

果樹におけるウイルス無毒化と大量増殖

山 家 弘 士

(福島県果樹試験場)

Elimination of Fruit Tree Viruses and Mass Clonal Propagation
of Nematode Resistant Peach Root Stock Tukuba No. 4
by *in vitro* Shoot Tip Culture

Hiroshi YAMAGA

(Fukushima Fruit Tree Experiment Station)

1. はじめに

果樹のウイルス（接ぎ木伝染性病害を含む）は接ぎ木、昆虫、線虫などによって伝染することが知られているが、中でも接ぎ木による感染例が圧倒的に多い。特に有望な新品種はこれを迅速に増殖する必要があるため、既存の成木に無差別に高接ぎされ、その結果さまざまなウイルスに感染する。これらが、更に増殖され出回るため、感染域は短期間のうちに拡大して行く。このようにして保毒したウイルスが強力な病原性をもっていた場合、一部の病害を除いて治療法がないだけに、農家の被る損害は図り知れないものがある。

東北でウイルス病が大きな問題になったのは1930年代、1970年代の2回で、いずれもリングの旧品種を市場性の高い新品種に高接ぎ更新した場合に、樹が次第に衰弱枯死する「高接ぎ病」の発生を見た時である²⁰⁾。この病原ウイルスと寄主特異性について、その複雑な関係が解き明かされ^{35—37)}、更には植物防疫所による国内母樹

検疫が制度化されるに至って、被害発生面積は大幅に減少した。このように感染により寄主に衰弱枯死、奇形、斑葉、えそ斑、など容易に視認できる病徴を発現する場合をウイルス病と呼び、明確な病徴を発現しない場合を潜在ウイルス (Latent Virus) と区分し、後者については実害がないとされてきた。しかし最近ではこれら潜在ウイルスに複合感染した場合、熟期の遅延、接ぎ木活着率・耐凍性・収量・樹勢の低下^{4, 25, 38)} など捕捉が困難な影響を受けることが次々に報告されている。これらのウイルスについてフリー個体を獲得するには、感染苗木を熱処理 (37~40℃) したのち、先端部を切り取って予め準備した実生台木に緑枝接ぎする Campbell³⁾ の方法によるのが一般的である。この方法によってウイルスを除去するには、Campbell も指摘しているように熱処理期間の長さもさることながら、ウイルスの増殖にとって不利な条件下で、いかに新梢を急速に伸長させるかが重要なファクターとなる。すなわちこの方法は高

温によりウイルスの増殖が阻止され、その結果生じる新梢先端部の「拡大された無ウイルス域」を利用しているからである。しかし徒手によって接ぎ木するため新梢先端部約1cmが「無ウイルス域」化される必要がある。この方法の欠点は耐熱性の弱い品種・台木に対し十分な加熱期間を与えることが困難なこと、また伸長量の確保も難しいこと等である。Wood³¹⁾は32℃の休止期間を挟み、苗木の回復を図りながら2～3回熱処理する方法により、もっとも耐熱性の強いリンゴSGVの除去に成功している。ここでは茎頂培養法を利用しこれら従来法の改善を試みたので報告する。また果樹では挿し木発根の困難な台木が多く、一般にその増殖は取木や種子繁殖に頼っているが、種子繁殖をすると形質分離のため苗木が不揃いになる傾向がある。本試験ではウイルス無毒化試験と並行してこれら台木のクローン増殖をも試みたが、通常的手段では難発根性の台木も、継代培養を繰り返すことにより容易に発根個体が多数獲得できることが明らかになった。ここではモモの、ネコブ線虫抵抗性台木、筑波4号の大量増殖法についても述べる。なお本試験は1983～1985年まで中核研究、1986～1988年まで地域重要新技術開発研究として、青森県りんご試験場、山形県園芸試験場と共同研究として実施したものである。

2. ウイルス感染実態と茎頂培養による無毒化

(1) リンゴ

1) ウイルスの感染実態

福島県におけるわい化栽培の‘ふじ’、‘つがる’について行った最も普遍的なリンゴのウイルスである Apple Chlorotic Leafspot Virus

(CLSV), Apple Stem Grooving Virus (SGV), Apple Stem Pitting Virus (SPV) の感染実態調査の結果は表1の通りである。わい化栽培に使用されている台木はM26, M9Aが大部分であるが、このような汚染状況は導入された時点で既に台木がウイルスを保毒していたか、あるいは台木の増殖や苗木生産の過程で保毒したものと考えられ、また依然として感染源が野放し状態にあることをうかがわせる。町田ら¹⁸⁾の調査でも品種間差があるものの、SGV96～100%, CLSV65～89%の検出率である。

表—1 福島県におけるリンゴのウイルス感染実態

品 種	調査樹数	CLSV%	SGV%	SPV%
ふ じ	200	100	100	31
つがる	200	100	100	47

2) 茎頂培養によるウイルス無毒化

茎頂培養は多くの草本植物のウイルス除去に極めて有効な手段であり一部実用化の段階に入っているが、木本植物については1960～1970年代後半にかけて始めて培養法が確立^{1, 6, 11-13)}されたこともあって、培養する茎頂部の大きさと除去されるウイルスの種類が明らかにされていない。そこで種々の大きさに茎頂部を切り取り培養し、増殖した苗条についてウイルスの除去の有無を調査した。

a. 試験方法

供試材料；野外で生育中の品種‘つがる’及び‘恵×紅玉’、

摘出茎頂の大きさ； $L_1=0.20\sim0.25$, $L_2=0.3\sim0.5\text{mm}$, $L_3=0.8\sim1.0\text{mm}$, $L_4=4.0\sim5.0\text{mm}$, $L_5=9.0\sim12.0\text{mm}$,

培養条件；BA1.0mg加用 M.S 培地に置床、

40日間隔で同一新鮮培地に継代，培養温度26℃，日長16h，

SGV，CLSVの検定；4回の継代後，十分に増殖した苗条の一部を切り取りELISA法⁵⁾により検定を行った。

b. 試験結果

表2，表3に示したように1.0mm以下に茎頂部を切り取り培養すれば，CLSVが確実に除去できることが明らかとなった²⁾。また1.0cmの茎頂に由来する苗条も品種によってはCLSV

が除去されていた。しかしSGVはすべての茎頂部に由来する苗条から検出され除去できなかった。他方，瀬川²⁾らによれば茎頂部を0.1mm大に摘出し培養することによりSGVの除去が可能であることを示したが，採芽時期や年次によって必ずしも安定した結果が得られないとしている。またHuang・Millikan¹⁰⁾はSGVに感染しているリングから0.1～0.2mm大に茎頂を摘出し，*in vitro* Micro Graftingの手法でフリー・クローンを得ているが成功率は高くない。

表一2 ‘つがる’の摘出茎頂の大きさとフリー化状況（5/22）

区 分	置床数	生存数 (被検数)	被検部位	CLSV 判定結果 (Abs)			SGV 判定結果 (Abs)		
				+	±	—	+	±	—
L ₁	20	11	苗 条			11(0.25)	11(0.75)		
L ₂	12	8	”			8(0.26)	8(0.63)		
L ₃	12	8	”			8(0.26)	8(0.67)		
L ₄	12								
L ₅	15	4	”			4(0.19)	4(0.95)		
採 穂 樹		1	皮 部	1(5.31)			1(0.31)		
リング実生		3	”			3(0.54)			3(0.03)

表一3 ‘恵×紅玉’の摘出茎頂の大きさとフリー化状況（6/22）

区 分	置床数	生存数 (被検数)	被検部位	CLSV 判定結果 (Abs)			SGV 判定結果 (Abs)		
				+	±	—	+	±	—
L ₁	12	1	苗 条			1(0.34)	1(0.58)		
L ₂	12	3	”			3(0.34)	3(0.45)		
L ₃	12	11	”			11(0.35)	11(0.49)		
L ₄	12	12	”	10(2.41)	2(0.60)		12(0.57)		
L ₅	20	10	”	8(3.37)	1(0.77)	1(0.43)	10(0.59)		
採 穂 樹		1	皮 部	1(2.47)			1(0.25)		
リング実生		3	”			3(0.42)			3(0.04)

3) 熱処理併用によるリングのウイルス無毒化

茎頂培養単独ではSGVの安定した除去が困難であることが判明したので、他の有効な手段である熱処理法との併用について検討を行った。

a. 試験方法

供試材料；前年度に鉢植えたSGV保毒2年生ふじ、

加熱条件；30℃で予備加熱し、萌芽・伸長を確認したのち $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で熱処理を行った。2W、3W、4W後に加熱期間中の新梢伸長量を測定し茎頂部を約1.0cm切り取って培養した。

培養条件；BA1.0mg加用M.S培地に置床、40日間隔で同一新鮮培地に継代、培養温度26℃、日長16h、

SGVの検定；4回の継代後、十分に増殖した苗条の一部を切り取りELISA法により検定を行った。

b. 試験結果

37℃加熱期間中に伸長量が1.0cm未満の新梢の茎頂部を摘出し培養した苗条からは、加熱期間の長短にかかわらずSGVが検出された。このことは加熱期間の長さよりも伸長量のほうがフリー化に与える影響の大きいことを示している³³⁾。瀬川ら²⁷⁾も王林、陸奥を供試、35～37℃加熱10日後に約0.2mmの茎頂部を培養した結果、高い頻度でSGVフリー個体が獲得できることを示した。他方、山口ら⁴⁰⁾は西洋ナシのSGVについて試験を行ったが、フリー化個体を獲得するには加熱期間も重要なファクターであることを明らかにした。以上のような結果を総合して考えると、熱処理はウイルス粒子の増殖を阻止するだけでなく、徐々に粒子の崩壊をも促していることを暗示している。いずれにせよ、このような耐熱性ウイルスを除去するに当たって、茎頂培養法を併用することは極めて有効な手段であることが判明した。

表一4 熱処理期間・新梢伸長量とSGVフリー化状況（品種：ふじ）

新梢No.	37℃ 加熱期間	37℃加熱期間中の新梢長 (cm)						ELISA Value OD-492	判 定
		加熱開始時	1 W後	2 W後	3 W後	4 W後	伸長量		
7-1	2 W	3.5	7.5	8.0			4.5	0.03	-
14-1	"	4.5	8.0	8.0			3.5	0.02	-
15-1	"	3.0	7.5	7.5			4.5	0	-
5-3	3 W	2.5	6.0	6.0	6.0		3.5	0.03	-
9-3	"	2.5	6.5	6.5	6.5		4.0	0	-
10-5	"	3.0	4.0	4.0	4.0		1.0	0.83	+
15-2	"	0.5	4.5	5.0	5.5		5.0	0	-
1-2	4 W	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	1.0	0.71	+
3-1	"	4.0	8.0	9.0	9.0	9.0	5.0	0.02	-
5-2	"	2.0	4.5	4.5	4.5	4.5	2.5	0.05	-
6-3	"	3.0	5.5	5.5	5.5	6.0	3.0	0	-
7-2	"	3.5	7.0	7.5	7.5	7.5	4.0	0	-
10-4	"	2.0	4.5	4.5	4.5	4.5	2.5	0.05	-
14-2	"	2.0	5.0	5.0	5.0	5.0	3.0	0.05	-
Source tree								0.85	+
実 生								0.04	-

4) 抗ウイルス剤利用によるリンゴのウイルス無毒化

Ribavirin (以下 Rib.) は哺乳類の DNA, RNA ウィルスに対し幅広いスペクトルを有する合成ヌクレオシドである。また植物ウィルスに対しても Potato Virus X (PVX)¹⁷⁾, DHT との併用により Cucumber Mosaic Virus, Tobacco Mosaic Virus, PVX, Brome Mosaic Virus に対し顕著な増殖阻止効果が見られている²⁸⁾。そのほか Klein・Livingston¹⁵⁾ は Rib. を培地に添加してジャガイモの茎頂を培養した結果, PVX, Virus S の除去に成功している。果樹関係では Hansen・Green⁹⁾ が, あらかじめ Rib. を散布した *Chenopodium quinoa* に CLSV, SGV など 8 種類のウィルスを接種したところ, CLSV に対してのみ強い感染阻止効果がみられ, SGV, Prunus Necrotic Ringspot Virus, Prune Dwarf Virus, Grape Fanleaf Virus などに対しては効果がなかったとしている。また同じく Hansen らは, 生育期間中 7 日間隔で Rib. を散布したリンゴ 1 年生苗木から, 翌春になっても CLSV が検出されなかったことも併せて報告している。我々は Hansen の感

染阻止効果に力点を置いた試験方法に疑問をもち, SGV に対する効果の有無を再検討するため培地に添加して試験を行った。

a. 試験方法

供試材料; 熱処理併用法で SGV を除去できなかった苗条 NO.10—5, NO.1—2,

試験区; Rib. は 12.5ug/ml, 25.0ug/ml とし標準区 (BA1.0mg 加用 M.S 培地) に添加した。

処理期間; 40日, 80日, 120日とし新たに増殖した各区の新梢先端部を約 1.0cm に切り取り, 40日間隔で同一新鮮培地に移植することにより処理を行った。処理を完了した試験区は同様に新梢先端部を切り取り標準培地に継代した。SGV の検定は間接 ELISA²⁾ により試験開始後 240日に行った。

b. 試験結果

25.0ug 区では苗条がやや黄化し新梢の増加率も低下する傾向が見られ, 継代処理期間が長くなるほど枯死個体数が増加した。12.5ug 区では目立った薬害は見られなかった。Ribavirin 添加培地で 80日 (40×2 回) 継代処理した新梢はいずれの濃度でも SGV は検出されなかったが (表—5), 40日処理では一部の個体が, ま

表—5 Rib 添加処理開始 240 日後の ELISA 検定結果

Rib. Conc. μg/ml	Source No. (SGV+)	対照区		A 区		B 区		C 区	
		+	—	+	—	+	—	+	—
0	1—2	10 (0.51)							
	10—5	10 (0.47)							
12.5	1—2			3 (0.39)	7 (0.007)		10 (0.006)		10 (0.007)
	10—5				10 (0.007)		10 (0.007)		10 (0.007)
25.0	1—2			1 (0.46)	9 (0.006)		8 (0.007)		8 (0.007)
	10—5				10 (0.006)		5 (0.007)		3 (0.007)

注. () はマイクロプレート・オートリーダーによる 660~492nm 吸光度値

た対照区は全個体が陽性反応を示した。このように Ribavirin は CLSV だけでなく SGV についてもリンゴの生体内でその増殖を阻止する効果を示した³⁴⁾。このことは感染苗木に Rib. を定期的に散布することにより、新梢先端部に CLSV だけでなく SGV についても「無ウイルス域」を作り出せることを示唆しており、また作用機作の異なる数種の抗ウイルス剤を組み合わせることにより、より確実に簡便なフリー化技術の開発が可能となることを示している。

(2) モ モ

1) ウイルスの感染実態

福島県における調査結果を表—6 に示した。NRSV 感染樹は各品種とも少なく、東洋系品種の保毒率が少ないとする京谷ら¹⁶⁾の調査結果と一致した。CLSV は新品種ゆうぞら以外で感染率が高かった。しかし生産性に及ぼす影響については不明である。

表—6 福島県におけるモモ主要品種のウイルス感染実態 (宗形ら²¹⁾ 1985)

品 種	調査樹数	CLSV%	NRSV%	CLSV+ NRSV%
あかつき	354	94.9	—	4.8
白 鳳	224	74.1	—	0.9
ゆうぞら	76	26.3	2.6	—
大 久 保	207	64.3	—	—

注. 宗形らのデータを一部改変して表示した。

2) 茎頂培養によるウイルスの無毒化

CLSV に全身感染している白鳳の休眠枝を水挿し、加温して新梢を萌芽伸長させ茎頂部を 0.2~0.3mm、0.8~1.0mm 及び約 1.0cm に切り取り修正 M.S 培地に置床した。その結果 1.0mm 以下に茎頂部を摘出、培養すれば確実に無毒化できることが判明し²²⁾、後に Van Houten ら²⁰⁾によっ

て追認された。また 1.0cm の茎頂からも無毒個体が得られ、継代中の検定経過から培養中に CLSV が苗条塊の中で次第に偏在化して行き、無毒化個体が得られることがうかがえた²²⁾。同じく Van Houten らは野外生育中の大久保を供試、0.2mm の茎頂部を摘出し NRSV 無毒個体を獲得したが、茎頂の生存率は極めて低い。しかし熱処理を併用し茎頂部を 0.5~10.0mm に摘出することにより生存率、無毒化率が高まることを明らかにした²⁰⁾。

(3) オウトウ

1) ウイルスの感染実態

山形県、福島県の調査 (表—7、表—8) とも高砂の PDV 感染率が他の品種と比較して際立って高かった。NRSV、PDV は花粉により樹から樹に伝染することが岸ら¹⁴⁾によって実験的に証明されているが、福島県下における追跡調査、植栽暦、植栽状況などから判断して現在のところ PDV、NRSV とも花粉により樹から樹へ感染している兆候は見られていない。

表—7 山形県におけるオウトウのウイルス感染 (野口ら²⁶⁾ 1987)

品 種	調査樹数	PDV 保毒率%	NPSV 保毒率%
高 砂	9	55.6	—
佐 藤 錦	35	5.7	6.7
ナポレオン	29	—	3.4
そ の 他	21	—	—

注. 野口らのデータを一部改変して記載。

表—8 福島県におけるオウトウのウイルス感染実態

品 種	調査樹数	CLSV%	PDV%	NRSV%
高 砂	200	4.0	61.0	1.0
佐 藤 錦	300	0.7	2.3	0.7
ナポレオン	100	2.0	2.0	—

2) 茎頂培養によるウイルス無毒化

野口²⁶⁾、山口³⁹⁾は野外で生育中のPDV保毒高砂、NRSV保毒佐藤錦を供試、3段階の大きさに茎頂部を摘出し、BA1.0mg加用1/4 M.S培地に置床後、増殖した苗条についてウイルス検定を行った。茎頂部を0.2~0.3mmに摘出すれば両ウイルスとも確実に除去できることが判明し、オウトウのPDV、NRSVの除去に茎頂培養が極めて有効な手段であることを明らかにした(表-9)。

表-9 摘出茎頂の大きさとPDV、NRSVのフリー化(山形園試)

茎頂の大きさ	PDV陽性個体	NRSV陽性個体
0.2~0.3mm	0/10	0/5
0.4~0.6mm	1/7	2/6
1.0mm	2/5	3/5

2. ネコブ線虫抵抗性モモ台木のクローン増殖

筑波4号は吉田^{41,42)}により赤芽(RLRL DW-DW)×寿星桃(rlrl dwdw)交配実生のF₂より選抜され、遺伝子型はRLRL DWDWの赤葉高木性の台木でネコブ線虫に対して抵抗性をもっている。松川ら¹⁹⁾はこの筑波4号を含めほか3種類の台木について5カ年間‘あかつき’の栽培比較試験を行ったが、やや早熟性で樹がコンパクトに育つ矮性台木として注目された。しかしその増殖は種子繁殖に頼っており、苗木の揃いが悪いと言う指摘がある。ここでは *in vitro*における繁殖法²⁴⁾について報告する。

[試験方法]

初代培養：基本培地はBA0.2mg加用1/2 M.S培地とし寒天の種類、活性炭添加の効果につい

て検討した。

増殖培養：基本培地はBA0.5mg加用1/2 (KNO₃, NH₄NO₃) MSとし寒天の種類、ゲルライトとの混合比について検討。

発根培養：基本培地は増殖培地と同じくし、寒天の種類、ゲルライトとの混合比ならびにIBA添加濃度について検討した。

[試験結果]

初代培養は入手困難なT.C AGARの代わりにAGAR PURIFIEDを使用することにより、T.C AGARに匹敵する十分な生存率が得られた。増殖培養ではゲルライト1.25+BACTO AGAR3.0g, IBA0.5~1.0mgが良く、30日間で苗条1本当たり4本強の増殖率であった。また培地にIBAを0.2~0.5mg添加することにより発根率が高まる。発根培地30日後に各種用土に鉢上げを行ったが、鹿沼土を除いて70~90%の活着率であり、また鉢上げ後の生育も順調であった。1989年、弦間・牛谷⁸⁾は7月に緑枝を採取しミスト下に置くことにより高い発根率を得ているが、ここに述べた増殖法はミスト繁殖と異なり培養過程での増殖率が高く、必ずしもミスト繁殖法に劣っているとは言えない。いずれの方法にしる筑波4号や他の栄養繁殖が困難な台木の安定供給に道を開くものである。

3. おわりに

本稿では果樹のウイルスフリー化並びに台木のクローン増殖を中心に報告したが、最近国内外で種間交雑が盛んに行われ、果樹の台木として利用しようとする機運が高まってきている。これら種間雑種は一般に稔性がなく後代の得られないことが多い。また仮に後代が得られても、遺伝的に雑種であるために形質分離が激しく種

子による繁殖は実用的に難点がある。筑波4号に限らず、このような場合の増殖手段として茎頂培養系の存在意義は以前として失われている。また、茎頂培養系を利用して、コルヒチン処理による倍数体の作成²³⁾なども試みられており、作出された個体は育種母体としての活用が

期待されよう。また藤井⁴¹⁾により、リンゴの薬培養から半数体の獲得という木本植物では画期的な成果が得られているが、これらの成果が育種上どのようなインパクトをもたらすか、今後の研究の発展に期待したい。

引用文献

- 1) Abbott, A. J. ; Whiteley, E. 1976. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Scientia Hort.* 4 : 183-189.
- 2) Adams, A. N. ; Barbara, D. J. ; Clark, M. F. 1982. An indirect ELISA using a single antiserum and a general purpose conjugate. *Acta Hort.* 130 : 179-181.
- 3) Campbell, A. I. 1962. Apple virus inactivation by heat therapy and tip propagation. *Nature* 195 : 520.
- 4) ————. 1976. The production and performance of EMLA Virus-tested apple trees in the United Kingdom. *Compact Fruit Tree* 9 : 2330.
- 5) Clark, M. F. ; Adams, A. N. 1977. Characteristics of micro plate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 : 475-483.
- 6) Elliott, R. F. 1972. Axenic culture of shoot apices of apple. *N. Z. J. Bot.* 10 : 254-258.
- 7) 藤井芳一. 1989. リンゴ薬培養における不定胚形成と植物体再生. 育種学雑誌39(別1) : 68-69.
- 8) 弦間 洋, 牛谷敦子. 1989. モモ台木系統, 筑波1~10号の挿し木発根性について. 園学研究発表要旨 平元春 : 94-95.
- 9) Hansen, A. J. ; Linda, Green. 1982. Potential of Ribavirin for fruit virus inhibition. *Acta Hort.* 130 : 183-184.
- 10) Huang, S. C. ; Millikan, D. F. 1980. *In vitro* micrografting of apple shoot tips. *Hort Science* 15 : 741-743.
- 11) Huth, W. 1978. Kultur von apfelpflanzen aus apikalen meristemen. *Gartenbauwissenschaft*. 43(4)S : 163-166.
- 12) Jones, O. P. 1967. Effect of Benzyl Adenine on isolated apple shoot. *Nature* 215 : 1514-1515.
- 13) ———— ; Pontikis, C. A. ; Hopgood, M. 1979. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. *J. Hort. Sci.* 54(2) : 155-158.
- 14) 岸 国平, 高梨和雄, 我孫子和雄. 1985. 核果類のウイルス病に関する研究. III. Peach necrotic rings-

- pot viru および Prune dwarf virus の花粉伝染について, 果樹試報 A12 : 185-195.
- 15) Klein, R. E. ; Livingston, C. H. 1983. Eradication of potato virus X and S from potato shoot tip cultures with Ribavirin. *Phytopathol.* 73 : 1049-1050.
 - 16) 京谷英寿, 吉田雅夫, 山口正巳. 1983. 核果類における Prunus necrotic ringpotvirus (PRSV) 感染について. I. 核果類育種における感染状況. 果樹試報 A10 : 17-26.
 - 17) Lerch, B. 1977. Inhibition of the biosynthesis of potato virus X by Ribavirin. *Phytopathol. Z.* 89 : 44-49.
 - 18) 町田郁夫, 斎藤 彰, 田中弥平, 福島千万男. 1985. リンゴ・クロロティック・リーフスポット・ウイルス (ACLSV) の ELISA による感染実態調査・日植病報 51 : 363.
 - 19) 松川 裕, 阿部 薫, 吉田雅夫. 1985. モモのネコブ線虫抵抗性台木の特性について, 第2報 各種台木が“あかつき”の生育に及ぼす影響. 園学研究発表要旨 昭60春 : 52-53.
 - 20) 松中謙次郎. 1986. 高接ぎ病. 山口 昭, 大竹 昭郎編. 果樹の病害虫, 全国農村教育協会. P. 210-214.
 - 21) 宗形 隆, 山家弘士, 柳瀬春夫. 1985. 福島県内の核果類果樹および台木における ACLSV, PRSV, PDV の感染実態. 日植病報 52 : 364.
 - 22) ———, ———, 尾形亮輔. 1986. 核果類茎頂培養技術の確立とウイルスのフリー化. 園学研究発表要旨 昭61春 : 60-61.
 - 23) ———, ———, ———. 1987. 組織培養中のコルヒチン処理による6倍体コルトの作出. 園学研究発表要旨 昭62春 : 198-199.
 - 24) ———, 橋本 登, 山家弘士. 1989. 茎頂培養によるモモ台木の大量増殖について. 園学研究発表要旨 平元春 : 92-93.
 - 25) Meijneke, C. A. R. ; Van Oosten, H. J. ; Peerboom, H. 1973. Growth, yield, and fruit quality of virus-infected and virus-free Golden Delicious apple tree. IXth International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases : 209-211.
 - 26) 野口協一, 山口幸子, 大沼幸男. 1987. オウトウの茎頂培養とウイルスフリー化. 植物防疫 49(9) : 1721.
 - 27) 瀬川一衛, 福島千万男, 町田郁夫, 斎藤 彰. 1988. 茎頂培養による果樹のウイルスフリー化と大量増殖法 (農林水産省果樹試験場編, 昭和63年度寒冷地果樹試験研究成績概要集 (栽培). p. 71-74.
 - 28) Schuster, G. 1982. Improvement in the antiphytoviral chemotherapy by combining Ribavirin (Virazole) and 2, 4-dioxohexahydro1, 3, 5-triazine (DHT). *Phytopathol. Z.* 103 : 323-328.
 - 29) Van Houten, A. G. ; 石原愛也, 宗形 隆. 1988. モモの茎頂培養による NRSV 除去法の研究. 園学研究発表要旨 昭63春 : 74-75.
 - 30) Witkowski, J. T. ; Robins, R. K. ; Sidwell, R. W. ; Simon, L. N. 1972. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1- β -D-Ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide and related Nucleosides. *J. Med. Chem.* 15 : 1150-1154.
 - 31) Wood, G. A. 1972. Application of heattherapy for the elimination of viruses from pip and

- stone fruit trees in New Zealand. N. Z. J. Agric. Res. 16 : 255-262.
- 32) 山家弘士, 宗形 隆, 尾形亮輔. 1983. 茎頂培養によるリンゴ CLSV の除去について. 園学研究発表要旨 昭58春 : 78-79.
- 33) ———, ———, ———. 1985. 熱処理, 茎頂培養併用によるリンゴ ASGV のフリー化. 園学研究発表要旨 昭60春 : 126-127.
- 34) ———, ———, ———. 1986. Ribavirin 添加培地におけるリンゴ ASGV のフリー化. 園学研究発表要旨 昭61春 : 38-39.
- 35) Yanase, H. ; Sawamura, K. ; Yamaguchi, A. ; Mink, G. I. 1973. Viruses causing apple topworking diseases (Taka Tugi Byou) in Japan. IXth International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases : 221-229.
- 36) ——— ; Yamaguchi, A. ; Mink, G. I. ; Sawamura, K. 1979. Back transmission of apple chlorotic leafspot virus (Type strain) to apple and production of apple topworking disease symptoms in Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh. var. ringo Asami). Ann. Phytopath. Soc. Japan 45 : 369-374.
- 37) ———. 1983. Back transmission of apple stem grooving virus to apple seedlings and induction of symptom of apple topworking disease in Mituba Kaidou (*Malus sieboldii*) and KOBAN-OZUMI (*Malus sieboldii* var. arborescens) rootstock. Acta Hort. 130 : 117-122.
- 38) 山口正巳, 吉田雅夫, 京谷英寿. 1983. 核果類における Prunus necrotic ringspot virus (PRSV) の感染について. II. モモに生育に及ぼす PRSV の影響. 果樹試報 A10 : 27-38.
- 39) 山口幸子, 野口協一, 鈴木千代吉, 大沼幸男. 1987. 茎頂培養による PDV, NRSV のウイルスフリー化. 園学研究発表要旨 昭62秋 : 799.
- 40) ———, ———, 村山秀樹. 1987. 熱処理併用によるウイルスフリー化 (農林水産省果樹試験場編, 昭和62年度寒冷地果樹試験研究成績概要集 (栽培). p. 93-94.
- 41) 吉田雅夫, 清家金嗣. 1974. 赤葉のわい性モモ “レッド・ドワーフ” について. 果樹試報 A1 : 25-32.
- 42) ———, 京谷英寿, 西田光夫. 1975. モモネコブセンチュウ抵抗性台木の育成と選抜. 園学研究発表要旨 昭50春 : 60-61.