

特集：キクわい化病

キクわい化病の発生生態と診断

香川県農業試験場 ^{くすのき}楠 ^{みきお}幹生・^{まつもと}松本 ^{ゆりこ}由利子

はじめに

キクわい化病はキクわい化ウイルス (*Chrysanthemum Stunt Viroid*, CSVd) によって起こる病害で、我が国では大沢ら (1977) が初めて静岡県での発生を報告した。それ以降、香川県 (楠ら, 1993)、兵庫県 (塩飽ら, 1996)、熊本県 (森山ら, 1996)、北海道 (李ら, 1997)、和歌山県 (山下ら, 1997)、新潟県 (杉浦・花田, 1998)、山形県 (兼松ら, 1998)、秋田県 (山本ら, 2001)、岩手県 (勝部ら, 2003) など報告され、全国的に重要病害となっている。

ここでは、筆者らが行った一連の研究結果を中心に、キクわい化病の発生生態や診断方法について紹介する。

I 病徴と発生実態

1 病徴

キクわい化病の一般的な症状は、6～11月ごろに発生する。品種や環境条件によって異なるが、節間が短縮して草丈が正常なものに対して2/3～1/2に短くなる。葉は小型化・淡緑化し、茎との角度が小さくなって直立して生育する傾向があり、下葉は赤紫を呈する。花は小型化し、開花期の早期化 (1～2週間) などが見られ、赤色の花をつける品種では花が退色する傾向がある。挿し穂は発根が不良となり、その後の生育も悪くなる。

また、キク品種‘ミスルトー’ (Mistletoe) では、茎頂に近い若い展開葉に黄色斑点を生じるため、わい化病の検定用品種として用いられている (口絵)。

本病によりキクが枯死することはないが、小型化するので品質が低下し、収益性に問題が生じる。

2 香川県におけるキクわい化病の発生実態

香川県では1990年ごろに導入され、主要品種として栽培されていた‘精興黄金’にわい化症状が広範囲に発生し、品質を著しく低下させて問題となった (口絵)。1992～96年にかけて県内で栽培されている品種の発生実態を調査した結果、‘精興黄金’ほか28品種で感染を確認した (表-1)。

その後、健全親株の選抜や発生品種の淘汰などの対策がとられ、産地でのキクわい化病の問題は一時的に沈静化していたが、2003年に、導入したばかりの輪ギク‘宝の山’でわい化症状が発生して再び問題となっている。‘宝の山’とともに共同育苗されている‘美吉野’、‘サマーイエロー’、‘黄金浜’、‘花秀芳’、‘精興黄金’でも感染を確認したため、共同育苗センターでは、健全親株の選抜や主要品種のフリー化を行うとともに再感染防止のための栽培管理マニュアルを作成して耕種防除を徹底している。

小ギクでは、以前から多くの品種でCSVdの感染を確認しているが、2005年に本県西讃地域で栽培されている小ギクを検定したところ、共同出荷されている品種の約半数でCSVdの感染を確認した。小ギク産地では健全親株の選抜などの耕種防除を行っているが、栽培している品種が多く、抜本的な防除対策が困難なのが現状である。

II 診断法

1 生物検定法

CSVdの生物検定法としては、‘ミスルトー’の接ぎ木法が一般に用いられている (大沢ら, 1977; 楠ら, 1993 a)。「ミスルトー」を用いた生物検定法の接種方法、温度条件の検討および判別植物の検索をした。

罹病‘ミスルトー’に健全‘ミスルトー’を接ぎ木接種し

表-1 香川県内で栽培されこれまでにCSVdの感染を確認した栽培品種一覧 (1992～2004年度)

検定年度	品種名
1992	精興黄金, 花秀芳, 日の出丹頂, 紅景色, 精興の雪, さんご, 風あそび, つばさ, 桃車, 赤魚, 岩の雪山, 秀芳の光, 金丸黄金
1994	小鈴, 夕子, 夕霧, つやひめ, さざなみ, 青春, 愛情, 福だから, 秀芳金賞, 秀芳, 名月
1995	シテイ
1996	花手鞠, 金福, カルメン
2003	美吉野
2004	サマーイエロー, 宝の山, 金みその, さゆり, こまどり, 銀正月, 黄金浜

Epidemiology and Diagnosis of *Chrysanthemum Stunt Viroid*.
By Mikio KUSUNOKI and Yuriko MATSUMOTO
(キーワード: キクわい化病, ウィロイド, 発生生態, 診断)

たもの、健全‘ミスルトー’に罹病‘ミスルトー’を接ぎ木接種したものおよび健全‘ミスルトー’に汁液接種したものを、15、20、25、30℃定温および15℃で12時間、20℃で12時間の変温に置き、健全‘ミスルトー’での病徴の発現状況を調査した(表-2～4)。

15℃処理では、すべての接種法で38日経過しても健全‘ミスルトー’に斑点は生じなかった。30℃処理では、すべての接種法で24～38日経過後に健全‘ミスルトー’に斑点が生じたが、その斑点は不明瞭であった。最も早

表-2 罹病株に健全株を接ぎ木した場合の各温度における‘ミスルトー’の病徴発現時期

温度 (℃)	接ぎ木後の日数(日)				
	10	17	24	31	38
15	-	-	-	-	-
15～20	-	-	-	+	+
20	-	-	+	+	+
25	-	-	+	+	+
30	-	-	±	±	±

15～20：15℃で12時間、20℃で12時間の変温に置いた。
-：斑点を生じない。+：斑点を生じた。±：不明瞭な斑点を生じた。

表-3 健全株に罹病株を接ぎ木した場合の各温度における‘ミスルトー’の病徴発現時期

温度 (℃)	接ぎ木後の日数(日)				
	10	17	24	31	38
15	-	-	-	-	-
15～20	-	-	-	+	+
20	-	-	+	+	+
25	-	-	-	+	+
30	-	-	-	±	±

15～20：15℃で12時間、20℃で12時間の変温に置いた。
-：斑点を生じない。+：斑点を生じた。±：不明瞭な斑点を生じた。

表-4 汁液接種した場合の各温度における‘ミスルトー’の病徴発現時期

温度 (℃)	接ぎ木後の日数(日)				
	10	17	24	31	38
15	-	-	-	-	-
15～20	-	-	-	+	+
20	-	-	-	+	+
25	-	-	-	+	+
30	-	-	-	-	±

15～20：15℃で12時間、20℃で12時間の変温に置いた。
-：斑点を生じない。+：斑点を生じた。±：不明瞭な斑点を生じた。

く24日後に斑点症状が現れたのは、罹病‘ミスルトー’に健全‘ミスルトー’を接ぎ木接種した20、25℃処理と健全‘ミスルトー’に罹病‘ミスルトー’を接ぎ木接種した20℃処理であった。また、汁液接種法は接ぎ木接種法に比べて症状の発現が遅れた。

これらのことから、接種は罹病株に健全‘ミスルトー’を接ぎ木する方法がよく、最適温度条件は20～25℃であった。本法は判定までに約1か月程度の期間を要するが、高感度であること、新たな機器の購入や技術の習得がいらぬこと、また、経費がかからないことなどから有効な診断法の一つと考える。

次にCSVdの判別植物を探索したところ、トマト、ペチュニアに感染を確認した。しかし、トマトは無病徴感染であること、ペチュニアは養成に時間がかかることから、これらの植物を判別植物として利用するのは難しいと考える。

2 ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法

1992年に香川県の現地および試験場で栽培しているキクについて、PAGE法と‘ミスルトー’の接ぎ木法(生物検定法)によりCSVdの検定を行い、その結果を表-5に示した(楠ら、1993a)。

表-5 香川県におけるCSVdのPAGEおよび生物検定結果(1992)

品種	PAGE 検定 ^{a)}	生物検定 ^{b)}
精興黄金	+	+
花秀芳	+	+
日の出丹頂	+	+
紅景色	+	+
精興の雪	+	+
大天狗	-	+
青い鳥	-	±
秀芳の力	-	±
竹馬の友	-	-
銀鏡	-	-
さんご	+	+
風あそび	+	+
つばさ	+	+
桃車	+	+
赤魚	+	+
涼星	-	-
岩の雪山	+	+
秀芳の光	+	+
金丸黄金	+	+

^{a)} +：CSVd特有のバンドが認められた。-：CSVd特有のバンドが認められなかった。
^{b)} +：‘ミスルトー’に斑点を生じた。-：‘ミスルトー’に斑点を生じなかった。±：‘ミスルトー’に不明瞭な斑点を生じた。

CSVdの抽出は斉藤(1989)の方法に従った。電気泳動はSCHUMACHER et al. (1986)の二方向PAGE法を用いた(図-1)。PAGE法により13品種からウイロイド特有のバンドが認められ、10品種は生物検定法と一致した。しかし、生物検定法で特有の斑点が認められた3品種はPAGE法でウイロイド特有のバンドが認められなかった。このことは、植物体のウイロイド濃度が低くてPAGE法では検出できなかったか、CSVd以外の病害によって‘ミスルトー’に斑点が生じたことが示唆される。PAGE法はウイロイドの判別が明確にできるが、高感度の検定法ではないことから、正確に診断を行うためには生物検定法を併用する必要がある。

3 RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction) 法

RT-PCRによるCSVdの検出について検討した(楠ら, 1993b)。オーストラリア(HASELOFF and SYMONS, 1981)およびイギリス(GROSS et al., 1982)のCSVd分離株の塩基配列をもとにして4種類のプライマーを合成した。相補的なプライマーは、イギリス株での位置で第36塩基から第55塩基(CSVC-1)、第324塩基から第343塩基(CSVC-2)を、相同的なプライマーは第56塩基から第75塩基(CSVS-1)および第142塩基から第161塩基(CSVS-2)を用い、4種類の組み合わせで、RT-PCRによるCSVdの検出を試みた。cDNA合成反応およびPCR反応は、まず42℃で15分cDNA合成を行った後、DNAの変性:95℃, 30秒→プライマーのアニーリング:53℃, 1分→DNA合成反応:72℃, 2分を1サイクルとするインキュベーションを30サイクル繰り返した。その結果、CSVC-1(5'TTCTTTCAAAGCAGCAGGGT3')とCSVS-1(5'AAAGAAATGAGGCGA

AGAAG3')の組み合わせのみで、期待される大きさのDNA断片(全長の約350bp)が増幅された。このことは、香川県で発生しているCSVdとイギリス株との塩基配列の違いに起因するものと考えられ、既存の塩基配列データを利用する場合は1組以上のプライマーを合成し、プライマーの組み合わせを検討する必要があると考える。

次に、CSVdの抽出条件について検討した。斉藤(1989)の方法で抽出した核酸のうちCF-11セルロース処理をしなかった上清(A)、CF-11セルロース処理を行った上清(B)、さらにメトキシエタノール処理を行った上清(C)を、エタノール沈殿した試料および臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)処理を行った試料(D)を50μlの蒸留水に溶解してRT-PCRを行った(図-2)。その結果、Aでは期待される約350bpのDNA断片は検出されず、B、Cは約350bpのDNA断片が検出される場合もあったが再現性がなかった。一方、Dは約350bpのDNA断片が検出され、再現性もあった。このことは、キク抽出液中にRT-PCRの酵素反応を阻害する因子の存在が推察され、キクから抽出する場合は、高純度に精製する必要があると考え

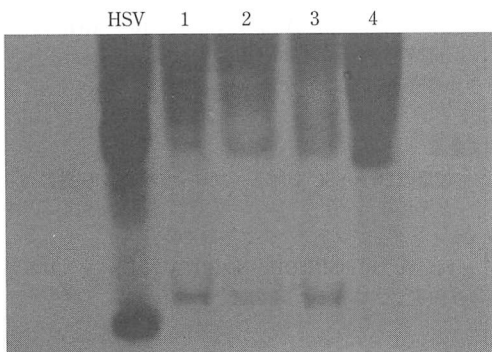


図-1 CSVdのPAGE法による検出
HSV: ホップわい化ウイロイド, 1: 精興黄金, 2: 精興黄金に接木したミスルトー, 3: 紅景色, 4: 秀芳の力。

- 凍結試料 (0.5 g)
 - 磨碎: + 6 ml 抽出液 [0.1M Tris-HCl, 2.8M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8), 1% SDS, 1%メルカプトエタノール], 0.25 g ポリビニルピロリドン
 - 加熱: (65℃, 10分間) + 2 ml 5M 酢酸カリウム
 - 静置: (水中, 20分間)
 - 遠心: 14,000 rpm, 10分間
 - 上清 (A)
 - エタノール 30% に調整
 - かくはん: + 0.2 g CF11 セルロース
 - 洗浄: 50 ml 30% エタノール/STE
 - 溶出: 3 ml STE buffer
 - 上清 (B)
 - エタノール沈殿
 - 溶解: + 2 ml 1.25M K_2HPO_4
 - かくはん: + 2 ml 2-メトキシエタノール
 - 遠心: 14,000 rpm, 10分間
 - 上清 (C)
 - + 等容: 0.2 M 酢酸ナトリウム, 半容 1% CTAB
 - 静置: 室温, 30分間
 - 遠心: 14,000 rpm, 10分間
 - 洗浄: 70% エタノール (0.1 M 酢酸ナトリウム)
 - 沈殿 (D)
 - 溶解: 50 μl 蒸留水
- CSVd 試料

図-2 RT-PCR法におけるCSVdの抽出法

る。実際の検定を行う場合は、健全コントロールとともに誤診の防止のために感染葉を陽性コントロールとして用いることが必要である。

検出感度について、RT-PCR法とPAGE法との比較を行った。PAGE法の場合、10倍以上希釈した試料からは検出することができなかった。RT-PCR法の場合、 10^4 倍希釈の試料まで目的のDNAが増幅され、これはPAGE法の検出限界をはるかに上回るものであった(図-3)。RT-PCRによるCSVdの検出法は高感度な方法であるが、抽出操作などが複雑であることから日常的に検定を実施する場合はやや面倒であり、抽出方法の簡易化が必要である。

抽出方法の簡易化については、検体磨砕の省力化やコンタミネーションの問題を解決するために、マイクロチューブ内での磨砕法(楠ら, 1994)やセラミックボールを用いた磨砕法(平田, 2000)が用いられている。また、非フェノール系の核酸抽出キット(楠ら, 1994)やCTABバッファーを用いた煮沸法(大石ら, 2001)を利用することにより、抽出時間の短縮や抽出時の安全性の向上が図られている。

また、キクからの抽出は遺伝子増幅を阻害する物質による検出感度の低下が考えられ、原理的に予想される感度は得られていない。平田(2000)は磁気性ビーズに吸着させたキャプチャープローブを用いたシーケンスキャプチャー RT-PCRで、山本ら(2001)は2種類のプライマーを用いて2段階のPCRを行うNested-PCRによって検出感度の向上を図っている。

4 ハイブリダイゼーション法

高感度の検出が可能で、プローブの作成が簡便なDig標識cDNAプローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーション法によるCSVdの検出について検討した。

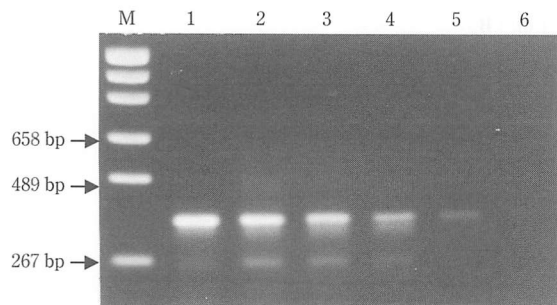


図-3 RT-PCR法におけるCSVdの検出感度

1: 原液, 2: 10倍希釈, 3: 10^2 倍希釈, 4: 10^3 倍希釈, 5: 10^4 倍希釈, 6: 10^5 倍希釈, M: 分子量マーカー。

プローブは完全長のCSVdのcDNAをpUC119のBamHI部位に挿入して作成したクローン(北海道大学より分譲)を用い、HATAYA et al. (1994)の方法に準じてDig標識プローブを作成した。RNAのドットプロットは、プロット装置を用い、抽出したRNA溶液すべてをメンブランにドットプロットした(図-4)。次に、図-5に示したようにハイブリダイゼーションを行い、発光反応および発色反応でCSVdの検出を行った。両反応ともに抽出試料を 10^3 倍に希釈しても反応し、シグナルについては発光反応のほうが強かった。反応に要する時間は発色反応では12時間、発光反応では現像時間を含めても、2時間程度であった。今回発光基質にAMPPDを用いたが、さらに発光が強いCDP-Starが開発されており、発光反応は感度の強さや検出の迅速さの点で実用性が高いと考える。一方、発色反応は暗室などの設備がない場合には有用である。

次に、ハイブリダイゼーション法によるCSVdの抽出条件を検討するため、図-2のA, B, Dの各段階の精製途中のRNA試料を上記の方法でハイブリダイゼーションを行った。その結果、Aでは罹病葉から抽出した試料での反応は弱く、健全試料でも僅かに反応したのに対し、B, Dは罹病葉から抽出した試料での反応は強く、健全試料では全く反応しなかった(図-6)。また、BおよびDを $10^1 \sim 10^5$ 倍希釈し、上記の方法でハイブリダイゼーションを行った結果、Dは 10^2 倍希釈までしか検出されなかったのに対し、Bは 10^3 倍希釈まで検出された。以上の結果から、ハイブリダイゼーションを行うためにはCF-11セルロース処理までの精製を行うのが適当である。大石ら(2003)も同様な検討をしており、

CSVdサンプル (50 μ l)

— 3倍量の変性溶液 [500 μ lホルムアミド, 162 μ lホルムアルデヒド (37%V/V), 100 μ l 10 \times MOPS緩衝液 (pH 7)]

インキュベート: 65 $^{\circ}$ C, 5分間

氷中で急冷

— 等量の20 \times SSCを加え、プロット装置に400 μ lを入れる

プロット装置: プロット装置で吸引

— 固定液 (10 mMNaOH, Na₂EDTA) 500 μ lを入れる

アルカリ固定: プロット装置で吸引

振とう: 5 \times SSCで30秒間

乾燥: -20 $^{\circ}$ Cで保存

図-4 CSVdのドットプロット装置

プレハイブリダイゼーション

ドットプロットしたメンブレンをハイブリダイゼーション溶液^{a)}に入れる
42℃, 5時間振とう

ハイブリダイゼーション

Dig 標識プローブを 95℃, 5分間熱変性後水中で冷却し, 1,000 倍希釈になるようにハイブリダイゼーション溶液に添加
42℃, 12時間振とう

洗 浄

2 × SSPE (0.1% SDS 含有: 68℃) 10分間振とうを 2回
0.1 × SSPE (0.1% SDS 含有: 68℃) 10分間振とう

ブロッキング

Washing Buffer^{b)} (室温) で 2分間振とう
Buffer2^{c)} (室温) で 30分間振とう

抗 Dig 抗体反応

Buffer2 に 10,000 倍希釈になるようにアルカリホスファターゼ標識 Dig 抗体を添加
37℃ で 30分間振とう

洗 浄

Washing Buffer (室温) で 10分間振とうを 3回
Buffer3^{d)} (室温) で 2分間振とう

発光反応

Buffer3 に 100 倍希釈になるように AMPPD 溶液を添加し, 5分間振とう
X線フィルムに 1時間感光し, 現像

発色反応

Buffer3 に 50 倍希釈になるように NBT/BCIP 溶液を添加し, 室温, 静置下で 12時間反応し, TE 溶液で反応停止

図-5 Dig 標識プローブによる CSVd の検出

^{a)} ハイブリダイゼーション溶液: 5 × SSPE, 50%ホルムアミド, 1% Blocking Reagent, 0.1% ラウロイルサルコシナトリウム塩, 0.01% SDS. ^{b)} Washing Buffer: 0.1M マレイン酸, 0.15 MnaCl, 0.3% Tween-20 (pH 7.5). ^{c)} Buffer2: 1% Blocking Reagent, 0.1M マレイン酸, 0.15 MnaCl (pH 7.5). ^{d)} Buffer3: 0.1M Tris (pH 10.3), 0.1MMgCl₂.

CTAB バッファーで磨砕し, 上清を煮沸する方法が適当としている。このように, キクの葉からの抽出の場合, 夾雑物が多いと非特異反応が起こるとともに十分な検出感度が得られない。一方, 精製を繰り返すと RNA の収量が低下して検出感度も低下すると考える。このように, ハイブリダイゼーション法は高感度の検出法であるとともに, 精製が簡単で多数の検体を一度に扱えることなどから CSVd の診断などに有用な方法と考える。

5 PCR-ハイブリダイゼーション法

RT-PCR を行い, 得られた核酸試料を Dig 標識プローブによるハイブリダイゼーションを行う PCR-ハイブリダイゼーション法, RT-PCR 法, ハイブリダイゼーション法との検出感度の比較を行った (楠ら, 1995)。

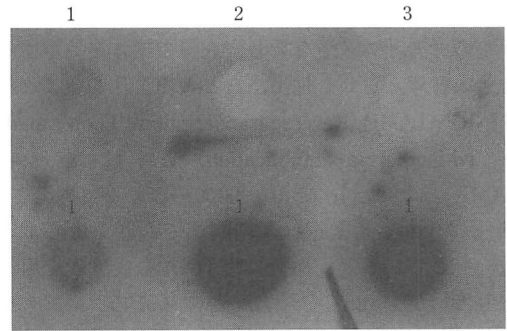


図-6 抽出条件の違いによるハイブリダイゼーション法による CSVd の検出

1: A 段階の核酸, 2: B 段階の核酸, 3: D 段階の核酸, 上段: 健全葉, 下段: 罹病葉。

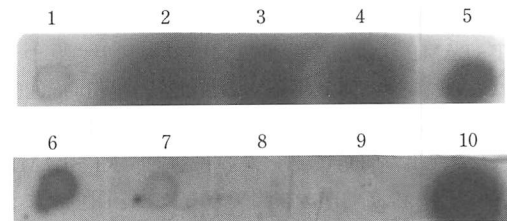


図-7 PCR-ハイブリダイゼーション法の CSVd の検出感度

1: 健全葉, 2~9 罹病葉, 10: 陽性コントロール, 2: 原液, 3: 10 倍希釈, 4: 10² 倍希釈, 5: 10³ 倍希釈, 6: 10⁴ 倍希釈, 7: 10⁵ 倍希釈, 8: 10⁶ 倍希釈, 9: 10⁷ 倍希釈。

RT-PCR 法では 10² 倍希釈まで検出され, ハイブリダイゼーション法は 10³ 倍希釈まで検出された。一方, PCR-ハイブリダイゼーション法では 10⁴ 倍希釈まで検出され, RT-PCR 法とハイブリダイゼーション法を組み合わせることで検出感度が上昇した (図-7)。

PCR-ハイブリダイゼーション法は, RT-PCR 法に比較して 100 倍検出感度が高かった。このことは, RT-PCR 法でのアガロースゲル電気泳動による核酸検出より, ハイブリダイゼーション法での免疫学的検出の感度が高いこと, また, RT-PCR 法では増幅した核酸試料の 1/10 のみを使用するのに対して, PCR-ハイブリダイゼーション法では増幅した全核酸を利用できることによるものと考えられる。PCR-ハイブリダイゼーション法は RT-PCR 法やハイブリダイゼーション法より検出感度が高い方法で有用性が高いと考える。また, 畑谷ら (1992) は ELISA 検定で用いるマイクロプレートをを用いた PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法を開発しており, 吸光度での判定を可能にしている。しかし,

本法は核酸抽出・精製, PCR, ハイブリダイゼーションと多くの労力とコストを要し, 大量の検体を処理するのは難しいと考えられ, 抽出法などの簡素化が望まれる。

6 RT-LAMP (Reverse transcription-Loop-mediated isothermal amplification) 法

LAMP 法は Noromi et al. (2000) によって開発され, PCR 法に代わる新規遺伝子増幅法であり, 次のような特徴をもっている。①鎖置換型 DNA 合成酵素を用いて一定温度 (60 ~ 65°C) で反応させるため, 1ステップの工程で行うことができる (RNA の場合でも, 逆転写酵素を加えるだけでよい)。②4種類のプライマーを用いるため, 特異性が高い。③増幅効率が高いため, 短時間 (15 ~ 60分) での増幅が可能である。④増幅反応によって生じる副産物 (ピロリン酸マグネシウム) の白濁で遺伝子の増幅を確認できる。

RT-LAMP 法は農業分野においても利用されつつあり, CSVd については平田ら (2002), 福田ら (2005) が報告している。平田ら (2002) は, RT-PCR 法では 1 pg まで検出が可能であったのに対し, RT-LAMP 法では 10^{-5} pg の高効率で検出できることを明らかにしている。また, RT-PCR 法のように高度な精製を必要としないことも明らかにしている。RT-LAMP 法は RT-PCR 法と比較して, 簡易さに加え, より高度な遺伝子増幅法であり, 特に遺伝子増幅を阻害する物質を含むとされるキクにおいては適した方法といえる。これらのことから, 本県では 2003 年から RT-LAMP 法による CSVd の検査業務を行っている JA と歌山県農に検査を依頼して, キクの親株等の診断を行っている。

III 発生生態

1 CSVd の感染における品種間差

県内で栽培している主要な品種には, ‘精興黄金’ のよ

うに導入まもなくキクわい化病が多発する品種や, ‘秀芳の力’ のように長年栽培されていても発病しない品種がある。キクわい化病の抵抗性品種は報告されていないが, 品種によっては無病徴感染して発病しない, もしくは発病までに時間がかかるなど, 発病に品種間差がある可能性がある。そこで, CSVd を接ぎ木および汁液接種し, 感染および発病における品種差異を調査した (十川ら, 1998)。

(1) 接ぎ木接種による発病の品種間差

主要品種におけるキクわい化病による病徴を調査するため, 健全な ‘秀芳の力’, ‘精興黄金’ および ‘花秀芳’ を CSVd に感染している ‘ミスルトー’ に接ぎ木して CSVd 感染親株を養成し, これを用いて健全株との栽培比較を行った。その結果, 3品種ともわい化症状を発症した (表-6, 口絵)。感染株の開花時莖長は, ‘秀芳の力’ が健全株の 69% で 3品種中では最も症状が軽かったのに対し, ‘花秀芳’ は 30% でわい化症状が強く現れた。また, 罹病株では 3品種とも開花時の節数・舌状花数・舌状花長の減少などの症状が現れた。花色は, 赤色品種 ‘花秀芳’ では罹病株で L*値が高く, 白色品種の ‘秀芳の力’, 黄色品種の ‘精興黄金’ に比較して淡色化の度合いが大きかった。これらのことから, CSVd に感染すると品種によって程度は異なるもののわい化症状を発症し, 赤色品種では淡色化することを確認した。また, これまで産地で発病が確認されていなかった ‘秀芳の力’ でも, わい化症状が発症することが明らかとなった。

(2) 汁液の葉面接種による品種間差

県内で栽培されている主要な品種について, 汁液接種を行い, CSVd 感染における品種間差を調査した。‘秀芳の力’, ‘花秀芳’, ‘精興黄金’ の 3品種を用い, 1993年7月5日にポットに定植し, 冬期最低夜温 18°C に加温したガラス室内においた。接種方法は, ‘ミスルトー’ の罹

表-6 接ぎ木接種による罹病株の生育と切り花時の特性 (1993)

品種 (花色)	定植1か月後の 莖長 (cm)	切り花の特性				舌状花の花色 ^{a)}			
		莖長 (cm)	節数	舌状花数	舌状花長 (mm)	L*	a*	b*	
秀芳の力 (白)	健全	28	51	46	230	56	78.8	-1.0	1.0
	罹病	16	35	35	219	53	61.5	-1.3	3.0
花秀芳 (赤)	健全	42	105	51	268	67	29.0	38.0	-10.8
	罹病	24	32	20	177	47	45.4	22.7	-9.9
精興黄金 (黄)	健全	34	57	34	362	71	73.7	-4.0	47.0
	罹病	20	25	25	345	57	71.3	-4.5	44.6

^{a)} L* a* b* 表色系による。L*値は明度軸で大きいほど明るく, a*とb*は, その値によって, 色相と彩度に相当する座標を示す。a*値は赤~緑の軸を, b*は黄~青の軸を表す。

病葉に0.1 M リン酸緩衝液を生葉重の2～3倍量加えて磨砕したものを接種源とし、定植から28日経過した株の展開最上位葉の表面に800メッシュのカーボランダムを振りかけ、接種源を浸した綿棒で軽くこすりつけた。カーボランダムおよび接種源残渣は接種後直ちに蒸留水で洗浄・除去した。CSVdの感染の有無を確認するため、接種から37日後に茎頂部に‘ミスルトー’を接ぎ木し、10か月間‘ミスルトー’の病徴を調査した(表-7)。1995年にも‘秀芳の力’、‘精興黄金’、‘新女神’ほか2品種を用い、同様の試験を行った(表-8)。

いずれの品種においても、276～319日後には6～9割の株で感染が確認された。感染確認が早かった品種は、‘花秀芳’、‘精興黄金’、‘ピンク精興’で、接種80～85日後であったのに対し、感染確認までの期間が長かった‘秀芳の力’では、接種240～290日であった。また、‘秀芳の力’は他の供試品種に比べて感染株率の増加も緩慢であった。両年度で供試した‘精興黄金’、‘秀芳の力’では発病までの期間に明らかな差が見られ、品種によってCSVdの体内での移動や増殖の早さおよび潜伏期間に差があることが示唆された。

2 CSVdの伝染

CSVdは親株を介しての伝染、汁液伝染が主要な伝染経路と考えられており、虫媒伝染や土壌伝染はしないとされている。最近では種子伝染や罹病株の花粉からの伝

染も報告されている(大石ら, 2001)。ここでは、刃物による伝染、土壌伝染および育苗・移植作業中の伝染について試験を行った(十川ら, 1998)。

(1) 刃物による伝染

CSVd罹病葉10gを30mlの0.1 M リン酸緩衝液で磨砕し、磨砕液にハサミをつけ、健全株(品種:‘精興黄金’および‘花秀芳’)の茎を1株ずつ切断する処理を行い、発病調査と‘ミスルトー’による生物検定を行った。その結果、6か月後に‘精興黄金’では100%、‘花秀芳’では18.8%の株でわい化症状を示し、その後に行った生物検定でもCSVdの感染を確認した。

次に、CSVdに感染した‘ミスルトー’と健全な‘ミスルトー’をプランターで栽培し、伸長するつど、はさみで感染株を刈り込んだ後に健全株の刈り込みを行う処理を8回繰り返しながら3年6か月間にわたり健全株の発病を調査した。その結果、健全‘ミスルトー’に斑点が生じることがなく、試験終了後に行ったハイブリダイゼーション法での検定においても感染は確認されなかった。

刃物を介しての伝染は、罹病葉をリン酸緩衝液で磨砕して安定したCSVdを接種源とすることにより、品種によっては高率に感染することが確認できた。しかし、‘ミスルトー’を用いて行った刃物による刈り込み試験では健全株への感染を確認はできなかった。このことから、刃物による感染は品種によっては感染しにくい

表-7 葉面接種によるキクわい化病の感染の品種間差(1993年接種)

	発病株率 (%) ^{a)}					
	1993/9/24 (53日) ^{b)}	1993/10/26 (85日)	1993/11/26 (116日)	1993/12/22 (142日)	1994/5/19 (290日)	1994/6/17 (319日)
秀芳の力	0	0	0	0	35	83
花秀芳	0	13	27	30	77	80
精興黄金	0	3	10	13	73	93

^{a)} 発病株率: 葉面接種株に接ぎ木した‘ミスルトー’の発病株率。各品種30株を供試。^{b)} 接種後の日数。

表-8 葉面接種によるキクわい化病の感染の品種間差(1995年接種)

品種名	発病株率 (%) ^{a)}							
	1995/12/18 (80日) ^{b)}	1996/1/17 (110日)	1996/4/2 (186日)	1996/5/22 (236日)	1996/5/28 (242日)	1996/6/10 (255日)	1996/6/20 (265日)	1996/7/1 (276日)
秀芳の力	0	0	0	0	20	43	43	60
精興黄金	30	30	60	60	70	78	78	89
新女神	0	0	0	0	90	90	90	90
ピンク精興	10	10	10	20	60	70	70	70
竹馬の友	0	0	0	0	60	60	70	70

^{a)} 発病株率: 葉面接種株に接ぎ木した‘ミスルトー’の発病株率。各品種10株を供試。ただし調査中に株が一部枯死したため枯死株はその都度除外した。^{b)} 接種後の日数。

表-9 根部接触による伝染試験区の構成と発病率

区別	処理および栽培の方法	発病率 (%)	
		用土 A ^{a)}	用土 B ^{a)}
地上部・地下部接触区	ポット内に罹病苗と健全苗を1本ずつ植え付け、根部と地上部が生育によって自然に接触するように栽培	0	0
地下部のみ接触区	ポット内に罹病苗と健全苗を1本ずつ植え付け、地上部はビニルフィルムで仕切って根部のみが自然に接触するように栽培	0	0
罹病生根擦過・接触区	罹病苗と健全苗の根部を定植時に人為的に擦過させたのちに根が触れ合った状態でポットに植え付け、罹病苗の地上部を除去して栽培	60	20

^{a)} 用土 A: パーライト, ピートモス, パーミキュライトの混合土. B: 花崗岩風化土, ピートモス, パーミキュライトの混合土. 用土 A は 10 反復, B は 5 反復. 植え付け日: 1996 年 6 月 27 日. 発病率は植え付け 203 日後に調査.

感染が確認できる濃度に達するのにかなりの期間を要すると考える。

(2) 乾燥残渣からの土壌伝染

乾燥させた罹病株の残渣を、①茎葉部と根部の両方すき込む区、②根部のみすき込む区を設け、40 l のプランターに 500 g すき込み、‘ミスルトー’の健全親株を植え付けた。定植から 1 年 3 か月間栽培を行ったが、‘ミスルトー’の病徴は出現しなかった。定植 9 か月後には、ハイブリダイゼーション法での検定においても感染は確認されなかった。このことから、乾燥残渣からの伝染はしにくいと考える。

(3) 根部接触による伝染

‘ミスルトー’の CSVd 罹病苗と健全苗を一つのポットに植え付けて栽培する試験を行った。培地にはパーライト、ピートモス、パーミキュライトを混合して用いた。試験区としては表-9 に示す 3 通りとし、‘ミスルトー’の病徴とハイブリダイゼーション法で感染の有無を定植後 203 日目まで調査した。その結果、健全株に病徴が発生したのは罹病苗の生根を擦過・接触させた区のみで、147 日後ごろから病徴が発生しはじめ、203 日後には 60% の感染を確認した。この試験から、植物体が自然に接触することでは伝染が起こりにくく、定植前に苗の根部が人為的に擦過されたことが感染の原因であり、苗の植え付け時に起こる根部の接触によって伝染することが明らかとなった。

次に、パーライトの代わりに花崗岩風化土を用土に用いて同様の試験を行った。パーライトを用いた場合と同様に、罹病苗生根擦過・接触区のみで伝染が確認されたものの、感染株率は 20% であった。このことから、パ

表-10 生根残渣をすき込んだ育苗用土からの伝染

定植後日数	発病率 (%)	
	罹病苗生根	健全苗生根
23 日	2	0
127 日	2	0
209 日	12	0

各 90 株を供試. 定植日: 1997 年 6 月 12 日.

ーライトのように焼成されて無菌に近い状態となった人工培地では土壌伝染が起こりやすいと考えられた。

(4) 育苗床における生根残渣からの伝染

‘ミスルトー’の罹病親株から採取した挿し穂を、パーライトをつめた育苗箱に挿し木して 20 日間養成した後、発根した苗を引き抜き、発生した根を同じ用土に混ぜ込んだ。この育苗箱に健全親株から採取した‘ミスルトー’の穂を直ちに挿し木し、20 日間養成した。こうして得られた苗をプランターに植え付け、‘ミスルトー’の病徴で感染の有無を調査した。その結果、定植 23 日後に 2% の感染が確認された。その後、発病率は切り戻しを行った 127 日後まで増加せず、それ以後に増加して定植後 209 日には 12% となった (表-10)。以上のことから、育苗用土の中に残された罹病苗の生根残渣によって挿し穂に CSVd が感染することが明らかとなった。杉浦・花田 (1998) は、栽培土壌において、罹病株を抜き取った直後に苗を定植して残渣による伝染の有無を調査し、6 か月間栽培を行ったが発病は認められなかったと報告している。育苗用土の場合は、一般栽培土壌と比較

して雑菌が少なく、苗の引き抜き時に残った根が分解されずに伝染源として残ったためと考える。

おわりに

LAMP 法などの遺伝子増幅による検定技術の進歩により、従来では検出が困難であった冬期の親株やフリー化した培養苗などから、低濃度の CSVd も検出することが可能になりつつある。一方、キクに含まれている阻害物質は低濃度の検出を著しく阻害するといわれている。実際の CSVd の遺伝子診断においても、濃度が薄いため検出できないのか、阻害物質によって検出できていないのかの判断がつかない。今後、さらなる検出感度の向上を図ることともに、阻害物質の特定やその除去方法などの開発が必要と考える。

また、高感度検定法の出現により、キク産地では CSVd による汚染がかなりの程度で進んでいることが明らかになりつつある。近年、品種の変遷が激しく、新品种の導入とともに CSVd が持ち込まれた例も多い。本研究で、CSVd は育苗に関わる作業中で感染する危険性が高いことを明らかにした。キク栽培では同じ挿し木用土を連用することが多く、種苗業者や共同育苗によって汚染を拡大させた可能性がある。

現在、種苗供給が分業化し、種苗の流通が国際化することで、キクわい化病の防除がますます困難になる傾向がある。定期的な検定によって汚染の程度を把握するとともに、育苗用土の消毒、セル成形成育苗や直接挿し定植等育苗のいらない栽培方法の活用などの耕種防除を徹底

することによって感染を抑制することが重要である。また、栽培品種の中には感染や発病が起りにくい特性をもつものがあり、品種特性を把握して抵抗性品種の育成を図ることも必要である。

引用文献

- 1) DELLAPORTA, M. S. et al. (1983): *Plant Molec. Biol. Rep.* 4: 19 ~ 21.
- 2) 福田至朗ら (2005): *関西病虫研報* 47: 31 ~ 36.
- 3) GROSS, H. et al. (1982): *Eur. J. Biochem.* 121: 249 ~ 257.
- 4) HASLEOFF, J. and R. H. SYMONS (1981): *Nucleic Acids Res.* 9: 2741 ~ 2752.
- 5) 畑谷達児 (1992): *日植病報* 58: 624 (講要).
- 6) HATAYA, T. et al. (1994): *J. Virol. Methods* 46: 223 ~ 236.
- 7) 平田行正 (2000): 和歌山県農業技術成果発表会発表要旨 1999: 77 ~ 78.
- 8) 平田行正ら (2002): *園学雑* 71(別2): 2614 (講要).
- 9) 細川宗孝ら (2004): 同上 73(別2): 457.
- 10) 兼松誠司ら (1998): *北日本病虫研報* 49: 73 ~ 75.
- 11) 勝部和則ら (2003): *岩手農研七研報* 3: 1 ~ 12.
- 12) KELLER, J. R. (1951): *Phytopathology* 41: 947 ~ 949.
- 13) 楠 幹生ら (1993 a): *香川農試研報* 44: 19 ~ 29.
- 14) ———ら (1993 b): *関西病虫研報* 35: 7 ~ 12.
- 15) ———ら (1994): 同上 36: 67 ~ 68.
- 16) ———ら (1995): *四国植防* 30: 151 (講要).
- 17) 森山美穂ら (1996): *九病虫研報* 42: 45 ~ 47.
- 18) 大石一史ら (2001): *園芸学会雑誌* 70(別2): 192.
- 19) ———ら (2003): *園学研* 2(1): 51 ~ 54.
- 20) 大沢高志ら (1977): *日植病報* 43: 372 ~ 373 (講要).
- 21) 斎藤真悦 (1989): 岩手大学農学部修士論文.
- 22) SASAKI, M. and E. SHIKATA (1977): *Proc. Japan Acad.* 53B: 103.
- 23) SCHUMACHER, J. et al. (1986): *J. Phytopath.* 115: 332 ~ 343.
- 24) 塩飽邦子ら (1996): *兵庫農技研報 (農業)* 44: 1 ~ 4.
- 25) 十川和士ら (1998): *香川農試研報* 50: 21 ~ 25.
- 26) 杉浦広幸・花田 薫 (1998): *園学雑* 67(3): 432 ~ 438.
- 27) 李世訪ら (1997): *北日本病虫研報* 48: 113 ~ 117.
- 28) 山本英樹ら (2001): 同上 52: 82 ~ 84.
- 29) 山下裕子ら (1997): *園学雑* 66(別1): 524 ~ 525.

新しく登録された農薬 (18.8.1 ~ 8.31)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**（製造者又は輸入者）登録年月日、有効成分：含有量、**対象作物**：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、**適用雑草**等を記載。（登録番号：21747 ~ 21759）下線付きは新規成分。

〔殺虫・殺菌剤〕

●クロチアニジン・オリサストロビン粒剤

21749：BASF 嵐ダントツ箱粒剤（BASF アグロ）2006/8/16

21750：嵐ダントツ箱粒剤（住化武田農薬）

クロチアニジン：1.5%，オリサストロビン：7.0%

稲（箱育苗）：いもち病、紋枯病、ウンカ類、ツマグロヨコバイ、イネミズゾウムシ、イネドロオイムシ：移植3日前～移植当日

●フィプロニル・オリサストロビン粒剤

21751：嵐プリンス箱粒剤 10（BASF アグロ）2006/8/16

フィプロニル：1.0%，オリサストロビン：7.0%

稲（箱育苗）：いもち病、紋枯病、ウンカ類、イナゴ類、ニカメイチュウ、コブノメイガ、イネミズゾウムシ、イネドロオイムシ、イネツトムシ：移植当日

21752：嵐プリンス箱粒剤 6（BASF アグロ）2006/8/16

フィプロニル：0.6%，オリサストロビン：7.0%

(15 ページへ続く)