

特集：キクわい化病

ハイブリダイゼーション法による ウイロイドフリー小ギク親株の選抜とわい化病防除対策

岩手県農業研究センター ^{かつ}勝 ^べ部 ^{かず}和 ^{のり}則*

はじめに

キクわい化病の病原ウイロイド CSVd (*Chrysanthemum stunt viroid*) は採穂によって伝染するため (柝原, 1993), 最も重要な対策は健全な親株の選抜利用である (山口, 1979 a ~ d)。そのための手段として, 茎頂培養によりウイロイドをできるだけ除去し, より高感度な検定法を併用して無毒株をスクリーニングする方法と, 育苗段階での診断により無病苗を選抜利用する方法が考えられる (山口, 1979)。

CSVd の検定法には, 病徴診断, 生物検定による診断 (検定品種: Mistletoe), ポリアクリルアミドゲル電気泳動による診断および遺伝子診断がある (柝原, 1993)。検出感度については生物検定が低コストかつ鋭敏であるが, 検定に約 30 日を要するため迅速性に欠ける。遺伝子診断である RT-PCR 法, ドットプロットハイブリダイゼーション法, RT-LAMP 法 (福田ら, 2005) は迅速かつ高感度であるがコストがかかる。なお, RT-LAMP 法は操作が簡便で, かつ特別な機器を必要とせず, 注目される。

本稿では, 生産現場を指導する普及指導員, 育苗施設職員急および研究機関が連携して実施しているウイロイドフリー親株の選抜利用によるキクわい化病防除対策の取り組みを紹介する。

I 岩手県における小ギク生産とわい化病の発生実態

岩手県の小ギクはリンドウに次いで生産の盛んな花き品目で, 2000 年には本県オリジナルのスプレータイプの小ギクを品種登録するなど, 県としても生産振興に重点をおいている。作付面積は 1986 年にはわずか 5 ha であったが, 90 年は 32 ha, 2004 年には 76 ha と生産は拡大している。ところが, 近年, 県内各地でわい化症状を

呈する小ギク株が散見されるようになり, 生産を不安定にする要因として広がりつつあった。

2001 年における本県の発生状況は, 親株を保有する圃場を中心に, 普及員段階で, 草丈短縮の有無で調査するとともに, 研究機関で cRNA プローブ (弘前大学農学生命科学部佐野輝男教授より恵与) を用いたドットプロットハイブリダイゼーション (DBH) 法などにより検定した。その結果, 5 市町 6 品種で, CSVd の感染が認められた。さらに, 後述する採穂用親株の選抜過程で明らかになった結果を加えると, 合計 8 市町村 49 品種で新たに感染が確認され, 県内の主要な産地で発生していることが明らかになった。

II 小ギク苗の生産プロセスと感染リスク

岩手県においては, 購入された母株は, 種苗供給元 (JA あるいは農家など) でいったん増殖され, 「親株」として維持される。配布用の苗は, わい化病やさび病類など種苗伝染性病害の発病しなかった親株の中から「採穂用」として, 圃場段階で選抜される。この「採穂用親株」は, 圃場段階では他の品種 (親株) と一緒に管理されている例が多い。また, 採穂用親株の栽培と一般栽培は圃場区画で分けられてはいるものの, すべての管理が厳密に区別されているわけでもなく, ウイロイドフリー母株を導入しても, 採穂用の親株の増殖段階では他の品種から再感染するリスクがある。

なお, 採穂用親株の選抜後は, 仮増殖や伏込み・育苗が温室や育苗器で管理されるため, この段階では他品種からの 2 次感染のリスクは小さいと考えられる。

III 親株の検定手法

小ギクの品種は花色, 開花期で分けても実に多く, 品種の変遷も激しいため, 品種ごとに無毒化する作業は非常に困難である。一方, 育苗中に配布用苗を検定するには検体数があまりに多く, 実施しにくい。そこで, 本県におけるキクわい化病の防除対策は, 各産地で維持されている親株の CSVd 検定を実施し, これから採穂・苗供給するという考え方にたって, 多数検体を扱うに適し, できるだけ感度が高く, かつ操作の簡便な手法であるこ

Control of Chrysanthemum Stunt Disease using Viroid-free Stock Plants by Tissue Blot Hybridization. By Kazunori KATSUBE (キーワード: ハイブリダイゼーション, ウイロイドフリー, キク, 親株選抜)

* 現所属: 財団法人岩手生物工学研究センター

とが望ましい。この諸条件を満たす手法として、ハイブリダイゼーション法が適当と考えられた。

山下ら (1997) によれば、ドットプロットハイブリダイゼーション (DBH) 法の検出感度は 10 pg/感染葉 g で、1 検体当たりの検定コストは約 276 円と報告されている。検出感度において、RT-PCR 法や RT-PCR マイクロプレートハイブリダイゼーション法や RT-LAMP 法には及ばない。しかし、ドットプロットハイブリダイゼーション法で検出されない極低濃度の感染であれば発病まで時間を要するため、品種利用上、経済的被害がほとんどないことが経験的に知られており、実際に DBH 法によりウイロイドフリー検定を行っている (平田, 2000)。

ところで、キリンピール(株)の旧 江刺ホップ管理センターでは、ホップわい化ウイロイドの実用的な診断法として、核酸抽出操作を必要としないティッシュプロットハイブリダイゼーション (以下、TBH) を導入している (門馬, 私信)。これはティッシュプリントハイブリダイゼーション (Chia et al., 1995) の変法で、組織切片をナイロンメンブレンに直接押しつけてウイロイド核酸を吸着させる方法である。

本法は被検部位をメンブレンに直接プロットすることから、核酸抽出の手間を省略できるため、生産現場段階で被検試料の葉汁液をメンブレンに直接吸着し、乾熱処理までを行うことが可能となる。これを研究機関に送付し、結果および対処を指示するという、筆者が理想とした診断体制 (後述) が成立することになる。

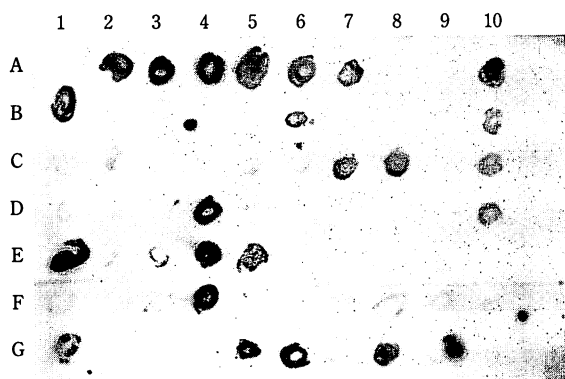


図-1 DIG 標識 cRNA プロープによるティッシュプロットハイブリダイゼーションの検出事例
9A: ネガティブコントロール (ドットプロット),
10A: ポジティブコントロール (ドットプロット),
黒色のシミ (プロット) は CSVd が検出されたことを示す。

IV ウイロイドフリー親株選抜利用の実用性

TBH 法は被検部位をメンブレンに直接プロットするため、核酸抽出の手間を省略できるメリットがあるが、反対に DBH 法の検出感度をやや犠牲とするため、親株の選抜、採穂、伏込みに至る過程で結果を比較するとともに、その後の追跡調査を実施し、“現場でできる” CSVd フリー株の選抜法として、TBH 法導入の妥当性を検証する必要がある。

そこで、6 品種について、採穂用親株の選抜を目的に TBH 検定に供したところ、4 品種からは CSVd が検出されなかったものの 2 品種で検出された。このうち 1 品種は供試 13 株のうち、CSVd が検出されなかった 11 株を採穂用母株に使用し、残る 2 株を廃棄した。また、もう一つの品種は供試株すべてで検出されたため、全株を廃棄した (図-1, 表-1(1))。以上の CSVd フリーと判定された株を採穂用として、増殖育苗した。これらを圃場で栽培した結果、生育中にわい化症状は認められず、かつ、台刈後のひこばえ葉を用いた TBH 検定でも CSVd は検出されなかった (表-1(2))。なお、このひ

表-1 ティッシュプロットハイブリダイゼーションによる小ギク親株の選抜と採穂苗の生育期のわい化病調査および収穫後の CSVd 検定

(1) 採穂用親株の選抜^{a)}

品種区分	検定株数	陽性母株数	選抜した母株数	備考
アーリーイエロー	15	0	15	
ホワイト	13	2	11	2 株廃棄
ピンク	13	0	13	
イエロー	13	0	13	
CM5 (系統)	13	13	0	13 株廃棄
CM6 (系統)	13	0	13	

^{a)} 伏込み中の親株における新展開葉を供した (2001 年 3 月)。陽性株数とは TBH 法によって CSVd が検出された株数。

(2) 選抜親株から採穂した株におけるわい化病調査と CSVd 検定^{a)}

品種区分	発病調査 (圃場)		CSVd 検定	
	調査株数	発病株数	検定株数	陽性株数
アーリーイエロー	50	0	8	0
ホワイト	50	0	8	0
ピンク	50	0	8	0
イエロー	50	0	8	0
CM6 (系統)	50	0	8	0

^{a)} 発病調査は生育中随時観察し、TBH 法による CSVd 検定は台刈後の新展開葉を供した (2001 年 9 月)。

こばえ葉を検定した株を親株に採穂し、増殖育苗した株においても翌年の発生は認められなかった(データ省略)。これらのことから、TBH法を用いたウイロイドフリー親株の選抜利用法は、“現場でできる”方法として十分実用に耐えると判断した。

TBH法を用いた採穂用親株の選抜に際しては“現場でできる”方法としてもう1点確認を要する点がある。検定葉の採集およびナイロンメンブレンへの吸着処理(検定葉切断面のスタンプ)、さらに加熱による固定といった一連の作業、およびその加熱固定済みのメンブレンを研究機関に送付するところまでを現場の職員が実施できるかどうかである。

この点において、全県的に実施したCSVdフリー親株の選抜作業には、あらかじめ予備的な基礎知識および作業上のノウハウを実技研修した職員にお願いし、以下の結果を得ており、特に問題はないと考えている。県内6地域の小ギク産地における採穂用親株累計63品種674試料について、上述のTBH法を用いたCSVdフリー株の選抜を行い、健全と診断された株を親とした苗を用いた一般栽培では、わい化症状の発生が認められなかった(データ省略)。

V 岩手県におけるウイロイドフリー親株選抜の体制

岩手県におけるCSVdフリー小ギク親株の選抜体制は次の通りである(図-2)：

- ① 採穂用親株の候補株の選抜：生産現場で肉眼観察。
- ② メンブレン吸着：普及指導員あるいは育苗施設職員が実施(図-3)：あらかじめ配布したSSC処理メンブレン(Hybond-NX, GEヘルスケアバイオサイエンス社：旧アマシャムバイオサイエンス社)に、被検葉は密に丸めて棒状とし、鋭利な刃物で切断した面を十数秒一定の力を加えて圧着する。乾熱でベーキング後、研究機関に送付。
- ③ ハイブリダイゼーション～結果の判定：研究機関で実施：ポジティブおよびネガティブコントロールをメンブレンにドット後、ドライヤー熱で部分的に“ベーキング”。ハイブリダイゼーション液にはホルムアミドを含み、プレハイブリダイゼーションではDIG標識cRNAプローブを加えて実施。CSPD化学発光検出キット(ペーリンガー社)でXフィルムを使用して検出し(図-1)、判定結果を通知。
- ④ 親株選抜および感染株の処分：普及指導員の指導で育苗施設職員が実施。

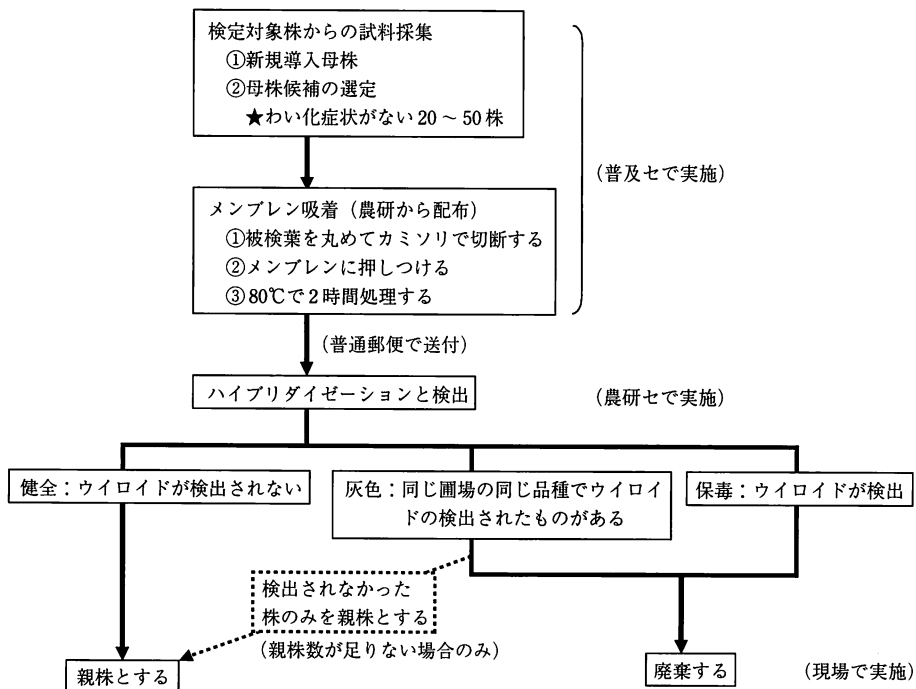


図-2 岩手県におけるウイロイドフリー親株選抜の体制

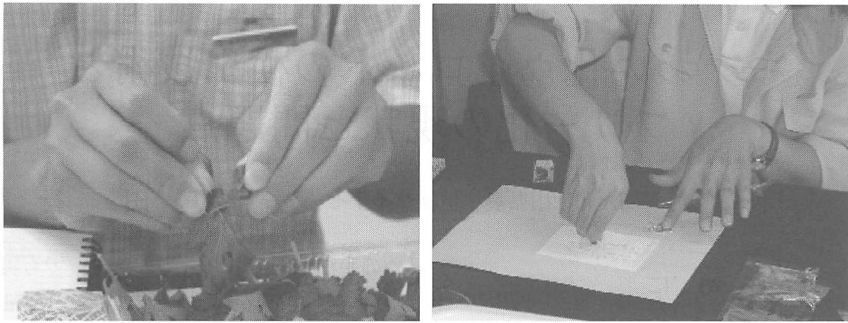


図-3 生産現場における被検葉汁液のメンブレン吸着作業の様子

⑤ 採穂・増殖：育苗施設職員または農家。

おわりに

本取り組みでは CSVd プローブに、より特異性が高く、定量性に優れる cRNA プローブを用いたが、一連の検定における簡素化あるいは低コスト化を実現するために、プローブ調製の容易な cDNA プローブの検討や、標識酵素の検討が求められる。この場合、検出感度を犠牲にする必要があり、改めて実用性評価が必要となろう。なお、ハイブリダイゼーション後の検出に安価かつ簡便な発色反応法の利用を試みたが、この場合は葉汁との識別が難しく、利用は難しいと考えられた。

本稿で紹介した検定系における特徴は、試料採取、検定葉のメンブレン処理および加熱による固定処理までを農業改良普及センターの普及指導員が担当し、県農業研究センターにおいてハイブリダイゼーション反応および検出を行い、判定結果を現場にフィードバックするとい

う「現場と研究の連携」にある。この場合の課題は、大規模に小ギク苗を出荷する団体にあっては営利が絡むため、公的機関による実施は妥当ではない。JA や種苗業者などが実施する場合には、独自に TBH 法による検定を実施できる環境を整えることが望ましい。

引用文献

- 1) CHIA, T. F. et al. (1995): Tissue-print hybridization for detection and localization of plant viruses. *Molecular methods in plant pathology* (edited by SINGH, R. P. and U. S. SINGH), Lewis publishers, U. S. A., p. 145 ~ 149.
- 2) 平田行正 (2000): JA 和歌山県農のウイロイドフリー苗の供給システム, 農業技術体系第 6 巻 (追録第 2 号・2000 年), 農文協, 東京, 206 の 2 ~ 6.
- 3) 梶原比呂志 (1993): キクわい化病, 作物ウイルス病事典, 土崎常男ら編, 全国農村教育協会, 東京, p. 504 ~ 509.
- 4) 山口 隆 (1979 a): 農及園 54: 57 ~ 60.
- 5) ——— (1979 b): 同上 54: 331 ~ 335.
- 6) ——— (1979 c): 同上 54: 431 ~ 436.
- 7) ——— (1979 d): 同上 54: 681 ~ 636.
- 8) 山下裕子ら (1997): 園学雑 66 (別 1): 524 ~ 525 (講要).

(新しく登録された農薬 11 ページからの続き)

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, イネツトムシ, 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

●カルボスルファン・オリサストロビン粒剤

21753: 嵐ガゼット粒剤 (日産化学) 2006/8/16

21754: BASF 嵐ガゼット粒剤 (BASF アグロ) 2006/8/16

カルボスルファン: 3.0%, オリサストロビン: 7.0%

稲 (箱育苗): いもち病, イネミズゾウムシ, イネドロオイムシ: 移植 3 日前~当日

●エトフェンプロックス・ジクロシメット水和剤

21755: 住友化学デラウストロポンエアー (住友化学) 2006/8/16

エトフェンプロックス: 15.0%, ジクロシメット: 7.5%

稲: いもち病, ウンカ類: 収穫 21 日前まで (空中散布)

稲: いもち病, ウンカ類, カメムシ類: 収穫 21 日前まで

(空中散布)

稲: いもち病, ウンカ類, カメムシ類: 収穫 21 日前まで (無人ヘリコプターによる散布)

稲, いもち病, ウンカ類, カメムシ類, ツマグロヨコバイ: 収穫 21 日前まで (散布)

〔殺菌剤〕

●オリサストロビン粒剤

21747: 嵐粒剤 (BASF アグロ) 2006/8/16

オリサストロビン: 3.3%

稲: いもち病: 葉いもち初発 10 日前~初発時

稲: 紋枯病: 出穂前日まで, 但し収穫 21 日前まで

21748: 嵐箱粒剤 (BASF アグロ) 2006/8/16

オリサストロビン: 7.0%

稲 (箱育苗): いもち病, 紋枯病: 移植 3 日前~移植当日

(19 ページへ続く)