

ミディトマトに発生した *Tobacco Mosaic Virus* の諸性質

福田明美*・駒野雅保**・本多範行*

Character of *Tobacco Mosaic Virus* Isolated from Tomato Plants Showing Necrotic Disease

Akemi FUKUDA Masayasu KOMANO and Noriyuki HONDA

ミディトマト「越のルビー」に果実えそ症状を引き起こす *Tobacco mosaic virus* F28 株の宿主範囲、外被タンパク質の遺伝子解析および防除方法について検討した。

F28 株は外被タンパク質遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列において TMV-OM 株との相同性はそれぞれ 98.5%, 98.8% と高かった。また、F28 株を 14 科 40 種 3 品種の植物に汁液接種したところ、7 科 21 種 3 品種に感染し、宿主範囲や病徴は TMV-OM 株と類似していた。本ウイルスの簡易な診断法として、抗原濃度 10,000 倍、ToMV 感染葉汁 100 倍液で吸収させた 20,000 倍 TMV 吸収抗血清、二次抗体濃度 4,000 倍の条件を用いた I-ELISA 簡便法によって、判別が可能であった。

F28 株に対する弱毒ウイルス L₁A 株の干渉効果はほとんど認められず、F28 株の単独接種と同様に葉にモザイク症状を示し、果実にえそ症状が発生した。

TMV 抵抗性遺伝子型の異なるトマト 25 品種に F28 株を接種したところ、TMV 抵抗性因子 +/+, *Tm-1*/+, *Tm-1*/*Tm-1* の品種では上葉にモザイクや退緑を生じ、全身感染した。*Tm-2*/+, *Tm-2* /+, *Tm-2* /*Tm-2* の品種は接種葉にえそ斑点、上葉でえそ症状を示し、萎縮したが、*Tm-2* の品種の中で上葉に移行せずに抵抗性を示す品種があった。

Key Word: 果実えそ症状, *Tobacco mosaic virus* (TMV), ミディトマト

1. 緒 言

トマトのモザイク病は罹病すると減収するだけでなく果実にも被害が発生することから、トマト栽培にとって重要な病害となっている。このトマトモザイク病の病原ウイルスには *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus X* (PVX) および *Potato virus Y* (PVY), *Tomato aspermy virus* (TAV) および *Tomato mosaic virus* (ToMV) の関与していることが明らかになっている¹⁾。

近年は対策として抵抗性品種が多く作付けされているが、福井県で開発されたミディトマト品種「越のルビー」(+/+)²⁾に 1993 年頃から TMV によるモザイク症状や果実にえそを示す株が発生³⁾し、栽培農家に大きな被害をもたらした。これまで、トマトに発生した TMV の報告は少ない。そこで本稿では、果実にえそを起こす TMV についての諸性質、診断

方法および防除対策を検討したので報告する。

なお、本研究を行うにあたり、有益なご助言を頂いた(前)北海道農業試験場生産環境部ウイルス病研究室(故)岩崎真人博士、農業生物資源研究所分子育種部遺伝子応答研究室西口正通博士、貴重な TMV-OM 株を分譲して下さった農業生物資源研究所分子遺伝部シグナル応答研究グループ大橋祐子博士に感謝の意を表する。

II. 試験方法

1. 供試ウイルス

1995 年に福井県池田町において、ミディトマト「越のルビー」に発生したえそ果症状株から *Nicotiana glutinosa* で単一病斑分離を 3 回繰り返して得た TMV-F28 株を用いた。対照にはタバコから分離した TMV-OM(農業生物資源研究所大橋博士分譲)株と ToMV-T(MAFF104034)株を用いた。また、弱毒ウイルスの防除試験には弱毒ウイルス L₁A(MAFF260004)株^{4,5)}、1995 年に福井市のミディトマトから分離した ToMV-F29 株を用いた。

* 福井県農業試験場 生産環境部 病理研究グループ

** 福井県農業試験場 園芸・バイオ部 バイテク研究グループ

2. F28株の宿主範囲

分離株 F28 を 14 科 40 種 3 品種の植物に汁液接種し、宿主範囲を調べた。検定植物の内訳はアカザ科 3 種、キンボウゲ科 1 種、ナス科 13 種 3 品種、ヒユ科 1 種、マメ科 2 種、アブラナ科 5 種、ウリ科 2 種、キキョウ科 1 種、キク科 7 種、クマツヅラ科 1 種、ゴマハノグサ科 1 種、シソ科 1 種、スミレ科 1 種、ナデシコ科 1 種であった。汁液接種は各ウイルス株のタバコあるいはトマト感染葉を 10 倍量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で磨砕した粗汁液を接種源とし、各植物の幼苗期にカーボランダムを用いて接種した。植物の育成およびこれに対する接種は 20 ~ 30 °C のガラス温室内で行い、約 1 ヶ月にわたり病徴を観察した。なお、ウイルス接種 30 日後に局部病斑宿主である *N. tabacum* 「Xanthi-nc」に戻し接種を行い、感染の有無を確認した。試験は 1998 年 8 月、1999 年 3 月 10 月の 3 回行った。

3. F28株の外被タンパク質遺伝子の解析

分離株 F28 を *N. glutinosa* で 9 回単一病斑分離を繰り返した後、*N. tabacum* 「Bright Yellow」に感染させた接種葉を試料に用い、全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により DNA 断片を合成・増幅した。RT-PCR に用いたプライマーは TMV の外被タンパク質 (CP) 遺伝子を含む DNA サイズ 550bp を増幅可能な以下のプライマーを使用した。

Tcp-1 (5'-ATTTCGGAGGCTACTGTCCG-3')

Tcp-2 (5'-TGTGATTACGGACACAATCC-3')

PCR 産物を 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し 550bp の DNA 断片を確認した。さらに PCR 産物を TA クローニング法によりサブクローニングし、塩基配列を DNA Sequencing System (ABI310, 解析ソフトは DNASIS) を用いて解析した。塩基配列データの比較には TMV-OM 株および ToMV-L (MAFF260001) 株を用いた。

4. enzyme linked immunosorbent assay (ELISA法)

によるウイルス診断方法の検討

I-ELISA (間接 ELISA) 簡便法¹⁰⁾ における F28 株の至適検出条件として、TMV-OM 株と ToMV-T 株を用いて検討した。抗原希釈濃度 100 ~ 10,000 倍、標識二次抗体濃度 2,000 ~ 8,000 倍、抗血清希釈濃度 10,000 ~ 20,000 倍における吸光度を比較した。抗血清はトマト「福寿 2 号」の健全葉、TMV 罹病葉および ToMV 罹病葉で吸収させ、F28 株の検出を行った。I-ELISA 簡便法は抗血清と標識二次抗体 (anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate, Product No.A-8025, SIGMA 社) を同時処理することで Koenig による I-ELISA¹¹⁾ を簡便化したもので、以下の手順で行った。① 0.05M 炭酸緩衝液 (pH9.6, 0.02 % Na₂S₂O₅ を含む) で磨砕した抗原をマイクロプレート

に 1 well あたり 0.2ml ずつ分注し、37 °C で 60 分間静置。②健全葉またはウイルス感染葉を 10 倍量の PBS (0.02M リン酸緩衝液 pH7.4, 0.15M NaCl) で磨砕、遠心分離 (8,000rpm, 10min) 後の上清を 10 倍希釈し、吸収葉汁液を作成する。③ 100 倍葉汁液で希釈した抗血清 (日本植物防疫協会) と TBST (0.02M Tris-HCl pH7.5, 0.15M NaCl, 0.05% Tween20) で希釈した標識二次抗体の混合液を 1well あたり 0.2ml ずつ注入し、4 °C で 1 晩静置した。④基質 (SIGMA104 (R) Phoshatase Substratetable) を注入し、37 °C で 60 分間反応させ、マイクロプレートリーダー (コロナ, MTP-100) で 405nm における吸光度を測定した。なお、各ステップ間のプレートの洗浄は蒸留水で行った。

5. 弱毒ウイルスL₁₁A株による防除

1) 弱毒ウイルスL₁₁A株の干渉効果

弱毒ウイルス L₁₁A 株の F28 株に対する干渉効果を調査した。L₁₁A 株はトマトで増殖させ、使用時まで -80 °C で凍結保存した。供試植物にはトマト「福寿 2 号」 (+/+) を用い、素焼鉢 (直径 30cm) に移植してガラス温室で試験を行った。1996 年 4 月 10 日、本葉 4 葉期のトマトに L₁₁A 株を接種した。強毒ウイルスには F28 株と福井市のトマトから分離した ToMV の F29 株を用い、L₁₁A 株接種 27 日後の 5 月 7 日にこれらのウイルスを二次ウイルスとして接種、その後の発病状況を調査した。なお、ウイルスの接種は 10 倍量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で磨砕した粗汁液を接種源とし、カーボランダム法により接種した。

2) 弱毒ウイルスL₁₁A株の増殖日数と干渉効果

トマト「福寿 2 号」は素焼鉢 (直径 15cm) に移植してガラス温室で試験を行った。L₁₁A 株は 1996 年 6 月 24 日に子葉展開期の子葉に接種した。強毒ウイルス F28 株は L₁₁A 株接種 10 日後の 7 月 3 日、20 日後の 7 月 14 日、30 日後の 7 月 24 日に上葉に接種し、その後の発病状況を調査した。

6. 抵抗性品種によるウイルス防除

F28 株、TMV-OM 株、ToMV-T 株のタバコあるいはトマト感染葉を 10 倍量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で磨砕した粗汁液を接種源とした。第 8 表に示した 25 品種のトマトの子葉にカーボランダムを用いて接種した。トマトの育成および接種は 20 ~ 30 °C のガラス温室内で行い、約 1 ヶ月にわたり病徴の有無を観察した。なお、接種 30 日後に *N. glutinosa* と *N. tabacum* 「Xanthi-nc」に戻し接種を行った。試験は 1998 年 7 月に行った。

III. 試験結果

1. ウイルスの宿主範囲

F28 株を汁液接種した結果、14 科 40 種 3 品種の接種植物のうち、5 科 11 種 1 品種で局部感染し、えそ

やえそ斑点を生じた。また、3 科 11 種 2 品種では上葉にモザイクを生じ全身感染した。ウリ科、アブラナ科など 9 科 19 種の植物には感染は認められなかった(第 1 表)。主な接種植物での病徴は以下のとおりである。

第 1 表 *Tabacco mosaic virus* F28 株汁液接種による各種植物の反応と感染の有無

植物 (品種)	F28		TMV-OM		ToMV-T	
	接種葉	上位葉	接種葉	上位葉	接種葉	上位葉
アカザ科						
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	NS→LF	—	NS→LF	—	NS→LF	—
<i>C. quinoa</i>	NS	—	NS→D	—	CS	—
ホウレンソウ(アクティブ)	—	—	—	—	—	—
キンポウゲ科						
千鳥草(ブルークラウト)	—	M, D(+)	—	M	—	—
ナス科						
<i>Nicotiana benthamiana</i>	N	Str→D	N	Str→D	N, NS	Str→D
<i>N. glutinosa</i>	NS→D	—	NS→D	VN→D	NS→D	—
<i>N. debneyi</i>	—	M(+)	—	M, Ma	—	M
<i>N. sylvestris</i>	—	M	—	M, Ma	NS→D	VN→D
<i>N. tabacum</i> (Xanthi-nc)	NS→D	Str	NS→D	Str	NS→D	—
<i>N. tabacum</i> (White Burley)	—	M	—	M, Ma	NS→D	VN→D
<i>N. tabacum</i> (Bright Yellow)	—	M(+)	—	M, Ma	NS→D	—
<i>Datura stramonium</i>	NS→D	—	NS→D	Stu	NS→D	—
<i>Physalis floridana</i>	—	YM(+)	—	M, Ma	—	M, Ma
トマト(福寿二号)	—	M	—	M, Ma	—	M
ナス(千両二号)	—	CS→m	NS	CS→m	—	CS→m
ピーマン(グリーン300)	N	NS, Str→D	N→LF	Str→D	N→LF	Str→D
ししとう	NS	VC→M(+)	NS	Chl→m	NS→LF	M, Str→D
ペチュニア(スカーレットエンサイン)	—	M(+)	—	Ma, D	NS→D	m, VN→D
ホオズキ	—	M(+)	—	M	—	M
ヒユ科						
センニチコウ	CS	—	CS, VN	—	VN	VN
マメ科						
インゲン(大手亡)	NS	—	NS	—	—	—
ダイズ(エンレイ)	NS	—	NS	—	—	—
アブラナ科						
カブ(太田)	—	—(-)	—	—	—	—
キャベツ(若越)	—	—(-)	—	—	—	—
コマツナ(浜美二号)	—	—(-)	—	—	—	—
ストック(高潮)	—	—(-)	—	—	—	—
ダイコン(福味)	—	—(-)	—	—	—	—
ウリ科						
カボチャ(鈴成錦)	—	—(-)	—	—	—	—
マクワ(銀泉)	—	—(-)	—	—	—	—
キキョウ科						
カンパニュラ(チャンピオンパープル)	—	—(-)	—	—	—	—
キク科						
アゲラタム(ブルーハワイ)	—	—(-)	—	—	—	—
アスター(ラベンダーシャンソン)	—	—(-)	—	—	—	—
ガザニア(デイブレイクブロンズ)	—	—(-)	—	—	—	—
ヒマワリ(太陽)	—	—(-)	—	—	—	—
百日草(ミニボンボン混用)	NS	M	NS	NS, CS	—	CS
マリーゴールド(ボナンガエロー)	—	—(-)	—	—	—	—
ルドベキア(ローランドミックス)	—	—(-)	—	—	—	—
クマツヅラ科						
バーベナ(ロマンスシルバー)	—	—(-)	—	—	—	—
ゴマノハノグサ科						
金魚草(トランパードル)	—	—(-)	—	—	—	—
シソ科						
サルビア(ビクトリアブルー)	NS	—(-)	NS	—	D	—
スミレ科						
パンジー(ホワイト)	—	—(-)	—	—	—	—
ナデシコ科						
西竹	—	(-)	—	—	—	—

注) NS: えそ斑点, N: えそ, Chl: 退緑, CS: 退緑斑点, LF: 落葉, VC: 葉脈透化, VN: 葉脈えそ, M: モザイク, m: 軽いモザイク
D: 枯死, Str: 茎えそ, Stu: わい化、萎縮, Ma: 奇形, —: 無病徴, →: 症状の変化, (-): 戻し接種で+は陽性、-は陰性


```

F28      5'  MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTVVQRQFSEVWKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVDPL
TMV-OM   5'  MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTVVQRQFSEVWKPSPQVTVRFPDSDFKVYRYNAVDPL
ToMV-L   5'  MSYSITSPSQFVFLSSVWADPIELLNVCNLSLGNQFQTQQARTVVQRQFSEVWKPFPQSTVRFPDGVYKRYRYNAVDPL
          *****
          1    10    20    30    40    50    60    70    80

F28      5'  VTALLGAFDTRNRIIEVENQANPTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLLVVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTSGPAT
TMV-OM   5'  VTALLGAFDTRNRIIEVENQANPTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLLVVELIRGTGSYNRSSFESSGLVWTSGPAT
ToMV-L   5'  ITALLGAFDTRNRIIEVENQSQPTTAETLDATRRVDDATVAIRSAINNLLVVELVIRGTGLYNQNTFESMSGLVWTSAPAS
          *****
          90   100   110   120   130   140   150   160
    
```

第2図 クローニングした *Tobacco mosaic virus* F28株外被タンパク質遺伝子のアミノ酸配列
*はホモロジーがある部分

株と26カ所でアミノ酸が異なっていたが、130番目のアミノ酸は同じであった。また、F28株のCP遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性を比較すると、TMV-OM株とは98.5%および98.8%、ToMV-L株とは74.1%および83.6%であった(第2表)。

第2表 *Tobacco mosaic virus* F28外被タンパク質のDNAおよびアミノ酸のTMV-OM株、ToMV-L株とのホモロジー

	相 同 性 (%)	
	DNA (480bp)	アミノ酸 (158残基)
TMV-OM	98.5	98.8
ToMV-L	74.1	83.6

3. ELISA法によるウイルス診断

TMVの簡易大量診断法の確立を目的にI-ELISA簡便法によるTMVの検出至適条件を検討した。標識二次抗体を4,000倍液で供試した場合、抗血清濃度が20,000倍と10,000倍区では吸光度に差がみられな

かった。また、抗原濃度は10,000倍まで希釈しても十分判定が可能であった(第3表)。抗血清を健全トマト葉汁液で吸収させた場合、ToMV感染葉は抗ToMV血清と強く反応したが、抗TMV血清とは反応が弱かった。一方、TMV感染葉は抗ToMV血清、抗TMV血清の両方と強く反応した。抗TMV血清をToMV感染葉汁液で吸収した場合には吸光度がやや低くなったが、TMV感染葉とは強く、ToMV感染葉とは弱く反応し、判定が容易となった(第4表)。

I-ELISA簡便法を用いてミディトマトから分離したウイルス株F28株の診断を行った。抗原にはF28株、ToMV、TMVの感染葉を10~10,000倍に希釈したものを用いた。抗TMV血清はToMV感染葉汁液で、抗ToMV血清はTMV感染葉汁液100倍液で吸収し、標識二次抗体濃度は4,000倍で行った。F28株は抗TMV血清と強い反応が認められる一方で抗ToMV血清とは弱く反応した。F28株の抗ToMV血清に対する反応はTMV感染葉よりも強かった(第3図)。

第3表 I-ELISA簡便法を用いた *Tobacco mosaic virus* 検出における吸収抗血清の種類と濃度の影響

抗血清の種類	吸収葉汁液の種類 ^{a)}	抗血清濃度 ^{b)}	タバコ葉汁液の種類と濃度(倍)								
			健全葉			ToMV			TMV		
			100	1,000	10,000	100	1,000	10,000	100	1,000	10,000
TMV	健全	20,000	-0.05 ^{c)}	-0.05	-0.04	0.19	0.12	0.15	0.91	0.85	0.61
		10,000	-0.05	-0.05	-0.04	0.31	0.24	0.19	0.76	0.82	0.62
	ToMV	20,000	-0.01	-0.01	-0.01	0.00	0.00	0.00	1.07	1.07	0.82
		10,000	-0.01	-0.01	-0.01	0.01	0.01	0.00	0.90	1.09	0.78
ToMV	健全	20,000	-0.05	-0.04	-0.04	0.60	0.37	0.40	0.58	0.56	0.40
		10,000	-0.05	-0.04	-0.04	0.60	0.39	0.46	0.53	0.53	0.35
	TMV	20,000	-0.01	-0.01	-0.01	0.49	0.33	0.27	-0.01	-0.01	-0.01
		10,000	-0.01	-0.01	-0.01	0.43	0.23	0.26	-0.01	-0.01	0.00

a) トマト葉汁液を使用。

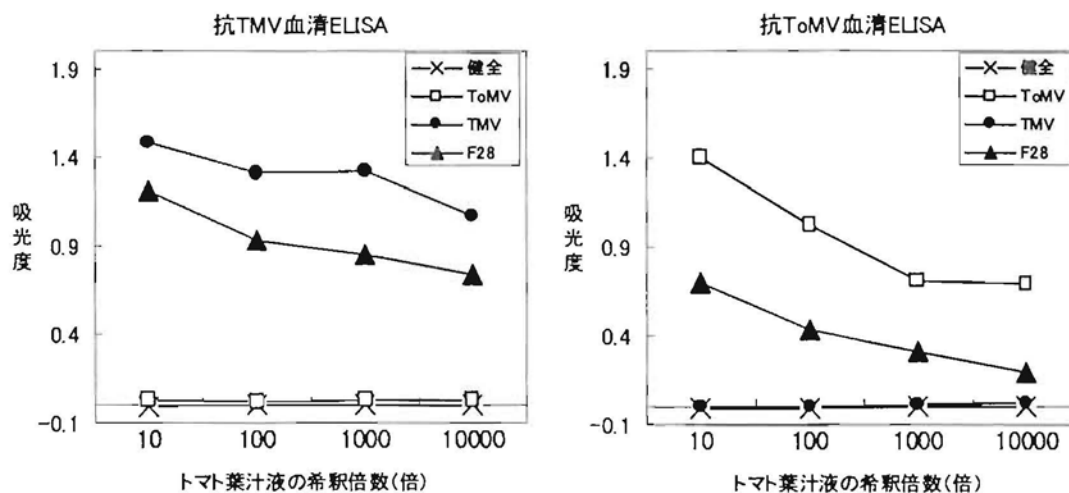
b) 標識二次抗体は4,000倍液で供試。

c) 基質を60分間反応させた後、マイクロプレートリーダーで405nmにおける吸光度を測定。

第4表 I-ELISA簡便法を用いた *Tobacco mosaic virus* 検出における吸収抗血清の種類と濃度の影響

抗血清の種類 ^{a)}	吸収葉汁液の種類 ^{b)}	標識二次抗体濃度	トマト葉汁液の種類と濃度(倍)								
			健全葉			ToMV			TMV		
			100	1,000	10,000	100	1,000	10,000	100	1,000	10,000
TMV	健全	8,000	-0.03 ^{c)}	-0.03	0.00	0.21	0.18	0.20	1.09	1.26	1.26
		4,000	-0.03	-0.03	-0.01	0.28	0.24	0.31	1.12	1.35	1.06
		2,000	-0.02	-0.01	-0.01	0.35	0.35	0.45	0.76	0.82	0.62
	ToMV	8,000	-0.02	-0.02	-0.02	-0.01	-0.01	0.00	0.73	0.82	0.58
		4,000	-0.01	-0.01	-0.01	-0.01	0.00	0.01	0.96	1.00	0.81
		2,000	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	1.63	1.58	1.44
ToMV	健全	8,000	-0.02	-0.02	-0.01	0.75	0.79	0.93	0.50	0.55	0.36
		4,000	-0.01	-0.01	-0.01	0.98	0.92	1.09	0.68	0.73	0.42
		2,000	-0.01	-0.01	0.04	1.34	1.39	1.58	0.97	1.22	0.99
	TMV	8,000	-0.01	-0.01	0.00	0.50	0.45	0.61	0.03	0.04	0.04
		4,000	-0.03	-0.03	-0.02	0.44	0.43	0.52	0.02	0.05	0.15
		2,000	-0.03	-0.02	-0.02	0.69	0.56	0.83	0.06	0.09	0.25

- a) 抗血清は20,000倍で供試.
- b) トマト葉汁液を使用.
- c) 基質を60分間反応させた後、マイクロプレートリーダーで405nmにおける吸光度を測定.



第3図 I-ELISA簡便法による *Tobacco mosaic virus* および *Tomato mosaic virus* の検出

4. 弱毒ウイルスL₁₁A株のF28株に対する干渉効果

弱毒ウイルス L₁₁A 株の接種による F28 株の干渉作用は顕著ではなく、F28 株の単独接種と同様に葉のモザイク症状やえそ果の発生がみられた。一方、F29 株を二次接種した場合、F29 株を単独接種した区に比べると草丈の低下や葉数の減少といった生育不良や葉のモザイク症状の発現を抑制した(第5表)。また、L₁₁A 株接種後の F28 株接種までの間隔が長くなるほど、病徴発現までの期間が遅くなる傾向がみられた。しかし、L₁₁A 株と F28 株の接種間隔が 30 日でも、F28 株接種 27 日後には発病株率は 100% となった(第6表)。

5. 抵抗性品種の防除効果

F28 株の接種により、TMV 抵抗性因子 +/+、*Tm-1/+*、*Tm-1/Tm-1* の品種では上葉にモザイクや退緑を生じた。*Tm-2/+*、*Tm-2' /+*、*Tm-2' /Tm-2'* の品種では接種葉にえそ斑点、上葉でえそ症状を示し、萎縮した。「オレンジキャロル」(*Tm-2/+*) は上葉への移行はなく、強い抵抗性を示した。また、F28 株のトマトにおける反応は、TMV-OM 株、ToMV-T 株における反応とほぼ同じであった(第7表)。

第5表 弱毒ウイルスL₁₁A株の防除効果

処 理 区 ^{a)}	生 育 調 査 ^{b)}		発 病 株 率 ^{c)}		えそ果
	草丈(cm)	葉数(枚)	葉	果実	
L ₁₁ A	145.0	23.0	0/3	0/3	0/23
F28	141.7	21.7	3/3	3/3	11/22
L ₁₁ A+F28	145.0	21.5	3/3	3/3	6/20
F29	136.7	21.0	3/3	0/3	0/25
L ₁₁ A+F29	151.7	23.0	0/3	0/3	0/27
無接種	148.3	23.0	0/3	0/3	0/20

a) 品種：福寿2号，L₁₁A接種：1996年4月10日，強毒ウイルス接種：5月7日

b) 1996年6月11日調査

c) 葉：モザイク株数/供試株数，果実：えそ症状株数/供試株数

第6表 弱毒ウイルスL₁₁A株の増殖日数と干渉効果

処 理 区	接 種 日		発 病 株 率 ^{a)}							
	L ₁₁ A	F28	7/12	7/22	7/24	7/29	7/31	8/10	8/16	8/20
L ₁₁ A	6/4	—	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
L ₁₁ A+F28①	6/24	7/3	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
L ₁₁ A+F28②	6/24	7/14	0/10	3/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
L ₁₁ A+F28③	6/24	7/24	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	5/10	10/10
F28	—	7/3	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
無接種	—	—	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

a) モザイク発病株数/供試株数

第7表 *Tabacco mosaic virus* F28株接種によるトマト品種の反応

トマト 品 種	抵抗性 因子型	F28		TMV-OM		ToMV-T	
		接種葉	上位葉	接種葉	上位葉	接種葉	上位葉
大型福寿	+/+	—	M, Chl(+)	—	M, Ma(+)	Chl	M(+)
福寿二号	—	—	M(+)	—	M, Ma(+)	—	M(+)
ボンテローザ	—	—	VC, M, Chl(+)	—	M, Ma(+)	LF, D	M, Chl(+)
大 王	<i>Tm-1</i> /+	CS	M, Chl(+)	—	M, Ma(+)	Chl	m(+)
福 丞	—	—	M(+)	—	M, Ma(+)	Chl	m(+)
桃太郎	—	—	M, Chl(+)	LF	M, Ma(+)	NS	m(+)
ゆうやけ	—	D	M, Chl(+)	—	M, Ma(+)	NS	m(+)
オレンジキャロル	<i>Tm-2</i> /+	NS	—(-)	NS	—(-)	NS	—(-)
サンチェリーエキストラ	—	NS	N, Stu→D, Str	NS	N, NS, Stu, Str	NS	VN→D(+)
瑞 健	—	NS	NS, Stu, Str	NS→D	N	NS	Str
瑞健102	—	NS	NS, Stu→D	—	N, VC, Stu→D, Str	LF, D	N, Stu→D
鈴太郎	—	D	NS, Stu→D	NS	N, Stu, Str	NS	N, YM→D, Str(+)
おどりこ	<i>Tm-2a</i> /+	NS	NS, Stu→D, Str	—	N→D, Str	NS	Str(-)
瑞 秀	—	—	NS, Stu→D	NS	N, Stu→D, Str	NS	N→D, Str
ハウス桃太郎	—	D	NS, Stu	—	N, Stu→D, Str	—	—(-~+)
豊 将	—	—	NS, Stu→D	NS	N, Stu→D, Str	Chl	m, VC→D, Str
桃太郎8	—	D	N, Stu→D, Str	NS	N, Stu→D, Str	NS	Str(-~+)
瑞 栄	<i>Tm-2a</i> / <i>Tm-2a</i>	NS	NS, Stu→D, Str	NS	N, Stu→D, Str	NS	N, Stu, Str
まごころ	—	NS	NS, VC, Stu→D, Str	NS	N, Stu, Str	NS	—(-)
メーテルヨーズ	—	NS	N, Stu, Str	NS	N, Stu, Str	LF	N, Stu, Str
GCR237	<i>Tm-1</i> / <i>Tm-1</i>	—	m, Chl(+)	—	M, D(+)	—	m(+)
GCR526	<i>Tm-2</i> / <i>Tm-2</i>	NS	—(-)	NS	m(+)	NS	—(-)
GCR267	<i>Tm-2a</i> / <i>Tm-2a</i>	NS	N, Stu	NS	—(-)	NS	N, Stu
GCR236	<i>Tm-2nv</i> / <i>Tm-2nv</i>	NS	—(-)	NS	N, Stu, Str	NS	—(-)
GCR254	<i>Tm-1</i> / <i>Tm-1</i> , <i>Tm-2nv</i> / <i>Tm-2</i>	—	—	—	—	—	—

注)NS:えそ斑点, N:えそ, Chl:退緑, CS:退緑斑点, LF:落葉, VC:葉脈透化, VN:葉脈えそ, M:モザイク, m:軽いモザイク, YM:黄色モザイク
D:枯死, Str:茎えそ, Stu:わい化, 萎縮, Ma:奇形, VC:葉脈透化, —:無病徴, →:症状の変化, ():戻し接種で+は陽性, -は陰性

Ⅳ. 考 察

ミディトマト「越のルビー」の果実えそ症状を起こした病原ウイルスは TMV であった。トマトモザイク病の病原ウイルスのうち、TMV、ToMV、PVX 及び CMV はトマトの茎葉や果実にえそ症状を引き起こすことで知られている^{5,7,14,15)}。大半は ToMV に起因するものであり、CMV または PVX は ToMV と重複感染してえそ症状を現す場合が多い^{14,15)}ことが報告されており、このような TMV の発生は僅かである^{14,15)}。

I-ELISA 簡便法において、抗血清を健全トマト葉汁液で吸収した場合、抗 ToMV 血清は対象とする ToMV 感染葉汁液だけでなく、TMV 感染葉汁液に対しても反応を示した。

本ウイルスの CP 遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を調べたところ TMV-OM 株と 98.5 % および 98.8 % と高い相同性を示した。CP 遺伝子における TMV と ToMV の相違点としては、3'末端のアミノ酸が ToMV ではセリンであるのに対し TMV はトレオニンであること、また ToMV にはメチオニンが含まれるのが TMV にはないことが報告されている²⁰⁾。本試験においても F28 株と TMV-OM 株にはメチオニンは含まれておらず、3'末端のアミノ酸もトレオニンであることが確認された。また、F28 株と TMV-OM 株とのアミノ酸配列の相違はわずか 2カ所であったが、この相違が F28 株による果実のえそ症状の発生に関与しているかどうかは検討を要する。

TMV は 22 科 198 種に感染し、宿主範囲は広い¹⁹⁾。本試験で TMV-OM 株を 14 科 40 種 3 品種の植物に汁液接種したところ、7 科 21 種 3 品種に感染したが、F28 株も 7 科 21 種 3 品種に感染し、病徴は TMV-OM 株とほぼ同じであった。ミディトマト「越のルビー」は挿し芽による栄養繁殖によって苗の増殖が行われている。被害の発生した時期は急速にミディトマトの作付が増えた時期と重なることから苗生産において何らかの原因によって親株が本ウイルスに汚染され、罹病苗が県内の産地に拡大したものと考えられる。

現在は厳正な管理の下でウイルスフリー苗の育成・供給が行われているため、1998 年頃からは ToMV の検出のみで TMV の検出は確認されていない⁸⁾。しかし、一旦 TMV の感染が起こると移植、芽かき、摘心といった農作業により容易に他の株へ伝染していくことから、今後もウイルスの診断と健全種苗の維持が望まれる。

農作物のウイルス診断には指標植物への汁液接種、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察、抗血清

を用いた血清学的診断、遺伝子診断法などがある。ELISA 法は血清学的診断法の中でも極めて感度が高く、大量検定に優れた方法として今日広く利用されている。中でも DAS-ELISA (二重抗体 ELISA)^{12,13)} は高感度で反応も安定しており低濃度のウイルスの検出に優れていることから、多くの農作物のウイルス診断法またはウイルス定量法として利用されているが、多種類のウイルスを診断する場合、各抗ウイルス血清から γ-グロブリンの精製とコンジュゲートを作成し、検定に用いる必要があり、経費がかかる、操作が煩雑になる等の欠点がある。一方、I-ELISA は市販の標識された二次抗体 (標識二次抗体) を抗血清と共に利用することによりウイルスの診断が可能になることから、同時に多種類のウイルスを診断する場合に適した方法である²¹⁾。I-ELISA 簡便法は抗血清と標識二次抗体を同時処理すること、各ステップ間のプレートの洗浄を蒸留水で行うことで、より簡便化を図った手法である。今回、I-ELISA 簡便法による TMV の検出至適条件を検討した結果、TMV の検出条件としては抗原濃度 10,000 倍、抗血清濃度 20,000 倍、標識二次抗体濃度 4,000 倍が適当であると考えられた。感染トマト葉汁液で吸収した抗血清を使用したところ、各抗血清に対して対象ウイルスが強く反応し、ToMV と TMV の判別が容易となった。現在「越のルビー」には ToMV 対策として弱毒ウイルス L₁₁A 株が接種されている。抗血清を ToMV 感染トマト葉汁液で吸収させることによってより確実に TMV を診断できると考えられた。前述の検定条件を用いて I-ELISA 簡便法でミディトマトから分離したウイルス F28 株の診断を行い DAS-ELISA と比較したところ、I-ELISA 簡便法では DAS-ELISA に比べて対象ウイルス感染葉汁液の反応がやや低くなったが、十分に診断は可能であると考えられ⁹⁾、本手法を用いることによって大量に安価で簡便な TMV の検定が可能と考えられた。

ウイルス病には直接有効な薬剤がないため、罹病植物の除去といった物理的手段のほか、抵抗性品種や弱毒ウイルスの利用等の手段がとられている。今回、弱毒ウイルス L₁₁A 株について F28 株に対する防除効果を調査した。L₁₁A 株接種後 F28 株接種の期間が長くなるほど、トマトでの病徴発現までの期間が遅くなる傾向はみられたが、最終的に発病株率は 100% となった。また L₁₁A 株を前接種して F28 株を接種したところ、F28 株を単独接種した場合と同様に葉のモザイク症状やえそ果の発生がみられた。しかし、ToMV である F29 株を二次接種した場合、F29 株の単独接種した区に比べると草丈の低下や葉数の減少といった生育不良や葉のモザイク症状の発現を抑制する効果がみられた。L₁₁A 株は接種 7 ~ 8 日後

から干渉効果を示し、接種 10 日後から 70 ~ 80 日後までは ToMV に対して、効果を十分に持続することが報告されている¹⁹⁾が、今回の試験においても ToMV の F29 株に対して、L₁₁A 株の増殖は十分に確認されたが、F28 株に対してはその干渉効果が不十分であった。弱毒ウイルスの干渉効果はウイルスの系統が異なると十分な効果を発揮できない。ToMV から作られた弱毒ウイルス L₁₁A 株についても、その干渉効果は ToMV に対しては認められるが、TMV には部分的にしか効果がないことが確認されている²⁰⁾。しかし近年、L₁₁A 株由来の自然突然変異株である L₁₁A-F 株が TMV に対して干渉効果を示すことが報告されている。この L₁₁A-F 株は福島 TMV 株に対しては強い干渉効果を示すが、青森 TMV 株ではやや効果が劣ることが確認されており、ウイルス株により干渉効果には差がみられた²¹⁾。弱毒ウイルスの干渉作用の機構についてはまだ定説はなく、ウイルス増殖部位の競合、ウイルス増殖に必要な物質の競合、ウイルス増殖阻害物質の生産、一次ウイルスの外被タンパク質による二次ウイルス RNA のコーティングおよび二次ウイルスの脱外被阻害などの仮説が提唱されている²²⁾。また、L₁₁A 株は親株の ToMV-L 株に比べて感染力やトマト内での増殖力が劣っていること、L₁₁A 株接種を行った場合でも強毒ウイルスの濃厚感染では発病することが報告されている²³⁾。これらの点から L₁₁A-F 株の TMV に対する干渉効果の差異は強毒ウイルスの増殖力が影響していることが考えられる。

同系統である TMV-OM 株から作出された弱毒ウイルス TMV#83、#84 株の F28 株に対する干渉効果を調査したところ、F28 株の単独接種と比べ、TMV 感染による草丈の低下といった生育不良や着果数の減少が抑えられる傾向にあったが、えそ果の発生を抑えることができなかつた⁹⁾。この結果については前述したように、使用した弱毒ウイルスのトマトでの増殖力が悪かった、あるいは F28 株が高い増殖力を有し、弱毒ウイルスの干渉効果を容易に打ち破るような分離株である可能性が考えられた。今後、L₁₁A-F 株の F28 株に対する干渉効果を調査するとともに、TMV-F28 株由来の弱毒ウイルスの作出を検討する必要があると思われる。

ミディトマト「越のルビー」は抵抗性遺伝子を持たない感受性品種²⁴⁾であるが、本試験で抵抗性品種に対して F28 株の接種を試みたところ、*Tm-1* を持つ品種では上葉にモザイクや退緑を生じ、*Tm-2*、*Tm-2'* を持つ品種では接種葉にえそ斑点、上葉でえそ症状を示し、萎縮した。*Tm-1* は保毒性抵抗性遺伝でウイルスの全身感染を完全に阻止するのではなく、感染してもウイルスの増殖を抑制し激しい症状を起こさ

ないものである。また、*Tm-2*、*Tm-2'* は過敏型抵抗性遺伝子でウイルスが細胞に侵入した場合、その細胞が急速に死んで病斑が局在化し、他の細胞組織へウイルスの移行を阻止、その結果、組織の致死部分がえそとなる。両者とも接種強度、栽培環境、ストレインの種類等の条件によりモザイク症状を起こしたり、致死部分が大きくなって肉眼で識別できるようなえそを生じることがある²⁵⁾。本試験では TMV-F28 株の接種は子葉展開時のトマト子葉に行っている。今回えそ症状を生じた「サンチュリーエキストラ」(*Tm-2/+*)、「瑞健」(*Tm-2/+*)、「GCR267」(*Tm-2' /Tm-2'*)等の品種に対し、本葉 1 葉期の本葉にウイルス接種を行った場合、無病徴であった⁹⁾。ウイルスに対する植物の感受性は苗齢により異なり、苗齢の進んだ植物にウイルスを接種した場合には感染の起こらない例⁹⁾やウイルス接種時期が遅くなるほど被害が減少する例^{14,22)}が報告されており、本試験におけるトマトのウイルス感受性は高かったものと考えられた。また、過敏型抵抗性遺伝子は高温によりえそを生じやすいということが指摘されている²⁶⁾。本試験のウイルスの接種時期は夏の高温条件下であり、ウイルスが感染しやすい条件であったことが考えられた。しかし、このような条件下においても「オレンジキャロル」は上葉へ移行せずに強い抵抗性を示した。抵抗性品種のもつ抵抗性には品種間差異があることが報告されており²⁷⁾、この品種についてはより強い抵抗性を持っている可能性が示唆された。

V. 引用文献

- 1) Clark, M.F. and Adams, A.N.(1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. gen. Virol. 34, 475-483.
- 2) 福田明美・本多範行・富田浩治・江端真智恵:ミディトマトのえそ果の発生, 北病研報(投稿中)
- 3) 後藤忠則・大島信行(1959): トマト, キュウリ, カボチャのモザイク病ウイルスについて. 日植病報, 24, 61.
- 4) 後藤忠則・根本正康(1971): 弱毒ウイルスによるウイルス病の防除—安定弱毒ウイルスの選出と各種植物に対する影響. 北海道農試報, 99, 67-76.
- 5) 後藤忠則・根本正康(1973): タバコモザイクウイルスとジャガイモ X ウイルスの重複感染によるトマト条斑病について. 北海道農試研報, 105, 1-8.
- 6) 後藤忠則(1984): 北海道におけるトマトのモザイク病とその防除に関する研究. 北海道農試研報, 140, 103-176.

- 7) 後藤忠則・吉田幸二・飯塚典男(1988): トマトのえそ症状株から分離されたキュウリモザイクウイルス. 北海道農試研報, 149, 35-43.
- 8) 本多範行(1996): 地域特産野菜における微生物を利用した防除技術. 平成8年度(1996)病害虫に関する試験成績: 18-29. 福井県.
- 9) 本多範行・上谷明美・岩崎真人(1998): トマトに発生したタバコモザイクウイルスの血清診断と発生状況. 日植病報, 64, 625(講要).
- 10) 岩崎真人・山本孝希・稲葉忠興(1996): ウイルスによるカボチャ台接ぎ木キュウリの萎凋症に関する研究. 四国農試研報, 60, 1-88.
- 11) 梶 和彦・園田高広・平子喜一(1993): タバコモザイクウイルス(TMV)によるトマト果実条斑病と弱毒ウイルス利用による防除. 日植病報, 59, 324(講要)
- 12) 勝田英郎・森 義夫・奈須田和彦・大城 関(1990): 組織培養による増殖を目的としたミディ系高糖度トマトの品種育成. 福井県立短期大学研究紀要, 15, 17-24
- 13) Koenig, R. (1981): Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. gen. Virol. 55, 53-62.
- 14) 小室康雄(1963): わが国におけるトマト条斑病の病原ウイルス. 日植病報, 28, 40-48.
- 15) 小室康雄・岩木満郎・中原 守(1966): トマトのモザイク. えそ症状株から分離されるウイルス, とくに tobacco mosaic virusのトマト系について. 日植病報, 32, 130-137.
- 16) M.H.V. Van Regenmortel and Heinz Fraenkel-Conrat.(1986): Tobamoviruses. The Plant Viruses. pp5-220. Plenum Press, New York.
- 17) 松本 勤・奈良雄一郎・高橋春實・古屋廣光・山本秀樹・平子喜一(1998): 弱毒ウイルスToMV-L₁₁A由来の自然突然変異株L₁₁A-Fの諸性質, 日植病報, 64, 421-422(講要).
- 18) 長井雄治・竹内妙子(1979): TMV弱毒系統の実用的接種法とトマトモザイク病に対する効果. 千葉農試研報, 20, 57-69.
- 19) 長井雄治(1984): トマト. 野菜のウイルス病(植物ウイルス研究所学会編), pp1-38, 養賢堂, 東京.
- 20) 日本植物病理学会(2000): トマト. 日本植物病名目録(初版), pp250-254, 日本植物防疫協会, 東京.
- 21) 西口正通・本吉総男(1986): 弱毒ウイルスの分子生物学的研究とその応用. 植物防疫, 40, 502-509.
- 22) 荻原佐太郎・青木宏史(1973): トマトのタバコ・モザイク・ウイルス抵抗性育種に関する研究—第1報 タバコ・モザイク・ウイルスによるトマトの被害様相. 千葉県農試研報, 13, 35-40.
- 23) 大島信行(1977): 施設トマト栽培における弱毒ウイルスの利用と実際. 農及園, 52, 548-552.
- 24) 高橋義行(1995): 酵素結合抗体法(ELISA). 植物病理学事典(日本植物病理学会編). pp.195-198, 養賢堂, 東京.
- 25) 富田浩治(1995): ミディトマトウイルス病防除対策技術の確立. 平成7年度(1995)病害虫に関する試験成績: 27-30. 福井県.
- 26) Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D.E., Clark, M.F. and Adams, A.N.(1976): The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). J.gen. Virol. 33, 165-167.
- 27) 山川邦夫(1978): トマトのTMV抵抗性品種とその利用上の問題点[1]. 農及園, 53, 1033-1038.
- 28) 山川邦夫(1978): トマトのTMV抵抗性品種とその利用上の問題点[2]. 農及園, 53, 1151-1154.

Character of *Tobacco Mosaic Virus* Isolated from Tomato Plants Showing Necrotic Disease

Akemi FUKUDA Masayasu KOMANO and Noriyuki HONDA

Summary

We examined the host range, the gene analysis of coat protein and the control of *Tobacco mosaic virus* F28 that occurred necrotic fruits in "Midi"-type Tomato "Koshi-no-Ruby".

TMV-F28 and TMV-OM coat protein gene have nucleotide and amino acid homologies of 98.5 and 98.8%. Out of 3 cultivar 40 plant species belonging 14 families, which were inoculated with sap of TMV-F28, 3 cultivar 21 species belonging to 7 family were infected. Host range and their symptoms were similar to TMV-OM. For rapid and convenient detection of TMV-F28, we examined the detectable condition of the modified indirect ELISA(I-ELISA). TMV was specifically detected by using antigen diluted 1:10000, antiserum diluted 1:20,000 in the sap of tomato plant infected with ToMV, and anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate diluted 1:4000.

Using an Attenuated *Tomato mosaic virus* ToMV-L₁₁A, we investigated cross protection against TMV-F28. Pre-inoculation of Tomato plants with ToMV-L₁₁A didn't protected from infection with TMV-F28, since it induced mosaic leaf symptoms and necrotic fruits.

TMV-F28 inoculated 25 resistant cultevars, it caused systemic invasion followed by mosaic or chlorosis on cultevars containing resistance gene *Tm-1*. On cultevars with the resistance gene *Tm-2* or *Tm-2^{*}*, the virus induced necrotic local lesions on the inoculated leaves, necrosis on the upper leaves and stunt. But it was not observed symptoms by the virus on tomato cultivar "Orange-carol" with resistant gene(*Tm-2/+*).