カボチャモザイクウイルス (WMV-2) の弱毒株作出と その干渉効果

亀谷 満朗^{*†}・栃原比呂志^{**}・花田 薫^{*}・鳥越 博明^{***}

Mitsuro KAMEYA-IWAKI, Hiroshi TOCHIHARA, Kaoru HANADA and Hiroaki TORIGOE :
Attenuated Isolate of Watermelon Mosaic Virus (WMV-2) and
Its Cross Protection against Virulent Isolate

Abstract

Attenuated isolates of watermelon mosaic virus 2 (WMV-2) were obtained by local lesion selection on *Chenopodium quinoa* after the treatments of partially purified materials of WMV-2 (W-80) with ultraviolet irradiation and nitrous acid. Squash, cucumber, muskmelon and watermelon seedlings inoculated with one of the isolates designated WI-9 remained symptomless, except mild symptoms on first true leaf, and showed protection to the later inoculation with virulent isolate of WMV-2 in greenhouse conditions.

Key words : attenuated watermelon mosaic virus 2, cross protection, cucurbits.

ウリ科作物に発生する主要な病原ウイルスとしてキュウリモザイクウイルス、カボチャモザイクウイルス (WMV-2)、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) などがある。露地栽培カボチャおよびキュウリなどではとくに WMV-2¹⁾ と ZYMV³⁾ の発生が多く、モザイク病を起こすとともに果実にもモザイクや奇形を生じ、大きな被害を起こしている。

本研究は WMV-2 によるウリ科作物のモザイク病の防除に利用できる弱毒株の作出を目的として、WMV-2 に紫外線照射処理と亜硝酸ナトリウム処理を行い、弱毒株を選抜した。

弱毒ウイルスの利用によるウイルス病防除については Tobamovirus や Closterovirus について実用化が進められ、大きな成果をあげている。Potyvirus についても、わが国では WMV-2 と ZYMV について希釈したウイルス液をメロンに接種することにより、弱毒株が選抜された²⁾。外国では papaya ringspot virus につ

いて亜硝酸ナトリウム処理により弱毒株が作出され³⁾、台湾などで試験した結果、干渉効果は低いが経済的效果のあることが示されている⁵⁾。また、フランスで発見されたアブラムシにより伝搬されにくく、病徴の軽い ZYMV が強い干渉力を持ち¹⁾、ZYMV によるモザイク病防除効果のあることが示されている⁴⁾。しかし、これまで紫外線照射処理により Potyvirus の弱毒株を作出した例は報告されていない。

本研究において弱毒株作出には WMV-2 の分離株 W-80 (山本孝彜氏より分譲) を供試した。弱毒株の選抜方法は以下のである。

W-80 感染カボチャ (品種 : 芳香青皮栗) 葉を 2 倍量の 0.01 M Na-diethyldithiocarbamate と 0.1% 2-mercaptoethanol を含む 0.3 M リン酸 2 カリウム (pH 8.8) および 0.3 倍量の四塩化炭素とともに磨砕し、8,500×g 15 分間遠心分離し、その上清に 2% トリトン X-100 を加えてよく振とうした。その後 20% ショ

* 農業研究センター National Agriculture Research Center, Kannondai, Tsukuba 305, Japan

** 九州農業試験場 Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-11, Japan

*** 鹿児島県農業試験場大隅支場 Kagoshima Agricultural Experiment Station Osumi Branch, Kimotsuki, Kagoshima 839-16, Japan

† 現在 : 山口大学農学部 Present address : Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yoshida, Yamaguchi 753, Japan

糖液のクッションを用いた超遠心分離 ($80,000 \times g$ 90分間)を行い、その沈でんを 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 8.5) によく懸濁し、 $8,500 \times g$ 15分間遠心分離した。この分画遠心分離を2回くり返し、その上清を W-80の部分純化液として弱毒化処理に用いた。

紫外線照射処理は上記部分純化液 0.3 ml を小型シャーレに入れ、ふたをとり、 15 W の殺菌灯下約 30 cm で、ときどき液を振とうして、 $5 \sim 30$ 分間行った後、その処理液を *Chenopodium quinoa* に接種した。亜硝酸ナトリウム処理は 0.8 M 亜硝酸ナトリウム液と上記部分純化液を等量混合し、恒温槽で 20°C 、 $30 \sim 120$ 分間行った。本処理液は $2 \sim 10$ 倍に 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈して、*C. quinoa* に接種した。これらの *C. quinoa* に生じた退緑性の局部病斑を切り取り、1個ずつ芳香青皮栗カボチャに接種し、病徴の程度を調べ、選抜 (局部病斑選抜) を行った。病徴の有無は肉眼により判定し、さらに二重抗体酵素結合抗体法 (ELISA) によって感染の有無についても調べた。

その結果 W-80 の部分純化液に紫外線照射処理を9分間1回、亜硝酸ナトリウム処理 (0.4 M) を 20°C で $30 \sim 120$ 分間3回、さらに紫外線照射処理を $5 \sim 30$ 分間1回行い、その都度 *C. quinoa* での局部病斑選抜を $1 \sim 2$ 回くり返した。最後の紫外線照射処理の15分間区で病徴のきわめて軽い株が得られた。その後さらに

C. quinoa で局部病斑選抜を3回くり返し、1株を選び、WI-9と命名した。

WI-9株は芳香青皮栗カボチャの子葉に接種した場合、第1本葉に軽い退緑斑点や葉脈透化を生じ、その後はまれに軽い退緑斑点を生じることもあるが、ほとんど無病徴で、生育には影響がみられなかった。そこで、この株を用いて干渉効果試験を行った。以下の試験において弱毒株は感染カボチャ葉の10倍液 (0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.2を用いた)をそれぞれの子葉に汁液接種した。なお実験1と3は空調温室 ($23 \sim 30^\circ\text{C}$) において、また2と4は網室 ($25 \sim 35^\circ\text{C}$) において行った。

実験1 芳香青皮栗カボチャの子葉に WI-9 を接種し、その8および20日後に強毒株 (K-10、キュウリモザイク株より分離) の100倍液をそれぞれ第2および3本葉に汁液接種した。その結果、対照の強毒株だけの区では $15 \sim 20$ 日後に明瞭なモザイクを生じたのに対し、あらかじめ弱毒株を接種した区では明瞭なモザイク症状はみられなかった (Table 1)。

実験2 芳香青皮栗カボチャの子葉に WI-9 を接種し、その約3週間後に第1および2本葉に強毒株を接種した。各試験区において3~4株の植物を供試した。対照の強毒株だけを接種した区では接種後11日目ごろから3株中2株において全身的な病徴が現われはじめ、次第に明瞭な病徴を示し、後に凹凸のある奇形果

Table 1. Cross protection effectiveness of a WMV-2 attenuated isolate (WI-9) against a virulent isolate (K-10) in squash after mechanical challenge at different time intervals

Plot	No. of test plants	Inoculation of WI-9 March 14	Challenge inoculation of K-10		No. of squash plants with severe symptoms	
			March 22	April 3	April 13	18
1	4	+ ^{a)}	+	—	0	0
2	4	+	—	+	0	0
3	4	+	—	—	0	0
4	4	—	+	—	4	4
5	2	—	—	+	2	2
6	2	—	—	—	0	0

a) + : inoculated, — : non-inoculated.

Table 2. Cross protection effectiveness of a WMV-2 attenuated isolate (WI-9) against a virulent isolate (K-10) via aphid, *Myzus persicae*, in squash^{a)}.

Plot	No. of test plants	Inoculation of WI-9 April 18	Challenge inoculation of K-10 via aphid May 2	No. of squash plants with severe symptoms May 22
1	15	+ ^{b)}	+	0
2	15	—	+	15

a) Aphid transmission test ; Fasting period before aquisition feeding : $1 \sim 2 \text{ hr}$, aquisition feeding period : 10 min , inoculation feeding period : one day, number of aphids per test plant : 10 aphids.

b) + : inoculated, — : non-inoculated.

Table 3. Pathogenicity of a WMV-2 attenuated isolate (WI-9) in cucurbit plant species

Plant	Cultivars	Symptoms
<i>Cucurbita maxima</i>	Hokou Aokawa Kuri	cs, vc ^{a)}
<i>C. moshata</i>	Shirokikuza	cr
	Hayato	vc, cr
	Huttsu Kurokawa	cr
	Heian Kogiku	—
<i>C. maxima</i> × <i>C. moshata</i>	Ebisu	vc, cr
	Shintosa	vc
	Kikusui	vc, cr
<i>Cucumis melo</i>	Earl's Favourite	—
	New melon	—
	Prince melon	—
<i>C. melo</i> var. <i>conomon</i>	Numame	—
	Tokyo Oo	—
<i>C. melo</i> var. <i>acidulus</i>	Shunkou	—
	Kintaro	—
<i>Citrullus lunatus</i>	Kyokuto	cs
<i>Lagenaria siceraria</i>	Shimotsukeshiro	—

a) cs: systemic mild chlorotic spot, vc: systemic mild vein clearing, cr: systemic mild chlorotic ring, —: no symptom.

実をつけた。それに対し、あらかじめ弱毒株を接種した区では強毒株を接種した1カ月後にも明瞭な病徴はみられず、果実も無接種区や弱毒株だけの区と同様で異常は認められなかった。

実験3 自然界においてWMV-2はアブラムシにより伝搬されるため、強毒株のアブラムシ伝搬に対する干渉効果を調べた。

芳香青皮栗カボチャの子葉にWI-9を接種した2週間後にモモアカアブラムシを用いて、強毒株を接種した。伝搬試験条件は獲得吸汁前絶食時間1~2時間、獲得吸汁時間10分間、接種吸汁時間1日とし、1株当りアブラムシ10頭を用いた。その結果、対照の強毒株だけの区では10日後ごろから発病しはじめ、20日後にはすべて発病したのに対し、あらかじめ弱毒株を接種した区では明瞭な病徴はみられなかった (Table 2)。

実験4 西洋カボチャ同様にWMV-2の発生の多い雑種カボチャ (えびす)、キュウリ (落合節成)、メロン (サンライズ)、スイカ (旭都) における干渉効果を調べた。上記作物の子葉にWI-9を接種し (7月14日)、15日後に強毒株を第4~5葉に接種した。各植物の各区において2~3株の植物を供試した。その結果、4種の植物において対照の強毒株だけの区では接種後9日ごろから退緑斑点やモザイクを生じたのに対し、あらかじめ弱毒株を接種した区では明瞭な病徴は認められなかった。これらの結果から本研究において作出したWMV-2の弱毒株WI-9はカボチャ等4種ウリ科作物

において強毒株に対し強い干渉作用を示すことが明らかとなった。

次に、本研究で作出した弱毒株WI-9の性状について試験した。本実験は空調温室 (23~30°C) において行った。

まず、WI-9の各種ウリ類に対する病原性を調べるため、カボチャ (芳香青皮栗・白菊座・菊水・はやと・富津黒皮・平安小菊・えびす・新土佐)、メロン (アルスフェボリット)、ニューメロン、プリンスメロン、シロウリ (沼目・東京大)、マクワウリ (春香・金太郎)、スイカ (旭都)、ユウガオ (しもつけしろ) の各子葉にWI-9を汁液接種した。その結果、平安小菊カボチャを除くカボチャ6品種とスイカの第1~2本葉に軽い退緑斑点、退緑輪紋、葉脈透化などを生じたが、後に不明瞭になり、生育にはあまり影響がみられなかった (Table 3)。このことからWI-9はカボチャ以外のウリ科作物においても弱毒ウイルスとしての利用が期待できる。

一方、インゲンマメ (本金時) にはかなり明瞭なモザイクを生じるため、インゲンマメ (本金時など限られた品種) などの畑の近くで栽培されるウリ科作物にWI-9を弱毒ウイルスとして使用する場合にはインゲンマメに感染しないよう注意する必要がある。

WI-9のアブラムシ伝搬性については、モモアカアブラムシとワタアブラムシを用いて試験した。試験条件は前記と同じである。感染の有無は病徴の有無および

Chenopodium amaranticolor への戻し接種により判定した。その結果、モモアカアブラムシでは15株中14株、ワタアブラムシでは15株中4株が感染した。したがって、WI-9はアブラムシ伝搬性を消失していないことが示された。

WI-9の粗汁液中の安定性については、芳香青皮栗カボチャの感染葉を用いて、不活化温度・希釈限界・保存限界を調べた。感染葉を10倍量の0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.2)とともに磨砕し、2重のガーゼで濾過した汁液を用いた。その結果、不活化温度は55~60°C(10分間)、希釈限界は 10^{-2} ~ 10^{-3} 、保存限界は7~14日

(20°C)であり、親株の安定性⁷⁾とほぼ同じであった。

以上述べたようにWI-9はウリ科作物に発生するWMV-2モザイク病防除に利用できる可能性があるが、実用化にあたってはそれぞれの地域において、病原性の程度や干渉効果、その地域の経済作物への影響などを調べる必要がある。

本研究を行うにあたり、WMV-2のW-80株およびその抗血清を分譲していただいた山本孝彗博士に深謝の意を表する。

引用文献

1. Lecoq, H., Lemaire, J.M. and Wipf-Scheibel, C. (1991). Control of zucchini yellow mosaic virus in squash by cross protection. *Plant Disease* 75 : 208-211.
2. 本吉総男・西口正通 (1984). ウリ類モザイク病防除のための弱毒ウイルスの作出. *植物防疫* 38 : 353-357.
3. 大津善弘・佐古宣道・Somowiyarjo, S. (1985). 宮古・八重山群島のカボチャから分離した Zucchini yellow mosaic virus. *日植病報* 51 : 234-237.
4. Wang, H.L., Gonsalves, D., Provvidenti, R. and Lecoq, H.L. (1991). Effectiveness of cross protection by a mild strain of zucchini yellow mosaic virus in cucumber, melon and squash. *Plant Disease* 75 : 203-207.
5. Wang, H.L., Yeh, S.D., Chiu, R.J. and Gonsalves, D. (1987). Effectiveness of cross protection by mild mutants of papaya ringspot virus for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. *Plant Disease* 71 : 491-497.
6. 山本孝彗・石井正義・勝部利弘 (1982). 血清学的性質によるカボチャモザイクウイルス分離株の類別. *日植病報* 48 : 613-619.
7. 山本孝彗・橘 泰宣 (1975). カボチャモザイクウイルスの2分離株について. *日植病報* 41 : 285.
8. Yeh, S.D. and Gonsalves, D. (1984). Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology* 74 : 1086-1091.

(平成3年12月9日受理)