

TMV弱毒ウイルス (L₁₁A) の純化と接種源としての実用化について

野村良邦・*小坪修一・木曾 皓
(野菜試験場久留米支場・*福岡県園芸連)

緒 言

福岡県下の促成栽培トマトでは、根腐萎ちょう(レースJ3)の被害とTMVによるモザイク病が併発し収量や品質に大きく影響している。特に両者の感染に伴って発生する果実のすじ腐れ症状は、栽培上致命的被害を与える。この被害を防除するために、最近千葉県や静岡県で実用化され、TMVの被害を軽減した弱毒ウイルス(L₁₁A)の導入を計画し、一部の産地でその利用を試験した。L₁₁Aの実用に際しては、接種源の調整とその期間の強力TMVの汚染防止、更にL₁₁A接種葉の保存などのために多大の労力を要するので、簡易な接種源の入手が強く望まれる。そこで、L₁₁A導入に先だてその純化を行い、実用化が期待されたので報告する。

材料及び方法

純化材料は、“福寿2号”を25℃に空調した温室で4～5葉期まで育苗し、L₁₁Aを常法のカーボランダムなすりつけ法で接種して10葉期まで栽培した。L₁₁A増殖葉は、生葉重の4倍量の0.1Mりん酸緩衝液(pH7.0)を加え氷冷下で磨砕、ろ過した。ろ液は10,000rpm(日立-55P)で30分、更に30,000rpmで60分遠心分離した。沈澱を0.1Mりん酸緩衝液に懸濁し、4,000rpmで遠心した上清を高・低速遠心で2回同じ操作を行った。得られた沈澱を0.1Mりん酸緩衝液に溶解し、ブタノール・クロロホルム(1:1)の等量液で処理後低速遠心した。上清を30,000rpmで遠心しウイルスを回収した。純化法を写真1に示した。純化ウイルスは、紫外部吸収特性及び電子顕微鏡(日立H-300)によるPTAを用いた逆染色法でその精製程度を、また*N. glutinosa*に対する葉面なすりつけ法でウイルス活性を試験した。

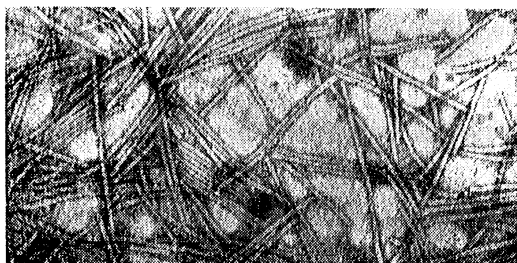
結果及び考察

ウイルス純化行程(写真1)でのウイルス損失は、*N. glutinosa*を供試した局部病斑で追跡した結果、写真1で示したA分画に対し、B分画部で約20%、すなわち、80%が回収された。純化ウイルスの紫外部吸収特性は、最低250nm、最高265nm、最高/高低=1.25であった。

N. glutinosa に対してはTMV特有の局部病斑を形成し、ウイルス活性を保持した。電子顕微鏡像を第2図に示した。PTA逆染色法で、ウイルス核酸、及びウイルス蛋白像も確認された。

第1表 L₁₁A の 純 化 行 程

感 染 葉	+	4倍容0.1MPB (pH7.0)
ろ 液(A)		磨砕後、ガーゼでろ過
上 清		10,000rpm (日立-55P) 30分
沈 澱		30,000rpm、60分
上 清		小量の0.1MPBで再溶解
上 清		4,000rpm、10分
上 清		10,000rpm、30分
上 清		30,000rpm、60分
沈 澱		0.1MPBに溶解クロロホルム・ブタノール(1:1)の等量液で10分処理4,000rpm、10分
上 清		(ウイルス粗液)
上 清		30,000rpm、60分
沈 澱(B)		
ウイルス(保存)		0.01MPBに溶解、凍結乾燥

写真1 純化 L₁₁A の電顕像 (PTA 染色)

以上の結果から、L₁₁A弱毒ウイルスは純化が可能であり、更に純化ウイルスは凍結乾燥ができるので、長期間安定した接種源として簡便に実用化利用ができるものと思われる。