

## フキのウイルスフリー株育成のための 茎頂培養

松原 幸子・益田 忠雄

(蔬菜園芸学研究室)

Received June 30, 1980

Production of virus free plant of *Petasites japonicus*  
Fr. Schmidt (Compositae) by apex culture

Sachiko MATSUBARA and Tadao MASUDA  
(Laboratory of Olericulture)

Virus free plant of *Petasites japonicus* Fr. Schmidt cv. Aichi-wase (Japanese butterbur) was obtained by apex culture and then effectively propagated with following method.

The medium used for apex culture was consisted of modified Murashige & Skoog (1962) medium and 30 g/l sucrose and 8 g/l bacto-agar as the basal medium and 0.1 mg/l NAA and BA. Apexes were aseptically dissected from stolons and planted on the medium. The medium for promoting root initiation was consisted of the basal medium that contained 0.1 mg/l NAA or 1.0 mg/l NAA and 0-0.1 mg/l BA. Root primordium of plantlets initiated from 4 to 6 days after transplanting to the media, and radicles started to grow from 10 to 13 days after transplanting. Ratio of virus free plants increased by replanting the apexes from sterile plantlets with 0.1-0.3 mm in length to the new medium.

Apexes or explants from stem, leaf or leaf stalk of virus free plantlets produced regenerated plantlets, while root explants showed to form only callus tissues.

### 緒 言

現在我国で栽培されているフキは、ほとんどが愛知早生フキである。このフキは3倍体で種子が形成されないため、営利的には地下茎の分割による栄養繁殖で増殖されている。現在ではこれらの株はほとんどウイルス罹病株とみられ、普通栽培では春、8~9月植付けの冷蔵株では秋に、いずれもほう芽後間もない時期にモザイク症状がみられる。アブラムシにより伝播するので葉は萎縮し奇形を呈する事もあるが、一般には軽いモザイクを示し、生育とともに次第に不明瞭になる株が多い<sup>1)</sup>。ウイルスは症状としては比較的軽いようにもみえるが、近年収穫低下をもたらしている一因ではないかと考えられてきている。しかしウイルス病に対する効果的な薬剤が見出されておらず、栄養繁殖を主とする作物では汚染は拡大する一方である。そこで茎頂培養によるウイルスフリー株の利用により、イチゴやカーネーション、キウなどで品質向上や収量増加が認められ実用化されていることから、フキでもウイルスフリー株を利用して品質向上や生産力の増加をはかることができるのではないかと考えられる。

本実験では、ウイルスフリー株育成のために生長点培養を試み、培地や増殖手段について調べた結果を報告する。

## 材料および方法

フキ, *Petasites japonicus* Fr. Schmidt の栽培種である「愛知早生フキ」のウイルス罹病株を, 1977年2月末に岡山大学農学部圃場に植付け, 必要な時地下茎の茎頂を切りとって供試した. 本実験を通じて用いた培地は, Murashige & Skoog (1962) の無機塩類に, thiamine-HCl 0.1 mg/l, pyridoxine-HCl 0.1 mg/l, nicotinic acid 0.5 mg/l, myo-inositol 100 mg/l, glycine 2.0 mg/l の有機成分と, 30 g/l のしょ糖, 0.8 g/l の bacto-agar を添加したものを基本培地とした. さらに各実験ごとに種々の濃度の naphthalene acetic acid (NAA) と N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) を添加した. 培養は 25°C, 3000 lux の人工光下で 16 時間日長とした. 又小植物体の継代培養は, 2月ごとに株分けをしながら新しい培地に植付けた. 培地は基本培地に NAA, BA それぞれ 0.1 mg/l 添加したものをを用いた.

### 実験 1) 生育促進培地

基本培地に NAA と BA をそれぞれ 0, 0.1, 1.0 mg/l 添加した 3 区をつくり, 1977年3月26日植付けた. 地下茎の茎頂を切りとり, 生長点と, それをおおっている数葉を残し, 70% エタノールに 1~2 分間浸漬し, 次いでアンチホルミン (10% 次亜塩素酸ナトリウム溶液) の 10 倍液中で約 10 分間振とうし表面殺菌した. クリーンベンチ内で 2~3 枚の葉原基をふくむ生長点を 0.5~1.0 mm の大きさに切りとり, 植付けた. 植付けは 20 ml 培地をふくむモルトン試験管内に 1 芽植付け, 2 月後にほう芽率・小植物体あたりの生体重・葉数・最大葉柄長を測定した. 以下の実験において特記しない限りこれらの項目について調査した.

### 実験 2) 発根促進培地

試験管内の植物を外へ出すには発根していなければならない. 伸長した苗條を発根させる培地を検討し, 同時に発根の状態を組織切片作成により観察した. 継代を続けている無発根の小植物体を, NAA-BA をそれぞれ 0.1-0, 0.1, 1.0 mg/l および 1.0-0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/l 添加した培地に移植し, 20 日後に発根率・根数・最大根長・葉数・葉柄長を測定した. さらに根原基の分化状態を観察するため, 発根を促進する NAA-BA を 0.1-0, 0.01, 1.0-0.05 mg/l 添加した培地と, 発根しなかった 0.1-1.0 mg/l 添加培地上に移植した. 小植物体の地際部を 2 日ごとに固定し, パラフィン切片を作成, ヘマトキシリン染色して根原基分化を観察した. 固定・切片作成・染色はいずれも常法でおこなった.

### 実験 3) 再茎頂培養

ウイルスフリーにするには茎頂をできる丈小さく切りとる必要がある. しかしフキは切断後すぐ褐変するし, 地下茎や地際に生長点があるため汚染されており, 強い殺菌をしなければならない. そこで無菌の小植物体から解剖顕微鏡下で直接 0.1-0.3 mm の茎頂を切りとり植付けた. 培地は基本培地に NAA, BA をそれぞれ 0.1 mg/l 添加した. 継代は 50 日ごとにおこない, 生長量を測定した. 以上を再茎頂培養とし, 対照として 1978年5月2日から 29 日までの間 4 回地下茎の茎頂を直接切りとった茎頂培養をおこなった. その生長量を測定し平均値を求めて再茎頂培養からの植物体の生長量と比較した.

ウイルス検定は *Chnopodium Amaranticolor* Coste & Reyn (アカザ) の葉に対するカーボランダム法でおこなった.

### 実験 4) 異った植付密度による増殖率の差

植付時にどの程度の密度にすればその後の生育がよいのかを, 葉柄切片と小植物体を用いて調査した. 培地はいずれも基本培地に 0.1 mg/l の NAA, BA を添加したものをを用いた. 継代培養を続けている小植物体の葉柄を 1 mm に切断し, 50 ml 培地上に 10, 30, 60 切片

植付けた。植付け 2 月後に調査した。又継代をつづけている無菌の小植物体を大・小 2 区に分け(大:葉数 4.0, 最大葉柄長 18.8mm)(小:葉数 2.6, 最大葉柄長 10.9mm), 50ml 培地上に 1, 5, 10 個体ずつ植付けた。植付 1 月後に調査した。又培養中中期 13 時間後の各植付密度内のフラスコ内の CO<sub>2</sub> 濃度を, 東洋製作所製 GCG-7B ガスクロマトグラフで測定した。検出器:熱電導セル, 検出器温度:50°C, カラム:1m のステンレスでポラパック Q (80-100 mesh) 充填, カラム温度:室温, キャリアーガス:He, 50 ml/min 流速で, ガス注入量:1 ml とした。

#### 実験 5) 植物体器官からの増殖

ウイルスフリー株が育成されると, それをできる丈早く多量に増殖しなければならない。そのため茎項以外の他の植物体器官も増殖可能である事が望ましく, 次の 5 部分について増殖率を調べた。継代を続けている無菌の小植物体を茎項 (1mm), 葉 (5×5mm), 葉柄 (5mm), 茎 (1 節を着けたもの), 根 (5mm) に分け 50ml 培地を入れたフラスコに各 10 切片植付けた。培地は基本培地に NAA, BA を各 0.1mg/l 又は 1.0mg/l 添加した 2 種とした。各区 4 フラスコ供試し, 2 月後に測定した。

## 結 果

#### 実験 1) 生育促進培地

ホルモン無添加区では芽が伸長せず, 褐変しただけであった。NAA, BA 0.1mg/l 添加区では 100% ほう芽し, 苗條も大きくなった (Table. 1)。NAA, BA 1mg/l 添加区ではほう芽し, 苗條も生長したが, いずれの調査項目も 0.1mg/l 添加区の 1/2 以下であった (Table. 1)。

Table 1 Shoot growth from apices cultured on the media containing NAA and BA in various concentrations

Regulator		%	Fresh weigh		No. of	Length of
NAA	BA		of shoot (mg)			
(mg/l)		apexes	per	plantlet	leaf	leaf stalk
		developed				(mm)
0	0	0	11.5		0	0
0.1	0.1	100	253.0		3.2	22.7
1.0	1.0	40	132.1		1.0	7.0

Table 2 Root and shoot growth of plantlet cultured on a root promoting media

Regulator		Root			Shoot	
NAA	BA	%	No. per	Length	No. of leaf	Length of
(mg/l)						
0.1	0.0	100	2.6	25.4	2.3※	1.1※
0.1	0.1	30	0.4	7.2	2.3	1.4
0.1	1.0	0	0	0	2.7	1.7
1.0	0.0	100	2.6	16.8	1.6	1.4
1.0	0.01	100	3.0	16.0	1.7	1.2
1.0	0.05	100	2.0	16.2	1.7	1.5
1.0	0.1	100	2.8	13.6	2.2	1.5
1.0	0.5	80	0.8	5.2	2.8	2.0

※ shows relative value when shoots were transplanted as one.

## 実験 2) 発根促進培地

発根促進効果があるといわれる NAA を 0.1 と 1.0 mg/l, それに種々の濃度の BA を培地に添加した結果 (Table 2), NAA のみ, 又は NAA 1.0 mg/l で BA が相対的に低濃度の 0.1 mg/l 以下で 100% の発根がみられた。一方 NAA と BA が同濃度 (0.1 mg/l) 又は BA がそれ以上 (0.1-1.0 mg/l) であると発根は非常に悪く, NAA の影響力の強さがうかがわれた。又根数・根長など地下部の生長も発根率とほぼ同じ傾向がみられた。逆に葉数・草丈などの地上部の生長は, 発根状態の悪い区ほどよい影響がみられた。ホルモン吸収何日後に発根してくるのかをみたのが Table 3 の結果である。発根促進培地では植付 4~6 日後にす

Table 3 Various combination of NAA and BA concentration and root initiation and growth of apices and explants cultured

Regulator		Days after transplanting						
NAA	BA	※						
(mg/l)	(mg/l)	2	4	6	8	10	13	15
0.1	0.0	※※	+	+	△	○	○	○
1.0	0.01	-	-	+	△	○	○	○
1.0	0.05	-	-	+	+	△	○	○
0.1	1.0	-	-	-	-	-	-	-

※ Transplanting from the basal medium containing 0.1 mg/l NAA and BA on December 21, 1978.

※※ -, unchangeable; +, root primordium initiation; △, root growth in pericycle and cortex; ○, root growth in medium.

に根原基の分化がみられ, 8~10日以内に皮層中を伸長し, 10~13日以内に皮層外へ伸長を始めている。これはホルモン濃度の低いほど早い傾向がみられた。

Table 4 Shoot and root growth of plantlets grown from apices of two sizes

Size of apex	Days after planting		
	0-50	51-100	101-150
	Proliferation rate of plantlet		
L	1	3.2	8.1
S	1	2.9	9.3
	Leaf number per plantlet		
L	4.0	7.1	8.5
S	4.5	6.6	9.7
	Root number per plantlet		
L	-	9.6	4.6
S	-	1.5	6.9
	Days to rooting		
L	-	26.0	12.4
S	-	26.4	6.1

※

L: Larger apices of 1.0-0.5 mm were obtained from stolons.

S: Smaller ones of 0.3-0.1 mm, from sterile plantlets.

## 実験 3) 再莖項培養

再莖項培養をした場合, 普通の莖項培養と比較すると (Table 4), 初期の外植体の大き

さの差が植付 100 日後位までは影響があるように見える。増殖率・地上部・地下部の生長量、いずれも小さな組織をとった再茎頂培養で 100 日までは劣るが、100 日以後には逆にどの点においても茎頂培養からの植物体をおいこしてゆく。但しこれはウイルスフリーの影響かどうか 150 日までの結果しかないので断言できない。

これらの小植物体をアカザ検定してみたところ、再茎頂培養からの小植物体では反応がみられなかったが、茎頂培養でできた 21 植物体中の 1 個でモザイク反応がみられた。

#### 実験 4) 異った植付密度による増殖率の差

葉柄切片を植付けた時の密度別の増殖率をみると (Table 5), 60 切片植付けた区で最もほ

Table 5 Shoot growth of leaf stalk explant cultured at different density

Population on 50 ml medium	% explants with bud	Total wt. of shoot (mg)	Total no. of leaf	Length of leaf stalk (mm)
10	3.3	8.2	0	0
30	11.1	10.8	1	3.3
60	30.6	170.0	24	23.0

う芽率もよく、それぞれの苗條もよく成長していた。60 切片までは密度が高いほど、増殖率も高い事が分る。一方小植物体を植付けた区では (Table 6), 小さなサイズのグループでは株あたり増殖率は 3.6~11.0 と大きくひらきがあり、低密度区ほど増殖率が高かった。生長量は高密度区の小植物体の発育がよかった。一方大きなサイズのグループでは、株あたりの増殖率はほとんど変わらず、生長量も 1 株あたりほとんど同じであった。だからこの程度の大きさの株ならば、50ml 培地上に 10 本位植付けてもよいと考えられる。

Table 6 Shoot growth of plantlet cultured at different density

Population on 50 ml medium	No. of plantlets regenerated	Total fresh wt. (mg)	No. of leaf per plantlet	Length of leaf stalk (mm)	CO <sub>2</sub> % after ※ 16hr-Light
smaller plantlet					
1	11.0	0.64	3.8	20.3	0.43
5	23.7	1.26	3.8	14.1	0.91
10	36.0	3.05	4.2	21.0	1.90
larger plantlet					
1	3.0	0.74	6.7	41.8	0.40
5	18.0	2.32	5.5	34.5	1.04
10	33.5	4.31	5.2	36.1	2.33

※  
See text.

CO<sub>2</sub> 濃度については、自然条件よりかなり高濃度の 4000~23300 ppm までの差はあったが、株数が多い程高濃度となり、1 本あたりの濃度でほぼ同じく、小植物体のサイズの大きいほどやや多い傾向が認められた (Table 6)。

#### 実験 5) 植物体器官からの増殖

植物体器官のうち、茎頂からのほう芽が最もよく、次いで 1 芽を着けて切った茎切片がよ

かった。これらの区では潜在的に存在する芽がのびたわけであり、一方葉柄・葉片では非常に低い程度だが不定芽が形成され、伸長した。根は一部がカルス化しただけでほう芽はしなかった (Table 7)。この傾向は2種の培地で同じであった。一方1切片からのほう芽数、苗條の生長は、ほう芽率の低かった葉片からが最もよく、莖頂からの植物体がこれに次いだ。莖・葉柄に形成された苗條は似た傾向であった (Table 7)。これをほう芽率×ほう芽数を増殖率とした index でみると、莖頂・莖・葉柄・葉の順に低く、17倍近くのひらきがある。しかし植物体全部からとれる切片数を考慮すれば、葉柄が最も効率がいまいだろう。

Table 7 Rate of shoot growth of various organ explants

Organ explant	% explants with bud	No. of bud per explant	No. of leaf	Length of leaf stalk (mm)	Proliferation rate ※
apex ※※	92.0	2.5	3.0	4.1	230.0
stem	60.3	1.7	2.5	3.7	102.5
leaf stalk	15.0	1.4	2.3	6.3	21.0
leaf	6.0	2.2	3.0	12.6	13.2
root	0	0	0	0	1.0

※ It is indicated by the % explants with bud × No. of bud.

※※ Each explant has one node.

## 考 察

ウイルスフリー株育成のための培地は、植物の種類により異なりカーネーションでは Holley & Baker (1963)<sup>13)</sup>, Murashige & Skoog (1962)<sup>1,3)</sup>, Morel<sup>1)</sup> 等の処方、又イチゴでは White (1943) の修正培地<sup>9)</sup>, Linsmaier & Skoog (1964)<sup>11)</sup>, Murashige & Skoog (1962) (著者未発表) がよいといわれる。植付け組織の大きさによっても異なり、小さな組織ほど複雑な培地が必要である<sup>7)</sup>。フキの莖頂は Murashige & Skoog 培地で 0.1 - 0.3 mm の組織でも十分生育する。ウイルスフリー株育成のためには、生長点をふくむできるだけ小さな組織をとる事が必要とされ、Hollings & Stone (1964, 1965) はカーネーションの mottle virus<sup>5)</sup> や ring spot<sup>6)</sup> をフリー化するのに 0.25 mm の莖頂で 40%, 0.5 mm の莖頂で 13%, 1.0 mm の莖頂で 0% であったと述べている。又吉野ら (1971)<sup>16)</sup> はキクで 0.6 mm 以下で 100% ウイルスフリー、1.1 mm 以上でも 58% のフリー化を誘導できたと述べている。これは材料や Virus の種類の違いによるものであろうが、いずれにしても莖頂から下の組織ほどウイルスの濃度が高く、下部組織の付着をできるだけ小さくする様切りとる必要がある。フキで特徴的な事は、切断面がすぐ褐変し、細胞も死にやすい。この褐変はフェノール物質によるものと思われるが、時間の経過と共にかなり内部まで褐変がすすむので切断後早急に植付ける必要がある。しかし生長点は地下莖の先端部にあるためかなり強度の殺菌をせねばならず、又葉柄に深く包まれているためとり出し難く、時間がかかり褐変も非常に早い。そのため 1.0 - 0.5 mm の莖頂組織をとるのがやっとである。これを一度植付け、無菌にした小植物体の莖頂はとり出しやすく、顕微鏡下で 0.1 - 0.3 mm に切りとる事は比較的簡単にできる様になる。莖頂を一度植付け、伸長した植物は Virus 濃度が低くなる<sup>15)</sup> 事がわかっており、それから更にもう一度小さな莖頂をとり出せばウイルスフリー植物になる

可能性は高い。事実アカザ検定では再莖頂培養の植物体は反応を示さなかった。

フキからはアルファルファ・モザイクウイルス (Al MV), アラビス・モザイクウイルス (Ar MV), キュウリ・モザイクウイルス (CMV), フキ・モザイクウイルス (Bu MV) の少く共4種のウイルスが発見されており, このうち前2者の影響は少なく, 後2者の影響が大きいと報告されている<sup>14)</sup>。この4種のウイルスはいずれもアカザ *Chenopodium Amaranthicolor* Coste & Reyn で反応を示すので, 反応がみられなかったという事はウイルスフリーにならなかったのか, ウイルス濃度が薄くなったと考えられる。

この様な莖頂培養はウイルスのみならず他の fungi や bacteria などからも free になったものとみられ, 無毒植物 (pathogen-free) といわれる<sup>4)</sup>。このことでその後の生育, 収量が増加した例はイチゴ<sup>10)</sup>, カーネーション<sup>13)</sup>, キク<sup>9)</sup>などで多くの報告がある。フキでは現在検討中であるが, in vitro の培養でも再莖頂培養植物は継代を重ねるにつれて生育がよく (Table 4), モザイクや退緑斑点もみられず, 又実際鍊上げた後の株の伸長もウイルス罹病株と比較するとよい様にみえるので, 生育・収量の面でよい結果があると思われる。

ただ, フキの様な多年生で栄養繁殖する植物は, ウイルスフリーになった株を一度使うと又罹病する可能性が高いので, 母株をウイルスフリーで維持しながらそこからとったさし穂で毎年更新して実際栽培に用いることが望ましい。そのためイチゴなどで農林水産省が昭和49年度より「野菜無病苗育成対策事業」でとり上げているように, ウイルスフリー株の育成, ウイルス検定, 原々苗の増殖, を県の研究機関で, そのあと原苗の増殖を現地増殖施設で, 増殖した苗を農協生産者団体による現地採苗圃で, そこから生産者に配布されるという様なルート<sup>12)</sup>にのせて年々更新してゆく必要があると思われる。

以上の実験を行うにあたり, 実験上の御助力を頂いた光延千加子・北川優・早川修の各氏, および材料の御提供を頂いた総社農協の池上博人氏, 倉敷農業改良普及所の茅野洋二氏に厚く御礼申し上げます。

## 摘 要

愛知早生フキのウイルスフリー株は, 次の様な方法で育成し, 繁殖することができる。

地下莖の莖頂を切りとり, 殺菌して次の様な培地に植付ける。修正 Murashige & Skoog (1962) の要素に 30 g/l しょ糖, 8g/l bacto agar を添加したものを基本培地とし, 0.1 mg/l NAA と BA を添加した培地である。又発根させるための培地としては, 基本培地に NAA 0.1 mg/l 又は 1.0 mg/l NAA と 0~0.1 mg/l BA を添加したものが有効である。これらの培地に移植すると根原基は 4~6 日で分化し, 幼根は 10~13 日で伸長する。

ウイルスフリーになる率は, 莖頂培養で得られた無菌の小植物の莖頂を 0.1~0.3 mm に切りとり, 再度植付けることにより増加する。

ウイルスフリー株の増殖のためには, それらの小植物の莖頂, 茎, 葉柄, 葉の切片を用いることができる。

## 文 献

- 1) ALPI, A. and M. I. GARIBALDI.: Rev. Ortoflorofruttic. ital. 53, 367-377 (1969)
- 2) BAKER, R. and D. PHILLIPS: Phytopathology 52, 1242-1244 (1962)
- 3) 藤野守弘: 農業富民 45, 97-100 (1973)
- 4) HOLLEY, W. D. and R. BAKER: WM. C. Brown Co. Inc. Dubuque IOWA (1963)
- 5) HOLLINGS, M. and O. M. STONE: Ann. Appl. Biol. 53, 103-118 (1964)
- 6) HOLLINGS, M. and O. M. STONE: Ann. Appl. Biol. 56, 73-86 (1965)

- 7) 石原愛也・竹内正幸・古谷力：植物組織培養 266-268 朝倉書店 (1972)
- 8) 森寛一・浜屋悦次・下村徹・池上雍春：農事試験場研究報告 13, 45-110 (1969)
- 9) 森田篤：園芸植物の器官と組織の培養，加古舜治編，98-113 (1979)
- 10) 長修・赤木博・中枝健・大和田常晴：昭和53年度園芸学会春季大会研究発表要旨，256-257 (1978)
- 11) 大沢勝治・西貞夫：野菜試報告 A 1, 41-57 (1974)
- 12) 高井隆次：昭和53年度園芸学会秋季大会シンポジウム講演要旨，59-64 (1978)
- 13) 武田恭明：滋賀県農試特報 No11 (1974)
- 14) 枋原比呂志・田村実：日植病報 42, 533-539 (1976)
- 15) WHITE, P. R. : *Phytopath.* 24, 1003-1011 (1934)
- 16) 吉野正義・橋本光司：関東東山病虫研報 18, 75 (1971)