オオムギうどんこ病菌の寄主親和性に関する形態学的 観察—表皮剝離接種による葉肉細胞への感染

河 野 満*・久 能 均*・石 崎 寛*

Morphological Observation of Host-Parasite Affinity in Barley Powdery

Mildew: the Fungal Infection in Epidermis-stripped Mesophyll Cells

Mitsuru KONO, Hitoshi KUNOH and Hiroshi ISHIZAKI

摘要: オオムギうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis hordei*) のレース H₇₇₄ と本菌に親和性または非親和性を示すオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の2品種 Russian 74 および H.E.S. 4 とを用いて実験を行なった。すなわち両品種オオムギの第1葉裏面表皮を剝離し、本菌が葉肉組織内でどのような行動をとるかを光学顕微鏡で観察した。その結果、親和性関係を示す Russian 74 では肉眼的に green island および菌叢が認められ、

解剖学的には葉肉細胞内に一種の吸器構造と思われる塊状菌体構造や細胞間隙菌糸および表層菌糸などが認められたが、非親和性関係の H.E.S. 4 ではそれらの認められる頻度は極めて低かった。また非親和性関係では、露出した葉肉表面の細胞壁に濃く染色された部分が認められた。これは菌の感染に対する何らかの抵抗性反応と考えられる。

緒 言

さび病菌、べと病菌など多くの純寄生菌は、一般に葉肉細胞内に吸器を形成することが明らかにされている。たとえば Zimmer⁹⁾ は、*Puccinia carthami* の夏胞子がベニバナ (*Carthamus tinctorius*) の葉の気孔から侵入して、葉肉細胞内に吸器を形成することを明らかにし、Ehrlich and Ehrlich²⁾ は、コムギ葉に感染した *Puccinia graminis tritici* の細胞間隙菌糸と吸器の微細構造を電子顕微鏡を用いて観察している。一方岩田⁵⁾ は、*Pseudoperonospora cubensis* はキュウリ葉の気孔から侵入し、葉肉組織の細胞間隙を伸長して細胞内に吸器を形成することを認めている。また Peyton and Bowen⁸⁾ は、ダイズ葉に感染した *Peronospora manshurica* の細胞間隙菌糸と葉肉細胞内の吸器の微細構造を明らかにし、吸器内の lomasome と吸器囊に見られる secretory body が純寄生性の重要な鍵をにぎるのではないかと推察している。これに対してオオムギうどんこ病菌のようなうどんこ病菌類は外部寄生性であり、植物表皮細胞内に吸器を形成して養分を吸収することが知られている。うどんこ病菌の中でも、*Phyllactinia* および *Leveillula* のような一部のものは上記のさび病

菌やべと病菌などと同じように行動することが知られているが、多くのうどんこ病菌は通常表皮細胞に寄生し、葉肉細胞に吸器を形成するようなことはない。

日浦⁴⁾によると、オオムギうどんこ病菌ではオオムギ品種と病原菌レースとの間に明確な親和性関係が存在していて、前者の抵抗性遺伝子と後者の病原性遺伝子との組み合わせによって、親和性関係が決定されている。平田³⁾ はこのような親和性、非親和性の関係を光学顕微鏡レベルで検討し、寄主一菌との間で生じる反応を5段階に分類した。それによると寄主の抵抗性の強い場合には、表皮細胞内に菌が侵入できない場合、侵入しても吸器が発達しない場合あるいは侵入を受けた表皮細胞下の葉肉細胞が死ぬ場合などが認められると述べている。Mackie⁷⁾ は、抵抗性および感受性のオオムギ葉の表皮を剝離して *E. graminis* D. C. を接種し、抵抗性および感受性の両方の葉肉組織内で菌糸の伸長ならびに分生胞子の形成を認め、表皮を剝離することによって抵抗性が低下すると述べている。しかしながら日浦⁴⁾ が報告しているように、もし親和性が寄主一菌相互間の遺伝子によって支配されているものとする、非親和性オオムギ品種の抵抗因子が表皮細胞内にだけ存在し、表皮細胞を除くと抵抗性が低下す

* 三重大学農学部

ると考えることは困難である。

そこで筆者らは、親和性および非親和性を示すオオムギ品種とうどんこ病菌レースとを用い、Mackie の結果を再度検討するとともに、うどんこ病菌が葉肉組織内でどのような行動をとるかを光学顕微鏡で観察した。

材料および方法

オオムギ品種 Russian 74 および H.E.S.4 の種子を素焼鉢に播き、照明灯付き恒温器(室温20°C, 照度250 lux)内で育苗した。播種後7日目に第1葉を切り取り裏面表皮を剝離して長さ1.5cm ぐらいの葉片とし、剝離面を上にして蒸留水を入れたシャーレ中に浮かべた。次いで剝離面にオオムギうどんこ病菌 *Erysiphe graminis hordei* のレース H₇₄ の分生孢子を筆で接種した後、照明灯付き恒温器(20°C, 250 lux)内において。

接種後6日目まで毎日病斑の有無、その他を肉眼的に観察するとともに、F.A.A. (フォルマリン, 酢酸, エタノール混合液)で固定し、常法にしたがってパラフィン切片(厚さ約12 μ)を作り、Flemmingの方法¹⁾によって染色し、葉肉組織内における病原菌の行動を光学顕微鏡で観察した。

なお表皮を剝離することによって葉肉組織が死滅し、腐生的に感染することも考えられるので、コハク酸脱水素酵素活性の有無⁶⁾を調べることによって葉肉組織の生死を判定した。すなわち、表皮剝離後シャーレ中の水に浮かべ無接種のままに放置したオオムギ葉片を2日、4日および6日目に取出し、直ちに Hooker plant microtome を用いて厚さ約12 μ の切片とし、0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4), 0.1M コハク酸ナトリウム, 0.1% Iodonitro tetrazolium violet の等量混合液中に入れ、30分間室温に放置した後コハク酸脱水素酵素活性を顕微鏡下で観察した。

実験結果

Russian 74-H₇₄ (親和性関係)：病原菌孢子接種後2日目に接種部を中心にして明瞭な green island が現われ、4日目には菌叢が肉眼的に認められた。葉肉組織上に形成された菌叢は囲場で一般に認められる典型的なうどんこ病斑と同様で、白色繊毛状であった。固定した葉肉組織切片を鏡検したところ、表皮を剝離することによって露出した葉肉組織上には菌糸の伸長が認められ、露出面から第1層および第2層の細胞中には濃く染色された塊状菌体構造が観察された(図1,

ma)。これをさらに高倍率で観察すると菌糸のからみあったような塊状菌体構造が認められ、外周が明瞭で寄主細胞容積の大部分を占めていた(図2, 3, ma)。また細胞間隙には菌糸が伸長しており、しばしば葉表の表皮細胞近くまで伸びていたが、葉肉側から表皮細胞中に侵入している例は認められなかった。これらの塊状菌体構造および細胞間隙菌糸は接種後2日目から認められた。接種後4—5日目になると露出した葉肉組織表面には分生孢子柄が形成され、連鎖状分生孢子も多数認められた(図4, c)。

H.E.S.4-H₇₄ (非親和性関係)：接種後4日目に接種部を中心に green island が認められたが、親和性の場合に観察されたものほど明瞭ではなかった。また露出した葉肉組織面には低倍率光学顕微鏡で菌糸の伸長が認められたが、肉眼的にはっきり菌叢として確認できるものではなかった。固定した葉肉組織の切片では、親和性の場合と同様接種後2日目から塊状菌体構造が観察されたが(図7, ma)、親和性と比較するとその形成頻度は極めて低かった。細胞間隙菌糸(図5, hy)および分生孢子(図8, c)も観察することができたが、その形成頻度は極めて低かった。また接種部の葉肉表面、すなわち露出した葉肉細胞の細胞壁が濃染されているのが認められたが、このような濃染部は病原菌を接種していない対照区の葉肉組織面では観察できなかった。したがってこのような細胞壁の変化はうどんこ病菌の感染によって生じたもので、非親和性における抵抗現象と関連するものであろう。このような変化は、寄主または菌あるいは両者の作用によって形成された物質の蓄積、あるいは細胞壁自体の変性の結果であろうと推察される。

表皮剝離葉におけるコハク酸脱水素酵素の活性：供試した2品種のオオムギの第1葉裏面表皮を剝離して水に浮かべ、2, 4, 6日後に酵素活性を調べたが、第1表に示したように両品種とも剝離後4日目まで強

Table 1. The activity changes of succinic dehydrogenase in barley leaf after stripping its epidermis.

Days after stripping the leaf epidermis	Barley variety	
	Russian 74	H.E.S.4
2	+++*	+++
4	++	+++
6	+	+

* The degree of positive response

い活性がみられた。6日後になると活性は低下し反応は弱くなるが依然として酵素活性は認められ、葉から表皮を除いても6日間は呼吸を維持するといえる。上記のように菌叢および塊状菌体構造は接種後2日目に葉肉組織で認められるので、これらは生きた細胞内で形成されたものと考えられる。

以上の結果から次の諸点が明らかになった。

1. オオムギうどんこ病菌は、オオムギ葉に表皮がない場合でも直接葉肉組織に侵入して感染を成立させ得る。さらに分生孢子を形成して、無性世代を維持できる。
2. オオムギうどんこ病菌 H_{r74} に対して親和性関係の Russian 74 では、葉肉細胞内の塊状菌体構造、細胞間隙菌糸および表層菌糸がよく観察されるが、非親和性関係の H.E.S.4 では、それらの観察頻度は極めて低い。
3. 非親和性関係の H.E.S.4 では、露出した葉肉組織表面の細胞壁に一種の抵抗反応と思われる濃染された部分が認められる。

考 察

オオムギ葉の表皮を剝離して、葉肉組織に直接うどんこ病菌を接種すると、細胞間隙に菌糸が伸長し、細胞内には塊状菌体構造が形成されることが明らかになった。また接種後4—5日目になると、葉肉表面には分生孢子も形成されることが明らかになった。これらの結果は、オオムギうどんこ病菌は正常な状態では外部寄生性であるが、もし *Phyllactinia* のように気孔侵入することができれば内部寄生も可能であることを示している。正常な状態で表皮細胞内に形成される樹状突起のある吸器は、葉肉細胞内ではごくまれに形成されるにすぎなかったが、葉肉細胞内に形成された塊状菌体構造は外周が明瞭で、これを中心にして菌糸が伸長していることなどから、一種の吸器構造ではないかと推察される。しかしながら吸器囊の有無の確認は光学顕微鏡では不可能で、電子顕微鏡の観察をまたなくてはならない。非親和性の場合でも親和性の場合と同様に塊状菌体構造が形成されるが、その形成頻度はきわめて低く、かつ肉眼的に葉肉組織上に菌叢が認められないことなどから、非親和性寄主は葉肉組織におい

ても抵抗性因子が作用しているものと考えられる。また非親和性関係の寄主体の露出した葉肉細胞の細胞壁が濃染されていたが、これは親和性関係では認められなかった。したがってこの細胞壁の変化は、菌の感染に対する寄主の抵抗反応に関連があるのではないかと考えられる。少なくとも本実験に用いた $H.E.S.4-H_{r74}$ のような非親和性の組み合わせでは、Mackie⁷⁾ が報告しているような表皮剝離による寄主の抵抗性の減少は認められなかった。平田⁸⁾ によると、1つのオオムギ品種と1つの菌レースを組み合わせた場合でも、必ずしも1種類の抵抗反応が現われるものではなく、場合によっては2、3種類の抵抗反応が同じ葉上に同時に現われることが明らかにされている。したがってもしこのような抵抗反応が、オオムギ品種の抵抗性遺伝子によって支配されているならば、実験に用いるオオムギ品種—菌レースの組み合わせによって、抵抗反応が表皮に現われたり葉肉細胞に現われたりすることは十分考えられる。本実験では親和性、非親和性関係とも、1種類の寄主—菌の組み合わせを用いたのに過ぎないので、いかなる非親和性関係でも上記の結果が得られるものか否かは、今後検討を要する問題である。

引 用 文 献

- 1) 明日山秀文・向 秀夫・鈴木直治 (1962). 植物病理実験法: 389—390, 日本植物防疫協会, 東京.
- 2) EHRLICH, H. G. and M. A. EHRLICH (1963): Amer. Jour. Bot., 50: 123—130.
- 3) 平田幸治 (1958). 植物防疫, 12: 105—108.
- 4) 日浦運治 (1960). 植物防疫, 14: 517—521.
- 5) 岩田吉人 (1938). 日植病報, 8: 124—144.
- 6) JENSEN, W. A. (1962): In Botanical histochemistry (W. H. Freeman and Company, San Francisco).
- 7) MACKIE, J. R. (1928): Phytopathol., 18: 901—910.
- 8) PEYTON, G. A. and C. C. BOWEN (1963): Amer. Jour. Bot., 50: 787—797.
- 9) ZIMMER, D. E. (1965): Phytopathol., 55: 296—301.

Summary

The epidermis-stripped primary leaves of two varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.) (var. Russian 74 and H.E.S.4) were inoculated with conidia of a race of *Erysiphe graminis hordei*, H_{r74} (affinitive to Russian 74 and non-affinitive to H.E.S.4) in order to clarify if the causal fungus can form haustoria

only in the epidermis and to analyse the direct affinitive and non-affinitive reactions to the mesophyll cells in response to the fungal invasion. The conidia germinated on the exposed mesophyll surface and the hyphae elongated into the mesophyll. Within 48 hours after inoculation, a number of mycelial aggregates were formed in the mesophyll cells. The intercellular hyphae were visible at the same time. These fungal developments were observed in both affinitive and non-affinitive host-parasite combinations; however, the numbers of the mycelial aggregates and intercellular hyphae were extremely restricted in the non-affinitive combination. Densely stained materials were deposited on the outermost cell wall of exposed mesophyll cells which were inoculated with the non-affinitive fungal conidia. They seemed to be associated with the extreme restriction of the fungal development in the non-affinitive host mesophyll.

Explanation of Figure

- Fig. 1. A photomicrograph of the cross section of the epidermis-stripped leaf of var. Russian 74 inoculated with the fungal race, H_{r74}. Mycelial aggregates (ma) are formed in the first and second cell layers of the exposed mesophyll.
- Fig. 2. A mycelial aggregate occupying the greater part of a mesophyll cell of var. Russian 74.
- Fig. 3. A mycelial aggregate in the first mesophyll cell layer and hyphae (hy) growing in the intercellular space of var. Russian 74.
- Fig. 4. A conidial chain (c) formed on the exposed mesophyll surface of var. Russian 74 on the 5th day after inoculation.
- Fig. 5. Hyphae elongating in the intercellular space of the mesophyll of var. H.E.S. 4.

Densely stained substances (arrows) adhere on the exposed wall surface of the mesophyll.

- Fig. 6. The densely stained substances (arrows) accumulated on the mesophyll cell surface of var. H.E.S. 4 in response to the fungal infection.
- Fig. 7. A mycelial aggregate in the second cell layer of var. H.E.S. 4 mesophyll.
- Fig. 8. A conidial chain of the fungal race H_{r74} formed on the exposed mesophyll surface of H.E.S. 4 and a mycelial aggregate in a mesophyll cell.

Key to the labeling

- c: conidial chain
ep: upper epidermis of the leaf
hy: hypha
ma: mycelial aggregate
me: mesophyll

(昭47.7.1.受付)