ジャガイモ男爵の組織培養による無ウイルス化

與 良 清・土 崎 常 男*

Kiyoshi YORA and Tsuneo TSUCHIZAKI: The elimination of latent viruses from potatoes of Danshaku variety by use of tissue culture.

I. 緒 言

組織培養を用いてウイルス感染個体からウイルスを除去することを最初に試みたのは Morel ら⁵⁾⁶⁾ である。氏らはダリアおよびジャガイモを用い、ウイルス感染個体の先端の分裂組織を小さく切りとり、これを人工培地上に培養して無ウイルス個体を作り出すことに成功した。その後、Norris⁷⁾、Thompson⁸⁾、Kassanis⁹⁾ らは同じ方法を用い、あるいは熱処理や薬品処理と組織培養とを組合わせて、ウイルスに感染しているジャガイモからウイルスを除去することを試み、同様の成功をおさめている。

わが国のジャガイモ品種はXウイルスなどの潜在性ウイルスに感染しているものが多い。男爵はわが国で最も重要な品種であるが、現在この品種ではすべての個体がXウイルスに感染しており、またSウイルスにも感染している⁹⁾。本論文は男爵からこれらの潜在性ウイルスを除去する目的で、組織培養を行なった実験の結果を述べたものである。

本研究を行なうにあたり、御教示、御指導を賜わった東大農学部明日山教授、川田教授、農林省研究部後藤和夫技官、実験材料その他で多大の御協力を賜わった駒恋馬鈴薯原原種農場、農林省農業技術研究所ウイルス病研究室の各位に厚く感謝の意を表する。なお、本研究は文部省科学研究費により行なわれたものである。

II. 実験材料および方法

(1) 供試ジャガイモ

供試したジャガイモの品種は男爵で、駒恋馬鈴薯原原種農場から分譲されたもの、ヤマト種苗会社から購入した北海道産の種いも、附近の商店から購入した神奈川県産の食用いもの3種である。

(2) 培 地

培地には Kassanis⁹⁾ が使用した組成のものを用

いた。その組成は、Knop 液 1/2 濃度、Berthelot 液 10 滴、寒天0.8%, sucrose 2%, hydrolysate of casein 1.0 mg/l, cystein 10.0 mg/l, adenine 5.0 mg/l, nicotinic acid 1.0 mg/l, pyridoxine hydrochloride 1.0 mg/l, calcium pantothenate 10.0 mg/l, inositol 0.1 mg/l, biotin 0.01 mg/l である。培地は 100°C で 30 分間の蒸気殺菌を1日1回、3日間行なつた。

(3) 生長点の分離および移植

男爵の塊茎を土壌に植え、地表から 1~2 cm 芽が出たとき、その先端を約 1 cm 切りとるか、または日光にさらした塊茎から発芽した芽の先端を約 1 cm 切りとつたものを、生長点の分離に便利のように径 1 cm、長さ 20 cm の棒の端にパラフィンで固定する。生長点の分離および移植はすべて無菌室で行なつた。まず大きな葉をあらかじめとり除いてから、20 倍の単眼解剖顕微鏡下で生長点をおおっている小さな葉を順にかみそりでとり除いて、生長点を露出させる。露出した生長点は物さしで 0.2 mm の長さにかみそりで切りとる。

切断した生長点の組織は 10 倍に希釈したアンチホルミン液にうつし、約 30 秒殺菌してから2回殺菌水で洗つて、培地を入れた内径 1 cm、長さ 10 cm の小試験管に移植する。これらの生長点組織の移動と移植はすべて殺菌した白金耳で操作する。生長点組織を植えた小試験管は綿栓し、その管口を火焰で焼いてから、水分の蒸発を防ぐため綿栓した口を溶かしたパラフィンに浸して封じる。

(4) 生長点組織の発育

生長点組織を植えた小試験管は 20°C (恒温) のガラス室内に置いた。移植後1週間から1カ月で生長点組織は径が約 0.5 mm の小さな緑色の組織塊に発育する。生長はこの段階で一度止まり、その後早いものでも移植後3カ月、おそいものでは6カ月後に発芽しはじめ、茎の長さが 3~4 cm になると発根をはじめる。発芽がはじまつたとき、培地を入れた内径2~3cm、長さ 25 cm の大試験管に移植し、綿栓後、管口を火

* 東京大学農学部

焰でよく焼いてから、水分の蒸発を防ぐため、ポリエチレンで綿栓をおおう。この大試験管も 20°C(恒温)のガラス室においた。発芽発根した生長点組織は早いものでは約 6 カ月後に約 5 cm ぐらいの小さな植物体 (plantlet) に発育するが、おそいものでは 1 年を経過しても、発芽したままで生長しない。この原因は明らかでない。

(5) 土壌への移植

大試験管の中で植物体の大きさが約 5 cm になったとき、土壌へ移植した。土壌はよく焼いて完全に水分を蒸発させてから、内径 12 cm の植木鉢に入れ、上をポリエチレンでおおってから、100°C で 30 分間蒸気殺菌する。この中に培地上に生育した小植物体は無菌的に移植する。植木鉢に殺菌水を十分に灌水してから、ポリエチレンでおおい、ガラス室に約 10 日間おく。根がついてから、高圧殺菌した土壌を入れた内径 19 cm の大きな植木鉢に移植し、アブラムシの飛来を防ぐため、昆虫飼育箱に植木鉢を入れてガラス室に置く。

(6) ウイルスの検定

X ウイルスの検定は培養前のジャガイモについては血清反応 (スライド法) で、培養により得られたジャガイモについてはセンニチコウに対する接種により行なつた。S ウイルスの検定は血清反応 (沈降反応およびスライド法) により行なつた。

III. 実験結果

結果は第 1 表に示すとおりである。ジャガイモの生長点組織を 158 個体培養したうち、バクテリアの混入のため 64 個体を捨てた。残つた 94 個体のうち 76 個体は発芽せず、18 個体が発芽した。発芽した 18 個体のうち、4 個体は大試験管に移植した際、バクテリアが混入したので捨てた。残つた 14 個体のうち、現在までに 5 個体を土壌に移植し、そのうち 3 個体から塊茎を採取することができた。

培養前の供試した男爵はすべて X ウイルスに感染していたが、組織培養により得られたジャガイモのうち、土壌に移植した 5 個体について調べたところ、いずれも X ウイルスに感染していなかった。S ウイルスについては、これら 5 個体のうちの 1 個体について調べたところ、S ウイルスに感染していなかった。

IV. 考 察

富士¹⁾ はウイルスに感染した植物体からウイルスを除去する方法として、熱療法、化学療法、新生組織分離法の 3 つをあげ、新生組織分離法を更に挿し木またはつぎ木による方法と分裂組織分離法とに区別している。このうちで、化学療法は現在研究の段階であつて実用化は将来の問題であり、熱療法はたとえ

第 1 表 ジャガイモ男爵の組織培養の結果

塊茎番号	塊茎の産地	発芽方法	小試験管への移植期日	大試験管への移植期日	土壌への移植期日	塊茎採取期日	X ウイルス感染の有無	S ウイルス感染の有無	備 考
D 8-10	神奈川	土壌中	'59. 4. 15	'59. 10. 23	'59. 10. 23				バクテリア混入
D 10-12	〃	〃	4. 21	7. 14	9. 18	'59. 12. 18	—		塊茎採取前枯死
D 12-4	燐 恋	〃	2. 26	7. 10			—		
D 18-6	神奈川	陽光下	3. 5	7. 14					
D 20-1	燐 恋	土壌中	3. 7	7. 14					
D 20-3	〃	〃	3. 7	7. 10	9. 18	'60. 2. 7	—		
D 24-10	〃	〃	4. 15	7. 14					
D 24-11	〃	〃	4. 15	10. 24					
D 24-16	〃	〃	4. 26	10. 23					
D 27-6	〃	〃	4. 21	7. 14	10. 23	'60. 6. 1	—	—	バクテリア混入
D 28-2	北海道	陽光下	3. 16	7. 10	9. 18		—		塊茎採取前枯死
D 28-3	〃	〃	3. 16	7. 14					
D 28-7	〃	〃	3. 16	7. 14					
D 28-14	〃	土壌中	4. 14	10. 23					
D 28-15	〃	〃	4. 14	7. 14					
D 29-6	燐 恋	〃	4. 6	10. 23					バクテリア混入
D 32-1	〃	〃	3. 19	7. 14					バクテリア混入
D 32-2	〃	〃	3. 19	7. 14					

ば Kassanis²⁾ がジャガイモの葉巻病の治療に用いて成功しているが、一般的な方法とは考えられない⁴⁾。本実験では富士が分裂組織培養法とよんだ方法を用いて、男爵の無ウイルス個体を作り出すことに成功した。この結果はジャガイモから潜在性ウイルスを除去するのに、組織培養がきわめて有効な方法であることを示すものであろう。

本実験では Kassanis³⁾ の方法に従って組織培養を行なった。ただし、氏は培地上に育つ小植物体を一度トマトにつぎ木してから土壤に挿し木をしているのに対し、本実験では培地上の小植物体を直接に土壤へ移植した。この場合、移植の際の植え込みによる枯死は認められなかったから、この方法の方がより簡単であろうと思われる。

また、氏は人工光線下で発芽した芽から生長点を分離したが、本実験の結果から考えると、土壤中に塊茎を植え、地表から 1~2 cm 出た芽から生長点を分離する方が、生長点の切断が一層容易であるようである。

男爵の無ウイルス個体を作り出されたことは、ジャガイモの実験栽培の面でも、また X ウイルスなどの潜在性ウイルスの研究の面でもその意義は少なくない。今後同様の方法でジャガイモの他の品種、更にまた果樹類、球根草花類などの栄養繁殖する植物で無ウイルス化が試みられることが望ましく思われる。

V. 摘 要

組織培養を用いて、ジャガイモ男爵の無ウイルス化を試みた。ジャガイモ男爵の塊茎から発芽した芽の先端の生長点の組織を 0.2mm の長さに切りとり、Kassanis (1957) の培地を入れた小試験管に移植した。158

個体を移植したうちで、バクテリアの混入した 64 個体を捨てた。残り 94 個体のうち 18 個体が移植後 2~6 カ月で発芽しはじめた。発芽した組織はさらに大きな試験管に移し、5 cm ぐらいの大きさの小植物体に発育したとき、殺菌土壤に移植した。このようにして現在まで 5 個体のジャガイモを土壤に移植したが、これら 5 個体はいずれも X ウイルスを保有していなかった。そのうち 1 個体について血清反応で S ウイルスの検定を行なったが、S ウイルスは検出されなかった。これら 5 個体のうち 3 個体から塊茎を得ることができたので現在増殖中である。(1962. 3. 10 受理)

引用文献

- 1) 富士貞吉 (1960). 農及園 35(6): 1043~1046.
- 2) Kassanis, B. (1950). Ann. appl. Biol. 37: 339~341.
- 3) Kassanis, B. (1957). Ann. appl. Biol. 45: 422~427.
- 4) Kassanis, B. (1957). Advances in Virus Research 4: 221~241.
- 5) Morel, G. and Martin, C. (1952). C.R. Acad. Sci. Paris 235:1324. [R. A. M. 32: 191. (1953)].
- 6) Morel, G. and Martin, C. (1955). C.R. Acad. Agr. Fr. 41(10): 472~475.
- 7) Norris, D. O. (1954). Austral. Jour. Agr. Res. 5: 658~663.
- 8) Tompson, A. D. (1956). Nature 177: 709.
- 9) 行本峰子・小林豊・興良清・戸倉幸三 (1960). 日植病報 25(5): 216~217.

Summary

An attempt was made to eliminate the latent viruses from potato plants of Danshaku variety, which is synonymous with Irish Cobbler and the one most commonly cultivated in Japan. All current stocks of the variety are infected with potato viruses X and S. The tubers were planted in soil under glass, and the apical meristems of their sprouts were excised into pieces less than 0.2mm in length and cultured in Kassanis' medium (1957). When these meristems grew into plantlets about 3~4 cm long, they were transferred directly from culture medium into sterilized soil. Of 158 meristem cultures, only five grew into plantlets, which were proved all to be free from virus X. One plantlet was tested for virus S, and shown to be free. Three of the plantlets survived and produced small tubers.

(Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo, Japan)