

イネおよびアシカキ水孔の微細構造 ——特にイネ白葉枯病菌の水孔侵入との関連*——

堀 野 修**

Osamu HORINO : Ultrastructural observation on the water pores in *Oryza sativa* L. and *Leersia japonica* Makino in relation to the hydathodal invasion of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*

Summary

The structural details of water pore apertures in *Oryza sativa* L. and *Leersia japonica* Makino were studied to obtain informations about hydathodal invasion of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. The former plant was invaded through its water pores by the causal bacterium, but the latter prevented the hydathodal invasion. The results obtained here are as follows :

1. Water pore apertures in both plants were fundametaly composed of 3 parts, subsidiary cells, guard cells and outer ledges on upper side of guard cells.
2. Subsidiary cells ($32.1 \times 9.7 \mu\text{m}$) of *O. sativa* were larger than those of *L. japonica*.
3. Outer ledges of *O. sativa* were distinctly short as compared with those of *L. japonica*.
4. Openings on the leaf surface of the guard cells in *O. sativa* were measured $2.9 \mu\text{m}$ in width on an average, and were 3 times as wide as openings ($0.9 \mu\text{m}$) of *L. japonica*.
5. An accumulation of the bacteria was found on the surface of the guard cells in *L. japonica*, but hydathodal invasion of the bacteria was never observed.
6. It is accordingly conceivable that the resistance of *L. japonica* to the hydathodal invasion was attributed to the morphological feature of outer ledges on the upper side of guard cells.

一般に植物病原細菌の健全な植物体への侵入は植物の気孔、水孔、蜜腺などの自然開口部に限られており、病原細菌が植物体表面から直接角皮を貫通して侵入することはない¹⁾。水上⁴⁾は白葉枯病菌のイネ葉への侵入に関する研究の中で、病原細菌が無傷のイネ葉に侵入する門戸は水孔であり、病原細菌が水孔下部の被覆組織で増殖することを始めて報告した。その後、田部井⁶⁾も光学顕微鏡により白葉枯病菌の寄主体侵入に関する解剖学的研究を行い、病原細菌のイネ葉への侵入は水孔から行われることを再確認した。

以上のように、無傷のイネ葉への白葉枯病菌の侵入門戸は水孔であることがすでに明らかにされているが、これまでに報告された観察結果はいずれも光学顕微鏡によって行われており、水孔形態の詳細についてはなお明確にされているとは言えない。したがって本報では白葉枯病菌の寄主体侵入門戸となる水孔の形態構造を走査型お

よび透過型電子顕微鏡(以後走査型電顕、透過型電顕と略記)によって明らかにした。本試験では白葉枯病菌に侵入抵抗を示すことがすでに明らかにされているアシカキ水孔⁶⁾についてもイネ水孔と対比して観察を行った。

本試験を実施するに当って当場病害第1研究室長大内昭博士および病害第2研究室古賀博則氏から有益なご助言をいただいたので深謝の意を表す。なお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。

実験材料および方法

実験材料として本病に感受性を示すイネ品種、金南風と本病原細菌の噴霧接種によっては発病しないが、針接種によって発病することが知られている禾本科雑草、アシカキ *Leersia japonica* Makino を供試した。金南風は1/5000 a ワグネルポットに移植して止葉展開期まで温室で栽培し、その止葉を観察試料として用いた。アシカキは2年間隔離栽培した無病株をワグネルポットに株分けして地上部を切りもどし、1茎当り10~15枚の葉が展開した高さ約20cmの展開最上葉を供試した。本病原細菌による両植物葉の発病の有無を確認するための接種

* 本論文の一部はすでに日植病報に投稿(8月19日受理)したが、本論文ではイネ水孔の観察結果について更に詳しく記述した。

** 北陸農業試験場環境部 Environment Division, Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Inada, Joetsu, Niigata 943-01

は、病原細菌T7174 (I群菌)を馬鈴薯半合成培地で28°C, 48時間培養し、細菌濃度 $10^8 \sim 10^9$ 個/mlの浮遊液を噴霧接種法および針接種法により行った。接種後12日目に病斑長を調査した。なお接種に用いた細菌浮遊液には界面活性剤を添加しなかった。

観察材料の採取は接種後2日目の晴天の午前9時から午前10時の間に行い、透過型電顕のための試料は常法に従って2.5%グルタルアルデヒドで3時間前固定し、1.0%オスミック酸で1時間後固定した。両植物とも葉先から2~3cmの葉片を観察材料として採取した。採取した葉片はエポキシ樹脂に包埋後、超薄切片とし、酢酸ウラニルおよび Reynolds 法⁵⁾によって電子染色して観察した。走査型電顕のための試料はグルタルアルデヒドとオスミック酸の二重固定後、エチルアルコール系列で脱水し、酢酸アミル、液化炭酸ガスで置換したのち臨界点乾燥装置で乾燥した。乾燥試料はイオンスパッタ装置で金を蒸着して観察した。

結 果

針接種法と噴霧接種法による発病の差

イネとアシカキに本病原細菌を針接種および噴霧接種し、両植物の発病の差異を第1表に示した。

第1表 白葉枯病菌の針接種、噴霧接種によるイネとアシカキの発病¹⁾

植 物	病 斑 長 (cm)	
	針 接 種	噴 霧 接 種
イ ネ	5.8	4.2
ア シ カ キ	3.5	0.0

1) 両植物とも各10枚の展開葉にT7174 (I群菌)を接種し12日後に調査。表中の数値は病斑長の平均値。

イネは両接種によっていずれも典型的な白葉枯病病斑を形成し、接種法の違いによって病斑長に明らかな差異はなかった。一方、アシカキは針接種により長さ3.5cmの病斑を形成したが、噴霧接種によっては肉眼的に確認できる病斑を形成しなかった。上記のように、イネとアシカキに異なる接種法を行った場合の発病の差から、アシカキは白葉枯病菌に侵入抵抗を示すが、拡大抵抗を示さないことが再確認された。

水孔の基本的形態

イネの水孔とアシカキの水孔は基本的に同じ形態を示していた。イネ、アシカキとも水孔(WP)の基本構造は気孔ときわめてよく類似し、孔辺細胞(GC)、副細胞(SC)および孔辺細胞に付着している ledge の3部分から構成されていたが、ここではこれら3部分を含めて水孔と称することとする。1個の水孔は2個の孔辺細胞

に囲まれ、孔辺細胞はさらに2個の副細胞にとり囲まれていた(図版I-1, 2)。2個の孔辺細胞の間にはレンズ状の小隙が認められた(図版I-2, 図版III-3)。イネとアシカキの水孔はいずれも他の表皮細胞と同じ面に位置しておらず、表皮細胞の面より少し陥入していた。水孔を斜め上方から観察すると、副細胞は孔辺細胞の位置よりかなり盛り上っていた。また水孔の小隙の周辺には2枚の outer ledge (OL) が存在し(図版I-1)、小隙の下部には2個の孔辺細胞の間隙からなる小孔(P_O)が開いていた(図版I-2, 3)。

イネの水孔(図版I-2)とアシカキの水孔(図版I-1)を走査型電顕によって観察したところ、両植物の孔辺細胞と副細胞の表面には蠟(wax)はほとんど認められなかった。しかし水孔以外の表皮細胞の表面には針状および粒状を呈する蠟が一面に分布していた。表皮細胞表面の蠟を両植物で比較すると、イネはアシカキに比べて多量の蠟が認められた。両植物葉上の蠟の形状について観察したところ、アシカキでは粒状もしくは不定形に近かったが、イネでは針状であった。また両植物の表面の直径約3μmの球体(図版I-1, 2)はいぼ状突起(papilla)である。孔辺細胞に付着している outer ledge (図版I-1, 2)の幅を上方から観察すると、アシカキ(図版I-1)ではイネ(図版I-2)よりも広がった。このためイネ葉の表面に開口している水孔の小隙はイネの方がアシカキよりも明らかに広いことがわかった。

次に両植物の水孔の孔辺細胞と副細胞を横断切裁して透過型電顕下で観察した結果を図版I-3, 4に示した。両植物とも水孔孔辺細胞の細胞壁は他の表皮細胞壁に比べて著しく硅化しているため硬く良好な超薄切片を作製することは非常に困難であった。水孔の横断切裁により孔辺細胞に付着している outer ledge を観察したところ、イネ水孔の outer ledge の長さはアシカキのそれより極端に短かった。

水孔孔辺細胞の下部には一定の範囲にわたって各所に細胞間隙が存在し、被覆組織(epithem)⁶⁾と呼ばれる特殊な組織が形成されており、この組織では柔組織細胞(PC)が疎に分布していた(図版II)。一方、気孔の孔辺細胞の下部の組織は水孔の場合と明らかに異なり、呼吸腔が認められた。水孔が分布しているイネ葉身先端の葉縁部を横断切裁すると、図版IIに示したように被覆組織の下部に導管が存在し、水孔と導管との間は被覆組織によって連絡していることが明らかとなった。この導管壁の厚さは均一でなく、導管壁の肥厚している部分と肥厚していない部分が認められた。導管壁の肥厚していない部位では薄い膜が被覆組織と導管内部の間に介在して

いた。

図版Ⅲにはイネ水孔とその下部の被覆組織の透過型電顕写真とイネ水孔の開閉状態をほぼ真上から撮影した走査型電顕写真を示した。孔辺細胞には葉緑体は含まれず、その他の細胞内器官も認められなかった。しかし副細胞には多数のミトコンドリア、ER、1個の核と数個のゴルジ装置が含まれていた(図版Ⅲ-1, 図版Ⅰ-2)。既に述べたようにイネ水孔ではアシカキ水孔に比べて孔辺細胞に付着している outer ledge が短いため、表面に開口している小隙は広がった。しかしながら、同一時期に採取したイネ葉でも、outer ledge の下方に位置している2個の孔辺細胞の間隙(PO)がかなり広く開口している水孔(図版Ⅲ-3)とほとんど閉じた状態の水孔(図版Ⅲ-2)が認められた。

第2表 走査電顕によるイネとアシカキの水孔、気孔の形態的比較¹⁾

観察項目		イネ	アシカキ
水孔	副細胞の長径	32.1 μm	24.5 μm
	副細胞の短径	9.7	6.7
	表面開口部の幅	2.9	0.9
気孔	副細胞の長径	23.9	22.4
	副細胞の短径	5.4	4.9
	表面開口部の幅	2.1	2.1

1) 各観察項目の測定はそれぞれ20個の水孔、気孔について行い、平均値で示した。

第2表は両植物の水孔と気孔それぞれ20個について、副細胞の長径と短径、孔辺細胞の開口部の幅を走査型電顕下で測定した結果である。イネ水孔副細胞の長径(32.1 μm)、短径(9.7 μm)はアシカキの水孔副細胞の長径(24.5 μm)、短径(6.7 μm)に比べて短かった。イネ水孔の開口部(2枚の outer ledge の間隙)は平均2.9 μm で、アシカキ水孔の開口部(0.90 μm)の約3倍であった。一方、イネ気孔の副細胞は長径23.9 μm 、短径5.4 μm で、イネ水孔の副細胞の長、短径に比べて明らかに短かった。しかしイネとアシカキの気孔開口部の幅はいずれも2.1 μm で、差異は認められなかった。

考 察

白葉枯病菌のイネ葉への侵入門戸となる水孔の外部形態と内部構造を電顕的に観察した報告はこれまで植物病理学の分野においても、作物生理学の分野においても皆無のようである。このため、水孔の詳細な形態構造、水孔の機能と構造との関係については不明な点が残されている。一方、白葉枯病抵抗性に関する研究の中で、特に感染初期における抵抗性発現を追究する場合、まず水孔

の分布密度と水孔形態の品種間差異、水孔の開閉機能、更に水孔下部の被覆組織における細菌増殖の様相を明らかにする必要がある。

上記の観点から、本報ではイネ水孔の基本的構造を明確にすることを目的としたが、同時に白葉枯病菌に侵入抵抗を持つことが知られているアシカキの水孔についても観察を行った。

田部井³⁾はアシカキとサヤマグサに本病原細菌を無傷および有傷接種した結果、無傷接種で発病するのはサヤマグサだけであるが、有傷接種ではアシカキにも発病することを報告した。本試験においてアシカキに有傷接種と無傷噴霧接種を行ったところ、アシカキは接種により病斑を形成したが、噴霧接種では病斑形成は認められず、田部井³⁾と同様の結果が得られた。接種試験の結果およびアシカキの侵入抵抗が水孔の外部形態に依存していることが光学顕微鏡観察によって示唆されているので、イネとアシカキの水孔形態を電顕下で観察した。イネ、アシカキとも水孔は気孔と外部形態的に、また内部構造的によく類似していた。しかし水孔と気孔とは両者の分布状態、副細胞の大きさ、副細胞上の蠟の多少、水孔下部の被覆組織と気孔下部の呼吸腔などがたがいに異なるので、両者を容易に識別することができた。

両植物の水孔を表面から観察した結果、アシカキ孔辺細胞の上部に付着している outer ledge はイネ孔辺細胞のそれより明らかに発達していた。このため、アシカキ水孔の表面に開口している小隙の幅は平均0.9 μm と狭く、イネ水孔の小隙(2.9 μm)の約1/3であった。他方、本病原細菌の水孔侵入に関しては表面に開口している小隙の幅が重要である。白葉枯病菌の長径と短径はそれぞれ1.79 μm 、0.61 μm ²⁾であることから、本病原細菌はアシカキ水孔の小隙(0.9 μm)から侵入することは不可能ではないと考えられる。しかし本病原細菌はその細胞周辺に多量の多糖質を有するためアシカキ水孔の小隙を通過することは不可能となり、無傷接種では発病しないと推察される。無傷接種で発病するイネでは、水孔の小隙の幅が白葉枯病菌の短径の約5倍であるため容易に水孔から侵入できると考えられる。上記の推測を裏付ける事実として、本病原細菌がアシカキの水孔上に到達しても水孔下部への侵入が2枚の outer ledge によって阻止されている電顕像を得ている(堀野未発表)。田部井⁶⁾は本病原細菌に対し侵入抵抗を示すアシカキの水孔の外部形態を調べ、アシカキが無傷接種で発病しない原因を水孔副細胞の突起に求めている。すなわち、アシカキの水孔はイネのそれと違って水孔副細胞の外側に突起があるため、この突起が物理的に病原細菌の水孔到達を妨げるので、アシカキは発病しないと結論している。本

試験の結果は田部井の結果とは異なり、アシカキの本病原細菌に対する侵入抵抗は水孔副細胞の突起に起因するのではなく、水孔孔辺細胞に付着している2枚の outer ledge に起因することが明らかとなった。

川田・山崎³⁾がとりまとめた禾本科植物の水孔の開閉能力に関する従来の知見によると、水孔は常時開口状態を示し開閉機能がない、また開閉機能が多少欠けているなど必ずしも一致した見解が得られていない。本試験においてイネの水孔を走査型電顕により観察した結果、2個の孔辺細胞の間隙が広く開口している水孔(図版Ⅲ-3)と、孔辺細胞がほとんど閉じている水孔(図版Ⅲ-2)が認められた。このことはイネの水孔がある程度の開閉機能を有することを示唆していると考えられる。しかし水孔開閉に及ぼす固定処理およびその他の影響について検討していないので、この点については更に追究する必要がある。

摘 要

白葉枯病に感受性のイネ品種、金南風の水孔と白葉枯病菌に侵入抵抗を示すアシカキの水孔を透過型および走査型電顕によって観察した。

1 イネとアシカキの水孔の基本的構造は同じであり、両植物の水孔は気孔と同様に副細胞、孔辺細胞および孔辺細胞に付着している outer ledge の3部分から構成されていた。

2 イネの水孔副細胞の長径(32.1 μm)、短径(9.7 μm)はアシカキの水孔副細胞の長径(24.5 μm)、短径(6.7 μm)に比べて長かった。

3 イネ水孔の outer ledge の長さはアシカキ水孔のそれより明らかに短いことがわかった。

4 イネ水孔の開口部(2枚の outer ledge の間隙)は平均2.9 μmで、アシカキ水孔の開口部(0.9 μm)の約3倍であった。

5 このため、白葉枯病菌がアシカキ水孔に到達しても、その後の侵入は2枚の outer ledge によって阻止されるようである。一方、イネ水孔では outer ledge が短く、開口部が広いため本病原細菌の侵入門戸となる。

6 以上の結果から、白葉枯病菌に対する侵入抵抗は水孔の孔辺細胞に付着している2枚の outer ledge が本病原細菌の侵入を阻止する防御壁としての機能を有しているためと考えられる。

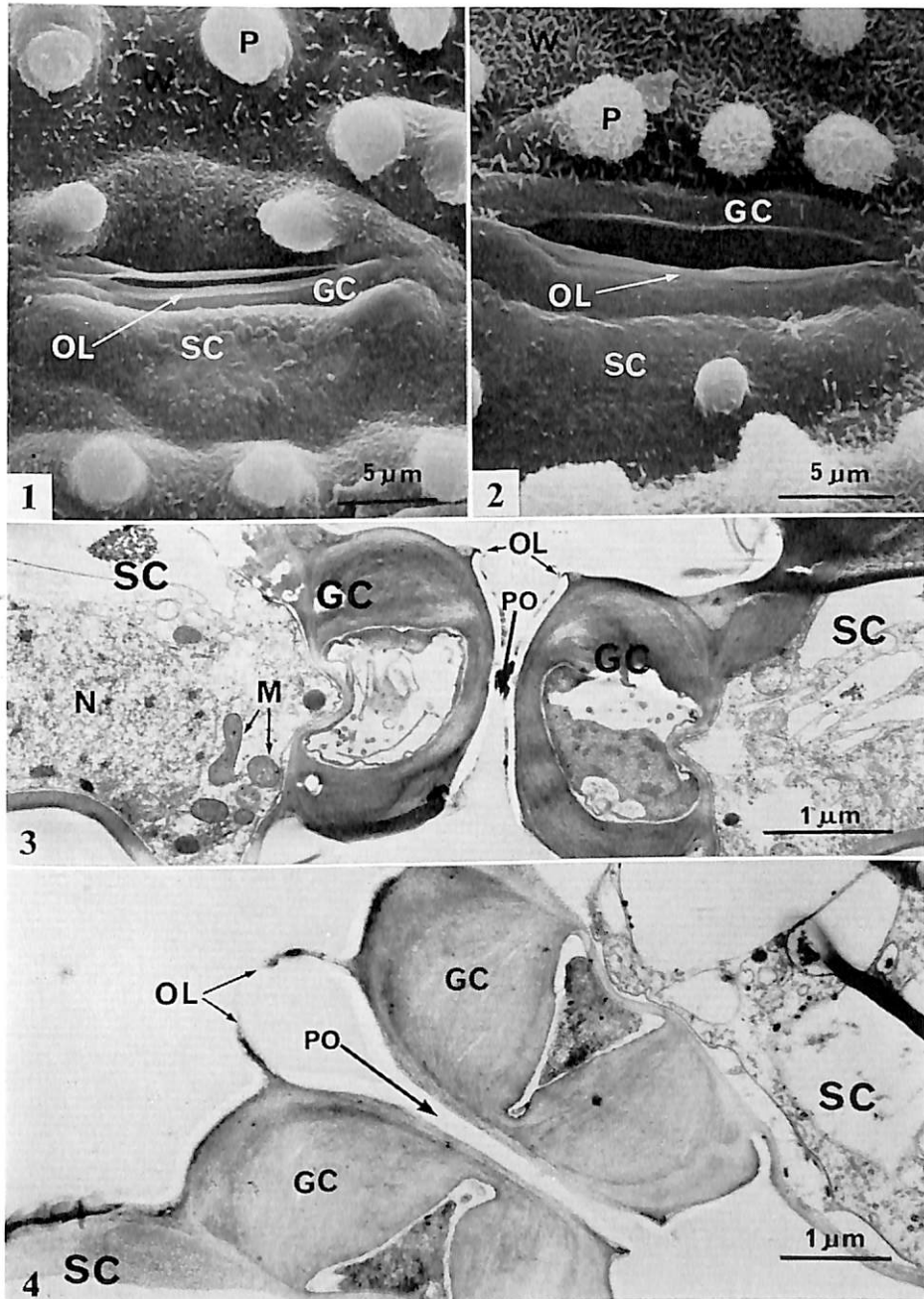
引用文献

- 1) 後藤正夫(1981)新植物細菌病学, 217, ソフトサイエンス社, 東京, 272pp.
- 2) Horino, O. (1973) Ultrastructure of *Xanthomonas oryzae* and its morphological changes by chemical treatment. Ann. Phytopath. Soc. Japan 39: 14~26.
- 3) 川田信一郎・山崎耕宇(1963)水稻の葉身先端部に見出される俵状の巨大な導管節について. 日作記 31: 332~336.
- 4) 水上武幸(1956)稲白葉枯病に関する研究 稲葉における病原細菌の侵入並に増殖部位について(予報). 佐大農彙 4: 169~177.
- 5) Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208~211.
- 6) 田部井英夫(1977)イネ白葉枯病原細菌の寄主体侵入に関する解剖学的研究. 九州農試報19: 193~257.

(昭和58年8月20日受領)

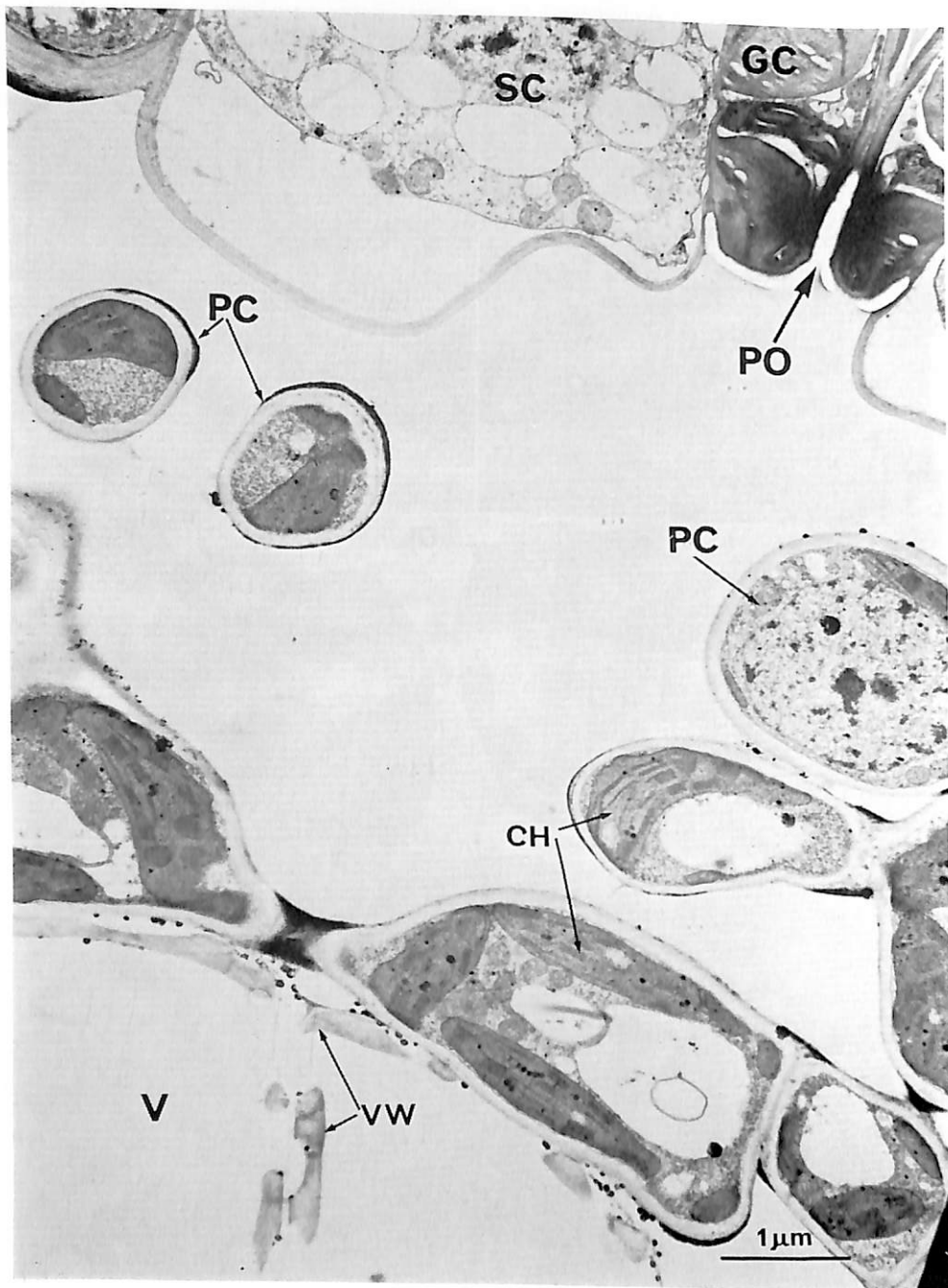
〔図版の略号〕

CH: 葉緑体, GC: 孔辺細胞, M: ミトコンドリア, N: 核, OL: outer ledge, P: いぼ状突起, PC: 柔組織細胞, PO: 2個の孔辺細胞の間隙, SC: 副細胞, V: 導管, VW: 導管壁, W: 蠟



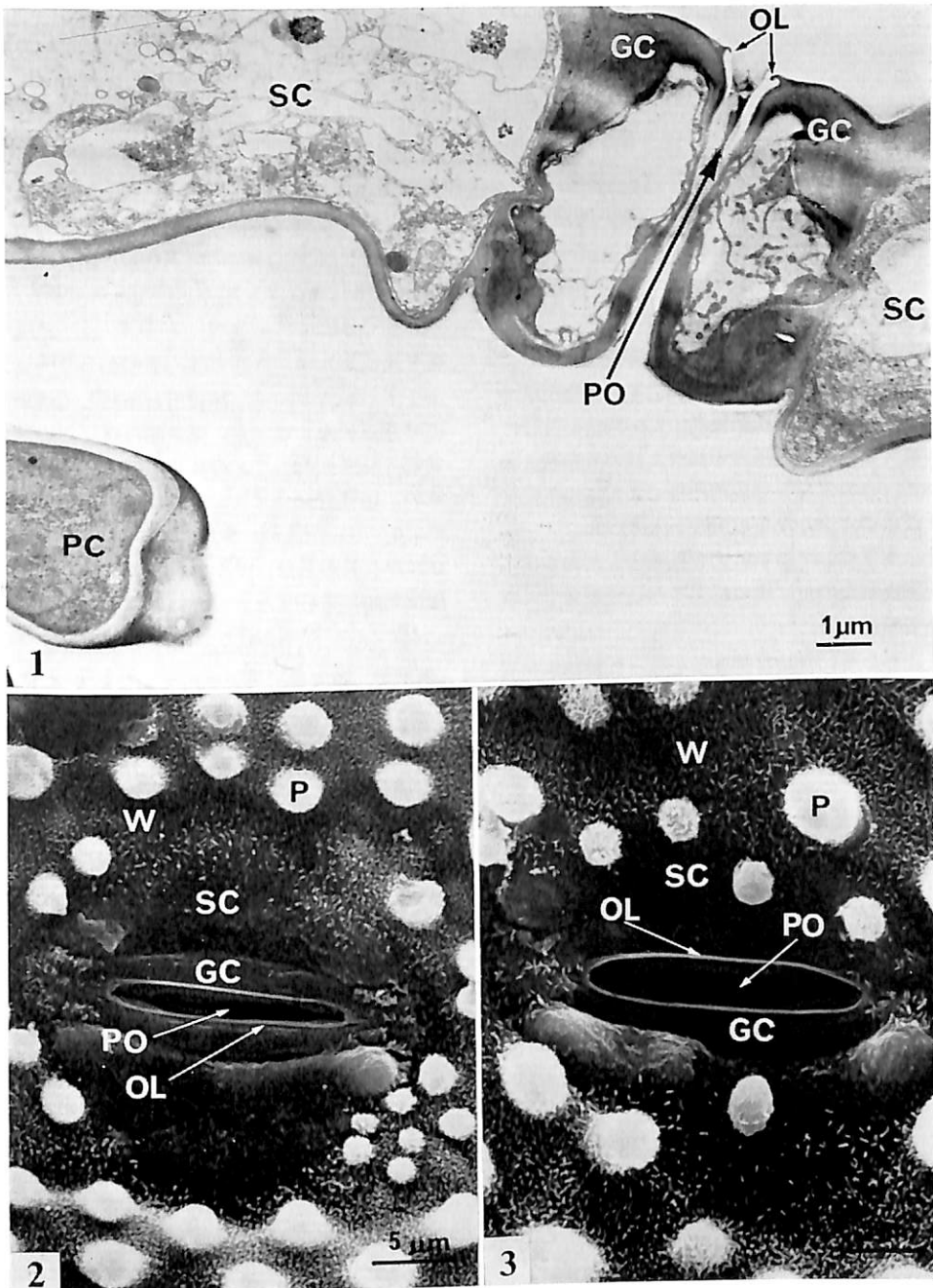
図版 I イネ水孔(2, 3)とアスカキ水孔(1, 4)の走査型および透過型電顕写真

- 1 斜め上方から観察したアスカキ水孔。outer ledge の幅が広く、水孔の開口部は狭い。葉面の蠟は少ない。
- 2 斜め上方から観察したイネ水孔。アスカキに比べて outer ledge の幅は狭く、水孔は広く開口している。葉面の蠟はアスカキに比べて多い。
- 3 イネ水孔の横断超薄切片像。水孔は2個の副細胞、2個の孔辺細胞および孔辺細胞の上部に付着している2枚の outer ledge から構成されている。
- 4 アスカキ水孔の横断超薄切片像。イネ水孔の outer ledge に比べてアスカキ水孔の outer ledge は長い。孔辺細胞の細胞壁はクチクラ化が顕著である。



図版Ⅱ イネ水孔の下部に存在する被覆組織と導管の透過型電顕写真

被覆組織には広い細胞間隙が存在し、柔組織細胞が疎に分布している。被覆組織の下部には導管が存在する。水孔から侵入した病原細菌は被覆組織で増殖したのち、導管に侵入する。



図版Ⅲ イネ水孔の透過型電顕写真(1)と走査型電顕写真(2, 3)

- 1 水孔の孔辺細胞には細胞内器官がほとんど含まれないが、副細胞には多数のミトコンドリア、ERが含まれている。矢印は2個の孔辺細胞の間隙を示す。未発達の短い outer ledge が認められる。
- 2, 3 真上から観察したほとんど閉じた水孔と広く開口した水孔。outer ledge の下方の2個の孔辺細胞の間隙がほとんど認められず閉じた状態の水孔(2)と広く開口している水孔(3)。葉の表面に認められる白い球体はいぼ状突起である。