

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660019

研究課題名(和文) ビタミンCおよび凍結保存処理を併用した新たなウイルスフリー化技術の開発

研究課題名(英文) Analyses of virus elimination from asparagus seedlings by ascorbic acid and slow-freezing treatments

研究代表者

鈴木 卓 (SUZUKI, TAKASHI)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30196836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：国内のアスパラガスにはウイルスが重複感染しており、収量低下との因果関係が示唆されている。安定したアスパラガス生産のためにウイルスフリー株の導入が必要であると考え、抗ウイルス効果があると期待されているアスコルビン酸および凍結保存処理を利用して、ウイルスが感染しているアスパラガス実生からのウイルス除去について検討した。どちらの処理においても、ウイルス除去効果が認められたが、除去率は感染ウイルスの種類や用いたアスパラガスの系統によって異なっていた。また、凍結処理によってウイルスが除去された実生では、生育促進効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Asparagus virus 1 (AV-1) and Asparagus virus 2 (AV-2) have been considered as major pathogenic viruses that cause the reduction of productivity of asparagus. To prepare the virus-free asparagus in vitro culture for field production, we here tried to establish a new approach for virus elimination from asparagus by using ascorbic acid treatment and slow-freezing cryotherapy. Virus elimination was observed in seedlings treated by either ascorbic acid or slow-freezing, but there were differences in elimination rate among asparagus cultivars. In addition, enhanced growth of asparagus seedling after slow-freezing treatment was observed in some tested plants. AV-2 was more difficult to be eliminated from seedlings than AV-1, probably due to systemic infection by AV-2 in asparagus. Additional immunohistochemical analysis confirmed that AV-2 was localized in the leaf primordia and vascular tissue around shoot meristem of asparagus seedlings.

研究分野：園芸学

キーワード：アスパラガス ウイルスフリー化 アスコルビン酸 凍結処理

1. 研究開始当初の背景

アスパラガスに感染する主要ウイルスには、*Asparagus virus 1* (AV1)および*Asparagus virus 2* (AV2)があり、海外では、これらのウイルス感染とアスパラガスの収量低下との因果関係が示唆されている。これまでの研究において、国内で生産されているアスパラガスのウイルス感染状況を調べたところ、ほぼ100%でAV1とAV2の感染が検出された。このことから、国内でもウイルス感染が原因でアスパラガスに減収が起きている可能性は高いと考えられる。AV1はアブラムシで伝搬されるため、感染株が圃場内にある場合、その感染拡大は容易に起こる。また、AV2は種子伝染性であるため、感染種子の流通が国内でのAV2蔓延の原因であることが考えられる。また、どちらのウイルスも汁液伝染するため、感染若茎を収穫した同一機具を用いることによって圃場内で容易にウイルス感染が拡大する。AV2のような種子伝染性ウイルスは、ウイルスフリー化に一般的に利用される茎頂培養や高温処理を用いても除去が難しいと考えられ、実際に海外から輸入されるAV2フリーとされる種子にもAV2の感染が検出されている。ウイルスフリー株の実用的な利用には、ウイルス感染を厳密に精査する診断技術と効率的なウイルスフリー化方法が必須である。これまでに我々は、RT-PCRなどを用いてAV1およびAV2の感染を厳密に診断する方法の確立を検討してきた。一方、アスパラガスは茎頂や側芽の組織培養によって植物体を増殖することが可能であるが、ウイルス除去を目的とした茎頂培養では、アスパラガスからのウイルス除去率は低く、ウイルス感染によって培養物の生存率が低下することも報告されている。このことから、アスパラガスのウイルスフリー化にはこれまでの茎頂培養を発展させた新しい工夫が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

安定したアスパラガス生産のためにはウイルスフリー株の導入が必要であり、ウイルスフリー化によってアスパラガスの生産性が向上することも期待できる。しかし、日本においてウイルスフリー化したアスパラガス苗の実例はなく、欧米ではウイルスフリー化が試みられているがその効率は低い。植物内在性アスコルビン酸(ビタミンC)は、RNAサイレンシングによるウイルス抵抗性を促進することが分かっている。また、凍結保存処理にもウイルス除去効果が報告されているが、それぞれアスパラガスで適用した研究例はない。そこで本研究では、ビタミンC処理および凍結保存処理を利用したウイルスフリー化を検討し、ウイルスフリーアスパラガス苗生産へ応用する基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ビタミンC処理実験

北大研究圃場で栽培されているアスパラガスおよび市販アスパラガスの若茎を材料として、側芽の茎頂培養によってアスパラガス培養物を得た。培養物はRT-PCRおよびnested PCRによって、AV1およびAV2の感染を確認した。ウイルスの重複感染が確認された培養物を以後の実験に使用した。十分にシュートが成長したアスパラガス培養物から、節部切片(約5mm)を切りだし、ビタミンCを添加した培地に置床し培養した。添加方法の検討として、ビタミンCを培地全体に攪拌した場合と、表面に塗布した場合の2通りの処理を行った。ビタミンCの処理濃度は、0、200、500、1000、1500 ppmとした。添加ビタミンCには、ビタミンC誘導体であるアスコルビン酸-2-グルコシド(AsG)と、アスコルビン酸硫酸エステル二ナトリウム・2H₂O(AsSNa)を使用した。1処理区あたり5切片を置床し、60日間の培養の後、成長したシュートから核酸抽出を行いウイルス感染の有無を調べた。

(2) 凍結保存処理実験

ビタミンC処理実験と同様に、AV1およびAV2の重複感染が確認された培養物を材料に使用した。十分にシュートが成長したアスパラガス培養物から、節部切片を2、5または8mmで切り出した。それぞれを12%ジメチルスルホキシド(DMSO)×0.2Mグルコースを添加)を充填したストロー管に入れた後に両端を封じた。切片を封入したストロー管は0に冷却した緩速冷却凍結機に並べ、0.5 /分の速度で-40℃まで冷却させた。その後ストロー管を取り出し、ただちに液体窒素に入れて切片をストロー管ごと完全に凍結させた。融解処理は38℃の温水を用いてクリーンベンチ内で行った。融解処理したストロー管は先端を切り落とし、取り出した切片を基本培地に置床して培養を行った。凍結処理を行わない無凍結区には5mmの節部切片を使用した。培地置床から60日後、成長したシュートから核酸を抽出しウイルス感染の有無を調べた。また、各処理区の生存サンプルについて最大シュート長およびシュート本数を測定し、平均値を各処理区の数値とした。

(3) AV-2の免疫組織染色実験

ビタミンC処理実験を行った培養物のうち、AV2が検出されたもの(ビタミンC無添加区)と検出されなかった培養物を用いて、AV2の免疫組織染色を行った。先端部分および節部部分を約1cmの大きさに培養物から切り出し、その切片をFAAで固定した。脱水後パラフィンに包埋し、ロータリーマイクロトームを用いて12-14μmに薄切した後、AV-2の外皮タンパク質(CP)を抗原として作成した抗体およびアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ抗体を反応させ、Vector blueで染色を行った。光学顕微鏡下で観察を行った。

4. 研究成果

(1) 若茎の側芽を材料にして、成長点組織を0.2~0.5 mmで切り出すことによって得られた培養物のウイルス検定を行ったところ、AV1は検出されない場合がわずかにみられたが、AV2はすべての培養物で検出された。このことから、通常の茎頂培養では、ウイルスフリー化個体を得る効率は非常に低く、また、AV-2の方がAV-1より除去が困難であると考えられた。そこで、ビタミンC処理実験によりウイルス除去を検討した。AV1はビタミンC無添加で培養した試験区でもウイルスが検出されない系統があったが、ビタミンCを処理した試験区のほうが多くの個体でAV1感染が検出されなかった(表1)。AV1に対する除去率(ウイルス除去個体数/検定個体数×100)は、平均46.7%であった。一方、AV2では、全ての系統においてビタミンC無添加区では感染が検出されていたが、供試した系統のうちほとんどのビタミンC処理区において、ウイルスの除去効果が認められた(表1)。AV2に対する除去率は平均27.5%であり、AV1よりもAV2のほうが除去効果が低い結果となった。

表1. ビタミンC処理によるアスパラガス培養物からのウイルス除去効果

	(ppm)	AV1 感染率 (%)				
		系統1	系統2	系統3	系統4	市販品
AsG	200	50	75	80	25	100
	500	25	100	0	25	100
	1000	10	60	20	25	100
	1500	0	40	40	50	100
AsSNa	200	40	55.6	25	30	100
	500	28.6	71.4	0	33.3	100
	1000	22.2	83.3	20	11.1	100
	1500	57.2	62.5	33.3	25	100
無添加区		71.4	100	0	100	100

	(ppm)	AV2 感染率 (%)				
		系統1	系統2	系統3	系統4	市販品
AsG	200	100	100	100	100	25
	500	62.5	100	100	62.5	50
	1000	60	100	60	12.5	71.4
	1500	100	100	60	62.5	50
AsSNa	200	100	100	75	30	37.5
	500	100	100	100	44.4	62.5
	1000	88.9	100	80	66.7	57.1
	1500	71.4	100	100	50	62.5
無添加区		100	100	100	100	100

また、1500 ppmまでのビタミンC処理濃度では、植物体の生育への悪影響は観察されなかった。今回の試験では、ウイルス除去効果以外で、ビタミンC添加による植物体生育への影響はみられなかった。ウイルス除去効果が得られた系統では、今回用いたビタミンC誘導体の種類や濃度の影響に一定の傾向はみられなかった。また、AV1およびAV2のいずれにおいても、茎頂培養のみの場合と比べて高いウイルス除去効果が得られたが、ウイルス除去率は系統ごとに違いがみられ、ウイルスが除去されやすい系統や、全くウイルス

が除去できなかった系統がみられた。ビタミンC処理によって除去が可能なウイルス濃度の上限が存在すると思われるが、今回使用した系統ごとにウイルス感染濃度やRNAサイレンシングの強度が異なる可能性もあり、このためにビタミンC処理によるウイルス除去効果にも違いが生じたものと考えられる。

(2) 凍結保存処理は、本来は植物体の長期保存を目的として行われるが、バナナやブドウにおいて、凍結処理によってウイルスが除去された例がある。また、凍結処理を行って再生させた植物体が無処理のものに比べて生育が促進されることも報告されていることから、凍結保存処理はウイルス除去に加えて生育促進も期待できる有用な方法であると考えられる。今回、AV1およびAV2に重複感染したアスパラガス培養物を用いて凍結処理を行った結果、無処理区ではすべての培養物でウイルスが検出されたが、凍結処理区ではウイルスが検出されない培養物が確認され、AV1の平均除去率は69.6%、AV2の平均除去率は41.3%であった(表2)。

表2. 凍結保存処理によるアスパラガス培養物からのウイルス除去

	ウイルス感染率 (%)							
	系統1		系統2		系統3		市販品	
	AV1	AV2	AV1	AV2	AV1	AV2	AV1	AV2
凍結処理区	0	40	0	100	25	0	100	67
無処理区	100	100	100	100	100	100	100	100

AV2の除去率はAV1と比べて低く、ビタミンC処理実験の結果と一致していた。また、ビタミンC処理実験と同様に、系統ごとの除去率には違いがみられた。高い除去効果が確認できた系統に関しては、処理に用いた切片のサイズに関わらず、どの処理区においても高い除去効果が得られた。詳細な最適条件については今後さらなる調査が必要であるが、8 mmの切片を用いてもウイルス除去効果が得られたことから、ウイルスの除去は切片のサイズに依存しないことが示唆された。茎頂培養のように切片を小さく切り出すことは精密な技術が必要であり労力を要する作業である。切片サイズが大きくてもウイルス除去効果がある凍結処理法は労力を軽減して高いウイルス除去率を得られる可能性があり、効率よくウイルスフリー植物体を生産できる方法であると考えられる。また、無凍結区よりも凍結処理区のほうが、植物体のシュート長やシュート本数が増加していたことから(表3)凍結処理によって培養物の生育を促進できる効果が認められた。この生育促進効果は、ウイルス(特にAV2)を除去できなかった培養物では認められなかった。AV2はアスパラガスに感染しても通常は無病徴であるが、高濃度で感染すると減収や植物体の

生育を阻害することが知られている。生育促進効果が低かった系統では AV2 の感染濃度が高く、処理後も残存した AV2 によって培養物の生育が阻害されたのではないかと推察される。

表3. 凍結保存処理がアスパラガス培養物の生育に及ぼす影響

	系統1		系統2		系統3		市販品	
	シュート数(本)	シュート長(cm)	シュート数(本)	シュート長(cm)	シュート数(本)	シュート長(cm)	シュート数(本)	シュート長(cm)
凍結処理区	5.5	4.33	12.3	2.93	3.5	2.66	5.0	4.27
無処理区	1.4	1.90	15.4	2.88	2.3	1.63	6.8	1.88

(3) AV2 について免疫組織染色を行ったところ、AV2 が感染しているサンプルでは葉原基および維管束系において発色がみられ、AV2 は節部組織、成長点および成長点近傍から生じた葉原基にも局在することが分かった。このことから、AV2 は成長点組織のかなり深部まで侵入できると考えられ、ビタミン C や凍結保存処理による AV2 の除去率が AV1 よりも低いのはこの局在性も要因の一つではないかと考えられる。AV1 の局在について今回は調査を行わなかったが、AV2 よりも除去率が高かったことを考えると、AV1 は AV2 ほど成長点組織まで侵入していないのではないかと考えられる。

(4) 凍結保存とビタミン C の併用効果について検討するため、凍結処理後の組織をビタミン C 誘導体添加培地で培養した結果、再生個体は得られなかった。凍結処理した組織・細胞からの植物体再生に、ビタミン C 誘導体が悪影響を及ぼしたものと考えられる。両処理の併用効果を得るには、ビタミン C 誘導体をさらに低濃度で使用するか、凍結処理後に通常の培地で個体再生を促した後、改めてビタミン C 誘導体添加培地に移植するなどの方策を講じる必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

松尾典之・志村華子・鈴木卓 (2013) ビタミンCおよび緩速凍結処理を利用したアスパラガスのウイルス除去, 園芸学研究, 12(別2):186. (査読無)

〔学会発表〕(計 1 件)

N. Matsuo, H. Shimura and T. Suzuki (2013) Virus elimination from asparagus seedlings by ascorbic acid and slow-freezing treatments, XIIIth International Asparagus Symposium (International Society for Horticultural Science) (Nanchang, China)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 卓 (SUZUKI, Takashi)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：30196836

(2) 研究分担者

志村 華子 (SHIMURA, Hanako)

北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：20507230

(3) 連携研究者

()

研究者番号：