



Title	オオムギ斑葉モザイクウイルスの物理的性質について
Author(s)	村山, 大記; MURAYAMA, Daiki; 根本, 正康 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 5(3), 160-168
Issue Date	1965-10-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11746
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(3)_p160-168.pdf



オオムギ斑葉モザイクウイルスの物理的性質について

村山大記・根本正康*・横山竜夫

(北大農学部植物学教室)

On some physical properties of barley stripe mosaic virus

By

DAIKI MURAYAMA, MASAYASU NEMOTO
and TATSUO YOKOYAMA

(Laboratory of Plant Pathology, Faculty of
Agriculture, Hokkaido University)

I. 緒 言

オオムギ斑葉モザイクウイルス (BSMV) の物理的性質に関する研究はアメリカ^{2,5)} およびカナダ⁴⁾ で報告されているが、わが国では井上^{3,7)} により発表された。著者らは BSMV の血清学的研究を行なっているが、とくに本ウイルス抗原の物理的性質について実験を行ない、若干の結果を得たのでここに報告する。

本実験を行なうに当り、オオムギ種子の恵を受けた農林省北海道農業試験場大島信行技官に心よりお礼申し上げる。

II. 実験材料

実験に用いたウイルスは札幌六角種オオムギの保毒種子を播種して得た罹病株から分離したものである。これを3葉期頃のモラビア種オオムギに接種して2~3週間後に刈取って用い、一部のものは茎葉を-35°Cに凍結

保存したものを用いた。感染性の検定はすべて3葉期のモラビアの第1本葉にカーボランダム法により接種した。抗原性の検出は沈降反応混合法により行なった。用いた抗血清は分画遠心法で部分純化し、adjuvant法でウサギに免疫して得た⁹⁾。

III. 実験方法および結果

A. ウイルスの希釈限界

BSMV 罹病オオムギの茎葉搾汁液を用いて希釈限界の実験を行なった。

実験第1

罹病オオムギ (モラビア種、以下同じ。) の茎葉を地際部から切り取り、滅菌乳鉢中にて完全に摩砕し、ガーゼを2枚重ねて搾汁した後、遠心分離 (750×g, 30 min) を行なった。この遠心上清を原液として、M/30りん酸緩衝液 (pH 7.0) で所望の濃度に希釈し、健全オオムギ (モラビア種、以下同じ。) に接種した。結果は第1表の通

第1表 感染性の希釈限界

希 釈 倍 数	1	10	10 ²	2×10 ²	5×10 ²	10 ³	2×10 ³	5×10 ³	10 ⁴
接 種 株 数	152	155	147	161	157	159	159	63	53
発 病 株 数	92	91	61	33	13	3	5	0	0
感 染 率 (%)	60.5	58.7	41.5	20.5	8.3	1.9	3.1	0	0

10回の実験結果の合計

りである。

以上のように BSMV 罹病オオムギの茎葉粗汁液の遠

心上清を M/30りん酸緩衝液で希釈した場合には、2,000倍希釈まで感染力が認められたが、5,000倍希釈でこれ

* 現北海道農業試験場

本実験の要旨は昭和34年度日本植物病理学会大会において発表した。

が認められなかった。

実験第2

前実験に用いた遠心上清液を一夜凍結させた後、融解して再び遠心分離 (750×g, 30 min) し、褐色の清澄液を得た。これを原液として2倍階段希釈し、抗血清の階段希釈液を用いて沈降反応混合法を行なった。非特異的沈殿を防ぐために、37°Cで60分間反応させた後すぐに結果を判定した。結果は第2表に示した。

第2表 抗原性の希釈限界 (混合法)

抗血清	抗原希釈倍数										対照
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
終末希釈倍数	8	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	16	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	32	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	64	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	128	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	256	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	512	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2048	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
対照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3回反復した中の1例

以上のように抗血清終末希釈8倍に対しては抗原希釈256倍までに反応が認められた。

実験第3

第3表 抗原性の希釈限界 (スライド法)

抗血清	抗原希釈倍数										対照
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
希釈倍数	2	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	8	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	16	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	64	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	128	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	256	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
512	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
対照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2回反復した中の1例

実験第1で使用した粗汁液を用いて、スライド法による血清反応を試みた。結果は第3表に示すようにスライド法による抗原の希釈限界の検定は沈降反応法に比してやや鋭敏度が劣るようであったが、抗血清希釈4倍のものに対しては抗原希釈256倍まで反応が認められた。

B. ウイルスの保存限界

罹病オオムギの茎葉粗汁液あるいは純化液中、または凍結葉あるいは乾燥葉中におけるウイルスの保存限界について実験を行なった。

1. 罹病茎葉搾汁液中のウイルスの保存限界

a. 粗汁液

(i) 室温保存

BSMV 罹病オオムギの茎葉搾汁液を室温保存し、ウイルスの感染性を調べた。

実験第1

茎葉搾汁液を遠心分離 (750×g, 30 min) し、上清を3ml ずつ滅菌小試験管に分けて入れ、ゴム栓をして実験室中に保存した。使用時には再び遠心分離 (750×g, 10 min) し、上清で接種した。結果は第4表に示した。

第4表 粗汁液中のウイルスの保存限界 (室温保存)

保存日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8
接種株数	50	40	40	40	40	50	50	50	20
発病株数	40	19	8	15	6	5	3	0	0
感染率 (%)	80	47.5	20	37.5	15	10	6	0	0

3回の実験結果の合計

以上の結果の示すごとく、BSMV 罹病オオムギの搾汁液は室温中で6日間感染性を保っていたが、7日目には感染性が認められなかった。

(ii) 低温保存

前実験に用いたと同じ搾汁液を4°Cの冷室中に保存して実験を行なった。

実験第2

搾汁液を滅菌小試験管に入れて4°Cの冷室中に保存し、使用毎に遠心分離 (750×g, 10 min) し、上清を用いて接種した。結果は第5表に示した。

すなわち、低温下においてはBSMV 罹病オオムギの茎葉搾汁液のウイルスは比較的長く感染性を保ち、11日間感染力が認められ、12日以後では感染性が見られなかった。

b. 純化液

BSMV 罹病オオムギ茎葉の搾汁液を分画遠心法によ

第5表 粗汁液中のウイルスの保存限界 (低温保存)

保存日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
接種株数	10	10	10	10	10	20	10	20	10	20	20	20	10	10	
発病株数	10	10	10	10	10	14	5	11	5	4	3	1	0	0	0
感染率 (%)	100	100	100	100	100	70	50	55	50	20	15	5	0	0	0

り部分純化し、M/30りん酸緩衝液中に再懸濁させたウイルスについて冷蔵保存による抗原の保存限界について実験を行なった。

実験第1

ウイルス液を滅菌小試験管に3mlずつ分けて入れ、

第6表 純化ウイルス抗原の保存限界 (低温保存)

保存日数	抗血清終末希釈倍数									対照
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
0	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
20	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
30	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
55	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-

第7表 乾燥葉中でのウイルスの保存限界 (室温保存)

保存日数	0	10	13	27	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
接種株数	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
発病株数	10	10	10	3	4	6	3	5	3	1	2	2	0	0	0	0
感染率 (%)	100	100	100	30	40	60	30	50	30	10	20	20	0	0	0	0

の減量分だけ M/30りん酸緩衝液を加えて搾汁し、遠心分離 (750×g, 10 min) を行なった上清を接種に用いた。結果は第7表に示したごとく、BSMV罹病オオムギの茎葉を室温中で乾燥保存した場合、刈取後36日まで感染力が認められたが、37日以後ではまったく発病が見られず、感染力が失われたものと思われた。

b. 凍結葉中のウイルスの保存限界 (-35°C 保存)

罹病植物の茎葉を切りとった後、直ちに-35°Cの低温室中で凍結保存して実験を行なった。

実験第1

凍結保存期間が約8, 11, 12, 15, 19および20カ月の罹病オオムギ茎葉を磨砕・搾汁し、遠心分離 (750×g, 30 min) した上清を健全オオムギに接種した。

ゴム栓をして4°Cの冷蔵室に保存し、使用の際には遠心分離 (750×g, 10 min) して沈殿を除いた。上清について混合法による血清反応を調べた結果は第6表に示す通りである。

以上のごとく、分画遠心法により部分純化し、M/30りん酸緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁させたウイルスは4°Cの低温下ではよくその抗原性を保持し、55日間の保存に対してもなお抗原性が認められた。

2. 罹病茎葉中のウイルスの保存限界

a. 乾燥葉中のウイルスの保存限界 (室温保存)

罹病オオムギの地上部を切り取り室温中で風乾して保存した場合のウイルスの感染性について実験した。

実験第1

BSMV罹病植物の茎葉を地際部から切り取り、濾紙上に並べて実験室内の風通しの良い場所に保存した。所望日数経過後、滅菌乳鉢にて完全に磨砕し、全体重量

第8表 凍結葉中のウイルスの保存限界 (-35°C)

保存日数	0	266	358	365	465	596	624
接種株数	20	20	20	20	20	20	20
発病株数	20	20	20	20	20	18	20
感染率 (%)	100	100	100	100	100	90	100

第8表に示すごとく、凍結保存期間624日 (約20ヵ月) の茎葉中でウイルスの感染力はほとんど影響されないようであった。

実験第2

前実験と同様に、約3, 13, 16, 24および26ヵ月間凍

結保存したものについて実験を行なった。結果は第9表に示す通りである。

第9表 凍結葉中のウイルスの保存限界 (-35°C)

保存日数	0	88	388	487	742	795
接種株数	30	30	30	30	30	30
発病株数	30	30	30	29	30	30
感染率 (%)	100	100	100	96.7	100	100

以上のごとく、刈り取り後795日(約26ヵ月)間の凍結保存によっても、BSMV罹病オオムギ茎葉中のウイルスは感染力を保持し続けることが認められた。

C. ウイルスの耐熱性

BSMV罹病オオムギの凍結保存茎葉を滅菌したすり鉢で磨砕し、搾汁液を遠心分離(750×g, 30 min)した後、一夜凍結した。融解後、遠心分離(750×g, 30 min)を行ない上清を実験に用いた。この清澄液を内径5mm、長さ10cmの肉薄のガラス管に入れ、両端をゴム栓で密閉した後、予め所望の温度に調節した恒温槽中に10分間浸漬した。処理終了後、直ちに流水中に処理ガラス管を沈めて冷却した。加熱温度を高めるに伴って汁液中の沈殿の量が増加したが、遠心分離(750×g, 10 min)で再び清澄化したこともある。なお実験に用いた試験管は内径5mm程度のものであるので、処理液温の上昇は早く、浸漬後温度を下降せしむるに要する時間とはほぼ相殺できたので、温湯に10分間浸漬した。

実験第1

BSMV罹病オオムギの粗汁液を30, 40, 50, 55, 60, 65および70°Cにて各々10分間加熱した。60°C以上の加熱のものでは遠心上清はいちじるしく清澄化し、かつ淡色となった。結果は次に示す通りである。

第10表 ウイルスの耐熱性

処理温度(°C)	無処理	30	40	45	50	55	60	65	70
接種株数	30	20	20	20	30	30	20	30	30
発病株数	23	14	12	3	6	3	0	0	0
感染率 (%)	76.7	70	60	15	20	10	0	0	0

第10表に示したごとく、45°C、10分間の加熱によりBSMVの感染性はいちじるしく減じ、65°C、10分間の加熱によりまったく感染性を失なった。

実験第2

前同様に48, 50, 52, 54, 56, 58および60°Cで

10分間ずつ加熱したものについて、抗原の耐熱性を調べた。

第11表 抗原の耐熱性

処理温度(°C)	抗血清終末希釈倍数							抗原対照
	8	16	32	64	128	256	512	
無処理	+	+	+	+	+	±	-	-
48	+	+	+	+	+	±	-	-
50	+	+	+	+	+	±	-	-
52	+	+	+	+	+	±	-	-
54	+	+	±	-	-	-	-	-
56	±	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-

以上の表に示すごとく、52°C、10分間加熱したものは無処理のものと同様で、抗原性にほとんど影響が見られなかったが、54°C、10分間の加熱により抗原性はいちじるしく弱くなり、56°C以上の加熱によっては抗原性はまったく消失した。

D. 紫外線照射に対する抵抗性

罹病オオムギの搾汁液を分画遠心法によって部分純化し、マツダ殺菌灯[GR-1510型吊下傘付, 15 W, 波長2537 Å, 殺菌線出力2.3 W, 殺菌線照度2160 μW/cm², 定電圧装置(100±2 V)付]を用いて10cmの距離で照射を行なった。純化液をペトリ皿中に入れ、照射中は振とう機で絶えず振とうを続けた。照射時間の増加に伴って、ウイルス液は沈殿を生じ白濁した。所望時間の照射を行なった後、遠心分離(750×g, 10 min)して実験に用いた。

実験第1

紫外線を1, 3, 5および7分間照射し、感染性の抵抗性について調べた。実験結果は第12表に示す通りである。

第12表 紫外線照射に対する抵抗性

照射時間(分)	0	1	3	5	7
接種株数	29	29	29	29	20
発病株数	29	8	0	0	0
発病率 (%)	100	29	0	0	0

3回の実験結果の合計

以上のごとく、分画遠心法による純化を行なったBSMVは10cmの距離から紫外線を1分間照射した場

合に、感染性の低下が見られ、3分間照射によりまったく感染性を消失した。なお本実験では抗原性にほとんど変化が認められなかった。

実験第2

前実験と同様にして、1~5時間時間照射を行なった遠心上清を抗原として沈降反応混合法を試みた結果は次のごとくである。

第13表 紫外線照射に対する抗原の抵抗性

照射時間 (時間)	抗血清終末希釈倍数					対照
	8	16	32	64	128	
0	+	+	+	+	+	-
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	±	-
3	+	+	+	±	-	-
4	+	+	±	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-

第13表に示すように、紫外線1時間照射のものでは、無照射対照とほとんど抗原性に差が認められなかったが、2時間照射によりやや低下が見られ、4時間照射で急激に抗原性が減じたが、5時間照射のものでもなおわずかに抗原性が認められた。

実験第3

前同様に、さらに1, 5, 6, 7および8時間照射を行なった。5時間照射以上のものでは処理液にきわめて多くの沈殿が認められ、いちじるしく白濁したが、これらの遠心上清はいちじるしく清澄となり、とくに7時間照射以後のものにおいてはまったく蛋白光を失なった。血清反応の結果は次の通りである。

第14表 紫外線照射に対する抗原の抵抗性

照射時間 (時間)	抗血清終末希釈倍数					対照
	8	16	32	64	128	
0	+	+	+	+	+	-
1	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	±	-	-
6	+	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-

第14表に示したごとく、紫外線照射6時間までに抗原性が認められたが、7時間照射で抗原性はまったく消失した。すなわち照射後の純化液が肉眼的に蛋白光を有するものでは沈降反応混合法で抗原性が検出されたが、

蛋白光を失なった7時間照射以後のものでは抗原性を消失した。

E. 紫外線照射ウイルスの感染性におよぼす日光の影響

BSMV において光再活性化の現象が認められるか否かにつき実験を行なった。

実験第1

罹病オオムギの凍結保存茎葉からの搾汁液を分画遠心法によって部分純化し、前項において述べた方法で紫外線を1~4分間照射し、かかるウイルス液を用いて健全オオムギに接種した。接種直後、植物を暗黒の状態に置き、30分、24時間および48時間後に日光に当てた。対照としては、接種後ひき続いて日光に当てたものを用いた。結果は第15表に示す通りである。

第15表 紫外線照射ウイルスの感染性

紫外線照射時間 (分)	暗黒処理時間 (時間)			
	0	0.5	24	48
0	$\frac{14}{16}$ (87.5)	$\frac{17}{20}$ (85)	$\frac{15}{19}$ (78.9)	$\frac{14}{16}$ (87.5)
1	$\frac{8}{17}$ (47.1)	$\frac{9}{17}$ (52.9)	$\frac{7}{15}$ (46.7)	$\frac{9}{18}$ (50)
2	$\frac{1}{14}$ (7.1)	$\frac{4}{21}$ (19)	$\frac{0}{13}$ (0)	$\frac{0}{12}$ (0)
3	$\frac{0}{20}$ (0)	$\frac{1}{17}$ (5.9)	$\frac{0}{17}$ (0)	$\frac{0}{18}$ (0)
4	$\frac{0}{14}$ (0)	$\frac{0}{18}$ (0)	$\frac{0}{27}$ (0)	$\frac{0}{16}$ (0)

分母：接種株数，分子：発病株数，() は感染率(%)

すなわち、紫外線無照射のものでは暗黒処理によってもその感染性にはほとんど変化が認められなかったが、紫外線2分間照射のものでは接種直後および接種後30分後に日光に当てたものにのみ発病が見られ、24および48時間暗黒状態においたものではまったく発病が認められなかった。また3分間照射のものでは接種後30分間暗黒においたものにのみ発病が見られ、接種後ひき続き日光に当てたものや、接種後24時間あるいは48時間暗黒に保った後日光に当てたものではまったく発病は認められなかった。以上の実験結果から、本ウイルスで光再活性化が起るものと推定される。

F. 接種条件が感染性におよぼす影響

1. カーボランダム法における摩擦回数と感染率の

関係

3葉期のオオムギにカーボランダム法で接種する場合に摩擦回数が感染率に影響を与えるか否かにつき実験した。

実験第 1

摩擦回数を1~10回とした接種を行なった。接種にはオオムギの第1葉にカーボランダムを散布し、3cm角の滅菌ガーゼを4つ折りとして罹病粗汁液に浸して軽く葉面を摩擦した。結果は第16表に示した。

第16表 摩擦回数と感染率の比較

摩擦回数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
接種株数	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
発病株数	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
感染率 (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

すなわち、本実験では摩擦回数と発病の間にはまったく関係が認められず、接種株のすべてが発病を見た。1回摩擦を行なった葉面には肉眼ではまったく摩擦は見られなかったが、摩擦回数の増加に従って摩擦が顕著になった。10回摩擦のものでは葉面に一様に傷がで、接種後1日で接種葉は枯死したが、これらの株でもすべて発病が認められた。

2. 接種方法および接種部位と感染率の関係

カーボランダム法による接種を第1葉と第2葉に行なった場合の感染率、および切断面を罹病植物汁液中に浸漬した場合の感染率について実験を行なった。

実験第 1

3葉期のオオムギを用い、一部は第1葉に、一部は第2葉にそれぞれカーボランダム法により1回摩擦を行ない接種した。また一部は第1葉の先端約5mmを切り落とし、切断面を罹病オオムギ汁液中に浸漬した。結果は次に示す通りである。

第17表 接種方法・接種部位と発病率の比較

接種方法	カーボランダム法		浸漬法
	第1葉	第2葉	第1葉
接種株数	28	43	18
発病株数	26	41	0
感染率 (%)	92.9	95.3	0

以上の表に示すように、第1葉または第2葉にカーボランダム法で接種した場合には感染率に差は認められず、第1葉先端の切断面からの感染は見られなかった。

G. 接種後の日数および接種原濃度の感染におよぼす影響

罹病オオムギの茎葉搾汁液を接種原として用いる場合、接種後の日数および搾汁液の希釈がウイルス活性におよぼす影響について実験を行なった。

実験第 1

接種後10日および18日を経過したオオムギの茎葉搾汁液を10、100、200および500倍に希釈して健全オオムギに接種し、原液と比較した。希釈にはM/30りん酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。結果は第18表に示した。

第18表 接種後10日および18日での感染性の比較

接種後日数	汁液希釈倍数				
	1	10	10 ²	2×10 ²	5×10 ²
10日	$\frac{10^*}{10}$ (100)	$\frac{10}{10}$ (100)	$\frac{6}{10}$ (60)	$\frac{7}{10}$ (70)	$\frac{2}{10}$ (20)
18日	$\frac{8}{9}$ (88.9)	$\frac{7}{10}$ (70)	$\frac{8}{9}$ (88.9)	$\frac{7}{10}$ (70)	$\frac{1}{9}$ (11)

* 分母：接種株数，分子：発病株数
()内は感染率(%), 以下同じ

すなわち、本実験においては接種原の希釈に伴って感染力の低下が認められたが、接種後10日および18日のもの間には差は認められなかった。

実験第 2

接種後24日および30日を経過したオオムギの茎葉搾汁液を用いて、前実験と同様に実験を行なった。結果は第19表に示した。

第19表 接種後24日および30日での感染性の比較

接種後日数	汁液希釈倍数				
	1	10	10 ²	2×10 ²	5×12 ²
24日	$\frac{2}{9}$ (22)	$\frac{7}{8}$ (87.5)	$\frac{5}{8}$ (62.5)	$\frac{1}{9}$ (11)	$\frac{1}{8}$ (12.5)
30日	$\frac{0}{9}$ (0)	$\frac{10}{10}$ (100)	$\frac{8}{10}$ (80)	$\frac{3}{10}$ (30)	$\frac{2}{10}$ (20)

すなわち、24日後のものにおいては10および100倍希釈の接種原を用いた場合に最も高い感染力が認められ、原液濃度のもものではきわめて低い感染力を示した。また30日後のものではこの傾向はさらにいちじるしく、原液濃度の接種原を用いて接種した場合にまったく発病

が認められず、10 および 100 倍希釈のものではきわめて感染率が高く、これらの希釈接種原中でのウイルス活性が高いものと考えられた。

実験第 3

同様にして接種後 38 日および 50 日を経過したものについて実験を行なった。結果は次に示す通りである。

第 20 表 接種後 38 日および 50 日での感染性の比較

接種後日数	汁液希釈倍数				
	1	10	10 ²	2×10 ²	5×10 ²
38 日	$\frac{5}{11}$ (45.5)	$\frac{9}{10}$ (90)	$\frac{3}{10}$ (30)	$\frac{1}{8}$ (12.5)	$\frac{0}{11}$ (0)
50 日	$\frac{5}{10}$ (50)	$\frac{6}{10}$ (60)	$\frac{6}{10}$ (60)	$\frac{5}{10}$ (50)	$\frac{0}{10}$ (0)

すなわち、本実験においても原液濃度での発病は少なく、10 倍希釈の接種原を用いた場合に最も高い感染率を認め、ウイルス活性がこの希釈接種原中で最も高いと考えられる。しかし前実験に比較して感染率がやや低下しており、とくに 50 日後のものでこの傾向がいちじるしく、これは罹病茎葉中のウイルス濃度の低下と考えられる。

H. 凍結・融解の感染性におよぼす影響

BSMV 罹病オオムギの茎葉搾汁液に凍結・融解操作を反復した場合のウイルスの耐性について実験した。

実験第 1

罹病オオムギの茎葉搾汁液を遠心分離 (750×g, 30 min) し、滅菌小試験管に 5 ml ずつ分注し、冷凍室中に保存した。1 日間隔で一旦全部を取り出して融解させ、その中の 1 本を用いて接種試験を行ない、他は再び冷凍室中に保存した。これを 7 日目まで繰返し、1~7 回の凍結・融解操作に対する感染性の耐性について調べた。対照としては凍結前の搾汁液遠心上清を用いた。結果は次表の通りである。

すなわち、BSMV の感染性は汁液を 1 回凍結・融解

第 21 表 汁液の凍結・融解に対する耐性

凍結・融解の回数	0	1	2	3	4	5	6	7
接種株数	30	30	30	30	30	30	30	30
発病株数	30	11	7	10	2	4	0	0
感染率 (%)	100	36.7	23.3	33.3	6.7	13.3	0	0

することでいちじるしく減じ、4 回ではほとんど感染性がなくなり、6 回でまったく消失した。

IV. 考 察

McKINNEY (1953)⁵⁾ は罹病コムギを用いて実験し、蒸留水で希釈したウイルス汁液の耐希釈性は 10,000 倍以上であると報告し、KASSANIS and SLYKHUIS (1959)⁴⁾ は接種後 15 日を経過した接種葉中での感染性の希釈限界は 2,048 倍であり、抗原性は抗血清希釈 256 倍で陽性であったと報告した。本実験においては感染性の希釈限界は 2,000 倍までが陽性であり、抗原性は抗原希釈 256 倍、抗血清希釈 1,024 倍までそれぞれ陽性反応が認められた。このように BSMV の希釈限界は感染性の方が抗原性より高いが、本実験の結果ではこの差は 2~3 管程度のものであり少なかった。このことは感染にはかなりの多量のウイルスを必要とし、血清学的に検出可能なウイルス量と感染試験で検出可能なウイルス量との間にあまり差がないことを意味する。このような例は他に broad bean mottle virus¹⁾ で報告されている。

本ウイルスの保存限界については McKINNEY (1953)⁵⁾ は風乾葉中の感染性は室温保存で 35~40 日間保たれたが、罹病植物上では葉が枯死するとただちにウイルスが不活化したと報じた。また 20°C に保った搾汁液中では 32 日間感染力を保ち、5°C ではさらに長時間活性が保たれたが、汁液を -15~-20°C に保存した場合には 1 日でいちじるしく感染力を失ない、3~4 日ではほとんど、あるいはまったく感染力を失なうことが知られている⁴⁾。葉を 3 日間 -20°C で凍結保存したものではウイルスの活性はそこなわれない⁴⁾。

我々の得た結果では、搾汁液を室温保存した場合には 7 日後に感染力を失ない、低温保存した場合でも 12 日後には活性を失なった。しかし純化ウイルスの抗原性は 4°C で保存した場合には 55 日後にもなおほとんど変化が認められなかった。切り取った乾燥葉中でのウイルスの感染性は室温保存で 36 日まで保たれ、McKINNEY (1953)⁵⁾ の結果とよく一致した。また茎葉を -35°C で凍結保存すると約 26 か月間感染性を保ち、茎葉を長期にわたって凍結保存してもウイルスの活性に変化を与えないようであった。しかし罹病オオムギ搾汁液の凍結・融解の操作はウイルスの感染性をいちじるしく低下させるようであった。

BSMV の耐熱性は McKINNEY (1953)⁵⁾ によると 68°C (154.4°F)、10 分間まで感染性が認められ、KASSANIS and SLYKHUIS (1959)⁴⁾ は 65°C でわずかに感染性が残

るが、70°Cでは完全に不活化され、抗原性は感染性と平行して65°C以上では反応が認められなかったと述べている。

本実験の結果、感染性は60°C、10分間の加熱処理により失われ、抗原性は56°C、10分間で認められなくなった。

BSMVに対する紫外線照射の影響についての報告はないようであるが、我々の実験から紫外線3分間照射により感染性はまったく消失したが、抗原性は7時間以上の照射により認められなくなった。紫外線照射2分および3分のウイルスを接種に用いた場合、接種後の植物を30分後暗所より明所へ移した場合に発病が見られた。しかし、24時間または48時間暗所に置いた場合にはまったく発病が見られず、このことは紫外線による不活化あるいは部分的不活化ウイルスを接種後暗所に接種植物を置き、30分後に日光に当てる処理によって、感染性が増進されたものと考えられる。

BSMVの感染力に影響を与える諸条件の中で、接種方法と接種原濃度に関して行なった実験の結果から、葉面にカーボランダムをふりかけた後接種する場合、摩擦回数の多少はまったく感染率に影響を与えず、また第1葉と第2葉のいずれに接種した場合にも感染率に差が見られなかったが、第1葉の先端を切り落して傷口を接種原汁液に浸漬した場合には感染は認められなかった。

高橋・赤木・井上(1957)⁷⁾は本ウイルスは常法による汁液接種で高い感染率を示し、カーボランダムの使用の有無によってはあまり差が見られず、病葉と健全葉とをすり合わせることや病葉をもんだ指で健全葉をしごくことによっても低率ながらウイルスが感染することを報じた。このように本ウイルスは容易に汁液伝染するが、このような性質が自然状態での接触伝染が起りやすい原因となるように思われる。

KASSANIS and SLYKHUIS(1959)⁹⁾はBSMV罹病植物体中のウイルス濃度は、植物の年齢、感染後の日数、接種後おかれた環境条件により変化し、24°Cで生育させた若いオオムギの接種葉中でのウイルス濃度は、接種後2日では終末希釈2倍、3日で64倍、5日で256倍であり、9日および15日で2,048倍であることを示した。このことは接種後3日から15日までの罹病植物を接種原として用いる場合、終末希釈倍数の高いものももっともウイルス濃度が高いと考えられる。我々の実験結果では、接種後24日および30日のウイルス濃度がかなり高いと思われるものを希釈しないで接種原として用いた場合に、10倍希釈のものに比較してかなり感染率が低かっ

た。したがって接種原として用いる罹病植物はウイルス濃度と感染性の両者を考慮し、オオムギの場合接種後10日から18日頃のもののが適当と考えられる。

以上のように、BSMVの物理的諸性質については研究者によりかなり結果に差が認められ、とくに希釈限界および耐熱性においてこの差が多いが、この原因の一つとして実験に用いた罹病植物中のウイルス濃度が大きな影響を与えているのではないかと思われる。

V. 摘 要

1. BSMVの物理的性質に関して行なった実験結果について報告した。

2. 本ウイルスの希釈限界は感染性で1:2,000、抗原性で1:256であった。

3. 保存限界は搾汁液の室温保存で6日間、低温保存(4°C)で11日間であり、純化ウイルスの抗原性は低温保存(4°C)で55日間ほとんど変化しなかった。室温保存の乾燥中では37日で感染性を消失したが、凍結保存(-35°C)によっては795日(約26カ月)後にも感染性にほとんど変化がなかった。

4. BSMVの感染性は55°C、10分間の加熱処理によりいちじるしく低下し、60°C、10分間でまったく失われた。抗原性におよぼす高温の影響では54°C、10分間でいちじるしく反応が弱まり、56°C、10分間の処理でまったく反応が認められなくなった。

5. BSMVは紫外線照射3分間で感染力を失ったが、抗原性は照射6時間まで保たれた。

6. 紫外線を2分または3分間照射したウイルスはほとんど、またはまったく感染力を失ったが、接種後植物を30分間暗所に置き、その後日光に当てた場合に感染性が少しく回復した。

7. 汁液接種はきわめて容易であり、摩擦回数の多少および接種葉位の差異はウイルスの感染性にほとんど影響を与えなかった。

8. 接種原植物の接種後日数は感染性に影響するが、接種後10日から18日を経過した植物が接種原としてもっとも適していると思われた。

VI. 引用文献

1. BAWDEN, F. C., CHAUDHURI, R. P. and KASSANIS, B. (1951). *Ann. appl. Biol.* 38: 774.
2. BRAKKE, M. M. (1959). *Virology* 9: 506.
3. 井上忠男 (1960). *農学研究*, 48: 33.
4. KASSANIS, B. and SLYKHUIS, J. T. (1959). *Ann.*

- appl. Biol. 47: 254.
5. MCKINNEY, H. H. (1953). Plant Dis. Repr. 37: 292.
 6. 村山大記・横山竜夫 (1962). 日植病報, 27: 37.
 7. 高橋隆平・赤木温郎・井上忠男 (1957). 農学研究, 44: 147.

Summary

This paper reports the experimental results concerning the physical properties of barley stripe mosaic virus (BSMV).

Using the infected barley plants as source material, the infection end-point of this virus in the expressed juice diluted with M/30 phosphate buffer solution (pH 7.0) was 1/2,000, whereas the precipitation end-point of the virus in clarified sap with homologous antiserum was 1/256.

BSMV lost its infectivity after 7 days at room temperature, and after 12 days at a low temperature (4°C), when expressed crude juices were stored; the antigenicity in partially purified virus suspensions was retained even after 55 days at a low temperature (4°C).

BSMV lost its activity when the diseased leaves were

kept at room temperature for 37 days. Infectivity and antigenicity were not reduced even after 795 days when diseased plants were stored at -35°C.

The infectivity of BSMV was greatly reduced by heating the sap at 55°C for 10 minutes, and completely destroyed at 60°C; the antigenicity of the virus seemed to be destroyed at between 54 and 56°C for 10 minutes.

BSMV was rendered inactivated by 3 minutes exposure to ultraviolet radiation at a distance of 10 cm from the lamp; the serological activity of BSMV was retained after 6 hours exposure to radiation by ultraviolet rays.

BSMV was found to be easily sap-transmissible and the rate of transmission was not changed even if the degree of rubbing on the surface of leaves with inoculum was increased.

The infectivity in the virus source plants was greatly affected by the incubation period after inoculation. Infectivity assays and serological tests showed that the concentration of BSMV in barley plants was highest at 10-18 days after inoculation. Therefore, the diseased plants for about 2 weeks after inoculation seem to be the most suitable virus source.