

エンバク葉面における冠さび菌付着器の走査電顕的観察

尾上 孝利・谷 利一・内藤 中人

植物病原菌の侵入前行動については、光学顕微鏡によりすでに大要が明らかにされているが、最近では走査電子顕微鏡による新発見が加わり、植物体の表面構造と付着器の形成部位、あるいは菌体から分泌される粘液層の存在などが一段と明確になってきた^(1, 7, 14, 15)。さび病においても、夏胞子の表面微細構造^(2, 3, 5, 9, 10, 16)および発芽管突出部位^(8, 9)についての走査電顕像は観察されているが、気孔侵入にいたる菌の動向と植物体表面の微細構造との関係については、いまなおほとんど明らかでない。

さび菌夏胞子の発芽管が気孔に到達すると、通常、発芽管先端部に付着器が形成されるが、その形成誘起は植物体表面のワックスまたはクチン成分によると考えられている^(11, 17)。また、発芽管および付着器の植物表面への固着は菌体表面に分泌された油脂状物質がクチクラ層に密着するためと推定されている⁽¹⁷⁾。このような現象は恐らく植物体表面の微細構造に何らかの影響をおよぼしているものと考えられる。そこで、筆者らは *Puccinia coronata* を接種した罹病性エンバク葉の表面構造と付着器との関係を明らかにするため、有機溶媒で処理した葉片と無処理のものについて、走査電子顕微鏡による比較観察を行なった。ここにその結果を報告する。なお、発芽管および付着器の表面微細構造についてもあわせて記載しておく。

本研究に際し、有益な助言を賜った京都大学福富雅夫博士、ならびに電顕観察に種々便宜をあたえられた日本電子株式会社に深く感謝する。

実験材料および方法

罹病性エンバクのピクトリアを常法⁽¹³⁾によって育苗し、播種7日後の第1葉裏面に *Puccinia coronata* CORDA の夏胞子を筆で塗布する。これを25°Cの温室に納め、5-24時間後にとり出して長さ3mmに切りとり、つぎの処理を行なう。

方法A：葉片を支持台にはりつけ、高真空下で金パラジウムを蒸着する。

方法B：葉片を0.1%リソ酸緩衝液(pH 6.9)に溶解した5%グルタルアルデヒド溶液で5時間固定し、ついで1%オスmium酸で2時間固定後エタノール系列で脱水、無水エタノールに24時間浸漬してA法同様に蒸着する。微細構造の観察は日本電子のJSM-S1型走査電子顕微鏡による。

実験結果と考察

A法によると、エンバク葉面のワックスは比較的良好に残っており、一部では集合して塊状(GW)をなすが、多くは鱗片状のまま wax crystal⁽⁴⁾(WC)として表面から垂直に密生している。Fig. 1-Aは夏胞子から伸長した発芽管が気孔上に到達して先端部がわずかにふくらんだ状態を示すものであるが、恐らく付着器形成の初期段階であろう。この発芽管の周辺をみるのに、先端寄りの部分に巾約3 μ の平面な層(WP)が葉面側に付着している。Fig. 1-Bはその拡大であるが、発芽管表面にはワックスの鱗片が認められ、また、葉面と接する部分の板状の層(WP)は、その表面構造からみて、発芽管表面と同じ物質からなると考えられる。また、同層の周辺部は約1.5 μ の巾でワックス顆粒が消失している(+)点が注目される。

B法によると、葉面のワックス片は観察されないが、これは処理の過程でほとんど消失するためと考えられる。この方法で形成初期の付着器を観察すると、Fig. 1のような板状層はみあたらない(Fig. 2, 3)。また、発芽管の表面にはその伸長方向にそった線状の浅い溝と小さい陥没部があり、表面構造はA法の場合とかなり異なる(Fig. 3)。このような両者の比較から、付着器形成にあたって本菌は葉面ワックスを溶解し、それが菌体表面を覆うと同時に菌体を葉面に接着させているものと推定する。

一方、発芽管からも浸出物があるようで、ときに Fig. 3 のように、B 法でも消失しない薄膜の層(T)をみることもある。この層は2本の発芽管が接触した場では両者を癒着させている (AM)。LITTLEFIELD および BRACKER⁽¹⁰⁾ は *Melampsora lini* の夏胞子の微細構造を観察し、最外層は疎水性であり、胞子細胞壁の一部とみなすよりもむしろ分泌物の層と考えるほうがよいと述べている。また、WOODBURY および STAHMANN によると、*Puccinia graminis tritici* および *Uromyces phaseoli* の夏胞子や発芽管の表面は油状物質で覆われ、水面上ではそれが酸化して容易に皮膜を形成するという。したがって、本菌でも、発芽管をとりまく疎水性または半極性 (semipolar) の物質の存在が十分に考えられるので、このような層が親水性の菌体細胞壁と疎水性の葉面ワックスとの仲だちをして Fig. 1 のようになったものと解される。また、筆者ら (未発表) の実験によると、エタノール、エチルエーテル、または石油エーテルで処理した葉面においては、本菌は infection structure を形成せず、一方、葉面のエチルエーテル抽出物を塗布したガラス板上では形成が良好であったので、菌によるワックスの溶解は付着器形成の誘起に関与すると考えてよからう。ただし、さび菌が発芽管壁によってワックスを認識するのか、あるいは分解物の一部が菌体内にとり込まれて分化を誘起するのかわ不明である。いずれにしても、孔辺細胞の表面には鱗片状ワックスがとくに多いようなので (Fig. 1)、それが気孔上に特異的に付着器を形成する原因かもしれない。

成熟した付着器の部分をA法によって観察すると、Fig. 4のとおり、付着器表面を覆うワックス層と葉面とが完全に融合して両者の間に全く境界を認めえない部分がある (矢印)。しかし、同様の箇所をB法で固定すると、ワックスは除かれて宿主表面との付着器との境界が明瞭になる (Fig. 5)。また、ワックスの除去された付着器は発芽管のときと同様に、粗面で巾約2 μ の陥没部分が随所にみられることがある (Fig. 6, 矢印)。さらにまた、葉面に接した側では部分的に薄層片(T)が認められるので、付着器も発芽管同様に菌の分泌する疎水性膜質に覆われているものと考えられる。

本菌の特徴として、HARD-KARRER および RODENHISER⁽⁶⁾ は付着器における指状突起 (finger-like projection) の存在を指摘し、筆者ら⁽¹³⁾ も培地上およびエンバク葉上でそれを確認したが、その表面微細構造(F)は Fig. 5 および 6 のとおりである。この小突起は巾約2 μ 、長さ約3.5 μ で1つの付着器に5-6箇認められ、多くが孔辺副細胞に接して発達している。その周辺部には発芽管のときと同様の薄膜(T)がみられる。なお、付着器と発芽管との境界には巾約0.5 μ の環状模様(R)がある (Fig. 4, 5)。

付着器の表面は時間がたつにつれ縮少して皺が多くなり (Fig. 7)、内容物が気孔下のうに移動し終ると中央部が大きく陥没して薄い膜だけが残る (Fig. 8)。同図で明らかのように、付着器下の孔辺副細胞の表面は極めて平滑で、B法によっても除かれなかった微小ワックス片も完全に消失するが、細胞壁の損傷はみうけされない (矢印)。AKAI ら⁽¹⁾ は *Colletotrichum lagenarium* 分生胞子を接種したウリ成葉の表面微細構造を観察し、表皮細胞壁に付着器で損傷をうけた跡を認めている。このような相違は、前者が気孔侵入、後者が角皮侵入であるためと推定される。

摘 要

エンバク冠さび菌 (*Puccinia coronata* CORDA) の夏胞子を罹病性エンバク (ビクトリア) の子苗第1葉に接種して、25°C の温室下に5-24時間納めてから取り出し、主として付着器の状態と葉面構造の変化を走査電子顕微鏡で観察した。

葉表面のワックス成分は菌によって溶解し、発芽管を覆う疎水性膜質と融合するようである。この現象は付着器形成の誘起に関連があるものと推定する。

付着器の表面も発芽管同様に葉面ワックスで覆われ、そのために付着器は気孔上に固着するようである。付着器下における孔辺副細胞の表面では、ワックス片は完全に消失するが、細胞壁は何ら損傷をうけない。

表面のワックス成分を無水エタノールで除去すると、発芽管および付着器はともに粗面を呈し、ところどころに陥没部分が認められる。付着器と発芽管との境界には環状の隆起がある。付着器の指状突起は孔辺副細胞に接して発達している。

引用文献

(1) AKAI, S., HORINO, O., FUKUYOMI, M., NAKATA, A., KUNOH, H., SHIRAIISHI, M.: Cell wall reac-

tion to infection and resulting change in cell organelles. Morphological and Biochemical

- Events in Plant-Parasite Interaction (ed. AKAI, S., OUCHI, S.), 329-347 (1971).
- (2) BOSE, A., SHAW, M.: Sporulation and pathogenicity of an Australian isolate of wheat rust grown in vitro. *Can. J. Bot.*, **49**, 1961-1964 (1971).
- (3) CORLETTI, M.: Surface structure of the urediniospores of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. *Can. J. Bot.*, **48**, 2159-2161 (1970).
- (4) DAVIS, D.G.: Scanning electron microscopic studies of wax formations on leaves of higher plants. *Can. J. Bot.*, **49**, 543-546 (1971).
- (5) 福富雅夫, 赤井重恭, 平田 衡: 走査電子顕微鏡による植物ならびに菌体表面の微細構造の観察法. 化学と生物, **7**, 92-96 (1969).
- (6) HARDA-KARRER, A. M., RODENHIESER, H. A.: Structure corresponding to appressoria and substomatal vesicles produced on nutrient-solution agar by cereal rust. *Am. J. Bot.*, **34**, 377-384 (1947).
- (7) HASHIOKA, Y., KITANO, N.: Fine structure of the rice blast VI. Scanning electronmicroscopy on neck-, node-, and spikelet-blast. *Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.*, **29**, 11-20 (1970).
- (8) HIRATSUKA, Y.: Emergence of the aeciospore germ tubes of *Cronartium coleosporioides* (= *Peridermium stalactiforme*) as observed by scanning electron microscope. *Can. J. Bot.*, **48**, 1692 (1970).
- (9) JONES, D. R.: Surface structure of germinating *Uromyces dianthi* urediniospores as observed by scanning electron microscopy. *Can. J. Bot.*, **49**, 2243 (1971).
- (10) LITTLEFIELD, L. J., BRACKER, C. E.: Ultrastructure and development of urediospore ornamentation in *Melampsora lini*. *Can. J. Bot.*, **49**, 2067-2073 (1971).
- (11) MAHESHWARI, R., ALLEN, P. J., HILDEBRANDT, A. C.: Physical and chemical factors controlling the development of infection structures from uredospore germ tubes of rust fungi. *Phytopathology*, **57**, 855-862 (1967).
- (12) NAITO, N., TANI, T., ARAKI, T.: Relationship between parasite development and infection type in oat, wheat, and barley inoculated with *Puccinia coronata*. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **11**, 16-22 (1970).
- (13) 内藤中人, 谷 利一, 戸出英輝: エンバク冠銹菌夏胞子の人工培地における infection-type structure. 香川大農報, **16**, 44-49 (1964).
- (14) PURNELL, T. J., PREECE, T. F.: Effects of foliar washing on subsequent infection of leaves of swede (*Brassica napus*) by *Erysiphe cruciferarum*. *Physiol. Plant Pathol.*, **1**, 123-132 (1971).
- (15) ROYLE, D. J., THOMAS, G. G.: Observations with the scanning electron microscope on the early stages of hop leaf infection by *Pseudoperonospora humuli*. *Physiol. Plant Pathol.*, **1**, 345-349 (1971).
- (16) WILLIAMS, P. G., LEDINGHAM, G. A.: Fine structure of wheat stem rust urediospores. *Can. J. Bot.*, **42**, 1503-1508 (1964).
- (17) WOODBULY, W., SAHMANN, M. A.: Role of surface films in the germination of rust urediospores. *Can. J. Bot.*, **48**, 499-511 (1970).

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF CROWN RUST
APPRESSORIUM PRODUCED ON OAT LEAF SURFACE

Takatoshi ONOE, Toshikazu TANI, and Nakato NAITO

Summary

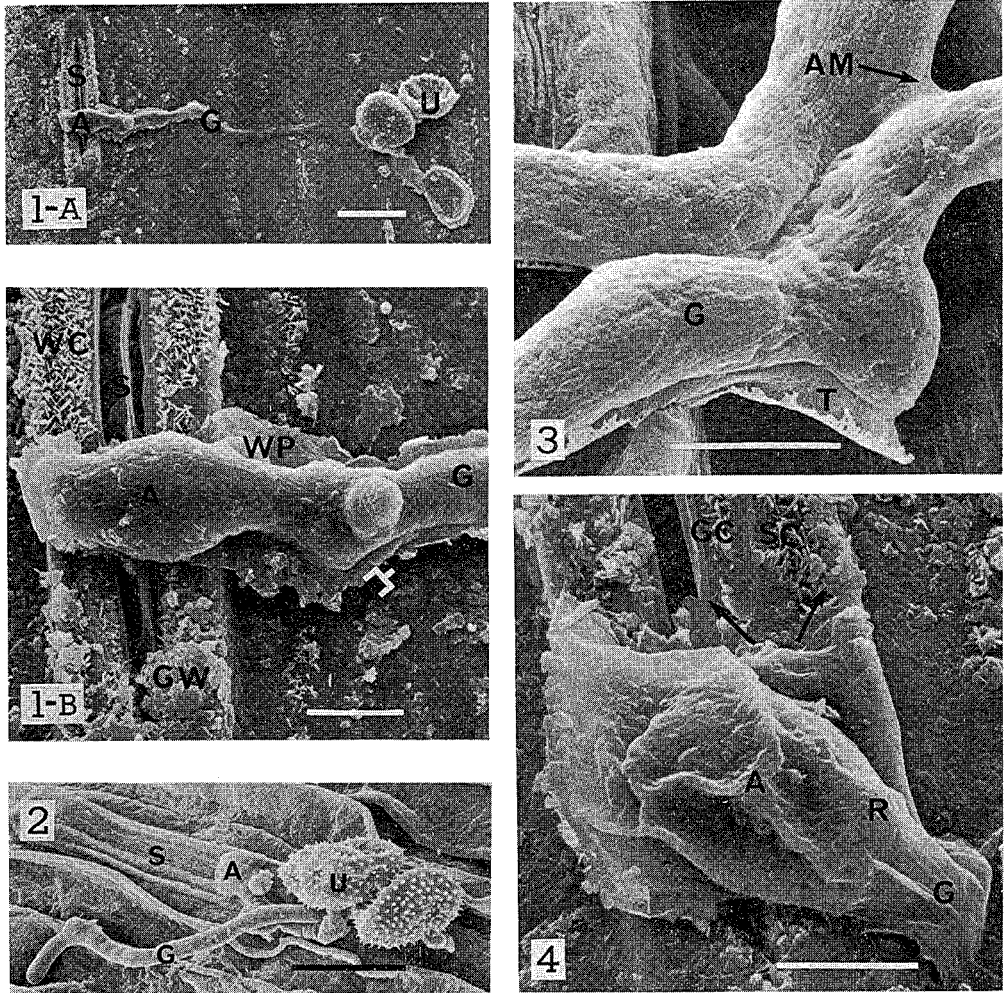
The primary leaves of oat seedlings (Victoria, susceptible var.) were inoculated with uredospores of *Puccinia coronata* CORDA and incubated in the moist chamber at 25°C. The inoculated leaves were harvested 5 to 24 hours after inoculation, and subjected to scanning electron microscopic observation.

It was suggested that the wax material on the leaf surface is dissolved by the fungus and covers the surface of fungal bodies in association with hydrophobic excreta from the fungus. This may result in an induction of appressorium formation.

The surface of appressoria is also coated with hydrophobic excreta and wax material, which may serve to hold the appressoria on stomata. The surface area of subsidiary cells beneath the appressoria is completely free from wax material, while the cell wall of this portion appears to be of no damage.

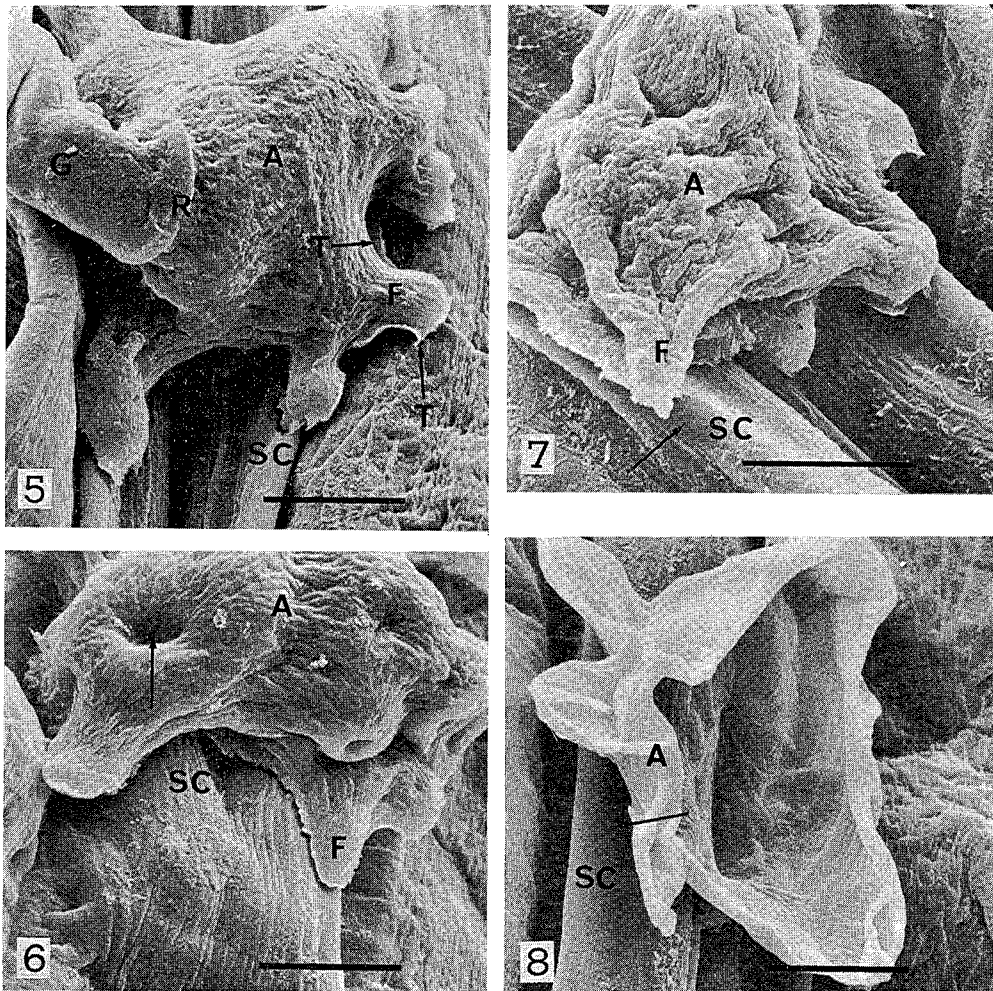
When viewed the specimens which had been treated with absolute ethanol to remove wax material, germ tubes and appressoria are rough on the surface and have depressions. Finger-like projections which emerge from appressoria are usually located close to the leaf surface.

(1972年6月5日 受理)



Explanation of Figs. 1-8

Fig. 1, 2. Overlooking view of uredospores, germ tube, and young appressorium. 1. The specimen (fresh cut leaf) was subjected to observation without dehydration by organic solvent or any other previous treatment (Method A). Germinated uredospores are utterly shrunk. Elongation of the germ tube is terminated when it encountered a stomata, on which a young appressorium is produced. Both of the germ tube and appressorium are coated with a substance that appears to be the same in texture as wax material on the leaf surface. This material seems to develop a plate at the boundary between the fungal body and leaf surface resulting in holding the parasite in position. Around the outside of this waxy plate, wax material on the leaf surface is lost (\perp), probably due to a liquefying action by the fungus. (1-A $\times 450$; 1-B $\times 2,600$) 2. The specimen was dehydrated through ethanol series, kept in absolute ethanol for 24 hours at the final process, and then subjected to observation (Method B). In this case, wax material over the leaf surface, appressorium, and germ tubes is mostly removed. ($\times 775$) **Fig. 3.** Side view of germ tubes (Method B). Presence of a coating material over germ tubes other than wax, probably excreta from the fungus, is indicated by the thin membrane and adhering material at the contact portion of two germ tubes. ($\times 4,500$) **Fig. 4.** Overlooking view of appressorium (Method A). The appressorium is tightly fixed with wax material to the guard cell and subsidiary cell so that boundary of the leaf surface and appressorium is hardly visible (arrows).



The appressorium is contiguous to germ tube by circular ridge. ($\times 3,700$) **Fig. 5, 6.** Overlooking and side views of mature appressoria (Method B). Finger-like projections emerging from appressoria are located close to the leaf surface. Thin membrane is observed at the edge of finger-like projection as well as appressorium. 5. The germ tube is terminated by a circular ridge. The surface of the appressorium is rough. ($\times 3,700$) 6. In some places deep depressions are observed (arrow). ($\times 3,700$) **Fig. 7, 8.** Side view of old appressoria (Method B). The appressorium becomes to shrink revealing deep wrinkles as the inner material begins to move into the substomatal vesicle (7) and finally only an empty envelope remains (8). The surface area of subsidiary cells that had been covered with appressorium is completely free from wax material, but the cell wall seems to be of no damage (arrows). ($\times 4,500$ and $3,700$, respectively)

Key to Labeling—A: Appressorium, AM: Adhering material, CW: Clump of wax crystal, F: Finger-like projection, G: Germ tube, GC: Guard cell, GW: Granulated wax, R: Circular ridge, S: Stomata, SC: Subsidiary cell, T: Thin membrane, U: Uredospore, WC: Wax crystal, WP: Waxy plate

Scales in the sections represent 20μ for Figs. 1-A and 2, and 5μ for Fig. 1-B, 3, 4, 5, 6, 7, and 8, respectively.