HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オオムギ葉肉プロトプラストへのオオムギ黄萎ウイルス（BYDV）の感染
Author(s)	大島, 一里; 松原, 旭; 上田, 一郎; 四方, 英四郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 14(2), 98-102
Issue Date	1984-10-18
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12010
Type	bulletin (article)
File Information	14(2)_p98-102.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

オオムギ葉肉プロトプラストへのオオムギ黄萎ウイルス(BYDV)の感染

大島一里・松原　旭*
上田一郎・四方英四郎
*三和化学研究所株式会社
(北海道大学農学部植物学教室)
(昭和58年11月1日受理)

Infection of Barley Mesophyll Protoplasts with Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV)

Kazusato OHSHIMA, Akira MATSUBARA*, Ichiro UYEDA and Eishiro SHIKATA
*Sanwakagaku Kenkyujo Co. Ltd. Kasugai, Japan 486
Department of Botany, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan 060

緒　言

オオムギ黄萎ウイルス(BYDV)は，OSWARD and HOUSTON[15]により，初めて報告された。その後，ROCHOW and BRAKKE[17]がウイルスの純化に成功して以来，純化法についていくつかの改良が行なわれた[5),10),18)]。BYDVは，アブラムシで永続的に媒介される師部局在のLuteovirus groupで[3),7)]これまで4つの系統(RMV, RPV, MAV, PAV)が報告されている[1),16),18)]。1980年，KOJIMAら[8)]は，日本においても新潟県下でオオムギ黄萎病を発見し，病原はBYDVの一系統であると報告した。TAKANAMI and KUBO[9),19)]は，BYDVと同じLuteovirus groupに属するタバコえそ萎縮ウイルス(TNDV)とジャガイモ葉巻ウイルス(PLRV)を，タバコプロトプラストへ高率に感染させたと報告した。ところが，BARNETTら[2)]は，BYDV-PAV系統をオオムギプロトプラスト，エンバクプロトプラストへ接種したが，その感染率は，わずか5%以下という低率であったと報告している。

本論文は，本邦で発見されたBYDV-805分離株を用いて，プロトプラスト感染系を確立するため，行なった研究の結果を報告する。

実験材料及び方法

1. 純化材料

供試ウイルスは，KOJIMAら[8)]の分離したBYDV-805分離株である。播種後2週間のエン麦(品種：モイワ)に，BYDV保毒ムギクビレアブラムシ(*Rhopalosiphum padi*)で接種し，温室内(23°C)で約30日間生育し，発病させたものを純化材料とした。

2. ウイルスの純化

BYDVの純化は，松原ら[10)]の方法に準じて行なった。すなわち，−70°Cで保存しておいた凍結葉を0.1Mリン酸緩衝液(0.5%メルカプト・エタノール含む) pH 7.0を加えて磨砕し，その搾汁に1/3量のクロロホルムを混ぜ撹拌した。低速遠心分離後の水相に，8% PEG #6,000, 0.2 M $NaCl_2$を加え溶解後，一夜放置し，低速遠心分離して濃縮した。その沈殿を1% Triton X-100を含む緩衝液で懸濁し，20%蔗糖クッションを用いた分画遠心分離を2回反復して濃縮した。その後，10〜40%蔗糖密度勾配遠心分離を行ないウイルスゾーンを分画し，分画遠心後の沈殿を0.01Mリン酸緩衝液で溶解後，−70°Cで保存した。

3. プロトプラストの分離

1%過酸化水素水でオオムギ(品種：北斗裸)の種子を消毒したのち，ネニサンソ上に播種しその上にバーミュ

キュライトをかぶせ，25°C，5,000 lux，16 時間照明下で生育した。7 日後にオオムギの第一葉を採取し，0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌した後，裏表皮を剥離し，1% Cellulase "onozuka" R-10 あるいは Cellulase "onozuka" RS, 0.05% Macerozyme R-10 あるいは Pectolyase Y-23, 0.7 M マンニット (pH 5.5) を含む酵素液に裏面を下にして浮かべ，プロトプラストを得た。さらに，0.7 M マンニット液で酵素液を除くため遠心分離洗浄した。

4. プロトプラストへの接種

25°C，15 分間，前処理しておいた BYDV，ポリー L-オルニチン (PLO)，クエン酸カリウム緩衝液あるいはリン酸カリウム緩衝液 (0.7 M マンニットを含む) の混合物に，等量のプロトプラスト溶液 (0.7 M マンニットを含む) を混ぜ，25°C，15 分間処理した。さらに，0.7 M マンニット溶液 ($CaCl_2$ 含む) で遠心分離洗浄した。

5. プロトプラストの培養

プロトプラストの培地は，OKUNO and FURUSAWA ら[12),14)] に準じ，0.2 mM KH_2PO_4, 1 mM KNO_3, 1 mM $MgSO_4$, 1 μM KI, 0.01 μM $CuSO_4$, 10 mM $CaCl_2$, 750 μg/mℓ セファロリジン，0.7 M マンニット pH 5.3 を含む培地で，23°C，1,000 lux 下で培養した。

6. 螢光抗体染色

純化ウイルスを家兎に注射し，力価 2048 倍の BYDV 抗血清を得た。螢光抗体の作製は，伊藤[6)] の方法に準じて行なった。すなわち，BYDV-抗血清から γ-グロブリンを精製し，それに FITC (同仁化学) をタンパク質の 100 分の 1 量混ぜ，色素，タンパク比が 1～2 のものを螢光抗体液とした。螢光観察は，螢光顕微鏡 (日本光学) の下で行なった。

結　果

1. プロトプラストの分離，培養

酵素処理により得られたプロトプラストの生存率は，分離直後と培養 72 時間後でともに約 80% あった (Fig. 1)。また，培地中のセファロリジン濃度を 750 μg/mℓ にすると，プロトプラストに害をおよぼす事なくバクテリアの増殖を阻害した。

2. プロトプラストへの接種

A) クエン酸緩衝液による接種

1) pH による感染率の差異　pH 4.0～5.9 の範囲における感染率の差異を調べた (Table 1)。pH 4.0 では培養 48 時間後，プロトプラストは害を受け死に致った。また，この pH の範囲で感染が認められたのは pH 5.0 おいてのみで，他の pH においてはまったく感染が認められなかった。

2) pH 5.0 による感染率の差異　pH 5.0 において，ウイルス濃度を変えて感染率の差異を調べた (Table 2)。BYDV 1～2 μg/mℓ, PLO 0.2～2 μg/mℓ では，ほとんど感染率に差異を生じなかったが，BYDV, PLO ともに 1 μg/mℓ の時，1% の感染率を示す事があった。

3) オスモティクショック法[13)]　酵素処理 0.6 M，接種 0.8 M，培養 0.7 M と，マンニット濃度を接種時に

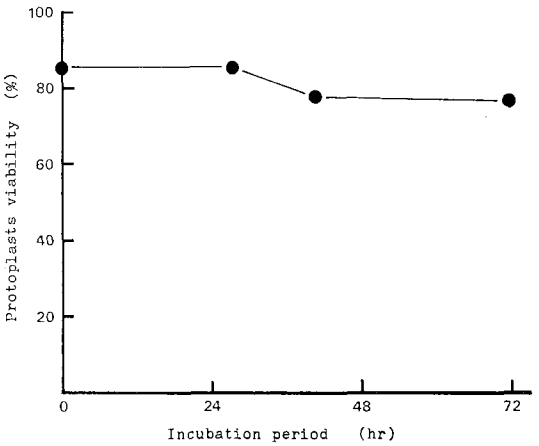


Fig. 1. The time course of protoplasts Viability obtained from barley leaves.

Table 1. Effect of different pH in citrate buffer on infection of protoplasts with BYDV

pH	Virus concentration (μg/mℓ)	PLO concentration (μg/mℓ)	Infectivity (%)
4.0-4.7	1	1	0
5.0	1	1	0.1>
5.3-5.9	1-2	1-2	0

Table 2. Effect of different concentration of BYDV, PLO at pH 5.0 citrate buffer on infection of protoplasts with BYDV

Virus concentration (μg/mℓ)	PLO concentration (μg/mℓ)	Infectivity (%)
2	0.2	0.1>
1	0.2	0.1>
1	1	1.0>
1	2	0.1>

上げるオスモティク・ショック法を用いて感染率の差異を調べた (Table 3)。pH 5.0～5.6 の範囲でどの区においても感染が認められ，BYDV 10 μg/mℓ という高濃度を用いることにより感染率は，4.7% まで上昇した。

4) $CaCl_2$ 濃度　接種後の洗浄液中に含まれる $CaCl_2$ 濃度による感染率の差異を調べた。BYDV, PLO ともに 1 μg/mℓ，緩衝液の pH 5.0 の条件で接種を行ない，$CaCl_2$ 0～100 mM を含む 0.8 M マンニット液で遠心分離洗浄したが，感染率に差異は認められなかった。

B) リン酸緩衝液による接種

リン酸緩衝液を用いて，接種を行なった (Table 4)。ウイルス濃度 1～4 μg/mℓ，PLO 濃度 0.2～2 μg/mℓ，緩衝液 pH 5.3～5.6 の範囲では，どの区においても感染率は低く，顕著な差は認められなかった。しかし，pH 5.6 において BYDV 10 μg/mℓ に上げ，オスモティク・ショック法を用いて接種を行なうと，感染率は 1.8% となった。

Table 3. Effect of osmotic shock on infection of protoplasts with BYDV

Virus concentration (μg/mℓ)	PLO concentration (μg/mℓ)	pH	Infectivity (%)
1	1	5.0-5.6	0.1>
1	1-2	4.7	0
1	2	5.0	1.0
1	2	5.3-5.6	0.1>
2	1	5.3-5.6	0.1>
4	1	5.6	0.1>
10	2	5.0	4.7

Table 4. Effect of phosphate buffer with or without osmotic shock on infection of protoplasts with BYDV

	Virus concentration (μg/mℓ)	PLO concentration (μg/mℓ)	pH	Infectivity (%)
1. a)	1-4	0.2-2.0	5.3-5.6	0.1>
2. b)	10	2	5.6	1.8

a) without osmotic shock.
b) with osmotic shock.

考　　察

BYDV-805 分離株がオオムギ葉肉プロトプラストへ低率ながらも感染することが認められた (Plate 2)。本実験では，クエン酸緩衝液 pH 5.0 を用いて接種するのが最も有効であり，またウイルス濃度が高いほど感染率が高く，オスモティク・ショック法も有効であった。本実験結果と BARNETT ら[2] の結果と比較してみると，プロトプラストへの感染率がともに低率であったこと，また BARNETT らが最高の感染率を得た接種条件，すなわちクエン酸緩衝液 pH 5.0 を用いて接種した結果本実験でも感染率が高くなった点でよく一致した。しかし，BYDV 濃度が高い方が感染率が上昇したことは，彼らの結果と相反する点である。

TAKANAMI and KUBO ら[19] は，同じ Luteovirus group の TNDV, PLRV をタバコプロトプラストへ低濃度のウイルスで高率に感染させた。このことは，虫媒性ウイルスにおいても植物細胞内にウイルスを注入せず，細胞膜との吸着，のみ込み作用によって感染，増殖することを示している。したがって BYDV とオオムギプロトプラストの系においても，プロトプラストの生理的な状態，ウイルスの活性の問題およびウイルスの吸着条件などをさらに追求する必要があろう。

最近，FUKUNAGA ら[4]，NAGATA ら[11] が TMV-RNA をリポソームに包んでタバコプロトプラストへ感染させた。Luteovirus のように *in vivo* において直接生細胞内へ持ち込まれるウイルスの場合，リポソーム法によってウイルスを取り込ませることも試みる必要がある。

摘　　要

オオムギ黄萎ウイルス (BYDV) のオオムギ葉肉プロトプラストへの接種を行なった。

1) クエン酸緩衝液を用いて pH 4.0～5.9 の範囲で接種を行なうと，pH 5.0 のみで低率ながら感染が認められた。

2) クエン酸緩衝液 pH 5.0 を用いて，ウイルス，ポリ-L-オルニチン (PLO) 濃度を変えて接種を行なうと，BYVD 1 μg/mℓ, PLO 1 μg/mℓ を用いた場合，時に 1% まで感染率が上昇することがあったが，大きな感染率の差異は認められなかった。

3) オスモティク・ショック法を用いて接種を行なうと用いない場合よりも有効であり，BYDV 10 μg/mℓ とウイルス濃度を上げることにより感染率は 4.7% まで上昇した。

4) リン酸緩衝液中での接種は，クエン酸緩衝液中での接種より感染率が低かった。

5) プロトプラスト接種後のマンニット洗浄液中の

$CaCl_2$ 濃度を変えてプロトプラストを遠心分離洗浄したが，感染率に差はなかった。

引 用 文 献

1. APPOLA, A. I. E. and ROCHOW, W. F.: Relationships among three isolates of barley yellow dwarf virus, *Virology*, **46**: 127–141. 1971
2. BARNETT, A., HAMMOND, J. and LISTER, R. M.: Limited infection of cereal leaf protoplasts by barley yellow dwarf virus, *J. gen. Virol.*, **57**: 397–401. 1981
3. ESAU, K.: Phloem degeneration in gramineae affected by barley yellow-dwarf virus, *Amer. J. Bot.*, **44**: 245–251. 1957
4. FUKUNAGA, Y., NAGATA, T. and TAKEBE, I.: Liposome-mediated infection of plant protoplasts with tobacco mosaic virus RNA, *Virology*, **113**: 752–760. 1981
5. HAMMOND, J., LISTER, R. M. and FOSTER, J. E.: Purification, identity and some properities of an isolate of barley yellow dwarf virus from India, *J. gen. Virol.*, **64**: 667–676. 1983
6. 伊藤道夫： 螢光抗体法，蛋白質核酸酵素，**10**: 25–29, 103–107, 351–355, 438–443, 1965
7. JENSEN, S. G.: Occurrence of virus particles in the phloem tissue of BYDV-infected barley, *Virology*, **38**: 83–91. 1969
8. KOJIMA, M., MATSUBARA, A., YANASE, S. and TORIYAMA, S.: The occurrence of barley yellow dwarf disease in Japan, *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **49**: 338–346. 1983
9. KUBO, S. and TAKANAMI, Y.: Infection of tobacco mesophyll protoplasts with tobacco necrotic dwarf virus, a phloem-limited virus, *J. gen. Virol.*, **42**: 387–398. 1979
10. 松原 旭・小島 誠・河野伸二・上田一郎・四方英四郎：オオムギ黄萎ウイルスの純化，日植病報，**49**: 123. 1983
11. NAGATA, T., OKADA, K., TAKABE, I. and MATSUI, C.: Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evapolation vesicles (liposomes), *Mol. Gen. Genet.*, **184**: 161–165. 1981
12. OKUNO, T. and FURUSAWA, I.: Modes of infection of barley protoplasts with brome mosaic virus, *J. gen. Virol.*, **38**: 409–418. 1978
13. OKUNO, T. and FURUSAWA, I.: The use of osmotic shock for the inoculation of barley protoplasts with brome mosaic virus, *J. gen. Virol.*, **39**: 187–190. 1978
14. OKUNO, T., FURUSAWA, I. and HIRUKI, C.: Infection of barley protoplasts with brome mosaic virus, *Phytopathology*, **67**: 610–615. 1977
15. OSWARD, J. W. and HOUSTON, B. R.: The yellow-dwarf disease of cereal crops, *Phytopathology*, **43**: 128–136. 1953
16. ROCHOW, W. F.: Biological properities of four isolates of barley yellow dwarf virus, *Phytopathology*, **59**: 1580–1589. 1969
17. ROCHOW, W. F. and BRAKKE, M. K.: Purification of barley yellow dwarf virus, *Virology*, **24**: 310–322. 1964
18. ROCHOW, W. F., APPOLA, A. I. E., BRAKKE, M. K. and CARMICHEL, I. E.: Purification and antigenicity of three isolates of barley yellow dwarf virus, *Virology*, **46**: 117–126. 1971
19. TAKANAMI, Y. and KUBO, S.: Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll, *J. gen. Virol.*, **44**: 153–159. 1979

Summary

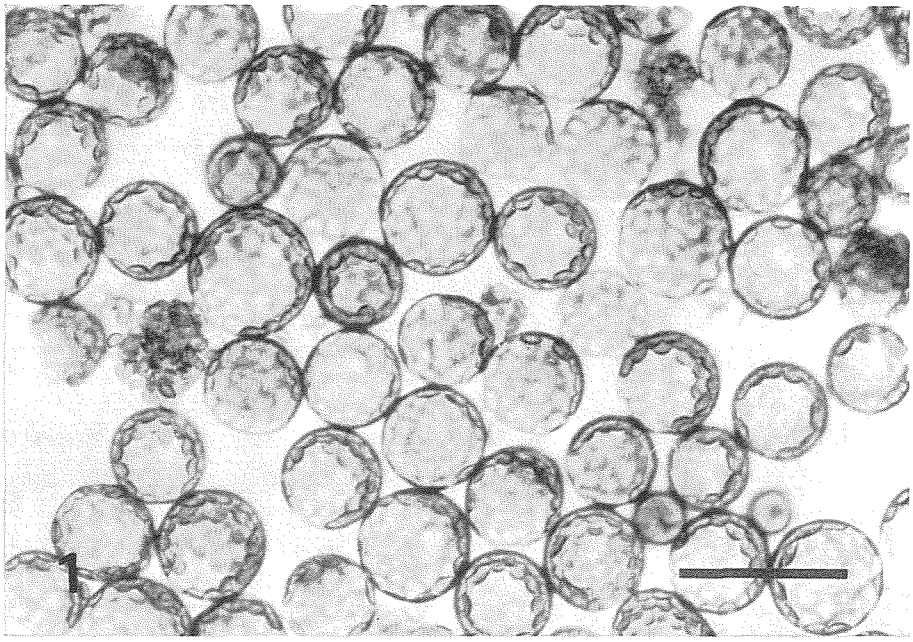
Mesophyll protoplasts of barley 72 hr after isolation were infected with barley yellow dwarf virus (BYDV). Protoplasts which inoculated in citrate buffer caused higher infection than those in phosphate buffer. When procedure of osmotic shock was applied for inoculation using higher concentration of the virus, the increase of infection to protoplasts was obtained. At optimum conditions for inoculation (BYDV 10 μg/mℓ, poly-L-ornithine 10 μg/mℓ, in citrate buffer at pH 5.0 containing 0.8 M mannitol), infection of protoplasts was only about 4.7%.

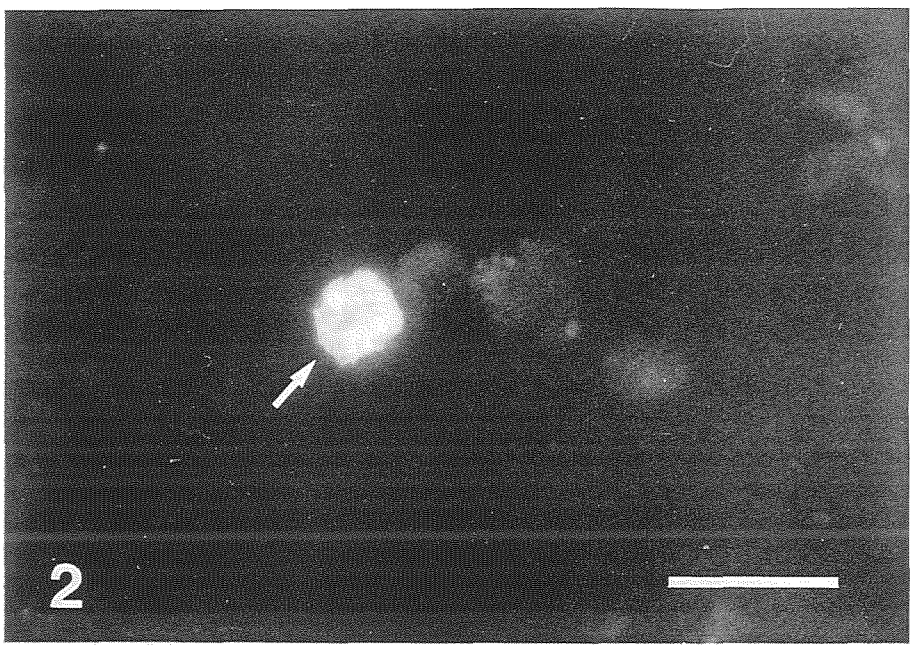
Explanation of plates

Plate

1. Protoplasts isolated from barley leaves after enzyme treatment. Bar represents 50 μm.

2. An infected barley protoplast stained with BYDV-fluorescent antibody 48 hours after inoculation (an arrow). Uninfected protoplasts that were not fluoresced were shown besides the infected protoplast. Bar represents 50 μm.


1


2