

馬鈴薯葉柄中肋細胞表面構造の電子顕微鏡による観察 (第2報)

疫病菌に対し抵抗性を異にする品種の葉柄中肋細胞壁の微細構造

山本昌木・野津幹雄

Masaki YAMAMOTO and Mikio Nozu

Observations on the Petiole-Midribs of Potato Leaves
by Means of Electron-Microscope (2)

On the Fine Structure of Cell wall of Potato Plant having
Different Resistance to the Invasion of
Phytophthora infestans

はじめに

植物の細胞壁の微細構造についてはワタ⁽⁷⁾、ジュズモ属⁽⁷⁾ (*Caulerpa prolifera*)⁽⁷⁾、糸状菌特に麹菌⁽⁵⁾、グラム陰性菌や⁽⁵⁾ 木材においてしらべており、FREY WYSSLING, ROLFS-⁽³⁾ EN⁽¹⁰⁾および ALBERSHEIM⁽¹⁾らは総合的な記載を行なった。植物の細胞壁はセルローズやペクチンなどの多糖類を主とし、リグニン、脂質、蛋白質などを含み、病原菌に対する防禦層としての役割を果しているといわれる⁽¹⁾。筆者の一人山本⁽¹²⁾は、馬鈴薯葉柄中肋細胞壁の電顕像につき予報したが、今回は疫病に対し抵抗性を異にする品種の細胞壁を位相差および電子顕微鏡を用いて観察した結果を報告する。稿を起すに当り、助言していただいた京大林産工学教室原田浩教授に感謝する。本実験の実施にあたっては、専攻学生大木博英君の全面的な協力を得たので、ここに謝意を表する。

実験材料および方法

A. 中肋表皮細胞壁の外表面側の微細構造

種間雑種 1506-6(9) (抵抗性遺伝因子 R₁R₄) と農林1号 (罹病性因子 r) を用い、馬鈴薯疫病菌 (Race 0) を菜豆寒天培地上に 21°C で 16 日間培養し、殺菌水で洗い分生孢子懸濁液 (150×1 視野 15~20 孢子) を 10~12°C で 2 時間保ち、遊走子を逸出せしめたものを接種した。対照、接種両区とも、上より第 3 位葉中肋部を 2~3×3~4 mm の大きさに切り取り、つぎの処理を行なって細胞壁充填物質を除去した。①エタノール処理：50, 70, 80, 100%エタノールに各 2 分間浸漬、②カセイソーダ処理：1 N カセイソーダに 24 時間浸漬、③エタノールアミン処理：無水エタノールアミン 40%, ヒドラジンヒドラート (1:1) 混合液 24 時間浸漬、④塩酸

処理：N/20 塩酸に 120 時間浸漬。これらのうち、①はワックス、②~④はペクチンとリグニンをそれぞれ溶解するためである。

電子顕微鏡観察はレプリカ法で行なった。厚さ 1 mm のメチルメタクリル樹脂板 (10×10 mm) に低圧モールドリング法 (100°C で kg/cm² の圧力を加え試料の凹凸を写し取る) で試料をリプリケートし、高真空でクロムまたは白金パラジウムをシャドウイングし、つぎに真上からカーボン蒸着して樹脂レプリカ面上に厚さ 100~300 Å のクロムまたは白金パラジウムとカーボンの合成被膜を作り、この膜をクロロホルム、トルエンなどの有機溶媒で樹脂板から剝離し、メッシュにすくい検鏡した。観察には、日立 H S-6 型電子顕微鏡、蒸着は日立 H U S-3 A 型真空蒸着装置を用いた。

B. 柵状組織の細胞壁と接する側における中肋表皮細胞壁の微細構造

供試品種、病原菌接種方法は A と同様である。病斑部または無接種の対照区を 2~3×3~4 mm の大きさに表皮細胞層のみを剝離し、つぎの処理で細胞壁充填物質を除去した。①エタノール・塩酸処理：50, 70, 90, 100%エタノールに各 20 分間浸漬し、N/20 塩酸に 240 時間浸漬、②エタノール・塩酸・エタノールアミン処理：50, 70, 90, 100%エタノールに各 20 分間浸漬し、N/20 塩酸に 216 時間浸漬し、無水モノエタノールアミン：40%ヒドラジンヒドラート (1:1) 混合液に 24 時間浸漬。①はワックス、ペクチン、リグニンを溶解、②はワックス、ペクチン、リグニン、ヘミセルローズを溶解するためである。試料は低圧モールドリング法で剝離した表皮の剝離面をレプリケートした。検鏡までの操作は A と同様である。

実験結果

A. 中肋表皮細胞外側側の微細構造

馬鈴薯中肋中央部には、疫病菌に抵抗性種間雑種1506—b(9)、罹病性品種農林1号とも、20~30×80~120μの表皮細胞が縦に長く並び、エタノール、カセイソーダ、エタノールアミン、塩酸などで処理すると、細胞長軸に平行に走る線条が認められる(位相差顕微鏡観察第1, 2図)。この線条(LN)を電子顕微鏡で観察すると、1つの線条の中は4,000~15,000Åで、多くの膨張部(第3・5図SW)を持つ。この線条は、数本から10数本連合した形で、細胞壁の長軸に対し平行に走る。これらの線は、細胞の結合部付近では認められない。長軸に対しほぼ90°の角度で交差する線条が認められることもある。これらの細胞壁構造は、抵抗性、罹病性両品種の健全部(第3・5図)、罹病部(第4・6図)に同様に認められた。

B. 柵状組織の細胞壁と接する側における中肋表皮細胞壁の微細構造

中肋表皮細胞壁は、マイクロフィブリル(セルローズの小繊維)の層を骨格とするものと考えられる。観察されたマイクロフィブリルには、主軸に対し平行に走るもの、ほぼ90°で交差するもの、あるいは主軸に対し種々の角度をなして走るものなどがあつた。時には、マイクロフィブリルが集まって束となる(マイクロファイバー)こともあつた。1本のマイクロフィブリルの直径は100~200Åで、マイクロファイバーのそれは、2,000~3,000Åである。これらのマイクロフィブリルやその配置は、抵抗性種間雑種1506—b(9)および罹病性品種農林1号の健全部(第7図抵抗性・第9図罹病性)、罹病部(第8図抵抗性・第10図罹病性)の表皮細胞壁においてはほぼ同様であつた。マイクロフィブリルの鮮明な像は、エタノール・塩酸処理よりも、エタノール・塩酸・エタノールアミン処理において得ることができた。

考 察

実験Aでマイクロフィブリルの構造が観察できなかったのは、表皮細胞の外側特有のワックス、クチクラなど細胞壁充填物質が強固に結びついたためと考えられる。FREY WYSSLING, ROELOFSENらの報告では、植物細胞の第1次細胞壁に方向の一定しないマイクロフィブリルの層、第2次細胞壁には細胞長軸に対し直角の走向を示すマイクロフィブリルの層があり、層の数およびマイクロフィブリルの走向は、植物の発育段階によって異なるという。実験Bにおいて観察したマイクロフィブリルは、ALBERSHEIM, FREY WYSSLING, ROELOFSENらの報告

している細胞壁構成要素のマイクロフィブリルの直径100~300Åとはほぼ一致するが、現在までの観察では、抵抗性種間雑種1506—b(9)と罹病性品種農林1号の健全部、罹病部に同様に認められたので、過敏現象を示す抵抗性品種の抵抗性とを直接結びつけることはできない。この結果から過敏現象に伴う複屈折の変化もセルローズのマイクロフィブリルに関係するといえないようである。ALBERSHEIMは、病原菌に対する防禦層としての役割は細胞壁中の多糖類が果たすと述べているが、むしろマイクロフィブリル間充填物質が抵抗性に重要な役割を果たしているのかも知れない。これらは溶媒処理により溶解されたはずであり、この点については今後の研究をまたねばならない。

摘 要

1. 馬鈴薯中肋表皮細胞壁の外側側には、細胞長軸に対し互いに平行するかあるいはほぼ90°の角度で交差する線条構造が認められ、これらの線条構造は、細胞接合部の長軸方向には認められない。個々の線条は、幅4,000~15,000Åであり、多くの膨張部を持っている。

2. 中肋表皮細胞の柵状組織細胞壁と接する側では、セルローズのマイクロフィブリルを基本構成単位とし、マイクロフィブリルが互いに平行して走るか、あるいはほぼ90°の角度で織り合わされているか、または主軸に対し種々の角度を示すマイクロフィブリルが認められる。マイクロフィブリルの直径は100~200Åである。

3. これらの細胞壁構造は、疫病菌(Race 0)に対し、抵抗性遺伝因子R₁R₄を持つ種間雑種1506—b(9)および罹病性遺伝因子rを持つ農林1号の健全部および罹病部の細胞壁にほぼ同様に存在するので、現在までの研究では、感受体の疫病菌に対する機械的抵抗性とレプリカ法による細胞壁微細構造の観察結果とを関連させることはできない。

図 版 説 明

1. 馬鈴薯種間雑種1506—b(9)(抵抗性品種)健全葉柄中肋表皮表面構造エタノール・塩酸処理レプリカ、位相差顕微鏡観察×600
2. 農林1号(罹病性品種)健全葉柄中肋表皮表面構造エタノール・塩酸処理レプリカ、位相差顕微鏡観察×600
3. 種間雑種1506—b(9)健全葉柄中肋表面構造エタノール・塩酸処理レプリカ、電顕像×2,600
4. 種間雑種1506—b(9)葉柄中肋表面に馬鈴薯疫病菌(Race 0)遊走子接種48時間後エタノール・塩酸処理レプリカ、電顕像×3,300
5. 農林1号健全葉柄中肋表面構造エタノール・塩酸処

- 理レプリカ，電顕像×5,400
6. 農林1号 葉柄中肋表面に馬鈴薯疫病菌接種48時間エタノール・塩酸処理レプリカ，電顕像×5,400
 7. 種間雑種 1506—b (9) 健全葉柄中肋柵状組織の細胞壁と接する側の表皮細胞壁微細構造エタノール・塩酸処理レプリカ，電顕像×16,000
 8. 種間雑種 1506—b (9) 葉柄中肋に馬鈴薯疫病菌 (Race 0) 接種48時間後エタノール・塩酸・エタノールアミン処理レプリカ柵状組織の細胞壁と接する側の表皮細胞壁微細構造，電顕像×21,000
 9. 農林1号 健全葉柄中肋柵状組織の細胞壁と接する側の表皮細胞壁微細構造エタノール・塩酸処理レプリカ，電顕像×13,000
 10. 農林1号 葉柄中肋に馬鈴薯疫病菌 (Race 0) 接種48時間後エタノール・塩酸・エタノールアミン処理レプリカ柵状組織の細胞壁と接する側の表皮細胞壁微細構造，電顕像×19,000

引用文献

1. ALBERSHEIM, P. : The structure and function of the cell wall. In *Plant Biochemistry* 151~181, 1965
2. ALBERSHEIM, P. : Abstracts of submitted papers at the International Symposium on Plant Biochemical regulation in viral and other diseases or injury. Aug. 17~19, 1967
3. FREY-WYSSLING, A. : Growth of plant cell walls. In S. E. B. Symposia VI. Structural aspects of cell physiology 320~327, 1952. Univ. Press, Cambridge.
4. 原田浩・宮崎幸男・若島妙子：林試研報 104：1~115, 1958
5. 堀越弘毅：微生物の構造 東大応微研シンポジウム 3：124~145, 1962
6. 本間遊：微生物の構造 東大応微研シンポジウム 3：146~186, 1962
7. 三井養蔵：植雑171(840)：224~232, 1958
8. PREI, E. and PRESTON, R. R. : The world through the electron microscope. *Biology* II. 1964 Japan Electron Optics Lab. Co. p91~91
9. PRESTON, R. D. : Biological units of cellulose structure in S. E. B. Symposia VI. Structural aspects of cell physiology. 1952 Univ. Press., Cambridge p 348~356
10. ROELOFSEN, P. A. : The plant cell wall. In *Encyclopedia of plant anatomy*. W. Zimmermann and P. G. Ozenda, Eds. Vol. 3. Bornträger Berlin. p 1~335
11. 山本昌木：島根農大植病研特報 1：1~151, 1961
12. 山本昌木：島根大農研報 1：33~37, 1967

Summary

The present paper deals with the results of electron-microscopic observations of cell wall of potato plant. The epidermal cell walls of petiole midribs infected with *Phytophthora infestans* (Mont.) DeBary were treated with ethanol, ethanolamine, NaOH and HCl, and examined under electron microscope using the technique of replication. At the same time, the healthy walls were examined in the same way. For shadowing, Cr. or Pt-Pd were used and shadow-angles were 25 degrees. Shadowing films were examined with HS-6 electron microscope.

1. The linear structure were recognized on cell wall. The lines on cell wall run parallel to longitudinal cell wall or run almost at right angle to each other. The lines on cell wall have many swellings and have 4,000~15,000 Å in diameter.

2. Cellulose microfibrils are the basic structural unit of cell wall. The microfibrils interwave almost at right angle to each other. Besides this, paralleled microfibrils or the microfibrils of various degrees against the axis of main microfibrils were investigated. Microfibrils have 100~200 Å, and microfibrils have 2,000~3,000 Å in diameter.

3. Within the scope of these observations, there is no difference on the basic structure of cell wall between the resistant and susceptible varieties of potato plant. And there was no evidence of changing the fine structure of microfibrils both in resistant and susceptible varieties after the invasion of *Phytophthora infestans*.



