

琉球大学学術リポジトリ

沖縄のウリ科植物に発生する Potyvirus に関する研究：第2報 スズメウリ斑紋ウイルスの性質(生物生産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 与那覇, 哲義, 永田, めぐみ, 河野, 伸二, 田盛, 正雄, Yonaha, Tetsuyoshi, Nagata, Megumi, Kawano, Shinji, Tamori, Masao メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3787

沖縄のウリ科植物に発生する Potyvirus に関する研究

第2報 スズメウリ斑紋ウイルスの性質*

与那覇哲義**・永田めぐみ**・河野伸二***・田盛正雄**

Tetsuyoshi YONAHA, Megumi NAGATA, Shinji KAWANO and Masao TAMORI : Studies on Potyvirus Parasite on Cucurbitaceae in Okinawa. 2. Some properties of Melothria Mottle Virus

Summary

A virus was isolated from a wild Cucurbitaceae (*Melothria liukiuensis* Nakai) plant showing faint mottle collected in Naha, Okinawa prefecture. Identification of the virus was based on host range, aphid transmission, physical properties, cross protection, particle morphology and serology.

The host range of the virus was moderately wide, 20 species in the families Cucurbitaceae, Solanaceae, Pedaleaceae, Aizoaceae, Chenopodiaceae and Amaranthaceae among 42 species belonging to 9 families tested. The virus was transmitted by aphid (*Myzus persicae*) in the non-persistent manner. The thermal inactivation was between 60 ~ 65°C, dilution end point was between 10^{-3} ~ 10^{-4} and longevity *in vitro* was between 8 ~ 10 days at 20°C in crude sap of diseased *Nicotiana benthamiana*. No cross protection was detected between the virus and watermelon mosaic virus-2, zucchini yellow mosaic virus, papaya ringspot virus-W and trichosanthes mottle virus as test plant of *Cucurbita maxima* used. The virus particles were flexuous filamentous, about 725×12 nm in leaf dip preparation. The titer of antiserum to the virus was 1 : 256 in the ring interface tests. The antiserum reacted with homologous antigen, but not reacted with WMV-2 and ZYMV in immuno-electron microscopy and in agar gel diffusion tests. The virus did not react with antisera against WMV-2, ZYMV, papaya ringspot virus-W and trichosanthes mottle virus in immuno-electron microscopy. Based on the results, the virus was identified as Melothria mottle virus (MeMV), a new potyvirus.

緒言

沖縄県のウリ科作物では1978年に watermelon mosaic virus によるモザイク病が県内各地で発生したが、特に宮古島では大発生した。また、1982年には tomato spotted wilt virus によるスイカ灰白色斑紋病が多発して問題になった²⁾。今日でもウイルス病の発生被害は軽視できない状況にある。

* 平成4年度日本植物病理学会九州部会で発表

** 琉球大学農学部生物生産学科

*** 沖縄県農業試験場

琉球大学農学部学術報告 40 : 9 ~ 19 (1993)

本県では古くから各種のウリ科作物でウイルス病の発生が認められていたが^{4,18)}、小室⁵⁾により watermelon mosaic virus によるスイカのリモザイク病の発生が判明した。1970年代になってウイルス病の発生が増えるようになり、その発生実態を明らかにするための調査研究が進められた。

現在、watermelon mosaic virus (WMV)^{5,20)}、zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)^{9,11)}、papaya ring-spot virus-W (PRSV-W)^{9,21)}、trichosanthes mottle virus (TrMV)²¹⁾、cucumber mosaic virus (CMV)、tomato spotted wilt virus (TSWV)²⁾ および melon necrotic spot virus (MNSV)³⁾ の発生が知られている。

著者らは、これまでウリ科植物のウイルス病の発生実態を解明するため、作物やウリ科野草についてもウイルスの検出を試み、前報²¹⁾ではケカラスウリから分離されたケカラスウリ斑紋ウイルス (TrMV) について報告した。

1991年2月に那覇市首里石嶺町で採集した退緑斑紋症状を示したクロミノオキナワズメウリから分離されたウイルスの同定試験を行ったところ、ウリ科に発生する既知 potyvirus の寄主範囲や病徴に差異があり、血清的反応が認められない potyvirus であることが明らかになった。本報は、供試ウイルスの緒性質について記述したものである。

本研究を行うに当り、四国農試の岩崎真人氏より WMV-2 (9M)、ZYMV (8E) のウイルス株、農研センターの御子柴義郎氏より WMV-2、ZYMV-49 の抗血清および果樹試の天津善弘氏より ZYMV-102 抗血清を分譲いただいた。ここに記して感謝の意を表す。

実験材料および方法

供試ウイルス 1992年2月に那覇市首里石嶺町で採集した退緑斑紋症状を示したウリ科野草のクロミノオキナワズメウリ (*Melothria liukiuensis* Nakai) からウイルスを分離した。原株の病葉汁液をペポカボチャ苗に汁液接種し、発病株葉を凍結保存 (-30℃) して接種源に用いた。

供試植物 すべての植物はガラス室内で播種育成し、素焼鉢に各1本移植して実験に供した。ガラス室内は適宜殺虫剤を散布してアブラムシなどの発生を防止した。

汁液接種 凍結病葉に少量の0.1Mリン酸緩衝液を加えて乳鉢中で磨砕した。この搾汁液にカーボランダムをふりかけてよく混ぜ、指で接種葉面に軽く2~3回こすりつけた。接種した植物は、接種後20~30日間観察した後、検定植物に戻し接種を行って感染の有無を確かめた。

アブラムシ伝播 実験室内の健全植物上で飼育したモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) を用いた。供試虫は小三角フラスコ中で2時間絶食後、短時間獲得吸汁させたのち検定植物に移して24時間接種吸汁させた。検定植物は殺虫剤を散布した後、ガラス室内に移して発病の有無を調べた。

ウイルス粒子の形態 ペポカボチャと *Nicotiana benthamiana* の罹病葉を用いた2%リタングステン酸 (PTA) pH6.3で染色したDip法試料について電子顕微鏡 (JEM-100B) 観察を行った。

血清反応試験 抗 MeMV 血清は *N. benthamiana* 罹病葉から得られた部分純化標品を家兎に静脈注射5回、さらに部分純化標品とアジュバントを等量混合して3回筋肉注射して抗血清を作製した。得られた抗血清は非特異反応が若干みとめられたので健全葉の純化液を用いて吸収処理を行い供試した。抗血清は重層法により256倍まで反応が認められた。

免疫電顕法による血清反応は抗原に供試ウイルス (MeMV)、WMV-2 (9M) および ZYMV-8E また、MeMV、WMV-2 (9M)、WMV-2、ZYMV-102、ZYMV-49、PRSV-W、TrMV の抗血清を用いた。

寒天ゲル内拡散法による血清反応は抗原に MeMV、WMV-2 (9M) および ZYMV-8E の純化ウイルスを用いた。MeMV および ZYMV-49 の抗血清を実験に供した。

実験結果

寄主範囲と病徴

供試ウイルスの寄主範囲は9科42種植物に汁液接種した結果、Table 1に示したように6科20種の感染がみとめられた。そのうちウリ科12種、*N. benthamiana*、シロゴマは全身感染し、*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*、ホウレンソウ、ツルナおよびセンニチコウは局部感染した。

Table 1 Host range and symptoms of MeMV

Plants inoculated	Symptom of	
	Inoculated leaves	Upper leaves
<i>Melothoria liukuensis</i>	O	Mo
<i>Cucurbita pepo</i> L. var. <i>ovifera</i>	CS	VC, M
<i>Cucurbita maxima</i> cv. Ebisu	NS	CS
<i>Cucurbita moschata</i> cv. Heiankogiku	O	CS
<i>Cucumis sativus</i> cv. Riturin	NS	VC, CS
cv. Nisschiaonagafushinari	NS	VC, CS
<i>Cucumis melo</i> cv. Aruseimu	O	CS
<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>conomon</i> cv. Kokumonaodai	O	VS, CS
<i>Cucumis melo</i> L. var. <i>makuwa</i> cv. Kintarou	CS	CS
<i>Citrullus lanatus</i> cv. Shinyamoto No. 2	NS	CS
<i>Benincasa hispida</i>	O	VC, CS
<i>Momordica charantia</i>	O	CS
<i>Bryopsis laciniata</i>	NS	CS, NS
<i>Nicotiana benthamiana</i>	CS	VC, M
<i>Sesamum indicum</i>	NS	SN, Wt
<i>Tetragonia expansa</i>	CS	-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	NS	-
<i>Chenopodium quinoa</i>	NS	-
<i>Chenopodium murale</i>	NS	-
<i>Spinacia oleracea</i>	NS	-
<i>Gomphrena globosa</i>	NS	-

Mo : mottle M : mosaic NS : necrotic spot CS : chlorotic spot VC : vein clearing
SN : stem necrosis Wt : wilt O : latent

供試ウイルスは、ヘチマ、トカドヘチマ、ユウガオ、ケイトウ、ヒモゲイトウ、*Nicotiana glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. rustica*, タバコ、ナス、トマト、ピーマン、*Datura stramonium*, *D. metel*, *Physalis floridana*, ペチュニア、エンドウ、インゲンマメ、ササゲ、ソラマメは感染しなかった。

主な感染植物の病徴

クロミノオキナワズメウリ *Melothria liukiuensis* 自然感染株は殆の葉に不鮮明な退緑斑紋症状が現れた(Plate 1-1)

ペポカボチャ *Cucurbita pepo* 接種後6～8日に接種葉に退緑斑点を生じた。上葉には葉脈透化が現われ、後にはモザイク症状を示し、株全体が萎縮した(Plate 1-3)。

セイヨウカボチャ *Cucurbita maxima* 接種後6日に接種葉にえそ斑点が現れた。上葉には退緑斑点が散在した(Plate 1-2)が、成長するにつれ症状は軽微になった。

キュウリ *Cucumis sativus* 接種後4日に接種葉にえそ小斑点を生じた。上葉には葉脈透化と退緑斑点を示し、葉緑が幾分黄化した

マスクメロン *Cucumis melo* 接種後8日に上葉に退緑小斑点が現れ(Plate 1-4)、ときには退緑斑点が拡大融合して葉全面が退緑症状を呈した。

Nicotiana benthamiana 接種後10日に接種葉に大型の退緑斑点が現れた。上葉にははじめ葉脈透化を生じ、後には葉全面が退緑して株全体が萎縮した(Plate 1-5)。

シロゴマ *Sesamum indicum* 接種後7日に接種葉にえそ斑点を生じた。上葉には葉脈えそおよび茎えそ症状を示して早期に萎凋枯死した。

C. quinoa, *C. amaranticolor*, *C. murale* およびホウレンソウは接種後7～10日にえそ小斑点が多数現れた。全身感染は認められなかった。

センニチコウ *Gomphrena globosa* 接種後5日に接種葉に初め退緑斑点が現れた。この病斑は後に赤褐色に変わり、更に灰白色の斑点に変化した(Plate 1-6)。

モモアカアブラムシによる伝搬

アブラムシによる伝搬試験の結果を Table 2 に示した。供試ウイルスは、いずれの実験でも短時間の獲得吸汁により伝搬されたが、やや低い伝搬率を示した。この結果、供試したウイルスはモモアカアブラムシにより非永続的に伝搬されるウイルスと考えられた。

Table 2 Transmission of MeMV by *Myzus persicae*

Virus source plant	Plants inoculated	Acquisition feeding time (min)	No. of plants infected No. of plants inoculated
<i>C. pepo</i>	<i>C. pepo</i>	5-26	7/17
<i>N. benthamiana</i>	<i>C. pepo</i>	3-15	6/10

Aphids were starved for 2 hours. Seven to ten aphids per a plant were used.

ウイルスの物理的性質

ウイルス源に *N. benthamiana* 病葉汁、検定植物に *C. amaranticolor* を用いて粗汁液中におけるウイルスの物理的性質の検定を行った。Table 3 に示したようにウイルスの耐熱性(10分)は60～65℃、耐希釈性は 10^{-3} ～ 10^{-4} および20℃における耐保存性は8～10日であった。

Table 3 Physical properties of MeMV in crude sap

Thermal inactivation (10 min)						
40	45	50	55	60	65	70 °C
5.8*	23.0	21.4	3.6	0.6	0	0
Dilution end point						
Undiluted		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
19.5		40.8	1.6	0.3	0	0
Longevity <i>in vitro</i> (20°C)						
0	1	2	4	6	8	10 Days
39.2	16.4	13.4	2.0	1.0	0.4	0

* Average number of local lesion on *Chenopodium amaranticolor* leaves

ウイルスの干渉効果

セイヨウカボチャ（えびす）を検定植物に用いて zucchini yellow mosaic virus (8E), watermelon mosaic virus-2 (9M), papaya ringspot virus-W (H4) および trichosanthes mottle virus に対する供試ウイルスの干渉効果の有無を調べた。

Table 4 Cross protection between MeMV and some potyviruses

First virus	Challenge virus	Time interval (Day)	Challenge virus	
			No. of infected plant	Symptoms
MeMV	ZYMV (-8E)	13	5/5	sM
MeMV	WMV-2 (9M)	13	5/5	mM
MeMV	PRSV-W (H4)	13	5/5	sM
MeMV	TrMV	13	5/5	mM
MeMV			5/5	CS

Number of infected plant / Number of inoculated plants

sM : sever mosaic mM : mild mosaic CS : chlorotic spot

その結果を Table 4 に示した。1 次ウイルスの病徴が現れた後に 2 次ウイルスをそれぞれ汁液接種したところ、各接種区のすべての検定植物には二次ウイルスによるモザイク症状が現れた。この結果から 4 種の potyvirus に対する供試ウイルスの干渉効果はないものと判断された。

Table 5 Serological relationships among several potyvirus in immunoelectron microscopy

Antisera	Antigen						
	MeMV	WMV-2 (9M)	WMV-2	ZYMV (102)	ZYMV (49)	PRSV-W (H4)	TrMV
MeMV	+	-	-	-	-	-	-
WMV-2(9M)	-	+	+	±	±	-	-
ZYMV(49)	-	±	±	+	+	-	-

Each antiserum was diluted 1:10 with 0.1 M phosphate buffer pH 7.4

ウイルス粒子の形態

Dip法試料について電顕観察したところ、ひも状粒子が多数観察された(Plate II-1)。

電顕観察された74個の粒子長を測定した結果はFig.1に示すように供試ウイルス粒子は625~775nmの長さに分布し、725nmの長さに最も多く分布した。

血清反応試験

1. 免疫電顕法

ウイルス間血清反応を免疫電顕法により調べた結果をTable 5に示した。供試ウイルスは本実験において作製した同種抗血清(MeMV)と反応し、ウイルス粒子表面に抗体が付着している電顕像(Plate 3-2)が観察されたが、他6種の抗血清との反応は認められなかった。また、MeMV抗血清に対するWMV-2(9M)およびZYMV(49)の反応は陰性であった。

2. 寒天ゲル内拡散法

寒天ゲル内拡散法により血清反応を調べたところ、MeMV抗血清に対し供試ウイルスは強く反応して明瞭な沈降線を生じたが、WMV-2 9M およびZYMV-8E との反応は認められなかった。一方、ZYMV-49抗血清に対してZYMV-8Eは強く反応して沈降線を生じ、またVWMV-2 9Mの反応との弱い反応が認められたが、供試ウイルスとの反応は認められなかった(Plate II-3)。

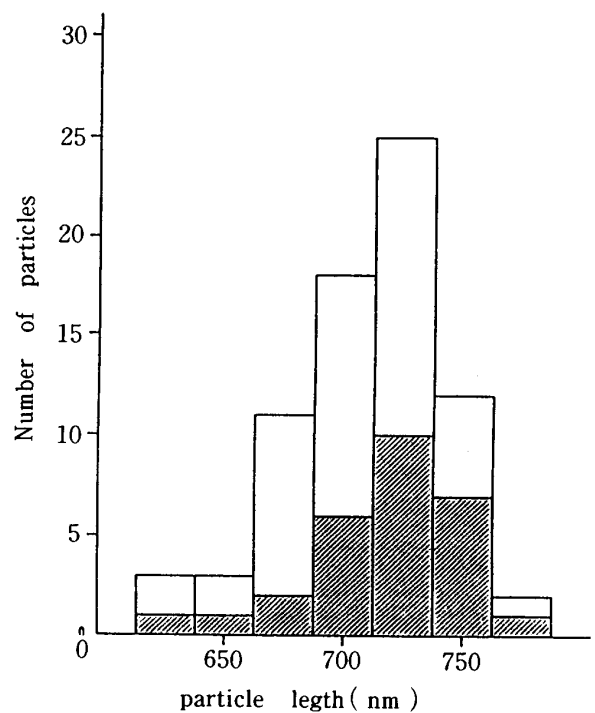


Fig.1 Particle length distribution of MeMV in dip method preparation
 □ *Cucurbita pepo* leaves
 ▨ *Nicotiana benthamiana* leaves

考 察

供試ウイルスは長さ約725nmのひも状粒子であり、モモアカアブラムシにより非永続的に伝搬されることからPotyvirus群に属するウイルスと考えられる。

現在、ウリ科に発生するPotyvirusには、WMV-2^{1,15,18)}, ZYMV^{6,8)}, BMoV⁹⁾ PRSV-W^{14,17)} ZYFV¹⁶⁾, TrMV²¹⁾, BYMV¹²⁾ および CIYVV⁷⁾ が知られ、watermelon mosaic-2, zucchini yellow mosaic virus および papaya ringspot virus-W は世界各地に広く分布するウイルスである。供試ウイルスは6科20種植物

に感染する寄主範囲のやや広いウイルスである。

PRSV-W, ZYFV, TrMV はいずれも寄主範囲がウリ科に限られることで供試ウイルスの寄主性とは相違する。PRSV-W, TrMV は供試ウイルスとの血清的關係はない。BYMV と CIYVV はどちらも多くのマメ科植物に全身感染するが、供試ウイルスはマメ科には感染しない点でウイルスの寄主範囲には大きな差異がみられる。BMoV はカボチャに局部感染し、*C. quinoa*, *C. murale*、ホウレンソウおよびツルナには感染しないが、供試ウイルスはセイヨウカボチャ、ニホンカボチャ、ペポカボチャに全身感染し、*C. quinoa*, *C. murale*、ホウレンソウ、ツルナに局部感染することで、寄主性が相違している。

ZYMV はヘチマ、トカドヘチマ、ユウガオに全身感染するが、供試ウイルスは感染しない。さらに ZYMV によるウリ科植物の病徴は一般に強いモザイク症状が現れるが、供試ウイルスの病徴は軽微である。血清的關係は認められない。WMV-2は数種のマメ科植物に全身感染するが、供試ウイルスは感染しない。しかし、両ウイルスは *N. benthamiana* に全身感染し、ヘチマやトカドヘチマに感染しない点が類似しているが、両ウイルス間には血清的關係は認められない。

以上のように供試ウイルスはウリ科植物に発生する既知の Potyvirus とは寄主範囲や病徴に差異がみられる。また、多くのウイルスとは血清的性質が異なることなどから供試ウイルスは新 Potyvirus と考えられるのでズメウリ斑紋ウイルス (*Melothria mottle virus* : MeMV) と命名したい。なお本ウイルスのウリ科作物での発生については調査していない。

摘 要

1. 1991年2月に那覇市首里石嶺町で採集したクロミノオキナワズメウリ (*Melothria liukuensis* Nakai) の退緑斑紋症状を示した病葉から分離したウイルスの同定試験を行った。
2. 9科42種植物に汁液接種したところ、ウリ科12種、アカザ科4種、*N. benthamiana*、シロゴマ、センニチコウおよびツルナの6科20種の感染が認められた。ウイルスは容易に汁液伝染し、モモアカアブラムシにより非永続的に伝搬された。
3. ウイルスの耐熱性 (10分) は60~65℃、耐希釈性は 10^{-3} ~ 10^{-4} および耐保存性 (20℃) は8~10日であった。セイヨウカボチャを検定植物に用いて WMV-2, ZYMV, PRSV-W および TrMV に対する MeMV の干渉効果を検定した結果、どちらのウイルスとも干渉効果は認められなかった。
4. 2% リンタンゲステン酸で染色した Dip 法試料中のウイルス粒子は725×12nm の湾曲したひも状粒子が観察された。
5. 免疫電顕法および寒天ゲル内拡散法による血清反応を調べたところ、MeMV は WMV-2, ZYMV, PRSV-W および TrMV のいずれのウイルスとも血清的關係は認められなかった。
6. 本報のウイルスは新 Potyvirus と判断されたのでズメウリ斑紋ウイルス (*Melothria mottle virus* : MeMV) と命名した。

引用文献

1. Inouye, T. 1964 A virus disease of pea caused by watermelon mosaic virus. *Berichte d Ohare Instituts* 12 : 133-143
2. Iwaki, M. , Honda , T. , Hanada, K. , Tochiara, H. , Yonaha, T. Hokama, K. and Yokoyama, T. 1984 Silver mottle disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 68 : 1006 - 1008
3. 河野伸二・渡嘉敷唯助・上原勝江 1993 沖縄県におけるメロンえそ斑点病の発生 沖縄農業 (投稿中)

4. 小室康雄 1960 植物バイラスの検出、診断および防除 琉球政府経済局農業叢書45 沖縄県
5. 小室康雄 1962 カボチャモザイクウイルスによるキュウリおよびスイカのウイルス病. 日植病報 27: 31~36
6. Lisa, V. , Baccardo, D. , D'Agostins, G. Dellavalle, G. and dAguilio. M. 1981 Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic virus. *Phytopathology* 71: 667~672
7. Lisa, V. and. Dellavelle, G 1981 Characterization of two potyvirus in *Cucurbita pepo*. *Phytopath.* Z. 100: 279~286
8. Lisa, V. and Lecoq, H. 1984 Zucchini yellow mosaic virus. CMI/AAB Discriptions of plant viruses No. 282
9. Lockhart, B. E. L. and Fischer, H. U. 1979 Host range and some properties of Bryonia mottle virus, a new member potyvirus group. *phytopath.* Z, 96: 244~250
10. 大津善弘 1988 八重山群島の夏作ウリ科作物における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-1)の検出(講要). 日植病報 54: 76
11. 大津善弘・佐古宣道 1982 宮古・八重山群島におけるカボチャモザイク病. 1. 石垣島でのカボチャモザイクウイルスの発生(講要). 日植病報 49: 91
12. 大津善弘・佐古宣道・Susanto SOMOWIYARJO 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
13. Provvidenti, R. and Uyemoto, J. K. 1973 Chlorotic leaf spotting of yellow summer squash caused by the sever strain of bean yellow mosaic virus. *Pl. Dis. Repr.* 57: 280~282
14. Purcifull, D. , Edwardson, J. , Hiebert, E. and Gonsalves, D. 1984 Papaya ringspot virus. CMI/AAB. Discriptions of plant viruses No. 292
15. Purcifull, D. , Hiebert. E. and Edwardson, J. 1984 Watermelon masaic virus 2. CMI/AAB Discriptions of plant Viruses No. 293
16. Vovlas, C. , Hiebert, E. and Russo, M. 1981 Zucchini yellow fleck virus a new potyvirus of zucchini squash. *Phytopath. medit.* 20: 123~128
17. Webb, R. E. and Scott, H. A. 1965 Isolation and identification of watermelon mosaic virus 1 and 2. *Phytopathology* 55: 895~900
18. 山本孝猪・石井正義・勝部利弘・大畑貫一 1984 カボチャモザイクウイルスの伝染学的研究 四国農試報 44: 26~140
19. 与那覇哲義・島袋俊一 1963 沖縄における植物ウイルス病の種類. 沖縄農業 2 (1): 43~47
20. 与那覇哲義・田盛正雄・根川守・桑江忠・久部良敦子 1977 マスクメロンおよびカボチャのモザイク病株から分離されたカボチャモザイクウイルスの2系統. 琉大農学報 24: 181~190
21. 与那覇哲義・田盛正雄・藤原裕治・伊志嶺正人 1988 沖縄のウリ科植物に発生する Potyvirus に関する研究. 第1報 *Trichosanthus mottle virus*および*Watermelon mosaic virus 1*の性質 琉大農学報 35: 1~15

Explanation of Plates

Plate I

1. Symptoms in *Melothria liukiuensis* naturally infected with MeMV
2. *Cucurbita maxima* cv. Ebisu systemically infected with MeMV produced small chlorotic spots.
3. *Cucurbita pepo* systemically infected with MeMV showing severe mosaic
4. *Cucumis melo* systemically infected with MeMV appearance small chlorotic spots.
5. *Nicotiana benthamiana* systemic infected with MeMV, showing severe mosaic.
6. Chlorotic and necrotic local lesions induced by MeMV in *Gomphrena globosa*.

Plate II

1. MeMV particles in leaf dip preparation. Scale: 300 nm
2. Serological reaction of MeMV particles with antiserum against MeMV in immunoelectron microscopy.
3. Serological reactions in agar gel diffusion
A : MeMV antiserum B : ZYMV antiserum
1 : Purified preparation of MeMV
2 : Purified preparation of WMV-2
3 : Purified preparation of ZYMV

Plate — I

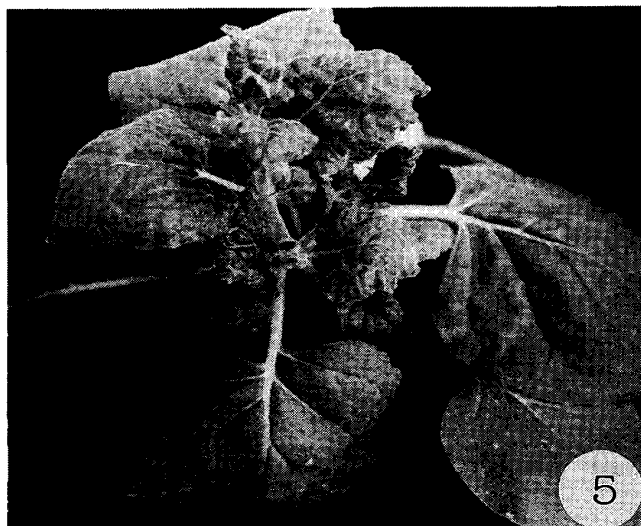
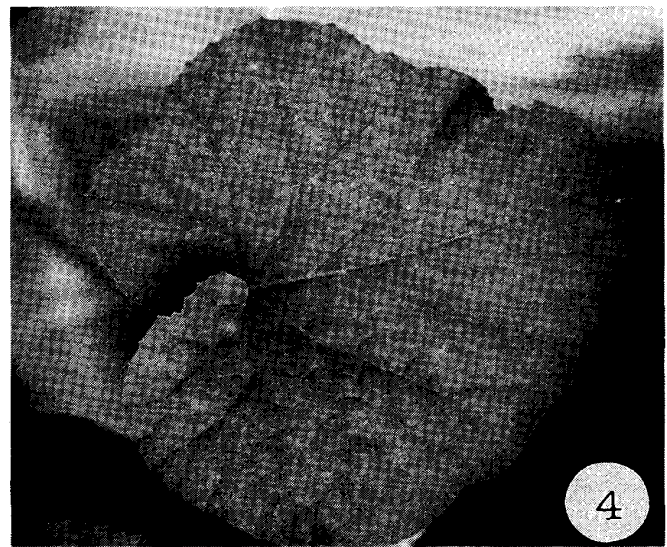
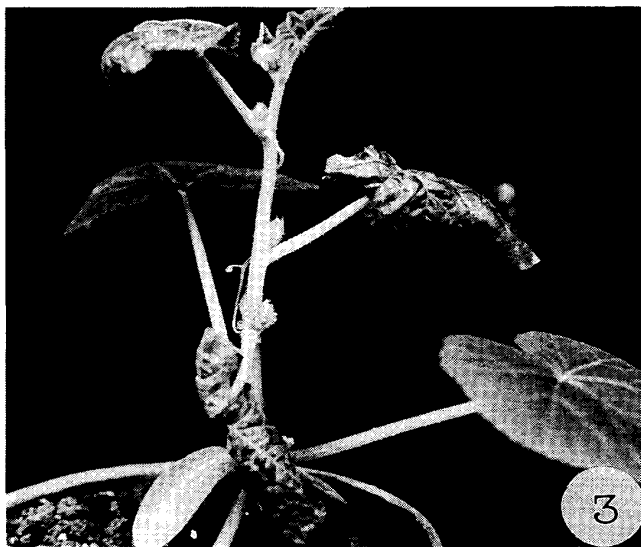
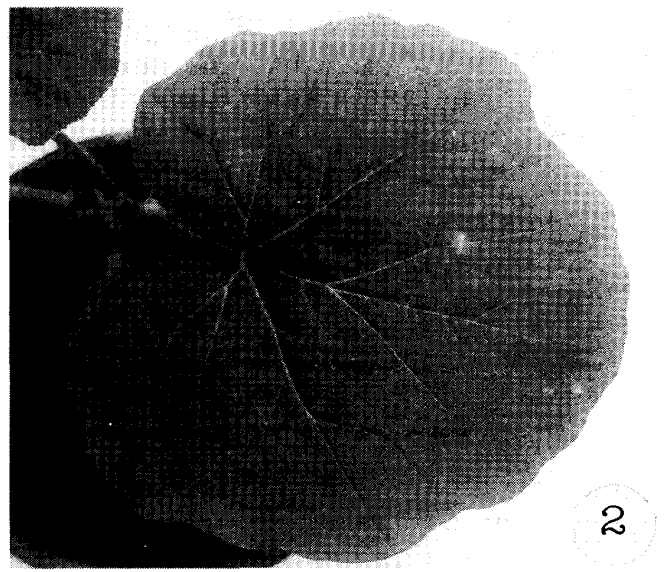
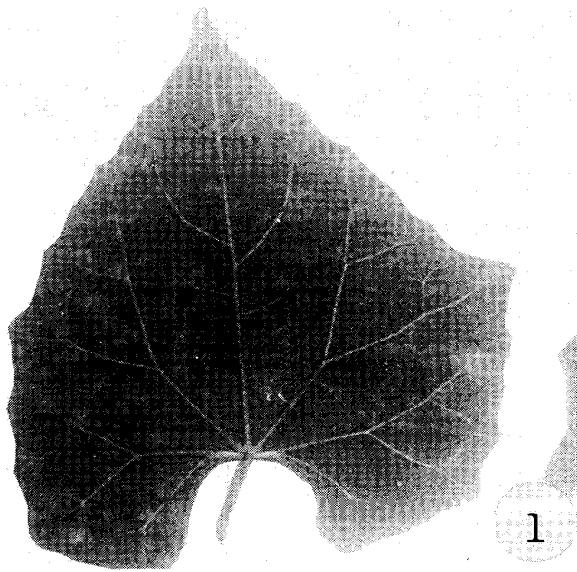


Plate — II

