ブドウすす点病果の走査電子顕微鏡観察

那須英夫*・久能 均**

Hideo NASU* and Hitoshi KUNOH** : Scanning Electron Microscopy of Flyspeck of Grape

Abstract

Grape berries infected by the flyspeck disease, were observed by scanning electron microscopy. The bloom covering the surface of healthy berry consisted of crystalline structure of flake-like appearance. This structure around attaching conidia and growing hyphae of *Zygothiala jamaicensis* Mason, a causal fungus, has been degenerated probably by enzyme (s) secreted by this fungus and changed into a thin film. Most of hyphae were found to grow underneath such a film. The crystalline structure around apices of growing hyphae remained unaltered but that along the hyphal region 10-15 μm and more behind the apex appeared to be altered, suggesting that the bloom-degenerating enzyme(s) might be secreted from the latter region but not apex. The microsclerotium-like structure formed on the bloom-evanescent regions of berry seemed to be formed by a great number of branching hyphae emerged from several, thick hyphae. Micromanipulation at the scanning electron microscope level revealed that the central region of microsclerotium-like structure consisted of 3-4 hyphal layers and the marginal region 2-3 layers. This technique also revealed that there were no fungal structures penetrating cell walls of the berry. These observations support our earlier result by light microscopy that the present causal fungus might be an ectoparasite which lives on the bloom of grape berries.

(Received January 30, 1986)

Key words : grape flyspeck, *Zygothiala jamaicensis*, bloom-degenerating enzyme(s), microsclerotium-like hyphal structure, scanning electron microscopy.

緒 言

ブドウすす点病は、果実の果粉を消失させ商品価値を著しく低下させる病害として、従来から岡山県のマスカット・オブ・アレキサンドリアの栽培者に脅威をもたらしていた。著者らは本病の防除を最終目的として、病原菌の同定、その寄生範囲、培養性質などの検討を始め、本病原菌が従来我が国で記載されていた *Leptothyrium pomi* (Montagne et Fries) Saccardo ではなく、バナナの leaf speckle¹⁶⁾、カーネーションの greasy blotch⁹⁾、リンゴの flyspeck^{3,7,8)} の病原菌と同じ *Zygothiala jamaicensis* Mason であることを明らかにした¹⁷⁾。本菌については、このようにいく

つかの報告がなされているものの、植物上の本菌の行動および植物組織との関係は詳細には明らかにされていないので、著者らは形態的にこれらの点を明らかにしようとした。前報¹⁸⁾ では罹病果実を光学顕微鏡で観察した結果を報告したが、走査電子顕微鏡（以下 SEM と略す）を用いてさらに詳しく検討したので、その結果を報告する。

実験材料および方法

供試果実 すず点病の罹病果は1981年7月中旬から9月に岡山県赤磐郡山陽町でガラス室栽培されているブドウ（マスカット・オブ・アレキサンドリア：以下アレキと略す）から採取した。本実験で行ったミク

* 岡山県農業試験場 Okayama Prefectural Agricultural Experiment Station, Sanyocho, Okayama 709-08, Japan

** 三重大学農学部 Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Mie University, Kamihama-cho, Tsu 514, Japan

ロマネプレーター操作をするためには化学固定剤による試料固定を必要とするが、固定をほどこすとその操作中に試料表面の果粉が変性する恐れがあったので、果粉の状況を検討するために乾燥標本も供試した。

乾燥標本作成 採取した新鮮な罹病果粒の表皮（果肉を含む）を剥離し、約 5~10 mm 角に切り取りスライドガラス上に貼り付け、デシケーター内で少なくとも10日間乾燥させ、約 5 mm 角に切断し、SEM 試料台に固着させた。イオンコーターで約 25 nm の金蒸着をほどこし、日立 SEM (HHS-2X) を用い、加速電圧 15-20 kV で観察した。

固定標本作成 新鮮な罹病果粒の表皮（果肉を含む）を剥離し、約 5 mm 角に切り取り、タンニン酸固定法¹²⁾ によって固定した。第一固定液（0.2%タンニン酸・2%グルタルアルデヒド）に12時間浸漬した後、第二固定液（2%タンニン酸・2%グルタルアルデヒド）にさらに12時間浸漬した。その後イオン交換水で十分水洗し、第三固定液（1% OsO₄、水溶液）に24時間浸漬した。イオン交換水で1時間水洗した後、エタノールシリーズで脱水し、酢酸イソアミルに置換した。試料を臨界点乾燥器で乾燥させ約 5 nm 厚さの金蒸着をほどこした後、上記と同じ顕微鏡条件で観察した。ミクロマネプレーター法¹³⁾ を用いて試料の一部の剥離または切開を行った場合には、固定標本を供試したが、ミクロマネプレーター操作によって露出された部分はチャージアップして写真撮影ができないので、試料を一旦 SEM 外に取り出し、さらに約 5 nm の金蒸着をほどこしてから再び観察・写真撮影を行った。

実験結果

罹病果粒の乾燥標本観察

健全な果粒表面は薄片結晶状の果粉に覆われており、クチクラ層表面を直接観察することはできなかった（Plate I-1）。罹病果には特徴的な果粉消失部が拡がっており、一見して罹病果と判定できたが、それに隣接する外見上健全に見える果粒の表面を見ると、附着した分生子から伸びる菌糸に沿ってほぼ筋状に果粉消失部がしばしば認められた（Plate I-2）。

Plate I-2 の分生子を高倍率で観察したところ、前報¹⁸⁾ で述べたように2個の分生子が対になっており、それぞれの scar 部分が明瞭に示されていた（Plate I-3）。scar 部分の中心部には隔壁孔に相当する孔が認められた。

菌糸先端部を高倍率で観察したが、菌糸最先端部周辺の果粉には形態的な変化は認められなかった（Plate I-4）。最先端部よりやや基部に近い菌糸部分両側では果粉の結晶構造が壊れ始めていた（Plate I-4, 矢印）。さらに基部に向かって菌糸をたどると、菌糸の両側の果粉は著しく変性し、結晶構造が消失してその分解物質が薄膜状になり菌糸を覆っていた（Plate I-5）。病状が進んで肉眼的に病徴が認められる部位を観察したところ、結晶状構造は殆んど認められず、平滑なクチクラ表面が露出していた（Plate I-6）。この果粉消失部には菌糸が無数に伸長していた（Plate I-6, 矢印）が、このような菌糸を高倍率で観察してみると、果粉分解物質からなると考えられる薄膜に覆われていることが多かった（Plate I-7, 矢印）。前報¹⁸⁾ で述べたように、果粉消失部には通常、小菌核様の黑色菌糸組織（以下黑色菌糸組織と略す）が形成されるが、この組織の中央部は盛り上がり、癒着した菌糸集団からなっており、周縁部はやや疎らになった菌糸からなっていた（Plate I-8）。この組織周辺の果粒表面には無数に伸びた菌糸が認められ、その殆んどが薄膜に覆われていた。

罹病果粒の固定標本観察

タンニン酸固定をした果粒表面の果粉は明らかに変性し、固定操作に用いた有機溶媒によってその大部分が流出したことが明らかになった。しかしながら、果粉存在部と消失部との識別は可能であった（Plate II-1）。果粉消失部には黑色菌糸組織形成の様々な過程が認められた。Plate II-1 に示すように、黑色菌糸組織形成の場では、太い主軸菌糸から生じた分枝が盛んに分枝をくりかえし、菌糸の集合体を作っていた。この場では、すべての菌糸の輪郭は明瞭であり、菌糸が薄膜に覆われているようには見えなかった。菌糸集合体の中央部では周縁部に比べて菌糸が密で全体的にやや盛り上がっているように見えた（Plate II-2）。さらに過程が進むと、組織中央部は盛り上がり、長い裾野をひく小山のような形状を示した（Plate II-3）。固定標本の黑色菌糸組織の様相は乾燥標本のそれ（Plate I-7）と類似しており、固定による黑色菌糸組織の変化がないことが示された。

ミクロマネプレーターによって、黑色菌糸組織の中央部を切開したところ、組織は果粒表面から容易に剥離し、その下からクチクラ表面と考えられる平滑面が現われた（Plate II-4, 矢印）。露出された組織中央部の底面は湾曲していたので、盛り上がった中央部は中空状になっていると考えられた（Plate II-4, 5）。露

出されたクチクラ表面を高倍率で観察しても、菌糸が侵入した形跡は認められなかった。ところが、低倍率では菌糸が明瞭であると見られた黒色菌糸組織中央部付近の表面では数本の明瞭な菌糸が認められるものの大部分の癒着している菌糸は輪郭も明瞭でなく何らかの膜に覆われていると考えられた (Plate II-5)。組織中央部断面は垂直断面ではないので、断面に露出された菌糸が何層にわたって集合しているかは明らかではなかったが、断面の厚さおよび菌糸の直径から推定すると、菌糸は3~4層をなしていると考えられた。Plate II-6は剝離した黒色菌糸組織の裏面 (果粒との接触面) を示しており、菌糸が集合している状態をよく表わしている。図中の矢印で示した部分には菌糸を覆う薄膜が見られるが、これは恐らく果粉分解産物であり、Plate I-5, 7で示した薄膜と同じ性質をもつと考えられる。Plate III-1, 2は形成途上の黒色菌糸組織 (Plate II-2とはほぼ同じ時期) 周縁部を剝離した状態を示している。この部分の菌糸は2~3層に重なり、個々に識別はできるが、果粉分解産物と思われる均質な物質に埋もれていた。Plate III-3は成熟した黒色菌糸組織 (Plate II-3とはほぼ同じ時期) の中央部の断面を示している。この図はミクロマニプレーターで組織を逆転させた状態を示しているので、下面が組織表面である。菌糸は3~4層になっており、組織の表側は果粉分解産物と考えられる約0.7 μ mの層に覆われている。Plate III-4は黒色菌糸組織の中央部を除去した状態で組織周縁部の菌糸、果粉分解産物層に覆われ、全体としてクチクラ表面上に存在している。菌糸体はすべてクチクラ層上に層をなして密着しており、細胞壁の下側、すなわち表皮細胞内には菌糸体は認められなかった。果粒表皮細胞壁の断面 (Plate III-5) を見ると、やや暗く見える厚さ約1.5 μ mのクチクラ層がその下の明るく見える細胞壁の1.5~2倍の厚さをもっていることが明らかとなり、小林¹¹⁾の記述とはほぼ一致した。これらの細胞壁断面を見ても菌糸が侵入した形跡は認められなかった。Plate III-6は黒色菌糸組織からやや離れた果粒表面の菌糸断面を示しており、Plate I-7, II-6で述べたような薄膜によって覆われている状態がよく表わされている。

考 察

植物体地上部の表面は通常ワックスに覆われていることはよく知られている^{1,2)}。従って、病原菌の分生子が植物表面に付着する時には、当然のことながら、ワ

ックスがその最初の接触の場となり、病原菌のその後の行動に制約を与え得ることは十分に考えられる。例えば、Ram²⁰⁾は茶の葉上のワックスが *Pestalotia theae* の分子発芽を促進することを報告しており、逆に、Blakeman and Szejnberg⁴⁾ および Martin *et al.*¹⁵⁾ はそれぞれ、ビート葉上の *Botrytis cinerea*、リンゴ葉上の *Podosphaera leucotricha* の分生子がワックスによって発芽抑制を受けることを報告している。赤井¹⁾ および DeBary⁶⁾ によると、ワックスは桿状、板状、繊維状、海綿状を呈しており、植物の種によって独特な形状を示すことを報告している。前報^{18,19)} で述べたように、アレキ果粒の表面はいわゆる果粉に覆われているが、本実験のSEM観察によると、果粉は薄片状結晶構造の集合体で、全体では海綿状に見えることが明らかになった。Plate I-2に示したように、ブドウ果粒上で *Z. jamaicensis* の分生子が発芽し菌糸が伸長すると、それに接する果粉は変性し結晶構造を失った。前報¹⁸⁾ の光学顕微鏡観察によると、果粉消失部からは果粉が完全に消失しているように見えたが、SEM観察すると結晶構造は確かに消失しているものの、その分解産物と考えられる薄膜状物質が残っており、菌糸を覆っていることが多かった (Plate I-5, 7)。また、光顕観察¹⁸⁾ では、伸長する菌糸先端部周辺から果粉消失が始まっているように見えたため、果粉を分解する酵素は菌糸全体から分泌されると推定したが、SEM観察して見たところ、菌糸最先端部は殆どの場合結晶状果粉の上にあり、最先端部から10~15 μ m後方から果粉変性が認められ、菌糸はその位置から果粉またはその分解物質の中に埋もれていた (Plate I-4)。この結果は、果粉分解酵素が菌糸の生長点といわれる最先端部からではなく、最先端のやや後方から分泌されることを示唆している。しかし、このような推察は、結晶構造の外見に基づいているので、微量の酵素が最先端から分泌される可能性をも否定し得るものではない。光顕観察¹⁸⁾ あるいはSEM観察によって、本菌の菌糸が無数に迷走した果粉表面からは果粉の結晶構造がほぼ完全に消失すること、また、パラフィン切片観察¹⁸⁾ およびSEMレベルのミクロマニプレーター操作によって、本菌の菌糸が果粒内部に侵入した形跡が全く認められないことが明らかにされたが、これらの事実は本菌が果粒上の果粉を栄養源として生長する表生菌であることを示している。前報¹⁸⁾ で述べたように、果粉の主成分と考えられるワックスを利用しているのか、あるいはワックス以外の不純物、例えば特異的な糖質などを利用しているの

かは明らかではない。また、菌糸周辺の広範囲にわたって分解される果粉がすべて本菌によって利用されるか否かも不明のままである。

果粉消失部に形成される黒色菌糸組織はクチクラ層表面上の構造であり、果肉内部と直接関係をもたないことが本実験のマイクロマンipレータ操作によって明らかにされた。顕微鏡観察¹⁸⁾に基づいて、この構造が形成される初期には果粒表面を伸長する菌糸が多数集合すると考察されたが、SEM 観察したところでは、数本の太い主軸菌糸が旺盛に分岐をくり返して本構造の基礎を形作るようであり (Plate II-1), その様相は *Rhizoctonia solani*^{5, 14)}, *Pelicularia sasakii*¹⁰⁾ などが形成する infection cushion と形態的に類似していた。成熟した本構造を表面から見ると、中央部が盛り上がった小山の様な形状を呈しており、中央部が厚く裾野部分は薄くなっていた。*Corticium rolfsii*^{21, 22)} が形成する菌核では表層菌糸はほぼ完全に癒着して個々の構成菌糸を表面から識別することは難しいが、本構造では菌糸は癒着してはいるものの、個々の菌糸の識別は可能であった。さらにマイクロマンipレータで露出した本構造の断面を見ても、*Rhizoctonia solani*¹⁹⁾, *Corticium rolfsii*^{21, 22)} の菌核に見られるように、癒着した黒色菌糸組織が外層、中層、内層に分化しているようには見られなかった。従って、本構造は一般に認められている菌核とは本質的に形状を異にするものと考えられる。しかしながら、Plate II-4, 5 で示したように、本構造の中央部は極めて容易に果粒表面から剝離されるので、中央部は果粒表面に密着しておらず中空状になっていると推定されること、および本構造の中央部は古くなると断片化して離脱すること¹⁸⁾ などが

ら推定すると、本構造は菌核と同様、越冬源としての機能をもつと考えられる。

摘 要

Zygophiala jamaicensis Mason によって引き起こされるすす点病に侵されたブドウ果実を走査電子顕微鏡で観察した。健全なブドウ果粒の表面は薄片状結晶構造をもつ果粉によって覆われていた。果粒表面に付着した分生子が発芽して菌糸を伸長させると、菌糸周辺の果粉結晶構造は消失し、その分解産物と考えられる薄膜が残り菌糸を覆っていた。菌糸最先端は結晶構造の上にあり、先端から 10-15 μ m 後方に相当する菌糸周囲の結晶構造の変化が認められ、果粉分解酵素が菌糸の最先端からではなく、基部に向ってやや後方から分泌されることを示唆していた。病徴が進展すると菌糸は果粒上を無数に迷走しており、それに接する部位の果粉をほぼ完全に消失させた。菌糸の多くは、果粉分解産物からなると考えられる薄膜の下に埋もれていた。病徴後期に果粉消失部に見られる黒色菌糸組織は、数本の太い主軸菌糸から生ずる分枝が分岐をくり返して集合し、その形成が開始されるようであった。マイクロマンipレータでこの黒色菌糸組織の断面を露出させたところ、組織中央部は3-4層、周縁部は2-3層の菌糸層からなっていた。この組織を剝離した時に露出するクチクラ層表面には菌糸の侵入孔に相当する構造は見当らず、さらに、組織下にある果粒細胞壁断面にも菌糸侵入の形跡は認められなかった。以上の観察結果は、本菌が果粉を栄養源として伸長する表生菌であることを示している。

引 用 文 献

1. 赤井重恭 (1982). 農業および園芸 57: 880-886.
2. 赤井重恭 (1982). 同上 57: 999-1006.
3. Baker, K. F., Davis, L. H., Durbin, R. D. and Snyder, W. C. (1977). Phytopathology 67: 580-588.
4. Blakeman, J. P. and Szejnberg, A. (1973). Physiol. Plant Pathol. 3: 267-278.
5. Christou, T. (1962). Phytopathology 52: 381-389.
6. DeBary, A. (1871). Bot. Zeitg. 29: 145-154.
7. Durbin, R. D., Davis, L. H., Snyder, W. C. and Baker, K. F. (1953). Phytopathology 43: 470 (Abstr.).
8. Durbin, R. D. and Snyder, W. C. (1953). Ibid. 43: 586 (Abstr.).
9. 羽柴輝良 (1977). 植物防疫 31: 26-30.
10. 石崎 寛・藤野正人・河野 満・久能 均 (1979). 三重大農学報 59: 1-32.
11. 小林 章 (1970). ブドウ園芸. 養賢堂, 東京. pp. 276.
12. Kunoh, H., Ishisaki, H. and Nakaya, K. (1977). Physiol. Plant Pathol. 10: 191-199.
13. Kunoh, H., Ishisaki, H., Watanabe, T., Yamada, M. and Nagatani, T. (1976). Pl. Dis. Repr. 60: 95-97.

14. Marshall, D. S. and Rush, M. C. (1980). *Phytopathology* 70 : 947-950.
15. Martin, J. T., Batt, R. F. and Burchill, R. T. (1957). *Nature* 180 : 796-797.
16. Martyn, E. B. (1945). *Mycological paper* 13 : 1-5.
17. 那須英夫・藤井新太郎・横山竜夫 (1985). *日植病報* 51 : 536-545.
18. 那須英夫・畑本 求・久能 均 同上 52 : 445-452.
19. 那須英夫・久能 均 (1984). 同上 50 : 121 (講要).
20. Ram, C. S. V. (1962). *Current Sci.* 10 : 428-429.
21. Shigemitsu, H., Kohno, M. and Kunoh, H. (1981). *Trans. mycol. Soc. Japan* 22 : 383-391.
22. Shigemitsu, H., Kunoh, H. and Akai, S. (1978). *Mycologia* 70 : 935-943.

Explanation of plates

Plate I

Micrographs obtained from air-dried specimens.

1. A surface view of a healthy grape berry covered with crystalline bloom.
  2. The bloom-evanescent region along hyphae emerging from conidia (arrow).
  3. An enlarged view of scars of paired conidia which are indicated by an arrow in Fig. 2. A pore (P) corresponding to a septal pore is seen in each of the scar surfaces.
  4. A hypha (H) growing on the bloom. Note that crystalline bloom appears unaltered around the hyphal apex but that along the hyphal part 10-15 μm behind the apex appear to have been altered (arrows).
  5. A hypha (H) covered with a thin film probably consisting of the degenerating product of bloom.
  6. A berry surface from which bloom has evanesced almost completely. Arrows indicate hyphae growing on the exposed cuticle surface.
  7. A hypha (H) observed to grow on the bloom-evanescent region of berry. Note that a branching hypha (arrow) is covered with a thin film similar as that seen in Fig. 5.
  8. A microsclerotium-like structure formed on the bloom-evanescent region of a berry.
- Bar=1 μm in Figs. 3-5, 7, 10 μm in Fig. 1, 20 μm in Figs. 2, 8, and 100 μm in Fig. 6.

Plate II

Micrographs obtained from fixed specimens.

1. An initial stage of formation of a microsclerotium-like structure. Relatively thin hyphae emerging from several, thick, main hyphae have branched vigorously.
  2. A great number of hyphae gathering to result in a thick mycelial mat at the central region.
  3. A mature microsclerotium-like structure showing a hill-like appearance.
  4. The central region of a microsclerotium-like structure having been opened with a microneedle (N). An arrow indicates a cuticle surface exposed with a microneedle.
  5. No penetration pores are seen in the cuticle surface (arrow) which had been covered with a microsclerotium-like structure, exposed with a microneedle.
  6. A reversed side of a microsclerotium-like structure revealed by micromanipulation. Arrows indicate thin films probably consisting of the degenerating product of bloom.
- Bar=5 μm in Fig. 6, 10 μm in Fig. 5, 20 μm in Figs. 1-3, and 50 μm in Fig. 4.

Plate III

Micrographs obtained from fixed specimens.

1. A marginal region of a microsclerotium-like structure exposed with a microneedle (N).
2. A cut surface of the marginal region of a microsclerotium-like structure revealed by micromanipulation. Note that hyphae (H) in 2-3 layers are berried in a homogeneous matrix.
3. A cut surface of the central region of a microsclerotium-like structure reversed by a microneedle. Note that the structure surface is covered with a layer consisting of the bloom-degenerating product (BDP).
4. A cuticle surface which had been covered with the marginal region of a microsclerotium-like structure (H), exposed with a microneedle. Hyphae on the cuticle surface are

berried in the bloom-degenerating product (BDP).

5. A cut surface of a berry epidermal cell wall which consists of a thick cuticle (CU) and a substantial cell wall (CW).
6. A hypha (H) covered with a thin film of the degenerating product of bloom (double arrow), seen on the bloom-evanescing region near a microsclerotium-like structure.

Bar=1 μm in Figs. 5, 6, 2 μm in Fig. 3, 5 μm in Figs. 2, 4, and 10 μm in Fig. 1.

Plate I

Plate II

Plate III