

# キクわい化ウイルスの探索収集

松下 陽介

農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所

[〒305-8619 つくば市藤本 2-1]

## Collection of *Chrysanthemum stunt viroid* in Japan

Yosuke MATSUSHITA

National Institute of Floricultural Science,  
National Agriculture and Food Research Organization

### 1. 目的

キクはわが国の花き類の中で生産量・栽培面積ともに1位である重要品目であり、全国各地に産地が存在する。近年、キクわい化ウイルス (*Chrysanthemum stunt viroid*, 以下 CSVd) を病原とするキクわい化病の発生が問題となっている。本ウイルスに感染すると、草丈が著しくわい化し、商品価値を完全に失う (Horst, 1977)。

キクわい化病は1977年に国内で発生が報告 (大沢ら, 1977) されて以来、三重 (花田ら, 1982)、香川 (楠ら, 1993)、兵庫 (塩飽ら, 1996)、熊本 (森山ら, 1996)、北海道 (李ら, 1997)、山形 (兼松ら, 1998)、新潟 (杉浦・花田, 1998)、静岡 (土井・加藤, 2004) など各地で発生が報告されている。主要な伝染源は無病徴株を含めた罹病ギクで、摘蕾、収穫、刈り込みなどの管理作業に伴う接触、あるいは刃物によって伝染が起こる。病徴が現れていない時期に外観から判断して感染個体を除去することは非常に困難であるため、罹病個体を親株として増殖していることにより被害が拡大している。宿主は栽培ギク以外にはシネラリア (Lawson ら, 1968) やペチュニア (Verhoeven ら, 1998) などが報告されており、キク科の他にナス科植物にも感染することがわかっているが、キク以外で CSVd の感染が問題となることはほとんどない。

ウイルスは1本鎖環状 RNA から成る最小の植物病原体であり、1971年に Diener らによってジャガイモから発見された (Diener, 1971)。構造上も、遺伝情報量からも最小の病原体 (246-399塩基) である。ウイルスは DNA または RNA を包むようにタンパクの殻を持っているが、ウイルスはこういったタンパクの殻をもたない上、その RNA にはタンパク質がコードされておらず、宿主細胞の酵素に依存して RNA から RNA へ自律的に複製・増殖している。現在、28種のウイルスが報告されており、主なウイルスはジャガイモに感染する *Potato spindle tuber viroid*

(PSTVd)やかんきつ類で発生する *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd) などがあげられる。ウイロイドはポスピウロイド科とアブサンウイロイド科に分類されており、CSVd, PSTVd および CEVd は前者に属する (佐野, 2007)。

本病は、1977年の初発報告以降、全国のキク産地で発生が増加傾向にあると考えられている (松下, 2006)。ウイロイドはRNAのみから成る病原体であり、病徴発現や宿主内での増殖は構成するRNAの塩基配列に依存している。最近、ジャガイモで発生するウイロイド、PSTVdに関する変異体を用いた研究では、1塩基の変異によってウイロイドの増殖や移行、病徴発現などの特性が決定されている例も報告されており、1塩基の変異がウイロイドの諸特性に及ぼす影響は大きい。しかし、CSVdに関してはこれらの情報が乏しく、研究が遅れている。CSVdに関する病徴発現や増殖に関する研究を進める必要があるが、本病原の変異体の情報やサンプル登録はなされておらず、変異体を用いた研究が困難である。

今後、本病の防除研究に必須である各種変異体の分子生物学的観点からの比較を行うためには国内の本病原体を収集することが重要と考えられた。そこで、今回、鹿児島県を中心に本病原体の探索収集を行った。

## 2. 探索概要

2007年7月23～26日に九州地方2地点、鹿児島県指宿市山川 (薩摩半島) および和泊町 (沖永良部島) においてCSVdに感染していると思われるキク植物体の採取を行なった (表1, 図1)。収集した植物体は、冷蔵した状態で持ち帰り分離源とした。

表 1. 探索・収集日程

年月日	行程	行動内容
H19.7.23	つくば市→鹿児島市	移動 (空路)
	鹿児島市→指宿市	移動 (陸路)
	指宿市内	キク圃場を探索
24	鹿児島市→和泊町	移動 (空路)
25	和泊町	キク圃場を探索
26	和泊町→鹿児島市	移動 (空路)
	鹿児島市→つくば市	移動 (空路)

## 3. 収集成果

Hosokawa ら (2005) が開発したウイロイドの簡易検定方法である Direct RT-PCR 法により、収集した試料からRNAを得た。この方法は操作が煩雑なRNA抽出を行わずに注射針 (25 G×25 mm, テルモ) を検体に突き刺し、付着した細胞液を逆転写 (RT) 溶液に浸すことでウイロイドRNAを得る方法で、従来のRNA抽出操作を通じるRT-PCRと同等の検出結果が得られている。プライマー 【5'CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG (CSV-F) and 5' GCC TCAAGG TCA TAT TCA



図 1. 鹿児島県における採取地点

GC (CSV-R)】(Hosokawa ら, 2005)を用いて特異的 DNA の増幅を調べた. PCR 条件は 98 °C -45 秒, 62°C -10 秒, 74 °C -45 秒の 35 サイクルとした. CSVd が検出されたサンプルを用いて, 同ウイルスの全塩基配列を解析した. プライマーセット【5' TGT GGT GCA CTC CTG ACC CT (CSV-ZF) and 5' GGA ACC ACA AGT AAG TCC CG (CSV-ZR)】(Matsushita ら, 2007) を用いて Direct RT-PCR を行い, PCR 産物の pGEM-T-Easy (プロメガ) へのクローニングにより得られた 5 クローンの塩基配列を解析した.

Direct RT-PCR による検出の結果, 指宿市の 2 サンプル中, 1 サンプルから, 和泊町の 5 サンプル中, 3 サンプルから CSVd が検出された (表 2). それら CSVd の全長はすべて 354 塩基であった. 国内では熊本県において 356 塩基の CSVd が見つかっている (森山ら, 1996). 海外では 348 塩基 (インド), 354 塩基 (韓国, ハンガリー, アメリカ), 355 塩基 (カナダ) および 356 塩基 (オーストラリア) の CSVd が報告されている (Matsushita ら, 2007).

今回, 得られた 4 つの変異体の内 (表 2・図 2), CSV-IB1 (MAFF260079) は全ての検出サンプルからクローニングされ, その配列は兵庫株 (DDBJ accession no. X16408; 塩飽ら, 1996)と同じであった. この兵庫株は全国各地のキク産地から検出されている一般的な CSVd の変異体である (Matsushita ら, 2007). また, CSV-IB2 (MAFF260080) の塩基配列は CSV-IB1 と比較すると 73A→G および 254U→A であった. 同様に, CSV-OK1 (MAFF260081) は 79U→C, CSV-OK2

表 2. 指宿市, 沖永良部島での採取数と CSVd 検出数, 検出された変異体

採取地	試料数	検出数	検出変異体
指宿市	2	1	CSV-IB1 (MAFF260079) , CSV-IB2 (MAFF260080)
和泊町 (沖永良部島)	5	3	CSV-IB1, CSV-OK1 (MAFF260081) , CSV-OK2 (MAFF260082)

(MAFF260082) は 248U→C の変異が見られた. 254U→A の変異箇所は茨城県から検出された変異体 (DDBJ accession no.AB279770) と同じ変異箇所である (Matsushita ら, 2007). また, 248U→C の変異箇所は静岡県から検出された変異体 (土井・加藤, 2004) と同じ変異箇所である.

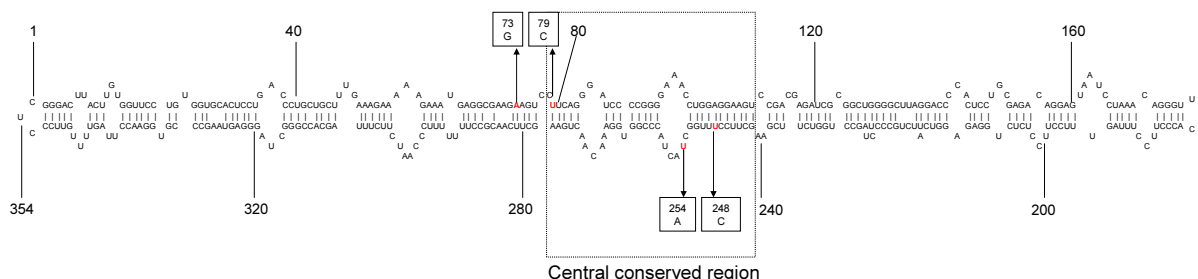


図 2. 検出された CSVd の全塩基配列

CSV-IB1 の塩基配列を基準にして、CSV-IB1・CSV-OK1・CSV-OK2 の変異部分を赤字で示した。Central conserved region: ポススピウイロイドに共通した配列

#### 4. 所感

今回キクわい化病の罹病サンプルを多数採集し、RT-PCR による感染の確認後、クローニングによって変異体の解析を行った結果、CSV-IB1 (MAFF260079), CSV-IB2 (MAFF260080), SV-OK1 (MAFF260081) および CSV-OK2 (MAFF260082) の 4 つの変異体を分離・登録することができた。今後、それらの変異箇所が CSVd の複製や病原性などの諸特性に与える影響の解析が必要である。今後、それらの変異体を供試し、CSVd の病原性に関する試験研究の展開と新たな知見の集積が期待される。

しかしながら、CSVd の病原性をはじめとする諸特性をより理解し、その防除技術を開発するための解析対象として、まだまだ変異体数が少ない状況であるため、今後とも全国のキク産地を中心に、キクわい化病の発病調査および病原体収集が必要である。

#### 5. 謝辞

本探索では、多くの方々にご支援とご協力をいただいた。鹿児島県農業開発総合センター花き部 白山竜次氏には鹿児島県指宿市での探索に同行していただき、多大なご協力をいただいた。鹿児島県大島支庁沖永良部事務所農業普及課木戸君枝氏には沖永良部島での探索に同行いただき、多大なご協力をいただいた。鹿児島県関係者および生産者の方々には、探索期間中多くの情報とご助言をいただいた。ここに記して、深く感謝の意を表する。

#### 6. 参考文献

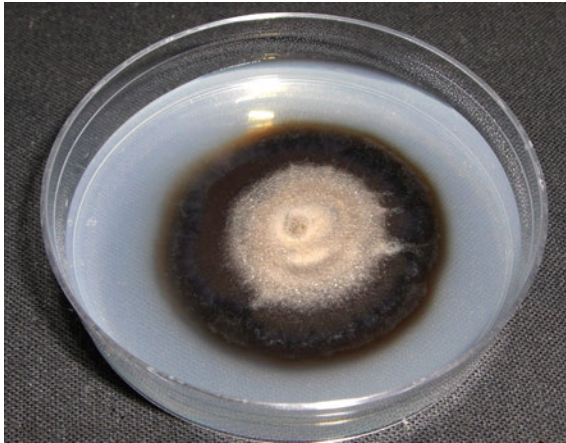
1) Diener, T.O. (1971) Potato spindle tuber "virus". Replicating, low molecular weight RNA.

- Virology 45: 411–428.
- 2) 土井 誠・加藤公彦 (2004) 静岡県で発生したキクわい化ウイルス (CSVd) の塩基配列とキク品種の病徴. 関西病虫研報. 46: 11–14.
  - 3) 花田 薫・栢原比呂志・橋本純治・沖村 誠・川田譲一 (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.
  - 4) Horst, R. K., R. W. Langhans, S. H. Smith (1977) Effects of chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspermy and mosaic on flowering and rotting of chrysanthemums. Phytopathology 67: 9–14.
  - 5) Hosokawa, M., Y. Matsushita, H. Uchida, S. Yazawa (2005) Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plants tissue. J. Virol. Meth. 131: 28–33.
  - 6) 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.
  - 7) 楠 幹生・寺見文宏・寺内英貴・十河和博 (1993) 逆転写—Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)によるキク矮化ウイルスの検出. 関西病虫研報. 35: 7–12.
  - 8) Lawson, R. H. (1968) Cineraria varieties as starch lesion test plants for chrysanthemum stunt virus. Phytopathology 58: 690–695.
  - 9) 李世訪・畑谷達児・古田和義・堀田治邦・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.
  - 10) 松下陽介 (2006) アンケートによるキクわい化病の発生実態調査. (ミニ特集:キクわい化病). 植物防疫. 60 (10) : 455–456.
  - 11) Matsushita, Y., Tsukiboshi, T., Ito, Y., and Chikuo, Y. (2007) Nucleotide Sequences and Distribution of Chrysanthemum Stunt Viroid in Japan. J. Japan Soc. Hort. Sci. 76: 333–337.
  - 12) 森山美穂・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. 九病虫研報. 42: 45–47.
  - 13) 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, 指標植物への接木接種によるウイルスの検定. 日植病報. 43: 372–373.
  - 14) 佐野輝男 (2007) ウィロイド (Viroid). 植物防疫. 61 (11) 660–664.
  - 15) 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.
  - 16) 杉浦広幸・花田 薫 (1993) 大ギクのキクわい化ウイルスによる生育障害の発生. 日植病報. 59: 344.
  - 17) Verhoeven, J. Th. J., M. S. J. Arts, R. A. Owens, W. J. Roenhurst (1998) Natural infection of petunia by chrysanthemum stunt viroid. Eur. J. Plant Pathol. 104: 383–386.

## Summary

Two and five chrysanthemum samples showing stunt or suggestive of infection of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) were collected in Wadamari and Ibusuki in Kagoshima Prefecture, Japan, respectively. Direct RT-PCR was conducted to detect CSVd from these samples and the complete sequences of CSVd isolates were determined. The results showed that four variants of CSVd were distinguished among the 5 isolates based on differences of their nucleotide sequences. In this investigation, the four CSVd variants were registered in NIAS Genebank.

## 微生物遺伝資源の調査プロフィール



屋久島の森林土壌から分離された  
*Veronaeopsis simplex* の菌叢 (成澤)



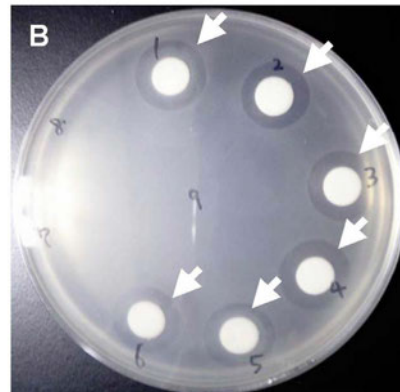
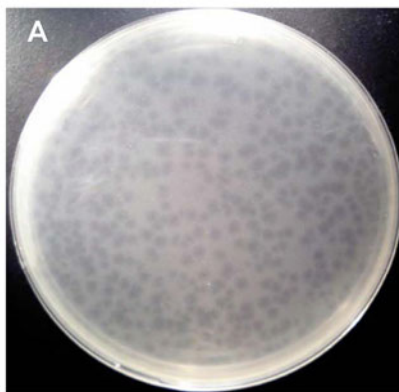
キクわい化病の発生状況  
(中央下の生育不良株) (松下)



チベットの伝統的発酵食品である Qula  
から分離された微生物の菌叢 (蔡)



ミャンマー連邦 Shan 州の高原地帯では陸稲  
の多くでいもち病が発生していた (林・入江)



A : 青枯病菌ファージによるプラーク  
B : ディスク法による溶菌特性の確認 (浅川)