

サトウキビ黒穂病罹病組織の電子顕微鏡観察

荒井 啓・植原一雄・山内昌治*

(植物病理学教室)

昭和56年 8月10日 受理

Electron Microscopic Studies on Sugarcane Tissues Infected with *Ustilago scitaminea* Sydow

Kei ARAI, Kazuo UEHARA and Shoji YAMAUCHI*

(Laboratory of Plant Pathology)

緒 言

サトウキビ黒穂病 (*Ustilago scitaminea* Sydow) は、世界各地のサトウキビ栽培地で発生し、サトウキビの重要病害の一つとされている。わが国でも、1931年頃までは沖縄県の各地で発生が認められていたが、抵抗性品種の普及により、その後は全く発生が認められていなかった。ところが、1972年に沖縄県内各地で本病の再発生が認められ⁶⁾、その後、鹿児島県の奄美群島、種子島にも発生が認められるようになった。本病は、茎の先端部から、黒色の鞭状物が出てくるのが特徴で、そのような茎は、健全茎にくらべて、草丈・草茎・葉身が細く、逆に茎長や節間が長く全体に細長くなり、後に枯死する。

本病に関する研究報告は、かなりの数にのぼっているが^{1, 2, 3, 5, 6, 7, 8)}、罹病組織を電顕観察した報告はないようである。そこで、本実験では、黒穂病に感染したサトウキビの組織を走査型および透過型電顕で観察した。その結果、組織内の菌糸の所在ならびに孢子形成について、いくつかの知見を得ることができたのでここに報告する。

材料と方法

供試材料は *Ustilago scitaminea* Syd. に感染したサトウキビ, *Saccharum officinarum* L.; 栽培品種 NCO

本論文の概要は1979年日本植物病理学会九州部会および1980年九州病害虫研究会にて発表した。

*沖縄県農試, 沖縄県那覇市崎山町

Okinawa Agricultural Experiment Station, Sakiyama-cho, Naha, Okinawa

310, の罹病組織で、沖縄県那覇市で自然発病していたもの、および人工接種により発病せしめたものである。なお、接種は、催芽苗の芽の部分に、昆虫針で傷をつけ、 10^7 spores/ml 位の濃度の黒穂孢子浮遊液を塗付することによって行った。この苗をポットに植え28°C に2~3週間保ち、その後は自然条件の室内に置いた。

数ヶ月後、鞭状物の形成が認められたものについて、罹病茎の生長点部分および鞭状物の基部から先端にかけて順々に細切し、グルタルアルデヒドとオスミック酸で二重固定し、エタノールで脱水した。走査型電顕用試料は、脱水後、液体窒素を用いて凍結切断を行い、臨界点乾燥 (日立 HCP-1) し、金蒸着 (日本電子 JFC 1100) を施し、日本電子 JSM-15で観察した。また、透過型電顕用試料は、脱水後、エポキシ樹脂に包埋、ウルトロトーム (LKB 8800) で薄切、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色後、日本電子 JEM-100Cで観察した。また、一部の試料については、エポキシ樹脂包埋試料を2~3 μ m の厚さに切り、無染色あるいはトルイジンブルー、石炭酸フクシンなどで染色後、光顕で観察した。

結 果

まず、透過型電顕 (TEM) によって、茎の生長点の分裂組織を観察した。その結果、分裂組織は比較的小さくて薄い細胞壁を有する細胞で充満しており、細胞質の密度が高いのが特徴的であった。このような組織で、一部に数本の菌糸が侵入しているのが認められた (Fig. 1) が、一般的には分裂組織では、このように数

本の菌糸が一度に観察される例は少なかった。

菌糸は、宿主細胞の細胞壁と細胞膜との間に見出されることが多く、時には、細胞壁中層にも認められた。分裂組織より少し離れた柔組織では、細胞は大きく、液胞の発達が顕著であった。このような組織では、菌糸を比較的容易に認めることが出来た (Fig. 2, 3, 4)。菌糸が認められる宿主細胞の細胞膜は菌糸と接触する部分がいずれも内側に押し広げられたように陥入し、波打った状態にみえるのが特徴的であった。また、菌糸が存在する部分の周辺細胞にはとくに顕著な変化を認めなかったが、Fig. 4 に示したように、わずかに原形質分離を起し、細胞質密度の低下を示す像が一部で観察された。一般的な菌糸の微細構造は、Fig. 5 に示したように、外層は電子密度の異なる二層から成る細胞壁と細胞膜より成り、内部にリボソーム様顆粒、膜状構造物、液胞などを認めた。Fig. 6 は菌糸の分枝状態を示す像と思われるが、隔壁が認められ、3細胞から成ることが明瞭である。内部の微細構造には、とくに顕著な変化は認められなかったが、細胞壁の電子密度が若干異なり、細胞壁中層 (middle lamella) が明瞭に認められた。鞭状物の基部では、これら分枝した菌糸が顕著に認められ、このような菌糸では枝が比較的明瞭に認められた (Fig. 7, 8)。一般に、組織内の菌糸の太さは一定せず、 $0.8\sim 3.5\mu\text{m}$ の範囲で、 $2\mu\text{m}$ 前後のものが多かった。

一方、走査型電顕 (SEM) では、罹病茎の生長点附近や、鞭状物の基部では、菌糸が観察される例は少なかったが、それらの組織の縦断面では、菌糸の一部が露出した例を認めた (Fig. 9)。鞭状物を基部より先端にむけて順次観察すると、やがて縦断面でも横断面でも容易に菌糸を認めることができるようになった。Fig. 10, 11 はそれぞれ、縦断面と横断面の例であるが、無数の菌糸が露出しており、数本の菌糸が束になっているのが認められた。これと同じような部分を TEM で観察したのが Fig. 12 である。数本の菌糸が集団となり、それらは、宿主細胞の間隙に認められた。周囲の細胞は押しつぶされたように、変性・収縮しているようにみえた。このような菌糸の集団は、やがて、さらに分枝を繰返し、より大きな菌糸集団、すなわち菌糸塊を形成するものと思われる。Fig. 13 はそのような状態を SEM で観察したものである。Fig. 13 で示すように、このような菌糸塊は、鞭状物の中心部より、表層に近い皮層部分に認められた。

鞭状物の内部に形成される菌糸塊は、大きさが、数十から数百 μm で、時には数 mm におよぶものも

られた。Fig. 14 はそのうちの一つを光顕で観察したものである。一般的には、菌糸塊内部の周辺部では、amorphous な様相を呈するが、中心部では、輪郭がかなり明瞭な菌糸が充満しているようであった。また、形成初期の菌糸塊内部は、大部分が amorphous な状態で、時間の経過とともに、輪郭の明瞭な菌糸に変化する傾向がみられた。この amorphous な部分を TEM で観察したのが Fig. 15 である。すなわち、この部分の菌糸細胞の細胞質は微細構造が不明瞭で、菌糸と菌糸の境界もはっきりせず、変性を想像させる所見が得られた。時間の経過した菌糸塊内部は、Fig. 16, 17 に示すように、菌糸の輪郭も明瞭であったが、球形や楕円形を呈しているものが多く認められた。これと同じような段階の菌糸塊を SEM で観察すると Fig. 18 に示すように、先端の丸い短桿状の菌糸が多数認められた。

つぎに、菌糸塊の周辺部を TEM で観察した (Fig. 19, 20)。Fig. 19 では、菌糸と宿主細胞の間に、特異的な構造は認められないが、菌糸塊の内部では宿主細胞の細胞質が崩壊したと思われる構造物が認められた。また、Fig. 20 では、菌糸塊と宿主細胞との間に、変性・収縮したと思われる細胞が認められた。それらに隣接する細胞の間隙には菌糸の侵入は認められたが、とくに顕著な変性は認められなかった。このような菌糸塊内部の菌糸細片の短径は、ほぼ $0.5\sim 2.3\mu\text{m}$ の範囲で、 $2\mu\text{m}$ 位のものが多かった。

このような菌糸塊がより成熟すると、短桿状の菌糸細片は、さらに短かく、球形に近くなり、大きさも増すようであった。一部では、針状の突起を有する孢子様構造物として認められた (Fig. 21, 22, 23)。この過程を SEM で観察したのが Fig. 24~28 である。Fig. 24 では、菌糸塊内部に短桿状の菌糸細片と球形の孢子様構造物が混在して認められた。Fig. 25 は、ドーナツ形と球形の孢子様構造物の混在を示すものである。Fig. 26 は孢子様構造物の断面を示すものである。成熟した孢子様構造物の大きさは $5\sim 8\mu\text{m}$ で、その形態から黒穂孢子に間違いのないと思われる (Fig. 27)。Fig. 28 は、菌糸塊内部のほとんどの菌糸細片が孢子になった状態を示し、孢子塊と考えられる。

考 察

サトウキビ黒穂病菌は、主として芽の部分から組織内に侵入し、やがて分裂組織に達し、サトウキビの生長とともに茎の先端部へ移動していくものと推定されている^{3,5,8)}。また、一般的には、その菌糸は、宿主細

胞の細胞間隙に侵入しているものと理解されている。

本実験では、罹病茎の分裂組織や鞭状物に菌糸の存在を認めた。これと同様の菌糸は、健全茎の分裂組織には認められなかったことから、黒穂病菌の菌糸と考えた。これらの菌糸は TEM では主として宿主細胞の細胞壁と細胞膜との間に認められ、それらの細胞質は内側に圧迫され (Fig. 1~6)、あたかも菌糸が押し入ったように思われる。これらの観察結果は、上述の既往の報告での推論を裏付けるものであろう。

罹病茎に形成された鞭状物内では、いずれの部位にも菌糸が認められるが、その基部では菌糸量が少なく、先端にゆくに従ってその量が増加する傾向が認められた (Fig. 3~11)。とくに、先端部では、分枝した菌糸も多く、数本が束になっているものが多く観察された (Fig. 10~12)。この状態は SEM での観察で顕著に認められた。これらの束になった菌糸は、さらに分枝を繰返し、数十本が集まって集団となり、菌糸塊を形成するものと思われる (Fig. 13)。このような菌糸塊は鞭状物の周辺部に顕著に認められる。

形成初期と思われる菌糸塊は、単なる菌糸の集団であるが (Fig. 13)、これよりやや成熟したと思われるものでは amorphous な状態がみられる (Fig. 15)。さらに成熟の進んだと思われる菌糸塊内部では、菌糸細片と思われる短桿状のものが充満しているのがみられる (Fig. 16~20)。また、菌糸塊によっては、この細片よりも丸く、時には針状の突起を持った球形のものが多数みられる (Fig. 21~28) が、これは黒穂胞子と思われる。これら菌糸塊に関する一連の観察像から、菌糸塊の成熟過程を次のように推定した。すなわち、初めはごく普通の菌糸であったものが、その高密度化とともに、次第に変化し、その構成細胞の一つ一つが不定形を示すようになり、やがて segmentation が起ってその菌糸の細片が黒穂胞子に成熟するものと思われる。

以上の結果から、サトウキビの黒穂病の場合にも、ムギ類の黒穂病の場合と同様に^{4,9)}、菌糸から全実性的に黒穂胞子が形成されるものと思われる。

要 約

本実験は、黒穂病菌に感染したサトウキビ組織内の菌糸の所在ならびに胞子形成過程を走査型および透過型電顕で観察したものである。観察には、罹病茎の分裂組織および罹病茎より出る鞭状物を用いた。得られた結果を要約すると以下のとおりである。

菌糸は、罹病茎の分裂組織に侵入していた。その侵入部位は、主として宿主細胞の細胞壁と細胞膜との間

で時には細胞壁中層にも認められた。このような組織では、菌糸が見出される頻度は低かったが、鞭状物基部では、比較的容易に観察された。菌糸の微細構造は、外層が、電子密度の異なる 2 層の細胞壁と細胞膜からなり、内部にリボソーム様顆粒、液胞、膜状構造物、核などが認められた。その太さは 0.8~3.5 μm で、2 μm 前後のものが多かった。菌糸が認められる組織の周辺の宿主細胞には、特に顕著な形態の変化は認められなかった。

鞭状物を基部より先端にむけて観察すると、菌糸量が次第に多くなる傾向になり、菌糸が分枝している状態が観察された。分枝した菌糸の TEM 像では、細胞壁の電子密度が若干変り、枝が明瞭に認められた。時間の経過とともに、菌糸の分枝が盛んとなるようで、これらが束状の菌糸集団となり、菌糸塊を形成することを示唆する像が得られた。菌糸塊の大きさは、数十から数百 μm で、時には数 mm のものが観察された。これらの菌糸塊は、概して、鞭状物の表層に近い皮層部分に観察された。

形成初期と思われる菌糸塊は、単なる菌糸の集団として観察されたが、やや成熟したと思われる菌糸塊の内部は amorphous な状態で、その部分には、境界のはっきりしない菌糸で充満していた。さらに成熟したと思われる菌糸塊の内部では、境界のはっきりした短桿状の菌糸細片で充満しているのが観察された。また、菌糸塊によっては、この細片よりも丸く、時には針状の突起を持った球形のものが多数充満していた。これらは、5~8 μm の大きさで、その形態から黒穂胞子と思われた。

文 献

- 1) Lee-Lovick, G.: Smut of sugarcane-*Ustilago scitaminea*. *Rev. Plant Path.*, **57**, 181-188 (1978)
- 2) 佐藤徹: *Ustilago scitaminea* Syd. のサトウキビ葉上の黒穂胞子堆について. 九病虫研報, **23**, 32-33 (1977)
- 3) Sharma, S.L.: Morphological modifications in sugarcane plant by systemic infection of smut (*Ustilago scitaminea* Syd.). *Proc. Int. Soc. Sug. Cane Tech.*, 9th Congress, 1134-1168 (1956)
- 4) 篠原正行: オオムギ裸黒穂病 (*Ustilago nuda* (Jens.) Rostrup) の病理解剖学的研究. p. 1-99, 日大, 東京 (1973)
- 5) Waller, J.M.: Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. I. Epidemiology. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **52**, 139-151 (1969)
- 6) 山内昌治: 沖縄県におけるサトウキビ黒穂病の発生. 植物防疫, **27**, 194-196 (1973)
- 7) 山内昌治・上原勝江: サトウキビ黒穂病菌の花序と葉における標徴及び胞子形成. 九病虫研報, **23**, 34-36 (1977)

- 8) 山内昌治・上原勝江：サトウキビ黒穂病菌の植物組織内侵入について(I)。沖縄甘蔗年報, 17, 5-8 (1977)
- 9) 吉井甫・河村栄吉：解剖植物病理学。p.166-170, 朝倉書店, 東京 (1947)

Summary

Both the location of mycelia and the process of sporulation in the tissues of a sugarcane, *Saccharum officinarum* L. (cultivar NCO 310) infected with *Ustilago scitaminea* Sydow, were observed under a scanning- and transmission-electron microscopes. Materials used are apical tissues of the diseased stems and whips produced on some diseased plants. The results are summarized as follows.

The invasion of mycelia was made in the apical meristem of the diseased stem, but the chance of their being observed was quite few. Mycelia were mainly observed at the intracellular space between the host cell wall and the cytoplasmic membrane, but sometimes they were observed in the middle lamella. The mycelia were easily observed in the base of a whip. The size of mycelium in the tissue was 0.8–3.5 μ m in width, the mean being about 2 μ m. No specific cytopathic effects could be recognized both in the host cells containing mycelia and in their adjacent cells. It was to be observed at the whip-tissues from the base to the tip in order. The numbers of mycelia observed increased with the progress of observations to the tip sections and branched mycelia were also observed under both SEM and TEM. The branching of mycelium got active with age and the masses of mycelia were formed in whip.

The location of the mycelial mass was fixed at cortex near the epidermis. The size varied from dozens to hundreds micron in diameter. The inside of the initial mycelial mass was amorphous and was filled with a large number of mycelia indistinguishable in their boundary. Some time later, the inside of the mycelial mass got filled with the pieces of mycelia supplied with a rod-shaped structure. It was suggested that mycelia were segmented there. Such mycelial segments became gradually hypertrophied, matured, forming spore-like structures with needle-like spines. Judging from their form and size (5–8 μ m) it was assumed that these structure were smut spores. In the mycelial mass the sporulation was noted to be developed from the central to the edge.

Explanation of Figures

- Abbreviations: c; chloroplast, M; mycelium, N; mycelial nucleus, n; host cell nucleus, V; mycelial vacuole, v; host cell vacuole
- Fig. 1. Ultra-thin section electron micrograph of apical meristem tissue. Mycelia exist in the intracellular space between the host cell wall and the cytoplasmic membrane and in the middle lamella (arrow).
- Fig. 2. Mycelia in the parenchyma fixed a little away from apical meristem. TEM.
- Fig. 3. Mycelia in the bases of whip. TEM.
- Fig. 4. Ditto. Slight plasmolysis and low density of cytoplasm of the adjacent cells. Cytoplasmic membrane waves and extends toward the inside of cytoplasm. TEM.
- Fig. 5. Ultrastructure of mycelium on the cross section. Mycelial cell wall is constituted with two layers showing both low and high densities. Vacuole and membrane-like structure (arrow) are observed.
- Fig. 6. Mycelium formed septa. The structure of cell wall is different from that in Fig. 5. In septa, formation of a clear middle lamella is observable. TEM.
- Fig. 7. Mycelia branched in the tip of whip. Nucleus in mycelium (arrow) is observed. TEM.
- Fig. 8. Ditto. Mycelia exist in the outside of host cytoplasmic membrane. A slight degeneration of host cytoplasm is observed. TEM.
- Fig. 9. Scanning electron micrograph of the vertical section at the base of whip. It is observed that mycelia (arrows) are exposed at the cracking phase.
- Fig. 10. Branching of mycelia in the tip of whip. The bundles of mycelia and the portion of branching are

- observed. Some mycelia invade into host tissue. Vertical section. SEM.
- Fig. 11. Ditto. Cross section. TEM.
- Fig. 12. Ultra-thin section electron micrograph in the same stage in Fig. 10 and 11. A bundle of mycelia existing in the intracellular space of host tissue.
- Fig. 13. Mycelial mass in the cortex fixed close on epidermis of whip. Cross section. SEM.
- Fig. 14. Light microscopic micrograph of the tip of whip. A mycelial mass in whip.
- Fig. 15. Something amorphous in the inside of initial mycelial mass. The boundary of mycelia is indistinguishable. TEM.
- Fig. 16. Rod-shaped mycelia and fiber-structure are filled in the mycelial mass. TEM.
- Fig. 17. Ditto. TEM.
- Fig. 18. Scanning electron micrograph of vertical section. This is a stage similar to those in Fig. 16 and 17. Short rod-shaped mycelia are observed in the mycelial mass.
- Fig. 19. The border of the mycelial mass and the host tissue. The cytoplasm of the host cell degenerates and their organella (arrows) are present among mycelia. TEM.
- Fig. 20. Ditto. It is possible to observe one or two layers of degenerate and contract host cells (arrows). TEM.
- Fig. 21. Ultra-thin electron micrograph of the mycelial mass of the later stage. Mycelia of various forms are observed and some form septa.
- Fig. 22. Ditto. The pieces of mycelia having needle-like spines are observed. TEM.
- Fig. 23. Spore-like structures in the mycelial mass of the later stage. TEM.
- Fig. 24. Scanning electron micrograph of the mycelial mass of the later stage. Rod-shaped mycelia and spore-like structures are observed in the same place.
- Fig. 25. Doughnut-like structures in the mycelial mass of the later stage. SEM.
- Fig. 26. Spore-like structures and their cracking section. SEM.
- Fig. 27. Mature and immature spores. SEM.
- Fig. 28. Scanning electron micrograph of mass of spores on whip.













