トマト系タバコモザイクウイルスの弱毒ウイルス TMV-L₁₁A に 由来する自然突然変異株の干渉効果

松本 勤*・古屋 廣光*・平子 喜一**・山本 英樹***

Tsutomu MATSUMOTO*, Hiromitsu FURUYA*, Kiichi TAIRAKO** and Hideki YAMAMOTO*** :
Cross Protection of Spontaneous Mutants Derived from an Attenuated
Tomato Strain of Tobacco Mosaic Virus TMV-L₁₁A

Abstract

Several isolates derived from the attenuated tomato strain of tobacco mosaic virus TMV-L₁₁A were examined in regard to their degree of cross protection against a virulent virus TMV-AK1 in tomato cultivar Momotaro with resistance gene *Tm-1/+* to TMV. Among four attenuated isolates tested, L₁₁A Fukushima gave the highest degree of cross protection. The other isolates, in decreasing order of the degree of cross protection, were as follows: L₁₁A Chiba, L₁₁A237 and L₁₁A. In addition, L₁₁A Fukushima prevented appreciable symptom development even under high temperature conditions in the summer, whereas L₁₁A and L₁₁A237 did not.

Key words: attenuated tobacco mosaic virus, tomato, spontaneous mutants, cross protection, biological control.

TMV によるトマトモザイク病に対しては、わが国ではトマト系 TMV の 1 系統 (TMV-L) から弱毒ウイルス TMV-L₁₁⁸⁾ が作られ、これをさらに改良した TMV-L₁₁A が後藤・根本³⁾ によって作出された。また、TMV 抵抗性遺伝子 *Tm-1* を持つ抵抗性品種も育種されて本病は解決されるかに見えた。しかし、やがてこの抵抗性品種をおかす TMV の系統が現れ⁹⁾、これに対して大島ら¹⁰⁾ は L₁₁A では防除効果は期待できないとして、TMV 抵抗性品種である GCR237 (*Tm-1/Tm-1*) に L₁₁A を 4 代継代して L₁₁A よりも防除効果を示す L₁₁A 由来の弱毒ウイルス変異株 L₁₁A237 を選抜した。

一方、本病に対して L₁₁A による防除実績の豊富な千葉県^{1,6)} では、L₁₁A を 1974 年に大島信行氏から譲り受け、1975 年から千葉県農業試験場で毎年継代増殖してきた L₁₁A が抵抗性遺伝子を持つトマト品種 ‘桃太郎’ (*Tm-1/+*) (タキイ種苗株式会社) においても TMV に対する防除効果が認められるとして使用されてきた。この L₁₁A は福島県の ‘桃太郎’ の栽培においても防除効果が確認され⁵⁾、秋田県でも ‘桃太郎’ に本病が発生した際に、千葉県から 1995 年に分譲された L₁₁A を使用して本病による被害をほぼ完全に防いだ。このことより千葉県から分譲された L₁₁A は、元の L₁₁A とは異なり、千葉県で継代増殖して

いるうちに ‘桃太郎’ をおかす TMV に対しても防除効果を示すように変異した可能性が高いと考えた。そこで L₁₁A の変異を確かめるために、後藤忠則氏から分譲された L₁₁A, L₁₁A237 (MAFF26005)、千葉県農業試験場から分譲された L₁₁A (以後 L₁₁A Chiba と呼ぶ)、L₁₁A Chiba を接種した福島県の農家の ‘桃太郎’ から分離した L₁₁A (以後 L₁₁A Fukushima と呼ぶ) の各弱毒ウイルスについて強毒ウイルスに対する干渉効果を比較した。その結果、各弱毒ウイルスの干渉効果の程度には明らかな差異があり、夏期の高温条件の実験ほど差異が顕著であることが判明した。また、供試弱毒ウイルスの中では L₁₁A Fukushima が最も強い干渉効果を示し、L₁₁A Chiba よりも防除効果の高い突然変異株であることも確かめられたので報告する。

一次ウイルスとして用いた各弱毒ウイルスの接種源はトマト品種 ‘大型福寿’ (+/+) (タキイ種苗株式会社) で増殖し、使用時まで -40°C で凍結保存した。二次ウイルスとして用いた強毒ウイルス (以後 TMV-AK1 と呼ぶ) は秋田県において果実や葉に奇形やモザイク症状を起こした ‘桃太郎’ から *Nicotiana glutinosa* を用いて単一病斑分離法によって分離した。なお、TMV-AK1 は *Tm-1* をヘテロに持つトマト品種 (*Tm-1/+*) を激しくおかすが、ホモに持つ品種 (*Tm-1/Tm-1*) には病徴を現さず、タバコ品種

* 秋田県立農業短期大学 Akita Prefectural College of Agriculture, Ogata, Akita 010-0444, Japan

** 福島県農業試験場 Fukushima Prefecture Agricultural Experiment Station, Koriyama 963-8041, Japan

*** 秋田県遺伝資源開発利用センター Akita Research Institute for Genetic Resources, Ogata, Akita 010-0442, Japan

‘Bright Yellow’ およびペチュニア品種 ‘フルコン’ (サカタのタネ株式会社) の接種葉に局部病斑を形成するトマト系 TMV であった。TMV-AK1 の接種源は ‘桃太郎’ で増殖させ、弱毒ウイルスと同様に使用時まで凍結保存した。ウイルスの接種方法は凍結保存した感染葉を 1 g 当たり 9 ml の 0.05 M, pH 7.4 のリン酸緩衝液中ですり潰し、病汁液を常法のカーボランダム法によって汁液接種した。

干渉効果の試験は以下のように行った。供試品種は ‘桃太郎’ および台木用品種 ‘LS-89’ (+/+) (タキイ種苗株式会社) を用いた。供試植物は素焼鉢 (直径 18 cm) に移植して温室 (冬期) またはガラス網室 (春から夏) で試験した。各弱毒ウイルス当たり本葉 2~3 葉期のトマトを 10 本または 11 本準備し、弱毒ウイルス (10 倍希釈粗汁液) は一次ウイルスとして本葉第 1 葉に接種した。弱毒ウイルス接種 3 週間後に二次ウイルスとして TMV-AK1 (10 倍希釈粗汁液) を第 6 葉に接種した。その後、強毒ウイルスによるモザイク症状の発現時期および発病株数を 12 週間調べた。この干渉効果の比較試験は温度条件の異なる季節で 3 回行った。1 回目の試験 (冬期) は温室 (18~25°C) を用いて行い、TMV-AK1 を 12 月 22 日に接種して 3 月 15 日まで発病の有無を観察した。2 回目の試験 (春から盛夏) は、窓および天窓を開け放したガラス網室 (春は最高温度 30~35°C, 夏は最高温度 35~40°C) で行い、TMV-AK1 を 5 月 10 日に接種して 8 月 2 日までの発病の有無を調査した。3 回目の試験 (初夏から晩夏) も 2 回目と同じ開放したガラス網室 (最高温度 35~40°C) で行い、TMV-AK1 を 6 月 7 日に接種して 8 月 30 日まで調査を行った。

Fig. 1 は各弱毒ウイルスの干渉効果を温度条件の異なる季節で比較したものである。一次ウイルスとして L₁₁A を接種した ‘桃太郎’ では、冬期の試験においては TMV-AK1 接種 5 週間後まで病徴が現れず、干渉効果がある程度認められた。しかし、その後発病株率が上がり、8 週間後には 80% に達した。‘LS-89’ においても類似した傾向を示し、4 週間後までは TMV-AK1 の病徴が現れなかったが、その後発病株率が上がり、8 週間後には全株が発病した。春から盛夏の試験ではいずれの品種も TMV-AK1 接種 3~4 週間後から発病し始め、初夏から晩夏の試験においては 2~3 週間後にはほぼ全株にモザイク症状が現れ、両試験とも干渉効果がほとんど認められなかった。

L₁₁A237 については冬期の試験ではいずれの品種においても高い干渉効果を示し、‘桃太郎’ では TMV-AK1 接種後 12 週間を経ても発病株は現れなかった。また、‘LS-89’ においても 8 週間後に 30% の株が発病したが、その後発病株は増えなかった。しかし、春から盛夏の試験では両品種とも TMV-AK1 接種 5 週間後には 40% の株が発病し、8 週間後ではほぼ全株が発病した。初夏から晩夏の試験では、さらに干渉効果が低下し、‘桃太郎’ では 3 週間後、

Fig. 1. Cross protection by spontaneous mutants derived from TMV-L₁₁A against challenge virus TMV-AK1 at different seasons. TMV-L₁₁A and its spontaneous mutants (L₁₁A 237, L₁₁A Chiba, L₁₁A Fukushima) were applied to ten or eleven tomato plants of cv. Momotaro (*Tm-1/+*) and cv. LS-89 (+/+). After three weeks, the plants were challenge inoculated with TMV-AK1. Experiments in winter were conducted in a greenhouse at 18–25°C. Experiments from spring to midsummer and early to late summer, were carried out in an open greenhouse covered with plastic net to protect from insects. □: not inoculated with the attenuated TMV, ◇: protected by L₁₁A, ○: protected by L₁₁A237, △: protected by L₁₁A Chiba, ⊞: protected by L₁₁A Fukushima.

‘LS-89’ では 4 週間後に全株が発病した。したがって、L₁₁A237 は気温が高くなると極端に防除効果が低下するため、春から栽培する東北地方のトマトの作型には防除効果の期待が持てない弱毒ウイルスであることがわかった。

L₁₁A Chiba については、冬期の試験ではいずれの品種においても TMV-AK1 接種 7~8 週間後まで発病する株が無く、その後も 10~30% の発病株率にとどまり、高い干渉効果を示した。春から盛夏の試験においても、冬期の結果に比べ干渉効果は低下したものの、かなり高い防除効果を示した。しかし、初夏から晩夏の ‘桃太郎’ における試験で

は TMV-AK1 接種 5 週間後で 40%, 8 週間後で 80% の株が発病した。また, 'LS-89' においても 4 週間後で 50%, 8 週間後で全株が発病した。この結果から, L₁₁A Chiba は明らかに L₁₁A や L₁₁A237 よりも高い防除効果を示しており, 春に定植する '桃太郎' の作型においても実用に耐える弱毒ウイルスであることが確かめられた。しかし, 夏期の高温条件で使用した場合には干渉効果がかなり低下することもわかった。

L₁₁A Fukushima の干渉効果については, 冬期の '桃太郎' の試験では TMV-AK1 接種 9 週間後に 10% の発病株が見られたが, その後発病株は増えなかった。また, 'LS-89' においては調査期間中全く発病株は見られなかった。春から盛夏の試験においても TMV-AK1 接種 8 週間後に両品種に発病株が 10% 現れたが, 12 週間経過しても '桃太郎' で 30%, 'LS-89' でわずか 10% の発病株率に抑えられた。さらに, 初夏から晩夏の高温条件の試験においても, TMV-AK1 接種後約 1 カ月間両品種とも発病せず, その後も '桃太郎' では発病株率を 30% に, 'LS-89' では 20% に抑えた。したがって, L₁₁A Fukushima は気温の高い夏期のトマト栽培においても, 他の供試弱毒ウイルスに比べ高い防除効果を示した。

以上の実験結果から, L₁₁A ならびに L₁₁A 由来の弱毒ウイルス間の干渉効果の程度には明らかな差異が認められた。このことは L₁₁A の変異によるものと考えられた。また, 供試弱毒ウイルス間の干渉効果の差異は高い温度の実験条件ほど顕著であった。しかし, '桃太郎' (*Tm-1/+*) と 'LS-89' (+/+) の 2 品種間における干渉効果の程度に差異は認められなかった。

品種間差異が無かった理由については, これまでの報告から, *Tm-1* 遺伝子を持つトマトの TMV の増殖に対する抵抗性はウイルスの系統や温度に大きく影響され, 特に温度が高くなるにつれて抵抗性が失われて行くことが明らかにされている²⁾。また, 個体レベルの実験ではないが, *Tm-1/+* を持つトマト品種のプロトプラストであっても接種源の TMV-RNA の濃度を高くして接種すると TMV-RNA が早くから増殖し, 増殖量も増すことが報告されている¹¹⁾。したがって, 本実験でも一次ウイルスとして用いた弱毒ウイルスが温度や接種源濃度などの何らかの条件で抵抗性品種の '桃太郎' においても 'LS-89' と同程度に増殖したために, 干渉効果の程度に差がなかったものと考えられる。

本研究では, L₁₁A は冬期の試験での感受性品種においても完全な干渉効果を示さなかった。しかし, これまで多くの地域で L₁₁A は実用化され, 感受性品種におけるトマト系 TMV に対して高い干渉効果を示してきた。このことについては, 本実験に供試した TMV-AK1 が以前感受性品種に発生していたトマト系 TMV に比べて L₁₁A の干渉

効果をより容易に打ち破るような分離株であることも考えられるが, 理由は定かでない。

L₁₁A および L₁₁A 由来の弱毒ウイルスの干渉効果は温度の高い実験条件ほど不完全になる傾向が認められた。しかし, 供試弱毒ウイルス間でその程度に明らかな差が認められ, L₁₁A Fukushima が特に高温の影響が少なく, L₁₁A Chiba も比較的影響が少なかったが, L₁₁A と L₁₁A237 については高温の影響が顕著に現れた。既に西口・大島⁷⁾ は L₁₁A の増殖適温は 25~28°C にあり, それより高温になると減少し, 35°C では増殖しないことから, 夏の高温時期には干渉効果が低下することを示唆している。したがって, 本論文で供試した L₁₁A においてもこのことが実証された。一方, 長井・竹内⁹⁾ の報告では, 彼らの供試した L₁₁A (千葉県農試で毎年継代増殖してきた接種源) は夏季のハウスと露地の抑制栽培においても十分な発病抑制効果を示した。この結果は本論文の L₁₁A Chiba の干渉効果の結果とほぼ類似していた。なお, Holmes⁴⁾ の masked strain は高温条件でも増殖すると報じられている。

これらのことから, L₁₁A 由来の変異株である L₁₁A Fukushima と L₁₁A Chiba が L₁₁A に比べて高温条件においても比較的高い干渉効果を示すのは L₁₁A の温度感受性に関与する遺伝子領域に変異が起き, 高温下でも L₁₁A に比べて増殖力に影響を受けないためと考えられる。今後, 最も強い干渉効果を示した L₁₁A Fukushima の実用化試験を行うとともに, これら L₁₁A 由来の自然突然変異株の変異については分子遺伝学的にも証明する必要がある。

本研究を行うにあたり, 元北海道農業試験場の後藤忠則氏からは TMV-L₁₁A を分譲いただき, また千葉県農業試験場の青木宏史氏ならびに竹内妙子氏からも圃場で使用予定の TMV-L₁₁A を分譲いただいた。心より厚く御礼申し上げる。本研究の遂行にご助力いただいた当時の本学植物病理学専攻生にも感謝の意を表する。

引用文献

1. 青木宏史・荻原佐太郎 (1974). 弱毒ウイルスによるハウストマトのタバコ・モザイク・ウイルス防除. 千葉農試研報 14: 135-143.
2. Fraser, R.S.S. and Loughlin, S.A.R. (1982). Effects of temperature on the *Tm-1* gene for resistance to tobacco mosaic virus in tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 109-117.
3. 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. 北海道農試彙報 99: 67-76.
4. Holmes, F.O. (1934). A masked strain of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 24: 845-873.
5. 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).
6. 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.
7. 西口正通・大島信行 (1979). 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. 日植病報 45: 654-659.
 8. 大島信行・小餅昭二・後藤忠則 (1965). 弱毒ワクチンによるウイルス病の防除 (1) トマトモザイク病の防除. 北海道農試彙報 85: 23-33.
 9. 大島信行・荻原佐太郎・青木宏史 (1971). TMV 抵抗性トマトから分離されたトマト系 TMV について. 日植病報 37: 401-402 (講要).
 10. 大島信行・大沢高志・森田 儔・森 喜作 (1978). 新弱毒ウイルス L₁₁A237. 日植病報 44: 504-508.
 11. Watanabe, Y., Kishibayashi, N., Motoyoshi, F. and Okada, Y. (1987). Characterization of *Tm-1* gene action on replication of common isolates and a resistance-breaking isolate of TMV. Virology 161: 527-532.

(平成 9 年 11 月 25 日受付; 平成 10 年 2 月 26 日受理)