

リンゴのウイルス無毒化組織の育成,増殖に関する研究

誌名	果樹試験場報告. C, 盛岡
ISSN	03852334
著者	真田, 哲朗 吉田, 義雄 羽生田, 忠敬
巻/号	10号
掲載ページ	p. 1-9
発行年月	1983年3月

リンゴのウイルス無毒化組織の育成, 増殖に関する研究†

真田哲朗‡, 吉田義雄, 羽生田忠敬

I 緒 言

我が国で、リンゴの台木として広く使用されているマルバカイドウおよびミツバカイドウは、ACLSV (Apple chlorotic leaf spot virus) および ASPV (Apple stem pitting virus) に感受性であり、保毒した穂木を接ぐと樹が衰弱し、ひいては枯死する (Yanase, 1974)。また、最近、これらのウイルスに抵抗性であるとされている M9, M26 などのわい性台木でもウイルスを保毒した樹では無毒樹に比べて樹の生育が劣り生産力が減少することが報告されている (Cutting ら, 1973; Campbell ら, 1978)。

リンゴは接木によって繁殖するため、その間にこれらのウイルスが感染するおそれがあり、苗木の養成や高接による品種更新を行う場合に大きな問題となっている。

これらのリンゴ高接病の病原ウイルスは、37°C前後の高温条件下で伸びた新しょうの頂端部では無毒化されることが報告されている (Posnette ら, 1962; Campbell, 1962a; 1962b; 1968; Campbell ら, 1963; Welsh ら, 1965; Nyland ら, 1969; 吉田ら, 1970; Larsen, 1974)。

本試験では ACLSV 無毒化のため30°Cの熱処理を行ない、無毒個体が得られるか、また、夏の高温時期には場条件下で伸長中の枝の頂端部を採ることにより大量の無毒個体が得られるか否かを検討した。さらに、得られた無毒穂木を接木反復することによる増殖法について検討した。

なおこの試験は1976年度から開始された特別研究「果樹の育種及び品種更新におけるウイルスの無毒化並びに被害回避に関する研究」の一課題として実施されたものである。

当初本試験の設計を担当された、果樹試験場育種第4研究室土屋七郎室長、また実験材料を提供された、果樹試験場病害第1研究室柳瀬春夫室長に深謝の意を表す。

II 材料及び方法

1. 熱処理による ACLSV 無毒個体の育成

ACLSV に単独感染している「ふじ」の穂木を鉢植えの実生台に接木し、温室内で接ぎ穂が芽出しした時期に、30°Cおよび37°Cの熱処理を行い、2-3週間後、生育した伸長枝の頂端から1, 5, 10cmの3部位各1cmを採取し、実生台に接木した。なお、水分の蒸散を防ぐため、接木部をポリエチレン袋で約3週間被覆し、直射光をさえぎるため、その上をよしずでおおった。この水分蒸散防止の処理は

† 果樹試業績番号：C-73 (昭和57年11月10日受付)

‡ 現農技研放射線育種場

以後の緑枝接ぎの試験でも同様に行った。ウイルスの検定は実生台に指標植物のマルバカイドウ 'Mo84' を二重接して行った。

2. ほ場条件での ACLSV 無毒個体の獲得

ACLSVに感染している実生台 'ふじ' (成木) を用い、6~8月に数回新梢を採取した。穂木の採取にあたっては、枝の伸長を旺盛にするためあらかじめ切り返しを加えた。また、高温条件に保つ目的で穂木採取の2~4週間前にポリエチレン袋で枝を被覆し、枝の頂端から1, 2, 3cmの3部位各1cmを採取し、マルバカイドウの新しょうに接木して ACLSV の保毒の有無を検討した。

3. 無毒個体の増殖

熱処理によって ACLSV が無毒化された 'ふじ' の休眠枝を用い、2月中旬にこの休眠枝の1芽を温室内の実生台に接木し、伸長した緑枝を4月下旬には場の実生台の新しょうに1芽接ぎした。その後、接木可能な芽の数が10または20芽になった時期に、その各々を1芽接ぎし、8月上旬まで2~3回この方法をくり返した。

III 結 果

1. 熱処理による ACLSV 無毒個体の育成

熱処理の温度条件、処理期間と接木活着率および ACLSV 無毒化率の関係を Table 1 に示した。

Table 1. Effect of heat treatment on inactivation of ACLSV grafted on indexing plant of *M. prunifolia*.

Heat treatment		Setting % and inactivated % on bud position					
Temperature	Weeks	Tip (1 cm) ^a		5 cm ^a		10 cm ^a	
		Setting %	Inact. %	Setting %	Inact. %	Setting %	Inact. %
37°C ^b	2	67	100	100	92	100	58
	3	83	100	100	75	92	55
30°C ^b	2	83	80	100	67	100	50
	3	100	100	100	100	83	40

a Distance from the tip, about 1 cm scions were used.

b Number of grafted scions were 12 per each treatment at 37°C and 6 at 30°C.

接木活着率は、頂端部を接木した場合に平均80%とやや低い値を示したが、5, 10cm部位を接木した場合は各々100, 94%と高い値が得られた。無毒化率は、頂端1cmの部分で熱処理温度が37°Cでは処理期間が2, 3週間ともに100%であり、穂木の採取部位が5, 10cmと頂端部から基部に向うに伴い無毒化率は低くなる傾向を示したが、10cm部位でも50%程度の無毒化率を示した。また、30°Cでも頂端部の無毒化率は2週間処理で80%, 3週間処理で100%であり、ACLSVは熱処理温度として一般に用いられている37°Cよりも低い温度でも高い無毒化率が得られた。

2. ほ場条件での ACLSV 無毒個体の獲得

1978年、6~8月に ACLSV 保毒樹の新しょうを接木した場合の穂木採取時期、採取部位における活着率、無毒化率を Table 2 に示した。各接木時期、各処理区ともに頂端部の活着率が低く0~69%であった。ACLSVの検定は1979~1981年に行った。この結果、6月15日、8月18日の接木では無毒

個体は得られなかったが, 7月21日に接木を行った2週間のポリエチレン袋被覆区と8月4日に接木を行った全区で高い無毒化率が得られた。

Table 2. Inactivation of ACLSV in growing shoots on an adult tree during summer.

Treatment	Bud position from tip	Date of garfing (1978)							
		Jul. 15		Jul. 21		Aug. 4		Aug. 18	
		Setting % ^a	Inact. %	Setting % ^a	Inact. %	Setting % ^a	Inact. %	Setting % ^a	Inact. %
Control	tip	0	—	0	—	0	—	0	—
	2cm	40	0	30	0	50	100	90	0
	3cm	60	0	40	0	90	100	100	0
Wrapped with ^b polyethylen bag for 2 weeks	tip	0	—	0	—	30	100		
	2cm	40	0	70	57	90	89		
	3cm	80	0	90	78	90	89		
Wrapped with ^b polyethylen bag for 3 weeks	tip					69	100		
	2cm					100	100		
	3cm					100	100		

a Number of grafted scions were 10 to 13.

b Shoots were wrapped with polyethylen bag before grafting.

ほ場条件での無毒個体の獲得は, 夏の高湿時期を除いて可能性がないと考えられたので1979年, 1980年については7~8月上旬に接木を行い, 活着率と無毒化率を調査し, その結果を Table 3 に示した。頂端部の活着率が低い傾向は Table 2 の結果と一致した。ACLSV の検定は1981年に行った。

Table 3. Inactivation of ACLSV in growing shoots on an adult tree during summer.

Treatment	Bud position from tip	Date of grafting							
		Jun. 16, 1979		Aug. 3, 1979		Jun. 23, 1980		Aug. 9, 1980	
		Setting % ^a	Inact. %	Setting % ^a	Inact. %	Setting % ^a	Inact. %	Setting % ^a	Inact. %
Control	tip	10	0	50	0	10	0	40	0
	2cm	90	0	100	0	90	0	100	0
	3cm	90	0	100	0	100	0	100	0
Wrapped with ^b polyethylen bag for 3 weeks	tip	70	0	30	0	40	0	43	0
	2cm	100	0	100	10	100	0	100	0
	3cm	100	0	100	10	100	0	100	0

a Number of grafted scions were 7 to 10.

b Shoots were wrapped with polyethylen bag before grafting.

この結果, 1979年8月3日に接木を行った3週間のポリエチレン袋被覆区で10%程度の無毒化率であったが, 1979年7月16日, 1980年7月23日および8月9日の接木ではポリエチレン袋被覆区でも無毒個体は得られなかった。

試験期間中の7, 8月の6半旬別の平均最高気温と日照時間を Fig. 1 に示した。また, 晴天時の直

射光下の気温とポリエチレン袋内の気温を Fig. 2 に示した。ほ場条件で高い無毒化率が得られた1978年の夏は盛岡では30℃を越す日が多く、日照時間の多い異常高温の年であり、1980年は7~8月上旬にかけて平年より気温が低い異常低温の年であった。また、ポリエチレン袋を被覆すると Fig. 2 に示したように、晴天の日の気温が30℃でも袋内の温度は40℃を越しており、直射光がさえぎられない場

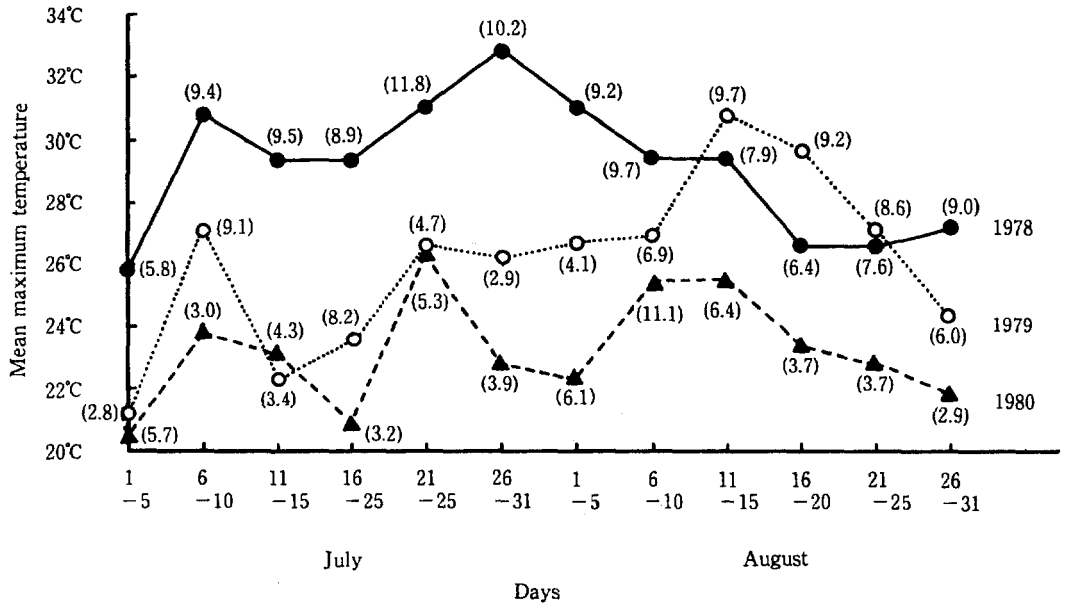


Fig. 1. Mean maximum temperature and mean times (hr) of solar radiation in bracket in 5'days dulation observed at Tohoku National Agricultural Experiment Station.

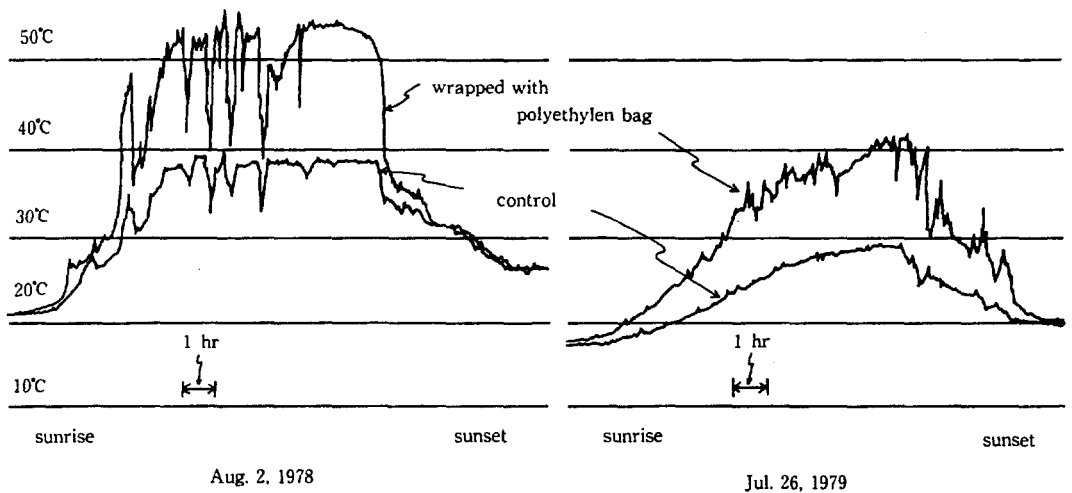


Fig. 2. The fluctuating temperature when wrapped with polyethylen bag or when not wrapped under sunlight by thermocouple.

合は37℃以上の温度条件が得られた。1978年のように夏の気温が高温に経過した年の伸長枝の頂端部を採り、接木することにより ACLSV 無毒株を得ることができると、その年の気温に影響されるため安定した技術になり得ないことが示された。

3. 無毒個体の増殖

1979年2月16日に無毒穂木の休眠枝10芽を温室内で鉢植えの実生台に1芽接ぎした。その後、ほ場で緑枝接ぎが可能になった4月25日以降は伸びた新梢をほ場の実生台に接木し、ほ場で緑枝接ぎをくり返した。このほ場で緑枝接ぎの各接木時期における穂木の採取部位と活着率の関係を Table 4 に示した。接ぎ穂の部位別活着率は、各接木時期では大差がなく、頂端部(1 cm)の活着率は10~60%と低い、第2芽目からは90%以上の高い活着率を示した。しかし、高温時期である8月1日の接木では基部(15~20芽目)の活着率は67~83%とやや低い傾向を示した。

Table 4. Setting % of scions collected from different bud positions on softwood at various grafting times.

Date of grafting	Setting % ^a of scions from different bud position									
	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30 ^b
Apr. 25	10	90	100	100	100	100	100	100	—	—
Jun. 28	60	100	100	100	100	100	100	100	—	—
Jul. 3	10	90	100	100	100	100	—	—	—	—
Aug. 1	29	100	100	100	100	100	67	83	—	—
Aug. 9	20	100	100	100	90	90	—	—	—	—
Aug. 23	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100

a Number of grafted scions were 10 to 14.

b Tips in lengths of about 1 cm are shown under 1, the other numbers (2-30) indicate bud position from the tip.

2月16日に温室内で無毒の休眠枝を1芽接ぎし、その伸長枝の各1芽を4月25日にほ場で緑枝接ぎした後、伸びた新梢の10芽または20芽が接木可能となるにしたがい、8月上旬まで1芽接ぎをくり返し増殖した場合の増殖率を Fig. 3 に示した。10芽が接木可能になる時期を目安に接木を反覆するとほ場で年3回、20芽を目安に接木を反覆するとほ場で年2回の接木ができた。穂木採取時の平均芽数、活着率 (Table 4 の結果を基に頂端部の活着率を0%, 第2芽目以下の活着率を100%として計算) および接木回数を基に増殖率を計算すると、10芽を目安に反復接木し増殖した場合は1年間に1芽から約24,400芽、20芽の場合は約8,100芽となった。

IV 考 察

リンゴの高接病の各種の病原ウイルスは、一般に37℃前後の熱処理を20~30日行った後、伸びた枝の頂端部を採り接木することにより、無毒化できることが報告されている (Posnetteら, 1962; Campbell, 1962a; 1962b; 1968; Campbellら, 1963; Welshら, 1965; Nylandら, 1969; 吉田ら, 1970; Larsen, 1974)。さらに、本試験では ACLSV の場合は、30℃の2, 3週間処理の頂端部で高い無毒化率が得られており、Larsen (1974) も32℃, 4週間処理で数種のウイルスが無毒化されることを報告している。このよ

うに、ウイルスの種類によっては植物を管理しやすい30℃程度の温度でも無毒個体が得られる可能性もあると思われる。また、ASPVのように37℃の熱処理でも比較的無毒化し難いウイルスもあり (Campbell, 1968), ウイルスの種類によっては、熱処理と生長点培養の併用も検討する必要がある。

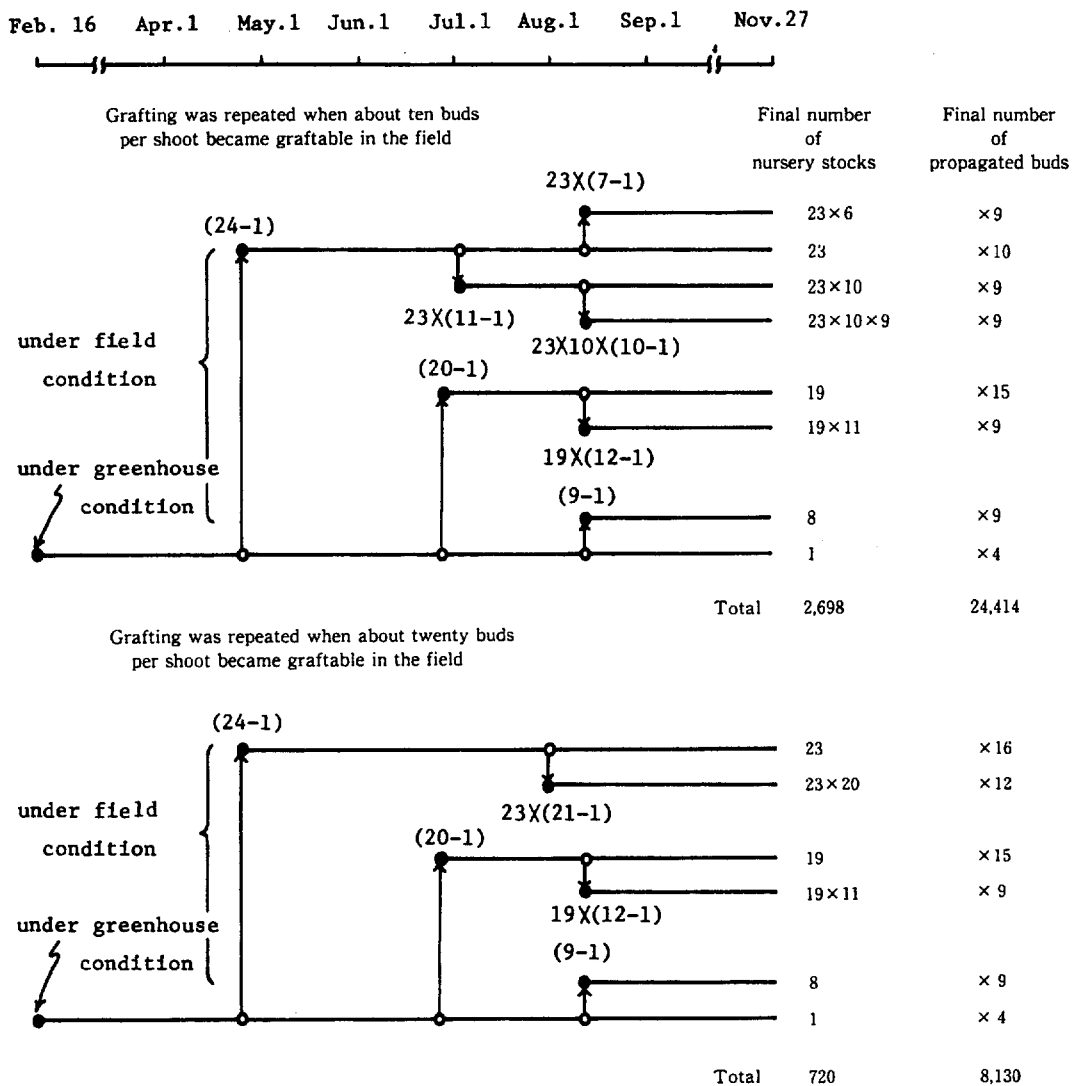


Fig. 3. Schematic representation of the propagation of scions by softwood grafting during one season. ○; sampling of scions, ●; softwood grafting on seedlings. (x-1); x means number of graftable buds until grafting time, and 1 was excluded from x because shoot tip was difficult to graft although buds under tip were easily grafted (see Table 4).

夏の期間中は場条件下で伸長した枝の頂端近くの芽を採ることにより, 大量に無毒個体を得ることが出来るか否かを検討した結果, 1978年の夏期に枝の切り返しを行い, 旺盛な伸長枝を採ることにより, ポリエチレン袋被覆区, 無処理区で高い無毒化率が得られた。この年の夏は盛岡では日照時間の多い, 異常高温の年で, 晴天時の直射日光下の温度は, 37℃で約5時間, 30℃で約10時間保たれている。Table 1の熱処理の結果によると, ACLSVは30℃に2~3週間保たれると頂端1cm部は無毒になっており, また, Larsen (1974)は36℃, 8時間と20℃, 16時間の変温4週間でも全ての頂端芽は無毒であったと報告している。

このように, ACLSVは30℃程度の温度で, また, 1日当り数時間の高温で無毒化されており, 1978年のように異常高温の夏は無処理でも生育枝の頂端部が無毒になっていたものと思われる。しかし, 1979年, 1980年のように, 気温が低く, 曇りの日の続いた年では, ポリエチレン袋処理でも無毒個体の獲得は極めて低く, この方法はその年の天候に影響され安定した技術にはならないと思われる。

無毒化された穂木の増殖法として, 温室およびほ場で1芽接ぎを反覆する方法を検討した。緑枝の接木は頂端部1cm部位の活着が悪かったが, 頂端芽以下の芽の接木では高い活着率であった。10芽を目安に接木をくり返すと, ほ場で年3回接木が出来, 1年間に1芽から約24,400芽が翌年接木可能となり, 20芽を目安に接木をくり返した場合(ほ場で年2回の接木)の約8,100芽より高い増殖率を示した。また, 仮にほ場で年4回の接木を行うとすると, 4芽が接木可能な時期を目安に接木反覆することになり, 試算すると1年間に約14,000芽となる。このように, 1979年, すなわち, 盛岡で平年なみの気象条件下では, ほ場で年3回の接木反覆が最も増殖率が高い。しかし, 1980年のように日照時間の少ない, 気温の低い年では最終接木が遅れて, 接ぎ穂の伸長が悪く, 芽数も少なくなり, 冬期間に枯死する危険もある。安全を考えると, 盛岡では最終接木は7月中旬を限度に, 15芽程度を目安にほ場で年2回の接木が適当と思われる。

V 摘 要

リンゴ高接病の病原ウイルスである ACLSV を無化するため30℃の熱処理を行ない無毒化を検討した。また, 夏の高温時期にほ場条件下で伸長中の枝の頂端部を採ることにより大量の無毒個体が獲得できるか否か検討した。さらに, 得られた無毒穂木を接木反覆することによる増殖法についても検討した。

1. ACLSVは, 37℃で2~3週間, 30℃でも3週間の熱処理を行うと頂端部1cmはすべて無毒になった。しかし, 頂端部より5, 10cmと基部に向うに伴い無毒化率は低下した。

2. ほ場条件での ACLSV 無毒個体の獲得試験の結果, 活着率は全処理をとおして頂端部1cmで低く, 0~60%であった。1978年の接木では7月21日のポリエチレン袋被覆区と8月4日の無処理およびポリエチレン袋被覆区で高い無毒化率が得られた。しかし, 気温の低かった1979年, 1980年の接木では無毒化率は極めて低く, この方法は天候に影響され安定した技術にはならないことが示された。

3. 無毒化された穂木を増殖するため, ほ場の実生台に緑枝接ぎを行った結果, 接ぎ穂の部位別活着率は, 接木時期では大差がなく, 4月下旬~8月下旬の接木時期をとおして, 頂端部では10~60%と低かったが, 第2芽目以下では90%以上の高い活着率であった。

4. 1979年2月16日に温室で接木を開始し、その後4月25日から8月上旬まではほ場で、それぞれの伸びた新しょうを用いて、1芽接ぎをくり返した場合の増殖率を検討した。10芽が接木可能となる時期を目安に接木をくり返すとほ場で年3回接木ができ、20芽では年2回の接木ができた。接木回数、活着率、穂木採取時の平均芽数を基に計算すると10芽を目安に接木した場合は1芽から約24,400芽となり、20芽を目安に接木を行った場合の約8,100芽より高い増殖率を示した。

引用文献

- 1) Campbell, A. I. (1962a). Apple virus inactivation by heat therapy and tip propagation. *Nature* **195**, 520.
- 2) Campbell, A. I. (1962b). Techniques used in the inactivation of some apple viruses. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta.* **1961**, 73-76.
- 3) Campbell, A. I. and Best, M. W. (1964). The effect of heat therapy on several apple viruses. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta.* **1963**, 65-70.
- 4) Campbell, A. I. (1968). Heat sensitivity of some apple virus. *Tagungsberichte der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin* **97**, 311-316.
- 5) Campbell, A. I., Sparks, T. R. and Goodall, A. (1978). Improvement of fruit trees by eliminating virus and mycoplasma infections. Apple virus trial. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta.* **1977**, 33-35.
- 6) Cutting, C. V. and Montgomery, H. B. S. (1973). More and better fruit with EMLA. Published by East Malling Res. Sta. Long Ashton Res. Sta. 1-29.
- 7) Larsen, E. C. (1974). Heat inactivation of viruses in apple cl. MM 109 by use of daily temperature cycles. *Tidsskr. f. Planteavl* **78**, 422-428.
- 8) Nyland, G. and Coheen, A. C. (1969). Heat therapy of virus diseases of perennial plants. *Ann. Rev. Phytopathology* **7**, 331-354.
- 9) Posnette, A. F., Cropley, R. and Wolfswinkel, L. D. (1962). Heat inactivation of some apple and pear viruses. *Ann. Rep. E. Malling* **1961**, 94-96.
- 10) Yanase, H. (1974). Studies on apple latent viruses in Japan. The association of apple topworking disease with apple latent viruses. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. Japan Ser. C* **1**, 47-109.
- 11) 吉田義雄, 定盛昌助, 土屋七郎, 羽生田忠敬 (1970), リンゴの育種技術に関する研究 第2報. 高つきによる育種年限短縮と無毒穂木獲得について. 園試報 **C6**, 1-9.
- 12) Welsh, M. F. and Nyland, G. (1965). Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry heat. *Can. J. Plant Sci.* **45**, 443-454.

Studies on the Inactivation of ACLSV and Efficient Propagation Method of Virus-Free Scions in Apple

Teturo SANADA†, Yoshio YOSHIDA and Tadayuki HANIUDA

Summary

Techniques of heat treatment at about 37°C have been established to produce virus-free plants from infected ones. The experiments in this paper deal with heat treatments at the lower temperature of 30°C, and the possibility of inactivation of ACLSV in the tip of actively growing shoots on an adult tree was examined under field conditions during the summer. Moreover, an efficient propagation method by softwood grafting of virus-free scions was investigated.

1. ACLSV was inactivated by softwood grafting of shoot tips from potted apple trees after 3 weeks at 30°C (Table 1).

2. In the trial of inactivation of ACLSV when tips of actively growing shoots on an infected adult tree were grafted on *M. Prunifolia*. ACLSV was inactivated by softwood grafting on July 21 and August 4 of shoot tips wrapped with polyethylen bags before grafting, as well as those not wrapped on August 4 in the hot summer of 1978 (Table 2). However, this method seems to be unreliable because ACLSV could not be inactivated in the cool summer of 1979 and 1980 (Table 3).

3. For the propagation of virus-free scions, softwood grafts were examined during one season. The softwoods using one bud grafted well but scions of the shoot tips were difficult to graft (Table 4).

4. The propagation rate was examined after softwood using one bud were repeatedly grafted in the field, from April to August. They were first grafted in the greenhouse on February 16, 1979. Softwood grafting could be performed in the field three times if the grafting was repeated when about ten buds per shoot become graftable, but only two times in case of about twenty buds. With this method, about 24,400 buds were graftable the following year by repeated propagation when about ten buds per shoot were graftable but only about 8,100 buds in the case of about twenty buds (Fig. 3).

† Institute of Radiation Breeding NIAS, Ohmiya-machi in Ibaraki prefecture.