キュウリモザイクウイルス (CMV) の弱毒系統を用いた CMVによるトマトモザイク病の防除

岩木満朗*・善林六朗**・花田 薫***・渋谷三郎**・栃原比呂志***

Mitsuro IWAKI*, Rokuo ZENBAYASHI**, Kaoru HANADA***, Saburo SHIBUKAWA**
and Hiroshi TOCHIHARA*** : Control of Cucumber Mosaic Virus (CMV)
Disease of Tomato by Application of an Attenuate Strain of CMV

Abstract

In Japan, tomato plants are cultivated in the fields from spring to autumn. Mosaic disease of tomato caused by cucumber mosaic virus (CMV) is one of the most important virus diseases in these fields. A strain of CMV (CMV-SR) isolated from spinach plants showing rugose symptoms did not induce any symptoms in systemically infected tomato plants. CMV-SR was tested in the glasshouse and fields for assessing the possibility of using it as an attenuate virus in order to control the occurrence of CMV causing mosaic symptoms on tomato plants. In the glasshouse, the pre-inoculation of crude juice prepared from *Nicotiana debneyi* leaves infected with CMV-SR protected effectively the infection of tomato plants performed through sap inoculation of virulent CMV. The pre-inoculation of purified CMV-SR (3, 6, 30, 100 µg/ml) also controlled effectively the infection of tomato plants performed through sap inoculation and aphid transmission of virulent CMV, especially CMV-SR at a concentration of 100 µg/ml controlled nearly completely the infection. In the field experiments carried out in spring to autumn, the pre-inoculation of purified CMV-SR (100 µg/ml) markedly reduced the rate of occurrence of mosaic disease, disease index, and the rate of abnormally colored tomato fruits caused by CMV infection. The inoculation of CMV-SR did not adversely affect the growth of the tomato plants. These results indicated that CMV-SR could be used practically as an attenuate virus to control the mosaic disease caused by CMV on tomato plants.

(Received May 16, 1986)

Key words: cucumber mosaic virus SR strain, attenuate virus, cross-protection, tomato.

緒 言

わが国のトマト栽培は春から秋にかけては露地栽培が多いが、そのトマトにキュウリモザイクウイルス (CMV) による病害が多く発生し、生産阻害要因のひとつになっている。トマトでは CMV に対する実用的な抵抗性品種が見つかっていないため、CMV の弱毒

ウイルスの利用による防除が望まれている。最近、CMV のサテライト RNA を取り込んだ弱毒 CMV がトマトにえそを生ずる CMV に対し、温室で強い干涉効果を示すことが報告されている⁹⁾。

縮葉症状を示すホウレンソウから分離された CMV のホウレンソウ縮葉系 (CMV-SR) は多くの寄主にきわめて軽い病徴を生じ、とくにトマト、キュウリ、タバコ (Bright Yellow, Xanthi nc) には全身感染す

* 農業環境技術研究所
305, Japan

** 埼玉県園芸試験場

*** 農業研究センター

National Institute of Agro-Environmental Sciences, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki

Saitama Horticultural Experiment Station, Kuki, Saitama 346, Japan

National Agriculture Research Center, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

るが病徴を生じない⁴⁾。このことから本ウイルスをトマトで弱毒ウイルスとして利用できる可能性が考えられたので、CMV によるモザイク病に対する防除効果を調べた。

実験材料および方法

CMV 弱毒系統 (CMV-SR) の接種源としては全身的にモザイクを生じている *Nicotiana debneyi* 葉の粗汁液とタバコ (Bright Yellow) の接種葉から Takamami の方法²⁾ に準じて純化したウイルスを用いた。汁液接種はカーボランダム (800メッシュ) を用いる常法によった。

ガラス室の試験において、対象として用いた強毒 CMV はシクラメンから分離され、トマトにモザイクを生ずるもので、血清型は CMV-Y 型³⁾ であった。この強毒 CMV をタバコ (Bright Yellow) に接種し、7～10日後の葉脈透化を生じた上葉に約5倍量の0.02% KCN 加用 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて磨砕し、その汁液を用いた。強毒 CMV のアブラムシによる接種試験においても上記罹病タバコをウイルス源とした。アブラムシによる伝搬試験はモモアカアブラムシを用い、獲得吸汁前絶食時間1～2時間、獲得吸汁時間10～15分間、接種吸汁時間24時間とし、トマト1株あたり10頭のアブラムシを用いた。

ガラス室の試験では子葉の展開・伸長後まもない苗の子葉に CMV-SR を汁液接種し、一定期間後に強毒ウイルスを接種した。干渉効果はその発病の有無で調べた。

圃場試験ではガラス室内で播種・育苗し、第1本葉が完全に展開し、第2本葉が展開しかかった時に CMV-SR (100 µg/ml) を子葉と第1本葉に接種し、ガラス室または人工気象室 (最高 25 C) で育成後、

本葉6～8葉期に本圃に定植した。栽植密度は40×60 cm とし、1ベットに2条植えとした。管理は殺虫剤を散布しない点を除いて慣行に従った。試験規模は時期により異なり、2または4連制で、1区当たり26または21株とした。これらのトマトについて、CMV-SR の前接種によるモザイク病の防除効果、果実の異常着色の発生率に及ぼす影響、接種したトマト体内の CMV-SR の濃度の推移、CMV-SR の接種がトマトの生育に及ぼす影響などを調査した。

供試したトマトは TMV の混入を避けるため、ガラス室での試験では TMV 抵抗性品種「強力米寿」または「サターン」を用い、圃場試験では「瑞光102」を用いた。

実験結果

CMV-SR 感染 *N. debneyi* 葉粗汁液の前接種による強毒 CMV に対する干渉作用

CMV-SR に感染した *N. debneyi* 葉の粗汁液を播種約14日後のトマト苗の子葉に接種した。そして、その10日と26日後に第1本葉または第2・3本葉に強毒 CMV を汁液接種した。その結果、CMV-SR だけを接種した区では病徴が全く見られず、強毒 CMV だけを接種した区では全株 (12/12) 発病し、典型的なモザイクを生じた。一方、CMV-SR を予め接種し、10日と26日後に強毒 CMV を接種した区の発病は各12株中0～2株にとどまった (Table 1)。この結果、CMV-SR は強毒 CMV の感染に対し強い干渉作用のあることが明らかとなった。

純化 CMV-SR の前接種による強毒 CMV に対する干渉作用

純化した CMV-SR の各種濃度による強毒 CMV に対する干渉作用の程度を比較した。

Table 1. Effect of the pre-inoculation of CMV-SR on the disease occurrence of tomato plants through sap inoculation of virulent CMV

Exp. plot	Inoculated virus			No. of diseased plants/no. of tested plants	
	Date 10/25	11/4	11/20	11/29	12/25
I	CMV-SR ^{a)}	—	—	0/12	0/12
II	"	CMV ^{b)}	—	0/12	0/12
III	"	—	CMV ^{b)}	2/12	2/12
IV	—	CMV ^{b)}	—	12/12	12/12

a) Crude juice of *Nicotiana debneyi* leaves showing mosaic symptoms.

b) Virulent CMV.

純化 CMV-SR の濃度を 30, 6, 3 μ g/ml とし、播種約14日後のトマト苗の子葉に接種し、その14日または23日後に強毒 CMV を上葉に汁液接種した。その結果、純化 CMV-SR はいずれの濃度でもトマトに病徴を現わさず、対照の強毒 CMV だけを接種した区では接種7～10日後に全株 (6/6, 3/3) 発病した。一方、予め純化 CMV-SR を接種し、その14日または23日後にそれぞれ強毒 CMV を汁液接種した区では CMV-SR の濃度および強毒 CMV を接種するまでの期間に関係なく、12株中0～3株の発病にとどまり、更に発病までの期間も1週間から1カ月間遅くなった。

また、強毒 CMV をアブラムシを用いて接種した場合、強毒 CMV だけを接種した区では6株中2株発病したのに対し、予め CMV-SR (30, 6, 3 μ g/ml) を接種し、その14日後に強毒 CMV を接種した区ではそれぞれ12株中0～1株の発病にとどまった。

このように純化 CMV-SR を前接種した場合も、強

毒 CMV に対し強い干渉作用が認められ、その程度は CMV-SR の濃度を 3 μ g/ml にしてもかなり高かった。しかし、干渉効果が完全でなかったところから、CMV-SR の濃度を 100 μ g/ml にして次の試験を行った。

播種約14日後のトマト苗の子葉に純化 CMV-SR (100 μ g/ml) を接種し、その5, 10, 21日後に強毒 CMV を汁液接種した。その結果、CMV-SR は 100 μ g/ml の濃度で接種してもトマトに病徴が全く見られなかった。対照の強毒 CMV だけを接種した区では接種7～15日後に全株 (6/6, 6/6, 6/6) 発病した。一方、予め純化 CMV-SR を接種し、その5, 10日後に強毒 CMV を汁液接種した区では約2カ月間発病しなかった。しかし、21日後に強毒 CMV を汁液接種した区では6株中5株に発病が認められた (Table 2)。これは強毒 CMV の濃度が極めて高かったためと判断された。

Table 2. Effect of the pre-inoculation of purified CMV-SR on the disease occurrence of tomato plants through sap inoculation of virulent CMV

Exp. plot	Inoculated virus				No. of diseased plants/no. of tested plants			
	Date 12/16	12/21	12/26	1/6	12/28	1/5	1/21	2/21
I	CMV-SR ^{a)} 100 μ g	—	—	—	0/6	0/6	0/6	0/6
II	"	CMV ^{b)}	—	—	0/6	0/6	0/6	0/6
III	"	—	CMV ^{b)}	—		0/6	0/6	0/6
IV	"	—	—	CMV ^{b)}			5/6	5/6
V	—	CMV ^{b)}	—	—	6/6	6/6	6/6	6/6
VI	—	—	CMV ^{b)}	—		6/6	6/6	6/6
VII	—	—	—	CMV ^{b)}			6/6	6/6

a) Purified virus. b) Virulent CMV.

Table 3. Effect of the pre-inoculation of purified CMV-SR on the disease occurrence of tomato plants by aphid-transmission of virulent CMV^{a)}

Exp. plot	Inoculated virus				No. of diseased plants/no. of tested plants			
	Date 12/16	12/21	12/26	1/6	12/28	1/5	1/21	2/21
I	CMV-SR ^{b)} 100 μ g	—	—	—	0/6	0/6	0/6	0/6
II	"	CMV ^{c)}	—	—	0/12	0/12	0/12	0/12
III	"	—	CMV ^{c)}	—		0/12	0/12	0/12
IV	"	—	—	CMV ^{c)}			0/12	0/12
V	—	CMV ^{c)}	—	—		3/12	4/12	4/12
VI	—	—	CMV ^{c)}	—		3/12	3/12	3/12
VII	—	—	—	CMV ^{c)}			3/12	3/12

a) Number of aphids per plant : 10. b) Purified virus. c) Virulent CMV.

また、純化 CMV-SR (100 μ g/ml) を接種し、その5, 10, 21日後にアブラムシを用いて強毒 CMV を接種した。その結果、対照の強毒 CMV だけをアブラムシを用いて接種した区では合計36株中10株に発病が認められたが、予め純化 CMV-SR を接種した区では合計36株中全く発病が認められなかった (Table3)。

圃場における CMV-SR の前接種によるトマトの CMV モザイク病の防除試験

1) CMV-SR の前接種によるトマトの CMV モザイク病の防除効果

圃場における試験は春期と秋期の2回実施し、発病株率と発病度について調査した。春期試験では CMV-SR 接種39日後の5月15日に、秋期試験では CMV-SR 接種29日後の9月7日に圃場に定植した。定植後10~15日間隔で4~5回、各区全株を対象にしてモザイクや糸葉症状など CMV によると思われる症状の発生の有無を調査し、発病株率を算出した。また、発病株は発病程度を3段階に分けて調査し、それをもとに発病度を算出した。発病度の算出は次の式によった。

$$\text{発病度}(\%) = \frac{\text{発病程度 甚の株数} \times 3 + \text{発病程度 中の株数} \times 2 + \text{発病程度 軽の株数} \times 1 + \text{健の株数} \times 0}{\text{調査株数} \times 3} \times 100$$

発病程度・健：病徴が見られない。

健全株と同等である。

軽：先端に近い部分の葉にモザイクや葉脈透化を発現しているが、発現葉数は少なく、葉の生育はほぼ正常で、草丈は

中：葉に明瞭なモザイクや葉脈透化が発現し、巻葉や奇形も生じ、病徴発現葉の割合が高い。草丈は健全株より低い。

Table 4. Effect of the pre-inoculation of CMV-SR on the occurrence of mosaic disease caused by CMV on tomato plants in spring

Exp. Plot	Percentage of infection				Disease index ^{a)}
	Date 6/4	6/16	7/2	7/19	7/19
CMV-SR (84) ^{b)}	0 %	7 %	18 %	19 %	7.9 %
No pre-inoculation control (84) ^{b)}	1	54	64	75	38.9

a) Disease index

$$= \frac{\text{No. of plants showing severe symptom} \times 3 + \text{No. of plants showing midium symptom} \times 2 + \text{No. of plants showing mild symptom} \times 1 + \text{No. of plants showing no symptom} \times 0}{\text{No. of tested plants} \times 3} \times 100$$

in which

mild : Plants showed mosaic or vein-clearing symptoms on a few top leaves, but grew similarly to healthy plants.

midium : Plants showed distinct mosaic or vein-clearing symptoms and leaf rolling or malformation, and slightly stunted.

severe : Plants showed severe symptoms and malformation, and dwarfed.

b) Number of tested plants.

Table 5. Effect of the pre-inoculation of CMV-SR on the occurrence of mosaic disease caused by CMV on tomato plants in autumn

Exp. plot	Percentage of infection					Disease index ^{a)}
	Date 10/4	10/16	10/20	11/12	11/21	11/21
CMV-SR (52) ^{b)}	4 %	4 %	6 %	12 %	12 %	7.1 %
No pre-inoculation control (52) ^{b)}	8	10	24	46	48	22.0

a) See foot note a) in Table 4. b) Number of tested plants.

甚:「中」より発病程度が高く、葉の奇形や株の萎縮が著しい。

その結果、CMV-SR を前接種した区は無接種区より発病が遅く、しかも最終発病株率も無接種区が75% (春期) と48% (秋期) であったのに対し、それぞれ19%と12%に抑えられた。また、発病度も無接種区の38.9% (春期) と22.0% (秋期) に対し、CMV-SR の前接種区はそれぞれ7.9%と7.1%であった (Table 4, 5)。

これらのことから、CMV-SR の前接種は圃場のトマトにおいて CMV モザイク病の発生をかなり抑える効果のあることが明らかとなった。

2) CMV-SR の前接種による異常着色果率への影響

果実の表面に円形ないし不定形のやや凹んだ黄白色を呈するもの、基部の表面に不定形の黄白色ないし黄緑色を呈するものを異常着色果と呼び、CMV の感染により起るとされている。

CMV-SR の前接種による異常着色果率への影響を春期試験で2回 (7月30日と8月7日) 調査した。その結果、無接種区がそれぞれ24.9%と29.3%であったのに対し、CMV-SR の前接種区は14.2%と14.6%であり、CMV-SR の前接種により、異常着色果の発生はかなり抑えられた (Table 6)。

3) トマトにおける CMV-SR の濃度の推移

CMV-SR の前接種はトマトの CMV モザイク病の発生を抑える効果が見られたが、接種されたトマトにおける CMV-SR の濃度がどのように推移していくか調査した。

任意に5株を選定し、接種後約15日間隔で5回、最上位葉から数えて2, 3番目の葉の一部を採取し、その10倍容量の0.05 M リン酸緩衝液を加えて磨砕後、*Chenopodium amaranticolor* に接種した。ウイルス濃度はその接種葉の1 cm² 当たりの局部病斑数により調査した。その結果、育苗期のウイルス濃度は低く、一度増加するが、その後は減少し、極めて低い濃度で推移した (Table 7)。

4) トマトの生育に及ぼす CMV-SR の影響

CMV-SR の接種がトマトの生育に及ぼす影響を調べるため、定植前と定植後の2回、CMV-SR 接種区及び無接種区について、いずれも無病徴株30株を選び、草丈、葉数及び最大葉長を調べた。その結果、CMV-SR 接種株の生育は定植前の育苗期には無接種株に比べて草丈及び最大葉長とも短かく、葉数も少なかった。しかし、定植後の生育は草丈、葉数及び最大葉長のいずれもほぼ同じとなった (Table 8)。

Table 6. Effect of the pre-inoculation of CMV-SR on the occurrence of abnormally colored fruits in tomato plants

Exp. plot	Date 7/30		8/7	
	No. of tested fruits	No. of abnormally colored fruits	No. of tested fruits	No. of abnormally colored fruits
CMV-SR	380	14.2 %	206	14.6 %
No pre-inoculation control	333	24.9	181	29.3

Table 7. Concentration of CMV-SR in tomato plants

Position of leaf ^{a)}	No. of local lesions in one cm ² of inoculated leaves in <i>Chenopodium amaranticolor</i> ^{b)}						
	Date	4/6	4/21	5/9	5/25	6/9	6/24
2		(178) ^{c)}	5.2	1.7	15.4	0.4	0.2
3			2.6	1.9	6.4	0.1	0.7

a) Second and third leaves under top leaf.

b) Average number of local lesions induced by juice inoculation from five plants.

c) Number of local lesions induced by inoculum of CMV-SR.

Table 8. Effect of the inoculation of CMV-SR on the growth of tomato plants^{a)}

Exp. plot	Date 4/23			6/5		
	Height of plant	No. of leaves	Length of longest leaf	Height of plant	No. of leaves	Length of longest leaf
CMV-SR	4.9 cm	3.2	3.8 cm	58.6 cm	16.4	40.5 cm
No pre-inoculation control	6.9	4.4	6.1	62.5	16.6	40.0

a) Average of 30 plants.

考 察

CMV-SR をトマトに接種すると、接種直後の育苗期には生育がやや抑制される傾向にあるが、明瞭な病徴は全く発現せず、生育が進むにつれて無接種区との差がなくなることから、CMV-SR の接種はトマトの生育に実害はほとんどないと考えられる。

強毒 CMV に対する CMV-SR のトマトでの干渉作用はガラス室内ではきわめて高いが、圃場においては無接種区の発病株率の4分の1程度までしか発病を抑えることができなかった。CMV-SR 接種区で発病した原因については明らかでないが、他の試験の結果から CMV-SR の感染率はほぼ100%に近いと判断されたことから、次のようなことが考えられる。1) トマト体内において、CMV-SR の分布むらがあり、強毒 CMV の感染を防ぐことができなかった。2) ガラス室内と圃場では環境条件が異なるために、圃場の方が CMV-SR の濃度が低く推移し、干渉作用が十分でなかった。3) ガラス室で防除効果が高かったのは CMV-SR 接種後1カ月以内の試験であり、トマト体内の CMV-SR の濃度が十分高かった。4) ガラス室での試験に用いた強毒 CMV と圃場試験で発生した CMV はともに血清型が Y 型であったが、ウイルス株により干渉作用の程度の異なる可能性がある。

しかし、CMV-SR の前接種区を無接種区と比較した場合、発病株率が低下するだけでなく、それ以上に発病度が低下し、また、異常着色果率も低下することから、CMV-SR は弱毒ウイルスとして実用に供しうものと考えられる。

ただし、CMV-SR はアブラムシにより伝搬され、ホウレンソウやピーマンに縮葉症状やモザイクを生ずることから、露地で使用する場合、周辺のこれらの作

物に被害を起す恐れがあり、実用化のためにはこれらの作物にも発病しないか、アブラムシにより伝搬されない弱毒株への改良が望まれる。また、実用化のためには簡易接種法、接種源の調整法・保存法などについても検討する必要がある。

摘 要

縮葉症状を示すホウレンソウから検出されたキュウリモザイクウイルス (CMV-SR) はトマトに病徴を生じないことから、弱毒ウイルスとしてトマトの CMV モザイク病の防除に使用できる可能性を調べた。ガラス室での試験では CMV-SR の接種源として感染 *Nicotiana debneyi* 葉の粗汁液を用いた場合、汁液接種した強毒 CMV に対して強い干渉作用のあることが認められた。CMV-SR の接種源として純化ウイルス (3, 6, 30, 100 µg/ml) を用いた場合も汁液接種およびアブラムシを用いて接種した強毒 CMV に対して強い干渉作用を示し、とくに 100 µg/ml の場合はほぼ完全に発病を抑えた。圃場で行った春期と秋期の試験で 100 µg/ml の CMV-SR を接種したトマトの発病株率はそれぞれ19%と12%で、無接種の発病株率75%と48%に比して低かった。発病度は CMV-SR 接種区の7.9%と7.1%に対して無接種区は38.9%と22.0%であった。また、CMV の感染により起こるとされている異常着色果率も CMV-SR 接種区の14.6%に対し、無接種区は29.3%であった。CMV-SR を接種したトマト体内でのウイルス濃度を調べたところ、接種後1時期上昇したが、その後は極めて低濃度に推移した。また、CMV-SR の接種はトマトの生育に大きな影響を与えなかった。以上から、CMV-SR はトマトの CMV モザイク病を防除するための弱毒ウイルスとして利用できる可能性がある。

引用文献

1. Hanada, K. and Tochiwara, H. (1980). 日植病報 46 : 159-168.
2. Takanami, Y. (1981). Virology 109 : 120-126.
3. Yoshida, K., Goto, T. and Iizuka, N. (1985). 日植病報 51 : 238-242.
4. 善林六朗・花田 薫・岩木満朗・渋谷三郎 (1983). 同上 49 : 716-719.