佐賀大農彙（Bull. Fac. Agr., Saga Univ.）92：９～15（2006）

ジネンジョウのウイルスフリー苗の大量増殖

溝上　藍・谷本　静史
（植物工学研究室）
平成18年９月19日　受理

Mass Propagation of Virus-free Japanese Yam Plantlets

Ai MIZOKAMI and Shizufumi TANIMOTO
(Plantech Research Laboratory)
Received September 19, 2006

Summary

Our major purpose is development of method for mass propagation of virus-free plantlets of Japanese yam (*Discorea japonica* Thunb.). Using apical- and lateral-bud explants, shoot formation was most frequently (75%) induced on 1/2-strength MS medium with 1.0 μM NAA and 0.3 μM BA, and number of shoots formed were about 4. The formed shoots were transferred to rooting medium with 0.1 μM NAA and 0.1 μM BA, about 60% of shoots formed roots. Rotation cultures of apical- and lateral-bud explants induced multiple shoot formation, 1 μM BA induced ca 10 shoots. These plantlets were readily acclimatized to natural environment. Virus assay was performed by RT-PCR for Japanese yam mosaic virus (JYMV), and about 70% plantlets were virus (JYMV)-free.

Key words: *Discorea japonica*, Micro propagation, Rotation culture, RT-PCR, Virus-free

緒　　　言

ジネンジョウ（*Discorea japonica* Thunb.）は，自然薯とも書くように本来は天然環境下で自生しているものを採集していた．しかしその天然系統がきわめて粘りが強く美味であるために，近年は特産作物の一つとして栽培されており，かなり高価で取り引きされている．しかしながらこの植物は栄養繁殖性であるために，連作によるウイルス被害が増大することが問題である．特に九州地方では，ウイルスを媒介するアブラムシが多いため，東北地方等で生産されるものに比較して，２～３割安い価格で市販される．我々は佐賀県上場台地等の中山間地農業における重要な特産作物としてジネンジョウの栽培を進めたいと考えているが，そのためには安定したウイルスフリー苗の大量増殖法の開発が必要である．

ウイルスフリー苗の作出には通常，成長点培養が用いられる．White[1]は，ウイルス感染したトマトの根や茎の成長点にウイルスが存在しないことを観察し，成長点培養によるウイルスフリー苗の作出を示唆した．この観察をもとに，ダリア[2]，ジャガイモ[3]等でウイルスフリー苗が作出されてきた．現在では，イチゴ，ネギ，サツマイモ，カーネーション等のウイルスフリー

苗が，農水省の種苗管理センターや県等の試験場から安定的に供給され，着実に地域農業に根づいている．

従来の成長点培養では,1個の成長点（茎頂＝頂芽）から作出される苗（小植物体）の数は１本である．大量増殖という観点からは，発生するシュート数を増加させることが必要である．比較的高濃度のサイトカイニンの添加が有効であること[4]は知られているが，苗条原基[5]の誘導も有効であるかもしれない．この方法によって，頂芽や側芽の液体回転培養により，金平糖様の複数の突起を持つ構造を誘導できる．この突起の各々が苗条原基であり，これを分割し，固形培地で培養することにより多数の苗条を作出することが可能である．

ジネンジョウについては，大分県[6]，愛知県[7]，新潟県[8]等の試験場において，ウイルスフリー化の試みが行われている．いずれの研究においても，ある程度のウイルスフリー化には成功しているが，苗の大量生産という観点からはさらなる検討が必要である．

本研究では，佐賀県上場台地産の優良系統のジネンジョウを材料として，ウイルスフリー化を目的とした種苗の大量増殖法の開発と，得られた種苗におけるウイルスの有無について検討した．

植物がウイルスに感染すると，モザイク病斑や萎縮などの症状が顕われるが，生育条件等によっては病斑が全く顕われないこともある．電子顕微鏡による観察，指標植物に対する汁液接種，ELISA 法等も用いられるが，いずれもウイルス検出感度は高いとはいえない．最近，Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 法（RT-PCR 法）が有効であるという報告[9]があるので，本研究では RT-PCR 法によるウイルスフリー化の確認を行った．

材 料 と 方 法

１．材料

材料としては，ジネンジョウ（*Discorea japonica* Thunb.）のムカゴを用いた．佐賀県唐津市，鎮西町（現唐津市），呼子町（現唐津市）の上場台地の栽培農家から分与されたムカゴと，同地方の地場農産物販売所で市販されていたムカゴを材料とした．栽培農家からの分与については，佐賀大学海浜台地生物生産研究センター（現海浜台地生物環境研究センター）の芝山秀次郎前教授のご提供によるものである．

２．頂芽及び側芽の固形培地による培養

ムカゴを10％次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分間滅菌し，その後滅菌水でよくすすいだ．それを，滅菌水を入れポリエステルウールを支持体とした培地上に置床した．16時間明期，照度60μmol/m^2/sec，温度25℃で４週間栽培後，ムカゴ１個から３～４本のシュートが発育した．このシュートを採取し，10％次亜塩素酸ナトリウム溶液で20分間滅菌し，その後滅菌水でよくすすいだ．クリーンベンチ内で，実体顕微鏡下で，頂芽及び側芽から約５㎜長の成長点部分を切り出した．成長点はほぼ２㎜程度であるが，余りにも微小であると培養が困難であると予想されたので，比較的大きな外植体を利用することとし，成長点培養とは呼ばず頂芽及び側芽培養と呼ぶこととした．

培養に用いた基本培地は，３％ショ糖と0.3％ゲルライトを含む１/２強度の Murashige と Skoog の培地[10]（１/２MS 培地)である．これにオーキシンとして naphthaleneacetic acid（NAA）とサイトカイニンとして６-benzyladenine（BA）を各種濃度で添加した．培養条件は，16時間明期，照度60μmol/m^2/sec，温度25℃とした．約70日の培養後，シュートの発生率，発生した

シュート数等を観察した．さらにそのシュートを１/２MS 培地に NAA と BA を各種濃度で添加した発根培地に移植し，約30日後に発根率を測定した．１処理区当り少なくとも12個の頂芽あるいは側芽を使用し，すべての実験は３回繰り返し，標準誤差を算出した．

３．液体回転培養

上述の条件で得られた頂芽及び側芽を材料とした．ゲルライトを除いた１/２MS 培地に NAA と BA を各種濃度で添加した液体培地を丸底の培養管に入れ，そこに外植体を投入し，傾斜式回転培養器で回転させた．培養条件は，16時間明期，照度60μmol/m^2/sec，温度25℃とし，回転速度は100rpm とした．約45日の回転培養後，同じ植物ホルモン条件の１/２MS 固形培地に移植し，さらに約70日培養後，形成されたシュートの本数を測定した．１処理区当り少なくとも12個の頂芽あるいは側芽を使用し，すべての実験は３回繰り返し，標準誤差を算出した．

４．馴化

固形培養あるいは液体回転培養によって発育した小植物体を材料とした．根に付着した培地を洗浄後，湿らせたバーミキュライトを入れた瓶内に移植した．瓶にはキャップをし，随時キャップを緩め，最終的にはキャップを完全に開けて馴化の状態を観察した．馴化したと思われる小植物体は土に移植した．

５．RT-PCR 法によるウイルスフリー化の確認

固形培養あるいは液体回転培養によって発育した小植物体を馴化させ，その中からランダムに10個体を選んだ．また，秋田県立大学の藤晋一博士からご分与いただいた，免疫学的に Japanese yam mosaic virus（JYMV）感染が確認されているムカゴから小植物体を得，これも使用した．これらの小植物体の葉各0.25ｇから以下の方法により全 RNA を抽出した．

各サンプルを液体窒素中，乳鉢と乳棒で粉砕し，遠心管に移した．これに1.25㎖の塩酸グアニジン溶液と１㎖のフェノール・クロロホルムを加え，撹拌後，13,000rpm で10分間遠心し，水相を得た．これに0.25㎖の２M 酢酸ナトリウム溶液，1.5㎖のフェノール・クロロホルムを加え，撹拌後，13,000rpm で10分間遠心し，水相を得た．この操作を３回繰り返した．水相に0.25㎖のクロロホルムを加え，撹拌後，13,000rpm で10分間遠心し，水相を得た．この水相に塩化リチウムを最終濃度2.5M になるように加えた後，４℃に一晩置き，RNA を沈澱させた．12,000rpm で10分間遠心し，沈澱を得た．沈澱を Milli-Q 水で溶解し，酢酸ナトリウム溶液を加えて15,000rpm で５分間遠心し，不純物を除去した．同量の２－イソプロパノールを加えて15,000rpm で５分間遠心し，RNA を沈澱させた．これに微量の Milli-Q 水を加えて溶解し，全 RNA 試料とした．

これらの全 RNA を鋳型として，RT-PCR high-Plus 逆転一発（TOYOBO）キットを用いて RT-PCR を行った．プライマーとして，５’-ATGGCTGGTGATGAAAGG-３’及び５’-GCTTCATTGGTGGCTC-３’を用いた．PCR 反応は，60℃で30分間，94℃で２分間処理後，94℃１分間，55℃30秒間，60℃１分間のサイクルを40回行い，最後に60℃７分間処理した．反応終了後，1.5%アガロースゲル電気泳動にかけた．JYMV 検定においては，320bp 付近にバンドが生じることになる．

結 果 と 考 察

1．頂芽及び側芽からのシュート発育と小植物体再生

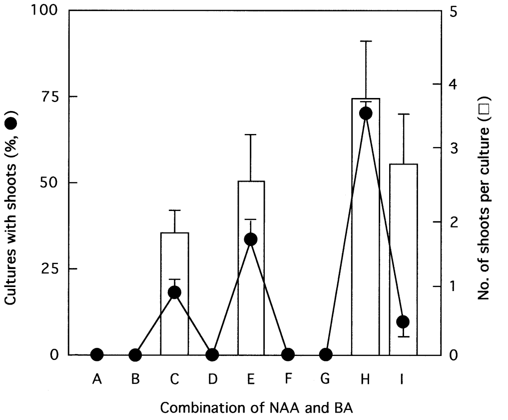

Fig. 1 Effects of different combination of NAA and BA on shoot formation in apical- and lateral-bud cultures of *Discorea japonica*. Data were recorded after 70 days of culture. Combination of NAA and BA: A; without NAA and BA, B; 0.3 μM BA, C; 1.0 μM BA, D; 0.3 μM NAA, E; 0.3 μM NAA + 0.3 μM BA, F; 0.3 μM NAA + 1.0 μM BA, G; 1.0 μM NAA, H; 1.0 μM NAA + 0.3 μM BA, I; 1.0 μM NAA + 1.0 μM BA.

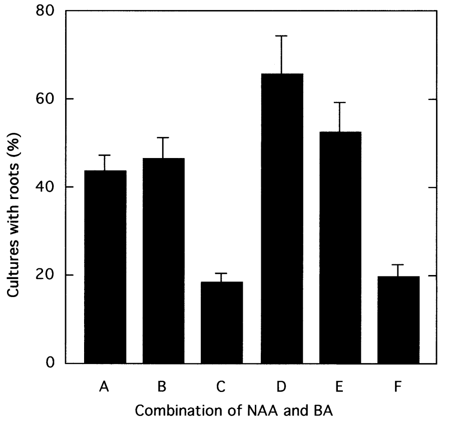

Fig. 2 Effects of different combination of NAA and BA on root formation in apical- and lateral-bud cultures of *Discorea japonica*. Regenerated shoots were transferred to new rooting medium, and then cultured for 30 days. Combination of NAA and BA in rooting medium: A; 0.1 μM BA, B; 0.3 μM BA, C; 1.0 μM BA, D; 0.1 μM NAA + 0.1 μM BA, E; 0.1 μM NAA + 0.3 μM NAA, F; 0.1 μM NAA + 1.0 μM BA.

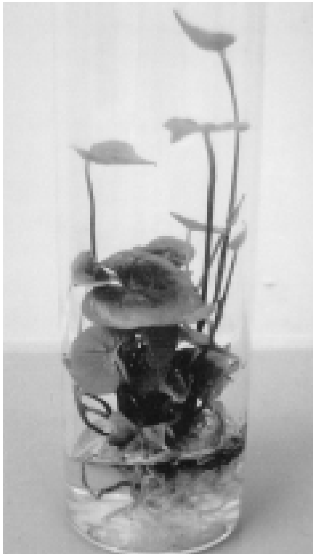

Fig. 3 Plantlet regeneration from apical-bud of *Discorea japonica* cultured on 1/2 MS medium supplemented with: shoot formation; 1.0 μM NAA + 0.3 μM BA, root formation; 0.1 μM NAA + 0.1 μM BA.

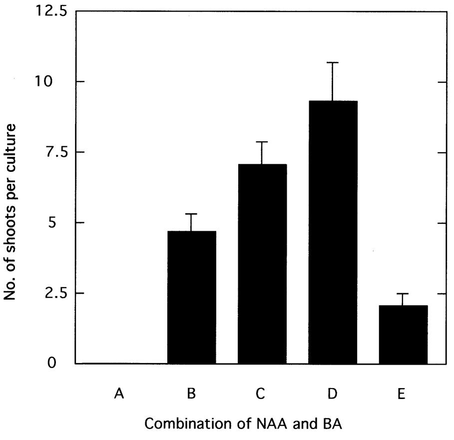

Fig. 4 Effects of different combination of NAA and BA on multiple shoot formation. The apical- and lateral-buds of *Discorea japonica* were cultured for 45 days rotation culture and then 100 days of solid culture. Combination of NAA and BA in both culture: A; without NAA and BA, B; 0.1 μM BA, C; 0.3 μM BA, D; 1.0 μM BA, E; 0.1 μM NAA + 1.0 μM BA.

ジネンジョウの頂芽及び側芽を各種濃度の NAA と BA を添加した１/２MS 培地で培養した結果，BA を添加した培地でシュートの発育が認められ，NAA の同時添加は促進的であった（Fig. １）．もっとも有効であったのは，NAA １μM に BA０.３μM を添加した培地を使用した場合であり，約75%の培養物からシュートが発生し，その本数は４本弱であった．景山らの報告[7)]では，NAA０.０1㎎/ℓ と BA０.１㎎/ℓ を添加した場合に，100%のシュート発育率を得ているが，そのシュートの本数は１本であった．

上記の条件では発根率が低かったので，シュート発生と発根を二段培養で行うこととし，発生したシュートを発根培地に移植した．その結果（Fig. ２），NAA０.１μM と BA０.１μM を同時添加した培地で，約60%の発根率が得られ，小植物体が形成された（Fig. ３）．景山ら[7)]は80%強の発根率を得ているが，我々の結果との違いは用いた系統によるものかもしれない．

もっとも有効な条件を組み合わせた場合，１個の頂芽あるいは側芽から，約２本の小植物体が得られることになる．

２．液体回転培養

ジネンジョウの頂芽及び側芽を様々な濃度の NAA と BA を含む培地で液体回転培養し，45日後に同じ NAA，BA 組成の固形培地に移植した．その結果，特に１μM BA を添加した培地を用いた場合に約10本の苗条が誘導された（Fig. ４）．これらの苗条はいずれも発根し，小植物体となった．

１個の頂芽あるいは側芽から約10本の小植物体が得られることになる．

３．馴化

固形培養あるいは液体回転培養によって発育した小植物体の根に付着した培地を洗浄後，湿らせたバーミキュライトを入れた瓶内に移植し，キャップをした．このキャップを移植１，２，６日後に開けた．そのままの状態で２週間観察を続けたが，いずれの条件でも小植物体は100%馴化していた（Fig. ５）．その馴化した小植物体を土壌に移植した結果，順調に生育した（Fig. ６）．

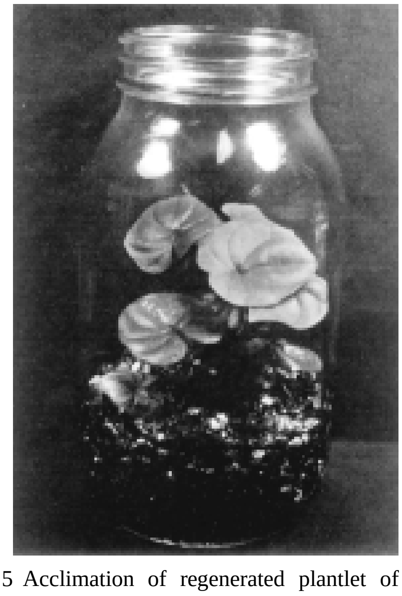

Fig. 5 Acclimation of regenerated plantlet of *Discorea japonica*. The plantlet was transplanted to vermiculite, and then the cap was opened completely.

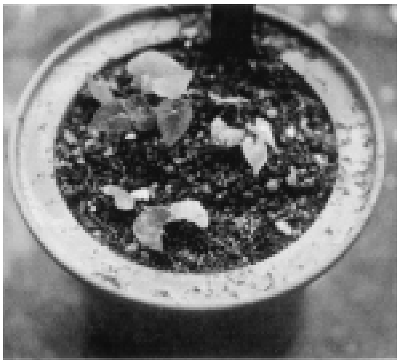

Fig. 6 Acclimation of regenerated plantlet of *Discorea japonica*. The plantlet was transplanted in soil.

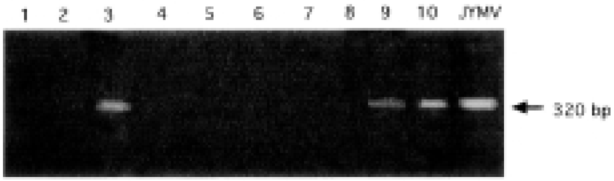

Fig. 7 Gel plate of JYMV assays by RT-PCR of *Discorea japonica* plantlets. Lane 1 to 10; Total RNA isolated from each regenerated plantlets were used to RT-PCR. Lane JYMV; total RNA from a virus (JYMV)-infected plant.

４．RT-PCR 法によるウイルスフリー化の確認

土壌に移植し確立した苗の葉から全 RNA を得，これを用いて RT-PCR 法により Japanese yam mosaic virus（JYMV）感染の有無を確認した．用いたプライマーから JYMV が感染していれば，320bp のバンドが出現する筈であるが，10本の苗中３本のみでこのバンドが確認された（Fig. ７）．すなわち，本実験により作出された苗の70％は JYMV に関してはウイルスフリーであることになる．

５．結語

１個のムカゴを出発材料とした場合，４週間無菌栽培すると４本弱のシュートが発育し，１本のシュートから約10個の頂芽と側芽を採取することができる．これらを用いて液体回転培養を行えば，各頂芽あるいは側芽から約10本の小植物体が得られる．元のムカゴ１個からは400本の小植物体が得られる計算になる．それらの７割がウイルスフリーであれば，１個のムカゴから280本のウイルスフリー苗を得ることができる．従って，今回報告した方法は，ジネンジョウのウイルスフリー苗を作出する上で極めて有効な方法であると考えられる．現在これらのウイルスフリー苗を圃場で栽培し，ウイルスフリーとして出荷できる商品が得られるか否かについて検討している．

摘　　要

ジネンジョウ（*Discorea japonica* Thunb.）のウイルスフリー苗の大量増殖法の開発を目的として研究を行った．頂芽及び側芽外植体を各種濃度の NAA と BA を添加した１/２MS 培地で培養した結果，１μM NAA と BA 0.3μM BA を含む培地を使用すると，約75％の培養物からシュートが発生し，その本数は約４本であった．シュート発生と発根を二段培養で行うこととし，発生したシュートを発根培地に移植した結果，0.1μM NAA と0.1μM BA を同時添加した培地で，約60％の発根率が得られ，小植物体が形成された．頂芽及び側芽外植体を様々な濃度の NAA と BA を含む培地で液体回転培養した後，同じ NAA，BA 組成の固形培地に移植した．その結果，特に１μM BA を添加した培地を用いた場合に約10本の苗条が誘導された．１個の頂芽あるいは側芽から約10本の小植物体が得られることになる．固形培養あるいは液体回転培養によって発育した小植物体の馴化には全く問題はなく，100％が馴化した．RT-PCR 法により Japanese yam mosaic virus（JYMV）感染の有無を確認した結果，10本の苗中３本のみで JYMV 感染が確認された．すなわち，本実験により作出された苗の70％は JYMV に関してはウイルスフリーであることになる．

謝　　辞

本研究で使用したジネンジョウのムカゴの一部は，佐賀大学海浜台地生物生産研究センター（現佐賀大学海浜台地生物環境研究センター）の芝山秀次郎前教授の御提供によるものです．心から感謝致します．また，本研究で用いた Japanese yam mosaic virus 感染が確認されたムカゴを御提供下さった秋田県立大学の藤晋一博士及び御仲介下さった佐賀大学農学部植物ウイルス病制御学研究室の大島一里教授に深く感謝致します．

引 用 文 献

1. White, P. R. (1963). The Cultivation of Animal and Plant Cells. 2nd. ed. Ronald Press, New York, p 32, 39, 41, 43, 44, 246, 273.
2. Morel, G. and Martin, C. (1952). Guerison de dahlia atteints d’unn maladie a virus. *C. R. Acad. Sci. Paris* **235**, 1324-1325.
3. Morel, G. and Martin, C. (1955). Guerison de pommes de terre atteints de maladie a virus. *C. R. Acad. Sci. Agri. France* **41**, 472-475.
4. 大澤勝次（1994）．植物バイテクの基礎知識．農山漁村文化協会　東京 p95－105.
5. Tanaka, R. and Ikeda, H. (1983). Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* (2n=4) by shoot tip cloning. *Jap. J. Genetics* **58**, 65-70.
6. 大分県農業技術センター生物工学部（1998）．ウイルスフリー化と大量増殖．http://www.agri.pref.oita.jp/kakubu/seibutu/seibutu_jun98/seibutu_jun.html
7. 景山幸二・矢部和則・飯田孝則・鷲田純彦（1988）．ジネンジョの茎頂からの植物体再生および順化．植物組織培養 **5**，11－14.
8. 新潟県農業総合研究所アグリ・フーズバイオ研究部（2000）．新潟県産ジネンジョのムカゴを利用したウイルスフリー化苗の大量増殖法．http://www.agri.pref.niigata.jp/nourinsui/seika00/fukyu/03/000103.html
9. Yamamoto, H., Fuji, S. and Asari, Y. (2004). Production of virus-free Chinese artichoke through shoot tip culture. *J. Jap. Soc. Hort. Sci*. **73**, 82-84.
10. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. **15**, 437-497.