

穂いもち自然感染部位の微細構造

古賀 博則・吉野 嶺一*

Hironori KOGA and Reiichi YOSHINO*: The ultrastructure of
rice panicles infected with *Pyricularia oryzae* Cav

Summary

Ultrastructure of rice panicles infected with *Pyricularia oryzae* was studied by using transmission and scanning electron microscopes. Invaded hyphae of blast fungi developed in the most of tissues where the symptoms were observed. Mesophyll cells were often digested by the invaded hyphae, whereas epidermal cells, sclerenchyma tissues and vascular bundles were scarcely digested. The host cytoplasm was degenerated by the invasion of blast fungi in any tissues. It was presumed that these degeneration of host tissues caused the white ear. Although sclerenchyma tissues had thick cell wall, they were connected with thin later of cell wall called as pit-pairs. Therefore, it was suggested that invaded hyphae developed in the sclerenchyma tissues rapidly to penetrate through pit-pairs.

穂いもちの感染成立過程を明らかにするために、これまでパラフィン切片の光学顕微鏡観察^{4,5,14}や蛍光顕微鏡⁷による観察が多数の研究者により行なわれてきた。また、穂表面の走査電子顕微鏡による観察についても報告されているが、穂内部における本菌の伸展と宿主細胞の変性については組織が硬くて樹脂の浸透が難しいなどの理由から、極めて少なく^{2,3,10,11}、不明な点が多い。

本報告では自然感染した穂くび・穂軸・枝梗における本菌の侵入・伸展と宿主細胞・組織の病態変化を電子顕微鏡観察により明らかにすることを目的とした。

材料及び方法

1. 観察試料

1985年にイネ品種越路早生とこがねもちを、北陸農業試験場内の圃場に慣行に従って育苗・移植し、多肥栽培した。試験圃場には毎年総量で10アール当たり成分量で16kgの窒素肥料を投与した。出穂日を各穂ごとに記録し、自然発病した穂を出穂4~12日後に採取した。発病がいもち病菌の感染によるものであるか否かを確認するために、採取した穂の発病部位をカルコフルオールホワイトで染色後、蛍光顕微鏡下で観察した⁷。いもち病菌の分生子柄とそこに新たに形成された分生子胞子が確認された試料のみを、透過型および走査電子顕微鏡観察のための試料として固定した。なお、本報で出穂とは止葉葉鞘部より穂の先端部が露出する状態に至ったことを指す。

2. 透過型電子顕微鏡観察

いもち病感染部位を約2mm×1mmにカミソリで細片し、グルタルアルデヒド(0.05M カコジル酸緩衝液 pH7.2)で前固定後、1%四酸化オスミウム(同緩衝液)で後固定した。アセトンシリーズで脱水後、プロピレンオキシドと置換し、エポニーアラライト樹脂(Epock 812: Araldite 6005: DDSA を容量比で3:3:8に配合後、全容量の1.5%のDMP-30を加えた)に包埋した。ウルトラミクロトーム MT6000 (du Pont-Sorvall)に装着したガラスナイフおよびダイヤモンドナイフで超薄切片の作製を行い、得られた切片を酢酸ウランおよびクエン酸鉛で電子染色後、透過型電子顕微鏡日立 H7000で検鏡および写真撮影を行った。

3. 走査電子顕微鏡観察

いもち病感染部位を、グルタルアルデヒド(0.05M カコジル酸緩衝液 pH7.2)で前固定後、1%四酸化オスミウム(同緩衝液)で後固定した。アルコールシリーズで脱水後、試料を100%エタノール溶液とともにゼラチンカプセル中に入れ、液体窒素で固化して切断した¹²。切断した試料を再び100%エタノールに戻し、100%エタノールから酢酸イソアミルへと置換後、臨界点乾燥を行った。乾燥した試料に白金蒸着した後、電界放射型走査電子顕微鏡(日立 S800)で検鏡および写真撮影を行った。

結果および考察

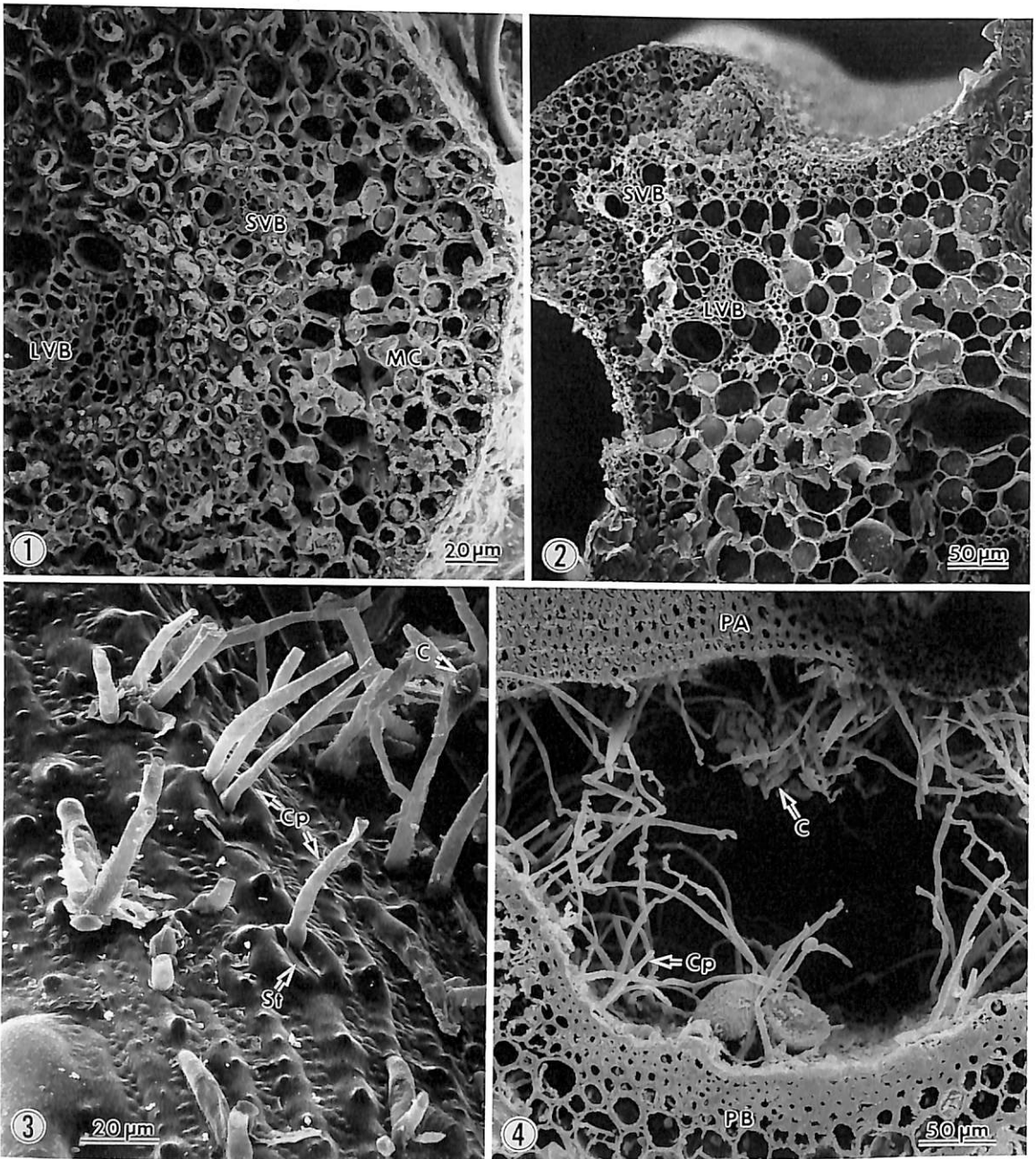
本報告で使用した穂組織の各部の名称は、星川の記載⁹に準拠した。

1. 穂くび・穂軸・枝梗の表面観察

穂くび・穂軸・枝梗の表面には気孔および円形状突起、

農林水産省草地試験場 National Grassland Research Institute, Nishinasuno, Tochigi, 329-27

*農林水産省東北農業試験場 Tohoku National Agricultural Experiment Station, Shimokuriyagawa, Iwate 020-01



Figs. 1-8. Scanning electron micrographs of panicles from *Oryza sativa* non-infected (Figs. 1-2), and infected (Figs. 3-8) with *Pyricularia oryzae*.

Fig. 1. Cracked surface of a secondary branch of rice panicle. Outer epidermal cells, mesophyll cells (MC), small (SVB) and large vascular bundles (LVB) are seen.

Fig. 2. Cracked surface of a secondary branch of a rice panicle. Small and large vascular bundles are seen.

Fig. 3. Conidiophores (Cp) outthrustured from stomata (St), and directly from cuticle of epidermis of the secondary branch of a rice panicle.
C: conidium

Fig. 4. Conidiophores and conidia formed between a primary axis (PA) and a primary branch (PB).

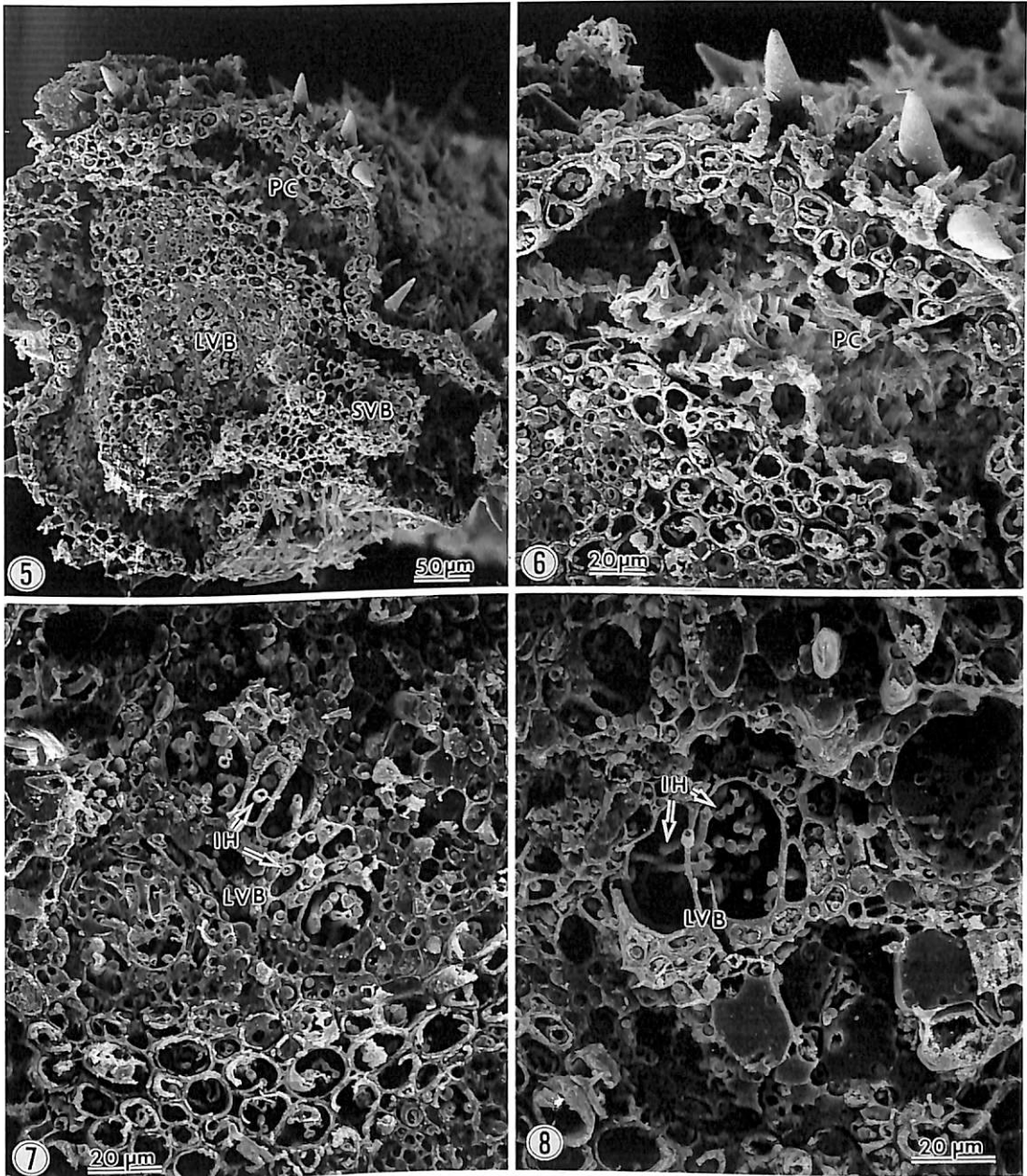


Fig. 5. Cracked surface of a secondary branch of a rice panicle infected with *P. oryzae*. Mesophyll cells are collapsed and digested by the infection of blast fungi.
Fig. 6. Magnification of the collapsed mesophyll cells in Fig. 5. The cell wall and the cytoplasm of mesophyll cells are almost digested by the blast fungi, but the cell wall of outer epidermal cells, sclerenchyma cells and vascular bundles are remained without digestion.
Fig. 7. Cracked surface of invaded hyphae (IH) of *P. oryzae* in a vascular bundle and sclerenchyma cells of a panicle neck.
Fig. 8. Cracked surface of invaded hyphae of *P. oryzae* in the vascular bundle of a primary axis.

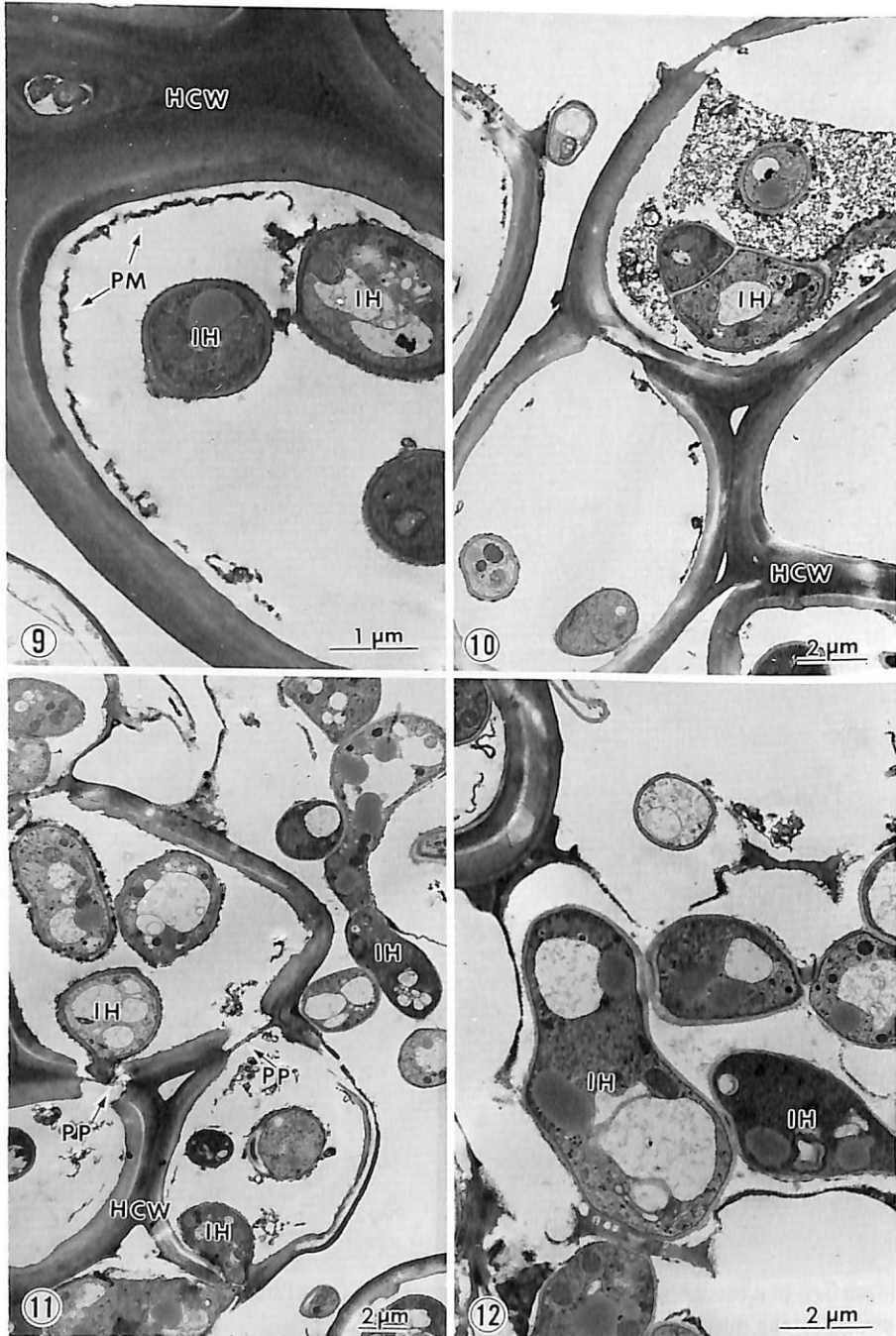


Fig. 9-12. Transmission electron micrographs of panicles from *Oryza sativa* infected with *P. oryzae*.

Fig. 9. Cross section of invaded hyphae of *P. oryzae* in a sclerenchyma cell of a primary axis. Ultrastructural changes are not observed in the cell wall (HCW) of the sclerenchyma cell, but the plasmamembrane and cytoplasm are collapsed by the infection of blast fungi.

Fig. 10. Cross section of invaded hyphae of *P. oryzae* in sclerenchyma cells of panicle neck.

Fig. 11. Cross section of invaded hyphae of *P. oryzae* in mesophyll and sclerenchyma cells of panicle neck. Pit-pairs (PP) are seen in the cell wall of sclerenchyma cells.

Fig. 12. Cross section of invaded hyphae of *P. oryzae* and degenerated host cell wall in mesophyll cells of a primary axis.

小さい毛茸が縦列をなしており、まれに剛毛が観察された (Fig. 3)。穂くび・穂軸・枝梗はクチクラ層に覆われており⁹⁾、葉身と異なってその表面にワックスは認められなかった (Fig. 3)。肉眼的に病徴が認められた感染組織の表面には、いもち病菌の分生子柄が気孔、大小の毛茸、あるいはクチクラなどから直接突出し、分生子柄上には新たに形成された分生子胞子が観察された (Fig. 3)。

また、穂いもちの病徴は穂くびと一次枝梗、穂軸と一次枝梗、一次枝梗と二次枝梗などの分岐箇所の両者に挟まれた内側に認められるが多かった。Fig. 4 は穂軸と一次枝梗の分岐点の近くを切断して、走査電子顕微鏡で観察したものであるが、両者間の間隙には多数の分生子柄と分生子胞子の形成が認められた。これらの部位は、溢泌液、露および雨滴などが乾燥しにくいと、寡雨年でも感染し易いことが、圃場での発病調査で報告されている⁹⁾。

2. 穂くび・穂軸・枝梗の内部観察

穂くび、穂軸および枝梗の横断面を観察すると、表皮細胞の内側に厚膜細胞組織、さらにその内側には柔細胞組織、柔細胞組織の間には小維管束の環列、小維管束のさらに内側には大維管束が認められた (Figs. 1, 2)。

厚膜細胞組織は硬くて厚い細胞壁を有しているにもかかわらず、侵入菌糸の蔓延が顕著であった (Figs. 7, 8)。この理由として、厚膜細胞間には pit pairs¹⁾ と呼称されている薄い細胞壁の部分があり (Fig. 11)、菌糸はこの部位を通じて容易に隣接細胞に侵入できる^{9,11)} ためと推定される。

いもち病菌の蔓延した穂組織では、柔細胞組織の崩壊が著しく、その部位はほぼ消失しているのが走査電子顕微鏡で観察された (Figs. 5, 6)。このような柔細胞組織の切片を透過型電子顕微鏡で観察すると、柔細胞内ではいもち病菌が蔓延しており、柔細胞の細胞壁と細胞内容物はほとんど消失していた (Fig. 12)。これらの電顕像から、穂組織ではいもち病菌が活発に細胞分解酵素を分泌し、その分解物を養分として吸収していることが推定される。

一方、表皮細胞、厚膜細胞組織および大小維管束では、これらの組織内にもいもち病菌の菌糸が多数蔓延しているが、柔細胞組織に見られるような細胞組織が崩壊・消失している像は観察されなかった (Figs. 7, 8)。透過型電子顕微鏡でいもち病菌の蔓延している厚膜細胞組織の切片を観察すると、宿主細胞壁の変性は柔細胞と比較して極めて少なかった (Fig. 9)。

いもち病菌の侵入の初期と推定される細胞では、宿主細胞の細胞質の変性も少ない (Fig. 10) が、菌侵入後の時間の経過とともに、細胞質は消失するようであった (Fig. 11)。また本菌を人工接種した穂くび組織の電顕観

察から、本菌の侵入を受けた宿主細胞では、初期には種々の細胞小器官が明瞭にみられ宿主細胞は生きているものと推定され、その後徐々に崩壊していくという結果が得られた⁹⁾。これらのことから、宿主細胞への侵入初期には本菌が強力な殺生性の毒素を分泌しているとは考え難く、被侵入細胞の壊死は毒素よりも細胞壁分解酵素の分泌によるものと推定される。

穂くび・穂軸・枝梗ではいもち病菌の感染によって、これより先端部分が白化し、白穂となることが多い。吉井¹⁴⁾ は穂いもち感染部位のパラフィン切片の光学顕微鏡観察の結果から、穂組織の崩壊がもたらす水分補給が著しく阻害され、白穂が起こるものと推察した。本電顕観察からいもち病菌は維管束の道管をはじめほとんどの穂組織で蔓延し、そこでは宿主組織が壊死・崩壊していることが明らかとなった。これらの結果は、上記の吉井の説を強く支持するものである。一方、いもち病菌の産生する糖ペプチドが道管閉塞を起こし、白穂を誘起することが報告されている¹³⁾ が、本電顕観察の結果、いもち病菌の蔓延した穂組織では道管閉塞は認められなかった。今後この物質の出現時期、局在性と本菌の伸展、組織の変性との関係を、詳細に検討する必要がある。

摘 要

1. 透過型および走査電子顕微鏡を用いて、穂いもち自然感染部位の表面および内部構造を走査電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。

2. 病徴の認められた穂ではほとんどの組織で、いもち病菌が蔓延しており、柔組織では、細胞壁と細胞内容物はほとんど消失していたが、表皮細胞、厚膜細胞組織および大小維管束では、宿主細胞壁の変性は少なかった。

3. いもち病菌の侵入を受けた宿主細胞ではいずれも細胞質が変性・消失しており、これらの組織の変性が白穂を誘起しているものと推測された。

4. 表皮細胞の下にある厚膜細胞組織は厚い細胞壁に覆われているが、細胞壁の所々には薄膜の部分 (pit pairs) があり、本菌はそこを容易に貫通して隣接細胞に侵入するものと推察された。

引用文献

- 1) Esau, K. (1977) *Anatomy of seed plants* (2nd Ed.). John Wiley & Sons' Inc. New York, 550pp.
- 2) Hashioka, Y. and Kitano, N. (1970) Fine structure of the rice blast. VI. Scanning electron microscopy on neck-, node- and spikelet-blast. Res Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. 29: 11-20.
- 3) Hashioka, Y. and Kitano, N. (1971) Fine structure of the rice blast. VIII. Structure and ultrastructure

- of the initial infection of neck-blast. Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. 31 : 83~97.
- 4) 平野喜代人・後藤和夫 (1963) 枝梗イモチの発病機構並びに生態に関する研究. 農枝研報 C16 : 1~56
 - 5) 堀野 修・後藤敬助 (1986) 穂いもちの病理解剖学的観察. 北日本病虫研報 37 : 21~23.
 - 6) 星川清親 (1977) 解剖図説 イネの生長. 農山漁村文化協会, 東京 317pp.
 - 7) 古賀博則・吉野嶺一 (1988) 蛍光色素による穂いもち感染部位の染色. 日植病報 54 : 229~232.
 - 8) 古賀博則・小林尚志・吉野嶺一 (1988) 自然感染による穂いもち発生と気象要因. 北陸病虫研報 36 : 1~5.
 - 9) 古賀博則 (1990) 穂へのいもち病菌の侵入・伸展過程の電顕観察. 日植病報 56 : 360 (講要).
 - 10) 古賀博則・吉野嶺一 (1990) 穂いもち形成部位の走査電子顕微鏡による観察. 北陸病虫研報38 : 3~8
 - 11) 古賀博則・吉野嶺一 (1991) 穂いもち自然感染部位の微細構造. 北陸病虫研報 39 : 23~28.
 - 12) 田中敬一・永谷 隆 (1980) 図説 走査電子顕微鏡—生物試料作製法—. 朝倉書店, 東京, 282pp.
 - 13) 高坂卓爾・土沢 誠・花上雅美・渡辺 実 (1985) イネいもち病菌の産生する白穂誘起物質, 糖ペプチドについて. 日植病報51 : 199~205.
 - 14) 吉井 甫 (1937) 稲熱病に関する研究. II. 病原菌の侵入法について. 日植病報 6 : 205~218.

(1991年7月31日受領)