

斑入りタバコにおけるウイルスの感染と増殖に関する研究 (2) : Samsun Nc タバコの斑入り葉におけるTMVの感染と増殖

長尾, 記明
九州大学農学部植物病理学教室

<https://doi.org/10.15017/22278>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 35 (3/4), pp.129-136, 1981-07. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

斑入りタバコにおけるウイルスの感染と 増殖に関する研究

II. Samsun Nc タバコの斑入り葉における TMV の感染と増殖

長 尾 記 明

九州大学農学部植物病理学教室

(1981年3月26日 受理)

Studies on Infection and Multiplication of Plant Viruses in Variegated Tobacco Plants

II. Infection and Multiplication of Tobacco Mosaic Virus in Variegated Leaves of Tobacco Cultivar Samsun Nc

NORIAKI NAGAO

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-01, Fukuoka 812

緒 言

材料および方法

一般に宿主のウイルス感受性は宿主の持つ遺伝的素質のほか温度、湿度、光などの環境条件に関連する葉組織の生理的状态により大きく影響されることが知られている。このような現象は主として局部病斑を生じるウイルスと宿主との組み合わせで研究されてきた。その理由の1つは宿主のウイルスに対する感受性の程度が局部病斑数の多少として表わされ、数的処理が容易であることにある。

N因子を持つている斑入りタバコ (Samsun Nc) に TMV を接種すると接種葉に局部病斑を生ずる。本研究ではこの局部感染系を利用して、まず白色部と緑色部とにおける TMV の病斑形成能、局部病斑の拡大度および病斑部の TMV 量などを比較することにより両部位のウイルスに対する感受性の差異、ウイルスの増殖、移行について検討した。その結果、両部位のウイルスに対する反応に明らかな差が認められたので、さらにその原因究明の目的で局部病斑部組織の微細構造を電子顕微鏡により詳細に比較検討した。

本研究を遂行するにあたり終始ご指導とご鞭撻を賜わった九州大学農学部日高醇前教授ならびに本報告にあたり有益な助言とご校閲を頂いた九州大学農学部脇本哲教授に深謝の意を表する。

1. 供試ウイルス

当教室保存の TMV 普通系 (TMV—OM) を用い、接種源には精製 TMV を用いた。TMV の精製はタバコ (品種ブライトエロー) に TMV を接種して、2~3 週間後のモザイク葉を採取し、 -20°C で凍結保存後、久保の方法 (久保, 1971) に準じて行なった。TMV 濃度は分光光度計 (Beckman 社製, DU-2 型) で測定した OD 260nm の値 2.7 を 1 mg/ml として計算することにより求めた。

2. 供試植物

斑入りタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun Nc) は前報 (長尾, 1981) と同様な方法で育成した。ウイルス濃度の生物定量にはインゲン (*Phaseolus vulgaris* 品種改良大手亡) を用いた。インゲンは一鉢 2 本植とし、播種後 10~14 日目の初生葉を用い、接種前日に心止した。実験植物の育成は $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ のガラス室で行なった。

3. 斑入りタバコへの TMV の接種とウイルス濃度の検定

TMV を斑入り葉へ接種するためには精製して凍結

保存しているウイルス液（濃度 0.05~0.1 $\mu\text{g/ml}$ ）を接種源として用い、塗抹接種を行なった。接種葉上に形成された局部病斑部に含まれる TMV の定量のためにはインゲンの半葉法を用いて次のように行なった。TMV 接種後 2 日目、3 日目および 4 日目に斑入り葉の白色部と緑色部とから 2~4 枚ずつを採取し、それらの試料からそれぞれ大きさのそろった病斑（2 日目：直径 0.8~1.0 mm, 3 日目：1.5~1.8 mm, 4 日目：2.1~2.4 mm）各 20 個を切り取って、 -20°C の冷凍庫に保存した。各試料に 0.1 M りん酸緩衝液、pH 7.0 を 10 ml 加えて、ガラスホモゲナイザーで磨砕し、その磨砕液をインゲンの半葉に接種した。対半葉には精製 TMV (0.3~0.5 $\mu\text{g/ml}$) を接種した。1 試料の検定にインゲン葉 12~16 枚を用いた。接種 3 日後に現われた病斑を数え、TMV 濃度は検定区の病斑数を対照区の病斑数で割った値で示した。

4. 局部病斑部の電顕観察

TMV 接種後白色および緑色部に生じた 4 日目の局部病斑を試料とした。病斑内部と病斑周縁部とから採取した 1~2 mm の細片を前報（長尾, 1981）と同様な手順で固定・包埋し、切片を作成して電顕観察を行なった。

結 果

1. 白色部および緑色部における TMV 局部病斑形成能の比較

TMV 接種後 2 日または 3 日目に白色部と緑色部の同面積内に生じた局部病斑を数えた。実験は 5 回反復し、各実験には斑入りタバコ 8~10 本中から選んだ斑入り葉 10~12 枚を用いた。白色部の局部病斑数を緑色部の局部病斑数で割った値の各実験における平均値を Table 1 に示した。Table 1 にみられるように白色部は緑色部に比べて、1.6~2.6 倍数（平均 2.0 倍）の TMV 病斑を生じた。

緑色部に生じた局部病斑は周縁が濃褐色で中心は褐色あるいは淡褐色を呈するが白色部においては病斑周縁はごく淡い褐色で、中心部はさらに淡く、灰白色に近かった (Plate 5-1)。

2. 白色部および緑色部における TMV 局部病斑の拡大度の比較

斑入り葉に生じた接種後 2 日目の TMV 局部病斑

Table 1. Comparison of local lesion formation between white and green areas of variegated tobacco leaves inoculated with TMV.

Replicate ^{a)}	Ratio ^{b)}
I	1.6 \pm 0.2
II	2.6 \pm 0.3
III	1.9 \pm 0.2
IV	2.2 \pm 0.4
V	1.9 \pm 0.2

a) Ten to 12 variegated leaves were used for each experiments.

b) Ratio=No. of local lesions on white area/No. of local lesions on green area \pm standard error.

の中から、1 葉につき白色、緑色それぞれの部位で 2~5 個ずつを任意に選び、それらの病斑に番号をつけ、2 日から 5 日目まで毎日各病斑の直径を 7 倍のスケール (1/10 mm) 付ルーペを用いて測定した。各測定日における 30~40 個の病斑直径を Table 2 に示した。

接種後 2 日目の TMV 局部病斑の直径は白色部では約 0.8~1 mm, 緑色部では 0.7~0.9 mm であった。接種後の日数の経過に伴う病斑拡大率を 2 日目の病斑直径に対する割合で示した場合 3 日、4 日目では白色 1.9, 2.6; 緑色 1.8, 2.5 であり、両部位における病斑の拡大率は接種後の日数の経過と共に減少する傾向を示した。白色部における局部病斑の直径に対する緑色部の病斑直径の比は 2 日から 4 日目の間では 1.1~1.2 であり、5%または 1%の水準で有意差が認められた。したがって緑色部位より白色部位においてやや大きい TMV 病斑が生じ、その後の病斑の拡大も若干大きいと言える。しかし白色部位では病斑は 4 日目を過ぎると互いに融合し、流れることが多く、特に葉の周縁部でその傾向が強かった。

3. 白色部および緑色部の局部病斑に含まれる TMV 濃度の比較

緑色部位に形成された局部病斑部の TMV 濃度は白色部位でのその濃度に比べて著しく高く、2 日目、3 日目および 4 日目にそれぞれ 0.7~2.8 倍、2.0~4.7 倍、2.1~6.3 倍であった。また TMV の増加率は緑色部位の病斑において大であり、両部位における病斑部の TMV 濃度差は接種 3 日目以降でより大きくなった (Table 3)。病斑拡大に伴う TMV 濃度の増加は両部位において 2 日から 3 日目の方が 3 日から 4 日の間よりも高かった。

Table 2. Enlargement of local lesions on white (W) and green (G) areas of variegated tobacco leaves inoculated with TMV.

Replicate	Days after inoculation	Diameter of local lesion (mm)		Ratio of W/G ^{a)}
		W	G	
I	2	0.84±0.03 ^{b)}	0.73±0.03	1.2**
	3	1.62±0.06	1.38±0.04	1.2**
	4	2.23±0.08	2.01±0.06	1.1**
	5	— ^{c)}	2.60±0.10	—
II	2	1.05±0.04	0.91±0.04	1.2**
	3	2.21±0.07	1.91±0.07	1.2**
	4	3.18±0.12	3.01±0.09	1.1
	5	—	3.61±0.10	—
III	2	0.79±0.02	0.72±0.02	1.1
	3	1.59±0.05	1.38±0.07	1.2*
	4	2.23±0.14	1.97±0.10	1.1*
IV	2	0.99±0.03	0.91±0.02	1.1*
	3	1.80±0.05	1.50±0.03	1.2**
	4	2.36±0.08	2.00±0.08	1.2**

a) Diameter of local lesions on white area/Diameter of local lesions on green area.

b) Average diameter of local lesions±standard error. *: P=0.05, **: P=0.01.

c) Could not measure due to withering of the surrounding tissue.

Table 3. TMV concentration in local lesions produced on white (W) and green (G) areas.

Replicate	Area	Days after inoculation		
		2	3	4
I	W	0.03	0.13	0.16
	G	0.02	0.54	0.68
	G/W	0.7	4.2	4.3
II	W	0.08	0.14	0.12
	G	0.11	0.66	0.74
	G/W	1.4	4.7	6.3
III	W	0.09	0.18	0.35
	G	0.25	0.55	1.16
	G/W	2.8	3.1	3.3
IV	W	—	0.30	0.42
	G	0.10	0.60	0.89
	G/W	—	2.0	2.1

4. 白色部と緑色部とに生じた局部病斑部の微細構造および TMV 粒子の存在状態の比較

(1) 局部病斑内部

白色および緑色両組織における局部病斑内部の細胞では共に central vacuole が消失し、細胞内のすべての器官は崩壊して、細胞質は凝集し電子密度が著しく高くなっていた。また細胞全体は収縮し、細胞間隙が顕著に増加していた (Plate 5-3, 4)。緑色組織ではそれらの中にこわれた膜状物が密に集まり、澱粉顆粒が集積していた (Plate 5-4, 5)。また変質した細

胞質よりもさらに電子密度の高い不定形の物質が散在していた (Plate 5-4, Plate 6-1)。白色組織では緑色組織と比較して、変質した細胞内に膜状物が少く、電子密度も低いので、リボソーム粒子が多く観察された (Plate 6-3)。また澱粉顆粒は見られず、円形の電子密度の高い顆粒が凝集あるいは分散して存在していた (Plate 5-3, Plate 6-3)。

TMV 粒子はこれらの電子密度の高い変質細胞質中に結晶状に配列するかあるいは大きな集団として見られることが多く、緑色組織においては 12, 13 層の柵状に配列した集団となっている場合も観察された (Plate 6-1, 2)。これらの TMV 集団内には崩壊した細胞器官は含まれていなかった。

白色組織では 5, 6 層の TMV 粒子の柵状集団も見られたが一般に 1~3 層の小集団の形で散在することが多かった (Plate 6-3)。

(2) 局部病斑周縁部

白色組織においても緑色組織においてもえ死を起こした細胞では変質した核や仁、ミトコンドリアなどが識別できることが多かった (Plate 7-2)。細胞質は病斑内部の場合と同じように変質凝集し、部分的に細胞壁から分離し、TMV 粒子は細胞質内のほかそれらの間隙に散在していた (Plate 7-1)。え死を起こしつつあると思われる細胞では原形質分離を起こし、tonoplast が崩壊して、細胞器官や TMV 粒子が central vacuole 内に散在していた。またこの時期には細胞膜の連続性

を失う細胞が多く見られた (Plate 7-5, Plate 8-1)。緑色組織においては葉緑体はまずラメラ構造の変化と基質の膨潤をおこし、それに伴って葉緑体膜の崩壊を生じ (Plate 7-3, 4), またこれらの葉緑体内では脂肪体が多く見られた。葉緑体以外の細胞内容の変化については白色組織において観察された所見と著しい差異は認められなかつた。

同じ程度にえ死化の進んだ白色および緑色両組織の細胞を比較したところ、ともに原形質分離を起している細胞でも細胞質膜の連続性を失った細胞の頻度は緑色組織において少ない傾向が認められた。また tonoplast のこわれた細胞で TMV 粒子が観察される頻度は白色組織よりも緑色組織で高く、ほとんどの細胞に存在していた。

(3) 病斑外部

え死化の始まった細胞の数層外側の細胞まで細胞質膜は波状を呈し、細胞壁と細胞質膜との間に小 vesicle 様のものが見られることが多かつた (Plate 8-2, 4, Plate 9-1, 3)。そのため plasmodemata が細胞質膜との間で消失しているような像も認められた (Plate 8-4)。また細胞壁がカロスと思われる物質の沈着により肥厚している細胞も見られた (Plate 9-1)。これらの形態学的変化については白色および緑色組織との間に顕著な差異は認められなかつた。

白色組織の細胞内で見られる plastid は好オスミウム顆粒に富み、それらは大小種々の集団となつて存在していた (Plate 9-1, 2)。細胞質内にはリボソームを伴う ER (粗面小胞体) およびミトコンドリアが多く観察され、結晶を有する spherosome も観察された (Plate 9-2)。TMV 粒子はえ死を起した細胞より数層外側の細胞でも見られ、1, 2層の柵状に配列したものが多かつた (Plate 8-2)。

緑色組織の細胞では葉緑体は細長く凹凸のある形を呈するものがかなり見られた。またミトコンドリアの基質が消失したと思われるもの、あるいは変形したものもあつた (Plate 9-4)。TMV 粒子は1~4層に配列した集団の形で存在するかあるいは細胞質内に散在していた (Plate 8-3)。え死化した細胞より離れるにしたがつて正常な形態に近い細胞内器官および細胞質膜が観察された。

白色、緑色いずれの組織においても細胞内器官である核、葉緑体または plastid, ミトコンドリア内では TMV 粒子は全く見られなかつた。

考 察

斑入り葉にキュウリモザイクウイルス (CMV) を接種した場合、白色部のウイルス濃度が緑色部より常に高いことを前報 (長尾, 1981) で明らかにし、両部位の間にはウイルスに対する感受性に差があるものと考えた。

本実験においては局部病斑系の宿主-ウイルスの組み合わせを用い、斑入りタバコの緑色部と白色部とにおけるウイルスの感染と増殖を比較した。

McLaren *et al.* (1970) および Wenzel (1970) はタバコ斑入り葉に TMV を接種したところ、生じた病斑数には緑色部と白色部との間で差が認められなかつたと報告している。ところが筆者の結果は彼等の結果とは異なり、白色部において緑色部よりも約2倍多数の病斑を形成した (Table 1)。この結果は前報 (長尾, 1981) で得られた全身感染系での CMV 増殖量が緑色部よりも白色部で高いことと相関しており、ウイルスに対する組織の感受性が白色部で高いことを示している。

斑入り葉の両部位で生ずる TMV の局部病斑直径には1%または5%水準で有意差があり、局部病斑は緑色部におけるよりも白色部において拡大する傾向を示した。しかし局部病斑部から回収される TMV 量は緑色部で高く、接種後3, 4日目では白色部の病斑から回収される量の2~6倍であつた。また局部病斑の色においても差があることから両部位における病斑形成過程に質的差異があるものと思われる。

ウイルスを接種した場合に宿主上に生じる局部病斑の数、大きさ、色およびその病斑から回収されるウイルス量などはウイルスと宿主との組み合わせの違いにより大きく異なることが知られている。「大沢・山口 (1970) の報告によると TMV とインゲンとの組み合わせでは病斑直径が約1mm になるとその拡大が停止するが *Nicotiana glutinosa* や Samsun NN では時間の経過と共に病斑は拡大し、接種後100時間ごろの接種葉から回収される TMV 量はインゲンの場合を1とすれば *N. glutinosa* では2, Samsun NN では105となり、局部病斑の質により回収されるウイルス量も異なるという。本実験で得られた斑入り葉の白色部と緑色部とにおける局部病斑の質的差異は組織がクロロフィルを持つか持たないかにより派生する光合成能の差またはそれによつて生じる組織の生理的状態の差異に関連していると思われる。これらを解析する手段として電顕を用いて白色部と緑色部との局部病斑部組織

の微細構造を詳細に比較した。

今までに斑入りあるいはアルビノ植物に生じた TMV 局部病斑の微細構造を明らかにしたものはないが、*Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum* var. *Samsun NN*, インゲン, *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium* などに生じた局部病斑部の微細構造およびそれらの細胞内における TMV 粒子の存在状態を明らかにした報告はかなり多い (Weintraub and Ragetli, 1964; Hayashi and Matsui, 1965, 1966; Carroll and Shalla, 1965; Milne, 1966; Carroll, 1966; Israel and Ross, 1967; Ross and Israel, 1970; Spencer and Kimins, 1971; Da Graca and Martin, 1975)。したがって白色部と緑色部とに生じた局部病斑部の微細構造の比較においては、特にえ死化に伴う細胞の崩壊過程およびえ死細胞内の TMV 粒子の存在状態に重点を置き比較した。

白色部の局部病斑内部の細胞は緑色部のものと比較して、一般に電子密度が低く、澱粉顆粒の集積も見られず、膜状物も少なかった。したがって緑色組織のえ死細胞で見られる膜状物は主として葉緑体のラメラ構造の崩壊物に由来するものと思われる。このことは澱粉顆粒の周囲に膜状物が層状にとり囲んでいる像が観察されることから裏づけられる。白色組織のえ死細胞では変質した細胞質内に電子密度の高い円形顆粒が集合あるいは分散して見られた。これらの顆粒は plastid 内に集合した形で局在していた好オスミウム顆粒が plastid 崩壊後もこわれずに残ったものであり、緑色組織で見られる高電子密度の不定形物質とは質的に異なるものである。

病斑周縁部組織では細胞のえ死化の種々の段階の像が観察され、白色組織においても緑色組織においてもその第 1 段階は細胞質膜の細胞壁からの分離即ち原形質分離であった。ついで tonoplast の崩壊が起こり、central vacuole が消失した。この段階での葉緑体は大きな澱粉顆粒を含み、ラメラ構造が変化し、基質の膨潤に伴ってついでには葉緑体膜が崩壊するようであった。白色組織では基質の膨潤した plastid も見られたが、葉緑体ほど顕著に変化することなく崩壊するようであった。またえ死化の程度がほぼ同じと思われる細胞の形態的变化を両組織で比較したところ、白色組織においては細胞質膜の連続性が緑色組織よりも早く失われ、plastid 膜の崩壊よりも早いようであった。

Da Graca and Martin (1975) は TMV と Samsun NN の系でまず葉緑体が膨潤して崩壊し、それに引き続いて tonoplast がこわれると報告している

が、本観察所見では plastid あるいは葉緑体膜の崩壊よりも tonoplast の崩壊の方が早いようであった。病斑周辺部の細胞では健全細胞と比較して ER、リボソーム、ミトコンドリアなどが豊富に分布しており、細胞の生理活性が高いことが知られている (下村, 1978) が、本実験でも白色、緑色両組織の病斑周縁細胞で同様の結果が観察された。

近年、種々のウイルスと宿主との組み合わせで、局部病斑周辺部の細胞では健全組織の細胞に見られない各種の形態的变化が報告されている。主なものは paramural body の形成 (Spencer and Kimmins, 1971)、カロースの集積 (Esau, 1967; Wu *et al.*, 1969; Wu and Dimitman, 1970; Tu and Hiruki, 1971; Hiruki and Tu, 1972; Simons *et al.*, 1972; Allison and Shalla, 1974; Shimomura and Dijkstra, 1975) あるいは結晶を有する spherosome の存在 (Israel and Ross, 1967) などであり、これらがウイルスの細胞間移行を阻害し、その局在化に関与している可能性を論じた報告が多い。しかし全身感染宿主においてもウイルス接種後 1, 2 日目に葉を熱水、氷水、紫外線などで処理するか、またはアクチノマイシン D, クロモマイシン A₃ などの薬剤で処理すればウイルス感染部位に局部病斑と類似のえ死斑が形成されることが知られており (下村, 1978)、局部病斑の形成機構およびウイルスの局在化の機構は未だ十分に解明されているとはいえない。

白色および緑色組織のいずれにおいてもえ死細胞を取りまく細胞では細胞質膜が波状を呈し、細胞壁との間にできた間隙に vesicle 様構造物が認められ、また細胞壁の肥厚なども観察されたが、白色、緑色両組織の間ではこれらの形態的变化に顕著な差異は見られなかった。

局部病斑部における TMV 粒子の存在状態は白色組織では緑色組織で見られるような大きな柵状集団を形成しているのはまれであり、また病斑周辺部の細胞で TMV 粒子が観察される頻度は緑色組織よりも白色組織において低い傾向が認められた。これらの観察結果は TMV 感染に伴う細胞え死化の過程が白色組織と緑色組織とで異なることを示しており、白色部に生じた局部病斑部の TMV 量が緑色病斑部のそれよりも低い原因は前者の細胞では後者のそれに比較してより早く細胞機能の低下が起こり、TMV が十分に増殖する前にえ死することにあると考えられる。これは細胞え死化の初期段階における細胞質膜の連続性が緑色組織よりも白色組織において早く失われる事実から得

られた仮説である。

白色組織での病斑が緑色組織でのそれに比べて大きくまた融合し流れ易い理由を解明する目的で両組織における病斑周辺部細胞の形態的变化を詳細に比較観察したが顕著な差異が認められず、本実験ではその原因を明らかにすることはできなかつた。

白色組織はクロロフィルをほとんど含んでいないので、緑色組織から移送される光合成関連物質に依存し生きているものと考えられ、傷害に対しても緑色組織より弱い。このような組織にえ死細胞の集団が点在すれば当然養分の補給経路は遮断され、これが病斑を流れ易くする直接的要因になっているのではないかと考えられる。

要 約

タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun Nc) の斑入り葉の白色部と緑色部とにおける TMV の感染・増殖を比較した。

1. TMV 局部病斑は白色部において多く現われ、その数は緑色部における病斑数の約 2 倍であつた。

2. 局部病斑の拡大は白色部においてやや速やかであつたが、接種 3, 4 日目の病斑部から回収される TMV 量は緑色部の病斑において高く、白色部の病斑から回収される量の 2~6 倍であつた。

3. 白色部と緑色部とにおける 4 日目の局部病斑の内部およびその周縁部組織を電顕観察して、細胞え死に伴う崩壊過程と TMV 粒子の存在状態を詳細に比較した結果次のような所見が得られた。

1) 白色および緑色両組織における局部病斑内部の細胞は完全に崩壊し、収縮して星形を呈した。これらの細胞においては TMV 粒子は変質した細胞質内に結晶状に集合した状態で存在し、白色細胞より緑色細胞でより大きな集団を形成し、またその数も緑色細胞で多かつた。

2) 病斑周縁部の組織においては細胞え死化の種々の段階の像が見られ、え死化の第 1 段階は原形質分離と tonoplast の崩壊であつた。これに続いて plastid または葉緑体と細胞質膜の崩壊が起こつた。細胞質膜の連続性は緑色組織より白色組織でより早く失われた。TMV 粒子は白色および緑色細胞のいずれにおいても tonoplast の崩壊によつて細胞質内に散在していた。

3) 病斑を取り巻く細胞内で見られる形態的变化においては白色、緑色両組織の間に顕著な差異が認められなかつた。TMV 粒子はえ死細胞の数層外側の細胞

においても見られた。

4) 以上の結果から、白色部の TMV 感受性 (病斑形成数) は緑色部のそれに比べて高いにもかかわらず白色病斑部の TMV 量が緑色病斑部の量に比べて低い原因はウイルス増殖に伴う細胞え死化が白色細胞において緑色細胞におけるよりもより早く現れ、TMV が十分に増殖する前に細胞機能の低下を引き起こすためと考えられる。

文 献

- Allison, A. V. and T. A. Shalla 1974 The ultrastructure of local lesions induced by potato virus X: a sequence of cytological events in the course of infection. *Phytopathology*, 64: 784-793
- Carroll, T. W. 1966 Lesion development and distribution of tobacco mosaic virus in *Datura stramonium*. *Phytopathology*, 56: 1348-1353
- Carroll, T. W. and T. A. Shalla 1965 Visualization of tobacco mosaic virus in local lesions of *Datura stramonium*. *Phytopathology*, 55: 928-929
- Da Graca, J. V. and M. M. Martin 1975 Ultrastructure changes in tobacco mosaic-induced local lesions in *Nicotiana tabacum* L. cv. "Samsun NN". *Physiol. Plant Pathol.*, 7: 287-291
- Esau, K. 1967 Anatomy of plant virus infections. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 5: 45-76
- Hayashi, T. and C. Matsui 1965 Fine structure of lesion periphery produced by tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 55: 387-392
- Hayashi, T. and C. Matsui 1966 Electron microscopy of dark green spots on leaves of *Nicotiana glutinosa* induced by tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 56: 192-196
- Hiruki, C. and J. C. Tu 1972 Light and electron microscopy of potato virus M lesions and marginal tissue in Red kidney bean. *Phytopathology*, 62: 77-85
- Israel, H. W. and A. F. Ross 1967 The fine structure of local lesions induced by tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 33: 272-286
- 久保 進 1971 タバコモザイクウイルスの感染ならびに増殖に関する研究. 秦野たばこ試報, 70: 1-41
- McLaren, A. D., J. Kirwan, O. Hidalgo-Salvatierra, E. D. Owen and C. A. Knight 1970 Photoreactivation on ultraviolet irradiation-inactivated RNA from tobacco mosaic virus on white leaves of a variegated mutant of

- Xanthi tobacco. *J. Virol.*, 7: 167-168
- Milne, R. G. 1966 Electron microscopy of tobacco mosaic virus in leaves of *Chenopodium amaranticolor*. *Virology*, 28: 520-526
- 長尾記明 1981 斑入りタバコにおけるウイルスの感染と増殖に関する研究 I. 斑入り葉におけるキュウリモザイクウイルスの増殖. 九大農学芸誌, 35: 121-128, 3 図版
- 大沢 淳・山口 昭 1970 局部病斑植物の接種葉内でのタバコモザイクウイルスの増殖様式とえそ病斑の質との関係. 日植病報, 36: 254-259
- Ross, A. F. and H. W. Israel 1970 Use of heat treatments in the study of acquired resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. *Phytopathology*, 60: 755-770
- 下村 徹 1978 局部感染宿主におけるウイルス抵抗性. 植物病理化学最近の進歩. 植物病理化学最近の進歩刊行会, 名古屋, 25-40 頁
- Shimomura, T. and J. Dijkstra 1975 The occurrence of callose during the process of local lesion formation. *Neth. J. Plant Path.*, 81: 107-121
- Simons, T. J., H. W. Israel and A. F. Ross 1972 Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on tobacco mosaic virus lesions. *Virology*, 48: 502-515
- Spencer, D. F. and C. W. Kimmins 1971 Ultrastructure of tobacco mosaic virus lesions and surrounding tissue in *Phaseolus vulgaris* var. Pinto. *Can. J. Bot.*, 49: 417-421
- Tu, J. C. and Hiruki, C. 1971 Electron microscopy of cell wall thickening in local lesions of potato virus-M infected Red kidney bean. *Phytopathology*, 61: 826-868
- Weintraub, M. and H. W. J. Ragetli 1964 An electron microscope study of tobacco mosaic virus lesions in *Nicotiana glutinosa* L., *J. Cell Biol.*, 23: 499-506
- Wenzel, G. 1970 Grad der Tabakmosaik-Virus. Infektion in Tabakblättern mit gestortem Photosystem II in den Chloroplasten. *Phytopath. Z.*, 67: 370-372
- Wu, J. H., L. M. Blakely and J. E. Dimitman 1969 Inactivation of a host resistance mechanism as an explanation for heat activation of TMV-infected bean leaves. *Virology*, 37: 658-666
- Wu, J. H. and J. E. Dimitman 1970 Leaf structure and callose formation as revealed by UV irradiation studies. *Virology*, 40: 820-827

Summary

The sensitivity of white (W) and green (G) areas of variegated tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun Nc) to infection and multiplication of tobacco mosaic virus (TMV) was compared.

1. The number of local lesions produced on W was double of that on G.

2. The enlargement of local lesions was relatively faster on W, however, TMV concentration at 3-4 days after inoculation was 2-6 times higher in the lesions produced on G as compared to that in the lesions on W.

3. The central and marginal tissues of local lesions developed on W and G were observed by electron microscopy to clarify the processes of collapse and necrotization of cells in relation to TMV multiplication. The results are as follows.

1) In the central tissues of lesions on both areas of W and G, all cells were completely collapsed, shrunken and star-shaped. In these cells, TMV particles were aggregated in crystalline form in altered electron-dense cytoplasm. The size and number of the virus-aggregates in G cells were greater than those in W cells.

2) In marginal tissues of the lesions, various stages of cell necrotization were observed. The first events of cell necrotization were plasmolysis and rupturing of tonoplast. Following these events, the plastids or chloroplasts burst and the continuity of the cytoplasmic membrane was lost. In W tissues, however, the loss of continuity in the cytoplasmic membrane occurred earlier than bursting of plastids. TMV particles were scattered in the cytoplasm with bursting of the tonoplast in W and G cells.

3) No remarkable difference was observed in the ultrastructure of margins of the lesions from W and G. TMV particles were observed in the cytoplasm of sever-

al cells beyond the necrotic region.

4. From these results, the fact that TMV concentration in local lesions on W is lower than that in the lesions on G, contrasting to higher sensitivity (in terms of lesion formation) of the former than the latter, may be attributed to the rapid cell necrotization in W cells as compared to that in G cells resulting in early inhibition of virus multiplication.

Abbreviations for figures of plates

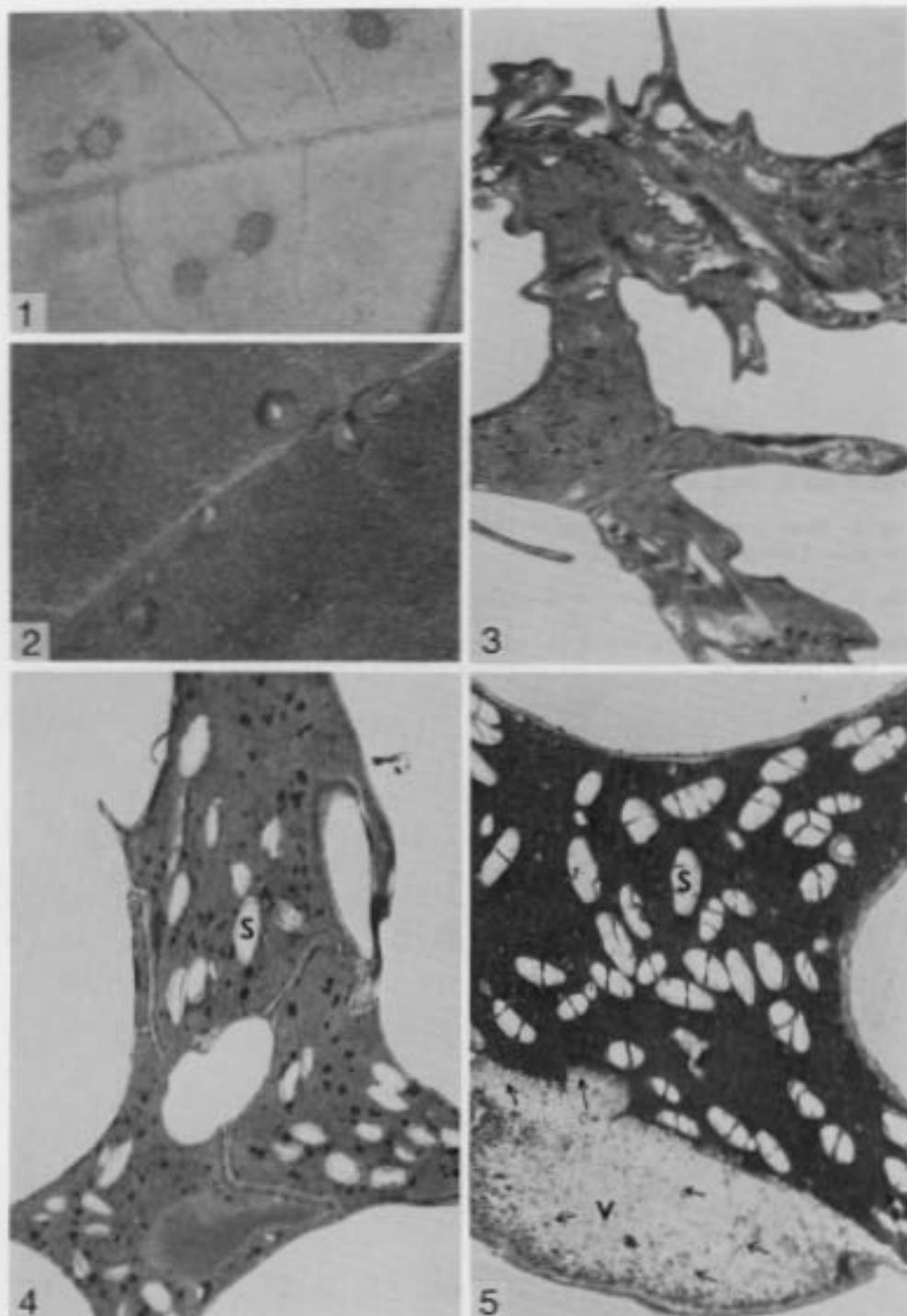
Ch	chloroplast	P	plastid
CM	cytoplasmic membrane	Pd	plasmodesmatum
ER	endoplasmic membrane	R	ribosome
G	granum	S	starch
L	lipid	Sp	spherosome
M	mitochondrion	V	virus particles
N	nucleus	Va	vacuole
OG	osmiophilic globule	Ve	vesicle

Explanation of Plate 5

Figs. 1 and 2. TMV local lesions appeared on white (Fig. 1) and green (Fig. 2) areas of variegated tobacco leaves.

Figs. 3 and 4. Typical features of necrotic cells in the central part of local lesions produced on white (Fig. 3) and green (Fig. 4) areas. Many starch grains can be seen in Fig. 4, but not in Fig. 3. $\times 4,500$ (Fig. 3), $\times 4,200$ (Fig. 4).

Fig. 5. A part of necrotic cell of the local lesion in the green area. Many TMV particles (arrows) can be seen in the space between the dense cytoplasm and cell wall. $\times 5,500$.



Samsun No. 2 タバコの混入り葉での TMV の感染・増殖

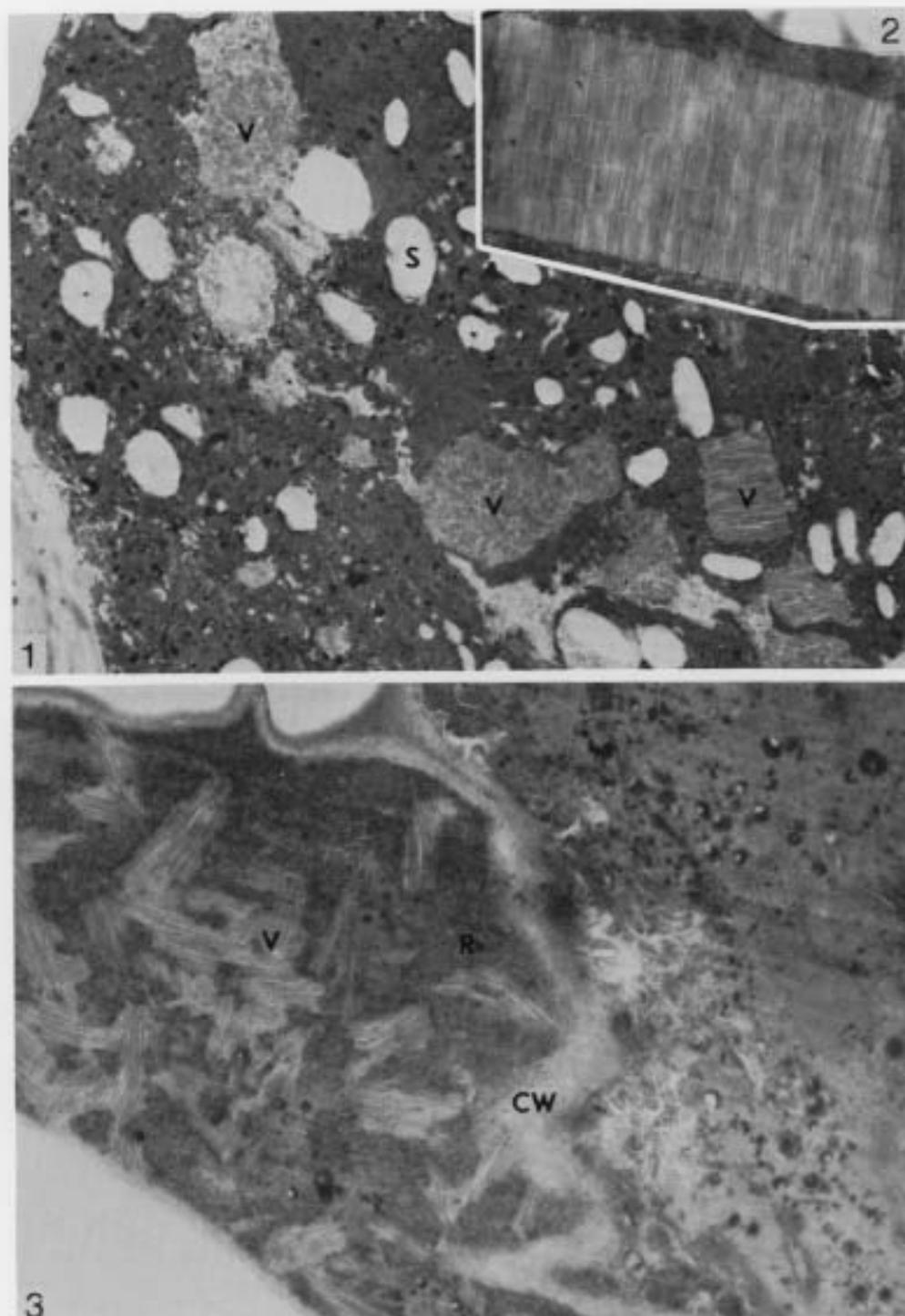
Explanation of Plate 6

Figs. 1 and 2. Parts of necrotic cells of the lesions in the green area.

Fig. 1. Many crystalline aggregates of TMV particles and starch grains are embedded in the altered cytoplasm. $\times 6,000$.

Fig. 2. TMV particles are arrayed in parallel in crystal form. $\times 22,000$.

Fig. 3. A part of necrotic cell of the lesion in the white area. The small parallel arrays of TMV particles and ribosomes are embedded scattering in the altered cytoplasm (left cell). $\times 18,000$.



Samsun Nc タバコの斑入り葉での TMV の感染・増殖

Explanation of Plate 7

Figs. 1-5. Sections showing different stages of the necrotization of the cells at a peripheral part of local lesions.

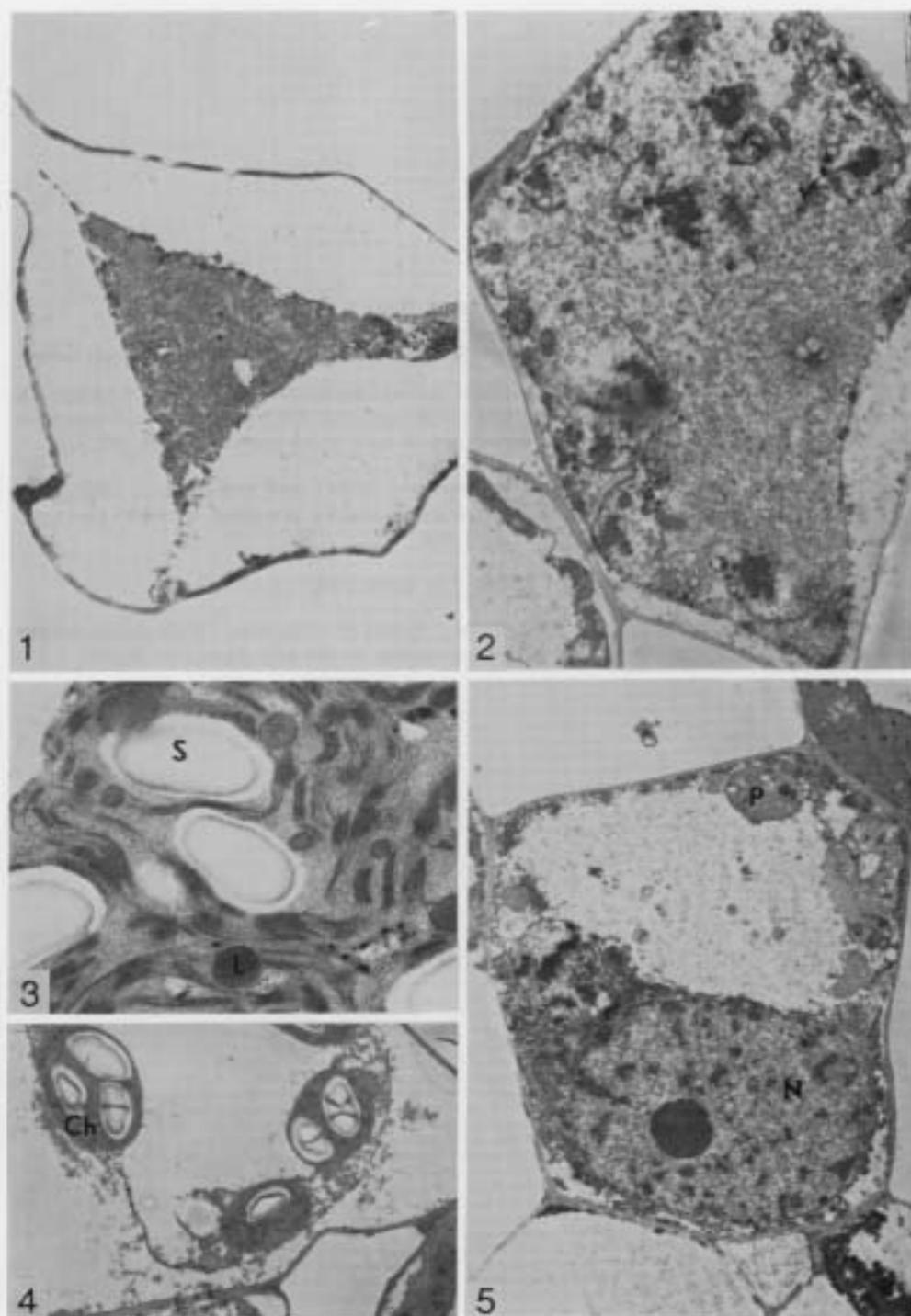
Figs. 1 and 2. A part of mesophyll cell of the lesion in white area at a later stage of necrotization. Altered cytoplasm containing small TMV aggregates is shrinking, and is separated from the cell wall. $\times 4,700$.

Fig. 2. A part of mesophyll cell of the lesion in white area at middle stage of necrotization. Cell organs are destroyed but the cytoplasm is not shrunken. $\times 5,000$.

Fig. 3. A part of mesophyll cells of the lesion in green area. Chloroplasts are closely associated one another, whose membranes are ruptured and thylakoidal system are locally displaced by starch grains and lipoidal globules. $\times 18,000$.

Fig. 4. Cytoplasmic membrane is ruptured and chloroplasts are swelling but not collapsed. $\times 4,000$.

Fig. 5. A part of mesophyll cells of the lesion in white area. Cytoplasmic membrane and tonoplast are ruptured but cytoplasmic organs are discernible clearly. $\times 4,300$.



Samsun No. 2 タバコの斑入り葉での TMV の感染・増殖

Explanation of Plate 8

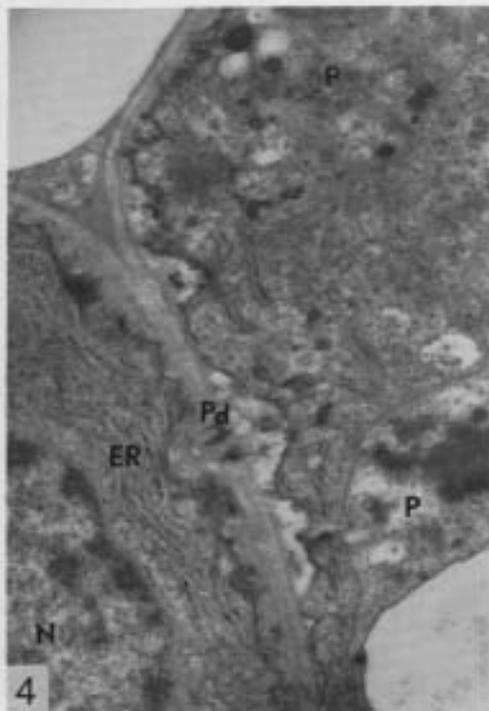
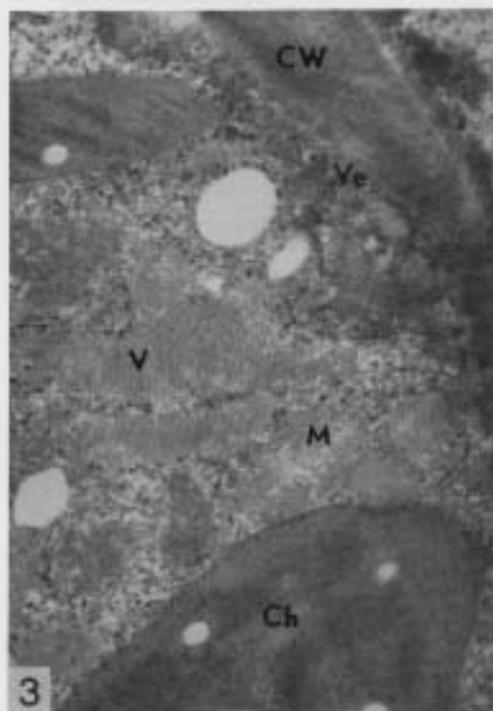
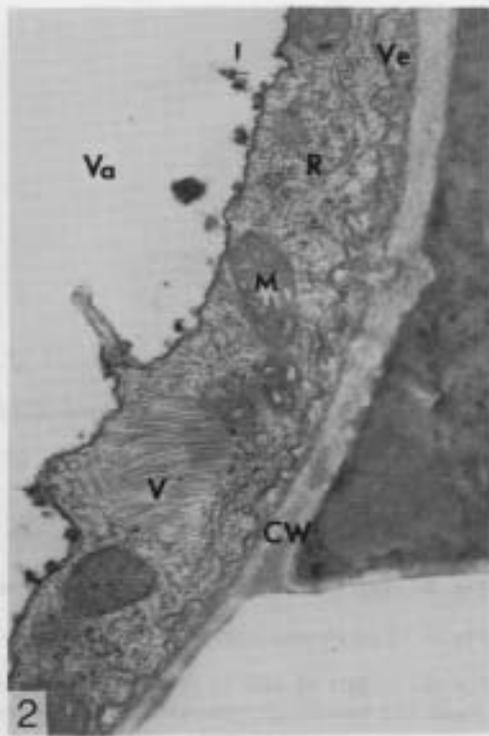
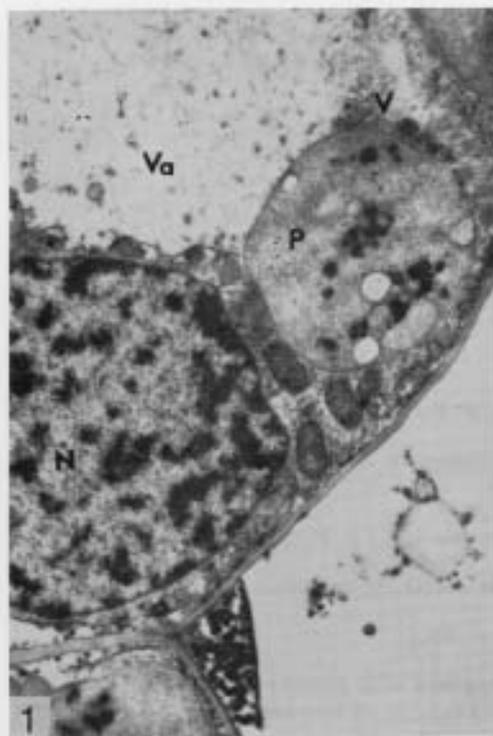
Figs. 1-3. Sections showing parts of mesophyll cells from the peripheral part of local lesions.

Fig. 1. A part of a cell at an early stage of necrotization in white area. Cytoplasmic membrane lost its continuity. The tonoplast is ruptured and TMV particles are scattered in the vacuole. The nucleus, plastid and mitochondria seem to be normal. $\times 10,000$.

Fig. 2. A part of the interface between the necrotic (right) and non-necrotic (left) cells of white area containing TMV particles. Note small vesicles presented between the cytoplasmic membrane and cell wall (left). $\times 34,000$.

Fig. 3. A part of a cell correspondent to Fig. 2 in green area. $\times 18,000$.

Fig. 4. A part of cells in adjacent area of local lesions of white area. Note sealed plasmodesmata and abundant profile of endoplasmic reticulum in the cytoplasm. $\times 16,000$.



Samsun Ne タバコの葉入り葉での TMV の感染・増殖

Explanation of Plate 9

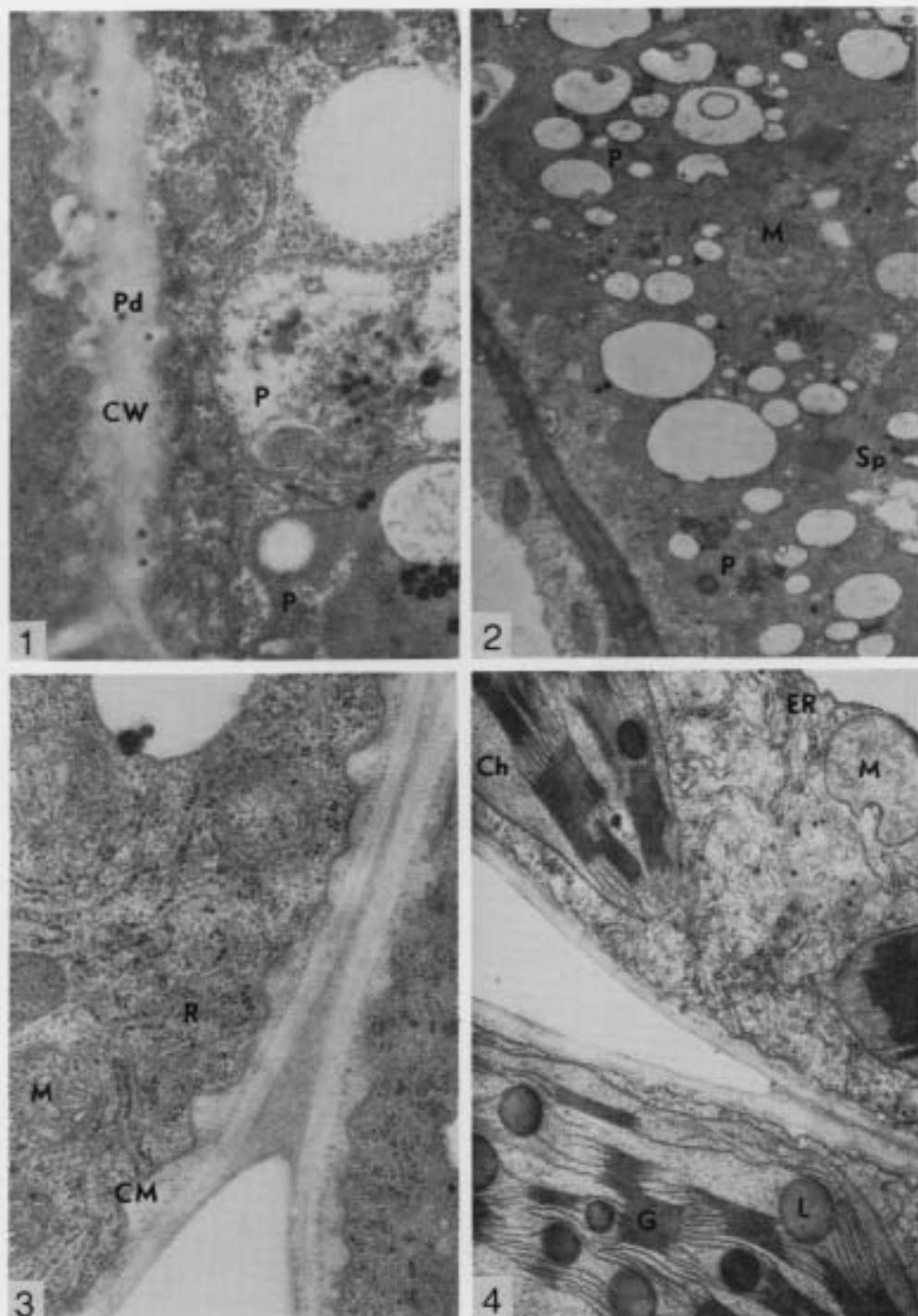
Figs. 1-3. Sections showing various parts of mesophyll cells surrounding local lesions in white area.

Fig. 1. Cell wall is thickening and a plastid is swelling. $\times 21,000$.

Fig. 2. Aggregates of plastids and spherosomes containing crystals. $\times 16,000$.

Fig. 3. Cytoplasmic membrane is waving. $\times 41,000$.

Fig. 4. A part of cells in green area. In comparison with healthy cells, ER in the cytoplasm and lipoidal globules in chloroplasts seems to be much increased in number. $\times 23,000$.



Samsun Nic. タバコの斑入り葉での TMV の感染・増殖