

組織培養によるフキのウイルスフリー化

松本純一*・塩飽邦子*・大谷良逸*

要 約

茎頂と頭花を用いた組織培養によってフキのウイルスフリー個体を作成した。

- 1 初代培養には植物ホルモン (NAA を0.1-1.0mg/L, BAを1.0mg/L) 加用のMS培地を用いてシュートを再生させた。頭花を外植体として用いると、75-88%の個体でシュートが再生された。
- 2 発根用培地 (植物ホルモン無添加1/2B5培地) に置床したシュートの伸長・発根は良好であった。また、発根用培地に置床したシュートから新たなシュートの形成がみられ、これらのシュートを分割し、継代培養することで同じ系統を大量に増殖することができた。
- 3 検定の結果、再生植物の24%がウイルスフリーであった。
- 4 ウイルスフリーの鉢上げ苗を本圃に定植する際、7月定植より、7、8月に冷房温室で管理し9月に定植した方が種茎の増殖率がよくなった。

Production of Virus Free Japanese Butterbur Plants (*Petasites japonicus* Fr. Schmidt).

Jun-ichi MATSUMOTO, Kuniko SHIWAKU and Ryoichi OHTANI

Summary

Virus free plants were obtained from flower-head tips cut from virus infected Japanese butterbur plant.

- (1) Shoots were induced on Murashige and Skoog's solid media containing 0.1-1.0mg/L NAA and 1.0mg/L BA. The rate of shoot regeneration from flower-heads was 75-88% and even better from meristems.
- (2) These shoots formed roots and new shoots remarkably well on half-strength B5 solid media. Many plantlets were obtained by repeating subcultures on the same media.
- (3) Although filamentous virus was detected in many of the plants, 24% of the regenerated plants were virus free.
- (4) The growth of rhizomes increased when the virus free plants were grown in an air-conditioned greenhouse in July and August.

キーワード：フキ、組織培養、ウイルスフリー、大量増殖

緒 言

兵庫県津名郡一宮町では昭和28年頃からフキ生産が行われている。しかし、近年、葉柄が細い、色が悪いなどの症状が生じている。これらの原因として連作による土壌条件の悪化、ウイルスの感染などが考えられる。

フキに発生するウイルスとしては5種類が報告されている¹⁾が、深谷ら⁴⁾は愛知県の産地からモザイク症状を現わすフキを採集しウイルス検定を行った。その結果、ウイルス感染株率はフキモザイクウイルス (ButMV) は100%、キュウリモザイクウイルス (CMV) は94%、

アラビスモザイクウイルス (ArMV) は45%であった。フキは栄養繁殖性であることから、ウイルスに感染した株から育成した種茎はすべてウイルスを保有している可能性がある。そのため、生育に及ぼす感染の影響を検討するにはウイルスを保有していない個体を供試する必要がある。

フキのウイルスフリー化は主として組織培養によって試みられてきた。茎頂培養⁵⁾、花茎および葉柄組織の培養⁶⁾、さらに葉身および葉柄培養¹¹⁾が主なものとしてあげられる。しかしながら、いずれの方法もフリー化率の向上や形質変異など課題が多かった^{5, 7, 11)}。また、フキの茎頂部は地際にあるため、茎頂培養は雑菌による汚染率が高い欠点がある⁵⁾。最近、岩本・嘉儀²⁾は培養

2001年8月30日受理

* 中央農業技術センター

部位として花芽分化初期の頭花を用いて、ウイルスフリー化率が高く形質変異のほとんどない培養系を確立した。

そこで、本研究では生産性の向上を図るため、岩本・嘉儀の方法により頭花を、また同じ培養系で茎頂を外植体にそれぞれ用いて、組織培養を行い、ウイルスフリー個体の作出を試みた。

なお、本研究を行うに当たり、助言と試験の便宜をはかっていただいた兵庫県立淡路農業技術センター農業部小林尚司主任研究員、材料の収集、現地での栽培などご協力いただいた北淡路農業改良普及センター池川佐保子氏（現在：豊岡農業改良普及センター）・田中得久氏（現在：西脇農業改良普及センター）・樋本英司氏、津名郡一宮町の大植勉氏をはじめ日の出農協ふき部会の方々に深く感謝します。

材料及び方法

1 組織培養によるウイルスフリー化

津名郡一宮町の生産者より提供されたフキ (*Petasites japonicus* Fr. Schmidt, 品種「愛知早生」) を、2か月間冷蔵の後、温室内で栽培して実験に供試した。地下茎先端部あるいはふきのとうを切り取り、中性洗剤で洗浄して土を落とし70%エタノールに30秒間浸漬した後、有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で10分間攪拌しながら消毒した。消毒後に茎頂あるいは頭状花序を露出して、生長点あるいは頭花（花芽分化初期の未熟な頭花）を切り出し培養した。

初代培養はpH5.7に調整した Murashige and Skoog (以下MS) 培地⁹⁾ にショ糖30g/L、寒天9g/L加えたものを基本として、ナフタレン酢酸 (NAA) とベンジルアデニン (BA) を表1に示した濃度に調整して茎頂あるいは頭花を置床し、4週間ごとに2回継代培養した。茎頂培養では置床67日目、頭花培養では置床81日目にそれぞれシュートの再生を調査し、発根用培地に移植した。

発根培養はショ糖30g/L、ゲルライト2.5g/L加用の1/2B5培地¹⁾ (pH5.7) を用いた。培養5週間後にシュートの発根を調査した。初代培養、発根培養ともに25°C、16時間日長で行った。

2 ウイルス検定

組織培養から再生した個体のウイルス感染の有無は、鉢上げ前に ButMV を対象として電子顕微鏡観察、CMV、ArMVを对象としてササゲおよびセンニチコウに対する接種検定法（生物検定）により行った。

3 親株の養成および種茎の増殖

ウイルスフリーが確認された再生植物体は市販の培養

土2種を詰めた径9cmの黒ポリポットに1998年6月13日に移植し、5~7葉、葉柄長約10cm程度の苗に成長させて7月9日まで育苗した。

培養個体のポット苗のうち茎頂由来の1系統（系統名：茎頂-1、④に由来）40個体、頭花由来の2系統（系統名：頭花-1、頭花-2、ともに⑦に由来）それぞれ50個体を選び、そのうち70個体は7月9日に津名郡一宮町の網ハウス（パイプハウスに寒冷紗を張ったもの）内に植えつけ、残り70個体は兵庫県立淡路農業技術センターの冷暖房ガラス室（室内気温20°C~30°C）で保管した後に、9月4日に同じ網ハウスに植えつけて親株（種茎）を養成した。

1999年7月13日に養成した個体を掘り上げて、地下茎を調整後、ウイルスフリー苗から増殖した種茎の重量を測定した。

結 果

1 組織培養によるウイルスフリー化

初代培養はMS培地を基本として、NAAとBAの濃度の組合せを表1のように4種類設定して、シュートの再生率を調査した。茎頂を培養した場合、雑菌の汚染が激しくシュートが再生した個体数は少なかった。これに対して頭花を培養した場合、シュートの再生率は高かった（表1）。再生したシュートを発根用培地に置床した。シュートの伸長および発根は良好で、発根用培地で新たなシュートの形成も認められた（表1）。茎頂培養によって得られた9系統と頭花培養によって得られた24系統のうち、ウイルス検定の結果、ウイルスフリーが確認されたのは茎頂由来1系統、頭花由来7系統で、ウイルスフリー化率は24%であった（表2）。ウイルスフリーが確認された8系統180個体を鉢上げし、177個体が順調に生育した。

2 種茎の増殖

鉢上げを行った個体のうち、3系統（茎頂-1、頭花-1、2）計140個体を現地隔離圃場に植え付けて親株（種茎）を養成した。養成した株を掘り上げて地下茎を調整後、種茎の収量をみた。7月定植では1個体当たり611g、9月定植では1個体当たり873gの種茎がそれぞれ得られた。また、系統によっても生育の程度に差がみられた（表3）。

考 察

初代培養において、茎頂あるいは頭花を培養したいずれの場合でも植物成長調節物質（NAAとBA）の濃度によるシュート再生率の差はみられなかった。再生した

表1 シュート再生および発根におよぼす外植体・植物成長調節物質の影響

区 No.	外植体	培地	NAA (mg/l)	BA (mg/l)	供試 切片数	シュート再生 切片数(%)	発根用培地への ^{*)} 移植シュート数	発根 シュート数(%)	新たに形成された シュート数
①	茎頂	MS	0.1	0.1	16	2 (13)	1	0 (0)	—
②	茎頂	MS	0.1	1.0	16	4 (25)	4	4 (100)	25
③	茎頂	MS	1.0	0.1	15	3 (20)	3	2 (67)	4
④	茎頂	MS	1.0	1.0	15	3 (20)	3	3 (100)	9
⑤	茎頂	1/2MS	0.1	1.0	15	3 (20)	2	2 (100)	14
⑥	頭花	MS	0.1	0.1	24	21 (88)	12	9 (75)	23
⑦	頭花	MS	0.1	1.0	24	18 (75)	15	15 (100)	93

*)：再生したシュートの一部は別試験に供試した。

シュートを発根用培地に植え替えることで発根と新たなシュートの形成が認められた。発根用培地での新たなシュートの増殖は、初代培養でBA濃度が高い試験区で高くなり、このことは移植した切片に残るBAの影響によると考えられる。この新たに形成されたシュートを分割して発根用培地で継代培養することにより、特別な増殖の処理をすることなく、培養個体を大量増殖できるようになった。このシュート分割による増殖は、発根と増殖を同時に行えること、植物成長調節物質を添加しないことで変異の確率が低くなることなどから、岩本・嘉儀²⁾の腋芽増殖よりも非常に有利な増殖法と考えられる。

本研究では、茎頂培養によるウイルスフリー化率は非常に悪かった。一般的に茎頂培養では切り出す茎頂が小さければ小さいほどウイルスを除去する可能性が高くなるが、生存する割合が低くなり培養が困難となる。松原・益田⁵⁾はフキの茎頂は0.1~0.3mmの組織でも十分生育することを報告しているが、フキに含まれている物質による褐変、強度の殺菌の必要性などから、茎頂組織で切り出すことができるのは1.0~0.5mmの組織となることも報告している。本研究でも、生長点の切り出し時に組織の褐変が起り、1.0~0.5mmあるいは1.0mm以上の組織を切り出すこともあった。このように茎頂よりも下部の組織も一緒に切り出したことが、茎頂培養でウイルスフリー化が困難であった原因と考えられる。

定植したウイルスフリー苗からの種茎の増殖は7月定植より9月定植の方がよかったが、これは夏の高温期に冷房処理をした効果と考えられる。ウイルスフリー苗において夏の高温期に冷房条件下に置くことで種茎の増殖率が良くなることが判明した。

再生した個体のウイルス検定において、生物検定の結果からCMVとArMVは検出されず、この2種のウイルスについてはウイルスフリーであると考えられる。しかし、電顕観察では長さ約620~680nmのひも状のウイ

表2 再生系統のウイルス検定

区 ¹⁾ No.	供試 系統数 (シュート数)	電顕観察 ²⁾		生物検定 ³⁾			
		+	-	ササゲ		センニチコウ	
				+	-	+	-
②	3	3	0	0	3	0	3
③	2	2	0	0	2	0	2
④	2	1	1	0	2	0	2
⑤	2	2	0	0	2	0	2
⑥	9	8	1	0	9	0	9
⑦	15	9	6	0	15	0	15

1)：培地および植物成長調節物質濃度による区分。

表1参照。①は増殖中に枯死したため欠番。

2)：+；ひも状ウイルス様粒子が確認された。

-；粒子は確認されなかった。

3)：+；局部病斑を形成した。

-；局部病斑を形成しなかった。

表3 ウイルスフリー苗からの種茎の増殖

系統	7月9日定植 ¹⁾		9月4日定植 ²⁾	
	定植個体数	種茎重量 (g/個)	定植個体数	種茎重量 (g/個)
茎頂-1	20	615	20	1100
頭花-1	20	500	30	510
頭花-2	30	683	20	1190
平均 ³⁾		611		873

1) 直接圃場に定植した。

2) 淡路農技の冷房温室で2か月間栽培した後定植した。

3) 全個体の種茎重量/定植個体数。

ルス様粒子が高頻度で認められ、形状および長さからButMV⁹⁾と考えられた。ButMVとCMVはアブラムシによって伝搬される⁹⁾ため、圃場内に感染した個体が少数でも存在する場合にはアブラムシによって、また、感染した個体がなくてもウイルスを保毒したアブラムシ

が圃場外より侵入することで、ウイルスが圃場全体に蔓延する可能性があり、ウイルスフリー株のウイルス再感染の危険性も高い。そのため他の栄養繁殖作物同様、フキにおいてもウイルスフリー母株の隔離栽培は厳重に行い、再感染の防止に努めなければならない。

引用文献

- (1) Gomborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima (1968) : Nutrient requirements of suspensions of soybean root cells : Exp. Cell Res. 50, 151-158
- (2) 岩本 嗣・嘉儀 隆 (1995) : 組織培養によるフキ (*Petasites japonicus* Fr. Schmidt) ウイルスフリー株の大量増殖 : 園芸学雑誌 64, 103-111
- (3) 岩本 嗣 (1999) : *in vitro* 選抜を利用したフキの優良系統「のびすぎでんねん」の育成 : 近畿作育研究 44, 73-76
- (4) 深谷雅博・花田 薫・栃原比呂志・宮川寿之 (1983) : 愛知早生フキから検出されるウイルスの種類について : 関西病虫研報 25, 42
- (5) 松原幸子・益田忠雄 (1980) : フキのウイルスフリー株育成のための茎頂培養 : 岡山大農学報 56, 21-28
- (6) 森下正博・嘉儀 隆・山田貴義 (1980) : フキの花茎および葉柄組織からのウイルスフリー株大量育成 : 大阪農技セ研報 17, 1-6
- (7) 森下正博・山田貴義 (1981) : フキの組織培養株の形質変異について : 大阪農技セ研報 18, 9-18
- (8) Murashige, T. and F. Skoog (1962) : A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture : Physiol. Plant. 15, 473-497
- (9) 栃原比呂志・田村 実 (1976) : フキのウイルス : 日植病報 42, 533-539
- (10) 栃原比呂志 (1993) : 原色作物ウイルス病事典 (全国農村教育協会) : 401-404
- (11) 矢部和則・桜井雍三・飯田孝則・鷲田純彦 (1986) : 葉身及び葉柄培養によるフキ (*Petasites japonicus* Fr. SCHMIT) 無病苗の作出 : 愛知農総試研報 18, 102-109