島根大農研報 (Bull. Fac. Agr. Shimane Univ.) 24 : 28−38, 1990

うどんこ病菌によるキュウリ葉緑体の形態変化

野　津　幹　雄*

Morphological changes of chloroplasts in cucumber leaves infected with *Sphaerotheca fuliginea*

Mikio Nozu

Morphological changes of chlorplasts in cucumber leaves inoculated with *Sphaerotheca fuliginea* were observed by means of an electron-microscope (Hitachi HU 12-A). Both the infected and uninfected tissues were fixed with 6.25% glutaraldehyde solution for 4 hours and then with 1% osmium tetraoxide solution for 4 hours. In chloroplasts of the uninfected tissues, chloroplast membrane (double membrane), developed granum stack (grana thylakoids) and storomal thylakoid were clearly observed. Starch grains and osmiophilic globules in stroma (Figs. 3 and 4) became more large with aging (Figs. 5-8). However, large differences in the morphological change of choloroplasts were recognized between the uninfected and infected leaves. In the leaves of a week after inoculation, chloroplasts swelled and then contracted (Figs. 9 and 10). Osmiophilic globules enlarged significantly two weeks after inoculation (Figs. 11 and 12). On the contrary, starch grains were not observed (Figs. 13 and 14). Furthermore, the irregular arrangement and the swelling of grana thylakoids were also occurred. As shown in Figs. 13 and 14, at this stage, disintegration of chloroplast membranes were still not occurred (Fig. 14). Such morphological changes in chloroplasts were also recognized in infected cucumber cotyledons (Figs. 1 and 2).

はじめに

病原体により植物組織細胞は種々の反応を示す．細胞では，核，葉緑体，ミトコンドリア，ペルオキシソーム等が相互に関連しながら，それぞれの機能を分業している．各種病原体による植物細胞の変化については電子顕微鏡で観察されており，細胞内器官の形態変化についても報告があるが電顕写真としては不明瞭なものもあり，まだ問題は残されている．現在，生物の電子顕微鏡試料作成法はルーチン化されており，電子顕微鏡も扱い易くなっている．しかし，健全だと思われる細胞を取り扱いながら，何らかの原因で微細構造が観察できない場合もある．例えば，葉緑体膜は二重膜であることは判っているのに，それが明瞭でない写真や葉緑体の一部分を提示したものもある．電顕試料成作法は生細胞について検討されており，病細胞や死細胞を取り扱う場合は充分な配慮が必要であろう．

筆者は植物体上における病原体や感染に伴う植物細胞内器官の形態変化をさらに明確にしたいと考えている．種々の罹病組織に見られるように，筆者が今まで扱った各種罹病組織においても葉緑体の変化が目立つ．そこで超薄切片が作成しやすく，組織に病原体を接種しても急速な細胞死を起こさず，葉緑細胞に病原体が侵入しない材料の一例としてキュウリうどんこ病菌を接種したキュウリ葉葉緑体の形態変化について観察した．不備な点も多いが，今までに得られた結果について述べる．本研究にご協力いただいた研究室の各位に謝意を表する．

実験材料と方法

キュウリうどんこ病菌［*Sphaerotheca fuliginea* (Schlechtendahl) Pollacci］は自然発生したキュウリ

＊　植物病理学研究室

葉より採取し，キュウリに植え継いで接種源とした．うどんこ病菌に感受性のあるキュウリ（品種　四葉）の種子を一晩水に浸漬し，ピートモスを入れたポットに播種し，成育させた．完全に展開した第2葉に筆を用いて接種し，12時間，20Cの暗所に放置した．それ以降は温室で育てた．接種後1週間，2週間，3週間目の罹病葉ならびにそれに対応する健全葉を供試した．なお，播種後1週間目の子葉にも接種し，1週間目，2週間目の罹病子葉を供試した．

試料は 1×5 mm 程度の組織片にし，6.25%グルタールアルデヒドーリン酸緩衝液 (pH 7.3) で4時間，1%オスミウム酸ーリン酸緩衝液（pH 7.3）で4時間固定し，エタノール系列で脱水した．脱水後プロピレンオキサイドに置換し，樹脂 (Epok 812：46.2 mℓ, DDSA：28.3 mℓ, MNA：25.6 mℓ, DMP-30：1.5 mℓ)[1] に包埋した．超薄切片はガラスナイフ（厚さ 6 mm）を用いウルトラミクロトーム (Porter-Blum MT 2-B) で作成した．超薄切片は50%エタノール・ウラニールアセテート飽和溶液で1時間，クエン酸鉛で15分間二重染色し，カーボン補強し，日立 HU-12 A 型電子顕微鏡 (75 KV) で観察した．

結　　果

罹病子葉の葉緑体：接種後1週間目の子葉の葉緑体（図1）は葉緑体膜（二重膜）で取り囲まれているのが明瞭で，でんぷんを持ち，グラナチラコイド，マトリックスチラコイドは明瞭で，好オスミウム性顆粒が存在しており，後述する展開健全葉葉緑体（図4）に比較してほとんど変化がない．ただし，葉緑体内の周縁部に膨化したチラコイドが観察された．

接種後2週間目の子葉の葉緑体（図2）も葉緑体膜で取り囲まれていた．葉緑体内にはでんぷん（粒）は認められず，グラナチラコイドの層は減少し，配列も乱れていた．しかし，チラコイドはほとんど膨潤していなかった．好オスミウム性顆粒は極端に大きくなり，その数も増加した．

健全葉葉緑体の変化：植物の葉は展開後も熟成(加齢)しながら機能しているから，その細胞の働きも変化し，葉緑体の形態も変化することが考えられる．図3は展開したばかりのキュウリ健全葉の柵状組織細胞である．図3では核が細胞の中央に存在しているが，一般に細胞の大部分は発達した液肥，いわゆる中央液肥によって占められており，細胞質部分は細胞壁に接して存在する．このこともあって，葉緑体は細胞の周辺部に存在する．また，葉緑体に近接してミトコンドリアやペルオキシソーム（図4の PE）が存在する結果になる．葉緑体は葉緑体膜（二重膜）で囲まれており，マトリックス内には発達したグラナ・スタックが認められた．図4に示されるようにグラナチラコイドは30層にも重なっている場合もあった．またほとんどの葉緑体にはでんぷん粒が認められ，直径 0.18 μm 程度の好オスミウム性顆粒が認められた．キュウリ葉は展開後日数を経るに従って，葉緑体にはでんぷん粒が占める割合が高くなり，チラコイド構造は葉緑体の周縁部へ押しやられた形になる(図5・6)．また好オスミウム性顆粒はいくらか大きくなり(直径0.4 μm)，展開後3週間目の葉緑体はアミロプラストに近い形態になるものもあった（図7・8）．同一視されがちな葉組織細胞の形態や機能は生育の時期によって異質であることが明らかである．

罹病葉葉緑体の変化：*Sphaerotheca fuliginea* は表皮細胞に吸器を挿入するのみで，葉緑細胞には侵入しないが（気孔孔辺細胞には葉緑体があるが，表皮細胞には葉緑体はない.），図4・6・8に示されるような健全葉の葉緑体は本菌の感染に伴い変化する．接種後2週間目の第2葉組織の葉緑体はいくぶん膨化し，でんぷん粒は減少し，好オスミウム性顆粒の数と大きさは共に増加していた．葉緑体膜とグラナチラコイドには特別な変化は認められなかった（図9・10）．接種後2週間目第2葉組織の葉緑体も膨化していた．でんぷん粒の蓄積は展開後2週間目の健全葉のそれに比較して少なく，好オスミウム性顆粒の数，大きさ（直径 0.8 μm）共に増加した．好オスミウム性顆粒は葉緑体の体積のほぼ20%を占める場合もあった（図11)．葉緑体膜は内外膜の間隔が大きくなった部分，不明瞭な部分もあり，グラナチラコイドの膜間隔が広くなる場合もあった（図11・12)．接種後3週間目の第2葉組織の葉緑体は全体的に収縮しているようである．葉緑体内にはでんぷん粒は観察できなかった．好オスミウム性顆粒は極端に大きくなるものもあった（直径 1 μm 程度)．展開後2週間目（図6)，3週間目（図7）の健全葉葉緑体に比較して極端に変化していることが判る．グラナチラコイドの配列の乱れ，チラコイドの膨化が認められる．葉緑体の内膜と外膜の間隔が拡大している葉緑体や葉緑体膜の一部が消失しているものもあった（図13・14)．

以上図示したように本病罹病組織の葉緑体の変化としては，グラナチラコイドの配列の乱れ，チラコイドの膨化，それに並行して好オスミウム性顆粒の数と大きさの顕著な増加ならびにでんぷん粒の大きさの減少につぐ消失が特徴である．また葉緑体変化のプロセスとしては全体の膨化につぐ収縮，グラナチラコイドの配列の乱れ，

チラコイドの膨化，葉緑体膜の内外膜間の拡大，外膜の消失，葉緑体膜の崩壊ということになる．これらの変化は単独に起こるものではなく，相互に関連あるいは並行しているであろう．また図14からも判るように，葉緑体内の変化は葉緑体膜が崩壊する前に起っていることが明瞭である．

考　　察

展開後のキュウリ葉の葉緑体は加齢に伴ってでんぷんが蓄積し，チラコイドは葉緑体の周縁部に局在するようになり，好オスミウム性顆粒はいくぶん大きくなる．すなわちキュウリ葉では展開後，それぞれの細胞は経時的に変化していると言える．このような健全葉の葉緑体は，うどんこ病菌接種により，全く異った形態に変化する．

接種後1週間目には健全葉の葉緑体のようにでんぷん粒を持っているが（図9・10），徐々にでんぷん粒が消失し（図11・12），それに伴い，好オスミウム性顆粒の大きさと数の増大，グラナチラコイドの配列の乱れ（図11），チラコイドの膨化が認められた（図12）．図13に見られるように，でんぷん粒の消失に伴って，好オスミウム性顆粒の形が極端に大きくなることやチラコイドの配列の乱れや膨化は本病によるキュウリ葉緑体の変化の特徴であると言える．このような葉緑体の変化は葉緑体膜（二重膜）の崩壊以前に起った現象であることが判った（図14）．葉緑体に一番近いのは細胞質である．本実験の結果より，病原体（うどんこ病菌）による細胞質の変化が極めて緩慢であることや葉緑細胞は病原体が侵入しないにもかかわらず異常になることが判った．

植物の罹病組織は解剖学的に光顕で観察され，化学的にも分析された．植物病理学の立場から検討された形態的異常の電子顕微鏡観察の結果もあるが，それでも生物学的に病気について理解することは困難である．すなわち病的現象は機能面と形態面の研究により捕えられるはずで，より一層正確な結果が必要である．

病原体による植物の奇形組織の超薄切片においても異常と思われる葉緑体をしばしば観察した．すなわち，グラナチラコイドが未発達な葉緑体[2]，でんぷん粒を持つ葉緑体，アミロプラスト様の葉緑体[3]などを観察したが，典型的病徴を示した段階までには葉緑体膜やグラナチラコイドの崩壊等の変化は認められなかった．

白さび病菌とカラシナ・タカナ・ワサビ[4]，べと病菌とキュウリ葉[5]，イネごま葉枯病菌とイネ葉[6]，疫病菌とジャガイモ葉[7]，灰色かび病菌とキュウリ葉[8]等の関係においても葉緑体の変化について観察されており，大きな好オスミウム性顆粒が形成されるものもある．図4では切片が汚染されている．図9－12では膜系はよく観察できるが，好オスミウム性顆粒の染色が不充分である．今後植物病理学分野においては物質レベルでの解析が要求されるので，それに対応できる詳細かつ正確な病組織の細胞内器官の形態観察が必要である．

摘　　要

病原体による植物細胞の形態変化についてはすでに多くの報告があるが，さらに観察する必要があると考える．ここでは，その植物細胞に病原体が侵入していない細胞の病的変化を検討する目的で，完全に展開したキュウリ（品種　四葉）の第2葉に *Sphaerotheca fuliginea* を接種し，1，2，3週間後の罹病組織とそれに対応する健全葉組織の超薄切片を観察した．接種後1週間目，葉緑体はいくぶん膨化し，でんぷん粒は減少し，好オスミウム性顆粒の数と大きさが増加した．葉緑体膜とチラコイドには特別な変化がなかった．2週間目，でんぷん粒は健全葉のそれに比較して少なく，好オスミウム性顆粒の数と大きさは共に増加し，葉緑体の体積の20%にも及ぶものもあった．葉緑体膜，チラコイドの膜間隔が広くなる場合もあった．3週間目の葉緑体は全体的に収縮しているようである．でんぷん粒は消失し，好オスミウム性顆粒は極端に大きくなった．グラナチラコイドの配列の乱れと膨化が認められた．葉緑体膜の内膜と外膜の間隔が拡大し，一部が消失しているものもあった．このような葉緑体の変化は子葉においても認められたので，子葉は今後の実験に使用できると考えた．いずれにしろグラナチラコイド，ストローマチラコイド，好オスミウム性顆粒，でんぷん粒などの変化は葉緑体膜が崩壊する以前に生じた現象である．また葉緑体の形態変化の原因はその葉緑体が接している細胞質に関係していると推測した．

引用文献

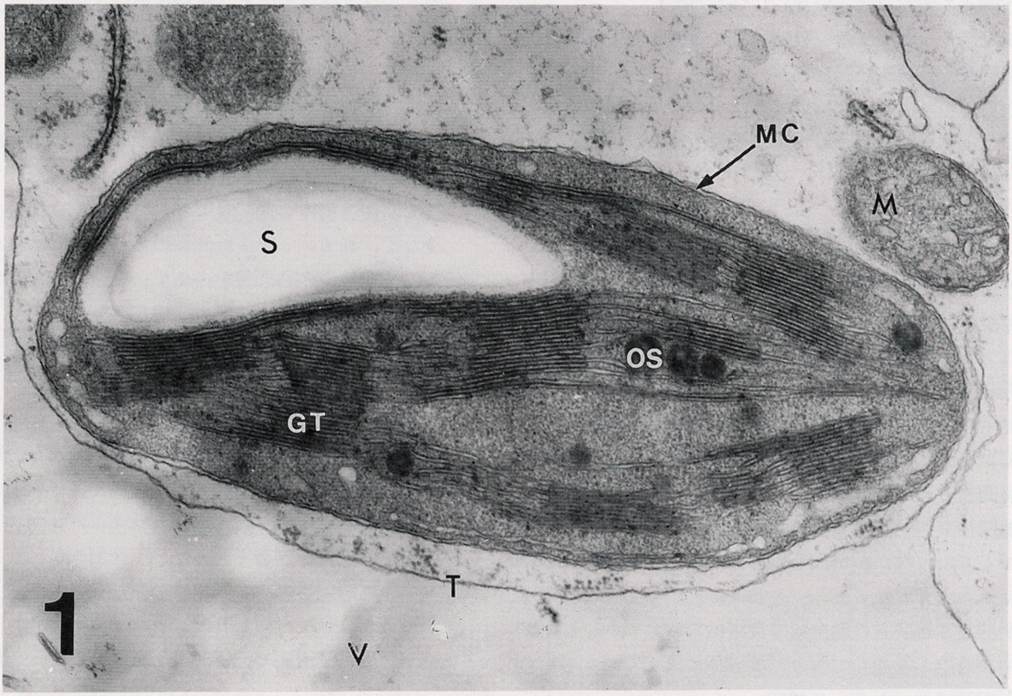
1. 野津幹雄・城野洋一郎・糸井節美：細胞　**10**：534–542，1978.
2. 野津幹雄・山本昌木：日植病報　**38**：1–3，1972.
3. 野津幹雄・山本昌木：島根大農研報　**5**：23–27，1971.
4. 野津幹雄・糸井節美・豊嶋洋悦・城野洋一郎：島根大農研報　**12**：46–53，1978.
5. 梶原敏宏：農技研報告　C **23**：63–91，1969.
6. 堀野　修：電子顕微鏡によるイネごま葉枯病の病理解剖学的研究，とくに病原菌と寄主細胞の微細構造

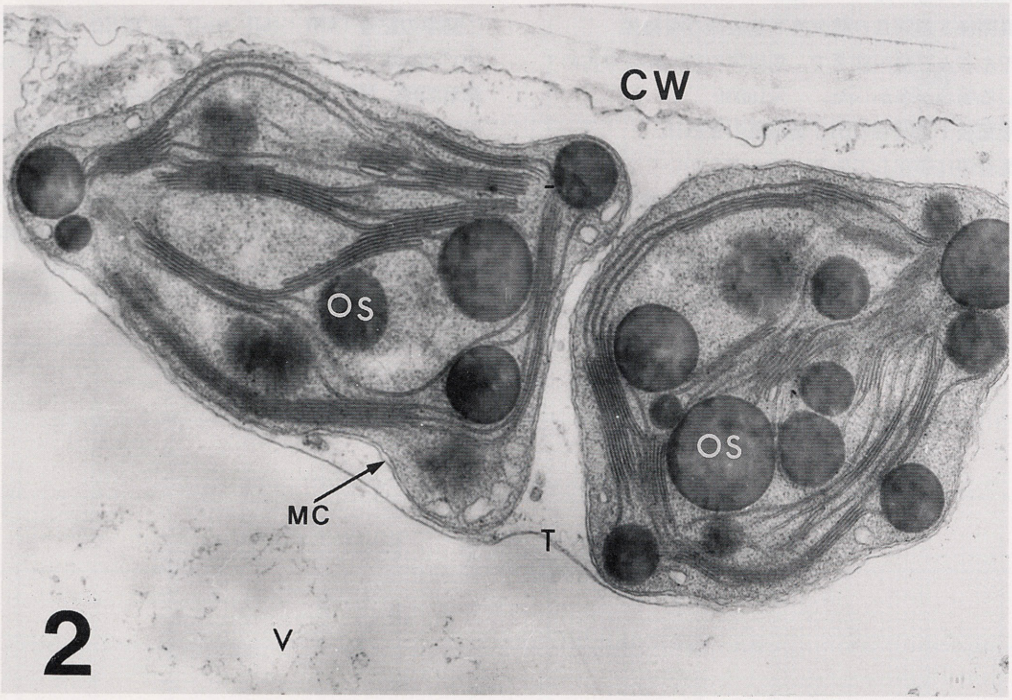
に関する観察（学位論文）1-136, 1971.
7. 山本昌木・野津幹雄・荒瀬　栄・重光善弘：島根大農研報　**9**：12-15, 1975.
8. 白石雅也：灰色かび病菌（*Botrytos cinerea Per.*）の寄主体感染に関する電子顕微鏡的研究（学位論文）1-114, 1972.

図の説明

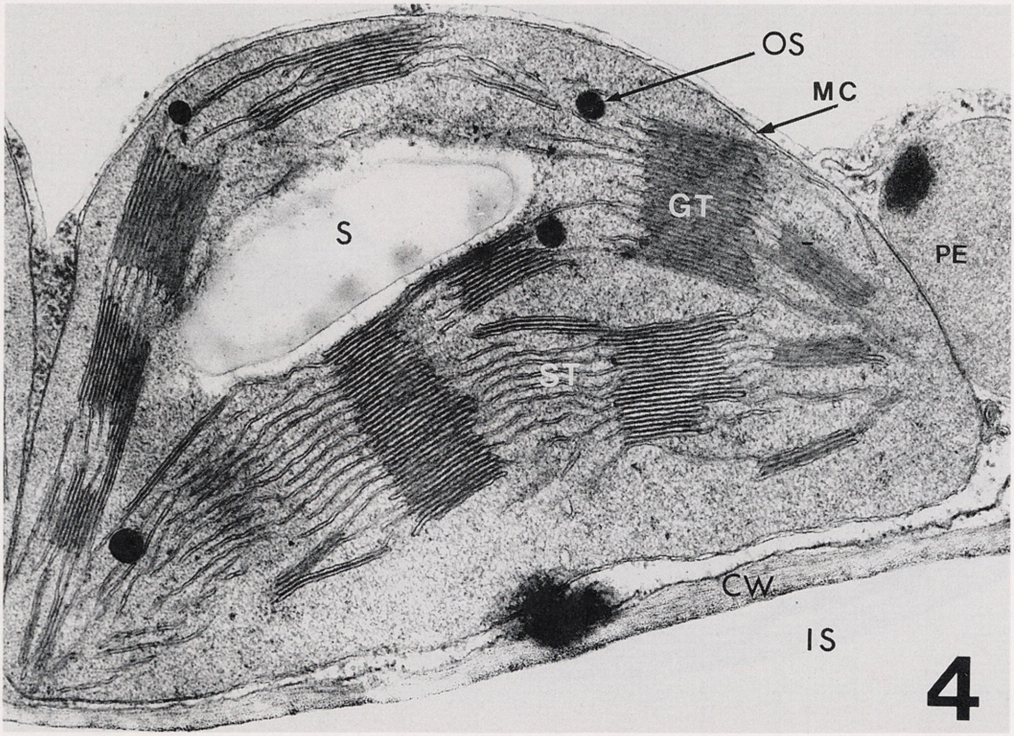
1. うどんこ病菌分生胞子接種後1週間目の子葉組織の葉緑体.　×28000
2. うどんこ病菌分生胞子接種後2週間目の子葉組織の葉緑体.　×25000
3. 完全に展開した健全第2葉組織細胞.　×6300
4. 完全に展開した健全第2葉組織の葉緑体.　×27000
5. 展開後2週間目の健全第2葉組織細胞.　×7700
6. 展開後2週間目の健全第2葉組織の葉緑体.
でんぷん（粒）が増加し，好オスミウム性顆粒もいくぶん大きくなった.　×23000
7. 展開後3週間目の健全第2葉組織細胞.
中央液胞が発達しており，葉緑体にはでんぷん蓄積が顕著であった.　×4600
8. 展開後3週間目の健全第2葉組織の葉緑体.
でんぷん蓄積が顕著で，葉緑体の70～80％を占めている場合が多かった.　×18000
9. 接種後1週間目の第2葉組織の葉緑体.
葉緑体は膨化しており，でんぷんがいくぶん減少し，好オスミウム性顆粒の数，大きさ共に増加した.　×18000
10. 接種後1週間目の第2葉組織の葉緑体.
図9とほぼ同じである．葉緑体膜は不明瞭な部分もあるが，グラナチラコイドには変化は認められなかった.　×27000
11. 接種後2週間目の第2葉組織の葉緑体.
葉緑体は膨化しており，葉緑体膜の内外膜の間隔が広がったもの，外膜が不明瞭なものもあった.
でんぷん蓄積は2週間目の健全葉のそれに比較して少なく，好オスミウム性顆粒の数，大きさ共に増加し，葉緑体中の約20％を占めていた.　×23000
12. 接種後2週間目の第2葉組織の葉緑体.
グラナチラコイドの間隔が広がっている場合もあった.　×27000
13. 接種後3週間目の第2葉組織の葉緑体.
葉緑体は収縮しており，葉緑体膜は外膜が部分的に消失したり，内外膜の間隔が拡大した．ほとんどの葉緑体で，でんぷん粒は認められず，好オスミウム性顆粒の増大が顕著であった.　×24000
14. 接種後3週間目の第2葉組織の葉緑体.
グラナチラコイドの乱れ，チラコイドの膨化，ストローマの電子密度の低下が認められた.　×24000

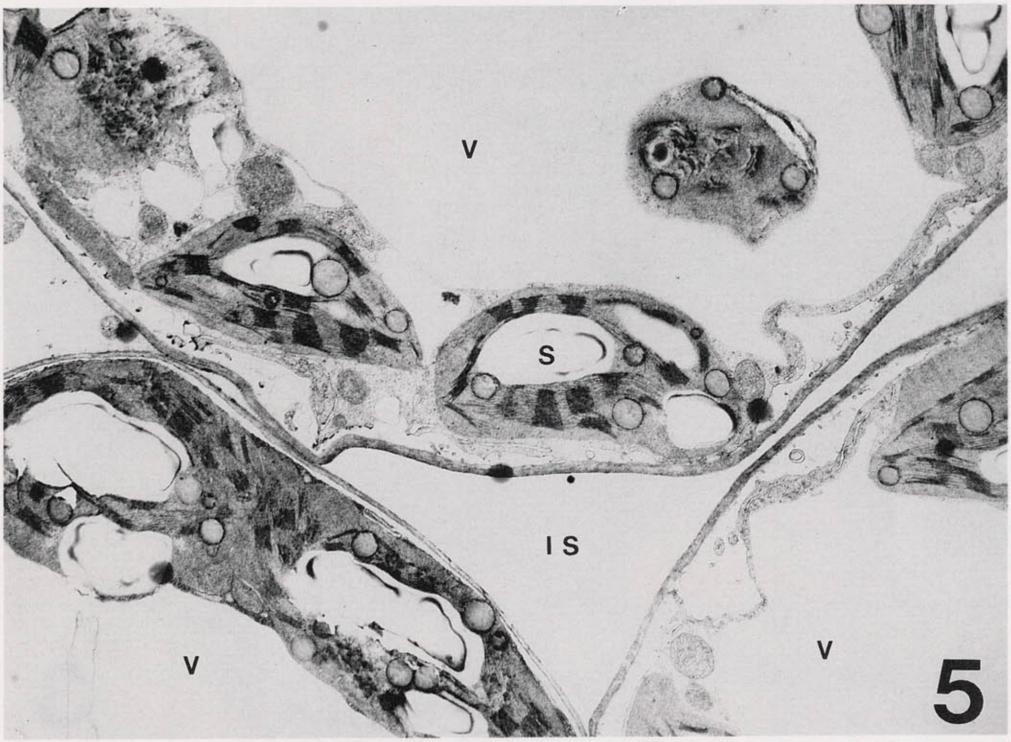
図中の記号：**CW**：cell wall 細胞壁，**GT**：grana thylakoid グラナチラコイド，**IS**：inter cellral space 細胞間隙，**MC**：chloroplst membrane 葉緑体膜，**N**：nucleus 核，**NO**：nucleolus 仁，**OS**：osmiophilic globule 好オスミウム性顆粒，**PE**：peroxisome ペルオキシソーム，**S**：starch grain でんぷん粒，**ST**：storomal thylakoid ストローマチラコイド，**T**：tonoplast トノプラスト，**V**：central vacuole 中央液胞

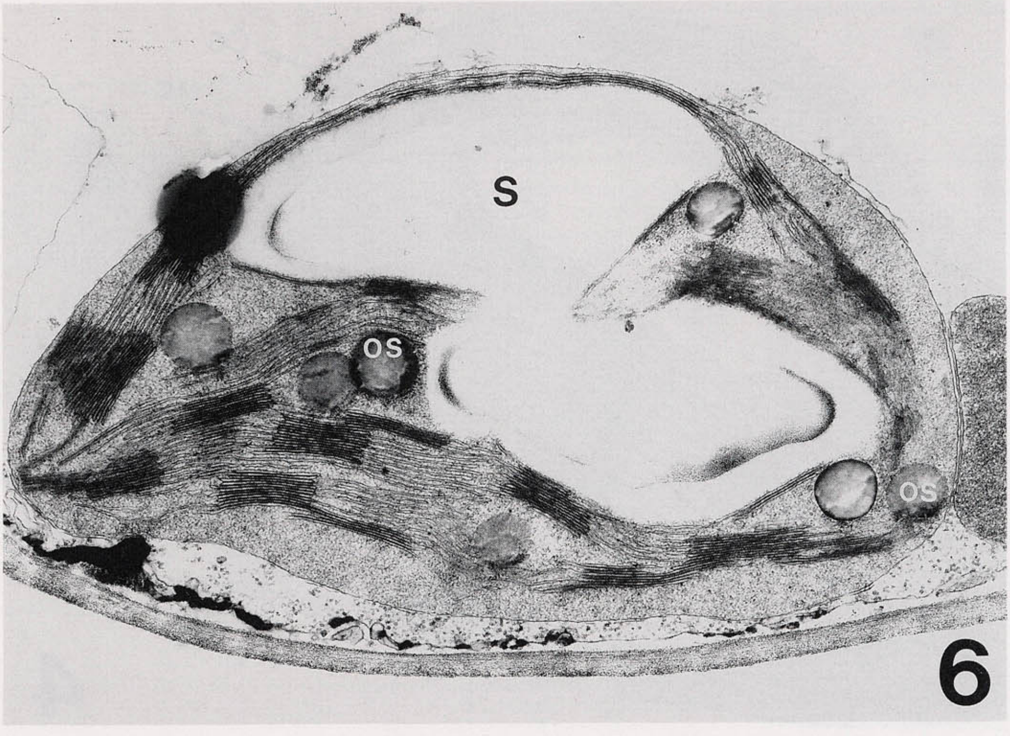

MC
M
S
OS
GT
T
1
V

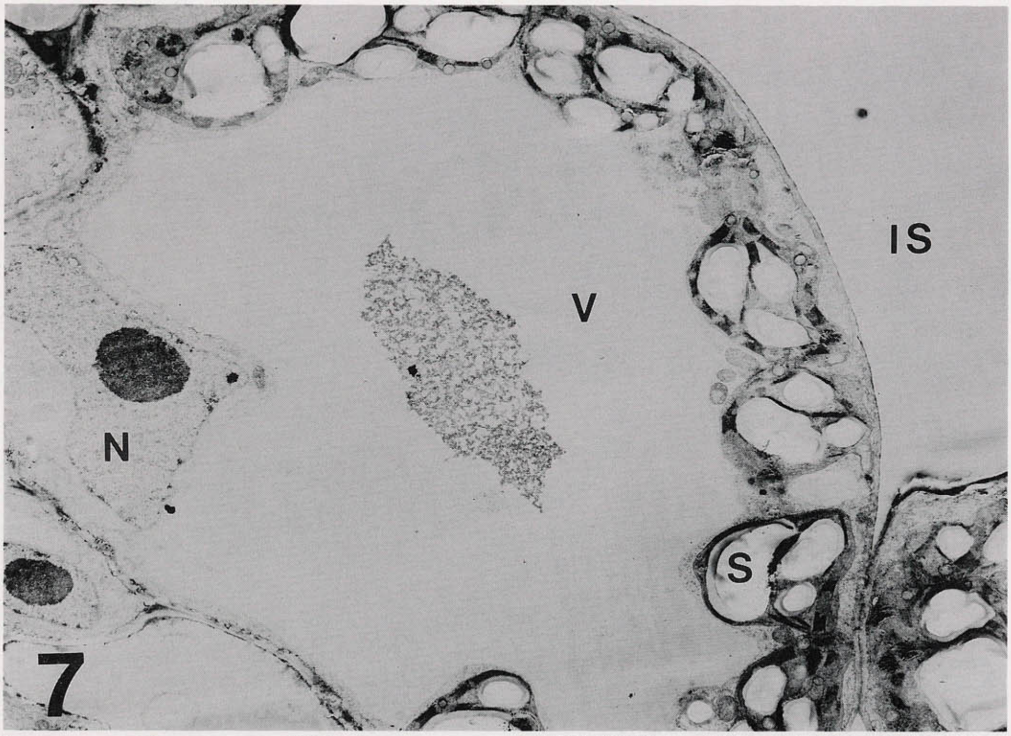

CW
OS
OS
MC
T
2
V

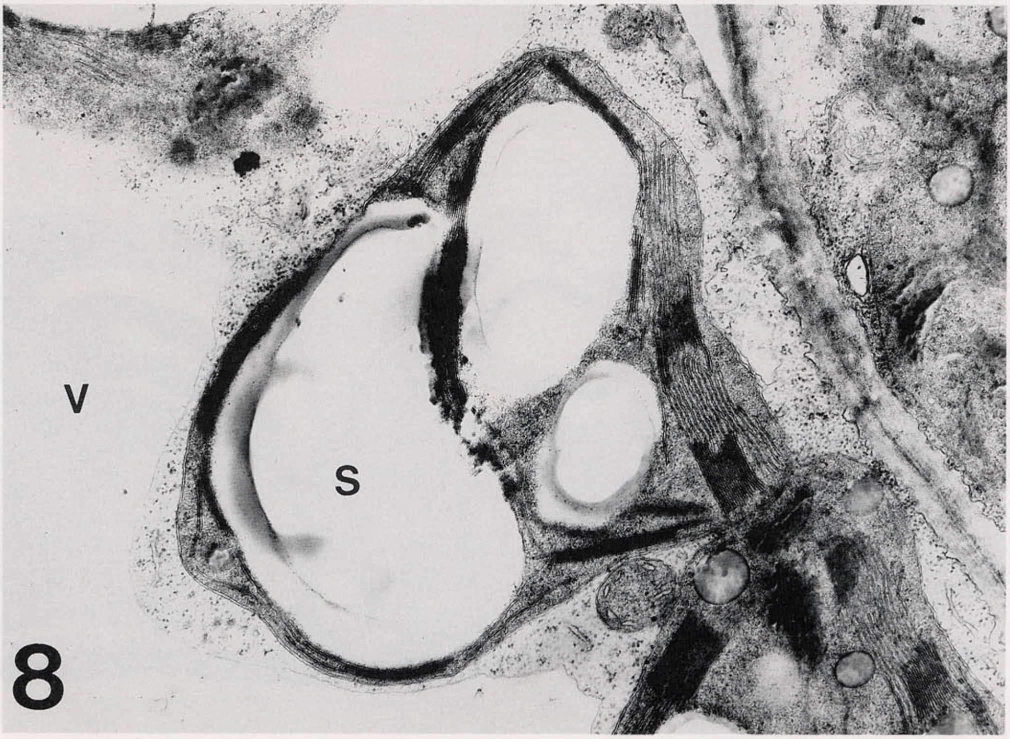
IS
S
V
N
NO
S
V
3

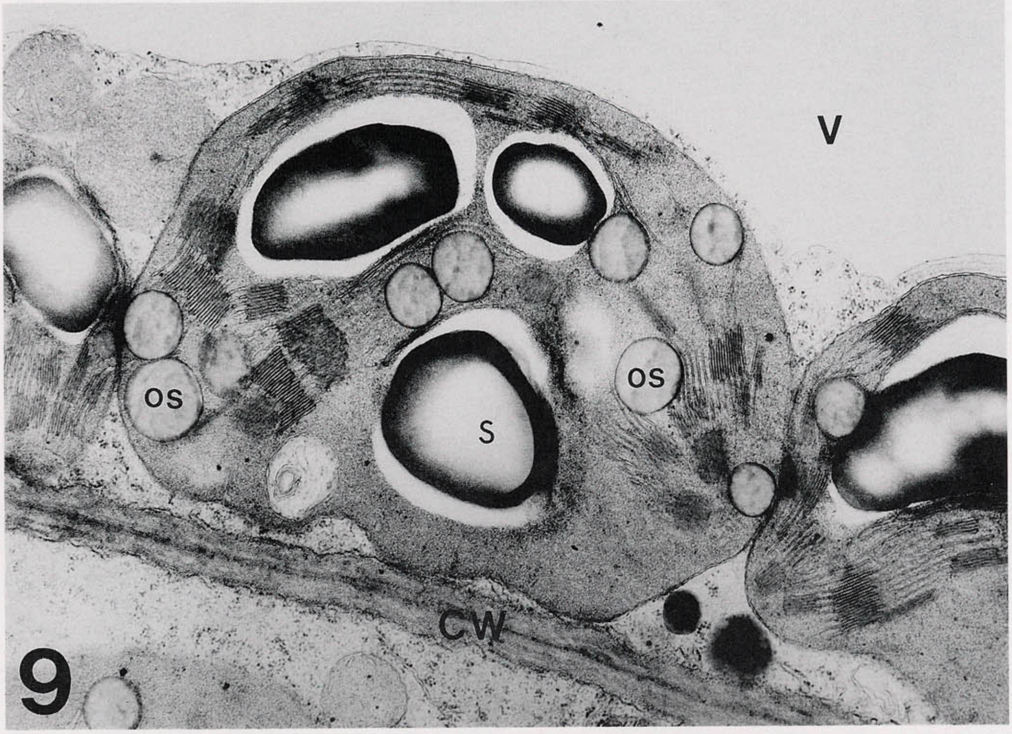

OS
MC
GT
S
PE
ST
CW
IS
4

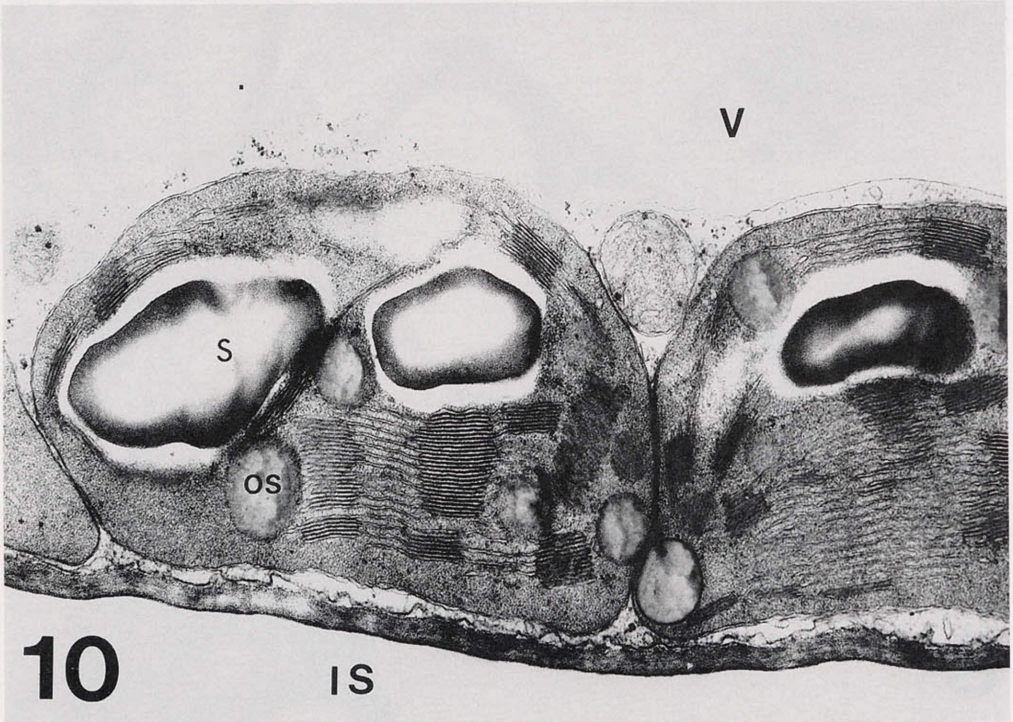

V
S
IS
V
V
5

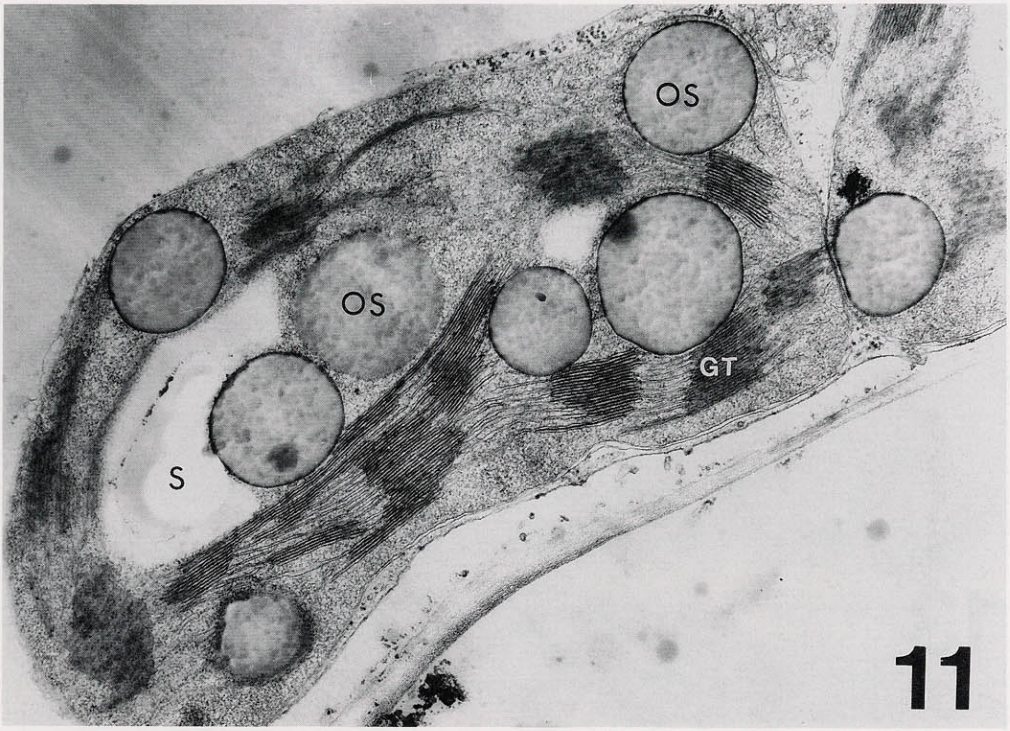

S
OS
OS
6

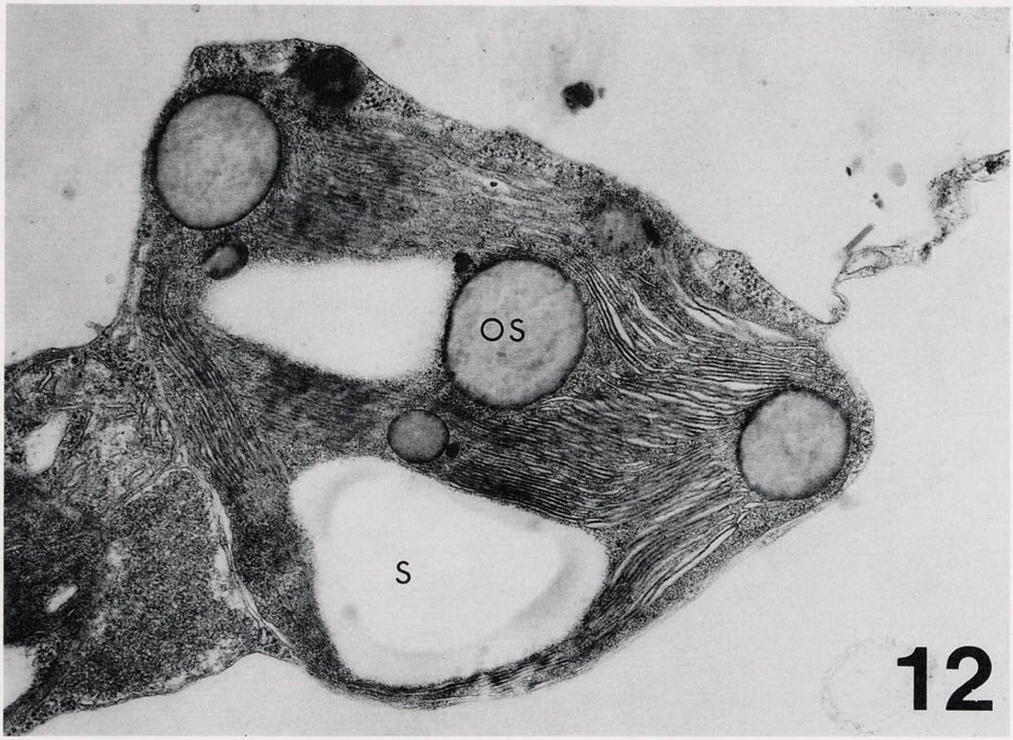

IS
V
N
S
7

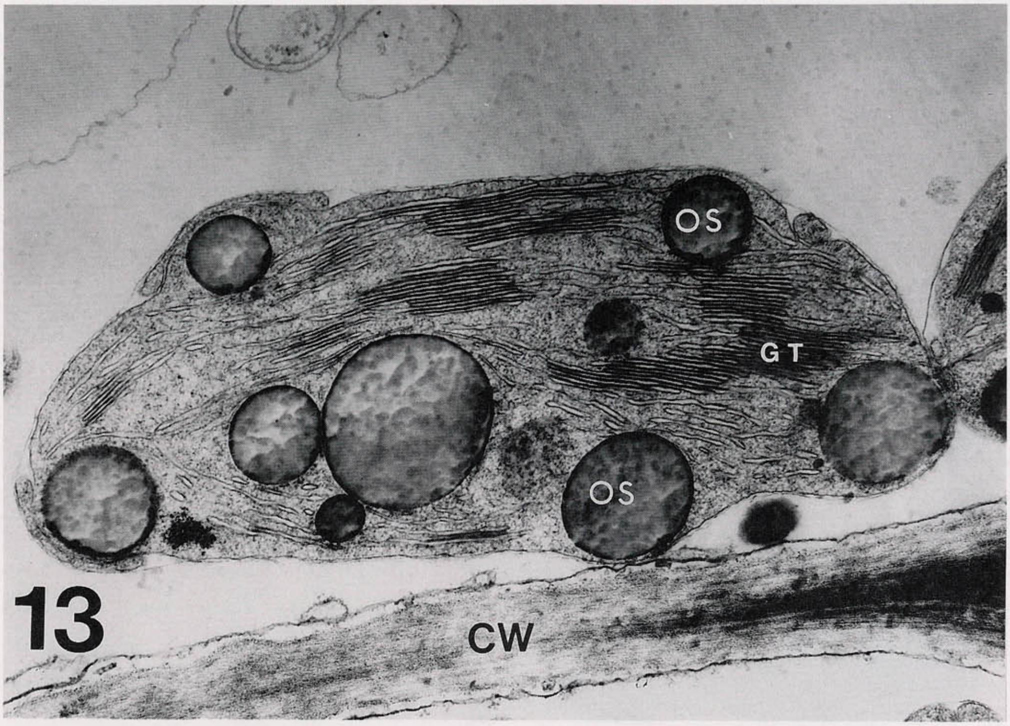

V
S
8

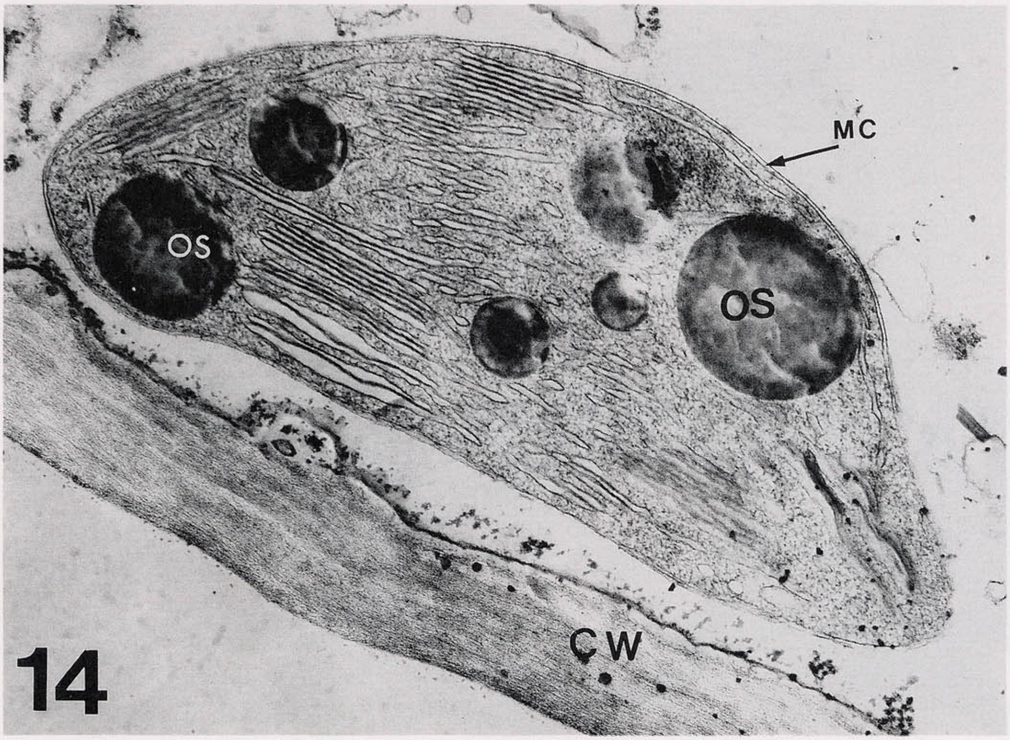

V
os
os
S
CW
9


V
S
os
IS
10


OS
OS
GT
S
11


OS
S
12


OS
GT
OS
13
CW


MC
OS
OS
14
CW