

蛍光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の研究

生長点近傍組織におけるウイルスの増殖・分布

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	森,寛一 細川,大二郎 渡辺,実
発行元	日本植物病理學會
巻/号	48巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 433-443
発行年月	1982年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



螢光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の研究 I 生長点近傍組織におけるウイルスの増殖・分布*

森 寛一**・細川大二郎***・渡辺 実***

Kanichi MORI**, Daijiro HOSOKAWA*** and Minoru WATANABE***:
Studies on Multiplication and Distribution of Viruses in Plants
by Use of Fluorescent Antibody Technique I. Multiplication
and Distribution of Viruses in Shoot Apices*

Abstract

Multiplication and distribution of viruses in the stem tissues adjacent to the apical meristem of infected plants was studied by the fluorescent antibody technique and electron microscope observation. Combinations of viruses and plants used were: tobacco mosaic virus-petunia, tobacco and tomato; cucumber mosaic virus-tobacco, petunia and cucumber; potato virus X-tobacco, potato, *Nicotiana glutinosa* and *Datura stramonium*; potato virus Y-tobacco and potato. In any combinations of virus and plant tested, no virus was detected in the apical meristem, in the region close to the base of meristem where the tissue remained to be differentiated and in the very young leaf primordia on an early stage after generation from regions adjacent to the meristem. Virus was detected in the regions located below such parts, where tissue differentiation was considerably advanced. The virus content successively increased from less differentiated cells to more differentiated ones. In the leaf primordia, virus was first detected in the phloem when the vascular bundle became differentiated, and then spread to the lamina as the primordia grew.

(Received December 9, 1981)

Key Words: shoot apex, virus distribution, TMV.

緒 言

ウイルスに全身感染した植物においても、生長点近傍組織にはウイルスが認められないことが White²⁹⁾により aucuba mosaic virus に感染したトマトの根で最初に報告された。つづいて Holmes⁸⁾ もトマト黄化えそウイルスに罹病したダリアで芽の先端に病徴が認められないことから、この部位にはウイルスが存在しないのではないかと報告した。Holmes⁸⁾ はウイルス罹病植物の芽先を切りとって挿木することにより、また Morel・Martin^{14,15)} は生長点近傍組織の部分を

小さく切り取り人工培地で培養することによって、それぞれウイルス・フリー植物を育成することに成功した。この生長点培養によるウイルスの無毒化法は、以後各国の研究者により多くのウイルスについて成功し、わが国でもこの技法が実用化されるようになって^{16,31)}、栄養繁殖作物のウイルス病防除に効果を上げている¹⁷⁾。

森ら¹⁶⁾は、生長点培養でウイルスを除去できる分離培養組織片の大きさが植物およびウイルスの種類によって異なること、すなわちタバコモザイクウイルス (TMV)、ジャガイモ X ウイルス (PVX)、などは 0.2

* 本研究の一部は文部省科学研究費 (No. 36006) の補助を受けて行った。

** 現在：日本きのこ研究所 Present address: Mushroom Research Institute of Japan, Kiryu, Gunma 376, Japan

*** 東京農工大学農学部 Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan

mm 以下に小さく切りとらないと無毒化できないが、ジャガイモYウイルス (PVY), サツマイモ斑紋モザイクウイルスなどは1~2mmの大きめの組織片の培養でウイルス・フリー植物が得られることを明らかにした。しかしこの違いが、生長点近傍組織におけるウイルスの分布や濃度の違いによるか、あるいはウイルスにより培養中に消失するためなのかは明らかでない。またこれまで生長点近傍組織におけるウイルスの増殖・移動・分布、消長などについては、詳細に調べた研究は少なく、不明な点が残されたままである¹⁷⁾。

本実験では、これらの点を明らかにするため主として蛍光抗体法を用い、一部に電子顕微鏡を併用しながら、2・3ウイルスの生長点近傍組織における増殖・分布を組織・細胞学的な面から検討した。

本実験を行うに当たり、日本専売公社秦野たばこ試験場都丸敬一博士(現同公社盛岡たばこ試験場)にはウイルスの精製について御指導いただき、農林水産省婦恋馬鈴薯原産農農場堀尾英弘博士、田中智博士にはウイルス・フリージャガイモとPVYの抗血清を分譲いただいた。また福田頼穂氏(現在東京水産大学)、草野友延氏(現在Tufts University)には種々御協力いただいた。ここに深甚の謝意を表する。

さらに本文をとりまとめるにあたり御懇篤な御指導を賜った東京大学農学部教授與良清博士(現玉川大学農学部教授)、当研究室教授高坂渾爾博士(現植物防疫協会)に衷心より感謝の意を表する。

実験材料および方法

供試植物 ペチュニア(ピンクプロフェクション)、タバコ(Xanthi)、トマト(世界一)、キュウリ(相模半白節成)、ジャガイモ(農林1号)、*Nicotiana glutinosa*、*Datura stramonium*を用いた。これらの植物は鉢植にして、温室内(自然温度)で栽培した。

供試ウイルス タバコモザイクウイルス普通系(TMV-OM)、キュウリモザイクウイルス黄斑系(CMV-Y)、ジャガイモXウイルス(PVX)、ジャガイモYウイルス(PVY)を用いた。ウイルスの接種はカーボランダムを用いて摩擦接種法により行った。

ウイルスの精製 TMVはBoedtker・Simmonsの方法²²⁾、CMVはTakanami・Tomaruの方法²⁴⁾、PVXはShepard・Secorの方法²³⁾により、いずれも感染タバコ葉から精製した。

ウイルス抗血清の作製 ウイルス抗血清は、家兎に精製ウイルスを静脈注射あるいは、Freund's incomplete adjuvantと混合し筋肉注射することにより

作製した。抗血清の力価はミクロ沈降法で、TMVは1:1024、CMVは1:512、PVXは1:1024であった。PVYの抗血清は田中智氏より分譲いただいたものを用いた。

蛍光抗体の作製 蛍光抗体の作製は伊藤の方法²⁵⁾に準じて以下のように行った。抗血清より1/3飽和硫酸による塩析法で、 γ -グロブリンを調製し、これに蛍光色素[fluorescein isothiocyanate (FITC), Baltimore Biochemical Laboratory]を1/100~1/150量加えて、4~6°Cの冷室で4~6時間標識し、遊離の色素は、Sephadex G-25カラムで除き、DEAEセルロースカラムで精製し、色素/蛋白質(F/P)モル比1.0~1.5の分画を集めた。蛍光抗体の力価は抗血清の力価の1/4~1/8を保持していた。蛍光抗体の染色特異性は健全組織の染色、阻止試験、吸収試験により確認した。蛍光抗体は0.1%濃度にNaN₃を加えて冷蔵庫内で、また-20°Cで凍結して保存した。

低温パラフィン切片法 切片の作製はSainte-Marie²⁶⁾、浜島・京極⁵⁾の方法に準じ次のように行った。供試植物の茎の先端部分を約1cmの長さに取り、冷アセトンまたは冷カルノア液で、2時間固定後、冷100%エチルアルコールに1.5~2時間ずつ4回、冷キシロールに1.5~2時間ずつ4回、50~52°Cのパラフィン(融点46~48°C)に1.5時間ずつ4回浸漬し、パラフィンに包埋した。次いでミクロトームで厚さ10~15 μ mの連続切片とし、マイヤー氏卵白液を塗布したスライドガラスにはりつけた。この切片はキシロールに3~4分間ずつ3回浸漬し、脱パラフィンしたのち、100, 95, 90, 80, 60, 40%のエチルアルコールに瞬時、PBS(0.01Mりん酸緩衝生理食塩水、pH7.2)に5分間ずつ4回浸漬した後、湿室シャーレ内に入れ、蛍光抗体により室温または35°Cで1.5~2時間染色した。染色した切片はPBSに10分間ずつ3回浸漬した後、緩衝グリセリン[グリセリン9:炭酸-重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.1)1の混合液]で封入した。

凍結切片法 供試植物の茎の先端部分約1cmを40~45°Cに保った30%ゼラチン液に生のまま入れ、直ちに固め、これを適当な大きさのブロックとして、-20°Cのディープフリーザー内で凍結したのち、スライディングミクロトームで厚さ30~40 μ mの切片とした。切片は直ちに冷アセトンで30分間固定したのち、PBSに10分間ずつ4回浸漬してから蛍光抗体で染色した。染色後切片はPBSでよく洗いスライドガラス上にのせて緩衝グリセリンで封入した。

標本は蛍光顕微鏡（日本光学）で BV および UV 系フィルターを用いて観察した。

電子顕微鏡観察 生長点近傍組織を約 2 mm の大きさに切り取り、2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.2) に入れ、4℃ で 4 時間固定し、リン酸緩衝液で 5～12 時間洗浄したのち、さらに 2% オスミウム酸 (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.2) に入れ、4℃ で 4 時間固定した。固定した試料は常法にしたがって、エポキシ樹脂に包埋したのち、超ミクロトーム (Sorvall MT-1 型) で薄切し、酢酸ウラン液で 20 分間、クエン酸鉛液で 5 分間染色後、電子顕微鏡（日立 HU-125DS 型または日本電子 100C 型）を用いて観察した。

結 果

A. タバコモザイクウイルス

1. ベチュニア

蛍光抗体法による観察 5～8 葉期のベチュニアに TMV を接種し、10, 20, 30 日後に生長点近傍組織について調べた。生長点近傍組織での特異蛍光の分布状態はいずれの試料でも、あまり差は認められなかった。Plate I-1 に接種 30 日後の茎の先端部分の縦断切片を示す。特異蛍光は茎のかなり先端まで認められるが、生長点分裂組織 (tunica および corpus) とその下につづく未分化な組織 (頂端から 0.2 mm 前後まで) には特異蛍光は認められなかった。特異蛍光は、生長点分裂組織より下部で表皮、皮層、維管束、髄などの組織が分化し始める部位に初めて検出され、その輝度は上部から下部へ向かって次第に強くなるが、これはおそらく細胞が未分化の状態から分化した状態になるに従い、順次ウイルスに感染した結果を示すものと思われる。

生長点分裂組織の近傍には種々の生長段階の葉原基が多数存在するが、これらは最初生長点近傍のウイルスの認められない部位から発生しており、生長初期の維管束の未分化のもの (長さ約 0.5 mm) には、ウイルス抗原は認められなかった (Plate I-1, 2)。維管束の分化が明瞭になった葉原基では、特異蛍光が篩管に隣接した篩部の少数の細胞に認められ始めた (Plate I-2, 3, 5)。さらに生長の進んだ葉原基では、ウイルス抗原が篩部から周囲の細胞へ順次拡がり、葉原基内に広く分布するようになった (Plate I-1, 2, 4, 6)。すなわち、葉原基では維管束が分化したのち、ウイルスの感染が急速に進むようであった。

電子顕微鏡による観察 生長点分裂組織 (tunica

および corpus) の細胞は小型で中心には大きな核が存在し、原形質がよく充満し、多数のリボソームとミトコンドリア、ゴルジ体、プロプラスチドなどが認められ、またこの部分では、細胞分裂も観察された。この生長点分裂組織の細胞には、ウイルス粒子は認められなかった (Plate II-1)。ウイルス粒子は、この生長点分裂組織の下につづく維管束の分化が明瞭になった部位に認められた。ウイルス粒子は上部では篩部とその近傍の細胞に認められ、下部になると篩部からさらに周囲の細胞にわたって広く認められるようになった。この場合細胞内のウイルス粒子の分布状態を上部から下部へ向かって記述すると次のとおりである。すなわち、上部の細胞はかなり液胞化が進んでいるが、なお原形質がよく充満しており、ウイルス粒子は細胞質内に並列した小さな集塊となって観察された (Plate II-2)。それより下部の細胞ではウイルス粒子の集塊はその大きさが増大した。この場合、ウイルス粒子は 1 列に並列した状態で集積するとともに、これが層状になり結晶状集塊となった (Plate II-3)。頂端から 1～2 mm 下部では、細胞の液胞化が進み、細胞内は大部分が液胞となり、原形質は細胞壁の内側に薄い層になっているが、ウイルス粒子は原形質内に大きな集塊となり、トノプラストを液胞内におしあげた状態が観察された (Plate II-4)。

植物体内でのウイルスの細胞間移行は plasmodemesmata を経由して行われると考えられている。生長点分裂組織がウイルスに感染していない理由として、基部組織から生長点分裂組織へ plasmodemesmata を経由するウイルスの移行が阻害されている可能性が考えられる。そこで、ウイルス粒子が認められない生長点分裂組織の細胞と、それより下のウイルス粒子が認められる部位の細胞について plasmodemesmata の形態と数を比較した。その結果、plasmodemesmata の形態は両者間で著しい差は認められず、また plasmodemesmata の数は切片上で細胞あたり、前者で 11.3 個、後者で 4.7 個であり、前者のほうがむしろ多かった。この結果から、plasmodemesmata を経由するウイルスの移行が生長点分裂組織で特に阻害されているとは思われなかった。

生長点近傍に存在する種々の生長段階の葉原基のうち、生長初期の葉原基 (長さ約 0.5 mm 以下) は維管束などの組織が未分化 (procambium は認められる) であり、細胞は小型で中央に大きな核を有し、原形質がよく充満しており、全体として分裂している状態であるが、これらの葉原基内にはウイルス粒子は認めら

れなかった。一方、生長が進み維管束の分化が明瞭になった葉原基では、節管近傍の柔細胞（伴細胞および節部柔細胞）にウイルス粒子が小さな集塊となって現われ始めた（Plate II-5）。しかし、これらの細胞は数が少なかった。さらに生長の進んだ葉原基ではウイルス粒子が節部からその周囲の細胞に拡がり、laminaの細胞にも認められた。この場合、節部およびその近傍の細胞ではウイルス粒子は、大きな集塊となっているが（Plate III-1）、laminaの周縁部に向かうにしたがって、ウイルス粒子の集塊は次第に小さくなり（Plate III-2, 3）、さらに周縁部の細胞ではウイルス粒子は認められなかった。さらに生長の進んだ葉原基では全体にわたり多数の細胞にウイルス粒子の大集塊が観察された。これらの所見からも蛍光抗体法による観察と同様葉原基においては生長が進むのに伴ってウイルス感染が維管束部の節管近傍からlaminaの部分へと進むものと思われた。

2. タバコ・トマト

蛍光抗体法および電顕観察ともペチュニアとはほぼ同様の所見が得られた。

B. キュウリモザイクウイルス

1. タバコ

蛍光抗体法による観察 5～7葉期のタバコの中位葉2枚にウイルスを接種し経時的に観察を行った。接種4日後に初めて生長点下部の維管束が明瞭に分化している部位の節部とその近傍に特異蛍光が観察され始めた。接種6～7日後では、特異蛍光は節部近傍から茎内に広く拡がる。しかし、生長点分裂組織とその下ににつづくやや組織の未分化な部位（tunicaとcorpusを含む、頂端から約0.2mmまでの距離の部位）およびこの部位から発生し生長しつつある小さな葉原基（長さ約0.5mm以下）には特異蛍光は認められなかった。生長点より下で特異蛍光が認められ始めた部位では、その輝度が上部から下部へ向かって次第に高くなっていった（Plate I-7）。

この時期から接種10日後までは、生長点近傍組織のウイルス抗原の分布状態には、ほとんど変化がなかった。しかし、接種15日後には、生長点近傍組織において特異蛍光の輝度の低下が認められ、接種20日後では、特異蛍光を示す細胞は少なく数個ずつかたまった状態で組織内に局在するようになり、その輝度も弱いものが多かった。しかし、組織内のすべての細胞からウイルス抗原が消失してしまうことはなかった。

生長点近傍の葉原基のうち、生長が進んだ葉原基には接種4～5日後に、特異蛍光が認められ始めた。特

異蛍光は初め葉原基の節部とその近傍に認められ、その後、周囲の細胞に広く拡がった。しかし、生長初期の葉原基には特異蛍光は認められなかった。接種10日後頃までは、生長の進んだ葉原基は全体的に強い特異蛍光を示したが、生長点近傍組織に特異蛍光を示さない細胞が多数生じる時期（接種15日以後）には、生長の進んだ葉原基にも特異蛍光を示さない部位が生じ、特異蛍光を示す細胞はその一部に局在するようになった。

2. ペチュニア・キュウリ

蛍光抗体法により観察した結果、タバコとはほぼ同様の所見がえられた（Plate I-8）。

C. ジャガイモXウイルス

1. タバコ

蛍光抗体法による観察 5～7葉期のタバコの中位葉2枚にウイルスを接種してから、経時的に観察した。接種3, 4, 5日後では生長点よりかなり下の部位にも特異蛍光は観察されなかった。接種6日後には生長点の頂端から1mmほど下部の節部近傍に特異蛍光が認められ、その後さらに上部の部位にも認められるようになった。しかし、生長点分裂組織とその下ににつづく部位、すなわち頂端から0.3～1mm、通常0.5mm前後の部位には特異蛍光は観察されなかった。これより下部では、特異蛍光は維管束部とその近傍の細胞にのみ認められ（Plate I-9）、さらに下部では茎内全体の分布が観察された。

生長点近傍に存在する各種の生長段階の葉原基は、生長点分裂組織の特異蛍光の認められない部位から発生し、生長の初期（長さ約0.5mm以下）には特異蛍光は認められなかった。生長が進み内部に維管束の分化が明瞭になった葉原基では、特異蛍光が節部の柔細胞から、さらに周辺部へと拡がる。

2. ジャガイモ

蛍光抗体法による観察 ウイルス保毒塊茎から萌芽伸長した植物（長さ10～30cm）、あるいはウイルス・フリーの塊茎から成長した植物にウイルスを接種した個体について観察したが、タバコとはほぼ同様の所見が得られた。

電顕による観察 蛍光抗体法の場合と同様の植物を供試したが、いずれでも生長点分裂組織とその下ににつづく組織が未分化な部位にはウイルス粒子は認められず、組織の分化がかなり進んだ部位（頂端から約0.5mm）より下部に認められた。この場合、上部にはウイルス粒子を含む細胞は少なくウイルス粒子は茎の節部とその近傍にのみ認められ、細胞質に少数散在する

ことが多かった (Plate III-4) が、下部にはウイルス粒子を含む細胞は篩部近傍から周囲に広く拡がり、細胞内に大きな集塊となっていることが多かった (Plate III-5)。しかし、これらの細胞には PVX 感染に特有の封入体は認められなかった。

生長点近傍の葉原基においても、生長の初期にはウイルス粒子は認められず内部に維管束が分化する段階になると、篩部とその近傍にウイルス粒子が認められ始めた。

3. *N. glutinosa*, *D. stramonium*

蛍光抗体法により観察した結果、タバコ、ジャガイモとはほぼ同様の所見が得られた。

D. ジャガイモ Y ウイルス

1. タバコ

5 葉期のタバコの中位葉 2 枚にウイルスを摩擦接種し、10, 20, 30 日後におけるウイルス分布を蛍光抗体法で検討した。いずれの時期にも生長点の先端から約 2 mm 下部までには、ウイルス抗原が認められなかった。これより下部では茎内に広く特異蛍光が観察されたが、その輝度は低かった。

2. ジャガイモ

ウイルス保毒塊茎から萌芽した植物について蛍光抗体法で調べた結果タバコと同様の所見が得られた。

考 察

ウイルスに感染した植物の生長点近傍組織におけるウイルスの分布は、これまで接種検定あるいは dip 法や超薄切片法による電顕観察などにより調べられているが、ウイルスを認めなかったという報告^{7,10,12,13,23,25,29}と、認めたという報告^{1,3,4,11,19,21,27,28}とがある。また生長点培養法によりウイルス・フリー植物が得られるのは、培養中にウイルスが消失するためであると述べている報告もある^{6,26}。

本研究では、TMV と ペチュニア、タバコ、トマト、CMV とタバコ、ペチュニア、キュウリ、PVX とタバコ、ジャガイモ、*N. glutinosa*, *D. stramonium* および PVY とタバコ、ジャガイモの組合わせについて蛍光抗体法と一部に超薄切片の電顕観察を併用して、茎の生長点近傍組織におけるウイルスの増殖・分布について検討した。その結果、いずれのウイルスと植物の組合わせでも、生長点分裂組織 (tunica および corpus) と、その下につづく組織の未分化な部位および生長点近傍の生長初期の葉原基には、ウイルス抗原あるいはウイルス粒子は認められなかった。この場合これらの部位がウイルスにまったく感染していな

いか、あるいはウイルスに感染してはいるが、その増殖が極めて少なく用いた方法では検出されなかったのかは明らかでない。しかし、TMV, PVX では、生長点近傍でウイルスが検出されなかった部位の大きさが、生長点培養法によりウイルスが無毒化される生長点の大きさ^{16,17}とほぼ一致しており、またこれらのウイルスは増殖量が多く、安定であるので、もし極く微量のウイルスが組織に存在すれば培養中に増殖して、育成された植物ではウイルス感染が認められるようになることも考えられるので、生長点分裂組織にはウイルスが存在しないと考えるのが妥当のように思われる。

このように生長点組織がウイルスに感染しない理由として、①生長点組織の伸長がウイルスの細胞間の移行速度より速い、②生長点の近傍にはウイルスの移行を阻害するような組織構造がある、③生長点の細胞はウイルスの感染増殖に不適当な生理状態にあることなどが考えられている。①については、茎の生長点の伸長速度は不明であるが、根端などで測定された細胞の分裂周期は 17~30 時間位であるので¹⁸、生長点の伸長はウイルスが先端部へ到達できないほど速いとは思われない。②については、ウイルスの細胞間移行は、plasmodesmata によるといわれているが生長点とそれより下部のウイルスの存在する細胞の plasmodesmata 数とその微細構造を比較したところ、細胞当りの plasmodesmata 数は前者の方がむしろ多く、微細構造にも著しい差は認められない。plasmodesmata の数や構造の観察結果からはウイルスの生長点への移行が阻害されているとは考えられなかった。③については分裂の盛んな若い培養カルスほどウイルスに対する感受性が低く、ウイルスの増殖も少ないこと³⁰、また根を ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 処理し、根端近傍組織の細胞分裂指数が減少すると TMV が根端近くまで分布すること¹²などから分裂細胞ではウイルスの増殖が阻害される傾向にあるようである。生長点あるいは生長初期の葉原基ではほとんどの細胞が分裂過程にあり、ウイルスが増殖できないのはそのためかもしれない。

一方、超薄切片の電顕観察で、生長点の細胞内にウイルス粒子が認められた場合も報告されており^{1,3,4,11,19,28}、生長点にウイルスが侵入していることもあるようである。

このように、ウイルスの種類により生長点における分布状態が異なる理由は明らかでないが、ウイルスの増殖機作の面から興味ある現象と思われる。

次に生長点近傍組織におけるウイルスの分布状態と生長点培養法によるウイルス無毒化との関連について考察する。TMV とペチュニアおよび PVX とジャガイモの組合わせでは、すでに述べたように生長点近傍でウイルスの認められない部位とウイルス・フリー株の得られる生長点組織の大きさがほぼ一致した。一方 CMV においては 1 mm 以上の大きさの生長点組織からもウイルス・フリー株が得られているが¹⁶⁾、蛍光抗体法の観察では生長点近傍での無ウイルス部位は 0.2 mm 前後であった。したがってこの場合には、培養途中にウイルスが消失し、ウイルス・フリー株が得られた可能性が高い。培養の過程でウイルスが検出されていた生長点組織からウイルスが消失した例はカーネーション斑紋ウイルスとカーネーション⁶⁾、cherry leaf roll virus または arabis mosaic virus と *N. rustica*²⁶⁾の組合わせでも知られている。

生長点培養法の場合、生長点組織に 2～4 個の葉原基をつけた状態で培養するのが普通である。この場合、培養する生長点組織が小さいほど無毒化率は高くなるが、それだけ生長に長期間を要し、生存率も低くなる。したがって培養能率の点からは生長点組織は大きく、葉原基も多数残した方が有利であり、どの程度生長した葉原基までを残すべきかが問題となる^{16,17)}。本実験の結果では、葉原基は維管束が明瞭に分化するまではウイルスに感染しておらず、維管束が分化したのちに感染が急速に進むので、これ以上に生長した葉原基は除去した方がよいと考えられる。

摘 要

生長点培養によるウイルスの無毒化法についての基

礎資料を得る目的で、TMV とペチュニア、タバコ、トマト、CMV とタバコ、ペチュニア、キュウリ、PVX とタバコ、ジャガイモ、*Nicotiana glutinosa*、*Datura stramonium*、PVY とタバコ、ジャガイモの各ウイルスと植物の組合わせについて、生長点近傍組織におけるウイルスの増殖・分布を主として蛍光抗体法により、一部に電子顕微鏡観察を併用して検討した。

いずれのウイルスと植物の組合わせにおいても、生長点分裂組織 (tunica および corpus) とその下につづく組織の未分化な部位にはウイルス抗原あるいはウイルス粒子は検出されなかった。この生長点近傍組織でウイルスの認められない部位までの頂端からの距離は植物の個体によって異なったが、TMV、CMV では約 0.2 mm、PVX では約 0.5 mm、PVY では約 2 mm までであった。ウイルス抗原あるいはウイルス粒子はこれより下部の組織の分化が明瞭になり始める部位に認められ、下部へ向かって、感染段階の進んだ細胞が連続分布しているのが観察された。これは生長点の伸長にともなって、その下部の細胞が未分化の状態から分化した状態になるにしたがいウイルスが順次感染することを示すと考えられる。生長点近傍の葉原基は初めウイルスに感染していない生長点分裂組織から発生し、生長の初期 (葉原基の長さ約 0.5 mm まで) にはウイルス抗原もウイルス粒子も認められなかった。葉原基の生長が進み内部に維管束が分化すると、ウイルスが篩部に認められ始め、そこから周囲の組織へ広がった。葉原基では維管束が分化したのちに急速にウイルスの感染が進むようであった。

引 用 文 献

1. Appiano, A. and Pennazio, S. (1972). J. gen. Virol. 14: 273-276.
2. Boedtker, H. and Simmons, N. S. (1958). J. Amer. Chem. Soc. 80: 2550-2556.
3. Crowley, N. C., Davison, E. M. R., Francki, R. I. B. and Owusu, G. K. (1969). Virology 39: 322-330.
4. Edwardson, J. R. and Purcifull, D. E. (1974). Phytopathology 64: 1322-1324.
5. 浜島義博・京極方久 (1968). 免疫組織学. 医学書院, 東京. pp. 481.
6. Hollings, M. and Stone, O. M. (1964). Ann. appl. Biol. 53: 103-118.
7. Hollings, M. and Stone, O. M. (1965). Ibid. 56: 73-86.
8. Holmes, F. O. (1955). Phytopathology 45: 224-226.
9. 伊藤道夫 (1964, 1965). 蛋白質核酸酵素 9: 1268-1273, 10: 25-29, 103-107, 351-355, 438-443.
10. Kitajima, E. W. (1965). Virology 26: 89-99.
11. Kitajima, E. W. and Costa, A. S. (1969). J. gen. Virol. 4: 177-181.
12. Kozłowska, A. (1966). In Viruses of Plants (Beemster A. B. R. and Dijkstra, J. eds.). North-Holland Publ., Amsterdam. pp. 83-89.

13. Limasset, P. and Cornuet, P. (1949). *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 228: 1971-1972.
14. Morel, G. and Martin, C. (1952). *Ibid.* 235: 1324-1325.
15. Morel, G. and Martin, C. (1955). *Compt. Rend. Acad. Agric. France* 41: 472-475.
16. 森 寛一・浜屋悦次・下村 徹・池上雅春 (1969). *農試研報* 13: 45-110.
17. 森 寛一 (1971). *植物の化学調節* 6: 52-68.
18. 新津恆良 (1967). *細胞* 1: 19-24.
19. Roberts, D. A., Christie, R. G. and Archer, Jr. M. C. (1970). *Virology* 42: 217-220.
20. Sainte-Marie, G. (1962). *J. Histochem. Cytochem.* 10: 250-256.
21. Sheffield, F. M. L. (1942). *Ann. appl. Biol.* 29: 16-17.
22. Shepard, J. F. and Secor, G. A. (1969). *Phytopathology* 59: 1838-1844.
23. Solberg, R. A. and Bald, J. G. (1963). *Virology* 21: 300-308.
24. Takanami, Y. and Tomaru, K. (1969). *Ibid.* 37: 293-295.
25. 土崎常男・日比野啓行 (1971). *日植病報* 37: 18-21.
26. Walkey, D. G. A., Fitzpatrick, J. and Woolfitt, J. M. G. (1969). *J. gen. Virol.* 5: 237-241.
27. Walkey, D. G. A. and Webb, M. J. W. (1968). *Ibid.* 3: 311-313.
28. Walkey, D. G. A. and Webb, M. J. W. (1970). *Ibid.* 7: 159-166.
29. White, P. R. (1954). *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. The Ronald Press Company, New York. pp. 228.
30. Wu, J. H., Hildebrandt, A. C. and Riker, A. J. (1960). *Phytopathology* 50: 587-594.
31. 與良 清・土崎常男 (1962). *日植病報* 27: 219-221.

Explanation of Plates

Plate I.

Distribution of virus antigen in shoot apex and leaf primordia of virus-infected plants. Areas containing virus antigen show yellow-green fluorescence.

1. Longitudinal section of shoot apex of petunia infected with tobacco mosaic virus. ($\times 65$).
2. Transverse section through upper portion of shoot apex of petunia infected with tobacco mosaic virus. The leaf primordia demonstrated at their successive stages of development. The virus antigen was primarily detected in few cells of the phloem (arrows) and gradually spread to lamina during leaf development. ($\times 65$).
- 3-6. Transverse (3, 4) and longitudinal (5, 6) sections of leaf primordia of petunia infected with tobacco mosaic virus. The virus antigen was primarily detected in phloem (3, 5: arrows), and then spread to lamina (4, 6). (3: $\times 320$, 4: $\times 260$, 5: $\times 260$, 6: $\times 65$).
7. Longitudinal section of shoot apex of tobacco infected with cucumber mosaic virus. ($\times 65$).
8. Longitudinal section of shoot apex of petunia infected with cucumber mosaic virus. ($\times 65$).
9. Longitudinal section of shoot apex of tobacco infected with potato virus X. ($\times 65$).

Plate II.

- 1-4. Electron micrograph of shoot apex of petunia infected with tobacco mosaic virus.
 1. Apical meristem cells. No virus particles were found in these cells. (Bar = $5\mu\text{m}$).
- 2.3.4. Virus particles in the cells taken from the portion below the apical meristem. Virus particles were found as small aggregates, in cells of upper portion (2) and as large aggregates, in cells of lower portion (3, 4). (Bar = 2, 3: 500nm , 4: $1\mu\text{m}$).
5. Electron micrograph of leaf primordium cells of petunia infected with tobacco mosaic virus. A small aggregate of the virus was found in the phloem parenchyma cell adjacent to a sieve element during development of leaf primordium. (Bar = $1\mu\text{m}$).

Plate III.

- 1-3. Electron micrograph of leaf primordium cells of petunia infected with tobacco mosaic virus. Virus aggregates in cells taken from the portions near midrib (1), and successively near margin (2, 3) of the lamina of same leaf primordium. (Bar = 1: 1 μ m, 2, 3: 500nm).
4. 5. Virus particles in the cells below the apical meristem of shoot of potato infected with potato virus X. Virus particles were found, separately or as small aggregates, in cell of upper portion (4) and as large aggregates, in cell of lower portion (5). (Bar = 4: 300nm, 5: 1 μ m).

Abbreviations

PP: P-protein, SE: sieve element, V: virus particle, W: cell wall, X: xylem.

Plate I

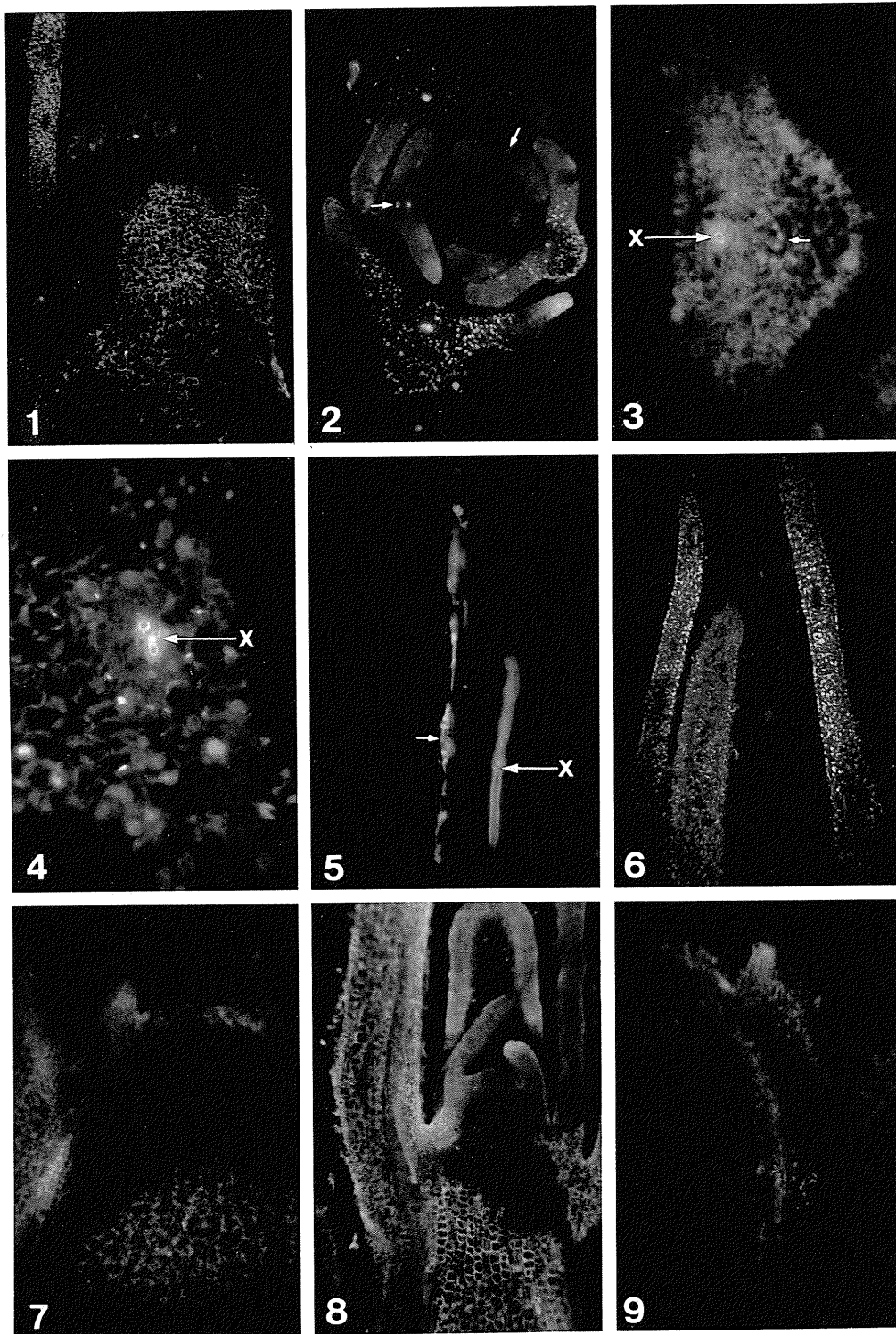


Plate II

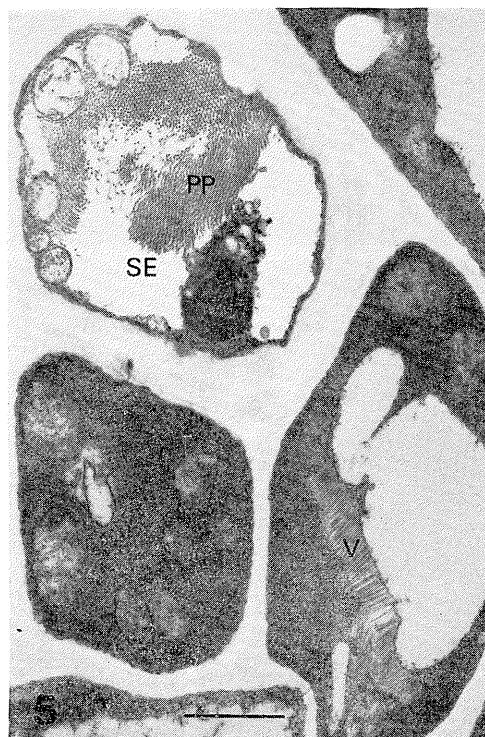
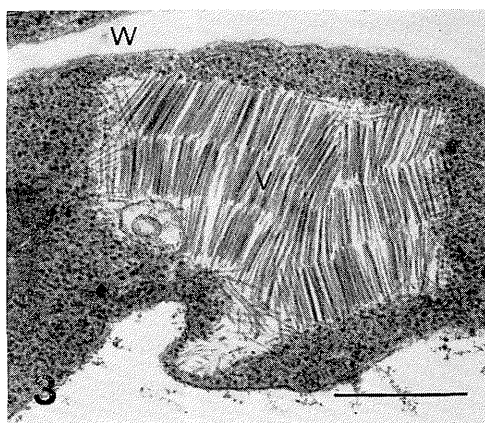
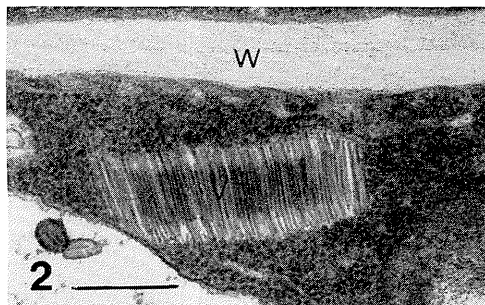
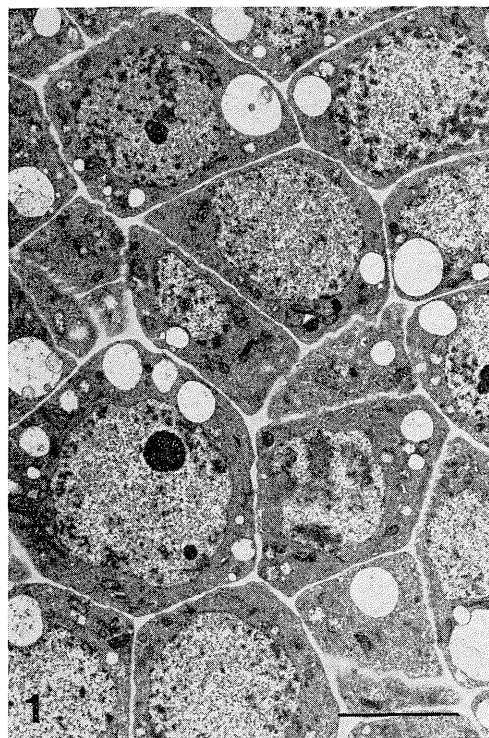


Plate III

