

# 組織培養によるアマリリスのウイルス・フリー球育成

誌名	兵庫県農業総合センター研究報告 = Bulletin of the Hyogo Prefectural Agricultural Center for Experiment Extension and Education
ISSN	03858790
著者名	藤野, 守弘 塩飽, 邦子 稲垣, 国昭 森, 俊人
発行元	兵庫県農業総合センター
巻/号	34号
掲載ページ	p. 85-90
発行年月	1986年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 組織培養によるアマリリスのウイルス・フリー球育成

藤野 守弘・塩飽 邦子・稲垣 国昭・森 俊人

## Obtaining Virus-Free Plants of *Hippeastrum hybridum* by Twin-Scale

### Culture *in vitro*.

Morihiro FUJINO, Kuniko SHIWAKU, Kuniaki INAGAKI and Toshihito MORI

### 1. 緒 言

アマリリスのウイルスには、ヒッペアストラム・モザイク・ウイルス、ラテント・ヒッペアストラム・ウイルス、キュウリ・モザイク・ウイルスおよびトマト・ブロンズ斑ウイルスの4種があるとされており、わが国ではヒッペアストラム・モザイク・ウイルスとキュウリ・モザイク・ウイルスが確認されている<sup>5)</sup>

アマリリスは、通常、りん片を用いて繁殖するため、母球が前記のウイルスに感染していれば、子球を通じてさらにウイルス病が広がることになる。ウイルス病の拡大を防ぎ、品質の高い球根を生産するためには、ウイルス・フリー球を育成し、これを母球として健全な子球を繁殖する必要がある。ウイルスの除去には生長点部の組織培養の効果が大きいことは、他種の球根植物、例えば球根アイリスで認められている<sup>4)</sup>が、アマリリスのウイルス・フリー球育成を対象とした研究はみられない。

本報では組織培養により、アマリリスのウイルス・フリー球を育成し、その生長を調査するとともに、生物検定によるウイルスの同定を行った結果について述べる。

### 2. 材料および方法

試験には加古川市野口町古大内の乾 寿氏方で生産された、品種「播磨の誉」(球重:151g, 球周:22.1cm), 「キャンディー・ケーン」(球重98g, 球周:19.6cm)の球根を使用した。培養にあたっては、葉および根を除去した球根を流水でよく洗浄したのち、ウイルソン液に20分間浸漬した。殺菌の終わった球根を滅菌水で3回すすぎ、殺菌した濾紙の上で横に2分し、下部を32等分し、最外部のりん片を除き、りん片2枚に底盤部をつけて切り取った切片を外植体とした。初代培養にはNAA 1.0mg/ℓ, BA 1.0mg/ℓを加えたハイポネックス培地を用いた。容器には30×100mmの試験管を使用し、培地量は15ml/本とした。容器はアルミはくと硫酸紙で栓をした。継代培養では1.0mg/ℓのNAAを加えたハイポネックス培地にりん片の間に形成された丘状組織を大きさにより3~4等分した切片を植えた。1切片の大きさは約2mmであった。容器には10×100mmの試験管を用い、培地量は3ml/本とし、アルミはくと硫酸紙で栓をした。培養条件は初代培養、継代培養ともに温度25℃, 光700 luxの連続照明

第1表 アマリリスのりん片繁殖における丘状組織形成(植付け:4月7日, 調査:5月2日)

品 種	植付け 切片数	生 存 切片数	丘状組織形成 切片数(%)	丘状組織数	
				切 片	丘 状 組 織 の大きさ(mm)
播 磨 の 誉	60	60	59 (98.2)	1.6	5.8×3.6
キャンディーケーン	40	39	13 (33.0)	1.0	3.7×2.8

第2表 アマリリス丘状組織の継代培養における幼植物形成 (調査: 6月30日)

植付け日	品 種	植付け 切片数	生 存 切片数	切片の器官形成						
				未分化	生長点 分 化	萌芽	発根	萌芽と 発 根	葉数	根数
4月20日	播 磨 の 誉	60	60	17	6	25	3	9	1.2	1.1
	キャンディー・ケーン	36	35	9	4	1	6	15	1.1	1.2
5月6日	播 磨 の 誉	70	70	16	4	16	13	21	1.0	1.1
	キャンディー・ケーン	49	49	10	7	5	6	21	1.0	1.1
5月20日	播 磨 の 誉	65	65	18	11	6	11	19	1.0	1.1
	キャンディー・ケーン	43	43	13	3	5	12	10	1.0	1.1
6月9日	播 磨 の 誉	80	80	22	2	46	1	9	1.5	1.1

であった。

幼植物は径9 cmの黒色ポリ鉢にパーライトとパーミキュライトを等量に混合した用土をつめて鉢上げした。幼植物の一部を当センター内で、初年度は最低5℃に加熱したガラス室で栽培し、次年度は無病徴の球とモザイク症状を示す球とに分け、それぞれ別のガラス室のベンチに植え、無加熱で栽培した。また、他の幼植物は乾農園のビニルハウス内で、寒冷紗を被覆して栽培した。

ウイルス検定は、アマリリスの末展開葉を0.5 g切り取り、0.05% NaCN を添加した0.05 M リン酸緩衝液とともに磨碎し、カーボランダム法により、センニチコウ (*Gomphrena g lobosa*)、キュウリ (*Cucumis sativus*) など6種の検定植物の葉に接種して行った。

### 3. 結 果

りん片の組織培養における丘状組織の形成は品種によるちがいが大きく、「播磨の誉」の丘状組織形成率は100%近かったのに、「キャンディー・ケーン」では約30%であった。「播磨の誉」は1切片当りの丘状組織数あるいは丘状組織の大きさにおいても「キャンディー・ケーン」よりすぐれていた(第1表)。丘状組織を分割して継代培養したときの器官形成は「キャンディー・ケーン」のほうがやや早く進み、萌芽、発根し、幼植物を形成した切片が多かった。継代培養の時期は切片からの萌芽、発根に大きな影響は与えなかった(第2表)。幼植物の葉数、

根数は、品種や継代培養の時期が異っても、ほとんど差はなかった。

萌芽、発根した幼植物を1982年9月16日に鉢上げし11月30日にモザイク症状の発現について調査した結果を第3表に示した。センター内で栽培した株も農家で栽培した株も、継代培養の時期が遅れるほどモザイク症状を示す株が多くなった。全般に、農家で栽培した株は、センターで栽培したものよりモザイク症をあらわす株の率が高く、とくに、6月25日植えの「播磨の誉」では70%の株がモザイク症状を呈していた。

培養株の初期生長を無病徴の株について、1983年2月6日に調査したが、第4表から分るように「キャンディー・ケーン」は「播磨の誉」よりも、生長がやや劣っていた。また、継代培養の時期が異っても株の生長にはほとんど差がなかった。ガラス室内のベンチに定植して1年を経過した株については、無病徴株の生長が、葉重、球重、球周などで、明らかにモザイク症株の生長をうまわった(第5表)。

カーボランダムを用いる汁液接種によるウイルス検定を行い、第5表に示した結果を得た。汁液を接種した葉にウイルスによると思われる局部病斑があらわれたのはセンニチコウだけであり、他の検定植物については局部病斑は認められなかった。モザイク症状を示す株の葉の汁液をセンニチコウの葉に接種した場合は、すべての接種葉に局部病斑があらわれた。なお、無病徴の株につい

て検定を行った場合にも、半数以上の接種葉に局部病斑が観察された。

#### 4. 考 察

アマリリスの組織培養については、わが国でもすでに二、三の研究が行われており、Mii (1974) は器官形成には NAA の影響が大きく、カイネチンは高濃度では毒性を示すと述べている<sup>1)</sup>。藤野 (1976) はりん片2枚に底盤部をつけた切片のほうがりん片1枚に底盤部をつけた切片よりも、子球の形成と発根においてすぐれていることを報告した<sup>2)</sup>。藤岡 (1979) は子球形成、発芽に対してはカイネチンとサイアミンの組合せが適しており、NAA は子球の形成をいちじるしく抑制することを認めている<sup>3)</sup>。

本試験では NAA と BA をともに 1 mg/l 含む培地で 2枚1組のりん片を培養したが、りん片から直接、子球が形成されるのではなく、まず丘状の組織が分化し、つづいて、この丘状組織から子球が形成された。丘状組織の分化はスイセンのりん片培養においても観察されているが、この現象が培地に加えた植物ホルモンの影響によるもの

か、培養時期の影響によるものか明らかでない。別の試験 (未発表) では、植物ホルモンを添加しない培地で正常な子球形成を認めており、丘状組織の形成は植物ホルモンの影響による可能性が高いが、この問題についてはカイネチンの毒性、NAA の子球形成の抑制とともに、さらに詳細な検討が必要である。

りん片に形成された子球の生長点部を切り取り、培養してウイルス・フリー球を育成する予定であったが、前述のように子球の形成が遅れたので、丘状組織を分割して継代培養することにした。継代培養時には生長点が分化していない切片でも、長期間培養すれば萌芽、発根して子球を形成する (第2表) ので、丘状組織が形成されたのち、生長点の分化がおこる時期に、これを分割し継代培養することによってウイルス・フリー球育成は可能であると判断した。

培養球のモザイク症発生は、継代培養の時期が遅れるほど、つまり、丘状組織が母球のりん片とともに育てている期間が長いほど高率となった (第3表)。これは、ウイルスが母球から丘状組織に侵入する前に丘状組織を切除

第3表 アマリリス培養株のモザイク症発生 (針上げ：9月16日 調査：11月30日)

丘状組織 植付け日	品	種	栽培地	鉢上げ数	生存数	枯死数	モザイク症 数 (%)
4月20日	播磨の誉	農試	農試	25	22	3	0 (0)
	キャンディケーン	農試	農試	16	12	4	0 (0)
5月6日	播磨の誉	農試	農試	47	45	2	0 (0)
	キャンディケーン	農家	農家	23	16	7	5 (31)
5月20日	播磨の誉	農試	農試	18	18	0	1 (6)
	播磨の誉	農家	農家	30	30	0	8 (27)
	キャンディケーン	農家	農家	24	18	6	8 (44)
6月9日	播磨の誉	農試	農試	30	30	0	2 (7)
	播磨の誉	農家	農家	30	24	6	6 (25)
6月25日	播磨の誉	農試	農試	30	26	4	5 (19)
	播磨の誉	農家	農家	30	30	0	21 (70)

第4表 アマリリス培養株の生長(無病徴の株)(針上げ:9月16日,調査:2月6日)

品 種	丘状組織 植付け日	調 査 株 数	葉 数	葉 長 (cm)	球 径 (mm)
播 磨 の 誉	4月20日	21	2.9	7.8	9.4
	5月6日	42	2.6	8.1	9.1
	5月20日	16	2.7	8.6	11.0
	6月9日	28	2.5	7.6	9.3
	6月25日	26	2.7	6.8	9.0
キャンディーケーン	4月20日	9	2.7	7.3	8.2

しなければいけないことを示すものである。農家のビニルハウス内で栽培した場合は、モザイク症の発生がきわめて高率であった(第3表)。アマリリスのウイルスは汁液によって伝染するほか、スリップスによって媒介されることを考えると、栽培時の接触に加えてスリップスの害のために、このような高率のモザイク症発生にいたったものと思われる。したがって、ウイルス・フリー球の育成と増殖にあたっては、厳重な隔離栽培が必須である。

鉢上げた幼植物の生長は、継代培養の時期が異っても大きな差はなかった(第4表)が、ガラス室内で1年間栽培した株の生長については、葉重、球重、球周において無病徴株がモザイク症株より明らかにすぐれていた(第5表)。葉の外観だけでなく球の生長のうえからもウイルス・フリー球が要求される。

カーボランダムを用いた汁液接種で、センニチコウだけにウイルスによると思われる局部病斑が認められ、キュウリやタバコでは局部病斑が見られなかった(第6表)ことから推察すると、乾農園のアマリリスが感染してい

るウイルスはヒッペアストラム・モザイク・ウイルスであり、キュウリ・モザイク・ウイルスやトマト・ウイルスあるいはトマト・ブロンズ斑ウイルスではないと思われる。また、葉にはモザイク症状があらわれていないのに、汁液接種でセンニチコウに局部病斑をあらわした球が多かったことは、ラテント・ヒッペアストラム・ウイルスの保毒を示すものであろう。このウイルスの存在については今後、電顕観察により確認したい。

### 5. 摘 要

1. アマリリスの品種「播磨の誉」、「キャンディー・ケーン」の球根を32等分し、りん片2枚に底盤部をつけて切り取った切片を、NAA 1.0mg/l, BA 1.0mg/lを添加したハイボネックス培地に植えた。培養条件は温度25℃、光700luxの連続照明であった。りん片培養においては、品種による丘状組織形成の差が大きく、「播磨の誉」の丘状組織形成率は100%近かったのに対し「キャンディー・ケーン」では約30%であった。

2. 丘状組織を3~4等分し、1.0mg/lのNAAを含む

第5表 定植1年後のアマリリス培養株の生長(品種:播磨の誉)

培養株の種類	葉 数	葉 重 (g)	球 周 (cm)	球 重 (g)	根 重 (g)	全株重 (g)
無 病 徴 株	9.4	73.4	17.5	84.8	50.8	209.0
モザイク症株	8.4	49.0	15.2	56.8	59.4	165.2
有 意 性 <sup>a)</sup>	※	※※	※※	※	N.S.	※※

a) ※※P<0.01, ※P<0.05

第6表 アマリリス培養株のウイルス検定 (品種：播磨の誉)

検 定 植 物	無 病 徴 株			モ ザ イ ク 症 株		
	個体数	-	+	個体数	-	+
ア カ ザ	14	14	0	4	4	0
キ ュ ウ リ (四葉)	14	14	0	4	4	0
セ ン ニ チ コ ウ	14	6	8	4	0	4
タバコ(グルティノーザ)	14	14	0	4	4	0
タバコ(ブライトエロー)	14	14	0	4	4	0
ペチュニア(タイタンレッド)	14	14	0	4	4	0

ハイポネックス培地で継代培養した。切片からの幼植物形成については「キャンディー・ケーン」がややすぐれていた。継代培養の時期は幼植物の生長には大きな影響を与えなかった。

3. モザイク症状の発生は遅れて継代培養をした丘状組織に由来する幼植物で多くなった。また、乾農園で栽培した幼植物については、ウイルス症状をあらわした株の率がきわめて高かった。

4. 1年間、ガラス室で栽培した「播磨の誉」の無病徴株は葉重、球周、球重において、モザイク症株よりもすぐれていた。

5. センニチコウ、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、タバコ (*N. glutinosa*)、ペチュニア、アカザ、キュウリを検定植物として、汁液接種によるウイルス検定を行った。モザイク症状を示す株は4株のすべてがセンニチコウの接種葉に赤色の局部病斑をあらわした。無病徴の株につ

いては14株のうち8株からウイルスが検出された。キュウリなどの他の検定植物では局部病斑が認められなかったことから、このウイルスはヒッペアストラム・モザイク・ウイルスであると思われる。

### 引用文献

- 1) BERGMAN, B. H.H. et al. ed., Ziekten en Aufwijkingen bij Bolgewassen. 2, Lab. Bloemboll. Lisse. (1978)
- 2) 藤野 守弘 兵農特研報 (1976)
- 3) 藤岡 作太郎 兵農研報 28, 89, (1979)
- 4) 平田 良樹ら 野菜試報 c 6, 83, (1982)
- 5) 岩木 満朗 日植病報 33, 237 (1967)
- 6) Mu, M. et al. J. hort. Sci. 49, 24 (1974)

### Summary

Obtaining Virus-Free Plants of *Hippeastrum hybridum* by Twin-Scale Culture *in vitro*.

FUJINO, M., K. SHIWAKU, K. INAGAKI, and T. MORI.

Bull. Hyogo Pref. Agric. Centre 34, 85-90, 1986.

1. The lower halves of bulbs of *Hippeastrum hybridum* cv. Harima no Homare and cv. Candy Cane were divided by median vertical cuts into 32 equal sectors. Pieces were cut tangentially containing two scales with basal plate from the sectors. The pieces were cultured on Hyponex medium supplemented with 1.0 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA at 25°C in continuous light under 700 lux.
2. Initiation of mound like tissues from scales differed widely with cultivars. After 28 days of culture, nearly 100% of the cultured scales produced the mound like tissues in cv. Harima no Homare, while about 30% of the scales differentiated the mound like tissues in cv. Candy Cane. The mound like tissues were cut into three to four segments according to size and subcultured on Hyponex medium containing 1.0 mg/l NAA. Plantlets formation from the segments of cv. Candy Cane was a little better than that of cv. Harima no Homare. The time of subculture did not affect on the production of plantlets.

3. The later subculturing of the segments resulted in increase the number of mosaic plantlets. A batch of the plantlets grown in the greenhouse of grower showed higher rate of virus infection, while another batch of the plantlets grown in the greenhouse of Hyogo Pref. Agric. Centre revealed lower rate of virus infection. The symptomless, plants were superior in growth to the mosaic plants in fresh weight of leaves or bulbs and size of bulbs
5. All the mosaic plants showed local lesions on the leaves of *Gomphrena globosa* in juice inoculation. Six out of fourteen plants that have no mosaic leaves did not show local lesions. Index plants, such as *Chenopodium amaranticolor*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* cv. *Bright Yellow*, *Petunia hybrida* were not susceptible to the virus. Therefore, the virus was identified as Hippeastrum mosaic virus.