茎頂培養によるウイルスフリーチャロギの作出

山本英樹^{1*}・藤 晋一²・浅利幸男¹

¹ 秋田県農業試験場 010-0442 南秋田郡大潟村

² 秋田県立大学生物資源科学部 010-0195 秋田市下新城中野

Production of Virus-free Chinese Artichoke through Shoot Tip Culture

Hideki Yamamoto^{1*}, Shin-ichi Fuji² and Yukio Asari¹

¹ Akita Agricultural Experiment Station, Ohgata, Akita 010-0442

² Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Akita 010-0195

Summary

Most Chinese artichoke plants cultivated in Akita, Fukui and Yamagata Prefectures, Japan, were found to be infected with viruses. In this study, we produced virus-free plants through shoot tip culture of axillary buds. Shoot tips formed multiple shoots on MS medium containing 0.5 mg·liter⁻¹ BA, or formed callus that subsequently developed adventitious shoots on MS medium with 0.5 mg·liter⁻¹ NAA and 0.5 mg·liter⁻¹ BA. When these shoots were excised and transferred to hormone-free MS medium, they developed roots. Inoculation tests, RT-PCR assays and visual observations of rooted plantlets that readily acclimatized in a greenhouse, indicated that three were virus-free.

Key Words: Chinese artichoke, fabavirus, potyvirus, shoot tip culture, virus-free plant.

緒 言

チャロギ (*Stachys sieboldii* Miq.) は地下にのびるストロンの先端にできる念珠状の塊茎で栄養繁殖を行うシソ科の野菜で、この塊茎が漬け物等に利用されている。秋田県では県南の皆瀬村の特産品で、重点作物として栽培に力を入れているが、生育状況を調査したところほとんどの株が葉に退緑斑紋もしくはモザイク症状を呈していた。電子顕微鏡観察並びに遺伝子解析の結果、新規 potyvirus と *Broad bean wilt virus 2* に近縁の fabavirus の感染が確認された (藤ら, 2002)。これまで国内外でチャロギのウイルス病の報告はなく、これらの症状がウイルスによる新病害と考えられた。現在、両ウイルスの単離と同定を進めているが、単離ウイルスの病原性を確認する際に健全株が必要になる。また、ウイルス病の発生が確認されたことで、生産現場では健全株への更新が望まれている。

本研究では、皆瀬村に加え、他県産のチャロギについてウイルス感染状況を調査した。また、チャロギは栄養繁殖性であることから無病株の探索が難しいと予想され

たので、茎頂培養によるウイルスフリー (VF) 株の作出について検討した。

材料および方法

供試材料

皆瀬村のチャロギ圃場から採取した塊茎 10 個、および種苗会社を通じて購入した福井県と山形県産の塊茎それぞれ 20 個を市販の育苗培土 (ニッピ園芸培土 1 号, 日本肥料) の入ったプランターに植え付けて、温室で育苗して供試した。

ウイルス検定

両ウイルスを検定できる *Chenopodium quinoa* Willd. を用いて汁液接種 (大木, 1997) により生物検定を行った。

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 検定は GTC 法 (市川・高辻, 1995) により調製した全 RNA を鋳型とし、One Step RNA PCR Kit (TaKaRa) を用いて、添付の説明書に従って行った。PCR 時のアニーリング温度は 62℃、伸長時間は 30 秒、サイクル数は 30 に設定した。プライマーセットは藤ら (2002) の報告を基に設計し、potyvirus の検定では 5'-GATTTTAGTTCT-CGCACACG-3' と 5'-CTTCTCCTCTCTTTTCCAG-3' (増幅産物: 447 bp) を、fabavirus の検定では 5'-

2003 年 3 月 25 日 受付. 2003 年 5 月 29 日 受理.

*Corresponding author.

GTATCTAGTGCCTCGAAGG-3' と 5'-TGGAAC-CATCAAGGCGCATTTT-3' (増幅産物:322 bp)を用いた。

茎頂培養と順化

えき芽を含むように切り取った長さ5 cm程度のチョロギの茎を5%ピューラックス(オーヤラックス)で5分間表面殺菌後、実体顕微鏡下でえき芽茎頂を約0.5 mmの大きさに摘出した。次に、各試験管に1個の茎頂を置床し、25℃、16時間照明(2,000-3,000 lux)で培養した。培地には1-ナフタレン酢酸(NAA)および6-ベンジルアミノプリン(BA)を第1表に示す濃度で添加した、30 g・liter⁻¹ ショ糖と8 g・liter⁻¹ 寒天を含むMS培地(Mura-shige・Skoog, 1962; pH 5.8)を使用し、これを24×120 mm試験管に10 mlずつ分注した。2ヵ月後、伸長した茎葉を切り出してホルモン無添加のMS培地(30 g・liter⁻¹ ショ糖と8 g・liter⁻¹ 寒天を含む; pH 5.8)に移植し、25℃、16時間照明(2,000-3,000 lux)で2ヵ月間培養し、発根させた。

十分に発根した幼植物を市販の育苗培土(ニッピ園芸培土1号)、小粒赤玉土と腐葉土(4:2:1)の入った6 cmポリ鉢に移植して、活着するまで(10日程度)寒紗で覆ったプラスチックキャップを被せて、強光と乾燥から保護しながらガラス温室で順化を行った。

結果および考察

ウイルス感染状況

皆瀬村、福井県、山形県産のチョロギ、計50株はいずれも退緑斑紋やモザイク症状を現した。生物検定の結果、全てにおいて*C. quinoa*の接種葉に退緑斑点やえそ斑点が生じた。このことから、皆瀬村のみならず他県の産地で栽培されているチョロギの多くがウイルスに感染しており、健全株を採り出すのは困難と推測された。

VF株の作出

茎頂培養には皆瀬村のウイルス感染株を用いた。置床した茎頂はホルモン無添加の培地では全て褐変し、生育を停止した。また、NAAを0.5 mg・liter⁻¹ 添加した場合もカルス化はするものの、その後ほとんどが褐変し、生育を停止した。一方、BAを0.5 mg・liter⁻¹ 添加した培地では、1個の茎頂から多数の茎葉が発育し、多芽体を形成した。BAとNAAを各0.5 mg・liter⁻¹ 添加した場合は

カルス形成した後、カルスの一部に不定芽を形成して茎葉を再分化することが多かった(第1表、第1図)。

茎葉が伸長した33試験管、それぞれから茎葉を1本切り出し、ホルモン無添加のMS培地に移植したところ、全てが発根した。これにより、生育した茎葉をさらに節を含むように切り分け、ホルモン無添加のMS培地に移植して節培養を行うことによって、効率的な大量増殖が可能と考えられる。

生育が遅れ気味であった2株を除いた31株を順化したところ、全株容易に活着した。しかし、順化1週間後には20株に退緑斑紋症状が現れた。生物検定の結果、無症状の11株のうち3株からウイルスが検出された。残りの8株についてRT-PCR検定を行い、ウイルス由来の増幅断片が見られなかった3株を選抜した(第2図)。これらはその後もウイルス感染症状が現れず(第3図)、最終的に3株のVF個体が得られた。なお、このうち2株はBA単独添加培地での茎頂培養由来であり、1株はBAとNAA添加区由来であった。

VF化された株が少なかったのは摘出した茎頂の大きさによるものであり、VF株の作出には茎頂を0.5 mmより小さく切り出す必要があると考えられる。一般に、カルスを経由して得られた再分化個体は変異が多いとされる。また、1外植体から多数の茎葉が得られることから、チョロギをVF化する場合、BAのみを添加したMS培地が適していると考えられる。一方、設計したプライマーセッ

Fig. 1. Regenerated plantlets derived from shoot tips of Chinese artichoke on MS medium with NAA and BA after 2 months. 1) hormone-free (explant browning); 2) 0.5 mg・liter⁻¹ NAA (browning after callus formation); 3) 0.5 mg・liter⁻¹ BA (multiple shoot formation); 4) 0.5 mg・liter⁻¹ NAA and 0.5 mg・liter⁻¹ BA (adventitious shoot formation on callus).

Table 1. Effects of NAA and BA on the growth of shoot tip of Chinese artichoke on MS medium after 2 months (n=20).

NAA (mg・liter ⁻¹)	BA (mg・liter ⁻¹)	Explant browning	Browning after callus formation	Callus formation	Multiple shoot formation	Adventitious shoot formation on callus
0	0	20	0	0	0	0
0.5	0	0	18	0	0	2
0	0.5	3	0	0	17	0
0.5	0.5	2	0	4	0	14

Fig. 2. Gel plate of potyvirus and fabavirus assays by RT-PCR of Chinese artichoke plantlets obtained through shoot tip culture, lanes 1-3; lane 4, an assay of a virus-infected plant showing a mosaic leaf symptom (explant source); M, 100 bp marker.

Fig. 3. A leaf from a virus-infected mother plant of Chinese artichoke showing a mosaic symptom (left) and a symptomless leaf from a virus-free plant obtained through shoot tip culture (right).

トを用いることによって病原と考えられる2つのウイルスが個別に高感度で検出可能ことが確認され、単離ウイルスや茎頂培養株の検定に有効な手法が確立された。

今後、今回得られたVF株を用いて、分離を進めている

2つのウイルスの病原性を確認する予定である。また、チョロギは塊茎を多数形成することから、大量増殖は容易であると考えられる。得られたVF株にこれまでのところ形態の変異は認められていないので、さらに栽培特性や収量を検討した後、産地に普及させる予定である。

摘 要

調査した秋田、福井、山形県産のチョロギは全てがウイルスに感染していた。そこで、0.5 mm程度のえき芽茎頂をMS培地に置床した結果、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAを添加した場合は多芽体を形成したのに対し、NAAとBAそれぞれ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を添加した場合はカルス形成した後、苗条が再分化した。これらの苗条をホルモン無添加のMS培地に移植したところ、発根し、容易に順化した。順化個体の症状観察、接種試験およびRT-PCR検定を行った結果、3個体がVFであることが確認された。

謝 辞 本試験に対し、近藤亨博士にはご助言を頂いた。谷屋繁克氏、吉田有男氏、工藤英明氏、利部大和氏、小濱結希枝氏、工藤真由美氏ならびに和田節子氏には調査等にご協力頂いた。厚くお礼申し上げる。

引 用 文 献

- 藤 晋一・山本英樹・古屋廣光・内藤英樹. 2002. モザイク症状を示したチョロギから得られたウイルスについて. 日植病報. 68(講要): 59.
- 市川裕章・高辻博志. 1995. GTC法. p. 42-43. 島本 功・佐々木卓治監修. 植物のPCR実験プロトコル. 秀潤社. 東京.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 大木 理. 1997. 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン. p. 57-60. 日本植物防疫協会. 東京.