 (88.1)	369 (97.9)	351 (95.1)	5 (1.4)
3	288	212 (73.6)	200 (94.3)	186 (93.0)	6 (3.2)
Total	1,061	824 (77.7)	777 (94.3)	734 (94.5)	19 (2.6)

^a Callus tissues were induced from tomato leaf explants and subcultured in MS medium containing 0.01 mg/l IAA and 0.1 mg/l BAP (pH 5.6, 0.8% agar). A number of small green spots (GS) were formed in the tissues within two weeks after transfer. Callus tissues were cut into small clumps so as to contain one green spots and transferred to the medium for shoot regeneration (MS medium containing 0.1 mg/l IAA and 1.0 mg/l BAP). Shoots (SH) developed from enlarged GS were rooted in the hormone-free MS medium and dipped in the aqueous solution containing 50 µg/ml fusaric acid (FA) for examining the resistance to FA.

GS (直径 0.5~1 mm) が形成された。次に、上述の方法でカルス組織小塊を作成してそれらを茎葉分化誘導培地に移植したところ 68~88% のカルス小塊が GS を肥大させ、移植 10~20 日後には、それぞれの GS から高率の茎葉再分化が観察された (Table 1)。

2) FA 抵抗性再生体の選抜

植物の細胞・組織培養系において各種薬剤抵抗性を選抜する場合、その薬剤を培地中に添加して培養過程での選択圧を高めるが、そのような処理を施さなくとも比較的高率に変異が分離されたとする報告もある⁹⁾。たとえば Shahin と Spivey¹⁰⁾ がトマト葉肉細胞プロトプラストから FA 抵抗性を選抜したときにも選抜剤を処理した区と無処理区の双方から抵抗性個体の分離に成功している。そこで筆者らも、FA 無添加培地で誘導した再生体を FA 添加茎葉分化誘導培地に移植し、どの程度 FA

抵抗性個体が得られるかを調べた。まず、茎葉分化誘導培地に添加する FA の効果的な濃度を決定するため、10, 25, 50 および 100 µg/ml の FA を添加した培地で上記の茎葉再分化個体を培養した。それによると、50 µg/ml 以上の FA を添加した場合に、茎葉の褐変や萎ちょう症状が観察されたので、以後の選抜実験には 50 µg/ml の FA を用いることにした。茎葉再分化個体を FA 無添加培地から添加培地に移したときの抵抗性選抜結果を Table 1 に示したが、得られた選抜効率率は 1~4 % で、かならずしも満足のいく値ではなかった。そこで選抜効率をさらに向上させるため、小形 GS を含むカルス組織小塊を FA (50 µg/ml) 添加茎葉分化誘導培地で培養し、抵抗性再生体の分離を試みた。この方法の利点は、GS 形成カルスを用いることで再分化能を保証し、かつその生長・分化過程で FA による選択圧を高

Table 2. Fusaric acid-resistant shoots^a redifferentiated from tomato (*L. esculentum* cv. Fukuju No. 2) leaf explant-derived callus tissues.

Experiments	No. of callus clumps				No. of SH FA-resistant
	Small GS	Enlarged GS	Browned	Whitened	
	A	B (100 B/A)	C (100/A)	D (100 D/A)	
1	338	103 (30.5)	204 (60.4)	31 (9.2)	41 (39.8)
2	361	119 (33.0)	209 (57.9)	33 (9.1)	66 (55.5)
3	307	80 (26.0)	178 (58.0)	49 (16.0)	46 (57.5)
Total	1,006	302 (30.0)	591 (58.7)	113 (11.4)	153 (50.7)

^a Callus tissues producing small green spots (GS) were cut into small callus clumps and transferred to the shoot redifferentiation medium containing 50 µg/ml fusaric acid (FA). In the FA-containing medium, shoots (SH) were developed from enlarged GS. The concentrations of plant hormones added to each medium were given in the legend of Table 1.

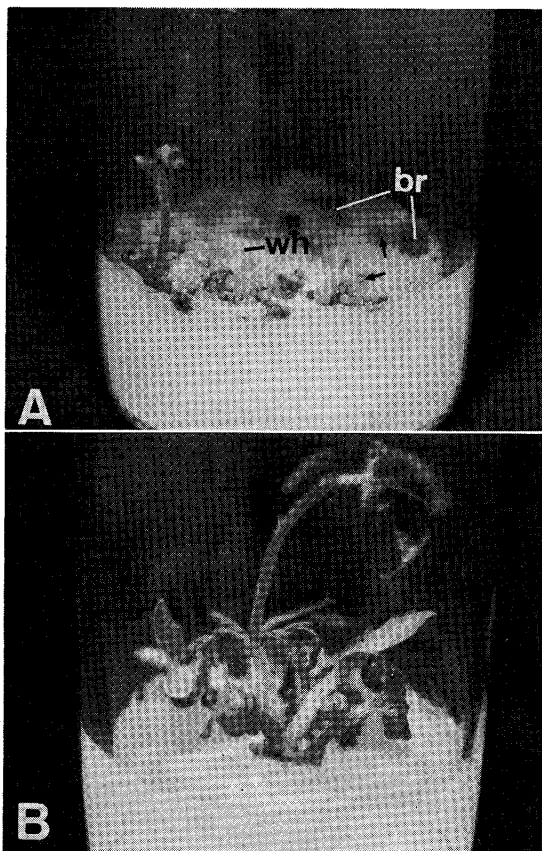


Fig. 1. **A:** Fusaric acid-resistant shoot redifferentiated from enlarged green spot (GS) of callus tissues derived from tomato (*L. esculentum* cv. Fukuju No. 2) leaf explants. The callus tissues forming green spots were cut into small callus clumps so as to contain one small GS and cultured in MS medium (0.1 mg/l IAA and 1.0 mg/l BAP) containing 50 µg/ml fusaric acid. In this selection medium, some clumps were browned (br) or whitened (wh), where the shoot redifferentiation was not found. Some of the enlarged GS (arrows) were not browned or whitened at one month after incubation in the selection medium. **B:** Root formation of fusaric acid-resistant regenerant in hormone-free MS medium containing 50 µg/ml fusaric acid.

めることができる点にある。FA 添加茎葉分化誘導培地で小形 GS 形成カルスを培養すると (Table 2), 培養開始約 1 週間で 60% の小塊が褐変し, さらに 10% の小塊では GS が白色化して (Fig. 1-A), これらのいず

れからも茎葉の再分化は確認されなかった。しかしながら, 残り 30% の小塊では GS の生長・肥大が認められ, さらにそのうちの半数からは茎葉の再分化も観察された (Fig. 1-A)。得られた茎葉再分化個体 (総数 153 個体) については, 半数を FA 添加発根培地, 残りの半数を FA 無添加発根培地に移して発根誘導し, さらに後者については, 発根後, 培地寒天を洗い落として FA (50 µg/ml) 水溶液に漬根処理した。上記の選抜操作とその結果を Fig. 2 に図示したが, それによると, 茎葉再分化個体を直接 FA 添加発根培地で培養したものについては, 76 個体中 61 個体が正常に発根し (Fig. 1-B), 後者では 77 個体のうち FA 無添加培地で 72 個体が発根し, そのうちの 59 個体が FA 水溶液に漬浸しても抵抗性を示した。最終的に得られた FA 抵抗性の 120 個体については, 温室で 5 日間馴化した後, 通常の土壤環境で栽培したところ良好な生育が観察された。

Fig. 2 から明らかなように, 生長・肥大した GS からでも茎葉を再分化しないもの (Fig. 1-B) (Fig. 2 の A で示す) あるいは茎葉を再分化しても発根しないもの (Fig. 2 の B と C) がそれぞれ若干数存在した。これらの詳細は不明であるが, いずれの場合も, GS が褐変化 (または白色化) したり, あるいは茎葉再分化個体が萎ちょうするようなことはなかった。このような点を考慮すると, これらの個体は, FA 抵抗性は獲得したものの, 再分化機能に何らかの不都合な変異を併発した可能性が考えられた。

一方, Fig. 2 の D で示したような個体については, いったん FA で選抜しその後 FA フリーで発根させたもので, 発根および根の伸長時には FA による選択圧が解除された状態にあった。これらの個体が FA 抵抗性を消失した理由としては, FA での選抜時に何らかの “physiological escape” が生じて一時的な抵抗性を示したか, あるいは選抜されたカルスや再分化組織に FA 感受性細胞が存在し (すなわち, FA 抵抗性細胞と感受性細胞がカメラ状態で存在し), それらが FA 不在下で増殖して根などの分化に関与した可能性が考えられる。特に後者の可能性については, 土壤移植した再生体についても検討を加える必要があり, 以下の項でその結果を述べることにする。

3) 土壤移植再生体の分枝における FA 抵抗性の検定

再生個体を土壤に移植した場合, FA が存在しない状態でそれらを栽培することになる。それゆえ, 土壤環境下で新たに形成された分枝においては, FA 抵抗性が有効に保持されているかどうかを検討する必要があるもの

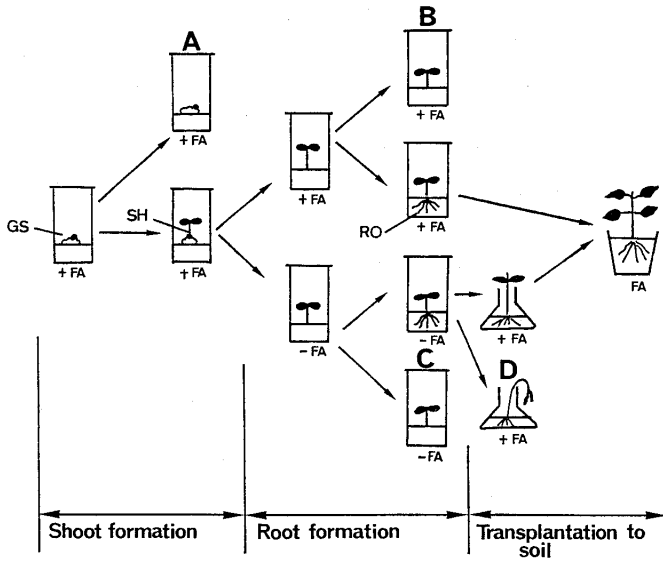


Fig. 2. Selection of fusaric acid-resistant regenerants at the stages of shoot (SH) and root (RO) formation of tomato callus tissues producing green spots (GS) in the presence or absence of 50 $\mu\text{g/ml}$ fusaric acid (FA). **A**: Enlarged GS which did not redifferentiate the shoot. **B** and **C**: Shoots which did not form roots. **D**: Wilting regnerant in FA-containing medium, whose roots have been developed in hormone free MS medium without FA. The numbers in the figure represent the regenerants selected in each stage.

と考えられた。そこで、無作為に抽出した 30 個体について、土壌移植後約 1 カ月間経過した個体の最上位分枝を切り取り、FA 水溶液に浸漬処理した。ただ、このような時期の個体はすでに草丈が約 30~40 cm に伸長し(移植時は 10 cm 程度)、5~6 分枝を形成していたので、FA に対する感受性を再度検討することにした。すなわち、あらかじめ福寿 2 号の種子から育成した同生育期の対照個体から切枝を作製し、種々の濃度 (10, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$) の FA 水溶液に浸漬してその毒性程度を調べた。その結果、50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の FA 処理ではほとんど毒性効果は認められず、また、100 および 200 $\mu\text{g/ml}$ 処理区では、浸漬後 2~3 日で葉の黄変と基部の褐変が現れ、5 日後に上位葉にわずかに萎ちよう症状が観察されるのみであった。しかしながら、300 $\mu\text{g/ml}$ の FA 処理区では、その効果は明白で、処理 6 時間後で茎部に褐変が生じ、10 時間後には完全に枯死した。このような結果から、FA の毒性効果をもっとも顕著である 300 $\mu\text{g/ml}$ FA 液を検定液とし、それに再生個体から調製した分枝を浸漬処理したところ、いずれの個体においても FA の毒性は確認されなかった (Fig. 3)。

以上の結果から、茎葉再分化時と発根時に FA 選択

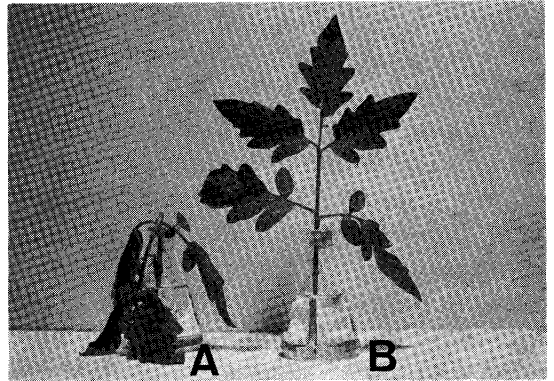


Fig. 3. Resistance of regenerated plant to fusaric acid. At one month after transplantation to soil, the upper branches were excised from both a control plant (A) (from which the callus tissues were originally induced) and a fusaric acid-resistant regnerant (B) selected in vitro and dipped in the aqueous solution containing 300 $\mu\text{g/ml}$ fusaric acid. Toxic effect of fusaric acid was not observed in the regnerant.

すれば、FA 抵抗性再生体を効率よく選抜できることが示され、さらに、培養時に FA を添加した場合、選抜率が数%向上することも観察された (FA 添加区; $120/1006 \times 100 = 11.9\%$, 無添加区; $19/1061 \times 100 = 1.8\%$)。しかしながら、FA 添加がなぜ選抜率の向上に役立ったのかについては不明な点も多い。たとえば、単細胞系を用いて変異を選抜する場合、選抜薬剤を添加しても、抵抗性変異体のみを生育させるだけで、選抜率そのものを変化させる訳ではない。一方、カルス小塊のような多細胞系では、FA を無毒化する細胞が存在すれば小塊を構成するすべての細胞が抵抗性でなくとも FA 存在下で生育できる可能性がある。このような点を考慮すると、本実験のようにカルス小塊を用いた系では、FA 抵抗性がどのような機構で誘導され、またどのような機構で FA の毒性を無毒化するのかなどの問題とも関連し、その機構はさらに複雑であると考えられる。それゆえ、細胞レベルで FA 無毒化機構を明らかにすることが、再生体における FA 抵抗性機構を知る上で重要であると考え、この点についても現在検討を進めている。

病原毒素を用いた病害抵抗性植物の選抜と育成に関する研究は、Carlson¹¹⁾ の報告が最初で、その後は宿主特異毒素 (host specific toxin, HST) を使用した選抜例が多数報告された¹²⁾。病原菌が HST を生産する植物疾病においては、HST に対する抵抗性の有無が、その病害に対して抵抗性であるかどうかを決定するので、その選抜は容易でかつ効果的であったといえる¹³⁾。しかしながら、作物の重要病害にはこのような HST が関与しないものも多く、特に有効な抵抗性品種が育成されていない土壌病害に対しては、効果的な抵抗性植物の育成法を確立することが急務であった。このような観点から、土壌病原菌の一種である *Fusarium* 属菌が植物体に感染した後、植物体内で生産する非特異的萎ちょう毒素 FA に注目した。すなわち、FA に対する抵抗性を選抜すれば種々の作物の *Fusarium* 病において、少なくともその病害の軽減に役立つものと期待された。最近、同種の研究が Shahin と Spivey¹⁰⁾ によってなされ、FA で選

抜したトマトプロトプラストの FA 抵抗性再生体およびそれらの自殖後代が、トマト萎ちょう病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2) に対しても抵抗性を示すことが報告された。*Fusarium* 属菌による土壌病害はトマト以外の作物においても深刻で、たとえばメロンつる割れ病 (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) やイチゴ萎黄病 (*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*) など多数の病害を挙げることができるが、以上の結果は、本法を応用して抵抗性植物を育成できる可能性を示唆するものとして興味深い。すでに筆者らは、メロンやイチゴカルスからも FA 抵抗性細胞系統を分離しているので、今後はこれらの植物についても FA 抵抗性再生体を分離し、*Fusarium* 病抵抗性系統の育成を試みたい。

文 献

- 1) 豊田秀吉, 1986. 組織培養, **12**: 119-123.
- 2) 豊田秀吉, 大形 浩, 松田克礼, 茶谷和行, 平井篤造, 1985. 植物組織培養, **2**: 70-73.
- 3) 豊田秀吉, 清水邦彦, 宋 英凱, 大内成志, 1987. 植物組織培養, **4**: 41-42.
- 4) 豊田秀吉, 茶谷和行, 清水邦彦, 前田和彦, 竹林晃男, 宋 英凱, 大内成志, 1987. 植物組織培養, **4**: 8-12.
- 5) Harborne, J. B., 1983. In "Plant and Fungal Toxins" (ed. by Keeler, R. F., A. T. Tu), Vol. 1, p. 743-782, Marcel Dekker, New York.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 7) Toyoda, H., N. Tanaka, T. Hirai, 1984. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **50**: 53-62.
- 8) Toyoda, H., H. Hayashi, K. Yamamoto, T. Hirai, 1984. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **50**: 538-540.
- 9) Evans, D. A., W. R. Sharp, 1983. *Science*, **221**: 949-951.
- 10) Shahin, E. A., R. Spivey, 1986. *Theor. Appl. Genet.*, **73**: 164-169.
- 11) Carlson, P. S., 1973. *Science*, **180**: 1366-1368.
- 12) 古沢 巖, 1987. *化学と生物*, **25**: 610-615.
- 13) Brettell, R. I. S., D. S. Ingram, 1979. *Biol. Rev.*, **54**: 329-345.

Summary

In Vitro Selection of Fusaric Acid-resistant Regenerants from Tomato Leaf Explant-derived Callus Tissues

Hideyoshi TOYODA, Yoshinori MATSUDA, Kunihiko SHIMIZU,
Hiroshi OGATA, Hisako HASHIMOTO and Seiji OUCHI

*Faculty of Agriculture, Kinki University, Kowakae
3-4-1, Higashiosaka 577, Japan*

Fusaric acid-resistant regenerants were selected in vitro by using the tissue culture system of tomato. The callus tissues were induced from the leaf explants of tomato and subcultured in a MS (0.01 mg/l IAA and 0.1 mg/l BAP) medium. After incubation for two weeks, a lot of green spots were produced in the callus tissues. The tissues were cut into small callus clumps so as to contain one green spot and transferred to a MS medium (0.1 mg/l IAA and 1.0 mg/l BAP) containing 50 μ g/ml fusaric acid. Fusaric acid-resistant regenerants were effectively developed from enlarged green spots and rooted in a hormone-free MS medium. For examining the resistance in regenerants at one month after transplantation to soil, their upper branches were cut and dipped in the solution containing 300 μ g/ml fusaric acid. In the branches of regenerants grown in the absence of fusaric acid, the resistance was fully maintained and expressed.