

ヒガンバナ科およびユリ科球根花卉のりん葉切片 からの子球形成とウイルスの無毒化

尾崎武司*・野口総一郎*・浜中昭彦*・平田明靖*・梁川 正**

* 大阪府立大学農学部

(〒593 堺市学園町1番1号)

* 京都教育大学教育学部

(〒612 京都市伏見区深草藤森町1番地)

(1995年7月22日受付)

(1996年1月8日受理)

ヒガンバナ科とユリ科に属する7種の植物のウイルス保毒球根を供試し、りん葉の *in vitro* 培養による子球形成とウイルス除去効果について検討した。得られた1次子球からのキュウリモザイクウイルス(CMV)の除去率は *Lycoris squamigera* など5種の植物では90~100%と高率であった。しかし、*Lilium longiflorum* (15.4%)と *Narcissus jonquilla* (5.4%)ではCMV除去効果はほとんど認められず、ひも状ウイルスの除去率もいずれの植物でも0%~67.6%と低かった。子球の大きさ別の保毒検定では子球径が小さいほど除去率が高まる傾向が認められた。保毒1次子球の2次培養ではウイルス除去率は植物の種類により異なり、*L. longiflorum* ではCMV除去率は80%に増加した。さらに、DHT(2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazine)0.1%添加培地で2次培養を行った場合、ひも状ウイルスに対しては効果は認められなかったが、CMV除去率は *N. jonquilla* で60%、*L. longiflorum* で93.3%とさらに高まった。

1. 緒言

有皮りん茎を有する植物は、ヒガンバナ科およびユリ科に属するものがほとんどで、鑑賞的価値を持つものが多い。しかし、栄養繁殖によって増殖するこれらの植物は、ウイルス感染による花卉のふ入りや奇形および球根の矮小化等の品質低下が著しく、球根生産上大きな問題となっている。一般にウイルスの無毒化には、生長点部の組織培養の効果が大きいことが知られているが^{1,2)}、近年はDHT(2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazine)等の薬剤を用いた化学的方法や熱を用いた物理的方法を組合わせて無毒化率の向上が試みられている。一方、筆者ら³⁻⁵⁾はヒガンバナ科の *Hippeastrum* (アマリリス)では、りん茎組織の *in vitro* 培養によりウイルスの無毒化が可能であることを見出ししている。この方法は、生長点培養に比べて、より簡便で大量増殖が可能であることから、ヒガンバナ科やユリ科植物の多くのものに適用できれば、実用上の価値は高いものと考えられる。

そこで本研究ではヒガンバナ科およびユリ科に属する7種の植物を供試して、りん茎組織の *in vitro* 培養による子球の増殖ならびに、ウイルス無毒株育成の可能性について検討した。

2. 材料および方法

供試植物は Table 1 に示すヒガンバナ科の6種とユリ科の1種で、すべて大阪府立大学農学部附属農場で5~15年にわたって露地栽培されていたものである。球根を掘上げる前に地上葉を供試し、あらかじめウイルス保毒の有無とその種類を確認した。CMVの検出は全供試株から間接ELISA法⁶⁾あるいはDIBA(dot immunobinding assay)法⁷⁾により行った。その他のウイルスの検出は以下のとおり行った。*Lilium longiflorum* (テッポウユリ)からの検出は、ユリ潜在ウイルス(lily symptomless carlavirus, LSV)とチューリップモザイクウイルス(tulip breaking potyvirus, TBV)は免疫電顕法⁸⁾により、カンキツタターリーフウイルス(citrus tat-

ter leaf closterovirus, CTV)は電顕による形態観察により行った。*Narcissus jonquilla*(スイセン)からの検出は、スイセン黄色条斑ウイルス(narcissus yellow stripe potyvirus, NYSV), スイセンモザイクウイルス(narcissus mosaic potexvirus, NMV)およびスイセン微斑モザイクウイルス(narcissus mild mosaic carla virus, NMMV)について、いずれも免疫電顕法により行った。その他の植物からの検出はCMV以外はすべて電顕観察により、ウイルス粒子の検出されたものについては未同定のままひも状あるいは球状ウイルスとして記載した。なお、CMV抗血清は本研究室保存のものを、LSVとTBV抗血清はA. F. L. M. Derks博士(Bulb Res. Cent.)より、NYSV, NMV, NMMV各抗血清はW. P. Mowat博士(Scottish Hort. Res. Inst.)より分譲されたものを用いた。

子球(1次子球と呼ぶ)の形成は、基本的には以下のとおり促した。供試球根から根および最外部のりん葉を1~2枚除去した後、70%エタノールに10分間、さらに1%アンチホルミンに20分間浸漬して滅菌し、滅菌水で3回洗浄した。球根の中部に着生するりん葉より低盤部にりん葉を1~2枚付けた切片(1辺約5mm)を摘出し、1次子球形成のための培養片を作成した。また、2次子球の形成には1次子球を材料とし、底盤部より子球長の約半分まで縦に十字の切れ目を入れたものを培養片とした。子球形成培地には基本的にはWhiteの培地に α -ナフタレン酢酸(NAA)0.01 mg/lと6-ベンジルアミノプ

リン(BAP)1 mg/l, ショ糖20 g/l, 寒天8 g/lを加えた固形培地を用いた。培養条件は20~25°C, 1,500 lux連続照明とした。また、2次子球形成には上記の培地から寒天を除いた液体培地を用いた。培養片を液体培地の入った50 mlのエrlenマイヤー・フラスコに移し、上記培養条件下で回転振盪培養(毎分70回転)して2次子球形成を促した。

抗ウイルス剤DHT(2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazine)の子球形成とウイルス除去に及ぼす影響については、*L. longiflorum*と*N. jonquilla*を供試して検討した。両種球根の中央部に着生するりん葉を0.01% DHTを浸ませた脱脂綿上に2週間置床した。その後、1辺約3mmの培養片を切り出し、0.1% DHTを添加した子球形成培地に移し25°C, 12時間日長で培養した。さらに3mm以下の1次子球を0.1% DHTを添加した液体培地に移し2次培養を行い、得られた子球についてウイルス保毒の有無を検討した。

3. 実験結果

(1) 各種植物のウイルス保毒状況

供試植物からのウイルスの検出結果はTable 1に示すとおりである。供試全個体からCMVとひも状ウイルスの両者が検出されたのは*Lycoris albiflora*(シロバナヒガンバナ), *L. squamigera*(ナツズイセン)および*N. jonquilla*であった。また、CMVはすべての植物から高率に検出され、ひも状ウイルスもすべての植物から見出された。さらに2種以上のウイルスが混合感染している場

Table 1. Detection of viruses in tested plants.

Species	Number of plants tested	Detected viruses*1	
		CMV	Filamentous Virus
Amaryllidaceae			
<i>Amaryllis belladonna</i>	20	11*2	18*3
<i>Crytanthus mackenii</i>	20	13	20
<i>Lycoris albiflora</i>	15	15	15
<i>Lycoris squamigera</i>	20	20	20
<i>Narcissus jonquilla</i>	43	43	43*4
<i>Sternbergia lutea</i>	20	17	13
Liliaceae			
<i>Lilium longiflorum</i>	50	32	42*5

*1 CMV and filamentous viruses were detected by ELISA and by electron microscopy using the direct negative stain method, respectively.

*2 Number of plants in which viruses were detected.

*3 All were regarded as hippeastrum mosaic virus(HMV)

*4 Narcissus yellow stripe virus(NYSV) and narcissus mild mosaic virus(NMMV) were present in 93% and 91% of the samples of detected viruses, respectively.

*5 Tulip breaking virus(TBV), lily symptomless virus(LSV) and citrus tatter leaf virus(CTLV) were present in 55%, 74% and 21% of the samples of detected viruses, respectively.

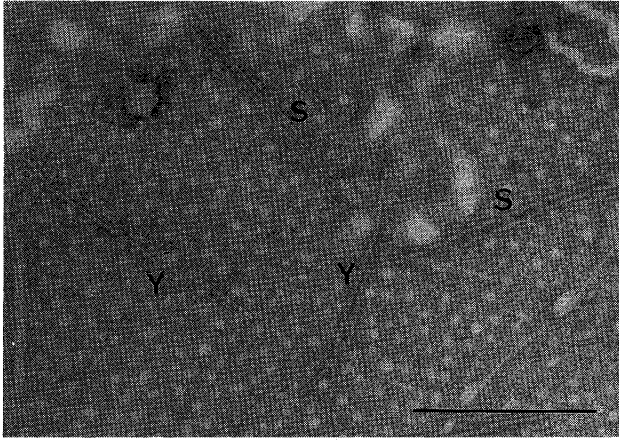


Fig. 1 Electron micrograph of slightly flexuous, carla-like particles(S) about 650 nm in length and flexuous, poty-like particles(Y) about 750 nm in length in negatively stained sap preparation from *Lilium longiflorum* plant. Bar represents 500 nm.

合が多く (**Fig. 1**), *N. jonquilla* では NYSV, NMMV, CMV の 3 者が, *L. longiflorum* では TBV, LSV, CTLV, CMV の 4 者が混合感染している個体もあった。

(2) 数種植物の球根内での CMV の分布

掘り上げ直後の *N. jonquilla* ならびに 20 日前後保存した *L. longiflorum* の球根から, 外部りん葉数枚の上部約 1/3 を採取し, CMV 保毒の有無を検定した。保毒を確認した球根各 5 個を供試し, 母球上の種々の位置のりん葉および底盤部から直径 8 mm のディスクを採取し, CMV 濃度を間接 ELISA 法により調べた (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の純化 CMV の ELISA 値は約 1.0)。

N. jonquilla での CMV 濃度は, 外部りん葉で高く (5 球根平均 ELISA 値, 内部; 0.450, 中部; 0.905, 外部; 1.197), 同一りん葉では頂部の方が高かった (同上, 基部; 0.427, 中部; 0.945, 頂部; 1.006)。一方, *L. longiflorum* 球根内での CMV 濃度は個体により差が見られ, *Hippeastrum*⁵⁾ や *N. jonquilla* に見られたほど位置関係による明瞭な濃度差は見られなかった。一般的には *Hippeastrum* と同様に⁵⁾ 内部に着生するりん葉の ELISA 値 (0.642~1.231) より外部のりん葉のそれ (0.114~0.803) の方が低かった。同一りん葉での ELISA 値は基部 (0.803~1.231) より頂部 (0.114~0.642) の方が低い傾向にあった。なお, 底盤部の CMV 濃度はいずれの球根でも極めて低いものであった (0.015~0.033)。

(3) りん葉の *in vitro* 培養による子球の形成

1 次培養による子球形成率には植物により差が見られ, *Amaryllis belladonna* (ホンアマリリス), *L. longiflorum*, *N. jonquilla* 等では高率であったが, *L. squamigera* のように低率のものもあった (**Table 2**)。な

お, 子球形成率は 1 枚のりん葉切片供試区の方が 2 枚のりん葉切片供試区よりやや高かったが, 子球形成数は後者の方が高い傾向が認められた (**Table 2**)。

(4) りん葉の *in vitro* 培養により得られた子球のウイルス保毒検定

りん葉切片の培養により得られた 1 次子球ならびに, それらを振盪培養して得られた 2 次子球のウイルス保毒状況を検討した。結果は **Table 3** に示すとおりであり, ウイルスの除去効果は植物およびウイルスの種類により異なった。一般に CMV の除去効果は高く, *Sternbergia lutea* (キバナノタマズグレ), *L. squamigera* では 1 次培養により得られた子球の全てが, また *A. belladonna*, *L. albiflora* および *Crytanthus mackeenii* では 90% 以上が無毒化されていた。さらに, *A. belladonna* では, 保毒 1 次子球を 2 次培養することにより完全に CMV を除去することが出来た。*L. longiflorum* と *N. jonquilla* では 1 次培養による CMV 除去効果は低く, 除去率は 15% 以下であった。しかし, 2 次培養による CMV 除去効果には両者間で差が見られ, *L. longiflorum* では除去率が 80% と上昇したのに対し, *N. jonquilla* ではその効果はほとんど認められなかった。一方, いずれの植物においても 1 次培養あるいは 2 次培養によるひも状ウイルスの除去効果は低く, *L. longiflorum* と *N. jonquilla* では 2 次培養後も全ての子球がウイルスを保毒していた。

1 次子球の大きさ別のウイルス除去率の検定結果は **Table 4** に示すとおりであり, 3 mm 以下の子球での除去率が高く, CMV は *L. longiflorum* と *N. jonquilla* を除く全ての子球から除去されていた。5 mm 以上の子球

Table 2. Bulblet regeneration from single-scale explants and twin-scale explants attached to basal plate tissue of several bulbous ornamentals in primary culture*¹.

	Single-scale explant			Twin-scale explant		
	No. of explants cultured	No. of explants regenerating bulblets (%)	No. of bulblets per explant* ²	No. of explants cultured	No. of explants regenerating bulblets (%)	No. of bulblets per explant
Amaryllidaceae						
<i>Amaryllis belladonna</i>	19	17 (89.5)	1.53	23	16 (69.6)	2.63
<i>Crytanthus mackenii</i>	48	40 (83.3)	1.45	26	16 (61.5)	2.44
<i>Lycoris albiflora</i>	43	20 (46.5)	1.45	44	18 (40.9)	2.67
<i>Lycoris squamigera</i>	22	5 (22.7)	1.00	31	4 (12.9)	2.50
<i>Narcissus jonquilla</i>	16	4 (25.0)	1.50	24	24 (100)	1.25
<i>Sternbergia lutea</i>	32	12 (37.5)	1.33	30	11 (36.7)	1.36
Liliaceae						
<i>Lilium longiflorum</i> * ³	26	23 (88.5)	2.52	—	—	—

*¹ The square explants were vertically placed on each White's agar medium supplemented with 0.01 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA for 12 weeks.

*² Number of bulblets/number of explants regenerating bulblets.

*³ Explants of bulb-scale tissue alone were used.

Table 3. Number of virus-free bulblets obtained from primary culture and subculture*¹.

Species	Virus	Bulblet from primary culture* ²	Bulblet from subculture* ³
Amaryllidaceae			
<i>Amaryllis belladonna</i>	CMV	18/20 * ⁴ (90.0)	12/12 (100)
	Filamentous V.	5/13 (38.5)	1/ 7 (14.3)
<i>Cryanthus mackenii</i>	CMV	38/39 (97.4)	—* ⁵
	Filamentous V.	18/39 (46.2)	—
<i>Lycoris albiflora</i>	CMV	32/34 (94.1)	6/11 (54.5)
	Filamentous V.	23/34 (67.6)	3/ 8 (37.5)
<i>Lycoris squamigera</i>	CMV	9/ 9 (100)	—
	Filamentous V.	1/ 9 (11.1)	—
<i>Narcissus jonquilla</i>	CMV	2/37 (5.4)	0/10 (0)
	Filamentous V.	0/37 (0)	0/10 (0)
<i>Sternbergia lutea</i>	CMV	15/15 (100)	—
	Filamentous V.	9/15 (60.0)	—
Liliaceae			
<i>Lilium longiflorum</i>	CMV	6/39 (15.4)	24/30 (80.0)
	Filamentous V.	0/39 (0)	0/39 (0)

*¹ CMV and the filamentous virus were detected by ELISA and by electron microscopy using the direct negative stain method, respectively.

*² Bulblets formed on the bulb-scale explants in the primary culture.

*³ Bulblets formed on the bulblet explants in the first culture.

*⁴ Relative number and percentage (shown in parenthesis) of bulblets free of viruses.

*⁵ Not tested.

Table 4. Efficiency of virus elimination of bulblets in relation to size of bulblets obtained from bulb-scale explants in primary culture*¹.

Species	Virus	Size of tested bulblets			
		< 3 mm* ²	3~5 mm	5 mm <	Total
Amaryllidaceae					
<i>Amaryllis belladonna</i>	CMV	7/ 7 * ³ (100)	7/ 8 (87.5)	4/ 5 (80.0)	18/20 (90.0)
	Filamentous V.	3/ 5 (60.0)	2/ 6 (33.3)	0/ 2 (0)	5/13 (38.5)
<i>Cryanthus mackenii</i>	CMV	30/30 (100)	3/ 4 (75.0)	5/ 5 (100)	38/39 (97.4)
	Filamentous V.	16/30 (53.3)	1/ 4 (25.0)	1/ 5 (20.0)	18/39 (46.2)
<i>Lycoris albiflora</i>	CMV	12/12 (100)	11/11 (100)	9/11 (81.8)	32/34 (94.1)
	Filamentous V.	11/12 (91.7)	8/11 (72.7)	4/11 (36.4)	23/34 (67.6)
<i>Lycoris squamigera</i>	CMV	4/ 4 (100)	4/ 4 (100)	1/ 1 (100)	9/ 9 (100)
	Filamentous V.	0/ 4 (0)	1/ 4 (25.0)	0/ 1 (0)	1/ 9 (11.1)
<i>Narcissus jonquilla</i>	CMV	1/13 (7.8)	1/20 (5.0)	0/ 4 (0)	2/37 (5.4)
	Filamentous V.	0/13 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)	0/37 (0)
<i>Sternbergia lutea</i>	CMV	1/ 1 (100)	9/ 9 (100)	5/ 5 (100)	15/15 (100)
	Filamentous V.	1/ 1 (100)	5/ 9 (55.6)	3/ 5 (60.0)	9/15 (60.0)
Liliaceae					
<i>Lilium longiflorum</i>	CMV	2/13 (15.4)	3/16 (18.8)	1/10 (10.0)	6/39 (15.4)
	Filamentous V.	0/13 (0)	0/16 (0)	0/10 (0)	0/39 (0)

*¹ CMV and the filamentous virus were detected by ELISA and by electron microscopy using the direct negative stain method, respectively.

*² Diameter of tested bulblets.

*³ Relative number and percentage (shown in parenthesis) of bulblets freed of viruses.

では CMV の除去率は多少劣ったが、80% 以上のものが無毒であった。一方、ひも状ウイルスでも小さい子球ほど除去率が高い傾向が見られたが、*L. longiflorum* と *N. jonquilla* のように全く除去されないものや、*A. beladonna* のように子球の大きさにかかわらず除去率に差が見られないものなどがあつた。

(5) 子球の無毒化に及ぼす抗ウイルス剤の影響

前実験でウイルス無毒化が困難であつた *L. longiflorum* と *N. jonquilla* を供試し、DHT の子球形成に及ぼす影響を調べたところ、1 培養片あたりの平均子球形成数は *L. longiflorum* では 2.5~2.1 に、*N. jonquilla* では 1.3~0.8 に低下した。また、子球形成時期も前処理中の 13 日目頃~30 日以降とかなりばらつきが見られた。形成された子球のウイルス無毒化状況は Table 5 に示すとおりである。ひも状ウイルスについては両者とも DHT 処理効果は認められず、1 次、2 次培養で得られた子球は全て保毒していた。CMV については *N. jonquilla* では 1 次培養による除去率は 5% と低く、2 次培養でも 60% にとどまった。しかし、*L. longiflorum* では DHT 処理効果が顕著に現われ、除去率は 1 次培養で 54.5% となり、2 次培養ではさらに 93.3% に増加した。

4. 考 察

有皮りん茎の多くはりん葉の葉えきに子球を形成し、自然に分球し増殖するが、自然分球の少ないものについては人為的増殖が必要であり、*Hippeastrum*⁹⁾、*Hyacinthus*¹⁰⁾、数種のヒガンバナ科およびユリ科植物¹¹⁾で切片挿しによる増殖が試みられている。さらに近年、りん葉片の *in vitro* 培養による実用的な大量増殖法が、無皮りん茎の *Lillium* 類^{12,13)}や *Tulipa*¹⁴⁾の他、有皮りん茎の *Hippeastrum*¹⁵⁾、*Hyacinthus*¹⁶⁾、*Narcissus*¹⁷⁾、*Lycoris*¹⁸⁾ 等で行われている。本研究ではウイルス無毒化を目的として *in vitro* 培養による子球形成を試みた。

りん茎の *in vitro* 培養においては、その種類により濃度や比率は異なるが、NAA が BAP と組合わせて添加された場合には、培養片における子球形成が著しく促進されることは *Lilium*^{13,19,20)}、*Hyacinthus*¹⁶⁾、*Narcissus*^{17,21)}、*Crinum*²²⁾ 等で認められているが、本実験の培養条件下 (NAA, 0.1 mg/l; BA, 1 mg/l) では子球形成数は植物によって差が認められた (Table 2)。しかし、2 枚のりん葉片をつけた切片からは 1.3~2.7 個の子球が得られ、供試植物のウイルス無毒化実験には本培養条件が適用出来るものと考えられた。なお、大量増殖の為には今後、個々の植物に適した培養条件を詳細に検討する必要がある。

本実験ならびに前報 (*Hippeastrum*)⁹⁾での球根内における CMV の分布調査から、ウイルスは必ずしも各部位に均一に分布するものではないこと、ならびに分布状況は植物により異なることが明らかになった。この理由の 1 つとして供試球根の保存時期の違い²³⁾が考えられる。*N. jonquilla* の場合、新芽の出葉した貯蔵球根では中部および外部に着生するりん葉中部でのウイルス濃度が低く、新芽を含む内部着生りん葉では高い傾向を認めており (未報告)、貯蔵中におけるウイルス濃度の変動が示唆された。なお、本実験ではひも状ウイルスの分布については調査を行わなかったが、萩田²⁴⁾は *Lilium leichtlinii* var. *maximowiczii* (コオニユリ) りん葉内での LSV と TBV の分布は異なることを報告していることから、ウイルスの種類により分布状況は異なる事が推測される。また、供試植物の多くは CMV とひも状ウイルスに混合感染していたが (Table 1)、CMV と potyvirus が混合感染した場合には CMV の濃度が極端に増加することが報告されている²⁵⁻²⁷⁾。したがって、混合感染株の球根内の CMV 濃度は増加することが予測されるとともに、その分布の様相も異なると考えられる。さらに、ウイルス感染株の球根でも、部位によりウイルスが検出されない

Table 5. Effects of DHT treatment on the virus elimination in bulblets obtained from primary culture and subculture*1.

Species	Treatment of DHT	Bulblet from primary culture		Bulblet from subculture	
		CMV	Filamentous Virus	CMV	Filamentous Virus
<i>Narcissus jonquilla</i>	+	1/20*2 (5.0)	0/20 (0)	9/15 (60.0)	0/15 (0)
	-	2/37 (5.4)	0/37 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>Lilium longiflorum</i>	+	30/55 (54.5)	0/55 (0)	28/30 (93.3)	0/30 (0)
	-	16/67 (23.8)	0/39 (0)	24/30 (80.0)	0/39 (0)

*1 CMV and the filamentous virus were detected by ELISA and by electron microscopy using the direct negative stain method, respectively.

*2 Relative number and percentage (shown in parenthesis) of bulblets free of viruses.

場合があると報告されている^{23,24}。今後、球根からのウイルス検出や培養片としての利用に際しては以上のようなことを念頭に置く必要があると考えられる。

In vitro 培養によるウイルス除去効果は、植物やウイルスの種類により大きく異なった (Table 3)。茎頂培養によるウイルス無毒化の場合にもこのような傾向は認められており、*L. longiflorum* の場合、CMV の除去効果は極めて高いが、ひも状ウイルスの除去は難しいとされている²⁸。茎頂培養によるウイルス無毒化機構の1つとして、茎頂部ならびにその近傍組織にはウイルスが存在しないことがあげられ、この原因はこれらの部位での維管束系の未分化にあると考えられている¹。*In vitro* 培養におけるりん葉切片からの子球形成の起源は、維管束から至近距離にある表皮および表皮下の柔組織細胞から作られた分裂組織であることが明らかにされている⁹。したがって、このような組織には茎頂におけるウイルス無毒部位に相当する部位が存在しないことから、CMV の無毒化の原因としては、代謝活性の高い分裂組織でのCMV の特異的な複製阻害や、物理的な不安定さが考えられる。また、森ら¹はCMV を含む茎頂組織を培養しても無毒個体が得られたことから、CMV は培養途中で失活すると推察しているが、*in vitro* 培養によるCMV 無毒化の場合も同様の原因が考えられる。一方、*L. longiflorum* と *N. jonquilla* ではCMV の無毒化が困難であった (Table 3, 4)。この理由は明らかではないが、両植物には potyvirus を含む数種のひも状ウイルスが混合感染していることから (Table 1)、子球原基細胞のCMV 濃度が極端に高まっていたことが推察される。

ひも状ウイルスは供試したいずれの植物からも1次培養のみでは除去が不可能であった (Table 3)。ヒガンバナおよびユリ科植物に感染するひも状ウイルスには potex, carla, poty および closterovirus グループに属するウイルスがあり、その転写と翻訳機構はグループにより異なる。無毒化が難しかった *L. longiflorum* と *N. jonquilla* にはおのおの6種と9種のウイルスの発生が報告されており²⁹、本研究でも全てが2種以上のひも状ウイルスに混合感染していた (Table 1)。Verbeck ら³¹ はニンニクの茎頂培養によるひも状ウイルスの除去を試み、potyvirus に比べて carlavirus が困難であることを報告している。筆者ら⁵も *Hippeastrum* では potyvirus グループの HMV の除去が可能であることを報告し、藤野ら³⁰も子球の前駆形態である丘状組織の *in vitro* 培養により HMV の無毒化に成功している。したがってウイルスの複製あるいは組織内の移行機構の違いが無毒化の難易を決めている可能性がある。本研究では子球の

大きさにより無毒化率が異なった (Table 4)。この理由としてはウイルスの遠隔移行は維管束を通じて行われる^{32,33}ことから、維管束が未分化の子球ではウイルス濃度は低いために無毒化が容易であったと考えられる。このことは、2 mm 以下の1次子球を2次培養すると無毒化率が向上したことから推測できる。したがって、2次培養の材料としては子球原基が膨らみ始めた初期の子球ほど適していると考えられる。

DHT はウイルスの増殖または移行を阻害する抗ウイルス剤であり^{34,35}、治療試験や茎頂培養への利用が試みられており、CMV をはじめ tobacco mosaic tobamovirus, potato potexvirus X などに対する効果が認められている。本実験でもCMV に対する効果は認められたが、ひも状ウイルスに対する効果は植物の種類により異なった (Table 5)。この原因の1つとしては処理濃度、処理方法、処理時間があると考えられる。今後これらについて詳細に検討するとともに、熱処理や抗体利用等対象とするウイルスや植物に適した方法を開発し、DHT と併用することにより、*in vitro* 培養によるウイルス無毒植物の獲得がさらに確実に行い得るものと考えられる。

文 献

- 1) 森 寛一, 細川大二郎, 渡辺 実, 1982. 日植病報, **48**: p. 433-443.
- 2) Warren, G. S., P. Thomas, M.-T. Herrera, S. J. L. Hill, 1992. Journal of Biotechnology, **22**: 171-200.
- 3) 梁川 正, 尾崎武司, 1987. 第10回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, p. 83.
- 4) 梁川 正, 坂西義洋, 尾崎武司, 1987. 園学要旨, 昭62春, p. 412-413.
- 5) Yanagawa, T., T. Osaki, 1996. Plant Tissue Culture Letters, **13**: (印刷中)
- 6) Koenig, R., 1981. J. Gen. Virol., **55**: 53-62.
- 7) Hibi, T., Y. Saito, 1985. J. Gen. Virol., **66**: 1191-1194.
- 8) Milne, R. G., 1984. In "Methods in Virology Vol. 7" (eds. by Maramorosch, K., H. Koprowski), p. 87-120, Academic Press, New York.
- 9) 藤岡作太郎, 1964. 園学雑, **33**: p. 159-170.
- 10) 西井憲治, 筒井 澄, 豊田篤治, 1963. 富山農試礪波園芸分場研報, **3**: p. 6-13.
- 11) 坂西義洋, 梁川 正, 1979. 園芸学研究集録, **9**: p. 100-107.
- 12) Takayama, S., M. Misawa, 1983. Scientia Hort., **18**: 353-362.
- 13) Novak, F. J., E. Petru, 1981. Scientia Hort., **14**: 191-199.
- 14) 西内義男, 1982. 北海道教育大紀要 (II. B), **33**: p. 49-65.
- 15) 高山真策, 天羽孝子, 深野真弓, 林 勇, 1986. 園学要旨, 昭61春, p. 400-401.
- 16) Takayama, S., T. Amo, M. Fukano, 1991. Scientia Hort., **45**: 315-321.

- 17) Hosoki, T., T. Asahira, 1980. HortSci., **15**: 602-603.
- 18) Huang, L. -C., D. -M. Liu, 1989. Scientia Hort., **40**: 145-152.
- 19) Fukui, H., N. Adachi, T. Hara, M. Nakamura, 1989. Plant Tissue Culture Letters, **8**: 119-124.
- 20) Panizza, M., A. Mensuali Sodi, F. Togoni, 1990. Adv. Hort. Sci., **4**: 103-106.
- 21) Chow, Y. N., C. Selby, B. M. R. Harvey, 1992. J. Hort. Sci., **67**: 289-293.
- 22) Slabbert, M. M., M. H. de Bruyn, D. I. Ferreira, J. Pretorius, 1990. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **33**: 133-141.
- 23) Van der Vlugt, C. I. M., H. Lohuis, J. Dijkstra, A. Marquart, R. W. Goldbach, P. M. Boonekamp, 1993. Ann. appl. Biol., **123**: 601-610.
- 24) 萩田孝志, 1989. 日植病報, **55**: p. 344-349.
- 25) Sano, Y., M. Kojima, 1989. Ann. Phytopath. Soc. Japan, **55**: 296-302.
- 26) Ishimoto, M., Y. Sano, M. Kojima, 1990. Ann. Phytopath. Soc. Japan, **56**: 63-72.
- 27) Poopol, P., T. Inouye, 1986. Ann. Phytopath. Soc. Japan, **52**: 22-30.
- 28) 森 寛一, 浜屋悦次, 下村徹, 池上雍春, 1969. 農事試験報, **13**: p. 78-81.
- 29) 大木 理, 1992. 植物防疫特別増刊号, p. 1-93.
- 30) 藤野守弘, 塩飽邦子, 稲垣国昭, 森 俊人, 1986. 兵庫農研報, **34**: p. 85-90.
- 31) Verbeek, M., P. van Dijk, M. A. van Well, 1995. European Journal of Plant Pathology, **101**: 231-239.
- 32) Atabekov, J. G., M. E. Taliansky, 1990. Adv. in Virus Res., **38**: 201-248.
- 33) Hull, R., 1989. Annu. Rev. Phytopath., **27**: 213-240.
- 34) Borissenko, S., G. Schuster, W. Schmygla, 1985. Phytopath. Z., **114**: 185-188.
- 35) Bogusch, L. J., T. D. Verderevskaja, G. Schuster, 1985. Phytopath. Z., **114**: 189-191.

Summary

In vitro Bulblet Regeneration and Efficiency of Virus Elimination from Several Bulbous Ornamentals of the Amaryllidaceae and Liliaceae by Bulb-scale Cultures

Takeshi, OSAKI*, Soichiro NOUGUCHI*, Akihiko HAMANAKA*, Akiyasu
HIRATA* and Tadashi YANAGAWA**

* College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 593, Japan

** Faculty of Education, Kyoto University of Education, Fukakusa-Fujinomori-cho,
Fushimi-ku, Kyoto 612, Japan

The efficiency of virus elimination by *in vitro* bulb-scale cultures was investigated using seven species of bulbous ornamentals infected with CMV and filamentous viruses. Primary cultures were done with explants containing one or two bulb-scales attached to basal plate tissue. CMV was eliminated in 90-100% of all regenerated bulblets obtained from the primary culture from five species except for *Narcissus jonquilla* (5.4%) and *Lilium longiflorum* (15.4%) in the tested species. However the removal of filamentous viruses was less successful (0-67.6%) irrespective of the species tested. The efficiency of virus elimination in bulblets from subcultures varied considerably according to the species, and the frequency of virus elimination tended to decrease with increasing bulblet size. When bulblets were subcultured in a liquid medium supplemented with 0.1% DHT (2,4-Dioxohexahydro-1,3,5-triazine), 60.0% and 93.3% bulblets in *Narcissus jonquilla* and *Lilium longiflorum*, respectively were found to be free of CMV. In contrast, it was impossible to eliminate the filamentous virus by treatment with DHT.