弱毒ウイルスの複合利用によるキュウリウイルス病の防除

はじめに

ウイルス間の干渉作用を応用した弱毒ウイルスの利用 技術は、これまでのいくつかの事例で示されているよう に、作物ウイルス病の防除に有効である。主な弱毒株の 特性と最近の利用状況は、亀谷の総説(1994)に詳し い。本稿では、複数の弱毒ウイルスを同時に使う「複合 利用技術」について、キュウリウイルス病を対象とした 現在までの研究成果の概要を述べる。

なぜ、この技術の開発が必要となるのか。それは、露地栽培の作物などでは2種以上のウイルスが混合感染している場合が多く、その被害を回避するには単独の弱毒ウイルス接種だけでは不十分と考えられるためである。一般に、異種のウイルスに混合感染した植物はそれぞれが単独感染した場合よりも明瞭な病徴を現し、ウイルスの組み合わせによってはかなり激しい症状となるが、この現象はキュウリでも報告されている(山本ら、1984; POOLPOL and INOUE, 1986; IWASAKI and INABA, 1988)。このようなウイルス間の相互作用からすると、弱毒ウイルスといえども混合感染した場合には、作物の生育や収量への影響がかなり強くなることが懸念される。また、お互いの強毒ウイルスに対する干渉力にも影響するのではないかなど、未解明の点が多い。

農林水産省によって平成3年度から5年間実施された「地域バイテク事業」では、対象の作物やウイルスは異なるものの、県と国の研究機関が協力して弱毒ウイルスの「複合利用技術」の実用化を目指した。筆者らは、全国のキュウリ産地でまん延している3種類のウイルスを対象とした。なお、本稿の内容は京都農総研で行われた「複合利用技術」の実用性の検証を中心にした。弱毒株の改良の過程やその特性および検出手法などについては別の機会に報告したい。

I キュウリのウイルス病と弱毒ウイルスの選定

我が国のキュウリに発生するウイルスは7種が報告さ

Multiple Inoculation with Three Attenuated Viruses for the Control of Cucumber Virus Disease. Ву Yoshitaka Козака and Mabito Iwasaki

れているが、このうち、キュウリモザイクウイルス (CMV)、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) およびカボチャモザイクウイルス (WMV 2) は恒常的 に発生の多いウイルスである。これらはともにアブラムシ伝染または各種の管理作業によってまん延し、混合感染の頻度も高く、特に露地の夏秋作型では被害が大きい。また、近年ブルームレスキュウリ栽培の進展により接木栽培の比率が高くなり、これら3種ウイルスによる萎ちょう症の発生も多くなっている(河野・善林、1988;Iwasaki and Inaba、1988;岩崎、1991;小坂・福西、1991;岩崎ら、1993)。

そこで、弱毒ウイルス接種によってこれらウイルスの感染を同時に防ぐため、農林水産省や他府県の農業試験研究機関で既に作出されていた多くの弱毒株を一堂に集め、キュウリへの適合性を比較した。キュウリでの弱毒性、他種ウイルスとの混合感染での病徴発現や強毒ウイルスに対する干渉効果の検定結果から、WMV 2 は WI-9 (亀谷ら、1992)、ZYMV は 2 S 142 a 6 (外間ら、1989:この報告では WMV とされ、後に ZYMV に訂正)をいっそう弱毒化した 20 T 6 とこれから選抜した ZY 95、CMV は 2 種 CMV 分離株の混合感染植物から得られた Π -19 とこれから選抜した CM 95 を選定し、防除試験に供試した。

Ⅱ 3種弱毒ウイルスの複合接種方法

3種類の弱毒株の増殖用植物として、増殖の容易さとコンタミネーションの防止から、CMVには Nicotiana rustica, WMV 2 にはインゲンマメ(本金時)、ZYMVにはセイヨウカボチャ(えびす)を選んだ。これらの感染葉を 15~20 倍量のリン酸緩衝液(0.1 M, pH 7.2)で同時に磨砕し、2 重ガーゼで沪過した汁液を接種源とした。接種直前に数%のカーボランダムを加え、この懸濁液に浸した綿棒でキュウリの子葉に接種した。キュウリ子葉への接種ではいずれのウイルスとも 100%の感染率であったが、苗齢が進むと CMV の感染率は著しく低下した。この結果から、3種弱毒株の複合接種方法としては、3種ウイルスの感染葉の混合汁液を播種後 7~8日のキュウリ子葉に接種する「混合接種」を選定した(以降、複合接種を混合接種という)。

Ⅲ 複合弱毒ウイルスのキュウリへの影響

1 生育・病徴発現・各ウイルスの増殖量

冒頭で述べたように、3種弱毒ウイルスの混合接種によってキュウリの生育、病徴発現やウイルスの増殖量が大きく変動することが考えられたので、単独接種株と混合接種株で比較した。キュウリの品種はいずれのウイルスにも感受性の高い相模半白(山本ら、1984)、弱毒株にはCM 95、ZY 95 および W I -9 を用いた。温室内のポットで育てた7日苗の子葉に単独、2種混合あるいは3種混合接種した。接種後12~20日の第1~3本葉の病徴は、ZYMV単独接種では無病徴、CMVとWMV2の単独接種およびZYMV+WMV2混合接種ではごく軽いモザイク症状が生じた。CMV+ZYMVまたはCMV+WMV2混合接種では明らかに病徴は強まり、3種混合接種では比較的明瞭な黄斑モザイク症状が認められた。

接種後20日の草丈と株重を調べたところ,CMVを単独または混合接種した株は無接種株よりも有意に劣った。ZYMVまたはWMV2の単独接種と両者の混合接種は、生育にはほとんど影響しなかった。

各弱毒株について、単独接種と混合接種での増殖量をエライザ法(2重抗体法)によって比較した。接種後20日の第1,2本葉からウイルスを検出したところ、CMVはいずれのウイルスとの組み合わせでも単独感染よりも高く、WMV2はCMVとの混合感染によって抑えられたが、ZYMVには影響されないようであった。ZYMVの増殖は他2種ウイルスによってかなり抑制された。

2 果実の収量・品質

1995年と96年の5~8月,農総研内網室で栽培した 接木キュウリ(穂木=シャープ5, 台木=ひかりパワ ー) において、3種混合接種株と無接種株の果実の生産 性を比較した。移植前の接種苗の生育は明らかに劣っ た。生育前半では、混合接種株の果実は無接種株のもの とまったく変わらなかったが、葉には軽い黄斑モザイク 症状が現れた。後半には、葉のモザイク症状が強まり、 退緑斑と軽い奇形を現す果実が発生した。その結果、ま ったく病徴のない果実数は、無接種株よりも 25~30% 減少した。しかし、軽い退緑斑のみを示す果実は販売可 能とされることから、可販物としては10~15%の減少 であった。なお、単独接種株のうち ZYMV 弱毒株は収 穫後半には葉のモザイク症状が明瞭となったが、果実へ の影響は混合接種株よりも小さかった。CMV および WMV 2 弱毒株の単独接種株の果実には悪影響は認めら れなかった。

温室内において、8日苗の相模半白の子葉に CM 95、 ZY 95 および W I-9 の感染葉汁液を単独あるいは 3 種 混合接種した。いずれの場合も、各ウイルスの感染葉を 15 倍希釈汁液となるようにリン酸緩衝液で調製した。 接種 15 日後の第 3 本葉に、強毒ウイルス(いずれもキュウリからの分離株)の感染葉汁液(50 倍希釈)をチャレンジ接種し、その後の病徴の発現を 25 日間観察した。

図-1 に示したように、いずれの弱毒株とも、単独接種と混合接種との間で、強毒ウイルスに対する干渉効果には差が認められなかった。CM 95 と ZY 95 は強毒ウイルスの病徴発現を明らかに遅らせたが、その干渉効果は不十分であった。WMV 2 は完全な干渉効果を示した。キュウリ品種は異なるものの、接木株でも比較したが、結果はほぼ同じであった。以上のことから、それぞれの弱毒株が示す干渉効果は、3 種類を混合接種してもお互いに影響しないことが検証された。

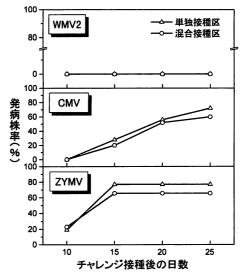


図-1 弱毒ウイルスの単独接種と混合接種の干渉効果 各区 24~26 株を供試した。弱毒ウイルス無接種株 は,強毒ウイルスのチャレンジ接種後 8 日以内に全 株発病した。調査最終時において無病徴株は生物検 定またはエライザ法によって強毒ウイルス感染の有 無を調べた。いずれのウイルスとも,2 区間には Fisher の正確確率検定あるいは x² 検定 (5%) で有意 差は認められない。

V 弱毒ウイルス複合利用技術の実用化試験

1 研究所内試験

1994年と95年5~8月,3種強毒ウイルスの感染株を配置して多発条件にした農総研内圃場において,3種弱毒株を混合接種した接木苗(穂木=シャープ5,台木=ひかりパワー)の防除効果を調べた。1994年はIII-19,20 T6 および W I-9 を供し,1 \boxtimes 6 株 (4 \boxtimes 6 \boxtimes 6 とした。1995年はI1 \boxtimes 5 株 (4 \boxtimes 6 \boxtimes 6 \boxtimes 7 \boxtimes 8 が \boxtimes 9 を供試した。

混合接種株では6月中旬(接種後40~50日)にはごく軽いモザイク症状が認められ、その後も症状は進展した。一方、無接種株では6月下旬~7月上旬ごろには軽いモザイク症状が見られる程度であったが、その後急激に病徴が激しくなった。この傾向は2年ともほぼ同じであった(図-2)。さらに各発病調査時に試料を採集し強毒ウイルスの感染株率を調べた。CMVはササゲ(黒種三尺)での接種葉のえそ斑点の発現、WMV2ではインゲンマメ(本金時)にいったん戻し接種し、その上位葉を接種した新土佐カボチャに現れる病徴の激しさ、ZYMVでは、強毒ウイルスに特異的に反応するエライザ法(弱毒株との交差吸収抗体を用いた2重抗体法)の陽性反応により、強毒ウイルスの感染を判定した。無接種区(対照区)では6月中旬ごろから強毒ウイルスとを極め染が始まり、7月中・下旬には3種のウイルスとも極め

て高率となった。一方、弱毒ウイルス混合接種区ではいずれも無接種区より明らかに低く推移した。CMVとZYMVに対する感染阻害効果はWMV2のそれよりも劣り、生育後半には感染株は増加した。しかし、萎ちょう症状はまったく発生しなかった(図-3)。混合接種株の可販果実数は、収穫期の前半では無接種株とまったく

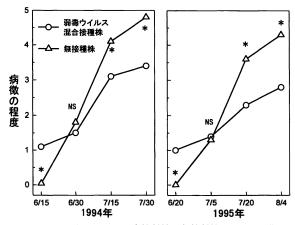


図-2 弱毒ウイルス混合接種株と無接種株における病徴 の推移

1994年5月26日,1995年5月29日に,無接種苗と3種弱毒株混合接種苗を定植した。病徴の程度 0:無病徴~5:えそ・芯止まり・激しいモザイクまたは萎ちょう。*はKolmogorov-Smirnovの検定(5%)での2区間の有意差を示す。

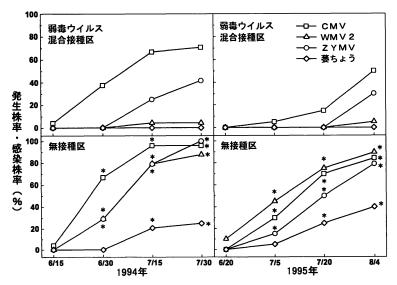


図-3 強毒ウイルスの感染株率と萎ちょう症状の発生株 変の推発

耕種概要は図-2 に準ずる。各調査時期の採集試料から,生物検定またはエライザ法によって各強毒ウイルスを検出した。*は Fisher の正確確率検定あるいは χ^2 検定 (5%) での 2 区間の有意差を示す。

作型	栽培期間	ウイルス病 ^{a)}		感染防止率(%)的			萎ちょう発生率(%)		市場出荷量
		発生時期	発生量	CMV	ZYMV	WMV 2	無接種区	混合接種区	(対無接種区比)
トンネル 早 熟	4~7月	後期	多	33	85	26	0	()	90.6 ^{xse}
露地前進	5~8月	後期	多	87	75	85	16.6	0	89.5*
露地夏秋	6~9月	中训	多	69	88	47	51.7	0	160.6*
ハウス 抑 制	8~11月	中捌	少	100	80	100	14.7	0	94.2 ^{NS}

表-1 各作型における防除効果

- a): 発生時期は収穫期間を3つに分けた、発生量は収穫後期~終期の状況。
- り: 強毒ウイルスの感染防止率:100-混合接種区感染株率/無接種区感染株率×100. 強毒ウイルス感染の検定は 図-3 に準ずる.
- c): 適合度検定(5%)で、それぞれの無接種区とは、*、有意: NS, 有意差なし、

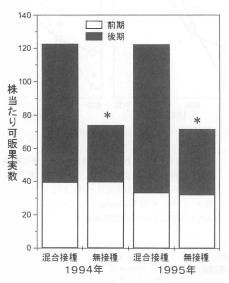


図-4 弱毒ウイルス混合接種株と無接種株における1株 当たりの収量 ごく軽いウイルス症状果実を含む販売可能な果実数

ごく軽いウイルス症状果実を含む販売可能な果実数の累計を示す。*は | 検定(5%)での2区間の有意差を示す。

差がなかったが、後半ではほぼ2倍となったため、2年とも無接種区を約7割上回った(図-4)。

2 現地試験

表-1 に示すように、1994年、京都府内のキュウリ産地の四つの作型に混合接種苗を導入して実用性を検証した。いずれの作型でも強毒系統の感染は抑制され、萎ちょう症状もまったく発生しなかった。しかし、この効果が収量(市場出荷量)に反映されたのは、収穫中期から萎ちょう症状が多発した露地夏秋栽培のみであった。ウイルス病の発生が遅かったトンネル早熟栽培と露地前進栽培、発生が少なかったハウス抑制栽培では、無接種区と同じかやや減収した(表-1)。

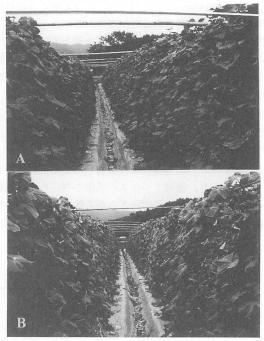


図-5 現地圃場における防除効果 1995年9月8日の生育状況:A:3 種弱毒株混合接種区、B:無接種区。

この結果を踏まえ、1995年は露地夏秋栽培において同一圃場で実証試験を行った。その結果、明らかな被害 回避効果が見られ、弱毒ウイルス混合接種の有効性が確認できた(図-5)。しかし、2年とも一時的(8月上旬ごろ)に接種の影響による果実品質の低下が認められた。 なお、WI-9の干渉効果は、温室や研究所内圃場での試験ほどには発揮されなかったが、所内で供試した WMV 2 強毒分離株と現地で発生している WMV 2 との性質の違いによるのかもしれない。

VI 弱毒ウイルス複合利用の技術的評価

以上のように、苗への弱毒ウイルス混合接種は、圃場レベルでも強毒ウイルスの重複感染をかなり抑えることができる。また、萎ちょう症状の発生もほぼ完全に防ぐことが可能になる。しかし、弱毒ウイルス接種そのものの生育への影響が強く、健全株と比べると生産性は明らかに低い。このことは、キュウリ緑斑モザイクウイルスと WMV 2 の弱毒株を混合接種したユウガオでも認められている(中山ら、1994)。減収の要因には、着果数の減少と外観品質の低下による可販果実数の減少が挙げられる。京都府外を含めた各地の試験結果からすると、どちらが主因となるかは、品種や栽培・環境条件によって異なるように思われる。今後は、弱毒株そのものの改良はもちろんであるが、不良な特性ができるだけ現れないような品種の選定や栽培管理技術の検討が必要であろう。

現在のところ、本技術は、接種による減収率を大きく 上回るだけのウイルス病の被害が発生しやすい露地夏秋 栽培に適用するのが最も有効といえる。現地導入に当たっては、この点を生産農家に十分理解してもらうことが 重要であろう。

おわりに

筆者らは、キュウリを対象として複数の弱毒ウイルス を同時に使う「複合利用技術」の開発を行い、実用化に かなり近い段階まで到達できたと思っている。この5年 間の研究を通じて考えてきたことを以下に述べたい。

第一に、ZYMV を含む複数の弱毒株を混合接種した 接木株では、弱毒ウイルスそのものによっても、また、 干渉効果が打破されて強毒ウイルスが感染するに至って も、萎ちょう症状がまったく現れないか、極めて発生し にくくなる要因についてである。同じ現象は ZYMV 弱 毒株を単独接種しても認められる。今のところ,ウイル スによる接木キュウリの萎ちょう症状は、接木接着部と キュウリ下胚軸の導管の閉塞によって生じた水の移行阻 害に起因し、その後の導管の分化・発達の程度によって 回復するか否かが決まると推察されている(岩崎, 1996)。おそらく、ZYMV 弱毒株が感染した場合でも、 何らかの導管組織の異常は起こっているのではなかろう か。しかし、感染後は速やかに正常な導管が形成される ため、萎ちょうには至らないのであろう。そして、いっ たん生じたこの導管新生機能が維持されることによっ て, 導管の閉塞が起こりにくくなるのではないかと思わ

れる。

第二に、各弱毒株の強毒ウイルスに対する干渉効果は、混合接種すると他の弱毒株の影響によって増殖量が変動しているにもかかわらず、単独接種の場合と差が見られないことである。このことからすると、弱毒ウイルスがあるレベルにまで増殖すればその干渉効果は発揮され、他の弱毒ウイルスの存在も干渉効果にはほとんど影響しないものと推察される。なお、ここで述べた干渉効果とは、強毒ウイルスの病徴発現に対するものであり、強毒ウイルスの感染に対するものではない。本研究で開発した CMV と ZYMV の弱毒株は強毒ウイルスの感染に対して強い干渉力を有しているとは思われないが、強毒ウイルスによる病徴発現と被害を実用的なレベルで阻止できる性質を有するものと思われる。

最後に、誰が弱毒ウイルスあるいは接種した苗を生産 現場に供給していくのか、という問題がある。これは弱 毒ウイルスの開発に携わる者は常に考えておかなくては ならない重要な課題といえる。ごく限られた使用量にと どまるものなら、開発者が増殖し、接種源あるいは接種 苗を供給していくことは可能であるが、それには限界が ある。一方、弱毒ウイルス利用技術はウイルス病の防除 法の一つであり、どこでも、誰にでも使ってもらえるよ うにすべきものである。そういう意味で、現在、この技 術の普及のため接種苗大量生産や製剤化による生物農薬 登録を目指し、専門的な知識と技術が蓄積された民間企 業との共同研究を実施している。

本研究では、おそらく混合接種によって生じるであろう細胞内あるいは植物体内での複数ウイルス間の遺伝的相互作用までは解析できなかった。この点は、今後の課題としたい。

本研究を進めるに当たり、弱毒株を分譲いただいた、 山口大学農学部亀谷満朗教授、前沖縄農試外間也子、埼 玉園試庄司俊彦の諸氏に感謝申し上げる。

引 用 文 献

- 1) 外間也子ら(1989):日植病報 55:534~535.
- 2) 岩崎真人(1991):植物防疫 45:419~422.
- IWASAKI, M. and T. INABA (1988): Ann. Phytopath. Soc. Japan 54: 584~592.
- 4) 岩崎真人ら(1993):日植病報 59:481~484.
- 5) ―――― ら (1996):四国農試報 60:1~88. 6) 亀谷満朗 (1994):農及園 69:137~142.
- 8) 河野 勉·善林六朗 (1988): 関東病虫研報 35:58~59.
- 9) 小坂能尚・福西 務 (1991): 関西病虫研報 33:132.
- 10) 中山喜一ら (1994): 関東病虫研報 41:115~118.
- POOLPOL, P. and T. INOUE (1986): Ann. Phytopath. Soc. Japan 52: 22~30.
- 12) 山本孝狶ら (1984):四国農試報 44:26~140.