

グラジオラスにおける茎頂培養苗を利用した効率的ウイルス接種法

長岡(中園)栄子¹・小坂能尚
(京都府農業資源研究センター)

An Efficient Method Using Mericlone for Inoculating Viruses to Gladiolus Plants

Eiko NAKAZONO-NAGAOKA² and Yoshitaka KOSAKA

摘 要

ウイルス接種が困難であるグラジオラスへの効率的な接種方法を確立するために、茎頂培養苗の利用を試みた。CMVとBYMVについて、それぞれの強毒株と弱毒株を供試し、発根培地上での培養期間が異なる未順化苗の葉に対して、純化ウイルスまたは部分純化ウイルスをカーボランダム法により擦り付け接種した。その結果、いずれのウイルスとも容易に感染し、培養苗の生育期間が短いほど高率であった。また、培養苗に感染したBYMVの強毒株または弱毒株は、後代の木子に100%伝搬されることが明らかとなった。

グラジオラスは主要な花き園芸植物のひとつであるが、ウイルス病がその生産性や商品価値の著しい低下をもたらし、大きな問題となっている。国内のグラジオラスに発生する主な病原ウイルスとしては、インゲンマメ黄班モザイクウイルス (BYMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、タバコ輪点ウイルス、タバコモザイクウイルス及びソテツえそ萎縮ウイルスがある (大木, 1997)。これらのうち、BYMVとCMVは全国的に発生が多く、最も重要な病原ウイルスであることが報告されている (福本ら, 1982; 長岡ら, 2004; 高津ら, 1998; 和田ら, 2000)。グラジオラスへのウイルス接種は、品種の特定が不可能な種子由来の実生苗を用いた場合に、低率ではあるが可能である (福本ら, 1982)。一方、球茎や木子由来の苗は品種を特定できるものの、ウイルスの接種は非常に困難であり (岩井・高津, 私信)、このことがグラジオラスにおけるウイルス病の研究に大きな障害となっている。

筆者らは、ウイルス病防除の手段としてBYMVとCMVの弱毒ウイルスを既に開発しており、これらをグラジオラスへ利用するためには、効率的なウイルス

接種法を確立する必要がある。

本報告では、グラジオラスへの効率的なウイルス接種方法として、茎頂培養後の未順化苗への接種を検討し、さらに感染したBYMVの後代への伝搬性を調べた。

材料および方法

グラジオラス (品種: ガリレイ) 球茎より摘出した茎頂を初代培地 (ハイポネックス[®] 2 g/l, NH₄NO₃ 100mg/l, MgSO₄·7H₂O 100mg/l, Fe-EDTA 30mg/l, ピロドキシン 4 mg/l, ショ糖30g/l, インドール酢酸 1 mg/l, カイネチン 0.1mg/l, アデニン 4 mg/l, 寒天 6 g/l, pH5.7) に置床し、カルス形成したものを増殖培地 (MS基本培地, ショ糖30g/l, ナフタレン酸 0.02mg/l, ベンジルアデニン 0.2mg/l, 寒天 6 g/l, pH5.7) に移植してシュートを形成させた。シュート形成したものを株分けした後、発根培地 (ホルモン無添加の増殖培地) で培養し、発根が認められた未順化苗 (培養苗) を培地より取り出して根部の培地を十分洗浄した後、ウイルス接種に供試した。培養苗の生育ステージは、発根培地での培養期間が1ヵ月未満 (), 1ヵ月以上2

1 現在 中央農業総合研究センター

2 Address: National Agricultural Research Center, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan
2007年5月14日受領
2007年6月20日登載決定

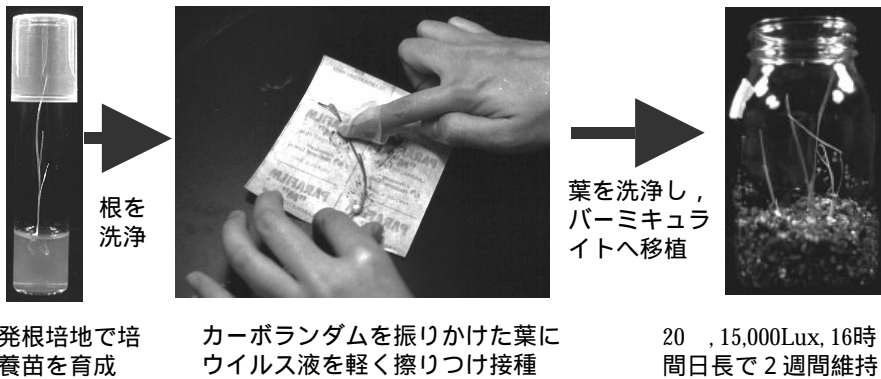
ヵ月未満(), 2ヵ月以上()で区別した。接種には、グラジオラスより分離したCMV強毒株GC83、弱毒株CM95 (Kosaka and Fukunishi, 1997; Nakazono-Nagaoka et al., 2005)、茨城県農業総合センター生物工学研究所より分譲されたBYMV強毒株IbG (グラジオラス分離株) 及び弱毒株M11 (Nakazono-Nagaoka et al., 2004) を供試した。CMVの接種に用いた純化ウイルスの濃度及び苗1株当たりの接種量は、GC83においては0.001~1.0 mg/m^lで10 µ^l、CM95では1.0~2.0 mg/m^lで20 µ^lとした。一方、BYMVではPEG・ショ糖クッション超遠心処理後の部分純化ウイルス液を10 µ^l接種した。いずれもカーボラダムを用いて培養苗の葉に擦り付け接種した。これを洗浄して培養ビン内のパーミキュライトに移植し、22~25 °C・15,000luxで約2週間

育成した後、ウイルス感染の有無を調べた(第1図)。

BYMVの感染が認められたグラジオラス苗は温室内で5代目まで栽培し、各世代の球茎及び4代目の球茎に着生した木子について、出芽した葉の一部からウイルスを検出した。検出には、簡易間接ELISA法を用い、陰性の場合にはさらに強毒株と弱毒株が識別できるRT-PCR法 (Nakazono-Nagaoka et al., 2004, 2005) により確認した。

結果および考察

培養苗におけるウイルス感染率は第1表に示した。CMV強毒株GC83の感染率は、生育ステージの苗においてはウイルス濃度が0.1 mg/m^lと1.0 mg/m^lで100%であった。生育が進んだステージの苗では、ステージの苗より感染率は低下したが、ウイルス濃度が低



第1図 グラジオラス未順化培養苗へのウイルス接種方法

第1表 グラジオラスの培養苗におけるウイルスの感染率

ウイルス	分離株	生育ステージ ^{a)}	接種濃度 (mg/m ^l) ^{b)}	感染株数 / 接種株数	感染率 (%)
CMV	GC83 (強毒)		0.1	4/4	100
			1.0	7/7	100
	0.001		2/3	66.7	
	0.01		3/6	50.0	
	0.1		4/6	66.7	
	1.0		6/7	85.7	
	CM95 (弱毒)		1.0	0/3	0
	2.0	19/24	79.2		
	2.0	11/37	29.7		
BYMV	IbG (強毒)			12/14	85.7
			M11 (弱毒)	11/25	44.0

a) 生育ステージ : 発根培地での培養が1ヶ月未満, : 1ヶ月以上2ヶ月未満, : 2ヶ月以上

b) GC83は1株当たり10 µ^l, CM95は20 µ^l, BYMVは部分純化ウイルス10 µ^lを擦り付け接種した

第2表 BYMV感染グラジオラス球茎苗の葉におけるウイルスの検出^{a)}と病徴の出現

分離株	苗No.	3代目		4代目			5代目		
		ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	病徴 ^{b)}	ELISA	RT-PCR	病徴
M11 (弱毒)	1	-	+	+	nt	...	-	+	...
	2	-	-	-	+	...	+	nt	...
	3	-	+	-	+	...	+	nt	...
	4	-	+	+	nt	...	+	nt	(mM)
IbG (強毒)	1	+	nt	+	nt	(mM)	+	nt	mM
	2	+	nt	+	nt	...	+	nt	M
	3	+	nt	+	nt	...	+	nt	(vmM)
	4	+	nt	+	nt	(mM)	+	nt	...
	5	+	nt	+	nt	...	+	nt	...
	6	+	nt	+	nt	mM	+	nt	(M)
無接種	1	-	nt	-	-	...	-	-	...

a) +: 陽性, -: 陰性, nt: 検定せず

b) 病徴 M: 比較的明瞭なモザイク, mM: 軽いモザイク, vmM: 極めて軽いモザイク, ...: 無病徴,

() 内はまれに生育初期に現れる一時的な病徴

い場合でも50%以上が感染した。感染個体の新葉にはCMV強毒株の病徴と思われる白色条斑モザイク症状が現れた。一方、培養苗を栽培して得られた次代球茎やその木子の幼苗に対して、ウイルス濃度0.1 mg/mと1.0 mg/mの強毒株GC83を接種したが、感染は認められなかった(データ省略)。ウイルス濃度が2.0 mg/mの弱毒株CM95については、生育ステージの苗において79.2%と高率に感染したが、ステージの苗では29.7%に低下した。BYMV接種には生育ステージの苗のみを供試した。強毒株IbGの感染率は85.7%で、感染個体の新葉にはモザイク症状が認められた。一方、弱毒株M11の感染率は44.0%で、感染個体は無病徴であった。なお、無接種の培養苗からは、ウイルスは全く検出されなかった。

これらの結果より、ウイルス接種が困難なグラジオラスにおいて、培養苗を用いることで効率的なウイルス接種が可能と考えられた。本接種法は、強毒株に比べて感染率は低下するものの、弱毒株の接種にも有効であった。さらに、培養苗の生育ステージが進むにつれてウイルス感染率は低下するため、発根培地での培養期間が2ヵ月未満の若い苗の利用がより有用であると思われた。

次に、BYMVの感染が認められたグラジオラス苗を温室内で5代目まで栽培し、球茎と木子によるウイルスの伝搬性を調べた。球茎より出芽した葉においては、強毒株IbGは全ての代で簡易間接ELISA法によって容易に検出された。一方、弱毒株M11は、5代目では全

ての苗から検出されたが、それ以前の代で簡易間接ELISA法や検出感度の高いRT-PCR法でも検出されない場合があった(第2表)。これは、弱毒株M11がグラジオラス植物体内で局在していたか、ウイルス濃度が低いために検出できなかったと推察される。強毒株IbGが感染している4、5代目の球茎では、葉において病徴が現れたが、弱毒株M11では、殆どが無病徴であった。4代目の球茎に着生した木子においては、いずれのウイルス株とも、全ての木子苗の葉から検出された(第3表)。以上のことより、グラジオラスの培養苗に感染したウイルスは、栄養繁殖により後代の球茎や木子へ安定して垂直伝搬することが確認された。

本研究では、培養苗を利用することで、グラジオラ

第3表 4代目の球茎に着生した木子苗の葉におけるウイルスの検出

分離株	苗No.	検出木子数 / 検定木子数 ^{a)}	検出率(%)
M11 (弱毒)	1	2 / 2	100
	2	5 / 5	100
	3	7 / 7	100
	4	26 / 26	100
IbG (強毒)	1	4 / 4	100
	2	6 / 6	100
	3	17 / 17	100
	4	11 / 11	100
	5	11 / 11	100
	6	16 / 16	100

a) ウイルス検出は簡易間接ELISA法で行った

スの品種を特定して、ウイルスを高率に接種できる方法が示された。これにより、ウイルスに対する品種特性の調査が可能になると思われる。また、グラジオラス葉において病徴が現れず、後代に100%伝染するBYMV弱毒株M11は、ウイルス防除を目的としたグラジオラスの弱毒ウイルスとして有望であると考えられる。

引用文献

- 福本文良ら（1982）日植病報 48：68 - 71 .
- Kosaka, Y. and T. Fukunishi (1997) Plant Dis. 81：733 - 738 .
- Nakazono-Nagaoka, E. et al. (2004) J. Gen. Plant Pathol. 70：359 - 362 .
- 長岡(中園)栄子ら（2004）関東東山病虫研報 52：71 - 74 .
- Nakazono-Nagaoka, E. et al. (2005) J. Gen. Plant Pathol. 71：243 - 246 .
- 大木 理（1997）植物ウイルス同定のテクニックとデザイン．日本植物防疫協会，東京．165pp.
- 高津康正ら（1998）茨城県農業総合センター生物工学研究所研究報告 2：91 - 98 .
- 和田行央ら（2000）日植病報 66：44 - 48 .