

クワ萎縮病罹病腋芽培養における病徴発現に及ぼす低温処理の影響

工藤 哲朗・伊藤 聡子

(山形県蚕業試験場)

Effect of Low Temperature Treatment on Symptom Development of Mulberry Dwarf  
in the Axillary Bud Culture

Tetsuro KUDO and Toshiko ITO

(Yamagata Sericultural Experiment Station)

1 はじめに

組織培養技術の用途開発の一環として、組織培養では圃場とは異なって、*in vitro*での制御のしやすさ、観察のしやすさ等のあることに着目し、培養幼植物体について各種の研究素材としての活用方法を検討している。

クワ萎縮病については、既に多くの研究がなされ、病原媒介昆虫と伝染経路、更に肥培管理や収穫体系等の多くの発病要因が知られている。しかし、罹病枝条を初冬季の降霜時以降に採取し、接木や挿木をすると病徴が現れない<sup>4)</sup>ことや、落葉期以降の枝条組織内から病原 Mycoplasma Like Organism (MLO) が漸次減少し、いずれ消失するものの、氷点下にならない根部に残存することが電子顕微鏡 (TEM) で確認され<sup>1)</sup>、一方では、罹病新梢腋芽の超低温保存による病原MLOの生存が確認されており<sup>2)</sup>、MLOの不活化と低温とのなんらかの関係が示唆されながらも、なお不明な点が多い。

そこで筆者らは、前報では罹病新梢腋芽の初代培養において、シュート形成個体の展開葉の縮葉症状により病徴発現が確認できることを報告した<sup>3)</sup>が、本報では、培養当初に低温遭遇処理をし、生育と病徴発現への影響を検討した。

2 試験方法

(1) 供試材料：品種剣持の春切株で、夏季に明らかな縮葉及びそう生枝症状を呈した重症株から、晩秋から初冬

季にかけて枝条を基部で伐採し、古条挿木法に準じ15~20 cmの挿穂に調整した後、パーミキュライト床に挿し込み、26℃の恒温室内で発芽を促し、30~50日後に新梢長10~15 cm、第5~8開葉期のもので、明らかな病徴を呈した新梢のほぼ中央部の緑色腋芽2~3芽を用いた。

(2) 外植体の滅菌及び調整：腋芽培養の常法にほぼ準じ、1~2芽付き茎に切断し、中性洗剤で洗浄後に水道水で十分に洗い流し、70%アルコールに数秒間、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)に25分間浸漬して滅菌処理をし、滅菌水で3回洗浄した。その後、10mmの茎付き1芽1節に調整して外植体とし、培地に横置きに茎部が培地中に埋まるよう置床した。

(3) 培地条件：Murashige-Skoog (MS)を基本培地にし、ベンジルアデニン(BA) 1mg/lとナフタレン酢酸(NAA) 0.1mg/lを加え、果糖3%、寒天0.6%、pH5.6に調整し、管瓶(直径25mm、長さ120mm)に10mlずつ分注し、1気圧15分間のオートクレーブ処理をした。

(4) 低温処理：培地移植直後、恒温器(クールニックス)を用い、処理温度は-2、-3、-5℃とし、時間は-2℃と-3℃は、6、24、48、72hr、-5℃は3、6hrとした。その間はいずれも暗条件とした。

(5) 培養条件：26±2℃、12hr明12hr暗、約2,000lx

3 結果及び考察

発育状況は、無処理区も含めてシュート形成個体率がや

表1 発育の状況

(培養30日)

区 (°C/hr)	供試個体数 n	発育程度			A / n (%)	Aの平均最 長シュート長 (mm)	シュート数 A-explant (本)	葉数 A-explant (枚)
		A	B	C				
無処理	19	11	0	8	57.9	18.5	2.7	5.2
-2 / 6	19	9	0	10	47.4	17.8	2.7	4.3
/24	19	12	0	7	63.2	19.8	2.7	4.1
/48	17	8	0	9	47.1	15.9	3.1	6.4
/72	18	11	0	7	61.1	16.5	2.5	5.6
-3 / 6	12	8	0	4	66.7	23.8	2.0	5.0
/24	16	11	0	5	68.8	20.5	2.9	4.7
/48	15	9	1	5	60.0	18.7	2.6	6.3
/72	14	10	1	3	71.4	15.7	2.3	5.1
-5 / 3	13	6	1	6	46.2	18.2	2.7	6.7
/6	13	10	0	3	76.9	15.4	2.3	6.1

注. A:シュート形成, B:葉の展開のみ, C:ほとんど発育せず

や低率であったが、シュートを形成した個体の平均シュート数及び展開葉数等は区間に大きな差はなく、発育に及ぼす低温処理の直接的な影響は認められなかった。

病徴発現の状況は、展開葉の縮葉症状により判定したが、培養当初は判然としない個体が多く、培養経過とともに識別可能な個体が多くなる傾向にあった。

病徴発現率は、-2℃では24hr以上の処理でやや減少する傾向がみられたものの、判然としないままの個体が多かった。

-3℃では、処理時間が長くなると病徴発現率が減少す

る傾向にあり、48hr処理では9個体中2個体が、72hr処理では10個体中4個体が不発現のままであった。

-5℃では、処理時間が短かったためか、ほとんどが無処理区と同様に発現した。

このような判然としない個体や不発現個体については、これまで病徴が判然としない培養当初でも、茎葉組織内に明らかなMLOの存在が電子顕微鏡で確認されている<sup>5)</sup>ことからすれば、発病遅延なのかMLOの不活化によるものかは明確ではないものの、病徴発現が抑制されたものとみることにはできる。

表2 シュート形成個体の病徴発現の状況

区 (℃/hr)	培養30日目				培養50日目			
	-	±	+	+ / A (%)	-	±	+	+ / A (%)
無 処 理	0	2	9	81.8	0	0	11	100.0
- 2 / 6	0	1	8	88.9	0	1	8	88.9
/ 24	1	5	6	50.0	0	4	8	66.7
/ 48	0	3	5	62.5	0	2	6	75.0
/ 72	0	4	7	63.6	0	3	8	72.7
- 3 / 6	0	2	6	75.0	1	1	6	75.0
/ 24	0	4	7	63.6	1	1	9	81.8
/ 48	2	3	4	44.4	2	3	4	44.4
/ 72	4	1	5	50.0	4	1	5	50.0
- 5 / 3	1	0	5	83.3	0	1	5	83.3
/ 6	0	2	8	80.0	0	1	9	90.0

注. 縮葉症状による判定 - : 不発現, ± : 判然としないもの, + : 発現

このことから、病徴消失になんらかの形で低温が関与しているものと推察された。

しかし、今回の処理の範囲内では、いずれの処理区でも無処理区と同様の病徴を呈する個体も多かったことから、低温処理による影響が直接的なものか、それともMLOの生息環境の物理的、化学的变化を介して間接的に影響を及ぼすものか、依然として不明であり、今後それらの点を含めて更に検討を要するものと思われた。

#### 4 ま と め

クワ萎縮病の病徴消失と低温との関係を探るために、罹病新梢腋芽を-2~-5℃の低温処理をし、MS+BA 1 mg / l + NAA 0.1 mg / l 培地で初代培養を試み、発育及びシュート形成個体の病徴発現状況を調査した。

(1) 低温処理の発育への直接的な影響は認められなかった。

(2) -3℃の48hr及び72hr処理で病徴発現率が低下し、明らかな不発現個体がみられた。

発病遅延によるものか、病原MLOの不活化によるものかは不明であるものの、病徴消失になんらかの形で低温が関与しているものと推察された。

#### 引 用 文 献

- 1) 川北 弘. 1977. クワ萎縮病に関する電子顕微鏡的研究, II 罹病クワ組織内におけるマイコプラズマ様微生物の季節的消長. 日蚕雑 46: 404-410.
- 2) ————. 1986. クワ萎縮病病原の凍結保存法の検討(予報). 日蚕関東支部講要 37: 6.
- 3) 工藤哲朗. 1986. クワにおける組織培養技術の用途開発に関する研究. 第1報 クワ萎縮病株の分離芽培養. 東北農業研究 39: 327-328.
- 4) 宮下栄紹, 山田景三. 1983. 桑萎縮病の発病推移解析と耕種的防除法に関する研究. 蚕試報 28: 741-765.
- 5) 大山勝夫, 川北 弘. 1975. クワ萎縮病罹病新梢の茎頂培養について. 日蚕雑 44: 413-414.