

岩手県におけるキクわい化病の発生と ウイルスフリー親株の選抜利用による対策

勝部和則・川村武寛¹⁾・渡辺愛美・佐野輝男²⁾

抄 録

2000年岩手県内広域に発生したわい化症状を呈する小ギクから *Chrysanthemum stunt viroid* (*CSVd*) が検出され、キクわい化病と診断された。本病対策として、ティッシュブロットハイブリダイゼーション法で *CSVd* フリーと判定された株を採穂用親株に使用するとその後の発病は認められず、有効である。

Abstract

In 2000, Chrysanthemum stunt disease, caused by *Chrysanthemum stunt viroid* (*CSVd*), was widely found in chrysanthemum plants exhibiting characteristic stunting symptoms in Iwate prefecture, Japan. The use of *CSVd*-free stock plants by the Tissue blot hybridization method with DIG labeled RNA probes was a practical method for control of Chrysanthemum stunt disease.

キーワード：キクわい化病，ウイルス，発生，対策，ティッシュブロットハイブリダイゼーション，親株，選抜

I 緒 言

岩手県の小ギクはリンドウに次いで生産の盛んな花き品目で、作付面積は1986年5.2ha、1990年31.8ha、1995年47.7ha、2000年55.9haと年々増加してきている⁹⁾。スプレーギクや輪ギクを含むキク全体の作付面積が67haで、小ギクはこの9割を占める⁹⁾。2000年には本県オリジナルのスプレータイプの小ギクを品種登録するなど、県としても生産振興に重点を置いている。この間、単価の変動により生産額には若干の増減がみられるが、一方では、最近、県内各地でわい化症状を呈する小ギクが散見されはじめ、生産を不安定にする要因になりつつあった。

小ギク株をわい化させる要因の一つにキクわい化ウイルス (*Chrysanthemum stunt viroid*, *CSVd*) によるわい化病が知られている。キクわい化病は1947年にDimockによりアメリカで初めて報告され⁵⁾、1973年に

本病の病原がウイルスであることが明らかにされた⁴⁾。*CSVd* は世界中に広く分布し、わが国においても1977年、大沢らにより初めて報告され¹⁸⁾、以降国内で広く発生が確認されている^{10,13,20,24,25,32,33)}。このうち、北日本では1993年青森県での発生が接木検定により確認され^{24,26)}、以後、北海道²⁰⁾、秋田県^{6,24)}、山形県¹⁰⁾での発生が報告されている。

わい化病発病株の症状²⁷⁾は節間が短縮して草丈が健全株に比して2/3～1/2に矮化するのが特徴で、上位葉は小型化し、葉縁が下方に捲き、花には小型化、退色、早期開花等の症状が現れる。しかし、品種間差が大きく、感染しても無病徴である品種が多い。わい化病の被害拡大は、*CSVd* 罹病株からの採穂苗によるものが主である²⁷⁾。このため、栄養繁殖系のキクでは*CSVd* に感染していない健全な親株を選抜利用することが重要な防除対策といえる^{25,28~31)}。

CSVd の検定法には、病徴診断²⁵⁾、検定植物 (Mistletoe) を用いた診断^{13,18,24~26)}、ポリアクリルアミ

1) 水沢農業改良普及センター、2) 弘前大学農学生命科学部

ドゲル電気泳動による診断^{20,24)} および遺伝子診断²⁵⁾ があげられる。検出感度については生物検定が鋭敏で、無病徴感染や低いウイロイド濃度の場合に電気泳動による診断法より優れるが、接種後 30 日程度を要するなど、迅速性に欠ける¹³⁾。遺伝子診断については RT-PCR (Reverse transcription and polymerase chain reaction) 法とドットプロットハイブリダイゼーション法があり、いずれも高感度で、迅速性が高い^{14,14,21,25,28~31,35)}。

本研究では、岩手県内で広域に発生した小ギクのわい化症状が *CSVd* によるものであり、本県における初発生を確認するとともに、ハイブリダイゼーション法を用いたウイロイドフリー親株の選抜と利用による本病防除対策を確立したので報告する。本防除対策は生産現場の改良普及員および育苗施設職員と研究機関が一体となって実施できるところに特徴がある。なお、本報告の一部はすでに日本植物病理学会東北部会（秋田市）において発表した¹¹⁾。

II 岩手県におけるキクわい化病発生地域 およびキクわい化ウイロイド感染確認 品種

ここでは小ギクのわい化症状の原因としてキクわい化ウイロイド (*CSVd*) によるわい化病 (図 1)²⁶⁾ が考えられたので、ウイロイド様核酸を特異的に検出できるリターンゲル電気泳動法²⁷⁾ により各産地でみられるわい化症状を呈する品種を調査するとともに、一部の試料については *CSVd* に特異的な RNA プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーション^{1,33)} により検定を行った。

材料および方法

1. リターンゲル電気泳動法によるウイロイド様核酸の 検出

供試材料 岩手県内のキクわい化病の発生状況については、2000 年において県内 3 地域の農業改良普及センター（以下、普及センター）および県経済連園芸育苗センターからの診断依頼試料を用いた。すなわち、一関普及センター 5 品種 10 検体（一関市 10）、水沢普及センター 1 品種 5 検体（水沢市 3、金ヶ崎町 2）、二戸普及センター 4 品種 4 検体（二戸市 4）、県経済連園芸育苗センター 2 品種 3 検体（江刺市 2 品種 2 検体、紫波町 1 品種 1 検体）、計 6 市町、累計 12 品種・22 検体であった。試料はいずれも 6 月から 7 月にかけて採集されたものであり、品種の詳細は結果の表 1 に記載した。

核酸の抽出 検定試料からの核酸抽出は Dellaporta



図 1 キクわい化病の病徴
左側の草丈の低い方が発病株

らの方法²⁷⁾ を一部修正して行った。すなわち、検定薬 0.5g 当たり、3.75ml の抽出用緩衝液 (0.1M Tris-HCl, 2.8M NaCl, 0.05M EDTA- Na_2 , pH8.0)、250 μ l の 20% SDS、15 μ l の 2-メルカプトエタノールを加えて摩砕後、試験管に移し、65°C 下で 10 分間静置した。これに 1.25ml の 5M 酢酸カリウムを加えて激しく攪拌し、氷温で 20 分間静置した。14,000rpm、10 分間の遠心分離後、上清を回収し、0.6 容のイツプロパノールを加えて -20°C で 30 分間静置した。10,000rpm、10 分間の遠心分離を行った後、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、減圧乾燥後、50 μ l の TBE 緩衝液に懸濁した。

電気泳動法による診断 (*CSVd*) Schumacher ら²⁸⁾ に基づきリターンゲル電気泳動法 (R-GE) により行った。すなわち、高塩濃度の泳動緩衝液 (89mM Tris-HCl, 89mM ホウ酸, 2.5mM EDTA- Na_2 ; IS 緩衝液) で調製した 5% ポリアクリルアミドゲル (5% acrylamide, 0.12% bisacrylamide; 脱気後 10% 過硫酸アンモニウム, 0.12% TEMED を加用) を用い、核酸試料に 20% 量の Loading 緩衝液を加えた後、20 μ l をゲルのスロットに注入した。ウイロイド兼変性条件の電気泳動は 5°C 下の

HS 緩衝液中で, Loading 緩衝液に含まれる Xylene-cyanol がゲル下端に達するまで電気泳動した. 次に低塩濃度泳動緩衝液 (HS 緩衝液の 9 倍希釈) を用い, 65°C の変性条件下で今度はゲル下端から上方へ試料が流れるように電極を切り替えて, 同じく Loading 緩衝液に含まれる Xylene-cyanol がゲル上端に達するまで泳動した. 電気泳動後のゲル染色には市販の銀染色キット (第一化学薬品(株)製) を用い, ウイロイド様低分子核酸のバンドの有無で感染有無を判定した.

ELISA による診断 (*TSWV*) 小ギクにおけるわい化症状は, 葉の枯れ上りや茎えそ条斑を伴うキクえそ病¹²⁾においても観察されることから²¹⁷⁾, トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*) の抗血清 (日本植物防疫協会研究所で市販) を用いて ELISA (直接法) により *TSWV* 感染有無を併せて調査した.

2. ドットブロットハイブリダイゼーションによる診断

一部の試料については *CSVd* 全長 354 塩基のうち約 280 塩基からなるディゴキシゲニン (DIG)¹⁾ 標識 RNA プローブを用いたドットブロットハイブリダイゼーション²¹⁷⁾ に供し, 電気泳動法により検出されるウイロイド様低分子核酸が *CSVd* であることを確認した. すなわち, 核酸試料の吸着は, 10 × SSC で前処理した核酸用ナイロンメンブレン (Hybond-NX, アマシャム社) に各試料 2 μl をスポットした後, ろ紙に挟んでアルミホイルで包み, 80°C で 2 時間加熱して固定した. プレハイブリダイゼーションは, ハイブリダイゼーション液 [2.5ml ホルムアミド, 625 μL 0.5M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7), 313 μL 120% SDS, 75 μL サケ精子 DNA (10mg/ml), 20 μL 酵母 tRNA (100 mg/ml), 1.75ml 蒸留水, 125ml 50% デキストラン溶液] で 55°C, 4 時間以上行った. また, ハイブリダイゼーションは同溶液 10ml に 2 μl の DIG 標識 RNA プローブを加え, 55°C で 1 晩反応させた. ハイブリダイゼーション後, メンブレンを 2 × SSC 溶液で 10 分間, 2 回洗浄し (室温), 次いで 0.1 × SSC-0.1% SDS 溶液で 65°C にて 10 分間 2 回洗浄した.

次にブロッキングは, 緩衝液 1 (0.1M マレイン酸, 0.15M NaCl, pH 7.5) に 0.3% (w/v) Tween 20 を加えた洗浄緩衝液に置換後, 1% ブロッキング反応試薬 (ペーリンガー社) を含む緩衝液 1 (緩衝液 2) で 30 分間行った. 抗 DIG 抗体反応は Anti-DIG-AP (Fab fragments を含む, ペーリンガー社) 1 μl を含む緩衝液 2 10 ml 中で 37°C で 30 分間行い, 洗浄緩衝液でメンブレンを 2 回洗浄した. 基質 CSPD を用いた化学発光反応は, 緩衝液 3 (0.1M Tris-HCl, pH9.5, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂, pH9.5) に置換後, 基質 CSPD 1,000 倍

液 (緩衝液 3) をメンブレンに滴下した. 37°C で約 10 分間静置後, X 線フィルムに 40 分程度感光させた後, 現像した.

結 果

1. リターンゲル電気泳動法によるウイロイド様核酸の検出

一関市, 水沢市, 江刺市, 金ヶ崎町, 紫波町および二戸市で発生した小ギクのわい化症状株を含む 22 検体を R-GE に供したところ, 11 検体からウイロイド様低分子核酸が検出された (図 2, 表 1).

一関市の検体は 5 品種 (紅とんぼ, 入船, 白舟, はるか, まなざし) それぞれについて同一圃場で発生したわい化症状が顕著な株と, わい化がみられず, 外観上健全な株を R-GE に供したところ, 前者でウイロイド様低分子核酸のバンドが確認されたが, 後者では確認されず, すべての品種で一致した. なお, わい化した株における *TSWV* の感染は認められなかった.

水沢市ではわい化症状が認められた品種やよいで 3 検体中 2 検体で R-GE によるウイロイド様低分子核酸が検

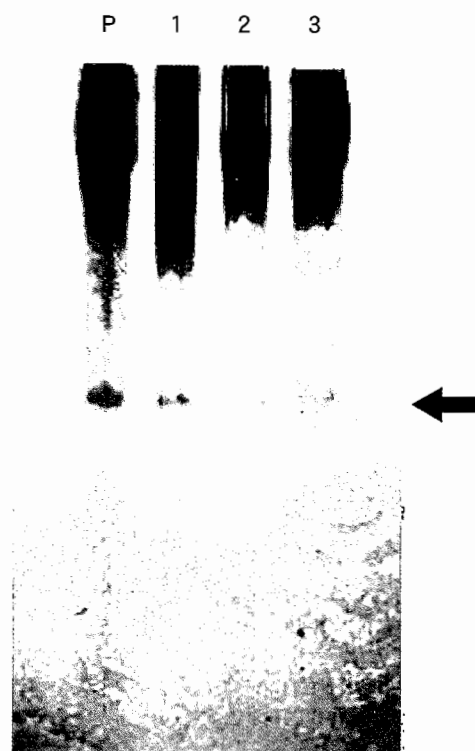


図 2 リターンゲル電気泳動法によるウイロイド様核酸の検出事例

- P ポジティブコントロール
 - 1 わい化症状を呈する試料 1 (品種紅とんぼ, 一関市)
 - 2 外観的に健全な試料 (同上)
 - 3 わい化症状を呈する試料 2 (品種やよい, 紫波町)
- 矢印 (←) はウイロイド様 1 本鎖環状低分子核酸のバンド

表1 わい化症状を呈する小ギクからのウイロイド様低分子核酸およびトマト黄化えそウイルスの検出状況

市町村名	試料区分 ¹⁾		ウイロイド様核酸 ²⁾	<i>TSWV</i> ³⁾		<i>CMV</i> ³⁾	
	品種名			ABS		ABS	
一関市	紅とんぼ	○	-	0.01	-	0	-
		×	+	0.00	-	0	-
	入舟	○	-	0.11	-	0.03	-
		×	+	0.05	-	0	-
	白舟	○	-	0.14	-	0.11	-
		×	+	0.33	-	0.25	-
はるか	○	-	0.07	-	0.05	-	
	×	+	0.04	-	0.01	-	
まなざし	○	-	0.17	-	0.04	-	
	×	+	0.02	-	0	-	
水沢市	やよい	1	+	0.16	-	0.11	-
		2	+	0.06	-	0	-
		3	-	0.45	-	0.33	-
江刺市	小雨		-	0.23	+	0.05	-
	やよい		+	0.32	+	0.07	-
金ヶ崎町	やよい	1	-	NT		NT	
		2	-	NT		NT	
紫波町	やよい		+	0.02	-	0	
二戸市	紅とんぼ		-	0	-	0	-
	はるか		+	0.13	-	0.01	-
	白助		-	0	-	0	-
	白舟		+	0.10	-	NT	

- 1) 一関市試料の品種の横に付した○はわい化症状を伴う株, ×は外観的に健全な株であることを示す. その他の地域はすべてわい化症状を伴う株である. 品種名横の数値は株が異なることを示す.
 2) リターン・ゲル電気泳動法 (21) による検出結果で, 表中の+は陽性, -は陰性であったことを示す.
 3) ELISA (直接法) による検出で, +は陽性, -は陰性であったことを示す. ABS (吸光値) が高いにもかかわらず-とした試料は, 参考に供した CMV 抗血清にも反応したため, 非特異反応と判定した. なお, 表中の NT は実験していない.

出された. ウイロイド様核酸は検出されなかった別の 1 検体は *TSWV* 抗血清を用いた ELISA において吸光値が比較的高かったが, 参考に供した *CMV* (*Cucumber mosaic virus*) 抗血清においても同程度の吸光値を示したことから, *TSWV* 感染については判定を保留した.

江刺市では同一圃場に作付けされる 2 品種 (小雨, やよい) でわい化症状が認められ, ウイロイド様低分子核酸が検出されたのはやよいであった. また, 小雨, やよいの両者から *TSWV* が検出された. なお, このやよいは後述する紫波町でわい化症状が確認されたやよいと親株が同じである.

金ヶ崎町でわい化症状が認められた品種も水沢市と同様にやよいであったが, 供試した 2 検体からはウイロイド様低分子核酸は検出されなかった.

紫波町でわい化症状が認められた品種やよいからはウイロイド様低分子核酸が確認されたが, *TSWV* の感染は認められなかった.

二戸市では 4 品種 (紅とんぼ, 白舟, はるか, 白助) でわい化症状が認められた. ウイロイド様低分子核酸が

検出されたのは, 白舟, はるかの 2 品種で, 紅とんぼ, 白助からは検出されなかった. なお, *TSWV* の感染はいずれの品種でも確認されなかった.

2. ドットプロットハイブリダイゼーションによる診断
 一関市の試料 (前出) について *CSVd* に相補な DIG 標識 RNA プローブを用いたドットハイブリダイゼーションを行ったところ, わい化症状株から *CSVd* が検出された (図 3, 表 2). また, わい化のみられない外観上健全な株からも *CSVd* が検出された (表 2). 反応の強さは発症株で強く, 外観上の健全株で弱かった.

考 察

小ギクの草丈が極端に短縮し, わい化する原因の一つに *CSVd* によるわい化病がある²⁷⁾. ウイロイドは 1 本鎖の環状 RNA 分子で, 共有結合により擬似的な 2 本鎖領域を持つ短い棒状の 3 次元構造をとるが, この理化学的性状を利用してウイロイド様の低分子核酸を検出する方法として R-GE がある²¹⁾. この R-GE 診断の結果, わ

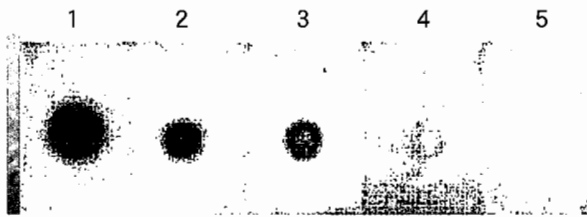


図3 DIG 標識 cRNA プローブによるドットブロットハイブリダイゼーションの検出事例
1~4: ポジティブコントロール
5: ネガティブコントロール
黒色のシミ(プロット)は *CSVd* が検出されたことを示す。

い化症状のみられる株では一部を除き、特異的なウイロイド様核酸が検出され、一部一関市の試料について *CSVd* 相補 RNA プローブを用いたドットブロットハイブリダイゼーションにより、*CSVd* が検出された。このことから、本県で発生した小ギクのわい化症状は *CSVd* によるわい化病と考えられ、本県におけるわい化病(図1)の発生が初めて確認された。小ギクのわい化症状の原因は次のように考察された。

一関市の試料(紅とんぼ, 入船, 白舟, はるか, まなざし)ではわい化症状のみられない外観上健全な株における *CSVd* の保毒(無病徴感染)が確認されたが、R-GE の検出限界は精製 *CSVd* で 1ng と、RNA プローブによるドットブロットハイブリダイゼーション(DBH, 10pg)よりも劣ること³³⁾、発症株と健全株は親株が共通し、同一圃場で管理されていたことから、外観上の健全株についても無病徴感染していたものと判断できる。さらに採穂した親株はすでに *CSVd* を保毒していた可能性が高い。

水沢市の品種やよい3検体については2点がわい化病と診断され、残る1点はELISAによる *TSWV* の吸光値が高かったことからえそ病¹²⁾によって草丈が低くなった可能性もあるが²¹⁶⁾、参考に供した *CMV* での吸収も同様に比較的高く、判定は保留すべきと考えた。

金ヶ崎町の品種やよいについてはウイロイド様低分子核酸は検出されず、小ギクの草丈を短縮させる別の要因についての検討が必要である。

江刺市の品種やよいについては、紫波町のウイロイド様核酸が検出された株を親として採穂増殖したものであり(苗生産者からの聞取り)、採穂された段階から *CSVd* に感染していた可能性が極めて高い。また、このやよいと、これに隣接して栽植されていた品種小雨からは *TSWV* が検出されたことから、やよいは *CSVd* と *TSWV* の混合感染、小雨は *TSWV* の単独感染によってわい化症状がもたらされたものと考えられた。なお、紫

表2 ドットブロットハイブリダイゼーションによるキクわい化ウイロイド検出¹⁾

品種名	試料区分 ²⁾		ウイロイド様核酸 ³⁾	<i>CSVd</i> ⁴⁾
	区分			
紅とんぼ	○		-	+
	×		+	+
入船	○		-	+
	×		+	+
白舟	○		-	+
	×		+	+
はるか	○		-	+
	×		+	+
まなざし	○		-	+
	×		+	+

- 1) 表1に示した一関市の試料と共通で、ウイロイド様核酸の検出データは表1から引用している。
- 2), 3) それぞれ表1の1), 2)に対応する。
- 4) ドットブロットハイブリダイゼーションによる検出で、+は陽性であったことを示す。

波町の品種やよいの親株では *TSWV* が検出されなかったことから、江刺市の圃場では *CSVd* はやよい、*TSWV* は小雨によってそれぞれ持ち込まれたと推定された。

二戸市の2品種白舟, はるかはわい化病と診断されたが、紅とんぼと白助からはウイロイド様低分子核酸および *TSWV* は検出されず(表1)、紅とんぼ, 白助については別の要因により草丈が短縮したと考えられる。

以上、一関市, 水沢市, 江刺市, 紫波町および二戸市においてキクわい化病の発生を確認した。無病徴感染を含み、保毒を確認した品種は紅とんぼ, 入船, 白舟, はるか, まなざしおよびやよいであった。

Ⅲ ウイロイドフリー親株選抜のための検定法

前章では *CSVd* の診断に電気泳動法(R-GE)を用いたが、この方法は核酸抽出操作および2回の電気泳動操作を行うなど、操作が煩雑なため、多数の試料を扱うに適さず、検出感度も生物検定には及ばない^{13,20,33)}。ここでは次年度の小ギク採穂用親株選抜のための検定手法として高精度かつできるだけ簡便に操作できる手法として、ハイブリダイゼーション法^{1,7,17,19,20,33)}の適用を検討した。なお、RT-PCR法についてはハイブリダイゼーション法よりも高感度であるがPCR装置や高価な試薬類を必要とするため^{14,33)}、ここでは検討しなかった。さらに有効と考えられる手法を用いて採穂用親株の *CSVd* 検定、選抜親株由来の苗でのわい化病発生状況、さらにこれらの

株での *CSVd* 保毒状況について追跡し、実用性について検証した。

材料および方法

1. *CSVd* 検定手法の検討

供試材料 一関市および紫波町の親株養成圃場から9月にわい化症状のみられない外観上健全な株の頂葉を採集した。一関市の検定品種は白舟、はじめ、入舟、はるか、紅とんぼの5品種で、品種毎に6株を検定した。これらの品種は、表1に示した同市の *CSVd* の保毒およびわい化病の発病が確認されている試料とは親株の由来が異なる。紫波町はきりん、いさはや、夏すずみ、ひかりの4品種で、きりん6点、いさはや、夏すずみ各2点、ひかり1点について、1点当たり5株を検定した。なお、この4品種は7月にも別途わい化症状の調査およびR-GEによるウイロイド様核酸の検出を行っている。

検定方法

リターンゲル電気泳動法 (R-GE) 核酸抽出は Schumacher *et al.*²⁰⁾ に従い、フェノール・SDS 法によって行い、TE 緩衝液 10 μ l に懸濁した。以降の電気泳動については前章で述べたとおりである。

ドットプロットハイブリダイゼーション (DBH) R-GE 用にフェノール・SDS 抽出した全核酸試料 2 μ l ずつを滴下し、風乾後、乾熱処理 (80°C, 2時間) により固定した。以後のハイブリダイゼーションは前章で述べたとおりである。

ティッシュプロットハイブリダイゼーション (TBH) 被検葉を渦巻き状に丸め、カミソリによる切断面を、SSC 処理済みのナイロンメンブレンに十数秒間押しつけ (吸着処理)、風乾後、乾熱処理により固定した。以後のハイブリダイゼーションは前章のドットプロットハイブリダイゼーションの手順で述べたとおりである。

2. ティッシュプロットハイブリダイゼーション法を用いた親株選抜の実用性の検討

供試材料 品種アイマム・アーリーイエロー、アイマム・ホワイト、アイマム・ピンク、アイマム・イエローおよび系統 CM5, CM6。

検定時期および調査項目 採穂用親株の伏込み期 (2001年3月) における *CSVd* 保毒状況、選抜親株に由来する苗でのわい化症状の発生状況 (圃場、随時) およびこれらの株での *CSVd* 保毒状況 (台刈り後、同年9月) をそれぞれの時期に調査した。

調査方法 *CSVd* の検定は TBH (前出) によるが、調査株数は伏込み期が 13 ~ 15 検体、その後の調査では

8 検体とした。発病有無は随時症状の観察により行った (概ね 50 株) が、系統 CM5 については結果に述べるように伏込み期の検定で全検体の保毒が確認され、廃棄したため、ここでは調査対象外とした。

検定方法 ティッシュプロットハイブリダイゼーション法 (前出) により行った。

結 果

1. *CSVd* 検定手法の検討

ティッシュプロットハイブリダイゼーションによる検出事例は図4に示した。一関市、紫波町の各品種の親株候補における *CSVd* の感染有無を R-GE, DBH, TBH で比較した結果、*CSVd* の検出傾向は、一関市の試料では検定5品種すべてで3つの診断方法でほぼ一致した (表3)。すなわち、白舟では *CSVd* が全く検出されなかったが、他の4品種では *CSVd* が検出され、6株当りの検出数がほぼ一致した。

紫波町では7月の調査でわい化症状が認められたのは品種きりんの6点のみで、他の3品種はすべて症状が認められなかった。R-GE 検定では4品種でウイロイド様核酸が検出された。ところが、9月の R-GE 検定ではウイロイド様核酸が全く検出されなかった (表4)。これに対して DBH, TBH の両検定方法ではほぼ全試料から *CSVd* が検出された。

2. ティッシュプロットハイブリダイゼーション法を用いた親株選抜の実用性の検討

伏込み期における親株の保毒状況を調査したところ (表5)、品種アイマム・ホワイトは供試13検体中2点、

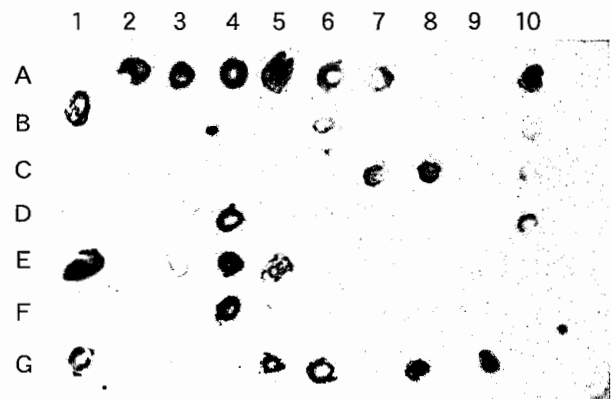


図4 DIG 標識 cRNA プローブによるティッシュプロットハイブリダイゼーションの検出事例

9A: ネガティブコントロール (ドットプロット)
10A: ポジティブコントロール (ドットプロット)
黒色のシミ (プロット) は *CSVd* が検出されたことを示す。

系統 CM5 は全検体で *CSVd* が検出された。その他の 4 品種・系統では *CSVd* が検出されなかった。なお、*CSVd* の保毒が確認された伏込み株はすべて廃棄することとした。

生育期における発病状況については（表 5）、伏込み期に *CSVd* が検出されなかった親株から採穂・養成された苗を圃場に定植したところ、すべての品種・系統において発病は認められなかった。

台刈後の株の展開葉の検定では全品種・系統において *CSVd* は検出されなかった（表 5）。

表 3 リターン・ゲル電気泳動，ドットプロットハイブリダイゼーションおよびティッシュプロットハイブリダイゼーションによるキクわい化ウイルス検出精度の比較（1）¹⁾

品 種	R-GE	DBH	TBH
白舟	0 / 6	0 / 6	0 / 6
はじめ	5 / 6	5 / 6	5 / 6
入舟	3 / 6	6 / 6	6 / 6
はるか	3 / 6	3 / 6	3 / 6
紅とんぼ	4 / 6	4 / 6	4 / 6

1) 表中ではリターン・ゲル電気泳動を R-GE，ドットプロットハイブリダイゼーションを DBH，ティッシュプロットハイブリダイゼーションを TBH とそれぞれ略記する。なお、DBH では R-GE 検定用に抽出した核酸試料を使用した。

表 4 リターン・ゲル電気泳動，ドットプロットハイブリダイゼーションおよびティッシュプロットハイブリダイゼーションによるキクわい化ウイルス検出精度の比較（2）¹⁾

品 種	7月調査		9月調査（陽性株数/検定株数）			
	R-GE	わい化症状	ロット番号	R-GE	DBH	TBH
きりん	+	+	19	0 / 5	5 / 5	5 / 5
			20	0 / 5	5 / 5	5 / 5
			21	0 / 5	5 / 5	5 / 5
			22	0 / 5	5 / 5	5 / 5
			23	0 / 5	5 / 5	5 / 5
			24	0 / 5	5 / 5	5 / 5
いさはや	+	-	25	0 / 5	5 / 5	5 / 5
			26	0 / 5	5 / 5	5 / 5
夏すずみ	+	-	27	0 / 5	5 / 5	5 / 5
			28	0 / 5	5 / 5	5 / 5
ひかり	+	-	29	0 / 5	5 / 5	4 / 5

1) 表 3 参照。

考 察

キクわい化病の病原ウイルス *CSVd* は保毒親株からの採穂によって伝染する^{25,27)}。このため、防除において最も重要な対策は健全な親株の確保である^{25,28~31)}。そのための手段として、茎頂培養によりウイルスをできるだけ抜き、より高感度な検定法を併用して無毒株をスクリーニングする方法^{22,23,28~33)}と、育苗段階での診断により無病苗を選抜利用する方法¹³⁾が考えられる。

基本的には無病苗の供給という点で一致するが、小ギクの品種は花色、開花期で分けても実に多様なことに加え、品種変遷が激しいことから、本県のように急速に作付けが拡大している場合、品種毎に無毒化する作業は非常に困難である。したがって、本県におけるキクわい化病の防除対策は、産地毎に維持されている親株の *CSVd* 検定を実施し、これから採穂・苗供給するという、上記 2 法の中間的な考えにたって体系立てることが望ましい。

表 5 ティッシュプロットハイブリダイゼーションによる小ギク親株の選抜と採穂苗における発病およびキクわい化ウイルスの検定

a. ティッシュプロットハイブリダイゼーションによる小ギク親株の検定（伏込み期）¹⁾

品種区分	検定株数	陽性母株数	選抜した母株数	備考
アーリーイエロー	15	0	15	
ホワイト	13	2	11	2 株廃棄
ピンク	13	0	13	
イエロー	13	0	13	
CM5（系統）	13	13	0	13 株廃棄
CM6（系統）	13	0	13	

1) 伏込み中の母株における新展開葉を供した（2001 年 3 月）。陽性株数とはティッシュプロットハイブリダイゼーションによって *CSVd* が検出された株数。

b. 選抜親株から採穂した株におけるわい化病の発生とウイルス検定（生育期）¹⁾

品種区分	発病調査（圃場）		<i>CSVd</i> 検定	
	調査株数	発病株数	検定株数	陽性株数
アーリーイエロー	50	0	8	0
ホワイト	50	0	8	0
ピンク	50	0	8	0
イエロー	50	0	8	0
CM6（系統）	50	0	8	0

1) 発病調査は生育中随時、ティッシュプロットハイブリダイゼーションによる *CSVd* 検定は台刈後の新展開葉を供した（2001 年 9 月）。

山下ら³³⁾によれば、CSVd 検定法で最も高感度であるのは RT-PCR マイクロプレートハイブリダイゼーション法 (精製 CSVd 1 μ g / 感染葉 g) であり、指標品種「ミスルトー」を用いた場合 (同 1 μ g / 感染葉 g) の 10¹⁵ 倍の感度である。同様に、本研究で検討した検定法の検出限界は R-GE が 1ng / 感染葉 g, DBH は 10pg / 感染葉 g で、DBH が R-GE に比し、100 倍高感度とされる³³⁾。

そこで、はじめに、ウイロイドの検出されない健全な親株を確保するための検定手法として電気泳動法である R-GE, ハイブリダイゼーション法である DBH, TBH の 3 者を比較したところ、一関市の試料ではほぼ結果が一致した。紫波町の試料では 7 月調査でわい化症状のみられなかった試料でも R-GE でウイロイド様核酸が検出されていたが、9 月調査では全く検出されなくなった。R-GE では検定時期により検出されない事例も認められており¹³⁾、試料中のウイロイド濃度が低下し、R-GE による検出限界以下にあった可能性がある。これに対して DBH, TBH ではほぼ全試料で CSVd が検出された。TBH の検出限界について検討した報告はないが、DBH と同じプローブを使用し、ハイブリダイゼーションおよび検出方法が同じ場合に DBH 並みの検出限界が得られると考えられる。このことから、R-GE でウイロイド様核酸が検出されず、DBH または TBH で検出された事例については妥当な結果といえる。

検定コストについては 1 検体あたり、R-GE が約 950 円、DBH が約 276 円とされる³³⁾。TBH は「検定方法」に述べたように核酸抽出という煩雑な操作を必要としないことから、この分のコストは低下すると考えられる。

ところで、山下ら³⁴⁾によれば、茎頂培養後のウイロイド検定において、DBH で CSVd が検出されない個体が得られても、RT-PCR で検出されることがあることを認めており、ハイブリダイゼーションにおいても完全にウイロイドフリーであると結論することは困難と考えられる。DBH と生物検定の検出限界を比較すると、精製 CSVd の接種量は最低限で 1 μ g / 生葉 g とすると指標品種ミスルトーで発病する³⁴⁾。この値は DBH の検出限界を遙かに上回っている³³⁾。また、平井⁸⁾によれば DBH で検出されない極低濃度の感染であれば発病まで時間を要するため、品種利用上経済的被害はほとんどないことが JA 和歌山県農では経験的に知られており、実際に DBH によりウイロイドフリー検定を行っているという。

これらのことから、TBH が実用レベルでのウイロイドフリー親株選抜のための検定方法として望ましいと考えられたので、伏せ込み期の採穂用親株の展開葉を試料に

TBH で検定し、CSVd の検出されない健全な株を親として苗を確保する方法の実用性を評価しようとした。その結果、この親株に由来する苗を用いた品種群ではわい化病の発生が見られず、また、台刈り後のひこばえ葉からの CSVd 検出もなかった。データには示していないが、この台刈り後の検定で健全とした株を親株として利用し、2002 年に栽培している品種群でも 8 月現在、わい化症状の発生は認められていない。

TBH を用いた親株の検定において、検定葉の採集およびナイロンメンブレンへの吸着処理 (検定葉切断面のスタンプ)、さらに加熱による固定といった一連の作業を、核酸を取り扱った経験やハイブリダイゼーションに関する知識を有しない職員が実施した。加熱固定済みのメンブレンを筆者が受け取り、ポジティブコントロールとネガティブコントロールをそれぞれを 2 μ l ずつ吸着させ、ドライヤーの熱風で加熱吸着させた後、ハイブリダイゼーション反応および化学発光検出を行った。このような一連の流れで得られた結果が表 5 であり、結果の判定において支障はなかった。

以上、ティッシュプロットハイブリダイゼーション法による健全親株の選抜はキクわい化病の防除対策として実用的な手法であることが検証された。

IV 総合考察

ウイロイドは共有結合で閉じた 1 本鎖環状の低分子 RNA で、らせん状に 2 本鎖領域とループ状の 1 本鎖領域が交互に連なり、分子全体として 40 ~ 50nm の短い棒状構造をとっている²⁵⁾。今回、このウイロイドの理化学的性状を利用したリターン・ゲル電気泳動法による診断法 (R-GE)²¹⁾ により、本県で最近発生が増えつつあった小ギクのわい化症状がウイロイドに起因するものであり、RNA プローブを利用したドットプロットハイブリダイゼーションを併用したことによってキク矮化ウイロイド (*Chrysanthemum stunt viroid* : CSVd) によるわい化病²⁷⁾ であることが明らかになった。

キクわい化病の病原ウイロイド CSVd は保毒親株からの採穂によって伝染する^{25,27)}。このため、防除において最も重要な対策は健全な親株の確保である^{25, 28~31)}。

山下らは CSVd の検定手法を比較し、ウイロイドフリー株選抜の 1 次スクリーニングに RNA プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションを用い、最終的な健全性の確認には RT-PCR- マイクロプレートハイブリダイゼーションを行うことが望ましいとしている³³⁾。また、茎頂培養による無毒化には低温処理後、

amantadin 添加培地で茎頂培養後、検定・選抜することでより確実にフリー個体が得られる可能性の高いことを報告している³⁴⁾。このウイロイド検定において、ドットプロットハイブリダイゼーションで *CSVd* が検出されない個体が得られても、RT-PCR で検出されることを認めている³⁴⁾。

塩飽らはウイロイドフリー個体を得るためには低温処理と茎頂培養との併用が有効で²³⁾、*CSVd* 検定にはドットプロットハイブリダイゼーション法を採用している²²⁾。

楠らは診断の際、R-GE の感度は高くないため、生物検定を併用すべきであること¹³⁾、また、より高感度な手法である RT-PCR 検定はウイロイドフリー苗のスクリーニングにも有効であることを報告している^{14,15)}。

小ギクの品種は花色、開花期で分けても実に多く、品種の変遷も激しいため、品種毎に無毒化する作業^{22,23,28-31,33,34)}は非常に困難である。一方、育苗中に配布用苗を検定するには検体数があまりに多く、実施しにくい。そこで、本県におけるキクわい化病の防除対策は、各産地で維持されている親株の *CSVd* 検定を実施し、これから採穂・苗供給するという考え方にたつて、多数検体を扱うに適し、できるだけ感度が高く、かつ、操作の簡便な手法を検討する必要があった。

この諸条件を満たす手法として、ハイブリダイゼーション法が考えられる^{9,17,22,33)}。本研究では、ウイロイドに特異性が高く、定量性のある cRNA プローブ^{7,33)}をラジオアイソトープ並みに高感度検出が可能なデオキシゲニン (DIG)¹⁷⁾で標識したものをを用いた。ハイブリダイゼーションは、植物組織内におけるウイルスの局在性を調べるための手法で、核酸抽出操作を必要としないティッシュプリントハイブリダイゼーション¹⁾の変法として、組織切片をナイロンメンブレンに直接押しつけてウイロイド核酸を吸着させる方法(ティッシュプロット)により行った。本法ではハイブリダイゼーション液にホルミアミドを含むため、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションでの加温により、ウイロイドが 1 本鎖の環状構造に変性し、プローブが結合できる¹⁾。

このティッシュプロットハイブリダイゼーション (TBH) を応用したウイロイドフリー母株選抜のための検定系では伏せ込み中の採穂用親株あるいは台刈後の新展開葉を試料とした検定で、*CSVd* が検出されない株由来の苗での発病はみられていない。また、データには示していないが、県内 6 地域のキク産地における 2002 年採穂用親株について累計 63 品種 674 点において同様の方法で *CSVd* に感染していない株の選抜を行い (2001 年 9 月)、健全と診断された株を親とした苗でのわい化症

状の発生は 2002 年 8 月現在みられていない。

この検定系における特徴は、試料採取、検定葉のメンブレン処理および加熱による固定処理までを農業改良普及センター改良普及員が担当し、県農業研究センターにおいてハイブリダイゼーション反応および検出を行い、判定結果を現場にフィードバックするという「現場と研究の連携」にある。ただし、大規模に小ギク苗を出荷する団体にとっては TBH による検定を独自に実施できる環境を整えることが望ましい。

本研究では *CSVd* プローブに、より特異性が高く、定量性に優れる cRNA プローブ^{7,16,33)}を用いたが、一連の検定における簡素化あるいは低コスト化を実現するために、プローブ調製の容易な cDNA プローブ^{7,16)}の検討や、標識酵素の検討が求められる。この点について山下³³⁾は cRNA プローブによる検出精度は cDNA プローブより感度の高いことを報告しており、筆者も予備試験で cDNA プローブによる検出限界が cRNA プローブの場合よりも 10 倍程度劣ることを経験している。また、本研究では高感度検出が可能な基質 CSPD を用いて X 線フィルムで感光させる方法を採用したが、この方法は高価である上に、暗室やフィルムの現像という操作を伴う。このため、予備試験で NBT (ニトロブルーテトラゾリウム) と BCIP (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸-トリジン塩) を用いる安価かつ簡便な発色反応法を試みたが、青色発色のため、葉汁との識別が難しかった。これらのような簡便性、低コスト化については母株導入以後どの場面でウイロイドフリーの検定を実施すべきかを含めて十分に議論する必要がある。

V 摘 要

2000 年岩手県内の小ギク産地で発生したわい化症状の原因を検討し、その対策として採穂用のウイロイドフリー親株の選抜法を確立した。得られた結果は次の通りである。

(1)一関市、水沢市、江刺市、紫波町および二戸市の小ギク圃場で発生したわい化症状株からリターン・ゲル電気泳動法 (R-GE) によってウイロイド様低分子核酸が検出された。このうち、一関市の試料について DIG 標識したキクわい化ウイロイド (*CSVd*) に相補な RNA プローブを用いてドットハイブリダイゼーション (DBH) に供したところ、*CSVd* が検出された。このことから、岩手県におけるキクわい化病の発生がはじめて明らかとなった。また、R-GE で検出されなかった試料でも DBH で *CSVd* が検出され、無病徴感

染している事例がみられた。なお、無病徴感染を含み、CSVd の感染を確認した品種は紅とんぼ、入船、白舟、はるか、まなざしおよびやよいであった。

- (2) CSVd の検定法として R-GE, DBH, TBH (ティッシュプロットハイブリダイゼーション) を比較したところ、TBH が最も簡便で、R-GE に比較して高感度であったことから、ウイロイドフリー親株の選抜法として望ましいと考えられた。
- (3) TBH を用いたウイロイドフリー親株の選抜法の実用性を評価するために、伏込み期における検定、生育中の発病状況および収穫後の展開葉での検定を行った。伏込み期に CSVd の感染が確認された株は廃棄し、CSVd が検出されなかった親株から増殖させた苗を圃場に定植したところ、すべての品種・系統において発病は認められなかった。また、刈後の株の展開葉の検定では全品種・系統において CSVd は検出されなかった。
- (4) 以上のことから、TBH による健全親株の選抜法はキクわい化病の防除対策として実用的な手法であると考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、(株)キリンビール江刺ホップ管理センター門馬孝之博士には実験手法並びに貴重な御助言をいただいた。(財)岩手県生物工学研究センター科学技術特別研究員黒田智久博士には CSVd 核酸試料の供与と御助言をいただいた。岩手県農業研究センター専門技術員室高橋 晋上席専門技術員、同花き研究室小田島雅技師、県内農業改良普及センターの花き担当改良普及員並びに岩手県経済農業協同組合連合会(県経済連、現全国農業協同組合連合会岩手県本部)園芸育苗センター担当職員には特にハイブリダイゼーション法導入の実用性評価に際し、種々ご便宜いただいた。以上の方々に対し、ここに記して衷心より感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Chia, T.F., Y.S. Chan and N.H. Chua (1995). Tissue-print hybridization for detection and localization of plant viruses. *Molecular methods in plant pathology*. (edited by R.P. Singh and U.S. Singh). Lewis publishers, U.S.A., pp.145-149.
- 2) Daughtrey, M.L., R.K. Jones, J.W. Moyer, M.E. Daub and J.R. Baker (1997). *Tospoviruses strike the greenhouse industry* : INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Dis.* 81: 1220-1227.
- 3) Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 4: 19-21.
- 4) Diener, T. O. and Lawson, R. H. (1973). *Chrysanthemum stunt: a viroid disease*. *Virology* 51: 94-101.
- 5) Dimock, A. W. (1947). *Chrysanthemum stunt*. *N. Y. State Flower Grower's Bull.* 26, Oct., p.2.
- 6) 古屋廣光・松本 勤 (1994). 秋田県: 野菜・花き(東北各県における病害発生の変遷). 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編), 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, p.64-68.
- 7) 長谷 修 (1995). RNA ドットプロットハイブリダイゼーション法(「植物生産農学実験マニュアル」, 日向康吉・羽柴輝良編), 東京. p.233-236.
- 8) 平田行正 (2000). JA 和歌山県農のウイロイドフリー苗の供給システム, 農業技術体系第6巻(追録第2号・2000年), 農文協, 東京. 206の2-6.
- 9) 岩手県, 「花きに関する資料」(農産園芸課)
- 10) 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ロイドについて. *北日本病虫研報* 49: 73-75.
- 11) 勝部和則・川村武寛・猫塚修一 (2002). 岩手県内におけるキクわい化病の発生と Tissue blot hybridization 法による検出. *日植病報* 68: 53 (講要).
- 12) 加藤公彦・牧野孝宏・亀谷満郎・花田 薫 (1995). トマト黄化えそウイルス普通系統(TSWV-O)によるキクえそ病(新称). *日植病報* 61: 274 (講要).
- 13) 楠 幹生・松本由利子・中西正憲・祖一範夫・十河和博 (1993). 香川県におけるキクわい化病の発生状況. *香川農試研報* 44: 19-26.
- 14) 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ロイドの検出. *関西病虫研報* 35: 7-12.
- 15) 楠 幹生・寺見文宏・十河和博 (1994). RT-PCR のためのキュウリモザイクウイルスおよびキク矮化ウイロイドの簡易抽出法. *関西病虫研報* 36: 67-68.
- 16) 守川俊幸・堀井香織・築尾嘉章 (1997). 富山県で発生したトマト黄化えそウイルス (Tomato spotted wilt virus: TSWV) によるレタス黄化えそ病(新称)とキクえそ病. *北陸病虫研報* 45: 11-16.

- 17) Nikolaeva, O.V. (1995). Nucleic acid hybridization methods in diagnosis of plant viruses and viroids. *Molecular methods in plant pathology* (edited by R.P. Singh and U.S. Singh). Lewis publishers, U.S.A. pp.133-144.
- 18) 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. 指標品種への接木接種によるウイルス検定. *日植病報* 43: 372-373 (講要).
- 19) Palukaitis, P. and R.H. Symons (1979). Hybridization analysis of *Chrysanthemum stunt viroid* with complementary DNA and quantitation of viroid RNA sequences in extracts of infected plants. *Virology* 98: 238-245.
- 20) 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ロイドの検出. *北日本病虫研報* 48: 113-117.
- 21) Schumacher, J., N. Meyer, D. Riesner and H.L. Weidemann (1986). Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by "Return"-gel electrophoresis. *J. Phytopathology* 115: 332-343.
- 22) 塩飽邦子・岩井豊通・山元義久 (1996). ドットブロットハイブリダイゼーションによるキクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum stunt viroid*) の検定. *関西病虫研報* 38: 1-6.
- 23) 塩飽邦子・岩井豊通・藤野守弘・渡辺和彦 (1999). 低温処理および茎頂培養によるキクわい化ウイロイドの除去. *兵庫農技研報 (農業)* 47: 68-71.
- 24) 杉山 悟 (1994). 青森県：草花・牧草・芝草を含む (東北各県における病害発生の変遷). 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編), 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, p.29-30.
- 25) 高橋 壯 (1992). 植物のウイロイド病. *北日本病虫研報* 43: 1-6.
- 26) 高橋 壯・吉川信幸 (1994). 東北地方で問題となった病害等：ウイロイド病. 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編), 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, p.180-184.
- 27) 栃原比呂志 (1993). キクわい化病 (土崎常男ら編「作物ウイルス病事典」), 全国農村教育協会, pp.504-509.
- 28) 山口 隆 (1979). キクの無病苗生産に関する諸問題 [1]. *農及園* 54: 57-60.
- 29) 山口 隆 (1979). キクの無病苗生産に関する諸問題 [2]. *農及園* 54: 331-335.
- 30) 山口 隆 (1979). キクの無病苗生産に関する諸問題 [3]. *農及園* 54: 431-436.
- 31) 山口 隆 (1979). キクの無病苗生産に関する諸問題 [4]. *農及園* 54: 681-636.
- 32) 山本英樹・木口忠彦・大屋俊英 (2001). 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.
- 33) 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 (講要).
- 34) 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 (1997b). 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2報) キクわい化病無毒化の検討. *園学雑* 66 別 1: 526-527 (講要).

Occurrence and control of Chrysanthemum stunt disease in Iwate prefecture using stock plants selected as viroid-free.

Kazunori KATSUBE, Takehiro KAWAMURA*, Manami WATAMABE and Teruo SANO**

Summary

In 2000, chrysanthemums showing irregular stunting were observed widely in Iwate prefecture. The causal agent of the irregular stunting of chrysanthemum was investigated and practical control was established. Obtained results were as follows:

- (1) Low molecular weight viroid-like RNA nucleic acid was detected by return-gel electrophoresis (R-GE) from stunted chrysanthemum collected in Ichinoseki, Mizusawa, Esashi, Shiwa and Ninohe with. From the Ichinoseki samples, *Chrysanthemum stunt viroid* (*CSVd*) was detected with dot blot hybridization using DIG-labeled complementary RNA probe (DBH). In this hybridization, *CSVd* was detected even from symptomless plants which were negative for the viroid-like RNA by R-GE. These results indicated that chrysanthemum stunt disease, caused by *CSVd*, occurred in Iwate prefecture. This is the first report on the detection of *CSVd* from chrysanthemums cultivated in Iwate prefecture. Cultivars from which *CSVd* was detected were Benitonbo, Irifune, Shirafune, Haruka, Manzashi and Yayoi.
- (2) Tissue blot hybridization (TBH) was easy to perform compared to R-GE and DBH, and sensitive enough to diagnose *CSVd* in field-growing chrysanthemums.
- (3) The chrysanthemum cutting propagated from mother stocks which were negative for *CSVd* by TBH diagnosis, did not show any stunting symptoms in the next growing season in the field.
- (4) These results indicate that TBH is a practical method for screening *CSVd*-free mother stocks and is available for sustainable chrysanthemum production.

keywords : chrysanthemum stunt disease, viroid, occurrence, control, tissue blot hybridization, parent plants screening

*Mizusawa Agricultural Extension Center

** Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University