

蛍光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の研究(5)

タバコモザイクウイルス感染タバコにおける葉の発達とウイルスの増殖・分布ならびにモザイク症状の出現

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	細川,大二郎 渡辺,実 森,寛一
発行元	日本植物病理學會
巻/号	55巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 187-193
発行年月	1989年4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



蛍光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の研究 (V)

タバコモザイクウイルス感染タバコにおける 葉の発達とウイルスの増殖・分布ならびに モザイク症状の出現

細川大二郎*・渡辺 実*・森 寛一**

Daijiro HOSOKAWA*, Minoru WATANABE* and Kanichi MORI**:

Studies on Multiplication and Distribution of Viruses in Plants by Use of
Fluorescent Antibody Technique (V) Virus Multiplication and Mosaic
Symptom Development during Leaf Ontogeny in
Tobacco Infected with Tobacco Mosaic Virus

Abstract

Leaf ontogeny and virus multiplication in tobacco plants systemically infected with tobacco mosaic virus were investigated using a fluorescent antibody technique to know the origin of mosaic symptoms. Leaf primordium was initiated at the apical meristem where virus antigen was not detected, and contained no virus antigen in the early stages of development. Virus infection was first detected in the phloem after the vascular bundle had differentiated in the leaf primordium and thereafter spread to the lamina. Areas where no virus antigen was found, were produced near the midvein, secondary veins and tertiary veins during leaf development, while abundant virus multiplication occurred in other areas. In the course of mosaic symptom development, dark green areas arose from the areas where no virus antigen was found, and yellow green areas resulted from the areas where the virus multiplied abundantly. In the dark green areas, most cells contained no virus antigen for weeks after the leaves had fully expanded, although infection was noted in a small number of cell groups. In contrast, no mosaic symptoms appeared in leaves which had fully expanded at the time the plant was inoculated although the virus antigen was found in all parts of the leaf tissues. These results suggested that the occurrence of dark green areas is related to the histogenesis of areas near the leaf veins.

(Received November 1, 1988)

Key words: tobacco mosaic virus, *Nicotiana tabacum*, fluorescent antibody technique, mosaic symptom.

緒 言

タバコモザイクウイルス (TMV) に感染したタバコには、その後展開する上位葉に緑色部と黄色部とからなるモザイク症状が現れる。このモザイク葉にお

るウイルス濃度は黄色部では高いが、緑色部ではきわめて低く、この部位にはウイルスに感染していない細胞が多数存在すると考えられている^{7,11,12)}。しかし、モザイク葉内にウイルスの不均一な分布が生じる原因やモザイク症状出現の機構については明らかにされて

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

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

いない⁹⁾。本実験においては蛍光抗体法を用いてTMVに感染したタバコにおける葉の発達と葉内におけるウイルスの増殖・分布を調べ、モザイク葉にウイルスの不均一な分布が生じる原因とモザイク症状出現の機構について考察した。

材料および方法

供試ウイルス タバコモザイクウイルス普通系 (TMV-OM) を用いた。ウイルスの精製は感染タバコ葉から Boedtker and Simmons の方法³⁾に従って行った。ウイルスの接種は精製ウイルスを用いて摩擦接種法により行った。

供試植物 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi を用いた。植物は 20~28 C の温室内(自然光)で育成し、5 葉期に最大葉とその下位葉の 2 枚に TMV (10 µg/ml) を接種した。接種 30 日後に葉を採取し蛍光抗体法の切片作製に用いた。

蛍光抗体法 生長初期の小さな葉(葉原茎)は全体を、生長した葉は中央部付近から 1×1 cm くらいの大きさの葉片を切りとって切片作製に用いた。これらの葉片は前報¹⁰⁾と同様にして、冷エタノールあるいは冷カルノア液(エタノール 3:酢酸 1)で 4 C, 2 時間固定し、冷エタノールで脱水後、冷キシロールに浸してからパラフィン(融点 46~48 C)に包埋した。包埋した葉片は 15 µm の切片とし、マイヤー氏卵白アルブミン液を塗布したスライドグラスにはりつけ、30 C に一夜保ってからキシロールで脱パラフィンしたのち、100, 95, 90, 80, 60, 40% のエタノールに瞬時浸し、PBS (0.01 M リン酸緩衝液, 150 mM NaCl pH 7.2) に 5 分間ずつ 4 回浸漬した。この切片は前報¹⁰⁾と同様に調製した蛍光抗体により室温または 35 C で 1.5~2 時間染色し、PBS で洗浄のち緩衝グリセリン [グリセリン 9:炭酸-重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.1) 1 の混合液] で封入した。標本の観察は透過型蛍光顕微鏡 (ニコン FP 型) で、UV フィルターを用いて行った。

結 果

TMV に感染したタバコの葉に生ずるモザイク病徴は、葉位、環境条件などによって異なった型のものが観察される。本実験の条件下では葉位により次のような変化がみられた。すなわち、接種葉とその上位 1~2 葉にはモザイク病徴は出現しなかった。これより上位 1~2 葉は葉脈透化ののち全体が退緑した。さらに上位 1~2 葉では黄色部と緑色部からなるモザイク症

状が現れた。これより上位 2~3 葉では初め全体が緑色であるが、葉がほぼ完全に展開するころには全体が退緑した。しかし、これより上位の葉では黄色部と緑色部からなるほぼ同じ型のモザイク葉が連続して出現した。すなわち、これらの上位の葉は生長点分裂組織に発生してからいずれも同様の過程を経てモザイク症状が出現していると考えられた。そこで、本実験では、接種後 30 日が経過し、このように上位葉に同じ型のモザイク葉が連続して出現しつつあるタバコについて、葉の生長段階を葉の長さによって区別して、葉内におけるウイルスの増殖・分布を蛍光抗体法を用いて検討した。また、接種葉の上位 1~2 葉の病徴を示さなかった葉についても同様に葉内のウイルス分布を調べた。

以下、葉長ごとにこの所見を記述する。

葉長 1 mm 以下: 葉原基は特異蛍光の認められない生長点分裂組織から発生した。長さ約 0.5 mm に生長するまでは、維管束は未分化 (procambium は分化している) であった。これ以上の長さの葉原基では中央脈に維管束が分化した。これらの葉原基には特異蛍光は認められなかった。

葉長 1~2 mm: 中央脈の節部にまれに特異蛍光が認められることがあった。

葉長 2~3 mm: 中央脈の両側に lamina が形成され、2 次脈も分化した。特異蛍光が中央脈および 2 次脈の節部の少数の細胞に認められた (Plate I-1, 2)。

葉長 3~5 mm: 特異蛍光が中央脈および 2 次脈から lamina に拡がった (Plate I-3)。

葉長 5~10 mm: 中央脈、2 次脈には維管束が発達し、3 次脈も分化した。ウイルスは中央脈および 2 次脈の脈間部では多量に増殖したが、これらの葉脈の近傍には特異蛍光の認められない部位が生じた (Plate I-4, 5)。

葉長 10~20 mm: 中央脈および 2 次脈の脈間部では特異蛍光の輝度がさらに増大したが、これらの葉脈の近傍では特異蛍光は認められなかった (Plate I-6)。この生長段階になると特異蛍光の認められない部位では柵状組織の細胞が葉の垂直方向に伸長し始めたが、ウイルス抗原の認められる部位では、その伸長が阻害された (Plate I-7)。

葉長 20~30 mm: 中央脈、2 次脈の近傍の特異蛍光の認められない部位が広がった (Plate I-8)。また 3 次脈近傍にも特異蛍光の認められない部位が生じた (Plate II-1, 2)。しかし、その幅は狭いことが多かった (Plate II-2)。この生長段階の葉にはモザイク症

状が認められたが、この場合ウイルスの増殖した部位は黄色部となり、特異蛍光の認められない部位は緑色部となった。

葉長 30~50 mm: ウイルス抗原の分布は前の生長段階の葉とはほぼ同様であったが (Plate II-3), 特異蛍光の認められない部位では柵状組織の細胞が葉の垂直方向に著しく伸長し、ウイルスの増殖した部位では、その伸長は阻害されたままであった (Plate II-3, 4)。また、前者の部位では海綿状組織の細胞間隙が増大するが、後者の部位ではそれが阻害された (Plate II-4)。

葉長 50~100 mm: 特異蛍光の分布には前の生長段階の葉と著しい差は認められなかった。

葉長 100~150 mm: 葉は完全に展開した状態であり、モザイク症状には著しい変化は認められなかった。モザイク葉の黄色部ではほとんどの細胞に強い特異蛍光が認められたが、緑色部では特異蛍光がほとんど認められないままであった。黄色部と緑色部の境界は明瞭であり、この部位では強い特異蛍光を示す細胞と特異蛍光の認められない細胞とが隣接し、前者から後者へウイルスが急速に拡がる様子はみられなかった (Plate II-5, 6)。しかし、緑色部の一部には Plate II-7 にみられるように特異蛍光を示す細胞が少数個かたまって観察されることがあった。この場合、特異蛍光は上側表皮と柵状組織および海綿状組織の細胞に分布する場合と上側表皮と柵状組織の細胞のみに分布する場合とがあったが、この部位の中央には小さな維管束が認められ、この維管束を經由して移行してきたウイルスがその近傍で増殖したと考えられた (Plate II-7)。また、この特異蛍光陽性部では柵状組織の細胞の伸長は阻害されておらず、葉の生長が進んだのちにウイルスの感染が起こったことを示していると思われた (Plate II-7)。

無病徴葉: 葉内全体に強い特異蛍光が観察され、葉脈近傍に特異蛍光の認められない部位は生じていなかった (Plate II-8)。

考 察

Goldstein⁶⁾ は TMV 感染タバコにおけるモザイク葉の緑色部は葉の生長の初期に偶然にウイルスの感染をまぬかれた細胞から生じたと考えた。しかし、Atkinson ら¹⁾ はこのモザイク葉の緑色部の大きさと葉の生長過程における細胞分裂の回数とから、この部位が生長初期の葉原基内の数百個の細胞集団から生じていると推定し、これは偶然にウイルスの感染をまぬかれた細胞から生じたのではなく、そこに拡散性のある

緑色部形成因子が作用したためと考えた。本実験では、葉原基が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すること、生長の初期にはウイルスの増殖は認められず、生長が進み維管束の分化が明瞭になったのちに、その節部においてウイルスの増殖が認められやがて lamina へも拡がることを観察した。しかし、さらに葉の生長が進み、中央脈、2 次脈、3 次脈が発達する段階になると、これらの葉脈の近傍には特異蛍光の認められない部位が生じ、脈間部では多量のウイルスが増殖することを認めた。さらに葉が生長しモザイク症状が現れる段階になると、ウイルスの認められない葉脈近傍の部位は緑色部に、ウイルスの多量に増殖した脈間の部位は黄色部へと発展した。一方、3 次脈より小さい葉脈の近傍にはこのような特異蛍光の認められない部位は生じなかった。また、ウイルスの接種時に生長の進んでいた葉ではモザイク症状は現れないが、これらの葉ではウイルスが葉内全体に分布し、前記のようにウイルスの認められない部位が葉脈近傍に生じることがなかった。これらの結果、モザイク葉における緑色部の形成には、中央脈、2 次脈および 3 次脈の近傍の組織分化が関連していると考えられた。葉の生長過程には初め頂端生長と周縁生長があり、これらに続いて葉の内部での介在生長がある^{2,4)} が、葉の組織分化にはこの介在生長が重要であると考えられている¹³⁾。また、生長過程にある葉では葉脈近傍で細胞分裂の頻度が高いとする報告もある⁸⁾。一方、生長点近傍組織では多くの場合ウイルスの増殖が認められず¹⁰⁾、培養カルスではウイルスの増殖が抑制されることが多い^{14,16)} が、これらの組織ではいずれも細胞分裂の頻度が高い。したがって、前記のように葉の生長過程で中央脈、2 次脈、3 次脈近傍にウイルスの増殖の認められない部位が生じる時期には、これらの葉脈の近傍で細胞分裂が盛んで、この部位でのウイルスの増殖が阻害されたことも考えられる。この点を明らかにするには、葉内における分裂細胞の分布とウイルスの増殖・分布との関連を直接対応させて明らかにする必要がある。

また、モザイク葉が完全に展開する時期にはすでに葉の組織分化は完了していると考えられるが、モザイク葉の緑色部ではその後も長期間にわたりほとんどの部位にウイルスの増殖は認められなかった。さらに、このようなモザイク葉の緑色部は TMV の再接種に抵抗性を示すことが報告されている^{1,5,7)}。したがって、モザイク葉内でのウイルスの不均一な分布の生じる原因には、葉脈近傍の組織分化とともに葉内に生じる何

らかの抗ウイルス作用が関連するかもしれない。

すでに述べたように、葉にモザイク症状が生じる場合には、葉の発達の早い段階で葉内にウイルスが増殖する部位としない部位が生じ、これらの部位が、それぞれ黄色部と緑色部になった。これは、葉が生長する過程で起こる葉緑体の発達¹⁵⁾とクロロフィルの形成が、ウイルスの増殖した部位では阻害され、ウイルスの増殖の認められない部位では阻害されなかったため、それぞれ黄色部と緑色部になったと考えられる。しかし、ウイルスの増殖した部位で葉緑体の発達とクロロフィルの形成がいつの段階でどのようにして阻害されるかは明らかでない。

摘 要

蛍光抗体法を用いて TMV に感染したタバコの葉の発達と葉内におけるウイルスの増殖・分布を調べ、モザイク葉内におけるウイルスの不均一な分布の生じる原因とモザイク症状の出現する機構とについて検討した。

葉（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、生長の初期にはウイルスの増殖は認められなかった。葉原基の生長が進み維管束の分化が明瞭になったのちに、その篩部に最初にウイルスの増殖が認められた。ウイルスはそこからやがて lamina へも拡がった。しかし、さらに葉の生長が進み中央脈、2 次脈、3 次脈が発達する段階になると、これらの葉脈の近傍に特異蛍光の認められない部位が生じ、これらの葉脈の脈間部ではウイルスが多量に増殖するようになった。さらに葉が生長し、モザイク症状が現れる段階になると、ウイルスの増殖の認められない葉脈近傍の部位は緑色部に、脈間部のウイルスの増殖した部位は黄色部へと発展した。また、3 次脈より細い葉脈の近傍には特異蛍光の認められない部位は生じなかった。一方ウイルスの接種時にすでに組織分化の進んだ葉ではモザイク症状は現れないが、これらの葉ではウイルスが葉内全体に分布し、前記のように葉脈近傍に特異蛍光の認められない部位の生じることはなかった。これらの結果からモザイク葉緑色部の形成には葉脈近傍の組織分化が関連すると考えられた。

引 用 文 献

1. Atkinson, P.H. and Matthews, R.E.F. (1970). *Virology* 40: 344-356.
2. Avery, G.S. (1933). *Amer. J. Bot.* 20: 565-592.
3. Boedtker, H. and Simmons, N.S. (1958). *J. Amer. Chem. Soc.* 80: 2550-2556.
4. Esau, K. (1977). *Anatomy of Seed Plants*. John Wiley and Sons, New York.
5. Fulton, R.W. (1951). *Phytopathology* 41: 579-592.
6. Goldstein, B. (1926). *Bull. Torrey Bot. Club* 53: 499-599.
7. Kobayashi, S., Miyahara, H., Hosokawa, D., Watanabe, M. and Kozaka, T. (1980). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46: 545-548.
8. Maksymowych, R. (1973). *Analysis of Leaf Development*. Cambridge Univ. Press, London.
9. Matthews, R.E.F. (1981). *Plant Virology*, 2nd ed. Academic Press, New York.
10. 森 寛一・細川大二郎・渡辺 実 (1982). *日植病報* 48: 433-443.
11. Mori, K., Hosokawa, D. and Yamashita, T. (1982). *In Plant Tissue Culture* (Fujiwara, A. ed.). Maruzen, Tokyo. pp. 803-804.
12. Murakishi, H.H. and Carlson, P.S. (1976). *Phytopathology* 66: 931-932.
13. Poethig, R.S. and Sussex, I.M. (1985). *Planta* 165: 158-169, 170-184.
14. Reinert, R.A. (1966). *Phytopathology* 56: 731-733.
15. Stetler, D.A. and Laetsch, W.N. (1969). *Amer. J. Bot.* 56: 260-270.
16. 谷口達雄・細川大二郎・森 寛一 (1974). *日植病報* 40: 210 (講要).

Plate I

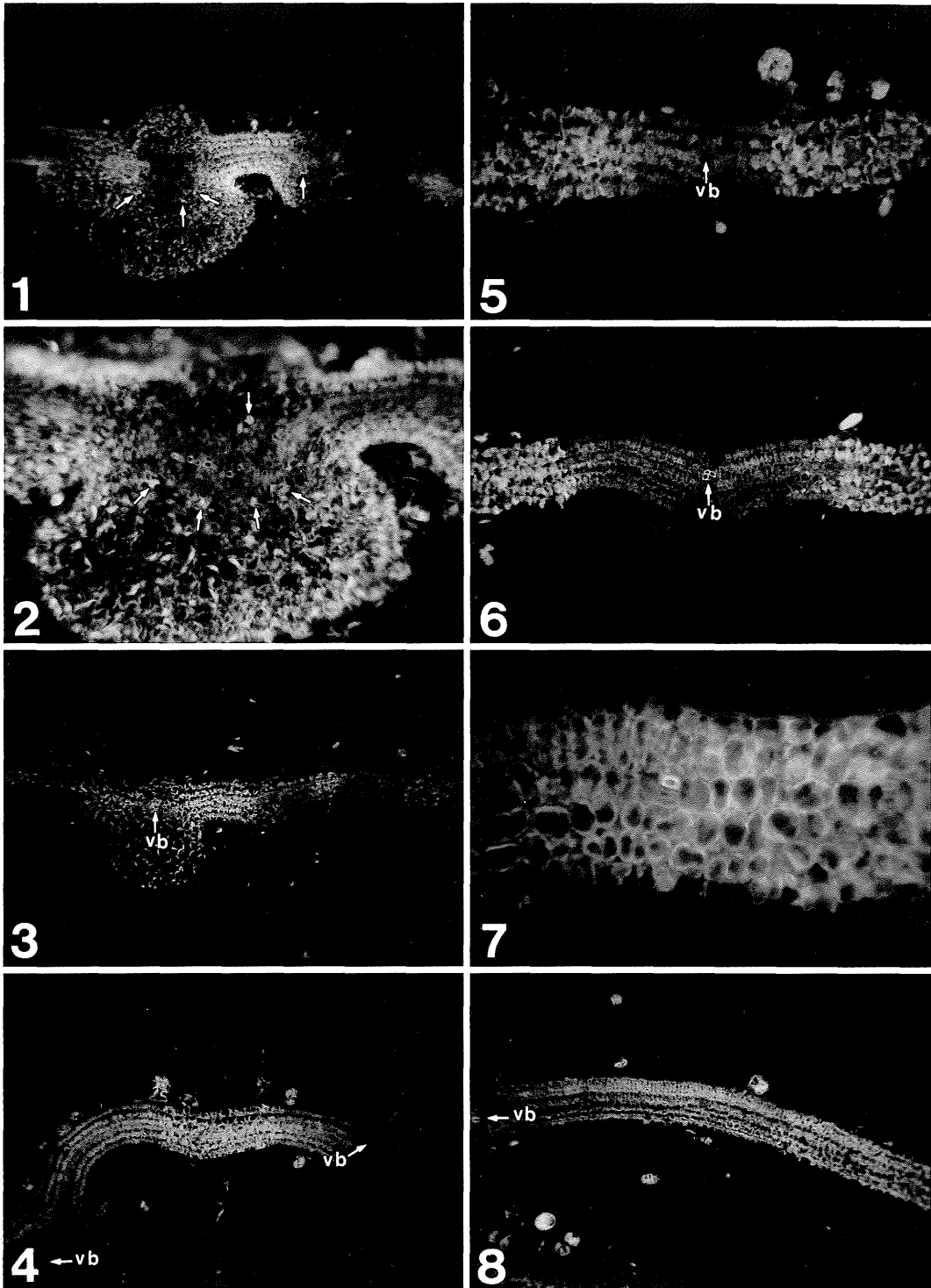
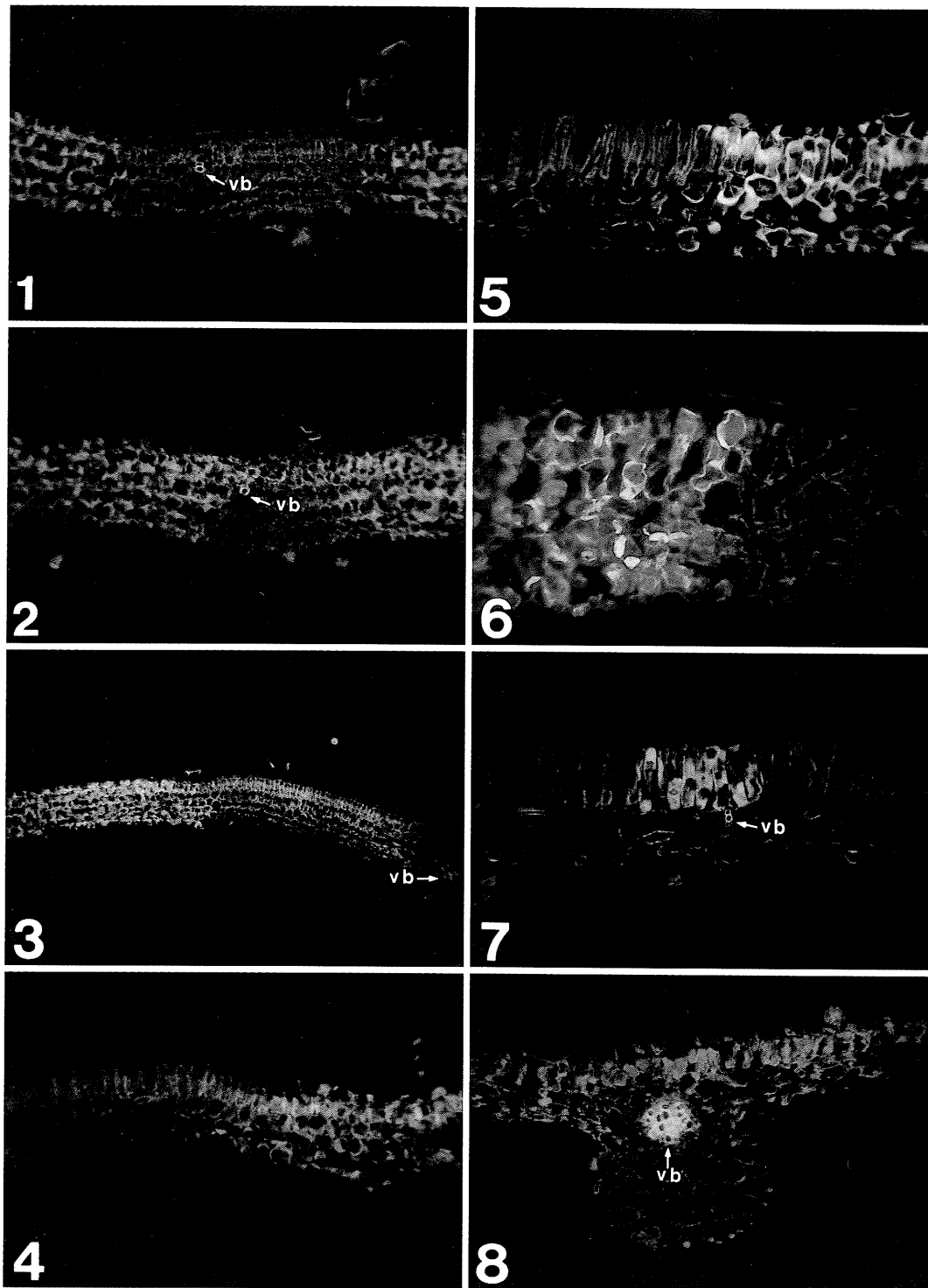


Plate II



Explanation of plates

Fluorescent antibody staining of the virus antigen in successively older leaves from tobacco plants infected with tobacco mosaic virus. Areas containing the virus antigen show a yellow-green fluorescence.

Plate I.

1. Leaf primordium with a length of 2~3 mm. Virus antigen was first found in a few phloem cells (arrows). ($\times 90$)
2. The same midvein as 1 at higher magnification. The arrows show the specific fluorescence in the phloem cells. ($\times 190$)
3. Leaf primordium with a length of 3~5 mm. Virus antigen had spread from the veins to the lamina. ($\times 70$)
4. Leaf primordium with a length of 5~10 mm. Areas in which virus antigen was not found were near the midvein or secondary veins, while interveinal areas supported abundant virus multiplication. ($\times 70$)
5. Leaf with a length of 5~10 mm. Areas in which no virus antigen was found were observed on either side of the secondary vein. ($\times 140$)
- 6 and 7. Leaf with a length of 10~20 mm. The areas on either side of the secondary vein still had no virus antigen. In this stage, palisade cell elongation at a right angle to the leaf surface began in areas without virus antigen while areas affected by the virus have reduced elongation. (6, $\times 140$. 7, $\times 300$)
8. Leaf with a length of 20~30 mm. Mosaic symptoms appeared in the leaf of this stage. Areas where no virus antigen was found were dark and those containing the virus were yellow green. ($\times 70$)

Plate II.

- 1 and 2. Leaf with a length of 20~30 mm. In wide (1) or narrow (2) areas near the tertiary veins no virus antigen was found. (1, 2, $\times 140$)
- 3 and 4. Leaf with a length of 30~50 mm. Wide areas with no virus antigen were observed near the secondary veins. The palisade cells were further differentiated by elongation at right angles to the leaf surface in areas without virus antigen, but this elongation was markedly reduced in regions attacked by the virus. (3, $\times 70$. 4, $\times 140$)
- 5 and 6. Leaf with a length of 100 mm (5), and 120~150 mm (6, fully grown). The boundaries between areas where the virus antigen was and was not were very clear. Cells containing abundant antigen could be found adjacent to cells without the antigen. (5, $\times 140$. 6, $\times 200$)
7. Leaf with a length of 120~150 mm. Virus infection was seen in a small number of cell groups near smaller veins in areas without the antigen (dark green areas). ($\times 140$)
8. Leaves which had fully expanded at the time the plant was inoculated showed no mosaic symptoms. Virus antigen was found throughout the leaf tissues. ($\times 70$)

Abbreviation: vb: vascular bundle.