親和性および不親和性組合せでのイネ

いもち病菌感染葉の電顕観察

Ⅲ. 葉鞘裏面表皮細胞の抵抗性発現と原形質分離能喪失*

古賀博則**・堀野 修***

Hironori KOGA** and Osamu HORINO***: Electron Microscopical Observation of Rice Leaves Infected with *Pyricularia oryzae* Cav. in Compatible and Incompatible Combinations

III. Resistance Expression and Loss of Capability for Plasmolysis in Inner Epidermal Cells of Leaf-Sheath*

Abstract

Light and electron microscopic studies were carried out to clarify the relationships between cytoplasmic granulation and hypersensitive cell death in the inner epidermal cells of rice leaf-sheaths inoculated with an incompatible race of *Pyricularia oryzae* Cav. Hypersensitive cell death, as determined by the loss of capability for plasmolysis, was clearly observed by electron microscopy when the epidermal tissues were treated with a hypertonic sucrose solution. In the incompatible combination between race 037 and var. Toride 1 (resistance gene *Pi-z¹*), fragmentation of plasma membranes and destruction of the unit membrane structure were observed in infected epidermal cells that did not plasmolyze. Disruption of the plasma membrane was also observed in non-plasmolyzed cells, suggesting that membrane disruption was not caused by the plasmolysis treatment. Infected epidermal cells in the incompatible combination were found to be alive until invagination and lomasome-like structures were formed in plasma membranes. In the compatible combination between race 037 and var. Koshihikari, ultrastructural changes were not observed in plasma membranes of infected epidermal cells and normal plasmolysis occurred. Thus, it is suggested that hypersensitive cell death may occur when plasma membranes invaginate and form lomasome-like structures then followed by disruption into vesicles which are observed light-microscopically as cytoplasmic granules. (Received January 4, 1984)

Key Words: ultrastructure, resistance, host cell plasmolysis, rice blast.

緒 言

いもち病に対するイネの抵抗性発現には、イネ表皮細胞の過敏死^{3,9)}と細胞内容物の顆粒化^{4-7,11,13-15)}

が密接に関与していることが多数報告されている。しかし、過敏細胞死と細胞内容物の顆粒化との関係を微細構造的に観察した結果は、これまで報告されていない。既に著者ら⁷⁾は、葉身表皮細胞内容物の顆粒化の過程を電顕観察し、細胞内顆粒の多くは宿主細胞の

* 本報告の概要は、昭和58年度日本植物病理学会大会で発表した。

** 農林水産省北陸農業試験場 Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Joetsu, Niigata 943-01, Japan

*** 現在：農林水産省東北農業試験場 Present address: Tohoku National Agricultural Experiment Station, Omagari, Akita 014-01, Japan

原形質膜に由来する小胞状構造であることを明らかにした。本報では本病抵抗性に関する過敏細胞死と細胞内容物の顆粒化との関係を微分干渉位相差顕微鏡および電子顕微鏡観察により明らかにすることを目的とした。

本実験を行うに当たり、当场病害第2研究室小林尚志前室長に終始御教示いただいた。また、当场病害第2研究室吉野嶺一室長および香川大学農学部真山滋志博士に本稿の御校閲をいただいた。記して深謝の意を表する。

実験材料および方法

不親和性組合せとして、いもち病菌菌株研60—19 (レース 037¹⁶⁾) とイネ品種とりで1号 (抵抗性遺伝子 *Pi-z¹⁷*) を、親和性組合せとして菌株研60—19とイネ品種 コシヒカリを供試した。本実験では6.5葉期の最上完全展開葉のイネ葉鞘裏面表皮細胞を用い、葉鞘裏面に供試菌株の胞子を高橋の方法¹²⁾に従って接種した。接種葉鞘を恒温器内で24°Cに保ち、所定時間毎に裏面表皮細胞を剝離し、0.8 M ショ糖水溶液に浸漬して、原形質分離の状態をノマルスキー微分干渉位相差顕微鏡により観察した。

電顕観察のための試料の採取は、不親和性組合せで原形質分離能喪失がまったく起きていない接種後11時間目、さらに分離能の喪失が被侵入宿主細胞の90%以上で起きている接種後27時間目に行った。親和性組合せについても、同様に試料の採取を行った。なお対照区として、原形質分離を起こさなかった接種葉鞘を採取した。剝離葉鞘の固定として、2.5%グルタルアルデヒドで前固定を2時間行い、ついで1%オスミウム酸で後固定を40分間行った。固定後エタノール系列によって脱水し、プロピレンオキシドに置換して、ゼラチンカプセル中のエポキシ樹脂 (7 Epock 812 : 6 DDSA : 4 MNA に DMP-30 を1.5%加えたもの)²⁾ に包埋した。超薄切片の作製はガラスナイフを使用して、Reichert Om U2 型超ミクロームによって行い、酢酸ウランおよび Reynolds 法¹⁰⁾ で電子染色後、JEM 100B 型電子顕微鏡により観察した。

実験結果

光顕観察

いもち病菌菌株研60—19を接種したとりで1号 (不親和性組合せ) において、接種後11時間目では侵入菌

糸および表皮細胞内容物の顆粒化は認められなかった。しかし、接種後27時間目では被侵入表皮細胞の大部分が細胞内容物の顆粒化を起こし、同時に原形質膜は陥入していることが多く、その原形質膜は部分的に連続性を喪失しているように認められた (Fig. 1)。顆粒化の起きている細胞が原形質分離能を保持しているかどうかを知るために、これらの細胞部位をショ糖水溶液に浸漬した。この結果、顆粒化の起きている細胞は原形質分離能を喪失していた (Fig. 2)。したがって、接種後27時間目のとりで1号の被侵入表皮細胞の大部分は細胞内容物の顆粒化を起こしていると同時に、過敏細胞死を起こしていると判断される。なお、Figs. 1, 2 から明らかなように、原形質分離能を喪失した被侵入表皮細胞の原形質膜および細胞質においては、ショ糖水溶液処理による artifact は認められなかった。

一方、コシヒカリ (親和性組合せ) の接種後11時間目および27時間目の葉鞘では、いずれも細胞内容物の顆粒化は観察されなかった (Fig. 3)。また、接種後27時間目の剝離葉鞘 (Fig. 3) をショ糖水溶液に浸漬した結果、被侵入表皮細胞の原形質分離が明らかに認められた (Fig. 4)。したがって、コシヒカリの被侵入表皮細胞は過敏細胞死を起こしていないと判断される。

電顕観察

原形質分離能の有無によって宿主細胞の生死鑑別を行う¹⁾ ために、ショ糖水溶液に浸漬したとりで1号の葉鞘裏面表皮細胞を電顕観察した。接種後11時間目の表皮細胞では原形質膜が細胞壁から離れて、表皮細胞は明らかに原形質分離を起こしていた。原形質分離を起こした細胞の原形質膜および細胞質に微細構造的変化は認められなかった。一方、接種後27時間目の表皮細胞では原形質膜が随所で寸断され、原形質膜はしばしば細胞壁の近くに存在したままであった (Fig. 5)。したがって、表皮細胞は明らかに原形質分離能を喪失したと判定された。これらの表皮細胞の原形質膜を詳細に観察した結果、単位膜構造は不明瞭であり、電子密度は著しく高くなっていた (Fig. 7)。また、原形質分離能を喪失した表皮細胞内には大きさの異なる小胞状構造 (直径 0.2~1.0 μm) が多数観察され (Figs. 8, 9), それらの小胞状構造は原形質膜と連続していることが多かった (Figs. 6, 7)。なお、原形質分離を起こさなかった接種後27時間目のとりで1号の表皮細胞の微細構造は、原形質分離を起こさせた場合と同様であった (Fig. 11) が、稀に原形質膜の部分的陥入およびロマゾーム様構造が観察される場合があった

(Fig. 10)。侵入菌糸の内容物は密に詰っており (Figs. 5, 7), 菌糸内には隔膜 (Fig. 5), 核および細胞小器官が観察された。

一方, 接種後27時間目の親和性組合せのコシヒカリの表皮細胞では, ショ糖水溶液処理により原形質膜が細胞壁から離れて, 典型的な原形質分離が起きていた (Fig. 12)。コシヒカリで観察された表皮細胞の原形質膜は明瞭な単位膜構造を示しており (Fig. 14), とりで1号で観察された原形質膜の寸断は認められなかった。また, 表皮細胞内の核および種々の細胞小器官の微細構造的変化はほとんど観察されなかった (Fig. 13)。コシヒカリの表皮細胞に侵入した菌糸を観察したところ, とりで1号における侵入菌糸と同様に細胞質基質が密に詰っており, 菌糸内には多数の細胞小器官が認められた。しかし, コシヒカリではとりで1号と異なり, 表皮細胞に侵入した菌糸は宿主細胞質に取り囲まれていた (Fig. 15)。

考 察

本報ではイネいもち病抵抗性の発現に関与すると報告されている過敏細胞死^{3,9)}が, 同様に抵抗性発現に関与すると考えられる細胞内容物の顆粒化^{4-7, 11, 13-15)} (電子顕微鏡観察による小胞状構造の出現) とどのように関連しているかを追究した。

イネ葉身細胞は葉鞘裏面細胞に比べて細胞壁が厚く, 多数の葉緑体を含んでいるため, 原形質分離を光学顕微鏡によって観察することが困難であった。したがって本実験では, 葉身細胞のかわりに葉鞘裏面細胞を供試した。本実験の結果, 原形質分離能を喪失したとりで1号の細胞においては, 原形質膜の寸断および単位膜構造の不明瞭化が観察された。一方, コシヒカリでは原形質膜は連続しており, 原形質分離能を保持していた。したがって, 原形質膜の変性が過敏細胞死と密接に関連していると考えられる。なお, 原形質分離処理をしなかった接種葉鞘細胞でも, 上記と同様の原形質膜の変性が認められたので, 原形質膜の寸断および変性が原形質分離処理による artifact であるとは考えられない。

とりで1号の接種葉鞘裏面細胞では葉身細胞⁷⁾の場

合同様, Fig. 10 に示したように抵抗性発現に関与すると考えられる原形質膜の陥入, ロマゾーム様構造の出現および小胞状構造の出現が認められる。本観察において, 原形質膜の陥入およびロマゾーム様構造が認められた細胞では, 原形質膜の寸断および変性は起きていなかったのも, 宿主細胞は生存しているものと判断される。その後, 原形質膜の陥入がさらに進展し, 小胞状構造が形成された後に原形質膜の寸断が認められた。おそらく, 原形質膜の寸断が生じた時点で, 宿主細胞は過敏細胞死を起こすものと推察される。したがって, 過敏細胞死は小胞状構造形成 (光顕的には細胞内容物の顆粒化) 後に起きる現象であると結論される。

コシヒカリおよびとりで1号の葉鞘細胞に侵入した菌糸は, 形態的に差異はなく, いずれも生存しているように認められた。しかし, コシヒカリに侵入した菌糸は, とりで1号の場合とは異なり, 表皮細胞の細胞質に取り囲まれているのが特徴的であった。親和性組合せにおける侵入菌糸と宿主細胞との相互関係については, さらに詳細に検討して別に報告した⁸⁾。

摘 要

いもち病の抵抗性発現と密接に関連するイネ表皮細胞内容物の顆粒化と過敏細胞死との関係を明らかにするために, 抵抗性発現部位の光顕および電顕観察を行った。不親和性組合せにおいて, 原形質分離能を喪失したイネ葉鞘裏面表皮細胞では原形質膜の寸断が起きており, 原形質膜は単位膜構造を消失していた。一方, 親和性組合せにおいては表皮細胞は原形質分離能を保持しており, 原形質膜に変性は認められなかった。したがって, 原形質膜の寸断および単位膜構造の消失が, 過敏細胞死と密接に関連していると考えられる。光顕観察による細胞内容物の顆粒は, 電顕的には小胞状構造として観察された。この小胞状構造の形成期に, 原形質膜の陥入およびロマゾーム様構造が観察されるが, この時期には原形質膜の寸断および単位膜構造の消失は起きていなかった。その後, 原形質膜の寸断が起こり, 宿主細胞は過敏細胞死を起こすものと推察される。

引 用 文 献

1. Gahan, P. B. (1981). *In Cell Death in Biology and Pathology*. (Bowen, I. D. and Lockshin, R. A. eds.) Chapman and Hall, London, New York. pp. 145-169.

2. 堀野 修 (1973). 東近農試研報 25 : 65-97.
3. 鋤方末彦・松浦 義・田口重良 (1931). 農事改良資料 20 : 1-40.
4. 河村栄吉・小野小三郎 (1948). 農事試集報 4 : 13-22.
5. 古賀博則・小林尚志 (1982). 日植病報 48 : 506-513.
6. 古賀博則・小林尚志 (1982). 北陸病虫研報 30 : 12-18.
7. 古賀博則・堀野 修 (1983). 日植病報 49 : 322-330.
8. 古賀博則・堀野 修 (1984). 同上 50 : 375-378.
9. 大畑貫一・後藤和夫・高坂淳爾 (1963). 日植病報 28 : 24-30.
10. Reynolds, E. S. (1963). J. Cell Biol. 17 : 208-211.
11. 坂本正幸 (1968). 坂本正幸教授還暦記念論文集. 1-139.
12. 高橋喜夫 (1951). 北海道立農試報 3 : 1-61.
13. 高橋喜夫 (1956). 山形大学紀要 (農学) 2 : 37-51.
14. 富樫邦彦 (1962). 新潟農林研究 14 : 25-31.
15. 富田啓文・山中 達 (1983). 日植病報 49 : 514-521.
16. Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, T. and Watanabe, S. (1976). Ann. Phytopath. Soc. Japan 42 : 216-219.
17. Yokoo, M. and Kiyosawa, S. (1970). Japan. J. Breed. 20 : 129-132.

Explanation of plates

Plate I

Figs. 1- 4. Normarski differential interference contrast micrographs of infection sites in the leaf-sheath of rice plants inoculated with *Pyricularia oryzae* Cav. 27 hr after inoculation. Each bar in the micrographs represents 20 μ m.

- Fig. 1. Cytoplasmic granulation (CG) in the inner epidermal cell in the incompatible combination of variety Toride 1 and race 037. A : appressorium.
2. Plasmolyzed cell in the infection site shown in Fig. 1. The infected host cell may be hypersensitively dead, because it did not plasmolyze. Note that almost no morphological changes due to plasmolysis are induced in the cytoplasm and plasma membranes of the infected host cells. PM : plasma membrane.
 3. An infection hypha (IH) in the epidermal cell in the compatible combination of variety Koshihikari and race 037. Note that cytoplasmic granulation is not found in the infected epidermal cell.
 4. Plasmolyzed cell in the infection site shown in Fig. 3. The infected host cell may be alive, because it was plasmolyzed.

Figs. 5-11. Ultrastructures of incompatible interaction between rice variety Toride 1 and *Pyricularia oryzae* Cav. race 037 27 hr after inoculation. The inoculated epidermal cells of the leaf sheath in Figs. 5-9, were plasmolyzed in 0.8 M sucrose solution and fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide to test whether the infected cells are alive or not. Each bar in the micrographs represents 1 μ m.

- Fig. 5. Electron-dense and fragmentary plasma membranes in infected epidermal cell. The epidermal cell may be hypersensitively dead because of loss of the capacity for plasmolysis. Infection hyphae are filled with cytoplasmic matrix and cell organelles. EC : epidermal cell, HCW : host cell wall, PP : penetration peg.

Plate II

- Fig. 6. Fragments of plasma membranes and vesicles (V).
7. Vesicles in the epidermal cell where plasmolytic ability has been lost. Infection hyphae are filled with cytoplasmic matrix and cell organelles. Note that most of vesicles are connected with the plasma membranes.
 8. Fragments of plasma membranes and vesicles in the epidermal cell. Note that infection hypha is not surrounded by the host cytoplasm.
 9. Many vesicles of various size in the epidermal cell.
 10. Invaginated plasma membranes (IP) and a lomasome-like structure (Lo) in

an epidermal cell which was fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide without treatment by the hypertonic solution. M: mitochondrion.

11. Disruption of plasma membranes in an epidermal cell which was fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide without treatment by the hypertonic solution.

Plate III

Figs. 12-15. Ultrastructures of the compatible interaction between rice variety Koshihikari and *Pyricularia oryzae* Cav. race 037 27 hr after inoculation. Infected epidermal cells of the leaf-sheath were plasmolyzed in 0.8 M sucrose solution and fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide.

- Fig. 12. Plasmolyzed epidermal cells. Note that plasma membranes appear normal in comparison with those in the incompatible combination (Fig. 5).
13. A plasmolyzed epidermal cell. Nucleus and mitochondria in the epidermal cell appear normal. N: nucleus.
14. Higher magnification of a plasma membrane at portion indicated by the rectangle in Fig. 13. Note that unit membrane structure is found. CP: cytoplasm.
15. Infection hypha (IH) surrounded by host cytoplasm. Infection hyphae are filled with cytoplasmic matrix and cell organelles.

Plate I

Plate II

Plate III