

弱毒ウイルスによるサツマイモ帯状粗皮病の 防除技術の開発

大分県農林水産研究指導センター ^{やま}山 ^{さき}崎 ^{しゅう}修 ^{いち}一

は じ め に

サツマイモ帯状粗皮病は、サツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系統 (*Sweet potato feathery mottle virus* - severe strain : SPFMV-S) によるウイルス病である (USUGI et al., 1994)。本病は、青果用サツマイモでは、塊根表皮の帯状のひび割れ (帯状粗皮) 症状や激しい退色といった外観形質の劣化による市場評価の低下をもたらす。また、加工原料用では、ひび割れやくびれ等の塊根の形状劣化により、泥などの汚れが取れにくくなることから、品質への悪影響が問題となる。

本病に対する有効な防除対策として、ウイルスフリー苗の利用がある。主産県では、約 20 年前から供給体制や施設が完備され、毎年の苗更新が徹底されたため、現在では本病はほとんど発生せず、もはや「過去の病気」となっている。一方、大分県でも 2000 年までに供給体制が整備され、一定の効果を上げてきた。しかし、サツマイモの販売単価が低迷する中、産地規模が小さい本県では、苗供給を行うための設備投資に限界がある。そのため、生産者も苗経費の負担を節約するために毎年の更新が徹底されておらず、本病の撲滅や十分な品質向上には今なおつなっていない。そこで、本県では、低コストで高品質なサツマイモ生産の実現のために、ウイルスの発生実態と同定を行うとともに、1995 年より本病に防除効果のある弱毒ウイルスの選抜に取り組み、弱毒ウイルスを接種したサツマイモを種イモとして利用する中長期的な防除技術を開発したので紹介する。

なお、本研究成果は、先端技術等地域実用化促進事業 (1996 ~ 2003) 並びに文部科学省都市エリア (大分県) 産学官連携促進事業 (2004) において、中央農業総合研究センター花田 薫博士並びに九州沖縄農業研究センター酒井淳一博士との共同研究で得られたものである。また、本研究の遂行にあたり、ご指導を賜った佐賀大学大島一里教授および秋田県立大学藤 晋一准教授、並び

にご協力いただいた本県内外の関係者の方々に感謝申し上げます。

I 本病の発生実態とウイルスの同定

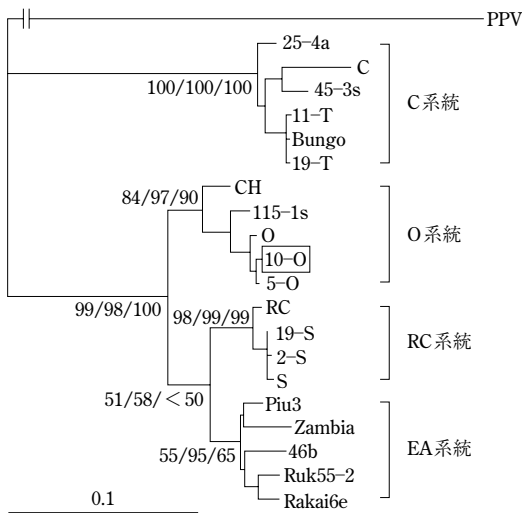
1997 ~ 2005 年に、大分県豊後大野市および臼杵市の選果場において、出荷されたサツマイモを対象に帯状粗皮病の発生実態を調査した。その結果、ウイルスフリー苗の供給体制の整備により、2002 年を期に発生は減少したものの、調査期間を通して大分県内で本病が発生していることが確認された。世界各国で発生した SPFMV は、現在 3'末端側領域のゲノム配列に基づき、Russet crack (RC), Ordinary (O), Common (C) および East Africa (EA) の 4 系統に分類されている (KREUZE et al., 2000; UNTIVEROS et al., 2008)。これにより、SPFMV-S は RC 系統に属する分離株と位置づけられたことから、本論文では S 分離株とする。罹病塊根からウイルスを分離し、前記の基準に基づいて分類したところ、これまで日本で発見されていた RC (S 分離株) および O 系統 (O 分離株; USUGI et al., 1991) のほかに、新たに C 系統 (Bungo 分離株ほか; 山崎ら, 2009 b) 並びに *Sweet potato virus G* (SPVG, Oita 分離株; 山崎ら, 2009 a) を同定した。

C 系統および SPVG は、10 科 16 種の植物中、アサガオ (*Ipomoea nil*) および *I. setosa* に感染し、アサガオの症状は SPFMV-S, O および Tokushima (T) 分離株 (系統未定; 宇杉・真岡, 1993) とは異なっていた。また、SPVG は、*Chenopodium amaranticolor* にも感染した。両ウイルス共に、粒子の長さは約 850 nm であり、モモアカアブラムシによって非永続的に伝搬され、アサガオ粗汁液中の本ウイルスの保存限界は 20℃で 1 日以内、希釈限界は 10^{-3} ~ 10^{-4} 倍、不活化温度は 50 ~ 60℃であった。Bungo 分離株の全ゲノム RNA を解析したところ、10,830 nt からなり、3,481 aa のポリタンパク質が存在していた。その塩基およびアミノ酸配列は、S, O および Piu3 分離株 (EA 系統; KREUZE et al., 2009) と比較して、それぞれ 72.6 ~ 73.1% および 77.7 ~ 78.0% の相同性であった。各タンパク質領域の塩基配列に基づく系統樹解析の結果、C 系統の分離株は、最尤法、近隣結合法および最節約法によるいずれの系統樹において

Characterization of Sweetpotato Viruses and Successful Control of Russet Crack Disease using a Characterized Protective Mild Isolate.
By Shuichi YAMASAKI

(キーワード: サツマイモ斑紋モザイクウイルス, サツマイモ帯状粗皮病, サツマイモウイルス G, 弱毒ウイルス)

A. 外被タンパク質領域



B. P1タンパク質のN末端側領域

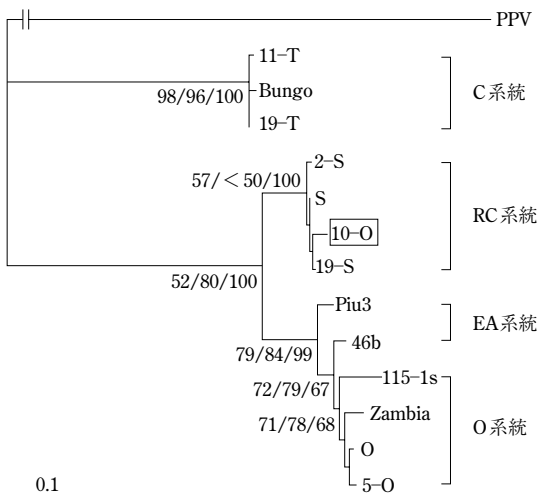


図-1 塩基配列に基づく SPFMV の系統樹解析 (最尤法)
Sweet potato mild mottle virus (SPMMV, Z73124)
および Plum pox virus (PPV, D13751) をアウトグループに用いた。ブートストラップ値は、最尤法/近隣結合法/最節約法による解析データを示し、いずれも 1,000 回の解析によるデータに基づいた。

も、RC、O および EA 系統と異なるリネージに位置づけられた (図-1)。このことから、C 系統は SPFMV の他系統とは別種の可能性が示唆された。一方、SPVG-Oita 分離株は、3'末端側の塩基配列により SPVG-III 系統 (UNIVEROS et al., 2008) に分類され、サツマイモへの単独感染では塊根表皮のわずかな退色などの病徴であったが、S 分離株との重複感染では、S 分離株の単独感染

よりも激しい病徴を示した。これらの知見により、2009 年 11 月に、C 系統の分離株を「斑紋モザイク病」、SPVG を「帯状粗皮病」とし、それぞれ病原の追加を行った。

2001 年には、大分県内産地のサツマイモ圃場において、前述のウイルスの感染実態を調査した。その結果、RC および O 系統が広範囲に分布していることを明らかにした。特に、帯状粗皮病の病原ウイルスである RC 系統の分布は、ウイルスフリー苗の普及が遅れている圃場で目立っており、これらの圃場が今後も本病の汚染源となる可能性が懸念される。一方、C 系統および SPVG の発生も確認されたものの、これまでのところ、両ウイルスの分布は限定された地域に限られていた。

II 弱毒ウイルスの選抜と S 分離株に対する防除効果

大分県のサツマイモに感染する SPFMV の 3 系統および SPVG の中で、病原ウイルスとして被害をもたらすものは、基本的に S 分離株 (RC 系統) のみであった (山崎ら, 2009 a; 2009 b)。そこで、発生実態調査と平行して、S 分離株を防除できる弱毒ウイルスの探索と選抜を行った。すなわち、1995～99 年に、大分県豊後大野市および臼杵市の 4 圃場からサツマイモ約 5 万株を採取し、病徴調査を実施し、塊根の症状が比較的軽微なサツマイモ 249 株を採集した。これらの株では、すべて SPFMV に感染していることを確認した。また、萌芽苗に S 分離株に単独感染したアサガオを接木して、二次接種を行い、塊根の症状を調査した。その結果、1 株は、なお症状が軽微であった。また、この 1 株から、O 系統、C 系統および SPVG の 3 分離株が分離された。

そこで、これらの 3 分離株をサツマイモウイルスフリー苗に戻し接種したのみの株と、さらに S 分離株の二次接種を行った株を作出し、塊根の症状を圃場で調査した。その結果、O 系統の分離株 (10-O 分離株) に感染したサツマイモ塊根は、まれに軽微な退色が見られるものの、S 分離株に感染したサツマイモのように帯状粗皮症状や激しい退色は見られなかった (表-1)。また、10-O 接種株では S 分離株を二次接種した株でも、ほとんどの塊根で帯状粗皮病は発病しなかった。これらの結果から、10-O 分離株は、それ自身ほとんど病徴を生じないばかりでなく、S 分離株に干渉効果を有しており、サツマイモ帯状粗皮病の防除に利用できることが実証された (YAMASAKI et al., 2009)。

表-1 SPFMV-S に対する 10-O 分離株の干渉効果

年	定植日	収穫日	圃場	一次接種 ウイルス	二次接種 ウイルス	供試株数	発病株率	発病指数 ^{a)}				発病度 ^{b)}
								0	1	2	3	
2000	6/8	10/26	場内	10-O	SPFMV-S	30	16.7	25	5	0	0	5.6
				— ^{c)}	SPFMV-S	30	100	0	0	0	30	100
				10-O	—	30	20.0	24	6	0	0	6.7
2000	6/9	11/7	現地 A	10-O	SPFMV-S	30	40.0	18	10	2	0	15.6
				—	SPFMV-S	30	100	0	0	6	24	93.3
				10-O	—	30	50.0	15	13	2	0	18.9
2001	5/15	10/15	場内	10-O	SPFMV-S	30	23.3	23	5	0	2	12.2
				—	SPFMV-S	30	100	0	0	7	23	92.2
				10-O	—	28	21.4	22	6	0	0	7.1
2001	5/29	10/30	現地 A	10-O	SPFMV-S	30	16.7	25	3	2	0	7.8
				—	SPFMV-S	30	100	0	3	4	23	88.9
				10-O	—	30	6.7	28	2	0	0	2.2
2001	5/29	11/19	現地 B	10-O	SPFMV-S	30	30.0	21	8	1	0	11.1
				—	SPFMV-S	30	100	0	3	8	19	84.4
				10-O	—	30	20.0	24	5	1	0	7.8
2001	5/16	10/26	現地 C	10-O	SPFMV-S	30	30.0	21	7	2	0	12.2
				—	SPFMV-S	30	100	0	1	7	22	90.0
				10-O	—	30	10.0	27	3	0	0	3.3
2002	5/15	11/5	現地 A	10-O	SPFMV-S	79	22.8	61	15	3	0	8.9
				—	SPFMV-S	80	93.8	5	8	16	51	80.4
				10-O	—	40	15.0	34	6	0	0	5.0
2003	5/13	11/13	場内	10-O	SPFMV-S	49	12.2	43	4	2	0	5.4
				—	SPFMV-S	34	97.1	1	2	0	31	93.1
				10-O	—	41	9.8	37	4	0	0	3.3

^{a)} 発病指数 0：無病徴，1：ごくわずかな退色，2：軽微な退色，3：帯状粗皮症状および激しい退色。

^{b)} 発病度 = $\sum (\text{程度別発病塊根数} \times \text{発病指数}) \div (\text{調査株数} \times 3) \times 100$ 。

^{c)} —：無接種。

III 弱毒ウイルスの諸特性と RT-PCR-RFLP による検出

10-O 分離株のウイルス粒子の長さは約 850 nm であった。サツマイモへは，モモアカアブラムシによって非永続的に伝搬されるとともに，アサガオを用いた接木接種により感染したが，汁液感染はしなかった。アサガオと *I. setosa*（いずれもヒルガオ科）に感染し，上位葉にそれぞれ斑紋と葉脈透化が観察された。*C. amaranticolor* と *C. quinoa*（いずれもアカザ科）の接種葉に，まれに退緑斑点を形成した。また，サツマイモに対する O および C 系統，T 分離株，SPVG，サツマイモ潜在ウイルス (*Sweet potato latent virus*: SPLV, USUGI et al., 1991) および *Sweet potato chlorotic fleck virus* (SPCFV; USUGI et al., 1991) との重複感染により，塊根への症状や品質劣

化等の悪影響は認められなかった。

10-O 分離株の全ゲノム RNA を解析したところ，10,820 nt からなり，3,493 aa のポリタンパク質が存在していた (YAMASAKI et al., 2010; DDBJ/EMBL/GenBank accession number, AB439206)。また，各タンパク質領域の塩基配列に基づく系統樹解析を，最尤法，近隣結合法および最節約法により行った。その結果，外被タンパク質領域による解析から，10-O 分離株は，O 系統に属することが明らかとなり，ポリタンパク質，P1 の C 末端領域，HC-Pro および P3 領域に基づく系統樹でも O 系統に位置づけられた (図-1 A)。しかし，P1 の N 末端領域による系統樹では，RC 系統に位置づけられた (図-1 B)。さらに Simplot および SISCAN による解析により，10-O 分離株における P1 の N 末端領域の塩基配列は，S 分離株と極めて相同性が高かったが，残りの領

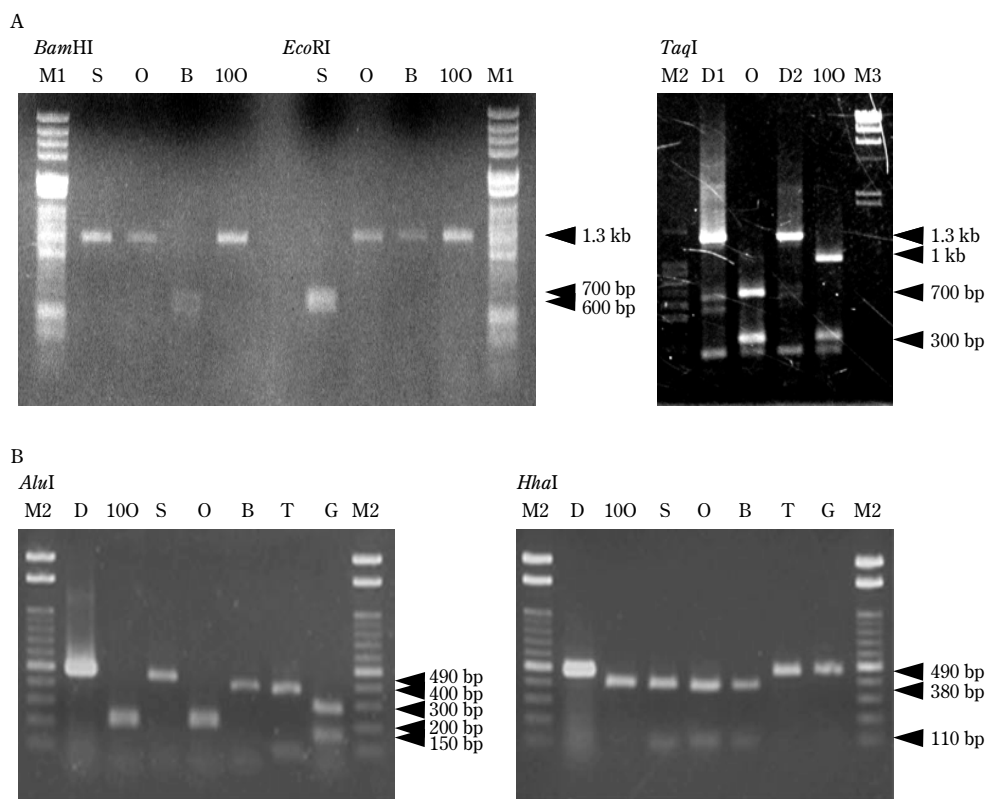


図-2 RT-PCR-RFLPによる10-O分離株とSPFMVおよびSPVGとの識別検出

プライマーは、Aは花田ら（1997）を、Bは酒井ら（2000）により報告されているものを用いた。

レーンDおよびD2：10-O分離株（未切断），レーンD1：O分離株（未切断），レーン100：10-O，レーンS：S分離株，レーンO：O分離株，レーンB：Bungo分離株，レーンT：T分離株，レーンG：SPVG-Oita分離株，レーンM1： λ /HindIII・HincII，レーンM2：100-bp ladder marker，レーンM3： λ /HindIII。

各写真の右側の黒矢印は、PCR産物あるいはRFLPフラグメントの大きさを示す。

域はO分離株と相同性が高いことが判明した。また、P1領域（118～2,109 nt）の中央部分に当たる1,128～1,131 ntの位置に組換え部位が存在していた。組換え部位の5'末端側の塩基配列は、SおよびO分離株と比較して、それぞれ99.0%および84.8%の相同性であり、3'末端側は、それぞれ88.5%および98.9%の相同性であった。これらの結果から、10-O分離株はRCおよびO系統に属するSおよびO分離株のP1領域における組換え体である可能性が示唆された。

RT-PCR-RFLPにより、10-O分離株とS、O、TおよびBungo分離株並びにSPVGとの識別検出法を検討した。花田ら（1997）によるプライマーを用いたRT-PCRにより、10-O分離株は、S、OおよびBungo分離株と同様に約1.3 kbのcDNA断片が検出された。cDNA断片は、*Bam*HIと*Eco*RIのいずれの処理でも切断され

ず、SおよびBungo分離株と識別できた（図-2A）。また、*Taq*I処理により1,007および336 bpの二つの断片に分離され、O分離株と識別できた。一方、酒井ら（2000）によるプライマーを用いたRT-PCRにより、10-O分離株では、S、O、BungoおよびT分離株並びにSPVGと同様に約490 bpのcDNA断片が検出された（図-2B）。cDNA断片は、*Alu*I処理により、238、214および36 bpの三つの断片に分離され、約200 bpの三つの断片に分離され、*Hha*I処理により、380および110 bpの二つに分離された。その結果、本方法は、10-O分離株をO分離株と識別できなかったものの、S、BungoおよびT分離株並びにSPVGから識別できた。さらに、10-O分離株を一次接種しS分離株を二次接種したサツマイモを、酒井ら（2000）によるプライマーおよび*Alu*I処理によるRT-PCR-RFLPに供試したとこ

ろ、10-O 分離株のみが検出され、S 分離株は検出されなかった。このことから、10-O 分離株の S 分離株に対する干渉効果が、S 分離株の増殖阻害によるものであることが示唆された。

IV 弱毒ウイルスを接種したサツマイモの品質と加工適性

10-O 分離株に感染したサツマイモの収量は、対無感染株比で 92 ~ 105% となり、ほぼ同等であった (山崎ら, 2009 c)。また、10-O 分離株の感染による塊根の内容成分と醸造適性に及ぼす影響はなく、焼酎用原料として利用可能であることが明らかにされた。さらに、10-O 分離株が感染すると、塊根表皮のひび割れやくびれが生じないだけでなく、塊根の形状が細長くなり、熱伝導性や加工作業性を高める可能性が示された。以上から、サツマイモにおける 10-O 分離株の利用は、帯状粗皮病の防除のみならず、醸造原料としての加工適性の向上にも有用であることが示唆された。

お わ り に

弱毒ウイルスを利用した帯状粗皮病の防除技術を確認するために、弱毒ウイルスの選抜や防除効果試験に取り組んだ結果、本技術は、ほぼ実用化できる段階まで到達した。また、2009 年には本技術の特許権 (特許第 4336844 号) が認められた。しかし、現在まで大分県の青果用サツマイモ産地へ普及される見通しは立っていない。その理由は、ウイルスフリー苗供給体制の整備により、本病の発生が少なくなったためであり、再感染による発病や品質劣化はいまだに続いているものの、この体制を変更してまで新たな技術を参入させていくのは今と

なっては容易ではない。この理由として、もともと弱毒ウイルスの防除技術開発にはかなりの年数を必要とすることに加え、サツマイモが 1 年 1 作の作物のため、弱毒ウイルスの選抜や防除効果の確認を行える時期が限定されたことが挙げられる。そのため、本技術開発は、10 年 (1995 ~ 2004 年) という長い期間を要してしまい、結果として技術普及のタイミングを逃したことは悔やまれる。

ただし、10-O 分離株は、青果用サツマイモに加えて、醸造原料用のサツマイモにも優れた防除資材であることを明らかにした (山崎ら, 2009 c)。特に、サツマイモの国内消費量は、これまで利用の多かった青果用やでんぷん原料用の消費が減少する中、焼酎原料用のみが需要を伸ばしている (日本いも類研究会, 2008)。醸造原料用に対するウイルスフリー苗の普及は、コストの面から今後も見込めないことから、まずはこの分野への利用を図ることを目指している。

引 用 文 献

- 1) 花田 薫ら (1997): 日植病報 63: 259.
- 2) KREUZE, J. F. et al. (2000): Arch. Virol. 145: 567 ~ 574.
- 3) ——— (2009): Virology 388: 1 ~ 7.
- 4) 日本いも類研究会 (2008): さつまいも MiNi 白書 Ver.3.0, 日本いも類研究会, 東京, p. 5 ~ 9.
- 5) 酒井淳一ら (2000): 日植病報 66: 258.
- 6) 宇杉富雄・真岡哲夫 (1993): 同上 59: 331.
- 7) USUGI, T. et al. (1991): Ann. Phytopath. Soc. Japan 57: 512 ~ 521.
- 8) ——— (1994): ibid. 60: 545 ~ 554.
- 9) UNTIVEROS, M. et al. (2008): Arch. Virol. 153: 473 ~ 483.
- 10) 山崎修一ら (2009 a): 日植病報 75: 102 ~ 108.
- 11) ———ら (2009 b): 同上 75: 156 ~ 163.
- 12) ———ら (2009 c): 同上 75: 323 ~ 327.
- 13) YAMASAKI, S. et al. (2009): Plant Dis. 93: 190 ~ 194.
- 14) ——— (2010): Arch. Virol. 155: 795 ~ 800.

発生予察情報・特殊報 (22.11.1 ~ 11.30)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物: 発生病害虫 (発表都道府県) 発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたは JPP-NET (<http://www.jpnp.ne.jp/>) でご確認下さい。

- アブラナ科作物: ケブカノメイガ (東京都: 初) 11/8
- ブロッコリー: トビイロシワアリ (佐賀県: 初) 11/9
- 水稲: イネ南方黒すじ萎縮病 (仮称) (福岡県: 初) 11/11
- 水稲: ミナミアオカメムシ (千葉県: 初) 11/12
- ばれいしょ: トビイロシワアリ (長崎県: 初) 11/16
- 水稲: ミナミアオカメムシ (京都府: 初) 11/16
- ホウレンソウ: ホウレンソウベと病レース 8 (徳島県: 初)

- 11/19
- サツマイモ: アワダチソウゲンバイ (茨城県: 初) 11/24
- ブルーベリー: 赤色輪点病 (宮城県: 初) 11/25
- いちご: チビクロバネキノコバエ (長崎県: 初) 11/29
- ユキヤナギ: ユキヤナギハマキフシダニ (仮称) (福島県: 初) 11/30