

組織培養によるウイルス無毒化試験

（1）パレイショ・オランダイチゴについて

松本 工*・難波 一郎・渡辺 義明

神戸植物防疫所業務部国際第二課

Elimination of Viruses by Meristem Culture. (1) Production of Virus-free Potato and Strawberry. Takumi MATSUMOTO, Ichiro NAMBA and Yoshiaki WATANABE (Kobe Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 25: 31-34 (1989)

Abstract: By using a technique of meristem culture, virus-free plants were obtained from potatoes infected with southern potato latent virus (SPLV), potato virus Y (PVY-T) and potato virus S (PVS), and from strawberries infected with strawberry vein banding virus (SVBV) and mixed infection strawberry mottle virus (StMV) and strawberry mild yellow edge virus (SMYEV). Developed plantlets were assayed against viruses by indicator plants. The results of the assay indicated that 94/100 were free from SPLV, 26/27 were free from PVY-T, 10/11 were free from PVS, 21/23 were free from VB and 12/12 were free from Mo and MYE.

はじめに

近年における植物組織培養技術の急速な発展にともない、培養器に封入された状態での果樹類、イモ類および花卉球根類などの組織培養体の流通が、国内外において活発化してきている。かかる組織培養体に対する検疫体制の整備が植物防疫所の緊急課題となり、昭和62年2月当所伊川谷圃場に「組織培養植物等検定施設」が建設され、組織培養体の受け入れが可能となり、現在までにイモ類、球根類の組織培養体を当該施設で受入れ、検疫を行っている。パレイショからは若干ではあるが potato leaf roll virus が発見されており、また、当該施設での受け入れではないが、横浜植物防疫所大和圃場において受け入れられた同様のパレイショからも potato virus S が発見されていることから、たとえウイルスフリーと称して輸入される組織培養体であっても、検疫上重視しなければならない現状である。このため、組織培養体の植物検疫を迅速かつ適確に実施するため本試験を実施した。

なお、本試験に当たり、ウイルスフリーのパレイショ塊茎および Potato virus S (PVS: モザイク系統) 保毒塊茎は種苗管理センター孺恋農場より、Potato Virus Y えそ系統 (PVY-T) は横浜植物防疫所調査研

究部病菌課より、ウイルスフリーのオランダイチゴ苗（品種：宝交早生）は奈良県農業試験場小島博文氏より、並びに strawberry mottle virus (StMV) および strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) 保毒のオランダイチゴ苗は大阪府立大学尾崎武司氏より各々分譲いただいた。御協力を賜った各位並びに各担当官に厚く御礼申しあげる。

材料および方法

1. 供試材料および茎頂の摘出

① パレイショ

ウイルスフリーの農林一号およびデジマを供試品種とし、当所で分離保存中のジャガイモ南部潜在ウイルス southern potato latent virus (SPLV: 小林ら, 1985) を接種し保毒を確認した農林一号およびデジマ、分譲された PVS 並びに PVY-T を同様に保毒させた各農林一号を供試材料として用いた。茎頂の摘出は、春期および秋期に、各ウイルス保毒塊茎を表面殺菌した後プラスチック容器内で萌芽させ、その芽を水流アスピレーターを用いた減圧下で Tween 20 0.1% 加用次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 0.5%）で3分間消毒し、さらに減菌水で3回洗浄した後、茎頂組織を摘出して、培地に置床した。茎頂組織の大きさとして、SPLV は 0.2, 0.3 及び 0.4～0.5 mm の3段階、

* 現在、神戸植物防疫所伊丹支所

PVY-Tは0.2, 0.5, 1.0及び2.0 mmの4段階を設定した。また、PVSの無毒化には摘出する茎頂組織を十分に小さくする必要があることが知られている(MELLOR *et al.*, 1977)ことから、摘出する茎頂組織の大きさを全て0.2 mmとした。

② オランダイチゴ

当所で保存中の strawberry vein banding virus (SVBV)を小葉接ぎによって接種し保毒を確認した宝交早生 (*Fragaria × ananassa* DUCH.)と、StMVおよびSMYEVを同様の方法で重複保毒させた宝交早生を供試材料とした。7~8月頃に発生するランナーを採取し、そのランナー先端部をバレイショ同様に消毒した後、それぞれ茎頂組織を0.3~0.5 mmの大きさに摘出し、培地に置床した。

2. 供試培地および培養条件

① バレイショ

MURASHIGE & SKOOG (1962) 培地 (寒天7 g/l又はジェランガム Gelrite 2 g/l, pH 5.7) を用い、24℃, 16時間照明 (3000 Lx) で培養した。培養組織を農林一号では約2か月、デジマでは4~5週間ごとに新しい培地に移植した。

② オランダイチゴ

6ベンジルアデニン 1 mg/lを添加した LINSMAIR & Skoog (1965) 培地 (寒天7 g/l, pH 5.8) を用い、24℃, 16時間照明 (3000 Lx) で培養した。

3. 馴化育生およびウイルス検定

① バレイショ

馴化育生は、培養中に発根が認められた個体について培養器から取り出し、根まわりの培地を十分に洗い流した後、滅菌培養土を用いて鉢上げし、ガラス温室内で育生した。ウイルス検定は鉢上げ1~2か月後に指標植物への汁液接種を行ない、一部については電顕観察を併用して行った。指標植物はSPLVが *Chenopodium quinoa*, PVSが *C. quinoa* 又は *C. murale* 並びにPVY-Tが *Nicotiana tabacum* (White Burley)を用い、それぞれ2反復の検定を行った。

② オランダイチゴ

馴化育生はバレイショと同様に行った。ウイルス検定は鉢上げ1~2か月後に指標植物の小葉接ぎにより行った。SVBVは指標植物の *Fragaria vesca* (UC-4およびUC-5又はUC-6), StMVおよびSMYEVは同 *F. vesca* (UC-5およびUC-6)を各々1株ずつ計2株用いて検定した。

Table 1. Elimination of potato viruses from infected potato by apical meristem-tip culture

Virus	Meristem-tip size (mm)	Indexing result*	
		CV. Norin-1	CV. Dezima
SPLV	0.2	25/28 (89)	4/4 (100)
	0.3	17/20 (85)	9/10 (90)
	0.4~0.5	14/18 (78)	15/19 (79)
PVY-T	0.2	5/5 (100)	
	0.5	7/7 (100)	
	1.0	8/8 (100)	
	2.0	9/10 (90)	
PVS	0.2	10/11 (91)	

*: no. of plants free from virus/no. of plants developed (ratio: %)

結果および考察

① バレイショ

培養・馴化育生できた個体における各ウイルスの無毒化率はTable 1のとおりであった。SPLVでは農林一号、デジマともにとりだす茎頂組織が小さいほど無毒化率が高くなる傾向がみられるが、0.4~0.5 mmの比較的大きな茎頂からでも各々70%以上のウイルス無毒化個体が得られた。PVY-Tは0.2~1.5 mmの区で生育した個体の100%が無毒化されていたが、10個体ずつ培地に置床した4区の中では茎頂組織の小さな区ほど培養中の枯死が多かった。PVSでは培地に置床した茎頂組織20個体中11個体が生育し、10個体が無毒化されていた。

馴化育生が可能となるまでの培養期間は約3~12か月であり、新しい培地への移植の間隔が短いほど早く鉢上げが可能であった。また、ジェランガムを用い、約4週間ごとに移植したものは、その多くが3か月で鉢

Table 2. Indexing result of strawberry viruses on Hokowase obtained from meristem culture

Virus	plants developed		plants assayed	
	no.*	%	no.**	%
SVBV	23/27	85	21/23	91
StMV & SMYEV	12/17	71	12/12	100

*: no. of meristem developed into plants/no. of meristem excised from stolon

**: no. of plants free from virus (es)/no. of plants developed

上げできた。ジェランガムは培地固型化剤として用いた場合、寒天と比べ培養植物体の生長が良好となること他種植物で報告されており(下村講一郎ら, 1986; Ichi *et al.*, 1986)。パレイショにおいてもこの効果があると思われる。2回反復のウイルス検定が終了する

までの期間は約6~15か月であった。

② オランダイチョ

SVBV 単独保毒株および StMV, SMYEV 重複保毒株の無毒化状況は Table 2 のとおりであった。SVBV では培地に置床した茎頂組織の 85% が生育

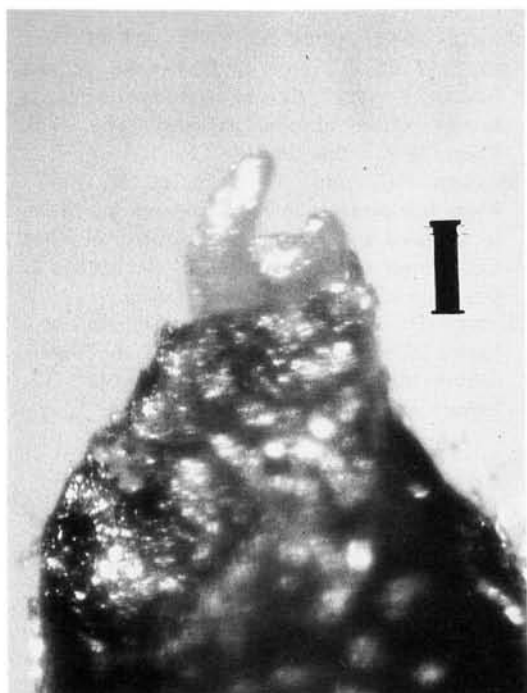


Fig. 1. An apical meristem of potato (Norin-1) with three leaf primordia. The bar represents 0.3 mm.

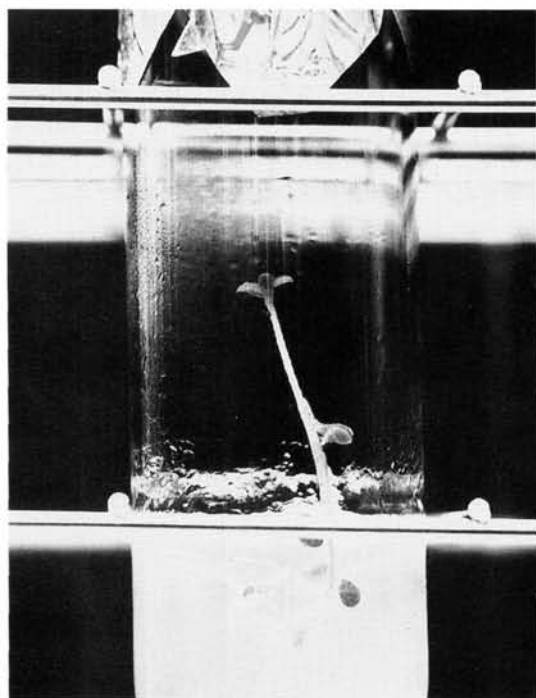


Fig. 2. Potato plantlet regenerated from meristem (5 months after placement on medium).



Fig. 3. A meristem of strawberry (Hokowase).

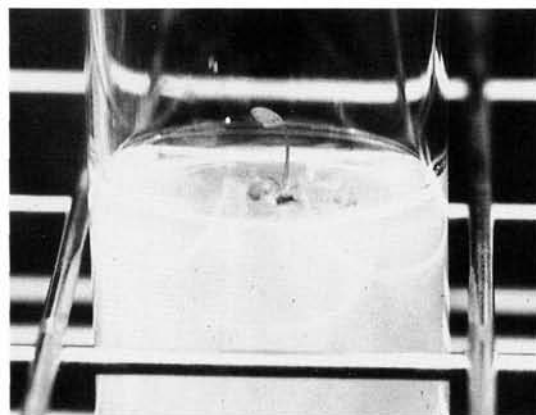


Fig. 4. Strawberry plantlet regenerated from meristem (6 weeks after placement on medium).

し、その91%が無毒化されていた。StMVおよびSMYEVでは茎頂組織の71%が生育し、そのすべてが無毒化されていた。鉢上げまでに要した培養期間は約2か月で、ウイルス検定が終了するまでの期間は約5~6か月であった。

以上の結果、試験に供したウイルスについては組織培養により高率に無毒化できることが確認され、本技術は試験に供するバレイショ品種やオランダイチゴの指標植物の健全維持等のための実用技術として導入できるものと考えられる。今後の課題として、*in vitro*の植物体についての早期検定方法を検討するとともに、主要果樹のウイルス無毒化試験を行う計画である。

引用文献

- 加古舜治 (1985) 増補/園芸植物の器官と組織の培養 誠文堂新光社。
- 小林敏郎・木村伸司・西尾 健・元島俊治・松濤美文 (1985) ジャガイモから分離された carlavirus. 植防研報 21: 41-46.
- 下村講一郎・鎌田 博 (1986) 植物組織培養における培地固型化剤の役割. 植物組織培養, 3(1): 38-41.
- 高山 覚 (1986) 図解バイオテクノロジー 農業図書。
- 竹内正幸他 (1979) 新植物組織培養 朝倉書店。
- 速水敦子・三十尾修司・松林元一 (1984) 成長点培養によるバレイショのウイルス無毒化に関する研究 第一報 生長点組織の幼植物分化に影響する若干の要因と分化植物のウイルス無毒化, 神大農研報, 16: 43-53.
- 古川仁郎 (1985) 図解組織培養入門 誠文堂新光社。
- ICHI, T., KODA, T., ASAI, I., HATANAKA, A. and SEKIYA, J. (1986) Effects of gelling agents on invitro culture of plant tissues. Agric. Biol. Chem., 50(9): 2397-2399.
- MELLOR, F.C. and STACE-SMITH, R. (1977) Virus-free potatoes by tissue culture. pp.16-646 in "Applied and Fundamental Aspects of plant Cell, Tissue and Organ Culture" J. Reinert and Y. P.S. Baja eds. Springer-Verlag, Berlin.
- WAIKEY, D.G.A. (1980) Production of virus-free plants by tissue culture pp.109-117 in "Tissue culture Methods for Plant Pathologists" D.S. Ingram and J.P. Helgeson.