

# さび病菌の細胞学的研究 (VIII) 抵抗性の異なる 栽培ギク3品種へのキク白さび病菌の感染\*

河野 満・石崎 寛・久能 均

Cytological Studies on Rust Fungi (VIII) Infection of *Puccinia horiana*  
P. Hennings on Three Chrysanthemum Cultivars of Different Resistance  
Levels

Mitsuru KOHNO, Hiroshi ISHIZAKI and Hitoshi KUNOH

## 緒 言

植物の品種と病原菌のレースとの組み合わせによって、高度の感受性を示す場合から免疫性を示す場合まで、様々な宿主抵抗性の段階が生じることはよく知られている。抵抗性の機序を解明するために現在までに、多くの形態学および生理、生化学的な研究が行なわれ、抵抗性の諸問題が徐々に明らかにされてきた。

栽培ギクにもキク白さび病菌に対する抵抗性に品種間差異があり、山口<sup>1)</sup>は発病基準によって、栽培ギク品種を発病階級 I (病徴が全く認められないもの) から発病階級 VI (小生子をもつ冬胞子層が葉面積の $\frac{1}{2}$ 以上を占めるもの) までの6階級に分類した。

本試験では、本病に対するギク品種の抵抗性を解剖、形態学的側面から検討するために、山口が分類した品種群の中からキク白さび病菌に対して抵抗性の異なる栽培ギク3品種を選び、それぞれの感染過程でどの様な形態的差異が生じるかを微細構造的に観察した。

なお本試験に供試した栽培ギクおよび菌を提供して戴いた農林水産省野菜試験場の山口隆氏に感謝の意を表す。

## 材料および方法

### 1. 供試菌および供試植物

昭和55年6月30日 受理

\*三重大学農学部植物病理学研究室業績No. 54.

農林水産省野菜試験場花卉育種研究室のガラス室内で発生した罹病葉(品種、精興の華)を譲り受け、三重大学農学部植物病理学研究室ガラス室内で育成した栽培ギク(精興の華)に接種し、14日後葉上に形成されたキク白さび病菌 *Puccinia horiana* P. Hennings の冬胞子堆を供試菌として用いた。また供試植物には、本菌に対して抵抗性を異にする栽培ギク3品種、精興の華(発病階級 V)、千代桜(同 III) および聖山(同 I)を選び、本研究室ガラス室内で健全植物として育成した。なお発病階級は、以下に示す山口<sup>1)</sup>の基準を適用した。

発病階級 I: 病徴が全く認められないもの

同 II: 黄〜褐色の斑点は認められるが、小生子をもつ冬胞子層が認められないもの

同 III: 小生子をもつ冬胞子層が1葉当たり1〜3個程度散発的にしか形成されないもの

同 IV: 小生子をもつ冬胞子層が1葉当たり数個以上で葉面積の $\frac{1}{4}$ 未満のもの

同 V: 小生子をもつ冬胞子層が葉面積の $\frac{1}{2}$ 以上 $\frac{1}{4}$ 未満のもの

同 VI: 小生子をもつ冬胞子層が葉面積の $\frac{1}{2}$ 以上を占めるもの

### 2. 小生子発芽率および発芽形態

栽培ギク3品種の葉上での本菌小生子の発芽率および発芽形態に違いがあるかどうかを調べるために本実験を行なった。

ペトリ皿に浅く水を入れ、ガラスのU字管を中央にお

き、U字管の上にスライドグラスをおいた。次に葉柄から切り離した各品種の葉を表側表皮が上になるようにスライドグラス上においた。このとき葉身部はスライドグラス上におき、葉柄切口部はベトリ皿底の水に没するようにおいて、葉柄から吸水されるようにした。葉の表面にイオン交換水を噴霧し、この上に罹病葉から切り取った若い冬孢子堆をのせ、ベトリ皿の上ぶたをかぶせて温室にした。これを23℃の暗黒下に24時間保った。接種24時間後に接種部位をカミソリで切り取り、タンニン酸固定法により固定した<sup>2)</sup>。タンニン酸-O<sub>3</sub>O<sub>4</sub>固定後、エタノールシリーズで脱水し、酢酸イソアミルで置換した。この試料を臨界点乾燥器で乾燥して、金を蒸着後、小生子発芽率および発芽形態を走査型電子顕微鏡で観察した。

### 3. 感染過程の微細構造観察

本菌感染過程が栽培ギク3品種間でどのように異なるかを微細構造的に調べるために本実験を行なった。

鉢植えの栽培ギク各品種の葉表面にイオン交換水を噴霧し、前項で述べたように罹病葉から切り取った若い冬孢子堆をのせて接種し、ビニール袋で植物全体をおおって温室にした。接種1, 3, 6, 12日後に接種部位をカミソリで切り取り、Kanovskyの固定液(5.1%グルタルアルデヒド+4.1%パラホルムアルデヒド)で24時間固定した。水洗後さらに1%O<sub>3</sub>O<sub>4</sub>で2時間固定した後、エタノールシリーズで脱水した。試料をエポンに包埋後、超ミクロトームで超薄切片を作り、酢酸ウラニルとReynoldの鉛液で電子染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

## 結 果

### 1. 小生子発芽率および発芽形態

小生子接種24時間後、各品種葉上の200個の小生子を観察し発芽率を調べた。小生子発芽率は精興の華では61%、千代桜では48%、聖山では47%であった。一枚の葉上でも、発芽小生子が密集している部位と未発芽小生子が密集している部位とがあり、発芽率は葉上の部位によって一定していなかった。

小生子の発芽管は通常1本で、太さ約2.0μm、長さ約5.0μmのものが多かった。多くの小生子はその短軸の彎曲面部(凸面部)から発芽管を生じるが(図1)、なかには短軸の水平面部から発芽管を生じるものが認められた(図2)。また著しく伸長した発芽管もしばしば観察された(図3)。発芽管の先端部はわずかに膨潤傾向が見られ

るのみで、明瞭な付着器は形成されなかった。小生子の表面は平滑であったが、発芽管の表面はや、粗くなっていた(図4)。

なお3品種のキク葉上での小生子発芽形態を比較観察したが、品種間で特に著しい差異は認められなかった。

### 2. 感染過程の微細構造

#### 1) 精興の華

接種1日後、クチクラ貫入を行なった侵入菌糸が表皮細胞内を下方へ向かって伸長しているのが認められた(図5)。菌糸細胞内には2つの核、ミトコンドリア、小胞体、脂肪顆粒などが認められた。また菌糸には隔壁が形成されて、2胞となっているものもあった(図6)。侵入菌糸全体は寄主原形質膜と思われる膜構造によって取り囲まれていたが(図6、矢印)、明瞭な吸器のうは認められなかった。侵入菌糸上部の周囲にはバピラが認められた(図5)。侵入をうけた寄主表皮細胞は液胞化していたが、著しい変性はみられなかった。

接種3日後、表皮細胞内の菌糸は表皮細胞下部の細胞壁を貫通して、柵状組織へ侵入し、菌糸先端は柵状組織の下部にまで達していた。細胞間隙の菌糸はところどころで柵状組織細胞内へ侵入していた(図7)。細胞間隙菌糸および細胞内菌糸には核、ミトコンドリア、小胞体、脂肪顆粒、液胞などが観察された。また細胞内菌糸は寄主原形質膜と思われる膜構造によって取り囲まれていた(図7、矢印)。侵入をうけた柵状組織細胞では特に著しい変性はみられなかった。

接種6日後、海綿状組織の細胞間隙に多くの菌糸が認められ、ところどころで海綿状組織細胞に侵入していた。この時期になると細胞内菌糸の周囲に、発達した吸器のう様構造がしばしば認められるようになった(図8、矢印)。また侵入をうけた海綿状組織細胞では特に著しい変性はみられなかった。

接種12日後、裏側表皮上に冬孢子堆が形成された。この時期には海綿状組織の下部で密になった菌体群が認められた(図9)。この菌体群は大小様々な不整形の菌体から成り、個々の細胞は著しく液胞化していた。この菌体群のうちで、下側表皮細胞に近い部位にある菌体の細胞壁は厚膜化しており、2核を有するものも認められた(図10)。冬孢子堆はこの菌体群から生じていた。

#### 2) 千代桜

小生子から生じた発芽管が表皮内に侵入してから冬胞

子堆を形成するまでの感染過程は前項の精興の華の場合とほぼ同様であった。

すなわち、接種1日後には表皮細胞内に菌糸が侵入し(図11)、3日後には菌糸は柵状組織内で伸長し(図12)、6日後には海綿状組織で多くの菌糸が認められた(図13)。また接種12日後には裏側表皮上に冬孢子堆が形成された。この時期には柵状および海綿状組織中で、多くの菌糸や不整形の菌体群が観察された。肉眼的な観察によると、千代桜葉上に形成された病斑(冬孢子堆)面積は精興の華葉上のものより著しく小さかった。

### 3) 聖山

接種1日後には表皮細胞内に侵入菌糸が認められたが、菌糸はパピラによって取り囲まれており、伸長が妨げられているようであった(図14)。パピラは電子密度がや、高く、内部には小胞あるいは顆粒状の構造が認められた。パピラによって囲まれた菌糸の細胞質は電子密度が高く、細胞内小器官の識別は困難であった(図14)。

接種3日あるいは6日後になっても侵入菌糸は表皮細胞内に認められたのみで、柵状および海綿状組織内では菌糸を全く認めることはできなかった(図15)。侵入菌糸内には細胞内小器官がみられたが、精興の華、千代桜の場合と比較すると細胞内小器官の輪郭は不明瞭であった(図16)。接種1、3、6日後とも侵入をうけた表皮細胞は変性を示していなかった。

## 考 察

キク白さび病菌は冬孢子世代のみを有する短世代種のさび病菌であり、これと同様な生活史を送るものにバラさび病菌 *Kuchneola japonica* がある。前報<sup>3)</sup>で示した *K. japonica* と今回得られた *P. horiana* の感染過程の微細構造の結果とは非常によく似ていた。すなわち感染初期には、両菌とも寄主細胞内に侵入するが明瞭な吸器および吸器のうをもたず、いわゆる細胞内菌糸 intracellular hypha を形成する。感染後期に至り、細胞内菌糸の周囲に明瞭な吸器のう様構造が認められるようになる。一般に気孔侵入する夏孢子世代では、菌糸が細胞間隙内を伸長し、寄主細胞内に侵入して、吸器のうを有した吸器を形成する<sup>4)</sup>。クチクラ侵入する *P. horiana* と *K. japonica* の細胞内菌糸周囲にどのような過程で吸器のう様構造ができ、またそれにはどのような生理的意義があるのかはなお明らかではないが、クチクラ侵入と気孔侵入とを有する孢子世代の感染過程に明らかな差があることは極

めて興味深いことである。

キク白さび病菌に対して抵抗性の異なる栽培ギク3品種を対象に、小生子侵入から冬孢子堆形成までの感染過程を形態学的に比較検討した。その結果、精興の華と千代桜との間で感染過程における菌糸の伸展速度や微細構造に顕著な差は認められず、両品種間では冬孢子堆形成量にのみ差が認められた。一方、聖山の場合には小生子発芽管は表皮細胞内に侵入するが、その後葉肉組織への菌糸の伸展はみられなかった。これらの結果から、本試験に用いた3品種の間では少くとも2段階の抵抗反応が認められたことになる。すなわち、

- i) 表皮細胞内における抵抗反応—聖山では顕著であるが、精興の華、千代桜では全く発現しない。
- ii) 冬孢子堆形成量に影響を与える反応—千代桜では精興の華より強く現われる。

植物病原菌が植物細胞に侵入する際に植物細胞壁内側にパピラが形成されることは古くから知られており、このパピラの形成機構やその機能については様々な論議がなされてきた<sup>5)</sup>。例えば Smith<sup>6)</sup> は植物病原菌が侵入する際に形成されたパピラは侵入菌糸の発達を妨げることを指摘した。また草野<sup>7)</sup> は *Olpidium* や *Synchytrium* ではカルス(パピラと同義語であり、草野はこれを「カルス」と呼んだ)が侵入菌糸によって貫通されているので、カルスは菌の侵入阻止作用というよりむしろ植物のもつ傷痕反応であろうと推論した。本試験の結果、発病階級Vの精興の華、同IIIの千代桜とも侵入部位の表皮細胞内にパピラが形成されたが、このパピラは小さく、侵入菌糸によって貫通されていた。一方、発病階級Iの聖山ではしばしば大きなパピラが形成され、侵入菌糸の発達を阻害しているような場合も認められた(図14)、図15、16に示したようにパピラがほとんど認められないような場合もあった。これらの結果から、パピラの有無や大きさと発病階級との間に強い相関関係が有る可能性は少ないと思われる。したがって、聖山でみられる表皮細胞内の抵抗反応は、パピラのような形態的に認められるものではなく、代謝変化をともなった生理的な要因によるものではないかと思われる。

冬孢子堆形成前までの葉肉組織内における菌の感染過程には、精興の華と千代桜との間に大きな違いはみられなかったが、冬孢子堆形成時に両者の間に差が認められた。すなわち、発病階級IIIの千代桜葉上に形成された冬孢子堆量は同Vの精興の華葉上のものより著しく少く、そ

の冬孢子堆形成量を比較すると山口<sup>1)</sup>の分類した基準とよく一致した。この結果から冬孢子形成過程で、千代桜と精興の華との間に差がでたといえる。これは菌糸生長から冬孢子形成に移行する際に、冬孢子形成を促進する要因(孢子形成を誘導する生理活性物質など)が精興の華より千代桜の方に量的に少いかあるいは移行性が悪いことによるのではないかと思われるが、本研究のような形態的研究ではその原因を明らかにできないので、生理、生化学的な方法によらなければならないと思われる。

この他に病原菌の侵入に対する植物の抵抗反応として過敏反応がある<sup>8)</sup>。Firman<sup>9)</sup>はキク白さび病の場合にも抵抗性品種のあるものは過敏反応をおこすものがあると報告している。しかしながら、上述のように、本試験に用いた3品種の場合にはいずれも過敏反応は全く観察されなかった。一方、本病原菌には病原性を異にするレースが存在する可能性を示す報告<sup>1,9)</sup>もある。このような報告から推定すると、本病に対するキクの抵抗反応は極めて複雑で、単に1つの菌株を用いて試験しても明らかにできるものではないように思われる。前述のように山口<sup>1)</sup>の発病階級の分類は肉眼的観察にもとづいたものである。したがって同じ発病階級に属する品種であっても、さらに菌株を変えて試験したり、あるいは微細構造まで分類基準にもちこむと、別の発病階級に移行することもありうると思われる。

本試験の結果、抵抗性が発現する時期および部位についての手掛りは得られたが、さらに品種を増やして、これらの結果が普遍的なものであるかどうか十分検討する必要があろう。

### 摘 要

キク白さび病菌接種第1日後には、栽培キク3品種の表皮細胞内には侵入菌糸が認められた。精興の華、千代桜の葉肉組織中を菌糸が伸展し、接種12日後には冬孢子堆を形成したが、聖山の場合には表皮細胞内の侵入菌糸はパピラにとり囲まれ、以後菌糸の伸長は認められなかった。精興の華と千代桜とを比較すると前者の方がより多くの冬孢子堆を形成したが、その差が何に由来するのかは本研究では明らかにし得なかった。最も抵抗性の高い聖山では表皮細胞へ菌が侵入した時に何らかの抵抗反応が働き、以後の菌の伸長を抑制するが、千代桜および精興の華ではこの段階の抵抗反応が弱いかまたは全くなく、菌は冬孢子堆形成に至る。しかしながら冬孢子堆形成の

段階で千代桜と精興の華との間に抵抗反応の差が現われた。

### 引 用 文 献

- 1) 山口 隆・栽培キクの白さび病防除と耐病性品種の育成, 農業および園芸 51:435-440. 1976.
- 2) Kunoh, H., H. Ishizaki and K. Nakaya. Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat leaves (II) Significance of primary germ tube of *Erysiphe graminis* on barley leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 10:191-199. 1977.
- 3) Kohno, M., H. Ishizaki and H. Kunoh. Cytological studies on rust fungi VI. Fine structure of infection process of *Kuehneola japonica* (Diet.) Dietel. *Mycopathologia* 61:35-42. 1977.
- 4) Coffey, M. D., B. A. Palevitz and P. J. Allen. The fine structure of two rust fungi, *Puccinia helianthi* and *Melampsora lini*. *Can. J. Bot.* 50:231-240. 1972.
- 5) Aist, J. R. Papillae and related wound plugs of plant cells. *Ann. Rev. Plant Pathol.* 14:145-163. 1976.
- 6) Smith, G. The haustoria of Erysipheae. *Bot. Gaz.* 29:153-184. 1900.
- 7) 草野俊助・菌の侵入作用と細胞膜の「カルス」形成との関係について. 日植病報 9:111-112. 1939.
- 8) 富山宏平・ジャガイモの疫病抵抗性機作. 植物防疫 34:2-8, 1980.
- 9) Firman, I. D. and P. H. Martin. White rust of chrysanthemum. *Ann. appl. Biol.* 62:423-442. 1968.

### Summary

The infection process of *Puccinia horiana* P. Hennings in chrysanthemum cultivars of different resistance levels was investigated by scanning and transmission electron microscopy. Test fungus was harvested in a greenhouse of the National Vegetable and Ornamental Experiment Station in Tsu city. Test cultivars of chrysanthemum were Seiko-no-hana (highly susceptible to the test fungus), Chiyo-zakura (susceptible) and Seizan (highly resistant). Numerous teliospores developed on Seiko-no-hana leaves, whereas only a few developed on Chiyo-zakura. No teliospores occurred on Seizan leaves. Germination of sporidia on three cultivars was compared by a scanning electron microscope. No differences in germination rate and morphology of germ tubes were found among the three cultivars. Infection process after the cuticle penetration was examined by a transmission electron microscope. Hyphae were observed in leaf epidermises of all test cultivars 1 day after inoculation. The hyphae in Seizan epidermises were enclosed by thick papillae, resulting in no further hyphal elongation in mesophyll cells. However, those in Seiko-no-hana and Chiyo-zakura epidermises further grew into mesophyll tissues and produced haustoria in mesophyll cells. In specimens fixed 12 days after inoculation, hyphal masses were observed in intercellular spaces between epidermal and mesophyll cells of Seiko-no-hana and Chiyo-zakura leaves. Teliospores arose from such hyphal masses. A greater number of teliospores was produced on Seiko-no-hana than on Chiyo-zakura. These results suggest at least two steps of resistance mechanism: i) one associated with papilla deposition in epidermal cells, remarkable in highly resistant cultivars such as Seizan, and ii) one which acts when teliospores are formed.

### Explanation of plate

#### Abbreviations

cw: fungal cell wall CW: host cell wall EP: epidermal cell gt: germ tube h: intercellular hypha  
 hi: hilum ih: intracellular hypha n: nucleus PA: papilla PP: palisade parenchyma se: septum  
 sp: sporidium SP: spongy parenchyma v: fungal vacuole V: host vacuole Bar=5 $\mu$ m

Figs. 1—4. Scanning electron micrographs of germinated sporidia of *Puccinia horiana* P. Hennings on chrysanthemum leaves (cv. Seiko-no-hana) 1 day after inoculation.

1, 2. A sporidium with a short germ tube (1. a typical germ tube). 3. A sporidium with an elongating germ tube. 4. An enlarged germ tube with a rough surface and a sporidium with a smooth surface.

Figs. 5—10. Transmission electron micrographs of infection process of *P. horiana* on Seiko-no-hana leaves. 5. A hypha growing in an epidermal cell 1 day after inoculation. A papilla surrounding a hyphal part near the host cell wall. 6. A hypha separated by a septum in an epidermal cell.

The plasma membrane attaches the hyphal surface (arrow). 7. A hypha growing in a palisade parenchyma cell 3 days after inoculation. An arrow indicates a host plasma membrane attaching the hyphal surface. 8. A hypha growing in a spongy parenchyma cell 6 days after inoculation. An encapsulation-like structure surrounds the hypha (arrow). 9. A fungal cell mass formed in intercellular space of spongy parenchyma tissue 12 days after inoculation. 10. An enlarged portion of a binucleate fungal cell with a thick cell wall in the cell mass formed in intercellular space of spongy parenchyma tissue.

Figs. 11—13. Transmission electron micrographs of infection process of *P. horiana* on Chiyo-zakura.

11. A bicellular intracellular hypha in epidermal cell 1 day after inoculation. 12. An intracellular hypha growing in a palisade parenchyma cell 3 days after inoculation. 13. An intracellular hypha surrounded by an encapsulation-like structure (arrow) in a spongy parenchyma cell 6 days after inoculation.

Figs. 14—16. Transmission electron micrographs of infection process of *P. horiana* on Seizan. 14. A hypha in an epidermal cell 1 day after inoculation. The hypha is enclosed by a thick papilla including vesicular and tubular structures. 15. Intracellular hyphae in an epidermal cell 3 days after inoculation. At this stage no hyphae were found in mesophyll cells. 16. An enlarged hypha which is at the right in Fig. 15. Features of organelles are obscure.











