

九州・沖縄で発生したキクわい化ウイルスの塩基配列

花田 薫・酒井 淳一
(九州沖縄農業研究センター)

Nucleotide sequence of *Chrysanthemum stunt viroid* occurred in Kyushu-Okinawa
Kaoru Hanada and Jun-ichi Sakai (National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Suva, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan)

Key words: *Chrysanthemum stunt viroid*, nucleotide sequence, RT-PCR

緒 言

キクわい化ウイルス *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) によって引き起こされるキクわい化病は、わが国では静岡県での発生が大沢ら (1977) によってはじめて報告された。キクの病徴と CSVd の検定品種である Mistletoe への接木検定の結果に基づいた報告であった。その後、花田ら (1982) はキク 2 品種を Mistletoe に接木して特徴的な黄斑症状を呈した葉から抽出した核酸を用いて電気泳動により CSVd 特有のバンドを検出した。これらの報告に続いて、北海道・青森県・秋田県・新潟県など、北日本を中心に CSVd の発生が報告された (兼松ら, 1999; 杉浦・花田 1998)。CSVd の全塩基配列についてはオーストラリア株に関して世界ではじめて決定された (Haseloff and Symons, 1982)。その後イギリス株 (CSVd-E) についても塩基配列が報告された (Gross et al., 1982)。わが国では兵庫株 (塩飽ら, 1996)、栃木株 (李ら, 1997)、新潟株 (杉浦・花田, 1998) 及び寒河江株 (兼松ら, 1999) について CSVd の塩基配列がすでに報告されている。

九州沖縄地方では、先ず森山ら (1996) が熊本県のキクから、その後、尾川ら (1999) が鹿児島県のキクから CSVd の発生とその塩基配列を報告している。本研究では、これまで CSVd の発生が報告されていなかった福岡県・宮崎県・沖縄県での発生確認とそれらの塩基配列について報告するとともに、既報の CSVd との塩基配列の比較を行った。

材料および方法

1. 供試植物

福岡県・佐賀県・大分県・宮崎県・沖縄県で採取されたわい化病類似症状 (わい化や黄斑) を呈していたキク

を用いた。第 1 表に供試した県ごとのキク品種を示した。

2. RT-PCR

約 0.1g のキク茎葉から CF-11 セルロースを用いた簡易法 (大貫・花田, 1998) によって RNA を抽出した。供試プライマーは、森山ら (1996) が用いたもの (プライマーセット AB)、または杉浦・花田 (1998) が報告している AB とは異なる部分の塩基配列に基づくプライマー (プライマーセット CD) を用いた。RT-PCR の条件は、森山ら (1996) と同一であった。

3. 塩基配列の解析

特に記さない限り、プライマーセット AB を用いた RT-PCR によって得られた増幅産物を直接、dT を付加した pBluescript に組み込んでクローニングした。塩基配列の決定は DNA シークエンサー (ABI373) により行った。すべてのクローンについて、両方向から塩基配列を決定した。決定した塩基配列を CSVd-E 及び本邦で塩基配列が報告されている CSVd と比較した。

結果及び考察

1. CSVd の RT-PCR による検定

九州沖縄地方のわい化病様症状を呈していたキクから抽出した RNA を鋳型として用いた RT-PCR によって、CSVd の検出を行った。今回、九州・沖縄の 5 県、7 品種のキクから行った検定結果を第 1 表にまとめて示した。5 県のうち 3 県の 5 品種から CSVd が検出された。これによって、これまで CSVd の発生が確認されていなかった福岡県・宮崎県・沖縄県のキクでの CSVd の発生が確認された。

2. 塩基配列の決定と比較

これまで発生が報告されていなかった福岡・宮崎・沖縄 3 県の CSVd 感染キク 9 個体の RT-PCR 産物からそれぞれクローニングした 9 クローンについて塩基配列を

第1表 九州・沖縄のキクからのRT-PCRによるCSVdの検定結果

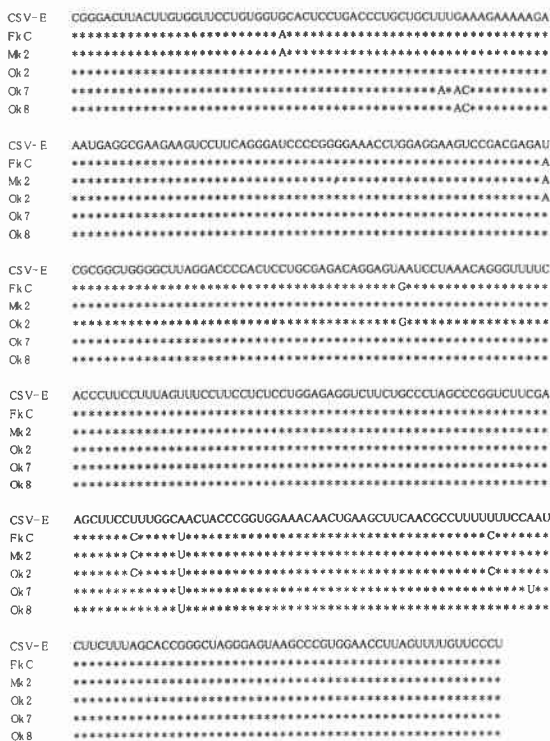
県名	検定依頼時期	キク品種	RT-PCRの結果 ^{a)}
福岡県	1996年12月	舞風車	4 / 4
佐賀県	2000年11月	秀芳の力	0 / 1
大分県	2000年9月	神馬	0 / 1
		秀芳の力	0 / 1
宮崎県	1998年8月	息吹の扇	2 / 4
		風あそび	2 / 2
沖縄県	1998年8月	秋芳	2 / 3
		芳香	2 / 4

a) 陽性株数 / 検定株数

決定して、相同性の高いCSVd-Eと比較した。配列を決定したのは、福岡県の1クローン (FkC)、宮崎県の4クローン (息吹の扇からのMk 2~4, Mk 8)、沖縄県の4クローン (芳香からのOk 2, 秋芳からのOk 7~9)であった。

塩基配列を決定したCSVdはすべてCSVd-Eと同じ354塩基からなっていた。CSVd-Eと同一の配列を有するものはなかったが、1~2塩基が異なるのみで高い相同性を有するもの (Mk 3, Mk 8, Ok 9) から、6塩基異なるもの (FkC) までであった。今回、配列を決定した9クローンの中で比較的異なる塩基配列が多い6クローン (Mk 4はMk 2と同じ配列であった) について、CSVd-Eと異なる塩基を第1図に示した。なお、CSVd-Eと高い相同性を示した3クローンについて、CSVd-Eと異なっていた塩基は次の通りであった。すなわち、Mk 8では298番目のAがUに、Ok 9では254番目のAがUに、Mk 3では183番目のCがU及び254番目のAがUであった。

本研究で決定したCSVd 9株の塩基配列は、すべての株について1種類のプライマーセットで1クローンしか決定していない。従って、プライマー部分の塩基配列は変異を見落とす可能性があり、また、PCR中のポリメラーゼによるエラーも考慮する必要がある。そこでこれらの点を検討するために、2株 (Mk 2, Mk 4) についてはプライマーCDでRT-PCRを行ったものもクローニングして塩基配列を決定したところ、プライマーABで得たクローンと同一配列であった。また、Ok 2, Ok 7, Ok 8に関しては複数のクローンについて塩基配列を決定したところ同一であった。これら以外の株については確認していない。主として用いたプライマーセットABについては、既報のCSVdでは保存性の高い部分の塩基配列に基づいて作製したものであったが、それでもプライマー部分に塩基レベルでの変異がおきている可能性が



第1図 九州・沖縄のキクより分離したCSVdの塩基配列の比較

CSVd-E: イギリス株 (Gross et al., 1982)

FkC: 福岡株, Mk 2: 宮崎株, Ok 2・7・8: 沖縄株

*: CSVd-Eと同じ塩基を示す

ないとはいえない。

これら9株の塩基配列を日本の既報のCSVdの塩基配列と比較した結果、以下のことが判明した。沖縄県のOk7は、山形県で分離されたCSVd-Eとは4塩基異なる配列を持つ寒河江株 (兼松ら, 1998) と1塩基を除いて同一配列で高い相同性を示した。CSVd-Eとは2塩基が異なる新潟株とMk 3では254番目の置換は同一であったが、もう1カ所は異なっていた。また、CSVd-Eとは1塩基のみ異なる沖縄県のOk 9は鹿児島株 (尾川ら, 1999) 及び兵庫株 (塩飽ら, 1996) と同じ配列であった。我が国のCSVdには、CSVd-EではAである254番目の塩基がUに変わっているものが多かった。CSVd-Eとはかなり異なる配列を有する森山ら (1996) が報告した熊本株と類似の配列を持ったものは見つからなかった。他の7株については、我が国で既報のものと同じ配列のものは見出されなかった。塩基配列の違いはわずかな違いである場合が多いが、わが国のCSVdは相互に異なる塩基配列を持ったものが多く存在していることが明らかとなった。このような違いは、CSVdの疫学的

な調査に利用できると思われる。ただ、このような塩基配列の相違がキクにおける病徴に影響するかどうかは明らかでない。今後、感染性クローンを用いた検討が必要である。

本研究で検定したキクは、わい化症状を呈していたものがほとんどであったが、CSVdの発生が未確認であった県からのキクにしては、予め予想された感染率より高く、CSVdの発生が拡大しているものと思われる。このように九州・沖縄地域において、熊本県・鹿児島県に続き、福岡県・宮崎県・沖縄県でもCSVdの発生が確認されたことから、CSVdの発生確認地域は西九州を除いたほぼ九州・沖縄地域全体となった。今後は、CSVdの被害回避のための対策を九州沖縄全域で協力して行うことが重要である。

引用文献

- Gross, H., G. Krupp, H. Domdey, M. Raba, P. Jank, C. Lossow, H. Alberty, K. Ramm and H. L. Saenger (1982) Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *Eur. J. Biochem.* 121: 249-257.
- 花田 薫・栃原比呂志・橋本純治・沖村 誠・川田穰一 (1982) わが国のキクから分離されたキク矮化ウイルス日植病報 48: 131 (講要).
- Haseloff, J. and R. H. Symons (1981) Chrysanthemum stunt viroid: Primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acid Res.* 9: 2741-2752.
- 兼松誠司・日高 操・村山 徹・石黒 潔 (1998) 山形県寒河江市で分離されたキクわい化ウイルスについて. *北日本病虫研報* 49: 73-75.
- 李世訪・畑谷達児・古田治邦・佐野輝男・四方英四郎 (1997) 北海道におけるキク矮化病の発生と電気泳動法およびハイブリダイゼーション法によるキク矮化ウイルスの検出. *北日本病虫研報* 48: 113-117.
- 森山美徳・杉浦広幸・清田洋次・花田 薫 (1996) 熊本県のキクから検出されたキク矮化ウイルス. *九病虫研会報* 42: 45-47.
- 尾川宜広・大保勝宏・酒井淳一・花田 薫・岩井 久 (1999) 鹿児島県におけるキクわい化病の発生. *九農研* 61: 78.
- 大貫正俊・花田 薫 (1998) RT-PCR法を利用したサツマイモウイルス病の高感度簡易診断. *植物防疫* 50: 102-105.
- 大沢高志・森田 儔・森 喜作 (1977) キクウイルス病の防除に関する研究 2. 指標品種への接ぎ木接種によるウイルスの検定. *日植病報* 43: 372-3 (講要).
- 杉浦広幸・花田 薫 (1998) 新潟県の大輪ギクに発生したキクわい化ウイルスによる病害. *園学雑* 67: 432-438.
- 塩飽邦子・山元義久・岩井豊通 (1996) キクわい化ウイルス (Chrysanthemum Stunt Viroid) 遺伝子のクローニングと全塩基配列. *兵庫農技研報 (農業)* 44: 1-4.

(2001年4月30日 受領)