病原性を異にするアブラナ科植物べと病菌の各種アブラナ科 植物子葉における感染行動の比較観察

吉田 克志*・大口 富三*

Katsuyuki YOSHIDA* and Tomizo OHGUCHI* : Comparative Studies on Infection Behavior of Four Isolates of *Peronospora parasitica* Differing in Pathogenicity to Cotyledons of Cruciferous Plants

Abstract

Pathogenicities of four isolates of the downy mildew fungus of cruciferous plants, *Peronospora parasitica*, obtained from Japanese radish, oil seed, broccoli and shepherd's purse, were compared by observing infected cotyledons. These isolates eventually sporulated on host plant cotyledons (compatible combination), but formed only small necrotic lesions on non-host cotyledons (incompatible combination). Sheath encasement of haustoria and host cell death frequently occurred in the incompatible combinations. Growth of intercellular hyphae stopped within 48 hr after inoculation. The shepherd's purse isolate could only infect the host plant; haustorium formation in non-hosts was inhibited mainly by papillae. Cytochemical observation showed that these papillae contained callose and polyphenol compounds but not lignin. The significance of these results is discussed in relation to pathogenicities of *P. parasitica* isolates and plant defense reactions.

(Received December 10, 1997 ; Accepted April 7, 1998)

Key words : *Peronospora parasitica*, cruciferous plants, pathogenicity, resistance.

緒 言

アブラナ科蔬菜には *Peronospora parasitica* Pers. ex Fr. によるべと病の発生が多く認められる。本菌には病原性の分化が存在することが知られており、Gäumann^{7,8)} 以来多くの報告^{6,12,17,21)} があるが、これらはすべて交差接種後の病斑型の差異に基づいて検討されている。また、Greenhalgh and Dickinson⁹⁾ は3種類の植物におけるカリフラワーべと病菌の感染機作について組織学的比較観察を行い、非宿主子葉におけるべと病菌感染部位の植物細胞死が顕著であることを明らかにし、Kluczewski and Lucas¹³⁾ はカリフラワーおよびアブラナべと病菌をそれぞれの宿主と非宿主に接種し、菌糸の生育程度と感染葉の生理学的な変化の差異について報告している。しかしながら、これらの報告は抵抗反応を組織レベルで解析したものであり、子葉の抵抗反応を細胞レベルで解析するための組織化学的な検討は行われていない。

筆者らは、人工気象器で栽培した子葉を用いたべと病菌の室内培養法を確立したことをすでに報告した¹⁸⁾ が、本法を応用すると数種のべと病菌と植物種との組み合わせで、べと病菌感染部位の比較観察が可能となる。本研究では

P. parasitica のダイコン、アブラナ、ブロッコリーおよびナズナ分離菌を人工気象器で栽培したアブラナ科蔬菜子葉にそれぞれ接種し、感染部位における分離菌-供試植物間の相互反応の比較観察を行い、これら分離菌間の病原性の差異を検討した。

材料および方法

供試菌 *Peronospora parasitica* Pers. ex Fr. のダイコン分離菌およびナズナ分離菌を既報²²⁾ に従い準備した。また、アブラナ分離菌は徳島県脇町舞中島、ブロッコリー分離菌は愛媛県松山市枝松で採集した。これらはダイコンべと病菌室内増殖法に準じて、アブラナ分離菌をアブラナ子葉（栽培品種；食用菜の花、松山種苗）上で、ブロッコリー分離菌をブロッコリー子葉（栽培品種；みかも、トーホク種苗）上で継代培養した。以下、ダイコン分離菌を Rs 菌、ナズナ分離菌を Cb 菌、ブロッコリー菌を Bo 菌、アブラナ菌を Bc 菌と表記する。

供試植物 供試植物および供試品種として Table 1 に示した2属4種10栽培品種を用いた。これらを人工気象器で栽培し、本葉を生じる直前の完全に子葉が展開した幼苗を供試した。ダイコンでは播種4日後（日本医化器械

* 愛媛大学農学部 College of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790-0905, Japan

Table 1. Conidiation of *Peronospora parasitica* isolates on various species of cruciferous plants

Test plants		Frequency of sporulation (%) ^{a)}				Quantity of sporulation			
Species and cultivar		Rs	Bc	Bo	Cb ^{b)}	Rs	Bc	Bo	Cb
<i>Raphanus sativus</i> L.									
var. <i>hortensis</i> Backer									
Japanese radish	Shirokubimiyashige	100.0	0.0	0.0	0.0	+++ ^{c)}	—	—	—
<i>Brassica campestris</i> L.									
Oil seed	Shokuyounanohana	0.0	100.0	0.0	0.0	—	+++	—	—
Chinese cabbage	Taibyorokujunichi	0.0	100.0	0.0	0.0	—	+++	—	—
Turnip	Taibyohikari	0.0	100.0	0.0	0.0	—	+++	—	—
Chinese mustard	Komatsuna	0.0	100.0	0.0	0.0	—	+++	—	—
<i>Brassica juncea</i> Czern. et Coss.									
Leaf mustard 1	Kikarashina	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
2	Akachirimentakana	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—	—	—
<i>Brassica oleracea</i> L.									
Broccoli	Mikamo	0.0	0.0	100.0	0.0	—	—	+++	—
Cabbage	Myojyo	12.5	0.0	100.0	0.0	+	—	+++	—
Cauliflower	Nozakihanayasai	87.5	0.0	85.0	0.0	+	—	++	—

a) Number of cotyledons with sporulation per total inoculated cotyledons. Twenty seedlings (40 cotyledons) were observed 7 days after inoculation.

b) Rs, Japanese radish isolate; Bc, Oil seed isolate; Bo, Broccoli isolate; Cb, Shepherd's purse isolate.

c) —, No sporulation, +, Sparse sporulation (1-100 conidiophore); ++, Moderate sporulation (101-200); +++, Abundant sporulation (>200).

LH200-RDS, 24°C, 10,000 lux), アブラナでは播種5日後(同上), 他のアブラナ科蔬菜では播種7日後(日本医化器械 LPH-1000-RTC, 20°C, 20,000 lux)の幼苗を供試した。幼苗は既報¹⁸⁾に従って調製し, 修正 knop 液^{2,18)}を用いた湿室ペトリ皿(直径9 cm)に8個体の幼苗を子葉裏面を上にして入れた。

接種法 接種7日後の分生子を多量に形成したべと病罹病子葉を0.01% Tween 20 水溶液中で緩やかに振とうして分生子を遊離させ, 4重ガーゼでろ過した後, 300×gで5分間遠心分離した。沈澱を0.01% Tween 20 水溶液中に懸濁し, 再度遠心分離した後で, 分生子濃度を50個/μlに調整し, 子葉裏面に半葉当たり5μl接種した。

分生子形成観察法 接種した子葉を15°C, 2000 luxで6日間の連続照明下で培養後に18時間の暗期を与えて分生子形成を誘導し, 解剖顕微鏡(25倍)を用いて分生子形成を確認した。

罹病組織観察法 子葉に各分離菌を接種後, 20°C, 1000 luxの連続照明下で培養し, べと病菌感染部位を調査した。子葉を接種後経時的に取り出し, 80%エタノールで固定した。組織化学的染色を行う場合には罹病子葉の接種部位表面をカミソリで剝離した後に観察した。組織中のべと病菌の菌糸長を観察するために, 80%エタノールに1週間浸漬した子葉を蒸留水で水洗後に15%KOHで12時間脱色し, アルカリアニリンブルー蛍光染色法¹⁹⁾を行った。1実験区あたり100カ所の感染部位を蛍光顕微鏡で調査し, 無作為に選んだ50本の侵入菌糸長を測定し, さらに吸器が形成された宿主細胞の変化および吸器へのカロース蓄積を観察

した。

組織化学的観察法 既報²²⁾に準じて, エタノールで固定した子葉を用いて, 自家蛍光, アルカリアニリンブルー蛍光観察法(β-1,3グルカン), フロログルシン塩酸法(リグニン), ローダミンB染色(ポリフェノール化合物), ラクモイド染色(カロース)を行った。また, 生組織切片を用いてキサントプロテイン反応(タンパク質), ニトロソフェノール反応(ポリフェノール化合物)を行った。光学および蛍光顕微鏡観察にはオリンパス落射蛍光顕微鏡BHS-RFKを用い, 蛍光観察ではV励起法[励起フィルターV(BG-3+IF405), ダイクロイックミラーV(DM455+Y455), 接眼フィルターY475]を使用した。

実験結果

交差接種子葉上における分生子形成

各分離菌を各種蔬菜子葉に接種し, 1週間後に接種部位における分生子形成を調査した。その結果をTable 1に示す。Rs菌を接種した場合には, ダイコンと*B. oleracea* 2品種(明星カンラン, 野崎ハナヤサイ)で分生子形成が認められた。しかしながら, ダイコンでは接種葉のすべてで子葉全面における盛んな分生子形成が観察されたのに対し, *B. oleracea*の2品種では分生子形成率は低く, その形成部位は葉面積の1/4以下に限定された。Bc菌ではアブラナを含む*B. campestris*の全供試品種で, Bo菌ではブロッコリーを含む*B. oleracea*の全供試品種で子葉全面に分生子形成が観察された。以上の3分離菌では, これらが分離された植物と同種の植物上で子葉全面にわたる退緑を伴う罹

Table 2. Development of intercellular hyphae of *Peronospora parasitica* in cruciferous cotyledons

Test plant	Isolate ^{a)}	Time after inoculation (hr)		
		24	48	72
Japanese radish	Rs	715.2±241.0 ^{b)}	MH	CF
	Bc	209.8± 79.6	462.7±191.8	387.7±163.0
	Bo	137.6± 35.2	192.1± 54.8	211.6± 86.4
Oil seed	Rs	78.6± 29.1	95.9± 52.2	104.2± 45.7
	Bc	348.3±110.7	MH	CF
	Bo	151.6± 46.8	142.0± 52.1	164.0± 56.1
Broccoli	Rs	144.5± 62.9	191.2± 85.1	190.7± 76.8
	Bc	210.4± 57.5	207.1± 62.7	226.0± 74.7
	Bo	485.3± 95.3	MH	CF

a) See Table 1. b) Hyphal length (μm); MH, Massive hyphae formation; CF, Conidiophore formation. Fifty infection hyphae were observed.

病性病斑と分生子形成が観察され、それ以外の子葉の接種部位には壊死病斑が観察された。一方、Cb 菌を接種した場合には、全供試植物で分生子形成は認められず、壊死病斑の形成のみ認められた。以後、分生子形成が子葉全面で盛んに認められる分離菌-植物種の組み合わせを親和性、壊死病斑の形成のみの組み合わせを非親和性として、Rs, Bc および Bo 菌とそれらの宿主を用いた交差接種を行い、感染部位の比較観察を行った。また、すべての組み合わせで非親和性であった Cb 菌については、全供試子葉における感染部位の観察とダイコン子葉における侵入部位の組織化学的観察を行った。

侵入菌糸の生育伸長

親和性および非親和性の組み合わせに関係なく、ベと病菌分離菌は接種3時間以降に付着器を形成し、細胞縫合部から組織へ侵入した。親和性の場合には、その後侵入菌糸の生育が著しく (Plate I-1)、接種48時間後には菌糸塊が形成され、接種72時間後からは分生子が形成された (Table 2)。これに対し、非親和性の場合には、いずれの子葉においても接種24~48時間後までに生育が停止したが、他の子葉に比較するとダイコンでは菌糸が伸展していた。

吸器が形成された宿主細胞の死

接種3日後の子葉で生じる壊死病斑を検鏡したところ、ほとんどの壊死細胞ではその内部に吸器が形成されていた。このように吸器が形成された宿主細胞が顆粒化もしくは褐変した場合に、吸器形成細胞死として記録した。非親和性の場合、細胞間隙菌糸の生育は接種48時間以内に停止し、吸器形成数も少ないので、吸器が形成された細胞 (吸器形成細胞) のすべてについて観察した。しかし、親和性では細胞間隙菌糸の生育が盛んで、吸器が多数形成されるために、全吸器形成細胞について観察するのは困難であった。そこで、接種24時間後までに形成されたと考えられる、侵入部位から数えて25個目までの吸器が形成された細胞についてのみ調査した。親和性の組み合わせでは吸器形成細胞の壊死はほとんど観察されなかったが、非親和性の組

Fig. 1. Time course of cotyledon cell death after infection by isolates of *Peronospora parasitica*. One hundred-fifty infection sites were observed. a) Time after inoculation. A, Japanese radish (cv. Shirokubimiyashige); B, Oil seed (cv. Shokuyounanohana); C, Broccoli (cv. Mikamo).

み合わせでは、吸器形成細胞死が経時的に増加し (Fig. 1)、形成される吸器の大きさも親和性菌に比較して小さかった。特に、Bc および Bo 菌を接種したダイコン子葉では接種24時間までの吸器形成細胞死の頻度は少ないが、接種48時間では56~68%、72時間後には90%以上の吸器形成細胞で顕著な壊死が認められ、細胞は褐色から、黒褐色に変化した (Plate I-2)。アブラナ子葉では細胞の顆粒化が観

Fig. 2. Sheath encasement of *Peronospora parasitica* haustoria in cruciferous plant cotyledons. a) Time after inoculation. A, Japanese radish (cv. Shirokubimiyashige); B, Oil seed (cv. Shokuyounanohana); C, Broccoli (cv. Mikamo).

察されたが、褐変化の程度は弱く、壊死細胞率も他の子葉に比較すると低かった (Fig. 1)。

吸器へのカロース蓄積

吸器へのカロース蓄積は壊死細胞の調査と同時に行い、吸器全体にカロースの蛍光が認められる場合に吸器被覆化として記録した (Plate I-3, 4)。親和性のすべての組み合わせで、接種 48~72 時間後に吸器被覆化が増加したが、非親和性の場合には親和性に比較して吸器へのカロース蓄積が早く、接種 24 時間後より顕著に吸器被覆化が認められた (Fig. 2)。また、非親和性の場合のアブラナおよびブロッコリーでは壊死細胞以外の細胞に形成された吸器へのカロース蓄積が顕著であった。

ナズナベと病菌感染子葉の観察

ナズナ分離菌 (Cb 菌) を接種したダイコンでは吸器形成は認められず、複数の柔組織細胞と侵入菌糸の接触部位にパピラが観察された (Table 3, Plate I-5, 6)。*B. campestris* ではアブラナ (食用菜の花) でわずかに吸器形成が観察されたが、その他の栽培品種 (耐病光カブ, 耐病強力六十日ハクサイ, コマツナ) では吸器の形成は認められなかった。吸器形成は 4 品種ともにパピラによって阻害されていた (Table 3)。また、*B. juncea* の赤チリメンタカナでは付着器で生育が停止する場合は 44.7% 観察され、最も強い抵抗反応が観察された。*B. oleracea* では供試子葉の中で、カリフラワー (野崎ハナヤサイ) が最も吸器形成率が高く、ブロッコリー (みかも) でもわずかに吸器形成が観察された。しかしながら、吸器形成が認められる場合には吸器におけるシース肥大化が顕著であり (Plate I-3, 4), Cb 菌の侵入菌糸の生育は吸器形成の有無にかかわらず、接種 24 時間後

Table 3. Observation of infection site of shepherd's purse isolate in some cruciferous plants

Test plants	Fungal structure (%) ^{a)}				Length of infection hypha ^{b)} Time after inoculation (hr)			Frequency of host cell death (%) Time after inoculation (hr)		
	Ha	Pa	Hy	Ap	24	48	72	24	48	72
<i>Raphanus sativus</i>										
Japanese radish	0.0	85.0	12.5	2.5	55.4±59.6	59.6±20.7	54.4±18.9	41.8 ^{c)}	62.7	75.7
<i>Brassica campestris</i>										
Oil seed	7.8	90.1	0.4	1.7	72.9±18.4	64.1±16.0	64.3±15.2	26.9	11.0	63.0
Chinese cabbage	0.0	77.5	17.6	4.9	50.6±18.9	57.3±24.7	54.8±17.7	48.5	56.3	62.5
Turnip	0.0	84.4	12.7	5.9	47.4±13.4	47.1±15.0	47.6±14.1	30.6	68.8	72.9
Chinese mustard	0.0	81.6	14.7	3.7	56.2±20.0	55.6±19.3	57.5±17.3	27.4	40.4	83.0
<i>Brassica juncea</i>										
Leaf mustard 1	3.0	55.2	25.4	16.4	45.9±10.5	52.4±13.8	54.4±15.7	22.3	32.1	57.1
2	0.0	26.3	28.9	44.7	52.9±15.1	50.8±19.6	47.7±21.3	12.7	59.0	70.7
<i>Brassica oleracea</i>										
Broccoli	8.0	92.0	0.0	0.0	64.0±28.0	63.5±18.6	58.7±19.9	70.0	89.0	100.0
Cabbage	0.0	76.3	15.6	8.1	50.8±18.6	56.0±12.6	55.4±12.9	50.3	96.3	100.0
Cauliflower	70.8	25.8	3.4	0.0	46.8±13.1	43.5±16.2	48.5±16.5	32.6	47.1	73.5

a) Ha, Haustorium; Pa, Haustorium formation was inhibited by papilla; Hy, Only infection hypha; Ap, Appressorium failed to invade plant tissues.

b) Fifty infection hyphae were observed. ± indicated standard deviation.

c) One hundred-fifty infection sites were observed.

Table 4. Histochemical observation of infection site of *Peronospora parasitica* in Japanese radish cotyledon

Reagents and reactions	Specificity	Rs isolate		Cb isolate	
		Sheath		Papilla	
Autofluorescence	Aromatic compounds	—		±	
Aniline blue fluorescence	β -1,3-glucan	+		++	
Phloroglucinol-HCl	Lignin	—		—	
Rhodamine B	Polyphenol compounds	—		++	
Lacmoid	Callose	±		+	
Nitrosophenol reaction	Polyphenol compounds	—		++	
Xanthoprotein reaction	Protein	—		±	

Infection sited were observed 24–48 hr after inoculation.

には停止していた (Table 3)。

Cb 菌感染の場合には吸器形成がほとんど観察されないで、吸器形成細胞の壊死ではなく、侵入部位周辺の壊死細胞の出現について調査した。その結果、栽培品種間で差異はあるものの、経時的に壊死細胞が増加するのが認められた (Table 3)。これは主に感染部位の表皮細胞もしくは柔組織細胞の壊死に起因するが (Plate I-7)、壊死細胞数は感染部位あたり 1~2 個で、パピラが形成された細胞において壊死が顕著であるということとはなかった。

組織化学的観察

ダイコン子葉における Rs および Cb 菌の感染部位の組織化学的観察を行った。自家蛍光は Cb 菌感染部位のパピラにわずかに観察され、その部分の褐変化が進むにつれて蛍光は弱くなったが、Rs 菌の吸器にはこの蛍光は観察されなかった (Table 4)。

アルカリアニリンブルー蛍光観察法では Rs および Cb 菌ともにべと病菌菌糸、パピラおよび吸器のシースに顕著な蛍光が観察された (Plate I-3, 4, 6)。パピラでは褐変化に伴い、この蛍光は弱まった。フロログルシン塩酸法ではべと病菌感染部位にはまったく反応が認められなかった (Table 4)。ローダミン B 染色法およびニトロソフェノール反応法では、パピラおよび感染部位の壊死細胞に陽性反応が観察されたが、親和性の組み合わせで認められる吸器には反応は認められなかった (Table 4)。ラクモイド染色法ではパピラおよび吸器のシースに陽性反応が認められたが、反応は比較的弱く、キサントプロテイン反応はパピラにのみわずかな反応が観察された。また、スダンブラック染色法、ニンヒドリン反応および塩化亜鉛ヨード法では感染細胞と非感染細胞の間に染色の差異は認められなかった。

考 察

湿室ペトリ皿中の子葉を用いた交差接種の結果、Rs, Bc および Bo 菌では宿主植物ならびに宿主と同種の植物上で分生子形成が認められ、それ以外では壊死病斑の形成が観察されたが、Cb 菌では供試したすべての植物種の子葉で

分生子形成は認められなかった。これらの結果は現在までに報告されている圃場での子苗への接種実験による病原性判定の結果と良く一致しており^{7,12)}、本法によるべと病菌の病原性判定が可能であることが示唆された。

交差接種を行った子葉の感染部位の詳細な観察を行ったところ、べと病菌の侵入に対して大きく分けて 4 段階の植物抵抗反応が発現することが示唆された。発現時期の第 1 段階としてはべと病菌付着器形成後の組織への侵入阻害であり、最も強い抵抗性発現である。第 2 段階はパピラ形成によるべと病菌吸器形成阻害^{1,11)}であり、吸器を細胞内に形成する以前に抵抗性が発現したと考えられる。これらは Cb 菌を接種した場合に多く観察され、吸器の形成を阻止する極めて強い抵抗反応であると考えられる。第 3 段階は吸器のシースによる被覆化¹⁰⁾、第 4 段階が吸器形成細胞の壊死である。吸器形成後の宿主抵抗反応を抑制できないために吸器が被覆され、養分吸収が困難となって吸器自体が生育を停止するとともに、吸器形成細胞の壊死が起こり、細胞間隙菌糸の生育が停止した。この場合、吸器は親和性の場合と同様に、数個の細胞に形成されるが、やがて生育を停止する。これらはダイコン、アブラナおよびブロッコリー分離菌の非親和性の組み合わせで多く観察された。感染部位における壊死細胞はほとんど吸器形成細胞に限られていること、さらに吸器形成が極めてまれである Cb 菌感染の場合には壊死細胞数が少ないことなどから、非親和性の場合、吸器の肥大成長の場面で何らかの物質が吸器から放出されるために、吸器の被覆化や宿主細胞死が誘導されると推定される⁴⁾。この現象は、細胞死の結果、吸器が封じ込められ、細胞間隙菌糸の生育が停止するので、抵抗反応と考えられるが、この細胞死の発現時期は遅く、抵抗反応としては弱いものと考えられる。また、ダイコン子葉では非親和性菌を接種した場合の細胞間隙菌糸の生育が大きいが、これは吸器形成細胞死が接種 24~48 時間後と遅く、それまでに形成された吸器からの養分吸収が可能であるため、細胞間隙菌糸の生育が大きくなったと考えられる。レタス-べと病菌の相互反応^{4,14)}では第 1 次吸器が形成された単一の表皮細胞が過敏細胞死を起こし、べと病菌の生育

が停止するが、今回観察された吸器形成細胞死は過敏反応とは異なると考えられる。また、親和性の組み合わせでは前述の抵抗反応が起こらないので、感染細胞におけるべと病菌の活物寄生性が維持され、分生子が形成されるまでべと病菌が生育すると考えられる。

組織化学的観察の結果、非親和性の場合のシースで被覆された吸器へのカロースの蓄積ならびに、Cb菌接種の場合にパピラへのカロースとポリフェノールの蓄積が観察されたが、ダイコン根組織のダイコンべと病菌感染部位で観察された細胞壁のリグニン化⁹⁾は認められなかった。したがって、非親和性べと病菌感染に対する抵抗性の発現は組織により、異なることが示された。カロースは病原菌感染部位にいち早く蓄積し、物質の透過性を低下させる物質として報告されており^{1,5)}、パピラやシースへの蓄積が抵抗性に関与することが報告されている^{1,10)}。Cb菌に対する抵抗反応としてのパピラ形成および吸器の被覆化の場合にはカロースの蓄積が早く、抵抗性発現の決定的な役割を果たすと考えられる。一方、赤チリメンタカナにCb菌を接種した場合に付着器以降の組織への侵入が停止する場合が観察されたが、組織化学的な観察を行っても、付着器下で半透明の物質が蓄積するものの、カロースやポリフェノールの反応は認められず、柔組織細胞と表皮細胞縫合部における抵抗性発現に差異が観察された。また、他の3分離菌の非親和性の場合には、宿主細胞死に先立ち、カロースによる吸器被覆化が観察された。アブラナ科蔬菜子葉組織におけるべと病菌抵抗反応に関する現在までの報告^{6,9,13,17,20)}では感染細胞の壊死のみが報告されてきたが、これは筆者らの吸器形成細胞の壊死に相当するもので、これ以前にシースによる吸器被覆化により、吸器からの養分吸収阻害が生じて、これがべと病菌抵抗性に関与することが示唆された。パピラへのポリフェノールの蓄積は吸器形成阻害に関与すると考えられるが、オオムギ¹⁵⁾やキュウリ¹⁹⁾葉で認められるパピラのような顕著な自家蛍光は認められず、わずかに認められる自家蛍光もパピラの褐変化により減衰した。これは過度の酸化によりメラニン様の物質となったと推定されるが、今後の詳細な検討が必要である。

以上の結果より、供試した4分離菌の病原性はそれぞれ異なり、これは植物の抵抗反応を抑制する能力の差異に起因する病原性の分化と考えられるが、特に蔬菜類から分離した3分離菌とCb菌の病原性の差異は顕著であった。Cb菌感染に対する蔬菜子葉の抵抗反応は強く、どちらかというと非病原菌の感染に対する抵抗反応と類似しており^{10,11)}、他の3分離菌とは系統的に著しく離れていると考えられ、この点については今後、RFLP解析などの分子生物学的手法¹⁶⁾を用いて証明する必要があると考えられる。

摘 要

湿室ペトリ皿中のアブラナ科蔬菜子葉にダイコン、アブラナ、ブロッコリーおよびナズナから分離した *P. parasitica* を交差接種し、感染部位を組織化学的に観察することにより、その病原性を調査した。各分離菌は宿主植物と同属同種の植物上で盛んに分生子を形成したが(親和性)、他種の子葉では分生子形成が認められなかった(非親和性)。交差接種を行った子葉感染部位をアルカリアニリンブルー蛍光観察法により調査すると非親和性の場合には、宿主の抵抗反応として、付着器形成以降の組織への侵入阻害、パピラによる吸器形成の阻害、シースによる吸器被覆化および吸器が形成された宿主細胞の壊死が観察され、べと病菌の生育は接種後48時間以内に停止した。これらの結果、べと病菌は段階的に発現する植物の抵抗反応をすべて抑制した場合に分生子形成に至ることが示唆された。また、Cb菌では供試したすべての植物種の子葉で他の分離菌に比較して強い抵抗反応が観察され、特に、パピラによって吸器形成が阻害される場合が多かった。RsおよびCb菌感染部位を組織化学的染色法を用いて観察したところ、吸器にはシースおよび吸器頸部にカロースの反応が認められた。パピラにはカロース、ポリフェノールの顕著な蓄積が認められたが、自家蛍光は弱く、また、べと病菌感染部位の宿主細胞壁の木化は観察されなかった。

引用文献

1. Aist, J.R. (1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14: 145-163.
2. Asada, Y. and Ohguchi, T. (1981). Behavior of downy mildew fungus of Japanese radish on modified knop's medium. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 47: 71-74.
3. Asada, Y., Ohguchi, T. and Matsumoto, I. (1979). Induction of lignification in response to fungal infection. *In Recognition and Specificity in Plant Host-parasite Interactions* (Daly, J.M. and Uritani, I. eds.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, and University Park Press, Baltimore, pp. 99-112.
4. Crucefix, D.N., Mansfield, J.W. and Wade, M. (1984). Evidence that determinants of race specificity in lettuce downy mildew disease are highly localized. *Physiol. Plant Pathol.* 24: 93-106.
5. Currier, I.R. (1957). Callose substance in plant cells. *Am. J. Bot.* 44: 478-488.
6. Dickinson, C.H. and Greenhalgh, J.R. (1977). Host range and taxonomy of *Peronospora parasitica* on crucifers. *Trans. Br. mycol. Soc.* 69: 111-116.
7. Gäumann, E. (1918). Über die Formen der *Peronospora parasitica* (Pers.) Fries. Ein Beitrag zur Speziesfrage bei den parasitischen Pilzen. *Beih. Bot. Centralb. Abt. I.* 35: 1-143.
8. Gäumann, E. (1926). Über die Spezialisierung des falschen Mehltaus (*Peronospora brassicae* Gäum.) auf dem Kohl und seinen Verwandten. *Landwirts. Jahrb.*

- Schweiz 40 : 463-468.
9. Greenhalgh, J.R. and Dickinson, C.H. (1975). Differential reactions of three crucifers to infection by *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr. Phytopathol. Z. 84 : 131-141.
 10. Heath, M.C. (1971). Haustorial sheath formation in cowpea leaves immune to rust infection. Phytopathology 61 : 383-388.
 11. Heath, M.C. (1980). Reactions of nonsusceptible to fungal pathogen. Annu. Rev. Phytopathol. 18 : 211-236.
 12. Hiura, M. and Kanegae, H. (1934). Studies on the downy mildews of cruciferous vegetables in Japan. Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc. 13 : 125-133.
 13. Kluczewski, S.M. and Lucas, J.A. (1982). Development and physiology of infection by the downy mildew fungus, *Peronospora parasitica*, in the susceptible and resistant *Brassica* spp. Plant Pathol. 31 : 373-390.
 14. Maclean, D.J. and Tommerup, I.C. (1979). Histology and physiology of compatibility and incompatibility between lettuce and downy mildew fungus *Bremia lactucae* Regal. Physiol. Plant Pathol. 14 : 249-312.
 15. Mayama, S. and Shishiyama, J. (1978). Localized accumulation of fluorescent and UV-absorbing compounds at penetration site in barley leaves infected with *Erysiphe graminis hordei*. Physiol. Plant Pathol. 13 : 347-354.
 16. Michelmores, R.W. and Hulbert, S.H. (1987). Molecular marker for genetic analysis of phytopathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 25 : 383-404.
 17. Natti, J.J., Dickson, M.H. and Atkin, J.D. (1967). Resistance of *Brassica oleracea* variety to downy mildew. Phytopathology 57 : 144-147.
 18. 大口富三・吉田克志・Ismail, M.Y.・浅田泰次 (1989). ダイコン幼苗の本葉および子葉を用いたべと病菌の室内増殖法. 日植病報 55 : 561-566.
 19. 大口富三・吉田克志・Ismail, M.Y. (1991). キュウリ葉のべと病菌と炭そ病菌感染部位の蛍光並びに光学顕微鏡による比較観察. 愛媛大農紀要 36 : 187-197.
 20. Wang, T.M. (1949). Studies on the mechanism of resistance of cruciferous plants to *Peronospora parasitica*. Phytopathology 39 : 541-547.
 21. Yerks, W.D. and Shaw, C.G. (1959). Taxonomy of the *Peronospora* species on crucifer and *Chenopodiaceae*. Phytopathology 49 : 499-507.
 22. 吉田克志・松本 勲・大口富三 (1993). ダイコンべと病菌とナズナべと病菌のダイコン根組織における感染行動の組織化学的比較観察. 日植病報 59 : 163-170.

Explanation of plate

Plate I

1. Intercellular hypha and haustorium of Japanese radish isolate in Shirokubimiyashige cotyledon (48 hr after inoculation).
 2. Death of Shirokubimiyashige cotyledon cell invaded by broccoli isolate (48 hr after inoculation). An arrow indicates haustorium.
 3. Sheath of haustorium of shepherd's purse isolate in cauliflower cotyledon (24 hr after inoculation). Arrows indicate haustoria.
 4. The same haustoria as in plate I-3 observed with a fluorescent microscope after staining with alkaline aniline blue.
 5. Papilla formation in Shirokubimiyashige cotyledon infected with shepherd's purse isolate (24 hr after inoculation). Arrows indicate papillae.
 6. The same papillae as in plate I-5 observed with a fluorescent microscope after staining with alkaline aniline blue.
 7. A dead epidermal cell (arrow) of Shirokubimiyashige cotyledons infected with shepherd's purse isolate (48 hr after inoculation), stained with rhodamine B.
- Scale : 1, 3, 4, 7=20 μ m, 2, 5, 6=10 μ m.

Plate I