

氏 名	おお いし かず し 大 石 一 史
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2537 号
学位授与の日付	平 成 16 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	キクの優良系統の選抜および無病苗生産法の確立

論文調査委員 (主 査) 教授 矢 澤 進 教授 米 森 敬 三 教授 山 田 利 昭

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、愛知県で長く栽培され生産量が多いキク品種について、産地から株を収集後、特性を比較して優良系統を選抜し、それらの苗生産の分業化に備えウイルス、ウイロイド病の対策として簡易診断法および無病化苗生産法について検討した。また、キク白さび病の抵抗性の検定法について考察を加えたものであり、得られた結果は以下のように要約される。

1. キク品種‘秀芳の力’、‘黄秀芳の力’を対象に、系統分離した集団の中から優良な系統を選抜する過程を示し、無病化のための茎頂培養に伴う変異の問題を取りあげた。‘秀芳の力’は、愛知農試育成の茎頂培養株に由来する4系統および愛知県内の産地から収集した48系統の特性を比較した結果、茎頂培養株に由来し収集系統の中では最も早く開花し、満開になっても花型が乱れず低温開花性の高い系統を優良系統として選抜した。‘黄秀芳の力’については、花色が濃い系統ほど開花が遅く、茎の伸長性と萌芽性が低い傾向が認められた。元品種‘秀芳の力’と同程度の早生性、茎の伸長性および萌芽性を示し、花型が乱れず花色が黄色花として流通する程度に濃いことを基準として優良系統を選抜した。これらの選抜系統は県内産地に直ちに普及し、切り花品質と生産性の向上を促進した。‘黄秀芳の力’および‘天寿’の茎頂培養株の変異について調査したところ、‘黄秀芳の力’では培養元株より花色が濃くなる変異が2.7%の頻度で出現した。‘天寿’では、同一の元株から育成した茎頂培養系統間に到花日数で大きな差が認められ、最も早く開花した系統と最も遅く開花した系統では、5日の差があった。これらのことは、苗を生産者に配布する前には厳しい検定が必要であることを示唆するものであった。

2. 近年被害が増大しつつある CSVd (キクスタントウイロイド) について生産現場に近い段階で検定を行うことを前提に、多検体を扱うドットプロットハイブリダイゼーションに供する RNA の抽出方法を検討し、また TSWV (トマトスポッテッドウィルトウイルス) の無病化を図るため茎頂培養を試みた。最も検出感度の高い RT-PCR/nested PCR 法で CSVd の保毒率を調べたところ、生産地で病徴を示さない株からも90%の割合で検出されたことから CSVd が蔓延していることが判明した。ドットプロットハイブリダイゼーションで CSVd を検定するため、キクの葉を CTAB バッファーで磨砕し遠心した上清を煮沸した。さらに、遠心分離後、上清にイソプロパノールを加え 2M 塩化リチウムで分画し、さらに遠心して CSVd-RNA を沈殿、精製する方法を開発した。この煮沸法による CSVd の検出感度は GTC/フェノール法の10倍程度高く、かつ劇物を使用しない優れた抽出法であった。煮沸法で抽出した CSVd-RNA は CSVd の全長を増幅するプライマーを用いた RT-PCR で目的サイズの DNA が増幅されており、煮沸しても分解されない CSVd 遺伝子が残存することが確かめられた。また、CSVd 保毒株およびフリー株を用いた交雑を行い、無菌播種して育てたインビトロの実生個体について CSVd を検定し、子房を通じて高い割合で CSVd が種子伝染し、花粉を通じて CSVd が種子伝染する可能性が示唆された。さらに、TSWV に感染しているキクをインビトロの状態では 37℃ で30日間高温処理し、茎頂培養することにより100個の茎頂から1個体のフリー植物が、培地にアマンタジンを25~100 mg/l 添加することにより12個の茎頂(大きさ0.3 mm)から1個体のフリー植物が得られたが、フリー化の効率は低く今後の検討が必要であった。

3. キク白さび病菌をインビトロのキク幼植物で培養する方法を開発した。温室内の発病葉を培養容器内のキクに接触しないように容器内の上方に固定して接種することにより、雑菌の汚染を免れてキク白さび病に感染させることに成功した。

その発病葉を接種源として本病原菌を継代培養し増殖することができ、培養容器内のキクで発病したキク白さび病菌は、4か月間の低温貯蔵が可能であった。また、培養14か月後も土耕栽培のキクに対する病原性を維持していた。ガラスシャーレ内の寒天培地上に検定品種の葉の裏面が培地に接するように並べ、培養容器内のキクで継代培養した約1 cm²の発病葉をそれぞれの葉の上に冬胞子堆が下を向くように置きキク白さび病菌を接種する方法で、キクの白さび病に対する抵抗性の検定が可能であることを明らかにした。

4. 優良系統の選抜効果並びに CSVd の簡易診断法の普及について考察した。

5. 本論文の内容を総括し、キク無病化苗生産についての諸問題点を整理し、今後の展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

キクはわが国の切り花生産の中で最も多い花卉である。本論文は、キクの主要な生産地である愛知県におけるキクの優良系統の選抜および無病苗生産に関する研究の成果をとりまとめたものである。評価すべき点は以下のとおりである。

1. キク品種‘秀芳の力’、‘黄秀芳の力’について、優良な系統の選抜を行い、優良系統の茎頂培養に伴う変異の問題を取りあげた。その結果、両品種の茎頂培養株に由来するものの中から花型、生産特性の優れた系統をそれぞれ選抜した。これらの系統は現在愛知県で広く栽培されている。茎頂培養個体の変異率は品種によっては2.7%に及ぶものがあり、茎頂培養由来の苗を生産者に配布する前には厳しい検定が必要であることを指摘した。

2. キク生産地で被害が広がりつつある CSVd (キクスタントウイロイド) について、現在知られている中で最も検出感度の高い RT-PCR/nested PCR 法で生産地で病徴を示さない株からも90%の割合で検出されたことから、CSVd が生産地では蔓延していることを初めて明らかにした。また、簡易で取り扱いが安全な CSVd 保毒および作出した CSVd フリー株を用いた交雑実験から CSVd が種子伝染し、花粉を通じて種子伝染することを初めて明らかにした。また、37°C・30日間の高温処理および培養時に培地に抗ウイルス剤であるアマンタジンを添加することにより、TSWV (トマトスポッテッドウィルトウイルス) フリーの個体を低率ではあるが獲得している。

3. キクの主要病害の一つである白さび病菌をインビトロのキク幼植物体で培養する方法を開発・確立した。さらに、発病葉を接種源として本病原菌を継代培養し、増殖することができ、培養容器内のキクで発病した白さび病菌は、4か月間の低温貯蔵が可能であることを明らかにした。また、白さび病菌の新規な接種法を開発した。これらの成果をもとに多数の個体について白さび病抵抗性を短時間で検定することができる方法を確立した。

4. 選抜した優良系統の愛知県における無病苗の供給体制の確立をするとともに本研究で得られた成果をもとにした汁液煮沸法による CSVd の簡易診断法の苗生産企業への普及を行った。

以上のように本論文は、わが国の主要な花卉であるキクのウイロイド、ウイルスフリー苗生産のための基礎的・応用的研究を行ったものであり、園芸種苗生産学並びにキクの実際栽培に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年6月24日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。