

効率的なニンニク培養系の確立と抗ウイルス剤を用いたウイルスフリー技術の改良

作物生産生物学講座 園芸緑地学分野園芸学研究室
丸山 翔平

【背景と目的】ニンニクのウイルス病は国内外で甚大な被害をもたらしている。一般にウイルスフリー種子の作出には茎頂培養が用いられるが、ウイルスフリー化率の低さや植物体再生率の低さが問題となっている。最近、アスコルビン酸 (AsA) 誘導体に RNA サイレncing機構を活用した抗ウイルス作用があることが見出された。そこで本研究では、ウイルスに感染したニンニクからウイルスフリー種子を作出する過程で、RNA サイレncingが他の組織よりも強く誘導される成長点組織に AsA 誘導体を処理し、この処理がニンニクのウイルスフリー化を促進するかどうかについて検討を行った。また、より増殖効率のよい培養系を確立するために、培養組織に珠芽を用いることについても検討を行った。

【材料および方法】材料には北大実験圃場で栽培されているニンニクを用いた。伸長した花茎の先端に形成される珠芽をサンプリングし、珠芽を利用した培養および成長点培養用の材料とした。成長点培養では、切り出す組織の大きさ (0.7~1 mm または 1~1.5 mm)、AsA 誘導体の種類 (アスコルビン酸 2 グルコシド (AsG) またはアスコルビン酸 2 硫酸エステル二ナトリウム二水和物 (AsS))、AsA 誘導体の濃度 (0, 500, 1000, 1500 ppm) によって異なる試験区を作成した。基本培地には IAA と BA を各 1 μ M 添加した LS 培地を用いた。ウイルス検定では、成長点から伸長した葉から核酸を抽出し、ウイルスの塩基配列特異的プライマーを用いて RT-PCR 法により検出を行った。

【結果および考察】珠芽を無菌的に培養した結果、珠芽からの増殖率は非常に高く、1つの個体から数十個の幼植物体を作成することができた。珠芽をサンプリングした圃場のニンニクの葉からは、タマネギ萎縮ウイルス (OYDV) とリーキ黄色条斑ウイルス (LYSV) の重複感染が検出されたが、その珠芽に由来する培養個体もすべて OYDV および LYSV の感染が検出され、ウイルスは珠芽にも感染していることがわかった。今回の試験では、成長点培養由来の植物体のウイルス検定には OYDV のみの検定を行った。培養の結果、1 mm 以上の切り出しでは AsA 誘導体の添加に関わらず OYDV が検出された。一方、1 mm 以下で切り出した場合では複数の試験区で OYDV の減少が見られ、特に 500 ppm の AsG 添加区ではほとんどの幼植物体で OYDV が減少していた (図)。これらの結果から、1 mm 以上の成長点の切り出しでは組織内のウイルス量が多いため AsA 誘導体による抗ウイルス効果はみられなかったと考えられる。しかし、成長点を 1 mm 以下にすると AsA 誘導体がつ RNA サイレncing促進効果があらわれ、植物体内のウイルスの複製が抑制されることでウイルス量も減少したものと思われる。また、AsA 誘導体の抗ウイルス作用は濃度依存的にみられるわけではなかった。これは、あまり高濃度の AsA 誘導体が存在すると、AsA 誘導体がつ抗酸化性により活性酸素が除去されて、活性酸素が関わる病害抵抗性の誘導が抑制され、むしろウイルス増殖に適した状況を導いたためではないかと考えられる。一方、低濃度の AsA 誘導体では病害抵抗性を抑制するまで達しなかったため、低濃度条件が有効であったのではないかと推察される。以上、本実験で得られた知見から AsA 誘導体による高効率なウイルスフリー個体作出の可能性が示唆された。

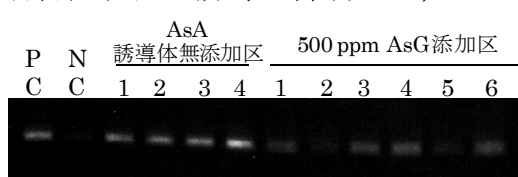


図 RT-PCR法による OYDV の検出
PC: Positive Control
NC: Negative Control