
馬鈴しょ原原種の生産・検定技術 をめぐる最近の話題

農 林 水 産 省 堀 尾 英 弘
婦恋馬鈴しょ原原種農場

馬鈴しょ原原種農場（以下、農場と記す）では、優良な無病原原種を効率的に生産配付するために日頃から工夫・改善をこらし、自ら技術開発を行うとともに試験研究機関で基礎開発された新技術についても積極的に実用化を試み、自前の技術として定着させてきた。最近外国では、通常の方法では増殖率の低い馬鈴しょを、特殊な技術を用いて短期間に増殖する“急速増殖法”が開発され、新品種の早期普及、種いも増殖年限の短縮による病害虫感染機会の回避と効率的生産等が期待できる新技術として注目されており、農場においてもその実用化を試みている。急速増殖には二つの方法があり、その一つは器内大量増殖法で、他は茎葉から挿穂をとり、これを挿木して増殖する方法である。

一方、採種栽培における農場の大きな特色は科学的な診断法による病害虫検定であるが、とりわけウイルス病の検定については、これまでも操作が簡単なスライド法を中心とした血清検定、ウイルスの種類と検定植物の組み合わせによっては効率的で検定精度も高い集団接種検定法、およびウイルス粒子の有無を直接的に判定できる電子顕微鏡検定が実用化されてきた。最近では血清学的な診断技術が日進月歩で発達しており、ウイルス検出精度が極めて高く、かつ、大量個体の検定が可能なエライザ法（酵素結合抗体法, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）の農場

への導入が図られつつある。

最近におけるこれら二つの新技術を中心とした農場の技術的なトピックスを紹介してみたい。

1 急速増殖法による馬鈴しょ 原原種の効率的生産

育種機関で新品種が育成されると農場でその増殖が行われるが、長い品種育成期間中にウイルス病、特に潜在性のウイルス病に汚染されることが多く、このため農場で最初に手がけるのが組織培養による無ウイルス化である。農場での組織培養は1964年から実施されており、現在、国内で栽培されている品種はほとんどすべて、試験管培養を経た無ウイルス株から増殖されたものである。微小な生長点組織から出発するため、培養中の突然変異を避ける必要があり、農場ではオーキシン類、サイトカイニン類のような生長調節物質を一切使わないので、試験管内で幼植物に育つまでに1年前後かかる。組織培養によって作出された無ウイルス株はガラス室で2年間増殖されて網室に植えられ、ここで収穫されたものが翌年初めてほ場（基本ほⅠ）に出るが、組織培養から出発して網室栽培終了までに4年間を要することになる。その後3作のほ場栽培（基本ほⅠ→基本ほⅡ→原原種ほ）を加えると原原種配付までに7年間、さらにその後の採種体系（原種ほ→採種ほ→一般栽培）

を考えると消費者の手に届くまでに10年を要している訳である。この長い増殖年限を可能な限り短縮して新品種の速かな普及を図るために、特に初期段階での増殖年限短縮に急速増殖法の導入、実用化が試みられている。

(1) 器内大量増殖法

無ウイルス株作出のための組織培養で得られた幼植物は、従来すぐに無菌土壌に移植して育てられ、ウイルス病検定によって無ウイルスであることを確認後、原原種増殖体系に乗せられるが、本法では土壌移植する前に幼植物の茎を無菌的に数個の節片に切断して培地の入った培養フラスコに置床し、各節片の腋芽から幼植物を伸長させる。これをさらに前と同じ方法で培地に分割移植することによ

ってネズミ算式に個体数を殖やすのであるが、増殖する個体が無ウイルスであることを早く確認する必要があるので、最初の1株のみは土壌移植して育て、肉眼・接種・血清・電顕の各検定手段によってウイルスの有無を調べる。Rocaら(1979)によれば、この器内増殖の1サイクルは約2～3週間であるので、短期間のうちに所定の個体数を確保でき、さらに土壌移植後において後述の挿木による増殖を併用すれば無ウイルス株作出後1年以内に網室用種いもを確保できるので、増殖の初期段階において従来よりも1年間短縮できる。

(2) 挿木による急速増殖法

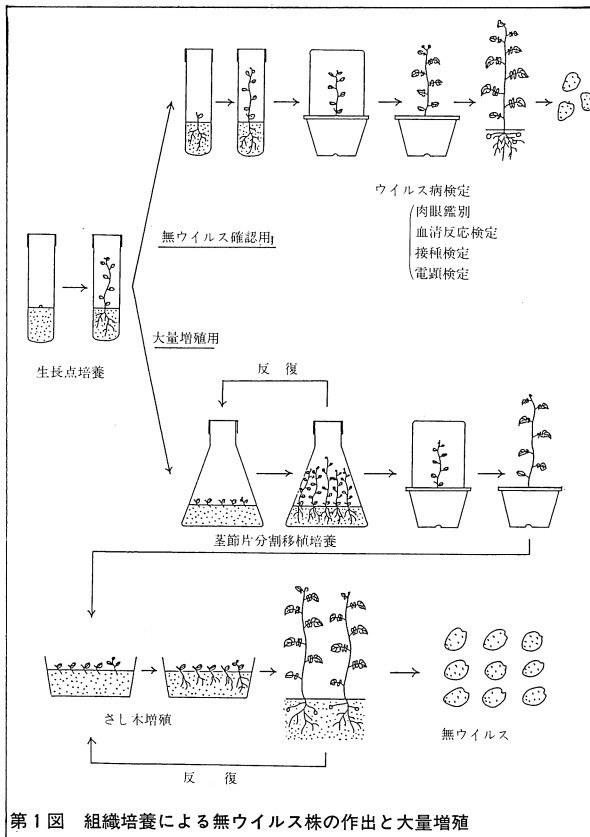
急速増殖を目的とした挿木の方法には、塊茎を植えないで直接萌芽させた幼芽を分割節

片として植える方法、塊茎を植えて伸長してきた茎葉を挿穂として用いる方法など種々あるが、農場で行う場合に、より実用的と思われるのは次の方法である。

① 茎挿し (stem cuttings) : 葉つきの頂芽を挿穂として用いるもので発根が比較的早く、活着率が高い。

② 節片挿し (single-node cuttings) : 茎を1節ずつ、葉をつけたまま分割し挿穂とする方法である。長日期間は発根し、腋芽も伸長して育つので新塊茎が得られるが、短日期間は発根しないで腋芽が肥大し、小さな気中塊茎が1個得られる。

上記の方法は挿木株から伸長した茎も再び挿穂に用い、これをくり返すことによって急速増殖するもので、茎挿し法では Cole & Wright (1967) によれば1個の塊茎が12ヵ月で5,000kgに、胆振農場の試験例では60gの塊茎から出発して、



第1図 組織培養による無ウイルス株の作出と大量増殖

第2図 急速増殖法による馬鈴しょ原種の増殖計画

↓：塊茎 ↓：植物体 破線は補助的な増殖

年次	急速増殖法による増殖体系	従来の増殖体系
1	組織培養 無ウイルス化 ↓ 試験管内 大量増殖	組織培養 無ウイルス化
2	急速増殖室 さし木による急速増殖 ↓	ガラス室 ポット栽培
3	網室 ↓ 基本ほ	ガラス室 箱植栽培
4	基本ほ ↓	網室
5	原原種ほ ↓	基本ほⅠ
6	原種ほ ↓	基本ほⅡ
7	採種ほ	原原種ほ

1年間で約8,800倍(528kg)に増殖している。節片挿し法は上手に行えば増殖率が高く、Goodwin(1980)によれば1個の塊茎を12ヵ月で256トンにまで増殖できる。

挿木による急速増殖法を実際に使うには挿穂の活着を助けるミスト室、ウイルス媒介虫から保護して挿木増殖するための網室が必要となるが、農場では器内大量増殖と挿木増殖を組み合わせるの新品種の急速増殖による早期普及のみでなく、将来的には急速増殖法によって、現在3年間のは場栽培を2年間に短縮し、は場で病害虫に感染する機会を少なくすることによって、より優良な原原種の効率的生産を意図している。

2 エライザ法による

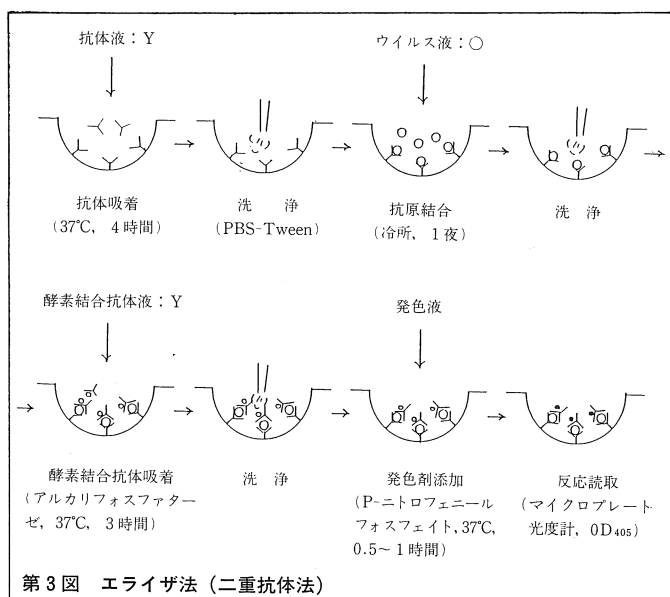
ウイルス病検定の精度向上と効率化

農場におけるウイルス病検定は種いも検定および立毛株検定に大別され、後者は栽培期間中8～10回の病株抜取が作業の中心になっ

ていて、高い効果をあげている。種いも検定は個別検定と呼ばれる方法によって冬季に温室内で実施されている。この方法は、種いもの1目を特殊なナイフ(抉芽刀)によって抉り取り、これを温室に植えて肉眼による病徴鑑別のみでなく、接種、血清あるいは電顕検定によって潜在するウイルスまでも調べ、もし陽性株があれば元の母塊茎を捨てるというものである。

ここで問題となるのは、各種検定方法のうちウイルスを検出する精度と能率である。Xウイルス(PVX)については集団接種検定法(幾枚かの葉を一まとめにして一緒にすりつぶし、その汁液を検定植物に接種してウイルス感染有無を、一まとめにした集団単位で調べる方法で、PVXの場合には400枚の葉の中に病葉が1枚入っていても確実に検出できる)で効率的に行われているが、Yウイルス(PVY)は系統によって検定植物の反応が異なり、また、Sウイルス(PVS)では必ずしも十分な検出精度が得られていない。最も被害の大きい葉巻病に対しては肉眼による病徴鑑別のみで、他の科学的で有効な検定手段を持たなかった。最近開発されたエライザ法はウイルス検出精度が極めて高く、しかも農場の検定作業として導入する場合に不可欠な大量検定が可能であり、もちろん葉巻ウイルス(PLRV)の検定も可能である。

エライザ法は1976年に英国で初めて植物ウイルスに応用された新しい血清学的な検定方法で、わが国でも数年前から試験が開始され、多くのウイルスで検出に成功している。カンキツ等果樹のウイルス病、馬鈴しょのウイルス病などでは実際の検定作業に用いられている。



本法 (ELISA二重抗体法) は第3図に示すように①精製したウイルス抗血清 (γ -グロブリン) をマイクロプレートの各ウェルの内壁に吸着させて、②これに磨砕・搾汁した試料液 (ウイルス抗原) を入れて抗体と結合させる。③次に酵素 (アルカリフォスファターゼ) と予め結合させた抗血清 (酵素結合抗体) を入れてこれに結合させ、④発色剤を入れる。⑤酵素があれば反応して黄色に発色するので発色の有無、程度を専用の分光光度計 (マイクロプレート光度計) によって吸光値を読み取り、判定する。①～③の各処理の後には吸着または結合しなかった余剰分を洗い流すための洗浄を行う。本法は良質の抗血清を用いれば高精度にウイルスを検出できる。

農場ではPLRVの検出も可能なこの高精度の検定法に注目し、1980年頃から北海道中央農場および婦恋農場を中心に手技の習得と実用化試験を開始した。実用化の鍵は本法により大量の個体を検定できるか否かにかかっている。この大量検定を実現するため集団接

種検定の場合と同じ発想で、複数の葉 (10～25枚) を1集団として一度に調べる“集団エライザ検定”を試みたところ、用いる抗血清の品質にもよるが、一度に調べられる集団の大きさはPVY, PVS 25枚, PLRV 10枚, PVX 100枚で実用的に可能であることがわかった。ウイルスを特定する必要がなく病株を除去するのが目的であれば、個々のウイルスごとに検定するよりも何種類かの抗血清を混合して検定できれば能率的である。

このウイルス混合抗体によるエライザ検定は、検出そのものは可能であるが、ウイルスの種類により単独で検出するよりも感度のやや低下するものがあり、実用化のためにはさらに改善が必要である。このほか塊茎からウイルスを検出する試み、抗原処理方法の簡便化などが試みられ、これらの成果は主として日本植物病理学会北海道部会において発表されている。

エライザ法による検定は1984年から農場に導入が始まり、現在、新技術への移行が実施されつつあるが、本法の導入はこれまで有効な科学的診断法を欠いていたPLRVの検定に威力を発揮するのみならず、PVY, PVSにおいても検定精度の飛躍的な向上が期待できる。一方ではまた、良質抗血清の作製技術、作業の簡便・能率化、マイクロプレートの再利用など今後改善すべき点も少なくない。これらへの積極的な取り組みが農場の技術向上と検定の効率化に大きく寄与するものと確信している。