べと病菌感染ダイコン葉表面の走査型電子顕微鏡像*

白石雅也**・坂本和成**・浅田泰次**

永谷 隆***・肥高 洋***

Masaya SHIRAISHI**, Kazunori SAKAMOTO**, Yasuji ASADA**, Takashi NAGATANI*** and Hiromi HIDAKA***: A Scanning Electron Microscopic Observation on the Surface of Japanese Radish Leaves Infected by *Peronospora parasitica* (Fr.) Fr.

Abstract

Surface ultrastructure of conidia, germ tubes, appressoria and conidiophores of *Peronospora parasitica*, and of the diseased leaves (*Raphanus sativus*) was observed by the scanning electron microscopy. Mature conidia were approximately $7 \times 10 \mu\text{m}$ in length. Most of appressoria were connected laterally with the germ tube. Appressoria and germ tubes had smooth surfaced structures. Penetration pegs can usually be found on the surface of the diseased region when materials were fixed 4 days after inoculation. Usually, cuticular penetration was observed, and stomatal infection was sometimes found. Conidiophore was formed through the stoma. In the early stages of conidiophore formation, no concave image was found in the basal region of the conidiophore, and then a contracted image was found in the region when the conidiophore developed. This seems to be caused by the mechanical pressure of stomatal guard cells. A wrinkled surface of young conidiophore was also observed. Conidia were formed directly from the swelling tips of the conidiophore, and they had the same surface structure as the conidiophore. Old conidia, however, had many wart-like structures, although the mature conidiophore had a smooth surface. Stomata on naturally infected leaves seem to expand more remarkably as compared with those of healthy ones. The surface of the diseased region also showed a crumpled image by exfoliation of wax and cuticular substance.

(Received February 9, 1974)

緒 言

Peronospora parasitica の宿主への侵入方法は、ハクサイでは気孔侵入⁸⁾、キャベツ、カブ、アブラナなどでは表皮細胞ほう合部侵入³⁾、エンドウの *P. pisi* では気孔侵入²⁾、タバコの *P. tabacina* では角皮侵入⁶⁾、ネギの *P. schleideni* およびホウレンソウの *P. spinaciae* では気孔侵入^{17,18)}、*P. aparines* は6科10種の植物に対して表皮細胞ほう合部侵入を行なうが、

イヌガラシ、オニタビラコでは気孔侵入、コマツナでは角皮侵入することが観察されている¹⁰⁾。Chou⁴⁾ は *P. parasitica* がキャベツ子葉の表皮細胞ほう合部から侵入すると述べ、その感染様相を透過型電子顕微鏡を用いて詳細に観察している。しかし *P. parasitica* の宿主侵入、分生子梗および分生胞子形成について走査型電子顕微鏡(走査電顕)を用いて観察した報告は見当たらない。筆者らはダイコン葉での *P. parasitica* の侵入様相、分生子梗および分生胞子形成、罹病組織

* 植物病理学研究室業績 No. 17.

** 愛媛大学農学部 College of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790, Japan.

*** 日立製作所那珂工場応用技術部 Application Laboratory, Naka Works, Hitachi Ltd., Katsuta 312, Japan.

表面の構造などについて走査電顕を用いて観察したので、その結果を報告する。なお用いたダイコンベと病菌の学名は Yerkes ら¹⁹⁾ にしたがって *P. parasitica* (Fr.) Fr. を用いた。

実験材料および方法

圃場で採集したベと病罹病ダイコン葉を一夜湿室に保ち、新しく形成された分生胞子を用いて、宮重ダイコン葉 (播種後約2カ月の成葉) 裏面に点滴接種し、接種後2日および4日目の接種部を材料とした (図1~19)。また圃場で自然発生した宮重ダイコン葉のベと病病斑もあわせて用いた (図20~26)。これらの材料を5mm²に切り取り、2.5% グルタルアルデハイド液で1時間固定し、臨界点乾燥器 (HCP-1) で脱水し、炭素および金で二重蒸着し、日立 HSM-2B 型走査電顕を用いて観察した。写真撮影時の加速電圧は5~20 kV である。

観 察 結 果

分生胞子の大きさは7×10 μm であって表面はかなり粗であり、全面にいぼ状構造がみられる (図版 I-1, 2)。宿主への侵入方法には、気孔侵入、表皮細胞ほう合部侵入および角皮侵入の3種類がみられた。接種後2日目の試料では分生胞子は発芽して、発芽管が伸長しており、その直径は2~3 μm である (図版 I-3, 5, 7)。気孔侵入の場合では、付着器は気孔上に形成され、気孔腔内部へ侵入糸が伸展し始めている (図版 I-3~6)。なお角皮侵入の場合、侵入糸の直径は侵入部位の表面構造から2~3 μm と推定される (図版 I-7, 8)。接種後2日目の試料では、分生胞子はなお完全に収縮していないが、発芽管や付着器などは顕著に収縮しており (図版 I-7, 8)、接種後4日目の試料では、それら諸器官の収縮度は分生胞子、発芽管、付着器の順に顕著であった (図版 II-9~14)。これはそれら諸器官の内容物が組織内菌糸に移行したためと考えられ、試料固定の結果生じたものではない。一般に発芽管はかなり短い (2~5 μm) (図版 I-5, 7, II-9, 14)、長いもの (10~20 μm) もしばしば認められた (図版 II-10, 13)。しかしその長短は本菌の気孔あるいは角皮侵入とは無関係である。図版 II-12, 14 は角皮侵入の場合であり、付着器はほとんど収縮し、表皮細胞上に侵入糸の貫せん跡が認められた。

病徴発現後、すべての分生子梗は気孔から新生する (図版 III-15, 16, 18)。新生初期の分生子梗の基部はごくわずかに陥入しているに過ぎないが、分生子梗の長

さが約12 μm になると孔辺細胞の機械的圧迫によるためか、くびれが大きくなるようである。本実験に用いた試料では、細胞ほう合部その他の部分からの分生子梗形成はまったくみられなかった。図版 III-16, 18 は分枝中の分生子梗である。新生初期の分生子梗の表面には、波状構造がある (図版 III-17)。分生胞子の形成法は図版 III-19 および 20 に示すように先端がふくらみ始め、その後成熟胞子となるので、同じ分生子梗上では、分生胞子はほぼ同調して形成されるものと思われる。分生子梗および形成初期の小型分生胞子の表面には、波状模様があり (図版 III-19)、成熟した分生子梗の基部の表面構造とはかなり異なっていた (図版 IV-26)。

肉眼的に菌そうがわずかに認められ、表面が褐変している病斑部では、表皮細胞壁のワックスおよび角皮層はよく離れていた (図版 IV-21)。また自然発生病斑では酵母状の菌類がしばしば随伴していた (図版 IV-24, 矢印)。健全部の気孔 (長径3.5 μm, 短径1.5 μm) には2個の孔辺細胞と数個の副細胞が大型の表皮細胞で取り囲まれている (図版 IV-25)。新しい病斑部の気孔は長径3 μm, 短径1.5 μm で健全部のものと大差はないが (図版 II-9, 10, IV-21)、古い病斑部の気孔は長径4.5 μm, 短径3 μm であって、健全部の気孔にくらべて大きく開いていた (図版 IV-22, 23, 24)。病斑部ではワックス、角皮層のはく離 (図版 IV-21)、気孔の著しい開き (図版 IV-22, 23, 24)、表皮細胞壁の収縮 (図版 IV-22, 23, 26) などがみられ、臨界点乾燥法による走査電顕での観察によって、罹病部および健全部両組織の表面構造の差を容易に区別できた。

考 察

ベと病菌は気孔侵入^{1,2,5,7,8,14,16,17,18)}、細胞ほう合部侵入^{3,4,10,11,12,13,15)}、角皮侵入^{1,6,13)} などを行なうことが知られている。走査電顕を用いた筆者らのダイコン葉上でも、本菌が気孔、細胞ほう合部および角皮侵入することが明らかになった。そして孔辺細胞と副細胞およびそれらのほう合部への直接侵入が、低倍率の写真判定から他の表皮細胞壁およびほう合部侵入にくらべるとやや多いように思われた。朱³⁾ はハクサイ、アブラナ、キャベツ、キョウナ、カブなどの葉上では、本菌は細胞ほう合部から侵入すると述べ、気孔侵入を否定している。それは本菌にも生態型があって、そのために侵入方法の相違が生ずるのではないかと推論している。その後、本菌がなぜ気孔侵入したり、角皮侵入したりするのかについてはまったく検討されていない

い。筆者らの場合でも供試菌に生態型の相違があったのか、あるいは宿主品種によって種々の侵入法がみられるのかは判別できなかった。したがって今後異なる品種に同系統の病原菌を接種して侵入方法の差があるかどうかを比較検討せねばならない。べと病菌にもさび病菌やうどんこ病菌のように、当然生態型があると思われるが、今後の一つの研究課題である。岩田¹⁰⁾は *P. aparines* をオニタビラコ葉に接種すると、表皮細胞ほう合部侵入を行なう場合には発芽管が短く、気孔侵入の場合には長い、それは発芽管が植物体表面を伸長したのち気孔に達するためであるとし、事実気孔侵入の例は少ないと述べている。しかし筆者らの観察では、このような関係はまったく認められなかった。本菌は侵入後の時間的経過に伴って分生孢子、発芽管および付着器が収縮し始める。接種後4日目では、これらの諸器官は完全に収縮していた。これはそれら諸器官内容物の宿主細胞内菌糸への移行と残存諸器官の変性によるものと考えられる。

べと病菌の分生子梗が気孔から発生することは古くから知られている^{7,9)}。筆者らの観察では、1個の気孔から2本の分生子梗あるいは分岐した分生子梗などが認められた。新生初期の分生子梗の表面は粗で、幅約0.2 μm の波状模様を持っている。分生孢子は分生子梗の先端がふくれて外生される。若い分生孢子および分生子梗の先端部の表面構造はよく似ており、顕著なしわ状構造があって、分生孢子は明らかに分生子梗の先端の分化したものと考えられる。分生孢子が成熟して分生子梗から離れる部分は分生孢子新生初期には観察できなかった。成熟した分生子梗の基部はくびれているが、その新生初期にはほとんど認められない。したがって、これは分生子梗発達時における気孔の機械的圧迫によるのではないかと考えられ、気孔孔辺細胞がこの時期では生きていることを示していると思われる。

自然発生した病斑部表面を観察すると、酵母状の菌(未確認)および多数の菌類が認められた。それらは新しく葉上に落下した分生孢子的付近に比較的多くみられた。これらは随伴菌とも考えられるが、それらのべと病菌あるいは宿主への影響などについてはまったく不明である。なお病斑が進展すると、葉表面のワックスおよび角皮層のはく離、表皮細胞壁のしわ、開いた気孔などが認められた。これらは病原菌による宿主細胞の変性の1パターンと考えられる。

摘 要

べと病菌の宿主葉への侵入方法、分生子梗および分生孢子形成、病斑部と健全部との表面構造の相違などを臨界点乾燥法を利用して走査顕微鏡で観察した。本菌の成熟分生孢子的の大きさは $7 \times 10 \mu\text{m}$ で、表面にはいぼ状構造がある。本菌は気孔、表皮細胞ほう合部および角皮侵入の3種類の侵入方法をとる。接種後2日目では、分生孢子から発芽管、付着器などが形成される。2日目以後では、葉上の菌体諸器官は顕著に収縮した。これはそれらの内容物が侵入糸および組織内菌糸に移行したためと思われる。発芽管長は $2 \sim 20 \mu\text{m}$ であったが、その長短は気孔および角皮侵入の差に無関係であって、本菌のダイコン葉への侵入は、角皮侵入が多かった。分生子梗はすべて気孔から新生する。新生初期では、分生子梗の基部はほとんどくびれていないが、分生子梗の成熟に伴ってくびれが生ずる。新生初期の分生子梗の表面には波状構造がある。分生孢子は、分生子梗の先端がふくらんで形成される。形成初期の小型分生孢子和分生子梗の表面構造とはよく類似しており波状模様があるが、成熟したものでは前者にはいぼ状構造があるが、後者にはみられない。病斑部の気孔は健全部のそれにくらべて顕著に開いており、ワックス、角皮層のはく離、表皮細胞壁のしわなどが顕著であった。

引用文献

- 1) Butler, E. J. (1918)*. Fungi and Diseases in Plants. pp. 298.
- 2) Campbell, L. (1935). Bull. Wash. State Coll. Agr. Exp. Stn. 318: 1-42.
- 3) 朱学曾 (1935). 日植病報 5: 150-157.
- 4) Chou, C. K. (1970). Ann. Bot. 34: 189-204.
- 5) Gregory, F. G. (1912). Phytopathology 2: 235-249.
- 6) Henderson, R. G. (1937). Phytopathology 27: 131.
- 7) 樋浦 誠 (1964). 植物病原菌類解説. 養賢堂, 東京, pp. 85-97.
- 8) 銚方末彦・山内己酉 (1931). 病虫害雑誌 18: 93-99.
- 9) 伊藤誠哉 (1936). 大日本菌類誌第一巻. 養賢堂, 東京, pp. 227.
- 10) 岩田吉人 (1940). 日植病報 10: 204-214.
- 11) 岩田吉人 (1943). 日植病報 12: 97-108.
- 12) Preece, T. F., Barnes, G. and Bayley, J. M.

- (1967). Plant Pathol. 16: 117-118.
- 13) Richards, M. C. (1939)**. Bull. Cornell Univ. Agr. Exp. Stn. 718: 29.
- 14) Schults, H. (1937). Phytopath. Z. 10: 490-503.
- 15) Whitaker, T. M. and Pryor, D. E. (1943). Stain Technol. 18: 121-123.
- 16) Wolf, F. A. (1947). Phytopathology 37: 721-729.
- 17) Yarwood, C. E. (1939). Phytopathology 29: 933-945.
- 18) Yarwood, C. E. (1943). Hilgardia 14: 595-691.
- 19) Yerkes, W. D. Jr. and Shaw, C. G. (1959). Phytopathology 49: 499-507.
- * 印の文献は岩田¹⁰⁾, ** 印は Chou⁴⁾ の引用文献による。

記 号 説 明

A: Appressorium	付 着 器
C: Conidium	分 生 胞 子
CP: Conidiophore	分 生 子 梗
DT: Diseased tissue	罹 病 組 織
E: Epidermal cell wall	宿主表皮細胞壁
G: Germ tube	発 芽 管
GC: Guard cell	孔 辺 細 胞
HT: Healthy tissue	健 全 組 織
J: Junction line of the epidermal cell wall	表皮細胞ほう合部
S: Stoma	気 孔

図 版 説 明

図版 I, II 分生孢子, 発芽管および宿主への初期侵入様相。

1. 成熟した分生孢子。表面は粗で、いぼ状構造がある。
2. 成熟した分生孢子的分生子梗からの離脱初期。
3. 付着器が気孔上に形成され、気孔腔内部へ侵入糸が伸展を始めている。
4. 3. の拡大図。形成初期の付着器にはしわ状構造がある。
5. 発芽後 48 時間以内の病原菌。付着器が気孔上に形成され、気孔侵入を始めている。
6. 5. の拡大図。侵入は機械的作用だけでなく、付着器が孔辺細胞に接する部分では表皮細胞のわずかな変性が認められる。
7. 角皮侵入。発芽管は孢子的側面から生じている。
8. 7. の拡大図。付着器はかなり収縮している。
9. 孔辺細胞と副細胞との細胞ほう合部への侵入。
10. 副細胞への角皮侵入。発芽管はかなり伸びているが、侵入は気孔の有無には関係しない。
11. 9. の拡大図。付着器の表皮細胞壁への接着のための粘性物質はあまりみられない。
12. 10. の拡大図。発芽管、付着器は顕著に収縮し、侵入糸の侵入した円形跡が表皮細胞壁に認められる。
13. 長い発芽管を有する病原菌の角皮侵入。気孔および細胞ほう合部の有無に関係せず角皮侵入を行なっている。
14. 短い発芽管での角皮侵入。分生孢子は気孔に接着しているにもかかわらず、気孔の反対側の分生孢子壁から発芽し、角皮侵入を行なっている。

図版 III, IV 分生子梗の発生およびその伸展と分生孢子形成。

15. 分生子梗はかならず気孔から発生し、同時に2本出ることもある。
16. 新成初期の分枝中の分生子梗。
17. 新成初期の分生子梗表面。波状構造がある。
18. かなり伸長した分生子梗。基部にくびれができて始めている。
19. 分生孢子形成初期。分生子梗の先端がふくれて分生孢子が形成される。分生子梗、分生孢子とも表面構造は類似している。
20. 成熟して房状になり始めた分生孢子群。
21. 分生孢子のない分生子梗。図の右上部は比較的若い病斑部であって表皮細胞のワックスおよび角皮層のはく離がみられる。
22. 病徴の進展した病斑部。病斑部の表皮にはしわができ、開いた気孔がみられる。
23. 分生子梗の多発した病斑部。
24. 病徴の進展した病斑部。分生子梗基部にくびれがみられる。酵母状の菌類が随伴している(矢印)。
25. 健全部の気孔。2個の孔辺細胞と数個の副細胞から構成されている。
26. 分生子梗基部は気孔の機械的圧迫のためかくびれている。宿主表面はしわが顕著である。