

## 茎頂・脇芽培養によるウイルスフリーかんしょ種苗の大量増殖法の確立

陳 蘭莊・杜 召生<sup>1)</sup>・寺尾寛行<sup>1)</sup>・續 栄治<sup>1)</sup>

宮崎大学遺伝子実験施設, <sup>1)</sup> 宮崎大学農学部植物生産科学講座

(2004年1月26日受理)

### Establishment of Propagation Method in Large Quantities to Produce Virus-Free Plants of Sweet Potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. by Means of Cultures of Shoot Apex and Sucker

Lanzhuang CHEN, Zhaosheng DU<sup>1)</sup>, Hiroyuki TERAO<sup>1)</sup>, Eiji TSUZUKI<sup>1)</sup>

Gene Research Center, University of Miyazaki, <sup>1)</sup> Division of Plant Production Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

**Summary:** Lump surface of edible sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. showed chapped and cracked band symptom, which is called russet crack-like symptom, and this symptom deteriorate commercial value and has become a severe problem in agricultural production. This research was to establish a propagation method in large quantities to produce virus-free plants of sweet potato by means of cultures of shoot apex and sucker.

On shoot apex culture, the treatment with 0.3 % sodium hypochlorite solution and 10 min. stop the infection of unwanted bacteria perfectly, when young seedlings cultured in artificial conditioner were used.

Virus could be removed by the culture of shoot apex less than 0.3 mm in size, and the russet crack-like symptom disappeared and skin color of the lump surface became good for commercial value.

In the shoot apex culture, good results were achieved from adding 0.01 mg/L NAA and 1 mg/L BA in modified LS (Komamine and Nomura 1998) medium and adding 0.01 mg/L NAA and 1 mg/L BA in MS (Murashige and Skoog 1962) medium, which brought surviving rates of 82 % and 65 %, respectively.

In the acclimatization of regenerated plants, the method using plastic bag covering the pot gave the best results with speedy growth of the plant and simple operation in surviving rates of 100 %.

80-100 % of suckers from middle and lower stems of virus-free plants from shoot apex culture grew into plants after 6 weeks of culture. This method can propagate clonally the virus-free plants with 5 times by a short circle of every 6 weeks.

**Key words:** *Ipomoea batatas* (L.) Lam., Propagation method in large quantities, Shoot apex culture, Sucker culture, Virus-free plants.

## 緒 言

かんしょは南九州の畑作地帯における重要な作物であり、食用あるいは原料用として栽培されている。食用かんしょは食味と形、皮色などの外観が、商品性の面から重視されている。しかし、1975年頃から塊根表皮に帯状粗皮症による肌あれ、ひび割れなどの症状が発生し、商品価値を低下させ、問題となってきている。

本症状は食用かんしょの各作型に亘って発生しており、症状は株単位の発生となる割合が高く、軽度の場合には、皮色が横しま状に退色する程度で塊根収穫時では土のついた状態では気付かないことが多い。本症状は塊根表皮部のみに見られ、塊根内部には認められない。また、地上部（莖葉部）での症状は認められず、生育にも支障が見られない（長田 1990）。

かんしょは畑で旺盛な繁殖力からすると、組織培養による増殖が容易であると思われがちであるが、実際は取り扱いにくい作物の1つである（村田 1994）。これまでに、Murashige & Skoog (MS) (1962) 培地で莖頂培養を用いたウイルスフリー種苗生産の試みは長田 (1990, 1991) などによって行われてきた。ウイルスの検定法については、肉眼による塊根の罹病の有無を調べる方法もあるが、この方法では長時間を要する。なぜなら、ウイルスが存在しても、一般に初年度にできた塊根には症状が発生せず、2年目においてはじめて病状が現れるからである。他の1つの方法は電子顕微鏡によるひも状ウイルス粒子の観察法である。この方法はサンプルの調整から観察まで大がかりの仕事になるのが難点である。近年、これらの観察法を改善するために、分子生物学的手法の急速な発展によりRT-PCR法によるウイルス早期検定法が確立されつつある（Nagata *et al.* 2001）。

一方、中国の黄河流域は、中国の中でもかんしょの栽培面積が最も広く、重要な産地である。中国では、これまで食料の自給を図るため増産増収をめざしてきたが、近年国民の生活レベルの向上に伴い、消費者の農産物に対する要求は量から質へと高まりつつある。かんしょも例外ではなく、いままでの伝統的な栽培法では生産物の売り残りが生じることとなり、生産者が困窮する事態となる。その中で、サツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒

系 (SPFMV-s)、いわゆる帯状粗皮症によって、商品価値の低下を招き、大きな問題となっている。これらの問題を解決するためには莖頂培養によるウイルスフリーかんしょ種苗の大量増殖法を早急に確立する必要がある。しかし、中国では、これらの技術が確立されていないため、すぐにはできないのが現状である。また、ウイルス病については農民や消費者が意識しておらず、そのウイルスの検定法はまだ確立されていない。

そこで日本ですでに実用化されているウイルスフリー化とその増殖技術が参考になると考えられる。これまでの参考資料を見る限り、10年前の報告がほとんどでしかも古い品種が使われていて、MS培地を用いた培養効率に品種間差がかなりあった（長田 1990, 1991）。また、サツマイモの組織培養の再現性は低いが、試料の消毒法から馴化までの過程において体系的に取り組んだ研究はあまり報告されていない。さらにいま、宮崎県で主力品種となっている“宮崎紅”についても断片的に報告されているが、体系的に行われた実験研究は報告されていない。本研究では、将来的に中国でもウイルスフリー苗の実用化を目指してその第一歩としてこれまでの莖頂培養法をもとに、宮崎県の主力品種となっている“宮崎紅”を材料として培養培地の種類、消毒法や馴化、さらに脇芽培養による大量増殖の方法について体系的に検討して2, 3の知見を得たので報告する。

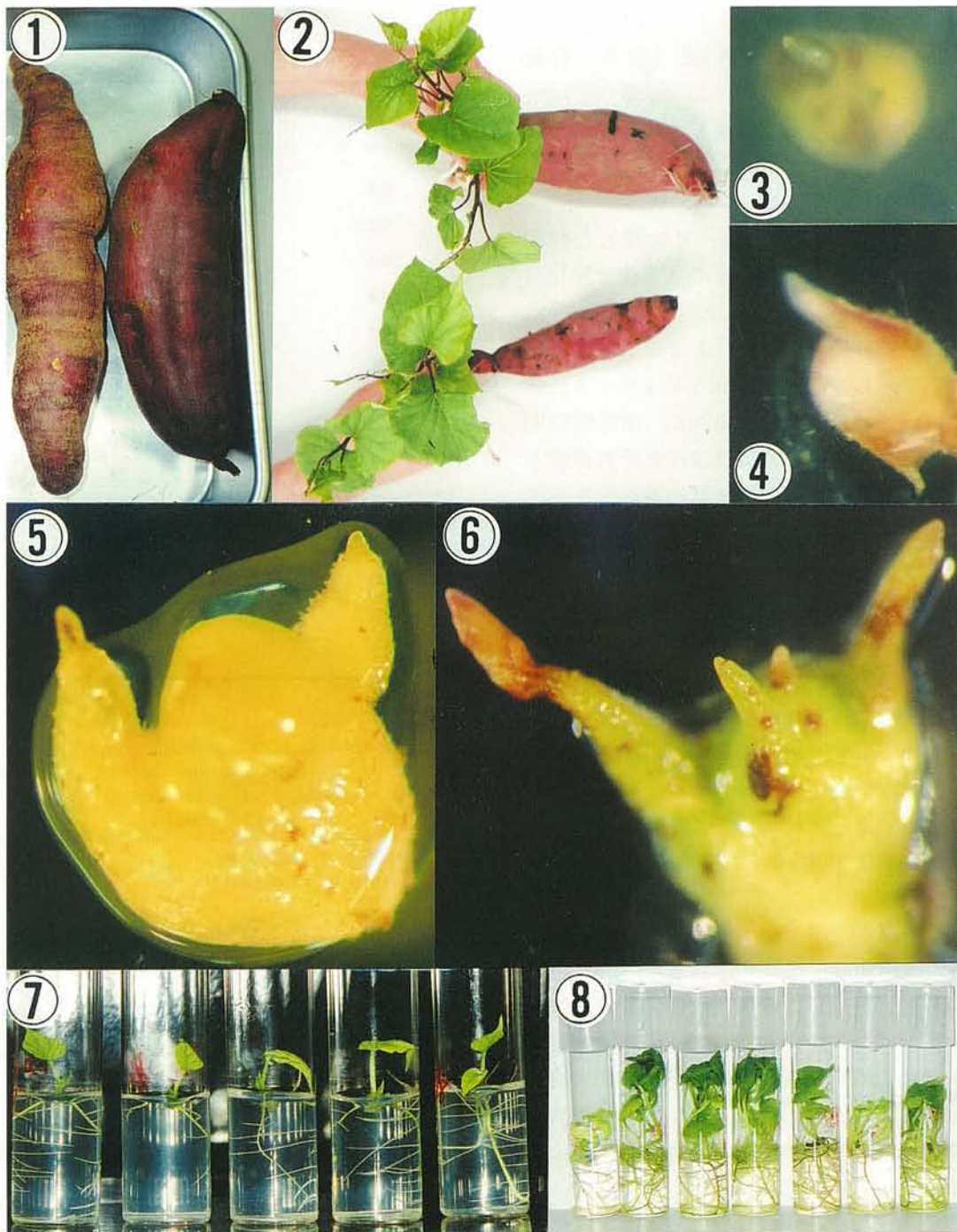
## 材料および方法

### 1. 植物材料

南九州で主に栽培されているかんしょ (*Ipomoea batatas* (L.)) 品種“宮崎紅”の罹病した塊根 (Fig. 1.1, left) と正常塊根 (Fig. 1.1, right) を宮崎県総合農業試験場園芸支場 (都城市) から分譲を受け、バーミキュライトに植え込み、25℃、3000 lux、16時間照明の人工気象器内で育苗した (Fig. 1.2)。

### 2. 莖頂培養法

それぞれの生長点部分を含む数枚の葉を有する幼蔓を切り取って0.1-2.0%次亜塩素酸ナトリウムで5, 10, 15および20分間それぞれ処理し、滅菌水で洗浄した。その後、生長点と1つの小葉のついている莖頂 (約0.3 mm) (Figs. 1-3) を取り出



**Fig. 1** Obtaining of virus-free plants of sweet potato with culture of shoot apex on modified LS medium complemented with 0.01 mg/L NAA and 1 mg/L BA. 1. Experimental materials used in this study. Left: Sweet potato with russet crack-like symptom and right: normal one; 2. New plants growing from sweet potatoes of normal (upper) and of russet crack-like symptom (lower). 3. Shoot apex 0.1-0.3 mm in size cultured on LS medium; 4. Growing of shoot apex after 2 weeks of culture; 5. Growing with new small leaf after 4 weeks of culture; 6, 7, 8. Formations of shoot, young plants and completed plants after 6, 8 and 12 weeks of culture, respectively.

し、ホルモンフリーMS、NAA（ナフトレン酢酸）とBA（ベンジルアミノプリン）を入れたMSおよびNAAとBAを入れた改変LS（駒嶺，野村1998）培地にそれぞれ置床し、25℃，3,000 lux，16時間照明の人工気象器で培養した。

### 3. 再生植物の馴化

3-4か月後に茎頂培養によって生長した植物体を試験管から取り出し、つぎの3方法で馴化法を検討した。(1)滅菌した土に直接移植する，(2)滅菌した蛭石に直接移植する，および(3)ビニールバッグで密封し滅菌したパーミキュライトに移植する。移植後は25℃，3,000 lux，16時間照明の人工気象器で育てた。活着後はそれぞれ滅菌した土壌に移し，温室あるいはビニールハウス内で育てた。

### 4. 脇芽培養による茎頂培養由来の植物の大量増殖

実際の生産状況を想定し，ウイルスフリー植物を得た場合，いかにそれらを効率よく迅速に大量増殖できるかが重要であることから，茎頂培養によって得られた植物（4-5枚葉が付いている）(Fig.1.8)を，上，中，下部にそれぞれ分け，脇芽をホルモンフリーMS培地で培養した。

## 結果および考察

### 供試材料の消毒法

最初に，食用かんしょの茎頂培養に及ぼす次亜塩素酸ナトリウムの消毒濃度の影響を調査した (Table 1)。Table 1にみられるように，消毒時間が15分の場合，0.1から1.5%濃度の範囲内で，0.3から0.8%の処理は，いずれも100%の活着率を得ることができた。

そこで0.3%の消毒濃度を用い，異なる処理時間が茎頂培養に及ぼす影響を調べた (Table 2)。その結果，Table 2にみられるように10分と15分の処理時間で最も高い活着率（100%）が得られた。

従って，人工気象器内で育成した食用かんしょの苗を使って茎頂を培養した場合，消毒濃度0.3%，消毒時間10分間の処理で雑菌の感染を抑えることができるものと考えられた。

**Table 1.** Effect of sodium hypochlorite solution on shoot apex culture of sweet potato (15 minutes of sterilization, observed after one week of culture).

Sodium hypochlorite solution %	No. shoot apices plated	No. surviving	Surviving rates %
0.1	30	24	80
0.2	30	27	90
0.3	30	30	100
0.4	30	30	100
0.5	30	30	100
0.6	30	30	100
0.7	30	30	100
0.8	30	30	100
1.0	30	24	80
1.1	30	24	80
1.2	30	18	60
1.3	30	12	40
1.4	30	3	10
1.5	30	3	10

**Table 2.** Effect of sterilizing time (sodium hypochlorite solution=0.3%) on shoot apex culture of sweet potato (Observed after one week of culture).

Sterilizing time (min.)	No. shoot apex plated	No. surviving	Surviving rates %
5	30	18	60
10	30	30	100
15	36	36	100
20	39	36	92.3

### 培地の種類の比較

ホルモンフリーMS培地，0.01 mg/L NAAと1 mg/L BAを添加したMS培地および0.01 mg/L NAAと1 mg/L BAを添加したLS培地でそれぞれ茎頂培養を行った結果，活着率はそれぞれ10，65および82%であった (Table 3)。LS培地での活着率（82%）は，長田（1990）の同じホルモンの添加のMS培地を用いた結果（68.2%）に比べるとかなり高くなった。よって検討した培地の範囲では，LS培地がかんしょの茎頂培養に最も適していることが示唆された。LS培地とMS基本培地の組成を比べると (Table 4)，培地の組成ではLS培地にはグリシンとmyo-イノシトール

**Table 3.** Comparison of different media and hormones on shoot apex culture of sweet potato (Observed after 4 months culture).

Media	Hormones	No. shoot apex plated	No. surviving	Surviving rates %
LS	1 mg/L BA 0.01 mg/L NAA	33	27	82
MS	0 0	40	4	10
MS	1 mg/L BA 0.01 mg/L NAA	26	17	65

**Table 4.** Comparison of chemical components between LS and MS media.

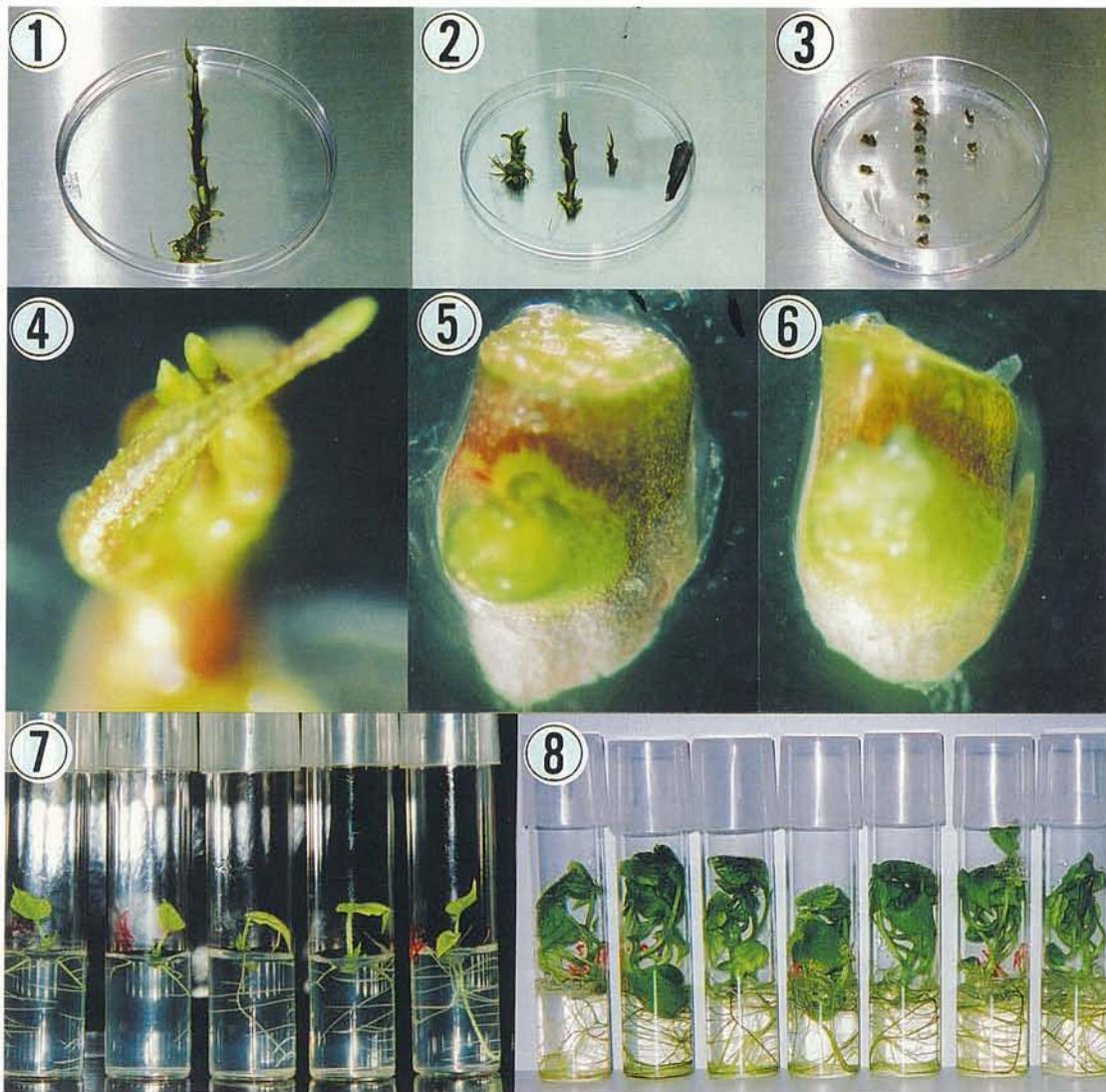
LS medium		MS medium	
Components	mg/L	Components	mg/L
KNO <sub>3</sub>	5,560	KNO <sub>3</sub>	1,900
NH <sub>4</sub> Cl	268	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	220	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	185	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	7.14	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16.9
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.05	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
KI	0.375	KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.127	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.01	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.01	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> · EDTA	37.3	Na <sub>2</sub> · EDTA	37.3
Nicotinic acid	0.5	Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine · HCl	0.05	Pyridoxine · HCl	0.5
Thiamine · HCl	0.3	Thiamine · HCl	0.1
Sucrose	20,000	Glycine	2
		myo-inositol	100
		Sucrose	30,000

が含まれておらず、硝酸態アンモニアが塩素態アンモニアに変更されている。両培地の用量を比較すると、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>a · EDTA, ニコチン酸の3種の組成では変化はないが、KNO<sub>3</sub>とチアミン · HClではLS培地で約3倍増えている。その他の11種の組成の中では、NH<sub>4</sub>Clが6倍、他の10種が2-3倍でそれぞれ低下している。植物の種類によって培地の組成や用量が異なることは知られており、LS培地がMSに比べて全体的に成分が少なく、用量も少ないが、かんしょの培養

にはLS培地が適しているものと考えられた。

#### 茎頂培養法

生長点をもつ1小葉がついている茎頂(約0.3 mm)が培養2, 4, 6, 8および12週間後の生育状態をFig. 1. 4-8に示した。それぞれの個体に小葉ならびに根が生長している過程が観察される。LS培地で茎頂培養を行う場合、3-4か月で82%の茎頂から植物体を得ることができた。



**Fig. 2** Cultures of suckers from upper, middle and lower parts of stem of virus-free plants on hormone-free MS medium. 1. Stem for sucker culture; 2. Stem cut into upper, middle and lower parts; 3. Suckers cut from the upper (right), middle (middle) and lower (left) parts, respectively. 4, 5, 6. Suckers from upper, middle and lower parts, respectively, cultured on MS medium; 7, 8. Middle suckers after 4 and 6 weeks of culture, respectively.

## 馴化

茎頂培養で得られた植物体を馴化するために、(1)滅菌した土に直接移植する方法、(2)滅菌したパーミキュライトに直接移植する方法、および(3)ビニールバッグで密封し滅菌したパーミキュライトに移植する方法を試みた。移植後は25℃、3,000 lux、16時間照明の人工気象器で育成し1週間後に調査した。その結果、(3)のビニールバッグで密封し滅菌したパーミキュライトに移植する方法が苗の生長が早く、操作が簡便であるため、大量に扱うためには馴化法として最もよい方法であろうと考えられた。

## 大量培養法

実際の農業生産の現場では大量のウイルスフリー苗を必要とすることを考えて、数の少ない茎頂培養由来の植物体の脇芽を、Fig. 2に示すように、上、中、下部に分けて切り取り、培養した。培養にあたってはホルモンフリーMS培地を用い、25℃、3000-4000 lux、16時間照明の人工気象器で培養した。

Figure 2. 4-6はそれぞれ上部、中部、下部の脇芽である。Figure 2. 7-8はそれぞれ培養4および6週間後の植物体である。培養して6週間後に植物体形成率を調査した結果をTable 5に示し

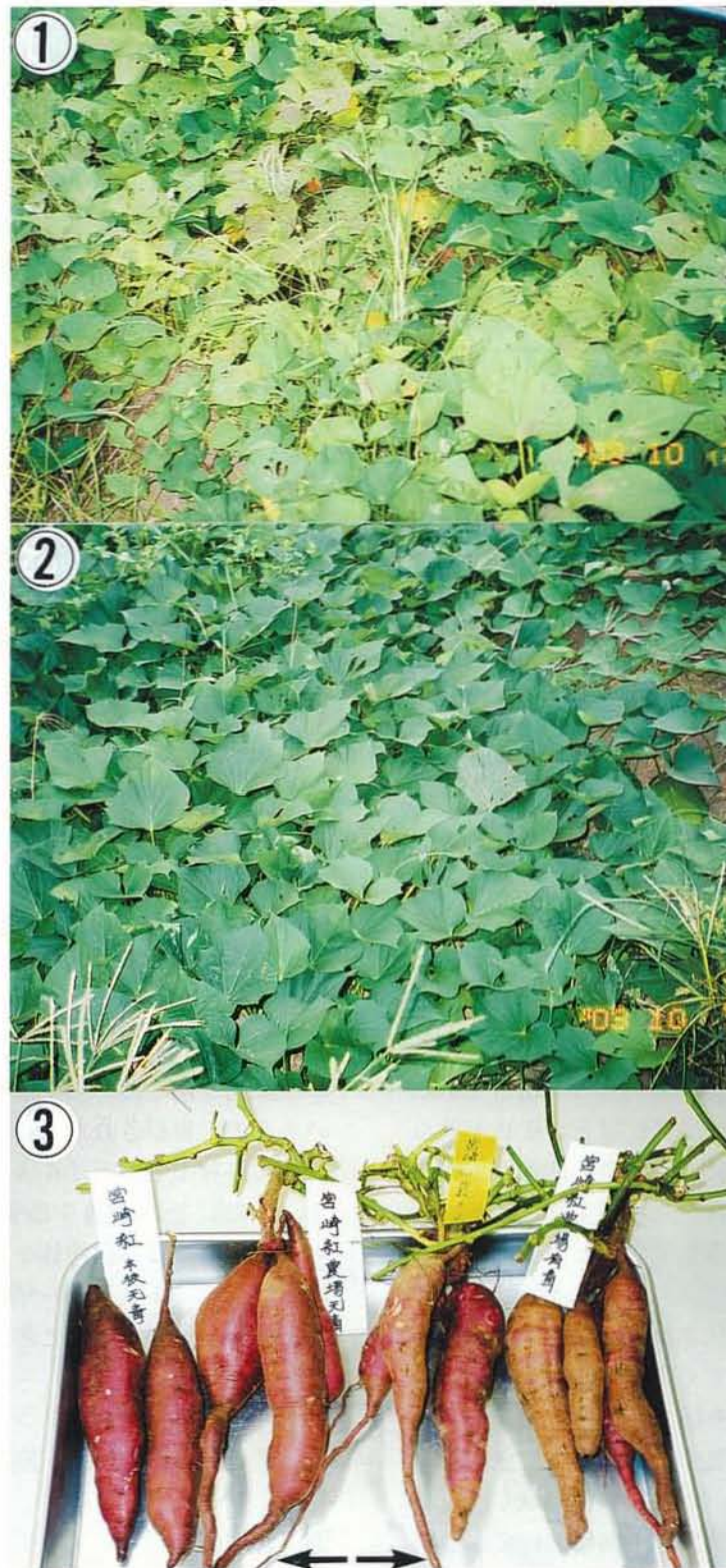


Fig. 3 Comparison of plants and lumps from sweet potato with russet crack-like symptom and normal one. 1. Plants with russet crack-like symptom; 2. Plants with virus free derived from shoot apex culture; 3. Lumps from plants of 2 (left arrow) and from 1 (right arrow).

**Table 5.** Effect of different parts of stem with sucker on propagation method in large quantities to produce virus-free plants of sweet potato.

Explants	No. suckers plated	Sucker's size (mm)	Rates of produced plants %
Upper stem	33	1	60
Middle stem	36	0.5	100
Lower stem	36	0.1-0.2	80

た。上、中、下部の脇芽からそれぞれ60%、100%、80%の植物体を得ることができた。

以上の結果、茎頂培養由来のウイルスフリー植物体から茎の中、下部の脇芽を、約6週間培養することによって80-100%の植物体を得ることができた。この方法はウイルスフリー植物体を短いサイクルで大量に繁殖でき、実際の生産上でも応用できるものと考えられる。

圃場の土壌に移植した茎頂培養由来の植物および脇芽培養による大量増殖した植物から4か月後に塊根を得ることができた。地上部の罹病性(Fig. 3.1)とウイルスフリー苗由来のかんしょ植物(Fig. 3.2)を比べても、前者の黄色で弱い成長に対して後者は濃い緑色で旺盛な成長が認められた。その塊根を掘り取り、罹病した塊根とウイルスフリーの塊根とを比較したところ(Fig. 3.3)、茎頂培養植物からの塊根は罹病性のものに比べて帯状粗皮症による肌あれ、ひび割れなどの症状が見られなかった。このようにして材料の消毒から馴化までの一連の実験を行い、ウイルスフリー苗の獲得とその大量繁殖法を確立することができた。

食生活の水準が向上している現在、食用かんしょは健康食品としても注目されつつあり、今後食用かんしょの需要が増してくることが考えられる。そこで商品価値の低下を招き、最近問題化してきている古くて新しい病気である帯状粗皮症の克服はきわめて重要であり、新たに早急に取り組む必要のある課題である。最近、中国においても食用かんしょの需要が増し、同時に品質にも注目されはじめている。従って、中国ではこの帯状粗皮症による病気の早期解決が強く要求されている。本研究ではそれに対応するための第1歩として、確立した茎頂培養によるウイルスフリー植物の大量増殖法は、日本だけではなく、東アジア、特に中

国においても実施可能な方法であり、生産者に福音を与えるものと考えられる。

## 要 約

食用かんしょの塊根表面に帯状の肌あれやひび割れなどの症状が発生する病気はウイルス病状の1つで、帯状粗皮症と呼ばれ、生産物の品質を低下させ、問題となっている。本研究は茎頂・脇芽培養によるウイルスフリー食用かんしょの大量増殖法を確立するために一連の実験を実施したものである。

茎頂培養について、人工気象器内で育った植物を用いる場合、消毒濃度0.3%、消毒時間10分の処理でほぼ100%の雑菌の感染を抑えることができた。ウイルスは0.3mm以下の外植体で摘出すれば、除去でき、帯状粗皮症の症状の消失や皮色の改善が見られた。

ホルモンフリーMS培地、0.01 mg/L NAAと1 mg/L BA添加のMS培地および0.01 mg/L NAAと1 mg/L BA添加の改変LS培地でそれぞれ茎頂培養を行った結果、活着率はそれぞれ10%、65%と82%であった。検討した培地の範囲でLS培地がかんしょの茎頂培養に最も適していることが示唆された。

馴化には、ビニールバッグで密封し滅菌したパーミキュライトに移植する方法が苗の生長が早く、かつ簡便であるため大量に培養することに適しているものと推察された。

茎頂培養由来のウイルスフリー植物体の茎を上、中、下部に分けて脇芽培養した結果、80-100%の中下部脇芽から植物体を得ることができた。この方法でウイルスフリー植物を6週間のサイクルごとに5倍に増殖することが可能となった。

**キーワード:** ウイルスフリー植物, かんしょ, 茎頂培養, 大量増殖, 脇芽培養

## 謝 辞

本研究を行うに当たり、食用かんしょの茎頂培養技術全般に亘り、御教示いただいた宮崎県総合農業試験場生物工学部遺伝子工学科長 長田龍太郎氏並びに快く「宮崎紅」の罹病した食用かんしょなどの実験材料の使用をお許しいただいた宮崎県総合農業試験場園芸支場 下郡正樹氏に対し、記



して深謝の意を表する。

#### 引用文献

- 駒嶺 穆・野村港二 (1998) 植物細胞工学入門.  
学会出版センター. 東京, 22-23.
- 村田達郎 (1994) カンショへの期待と可能性. 4.  
バイオテクノロジーによるカンショ改良の方向.  
農業技術, 49(10), 17-22
- Murashige, T., F. Skoog (1962) A revised  
medium for rapid growth and bioassays with  
tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473-  
479.
- 長田 龍太郎 (1990) 食用カンショウイルスフリー  
苗の作出と効果, 宮崎県総合農業試験場研究報  
告, 第25号, 77-90.
- 長田龍太郎 (1991) 青果用サツマイモ帯状粗皮病  
対策としての茎頂培養苗の利用と再汚染防止技  
術, 農業技術, 46(2), 71-74.
- Nagata, R., M. Mori, K. Hanada, M. Nishiguchi  
(2001) An improved method of reverse tran-  
scription and polymerase chain reaction (RT-  
PCR) to efficiently detect potyvirus, sweet  
potato feathery mottle virus (SPFMV) RNA  
in sweet potato. *J. Gen. Plant Path.* **67**, 164-  
168.