Alfalfa Mosaic Virus の全身感染に見られる 2, 3 の現象

I. 壊疽病徴発現に関係する要因

三 沢 正 生 ・ 工 藤 晟*

SOME PHENOMENA OBSERVED IN SYSTEMIC INFECTION OF ALFALFA MOSAIC VIRUS

I. Factors concerned with necrotic symptom development

Tadao MISAWA and Akira KUDO*

Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan

[受付: 9月2日, 1971年]

総 括

本報告は、アルファルファモザイクウイルス (AMV) とソラマメとの間で認められる全身感染に伴う壊疽病徴発現の条件を検討したものである。

1) 接種葉でのウイルスの増加は、上位葉で急速であり、age の進んだ下位葉では少ない。壊疽病斑の形成は、接種葉のウイルス増加の程度と密接な関係が認められ、接種葉の葉位が高い方が、壊疽病斑の発現が多い。

2) 接種を葉・葉柄・茎のいずれに行なつても、上位葉あるいは茎の上方部位に接種した場合には、頂部葉壊疽はほとんど同じ時期に発現する。下位葉と茎の下方部位に接種した場合には、頂部葉壊疽は発現し難い。

3) 接種源濃度は、頂部葉壊疽の発現に影響を与える。接種源濃度が大きければ、接種葉に生ずるウイルス量は多くなり、頂部葉壊疽の発現率は高くなる。

4) 頂部葉壊疽の発現は、頂部葉の生育時期と関係がある。接種時に葉長が約24mm 以下の幼葉にのみ症状が生じ、これ以上生長している葉には生じない。

序 文

ウイルスに感染した植物の示す病徴は多種多様と云えるが、その発現機構に関する報告には、局部感染による局部壊死斑を対象とするものと、全身感染病徴のうち、

モザイク斑を対象とするものがある。いずれを対象とした研究も未だ不明のことが多いが、特にモザイク斑の形成については、観察データをさらに集積する必要がある。

著者らは、アルファルファモザイクウイルスに全身感染したソラマメに生ずる壊疽病徴の発現について、実験を行なつたので、その結果をここに報告する。

材料および実験方法

本実験に用いたアルファルファモザイクウイルス (AMV) は、1966年秋期および翌年春期に、宮城県岩出山町・県営種畜場採草地の黄色モザイク症状を呈していたラジノクローバー (*Trifolium repens* L. var. Ladino) から分離同定したものである。ウイルスの接種用液は、罹病ソラマメ株の壊疽症状を呈している上位葉、あるいは茎に、その重量に対して5倍(W/V)の0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて磨碎・搾汁したものである。

供試植物は、ソラマメ (*Vicia faba* L. 品種は早生ソラマメ) を使用し、屋外およびガラス室内で鉢栽培した。多くの場合、展開葉数が4~6葉の生育時期の株を実験に用いた。本報告では、展開葉とは葉身の最長部分が約40mm 以上のものとし、最下位の本葉を第1葉と呼ぶこととした。

接種は、カーボランダムを使用した摩擦接種法により、各葉位の複葉のそれぞれに行なつた。接種後、株は24°C の自然光ファイトロン内に保つた。

感染葉のウイルス濃度検定は各葉から直径7 mm の円

(東北大学農学部)

* 現在一農林省園芸試験場(平塚)

Present address: Horticultural Research Station,
Hiratsuka.

板を1枚ずつ切り取り、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を0.1ml 加え磨砕し、その搾汁をササゲ (*Vigna sinensis*, 品種は黒種三尺) の初生葉に接種し、Growth Cabinet (25~28°C, 12,000 Lux, 12時間照明) 内に置き、24~30時間後形成した局部壊死斑点数を調査し、その葉の示す値とした。

実験成績

1. 接種葉での病斑形成

a) 接種葉位と壊疽病斑形成

ソラマメの成葉に接種すると、接種葉には一般に大型の壊疽病斑を形成する。株の生育程度、葉の age の相違と壊疽病斑形成との関係を検討した。各葉位に接種後、5日目に接種葉に形成された壊疽病斑数を調査した。実験は、同一葉数を持つ株を3株ずつ選び、1区を3株として行なつた。結果は表1に示した。壊疽病斑の

表 1. 接種各葉に形成された壊疽病斑数

展開葉数	葉 位									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	0	14*	78							
5	—**	0	35	92						
6	—	—	0	66	104					
7	—	—	0	28	81	113				
8	—	—	—	0	0	32	39	65		
10	—	—	—	0	0	0	0	26	72	

* 表中の数値は接種半葉の平均病斑数を示す。

** 非接種葉

形成数は、どの生育時期においても、下位葉よりも上位葉に多い。生育の進んだ株では、この傾向は一層明瞭であつた。すなわち上位の2~3葉にのみ病斑が形成され、age の進んだ下位葉には、まったく形成されなかつた。しかし若い株 (展開葉数が3~4葉) では、比較的下位葉まで壊疽病斑は形成された。これらの結果は、接種葉での壊疽病斑形成には、株の age よりも各葉の age が、より密接に関係していることを示している。

b) 壊疽病斑形成とウイルス増加量

6葉展開期の株を使用し、第一葉 (L-1) から第5葉 (L-5) までの葉位に同時接種を行ない、接種後2日目から各葉位ごとに、ウイルス増加量を測定した。結果は図1に示した。最若葉である第5葉 (L-5) では、ウイルスの増加が急速であり、壊疽斑形成も早く、接種3日後に発現した。第4葉 (L-4) でも同様の傾向が認められた。第3葉 (L-3) では、ウイルスの増加は遅く、6日目に壊疽病斑を少数形成した。第2葉 (L-2) では、さ

↑: 壊疽病斑の出現時期を示す

図 1 接種各葉位でのウイルス増加量と壊疽病斑の発現

表 2. 株の age と頂部英壊疽発現

展開葉数*	接 種 葉 位	壊疽初発現葉位
4	L-2・4	L-6
	L-3・4・5**	L-7
	L-4・5**	L-6・7
5	L-1・3	L-9
	L-1・3・5	L-7・8
	L-2・3・4	L-8
	L-2・4	L-8・9
	L-3・4	L-7・8
6	L-3・5	L-9
	L-2・3・4	L-8
	L-2・4	L-8
	L-3・4	L-8
	L-3・4・5	L-8・9
	L-4・5	L-9
7	L-4・5	L-11
	L-4・6	L-10

* 接種時の全展開葉数

** 未展開葉

らにこの傾向が顕著となり、しかも壊疽病斑は形成しなかつた。第1葉 (L-1) では、接種6日後でもウイルス活性は、まったく認められなかつた。上位の接種葉 (L-5, L-4) の間では、壊疽病斑出現時のウイルス濃度はほぼ同じであつた。

2. 全身感染による頂部葉壊疽の発現

a) 株の age と病徴発現

生育程度を異にするソラマメ株を用い、図1の結果から、全身感染が十分に起りうる葉位を、表2に示すように選択し、接種した。4葉展開の株では、展開途中の第5葉にも接種した。接種後10日目に病徴を観察した。結果は表2に示したが、展開葉数が同じ個体では、接種葉位が異つても、それには関係なく、ほぼ同じ葉位に壊疽が発現した。また壊疽発現葉は、接種時に認められた最上展開葉から数えて2～4葉位上方のものであり、これらの葉は、接種後新たに展開したものである。しかし葉数の多い株、すなわち生育の進んだ株ほど壊疽症状の発現が、より上位葉になる傾向が見られた。また最初に壊疽が発現する葉位は、接種葉と同側の葉位になる傾向がある。これは、ソラマメが互生葉序であることに関係があると思われる。

b) 接種部位と病徴発現に要する日数

第5葉まで展開した株を用い、接種部位と頂部葉壊疽

表 3. 接種部位の違いと頂部葉壊疽発現に要する日数との関係

接種部位	第6・7葉* の葉長 (mm)	壊疽初発 現葉位	壊疽初発現 までの接種 後日数
L-2 ↔L-3	L-6 15 L-6 22 L-6 26	—** L-7 —	9
L-3	L-6 25 L-6 35 L-6 15	— — —	
L-3 ↔L-4	L-6 25 L-6 20 L-6 14	L-7 L-7 L-6	9 9 9
L-4	L-7 14 L-7 13 L-7 25	L-7 — —	12
L-5	L-6 34 L-7 17 L-6 29	L-7・8 L-9 L-7	9 11 9
P-3・4	L-6 32 L-6 23 L-6 20	L-7 L-6・7 L-7	9 9 9
P-4・5	L-7 22 L-6 28 L-6 32	L-7 L-7 L-7・8	9 9 9

L; 葉身, L↔L; 茎部節間, P; 葉柄。

* 接種時未展開の頂部葉。

** 頂部葉壊疽不発現。

発現に要する日数との関係について実験した。接種は、各葉位の葉表面、茎の節間全面、および各葉柄部にそれぞれ行なつた。壊疽発現の有無は、接種後20日目まで観察した。結果は表3に示した。頂部葉壊疽は、接種後9日目に大部分の株に初めて認められた。その後、11日目と12日目に各1株が発病したが、残りの株には接種後20日を経過しても病徴が発現しなかつた。頂部葉壊疽を発現しなかつた株の多くは、接種部位が下位葉、あるいは下位節間の株であつた。第3、第4葉は、展開葉数から考えても、十分に全身感染しうる葉位であるが、本実験ではほとんどの株が頂部葉壊疽を発現しなかつた。一方、第3葉位と第4葉位間の茎、または各葉柄に接種した場合には、著しい頂部壊疽を発現した。壊疽症状を呈する葉は、接種時に葉長が小さい未展開葉であつた。接種部位を異にしても、頂部葉壊疽が発現した株では、発現に要する日数は、ほとんど同じであり、接種後9日目であつた。

c) 接種源濃度と病徴発現

頂部葉壊疽の発現は、接種部位でのウイルス増加の程度に関係していると考えられたので、次の実験を行なつた。罹病株からウイルス接種源を前述のように作製し、これを原液とし、さらに緩衝液で25倍と50倍に希釈し、濃度の異なる3種の接種液を作製した。5葉展開株は第3葉、6葉展開株は第4葉に、各接種液を接種した。接種後1日目から7日目まで24時間毎に、接種葉でのウイルス増加量を比較した。各濃度区での頂部葉壊疽発現の有無は、接種後25日目まで調査を行なつた。

図2は、接種後7日目までの各接種源濃度におけるウイルス増加量を示したものである。第3葉・第4葉でのウイルス増加程度はほとんど同じであつた。各濃度とも、ほぼ類似した曲線を示したが、原液接種のものが最もウイルスの増加量が大きく、接種後5日目までに急速

図 2 濃度を異にする接種源によるウイルス増加

表 4. 接種源濃度と頂部葉壊疽の発現割合

実 験	原 液	25倍希釈液	50倍希釈液
I	7/7*	5/5	3/6
II	5/5*	4/5	0/4

頂部葉壊疽発現株数/供試株数

* 接種後11日目での調査

な増加が認められた。25倍希釈、50倍希釈になるに伴ない、増加速度は低下した。なお接種時の各接種源によるウイルス活性は、ササゲ初生葉に生じた局部壊死斑数の平均では、原液：146、25倍希釈液：84、50倍希釈液：41であつた。各接種源濃度での頂部葉壊疽発現は表4に示した。原液接種区の株は、接種後11日目までに全株とも、頂部葉壊疽を発現した。接種後25日目の最終観察では、原液と25倍希釈液接種株では、発病率に差はほとんど認められなかったが、50倍希釈液の場合は発病率が低下した。しかし発病した全株を通じて、接種源の濃度は、壊疽症状の程度には著しい影響を与えなかった。

d) 病徴発現と頂部葉の生育度

全身感染により頂部葉壊疽を発現する葉は、接種時に未展開の幼葉に限られることが、前項の実験から明らかとなつた。したがつて、この病徴の発現には、頂部葉の生育程度が関係していることが考えられたので、接種時に測定可能な頂部の未開葉について、葉身の最長部を測定した。供試株は5～6葉展開期の34株を用いた。5葉展開株は第6葉を、6葉展開株は第7葉をそれぞれ測定した。病徴発現の観察は、接種後10日目に行なつた。結果は、表5に示した。表3の結果も含めて考えると、頂部葉で壊疽症状が発現した葉は、ほとんどの場合、接種時の葉長が約24mmに達しないものであつた。25mm以上の葉には、まったく病徴が発現せず、その後生長してくる幼葉に初めて壊疽症状が発現した。

考 察

AMVに感染したソラマメは、接種葉と頂部葉に壊疽症状を示す。壊疽の発現する頂部葉と接種葉との関係は、吉井(1969)²⁾の報告したタバコモザイクウイルス

(TMV)によるトマトとグルチノーザタバコに生ずる“二次的壊死斑”の発現に見られる関係とよく類似している。しかしソラマメでは、接種葉と頂部葉には壊疽症状が発現するが、両者の中間に存在する葉には、葉柄と葉基部の主葉脈に壊疽を生ずる場合もあるが、葉身には識別しうる病徴が生じない。接種葉に形成される壊疽病斑の数は、上位葉の方が下位葉よりも著しく多い。このことは、接種葉でのウイルス増加程度がきわめて密接に関連していることを示している。図1で示したように、展開葉数が6枚のソラマメ株では、上位葉である第4葉と第5葉で、AMVの増加はきわめて急速であり、接種後3日目には、すでに壊疽病斑が形成される。しかし下位葉である第1葉、あるいは第2葉では、ほとんど壊疽病斑の発現はなく、ウイルスの増加も認められないか、あるいは少ない。これは、接種時にすでに葉の代謝活性が低下していたためか、あるいは接種後これらの葉位の葉が黄化することから考えて、接種によりさらに葉の衰弱が急速に進行することに原因があるように考えられる。このように接種葉での壊疽病斑の形成には、接種葉が若齢であり、ウイルス増加が旺盛であることが必要と思われる。他方、株としての生育程度にも関係があり、生育の進んだ株では、上位の葉でも形成される壊疽病斑数が少ない。

ウイルス感染に対する葉の感受性については、Kiralýら(1968)²⁾がTMVと局部感染植物であるPinto beanを用い、若齢葉よりも、ある程度老化の進んだ葉の方が感受性が高く、多くの局部壊死斑点を形成すると述べた。さらに、老化葉のウイルス感受性の増大は、寄主本来のRNA—および蛋白—代謝の低下と関連があると推論した。大橋ら(1971)³⁾はTMVとキサンチタバコにおいて、古い葉よりも若い葉の場合、形成される壊死斑点数が多いことを報告している。本実験の結果は、大橋らの結果と一致し、若齢葉の方がウイルス感受性が高い。葉位と感受性の関係は、ウイルスと寄主植物の種類により異なるものであろう。またウイルスの増加率により寄主の感受性を表現する場合と、局部壊死斑点数によりそれを評価する場合とでは、その意味する内容は異つ

表 5. 壊疽病徴発現の葉長限界

測定葉の 壊疽発現 状態	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葉 長*	11	13	14	15	16	17	20	21	22	23	24	25	28	29(mm)

+ ; 壊疽発現, - ; 壊疽不発現 * 接種時の測定

てくる。

全身感染により壊疽症状を呈する葉は、幼葉に限られ、接種時の葉長が約24mm以下のものであつた。約25mm以上に生長した葉では、この壊疽症状がまったく発現せず、生育完了後も病徴は発現してこない。Reidら(1966)⁵⁾はカブ黄斑モザイクウイルスとハクサイの場合、全身感染によりモザイク症状を示す葉は、接種時に1cm以下の葉長であると述べている。Atkinsonら(1970)¹⁾は、TMVとタバコを用いて、全身感染によるdark green部の形成は、頂部葉の生育度と関係があり、長さ2.5cm以下の葉にのみ認められると報告している。これらの報告はいずれもモザイク症状の場合であるが、本実験の壊疽発現についての結果も同様であり、頂部葉の病徴発現には幼葉のある生長段階までにウイルスが移行することが、必要であることが明らかである。細胞分裂・細胞内諸器官の发育過程とウイルスの感染との関係を、発生学的見地から、今後検討する必要があるものと考えられる。展開葉数、すなわち株の生育程度と接種葉の葉位が、頂部葉壊疽発現に密接に関係している。頂部葉の長さ約24mm以下の幼葉にのみ壊疽が生ずる組織学的理由については、現在のところ明らかではない。しかし壊疽発現条件として、少なくとも二つのことが考えられる。その一つは、展開葉数、言い換えれば株の生育程度と接種葉位の関係である。このことは、実験結果で示したように、接種葉のウイルス増加の難易の問題である。ウイルス増加の大なるほど、頂部葉壊疽の発現頻度は高くなる。つまり上部に移行しうる多量のウイルスが接種葉内に存在していることが一条件となる。他の条件は、葉位を異にするソラマメ葉のAMVに対する感受性の相違である。都丸(1967)⁶⁾がキュウリモザイクウイルスとタバコの場合、接種葉より上位の成葉にはいずれもウイルスが移行することを検定しており、他のウイルスでも、このような現象は認められている。しかしAMVとソラマメの場合は異なっている。接種葉と壊疽を生じた頂部葉との中間に存在する葉では、中肋の一部と第1次葉脈の一部にのみウイルスが検知されるが、葉肉組織ではウイルスが検知されない⁴⁾。このことは、AMVはソラマメに全身感染し、ソラマメ体内では特異な移行をするものと考えられる。AMVによるソラマメの頂部葉壊疽の発現は、接種葉でのウイルスの増加量と上位葉のウイルス感受性に支配され、頂部葉の生育時期により決定されると考えられる。

謝 辞

本研究を実施するに際し、有益な御助言を戴いた山中達博士に深く感謝する。

Summary

Necrotic symptom occurs on broad bean by local and systemic infection caused by alfalfa mosaic virus. Some factors concerning the occurrence of this necrotic symptom were observed.

The results are presented in this paper.

1) Occurrence of necrotic symptom of inoculated leaf is closely associated with the degree of multiplication of the virus. In an inoculated young leaf which the virus increases more rapidly than in an old lower leaf, necrotic symptom appears more sever.

2) Wherever inoculation is done on any part (leaf, leaf-petiole and stem), if the virus multiplies sufficiently there, necrosis develops always almost concurrently on systemically infected apical leaves. When lower leaves and lower part of stem were inoculated, necrosis of apical leaf is difficult to appear.

3) The virus concentration in the inoculum influences remarkably the development of necrosis on apical leaves. When dense inoculum was used, the virus multiplies much more in inoculated leaf and necrosis of apical leaf appears in higher rate.

4) Appearance of necrosis of apical leaf relates with the growth stage of upper leaves. Leaves which exhibit necrosis due to systemic infection are limited to unexpanded apical leaves smaller than about 24 mm in length at the time of inoculation.

文 献

- 1) Atkinson, P. H. and Matthews, R. E. F. (1970). On the origin of dark green tissues in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 344, 356.
- 2) Király, Z., Hammady, M. E. and Pozsár, B. I. (1968). Susceptibility to tobacco mosaic virus in relation to RNA and protein synthesis in tobacco and bean plants. *Phytopath.* Z. 63, 47-63.
- 3) 大橋祐子, 下村徹 (1971). TMVに感染した systemic hostの葉に熱処理によって誘起される壊死斑。日植病報 37, 22-28.
- 4) 三沢正生, 工藤晨 (1970). ウイルスの全身移行に伴う2・3の現象について, 日植病報 36, 181-182 (講演要旨)。
- 5) Reid, M. S. and Mathews R. E. F. (1966). On the origin of the mosaic induced by turnip yellow mosaic virus. *Virology* 28, 563-570.
- 6) 都丸敬一 (1967). タバコにおけるキュウリモザイクウイルスの濃度の消長・タバコの各部分および2・3のタバコ品種におけるウイルス濃度の推移。秦野たばこ試験場報告 58, 27-32.
- 7) 吉井甫 (1969). ウイルス病に感染した局部壊死斑寄生における壊死斑の転移。日植病報 35, 194-201.