

講演要旨

病害の部

佐賀県のイネ育成系統のいもち病真性抵抗性遺伝子型推定

釈迦郡崇吉・八重樫博志
(佐賀大学農学部)

イネ育成系統のいもち病抵抗性検定の一環として、佐賀10号、佐賀11号、佐賀酒12号、佐賀14号、佐賀17号、佐賀18号および佐賀19号のいもち病真性抵抗性遺伝子型を推定した。遺伝子型推定の検定には、9種類のいもち病菌レース(037, 007, 033, 035, 333, 137, 301, 537-*b*⁺, 033-*b*⁺)各1菌株を供試した。育苗は粒状イネ育苗土(暖地用)を入れたシードリングケース(15×5×10cm)を用いてガラス室内で行った。1系統10粒ずつを播種した。4葉期の苗に各レースの孢子懸濁液を噴霧接種し、20~26℃の接種箱に20~24時間静置したのちガラス室内に移した。発病調査は接種後6~7日目に行った。イネ系統の真性抵抗性遺伝子型は、9種類のレースに対する反応パターンから基準により推定した。実験は2回繰り返し、反応の不明確なものについては、さらに1~3回繰り返した。検定の結果、佐賀10号はPi-a Pi-i型、佐賀11号、佐賀酒12号、佐賀18号および佐賀19号はいずれもPi-i型、佐賀17号は+型、佐賀14号はPi-ta²型と推定された。佐賀14号の真性抵抗性遺伝子型はPi-ta²と推定されたが、本系統の来歴にはPi-ta²遺伝子を有するものはなく、いつの時点でアウトクロスした可能性が考えられる。交配母本の一つ関東157号はPi-i型の愛知56号と+型の佐賀1号の交配に由来するが、現時点では関東157号自体の真性抵抗性遺伝子型が不明となっており、どの時点でアウトクロスしたかを推察することはできなかった。

長期残効型殺虫剤の育苗箱処理による葉いもち発生助長と防除

田村 逸美¹⁾・松浦 明²⁾・三浦 猛夫²⁾
(¹⁾宮崎県営農指導課・²⁾宮崎県総合農業試験場)

宮崎県の普通期水稻では近年葉いもちの発生型に変化がみられている。1994年は梅雨明けが早く、7~8月は真夏日で高温乾燥が続いたが、高温抑制を受けないで穂

期まで葉いもちが多発生し、1995年も同様な状況であった。その原因の一つにイミダクロプリド箱粒剤やフィプロニル粒剤の育苗箱処理の影響が考えられる。そこで両殺虫剤の施用がイネの生育といもち病発病に及ぼす影響と、長期残効型いもち病防除剤を使った時の防除効果を、6月28日植えの品種ユメヒカリで調査した。その結果、田植え28日後には無処理の発病度1.4に対してイミダクロプリド、フィプロニル粒剤区はそれぞれ18.1、20.1とすでにかなり高く、田植え2ヶ月後には無処理の発病度20.0に対して、イミダクロプリド、フィプロニル粒剤区はそれぞれ44.8、41.1と多発状態となり、両粒剤の施用が葉いもちの発生を助長するという現象が再現された。両粒剤の使用がイネ体に及ぼす影響について1株あたり総莖数、有効莖数、総葉数、生葉数について7月29日から約2週間おきに調査したが、葉いもちの発生を助長したと思われる傾向は認められず、今後の検討が必要である。発病が助長される条件下での葉いもちの防除試験の結果、イミダクロプリド・カルプロバミド粒剤及びプロベナゾール(24%)箱粒剤+イミダクロプリド粒剤は出穂期まで発病が少なく、育苗箱処理のみで防除が可能と思われる。しかし、広く使用されているイミダクロプリド・トリシクラゾール箱粒剤は田植え1ヶ月後まで少ない発生に抑えていたが、その後、残効が低下したものと恐れ、急速に進展がみられ無処理区より高い発病度になり、田植え約1ヶ月後には追加防除が必要と思われる。

サトウキビ連作圃場に発生する生育障害の要因について

野島 秀伸¹⁾・江口 洋²⁾・古江 広治³⁾
森田 重則⁴⁾・三浦 伸之⁴⁾

(¹⁾鹿児島県農業試験場大島支場・²⁾鹿児島県農業試験場
³⁾農業研究センター・⁴⁾鹿児島県農業試験場徳之島支場)

鹿児島県の徳之島においてサトウキビの連作、野菜・緑肥作物の輪作圃場での線虫密度調査、さらに根の生育状況調査および根からの病原菌の分離、菌接種を行い、サトウキビの生育との関連性を検討した。1994年の線虫密度調査ではサトウキビの連作区からはネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウなどの有害線虫が多く分離され、サトウキビを長期間栽培していた圃場では分離数が多く

なる傾向を示した。1994年、1997年にサトウキビの連作、野菜・緑肥との輪作及び野菜連作がサトウキビの根に及ぼす影響を調査した結果、蔗苗根の褐変率は、野菜・緑肥輪作、消毒区で低く、これらの区の初期の生育（仮茎長、茎葉重、根量）は他の区より上回った。サトウキビ連作区では蔗苗根、茎根の褐変度合が高く、このことがサトウキビの生育・収量に影響していると考えられた。また、1997年にサトウキビの根の褐変部位から菌分離を行った結果、サトウキビに根腐病を起こすとされる *Pythium* 属菌がよく分離された。また、*Fusarium*、*Trichoderma* 属菌もよく分離され、*Rhizoctonia*、*Penicillium*、*Cylindrocarpum*、*Gliocladium* 属菌等も分離された。分離頻度の高かった菌および *Pythium* 属菌をサトウキビの2品種（NiF4、NiF8）に接種し、サトウキビの生育に及ぼす影響を検討した結果、*Pythium* 属菌を接種した区において蔗苗根の細根量は少なく、蔗苗根、茎根の褐変度合が高いことが認められた。以上のことから、サトウキビの連作区の収量低下などサトウキビの生育にはこれら有害線虫や土壌病原菌が関与していると推察された。

*現在 鹿児島県農業試験場

低温暗黒処理前の育苗期高温処理による イチゴうどんこ病の防除効果の年次間差

益永 輝幸・大野 和朗
(福岡県農業総合試験場)

イチゴうどんこ病菌の薬剤感受性の低下が指摘され、化学防除に替わる防除法の確立が望まれている。そこで、イチゴうどんこ病の発病が高温で抑制されることに着目し、1996年に育苗期高温処理による本病の防除効果を検討した。その結果、高温処理は物理的防除法として有効である可能性が示唆された。しかし、その成果は単年度のものであり、気象等の違いによる効果の年次間差を明らかにする必要がある。そこで、1997年に再度、低温暗黒処理開始まで42日間ガラス室で育苗する高温処理区と露地で育苗する無処理区を設け、高温処理の効果を検討した。その結果、高温処理区では育苗期での発病小葉率が無処理区に比べ有意に低く推移した。しかし、1996年の高温処理区では低温暗黒処理直前に発病葉が認められなくなったが、1997年では同時期に第3葉および第4葉での発病が認められた。このため、高温処理した苗を定植した本圃では、1996年の12月中旬では発病が認められなかったが、1997年では10月上旬に発病が確認された。このように、両年での高温処理の効果が異なった原因としては高温処理期間の気温が1997年では1996年より低く

推移し、ガラス室内の気温も1996年より低く推移したことが考えられる。今回の結果から、高温処理の効果は気象に影響され、夏季が低温で推移する年には不十分であることが明らかとなった。

イチゴ炭疽病の発生生態と防除

1. 接種により潜在感染した親株における炭疽病菌の存在部位

稲田 稔・山口純一郎
脇部 秀彦・中村 宏子
(佐賀県農業試験研究センター)

イチゴ炭疽病の防除対策を確立するために、接種により潜在感染した親株における本病菌の存在部位を時期別に検討した。その結果、4月26日のランナー発生初期には、クラウン及び下位葉から本病菌が検出され、根、上位葉、ランナーからは検出されなかった。しかし、6月16日のランナー切り離し時には上位葉及びランナーからも本病菌が検出され存在部位の拡大が認められた。一方、このような親株に対して4月28日～6月6日にアゾキシストロビルリンフロアブル、イミノクタジンアルベシル酸塩フロアブル、プロピネブ水和剤、有機銅フロアブル、チオファネートメチル・ジエトフェンカルブ水和剤を約10日間隔で輪番散布した場合には、ほとんどの部位から本病菌が検出されず防除効果が認められた。さらに、これらの親株から採苗した子苗についても発病程度別に同様の調査を行った結果、多発生苗ではクラウン、根、上位葉、下位葉等のほとんどの部位から本病菌が高率に検出された。また、少発生苗においてもほとんどの部位から検出されたが、各部位の検出率は多発生苗に比べて低かった。一方、本病の病徴が認められない無病微苗の各部位からも本病菌が検出され、各部位の検出率は少発生苗とほぼ同程度であった。これらの結果から、イチゴ炭疽病の防除対策として、薬剤防除は親株床のランナー発生初期ごろからの実施が効果的であり、生産用及び次年度の親株用の子苗には本病菌が感染していないものを使用することが重要である。

せん枝と保護殺菌剤の組み合わせによる チャ輪斑病の防除

西 八東・松比良邦彦
神寄 保成・野中 壽之
(鹿児島県茶業試験場)

輪斑病の防除薬剤で治療効果のある殺菌剤は限られて

いる。そのため、同一剤が連用され、耐性菌の出現により、ベンズイミダゾール系薬剤においては本病の防除効果の低下が生じている。さらに、他の薬剤においても同様なことが懸念される。このため、保護殺菌剤の利用を図る必要がある。しかし、保護殺菌剤は摘採翌日までに散布しなければ効果が低く、使用場面が限られる。そこで、せん枝処理と保護殺菌剤散布との組み合わせにより、本病の防除適期の拡大が可能か試みた。試験には、TPNフロアブル剤700倍、イミノクタジナルベシル酢酸塩1,000倍、カスガマイシン・銅水和剤500倍を供試した。また、せん枝処理は三番茶摘採7日後に行い、せん枝の深さは、三番茶摘採面より1cm、2cm及び無せん枝とした。その結果、無せん枝ではTPNフロアブル剤、イミノクタジナルベシル酢酸塩剤、カスガマイシン・銅水和剤による防除効果は摘採翌日までに散布すれば高いが、摘採8日後散布ではほとんど効果が認められなかった。しかし、適採7日後でも摘採面より1cm以上切り下げてせん枝し、その翌日までに殺菌剤を散布した場合、いずれの薬剤でも高い防除効果が得られた。以上のことより、チャ輪斑病の保護殺菌剤による防除が摘採翌日までにできない場合、摘採7日後までに摘採面より1cm程度せん枝し、その翌日までに保護殺菌剤を散布すると高い防除効果が得られ、本法は摘採翌日までに保護殺菌剤の散布ができない場合に有効であると考えられた。ただし、三番茶以降にせん枝処理を行う場合は葉層を確保するために、せん枝時期は遅くならぬように留意する必要があるものと思われた。

ブドウ褐斑病菌 (*Pseudocercospora vitis*) の諸性質

田代 暢哉¹⁾・孫 益林²⁾

井手 洋一¹⁾・衛藤 友紀¹⁾

(¹⁾佐賀県果樹試験場・²⁾江蘇省豊県園芸場)

ブドウ褐斑病は施設栽培「巨峰」を中心に近年多発傾向にあり、重要病害の一つになっている。しかし、本病については不明な点が多いことから、まず病原菌の生理的性質について検討した結果、以下のことが明らかになった。胞子発芽と温度：素寒天培地上での胞子発芽は12時間後には10～40℃の範囲で認められ、特に20～37℃で良好であった。発芽管の伸長は28～32℃で良好で、次いで25℃、23℃の順であった。胞子発芽と湿度：各種塩類等の過飽和溶液によって一定湿度に調整したデシケーター内における胞子発芽は15時間後には湿度96%以上で認められ、特に99%以上で良好で、発芽管は湿度99%以上

で良好に伸長した。菌そう生育と培地の種類：各種平板培地に菌そうディスクを接種して25℃・暗黒下で28日間培養後の菌そう生育は合成培地(リチャーズ寒天培地、ツァペック寒天培地)では極めて不良であったが、天然培地では良好で特にPIA(ジャガイモ煎汁・イノシトール寒天培地)や巨峰葉煎汁寒天培地、ニンジン煎汁寒天培地が優れていた。菌そう生育と温度：PDA培地に菌そうディスクを接種して暗黒下で28日間培養後の菌そう生育は5～32℃の範囲で認められ、20～28℃で優れていた。菌体生育と温度：PI液体培地を用いて振とう培養を行った結果、菌体重は23℃で最大となり、次いで25℃、28℃の順であった。

ナシ「幸水」の樹体における枝枯病の初発病部位について

中尾 茂夫

(大分県農業技術センター)

加温ハウス栽培のナシ「幸水」に、枝枯病が多発した。発病の様相、とくに初発病部位に顕著な特徴がみられたので、剪定前に発病状況調査を行った。初発病部位は、短果枝(通常短果枝・盲芽短果枝)と中長果枝での発病に大別された。症状は、短果枝では果柄脱落痕からの腐敗・枯死で、激しい場合は短果枝の着生枝に及んだ。中長果枝では、頂芽または腋芽からの腐敗で、腐敗が枝を一周すると、その部分から先が枯死した。通常短果枝(果そう葉または新梢葉が形成された短果枝)での発病は、1樹平均35.5～37.4%で、非常に目立つ発病であった。とくに着果させた短果枝の方が、未着果短果枝にくらべ顕著に発病が多かった。また、果柄脱落痕の害虫食害がみられる短果枝の方が、無被害短果枝にくらべ顕著に発病が多かった。盲芽短果枝での発病は、1樹平均48.8～55.2%で、通常短果枝よりさらに多かった。この場合も、害虫食害を受けた短果枝が顕著に発病が多かった。中間芽短果枝での発病は全くみられなかった。発病した通常短果枝・盲芽短果枝から、その着生枝への病斑進展率は1樹平均40.2～45.7%で、かなり高い頻度で着生枝に腐敗が及んだ。中長果枝での発病は、1樹平均12.8～19.0%で短果枝にくらべ少なかった。枝幹病害で常に指摘される樹体傷口からの発病はほとんどみられなかった。以上の結果から、枝枯病の初発病部位は、通常短果枝・盲芽短果枝・中長果枝で、この部分が病原菌の侵入部位と考えられた。また、通常短果枝・盲芽短果枝の発病は、果柄離脱部の害虫食害が引き金となっていると推察された。

イミベンコナゾール・マンゼブ（マネージ M®）水和剤のカンキツそうか病および黒点病に対する防除効果

斉藤 泰彦¹⁾・平松 基弘¹⁾

竹内 明子¹⁾・小野 文彦²⁾

(¹⁾北興化学工業(株)開発研究所・²⁾同 福岡支店)

イミベンコナゾール・マンゼブ水和剤は、みかんの主要病害であるそうか病、灰色かび病および黒点病に対して高い効果を示す。今回は、カンキツそうか病および黒点病に対する防除特性について検討した。カンキツそうか病：1996年、佐賀県下の一般農家圃場において、落弁期および幼果期の2回散布で春葉および果実に対する効果を検討した結果、本剤の600倍液散布で高い防除効果が確認された。ポット苗を用いて防除特性について検討したところ、予防散布では低濃度においても高い効果を示したが、治療効果は低かった。また、二次感染の阻止効果についてモデル試験により検討した結果、高い阻止効果があることが認められた。すなわち、すでに病斑形成した温州樹に本剤の常用濃度を散布後、その下にポット苗を配置し降雨処理を行ったところ、無散布樹の下のポット苗では多数の病斑が形成されたが、散布樹の下のポット苗ではほとんど発病が認められなかった。カンキツ黒点病：1996年および1997年に佐賀県内の農家圃場において幼果期から250mm降雨ごとに連続散布した結果、マンゼブ水和剤の600倍液散布より優る効果を示した。さらに幼果期1回散布あるいは落弁期および幼果期の2回散布においても高い効果を示した。一方、圃場試験サンプルについて、本剤の有効成分の一つであるマンゼブの付着量を分析したところ、総降雨量350mm後（散布10日後）において、葉部では $0.52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、果実では $2.15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。この葉部での付着量は、ポット苗で完全に発病を抑制する $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ を大きく上回っていた。従って本剤がカンキツ黒点病に対して高い防除効果を示す理由として、耐雨性が優れていることも要因の一つと考えられた。

カンキツ果実腐敗多発生要因の薬剤面からの検討

田代 暢哉・井手 洋一・衛藤 友紀

(佐賀県果樹試験場)

1997年11月から1998年1月にかけて収穫後および出荷中の温州ミカン等に緑かび病を主体とした果実腐敗が多発し、大きな被害を生じた。収穫前の防腐剤として散布

されているイミノクタジン酢酸塩液剤の効果が低下したのではないかと考え、同剤散布園で発生していた緑かび病罹病果実から分離した同病菌314菌株の同剤に対する感受性を調査した。その結果、すべての菌株はMIC値 $0.78 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の感受性菌で、耐性菌の出現は認められなかった。そこで次に、同剤の緑かび病に対する防除効果に及ぼす降雨の影響について人工降雨条件下で検討した。その結果、無降雨条件下では同剤3,000倍はすぐれた防腐効果を示したが、降雨量が増加するにつれて徐々に効果は低下し、累積降雨量が100mmに達すると防除価は30程度とほとんど防腐効果が認められなくなった。1997年の11月中旬～12月上旬にかけての降雨回数は18回、降雨量は264mmで、これらは平年値よりそれぞれ6回および187mmも多かったことから収穫期の大雨がイミノクタジン酢酸塩液剤の防腐効果の低下を招き、果実腐敗の多発生につながったものと考えられた。

ジャガイモ青枯病抵抗性に及ぼす biovar の影響

菅 康弘・仲川 晃生

(長崎県総合農林試験場愛野馬鈴薯支場)

ジャガイモ品種の青枯病抵抗性は汚染圃場を用いた秋作栽培条件下で検定されるが、検定結果が年次間で異なることが指摘されている。長崎県に分布するジャガイモ青枯病菌には biovar の異なる菌株(Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ)の存在が知られている。そこで、biovar Ⅱ およびⅣに属するジャガイモ青枯病菌5菌株を供試し、菌株の違いによるジャガイモ品種の青枯病抵抗性の変動を、塊茎浸漬接種法を用いて調べた。試験は1997年秋作で行った。9月9日に供試菌株の培養菌液を $10^7 \text{cfu}/\text{ml}$ の濃度に調製し、切断したジャガイモ塊茎を1分間浸漬接種した。接種塊茎は、翌日の9月10日に、予めクロロピクリンくん蒸剤(20ℓ/10a)処理により土壤消毒した圃場に植付けた。供試品種としては、汚染圃場を用いた検定により青枯病抵抗性がそれぞれ強、中、弱と判定された、農林1号、タチバナ、デジマの3品種を用いた。この結果、各供試菌株ともに農林1号で発病株率が低かったが、タチバナおよびデジマでは菌株によって発病株率が異なり、biovar Ⅳに属する2菌株(AA3114, AA6028)を用いた場合はタチバナでの発病株率がそれぞれ31.1%、33.3%に対して、デジマでは35.6%、44.4%となり、従来の検定結果と一致した。一方、biovar Ⅱに属する3菌株(AA4017, AA6009, AA6053)を接種した場合には、デジマで発病株率15.6%、13.3%および33.3%を示

したのに対して、タチバナで31.1%、24.4%および60.0%となり、デジマよりもタチバナで発病株率が高くなった。以上のことから、供試5菌株では、biovar毎にジャガイモ品種の青枯病抵抗性が異なり、菌株と品種の間に特異的な関係が存在することが示唆された。このことが、汚染圃場での品種抵抗性検定の結果を不安定にする一因であると思われる。

Solanum toxicarium における *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* の動静

神 善和・福永 泰也・黒田 弥生
松添 直隆・岩井 久・荒井 啓
(鹿児島大学農学部)

ナス科植物青枯病細菌 (*Ralstonia solanacearum*) の抵抗性植物, *Solanum toxicarium* および *S. toxicarium* 台木植物 (穂木は感受性のトマト; 強力米寿) に病原型がIV群菌に属する *R. solanacearum* 8224株を接種し, 植物体内での細菌の動静および発病の有無を調べた。接種源として細菌懸濁液 (10^8 cfu/ml) を用い, 断根および穿針接種した。すなわち, ポット栽培した植物体の土壌にナイフを差し込み断根し細菌懸濁液を流し込む方法と, 細菌懸濁液に木綿針を浸し植物体の茎を突き通す方法を用いた。細菌の動静を本細菌の選択培地 (原・小野, 1984) と走査型電顕で調べた。*S. toxicarium* と *S. toxicarium* 台木植物に断根接種した場合, 接種30日後でも本細菌が分離されたが植物体に異常は認められなかった。細菌が分離された部分は *S. toxicarium* では地際部 (地面よりも約4 cm 上部まで) で, 接ぎ木植物では台木部分に限定され穂木部分からは検出されなかった。一方, 穿針接種した場合, *S. toxicarium* では, 接種90日後でも接種部位より上下約3 cmの部分から分離された。この場合も植物体に外観上の異常は認められなかった。しかし, *S. toxicarium* 台木植物の穂木に穿針接種した場合, 10日後にほとんどの穂木は枯死した。選択培地で本細菌が分離された部位を走査型電顕で観察したところ, 導管と思われる組織に細菌の集団が認められた。以上の結果より, *R. solanacearum* は *S. toxicarium* 体内で生存でき, 組織内での若干の移動が可能であるが, 植物体に萎ちょう等の症状を示さないことが確かめられた。

ジャガイモ塊茎えそ病 (新称)

平石千賀子¹⁾・大島 一里¹⁾・仲川 晃生²⁾
松尾 和敏³⁾・小川 哲治⁴⁾・四方英四郎⁵⁾
佐古 宣道⁶⁾

¹⁾佐賀大学農学部・²⁾長崎県総合農林試験場愛野

³⁾長崎県病害虫防除所・⁴⁾長崎県総合農林試験場

⁵⁾北海道グリーンバイオ研究所・⁶⁾佐賀大学)

長崎県においてジャガイモ塊茎にえそ症状を示す病害が発生しており, 迫ら (九州病害虫研究会, 1997) 及び大島ら (日本植物病理学会, 1997) の研究結果からこの病害の原因がジャガイモYウイルス (PVY) の一系統であることが示唆されている。そこで, 本研究では塊茎えそ症状を示したジャガイモ葉から分離した PVY^{TND6} を, ウイルスフリーのジャガイモ品種ニシユタカ29個体とシマバラ30個体に接種し, えそ症状が再現されるかどうかを検討した。その結果, ニシユタカでは120個体の次代塊茎が得られ, このうち28個体の次代塊茎がえそ症状を示し (発病率23.3%), シマバラでは167個体の次代塊茎中9個体がえそ症状を示した (発病率5.4%)。従って, ジャガイモ品種ニシユタカ及びシマバラ間での塊茎発病率に差異が認められたことから, PVY^{TND6} の病原性はジャガイモ品種間において異なることが示唆された。以上の結果からジャガイモ塊茎えそ病の病原ウイルスは PVY^{TN} (PVY 塊茎えそ系統) であることが明らかとなり, 本邦で初めてジャガイモ塊茎に塊茎えそ症状が再現されたことからジャガイモ塊茎えそ病 (新称) を病名として提案したい。次に, 長崎県で採集した塊茎えそ症状を示した4品種5分離株の PVY 感染ジャガイモ葉から逆転写—polymerase chain reaction 法により外被タンパク質 (CP) 遺伝子をクローニングし, 塩基配列を決定した。その結果いずれの CP も267アミノ酸残基から構成され, アブラムシ伝搬性に関与する DAG モチーフが保存されていた。またアブラムシ伝搬試験の結果, 5分離株すべてがアブラムシ伝搬性であることが判明した。さらに CP のアミノ酸配列をもとに平均距離法 (UPGMA 法) を用いて分子系統樹を作製し, 本邦及び諸外国の PVY 普通系統及びえそ系統と比較したところ, PVY 塊茎えそ系統は PVY えそ系統のクラスターの中に存在することが明らかとなった。

ジャガイモ塊茎えそ病発病塊茎率の品種間差異

仲川 晃生¹⁾・菅 康弘¹⁾・迎田 幸博¹⁾
大島 一里²⁾・平石千賀子²⁾・山並 昭朗³⁾
松尾 和敏⁴⁾

¹⁾長崎県総合農林試験場愛野馬鈴薯支場
²⁾佐賀大学農学部・³⁾種苗管理センター
雲仙農場・⁴⁾長崎県病害虫防除所)

ジャガイモ塊茎えそ病(新称)は、新系統のジャガイモYウイルス(PVY^{TN})により引き起こされる、ジャガイモ塊茎にえそ症状を生じる病害である。現地調査では、本病の発病塊茎率は品種により差が認められることを前回報告した。今回は、本病に対する品種の発病程度を明らかにするため、圃場条件下で発病塊茎率の差異を調べた。試験は愛野馬鈴薯支場圃場を使い、①1996年秋作—1997年春作、②1997年春作—1997年秋作の2回行った。いずれの試験でもウイルスフリー塊茎を使い一作栽培後、当代での発病塊茎率を調査するとともに、自家採種により発病塊茎率が增大するとの現地での知見をもとに、一部を次作の種として使い次代での発病塊茎率も調べた。試験は1区当たり品種により10株~35株植え、3反復で行った。この結果、外部にえそ症状を生じたジャガイモの発病塊茎率は品種により異なり、ニシユタカでは1996年秋作—1997年春作試験の春作で13.8%、1997年春作—1997年秋作試験の春作で32.3%に達する高い値を示した。これに対しデジマの発病塊茎率はニシユタカより低く、現地調査の結果と一致した。一方、メイン・アイノアカ等では発病塊茎率は低かった。男爵薯などの北海道品種では概して発病塊茎率は低く、また、総じて二作目での発病塊茎率が高い傾向を示した。以上のことから、塊茎えそ病に対し、圃場レベルで品種間差異が認められた。本病の場合、塊茎内部にもえそを生じるため、内部えその発生程度の評価とともに、隔離温室条件下での接種試験結果を併せて品種抵抗性を検定する必要がある。

3種のRNA抽出法及び3種のReverse TranscriptaseがSPFMVのRT-PCRによる検定に及ぼす影響

長田龍太郎
(宮崎県総合農業試験場)

サツマイモ斑紋モザイクウイルス(SPFMV)の検定方法として、*Ipomoea* 属を用いた植物検定法、電子顕微

鏡法、抗原抗体法等があり、より高感度な方法として長田ら及び酒井らによりRT-PCRを用いた方法が報告されている。今回、RT-PCRに用いるRNA抽出法の比較及びreverse transcriptaseの比較を行ったので報告する。なお、使用したプライマーは長田らが報告したSPFMV強毒系統及び普通系統共通のプライマーを用いた。RT-PCRには、Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400を用いた。まず、RNA抽出法として、SPFMVに罹病したサツマイモの葉からISOGEN法、SDS・フェノール法、CF11法の3種類のRNA抽出法を用いてRNAを抽出した。抽出されたRNA量には差が認められ、生葉0.1gからISOGEN法で平均39.0 μ gと最も多く抽出され、SDS・フェノール法、CF11法はそれぞれ2.9 μ g及び2.6 μ gと少なかった。また、各RNA濃度を0.1 μ g/ μ lに調整し、10倍ずつ段階希釈を行い、rTth DNA polymeraseを用いたRT-PCRを試みた結果、ISOGEN法及びSDS・フェノール法で総RNA量2pg/ μ lの濃度までウイルス由来DNA断片が合成された。しかしCF11法では200pg/ μ lまでであった。次いでrTth DNA polymerase、AMV reverse transcriptase・Taq DNA polymerase、MuLV reverse transcriptase・Taq DNA polymeraseの組合せで各reverse transcriptaseの比較を行った。前の実験と同様にRNA濃度を調整してRT-PCRを行った結果、AMV・Taqの組合せで最も感度が高く、総RNA量200fgまで検出可能であった。なお、AMV reverse transcriptaseによるcDNA合成は、これらのプライマーでは48 $^{\circ}$ C、15分間で最も良かった。この結果、RT-PCRに用いるRNA抽出法としてISOGEN法が、また使用酵素としてAMV・Taqの組合せが良いと判断された。

サツマイモ斑紋モザイクウイルスF系統の諸性質とその分類学的所属の再検討

花田 薫・大貫 正俊
(九州農業試験場)

平成4年8月九州農試圃場で斑紋症状を呈していたサツマイモから分離したひも状ウイルスは、主にその血清学的性質からサツマイモ斑紋モザイクウイルス(SPFMV)の1系統と考えられ、F系統と仮称することを提案した(大貫ら、1993)。今回、このF系統のウイルス遺伝子の塩基配列を含めた諸性質を検討した。F系統に感染したアサガオから、Usugi *et al.* (1994)の方法に準じてウイルスを純化精製した。純化ウイルスからRNAを抽出し、Oligo dTをプライマーとして常法によ

り cDNA を作製し Bluescript にクローニングした。えられた4クローンの両末端の塩基配列を決定した結果、既知の SPFMV の配列との相同性は認められず、大貫ら (1996) が報告したサツマイモシンブトムレスウイルス (SPSV) やカーネーション潜在ウイルスと相同性を示した。感染アサガオ葉から CF11 を用いて RNA を簡易精製し、SPFMV 共通プライマーやサツマイモ潜在ウイルスまたは SPSV 特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、SPSV プライマーを用いたときにのみ、予想される大きさの特異的なバンドが検出され、えられた RT-PCR 断片をクローニングしてその両末端の塩基配列を決定した結果、SPSV の配列と90%以上の相同性を示した。また、SPSV 抗血清を用いたウエスタン解析によっても、F系統に感染したアサガオ葉から、SPSV 感染アサガオと同じ位置に特異的なバンドが認められた。F系統のアサガオの病徴は極めて軽微であり、SPFMV より SPSV の病徴に類似していた。以上の結果から、前に SPFMV の F 系統と仮称したウイルスは、SPSV であると結論された。

ハクサイから分離されたカブモザイクウイルス 2 分離株の生物学的、遺伝子学的解析

上田 結佳・前田 佳代・大島 一里
(佐賀大学農学部)

ハクサイから分離したカブモザイクウイルス (TuMV) の Ka1J 及び 2J 分離株の生物学的性質を調べ、ポテイウイルス遺伝子間で変異が多いと言われている 5' 末端非翻訳領域、P1 タンパク質遺伝子、外被タンパク質 (CP) 遺伝子及び 3' 末端非翻訳領域について塩基配列を決定した。Ka1J 分離株をアブラナ科植物に接種すると、カブ品種博多据りでは茎えそ、萎凋及び壊死症状、ダイコン品種秋まさりではえそ斑点、ハクサイ品種野崎1号では大きなえそ斑点を示した。一方 2J 分離株を接種すると、カブ品種博多据りでは激しいモザイク症状、ダイコン品種秋まさりではモザイク症状、ハクサイ品種野崎1号では輪点を示し TuMV の典型的な症状を示した。またタバコ品種キサンチ nc では Ka1J 及び 2J 分離株共にえそ斑点を示した。次に、遺伝子レベルで検討するために、Ka1J 分離株の純化ウイルス或いは 2J 分離株が感染したカブ植物から RNA 或いは全核酸を抽出し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法を用いて TuMV 遺伝子の cDNA を増幅した。その後 pBluescript II SK⁺ にクローニングし、5' 末端非翻訳

領域、P1 遺伝子、CP 遺伝子及び 3' 末端非翻訳領域の塩基配列を決定したところ、2 分離株間での 5' 末端非翻訳領域の塩基数、P1 タンパク質遺伝子の推測されるアミノ酸残基数、CP 遺伝子の推測されるアミノ酸残基数及び 3' 末端非翻訳領域の塩基数は保存されていた。また、Ka1J 及び 2J 分離株間の 5' 末端非翻訳領域の塩基配列の相同性は87.2%であり、P1 タンパク質遺伝子の推測されるアミノ酸配列の相同性は90.9%であったが、CP 遺伝子の推測されるアミノ酸配列の相同性及び 3' 末端非翻訳領域の塩基配列の相同性は共に100%であった。以上の結果より、TuMV のアブラナ科植物における病徴の違いには、CP 遺伝子および 3' 末端非翻訳領域は関与していないことが示唆された。今後、TuMV 遺伝子の他の領域の塩基配列を決定し病徴に関する遺伝子を解析したい。

熊本県下で発生したキュウリ急性萎凋症の原因究明

森山 美穂¹⁾・清田 洋次¹⁾*・岩本 英伸²⁾*

(¹⁾熊本県農業研究センター・²⁾熊本県菊池農業改良普及センター)

熊本県菊池郡西合志町の抑制型キュウリで毎年発生が多く、産地全体の問題となっていた急性萎凋症の原因について調査した。育苗期～収穫末期までほぼ10日間隔で発症調査を行ったところ、急性萎凋症は、定植後、着果が始まる頃から発症し始め、10月初旬には40%以上で発症が認められた。この調査期間中に、①株全体が萎凋している、②上位葉のみが萎凋、③数枚の葉が萎凋している、④枯死の4程度に分類してサンプルを採集し、細菌及び糸状菌の検出を試みたが、いずれの株からも検出されなかった。そこで、間接 ELISA 法に供試したところ、採集した869株のうち82%の株からウイルスが検出された。このうち最も多く検出されたウイルスは、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) とカボチャモザイクウイルス (WMV-2) の両ウイルスで、全体の54%であった。次いで WMV-2 の単独感染が20.9%、ZYMV の単独感染が6.9%で、以前、香川県や京都府で報告されている急性萎凋症の原因の1つであるキュウリモザイクウイルスは全く検出されなかった。程度別での検出ウイルスの割合は、①及び④の株からは ZYMV と WMV-2 の両ウイルスが検出される割合が最も多く、②及び③では混合感染の割合が低かった。そこで、各グループから6株を選び、カボチャ木キュウリに接種して再現試験を試みた。供試した24株のうち混合感染していた株を接種

源として用いた場合、接種したキュウリはいずれも萎凋症状を示し、接種キュウリからもウイルスが再検出された。単独感染株でも萎凋症は再現されたが、その程度は軽かった。また、ウイルスが検出されなかったが萎凋している株を接種したが、萎凋は再現されなかった。次に、CMV との感染の関連を調べるために、同地域で栽培されているメロンから分離した CMV をこれらの株に接種した。軽度の萎凋しか認められなかった WMV-2 あるいは ZYMV 単独感染株に CMV を混合感染させると、萎凋の程度が重くなった。以上の結果から、本県で発生したキュウリの急性萎凋症は、WMV-2 と ZYMV によるものと推察された。

*現在 熊本県病害虫防除所

ASGV 抗血清を用いた ELISA および イムノカプチャー RT-PCR による CTLV の検出

黒木 健児¹⁾・大島 一里¹⁾・井手 洋一²⁾

田代 暢哉²⁾・吉川 信幸³⁾

¹⁾佐賀大学農学部・²⁾佐賀県果樹試験場

³⁾岩手大学農学部

今日までカンキツタターリーフウイルス (CTLV) の純化は難しく良質の抗血清を得ることが困難であり、また本研究を開始した時点では本邦において CTLV 抗血清を手に入れることができなかった。CTLV 及びリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) はカピロウイルス属に属し、ASGV と CTLV の外被タンパク質 (CP) のアミノ酸配列を比較した結果相同性が90%以上であったことから、ASGV の抗血清が CTLV の検出に使えるのではないかと考え本研究を行った。ASGV の CP 遺伝子を組み込んだクローン pET3a-CP2 を用いて大腸菌内で ASGV-CP を発現させ、この発現タンパク質をウサギに注射し抗血清を作製した。その抗血清を用いて二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法 (DAS-ELISA) およびイムノカプチャー逆転写 PCR (IC-RT-PCR) において感染キノア葉から ASGV 及び CTLV を検出できるかを検討した。Tween-20 を含んだクエン酸—リン酸緩衝液 (CPB-T, pH 5.0), 生理食塩リン酸緩衝液 (PBS-T, pH 7.4) 或いは炭酸—重炭酸緩衝液 (CBB-T, pH 9.6) を磨砕液として ASGV 或いは CTLV 感染キノア葉を磨砕し DAS-ELISA に供試したところ、CBB-T を用いて磨砕した場合が両ウイルスを感度良く短時間で検出できた。次に ASGV 感染キノア葉を用いて IC-RT-PCR の条件を検討した。IC

時に Nunc TopYeild™ Strip 或いは 0.2ml マイクロチューブに抗血清を吸着後 RT-PCR を行ったところ、前者の場合に多くの ASGV-CP 遺伝子の cDNA 増幅が認められた。また抗体にウイルス粒子を吸着後ウイルスの CP と RNA を解離させるため、Triton X-100 を用いて攪拌或いは 65℃ で 10 分間熱処理したところ、前者の場合に顕著な CP 遺伝子の増幅が認められた。この方法で CTLV 感染キノア葉について IC-RT-PCR を行ったところ、CTLV-CP 遺伝子の cDNA 増幅が認められた。以上の結果より、ASGV-CP に対する抗血清が DAS-ELISA および IC-RT-PCR において使用可能であり、また CTLV を感染キノア葉より検出できることが明らかとなった。

ELISA によるカンキツ葉からの CTLV および SDV の検出条件の検討

井手 洋一¹⁾・黒木 健児²⁾・大島 一里²⁾

田代 暢哉¹⁾・吉川 信幸³⁾

¹⁾佐賀県果樹試験場・²⁾佐賀大学農学部

³⁾岩手大学農学部

大腸菌で発現させたリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) 外被タンパク質に対する抗血清 (黒木ら, 1998) および温州萎縮ウイルス (SDV) 抗血清 (日本植物防疫協会) を用いて、カンキツタターリーフウイルス (CTLV) ならびに SDV の ELISA による検出を効率良く行うための諸条件について検討した。まず、カンキツ葉を磨砕する緩衝液としてツィーン20を0.05%の濃度で加用した 0.1M クエン酸—0.2M リン酸緩衝液 (CPB-T, pH 5.0), 0.1M クエン酸緩衝液 (CB-T, pH 7.2), 0.02M 生理食塩リン酸緩衝液 (PBS-T, pH 7.4), 0.05M 炭酸—重炭酸緩衝液 (CBB-T, pH 9.6) の4種類について比較した。CTLV においては CBB-T で最も検出感度が高く、SDV では CBB-T, CB-T, PBS-T を用いた場合にほぼ同等の検出感度であった。次に、CBB-T に対する酸化防止剤としてチオグリコール酸 (TGA) および *N, N*-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水合物 (DIECA) を加用した場合、ともに CTLV の検出感度は著しく低下した。SDV については TGA の加用で検出感度が高まったものの、DIECA の加用ではやや低下した。CTLV, SDV とともに磨砕液とコンジュゲート液の同時分注は検出感度を高めたが、ブロッキング処理の効果は認められなかった。以上の結果から、カンキツ葉の磨砕液として CBB-T (pH 9.6, ツィーン20の濃度は0.05%) を用い、抗体のコーティン

グ、磨砕液とコンジュゲート液の同時分注、基質添加の
手順で ELISA を行うことで、CTLV および SDV を効
率良く検出できることが明らかとなった。

‘八朔’ および ‘日向夏’ から分離されたカ ンキツトリステザウイルスに対する弱毒 ウイルスについて

下村 克己¹⁾・草野 成夫¹⁾・平島 敬太²⁾

¹⁾福岡県農業総合試験場果樹苗木分場

²⁾福岡県農業総合試験場)

カンキツトリステザウイルス (CTV) は、主に中晩生
カンキツにおいて、樹勢の衰弱、収量の低下等を招き、
被害が甚大な場合は枯死させる場合もある。本ウイルス
は虫媒伝染し、ウイルスフリー化等の効果が上がりにく
いため、我が国では、広島県の八朔から分離された HM-
55 が弱毒ウイルスとして広く利用されてきた。しかし、
近年この HM-55 の効果の発現程度が品種によって異な
る可能性が指摘され、さらに効果の高い弱毒ウイルスの
必要性が高まってきた。そこで本県では、平成元年度か
ら県内4ヶ町村のカンキツ産地において ELISA 調査や
ピッチング調査を行い4品種15株を選抜し、ライム検
定によりスクリーニング後、CTV に感受性のユズ実生
樹および栽培品種‘宮内伊予柑’、‘土佐文旦’、‘八朔’の生
育に対する影響や病原性等を調査した。その結果、樹齡
35年生(平成元年当時)の‘八朔’から分離された HaM1
および同100年生の‘日向夏’から分離された HyM2 を弱
毒ウイルス候補として選抜した。この2株は、ユズ実生
樹および供試栽培品種の生育に影響を及ぼさない他、ピ
ッチング等の病徴も認められず、弱毒ウイルスとして
有望と考えられた。さらに、幼苗割接ぎ法により干渉効
果を検討したところ、弱毒候補株未接種の対照樹(ウイ
ルスフリー樹)と比較して、明らかに生育が良好であり、
干渉効果を有する可能性が示唆された。今後ほ場におけ
る生育、収量および病徴調査を実施して、干渉効果を実
証する必要がある。

ELISA によるブドウリーフロールウイ ルスおよびブドウファンリーフウイルス の検出

草野 成夫・下村 克己

(福岡県農業総合試験場果樹苗木分場)

福岡県のブドウは、約1,600haと県内の落葉果樹では
カキに次いで第2位の生産面積を誇っており、特に、粒

の大きい巨峰はその6割を占めている。西南暖地である
九州では、北の生産地である長野県等の黒く着色した果
実と比較して、赤熟れの果実の割合が大きいのが実態で
あり、この赤熟れ症状の多くが、ウイルス保毒によるも
のであることが明らかになってきている。そこで、ウイ
ルス検出が簡単な ELISA による診断法について検討を
行った。なお、抗体は、バイオレバ社から市販されてい
るブドウリーフロールウイルス (GLRV) I、Ⅲ及びブド
ウファンリーフウイルス (GFLV) 抗体を使用した。磨
砕緩衝液には、ニコチン加用トリス緩衝液 (0.5M, pH
8.2) より何も加用しないトリス緩衝液が良かった。また、
検出感度は時期により異なったが、GLRV では7月上旬
から検出感度が高くなり、落葉時期まで検出が可能で
あった。しかし、GFLV では、生育初期の5月から6月
まで検出感度が高かったが、7月以降は急速に低下し検
出が不可能となった。なお、磨砕液の希釈限界は、
GLRV では270倍程度までで、GFLV では810倍程度ま
でであった。部位別では、葉柄と葉身に分けて検出を試み
たが、一定の傾向は認められなかった。そこで、上記手
法を用いて県内のブドウ品種188検体について検定を行
った結果、GLRV I で2.1%及び GLRV Ⅲ で15.4%が保毒
していたが、GFLV は検出されなかった。