

Crown Gall 形成初期における2,3の知見

野津 幹雄[※]・城野洋一郎[※]・糸井 節美[※]

Mikio Nozu, Youichirou KINO, Setsumi ITOI

Some Observations on Earlier Stages of Crown Gall Formation

はじめに

Crown gall の電子顕微鏡による研究はこれまでも報告されている^{1,2,3,4,5)}。それらのほとんどは、針や注射器で傷をつけ、病原細菌を接種し生じた crown gall 組織の微細構造に関するものである。一般に、形成された crown gall 組織内に病原細菌は認め難い。そのため、*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. と植物との bacteria-plant interaction に関する報告は少ない。筆者らは前報で、インゲン初生葉にカーボランダム (#400) で病原細菌を接種し、その後の動向について報告した。その場合、病原細菌の増殖はほとんど認められなかった。カーボランダムにより生じる傷は規模の小さい電子顕微鏡レベルのものである。ここでは、より大きな傷を生じる木綿針を用いてインゲンの茎に接種し、その後の病原細菌の様相と植物細胞の形態について述べる。

実験材料および方法

発芽後2週間のインゲン(大平英尺五寸)の茎節間に木綿針で傷を付け、*A. tumefaciens* S1 株(48時間培養)の濃厚懸濁液を接種した。接種後25°Cの人工気象器内に保ち24, 48, 72時間後に供試した。接種組織を細切し、4%グルタルアルデヒド-りん酸緩衝液(0.1M, pH 7.3)で4°C, 5時間前固定した。その後、同緩衝液中に1夜放置した。1%オスミック酸-りん酸緩衝液で4°C, 5時間、後固定し、水洗後、エタノール系列で脱水した。脱水した試料はプロピレンオキシドを通してエポキシに包埋した。切片はPotter-Blum MT2-B型超ミクロトームでガラスナイフを用いて作成し、50%エタノール飽和酢酸ウランで電子染色後、日立HU-12A型電子顕微鏡で観察した。

結果および考察

接種後24時間には、針傷部位には付傷により崩壊した

細胞より流出した植物原形質と思われる物質が存在する。接種した病原細菌のほとんどは、流出した植物原形質と思われる物質の中に存在する(図1)。しかし、観察される病原細菌の数はあまり多くなく、固定処理の段階で流出したものと考える。傷に直接面していても崩壊していない植物細胞も認められる(図1)。これらの細胞では核が肥大している場合もあるが、葉緑体、ミトコンドリア、細胞膜に変化は認められない。植物細胞から遊離して存在する病原細菌以外に、傷に面した植物細胞の露出した細胞壁に付着している病原細菌が若干認められる(図2)。

接種後48時間では、針傷部位には植物原形質と思われる物質はほとんど認められなくなる。24時間後に比較してより多くの病原細菌が傷に面した植物細胞の細胞壁に付着している(図3)。Beiderbeckら⁷⁾によると、*A. tumefaciens* はヒロハヒルガオの葉肉細胞により誘引される。⁸⁾ *A. tumefaciens* は1~4本の周毛を持つとされており、付傷により露出した植物細胞に誘引されて遊離の状態から移動してきたものと思われる(図2, 3)。付傷により崩壊した植物細胞は原形質が流出し、細胞壁だけが残っている。残存している細胞壁は重なり合っており、その間に分裂増殖した病原細菌が充満している(図4)。その場合、細胞壁部分にも病原細菌が認められ、病原細菌は崩壊した植物細胞の原形質や細胞壁を利用して腐生的に増殖したと思われる。同じように、傷に近い細胞間隙にも、病原細菌が充満している(図5)。

接種後72時間経過すると、傷によって崩壊した細胞から2~3細胞離れた細胞間隙でも増殖した病原細菌が認められるようになる(図6)。72時間後でも観察される病原細菌は細胞壁、細胞膜、細胞質、核域を有する典型的な細菌の微細構造を示す(図6)。このように病原細菌の充満している細胞間隙に面する植物細胞では、小胞化(vesiculation)が起こり、トノプラストが崩壊している(図6)。

※ 植物病理学研究室

以上のように木綿針で付傷接種した場合、接種後72時間まででは植物組織の細胞間隙に分裂増殖した病原細菌が多数観察される。Braun⁹⁾によると、ツルニチソウの茎にパストゥールピペットで傷を付け病原細菌を接種した場合、接種後3日目まで病原細菌数は増加し以後減少⁴⁾している。Manocha⁴⁾によると、注射器で傷を付け接種後4～24日のヒマワリの crown gall 組織内に病原細菌は認められない。インゲンの茎に生じた crown gall 組織内にも病原細菌は認められない。これらのことから、大きな傷を付け病原細菌を接種すると、病原細菌は初期には増殖しそれ以後は死滅していく傾向にあると考えられる。

一方、カーボランダムで接種した場合、接種後48時間で病原細菌は植物細胞壁に由来すると思われる物質でおおわれて不動化 (immobilization) し、増殖場面はほとんど観察されない。カーボランダム、木綿針のいずれを用いても crown gall は誘導される。このことより、大きな傷の場合に認められる病原細菌の増殖は腐生的であり、crown gall の誘導には病原細菌の増殖は直接必要ではないと考えられる。

木綿針で傷を付け病原細菌を接種した場合、接種後72時間経過しても分裂する植物細胞は観察されなかった。一方カーボランダムの場合、接種後48時間ですでに分裂する植物細胞が出現する。この場合、病原細菌は接種後12時間ですでに棚状組織細胞間隙および細胞壁中層に侵入している。木綿針の場合、接種後48時間で、病原細菌と植物細胞壁との接触が頻繁になる (図3, 4, 5)。Lippincott¹⁰⁾らは *A. tumefaciens* の非病原系統 (II BN-V 6) と病原系統 (B6) の混合接種や非病原系統の前接種で、crown gall 形成が拮抗的に阻害されることから、病原細菌の植物組織内での特定部位への付着の必要性を報告している。

以上のことは、病原細菌の特定部位 (植物細胞壁) への付着の必要性を裏づけているといえよう。

摘 要

インゲンの茎に木綿針で傷を付け、*A. tumefaciens* を接種し、その後の病原細菌の様相と植物細胞の形態を電子顕微鏡で観察した。

接種後24時間では、ほとんどの病原細菌は植物細胞から遊離して存在する。傷に面した植物細胞では核が肥大している場合もある。48時間後には多くの病原細菌が傷に面した植物細胞壁に付着し、崩壊した細胞や細胞間隙には病原細菌が充満している。72時間後には傷から2～3細胞離れた細胞間隙にも病原細菌が認められるようになる。72時間経過すると、病原細菌に近い植物細胞では小胞化が起るが、分裂はまだ認められない。

引用文献

1. HOHL, H. R. : *Phytopath. Z.* **40** : 317—356, 1961.
2. GEE, M. M., SUN, C. N. and DWYER, J. D. : *Protoplasma* **64** : 195—200, 1967.
3. 赤井重恭・白石雅也 : 日植病報**37** : 392, 1971.
4. MANOCHA, M. S. : *Can. J. Bot.* **48** : 1455—1458, 1970.
5. 西沢良一 : 日植病報**43** : 482—486, 1977.
6. 城野洋一郎・野津幹雄・糸井節美 : 日植病報**45** : 275—278, 1979.
7. BEIDERBECK, R. and HOHL, R. : *Phytopath. Z.* **92** : 184—187, 1978.
8. BUCHER, D. N. : *Determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams and Wilkins company, Baltimore : 265, 1974.
9. BRAUN, A. C. : *Amer. J. Bot.* **34** : 234—240, 1947.
10. LIPPINCOTT, B. B. and LIPPINCOTT, J. A. : *J. Bacteriol.* **97** : 620—628, 1969.

図の説明

- 図1. 針傷部位の病原細菌 (24時間) × 14000
- 図2. 植物細胞壁に付着する病原細菌 (24時間) × 31000
- 図3. 植物細胞壁に付着する病原細菌 (48時間) × 2000
- 図4. 崩壊した植物細胞に充満する病原細菌 (48時間) × 8600
- 図5. 傷に近い細胞間隙に充満する病原細菌 (48時間) × 24000
- 図6. 傷から2～3細胞離れた細胞間隙に充満する病原細菌 (72時間) × 10000

図中の記号

B 病原細菌 CH 葉緑体 CM 細胞膜
 CW 細胞壁 IS 細胞間隙
 M ミトコンドリア N 核

Summary

French bean stem tissues inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* by needle stabbing were examined under electron-microscope. Twenty-four hours after inoculation, almost all agrobacteria were in needle-wound site. Undamaged french bean cells face to wound site had a large nucleus. Forty-eight hours after inoculation, many agrobacteria adhered to french bean cell wall exposed by needle stabbing. Numerous agrobacteria were also observed in french bean cells injured by needle stabbing and intercellular spaces. Seventy-two hours after inoculation, there were many agrobacteria in intercellular spaces apart 2 or 3 cells from wound site. French bean cells in close proximity to agrobacteria showed a vesiculation.



