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

笹原宏之*・多田邦雄*・井理正彦**・竹沢泰平**・田崎三男**

(株式会社ミヨシ*, 160 東京都新宿区百人町
マンズワイン株式会社**, 130 東京都中央区日本橋)

Regeneration of Plantlets by Meristem Tip Culture for Virus-free grapevine.

Hiroyuki SASAHARA, Kunio TADA, Masahiko IRI, Taihei TAKEZAWA, Mitsuo TAZAKI

Miyoshi Company Limited, Shinjuku-ku, Tokyo 160.

Manns Wine Company Limited, Chuo-ku, Tokyo 103.

Summary

Regeneration of intact plants of Zenkoji grapevine was established by meristem tip culture for the purpose of obtaining virus-free plants. Half strength Murashige and Skoog (1962) Medium supplemented with 0.1 mg/liter NAA, 1.0 mg/liter BA, 0.5 mg/liter kinetin, 4.0 mg/liter adenine, 30 g/liter sucrose and 6.0 g/liter agar (Medium I-2) was optimal for the greening and enlargement of inoculated meristem tips. For the subsequent growth, monstrous leaf formation and succeeding multi-shoots formation, it was necessary to substitute 0.2 mg/liter IAA for 0.1 mg/liter NAA (Medium II-1). The further development of shoots, opening and growth of small leaves, was better on the Medium II-1 but with BA and sucrose concentration reduced by half (Medium II-4). Rooting was induced on Galzy (1964) medium supplemented with 0.1 mg/liter NAA (Medium III-1) and the further plant development was better on the same medium but without NAA (Medium III-2). Plants were easily established in soil.

Repeated multiplication was also achieved by transplanting the fully developed shoots on a half strength MS (1962) medium supplemented with 0.2 mg/liter IAA, 1.0 mg/liter BA, 0.5 mg/liter kinetin, 4.0 mg/liter adenine, 15 g/liter sucrose and 6.0 g/liter agar (Medium II-2) followed by Medium II-4.

緒 言

我が国におけるブドウウイルス病に関する研究は、諸外国からかなり立ち遅れており、1965年岸ら(1)によって報告がなされたのが始まりである。その後、1973年以降田中ら(2)により国内のブドウ樹に対するウイルス汚染の調査がなされ、種々のウイルス病の存在が明らかとなってきた。さらに最近になって、矢野ら(3)、難波ら(4)により、甲州ブドウの味無し果の原因がウイルス病との関連で検討されている。またウイルスに汚染したブドウ樹は果実糖度の低下や収量の減少、樹勢の衰弱などをきたすことが知られており(5)、これによる経済的損失は極めて大きい。したがってブドウ樹のウイ

ルスフリー化の要求は、近年急速に高まっている。

ウイルスフリー化の手段としては現在、種々の植物で熱処理法と生長点培養法が広く利用されている。しかしブドウ樹では、世界的にみても生長点培養による個体再生に関する研究報告は極めて少なく(6, 7)、これはフリー化の手段として古くから熱処理法が行われてきたこと、また従来から木本類では組織培養が困難とされてきたことなどによるものと思われる。一方、ブドウのやく培養による幼植物の分化も(8, 9)フリー化の一手段と考えられるが、これは遺伝的形質の安定性の面から考えると利用することは難しいと思われる。しかし組織培養の場合は、ウイルスフリー化とあわせて大量繁殖と結びついた増殖の可能性も考えられる。

1981年3月31日受理

著者らは 1970 年以来、各地の栽培地においてウイルス病の調査、研究を行ってきた結果、日本在来種である甲州ブドウ、甲州三尺ブドウ、善光寺ブドウ (10) などがすでにリーフ・ロール病及び一部フレック病のウイルスに汚染されていることを確認した。以後これら 3 品種のブドウ樹のウイルスフリー化を目的として熱処理法及び生長点培養法による研究を進めてきたが、その経過についてはすでに別報で報告したとおりである (11)。

本報では、生長点培養法における各種培地の検討を行った結果、生長点近傍組織から完全植物体の再生及び増殖に成功したのでその経過を報告する。

材料及び方法

汚染の確認された善光寺ブドウより 1979 年 11 月穂木を採取し、5℃ で冷蔵保存した。これを温度 25℃、湿度 80%、16 時間日長の条件下で水耕により新しょうを出させ生長点近傍組織 (生長点及びその近傍組織) の摘出を行った。

材料の滅菌は長さ約 5cm の新しょうを基部から切り取り、葉を除去後水洗し、次亜塩素酸ソーダ溶液 (有効塩素 3%) で 5 分間フラスコ内で振とうした。その後滅菌水で数回洗浄し、顕微鏡下で無菌的に生長点組織の摘出を行った。大きさは 0.2~0.3 mm (葉原基 1 枚を含む生長点組織) とした。なお 0.4~0.5 mm (葉原基 2 枚を含む生長点組織) の大きさのものも比較検討した。

培養条件は温度 27℃、照度 3,000 Lx の連続照明とし

た。培地は種々のホルモン類、基本培地、糖濃度などについて試験を行った。またいずれの試験においても、調査期間及び培地内容の変換は移植 1 か月後とした。

結果及び考察

生長点組織の置床からはち上げに至るまでの生育過程を、培地組成の面から検討した結果、第 1 図に示したように A から G の 7 段階に表わすことが出来た。すなわち A 期；生長点の置床から緑化、肥大期、B 期；奇型葉形成期、C 期；多数の芽の形成、伸長期、D 期；多数の芽からの小葉の展開、伸長期、E 期；発根の誘導期、F 期；地上部、地下部の伸長期、G 期；はち上げ期である。

1. 生長点の置床から緑化肥大期 (以下 A 期と記す) まで。

予備試験で基本培地を MS (Murashige & Skoog (1962)) 培地とし、ホルモン類とその濃度の組合わせ試験を行ったところ、ジベレリンが培地に存在すると大部分が黄化した膨軟な組織となり、その後の移植にはほとんど失敗し、また NAA (α -naphthaleneacetic acid), BA (6-benzylaminopurine), カイネチン、アデニンなどの組合わせでは、NAA が 0.1 mg/l, BA が 1.0 mg/l, カイネチンが 0.5 mg/l, そしてアデニンが 4 mg/l で良好な結果が得られた。そこで本試験では基本培地の種類と濃度についての検討を行った。

培地組成として MS 培地、そしてその 1/2 濃度の培地、Hyponex 主体の培地、及び Galzy (1964) の培地

Fig.1. Diagram of growth stage.

Table 1. Effects of basal media and of its concentrations on the growth of the cultured meristem tips.

Media	Total number	Situations of growth (mm)					Composition of media**
		blasted	~0.5	~1	~2	2~	
I-1	15 (100)	2 (13.3)	3 (20.0)	7 (46.7)	3 (20.0)		MS medium
2	15 (100)	2 (13.3)	0 (0)	2 (13.3)	9 (60.0)	2 (13.3)	MS/2 medium
3	14 (100)	4 (28.6)	3 (21.4)	7 (50.0)			Hyponex 2g/l, NH_4NO_3 0.1g/l MgSO ₄ 0.1g/l, Fe-EDTA 30mg/l
4	13 (100)	6 (46.2)	2 (15.4)	5 (38.5)			Galzy (1964) medium
2	15* (100)	0 (0)	0 (0)	2 (13.3)	8 (53.3)	5 (33.3)	MS/2 medium

(%)

* Inoculated size : 0.4~0.5 mm with two leaf primordia instead of 0.2~0.3 mm With one.

** Additive for all media.: NAA 0.1 mg/l, BA 1 mg/l, Kinetin 0.5 mg/l, Adenine 4 mg/l, Sucrose 30 g/l, Agar. 6 g/l, pH 5.8.

(12) の 4 種類 (それぞれを I-1, 2, 3, 4 とした) を用いた。なおホルモン類及びシヨ糖濃度は一定とした。その結果を第 1 表に示した。置床 1 か月後に緑化肥大の大きさを調査し、大きさ別に個体数で示した。I-2 培地で枯死率が 13.3% と低く、1 mm 以上に生育したものが 86.6% と最もよかった。よって生長点の置床から A 期までは I-2 培地 (MS 1/2 濃度, NAA, 0.1mg/l, BA, 1.0mg/l, カイネチン, 0.5mg/l, アデニン, 4.0mg/l, シヨ糖, 30g/l, 寒天, 6.0g/l, pH.5.8) でよいことがわかった。

次に生長点組織の大きさを約 2 倍の 0.4~0.5 mm とし、同じ I-2 培地で生育状況を比較した。その結果を第 1 表の下欄に示したが、ほとんど差は認められなかった。なお A 期の状態を第 2 図に示した。

2. A 期から茎葉の生育期 (D-2 期) まで

A 期のものを再度 I-2 培地で継代培養を試みたが、生育せず枯死した。そこでオーキシンを、従来の NAA 0.1mg/l から IAA (β -indolacetic acid) に変えて濃度を倍の 0.2mg/l とし、さらに BA 及びシヨ糖濃度を組合わせた 4 種の培地 (以下 II-1, 2, 3, 4 とした) を検討した。その培地組成を第 2 表に示した。なおこの場合基本培地、カイネチン、アデニンは、I-2 培地と同様の濃度とした。

まず始めに A 期より奇型葉形成期 (B 期)、さらには D-2 期までへの生育過程について調査した。その結果を各生育段階まで到達した個体数で第 3 表に示したが、II-1 培地で 34.1% が B 期まで到達しており、他の培地ではほとんど生育せず枯死した。なお B 期の状態を第 3 図に示した。この結果から A 期から B 期までは II-1 培地 (MS 1/2 濃度, IAA, 0.2mg/l, BA, 1.0mg/l, カ

Fig.2. Greening and enlargement (Stage A)

イネチン, 0.5mg/l, アデニン, 4.0mg/l, シヨ糖, 3.0 g/l) がよいことがわかった。ここで II-1 培地の A 期の 31.9% は、その後生育は見られず枯死した。

次に B 期から多数の芽の形成、伸長期 (C 期)、さらに

Table 2. Compositions of media examined on the stage from the greening and enlargement (Stage A) to the growing of shoots (Stage D-2)

Media	IAA(mg/l)	BA(mg/l)	Kinetin(mg/l)	Adenine(mg/l)	Sucrose(g/l)	Concentration ratio to MS medium
II-1	0.2	1	0.5	4	30	MS/2
2	0.2	1	0.5	4	15	MS/2
3	0.2	0.5	0.5	4	30	MS/2
4	0.2	0.5	0.5	4	15	MS/2

Table 3. Effects of media on the subsequent growth of the meristem tips on the greening and enlargement stage (Stage A)

Media	Situations after transplanting					Total number
	blasted	A	B	C	D	
II-1	24 (26.4)	29 (31.9)	31 (34.1)	0	7 (7.7)	91 (100)
2	8 (100)	0	0	0	0	8 (100)
3	16 (84.2)	2 (6.5)	1 (5.3)	0	0	19 (100)
4	10 (100)	0	0	0	0	10 (100)

(%)

Fig.3. Monstrous leaf formation (Stage B)

D-2 期までの生育経過についても同様に調査した。結果を第4表に示したが、II-1 培地で 76.7% がC期まで到達しており、他の培地では枯死か又は到達した確率が低

Fig.4. Maltishoots formation and its elongation (Stage C)

かった。これよりB期からC期までは同様に II-1 培地でよいことがわかった。C期の状態を第4図に示した。

C期からD期に至るまでの結果を、同様に第5表に示した。いずれの培地でもD期まで到達した。しかし II-1, 2, 3 の培地では、第5図に示したように小葉の展開、伸長は盛んとなる(D-1期)が、茎葉の大型化(D-2期)は認められなかった。これに対しII-4 培地ではD期の94.4%とそのほとんどが茎葉の発達したD-2期(第6図)まで到達した。よって茎葉の発達を促すためには、ショ糖, 15 g/l, BA を 0.5 mg/l と減少させる必要のあることがわかった。

3. D-2 期から地上、地下部の生育期(F期)まで

Table 4. Effects of media on the subsequent growth of the plantlets on the stage of monstrous leaf formation (Stage B)

Media	Situations after transplanting					Total unnumber
	blasted	A	B	C	D	
II-1	8 (18.6)	—	1 (2.3)	33 (76.7)	1 (2.3)	43 (100)
2	10 (100)	—	0	0	0	10 (100)
3	8 (72.7)	—	0	0	3 (27.3)	11 (100)
4	4 (50)	—	4 (50)	0	0	8 (100)

(%)

Table 5. Effects of media on the subsequent growth of the plantlets on the stage of multishoot formation and elongation (Stage C)

Media	Situations after transplanting					Total number
	blasted	A	B	C	D	
II-1	1 (1.6)	—	—	35 (55.6)	27 (42.9)	63 (100)
2	3 (30.0)	—	—	0	7 (70.0)	10 (100)
3	61 (30.5)	—	—	29 (14.5)	110 (55.0)	200 (100)
4	1 (5.6)	—	—	0	17 (94.4)	18 (100)

(%)

Fig.5. Opening of small leaves (Stage D-1)

Fig.6. Growth of shoots (Stage D-2)

Galzy (1964) の培地に、NAA, 0.1mg/l を添加した培地（以後 III-1 培地と記す）で発根試験を行った。フラスコ内で約 2cm の高さに生育した茎葉を分割し、上記発根培地にできるだけ浅くさし、50日経過後にその生育状態を調査した。20 日目ころから発根が観察されたが、その後ほとんどのものが地下部の生育だけで（127 個体中 114 個体；89.8%）、地上部の生育が同時に起こったものは 10.2%（127 個体中 13 個体）だけであった。

そこで今度は地上部も同時に生育させる目的で、上記

の III-1 培地において 0.5cm 程度に発根伸長したもの（培養期間約 20 日間、発根の誘導期；E 期）を、III-2 培地（III-1 より NAA を除いた培地）に移植した。73.7%（19 個体中 15 個体）のものが地下部の生育とともに地上部の生育も起こり、III-2 培地へ移植した後約 1 か月で地上部は 4~5cm、葉数 5 枚前後となった（F 期）。第 7 図にその状態を示した。この結果、D-2 期から F 期までは III-1 培地で約 20 日間 0.5cm 前後の発根が起こるまで培養し、のち III-2 の培地へ移植することがよ

Fig.7. Growth of shoot and roots (Stage F)

いことがわかった。

4. F期からはち上げ（G期）まで。

F期のものをできるだけ根を痛めないよう取り出し水洗後、パーミキュライトを土とした直径 6cm のポリポットにはち上げた。栽培は温度 15～25℃、3,000Lx、16時間日長、湿度 80% の順化室内で行った。ここで約 20日間育成し、地上部の伸長及び緑化の進んだものから通常の温室へ移し隔離栽培を開始した。はち上げ後 20日目のものを第 8 図に示した。

5. 大量増殖のための培地の検討。

Fig.8. Potting and habituation (Stage G)

D-2 期に茎葉の集塊より茎葉を 1 本ずつ分割し、多数の芽の形成を促すための培地の試験を、第 2 表に示した培地を用いて行った。結果を第 6 表に示した。いずれの培地でも茎葉の基部より多数の芽の形成、伸長が起こり、特に II-2 の培地では 75.8% と C 期を経て D 期まで到達した割合が最も高かった。ただしこの状態は、いずれも第 5 図の状態（D-1 期）までであった。よって増殖のためのサイクルを循環させるためには、D-2 期まで生育した個体を分割後 II-2 の培地へ移植して D-1 期まで、そしてその後 II-4 培地へ移植して、再び D-2 期へと導くことにより完成させることができた。

以上の結果をまとめたものが第 1 図である。なお、生長点組織の置床よりはち上げまでの期間は、最も短かったもので約 4 か月であった。

現在、ブドウ樹については、生長点培養により樹体を再生したとの報告が極めて少なく、ましてやウイルスフリー化に関してもほとんど言及されていない。これらのことから、今回個体の再生に成功したことは、生長点培養法によってウイルスのフリー化がなされているかどうかを検討する意味で、非常に興味深いと思われる。このようなことから、引き続きウイルスフリー化の確認を行うため、Pinot Noir, St. George の両品種を用いて接ぎ木検定を、さらに並行して蛍光顕微鏡による直接蛍光診断法を用い、リーフ・ロール病、フレック病の検定を行っている。

Table 6. Effects of media on the subsequent growth of the plantlets on the shoot growing stage (Stage D-2)

Media	Situations after transplanting					Total number
	blasted	A	B	C	D	
II-1	5 (5.8)	—	—	38 (44.2)	43 (50.0)	86 (100)
2	7 (21.2)	—	—	1 (3.0)	25 (75.8)	33 (100)
3	101 (43.4)	—	—	20 (8.6)	112 (48.0)	233 (100)
4	14 (93.3)	—	—	0	1 (6.7)	15 (100)

(%)

摘要

ウイルスフリー化を目的に、ウイルス病に汚染されている善光寺ブドウを材料とし生長点培養により完全植物体の再生及び増殖に成功した。大きさ 0.2~0.3 mm の生長点組織を置床後緑化、肥大するまでは、Murashige & Skoog (1962) の 1/2 濃度の培地へ NAA, 0.1mg/l, BA, 1.0mg/l, カイネチン, 0.5mg/l, アデニン, 4.0 mg/l, ショ糖, 30g/l, 寒天, 6g/l を添加し, pH 5.8 に調整した I-2 培地が最も適していた。続いて奇型葉の形成, 引き続いての多数の芽の形成には, I-2 培地の NAA を IAA, 0.2mg/l にかえた II-1 培地が適していた。引き続いての多数の芽から小葉の展開, 伸長には II-1 培地から BA とショ糖濃度を半減した II-4 培地が適していた。発根の誘導には, Galzy の培地(1964) に NAA, 0.1mg/l を加えた III-1 培地が, そしてその後の地上部, 地下部の伸長には III-1 培地から NAA を除いた III-2 培地が適していた。その後, はち上げ, 順化が行われた。この間最も短かいもので約 4 か月間を要した。

また, 増殖は小葉の展開, 伸長した茎葉を分割して II-2 培地 (II-1 培地のショ糖濃度を 1/2 としたもの) へ移植し, 多数の芽の形成, 伸長を促進させ, その後 II-4 培地で再度小葉の展開, 伸長期まで到達させることで成功した。

謝辞

本研究の機会を与えていただき, 発表を許可されたマンズワイン株式会社, 茂木七左衛門社長, 株式会社ミヨシ, 三好勲男社長並びに終始懇切な御指導を賜ったマンズワイン株式会社専務取締役上野雄靖博士, また研究に御協力いただいた株式会社ミヨシメクリクロン研究室, マンズワイン株式会社勝沼工場, 研究室の皆様に感謝の意を表します。

引用文献

1. 岸 国平・高梨 和雄・我孫子 和雄・北島 博. 1965. ブドウのウイルス病に関する研究(第 1 報). アカザに感染するウイルスの検出ならびにその分布について. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* XXX (2).
2. 田中寛康・久郷 毅・今田 準. 1973. ブドウウイルス病に関する研究. ブドウのウイルス病様の症状について, 安芸津支場試験研究年報 No.1: 49—50.
3. 矢野 龍・寺井康夫. 1979. ブドウの味なし果の接木伝染性について. 昭和 54 年度日植病大会講演要旨集.
4. 難波成任・山下修一・土居養二・興良 清. 1979. 甲州ブドウの味無果病で見出される小球形ウイルス. *日植病報.* 45: 70—73.
5. 田中寛康. 1976. ブドウウイルス病の被害とわが国における発生状況. 今月の農業. 2: 74—80.
6. WOLFSWINKEL, L. D. 1965. Tissue culture as a possible means to healthier grape propagation material. *Proc. Int. Conf. on Virus and Vector on Perennial Hosts*, Davis, Calif.: 318—322.
7. HOFFERT L. L., GIFFORD E. M. Jr., 1964. Growth in vitro of excised stem tips of *Vitis vinifera*. *Amer. J. Bot.* 51: 677 (abstr.)
8. 平林利郎・秋浜友也. 1978. ブドウ属の薬培養における幼植物の分化について, 園芸学会昭和53年度春季大会発表要旨. 116.
9. K. RAJASEKARAN., M. G. MULLINS., 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid Grapevines. *Jour. Exp. Bot.* 30: 399—407.
10. 茂木七左衛門・上野雄靖・木下研二. 1978. 善光寺ブドウとそのワインについて. *醸協誌.* 73: 608—612.
11. 上野雄靖・木下研二・三田村雅・赤沢賢三・井理正彦. 1981. 醸造用ブドウのウイルス無毒化について. 76: 428—430.
12. GALZY, R. 1964. Techniques de thermothérapie des viroses de la Vigne. *Ann. Epiphyties.* 15: 245—256.