アカクローバ茎割病に関する研究

第3報 抵抗性を異にした寄主組織への病原菌の侵入過程

佐久間 勉*・島 貫 忠 幸*

Tsutomu SAKUMA* and Tadayuki SHIMANUKI*: Studies on Northern Anthracnose of Red Clover, Caused by *Kabatiella caulivora* (Kirchn.) Karak.

3. Histological observation of the anthracnose symptom development on resistant and susceptible clones

Abstract

Observation on the process of infection of red clover by *Kabatiella caulivora* was made to compare the response of resistant and susceptible clones of host plant.

Conidial germination by germ tube formation on the epidermal tissues began 16 hours after inoculation, and actual penetration was observed 48-72 hours after inoculation. Appressoria were not detected.

There was no difference in percentages of conidial germination on the epidermal tissues between resistant and susceptible clones. Hyphae were found to penetrate through cuticular layer. In the case of the resistant clones, cells at the infection site were not killed in the early stage of infection.

Growth of the fungus within the host tissue was as follows: hyphae 2.5-4.0 μ in diameter elongated in the intercellular space and reached phloem but no haustorium was observed within the cells. The hyphae did not penetrate into the xylem, but into the phloem. In the phloem, hyphae increased from 2.5-4.0 μ to 8.0-12.5 μ in diameter and formed abundant branches and septa. Finally the phloem collapsed.

The difference in the hyphal growth and symptom development between the tissue of both clones was as follows. Symptoms: elongated lesions about 20 mm in length, having water-soaked appearance, appeared on the petioles of the susceptible clone 6 days after inoculation; conversely, there were minute black flecks on those of the resistant clone 7 days after inoculation. Sometimes lesions with black margin appeared on the petiolules of the resistant clone 9 days after inoculation. Hyphal growth: microscopical observation was made on transverse sections of young lesions 7 days after inoculation. Degenerated cells, showing a slight browning, extended to the phloem in the susceptible clone. These degenerated cells finally collapsed. Conversely in the resistant clone, degeneration of the infected tissue showing deep browning was limited to 2-3 cell layers. These cells were found to be coagulated.

Regardless of the water-soaked type or the minute black fleck type of lesions, hyphae were observed in the intercellular space of tissues around the lesions.

(Received January 12, 1970)

緒 言

本病病原菌 (*Kabatiella caulivora* (Kirchn.) Karak.)

* 北海道農業試験場 Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Sapporo, Japan.

の寄主組織への侵入過程に関して、Cole *et al.*¹⁾, Sampson²⁾らは侵入後の菌糸の行動には細胞間げき進展と細胞内進展の両方があると述べている。しかし、詳細な記載はなく、とくに抵抗性および罹病性個体間の比較において侵入過程の観察を行っていない。

本報告は病原菌の侵入から病斑形成までの過程を抵抗性および罹病性個体について顕微鏡観察を行ない、本病に対する抵抗性機作を解明するための問題点を明らかにするために行なった実験の結果である。

本研究を進めるにあたり有意義なご意見を賜わり、また本稿を草するにあたり校閲の労を願った当場草地開発部牧草第3研究室長荒木隆男博士に感謝の意を表す。

実験材料および方法

供試菌：供試菌はケンランドから分離した北農試保存 K-1 菌であり、本菌を前報³⁾に準じ、19°C、4日間、液体培地で培養後、菌体を遠心分離機で洗浄し実験に供用した。

供試植物：前報⁴⁾に述べた感受性程度の明らかに異なる個体（第1表）を株分けまたは挿木法によりガラス室内で増殖し、接種には刈取後再生した3-4週間目の植物を供試した。

接種方法：切離葉柄に対する接種は、上記植物の未展開葉から第2-3葉の葉柄を切り取り、水洗後濾紙を敷き湿室としたペトリ皿にならべ、孢子濃度 5×10^5 /ml 前後の液を噴霧し、19°C の恒温器に保った。

成植物に対する接種は、孢子濃度 10^6 /ml 前後の液を水滴が流れない程度に噴霧し、小沢式接種装置に19°C、48時間保ったのち18-23°C のガラス室に移し、1日4-5回噴霧器で散水し湿度を保った。

観察法：病斑形成過程を次の3期にわけ、おもに葉柄について観察した。

- (1) 侵入初期…孢子発芽から表皮細胞貫穿まで。
- (2) 侵入中期…表皮細胞から内部組織への侵入。
- (3) 病斑形成…節部への菌糸の到達および病斑形成。

侵入初期の観察はかみそりで表皮をはぎとり直接または、アニリンブルーで染色して観察した。組織内部の菌糸の観察は接种植物から採取した葉柄を、カーボワックス包埋切片法⁵⁾およびスライディング・ミクロームによる切片について顕微鏡観察を行なった。

結 果

1. 供試個体の感受性程度

供試個体の感受性程度を次の基準によって第1表のように表現した。すなわち、素焼鉢に個体植えとした植物に 10^6 /ml 濃度の孢子液を接種し、初発病までの日数・接種10日後の罹病程度・病斑型の3点の比較によった。

Table 1. Susceptibility of clones used

Clones	Original cultivar	Symptom	Latent period
R	Lakeland	Minute black flecks on stem and petiole.	9 days
S	Medium	Longitudinal grayish-brown spots on stem and petiole.	6 days

Table 2. Comparison of percentages of conidial germination on the surface of resistant and susceptible clones

Clones	Germination (%)			
	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Aver.
S-1	36.5	33.5	19.8	29.9
S-2		54.4	9.8	32.1
R-1	16.7	52.9	30.3	33.3
R-2	4.6	39.5	19.8	21.3

Observation was made 48 hours after inoculation.

S: Susceptible clone.

R: Resistant clone.

抵抗性個体(R): 接種9日後に小葉柄に暗黒色の病斑を発見するが、以後小葉柄部から拡大することはまれであった。また、葉柄および茎に黒褐色小点を形成するが、以後の拡大はまれであった。

罹病性個体(S): 接種6日後に水浸状進展性の病斑を発現する。10日後の罹病程度は小葉柄では30-40%が罹病し、葉柄では2cm前後の大型病斑を導管組織に沿って形成し、隣接する2,3の導管組織が崩壊、葉柄が捻転垂下するものが多かった。

2. 供試個体上における孢子発芽比較

本菌分生孢子は水滴中ではごくわずかに発芽するだけであるが、アカローバ表皮上の水滴中では良く発芽する³⁾。この分生孢子の発芽が本病に対して抵抗性および罹病性のアカローバ植物体上で差があるか否かについて、切離葉柄上で観察を行なった。その結果は第2表のとおりであった。すなわち、発芽は接種16時間後から認められたが、接種48時間後における発芽率では両者間に明瞭な差異が認められなかった。

3. 病斑形成過程

(1) 表皮への侵入

発芽管の表皮への接触、侵入過程を図3に示した。菌は侵入に際し特別な付着器または菌糸塊を形成することはなかったが、若干先端が太くなる傾向にあった。侵入部位は表皮細胞、およびその縫合部の別なく

侵入が認められたが、表皮から直接侵入するケースが多い。

表皮から侵入した菌糸がのちに表皮細胞壁とクチクラ層間を移行する過程の正確な観察は本試験ではできなかったが、多くの場合図 2 のような変形形態菌糸になる。また図 3 に示したように菌糸が表皮細胞壁と原形質膜間を走るような場合も観察されたが、この点については、さらに精密な観察を行ない確かめたい。病原菌の表皮貫穿部位および変形菌糸の周辺は橙黄色を呈したが、これは原形質分離を起こさせてからの観察によると変形菌糸の周辺では細胞壁に変形菌糸が接触した部分にだけ認められた。

縫合部侵入の場合には、おもに侵入部位にだけ橙黄色の変色が認められ、表皮細胞間をただちに第 2 細胞間げきに移行し、図 2 に見られるような変形菌糸を伸ばす例は少なかった。

以上の過程で 0.8 M ショ糖液で原形質分離をおこさせ寄主細胞の生死を確かめたところ抵抗性個体の侵入部位細胞が短時間に死に到る例はなく、この段階では抵抗性および罹病性個体間で差異は見出されなかった。

(2) 侵入中期

a) 前期: 表皮細胞間を迷走した変形菌糸はその後表皮細胞層と第 2 細胞層との間げき (図 4) に入り進行するが、このときの菌糸は普通の形態となる。その速度は接種第 3 日後の切片観察によると、侵入部位細胞から約 2-3 細胞であるが、まだ第 2 細胞層より深部には到達していなかった。菌糸は細胞内に吸器を挿入したり、第 2 層細胞内に菌糸が直接侵入することもみられなかった。

この段階でもまだ抵抗性および罹病性個体間で差異は認められなかった。

b) 後期: 菌糸は図 8 に示すように、ところどころで分枝し細胞間げきを進む。分枝するときには多くの場合隔膜を形成した。菌糸は吸器を細胞内に挿入、または菌糸が直接細胞内に侵入することはなかった。さらに菌糸の先端が接触する細胞は外観健全とみられた。

やがて細胞間隙を走った菌糸は節部に到達するが、接種第 7 日後における抵抗性、罹病性個体の病斑を切断して比較すると次のとおりであった。

病斑の形では、罹病性個体では 20 mm 前後の水浸状進展型病斑 (water-soaked lesion) であり、抵抗性個体では一般には黒褐色止り型 (minute black-fleck) である。これらの切片について顕微鏡観察を

行なうと図 9, 10 に示したように、罹病性個体では水浸状に褐変した細胞が節部にまでおよんでおり、節部の崩壊している場合も認められた。抵抗性個体では表皮細胞から 1-2 細胞層が黒褐色に変色しており、これら細胞は凝固していた。以上のように抵抗性、罹病性の差は明瞭であった。これら被害を受けた細胞周辺の健全細胞間げきには菌糸が認められた。

(3) 病斑形成

罹病性個体: 細胞間げきを迷走した菌糸は太さ約 $2.5-4\mu$ であったが、節部到達後は節部組織内で多分枝、多隔膜の菌糸 (図 12, 13, 14) となり、太さも $8-12.5\mu$ と約 3 倍となった。このような菌糸が節部内に形成されると節部は崩壊し、病斑は節部沿いに急速に拡大して、2-3 隣接節部にまでおよび、葉柄は捻転垂下する。茎では病斑中心部が縦に割れて、いわゆる茎割症状を呈しいちじるしい被害となる。

抵抗性個体: 葉柄上に水浸状進展型病斑を形成することはなく、一般には黒褐色止り型病斑を形成することは前述のとおりである。この種の病斑切片を観察すると、黒褐色細胞は節部にまでおよび太い菌糸が節部組織内に認められるが (9 日以降)、節部組織は黒褐色を呈し病斑のすみやかな拡大は認められなかった。

抵抗性個体の特徴として、小葉柄部に感染が認められるが、この場合も黒褐色止り型病斑の形成にとどまり、病斑が下方におよぶのは 1 mm 前後である。また葉片への病斑の拡大も認められず、この種病斑は小葉柄部の黒褐色の病斑で止まる。

考 察

アカクロローバ茎割病菌分生胞子は、水滴中ではごくわずかに発芽するだけであるが、寄主組織表皮上の水滴中で良く発芽する性質がある。この侵入前の行動では抵抗性および罹病性個体間で差は認められない。さらに侵入初期、すなわち表皮細胞貫穿時においても両者間に差は認められなかった。

侵入した菌糸は細胞間げきを迷走し内部組織に伸長するが、この侵入後の拡大の過程で両者間に差異が認められた。すなわち罹病性個体では侵入後細胞間げきを分枝しながら細胞を殺すことなくすみやかに節部組織に到達し、約 6 日後に水浸状進展型の病斑を形成する。節部組織に到達した菌糸は太さを増し ($2.5-4\mu$ から $8.0-12.5\mu$ になる)、分枝をさかんにして、やがて節部を崩壊する。一方、抵抗性個体では一般には黒褐色小点で止る。切片観察の結果、黒褐色細胞は一般には表皮細胞から 2-3 細胞で止り、それら細胞は凝固

Plate I

1

2

3

4

5

6

7

8

Plate II

9

10

11

12

13

14

していた。また抵抗性個体の病徴の一つとして小葉柄が侵される場合がある。この場合は、切片観察によると太型の菌糸は節部内に認められるが、組織は黒褐変しており病斑は小葉柄から他に進展するのはまれである。

以上が抵抗性および罹病性個体における病斑組織の顕微鏡観察の差であるが、いずれの場合にも病斑周辺の健全細胞の間げきに菌糸が確認される。このことから抵抗性個体においては、その褐変組織内およびその周辺組織において抗菌性物質の生産、または菌の生育促進物質の不活性化がおきているか、さらには物理的な抵抗組織が形成されることにより菌糸の進展が抑制されているものと考えられる。

一般に導管病といわれている *Verticillium* 菌による萎凋性病害では、菌は節部では繁殖せず²⁾、導管内で良く生育し寄主に被害を与える。*Kabatiella* 菌は節部で良く繁殖し寄主に被害を与えるが、導管内に菌が存在するのはごくまれであった。

摘 要

K. caulivora 菌のアカクロバ植物への侵入過程を抵抗性および罹病性個体間の比較において顕微鏡観察を行なった。

1. 抵抗性および罹病性個体葉柄上における病原菌分生胞子の発芽率には明瞭な差異は認められなかった。

2. 侵入の際に付着器および菌糸塊の形成は認められなかったが、若干先端が太くなる傾向にあった。

3. 侵入後菌糸は細胞間げきを迷走するが、吸器を細胞内に挿入したり、直接菌糸が細胞内に侵入することとはなかった。

4. 菌糸は節部内でさかんに増殖したが、導管内にはごくまれにしか認められなかった。

5. 抵抗性個体、罹病性個体間で次の点において差異が認められた。

罹病性個体：水浸状進展性の病斑が接種6日以降に発現する。切片観察によると菌糸は節部組織内に侵入したのちさかんに分枝し、多くの隔膜を形成する。この時期になると菌糸の太さは $2.5\text{--}4\mu$ から $8\text{--}12.5\mu$ と約3倍になり節部を崩壊する。

抵抗性個体：黒褐色止り型病斑を形成する。切片観察によると2-3細胞層が黒褐色となり凝固している。抵抗性個体の特徴の一つとして、小葉柄が罹病する場合がある。これらは黒褐色止り型病斑であり、節部内に太型の菌糸が認められたが、その周辺は黒褐色の組織に囲まれ急速に進展することなく小葉柄部分に極限される。

図6. 進展性、止り型病斑の別なく、病斑組織周辺の健全細胞間げきに菌糸の存在が確認された。

引用文献

1. Cole, H. J. and Couch, U. B. (1958). *Phytopathology* 48 : 326-331.
2. Garber, R. H. and Houston, B. R. (1966). *Ibid.* 56 : 1121-1126.
3. 佐久間 勉・酒井隆太郎 (1970). 北農試集報(投稿中)
4. 佐久間 勉・島貫忠幸・酒井隆太郎(1970). 日草誌(投稿中)
5. Sampson, K. (1928). *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 13 : 103-142.
6. 高橋幸吉 (1956). 日植病報 21 : 201-203.

Explanation of Plates

Kabatiella caulivora on red clover

Plate I

- 1-3. Early stage of penetration of epidermal cell.
- 4-7. Transverse section of young lesion on red clover petiole. Hyphae are seen in intercellular space.
8. Longitudinal section of young lesion. Branched hyphae are seen in the intercellular space.

Plate II

- 9-11. 9 : Transverse section of lesion in resistant clone; 10 : in susceptible clone; 11 : healthy tissue.
- 12-14. Hyphae in the phloem.