

## 弱毒 담배 모자이크 바이러스

### I. 弱毒바이러스의 誘起 및 特性

崔章京·孫經玉

江原大學校 農科大學 植物保護學科

## Studies on Mild Mutants of Tobacco Mosaic Virus

### I. Induction of Mild Mutants and Their Characteristics

Jang Kyung Choi and Kyung Ok Son

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Kangwon  
National University, Chuncheon 200, Korea

#### 要 約

TMV-OM系統을 接種하여 高温處理시킨 Samsun으로부터 3種의 弱毒變異系統 Tg 5272, Tw 227 및 Tw 333을 誘起시켰다. 이들 弱毒바이러스는 담배 및 고추에 가벼운 mottling 症狀이나 無病徵으로 感染되어 TMV-OM에 의한 모자이크, 奇形, 萎縮現象 등을 나타내지 않고 健全植物과 比較하여 生育에 거의 差異를 보이지 않았다. 또한 局部病斑寄主에 感染되었을 때에도 原株에 비해 전반적으로 미약한 反應을 나타냈고, 특히 Tw 227 및 Tw 333은 *N. glutinosa*, *D. stramonium* 및 *G. globosa*에서 매우 特異한 病徵을 나타냈다. 弱毒바이러스의 物理的 性質 및 TMV-OM抗血清에 對한 血清學的 性質의 差는 認定되지 않았다. 한편 弱毒바이러스를 純化하였을 때, 弱毒바이러스의 濃度は TMV-OM에 비해 매우 낮았으나, 이들 바이러스의 紫外線吸收 및 電氣泳動패턴에는 差異를 보이지 않았다.

#### ABSTRACT

Three mild mutant strains of tobacco mosaic virus (TMV) were isolated from *Nicotiana tabacum* var. Samsun incubated at 38°C for 10 days after inoculation with a wild type of TMV-OM strain. They were designated into Tg 5272, Tw 227 and Tw 333. All mild strains could be distinguished from TMV-OM by their reactions on different indicator plants. The mild strains induced the mild mottling without distinct symptoms, whereas the wild strain produced severe mosaic, rugose and stunting on tobacco and red pepper plants. Tw 227 and Tw 333 produced smaller necrotic spots than those of Tg 5272 and TMV-OM on *N. glutinosa* and *Datura stramonium*. The former two strains also produced ring spots and mosaic on *Gomphrena globosa* compared with necrotic spots by the latter strains. Three mild strains were serologically identical to TMV-OM. Their physical properties were thermal inactivation point 80-85°C, dilution end point between 10<sup>-4</sup> and 10<sup>-6</sup>, and longevity *in vitro* 7 days or longer. Ultraviolet absorption spectra of purified preparations of the mild strains and TMV-OM were identical, with a minimum at 247 nm, a maximum at 260 nm, and a slight shoulder at 290 nm. Electrophoresis

※ 本 研究는 1984년도 韓國科學財團의 一般研究費에 의해서 施行되었음.

of the strains in polyacrylamide-agarose gel showed that all the strains formed one major band and two minor bands, except for one minor band of Tw 333. However, when sodium dodecyl sulfate was added to the purified viruses before electrophoresis, each strain formed only one major band.

**Key words:** TMV, mild mutants.

## 緒 論

植物바이러스에 있어서 近緣의 바이러스間에 成立되는 干涉作用(cross protection)은 바이러스病의 生物的 防除手段으로서 많은 관심을 모아왔다. 特히 담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus, TMV)의 경우, 1934年 Holmes (9)가 高温處理해서 誘起시킨 無病徵系統의 TMV를 前接種하여 TMV에 의한 토마토 모자이크病을 防除할 수 있다는 것을 示唆한 이래, 人工弱毒바이러스의 誘起 및 實用化에 관한 研究가 많이 진척되었고, 一部는 實用性이 認定된 例도 있다(1, 3, 4, 6, 12, 13, 16). 이와 같은 弱毒바이러스는 일반적으로 高温處理(6, 9, 10, 12)나 化學劑處理方法(16, 18)에 의해서 誘起되는데, 誘起된 弱毒바이러스는 主로 그 變異株가 完全干涉効果를 나타내는 強毒系바이러스病의 防除에 應用되어 왔으나, 한편으로는 TMV의 遺傳學的, 生物學的 및 生化學的 特性을 究明하는 材料로도 많이 利用되기도 하였다(7, 15, 17, 19, 21). 그러나 이러한 弱毒바이러스의 利用性은 對象植物이나 環境條件에 따라서 달라지기 때문에 現在까지 弱毒바이러스에 관한 研究가 전혀 이루어지고 있지 않은 우리나라의 경우, 各作物 및 바이러스를 對象으로 弱毒바이러스의 誘起 및 利用性의 檢討가 필요하다고 생각된다.

本 研究는 담배 및 고추에 있어서 가장 중요한 病原中の 하나인 TMV를 對象으로 이들 作物에 있어서의 TMV病防除 및 弱毒TMV의 生物學的, 生化學的 特性究明에 目的을 두고 實施, 弱毒 TMV의 誘起 및 그 特性에 관한 結果를 여기에 報告한다.

## 材料 및 方法

**供試바이러스:** 바이러스는 TMV의 普通系(OM strain)를 供試, *Nicotiana tabacum* var. Samsun에 增殖시킨 후, 罹病葉에 10倍量의 0.1M 인산완충액(pH 7.0)을 넣고 마쇄한 汁液을 接種原으로 使用하였고, 接種은 Carborandum (400 mesh)를 利用하여

다.

**弱毒바이러스의 誘起:** 弱毒바이러스의 誘起에는 Samsun 및 *N. glutinosa*를 供試하였다. 7~8葉期の Samsun에 TMV를 接種한 후, 接種된 植物을 野外에 설치된 growth cabinet(Kiya Tron P 60-B)에 넣고, 25℃에서 5日間 增殖시킨 다음, 38℃에서 10日間 高温處理하였다. 이때 光은 自然光狀態下에 두었고, 1日 1回 灌水하였다. 高温處理후 TMV에 感染된 Samsun은 各葉에 나타난 모자이크病徵을 色에 따라 黃色部, 綠色部 및 黃綠接合部로 分離시킨 다음, 이들을 各各 마쇄하여 *N. glutinosa*의 全開葉에 接種하였다. 接種 3日후 *N. glutinosa*에 形成된 局部病斑中 無處理 TMV에 의해서 形成된 病斑보다 小型의 病斑만을 各各 單一分離시켰다. 이때 各 病斑은 黃色部에서 由來된 것을 Ty, 綠色部 Tg, 黃綠接合部 Tw로 命名하고, 여기에 高温處理한 Samsun의 個體番號를 앞에, 그리고 各 病斑의 順序를 뒤에 表記하여 各系統名으로 하였다. 分離된 이들 小型病斑은 各各 Samsun에 接種, 增殖시킨 후, 無病徵 또는 미약한 病徵을 나타내는 個體를 선발하고 *N. glutinosa*에서 感染有無를 檢定하여, 弱毒바이러스로 認定되는 個體는 2代에 걸쳐 Samsun에 繼代接種하면서 病徵의 變化를 관찰한 후, 弱毒變異系統을 선발하였다.

**弱毒바이러스의 宿主反應:** 선발된 弱毒바이러스는 TMV의 主要 指標植物 및 弱毒바이러스利用對象植物에서의 反應을 檢定하였다. 檢定植物은 담배(Samsun), 고추(品種, 새서울), *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Phaseolus vulgaris* 및 *Physalis floridana*를 供試, 各 弱毒바이러스를 接種한 후 溫室(18~28℃)에 넣고, 全身感染寄主는 7~50日間, 局部感染寄主는 2~15日間, 매일 病徵의 變化를 관찰하였다. 한편 *N. glutinosa*에서는 各 弱毒바이러스와 TMV-OM을 半葉法으로 接種하여 局部病斑의 形成能도 아울러 調査하였다.

**弱毒바이러스의 物理的 性質:** 弱毒變異系統에 感染된 Samsun葉의 汁液을 常法에 따라 耐熱性, 耐稀釋性 및 耐保存性을 檢定하였는데, 檢定은 各處理當 *N. glutinosa* 8葉씩 使用하였다.

血清學的 性質: 弱毒바이러스의 血清學的 性質은 寒天 겔二重擴散法(14) 및 免疫電氣泳動法(20)에 의해 TMV-OM과 比較하였다. 이때, 겔은 0.75% agarose 를, 완충액은 0.15 M NaCl 및 0.02% Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>가 포함된 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)을 使用하였고, 各 바이러스에 感染된 Samsun 葉汁液을 抗原으로, TMV-OM 抗血清을 抗體로 20℃에서 24時間 反應시킨 다음 形成되는 沈降線을 관찰하였다. 免疫電氣泳動은 agarose 平板 slide glass에 抗原을 미리 넣고, 2V/cm로 2時間 泳動한 후, 抗血清을 넣고 反應시켰다.

純化 및 純化바이러스의 性質: 弱毒바이러스 및 TMV-OM에 罹病된 Samsun 으로부터 Gooding and Hebert 의 方法(5)에 따라 바이러스를 純化하여, 各 바이러스의 紫外線吸收 및 電氣泳動패턴을 比較하였다. 純化바이러스의 紫外線吸收는 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)에 懸탁시킨 바이러스를 Shimazu UV-240 分光光度計에서 220~320mm 範圍의 吸收패턴을 調査하였다. 한편, 電氣泳動은 1% polyacrylamide-0.5% agarose 混合 겔(22)을 利用, 0.0025 M Na<sub>2</sub>EDTA가 포함된 0.09 M tris-boric acid 완충액(pH 8.3)에서, 同완충액에 懸탁시킨 試料 및 泳動前 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS)로 15分間 處理한 各 바이러스의 試料를 Vokam 500-150 電氣泳動裝置에서 電流 2mA로 6時間 泳動하였다. 泳動後 겔은 0.25% Coomassie brilliant blue로 염색하고 methanol-acetic acid로 탈색시킨 다음 Ozumor-82 densitometer 를 使用, 550 nm에서의 吸收패턴을 調査하였다.

## 結 果

Table 1. Reactions of 3 mild mutant strains and wild type of tobacco mosaic virus OM strain on different indicator plants

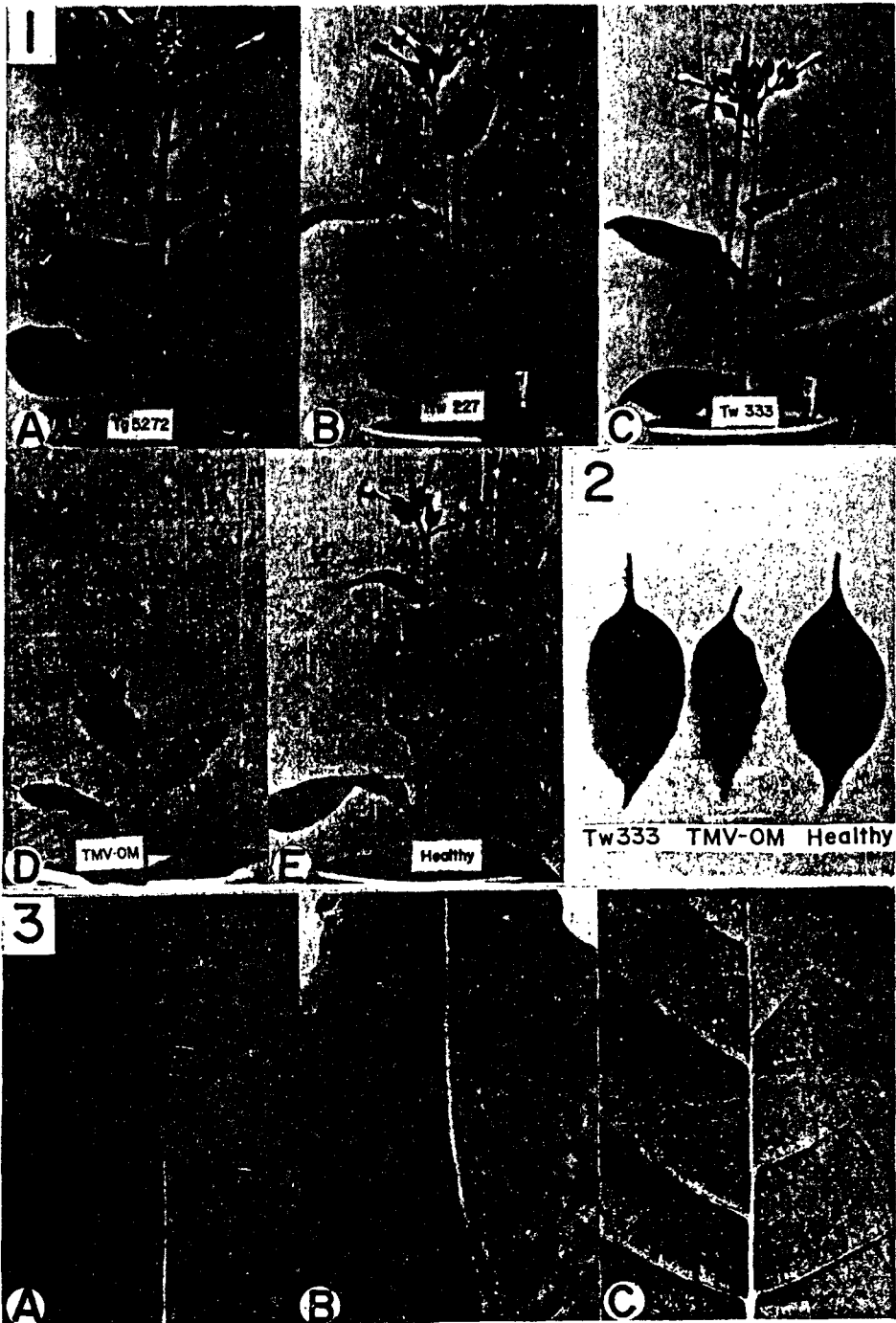
Indicator plant	Mild strains			TMV-OM
	Tg 5272	Tw 227	Tw 333	
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Samsun	m <sup>a</sup>	m(N)	m(N)	M,St
<i>Capsicum annuum</i> var. Saeseoul	m	m	m(N)	M,St
<i>N. glutinosa</i>	LL	sLL	sLL	LL
<i>Datura stramonium</i>	LL	LL	sLL	LL
<i>Gomphrena globosa</i>	LL	RS,M	RS,M	LL
<i>Phaseolus vulgaris</i>	LL	-	-	LL
<i>Physalis floridana</i>	M	M	CS,m	M

a m = mild mottling, (N) = symptomless infection, M = severe mosaic, St = stunting, LL = local lesions on inoculated leaves, sLL = local lesions of small size, RS = ring spots, - = no reaction, CS = chlorotic spots.

弱毒바이러스의 誘起: TMV-OM을 接種하여 高溫處理한 Samsun은 無處理TMV 感染植物에 比較해서 比較적 弱한 모자이크病徵을 나타냈다. 이들 모자이크病徵을 細分하였을 때, 黃色部>綠色部>黃綠接合部(高溫處理初期에는 白色)의 連續분포를 나타냈다. 그러나 이들 各部分을 *N. glutinosa*에 接種한 후 形成된 病斑中에서 선발한 397個의 小型病斑은 綠色部에서 出來된 것이 51.9%로 가장 많았고, 黃綠接合部 26.2%, 黃色部 21.9%의 比率로 나타났다. 單一局部病斑分離法에 의해 分離한 이들 小型의 病斑은 各各 5~6葉期 Samsun의 2 또는 3葉에 接種한 후, 미약한 mottling 症狀 또는 無病徵으로 感染된 69個體를 2次 선정하였다. 이들 個體는 계속해서 2代에 걸쳐 Samsun에 繼代接種하면서 病徵의 變化를 나타내지 않는 弱毒變異 3系統을 최종 선발하였다. 3系統의 弱毒바이러스는 綠色部에서 出來된 Tg 5272와 黃綠接合部の Tw 227 및 Tw 333으로, 이들 바이러스는 溫室에서 Samsun에 增殖, 一部는 保存하면서 實驗에 使用하였다.

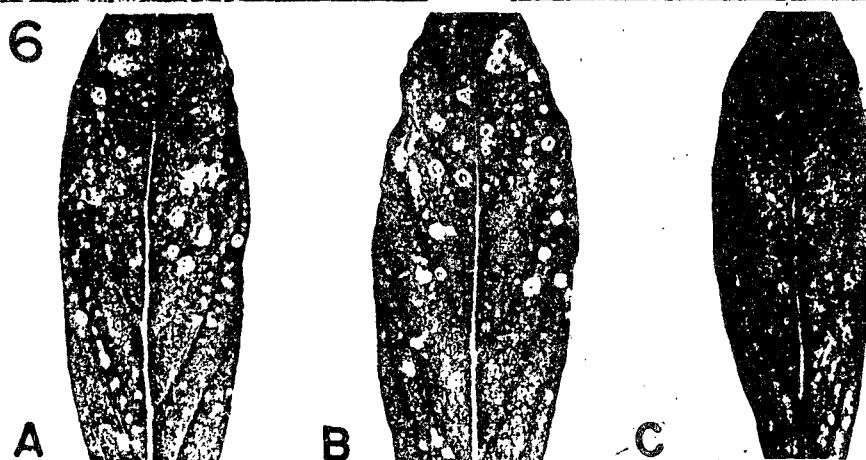
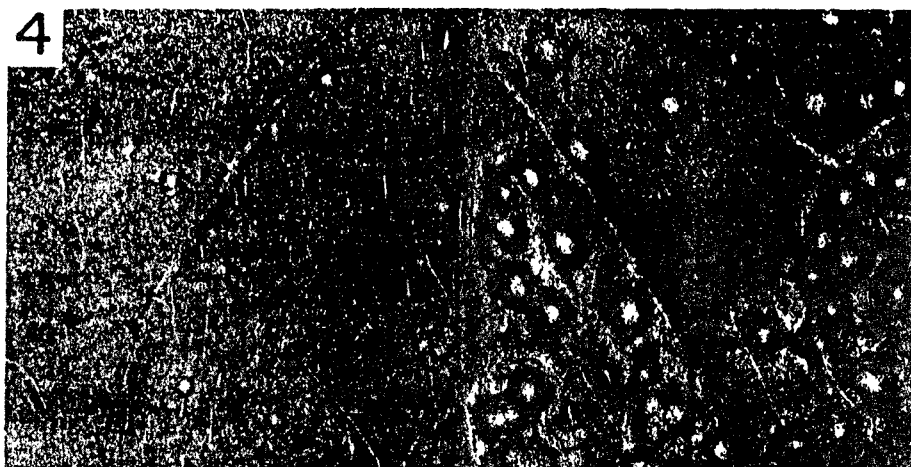
弱毒바이러스의 寄主反應: TMV의 指標植物에 感染된 3種의 弱毒바이러스는 TMV-OM에 比較적 弱한 弱한 病徵을 나타냈다(표 1). 弱毒바이러스에 感染된 담배 및 고추는 가벼운 mottling 症狀이나 無病徵을 나타냈고, TMV-OM에 感染되었을 때 나타나는 심한 모자이크症狀이나 葉의 畸形, 植物體의 萎縮現象 등은 보이지 않았으며 健全植物과 거의 差異를 나타내지 않았다(Plate 1-1~3). *N. glutinosa*에서는 Tw 227 및 Tw 333에 의해서 形成된 괴사病斑이 TMV-OM이나 Tg 5272에 의한 것보다 매우 작았고, 특히 Tw 333에 의한 病斑은 극히 均一한 小型의 괴사斑을 形成하였으며(Pl-

# Plate I



1. Tobacco plants infected with the following TMV strains : (A) Tg 5272, (B) Tw 227, (C) Tw 333, and (D) TMV-OM. (E) Healthy plant.
2. Red pepper leaves infected with Tw 333 and TMV-OM.
3. Tobacco leaves infected with Tw 333 (A) and TMV-OM (B). (C) Healthy Tobacco leaf.

# Plate II



4. Necrotic spots produced by Tw 333 (left) and TMV-OM (right) on *Nicotiana glutinosa*.
5. Necrotic spots produced by Tw 333 (A) and TMV-OM (B) on *Datura stramonium*.
6. Ring spots and necrotic spots produced by Tw 227 (A), Tw 333 (B) and TMV-OM (C) on *Gomphre globosa*.

Table 2. Physical properties (in crude sap) of three mild mutant strains and wild type of TMV-OM<sup>a</sup>

Treatment	Mild strains			TMV-OM
	Tg 5272	Tw 227	Tw 333	
Thermal inactivation point (°C)	85	85	80	85
Dilution end point	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>
Longevity <i>in vitro</i> (day)	> 7	> 7	7	> 7

<sup>a</sup> Assay host : *Nicotiana glutinosa*.

ate 2-4), 이러한 現象은 *D. stramonium* 에서도 類似하게 나타났다(Plate 2-5). 한편 *N. glutinosa* 에서 半葉法으로 調査한 各 系統의 局部病斑形成能은 TMV-OM에 비해 Tg 5272가 53.7%, Tw 227 58.1% 및 Tw 333 48.7%였다. 各 바이러스를 *G. globosa*에 接種하였을 때, Tg 5272는 TMV-OM과 同一하게 接種葉에 局部괴사斑을 形成시킨 반면, Tw 227 및 Tw 333은 輪紋의 괴사斑(Plate 2-6)과 함께 接種上位葉에 모자이크症狀을 나타냈다. 또한 이들 弱毒系 Tw 227 및 Tw 333은 *P. vulgaris*에 感染되지 않았으며, *P. floridana*에서는 모든 系統의 바이러스가 모자이크를 나타내는데 반해 Tw 333만이 退綠斑紋을 同伴한 mottling 病徵을 나타냈다(표 1).

弱毒바이러스의 物理的 性質: *N. glutinosa*에서 檢定한 弱毒바이러스 및 TMV-OM汁液의 物理的 性質은 Tw 333이 다른 弱毒系 또는 TMV-OM에 비해 약간 약한 耐性을 나타냈으나, 모든 바이러스

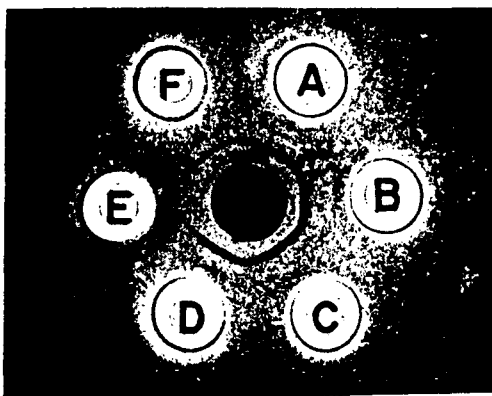


Fig. 1. Serological reaction in Ouchterlony agar-gel double diffusion test. The central well contains TMV-OM antiserum and the peripheral wells contain tobacco plant sap infected with the following strains : (A) Tg 5272, (B) Tw 227, (C) Tw 333, (D) and (F) TMV-OM, and (E) not infected.

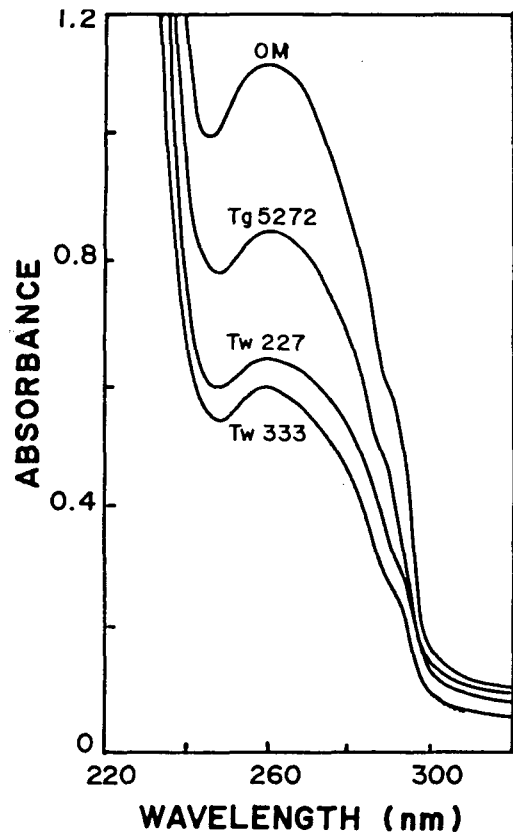


Fig. 2 Ultraviolet absorption spectra for purified mild strains and TMV-OM.

에서 耐熱性 80~85°C, 耐稀釋性 10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup>, 耐保存性 7~>7日의 結果를 보여, 바이러스間에 큰 差는 나타나지 않았다(표 2).

弱毒바이러스의 血清學的 性質: 寒天鏡二重擴散法에서 TMV-OM抗血清에 對한 弱毒바이러스抗原의 反應은 서로 융합하는 1種의 沈降線을 形成하였다(그림 1). 또한 各 바이러스의 抗原을 電氣泳動한 후 抗血清과 反應시킨 免疫電氣泳動 結果에서도 1種의 沈降線을 같은 위치에 形成시켰다.

弱毒바이러스의 紫外線吸收 및 電氣泳動 패턴: 罹

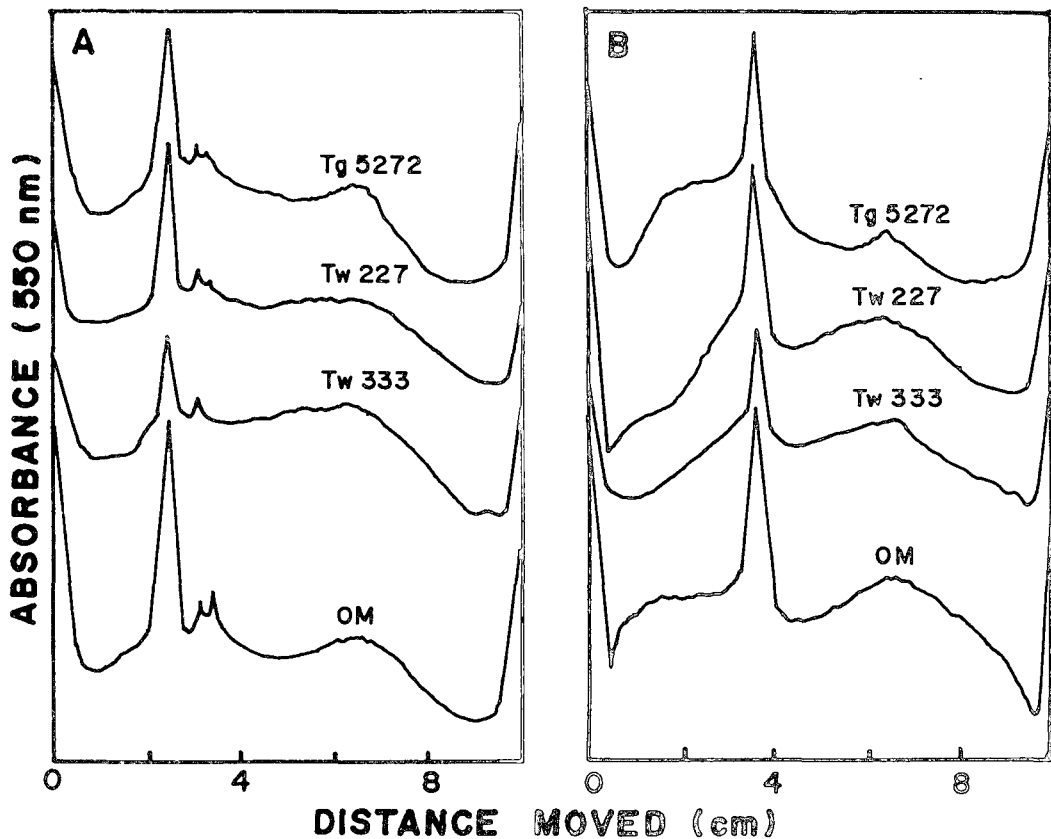


Fig. 3. Densitometric tracings of electrophoretic patterns of viruses purified from tobacco plants infected with three mild strains and wild type of TMV-OM. Migration is from left (cathode) to right (anode). (A): Migration of the viruses in 1% polyacrylamide - 0.5% agarose gel. Buffer solution is tris-boric acid- $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 8.3. (B). As (A), with addition of 0.1% SDS to the virus suspension for 15 minutes before electrophoresis.

病 Samsun으로부터 純化한 바이러스의 紫外線吸收은 3種의 弱毒系 모두 TMV-OM과 같이 260 nm 에서 最高, 247 nm에서 最低値를 나타냈고, 290 nm 에서 약간의 shoulder를 나타냈다(그림 2). 이때  $A_{260}/A_{280}$  比는 1.27~1.28,  $\text{max}/\text{min}$  比는 1.07~1.11의 分布를 보였다. 한편 紫外線吸收 패턴으로부터 算定한 바이러스의 濃度는 TMV-OM이 1.16 mg/ml 인데 比해 Tg 5272 0.80 mg, Tw 227 0.59 mg, Tw 333 0.57 mg으로 弱毒바이러스의 濃度가 TMV-OM 보다 매우 낮았다.

純化바이러스의 電氣泳動結果는 모든 바이러스에서 同一인  $Rf$  値를 갖는 1種의 major band와 1~2種의 minor band를 나타냈다(그림 3-A). 그러나 이들 바이러스를 泳動前 SDS로 處理하였을 때에는 모두 같은 1種의 major band만이 나타나(그

림 3-B), 電氣泳動 패턴에서도 바이러스間에 差를 보이지 않았다.

### 考 察

高温處理에 의해서 TMV의 弱毒變異를 誘起시킬 수 있는 溫度範圍는 35~38℃로 알려져 있다(6, 9, 11). 따라서 本 實驗에서 利用한 38℃ 處理方法도 TMV-OM系를 弱毒化시키는데 成功的이었고, 上記 報告들을 충분히 立證시키 주었다. 그러나 現在 까지 報告된 高温處理方法들이 바이러스를 接種한 植物의 줄기나 잎의 disk를 利用에 왔었으나(6, 9, 10, 12, 13), 本 實驗에서는 TMV를 接種한 植物體全體를 處理, 弱毒變異系統을 誘起시키므로서 高温處理後 形成되는 病徵에 따른 弱毒바이러스의 變異

特性을 알 수 있었다. 즉 高溫處理 후 나타난 Samsun의 모자이크病徵을 黃色部, 綠色部 및 黃綠接合部로 細分하여 弱毒系統을 誘起함으로써, 病徵別 弱毒變異바이러스의 出現頻度, 病徵과 變異의 關連性, 溫度과 病徵의 關係 및 바이러스의 變異機作 등을 究明하는데 좋은 자료가 될 것으로 생각되었다.

1960年 Siegel (18)은 亞窒酸(HNO<sub>3</sub>)處理한 TMV를 *N. glutinosa*에 接種하였을 때, 形成된 局部病斑中 小型의 病斑을 形成하는 바이러스가 變異株라는 것을 報告하였다. 이러한 事實은 高溫處理한 TMV-OM을 *N. glutinosa*에 接種하였을 때, 小型病斑의 出現頻度가 극히 낮았고, 이들을 單一局部病斑分離에 의해 Samsun에 接種한 結果, 約 17% (397個中 69個體)가 TMV-OM에 의한 病徵과 差異를 나타낸 점으로 미루어 小型病斑의 選定法은 高溫處理한 TMV에서도 變異바이러스를 選發할 수 있는 指標로 충분히 活用될 수 있었다.

선발된 3種의 弱毒바이러스中 Tw 227 및 Tw 333은 寄主反應에서 原株(TMV-OM)와 큰 差異를 나타냈다. 이와 같은 結果는 이들 變異系統이 TMV-OM과 서로 다른 遺傳의 特性을 갖고 있음을 暗示해 주고 있다. 그러나 이들 弱毒바이러스의 血清學的 性質이나 物理的 性質 등에서는 原株와 거의 差를 보이지 않았는데, 이것은 遺傳的 特性을 지배하는 바이러스제놈의 一部가 變異를 일으켰다 할지라도 단백질(抗原性을 規定하는)이나 粒子에 영향을 미치지 않을 수 있다는 事實(8)에 부합시킬 수 있을 것으로 생각된다.

純化弱毒바이러스의 紫外線吸收에서도 TMV-OM과 差를 나타내지 않았다. 또한 지금까지 報告된 TMV의 패턴과도 類似한 結果를 보였으며, A 260/A 280 및 max/min의 比도 典型的인 TMV의 特性을 보여 주었다. 그러나 이들 粒子의 電氣泳動 結果에서는 1~2種의 minor band를 形成해서 Wolf and Casper (22)의 報告와 差異를 나타냈다. 이러한 結果는 minor band의 形成이 電氣의 荷電을 달리하는 단백질의 存在 또는 純化바이러스의 不均一性을 意味하는 것으로 생각되며, 따라서 SDS處理바이러스에서는 minor band가 나타나지 않은 것으로 分析된다. 한편 罹病 Samsun으로부터 純化한 弱毒系 바이러스의 濃度는 TMV-OM의 1/2 정도에 지나지 않았다. 이와 같은 結果는 弱毒바이러스의 植物體內에서의 增殖速度가 原株보다 늦거나 增殖量이 적다는 意味를 갖기 때문에 TMV病의 生物的防

除에의 利用이 問題가 될 수 있으나, 바이러스間의 干涉効果에 있어서 弱毒系統을 利用할 경우, 弱毒 바이러스가 強毒系의 1/10 정도의 濃度만 增殖되어도 충분히 干涉効果를 나타낸다는 TMV 토마토系에서의 報告(2)도 있어, 3種의 弱毒變異 바이러스를 利用하는 데에는 問題가 없을 것으로 생각된다.

以上の 結果들을 종합해 볼 때, 高溫處理에 의해서 TMV-OM으로부터 誘起된 3種의 弱毒系統은 今後 (1)干涉效果, 遺傳的 安定, 增殖·保存 등에 관한 利用性檢定과 (2) 바이러스의 生化學的 特性, (3) 담배 및 고추에의 應用性 등이 究明된다면, 그 活用性은 클 것으로 기대된다.

### 參 考 文 獻

1. BROADBENT, L. (1964). The epidemiology of tomato mosaic. VII. The effect of TMV on tomato fruit yield and quality under glass. *Ann. Appl. Biol.* 54:209-224.
2. CASSELLS, A. C. & HERRICK, C. C. (1977). Cross protection between mild and severe strains of tobacco mosaic virus in doubly inoculated tomatato plants. *Virology* 78:253-260.
3. FLETCHER, J. T. & ROWE, J. M. (1975). Observations and experiments on the use of an avirulent mutant strain of tobacco mosaic virus as a means of controlling tomato mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 81:171-179.
4. FLETCHER, J. T. (1978). The use of avirulent virus strains to protect plants against the effects of virulent strains. *Ann. Appl. Biol.* 89: 110-114.
5. GOODING, G. V. & HEBERT, T. T. (1967). A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathology* 57:1285.
6. 後藤忠則·飯塚典男·小餅昭二(1984). タバコモザイクウイルス・トウガラシ系統の弱毒ウイルス作出とその利用. *口植病報* 50: 221-228.
7. HARIHARASUBRAMANIAN, V. & SIEGEL, A. (1969). Characterization of a new defective strain of TMV. *Virology* 37:203-208.
8. HENNIG, B. & WITTMAN, H. G. (1972). Tobacco mosaic virus: mutants and strains. In



- Principles and Techniques in Plant Virology*,  
Ed. by C. I. Kado & H. O. Agrawal,  
p. 546. Van Nostrand Reinhold, New York.
9. HOLMES, F. O. (1934). A masked strain of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 24: 845-873.
  10. JOCKUSCH, H. (1968). Two mutants of tobacco mosaic virus temperature sensitive in two different functions. *Virology* 35: 94-101.
  11. KASSANIS, B. (1957). Some effects of varying temperature on the quality and quantity of tobacco mosaic virus in infected plants. *Virology* 4: 187-199.
  12. 大島信行. (1968). 弱毒ウイルスによるウイルス病防除の試み. 植物防疫 22: 245-248.
  13. 大島信行. (1974). 植物ウイルス病防除手段とこの弱毒ウイルスの利用. 植物防疫 26: 184-190.
  14. OUCHTERLONY, O. (1962). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. *Prog. Allergy* 6: 30-154.
  15. PELHAM, J. (1972). Strain-genotype interaction of tobacco mosaic virus in tomato. *Ann. Appl. Biol.* 71:219-228.
  16. RAST, A T. B. (1972). M II-16, an artificial symptomless mutant of tobacco mosaic virus for seedling inoculation of tomato crops. *Neth. J. Plant Pathol.* 78:110-112.
  17. SEHGAL, O. P. & SOONG, M. M. (1972). Reaction of nitrous acid with viral nucleic acids *in situ*. *Virology* 47: 239-243.
  18. SIEGEL, A. (1960). Studies on the induction of tobacco mosaic virus mutants with nitrous acid. *Virology* 11:156-167.
  19. TSUGITA, A. (1962). The proteins of mutants of TMV: Classification of spontaneous and chemically evoked strains. *J. Mol. Biol.* 5: 293-300.
  20. VAN REGENMORTEL, M H V. & LELARGE, N. (1973). The antigenic specificity of different states of aggregation of tobacco mosaic virus protein. *Virology* 52:89-104.
  21. WANG, A. L. & KNIGHT, C. A. (1967). Analysis of protein components of tomato strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 31:101-106.
  22. WOLF, G. & CASPER, R. (1971). Disc electrophoretic separation of elongated plant viruses in polyacrylamide-agarose gels. *J. Gen. Virol.* 12:325-329.