

低温処理および茎頂培養によるキクわい化ウイルスの除去

塩飽 邦子*・岩井 豊通*・藤野 守弘**・渡辺 和彦*

要 約

キクわい化ウイルスに感染したキクからウイルスを除去し、健全な苗を得る方法を検討した。

- 1 キク体内のキクわい化ウイルスの濃度は、冬季に低下し、上位葉ほどこの傾向が著しい。
- 2 冬季に生じる吸枝の中にはウイルスが検出できないほど濃度の低い個体もあるが、その後、高温で4か月間栽培するとウイルスは検出され、品種によってはウイルス症状が肉眼的に確認できるほど濃度は上昇した。
- 3 ガラス温室で栽培しているキクわい化ウイルス感染株を茎頂培養してもウイルスフリー株は得られなかった。
- 4 5°C, 5,000lx, 16時間照明で6か月間低温処理した後、茎頂培養(2段階法)することでキクわい化ウイルスを高率に除去することができた。また、この低温処理でキクはほとんど枯死することはなかった。

Elimination of Chrysanthemum Stunt Viroid from Infected Plant by a low Temperature Therapy and Meristem-tip Culture

Kuniko SHIWAKU, Toyomichi IWAI, Morihiko FUJINO and Kazuhiko WATANABE

Summary

Possibilities of elimination of chrysanthemum stunt viroid have been investigated.

- (1) The stunt viroid disease of chrysanthemum is very severe in summer; however, the multiplication of viroid decreases drastically in winter.
- (2) The concentration of viroid in the succers occurred in the winter, but growth condition of high temperature for 4 months allows to detect stunts easily.
- (3) A meristem-tissue culture was not enough when meristem tissues were obtained from the infected plants grown at an ordinary temperature.
- (4) Elimination of the viroid from the infected plants was successfully achieved by using the meristem-tips cut from the infected plants which were kept in the growth chamber at 5°C and 16h daily light for 6 months.

キーワード：キク, キクわい化ウイルス, 低温処理, 茎頂培養

緒 言

キクわい化病はキクわい化ウイルス(CSVd)により起こる病害でキクの草丈が著しく短くなるため発生すると被害が大きい。夏ギクに発生が多く、品種によっては全株保毒し、栽培が続けられない例もある。一方、秋冬キクではほとんど発生が見られない。ウイルスによる病害は、ウイルスに起因する病害と同様、一度感染する

と、穂木を通じて次世代に伝染する。栄養繁殖性作物のウイルスの除去は、茎頂培養や高温処理と茎頂培養を組み合わせた方法により、多くのウイルス病で成功している^{7,9)}。この高温処理と茎頂培養の組合せは、高温期にウイルスの増殖が抑えられるということと、生長点の近傍にはウイルスが存在しないか非常に少ないということからウイルスフリーの苗が得やすくなると考えられている⁹⁾。これに対して、ウイルスは、高温処理と茎頂培養の組合せによって除去できるとする報告と^{3,11)}、高温処理と茎頂培養の組合せではフリー化できないという報告

1998年8月31日受理

* 中央農業技術センター ** 元中央農業技術センター

5. 8) がある。筆者らは、キクわい化病が低温期に症状がマスクされ、ウイロイドの検出も難しくなること、高温期には症状が激しくなりウイロイドの検出も容易になることから、高温処理よりも低温処理の方がウイロイドを除去しやすいのではないかと考えた。低温期に生じる吸枝を採取することにより健全な苗が得られるとの報告もある¹²⁾。そこで、冬季の低温または、低温処理と茎頂培養を利用したウイロイドの除去方法を検討した。

材料及び方法

香川農試より分譲されたウイロイドフリー「ミスルトー」と CSVd 接種「ミスルトー」、および 1995 年 6 月に三木市より採集した夏ギク「夢志光」と「丹生の月」を供試した。これらの株は、BACHELIER ら¹¹⁾の報告に基づき、6 月と 9 月の 2 回ウイロイド検定をして保毒株と無毒株に分類した。

ウイロイド検定は DIG 標識プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーション法により既報¹⁰⁾に準じて行った。

試験 1 低温期に生じる吸枝によるウイロイド除去

1995 年 9 月 8 日かき芽(夏季に生じた吸枝)をとりポリポットに挿し芽し、10 月 16 日プランターに移植し露地で栽培した。対照として最低温度を 18℃ に設定したガラス温室で栽培する区を設けた。1996 年 2 月 16 日にプランターに植えた株の上位葉を葉位別に検定し、このとき生じている吸枝の最上位葉もウイロイド検定した。葉位は最も上位で長径が 1cm 以上の葉を第 1 葉とした。おおむね第 1 葉と第 2 葉は未展開葉、それ以下は展開葉であった。3 月 18 日、これらの株から生じた吸枝をとり、5 号鉢に植え付け、ウイロイドの増殖を促すため最低温度 18℃ のガラス温室で栽培した。6 月 19 日に吸枝由来のポット苗を検定し、冬季にとった吸枝がウイロイドを保

毒しているか否かを判定した。

試験 2 低温処理と茎頂培養によるウイロイド除去

1995 年 9 月 8 日 CSVd に感染したキクから穂をとり、9cm ポットに挿し芽し、ガラス温室で管理した。10 月 16 日日光定温器に移し、15℃ で 7 日間、10℃ で 7 日間順化の後、5℃ で 6 か月間低温処理した。この間、5,000 lx、16 時間照明とした。1996 年 4 月 30 日に各植物体の茎頂を約 0.2mm の大きさに切り取り、1/2MS 培地⁶⁾(0.1ppm の NAA、3% のしょ糖、0.8% の寒天加用)に置床した。10 月 15 日と 12 月 16 日に再分化発根した個体を鉢上げし、最低気温 18℃ に設定したガラス温室で管理した。1997 年 3 月 4 日茎頂培養株のウイロイド検定を行った。なお、対照として、CSVd 保毒株を低温処理せずに茎頂培養した区と、ウイロイドに感染していない株を低温処理と茎頂培養した区を設けた。

1996 年に再試験をした。10 月 15 日に挿し芽、11 月 11 日に日光定温器に入れ 15℃ で 7 日間、10℃ で 7 日間の順化の後 5℃ の低温実験室に移し 6 か月間低温処理した。その他条件は先の試験と同様である。1997 年 5 月 26 日に茎頂培養し、同 7 月 25 日発根培地に移植した。茎頂培養用の培地は、0.1ppm の NAA、0.2ppm の BA、3% しょ糖、0.8% 寒天加用 1/2MS 培地、発根用は 0.012% 硫酸マグネシウム加用 BDS 培地²⁾を用いた。10 月 21 日に鉢上げし、以後最低気温 18℃ に設定したガラス温室で管理した。ウイロイド検定は 1998 年 6 月 25 日に行った。

結 果

試験 1 低温期に生じる吸枝によるウイロイド除去

ウイロイドを保毒しているかき芽苗を露地で栽培すると気温の低下にともないウイロイド症状が不明瞭となり、12 月には「ミスルトー」の黄色斑点もみられなくなった。2 月にかき芽苗由来株を検定したところ、下位葉で

表 1 キクかき芽苗由来株の 2 月期の葉位別キクわい化ウイロイド (SVd) 検出状況

品種	CSVd	栽培場所	葉位別 CSVd 検定				
			第 1 葉	第 2 葉	第 3 葉	第 4 葉	第 5 葉
丹生の月	保毒	露地	-	+	+	+	+
丹生の月	保毒	〃	-	-	+	+	+
ミスルトー	保毒	〃	-	-	-	-	-
夢志光	無毒	〃	-	-	-	-	-
丹生の月	保毒	ガラス温室	+	+	+	+	+
丹生の月	保毒	〃	+	+	+	+	+
ミスルトー	保毒	〃	+	+	+	+	+
夢志光	無毒	〃	-	-	-	-	-

注) + : 検定で陽性反応, - : 検定で陰性反応

はウイルスが検出される株もあったが、第1葉ではすべて陰性を示した(表1)。これに対して、温室で栽培していた株は、冬季でも黄色斑点やわい化症状を示し、最上位葉からもウイルスが検出された。かき芽苗由来の株から冬季に生じてきた吸枝を検定した結果、2月の時点では陰性を示すものもあった。しかし、これらの吸枝をとって挿し芽し、温室で4か月間栽培したところ、「ミスルトー」ではわい化ウイルス特有の小型の黄色斑点が生じた。感染株から生じた吸枝は品種に関わらず、すべてウイルスが検出された(表2)。12月から3月前半の気象は、露地では最高気温平均9.8℃、最低気温平均-2.6℃、ガラス温室では前者が29℃、後者が18℃であった。

試験2 低温処理と茎頂培養によるウイルス除去

1995年に低温処理し1996年に茎頂培養したものは茎頂からの再分化が遅く、鉢上までに6か月を要した。鉢上げ78日後にウイルス検定をした結果、「ミスルトー」、「夢志光」からはウイルスが検出されなかったが、「丹生の月」は鉢上げた9株すべてが陽性であった(表3)。用いた個体数が少なかったので1996年に再試験を行った(表4)。茎頂培養と発根培養の2段階法で行った。茎頂培養から2か月後発根培地に移植し、さらに3か月後に鉢上げた。鉢上げ8か月後にウイルスを検定した。低温処理をした株のうち「丹生の月」、「夢志光」はウイルスが全く検出されなかったが、低温処理した「ミスルトー」1株からウイルスが検出され、「ミスルトー」の葉にはわい化ウイルス特有の黄色斑点が認められた。低温処理したキクの茎頂を2段階法で培養することにより、高率にウイルスフリー株を得ることができた。

考 察

栄養繁殖性作物のウイルスの除去には茎頂培養が広く行われてきた⁹⁾。茎頂培養のみで除去が困難なものにつ

いては42℃短時間処理または、35℃くらいで数週間ないし数か月栽培した後茎頂培養することにより多くのウイルスを除去できるようになった^{7,9)}。ウイルス類についても茎頂培養及びその前段階に温度処理をして防除しようという試みがなされている。KRYZKYNSKIら⁴⁾はウイルスは高温により増殖と移動が抑制されるがウイルスは促進されると報告している。杉浦ら¹²⁾は冬季に生じる吸枝を取って栽培することによりわい化症状を示さない株を得たと報告している。これらの報告をふまえ、CSVdに感染しているキクからウイルスフリー苗をえるためのいくつかの方法を検討した。冬季に生じた吸枝を2月にウイルス検定したところ陽性のものと陰性のものがあった。3月に採取し温室で4か月間栽培後ウイルス検定した結果、すべての株からウイルスが検出された。これは低温期の吸枝が無毒化していたのではなく、濃度が低かったため検出できなかったと考えられる。冬季に発生する吸枝によりCSVdフリー株が得られるという報告¹²⁾があるが、この試験の結果からは、冬季に生じる吸枝を使った健全株の獲得は実用性が低いと考えられる。

2月にかき芽苗由来株のウイルス検定を葉位別に行った。ガラス室で栽培していた株からは検定したすべての葉からウイルスが検出された。しかし、露地で栽培していた株は、上位5葉のいずれからもウイルスが検出されなかったものや、未展開葉(上位2葉)のみ陰性のものなどが見られた。これは、冬にウイルスの症状が抑えられ健全株と区別がつかなくなることから、低温に遭遇すると増殖が抑えられ、ウイルス検定でも検出できなかったと考えられた。上位葉ほどウイルスが検出されにくいので茎頂部はさらにこの傾向が著しいと推察された。そこで、低温処理(5℃、6か月間)したキクの茎頂を切り取り培養し、個体再生した。1996年から低温処理した茎頂培養個体は「ミスルトー」ではウイルスフリーの個体が3株得られたが「夢志光」、「丹生の

表2 かき芽苗由来株より冬季に生じた吸枝のキクわい化ウイルス検定

品 種	CSVd	栽培場所	2月検定		6月検定(吸枝由来苗)	
			検定吸枝数 (本)	検出吸枝数 (本)	検定吸枝数 (株)	検出吸枝数 (株)
丹生の月	保毒	露 地	5	5	17	17
夢志光	保毒	"	2	1	11	11
夢志光	無毒	"	5	0	5	0
ミスルトー	保毒	"	3	0	14	14
丹生の月	保毒	ガラス温室	5	5	3	3
ミスルトー	保毒	"	5	5	ND	ND

注) + : 検定で陽性反応, - : 検定で陰性反応, ND : 病徴がでていたため未検定

表3 低温処理(5℃, 6か月間)と茎頂培養によるウイロイド除去試験—その1(1995年~1997年)

品種	処理温度	処理株数 (株)	処理後生存株数 (株)	茎頂培養数 (個)	鉢上げ株数 (株)	ウイロイドフリー株数 (株)
丹生の月	5℃	5	5	14	9	0
丹生の月	18℃以上	4	4	4	2	0
夢志光	5℃	2	2	2	1	1
ミスルトー	5℃	10	9	17	2	2
ミスルトー	18℃以上	4	4	4	2	0

表4 低温処理(5℃, 6か月間)と茎頂培養によるウイロイド除去試験—その2(1996年~1998年)

品種	処理温度	処理株数 (株)	処理後生存株数 (株)	茎頂培養数 (個)	鉢上げ株数 (株)	ウイロイドフリー株数 (株)
丹生の月	5℃	6	6	6	6	6
丹生の月	18℃以上	10	—	10	10	0
夢志光	5℃	3	3	3	3	3
ミスルトー	5℃	5	2	2	1	0

月]ではウイロイドは除去できなかった。一方、1997年からの低温処理区では「丹生の月」、「夢志光」からはすべてウイロイドが除去されており、「ミスルトー」の再分化個体はわずか1個体であったが検定時にはすでにわい化ウイロイド特有の小型黄色斑点がでており検定結果も陽性であった。

1996年と1997年の試験結果が大きく異なっているが、これは外植片から個体を得るのに1段階法(1996)と2段階法(1997)の差によると考えられる。また、キクは低温に強く、5℃、6か月処理でほとんど枯死することはなかった。これらの結果から、キクわい化ウイロイドの除去には5℃、6か月間の低温処理の後2段階法で茎頂培養すると良いと結論された。

引用文献

(1) BACHELIER, J.C., M. MONSION and J. DUNEZ (1976) : Possibilities of improving detection of chrysanthemum stunt and obtention of viroid-free plants by meristem-tip culture: *Acta Hort.* 59, 63-69
 (2) DUNSTAN, D.I. and K.C. SHORT (1977) : Improved growth of tissue cultures of onion, *Allium cepa*: *Physiol. Plant.* 41, 70-72
 (3) HOLLINGS, M. (1965) : Attempts to eliminate chrysanthemum stunt from chrysanthemum by meristem-tip culture after heat treatment: *Ann. appl. Biol.* 65, 311-315
 (4) KRYCZYNSKI, S. (1983) : Transmission of viroids and viruses by tissue implantation and transport across the

cullus barrier: *Phytopath. Z.* 106, 63-75
 (5) LIZARAGA, R.E., L.F. SALAZAR, W.M. ROCA and L. SCHILDE-RENTSCHLER (1980) : Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture: *Phytopath.* 70, 754-755
 (6) MURASHIGE, T. AND F. SKOOG (1962) : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures: *Physiol. plant.* 15, 473-497
 (7) NYLAND, G., and A.C. GOHEEN (1969) : Heat therapy of virus disease of perennial plants: *Ann. Rev. Phytopath.*, 331-354
 (8) PADUCH-CICHAL, E and S. KRYCZYNSKY (1987) : A low temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected plants: *J. Phytopath.* 118, 341-346
 (9) 下村徹 (1985) : ウイルス病とその検定法: 増補/園芸植物の器官と組織培養(誠文堂新光社) 76-96
 (10) 塩飽邦子・岩井豊通・山元義久 (1996) : ドットプロットハイブリダイゼーションによるキクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum stunt viroid*) の検定: 関西病虫研報 38, 1-6
 (11) STACE, R. and F.C. MELLOR (1970) : Eradication of potato spindle tuber virus by thermotherapy and axillary bud culture: *Phytopath.* 60, 1857-1858
 (12) 杉浦広幸・花田薫 (1993) : 大ギクのキクわい化ウイロイド (CSV) による生育障害の発生: 日植病報, 59, 344