

## 加工用イチゴのウイルスフリー株育成に関する研究—Ⅱ

各地の加工用品種「アメリカ」のウイルス病の検定および  
やく培養によるウイルスフリー株の育成

宮崎 正則・美谷 誠一・藪内 一雄

### Studies on the Breeding of Virus-Free Strawberry Plant for Processing Use—Ⅱ

#### Virus Test of var. America Strawberry Plant for Processing Use in Various Growing Districts and Breeding of Virus-Free Strawberry Plant by Anther Culture

Masanori Miyazaki, Seiichi Miya and Kazuo Yabuuchi.

This study was carried out to investigate the actual conditions of virus infection of var. America strawberry plants in various growing districts and to breed virus-free strawberry plants by the anther culture.

From the results of the virus tests of strawberry plants, it was found that most of var. America strawberry plants collected from Hyogo, Kyoto, Ehime and Kagawa prefectures had been infected with the strawberry virus.

As a result of the anther culture, it was found that callus is formed from the anthers cultured in RM-1964 medium containing NAA (Sodium  $\alpha$  Naphthylacetate) and BA (N-Benzyladenine) and then the shoots are formed from the callus. When the anthers in a bud of 3 to 4 mm in width were cultured, the rates of the callus and the shoots formations were very high. After the shoots were transplanted in the medium without NAA and BA, the strawberry plantlets were induced.

From the results of the virus tests of the cultured plants, it was found that all of the mother plants of var. America were severely infected with the strawberry virus. On the other hand, 50 to 81% of the cultured plants of var. America were virus-free.

各地の生食用イチゴの多くがウイルス病にり病し、減収している現在<sup>1~4)</sup>、加工用イチゴもウイルス病にり病している危険性が大きいと考え、前報<sup>5)</sup>で加工用品種「アメリカ」のウイルス病について検討し、東洋食品研究所および兵庫県下の同品種がり病していたこと、その対策として株の熱処理法が有効であることを報告した。その後さらに各地の「アメリカ」のり病実態を調査し、その多くがり病していること、さらにウイルスフリー株育成法の一つとしてやく培養を試み、若干のウイルスフリー株を獲得することができたことを本報で報告する。

#### 実験材料および方法

##### 1 各地の「アメリカ」のウイルス病の検定

京都府、愛媛県、香川県の「アメリカ」を数株ずつ検定した。さらに兵庫県の生育障害をしめす2種の「アメリカ」も検定した。検定法は前報のとおりで、指標植物(EMCとUC-1)の小葉に上記の「アメリカ」の小葉をつぎ木してウイルスを接種し、指標植物に発現した病徴からそのり病

程度を判定<sup>1)</sup>し、病徴なし、軽症、重症にわけて表わした。

## 2 やく培養

やく培養法はイチゴのやくを培養し、カルスを経由して茎葉を分化させ幼植物を得る方法で<sup>6)</sup>、ウイルス病の重症株のやくを用いてもカルス経由の幼植物はウイルスフリーになると報告されている<sup>7,8)</sup>。実験1は1974年12月上旬にガラス室栽培の「アメリカ」,「エンパイア」の株から横径の異なるつぼみを採取した。実験2は1975年5月上旬の露地栽培(開花末期)の「アメリカ」のつぼみを、実験3は1976年4月下旬の露地栽培(開花盛期)の「アメリカ」,「UC-1」,「EMC」のつぼみを採取した。いずれもウイルス病の重症株から採取した。

培養法は大沢らの方法<sup>7)</sup>に従い、まずつぼみをエタノールとサラシ粉上澄液で表面殺菌し、無菌的にやくをとりだし、寒天培地に置床した。培地はRM 1964培地を基礎培地とし、ショ糖3%, 寒天0.7%, NAA $10^{-6}$ M, BA $10^{-5}$ Mを加えてpH 6に調整し、試験管に分注してアルミフイルでふたをし、オートクレーブで $1\text{ kg/cm}^2$ , 15分間殺菌した。やく置床後、 $25^\circ\text{C}$ 下で12時間3,000ルクス照明して培養した。培養4週間後にはカルスが形成され、その後茎葉が分化したが、この茎葉をつぎにNAAとBAを含まない培地に移して生育させ、根が伸長したのち石英砂を入れた小鉢に植えなおし、ハイポネックス1,000倍液で水耕した。さらにその後、土を入れた鉢に移してあみ室で管理した。この方法で得られたやく培養苗をさらに生育させて、ウイルス病の検定および果実と茎葉の形態を観察した。

## 実験結果

### 1 各地の「アメリカ」のウイルス病の検定

兵庫県, 京都府, 愛媛県, 香川県の「アメリカ」を検定して表1に示した。なお東洋食品研究所および兵庫県の生育不良株, 生育良好株, ウイルスフリー株の検定結果は前報で報告したが、比較のため同表に記載した。検定の結果、今回新たに検定した兵庫県の生育不良A株とB株はともに重症で、A株は展開葉のモザイク, わい化を伴い、Mottle ウイルスを中心とした重複感染と思われた。B株は写真1のように成葉が著しく紫変し、その後枯死して、おもにMild yellow edge ウイルスに感染していたものと推定した。京都府の「アメリカ」はその生育状態は不明であったが、3

Table 1 Symptoms development on the indicators by excised leaf-petiole grafting inoculation of var. America strawberries collected from various districts

District and growing condition of plant	Number of identified plant	Degree of symptom development			Per cent of plant infected
		No symptom	Slight	Severe	
Toyo Inst Food Tech	10	1	0	9	90 <sup>%</sup>
Growing district of Hyogo					
Degenerated plants	6	2	2	2	66
Well-growing plants	2	2	0	0	0
Virus-free plants	2	0	0	0	0
Degenerated plants A	2	0	0	2	100
Degenerated plants B	2	0	0	2	100
Growing district of Kyoto	3	1	2	0	66
Growing district of Ehime					
Degenerated plants	2	0	1	1	100
Well-growing plants	4	1	3	0	75
Growing district of Kagawa	6	1	0	5	83

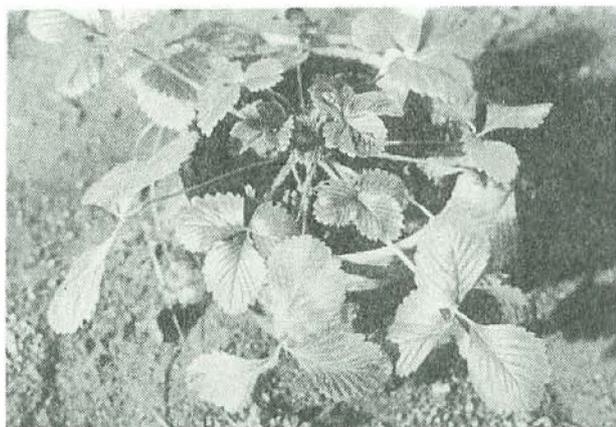


Plate 1 Purpling in old leaves of UC-1 by in-coculation of var. America strawberry plant



Plate 2 Virual severe symptoms in EMC by in-coculation of var. America strawberry plant

Right : check plant  
Left : inoculated plant

株のうち2株が軽症であった。愛媛県の株は生育良好株と不良株にわけて検定し、前者は4株のうち3株がり病し、後者は2株ともり病し、うち1株は写真2のように重症であった。香川県の株は6株検定し、5株がり病し、展開葉がモザイク、わい化を伴う重症株であった。

## 2 やく培養

実験1では、やく置床4週間後には黄緑色のカルスが形成され(写真3)、その後茎葉が分化したが(写真4)、その結果を表2に示した。カルス形成率は「アメリカ」では横径6.1 mm以上のつぼみで劣ったが、「エンパイア」ではつぼみの横径との関係は明らかでなかった。「アメリカ」のカルス形成率は17~29%で、「エンパイア」の41~79%に比べて劣った。両品種の開花した花の花粉をアセトカーミンで染色すると、「アメリカ」はほとんど不稔性であったが、「エンパイア」は稔

Table 2 Callus and shoot formations from strawberry anther

Time of picking of bud	Variety	Width of bud mm	Number of cultured anther	Callus formed from anther		Shoot formed from callus		Number of plant induced
				Number	Per cent	Number	Per cent	
Test No. 1. Growing in green house. At the beginning of December.	America	3.1 to 3.5	126	37	29	1	3	6
		3.6 to 4.0	160	39	24	6	15	
		4.1 to 5.0	180	46	25	0	0	
		5.1 to 6.0	127	32	25	0	0	
		over 6.1	133	23	17	0	0	
	Empire	3.1 to 4.0	162	72	44	9	12	6
4.1 to 6.0	168	120	71	2	2			
over 6.1	186	92	49	0	0			
Test No. 2. Open culture. At the beginning of May	America	2.5 to 3.0	128	60	47	7	11	8
		3.1 to 4.0	579	92	16	11	12	
Test No. 3. Open culture. At the middle of April.	America	3.1 to 3.5	263	192	73	79	41	35
		3.6 to 4.0	393	273	70	72	26	
	UC-1	1.5 to 3.0	617	183	30	40	22	0
EMC	1.5 to 3.0	566	188	33	44	23	0	

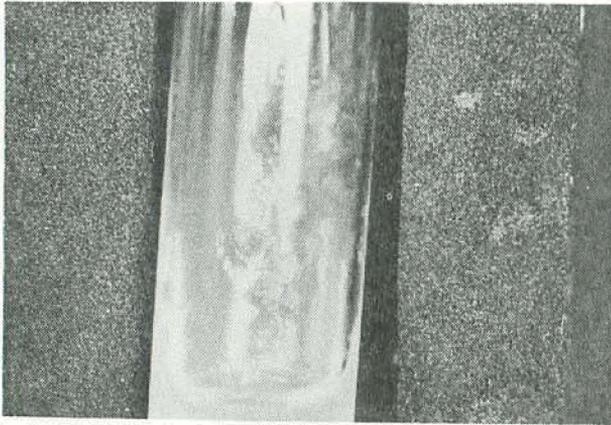


Plate 3 Callus formation from strawberry anther

性であった。カルス経由の茎葉分化は「アメリカ」では横径 3.1~4.0mm のつぼみのやくからのカルスで認められたが、4.1mm 以上のつぼみからは認められず、「エンパイア」もほぼ同様の傾向にあった。やく中の花粉を調べたところ、横径 3mm 以下のつぼみの花粉は四分子期であった。つぎにこの分化した茎葉を NAA と BA を含まない培地に移すと、写真 5 のように幼植物が生成されたが、途中枯死する苗が多く、その後水耕、土耕を経て得られた成体は「アメリカ」6 株、「エンパイア」6 株であった。



Plate 4 Shoot formation from strawberry callus

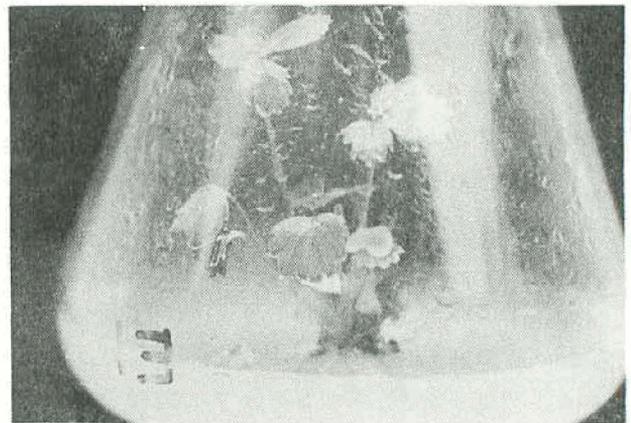


Plate 5 Strawberry plantlet formation by anther culture

上記の実験 1 でやく培養の概要を把握したが、「アメリカ」の花粉が不稔性であったこと、得られた成体が少数であったことなどから改めて露地栽培の株からつぼみを採取して実験 2、実験 3 を行なった（表 2）。その結果、実験 2 のカルス形成率、茎葉分化率は実験 1 と大差がなく、成体は 6 株しか得られなかった。しかし実験 3 では「アメリカ」のカルス形成率、茎葉分化率は実験 1、実験 2 に比べて相当高く、「UC-1」、「EMC」も高率で茎葉が分化した。しかしその後 NAA と BA を含まない培地中で枯死する苗が多く、「アメリカ」の成体は 35 株しか得られず、「UC-1」と「EMC」はすべて枯死した。

つぎに、得られた成体をあみ室で生育させて（写真 6）、ウイルス病の検定および果実や葉の形態を観察した。ウイルス病の検定結果は表 3 に示したとおりで、実験 1 と実験 2 のやく培養「アメ

Table 3 Symptoms development on the indicators by excised leaf-petiole grafting inoculation of strawberry plants bred by means of anther culture

Test No.	Variety	Number of identified plant	Degree of symptom development			Per cent of plant infected
			No symptom	Slight	Severe	
No. 1.	America	6	3	3	0	50 <sup>%</sup>
	Empire	3	3	0	0	0
No. 2.	America	6	3	3	0	50
No. 3.	America	31	25	6	0	19



Plate 6 Strawberry plants induced by anther culture

「アメリカ」はいずれも6株のうち3株がウイルスフリーで、他の3株も極く軽症であった。「エンパイア」は6株ともウイルスフリーであった。実験3の「アメリカ」31株のウイルス病のり病率は19%であった。これらのやく培養ウイルスフリー株の果実と茎葉を観察したところ、実験1の「アメリカ」は親株に比べて果皮色が濃く、種子が果皮面より突出し、葉は厚く、濃緑色で親株とは若干異なるのではないかと思われた。しかし実験2の「アメリカ」は写真7、8のように親株とほぼ同じ形態であった。収量調査をするには至っていないが、収穫末期の株の大きさは写真9のように親株（ウイルス病の重症株）に比べて良好であった。実験3の「アメリカ」については果実の形態観察をするには至っていないが、茎葉はほぼ同一と考えている。実験1の「エンパイア」もほぼ同一とみなしている。

#### 考 察

兵庫県をはじめ各地の「アメリカ」のウイルス病を検定し、地域によってそのり病程度に差異があったが、すべての地域で病していることが判明した。このことから他の地域の「アメリカ」も何んらかの対策がとられていないかぎりり病しているものと思われる。兵庫県や香

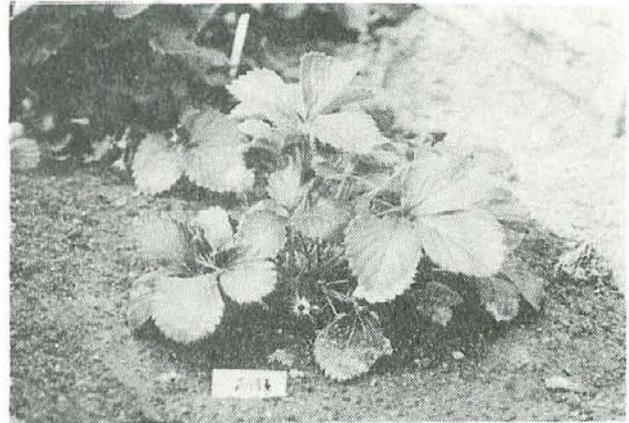


Plate 7 Growing condition of var. America strawberry plants induced by anther culture

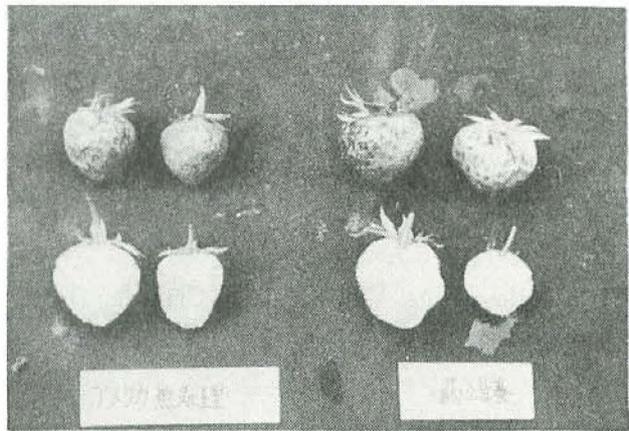


Plate 8 Fruit of var. America strawberry plant induced by anther culture  
Right : fruit of cultured plant  
Left : fruit of mother plant

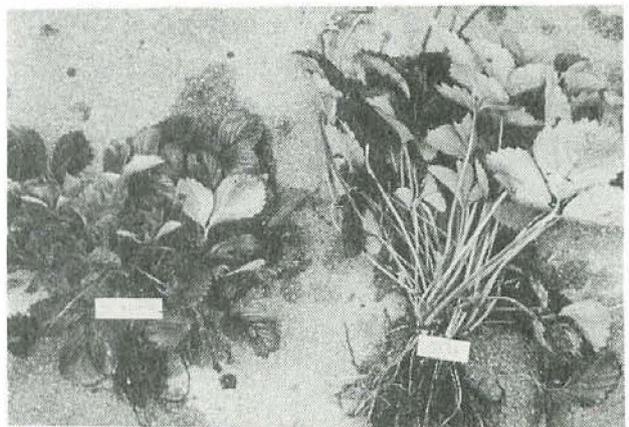


Plate 9 Growing condition of var. America strawberry plant induced by anther culture at the end of the harvest period  
Right : cultured plant  
Left : mother plant

川県では「アメリカ」の連作障害が発生し、その原因を根腐れ病あるいは芽枯れ病と考えているが、これらの地域の「アメリカ」はウイルス病にもり病しているので、この連作障害の対策にはウイルス病対策も考慮しなければならない。

ウイルス病のり病株の果実生産量は当研究所では前報<sup>5)</sup>のようにウイルスフリー株の $\frac{1}{2}$ に減少し、他の報告<sup>1)</sup>では著しい場合には $\frac{1}{10}$ に低下している。したがってウイルス病対策が緊急に構じられなければならない。その対策として生食用イチゴでは、ウイルスフリー苗の育成、増殖、配布という一貫した事業が多く の県で行なわれている<sup>2~4)</sup>。しかし加工用イチゴの場合、業会にはウイルスフリー苗はほとんど無いか、あるいは極く少数である。そこで筆者らはウイルスフリー苗を加工業会に供給したいと考え、ウイルスフリー株の育成について検討した。前報<sup>5)</sup>では熱処理を試み、良好な結果が得られたので関連企業に配布したことを報告した。今回は西ら<sup>6)</sup>、大沢ら<sup>7)</sup>の報告に従ってやく培養を試み、親株の形質にほぼ一致する「アメリカ」のウイルスフリー株を若干獲得することができた。

やく培養はイチゴのやくを培養し、カルスを経由して茎葉を分化させ、幼植物を得る方法である。やくからカルスが形成されるのは脱分化と呼ばれる現象で、一度分化した体細胞が再び若返って細胞分裂能力を回復したり、全形成能を持つようになることにある。またカルスから茎葉が分化するのは、植物細胞は本来どの器官の細胞も完全な植物体を復元する能力を持つことにあると考えられている<sup>8)</sup>。本実験では開花盛期頃の横径 3~4 mm のつぼみのやくを培養することによりカルス形成率、茎葉分化率が高かった。

本実験の目的であるウイルスフリー化については、カルスを経由することによりイチゴの Mottle, Mild yellow edge, Veinbanding, Crinkle の 4 種のウイルスを除去することができると報告され<sup>7)</sup>、これは次報で報告予定の生長点培養<sup>10)</sup>も同様であり、前報の熱処理法が Mottle ウイルスのみを不活化するのに比べて有利である。ウイルス病にり病した植物体のやくにはウイルスが存在するが<sup>7)</sup>、これから生じたカルス経由の幼植物にはウイルスが存在しない理由として、一般にカルス中のウイルス濃度は継代培養すると低下すること、培地に添加する NAA, BA は植物ウイルスの増殖阻害物質であるとも考えられること、ウイルスの増殖速度よりもカルス細胞の分裂速度が速いためカルス中のウイルス濃度が低下することおよびウイルスはカルス中で偏在するので分化した茎葉を早くカルスから切り離すことなどが考えられている<sup>7)</sup>。大沢らによれば<sup>7)</sup>、やく培養苗はほとんどがウイルスフリーであったが、本実験では「アメリカ」のウイルスフリー率は低かった。この原因として茎葉をカルスから切り離す時期がおくれたこと、あるいは成体管理中にミスがあり、再びり病したことなどが考えられた。

なお本実験において、もう一つ考えなければならない点として変異の問題がある。つまり実験 1 の「アメリカ」のやく培養苗が親株の形態とは若干異なるのではないかと思われた点である。一般にカルス培養中に染色体が倍化し、突然変異株の生じることがあると報告され<sup>6,7)</sup>、やく培養はイチゴのウイルスフリー株育成法としてやや問題があるといわれている。しかし実験 2、実験 3 の「アメリカ」の培養苗、実験 1 の「エンパイア」の培養苗は外観的には親株とほぼ一致しているので、今後さらに形態や収量、品質調査を行い、良好な株を選抜していきたいと考えている。

## 要 約

- 1) 加工用イチゴ品種「アメリカ」のウイルス病についてそのり病実態調査およびやく培養によるウイルスフリー株の育成について検討した。
- 2) 兵庫県、京都府、愛媛県、香川県の「アメリカ」のウイルス病を検定し、地域によってそのり病程度には差異があったが、全ての地域の株がり病していることが判明した。

- 3) やく培養において、開花盛期頃の横径 3~4 mm のつぼみのやくを培養することにより、カルス形成率、茎葉分化率の高まることを認めた。
- 4) やく培養苗のウイルスフリー率は「アメリカ」で50~81%、「エンパイア」で100%であり、この中から葉や果実の形態が親株に一致する株を選抜し、現在増殖中である。

終りに 本研究を行なうにあたり御助力いただいた当研究所木多武雄氏、杉原八郎氏、若狭勝氏に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 高井隆次：園試報，C 8, 59 (1973).
- 2) 小室康雄：野菜のウイルス，新光社，東京，p. 336 (1973).
- 3) 水谷裕恒・大内良実：農及園，48, 949 (1973).
- 4) 水谷裕恒・大内良実：農及園，48, 1093 (1973).
- 5) 美谷誠一・宮崎正則・藪内一雄・黛 乙郎：缶詰時報，55, 761 (1976).
- 6) 西 貞夫・大沢勝次・豊田 努：野試報，A 1, 1 (1974).
- 7) 大沢勝次・戸田幹彦・西 貞夫：野試報，A 1, 41 (1974).
- 8) 大沢勝次・戸田幹彦・西 貞夫：農及園，49, 539 (1974).
- 9) 竹内正幸・石原愛也・古谷 力：組織培養，朝倉書店，東京，p. 195 (1972).
- 10) 森 寛一・浜屋悦次・下村徹・池上雍春：農事試研報，13, 45 (1969).