

蛍光抗体法による植物ウイルスの増殖・分布の研究(6)

タバコモザイクウイルスのNicoiana abacum cv.Samsun
NN葉内における増殖・分布とえ死病斑形成との関係

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. 194-200
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 (VI)

タバコモザイクウイルスの *Nicotiana tabacum* cv.

Samsun NN 葉内における増殖・分布と

え死病斑形成との関係

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 (VI) Progressive Distribution of
Tobacco Mosaic Virus and Necrotic Local Lesion Formation
in *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN Leaves

Abstract

The multiplication and distribution of tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN leaves were investigated using the fluorescent antibody technique, in relation to the local lesion development. Virus antigen was first detected 24 hr after inoculation in cell groups in the epidermal and palisade layers as well as in a few cells of spongy layer. Thereafter, progressive cell-to-cell spread of the antigen in leaf tissues was observed, and 32 hr after inoculation, the stained areas were in the form of a cell group extending from the upper epidermal to the lower epidermal layer. By this time the virus antigen was also found in phloem cells, suggesting that virus long distance movement had begun. Necrosis was discovered in one or two cells of the upper spongy layer located in the central part of the stained areas 36 hr after inoculation. Thereafter, cell necrosis spread rapidly in the spongy layer, and then in the palisade layer and upper and lower epidermis. When local lesions became visible 44 hr after inoculation, necrosis had already spread throughout the greater part of the stained area. However, a few cells bordering the lesions contained the virus antigen and had no necrosis. Thereafter, continuous cells become progressively infected and necrosis developed into the inner cells, increasing the size of the local lesions. In *N. tabacum* cv. Samsun, the progressive spreading pattern of the virus antigen was similar to that of *N. tabacum* cv. Samsun NN until cell necrosis first appeared in the latter.

(Received November 1, 1988)

Key words: tobacco mosaic virus, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, fluorescent antibody technique, necrotic local lesion.

緒 言

局部病斑の形成にともなう、ウイルスが局在化する場合の宿主組織内におけるウイルスの増殖・分布については、これまで電子顕微鏡を用いて、タバコモザ

イクウイルス (TMV) を中心に多くの報告がある^{1,2,4-6,8-11,13,14,18,19,22,23,25}。しかし、これらは局部病斑が形成されたのちの観察が多く、局部病斑が形成されるまでの時期についての観察は少ない。また電子顕微鏡は視野がきわめて狭いため、組織レベルにおけ

* 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

るウイルスの分布を全体的に把握するのが困難である。このためウイルスの宿主組織内における増殖・分布と局部病斑形成との関係についても十分明らかにされていない。本実験においては、蛍光抗体法を用いて、TMVの *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN 葉内における増殖・分布と局部病斑形成との関係を TMV が全身感染する *N. tabacum* cv. Samsun の場合と比較しながら検討した。

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摩擦接種法により行った。

供試植物 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN および *N. tabacum* cv. Samsun を用いた。これらの植物は 20~25°C の温室内(自然光)で育成し、8~10 葉期の中位葉に TMV (1 または 10 µg/ml 濃度)を接種した。

蛍光抗体法 TMV 接種葉から 4 時間間隔で経時的に毎回 1×1 cm の葉片を 15 枚ずつ切り取り、前報¹⁵⁾と同様にして、冷エタノールあるいは冷カルノア液で固定し、冷エタノールで脱水後、パラフィンに包埋してから切片を作製した。切片はキシロールでパラフィンを除去し、エタノールと PBS (0.01 M リン酸緩衝液, 150 mM NaCl, pH 7.2) に浸漬してから前報¹⁵⁾と同様に調製した蛍光抗体により染色し、透過型蛍光顕微鏡(ニコン FP 型)で UV フィルターを用いて観察した。

結 果

1. *N. tabacum* cv. Samsun NN

特異蛍光は接種 24 時間後に最初に観察された。この時期には特異蛍光が上側表皮細胞と柵状組織の細胞、これに隣接する少数の海绵状組織の細胞とに拡がった (Plate I-1)。その後特異蛍光はこの部位から時間の経過とともに葉の水平方向と垂直方向に同時に細胞から細胞へと拡がった (Plate I-2)。接種 32 時間後には特異蛍光が上側表皮、柵状組織、海绵状組織、下側表皮へと拡がっており、同時に葉の水平方向へも広く分布するようになった (Plate I-3, 4)。この場合、特異蛍光の水平方向への拡がり幅がウイルスの侵入の早い上側の組織ほど広がっているため、葉の横断切片では特異蛍光陽性細胞が V 字型に分布した状態で観察された。また細胞内の特異蛍光の輝度も感染の早い細胞ほど強くなっていた (Plate I-3, 4)。さらに葉内では

柵状組織と海绵状組織の間に維管束があるため、この近くに最初の感染部位が形成されると、接種後の早い時期 (24~32 時間後) に維管束の篩部細胞にも特異蛍光が認められ (Plate I-3, 4)、ウイルスの篩部を經由する遠隔部への移行がすでに起こりつつあるように思われた。

接種 36 時間後には、特異蛍光が葉内にさらに広く分布するようになるが、この時期になると、特異蛍光の認められる部位の中央付近にある柵状組織に接した海绵状組織の 1~2 個の細胞がえ死褐変を起こした (Plate I-5, 6)。その後、細胞のえ死は周囲の海绵状組織の細胞に急速に拡がり (Plate I-7, 8)、続いて柵状組織の細胞、さらに上側と下側の表皮細胞に及んだ (Plate II-1)。

接種 44~48 時間後になると特異蛍光の認められる部位のほとんどの細胞がえ死を起こしたが (Plate II-2)、この時期には肉眼的にも局部病斑が認められた。この場合、え死を起こした細胞では細胞器官が破壊され、細胞質は消失し、全体がおしつぶされた状態となった。このようになった細胞では、特異蛍光の輝度が減少し、やがて消失するようになった。しかし、局部病斑が形成された後においても、その周縁部には特異蛍光が認められ、え死を起こしていない細胞が少数存在した (Plate II-3)。これらの細胞ではウイルスが増殖し、さらに周囲の細胞に拡がりつつあるように思われた。それと同時にこれらの細胞も時間の経過とともに内側の細胞からえ死を起こすため、局部病斑はゆっくり拡大した。しかし、接種 60 時間後になると、局部病斑の周縁部にも特異蛍光が認められなくなった。さらに接種 60 時間以後になると局部病斑の周縁部には強い紫色の自家蛍光を発する物質が集積するようになることが多かった (Plate II-4)。

2. *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

葉内に特異蛍光が観察されるようになるのは接種 24 時間後であり、この時期の特異蛍光の葉組織内における分布状態は Samsun NN と同様であった (Plate II-5)。さらにその後も特異蛍光は時間の経過とともに Samsun NN の場合と同様の経過で葉組織内に分布するようになった (Plate II-6)。しかし、接種 36 時間以後になっても細胞のえ死は起こらず、細胞内では特異蛍光の輝度がさらに増大した (Plate II-7)。接種 72 時間後には、Plate II-8 にみられるように葉内のほとんどの細胞に強い特異蛍光が認められた。これらの細胞では特異蛍光は細胞質に少数の大きな塊状となって観察されることが多かった (Plate II-8)。

考 察

N因子を有するタバコにおけるTMVの増殖曲線が、局部病斑の出現するまでは、N因子を有しないタバコでのそれと同様であることが報告されている^{12,24)}。本実験においても Samsun NN の接種葉組織内における TMV の増殖・分布の経過が局部病斑が形成されるまでは Samsun 葉におけるそれとほぼ同様であることが認められた。これは N 因子を有するタバコでも局部病斑が形成されるまでは組織内における TMV の増殖が抑制されていないことを示していると思われる。しかし、Shimomura²⁰⁾ は N 因子を有するタバコでは、局部病斑の形成されない条件下でもウイルスの増殖に害的に働く要因のあることを報告しており、局部病阻斑宿主ではウイルス接種後のいつの時期からウイルスの増殖抑制が起こるかは、さらに検討する必要がある。

局部病斑宿主においてウイルスが局在化し全身へ拡がらないのは、ウイルスが局部病斑内かその近傍に封じ込められるためであると考えられている。しかし、本実験では Samsun NN において、ウイルスはまだ局部病斑の形成されていない接種 28~32 時間後に維管束の篩部細胞で増殖しているのが観察された。ウイルスの篩部を経由する遠隔部への移行速度は細胞間の移行速度に比べてきわめて速く、タバコでは TMV が接種 32~48 時間後に接種葉から葉柄を経て茎へ移行しているとの報告もある¹⁷⁾。本実験の場合にも篩部で増殖したウイルスが局部病斑が形成される前に篩部を経由し遠隔部へ移行していることが考えられる。したがって、Samsun NN で TMV の感染が遠隔部へ拡がらないのは、局部病斑が形成される前に篩部に侵入増殖したウイルスが遠隔部へ移行する過程を阻害する状態が生じているか、あるいはウイルスは篩部を経由し遠隔部へ移行はするが、そこでの増殖が起こらないためではないかと考えられた。下村²¹⁾は *N. glutinosa* および *N. tabacum* cv. Xanthi nc の葉に TMV を接種した場合、局部病斑が形成されたのちには TMV の遠隔部への移行が中肋から葉柄基部にいたる部位で阻止されていることを報告している。しかし、局部病斑が形成される前にこうした中肋から葉柄基部にいたる部位でのウイルスの移行阻止があるかどうか明らかなでない。

局部病斑宿主でもプロトプラストではウイルスの感染にともなう細胞のえ死は起こらないことから、局部病斑宿主での細胞のえ死は組織レベルでの現象であると理解されている¹⁸⁾。本実験においても、局部病斑が形成される際の葉組織内における細胞のえ死はウイル

スの感染の早い細胞から生じるのではなく、感染がある範囲の細胞に拡がったのちに、その中央部付近の柵状組織に接した海綿状組織の少数の細胞に生じ、その後、周囲の海綿状組織の細胞、続いて柵状組織と上側および下側表皮へと拡がった。これは局部病斑の形成が組織レベルの現象であり、ウイルスの感染にともなって葉内の複数の細胞が相互に反応してえ死が誘起されていることを示していると考えられる。

Samsun NN において、TMV の感染にともなって局部病斑が形成される場合、ウイルスの増殖した部位のほとんどの細胞がえ死を起こすが、局部病斑の周縁にはウイルスが感染・増殖してもえ死を起こしていない細胞が少数存在した。ウイルスはこれらの細胞からさらに周囲の細胞へ移行・増殖を続けた。しかし、これらの細胞もやがて内側からえ死を起こすため、局部病斑はゆっくり拡大した。すでに電顕観察によっても、*N. glutinosa* や *Chenopodium amaranticolor* の局部病斑では病斑内部とその周縁の細胞に TMV 粒子が認められている^{8,9,13,14)}。このように局部病斑が形成されたのちに、その周縁にウイルスが増殖してもえ死を起こしていない細胞が存在するのは、これらの細胞ではえ死が起こるほどにウイルスが増殖していないか、あるいはウイルスの感染後え死が起こるまでに十分な時間が経過していないためではないかと考えられるが明らかでない。

Samsun NN で細胞がえ死を起こすと、細胞内の特異蛍光は弱くなりやがて消失した。これは細胞がえ死すると抗原性がマスクされたり、標本作製過程でウイルス抗原が流失しやすくなることも考えられるが、局部病斑の中心部では周縁部よりウイルスの活性が低くなっているとの報告²³⁾もあるので、細胞のえ死の過程で細胞内の消化活性が高まり、ウイルス蛋白質が分解された可能性が強い。

局部病斑の形成にともなって、ウイルスが局在化するのには、その周縁にウイルスの増殖や移行を阻害する物質が生じるためであると考えられている⁷⁾。本実験において、局部病斑が形成されたのちに、その周縁に強い紫色の自家蛍光を発する物質の集積がみられ、これがウイルスの局在化に関連することも考えられたが明らかにできなかった。

摘 要

蛍光抗体法を用いて、タバコモザイクウイルス (TMV) の *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN の接種葉組織内における増殖・分布と局部病斑形成との関係

を TMV が全身感染する *N. tabacum* cv. Samsun の場合とも比較しながら検討した。

Samsun NN においてはウイルス抗原は接種 24 時間後に初めて認められた。この時期にはウイルス抗原が表皮、柵状組織とこれに接した少数の海绵状組織の細胞に分布した。その後ウイルス抗原は葉の水平方向と垂直方向に拡がり、接種 32 時間後には下側表皮にまで達した。またこの間にウイルスの増殖部位の篩部細胞でもウイルスの増殖が認められ、篩部を経由するウイルスの遠隔部への移行が局部病斑が形成される前にすでに始まりつつあるように思われた。接種 36 時間後になるとウイルスの増殖した部位の中央部附近の柵状組織に接した海绵状組織の少数の細胞にえ死が起こり、その後細胞のえ死は海绵状組織の他の細胞に急速に拡がり、続いて柵状組織の細胞から表皮の細胞

へと及んだ。接種 44~48 時間後にはウイルスの増殖した部位のほとんどの細胞がえ死を起こし、局部病斑が形成された。しかし局部病斑が形成されたのちにおいても、その周縁には特異蛍光が認められてもえ死を起こしていない細胞が少数存在し、ウイルスはこれらの細胞からさらに周囲の細胞へ移行、増殖を続け、これらの細胞もやがて内側からえ死を起こすため局部病斑はゆっくり拡大した。接種 60 時間後にはこの局部病斑周縁部の特異蛍光は認められなくなり、病斑の周縁には強い紫色の自家蛍光を発する物質が集積した。

一方、Samsun の葉組織内における TMV 抗原の分布経過は Samsun NN で細胞え死が始まる接種 36 時間後までは、Samsun NN のそれと同様であった。しかし、Samsun ではその後もウイルスは組織内にさらに広く分布し、細胞内の特異蛍光の輝度も高まった。

引用文献

1. Allison, A.V. and Shalla, T.A. (1974). *Phytopathology* 64: 784-793.
2. Appiano, A., Pennazio, S., D'Agostino, G. and Redolfi, P. (1977). *Physiol. Plant Path.* 11: 327-332.
3. Boedtker, H. and Simmons, N.S. (1958). *J. Amer. Chem. Soc.* 80: 2550-2556.
4. Carrol, T.W. (1966). *Phytopathology* 56: 1348-1353.
5. Da Graca, J.V. and Martin, M.M. (1975). *Physiol. Plant Path.* 7: 287-291.
6. Favali, M.A., Conti, G.G. and Bassi, M. (1978). *Ibid.* 13: 247-251.
7. Fraser, R.S.S. (1987). *Biochemistry of Virus-infected Plants*. Research Studies Press. Letchworth, Hertfordshire.
8. Hayashi, T. and Matsui, C. (1963). *Virology* 21: 525-527.
9. Hayashi, T. and Matsui, C. (1965). *Phytopathology* 55: 389-392.
10. Hiruki, C. and Tu, J.C. (1972). *Ibid.* 62: 77-85.
11. Israel, H.W. and Ross, A.F. (1967). *Virology* 33: 272-286.
12. 久保 進 (1971). 秦野たばこ試報 70: 1-42.
13. Milne, R.G. (1966). *Virology* 28: 520-526.
14. Milne, R.G. (1966). *Ibid.* 28: 527-532.
15. 森 寛一・細川大二郎・渡辺 実 (1982). 日植病報 48: 433-443.
16. Otsuki, Y., Shimomura, T. and Takebe, I. (1972). *Virology* 50: 45-50.
17. Oxelfelt, P. (1970). *Phytopath. Z.* 69: 202-211.
18. Pennazio, S., D'Agostino, G., Appiano, A. and Redolfi, P. (1978). *Physiol. Plant Path.* 13: 165-171.
19. Pennazio, S., Appiano, A. and Redolfi, P. (1979). *Ibid.* 15: 177-182.
20. Shimomura, T. (1971). *Ibid.* 70: 185-196.
21. 下村 徹 (1972). 日植病報 38: 75-80.
22. Spencer, D.F. and Kimmons, W.C. (1971). *Canad. Jour. Bot.* 49: 417-421.
23. Stobbs, L.W. and Manocha, M.S. (1977). *Physiol. Plant Path.* 11: 87-94.
24. Takahashi, T. (1973). *Phytopath. Z.* 77: 157-168.
25. Weintraub, M. and Ragetli, H.W.J. (1964). *J. Cell Biol.* 23: 499-509.

Explanation of plates

Plate I, 1~8 and plate II, 1~4: Progressive spread of the virus antigen and the development of necrotic local lesions in *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN leaves inoculated with tobacco mosaic virus were examined by fluorescent antibody staining (cross section). Plate II, 5~8: Progressive spread of virus antigen in *N. tabacum* cv. Samsun leaves (cross section) inoculated with tobacco mosaic virus. Areas containing the virus antigen show a yellow-green fluorescence.

Plate I.

1. Virus antigen was first detected 24 hr after inoculation in cell groups in the epidermal and palisade layers and in the next spongy parenchyma layer. ($\times 140$)
2. Progressive cell-to-cell spread of virus antigen was observed in a leaf sampled 28 hr after inoculation. ($\times 140$)
- 3 and 4. The stained area was in the form of a cell group extending from the upper epidermal to the lower epidermal layer 32 hr after inoculation. By this time, virus antigen was found in the phloem cells, suggesting that the long distance movement of virus had begun. (3, $\times 140$. 4, $\times 70$)
- 5 and 6. Necrosis was first found in one or two cells (arrow) of the upper spongy layer located in the central part of the stained area 36 hr after inoculation. (6, 7, $\times 140$)
- 7 and 8. Spread of cell necrosis (arrow) in the spongy layer was observed 40 hr after inoculation. (7, 8, $\times 140$)

Plate II.

1. Necrosis spread from the spongy to the palisade layer and then to the upper and lower epidermis in the stained area 44 hr after inoculation. ($\times 70$)
2. By 48 hr after inoculation necrosis had spread throughout most of the stained area and a necrotic local lesion was visible. ($\times 70$)
3. A few cells bordering the lesion which contained the virus antigen were seen without necrosis 48 hr after inoculation (arrow). ($\times 280$)
4. The accumulation of fluorescent metabolite (blue fluorescent) was observed in area bordering the lesion at a late stage (72 hr) of infection. ($\times 70$)
- 5 and 6. The progressive spread pattern of the virus antigen was the same as that of *N. tabacum* cv. Samsun NN 24 hr (5), and 28 hr (6) after inoculation. (5, 6, $\times 180$)
7. Virus antigen had spread widely in the leaf by 48 hr after inoculation. ($\times 180$)
8. The antigen can be seen in large masses in all cells 72 hr after inoculation. ($\times 140$)

Abbreviation: vb: vascular bundle.

Plate I

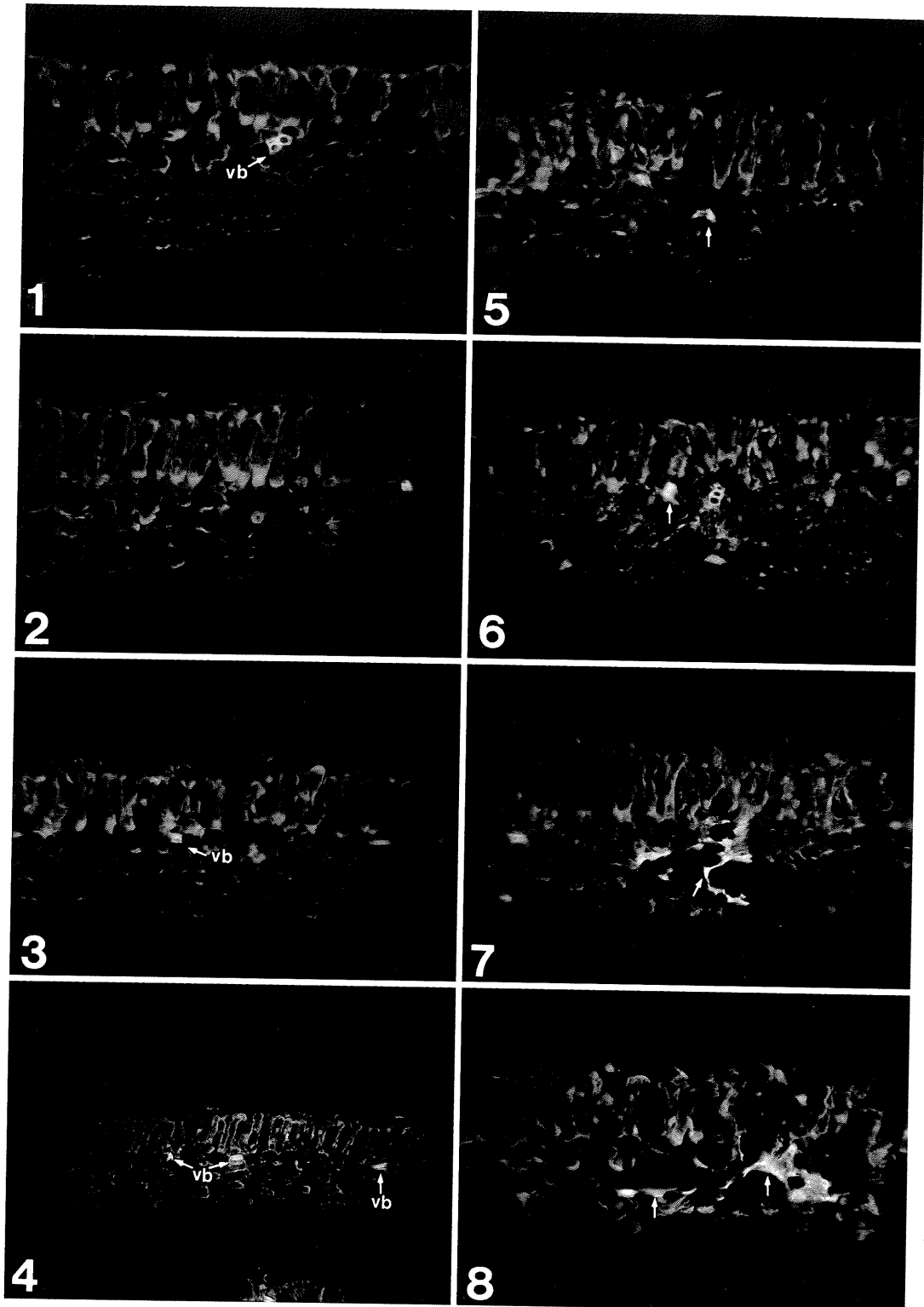


Plate II

