

靱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 spikelets infected with *Pyricularia oryzae* Cav

Summary

Ultrastructure of rice spikelets infected with *Pyricularia oryzae* was studied by using transmission and scanning electron microscopes. Conidiophores outthrust both directly from lemma epidermis and from large trichomes. It seems that invaded hyphae in the epidermal cells penetrated pits cross wall between epidermal cells and large trichomes, and outthrust conidiophores from the inside of a large trichome after growing in the hole of the trichome. Sclerenchyma tissues of glumes had thick cell wall, and also had thin layer parts called as pit-pairs, through which invaded hyphae penetrated into neighbor cells. Mesophyll cells and inner epidermal cells of lemma infected with blast fungi were remarkably digested by the infection of blast fungi, but the outer epidermal cells, sclerenchyma, and vascular bundles were hardly digested.

靱は出穂の最も早期にいもち病菌の感染を受け、そこでは短期間に多量の分生胞子が形成され、それらは他の穂部への伝染源となる。^{7,9)}このように靱いもちは穂いもち発生の重要な位置を占めていることから、これまで靱における本菌の侵入・伸展過程を明らかにするために、パラフィン切片の光学顕微鏡および蛍光顕微鏡による観察が多数報告されてきた^{3,4,8)}。一方、電子顕微鏡観察については分生胞子形成について2, 3の報告がある^{2,11)}が、組織内での本菌の伸展と宿主細胞の変性については不明な点が多い。本論文では自然感染した靱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的に明らかにすることを目的とした。

材料および方法

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⁸⁾。いもち病菌の分生子柄とそこに新たに形成された分生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靱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、プロピレンオキサイドと置換し、エポニーアララルダイト樹脂(Epock812: 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。超薄切片の作製はウルトラミクロトームMT6000(du Pont-Sorvall)でガラスナイフおよびダイヤモンドナイフを用いて行い、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

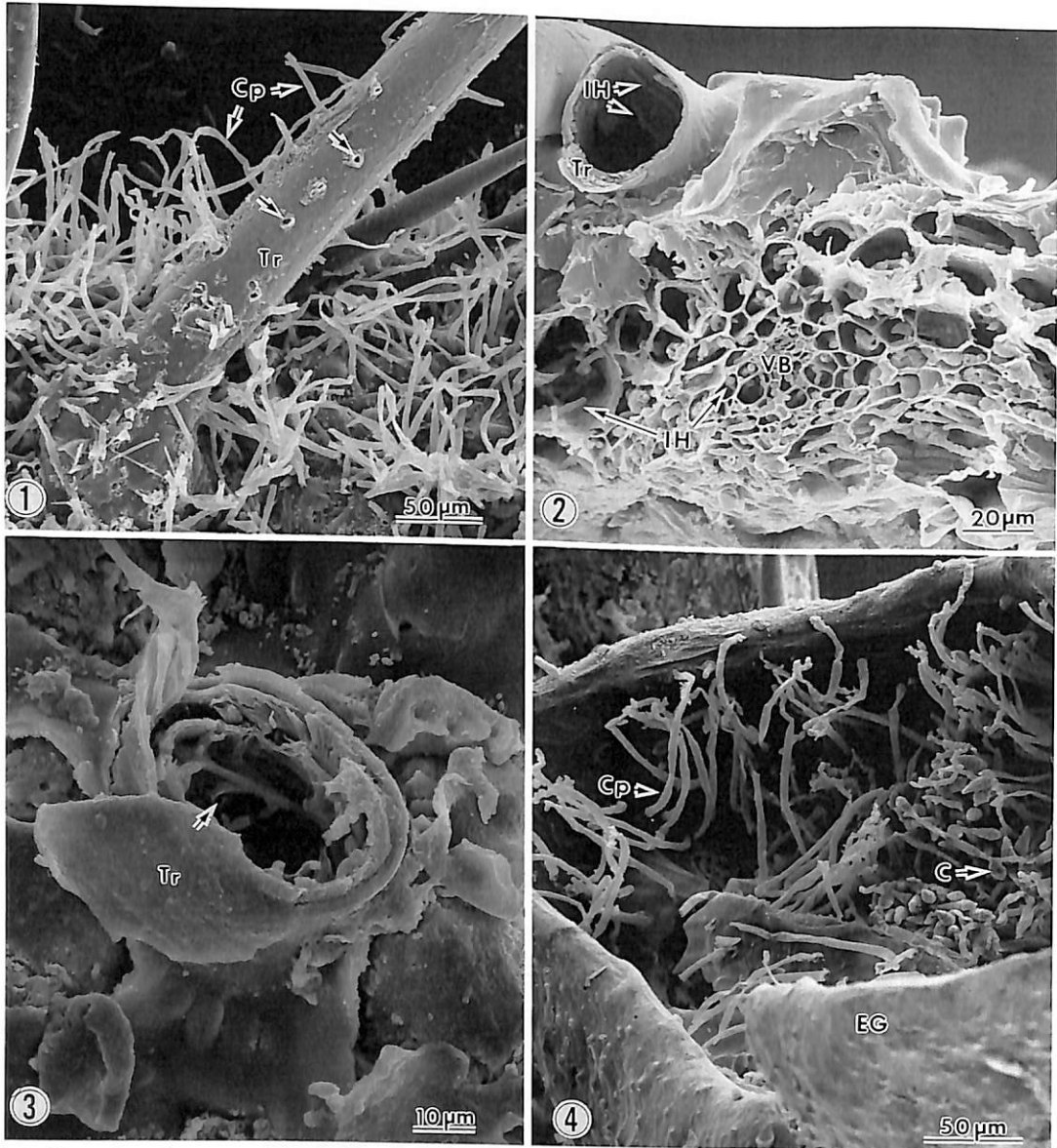
いもち病感染部位を、グルタルアルデヒド(0.05M カコジル酸緩衝液 pH7.2)で前固定後、1%四酸化オスミウム(同緩衝液)で後固定した。アルコールシリーズで脱水後、試料を100%エタノール溶液とともにゼラチンカプセル中に入れ、液体窒素を入れた凍結割断装置TF-1(エイコーエン지니어リング社)上で固化して割断した¹³⁾。割断した試料を再び100%エタノールに戻し、100%エタノールから酢酸イソアミルへと置換後、臨界点乾燥を行った。乾燥した試料に白金蒸着した後、走査電子顕微鏡日立S800で検鏡および写真撮影を行った。

結果および考察

本報告で使用した靱組織の各部の名称は、星川⁶⁾、およ

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



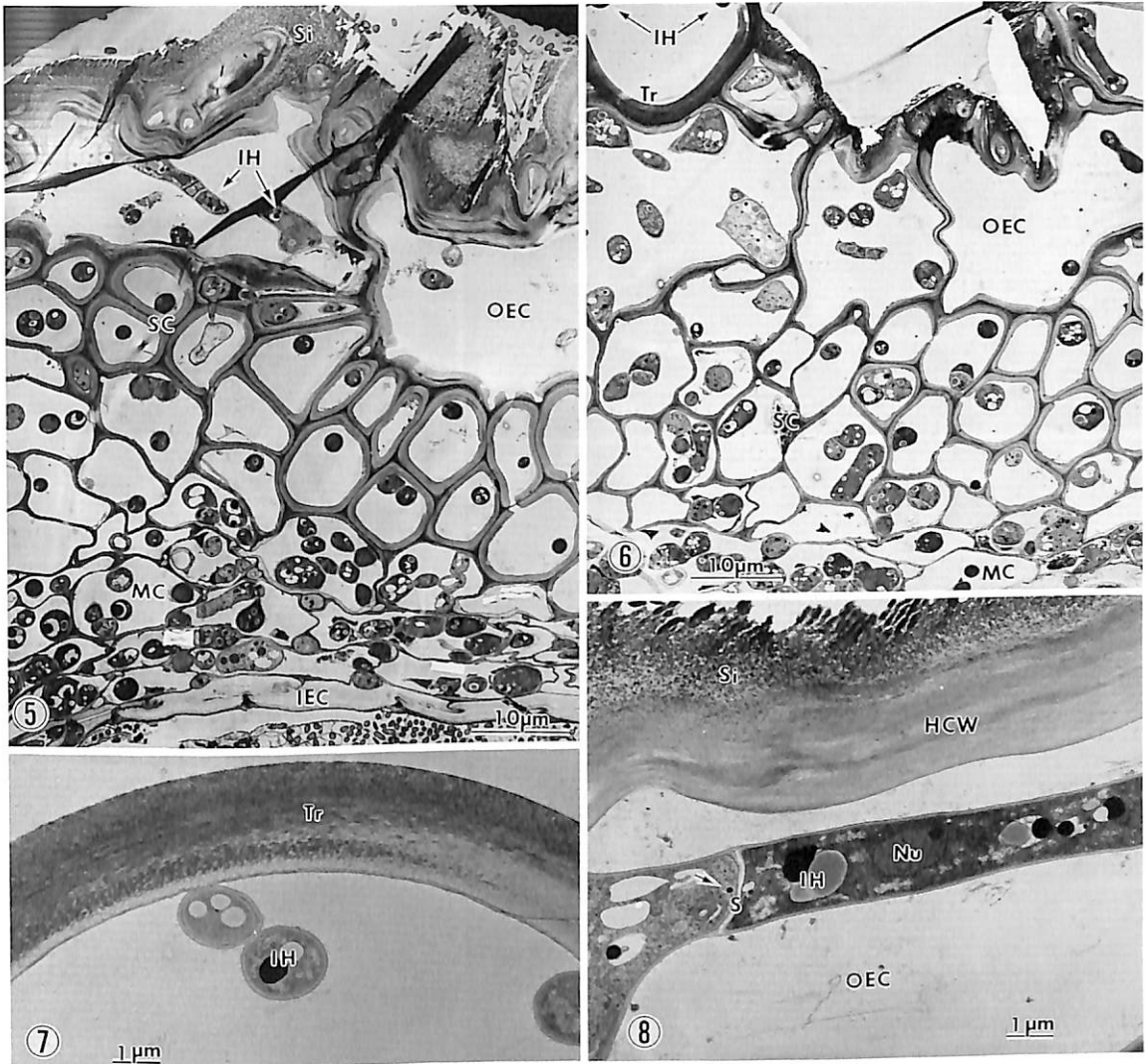
Figs. 1-4. Scanning electron micrographs of spikelets of rice panicle infected with *Pyricularia oryzae*.

Fig. 1 . Conidiophores (Cp) and their traces (arrows) on a large trichome (Tr).

Fig. 2. Cracked surface of a lemma infected with *P. oryzae*. Note that invaded hyphae (IH) are seen in a large trichome and vascular bundle (VB).

Fig. 3. Cracked surface of a basal portion of a large trichome. An arrow shows a pit in cross wall.

Fig. 4. Conidiophores (Cp) and conidia (C) formed at inner side of empty glume (EG).



Figs. 5-13. Transmission electron micrographs of rice spikelets infected with *P. oryzae*.

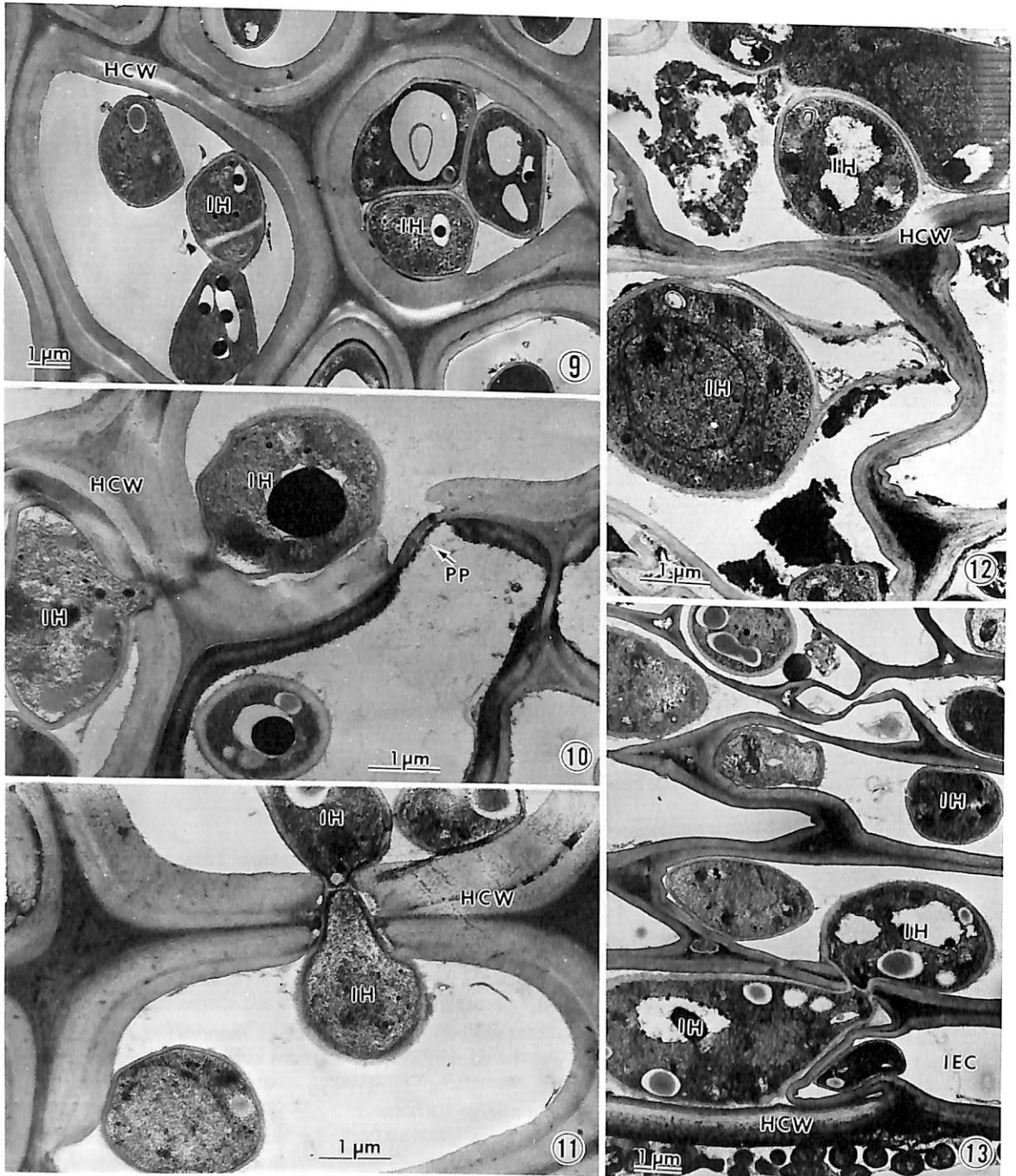
Fig. 5. Cross section of a lemma infected with *P. oryzae*.

The invaded hyphae are observed in the outer epidermal cells (OEC), sclerenchyma cells (SC), mesophyll cells (MC) and inner epidermal cells (IEC). Note that silicon layer (Si) is seen on the outer epidermis.

Fig. 6. Cross section of a lemma infected with *P. oryzae*. Invaded hyphae are seen in a large trichome, outer epidermal cells, sclerenchyma cells and mesophyll cells.

Fig. 7. Cross section of invaded hyphae of *P. oryzae* in a large trichome.

Fig. 8. Cross section of invaded hypha of *P. oryzae* in an outer epidermal cell of a lemma. Septum (S), Worinin body (arrow) and nucleus (Nu) are seen in the invaded hypha. Note the silicon layer on the outer epidermal cell.



- Fig. 9. Cross section of invaded hyphae in sclerenchyma cells of a lemma infected with *P. oryzae*. Ultrastructural changes are scarcely observed in the host cell wall.
- Fig. 10. Cross section of invaded hyphae of *P. oryzae* in sclerenchyma cells of a lemma.
- Fig. 11. Penetration by *P. oryzae* through pit-pairs of sclerenchyma cell wall to a neighbor cell. Pit-pairs (PP) are thin layer part of host cell wall.
- Fig. 12. Invaded hyphae of *P. oryzae* and denaturated host cytoplasm in mesophyll cells.
- Fig. 13. Cross section of invaded hyphae in mesophyll cells and inner epidermal (CEC) cells of a lemma infected with *P. oryzae*. Note that a septum is seen at the penetration site between a mesophyll cell and an inner epidermal cell.

び前田¹²⁾の記載に準拠した。

1. 穎の剛毛 (大きい毛茸)

穎の表面には長い針状の剛毛 (大きい毛茸: Tr) があり、穎の一部分か全体が褪緑色から灰白色に変化した部位では、剛毛上に多数の分生子柄形成が観察された (Fig. 1)。また、剛毛上には分生子柄の取れた跡 (Fig. 1 矢印) も観察され、その中央にはいもち病菌菌糸が剛毛の内から外に向けて貫穿した直径約 1 μm の穴が認められた¹¹⁾。剛毛内を伸展している菌糸は、凍結切断した試料の走査電子顕微鏡観察 (Fig. 2) および超薄切片の透過電子顕微鏡観察 (Figs. 6, 7) で、内部が中空になっている剛毛の細胞壁に沿って伸展しているのが認められた。剛毛の基部を走査電子顕微鏡で観察すると、細胞間壁に膜孔が認められた (Fig. 3 矢印)。籾にイネいもち病菌を人工接種した実験では、接種48時間後にはいもち病菌は剛毛内に認められた¹⁰⁾が、このように菌糸の伸展が速い理由としては剛毛内が中空であることに加えて、この膜孔が本菌によって容易に通過されるためと推察される。

2. 穎表面の表皮細胞

穎表面の表皮細胞はいもち病菌がクチクラ貫穿して最初に侵入する細胞であり、いもち病菌が蔓延した後は分生子柄を突出させる場所でもある (Fig. 1)。表皮の細胞壁の表層には、シリカ層が形成されており¹⁴⁾ (Fig. 8)、通常の電顕の樹脂包埋では、この層が極めて硬いため、この部分の切梢は著しく困難でアーティファクトが生じることが多かった (Figs. 5, 6)。出穂の極初期の電顕観察ではこのようなシリカ層の形成は穎上にほとんど認められなかったことから、シリカ層は出穂後の日数が経過するに従って形成されるものと推察される。出穂12日を過ぎると籾いもちの発病が急速に低下するという報告⁵⁾は、このシリカ層の形成と密接に関わっているものと考えられる。

3. 厚膜細胞組織・維管束組織・柔組織・裏面表皮細胞

表面表皮細胞・厚膜細胞組織および維管束組織ではいもち病菌が蔓延しても、その形態をとどめていたが (Figs. 2, 9)、柔細胞組織と裏面表皮細胞は崩壊し、消失していることが多かった (Fig. 2)。厚膜細胞組織では細胞壁が著しく厚いにもかかわらず、ほとんどの細胞に本菌が侵入し蔓延していた (Figs. 5, 9)。筆者の一人である古賀は、本菌の人工接種によって、48時間後には大部分の厚膜細胞に本菌が侵入していることを報告している¹⁰⁾。このように本菌の厚膜細胞組織で伸展が速い理由として、厚膜細胞の細胞壁には pit-pairs と呼称される薄膜の部分¹³⁾があり (Fig. 10)、本菌はこの部分を貫通して容易に隣接細胞に侵入できる (Fig. 11) ためと推察される。柔細胞組織と裏面表皮細胞は厚膜細胞や維管束細胞と比較して薄い細胞壁であるため、本菌によって分解さ

れ易く、顕著な場合には組織そのものが消失していることも少なくなかった。また、柔細胞内にある葉緑体は本菌によって破壊され (Fig. 12)、本菌は柔組織で顕著に増殖していた (Figs. 5, 13)。

4. 護穎

小穂軸と護穎の間には、Fig. 4に見られるように分生子柄と分生胞子がしばしば形成されていた。菌糸伸展がさらに進んだ籾では、副護穎や小穂軸そして小枝梗上にもいもち病菌が蔓延し、そこには分生子柄と分生胞子の形成が観察された。このような部位は、溢液、露そして雨滴などが乾燥しにくいいため、寡雨年でも感染を受け易いことが、圃場での発病調査で報告されている⁹⁾。

摘 要

1. 透過型および走査電子顕微鏡を用いて、籾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. 穎表面の表皮細胞と剛毛は、膜孔のある細胞壁で仕切られており、表皮細胞内で蔓延したいもち病菌はこの膜孔を貫通後、中空の剛毛内を伸展し、そこから分生子柄を外側に突出させるものと推察された。
3. 穎の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、本菌はそこを貫通して容易に隣接細胞に侵入・伸展するものと推測された。
4. 穎の柔組織と裏面表皮細胞は、表面の表皮細胞、厚膜細胞組織および維管束組織と比較して細胞壁が薄いため、本菌によって分解され易く、組織そのものの分解・消失がしばしば観察された。

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) 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. 農技研報 C16: 1-56.
- 4) 堀野 修・進藤敬助 (1986) 穂いもちの病理解剖学的観察. 北日本病虫研究報 37: 21-23.
- 5) 堀野 修・進藤敬助 (1987) 圃場抵抗性および真性抵抗性遺伝子型の異なるイネ品種の出穂後経過日数と籾いもち発病との関係. 北日本病虫研報 38: 14-18.

- 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) 加藤 啓・佐々木次雄・越水幸夫 (1970) イネいもち病の伝染環における二次伝染源としての籾いもちの意義について. 東北農試研報 39: 33~54.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 古賀博則 (1990) 穂へのいもち病菌の侵入・進展過程の電顕観察. 日植病報 56: 360 (講要).
- 11) 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.
- 12) 前田英三 (1972) 走査電子顕微鏡によるイネ籾表面構造の観察. 日作紀 41: 459~471
- 13) 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.
- 14) 吉田昌一 (1965) 水稻体内におけるケイ素の存在様式と生理的意義に関する研究. 農技研報 B 15: 1~58.

(1991年7月31日受領)
