

うどんこ病に対するオーチャードグラスの細胞レベルでの抵抗反応

誌名	草地試験場研究報告 : s ō chi shikenj ō kenky ū h ō koku = Bulletin of the National Grassland Research Institute
ISSN	03850196
著者名	古賀,博則 月星,隆雄 植松,勉
発行元	農林省草地試験場
巻/号	50号
巻号補足	
掲載ページ	p. 11-16
発行年月	1994年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



うどんこ病に対するオーチャードグラスの 細胞レベルでの抵抗反応

古賀博則・月星隆雄・植松 勉

環境部
作物病害研究室

(平成5年12月14日受理)

要 旨

古賀博則・月星隆雄・植松 勉(1994):うどんこ病に対するオーチャードグラスの細胞レベルでの抵抗反応. 草地試研報 50:11~16.

うどんこ病に対するオーチャードグラスの抵抗性機構を細胞レベルで明らかにするために、抵抗性系統と罹病性品種の感染初期過程を光学顕微鏡および蛍光顕微鏡で比較観察した。罹病性品種アキミドリでは接種4~5日目に全個体が病斑を形成したのに対し、抵抗性系統ER 571では、約3%の個体がアキミドリと同じ罹病性病斑を形成したが、残りの個体は接種後6日目でも病徴をまったく示さなかった。この無病徴葉について細胞レベルでの観察を行った結果、ER 571ではアキミドリと比較して成熟吸器形成率と菌糸伸展のいずれも接種後2日目から著しく阻害されており、侵入を受けた表皮細胞では過敏感壊死が起きていた。この過敏感壊死は、蛍光顕微鏡下で観察すると細胞全体が自家蛍光を発するため、容易に検出できた。この過敏感壊死反応はER 571では接種2日後から88%と高率で出現するのに対し、アキミドリでの出現はほとんど認められなかったことから、過敏感壊死反応がER 571の抵抗性発現と最も密接に関連した細胞反応と考えられる。一方、吸器形成阻害によるパピラ形成は、ER 571とアキミドリともにその出現率が2-5%と低率であったことから、主動抵抗性遺伝子の発現とは無関係の非特異的抵抗反応であると考えられる。

キーワード: オーチャードグラス, うどんこ病, 抵抗性, 過敏感壊死

緒 言

オーチャードグラスうどんこ病は、我が国では九州を除いて全国的に発生する重要病害である(西原 1981)。本病の病原菌は西原(1970)によって、*Erysiphe graminis* DC. と同定された。その後、奥ら(1985)は本菌の寄主範囲を検討した結果、本菌がオーチャードグラスのみに感染し、病徴を発現したことから、本菌を *E. graminis* f. sp. *dactylidis* としている。

我が国で育成された品種アオナミヤアキミドリは、本病に対する抵抗性選抜を育種過程で受けていないため、ほとんど抵抗性を持っていない。このため藤本ら(1993)は、我が国の本病菌に対して抵抗性を示すヨーロッパ・北アメリカの品種を国内育成品種と交配・選抜し、本病抵抗性選抜系統ER 571を育成した。

ER 571は本病菌に対して病徴を呈しない極強系統であるが、この抵抗性がどのような機構で起きているのかは明らかにされていない。オオムギうどんこ病やウリ類

うどんこ病などの抵抗性機作の研究は、これまで多数報告されており、感染初期の抵抗性反応としては、宿主細胞の過敏感壊死とパピラ形成による吸器形成阻害が報告されている(Cohen *et al.* 1990; Johnson *et al.* 1979; Koga *et al.* 1978, 1980, 1983, 1988, 1990; Mayama and Shishiyama 1978)。しかし、オーチャードグラスうどんこ病ではこのような抵抗性機構に関する報告は見当らない。そのため、オーチャードグラスうどんこ病抵抗性選抜系統ER 571の抵抗性が、感染のどの時期にどのように発現するのか、細胞レベルで解明することを目的として研究を行った。

材料及び方法

1. 供試植物と病原菌の人工接種

本病抵抗性選抜系統ER 571(藤本ら 1993)と比較品種として草地試で育成された罹病性のアキミドリの種子を鉢に播種し、60日後の幼植物の最上完全展開葉に、オーチャードグラスうどんこ病菌 (*E. graminis* DC f.

sp. *dactylidis* Oku, Yamashita, Doi et Nishihara) を人工接種した。オーチャードグラスうどんこ病菌は草地試験場内に自然発生していた病斑から胞子を採集し、罹病性品種上で継体培養しているものを、人工接種用に大量に増殖させた。人工接種はオオムギうどんこ病菌の接種法 (Koga *et al.* 1988) にしたがって、接種6日後の罹病性品種葉上の胞子を検定植物葉上に自然落下させて行い、その後接種植物を相対湿度 100%, 温度 20℃ の暗室に 1 時間保持し、続いて相対湿度 50-80%, 温度 20℃ の暗室に 15 時間置いた。その後は、蛍光灯で昼夜 12 時間ずつ照明し、所定時間後に接種植物から試料を採取した。

2. 光学顕微鏡観察

接種した植物から最上完全展開葉を採取し、葉身の先端 2 cm を除去し、その下の 3 cm のみを観察試料とした。Koga *et al.* (1990) の方法にしたがって、この葉片をアルコール・ラクトフェノール溶液に浸漬し、1~2 分間煮沸する操作を 2 回繰り返して葉緑素を除去した。葉緑素を除去した葉片をラクトフェノール溶液に浸漬して、光学顕微鏡及び蛍光顕微鏡観察時まで冷暗黒下に保持した。光学顕微鏡観察の直前に、0.05% アニリンブルーを溶かしたアルコール・ラクトフェノールに葉片を浸漬、加温して、染色後、水洗してうどんこ病菌の吸器形成と二次菌糸伸長と宿主細胞反応を光学顕微鏡下で観察した (Koga *et al.* 1990)。なお、十分伸展したローブを形成したものを成熟吸器と見なした。

3. 蛍光顕微鏡観察

葉緑素を除去した葉片をスライドガラス上にマウントし、オリンパス蛍光顕微鏡装置 Vanox-S, B 励起フィルター (360-500 nm 透過), 吸収フィルター O-515 下で観察し, Tri-X pan, ASA 400 の白黒フィルム (Kodak 社) で写真撮影を行った。

結 果

罹病性品種アキミドリでは全個体が、オーチャードグ

ラスうどんこ病菌を接種後 4~5 日目に肉眼でも菌叢が認められるようになり、6 日目には病斑上に多数の分生子を形成していた。一方、抵抗性選抜系統 ER 571 では、約 3% の個体がアキミドリと同じ病斑を形成したが、残りの個体は接種後 6 日目でも病徴を全く示さなかった。このため、ここでは 3% の罹病性個体を除いて観察した。

光学顕微鏡による観察の結果、アキミドリではうどんこ病菌の成熟吸器の形成率は接種後 2 日目ですでに 87.8% と高率に達しており、二次菌糸も同調的に伸展し、二次菌糸の伸長は、接種後 2 日目で平均 194 μm , 3 日目で 677 μm , 6 日目で 2400 μm に達した (Table 1, Fig. 1)。それに対し ER 571 では、成熟吸器形成率は接種後 6 日目でも 1.8% と低率であり、菌糸伸長も 31.7 μm と著しく阻害されており、成熟吸器形成率と菌糸伸展ともに接種後 2 日目からアキミドリとの差異は明瞭であった (Table 1)。このため、ER 571 で罹病性反応を示す約 3% の個体は、アキミドリと同様の吸器形成率と菌糸長を接種後 2 日目で示すことから、他の抵抗性の個体と容易に区別することができた。ER 571 でもまれに成熟吸器が形成されるが、その感染部位で第 2 吸器が形成されていることはなかった。アキミドリでは接種 3 日目以降、二次菌糸の伸展が著しく、1 感染部位で第 2 吸器をはじめとして多数の吸器が形成された。このため、1 つの病斑が隣接の感染部位まで覆うようになり、観察した付着器当たりの吸器形成率や細胞反応の出現率を算出することができなかった。

付着器からの吸器形成に対する宿主細胞反応を Table 2 に示した。ER 571 では宿主細胞が接種後 2~6 日に 87.7~91.0% と高率で過敏感壊死を起こし、それに伴って吸器は成熟の途中で生育を停止していた (Fig. 2)。この過敏感壊死は、蛍光顕微鏡下で観察すると表皮細胞が細胞全体に鮮黄色の自家蛍光を発するため、容易に検出できた (Fig. 3)。この過敏感壊死は ER 571 では接種 2 日後から高率で出現するのに対し、アキミドリではほとんど出現しなかった (Table 2)。接種 6 日後に ER 571 では隣接柔細胞の過敏感壊死も伴って観察されることが

Fig. 1-4. Light microscope (Figs. 1, 2, 4) and fluorescence microscope (Fig. 3) photographs of host-parasite encounter sites in epidermal cells of leaves of the susceptible cultivar "Akimidori" (Figs. 1, 4) and resistant strain "ER 571" (Figs. 2, 3) 2 days after inoculation of *Erysiphe graminis* f. sp. *dactylidis*.

Fig. 1. A mature haustorium (MH) in an epidermal cell and secondary elongating hyphae (SH). Ap: appressorium, Sp: inoculated spore

Fig. 2. Interruption of development of haustorium at the immature stage in a hypersensitive dead epidermal cell.

Fig. 3. Autofluorescence of a hypersensitive dead epidermal cell (FEC) under attack of an appressorium.

Fig. 4. Interruption of haustorial formation by a papilla (P) formed under attack of an appressorium.

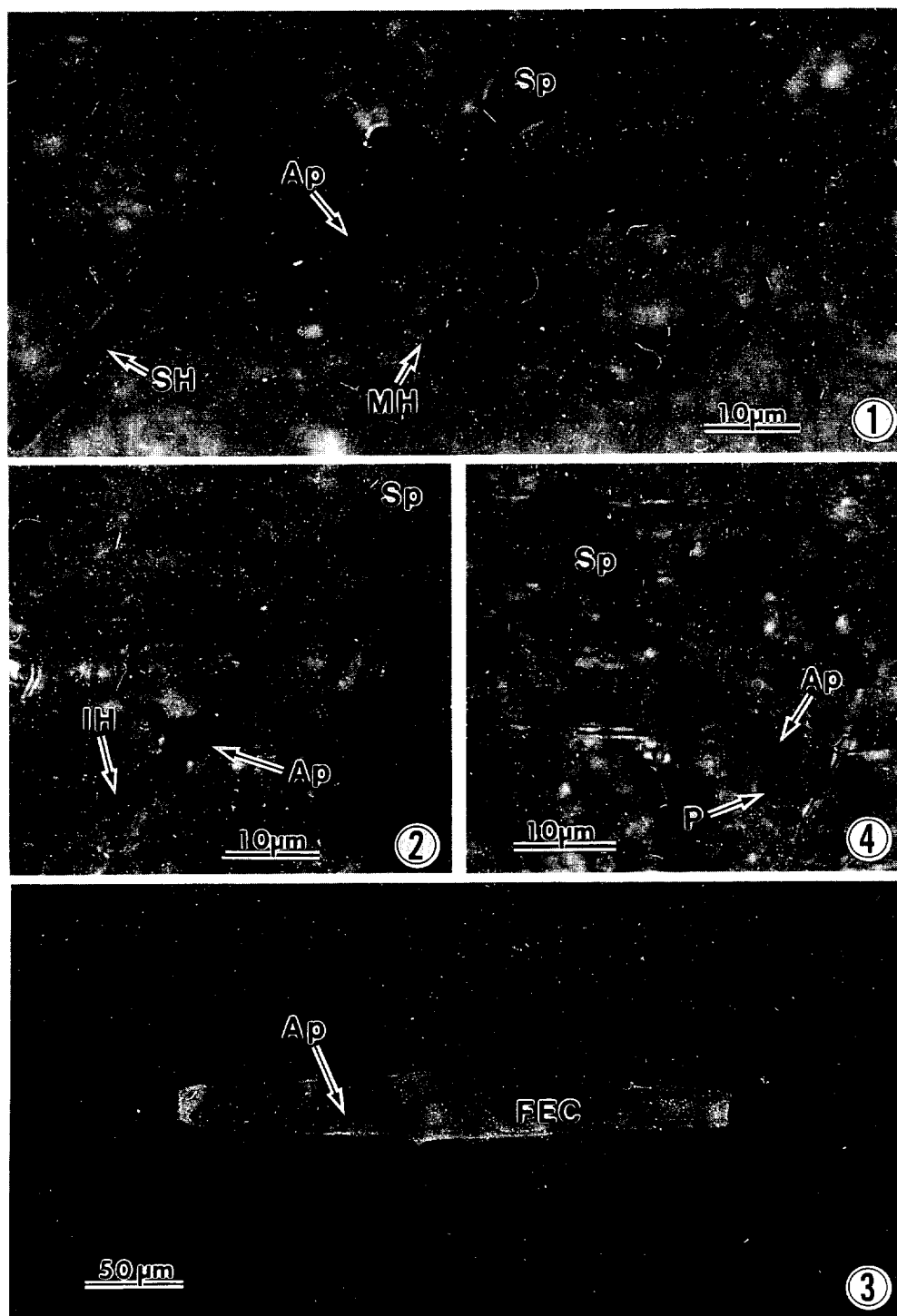


Table 1. Haustorial formation and growth of secondary hyphae of *Erysiphe graminis* f. sp. *dactylidis* in leaves of resistant strain, ER 571 and susceptible cultivar, Akimidori.

Days after inoculation	ER 571 ^{a)}		Akimidori	
	Haustorial ^{b)} formation (%)	Lengths of secondary hyphae(μm)	Haustorial formation (%)	Lengths of secondary hyphae(μm)
2	2.3	3.7	87.8	194
3	2.3	24.2	>80	677
6	1.8	31.7	—	2400

^{a)} Percentages of haustorial formation and growth of secondary hyphae in about 3% of the leaves were almost the same as those in the susceptible cultivar 2-6 days after inoculation. Data of the leaves were not included.

^{b)} Ratio of mature haustorial formation to the observed appressoria.

Table 2. Host cellular reactions of epidermal cells of leaves of the resistant strain, ER 571, and susceptible cultivar, Akimidori, under attack of *Erysiphe graminis* f. sp. *dactylidis*

Days after inoculation	ER 571 ^{a)}			Akimidori		
	HR ^{b)} (%)	Papillae ^{c)} (%)	No response ^{d)} (%)	HR (%)	Papillae (%)	No response (%)
2	87.7	2.4	7.6	2.4	3.3	6.5
3	88.7	3.8	5.2	—	—	—
6	91.0	4.5	2.7	—	—	—

^{a)} Percentages of haustorial formation and growth of secondary hyphae in about 3% of the leaves were almost the same as those in the susceptible cultivar 2-6 days after inoculation. The data of the leaves were not included.

^{b)} Ratio of hypersensitive cell death to observed appressoria.

^{c)} Ratio of interruption of haustorial formation at papilla to the observed appressoria.

^{d)} Ratio of interruption of haustorial formation without host response to the observed appressoria.

あったが、その壊死数は1感染部位あたり1~9個であった。

吸器形成を阻害するもう一つの反応として、バビラ形成が観察された (Fig. 4) が、その出現率は ER 571 とアキミドリともに 2.4~4.5% と低率で、両者間でその形態や出現率に差異は認められなかった (Table 2)。

考 察

オオムギうどんこ病菌の接種による抵抗性と罹病性系統の感染の差異を、感染初期に検出するためには最も活性に富んだ病原菌の胞子を、最適条件下で接種することが望ましい (Koga *et al.* 1990)。オーチャードグラスうどんこ病菌においても接種用胞子には、接種後6日目の成熟して間もない胞子のみを用い、接種後1時間は100% 湿室に、その後は暗所に15時間保つという処理によって、罹病性品種で80~90% という高い吸器形成率を得ることができた。また、二次菌糸が同調的に伸展したことは、オオムギうどんこ病菌の罹病性品種における

二次菌糸の伸展過程の観察結果 (Koga *et al.* 1978) とよく一致した。このことは、罹病性品種上では一旦侵入した菌の菌糸伸展は、宿主細胞により何等阻害を受けていないことを示唆している。

アルコールリック・ラクトフェノールで処理した葉身の細胞変性のみから、細胞の生死を論ずることはできないが、細胞全体に自家蛍光を発する細胞が過敏感壊死細胞と一致することは、オオムギうどんこ病抵抗性の細胞生理学的研究ですでに証明されている (Koga *et al.* 1988)。このことはオーチャードグラスうどんこ病の場合にも当てはまるものと考えられる。

抵抗性系統 ER 571 では過敏感壊死反応が、罹病性品種での高い吸器形成率とほぼ同率で起き、吸器形成が阻害されていた。過敏感壊死が起ると、その時点で吸器の生育が停止することはオオムギうどんこ病において示されている (Bushnell 私信, Koga *et al.* 1990)。本病抵抗性系統 ER 571 の場合も吸器形成段階で過敏感壊死が起き、生育が停止したのと考えられる。この過敏感壊

死反応はER 571では接種2日後から88%と高率で出現するのに対し、罹病性のアキミドリでの出現はほとんど認められなかったことから、この過敏感壊死反応はER 571の抵抗性発現と最も密接に関連した細胞反応と考えられる。ER 571はその育成過程から少数の主働抵抗性遺伝子を持っていると推測されている(藤本ら 1993)。本病の抵抗性と最も密接に関連した細胞反応が過敏感壊死であるという結果は、オオムギうどんこ病(Koga *et al.* 1983, 1988, 1990) やウリ類うどんこ病(Cohen *et al.* 1990) での主働遺伝子に支配された抵抗性反応の結果と一致した。

パピラ形成による吸器形成阻害は、ER 571とアキミドリともに出現率が2-5%と低率であったことから、ER 571の特異的抵抗性発現とは考えられない。オオムギうどんこ病では、パピラ形成による吸器形成阻害は植物の葉齢や葉位が進むと増加した(古賀ら 1978)。また、オオムギ葉身では維管束上や裏面表皮に多く存在する長大細胞上で大きなパピラが出現し、吸器形成が高頻度で阻害された(Koga *et al.* 1990)。これらのことから、パピラによる吸器形成阻害は主働抵抗性遺伝子の発現とは無関係の非特異的抵抗反応と考えられる。なおオーチャードグラスの場合には、オオムギで見られるような長大細胞は認められなかった。

主働抵抗性遺伝子を持った品種が普及すると数年後にはそれを侵すレースが出現することは、イネいもち病(山田 1987) やオオムギうどんこ病(Limpert and Schwarzbach 1981) など多くの病害で知られている。我が国のオーチャードグラスうどんこ病菌については、これまで抵抗性品種そのものがなかったためレースの研究がなされていない。また、ER 781の本病抵抗性は少数の主働遺伝子による可能性が高いと考えられている(藤本ら 1993)が、その遺伝子については明らかにされていない。今後、この遺伝様式が解明されれば、個々の遺伝子発現を宿主の細胞反応との関連で明らかにできると考えられる。

謝 辞

本実験に用いたオーチャードグラス ER 571 とアキミドリの種子を提供していただいた草地試験場育種部育種第1研究室藤本文弘室長(現在岐阜大学農学部)、神戸三智雄主任研究官(現在愛知県総合農業試験場作物研究所)、水野和彦主任研究官に深謝の意を表す。また、本稿の校閲をしていただいた草地試験場但見明俊環境部長に厚くお礼申し上げる。

引用文献

- Cohen, Y., H. Eyal and J. Hanania (1990). Ultrastructure, autofluorescence, callose deposition and lignification in susceptible and resistant muskmelon leaves infected with the powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea*. *Physiol. Plant Pathol.* **36**: 191-204.
- 藤本文弘・神戸三智雄・小田俊光・川端習太郎・樋口誠一郎・山口秀和・水野和彦・佐藤信之助・稲波 進(1993): オーチャードグラスうどんこ病抵抗性中間母本「ER 571」の育成。草地試験報 **48**: 27-36.
- Johnson, L. E. B., W. R. Bushnell and R. J. Zeyen (1979). Binary pathways for analysis of primary infection and host response in populations of powdery mildew fungi. *Can. J. Bot.* **57**: 497-511.
- 古賀博則・豊田秀吉・真山滋志・獅子慈孝・日浦運治(1978) オオムギうどんこ病の抵抗性発現にあずかる分化の達成過程(子葉鞘と葉位)。日植病報 **44**: 92 (講要)
- Koga, H., S. Mayama and J. Shishiyama (1978). Microscopic specification of compatible and incompatible interactions in barley leaves inoculated with *Erysiphe graminis hordei*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **44**: 111-119.
- Koga, H., S. Mayama and J. Shishiyama (1980). Correlation between the deposition of fluorescent compounds in papillae and resistance on barley against *Erysiphe graminis hordei*. *Can. J. Bot.* **58**: 536-541.
- Koga, H., H. Toyoda, S. Mayama, J. Shishiyama and U. Hiura (1983). Characteristic cellular responses as expression of genes for resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in barley. *Phytopathology* **73**: 907-910.
- Koga, H., R. J. Zeyen, W. R. Bushnell and G. G. Ahlstrand (1988). Hypersensitive cell death, autofluorescence, and insoluble silicon accumulation in barley leaf epidermal cells under attack by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **32**: 395-409.
- Koga, H., W. R. Bushnell and R. J. Zeyen (1990). Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Can. J. Bot.* **68**: 2344-2352.
- Limpert, E. and E. Schwarzbach (1981). Virulence analysis of powdery mildew of barley in different European regions. *Barley Genetics IV*: 458-465.
- Mayama, S. and J. Shishiyama (1978). Localized accumulation of fluorescent and u.v.-absorbing compounds at penetration sites in barley leaves infected with *Erysiphe graminis hordei*. *Physiol. Plant Pathol.* **13**: 347-354.
- 西原夏樹(1970). イネ科植物うどんこ病菌の寄生と寄主植物の亜科との関係。日植病報 **36**: 335 (講要)
- 西原夏樹(1981). オーチャードグラスうどんこ(白波)病。農林水産研究文献解題 No. 8 牧草病害編。農林統計協会、東京。pp. 300-301.
- 奥 尚・山下修一・土居養二・西原夏樹(1985). オーチャードグラスうどんこ病菌(*Erysiphe graminis* DC.)の寄主範囲と分化型について。日植病報 **51**: 613-615.
- 山田昌雄(1987). 病原性とレース。稲いもち病、山中 達・山口 富夫編、養賢堂、東京。pp. 189-216.

Characteristic Cellular Responses of Orchardgrass Leaves Resistant to
infection with *Erysiphe graminis* f. sp. *dactylidis*.

Hironori KOGA, Takao TSUKIBOSHI and Tsutomu UEMATSU

Department of Environment, National Grassland Research Institute,
Nishinasuno, Tochigi, 329-27 Japan

Received December 14, 1993

ABSTRACT

Koga, H., T. Tsukiboshi and T. Uematsu (1994) : Characteristic cellular responses of orchardgrass leaves resistant to infection with *Erysiphe graminis* f. sp. *dactylidis*. Bull. Natl. Grassl. Res. Inst. 50 : 11~16.

In order to analyze the characteristic cellular responses of the orchardgrass strain "ER 571" resistant to the infection with *Erysiphe graminis* DC f. sp. *dactylidis*, Oku, Yamashita, Doi et Nishihara, the primary infection processes of "ER 571" were compared with those of the susceptible cultivar, Akimidori based on observation by light and fluorescence microscopy. In "ER 571" the inhibition of the formation of most of the mature haustoria and the development of secondary hyphae was associated with hypersensitive reaction of the epidermal cells which became auto-fluorescent. Eighty-eight percent of the epidermal cells under attack of powdery mildew due to hypersensitivity died in "ER 571" 2 days after inoculation, unlike only a few cells in Akimidori.

These results suggest that cell death due to the hypersensitive reaction was closely correlated with the resistance expression of "ER 571". The percentage of papilla formation where haustorial formation had ceased ranged from 2 to 5% in both ER 571 and Akimidori. Therefore, it is suggested that papilla formation is not the specific resistance reaction of "ER 571".

Key words : orchardgrass, powdery mildew, resistance, hypersensitive reaction