

オランダイチゴウイルス検定植物 の低温培養による長期保存技術

堀越浩二・山路禎之・山下 均・松本 工

神戸植物防疫所業務部種苗担当

In vitro conservation of strawberry virus indicator plants under the low temperature culture conditions. Koji HORIKOSHI, Yoshiyuki YAMAJI, Hitoshi YAMASHITA, Takumi MATSUMOTO (Kobe Plant Protection station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 33 : 103-106

Abstract: Stolon tips of strawberry virus indicator plants were cultured on B5 medium without plant growth regulators in vials at 25°C. After one or two months culture, these vials were transferred to low temperature condition (5°C) and conserved for 3 months to 1 year. After conservation, these plantlets grew normally at 25°C for three months. And then, these plants were transplanted to the soil and were inoculated with strawberry vein banding virus. After inoculation, conserved plants were successfully infected with the virus, and showed virus symptoms as well as the plants normally grown in green house.

Key words: strawberry virus indicator, conservation, low temperature culture

はじめに

オランダイチゴ (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) のウイルス検定において、同属の検定植物を用いた接木検定は基本的な方法である。当所隔離圃場ではウイルス検定植物である *Fragaria vesca* 及び *F. virginiana* の各系統を栽培管理し保存している。オランダイチゴ属植物はストロンで栄養繁殖するため比較的容易に増殖させることができるが、広い管理場所を必要とし、また隔離植物の輸入に備えて常時健全な状態で維持しなければならない。一旦ウイルスに感染すれば栄養繁殖性のため容易に蔓延してしまうことから、アブラムシのような媒介虫の防除が必要である。ウイルスに感染した場合、茎頂培養で無毒化することが考えられるが、ウイルス検定植物は栽培種に比べ茎頂部が小さいため無毒化は困難である。

これらの対策として、検定植物を培養びん内において保存することができれば、保存中にウイルスに汚染されることはなく、また小型バイアルびんに培養すれば、保存スペースを小さくすることができる。

このようなことから、栽培種で行われているように植物体を低温で培養して長期間保存する技術

(NOGUCHI: 1993) を、ウイルス検定植物の保存に応用できないか調査した。

なお、本報告を取りまとめるにあたり、有益な御助言を賜った野菜・茶業試験場久留米支場育種第二研究室の野口裕司氏に厚くお礼申し上げる。

材料及び方法

1. 供試材料

オランダイチゴのウイルス検定植物である *Fragaria vesca* (UC-1, UC-4, UC-5, UC-6, EMC) 及び *F. virginiana* (UC-10, UC-12) の、親株から発生するストロンを培養材料として用いた。採取したストロンを70% エタノール及び次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1%）で表面殺菌した後、滅菌水で3回洗浄して培養に用いた。

2. 培養方法

ストロン先端の表面を包んでいる「はかま」と、内部にある葉、二次ランナーを取り除き、先端部を1mm～2mmに切断して、ホルモン無添加B5培地 (GAMBORG *et al.*: 1968, ショ糖2%, 寒天1%)

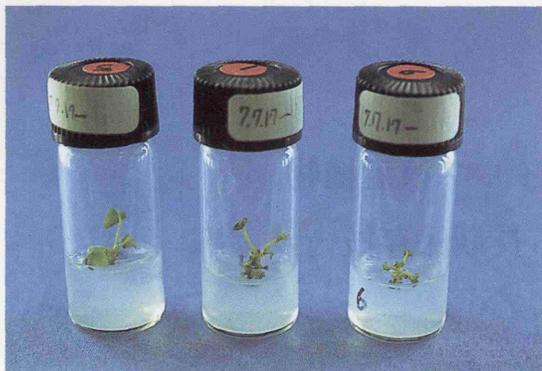


Fig. 1 Shoots after pre-culture in vials (1 month after placement on medium)

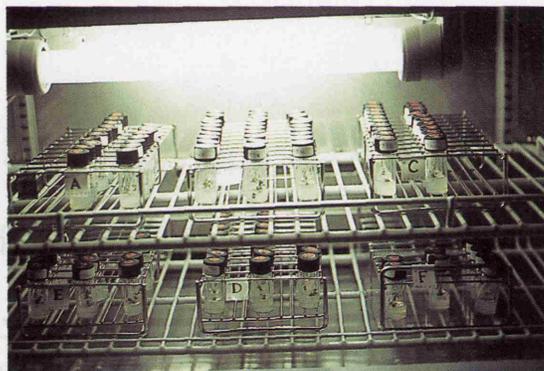


Fig. 2 Conservation of cultures under low temperature (5°C) condition

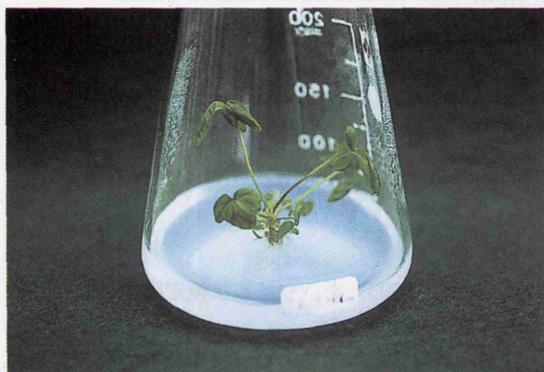


Fig. 3 Plant growth in flask after conservation under low temperature condition



Fig. 4 Graft inoculation on growing plant

の入った小型バイアルびん（直径18mm×高さ45mm，培地量1.5ml）に置床して25℃，3,000Lx，12時間日長に設定した人工気象器内で培養した。葉が数枚生じた1～2ヶ月後（Fig. 1），これらのバイアルびんを5℃，3,000Lx，12時間日長の条件に設定した低温恒温器内に移動して長期間保存した（Fig. 2）。平成7年7月から11月までの間に131個体を保存試験に供試した。

3. 保存株の育成と馴化

低温培養3ヶ月，6ヶ月及び1年後にバイアルびんから植物体を取り出して，直径25mm，高さ120mmの培養チューブ（B5培地10ml）または，200mlコニカルピーカー（B5培地40ml）に移植し，25℃，3,000Lx，12時間日長に設定した人工気象器内で培養を続

けた（Fig. 3）。新しい葉が2cmほどに生育し，十分発根したものを殺菌土壌の入ったビニールポットに移し替え，ミスト装置で保湿して1週間馴化した。

4. ウイルスに対する反応

馴化後生長した個体のうち，葉柄が小葉接ぎできるくらい太くなったものにウイルスを接種し，その病徴発現状況について調査を行った。接種源として当所で保存中のstrawberry vein banding virus保毒株（UC-5）の葉柄を用い，培養個体に小葉接ぎした（Fig. 4）。

全体の手順をFig. 5に示す。

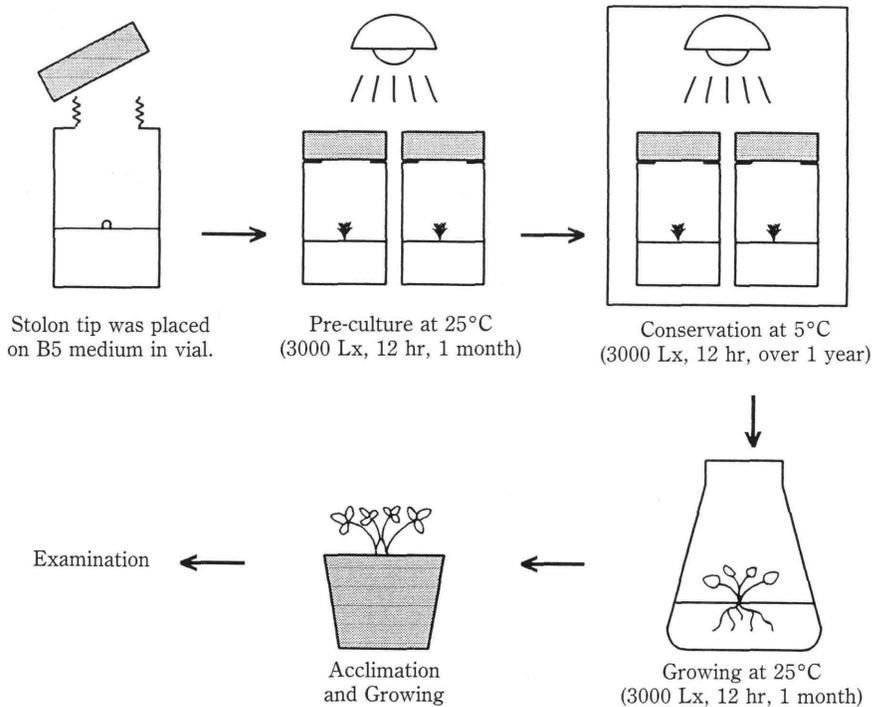


Fig. 5 Procedure of in vitro conservation under low temperature culture for virus detection

結果及び考察

131個体中3ヶ月間低温保存した11個体を、25℃に移して育成した結果、すべての株が順調に生育した。さらに、これらの個体にstrawberry vein banding virus罹病株を小葉接ぎした結果、接種後約40日に新葉に葉脈退緑が現われた。この接木接種におけるウイルス症状の発現状況については、通常のスロンから増殖させた株と同様であった。同じ操作を低温保存後6ヶ月（5個体）及び1年（4個体）を経た株に対して行った結果、生育及びウイルス症状の発現は3ヶ月間保存した株と同様であった。

低温保存に供した131個体中、3ヶ月以内に1個体、3ヶ月～6ヶ月に3個体、そして、6ヶ月～1年に40個体が枯死した。6カ月までに枯死したものはその原因が確認できなかったが、本調査で用いた低温恒温器は小型のもので器内に照明ムラがあり、照明不足（数百Lx）の箇所に置いたものが6ヶ月～1年以内に枯死したことから、枯死には照明不足が影響しているものと考えられた。

植物体を生きたまま低温あるいは凍結することにより長期に渡って保存する方法は数多く研究され（深井

ら：1988，大澤：1994），オランダイチゴにおいてもその栽培種の低温保存が行われている。オランダイチゴの栽培種を用いた研究（NOGUCHI：1993）によれば、低温条件保存することにより植物体の生育は著しく抑制されるため、移植する必要もなく4年間保存できると報告している。これらの保存法の目的は遺伝資源を保存するためである。しかし、隔離検疫においてウイルス検定植物の保存は1年～1年半できれば充分であると思われる。

低温保存から再び25℃に移す場合、長身の培養チューブよりも底の広いコニカルビーカーを用いた方が葉面積の広い苗が得られ、育成期間も短縮された。低温培養から出して育成、馴化した植物体が検定に使用可能な苗に成長するまで早いもので3ヶ月であったが、ほとんどの個体が4～6ヶ月必要であった。そこで、低温培養後の生育期間を短縮するためには、初期培養時に置床する茎頂組織を大きくし初期生育を旺盛にすると共に、25℃での培養期間を延長し葉数5枚程度で発根した苗になった状態で低温保存を開始することが望ましいと考えられるが、今後検討が必要である。

なお、通常オランダイチゴは春期から夏期にかけて盛んにストロンを発生して増殖するが、秋期には生育

が止まり冬期には休眠に入る。そのため冬期の隔離検疫において、検定植物を確保することが困難になっているが、本法を用いて春期に一定量の保存株を確保しておき、計画的に馴化していくことにより、周年オランダイチゴのウイルス検定が可能になると思われる。

以上の調査から、低温培養はオランダイチゴの隔離検疫に有効に利用できることが示唆された。

引用文献

- 深井誠一・森井正弘・大江正温 (1988) キクのin vitro保存. 植物組織培養 5 (1):20-25
- GAMBORG, O. L., R. A. MOLLER and K. OJIMA (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158
- NOGUCHI, Y. (1993) In vitro conservation of vegetatively-propagated crop species. Japan-Russia Workshop Gen. Res. Biotech. 85-90
- 大澤勝次 (1994) 図集・植物バイオテックの基礎知識. 農文協. pp. 125-134