

組織培養によるウイルス無毒化試験 (3) ブドウのgrapevine fanleaf virusについて

前川 晃演*・梅本 好美**・山下 均・山下 博

神戸植物防疫所業務部国際第二課

Elimination of Viruses by Meristem Culture. (3) Elimination of Grapevine Fanleaf Virus. Akinobu MAEKAWA, Yoshimi UMEMOTO, Hitoshi YAMASHITA, and Hiroshi YAMASHITA (Kobe Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 31: 113-116 (1995)

Abstract : Meristematic culture of grapevine infected with grapevine fanleaf virus (GFV) were treated with heat to eliminate the pathogen. The elongated shoot from the culture were excised at 5 to 10 mm in length and then treated *in vitro* for 16 hours at 40°C with lighting followed by 8 hours at 30°C without lighting (40°C/30°C) and 35°C/25°C for 20, 30 and 40 days. After the treatment, shoots were excised and cultured about for one month at 25°C and then assay by ELISA. The results showed that plantlets treated with heat for 20 days at 40°C/30°C and 30 days at 35°C/25°C were free from GFV. Damage on growth caused by heat therapy were found in the treatment at 40°C/30°C, but not at 35°C/25°C.

Key word : virus eliminatin, heat treatment, grapevine fanleaf virus

はじめに

植物防疫法に基づく隔離検疫が必要なジャガイモ、サツマイモ、オランダイチョ等は、近年の組織培養技術の進歩に伴い、従来の塊茎根や挿穂等の形態での輸入に代わり組織培養体での輸入の比率が高まり、かつ、数量も年々増加している。一方、組織培養の目的のひとつはウイルスの無毒化であるが、輸入される組織培養体の中には無毒が行われたとして輸入されていてもウイルスを保毒している場合がある（前川ら：1993）。また、組織培養体で輸入されると育成・管理は培地への移植、順化、鉢あげといった技術が必要である。このため、当所伊川谷圃場では組織培養体の検疫を迅速かつ的確に行うため、組織培養技術及びウイルス無毒化技術の導入を目的として、1989年以降ジャガイモ、オランダイチョ、ブドウ及びカンキツのウイルスについて組織培養による無毒化試験を行ってきた（松本ら：1989、前川ら：1993）。このうちgrapevine fanleaf virus (GFV) を無毒化するには、茎頂培

養単独では無毒化が困難で、熱処理後茎頂培養を行うことが必要であった（前川ら：未発表）。

近年、大村ら（1991）、M. BARLASSら（1982）及び P. L. MONETTE（1986）は、ウイルスを保毒している組織培養体を熱処理することにより無毒化が可能であることを報告している。この方法は、成植物体を熱処理する方法に比べ有利な点が多いと思われた。

そこで、筆者らは、ブドウのGFVを対象にこの組織培養体を熱処理することによるウイルス無毒化試験を行い、2～3の知見が得られたので報告する。

材料及び方法

1. 供試材料

農林水産省果樹試験場安芸津支場から分譲された当所で保存中のGFV保毒ブドウ（*Vitis vinifera* L. 品種：Rkatsiteri rozovyy）苗の先端から0.5mmの茎頂部を摘出し、前川ら（1993）が継代培養に用いた培地で、25°Cで2回継代培養して増殖し、GFVの保毒をELISAで確認後、同一条件で再度継代培養増殖した組織培養体を供試した（Fig. 1）。

*現在、神戸植物防疫所業務部国際第一課

**現在、神戸植物防疫所関西空港支所

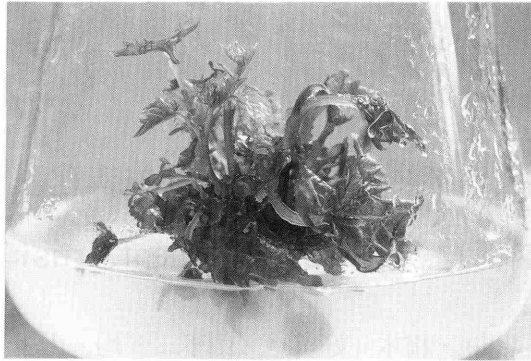


Fig. 1. Plantlet infected with GFV.



Fig. 2. Plantlet cut and placed on medium for *in vitro* heat treatment.



Fig. 3. Heat treated plantlet after 40 days. left: 40°C/30°C, center: 35°C/25°C, right: 25°C/25°C (no treatment).

2. ウイルス無毒化の方法

増殖したウイルス保毒の組織培養体の苗条を5～10mm（1～2節）に切りとり、展開葉除去後前記の倍地に移植し（Fig.2）、人工気象器内（小糸工業 コイトロン M20-L, M20-LT）で昼間照度3,000Lx40°C

16時間／夜間30°C 8時間（40°C／30°C区）、同35°C16時間／同25°C 8時間（35°C／25°C区）の熱処理を行った。無処理区の温度は、昼夜一定（25°C）とした。処理期間は、20、30、40日とした。

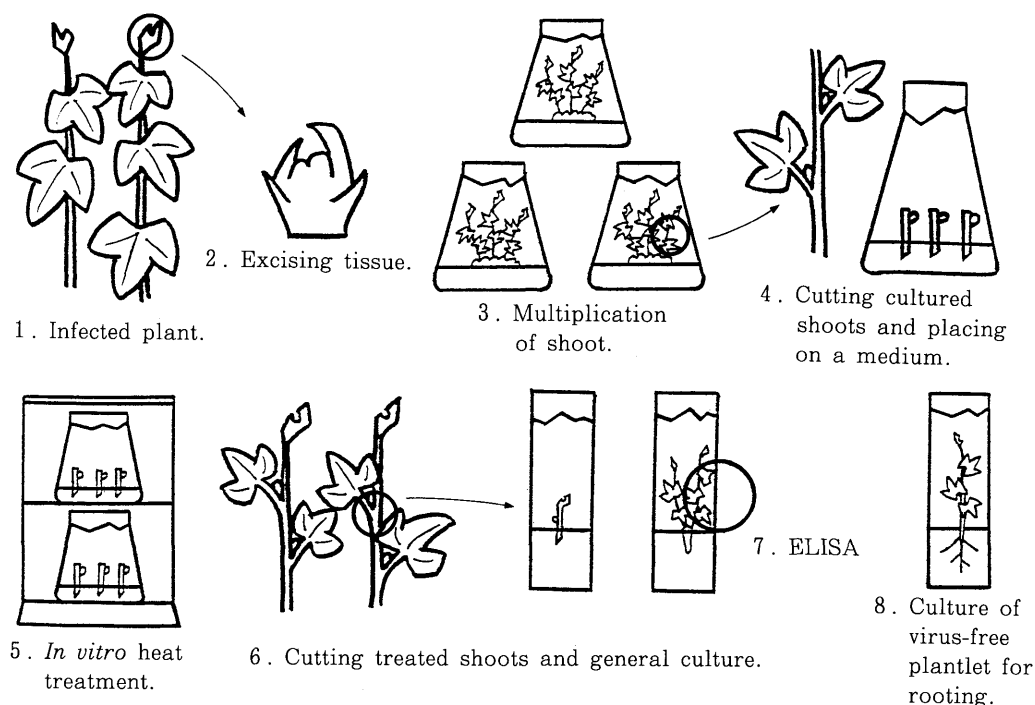


Fig. 4. Elimination procedure of infected tissue culture plant by heat treatment.

Table 1. The result of indexing for elimination of GFV from grepevine plantlet by *in vitro* heat treatment.

Treatment		40°C/30°C for 16hr/8hr				35°C/25°C for 16hr/8hr					25°C for 24hr			
Duration of treatment (days)	Growth in duration of treatment	Meristem-tip size excised after treatment (mm)												
		1	2	5	Sub total	1	2	5	10	Sub total	1	2	Sub total	
20	under 5 mm	6/6 ^{a)}	10/10	8/8	24/24	4/4	3/3	3/3	—	10/10	0/3	0/3	0/6	
	5-10 mm	— ^{b)}	—	—	—	3/3	7/7	4/9	5/9	19/28	0/3	0/3	0/6	
	10-15 mm	—	—	—	—	2/2	3/4	3/5	3/4	11/15	0/3	0/3	0/6	
	over 15 mm	—	—	—	—	1/1	1/1	1/1	1/1	4/4	0/1	0/1	0/2	
Total					24/24	Total					44/57	Total		0/20
30	under 5 mm	6/6	12/12	12/12	30/30	4/4	4/4	5/5	—	13/13	—	—	—	
	5-10 mm	—	—	—	—	13/13	9/9	12/12	12/12	46/46	0/5	0/3	0/8	
	10-15 mm	—	—	—	—	10/10	7/7	7/7	9/9	33/33	0/5	0/3	0/8	
	over 15 mm	—	—	—	—	10/10	9/9	7/7	6/6	32/32	0/5	0/4	0/9	
Total					30/30	Total					124/124	Total		0/25
40	under 5 mm	10/10	16/16	8/8	34/34	7/7	7/7	6/6	—	20/20	—	—	—	
	5-10 mm	—	—	—	—	18/18	14/14	15/15	13/13	60/60	0/5	0/5	0/10	
	10-15 mm	—	—	—	—	11/11	11/11	12/12	12/12	46/46	0/5	0/5	0/10	
	over 15 mm	—	—	—	—	3/3	7/7	7/7	6/6	23/23	0/5	0/4	0/9	
Total					34/34	Total					149/149	Total		0/29

a) : Number of plantlets free from virus/Number of plantlets developed.

b) : Not obtained plantlet.

3. 無毒化の検定法

各処理期間中に新たに伸長した苗条 (Fig. 3) を伸長量別に5mm以下, 5~10mm, 10~15mm, 15mm以上に分け, それらの茎頂部分を各先端部から1, 2, 5, 10mm (1~2節) に切りとり, 展開葉除去後に前記倍地に移植し, 25℃16時間照明 (3,000Lx) で約1カ月間培養した。その後全培養個体を前川ら (1993) の発根倍地に移植し, 培養を続けると同時に, 移植時に組織の一部を採取しELISAにより無毒化の正否の検定を行った (Fig. 4)。

結果及び考察

無毒化の検定結果はTable 1のとおりであった。

40℃/30℃区では5 mm以上伸長した個体はなかったが, 20日処理で24個体, 30日処理で30個体, 40日処理で34個体がそれぞれすべてが先端部の大きさに関係なく無毒化された。

35℃/25℃区では, 20日処理で57個体中44個体は無毒化されたが, 伸長量5~10mmの先端部5mmで4/9個体, 同10mmで5/9個体, 伸長量10~15mmの先端部2mmで3/4個体, 同5mmで3/5個体, 同10mmで3/4個体の合計13個体が無毒化されなかった。30日処理では124個体, 40日処理では149個体のそれぞれすべてが, 伸長量及び先端部の大きさに関係なく無毒化された。

無処理区 (25℃) は, 20日で20個体, 30日で25個体, 40日で29個体のいずれの個体もすべてGFVを保毒していた。

熱処理期間中の生育状況は, 40℃/30℃区では, 20日間ですべて無毒化できるものの, 処理期間中の培養体の生育が非常に劣り, 枯死する個体も若干ではあるが認められた。これは高温障害によるものと思われた。しかし, 35℃/25℃区は, 生育が通常の培養温度 (25℃) の場合とほとんど変わらなかった。

以上の結果から, ブドウに感染しているGFVを40℃/30℃区で20日以上, 35℃/25℃区で30日以上熱処理を行うことで無毒化できることが判明した。

MONETTE (1986) のGFVでの報告では, すべての個体を無毒化するのに39℃6時間/22℃18時間の16時間照明で40日間を, 35℃12時間/22℃12時間の10時間照明では66日間を要している。前者に対しては本試験の

40℃/30℃区が, 後者に対しては35℃/25℃区がほぼ対応しているが, 本試験では, いずれも約半分の処理期間ですべて無毒化された。これは, 本試験では, 1日当たりの高温時間をMONETTE (1986) の方法より長く設定したこと (39℃6時間に対し, 本試験では40℃16時間) の効果であると考えられる。

茎頂摘出から発根培養に至るまでの間の通常の培養期間内に無毒化処理として35℃/25℃30日間の処理を組み込むことにより, 無毒化個体作出に要する期間を, 従来の熱処理後茎頂培養を行う方法に比べ大幅に短縮することが可能と考えられる。また, 本試験の方法では, 組織培養体のために摘出する茎頂の大きさに関係なく無毒化できること, 組織培養体の熱処理であることから熱処理施設が小型の人工気象器で十分である等従来の方法に比べて利点がある。

熱処理に供した組織培養体 (Fig. 3) から処理期間中に数本の苗条が発生した。処理期間中短期間に大きく伸長したもののほど, しかもその先端部に近いほど無毒化の可能性が高いのではないかと推察されたので, 伸長量別に無毒化の有無を調査したところ, 40℃/30℃区及び35℃/25℃区で苗条の伸長量及び切りとり量に関係なくすべて無毒化されていた。これは熱処理により, ①処理した供試組織全体が無毒化された, ②供試組織から発生した苗条が無毒化された等が考えられるが, この点を解明することにより, 以後の手順の簡略化等, 更に改良が可能となると考えられる。

引用文献

- 前川晃演・難波一郎・田中安彦・山下 博 (1993) 組織培養によるウイルス無毒化試験 (2) ブドウのgrapevine leafroll virusについて, 植防研報 29: 57-61
M. BARLASS, K. G. M. SKENE, R. C. WOODAM and L. R. KRAKE (1982) Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. Annals of Applied Biology 101: 291-295
松本 工・難波一郎・渡邊義明 (1989) 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, 植防研報 25: 31-34
大村三男・日高哲志・岩波 徹 (1991) 培養茎頂におけるカンキツタタリーフウイルスの無毒化の一事例について, 園学雑60別2: 152-153
P. L. MONETTE (1986) Elimination *in vitro* of two Grapevine Nepoviruses by an Alternating Temperature Regime. Journal of Phytopathology 116: 88-91