

チャかいよう病罹病葉組織の電子顕微鏡観察

荒井 啓・植原一雄

(植物病理学研究室)

昭和59年8月10日 受理

Ultrastructural Investigation of the Leaf-Tissues Infected with *Xanthomonas campestris* pv. *theaeicola* (Uehara et Arai 1980) Dye 1980

Kei ARAI and Kazuo UEHARA
(Laboratory of Plant Pathology)

緒 言

チャかいよう病は1970年頃に鹿児島県の大隅半島(垂水市, 肝属郡田代町)と薩摩半島(川辺郡知覧町)で発見された細菌病²⁷⁾で, 病原細菌は *Xanthomonas campestris* pv. *theaeicola* (Uehara et Arai 1980) Dye 1980 と同定された³⁵⁾.

本病は自然条件では5月から9月にかけて若い葉や茎に典型的なかいよう症状を呈する. 一方, 病原細菌の懸濁液をチャ葉に付傷接種すると, 約2週間位で接種葉の水浸状部分が肥厚し始め, かさぶた状となり病斑中央部はやがて裂開, 陥没し, やはり典型的なかいよう症状となる.

本実験は, 接種により発病した葉の病斑部分の電顕(走査型および透過型)観察により, 細菌の所在ならびに組織の病変を調べたものである.

材 料 と 方 法

供試細菌は著者らが知覧町の罹病葉から分離した *X. campestris* pv. *theaeicola* (分離株 TC-1) を用いた. 供試細菌を PDA 培地(ジャガイモ 200 g, ブドウ糖 20 g, 寒天 18 g, 蒸留水 1 liter)で 25°C, 24 時間培養したものを滅菌水で約 10^8 cells/ml に調整した. この細菌懸濁液に市販のナイロンタワシ(東和産業製)を約 2 cm 角に切ったものを浸し, ポットに植えた健全なチャ, *Thea sinensis* L., 栽培品種やぶきた, の若葉裏面を軽くこすり, 接種した.

接種した植物は約 20°C の恒温室(約 1,000 lux で 14 時間照明)に置き, その都度実験に供した. すなわち, 接種後 10~14 日で接種葉の水浸部分が肥厚し始め, 20~30 日後にはかさぶた状となり典型的なかい

よう症状となった. このような病斑部を適当な大きさに切り取り, 2.5% グルタルアルデヒドと 1% オスミック酸で二重固定し, エタノールで脱水した. 走査型電顕(日本電子製 JSM 15, 以下 SEM と略す)用試料は脱水後液体窒素を用いて凍結切断を行い, 酢酸イソアミルで置換後, 臨界点乾燥(日立製 HCP-1)し, 金蒸着(日本電子製 JFC 1, 100)を施し, 観察した.

また, 透過型電顕(日本電子製 JEM 100C, 以下 TEM と略す)用試料は, 脱水後, エポキシ樹脂(エポン 812)に包埋, ウルトロトーム(LKB 社製 8, 800)で薄切, 酢酸ウラン, クエン酸鉛で二重染色後, 観察した.

結 果

まず, 接種 10~14 日後に葉裏面の接種部位にわずかな隆起が認められた. すなわち葉の表面になだらかな丘が点在しているように観察された. やがて頂端部が裂開し, 後にその部分が陥没し, 典型的なかいよう症状となった(Fig. 1). 隆起部の切断面は, 維管束状の比較的小さな細胞からなる組織がほぼ中央附近に認められ, その周囲の柔細胞が肥大したり, 増生したりしているのが観察された(Fig. 2, 3). 隆起および裂開の程度は, 時間の経過とともに大きくなる傾向が認められた(Fig. 4). 裂開部の内部の組織は崩壊し, 周辺には細菌の集団が観察された(Fig. 5, 6). また, なかには細菌が外部に漏出したと思われるような像も観察された(Fig. 7, 8).

接種後あまり時間の経っていないような切断試料では, 細菌を認めるのが困難であった. しかしながら, 時間の経過とともに健全葉では認められないような領域が観察された(Fig. 9, 10). この部分を拡大してみると細菌が凝集しているのが認められた(Fig. 11, 12).

本研究の概要は昭和52年度日本植物病理学会および昭和57年度日本植物病理学会九州部会で発表した.

SEM ではこのように細菌の凝集部位を見出すことは比較的容易であったが、個々の細菌の所在部位を明らかにすることは困難であった。

つぎに、超薄切片を TEM で観察した。ナイロンタワシで付傷接種した部分には、細胞壁に沿って定着したと思われる細菌が認められた (Fig. 13)。時には、はく離した細胞壁の内側にも観察された (Fig. 14, 15)。接種直後では細菌の検出頻度は余り高くなかったが、10~14 日後に組織の隆起が認められるような時期になると、隆起部の細胞間隙に容易に細菌を認めることができた。隆起部の細胞は細胞質が崩壊したり、凝集し、電子密度が高くなったものや、細胞壁が軟弱になり蛇行した例が多かった (Fig. 16, 17, 18)。そのような部分では、細菌は細胞壁内層あるいは細胞間隙に認められ、細菌の増殖により内層が拡大したと思われる像が多数観察された (Fig. 19, 20)。時には変性した細胞質内に細菌が認められる像も観察された (Fig. 17, 19)。このような細菌群に隣接した細胞は、概して壊死あるいは崩壊していた。一方、細胞間隙に浮遊していると思われる細菌も観察され、この場合も、隣接の宿主細胞は壊死あるいは崩壊している例が多かった (Fig. 21, 22)。

また、壊死細胞間の細胞壁内層に細菌が包み込まれたような像も観察された (Fig. 23, 24, 25, 26)。内部の細菌は壊死などの形態異常を呈していた。さらに、このような部位の細菌の周囲は繊維状物質 (Fig. 24) や無構造の高電子密度の物質 (Fig. 26) で充たされる例が多かった。

考 察

本実験で、チャカイよう病細菌の接種葉を電顕観察した結果、病斑部に多数の細菌が観察された。このような細菌は病斑部以外や、健全葉では見出されなかったことから、本病原細菌であろうと考えられた。

まず、本病の特徴である「いぼ状」隆起部では、細胞の肥大と増生が顕著に認められた。この隆起部は、後に頂端部が裂開、陥没し、典型的なチャカイよう症状となった。細菌の所在部位は主として細胞間隙であるが、その所在様式を分けると以下の4形態に集約された。

1. 細菌が宿主の細胞壁に密着して認められる場合。この場合は概して細菌数が少なく、恐らく細胞間隙に浮遊していた細菌が定着して間もない頃の状態と考えられた。本病では細菌の周囲に多糖類様のものが認められる例と、はく離した細胞壁内層に密着した例とが見出された。このような例は、他の細菌病でもごく普

通に見出される例で、感染の初期段階と考えられる。

2. 細菌が宿主の細胞壁内層の拡大部分に認められる場合。この形態は本病の特徴である。細胞壁内層に定着した細菌は、分裂増殖をくり返し、その数を増すものと考えられた。その結果、細胞壁内層は領域を拡張、広大なマトリックスを形成した。時には、細胞壁がひきちぎれたり、部分的に消失したりして細菌が宿主細胞質内には入りこんだことを示唆する像も観察された。さらに、病斑の裂開部より外部に漏出する例も観察された。このことより、本菌は、病斑部で比較的旺盛な増殖をするものと考えられた。一方、宿主細胞は、細菌の増殖により細胞壁が軟弱になり、収縮・変性し、壊死するものと考えられた。このように細胞壁内層が拡大し、その中で細菌が増殖する例としては、カンキツかいよう病²¹⁾、ビワがんしゅ病²²⁾、ワタ角点病^{1,2)} *Pseudomonas pisi* 感染インゲン葉⁷⁾などでも知られているが、インゲンでは隣接細胞に変性が認められないことから、本病とは若干異なるようである。

3. 細菌が細胞壁内層にとじ込められた状態で認められる場合。本実験で細胞壁内層で増殖しかけたと思われる細菌群の変性を示唆する例が認められた。これは隣接する宿主細胞の収縮・壊死の過程で生じたものとも考えられたが、このような部分では、細菌をとり囲むかのように繊維状の物質や無構造の高電子密度の物質が観察された。一般に細菌感染によって、健全部分には観察されない fibrillar material (FM) や granular material (GM) あるいは amorphous material (AM) が細菌とともに見出され、なかにはそれらの物質に包み込まれたような例が数多く報告されている^{1-3,6,7,11,13,17,19,29,31,36,37)}。特に導管病では、導管壁内側から生じる FM や AM による細菌の包み込みや閉塞の例^{9,14-18,32-34)} や細菌の代謝産物に由来する extracellular polysaccharide による同様の例^{11,30)}などが報告されている。さらに、カンキツでは、導管にポリステレン球を注入すると AM が生じこれらの球をとり囲むことが知られている⁹⁾。また、柔組織病でも、ワタ角点病¹⁻³⁾や *Ps. pisi* を注入したインゲン葉⁷⁾、*Erwinia stewartii* 感染のトウモロコシ葉⁵⁾、あるいはタバコ葉に種々の細菌を強制注入した場合^{10,26)}などで見出されている。このような物質は、カンキツとポリステレン球の組合せのように非特異的な例もあるが、抵抗性の組合せや不親和性の組合せでより顕著に見出されるもので、一般的には、抵抗現象の結果生じるものとして理解されているようである。本実験で観察された例は、いずれによるものか明らかにされな

ったが、今後検討したい。

4. 細菌が細胞間隙に散在している場合、1. の場合と同様、細菌病で認められる代表的な所見で、広大な細胞間隙に見出される例である。本病の特徴としては、細菌群に隣接する細胞のほとんどが収縮や壊死を呈したり、原形質分離を起こしていたことである。このように細菌群に隣接する細胞が変性する例も比較的良く知られている^{2,23,24,32)}。

以上の観察所見より、本菌はチャの傷口より侵入し、細胞壁附近に定着し、はく離した細胞壁内層に侵入するものと思われた。細胞壁内層あるいは細胞間隙で細菌が増殖するとともに、細胞分裂が促進され、増殖するものと考えられた。増殖した細菌は宿主細胞に殺生的に作用し、壊死・収縮に致らしめ、かいよう症状を呈するものと考えられた。このような解剖所見は、いくつか知られている増生病^{4,8,12,19-22,25,28,38)}のなかでは、ピワがんしゅ病²²⁾やカンキツかいよう病^{19,21)}と類似していた。

要 約

チャかいよう病細菌をチャ葉に付傷接種し、発病した病斑部分を電顕観察し、病変ならびに病原細菌の所在を検討した。接種後 10~14 日で部分的に肥厚が認められ、いわゆる「いぼ状」の隆起を形成した。これは時間の経過とともに大きくなり、やがて頂端部が裂開、陥没し、典型的なかいよう症状となった。隆起部分を切断すると、維管束状の比較的小さな細胞群を中心にやや肥大した細胞が増生していた。細菌は隆起部分の細胞間隙に認められた。すなわち、(1)宿主細胞の細胞壁に密着した状態、(2)領域の拡大した細胞壁内層で増殖した状態、(3)細胞壁内層でとじ込められたように変性している状態、(4)細胞間隙に浮遊している状態、などである。細菌の認められる部分では宿主細胞の変性が顕著で、収縮、壊死、細胞壁の蛇行、原形質分離などが複合して認められた。また、細菌の変性が認められた部分では、繊維状あるいは無構造の物質で充たされていた。これは宿主の防衛反応の結果とも推定された。以上の観察結果より、本病は、ピワがんしゅ病、カンキツかいよう病と類似した部分的肥厚病と判断された。

付記 植原一雄元教授は昭和 58 年 8 月 11 日死去しました。

文 献

- 1) Al-Mousawi, A.H., Richardson, P.E., Es-senberg, M. and Johnson, W.M.: Ultrastructural studies of a compatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Phytopathology*, **72**, 1222-1230 (1982)
- 2) Al-Mousawi, A.H., Richardson, P.E., Es-senberg, M. and Johnson, W.M.: Cotyledon and leaf ultrastructure of a bacterial blight-immune cotton line inoculated with a low level of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Phytopathology*, **72**, 1230-1234 (1982)
- 3) Al-Mousawi, A.H., Richardson, P.E., Es-senberg, M. and Johnson, W.M.: Specificity of the envelopment of bacteria and other particles in cotton cotyledons. *Phytopathology*, **73**, 484-489 (1983)
- 4) 荒井 啓・丸尾正司・植原一雄: 茶天狗渠病に関する研究, VIII. 罹病組織中に見出される細菌について。九病虫研報, **20**, 144 (1974)
- 5) Braun, E. J.: Ultrastructural investigation of resistant and susceptible maize inbreds infected with *Erwinia stewartii*. *Phytopathology*, **72**, 159-166 (1982)
- 6) Cason, E.T. Jr., Richardson, P.E., Essenberg, M.K., Brinkerhoff, L.A., Johnson, W.M. and Venere, R.J.: Ultrastructural cell wall alterations in immune cotton leaves inoculated with *Xanthomonas malvacearum*. *Phytopathology*, **68**, 1015-1021 (1978)
- 7) Daub, M. E. and Hagedorn, D. J.: Growth kinetics and interactions of *Pseudomonas syringae* with susceptible and resistant bean tissues. *Phytopathology*, **70**, 429-436 (1980)
- 8) Fudl-Allah, A.E.-S.A. and Baraka, M.M.: Pathological anatomy of olive tumors caused by *Pseudomonas savastanoi*. *Libyan J. Agric.*, **3**, 105-108 (1974) [R. P. P., **56**, 5127]
- 9) Gardner, J.M., Feldman, A.W. and Stamper, D. H.: Role and fate of bacteria in vascular occlusions of citrus. *Physiol. Plant Path.*, **23**, 295-309 (1983)
- 10) Goodman, R.N., Huang, P.Y. and White, J. A.: Ultrastructural evidence for immobilization of an incompatible bacterium, *Pseudomonas pisi*, in tobacco leaf tissue. *Phytopathology*, **66**, 754-764 (1976)
- 11) Goodman, R. N. and White, J. A.: Xylem parenchyma plasmolysis and vessel wall disorientation caused by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, **71**, 844-852 (1981)
- 12) 後藤正夫: 新植物細菌病学, p. 156-161, ソフトサイエンス社, 東京 (1981)
- 13) Hildebrand, D.C., Alosi, M.C. and Schroth, M.N.: Physical entrapment of pseudomonads in bean leaves by films formed at airwater interfaces. *Phytopathology*, **70**, 98-109 (1980)

1) Al-Mousawi, A.H., Richardson, P.E., Es-

- 14) 堀野 修・江塚昭典: イネ白葉枯病に対する品種抵抗性に関する研究, 3. 第 I 群菌系に対する黄玉の抵抗性現象の電顕的観察. 日植病報, 38, 200 (1972)
- 15) 堀野 修・山田昌雄: 白葉枯病菌以外の植物病原細菌接種イネ葉の導管内部と侵入細菌の電顕観察. 日植病報, 41, 274 (1975)
- 16) 堀野 修: 幼苗期に抵抗性の異なる黄玉群イネ品種の幼苗期におけるイネ白葉枯病感染葉の微細構造. 日植病報, 47, 501-509 (1981)
- 17) 堀野 修・山田利明: 親和性および不親和性レース白葉枯病菌によるイネ品種ジャワ No. 14 の感染部位の電顕観察. 日植病報, 48, 372 (1982)
- 18) 堀野 修: イネ白葉枯病菌接種葉の導管内における繊維状物質と培養菌ゼンサンの比較観察. 日植病報, 50, 415 (1984)
- 19) Koizumi, M.: Ultrastructural changes in susceptible and resistant plants of citrus following artificial inoculation with *Xanthomonas citri* (Hase) Dowson. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 45, 635-645 (1979)
- 20) 松田 泉・土居養二・與良清: 病原細菌組織内動態の電顕による比較. フジがんしゅ病およびタバコ野火病について. 日植病報, 36, 370 (1970)
- 21) 松田 泉・土居養二・與良 清: カンキツかいよう病菌 (*X. citri*) 感染様式の電顕観察. 日植病報, 37, 367-368 (1971)
- 22) 松田 泉・土居養二・與良 清: ピワがんしゅ病菌 (*Pseudomonas eriobotryae*) 感染によるがんしゅの電顕観察. 日植病報, 39, 238 (1973)
- 23) 松田 泉・土居養二・與良 清: 植物細菌病の電子顕微鏡による病理解剖一クワ縮葉細菌病について. 日植病報, 40, 198 (1974)
- 24) 松田 泉: 植物細菌病の病理解剖学的研究, 8. イネ褐条病菌 *Pseudomonas avenae* のイネ幼苗組織内における動態. 日植病報, 49, 410 (1983)
- 25) 松田 泉: 植物細菌病の病徴と病原細菌. 植物防疫, 37, 503-507 (1983)
- 26) Mazzucchi, U. and Bazzi, C.: Encapsulation of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in relation to its growth in tobacco leaves both pretreated and not pretreated with protein-lipopolysaccharide complexes. *Physiol. Plant Path.*, 21, 105-112 (1982)
- 27) 野中寿之・植原一雄: 潰瘍症状を呈するチャの新病害について. 九州農業研究, 35, 87-88 (1973)
- 28) 大宣見朝榮: センダンこぶ病に関する研究. 琉大農学術報告, 24, 497-556 (1977)
- 29) Smith, J. J. and Mansfield, J. W.: Ultrastructure of interactions between pseudomonads and oat leaves. *Physiol. Plant Path.*, 21, 259-266 (1982)
- 30) Suhayda, C.G. and Goodman, R.N.: Early proliferation and migration and subsequent xylem occlusion by *Erwinia amylovora* and the fate of its extracellular polysaccharide (EPS) in apple shoots. *Phytopathology*, 71, 697-707 (1981)
- 31) 津野和宣・脇本 哲: イネ白葉枯病菌およびイネ条斑細菌病菌を強制注入したイネ葉組織細胞間隙における宿主一寄生者間相互反応. 日植病報, 48, 131 (1982)
- 32) Tsuno, K. and Wakimoto, S.: Ultrastructural investigations on the host-parasite interactions in the rice leaf parenchymatous tissue infiltrated with bacterial leaf blight and leaf streak pathogens. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 49, 659-669 (1983)
- 33) 津野和宣・脇本 哲: 植物病原細菌を接種したイネ葉導管内にみられる繊維状物質について. 日植病報, 50, 102 (1984)
- 34) 津野和宣・脇本 哲: 親和性の異なる各種植物病原細菌とイネ葉小維管束導管との宿主一寄生者間相互反応. 日植病報, 50, 415 (1984)
- 35) 植原一雄・荒井 啓・野中寿之・佐野岩男: 茶かいよう病 (新病害) とその病原細菌. 鹿大農学術報告, 30, 17-21 (1980)
- 36) Wallis, F. M.: Ultrastructural histopathology of plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Path.*, 11, 333-342 (1977)
- 37) Wallis, F.M. and Truster, S.J.: Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. *Physiol. Plant Path.*, 13, 307-317 (1978)
- 38) Wilson, E. E. and Magie, A. R.: Systemic invasion of the host plant by the tumor-inducing bacterium, *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopathology*, 54, 576-579 (1964)

Summary

Both the location of bacteria and the pathological disorders in the leaf-tissues of tea plant, *Thea sinensis* L. infected with *Xanthomonas campestris* pv. *theaecola* (Uehara et Arai) Dye, 1980 were observed under a scanning- and a transmission-electron microscopes.

Several protuberances resembling warts were observed in some water soaked area of the lower surface of leaf in 10-14 days after the inoculation. These warts were gradually enlarged and their tops become dehiscent and collapsed in a short time. This symptom got developed into a typical cankerous one in 20-30 days after inoculation. Hypertrophy and hyperplasia were observed in the vertical section of the protuberance.

Bacteria were observed in the intercellular spaces of the protuberance. The bacterial location styles were classified into the following four.

1. Bacteria were close to the host cell-wall or were present in the inner spaces of the swelling cell-wall.
2. Bacteria increased in the inner space of the expanded cell-wall.
3. Bacteria were enclosed in some intercellular spaces and some degeneration of bacterial cell was observed in such space. Moreover, some fibrillar or amorphous materials were observed in the environment of bacteria.
4. Bacteria were scatteringly observed in the extensive intercellular.

The pathological disorders of host cells were distinguished in the diseased parts. Those were the contraction, necrosis, plasmolysis and the weave of cell-wall. These results were closely similar to cankers of loquat and citrus.

Explanation of Figures

Abbreviations: CW; cell-wall, IS; inner space of cell-wall, N; necrotic cell, S; stomata, SL; slime layer

- Fig. 1. Protuberances were observed on the lower surface of leaf inoculated with pathogenic bacteria. The tops of them are cracked and collapsed in the ends. $\times 30$. SEM.
- Fig. 2. Vertical section of the protuberance. Hypertrophy and hyperplasia of parenchyma cells were observed. $\times 50$. SEM.
- Fig. 3. Ditto. Smaller cells like vascular bundles were observed in the central parts of the protuberance and larger cells surrounding them. $\times 100$. SEM.
- Fig. 4. Expanding crack observed at the top of protuberance. $\times 100$. SEM.
- Fig. 5. Degenerated tissue and bacterial mass in the collapsed part. $\times 1,000$. SEM.
- Fig. 6. Ditto. High magnification. Rod shaped bacteria were observed. $\times 3,000$. SEM.
- Fig. 7. Large and small cracks on the lower surface of the leaf. $\times 300$. SEM.
- Fig. 8. High magnification of small crack. Bacteria (arrows) were observed at the outer margin of the crack. $\times 1,000$. SEM.
- Fig. 9. Vertical section of the protuberance. Abnormal matrix (arrow) was observed. $\times 300$. SEM.
- Fig. 10. Ditto. $\times 300$. SEM.
- Fig. 11. Ditto. Numerous bacteria were observed in the matrix. $\times 1,000$. SEM.
- Fig. 12. Ditto. High magnification. $\times 3,000$. SEM.
- Fig. 13. Bacteria were close to the host cell-wall and were surrounded by slime. $\times 35,000$. TEM.
- Fig. 14. Bacteria were observed in the inner space of the swelling cell-wall. $\times 35,000$. TEM.
- Fig. 15. Ditto. $\times 30,000$. TEM.
- Fig. 16. Plasmolysis and degeneration of the host cells. $\times 5,000$. TEM.
- Fig. 17. Cells degenerated and cytoplasm of high density. Bacteria (arrow) were observed in cytoplasm. $\times 3,500$. TEM.
- Fig. 18. Ditto. Weave of cell-wall and degeneration of cytoplasm. $\times 6,000$. TEM.
- Fig. 19. Bacteria increased in the inner space of the swelling cell-wall and in cytoplasm (arrow). $\times 6,000$. TEM.
- Fig. 20. Ditto. $\times 10,000$. TEM.
- Fig. 21. Bacteria (arrows) observed in the intercellular space and necrosis of the host cell. $\times 5,000$. TEM.
- Fig. 22. Bacteria (arrows) scattered in the intercellular space and degeneration of cytoplasm. $\times 6,000$. TEM.
- Fig. 23. Bacteria entrapped in the inner space of cell-wall. Some bacteria (arrow) were close to the host cell-wall. $\times 3,500$. TEM.
- Fig. 24. Ditto. High magnification. Bacteria surrounded by fibrillar material. $\times 17,000$. TEM.
- Fig. 25. Bacteria degenerated in the intercellular space. $\times 8,500$. TEM.
- Fig. 26. Ditto. Bacteria surrounded by capsular and amorphous materials (arrow). $\times 8,500$. TEM.







