

イセイモのウイルスフリー苗の作出に関する研究

(第1報) 茎頂培養による植物体再生及び種いもの形成

平野三男・立松伸夫・服部英樹・橋爪不二夫・河野 満

Studies on the Production of the Virus Free Plant of Chinese Yam,
Ise-imo (*Di scorea Opp sita* Thumb.), the Meristem Culture.

(1) The f r mation f plantlet and tuber

Mitsuo HIRANO, Nobuo TATEMATSU, Hideki HATTORI,
Fujio HASHIZUME and Mitsuru KOHNO

緒 言

三重県で栽培されているイセイモはヤマノイモ (*Dio-
scorea opposita* Thumb.) の1種であり、品質が良
いことから市場で高い評価を得ている。しかしながら、
生産地ではいもの形状の凹凸が目立つことや、収量が減
少していることなどの問題点が指摘され、改善が求めら
れている。これらの原因について明らかにはされていないが、
イセイモが栄養繁殖により増殖されてきたため、
ウイルスに罹病し、そのウイルスが一因と考えられてい
る。

近年、ウイルス病対策として茎頂培養によるウイルス
フリー苗の生産が多く試みられており¹⁰⁾、イチゴ、ナガ
イモでは既に優良種苗供給事業が実施されている。そこ
で、本研究では、イセイモのウイルスフリー苗による種
苗供給体制を確立するため試験を行ったので、その概要
について報告する。

材料及び方法

1. 現地におけるイセイモウイルス病の発生状況

一般に、植物がウイルス病にかかると茎葉にモザイク
症状を示すことが知られている。そこで、茎葉のモザイ
ク症状を指標にしてウイルス病の発生状況を調査した。
三重県多気郡多気町地区内で、1985年7月17日及び8月
21日、8圃場を選定し、葉のモザイク症状を調査した。

1圃場当たり無作為に10個体を選び、肉眼によるモザイ
ク葉の有無を判定した (Fig. 1)。

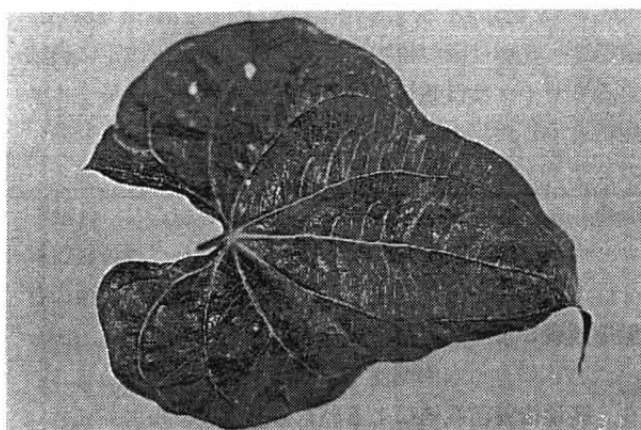


Fig. 1 Diseased leaf of Ise-imo

1個体のモザイク症状を次に示した指標で表した。

- 0 : モザイクのないもの
- 1 : 1~33%の葉がモザイク症状が生じている個体
- 2 : 34~66%の葉がモザイク症状が生じている個体
- 3 : 67~100%の葉がモザイク症状が生じている個体

2. ウイルス検定²⁾

モザイク葉中にウイルス粒子が存在するか否かを明ら
かにするため、Dip法により透過型電子顕微鏡 (日立H-

300型)で観察した。観察試料は、現地から採取したモザイク葉で、ピンセットで葉面を軽く押しながら葉中の汁液を滲出させた。この汁液に1%PTA(りんタングステン酸)水溶液を滴下し、混合した。定法によりコロジオン膜を張ったメッシュ上に、混合液を滴下し風乾後、観察した。

3. イセイモの茎頂培養

多気町で生産されたイセイモを鉢に植え、温室に置き、発芽させた。つるの長さが約30cmに伸長した後、鉢を35°Cの人工気象器内に静置した。静置後、経時的に頂端部を約1cm切り取り、供試材料とした。頂端部を軽く水洗した後、2.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に10分間浸漬した。殺菌水で3分間ずつ3回洗浄した後、実体顕微鏡を用い、無菌条件下で茎頂を摘出し、培地に置床した。Murashige and Skoog⁷⁾の培地(以下MS培地と記す)に、蔗糖3%、寒天0.8%になるように添加した培地を基本培地とし、Tanakaら¹³⁾の用いた25基盤目法に従い植物ホルモンとしてBA及びNAAを添加した。温度25°C、16時間照明(蛍光灯)、照度約2,000luxに調整した培養室内で培養を行った。

4. ウイルスフリーの検定

検定植物は、*Chenopodium amaranticola*, *C. quinoa*, *Nicotiana benthamiana*, *Crotalaria* sp. で、播種2~3か月後の植物体の成葉を用いた。検定に供試するモザイク葉は栽培されているイセイモからモザイク症状を示した葉を採集した。定法に従い、0.5g(生重)のモザイク葉を乳鉢にいれ、リン酸緩衝液を2ml加え、磨砕した。磨砕後、ガーゼで植物残渣を濾過し、汁液をカーボランダムとともに植物表面にこすりつけ汁液接種を行った。接種植物を温室に置き、1ヶ月後に病徴の有無を観察した。

5. 茎頂培養苗栽培によるいもの形成

1) 供試材料

試験管内で育成した5~6cmの幼植物を、パーミキュライトとパーライトの等量混合培土を入れたポリエチレン製ポット(直径8cm)に植え、25°C、80%Rhの人工気象器内で順化を行った。2か月後、人工気象器から温室へポットを移し、苗が成育した後に形成されたいも(重さ1~36g)を使用した。

2) 栽培

1990年4月5日、多気郡多気町地区の水田跡地圃場で、畦高25cm、畦幅125cm、条間50cm、株間20cmでいもを植え付けた。栽培方法は現地慣行法により行い、肥料

はイセイモ配合肥料を使用した。いもの収穫は同10月23日に行い、いもの重量を測定した。

結 果

イセイモの生産地域におけるウイルス病の発生状況を調査したところ、Table 1に示したように、調査した8圃場でイセイモ葉にモザイク症状が認められた。

Table 1 Survey of mosaic leaves of Ise-imo in fields

Field	Index of mosaic symptom	
	July, 17	Aug, 21
A	1.9	3.0
B	3.0	3.0
C	3.0	3.0
D	2.9	3.0
E	3.0	3.0
F	2.8	3.0
G	3.0	3.0
H	3.0	3.0

A to H shows the field, cultivated Ise-imo in Taki-cho, Mie. Each fields have an area of about 10a. and Ise-imo plants were grown from last week of April.

Indexes of mosaic leaves is as follows, 0 : No mosaic ; 1 : 1 to 33% ; 2 : 34 to 66% ; 3 : 67 to 100% of leaves in a whole plant showed mosaic. Figures in table indicates the average index of 10 plans. Data were taken at July, 17 and Augst, 17 and Augst, 21 in 1985.

7月17日の調査ではモザイク症状の軽微な圃場も見られたが、8月21日には、8圃場とも激しいモザイク症状を示した。これはイセイモが生育するにつれて、モザイク症状が顕著に現れてくることを示している。またこの調査により、ウイルス病の病徴であるモザイク症状を示したことから、イセイモがウイルス病にかかっていることが推定できた。そこで、イセイモモザイク葉を、Dip法による透過型電子顕微鏡で観察した結果、Fig 2に示したように、モザイク葉中からひも状のウイルス粒子が検出された。このひも状ウイルス粒子の長さは約800nmで、わずかに湾曲していた。

ヤマノイモ類(*Dioscorea* spp.)では、多くの組織培養事例があり、^{5), 8), 10)}、これらを参考に、茎頂培養によるウイルスフリー苗の作出を試みた。Table 2に示したように、培養2か月後には植物ホルモン無添加区でも、置床した茎頂から約2~3cmの幼植物体(Fig. 3)が

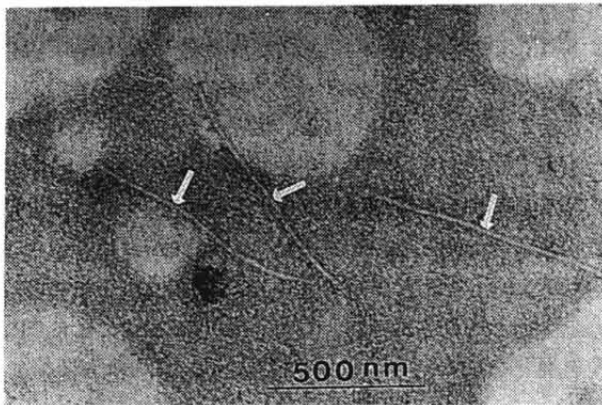


Fig. 2 Electron micrograph of virus particles isolated from mosaic leaves of Ise-imo plants.

Flexious-rod shape virus particles are shown as indicated with arrows.

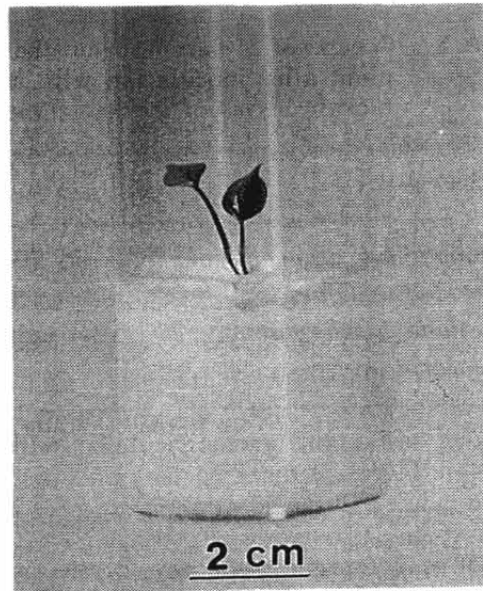


Fig. 3 Plantlet of Ise-imo.

The plantlet emerged from meristem of Ise-imo after 2 months of culture.

Table 2 Effects of plant hormones on shoot formation from shoot meristem of Ise-imo Plant.

NAA\BA (mg/l)	0	0.02	0.2	2	4
0	S (64)	S (59)	AS (64)	AS (42)	D (100)
0.02	S (83)	S (73)	AS (75)	AS (50)	D (100)
0.2	S (75)	S (33)	AS (50)	AS (64)	D (100)
2	SC (82)	C (80)	C (100)	C (40)	D (100)
4	SC (60)	C (91)	C (91)	C (56)	D (100)

Abbreviation ; S : formation of shoot, SC : formation of shoot with callus, AS : formation of aberrant shoot, C : formation of callus, D : death of implanted meristem.

Figures in () indicate the rate of occurrence of the each pheno-minon. 10 to 12 meristems were tested, and data were taken at 2-month after incubation.

再生した。さらに低濃度BAと低濃度NAA区では、植物ホルモン無添加区よりも高い植物体再生率を示した (Table 2)。低濃度BAと高濃度NAA区ではカルスを形成する傾向がみられ、高濃度BAと高濃度NAA区では茎頂がほとんど枯死した。一般にオーキシンの添加によりカルスを誘導することが知られているが、イセイモ茎頂から誘導されたカルスは水浸状あるいは毛状のカルスであった。このカルスからの胚葉体形成や茎葉分化はみられなかった。以上のように、茎頂培養によりイセイモの幼植物が得られたので、幼植物のウイルスフリーを確認する前段階として、まずウイルス検定植物へのイセイモのモザイク葉粗汁液の接種を試みた。Table 3に示したように、供試した4種の植物体に病徴は認められなかった。

次に、茎頂培養したイセイモ幼植物体からいもが形成されるか否かを検討するため、幼植物体から得られた小さいものを現地圃場で栽培した。

Fig. 4に示したように、収穫したいもの最大重量は285gであり、市販されるものと同様重量のイセイモが茎頂培養由来の種いもからも形成されることが明らかになった。また本試験で得られたいもの個数は極めて少なかったが、200g以上の重量のいもの形状は市販されているものと比べ、同等もしくはやや良好であった。

考 察

多くの栄養繁殖性植物はウイルスを保毒しており、これが原因となって、品質低下や収量減少を招き、その対策が求められている。現在、ウイルス病に対して直接防

Table 3 Occurrence of symptom on the test plant after inoculation with sap of mosaic leaves of Ise-imo plant

test plant	symptom
<i>Chenopodium amaranticola</i>	—
<i>Chenopodium quinoa</i>	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	—
<i>Crotalaria sp</i>	—

Leaves of test plant were inoculated with sap of mosaic leaves of diseased Ise-imo plant. The symptom were Observed at 1-month after inoculation.

- : Obvious symptom were not formed on the leaves of test plants.

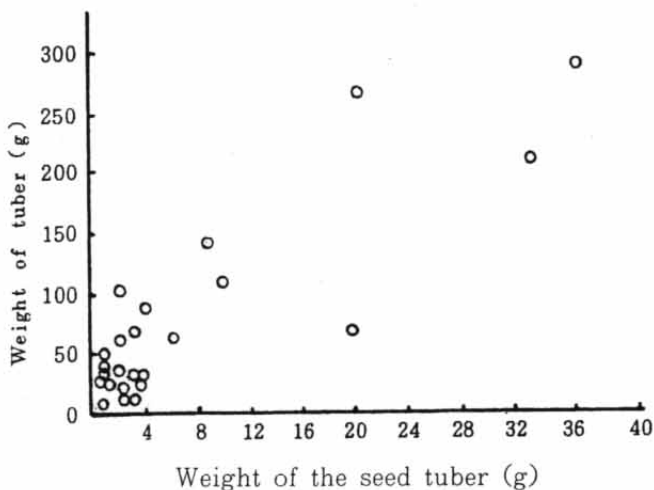


Fig. 4 Weight of tuber obtained by cultivating of small seed tuber.

除効果を示す農薬は無く、ウイルス病対策として、茎頂培養によるウイルスフリー植物の導入に頼らざるを得ないのが現状である。多くの植物でウイルスフリー苗が作られ、イチゴ、ネギ、ブドウ、カンキツ、キク、カーネーション等ではすでに実用化技術として普及している。本研究では、ヤマノイモの1種であるイセイモがウイルスを保有していることを明らかにし、さらにイセイモの茎頂培養から幼植物を再生させ、この幼植物体から種いもを生産し、これを栽培することにより、市販されているものと同様大きさのイセイモが収穫できることを実証した。イセイモのモザイク葉から検出したウイルス粒子は電子顕微鏡観察によりその大きさが700~800nmのひも状のPotyvirusであり、モザイク葉にはほとんどえそ斑が生じない。藤田⁹⁾、石川⁶⁾、福本・栃原⁹⁾、奥山・坂⁹⁾によって報告されているように、日本ではヤマノイ

モからCYNMV (ヤマノイモえそモザイクウイルス) とYMV (ヤマノイモモザイクウイルス) の2種類のウイルスが検出されている。これらのウイルス粒子の間に形態的差異は認められないが、調査した被害葉にはほとんどえそ症状が見られないことから、イセイモから検出されたウイルス粒子はYMVと考えられる。今回の試験では、病徴の肉眼観察と電子顕微鏡観察からのウイルスの同定を行ったが、確証を得るにはさらに血清学的な反応や生物・物理学的性質、指標植物への接種による病徴の再現等を試験する必要がある。

*Dioscorea*属の組織培養において、用いた植物ホルモンの種類や濃度に若干の違いはあるが、Asokan¹⁾や大沢¹⁰⁾も本試験とほぼ同様な結果を報告している。BAは培養細胞に変異を出現させ、またNAAはカルスを誘導することが知られており、均一種苗を大量生産する場合には不都合であると考えられる。すなわち、茎頂の初代培養には、植物ホルモンの添加量を抑え、かつ幼植物体の生存率を確保する必要がある。イセイモの茎頂培養に及ぼす植物ホルモンの影響を調べた結果、ウイルスフリー苗を作出する目的で茎葉を伸長させるには、低濃度の植物ホルモンを添加したMS基本培地が適することが明らかになった。イセイモ茎頂の初代培養では、植物ホルモンをNAA及びBAとした場合、共に0.02mg/l程度の濃度が適当であると考えられる。

一般に組織培養により試験管の中で育成される幼植物体は、高湿度、高栄養条件下で培養されるため、軟弱で、外部環境に適応できず、試験管から直接鉢植えにして栽培すると枯死する個体が多くなる。そこで、幼植物体の効率的な順化法を確立する必要がある。今回の試験ではイセイモの幼植物をまず高湿度条件下(密閉したプランターに培養苗を移植したポットをおき、更にプランターを25℃、80%に調節した人工気象器におく)に置き、徐々に湿度条件を外気に合わせていくことで順化を行った。順化した幼苗が生育した後に形成されるいもの試験結果を示さなかったが、これについては現在、試験管内外の培養環境や有望な培養資材の探索などを含めて効率的な順化方法を検討中である。茎頂培養により得られた種いもを栽培する場合、種いもの重量が約40gもあれば市販のイセイモと同重量のいもが収穫できると推測される(Fig. 4)。現地慣行栽培の種いも重量が70~80gと比較すると約1/2であり、茎頂培養由来の種いもの肥大率が高いことを示している。したがって、茎頂培養苗から40g以上の種いもを形成させることを目標に、順化方法ならびに栽培方法を見つけ出す必要がある。

今回の試験で茎頂培養苗由来の種いもを栽培したが収穫できたいもの個数が少なかったため、形状や品質を調

査できなかった。今後さらに試験個体数を増やして、これらの調査を行い、ウイルスフリー化によって品質向上、収量増加が期待できることを確認する必要がある。また今回、圃場に栽培されているイセイモのモザイク葉粗汁液の接種により指標植物の選定を試みたが、供試した4種類の植物体にはいずれも病徴が観察されなかった。藤田³⁾は30種類の植物に接種し、ヤマノイモ類に病徴が現れることを報告しているが、上記4種植物に病徴が現れるか否かについては明らかにしていない。今回の接種試験で、病徴を再現することができなかった理由については明らかではないが、イセイモ被害葉中のウイルス濃度が極端に低いことが原因と考えられる。イセイモのウイルスフリーを確認するためには検定植物が必要であり、今後、更に感受性の高い検定植物を探索する必要がある。

最終段階として、ウイルスフリーを現地へ導入した場合、想起される問題点を整理すると次のようになる。

- 1) 大量の種いもを必要とするため、培養レベルにおける大量増殖法ならびに圃場レベルにおける種いも増殖法を確立しなければならない。
- 2) 植え付け時点でウイルスフリーであっても、ウイルスを保有したアブラムシによって再感染する危険性がある。この再感染の防止対策を講ずる必要がある。
- 3) 組織培養法によってウイルスフリー苗を生産すると様々な変異が生じることが報告されている。したがってイセイモの商業的形質を損なわない程度の変異に押さえる培養方法を開発しなければならない。

摘 要

三重県で栽培されているイセイモは、いもに凹凸が目立つことや、収量が減少していることなどの問題点が指摘され、改善が求められている。これらの原因については明らかでないが、ウイルス病もその一因と考えられている。そこでこれらの問題点を改善するために、イセイモのウイルス病発生状況を調査し、ウイルスフリー苗の作出からその栽培によるいもの収穫を試験し、次の結果を得た。

- 1) 多気郡多気町で栽培されているイセイモを調査したところ、ほとんどの圃場で葉にモザイク症状がみられた。
- 2) モザイク症状を示すイセイモ葉を電子顕微鏡で観察した結果、長さ700~800nmのひも状のPotyvirusが検出された。
- 3) イセイモの茎頂培養を行ったところ、培養2か月後には植物ホルモン無添加区及び低濃度植物ホルモン添加区 (BA: 0~0.02mg/l, NAA: 0~0.2mg/l) で約2~3cmの幼植物体が再生した。

4) 数種の植物にイセイモ病葉の汁液接種を行ったが、病徴を再現することはできなかった。

5) 茎頂培養により得られた種いもを現地栽培した結果、重さ約200g以上のいもを収穫することが出来た。

謝 辞

本試験を行うに当たり、終始有益な助言をいただいた、三重県農業技術センター経営部長 伊藤雄一氏、前総括研究調整監 石黒一郎氏、前資源開発部長 橋本敏幸氏に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Aoskan, M. P., S. K. O Hair and R. E. Litz (1983): *Hortscience*, 18, 702~703.
- 2) 土居養二, 鳥山重光, 与良清, 明日山秀文 (1969): 日植病報, 35, 180~187.
- 3) 藤田隆 (1985): 日植病報 (講要), 50, 110.
- 4) 福本文良, 栃原比呂志 (1978): 日植病報, 44, 1~5.
- 5) 稲垣昇, 小松原佐和子, 岡雄二, 前川進, 寺分元一 (1985): 園学雑, 54, 66~74.
- 6) 石川亮, 贅田裕行, 難波成任, 山下修一 (1985): 日植病報 (講要), 50, 99.
- 7) Murashige, T. and F. Skoog (1962): *Physiol. Plant*, 15, 453~497.
- 8) Nagasawa, A. and J. J. Finer (1989): *Plant science*, 60, 263~271.
- 9) 奥山哲, 坂ひとみ (1978): 茨城大農学部学術報告, 26, 29~34.
- 10) 大沢勝次, 栗山尚志, 菅原裕幸 (1981): 野菜試報告, A9, 1~46.
- 11) Tanaka, R. and H. Ikeda (1983): *Jpn. J. Genet.*, 58, 65~70.

SUMMARY

It has been pointed out that the surface of Ise-imo tuber is undulate and the yield are gradually reduced. The cause has been unknown, but these phenominons seem to be responsible for the virus disease. In order to solve the problems, the production of virus-free plant of Ise-imo, and the formation of tuber, originated from shoot-tip culture were investigated. The results are as follows,

1) The mosaic leaves were observed on the Ise-imo plant cultivated in the paddy-fields in Taki-cho, Mie.

2) Potyvirus was detected in mosaic leaves by electron microscope. It was flexous-rod shaped and 700 to 800nm in length.

3) Plantlets were emerged from meristems of Ise-imo plant on the Murshige and Skoog medium with low concentration of BA (0 to 0.02mg/l) and NAA (0 to 0.02mg/l).

4) Symptoms were not shown on the leaves of several test plants after inoculation with sap of the deseased Ise-imo leaves.

5) The seed tubers, derived from shoot-tip culture, were formed the tubers of more than 200g in weight in the open field.

(英文摘要)