

ウリ類退緑黄化ウイルスの感染拡大と遺伝子診断法

埼玉県農林総合研究センター **宇賀博之**

はじめに

ウリ類退緑黄化ウイルス (Cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV) は、2004年に熊本県のメロンで発生が確認されて以降、05年にはキュウリにも感染が認められ、07年までに九州全域に広がった。2008年には愛媛県、埼玉県、群馬県および栃木県のキュウリで相次いで発生が報告された。本ウイルスは、クロステロウイルス科クリニウイルス属に分類され、タバココナジラミが媒介することが明らかにされた (行徳ら, 2009)。感染したキュウリの症状は、初めは中位葉に退緑斑紋を生じ (口絵①)、しだいに葉脈を残して葉全体が黄化する (口絵②)。このころには葉にしなやかさがなくなつてごわつくようになり、最終的には葉が外側に巻く (口絵③)。関東では、1977年に同属に分類されるウイルスでオンシツコナジラミが媒介するビートシュードイエロースウイルス (*Beet pseudo yellows virus*, BPYV, 別名キュウリ黄化ウイルス *Cucumber yellows virus*, CuYV) がキュウリおよびメロンで発生し、急速に拡大した (吉野ら, 1979)。このウイルス病は、その後は年ごとに減少し、また、原因が究明されて防除対策がある程度確立されたこともあり、1980年以降は低発生にとどまったようである。このウイルス病は、福島県や愛媛県でも同時期に相次いで発生が確認されている (善林ら, 1894)。キュウリにおける主要なウイルス病の一つであるメロン黄化えそウイルス (*Melon yellow spot virus*, MYSV) による黄化えそ病の発生が、埼玉県では2005年に初めて報告され、現在でも被害をもたらしている。

本稿では、主に2009年のキュウリ抑制作型 (8月上旬～11月下旬) におけるウイルス病とそのベクターとなるコナジラミ類の発生状況について、ウイルスの簡易遺伝子診断技術と併せて紹介する。

I コナジラミ類の発生状況

埼玉県のキュウリ産地である加須市および深谷市の2地域において、2009年の抑制栽培の定植1か月前の7

～11月中旬まで、コナジラミ類の発生状況を調査した。キュウリハウスわきに本葉1～2枚程度のキュウリの苗を2株設置し、期間中1週間間隔で更新し、交換時にコナジラミ類の寄生頭数およびコナジラミ類のウイルス保毒率を調査した。その結果、両地域とも調査期間を通じて、オンシツコナジラミが優占種であり (図-1)、関東近県では、千葉県における調査 (久保ら, 2007) と同じ傾向であった。一方、福岡県では、そのほとんどがタバココナジラミであり、オンシツコナジラミの発生はごく一部に限られている (浦・嶽本, 2008)。また、タバココナジラミのバイオタイプについては、バイオタイプQが優占種であり、バイオタイプBはほとんど発生がなかった。これに関しても、トマトにおける調査ではあるが、同様の結果が得られている (山城, 2007; 桑原ら, 2007; 大井田ら, 2007)。CCYVを保毒したタバココナジラミの比率は地域により若干異なっていたが、定植時期から10月中旬ころまで発生していた (図-1)。

ハウス内のコナジラミ類の発生数は、管理状況により大幅に異なっていたが、屋外とは逆に全般にややタバココナジラミの発生割合が高かった。これはタバココナジラミとオンシツコナジラミの薬剤感受性の違いが関係していると推測された。また、ハウス内の保毒虫率は、定植直後には確認できなかったが、発病株率の上昇とともに高まった (データ省略)。

II ウイルス病の発生状況

1 発生ウイルス

コナジラミ類の発生調査と同じく、加須市および深谷市において、それぞれ約20施設の抑制作型の施設キュウリにおけるウイルス病の発生調査を行った。その結果、加須地域ではCCYVとMYSVが、深谷地域ではこれらウイルスに加えて、ほぼ終息していたと思われたBPYVが発生していることが明らかとなった (図-2)。一方、2009年および10年の深谷地域の半促成作型では、MYSVとBPYVの感染が散見されたが、CCYVの発生は確認できなかった。キュウリには多くのウイルスが感染するが、今回調査した範囲ではこれら3種以外は発生が認められなかった。

2 CCYVの発生状況

抑制作型におけるウイルスの感染による黄化症状は、

The Expansion of Cucurbit chlorotic yellows virus and that Molecular Diagnostics in Saitama Prefecture. By Hiroyuki UGA

(キーワード: CCYV, キュウリ, ウリ類退緑黄化病, キュウリ黄化病, キュウリ黄化えそ病, コナジラミ類, RT-PCR)

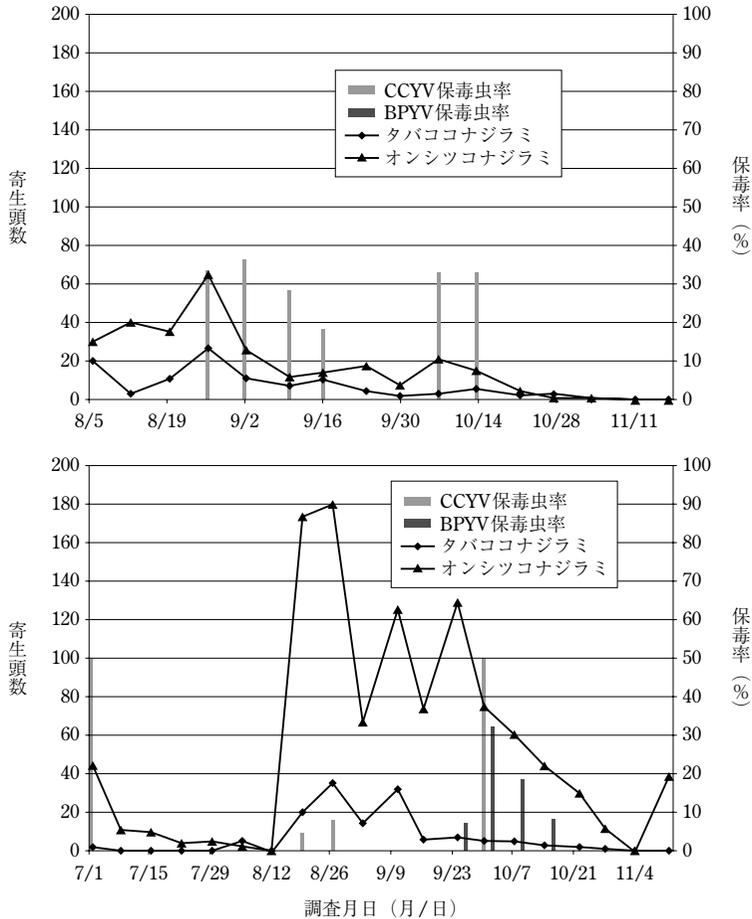


図-1 キュウリ苗トラップによるコナジラミ類の発消長とウイルス保毒率 (2009年)

上：加須市，下：深谷市。

寄生頭数は本葉1～2葉期のキュウリ苗2鉢を1週間曝露し、回収時に寄生していた虫数。

定植2～4週間後から認められるようになり、栽培が進むにつれて発病株率は高まった。栽培終了時の発病株率は施設により大きく異なったが、初期感染株の多少に連動する傾向が見られた。施設によってはBPYVが優先している場合があり、数百mの範囲内の近隣施設でもCCYVとBPYVの発消長に差異が認められた(データ省略)。これらのウイルス病の発生状況は、施設の形状や物理的・化学的対策により大きく異なっていた。1例として、天窓に1mm目合いの防虫ネットを展帳している大型連棟ハウスで、側窓に展帳している防虫ネットが1mm目合いの場合、側窓に近い畝ほどウイルス感染株率が高く、中心部ほど低かった(図-3A)。一方、側窓に展帳している防虫ネットが0.4mm目合いの場合、側窓に近い畝より天窓下の畝においてウイルスの感染が多

い傾向であった(図-3B)。

半促成の作型ではCCYVの発生は確認されていない。これは、産地内でも集落によってわずかに作型が異なっているが、抑制栽培終了から半促成の定植までに一定の期間があり、抑制から半促成へのもち込みがほとんどないこと、また、この作型は6月中に栽培が終わるのに対して、タバココナジラミの屋外における増加時期が7月以降(データ省略)であったことに起因すると思われる。一方、近縁種であるBPYVは、低率ではあるが発生が認められた。屋外におけるオンシツコナジラミの発生時期は、タバココナジラミと比べて早い5月であり、定植直後ではなく、栽培後期に保毒虫が飛来して感染したと推測された。

このように、作型によってCCYVの発生状況が明ら

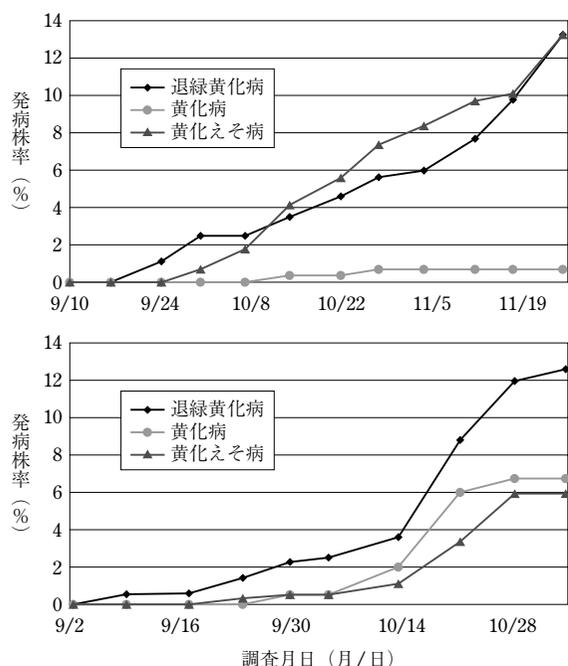


図-2 キュウリウイルス病の発生状況 (2009年)
上: 加須市, 下: 深谷市。

かに異なっていたが、近縁種である BPYV による黄化病についても同様の傾向が報告されており (善林ら, 1984; 平子ら, 1987), キュウリの作型とウイルスのベクターであるコナジラミ類の発消長の間に関連があることが容易に推察される。

3 CCYV の伝染環

埼玉県におけるキュウリの主な栽培体系では、半促成栽培から抑制栽培までの間にキュウリが作付けされていない期間が1か月以上あるため、半促成作型から抑制作型へのウイルスの直接的な伝搬は考えにくい。また、半促成作型での CCYV の発生はこれまで認められていない。これらのことから、主要な雑草に伝染源があると考えられるので、産地内に多数自生する雑草30数種について、それぞれ4~57株を調査したが、いずれも CCYV の感染は認められなかった。しかし、産地の中心部を流れる河川周辺に群生しているアレチウリに BPYV の感染が確認されたことから、CCYV の感染の有無についても今後調査する予定である。

一方、わずかに点在する露地栽培キュウリでは、低率であるが CCYV の感染が確認されている。また、ハウス周辺のウリ科作物について調査した結果、家庭菜園のメロンおよびスイカに CCYV の感染が認められた (口絵④)。しかし、抑制作型において、定植2~4週間後

には、産地全体で CCYV の発病が見られることから、効果的な防除対策のためにもさらなる伝染環の調査が必要である。

4 CCYV の感染が収量に及ぼす影響

栽培農家5施設の抑制作型において、退緑黄化病の発病時期が収量に及ぼす影響を調査した。発病日が同じで、かつ、最後まで他のウイルスが感染していない株を発病時期ごとに2~6株ずつ選抜し、栽培終了時に残された‘へた’の数を計数して総収穫果数を調べ、これを収穫量とみなした。その結果を図-4に示した。両者にはある程度の相関が認められ、発病時期が早いほど減収率が高く、定植1か月以内に発病した場合は30%程度減収した。一方、定植3か月以降に発病した場合、収量の低下は認められなかった。今回の調査方法では、残されたへたの数がすべて可販果ではない。また、それぞれの果実重量は若干異なっていることなど、多少誤差が生じているが、生産現場的に見れば問題ない範囲と思われる。

III 遺伝子診断法

CCYV による退緑黄化病と BPYV による黄化病の病徴は、いずれも中、下位葉に黄化症状が見られ、その直上葉には退緑小斑点や退緑斑紋を生じるが、新葉は無病徴である。このため、病徴による区別はできない。一方、MYSV による黄化えそ病は新葉にモザイク症状を呈することから、病徴による判断が可能であり、重複感染株も見分けられるが、熟練を要するし、精度が低い。CCYV の検出法としては、DAS-ELISA (日本植物防疫協会がキットを販売)、RT-PCR および RT-LAMP 法 (日本ジーンがキットを販売) がある。いずれも診断ツールとして価値が高いが、埼玉県では、MYSV や病徴が酷似する BPYV が混発していることから、CCYV、BPYV および MYSV のマルチプレックス RT-PCR により検定を行っている。

1 RNA サンプルの調整

RT-PCR に使用するサンプルには、キュウリ葉の粗汁液を使用している (UGA, 2005)。直径5mm程度の市販のストローを用いて葉を打ち抜き、これを75×100×0.1mmのビニール袋の中で10mM トリス塩酸緩衝液1mlで磨砕する。平底試験管など、そこが平らなもので数回しごくことで簡単に磨砕できる。葉の厚みを無視すれば、いつでもほぼ同濃度の粗汁液が簡単に作製できる。そのまま冷凍保存すれば、数回は RT-PCR のサンプルとして使用可能である。多くのサンプルを検定する場合は、圃場で葉を打ち抜いて、クーラーボックスに入れてもち帰るようにしている。この場合は乾燥に注

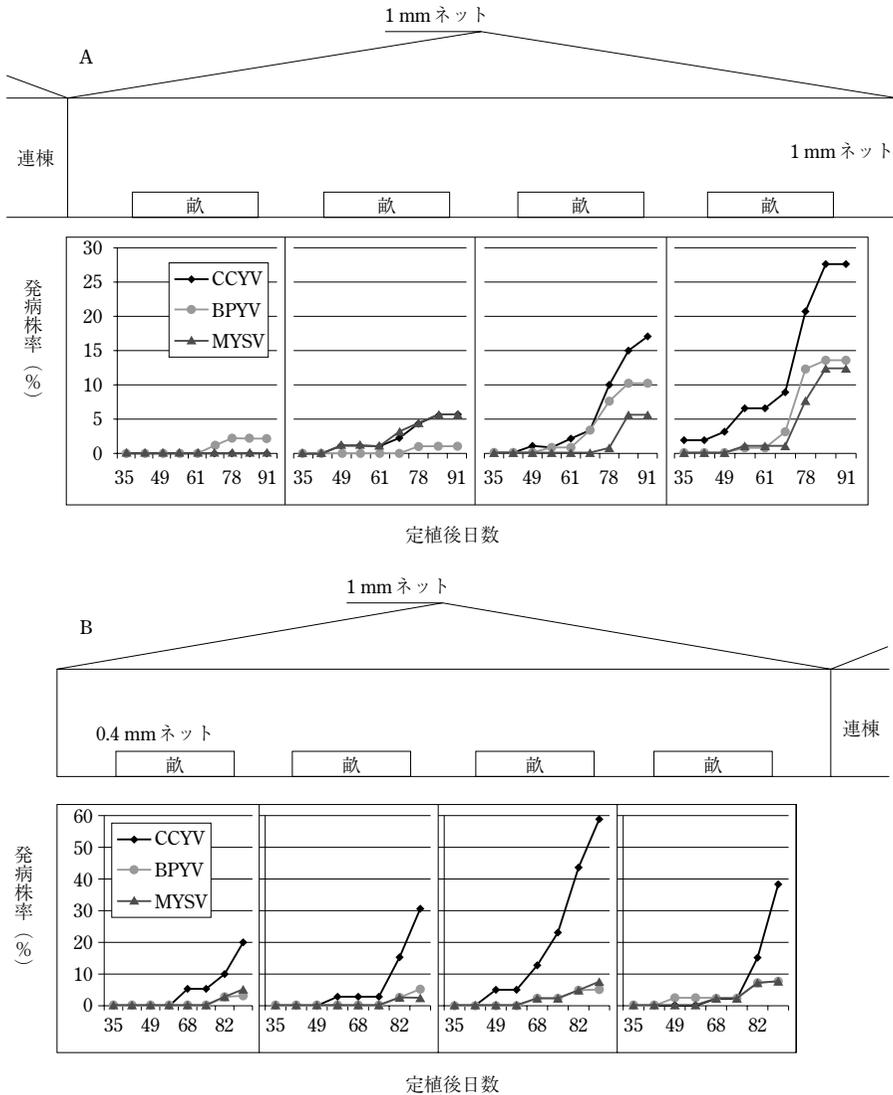


図-3 防虫ネットの目合いと畝ごとのウイルス発病株率

いずれも大型連棟ハウスで天窗には1 mm目合いの防虫ネットを展帳。

A: 側窓に1 mm目合いの防虫ネットを展帳。

B: 側窓に0.4 mm目合いの防虫ネットを展帳。

意が必要であるが、すぐにRT-PCR用のサンプルが作製できるほか、キュウリに対するダメージもない。

2 RT-PCR

RT-PCRにはTAKARAのPrimeScript® One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) または One Step RNA PCR Kit (AMV) を使用し、マニュアルに従って反応を行う。反応液量は、1検体当たり10 μ lで十分である。サンプルとして上記粗汁液を1 μ l添加する。CCYV用プライマーは、CCYV-HSP-F (5'-TGCGTATGT-CAATGGTGTATG-3') と CCYV-HSP-R (5'-ATC-

CTTCGCAGTGAAAAACC-3') (行徳ら, 2009) を、BPYV用には、BP-404F (5'-GTCTTAATGTCTCT-GTCCCGG-3') と BP-591R (5'-GAAAGTACCGC-CACCAAAGTC-3') を、MYSV用には、MY-SC2R (5'-GTAAACACCATGTCTACCGT-3') と MY-433 (5'-TGCTTTTCTTCCTCATTCTC-3') をそれぞれ最終濃度0.2 μ Mで使用する。反応条件は、50°C 30分の逆転写反応、2分間の変成反応の後、94°C 30秒、54°C 30秒、72°C 1分を1サイクルとする反応を35回行い、最後に72°C 7分間の最終伸長を行う。その結果、CCYV、

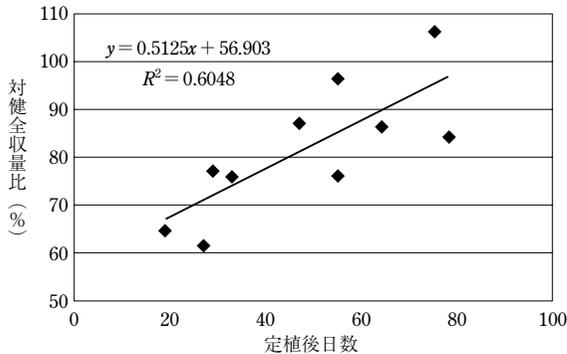


図-4 キュウリ抑制栽培における退緑黄化病の発病時期と総収穫果数

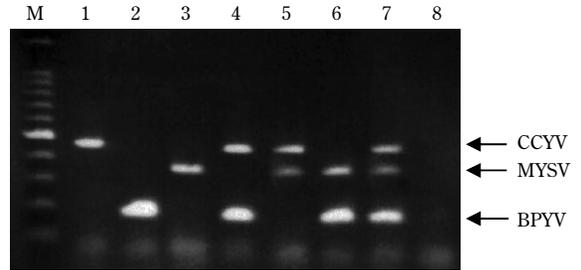


図-5 マルチプレックス RT-PCRによる CCYV, BPYV および MYSV の同時検出
レーン 1～7: 陽性検体, レーン 8: 健全, M: 100 bp ラダーマーカー。

BPYV および MYSV はそれぞれ約 450 bp, 190 bp および 370 bp の増幅断片が得られ、単独感染だけでなく、いずれの重複感染にも対応可能である (図-5)。

3 コナジラミ類からのウイルス検出およびバイオタイプの判別

媒介虫であるコナジラミ類のウイルス保毒検定には、上記の CCYV および BPYV 用のプライマーカクテルを用い、RT-PCR に使用するサンプルは、コナジラミ類の粗汁液を使用している。具体的には、キュウリ葉の場合と同様にビニール袋中でコナジラミ 1 頭当たり 10 mM トリス塩酸緩衝液 50 μ l で磨砕したものをサンプルとして RT-PCR を行い、保毒虫であればそれぞれのウイルスに特異的なバンドが検出される。

コナジラミの種の判別は、苗トラップなどで生きたまま捕獲した場合は、形態観察によりタバココナジラミとオンシツコナジラミを判別している。しかし、黄色粘着板などで採取した場合は、形態による判別は不可能であり、また、タバココナジラミのバイオタイプの判別を行う場合は、津金ら (2007) の手法により行っている。この場合も、サンプルには上記のコナジラミの粗汁液を使用してもなら差し支えない。

粗汁液を使用した遺伝子診断法には検出感度やその精度上で賛否両論あると思われる。しかし、例えば特徴的な症状を呈しているが CCYV か、BPYV が感染ウイルスを特定できない場合、いずれかの特異的なバンドが必ず検出されるはずで、いずれのバンドも検出されない場合は検定が不備であったとわかる。また、おおよその見当をつける予備検定などでは、手軽に行える。さらに、多くのサンプルを検定する場合には、検出に要するステップが増えるほど意図しない人為的なミスやコンタミネーションの確率が高くなることを考慮すれば多少の問題点は補えるほど簡便である。

おわりに

施設整備状況とウイルス病の関係について、防虫ネットを展開しづらいパイプハウスは比較的ウイルス病発生率が高かったが、ハウスによっては発生が低く抑えられている箇所があった。施設の状況や防除圧、栽培方法等を考慮しない場合においても、ハウス内のコナジラミ類誘殺数とウイルスの発病株率にはある程度の相関が認められた (データ省略)。また、初期発病率が高いほど後期の発病株率が高くなる傾向があることから、減収を抑えるためにも栽培期間前半の対策が重要であることがわかった。防除法については、(独)農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所のホームページ (<http://vegeta.naro.affrc.go.jp/index.html>) にマニュアルが掲載されているほか、トマトにおけるタバココナジラミ対策が数多く報告されており、これらが参考となる。以上、単年度の調査結果ではあるが、ある程度のウイルス病の発生状況が把握できたと考えている。今後、年次変動などを念頭に置きながら、調査を継続していきたい。

本研究成果は、新たな農林水産政策を推進する農林水産省の実用技術開発事業「タバココナジラミにより媒介される新規ウリ科野菜ウイルス病の統合型防除技術体系の開発 (課題番号 21017)」において得られたものである。

引用文献

- 1) 行徳 裕ら (2009): 日植病報 75: 109 ~ 111.
- 2) 久保周子ら (2007): 関東東山病虫研報 54: 195 ~ 196 (講要).
- 3) 桑原克也ら (2007): 同上 54: 127 ~ 132.
- 4) 大井田 寛ら (2007): 同上 54: 143 ~ 150.
- 5) 平子喜一ら (1987): 福島農試研報 26: 95 ~ 101.
- 6) 津金胤昭ら (2007): 関東東山病虫研報 54: 159 ~ 164.
- 7) UGA, H. (2005): J. Gen. Plant Pathol. 71: 86 ~ 89.
- 8) 浦 広幸・嶽本弘之 (2008): 福岡農試研報 27: 23 ~ 28.
- 9) 山城 都 (2007): 関東東山病虫研報 54: 113 ~ 115.
- 10) 吉野正義ら (1979): 植物防疫 33: 498 ~ 502.
- 11) 善林六朗ら (1984): 埼玉園試研報 13: 11 ~ 40.