

## 熊本県のキクから検出されたキク矮化ウイルス

森山 美穂<sup>1)</sup>・杉浦 広幸<sup>2)</sup>・清田 洋次<sup>1)</sup>・花田 薫<sup>3)</sup>  
(<sup>1)</sup>熊本農業研究センター・<sup>2)</sup>新潟県園芸試験場・<sup>3)</sup>九州農業試験場)

**Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) detected from *Chrysanthemum morifolium* in Kumamoto Prefecture.** Miho MORIYAMA<sup>1)</sup>, Hiroyuki SUGIURA<sup>2)</sup>, Hirotsugu KIYOTA<sup>1)</sup> and Kaoru HANADA<sup>3)</sup>. (<sup>1)</sup> Kumamoto Agricultural Research Center, Kosi, Kumamoto 861-11. <sup>2)</sup> Niigata Horticultural Research Center, Seirou, Niigata 957-01. <sup>3)</sup> Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-11)

**Key words:** chrysanthemum stunt viroid, RT-PCR, cloning, sequence

キクわい化病はウイルスによって引き起こされる病害であり、一般的な診断方法は検定用キク品種「Mistletoe」への接ぎ木接種あるいは機械的接種による生物検定である。

一方、近年、塩基配列が明らかになっているウイルスやウイルスについては、RT-PCR (Reverse transcription and polymerase chain reaction) 法が用いられ、迅速かつ高感度な検出方法として診断場面でも利用されてきている。キク矮化ウイルス (Chrysanthemum stunt viroid; CSVd) についても、オーストラリア分離株<sup>2)</sup>とイギリス分離株<sup>1)</sup>の全塩基配列がすでに決定されている。楠ら<sup>3)</sup>は、この配列をもとにしたプライマーを用いて香川分離株の RT-PCR 法による検出を行い、その結果を報告している。

熊本県下においても、1993年頃から激しいわい化症状

を呈したキクが見られ、生産現場において問題となっていた。今回、このような症状を呈していた株について RT-PCR 法によるウイルスの検出を試み、さらにその塩基配列を決定したので、その結果の概要について報告する。

なお、現地での調査並びに試料の採集に御協力頂いた上益城農業改良普及センター野口英美氏に対し厚く御礼申し上げる。

### 材料および方法

#### 1. 供試植物

熊本県内のキク生産圃場からわい化症状が顕著な株を採集した。それらを検定品種「Mistletoe」に接種し、CSVd に感染している可能性が高いと判断された2株 (熊本K株、熊本M株) を以下の実験に用いた。罹病葉



第1図 熊本県矢部町で発生したキクのわい化症状

は、RT-PCR 法に供試するまで $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

## 2. 供試株からの核酸の抽出

RT-PCR 法に供試するための核酸の抽出は、大貫ら<sup>4)</sup>の方法に準じた。

## 3. 合成プライマーの作製

RT-PCR 法に用いた合成プライマーは、イギリス分離株の配列をもとに作製したもので、比較的保存性の高い領域である、第101番目の塩基から第120番目の塩基までの20塩基に相補的なオリゴヌクレオチド (5'-CCTGGAGGAAGTCCGACGAG-3') と第81番目の塩基から第100番目の塩基に相補的なオリゴヌクレオチド (5'-TTTCCCCGGGGATCCCTGAA-3') である。このプライマーを用いることにより、約 350bp の DNA 断片が増幅されることが期待される。

## 4. RT-PCR 法の反応条件

RT-PCR 反応は、GeneAmp RNA PCR Kit (宝酒造) を用いて行った。まず、 $42^{\circ}\text{C}$ 、30分で cDNA 合成反応を行った後、 $95^{\circ}\text{C}$ 、40秒で DNA の変性、 $55^{\circ}\text{C}$ 、1分間でプライマーのアニーリング、 $72^{\circ}\text{C}$ 、2分間で DNA の伸長、これを1サイクルとして40サイクルの反応を行った。

## 5. 塩基配列の解析

RT-PCR 法によって増幅された cDNA 断片を Bluescript II SK の EcoRV 部位に挿入し、クローニングした。得られたクローンの塩基配列の決定は、蛍光プライマーを用いたジデオキシ法により行った。塩基配列の比較は遺伝子解析ソフト DNASIS (日立エンジニアリング) により行った。

## 結 果

### 1. 現地での発病調査

熊本県のキク生産地である上益城郡矢部町において、1994年5月にわい化症状を呈している株 (第1図) の品種毎の比率を調べた (第1表)。3圃場のいずれにおいてもわい化症状が認められたが、品種と発病率との間に関係は認められなかった。

品種「精興の誉れ」については、2圃場とも発病が多かった。このことは、これらの株が同じ親株床で育苗されていたためと思われた。

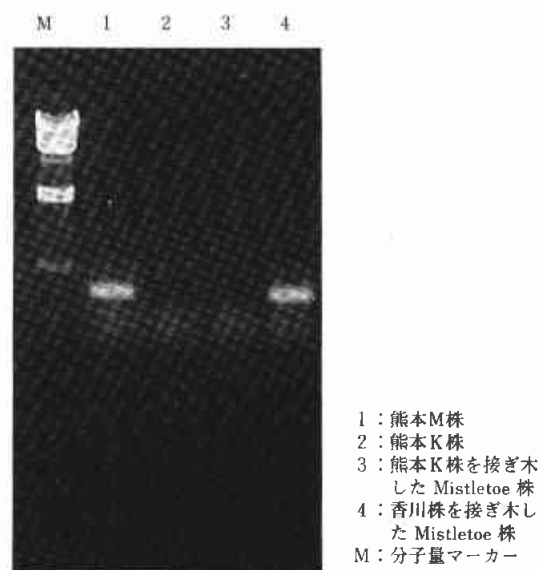
### 2. RT-PCR 法を用いた CSVd の検出

作製したプライマーを用いて供試株から CSVd の検出を試みたところ、熊本M株では、楠ら<sup>3)</sup>によって報告された香川株とほぼ同じ、約 350bp の位置に特異的に増幅された DNA 断片が検出された。しかし、熊本K株では、採集した原株及び接ぎ木接種した「Mistletoe」

第1表 品種別のわい化症状発病率 (1994年5月調査)

品 種	発 病 率 (%)		
	A圃場	B圃場	C圃場
精興の誉れ	22.1	15.9	— <sup>a)</sup>
精興の雲	13.2	—	4.7
秀芳の力	10.9	1.3	10.1
松本の朝	2.2	5.6	3.3
秀芳の心	—	0.4	0.0
黄金の力	1.9	1.8	—
精興の鶴	—	0.1	—
潮風	2.5	—	1.4
秀芳の鏡	8.7	3.7	2.9

a) 圃場における栽培未確認



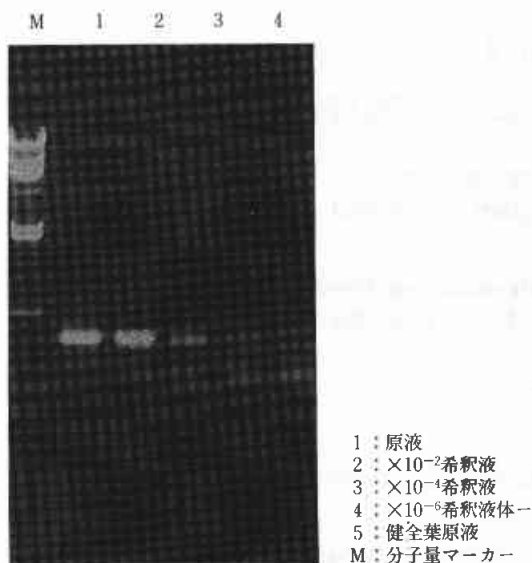
第2図 RT-PCR 法による CSVd の検出

からも DNA 断片の増幅は検出されなかった (第2図)。

次に、熊本M株を用いて、RT-PCR 法での検出限界を調べた。熊本M株0.2gの葉片から抽出した $20\mu\text{l}$ の核酸試料を滅菌蒸留水で $10^{-1}$ ~ $10^{-5}$ に希釈してRT-PCR法に供試したところ、 $10^{-4}$ まで検出可能であった (第3図)。

### 3. 熊本M株の塩基配列

RT-PCR 法で得られたM株の DNA 断片をプラスミドにクローニングした。得られた4個のクローンのうち代表的なクローンM3は356塩基から構成されていた (第4図)。このM3クローンの塩基配列をイギリス分離株と比較したところ、その相同性は87.6%であった。また、M3クローンと同じ356塩基を有するオーストラリア分離



第3図 RT-PCR法におけるキク矮化ウイルスの検出限界

1 : 原液  
 2 :  $\times 10^{-2}$ 希釈液  
 3 :  $\times 10^{-4}$ 希釈液  
 4 :  $\times 10^{-6}$ 希釈液  
 5 : 健全葉原液  
 M : 分子量マーカー

```

      10      20      30      40
5' GATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAGTCCGACGAGATCGC
      50      60      70      80
GCTGGGGCTTAGGACCCCACTCTGCGAGACAGGAGTAA
      90     100     110     120
CCTAAACAGGGTTTTACCCCTTCCCTTAGTTTCTTCCT
      130     140     150     160
TCCTGGAGAGGTCTTCTGCGCTAGCCCGGTCTTCCAAGC
      170     180     190     200
TCCTTTGGCTACTACCCGGTGGAAACAACCTGAAGCTTCA
      210     220     230     240
CGCCTTTTTTCCAATCTTCTTAGCACCGGGCTAGGGAG
      250     260     270     280
TAAGCCCGTGGAAACCTTAGTTTGTTCCTCGGGACTTA
      290     300     310     320
TTGTGGTTCTGTGGTGCCTCTGGACCCTGCTGTATA
      330     340     350
CAAGAAAAGAAATGAAGCGGAAGAAGTCTTCAGG 3'
  
```

第4図 M3 クローンの全塩基配列

株の配列とを比較したところ、その相同性は92.7%であった。

## 考 察

RT-PCR法を用いたCSVdの高感度検出が可能であることは、すでに楠ら<sup>3)</sup>が報告している。今回の熊本分離株においても、0.2gという少量の罹病葉から核酸を抽出し、それを $10^{-4}$ 希釈後供試しても検出可能な量のDNA断片が増幅された。このことは、親株床における育苗期間中でも、RT-PCR法により無病苗の選抜が可能であり、本診断法が本圃での被害の軽減に寄与し得る

ものと考えられる。

本報告で用いたプライマーは、イギリス分離株の塩基配列のうち、ウイロイド間で比較的保存性の高い中央保存領域の配列を基に作製した。供試した2株のうち熊本M株では、特異的なDNA断片が増幅されたが、熊本K株では、特異的なDNA断片の増幅は認められなかった。検定用品種「Mistletoe」への接ぎ木接種では、両株ともCSVd特有の病徴を発現させたにもかかわらず、RT-PCR法での検出結果に相違がみられたのは、熊本K株とイギリス分離株の塩基配列が異なっていることに起因していると考えられる。RT-PCR法では、プライマーの3'末端が1塩基異なるだけでも特異的なDNAは増幅されないため<sup>3)</sup>、今後、熊本県で発生しているすべてのCSVdの検出が行えるよう、新たなプライマーの検出について検討していく必要がある。

熊本M株から得られたPCR産物のクローンの一つであるM3クローンの塩基配列を解析した結果、本分離株は356塩基を有しており、その相同性もイギリス分離株よりオーストラリア分離株に近かったことから、オーストラリア分離株に類似しているものと考えられた。しかしながらM3クローンは、イギリス分離株のCSVdの病原性領域に含まれる、5'末端から307番目塩基と337番目塩基に1塩基ずつ挿入すると、その相同性が97.5%と非常に高くなった。塩飽ら<sup>5)</sup>の報告によると、兵庫県で分離され塩基配列が決定された株には、このような挿入は認められていない。したがって、熊本M株から得られたM3クローンで認められた病原性領域での塩基配列の相違が、現地圃場で見られた激しい萎縮症状を引き起こした可能性があるとも考えられる。今後は、他のキクからのCSVdのcDNAクローンの作製と塩基配列の解析を行い、病原性との関係について詳細な検討をすすめていきたい。

## 引 用 文 献

- 1) GROSS, H., G. KRUPP, H. DOMDEY, M. RABA, P. JANK, C. LOSSOW, H. ALBERTY, K. RAMM, and H. L. SAENDGER (1982) *Eur. J. Biochem.* 121: 249-257.
- 2) HASELOFF, J. and R. H. SYMONS (1981) *Nucl. Acids Res.* 9: 2741-2752.
- 3) 楠 幹生・寺見文宏・寺内英貴・十河和博 (1993) *関西病虫研報* 35: 7-12.
- 4) 大貫正俊・酒井淳一・森 昌樹・宇杉富雄・津田新哉・花田 薫 (1994) *日植病報* 60: 739-740 (講要).
- 5) 塩飽邦子・岩井豊通・山元義久 (1995) *日植病報* 61: 280 (講要).

(1996年4月30日 受領)