

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3742592号

(P3742592)

(45) 発行日 平成18年2月8日(2006.2.8)

(24) 登録日 平成17年11月18日(2005.11.18)

(51) Int. Cl. F I
AO 1 H 4/00 (2006.01) AO 1 H 4/00
C 1 2 N 5/04 (2006.01) C 1 2 N 5/00 F

請求項の数 5 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2001-504211 (P2001-504211)	(73) 特許権者	000250100
(86) (22) 出願日	平成12年6月20日(2000.6.20)		湧永製薬株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2000/004022		大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号
(87) 国際公開番号	W02000/078128	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成12年12月28日(2000.12.28)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成16年7月13日(2004.7.13)	(74) 代理人	100092624
(31) 優先権主張番号	特願平11-175768		弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成11年6月22日(1999.6.22)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 福本 積
早期審査対象出願		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
		(74) 代理人	100081330
			弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルスフリー植物の作出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

鱗茎または球根によって繁殖するウイルスに感染した植物の普通葉基部の培養によって形成されるドーム状組織を分離、培養することを特徴とするウイルスフリー植物の作出方法。

【請求項2】

茎頂及び普通葉を除いた普通葉基部から成る外植片を植物ホルモン非存在下で培養し、ドーム状組織を形成させる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記普通葉基部が、普通葉の付け根から1～3mm下部までの部分である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

鱗茎または球根によって増殖する植物がアリウム属植物である請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

アリウム属植物がニンニクである請求項4記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明はニンニクを代表とするアリウム属植物およびその他の鱗茎、球根によって繁殖する植物のウイルスフリー植物の作出法に関する。さらに具体的には普通葉基部を培養する

ことによって得られるドーム状組織を分離、培養してウイルスフリー植物体を作成する方法に関するものである。

背景技術

アリウム属植物には、ニンニク、タマネギ、ラッキョウ、ネギ、ワケギ、ニラ、アサツキ等がある。これら植物は、食用、香辛料として広く利用されている。また、ニンニクは古くから薬効も認められていて、強精、強壮薬等としても利用されている。アリウム属植物の栽培は日本をはじめ世界各国で行われているが、近年、ウイルスによる被害が栽培上の大きな問題となっている。このようなウイルスとして、例えばニンニクでは、garlic viruses (GarVs)、leek yellow stripe virus (LYSV)、onion yellow dwarf virus (OYDV)、garlic latent virus (GLV) などが知られている。ニンニクは栄養繁殖性の作物であるため、一度ウイルスに感染すると後代にまで伝搬してウイルス汚染が広がることが知られている。ニンニク以外のアリウム属植物でも同様の被害が知られており、このようなウイルス汚染に対する根本的な防除対策が迫られている。

10

一方、近年、植物の組織培養法が確立され、この技術を応用して各種栄養繁殖性植物のウイルス除去が可能となってきている。一般に、ウイルスに汚染された植物でも茎頂組織（生長点、meristem）にはウイルスが存在していないことが知られている。従って、この茎頂組織を培養して植物体を再分化させることにより、ウイルス無感染（ウイルスフリー）の植物を得ることができる。また、植物組織を培養してカルスを形成させ、そのカルスを継代培養していくことによりウイルスが除去されることも知られており、ウイルスが除去されたカルスより植物体を再分化させることにより、ウイルスフリーの植物を得ることもできる。

20

ニンニクに代表されるようなアリウム属植物についても上記方法によりウイルスを除去することが知られており、ウイルスフリーのアリウム属植物が実際に栽培されている。

しかし、茎頂組織を培養してウイルスフリーのアリウム属植物を得る方法では、通常一つの茎頂組織からは一個体もしくは数個体の植物体しか得られないため、多数の植物体を得るためには、それと同等数の茎頂組織を摘出する必要がある。また、茎頂組織はニンニク鱗片の基部にあり、大きさは約0.5mm以下であるため茎頂の摘出には顕微鏡下での作業が必要となる。従って茎頂摘出作業は煩雑となり、作業効率は非常に低い。

一方、カルスから再分化させてウイルスフリーのアリウム属植物を得る方法は、一度カルスを誘導すればそのカルスを大量に増殖させることが可能であり、再分化植物体も大量に得ることができる。しかし、カルス培養の際に頻発する変異のため、均一な遺伝的性質を持つアリウム属植物を得ることは困難である。

30

そのため、茎頂培養によってウイルスフリー化したアリウム属植物を組織培養法によって大量培養する方法や普通葉基部を用いた再分化植物体の調製法が開発され、少量のウイルスフリー植物を材料として大量に増殖させることが可能となった（特開平6-197650）。しかし、これらの方法は材料となるウイルスフリー植物を常に確保する必要があり、網室等を用いた隔離栽培を行い該植物を維持しなければならない。

発明の開示

本発明はウイルスに感染した植物をもとにして、茎頂以外の組織からウイルスフリー植物を作成する培養法に関するものである。

40

普通葉基部を培養することによって、ドーム状組織を経由した植物体分化が誘導される。このドーム状組織は活発に細胞分裂をしており、茎頂組織と同様にウイルスが存在しないことを本発明者ははじめて見出した。従って、ドーム状組織のみを分離し、培養することによりウイルスフリー植物を形成させることが可能となった。ドーム状組織は1鱗片から複数個形成されるため、従来の茎頂培養法に比べ、飛躍的に効率が向上する。

従って本発明は、鱗茎または球根によって繁殖する植物の普通葉基部から成る外植片の培養によって形成されるドーム状組織を分離し、培養することの特徴とするウイルスフリー植物の作成方法を提供する。

好ましくは、前記外植片は茎頂及び普通葉を除いた普通葉基部であり、それを植物ホルモンの非存在下で培養し、ドーム状組織を形成させる。

50

好ましくは、普通葉基部は、普通葉の付け根から1～3mm下部までの切片である。
鱗茎または球根によって増殖する植物は、好ましくはアリウム属植物である。
前記アリウム属植物は、さらに好ましくはニンニクである。

【図面の簡単な説明】

図1はニンニク鱗茎の断面を略図的に示す。

発明の実施の形態

(a) 適応する植物

本発明は、普通葉を備えた鱗茎または球根を形成する植物に適応する。ユリ、スイセン、チューリップなどがあげられるが、中でもアリウム属植物、特にニンニクが最も適している。

10

(b) 外植片の調製

本発明では外植片として、普通葉基部を用いる。鱗茎または球根から普通葉基部を摘出する方法としては、例えば、鱗茎もしくは球根または適当な大きさに切断した鱗茎もしくは球根を次亜鉛素酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、エチルアルコール等の植物細胞に直接影響のない殺菌剤で殺菌し、ついで殺菌水で十分洗浄後、貯蔵葉を取り除き、普通葉を露出させ上部を切断除去した後、普通葉下部、茎頂も除去し、残っている普通葉の基部を適当な厚さ、例えば約1～3mmに切りとり、培養に供する（特開平6-197650）。なお、ニンニクの鱗茎中の普通葉基部の位置を図1に示す。

(c) 使用培地

培地としては少なくとも無機塩類、ビタミン等の有機成分、炭素源、植物生長調節物質等の植物の生育に必要な成分を含む任意の培地を用いることができる。本発明では基本培地として、ムラシゲ・スクーグ培地、リンスマイヤー・スクーグ培地等を用いることができる。

20

(d) 培養

上記培地に(b)で示したようにして調製した外植片を植え込み、植物のよく生育できる温度下（10～30℃好ましくは20～26℃）、500～15000ルクス、好ましくは3000～8000ルクスの照明下（1日あたり9～18時間好ましくは12～16時間）で培養を行うことにより5日～7日でドーム状の組織が形成される。このドーム状組織はこのまま培養を継続すると生長して植物体となる。本培養法では、このドーム状組織を外植片から分離して培養する。5日～7日の培養で形成されたドーム状組織をカミソリ刃またはメスを使って切り取り、再度、(c)で示した培地に置床する。同様に培養を行なうことにより、ドーム状組織は緑化、生長し、1ヶ月程度で小植物体となる。さらに培養を継続すると、小植物体は発根する。

30

(e) 栽培

前記(d)の培養で得られた、発根した小植物体を適当な用土を入れたポリポットに移植し、育苗する。生長した植物体をさらに大きな鉢または圃場に移植し、栽培を行なう。

(f) ウイルス検定

本培養で得られた植物のウイルス検定を行い、ウイルスフリー植物であることを確認する。ウイルスの検定法は、各植物で確立された方法によって行なう。例えば、アリウム属植物では、抗ウイルス抗体を用いた検定法またはPCR法を用いたウイルス遺伝子の存在の有無を確認する検定法がある（PHYTOPATHOLOGY, Vol.86, No.3, 253～259（1996））。

40

実施例

本実施例では、アリウム属植物のうちニンニク（*Allium sativum* L.）を用いたウイルスフリー作出についてその培養方法を示す。

培養の材料としては、福地ホワイト種及び北海道在来種のニンニクを用いた。福地ホワイト種は1種類のウイルス（leek yellow stripe virus(LYSV)）または2種類のウイルス(leek yellow stripe virus(LYSV) 及びonion yellow dwarf virus(OYDV)）に、北海道在来種は4種類のウイルス〔garlic viruses (GarVs)、leek yellow stripe virus (LYSV)、onion yellow dwarf virus (OYDV) 及びgarlic latent virus (GLV)〕に感染している株を用いた。

50

1. 材料の殺菌

まず、ニンニクの鱗茎を小鱗茎に分解した後、外皮を除去した。次いで、塩化ベンザルコニウム溶液及び水で洗浄後、小鱗茎の基部を約1cmの立方体状に切断した。この切片を70%エタノールに5分間浸漬した後、滅菌水で洗浄した。

2. 外殖片の調製

材料の殺菌後、残っている貯蔵葉部分を取り除き、普通葉を露出させた。普通葉の高さが0.5cm程度になるように上部を切りとり、縦方向に4分割した後、残った普通葉下部をはぎ取り、茎頂を取り除いた後の基部を約2mmの厚さに切りとり外殖片とした。

3. 培地

植物ホルモン無添加のリンスマイヤーとスクーグの培地（以下LS培地）を培養に用いた。 10

4. 培養

調製済みの外殖片をLS培地に置床し、25℃、16時間照明で静置培養を行った。

5. ドーム状組織の形成及び分離培養

培養を開始して1週間目に、外殖片の一部に直径約0.5mmのドーム状の組織が形成された。1鱗片当り20～30のドーム状組織が形成された。このドーム状組織をメスを使って切り取り、ホルモン無添加のLS培地に置床し、25℃、16時間照明で静置培養を行った。ドーム状組織は緑化、生長し、2週間～4週間で植物体となった。分離したドーム状組織のほぼ100%がこのように生長した。この植物体を新しい培地に移植し、さらに培養を継続すると、植物体は発根した。発根した植物体は土を入れたポリポットに移植し栽培した。 20

6. ウイルス検定

ドーム状組織を分離培養して得られたニンニクの葉片を検体としてウイルス検定を行った。ウイルス検定はウイルスの遺伝子配列の一部をプライマーとするRT-PCRによって行った。

葉片からRNAを抽出し、cDNA合成キットを用いてcDNA合成を行った。このcDNAをテンプレートとし、ウイルス検出用プライマーを用いてPCRを行った。このプライマーはニンニクに感染するウイルス遺伝子の塩基配列をもとにし、ウイルスに特異的な増幅産物が得られるよう設計したものである。garlic viruses (GarVs)、leek yellow stripe virus (LYSV)、onion yellow dwarf virus (OYDV) 及びgarlic latent virus (GLV) の4種類のウイルスについてそれぞれ特異的なプライマーを設計し、PCR反応を行った。PCR反応後、特異的な増幅産物の有無をアガロースゲル電気泳動で調べ、ウイルスの有無を判定した。 30
その結果、福地ホワイト種、北海道在来種のいずれにおいても、ドーム状組織を分離培養して得られた植物からは、ウイルスの存在を示す増幅産物は確認されなかった。材料のニンニク、およびドーム状組織を分離することなく培養を継続して得られた植物では、ウイルスの存在を示す増幅産物が確認された。すなわち普通葉基部の培養で形成されるドーム状組織を分離培養することによって、ウイルスフリーニンニクが得られることが確認された。

なお、ウイルスの検出に使用したプライマーは次の通りであった。

表 1
プライマーの配列と増幅される領域

ウイルス	プライマーの配列		増幅している領域
GarV-A, B, C, D (common)	N-RT1 : 5'-CCTGCTAAGCTATATGCTCA-3'	(配列番号 : 1)	3'-terminal ORF
	N-RT2 : 5'-GTAAGTTTAGCCATATCAAC-3'	(配列番号 : 2)	3' non-coding
LYSV	7-RT3 : 5'-AAGAGTCAACACTTGCTTG-3'	(配列番号 : 3)	3' non-coding
	7-RT4 : 5'-GGTCTCAATCCTAGCTAGTC-3'	(配列番号 : 4)	3' non-coding
OYDV garlic-type	OGP1 : 5'-GAAGCGCACATGCCAAATCAAG-3'	(配列番号 : 5)	CP gene
	OGM1 : 5'-CCCCACAAC TAGTGGTACAC-3'	(配列番号 : 6)	3' non-coding
GLV/SLV	SLP1 : 5'-TATGCTCGAGCTCGTAGACC-3'	(配列番号 : 7)	3'-terminal ORF
	HRT2 : 5'-GGGTTTCACATTGTTACACC-3'	(配列番号 : 8)	3'-terminal ORF
GCLV	GCP1 : 5'-AATGGCTGTTCTAGCAGTGC-3'	(配列番号 : 9)	3'-terminal ORF
	GCM1 : 5'-TTAAACCTTAGTCAAGCTATTC-3'	(配列番号 : 10)	3' non-coding
Alliinase	C-AL5' : 5'-TCTGCTAGTCCGATTTCGCTGCGCCG-3'	(配列番号 : 11)	
	NC3'-1 : 5'-ACCATAGCATTAGCATGTATG-3'	(配列番号 : 12)	

また、ウイルス検定の結果を次に示す。

10

20

30

表 2

各植物のウイルス検定の結果

植 物	ウイルス			
	GarVs	LYSV	OYDV	GLV
福地ホワイト種（ウイルス1種）				
（1）親植物	—	+	—	—
（2）ドーム状組織を分離することなく再生した植物	—	+	—	—
（3）ドーム状組織を分離して再生した植物（合計11本）	—	—	—	—
福地ホワイト種（ウイルス2種）				
（1）親植物	—	+	+	—
（2）ドーム状組織を分離することなく再生した植物	—	+	+	—
（3）ドーム状組織を分離して再生した植物（合計5本）	—	—	—	—
北海道在来種				
（1）親植物	+	+	+	+
（2）ドーム状組織を分離することなく再生した植物	+	+	+	+
（3）ドーム状組織を分離して再生した植物（合計6本）	—	—	—	—

10

20

30

産業上の利用可能性

本発明によるウイルスフリー作出培養法によれば、茎頂培養に比較して大量のウイルスフリー植物が得られる。従来の茎頂培養法によれば、茎頂が1鱗片に1個もしくは数個しかなく、さらに1個の茎頂から1個体の植物体しか得られないことが一般的であることから、大量にウイルスフリー植物を得ることが困難であった。それに対し、普通葉基部の培養法では1鱗片の培養で複数個、ニンニクの場合は1鱗片から20～30のドーム状組織が得られる。従ってウイルスフリー植物の大量増殖が容易になる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 >	Wakunaga Seiyaku Kabushiki Kaisha	
< 1 2 0 >	Process for production of virus-free plants	
< 1 3 0 >	9 9 3 7 3 0	
< 1 6 0 >	1 2	
< 2 1 0 >	1	10
< 2 1 1 >	2 0	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	20
< 4 0 0 >	1	
ccigctaagc	tatatgctga	20
< 2 1 0 >	2	
< 2 1 1 >	2 0	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		30
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	
< 4 0 0 >	2	
gtaagtttag	cgatatcaac	20
< 2 1 0 >	3	

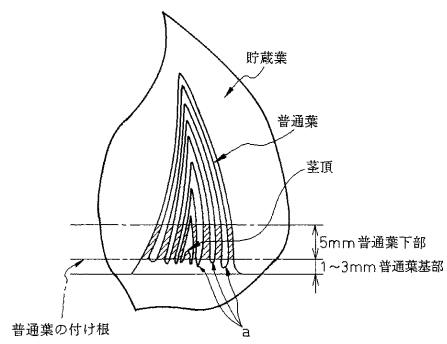
< 2 1 1 >	2 0	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	
< 4 0 0 >	3	10
aagagtc	aac acttgggttg	20
< 2 1 0 >	4	
< 2 1 1 >	2 0	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		20
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	
< 4 0 0 >	4	
ggtctcaatc	ctagctagtc	20
< 2 1 0 >	5	
< 2 1 1 >	2 1	30
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	

< 4 0 0 >	5	
gaagcgcaca tgcaaatgaa g		21
< 2 1 0 >	6	
< 2 1 1 >	2 0	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		10
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	
< 4 0 0 >	6	
cgccacaact agtggtagac		20
< 2 1 0 >	7	
< 2 1 1 >	2 0	20
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	
< 4 0 0 >	7	30
taigctcgag ctcgtagagc		20
< 2 1 0 >	8	
< 2 1 1 >	2 0	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		

< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	
< 4 0 0 >	8	
gggtttcaca ttgttacacc		20
< 2 1 0 >	9	
< 2 1 1 >	2 0	10
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	
< 4 0 0 >	9	20
aatgggtggt ctaggagtgc		20
< 2 1 0 >	1 0	
< 2 1 1 >	2 2	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		
< 2 2 1 >		30
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	Primer	
< 4 0 0 >	1 0	
itaaacctta gtcaagctat tc		22
< 2 1 0 >	1 1	
< 2 1 1 >	2 4	

< 2 1 2 >	DNA		
< 2 1 3 >	Artificial Sequence		
< 2 2 0 >			
< 2 2 1 >			
< 2 2 2 >			
< 2 2 3 >	Primer		
< 4 0 0 >	1 1		
tctggtatgc gatttgggtg ggcg		24	10
< 2 1 0 >	1 2		
< 2 1 1 >	2 1		
< 2 1 2 >	DNA		
< 2 1 3 >	Artificial Sequence		
< 2 2 0 >			
< 2 2 1 >			
< 2 2 2 >			20
< 2 2 3 >	Primer		
< 4 0 0 >	1 2		
accatagcat taggatgtat g		21	

【図 1】 Fig.1



フロントページの続き

- (72)発明者 綾部 昌則
広島県高田郡甲田町下甲立1 6 2 4 湧永製薬株式会社内
(72)発明者 角 慎一郎
広島県高田郡甲田町下甲立1 6 2 4 湧永製薬株式会社内

審査官 内藤 伸一

- (56)参考文献 特開平0 6－0 9 8 6 5 0 (J P, A)
特開平0 6－1 9 7 6 5 0 (J P, A)
特開平0 2－2 0 0 1 3 1 (J P, A)
Plant Cell Rep.,(1998), 17, p.773-779

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A01H 4/00
C12N 5/00
BIOSIS(DIALOG)
JICSTファイル(JOIS)
PubMed