

秋田県におけるキクのウイルス・ウイロイドの発生状況

山本 英樹¹⁾

抄 録

1996～2005年に秋田県内で採集した計709株のキクについてウイルス・ウイロイド検定を行い、本県における発生状況を明らかにした。1996年、以前より問題になっていたわい化症状株からRT-PCR法によりキクわい化ウイロイド(CSVd)が県内で初めて確認された。nested PCRのプライマーを設計して検出感度の改善を図り、発生状況を調査したところ、CSVdはキク栽培地域で広く、恒常的に発生しており、検定した品種の約6割で感染株が確認された。わい化症状による被害が大きいため本県では最も問題になる病原分子と考えられる。また、キクBウイルス(CVB)のプライマーを設計して診断を行ったところ、1998年にCVB感染キクを確認した。CVBによる症状は不明瞭であるが、約2割の品種から保毒株が検出されており注意が必要である。一方、発生が警戒されていたトマト黄化えそウイルス(TSWV)を1999年に初めて確認し、2000、2001年とTSWVの発生が多くなったが、その後の発生は少なく推移している。しかし、検出が難しいウイルスであるため、無病徴感染株で潜在している危険性がある。キク微斑ウイルス(TAV)については、キクにおける発生を2003年に確認したので、プライマーを設計して本ウイルスの発生状況を調査した。TAVは他のウイルス・ウイロイドと異なり感染株は非常に少なく、検出された品種、地域も限られていた。さらに、海外からの侵入が長年警戒されていたキククロロティックモットルウイロイド(CChMVd)が2003年に本県で初めて確認された。その後の調査から、本ウイロイドは少なくとも2002年には発生していたこと、約2割の品種が感染していたことが明らかになった。感染品種率は小ギクやスプレーギクよりも輪ギクで低く、病徴発現型CChMVdの方が非病徴発現型よりも多かった。2002、2003年に比べ、2004、2005年はCChMVd感染率が高く、主なキク生産地域に拡大していた。今後も、キクに感染する新規ウイルス・ウイロイドの本県への侵入、発生に警戒を続ける必要がある。

キーワード：RT-PCR、キク、キククロロティックモットルウイロイド、キクBウイルス、キク微斑ウイルス、キクわい化ウイロイド、トマト黄化えそウイルス、発生状況調査

	目次	
抄録	99	6 キク微斑ウイルス 110
1 緒言	99	7 キククロロティックモットルウイロイド 112
2 材料と方法	100	8 総合考察 116
3 キクわい化ウイロイド	101	謝辞 117
4 キクBウイルス	104	引用文献 118
5 トマト黄化えそウイルス	107	Abstract 120

1 緒 言

秋田県では稲作中心の農業構造となっているが、米価低迷もあり、経営の安定を図るべく野菜、花きとの複合化を進めている。花きの生産額はまだ低い状況ではあるが、その中でキク(*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura)が花き生産の28%(2005年、県農畜産振興課調べ)を占める主力品目となっている。新品種等、県外の園芸会社の育成品種に頼っているのが現状であり、キク農家・生産者団体によっては県外の

種苗会社から定植苗を購入し、利用しているため、頻繁に県外からキクが導入されている。一方で、農家間で苗のやり取りが行われることも多い。

キクは挿し穂により栄養繁殖されるため、一度ウイルス・ウイロイドに感染すると、それを基に増殖した苗は何れも保毒株となる。このため、キクの移動に伴ってウイルス・ウイロイドの拡大が起き、本県にもこうして侵入していると考えられる。しかし、本県ではキクを含む花きの生産は少ないため重要度が低かった

2007年11月16日受理

¹⁾ 秋田県農林水産技術センター農業試験場

ことに加え、ウイルス・ウィロイドの診断は遺伝子診断、抗体検定等のバイオテクノロジー、あるいは電子顕微鏡のような特殊な機器を必要とするため十分な診断・対応ができていなかった。そのため、本県における発生状況も明らかにされていなかった。

一方、1992年にバイオテクノロジーを活用した農業研究を行う施設として生物資源総合開発利用センターが開設され、1995年からウイルス病の診断依頼も対応することになった（なお、2001年に研究部門は農業試験場に統合された）。当初はトマトの依頼が多かったが、1998年以降はキクの診断依頼が半分以上を占めるようになり、1995～2005年の間に依頼を受けた1197株のうち677株（57%）がキクであった。まず問題になっていたのはわい化症状で、1996年に逆転写DNA増幅（reverse transcription-polymerase chain reaction：RT-PCR）法により本県で初めてキクわい化ウィロイド（*Chrysanthemum stunt viroid*：CSVd）が同定された。その後もプライマーの設計を行いながら診断依頼に対応し、キクBウイルス（*Chrysanthemum virus B*：CVB）、県内への侵入が警戒されていたトマト黄化えそウイルス（*Tomato spotted wilt virus*：TSWV）に続き、キク微斑ウイルス（*Tomato aspermy virus*：TAV）の本県初発生を確認した。さらに、2003年には海外からの進入が長年警戒されてきたキククロロティックモットルウィロイド（*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*：CChMVd）の国内初発生を確認することになった。

本報告は予算課題「野菜・畑作物における生物的防除技術の確立」（生物資源総合開発利用センター、1992～1997年度）、「先端技術による病気診断・防除法の確立」（同、1998～2000年度）および「園芸作物等におけるウイルス病防除技術の確立」（農業試験場、2001～2005年度）の下、1996年～2005年にキク栽培農家等から依頼を受けて行ったウイルス・ウィロイド診断の結果を取りまとめたもので、ウイルス・ウィロイドの初発生の事例や診断のために設計したプライマー等の

基盤技術についても合わせて報告する。また、本報告の一部は山本・藤（2000）、山本ら（2001a、2001b）、Yamamoto and Sano（2005、2006）、山本・千田（2005）および崔ら（2008）に発表している。

2 材料と方法

2-1 材 料

供試したキクは1996年～2005年に県内各地から検定依頼のあったキク677株と、依頼とは別に試験のために圃場より採取した32株の計709株で（第1表）、210品種669株と品種不明の40株を含む。採取場所は主要なキク産地を含む県内31市町村にわたるが（本報告では2004年10月以前の69市町村体制を基準にする）、特に仙北、平鹿地域からの依頼が多かった。

検定対象とするウイルス・ウィロイドは検定依頼株の症状や発生状況から適宜選定した。また、親株としての使用の適否判断が目的の場合では、無症状株についてCSVd、あるいはこれとTSWVの検定を依頼されることが多かった。

2-2 方 法

基本となるキクの全RNAの抽出、遺伝子増幅法（RT-PCR および nested-PCR）ならびに塩基配列の決定について記載する。なお、全RNAの抽出方法、遺伝子増幅法の反応条件等は随時検討を行い改良されているが、その過程は割愛し、現在用いている方法を記載することにとどめる。

全RNAの抽出はE.Z.N.A. Plant RNA Kit（Omega Bio-tek）を用い、約0.1gの葉から調製した。葉の磨砕に液体窒素を用いず、石英砂を少量添加して行った他は説明書に従った。なお、カラムからのRNAの溶出は50μlで行った。

RT-PCRはOne Step RNA PCR Kit（タカラバイオ）を用いて行った。反応液量を推奨の50μlから10μlに減じた他は説明書に従った（第2表）。反応条件は特記しない限り以下のとおりとした。すなわち、RT反応を

第1表 本研究で採集、調査したキク¹⁾。

地域	輪ギク	小ギク	スプレーギク	その他 ²⁾	合計
鹿角（1市）	1				1
北秋田（1町）				2	2
山本（3市町村）	49	4	10	9	72
秋田（7市町村）	56	41	18	10	125
由利（4町）	3	33			36
仙北（9市町村）	106	70	47		223
平鹿（4市町村）	70	99	25	11	205
雄勝（2町）	2	41	2		45
全県（31市町村）	283[52]+4	284[101]+4	100[56]+2	2[1]+30	669[210]+40

1) 株数、ただし全県のみ株数[品種数]+品種不明株数と表記した。

2) 食用ギクと何れのグループか不明の株。

第2表 RT-PCRの反応液の組成.

RNase Free dH ₂ O	4 μl
25 mM MgCl ₂	2 μl
10×One Step RNA PCR Buffer	1 μl
10 mM dNTP Mixture	1 μl
20 μM sense primer	0.2 μl
20 μM antisense primer	0.2 μl
40 U/μl RNase Inhibitor	0.2 μl
5 U/μl AMV Reverse Transcriptase XL	0.2 μl
5 U/μl AMV-Optimized Taq	0.2 μl
全RNA溶液	1 μl
	10 μl

第3表 nested PCRの反応液の組成.

滅菌蒸留水	11.9 μl
10×Ex Taq Buffer	2 μl
20 μM sense primer	2 μl
20 μM antisense primer	2 μl
2.5 mM dNTP Mixture	1.6 μl
5 U/μl TaKaRa Ex Taq HS	0.1 μl
RT-PCR反応液	0.4 μl
	20 μl

50 で30分行った後、94、2分の処理を行い、続けて、94 58 72 各30秒を30サイクル、最後に72、30秒の条件でPCRを行った。

nested PCRを行う場合は *Ex Taq* Hot Start Version (タカラバイオ) を用いて、反応液量を推奨の100 μlから20 μlに減じた他は説明書に従った(第3表)。温度条件は特記しない限り94、30秒の後、94 58 72 各30秒を30サイクル、最後に72、30秒とした。

増幅産物は主に2%アガロースゲルで、場合によっては0.7%アガロースゲルと1.5%SYNERGEL (DIVERSIFIED BIOTECH) のコンポジットゲルで電気泳動後、臭化エチジウムで染色した。

塩基配列は特記しない限り以下のようにして決定した。すなわち、増幅断片を1%アガロースゲルより切り出し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) を用いて精製後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems) とABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems) を用いたダイレクトシークエンス法により行った。

3 キクわい化ウイルス

本県ではキクのわい化症状は1994年以前から認められていたが(古屋・松本 1994)、病原であるCSVdの確認はされていなかった(松本 私信)。

そこで、CSVdの遺伝子診断に取り組むことになり、nested PCRのプライマーを設計して検出感度の改善を

図り、県内の主なキク生産地におけるCSVdの発生状況を明らかにした。

3-1 方法

RT-PCRはプライマーCSVC-1とCSVs-1(塩飽ら1996;第1図)を用いて行った。

nested PCRのプライマーは、プログラムOligo (National Bioscience) による既報の配列の解析結果を参考にしてCSVC-4とCSVs-4を設計した。本プライマーがCSVd遺伝子を増幅していることを増幅断片の塩基配列を決定して確認した。

CSVd検定はRT-PCRを行い、バンドが生じなかった場合、nested PCRを行った。

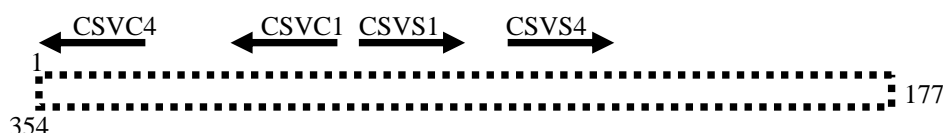
3-2 結果

3-2-1 プライマーの検証

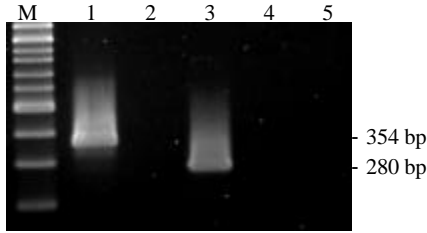
CSVd感染株の場合、RT-PCRにより354 bpの断片、あるいはnested PCRにより280 bpの想定されるサイズの断片が増幅された(第2図)。280 bpの断片の塩基配列を決定したところ、プライマーを除く配列が既報のCSVdの配列(DDBJ/EMBL/GenBank 受入れ番号AF394452)と100%の相同性が認められ(第3図)、本プライマーによるnested PCRがCSVdを増幅していることが確認された。

本法により遺伝子診断を行ったキク522株のうち241株からCSVdが検出された。このうち130株はRT-PCRで検出されたが、111株は続けて行ったnested PCRによってCSVdが検出された。前者はCSVdの濃度が高い場合(高濃度株)、後者は低い場合(低濃度株)と考えられ、nested PCRによってCSVdの検出率を高めることができた。

CSVC-4 : 5'-ACCACAGGAACCAAGTAA-3' CSVs-4 : 5'-TGGAGGAAGTCCGACGAGAT-3'



第1図 CSVdの遺伝子とRT-PCR(塩飽ら1996)およびnested PCRのプライマー.



第2図 RT-PCR (1, 2, 4) および nested PCR (3, 5) による CSVd の検定。
1, 高濃度感染株; 2と3, 低濃度感染株; 4と5, 健全株; M, 分子量マーカー。



第4図 CSVdによるキクわい化病。

3-2-2 初確認事例

1996年、河辺町の農家で、県外業者から購入したスプレーギクの苗を定植、栽培したところ典型的なわい化症状が現れ問題になった。そこで、RT-PCR法で検定を行ったところ CSVd の感染が確認され、わい化病と診断した。

3-2-3 発生状況

1996年～2005年の10年間にわたり、県内の主なキク生産地で調査を行った。圃場によっては第4図に示したような典型的なわい化症状も見られた。

県内各地の圃場より採取したキク 522 株 (183 品種 518 株と品種不明 4 株) を検定したところ、CSVd の感染品種率は輪ギク、小ギク、スプレーギク何れも高く、60%前後であったが(第4表)、感染株率は輪ギク(29%)で低く、小ギク(55%)、スプレーギク(57%)は高かった。

検定株数、感染株数とその割合の年次変化を第5図にまとめた。感染株率は年によって変動が大きかったが、25%以上の比較的高い割合で検出された。また、この感染率の年次変動は依頼株に占める無症状株(ほ

```

          1                               30                               60
CSVs4/CSVc4:CGCGGCTGGGGCTTAGGACCCACTCTGCGAGACAGGAGTAATCCTAAACAGGGTTTTTC
AF394452  :*****
          61                               90                               120
          ACCCTTCCTTTAGTTTCCTCCTCCTGGAGAGGTCTTCTGCCCTAGCCCGGTCTTCGA
          *****
          121                              150                              180
          AGCTTCCTTTGGCTACTACCCGGTGGAAACAAGCTTCAACGCCTTTTTTTTCCAAT
          *****
          181                              210                              240
          CTTCTTTAGCACCGGCTAGGGAGTAAGCCCGTGAACCTTAGTTTTGTTCCCTCGGGAC
          *****
    
```

第3図 プライマーCSVs4/CSVc4による nested PCR 増幅断片(プライマー除いた 240 bp) と既報 CSVd (AF394452) の塩基配列の比較。

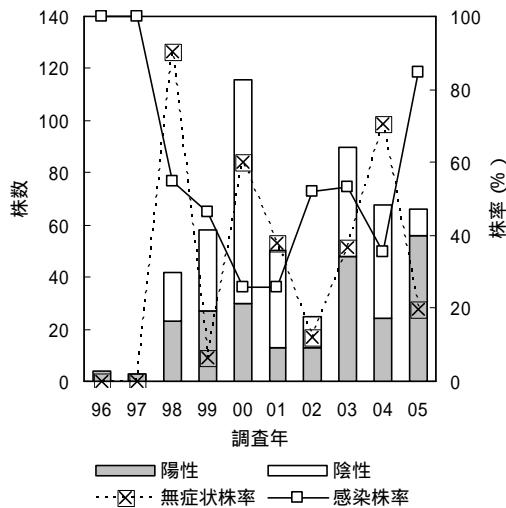
*は上列と同じ塩基であることを示す。

第4表 CSVd検定に供試したキクと検定結果。

	輪ギク	小ギク	スプレーギク	その他 ²⁾	合計
検定数 ¹⁾	186[43]+2	245[89]+1	87[51]	+1	518[183]+4
感染数 ¹⁾	55[29]	136[52]	50[34]		241[115]
感染株率(%)	29	55	57	0	46
感染品種率(%)	67	58	67	0	63

1) 株数[品種数]+品種不明株数。

2) 何れのグループか不明の株。



第5図 1996～2005年のCSVdの感染株率.

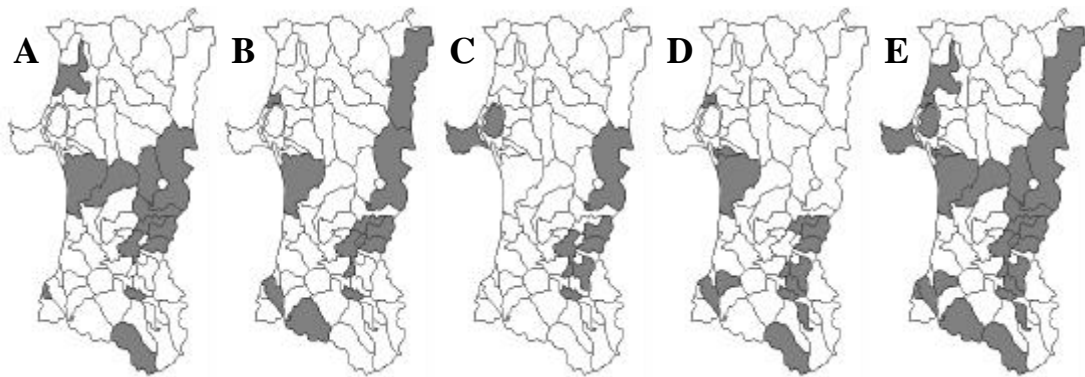
とんどが親株としての利用の可否を判断するためのCSVdフリー検定の依頼)の割合と反比例する傾向があり、これに影響を受けていると考えられた。すなわち、CSVdは恒常的に比較的高い率で発生していると思

第5表 地域別のCSVd感染状況.

地域	発生市町村数/ 調査市町村数	感染株数/検定株数 (感染株率, %)
鹿角	1/ 1	1/ 1 (100)
山本	2/ 3	5/ 26 (19)
秋田	5/ 7	40/ 87 (46)
由利	4/ 4	9/ 18 (50)
仙北	8/ 9	74/178 (42)
平鹿	4/ 4	92/174 (53)
雄勝	2/ 2	20/ 38 (53)
全県	26/30	241/522 (46)

れた。

さらに、発生地域の経時的変化を見るために、検定株数のばらつきが少なくなるように1996～1999年、2000～2001年、2002～2003年、2004～2005年に区分し、感染株が確認された市町村を第6図に示した。調査初期から主要なキク産地で常発しているように思われた。また、調査期間全体では何れの地域でも発生市町村率は高く、調査した30市町村のうち26市町村でCSVdの発生を確認した(第6図E、第5表)。感染株率も山本地域でやや低かったのを除き、高かった。



第6図 1996～2005年のCSVdの発生市町村.

A, 1996～1999年; B, 2000～2001年; C, 2002～2003年; D, 2004～2005年; E, 1996～2005年.

第6表 キクのグループと生育状況別のCSVd感染状況¹⁾.

生育状況	輪ギク	小ギク	スプレーギク	全体
症状なし	11/ 90 (12)	42/104 (40)	10/ 32 (31)	63/226 (28)
ややわい化 ²⁾	13/ 25 (52)	35/ 45 (78)	6/ 9 (67)	54/ 79 (68)
わい化 ²⁾	28/ 53 (53)	56/ 72 (78)	34/ 41 (83)	118/166 (71)
その他 ³⁾	3/ 13 (23)	2/ 22 (9)	0/ 3 (0)	5/ 38 (13)

1) 感染株数/検定株数(感染株率, %). 症状の記載もれ12株とグループ不明の1株は除いた.

2) 葉に退緑斑等の症状も認められる株も含む.

3) 葉に退緑斑等の症状が見られるが, 草丈の低下は認められない株.

3-2-4 症状と検出状況

検定結果を生育状況別に取りまとめたところ、輪ギク、小ギク、スプレーギク何れにおいても CSVd の検出率はわい化、ややわい化、症状なしの順に高く、わい化したスプレーギクでの検出率（83%）が最も高かった（第6表）。

また、感染株に占める CSVd 高濃度株の割合は輪ギク、小ギク、スプレーギクの順に低く、何れの種類においてもわい化、ややわい化、草丈の低下なしの順に高くなるようであった（第7図）。

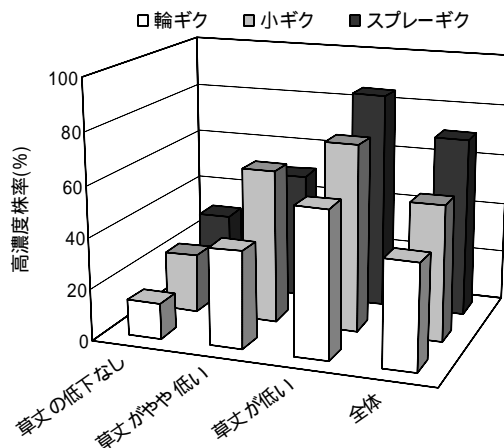
3-3 考察

キクわい化病は1945年にアメリカで発見され、1973年になって初めて病原が CSVd であることが明らかにされた（Diener and Lawson 1973）。病徴は品種、栽培環境によって異なり、無病徴のものから、草丈が3分の2から2分の1にわい化する、開花期が1~2週間早まるなどの典型的な病徴の他、発根不良などさまざまである（山口 1979a）。また、他のウイルスとの重複感染により花の小型化、奇形など症状が激しくなることも多いため、著しく商品価値が低下し、栽培農家に大きな被害を与えている。日本では1977年に本病が確認され、北日本でもこれまでに秋田県を含む5道県で発生が報告されている（勝部ら 2003）。秋田県では以前よりキクのわい化症状が見られていたが、CSVd の検定が行われていなかった当時は塩類障害とされることも多かった（小松 私信）。

CSVd はウィロイドであるので、迅速で簡易である抗体検定は適用できない。生物検定は可能であるが、反応が現れるまでに1~2ヶ月の期間を必要とし、これに検定植物の育成期間が加算されるので（山口 1979c）、迅速な対応には不向きである。そこで、迅速で高感度な RT-PCR 法を用いた CSVd の遺伝子診断に取り組むことになり、nested PCR のプライマーを設計して改良を行い、診断依頼に対応してきた。その結果、県内で栽培されている品種の6割以上で感染株が確認され、CSVd の汚染が進んでいることが示され、主なキク生産地に広く、恒常的に CSVd が発生していることが明らかとなった。

本研究から、スプレーギク、小ギク、輪ギクの順に、また、わい化、ややわい化、症状なしの順に、CSVd 高濃度感染株の割合が高いという結果が得られた。これは、CSVd の被害は輪ギクよりスプレーギクの方が大きい（山口 1979a、加藤・土井 1998）、あるいはウィロイド濃度とキクの草丈は相関する（山下ら 1997b）とされている従来の知見と矛盾しない。すなわち、スプレーギクではいったん感染すると CSVd の濃度が高くなりやすく、顕著なわい化症状が起こりやすいと考えられる。

これまで CSVd を媒介する生物は知られておらず、汁液、接ぎ木によって接種が可能であるが、宿主範囲



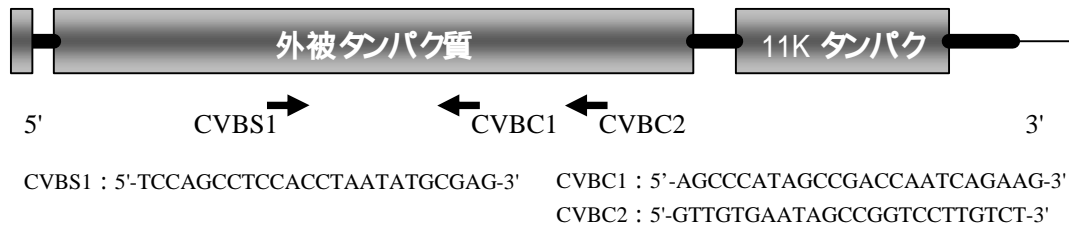
第7図 CSVd 感染キクにおける草丈と高濃度感染株の割合。

は狭いとされている（山口 1979b）。従って、本県での CSVd の発生拡大の要因は罹病親株の導入と栽培管理時の汁液伝染であると考えられる。に相当するものとして、1996年に本県初確認となった導入1作目で典型的なわい化症状が現れた事例、県内のある育苗農家から供給された苗を用いた複数の農家でわい化病が発生した事例が挙げられる。第6表に示したように、症状が認められない株のうち28%から CSVd が検出されており、こうした株が感染に気付かれずに配布されることが CSVd 蔓延の主要因になっていると考えられる。特に、小ギクにおいてはその値が40%と高く、注意が必要である。一方、の事例として、小ギクとスプレーギクを中心に多数の品種を栽培するある農家ではわい化病が多発し、1998~2000年に調査した19品種中14品種で CSVd が検出された。これは保毒親株の使用に加えて、栽培管理の際に剪定ばさみ等を介して健全株（品種）へ感染が拡大したことが強く疑われる。

現在、農家には生育の良い株を選んで次作の親株にするように指導しているが、典型的なわい化症状株が見られる場合は親株の選抜を行っても次作でわい化病が大発生する場合も認められている。従って、CSVd フリーを確認した健全な株を親株とし、切り花用と区別して栽培、管理し、親株の作業に際しては専用の用具を使用し、手洗いも行うなど入念な管理が望まれる。

4 キクBウイルス

キクに感染するウイルスとして CVB があるが、抗体を用いた dot immunobinding assay (DIBA) では非特異反応が強かったこと、CSVd は遺伝子診断が有効な手段であり、常法となっていることから、CVB についても RT-PCR による検出方法を検討した。また、これまで



第 8 図 CVB の遺伝子と RT-PCR のプライマー .

に行った診断の結果を取りまとめることで明らかになった県内のキク生産地における CVB の発生状況を報告する。

4-1 方 法

CVB 外被タンパク質遺伝子の塩基配列 (Levay and Zavriev 1991) を基に、相補プライマー CVBC1 と CVBC2、相同プライマー CVBS1 を設計した (第 8 図)。増幅断片の塩基配列は CEQ2000XL (BECKMAN COULTER) と DTCS Kit (BECKMAN COULTER) を使用して決定した。

4-2 結 果

4-2-1 プライマーの検証

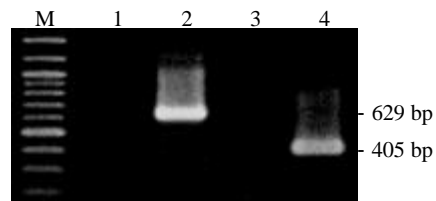
CVB-M (Suastika ら 1997) に感染した *Nicotiana clevelandii* を用いて RT-PCR を行ったところ、プライマー CVBS1 と CVBC1 の組み合わせで約 400 bp の断片が、また CVBS1 と CVBC2 の組み合わせでは約 630 bp の断片が生じた (データ示さず)。両増幅断片が想定されるサイズであったことから、本プライマーが CVB 外被タンパク質遺伝子を増幅していると考えられた。

診断依頼キクの中に見出された陽性株でも同じサイズの断片が増幅された (第 9 図)。さらに、プライマー CVBS1 と CVBC2 による 629 bp の断片の塩基配列を決定し、プライマーを除いた配列がコードする 193 アミノ酸の配列を既報 (Levay and Zavriev 1991) と比較

したところ、相同性は 96% と高かった (第 10 図)。この結果から、本法によって CVB が検出されることが確認された。なお、以降の検定においては短い断片が生じるプライマー CVBS1 と CVBC1 のセットを主に用いた。

4-2-2 初確認事例

本法を用いて診断対応を始めたところ、1998 年、千畑町の農家で親株として使用予定の健全と思われた (症状が認められない) スプレーギクから CVB が本県で初めて検出された。



第 9 図 プライマー CVBS1/CVBC2 (1, 2), CVBS1/CVBC1 (3, 4) を用いた RT-PCR による CVB の検定 . 1 と 3, 健全株 ; 2 と 4, 感染株 ; M, 分子量マーカー .

	1	30	60
既報 CVB	: DPTNMQVSSDFLWKIKPQRISNNMATSEDMVKIQVALEGLGVPTESVKEVIRLVLNC		
CVBS1/CVBC2	:**S*****T***R***K*****		
	61	90	120
	ANTSSSVYQDPKGVIEWDGGAI IADDVGVITKHSTLRKVCRLYA AVAWNYMHLQQTPPS		
	*****E*****		
	121	150	180
	DWSAMGFHPNVKYAAFDFDYVENGAAIRPSGGIVPKPTRA EYVAYNTYKMLALNKANN		
	*****K*****		
	181	193	
	DTFGNFDSAITGG		
	Y***		

第 10 図 既報 CVB とプライマー CVBS1/CVBC2 による RT-PCR 断片 (プライマー除いた 581 bp) の塩基配列から推定された外被タンパク質のアミノ酸部分配列の比較 .

*は上列と同じアミノ酸であることを示す .

第7表 CVB検定に供試したキクと検定結果.

	輪ギク	小ギク	スプレーギク	合計
検定数 ¹⁾	57[18]	44[31]+1	24[21]	125[70]+1
感染数 ¹⁾	9[4]	9[8]	2[2]	20[16]
感染株率 (%)	16	20	8	16
感染品種率 (%)	22	26	10	23

1) 株数[品種数]+品種不明株数.

4-2-3 発生状況

1998～2000年、2003～2005年に県内各地のキク栽培農家より採取した126株(70品種125株と品種不明1株)を検定した結果、CVBの感染は輪ギクと小ギクでやや高く(感染株率でそれぞれ16、20%)、スプレーギクでやや低かった(同8%;第7表)。感染品種率も同様の傾向にあり、キク全体で2割ほどの品種からCVB感染株が見出された。

検定株数、感染株数とその割合の年次変化を第11図に示した。感染株率は1998年と2000年、やや高かったが、CVBは低率ながら恒常的に発生しているようであった。また、調査した5地域何れでも発生は認められ、平鹿地域で発生がやや多い傾向であった。調査した14市町村のうち9市町村でCVBの発生を確認した(第8表、第12図)。

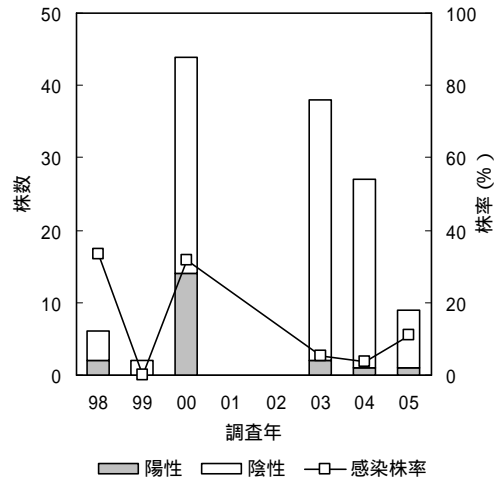
4-2-4 症状と検出状況

生育状況別にCVBの検出率を取りまとめたところ(第9表)、キク全体では症状なし、草丈に関らず葉に退緑斑等の症状が認められる株、草丈の低下した株の順に高かった。輪ギクでも症状がない株での感染率が最も高かった(25%)のに対し、小ギクでは葉に何らかの症状を呈していた株での感染率が最も高く(24%)、スプレーギクではわい化症状を呈する株で最も高かった(20%)。

4-3 考察

CVBはアブラムシで非永続性伝染(ウイルスを獲得後すぐに媒介可能であるが、媒介能力は短時間で消失する)され、汁液伝染もするため全世界の栽培キク品種に広く感染している(Levay and Zavriev 1991)。これまで、再現性の良いCVBの生物検定は感受性の高いペチュニア品種を選び、検定適期に複数株用い、かつ検定適温を維持して行う必要があり、病徴発現(判定)までに2～3週間を要していた(山口 1979c)。本研究によりRT-PCR法による検定が可能になり、1日で検定が終了する。

CVBによるウイルス病の症状には葉の退緑斑紋、葉脈透化や軽いえそ斑紋、株の軽いわい化などがあり、花卉の退色やえそ斑紋を生じる品種もある。しかし、病徴の程度は品種や栽培環境により大きく異なり、大半の品種は無病徴である。栗原ら(1980)によるCVBの発生状況調査によれば、ほとんどが無病徴の243株



第11図 1998～2005年のCVBの感染株率.

第8表 地域別のCVB感染状況.

地域	発生市町村数/ 調査市町村数	感染株数/検定株数 (感染株率, %)
山本	1/ 1	1/ 5 (20)
秋田	3/ 4	4/ 39 (10)
由利	1/ 2	1/ 9 (11)
仙北	1/ 4	1/ 35 (3)
平鹿	3/ 3	13/ 38 (34)
全県	9/14	20/126 (16)



第12図 1998～2005年のCVBの発生市町村.

第9表 キクのグループと生育状況別のCVB感染状況¹⁾。

生育状況	輪ギク	小ギク	スプレーギク	全体
症状なし	7/28 (25)	5/26 (19)	1/15 (7)	13/69 (19)
草丈の低下	1/12 (8)	0/2 (0)	1/5 (20)	2/19 (11)
その他 ²⁾	1/17 (6)	4/17 (24)	0/2 (0)	5/36 (14)

1) 感染株数/検定株数(感染株率,%)。症状の記載もれ2株は除いた。

2) 草丈に関らず葉に退緑斑等の症状が認められる株。

中28株(12%)からCVBが分離されたとしており、発病株は少ないが全国各地の栽培ギクに広く無病徴感染していると考えられている。

本調査の結果、2割ほどの品種でCVB感染株が見出された。感染率がスプレーギクに比べ、輪ギクと小ギクでやや高かった理由として、無症状株からの検出率が輪ギクと小ギクではスプレーギクに比べ高い値であったことから、輪ギクと小ギクはCVBが感染(あるいは他のウイルス・ウイロイドとの重複感染)しても症状が出にくい場合潜在感染株が目視によって除去されず、感染率が比較的高かったと推察される。しかし、調査株数が少ないための単なるバラツキであることも考えられる。こうしたキクのグループとCVBによる症状の関係について論じた報告はないので、今後は調査株数を増やすと共に、接種試験も含めたさらなる検討が必要であろう。何れにしても、CVBはCSVdや後述のTSWVのように問題視するほどではないが、他のウイルスやウイロイドとの重複感染により病徴が激しく現れることがあるとされており(山口1979b)、無視はできないウイルスである。

また、CVBの感染により、スプレーギクでは20%、輪ギクでは15%切花生体重が減少することが報告されている(山口1979a)。実際、八竜町や平鹿管内の栽培農家からキクの生育が劣ってきている(退化)ため茎頂培養によって親株の若返りを図って欲しいという要望が挙げられ、その原因を調査したところCVBの感染が確認された。そこで、茎頂培養を行い、RT-PCR法によりウイルス検定を行った後、2000、2002年にウイルスフリー親株を現地に供給した。今後も、ウイルス診断のみならずウイルスフリー化の際の検定においても本法を活用していきたい。

5 トマト黄化えそウイルス

TSWVは日本では1960年代にダリアで初めて確認され、1990年代になってミカンキイロアザミウマが全国に急速に蔓延するのに伴って、本ウイルスによる被害が拡大し、問題となっている(本田・津田1999)。キクでは1993年にTSWVによるえそ病が静岡県で国内初確認され(加藤ら1995)、北日本でも1998年までに秋田県を除く6道県でTSWVによる病害が確認された。

秋田県でもその発生を警戒していたところ、1999年にトマト、ダリア、キクで相次いでTSWVが検出され、本県における初確認の年となった。1998~2005年にキク農家等から依頼を受けて行ったTSWV検定の結果から本県における発生状況を取りまとめた。

5-1 方法

5-1-1 生物検定

添加剤として0.2%亜硫酸ナトリウムと1mM L-システインを用い、大木(1997)の方法により行った。

5-1-2 抗体検定

TSWVのヌクレオプロテインに対して作出した抗体(藤・中前1997)を用い、DIBA法あるいはenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法(大木1997)により行った。

5-1-3 遺伝子診断

RT-PCR法(藤ら1998、Tsudaら1994、Weekesら1996)により行った。藤ら(1998)のプライマーAとBを用いた場合、PCRの条件は92、1分50、1分72、3分を35サイクル、最後に72、5分とした。また、Tsudaら(1994)のプライマーforwardとreverseを用いた場合、PCRの条件は94、1分37、1分72、2分を40サイクルとした。

5-2 結果

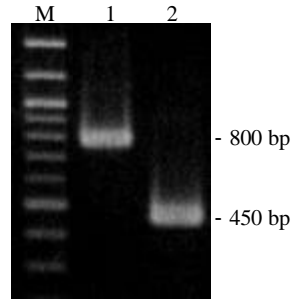
5-2-1 初確認事例

1999年に八竜町の葉にえそ斑点症状を呈したキクについて汁液接種を行い、感染した*N. benthamiana*を検

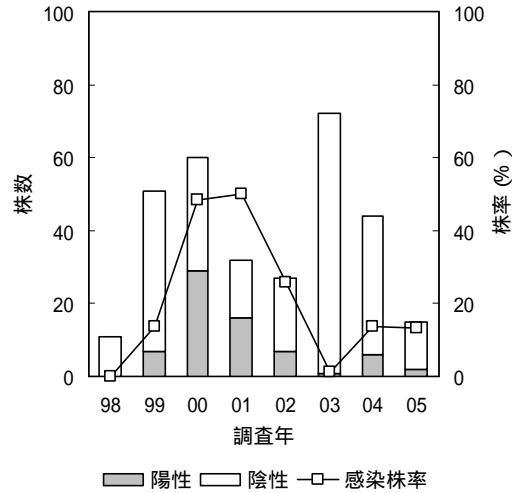
第10表 キク分離株の寄主範囲と病徴。

検定植物	病徴 ¹⁾
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CS, NS/-
<i>C. murale</i>	CS, NS/-
<i>C. quinoa</i>	CS, NS/-
<i>Datura stramonium</i>	NRS/M, Mal
<i>Nicotiana benthamiana</i>	CRS/Y
<i>N. glutinosa</i>	NS/NS, M, Mal
<i>N. rustica</i>	CRS/CRS
<i>Vigna sequepedalis</i>	CRS/M, CS, NS

1) 接種葉/上葉; CRS, 退緑輪点; CS, 退緑斑点; M, モザイク; Mal, 奇形; NRS, えそ輪点; NS, えそ斑点; Y, 黄化。



第 13 図 RT-PCR による TSWV の検定 .
1, Tsuda ら (1994) の方法 ; 2, 藤ら (1998) の方法 ; M, 分子量マーカー .



第 14 図 1998 ~ 2005 年の TSWV の感染株率 .

定植物に接種したところ、ササゲの接種葉における退緑輪紋など TSWV に特徴的な症状が現れた(第 10 表)。また、TSWV 抗体を用いた DIBA 法で陽性反応が認められた(データ省略)。さらに、RT-PCR の結果、Tsuda ら (1994) の方法によって約 800 bp、藤ら (1998) の方法によって約 450 bp の期待される断片が増幅された(第 13 図)。以上の結果から、TSWV によるキクえそ病と診断した。

312 株 (110 品種 275 株と品種不明 37 株) を調査した。検定は主に Weekes ら (1996) の RT-PCR 法によるが、一部 ELISA 法も使用した。検定した 312 株のうち 68 株 (22%)、110 品種のうち 39 品種 (35%) から TSWV が検出された(第 11 表)。また、感染品種率は輪ギク、小ギク、スプレーギクの順に高かったが、感染株率で見ると輪ギクと小ギクでは差がなく、スプレーギクで

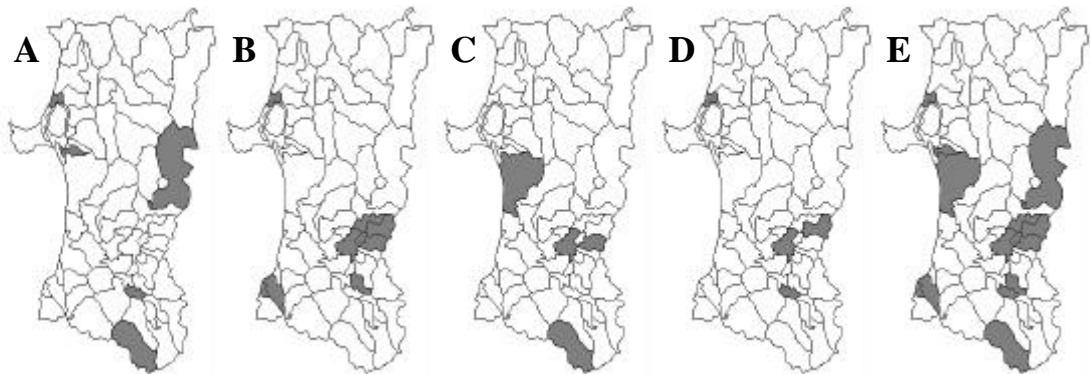
5-2-2 発生状況

1998 ~ 2005 年にかけて県内各地より採取したキク

第 11 表 TSWV 検定に供試したキクと検定結果 .

	輪ギク	小ギク	スプレーギク	その他 ²⁾	合計
検定数 ¹⁾	165[31]+2	82[55]+4	26[23]+2	2[1]+29	275[110]+37
感染数 ¹⁾	41[19]	20[16]+2	3[3]	2[1]	66[39]+ 2
感染株率 (%)	25	26	11	6	22
感染品種率 (%)	61	29	13	100	35

- 1) 株数[品種数]+品種不明株数 .
- 2) 食用ギクと何れのグループか不明の株 .

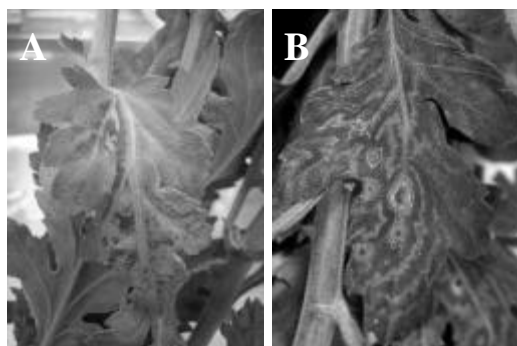


第 15 図 1998 ~ 2005 年の TSWV の発生市町村 .

A, 1998 ~ 1999 年 ; B, 2000 ~ 2001 年 ; C, 2002 ~ 2003 年 ; D, 2004 ~ 2005 年 ; E, 1998 ~ 2005 年 .

第12表 地域別のTSWV感染状況.

地域	発生市町村数/ 調査市町村数	感染株数/検定株数 (感染株率, %)
北秋田	0/ 1	0/ 2 (0)
山本	1/ 3	14/ 63 (22)
秋田	2/ 4	2/ 59 (3)
由利	2/ 3	8/ 30 (27)
仙北	6/ 8	36/109 (33)
平鹿	2/ 4	5/ 42 (12)
雄勝	1/ 1	3/ 7 (43)
全県	14/23	68/312 (22)

第16図 TSWVによるキクえそ病。
A, えそ; B, 輪紋.

低かった。

第14図に示した感染株率の年次変化から、2000、2001年に高かったことがわかる。また、2年ごとに区切って発生市町村の変化をみたのが第15図で、感染株率の高かった2000～2001年は他の区分の約2倍の9市町で発生が認められ、仙北地域が中心であった。しかし、2002年以降増加や拡大することなく、発生は比較的少なかった。これまでに調査した7地域23市町村のうち6地域14市町村でTSWVの発生を確認した(第15図E、第12表)。

5-2-3 症状と検出状況

生育状況別に検定結果を取りまとめたところ(第13表)、キク全体ではTSWVによるえそ病の特徴である葉に退緑、えそ等の症状を呈した株での感染率が最も高かった。しかし、そうした葉の症状は認められずわい化した株での検出率も次いで高かった。小ギクでは葉に症状が認められる株よりも草丈の低下した株での感染率の方が高かった。感染株の症状としては中～上位葉でのえそ、えそ斑点、葉脈えそ、周囲に黄化を伴うえそ、退緑斑紋などの症状が認められた(第16図A)。いくつかの品種では、特徴的な輪紋症状を呈していた(第16図B)。

5-3 考察

TSWVはアザミウマにより以下の様式で持続性伝染される。ウイルスの獲得は幼虫期のみで、潜伏期間の後、成虫期に終生ウイルスを媒介する。薬剤が効きにくいミカンキロアザミウマの本県への侵入が1996年に確認されたこともあってTSWVの発生を警戒してい

たところ、1999年にTSWVの発生を秋田県で初めて確認した。このことによりTSWVが注目されたことに加え、2000年はTSWV感染苗の流通によりえそ病の発生が多くなったため、2000、2001年はTSWVの検定依頼も多く、検出率も高かった。なお、2003年に検定株数が多かったのは病害虫防除所のTSWV広域調査の診断依頼があったためである。しかし、2002年以降は発生率が低く推移しており、懸念された爆発的な蔓延は起きていない。これについては多発した際、発生品種の廃棄と更新を迅速に行ったことが功を奏したためと考えている。

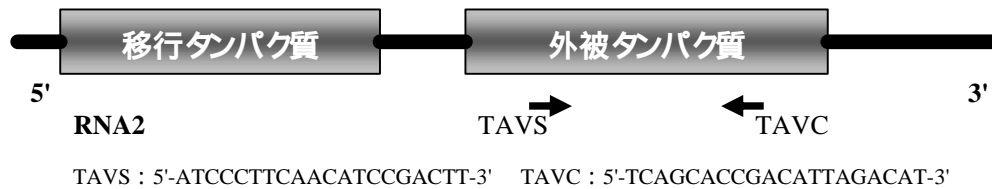
しかし、ストレスを極力回避するような栽培管理を行うと病徴を発現しない(無病徴感染)こと(平野1999)や県内のキク生産現場にTSWVの媒介虫であるアザミウマ類が蔓延している状況から考えて、詳細な調査を行うことによって、さらに多くの株からTSWVが検出されるものと思われる。根本的な問題として、TSWVはキクでは濃度が上がりやすく、感染株であっても局在することが報告されており(松浦ら2003)、このことが検出を困難にしている。特に、親株等におけるウイルスフリー検定においてエスケープが発生する危険性を有し、無病徴感染株の導入ややり取りが行われることが危惧される。最近、高感度な遺伝子診断法としてLoop-mediated isothermal amplification(LAMP)法が開発され、これを応用したRT-LAMP法をTSWV検定に導入する試みがなされている(松浦・重本2005)。

第13表 キクのグループと生育状況別のTSWV感染状況¹⁾.

生育状況	輪ギク	小ギク	スプレーギク	その他 ²⁾	全体
症状なし	3/ 37 (8)	0/14 (0)	1/12 (8)	0/27 (0)	4/ 90 (4)
草丈の低下	3/ 20 (15)	7/15 (47)	1/ 8 (13)		11/ 43 (26)
その他 ²⁾	35/110 (32)	15/57 (26)	1/ 8 (13)	2/ 4 (50)	53/179 (30)

1) 感染株数/検定株数(感染株率%)。

2) 草丈に関らず葉に退緑斑等の症状が認められる株。



第17図 TAVの遺伝子とRT-PCRのプライマー。

なお、TSWVによる病害はキクの他に、1999年にダリア（輪紋病）、トマト（黄化えそ病）、2003年にピーマン（黄化えそ病）で確認している。輪紋病が発生した雄和町のダリア農家によれば、1990年頃、導入品種で輪紋症状が確認されていたことから、TSWVは少なくとも1990年頃には感染したダリア苗により本県に持ち込まれ、発生していたものと考えられる。また、1997年頃から輪紋症状株が増え、種子繁殖株でも発病がみられており、ミカンキイロアザミウマの侵入と、それを含むアザミウマ類の発生量の増加が輪紋病の被害の増大を助長していると考えられる。

現在、TSWVによる病害は初発当時懸念されたような爆発的な拡大、被害は発生していないが、山本地区のキク産地では常発して問題視されている（横井 私信）他、県南部のキク、トマト、ピーマン等で散発している。これらの発生箇所では、伝染源となる周辺の宿主雑草や媒介虫であるアザミウマの防除の徹底に加え、栄養繁殖性であるキクでは無病親株の確保などの対策を講じる必要がある。

6 キク微斑ウイルス

ウイルスあるいはウイロイドによるとみられる生育不良のキクについて検定を行ったところ本県で発生が確認されているCSVd、CVBやTSWVが検出されなかったため、調査を進めたところTAVの感染が確認された。そこで、他のウイルス・ウイロイド同様に遺伝子診断できるようにプライマーを設計して、RT-PCRにより本県のキクにおけるTAVの感染状況を調査した。

6-1 方法

6-1-1 遺伝子診断

RT-PCR-RFLPはChoiら（1999）の方法によった。プライマーCPTALL-5とCPTALL-3を用い、PCRの条件は94 40 72 各1分を40サイクル、最後に72、10分とした。次に、RT-PCR反応液5 μ lに10 \times M buffer 0.5 μ l、BSA 0.5 μ l、滅菌蒸留水3.2 μ lと制限酵素XbaI 0.8 μ lを加え、37 で60分間反応させた。HincIIの場合は、RT-PCR反応液5 μ lに10 \times H buffer 0.5 μ l、滅菌蒸留水3.5 μ lと制限酵素1 μ lを加えた。

RT-PCRは既報TAVの塩基配列（DDBJ/EMBL/GenBank受入れ番号AJ237849、AJ277268、L15335）を基に外被タンパク質の一部を増幅するプライマー

TAVSとTAVC（第17図）を設計して行った。

ウイルス遺伝子の塩基配列はダイレクトシークエンス法により決定した。

6-1-2 生物検定

汁液接種は大木（1997）の方法に準じて行った。

6-1-3 抗体検定

DIBA法による抗体検定は大木（1997）により行った。

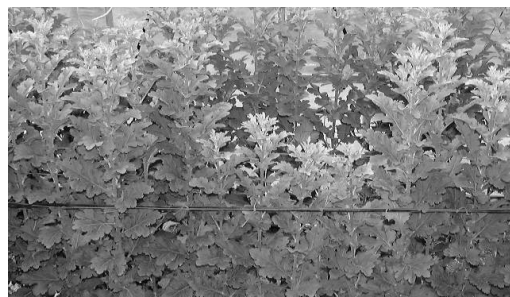
6-2 結果

6-2-1 初確認事例

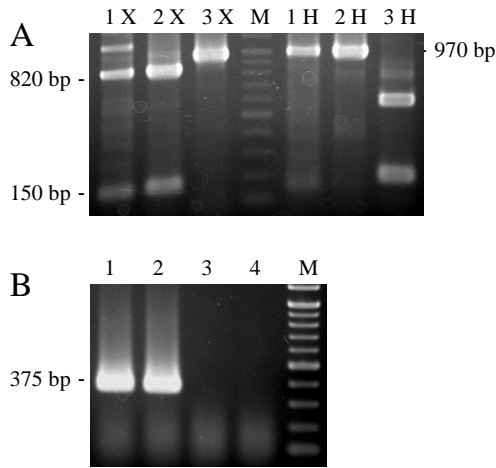
2003年に男鹿市で採取したわい化症状（第18図）を示す‘名門’2株についてRT-PCR検定を行ったところ、CSVd、CVB、TSWVの何れも検出されなかった（データ省略）。そこで、TAVを含むCucumovirus属を検出するプライマー（Choiら 1999）を用いてRT-PCRを行ったところ、約970 bpの断片が増幅された。このバンドはHincIIでは消化されず、XbaIにより約820と約150 bpに切断された（第19図A）。これはキュウリモザイクウイルス（CMV）の消化パターンとは異なり、既報のTAVのそれ（Choiら 1999）と一致した。また、*Chenopodium quinoa*を用いて得た単病斑分離株をササゲに汁液接種したところ、接種葉に小型のえそ斑点を生じ、キュウリには全身感染しなかった（データ省略）。以上の結果から本ウイルスをTAVと同定し、ウイルス病と診断した。

6-2-2 プライマーの検証

TAV感染株についてプライマーTAVSとTAVCによるRT-PCRを行ったところ、想定されるサイズ（375 bp）の断片が増幅された（第19図B）。この増幅断片のプラ



第18図 TAVによるキクウイルス病（わい化症状）。



第19図 RT-PCR-RFLP(A)とRT-PCR(B)によるTAVの検定.

1と2, わい化株; 3, CMV; 4, 健全株; M, 分子量マーカー. AにおけるXとHはそれぞれ *Xba*I, *Hinc*II 処理を示す.

イマーを除く塩基配列(DDBJ/EMBL/GenBank受入れ番号AB201716に登録)は既報TAVと99%の高い相同性を示した。この結果から、本法によりTAV遺伝子が増幅されていることが確認され、RT-PCR法によるTAVの検定が可能になった。

6-2-3 発生状況

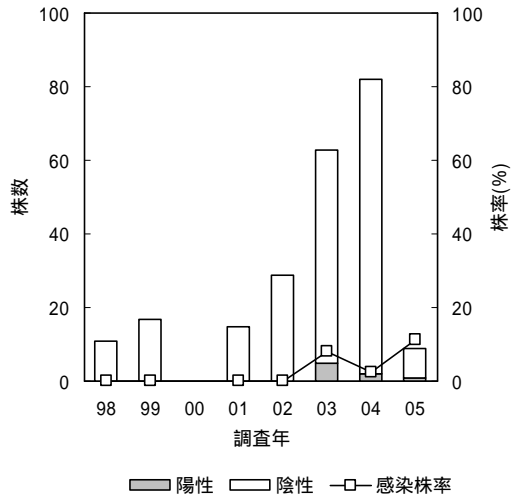
1998、1999、2001～2005年に県内の圃場から226株(86品種221株と品種不明5株)を採集した。このうち、1998、1999年の28株についてはDIBA法によりTAV検定を行った。また、2001年以降はRT-PCR法によったが、2001、2002年の試料は凍結保存RNAを用いた。

検定の結果、8株からTAVが検出された(第14表)。キク全体でのTAVの感染株率、感染品種率はそれぞれ4、3%で、CSVd、CVBやTSWVに比べ低かった。また、輪ギクの感染株率8%に比べ、小ギクでは1%と低く、スプレーギクでは感染株が検出されなかった。しかし、TAV感染株数が少ない上に、その内訳をみると8株のうち6株は‘名門’で偏りがあることから、キクのグループと感染状況の関係を論じるのは難しい。

第14表 TAV検定に供試したキクと検定結果.

	輪ギク	小ギク	スプレーギク	合計
検定数 ¹⁾	90[21]+2	93[41]+3	38[24]	221[86]+5
感染数 ¹⁾	7[2]	1[1]	0[0]	8[3]
感染株率(%)	8	1	0	4
感染品種率(%)	10	2	0	3

1) 株数[品種数]+品種不明株数.



第20図 1998～2005年のTAVの感染株率.

感染株は初確認の2003年以降、低率ではあるが毎年確認されている(第20図)。また、感染株が少ないため、調査した6地域18市町村のうち3地域4市町村のみで発生が確認された(第15表、第21図)。

6-2-4 症状と検出状況

生育状況別にまとめたところ(第16表)、輪ギクの草丈の低い株での感染株率25%(4株)が最も高かった。その他、TSWVとの重複感染が確認された茎えそ等の典型的な症状を呈した輪ギク1株を除くと、無症状の1株、葉に斑紋等の症状が観察された2株からTAVが検出された。

第15表 地域別のTAV感染状況.

地域	発生市町村数/ 調査市町村数	感染株数/検定株数 (感染株率, %)
山本	0/ 2	0/ 37 (0)
秋田	1/ 5	5/ 76 (7)
由利	0/ 2	0/ 11 (0)
仙北	1/ 5	1/ 61 (2)
平鹿	2/ 3	2/ 39 (5)
雄勝	0/ 1	0/ 2 (0)
全県	4/18	8/226 (4)

第16表 キクのグループと生育状況別のTAV感染状況¹⁾。

生育状況	輪ギク	小ギク	スプレーギク	全体
症状なし	1/33 (3)	0/33 (0)	0/19 (0)	1/85 (1)
草丈の低下	4/16 (25)	0/32 (0)	0/15 (0)	4/63 (6)
その他 ²⁾	2/43 (5)	1/31 (3)	0/ 4 (0)	3/78 (4)

1) 感染株数/検定株数 (感染株率, %)。

2) 草丈に関らず葉に退緑斑等の症状が認められる株。



第 21 図 1998～2005 年の TAV の発生市町村。

6-3 考 察

キクから分離される *Cucumovirus* は一括して TAV とされていたが、栃原 (1970) は TAV のうち CMV と血清関係が無いものをキク微斑ウイルス (*Chrysanthemum mild mottle virus*: CMMV) と命名した。しかし、分子分類が基盤となった近年は CMV と血清関係があるものを CMV、ないものを TAV とするようになり混乱が生じた。そこで、花田ら (1995) は和名をキク微斑ウイルスとし、学名は TAV を採用するように提案し、現在に至っている。TAV はアブラムシで非持続性伝染され、ウイルスを獲得したアブラムシはすぐに媒介可能であるが、媒介能力は短時間で消失する。TAV の症状は葉の退緑斑、黄斑、輪紋、えそ斑紋で、生育も悪くなる。花は変形し小型になると共に赤色系の品種では花弁の斑入り・退色が生じることがある。しかし、症状は品種により異なり、生育初期に不明瞭な退緑斑紋を示す品種も多い一方で、症状を示さないものも多い (栃原 1970)。

TAV は 2002 年、県内のウイルス症状のトマトから検出されており (藤 私信)、2004、2005 年にも TAV によるトマトモザイク病の発生を確認している。一方、TAV によるキクウイルス病については 2003 年に「名門」において本県初確認となった。「名門」は 20 年以上前に導入された古い品種で、草丈が低い等の生育不良株の発生が問題になっていた。本調査の結果、2 市の複数株で TAV の感染が確認されたことから、過去に本県に導

入した「名門」親株の一部が感染していたため、これに由来する株は保毒しており、生育不良症状を呈した可能性が考えられる。

本県においては検定した 86 品種のうち「名門」の他 2 品種から検出されたのみで、地域も限られていた。こうした発生状況は、本県では CSVd が広域で多くの品種で発生している状況や TAV が全国各地の栽培ギク各品種に広く感染しているとみられていること (栃原 1993) とは対照的であった。このことから、栃原 (1993) が TAV の発生状況を取りまとめた当時の品種は TAV の感染率が比較的高く、比較的新しい品種では TAV の汚染が少ない可能性も考えられるが、今後も調査を継続し、TAV の発生消長を解析する必要がある。

7 キククロロティックモットルウィロイド

キクの病原分子として CChMVd があり、海外からの進入が長年警戒されてきた (山口 1979b)。2003 年、男鹿市で発生した退緑・黄斑症状株の調査を進めたところ、国内未発生の CChMVd が確認されたのでその過程について報告する。

また、その後、2 府 5 県でも CChMVd が確認されたが (Hosokawa ら 2005、佐野 私信)、本ウィロイドの発生状況は不明のままであったので、秋田県内で栽培されている様々なキクを収集して CChMVd の感染状況を調査した。

7-1 方 法

CChMVd の検出はプライマーセット P と P (De la Pena ら 1999) を用いた RT-PCR 法で行った。PCR の条件は 94℃、30 秒 68℃、1 分を 35 サイクル、最後に 72℃、30 秒とした。また、プライマー P と P (De la Pena ら 1999) を利用して semi-nested PCR を行った。反応条件は 94℃、40 秒 60℃、30 秒 72℃、2 分を 30 サイクル、最後に 72℃ で 10 分とした。また、塩基配列の決定は以下のようにして行った。プライマー P と P による RT-PCR 断片を精製後、pGEM-T ベクター (Promega) に連結し、大腸菌 JM109 にクローニング後、4 クローンのプラスミドを精製して個別に塩基配列を決定した。

発生状況調査での CChMVd の検出と病原型の判定は RT-PCR-RFLP 法 (De la Pena ら 1999) で行った。P と P による RT-PCR 産物が *Hind* で消化された場合

を病徴発現(S)型、そうでない場合を非病徴発現(NS)型と判定した(第22図)。

7-2 結果

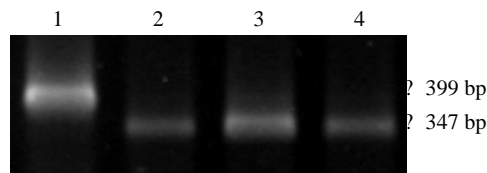
7-2-1 初確認事例

2003年7月中旬、小ギク‘七夕まつり’を導入・栽培した男鹿市の12農家全てで、しばしば中心にえそを伴う明瞭な黄斑が下位葉に現れた(第23図A)。この症状は上位葉に進展し、その後、発症株の葉は赤紫色を呈した。程度に差はあったものの最終的にほとんど全ての株が同様の症状を呈した。しかし、これらの発症株はわい化することなく、草丈は150 cmほどとなった。

なお、本品種は1995年頃、国内で小ギクの品種をかけ合わせ、選抜されたもので、購入した苗を4月に定植した際には症状は認められなかった。

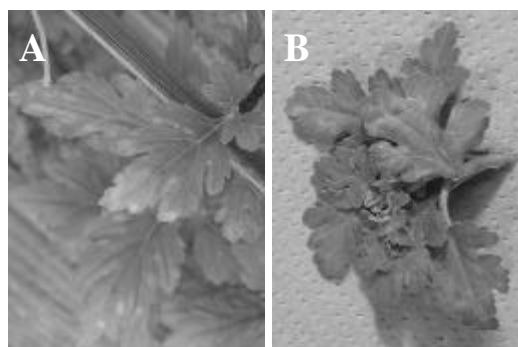
この症状は、下位葉から症状が現れた点や黄斑の境界部が明瞭であった点がやや異なっていたが、TSWVの感染により生じる症状に似ていた。そこで、RT-PCR法によりTSWV検定を行ったが、本症状を呈した3株とも陰性であった(データ省略)。さらなるRT-PCR検定の結果、TAVも陰性で、CVBあるいはCSVdの感染が確認されたが、両者が引き起こす典型的な症状の記載(橋原 1993)から何れも原因とは考えにくかった。

そこで、国内未確認であったが、葉に同様の症状を引き起こすとされているCChMVdの検定を行ったところ、検定した3株全てにおいて期待されるサイズの断片(約400 bp)が増幅された(第24図に1株の例を示す)。これを鋳型にプライマーセットP とP、P とP で semi-nested PCRを行ったところ、それぞれ約240 bpと約160 bpの期待されるバンドが生じた。このことからCChMVdである可能性が高まったので、発症株の1株から得られた4クローンの塩基配列を決定した(DDBJ/EMBL/GenBank 受入れ番号 AB181857 ~ AB181860に登録)。これらは398~399塩基からなり、相互の配列の相違は2.5%以下で、アメリカで報告されたS型CChMVd(Navarro and Flores 1997)と95.4~97.5%、NS型CChMVd(De la Penaら 1999)と94.0~96.7%の高い相同性を示した(データ省略)。また、4クローンは何れも82~85番の塩基配列がUUUCであったことから、S型CChMVdと同定した。



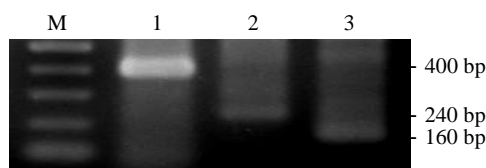
第22図 RT-PCR-RFLPによるCChMVdの病原型の判定。

1, NS型感染株; 2~4, S型感染株。



第23図 CChMVdによるキク退緑斑紋病。

A, 退緑・黄斑; B, 葉脈沿いの退緑。



第24図 RT-PCR(1)およびsemi-nested PCR(2, 3)によるCChMVdの検定。

2, P₁/P₂; 3, P₂/P₃; M, 分子量マーカー。

7-2-2 発生状況

2002~2005年にかけて県内の圃場から採集した94品種223株(2002年の試料は凍結保存RNA)についてRT-PCRを行ったところ、21品種46株からCChMVdが検出され、感染株率、品種率はそれぞれ21、22%で

第17表 CChMVd検定に供試したキクと検定結果。

	輪ギク	小ギク	スプレーギク	合計
検定数 ¹⁾	62[22]+1	122[51]+3	35[21]	219[94]+4
感染数 ¹⁾	10[3]+1	27[13]	8[5]	45[21]+1
うち S型	7[2]+1	21[9]	4[3]	32[14]+1
NS型	3[1]	6[5]	4[3]	13[9]
感染株率 (%)	16	22	23	21
感染品種率 (%)	14	25	24	22

1) 株数[品種数]+品種不明株数。

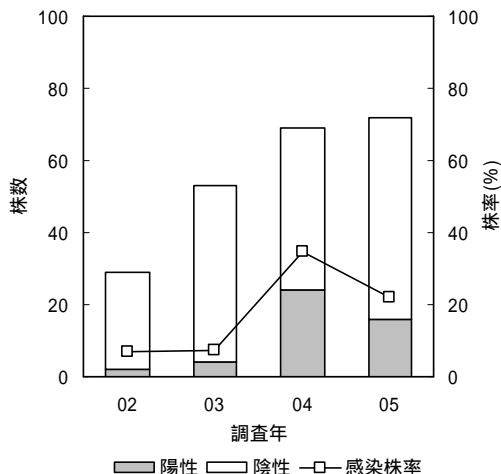
あった(第17表)。RFLP分析の結果、病原型はS型の割合が高く14品種33株から、NS型は9品種13株から検出された。なお、CChMVdが検出された21品種のうち19品種では複数の株から検出された場合であってもどちらか一方の型であったが、小ギクとスプレーギクの各1品種では株によりS型あるいはNS型に感染していた。輪ギクの感染株率は16%で、小ギクとスプレーギクはそれぞれ22、23%とやや高かった。感染品種率も同様な値を示した。

感染株率の年次推移をみると、2002、2003年はそれぞれ7、8%であったのに対し、2004、2005年のそれはそれぞれ35、22%と高かった(第25図)。また、CChMVdの発生が確認された市町村は2002年が1地域1町、2003年が1地域2市町であったものが、2004年には4地域5市町村、2005年は5地域6町と増加した(第26図)。その結果、4年間に調査した20市町村のうち12市町村で発生が確認された(第26図E、第18表)。

7-2-3 症状と検出状況

症状別感染状況を調べたところ、症状が認められない株からの検出率が33%と最も高かった(第19表)。次いで(草丈に関らず)葉に何らかの症状が見られる株の19%、わい化、ややわい化に区分された株ではそれぞれ14、9%であったが、これらの症状は他のウイルス、ウィロイドの重複感染によることも考えられた。CChMVdの感染により日本の品種が示す症状は不明であり、単独感染株が示す症状、さらに他のウイルス・ウィロイドの重複感染の影響を明らかにすることは重要であると考えられた。

そこで、CChMVdが検出された21品種46株について他のウイルス・ウィロイドの検定を行ったところ、単独感染であることが確認されたのは11品種17株であった。その症状をみると、S型感染キク8品種14株のうち6品種12株は症状が無く、小ギクの1品種1株では葉脈に沿った退緑(第23図B)が、またスプレーギクの1品種1株では株全体の退緑が観察された(第20表)。一方、NS型が単独感染した3品種3株は何



第25図 2002～2005年のCChMVdの感染株率。

第18表 地域別のCChMVd感染状況。

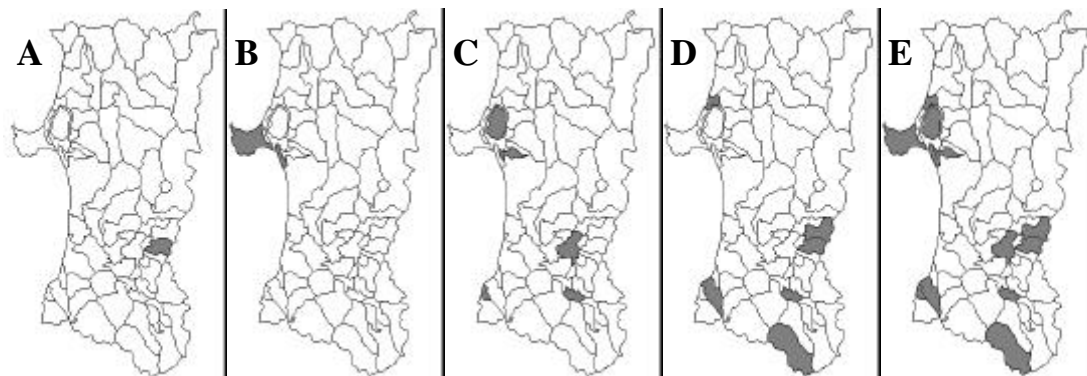
地域	発生市町村数 / 調査市町村数	感染株数 / 検定株数 (感染株率, %)
山本	1 / 1	3 / 5 (60)
秋田	4 / 5	22 / 58 (38)
由利	2 / 3	2 / 18 (11)
仙北	3 / 5	10 / 60 (17)
平鹿	1 / 4	3 / 66 (5)
雄勝	1 / 2	6 / 16 (38)
全県	12 / 20	46 / 223 (21)

第19表 キクの生育状況別のCChMVd感染状況¹⁾

生育状況	S型	NS型	全体
症状なし	20 / 73 (27)	4 / 73 (5)	24 / 73 (33)
ややわい化	1 / 33 (3)	2 / 33 (6)	3 / 33 (9)
わい化	5 / 65 (8)	4 / 65 (6)	9 / 65 (14)
その他 ²⁾	7 / 52 (13)	3 / 52 (6)	10 / 52 (19)

1) 感染株数/検定株数(感染株率, %)。

2) 草丈に関らず葉に何らかの症状が認められる株。



第26図 2002～2005年のCChMVdの発生市町村。

A, 2002年; B, 2003年; C, 2004年; D, 2005年; E, 2002～2005年。

第20表 CChMVdの病原型と単独感染キクの症状別感染数.

型	症状	輪ギク	小ギク	スプレーギク
S	なし	6[2] ¹⁾	6[4]	
	葉脈沿いの退緑		1[1]	
	株全体の退緑			1[1]
NS	なし		1[1]	2[2]

1) 株数[品種数].

れも症状は認められなかった。一方、15品種29株は他のウイルス・ウイロイドと重複感染しており、国内初確認の事例となったCSVd(1株)あるいはCVB(2株)が感染していた小ギク1品種は明瞭な黄斑症状を呈していた。しかし、その他はCChMVdの感染を気付かせるような特徴的な症状を示していなかった。例えば、CSVdが感染していた13品種24株のうち9株は無症状であり、15株はCSVdに特徴的なわい化と退緑症状であった。TSWVとの重複感染であった2品種2株のうち、一方はTSWVに特徴的な退緑輪紋を生じ、もう一方は生育が劣っていた。

7-3 考 察

Chrysanthemum chlorotic mottle disease は1967年にアメリカで初めて確認された(Dimockら1971)。本病によりキクは退緑斑を生じ、新たに展開した葉は退緑するとされ、これに似た症状の発生がこれまでにデンマーク、フランスとインドで報告されている(Horst1987)。一方、病原についてはウイロイドの性質を有することから *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* とされた(Romaine and Horst1975)。Horst(1975)はS型とNS型の存在を報告し、その後82~85番のCChMVd tetraloopの塩基配列が病徴発現に関与していることが明らかにされた(De la Penaら1999)。すなわち、この配列がUUUCタイプは斑紋や退緑等の典型的症状を引き起こす(S型)がGAAAタイプは潜在感染し、症状を引き起こさない(NS型)。

本病は日本でも長年、海外からの侵入が警戒されてきたが(山口1979b)、2003年に秋田県で初めて黄斑症状を呈した小ギクからCChMVdが検出された。また、その塩基配列からS型であることが確認された。本事例がCChMVdの国内での初発生であったので、CChMVdの和名を「キククロロティックモットルウイロイド」、病名を「退緑斑紋病」と申請した。

その後、本県以外に青森県(佐野私信)に続き、2府4県でもCChMVdの発生が確認されているが(Hosokawaら2005)、これまで日本のキクでのCChMVd感染実態の詳細な調査は行われておらず、不明のままであった。そこで、多くの品種、栽培地域で経時的にCChMVdの発生を調査した結果、本県では少なくとも2002年以前からCChMVdが発生し、栽培されているキクの2割ほどの品種が感染していることが

明らかとなった。また、感染株は増加傾向にあり発生地域も拡大していたが、発生地点を中心に周囲に拡大しているのではなく、年ごとに確認された市町村が異なり、その数が増加していた。調査した4年間で県内の主要なキク産地全てで発生が確認された。これは県内に導入される株の感染率が増加していることに起因する発生状況の変化であり、本ウイロイドが虫媒性でないことも一因であろう。また、より感度の高いnested PCRを行うことによって検出率が高くなること(Hosokawaら2005)も考え合わせ、実際にはCChMVdはより高率で県内に蔓延しているものと考えられる。

その理由として、本試験結果から推測された、少なくともCChMVdの単独感染では国内で栽培されているキク品種には無病徴かほとんど症状を現さないこと、さらに重複感染によってもCChMVdの感染を気付かせるような特徴的な症状を引き起こさないようであることが挙げられる。このためCChMVdの感染に気付かれずに県内各産地に感染親株が導入され、広がったと考えられる。また、本ウイロイドは汁液接種が可能である(Horst1975)ことから、感染品種を導入した農家でハサミを用いた管理作業時等に健全品種への感染拡大も起きていると思われる。

一方、輪ギクの感染率が小ギクやスプレーギクに比べ低かったことは、CChMVdに対する免疫性品種がないとするDimockら(1971)の報告を考慮すると、キクの管理・供給体制の差異が原因であることが推測される。すなわち、小ギクやスプレーギクは非常に多くの品種が存在する一方でパテント品種が少ないために増殖や交換・配布が活発に行われ、CChMVdに感染する機会や感染株の拡大を促している。一方、対照的に輪ギクは品種数が少ないがパテント品種の割合が高いために管理が厳密に行われており、感染の機会も少なく、また、勝手な増殖や配布が禁じられているために感染株の拡大も抑えられているのであろう。上述のようにほとんど症状が現れず、目視による選抜が行われなかったであろうことも主な要因であろう。

秋田県は県外の園芸会社から栄養繁殖で増やされた新品種、親株、定植苗などの種苗の導入が多い。こうしたことは他の多くの県でも似た状況にあるので、本研究で明らかになったCChMVdの発生状況は決して本県特有の現象ではなく、その他のキク産地でも同様に

CChMVdが蔓延していることを示唆するものである。

一方、CChMVdの症状についてはさらに検討すべきである。国内初確認となった2003年の事例では著しい退緑・黄斑症状のため廃棄せざるをえなかった。また、CChMVdがTSWVと似た症状を引き起こすことが示唆され、CChMVdによる退緑斑紋病がTSWVによるえそ病として見落とされていたり混同されていた可能性があり、発見当初は栽培上重要な病原であると考えた。しかし、その後の発生調査から、前述のように少なくともCChMVdの単独感染では国内で栽培されているキク品種には無病徴かほとんど症状を現さないと推察された。この理由として、初確認事例はCSVdあるいはCVBと重複感染していたもので、そのため症状が強く現れたことが考えられたが、その他の重複感染株ではCChMVdの感染を知らせるような特徴的な症状は示さなかった。また、Hosokawaら（2005）は葉の退緑や斑紋等の典型的な激しい症状を示すキク（品種不明）のCChMVdの濃度が低く、マイルドな症状を呈していた品種にNS型が高濃度で感染していたとしており、病徴とウイロイド濃度や病原型の関係がはっきりしない事例も報告されている。こうした矛盾については、明瞭な症状を呈する品種も多い一方で潜在感染する品種も多数あるとDimockら（1971）が報告しているように、日本のキクでもCChMVdによる症状に品種間差異があり、それが影響していることが推測される。こうしたことを明らかにするために、本試験を通じて得られたS型およびNS型CChMVd単独感染株ならびにウイルス・ウイロイドフリーキク品種を用いた接種試験を進めている（崔ら2008）。接種に際しては、CChMVdの発病好適条件（Horst 1975）に注意して行う必要がある。

このように、CChMVdによる病徴、病気の重要度はさらに検討を重ねなければならない状況ではあるが、このまま放置するとCChMVdによる汚染が進むことが懸念される。従って、今後もCChMVdの挙動に注意を払う必要があり、全国規模で調査を継続する必要がある。

8 総合考察

秋田県ではキクが花き生産の28%を占める主力品目で、新品種や定植苗等、県外から苗が頻りに導入されている。これらは園芸会社や種苗会社で栄養繁殖により増殖されたもので、その後、キク農家間でやり取りが行われることもある。こうした状況は新病害の進入、あるいは病気の拡大を促すことになり、本研究を行ったこの10年ほどの間に、CSVdによるわい化病、TSWVによるえそ病が問題となり、CVBおよびTAVによるウイルス病の発生も確認された。さらに、国内未確認であったCChMVdによる退緑斑紋病を同定するに至った。

ウイルス・ウイロイドの被害回避においては、病原

により伝染方法や伝染環が異なるので、対応を考える上でも診断が基本となる。しかし、病徴は品種、栽培環境により程度に差があり、生理障害でもウイルス・ウイロイド病と酷似した症状を呈することがあるので、一般に病徴から病原を特定することは難しい。ウイルス・ウイロイドの診断には生物検定をはじめいくつかの方法があるが、キクの重要な病原分子であるCSVdについては遺伝子診断が最も有効な方法であったので、本研究では他のウイルス・ウイロイドも同様に検定できるようにプライマーの設計等に取り組み、キクに発生する5つのウイルス・ウイロイドの検定を可能にした。これによりフリー化を含め親株の検定、発病株の診断が短時間に高感度で行えるようになった。また、診断結果は農業改良普及員を通じて農家に伝えられ、必要に応じて対策が講じられた。あるいは、栽培しているキクにウイルス・ウイロイドの感染の疑いがある親株の更新を考えている場合は最終的な判断材料になり、原因が解明されることで生産上の不安感を取り除くという間接的な貢献もできた。

診断技術の開発は今後2方向に展開していく必要がある。一つは確実な親株検定を想定した高感度化で、特にRT-LAMP法についての研究、実用化の動向をみながら技術の導入を図りたい。もう一つは簡易化で、親株検定における一次スクリーニングや農家からの発症株の診断依頼により多く対応できるような多検体処理化と、一度の遺伝子診断で複数のウイルス・ウイロイドの検定を行えるようなRT-PCRのmultiplex化である。前者については要望の多いCSVd検定についてtissue blot hybridization法（勝部ら2003）の有用性を検討したい。後者については現在試験中で、TSWVとTAV、CSVdとCVBのそれぞれの組み合わせにおいて一度のRT-PCRで検出できることを確認している（未発表データ）。

本研究では検定結果を取りまとめることで本県におけるキクのウイルス・ウイロイドの発生状況を明らかにした。しかし、特にTSWVはウイルス濃度が上がりやすく、局在するためその発生は低く評価されている可能性がある。また、検出するウイルス・ウイロイドごとにプライマーの配列が異なるため、検出感度が異なることも考えられる。さらに、特徴的な症状からCSVdでは検定依頼株に占めるわい化症状株の割合が、TSWVでは葉にえそ等の症状を呈している株の割合が高い。このため、感染率等の数値を単純に比較できないであろうが、これを考慮した上での発生状況を以下のように考える。すなわち、CSVdは感染品種が多く、広く常発して、被害も大きいことから最も問題になる病原分子である。CSVd感染株が絶えず流通していることが主因であろう。TSWVも発症すると被害が大きいので栽培農家の問題意識も高い。本県では、TSWV感染株が流通して多発生した年を除き発生が少なく推移

しているが、無病徴感染株の潜在的危険性があり、媒介虫のアザミウマ類が常発しているので注意しなければならない。一方、CVB や TAV は症状がほとんど無いので感染、発症しても被害が少ないが、前者については保毒率が高く、現場で「退化」と呼ばれている現象の主要な原因と考えられる。CChMVd についても顕著な症状が出ないので実害は無いと現時点では考えているが、日本の品種が示す症状について接種試験により確認中であり、残された課題である。

ウイルス・ウイロイド病は農薬が効かず、一度感染すれば治療できないため予防に重点をおく必要がある。すなわち、罹病残渣や、宿主範囲の広い TSWV や TAV では伝染源のおそれがある圃場周辺の雑草を除去するなど圃場衛生を良い状態に保つ。CVB と TAV の媒介虫であるアブラムシ、TSWV を媒介するアザミウマの発生を抑えるよう薬剤防除を行う。また、キクの生育状況に気を配り、ウイルス・ウイロイドが疑われる症状の早期発見に努めることも重要である。しかし、顕著なわい化は CSVd、えそや品種によっては輪紋の場合は TSWV と推定できるが、CVB、TAV、CChMVd は明瞭な症状を出さないので見落とされやすい。

ウイルス・ウイロイド病と診断された場合、発病株は伝染源になるので速やかに除去すると共に病原の伝染方法に応じた対策を立てる。すなわち、虫媒性の TSWV、CVB、TAV では対象媒介虫の駆除を徹底する。また、ウイルス・ウイロイドは芽かきや収穫時にハサミを介して汁液伝染するので(TSWV では汁液伝染は起こりにくいとされている)、疑わしい株の管理は後回しにするなどの配慮が必要である。TSWV や TAV のように宿主範囲が広い場合には関係する作物全体を対象にした総合的な防除対策が必要になってくる。

しかし、ウイルス・ウイロイドの最も重要な性質は栄養繁殖により次代の植物に伝染することで、キクのように挿し穂により種苗生産が行われる場合、親株の重要度が非常に高く、保毒苗の移動により遠隔地にも運ばれる。従って、キク栽培にあつてはウイルス・ウイロイドフリーの健全種苗を用いることが大前提である。この点においても遺伝子診断法はキクの健全親株の作出、すなわちウイルスフリー化の際も不可欠な技術であった。2000年、八竜町から依頼を受けた「寒精雪」、「精興の秋」、「精興黄金」の TSWV と CVB に関するウイルスフリー化を、また、2002年は平鹿地域農業改良普及センターより依頼のあった「夏休み」の CVBフリー化を行い、現地農家へフリー株を供給した。一方、ウイロイドのフリー化はこれまで困難とされてきたが、最近になって低温処理後 amantadine 添加培地で茎頂培養を行うか(山下ら 1997a)、超微小茎頂分裂組織培養法(Hosokawaら 2004)によって CSVd がフリー化できることが報告された。同様に、CChMVd も後者の方法でフリー化できることが示された(Hosokawa

ら 2005)。

しかし、キクは培養変異しやすく、フリー化できても変異の問題が起きかねない。また、品種が多く、その変遷が早いキクにあつてはフリー株が作出できたときには主力品種ではなくなっていることもあり得る。従って、ウイルス・ウイロイドが蔓延していない品種であれば問題が生じる前に栽培株の中から優良株を選抜し、さらに遺伝子診断を行ってフリー株の選定を行い、これを親株として防虫温室等で維持・管理、増殖して現地に供給する体制が望ましい。こうした観点から、本研究で確立した診断技術は花き種苗センターのキク親株のウイルス・ウイロイドフリー検定に活用された。すなわち、1999年、2000年はそれぞれ120株、98株の TSWV 検定を、2001年、2002年はそれぞれ64株、88株の CSVd、TSWV および CVB 検定を、2005年は135株の CSVd 検定を行った。現在、本県の花き生産では小ギクを重点的に振興を図っており、花き種苗センターと農業試験場で選定した品種を普及させていく計画がある。その際、CSVd の遺伝子診断法を花き種苗センターに技術移転し、CSVdフリー小ギクの供給体制の構築に活用される予定になっている。

最近、Chrysanthemum stem necrosis virus の国内初発生が確認されたように(松浦ら 2007)、キクに感染するウイルス・ウイロイドの種類は増え続けると考えられる。今後も、新たなウイルス・ウイロイドの本県への侵入、発生に警戒する必要がある。遺伝子診断を活用して農家からの診断依頼に迅速に対応していきたい。

謝 辞

弘前大学教授佐野輝男博士には CSVd 感染キクの分譲ならびにウイロイドに関する数多くの助言を賜ると共に CChMVd に関し共同研究して頂き、同准教授千田峰生博士から遺伝子実験に関し協力を請うた。県立大学名誉教授松本 勤博士にはウイルス病全般にわたる指導を賜った。同教授井上正保博士には客員研究員として受け入れて頂き、施設利用の便宜を図って頂くと共に抗体検定法、透過型電子顕微鏡の操作方法を教授頂いた。同准教授藤 晋一博士には遺伝子診断、ウイルス病に関する情報提供、助言を賜り、同助教上田健治博士には分子生物学に関する最新情報を提供頂いた。前同嘱託鈴木雅子氏、阿部幸江氏にはシークエンス実験に協力頂いた。北海道大学助教中原健二博士ならびに全農営農・技術センター三野真布氏にはウイロイドの検出法に関する情報を提供頂いた。北海道立花・野菜技術センター木口忠彦氏には研究当初、プライマーの設計に関し協力頂いた。東京農業大学教授夏秋啓子博士には CVB-M を分譲頂いた。花き担当農業改良普及員各位ならびに前生物資源総合開発利用センター利部大和氏には現地調査に協力頂いた。特に、平鹿地域振興局小松貢一氏には実験室と現場をつなぐ道筋を

つけて頂き、その後も先導的な役割を担って頂いた。また、花き担当専門技術員には農業改良普及センターの要望等の取りまとめや中継ぎをして頂いた。花き種苗センター浅利幸男氏には植物の組織培養に関する指導を賜り、共同でキクの茎頂培養作業を行った。前農業試験場和田節子氏、小濱結希枝氏ならびに農林水産技術センター工藤真由美氏には実験を補助して頂いた。同山谷正治氏、深谷富夫氏、由利地域振興局富樫仁氏、前森吉公民館A. T. Thompson氏および編集委員各位には本論文を校閲頂いた。これらの諸氏に厚くお礼申し上げる。

引用文献

- 崔 海東・山本英樹・佐野輝男 2008. 日本のキク品種におけるキククロロティックモットルウィロイドの病徴. 日植病報74 (印刷中).
- Choi, S.K., Choi, J.K., Park, W.M. and Ryu, K.H. 1999. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *J. Virol. Methods* 83: 67-73.
- De la Pena, M., Navarro, B. and Flores, R. 1999. Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: A tetraloop within the *in vivo* branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9960-9965.
- Diener, T.O. and Lawson, R.H. 1973. Chrysanthemum stunt: a viroid disease. *Virology* 51: 94-101.
- Dimock, A.W., Geissinger, C.M. and Horst, R.K. 1971. Chlorotic mottle: A newly recognized disease of chrysanthemum. *Phytopathology* 61: 415-419.
- 藤 晋一・中前 均 1997. 愛知県に発生したトマト黄化えそウイルスの諸性質. 愛知農総試研報 29: 151-156.
- 藤 晋一・大石一史・中前 均 1998. イムノキャプチャーRT-PCRによるキクえそ病の診断. 関西病虫研報 40: 111-112.
- 古屋廣光・松本 勤 1994. 東北各県における病害発生の変遷 秋田県 野菜・花き. 日本植物病理学会東北部会編, 東北地方における作物病害研究の歩みと展望. 日本植物病理学会東北部会創立30周年記念誌刊行会, 鶴岡. 64-68.
- 花田 薫・鈴木陽一・亀谷満朗・柘原比呂志 1995. キク微斑ウイルスの英名をtomato aspermy virusとすることについて. 日植病報 61: 274-275.
- 平野哲司 1999. 管理の違いと病徴の発生様相. 農耕と園芸 54 (12): 134-136.
- 本田要八郎・津田新哉 1999. 最近問題となっているトマト黄化えそウイルスによる花き類の被害と防止対策. 農耕と園芸 54 (12): 122-126.
- Horst, R.K. 1975. Detection of latent infectious agent that protects against infection by chrysanthemum chlorotic mottle viroid. *Phytopathology* 65: 1000-1003.
- Horst, R.K. 1987. Chrysanthemum chlorotic mottle. In Diener, T.O. ed., *The viroids*. Plenum, New York. 291-295.
- Hosokawa, M., Matsushita, Y., Ohishi, K. and Yazawa, S. 2005. Elimination of Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) recently detected in Japan by leaf-primordia free shoot apical meristem culture from infected cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 74: 386-391.
- Hosokawa, M., Otake, A., Ohishi, K., Ueda, E., Hayashi, T. and Yazawa, S. 2004. Elimination of chrysanthemum stunt viroid from an infected chrysanthemum cultivar by shoot regeneration from a leaf primordium-free shoot apical meristem dome attached to a root tip. *Plant Cell Rep.* 22: 859-863.
- 加藤彦彦・土井 誠 1998. 静岡県で発生したキクわい化ウィロイド (CSVd) の塩基配列とキク品種の病徴. 日植病報 64: 425.
- 加藤彦彦・牧野孝宏・亀谷満朗・花田 薫 1995. トマト黄化えそウイルス普通系統によるキクえそ病 (新称). 日植病報 61: 274.
- 勝部和則・川村武寛・渡辺愛美・佐野輝男 2003. 岩手県におけるキクわい化病の発生とウィロイドフリー親株の選抜利用による対策. 岩手農研セ研報 3: 1-12.
- 栗原則雄・茂木孝夫・柘原比呂志 1980. 群馬県におけるキクのウイルス感染状況. 関東東山病虫研報 27: 91-92.
- Levay, K. and Zavriev, S. 1991. Nucleotide sequence and gene organization of the 3'-terminal region of chrysanthemum virus B genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 72: 2333-2337.
- 松浦昌平・石倉 聡・梶原真二 2003. キク親株におけるトマト黄化えそウイルス (TSWV) の局をおよび感染親株から挿し穂への伝染率. 日植病報 69: 343.
- 松浦昌平・久保田健嗣・奥田 充 2007. Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)によるキク茎えそ病 (新称). 日植病報 73: 68.
- 松浦昌平・重本直樹 2005. RT-LAMP法による数種農作物からのトマト黄化えそウイルス (TSWV) の検出. 日植病報 71: 235.
- Navarro, B. and Flores, R. 1997. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: Unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11262-11267.
- 大木 理 1997. 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン. 日本植物防疫協会, 東京. 1-184.
- Romaine, C.P. and Horst, R.K. 1975. Viroid etiology of chrysanthemum chlorotic mottle disease. *Virology* 64:

- 86-95.
- 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.
- Suastika, G., Kurihara, J., Natsuaki, K.T. and Tomaru, K. 1997. A strain of chrysanthemum B carlavirus causing flower colour breaking on *Gymnaster savatieri* (Makino) Kitamura. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63: 1-7.
- 栃原比呂志 1970. キク微斑ウイルス. 日埴病報 36: 1-10.
- 栃原比呂志 1993. キク. 土崎常男ほか編, 原色作物ウイルス事典. 全国農村教育協会, 東京. 504-509.
- Tsuda, S., Fujisawa, I., Hanada, K., Hidaka, S., Higo, K., Kameya-Iwaki, M. and Tomaru, K. 1994. Detection of Tomato spotted wilt virus S RNA in individual thrips by reverse transcription and polymerase chain reaction. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 60: 99-103.
- Weekes, R.J., Mumford, R.A., Barker, I. and Wood, K.R. 1996. Diagnosis of Tosspoviruses by reverse-transcription polymerase chain reaction. Acta Hort. 431: 159-166.
- 山口 隆 1979a. キクの無病苗生産に関する諸問題[1]. 農業および園芸 54: 57-60.
- 山口 隆 1979b. キクの無病苗生産に関する諸問題[2]. 農業および園芸 54: 331-335.
- 山口 隆 1979c. キクの無病苗生産に関する諸問題[3]. 農業および園芸 54: 431-436.
- 山本英樹・藤 晋一 2000. 秋田県におけるトマト黄化えそウイルスの発生. 北日本病虫研報 51: 104-106.
- 山本英樹・木口忠彦・大屋俊英 2001a. 秋田県におけるキクわい化病の発生状況. 北日本病虫研報 52: 82-84.
- 山本英樹・木口忠彦・大屋俊英 2001b. RT-PCR法によるキクBウイルスの検出. 北日本病虫研報 52: 85-86.
- Yamamoto, H. and Sano, T. 2005. Occurrence of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 71: 156-157.
- Yamamoto, H. and Sano, T. 2006. An epidemiological survey of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* in Akita Prefecture as a model region in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 72: 387-390.
- 山本英樹・千田峰生 2005. 秋田県のキクにおけるキク微斑ウイルスの発生状況. 北日本病虫研報 56: 79-80.
- 山下裕子・平田行正・畑谷達児・佐野輝男・福井博一・四方英四郎 1997a. スプレーギクのウイルスフリー苗生産に関する研究 (第2報) キクわい化病無毒化の検討. 園学雑 66 別1: 526-527.
- 山下裕子・平田行正・本田孝志・畑谷達治・佐野輝男・福井博一・四方英四郎 1997b. スプレーギクのウイルスフリー苗生産に関する研究 (第3報) ウィロイド濃度がスプレーギクの生育に及ぼす影響. 園学雑 66 別2: 564-565.

Abstract

Field Surveys of Chrysanthemum-infecting Viruses and Viroids in Akita Prefecture, Japan

Hideki YAMAMOTO

(*Agricultural Experiment Station, Akita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center*)

A study to check for virus and viroid was conducted on a total of 709 chrysanthemums (*Dendranthema grandiflorum*) from chrysanthemum fields in Akita Prefecture, Japan during the 1996-2005 growing seasons. This revealed the epidemic characteristics of five chrysanthemum-infecting viruses and viroids in the prefecture as follows. In 1996, an RT-PCR assay identified *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) as the causal agent in chrysanthemums with stunting symptoms, which have been a problem from before. After constructing nested PCR primers to make the CSVd assay more sensitive, an outbreak monitoring of the viroid was conducted. It revealed that CSVd occurs continuously and is distributed throughout chrysanthemum fields, and infected plants were detected in about 60% of tested cultivars. It is believed that the viroid is more deleterious than the other four viruses and viroid toward producing chrysanthemums. An RT-PCR assay was designed to detect part of the gene for the coat protein of *Chrysanthemum virus B* (CVB), and the virus was detected in 1998. Though CVB causes almost no symptoms, it cannot be ignored, as this assay revealed that approximately 20% of chrysanthemum cultivars harbor the virus. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), whose outbreak had received attention in the prefecture, was detected in chrysanthemum plants in 1999 and occurred considerably in the following two years. However, occurrence of TSWV has decreased and has not spread since that time. At present, TSWV occurs only occasionally, but because TSWV is difficult to detect, there is a possibility that it is being overlooked. Since *Tomato aspermy virus* (TAV) was isolated from a chrysanthemum cultivar in 2003, a primer pair was designed for an RT-PCR to detect the virus. A survey of TAV revealed that the virus occurs in only a few cultivars and districts, which differs from cases of the other four viruses and viroids. Although Japan had long been alarmed about the invasion of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) from overseas, the viroid was first detected in the prefecture in 2003. A field survey of the viroid in various chrysanthemums revealed that CChMVd had invaded by 2002 and approximately 20% of cultivars harbored CChMVd, including more symptomatic type than nonsymptomatic. Large-flowered cultivars were less frequently infected than small-flowered and spray-type ones. CChMVd-infected chrysanthemums are increasing and have spread throughout major chrysanthemum-producing districts. Hereafter, it must continue to take great precaution against occurrence of new virus and viroid infecting chrysanthemum in the prefecture.

Key Words: Chrysanthemum, *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, *Chrysanthemum stunt viroid*, *Chrysanthemum virus B*, Field survey, RT-PCR, *Tomato aspermy virus*, *Tomato spotted wilt virus*