

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

前川 晃演・難波 一郎・田中 安彦**・山下 博

神戸植物防疫所業務部国際第二課

Elimination of viruses by Meristem Culture. (2) Elimination of Grapevine Leafroll Virus. Akinobu MAEKAWA, Ichiro NAMBA, Yasuhiko TANAKA and Hiroshi YAMASHITA (Kobe Plant Protection Station)

Abstract: Meristem-tip culture was studied in order to eliminate the grapevine leafroll virus (GLRV) from grapevines infected with GLRV. Meristem-tips were excised at 0.2 or 0.5 mm tall and were cultured on a half-strength nitrogen MURASHIGE and SKOOG (1/2N-MS) medium supplemented with 1mg/l 6-Benzylaminopurine, 1g/l Polyvinylpyrrolidone, 15g/l glucose and 8g/l agar. Elongated shoots from the subculture were rooted in a 1/2N-MS medium supplemented with 0.05mg/l 3-Indolebutyric acid, 15g/l glucose and 8g/l agar. Rooted shoots were acclimatized on a 1/2N-MS medium and mixture of vermiculite and perlite (1:1) instead of agar *in vitro*. The culture flasks were placed in a growth chamber and humidity was controlled by a number of small holes bored in each aluminium-foil cap of every flask. Then all rooted shoots were successfully transplanted into a pot of soil by using these procedures. A combination of green-grafting to *Vitis vinifera* cv. Cabernet Franc and ELISA tests proved that all developed plantlets were free from GLRV.

Key words: virus elimination, meristem-tip culture, acclimatization, grapevine.

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、イモ類及び花卉球根類などの組織培養体での流通が国内外において活発に行われている。かかる組織培養体に対する検疫体制の整備のため1987年2月神戸植物防疫所伊川谷圃場に「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、組織培養体で輸入されたイモ類、球根類の検疫を当該施設で行っている。組織培養によるウイルスの無毒化が実用化されつつあるなか(井上ら:1982, 佐藤ら:1985, 笹原ら:1981, 高山:1986), 組織培養体での輸入も増加傾向にあり、また組織培養によるウイルス無毒化を行ったものでありと称して輸入された組織培養体であっても、パレイショからの potato leafroll virus や potato virus S が検

出された場合もある。

このようなことから組織培養体の植物検疫を迅速かつ適確に実施するため、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当所ではすでにパレイショの3ウイルス、オランダイチゴの3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)。

今後は果樹類の組織培養体の輸入も予想されることからブドウを材料として組織培養による grapevine leafroll virus (GLRV) の無毒化を試みた。また、同組織培養の一行程である馴化において若干の改良を試み、良好な結果が得られたので併せて報告する。

材料および方法

1. 供試材料および茎頂の摘出

1981年に山梨県果樹試験場から分譲され当所で保存中の GLRV を保毒した甲州, ネオマスカット及び当所で保毒を確認した(渡辺:1989) 台木用品種420A

*: 現在神戸植物防疫所業務部国際第三課

** : 現在農林水産省農蚕園芸局植物防疫課

並びに前記の甲州から接木接種により GLRV を保毒させた (渡辺・伊川：1988) Baco 22A, Mission, Pinot Noir, Cabernet Franc の 7 品種を供試材料とした。茎頂の摘出は 4 月～5 月の春期に休眠枝より発芽した芽を 70% エタノールに数秒浸漬した後、水流アスピレーターを用いた減圧下で次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 1%) で 3 分間消毒し、更に滅菌水で 3 回洗浄した後、茎頂組織を摘出して培地に置床した。茎頂組織の大きさは 0.2 及び一部 0.5 mm (Table 1) とした。

Table 1. Meristem excised from grapevine of each variety

Variety	Meristem-tip size (mm)	Number of meristem excised from plants
Baco 22A	0.2	18
Mission	0.2	7
420A	0.2	35
Pinot Noir	0.2	7
Cabernet Franc	0.2	49
Koshu	0.2	21
	0.5	8
Neo Muscat	0.2	18
	0.5	10

2. 供試培地および培養条件

基本培地は、窒素成分 (NH_4NO_3 , KNO_3) を 1/2 にした MURASHIGE & SKOOG 培地に、グルコース 15 g/l (能塚ら：1989), 寒天 8 g/l, pH 5.8 とし、初代及び継代培養は、基本培地に 6 ベンジルアデニン 1 mg/l,

ポリビニルピロリドン 1 g/l (田村ら：1986) を添加したものをを用い、26℃, 16 時間照明 (3,000Lx) で培養した。培養組織は 4～5 週間ごとに新しい培地に移植した。

3. 発根培養および馴化

発根培養は継代培養で伸長した葉条 (Fig. 1) を一節一葉に調整し、発根培地 (基本培地にインドール酪酸 0.05 mg/l を添加) に移植し 26℃, 16 時間照明 (3,000Lx) で培養した。

馴化にあたっては、石原 (1980) がリンゴの硬化 (馴化) において使用した用土を一部改変したものを馴化培地とし、その調整及び人工気象器内 (26℃, 16 時間照明, 3,000Lx) での馴化を次のような手順で行った。また、アルミホイルの蓋に穴を開けることにより培養容器内の湿度調節を行った。

① バーミキュライトとバーライトの混合物 (1:1) を 200 ml 広口三角フラスコに 50 ml 入れ、それに基本培地からグルコースと寒天を除いた液体培地を 15～20 ml 加えて馴化培地とした。

② 馴化培地の入った広口三角フラスコにアルミホイルで蓋をし、高圧殺菌を行い馴化に供した。

③ 発根培養で根が数本 1 cm 程度に伸長した培養体 (Fig. 2) を培養器から取り出し根部の培地を滅菌水で洗い流した後、馴化培地に移植した。

④ フラスコ内面に根の伸長が観察されたら、アルミホイルの蓋に直径 5 mm 程度の穴を開け、1 週間ごとに穴の数を増やし開口面積を大きくしていき (Fig. 3), 1 ヶ月後にアルミホイルキャップを取除きそのまま約



Fig. 1. Plantlet regenerated from meristem after 68 days placement on medium.



Fig. 2. Rooted shoot after 20 days on the rooting medium.



Fig. 4. Plantlet 38 days after transferring to the acclimatizing medium.

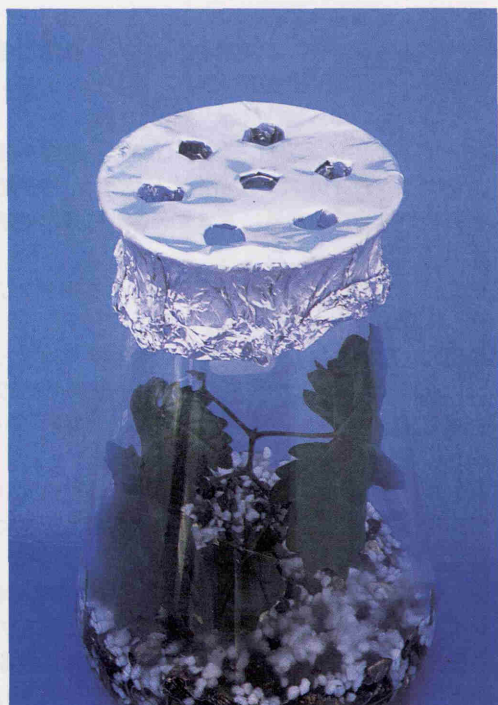


Fig. 3. Plantlet 25 days after transferring to the acclimatizing medium.

10日間人工気象器内で育生した (Fig. 4)。これらの馴化期間中、培地の乾燥防止のため開口部より蒸留水を適時注入した。

⑤ 馴化が終了したものを素焼鉢に移植し温室内に搬入した。

4. 無毒化の確認

無毒化の確認は、鉢上げから約9ヶ月後の6月に指標植物である Cabernet Franc への接木接種 (緑枝接ぎ) 及び、鉢上げされた培養体の秋期 (11月) の葉柄を用いた ELISA により行った。

結果および考察

GLRV 保毒ブドウの無毒化状況は Table 2 のとおりであった。茎頂の大きさ0.2mmに摘出した区では培地に置床した茎頂組織の5.2%が生存し、そのすべてが無毒化されていた。茎頂の大きさ0.5mmに摘出した区では茎頂組織の27.8%が生存し、こちらもそのすべてが無毒化されていた。茎頂組織を培地に置床してからウイルス検定が終了するまでに要した期間は約19ヶ月でそのうち鉢上げまでに要した培養期間は約5ヶ月、

Table 2. The result of indexing for elimination of GLRV from grapevine by meristem culture.

Meristem-tip size (mm)	Plants developed		Plants assayed ^{b)}
	Number ^{a)}	%	
0.2	8/155	5.2	8 ^{c)} /8
0.5	5/18	27.8	5 ^{d)} /5

- a) Number of meristem developed into plants/Number of meristem excised from plants.
 b) Number of plants free from virus/Number of plants developed.
 c) Name of variety (number of assayed): Baco22A (1), Mission (1), 420A (1), Pinot Noir (1), Neo Muscat (1) and Cabernet Franc (3).
 d) Name of variety (number of assayed): Koshu (2) and Neo Muscat (3).

ウイルス検定に要した期間は約5ヶ月であった。また、発根した培養体43個体（増殖個体を含む）は今回の馴化方法ですべて良好に馴化することができた。

以上の結果から0.5mm以下に摘出した茎頂を組織培養法により無毒化できることが確認できた。また、茎頂組織の摘出の難易、培地への置床後の生存率および生育状況等を考慮すれば0.2mmよりも0.5mmに茎頂を摘出する方が良いと思われた。また、組織培養体の馴化は培養体を密閉された容器内から外部環境へ移し、個体再生を完了させる最終かつ重要な操作であり、この過程において外部環境に順応せず枯死する個体がある。この場合その原因の多くは急激な湿度低下による乾燥や、温室内で馴化を行った場合の日光による葉焼け・高温障害と考えられる。一般には、このような諸原因に留意しながら、温室内等で遮光し、保湿のためにポリエチレンフィルム等で覆い徐々に開口部を広げていく方法が取られているが、馴化不良による枯死を完全に防止することは困難で、貞松（1987）がブドウで行った場合、品種間に差はあるが全体で約半数の個体が失われている。また、ブドウとは種類が異なるため一概に比較はできないが日高・梶浦（1989）の行ったカンキツの「2段階馴化法」の場合の馴化第2段階で、一般に行われている馴化方法で約1/3個体が、ミスト装置で保湿を行った場合で約1/10個体がそれぞれ失われている。これらのことから今回の馴化にあたって行った、容器にプラスチックを用い湿度調節をアルミホイルの蓋に穴を開けていく（穴の開け過ぎにより急激に乾燥した場合再度アルミホイルで蓋をする）方法で、安定した環境（温度、光）が得られる人工気象器内で管理する方法は、ミスト装置のような設備を必要とせず馴化期間全般にわたり管理も簡便であることから、

馴化不良による枯死の防止には極めて有効な方法と考えられる。また、本法は発根した培養体の根が酸素不足状態になっていると考えられる寒地培地から、発根後早期に気相を多く含む馴化培地に移植することにより根圏の形成が促進され、地上部の生育も促進されることが期待される。

以上のことから本技術はブドウの組織培養体の検疫にあたり実用技術として導入できるものと考えられる。また、今後は培養効率を高めるための初期培養技術の改良、in vitro での早期検定方法の検討の他、主要果樹類の組織培養技術の習得及びウイルス無毒化試験等を行う計画である。

引用文献

- 日高哲志・梶浦一郎（1989）. 組織培養により得られたカンキツ植物体の簡易馴化方法について. 果樹試験報 B 16: 19-28
 井上正彦・志村富男・戸川英夫・上野雄靖（1982）. 醸造用ブドウの熱処理および生長点培養による Grapevine Leafroll Virus の無毒化について. 植病報 48: 685-687.
 石原愛也（1980）. 果樹の茎頂培養と繁殖への利用（2）. 農業および園芸 55-10: 16-22.
 松本 工・難波一郎・渡辺義明（1989）. 組織培養によるウイルス無毒化試験（1）バレイショ、オランダイチゴについて. 植防研報 25: 31-34.
 能塚一徳・平川信之・角 利昭（1987）. 組織培養によるブドウウイルス無病苗の大量増殖（1）増殖培地中の糖が無病苗の増殖に及ぼす影響. 福岡農総試験報 B-6: 23-28.
 貞松光男（1987）. ブドウの茎頂培養とウイルスフリー化. 植物防疫 41-9: 12-16.
 笹原宏之・多田邦雄・井理正彦・竹沢泰平・田崎三男（1981）. ブドウ樹のウイルスフリー化のための生長点培養による個体の再生について. 園学雑 50（2）: 169-175.
 佐藤俊彦・西島 隆・原田 昭・矢野 龍（1985）. 茎頂組織培養によるブドウウイルス病の無毒化について. 園学要旨 昭60春 124-125.
 高山 寛（1986）. 図解バイオテクノロジー. 農業図書.
 田村史人・森本泰史（1986）. 組織培養法によるブドウ優良苗木の大量増殖法の確立 3, 褐変物質の蓄積防止法の確立, 農林水産省果樹試験場育種部 昭和60年度果樹課題別研究会資料 果樹におけるバイオテクノロジーの開発と利用: 43-48

渡辺義明・伊川秀幸 (1988). Grapevine leafroll の接
木検定方法に関する調査. 植防研報 25:31-34.
渡辺義明 (1989). 岡山・香川県のブドウに発生した

接木伝染性ウイルス病. 平成元年度神戸植物防疫所
調査研究成績 74-76.