

カーネーションのウイルスフリー苗育成に関する研究

第1報 母株の高温処理効果

是松博文・古谷博

要 約

是松博文, 古谷博(1976): カーネーションのウイルスフリー苗育成に関する研究。

第1報 母株の高温処理効果 広島農試報告 37: 69~74

生長点組織培養によるカーネーションのウイルスフリー苗を育成するための一連の試験をおこなっているが, 本報では採芽用親株への高温処理の効果について検討を行なった。

高温下における採芽用親株の生育は35~38°C処理では異常がなく, 長期間の処理が可能と思われた。41°Cでは3週目に36%, 45°Cでは1週目には58%が枯死あるいは枯死寸前であった。

培養苗の生育率は親株を35~45°Cで処理した場合, 生長点が大きいほど結果がよく, 処理期間が長くなるほど低くなる傾向にあった。

ウイルスフリー苗の育成率は親株を35°C以上の高温で3週以上処理すれば, 0.9mmで培養してもほぼ100%で0.5mmなら1週処理でも十分な効果が認められた。また, 33°Cでは5週以上の処理で処理効果があるが30°C以下では効果が認められなかった。

I 緒 言

カーネーションは施設栽培では主要な切花で, その生産量は逐次増加しているが病虫害の被害がきわめて多く, これが栽培上のネックになっている。カーネーションに被害を及ぼしている病害として大別すると糸状菌病, 細菌病, ウイルス病があるが, このうち糸状菌病, 細菌病の被害は農薬の開発と栽培管理の改善でその防除対策はある程度まで進んでいる。しかし, ウイルス病についての防除法はまだ確立されていない。

園芸作物で栄養繁殖を主体とする種類ではウイルス病に感染したものが多く, ウイルス病に感染した作物は生育が劣るばかりでなく, 花や果実が奇型になったり汚濁したりしてその被害はきわめて大きく生産量および品質の低下をもたらしている。

植物ウイルスには100種類以上がある^{2,6,7)}といわれ, カーネーションについては6種が同定されている^{10,16)}。これらのウイルス病を回避するために近年生長点組織培養によってウイルスフリー苗を育成する方法^{3,4,5,8,12,13,14,15)}が研究され実用化しつつある。

生長点組織培養によるウイルスフリー苗の育成は, 生長点近傍の細胞組織はウイルスに感染しておらず, この未感染の生長点近傍の細胞組織を分離, 培養するもので

あるが, 分離培養は無菌的に行う必要があり^{4,9,11)}また, 分離は顕微鏡を用いて大きさを0.3~0.5mm以下としなければウイルスフリー苗の育成は困難である。

ところがウイルスは高温に弱く, 高温下では不活性化して増殖速度が劣る性質がある^{5,6)}ことが明らかにされているので, この特性を利用して生長点を採取する前に予め親株を高温に遭遇させることによってウイルスの未感染部分を大きくすることができるものと考えられ, これが可能なら生長点の分離を大きくすることができ培養が容易になり, 育成率が高められるものと思われたのでこの試験を行った。

II 材料および方法

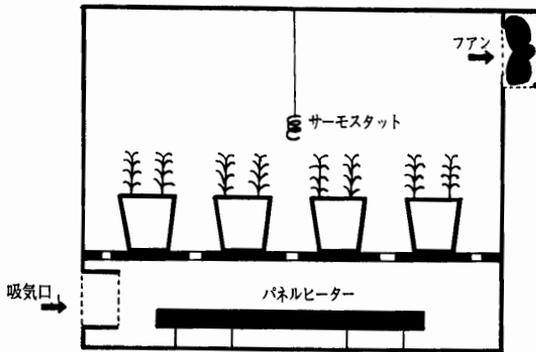
試験は1974年より2年間行った初年度は高温処理の温度を35°C, 38°C, 41°C, 45°Cの4処理区を設け, 採芽用親株をそれぞれの処理区について1週間から4週間処理して, 処理温度と処理期間がウイルスフリー苗の育成率に及ぼす影響を検討した。

供試品種はレット・ゲティを用い, 4月25日に挿芽したものを, 5月27日に6号素焼鉢にそれぞれ10本宛定植し, 6月25日より高温処理を開始した。

生長点分離の大きさは各処理区とも0.5mm, 0.7mm, 0.9mmとし, 無処理区ではさらに0.3mm区を設けた。

なお、培養数は1処理10~14本として Backer and Phillips の培地を用い、培養温度18~25°C、光源ビタルックス3,000Lux の下で培養した。

2年目は、1月13日に挿芽した苗を3月31日に前年と同様6号鉢に定植して、4月9日より処理を開始した。処理温度は28°C、31°C、33°Cとし5週間から9週間処理を行い、処理温度の低温限界と処理期間を検討した。処理期間が長いため苗が著るしく生長する様子がみられたので、4月16日に摘芯して1株から3本の脇芽を育てて採芽した。



第1図 高温処理装置

高温処理は、第1図のような高さ90cm、幅110cm、奥行90cmのファイロン張りの処理箱を作り、底部に800Wニクロム線入りパネルヒーター、上肩部に換気扇を取りつけてサーモスタットによってヒーターと換気扇が交互に作動して所定の温度を保つようにしたもの、を、ガラス室内に設置して処理を行った。

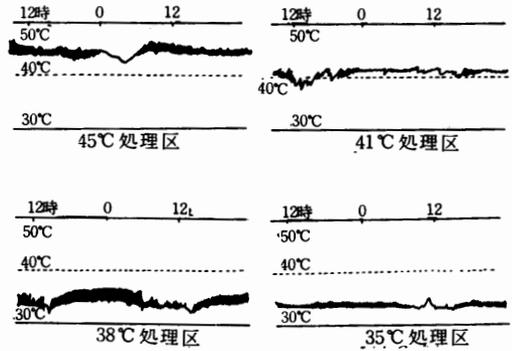
ウイルス保毒検定は西洋アカザ (*Chenopodium amaranticolor*) を用いて、試験管内で生育した植物体をおよそ2カ月後に取り出して常法により接種、10~15日後に局部斑点の有無によって判定した。

Ⅲ 試験結果

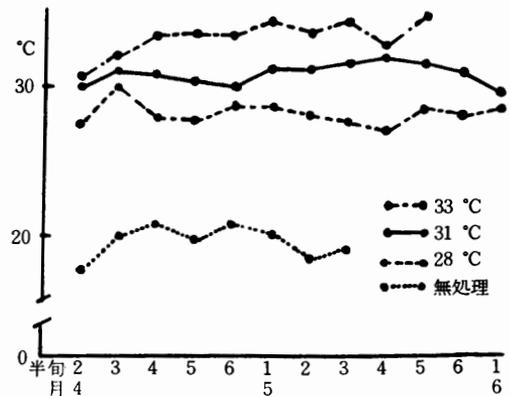
1. 高温処理による採芽用親株の生育

採芽用親株の生育状況についてみると、第1表のように38°C処理では生育にほとんど異常が認められず、長期間の処理が可能と思われたが、41°C処理では処理開始後1週目には19%、3週目には36%、また、45°C処理では処理開始1週目には58%が枯死あるいは枯死寸前で生長点組織の採芽ができなかった。この結果から鉢植えによる高温処理は41°C以上の温度で長期間の処理は困難なこ

とが判明した。



第2図 処理温度の日変化



第3図 処理温度の半月別変化

第1表 高温処理による親株の生育状況

処理温度 °C	調査 本数	処 理 期 間					
		1週 生存 本数	1週 生存 割合 %	2週 生存 本数	2週 生存 割合 %	3週 生存 本数	3週 生存 割合 %
41	190	154	81	154	81	133	64
45	213	89	42	0	0	0	0

2. 培養苗の生育割合

35°C~45°Cの高温で処理した場合は、各処理区とも分離した生長点部分が大きいほど培養苗の生育率が高く、また、高温処理の期間が長くなるほど劣る傾向にあった。

すなわち、1週処理区では45°C処理の0.9mmが70%の

生育率でやや劣ったが、40°C以下の処理では92~100%で生育がよく、0.7mmもほぼ同様の結果であった。0.5mmでは62~75%の生育率であった。無処理区は処理開始1週目と同時期に培養したが0.5mmが64%でいく分劣ったものの0.3mmでも91%で生育率が高かった。

第2表 培養苗の生育割合（35°C~45°C）

処理温度 °C	生長点の 大きさ mm	処 理 期 間			
		1 週 %	2 週 %	3 週 %	4 週 %
35	0.5	75	15	38	17
	0.7	92	33	45	30
	0.9	92	83	67	64
38	0.5	69	83	45	30
	0.7	75	86	50	45
	0.9	100	100	67	60
41	0.5	62	50	60	
	0.7	92	90	50	
	0.9	92	90	60	
45	0.5	90			
	0.7	80			
	0.9	70			
無処理	0.3	91			
	0.5	64			
	0.7	82			
	0.9	100			

(注) 41°C 4週および45°C 2週以後は親株が枯死して培養ができなかった。

第3表 培養苗の生育割合（28°C~33°C）

処理温度 °C	生長点の 大きさ mm	処 理 期 間		
		5 週 %	7 週 %	9 週 %
28	0.5	67	87	93
	0.7	69	93	100
	0.9	67	100	100
31	0.5	93	73	93
	0.7	93	80	100
	0.9	100	93	100
33	0.5	100	64	
	0.7	92	100	
	0.9	92	92	
無処理	0.3	83		
	0.5	77		
	0.7	100		
	0.9	92		

3~4週処理についてみると、0.9mmでは60~67%、0.7mmでは35°C 4週処理が30%とくに劣ったほかはいずれも45~50%であった。また、0.5mmでは3週処理が38~60%、4週処理では17~30%で劣っていた。

28°C~33°Cで処理した場合には、28°C 5週処理が67~69%、31°C 7週処理の0.5mmが73%、33°C 7週処理の0.5mmが64%のほかはいずれも80%以上の生育率であった。

なお、この処理温度内における親株の生育障害はほとんど認められなかった。

生長点の分離の大きさによる生育率は各処理間にほとんど影響がみられなかった。また、処理期間による影響は28°C処理と31°C処理ではほとんど認められなかったが、33°C処理では7週処理の生育がわずかに劣った。このことから、0.5mm以上の大きさであれば培養後の生育はほぼ順調にいくものと思われた。

3. ウイルスフリー苗の育成割合

1) 生育苗に対する割合

無処理で生長点を分離培養したものは、生長点組織を0.3mmの大きさにした場合92%のウイルスフリー苗が得られた。しかし、0.5mmでは69%のウイルスフリー苗率でいく分結果が劣り、0.7mmでは38%であった。また、0.9mmの大きさのものからはウイルスフリー苗を得ることができなかった。

35°C~45°C処理によるウイルスフリー苗の育成率は第4表のとおりであった。35°C処理では1週処理の0.9mmが36%で結果が著しく劣ったほかは、0.5mm、0.7mmがそれぞれ78%、82%、また、0.9mmでは2週処理が80%、4週処理が86%のほかはいずれも100%のウイルスフリー苗が得られた。

38°C処理では処理期間が3週以上ではいずれも100%のウイルスフリー苗が得られたが、2週処理の0.5mmおよび1週処理では結果が劣り、1週処理では0.5mmでも56%、0.9mmではわずかに9%であった。2週処理の0.7mmおよび0.9mmではそれぞれ67%、69%であった。

41°C処理では0.5mmの1週処理が88%のほかはいずれも100%のウイルスフリー苗が得られ、0.7mmでも2週処理が89%で結果がよかったが、0.9mmでは1~2週処理では33~35%で結果が劣ったが3週処理では100%であった。

45°C処理では1週処理の0.5mmが90%であったが、0.7mmおよび0.9mmではそれぞれ50%、57%で顕著な効果は認められなかった。2週処理以後は親株が著しく生育障害を起して採芽できなかった。

また、33°C処理では7週処理の0.9mmが73%でいく分

第4表 ウイルスフリー苗の割合 (35°C~45°C)

処理温度 °C	生長点の 大きさ mm	処 理 期 間							
		1 週		2 週		3 週		4 週	
		A %	B %	A %	B %	A %	B %	A %	B %
35	0.5	78	65	100	15	100	38	100	17
	0.7	82	75	100	33	100	45	100	30
	0.9	36	33	80	67	100	67	86	55
38	0.5	56	38	100	88	100	45	100	30
	0.7	78	68	67	67	100	50	100	45
	0.9	9	9	69	69	100	67	100	60
41	0.5	88	55	100	50	100	60		
	0.7	42	39	89	80	100	50		
	0.9	45	34	33	30	100	60		
45	0.5	90	80						
	0.7	50	40						
	0.9	57	40						
無処理	0.3	90	82						
	0.5	86	54						
	0.7	56	45						
	0.9	0	0						

註 Aは生育数に対する割合、Bは培養数に対する割合

第5表 ウイルスフリー苗の割合 (28°C~33°C)

処理温度 °C	生長点の 大きさ mm	処 理 期 間					
		5 週		7 週		9 週	
		A %	B %	A %	B %	A %	B %
28	0.5	80	53	69	60	50	47
	0.7	22	15	20	20	20	20
	0.9	40	27	36	36	27	27
31	0.5	64	60	73	53	50	47
	0.7	50	43	33	27	33	33
	0.9	31	27	20	20	20	20
33	0.5	100	100	100	64		
	0.7	100	92	92	92		
	0.9	90	75	73	67		
無処理	0.3	92	92				
	0.5	69	69				
	0.7	38	38				
	0.9	0	0				

ウイルスフリー苗率が劣ったほかは、5週以上の処理を行ったものはいずれも90%以上であった。

28°C~33°C処理では、28°C 5週処理の0.5mmが80%、同じく7週処理0.5mmが69%、31°C 5週処理0.5mmが64%でいく分ウイルスフリー苗率が高かったほかはいずれも50%以下であった。

2) 培養数に対する割合

培養数に対するウイルスフリー苗の育成割合は、35°C処理では0.5mmと0.7mmの1週処理がそれぞれ65%、75%であったほかはいずれも50%

以下であったが、0.9mmでは2週以上の処理でいずれも50%以上であった。

38°C処理では0.5mm 2週処理が88%で結果がよく、0.7mmでは1~2週処理が80%、3週処理は50%であった。また、45°Cでは0.5mmの1週処理が80%であったほかはいずれも40%であった。

28°Cから33°Cの処理では、33°C処理が67%以上のウイルスフリー苗を得た。31°Cでは0.5mmが5~7週処理で50%以上、28°C処理でも0.5mmの5~7週処理が50%以上であったが、0.7mm以上ではウイルスフリー苗率が低かった。無処理では0.3mmが82~92%であったが、0.5mmで54~69%、0.7mmでは38~45%で処理したものよりはいく分劣っていた。

IV 考 察

この試験の結果から、カネーションのウイルスフリー苗の育成において採芽前の親株を一定期間高温に遭遇させたのちに培養することによって、これまでは生長点組織を0.3~0.5mmの大ききで培養していたものが、0.9mmでも培養でき、また、幼苗の育成率は低下するものの、生育した苗については高率のウイルスフリー苗が得られ

ることが判明した。ただし、これは西洋アカザに接種検定の結果であり、カーネーションに感染しているすべてのウイルスが除去できたかどうかは判断できないが、実用上からは支障はないものと考えてよい。

このように、生育した苗についてのウイルスフリー苗の割合が高ければ接種検定等において投棄する無駄な苗が少なくなり、また、再感染の機会も少なくなるなど培養効率が高くなる。

カーネーションの高温処理の影響について武田¹⁵⁾は38~40°C 8週処理で除毒効果があったと報告しているがこの試験では33°Cで5週、35°Cなら3週以上で処理効果が認められており、親株の管理法や処理時期を夏期にするなど考慮することによってさらに短期間の処理でも効果が生じるものと思われる。

HOLLING and KASSANIS⁵⁾はキクの熱処理の結果、aspermy, stunt, ring pattern virusは除去できたがChrysanthemum vivus B, Chrysanthemum virus D, Vein mottole virusは除去できなかった。しかし重複感染しているウイルスは1種でも除去できれば品質は向上したと報告しており、麻谷¹⁾もChrysanthemum virus BおよびTomato aspermy virusに対して熱処理の効果を認めている。

高井^{*)}はイチゴについて、38°C12日間の熱処理によってStrawberry mottole virusが不活性化され収量が顕著に増加したと報告している。

このように、カーネーションを始めキク、イチゴなど栄養繁殖を行う主要作物では、今後ますます生長点培養法による無病苗の育成がはかられるものと考えられるが、これらの種類についても高温処理の効果がさらに明らかにされると、熟練を要する培養育成もかなり一般化し培養育成の効率も高まるものと推定される。

平井⁶⁾によれば、ウイルスの増殖を阻害し、あるいは促進する物質が次第に明らかにされており、これらを適当に組み合わせることによってウイルスを制御できる希望を生じたとしており、また、イチゴでは葯培養によるウイルスフリー苗が育成されており、ウイルス制御物質の利用や葯培養等によってウイルスフリー苗の大量増殖が可能となるものと考えられる。

V 摘 要

1) 生長点組織培養法によってカーネーションのウイルスフリー苗を育成するための一連の試験を行っているが、本報では採芽用親株への高温処理の効果について報

告する。

2) 高温下における採芽用親株の生育は、35~38°C処理ではほとんど異常がなく長期間の処理が可能と思われたが、41°Cでは3週目に36%、45°Cでは1週目に58%が枯死あるいは枯死寸前であった。

3) 培養苗の生育率は35~45°Cの高温下で処理した場合、生長点部分が大いほど成績がよく、処理期間が長くなるほど低くなる傾向にあった。

4) ウイルスフリー苗は35°C以上の温度で1週処理したのち0.5mm以下で培養すれば高率に育成できた。0.7mmでは1週処理で80%、3週以上の処理で100%、また、0.9mmでも3週以上の処理で高率に得られた。

5) 28°C~33°C処理では、33°Cで5週以上の処理を行えば0.9mmに培養しても高率のウイルスフリー苗が得られたが、30°C以下での処理効果は認められなかった。

謝 辞

本試験の実施に当り、生長点組織培養法その他について農林省農事試験場浜屋悦次博士に種々御指導をいただいた。また、貴重な助言と校閲の労をとられた當場園芸部沖森当部長および企画調査部信野尚専門技術員に深厚なる謝意を表す。

引用文献

- 1) 麻谷正義：1970. 熱処理と生長点培養によるChrysanthemum virus BとTomato aspermy virus罹病キクの無毒化。日植病報 36(5) 356.
- 2) 明日山秀文・飯田俊武：1967. 日本作物ウイルス病総覧。農業技術協会.
- 3) BAKER, R. and D.J. PHILLIPS: 1962. Obtaining pathogen-free stock by shoot top culture. Phytopathology. 52: 1242.
- 4) 浜屋悦次・森寛一：1969. 組織培養法によるウイルス罹病植物の無菌化。農事試験場報告 13: 45~110.
- 5) HOLLINGS, M. and B. KASSANIS: 1957. The cure of chrysanthemums from some virus diseases by heat. J. Roy. Hort. Soc. 82: 339~342.
- 6) 平井篤造：1972. ウイルスと植物。南江堂.
- 7) ———・山口昭：1969. 植物ウイルス総論。養賢堂.
- 8) 寛三男・是松博文：1974. カーネーションのウイルスフリー株の育成について。広島農業の研究 10: 39~44.
- 9) 加藤幸雄：1968. 植物組織培養法。誠文堂新光社.
- 10) 小室康雄：1966. そ菜花きウイルスの種類に関する

* 園試盛岡支場 昭和44年度 そ菜試験成績書

る研究. 日植病報 32: 114~116.

11) 森寛一: 1964. 組織培養による罹病植物の無毒化. 農及園 40(1): 21~24.

12) Os. HVAN: 1964. Production of virus-free carnation by means of meristem culture. Neth. Jour, Plant Path. 70: 18~26.

13) PHILLIPS D. J. : 1963. Control of carnation streak virus by shoot-tip culture. Colorado Flower

Growers Assoc, Bull. 155: 1~3.

14) 下村徹・平井篤造: 1967. 植物ウイルス治療の現況. ウイルス 17(1~2): 1~14.

15) 武田恭明: 1974. 茎頂培養によるカーネーション無病苗の育成と実用化に関する研究. 滋賀農試特別報告 11: 1~89.

16) 栃原比呂志: 1971. カーネーションウイルス病とその病原ウイルスの種類. 植物防疫 25(5): 184~186.

Studies on the Production of Virus-Free Plants of Carnation

1. Effect of high temperature treatment of mother plants

Hirofumi KOREMATSU and Hiroshi FURUYA

Summary

The custom method of apical meristem culture used very small growing points is extremely difficult and takes much time and also the growth of cultured nursery plants delays.

But in this case the percentage of virus free plants increases extremely. On the other hand, large growing points which are cut out so easy survive more than small points. But the percentage of virus free plants decreases as the points become larger.

This study was carried out in order to improve the rate of virus free plants and shorten the growing period on the apical meristem culture used large growing points which mother plant were kept at high temperature treatment.

1) The growth of mother plants for picking was good at 35~38°C and they were seemed to be able to grow for long period. But 36% of mother plants completely or almost died from three weeks treatment at 41°C and 58% of them died at 45°C after one week.

2) Young plants reproduced by larger growing points were grown up much when the mother plants were keeping at 35~45°C. But longer period of treatment brought less young plants.

3) Virus free young plants were nursenaried at higher percentage when mother plants were kept at 35°C for one week and the growing point size was below 0.5mm. Moreover, 0.7mm growing points brought 80% virus free young plants when mother plants kept at same temperature for one week and also 100% virus free plants were obtained after three weeks treatment. When growing point size was 0.9mm, virus free young plants were obtained at high percentage after more than three weeks treatment.

4) High temperature treatment of mother plants at 28~33°C more than five weeks produced high percentage of virus free young plants but at below 30°C the effect of treatment on mother plants was not recognized in young plants.