

平成13年度 試験研究成果

区分	指導	題名	ハイブリダイゼーション法によるウイロイドフリーきく母株の選抜法		
〔要約〕 キクわい化病に感染していないきく母株(ウイロイドフリー母株)選抜のための高感度検定法としてハイブリダイゼーションを用いた実用的な診断系を確立した。被検葉からメンブレン吸着を行い(普及セ担当)、ハイブリダイゼーション後、化学発光検出する(農研セ担当)体系である。この方法で選抜した母株由来の株ではわい化病の発病がみられていない。					
キーワード	キクわい化病	ウイロイドフリー	母株	選抜法	病害虫部 病理昆虫研究室

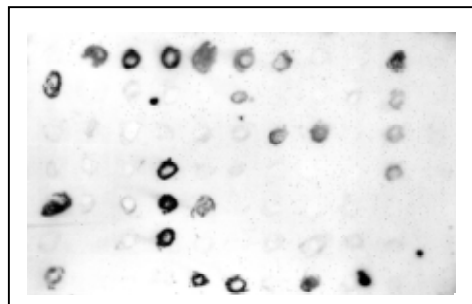
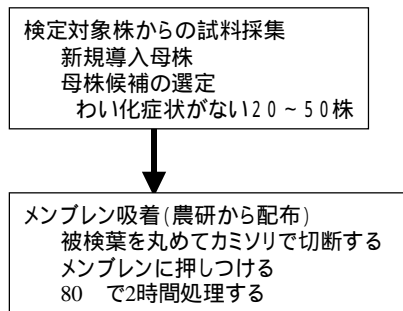
1. 背景とねらい

県内に広く発生しているキクわい化病は保毒株を母株とした場合に被害拡大する難防除病害である(HI2 指導)。病原ウイロイドは外皮タンパク質を持たない環状の1本鎖RNAで、診断に際しては検定品種「ミスルトー」に接ぎ木して生物検定するか、遺伝子診断を行う以外に方法がない。今回弘前大学の指導を得て、ディゴキシゲニン(DIG)標識RNAプローブを用いたティッシュ・プロット・ハイブリダイゼーション法による診断が母株の検定に適用できることを確認し、本法を利用して普及と研究が連携したウイロイドフリー株選抜の検定系を確立し、実用性を検討した。

2. 技術の内容

(1)試料採取 ウイロイド濃度の高まる6～8月に、小ぎくおよびスプレーギクの採穂用母株の頂葉を数枚採取する。

(2)メンブレン吸着(普及セで実施)

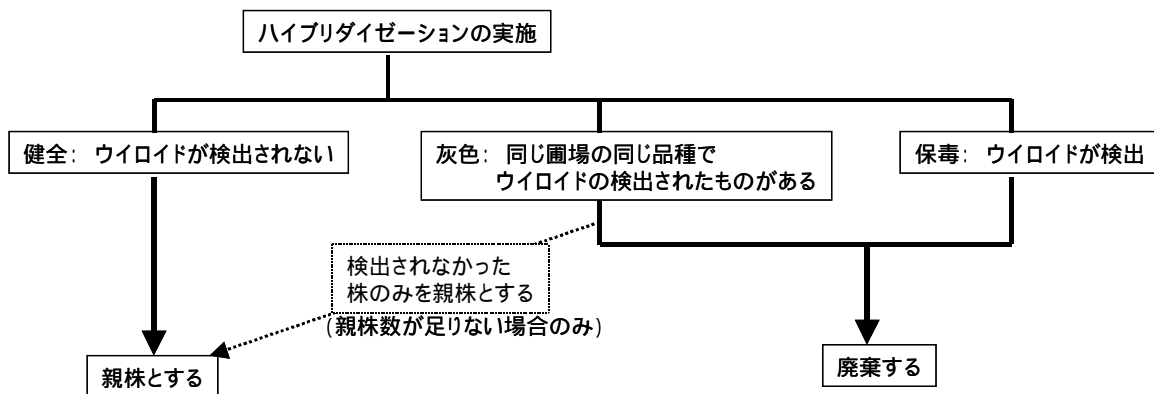


診断事例

(3)ハイブリダイゼーションおよび検出(農研セで実施)

DIG 標識 RNA プローブによるハイブリダイゼーションの実施と化学発光検出

(4)結果の判定 ウイロイドの感染葉を押しつけた部分は右上図のように黒色を呈する。非感染株は反応しない。この結果から次のフローにしたがって親株を選定する。



(6)ウイロイドフリー株での発病 本県育成のアイマムシリーズをはじめ、ウイロイドフリーとした母株あるいは挿し穂由来の株で発病はみられていない(表1)。

3. 指導上の留意事項

(1) ウイロイド濃度は夏季に高まる。台刈り後の展開葉あるいは伏せ込み株でも診断できるが、低温期であり、極低濃度の感染を検出できないおそれがある。なお、ハイブリダイゼーション法による検出限界は 10pg (10<sup>-11</sup>g) 程度である(山本

ら,1997:ドットプロットハイブリダイゼーションの場合)。

(2) 配布するメンブレンは冷蔵庫で1ヶ月程度は保存できる。

(3) 試料切断に用いるカミソリは1試料毎に交換する。180 以上で乾熱処理しない限り、再利用はできない。

(4) 試料吸着開始後7~10日の範囲であれば乾熱処理(80 ,2時間)まで冷蔵庫に保管できる。

(5) 本検定法で各産地の母株の検定をすでに実施したが(表2),刈払い機を用いた一斉刈りにより感染(刃物による接触伝染)する可能性もある(図1)。

4. 技術の適応地帯

県下全域

5. 当該事項にかかる試験研究課題

(734) キクわい化病の遺伝子診断法の確立(平成13~14年、予算区分:県)

6. 参考文献・資料

(1)平成12年度研究成果(指導)「キクわい化病の発生実態と対策」

(2)勝部和則ら(2001) 岩手県におけるキクわい化病の発生と Tissue blot hybridization 法による検出(講要). 日植病報 67

(3)李世訪ら(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委ウイロイドの検出. 北日本病虫研報 48: 113-117.

(4)山本裕子ら(1997) スプレーギクのウイロイドフリー苗生産に関する研究(第1報)各種ウイロイド検定法の検討, 園学雑 66 別 1:524-525.

7. 試験成績の概要

表1 アイマム(CM)系統における母株の検定と、ウイロイドフリー確認母株由来苗のわい化病発生

品種区分	検定株数	選抜したウイロイドフリー母株数 (ハイブリダイゼーション法)	フリー母株由来配布苗 での発生	備考
ア-リー-イロ-	15	15	なし	
ホワイト	13	11	なし	検出株は廃棄
ピンク	13	13	なし	
イロ-	13	13	なし	
CM5	13	0		全株廃棄
CM6	13	13	なし	

検定: 2001.3 母株伏せ込み時期の展開葉

表2 ハイブリダイゼーション法による母株の検定実績

(2001.10.19 現在)

公所等	品種数	総検体数	陽性品種数	陽性件数
農研セ	7	48	0	0
花き研				
北上	3	40	0	0
水沢	42	209	7	9
一関	4	282	0	0
遠野	3	58	0	0
二戸	5	135	3	23*
経済連	6	150	1	1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											P
B											
C											N
D											
E											
F											
G											

品種: はるか A1~C10: 農家A P:ポゴ  
D1~F10: 農家B N:カゴ

図1 2農家から採集した同一品種の母株候補株における検出事例

メンブレン吸着は普及センターおよび経済連が行い、農研センターでハイブリ判定した。

\*陽性23検体のうち,18検体は1品種60検体(2農家)からの検出(図1)