イネごま葉枯病菌菌糸およびいもち病菌菌糸の微細構造*

堀野 修**・赤井重恭***

Osamu HORINO** and Shigeyasu AKAI***: The Fine Structure of Hyphae of *Helminthosporium oryzae* Ito et Kurib. and *Pyricularia oryzae* Cavara

Abstract

Comparisons were made on the fine structure of hyphae of *Helminthosporium oryzae* Ito et Kurib. and *Pyricularia oryzae* Cavara by electron microscopy.

The fine structure of the cell wall, number of nuclei, mitochondrial volume and the arrangement of cristae were found to be highly differentiated in both hyphae of *H. oryzae* and *P. oryzae*.

The results obtained are as follows:

(1) Hyphae of *Helminthosporium oryzae*

The cell wall of hyphae was consisted of three layers (outer, middle and inner layers), as seen in conidia, and the hyphae of this fungus were recognized to be multinucleate. The cytoplasm contained well-defined mitochondria ($0.76 \times 0.51 \mu$), endoplasmic reticula (ER), vacuoles and unidentified spherical bodies.

(2) Hyphae of *Pyricularia oryzae*

Two layers (outer and inner layers) were detectable in the cell wall structures of hyphae. Each cell seemed to possess a single nucleus surrounded by a double membrane with nuclear pores. The nucleus contained a comparatively dense body identified as chromatin substance. The cytoplasm also contained coiled membrane fragments, twisted-ER, variable surfaced ER, large mitochondria ($1.28 \times 0.62 \mu$) and lipid granules (1.50μ in diameter).

(Received May 22, 1967)

イネごま葉枯病菌分生胞子の微細構造については松井⁵⁾⁶⁾、野津⁹⁾、さらに筆者らも⁸⁾観察を行なつたが、いもち病菌分生胞子の内部微細構造についてはわずかに水沢⁷⁾および筆者ら⁸⁾の観察結果があるのみである。しかしこれら病原菌の菌糸については光学顕微鏡的観察結果¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾は多いが、その微細構造については全く報告されたものがない。本報告はごま葉枯病菌およびいもち病菌菌糸の微細構造を電子顕微鏡で観察した結果である。

本実験を行なうに当り、供試いもち病菌の分譲その他種々便宜を与えられた岐阜大学農学部植物病理研究室橋岡良夫教授に深謝の意を表する。

1. 供試菌および実験方法

供試菌は岐阜大学植物病理研究室保存のいもち病菌 J-8 号および京都大学植物病理学研究室保存のごま葉枯病菌 13 号であつて、両菌をそれぞれジャガイモ寒天培地に2週間培養し、その菌叢から白金耳で菌糸を採取して 2% KMnO_4 および 1% OsO_4 -phosphate buffer (pH 7.2) を用いて、氷室内で 3.5 時間固定した。水洗後エタノール系列で脱水し、epoxy 樹脂 (Epon-812 : DDSA : MNA = 7 : 6 : 4) に DMP-30 を 1.5% 加えたものに包埋し、60°C で 20 時間重合さ

* 本論文要旨の1部は昭和40年4月、日本植物病理学会大会において発表された。

** 農林省東海近畿農業試験場 Tokai-Kinki National Agricultural Experiment Station, Tsu, Mie, Japan.

*** 京都大学農学部 Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan.

せ、JUM-4 型ウルトラミクロトームで超薄切片を作製し、JEM-6C 型電子顕微鏡で観察した。

2. 観 察 結 果

両菌糸を 2% KMnO_4 あるいは 1% OsO_4 で固定し、包埋にメタクリル樹脂を用いた場合、細胞の破壊または細胞質のあれが著るしかつたが、epoxy 樹脂を使用することによってかなり緩和された。

(1). イネごま葉枯病菌菌糸

本菌糸の細胞壁は分生胞子のそれと同様に⁸⁾⁹⁾、内層 (IL)、中層 (ML)、外層 (OL) の 3 層からなるが、その厚さは平均 0.80μ で、胞子のそれに比べて著るしく薄い (Plate I, Fig. 1, 3)。しかし外層の厚さは菌糸先端部から離れるほど、また菌糸が老化するほど厚くなるようである (Plate I, Fig. 4)。菌糸内の核 (N) は球形 (径約 1.30μ) あるいは楕円形 (平均 $1.50 \times 1.00\mu$) であつて (Plate I, Fig. 5, 6)、細胞当たり平均 3-4 個が認められる。核膜 (NM) は核孔 (NP) を有する二重膜によつて構成され、核質は細胞質に比べて一般にやや電子密度が低く、核質と細胞質は核孔を通して直接連絡している (Plate I, Fig. 5)。多数の切片を観察したが、分裂中の核を認めることは困難であつた。ミトコンドリア (M) は多数菌糸細胞中に観察され、それらにはオスミウムに親和性の外膜 (二重構造) とクリステ (cr) およびオスミウムに染りにくい内部基質とが認められる (Plate I, Fig. 2)。ミトコンドリア (M) は楕円体と考えられるが、菌糸縦断あるいは横断によつて、それぞれ楕円形 ($0.76 \times 0.51\mu$) (Plate I, Fig. 1, 3) または円形 (径 0.60μ) を呈している (Plate I, Fig. 4)。ミトコンドリア内のクリステ (cr) は不規則であつて、同一細胞内のものについて見てもクリステが認め難いものも多数観察される (Plate I, Fig. 1)。なお本菌糸のミトコンドリアではクリステがその長軸に平行に位置している場合が多い (Plate I, Fig. 2)。内細胞質網状体 (ER) は細長く連続した二重膜系であり、切断方向によつて、管状または囊状物として認められる (Plate I, Fig. 1)。なお本菌糸内の ER はその表面に顆粒をもたない滑面内細胞質網状体である。細胞内には以上の細胞質顆粒のほか空胞 (V) と George ら²⁾が *Bacillus cereus* で観察した peripheral body が認められる (Plate I, Fig. 1)。菌糸先端部では細胞壁の外層は薄く、細胞質の電子密度は低い¹⁾が空胞はほとんど認められない。しかし老化した部分では外層が厚く、細胞中には空胞が多く認められ、それらが 2, 3 合体して

菌糸の切断面の大部分を占めるようになる (Plate I, Figs. 3, 4)。

(2). イネいもち病菌菌糸

本菌糸の細胞壁は分生胞子と同様、外層と内層とから成り、外層の電子密度が高い⁹⁾。外層、内層の厚さを菌糸と分生胞子で比べると、概して内層は菌糸において厚いが、外層は胞子において厚い。しかし外層、内層を合せた細胞壁の厚さでは、菌糸、胞子間に著るしい差を認め難い。菌糸の外層では、一部老化したものを除けば、電子密度は一般に分生胞子のそれよりも低い。本菌糸の細胞核は不定形 (長径 2.48μ 、短径 1.98μ) であつて (Plate II, Fig. 9)、菌糸の 1 細胞中に 1 核以上を含むものは認められなかつた。ごま葉枯病菌菌糸細胞と同様に、本菌糸の細胞核の電子密度は細胞質のそれよりも低く、クロマチン物質が認められる (Plate II, Fig. 13)。いもち病菌の菌糸および分生胞子を同じ固定液で固定して観察した結果では、菌糸細胞内のミトコンドリア (平均 $1.28 \times 0.62\mu$) は胞子細胞中のもの (平均 $0.60 \times 0.45\mu$) よりも大きく (Plate II, Fig. 8)、胞子内ミトコンドリアのクリステは菌糸細胞中のそれに比べて一般に不明瞭である (Plate II, Fig. 7, 8)。菌糸細胞中のミトコンドリアはその長軸を菌糸の伸長方向と平行に分布している場合が多く、ミトコンドリアのクリステ (cr) はその外膜に対して垂直に分布しているものが多い (Plate II, Figs. 7, 10)。本菌糸の細胞内には二重膜の円形構造¹⁾ (CMF) を認めたが (Plate II, Fig. 7)、これらの一部はミトコンドリアの先端部の断面とも考えられる。細胞内の内細胞質網状体 (ER) を観察した場合、平行に走る二重膜からなるものが多いが、たがいに複雑によじれ合つた二重膜をもつものを認めることもある (Plate II, Fig. 7, 11)。さらに Alfred ら¹⁾の観察した coiled membrane fragment 様構造と連絡している場合もある (Plate II, Fig. 12)。なお部分的に二重膜構造を消失しているように見えるのは ER の曲面に沿つて切断されたためであると考えられる。本菌糸を sudan III で染色し、光学顕微鏡で観察すると脂肪粒が認められるが、第 13 図はその脂肪粒と考えられ、平均、約 1.50μ の直径を有し、菌糸の先端部近くに多数認められた。

3. 論 議

バクテリア、菌類の内部微細構造についてはすでに多くの報告²⁾⁴⁾⁹⁾があるが、植物病原糸状菌の菌糸の微細構造に関する報告はきわめて少ない。本論文はイネ

Table 1 Fine structural comparison of mycelia of *Helminthosporium oryzae* and *Pyricularia oryzae*.

Fungi	<i>H. oryzae</i>	<i>P. oryzae</i>
Organelles		
Cell Wall	0.80 μ *	0.34 μ *
Outer Layer	0.25	0.10
Middle	0.33	—
Inner	0.22	0.24
Nuclear Size	1.50 $\times$ 1.00	2.48 $\times$ 1.98
Nuclear Number	Multinucleate	Uninucleate
Mitochondrion	0.76 $\times$ 0.51	0.62 $\times$ 1.28
Lipid Diameter	0.42	1.50

* The figures listed are mean values taken from 50 samples of individual fungal mycelia.

いもち病菌とごま葉枯病菌との菌糸の構造を比較するため、それら両菌の菌糸の内部微細構造を電子顕微鏡で観察した結果について述べたのである (Table 1)。

ごま葉枯病菌菌糸の細胞壁は分生胞子と同様に外層、中層、内層から構成されているが、胞子の細胞壁に比較して著しく薄い。水沢⁷⁾によると、いもち病菌分生胞子壁は少なくとも3層からなると報告されているが、筆者らの観察結果では、いもち病菌菌糸ならびに分生胞子の細胞壁は外層、内層の2層から構成されているようである。ごま葉枯病菌の菌糸の核は円形または楕円形を呈しているが、いもち病菌では概して不定形である。しかしその核膜は両菌とも二重構造を示し、内部にクロマチン物質が認められる。多数の切片の観察結果その他から判断して、いもち病菌菌糸の細胞は単核であると考えられるが、ごま葉枯病菌では多核 (平均 3-5 個) であつて、核の大きさも前者に比べて小さい。両菌菌糸の細胞質顆粒にも 2, 3 の相違が見られた。すなわち、いもち病菌菌糸細胞のミトコンドリアはごま葉枯病菌菌糸、分生胞子またはいもち病菌分生胞子中のミトコンドリアに比べて著しく大きく、楕円形 (1.28 $\times$ 0.62 μ) で *Candida albicans* の細胞中で長田⁸⁾が観察しているミトコンドリアと酷似している。一般にいもち病菌菌糸細胞内のミトコンドリアのクリステは外膜に対して垂直に配列していたが、ごま葉枯病菌の菌糸では大部分のミトコンドリアにおいて、クリステが外膜に平行に分布していることが多かった。

ごま葉枯病菌菌糸で観察された peripheral body は

原形質連絡帯 (隔膜孔) に接近して存在する円形構造 (径約 0.30 μ) であつて、その内部の電子密度は低い。George ら⁹⁾によれば、peripheral body は細菌の隔膜 (transverse cell wall) 形成に関係し、細胞壁物質の分泌に役立つものであるという。筆者らの観察では、この peripheral body 様の構造がごま葉枯病菌菌糸、分生胞子の隔膜孔付近にたびたび認められたことから George らと同様に隔膜形成に関係をもつものかと推察されるが、なお考察を要する。

ごま葉枯病菌菌糸の ER は二重の平行膜からなる場合のみを観察したが、いもち病菌菌糸の細胞では、膜がたがいによじれ合つた場合も認められた。すなわち、外層の厚い老化したとみられる菌糸細胞中では二重膜がたがいによじれ合つているようである (Plate II, Fig. 11)。

いもち病菌菌糸細胞中の円形構造 (CMF) は Alfred ら¹⁰⁾によつて生長静止期の原生動物 (*Tetrahymena pyriformis*) に認められている coiled membrane fragment ときわめて類似している。彼ら¹⁰⁾の報告によれば、coiled membrane fragment は空胞が破壊された場合、その空胞膜がコイルして生ずるものようであるが、筆者らの観察では、Plate II, Fig. 12 のように ER と連絡していることから、ER の変形構造とも判断される。しかし Fig. 9 に見られるようにミトコンドリア、その他の先端部の断面構造とも考えられる。脂肪粒 (L) はごま葉枯病菌菌糸中にはきわめて少ないが、いもち病菌菌糸先端部には多数存在する (Plate II, Fig. 13)。

以上述べたように、菌糸と分生胞子¹¹⁾ではその形態的微細構造は多少異なっているが、このような構造の差違は菌糸と胞子における生理的機能の差に関連するものかと考えられる。

4. 摘 要

本論文ではイネごま葉枯病菌菌糸およびいもち病菌菌糸の微細構造を電子顕微鏡で観察し、両菌糸の比較を行なつた。

1. ごま葉枯病菌菌糸の細胞壁は分生胞子と同様に3層からなり、厚さは平均、0.80 μ である。細胞内には平均、4個の核を (1.50 $\times$ 1.00 μ) 有し、さらに滑面内細胞質網状体、楕円体のミトコンドリア (0.76 $\times$ 0.51 μ)、隔膜形成に関係すると思われる peripheral body などが認められる。ミトコンドリアのクリステはその外膜に平行に配列している場合が多い。

2. いもち病菌菌糸の細胞壁は外層、内層の2層か

Plate II

らなり、その厚さは平均、 0.34μ である。本菌菌糸細胞は1個の核($2.48 \times 1.98\mu$) および種々の細胞質顆粒を含有する。ミトコンドリアは楕円体で、そのクリスタは外膜に対し垂直に分布するものが多く、滑面内細胞質網状体には複雑によじれ合つた膜構造がみられる。また、脂肪粒(径 1.50μ)は菌糸先端部近くに多数存在する。

引用文献

1. Elliott, A. M. and Bak, I. J. (1961). J. Cell Biol. 20 : 113-129.
2. George, B. C. and James, H. (1953). J. Bact. 66 : 362-373.
3. 堀野 修・赤井重恭 (1965). 日本菌学会報 66 : 41-46.
4. Lillian, E. and Patricia, A. (1953). J. Gen. Microbiol. 31 : 491-494.
5. Matsui, C., Nozu, M., Kikumoto, T. and Matsuura, M. (1962). Phytopath. 52 : 88-89.
6. Matsui, C., Nozu, M., Kikumoto, T. and Matsuura, M. (1962). Phytopath. 52 : 717-718.
7. 水沢芳名 (1959). 植物防疫 13 : 717-718.
8. 長田昭夫 (1962). 米子医誌 13 : 4-24.
9. 野津幹雄・松井千秋 (1959). 日植病報 24 : 135-138.
10. 鈴木橋雄・渡辺 実・細川大二郎・岡本利高 (1964). 日植病報 29 : 56. (講要).
11. 八木広男 (1958). 日植病報 23 : 135-138.
12. 山崎義人・新関宏夫 (1964). 日植病報 29 : 56 (講要).

(京大植病 No. 213)

Explanation of plates

Plate I. Hyphae of *Helminthosporium oryzae*

1. Cell wall (OL, ML, IL) and peripheral bodies (PB) in a longisection of hypha.
OL: outer layer, ML: middle layer, IL: inner layer, ER₁: endoplasmic reticulum, M: mitochondrion, S: septum, PM: plasma membrane.
2. Cristae (cr) in a mitochondrion (M).
3. A longisection of hyphal cell.
V: vacuole, T: tonoplast.
4. A cross section of the aged hyphal cell.
5. Nucleus (N) with a distinct nuclear membrane (NM) in a longisection of hypha.
NP: nuclear pore.
6. A cross section of hyphal cell.

Plate II. Hyphae and conidium of *Pyricularia oryzae*.

7. A cross section of hyphal cell.
CMF: coiled membrane fragment, ER₂: endoplasmic reticulum with twisted double membrane, L: lipid granule.
8. Nucleus (N) and mitochondrion in a longisection of conidium.
9. Nucleus and mitochondrion in a cross section of hypha.
10. Mitochondrion (M) in a longisection of hypha.
11. A nucleus with distinct chromatin substance and endoplasmic reticulum (ER₂) in a longisection of hypha.
12. A cross section of hypha, an endoplasmic reticulum (ER₃) is connected with the coiled membrane fragment.
13. A nucleus (N) and lipid granules (L) in a longisection of hypha.