

キクわい化病の検定法

1. 試験のねらい

キクわい化病は夏秋きくに多く発生し、品種によって発生の差が見られる。その症状として株全体のわい化はもとより、葉の小型化及び直立化、節間の短縮、早期開花などが挙げられ、商品価値を著しく低下させる。本病は、挿し芽の調整や摘芯などの栽培管理によって伝搬されるため、無病苗の利用が唯一の防除法となる。しかし、本病は低温条件で病徴がマスクされることが多く、親株の症状から感染の有無を診断することはきわめて困難である。また、本病原キクわい化ウイルス(CSVd)はタンパク質を翻訳しない約350塩基の環状一本鎖RNAであるため、顕微鏡観察はもとより抗血清を用いた診断も不可能である。そこで、本病を正確かつ迅速に診断する方法を検討した。

2. 試験方法

(1) 生物検定

本病の検定に従来から用いられている品種「ミスルト」を検定植物として供試し、その接ぎ木方法について検討した。被検定植物として、わい化症状が見られるスプレーギク(はるか及びピアット)を供試した。接ぎ木は8月14日に行った。試験区は表-1のとおりである。穂木は茎頂部を約5cm切り取り、その下部をくさび形に削り取った。台木は茎頂部を切り取り、残った茎の上端に切り込みを入れた。台木の切れ込みに穂木を挿入して、接合部をパラフィルムで巻き、1週間穂木をビニール袋で覆い活着を促した(図-1)。検定植物に現れる病徴は、接ぎ木後6週間随時肉眼で観察した。

(2) RT-PCR

きくにはPCRの酵素反応阻害物質が含まれており、フェノール抽出によるCSVdの精製ではPCRで検出されない場合がある。そこで、精製物中の反応阻害物質をできるだけ少量に抑えるため、極少量の検定試料からのCSVd精製法を検討した。

表-1 試験区の構成

試験No.	台木	穂木
1	ミスルト	はるか
2	ミスルト	ピアット
3	はるか	ミスルト
4	ピアット	ミスルト

3. 結果および考察

(1) 生物検定

ミスルトを台木として用いた場合(No.1、2)は、接ぎ木5週目に台木の側枝に新しく展開した葉に病斑が認められた。一方、ミスルトを穂木として用いた場合(No.3、4)は、接ぎ木3週目から穂木の新展開葉に病徴が現れた。病徴は、検定植物であるミスルトを穂木に用いたほうが鮮明で病斑が大きかった(図-2)。

以上より、検定植物を用いて本病を診断する場合、ミスルトを穂として被検定植物に接ぎ木することで、検定時間を短縮することができ、病徴も鮮明に現れることが明らかになった。

(2) RT-PCR

直径6mmの1穴パンチで供試葉をくり抜き(8mg/枚)、その1、3、5または7枚を用いてCSVd精製用試料とした。抽出用緩衝液は楠らの方法に準じて作成したが、CF-11セルロースによる精製をマイクロチューブと遠心分離器を用いて行ない、すべての操作をマイクロチューブ内で行えるようにした(図-4)。また、同様の試料0.5gから楠らの方法でCSVdを抽出して対照とした。

その結果、いずれの方法でも予想された約350塩基の増幅が認められた。しかし、楠らの方法及び1穴パンチでくり抜いた7枚の感染葉から抽出した場合には非特異的増幅が多く観察された(図-

2)。以上より本抽出法でCSVdを精製しRT-PCRを行う場合、その試料は1穴パンチでくり抜いた感染葉1～5枚が適当であると考えられた。

4. 成果の要約

CSVdの感染を生物検定によって調査する場合、穂木に検定植物であるミスルトを用いると、その病徴が鮮明で、検定期間も約2週間早まることが明らかになった。

RT-PCRでは精製法の簡素化及び非特異的増幅の軽減を図るために試験を行った。その結果、1穴パンチでくり抜いた感染葉1枚(約8mg)からでも検出が可能であった。また、本法ではCSVd感染きくから採穂した無病徴の幼植物からも検出が可能であった。このようにRT-PCRは1～2日で生物検定と同様の精度でCSVdの感染を検定することが可能であり、抜検定植物に与える影響も少ない(直径約6mmの穴1～5個)。しかし本法は1検体当たり約500円のコストがかかるうえ、専用の機器も必要となるため、限られた施設でのみ可能となる技術である。



図-1 接ぎ木方法

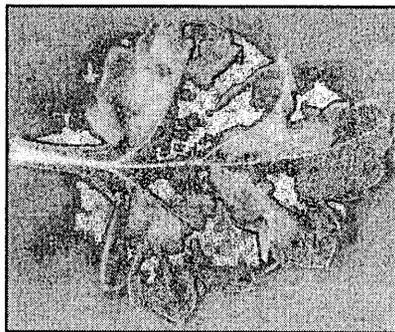


図-2 ミスルトの新展開葉に形成された病斑(接ぎ木3週間後)

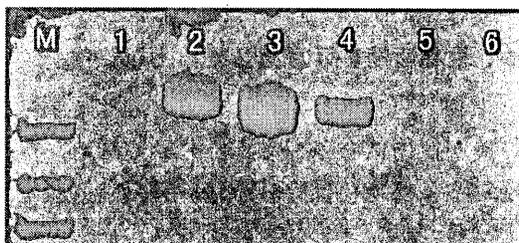


図-3 PCR産物の電気泳動像

M: マーカー(上から300, 200, 100bp)、1: CSVdフリー、2: 楠らの方法で0.5gの試料から抽出
3~6: 直径6mmの供試葉それぞれ7, 5, 3, 1枚より抽出

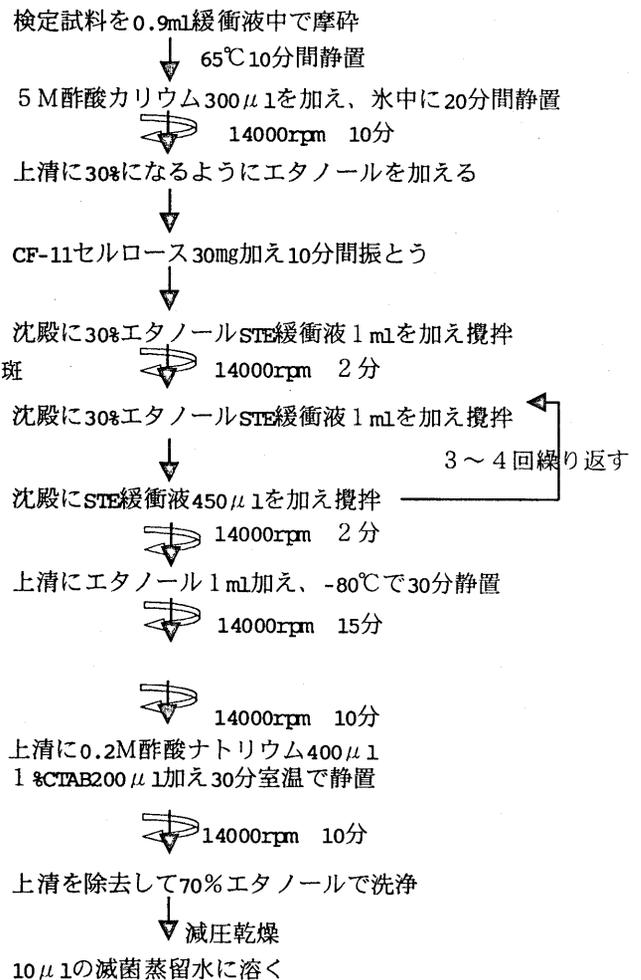


図-4 CSVd精製手順

(担当者 病理昆虫部 大野義文)