

熊本県天草地域におけるシモンイモからのサツマイモ斑紋モザイクウイルス (SPFMV) 検出と SPFMV フリー苗の効果 Detection of Sweet Potato Feathery Mottle Virus (SPFMV) from Simon (*Ipomoea batatas*) and Effect of the SPFMV Free Nursery at Amakusa Region in Kumamoto Pref.

飯牟禮和彦・春口真一*

Kazuhiko IMURE, Shinichi HARUGUCHI

要 約

天草市倉岳町で栽培されているサツマイモの一種でアンデス原産のシモンイモは、一般のサツマイモと異なり、その機能性からこの地域で機能性加工品として特産化されている。しかし近年その生産量が激減し葉の退緑斑紋やいも表面の裂開が認められるようになった。そこで、RT-PCR によるサツマイモ斑紋モザイクウイルス (Sweet Potato Feathery Mottle Virus, SPFMV) の検出を実施した結果、この地域のシモンイモは強毒系統 (S) と徳島系統 (T) に混合感染していることを確認した。一般にサツマイモは、本ウイルス感染による生産減少抑制対策として茎頂培養により作成されるウイルスフリー苗を用いた栽培が有効である。そこで、シモンイモについて新たに茎頂培養法を確立した。すなわち、感染株から摘出した茎頂の大きさが先端から 0.5mm 以下であれば、鉢上げ後の RT-PCR による検定の結果、11 個体中 10 個体がウイルスフリー苗であった。また、培養時の植物ホルモンはベンジルアデニン (BA) を 2 から 4mg/L 添加することで、3 ヶ月後には葉が展開し 20mm 以上発根した鉢上げ (順化) 可能な個体が得られた。さらに、そのウイルスフリー苗を天草市で現地栽培した結果、従来の苗と比較して収量が 3.8 倍、300g 以上でキズ、病害虫等がない販売単価の高いいも収量は 5.9 倍と高くなった。今後シモンイモのウイルスフリー苗導入は生産減少抑制対策に有効であることを示した。

キーワード：サツマイモ，シモンイモ，サツマイモ斑紋モザイクウイルス (SPFMV)，茎頂培養，RT-PCR

I 緒言

シモンイモ (*Ipomoea batatas*) はブラジル原産の白サツマイモで、インディオの秘薬として栽培されていたものをブラジル国立農科大学のシモン・S・チェン教授が栽培種として改良したものである。1973年に種いもを台湾出身の楊天和 (ようてんほう) 医師が日本に持帰り全国各地で栽培され¹⁷⁾、その後シモンイモの変異個体から新たな品種が 1992 年に育成されている¹²⁾。熊本県においても天草市倉岳町でシモンイモが 1988 年に導入され、葉やいもの粉末、葉や茎から茶やふりかけ、葉の粉を練り込んだうどんや素麺等が健康食品として特産化されている²⁾。しかし、導入当初 3t/10a 程度だったいも収量が 2006 年以降 1t/10a 以下に低下したことに伴い 2005 年から 2011 年にかけてのいも生産量は 70.6t から 0.7t と激減し産地消滅が危惧されている (天草地域振興局・農林水産部・農業普及・振興課調べ)。いも減収の原因および対策については、天草地域振興局・農林水産部・農業普及・振興課が 2004 年度と 2009

年度に施肥量、栽植密度、挿苗法等の検討や土壌分析を実施したが収量回復には至らなかった。さらに他の原因を調査する過程において、現地ほ場で栽培されているシモンイモの一部の葉に萎縮症状や退緑斑紋が認められたこと (第 1 図、第 2 図)¹⁴⁾、また、収穫したいも表面に裂開が多く認められたこと (第 6 図 b)¹⁸⁾ から SPFMV の感染が疑われた。そこで、RT-PCR による SPFMV 検出および 3 種系統 (普通系統 : O, 強毒系統 : S, 徳島系統 : T) 識別を試みた。

一方、植物の茎頂培養はウイルスフリー化に有効であり⁶⁾、作物のウイルスフリー化はその生産量や品質を向上することが知られている。一般のサツマイモの茎頂培養については森ら⁷⁾が着手し、その後採取する茎葉先端部の殺菌法、摘出茎頂の大きさ、培地組成などについて報告がある^{1,3,4,5,9,19,20)}。また植物ホルモンについて村田⁹⁾は品種間差があることを報告している。シモンイモについては SPFMV を含むウイルス感染や茎頂培養法の報告がないので、一般のサツマイモの茎頂培養法を基にシ

*現 農林水産部生産局農産課

モンイモの茎頂培養法，特に植物ホルモン条件と摘出茎頂の大きさについて検討した。

さらに，収量および品質低下がウイルス感染によるものであることを確認するため，茎頂培養により作成したウイルスフリー苗を現地である天草市倉岳町で栽培しウイルスフリー苗の効果について検討した。



第1図 現地ほ場での症状
注) 葉の萎縮がみられる。



第2図 研究所内ガラス温室での葉の症状
注) 葉に退緑斑紋がみられる。

II 材料および方法

1. 現地栽培シモンイモの SPFMV 検出 (2010 年)

現地で栽培されているシモンイモから採取した茎葉を5月に地表面を透水性シートで被覆したプランターに挿し，ガラス温室内で RT-PCR に十分な RNA が葉から抽出可能となるまで養成した。RNA 抽出には一定量の葉片を簡便に採取できるよう展開した葉をエッペンチューブの本体とふたで挟み，それによって得られる直径約 8 mm の葉片 4 枚 (約 100mg) を供試した。抽出する試薬として ISOGEN (ニッポン・ジーン社製) を用い，添付されている「プロトコール 1-3 植物試料からの RNA 単離」に記載されている方法により実施した。その際，抽出試料の重量に応じて使用する試薬を調整した。

得られた RNA は Qubit® (1.0) Fluorometer と Quant-iT・

RNA Assay Kit (いずれも Life Technologies 社製) により定量した。

RT-PCR は，PrimeScript™ RT-PCR Kit (タカラバイオ社製)，プライマーとして Tos プライマー¹¹⁾，PCR 装置として TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Version III Model TP600 (タカラバイオ社製) を用いた。それ以外の方法は，PrimeScript™ RT-PCR Kit のマニュアルに準じて実施した。

RT-PCR の後，反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し，1 mg/L エチジウムブロマイド液に浸漬したゲルを軽く洗浄した後，紫外線照射下で撮影し徳島系統 (T) で約 1.4kbp，普通系統 (O) あるいは強毒系統 (S) で約 1.3kbp のバンドの有無により SPFMV 感染の有無を判定した¹¹⁾。

さらに，上記 Tos プライマーを用いた RT-PCR 反応で増幅した DNA を EcoR I で消化，その反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し，1 mg/L エチジウムブロマイド液に浸漬したゲルを軽く洗浄した後，紫外線照射下で撮影し約 1.4kbp (T)，1.3kbp (O)，約 0.7bp と 0.6bp (S)，のバンドの有無により SPFMV の普通系統 (O)，強毒系統 (S)，徳島系統 (T) のいずれの系統かを判定した¹¹⁾。

2. 茎頂培養条件 (2010~2011 年)

ガラス温室内で地表面を透水性シートで被覆したプランターで生育中のシモンイモの伸長した茎葉先端から 4 cm 程度を切り取り，葉をできるだけ取り除き 70% エタノールに数秒浸漬し極微量の界面活性剤を含んだ 10% アンチホルミンに入れマグネチックスターラーで 5 分間穏やかに攪拌して殺菌した。次に滅菌水で 3 回洗い茎頂摘出までは滅菌水をしみ込ませた滅菌シャーレに入れ冷暗所で保存した。

茎頂の摘出は，クリーンベンチ内において実体顕微鏡下で実施した。

培養に用いる基本培地は Murashige & Skoog (MS) 培地⁸⁾ でショ糖 30g/L，ゲルライト 3 g/L，pH は 5.8 に調整した。また，培養温度は 25℃，照明時間は植物鑑賞・育成用蛍光灯を用いて 1,500lux で 16 時間とした。

【実験 1】茎頂培養における培地のナフタレン酢酸 (NAA) とベンジルアデニン (BA) 濃度が培養期間中の生育に及ぼす影響

オーキシンとして NAA，サイトカイニンとして BA を供試した。

供試する NAA，BA はいずれもナカライテスク社製で，ホルモン濃度は，BA を 0，2，4，8，12mg/L，NAA を 0，0.1，0.2mg/L とし，それぞれの組合せの合計 15 区を設定した。茎頂先端から 0.5mm 程度に調整した各区

19個の茎頂を内径18mm管ビンの培地表面に1個ずつ置床・培養し、3ヶ月経過した後に葉が展開し20mm以上発根した個体について鉢上げ（順化）可能個体とした。

【実験2】茎頂の大きさが順化個体のSPFMVフリー化に及ぼす影響

摘出する茎頂の大きさは、先端から0.3mmより大きく0.5mm以下と0.5mmより大きく1mm未満の2つのグループに分けた。

それぞれのグループの茎頂を内径18mmの管ビンの培地（BA2mg/L）表面に1個ずつ置床・培養し、3ヶ月経過した以降に葉が展開し20mm以上発根した各グループから11個体をランダムに選び9cmポリポットに移植した。その後、ガラス温室でRT-PCRに十分なRNAが葉から抽出可能となるまで養成し、前述と同様の方法でRNA抽出および定量を実施した。

RT-PCRは、PrimeScript™ RT-PCR Kit（タカラバイオ社製）、プライマーとしてCプライマー¹⁰⁾を用いた以外は前述と同様の方法でRT-PCRを実施した。

RT-PCRの後、反応液を1.5%アガロースゲルで電気泳動し、1mg/Lエチジウムブロマイド液に浸漬したゲルを軽く洗浄した後、紫外線照射下で撮影し約360bpのバンドの有無によりSPFMV感染の有無を判定した¹⁰⁾。

3. 現地（天草市倉岳町現地ほ場）栽培試験（2011～2012年）

前述した茎頂培養で得られたウイルスフリー苗と従来から栽培されていたウイルス感染苗を供試した区（それぞれウイルスフリー区、慣行区）を設けた。2011年は1区8.9㎡、2012年は1区6.6㎡の3反復とした。挿苗作業は5月26日（2011年）、5月24日（2012年）に実施した。2ヵ年とも栽植密度は3.0株/㎡（畦間1.1m×株間0.3m）の黒マルチ栽培であり、施肥量は基肥のみとし、アール当り窒素0.8kg、リン酸1.2kg、カリ2.0kg施用した。

掘取り後の調査は、現地の出荷規格に従い販売単価が高い順にA品（300g以上でキズ、病虫害等がないも）、B品（120から300gでキズ、病虫害等がないも）、C品（120g以上でキズ等があるも）の3種類に選別して実施した。

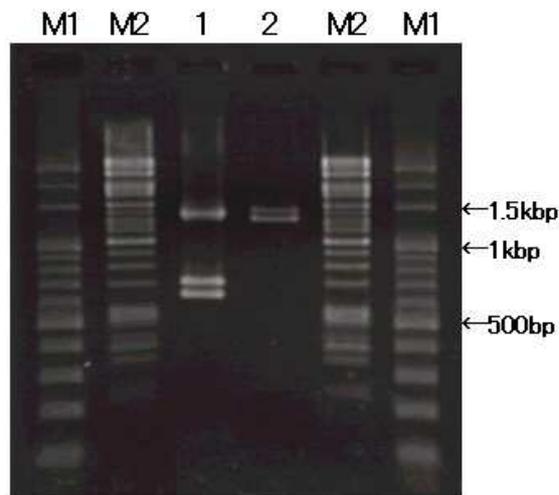
III 結果

1. 現地栽培シモンイモのSPFMV検出

葉1g当り1.4μg程度のRNAが得られた。

このRNAを鋳型としたRT-PCR反応液をアガロース電気泳動した結果、1.4kbpと1.3kbp付近にバンドが2本認められたため、供試したシモンイモはSPFMV感染して

おり、徳島系統（T）、それに普通系統（O）あるいは強毒系統（S）の混合感染であると判断された。さらに、このRT-PCR反応で増幅したDNAをEcoR Iで消化し、その反応液をアガロース電気泳動した結果、1.4kbpと0.7kbpおよび0.6kbp付近にバンドが3本認められたため、徳島系統（T）と強毒系統（S）が感染していることが判明した（第3図）¹¹⁾。



第3図 現地で栽培されているシモンイモのRT-PCRによるSPFMV検出

注1) M1: 100bpDNA ラダー, M2: λDNA の Hind II, Hind III 消化物, 1: RT-PCR 産物の EcoR I 消化物, 2: RT-PCR 産物 (EcoR I 未消化)

注2) プライマー: Tos プライマー

2. 茎頂培養条件

【実験1】茎頂培養における培地のナフタレン酢酸（NAA）とベンジルアデニン（BA）濃度が培養期間中の生育に及ぼす影響

茎頂培養開始から3ヶ月経過した後の鉢上げ可能個体を第4図に、鉢上げ可能個体数率（鉢上げ可能個体/供試茎頂数×100）を第1表に示した。BA0mg/L区では、鉢上げ可能個体は得られなかった。鉢上げ可能個体数率は、それ以外の区ではBA4mg/L区、2mg/L区、8mg/L区、12mg/L区の順に高く、各区の各NAA濃度間では、BA12mg/L区を除いて0mg/L区、0.1mg/L区、0.2mg/L区の順に高かった。特にBA4mg/L・NAA0mg/L区では100%、BA2mg/L・NAA0mg/LとBA8mg/L・NAA0mg/L区では、それぞれ89%、84%と高い数値を示した。

【実験2】茎頂の大きさが順化個体のSPFMVフリー化に及ぼす影響

摘出する茎頂の大きさが先端から0.3mmより大きく0.5mm以下と0.5mmより大きく1mm未満の2つのグループ由来個体の葉から抽出したRNAを鋳型にしたRT-PCR反応液をアガロース電気泳動した（第5図）。そ

の結果、360bp の位置にバンドが現れなかった SPFMV フリー株は、茎頂の大きさが先端から 0.5mm 以下では 11 個体中 10 個体、0.5mm より大きく 1 mm 未満では 11 個体中 8 個体であった (第 2 表)。

3. 現地栽培試験

ウイルスフリー区は、慣行区と比較して 1 株重、10a 当りの商品いも収量および株当たり商品いも個数が栽培年次において有意差が認められたが、いずれも増加した (第 3 表)。いもの 1 個重および長さも増加した。特に 10a 当りの商品いも収量は 3.8 倍であり、特に A 品では 5.9

倍となった (第 3 表, 第 4 表)。また、慣行区でいもの表皮に裂開が一部認められたのに対し、ウイルスフリー区では認められなかった (第 6 図)。

IV 考察

1. 現地栽培シモンイモの SPFMV 検出

今回、現地で栽培されているシモンイモは SPFMV に感染しており、強毒系統 (S) と徳島系統 (T) の混合感染 (S+T) であった。これまで熊本県における栽培サツマイモの SPFMV 感染系統の報告は少ないが、全国的にみると 3 系統の単独感染、O+S・O+T・O+S+T の混合感

第 1 表 BA および NAA 濃度が鉢上げ可能個体数率 (%) に及ぼす影響

NAA (mg/L)	BA(mg/L)				
	0	2	4	8	12
0	0	89	100	84	50
0.1	0	58	68	42	56
0.2	0	16	32	11	6

第 2 表 摘出茎頂の大きさが SPFMV の感染に及ぼす影響

摘出茎頂の大きさ	0.3mm~0.5mm	0.5mm~1mm
供試個体数 a	11	11
RT-PCR陰性 b	10	8

注1) SPFMV 感染株から茎頂を摘出

注2) 鉢上げ後、2週間後の展開葉から RNA を抽出した。

注3) b は RT-PCR 検定による SPFMV フリー株数

第 3 表 苗の種類と栽培年次が収量に及ぼす影響

年次	苗の種類	1 株重 10a 当たり商品いも収量					株当たり商品いも個数			
		(kg)	(kg)	A品 (kg)	B品 (kg)	C品 (kg)	合計 (個)	A品 (個)	B品 (個)	C品 (個)
2011	慣行	582	1731	645	1087	0	2.2	0.4	1.7	0.0
	ウイルスフリー	1858	5530	4175	1354	0	4.8	2.4	2.4	0.0
	慣行比	319	319	648	125	-	220	546	138	-
2012	慣行	114	345	147	130	68	0.4	0.1	0.2	0.1
	ウイルスフリー	787	2385	1802	583	0	2.0	1.0	1.0	0.0
	慣行比	691	691	1226	449	-	492	750	483	-
平均	慣行	348	1038	396	608	34	1.3	0.3	1.0	0.0
	ウイルスフリー	1323	3957	2989	969	0	3.4	1.7	1.7	0.0
	慣行比	380	381	755	159	0	262	594	174	-
分散分析	苗の種類	**	**	**	*	ns	**	**	**	ns
	年次	**	**	**	**	ns	**	**	**	ns

注) 分散分析により**は危険率 1% 以下で、*は 5% 以下で有意な差があることを示す。

第 4 表 苗の種類と栽培年次がいもの形状に及ぼす影響

年次	苗の種類	1 個重 長さ 長径 (長さ/径) 比			
		(g)	(cm)	(cm)	
2011	慣行	268	15.6	6.1	2.6
	ウイルスフリー	392	17.2	6.7	2.6
	慣行比	146	110	110	101
2012	慣行	287	13.6	7.1	1.9
	ウイルスフリー	391	17.2	7.5	2.3
	慣行比	136	126	105	120
平均	慣行	278	14.6	6.6	
	ウイルスフリー	392	17.2	7.1	
	慣行比	141	118	107	
分散分析	苗の種類	**	**	ns	-
	年次	ns	ns	**	-

注) 分散分析により**は危険率 1% 以下で有意な差があることを示す。

染の報告はあるが、S+Tの組合せの混合感染例は報告されていない¹³⁾。普通系統(O)が検出されなかった原因については、今後検討する必要があると考えられた。

2. 茎頂培養条件

【実験1】茎頂培養における培地のナフタレン酢酸(NAA)とベンジルアデニン(BA)濃度が培養期間中の生育に及ぼす影響

BAとNAAは、いずれもオートクレーブによる滅菌操作により活性が低下しにくい比較的扱いやすい植物ホルモンであり、一般のサツマイモの茎頂培養に関する文献では、これら2種のホルモン濃度の最適濃度範囲が0.2から2mg/L、NAAで0.01から0.1mg/Lとされている^{1,9,15,16)}。本実験でもこれら2種のホルモン濃度を検討したが、シモンイモが一般のサツマイモと比較して栄養成分が大きく異なることから¹⁷⁾、NAAで0, 0.1, 0.2mg/L、BAで0, 2, 4, 8, 12mg/Lという粗めの設定で実施した。その結果、NAA0mg/L・BA4mg/Lが最適濃度と判断されたが、より詳細に濃度を設定することでNAAでは0から0.1mg/L、BAでは2から8mg/Lの範囲でより最適な濃度がある可能性が考えられた。しかし、実際のウイルスフリー苗作出においては、順化後の苗増殖を考慮すれば鉢上げ可能個体数率が90%程度以上で問題

ないと考えられた。

【実験2】茎頂の大きさが順化個体のSPFMVフリー化に及ぼす影響

本試験から、茎頂が先端から0.3mmより大きく0.5mm以下の大きさの場合には、11個体の検定で10個体のウイルスフリー化を確認できた。さらに摘出する茎頂を小さくすれば、ウイルスフリー化の確率は高くなるが、置床後の生育が遅くなることと摘出する労力を考えると0.5mm程度を目安にすることが望ましいと考えられた。

3. 現地栽培試験

今回、ウイルスフリー苗を供試することにより、収量が大きく改善したことから、現地における収量低下の一要因としてSPFMVに感染していることであると考えられた。特に、A品の収量向上が著しかった。

今後の課題として、ウイルスフリー苗の継続使用の可能性について検討を行う必要があると考えられた。

VI 引用文献

- 1) 陳 蘭 荘・社 召 生・寺 尾 寛 行・續 栄 治 (2004) : 茎頂・腋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. 宮崎大学農学部研究報告, 50, 1-9



第4図 鉢上げ可能個体(培養3ヵ月後)
注) 個体の下の丸い部分はカルス



第5図 茎頂培養由来個体のRT-PCRによるSPFMVの検出

- 注1) M: 100bpDNA ラダー、1~8: 茎頂培養由来個体、9,10: 現地栽培個体、11: キット添付のポジティブコントロール
注2) プライマー: Cプライマー
注3) 8個体のうち、5を感染個体とした。



第6図 いもの形状比較 (a: ウイルスフリー区、b: 慣行区)
注) 矢印は表皮の裂開部分

- 2)株式会社くらたけ公式ホームページ.天草市倉岳町.
シモン芋, <http://www.dandl.co.jp/kuratake/goods.html>
(2015年1月28日閲覧)
- 3) 小林 仁 (1982): 細胞組織培養のカンショ育種への利用 1.遺伝子源の保存と増殖. 育種学雑誌別冊(2), 32, 66-67
- 4) 小林 仁 (1983): 細胞・組織培養のカンショ育種への利用 2.活性炭添加によるカルス化の抑制. 育種学雑誌別冊(2), 33, 90-91
- 5) 小林 仁 (1984): 細胞・組織培養のカンショ育種への利用 3.再分化系統の選抜と再分化条件の検討. 育種学雑誌別冊(1), 34, 14-15
- 6) 浜屋悦次 (1987): 組織培養法によるウイルス罹病植物の無毒化に関する先駆的研究. 日本植物病理學會報, 53, 279-281
- 7) 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株の無毒化. 農事試験場研究報告, 13, 45-110
- 8) Murashige,T.and F.Skoog. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures/ *Physiologia Plantarum*/15:473-497.
- 9) 村田達郎・福岡壽夫・宮司佑三 (1989): サツマイモの茎頂培養における培地条件の検討. 九州東海大農紀要, 8, 9-14
- 10) 長田龍太郎・森昌樹・花田薫・西口正通 (2002): RT-PCR を利用したサツマイモ斑紋モザイクウイルスの検定. 宮崎県総農試研報, 37, 1-12
- 11) (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター 成果情報 (1997): サツマイモ斑紋モザイクウイルスの共通プライマーを用いた RT-PCR による検出と系統識別
- 12) 農林水産省 品種登録ホームページ, <http://www.hinsyu.maff.go.jp> (2015年2月9日閲覧)
- 13) Okada,Y. and A.Saito.(2008). Evaluation of Resistance to Complex Infection of SPFMVs in Transgenic Sweet Potato/ *Breeding Science*/ 58:243-250.
- 14) 大貫正俊・酒井淳一・花田薫・加藤公彦・宇杉富雄 (1994): 静岡県サツマイモから分離されたサツマイモ斑紋モザイクウイルスの諸性質. 九病虫研会報, 40, 31-35
- 15) 大澤勝次・久保田旺 (2003): 植物バイオテックの実際, 農山漁村文化協会
- 16) 最新バイオテクノロジー全書編集委員会 (1992): 穀類・いも・牧草類の増殖と育種, 農業図書
- 17) 齋藤勝・渡邊啓子 (1994): 白サツマイモが効いた!, マキノ出版
- 18) Usugi,T., M.Nakano, M.Onuki, T.Maoka and T.Hayashi.(1994). A New Strain of Sweet Potato Feathery Mottle Virus That Causes Russet Crack on Fleshly Roots of Some Japanese Cultivars of Sweet Potato/ *Ann. Phytopath. Soc. Japan*/ 60(5):545-554
- 19) 山田良雄・小林 仁 (1984): 細胞・組織培養のカンショ育種への利用 4.茎頂の初期培養条件の検討. 育種学雑誌別冊(2), 34, 60-61
- 20) 山田良雄・小林 仁・鈴木昭隆 (1985): 細胞・組織培養のカンショ育種への利用 5.ジベレリン添加による茎頂初期培養条件の改良. 育種学雑誌別冊(1), 35, 44-45

Summary

Detection of Sweet Potato Feathery Mottle Virus(SPFMV) from Simon(*Ipomoea batatas*) and Effect of the SPFMV Free Nursery at Amakusa Region in Kumamoto Pref.

Kazuhiko IMURE, Shinichi HARUGUCHI

Simon sweet potato is a special product in Kuratake-machi, Amakusa-city. But in recent years, its yeild has decreased drastically and it showed peculiar symptoms of Sweet potato feathery mottle virus(SPFMV). We found that simon sweet potato in Kuratake-machi was infected with 2 strains of severe(S) strain and Tokushima(T) strain by RT-PCR and the following EcoR I digestion. And we investigated some conditions for the shoot tip culture and the effect of virus-free nursery on the yeild at Kuratake-machi. We determined that the optimum concentration of BA in MS medium was 2-4mg/L. Under this medium condition, after 3 months from the beginning of shoot tip culture, we could get the plants which had open leaves and roots over 20mm long and these plants were suitable for acclimation on pots. When the size of shoot tip which was extracted from SPFMV infected plant was under 0.5mm long among 11 individuals, 10 individuals were determined to be virus-free by RT-PCR test. The yeild became 3.8 times by using virus-free planas at local field.