

走査電顕による数種うどんこ病菌の無蒸着観察

荒井 啓・植原 一雄

(昭和51年8月30日 受理)

The Observation, Under Scanning Electron Microscopy, of Fresh Materials of Several Powdery Mildews

Kei ARAI and Kazuo UEHARA

(Laboratory of Plant Pathology)

緒 言

これまで植物病害研究における走査電子顕微鏡の利用例としては、1)糸状菌の外部形態^{19, 20, 21, 22, 24, 40, 41)}、2)胞子の発芽・発芽管の生育状況・付着器形成、あるいは分生胞子の形成離脱など菌の生育段階の観察^{1, 4, 12, 18, 21, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 46)}、3)病原菌の宿主への侵入、定着などの感染過程の観察^{6, 16, 17, 18, 21, 23, 30, 36)}、4)葉剤処理による菌の外形変化の観察^{13, 31)}、5)感染組織断面の内部構造の観察^{15, 27, 32, 44, 45)}、6)病徴や標兆の外部微細構造の観察^{5, 8, 9, 14, 28, 42, 43)}などが挙げられる。このように広範囲の利用が可能になったのは、試料作製技術、とくに臨界点乾燥法^{2, 11)}が走査電顕にとりいれられたことが大きな要因と言えよう。

今日では、各種の生物試料を走査電顕で観察する場合、試料を固定・脱水・乾燥後、導伝性を与えるために、C, Au, Pd, Pt等の金属を加熱蒸着またはイオンスパッタリング蒸着し、観察するのが常法である。

しかしながら上記方法は、試料採集後観察までに比較的時間がかかるのが欠点といえよう。

最近 Plumbら(1972)³⁰⁾は小麦うどんこ病菌(*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*)で、Dayら(1973)⁷⁾および Kunohら(1975)²⁵⁾は大麦うどんこ病菌(*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*)で、それぞれ生葉を予備処理せずに、ただちに電顕観察し、分生胞子、分生子梗、菌糸等の比較的良好な像を得た。Dayら⁷⁾はうどんこ病菌のほか小麦の黒さび病菌(*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*)についても比較観察したが、黒さび病菌では菌体の変形がひどく良好な結果が得られなかったと報告した。

著者らは、他のうどんこ病菌でも無蒸着観察が可能なのかどうか、また不可能ならばどのような試料破損が起こるのかを確かめることを主目的として電顕観察

した。さらに比較のために若干の材料を固定・脱水・金属蒸着したものも、観察した。本論文はそれらについて得られた結果をとりまとめたものである。

材料および方法

本実験に供試したうどんこ病菌は、次のとおりである。

エンバクうどんこ病菌：

Erysiphe graminis de Candelle f. sp. *avenae*
em. Marchal

タバコうどんこ病菌：

E. cichoracearum de Candolle

オオバコうどんこ病菌：

E. cichoracearum de Candolle

キュウリうどんこ病菌：

Sphaerotheca fuliginea (Schlechtendahl)

Pollacci

メロンうどんこ病菌：

S. fuliginea (S.) Pollacci

カボチャうどんこ病菌：

S. fuliginea (S.) Pollacci

ゴボウうどんこ病菌：

S. fuliginea (S.) Pollacci

セイヨウバラうどんこ病菌：

S. pannosa (Wallr.) Lev.

マサキうどんこ病菌：

Microsphaera euonymi-japonicae Viennot-
Bourgin

クコうどんこ病菌：

M. lycii Lasch

サルスベリうどんこ病菌：

Uncinula australiana McAlpine

これらのうどんこ病菌は自然発病したものをその都

度採集し実験に供した。

観察方法は、罹病葉病斑部を数ミリ角の大きさに切り、ただちに走査電顕用試料台に導電性樹脂（ドータイト）で接着し、JSM-15 型走査電顕を使用し、加速電圧 15 KV で観察した。このような無蒸着試料のほか、若干の材料については常法により固定・脱水・金属蒸着したものを観察した。これらの方法については、その都度述べることにする。

実験結果および考察

エンバクうどんこ病菌 (*E. graminis* f. sp. *avenae*) では分岐した菌糸が宿主表面に伸長し、菌糸のところで付着器の形成が認められた (Figs. 1, 2)。分生子梗は菌糸よりほぼ直角に分岐し、その先端に分生胞子が鎖生しているのが認められた。この菌は観察途中でチャージアップによる胞子の収縮変形がかなり顕著で電子線に対して弱いように思われた。

タバコうどんこ病菌 (*E. cichoracearum*) はタバコ葉の表裏に縦横に伸びた菌叢上に多数の分生胞子を形成していた。分生胞子は、分生子梗上に 3~4 個鎖生しており、胞子表面は平滑であった (Figs. 3, 4)。このような材料を 5% グルタルアルデヒド固定後、エタノール脱水、臨界点乾燥装置で乾燥したものを Pt-Pd で加熱蒸着した試料では、菌糸の保存状態は比較的良かったが、無蒸着試料にくらべ分生胞子の脱落が多いように思われた。また胞子はいくぶん小さく、無蒸着試料の 70~80% のものが多かった (Fig. 5)。

オオバコうどんこ病菌は、タバコと同種の菌であり、胞子、菌糸ともタバコ葉上の菌と同様の像が得られた (Fig. 6)。

キュウリ、メロン、カボチャ、ゴボウのうどんこ病菌はいずれも *Sphaerotheca fuliginea* によって起こる。いずれの菌も菌糸よりほぼ垂直にでた分生子梗上に、分生胞子を形成しているのが観察された (Figs. 7, 8, 9, 10)。 *S. fuliginea* の無蒸着試料を比較するためにキュウリうどんこ病菌を 2% OsO₄ で 48 時間蒸気固定後、C-Au で加熱蒸着したもの、およびシリカゲルを入れたデシケータ内で 48 時間乾燥したものを同じく C-Au で加熱蒸着したものをそれぞれ観察した。前者は、菌糸の保存状態は比較的良かったが、分生子梗や分生胞子のほとんどが、収縮、変形していた (Fig. 11)。後者もほぼ同様で、完全な胞子は、ほとんど認められず、着生の様子を確かめることはできなかった (Fig. 12)。いずれの処理でも毛茸細胞や宿主表面は比較的しっかりしており、原形を保

っているものと思われた。

セイヨウバラのうどんこ病菌 (*S. pannosa*) は、ウリ類うどんこ病菌と同じ属であるが、分生子梗もしっかりしており、分生胞子の着生状態がよく認められた (Fig. 13)。

マサキおよびクコのうどんこ病菌 (*M. euonymi-japonicae*; *M. lycii*) の分生胞子は、いずれも長楕円、単生型であることが確かめられた (Figs. 14, 15)。

サルスベリうどんこ病菌 (*U. australiana*) は菌糸、分生子梗、分生胞子ともに良好な像が得られた (Fig. 16)。分生子梗は、菌糸よりほぼ直角に分岐し、隔膜も明瞭に認められ分生胞子が単生で着生しているのが確かめられた。

以上の結果から、用いた材料により若干の相違はあるが、いずれの材料でも菌叢の状態、分生胞子の着生状態が確かめられた。すなわち、うどんこ病菌の分生胞子は菌糸よりほぼ直角に分岐した分生子梗上に、単生または鎖生状態で着生していた。肉眼ではつきりうどんこ症状の認められる部分は、いずれの宿主でも菌糸が何層にも重なり合い、その上に多数の分生胞子の着生が認められた。このような無蒸着試料では、用いた菌の種類により程度が異なるが、試料を電顕内に入れ、電子線を照射した段階ですでに変形したもののがかなり認められた。また同一試料を長時間観察したり、高倍率 (1000 倍以上) で観察した場合に、試料の破損が認められた。このような像障害は、主として収縮像として認められ、胞子よりも菌子や分生子梗の方が顕著のようであった。

無固定、無蒸着試料を固定試料と比較したところ、グルタルアルデヒドで固定し、臨界点乾燥したものが菌糸の状態は最も良かったが、胞子の大きさが、他の観察法よりかなり小さくなっているように思われた。臨界点乾燥法では、固定・脱水・酢酸イソアミル置換までの過程は、試料の体積変化はなく、臨界点乾燥した後は、10% 近く試料は収縮するといわれているが²⁹⁾、本実験では 20~30% の収縮が認められた。またタバコうどんこ病菌のグルタルアルデヒド固定試料では、分生胞子の数が極端に少なく、本来鎖生であるのに単生状態で観察されることが多かった。これは固定、脱水の過程で大部分脱落したのではないかと思われる。

以上のことから、自然発病したうどんこ病菌の菌叢部分を走査電顕で観察する場合には無固定、無蒸着のものを用いても菌叢や分生胞子の着生状態などをよく把握でき、固定の方法によってはむしろ優れている場

合も認められた。また無蒸着試料とC-Au, Pt-Pd 蒸着試料の像質については、本実験ではあまり差が認められなかった。ただ無蒸着試料では、加速電圧 15 KV では良好な結果が得られたが、低加速電圧 4 KV では、明瞭な像が得られなかった。これは 2 次電子の発生に差があるためではないかと思われる。

生葉の無蒸着観察例としては、Plumb ら³⁰⁾、Day ら⁷⁾、Kunoh ら²⁵⁾ のほかに松田ら²⁶⁾ もピーマンうどんこ病菌 (*Leveillula taurica*) で比較的良好な結果を得ている。これらはいずれもうどんこ病菌であり、ほかの病原菌については報告されていない。著者らは、うどんこ病菌のほかにカモシグサさび病 (*Puccinia Agropyri* Eu et Ev.) の宿主上の孢子堆、およびカナリーヤシ立枯病³⁾ の導管内の菌糸を同様の方法で観察してみた。前者では若干の変形が認められたものの、葉表面の夏孢子が明瞭に観察され、後者では導管内に伸びている菌糸の状態が観察された。

以上述べたことから判断して、走査電顕による植物病原菌の無固定、無蒸着観察は、試料を電顕内に入れ観察するまでに生じるであろう収縮変形や、電子線による直接の損傷等による像障害などの欠点はあるが、罹病葉の菌叢の状態、孢子の着生状態などを短時間に観察したい場合には、十分実用に供しうるものと考えられる。

要 約

本実験は自然発病した数種うどんこ病菌を無固定、無蒸着により走査電顕で観察したものである。また 2～3 の菌については、グルタルアルデヒドや OsO₄ で固定後、脱水、乾燥、金属蒸着した。

供試した材料は 11 種の植物に寄生する 4 属 7 種である。すなわち、エンバクうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *avenae*)、タバコ、オオバコうどんこ病菌 (*E. cichoracearum*)、ゴボウ、キュウリ、メロン、カボチャうどんこ病菌 (*Sphaerotheca fuliginea*)、セイヨウバラうどんこ病菌 (*S. pannosa*)、マサキうどんこ病菌 (*Microsphaera euonymi-japonicae*)、クコうどんこ病菌 (*M. lycii*)、サルスベリうどんこ病菌 (*Uncinula australiana*) の自然発病葉を用いた。

得られた結果を要約すると以下のとおりである。

1. 生葉を無固定、無蒸着で観察した結果、菌糸、付着器、分生子梗、分生孢子などがあまり変形せずに認められた。すなわち分生子梗は菌糸よりほぼ直角に分岐し、その先端に楕円形の分生孢子が単生あるいは

鎖生状に着生していることが認められた。とくに、セイヨウバラやサルスベリのうどんこ病菌では分生子梗の分岐状態、隔膜の有無、孢子の着生が明瞭に認められた。エンバクうどんこ病菌では、葉表面の葉脈を横断するように菌糸が伸長しており、葉の凸出部に付着器が認められた。

3. グルタルアルデヒド固定・臨界点乾燥したものは、菌糸の変形もあまりなく、自然状態に近いと思われる像が観察された。しかしながら孢子の脱落が顕著で、孢子は 20～30% 収縮していた。

4. OsO₄ 蒸気固定、自然乾燥したものは、いずれも分生子梗や孢子が変形しており、実用にはならなかった。

5. 無蒸着試料と、Pt-Pd, C-Au などの金属を加熱蒸着したものの像質を比較観察したが、本実験で用いた倍率 (主として 300～500 倍) では、ほとんど同じで、金属蒸着しなくても観察には十分であった。

以上の結果から、走査電顕による無固定、無蒸着観察は、宿主植物葉上のうどんこ病菌の生育過程、孢子などの着生状態を知るには簡便な方法であることが確かめられた。

文 献

- 1) 赤井重恭・福富雅夫・稲継芳弘・白石雅也：日植病報, **34**, 177 (講演要旨) (1968)
- 2) Anderson, T. F.: *Trans. N. Y. Acad. Sci. Ser. II*, 130-134 (1951)
- 3) 荒井 啓・山本 明：鹿大農学術報告, **27**, 31-37 (1977)
- 4) Bisiach, M. and Locci, R.: *Riv. Patol. Veg. Ser. IV*, **8**, 127-136 [R. P. P., **52**, 530] (1972)
- 5) Bruehl, G. W. and Cunfer, B. M.: *Phytopathology*, **65**, 755-760 (1975)
- 6) Carling, D. E., Brown, M. F. and Millikan, D. F.: *ibid.*, **66**, 419-422 (1976)
- 7) Day, P. R. and Scott, K. J.: *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 433-435 (1973)
- 8) Dubin, H. J. and English, H.: *Phytopathology*, **65**, 542-550 (1975)
- 9) 橋岡良夫・三浦信行：日植病報, **39**, 206 (講演要旨) (1973)
- 10) 平塚直秀・金子繁：同上, **40**, 181 (講演要旨) (1974)
- 11) Horridge, G. A. and Tamm, S. L.: *Science*, **163**, 817-818 (1969)
- 12) 石川武丕・有本裕・高橋広治・本間保男・見里朝正：日植病報, **42**, 67 (講演要旨) (1976)
- 13) Ishizaki, H., Mitsuoka, K., Kohno, M. and Kunoh, H.: *Ann. Phytopath. Soc. Japan*,

- 41, 131-140 (1975)
- 14) Jonens, M. G. K.: *Physiol. Plant Pathol.*, **7**, 259-263 (1975)
- 15) Kinden, D. A. and Brown, M. F.: *Phytopathology*, **65**, 74-76 (1975)
- 16) Locci, R.: *Riv. Patol. Veg. Ser. IV*, **7**, 3-14 [R. P. P., **51**, 535] (1971)
- 17) ——— and Quaroni, S.: *ibid.*, **7**, 109-125 [R. P. P., **51**, 304] (1971)
- 18) ———, Minervini Ferrante, G. and Rodrigues, C. J.: *ibid.*, **7**, 127-140 [R. P. P., **51**, 374] (1971)
- 19) ———, and Quaroni, S.: *ibid.*, **7**, 141-160 [R. P. P., **51**, 120] (1971)
- 20) ———: *Riso*, **20**, 55-64 [R. P. P., **51**, 1453] (1971)
- 21) ———: *ibid.*, **20**, 225-233 [R. P. P., **51**, 1468] (1971)
- 22) ———: *Riv. Patol. Veg. Ser. IV*, **8**, 172 [R. P. P., **53**, 846] (1972)
- 23) ——— and Bisiach, M.: *ibid.*, **8**, 239-249 [R. P. P., **52**, 3866] (1972)
- 24) ——— and Quaroni, S.: *ibid.*, **8**, 253-320 [R. P. P., **52**, 3969] (1972)
- 25) Kunoh, H., Watanabe, T., Yamada, M. and Nagatani, T.: *Trans. Microl. Soc. Japan*, **16**, 361-365 (1975)
- 26) 松田 泉・高橋広治・本間保男・見里朝正: 日植病報, **42**, 342 (講演要旨) (1976)
- 27) Moline, H. E. and Pollack, F. G.: *Phytopathology*, **66**, 669-674 (1976)
- 28) 西沢良一: 日植病報, **42**, 223-227 (1976)
- 29) 大隅正子: 細胞, **7**, 99-117 (1975)
- 30) Plumb, R. J. and Turner, R. H.: *Trans. Br. Myc. Soc.*, **59**, 149-150 [R. P. P., **52**, 1092] (1972)
- 31) Pring, R. J. and Richmond, D. V.: *Physiol. Plant Pathol.*, **8**, 155-162 (1976)
- 32) Rogers, J. D. and Noskowiak, A. F.: *Phytopathology*, **66**, 25-27 (1976)
- 33) Shearer, B. L., Zeyen, R. J. and Ooka, J. J.: *ibid.*, **64**, 163-167 (1975)
- 34) 白石雅也・山本茂博・浅田泰次: 日植病報, **41**, 106 (講演要旨) (1975)
- 35) ———・坂本和成・永谷隆・日高洋: 同上, **41**, 24-32 (1975)
- 36) Staub, T., Dahmen, H. and Schwinn, F. J.: *Phytopathology*, **64**, 364-372 (1975)
- 37) 高橋広治・古田 力: 日植病報, **40**, 182 (講演要旨) (1974)
- 38) ———・———: 同上, **41**, 69-72 (1975)
- 39) ———・浅賀宏一・古田 力: 同上, **41**, 81 (講演要旨) (1975)
- 40) ———・山田昌雄: 同上, **42**, 66 (講演要旨) (1976)
- 41) 竹内昭士郎: 同上, **42**, 49-52 (講演要旨) (1976)
- 42) 田中欽二・野中福次: 日菌報, **16**, 416-419 (1975)
- 43) Tu, J. C.: *Phytopathology*, **65**, 447-454 (1975)
- 44) Welch, B. L. and Martin, N. E.: *ibid.*, **63**, 1420-1422 (1973)
- 45) ——— and ———: *ibid.*, **64**, 1541-1546 (1974)
- 46) Wynn, W. K.: *ibid.*, **66**, 136-146 (1976)

Summary

In this paper, scanning electron micrographs of various powdery mildews were reported. Naturally infected leaves were used and observed without any pre-treatment. Some materials, sometimes, were fixed with 5% glutaraldehyde or 2% osmiumtetroxide vapour and dehydrated with ethanol series and critical point drying. Such treated materials were coated with carbon-gold or platinum-palladium.

The materials used are as follows: oat (*Erysiphe graminis* de Candolle f. sp. *avenae* em. Marchal); tobacco and plantain (*E. cichoracearum* de Candolle); cucumber, melon, squash and burdock (*Sphaerotheca fuliginea* (Schlechtendahl) Pollacci); rose (*S. pannosa* (Wallr.) Lev.); Japanese spindle tree (*Microsphaera euonymi-japonicae* Viennot-Bourgin); boxthorn (*M. lycii* Lasch); grape myrtle (*Uncinula australiana* McAlpine).

The results are summarized as follows:

1. Hyphae, appressoria, conidiophore and conidia were observed with little deformation in the tissues without pre-treatment. Namely, hyphae were ramified and conidiophore arose nearly rectangularly as short branches from hyphae. Oval conidium or chain-like conidia were attached at the head of conidiophore respectively. In the leaves of rose and grape myrtle, the forms of ramifying hyphae, septa of conidiophore and conidia were especially clear. It was clearly recognized that ramifying hyphae attached to the epidermis by paired appressoria on oat leaves.

2. In the tissues fixed with glutaraldehyde and dehydrated with ethanol and critical point drying, hyphae were observed as fairly clear figures without deformation. However, the co-

nidia size was smaller than the fresh materials with no pre-treatment about by 20-30 percent and many conidia had fallen off from conidiophore.

3. In the tissues fixed with osmiumtetroxide vapour and dried naturally, hyphae, conidiophore and conidia were almost deformed.

4. Details of fungi were well remained in the specimen without metal coating. The results were the same, compared with the specimen coated with carbon-gold or platinum-palladium.

In these results, various stages of powdery mildews were clearly observed under scanning electron microscopy. Therefore, it was ascertained that this method without pre-treatment was to be utilized for investigating the development of hyphae, either in germinating or attaching forms of conidia and microflora, on the diseased leaves.

Explanation of plates

Scanning electron micrographs of various powdery mildews. Materials were used naturally infected leaves and observed almost without pre-treatment. Bar in each figure shows 20 μ m.

Plate I

- Fig. 1. Oat (*Avena sativa* L.) infected with *Erysiphe graminis* f. sp. *avenae*. Ramifying hyphae and conidiophore.
- Fig. 2. Ditto. Ramifying hyphae and paired appressoria.
- Fig. 3. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L. var. Bright Yellow) infected with *E. cichoracearum*. Crossing hyphae and conidia.
- Fig. 4. Ditto. High magnification of conidia.
- Fig. 5. Ditto. Tissues were fixed with 5% glutaraldehyde and used a critical point drying apparatus and coated with platinum-palladium. Crossing hyphae and conidia. Conidia were shrunk about 20-30%.
- Fig. 6. Plantain (*Plantago asiatica* L.) infected with *E. cichoracearum*. Hyphae and conidia. A germinating conidium was observed.
- Fig. 7. Burdock (*Arctium Lappa* L.) infected with *Sphaerotheca fuliginea*. Conidiophore and conidia.
- Fig. 8. Melon (*Cucumis Melo* L. var. *albida* Kitamura) infected with *S. fuliginea*. Conidiophore and conidia.

Plate II

- Fig. 9. Squash (*Cucurbita moschata* Durh. var. *Toonas* Makino) infected with *S. fuliginea*. Conidiophore and conidia.
- Fig. 10. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) infected with *S. fuliginea*. Conidiophore and conidia.
- Fig. 11. Ditto. Tissues were fixed with OsO₄ vapour and coated with carbon-gold. Deformed conidiophore and conidia.
- Fig. 12. Ditto. Tissues were naturally dried and coated with carbon-gold. Deformed conidiophore.
- Fig. 13. Rose (*Rosa hybrida* Hort.) infected with *S. pannosa*. Ramifying hyphae, conidiophore and conidia.
- Fig. 14. Japanese spindle tree (*Euonymus japonica* Thunb.) infected with *Microsphaera euonymi-japonicae*. Conidiophore and conidia.
- Fig. 15. Boxthorn (*Lycium chinense* Mill.) infected with *M. lycii*. Conidiophore and conidia.
- Fig. 16. Grape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.) infected with *Uncinula australiana*. Ramifying hyphae, conidiophore and conidia.



