

# カーネーションの萎ちょう細菌病抵抗性育種と 薬剤および交雑育種による花持ち性の向上†

小野崎 隆

(平成13年11月13日受理)

Breeding for Resistance to Bacterial Wilt (*Burkholderia caryophylli*) and Improvement of Vase Life by Chemicals or Cross Breeding in Carnations

Takashi ONOZAKI

†本論文は京都大学学位審査論文(平成13年3月)を基に編集・加筆したものである。本報告の一部は、Acta Hort. Vol.454: 127-132 (1998); J. Japan Soc. Hort. Sci. Vol.68: 546-550 (1999); J. Japan Soc. Hort. Sci. Vol.68: 974-978 (1999); 園学研 Vol.1: 13-16 (2002); 野菜茶試研報 A.5巻: 69-79 (1992); J. Japan Soc. Hort. Sci. Vol.67: 198-203 (1998); Scientia Hort. Vol.87: 107-120 (2001)において発表した。

## Synopsis

Bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) is one of the most important and damaging diseases of carnations (*Dianthus caryophyllus*) in Japan. Interspecific hybridization between carnation and *D. capitatus* ssp. *andrzejowskianus*, a highly resistant wild species to bacterial wilt, was carried out in order to introduce the resistance into carnation cultivars. Thus, a new bacterial wilt resistant line 'Carnation Nou No.1' was selected out of the F<sub>1</sub> progenies.

Two approaches were used to improve the vase life of carnations. The application of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB) in continuous treatment and pretreatment was effective in the preservation of the freshness of cut carnation flowers. Moreover, conventional cross-breeding techniques were used to develop many carnation lines with long vase life. Many lines with long vase life that show low ethylene production or low ethylene sensitivity were obtained.

**Key Words:** Carnation, Breeding, Bacterial wilt, Disease resistance,  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, Flower longevity, Vase life, Ethylene

## 目次

## 緒言

## 第1章 カーネーションの萎ちょう細菌病抵抗性育種

## 第1節 抵抗性簡易検定法の開発

## 第2節 抵抗性遺伝子源の探索

## 第1項 カーネーション栽培品種における探索

## 第2項 ダイアンサス属野生種における探索

## 第3節 強抵抗性野生種とカーネーションとの種間交雑

## 第4節 抵抗性中間母本 'カーネーション農1号' の育成

## 第5節 抵抗性にリンクしたDNAマーカーの探索

## 第1項 抵抗性分離集団の育成とプライマーのスクリーニング

## 第2項 抵抗性にリンクしたDNAマーカーの連鎖解析

## 第6節 摘要

第2章  $\alpha$ -アミノイソ酪酸 (AIB) による切り花カーネーションの品質保持

## 第1節 重金属を含まない品質保持剤の検討

## 第1項 エチレン阻害剤の品質保持効果

## 第2項 リポキシゲナーゼ阻害剤の品質保持効果

## 第2節 AIB連続処理がカーネーションの花持ちに及ぼす影響

## 第1項 AIB連続処理による品質保持効果

## 第2項 AIB連続処理とカーネーション切り花のエチレン生成量

## 第3節 AIB前処理がカーネーションの花持ちに及ぼす影響

## 第4節 AIBへの硝酸カルシウムの添加がカーネーションの花持ちに及ぼす影響

## 第1項 AIB連続処理における硝酸カルシウムの添加効果

## 第2項 AIB前処理における硝酸カルシウムの添加効果

## 第5節 摘要

## 第3章 交雑育種によるカーネーションの花持ち性の向上

## 第1節 花持ち性簡易検定法の開発

## 第1項 切断葉片エチレン生成量の測定

## 第2項 種子発芽時のエセフォン処理によるエチレン感受性早期検定の試み

## 第2節 選抜と交配による花持ち日数の改良

## 第3節 選抜系統のエチレン生成量の測定

## 第4節 選抜系統のエチレン感受性と低感受性系統の受容体遺伝子 (ETR) ホモログ

## 第1項 選抜系統のエチレン感受性

## 第2項 低感受性系統の受容体遺伝子 (ETR) ホモログ

## 第5節 選抜系統の自己触媒的エチレン生成量

## 第6節 AIB、STS処理が選抜系統の花持ちに及ぼす影響

## 第7節 選抜系統の特性調査

## 第8節 摘要

## 第4章 総合考察

## 引用文献

## Summary

## 緒言

ダイアンサス属 (*Dianthus* L.) は、ナデシコ科 (*Caryophyllaceae*) に属し、主としてヨーロッパ、地中海沿岸から日本にかけてのアジア地域に約300種が分布し (Hamilton・Walters, 1989; 伊藤ら, 1989)、切り花、鉢花および花壇用の園芸素材として広く利用されている。中でも、カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) は、日本だけでなく世界的にみても、キク、バラと並んで生産量の多い、主要な花きの一つである。

現在のカーネーションは交雑種であり、その基礎となっているのは、原産地は不明であるがシシリー島、南ヨーロッパ、北アフリカ、西アジアなどの地中海沿岸で長く栽培され、自生化してきた *D. caryophyllus* である (小西・武田, 1989; 武田, 1996)。この原種に、セキチク (*D. chinensis* L.) など数種の野生種が交雑されて今日のカーネーションが育成されたと推定されている (Holley・Baker, 1963; 小西, 1980)。しかし、その詳細な育成過程については明らかではない。

カーネーションの品種改良は16世紀初頭からはじめられ (武田, 1989)、17世紀の中頃までに赤、白、ピンク、黄、紫などの基本色が揃い、絞り、覆輪、八重の花も出現した (池田, 1996)。茎のしっかりした切り花用ツリーカーネーションの育種がはじまったのは、19世紀に入ってからである。1840年に、フランスのダルメ (M. Dalmais) によって四季咲き性品種 'アティム' がはじめて育成された (土倉・犬塚, 1936; 小西・武田, 1989; 武田, 1996)。その後、育種の本拠地はアメリカに移り、

現在でも栽培されているシム系品種群が育成された。この品種群のもとにあたる品種が、1939年に育成された‘ウィリアムシム’である。この品種は非常に枝変わりしやすい性質を持っていて、今日までに300以上の品種が枝変わりによって生じている（小西・武田, 1989）。1950年頃から日本に導入され、1970年代から切り花カーネーションの中心的な存在であった。シム系よりやや遅れ、1965年頃から中輪房咲きのスプレーカーネーションが普及しはじめた。花色が豊富であること、フラワーアレンジメントや花束、ブーケなどに利用しやすく用途が広いことから人気が高まり、栽培・消費とも年々増加し、現在では全出荷量の半分以上をこのスプレー系が占めている。大輪カーネーションでは、1980年頃から地中海系と称される交雑品種群が、形態や耐病性などシム系にはない優れた特性によって急速に普及しはじめた。これは、イタリア、オランダ、フランスなどで1960年以前から育種されてきたものである。ヨーロッパを中心に全世界のカーネーション生産に多大の損害を与えている萎ちよう病 (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. and Delarc.) Snyd. and Hans.) 抵抗性の導入が大きな育種目標とされた。シム系に比べ花にボリューム感があり、花色も多彩で、がく割れも少ない。

現在日本で栽培されているカーネーション品種の多くは、外国で育成されたものである。毎年多くの品種が導入されているが、日本に定着するのはほんのわずかである。これは日本の夏期の高温多湿条件下では、萎ちよう細菌病 (*Burkholderia caryophylli* (Burkholder) Yabuuchi, Kasako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki and Arakawa [旧学名: *Pseudomonas caryophylli* (Burkholder) Starr and Burkholder]) をはじめとする立ち枯れ性の土壤伝染病害や生育障害等の発生が多く、日本の気候に合わないことが大きな原因である。また、導入した品種の花色や花型などの特性が、日本人の色彩感覚や好みと合わないことも多く、日本での品種改良の必要性は高い。

日本のカーネーション生産面積は、1991年の616haをピークに伸びが止まり、2000年には491haとなり、このところ減少傾向が続いている。他の新規洋花類との競合、生産者の高齢化、輸入カーネーションの増加などの要因もあるが、大きな原因は、いわゆるバブル崩壊以降カーネーションの市場価格が低迷しているのに、生産原価が下がらないことにある。特に、海外育成品種が国内の栽培品種の中心を占めている状況のもとで、品種のロイヤリティを含めた種苗費の比率が大きくなり、経営上の問

題となっている。この問題を根本的に解決するには、品種を海外のпатент品種に依存している体質を改めることが望ましい。育種を海外に依存することなく、日本の気候条件に適した新品種育成を、国公立などの公的機関や民間種苗会社で進めていくことは重要である。

日本でのカーネーション育種は、1918年に土倉氏により初の国産品種が作出されて以来、主に民間育種家の手によって新品種が育成され（土倉・犬塚, 1936）、1940年には現在なお栽培されている‘コーラル’が作出された。戦後になり1950年代以降は、大分県、福岡県、山口県、香川県、静岡県などの公立農業試験場で育種が進められ、‘せとのはつしも’、‘希望’、‘伊豆ピンク’などの品種が育成された。近年は民間の種苗会社での育種が主体となり、民間育種家や個人の生産者も育種に取り組んでいる。これまでは花色や花型、草姿などの外見的な観賞性の改良に重点を置いた育種が主体であったが、今後は低コスト・良品・安定生産に向けて、耐病性、花持ち性、耐暑性、高生産性といった形質の改良を進めていく必要がある。このうち、土壤伝染病害に対する抵抗性は、生産者にとって最も望まれる特性の一つである。また、近年は花持ち性という内的形質が民間の種苗会社での育種においても重要視されつつある。

病害抵抗性育種に関しては、ヨーロッパを中心にフザリウムによる萎ちよう病抵抗性品種の育種が進み、日本にも毎年抵抗性品種が導入され、実際面における防除に大きな成果を収めている。しかし、日本の温暖地におけるカーネーション栽培上最も恐ろしい病害といわれている萎ちよう細菌病 (*B. caryophylli*) の抵抗性育種については国際的にも全く手掛けられていない。

カーネーション萎ちよう細菌病に関する最初の報告は、Jones (1941) によるアメリカのワシントン州での発生の報告である。アメリカでは多くの地域で発病が報告され、第2次大戦後にはアメリカからデンマークへ病気が伝播し、ヨーロッパにも広がった (Holley・Baker, 1963)。しかし、近年は、欧米での本病発生の報告はない。日本では1964年に神奈川県秦野地方で、最初に発生が報告され、病原となる細菌が分離同定され、萎ちよう細菌病と命名された (土屋ら, 1965)。また、静岡県でも1969年に萎ちよう細菌病の発生が認められ、1971年からは本格的な被害が発生している (中村・森田, 1976)。本病原菌は、シュッココンカスミソウ (*Gypsophila paniculata* L.)、スターチス・シヌアータ (*Limonium sinuatum* (L.) Mill.) に対しても発病力がある (Jones・Engelhard, 1984; Liu, 1990)。

萎ちょう細菌病菌は、菌の大きさが $0.5-0.6 \times 1.0-2.7 \mu\text{m}$ で、単極または両極に1~7本のべん毛を持つ、グラム陰性の両端の丸い桿状の好気性細菌である(土屋ら, 1965)。発病は、土壤中の病原細菌が定植時の断根や植え込みなどによる根の傷口から侵入し、茎の導管内で増殖して水分通導を阻害するために起こる。高温下で発病しやすく、夏の高温期に激発する。菌の最適発育温度は $30-33^\circ\text{C}$ である(後藤, 1981, 1990)。被害株は急激に萎ちょうし、青枯れ症状を呈して枯死する。被害株の茎を切ってみると導管部は変色し、被害部からは、ねばねばした乳白色の粘液が出る。被害茎を切って水につけると、白い濁り(細菌液)が流れ出すのが特徴である。秋季から春季の低温期の場合は、細菌の増殖と移動が緩慢となるために、高温期のような急激な萎ちょう症状は起こらず、株元の茎に縦の亀裂が生じ、裂け目から病原細菌が溢れ出る症状(ステム・クラック)を示す(Dickey・Nelson, 1963; 上住・西村, 1975)。発病した病株に適用できる防除薬剤はないため、いったん発生すると、ただちにこれを隣接株をも含めて除去し、被害の拡大を防ぐ以外に有効な防除手段はなく、防除は薬剤や蒸気による土壤消毒に頼っているのが現状である。このような背景から、抵抗性品種開発が強く望まれている。そこで、第1章において、萎ちょう細菌病抵抗性育種を試みた。

抵抗性育種を効率的に進めるためには、抵抗性を簡易に評価できる検定法の確立が不可欠である。本研究を進めるにあたっては、まず抵抗性育種素材の検索に用いる簡易検定法の開発を目指した。次に、その検定法を用いて、品種と野生種の抵抗性の品種・種間差を明らかにしようとした。野生種に強抵抗性育種素材が見いだされたので、カーネーションとの種間交雑を試み、抵抗性育種の可能性を示した。得られた種間雑種系統の中から、抵抗性育種に利用できる中間母本を育成した。最後に、抵抗性個体の効率的な選抜を可能にする、抵抗性にリンクしたDNAマーカーの作出を試みた。

近年の花き生産の増加に伴い、切り花の流通量が著しく増加している。切り花は活発に輸出入が行われる国際商品となり、その輸出入量は今後ますます増加するものと予測される。切り花の流通は広域化が進んでおり、生産者から最終消費者にわたるまでの日数が、これまでよりも長くなる傾向にある。このような背景から、花持ちの良い高品質の切り花を消費者に安定供給するため、流通における品質保持技術の開発が一層重要性を増している。消費者にとって花持ち性は重要な特性であり、家庭

用の需要が目されるようになってきた現在では、花持ち性に対する要望も高くなっている。花持ち性という特性が、花きの育種現場において重要な育種目標の一つに数えられるようになりつつある。

現在、カーネーション切り花の品質保持技術として主に利用されているのは、チオ硫酸銀錯塩(STS)を中心とした品質保持剤である。生産者が、切り花収穫後の水あげ時に切り花の切り口をSTS溶液に1晩程度浸漬処理する前処理という方法で、STS処理が行われている。STSには、花の老化に関与するエチレンの活性を阻害し、自己触媒的なエチレン生成を抑える作用がある(Veen, 1983)。銀がエチレン作用を抑制することは古くから知られていたが、硝酸銀溶液などの銀イオン( $\text{Ag}^+$ )では、マイナスに帯電した切り花導管内を移動しにくいため、花持ち延長に及ぼす効果は低かった。オランダのVeen・Van de Geijn(1978)は、硝酸銀とチオ硫酸ナトリウムをある割合で混合すると銀が錯塩のSTSとなり、切り花導管内における移行性が顕著に高まり、カーネーションの花持ちを著しく延長することを見いだした。この発見以来多くの追試が行われ、その卓越した効果のため急速に普及し、今では多くの花きで市場出荷の際にSTS処理を行うのが常識になっている(宇田, 1998; 市村, 2000)。STSは安価なうえ、低濃度で大きな効果があるためにオランダ、アメリカ、日本などの世界の切り花生産国で1980年代以降急速に普及した。

しかし近年、地球環境の保全意識が高まり、STSは重金属の銀を含んでいることから環境汚染が懸念されている。日本ではSTSの使用を規制しようという動きはないが、オランダをはじめとする欧米ではSTSの使用は制限される方向へ進みつつある(Van Doorn・Woltering, 1991; 宇田, 1998; 市村, 2000)。

STS処理に替わり、カーネーション切り花の花持ち性を向上させる方法としては、大きく分けて二つの手法が考えられる。まず一つがSTSの代替薬剤を検索・開発することである。エチレン感受性の高いカーネーションにおいて特に効果が高いのは、エチレン生合成阻害剤またはエチレン作用阻害剤である。重金属を含まず安全性が高いと考えられ、かつ抗エチレン作用のある試薬や、老化遅延に効果の期待できる試薬の選抜を進める方法が考えられる。もう一つは遺伝的に花持ち性の優れた品種を育種によって作出する方法である。本研究では、この二つの方向性で、カーネーションの花持ち性の向上を試みた。第2章では、STSの代替薬剤の検索を行い、5種類の薬剤を供試した実験から $\alpha$ -アミノイソ酪酸(AIB)

を選び出し、このAIBの処理法について実用的な視点から検討した。第3章では、交雑育種法によりカーネーションの花持ち性の遺伝的な改良を試みた。また、花持ち性の改良された系統を用いて、老化時のエチレン生成量やエチレン感受性などの諸特性を調査した。

本研究を取りまとめるにあたって、京都大学大学院農学研究科教授 矢澤 進博士には、懇切な御指導、御校閲および終始暖かい激励を賜った。ここに記して、深甚なる謝意を表す。

また、農林水産省野菜・茶業試験場花き部切り花花き第2研究室長 山口 隆氏（現在 福花園美里研究農場長）、同主任研究官 姫野正己氏（現在 鹿児島県農業試験場花き部長）には、本研究開始時から御指導いただくとともに貴重な御助言と暖かい励ましのお言葉を賜った。また、本研究の実施と取りまとめにあたって、野菜・茶業試験場花き部育種研究室長 池田 広博士（現在 農業技術研究機構花き研究所企画調整室研究企画科長）には、終始暖かい御指導と御鞭撻を賜った。さらに前野菜・茶業試験場長 天野正之博士（現在（株）カネコ種苗技術顧問）、野菜・茶業試験場花き部育種法研究室長 柴田道夫博士（現在 農業技術研究機構花き研究所生理遺伝部遺伝育種研究室長）、同野菜育種部育種法研究室長 平井正志博士（現在 京都府立大学農学部教授）には、取りまとめに関して有益な御助言と激励をいただいた。また、実験の遂行にあたり野菜・茶業試験場花き部流通技術研究室主任研究官 市村一雄博士（現在 農業技術研究機構花き研究所生産利用部流通技術研究室長）、同生理生態部輸送貯蔵研究室長 永田雅靖博士（現在 農業技術研究機構野菜茶業研究所機能解析部収穫後生理研究室長）には、実験法に関し懇切な御指導をいただいた。以上の各位に対し、心から感謝の意を申し上げる。

また、第1章の抵抗性にリンクしたDNAマーカーの探索に御協力いただいた熊本県宇城農林事務所 工藤陽史氏、栃木県農業試験場 船山卓也氏、第3章の低感受性系統の受容体遺伝子（*ETR*）ホモログの研究に御協力いただいた野菜・茶業試験場花き部育種研究室 谷川奈津氏（現在 農業技術研究機構花き研究所生理遺伝部遺伝育種研究室）、研究の遂行にあたり御協力いただいた非常勤職員 前田咲子氏、田野田貴美子氏、野菜・茶業試験場業務科職員各位（現在 農業技術研究機構野菜茶業研究所）に厚く御礼申し上げます。

## 第1章 カーネーションの萎ちょう細菌病抵抗性育種

*Burkholderia caryophylli*によって発生するカーネーション萎ちょう細菌病は、夏の高温期に発病が多発する立ち枯れ性の土壌伝染病害であり、日本でのカーネーション栽培上最も重要な病害とされている。海外におけるカーネーションの主産地は冷涼な地域が多いので、本病害の大きな被害は日本以外ではあまり報告がなく、そのため、その抵抗性育種は国際的に未着手の状態であった。そこで、このような状況に対応するため、萎ちょう細菌病の抵抗性育種に着手した。

### 第1節 抵抗性簡易検定法の開発

抵抗性育種を効率的に進めるためには、効率的かつ安定した簡易検定法の確立が重要である。萎ちょう細菌菌の接種方法に関しては、過去の抵抗性検定試験では、浸根接種による方法が採用されている（Thomas, 1954; Nelson・Dickey, 1963; Dickey・Nelson, 1963; 太田, 1980）。そこで、本研究においても浸根接種法を用いることとした。浸根接種検定に好適な菌濃度を調べるために、‘スケニア’を用いて、接種菌濃度の違いによる発病の差異について検討した。

#### 1. 材料および方法

カーネーション‘初霜’より分離して冷凍保存された萎ちょう細菌菌（isolate 1）を解凍し、PSA培地（ジャガイモ300g分のエキス、硝酸カルシウム0.5g、リン酸2ナトリウム2g、ポリペプトン5g、ショ糖15g、寒天16gを1000mlの蒸留水に溶かし、pH6.8に調製し、オートクレーブ後固化させた培地）上に接種し、27℃で3日間培養した。繁殖した菌の一部を、1白金耳分採取し1000mlのPS液体培地（上記のPSA培地より寒天を除いた培地）中で培養した。27℃で3日間の振とう培養後、培養液を所定濃度に薄め、菌濃度を異にする5段階の接種液を作製した。野菜茶試で品種保存している‘スケニア’の母株から、1試験区当たり10~14本の展開葉数4~5対の挿し芽を採取した。挿し芽の基部にインドール酢酸0.5%含有の発根促進剤（オキシベロン粉剤0.5）を粉衣し、発根培地（砂：パーライト=1：1）に挿し、ミスト下で発根させた。30日後、発根苗の根を水道水で洗

って発根培地を除去し、さらに根端を約1 cm切除した後、根部を接種液に室温条件で30分間浸漬して浸根接種を行った (Fig. 1)。接種後、苗を土壌消毒済みの培養土の入った直径9 cmの黒色ビニルポットに鉢上げし、ビニルで2重被覆したガラス温室内で栽培した。地温は14日目までは活着を促進するため20℃、その後は25℃に設定した。外観病徴によって回復不可能な全身強度の萎ちようを示した株を発病株とし、接種から80日後まで発病株率を調査した。

接種液の菌濃度 (CFU) は希釈平板法によって検定した (Fig. 1)。浸根接種に用いた接種液を所定の濃度に薄め、9 cmシャーレ内のPSA培地上に0.2ml滴下し、滅菌したコーンラージ棒を用いてターンテーブル上で回転させながら培地上に均等に塗り広げた。27℃で3日間培養し、生じたコロニー数から菌濃度を計算した。

## 2. 結果および考察

3日間液体培養後の接種原液の菌濃度は、 $1.8 \times 10^9$  CFU/mlであった。一般に、細菌を振とう培養した場合の最大菌濃度は、細菌の種類に関係なく約 $10^{10}$  CFU/mlであり (後藤, 1981, 1990)、この最大菌濃度から希釈して試験区の濃度を設定する。1000mlのPS培地に対して

1白金耳分の菌量では少なすぎたので、培養する菌量を3白金耳程度に増やす必要があると判断された。

発病株は日中の高温時になると葉が生気を失う程度に萎ちようし、夜間温度が下がると回復するという症状を数日間繰り返した後、回復不可能な株全体の萎ちよう症状を示し、完全に枯死した。菌濃度が高いほど発病までの期間が短く、発病の程度も高かった (Fig. 2)。菌濃度が $10^8 \sim 10^9$  CFU/mlであると、接種後34日目には全株萎ちよう枯死した。 $10^7$  CFU/mlでは、接種後36日目には約60%が発病したが、その後の発病は緩慢となり、70日目に発病率が100%に達した。 $10^6$  CFU/mlではさらに発病が緩慢となり、試験終了時でも80%の発病率であった。 $10^5$  CFU/mlでは、試験終了時20%の発病にとどまった。

萎ちよう症状を示した株の茎を切り取り、透明なガラス容器内の水に挿すと、切り口から白濁した菌液が水中にしみ出る現象がみられ、細菌に感染していることが確認された。また、り病株の茎を1 cmほど切り取り、表面を70%エタノールで30秒間殺菌し、メスの先で砕いた後、PSA培地上に置床して培養すると、*B. caryophylli* 独特の茶褐色のコロニーを分離できた。したがって、供試材料の発病は、接種した萎ちよう細菌病菌によるものであることが確認できた。

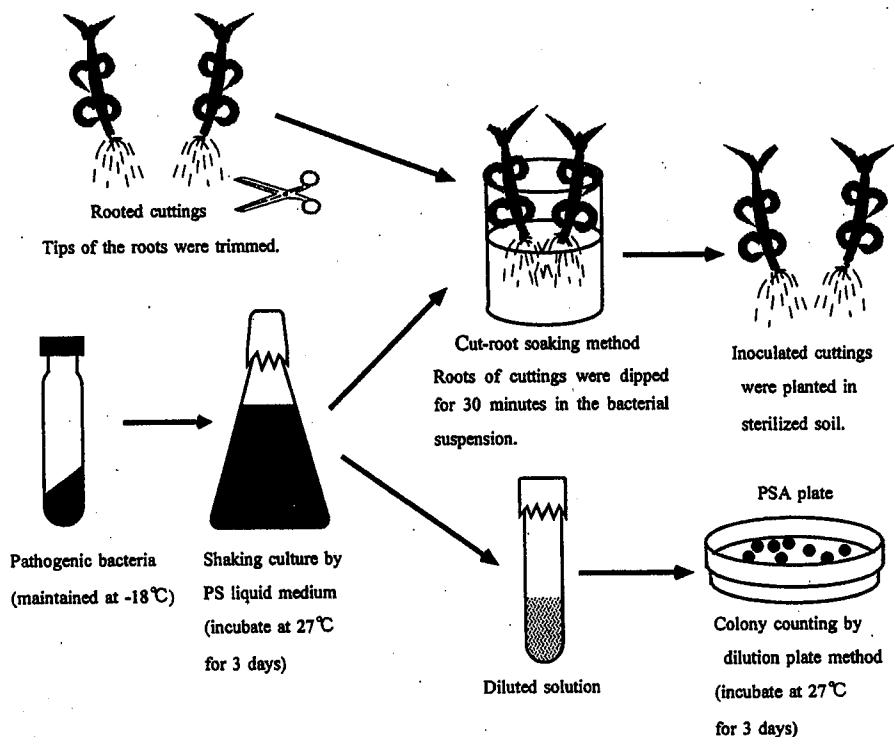


Fig. 1. Procedure for inoculation of *Burkholderia caryophylli* and measurement of inoculum concentration.

検定期間を3か月とした場合、その期間内に100%の株が発病することを目安に考えると、 $10^7$  CFU/mlの菌濃度が適切であると思われた。次節の抵抗性遺伝子源の探索には、この菌濃度を用いた。

## 第2節 抵抗性遺伝子源の探索

### 第1項 カーネーション栽培品種における探索

本病に対する抵抗性の品種間差異に関しては、現在までにいくつかの報告がある。Thomas (1954) は、5品種を供試して本病害に対する抵抗性を検討し、'ドゥランゴ'には発病がみられず、抵抗性品種であると報告している。Nelson・Dickey (1963) は、21品種の抵抗性の検定を行い、'ノースランド'、'スターライト'、'エレガンス'は抵抗性が高いことを報告している。一方で、Thomas (1954) が抵抗性と判定した'ドゥランゴ'については感受性であるとした。上住・西村 (1975) は、本病害に強い品種として、Nelson・Dickey (1963) の報告した3品種の他に'セス・パーカー'、'ピューリタン'、'バージニア・ヘアクルス'、'サーモン・バージニア'を挙げている。太田 (1980) は、25品種について抵抗性を検定したところ、品種により抵抗性に差があり、Nelson・Dickey (1963) の試験で抵抗性と判定された'ノースランド'、'エレガンス'、感受性と判定された'インブルーブドホワイトシム'の3品種の検定結果は同様であった。Nelson・Dickey (1963) の試験で最も抵抗性の高かった'ノースランド'よりもさらに抵抗性が高い品種として'ピーターフィッシャー' (島田系)、'ソアナ'、'ユーコンシム'、'ドリス'、'ショッキング

ピンクシム'、'スケニア' (静岡系) の6品種を選定した。'ピーターフィッシャー'では系統間に明瞭な差異がみられ、南部系よりも島田系が強かったとしている。植松ら (1991) は、80年代に日本国内に導入されたスプレー系品種を中心に126品種を供試して抵抗性の検定を行ったが、萎ちよう細菌病に強い抵抗性を示す品種はみられなかった。彼らの試験では、'スケニア'は100%病した。

抵抗性品種として上述の論文に報告されている品種でも栽培農家では多発事例が観察されており (植松, 1990)、全体からみて比較的抵抗性を示すにすぎないと思われる。事実、Nelson・Dickey (1963) や太田 (1980) の報告で抵抗性が高いとしている品種でも16~48%の発病率を示し、発病の全くみられない品種はなかった。また、報告されている品種は、現在では栽培や市販されていない古い品種が多く、入手は困難である。

野菜茶試では、農林水産省ジーンバンク事業の一環として、カーネーション約350品種を維持保存している。そこで、これらの品種を材料として、抵抗性育種素材の探索を試みた。

### 1. 材料および方法

野菜茶試で維持保存している栽培品種277品種を供試した。接種試験は、1990年夏と1996年夏の2回に分けて行った。1990年は保存品種を網羅的に検定し、1996年にはカーネーション萎ちよう病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*) 抵抗性との関連をみるために、Demminkら (1989) の論文に報告されている品種を供試して検定を行った。接種には、'初霜'からの分離菌 (isolate 1)

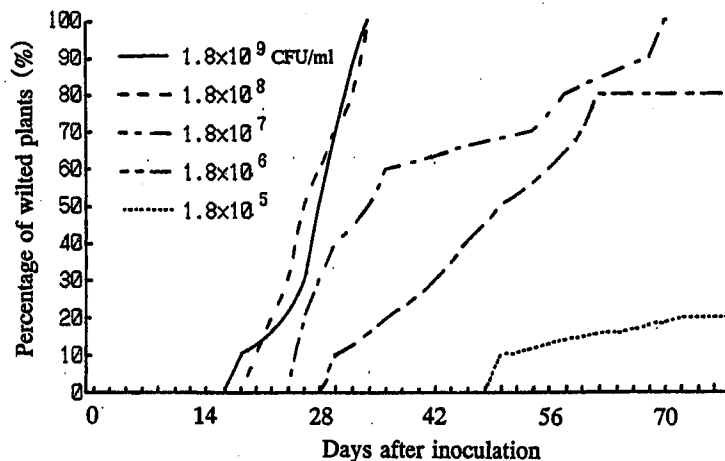


Fig. 2. Effect of inoculum concentration on the disease incidence of carnation cultivar 'Scania'. n=10~14.

を使用した。接種法は第1節と同様の方法で行った。菌の液体培養には3白金耳分の菌を接種し、接種液の菌濃度は、 $10^7$  CFU/mlとした。接種後苗をパイプハウス内の土壤消毒済みの用土（黒土：堆肥：市販の培養土（クレハ園芸培土）=2：1：1）の入ったベッド（長さ×幅×高さ：180cm×90cm×9cm）に定植した。検定期間中のパイプハウス内の気温は24～38℃の範囲にあり、発病に好適な温度条件を維持できた。接種から91日（13週間）後まで発病率を1週間毎に調査した。接種から91日後の発病率によって、抵抗性を極強（発病率：0%）、強（発病率：0<～≤20%）、中（発病率：20<～≤40%）、弱（発病率：40<～≤70%）、極弱（発病率：70<～≤100%）の5つに分類した。

1990年にスクリーニングした品種の抵抗性を確認するために、1991、1992年の夏に4菌株（isolate 1、isolate 2、isolate 3、isolate 4）を用いて、より高い菌濃度（ $10^8$  CFU/ml）で再試験を行った。isolate 2、3は千葉県暖地園芸試験場、isolate 4は兵庫県立淡路農業技術センターより入手した。

## 2. 結果および考察

栽培品種における萎ちょう細菌病抵抗性の検定結果をTable 1に示した。抵抗性には大きな品種間差が認められた。供試品種のほとんどは病性であり、抵抗性程度の割合は、供試した277品種中207品種（全体の74.7%）が抵抗性程度極弱、50品種（18.1%）が弱、17品種（6.1%）が中と判定された。抵抗性程度を強と判定した

品種は、'ウイコ'、'ノクト'、'サンドローサ'の3品種（全体の1.1%）であった。抵抗性程度が極強（発病率：0%）の品種は、供試した品種中には見いだされなかった。

抵抗性程度の異なる4品種における接種後の発病率の推移をFig. 3に示した。抵抗性程度が極弱の'コーラル'では、接種後14日目まで病徴が現れ、49日目にはすべての株が完全に萎ちょうした。一方、抵抗性程度が強の'ウイコ'では、接種後49日目まで病徴は現れなかった。その後徐々に発病率が増加したが、試験終了の91日目でも20%にとどまった。

1990年のスクリーニングで抵抗性程度が強と判定された3品種と極弱と判定された4品種を用い、4菌株で行った再試験の結果をTable 2に示した。供試品種の発病程度には、試験を実施した年次と用いた菌株によって多少の変動がみられた。例えば、抵抗性品種'ウイコ'では、発病率が0%（isolate 2, 1991）から30%（isolate 3, 1992）まで変動した。しかし、レース分化については認められなかった。'ウイコ'、'ノクト'、'サンドローサ'は、接種に使用した菌株に関わらず低い発病率を示した。一方、'コーラル'、'スケニア'、'ホワイトシム'、'希望'では、どの菌株においても発病率が高かった。4菌株による再試験の結果、'ウイコ'が最も抵抗性が高く、次いで'サンドローサ'、'ノクト'の順であることがわかった。

Table 1に示した試験結果では、Nelson・Dickey（1963）が抵抗性と判定した'エレガンス'、'スターライト'、'ノースランド'については、抵抗性程度が極弱

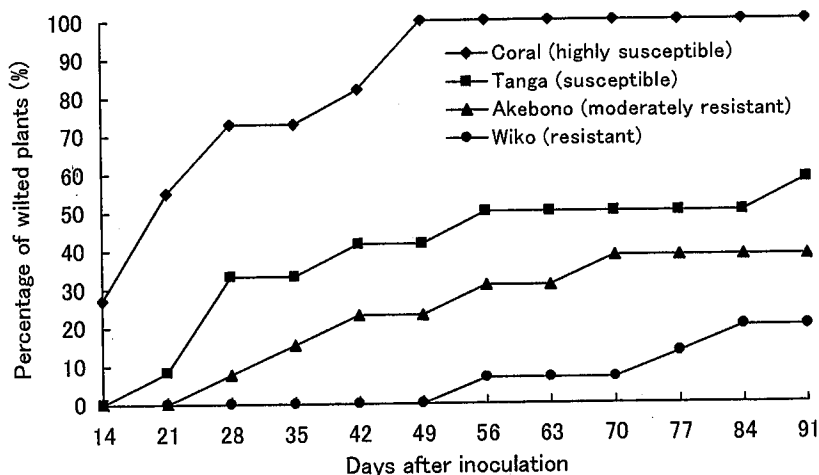


Fig. 3. Disease progression curves of 4 carnation cultivars inoculated with *Burkholderia caryophylli* (isolate 1).  
n=11~15.



Table 1. Classification of 277 carnation cultivars indexed for their resistances to bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*).

Disease index	Percentage of wilted plants	Cultivars
5 highly resistant	no symptoms	Total 0 cultivars 0%
4 resistant	0 < ~ ≤ 20	Wiko, Nocto, Sandrosa, Total 3 cultivars 1.1%
3 moderately resistant	20 < ~ ≤ 40	Akebono, Embar Rose, Kolivetta, Sarisprit, Juanito, Swan, Telstar, <i>Novada</i> , Barbara, Vanessa, Pink Hirisal, Pink Mamie, Florence, Maj Britt, Linda S64, <i>Revada</i> , Rodeo, Total 17 cultivars 6.1%
2 susceptible	40 < ~ ≤ 70	P. S. N. Pink Sim, Anne Marie, Yellow Stone, Evening Red, Evening Red sp. orange, William Sim, Etna, Ooita No.8, Orange Elf, Orange Beauty, Crown, Kurenainotubasa, Koranja, Samantha, Sam's White Scania, Sarome, Chinera, Jolivette, Sweet Heart, Scarlet Bell, Sonata, Solvik's White, Tanga, Tango Bambi, Dark Lena, Dusty, Totem, Domietta, Don Sierra, Butter Scotch, Pablo, Peterson's Red Sim, Peach Blossom, Pink Sim, Pink Barbi, Persian Pink, Honoo, White Lilli Ann, Boston, Portrait, Marina, Ministar, Myan, Mirna, Yufu, Yosooi, Linda, Luna, Regina, Royalette, Total 50 cultivars 18.1%
1 highly susceptible	70 < ~ ≤ 100	C-7, Calibe, CSU, CSU Red, G-G, Arthur Sim, Aoji Peter, Akane, Asaka, Anniversary, Anon, Apollo, <i>Alice</i> , Alicetta, Albivette, Angie, Yellow No.3, Yellow Improve, Yellow Sim, Yellow Smiling, Yellow Dusty, Yellow Beauty, Exquisite, Izu Rose, Evening Glow, Illuminator, Improved White Sim, Edith, Ehigasa, <i>Elsy</i> , Erufego, Elegance, Angel, Ooita No.9, Orchid Royal, Aurora, Orange Smiling, Cardinal Sim, Casino, Capri, Kaly, Carina, California, California White, Calypso, Cantaloupe, Keefers Cherry Sim, Xandra, Kito, Killer, Galaxy, Candy, Quinto, Christmas Fire, Kleopatra, Kurenai, Crowley's Sim, Glory, Goethe, Coral, Corise, Colorado White Pikes Peak, Salmon Pink Sim, <i>Sacha</i> , Sam, <i>Sam's Pride</i> , Sunset, Sunbeam, Zamora, Sissi, Shimada Peter, Shamrock Sp., Sirio, Shin Yosooi, Jumbo Cardinal, Super Gold, Scarlet King, Skyline, Scania, Susanna, Starlite, Stephany, Snow Crown Pink, Snow Fall, Sparkle, Smarty, Smiling, Setonohinode, Setonohatushima, Setonohana, Setonohanayome, Setonohinode, Cerise Royal, Cerise Royalette, Select White Royalette, Zecckino, Soana, Solvik, Solvit Sydney, Takuma, Tangerine, Dark Pink Ministar, Dark Red Sim, Dusty Pink Sim, Dannebu Rope, Tikushi, Tip Top, Tetra Red, Dizeel, Tortosa, Tony, Tobia, Dooka Pink, Donna Lee Supreme, Doria, <i>Niky</i> , New Red, Northland, Nora, Hollywood, Harunoka, Harunoyosooi, Pearl Lake, Pamera, Pallas, Paradiso, Bianca, Beauty Star, Peter Fisher OT, Peter Fisher Nanbukei, Peter Fisher Beikokukei, Pirana, Pink Ice, Pink Calypso, Pink Smiling, Pink Mist, Pink Ministar, Fantasia, Fidelio, Fuji, Flamingo Sim, Francesco, Pride of Woburn, Princess Irene, Pulcino, Hellas, Besper Sim, Variegated Sim, Bellona, Page, Peppermint Lace, Pepito, Percian Pink Sim, Honome, White Christmas, White Sim, White Peter Fisher, White Benon, White Wonder, Magestic, Manon, Mamie, Manmail Myriam, Monroe Romina, Miss Kokura, Muller's Yellow, Myriam, Miltian Maid, Monako, Yufunokagayaki, Yuubae, U Conn, U Conn NR68, Yukigesyou, Yurise, Light Pink Barbi, Raggio di Sole, Raspberry Ice, La Rebe, Lilli Ann, Ruby Red, Le Reve, Red Ivette, Red Gayety, Red Cross, Red Sun, Red Smiling, Red Diamond, Red Baron, Red Ministar, Red Rum, Red River, Red Lena, <i>Lena</i> , Lena Super, Romeo, Lolita, Ronkaruto, Lontagu, Ronda, Rondragel, Izu No.8, Izu Coral, Izunoodoriko, Kibou, Kibounohikari, Hinotukasa, Total 207 cultivars 74.7%

Two hundred sixty nine cultivars were evaluated in the summer of 1990, the other 8 cultivars (in *bold italic*) were tested in the summer of 1996. n=5 ~ 16.

と判定された。この結果の不一致の理由は、本試験では供試材料の根を接種する前に1 cm程度切除しているのので、Nelson・Dickey (1963) の実験よりも容易に菌が植物内に侵入できたためと思われる。さらに、本試験のその他の環境条件 (接種濃度、温度、菌株の発病力など) が彼らの実験に比べ、発病に好適であったためと考えられる。

'ノバダ', 'レバダ' は、萎ちよう病 (*Fusarium*

*oxysporum* f. sp. *dianthi*) のレース1、レース2、レース4のすべてに抵抗性を示す、萎ちよう病強度抵抗性品種である (Demminkら, 1989)。1996年に行った実験で、この2品種の萎ちよう細菌病 (*Burkholderia caryophylli*) に対する発病率は、'ノバダ' で29%、'レバダ' で36%であり、抵抗性程度が中に分類され、萎ちよう細菌病に対しても比較的強い品種であることがわかった一方、'アリス'、'エルシー'、'サッカ'、'サムスプライ

Table 2. Disease incidence of 7 carnation cultivars indexed 91 days after inoculation using 4 different isolates of *Burkholderia caryophylli*.

Cultivars	Percentage of wilted plants						
	1991			1992			
	isolate 1	isolate 2	isolate 3	isolate 1	isolate 2	isolate 3	isolate 4
Wiko	20 %	0 %	7 %	n. t.	n. t.	30 %	10 %
Sandrosa	n. t.	n. t.	n. t.	31 %	8 %	15	15
Nocto	7	0	38	38	n. t.	n. t.	38
Coral	100	67	72	100	100	100	100
Scania	100	67	75	100	100	100	91
White Sim	n. t.	n. t.	80	100	100	91	100
Kibou	n. t.	n. t.	100	100	100	100	n. t.

n.t.: not tested. n=8 ~ 20.

Isolate 1 was isolated from naturally infected carnation cultivar 'Hatsushimo'.

Isolates 2 and 3 were provided by Chiba Horticultural Experiment Station, Japan.

Isolate 4 was obtained from the collection held at Hyogo Prefectural Awaji Agricultural Institute, Japan.

ド'、'ニッキー'、'レナ'では抵抗性程度が極弱であった。

'ウイコ'は、葯が退化しており花粉が得られず、花粉親としては使えない。また、種子親とした場合も種子が結実しないので、'ウイコ'の有する抵抗性を本育種に用いることは難しいと判断された。'ウイコ'、'ノクト'はそれぞれ、マイクロ系、マルチフロラ系に属し、両品種とも品種育成の過程で野生種が用いられたと思われるコンパクトな草姿である。94年に'サンドローサ'と抵抗性程度極弱の'パラス'、'キャンディ'、'カーリー'との交雑後代156系統を供試して抵抗性を調べたが、抵抗性を有する後代は得られなかった(データ略)。したがって、抵抗性程度が強であった3品種は抵抗性育種の親としては不適當であるとの結論に達した。

## 第2項 ダイアンサス属野生種における探索

萎ちょう細菌病に対するダイアンサス属野生種の抵抗性種間差については、菌を有傷接種すると*D. barbatus*、*D. superbus*、*D. chinensis*を萎ちょう枯死させるが、*D. japonicus*には寄生性がないとの報告(鍵渡・土屋, 1968)があるので、これまでほとんど調べられていない。そこで、ダイアンサス属野生種における抵抗性の種間差を調べた。

## 1. 材料および方法

野菜茶試で遺伝資源として維持保存しているダイアンサス属野生種70種類を供試した。接種試験は1989年夏と1990年夏の2回に分けて行った。接種法については、カーネーション栽培品種における探索と同様の方法で行った。

スクリーニングされた野生種の抵抗性を確認するために、1991、1992年の夏に4菌株(isolate 1、isolate 2、isolate 3、isolate 4)を用いて、より高い菌濃度( $10^8$  CFU/ml)で再試験を行った。

## 2. 結果および考察

ダイアンサス属野生種における萎ちょう細菌病抵抗性の検定結果をTable 3、4に示した。ダイアンサス属野生種の萎ちょう細菌病抵抗性には、栽培品種と同様に、顕著な種間差が認められた。抵抗性程度の割合は、供試した70種・系統中28種類(全体の40.0%)が抵抗性程度極弱、18種類(25.7%)が弱、15種類(21.4%)が中、7種類(10.0%)が強と判定された。供試した野生種の中に、本病害に対する抵抗性が極強(発病率: 0%)の野生種2種、*D. capitatus* ssp. *andrzejowskianus* (以

後 *D. capitatus* と略す) と *D. henteri* を見いだした。これらの2種は、実験期間を通じて全く病徴を示さなかった。

*D. deltooides* (野菜茶試系統番号No. 34、35、38) と *D. plumarius* (野菜茶試系統番号No. 76、77、78、79、80) においては、抵抗性に大きな種内変異が認められた。この2種を除いては、種内変異は小さかった。

抵抗性程度の異なるダイアンサス属野生種3種とカー

ネーション2品種における発病率の推移をFig. 4に示した。抵抗性程度が極弱の*D. knappii*では、接種後21日目で病徴が現れ、42日目にはすべての株が完全に萎ちょうした。同様に、抵抗性程度が極弱の‘スケニア’では、接種後21日目から急激に萎ちょうが進行し、70日目に発病率が100%に達した。一方、抵抗性程度が強の‘ウイコ’では、接種後49日目までは病徴がみられなかったが、その後、徐々に発病株が現れ、91日目には発病率20%に

Table 3. Classification of 51 wild *Dianthus* accessions indexed for their resistances to bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) in 1989.

Disease index	Species (NIVOT accession number)	Percentage of wilted plants
5 highly resistant	<i>D. capitatus</i> ssp. <i>andrzejowskianus</i> (14)	0 %
	<i>D. henteri</i> (58)	0
4 resistant	<i>D. plumarius</i> var. <i>albiflorus</i> (78)	8
	<i>D. plumarius</i> ssp. <i>praecox</i> (80)	8
	<i>D. acicularis</i> (1)	9
	<i>D. pontederiae</i> (82)	10
	<i>D. anatolicus</i> (5)	17
3 moderately resistant	<i>D. cruentus</i> (32)	22
	<i>D. hungaricus</i> (59)	25
	<i>D. pallens</i> (69)	25
	<i>D. plumarius</i> (76)	25
	<i>D. plumarius</i> var. <i>albiflorus</i> (77)	25
	<i>D. uralensis</i> (104)	25
	<i>D. turkostanicus</i> (103)	27
	<i>D. zonatus</i> (106)	27
	<i>D. armeria</i> ssp. <i>armeria</i> (9)	29
	<i>D. crinitus</i> (31)	33
	<i>D. andronakii</i> (6)	36
	<i>D. prolifer</i> (83)	38
	<i>D. giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i> (48)	40
	2 susceptible	<i>D. giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i> (50)
<i>D. orientalis</i> (68)		42
<i>D. serotinus</i> (90)		43
<i>D. allwoodii alpinus</i> (2)		45
<i>D. gallicus</i> (45)		50
<i>D. pinifolius</i> (73)		50
<i>D. pungens</i> (84)		50
<i>D. carthusianorum</i> var. <i>humilisgriesselich</i> (17)		55
<i>D. giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i> (49)		60
<i>D. japonicus</i> (61)		60
<i>D. sylvestris</i> (101)		63
1 highly susceptible	<i>D. squarrosus</i> (93)	73
	<i>D. superbus</i> (94)	73
	<i>D. anatolicus</i> (4)	75
	<i>D. barbatus</i> (19)	75
	<i>D. cruentus</i> (33)	75
	<i>D. serotinus</i> (91)	78
	<i>D. haematocalyx</i> ssp. <i>pindicola</i> (57)	83
	<i>D. shinanensis</i> (92)	83
	<i>D. tristis</i> (102)	88
	<i>D. lusitanus</i> (63)	91
	<i>D. superbus</i> ssp. <i>speciosus</i> (96)	91
	<i>D. barbatus</i> (20)	92
	<i>D. alpinus</i> (3)	100
	<i>D. arvernensis</i> (10)	100
	<i>D. barbatus</i> (18)	100
	<i>D. dentosus</i> (39)	100
	<i>D. monspessulanus</i> (65)	100
	<i>D. myrtinervius</i> (67)	100
	<i>D. petraeus</i> ssp. <i>sapineus</i> (72)	100
	<i>D. pinifolius</i> var. <i>lilacinus</i> (74)	100

NIVOT: National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea.  
n=5 ~ 12.

Percentage of wilted plants was calculated and indexed for the degree of resistance 91 days after inoculation.

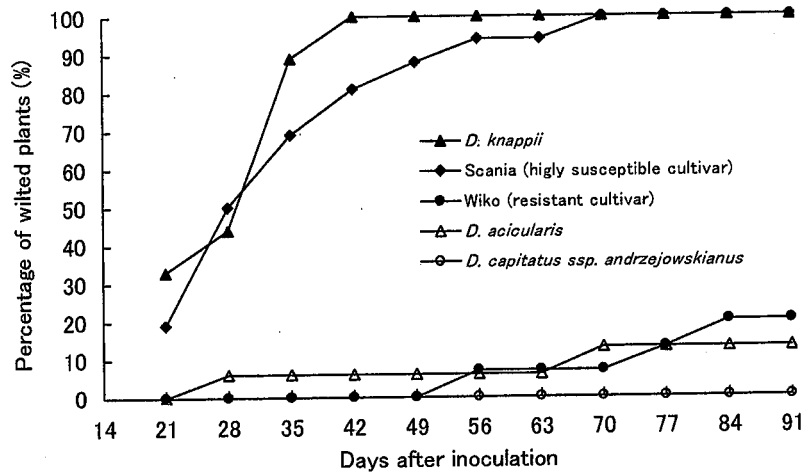


Fig. 4. Disease progression curves of 3 wild *Dianthus* species and 2 carnation cultivars inoculated with *Burkholderia caryophylli* (isolate 1). n=9~16.

Table 4. Classification of 19 wild *Dianthus* accessions indexed for their resistances to bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) in 1990.

Disease index	Species (NIVOT accession number)	Percentage of wilted plants
4 resistant	<i>D. deltoides</i> (34)	7 %
	<i>D. deltoides</i> (35)	19
3 moderately resistant	<i>D. collinus</i> (28)	25
	<i>D. pyrenaicus</i> (86)	38
2 susceptible	<i>D. gratianopolitanus</i> (51)	43
	<i>D. arenarius</i> (7)	50
	<i>D. pinifolius</i> ssp. <i>lilacinus</i> (75)	50
	<i>D. carthusianorum</i> (15)	67
	<i>D. seguieri</i> (89)	67
	<i>D. superbus</i> 'Alba' (95)	67
	<i>D. gratianopolitanus</i> (56)	69
1 highly susceptible	<i>D. carthusianorum</i> (16)	81
	<i>D. correnvonianus</i> (30)	87
	<i>D. scaber</i> (88)	87
	<i>D. deltoides</i> (38)	88
	<i>D. plumarius</i> var. <i>lumitzeri</i> (79)	88
	<i>D. superbus</i> var. <i>speciosus</i> (210)	91
	<i>D. imerecticus</i> (60)	100
	<i>D. knappii</i> (211)	100

NIVOT: National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea.  
n=6 ~ 16.

Percentage of wilted plants was calculated and indexed for the degree of resistance 91 days after inoculation.

達した。それに対し、抵抗性程度が強い *D. acicularis* では、実験期間を通じて発病率が低く、*D. capitatus* では全く発病がみられなかった。

抵抗性程度が極強と判定された *D. capitatus*、*D. henteri* と強い *D. acicularis*、極弱の *D. knappii* および前節で強と判定された 'ウイコ'、極弱の 'コーラル'、'スケニア'、'ホワイトシム' を用い、4 菌株を供試して行った再試験の結果を Table 5 に示した。*D. capitatus*、*D. henteri*、*D. acicularis* は、用いた菌株と

実施した年次に関わらず、低い発病率を示した。一方で、病性野生種 *D. knappii* および 'コーラル'、'スケニア'、'ホワイトシム' では、ほとんどすべての株が萎ちよう枯死した。特に、*D. capitatus* では、1992年の isolate 1 で 5% の発病がみられた以外は無病徴 (発病率 0%) であり、すべての菌株で強い抵抗性を示した。4 菌株を用いた再試験の結果、*D. capitatus* が最も強い抵抗性を示し、続いて *D. henteri*、*D. acicularis* という順であることがわかった。この 3 種の野生種は、カーネーション品

Table 5. Disease incidence of 4 wild *Dianthus* species and 4 carnation cultivars indexed 91 days after inoculation using 4 different isolates of *Burkholderia caryophylli*.

Species and cultivars	Percentage of wilted plants							
	1991			1992				
	isolate 1	isolate 2	isolate 3	isolate 1	isolate 2	isolate 3	isolate 4	
<b>Species</b>								
<i>D. capitatus</i> ssp. <i>andrzejkowskianus</i>	0 %	0 %	0 %	5 %	0 %	0 %	0 %	
<i>D. henteri</i>	11	0	5	15	0	6	21	
<i>D. acicularis</i>	13	6	0	n.t.	9	n.t.	18	
<i>D. knappii</i>	100	100	100	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	
<b>Carnation cultivars</b>								
Wiko	20 %	0 %	7 %	n.t.	n.t.	30 %	10 %	
Coral	100	67	72	100 %	100 %	100	100	
Scania	100	67	75	100	100	100	91	
White Sim	n.t.	n.t.	80	100	100	91	100	

n.t.: not tested. n=7 ~ 20.

Isolate 1 was isolated from naturally infected carnation cultivar 'Hatsushimo'.

Isolates 2 and 3 were provided by Chiba Horticultural Experiment Station, Japan.

Isolate 4 was obtained from the collection held at Hyogo Prefectural Awaji Agricultural Institute, Japan.

種中で最も抵抗性の高かった 'ウイコ' よりもさらに強い抵抗性を示した。10<sup>8</sup> CFU/ml という高濃度の接種でも抵抗性を示したことから、これらの野生種の抵抗性が確認され、また、抵抗性育種素材として有望と判断された。

*D. capitatus*は、南東ヨーロッパ原産であり (Tutin, 1964; Hamilton・Walters, 1989)、花茎は硬く直立し頭状花序を持つ。*D. henteri*は、ルーマニアのカルパチア山脈南部原産であり (Tutin, 1964)、草姿としては茎はほふく状でよく分枝して株全体がマット状になる。*D. capitatus*、*D. henteri*の花冠、花色をPlate 1、2に示した。

以上のように、萎ちょう細菌病に対し強い抵抗性を示す有望な抵抗性素材が野生種の中に見いだされ、抵抗性育種の可能性が示された。

### 第3節 強抵抗性野生種とカーネーションとの種間交雑

一般に、ダイアンサス属は種間交雑が容易であり (塚本, 1982; 伊藤ら, 1989)、自生地や形状の著しく異なる種間でも交雑が可能であることが知られている (Hamilton・Walters, 1989)。前節でカーネーション萎ちょう細菌病の抵抗性遺伝子源として有望な野生種を見いだしたので、強抵抗性野生種とカーネーションとの種間交雑を行い、交雑親和性を調べた。さらに、得られた雑種系統の抵抗性を検定し、野生種の持つ抵抗性のカー

ネーションへの導入に関する検討を行った。

#### 1. 材料および方法

カーネーション18品種と野生種*D. capitatus*、*D. henteri*、*D. acicularis*の間で種間交雑を行った。交配は1990~1992年の3~5月に行った。自然交雑を防ぐために開花2~3日前に種子親の花蕾の除雄を行い、袋がけした。除雄後4~7日目の成熟した雌ずいに花粉親の花粉を付着させる人工授粉を行い、再び袋がけした。種子親がカーネーションの場合は約2か月後、野生種の場合は約1か月後に結実程度を調査し、採種を行った。得られた種子は、1990~1992年の8月下旬から9月上旬に市販の混合用土 (メトロミックス350) を入れた98穴プラグトレーに播種し、室温条件下で発芽させ、約1か月後に温室内ベッドに定植して生育させた。翌年の5月に各個体から挿し芽を10~18本採種し、前節の方法で抵抗性を検定した。選抜した系統は、温室内の土壤消毒済み用土の入った90cm幅のベッドに10×20cmで定植して、冬期の最低夜温を13℃とした慣行法により栽培し、主要な特性を調査した。

さらに、カーネーションとの交雑親和性を調べるために、1992~1994年の3~5月に種間雑種系統 (90B31-4、90B28-3、91B03-3、91B04-2、92B36-11、92B36-14) とカーネーションを交配する戻し交雑を行い、結実程度を調査し、採種を行った。得られた種子は、1992~1994年



Plate 1. Highly resistant species, *D. capitatus* ssp. *andrzejowskianus*.



Plate 2. Highly resistant species, *D. henteri*.

の8月下旬から9月上旬に市販の混合用土（メトロミックス350）を入れた98穴プラグトレーに播種し、室温条件下で発芽させ、約1か月後に温室内ベッドに定植して生育させた。翌年の5月に各個体から挿し芽を10~18本採種し、前節の方法で抵抗性を検定した。

## 2. 結果および考察

カーネーション品種と野生種 *D. capitatus*、*D. acicularis*、*D. henteri* の種間交雑結果を Table 6 に示し

た。*D. capitatus* × カーネーションの組み合わせでは、結実率が16.7%と非常に低かった。得られた種子も2粒で、播種したが発芽せず、後代は得られなかった。カーネーション × *D. capitatus* では、43交配したうち結実したのは13（結実率30.2%）で、1さく果当たりの種子数は6.7粒と少量であり、充実度の低い不完全な形態の種子の比率が高かった。しかし、得られた種子は86粒中50粒が発芽し、発芽率は高かった。

カーネーション × *D. acicularis*、カーネーション × *D. henteri* では、結実率がそれぞれ71.4%、76.9%と高く、

比較的多量の種子が得られたが、充実度の低い不完全な形態の種子が多く、種子の発芽率は極めて低かった。発芽数はカーネーション×*D. acicularis*で110粒中9、カーネーション×*D. henteri*で255粒中13のみであった。

得られた雑種系統の萎ちょう細菌病抵抗性を、前節で述べた検定法で調べた (Table 7)。カーネーション×*D. capitatus*では、36系統中11系統 (全体の30.6%) が抵抗性を示し、そのうち6系統が無病徴であった。カーネーション×*D. acicularis*、カーネーション×*D. henteri*でもそれぞれ4系統中1系統、7系統中3系統の抵抗性を示す種間雑種系統が得られた。このことから、*D. capitatus*など3野生種の有する萎ちょう細菌病抵抗性がカーネーションとの種間交雑により後代に遺伝する

ことが明らかになった。カーネーション×*D. capitatus*の種間雑種系統92B38-1、カーネーション×*D. henteri*の種間雑種系統90B31-4を供試した抵抗性検定試験における接種後91日目の様子をそれぞれPlate 3、Plate 4に示した。

選抜した抵抗性種間雑種系統とその交配親の主要な特性を、Table 8に示した。いずれの雑種系統も草丈や草姿形態などについては両親の中間型を示した。カーネーション×*D. acicularis*の系統 90B28-3、カーネーション×*D. henteri*の系統 90B31-4はいずれも花色は淡桃色、花径は約4cmで、花弁数9~13枚の半八重の形態を示した。系統 90B28-3は草丈50cm程であり花茎がやや軟弱であった。90B31-4は草丈30cm程で特に茎が軟弱で直立

Table 6. Interspecific crosses between *D. caryophyllus* and highly resistant wild species to bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*).

♀	♂	Cross combination	Number of pollinated flowers	Number of capsule setting	Number of seeds obtained			Number of seeds per capsule <sup>w</sup>	Number of seeds sown	Number of seeds germinated
					Normal <sup>z</sup>	Abnormal <sup>y</sup>	Total			
		<i>D. capitatus</i> × <i>D. caryophyllus</i>	6	1 (16.7) <sup>x</sup>	0	2	2	2.0	2	0
		<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. capitatus</i>	43	13 (30.2)	29	59	88	6.7	86	50
		<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. acicularis</i>	14	10 (71.4)	22	104	126	12.6	110	9
		<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. henteri</i>	26	20 (76.9)	53	232	285	14.3	255	13

<sup>z</sup> Normal: black and mature seed.

<sup>y</sup> Abnormal: brown, shrunken and aborted seed.

<sup>x</sup> Values in parentheses represent the percentage of capsule setting.

<sup>w</sup> (Total number of seeds obtained)/(Number of capsule setting).

Table 7. Segregation of resistance in the F<sub>1</sub> populations between *D. caryophyllus* and highly resistant wild species to bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*).

♀	♂	Cross combination	Number of seedlings tested	Number of seedlings with disease indexes <sup>z</sup>					Ratio R <sup>y</sup> : S <sup>x</sup>	Percentage of seedlings with resistance	Number of selected lines
				5	4	3	2	1			
		<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. capitatus</i>	36	6	5	4	6	15	11:25	30.6 %	7
		<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. acicularis</i>	4	0	1	1	1	1	1:3	25.0	1
		<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. henteri</i>	7	1	2	1	2	1	3:4	42.9	1

<sup>z</sup> Disease index: 5, no visible symptoms; 4, 0<~≤20% wilted; 3, 20<~≤40% wilted; 2, 40<~≤70% wilted; 1, 70<~≤100% wilted.

<sup>y</sup> R: resistant (0<~≤20% wilted). <sup>x</sup> S: susceptible (20<~≤100% wilted).



Plate 3. Disease incidence 91 days after inoculation with *Burkholderia caryophylli*. Line 92B38-1, an interspecific hybrid between carnation and *D. capitatus*, showed no disease symptoms, whereas all 'White Sim' plants completely wilted and died.



Plate 4. Disease incidence 91 days after inoculation with *Burkholderia caryophylli*. Line 90B31-4, an interspecific hybrid between carnation and *D. henteri*, showed very low disease incidence, whereas 'Scania', 'Kibou' and 'Coral' plants completely wilted and died.

しない傾向があった。カーネーション×*D. capitatus*の雑種系統では、系統 91B03-3、91B04-2、92B36-11が花弁数約20枚の八重に対し、系統92B36-5、92B36-7、92B36-14、92B38-1では花弁数5枚の一重であり、一重と八重の分離がみられた。また、花色は7系統とも花粉親に用いた*D. capitatus*と同じ赤紫色であり、その他の花色は出現しなかった。カーネーション×*D. capitatus*の雑種系統は、花粉親である *D. capitatus*の、硬い花茎が伸長し頂端に小花が密生するという特性が遺伝して強い

茎を持ち、切り花用カーネーションの育種材料としては *D. acicularis*、*D. henteri*よりも有望と思われた。

抵抗性種間雑種系統とカーネーションとの戻し交雑では、充実した種子が多数得られ、野生種とカーネーションとの種間交雑と比較すると、交雑親和性は著しく向上した (Table 9)。カーネーション×*D. acicularis*、カーネーション×*D. henteri*の種間交雑では交雑親和性が低かったが、90B31-4×カーネーション、カーネーション×90B28-3、90B31-4では結実率が83.3~88.8%で1さ



Table 8. Characteristics of selected interspecific hybrids with bacterial wilt resistance and their parents.

Selected lines and their parents	Flower color	Diameter of flowers (cm)	Number of petals	Height of plants (cm)	Resistance to bacterial wilt <sup>a</sup>
<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. acicularis</i>					
90B28- 3 Pink Barbi × <i>D. acicularis</i>	Pale pink	3.9	13.0	54.2	4
<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. henteri</i>					
90B31- 4 Pink Barbi × <i>D. henteri</i>	Pale pink	4.2	9.2	30.4	4
<i>D. caryophyllus</i> × <i>D. capitatus</i>					
91B03- 3 Jolivette × <i>D. capitatus</i>	Red purple	4.2	19.8	86.8	5
91B04- 2 Super Gold × <i>D. capitatus</i>	Red purple	4.3	18.8	76.4	5
92B36- 5 Coral × <i>D. capitatus</i>	Red purple	4.1	5.0	89.2	5
92B36- 7 Coral × <i>D. capitatus</i>	Red purple	4.4	5.0	66.4	5
92B36-11 Coral × <i>D. capitatus</i>	Red purple	5.1	20.6	77.2	4
92B36-14 Coral × <i>D. capitatus</i>	Red purple	4.2	5.0	52.2	5
92B38- 1 Kibou × <i>D. capitatus</i>	Red purple	4.3	5.0	68.6	5
Pink Barbi	Pink	5.5	44.0	89.0	2
Jolivette	Yellow	5.4	54.0	98.0	2
Super Gold	Orange with red stripes	6.3	36.6	72.0	1
Coral	Red	6.7	28.0	75.0	1
Kibou	Deep pink	8.4	32.8	97.6	1
<i>D. acicularis</i>	Pale pink	2.6	5.0	27.5	4
<i>D. henteri</i>	Pale pink with purple eye	4.3	5.0	50.0	5
<i>D. capitatus</i>	Red purple	2.2	5.0	21.2	5

<sup>a</sup> Resistance to bacterial wilt: 5 (highly resistant), no visible symptoms; 4 (resistant), 0<~≤ 20 % wilted; 3 (moderately resistant), 20<~≤ 40 % wilted; 2 (susceptible), 40<~≤ 70 % wilted; 1 (highly susceptible), 70<~≤ 100 % wilted.

く果当たり25粒前後の種子が得られ、黒色で充実した正常種子の比率が高く、後代も容易に得られた。カーネーション×*D. capitatus*の雑種系統91B03-3、91B04-2、92B36-11、92B36-14を用いた戻し交雑においても結実率、1さく果当たり種子数とも向上し、充実種子が多数得られ、高い発芽率を示した。

次に、得られた種子を播種して生育させBC<sub>1</sub>（カーネーション×強抵抗性F<sub>1</sub>）における抵抗性の遺伝性を調査した（Table 10）。*D. henteri*の雑種系統への戻し交雑である、カーネーション×90B31-4では23系統中4系統（全体の17.4%）が発病率20%以下の抵抗性を示した。また、*D. capitatus*の雑種系統への戻し交雑である、カ

ーネーション×91B03-3では19系統中4系統（全体の21.1%）、カーネーション×91B04-2では132系統中16系統（全体の12.1%）、カーネーション×92B36-11では68系統中5系統（全体の7.4%）、カーネーション×92B36-14では77系統中17系統（全体の22.1%）が抵抗性を示した。このように、BC<sub>1</sub>世代では、抵抗性個体は全実生の約1~2割の比率で出現することが明らかになった。また、花色に関しても、F<sub>1</sub>では淡桃色と赤紫色しか出現しなかったが、BC<sub>1</sub>では赤、桃、白に赤条、サーモン色など様々な花色の分離がみられた。

カーネーションは栄養繁殖性花きであり、遺伝的に固定されていないため、遺伝解析を行うのは難しい。萎ち

Table 9. Back crosses between *D. caryophyllus* and selected interspecific hybrids with resistance.

Cross combination		Number of pollinated flowers	Number of capsule setting	Number of seeds obtained			Number of seeds per capsule <sup>w</sup>	Number of seeds sown	Number of seeds germinated
♀	♂			Normal <sup>z</sup>	Abnormal <sup>y</sup>	Total			
90B31-4	× <i>D. caryophyllus</i>	6	5(83.3) <sup>x</sup>	115	13	128	25.6	70	23
<i>D. caryophyllus</i>	× 90B28-3	9	8(88.8)	182	30	212	26.5	115	79
<i>D. caryophyllus</i>	× 90B31-4	16	14(87.5)	202	156	358	25.6	261	92
<i>D. caryophyllus</i>	× 91B03-3	5	2(40.0)	21	11	32	16.0	32	25
<i>D. caryophyllus</i>	× 91B04-2	23	15(65.2)	172	22	194	12.9	194	154
<i>D. caryophyllus</i>	× 92B36-11	9	7(77.8)	79	34	113	16.1	113	72
<i>D. caryophyllus</i>	× 92B36-14	12	10(83.3)	123	35	158	15.8	158	89

<sup>z</sup> Normal: black and mature seed.

<sup>y</sup> Abnormal: brown, shrunken and aborted seed.

<sup>x</sup> Values in parentheses represent the percentage of capsule setting.

<sup>w</sup> (Total number of seeds obtained)/(Number of capsule setting).

Table 10. Segregation of resistance in the BC<sub>1</sub> populations between *D. caryophyllus* and selected interspecific hybrids.

Cross combination		Number of seedlings tested	Number of seedlings with disease indexes <sup>z</sup>					Ratio R <sup>y</sup> : S <sup>x</sup>	Percentage of seedlings with resistance	Number of selected lines
♀	♂		5	4	3	2	1			
<i>D. caryophyllus</i>	× 90B31-4	23	1	3	4	5	10	4:19	17.4%	2
<i>D. caryophyllus</i>	× 91B03-3	19	2	2	2	2	11	4:15	21.1	4
<i>D. caryophyllus</i>	× 91B04-2	132	8	8	20	15	81	16:116	12.1	19
<i>D. caryophyllus</i>	× 92B36-11	68	2	3	5	13	45	5:63	7.4	6
<i>D. caryophyllus</i>	× 92B36-14	77	4	13	7	11	42	17:60	22.1	20

<sup>z</sup> Disease index: 5, no visible symptoms; 4, 0<~ ≤ 20% wilted; 3, 20<~ ≤ 40% wilted; 2, 40<~ ≤ 70% wilted; 1, 70<~ ≤ 100% wilted.

<sup>y</sup> R: resistant (0 ≤ ~ ≤ 20% wilted). \* S: susceptible (20<~ ≤ 100% wilted).

よう細菌病抵抗性の遺伝様式についても本節の結果から断定はできないが、り病性カーネーションと *D. capitatus* との交雑F<sub>1</sub>世代より病性カーネーション×強抵抗性F<sub>1</sub>のBC<sub>1</sub>世代における抵抗性程度が極強から極弱まで連続的に分離していることから、萎ちょう細菌病に関与する遺伝子は単因子ではなく、複数の遺伝子が関与していると推定される。

本節の結果から、野生種の持つ抵抗性を導入したカーネーションの萎ちょう細菌病抵抗性育種が可能であることが示された。

#### 第4節 抵抗性中間母本‘カーネーション農1号’の育成

カーネーション×*D. capitatus*の種間雑種系統の中から、強度の萎ちょう細菌病抵抗性を有し、かつ草姿、形態、生産性等の形質の優れる系統91B04-2を選抜した。本系統が有する強度な抵抗性が後代に遺伝することを確認したので、‘カーネーション農1号’として品種登録した。以後、系統91B04-2すなわち‘カーネーション農1号’を‘農1号’と表記する。

## 1. 材料および方法

カーネーション×*D. capitatus*の選抜系統5系統(91B03-3、農1号、92B36-5、92B36-11、92B36-14)と対照品種‘スーパーゴールド’‘スゲニア’‘コーラル’を供試して、切り花収量の季節変動を調査した。定植約1か月前に、基肥として堆肥200kg/a、苦土石灰100g/m<sup>2</sup>、ようりん100g/m<sup>2</sup>、CDU化成(N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=12:12:12)125g/m<sup>2</sup>を用土に施用し、ダゾメット微粒剤(商品名:バスマイド粉粒剤)で土壤消毒を行った。1995年7月7日に、ガラス温室内の90cm幅ベッドの中央20cmを中抜きし、10×20cm(栽植密度:36.5株/m<sup>2</sup>)で1品種・系統あたり6~9株を定植した。新葉展開後1回摘心をした。冬期は最低夜温13℃で加温した。追肥は、くみあい液肥2号(N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=10:4:8)の300倍希釈液を週1回施用した。開花の始まった1995年10月から調査終了の1996年5月31日まで各月毎の収穫本数を調査した。

1996年4~5月に、‘農1号’とその種子親の‘スーパーゴールド’、花粉親の*D. capitatus*の主要な特性を調査した。‘農1号’と‘スーパーゴールド’は収量調査中の株から5本の切り花を調査に用いた。*D. capitatus*は直径15cmの鉢に定植し、無加温のガラス温室内で維持している5株から採取した花を調査に用いた。

‘農1号’の抵抗性を確認するために、4菌株(isolate 1、isolate 2、isolate 4、isolate 6)を用いて1992年から2000年にかけて前節で述べた手法により合計8回の抵抗性検定を行った。isolate 6は、兵庫県淡路島

で採取されたカーネーション病株由来の菌株である。

カーネーションとの交雑親和性を調べるために、‘農1号’と‘希望’‘スゲニア’‘コーラル’‘ホワイトシム’の間で1993年の3~5月に交雑を行った。得られた種子は、1993年8月30日に市販の混合用土(メトロミックス350)を入れた98穴プラグトレーに播種し、室温条件下で発芽させ、約1か月後に温室内ベッドに定植して生育させた。‘農1号’の持つ抵抗性の後代への遺伝性を調べるため、翌年の5月に各個体から挿し芽を10~18本採穂し、前節と同様の方法で抵抗性を検定した。

## 2. 結果および考察

ダイアンサス属野生種は、日本の気象条件下では5月から6月にかけて開花する一季咲き性を示す種が多く、これらの種では正常に開花するためには冬季の自然低温に遭遇することが必要である(伊藤ら, 1989)。「農1号」の交配親野生種である*D. capitatus*は、1990~1991年における冬期加温温室での開花特性調査結果から、開花に低温要求性を持つ野生種であり、最低夜温13℃に加温した温室では全く開花しないことが明らかになっている(データ略)。しかし、四季咲き性のカーネーション品種に*D. capitatus*を交配すると、低温に遭遇しなくても開花する性質を獲得した雑種系統が得られた(Table 11)。「農1号」以外の91B03-3、92B36-5、92B36-11、92B36-14では、最低夜温13℃に加温した温室でも開花がみられたが、10月から1月の期間には全く開花せず、2月から開花が始まった。これに対し、「農1号」では、低温要求性がないだけでなく、定植より約3か月で開花

Table 11. Seasonal changes of the yield (number of cut flowers / plant) in selected interspecific hybrids between carnation and *D. capitatus*.

	95			96					Total
	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	
Super Gold	0.1	0.7	0.8	0.4	0.8	0.7	0.4	0.7	4.6
Scania	0.1	0.7	0.8	0.7	0.6	0.6	0.5	1.1	5.0
Coral	0.0	0.4	0.8	1.1	1.0	0.9	1.0	2.3	7.4
91B03-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.8	2.7	5.3
Nou No.1	5.7	1.5	1.2	0.2	0.2	0.8	0.5	1.5	11.5
92B36-5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.8	2.2
92B36-11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.5	0.3	1.3
92B36-14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.7

Data were collected from the onset of flowering (early October 1995) until May 30, 1996.

Cross combination of selected interspecific hybrids are shown in Table 8.

する極早生性を示した。10月に一斉に開花し、その後1、2月の冬期には開花が少なく収量が減少したが、春には再び収量が増加した。また、調査期間中の全収量は92B36-5、92B36-11、92B36-14では0.7~2.2本/株と少なく、99B03-3でも5.3本/株であったのに対し、'農1号'では11.5本/株とカーネーション品種を上回る多収性を示した。

96年に行った特性調査の結果をTable 12に示した。花粉親の*D. capitatus*は、花弁数が5枚の一重で、開花期以外はマット状に茂っているが開花期になると多数の開

花茎を伸ばし、調査時には草丈が21.2cmであった。'農1号'は、花弁数が18枚の八重で、草丈は81.0cmと切り花としても利用可能な草丈を示した。花色は、*D. capitatus*と類似した鮮赤紫色である。花径は4.3cmと'スーパーゴールド'の6.3cm、*D. capitatus*の2.2cmのほぼ中間であった。硬い花茎が伸長して、頂端に小花が密生するという草姿・形態や花色に*D. capitatus*の性質が残っている。12~3月の冬期になると開花茎の茎長が短い状態で開花し、採花本数が減少するという欠点がある。'農1号'の花型、草姿をPlate 5、Plate 6に示した。



Plate 5. 'Carnation Nou No.1', a carnation breeding line resistant to bacterial wilt.



Plate 6. Plant type of 'Carnation Nou No.1'.

Table 12. Characteristics of 'Carnation Nou No.1' and its parents.

Characteristics	Nou No.1	Super Gold	<i>D. capitatus</i>
Plant type	Upright	Upright	Creeping
Plant height (cm)	81.0	77.0	21.2
Flower type	Double	Double	Single
Number of petals	18.0	27.8	5.0
Flower diameter (cm)	4.3	6.3	2.2
Flower color	Vivid red purple	Light orange with striated vivid red	Strong purplish pink
Flowering habit	Perpetual	Perpetual	One season flowering
Earliness of flowering	Very early	Early	—
Number of styles	2.0	2.8	2.0
Maximum leaf length (cm)	17.7	12.6	4.1
Maximum leaf width (cm)	0.52	0.54	0.20
Leaf shape	Linear	Linear	Subulate
Leaf color	Green	Dark green	Green

Table 13. Disease incidence of 'Carnation Nou No.1' indexed 91 days after inoculation using 4 different isolates of *Burkholderia caryophylli*.

Tested year Isolate	1992 isolate 1		1992 isolate 2		1993 isolate 1		1996 isolate 4		1996 isolate 1		1997 isolate 6		1998 isolate 6		2000 isolate 2		Mean %
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Nou No. 1	10	0	7	0	18	11	14	14	13	0	18	28	13	8	14	21	10.0
<i>D. capitatus</i>	19	5	19	0	12	8	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	4.3
Super Gold	16	94	16	75	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	84.5
Scania	14	100	8	100	n. t.	n. t.	n. t.	10	90	12	100	7	100	n. t.	n. t.	n. t.	98.0
White Sim	12	100	11	100	18	100	n. t.	n. t.	11	82	13	100	n. t.	n. t.	18	100	97.0
U Conn Sim	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	14	100	n. t.	n. t.	n. t.	100.0
Coral	15	100	15	100	18	100	n. t.	n. t.	12	92	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	97.9
Lena	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	14	100	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	100.0

n: Number of plants tested.

n. t.: Not tested.

Isolate 1 was isolated from naturally infected carnation cultivar 'Hatsushimo'.

Isolate 2 was provided by Chiba Horticultural Experiment Station, Japan.

Isolate 4 was obtained from the collection held at Hyogo Prefectural Awaji Agricultural Institute, Japan.

Isolate 6 was isolated from naturally infected carnation cultivated in Awaji Island Hyogo, Japan.

Table 13に‘農1号’の萎ちょう細菌病抵抗性検定結果を示した。対照のカーネーション品種ではいずれの試験でもほとんど全株が発病し枯死した。一方、‘農1号’では、試験によって発病程度に多少の変動が認められたが、安定した抵抗性を示した。‘農1号’の萎ちょう細菌病抵抗性検定の様子をPlate 7に示した。

カーネーションと‘農1号’との戻し交雑の結果をTable 14に示した。カーネーション×‘農1号’の組み合わせでの結実程度は、種子親として用いたカーネーション品種によって違いがみられた。種子親として‘スケニア’、‘希望’を用いると結実程度が良好であったが、種子親が‘コーラル’、‘ホワイトシム’の場合は微量の

種子しか得られなかった。種子は、‘ホワイトシム’を種子親とした場合を除いて、高い発芽率を示した。前節で示したように、*D. capitatus* とカーネーションとの交雑親和性は低いが、‘農1号’とカーネーションとの戻し交雑では、結実の良い種子親カーネーションを選べば、充実種子が多数得られ、交雑親和性は向上した。

93年に実施した、カーネーションと‘農1号’との交雑後代、4交配組み合わせ132系統の抵抗性検定結果をTable 15に示した。132系統のうち、16系統(12.1%)が強抵抗性であり、そのうちの8系統(全体の6.1%)が発病率0%の非常に強い抵抗性を示した。以上の結果から‘農1号’の強抵抗性が後代へ遺伝することが確認

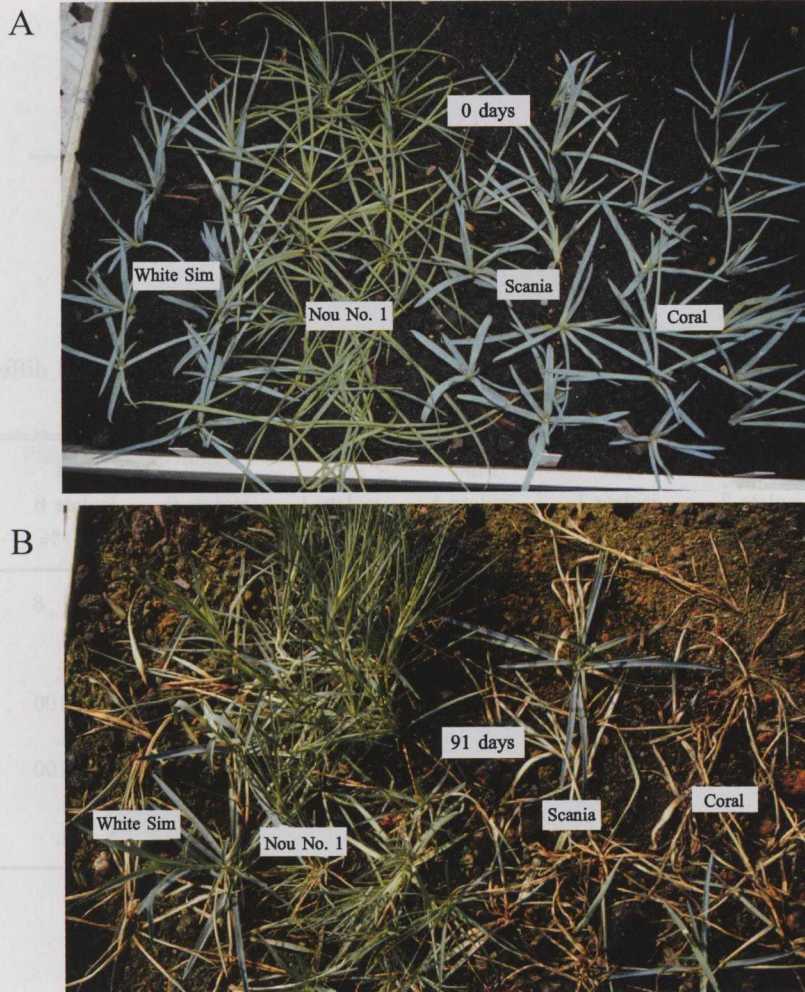


Plate 7. Appearance of inoculation test with *Burkholderia caryophylli*.

A: 0 days after inoculation; B: 91 days after inoculation.

Left to right: Susceptible cultivar ‘White Sim’, resistant breeding line ‘Carnation Nou No.1’, susceptible cultivar ‘Scania’ and ‘Coral’.

された。

育成された中間母本‘農1号’は、97年から有償配布を開始したが、カーネーションの育種を行っている民間の種苗会社や公立の試験研究機関、さらに一般の生産者などから多数の配布申請があり、現在までに合計18件の配布を行った。2000年3月30日には、登録番号第7943号として種苗法による品種登録が完了した。

Table 14. Back crosses between carnation cultivars and interspecific hybrid ‘Carnation Nou No.1’.

Cross combination		Number of pollinated flowers	Number of capsule setting	Number of seeds obtained			Number of seeds of seeds per capsule <sup>w</sup>	Number of seeds sown	Number of seeds germinated
♀	♂			Normal <sup>z</sup>	Abnormal <sup>y</sup>	Total			
Kibou	× Nou No.1	7	7(100.0) <sup>x</sup>	140	6	146	20.9	146	116
Scania	× Nou No.1	5	4(80.0)	32	8	40	10.0	40	33
Coral	× Nou No.1	3	2(66.7)	0	5	5	2.5	5	4
White Sim	× Nou No.1	8	2(25.0)	0	3	3	1.5	3	1

<sup>z</sup> Normal: black and mature seed.

<sup>y</sup> Abnormal: brown, shrunken and aborted seed.

<sup>x</sup> Values in parentheses represent the percentage of capsule setting.

<sup>w</sup> (Total number of seeds obtained)/(Number of capsule setting).

Table 15. Segregation of resistance in the progenies between carnation cultivars and ‘Carnation Nou No.1’.

Cross combination		Number of seedlings tested	Number of seedlings with disease indexes <sup>z</sup>					Ratio R <sup>y</sup> : S <sup>x</sup>	Percentage of seedlings with resistance
♀	♂		5	4	3	2	1		
Kibou	× Nou No.1	98	4	7	15	8	64	11: 87	11.2%
Scania	× Nou No.1	30	4	1	5	6	14	5: 25	16.7
Coral	× Nou No.1	3			1	3		0: 3	0.0
White Sim	× Nou No.1	1				1		0: 1	0.0
Total		132	8	8	20	15	81	16: 116	12.1

<sup>z</sup> Disease index: 5, no visible symptoms; 4, 0<~ ≤ 20 % wilted; 3, 20<~ ≤ 40 % wilted; 2, 40<~ ≤ 70 % wilted; 1, 70<~ ≤ 100 % wilted.

<sup>y</sup> R: resistant (0 ≤ ~ ≤ 20 % wilted). <sup>x</sup> S: susceptible (20<~ ≤ 100 % wilted).

## 第5節 抵抗性にリンクしたDNAマーカーの探索

本研究では、これまで萎ちょう細菌病の抵抗性を第1節で開発した浸根接種による検定法によって判定してきた。しかし、検定に必要な数の挿し芽を得るためには約半年間は生育させる必要があり、さらに抵抗性を判定するには接種から3か月という時間を要する。また、大量の個体数を扱うには大きな労力を必要とする。

近年の植物育種において、DNAマーカーを利用した個体識別技術や遺伝連鎖地図の作製、遺伝解析法がめざましい発展を遂げている。イネ、ダイズなどの主要作物や野菜では、病害抵抗性に連鎖したDNAマーカーの作出が多数報告されている (Paran・Michelmore, 1993; Kuginukiら, 1997; Parkら, 1998, 1999; Fazioら, 1999; Kikuchiら, 1999; Yuiら, 1999)。抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーを指標にすることにより、従来の抵抗性検定を行うことなしに抵抗性遺伝子の有無を評価できる。マーカーによる選抜は微量のDNAを抽出すれば実施できるので、幼苗時でも選抜が可能である。また、野生種の抵抗性遺伝子を導入する戻し交雑育種を行う際にも、戻し交雑の回数を最小限にして、最も望ましい個体を迅速に選抜することが可能になる。そこで本節では、萎ちょう細菌病抵抗性に連鎖したDNAマーカーの探索を試みた。

DNA多型の検出にはRFLP (Restriction fragment length polymorphism)、RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)、AFLP (Amplified fragment length polymorphism)、SSR (Simple sequenced repeat polymorphism)、ISSR (Inter-simple sequence repeat polymorphism) など多くの手法が開発されている (鶴飼, 2000)。これらの方法のうち、RAPD法は、8~12塩基程度の短いランダム配列から成るプライマーを用いてPCR (Polymerase chain reaction) を行い、ゲノムDNA中のプライマーと同じ配列を持つ部分に挟まれた領域を増幅し、それらを電気泳動して供試材料間の多型を検出する手法である (Williamsら, 1990)。他の方法に比べ、実験操作が簡便で迅速に多くの多型を検出できるという利点がある。本研究では、DNA多型検出にRAPD法を用いて行うこととした。

## 第1項 抵抗性分離集団の育成とプライマーのスクリーニング

### 1. 材料および方法

*D. capitatus*に由来する萎ちょう細菌病抵抗性を持つ‘農1号’と感受性の栽培品種‘プリティファボーレ’を交配親に選定して正逆の交配を行い、抵抗性分離集団を育成した。

系統A: ‘プリティファボーレ’ × ‘農1号’ 22系統  
系統B: ‘農1号’ × ‘プリティファボーレ’ 112系統

これら合計134系統の分離集団の抵抗性を調べるために、2菌株 (isolate 1, isolate 4) を用いて1998年から2000年にかけて前節と同様の方法で合計6回の抵抗性検定を実施し、平均発病率を算出した。

DNAの抽出はCTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 法 (Murray・Thompson, 1980) により行った。すなわち供試材料の若い葉0.5gを液体窒素で凍結し、乳鉢で粉砕後、500  $\mu$ lの2×CTABと5  $\mu$ lのメルカプトエタノールを加えて懸濁し、55℃で10分間インキュベートした。その後、水中で急冷し、500  $\mu$ lのイソクロ (クロロホルム: イソプロパノールを24:1に混合した液) を加え5分間振とう後、遠心分離を行った。上澄み液を取り、500  $\mu$ lの1×CTABを加えて穏やかに転倒混和後遠心分離した。上澄み液を捨て、沈殿を500  $\mu$ lの1M NaCl-TEに溶解させ、2.5倍量のエタノールを加えて混合し、DNAを沈殿させた。これを70%エタノールで洗浄し、沈殿を回収して100  $\mu$ lのTE bufferに溶解した。ゲル定量法によりDNAの濃度が20ng/ $\mu$ lとなるよう調整し、PCRの鋳型とした。

プライマーにはDNA Oligomer Set (12mer、和光純薬) のAシリーズ (略号WA) 60種、およびBシリーズ (略号WB) 60種の合計120種類を供試した。PCR反応には、鋳型DNA20ng、dNTP各0.2nmol、プライマー1.5pmol、Tth DNA合成酵素 (TOYOBO) 0.4unitおよび添付の10×反応緩衝液1  $\mu$ lを含む10  $\mu$ lの反応液を用いた。装置はASTEC社製 PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700を用い、前処理94℃30秒に続き、94℃30秒・40℃2分・72℃3分で45サイクル反復、後処理72℃7分の条件で反応させた。DNA増幅産物は、エチジウムブロマイドを含むTBE緩衝液1.5%アガ



ローズゲルを用いて100Vで約40分間電気泳動し、紫外線照射下でRAPDバンドの検出を行った。

抵抗性の*D. capitatus*と‘農1号’に共通して存在し、感受性で‘農1号’の種子親である‘スーパーゴールド’と、感受性で分離集団育成に使用した‘プリティファボーレ’には存在しないDNA断片を増幅できるプライマーを1次スクリーニングした。

次に、1次スクリーニングで多型が得られたプライマー78種類を用い、6回の抵抗性検定試験結果から得られた平均発病率を基に、平均発病率が20%以下の抵抗性程度が強い系統に高頻度で現れ、平均発病率が90%以上の極弱の系統では出現頻度の低い特異的なDNA断片を増幅できるプライマーを2次スクリーニングした。

さらに、2次スクリーニングで選抜したプライマー8種類(WA-1、WA-69、WA-85、WB-2、WB-26、WB-62、WB-65、WB-67)を用いて、分離集団134系統における多型の分離を調査した。それぞれのマーカーバンドの有無により分けた2つの集団について、 $\chi^2$ 分布による適合度検定(期待値1:1)を行った。さらに、萎ちょう細菌病接種試験の平均発病率の差をWilcoxon (1945)のノンパラメトリック法を用いて有意差検定を行った。

## 2. 結果および考察

‘農1号’と‘プリティファボーレ’との交雑後代134系統を供試して抵抗性を検定した結果、抵抗性に大きな分離がみられ、平均発病率5.2%の系統から100%の系統まで連続的な分布を示した。発病率60~70%の頻度が少なく、分布には2つのピークがみられた(Fig. 5)。集団全体の平均発病率は57.9%であった。抵抗性程度の割合は、供試した134系統中54系統(全体の40.3%)が

抵抗性程度極弱、43系統(32.1%)が弱、28系統(20.9%)が中と判定された。抵抗性程度を強と判定した系統は、9系統(全体の6.7%)であった。抵抗性程度が極強(発病率:0%)の系統は、見いだされなかった。

萎ちょう細菌病抵抗性の*D. capitatus*と‘農1号’に特異的なバンドを検出できるプライマーを検索した結果、120種類のプライマーのうちAシリーズで42種類、Bシリーズで36種類、合計78種類(全体の65%)で129本の多型バンドが検出された。*D. capitatus*と‘農1号’に特異的な多型がRAPD法により高頻度で得られることが明らかになった。

1次スクリーニングで多型が得られたプライマーを用いて、分離集団の抵抗性検定結果を基に、抵抗性系統に高頻度で現れ、感受性系統では出現頻度の低い特異的なバンドを検索した。8種類のプライマー(WA-1、WA-69、WA-85、WB-2、WB-26、WB-62、WB-65、WB-67)で現れる多型バンドを選抜マーカーの候補として選んだ。

この8種類のプライマーを用いて、分離集団134系統におけるマーカーバンドの有無を調べた。

萎ちょう細菌病抵抗性に関する遺伝子は、抵抗性野生種*D. capitatus*と感受性品種‘スーパーゴールド’との種間交雑により‘農1号’に伝わり、さらに‘農1号’と感受性品種‘プリティファボーレ’との交雑により分離集団へと遺伝する。このことから、‘農1号’はこの遺伝子をヘテロの状態を持っており、理論的には分離集団にこの遺伝子は1:1の比に分離すると考えられる。そこで、8個のマーカーバンド(WB2-1450、WB67-1050、WA1-1800、WB26-620、WB65-670、WB62-1200、WA85-700、WA69-2340)の分離集団における分離比と

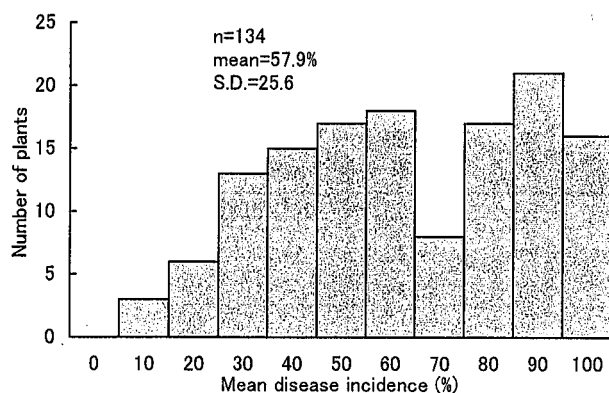


Fig. 5. Frequency distribution of mean disease incidence in the 134 progenies between ‘Pretty Favvare’ and ‘Carnation Nou No. 1’.

期待値1:1との間で $\chi^2$ 検定を行ったところ、いずれも期待される1:1の分離比に適合した (Table 16)。

マーカーバンドの有無により分けたそれぞれ2つの集団について、平均発病率の差をWilcoxon (1945) のノンパラメトリック法で有意差検定を行った。その結果、WB2-1450、WB67-1050では5%レベルで有意差が認められた。さらに、WA1-1800、WB26-620、WB65-670、WB62-1200、WA85-700、WA69-2340では、1%レベル

で有意差が認められ、抵抗性遺伝子座とより密接に連鎖していると考えられた (Table 17)。これらのマーカーの近傍に抵抗性遺伝子座が存在することが示唆された。

‘農1号’ (レーンN)、‘プリティファボーレ’ (レーンP) およびその後代の抵抗性系統 (レーン1~6)、感受性系統 (レーン7~13) から抽出したDNAを材料に、WA-1、WB-65をプライマーに用いて得られたマーカーWA1-1800、WB65-670の多型をPlate 8に示した。

Table 16. RAPD markers for bacterial wilt resistance.

Primer	Sequence of primer	RAPD marker	Fragment size (bp)	RAPD Pattern		$\chi^2$ value (1:1)	P
				+	-		
WB-2	5'-GTCATGCCTGGA-3'	WB 2-1450	1450	66	68	0.030	0.863
WB-67	5'-GCGGTCAGCACA-3'	WB67-1050	1050	62	72	0.746	0.388
WA-1	5'-TGCACTACAACA-3'	WA 1-1800	1800	69	65	0.119	0.730
WB-26	5'-ATGAGAAAGGAA-3'	WB26-620	620	74	60	1.463	0.227
WB-65	5'-GTGTGGAAGCCA-3'	WB65-670	670	73	61	1.075	0.300
WB-62	5'-TCTATGGACCCT-3'	WB62-1200	1200	69	65	0.119	0.730
WA-85	5'-TACTACTGTGGA-3'	WA85-700	700	66	68	0.030	0.863
WA-69	5'-TGGTACGGTATA-3'	WA69-2340	2340	59	75	1.910	0.167

Table 17. Significance tests of differences in the mean disease incidence between groups of lines categorized in terms of RAPD patterns.

RAPD marker	RAPD Pattern	Number of lines	Mean disease incidence	Difference of mean disease incidence
WB 2-1450	+	66	52.7%	10.3 <sup>z</sup>
	-	68	62.9	
WB67-1050	+	62	52.5%	10.0*
	-	72	62.5	
WA 1-1800	+	69	51.9%	12.3**
	-	65	64.2	
WB26-620	+	74	52.6%	11.8**
	-	60	64.4	
WB65-670	+	73	52.2%	12.5**
	-	61	64.7	
WB62-1200	+	69	51.9%	12.4**
	-	65	64.3	
WA85-700	+	66	50.3%	14.9**
	-	68	65.2	
WA69-2340	+	59	51.3%	11.7**
	-	75	63.1	

<sup>z</sup> Significance was tested according to Wilcoxon method (1945), which is a non-parametric significance test between two populations.

\*, \*\*: Significant at 5% and 1% levels, respectively.

+: present; -: absent

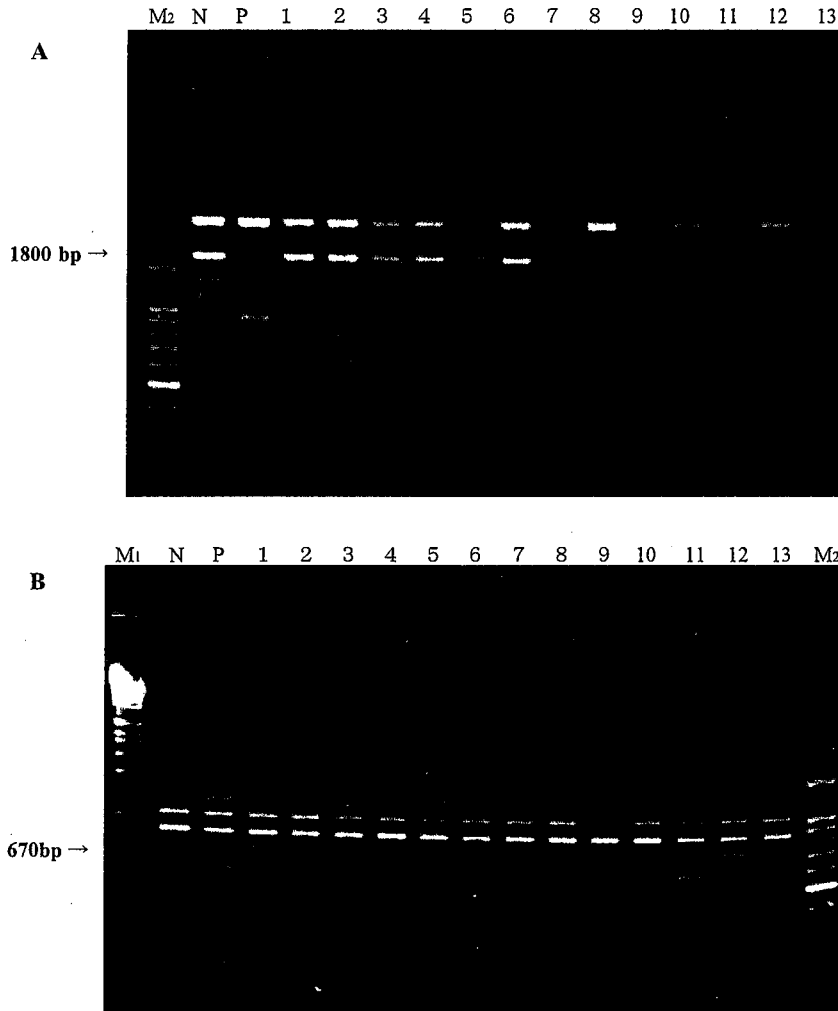


Plate 8. Gel electrophoresis patterns of RAPD markers generated by primers WA-1 (A) and WB-65 (B) on 'Carnation Nou No. 1' (N), 'Pretty Favvare' (P), six resistant progenies (1-6) and seven susceptible progenies (7-13).

M1: molecular size marker ( $\lambda$  DNA/EcoT14 I  $\cdot$  Bgl II).

M2: molecular size marker (100 bp DNA ladder)

A: Arrow indicates RAPD marker, WA1-1800.

B: Arrow indicates RAPD marker, WB65-670.

## 第2項 抵抗性にリンクしたDNAマーカーの連鎖解析

### 1. 材料および方法

見いだされた8個のマーカー間での連鎖関係を明らかにするため、分離集団におけるRAPDマーカーのバンドパターンデータを用いて、DNA多型連鎖解析用コンピュータプログラムMAPMAKER/EXP 3.0 b (Landerら, 1987) によって解析を行った。連鎖解析における地図関数にはKosambi関数 (Kosambi, 1944) を用いた。

### 2. 結果および考察

MAPMAKER/EXPを用いた連鎖解析の結果、8個のRAPDマーカーは6個のマーカー (WB2-1450、WB67-1050、WA1-1800、WB26-620、WB65-670、WB62-1200)

からなる全長62.1cMの連鎖群と2個のマーカー (WA85-700、WA69-2340) からなる全長27.0cMの2連鎖群に分けられた (Fig. 6)。したがって、萎ちょう細菌病抵抗性には少なくとも2つの遺伝子座が関与していることがわかった。

これらの連鎖群に座乗するマーカーのうち、WA85-700とWB65-670はそれぞれの連鎖群でマーカーバンドの有無による発病率の差が最も大きく (Table 17)、抵抗性遺伝子に密接に連鎖していると考えられた。WA85-700とWB65-670の有無により分けた集団の発病率別の分布をFig. 7に示した。両マーカーとも、抵抗性の部分 (発病率: 0~20%) ではマーカーバンドが存在する系統の頻度が高く、逆に感受性の部分 (発病率: 90~100%) ではマーカーバンドがない系統の頻度が高かった。

WA85-700またはWB65-670を単独の指標とした選抜を考えると、抵抗性程度が強い9系統はほとんどもれな

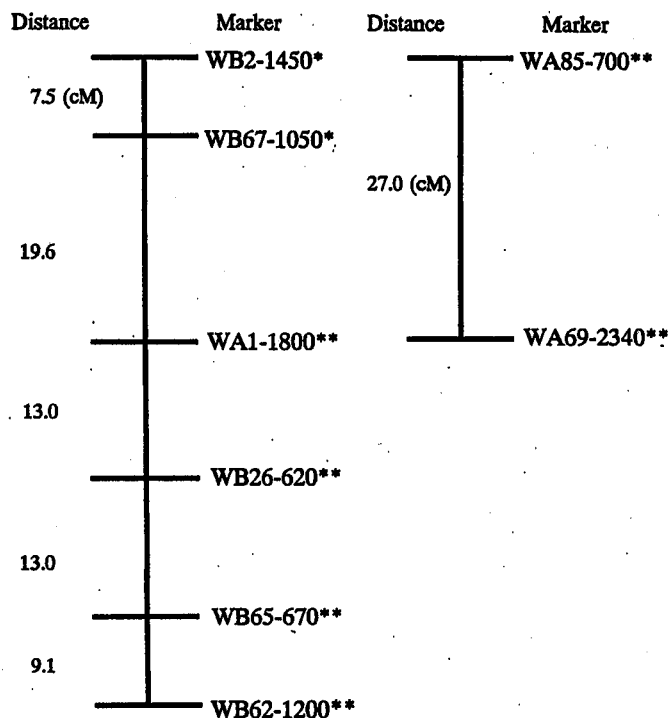


Fig. 6. A linkage map of RAPD markers for resistance to bacterial wilt.

Map distances (cM) between markers were computed by the MAPMAKER/EXP 3.0 b (Lander et al., 1987).

This figure was established from 134 lines derived from crossing of 'Pretty Favvare' and 'Nou No. 1'.

\*, \*\*: Significant at 5% and 1% levels, respectively.

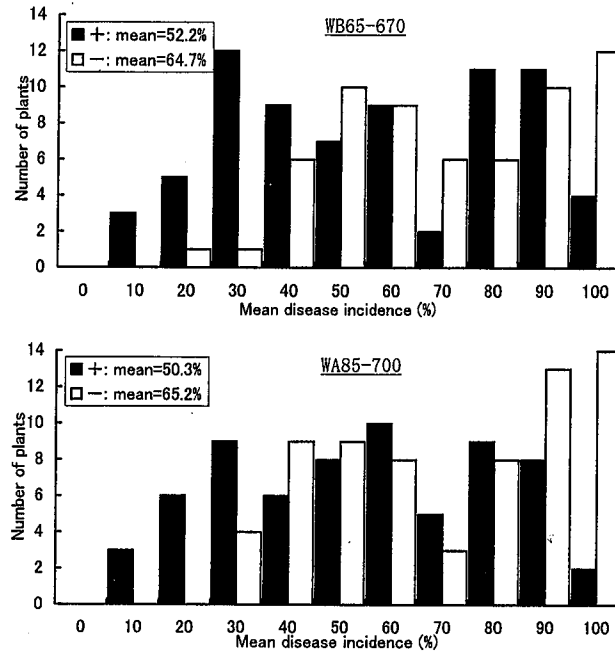


Fig. 7. Frequency distribution of mean disease incidence in the groups of lines in terms of RAPD patterns.

く選抜できるが、抵抗性程度が極弱の54系統ではWA85-700では19系統（極弱の35%）、WB65-670では26系統（極弱の48%）を誤って選抜してしまうことになる（Table 18）。そこで、2つのマーカーバンド、WA85-700とWB65-670の組み合わせによる発病率の分離を調べ、Table 19に示した。WA85-700とWB65-670の両方を持つ系統は44系統（全体の32.8%）、両方とも持たない系統は39系統（全体の29.1%）存在し、系統群の平均発病率はそれぞれ45.7%、67.6%と大きな違いがみられた。WA85-700とWB65-670の両方を持つ系統群中に発病率20%以下の抵抗性の9系統中8系統が含まれていた。抵抗性程度が極弱の54系統ではWA85-700とWB65-670の両方を持つ系統は11系統（極弱の20%）に減少した。したがって、これら2つのRAPDマーカーの組み合わせを

基準に選抜を行うことは、抵抗性の選抜効率を高める上で有用である。

本研究では、120種類のランダムプライマーを用いてスクリーニングを行った。2連鎖群ともマーカー間の平均距離が大きいため、さらに多くのプライマーを供試して抵抗性遺伝子座により強く連鎖したRAPDマーカーを検索する必要がある。また、今回明らかになったWA85-700、WB65-670が連鎖する2つの抵抗性遺伝子座以外にも抵抗性に関与する遺伝子座が存在する可能性がある。抵抗性遺伝子の連鎖地図上の正確な位置や複数の抵抗性遺伝子座を明らかにするためには、高密度の連鎖地図を作製し、コンピュータプログラムMAPMAKER/QTLを用いてQTL（Quantitative Trait Loci）の検出を行う必要がある。

Table 18. Number of lines with RAPD markers in each disease index class.

Disease index class	Total number of lines	Number of lines with		
		WB65-670	WA85-700	both 2 markers
1 (70 < ~ ≤ 100% wilted)	54	26 (48%) <sup>2</sup>	19 (35%)	11 (20%)
2 (40 < ~ ≤ 70% wilted)	43	18 (42%)	23 (54%)	11 (26%)
3 (20 < ~ ≤ 40% wilted)	28	21 (75%)	15 (54%)	14 (50%)
4 (0 < ~ ≤ 20% wilted)	9	8 (89%)	9 (100%)	8 (89%)
Total	134	73 (55%)	66 (49%)	44 (33%)

<sup>2</sup>(Number of lines with RAPD marker)/(Total number of lines) × 100.

Table 19. Segregation of the presence or absence of the WA85-700 and WB65-670 DNA band in each disease index class.

Disease index class	Total number of lines	Segregation of two markers			
		++	+-	-+	--
1 (70<~≤100% wilted)	54	11	8	15	20
2 (40<~≤ 70% wilted)	43	11	12	7	13
3 (20<~≤ 40% wilted)	28	14	1	7	6
4 ( 0<~≤ 20% wilted)	9	8	1	0	0
Total	134	44	22	29	39
Mean disease incidence (%)	57.9	45.7	59.6	62.1	67.6

++ : Both WA85-700 and WB65-670 are presence.

+- : WA85-700 is presence and WB65-670 is absence.

-+ : WA85-700 is absence and WB65-670 is presence.

-- : Both WA85-700 and WB65-670 are absence.

## 第6節 摘要

カーネーション萎ちょう細菌病抵抗性育種を効率的に進めるため、浸根接種による抵抗性簡易検定法を検討した。抵抗性遺伝子源のスクリーニングには、 $10^7$  CFU/mlの菌濃度が適切であることを示した。

栽培品種277品種の抵抗性を調査した結果、抵抗性に大きな品種間差異が認められた。抵抗性品種は3品種存在したが、抵抗性育種素材としては不適當であった。さらに、野生種70種類の抵抗性を調査した結果、野生種においても全く無病徴のものから100%発病するものまで幅広い抵抗性の種間差が認められた。*D. capitatus*、*D. henteri*は最も抵抗性が強く、抵抗性育種素材として有望と考えられた。

強抵抗性野生種とカーネーションとの種間交雑を行い、得られた種間雑種系統を接種試験に供して、野生種の持つ抵抗性のカーネーションへの導入に関する検討を行った。野生種とカーネーションとの交雑親和性は低かったが、得られた種間雑種系統のカーネーションへの戻し交雑では容易に栽培品種と交雑し、交雑親和性は向上した。

カーネーション×*D. capitatus*の種間雑種系統の中から、強度の萎ちょう細菌病抵抗性を有し、かつ草姿・形態、生産性等の形質の優れる系統91B04-2を選抜した。

本系統が有する強度な抵抗性が後代に遺伝することを確認したので、'カーネーション農1号'として品種登録した。'カーネーション農1号'は低温要求性がなく、四季咲き性を示した。定植後約3か月で開花する極早生で、茎長は81.0cm、花卉数は18.0枚の八重、花色は鮮赤紫色である。草姿・形態や花色に野生種の性質が残っており、なお改良の余地が残るが、育種素材としては実用品種の育成に利用できる。

抵抗性育種の効率化を図るため、抵抗性遺伝子のRAPDマーカー作出を試みた。8個のRAPDマーカー(WB2-1450、WB67-1050、WA1-1800、WB26-620、WB65-670、WB62-1200、WA85-700、WA69-2340)の有無による平均発病率に、いずれも有意差が認められた。これらのRAPDマーカーは6個のマーカーからなる全長62.1cMの連鎖群と2個のマーカーからなる全長27.0cMの2連鎖群に分けられた。したがって、萎ちょう細菌病抵抗性には少なくとも2つの遺伝子座が関与することがわかった。WA85-700とWB65-670は、2連鎖群の抵抗性遺伝子それぞれに最も密接に連鎖していると考えられた。WA85-700とWB65-670の両方を持つ系統は44系統(全体の32.8%)、両方とも持たない系統は39系統(全体の29.1%)存在し、系統群の平均発病率はそれぞれ45.7%、67.6%と大きな違いがみられた。これら2つのRAPDマーカーの組み合わせを基準に選抜を行うことは、抵抗性の選抜効率を高める上で有用である。

## 第2章 $\alpha$ -アミノイソ酪酸 (AIB) による切り花カーネーションの品質保持

切り花の薬剤による品質保持については、これまで多くの研究が行われてきた。チオ硫酸銀錯塩（以後STSと略す）は、多くの花きに対して品質保持効果が高く、処理方法も簡単で、安価であるため、現在最も広く用いられている。しかし、STSは重金属の銀を含み、近年は廃液による環境汚染の点からその使用が問題視される傾向にある。本章では、カーネーション切り花を材料に、成分に重金属を含まない薬剤の品質保持に及ぼす効果を検討した。第1節で、5種類の薬剤を供試した実験から $\alpha$ -アミノイソ酪酸（以後AIBと略す）を選び出した。第2節、第3節において、AIBがカーネーション切り花の花持ちに及ぼす影響について、実用的な視点から研究を行った。第4節ではAIBへの硝酸カルシウムの添加効果について検証した。

### 第1節 重金属を含まない品質保持剤の検討

切り花の種類の中には、エチレン処理により花卉のしおれや落花が促進されるエチレン感受性の花きと、促進されないエチレン非感受性の花きが存在する (Woltering・Van Doorn, 1988)。カーネーションはエチレン感受性型の代表的な花きであり、エチレンはカーネーション切り花の老化に深く関与している。ほとんどの品種では、花卉の老化が始まるときにエチレン生成量の急激な上昇（クライマクテリックライズ）が起こり、これに伴って花卉にインローリング（花卉の内側への巻き込み）、萎ちょうが生じ、観賞価値を失う。カーネーションのようなエチレン感受性型花きの品質保持に特に効果が高いのは、エチレン生合成阻害剤またはエチレン作用阻害剤である。エチレンは、メチオニンからS-アデノシルメチオニン (SAM)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸（以後ACCと略す）を経て生合成される (Fig. 8)。その生成を支配する重要な酵素がACC合成酵素とACC酸化酵素である。エチレン生合成阻害剤の大部分は、このACC合成酵素またはACC酸化酵素を阻害する作用を持つ。代表的な薬剤として、ACC合成酵素阻害剤のアミノオキシ酢酸 (AOA)、アミノエトキシビニルグリシン (AVG) があり、そのエチレン生合成阻害作用によりカーネーションの品質保持に効果があることが報告されている (Bakerら, 1977; Fujinoら, 1980)。AOA

はオランダで品質保持剤として実用化されたが、AVGは非常に高価なため品質保持剤としては商品化されていない。一方、STSはエチレン作用阻害剤の代表例である。STSがエチレンの受容体に結合して受容体とエチレンの結合を妨げるので、エチレンの自己触媒的生成が抑制されて作用を示す (Veen, 1983)。

エチレン阻害剤以外にも、糖、抗菌剤、界面活性剤など切り花の品質保持に効果を及ぼす物質がある。糖は、切り花の開花に必要なエネルギー源になり、花卉の伸長促進や花色を濃色に保つ効果があり、さらに数種の花きではエチレン生成を抑制する作用がある (市村, 2000)。抗菌剤は、生け水中の細菌の増殖を抑制し、導管閉塞による切り花の水あげ低下を抑える。バラのように細菌に感受性の高い花きでは抗菌剤の効果が高い。界面活性剤は、品質保持剤を含む生け水の吸収をよくするために用いられる補助的な薬剤である。この他、植物生長調節剤やリポキシゲナーゼ阻害剤などの切り花に対する品質保持効果が報告されている。

本節では、花の老化やエチレンに関する多くの基礎的研究報告を調査し、重金属を含まず安全性が高いと考えられ、かつ抗エチレン作用を有する試薬、またはその他の作用により切り花の老化遅延に効果を及ぼす試薬の品質保持効果をカーネーション切り花を使って調査した。第1項ではエチレン阻害剤として、AIB、サリチル酸、硝酸カルシウムとタンニン、キレートカルシウム、第2項ではリポキシゲナーゼ阻害剤の効果を調査した。

### 第1項 エチレン阻害剤の品質保持効果

AIBは、エチレンの前駆物質ACCの類似体であり (Fig. 9)、 $\alpha$ 炭素にアミノ基、カルボキシル基を持つ $\alpha$ -アミノ酸の一種である。タンパク質を構成するアミノ酸ではないので、タンパク質に対する物質代謝活性がないという特徴があり、植物や動物細胞におけるアミノ酸の吸収、代謝の研究によく用いられてきた (Talbert・Camper, 1983; Wolswinkelら, 1983; Liuら, 1984; Saftner・Baker, 1987)。AIBがエチレンの生合成阻害作用を持つことは、2つのグループがほぼ同時期に独立して発見した。Satoh・Esashi (1980) は、D型とL型アラニンを用い、アラニンの光学異性の違いがオナモミ種子の子葉切片におけるエチレン生成に及ぼす影響を調査していた。アラニンに非常に構造が類似しているAIBを供試して同様の実験を行ったところ、偶然にAIBが顕著にエチレン生成を阻害することを見いだした。また、

Apelbaumら (1981) は、リンゴの果実切片を使った実験で、AIBはエチレン生成を阻害する作用を持つことを報告している。エンドウの黄化上胚軸 (Sato・Esashi, 1980)、トマト果実の果皮組織切片 (Edwardsら, 1983)、リョクトウの胚軸切片 (Liuら, 1984)、二条大麦のカルス (Katohら, 1987) など様々な植物組織でエチレン生成を阻害することが明らかになった。AIBは基礎的な植物生理学分野でのエチレン生成阻害の研究には多く用いられたが、そのエチレン生成阻害作用発見から約10年間、花きの品質保持分野の研究者の目にはとまらなかった。

Serranoら (1990) は、AIBのエチレン生成阻害作用に注目し、AIBがカーネーションの老化遅延に有効であることを示し、切り花の品質保持剤としての利用の道を開いた。AIBによるエチレン生成阻害の作用機作については、ACC酸化酵素を競合的に阻害するためとされている (Sato・Esashi, 1980; Serranoら, 1990)。

サリチル酸 (以後SAと略す) は、セイヨウナシの細胞懸濁液培養において、ACC酸化酵素を非競合阻害する作用を持つことが報告されている (Leslie・Romani, 1986, 1988)。リンゴ果実およびリョクトウの胚軸切片

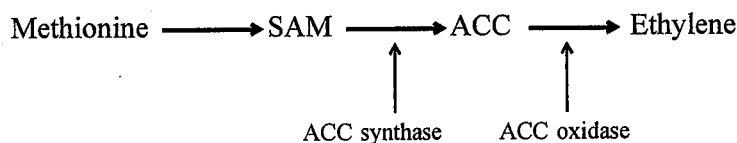


Fig. 8. Biosynthetic pathway of ethylene.

Abbreviations: SAM, S-adenosyl methionine;  
ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid.

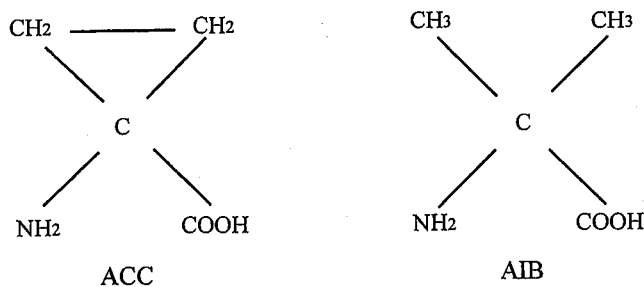


Fig. 9. Chemical structures of ACC and AIB.

Abbreviations: ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid;  
AIB,  $\alpha$ -aminoisobutyric acid.

Table 20. Criteria for scoring freshness according to the stage of senescence.

Score	Stage of senescence
5	normal fresh flowers
4	slightly discoloring and in-rolling at petal tips
3	in-rolling began but ornamentally enjoyable
2	clear wilting and in-rolling
1	completely wilted
0	dead (petals browning)



(Romaniら, 1989)、ウメ、トマト、キュウリの果実 (高ら, 1992)、イネの葉切片 (Huangら, 1993) でも、SA処理によりエチレン生成が顕著に抑制されたという報告がある。

硝酸カルシウムとタンニンの組み合わせ処理がカーネーションの花持ちに及ぼす影響を調査した報告がある (Michalczukら, 1989)。硝酸カルシウムとタンニンはそれぞれ単独では効果がないが、硝酸カルシウム0.5g/lにタンニン20mg/lを組み合わせた処理液で花持ちが顕著に延長した。併用処理によりエチレン生成量が低下し、生成のピークも2日遅れて現れた。タンニンは植物の膨圧に影響を及ぼし、呼吸過程での炭水化物の供給を制御し、タンニンと結合したカルシウムは組織内で流動性を増すといわれているが、併用処理がエチレン生成や花持ちに影響を及ぼすメカニズムについては明らかでない。

田中ら (1991) は、キレートカルシウム剤によるニホンナシ果実の貯蔵性向上効果を調査したところ、キレートカルシウム剤には貯蔵中の果実および果実切片のACC酸化酵素活性を抑制し、エチレン生成量を低下させる効果があることを報告している。

以上挙げた、抗エチレン作用のあるAIB、SA、硝酸カルシウムとタンニン、キレートカルシウムをカーネーション切り花の品質保持剤として使用し、花持ちの延長効果について検討した。

## 1. 材料および方法

‘ソアナ’、‘フランセスコ’の2品種を供試した。野菜茶試のガラス温室内ベッドで慣行法により栽培した株から、外花卉が水平状態の開花ステージで切り花を採花し、実験に供した。切り花を茎長50cmに切り揃えた後、基部2節の着生葉を取り除いた。

SA連続処理の実験は、蒸留水 (対照区)、SA 1mM、5mM、10mMの4処理区で行った。SA前処理は、5mMの濃度で0.5、1、2、6、18、24時間の6処理区で行い、さらに、対照区、AIB30mM 18時間処理区を設けた。連続処理では、各処理液1000ml入りの花瓶に切り花を挿した。前処理では、切り花に所定の時間前処理を行った後、切り花の切り口を水道水でよく洗浄し、蒸留水1000ml入りの花瓶に移した。

硝酸カルシウムとタンニンの組み合わせ処理については、2回の実験を行った。タンニンとしてはタンニン酸を用いた。実験1では、硝酸カルシウム0.5g/l (2.12mM) + タンニン酸20mg/l、実験2では硝酸カルシ

ウム2.5mM (0.59g/l) + タンニン酸40mg/lの組み合わせ処理液と、対照区、AIB20mM区との花持ち性を比較した。

キレートカルシウム剤の実験については、キレートカルシウム剤には、Ca-EDTA (エチレンジアミン4酢酸カルシウム2ナトリウム:  $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_2Ca \cdot 2H_2O$ ) を用いた。蒸留水 (対照区)、AIB20mM液、Ca-EDTA 1mM、2.5mM、5mM、10mM液各1000ml入りの花瓶に切り花を挿した。

各実験における切り花の供試本数は、Table 21、22、23、24、25の脚注に記載した。

切り花を挿した花瓶は室温条件下の実験室内に置いた。個々の切り花は、正常な花を5、花卉先端部にわずかに変色・インローリング (花卉の内側への巻き込み) のみられる花を4、インローリングが始まっているが観賞に耐える花を3、萎ちょう・インローリングの明らかな花を2、萎ちょうの進んだ花を1、枯死を0とする鮮度の評点 (Table 20) で毎日評価した。花持ち性は、花持ち日数として収穫日から鮮度の評点が3未満に達した日までの日数の平均値で示した。障害発生の有無についても観察し、障害発生の際には、その様相を調査した。

## 2. 結果および考察

SAの連続処理の結果をTable 21に示した。SAを5mM以上の濃度で使用すると切り花の茎葉に激しい薬害が発生した。処理後4~5日目に茎葉に脱水症状が現れ、6日目には5mM区では半数、10mM区では全個体に花茎の折れ曲がりが生じ、観賞価値が失われた。1mM区では、‘ソアナ’の1本のみで葉に軽い脱水症状が生じたが、観賞価値を低下させるほどではなかった。対照区と1mM区の花持ち日数を比較すると、‘ソアナ’では対照区の8.8日に対し10.6日と1.8日の有意な花持ち延長が認められた。‘フランセスコ’では有意な品質保持効果は認められなかった。

SA 5mM液による前処理の結果をTable 22に示した。処理時間が18時間以上の区では、連続処理時と同様の薬害が発生した。2時間、6時間処理ではそれぞれ9本中1本、9本中3本の葉に薬害が発生したが症状は軽度であり、花持ち日数がそれぞれ10.2日、10.7日と、対照区に比べ3日程度の有意な花持ち延長効果が認められた。薬害の全く発生しない30分、1時間処理区では、有意な品質保持効果は認められなかった。一方、AIB前処理区では対照区に比べ5.4日の有意な花持ち延長が認められ、

Table 21. Effect of salicylic acid (SA) on the vase life of 'Soana' and 'Francesco' flowers.

Treatment	Vase life (days)	
	Soana	Francesco
Control (H <sub>2</sub> O)	8.8 ± 0.3 <sup>z</sup>	11.6 ± 1.4 <sup>y</sup>
SA 1 mM	10.6 ± 0.3 <sup>x</sup> **	12.3 ± 0.3 n.s.
SA 5 mM	Injury to leaves and stems	Injury to leaves and stems
SA 10 mM	Injury to leaves and stems	Injury to leaves and stems

<sup>z</sup> Values are means of 8 replications ± S.E. <sup>y</sup> Values are means of 4 replications ± S.E.

Significance shown of difference against control by *t*-test. \*\*: 1% level, n.s.: not significant.

<sup>x</sup> One out of 8 suffered slight injury to leaves.

Experimental period and average room temperature: February 10 ~ February 26, 1992. 19.2 °C

Table 22. Effect of time of 5mM salicylic acid (SA) pretreatment on the vase life of 'Soana' flowers.

Pretreatment	Vase life (days)
Control (H <sub>2</sub> O)	7.4 ± 0.5 a
SA 5 mM 0.5 hr	8.5 ± 0.2 a
SA 5 mM 1 hr	8.4 ± 0.3 a
SA 5 mM 2 hr	10.2 ± 0.4 <sup>z</sup> b
SA 5 mM 6 hr	10.7 ± 0.4 <sup>y</sup> b
SA 5 mM 18 hr	Injury to leaves and stems
SA 5 mM 24 hr	Injury to leaves and stems
AIB 30mM 18 hr	12.8 ± 0.5 c

Values are means of 9 replications ± S.E.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

<sup>z</sup> One out of 9 suffered slight injury to leaves.

<sup>y</sup> Three out of 9 suffered slight injury to leaves.

Experimental period and average room temperature: February 24 ~ March 9, 1992. 21.2 °C

さらに、すべてのSA前処理区に対しても有意な差が認められた。

硝酸カルシウムとタンニン酸の組み合わせ処理の結果を Table 23、24に示した。硝酸カルシウム0.5g/l (2.12mM) + タンニン酸20mg/l区では、'ソアナ'、'フランセスコ'とも有意な品質保持効果が認められなかった (Table 23)。タンニン酸の濃度をMichalczukら (1989) による報告の倍の40mg/lにして同様の実験を行った結果、硝酸カルシウム2.5mM (0.59g/l) + タンニン酸40mg/l区の花持ち日数は、'ソアナ'では対照区の

7.0日に対して10.4日と3.4日の有意な花持ち延長効果が認められた。'フランセスコ'では対照区の8.5日に対して10.1日と1.6日花持ち日数が延長した (Table 24)が、この花持ち延長効果は有意ではなかった。一方、AIB20mM区では、2品種での2回の実験すべてで対照区に比べ有意に花持ちが延長した。

キレートカルシウムによる連続処理の結果を Table 25に示した。Ca-EDTA濃度が5mM区では切り花の花弁先端、10mM区では花弁全体が黄色を帯びる葉害が発生した。Ca-EDTA各処理区の対照区に対する有意な花持ち

Table 23. Effect of calcium nitrate and tannic acid combinations on the vase life of 'Soana' and 'Francesco' flowers. (Expt. 1)

Treatment	Vase life (days)	
	Soana	Francesco
Control (H <sub>2</sub> O)	8.6 ± 0.4 <sup>z</sup> a	10.4 ± 0.2 <sup>y</sup> a
Calcium nitrate 0.5g/l (2.12mM)+ Tannic acid 20 mg/l	8.7 ± 0.7 a	12.0 ± 1.0 a
AIB 20 mM	14.4 ± 1.2 b	17.3 ± 1.8 b

<sup>z</sup> Values are means of 6 replications ± S.E. <sup>y</sup> Values are means of 3 replications ± S.E.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Experimental period and average room temperature: March 9 ~ March 27, 1992. 21.3 °C

Table 24. Effect of calcium nitrate and tannic acid combinations on the vase life of 'Soana' and 'Francesco' flowers. (Expt. 2)

Treatment	Vase life (days)	
	Soana	Francesco
Control (H <sub>2</sub> O)	7.0 ± 1.0 <sup>z</sup> a	8.5 ± 0.7 <sup>y</sup> a
Calcium nitrate 2.5mM (0.59g/l)+ Tannic acid 40 mg/l	10.4 ± 0.2 b	10.1 ± 0.7 ab
AIB 20 mM	11.2 ± 0.4 b	12.1 ± 0.9 b

<sup>z</sup> Values are means of 4 replications ± S.E. <sup>y</sup> Values are means of 5 replications ± S.E.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Experimental period and average room temperature: June 8 ~ June 23, 1992. 20.0 °C

延長効果は認められなかった。一方、AIB20mM区では、対照区に比べ5.1日の有意な花持ち延長が認められた。

## 第2項 リポキシゲナーゼ阻害剤の品質保持効果

リポキシゲナーゼはcis,cis-1,4-ペンタジエン構造を有する不飽和脂肪酸の酸化を触媒する酵素であり(河村・山本, 1982)、リポキシゲナーゼにより膜構造におけるリン脂質が過酸化され膜機能が損なわれる。リポキシゲナーゼの作用により生成する過酸化脂質のレベルは老化や生体膜の透過性の増大と相関があることから、リポキシゲナーゼは植物の老化や障害に対する反応に関与すると考えられている(Pearcy・Prince, 1990)。そこで、このリポキシゲナーゼ活性を阻害する化合物を用いて切り

花の花持ちを向上させようとした一連の研究がある。Bakerら(1985)は、カーネーション'ホワイトシム'を用い、処理液に種々のリポキシゲナーゼ阻害剤(Pyrazon, Phenidone, BW755C, MPB, Tiron)を単独またはエチレン生合成阻害剤のAOAと組み合わせて使用し、切り花の花持ちを評価した。すべてのリポキシゲナーゼ阻害剤処理区で対照区よりも有意に花持ちが向上し、中でもフェニドン(1-phenyl-3-pyrazolidone)を用いた区が最も花持ちが良かった。また、グラジオラス、カーネーションの花弁におけるリポキシゲナーゼ活性の変化を調べた基礎的研究では、リポキシゲナーゼ活性は花弁が展開していないステージでは低いレベルだが、完全に開花したステージから上昇し、老化初期のしおれが始まるステージで最大となり、その後老化が進むにつれ

て低下した (Peary・Prince, 1990)。したがって、花卉の老化にはリボキシゲナーゼが関与している可能性があるとした。カーネーション花卉老化中のリボキシゲナーゼ活性の変化については、別の研究グループによる実験でも同様の結果が得られている (Rouet-Mayerら, 1992)。一方で、リボキシゲナーゼ阻害剤の品質保持剤としての利用に否定的な報告もある。Peary・Prince (1989) は、バラ、グラジオラス、カーネーションを供試し、リボキシゲナーゼ阻害剤で切り花を処理し、花持ちを調べたが、リボキシゲナーゼ阻害剤による花持ちの改善はわずかであり、商業的な利用価値については疑問であるとした。また、Princeら (1987) もテッポウユリを用いた試験で同様の結果を示している。このようにリボキシゲナーゼ阻害剤については研究者間で相反する報告が出されており、その利用の可能性については不明確である。そこで、Bakerら (1985) の試験で最も品質保持効果が高かったフェニドンをカーネーション切り花に連続処理し、花持ちを調べた。

## 1. 材料および方法

‘タンガ’、‘ソアナ’の2品種を供試した。1991年5月30日に切り花を収穫し、莖長を50cmに切り揃えた後、基部2節の着生葉を取り除いた。蒸留水 (対照区)、フェニドン0.1mM、1 mM液、各800mlを入れた花瓶に切り花を5本ずつ挿した。切り花を挿した花瓶は室温条件下の実験室内に置き、前項と同様の方法で花持ち日数を調査した。

## 2. 結果および考察

結果をTable 26に示した。‘タンガ’、‘ソアナ’の2品種とも、フェニドン0.1mM、1mMでの連続処理では対照区とほぼ同じ花持ち日数を示し、有意な花持ち延長効果は認められず、Peary・Prince (1989) と同様の結論に達した。前述したPeary・Prince (1990) とRouet-

Table 25. Effect of Ca-EDTA treatment on the vase life of ‘Soana’ flowers.

Treatment	Vase life (days)
Control (H <sub>2</sub> O)	8.9 ± 0.6 a
Ca-EDTA 1 mM	9.8 ± 0.4 a
Ca-EDTA 2.5 mM	10.7 ± 0.5 a
Ca-EDTA 5 mM	10.7 ± 0.8 <sup>2</sup> a
Ca-EDTA 10 mM	Injury to petals
AIB 20 mM	14.0 ± 0.7 b

Values are means of 10 replications ± S.E.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

<sup>2</sup> Slight injury to petal tips occurred on the 7th days after harvest.

Experimental period and average room temperature: May 1 ~ May 18, 1992. 19.9 °C

Table 26. Effect of phenidone on the vase life of ‘Tanga’ and ‘Soana’ flowers.

Treatment	Vase life (days)	
	Tanga	Soana
Control (H <sub>2</sub> O)	5.2 ± 0.6 a	6.1 ± 0.2 a
Phenidone 0.1 mM	5.3 ± 0.3 a	6.1 ± 0.2 a
Phenidone 1 mM	5.5 ± 0.5 a	5.6 ± 0.5 a

Values are means of 5 replications ± S.E.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Experimental period and average room temperature: May 30 ~ June 12, 1991. 21.3 °C

Mayerら (1992) の報告の結果から、カーネーション花弁の老化にリポキシゲナーゼが関与していることは事実と思われるが、エチレンに比べその影響は小さいと考えられる。

以上検討した結果、SAの連続処理、前処理、硝酸カルシウム+タンニン酸の連続処理は、対照区に対し有意な効果が認められた品種や処理区があったが、STSに替わる品質保持剤とするには効果が不十分と判断した。キレートカルシウム、フェニドンの対照区に対する有意な花持ち延長効果は認められなかった。一方、AIBは実施したすべての実験で対照区に対し有意な品質保持効果を示し (Table 22、23、24、25)、カーネーションの品質保持剤として高い効果があることがわかった。そこで、AIBの後処理剤 (流通・消費段階での連続処理)、前処理剤 (収穫後生産者が出荷前に行う短時間処理) としての処理法について、第2節、第3節で詳細に検討することとした。

## 第2節 AIB連続処理がカーネーションの花持ちに及ぼす影響

第1節において、AIBがカーネーションの品質保持剤として高い効果のあることを明らかにした。本節では実際の使用場面を想定して茎長50cmの切り花を用いて、

AIB連続処理がカーネーションの花持ちに及ぼす影響を調べた。

### 第1項 AIB連続処理による品質保持効果

#### 1. 材料および方法

‘ソアナ’、‘タンガ’、‘パラス’の3品種を供試した。野菜茶試のガラス温室内ベッドで慣行法により栽培した株から、外花弁が水平状態の開花ステージで切り花を採花し、実験に供した。‘ソアナ’は1991年1月28日、‘タンガ’は同年4月13日、‘パラス’は同年5月2日に切り花を収穫し、茎長を50cmの長さに切り揃えた後、基部2節の着生葉を取り除いた。

STSは、0.5mM液、AIBは、10mM、20mM、30mM、40mMの4段階の濃度液について検討した。前処理と連続処理の組み合わせにより、Table 27に示した8試験区を設定した。前処理にはSTS0.5mM液を用い、採取した切り花に2時間切り口から吸わせて処理した。なお、STSの前処理は、カーネーション1本当たりAgを0.5 $\mu$ mol吸収させたときに花持ちが最も延長され、障害が生じないと報告されている (宇田ら, 1986) ことから、0.5mMで2時間とした。‘ソアナ’を用いて上記処理に

Table 27. Effect of treatments of AIB and STS on the prolongation of the vase life of ‘Soana’, ‘Tanga’ and ‘Pallas’ flowers.

Treatment		Vase life (days $\pm$ S.E.)		
Pretreatment	Vase solution	Soana	Tanga	Pallas
	Distilled water	6.5 $\pm$ 0.5 a	5.3 $\pm$ 0.3 a	6.0 $\pm$ 1.1 a
	AIB 10 mM	8.2 $\pm$ 0.6 ab	7.3 $\pm$ 0.9 ab	8.9 $\pm$ 1.1 ab
	AIB 20 mM	12.8 $\pm$ 0.7 c	9.3 $\pm$ 1.3 b	11.8 $\pm$ 1.9 b
	AIB 30 mM	n.t.	n.t.	9.0 $\pm$ 2.2 ab
	AIB 40 mM	n.t.	8.7 $\pm$ 1.5 ab	n.t.
STS 0.5 mM 2 hours	Distilled water	12.8 $\pm$ 1.5 c	10.2 $\pm$ 1.3 b	n.t.
STS 0.5 mM 2 hours	AIB 10 mM	9.9 $\pm$ 0.8 b	n.t.	n.t.
STS 0.5 mM 2 hours	AIB 20 mM	13.0 $\pm$ 0.8 c	n.t.	n.t.

n.t.: not tested.

STS 0.5mM solution was prepared with the stock solution of AgNO<sub>3</sub>(0.1M) and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.1M) at the molar ratio of 1 silver to 4 thiosulfate.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Experimental period, average room temperature and number of flowers tested per plot.

Soana: January 28 ~ February 15, 1991. 22.4 °C, n=10.

Tanga: April 13 ~ April 30, 1991. 22.5 °C, n=6.

Pallas: May 2 ~ May 20, 1991. 23.4 °C, n=6.

よるAg吸収量を処理前後のSTS溶液吸収量を基に計算したところ、Ag吸収量は平均 $0.53 \mu\text{mol}$ であった。切り花は、前処理終了後、流水で切り口をよく洗浄し、所定濃度のAIB液または蒸留水800ml入りの花瓶に移した。

各試験区に‘ソアナ’は10本、‘タンガ’、‘パラス’は各6本の切り花を供試した。花瓶は室温条件下の実験室内に置き、個々の花の鮮度を毎日調査した。鮮度の評点は、Table 20に従って判定した。花持ち日数は、収穫日から鮮度の評点が3未満に達した日までの日数の平均値で示した。

## 2. 結果および考察

AIB20mMの連続処理はカーネーション切り花の品質保持に顕著な効果を示し (Fig. 10)、対照区に対し有意に花持ち日数が延長した (Table 27)。<sup>1</sup> ‘ソアナ’ではAIB20mMで連続処理した場合の花持ち日数は、対照区の6.5日、STS処理区の12.8日に対して12.8日となり、無処理の約2倍、STS処理と同等に延長した。これを調査期間前半の7日目時点で比較すると、鮮度の評点の平均

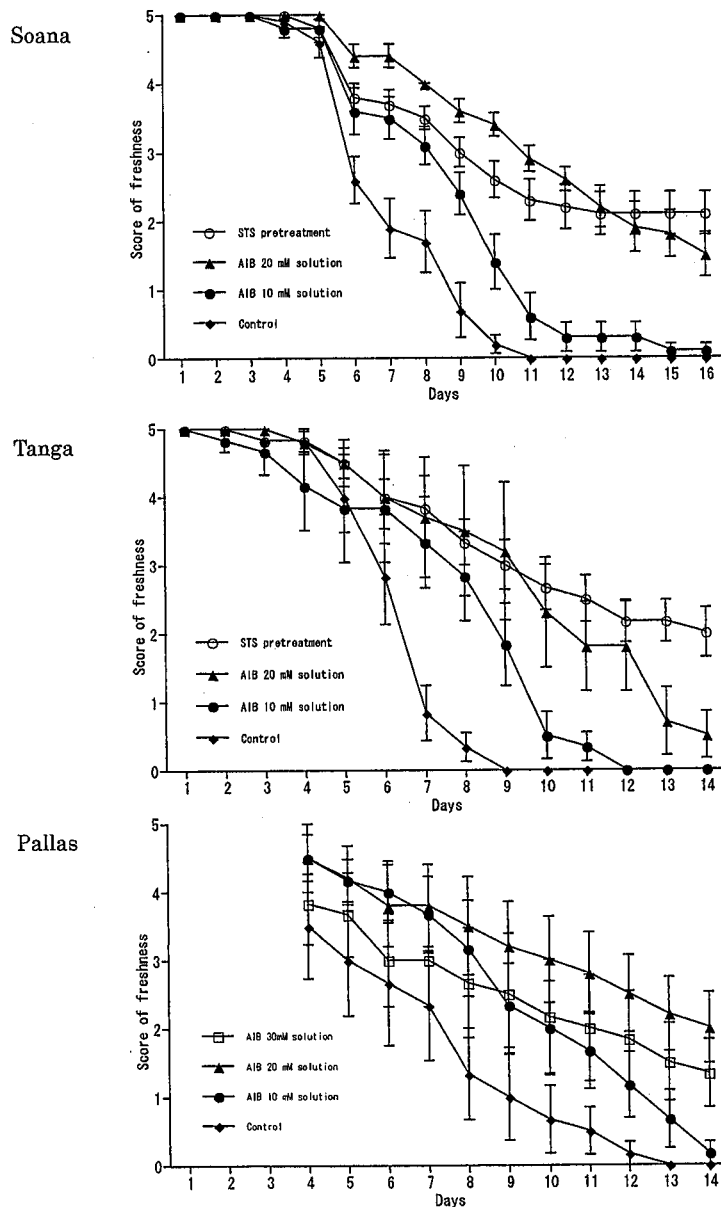


Fig. 10. Effect of AIB continuous treatment on the flower freshness of 'Soana', 'Tanga' and 'Pallas'.

Flower freshness of each flower was evaluated daily according to Table 20.

Vertical bars represent  $\pm$  S.E.

値は対照区では1.9と低下し、STS処理区でも3.7と老化が進行したのに対し、AIB20mM区では4.4と老化の程度が軽微であった (Fig. 10)。また、'タンガ' では、STS処理区の花持ち日数10.2日に対してAIB20mM区では9.3日であり、AIB連続処理はSTS前処理と比べると花持ち延長効果がやや劣ったが有意な差ではなかった。

'ソアナ' を用い、AIBにSTSの前処理を組み合わせたSTS+AIB10mM区では、花持ち日数がAIB単独処理のAIB10mM区に比べやや延長し、STS+AIB20mM区では単独処理のAIB20mM区とほぼ同等の花持ち効果を示した。また、両試験区で10日目以降に上位節の葉縁が若干褐変する障害が発生する個体も認められたが、観賞



Plate 9. Effect of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB) application on the prolongation of the vase life of cut carnation flowers.

- A: 11 days after treatment (Left: Control, Right: Application of 20 mM AIB solution in vase. Cv. 'Soana')
- B: 9 days after treatment (Left: Application of 20 mM AIB solution in vase, Center: Control, Right: STS pretreatment. Cv. 'Tanga')
- C: 11 days after treatment (Left: Control, Right: Pretreated with 60 mM AIB solution for 24 hours. Cv. 'Nora')

価値を低下させるほどではなかった。STS+AIB10mM区では7日目以降に花首や茎の折れ曲がり、垂れ下がりが発生する傾向があった。このように、AIBとSTSの併用処理では両者の相乗効果はさほど認められなかった。

AIBの濃度については、‘ソアナ’の10mM区では6日目から鮮度の評点が低下し始め、花持ち日数は8.2日であった。これに対し、20mM区では12.8日の花持ちを示した。‘タンガ’では、20mM区で9.3日、40mM区で8.7日と20mM以上に濃度を上げると花持ちが減少した。‘パラス’では、20mM区で花持ち日数11.8日と最大の花持ち効果があり、30mM区では9.0日と花持ち効果が減少した。したがって、連続処理するときの最適濃度は20mM程度であった。この濃度では、供試3品種で調査期間中、特に薬害らしい症状は認められなかった。

Serranoら(1990)の実験では、AIBは10mMの濃度で使用され、エチレン生成のピークが4日間遅延している。しかし、本実験においては10mMの濃度では品質保持効果は不十分であった。この不一致の理由は、Serranoらの実験では、カーネーションを茎長20cmの長さで切り、試験管内でAIB溶液の液面の $2\sim 3$ cmにがく片が位置する状態で切り花を挿しているの、本実験と比べてAIBの吸収が非常に容易であったためと思われる。なお、本実験では、実際の使用場面を想定して、茎長50cmで茎がAIB溶液に約9cm浸かる条件であった。

‘ソアナ’、‘タンガ’を用いた実験の11日目、9日目の切り花の様相を、Plate 9 A、9 Bに示した。

## 第2項 AIB連続処理とカーネーション切り花のエチレン生成量

### 1. 材料および方法

‘ホワイトシム’を供試した。収穫した切り花を茎長5cmの長さで切り、基部の着生葉を取り除いた。対照区、AIB 10mM区、AIB 20mM区の合計3試験区を設けた。各濃度の処理液を試験管に36mlずつ分注し、切り花を1本ずつ挿した。1試験区につき4本の切り花を供試した。試験管に挿した切り花は、気温22℃に制御し、蛍光灯により12時間日長で照明した恒温器内に置いた。処理後3日目から毎日、エチレン生成量を測定した。切り花の生体重を測定し、2花を容量580mlの容器に22℃で1時間密閉した後、内部ガスをシリンジで0.5ml採取し、ガスクロマトグラフィー(島津GC-7A)で定量した。

### 2. 結果および考察

各処理区におけるエチレン生成量をFig. 11に示した。対照区では4日目からエチレンの生成が始まり、花卉のインローリングの進行に伴って急激に生成量が増加し、6日目に最大値(25.6 nl/gFW/h)に達した。その後、花卉が完全に萎ちようするに従って減少した。これに対し、AIB10mM区では、エチレン生成量のピークが対照

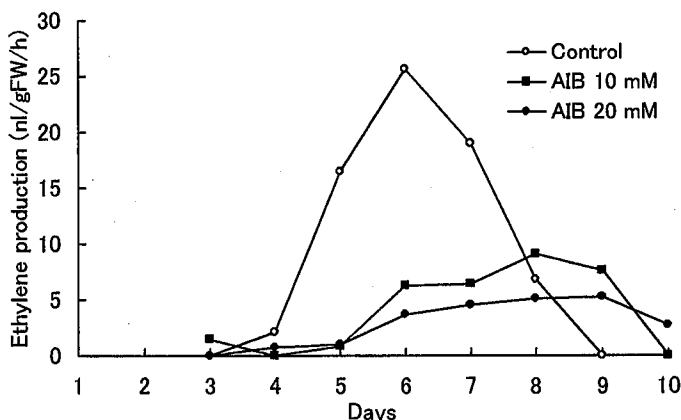


Fig. 11. Effect of AIB continuous treatment on ethylene production of ‘White Sim’ flowers. Cut flowers were held in distilled water, 10 mM or 20mM AIB solution at 22℃.



区よりも2日遅れ、また、そのエチレン生成量が対照区の3分の1程度に抑えられた。AIB20mM区では、エチレン生成量のピークが対照区よりも3日遅れ、そのエチレン生成量もAIB10mM区よりもさらに抑えられ、対照区の5分の1程度であった。AIBの連続処理によりカーネーション切り花のエチレン生成が抑制されることが明らかとなった。

### 第3節 AIB前処理がカーネーションの花持ちに及ぼす影響

AIBを前処理剤として用いた場合の品質保持効果についてはこれまで研究例がなく、明らかになっていない。そこで、茎長30、50cmの切り花を用いて、AIBの前処理による効果やその最適な処理法に関する検討を行った。

#### 1. 材料および方法

‘ノラ’、‘ホワイトシム’の2品種を供試した。収穫した切り花を、茎長30cmまたは50cmの長さに切り揃え、基部1節または2節の着生葉を取り除いた。これを所定濃度のAIB溶液 15ml入りの20mlメスシリンダーに1本

ずつ挿し、前処理終了後に液量を測定し、AIB吸収量を算出した。1試験区当たりの供試切り花数は4～5本とした。前処理終了後、切り花の切り口を流水でよく洗浄し、蒸留水入りの試験管または花瓶に移した。試験管または花瓶は室温条件下の実験室内に置き、Table 20に示した鮮度の評点で個々の切り花の鮮度を毎日評価した。花持ち日数は、収穫日から鮮度の評点が3未満に達した日までの日数の平均値で示した。

#### 2. 結果および考察

Table 28、Fig. 12に茎長30cmの切り花での実験結果を示した。AIBは、前処理剤として使用しても花持ちの延長に顕著な効果を示した。最も良い花持ちを示したのは、供試した2品種とも60mMで18時間処理した場合で、対照区に対して有意に花持ちが延長した。花持ち日数は‘ノラ’で対照区の10.1日に対して15.3日、‘ホワイトシム’で対照区の5.1日に対して9.3日であった。‘ホワイトシム’ではSTS処理区を設けてAIB処理区と比較した。STS0.5mM 2時間処理区に比べると、AIB60mM 18時間処理区の花持ち延長効果はやや劣ったが有意な差ではなかった。‘ノラ’、‘ホワイトシム’の両品種で、AIB吸収量が約200  $\mu$  molまではAIB吸収量が増加するにした

Table 28. Effect of AIB pretreatment on the vase life of ‘Nora’ and ‘White Sim’ flowers. (Stem length: 30cm)

Pretreatment	Vase life (days $\pm$ S.E.)	
	Nora	White Sim
Control (H <sub>2</sub> O)	10.1 $\pm$ 0.3 a	5.1 $\pm$ 0.4 a
AIB 30mM 2 hr	10.8 $\pm$ 0.5 a	7.3 $\pm$ 0.5 ab
AIB 30mM 6 hr	13.7 $\pm$ 0.5 bc	6.1 $\pm$ 0.7 a
AIB 30mM 18 hr	14.5 $\pm$ 0.5 bc	6.3 $\pm$ 0.5 a
AIB 30mM 24 hr	13.3 $\pm$ 0.2 b	7.4 $\pm$ 1.0 ab
AIB 60mM 2 hr	13.2 $\pm$ 0.4 b	5.6 $\pm$ 0.3 a
AIB 60mM 6 hr	13.5 $\pm$ 0.8 b	6.3 $\pm$ 0.9 a
AIB 60mM 18 hr	15.3 $\pm$ 0.8 c	9.3 $\pm$ 0.4 bc
AIB 60mM 24 hr	13.8 $\pm$ 0.2 bc	7.3 $\pm$ 0.6 ab
STS 0.5mM 2 hr	n.t.	10.6 $\pm$ 1.7 c

n.t.: not tested.

STS 0.5mM solution was prepared with the stock solution of AgNO<sub>3</sub> (0.1M) and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.1M) at the molar ratio of 1 silver to 4 thiosulfate.

Experimental period and average room temperature and number of flowers tested per plot.

Nora: April 9 ~ April 28, 1993. 17.3 °C, n=4 ~ 5.

White Sim: May 10 ~ May 24, 1993. 22.0 °C, n=4 ~ 5.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

がって花持ちが延長したが、それ以上吸収すると花持ちがかえって低下する傾向があった (Fig. 12)。最適な花持ちをもたらすAIB吸収量は180~230  $\mu$  mol/本程度であった。

実用的な見地から、茎長50cmの切り花についても同様の試験を行い、結果をTable 29、Fig 13に示した。茎長30cmの場合と同様に、AIBによる前処理は花持ちの延長に顕著な効果を示した。‘ノラ’では、60mM 24時間処理で最も花持ち日数が延長し、対照区の9.0日に対し、18.9日と対照区の約2.1倍の効果を示した。Plate 9Cに11日目の切り花の様相を示した。また、90mM区では6、18、24時間処理のいずれでも安定した効果を示し、約15日間鮮度が維持された。‘ホワイトシム’では、すべてのAIB前処理区で対照区に対し有意な品質保持効果

が認められた。60mM 18時間処理、90mM 6時間処理で最も花持ち日数が延長し、対照区の6.1日に対し、いずれも12.6日と無処理の約2.1倍に延長した (Table 29)。最適な花持ちをもたらすAIB吸収量は茎長30cmの場合より増加した (Fig. 13)。‘ノラ’ではAIB吸収量が約400  $\mu$  molで花持ちがピークに達し、最適吸収量は350~450  $\mu$  mol/本程度であった。‘ホワイトシム’では前処理剤としての最適吸収量は250~350  $\mu$  mol/本程度であった。

AIBの前処理剤としての使用にあたっては、処理する場所の室温、湿度などの条件によってAIB吸収量の変動が予想されるので、処理時のAIB吸収量を確認することが重要である。

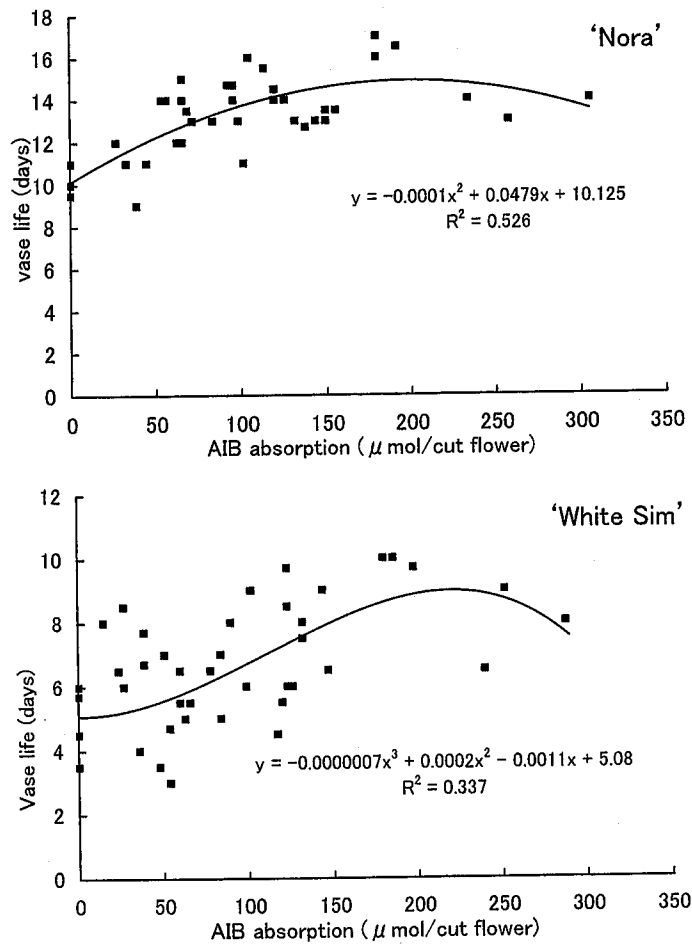


Fig. 12. Relationship between AIB absorption and flower vase life in 'Nora' and 'White Sim'. (Stem length: 30cm)

The amount of AIB absorption per cut flower was determined by measuring the amount of AIB solution absorbed.

Table 29. Effect of AIB pretreatment on the vase life of 'Nora' and 'White Sim' flowers. (Stem length: 50cm)

Pretreatment	Vase life (days ± S.E.)	
	Nora	White Sim
Control (H <sub>2</sub> O)	9.0 ± 1.6 a	6.1 ± 0.3 a
AIB 60mM 6 hr	12.6 ± 1.2 ab	9.4 ± 0.6 b
AIB 60mM 18 hr	14.7 ± 1.3 bc	12.6 ± 0.4 c
AIB 60mM 24 hr	18.9 ± 2.1 c	9.4 ± 0.6 b
AIB 90mM 6 hr	15.5 ± 0.8 bc	12.6 ± 0.4 c
AIB 90mM 18 hr	14.8 ± 1.6 bc	11.0 ± 1.7 bc
AIB 90mM 24 hr	15.3 ± 0.3 bc	11.4 ± 0.7 bc

Experimental period and average room temperature and number of flowers tested per plot.

Nora: January 20 ~ February 14, 1994. 22.4 °C, n=5.

White Sim: December 9 ~ December 26, 1993. 16.7 °C, n=4 ~ 5.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

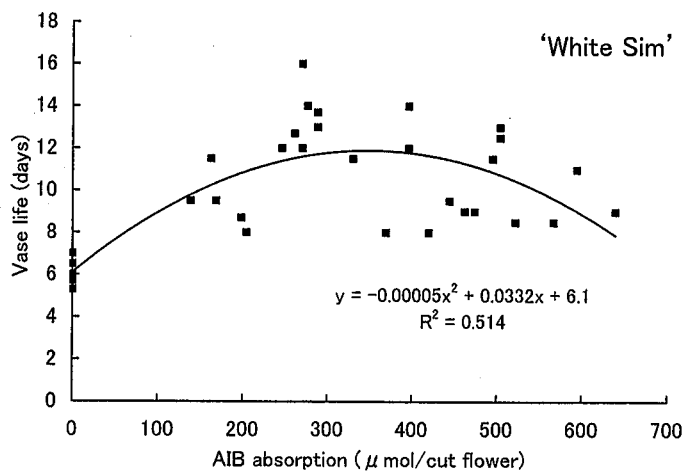
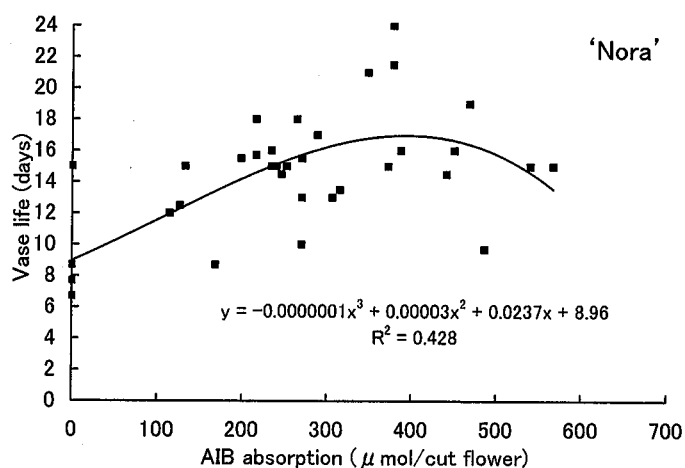


Fig. 13. Relationship between AIB absorption and flower vase life in 'Nora' and 'White Sim'. (Stem length: 50cm)

The amount of AIB absorption per cut flower was determined by measuring the amount of AIB solution absorbed.

#### 第4節 AIBへの硝酸カルシウムの添加がカーネーションの花持ちに及ぼす影響

AIBは、一般によく知られているエチレン生合成阻害剤であるAOA、AVGに比べると安価であるが、現在広く使われているSTSに比べると高価であることが問題点である。AIBが普及するためには、コストの低減が必要である。

Rickauer・Tanner (1986) は、カルシウムイオンがインゲン豆の根におけるアミノ酸の輸送と蓄積に及ぼす影響を調べ、 $Ca^{2+}$ 存在下ではAIB吸収が顕著に促進されたと報告した。また、Saftner (1989) はトマト果皮組織切片を用いた実験において、 $Ca^{2+}$ の存在により液胞へのAIB吸収が促進されたと報告している。そこで、AIBを切り花に処理する際に、カルシウムイオンを加えることにより切り花へのAIB吸収量を高めて、AIBの使用濃度を低減する可能性について検討した。

#### 第1項 AIB連続処理における硝酸カルシウムの添加効果

##### 1. 材料および方法

‘ソアナ’を供試し、2回実験を行った。野菜茶試のガラス温室室内ベッドで慣行法により栽培した株から、外花卉が水平状態の開花ステージで切り花を採花し、実験に供した。これらの莖長を50cmの長さに切り揃えた後、基部2節の着生葉を取り除いた。切り花はそれぞれ800mlの処理液の入った花瓶に挿し、室温条件下において、Table 20に示した鮮度の評点で、個々の切り花の鮮度を毎日調査した。花持ち日数は、収穫日から鮮度の評点が3未満に達した日までの日数の平均値で示した。1試験区当たりの供試切り花数は、実験1では9~10本、実験2では5本とした。実験2では、実験期間中切り花の生体重を毎日測定した。

##### 2. 結果および考察

AIB10mM液に2.5mMの硝酸カルシウムを添加すると、AIB10mM単独区、硝酸カルシウム2.5mM単独区に比較して有意に花持ち日数が増加した (Table 30)。このAIB10mMと硝酸カルシウム2.5mMの併用処理は、AIB20mMと同等の品質保持効果が認められた。AIB10mMと硝酸カルシウム2.5mMを単独で処理した場

合、対照区と比較して有意な花持ち延長効果は認められなかった。実験1の花持ち日数を比較すると、AIB10mM区では8.8日、硝酸カルシウム2.5mM区では8.6日であるのに対し、両者を併用すると14.1日とAIB20mM区の14.0日と同等の花持ちを示した。Plate 10A、10Bに実験1の各処理区の12日目における切り花の様相を示した。実験2においても同様な結果が得られた。さらに、2回の実験におけるAIB10mMと硝酸カルシウム2.5mMを併用処理した花の鮮度の評点の変化は、AIB20mMとほぼ同じ推移を示した (Fig. 14)。AIB10mM液に2.5mMの塩化カルシウムを添加しても硝酸カルシウムと同様に有意な花持ち延長効果が認められたが、硝酸カルシウムと比較すると添加効果は劣った。一方、AIB10mM液に2.5mMのCa-EDTAを添加した区では、Ca-EDTA単独処理区と同等の花持ちを示し、有意な効果は認められなかった。これらの結果は、AIBへのカルシウム添加による花持ち延長効果は、キレートカルシウムでは生じず、カルシウムイオンが関与することを示している。

切り花生体重の変化に対する硝酸カルシウムの添加効果はその花持ちに対する効果と同様であった (Fig. 15)。すべての処理区で生体重は2日目に最高となり、その後日数の経過とともに減少した。AIB10mMに硝酸カルシウム2.5mMを添加すると切り花の老化と関連した生体重の減少が抑えられ、常にAIB10mM単独処理区、硝酸カルシウム2.5mM単独処理区よりも生体重低下が抑制された。AIB10mMと硝酸カルシウム2.5mMの併用処理区はAIB20mM区とほぼ同じ推移を示した。

本実験の結果から、AIB連続処理時に硝酸カルシウムを添加することにより、AIBの使用濃度を半減できることが明らかになった。

#### 第2項 AIB前処理における硝酸カルシウムの添加効果

##### 1. 材料および方法

‘ノラ’、‘キラール’の2品種を供試した。収穫した切り花を、莖長50cmの長さに切り揃え、基部2節の着生葉を取り除いたのち、各処理液15mlを入れた20ml容メスシリンダーに1本ずつ挿し、所定の時間前処理を行った。前処理終了後、水道水で切り口をよく洗浄し、切り花を蒸留水1000ml入りの花瓶に入れて、室温条件下の実験室内に置き、前項と同様の方法で花持ち日数を調査した。

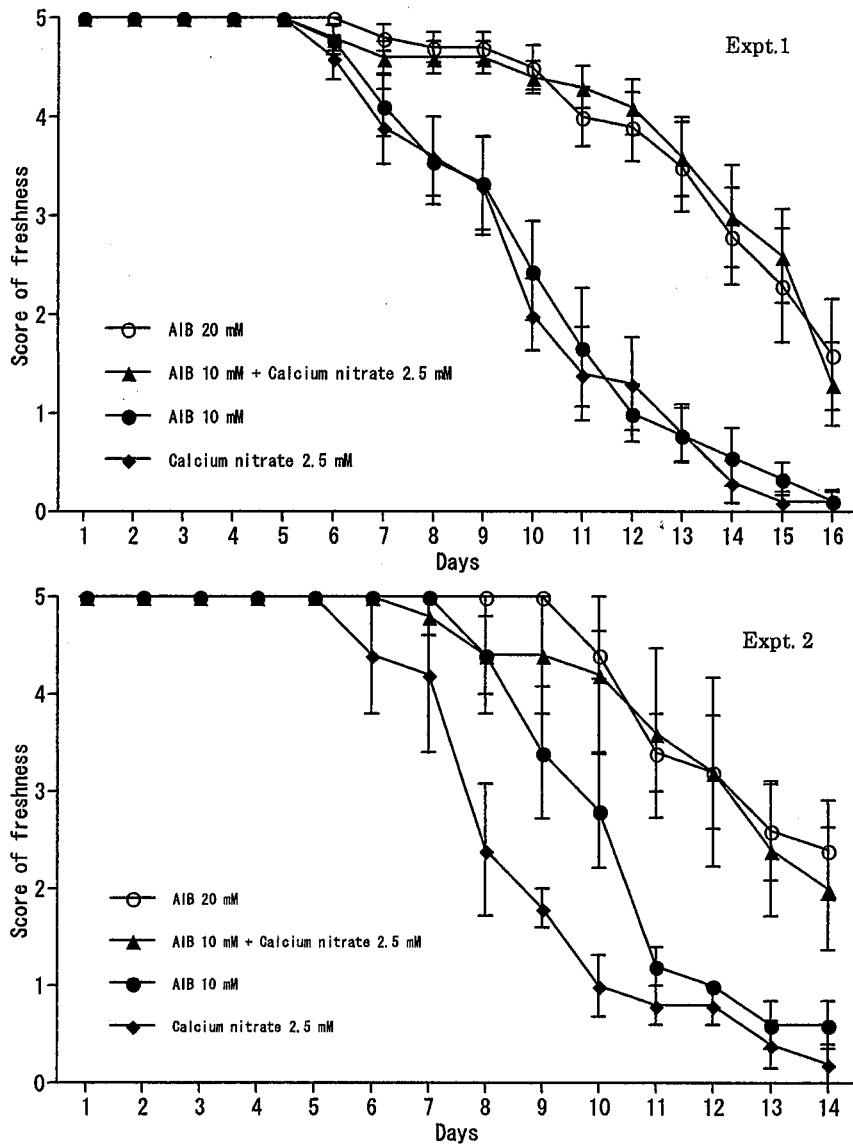


Fig. 14. Effect of calcium nitrate addition to AIB continuous treatment on the flower freshness of 'Soana' flowers. Flower freshness of each flower was evaluated daily according to Table 20. Vertical bars represent  $\pm$  S.E.

## 2. 結果および考察

‘ノラ’での2回の実験では、AIB60mM区およびAIB60mMに硝酸カルシウムを添加したすべての区で、対照区に比べ有意に花持ちが延長した。‘キラ’では、AIB60mMに硝酸カルシウム10mMを添加した区で、対照区に比べ有意に花持ちが延長した。

AIB60mMの前処理剤に硝酸カルシウム10mMを添加すると、単独処理 (AIB60mM) 区に比べ、14%~28%

花持ち日数が増加した (Table 31)。  
 ‘ノラ’では2回実験を行った。実験1では、対照区の8.0日に対して、AIB60mM区では11.5日、AIB60mM+硝酸カルシウム10mM区では13.8日と、単独処理区に比べ花持ち日数が2.3日増加した。実験2では、対照区の7.0日に対して、AIB60mM区では12.6日、AIB60mM+硝酸カルシウム10mM区では14.3日と、単独処理区に比べ花持ち日数が1.7日増加した。  
 ‘キラ’では、対照区の9.3日に対して、AIB60mM区では12.7日、AIB60mM+硝酸カルシウム10mM区では16.2日と、単独処理区に比べ花持ち日数が

Table 30. Effect of Ca-EDTA, calcium chloride or calcium nitrate addition in AIB continuous treatment on the vase life of 'Soana' flowers.

Treatment	Vase life (days $\pm$ S.E.)	
	Expt. 1	Expt. 2
Control (H <sub>2</sub> O)	8.9 $\pm$ 0.6 ab	7.4 $\pm$ 0.5 a
Ca-EDTA 2.5 mM	10.7 $\pm$ 0.5 bcd	n.t.
Calcium chloride 2.5 mM	9.3 $\pm$ 0.6 abc	n.t.
Calcium nitrate 2.5 mM	8.6 $\pm$ 0.6 a	6.8 $\pm$ 0.5 a
AIB 10 mM	8.8 $\pm$ 0.5 a	9.0 $\pm$ 0.4 a
AIB 10 mM + Ca-EDTA 2.5 mM	11.0 $\pm$ 0.4 cd	n.t.
AIB 10 mM + Calcium chloride 2.5 mM	12.5 $\pm$ 0.9 de	n.t.
AIB 10 mM + Calcium nitrate 2.5 mM	14.1 $\pm$ 0.6 e	11.8 $\pm$ 1.4 b
AIB 20 mM	14.0 $\pm$ 0.7 e	12.6 $\pm$ 0.7 b

n.t.: not tested.

Experimental period and average room temperature and number of flowers tested per plot.

Expt. 1 May 1~May 18, 1992. 19.9 °C, n=9~10.

Expt. 2 May 25~June 10, 1992. 20.0°C, n=5.

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

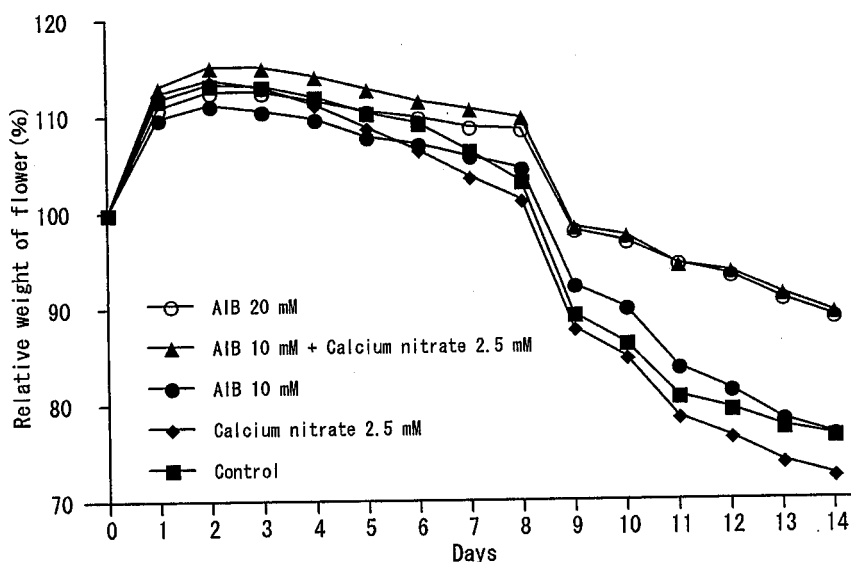


Fig. 15. Effect of calcium nitrate addition to AIB on the fresh weight of 'Soana' flowers (Expt.2).  
Relative fresh weight of cut flowers was based on the start of the experiment.

3.5日増加した。ただし、この硝酸カルシウム添加による単独処理区 (AIB60mM) に対する花持ち延長効果は有意でなかった。Plate 10Cに 'キラ' を供試した実験の15日目における切り花の様相を示した。

鮮度の評点の推移についても、AIBに硝酸カルシウム10mMを添加した区では、AIB単独区に比べ、減少が緩慢であった (Fig. 16)。AIB60mMの前処理液への硝酸カルシウムの最適添加濃度は10mM程度と考えられた。

この作用の機作については、Ca<sup>2+</sup>存在下では、インゲン豆の根におけるAIB吸収が顕著に促進されたとの報告

(Rickauer・Tanner, 1986) や、トマト果皮組織切片における液胞へのAIB吸収が促進されたとの報告 (Saftner, 1989) があることから、カーネーション切り花へのAIB吸収がCa<sup>2+</sup>により促進されたためと推定される。

以上のように、AIBを前処理に用いる場合も、AIBの前処理液に硝酸カルシウムを添加することにより、AIBによる品質保持効果をさらに向上できることが明らかになった。

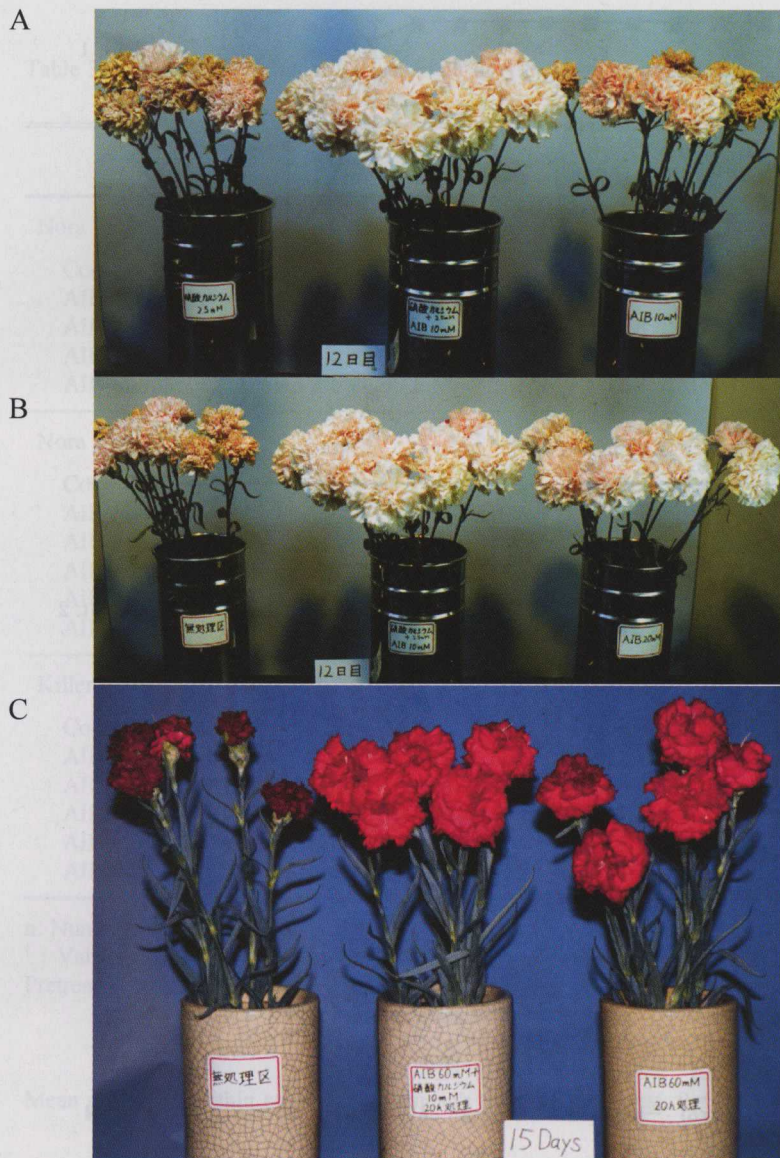


Plate 10. Effect of calcium nitrate addition to  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB) on the prolongation of the vase life of cut carnation flowers.

A: 12 days after treatment (Left: Calcium nitrate 2.5 mM, Center: AIB 10 mM + Calcium nitrate 2.5 mM, Right: AIB 10 mM. Cv. 'Soana')

B: 12 days after treatment (Left: Control, Center: AIB 10 mM + Calcium nitrate 2.5 mM, Right: AIB 20 mM. Cv. 'Soana')

C: 15 days after treatment (Left: Control, Center: 60 mM AIB + 10 mM calcium nitrate pretreatment for 20 hours, Right: 60 mM AIB pretreatment for 20 hours. Cv. 'Killer')

## 第5節 摘要

成分に重金属を含まない5種類の薬剤、AIB、サリチル酸 (SA)、硝酸カルシウムとタンニン酸、キレートカルシウム、フェニドンのカーネーション切り花に対する品質保持効果を調べた。SAの連続処理、前処理、硝酸

カルシウム+タンニン酸の連続処理は、対照区に対し有意な効果が認められた品種や処理区があったが、STSに替わる品質保持剤とするには効果が不十分と判断した。キレートカルシウム、フェニドンの対照区に対する有意な品質保持効果は認められなかった。一方、AIBは実施したすべての実験で対照区に対し有意な品質保持効果を示し、AIBが一番有望と判断された。

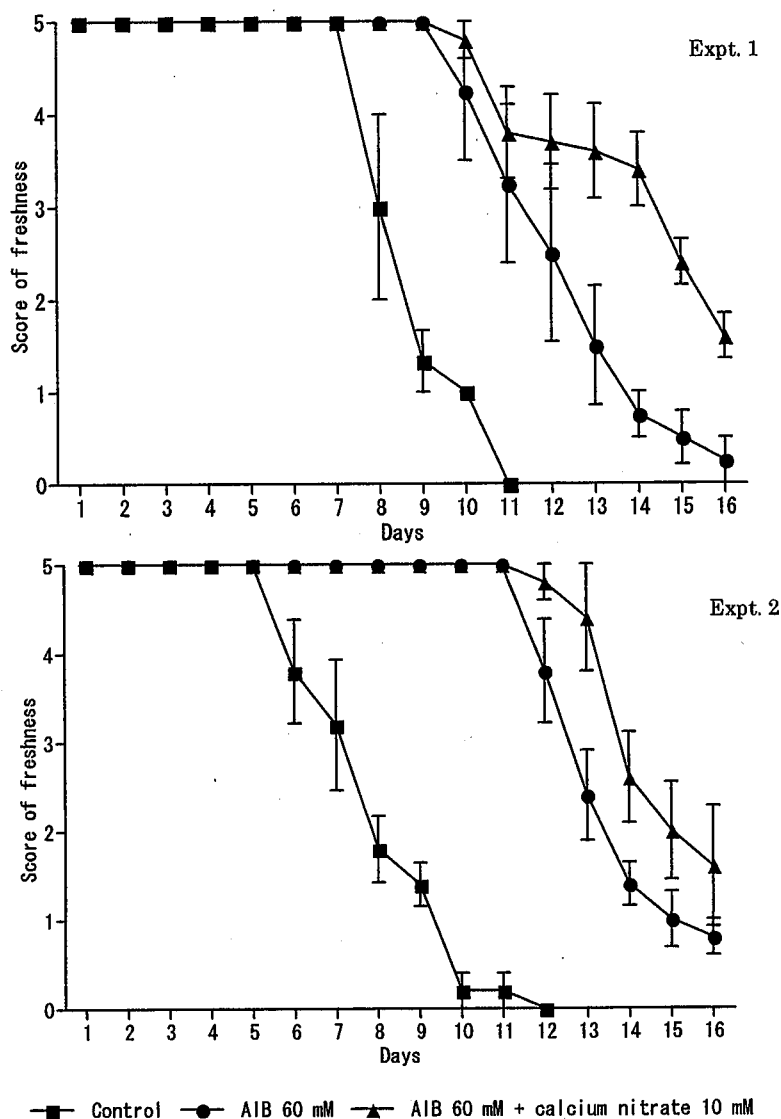


Fig. 16. Effect of calcium nitrate addition to AIB in pretreatment on the flower freshness of 'Nora' flowers.

Flower freshness of each flower was evaluated daily according to Table 20.

Vertical bars represent  $\pm$  S.E.

AIBをカーネーションの品質保持剤として、連続処理および前処理に使用し、品質保持効果を調べた。AIBの連続処理はカーネーション切り花の品質保持に顕著な効果を示した。連続処理の最適使用濃度は、20mM程度であった。AIB20mM液で連続処理すると、'ソアナ'、'パラス'では花持ち日数が無処理の約2倍、'タンガ'では約1.8倍に延長し、'ソアナ'では、STS前処理と同等の効果を示した。AIB連続処理によりカーネーションのエチレン生成量は顕著に抑えられ、その生成のピークは2~3日遅延した。

AIBは前処理剤として使用しても花持ちの延長に顕著な効果を示した。処理する切り花の茎長によりその最適な処理時間、処理濃度に違いがみられた。茎長50cmの切り花では、'ソラ'では60mM 24時間処理で最も花持ち日数が延長し、対照区の9.0日に対し、18.9日と無処理の約2.1倍の効果を示した。'ホホワイトシム'では60mM 18時間処理、90mM 6時間処理が適当であり、花持ち日数は対照区の6.1日に対し、いずれも12.6日と無処理の約2.1倍に延長した。前処理時のAIBの最適吸収量は、茎長30cmでは180~230  $\mu$ mol/本程度であり、茎長50cm



Table 31. Effect of calcium nitrate addition in AIB pretreatment on the vase life of 'Nora' and 'Killer' flowers.

Treatment	n	Vase life (days $\pm$ S.E.)
Nora Expt.1		
Control (H <sub>2</sub> O)	3	8.0 $\pm$ 0.3 a
AIB 60 mM	4	11.5 $\pm$ 0.8 b [100] <sup>z</sup>
AIB 60 mM + Calcium nitrate 10 mM	5	13.8 $\pm$ 0.8 b [120]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 20 mM	5	12.8 $\pm$ 0.5 b [111]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 30 mM	5	12.2 $\pm$ 0.8 b [106]
Nora Expt.2		
Control (H <sub>2</sub> O)	5	7.0 $\pm$ 0.5 a
AIB 60 mM	5	12.6 $\pm$ 0.3 b [100]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 10 mM	5	14.3 $\pm$ 0.8 b [114]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 20 mM	5	13.6 $\pm$ 0.6 b [108]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 30 mM	5	13.9 $\pm$ 0.8 b [111]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 40 mM	5	13.7 $\pm$ 1.0 b [109]
Killer		
Control (H <sub>2</sub> O)	4	9.3 $\pm$ 0.7 a
AIB 60 mM	5	12.7 $\pm$ 1.1 ab [100]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 10 mM	4	16.2 $\pm$ 1.1 b [128]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 20 mM	5	11.5 $\pm$ 0.5 a [ 91]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 30 mM	5	13.2 $\pm$ 1.2 ab [104]
AIB 60 mM + Calcium nitrate 40 mM	5	11.4 $\pm$ 1.9 a [ 90]

n: Number of flowers tested.

<sup>z</sup>: Values (%) in parentheses were based on AIB 60 mM.

Pretreated time, experimental period and average room temperature :

Nora Expt. 1 : 21 Hours, March 22 ~ April 7, 1994. 20.3 °C

Nora Expt. 2 : 24 Hours, May 9 ~ May 27, 1994. 22.5 °C

Killer : 20 Hours, May 6 ~ May 26, 1994. 22.3 °C

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

では品種により違いがみられた。AIBの前処理剤としての使用にあたっては、処理する場所の室温、湿度などの条件によってAIB吸収量の変動が予想されるので、処理時のAIB吸収量を確認することが重要である。

AIBの連続処理、前処理における硝酸カルシウム添加によるカーネーションの花持ち延長効果について検討した。連続処理において、AIB10mM液に硝酸カルシウム2.5mMを添加すると、対照区および単独処理区(AIB10mM区、硝酸カルシウム2.5mM区)に比べ、有意に花持ちが延長した。実験1での花持ち日数を比較すると、AIB10mM区では8.8日、硝酸カルシウム2.5mM区では8.6日であるのに対し、両者を併用すると14.1日と、AIB20mM区の14.0日と同等の花持ちを示した。実験2でも、同様な結果が得られた。したがって、AIB連続処理

液への硝酸カルシウムの添加でAIBの使用濃度を半減できることが明らかになった。

前処理については、'ノラ'での2回の実験ではAIB60mM区およびAIB60mMに硝酸カルシウムを添加したすべての区で、対照区に比べ有意に花持ちが延長した。'キラー'ではAIB60mMに硝酸カルシウム10mMを添加した区で、対照区に比べ有意に花持ちが延長した。AIB60mMの前処理剤に硝酸カルシウム10mMを添加すると、単独処理区(AIB60mM)に比べ、14%~28%花持ち日数が増加したが、この単独処理区(AIB60mM)に対する花持ち延長効果は有意でなかった。この作用の機作については、硝酸カルシウム添加により生じたCa<sup>2+</sup>により、カーネーション切り花へのAIB吸収が促進されたためと推定される。

### 第3章 交雑育種によるカーネーションの花持ち性の向上

花持ち性は、花きの経済的な流通・消費を考慮した場合、重要な形質である。収穫後の花持ちが良い花きを育種することは商品としての花きに高い付加価値を与える。育種により花持ち性の改良が進めばその意義は極めて大きい。しかし、これまでの花き育種は、花色、花型、草姿などの新規性・美しさや生産能力のような経済性を重視する傾向があり、花持ち性を考慮した花き育種はあまり取り込まれず、この分野の研究蓄積は非常に少なかった。近年、その重要性が認識されつつあり、花持ち性の選抜効果や花持ち性の遺伝に関する研究が、ガーベラ (Wernettら, 1996) やユリ (Van der Meulen-Muisersら, 1999) で報告されている。

カーネーション品種において、老化時のエチレン生成やエチレン感受性に大きな変異のあることが報告されている。Wuら (1989) は、'サンドラ' には老化時にエチレン生成のクライマクテリックライズや花卉のインローリング、萎ちょうがみられず、対照品種 'ホワイトシム' の約2倍の花持ちを示すことを明らかにした。しかし、'サンドラ' にエチレンを処理すると花卉のインローリング (花卉の内側への巻き込み)、萎ちょうを生じて観賞価値を失い、外生エチレン感受性は一般品種と変わらなかった。一方、'キネラ' は、自然老化時にエチレン生成の増加は認められるが、エチレンを処理しても花卉が萎れにくく花持ちの低下が緩慢であることから、外生エチレンに対する感受性が低い特性を持つことが明らかになった (Wuら, 1991a, b)。'キネラ' の後代の品種である 'エポメオ' も 'キネラ' と同様に外生エチレ

ン低感受性を示した (Wolteringら, 1993)。したがって、外生エチレンに対する低感受性は後代に遺伝する特性であり、従来の育種手法によるカーネーションの花持ち性改良の可能性が指摘された。

また、Serrano・Romero (1991) は、クライマクテリック型品種 'アーサー' と非クライマクテリック型品種 'キララ' を用いてエチレンとポリアミンの代謝を調査し、エチレンと二酸化炭素の生成において両品種間で大きな差異を認めた。エチレンと二酸化炭素の生成は 'アーサー' では老化の兆候が現れはじめたときに急激な増加がみられたが、'キララ' では常に低い生成量でほぼ一定であった。この結果から、'アーサー' と 'キララ' はエチレン生成に関して異なった調節機構を持つことが明らかになった。このほか、'サンドローサ' も 'サンドラ'、'キララ' と同様に老化時のエチレン生成量が常に少なく、花持ちの良い品種であることが明らかになった (Mayak・Tirosh, 1993)。

Brandt・Woodson (1992) は 'ホホワイトシム' よりも花持ちの良い育成系統 (799, 87-37G-2, 81-2) のエチレン生成量、外生エチレンへの反応、花卉のACC量、ACC酸化酵素活性を調べ、花持ちの良いカーネーションに3種類の遺伝子型が存在することを明らかにした。

これらの報告は、カーネーションではエチレン生合成系やその感受性に大きな変異が存在し、従来通りの育種手法を用いて遺伝的に花持ちの良いカーネーションを育成できる可能性を示唆している。

そこで本章では、花持ち性による選抜および選抜した花持ちの良い系統間の交配を継続することにより、STSなどの品質保持剤処理を必要としない、遺伝的に花持ちの優れたカーネーション育種素材の開発を試みた。

Table 32. Vase life and ethylene production from leaf discs in parental cultivars used for crossing.

Cultivar	Vase life		Ethylene production from leaf discs (nl·gFW <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
	n	(days)± S.E.	
Pallas	10	8.9±0.4	1.52
Sandrosa	10	10.1±0.6	2.18
Candy	8	6.9±0.2	1.10
White Sim	10	5.4±0.2	15.09
Tanga	10	6.8±0.4	7.39
Scania	10	6.5±0.2	16.29

n: number of flowers tested.

Vase life was evaluated in standard conditions (23 °C, 12-h photoperiod, 70% RH).

Four leaf discs (5×10 mm) from each cultivar were placed in a sealed vial (5.85 ml) for 3 hours at 25 °C. A gas sample was then withdrawn from the vial and its ethylene production was determined.

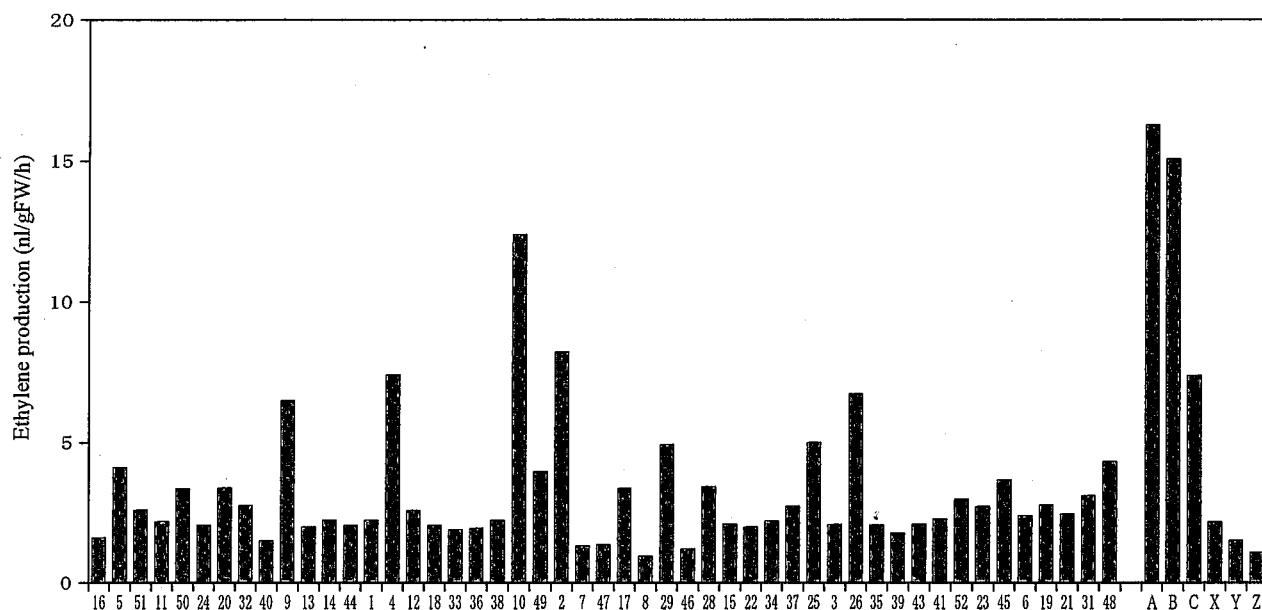


Fig. 17. Differences in ethylene production from leaf discs in parental cultivars and parental-generation primary-selected lines. Four leaf discs (5×10 mm) from each cultivar or line were placed in a sealed vial (5.85 ml) for 3 hours at 25°C. A gas sample was then withdrawn from the vial and its ethylene production was determined. Regular names of abbreviations are shown in Table 34.

Table 33. Cross combinations and results of crossings for parental generation.

Cross No.	Cross combination (♀ × ♂)	Number of seedlings obtained	Number of flowered seedlings	Mean vase life of progeny (days)	Range (days)	Number of primary selected plants	Number of secondary selected plants
1	Pallas self	1	0	—	—	—	—
2	Sandrosa self	24	15	8.1±2.0	5.0-11.3	6	1
3	Candy self	27	14	5.8±1.2	5.0- 9.0	1	0
4	Pallas × Sandrosa	30	17	8.8±2.8	5.0-16.0	8	3
5	Sandrosa × Pallas	41	18	6.9±1.6	4.4-10.0	3	1
6	Pallas × Candy	16	13	6.8±2.9	4.0-12.0	3	0
7	Candy × Pallas	25	18	7.0±1.6	4.0-10.0	3	0
8	Sandrosa × Candy	41	35	7.2±1.6	4.0-11.0	7	3
9	Candy × Sandrosa	32	23	7.5±1.3	5.0-10.0	6	2
10	Tanga self	5	3	7.3±2.8	5.0-10.5	1	0
11	Scania self	8	1	5.5	—	0	0
12	White Sim × Tanga	1	0	—	—	—	—
13	White Sim × Scania	3	1	7.5	—	0	0
14	Tanga × Scania	14	10	9.0±3.1	5.3-14.3	5	2
15	Scania × Tanga	12	11	8.2±2.8	4.0-12.4	5	0
16	Pallas × Scania	8	7	5.7±2.5	1.0- 9.0	1	0
18	White Sim × Sandrosa	1	1	8.8	—	1	0
19	Pallas × Tanga	7	7	7.6±2.1	5.3-10.8	3	0
20	Tanga × Pallas	1	1	8.0	—	0	0
Total		297	195	7.4±2.2	1.0-16.0	53	12

± indicates S.D. of the mean.

## 第1節 花持ち性簡易検定法の開発

1992年より、6品種を本研究の交配親に選定して交雑育種を開始した。同時に、花持ちの良い品種の選抜に役立つ花持ち性の簡易・早期検定法の開発を試みた。カーネーションの花持ちの良い品種には2つのタイプが存在する。一つは、'サンドラ'、'キラー'、'サンドローサ'のような老化時のエチレン生成量の少ないタイプ、もう一つは'キネラ'、'エポメオ'のような外生エチレンに対する感受性の低いタイプである。そこで、エチレン生成量が少ないタイプのカーネーションを選抜する手法として葉片エチレン検定法を考案し、実用性について検討した。また、エチレン感受性の低いタイプを選抜する手法として、種子発芽時のエセフォン処理によるエチレン感受性簡易検定法の開発を試みた。

## 第1項 切断葉片エチレン生成量の測定

## 1. 材料および方法

'パラス'、'サンドローサ'、'キャンデイ'、'ホワイトシム'、'タンガ'、'スケニア'の6品種を育種材料として、1992年の春にTable 33に示した組み合わせで交配を行った。1992年8月15日に交雑種子を播種し、得られた297個体の実生のうち、調査終了の1993年7月12日までに開花した195個体を親世代とした。得られたすべての切り花を花持ちの調査に用いた。1993年7月に花持ち日数が8.5日以上53系統を1次選抜し、挿し穂を採取して増殖した。1994年に、生育不良で枯死または未開花の3系統を除く50系統を供試して、花持ち日数の再調査と葉片エチレン生成量の測定を行った。

花持ち日数を調査するため、野菜茶試のガラス温室内ベッドで慣行法により栽培した株から、外花卉が水平状態の開花ステージで採花し、実験に供した。莖長を50cmに切り揃えた後、基部2節の着生葉を取り除き、蒸

Table 34. Flower vase life (days) of parental-generation primary-selected 50 lines out of 195 seedlings and abbreviations for Fig. 17.

Line	Abbreviation	Vase life	Line	Abbreviation	Vase life	Line	Abbreviation	Vase life
2-16	16	13.5(10)	3-36	36	10.4(10)	2-35	35	9.3(11)
14-5	5	13.0(12)	5-38	38	10.4(10)	5-39	39	9.2(11)
8-51	51	12.9(12)	15-10	10	10.2(10)	9-43	43	9.2(5)
2-11	11	12.7(9)	18-49	49	10.2(10)	8-41	41	9.1(9)
9-53	—	12.6(10)	14-2	2	10.1(15)	8-52	52	9.0(13)
4-50	50	12.4(10)	6-7	7	10.1(12)	8-23	23	8.9(10)
9-24	24	12.3(10)	9-47	47	10.1(9)	16-45	45	8.9(10)
5-20	20	11.9(10)	10-17	17	10.0(11)	4-6	6	8.2(10)
8-32	32	11.7(10)	6-8	8	9.9(10)	4-19	19	7.7(10)
8-40	40	11.3(10)	14-29	29	9.9(10)	6-21	21	7.5(10)
14-9	9	11.1(9)	19-46	46	9.8(10)	19-31	31	7.4(10)
8-13	13	11.0(10)	2-28	28	9.7(9)	15-48	48	7.4(10)
4-14	14	11.0(10)	19-15	15	9.6(10)	Parental Cultivar Abbreviation		
9-44	44	10.7(11)	7-22	22	9.6(11)	Scania		A
4-1	1	10.7(10)	4-34	34	9.5(11)	White Sim		B
15-4	4	10.6(11)	4-37	37	9.5(13)	Tanga		C
2-12	12	10.5(6)	14-25	25	9.4(20)	Sandrosa		X
15-18	18	10.4(11)	4-3	3	9.3(9)	Pallas		Y
7-33	33	10.4(10)	15-26	26	9.3(11)	Candy		Z

Fifty three plants with the longest mean vase life ( $\geq 8.5$  days) were primary-selected in 1993 and multiplied vegetatively. Three lines (2-27, 7-30, 9-42) were not flowered or dead. Values in parentheses represent the number of flowers tested.

留水約1000ml入りの花瓶に挿した。花持ち日数の調査は、気温23℃、相対湿度70%、蛍光灯（光強度：10  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>/s）で12時間日長に調節した恒温室内で行った。花持ち性は、個々の切り花をTable 20に示した鮮度の評点で毎日評価し、花持ち日数として収穫日から鮮度の評点が3未満に達した日までの日数の平均値で示した。交配親品種と第1世代1次選抜系統の供試切り花本数は、Table 32、34に示した。

葉片エチレン生成量の測定のため、栄養生長中の供試品種・系統から展開第3葉節の葉を採取し、葉の中央部をリーフパンチ（5×10mm）で切り取り、リーフディスクを作成した。サンプル管（5.85ml）に乾燥を防ぐため蒸留水0.05mlを注入し、リーフディスク4枚を重ねないように入れ、シリコン栓で蓋をした。サンプル管は25℃暗黒条件の恒温器内へ入れ、3時間後にシリンジでサンプル管内のガスを0.5ml採取し、エチレン生成量を測定した。エチレン生成量の測定にはガスクロマトグラフィー 島津GC-7A（カラムActive Almina、カラム温度80℃、キャリアガスN<sub>2</sub>、流速40ml/min）を用いた。測定は2回行った。

## 2. 結果および考察

カーネーションの花持ち性には顕著な品種間差異のあることが明らかになった（Table 32）。花持ち日数を比較すると、花持ち性の最も劣る‘ホワイトシム’の5.4日に対し、花持ち性の最も優れる‘サンドローサ’では10.1日と、両品種の間には花持ち日数に2倍近い差が認められた。また、葉片エチレン生成量は、花持ちの良い‘サンドローサ’、‘パラス’で少なく、花持ちの劣る‘ホワイトシム’、‘スケニア’では多い傾向を示した。

次に、親世代1次選抜系統の葉片エチレン生成量を測定し、Fig. 17に結果を示した。グラフの選抜系統の順番はTable 34に示した花持ち日数の調査結果により並べ替えてある。交配親品種・系統の葉片エチレン生成量は、花持ちの良い品種・系統では少なく、花持ちの劣る品種では極端に多かった。選抜系統では、葉片エチレン生成量の少ない系統が大部分であったが、系統14-9、15-4、15-10、14-2、15-26のように、葉片エチレン生成量が多いが、花持ちの良い系統もみられた。花持ち日数と葉片エチレン生成量との間には、有意な負の相関が認められた（ $r=-0.38^{**}$ ）。葉片エチレン検定法は花持ち性の簡易検定法として有効ではあるが、相関が低く、本法のみで選抜を進めるのは危険であると判断した。本法による花

持ち日数と葉片エチレン生成量との相関が低い理由としては、花持ち性にはエチレン生成量以外に、外生エチレンに対する感受性などその他のいくつかの要因も関与することに起因すると考えられる。花持ち性の育種における選抜は、切り花の花持ち性を実際に調査して行うこととした。

## 第2項 種子発芽時のエセフォン処理によるエチレン感受性早期検定の試み

カーネーションの外生エチレン感受性を早期に判定する方法の開発を試みた。エチレンは種子の発芽過程で伸長生長の阻害、肥大生長の促進、極端なフックの屈曲を引き起こすことが知られている（下川, 1988; 森・立木, 1998）。多くの双子葉植物では、エチレンを通気しながら暗黒下で発芽させると根の伸長生長が抑制されるが、エチレン感受性の低い変異体では根の伸長は抑制されない。シロイヌナズナやトマトでは、この発芽形態の差異によってエチレン低感受性の突然変異体が選抜されている（平山, 1998）。

大藪ら（1998）、菅原ら（1998）、大藪・菅原（1999）は、ハウスメロン品種を供試してエセフォンを希釈した溶液中で発芽試験を行い、根の伸長、根毛の発達など発芽時のエチレン感受性の差異から、日持ち性の高い系統、個体の選抜が可能であることを示している。このエセフォンを用いたエチレン感受性の差異の検出法は、従来行われてきたエチレンを通気しながら発芽の反応を調べる方法に比べ、簡便に大量の材料を扱えることから、育種のための簡易検定法として優れている。そこで、カーネーションのエチレン感受性簡易検定法として、種子発芽時のエセフォン処理によるエチレン感受性早期検定を試みた。

### 1. 材料および方法

#### (1) エセフォン処理における発芽時の反応

材料には、種子系カーネーション‘シャボー’（タキイ種苗）の種子を用いた。エスレル10（石原産業、エセフォン10%含有）をエセフォン濃度が2、10、20、100、1000 ppmになるよう希釈した液および蒸留水（対照区）を、ろ紙を敷いた9 cmシャーレに9 mlずつ分注した。これに種子を10粒ずつ置床し、20℃暗黒条件下に置いた。6日後に発芽した実生の根長を測定した。実験は4回行った。

## (2) エセフォン処理による根長と切り花のエチレン感受性との関係

1999年に選抜系統間で交配して得た種子を用いて、エセフォン10ppm液で発芽試験を実施した。選抜系統間の交配種子444粒を供試した。供試した種子の交配組み合わせと供試数はTable 35に示した。1999年6月22日、7月9日、7月16日、8月12日にエセフォン10ppm液9ml入りのろ紙を敷いた9cmシャーレに種子を置床し、20℃暗黒条件下に置いた。6日後に発芽した実生の根長を測定した。測定後、実生を蒸留水中で洗浄し、播種用ピートモス用土（ピートバン、サカタのタネ）に仮植した。約2週間後に市販の混合用土（メトロミックス350）を入れた6cmビニルポットに鉢上げして生育させ、鉢上げから約1か月後に温室内ベッドに定植した。外生エチレンへの感受性の検定は、実生から得られた切り花を茎長20cmの長さに切り、蒸留水を入れた三角フラスコに切り花を挿して、23℃の温度条件でエチレン処理（2

$\mu\text{l/l}$ で8時間処理）を行い、処理終了後の花持ち日数を調査することにより行った。

## (3) エチレン生合成阻害剤および作用阻害剤処理が発芽時の根長に及ぼす影響

種子発芽時の根長に及ぼす内生エチレンの関与を調べるため、エチレン生合成阻害剤および作用阻害剤を種子系カーネーション‘シャポー’（タキイ種苗）の種子に処理し、根長を調べた。さらにエセフォン10ppmとの併用処理についても調べた。使用した薬剤は、エチレン作用阻害剤のSTS (Veen, 1983)、ACC合成酵素阻害剤のAOA (Fujinoら, 1980)、第2章で品質保持剤として使用したACC酸化酵素阻害剤のAIB (Sato・Esashi, 1980; Serranoら, 1990)、阻害部位は未解明であるがエチレン生合成阻害剤の1,1-ジメチル-4-(フェニルスルホニル)セミカルバジド（以後DPSSと略す）(Midohら, 1996; Satoら, 1997)の4種類である。

Table 35. Cross combination and number of seeds tested for 10 ppm ethephon treatment.

Cross No.	Cross combination (♀×♂)	Number of seeds tested	Number of seeds germinated	Number of seedlings planted to soil beds	Number of flowered seedlings
99A01	515-10 × 64-56	56	49	41	41
99A02	945-15 × 64-56	54	49	31	22
99A03	63-8 × 62-48	24	22	16	12
99A04	Scania × 62-48	16	6	3	3
99A05	62-2 × 62-48	15	14	8	8
99A06	64-13 × 706-47	21	14	3	3
99A07	64-54 × 64-56	10	7	7	5
99A08	63-41 × 62-48	50	48	44	33
99A09	63-35 × 64-56	32	22	7	6
99A10	64-13 × 64-56	55	48	32	22
99A11	66-15 × 64-56	34	25	21	6
99A12	64-13 × 63-7	11	9	7	6
99A13	64-13 × 63-24	9	6	5	5
99A14	62-2 × 717-35	22	20	14	11
99A15	63-12 × 717-35	12	10	2	1
99A18	62-2 × 63-7	5	4	1	1
99A19	945-15 × 64-24	6	6	4	1
99A22	945-15 self	2	2	1	1
99A24	63-24 × 64-56	3	2	1	1
99A25	66-15 × 62-48	7	7	4	1
Total		444	370	252	189

STS 0、0.1、0.2、0.5、1mM液、AOAおよびDPSS 0、0.01、0.1、0.5、1mM液、AIB 0、0.1、0.5、1、5mM液および各処理液にエセフォンを10ppmの濃度になるよう添加した処理液をそれぞれ作成し、ろ紙を敷いた9 cmシャーレに9 mlずつ分注した。これに種子を15粒ずつ置床し、20℃暗黒条件下に置いた。6日後に発芽した実生の根長を測定した。

#### (4) エセフォンとAIBの併用処理による発芽試験

エセフォンとAIBを併用して、選抜系統間の交配種子を用いて発芽時の根長を調べた。材料には、508-22×945-15の交配（交配番号99A02）で得られた種子を用いた。蒸留水、エセフォン10ppm液、エセフォン10ppmとAIB 0.5mMの併用処理液を作成し、ろ紙を敷いた9 cmシャーレに9 mlずつ分注した。これに種子を置床し、20℃暗黒条件下に置いた。6日後に発芽した実生の根長を測定した。

## 2. 結果および考察

### (1) エセフォン処理における発芽時の反応

すべてのエセフォン処理区で、発芽時の根の伸長が抑制された (Fig. 18)。エセフォン 2 ppmですでに伸長抑制が観察され、エセフォン濃度が高くなるに従って根の伸長抑制の程度が大きくなった。エセフォン10ppmと20ppmの間の差はほとんどなかった。エセフォン1000ppmでは、根の伸長が強く抑制され、ほとんど根の伸長が認められなかった。

以上のように、カーネーションにおいてもハウスメロンと同様にエセフォン処理による種子発芽時の根の伸長抑制が観察され、エセフォン処理によるエチレン感受性簡易検定の可能性が示唆された。簡易検定での使用濃度は、エセフォン処理後鉢上げして植物を生育させる必要があるため、10ppm程度が適当と考えられた。

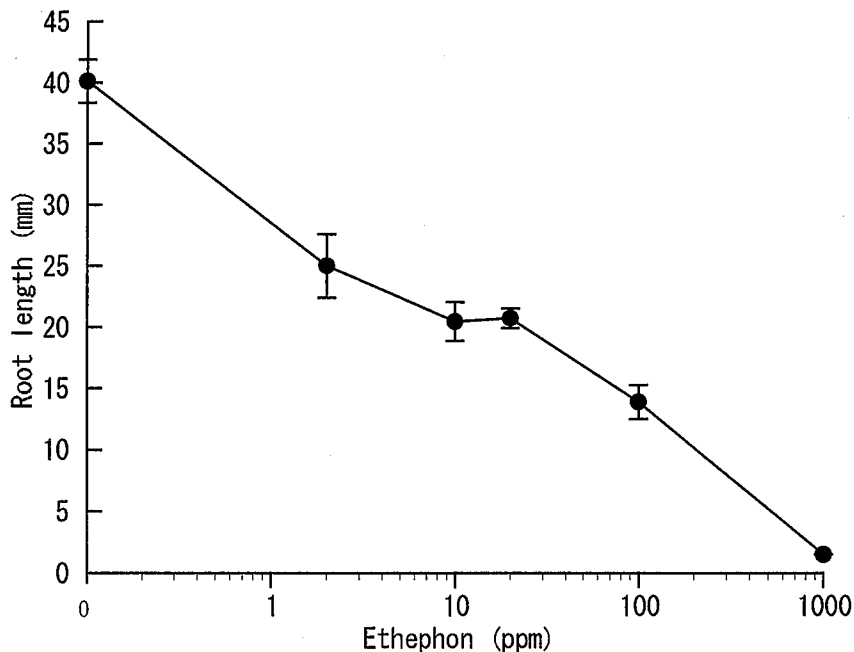


Fig. 18. Effect of various concentration of ethephon on post-germination root length of carnation 'Chaboud'. Root length was determined after 6 days from the beginning of soaking seeds in 9 cm petri dishes in various test solutions at 20℃ under dark conditions.

Values are means of 4 replicates each containing 10 seedlings.

Vertical bars represent  $\pm$  S.E.

## (2) エセフォン処理による根長と切り花のエチレン感受性との関係

播種した444粒のうち370粒が発芽し、根長を測定した。仮植、鉢上げの過程で枯死する実生があり、温室内ベッドには252実生を定植した。このうち調査終了の2000年5月31日までに開花に至り、エチレン感受性の検定を行うことのできた実生数は189であった (Table 35)。

Fig. 19に、エセフォン処理で発芽した種子の根長と切り花のエチレン感受性との関係を示した。根長と切り花のエチレン感受性との間には、有意な相関関係が認められなかった。エセフォン処理による根長が20mm以上、すなわちエセフォンによる伸長抑制がみられなかった実生は33個体あったが、これらから得た切り花でもエチレン処理終了時に花卉の萎ちょうが観察され感受性が高いと判定された実生が12個体存在した。エセフォン処理による根長からカーネーションの外生エチレン感受性を判定するのは困難と判断された。

## (3) エチレン生合成阻害剤および作用阻害剤処理が発芽時の根長に及ぼす影響

エチレン生合成阻害剤および作用阻害剤の処理は、カーネーションにおける種子発芽時の根の伸長を抑制することがわかった (Fig. 20)。特にAOAは顕著な伸長抑制作用を示し、0.5mM以上の濃度ではほとんど根の伸長がみられなかった。これらの結果から、カーネーション種子の内生エチレンは根の伸長促進作用を持つことが示唆された。

エチレン生合成阻害剤AIB、AOA、DPSSにエセフォン10ppmを添加した区は添加しない区と比較すると根の伸長がさらに抑制された。一方、STS 0.1、0.2、0.5mMにエセフォン10ppmを添加した区と添加しない区を比較すると、エセフォンによる伸長抑制作用は認められず、両処理区はほとんど同じ根長を示した。これは、STSによってエセフォンから発生する外生エチレンの作用が阻害されたためと推定される。STS 1mMではこの外生エチレンの作用阻害がみられなくなった。

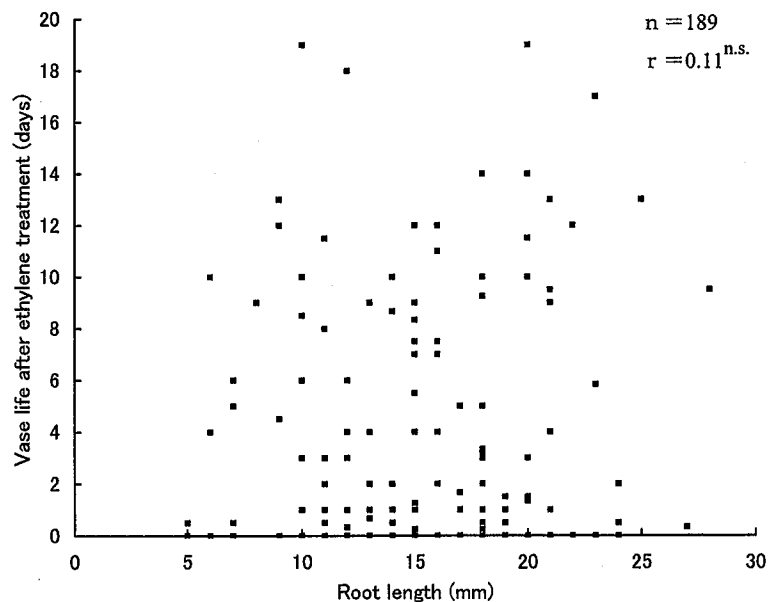


Fig. 19. Relationship between post-germination root length in 10 ppm ethephon solution and ethylene sensitivity of cut flowers.

n.s.: not significant.

Root length was determined after 6 days from the beginning of soaking seeds in 9 cm petri dishes in 10 ppm ethephon solutions at 20°C under dark conditions. Flowers were exposed to 2  $\mu$ l/l ethylene for 8 h at 23°C. After the treatment, the flowers were transferred to the temperature-controlled room and assessed daily for wilting symptoms. Finally, the vase life was determined.

Origin of seeds used for this experiment are shown in Table 35.



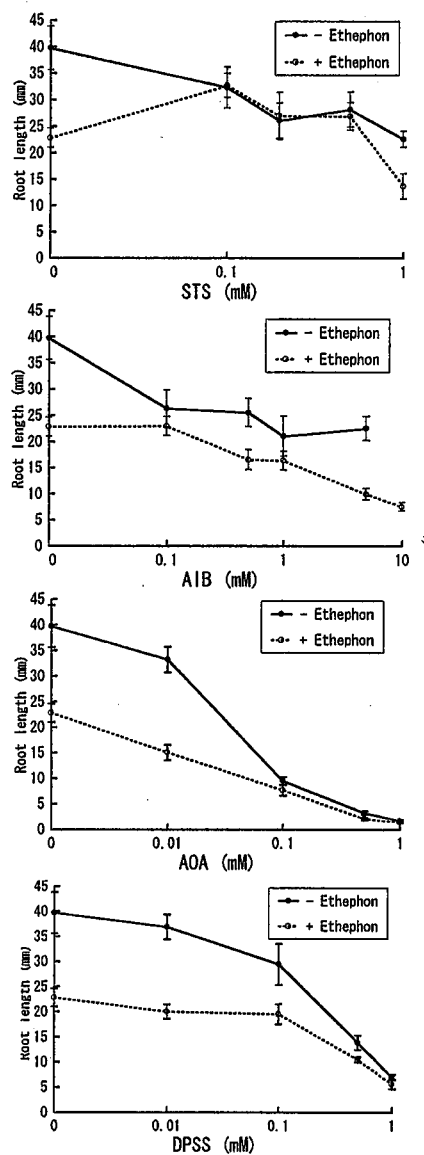


Fig. 20. Effects of various concentrations of STS, AIB, AOA or DPSS on post-germination root length of carnation 'Chabaud' under 10 ppm ethephon and non-ethephon conditions. Root length was determined after 6 days from the beginning of soaking seeds in 9 cm petri dishes in various test solutions at 20°C under dark conditions. Vertical bars represent  $\pm$  S.E.

エセフォン単独での発芽試験では、エセフォン処理による根長と切り花のエチレン感受性との間に相関が認められなかった (Fig. 19) が、これは種子発芽時の内生エチレン量が根の伸長量に影響したと考えることができる。エセフォンから発生したエチレンにより自己触媒的エチレン生成が起こり、内生エチレンレベルが上昇し、エチレン感受性が高い個体でも根の伸長促進が起きた可能性がある。これを防ぐには、エチレン生合成阻害剤で処理し、内生エチレン量を均一にする必要がある。エセ

フォンとエチレン生合成阻害剤を併用処理することにより、エチレン低感受性個体を選抜できる可能性が示唆された。

#### (4) エセフォンとAIBの併用処理による発芽試験

対照区では平均根長が21.7mmであったが、エセフォン10ppm液では12.5mm、エセフォン10ppmとAIB 0.5mMの併用処理では8.6mmへと減少した。エセフォン10ppmとAIB 0.5mMの併用処理の根長の分布は、4mm

から16mmまでの範囲にあり、大きなばらつきが観察された (Fig. 21)。根長14~16mmの6個体から得た切り花がエチレン低感受性を示すものと期待される。今後これらの実生を生育させて切り花を得て、実際のエチレン感受性を調査する予定である。

## 第2節 選抜と交配による花持ち日数の改良

花持ち性を育種により改良するために、交配で得た実生の花持ち日数を調査し、その花持ち性による選抜と選抜した系統間での交配を3世代にわたって繰り返し、花持ちの良いカーネーションの育種を試みた。

## 1. 材料および方法

前節で示したように6品種を育種材料として、1992年の春にTable 33に示した組み合わせで交配を行い、調査終了までに開花した195個体を親世代とした。53系統を1次選抜し、挿し穂を採取して増殖した。1994年に花持ち日数を再調査し、最も良い花持ちを示した12系統を2次選抜した (親世代選抜系統)。1994、1995年の春に、親世代選抜系統のうち11系統を用いてTable 36に示した合計22組み合わせで交配を行った。1994年8月12日または1995年7月17日に交雑種子を播種し、得られた399個

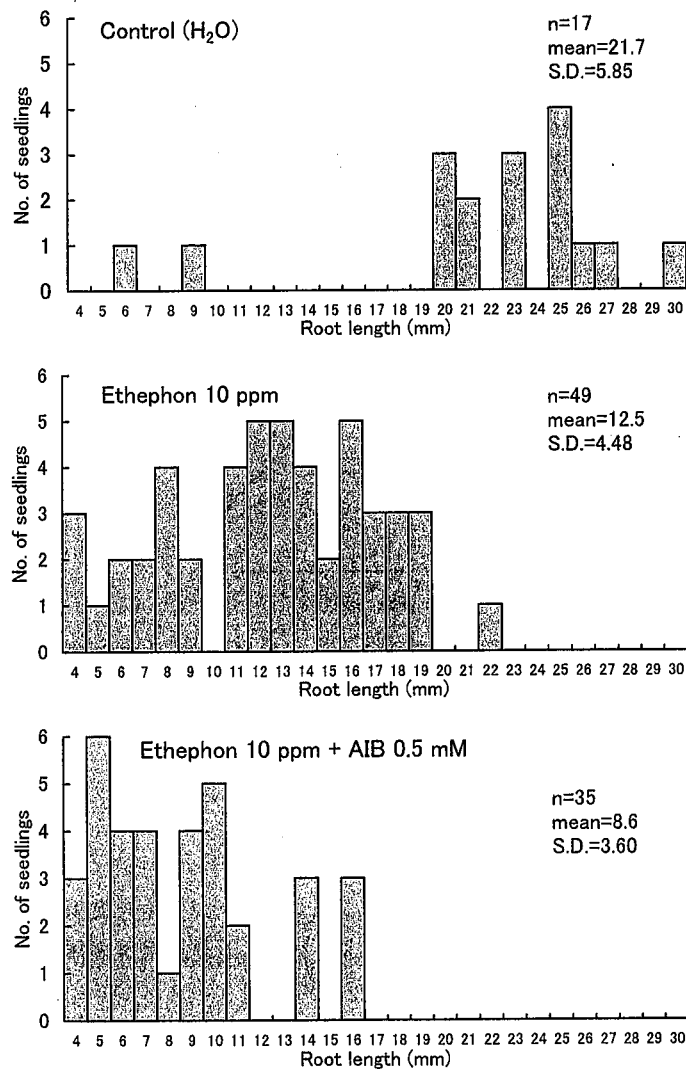


Fig. 21. Frequency distribution of post-germination root length in distilled water, 10 ppm ethephon or 10 ppm ethephon + 0.5 mM AIB solution. Seeds obtained by cross between line 945-15 and 64-56 (Cross No. 99A02) were used in this test. Root length was determined after 6 days from the beginning of soaking seeds in 9 cm petri dishes at 20°C under dark conditions.

Table 36. Cross combination and results of crossings for first generation.

Cross No.	Cross combination (♀×♂)	Number of seedlings obtained	Number of flowered seedlings	Mean vase life of progeny (days)	Range (days)	Number of primary selected plants	Number of secondary selected plants
941	14-5 ×2-16	16	15	9.0±2.2	5.0-13.5	5	1
942	2-16 ×8-13	7	7	9.0±2.1	7.0-12.0	3	0
943	2-16 ×9-24	14	10	7.9±1.9	5.0-11.0	3	0
944	8-13 ×14-5	42	37	7.6±1.4	5.0-12.0	5	0
945	8-13 ×2-16	41	36	9.2±2.3	5.0-16.0	16	9
947	8-32 ×8-13	24	16	8.5±2.2	5.0-14.0	4	0
948	8-32 ×8-51	5	4	9.3±0.5	9.0-10.0	1	0
949	8-51 ×4-50	8	2	10.5±4.9	7.0-14.0	1	0
501	4-1 ×2-16	2	2	11.0±0	11.0-11.0	2	1
502	4-1 ×4-14	4	3	9.4±0.5	9.0-10.0	2	0
503	4-1 ×8-13	9	7	7.9±1.2	6.8-10.0	1	0
504	4-1 ×9-53	11	6	8.6±1.3	7.0-10.3	2	0
505	8-32 ×4-14	7	6	8.5±1.8	7.0-11.8	1	0
506	8-51 ×2-16	6	5	9.3±1.1	8.0-11.0	2	0
507	8-51 ×9-24	20	14	7.7±1.9	4.0-12.0	1	1
508	8-51 ×9-53	14	12	8.7±1.4	7.0-11.8	1	1
509	9-53 ×4-50	8	5	7.9±1.9	5.0-9.4	3	0
510	9-53 ×8-13	12	9	9.2±1.0	7.0-10.5	5	1
511	9-53 ×8-32	34	30	8.5±1.3	6.0-10.5	9	1
512	4-1 ×14-5	11	9	7.7±0.7	7.0-9.0	0	0
513	8-32 ×14-5	56	33	7.9±1.4	6.0-13.0	4	0
515	8-51 ×14-9	48	41	8.3±1.6	2.0-11.0	11	2
Total		399	309	8.4±1.8	2.0-16.0	82	17

± indicates S.D. of the mean.

Table 37. Cross combination and results of crossings for second generation.

Cross No.	Cross combination (♀×♂)	Number of seedlings obtained	Number of flowered seedlings	Mean vase life of progeny (days)	Range (days)	Number of primary selected plants	Number of secondary selected plants
61	945-1 ×945-15	20	19	11.0±1.6	8.0-13.0	6	0
62	945-1 ×941-5	71	55	11.2±2.8	5.0-18.0	18	3
63	945-1 ×945-17	44	40	11.6±2.3	7.0-17.5	20	7
64	945-15 ×945-2	17	15	10.7±2.1	8.0-15.0	4	3
65	945-7 ×945-25	23	22	9.9±3.4	4.0-17.0	8	0
66	945-25 self	12	8	10.5±3.0	6.0-15.0	2	1
67	945-31 ×945-24	5	4	10.2±1.0	9.0-11.4	1	0
Total		192	163	11.0±2.6	4.0-18.0	59	14

± indicates S.D. of the mean.

体の実生のうち、調査終了の1995年6月27日または1996年6月24日までに開花した309個体を第1世代とした。1995年または1996年6月に花持ち日数が9.2日以上82系統を1次選抜し、挿し穂を採取して増殖した。1996年または1997年に花持ち日数を再調査し、最も良い花持ちを示した17系統を2次選抜した(第1世代選抜系統)。さらに、1996年の春に、第1世代選抜系統のうち9系統を用いてTable 37に示した合計7組み合わせで交配を行

った。1996年6月24日に交雑種子を播種し、得られた192個体の実生のうち、調査終了の1997年5月30日までに開花した163個体を第2世代とした。1997年6月に花持ち日数が11.0日以上58系統を1次選抜し、挿し穂を採取して増殖した。1998年に花持ち日数を再調査し、最も良い花持ちを示した14系統を2次選抜した(第2世代選抜系統)。

花持ち日数の調査のため、野菜茶試のガラス温室内ベ

ッドで慣行法により栽培した株から、外花卉が水平状態の開花ステージで採花し、実験に供した。切り花は、莖長を50cmに切り揃えた後、基部2節の着生葉を取り除き、蒸留水約800ml入りの花瓶に挿した。花瓶内の蒸留水は3~4日毎に取り替えた。切り花を入れた花瓶は、気温23℃、相対湿度70%、蛍光灯(光強度:10 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s)で12時間日長に調節した恒温室内に置き、花持ちを毎日評価した。花持ち日数は、収穫日から鮮度の評点(Table 20)が3未満に達した日までの日数の平均値で示した。

実生の花持ち日数の調査には、得られたすべての切り花を供試した。選抜系統と対照品種の花持ち日数の調査は、1998、1999年の2回実施した。対照品種として、交配親6品種に加え‘ユーコンシム’、‘コーラル’、‘キネラ’、‘キラー’の4品種を併せて供試した。1998年の調査後、各系統から挿し穂を採取して増殖し、改植して株を更新した。1998年の調査本数は、Table 38に示した。1999年の調査には10本の切り花を用いた。各選抜系統の‘ホワイトシム’、‘サンドローサ’に対する有意差は、t検定によって1%レベルで検定した。

Table 38. Flower vase life (days)  $\pm$  S.E. of carnation cultivars and selected lines under standard conditions (23 °C, 12-h photoperiod, 70% RH).

Cultivar or selected line		1998			1999		
		n	Vase life	%	n	Vase life	%
Control cultivars	White Sim	10	6.1 $\pm$ 0.3	100	10	5.4 $\pm$ 0.2	100
	Sandrosa	12	10.3 $\pm$ 0.5**	169	10	10.1 $\pm$ 0.6**	187
Normal cultivars	U Conn Sim	10	6.0 $\pm$ 0.4n.s.	98	10	6.1 $\pm$ 0.2n.s.	113
	Coral	8	6.1 $\pm$ 0.2n.s.	100	10	5.3 $\pm$ 0.2n.s.	98
Long vase life variants	Killer	7	10.4 $\pm$ 0.8**	171	10	11.1 $\pm$ 0.7**	206
	Chinera	12	10.6 $\pm$ 0.9**	173	10	10.9 $\pm$ 0.5**	202
Parental-generation selected line	4-50	11	12.9 $\pm$ 0.7**L	212	10	12.4 $\pm$ 0.5**L	230
	5-20	10	12.4 $\pm$ 0.9**	203	10	12.2 $\pm$ 0.6**	226
	2-16	10	11.1 $\pm$ 0.7**	182	10	10.2 $\pm$ 0.7**	189
	4-14	10	11.8 $\pm$ 0.7**	193	10	10.7 $\pm$ 0.5**	198
	8-13	9	12.6 $\pm$ 0.9**	206	10	8.7 $\pm$ 0.2**	161
	4-1	6	10.0 $\pm$ 0.4**	164	10	8.9 $\pm$ 0.2**	165
	8-51	10	11.1 $\pm$ 0.6**	182	10	11.1 $\pm$ 0.5**	206
	9-53	10	10.0 $\pm$ 0.5**	164	10	8.4 $\pm$ 0.3**	156
	14-9	10	7.9 $\pm$ 0.5**	130	10	8.1 $\pm$ 0.5**	150
First-generation selected line	945-1	12	13.0 $\pm$ 0.8**	213	10	13.1 $\pm$ 0.8**L	243
	945-2	14	11.9 $\pm$ 0.8**	196	10	11.8 $\pm$ 1.0**	219
	941-5	12	12.8 $\pm$ 0.6**L	209	10	10.6 $\pm$ 0.6**	196
	945-32	10	13.3 $\pm$ 1.2**	218	10	11.9 $\pm$ 0.8**	220
	945-7	11	12.5 $\pm$ 0.8**	204	10	9.9 $\pm$ 0.7**	183
	945-17	12	12.0 $\pm$ 1.1**	197	10	12.9 $\pm$ 0.6**L	239
	945-25	11	11.5 $\pm$ 1.0**	189	10	11.9 $\pm$ 0.8**	220
	945-24	6	10.8 $\pm$ 0.8**	178	10	12.2 $\pm$ 0.8**	226
	945-15	6	11.5 $\pm$ 0.7**	189	10	9.4 $\pm$ 0.7**	174
	945-31	10	10.3 $\pm$ 0.7**	169		not tested	
	508-22	14	12.9 $\pm$ 0.6**L	212	10	13.2 $\pm$ 0.6**L	244
	507-2	13	11.7 $\pm$ 0.7**	192	10	13.1 $\pm$ 0.8**L	243
	515-13	12	10.3 $\pm$ 0.8**	169	10	9.7 $\pm$ 0.4**	180
	511-15	10	11.1 $\pm$ 0.7**	182	10	9.2 $\pm$ 0.9**	170
	510-23	9	10.3 $\pm$ 0.8**	169	10	10.7 $\pm$ 0.9**	198
	501-6	8	10.5 $\pm$ 0.6**	172	10	13.2 $\pm$ 0.6**L	244
	515-10	11	10.2 $\pm$ 0.6**	167	10	11.9 $\pm$ 0.9**	220
Second-generation selected line	63-3	7	16.0 $\pm$ 1.9**L	262	10	15.4 $\pm$ 0.5**L	285
	63-12	5	15.8 $\pm$ 2.0**L	259	10	15.1 $\pm$ 0.5**L	280
	66-15	3	15.3 $\pm$ 4.4**	251	10	17.5 $\pm$ 1.1**L	320
	63-41	10	15.2 $\pm$ 0.6**L	249	10	15.0 $\pm$ 0.3**L	278
	62-18	13	15.2 $\pm$ 0.6**L	248	10	13.3 $\pm$ 0.8**L	246
	63-35	12	15.1 $\pm$ 1.0**L	247	10	13.9 $\pm$ 0.4**L	257
	63-8	8	14.9 $\pm$ 1.0**L	244	10	14.4 $\pm$ 0.8**L	267
	62-48	13	14.3 $\pm$ 0.4**L	235	10	13.6 $\pm$ 0.5**L	252
	64-56	13	14.1 $\pm$ 0.5**L	231	10	11.1 $\pm$ 1.2**	206
	63-7	10	13.7 $\pm$ 0.7**L	225	10	12.1 $\pm$ 0.6**	224
	62-2	11	13.2 $\pm$ 1.3**	216	10	14.0 $\pm$ 0.6**L	259
	63-24	6	12.3 $\pm$ 1.1**	202	10	12.3 $\pm$ 0.8**	228
	64-13	12	11.9 $\pm$ 0.9**	195	10	11.2 $\pm$ 0.7**	207
	64-54	9	11.0 $\pm$ 0.4**	180	10	12.2 $\pm$ 0.5**	226

n: number of flowers tested.

%: percentage of control cultivar, ‘White Sim’

Significance shown of difference against ‘White Sim’ (\*\*=1% level, n.s.=not significant).

L: Significantly longer than ‘Sandrosa’ at 0.01 level.

## 2. 結果および考察

花持ち性による選抜とその選抜系統間での交配の結果、全実生の平均花持ち日数が、親世代の7.4日から第1世代では8.4日、第2世代では11.0日へと増加した (Fig. 22)。親世代から第1世代の間での平均花持ち日数の増加が1.0日なのに対し、第1世代から第2世代の間では2.6日と大きな増加がみられた。花持ち日数が4～6日の花持ちが劣る部分の実生の頻度を比較すると、親世代では41.0%を占めているのに対し、第1世代では12.3%、第2世代では4.3%と大きく減少した。一方、標

準偏差を比較すると、親世代の2.16から第1世代では1.76へと減少したが、第2世代では逆に2.59と集団の花持ち日数の分布のばらつき具合が大きくなった。平均花持ち日数が、2世代後で3.6日という大きな増加を示したことから、カーネーションの花持ち性は比較的少数の遺伝子に支配された特性であることが示唆された。以上の結果から、選抜と交配によるカーネーションの花持ち性の改良が可能であることが明らかになった。

供試した6品種および選抜系統40系統は、花持ち日数に関して1998年の調査では6.0日から16.0日、1999年の調査では5.3日から17.5日という大きな変異を示した (Table 38)。カーネーション切り花の老化や品質保持に

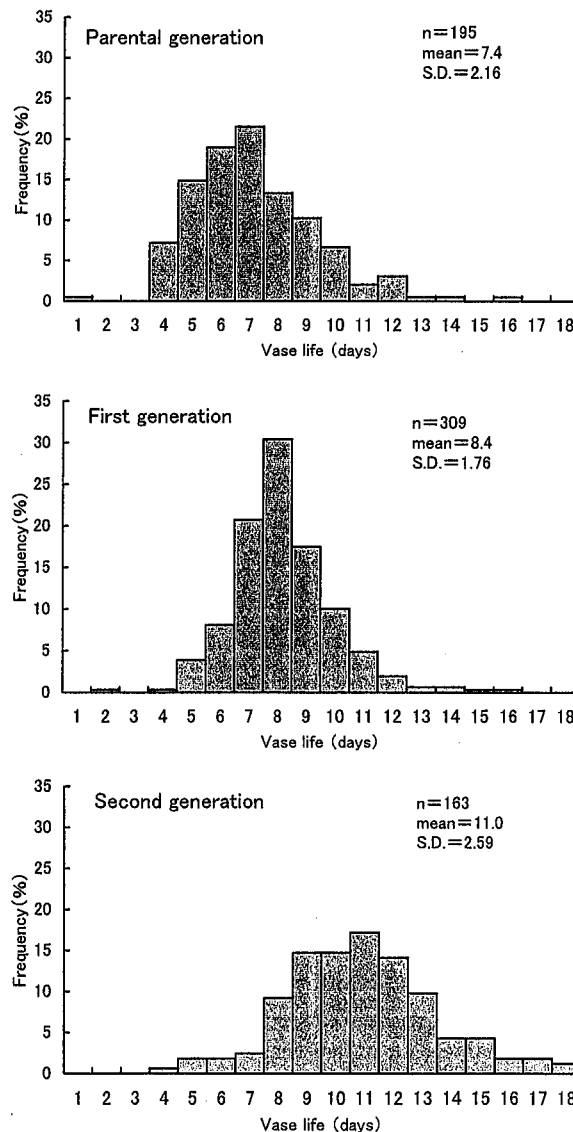


Fig. 22. Frequency distribution of vase life in parental, first and second generations.

関する多くの研究において標準品種として使われる‘ホワイトシム’の花持ち日数は、1998年調査で6.1日、1999年調査で5.4日であった。一般品種の‘ユーコンシム’、‘コーラル’の花持ち日数は6日程度であった。一方、老化時のエチレンのクライマクテリックライズを欠く品種であることが報告されている‘サンドローサ’ (Mayak・Tirosh, 1993)、‘キラール’ (Serrano・Romojaro, 1991)、および外生エチレン感受性が低い特性を持つことが報告されている‘キネラ’ (Wuら、

1991b)の花持ち日数は、10~11日程度であった。

本研究で選抜と交配により得られた選抜系統は、1998年と1999年の2回の実験のいずれにおいても、40系統のすべての系統で‘ホワイトシム’よりも有意に長い花持ち日数を示した。このことは、選抜系統の優れた花持ち性は環境変異ではなく、遺伝的に獲得された形質であることを示している。さらに、40の選抜系統のうち、1998年には12系統、1999年には15系統が、育種材料として用いた6品種の中で最も花持ちの良い‘サンドローサ’よ

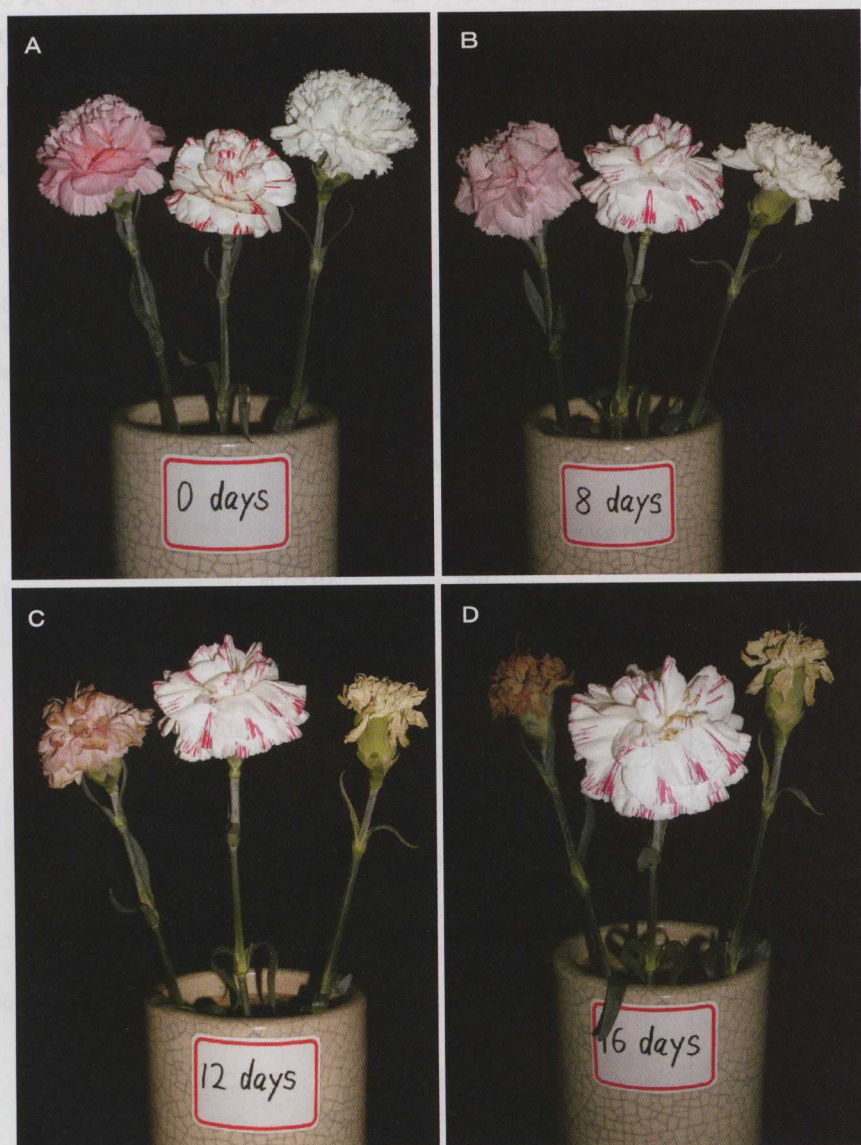


Plate 11. Variation in flower vase life of carnation.

A: 0 days after harvest. B: 8 days after harvest. C: 12 days after harvest. D: 16 days after harvest.

Left: ‘Sandrosa’. Center: second-generation selected line, 66-15. Right: ‘White Sim’.  
Line 66-15 (center) had a mean vase life of 17.5 days in 1999 without chemical treatment.



Plate 12. Ten days after harvest. Second-generation selected lines, 'U Conn Sim', 'Killer' and 'Sandrosa' (left to right).

Selected lines with low ethylene production (left) had a vase life of 11.1-17.5 days in 1999.

りも有意に長い花持ち日数を示した。

交配と選抜を3世代繰り返し、最も花持ちの改良を進めた第2世代選抜系統14系統では、2年の調査のいずれでも花持ち日数が11.0日以上を示した。15.0日以上の優れた花持ち日数を示したのは、1998年調査で系統63-3、63-12、66-15、63-41、62-18、63-35の6系統、1999年調査では系統63-3、63-12、66-15、63-41の4系統であった。特に系統66-15は、STSなどの品質保持剤処理無しで'ホワイトシム'の2.5倍(1998年調査)から3.2倍(1999年調査)という非常に優れた花持ち性を示した(Plate 11)。Plate 12に、対照品種'ユーコンシム'、エチレン生成量の低い品種である'キラー'および'サンドロサ'、第2世代選抜系統を供試した実験10日目の切り花の様相を示した。

### 第3節 選抜系統のエチレン生成量の測定

#### 1. 材料および方法

カーネーション切り花のエチレン生成量の推移については、収穫直後はエチレン生成が微量であるが、花卉の軽いインローリングやわずかな萎ちょうが観察される時(老化の初期のステージ)にエチレン生成量が急激に上昇してピークに達し、花卉が完全に萎ちょうすると逆に生成量が減少することが知られている(Buflerら, 1980; Lawtonら, 1989)。切り花の老化時のエチレン生成量を

多数の品種・系統を供試して比較するために、花卉の老化が最初に観察され、観賞価値を失った日にエチレン生成量を測定し、その値をその品種・系統のエチレン生成量として表すこととした。

Fig. 23に示した10品種と選抜系統38系統を供試した。各品種・系統の株から、外花卉が水平状態の開花ステージで採花し、実験に供した。切り花は、茎長を5cmに切り揃えた後、蒸留水入りの試験管に挿した。切り花は、気温23℃、相対湿度70%、蛍光灯(光強度:  $10 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )で12時間日長に調節した恒温室内に置いた。花卉にインローリングや褐変などが生じ、最初に老化が観察され観賞価値を失った日にエチレン生成量を測定した。切り花の生体重を測定し、470ml容のガラス容器に23℃で1時間密閉した後、内部ガスをシリンジで0.5ml採取し、ガスクロマトグラフィー(島津GC-7A)で定量した。

#### 2. 結果および考察

供試した10品種と選抜系統38系統の老化時のエチレン生成量は大きな差異を示した(Fig. 23)。「パラス」、「キャンディ」、「ホワイトシム」、「タンガ」、「スケニア」、「ユーコンシム」、「コーラル」のエチレン生成は、典型的なクライマクテリックのパターンを示した。その生成量は、「スケニア」の27.4nl/gFW/hから「タンガ」の88.4nl/gFW/hまでの範囲にあった。「キネラ」の生成量

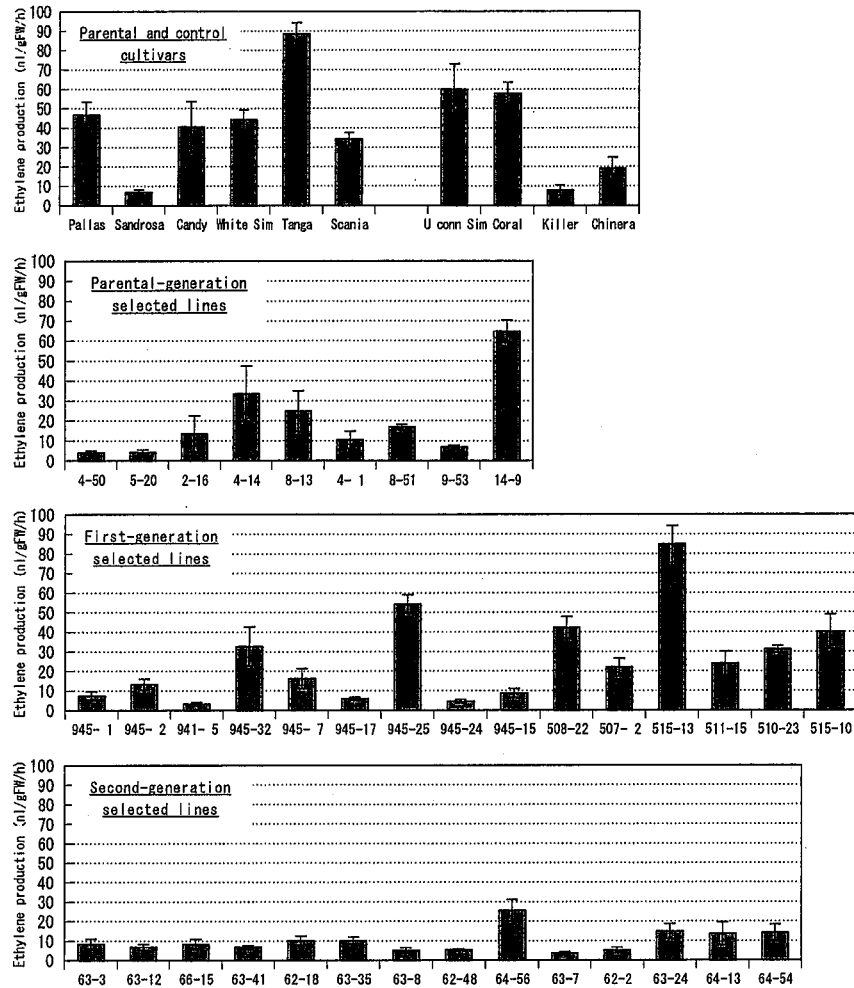


Fig. 23. Ethylene production of carnation flowers at senescence in cultivars or selected lines.

Vertical bars represent  $\pm$  S.E.

On average, 6 flowers of each cultivar or line were harvested at commercial maturity. Flower stems were cut to 5 cm and placed individually in a test tube containing distilled water. When senescence was first observed, individual flowers were weighed and then enclosed in a 470-ml glass jar and kept at 23°C. After 1-h incubation, a 0.5-ml sample of headspace gas was withdrawn and analyzed for ethylene concentration with a gas-chromatograph.

は‘ホワイトシム’の約半分の19.2nl/gFW/hであった。一方、‘サンドローサ’と‘キラー’の生成量は極端に少なく、それぞれ6.9nl/gFW/h、7.9nl/gFW/hであった。‘キネラ’、‘サンドローサ’、‘キラー’の測定結果は、Wuら (1991a)、Mayak・Tirosh (1993)、Serrano・Romero (1991) の報告と一致した。

親世代、第1世代選抜系統のエチレン生成量は、系統4-50、5-20、941-5、945-24など極めて少ない系統もみられたが、系統14-9、945-25、515-13などでは高い生成量を示した。

花持ち性による交配と選抜を3世代繰り返した第2世

代選抜系統では、14系統すべてにおいて生成量が低い傾向を示した。系統63-3、63-12、66-15、63-41、62-18、63-35、63-8、62-48、63-7、62-2では生成量が10nl/gFW/h以下と非常に少なく、エチレンのクライマクテリックライズが起らなかった。これらの10系統では、花卉の老化時に通常の品種で生じるインローリングや急激な萎ちようがみられず、花卉が生氣を失い縁から褐変するという症状で観賞価値を失った (Plate 13)。系統64-56、63-24、64-13、64-54では、生成量は低かったが、エチレンのクライマクテリックライズは観察され、通常の品種と同様な老化形態を示した。



供試した10品種と選抜系統38系統における老化時のエチレン生成量と花持ち日数との関係をFig. 24に示した。エチレン生成量と花持ち日数との間には有意な負の相関

( $r=-0.65^{**}$ ) が認められた。このように、選抜系統の優れた花持ち性はエチレン生成のレベルと関連していた。



Plate 13. Difference of petal senescence pattern.

Left: Line 66-15 did not show petal in-rolling or rapid wilting at senescence, but faded and turned brown from petal tips (20 days after harvest). Right: 'Pallas' senesced with in-rolling and wilting of the petals (8 days after harvest).

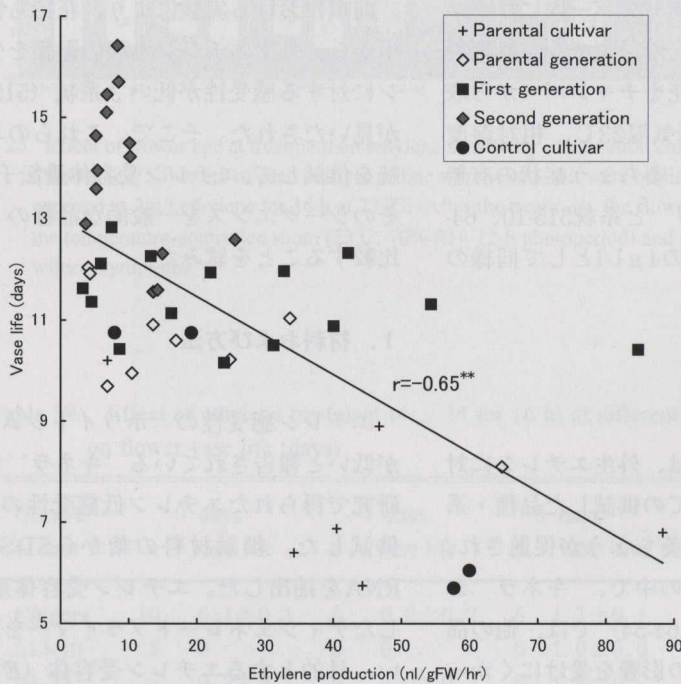


Fig. 24. Relationship between ethylene production at senescence and flower vase life.

\*\* : Significant at 1% level.

Ten cultivars and 38 selected lines shown in Fig. 23 were used.

Values of flower vase life are average of 1998 and 1999 data shown in Table 38.

## 第4節 選抜系統のエチレン感受性と低感受性系統の受容体遺伝子 (ETR) ホモログ

### 第1項 選抜系統のエチレン感受性

#### 1. 材料および方法

Fig. 25に示した10品種と選抜系統39系統を供試した。野菜茶試のガラス温室内ベッドで慣行法により栽培した株から、外花卉が水平状態の開花ステージで切り花を採花し、実験に供した。切り花の茎長を20cmに切り揃えた後、基部1節の着生葉を取り除き、蒸留水約100ml入りの三角フラスコに挿した。切り花は、実験開始日まで気温23℃、相対湿度70%、蛍光灯(光強度: 10  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>/s)で12時間日長に調節した恒温室内に置いた。エチレン感受性は、エチレン処理後の花持ちを調べることにより判定した。収穫日当日(0日目)または収穫から3、6、9日目に、三角フラスコに挿した切り花を50l容のアクリル製チャンバー内に入れ、2  $\mu$  l/lの濃度になるようエチレン標準ガスをシリンジで注入し、16時間エチレン処理を行った。各区毎に5花を供試した。エチレン処理時の温度条件は、23℃とした。処理時のエチレンガス濃度が均一となるように、チャンバー内にファンを設置してエチレン処理時に使用した。エチレン処理終了後、三角フラスコに挿した切り花をチャンバーから取り出して、温度制御した恒温室(気温23℃、相対湿度70%、蛍光灯12時間日長)に移し、萎ちょう症状の有無を毎日評価した。さらに、'キネラ'と系統515-10、64-13、64-54は、エチレン濃度を2倍の4  $\mu$  l/lとして同様の実験を行った。

#### 2. 結果および考察

一般に、カーネーション切り花は、外生エチレンに対し極めて感受性が高かった。すべての供試した品種・系統は、エチレン処理により花卉の萎ちょうが促進され、花持ち日数が大きく減少した。その中で、'キネラ'および3選抜系統(515-10、64-13、64-54)では、他の品種・系統に比べ外生エチレン処理の影響を受けにくかった。収穫日(0日目)にエチレン処理を行っても1.0日以上の花持ちを示し、エチレン低感受性と判定した(Fig. 25)。収穫日(0日目)にエチレン処理を行った実験の様子をPlate 14に示した。

選抜系統のエチレン感受性は、花の齢が増加するに従って低下する傾向があった。例えば、系統63-3、63-12、63-41は、0、3日目にエチレン処理をすると処理終了時には花卉が完全に萎ちょうし、高い感受性を示したが、6、9日目にエチレン処理を行うと処理終了後も1.0日以上の花持ちを示した。収穫日(0日目)に低感受性を示したのは系統515-10、64-13、64-54のみであったが、3、6、9日目に同様の実験を行うと低感受性を示す系統が増加した。9日目の感受性が最も低い系統が多かった。

さらに、低感受性を示した'キネラ'、系統515-10、64-13、64-54を供試して4  $\mu$  l/lのエチレン処理を行った場合の実験結果をTable 39に示した。'キネラ'と系統515-10は、0、3日目に処理を行った場合、処理終了後明らかな萎ちょう症状を示した。系統64-13は0日目に処理すると0.2日の花持ちであったが、3日目に処理すると2.0日の花持ちを示した。系統64-54はどの段階の花の齢においても1.0日以上の花持ちを示した。本実験結果から、系統64-54が最もエチレン感受性が低く、続いて64-13、'キネラ'、515-10という順であることがわかった。

### 第2項 低感受性系統の受容体遺伝子 (ETR) ホモログ

前項における実験により、花持ち性の良い選抜系統の中から、外生エチレン処理の影響を受けにくく、エチレンに対する感受性が低い3系統(515-10、64-13、64-54)が見いだされた。そこで、これらのエチレン低感受性系統を供試して、エチレン受容体遺伝子をクローニングし、そのシーケンスを一般的な品種の'ホワイトシム'と比較することを試みた。

#### 1. 材料および方法

エチレン感受性の'ホワイトシム'、エチレン感受性が低いと報告されている'キネラ'(Wuら, 1991b)、本研究で得られたエチレン低感受性の系統64-13、64-54を供試した。供試材料の葉からSDSフェノール法で全RNAを抽出した。エチレン受容体遺伝子単離用に設計したディジェネレートプライマーを用いてRT-PCRを行い、目的とするエチレン受容体(ETRまたはERS)遺伝子の部分配列約900bpを増幅した。増幅されたフラグメントはTAクローニングを行い、シーケンスの解析を行った。

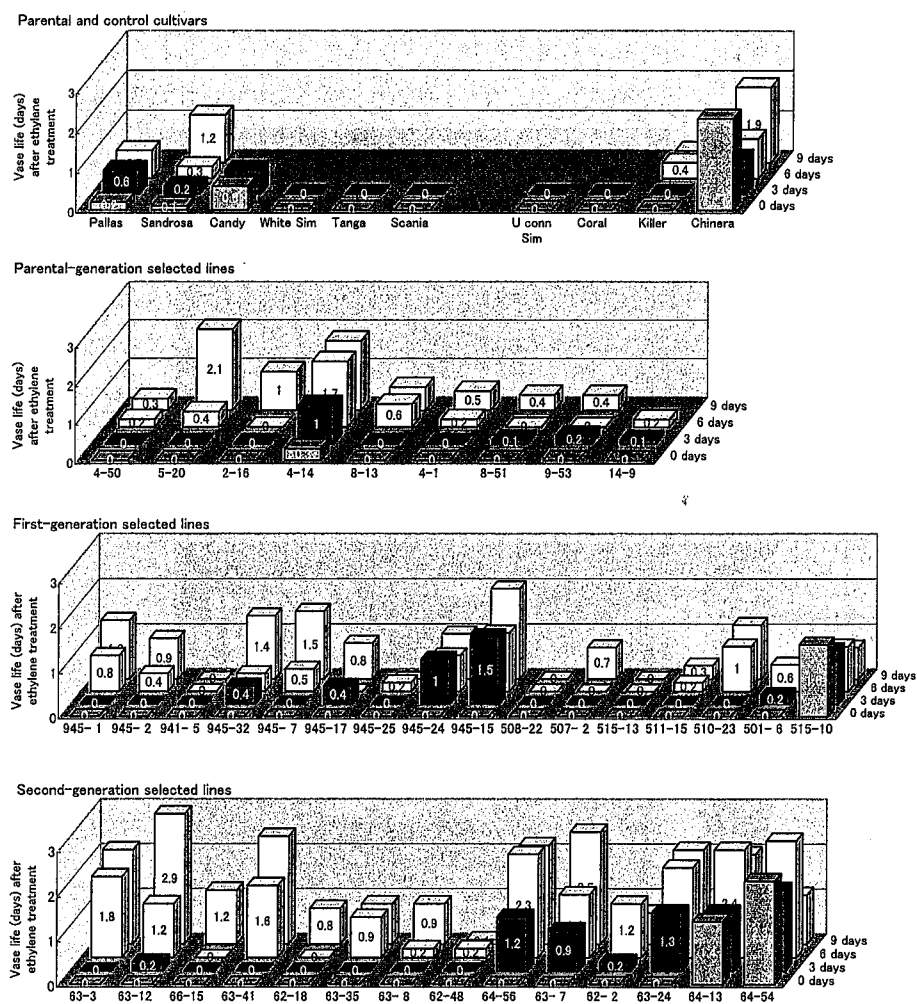


Fig. 25. Effect of flower age at treatment on ethylene sensitivity of carnation cultivars or selected lines. On average, 5 flowers of each cultivar or line were tested. Flowers of different ages were exposed to 2 $\mu$ l/l ethylene for 16 h at 23 °C. After the treatment, the flowers were transferred to the temperature-controlled room (23°C, 70% RH, 12-h photoperiod) and assessed daily for wilting symptoms.

Table 39. Effect of ethylene treatment (4  $\mu$  l/l for 16 h) at different flower ages on flower vase life (days).

Cultivar or line	0 days		3 days		6 days		9 days	
	n	vase life	n	vase life	n	vase life	n	vase life
Chinera	10	0.1 $\pm$ 0.1	5	0.2 $\pm$ 0.2	5	1.1 $\pm$ 0.1		n.t.
515-10	5	0	5	0	6	1.0 $\pm$ 0.0		n.t.
64-13	5	0.2 $\pm$ 0.2	5	2.0 $\pm$ 0.3	5	1.7 $\pm$ 0.2	5	2.0 $\pm$ 0.0
64-54	5	1.2 $\pm$ 0.4	5	1.4 $\pm$ 0.2	7	1.1 $\pm$ 0.0	5	1.9 $\pm$ 0.2

n: number of flowers tested.  $\pm$  indicates S.E. n.t.: not tested.

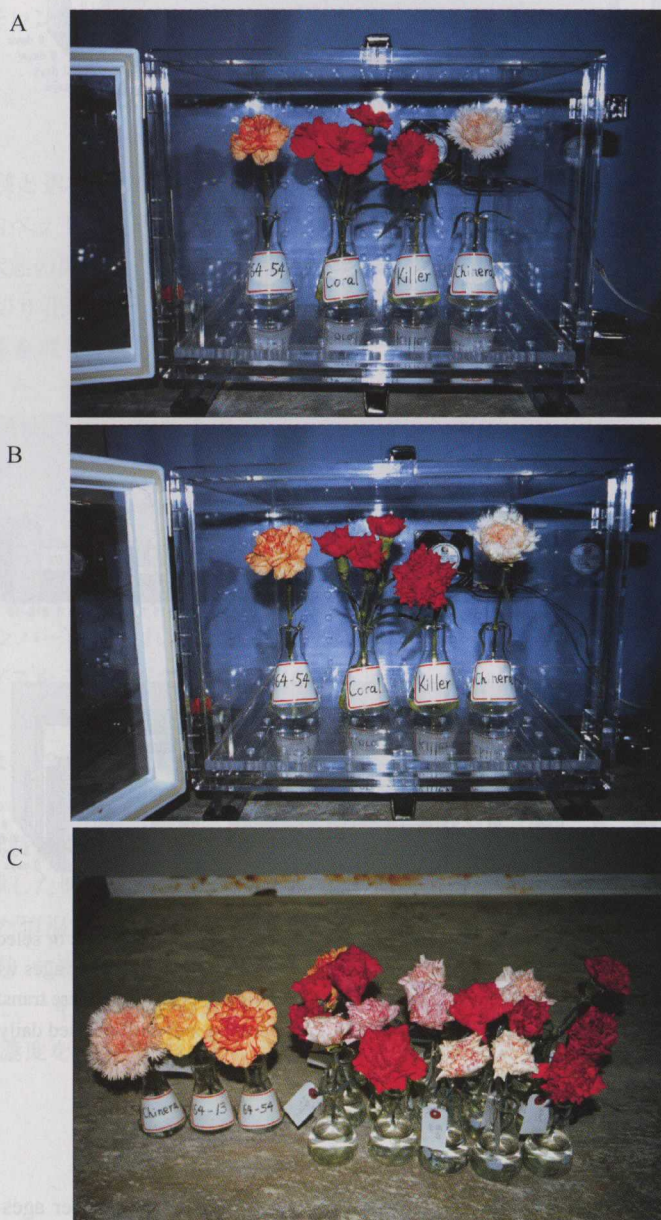


Plate 14. Effect of ethylene treatment ( $2 \mu$  l/l for 16 h) at 0 days on flower vase life.

A: Before treatment. Line 64-54, 'Coral', 'Killer' and 'Chinera' (left to right).

B: After treatment. Flowers were exposed to ethylene in a 50 l sealed transparent acryl chamber.

C: After treatment, the flowers were transferred to the temperature-controlled room ( $23^{\circ}\text{C}$ , 70% RH, 12-h photoperiod). Left: Low-sensitivity lines (64-13 and 64-54) and 'Chinera'. Right: Ethylene sensitive control.

2. 結果および考察

DC-ERS2およびDC-ETR1の推定アミノ酸部分配列をFig. 26に示した。供試したすべての品種・系統から、ERSタイプのエチレン受容体遺伝子のPCRフラグメント(897bp)が得られた。これらのアミノ酸配列は、カーネーションからすでに単離されているDC-ERS2(accession No. AF034770)とほぼ同様であり、変異がある場合にもこれまで知られている他の植物種のERS遺伝子の変異の範囲にあった。一方、ETRタイプのエチレン受容体遺伝子と考えられるPCRフラグメントもすべ

ての品種・系統から単離された。これまでカーネーションではETRタイプの報告はないが、得られた結果からカーネーションにもETR型受容体が存在することがわかった。本遺伝子を、カーネーションのETRタイプのエチレン受容体遺伝子(DC-ETR1)の部分配列として、DDBJ(DNA Data Bank of Japan)に登録した(accession No. AB035806)。このDC-ETR1は、メロンやリンゴのETRとアミノ酸レベルで約90%の類似性が認められた。DC-ETR1とDC-ERS2の配列は、DNAレベルで71.1%、アミノ酸レベルで74.6%が同一であった。各品種・系統におけるDC-ETR1のアミノ酸部分配列を比較したところ、‘ホワイトシム’に比べて‘キネラ’で

	1		50
DC-ERS2	<u>FIVLCGATHLINLWTF</u> SMHTKNVAIVMTIAKMATAAVSCVTALMLVHIIP		
DC-ETR1	<u>FIVLCGATHLINLWTF</u> RIHTKTVEIVMTTAKLLTAVVSCVTALMLVHIIP		
Cons	***** ** * **** * * *****		
	51		100
DC-ERS2	<u>DLLSVK</u> TREMFLRHKAELDKERGLILTQEETGRHVRMLTHEIRSTLDRH		
DC-ETR1	<u>DLLSVK</u> TRELFLKNAAQLDREMGLIRTQEETGRHVRMLTHEIRSTLDRH		
Cons	***** * * * * * *****		
	101		150
DC-ERS2	TILKTTLVELGRTLNLBECALWTPSQGTMTRLSHTLNHSMVVGSTVSMN		
DC-ETR1	TILKTTLVELGRTLALBECALWMPTRTGLELQLAYTLRQQYPVDYTVPIQ		
Cons	***** ***** * * * * * * * * * *		
	151		200
DC-ERS2	LSVISEVFNNTGAVRIPHTCPLVRTRPVSDRYRAPDVAVRVPLHHSNF		
DC-ETR1	LPVITQVFSTNRAVKISPNSPVARIRPVMGKYPGEVVAVRVPLHLSNF		
Cons	* *		
	201		250
DC-ERS2	<b>QINDW</b> PDNSAKNYAVMVLISPSDGIRKFRDHELELVEVVADQVAVALSHA		
DC-ETR1	<b>QINDW</b> PELSTKRYALMVLMLPSDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHA		
Cons	***** *		
	251		300
DC-ERS2	<b>AILED</b> SMRARDQLMEQNVALLARREAEMAIRARNDFLAVMNHMRTPM		
DC-ETR1	<b>AILEE</b> SMRAQQQLMEQNVALLARREAETAIRARNDFLAVMNHMRTPM		
Cons	**** *		

Fig. 26. Partial deduced amino acid sequence of the DC-ERS2 and DC-ETR1 in ‘White Sim’.  
 Cons: Consensus sequence. Identical amino acids are indicated by asterisks.  
 Sequences denoted with underlines represent putative transmembrane domains.  
 Sequences denoted in bold represent conserved region in bacterial histidine kinase domain.  
 Replacements in DC-ETR1: Tyr<sup>177</sup> to Asn, Asp<sup>180</sup> to Gly, Ser<sup>203</sup> to Thr, Ser<sup>206</sup> to Cys, Val<sup>214</sup> to Ile (‘Chinera’), Leu<sup>283</sup> to Pro (64-13), Ser<sup>131</sup> to Arg, Cys<sup>155</sup> to Arg (64-54).

は5個、64-13では1個、64-54では2個の変異が認められた (Fig. 26)。このDC-ETRIにみられた変異がカーネーションのエチレン感受性および花持ち性にどのように関わっているのか、さらに検討する必要がある。

### 第5節 選抜系統の自己触媒的エチレン生成量

カーネーション切り花にエチレン処理を行うと、花卉の急激な萎ちょうを引き起こし、同時に、自己触媒的にエチレン生成が促進されることが知られている (Mayakら, 1977; Halevy・Mayak, 1981; Borochoy・Woodson, 1989)。第3節、第4節で示したように、花持ち性による選抜と交配を繰り返すことにより、自然老化時のエチレン生成量が少ない系統や、外生エチレン処理を行った場合にも萎れにくい系統が得られたが、本節では、これらの系統を材料に、花の齢の進行に伴う自己触媒的エチレン生成量の変化を調べた。

### 1. 材料および方法

花持ち性の優れた第2世代選抜系統14系統と、対照品種として‘ホワイトシム’、‘スケニア’、‘サンドローサ’、‘キネラ’の4品種を供試した。

切り花の外生エチレン処理は、第4節第1項の実験と同様の方法で行った。蒸留水に挿した切り花に、収穫日から0、6日目にエチレン処理 ( $2\mu\text{l/l}$ で16時間)を行った。処理終了後の花の形態を観察し、温度制御した恒温室 (気温 $23^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度70%、蛍光灯12時間日長)内に8時間放置した。処理終了から8時間後に切り花の生体重を測定し、470ml容のガラス容器に $23^{\circ}\text{C}$ で1時間密閉した後、内部ガスをシリンジで0.5ml採取し、ガスクロマトグラフィー (島津GC-7A)でエチレン生成量を定量した。

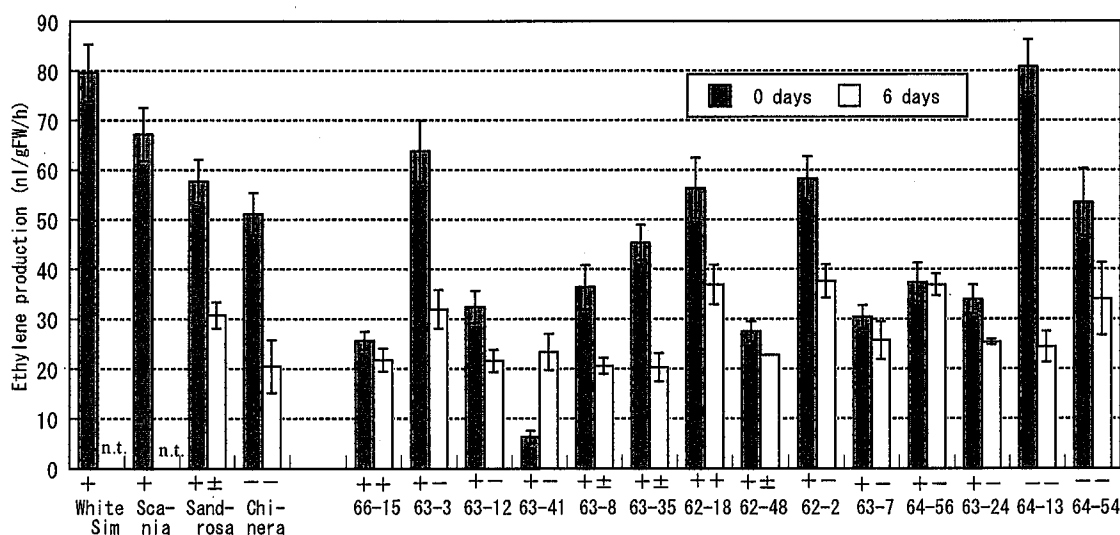


Fig. 27. Effect of flower age at treatment on ethylene-induced ethylene production in carnation cultivars or second-generation selected lines.

0 days: Flowers were exposed to  $2\mu\text{l/l}$  ethylene for 16 hours at  $23^{\circ}\text{C}$  immediately after harvest.

6 days: Flowers were aged for 6 days and then exposed to  $2\mu\text{l/l}$  ethylene for 16 hours at  $23^{\circ}\text{C}$ .

Then, they were transferred to air. After 8 hours, their ethylene production was determined.

+, - or ± represent the appearance of flowers after ethylene treatment.

+: All flowers showed wilting symptoms. -: All flowers did not show wilting. ±: Mixture of wilting and no wilting flowers.

n.t.: not tested. Vertical bars represent  $\pm$  S.E.

## 2. 結果および考察

第3節で示したように、供試した第2世代選抜系統は自然老化時のエチレン生成量が少ない特性を示すが、収穫日（0日目）に外生エチレン処理を行うと系統63-41以外の品種・系統ではエチレン生成が著しく促進された（Fig. 27）。系統64-13、64-54および‘キネラ’は、エチレン処理終了時に花卉の萎ちようは認められず外見上は健全な状態であったが、多量のエチレン生成が認められた。一方、系統63-41は、エチレン処理により花卉は著しく萎ちようしたが、エチレン生成量は極めて少なかった。6日目に同様の実験を行うと、ほとんどの品種・系統では0日目に比べエチレン生成量が減少したが、0日目の生成量が極めて少なかった系統63-41では逆に増加した。

以上の結果から、系統63-41は、収穫日におけるエチレン処理により花卉の萎ちようは生じるが、自己触媒的エチレン生成量が特異的に低い変異を有することが見いだされた。この系統63-41と同様の変異が、センスACO遺伝子を導入した花持ちの良い形質転換カーネーションで報告されている（Kosugiら, 2000）。それ以外の選抜系統では、花の齢の進行に従ってエチレン感受性が低下するとともに、自己触媒的制御の反応性も低下する傾向が認められた。また、系統64-13、64-54および‘キネラ’は、エチレン処理後外見上は花卉の萎ちようは生じていないが、多量のエチレン生成が誘導されており、自己触媒的エチレン生成能は有していることが明らかになった。したがって、エチレン処理による形態上の反応（花卉の萎れ）と自己触媒的エチレン生成は、付随的現象ではなく別個の独立した現象であることが示唆された。Kosugiら（2000）、Satohら（2000）による形質転換カーネーションを用いた実験でも、同様の結論が示されている。

### 第6節 AIB、STS処理が選抜系統の花持ちに及ぼす影響

花持ち性を改良した選抜系統に対するAIB、STSの品質保持効果について調査した。

#### 1. 材料および方法

第2世代選抜系統14系統と、対照品種として‘ホワイトシム’、‘タンガ’の2品種を供試した。野菜茶試のガ

ラス温室内ベッドで慣行法により栽培した株から、外花卉が水平状態の開花ステージで切り花を採花し、実験に供した。実験は1999年12月から2000年4月の期間に行った。切り花は、茎長を50cmに切り揃えた後、基部2節の着生葉を取り除いた。対照区、AIB20mM連続処理区、AIB60mM 24時間前処理区、STS0.5mM 2時間前処理区の4区を設けた。各試験区の供試本数は、Table 40に示した。花瓶は温度制御した恒温室（気温23℃、相対湿度70%、蛍光灯12時間日長）内に置いた。花持ち日数は、個々の切り花をTable 20に示した鮮度の評点で毎日評価し、収穫日から鮮度の評点が3未満に達した日までの日数の平均値で示した。

## 2. 結果および考察

対照品種‘ホワイトシム’、‘タンガ’の花持ち日数は、対照区の5.4日、6.1日に対しAIB 20mMの連続処理でそれぞれ10.2日、11.4日と約1.9倍に延長した。両品種にAIB前処理を行った場合も、対照区の約1.8~2倍の品質保持効果を示した。STS前処理の花持ち日数は、それぞれ11.6日、12.0日と対照区の約2~2.2倍に延長した。これを第2世代選抜系統63-3、63-12、66-15等の薬剤処理を行わない対照区の花持ち日数と比較すると、花持ち性を育種により改良した選抜系統の方が、STS、AIBで薬剤処理をして花持ちを延長した通常の品種よりも花持ちが良いことが明らかになった（Table 40）。この結果は、交雑育種により花持ち性の改良を進めれば、STSなどの薬剤処理の必要性がなくなることを示している。

次に、花持ちの優れた第2世代選抜系統にさらにAIB、STSの薬剤処理を行い、花持ち日数を調べた。系統63-35では、薬剤処理の効果は低かった。系統63-41ではAIBによる連続処理、前処理では対照区に比べ5日程度の花持ち延長効果が認められたが、STS前処理では効果が認められなかった。系統63-24では逆にSTS前処理では対照区に比べ4日程度の花持ち延長効果が認められたが、AIB連続処理、前処理では効果が認められなかった。それ以外の系統ではAIB連続処理、前処理、STS前処理によって花持ちがさらに延長した。しかし、対照品種のような無処理の1.8~2.2倍という顕著な品質保持効果は得られず、最高で系統64-13にSTS処理を行った場合の1.6倍の効果にとどまった。第2世代選抜系統で最も花持ちの良い系統66-15ではAIB連続処理区で対照区の18.7日からさらに5日花持ちが延長し23.7日という著しく長い花持ち日数を示した。

系統63-41は、第5節の実験においてエチレン処理により花卉は著しく萎ちようしたが、自己触媒的エチレン生成量は極めて少ない傾向を示した。本実験でのエチレン作用阻害剤のSTS処理による花持ち延長効果が認められないという結果とあわせると、系統63-41はエチレンの自己触媒的エチレン生成の制御がブロックされている変異体であることが示唆された。AIB、STSの効果が認められない系統63-35、STSは効果があるがAIBによる効果がみられない系統63-24に関しても、エチレンに関するこれまでに報告されていない変異が存在している可能性があり、今後検討する必要がある。

## 第7節 選抜系統の特性調査

### 1. 材料および方法

第2世代選抜系統14系統と交配親品種6品種を供試した。定植約1か月前に、基肥として堆肥200kg/a、苦土石灰100g/m<sup>2</sup>、ようりん100g/m<sup>2</sup>、CDU化成(N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=12:12:12)125g/m<sup>2</sup>を用土に施用し、ダゾメット微粒剤(商品名:バスアミド粉粒剤)で土壤消毒を行った。ガラス温室内の90cm幅ベッドの中央20cmを中抜きし、10×20cm(栽植密度:36.5株/m<sup>2</sup>)で1品

Table 40. Effect of treatments of AIB or STS on the prolongation of the vase life of carnation cultivars and second-generation selected lines under standard conditions (23 °C, 12-h photoperiod, 70% RH).

Cultivar or selected line	Control		AIB 20mM		AIB 60mM 24 hours		STS 0.5mM 2 hours	
	(distilled water)		continuous treatment		pretreatment		pretreatment	
	Vase life		Vase life		Vase life		Vase life	
	n (days)± S.E.		n (days)± S.E.		n (days)± S.E.		n (days)± S.E.	
Control cultivars								
White Sim	10	5.4±0.3	5	10.2±0.6 (189%)	5	9.8±0.7 (181%)	5	11.6±1.7 (215%)
Tanga	8	6.1±0.5	5	11.4±0.8 (187%)	5	12.2±1.6 (200%)	5	12.0±1.9 (197%)
Second-generation selected lines								
63-3	10	14.6±0.7	n. t.		5	17.4±0.6 (119%)	5	17.0±0.3 (116%)
63-12	8	14.8±0.5	5	18.4±0.6 (124%)	5	18.8±1.2 (127%)	5	16.0±2.3 (108%)
66-15	9	18.7±1.7	3	23.7±0.8 (127%)	n. t.		n. t.	
63-41	6	15.0±0.9	4	19.8±2.1 (132%)	5	20.6±0.7 (137%)	4	14.0±0.9 (93%)
62-18	10	10.5±1.5	5	17.6±2.3 (168%)	5	13.8±0.6 (131%)	5	15.4±2.2 (147%)
63-35	10	15.2±0.8	5	16.6±0.2 (109%)	5	17.0±1.3 (112%)	5	16.0±1.1 (105%)
63-8	9	12.2±0.7	5	16.6±0.4 (136%)	5	18.6±1.6 (152%)	5	15.2±1.5 (125%)
62-48	6	13.0±0.7	5	16.2±1.2 (125%)	5	15.6±1.0 (120%)	5	16.8±2.4 (129%)
64-56	10	11.1±0.8	5	16.4±1.5 (148%)	5	17.0±1.0 (153%)	5	14.4±2.0 (130%)
63-7	10	12.6±1.4	5	15.2±0.9 (121%)	5	17.4±0.8 (138%)	5	16.6±1.2 (132%)
62-2	10	11.6±0.7	5	15.2±1.9 (131%)	5	16.2±1.4 (140%)	5	14.8±1.7 (128%)
63-24	10	12.3±0.5	5	12.2±0.7 (99%)	5	13.2±1.9 (107%)	5	16.4±0.7 (133%)
64-13	10	9.7±0.6	5	13.7±1.9 (141%)	5	14.2±1.8 (146%)	5	15.8±1.0 (163%)
64-54	10	12.1±0.6	5	16.0±0.3 (132%)	5	15.4±1.7 (127%)	n. t.	

n: number of flowers tested. n. t.: not tested.

Values (%) in parentheses were based on control (distilled water).

STS 0.5mM solution was prepared with the stock solution of AgNO<sub>3</sub>(0.1M) and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O(0.1M) at the molar ratio of 1 silver to 8 thiosulfate.



種・系統当たり6～12株を定植した。新葉展開後1回摘心した。冬期最低夜温を13℃とした慣行法により栽培し、主要な特性を調査した。

収量、開花始期以外の特性は、1品種・系統当たり5本の切り花を調査に用いた。第2世代選抜系統は1998年春に、交配親品種は2000年春に調査を行った。草丈は、植物体の地際から採花する切り花の最頂部までの長さとした。花径は、外花卉が水平状態の開花ステージで測定した。花卉の厚さは、外花卉の中央部をシックネスゲージで挟み測定した。

収量、開花始期の調査に関しては、1997年6月～1998年5月、1998年6月～1999年5月、1999年6月～2000年5月の各年次に供試品種・系統から挿し穂を採取して増殖し、改植して株を更新して合計3回の調査を実施した。各年次の挿し芽、定植を行った期日はTable 43に示した。収量は調査期間中に採花した1株当たりの切り花数で示した。開花始期は、各品種系統で最初に開花がみられ、切り花を収穫した日で示した。

得られたデータをもとに、草丈、花径、花卉数、花卉厚さ、開花始期、収量および花持ち日数相互間の相関係数を計算した。交配親品種と第2世代選抜系統では、1997、1998年の定植日にそれぞれ10日、7日の違いがあるので、開花始期、収量のデータに関しては、全供試品種・系統の定植日が同一の1999年6月～2000年5月に得たデータを相関係数の計算に用いた。

## 2. 結果および考察

第2世代選抜系統と交配親品種の主要な特性の調査結果をTable 41に示した。第2世代選抜系統では、赤、桃、白に赤条、黄に桃条、オレンジに赤条の5種類の花色が分離した。草丈に関しては、最も低い系統63-8で87.2cm、最も高い系統63-12では111.8cmに達し、いずれの系統も切り花にするための十分な草丈が得られた。花径は交配親品種に比べ、第2世代選抜系統はやや小さい傾向があり、最も花径の大きい系統63-12、64-13では6.6cm、最

Table 41. Characteristics of parental cultivars and second-generation selected lines.

Cultivars or lines	Flower color	Plant height (cm)	Flower diameter (cm)	Number of petals	Petal thickness (mm)	Vase <sup>2</sup> life (days)
Pallas	Yellow with red stripes	86.0	7.1	44.7	0.24	8.9
Sandrosa	Pink	93.4	6.0	50.3	0.28	10.2
Candy	Yellow	87.4	7.2	43.3	0.28	6.9
White Sim	White	90.6	6.8	52.3	0.24	5.8
Tanga	Red	95.8	6.9	55.3	0.29	6.8
Scania	Red	88.6	7.5	62.5	0.25	6.4
63-3	Red	90.3	6.5	67.0	0.34	15.7
63-12	Pink	111.8	6.6	64.0	0.33	15.5
66-15	White with red stripes	109.6	5.8	58.7	0.34	16.4
63-41	Pink	103.6	6.1	70.3	0.33	15.1
62-18	Pink	89.2	5.8	59.3	0.31	14.2
63-35	Red	89.4	5.3	50.0	0.30	14.5
63-8	Red	87.2	5.7	57.0	0.36	14.6
62-48	Red	96.0	6.4	80.0	0.31	14.0
64-56	Yellow with pink stripes	110.2	6.1	61.0	0.33	12.6
63-7	Red	107.0	5.9	76.0	0.29	12.9
62-2	Red	104.2	6.2	67.0	0.29	13.6
63-24	Red	103.6	6.4	45.3	0.30	12.3
64-13	Yellow with pink stripes	94.8	6.6	78.3	0.32	11.6
64-54	Orange with red stripes	101.2	6.5	59.7	0.30	11.6

<sup>2</sup> Values of vase life are average of 1998 and 1999 data shown in Table 38.

Values except vase life are means of 5 flowers.

も小輪の系統63-35では5.3cmであった。花卉数は、系統63-24の45.3枚から系統62-48の80.0枚までの範囲にあり、交配親品種と比べると多い傾向があった。花卉の厚さは、第2世代選抜系統では交配親品種に比較して厚い傾向が認められた。

開花始期、収量の調査結果は、Table 42に示した。第2世代選抜系統の開花始期は交配親品種に比較して遅い傾向があった。特に、花持ちの最も優れる系統66-15や63-12では開花始期がいずれも2月26日と、交配親品種

よりも約3か月遅かった。収量性に関しては、系統63-35、62-48、64-56、63-7、62-2、63-24、64-54では株当たり収量が5.0本以上で交配親品種と同等の収量を示した。一方、系統66-15では生育が遅く、収量も株当たり1.9本と極端に低い生産性を示した。

草丈、花径、花卉数、花卉厚さ、開花始期、収量および花持ち日数相互間の相関を調べた (Table 44)。花持ち日数と花径の間には高い有意な負の相関 ( $r=-0.74^{**}$ ) が、花持ち日数と花卉の厚さとの間には高い有意な正の

Table 42. Earliness of flowering and yield (number of cut flowers / plant) in parental cultivars and second-generation selected lines.

Cultivars or lines	Onset of flowering				Yield (number of cut flowers / plant)			
	1997-98	1998-99	1999-2000	mean	1997-98	1998-99	1999-2000	mean
Pallas	n.t.	10/16	12/13	11/14	n.t.	4.8	6.0	5.4
Sandrosa	10/28	10/16	10/5	10/16	3.8	5.6	3.6	4.3
Candy	n.t.	10/16	11/15	10/31	n.t.	5.3	7.0	6.2
White Sim	10/28	11/5	10/12	10/25	5.8	4.0	4.6	4.8
Tanga	n.t.	12/25	10/29	11/26	n.t.	4.6	6.8	5.7
Scania	10/20	10/26	10/29	10/25	4.3	6.7	4.4	5.1
63-3	2/18	11/20	12/3	12/24	2.0	2.9	5.4	3.4
63-12	3/2	2/25	2/25	2/26	2.4	2.5	2.7	2.5
66-15	4/6	2/10	2/4	2/26	2.1	1.8	1.7	1.9
63-41	1/19	12/30	1/17	1/11	3.8	3.3	3.4	3.5
62-18	12/15	11/18	12/6	12/3	4.0	4.6	4.1	4.2
63-35	12/15	11/4	11/1	11/16	4.6	7.3	5.9	5.9
63-8	12/19	12/8	12/3	12/10	3.0	4.0	6.2	4.4
62-48	12/5	11/10	12/9	11/28	7.0	7.2	2.7	5.6
64-56	12/15	2/8	1/11	1/11	5.8	4.6	6.0	5.5
63-7	12/22	12/21	12/28	12/23	6.5	5.8	5.1	5.8
62-2	11/4	10/30	10/1	10/22	5.2	7.1	5.7	6.0
63-24	11/18	11/20	12/15	11/27	4.4	6.6	6.8	5.9
64-13	1/12	10/16	12/15	12/4	3.1	2.8	5.0	3.6
64-54	11/28	11/20	12/13	11/30	6.7	5.4	3.9	5.3

n.t.: not tested. Cultural data of experiments are shown in Table 43.

Yield data were collected from the onset of flowering (early October) until May 31 every year.

Table 43. Cultural data of parental cultivars and second-generation selected lines.

Culture year	Cultivar or line	Planting of cuttings in rooting medium	Planting of rooted cuttings in soil beds	Experiment terminated
1997-98	Cultivar	June 11, 1997	July 4, 1997	May 31, 1998
	Selected line	June 23, 1997	July 14, 1997	May 31, 1998
1998-99	Cultivar	June 15, 1998	July 7, 1998	May 31, 1999
	Selected line	June 9, 1998	June 30, 1998	May 31, 1999
1999-2000	Cultivar	June 10, 1999	June 29, 1999	May 31, 2000
	Selected line	June 8, 1999	June 29, 1999	May 31, 2000

All cultivars and lines were grown in a greenhouse at the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea by standard production methods.

The temperature inside greenhouse was maintained above 13 °C.

Rooted cuttings were planted at a density of 36.5 plants/m<sup>2</sup>.

Table 44. Correlation coefficients matrix between characters.

	Plant height	Flower diameter	Number of petals	Petal thickness	Onset of flowering	Yield
Flower diameter	-0.26					
Number of petals	0.36	-0.14				
Petal thickness	0.39	-0.58**	0.39			
Onset of flowering	0.60**	-0.17	0.29	0.58**		
Yield	-0.37	0.19	-0.44	-0.21	-0.42	
Vase life	0.45*	-0.74**	0.42	0.82**	0.57**	-0.40

\*\* , \* : Significant at 1% level and 5% level, respectively.

相関 ( $r=0.82^{**}$ ) が認められた。また、花持ち日数と開花始期、草丈との間には有意な正の相関 ( $r=0.57^{**}$ 、 $0.45^{*}$ ) が認められた。

本研究では、選抜はすべて切り花の花持ち日数をもとに行っており、その他の形質の優劣は選抜の対象としていない。花持ち性による交配と選抜を3回繰り返した第2世代選抜系統では、花径がやや小さくなり、開花始期が遅れる傾向がみられた。今後、花持ち性が優れ、かつ実用性に富む品種を育成するには、花持ち性に加えて花径や早晚性も考慮した選抜・交配を行う必要がある。

## 第8節 摘要

カーネーションの花持ち性簡易検定法として、切断葉片エチレン検定法と種子発芽時のエセフォン処理によるエチレン感受性検定の有用性を検討した。交配親品種と親世代の1次選抜系統を供試して、花持ち日数と葉片エチレン生成量との関係を調べたところ、有意な負の相関が認められた ( $r=-0.38^{**}$ )。しかし、簡易検定法として使用するには相関が低く、葉片エチレン検定法のみで選抜を進めるのは危険であると判断した。エセフォン処理発芽試験では、エセフォン10ppm処理による種子発芽時の根長と切り花のエチレン感受性との間には有意な相関関係が認められなかった。この原因は、種子発芽時の内生エチレン量が影響したためと考えられ、エセフォンとエチレン生合成阻害剤AIBを併用処理することによりエチレン低感受性個体を選抜できる可能性が示唆された。

花持ち性による選抜とその選抜系統間での交配の結果、全実生の平均花持ち日数が、2世代後で3.6日とい

う大きな増加を示した。カーネーションの花持ち性は比較的少数の遺伝子に支配された特性であることが示唆され、選抜と交配によるカーネーションの花持ち性の改良が可能であることが明らかになった。40系統の選抜系統はすべて、'ホワイトシム' よりも有意に長い花持ち日数を示した。さらに、1998年には12系統、1999年には15系統が育種材料として用いた6品種の中で最も花持ちの良い'サンドローサ' よりも有意に長い花持ち日数を示した。特に系統66-15は、STSなどの品質保持剤処理無しで'ホワイトシム' の2.5倍(1998年)から3.2倍(1999年)という非常に優れた花持ち性を示した。

第2世代選抜系統は、老化時のエチレン生成量が低い傾向を示した。系統63-3ほか9系統では生成量が10nl/gFW/h以下と非常に少なく、エチレンのクライマクテリックライズが起こらなかった。これらの10系統では、花卉の老化時に通常の品種で生じるインローリングや急激な萎ちようがみられず、花卉が生気を失い、褐変するという症状で観賞価値を失った。エチレン生成量と花持ち日数との間には有意な負の相関 ( $r=-0.65^{**}$ ) が認められた。

3つの選抜系統(515-10、64-13、64-54)では、他の選抜系統に比べ外生エチレン処理の影響を受けにくく、エチレン低感受性と判定された。系統64-13、64-54は、低感受性品種'キネラ' よりも感受性が低いことがわかった。選抜系統のエチレン感受性は、花の齢が増加するに従って低下する傾向があった。

これまでカーネーションではエチレン受容体遺伝子に関してETRタイプの報告はなかったが、カーネーションにもETR型受容体が存在することがわかった。これをDC-ETR1として登録した(accession No. AB035806)。

このDC-ETR1のアミノ酸部分配列を比較したところ、'ホワイトシム'に比べて'キネラ'では5個、64-13では1個、64-54では2個の変異が認められた。

系統63-41は、収穫日における自己触媒的エチレン生成量が特異的に低かった。それ以外の選抜系統では、花の齡の進行に従ってエチレン感受性が低下するとともに、自己触媒的制御の反応性も低下する傾向が認められた。また、エチレン低感受性系統64-13、64-54および'キネラ'は、エチレン処理後形態的には花卉の萎ちようは生じていないが、多量のエチレン生成が誘導されており、自己触媒的エチレン生成能は有していることが明らかになった。エチレン処理による形態上の反応（花卉の萎れ）と自己触媒的エチレン生成は、付随的現象ではなく別個の独立した現象であることが示唆された。

系統66-15等の選抜系統は、AIB、STS処理によって花持ちを延長した通常の品種よりも花持ちが良いことが明らかになった。大部分の選抜系統ではAIB連続処理、前処理、STS前処理によって花持ちがさらに延長した。系統63-41はエチレン作用阻害剤のSTS処理による花持ち延長効果が認められず、エチレンの自己触媒的エチレン生成の制御がブロックされている変異体であることが示唆された。

第2世代選抜系統では、花径がやや小さくなり、開花始期が遅れる傾向がみられた。今後、花持ち性が優れ、かつ実用性に富む品種を育成するには、花持ち性に加えて花径や早晚性も考慮した選抜・交配を行う必要がある。

## 第4章 総合考察

カーネーション萎ちよう細菌病は、1964年に日本での初の被害が報告された後、1970年代には全国のカーネーション産地で被害が発生し、被害面積が増大した。その後、本病の生態と防除法の究明がなされたが、防除は薬剤や蒸気による土壌消毒に頼っているのが現状である。

本病のような難防除性の土壌伝染病害の被害を軽減するには、抵抗性品種の利用が最も有効であると考えられる。そこで、本研究の第1章においては、萎ちよう細菌病抵抗性育種に取り組んだ。抵抗性育種を効率的に進めるために、抵抗性の簡易検定法を検討した。確立した浸根接種による簡易検定法により、大量の材料を扱う検定が可能となり、抵抗性遺伝子源の探索の効率化につながった。カーネーション栽培品種277品種、ダイアンサス属野生種70種類を供試して、抵抗性育種素材を検索した。萎ちよう細菌病抵抗性には大きな品種間差、種間差があることが明らかになり、検定結果から抵抗性の程度を5区分に分けて品種・野生種の抵抗性程度の分類を行った。カーネーション品種には適当な育種素材が見いだせなかったが、強抵抗性を示す野生種*D. capitatus*、*D. henteri*が見いだされて、種間交雑による抵抗性育種の可能性が示された。野生種*D. capitatus*に存在する抵抗性を種間交雑によりカーネーションに導入することに成功し、抵抗性中間母本'カーネーション農1号'を育成した。

また、RAPD法を用いて萎ちよう細菌病抵抗性の遺伝子座と連鎖したRAPDマーカーを得ることができた。これまでは植物に病原細菌を接種し、定植後の抵抗性を判定するには接種から3か月という時間を要し、大量の個体数を扱うには大きな労力を必要とした。しかし、得られたRAPDマーカーを用いれば、幼苗期にDNAを抽出し調査することにより、接種検定をせずに抵抗性遺伝子の有無を判定できる。このことによって、萎ちよう細菌病抵抗性育種の育種年限を大幅に短縮できると考えられる。

萎ちよう細菌病のレース分化の有無に関しては、これまで6菌株を用いて検討してきた。同一の種・品種に対する発病力には菌株の違いによる差が認められたが、供試した6菌株で、菌株と品種・系統間に相互作用や寄生性の分化はみられなかった。これまで、植物病原細菌では典型的なレースの存在が証明された例は少ない（後藤、1981）が、ナス科野菜青枯病（*Pseudomonas*

*solanacearum*)、ダイズ斑点細菌病 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)、ワタ角斑病 (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*)、イネ白葉枯病 (*X. campestris* pv. *oryzae*) などの細菌病でレースの存在が認められている (後藤, 1990; 尾崎・木村, 1992)。抵抗性品種を育成しても、ハクサイの根こぶ病などのように、レースによる抵抗性品種のり病化が問題となる場合がある (釘貫・南, 2000)。カーネーション萎ちよう細菌病についても、このような観点から、さらに供試菌株数を増やし、レースの有無に関する検討を続ける必要がある。また、萎ちよう細菌病抵抗性に種間・品種間差異が生じるメカニズムについては明らかにされていないので、この方面の基礎研究が進み、抵抗性の機作が解明されることを期待する。

現在までに、花きにおいて病害抵抗性育種に取り組まれたものは、本研究によるカーネーション萎ちよう細菌病をはじめ、カーネーション萎ちよう病、キク白さび病など極めて少ない。しかし、多くの花き類において様々な病害に対する抵抗性に品種間差が認められており (山口, 1989; 池田, 1997)、抵抗性品種育成の可能性がある。省力栽培や農薬による環境問題を防止する上でも、花きの病害抵抗性育種は今後ますます重要であり、進展が期待される。

第2章においては、STSに替わる品質保持剤の検索を行った。成分に重金属を含まない5種類の薬剤のカーネーション切り花に対する品質保持効果を調べ、AIBが最も有望と判断し、その処理法を明らかにした。また、AIBに硝酸カルシウムを添加することにより、連続処理の場合はAIBの使用量を半減できること、前処理の場合はその品質保持効果がさらに高まることを明らかにした。

近年、カーネーションやそれ以外の切り花に対するAIBの品質保持効果を調べた研究がいくつか報告されている。Shimamuraら (1997) は、ハイブリッドスターチスにおいてAIB、AOAの前処理による品質保持効果を調べたところ、AOAはほとんど効果がみられないのに対し、AIBでは顕著な効果を認めた。AIBは蕾の開花に対しても促進効果を示した。さらに、スクロースとAIBを併用処理すると、蕾の開花が促進されるだけでなく、花の萎ちようを抑制し、高い品質保持効果を示すことを明らかにした。

宇田ら (1997) は、エチレン阻害剤9種類について、カーネーション、ラークスパー、スイートピー切り花の品質保持期間の延長効果をSTSと比較し、実用化の可能

性を調べている。AIBを前処理したカーネーション切り花の品質保持期間は無処理の2倍程度に伸び、STSと同程度の効果が認められた。しかし、品質保持効果が最長のAIB400mMで24時間処理では品質保持期間が15.2日とSTS処理の11.0日を上回ったが、葉に激しいクロロシスが発生した。ラークスパーではAIB処理によって落花を抑制することができなかった。スイートピーではAIB50mM 24時間処理で品質保持期間は4.3日となり、無処理の3.0日よりやや長くなったが、STS処理の6.0日に比べ効果が劣った。

以上の報告から、AIBはカーネーション、ハイブリッドスターチスには顕著な品質保持効果が認められるが、ラークスパー、スイートピーには効果が低いことが判明した。STSは多くの種類の切り花に対し品質保持期間延長に効果があることから、AIBは汎用性という面ではSTSに劣ると考えられた。一方、本研究において明らかにしたAIBのカーネーションに対する顕著な品質保持効果については、宇田ら (1997) の研究によっても証明された。将来、STSの使用が規制されることになれば、STSに匹敵する効果を持ち、AOAよりも安価であるAIBはカーネーションの品質保持剤として重要となるであろう。

第3章においては、選抜と交配を繰り返すことにより、遺伝的に花持ちの良いカーネーションの育種が可能であることを示した。選抜にはエチレン生成量やエチレン感受性を指標とするのではなく、すべて切り花の花持ち性によって選抜を行った。多くの選抜系統はエチレン低生成量を示し、さらに3系統は低感受性を示した。さらに、親世代から2回の選抜と交配により、第2世代では3.6日の花持ちの増加をもたらした。これらの結果は、カーネーションの花持ち性は、エチレン生成量やエチレン感受性に関連した少数の遺伝子に支配された形質であることを示している。

交配親の6品種のうち、'サンドローサ'は極端に低いエチレン生成量を示した。第2世代選抜系統14系統はすべて'サンドローサ'の後代の系統である。この結果は、選抜系統の低エチレン生成量の形質は'サンドローサ'から導入されたことを示しており、エチレン低生成量の形質は後代に遺伝することが証明された。

本研究により、他の品種系統に比べ、外生エチレン低感受性の3系統 (515-10, 64-13, 64-54) が得られた。特に、系統64-13, 64-54は低感受性品種として知られている'キネラ' (Wuら, 1991b) よりもさらに感受性が低かった。しかし、これらの系統は、老化時のエチレン

生成量が少ない特性の系統63-3、63-12、66-15、63-41などに比べると花持ち性が劣った。これらの結果は、カーネーションの花持ち性を改良する上で、若い齢でのエチレン低感受性よりも老化時の低生成量の方が効果的であることを示唆している。しかし、若い齢でのエチレン低感受性も、輸送時等のエチレンに汚染された環境下における切り花の品質保持を考慮すると重要な形質である。今後は、エチレン低感受性とエチレン低生成量を組み合わせた育種にも取り組む必要がある。

一般に、開花から老化までの花の齢が増加するにつれてエチレン感受性も高まるのが、ペチュニア (Whitehead・Halevy, 1989)、ペラルゴニウム (Denekeら, 1990)、トルコギキョウ (Ichimuraら, 1998)、ハナスベリヒユ (Ichimura・Suto, 1998)、トレニア (Gotoら, 1999) などの多くの花きで報告されている。カーネーションでは、'ホワイトシム' を用いて蕾のステージから開花までの花の齢が増加するにつれてエチレン感受性が高まるのが報告されている (Barden・Hanan, 1972; Camprubi・Nichols, 1978; Woodson・Lawton, 1988)。一方、開花から老化までの成熟したカーネーションで感受性の変化を明らかにした報告は少ない。Mayak・Tirosh (1993) は、'サンドローサ' のエチレン感受性は開花後の花の齢の増加に従って低下することを示した。しかし、彼らはその感受性の変化を 'ホワイトシム' のようなエチレン生成量の多い通常の品種を用いて比較を行っていない。本研究で得られた選抜系統は、エチレン感受性に関して 'サンドローサ' と同様の変化を示した。この選抜系統における感受性の変化が低エチレン生成量の花持ちの良い品種・系統に独特のものなのか、なぜ感受性が花の齢の増加に従って低下するのかを明らかにするにはさらに検討が必要である。

低感受性を示した系統515-10、64-13、64-54は、'キャンディ'、'サンドローサ' の後代である。これらの2品種は、'ホワイトシム'、'タンガ'、'スケニア' に比べるとわずかであるが感受性が低い。Wolteringら (1993) は、外生エチレンに対する低感受性は遺伝する特性であることを報告している。したがって、系統515-10、64-13、64-54の低感受性は、この2つの親品種の持つ低感受性に関連した遺伝子が集積したという可能性がある。

本研究では、従来通りの選抜と交配の手法を用いて、多数の花持ちの良いカーネーション系統を育成した。一方で、近年は遺伝子組換え技術を利用した花持ちの良い花きの作出が報告されている。遺伝子組換えによる植物の育種は、すでに基礎研究の段階から実用化の段階に入

っている。カーネーションでは、アンチセンスACC酸化酵素遺伝子を導入し花持ち性を改良した例 (Savinら, 1995) や、アラビドプシスのエチレン非感受性変異体から単離された受容体遺伝子 (*etr1-1*) を導入し、花持ちが著しく改良された形質転換体の作出例 (Bovyら, 1999) が報告されている。これらの2つの報告は、遺伝子組換えはカーネーションの花持ち性の向上に極めて有効であることを示している。アンチセンスACC酸化酵素遺伝子を導入した形質転換体 (#705、#2373B) の花持ち日数は、21℃の温度条件で8~9日程度であった。アラビドプシスの *etr1-1* 遺伝子を導入した形質転換植物 (No.7086、8018) の花持ち日数は、20℃の温度条件で24日と、対照とした非形質転換体の花持ち日数の3倍近い花持ちを示した。一方、本研究で得られた系統66-15の花持ち日数は、23℃の温度条件で1998年には15.3日、1999年には17.5日と、'ホワイトシム' の2.5倍から3.2倍の花持ちを示した。花持ち調査の温度条件を考慮すれば、アラビドプシスの *etr1-1* 遺伝子を導入した形質転換植物と、本研究において交雑育種で得た選抜系統の花持ち性は変わらないと推定される。カーネーションは1世代に必要な時間が比較的短く (約1年)、選抜と交配による改良には、チューリップのような球根植物に比べ長い年月を必要としない。本研究で得られた結果は、カーネーションの選抜と交配による花持ち性の改良は、エチレン関連遺伝子組換えによる改良と同様に実用的であることを示している。

本研究において、カーネーションの萎ちょう細菌病抵抗性育種に関して、野生種の中に有望な抵抗性素材 *Dianthus capitatus* を見だし、カーネーションとの間で種間交雑を行い、野生種の持つ抵抗性をカーネーションに導入することに成功した。カーネーションの品質保持に関しては、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸 (AIB) の連続処理および前処理の有効性とその使用条件を明らかにした。交雑育種による花持ち性の向上に関しては、選抜と交配によるカーネーションの花持ち性の改良が可能であることを示し、遺伝的に優れた花持ち性を有し、かつエチレン低生成量または外生エチレン低感受性の系統の作出に成功した。本研究は、カーネーションの品質保持技術や育種研究に新たな道を拓いたと考える。

#### 引用文献

- Apelbaum, A., S. Y. Wang, A. C. Burgoon, J. E. Baker and M. Lieberman. 1981. Inhibition of the

- conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. *Plant Physiol.* 67: 74-79.
- Baker, J. E., C. Y. Wang, M. Lieberman and R. E. Hardenburg. 1977. Delay of senescence in carnations by rhizobitoxine analogue and sodium benzoate. *HortScience* 12: 38-39.
- Baker, J. E., C. Y. Wang and D. E. Terlizzi. 1985. Delay of senescence in carnations by pyrazon, phenidone analogues, and Tiron. *HortScience* 20: 121-122.
- Barden, L. E. and J. J. Hanan. 1972. Effect of ethylene on carnation keeping life. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 785-788.
- Borochoy, A. and W. R. Woodson. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Hort. Rev.* 11: 15-43.
- Bovy, A. G., G. C. Angenent, H. J. M. Dons and A. C. Van Altvorst. 1999. Heterologous expression of the *Arabidopsis etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. *Molecular Breeding* 5: 301-308.
- Brandt, A. S. and W. R. Woodson. 1992. Variation in flower senescence and ethylene biosynthesis among carnations. *HortScience* 27: 1100-1102.
- Bufler, G., Y. Mor, M. S. Reid and S. F. Yang. 1980. Changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content of cut carnation flowers in relation to their senescence. *Planta* 150: 439-442.
- Camprubi, P. and R. Nichols. 1978. Effects of ethylene on carnation flowers (*Dianthus caryophyllus*) cut at different stages of development. *J. Hort. Sci.* 53: 17-22.
- Demmink, J. F., R. F. Baayen and L. D. Sparnaaij. 1989. Evaluation of the virulence of races 1, 2 and 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation. *Euphytica* 42: 55-63.
- Deneke, C. F., K. B. Evensen and R. Craig. 1990. Regulation of petal abscission in *Pelargonium* × *domesticum*. *HortScience* 25: 937-940.
- Dickey, R. S. and P. E. Nelson. 1963. *Pseudomonas caryophylli* in carnation. I. Relation of soil temperature to symptom expression. *Phytopathology* 53: 1237-1238.
- Edwards, J. L., M. E. Saltveit, Jr. and W. R. Henderson. 1983. Inhibition of lycopene synthesis in tomato pericarp tissue by inhibitors of ethylene biosynthesis and reversal with applied ethylene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 512-514.
- Fazio, G., M. R. Stevens and J. W. Scott. 1999. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Fr1*) in tomato. *Euphytica* 105: 205-210.
- Fujino, D. W., M. S. Reid and S. F. Yang. 1980. Effects of aminooxyacetic acid on postharvest characteristics of carnation. *Acta Horticulturae* 113: 59-64.
- 高 俊平・西村修枝・久保康隆・中村怜之輔・稲葉昭次. 1992. 果実の微量エチレンの測定. *園学雑.* 61: 199-204.
- 後藤正夫. 1981. 新植物細菌病学. ソフトサイエンス社. 東京.
- 後藤正夫. 1990. 植物細菌病学概論. 養賢堂. 東京.
- Goto, R., R. Aida, M. Shibata and K. Ichimura. 1999. Role of ethylene on flower senescence of *Torenia*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 263-268.
- Halevy, A. H. and S. Mayak. 1981. Senescence and postharvest physiology of cut flowers, Part 2. *Hort. Rev.* 3: 59-143.
- Hamilton, R. F. L. and S. M. Walters. 1989. *Dianthus* Linnaeus. p. 185-191. In: S. M. Walters, J. C. M. Alexander, A. Brady, C. D. Brickell, J. Cullen, P. S. Green, V. H. Heywood, V. A. Matthews, N. K. B. Robson, P. F. Yeo and S. G. Knees (eds.). *The European garden flora* Vol. 3. Cambridge University press, Cambridge.
- 平山隆志. 1998. エチレンの情報伝達. p.151-163. 福田裕穂・町田泰則・神谷勇治・服部東穂監修. 植物ホルモンのシグナル伝達. 秀潤社. 東京.
- Holley, W. D. and R. Baker. 1963. Carnation production. WM. C. Brown Co-Inc., Dubuque, Iowa.
- Huang, Y. F., C. T. Chen and C. H. Kao. 1993. Salicylic acid inhibits the biosynthesis of ethylene in

- detached rice leaves. *Plant Growth Regulation* 12: 79-82.
- Ichimura, K. and K. Suto. 1998. Role of ethylene in acceleration of flower senescence by filament wounding in *Portulaca* hybrid. *Physiol. Plant.* 104: 603-607.
- Ichimura, K., M. Shimamura and T. Hisamatsu. 1998. Role of ethylene in senescence of cut *Eustoma* flowers. *Postharvest Biol. Technol.* 14: 193-198.
- 市村一雄. 2000. 切り花の鮮度保持. 筑波書房. 東京.
- 池田 広. 1997. 花きの耐病虫性育種の現状. p.53-63. 日本種苗協会編. 平成9年度日種協育種技術研究会シンポジウム資料.
- 池田宗平. 1996. 育種、品種開発の動向. p.47-50. 農文協編. 農業技術大系花卉編. 第7巻. 農文協. 東京.
- 伊藤秋夫・武田恭明・塚本洋太郎・富野耕治. 1989. ナデシコ属. p.455-462. 塚本洋太郎編. 園芸植物大辞典. 第3巻. 小学館. 東京.
- Jones, J. B. and A. W. Engelhard. 1984. Crown and leaf rot of statice incited by a bacterium resembling *Pseudomonas caryophylli*. *Plant Disease* 68: 338-340.
- Jones, L. K. 1941. Bacterial wilt of carnation. *Phytopathology* 31: 199.
- 鍵渡徳次・土屋行夫. 1968. カーネーション萎ちょう細菌病の発生とその防除. *植物防疫* 22: 67-70.
- Katoh, Y., T. Hasegawa, T. Suzuki and T. Fujii. 1987. Changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content and ethylene production in Hiproly barley callus during differentiation. *Agric. Biol. Chem.* 51: 2185-2190.
- 河村純夫・山本尚三. 1982. Lipoxygenase. p.165. 上代淑人・徳重正信・八木達彦・一島英治編. 酵素ハンドブック. 朝倉書店. 東京.
- Kikuchi, M., H. Ajisaka, Y. Kuginuki and M. Hirai. 1999. Conversion of RAPD markers for a clubroot resistance gene of *Brassica rapa* into sequence-tagged sites (STSs). *Breed. Sci.* 49: 83-88.
- 小西国義. 1980. カーネーション生産技術. 養賢堂. 東京.
- 小西国義・武田恭明. 1989. カーネーション. p.483-485. 塚本洋太郎編. 園芸植物大辞典. 第2巻. 小学館. 東京.
- Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugenics* 12: 172-175.
- Kosugi, Y., K. Shibuya, N. Tsuruno, Y. Iwazaki, A. Mochizuki, T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh. 2000. Expression of genes responsible for ethylene production and wilting are differently regulated in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) petals. *Plant Science* 158: 139-145.
- Kuginuki, Y., H. Ajisaka, M. Yui, H. Yoshikawa, K. Hida and M. Hirai. 1997. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. *Euphytica* 98: 149-154.
- 釘貫靖久・南 基泰. 2000. DNAマーカーを利用したアブラナ科野菜根こぶ病抵抗性育種〔1〕. *農業および園芸* 75: 1158-1164.
- Lander, E., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Lawton, K. A., B. Huang, P. B. Goldsbrough and W. R. Woodson. 1989. Molecular cloning and characterization of senescence-related genes from carnation flower petals. *Plant Physiol.* 90: 690-696.
- Leslie, C. A. and R. J. Romani. 1986. Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 5: 144-146.
- Leslie, C. A. and R. J. Romani. 1988. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. *Plant Physiol.* 88: 833-837.
- Liu, H. L. 1990. Bacterial wilt of *Gypsophila paniculata* caused by *Pseudomonas caryophylli*. *Bulletin of Taichung District Agricultural Improvement Station* 28: 33-42.
- Liu, Y., L. Su and S. F. Yang. 1984. Metabolism of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid in mungbean hypocotyls in relation to metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 161: 439-443.
- Mayak, S., Y. Vaadia and D. R. Dilley. 1977. Regulation



- of senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus*) by ethylene. *Plant Physiol.* 59: 591-593.
- Mayak, S. and T. Tirosh. 1993. Unusual ethylene-related behavior in senescing flowers of the carnation Sandrosa. *Physiol. Plant.* 88: 420-426.
- Michalczyk, B., W. Kowalczyk and J. Nowak. 1989. Effects of calcium nitrate and tannins on ethylene production and senescence of cut carnation flowers. *Acta Horticulturae* 251: 59-63.
- Midoh, N., Y. Saijou, K. Matsumoto and M. Iwata. 1996. Effects of 1,1-dimethyl-4- (phenylsulfonyl) semicarbazide (DPSS) on carnation flower longevity. *Plant Growth Regulation* 20: 195-199.
- 森 仁志・立木美保. 1998. エチレン生合成の制御機構. p.138-150. 福田裕穂・町田泰則・神谷勇治・服部東穂監修. 植物ホルモンのシグナル伝達. 秀潤社. 東京.
- Murray, M. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- 中村秀雄・森田 儔. 1976. カーネーション立枯性病害防除に関する研究. 静岡県有用植物園研究報告 2: 33-50.
- Nelson, P. E. and R. S. Dickey. 1963. Reaction of twenty-one commercial carnation varieties to *Pseudomonas caryophylli*. *Phytopathology* 53: 320-324.
- 太田光輝. 1980. カーネーション萎ちよう細菌病の品種抵抗性. 農業および園芸 55: 801-802.
- 大藪哲也・浅見逸夫・菅原真治. 1998. 日持ちの高いメロン (キングナイン) におけるエチレン感受性と果実の成熟特性. 農業および園芸 73: 381-384.
- 大藪哲也・菅原真治. 1999. 日持ちの高いメロン 'キングナイン' のF2世代におけるエチレン感受性と成熟特性. 農業および園芸 74: 1119-1121.
- 尾崎克己・木村俊彦. 1992. 病原性に基づくナス科野菜青枯病細菌の類別. 中国農研報. 10: 49-58.
- Paran, I. and R. W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
- Park, S. O., D. P. Coyne, A. Dursun and G. Jung. 1998. Identifying randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to major genes for common bacterial blight resistance in tepary bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 278-282.
- Park, S. O., D. P. Coyne, J. M. Bokosi and J. R. Steadman. 1999. Molecular markers linked to genes for specific rust resistance and indeterminate growth habit in common bean. *Euphytica* 105: 133-141.
- Peary, J. S. and T. A. Prince. 1989. Cut flower vase life is little-affected by lipoxygenase inhibitors. *HortScience* 24: 808-809.
- Peary, J. S. and T. A. Prince. 1990. Floral lipoxygenase: activity during senescence and inhibition by phenidone. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 455-457.
- Prince, T. A., M. S. Cunningham and J. S. Peary. 1987. Floral and foliar quality of potted Easter lilies after STS or phenidone application, refrigerated storage, and simulated shipment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 469-473.
- Rickauer, M. and W. Tanner. 1986. Effects of Ca<sup>2+</sup> on amino acid transport and accumulation in roots of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 82: 41-46.
- Romani, R. J., B. M. Hess and C. A. Leslie. 1989. Salicylic acid inhibition of ethylene production by apple discs and other plant tissues. *J. Plant Growth Regul.* 8: 63-69.
- Rouet-Mayer, M. A., J. Bureau and C. Lauriere. 1992. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. *Plant Physiol.* 98: 971-978.
- Saftner, R. A. and J. E. Baker. 1987. Transport and compartmentation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and its structural analog,  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, in tomato pericarp slices. *Plant Physiol.* 84: 311-317.
- Saftner, R. 1989. Effects of organic amines on  $\alpha$ -aminoisobutyric acid uptake into the vacuole and on ethylene production by tomato pericarp slices. *Physiol. Plant.* 75: 485-491.



- 植松清次・細谷宗令・赤山喜一郎. 1991. *Pseudomonas caryophylli* に対するカーネーション126栽培品種の反応. 関東東山病害虫研究会年報 38: 107-110.
- 上住 泰・西村十郎. 1975. 原色 花の病害虫. 農文協. 東京.
- 鶴飼保雄. 2000. ゲノムレベルの遺伝解析 MAPとQTL. 東京大学出版会. 東京.
- Van der Meulen-Muisers, J. J. M., J. C. Van Oeveren, J. Jansen and J. M. Van Tuyl. 1999. Genetic analysis of postharvest flower longevity in Asiatic hybrid lilies. *Euphytica* 107: 149-157.
- Van Doorn W. G. and E. J. Woltering. 1991. Developments in the use of growth regulators for the maintenance of post-harvest quality in cut flowers and potted plants. *Acta Horticulturae* 298: 195-208.
- Veen, H. and S. C. Van de Geijn. 1978. Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations. *Planta* 140: 93-96.
- Veen, H. 1983. Silver thiosulphate: an experimental tool in plant science. *Scientia Horticulturae* 20: 211-224.
- Wernett, H. C., G. J. Wilfret, T. J. Sheehan, F. J. Marousky, P. M. Lyrene and D. A. Knauff. 1996. Postharvest longevity of cut-flower Gerbera. I. response to selection for vase life components. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 216-221.
- Whitehead, C. S. and A. H. Halevy. 1989. Ethylene sensitivity: The role of short-chain saturated fatty acids in pollination-induced senescence of *Petunia hybrida* flowers. *Plant Growth Regulation* 8: 41-54.
- Wilcoxon, F. 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics* 1: 80-83.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wolswinkel, P., A. Ammerlaan and H. Kuyvenhoven. 1983. Effect of KCN and *p*-chloromercuribenzenesulfonic acid on the release of sucrose and 2-amino (1-<sup>14</sup>C) isobutyric acid by the seed coat of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 59: 375-386.
- Woltering, E. J. and W. G. Van Doorn. 1988. Role of ethylene in senescence of petals - morphological and taxonomical relationships. *J. Exp. Bot.* 39: 1605-1616.
- Woltering, E. J., D. Somhorst and C. A. de Beer. 1993. Roles of ethylene production and sensitivity in senescence of carnation flower (*Dianthus caryophyllus*) cultivars white sim, chinera and epomeo. *J. Plant Physiol.* 141: 329-335.
- Woodson, W. R. and K. A. Lawton. 1988. Ethylene-induced gene expression in carnation petals. Relationship to autocatalytic ethylene production and senescence. *Plant Physiol.* 87: 498-503.
- Wu, M. J., W. Van Doorn, S. Mayak and M. S. Reid. 1989. Senescence of 'Sandra' carnation. *Acta Horticulturae* 261: 221-225.
- Wu, M. J., W. G. Van Doorn and M. S. Reid. 1991a. Variation in the senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. I. Comparison of flower life, respiration and ethylene biosynthesis. *Scientia Horticulturae* 48: 99-107.
- Wu, M. J., W. G. Van Doorn and M. S. Reid. 1991b. Variation in the senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. II. Comparison of sensitivity to exogenous ethylene and of ethylene binding. *Scientia Horticulturae* 48: 108-116.
- 山口 隆. 1989. 主要切り花花きの病害抵抗性育種の現状と問題点. p.154-155. 日本育種学会編. 育種学最近の進歩. 第30集. 養賢堂. 東京.
- Yui, M., S. Monma, M. Hirai, S. Nishimura, Y. Ukai and S. Enomoto. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the selection of tomatoes resistant to bacterial wilt. *Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants & Tea* 14: 189-198.

# Breeding for Resistance to Bacterial Wilt (*Burkholderia caryophylli*) and Improvement of Vase Life by Chemicals or Cross Breeding in Carnations

Takashi ONOZAKI

## Summary

### 1. Breeding for Resistance to Bacterial Wilt (*Burkholderia caryophylli*)

Bacterial wilt is one of the most important and damaging disease of carnations (*Dianthus caryophyllus*) in Japan. It causes serious crop losses in carnations grown in the warm districts. Two hundred seventy seven carnation cultivars and 70 wild *Dianthus* accessions were screened for resistance to bacterial wilt by using the cut-root soaking method with an inoculum concentration of  $10^7$  cfu (colony-forming units) / ml. Two hundred seven cultivars (74.7%) were highly susceptible, whereas 3 cultivars, 'Wiko', 'Nocto', and 'Sandrosa' possessed adequate resistance. However, these resistant carnation cultivars seemed to be unsuitable as parents for resistance. Two highly resistant wild species, *D. capitatus* ssp. *andrzejowskianus* and *D. henteri* were found. These 2 species showed no disease symptoms throughout the experiment.

Interspecific hybridization between carnation and *D. capitatus* ssp. *andrzejowskianus*, highly resistant wild species to bacterial wilt, was carried out in order to introduce the resistance into carnation cultivars. Obtained  $F_1$  seedlings were tested for the bacterial wilt resistance using screening methods. It was shown that resistance of *Dianthus* wild species to *B. caryophylli* was inherited by interspecific hybridization. Thus, a new bacterial wilt resistant line 'Carnation Nou No.1' was selected out of  $F_1$  progenies derived from the cross of spray-type carnation 'Super Gold'  $\times$  *D. capitatus* and registered by Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries in 1996.

Linkage of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers with resistance genes to bacterial wilt was studied using 134 lines derived from crossing of susceptible 'Pretty Favvare' and resistant 'Carnation Nou No. 1'. Eight markers were found to be linked to resistance genes of bacterial wilt and identified two linkage groups. These markers should be useful for marker-assisted selection in carnation breeding programs.

### 2. Effect of $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB) application on the prolongation of the vase life of cut carnation flowers.

In order to detect a non-heavy-metalliferous and substitutable preservative for silver thio-sulfate which contains heavy metal, the effect of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB) on the vase life longevity of cut carnation flower was tested. As a vase solution, 20mM AIB solution gave a remarkable effect to retain freshness of cut carnations.

The addition of calcium nitrate to AIB solution is effective to extend the longevity of cut carnation flowers. In the continuous treatment, the addition of 2.5 mM calcium nitrate to 10 mM AIB in the vase solution significantly prolonged the vase life of 'Soana' cut flowers, relative to control, 10 mM AIB solution and 2.5 mM calcium nitrate solution. This combination treatment was as effective as 20 mM AIB solution in extending vase life of carnations. In the pretreatment, the use of single 60 mM AIB solution for 21 or 24 hours significantly extended the vase life of 'Nora', relative to control. Furthermore, the use of 60 mM AIB + 10 mM calcium nitrate solution for 21 or 24 hours enhanced the vase life by 20 % or 14 % over that of single 60 mM AIB solution, respectively.

### 3. Genetic improvement of vase life of carnation flowers by crossing and selection

Conventional cross-breeding techniques was used to develop many carnation lines with long vase life and either low ethylene production or low ethylene sensitivity. Two cycles of selection and crossing to improve vase life led to a 3.6-day increase in mean vase life. All 39 selected lines had significantly longer vase life than the control cultivar, 'White Sim'. In particular, second-generation lines 63-3, 63-12, 66-15, and 63-41 had a mean vase life of more than 15 days without chemical treatment. Measurements of ethylene production indicated that flowers of all second-generation selected lines had a greatly reduced capacity to produce ethylene. Three lines (515-10, 64-13, and 64-54) with low ethylene sensitivity was screened. Evaluation by exposure to ethylene at high concentration showed that 64-13 and 64-54 were less sensitive to ethylene than 'Chinera', which is known for its low sensitivity. The vase life of these low-sensitivity lines was about twice that of 'White Sim'. The extended vase life of selected lines was related to low ethylene production at flower senescence rather than to degree of ethylene sensitivity in young flowers. Ethylene sensitivity decreased with the age of the flower in many selected lines. The results clearly show that vase life of carnation flowers can be extended by crossing and selection.