

莖頂培養によるワケギウイルスフリー株の育成とその効果

池田 好伸・井本 征史

キーワード：ワケギ，ウイルスフリー，莖頂培養

ワケギ (*Allium wakegi* Araki) は分球によって増殖するネギ属の野菜である。特有の芳香と風味があることから「ぬた」や薬味などに利用されている。

広島県における栽培面積は約100haで、その大部分は向島町、尾道市及び三原市など東部沿岸島しょ部の温暖地で栽培されており、主として京阪神市場に出荷され、本県の重要な特産野菜となっている。

ワケギは栄養繁殖性作物であり、現在栽培されている品種はほとんどの株にウイルス症状がみられる。特に、9～11月出荷の栽培型ではモザイク症状や葉の曲がり、株の萎縮などの発現が激しく、品質及び収量の低下が大きくなっている。

ワケギに感染するウイルスとしてネギ萎縮ウイルス (OYDV) とニンニク潜在ウイルス (GLV) が報告されており^{6,7)}、筆者らの調査でも県内産ワケギに両ウイルスが広く感染していることを確認した。

栄養繁殖性作物のウイルスを除去する有効な手段として莖頂培養法があり²⁾、既にイチゴ・カーネーションなど多くの作物で利用されている。しかし、ワケギのウイルスフリー化については報告が見あたらない。このため、莖頂培養によるウイルスフリー株の育成法を開発し、フリー株の生育特性及び、収量、品質に与える影響を検討したので報告する。

材料及び方法

1. 本県のワケギに発生する病原ウイルスの確認

ウイルスフリー化を図るための基礎的な知見を得るため、本県のワケギに発生するウイルスを調査した。

御調郡向島町岩子島の現地圃場からモザイク・萎縮症状を現した株を採集し、農試隔離ガラス室で保存栽培した。ウイルス検定材料として伸長中の若い葉を採取し、

OYDV 及び GLV 抗血清を用いた免疫電顕法 (クランプ法) により試料を作成し、電子顕微鏡 (日立 H-300 型) によって1万倍でウイルス粒子の観察を行った。

2. 莖頂培養培地に添加するホルモン濃度の検討

莖頂培養によって効率よく植物体を再生させるため、培地に添加するホルモンの種類と濃度について検討した。

1985～86年に農試園芸部圃場で栽培し、1986年5月に掘上げた「木原晩生1号」の吊り玉貯蔵球を9月に供試した。りん茎の外皮を除き、横1/2に切断した下半部を70%エタノールに2～3秒浸漬後、7%さらし粉上澄み液に15分間浸漬して殺菌した。殺菌したりん茎はクリーンベンチ内で、滅菌水により3回洗浄した。莖頂は実体顕微鏡下で葉原基1～2枚を付けて直径0.3～0.5mmに摘出し、培地に置床した。基本培地は Linsmier & Skoog (1965)¹⁾の無機塩類及び有機物 (LS 培地) を用い、 α -ナフタレン酢酸 (NAA) と 6-ベンジルアミノプリン (BA) をそれぞれ 0, 0.02, 0.2mg/l の濃度で組み合わせる添加工の培地を用いた。置床数は1区24個体とした。培地にはショ糖 30g/l, 寒天 7g/l を加え、pH 5.7～5.8に調整した。20φ×90mmの試験管に7mlずつ分注し、2重のアルミホイルで栓をしてオートクレーブで15分間滅菌した。培養は温度25℃の陽光恒温器で、白色蛍光灯による12時間照明 (照度約3,000lx) の条件下で行った。莖頂培養で育成した幼苗は2カ月後に試験管から出し、根部に付いた寒天を流水でよく洗い流した後、パーミキュライトを詰めた6cm黒ポリポットに植付けた。プラスチックバットに並べ透明プラスチックの蓋をして湿度を保ち、徐々に外気に慣らした。1カ月後に床土を詰めた9cm黒ポリポットに植え替え、隔離ガラス室内で養成した。生育調査は、培養開始2カ月及び3カ月後に行った。

3. ウイルス検定

1986年に莖頂培養によって育成した培養株を1987年9

本報告の一部は園芸学会平成2年度春季大会で発表した。

第1表 ワケギ茎頂の生長に及ぼすホルモン濃度の影響

NAA濃度 (mg/ℓ)	BA濃度 (mg/ℓ)	シュート 伸長数	伸長率 (%)	葉数	草丈 (cm)	発根 株数	発根率 (%)	根数
0	0	21	87.5	1.5	2.1	10	41.7	1.8
0.02	0	22	91.7	2.0	3.1	20	83.3	2.1
0.2	0	20	83.3	1.7	2.8	19	79.2	2.8
0	0.02	21	87.5	1.9	3.1	16	66.7	1.3
0.02	0.02	17	70.8	2.2	3.3	12	50.0	2.0
0.2	0.02	19	79.2	2.2	3.3	18	75.0	2.6
0	0.2	20	83.3	2.3	5.3	0	0	—
0.02	0.2	22	91.7	2.7	4.9	2	8.3	1.0
0.2	0.2	20	83.3	3.2	4.6	2	8.3	1.0

注) 品種: 木原晩生1号, 供試個体数: 1区24個体, 培養開始2ヵ月後調査。

月に隔離ガラス室内に置いた9cm黒ポリポットに植付けた。伸長した新葉を採取し、1%リンタングステン酸(PTA)染色によるダイレクトネガティブ法(DN法)によりウイルス粒子を観察した。対照として農試園芸部圃場で品種保存栽培している木原晩生1号を供試した。

4. フリー株生育特性調査

フリー株の生育特性を明らかにするため、現地栽培の主要品種である‘寒知らず’、‘下関’を供試して、フリー株と非培養株との生育を比較した。1988年に向島町岩子島の農家圃場からそれぞれの品種特性を保持した株を選抜し、農試生物資源開発部圃場(細粒黄色土、土性: SCL)で維持・増殖した(以下、非培養株という)。1988年7~8月にNAA 0.02mg/ℓ添加LS培地を用いた茎頂培養によってウイルスフリー株を育成し、寒冷紗被覆した隔離ハウスで養成した(以下、フリー株という)。育成した幼苗は隔離ハウスでの養成中にDN法及び外観病徴の観察によるウイルス検定を行い、同時に生育不良株を淘汰した。りん茎を1球ずつに分割し、ほぼ同じ大きさの種球に調整した。三原市木原町に設置した白寒冷紗被覆パイプハウス内に、条間50cm、株間25cmの1条植えとした。1カ所1球植えとして1区30球、3連制とした。供試圃場の土壌は中粗粒黄色土(マサ土)であった。1989年9月11日に定植し、農家慣行に従って管理した。生育調査は定植後15及び80日目に、収穫調査は80日目に、調査株数は生育調査は30株、収穫調査は10株とした。

5. 保存温度と鮮度保持期間の検討

フリー株は収穫後に葉の黄化が遅い傾向が認められたため、保存温度と鮮度保持期間の関係について検討した。生育特性調査に供した‘寒知らず’のフリー株と非培養株及び隣接した圃場で露地栽培した非培養株を供試した。なお、露地栽培株の定植期は隔離栽培株より約10日早かった。1989年12月19日に出荷可能な大きさに生長した株をそれぞれ140~200gの束にして新聞紙で包み、直立した状態で室温(21℃)及び低温(7℃)の暗黒下で保存した。1処理5反復とし、処理後2日目と6日目に生体重及び葉の黄化程度を調査した。

結果及び考察

1. 本県のワケギに発生する病原ウイルスの確認

現地圃場から採集したモザイク症状株、萎縮株をOYDV及びGLV抗血清を用いたクランプ法によって観察した結果、供試したすべての株で抗血清と反応するウイルス粒子が認められた(第1図)。モザイク症状の株からはOYDVまたはGLVどちらかの抗血清と反応するウイルス粒子が認められる場合が多かったが、萎縮株の一部からは両方の抗血清と反応するウイルス粒子が検出され、重複感染により激しい症状が引き起こされることが推察された。本県のワケギに感染する病原ウイルスとしてOYDV及びGLVを確認した。

第2表 ワケギ茎頂培養株の順化後の生育に及ぼすホルモン濃度の影響

NAA濃度 (mg/ℓ)	BA濃度 (mg/ℓ)	生存 株数	生存率 (%)	葉数	草丈 (cm)	根数	根長 (cm)
0	0	18	75.0	2.1	6.0	3.6	1.5
0.02	0	20	83.3	2.2	8.9	5.1	2.1
0.2	0	16	66.7	2.4	7.8	6.9	1.7
0	0.02	16	66.7	2.3	7.8	4.4	1.6
0.02	0.02	13	54.2	2.4	8.7	4.8	1.6
0.2	0.02	16	64.0	3.0	8.2	6.1	1.5
0	0.2	9	37.5	2.8	8.1	2.3	2.9
0.02	0.2	15	62.5	3.1	8.4	2.5	1.6
0.2	0.2	15	62.5	4.4	8.0	3.9	1.5

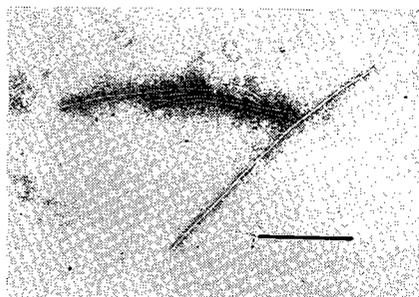
注) 品種：木原晩生1号，供試個体数：1区24個体，培養開始3カ月後調査。

2. 茎頂培養培地に添加するホルモン濃度の検討

培養2カ月後の生育状況を第1表に示した。供試した全ての培地でシュートが伸長した。シュートの伸長率は70.8～91.7%でホルモン濃度にかかわらず良好であった。NAA 0.02mg/ℓ単独添加区とNAA 0.02+BA 0.2mg/ℓ添加区は伸長率が90%以上と高かった。葉数はホルモン無添加区が1.5枚に対し、BA単独添加区は添加濃度に正比例して1.9～2.3枚に増加したが、NAA単独添加区は添加濃度との間に一定の傾向は認められなかった。NAA+BA添加区では2.2～3.2枚と最も多かった。草丈はホルモン無添加区が2.1cmに対し、BA単独添加区は添加濃度に正比例して3.1～5.3cmと伸長したが、NAA

単独添加区は添加濃度との間に一定の傾向は認められなかった。NAA+BA添加区はBA濃度が高いほど草丈が高く、NAA濃度が高いほど草丈が低くなる傾向があった。発根率は0～83.3%で、全ての区でシュートが伸長したのに対し、シュートからの発根はホルモン濃度の違いにより大きく異なった。すなわち、ホルモン無添加区が41.7%であったのに対し、NAA単独添加区は79.2%から83.3%に向上した。NAA+BA添加区はBA濃度によって発根率に差が認められた。BA 0.02mg/ℓ添加の場合NAA 0.02～0.2mg/ℓ添加区は発根率が50～75%であった。しかし、BA 0.2mg/ℓ添加の場合発根率はNAAの濃度に係わらず8.3%と低かった。また、BAを0.2mg/ℓ添加した3つの区では異常に肥大したシュートや水没状シュートが発生した。

培養後3カ月の生育状況を第2表に示した。順化終了時の生存率はBA 0.2mg/ℓ単独添加区が37.5%と低かったが、その他の区は54.2～83.3%であった。葉数はホルモン無添加区が2.1枚、NAAまたはBA単独添加区が2.2～2.8枚、NAA+BA添加区が2.4～4.4枚と添加ホルモン濃度が高くなるにしたがって優れる傾向があった。草丈はBA単独添加区はホルモン濃度に正比例して伸長する傾向にあったが、NAA単独添加区はホルモン濃度との間に一定の傾向は認められなかった。また、NAA+BA添加区はホルモン濃度が高くなるほど草丈が低くなる傾向であった。根数はホルモン単独添加の場合、NAA濃度が0～0.2mg/ℓと高くなるにしたがって3.6



第1図 ワケギから検出された2種のウイルス粒子 OYDV 抗血清と反応した粒子 (OYDV) と反応しない粒子 (GLV)。バーの長さは500nm

第4表 寒冷紗隔離栽培におけるワケギウイルスフリー株の生育状況

品 種		定植15日後		定植80日後			
		草丈(cm)	分げつ数	草丈(cm)	分げつ数	収量(g)	収量比(%)
寒知らず	フリー株	14.2 a	7.8 a	52.7 ab	24.4 a	291.7 a	159
	非培養株	9.2 b	4.6 b	48.2 c	14.3 c	183.7 c	100
下 関	フリー株	12.2 a	5.5 b	54.7 a	17.4 a	221.2 b	167
	非培養株	5.7 c	2.4 c	50.3 bc	8.5 d	132.8 d	100

注) 定植：1989年9月11日，1区30球，3連制。分げつ数，収量：1株当りの数値。同じ英文字を付記する数値間には5%で有意差なし (Duncan's multiple rang test)。

から6.9本と増加した。一方，BA濃度が0~0.2mg/lと高くなるにしたがって3.6から2.3本と少なくなった。NAA+BA添加区はBA濃度が高いほど根数が少なくなり，NAA濃度が高いほど根数が多くなる傾向であった。

以上の結果から，順化の容易な幼植物を効率良く再生するには，NAAを低濃度で添加したLS培地で培養することが適当と考えられ，これ以後の試験ではNAA 0.02 mg/l添加のLS培地を標準培地とした。本試験では1茎頂から育成した苗は1個体であったが，大越ら³⁾は栄養繁殖性のネギ‘坊主不知’のウイルスフリー株の効率的育成法として，初めにBAを1.5 ppm添加した培地で茎葉のみを多数分化させ，次にNAA 0.5 ppmとカイネチン 2.0 ppmを添加した培地で発根させた後，順化する方法が有効であるとしている。また，大沢ら⁵⁾はラッキョウの茎頂近傍組織をNAAとBAを $10^{-5}M$ 添加したLS培地で培養することにより，多数の茎葉が分化すると報告している。しかし，本試験ではBA 0.2 mg/lの添加によって茎葉が多数分化する現象は認められなかった。この理由として，本試験で検討したBA濃度は0.02~0.2 mg/lであり，他の2つの試験ではそれぞれ1.5~3 ppm及び $10^{-5}M$ とほぼ10倍の濃度で添加されていたこ

とがあげられる。今後フリー種苗の大量供給システムを確立するためには，試験管内での大量増殖法についても検討が必要と考えられる。

3. ウイルス検定

DN法による電子顕微鏡観察の結果を第3表に示した。供試した茎頂培養株131株中2株からひも状粒子が検出された。同時に観察した圃場栽培株からは供試した5株全てからひも状粒子が検出された。粒子の検出頻度は圃場栽培株は1~2視野に1本程度であり，茎頂培養株は4~5視野に1本であった。

以上の結果から，ワケギでは茎頂を0.3~0.5 mmの大きさで摘出して培養することによりウイルスフリー個体を獲得できると考えられる。

4. フリー株生育特性調査

植え付け直後に降雨があり萌芽が良く，特にウイルスフリー株の萌芽揃いが良かった。寒冷紗被覆栽培においては，露地栽培と比較して降雨時には高湿度で経過するためべと病の発生が予想されるが，その発生頻度は天候によって大きく左右される。本試験においては，試験期間中にはべと病の発生は認められなかった。しかし，越冬後には，春先の長雨によりべと病が多発生した。

生育初期の定植15日後及び収穫期に達した80日後の生育状況を第4表に示した。フリー株の生育を非培養株と比較すると‘寒知らず’の定植15日後の草丈はフリー株が14.2 cmに対し，非培養株は9.2 cm，分げつ数は同じく7.8と4.6となり，フリー株は非培養株に対して約1.5倍の生育量であった。また，‘下関’は草丈がフリー株12.2 cmに対し，非培養株は5.7 cm，分げつ数は同じく5.5と

第3表 ウイルス検定結果

	供試株数	外観病徴	ウイルス粒子検出株数
茎頂培養株	131	0	2
圃場栽培株	5	0	5

注) 品種：木原晩生1号

第5表 ワケギウイルスフリー株と非培養株の保存温度と鮮度保持期間

保存温度		処理2日後		処理6日後		
		重量比	黄化葉率	重量比	葉1/2以上 黄化葉率	葉1/4以上 黄化葉率
低温 (7℃)	フリー株(網)	95.7 a	0 a	92.7 a	3.5 a	4.3 a
	非培養株(網)	96.2 b	0 a	92.7 a	8.2 b	8.6 a
	非培養株(外)	97.1 a	0.6 a	94.2 a	15.1 c	15.7 b
室温 (21℃)	フリー株(網)	92.5 b	8.4 b	83.9 b	28.3 d	42.2 c
	非培養株(網)	91.9 b	9.3 b	81.2 bc	36.2 e	57.3 d
	非培養株(外)	93.3 b	14.0 c	79.5 c	44.6 f	67.3 e

注) 供試品種：寒知らず，処理月日：1989年12月19日，140～200gの束にして新聞紙で包み，立てて処理し，1区5反復とした。重量比：処理開始時を100として計算した。網：寒冷紗隔離栽培，外：露地栽培。

同じ英文字を付記する数値間には5%で有意差なし (Duncan's multiple rang test)。

2.4となり約2倍の生育量であった。すなわち，‘寒知らず’，‘下関’共にフリー株の初期生育は非培養株に比べて旺盛であった。

定植80日後では，両品種とも草丈の差は縮まったが，分けつ数は‘寒知らず’のフリー株が24.4に対し非培養株が14.3であり，‘下関’はフリー株が17.4に対し，非培養株は8.5とフリー株が非培養株の1.5～2倍となった。従って，収量は両品種ともフリー株が非培養株の1.6～1.7倍となった。このことから，フリー化によって生育が旺盛となり，その効果は特に，初期生育で著しいことが明らかになった。また，フリー株は葉色の濃淡や葉のねじれ，湾曲等奇形葉の発生が見られず外観が優れていた。

ネギ類のウイルスフリー化による効果について，大越ら¹⁾は‘坊主不知’ネギのウイルスフリー株の生育を調査し，フリー株は1～3割程度の増収効果と軟白部の白色の冴えが良くなることを報告しており，本試験の結果と同様の傾向を得ている。

5. 保存温度と鮮度保持期間の検討

保存温度と鮮度保持期間の関係について第5表に示した。フリー株の収穫後の鮮度保持期間は長く，21℃保存の場合，2日後の黄化葉率は露地栽培株が14%に対しフリー株は8.4%であった。黄化葉率が10%を越えると商品性が著しく損なわれると判断された。隔離栽培非培養

株は2日後の黄化葉率は9.3%とフリー株と同等だったが，6日後には葉1/2以上黄化率がフリー株28.3%に対して，非培養株は36.2%と差があらわれた。7℃保存の場合，フリー株，非培養株とも鮮度保持期間が長くなり，処理2日後では葉の黄化はほとんど見られなかった。しかし，モザイク症状がより激しい露地栽培株は，6日後には黄化葉率15.1%となった。このことから，ウイルス感染による影響は生育抑制や品質低下だけでなく，収穫後の鮮度保持期間にまで及んでいると考えられた。

ウイルスフリー株の品質面の効果として，大越ら¹⁾は‘坊主不知’ネギのフリー株は収穫後の葉の黄化が遅れ店持ち性が高まると指摘しており，本試験の結果と同様の傾向となっている。

以上のように，ウイルスフリー株は生育，収量，品質の改善が著しいだけでなく，鮮度保持期間も長いことが認められた。特に，初期生育が旺盛になることから栽培期間の短縮や新作型の開発が期待される。

摘 要

ウイルス病の発生による品質，収量の低下が問題となっているワケギのウイルスフリー株の育成に関して，病原ウイルスを確認するとともに，ウイルスフリー株育成のための培地に添加するホルモンの種類と濃度及びウイルスフリー株と非培養株の生育，収量並びに鮮度保持期

間について検討した。

1. 本県のワケギに感染する病原ウイルスとして OYDV 及び GLV を確認した。免疫電顕法によりそれぞれの抗血清と反応するウイルス粒子を観察した。

2. ウイルスフリー株を効率的に育成するための茎頂培養法としては、LS 無機塩類及び有機物に NAA 0.02 mg/l を添加した培地に、葉原基 1~2 枚をつけ 0.3~0.5mm に摘出した茎頂組織を置床し、温度約 25℃、白色蛍光灯 (約 3,000lx) による 12 時間照明下で 2 カ月培養することが適当と考えられた。

3. 培養株のウイルス検定を行ったところ 131 株中 2 株からウイルス粒子が検出された。

4. ウイルスフリー株は非培養株と比較して初期生育が優れ、分げつ数が多く、その結果、収量が約 60% 増加した。また、葉色が濃く、奇形葉の発生がみられず外観が優れていた。

5. ウイルスフリー株は非培養株と比較して収穫後の葉の黄化が遅く、鮮度保持期間が長かった。

謝 辞

本研究の実施にあたり、千葉県農業試験場深見正信主任技師には貴重な抗血清を分譲していただいた。また広島県野菜振興協会尾道地域協議会わけぎ部会の関係諸氏には現地試験に協力をいただいた。ここに厚く感謝の意

を表する。

引用文献

- 1) LINSMAIER, E. M., and F. SKOOG: 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **18**: 100-127
- 2) 森 寛一・浜屋悦次・下村 徹・池上雍春: 1969. 組織培養法によるウイルス罹病植物の無毒化. 農事試験場研究報告 **13**: 45-110.
- 3) 大越一雄・石井 勝・実川三朗: 1987. 「坊主不知」ネギの生長点培養によるウイルスフリー化とその実用性 第 1 報 培養方法及び変異発生の検討. 千葉原農研報 **9**: 1-10.
- 4) ————: 1986. ———— 第 2 報 フリー化効果. 千葉原農研報 **12**: 8-16.
- 5) 大沢勝次・栗山尚志・菅原祐幸: 1981. 組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究. 野菜試験場報告 A **9**: 1-46.
- 6) 佐古 勇・尾崎武司・井上忠男・中曾根渡: 1988. DIBA 法による各種ネギ属植物の GLV (garlic latent virus) の検出及び発生状況. 日植病報 **54**: 109.
- 7) 吉野正義・安 正純: 1965. ネギ萎縮病の生態に関する研究. 埼玉農試研究報告 **26**: 1-70.

Production of Virus-free Plant of *Allium wakegi* Araki by Means of Shoot Apex Culture and Its Efficiency.

Yoshinobu IKEDA and Masasi IMOTO

Summary

Experiments were carried out on shallot (*Allium wakegi* Araki, Japanese Wakegi) to examine the virus identification, culture method, yield and quality of products.

The particles covered with antibodies of OYDV antiserum or GLV antiserum were detected in immunoelectron microscopy.

The virus-free plants were produced by LS medium supplemented with 0.02 mg/l NAA from shoot apex (0.3~0.5mm in length) after 2 month incubation at 25 °C under 12 hr day-length supplemented with fluorescent lamps of 3,000lx.

Out of 131 regenerated plants the virus particles were found in 2 plants by electron microscopy.

By the virus elimination, the yeild was increased by 60%, effect for improving the greeness of leaves and delaying the yellowing of leaves after harvesting was obtained.

Key words: *Allium wakegi*, virus-free, shoot apex culture