

# キク矮化ウイルス抵抗性小ギク品種の選抜技術の開発および系統育成

栗原冴子、平井弓子<sup>1)</sup>、喜多晃一<sup>1)</sup>、市毛秀則<sup>2)</sup>、石井亮二<sup>3)</sup>、郷内 武

(茨城県農業総合センター生物工学研究所)

## 要約

キク矮化ウイルス (CSVd) はキク矮化病を引き起こし、本県ではその被害が増加傾向にある。CSVd への抵抗性には品種間差があり、根本的な解決のためには抵抗性品種の育成が重要である。そこで、選抜の過程で必要となる CSVd 感染の有無を確認する効率的な選抜方法の確立と、抵抗性育種素材の選抜および優良系統の育成を行った。選抜技術として開発した、培養物を用いた試験管接木接種法は、定法のポット接木接種法と比べて同等の接種効率で、かつ省スペースで多サンプルの取り扱いが可能となり、時期を選ばずに実施できる。さらに、爪楊枝法を用いた direct RT-PCR 検定に用いる植物体の部位は、上位葉および茎が適しており、接木部分の固定にシリコンチューブを用いることで接種効率が高くなった。また、当所の保存品種および現地収集品種 131 品種から育種素材となる抵抗性品種を選抜するとともに、それらを親として優良な抵抗性系統である 8 月咲き紫桃色の '18c27' を育成した。

キーワード：交雑育種、小ギク、品種、キク矮化ウイルス (CSVd)、抵抗性

## 1. はじめに

キク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) は、全国各地で生産されており、我が国の切り花類の中で出荷量・作付面積ともに第 1 位 (農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課園芸統計班、2021) の重要品目である。茨城県では、特に小ギクの生産割合が高く、2019 年には年間出荷量が 2140 万本、栽培面積が 101 ha であり、県内の切り花キク出荷量のうち 70% を占める (農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課園芸統計班、2020)。本県の小ギク生産は、7 月の東京盆、8 月の旧盆、9 月の彼岸の物日需要向けが主体であり、東京都中央卸売市場の小ギク出荷数量 (2020 年産) のうち、6 月から 10 月にかけては茨城県産が約 40% を占め、全国第 1 位である (茨城県営業戦略部東京渉外局県産品販売促進チーム、2021)。

キク矮化ウイルス (*Chrysanthemum stunt viroid*、以下「CSVd」) は、キク矮化病を引き起こし、本県では 2005 年に主要な産地において矮化病が初めて確認されて以来、被害が増加傾向にあり、その対策が問題となっている。対策としては、感染株の抜き取りや作業器具の消毒があげられる (愛知県農業総合試験場園芸研究部・花き研究室、2013) が、根本的な解決のためには抵抗性品種の育成が必要である。

これまでの研究から、輪ギクおよびスプレーギクにおいて CSVd に対する抵抗性には品種間差異があることが報告されている (Omori *et al.*, 2009 ; Nabeshima *et al.*, 2012 ; 長谷川ら、2016) が、小ギクにおいては、効率的な抵抗性品種のスクリーニング方法が未だに確立されていない。

抵抗性系統の選抜には、検定対象株の穂を保毒株に接木接種し、穂への CSVd の移行および増殖を検定する必要がある。接種法としては定法であるポット接木接種法が用いられるが、台木の養成を待つため実施時期に限られること、多サンプルの処理にはスペースを要することが課題である。そこで本研究では、ポット接木接種法と同等の接種効率で、通年実施可能で、さらに省スペースで多サンプルの処理を可能とするため、培養物を用いた新たな試験管内接木接種法について検討した。さらに育種素材となる抵抗性品種を選抜するとともに、それらを親として優良な抵抗性系統を作出することを試みた。

## 2. 材料および方法

- 1) 現 茨城県農林水産部産地振興課
- 2) 現 茨城県農業総合センター園芸研究所
- 3) 現 茨城県農業総合センター企画情報部専門技術指導員室

## 2. 1 効率的な CSVd 抵抗性検定方法の確立

CSVd 感受性小ギク品種‘ホタル’を検定品種（穂木）として、CSVd に罹病した‘千都の輝’を台木として供試した。

ポット接木接種法では、台木は3号ポリポット（直径9cm）に定植し養成した。穂木は基部をくさび状にし、葉を除去して約2cmに調整後、台木の上部5mmの切れ込み部に割り接ぎした。接木部分はパラフィルムで固定した。

試験管内接木接種法では、台木は無菌培養で維持した培養物の基部を約2cmに調整した。穂木は培養物をポット接木接種法と同様に調整し、台木の上部5mmの切れ込み部に割り接ぎした。接木部分はアルミ箔又はシリコンチューブで固定し、接木した植物体をMS培地（pH5.8）に置床した。

接木後は20℃・16時間日長の人工気象室または植物培養室で養成した。接木から1、2、3、4、5週間後および2カ月後に、上位葉、茎、下位葉をサンプリングし、爪楊枝法を用いた direct RT-PCR 検定（Hosokawa *et al.*, 2006）により検定品種における CSVd 感染の有無を調査した。また、それぞれの方法の接種効率を比較するために、作業効率（1時間当たりの接木本数）、接木活着率、面積効率（面積当たりの取り扱い個体数）を調査した。

## 2. 2 交雑親に用いる CSVd 抵抗性品種のスクリーニング

当所の保存品種・系統および県内の小ギク産地より収集した計131品種・系統について、CSVd に罹病した‘千都の輝’を台木としたポット接木接種法および試験管内接木接種法により CSVd を接種した後、爪楊枝法を用いた direct RT-PCR 検定により感染の有無を検定した。抵抗性品種の指標として‘岡山平和’（Matsushita *et al.*, 2012）を用いた。ポット接木接種法では接木1か月後および3か月後、試験管内接木接種法では接木20日後および30日後において CSVd が検出されない品種・系統を高度抵抗性、検出頻度が20%以下の品種・系統を中度抵抗性と判定した。direct RT-PCR は One Step SYBR® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit（タカラバイオ）を用いたリアルタイム RT-PCR で、上位葉を3回突き刺した有頭シガ昆虫針6号を反応液に1分間浸漬したものをテンプレートとし、42℃（5分）→95℃（10秒）→（95℃（5秒）→60℃（30秒））×40サイクル→95℃（15秒）→60℃（1分）で行った。プライマーの塩基配列は表1のとおり（松下ら、2006）。

表1 direct RT-PCR に用いたプライマーと塩基配列（松下ら、2006）

プライマー名	塩基配列
CSVd-Real 1	5'- tccgacgagatcgcggc -3'
CSVd-Real 2	5'- gaagaccgggctagggcaga -3'

## 2. 3 育成集団からの CSVd 抵抗性小ギク系統の選抜

上記の方法でスクリーニングした CSVd 高度抵抗性品種（CSVd-R1、R2、R3）を交配親として交雑を行い、得られた実生個体群を圃場に展開して、草丈、花色、葉色および草姿に優れるものを一次選抜した。一次選抜した系統について、茨城県花き栽培基準に準じた栽培管理を行い、各系統の開花時期、切花長、草姿等の特性を調査した。栽培特性および切り花形質に優れる系統について、CSVd に罹病した‘千都の輝’を台木、検定対象系統を穂木として、ポット接木接種法により CSVd の接種を行った。接種3か月後に最上位展開葉を採取し、爪楊枝法を用いた direct RT-PCR 検定によりスクリーニング時と同様に CSVd 感染の有無を確認した。さらに、CSVd を接種した各系統を台木（接種源）から切り離れた後の植物体より、RNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いて RNA を抽出し、One Step SYBR® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit（タカラバイオ）を用いたリアルタイム RT-PCR で CSVd 感染の有無を確認した。

## 3. 結果

### 3. 1 効率的な CSVd 抵抗性検定方法の確立

定法であるポット接木接種法（図1a）において上位葉または茎では接種後3週間から CSVd が安定して検出されたのに対し、培養物を用いた試験管内接木接種法（図1b）は、安定して検出されるまでに4週間を要した（図2）。爪楊枝法を用いた direct RT-PCR 検定に用いる部位は両接種法ともに上位葉および茎が適しており、

下位葉は長期間の接種によっても安定した検出が認められず、検定には適さなかった（図2）。

また、それぞれの接種法の効率を調査した結果、1時間当たりの接木本数（作業効率）はポット接木接種法が29.0本であったのに対し、接木部のアルミ箔固定による試験管内接木接種法が9.0本と少なかったが、シリコンチューブ固定による試験管内接木接種法が20.6本とアルミ箔固定に比べて効率が向上した。接木活着率はポット接木接種法が97.6%と最も優れ、シリコンチューブを使用した試験管内接木接種法が87.5%、アルミ箔を使用した試験管内接木接種法が73.3%であった。接木後の占有面積を示す面積効率は試験管内接木接種法が771.6本/m<sup>2</sup>と、ポット接木接種法の123.5本/m<sup>2</sup>に比べて約6倍のサンプルを取り扱い可能であった（表2）。

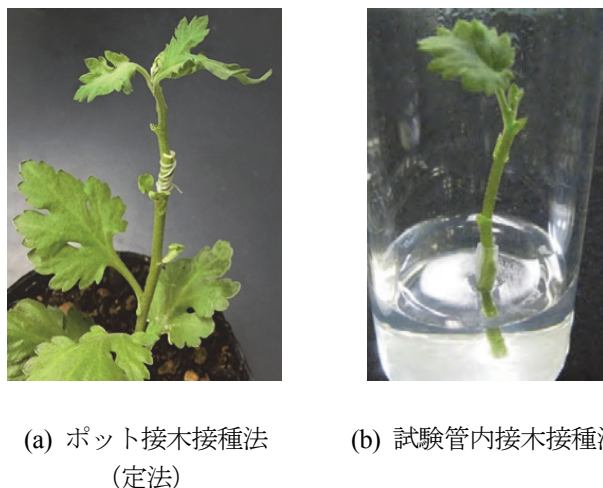


図1 CSVd 接木接種法の様子

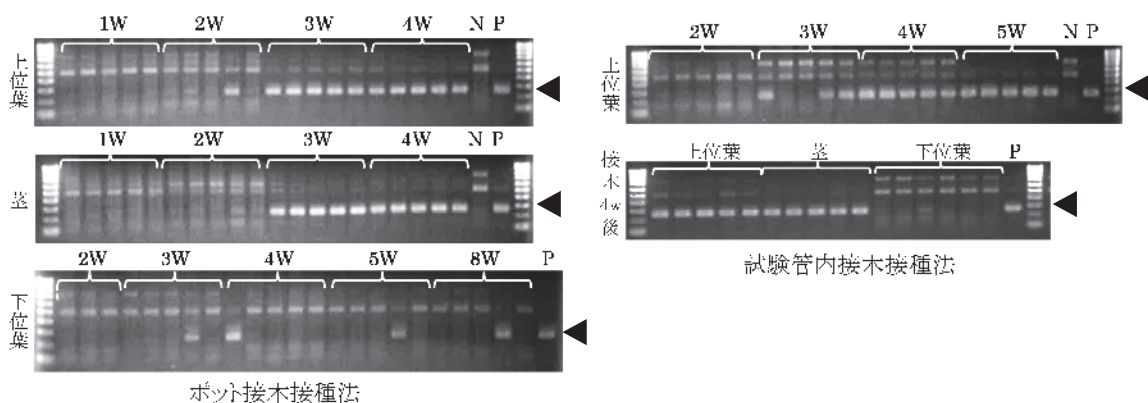


図2 ポット接木接種法および試験管内接木接種法による CSVd 検出結果（2015年）  
1W～8W：接木1～8週間後、N：健全株、P：罹病株。

表2 接木接種法の違いによる作業効率等の比較（2015年）

接木種類	調査項目	作業効率 (本/時間)	接木活着率 (%)	面積効率 (本/m <sup>2</sup> )
ポット接木接種		29.0	97.6	123.5
試験管内接木接種（アルミ箔）		9.0	73.3	771.6
試験管内接木接種（シリコンチューブ）		20.6	87.5	771.6

### 3. 2 交雑親に用いる CSVd 抵抗性品種のスクリーニング

当所の保存品種・系統および現地収集品種の計 131 品種・系統について、前述の接種法および検定法により、CSVd 抵抗性品種のスクリーニングを実施した。

ポット接木法では 129 品種を供試し、91 品種が接木接種 1 か月後に検出頻度が 100%を示し、CSVd に感受性を示した（データ省略）。表 3 に接木接種 1 か月後に検出頻度が 100%未満であった 38 品種のうち 28 品種を示す。‘岡山平和’をポット接木接種法における抵抗性品種の指標として抵抗性を判定した結果、‘CSVd-R3’、‘CSVd-R1’、‘CSVd-R2’が‘岡山平和’と同等以上の高度抵抗性を示した。

試験管内接木接種法では、ポット接木接種法に供試した一部の品種に新たに 2 品種を加えた計 18 品種を供試した（表 4）。3 品種が接木接種 20 日後に検出頻度が 100%を示し、CSVd に感受性を示した。抵抗性品種の‘岡山平和’における接種後 20 日および 30 日後の検出頻度はいずれも 0%であった。供試品種・系統における検定の結果、‘CSVd-R3’が高度抵抗性、‘CSVd-R4’、‘CSVd-R5’が中度抵抗性を示した。また、‘CSVd-R3’はポット接木接種法および試験管内接木接種法のいずれにおいても高度抵抗性を示した一方、‘品種 L’、‘品種 Z’はポット接木接種法と試験管内接木接種法とで CSVd に対する反応性が異なった。

以上の結果から、‘CSVd-R1’（6 月咲き白色）、‘CSVd-R2’（11～12 月咲き黄色）、‘CSVd-R3’（8 月咲き赤色）を高度抵抗性品種、‘CSVd-R4’（7 月咲き赤色）、‘CSVd-R5’（8 月咲き赤色）を中度抵抗性品種とした。

### 3. 3 育成集団からの CSVd 抵抗性の小ギク系統の選抜

高度抵抗性と判定した ‘CSVd-R1’、‘CSVd-R2’ および ‘CSVd-R3’ の 3 品種を片親として交雑し、13 組合せ 1,673 粒の種子を得た（表 5）。これらの実生について圃場における特性調査により開花期、草姿および花色に優れる 10 系統を一次選抜した（表 5、6）。これらの一次選抜系統について CSVd 抵抗性検定を行った結果、強接種圧条件においても CSVd 検出個体数が供試個体数の半数以下と抵抗性を示し、切花長や草姿が優れ、開花時期が需要期に合う 8 月咲き紫桃色系統の ‘18c27’（図 3、4）を有望系統として選抜した（表 7）。なお、紫桃色は生産や流通の現場では赤色として扱われる色である。

表3 ポット接木接種によるCSVd 抵抗性品種候補の選定

品種・ 系統名	2016年				2017年				抵抗性 評価
	接種1か月後		接種3か月後		接種1か月後		接種3か月後		
	検出数 /供試数	検出頻度 (%)	検出数 /供試数	検出頻度 (%)	検出数 /供試数	検出頻度 (%)	検出数 /供試数	検出頻度 (%)	
CSVd-R3	0/5	0	0/5	0	—	—	—	—	高度抵抗性
品種A	4/5	80	0/5	0	—	—	—	—	
品種B	2/5	40	2/5	40	0/5	0	2/8	25	
品種C	3/7	43	2/4	50	2/4	50	1/4	25	
品種D	2/4	50	3/5	60	5/5	100	—	—	
品種E	4/5	80	4/5	80	6/10	60	0/5	0	
品種F	0/5	0	5/5	100	5/5	100	—	—	
品種G	1/4	25	3/3	100	—	—	—	—	
品種H	2/5	40	5/5	100	—	—	—	—	
品種I	3/5	60	5/5	100	6/6	100	—	—	
品種J	3/5	60	5/5	100	—	—	—	—	
品種K	3/5	60	5/5	100	—	—	—	—	
品種L	3/5	60	5/5	100	9/10	90	4/5	75	
品種M	3/5	60	5/5	100	—	—	—	—	
品種N	3/5	60	5/5	100	—	—	—	—	
品種O	4/5	80	5/5	100	1/5	20	1/4	25	
品種P	5/6	83	5/5	100	—	—	—	—	
品種X	3/5	60	4/5	80	0/5	0	0/5	0	
品種Z	3/4	75	5/5	100	—	—	—	—	
品種Q	—	—	—	—	3/4	75	—	—	
CSVd-R1	—	—	—	—	0/4	0	0/4	0	高度抵抗性
品種R	—	—	—	—	4/5	80	—	—	
品種S	—	—	—	—	3/4	75	2/2	100	
CSVd-R2	—	—	—	—	0/5	0	0/4	0	高度抵抗性
品種T	—	—	—	—	3/5	60	6/6	100	
品種U	—	—	—	—	3/4	75	—	—	
品種V	—	—	—	—	3/4	75	4/4	100	
品種W	—	—	—	—	2/4	50	3/4	75	
岡山平和	0/5	0	1/5	20	0/3	0	0/7	0	



表4 試験管内接木接種による CSVd 抵抗性品種候補の選定 (2017 年)

品種・ 系統名	接種 20 日後			接種 30 日後			抵抗性評価
	検出数 /供試数	検出頻度 (%)	検出濃度 <sup>a)</sup>	検出数 /供試数	検出頻度 (%)	検出濃度 <sup>a)</sup>	
CSVd-R3	0/5	0	—	0/5	0	—	高度抵抗性
CSVd-R4	1/5	20	極低	0/5	0	—	中度抵抗性
CSVd-R5	0/5	0	—	1/5	20	低	中度抵抗性
品種 L	0/5	0	—	0/5	0	—	b)
品種 A	6/6	100	高	6/6	100	高	
品種 B	2/5	40	低・中	3/5	60	中・高	
品種 E	0/5	0	—	5/5	100	高	
品種 F	3/5	60	低・中	4/5	80	高	
品種 G	0/2	0	—	2/2	100	中	
品種 H	0/5	0	—	5/5	100	中・高	
品種 I	2/4	50	ND	3/4	75	ND	
品種 J	5/5	100	高	—	—	—	
品種 K	2/4	50	中・高	4/4	100	高	
品種 O	3/6	50	低・中	2/6	33	低・中	
品種 P	4/5	80	ND	—	—	—	
品種 X	0/5	0	—	2/5	40	低	
品種 Y	3/3	100	高	3/3	100	高	
品種 Z	0/4	0	—	2/4	50	低	
岡山平和	0/3	0	—	0/3	0	—	抵抗性品種

a) 濃度と PCR における Ct (サイクル数) 値には相関があり、高: Ct<23、中: 23≤Ct<26、低: 26≤Ct<29、極低: 29≤Ct と分類した。

b) 品種 L はポット接木接種において感受性品種と判断された。

表5 CSVd 抵抗性小ギク系統作出のための交配組み合わせと一次選抜結果 (2018 年)

種子親	花粉親	種子数 (粒)	発芽率 (%)	定植数 (株)	選抜数 (株)
CSVd-R3	品種 B	1,272	70.1	834	6
CSVd-R3	常陸オータムゆうひ	1	0	0	0
CSVd-R3	15c78	42	26.2	8	1
品種 B	CSVd-R3	60	28.3	17	0
常陸オータムゆうひ	CSVd-R3	26	0	0	0
CSVd-R1	品種 C	26	53.8	13	2
品種 C	CSVd-R1	17	47.1	7	0
常陸サマースノウ	CSVd-R1	28	89.3	22	0
CSVd-R2	常陸オータムゆうひ	31	35.5	8	0
CSVd-R2	15c78	1	0	0	0
CSVd-R2	品種 F	3	66.7	1	0
常陸オータムゆうひ	CSVd-R2	148	80.4	105	1
15c78	CSVd-R2	18	88.9	14	0
合	計	1,673	66.6	1,029	10

表 6 作出した系統の特性調査結果 (2019 年)

作型 <sup>a)</sup>	系統名	花色	発蕾日 <sup>b)</sup>	開花日 <sup>c)</sup>		切花長 (cm)	切花重 (g)	節数	花蕾数	FF <sup>d)</sup>	CSVd 抵抗性 <sup>e)</sup>	有望系統
				始	終							
7 月	18c02	赤紫	6/12	7/15	7/29	123.4	116.4	45	56	3	無	
	18c23	白	6/11	7/17	7/31	111.6	95.8	48	73	4	強	
8 月	18c27	紫桃	7/7	8/9	9/4	95.6	74.6	43	44	2	有	○
	18c29	紫桃	7/7	7/26	8/14	106.0	82.8	47	40	2	強	
	18c47	白	6/24	7/31	8/23	93.2	79.6	35	37	2~3	有	
	18c106	紫桃	— <sup>f)</sup>	9/15	9/23	144.2	129.2	42	72	3~4	有	
9 月	18c52	紫桃	7/24	8/23	9/9	81.0	87.4	43	18	2	無	
	18c61	淡桃	7/29	9/15	9/25	89.0	102.6	31	62	2~3	無	
	18c62	淡桃	7/26	9/9	9/20	70.8	88.4	31	54	2	強	
10 月	18c75	黄	9/13	10/16	10/25	74.4	58.6	46	42	2~3	強	

a) 7 月作型は 3 月下旬、8 月作型は 4 月下旬、9 月作型は 5 月下旬、10 月作型は 6 月下旬に定植し、いずれも定植から 7~10 日後に摘心を行い、3 本仕立てとした。

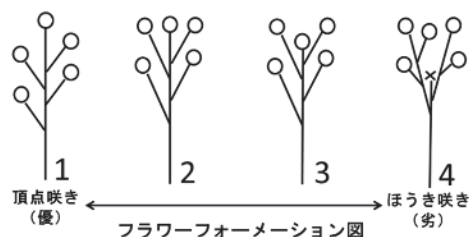
b) 全体の 50%以上が発蕾した日。

c) 頂花の管状花が外側から 2~3 周開花した時を開花とし、開花本数が全体の 5%に達した日を「始」、95%に達した日を「終」とした。

d) フラワーフォーメーションの略 (右下図参照)。

e) 接木接種法による CSVd 抵抗性検定において、「強」は接種 3 か月後において感染が認められなかった系統、「有」は接種 3 ヶ月後に感染が認められた個体が全体の 1/2 以下であった系統、「無」は接種 3 か月後に感染が認められた個体が全体の 3/4 以上であった系統を示す (n=4)。

f) データなし。



#### 4. 考察

キク矮化ウイルス (Chrysanthemum stunt viroid, CSVd) は、キク矮化病を引き起こし、主な病徴は葉が小型化し節間が短縮して矮化し、挿し穂の発根が悪くなることなどである (松下、2016)。

CSVd 感染によるキク矮化病が問題となり始めてから 20 年程度経過しており、耕種的対策として、使用する鉢等の火炎滅菌法および次亜塩素酸ナトリウム浸漬法 (中村ら、2013a) が提案されているが、作業効率などの面から生産現場における実施には課題がある。また、根を介した CSVd の接触伝染の可能性も指摘されており (福田ら、2012)、栽培上の対策によってまん延を防ぐことは非常に困難

である。さらに、CSVd のキクに対する病原性は品種によって異なることが明らかになっており、土井・加藤 (2004) は CSVd に感染させたキク 10 品種を比較し、健全個体と比べてほとんど矮化しない品種や健全個体の半分程度まで矮化した品種があったと報告している。また、中村ら (2013b) は愛知県内の外観上病徴のない



図 3 '18c27' の花色



図 4 '18c27' の草姿

291 品種について、葉をサンプリングし、高濃度保毒品種を検出できる RT-PCR/電気泳動法と、低濃度保毒品種を検出できる RT-PCR/ハイブリダイゼーション法で調べたところ、それぞれ 31%と 53%の品種で CSVd が検出されたことを報告している。そのため、生産現場における CSVd 感染には、感染していても無病徴または弱い病徴しか示さないような品種が感染源となっている可能性がある。

以上のことから、CSVd 抵抗性品種の利用は極めて有効な防除手段となり得る。CSVd 抵抗性キク育種は各地で精力的に行われており、愛知県においてスプレーギク（長谷川ら、2016）、奈良県において小ギク（仲、2020）の抵抗性品種が育成されている。小ギクは本県の主要切花の一つであり、本県においても気象条件等に適する CSVd 抵抗性品種の育成を進める必要がある。本研究では育成にあたり、既存の遺伝資源の抵抗性評価を行った後に、それらを親に用いた交雑育種により抵抗性品種を育成することとした。

選抜過程における CSVd の接種検定は、安定性と簡便性が求められるが、定法であるポット接木接種法はあらかじめポットで栽培した保毒台木を準備する必要があることと、接木実施に適する時期が限られることが問題であった。これまでに Matusita *et al.* (2009) により試験管内における保毒台木への接木と、その後の挿し穂植物体における CSVd の移行が確認されており、本研究ではこの手法を改変して選抜過程の簡易検定法とすることを試みた。開発した試験管内接木接種法は、シリコンチューブを用いることにより活着率が向上し、RT-PCR によって検出されるまでに 1 週間長く要するものの、省スペースで多サンプルの取り扱いが可能となり、有効な方法であった。また、CSVd を保毒する培養物と検定対象の培養物があれば時期を選ばずに実施できる点が定法よりも優れ、選抜過程における簡易な検定法として活用できる。CSVd の検出方法としては、昆虫針や爪楊枝を利用した direct RT-PCR 検定の有効性がすでに示されており（Hosokawa *et al.*, 2006）、当所においても標準手法として生産現場等の植物体の検定を行っている。本研究では、爪楊枝法を用いた direct RT-PCR 検定に用いる部位は、両接種法ともに上位葉および茎が適しており、下位葉は上位葉や中位葉より長く接種を続けたとしても安定した検出が認められず、検定に用いるのに適さないことが示された。また、昆虫針や爪楊枝を利用した direct RT-PCR 検定は 2 種類のウイルスのマルチプレックス検出にも適用可能であることが示されており（Hosokawa *et al.*, 2007）、今後、新たなウイルスおよびウイルス検定が必要となった際にも速やかに対応可能である。

Matsushita *et al.* (2012) は、CSVd 抵抗性品種として‘岡山平和’を見出しており、本研究においても、‘岡山平和’と同様に‘CSVd-R1’、‘CSVd-R2’および‘CSVd-R3’は CSVd に対して安定した高度抵抗性を示した一方、‘CSVd-R4’や‘CSVd-R5’のようにわずかに検出個体が現れる中度抵抗性を示す系統も確認された。このことは、CSVd に対する抵抗性を有する品種・系統間において、その抵抗性に強弱がある可能性を示唆している。長谷川ら (2016) は定量的 PCR による植物体内の CSVd 濃度を指標として、抵抗性程度を I ~ III 型（数字が大きいくほど検出量が低い）に分類している。また、抵抗性が I 型の個体と II 型の個体との交雑後代から、抵抗性がより強い III 型の系統が出現したことも示されており（長谷川ら、2016）、CSVd 抵抗性への複数遺伝子の関与と、それらの相加的効果の可能性が示唆されている。本研究において選抜した‘18c27’は接種 3 か月での感染個体数が全体の 1/2 以下で、実用的な抵抗性として十分であるという評価により選抜した。

‘18c27’は I ~ II 型の抵抗性を有すると思われ、他の抵抗性系統との交雑により高度抵抗性個体が獲得できることが期待される。‘18c27’は、さらに今後の切花特性評価によって品質の安定性を評価し、品種候補として調査を続け、品種化の可否を検討する。その他の CSVd 抵抗性を有する育成系統は中間母本として今後の育種に活用する予定である。

今回用いた接種検定法は 3~4 週間と長期間を要し、その結果は必ずしも安定しないという問題がある。本研究においても接木操作や効率性の面では方法を確立したが、接種方法の違いおよび反復検定により、結果が異なる事例も一部で認められた。また、ポット接木接種検定における‘品種 A’のように、接種 1 か月後に 80%の検出頻度であったものが接種 3 か月後には 0%となるなど、検定の確実性には課題が残されている。このような検定の不安定性を克服するためには、抵抗性遺伝子に連鎖する DNA マーカーの利用が効果的である。CSVd 抵抗性については、抵抗性品種の‘岡山平和’と CSVd 罹病性品種との交雑後代より抵抗性を示す個体が現れたことから、遺伝形質であることが示された（Matsushita *et al.*, 2012）が、その遺伝様式等は明らかにされておらず、選抜マーカーも未開発である。また、抵抗性は複数の量的遺伝子により支配されている可能性がある。栽培ギクは高次倍数体であり、その遺伝解析は困難であるが、一方で 2 倍体の近縁野生種であるキクタニギクの概要配列が公開されており（Hirakawa *et al.*, 2019）、これを活用した効率的な DNA マーカー開発



技術が報告されている (Sumitomo *et al.*, 2019)。これらの情報や技術を活用することにより、CSVd 抵抗性に連鎖する DNA マーカー開発が進展することが期待される。

### 謝辞

本研究の推進にあたり、JA グループ茨城花き流通部会の皆様、専門技術指導員室をはじめとする茨城県農業総合センター、各農林事務所経営・普及部門または地域農業改良普及センター、茨城県農産物販売推進東京本部の皆様には多大なるご協力・ご助言をいただいた。さらに、農業総合センター管理課分室、当研究所会計年度任用職員の皆様には試験圃場や培養物の管理に多大なるご支援をいただいた。ここに記して、これらの方々には心より感謝の意を表す。なお、本研究は文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業補助金の助成を受け、「キク矮化ウイルス抵抗性コギク品種の選抜技術の開発および系統育成 (2015~2019 年度)」として実施した。

### 引用文献

- 愛知県農業総合試験場園芸研究部・花き研究室 (2013) ウィロイドによって引き起こされるキク矮化病の蔓延防止マニュアル. 愛知県農業総合試験場.  
<https://www.pref.aichi.jp/nososi/seika/singijutu/singijiyutu102.pdf> (2022 年 8 月 26 日アクセス).
- 土井 誠・加藤公彦 (2004) 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. 関西病虫研報 46 : 11-14.
- 福田至朗・栗山幸子・平野哲司・服部裕美・中村恵章・大石一史 (2012) 根を介したキクわい化ウィロイドの接触伝染. 関西病虫研報 54 : 47-51.
- 長谷川 徹・遠山宏和・鈴木良地・堀田真紀子・新井和俊・伊藤健二 (2016) キク矮化病抵抗性を有するスプレーギク新系統の作出. 愛知農総試研報 48 : 161-164.
- Hirakawa, H.; Sumitomo, K.; Hisamatsu, T.; Nagano, S.; Shirasawa, K.; Higuchi, Y.; Kusaba, M.; Koshioka, M.; Nakano, Y.; Yagi, M.; Yamaguchi, H.; Taniguchi, K.; Nakano, M.; Isobe, S. N. (2019) De novo whole-genome assembly in *Chrysanthemum seticuspe*, a model species of Chrysanthemums, and its application to genetic and gene discovery analysis. DNA research 26(3): 195-203.
- Hosokawa, M.; Matsushita, Y.; Uchida, H.; Yazawa, S. (2006) Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amounts of plant tissue. J. Virol. Methods. 131 : 28-33.
- Hosokawa, M.; Shiba, H.; Kawabe, T.; Nakashima, A.; Yazawa, S. (2007) A Simple and simultaneous detection method for two different viroids infecting Chrysanthemum by multiplex direct RT-PCR. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 76:60-65.
- 茨城県営業戦略部東京渉外局県産品販売促進チーム (茨城県農産物販売推進東京本部) (2021) 東京都中央卸売市場における花きの取扱数量・価格の推移. 茨城県営業戦略部東京渉外局県産品販売促進チーム (茨城県農産物販売推進東京本部).  
<https://www.pref.ibaraki.jp/eigyoto/kyo/kensan/documents/r2kakahoukokur.pdf> (2022 年 8 月 26 日アクセス).
- 松下陽介・伊藤陽子・築尾嘉章 (2006) リアルタイム PCR を用いたキクわい化ウィロイドの定量. 日本植物病理学会関東部会講演.
- Matsushita, Y. and Penmetcha, K. K. R. (2009) In vitro-transcribed Chrysanthemum stunt viroid RNA is infectious to Chrysanthemum and other plants. Phytopathology 99:58-66.
- Matsushita, Y.; Aoki, K.; Sumitomo, K. (2012) Selection and inheritance of resistance to Chrysanthemum stunt viroid. Crop Prot. 35:1-4.
- 松下陽介 (2016) ウィルス・ウィロイド. 加除式農業技術体系花卉編・6 キク (クリサンセマム)・追録第 19 号. 農山漁村文化協会、東京、pp.327.
- Nabeshima, T.; Hosokawa, M.; Yano, S.; Ohishi, K.; Doi, M. (2012) Screening of Chrysanthemum Cultivars with Resistance to Chrysanthemum Stunt Viroid. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81 (3):285-294.
- 仲 照史 (2020) 生産者や関係機関と協同した切り花キク品種の育成と普及. 新近畿中国四国農業研究. 3 : 71-74.
- 中村恵章・福田至朗・栗山幸子・服部裕美・平野哲司・大石一史 (2013b) 栽培ギクのキク矮化ウィロイド

(CSVd) 保毒状況の把握. 愛知農総試研報. 45 : 53-59.

中村恵章、福田至朗、栗山幸子、服部裕美、平野哲司、大石一史 (2013a) キク矮化ウイルス (CSVd) の蔓延を防ぐ鉢等器具の消毒方法. 愛知農総試研報. 45 : 61-67.

農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課園芸統計班 (2021) 令和2年産全国の作付(収穫)面積及び出荷量. 作物統計調査・作況調査(花き)・確報・令和2年産花き生産出荷統計. 農林水産省.

<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000032129877&fileKind=0> (2022年8月26日アクセス).

農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課園芸統計班 (2020) 令和元年産全国農業地域別・都道府県別の作付(収穫)面積及び出荷量・切り花類・きく・小ぎく. 作物統計調査・作況調査(花き)・確報・令和元年産花き生産出荷統計. 農林水産省.

<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000032010816&fileKind=0> (2022年8月26日アクセス).

農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課園芸統計班 (2020) 令和元年産全国農業地域別・都道府県別の作付(収穫)面積及び出荷量・切り花類・きく・計. 作物統計調査・作況調査(花き)・確報・令和元年産花き生産出荷統計. 農林水産省.

<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000032010813&fileKind=0> (2022年8月26日アクセス).

Omori, H.;Hosokawa, M.;Shiba, H.;Shitsukawa, N.;Murai, K.;Yazawa, S.(2009)Screening of Chrysanthemum Plants with Strong Resistance to Chrysanthemum Stunt Viroid.J. Japan. Soc. Hort. Sci.78 (3):350-355.

Sumitomo, K.;Shirasawa, K.;Isobe, S.;Hirakawa, H.;Hisamatsu, T.;Nakano, Y.;Yagi, M.;Ohmiya, A.(2019)Genome-wide association study overcomes the genome complexity in autohexaploid chrysanthemum and tags SNP markers onto the flower color genes.Scientific reports.9(1):1-9.

# Development of Screening Method and Breeding of Chrysanthemum Stunt Viroid-Resistant Small Spray-type Chrysanthemum Line

Saeko KURIHARA<sup>1</sup>, Yumiko HIRAI, Koichi KITA, Hidenori ICHIGE,  
Ryoji ISHII and Takeru GONAI

## Summary

Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) causes Chrysanthemum stunting disease, and its damage is increasing in Ibaraki Prefecture. It is important to breed the cultivars resistant to CSVd for the control strategy. Therefore, we studied an efficient screening method for CSVd resistance, which was necessary to select resistant breeding materials and progenies. As a screening technique, it was developed an *in vitro* grafting inoculation method that could handle many samples in a space-saving manner with the same inoculation efficiency as the conventional pot grafting inoculation method, and could be performed at any time by using shoot cultures. Furthermore, it was revealed that upper leaves and stems were suitable parts of the plant body for direct RT-PCR assay using the needle method, and the use of silicon tubes for fixing the grafted parts improved the efficacy for inoculation. In addition, we selected resistant cultivars as breeding material from 131 cultivars owned by our laboratory and collected from the cultivated fields in this prefecture, and bred a resistant line '18c27' which flower color was red and flowered in August by crossing of the selected parents.

**Keywords:** crossbreeding, small spray-type chrysanthemum, cultivar,  
Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) , resistance

---

<sup>1</sup> Address: Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago 3165-1, Kasama, Ibaraki, 319-0292, Japan