

少しでも早く病勢の動きを知ろうとする場合には有効であると考えられる。I—K I による病斑の検出は F A A 固定材料でも可能であるが、この場合には脱色が不十分なため検出病斑の色の濃淡が不鮮明となり、本法のようにメタノールアセトンを用いる方が鮮明な病斑が検出された。また、検出のための脱色に要する時間はメタノールアセトンの量を多くするか、または液をひんばんにとりかえることによって短縮することが可能であり、採取葉についてその日の内に病斑を検出することも可能であった。また、I—K I によって過染した場合には水洗によって脱色することができた。

III 摘 要

1 葉いもち病の潜伏期間は稲の age, 病斑型によって若干異なるが、葉いもち流行期の罹病性病斑の潜伏期間は平均気温の一次式で表わすことが可能であり、およそ $y = -0.54x + 19.0$ で計算される。

2 罹病性病斑は罹病葉をメタノールアセトン 3 : 1 で脱色し、ヨード・ヨードカリ液で染色することにより、早期に検出することが可能であり、肉眼観察による病斑発現が接種 6 ~ 7 日後であったのにたいし、I—K I 検出病斑は 4 ~ 5 日後であった。この検出法は低温の場合に殊に有効であり、いもち病の発生初期において発

生子察に利用できると考えられる。

引用文献

- 1) 錠谷大節 (1958) 稲熱病抵抗性品種育成に関する植物病理学的研究 (第 2 報). 東北農試報告. 14 : 15 ~ 21.
- 2) 千葉末作・鷺尾貞夫・中川原考 (1960) 圃場における葉いもちの発生時期. 発生量と葉鞘接種による被害度. 北日本病虫研年報. 11 : 19 ~ 22.
- 3) 後藤和夫・深津量栄 (1955) 病斑周辺の澱粉滞積について. 東近農試報告. 栽培部 2 : 41 ~ 51.
- 4) 逸見武雄・安部卓爾・池屋重吉・井上義孝 (1936) 稲熱病に関する研究 (第 IV 報). 農事改良資料. 105 : 1 ~ 145.
- 5) 井村純三 (1940) 稲熱病及び稲胡麻葉枯病の潜伏期間並に発病程度に及ぼす日光の影響に就きて. 日植病報. 10 : 16 ~ 26.
- 6) 木場三朗 (1952) 作物の発病と収量との関係 2. 農及園. 27 : 285 ~ 286.
- 7) 吉井 甫 (1937) 稲熱病に関する研究 III. 日植病報 6 : 289 ~ 303.
- 8) 吉野嶺一・山口富夫 (1970) いもち病菌接種後の温度と発病との関係 (講要). 日植病報 36 : 156 ~ 157.
- 9) 吉野嶺一・山口富夫 (1970) 稲葉鞘におけるいもち病菌侵入に伴う Fontana 液陽性反応, 第 22 回北陸病害虫研究会講演 (1970).

イネいもち病菌の葉身組織内菌糸の観察法*

吉野 嶺 一 (農林省北陸農薬試験場)

植物病原菌の寄主体への侵入・伸展の観察にはマイクロームあるいは徒手切片を用いた顕微鏡観察、最近では超薄切片による電顕観察が多く行なわれている。これらの観察方法と並んで侵入頻度・菌—寄主反応を知るために従来から用いられている方法として、表皮を剝離して染色する方法、あるいは大きな組織片を透明化する leaf clearing method があり、このような観察方法は生態的な立場から菌の侵入を調査しようとする時、きわめて有用であると考えられる。leaf clearing method は古くから多数の植物病原菌の観察に用いられており、1930 年代の初めにラクトフェノールに浸漬する方法が報告されているのをはじめ Leven はピリジンで脱色後ラクトフェノールコットンブルーで染色することにより、キャ

ベツ・キュウリ・イチゴ・タバコ等各種の植物で病原菌の観察が可能なることを報告し、Isaac はジオキサンとプロピオン酸で固定後ヘマトキシリンガムで染色マウントすることによりさび菌・うどん粉病菌を観察し、White らは大麥うどん粉病菌をラクトフェールアニリンブルーで染色し、Janes は塩素ガスで漂白後メチルバイオレットで染色してトマト輪紋病を、Adegbola らはカルノア液で固定後ラクトフェノールアニリンブルーに浸漬して Pythium bean blight を観察するなど多数の報告がなされている。稲の病害においては水酸化カリに罹病葉を浸漬して黄化萎縮病菌卵胞子を観察することは広く知られているが、いもち病菌については伊藤らがピアネーズ液で染色後カルボールターベンチンに浸漬する方法を、鈴木がサフラニンで染色後フェノールに浸漬する方法を

*本報告の一部は昭和46年度日本植物病理学会大会において報告した。

イネ葉身組織内におけるいもち病菌糸の伸展



左上・右上・左下：機動細胞内での菌糸進展様相
右下：維管束表皮細胞内での菌糸進展様相
(以上はいずれも接種72時間後)

報告しているのみで、その後この種の方法による観察結果は報告されていない。最近 Phillips⁶⁾らはタマネギ・インゲンなどの根に寄生する *Olpidium* 菌の観察に際して、水酸化カリ処理後ラクトフェノールトリンプルーに浸漬することにより菌糸のよい観察結果を得ているが、筆者はいもち菌の侵入を調査する方法の一つとして Phillips らの方法を参考にしたアルカリ処理ラクトフェノール法によって葉身内菌糸を染色することを検討し、若干の観察結果を得たのでここに報告する。

I 観 察 方 法

ポット栽培した水稲品種日本海にいもち菌を噴霧接種し、72時間後に接種葉を採取して次に示すような処理で固定・染色し光学顕微鏡で観察した。

固定 ホルマリン・醋酸・アルコール固定液(6.5:2.5:100)に固定し、1週間～4ヶ月保存供試した。

脱珪酸 50%エタノール中に非水素酸を1%になるように入れた液に約1～1.5cmに細切した試料を入れ、4日間室温に放置して脱珪酸を行なった。

水洗 蒸留水で2～9回洗滌した。

アルカリ処理 試料を5% KOH に浸漬し一晚(約18時間)室温に放置した後温浴上で約10分処理するか、浸漬後ただちに温浴上約30分間処理した。

水洗 前記水洗と同様に処理した。

塩酸処理 稀塩酸(市販の濃塩酸23.6mlを100mlに希釈したもの)に1時間以上浸漬した。

染色 White⁹⁾らの方法によるラクトフェノール原液中に0.05%になるようにアニリンブルーを溶かし、温浴中で30分～60分間染色するか、30分温浴中で処理後一晚室温に置いて染色した。

脱色および封入にはラクトフェノールを用いた。

Phillips⁶⁾らによれば、アルカリ処理によって寄主細胞内の細胞質が分解消失するのにたいし、菌の細胞質が分解されないため、トリンプルーによって菌のみが染色され観察が容易になると述べているが、上記処理を行なった場合、稲葉細胞内の細胞質の分解は必ずしも充分行なわれず、アニリンブルーによって淡く染色されるようであった。また、アルカリ処理時間を長くした場合に葉組織細胞の細胞質が分解消失する場合も認められたが、その場合には菌糸の細胞質も若干分解され菌糸の染まりが薄くなる例が多かった。アルカリ処理は温浴中の温度が60°C以下の低温では、KOHの組織への浸透が悪く、よい観察結果を得るには2時間以上の浸漬が必要であった。80°Cでは約60分・100°Cでは約30分の浸漬でよい染色結果が得られたが、浸漬時間が長すぎると組織片が崩壊し、その後の処理を行なうことが不可能となった。ア

ルカリ処理時間は稲葉の葉位・展開後日数などによって若干異なり若い葉ほど短くする必要があると考えられた。アルカリ処理によって透明化された組織片は塩酸処理によって白色不透明化し、これによって組織片が酸性になったことがわかる。組織片の酸性化はアニリンブルーによる染色のために必要な処理であるが、塩酸の代りに30%酢酸を用いた場合には組織片の崩壊が認められ、観察には適さないようであった。普通のラクトフェノール法によって罹病葉を染色した場合、罹病葉上の孢子・発芽管・付着器等はよく染まるが、組織内侵入菌糸はほとんど染まらないのに対し、脱珪酸を行なった場合には組織内菌糸も若干染まる場合がある。本法においては脱珪酸の有無にかかわらず菌糸は染色されるが、上記のことを参考にすれば、短時間に観察結果を得なければならぬ場合以外は脱珪酸を行なうことが望ましいと考えられる。染色液の処方には未だ充分な検討を行っていないが、ラクトフェノール原液を用いた場合には透明度が高すぎる傾向があり、水またはエタノールで70～80%に稀釈した方がよい観察結果が得られた例もあった。菌糸を寄主体と染め分けるために用いられる色素としてはアニリンブルーの他に、トリンプルー・レゾルシンプルー・オルセイリン BB・マグダラレッド・サフラニン・酸性フクシンなどがあるが、これらの色素についての検討をも含めて、染色液および染色方法についてさらに検討を加え、より安定した観察を可能ならしめる必要がある。このように未だ改善する点は多数あるが、本法を用いて、いもち菌の稲葉組織内への侵入・伸展を観察した結果は次のとおりであった。

II 稲葉組織内菌糸の観察

稲葉上に形成された付着器からの侵入は機動細胞・気孔列の長・短形細胞・気孔孔辺細胞・維管束上の表皮細胞において認められたが、第1表に示したように各処理区各葉位1,000付着器当りの侵入付着器数は、機動細胞においてもっとも多く、長・短形細胞がこれにつぎ、孔辺細胞・維管束表皮細胞での侵入は比較的少なかった。この結果は吉井・島田¹⁰⁾らがいもち菌の侵入は機動細胞・長形細胞・気孔細胞からの侵入が多いことを観察している結果と一致する。気孔開口部からの侵入は観察付着器数約3万個のうちでわずかに2例でありごくまれにしか起らないものと考えられる。

菌糸伸展が認められた付着器数は、展開中の葉では無遮光の稲で488個・遮光の稲で354個であり、完全展開第1葉ではこれよりもわずかに少なかったが、完全展開第2葉では無遮光で169個・遮光で145個と展開中の葉の1/2以下であり、下位葉になるほど急激に侵入数が減少

第1表 菌糸伸展の認められる付着器数
(日本海：調査付着器数1000)

	展開中の葉	完全展開葉		
		第1葉	第2葉	
無 遮 光	機動細胞	291	295	99
	長・短形細胞	121	33	47
	孔辺細胞	40	23	17
	維管束	36	4	6
	計	488	354	169
遮 光	機動細胞	222	154	84
	長・短形細胞	92	49	30
	孔辺細胞	16	23	22
	維管束	24	7	9
	計	354	233	145

するものと考えられた。殊に侵入数をもっとも多く、侵入後の菌糸伸展の大きい機動細胞での侵入数の減少が著しく第2葉は展開中の葉のおよそ1/3であった。

図版に示したように、機動細胞に侵入したいもち菌糸は他の細胞にくらべて伸展が大きく、接種72時間後でもっとも伸展の大きい例では7個の細胞を侵しているものが観察された。機動細胞における菌糸の伸展は、葉鞘表面表皮細胞の場合のように比較的スムーズな伸びが観察される場合も認められたが、概して菌糸は太く、少し伸展してはくびれる伸び方をしているのが観察され、分岐も多く、水平方向と同時に垂直方向への伸展も著しいようであった。長・短形細胞における菌糸の伸びは機動細胞よりやや小さいが、水平方向については機動細胞とほぼ同様の伸び方を示した。垂直方向への伸展は比較的小さく、表皮細胞下の葉肉柔細胞の細胞壁で伸展が抑えられているように観察された。菌糸が葉肉柔細胞に侵入した場合には、細胞はアニリンブルーによって濃青色に染まり菌糸の観察が部分的に不可能であった。気孔々辺細胞における侵入菌糸は細胞一杯に充満している場合が多く、低倍率で観察すると、気孔孔辺細胞の片側だけが青く見えた例が多かった。維管束表皮細胞に侵入した菌糸は他の細胞に侵入した場合にくらべて著しく細く、伸び方も小さいようであった。これらの観察結果から、機動細胞に侵入した場合をもっとも菌糸が伸展し、病斑を作りやすく、長・短形細胞がこれに次ぎ、孔辺細胞・維管束表皮細胞からの侵入は病斑の形成にあまり関与しないように考えられた。なお、脱珪酸をしない場合、珪化機動細胞

と侵入菌糸を同時に観察することが可能であるが、現在までのところ珪化細胞上に形成された付着器からの侵入菌糸は観察していない。

III 摘 要

1 いもち病菌接種72時間後の稲葉を5%水酸化カリ水溶液に浸漬し、その後稀塩酸で酸性化シラクトフェノールアニリンブルーに浸漬、温浴中で処理することにより、表皮細胞内に侵入・伸展した菌糸を観察することが可能であった。

2 菌糸の侵入・伸展は機動細胞でもっともよく、長・短形細胞がこれに次ぎ孔辺細胞・維管束表皮細胞では比較的小さかった。機動細胞内の菌糸は太いが、同時にくびれも多く、水平・垂直両方向への伸展がいちじるしく、病斑形成にもっとも関与していると考えられた。

引用文献

- 1) Adegbola, M. O. K and D. J. Hagedorn (1969) Host-parasite relations in Pythium bean blight. *Phytopath.* 59: 1484~1487.
- 2) Isaac, P. K (1960) A whole leaf technique for studying infected leaves. *Phytopath.* 50: 474.
- 3) 伊藤誠哉・島田昌一(1937) 稲熱病に関する研究(第5報) 農事改良資料120: 1~190.
- 4) Janes, B. S. (1962) Leaf-clearing technique to assist fungal spore germination counts. *Nature*: 1098~1100
- 5) Leven, C (1952) A method for clearing leaves. *Phytopath.* 42: 352.
- 6) Phillips, J. M and D. S. Hayman (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. mycol. Soc.* 55: 158~161
- 7) 鈴木橋雄(1940) 稲熱病に対する感受性の差異と寄主体侵入との関係に就きて 農及園 15: 1999~2010.
- 8) 島田昌一(1937) 稲熱病菌の稲葉における侵入方法 農及園 12: 1106~1108.
- 9) White, N. H and E. P. Baker (1954) Host-parasite relations in powdery mildew of barley *Phytopath.* 44: 657~662.
- 10) 吉井甫(1936) 稲熱病に関する研究II 病原菌の侵入に就て. 日植病報 6: 205~219.