

トマト系タバコモザイクウイルスの弱毒系統(L11A)の2,3の性質

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	西口,正通 大島,信行
発行元	日本植物病理學會
巻/号	45巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 654-659
発行年月	1979年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



トマト系タバコモザイクウイルスの

弱毒系統 (L₁₁A) の 2・3 の性質

西口正通*・大島信行*

Masamichi NISHIGUCHI* and Nobuyuki OSHIMA*: Some Properties of an Attenuated Tomato Strain (L₁₁A) of Tobacco Mosaic Virus

Abstract

Some properties of an attenuated tomato strain (L₁₁A) of tobacco mosaic virus (TMV) were compared with the parent virulent strain (L). Dilution end point of L₁₁A was 10⁻⁷-10⁻⁸, while L was still infective at 10⁻⁸. L₁₁A lost its infectivity after heat treatment at 90 C for ten min while L did not. The infectivity of L₁₁A was lost more rapidly than that of L at 70 C. The shape of particles and the length distribution pattern of L₁₁A after purification were much the same as those of L. The sap of tomato leaves infected with L₁₁A retained about 50 % of the original infectivity after a week-storage at 25 C and less than 10% after a year-storage, whereas that of leaves infected with L retained 80 and 50 % of infectivity after respective periods. L₁₁A was suspended at 3.3 mg/ml either in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) or in the same buffer containing 2 % sucrose, then lyophilized and the resultant virus powder was stored at 22-25 C. The samples without sucrose completely lost their infectivities after 27 months storage, whereas the samples with sucrose were highly infectious still at the same stage of storage. To examine whether the lyophilization with sucrose affected virulence, the sample stored for 27 months was inoculated to *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc, and the produced lesions were isolated singly. The saps from these lesions were tested separately on tomato seedlings for their virulence. Only one lesion out of 50 produced a chlorotic patch on a leaflet of tomato. All other lesions caused no symptom. The effect of temperature on the multiplication of L₁₁A and L in tomato leaf discs was compared. The optimal temperature for L₁₁A was 25-28 C, while that for L was 28-30 C. At 35 C, L multiplied considerably but L₁₁A did not. The ratio of the amount of L₁₁A to that of L decreased consistently as the temperature was raised up to 35 C.

(Received September 4, 1979)

緒 言

トマト系タバコモザイクウイルス (TMV) の弱毒系統 (L₁₁A) を用い、トマトのモザイク病防除が行なわれている¹⁾が、L₁₁A を取り扱っていく上でその性質を明らかにしておくことは重要である。後藤ら²⁾は L₁₁A を 20 科 94 種の植物に接種し病徴・感染の有無を調べ、ペチュニアおよび *Physalis floridana* に見強い病徴を出し他の 15 科 52 種の植物では病徴が軽い

か不顕性保毒植物となることを報告している。また、大島ら³⁾は L₁₁A の外被蛋白質について調べ、L₁₁A の親ウイルスである L の外被蛋白質とほとんど同じ組成であることを報告している。著者らは、L₁₁A の基本的な性質、耐希釈性、耐熱性等 2, 3 の項目について調べたので報告する。なおこの報告の一部は既に講演で発表した⁴⁾。

この研究を行うに当たり種々の助言を頂いた当研究所本吉総男研究員ならびに凍結乾燥について教示された

* 植物ウイルス研究所 Institute for Plant Virus Research, Tsukuba Science City, Yatabe, Ibaraki 305, Japan.

同所福本文良研究員に対し深謝の意を表す。

実験材料および方法

供試ウイルスおよび接種 TMVの弱毒系統 $L_{11}A$ および親の強毒系統 L は、それぞれ感染したトマト葉を $-10 \sim -15^\circ C$ のフリーザーに保存したものを使用時に取り出し供試した。接種は感染葉に10倍量の0.01M リン酸緩衝液, pH7.0, を加え乳鉢で磨砕搾汁し, これを10倍液とみなし, 希釈して行った。一部の実験では純化ウイルスを用いた。

ウイルス純化方法 $L_{11}A$ あるいは L をタバコ (cv. Samsun) に感染増殖させた後フリーザーに保存しておいたものを, 0.01M EDTA を含む0.1M リン酸緩衝液, pH7.0, を加えミキサーで磨砕後二重のガーゼでろ過した。ろ液を低速遠心分離 (8,000rpm, 20分間) し, 上清に対しポリエチレングリコール (20g/l) および塩化ナトリウム (17.6g/l) を加え数時間ないし一夜攪拌した。次いで低速遠心分離により生じた沈殿を0.1M EDTA, pH7.0, にとかした後, 低速遠心分離と超遠心分離 (日立 RP30 ロータ, 27,000rpm, 90分間) を組合せた分画遠心を3回繰り返して純化した。最後に0.01M リン酸緩衝液, pH7.0, にとかし1mg/mlの濃度で1mlずつ細試験管に分注しフリーザーに保存した。また標準液用として, L の一部を1μg/mlの濃度で同様に分注し $-60^\circ C$ の超低温槽に保存した。

供試植物 感染性および病徴の検定にはタバコ (cv. Xanthi nc) およびトマト (福寿2号) を用いた。

凍結乾燥 $L_{11}A$ の凍結乾燥には, 感染葉汁液 (10倍希釈液) および純化標品を用いたが, 後者では0.01M リン酸緩衝液, pH7.0, あるいは2% (w/v) のショ糖を含む同緩衝液に3.3mg/mlの割合でとかししたものを用いた。各々のウイルス液1mlを凍結乾燥用アンフル (5ml 容) に分注し, $-18^\circ C$ で予備凍結した後, 真空凍結乾燥機 (VFD-1100FMS—S型, 大西真空技研 K.K.) にて真空乾燥させた。その後ガスバーナーで熔封後 $22 \sim 25^\circ C$ の定温器にて保存した。

増殖試験 トマト (福寿2号, 本葉6, 7葉期) の葉に純化した $L_{11}A$ あるいは L を0.5mg/mlの濃度で接種し, 約3分後水道水で洗浄, 直径1.4cmのコルクボーラーで切りとり無作為にそれぞれ10枚ずつシャーレ (直径6cm) に入れた水に浮かべ, 所定温度で3日間培養した後ディスクをフリーザーに保存した。各区のディスクに0.01M リン酸緩衝液2mlを加え乳

鉢で磨砕し, これを10倍希釈液とみなして感染性検定に用いた。

また一部のサンプルでは, ショ糖密度勾配遠心法でウイルス量を比較した。ショ糖密度勾配は1mM EDTA 溶液で40, 30, 20および10%のショ糖溶液を作り, それぞれ1.2, 1, 1および1.2mlずつ遠心チューブに重層し一夜冷蔵庫内に静置した。上記の磨砕液を20倍希釈液にし, 2mlとりクロロホルム0.8mlを加え15分間振とうした後, 3,500rpmで15分間遠心分離し上清0.5mlを上記チューブにのせ日立 RPS65 T で37,000rpm, 90分間遠心分離した。その後ISCO density gradient fractionator で分画し254nmの吸光度を調べた。ウイルス量の比較には, この吸光度パターン上のウイルスピーク部の紙重量を測定し, $30^\circ C$ における $L_{11}A$ のピーク部重量を基準としてその比で表わした。

実験結果

希釈限界 凍結感染葉にリン酸緩衝液を加え磨砕希釈し, 希釈限界を調べた (Table 1)。 $L_{11}A$ の希釈

Table 1. Dilution end point of $L_{11}A$ and L

Expt.	Strain	Dilution			
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
1	$L_{11}A$	67	5	1	0
	L	312	37	3	1
2	$L_{11}A$	54	10	1	0
	L	129	13	0	2
3	$L_{11}A$	30	3	1	0
	L	164	19	5	1

Figures represent total number of lesions on 8 half leaves of Xanthi nc.

限界は $10^{-7} \sim 10^{-8}$ であったが, L は 10^{-8} でもなお感染性が認められた。

耐熱性 ウイルス純化標品 (1μg/ml) を1mlずつ直径1cm, 長さ10.5cmの細試験管に入れ, パラフィルムで封じた後ウォーターバスにて所定温度で10分間処理し, 直ちに氷水中で冷却した。その後 Xanthi nc に接種し感染性を調べた (Table 2)。 $L_{11}A$ は $90^\circ C$, 10分間の処理で感染性が失われたのに対し, L ではなお感染性が認められた。

一方, 同じ方法により $70^\circ C$ におけるウイルスの感染性失活を経時的に調べた (Table 3)。 $L_{11}A$ の方が L よりも失活しやすいことが示された。

Table 2. Thermal inactivation point of L₁₁A and L

Expt.	Strain	Control*	Temperature(C)**			
			75	80	85	90
1	L ₁₁ A	1818	12	12	3	0
	L	2477	80	36	6	0
2	L ₁₁ A	3787	10	8	2	0
	L	3131	14	29	5	4
3	L ₁₁ A	2320	15	22	2	0
	L	2179	26	7	6	9

Figures represent total number of lesions on 10 half leaves of Xanthi nc.

* Sample without heat treatment.

** 10 min treatment at each temperature.

Table 3. Loss of infectivity on heating of L₁₁A and L

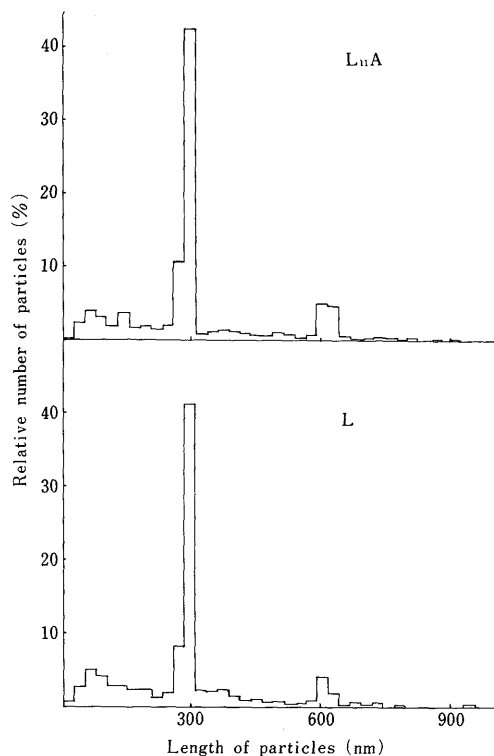
Strain	Incubation time (min) at 70C			
	2	5	10	15
L ₁₁ A	14.0	3.2	0.8	0.7
L	20.5	13.6	6.9	7.2

Figures represent:

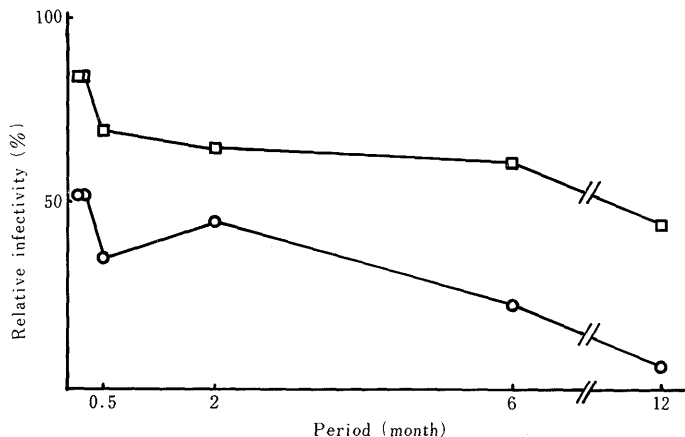
$$\frac{\text{Total number of lesions by heated virus}}{\text{Total number of lesions by unheated inoculum}} \times 100.$$

ウイルス粒子の観察 純化したウイルス, L₁₁A および L を電子顕微鏡で観察したが, 形態的な差異はみられなかった。また粒子を写真にとり, それぞれ約 1,000 粒子の長さを測定し長さの分布を調べた (Fig. 1)。両ウイルスとも約 300nm にピークがあり, 長さの分布に明らかな差はみられなかった。

汁液中の耐保存性 凍結したトマト感染葉の 10 倍希釈液を 1 ml ずつ細試験管に分注し, パラフィルムで封じ一部の試験管を 25C の定温器に保存し, 他を -10C のフリーザーで保存して対照とした。所定期間毎にとり出し, 2,000rpm, 5 分間遠心分離の後, 上清を用い Xanthi nc の半葉には 25C 保存のサンプルを接種し, 他の半葉には対照の -10C 保存のサンプルを接種し両者の比を求

Fig. 1. Length distributions of particles of L₁₁A and L.

めることにより耐保存性を調べた (Fig. 2)。25C 保存で L₁₁A は 1 週間で約 50% の感染性に低下し, その後徐々に失活し 12 カ月後では 10% 以下になった。一方, L は 12 カ月後でも約 50% の活性を保持しており

Fig. 2. Longevity of L₁₁A and L in tomato leaf sap at 25C.

Relative infectivity means:

$$\frac{\text{Total number of lesions by sample stored at 25C}}{\text{Total number of lesions by sample stored at -10C}} \times 100.$$

○—○: L₁₁A, □—□: L.

L₁₁A の方が失活しやすいことが示された。

凍結乾燥弱毒ウイルスの耐保存性 凍結乾燥した L₁₁A の 22~25°C における耐保存性を調べるため、アンプルで保存したウイルスを所定期間毎にとりだし 0.01M リン酸緩衝液, pH7.0, で希釈し, Xanthi nc の半葉に接種した。また他の半葉には -60°C で保存した L を標準液として接種し 両者の比を求めた (Table 4)。ショ糖を加えた区では 27 カ月後でもなおウイルス

Table 4. Infectivity changes of lyophilized L₁₁A during its preservation at 22-25°C

Virus and solvent during lyophilization	Duration (month) after lyophilization				
	0.3	6	12	27	
Purified L ₁₁ A in phosphate buffer	9.1×10 ³	5.4×10 ²	3.2×10	0	
Purified L ₁₁ A in phosphate buffer containing 2% sucrose	9.3×10 ³	5.9×10 ³	1.7×10 ³	8.4×10 ³	
L ₁₁ A sap in phosphate buffer	1 (month)	6	10	13	28
	2.0×10 ³	3.0×10 ²	1.3×10 ²	9.2×10	0.3

Figures represent:

Total number of lesions by L₁₁A×

Total number of lesions by standard

dilution factor

suspension of L at 0.1 µg/ml.

ス活性を保持したが、リン酸緩衝液単独区では次第に活性が低下し 27 カ月後では活性がなくなった。一方、汁液を凍結乾燥した場合も、徐々に活性が低下し 28 カ月後ではほとんど失活した。

凍結乾燥保存した弱毒ウイルスの変異性の検定

保存された凍結乾燥ウイルスが変化しないでもとの弱毒系統であるか否かをみるため、次の検定を行った。保存したサンプルを感染性検定とは別に Xanthi nc に接種し生じた局部病斑を分離した後、ホールスライドグラス上でリン酸緩衝液と共に磨砕後トマト幼苗 (本葉 2, 3 葉期) にそれぞれ接種した。以後 20~40 日間観察を続け病徴の有無を調べた。

純化した L₁₁A の凍結乾燥標品の場合、12 カ月目のサンプルではリン酸緩衝液単独区の 20 コの局部病斑をそれぞれトマトに接種すると、5 株について 1 株当たり 1 コの小不整形の退色あるいは黄色斑点がみられた。ショ糖添加区では接種した 20 株共すべて無病徴であった。また、27 カ月目のショ糖添加区では、分離した 52 コの局部病斑をそれぞれトマト幼苗に接種したところ、1 株だけ 1 カ所小不整形の退色斑点を生じた。

一方、汁液で凍結乾燥した場合、13 カ月目のサンプルでは局部病斑分離し接種したトマト苗 20 株のうち 1 株は 1 カ所小不整形の退色斑点を生じ、他の 1 株は軽いモットル症状を生じた。28 カ月目のサンプルでは 1

Table 5. Effect of temperature on multiplication of L₁₁A and L in leaf discs*

Expt.	Strain	Temperature (°C)						Cont.**
		22	25	28	30	32	35	
1	L ₁₁ A	6.8×10 ³	7.5×10 ³	1.1×10 ⁴	6.2×10 ³	—	—	9.0
	L	4.6×10 ⁴	5.6×10 ⁴	1.3×10 ⁵	1.5×10 ⁵	—	—	4.4×10
2	L ₁₁ A	5.7×10 ³	7.2×10 ³	1.4×10 ⁴	1.3×10 ⁴	—	0.12	1.0×10
	L	1.3×10 ⁴	1.2×10 ⁵	1.9×10 ⁵	4.3×10 ⁵	—	0.3	6.0×10
3	L ₁₁ A	2.7×10 ⁴	—	1.1×10 ⁴	—	4.6×10 ³	3.9	4.4×10
	L	1.8×10 ⁵	—	5.4×10 ⁵	—	4.2×10 ⁵	9.3×10 ⁴	1.4×10 ²
4	L ₁₁ A	—	—	—	—	—	0.3	5.5
	L	—	—	—	—	—	2.1×10 ³	4.7×10
5	L ₁₁ A	2.3×10 ⁴	3.2×10 ⁴	1.4×10 ⁴	—	6.0×10 ³	—	2.5×10
	L	1.3×10 ⁵	2.6×10 ⁵	3.1×10 ⁵	—	2.4×10 ⁵	—	8.4×10
6	L ₁₁ A	2.7×10 ⁴	—	1.1×10 ⁴	—	4.4×10 ³	3.9	4.4×10
	L	1.8×10 ⁵	—	5.4×10 ⁵	—	4.2×10 ⁵	9.3×10 ⁴	1.4×10 ²

* Leaf discs were inoculated with L₁₁A or L at 0.5mg/ml and incubated for three days.

Figures represent:

Total number of lesions by homogenate of discs×dilution factor

Total number of lesions by standard suspension of L at 0.1µg/ml.

**Samples taken before incubation.

コの局部病斑しか生じなかったが、検定したところ無病徴であった。

小不整形の退色あるいは黄色の斑点を生じたトマトもそれ以外の部分はすべて無病徴であった。なお凍結乾燥保存しなかった純化ウイルスについて同様の検定を行ったが、検定した50コの局部病斑ともすべてトマトには無病徴であった。

増殖に及ぼす温度の影響 トマト葉ディスクにおける増殖量を感染性検定により所定の各温度で調べた (Table 5)。また Table 5 中 Expt.1 および 2 のサ

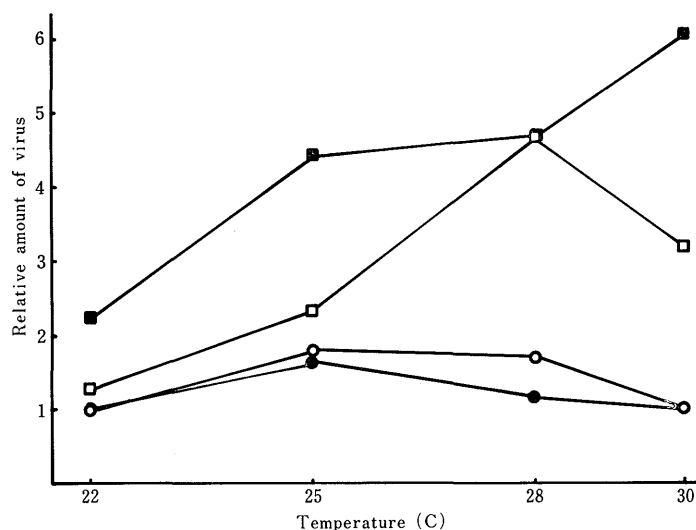


Fig. 3. Multiplication of L₁₁A and L in tomato leaf discs.

Relative amount of virus represents the ratio of the amount of each virus to that of L₁₁A at 30°C (=1.0), analyzed by sucrose density gradient centrifugation.

●—●: L₁₁A in Table 5, Expt.1, ■—■: L in Table 5, Expt.1.
○—○: L₁₁A in Table 5, Expt.2, □—□: L in Table 5, Expt.2.

ンプルの22, 25, 28および30°C区についてショ糖密度勾配遠心法により増殖量を比較した (Fig. 3)。L₁₁Aは25~28°Cで最も多く増殖し、それより高温になると減少し35°Cでは増殖しないようであった。一方、Lは28~30°Cで最も多く増殖し35°Cでも相当量増殖した。Table 5およびFig. 3よりLに対するL₁₁Aの増殖量の割合を各温度で比べると、22~35°Cの間ではL₁₁Aの割合が温度の高くなるにつれ減少することが示された。

考 察

大島ら⁵⁾は、Holmes⁶⁾の方法によりトマト系TMV (TMV-L)⁷⁾をトマト茎に接種し、2週間35°Cの高温で培養し、増殖したウイルスを局部病斑分離することによって弱毒株 L₁₁を得た。L₁₁Aは、後藤ら²⁾によ

って L₁₁ 接種トマトよりさらに選抜されたもので、L₁₁ に比べより安定した弱毒系統である。著者らはこの L₁₁A の性質を親系統の L と比較しながら調べた。

希釈限界では L₁₁A の方が低く、検定植物に対する感受性を考慮しなければならないが、感染葉内でのウイルス量の少ないことが示唆された。これは増殖試験の結果 (Fig. 3) から支持される。

耐熱性・耐保存性について、L₁₁A は L よりも弱く失活し易いことが示された。これらの原因がウイルス粒子の核酸あるいは外被蛋白質のいずれにあるのか不明

であるが、外被蛋白質の組成についてはほとんど違いがないとされている⁸⁾ことから、核酸、あるいは核酸と外被蛋白質の相互関係に違いがあるのかもしれない。長井ら⁹⁾は汁液の耐保存性について調べているが、L₁₁A の常温区では6カ月目より10%台の活性に保たれ27カ月目で約10%になったとしている。著者らの条件では、12カ月目に10%以下になったが、このあと徐々に低下していくものと考えられる。

Steepy¹⁰⁾は、トマト系 TMV を 38°C, 150日間培養することにより得た弱毒系統を用い、希釈限界、耐熱性、耐保存性について調べたが、いずれも弱毒系統は他の強毒系統より低く、弱かったと報告している。一方、Holmes⁶⁾の得た masked strain の耐熱性は強毒系統と同じ

であったとしている。このことから、弱毒系統のこれらの性質は個々のウイルスによって異なるものと考えられる。

凍結乾燥について、L₁₁A を扱う上でこの保存形態が最も便利であると考えられたので、その耐保存性およびウイルスの変異性について調べた。凍結乾燥に際し安定して保存するため保護剤を加える¹⁰⁾が、植物ウイルスの純化標品についてはあまり報告がみられない。キウリモザイクウイルス (CMV) 罹病葉汁液の凍結乾燥標品では、ショ糖5%, グルタミン酸ナトリウム1%, ポリペプトン0.3%等の添加区で顕著な効果が認められている¹¹⁾。著者らはショ糖を選び添加区と無添加区で耐保存性を調べたが添加効果は顕著であった。保存したウイルスの変化についても、無添加に比べ明らかに安定していた。しかし、添加区の27カ月

目のサンプルで、検定した52コの局部病斑のうち、1コがトマト苗に1ヶ所小不整形の退色斑点を生じた。これはウイルスが変化したためか、混在していたものか明らかではない。さらにより安定化させる保護剤その他の条件が検討される必要があろう。オランダでTMVの亜硝酸処理により作出された無病徴変異株M II-16で、感染葉を乾燥させ1年半後局部病斑分離を行ってウイルスの変化が調べられた¹²⁾。それによれば、検定された40コの局部病斑のうち7コだけがサ姆斯タバコに無病徴であり他はモザイクを生じた。これはM II-16の中に混在していた強毒系統の耐保存性が強く結果的にその割合が増大したとされている。M II-16の乾燥感染葉よりはL₁₁Aの凍結乾燥標品の方が安定しているといえるが、保存形態が異なっているため両ウイルスの直接の比較はできない。しかしながら、弱毒ウイルスを亜硝酸処理によって作出した場合にはしばしば不安定なウイルスを生ずることがあり¹³⁾、弱毒ウイルスの作出方法がウイルスの変異性に関係しているのかもしれない。

L₁₁Aの増殖に及ぼす温度の影響は、L₁₁Aの収穫上のみならず干渉効果という点で重要な項目と考えられる。トマト葉ディスクで調べた結果では、L₁₁Aの増殖適温は25~28℃にありLの適温(28~30℃)より低い温度であった。また35℃の高温ではL₁₁Aが全く増殖しないように思われた。L₁₁Aがこのような性質をもっていることから、夏の高温時期には干渉効果の弱められることが示唆される。Holmes⁶⁾のmasked strainでは明らかに強毒系統よりも高温(35.5℃)で良く増えておりL₁₁Aとは顕著に異なっている。M

II-16は高温では増殖しにくいことが推定されている¹²⁾が、はっきりしたデータは示されていない。

摘 要

トマト系TMVの弱毒系統(L₁₁A)の2, 3の性質について親系統(L)と比較しながら調べた。L₁₁Aの希釈限界は 10^{-7} ~ 10^{-8} であったが、Lは 10^{-8} でもなお感染性が認められた。耐熱性について、L₁₁Aは90℃10分間の処理で失活したがLではなお感染性が認められた。70℃におけるL₁₁Aの感染性失活の経時的変化は、Lのそれよりも早いことが示された。ウイルス粒子の形態および長さの分布は、L₁₁AとLの間ではほとんど差異がみられなかった。25℃における感染葉汁液の耐保存性について、L₁₁Aが1週間後約50%、1年後10%以下の感染性しか保持しなかったのに対し、Lは各々80%、50%の感染性を保持した。L₁₁Aの凍結乾燥標品を22~25℃で保存した場合、0.01Mリン酸緩衝液、pH7.0、中で凍結乾燥すると27ヵ月後には失活したが、シロ糖2%添加した区ではよく活性が保持された。また凍結乾燥標品の保存中におけるウイルスの変異性を調べるため、シロ糖添加区の27ヵ月目のサンプルについて生じた50コの局部病斑をそれぞれトマト苗に接種したところ、1株でのみ小不整形の退色斑点を生じた。L₁₁Aのトマト葉ディスクにおける増殖適温は25~28℃であり、35℃では増殖しないようであった。一方、Lの増殖適温は28~30℃であり、35℃でも相当量増殖した。Lに対するL₁₁Aの増殖量の割合は22~35℃の間で高温になるほど減少した。

引 用 文 献

1. 大島信行(1977). 農及園 52: 548-552.
2. 後藤忠則・根本正康(1971). 北海道農試集報 99: 67-76.
3. 大島信行・玉田哲男・野津佑三(1976). 日植病報 42: 62.
4. 西口正通・大島信行(1976). 日植病報 42: 380-381.
5. 大島信行・小餅昭二・後藤忠則(1965). 北海道農試集報 85: 23-33.
6. Holmes, F. O. (1934). Phytopathology 24: 845-873.
7. 大島信行・後藤忠則・佐藤倫造(1964). 北海道農試集報 83: 87-99.
8. 長井雄治・竹内妙子(1979). 日植病報 45: 567.
9. Steepy, T. L. (1968). Særtrykaf Tidsskrift for Planteavl 72: 81-85.
10. 森地敏樹・山里一英・鈴木正敏・高野光男・根井外喜男(1977). 微生物の保存法(根井外喜男編). 東京大学出版会, 東京. pp. 26-29.
11. 福本文良・栃原比呂志(1977). 日植病報 43: 365-366.
12. Rast, A. Th. B. (1975). Publicatie No. 192 van het proefstation voor Groenten-en Fruitteelt onder Glas, Naaldwijk, pp. 56.
13. 大島信行・後藤忠則(1968). 日植病報 34: 263-271.