

# 九州におけるキュウリ緑斑モザイクウイルスの 遺伝的多様性と臭化メチル全廃後にむけた代替 防除技術の開発

中央農業総合研究センター 久保田 健 嗣

## はじめに

キュウリの緑斑モザイク病は、キュウリ緑斑モザイクウイルス (*Kyuri green mottle mosaic virus*, KGMMV) の感染によって引き起こされる。病徴は葉のモザイクと生育抑制に加え、果実に著しい凹凸を伴う奇形が生じる。KGMMV は国内では1966年2月から近畿、中国、四国、九州地方の各地で大発生した(井上, 1966)。KGMMV は低頻度ながら種子伝染するため、ウイルスを保有した種子や苗の流通によって圃場にもち込まれ、感染株からの管理作業などを介した汁液伝染によって隣接株に感染する。さらに、本病は感染したキュウリ株の残根からの土壌伝染も起こる。現在は、乾熱処理や第三リン酸ソーダ(リン酸3ナトリウム)による種子消毒や、不可欠用途臭化メチル剤の許可地域では本剤による土壌くん蒸消毒によって散発的な発生に抑えているのが現状である。しかしながら、その不可欠用途臭化メチル剤の使用も2012年末日をもって全廃されることが決定した。本剤全廃後のウイルス病被害の拡大が懸念される。今後の対策としては臭化メチル剤に替わる効果的な土壌消毒法を開発するとともに、KGMMV の圃場への侵入予防、並びに圃場衛生を強化することも重要と考えられる。

筆者らは、現時点でどのようなKGMMV集団が存在し、それらがどのような経路をたどって圃場に侵入しているのかを解明することを目的として、2005年～09年にかけて九州地域で発生したKGMMV株を採取し、その遺伝学的解析を行った。本稿では、この結果から示唆された九州におけるKGMMV集団の遺伝的多様性について報告する。また、現在進められているキュウリの臭化メチル代替防除技術の開発についても紹介する。

## I 九州地域で発生したKGMMVの遺伝的多様性

九州地域は温暖な気候を利用したキュウリの周年栽培

が盛んであり、特に宮崎県は平成20年の産出額が176億円、全国シェア12.4%と第1位の規模を誇っている(農林水産省農業生産所得統計)。九州をはじめとして全国のキュウリ栽培で問題となっているウイルス病としてはKGMMVのほか、アブラムシ媒介性のキュウリモザイクウイルス(CMV)、パパイヤリングスポットウイルス(PRSV)、カボチャモザイクウイルス(WMV)、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス(ZYMV)、アザミウマ媒介性のメロン黄化えそウイルス(MYSV)、コナジラミ媒介性のビートシュードイエロースウイルス(BPYV)、ウリ類退緑黄化ウイルス(CCYV)等がある。これらの虫媒伝染性ウイルスと比較してKGMMVは種子伝染性および土壌伝染性のため被害の発生件数は少ない傾向にあるが、現在は防除対策が臭化メチルに限られることから、ひとたび発生するとその後の対応に苦慮するケースが多い。

KGMMVは、タバコモザイクウイルス(TMV)などと同じくVirgaviridae科Tobamovirus属のウイルスであり、約6,500塩基の1本鎖RNAをゲノムとする。RNAには、ウイルスの複製にかかわる130Kと180K、細胞間移行にかかわる移行タンパク質(MP)、外被タンパク質(CP)の四つの遺伝子がコードされている(図-1)。RNAはCPにらせん状に取り囲まれて、物理的に安定な棒状粒子を形成する。ウリ科に感染するトバモウイルスとして国内ではKGMMVのほかスイカ緑斑モザイクウイルス(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)とCucumber mottle virus (CuMoV)があり(小室ら, 1971; ORITA et al., 2007)、海外では韓国からZucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV)およびイスラエルからCucumber fruit mottle mosaic virus (CFMMV)が報告されている(RYU et al., 2000; ANTIGUNUS et al., 2001)。

KGMMVは現在までに日本、インドネシア、韓国で発生が確認されているが、そのうち詳しく解析された系統としては、1966年に徳島県のキュウリから分離されたCucumber系統(KGMMV-C, KGMMV-C1)(小室ら, 1971; YOON et al., 2001)、69年に愛媛県松山市余戸で分離されたYodo系統(KGMMV-Y)(木谷ら, 1970; TAN et al., 2000)、および2001年にインドネシア

Genetic Diversity of *Kyuri green mottle mosaic virus* in Kyushu Region and Development of its Control toward the Abolition of Methyl Bromide. By Kenji KUBOTA

(キーワード: キュウリ緑斑モザイクウイルス, KGMMV, 遺伝的多様性, 種子消毒, 土壌消毒, 腐熟促進, 臭化メチル)

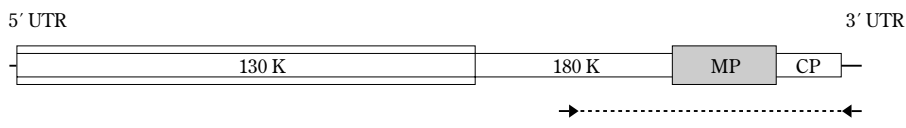


図-1 キュウリ緑斑モザイクウイルスのゲノム構造

KGMMV 特異的プライマー（矢印）には含まれた領域を RT-PCR で増幅した。実線で示した領域を解析に用いた。

のメロンから採取された KGMMV-YM (DARYONO et al., 2005) の 3 系統があり、全長塩基配列が明らかにされている。しかし、現在国内のキュウリ現地圃場で発生している KGMMV がどのような系統であって、これらの既報系統とどのような遺伝的關係にあるのかはほとんど明らかになっていない。

筆者は、現在発生している KGMMV 集団の遺伝学的關係を明らかにすることで、KGMMV の種子伝染などによる伝搬経路の手がかりをつかめるのではないかと考えた。そこで、2005～09 年にかけて、九州の 5 県 9 箇所の現地圃場で緑斑モザイク症状を示したキュウリをサンプリングした。サンプルは DAS-ELISA によって KGMMV の感染を確認した。各分離株の採取地と採取年を表-1 に示す。

これらの分離株をキュウリ苗に機械接種したところ、いずれの分離株においても KGMMV-C や KGMMV-Y を接種したときと同様のモザイク病徴と生育抑制が再現された。

次に、各分離株のゲノム RNA を鋳型とした RT-PCR によって、CP 遺伝子と MP 遺伝子を含む領域を増幅して、約 1.3 kb の塩基配列を決定した。前述の 3 系統を加えた計 12 系統を比較したところ、同一の配列をもつものは見つからなかったことから、九州地域に限ってもまだ同定されていない KGMMV 系統が多く存在することが推測された。

これらの KGMMV の 12 系統に、CGMMV を外群として加えて分子系統解析を行ったところ、KGMMV の各系統のうちインドネシア分離株である KGMMV-YM を除く 11 系統は四つのクラスター A～D に分類された(図-2)。CP 遺伝子、MP 遺伝子のどちらの配列を用いても、それぞれのクラスターに属する系統は同じであったが、クラスター間の關係は CP 遺伝子と MP 遺伝子とで若干異なっていた。KGMMV-C1 と同じクラスターに属する系統として佐賀県と宮崎県の 2 分離株 (Kawasoe と Miyazaki-3) があり、KGMMV-Y と同じクラスターに属する系統として大分県と宮崎県の分離株 (Hiji, Miyazaki-2) があった。他の 5 分離株は独立した

表-1 九州の現地圃場で採取したキュウリ緑斑モザイクウイルス分離株

分離株	発生地	採取年
Nijo-1	福岡県二丈町	2005
Nijo-2	福岡県二丈町	2009
Kawasoe	佐賀県川副町 (現佐賀市)	2007
Ureshino	佐賀県嬉野市	2007
Hiji	大分県日出町	2007
Miyazaki-1	宮崎県	2008
Miyazaki-2	宮崎県	2008
Miyazaki-3	宮崎県	2008
Higashikushira	鹿児島県東串良町	2007

久保田ら (2009) より一部改変して引用。

二つのクラスターを形成した。

各クラスターに属する分離株とその発生地の地理的分布を考察すると、クラスター A に属する分離株は九州北部に、クラスター B に属する分離株は九州南部に分布していた。しかし、今回の調査ではサンプル数が少なかったため、分離株間の系統關係と地理的分布とを明確に結論づけることはできない。したがって、この点については今後の継続的調査が必要であろう。

Yoon et al. (2008) は、CP 遺伝子の塩基配列解析によって、韓国で発生した CGMMV 集団には遺伝的多様性が非常に低いことを報告しており、それと比較すると九州における KGMMV 集団の遺伝的多様性は高いと考えられた。

日本にいつから KGMMV が存在していたのかは明らかでないが、井上ら (1966) は、1966 年に西日本一帯でキュウリの緑斑モザイク病が大発生した際に「九州地方の一部では数年前から発生していたようにもいわれるが確認の手段がない」と述べている。また、栃原・小室 (1974) は、国内で発生した CGMMV、KGMMV と海外の類似ウイルスを比較し、国内発生 of CGMMV はインドからユウガオ種子を通じてもち込まれた可能性が高いと指摘しているが、KGMMV の侵入経路について明らかにすることはできなかった。

当時と比較して現在は種子生産工程における圃場衛生

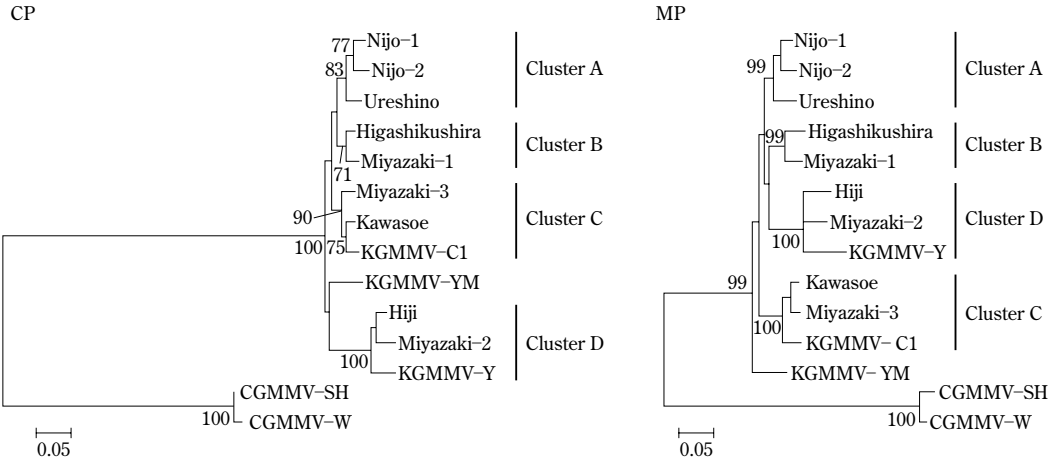


図-2 九州で発生したキュウリ緑斑モザイクウイルスの分子系統樹

キュウリ緑斑モザイクウイルス分離株の分子系統樹。CP 遺伝子と MP 遺伝子の塩基配列に基づき、近隣結合法で作成した。ブートストラップ値が70%以上の分岐を百分率で示した。スイカ緑斑モザイクウイルスのCGMMV-SH系統とCGMMV-W系統をアウトグループとした。久保田ら(2009)より一部改変して引用。

管理や種子消毒も向上しており、発生リスクは低減しているには違いないが、その一方で海外からの種子や苗の輸入量は格段に増大していることから、病原体侵入リスクは依然として高いと思われる。

今後、今回行ったような調査を全国規模で行い、さらに解析対象をCP、MP 遺伝子からウイルスの全長配列とすることで、KGMMV 集団の遺伝構造を解明するための基盤を構築し、ウイルス伝搬経路の解明につなげることができるかもしれない。そして臭化メチル全廃後に備えて、伝搬経路を効果的に断ち切るための情報として活用できればと期待する。

## II 臭化メチル代替技術の開発

不可欠用途臭化メチル剤の対象5品目はトウガラシ類(ピーマンを含む)、キュウリ、スイカ、メロン、ショウガである。現在、農林水産省の「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」において、不可欠用途臭化メチル剤が全廃された後の栽培体系を開発することを目的とした研究プロジェクト「臭化メチル剤から完全に脱却した産地適合型栽培マニュアルの開発」が、農水省所管独法研究機関および地方自治体農業試験研究機関、民間企業が参画して2008年度から実施されている(津田, 2008)。

キュウリの緑斑モザイク病と同様にトバモウイルスが病原となるピーマンのモザイク病は、トウガラシマイルドモットルウイルス(PMMoV)によって引き起こされる。本プロジェクトにおいてピーマンモザイク病に対し

ては、根圏隔離溶液土耕栽培、垂直二本仕立て栽培法、DAS-ELISA法を利用した土壤中ウイルス濃度の測定による感染リスク評価、抵抗性遺伝子Lを有する品種の導入、植物ウイルスワクチン(弱毒ウイルス)の開発と微生物農業登録に向けた取り組み、生分解性ポットの導入による定植時の感染抑制等の個別技術を統合した栽培マニュアルが作成されつつある。

一方キュウリでは、残念ながらKGMMVに対する抵抗性素材は見つかっておらず、また有効な弱毒ウイルスも開発されていないことから、代替技術としてとり得る手段は限られている。しかし、本プロジェクトにおいて宮崎県総合農業試験場では、土壤中のウイルスを含んだ地上部残さや残根の早期分解によるKGMMVの不活化を促進する試験を行っている。その結果、土壤に土壤改良材や牛糞堆肥を混和することで、残渣中のウイルスの不活化が促進されること、定植時の土壤伝染が比較的短時間(40日程度)で起こらなくなることが示唆されている(黒木・今村, 2009; 2010)。また、愛知県農業総合試験場で開発されたトマトの袋培地栽培技術(特願2005-13985号)は土壤伝染を防ぐうえで効果的と期待され、キュウリへの適用可能性が検討されたが、両者の栽培特性はかなり異なるため直ちにキュウリに応用することは難しく、今後さらなる検討が必要であると判断された。筆者は、CGMMVの弱毒ウイルス株であるCGMMV-SH33bを用いたキュウリモザイク病の防除法を検討している。CGMMV-SH33bはメロンの緑斑モザイク病予防のために開発された弱毒ウイルスであるが

(本吉・西口, 1984), 筆者らの予備的な実験により KGMMV に対しても干渉効果が認められた。CGMMV-SH33b はキュウリに接種しても生育を阻害せず, 果形にも全く影響を与えなかった。しかし, CGMMV-SH33b を接種した苗をハウスで栽培し, 摘心, 収穫等の管理作業においてウイルスに汚染されたハサミにより媒介される KGMMV の伝染は防ぐことができなかった(久保田ら, 2010)。残念ながら, CGMMV-SH33b による地上部でのウイルス防除に効果は認められなかったが, 土壌伝染に対する防除効果は試験されていない。一般に, トバモウイルスの土壌伝染は圃場中に残った前作のウイルス感染根に端を発するとされているが, その感染圧は地上部の水平伝染よりもかなり低いと想定される。そこで現在, ウイルスで汚染させた土壌に弱毒ウイルスを接種したキュウリ苗を定植し, その後の土壌伝染に対する防除効果を検討している。

## おわりに

不可欠用途臭化メチル剤は, キュウリにおいては土壌中の KGMMV の不活化を目的として用いられている。とはいえ, 臭化メチルのもつ高い消毒効果により, 同時

に他の土壌病害虫に対しても防除効果を発揮してきた側面もあり, 特にネコブセンチュウに対する対策が今後重要になると考えられる。臭化メチル全廃後の栽培体系の開発には KGMMV 対策とあわせて, これらの土壌病害虫に対する防除も視野に入れておくことも求められている。

## 引用文献

- 1) ANTIGNUS, Y. et al. (2001): *Phytopathology* **91**: 565 ~ 571.
- 2) DARYONO, B. S. et al. (2005): *J. Phytopathology* **153**: 588 ~ 595.
- 3) 井上忠男 (1966): *植物防疫* **20**: 375 ~ 378.
- 4) ————ら (1966): *農学研究* **51**: 175 ~ 186.
- 5) 木谷清美ら (1970): *四国植防研* **5**: 59 ~ 69.
- 6) 小室康雄ら (1971): *日植病報* **37**: 34 ~ 42.
- 7) 久保田健嗣ら (2009): *九州病害虫研究会報* **55**: 45 ~ 51.
- 8) ————ら (2010): 平成 22 年度日本植物病理学会大会講演要旨.
- 9) 黒木 尚・今村幸久 (2009): 平成 21 年度日本植物病理学会九州部会講演要旨.
- 10) ————ら (2010): 平成 22 年度日本植物病理学会大会講演要旨.
- 11) 本吉総男・西口正通 (1984): *植物防疫* **38**: 353 ~ 357.
- 12) ORTA, H. et al. (2007): *Plant Dis.* **91**: 1574 ~ 1578.
- 13) RYU, K. H. et al. (2000): *Arch. Virol.* **145**: 2325 ~ 2333.
- 14) TAN, S. H. et al. (2000): *ibid.* **45**: 1067 ~ 1079.
- 15) 栃原比呂志・小室康雄 (1974): *日植病報* **40**: 52 ~ 58.
- 16) 津田新哉 (2008): *植物防疫* **62**: 511 ~ 515.
- 17) YOON, J. Y. et al. (2001): *Arch. Virol.* **146**: 2085 ~ 2096.
- 18) ———— et al. (2008): *J. Phytopathology* **156**: 408 ~ 412.

## 登録が失効した農薬 (22.8.1 ~ 8.31)

掲載は, 種類名, 登録番号: 商品名 (製造者又は輸入者) 登録失効年月日。

### 「殺虫剤」

- DDVP 乳剤  
21330: STDDVP 乳剤 (住友化学) 10/08/04  
21331: STDDVP 乳剤 75 (住友化学) 10/08/04
- マラソン乳剤  
2308: 日産マラソン乳剤 (日産化学工業) 10/08/25

### 「殺虫殺菌剤」

- メトキシフェノジド・ベンシクロン粉剤  
20680: DAS モンセレンランナー粉剤 DL (ダウ・ケミカル日本) 10/08/30
- イミダクロプリド・メトキシフェノジド・ベンシクロン粉剤  
20684: DAS モンセレンランナー AD 粉剤 DL (ダウ・ケミカル日本) 10/08/30

### 「殺菌剤」

- イプロジオン水和剤  
21315: ST ロブラールフロアブル (住友化学) 10/08/04

21316: ST ロブラール 500 アクア (住友化学) 10/08/04

### 「除草剤」

- アニロホス・エトキシスルフロン・ダイムロン・ベンフレセート粒剤  
20665: ビンゴ 1 キロ粒剤 (バイエルクロップサイエンス) 10/08/22
- アニロホス・エトキシスルフロン・ダイムロン粒剤  
20678: ゴクウジャンボ (バイエルクロップサイエンス) 10/08/30
- ピアラホス液剤  
21321: ST ハービー液剤 (住友化学) 10/08/04

### 「植物成長調整剤」

- パクロブトラゼール水和剤  
21324: ST バウンティフロアブル (住友化学) 10/08/04  
21325: ST ボンザイフロアブル (住友化学) 10/08/04