

丹波ヤマノイモ栽培におけるウイルスフリー利用による増収効果と ヤマノイモモザイクウイルス罹病個体の実用的な判別法

岡本毅^{*1,3)}・鈴木裕志²⁾・梅崎輝尚³⁾・長屋祐一³⁾・谷山鉄郎³⁾

(¹⁾丸種(株)・²⁾十勝農協連・³⁾三重大学)

要旨: 丹波ヤマノイモ栽培におけるウイルスフリー利用による増収効果を多収品種の新丹丸を供試した圃場試験において検討した。栽培試験は1998年から2000年までの3年にわたり実施した。茎頂培養により作出したウイルスフリー個体の収穫イモ重はヤマノイモモザイクウイルス罹病個体のそれより有意に大きく、ウイルスフリー利用による増収効果は1998年が27%、1999年が17%、2000年が23%であった。ヤマノイモモザイクウイルスに罹病すると葉にモザイクを生じたほか、葉の変形や小型化、萌芽や生育の遅延といった特有の病徴を呈したことから、罹病個体が外観で容易に判別できた。外部病徴の有無から罹病個体を判別する方法は、その結果が血清反応によるウイルス検定の結果とよく一致し、有効性が高かった。同法は簡便で低コストなため、大量個体の検定が必要なウイルスフリー種イモの生産において実用性が高いと認められた。

キーワード: ウイルスフリー、収量、多収品種、病害、ヤマノイモ属、ヤマノイモモザイクウイルス。

青森県・石川県・兵庫県・三重県のツクネイモ栽培や埼玉県のイチョイモ栽培においてヤマノイモモザイク病の多発状況が報告されている(藤田 1986, 福嶋ら 1995, 平野ら 1991, 神納ら 1973, 小林 1991, 吉秋ら 1995)。著者らが京都府亀岡市と八木町の生産圃場で1992年から1996年にかけて観察した丹波ヤマノイモ (*Dioscorea opposita* Thunb.) もほとんどの個体がモザイクを呈しており、ヤマノイモモザイク病に罹病しているとみられた。ヤマノイモモザイク病はヤマノイモモザイクウイルス (Japanese yam mosaic virus) の感染により起こるが、丹波ヤマノイモ栽培では種イモによる栄養繁殖が繰り返されるため、ヤマノイモモザイクウイルスが蔓延した状態であると推定され、ヤマノイモモザイク病による生産性の低下が懸念される。ヤマノイモ類におけるウイルス病による減収あるいはウイルスフリー化による増収事例の報告は多い(平井ら 1986, 渡辺ら 1994, 吉秋ら 1995, 油本・谷口 1984)。丹波ヤマノイモにおいてもウイルスフリー化を利用した生産性の向上が期待できるが、実際の生産現場でその効果を正確に把握した事例はまだ少ない。そこで、丹波ヤマノイモ栽培の生産性向上を目的とし、ヤマノイモモザイク病による生産力低下の問題を解決するために、齊一な多収品種を供試し、実際栽培に準じた条件下で実施した圃場試験においてウイルスフリー化した丹波ヤマノイモの生産性がどの程度向上するかを調査した。

ところでウイルスフリー化した個体は再罹病を防止するために隔離網室内で栽培しているが、実際には再罹病がしばしば起こる。再罹病の有無を確認するために、手順が煩雑で高コストな血清反応によるウイルス検定を全個体に対して実施することは実用的ではない。ウイルスフリー種イモの実用化には生産コストが経済的に見合うことが必要である。そこで、血清反応によるウイルス検定にかわる簡便

で低コストな方法としてヤマノイモモザイクウイルスに罹病すると現れる特有の病徴から罹病を判別する方法の有効性をあわせて検討した。

材料と方法

1. ウイルスフリー化が収量形質に及ぼす影響

(1) ウイルスフリー個体の作出

北海道帯広市の十勝農業協同組合連合会農産化学研究所で実施した。供試品種は肥大能力に優れた多収品種の新丹丸(岡本ら 1999, 2000)を用いた。ウイルスフリー個体は茎頂培養により作出した。手順は次の通りである。

1) **培養材料:** 温室内で栽培した新丹丸の伸長した子づるの先端から切り出した約1 cmの茎頂をガーゼに包み、70%エタノールに数秒浸漬したのち水洗し、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素0.5%)に10分間浸漬後滅菌水で3回洗浄した。実体顕微鏡下で茎頂から直径0.2~0.3 mmの生長点を含む近傍組織を摘出した。

2) **初代培養:** 培地は基本組成を2分の1濃度のLinsmaier-Skoog (LS) とした。ナフタレン酢酸 (NAA) 0.01 mgL⁻¹ とベンジルアミノプリン (BAP) 0.1 mgL⁻¹、ショ糖 30 gL⁻¹ を添加し、pH を 5.8 に調整した後、寒天(和光純薬社製、一級) 7 gL⁻¹ を加えて 105°C・5 分で試薬類を溶解した。直径 25 mm の培養試験管に培地を 10 mL ずつ分注し、ポリプロピレン製キャップを被せ、オートクレーブで滅菌 (121°C, 20 分) した。クリーンベンチ内で摘出組織を試験管内の培地に置床した後、25 ± 2°C・16 時間明期 (4000 Lx) に設定した恒温室内で培養を行った。

3) **次代培養:** 培養開始から約 60 日後に茎葉が再分化した 4~5 節の植物体に生長するので、それを腋芽を含む節ごとに分割し、容量 500 mL の培養瓶(柏洋硝子社製、

M 450 型) 内の培地に移植した。培地は基本組成を LS とし、寒天 7 gL^{-1} とショ糖 20 gL^{-1} を添加し、pH を 5.8 に調整した。植物ホルモン類は添加しなかった。培養瓶に培地を 50 mL ずつ分注し、ポリカーボネイト製キャップを被せた。通気のためにキャップの中心に直径 5 mm の穴をあけ、メンブレンフィルター (ミリポア社製, ミリシール) を貼付した。その他の方法は初代培養と同一とした。

4) ウイルス検定: 分割切片は移植後約 30 日で再度 4~5 節の植物体に生長するので、任意の 1 個体を後述するウエスタンブロット法-酵素抗体染色法によるウイルス検定に供し、ウイルスフリー化したことを確認した。

5) 分節増殖: 残る個体を利用し、植物ホルモン類を添加しないショ糖 30 gL^{-1} の Murashige-Skoog (MS) 培地で約 1 カ月サイクルの腋芽培養による増殖を繰り返した。その他の方法は次代培養と同一とした。

6) 培養苗馴化: *in vitro* の再生個体をパーミキュライトを詰めた容量 90 mL のポリプロピレン製育苗鉢に移植し、移植直後は植物体を透明なプラスチック製のケース (イチゴパック) で覆い、さらに寒冷紗で 70% 遮光した。その後、ケースを少しずつ開けながら 2 週間かけて徐々に乾燥条件に馴らした。ケース除去時に、液肥 (窒素 5%, リン酸 10%, カリ 5%) を 500 倍に希釈して育苗鉢当たり 20 mL ずつ与えた。

7) ミニチューバー養成: 2 週間かけて馴化した培養苗を培養土 30 L を詰めた発泡スチロール製の箱 (縦 52 cm, 横 32 cm, 高さ 30 cm) に 10 個体ずつ均等に定植し、以後温室内で栽培した。1 箱当たり 22.5 g の粒状高度化成肥料 (窒素 10%, リン酸 20%, カリ 10%) を定植時と定植 45 日後の 2 回に分けて半量ずつ施用した。およそ 6 カ月後にウイルスフリー化した約 9 g のイモ (ミニチューバー) を収穫した。

(2) 栽培条件

主要産地の京都府亀岡市 (以下亀岡と記す) に平均的な収量実績を残す営利圃場 (前作は水稻) を選定し、1998 年から 2000 年までの 3 カ年にわたり試験を実施した。ウイルスフリー区と罹病区 (対照) を設け、ウイルスフリー区の種イモには上記の方法で作出し、大阪府高槻市の丸種株式会社高槻研究農場 (以下高槻と記す) 内の開口部をカンレイシャで覆った隔離網室で増殖・維持した個体を用いた。対照となる罹病区の種イモには各年ともその前年の栽培でモザイクを呈し、ヤマノイモモザイク病の罹病を確認した個体を用いた。各区とも 8 分割して 40 g に切り分け、切断面に殺菌剤を粉衣した切片を植え付けた。栽植様式は畦幅 120 cm, 株間 30 cm とし、高さ 120 cm のキュウリネットに茎葉を誘引した。栽植密度は 10 a 当たり 2778 株とした。定植は 1998 年が 4 月 22 日, 1999 年が 4 月 16 日, 2000 年が 4 月 17 日に行った。収穫は 1998 年が 11 月 5 日, 1999 年が 11 月 2 日, 2000 年が 10 月 30 日に行った。施肥成分量は窒素が 10 a 当たり 80 kg, リン酸とカリ

が各々同 70 kg とした。肥料は 1998 年が 5 月 22 日・7 月 8 日・8 月 9 日, 1999 年が 5 月 22 日・7 月 9 日・8 月 9 日, 2000 年が 4 月 27 日・7 月 7 日・8 月 8 日の 3 回に分けて施用した。その他の栽培条件は当地の慣行法に概ね準じた。

供試個体数は 1 試験区につき 1998 年が 60 個体 (10 個体, 6 反復), 1999 年が 80 個体 (10 個体, 8 反復), 2000 年が 30 個体 (10 個体, 3 反復) とし、収穫後に収穫イモの 1 個生体重 (以下収穫イモ重と記す) と形状を調査した。形状評点は亀岡市永田商店による実際の出荷規格における等級に準じて区分した特秀品を 5, 秀品を 4, 優品を 3, 良品を 2, 外品を 1 とした。形状は外形がより球形に近く、表面の凹凸が少ないものほど優れており評点が高い。形状の優れたイモほど価格も高い。

2. ウイルスフリー化に伴う形態と生態の変化

新丹丸を供試して 1998 年に高槻で試験を実施した。栽培は隔離網室内で行い、銀黒マルチと灌水チューブを使用した。前述の収量試験と同様な種イモを用いて、ウイルスフリー区と罹病区 (対照) を設けた。栽植様式は畦幅 180 cm, 株間 30 cm の 2 条植え (条間 60 cm) とし、園芸用支柱を株ごとに立て高さ 120 cm に茎葉を誘引した。栽植密度は 10 a 当たり約 3700 株とした。定植は 1998 年 4 月 28 日, 収穫は 1998 年 11 月 20 日に行った。施肥成分量は窒素が 10 a 当たり 40 kg, リン酸とカリが各々同 35 kg とし、1998 年 5 月 6 日・7 月 2 日・8 月 1 日の 3 回に分けて施用した。

供試個体数は 1 試験区につき 30 個体 (10 個体, 3 反復) とした。調査項目の葉面積, 葉身長, 葉身幅, 葉柄長は 1 反復当たり 100 葉について測定し, 茎長, 萌芽日, 第 1 本葉展開日は全個体について調査した。葉緑素含量は葉緑素計 (ミノルタ社製, SPAD-502 型) を用いて 1 葉につき 10 カ所, 1 反復当たり 30 葉について測定した。

3. ヤマノイモモザイク病の外部病徴と血清反応によるウイルス検定の関係

(1) 栽培条件

1997 年から 1999 年までの 3 カ年にわたり高槻で試験を実施した。各年とも種イモには前年にウイルスフリーと確認した個体を用い, 隔離網室内で栽培を行った。種イモ重は 40 g とした。

1997 年は 312 個体, 1998 年は 990 個体, 1999 年は 872 個体を供試した。外部病徴は各年とも全個体について調査した。罹病個体の発生がみられた 1997 年と 1998 年について, 1997 年が 120 個体, 1998 年が 240 個体を血清反応によるウイルス検定に供した。罹病個体の発生がなかった 1999 年は外部病徴のみを調査した。

(2) 血清反応によるウイルス検定

血清反応による検定にはウエスタンブロット法-酵素抗体染色法を用いた。血清反応には弘前大学より分譲を受け

第1表 ユイルスフリー化が丹波ヤマノイモの収量形質に及ぼす影響。

YMV	収量 kg 10a ⁻¹			収穫イモ重 g/個体			増殖率 倍			形状評点		
	1998年	1999年	2000年	1998年	1999年	2000年	1998年	1999年	2000年	1998年	1999年	2000年
VF	1356	1259	1537	488	453	553	12.2	11.3	13.8	3.7	2.8	2.5
V	1066	1079	1251	384	388	450	9.6	9.7	11.3	3.5	3.2	2.8
有意性	**	*	*	**	*	*	*	*	*			

YMV: ヤマノイモモザイクウイルス, VF: ユイルスフリー, V: 罹病. 収穫イモ重: 収穫イモの1個生体重. 増殖率: 種イモに対する収穫イモの重量倍率. 形状評点: 出荷規格の等級を評点化(特秀: 5, 秀: 4, 優: 3, 良: 2, 外: 1). **は1%, *は5%水準で処理間にF検定による有意差あり. 試験地: 京都府亀岡市. 品種: 新丹丸. 栽植密度: 2778株/10a (畦幅120×株間30cm). 種イモ重: 40g.

たヤマノイモモザイクウイルスの抗血清を使用した. ユイルス検定に使用する葉は1997年が7月3日・7月9日・7月16日に各40個体, 1998年が6月19日・6月30日・7月9日・7月16日に各60個体の親つるから採取した. 検定手順は次の通りである.

1) 試料調製: 新鮮重0.05~0.1gの葉に試料用緩衝液(トリス6.055g/L, メルカプトエタノール1%, ラウリル硫酸ナトリウム20g/L, pH9.0) 0.5~1.0mLを加えて乳鉢で磨砕し, その粗汁液を100°C・5分間で熱処理後, 6000G・5分間の遠心分離で得られた上清を試料とした.

2) 電気泳動: 試料80μLに20μLのマーカ液(シヨ糖500g/L, プロモフェノールブルー0.1%)を混合し, その10μLを10%濃度のアクリルアミドゲルに供して15mAの定電流で1時間電気泳動を行った. 泳動用緩衝液の組成は1L当たりトリス3.03g, グリシン14.4g, ラウリル硫酸ナトリウム1.0gとした.

3) ウェスタンブロット: 電気泳動後, 切り取ったゲルは定電流(ゲル面積×2mA)で1時間, セミドライ方式でブロッティングを行ないタンパクをポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜に転写した. ブロット用緩衝液の組成は1L当たりトリス3.03g, グリシン14.4g, メタノール200mLとした.

4) 血清反応: 転写を完了したPVDF膜を1000倍に希釈したヤマノイモモザイクウイルス血清とポリ袋中で反応(室温, 30分)させた. 次に, 1000倍希釈の抗ウサギーヤギアルカリフォスファターゼ標識抗体(BIOSORCE社製)とポリ袋中で反応(室温, 30分)させた. 反応完了後, TBST緩衝液で10分間を2回, 0.2Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.2)で1回洗浄した. TBST緩衝液の組成は1L当たりトリス2.422g, 塩化ナトリウム8.766g, アジ化ナトリウム5g, 界面活性剤(ICI社製, Tween20)0.5mLとし, pHは7.6に調整した.

5) 発色反応: 基質液(SIGMA社製, Naphtol AS-MX phosphate)と発色液(SIGMA社製, Fast Red TRsalt)の混合液をPVDF膜に滴下して全面に広げ30分間反応させた後, PVDF膜を停止液中に移して反応を止めた. 停止液の組成は1L当たりエチレンジアミン4酢

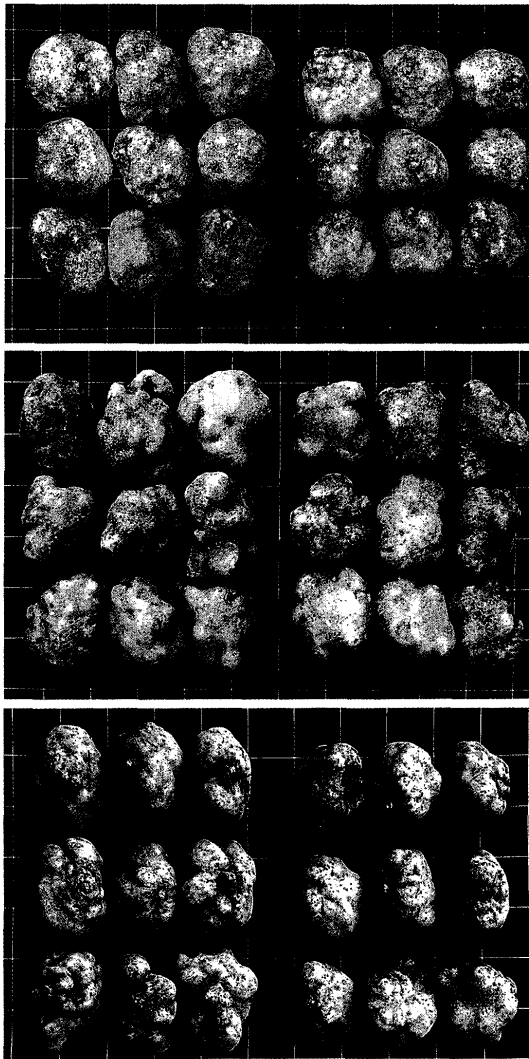
酸2ナトリウム(EDTA2Na)1.861gとトリス1.211gとした. 風乾後, PVDF膜上に現れたユイルスタンパクバンドの有無からユイルス罹病の有無を判定した.

結果と考察

1. ユイルスフリー化が収量形質に及ぼす影響

多収品種の新丹丸を供試して3カ年にわたり亀岡で実施した試験において, ユイルスフリー化が収量形質に及ぼす影響をみた. 1998年, 1999年, 2000年の順に値を記す. 収量はユイルスフリー区が10a当たり1356kg, 1259kg, 1537kgとなり, 罹病区の同1066kg, 1079kg, 1251kgより有意に高かった. 収穫イモ重はユイルスフリー区が488g, 453g, 553gとなり, 罹病区の384g, 388g, 450gより有意に大きかった. 増殖率(収穫イモ重/種イモ重)はユイルスフリー区が12.2倍, 11.3倍, 13.8倍となり, 罹病区の9.6倍, 9.7倍, 11.3倍より有意に高かった. 形状評点はユイルスフリー区が3.7, 2.8, 2.5, 罹病区が3.5, 3.2, 2.8となり, 1998年はユイルスフリー区の方が高く, 1999年と2000年は罹病区の方が高かった(第1表). ユイルスフリー区と罹病区の収穫イモを第1図に示した. 3カ年の収穫イモ重について年次とヤマノイモモザイクウイルス罹病の有無を要因とした二元配置の分散分析を行ったところ, 年次間・罹病の有無ともに1%水準で有意差が認められた(第2表). ユイルスフリー化した個体を種イモに使用した場合の収量増加率は1998年が27%, 1999年が17%, 2000年が23%であった.

ユイルスフリー化が出荷規格の等級別収量割合に及ぼす影響をみたところ, ユイルスフリー区の収量は1998年には罹病区に比べて秀品の割合が高く, 特秀品・優品・良品・外品の割合が低かった. 1999年では逆に秀品の割合が低く, 優品・良品の割合が高かった. 2000年では秀品・良品・外品の割合が高く, 優品の割合が低かった(第3表). 等級毎に価格が異なることから, 罹病区と比べたユイルスフリー区の収益性は1998年と2000年では高く, 1999年では同等と見積もられた. 実際の収益は収量だけではなく収穫イモの形状も加味して決まるため, ユイルスフリー化による収量の増加が収益の増加に一致しない事例も生じた.

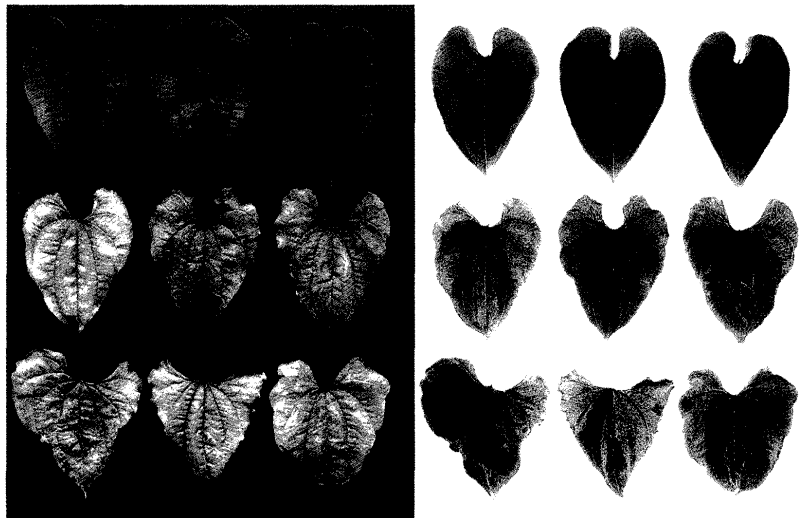


第1図 ウイルスフリー個体と罹病個体の収穫イモの比較。

左：ウイルスフリー個体，右：ヤマノイモモザイクウイルス罹病個体，品種：新丹丸。上図：1998年，中図：1999年，下図：2000年。背景の格子は8cm×8cm。

3カ年を通じてウイルスフリー区の収量が高かった一方で、ウイルスフリー化が形状に及ぼす影響については一致した傾向が認められなかった。吉秋ら(1995)はウイルスフリー化した加賀丸いも(ツクネイモ)が35%、ジネンジョが55%以上増収したと報告している。また、渡辺ら(1994)はヤマノイモモザイクウイルスに罹病した秦荘いも(イチョウイモ)が17%減収したと報告している。一方、平井ら(1986)はヤマノイモえそモザイクウイルス(Chinese yam necrotic mosaic virus)に罹病したナガイモをウイルスフリー化すると22~34%増収したと報告している。ところが、いずれの事例においても収穫イモの形状が悪くなったと報告されており、ウイルスフリー化すると増収するが形状劣化を伴う傾向が一般的とみられた。

以上の通り、丹波ヤマノイモ栽培におけるヤマノイモモザイク病の罹病による生産力の低下が明らかとなり、生産性を向上するためにウイルスフリー種イモを利用する効果



第2図 ヤマノイモモザイク病が丹波ヤマノイモの葉の形態に及ぼす影響。上段：ウイルスフリー葉，中・下段：罹病葉。左：反射光，右：透過光による撮影。試験地：大阪府高槻市，ハウス内で栽培。調査日：1998年8月18日。

第2表 収穫イモ重の二元配置分散分析表 (年次×罹病の有無)。

要因	自由度	平方和	平均平方	分散比
全体	33			
年次	2	28940	14470	5.5 **
罹病の有無	1	62253	62253	23.8 **
誤差	30	78325	2611	

罹病の有無：ヤマノイモモザイク病について。**：1%水準でF検定による有意差あり。

第3表 ウイルスフリー化が丹波ヤマノイモの等級別収量割合に及ぼす影響。

試験年	YMV	等級別収量割合 %				
		特秀	秀	優	良	外
1998年	VF	2.5	67.7	28.2	0	1.6
	V	7.0	49.7	35.1	5.2	3.1
1999年	VF	0	9.0	60.7	30.3	0
	V	0	37.8	44.1	18.1	0
2000年	VF	0	14.9	36.0	43.3	5.7
	V	0	5.1	70.4	22.6	1.9

YMV：ヤマノイモモザイクウイルス，VF：ウイルスフリー，V：罹病。等級は亀岡市永田商店の出荷規格に準じた区分。試験地：京都府亀岡市。品種：新丹丸。

は高いと考えられた。

丹波ヤマノイモ栽培では多収品種を用いた場合や大きな種イモを使った場合、疎植とした場合に収穫イモの肥大は優るが形状が劣った(岡本ら1999, 2000)。また、吉秋ら(1995)は20%減収すると形状の劣化が抑制されたと報告している。いずれの事例においても収穫イモの形状は生育が旺盛となる場合に劣り、ウイルスフリー化に伴い形状が

第4表 ウイルスフリー化に伴う丹波ヤマノイモの葉形態の変化。

YMV	葉緑素含量		葉面積 cm ² /葉	葉身長 mm	葉身幅 mm	葉形比	葉柄長 mm
	濃色部	淡色部					
VF	51.0 a	—	28.4	90.2	59.3	0.66	40.8
V	44.5 b	28.1 c	26.5	85.5	60.1	0.70	44.4
有意性			**	ns	ns	**	ns

YMV：ヤマノイモモザイクウイルス，VF：ウイルスフリー，V：罹病。葉緑素含量：葉緑素計（ミノルタ社製，SPAD-502型）の測定値，親づる第10節前後の葉を調査。葉形比：葉身幅/葉身長。葉緑素含量の同一記号を付記した値間にはダンカンの多重検定による5%水準の有意差がないことを示す。*は1%水準で処理間にF検定による有意差あり，ns：有意差なし。試験地：大阪府高槻市。調査日：1998年8月17日。

第5表 ウイルスフリー化が丹波ヤマノイモの生育初期の生長に及ぼす影響。

YMV	生育日数		茎長 cm				種イモ乾物重 g/個体			
	P-S	P-V1	5.26	5.29	6.1	6.5	4.29	5.31	6.16	7.1
VF	20.8	28.2	24.4	54.0	102.9	145.6	22.4	16.5	4.2	2.6
V	22.6	31.0	12.3	32.2	69.3	115.6	23.7	17.7	10.6	6.0
有意性	*	**	**	**	**	**	ns	ns	**	**

YMV：ヤマノイモモザイクウイルス，VF：ウイルスフリー，V：罹病。P：定植，S：萌芽，V1：第1葉展開。茎長：親づるの地際から先端までの長さ。試験地：大阪府高槻市。供試品種：新丹丸。種イモ重40g。定植日：1998年4月29日。

劣化する原因も生育が旺盛になることと関係が深いと推察された。ウイルスフリー化の効果を生かすためにはウイルスフリー化に伴う特性の変化に応じた栽培法の修正が必要と考えられた。

2. ウイルスフリー化に伴う形態と生態の変化

ウイルスフリー化した個体と罹病個体の形態形質を比較したところ，罹病個体の葉は葉色に濃淡を生じ濃緑色部と淡緑色部が明確に区分されるモザイク状斑紋（以下モザイクと記す）を呈した。葉脈に沿って帯状もしくは不正形の濃緑色部が現れ，残る部分が淡緑色となる葉脈緑帯を病徴として呈する個体も多数みられた。葉形はウイルスフリー個体が左右対称の長心臓形であるのに対して，罹病個体のそれは葉縁が波打ち左右非対称形に変形したものが多く見られ，表面の凹凸が大きかった（第2図）。ウイルスフリー個体の葉は罹病個体のものに比べて葉緑素含量が高く，葉面積が大きく，葉身長に対する葉身幅の比率が小さい葉形であった。葉柄長には差がなかった。罹病個体のモザイク葉の葉緑素含量は淡色部が濃色部より明らかに低く，濃色部の葉緑素含量もウイルスフリー個体の無病葉と比べると低かった（第4表）。罹病に伴うこのような形態の変化は生育初期に展開した葉に強く現れ，茎葉が最も繁茂する8月以降に展開した子づるや孫づるの葉に現れる変化は多くの個体で不明瞭であった。モザイクも葉の変形も同一個体内の全ての葉に様に現れるわけではなかった。高温期にこうした病徴の隠蔽がしばしば起こることはこれまでに

も指摘されている（奥山・坂 1978）。

ウイルスフリー個体は罹病個体に比べて萌芽が約2日早く，第1葉の展開は約3日早かった。親づるの茎長は定植から37日目まで調査したが，ウイルスフリー個体の方が常に長かった。定植から32・48・63日目に調査した種イモの乾物重はウイルスフリー個体の方が小さかった（第5表）。生長の早いウイルスフリー個体では種イモ重の減少が早く，種イモ養分の利用が速やかに進んだことが生長量に差を生じた原因の一つと考えられた。ハウス栽培の黄化開始は露地栽培に比べて10～14日遅かったが，黄化と枯死の程度には差がみられなかった。

山辺・吉秋（1991）はウイルスフリー化した加賀丸芋の葉緑素含量が生育期全般にわたり高く推移し，光合成能力の高く維持されたことが増収した原因と考察した。本研究においてもウイルスフリー個体の親づるの葉は茎葉最繁茂期の葉緑素含量が高く，光合成能力の高かったことが増収した原因と推察された。

3. ヤマノイモモザイク病の外部病徴と血清反応によるウイルス検定の関係

ヤマノイモモザイクウイルスに罹病すると現れるモザイクや葉の変形，萌芽や葉展開の遅延といった特徴的な変化をヤマノイモモザイク病による外部病徴と捉え，ウイルスフリー個体を栽培するとしばしば発生する再罹病個体の外観による判別を試みた。外部病徴が明らかな個体を陽性，紛らわしい個体を擬陽性，症状がみられない個体を陰性と

判定した。外部病徴が陽性と擬陽性の全個体と陰性個体の一部を血清反応によるウイルス検定に供した結果、供試した外部病徴陰性個体の全てが血清反応にも陰性で無病と判定された。外部病徴が陽性の個体は、1997年は全個体が、1998年は34個体中24個体が血清反応に対しても陽性を示した。外部病徴が擬陽性の個体は兩年とも血清反応に陰性を示すものと陽性を示すものとに分かれた(第6表)。モザイクを確認して外部病徴を陽性と判定した個体はその全てが血清反応にも陽性を示した。モザイクが不明瞭であるか、モザイクがみられず葉の変形や縮葉もしくは植物体のわい化のみがみられた個体はその程度に応じて陽性または擬陽性と判定したが、こうした個体の中に血清反応に対して陰性を示すものが混在した。症状の原因がウイルス罹病によらない生理的な障害か突然変異に由来する異常個体が含まれると考えられ、それらとウイルス罹病個体との判別は難しかった。一方、外部病徴に陰性で血清反応に陽性を示した個体は2カ年ともみられず、外部病徴のみに頼る判定でも罹病個体を見逃す危険性は小さいと考えられた。

わが国で栽培されている *D. opposita* が罹病するウイルスは今のところヤマノイモモザイクウイルスとヤマノイモえそモザイクウイルス、ソラマメウルトウイルス(Broad bean wilt virus)の3種が確認されている(油本1998)。ヤマノイモモザイクウイルスはツクネイモとイチヨウイモの他にジネンジョ(*Dioscorea japonica* Thunb.)にも感染し、ヤマノイモえそモザイクウイルスはナガイモのみに自然発病が認められている(遠山1984)。ソラマメウルトウイルスは丹波ヤマノイモで罹病が確認された事例がまだない。本研究では丹波ヤマノイモ栽培で実質的に問題となるウイルスがヤマノイモモザイクウイルスだけで

あると考え、ヤマノイモモザイクウイルスの検定のみを実施した。

種イモにヤマノイモモザイクウイルスを保毒した個体は最初に展開する葉から病徴を明確に現すので、感染源となるこうした罹病個体を速やかに抜き取り感染機会を減少させる作業がウイルスフリー維持のためには欠かせない。生育途中にヤマノイモモザイクウイルスに罹病した場合は、既に展開した葉には病徴が現れないが、新しく展開する葉に病徴が現れることがあるので、生育期間の全般にわたって外部病徴を観察し、罹病個体の抜き取りを実施することが重要である。

血清反応による検定にはウエスタンブロット法—酵素抗体染色法を用いたが、同法による検定手順で最も時間を要する作業は試料調整であった。ヤマノイモの葉が粘質成分を多く含む十分な磨砕のために時間を要した。血清反応を利用する検定法には同法の他に酵素結合抗体法(以下ELISA法と記す)やDIBA法(Dot—immunobinding assay)がある。ELISA法は検定数が一定数より多いとウエスタンブロット法—酵素抗体染色法より迅速性が優るが、最も時間を要する試料調整には同様な手順が必要であるため、本研究の供試数では検定効率に大きな差を生じないと考えられた。またELISA法には専用の機器を必要とする。一方、DIBA法は専用機器を必要とせず手順が簡便である。ELISA法やDIBA法によるウイルス検定にはウエスタンブロット法—酵素抗体染色法より高純度の抗血清を必要とする。本研究で使用したヤマノイモモザイクウイルスの抗血清は純度が高く、ELISA法やDIBA法で使用可能な品質を有していたので、今後特別な機器を必要としない利点を有するDIBA法の利用を検討したい。

ヤマノイモモザイク病罹病の有無は特有の病徴から外観で容易に判別できた。外部病徴でウイルスフリーと判定された個体は血清反応にも全個体が陰性を示し、外部病徴による罹病判別の精度は血清反応による検定と同等といえた。なお、1999年に外部病徴でウイルスフリーと判定した個体を種イモに用いて2000年に栽培した915株に罹病個体の発生はなかった。

ウイルスフリー利用に効果が認められたとしても、現状では高コストがその実用化に際する障壁となっている。ウイルスフリー種イモの生産過程において検定個体数が大量となる原種から販売用までのウイルス検定には外部病徴判別法を適用し、高コストの血清反応法による検定は確実性が優先する原々種生産に使用を限定すれば、ウイルス検定コストの大幅な低減が見込まれる。疑わしい症状がわずかでもみられた個体を抜き取ることを原則とするならば外部病徴判別法は実用的であり、ウイルスフリー種イモの実用化に貢献する技術と期待できる。

謝辞：栽培試験遂行にあたり多大なる御助力を頂いた京都府亀岡市永田正史・永田春代両氏とウイルスフリー個体作出に際し御助力を頂いた十勝農協連三口雅人氏、抗血清

第6表 丹波ヤマノイモにおけるヤマノイモモザイク病の外部病徴と血清反応によるウイルス検定結果の関係。

調査年	血清 検定	外部病徴		
		陰性	擬陽性	陽性
1997年	陰性	75	2	0
	擬陽性	0	0	0
	陽性	0	13	29
	未検定	193	0	0
1998年	陰性	177	22	6
	擬陽性	0	0	4
	陽性	0	7	24
	未検定	750	0	0
1999年	未検定	870	2	0

外部病徴は、陰性：無病徴、陽性：明瞭なモザイクか顕著な縮葉・葉の変形・わい化、擬陽性：紛らわしい症状。血清検定：ウエスタンブロット法—酵素抗体染色法による判定。供試個体数は、1997年：312個体、1998年：990個体、1999年：872個体。

を御提供頂いた弘前大学藤田隆氏に対して心より感謝申し上げます。

引用文献

- 藤田隆 1986. 農学研究からみた青森県農業. 2 ヤマノイモおよびニンニクのウイルス病の発生と対策. 弘大農. 164-168.
- 福嶋昭・岩井豊通・岩本政美 1995. ヤマノイモ (*Dioscorea opposita* Thunb.) のムカゴ由来種イモが収量並びに品質に及ぼす影響. 兵庫農技研報 43:75-78.
- 平井輝悦・種市正夫・松田幹男 1986. 栄養繁殖性野菜のウイルスフリーに関する研究. 第1報 ナガイモの生育特性. 東北農業研究 39:315-316.
- 平野三男・立松伸夫・服部英樹・橋詰不二夫・河野満 1991. イセイモのウイルスフリー苗の作出に関する研究. 第1報 茎頂培養による植物体再生及び種イモの形成. 三重農技研報 20:17-21.
- 神納浄・坂本庵・入江和巳・古川治郎・山田憲一・松尾綾男 1973. ヤマノイモのモザイク症状株とその影響. 関西病虫研報 15:89-92.
- 小林延子 1991. 組織培養によるヤマトイモウイルスフリー株の育成および大量増殖技術の開発. 埼玉園試研報 18:81-101.
- 岡本毅・梅崎輝尚・長屋祐一・谷山鉄郎 1999. 丹波ヤマノイモ多収系統の選抜とその収量形質. 日作紀 68:515-518.
- 岡本毅・梅崎輝尚・長屋祐一・谷山鉄郎 2000. 種イモ重と栽植密度が丹波ヤマノイモ多収品種の収量形質に及ぼす影響. 日作紀 69:153-158.
- 奥山哲・坂ひとみ 1978. ヤマノイモモザイクウイルス. 茨大農学術報告 26:29-34.
- 遠山明 1984. 野菜のウイルス病. 野菜の種類別にみたウイルス病の発生生態と防除. ヤマノイモ. 養賢堂, 東京. 309-315.
- 渡辺健三・志和将一・宇野弘子・豊岡幸二・古澤克彦 1994. 組織培養による‘秦荘ヤマノイモ’の優良苗生産に関する研究. 組織培養と挿し木法由来種苗の生産力試験. 滋賀農試研報 35:43-51.
- 山辺守・吉秋斎 1991. ツクネイモ (加賀丸芋) のウイルスフリー化と大量増殖. バイオホルティ 6. 誠文堂新光社, 東京. 91-93.
- 吉秋斎・高橋幸英・山辺守・森田恵子・松本淳・杉本直人・藤田和久 1995. ヤマノイモ類の無病苗の作出と増殖技術. 農林水産業北陸地域研究成果発表会要旨:8-9.
- 油本武義・谷口達雄 1984. ナガイモモザイク病の発生経過と被害に関する観察. 日植病報 50:117.
- 油本武義 1998. ヤマノイモ科. 岸國平編, 日本植物病害大辞典. 全農教, 東京. 495.

Effects of Using Virus Free Plants in the Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) Cultivation and Practical Method to Distinguish a Japanese Yam Mosaic Virus Plant: Tsuyoshi OKAMOTO^{*,1,3)}, Hiroshi SUZUKI²⁾, Teruhisa UMEZAKI³⁾, Yuichi NAGAYA³⁾ and Tetsuro TANIYAMA³⁾ (¹⁾Marutane Co. Ltd., Takatsuki 569-1035, Japan; ²⁾Tokachi Fed. Agr. Coop.; ³⁾Mie Univ.)

Abstract: To improve productivity in the cultivation of Chinese yam ‘Tanba-yamanoimo’ (*Dioscorea opposita* Thunb.), we investigated the effect of virus free plants on the yield of a high yielding variety ‘Shintanmaru’ at a commercial field in 1998, 1999 and 2000. The weights of rhizophore of the virus free clone obtained from shoot apex culture were significantly heavier than infected plants with Japanese yam mosaic virus. The rates of yield increase were 27% in 1998, 17% in 1999 and 23% in 2000. The infected plants with Japanese yam mosaic virus showed the disease symptoms as mosaic in leaf, leaf transformation, leaf miniaturizing, and a delay in sprouting and growth. They could be easily distinguished from the virus free plants by their appearance. The results of distinction by symptoms in appearance and by serum test were nearly the same, with few exceptions. Because the former method was simple and not costly, it was a more effective and practical way to obtain virus free plants in seed propagation.

Key words: Disease, High yielding variety, Japanese yam mosaic virus, Virus free, Yam (*Dioscorea*), Yield.