

## 第6章 精製マシン油乳剤散布によるうどんこ病菌の形態的变化

本剤は、各種作物のうどんこ病に対して高い防除効果を示し、特に本病菌接種後に散布した場合、分生孢子発芽、菌糸伸長および分生孢子形成におよぼす阻止効果は顕著であった。そこで、本剤がうどんこ病菌を阻害する作用機作を明らかにするために、うどんこ病菌の形態におよぼす影響を光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、光学顕微鏡による観察において、本剤を散布した場合葉上に形成される被膜によってとり囲まれたうどんこ病菌の分生孢子が著しく収縮していることが認められた。したがって、本剤がうどんこ病菌を阻害する作用機作の1つに被膜に包囲されることによって生じる圧力が推定されたので、本章では異なる水圧の条件を設定し、水圧が分生孢子的形態および発芽におよぼす影響についても検討した。

### 第1節 光学顕微鏡による観察

#### 第1項 実験材料および実験方法

実験は第2章、第3節、第1項に準じて行なった。あらかじめ準備したキュウリうどんこ病菌、キュウリ灰色かび病菌およびイネごま葉枯病菌の分生孢子をスライドガラス上に筆で払い落とし、精製マシン油乳剤10000ppm液および対照として蒸留水をガラススプレーを用いて2ml/100cm<sup>2</sup>の割合で散布した。散布後、室内に静置し薬液が自然乾燥するまで継時的に顕微鏡（日本光学社製 万能顕微鏡アポフォト）を用いて観察した。また、薬液乾燥後は温室としたペトリ皿に保持し、うどんこ病菌および灰色かび病菌は20℃、ごま葉枯病菌は25℃の孵卵器に静置し、24時間後に分生孢子的発芽の有無について調査した。一方、うどんこ病菌および灰色かび病菌についてはセイヨウカボチャ (*C. maxima* DOCH.) の子葉の裏面表皮細胞上で本剤の影響についても観察した。播種14～15日後のセイヨウカボチャの子

葉の裏面をカミソリで5×5mmに切れ目を入れ、その表皮をピンセットではぎ取り、スライドグラス上に置床した。その後、うどんこ病菌を接種し、薬剤散布後経時的に顕微鏡を用いて観察した。なお、薬剤散布後、うどんこ病菌および灰色かび病菌は20℃、ごま葉枯病菌は25℃の温室に24時間保持し、発芽の有無（1処理区300個、3連制）を調査した。

一方、上述した病原菌の分生孢子におよぼす水圧の影響を検討した。2×2cm角のスライドグラス上に分生孢子を絵筆で置床し、殺菌したセルローズ膜でスライドグラスを包み、さらに薄いゴム袋に包んだ後、糸で固く結び、分生孢子を置床した面を上にして直径9cm、高さ35cmのメスシリンダーの底にビニールテープで固定した。その後、水温20℃の水道水を水深5、10、20および30cmになるように上部より静かに注入した。注入5分、10分および30分後にスライドグラスを取り出し、分生孢子的形態におよぼす影響を観察した。観察後、うどんこ病菌および灰色かび病菌は20℃、ごま葉枯病菌は25℃の温室にそれぞれ24時間保持し、発芽の有無（1処理区300個、3連制）を調査した。

## 第2項 実験結果

うどんこ病菌についての観察結果は図. 6-1~6-7および図. 6-19~6-22に示した。灰色かび病菌についての観察結果は、図. 6-8~6-13に示した。また、ごま葉枯病菌についての観察結果は、図. 6-14~6-18に示した。

うどんこ病菌の分生孢子に蒸留水を散布した場合、形態的にはまったく変化は認められなかった。精製マシン油乳剤を散布した場合には散布液が蒸発するにしたがって、分生孢子的収縮が認められた。薬剤散布直後は、うどんこ病菌の分生孢子(C)の間に本剤の油滴(MO)が分散していた(図. 6-1)。薬剤散布15分後頃より散布液の水分の蒸発に伴い、本菌の分生孢子的周囲に精製マシン油乳剤の被膜(OF)が

形成され始めた。薬剤散布40分後の分生胞子と被膜の状態を図. 6-2に示した。すなわち、分生胞子を取り囲むように被膜（OF）が形成され、分生胞子の一部に収縮現象が生じた（図. 6-2 矢印）。薬剤散布90分後の分生胞子と被膜の状態を図. 6-3に示した。図. 6-3から明らかなように、散布液がさらに蒸発し、被膜によって取囲まれた部分が小さくなり、被膜内に存在していた分生胞子のほとんどが収縮し、形態上正常な分生胞子は観察されなかった（図. 6-3 矢印）。図. 6-4は薬剤散布90分後の収縮した分生胞子に蒸留水を散布した状態である。この処理により、分生胞子を取り囲むように形成されていた被膜の境界は消失したが、分生胞子の多くは収縮したままの状態であった。この分生胞子を温室としたペトリ皿に保持し、20℃で24時間静置後に観察したが、対照区では発芽した分生胞子が観察されるのに対し（図. 6-7）、精製マシン油乳剤散布区の分生胞子は収縮した状態のままで（図. 6-5）、発芽した分生胞子は観察されなかった。また、薬剤散布後蒸留水を散布せず20℃で24時間保持した後に観察すると被膜に覆われた多くの分生胞子が認められた（図. 6-6）。一方、薬液が自然乾燥した直後に蒸留水を散布すると分生胞子の周囲に形成された被膜は容易に消失したので、24時間放置すると被膜は容易に消失しないものと推察される。

灰色かび病菌およびごま葉枯病菌の分生胞子に蒸留水を散布した場合には、形態的变化はまったく認められなかった。精製マシン油乳剤を散布した場合には、うどんこ病菌の場合と同様に分生胞子（C）の間に本剤の油滴（MO）が分散していた（図. 6-8）。薬剤散布15～20分後頃より散布液の水分の蒸発に伴い、油滴が集合し、分生胞子の周囲に精製マシン油乳剤の被膜が形成され始めた（図. 6-9）。薬剤散布40分～50後の分生胞子と被膜の状態を図. 6-14に示した。すなわち、分生胞子を取り囲むように被膜（OF）が形成された（図. 6-14 矢印）。薬剤散布

90分後の分生孢子と被膜の状態を図. 6-10および図. 6-15に示した。図. 6-10, 6-15から明らかなように、散布液の水分がさらに蒸発し、被膜によってとり囲まれた部分が小さくなり、被膜内に存在していた分生孢子的ほとんどが収縮し、形態上正常な分生孢子は観察されなかった。しかしながら、これらの分生孢子は、うどんこ病菌の場合と異なり、薬液が自然乾燥した後に蒸留水を散布すると収縮していた分生孢子は本来の分生孢子的形態に復元した。また、この分生孢子的を温室としたペトリ皿に保持し、灰色かび病菌は20℃、ごま葉枯病菌は25℃で24時間静置後に観察したが、図. 6-11および図. 6-16に示したように、いずれの分生孢子的も発芽している状態が観察された。また、ごま葉枯病菌の場合は、被膜の中でも発芽している状態が観察され（図. 6-17）、対照区（図. 6-18）と同程度の発芽率が認められた（表. 6-1）。一方、灰色かび病菌およびごま葉枯病菌の分生孢子的を薬剤散布後ペトリ皿に静置し、20℃、10日間静置後その形態を観察した。これらの分生孢子的に蒸留水を散布すると本来の分生孢子的の形態に復元し、薬剤散布による影響はまったく認められなかった。

セイヨウカボチャ子葉の裏面表皮細胞上でもスライドグラス上と同様の現象が観察された。セイヨウカボチャにうどんこ病菌の分生孢子的を接種後、本剤を散布すると分生孢子的の間に油滴が分散し、薬液が自然乾燥すると被膜が形成され（図. 6-19）、分生孢子的は収縮した（図. 6-20）。その後、温室としたペトリ皿内に保持し、20℃で24時間静置後に観察したところ、対照の蒸留水散布区では発芽している分生孢子的が観察されたが（図. 6-22）、本剤散布区では収縮した分生孢子的は認められるものの（図. 6-21）、発芽した分生孢子的は観察できなかった（表. 6-1）。一方、灰色かび病菌についてもセイヨウカボチャ上で観察したが（図. 6-12～6-13）、スライドグラス上で観察された現象が宿主上でも同様に観察された。また、

薬液が自然乾燥した後に蒸留水を散布し、20℃の温室に24時間保持した後、発芽の有無を調査したが対照区と同程度の発芽率を示した(表. 6-1)。

病原菌の分生胞子におよぼす水圧の影響は、キュウリ灰色かび病菌およびイネごま葉枯病菌では認められず対照区と同様の形態を示し(図. 6-25~6-26)、本処理によって生じた収縮した分生胞子は灰色かび病菌でわずかに認められたに過ぎなかった(表. 6-2)。また、発芽率は、ごま葉枯病菌の場合は対照区と同じ値を示した。灰色かび病菌の場合は水圧の影響がやや認められ、水深が深いほど発芽率が低下する傾向が認められた(表. 6-3)。一方、うどんこ病菌では上記の2病原菌とは異なり、水圧による影響が顕著に認められた。水深5cm, 5分間処理を行なった場合、対照区に比べて2倍以上の収縮した分生胞子が認められ、30cm, 30分間の処理ではほとんどの分生胞子が収縮(図. 6-23)し、処理時間が長く、水深が深いほど収縮した分生胞子の比率は高くなる傾向が認められた(表. 6-2)。また、水圧処理24時間後に分生胞子を観察したが収縮した分生胞子は本来の形に復元せず(図. 6-24)、発芽した分生胞子は認められなかった。また、外見上健全な分生胞子を対象に発芽率を調査した結果(表. 6-3)、水圧処理した分生胞子の発芽率は対照区に比べて明らかに低く、処理時間が長く、かつ水深が深いほど発芽率は低くなる傾向が認められた。

## 第2節 走査型電子顕微鏡による観察

### 第1項 実験材料および実験方法

第5章, 第1節と同様の実験材料を用いて行なった。あらかじめ葉上で新しく形成させた分生胞子をキュウリ子葉に筆で払い落として接種し、その直後, 2日後および5日後に対照として蒸留水および本剤の10000ppm液をガラススプレーを用いて1.3ml/100cm<sup>2</sup>の割合で散布し、薬剤散布1日後に観察を行なった。

また、本剤を散布し自然乾燥後に接種し、3日後の菌糸の状態も観察した。

試料は対照の無処理葉と薬剤処理葉から5×5mmの葉片を切り取り、以下に述べる6種の異なる処理を観察のための試料作製の最適条件を検討した。観察は走査型電子顕微鏡（日立製作所製 S-500A型）によって行なった。

- ①グルタルアルデヒド・オスミウム酸固定→アセトン系列脱水→酢酸イソアミル置換→臨界点乾燥→金蒸着
- ②グルタルアルデヒド蒸気固定→金蒸着
- ③オスミウム酸蒸気固定→金蒸着
- ④ホルマリン蒸気固定→金蒸着
- ⑤エタノール浸漬→酢酸イソアミル浸漬→臨界点乾燥→金蒸着
- ⑥液体窒素凍結→サンプル台 -100～-120℃冷却観察（クライオシステム）

## 第2項 実験結果

走査型電子顕微鏡によって観察した結果は図、6-27～6-38に示した。

まず、試料を観察するための条件について検討を行なった結果、上記①の方法では分生孢子および菌糸の収縮はほとんど認められなかったものの、葉上から分生孢子的離脱が多く、また②、③および④の蒸気固定ではキュウリ葉、分生孢子および菌糸がいずれも収縮し、①～④のいずれの固定法でも満足すべき観察結果が得られなかった。そこで、⑤の方法を採用したところ、菌糸の収縮は多少認められたものの、分生孢子的収縮程度は蒸気固定に比べて軽微でしかも分生子梗からの分生孢子的離脱も少なかった。しかし、観察試料をエタノールや酢酸イソアミルに浸漬するため薬剤が有機溶媒に溶出して、葉上の薬剤付着状況を観察できなかった。⑥の方法ではチャージングが生じたが、キュウリ葉、分生孢子および菌糸の収縮は認められず、薬剤の付着状態も十分に観察できたので、以下の観察はクライオシステムを使用して行なった。

(1) 分生孢子発芽におよぼす影響 (図. 6-27~28, 6-32)

接種直後に蒸留水および精製マシン油乳剤10000ppm液を散布し、1日後に試料を採取して分生孢子について観察を行なった。蒸留水を散布した場合、分生孢子(C), 発芽管(G)および菌糸(H)は全体として丸みをおび、表面は平滑であった(図. 6-27)。また、キュウリ葉の表面は平滑で気孔(ST)が観察された(図. 6-28 矢印)。分生孢子については一部の細かい亀裂(図. 6-28)を除き、液体窒素に浸漬することによって生じる損傷は認められなかった。

精製マシン油乳剤を散布したキュウリでは、図. 6-31の矢印のように表皮組織の細胞融合部にそって油成分(O.F)が沈着し、特に毛状突起(P)の周辺には多量の油成分の付着が観察された。

キュウリうどんこ病菌に対する本剤の作用については、図. 6-32に見られるようにほとんどの分生孢子は油成分によってとりかこまれていることが指摘される。油成分に覆われた分生孢子は、すべて収縮している状態が観察された。

(2) 菌糸伸長におよぼす影響 (図. 6-29, 6-33~6-34)

接種2日後に蒸留水および精製マシン油乳剤10000ppm液を散布し、1日後に菌糸伸長について観察を行なった。

蒸留水を散布した場合、平滑な表面構造を示す菌糸がキュウリ葉上を縦横に伸長していた(図. 6-29)。接種した分生孢子は図. 6-27~6-28と同様に正常な表面構造を呈していた。本剤を散布した場合、分生孢子および菌糸の周りに被膜が固着し、そのため分生孢子(C)および菌糸(H)は圧縮されたような電頭像として観察された(図. 6-33~6-34)。また、気孔の開口部にも油成分が観察された(図. 6-34 ST)。

本剤をキュウリ子葉に散布し、自然乾燥後に接種して、接種3日後に菌糸の表面構

造を観察した(図. 6-35~6-36)。本剤散布後4日を経過しているが、無散布(図. 6-29)に比べて菌糸の伸長程度は抑制されているものの、油成分が存在しているにもかかわらず形態的に正常な分生胞子および菌糸がキュウリ葉上を伸長している電顕像(図. 6-36)が観察された。

### (3) 分生子梗におよぼす影響(図. 6-30, 6-37~6-38)

接種5日後に蒸留水および精製マシン油乳剤10000ppm液を散布し、1日後に試料を採取して分生子梗(Cp)について観察した。

蒸留水を散布した場合、キュウリ葉上を菌糸が縦横に伸長し、分生子梗は直立しその先端に7~8個の分生胞子が連続して直線的につながっている状態が観察された

(図. 6-30)。本剤を散布した場合、キュウリ表皮細胞上に収縮した分生胞子が観察され、また分生子梗上の分生胞子が集合し(図. 6-37)、しかも分生胞子は収縮している状態が観察された(図. 6-38)。しかし、直立している分生子梗もきわめてまれに観察された(図. 6-37)。

## 第3節 透過型電子顕微鏡による観察

### 第1項 実験材料および実験方法

第5章、第1節と同様の実験材料を用いて行なった。あらかじめ葉上で新しく形成させた分生胞子をキュウリ子葉に筆で払い落として接種し、その4日後に対照区は蒸留水を、処理区は本剤の10000ppm液をそれぞれガラススプレーを用いて

1. 3ml/100cm<sup>2</sup>の割合で散布し、薬液を自然乾燥させた。薬剤散布10時間後および24時間後にグルタルアルデヒド2.5%液、ついで四酸化オスミウム1.0%液でそれぞれ2時間ずつ固定し、水洗後アセトン系列で脱水し、プロピレンオキシドに30分間浸漬した。その後プロピレンオキシドとエポキシ樹脂(エポック812:アラルダイト6005:DDSA=3:3:8)を1:1, 1:3の混合液



に試料を各々12時間ずつ浸漬し、最後にカプセル中の純エポキシ樹脂に包埋して65~70℃で24時間重合させた。熱重合後ウルトラミクロトーム（ライヘルト社製、OmU2型）で試料の超薄切片を作製し、常法により酢酸ウラニル液と硝酸鉛液で染色を行ない透過型電子顕微鏡（日本電子社製、100B型）で観察した。

## 第2項 実験結果

(1) 正常なうどんこ病菌菌糸と吸器の微細構造（図. 6-39~6-42、6-51~6-52）

精製マシン油乳剤のうどんこ病菌におよぼす影響を検討するに先だって、まず対照区のキュウリ子葉上で生育している正常な菌糸と、キュウリ子葉表皮細胞内の吸器の超薄切片を作製して、それらの内部構造について透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

キュウリ子葉上の菌糸（H）は、その表皮細胞壁（CCW）にかなり密着して伸長している場合（図. 6-39）と、表皮細胞壁から離れた上方で伸長している場合（図. 6-41）が観察された。菌糸の細胞壁（HCW）は電子密度の高い外層と電子密度の低い内層の2層から構成されており、その厚さは約0.1~0.2 $\mu$ mであった。細胞壁の内側には原形質膜（PM）にとり囲まれて原形質が充満しており、核（N）、ミトコンドリア（M）、原形質網状体（ER）などの細胞内小器官、およびリボソームが認められた（図. 6-42）。菌糸細胞の核の直径は約3 $\mu$ mで、核内には仁（No）が明瞭に観察された。菌糸の細胞内には細胞内小器官が充満していることが多かったが、まれには細胞内容物が少なく、直径0.5~1.0 $\mu$ mの小さな液胞（V）が発達している菌糸も認められた（図. 6-40）。本実験では、分生胞子を接種してすでに5日を経過している試料を採取したので、菌糸はかなり老化していることが考えられ、そのため小さな液胞の発達した菌糸や、細胞内容物の比較的小さい菌糸が観察されたものと考えられる。

一方、本菌の正常な吸器の電顕像を図. 6-51~6-52に示した。子葉の表皮細胞内には樹状突起のある成熟した吸器 (HA) が多数形成されていた。吸器は1層の電子密度の低い、薄い細胞壁 (CW) に囲まれており、核 (N) は吸器の中央に1個あるのみで、樹状突起 (HL) には核は存在しなかった (図. 6-52)。侵入糸 (IP) の内部には核などの細胞内小器官はなく液胞によつて占められていた (図. 6-51)。吸器中心部と突起部との間には隔膜がなく、吸器全体が1つの細胞から構成されているようである (図. 6-51~6-52)。低倍率の電顕像のため、図. 6-51~6-52から明らかでないが、実際には吸器細胞内にミトコンドリア、原形質網状体、リボソームなどが充満している。吸器全体は吸器囊膜 (EM) と基質 (HM) とからなる吸器囊によつて包まれており、キュウリ表皮細胞の細胞質とは吸器囊膜によつて断絶されていた。吸器の周辺には葉緑体などを含む宿主細胞質が吸器囊膜に密着しているのが観察された。吸器形成後の宿主の細胞質は著しく減少しており、吸器が形成された表皮細胞の大部分は液胞化していた (図. 6-51~6-52)。

## (2) 本剤散布による菌糸の細胞内構造の変化 (図. 6-43~6-50)

本剤のうどんこ病菌糸におよぼす影響を明確にするため、接種4日後に本剤を散布し、その10時間後 (比較的初期の変化) および24時間後 (末期的変化) に、キュウリ子葉上の菌糸について細胞内構造の変化を透過型電子顕微鏡により観察した。

本剤散布によつて、菌糸の細胞質と細胞壁に微細構造的変化が明らかに認められた。本剤の影響によると考えられる菌糸細胞の比較的初期の変化は、薬剤散布10時間後に観察された。正常な菌糸を横断に切載した場合、菌糸はほぼ完全な円形を呈していたが、本剤散布により菌糸は円形からやや不定形に変化していることが多く (図. 6-44)、菌糸の細胞質は液胞化が生じた (図. 6-43)。また、細胞質が凝集

し(図. 6-44)、菌糸細胞質は高電子密度となり(図. 6-45)、正常な菌糸細胞内で多く存在していたミトコンドリアと原形質網状体はほとんど消滅していた(図. 6-46)。一方、菌糸の細胞壁は局部的に膨潤しており、特に内層の電子密度が低くなって、あたかも溶解しているように認められた(図. 6-45)。

上述した菌糸の微細構造的変化は、本剤散布によって生じた比較的初期の変性と考えられるが、これらの変化がさらに進行した電顕像が薬剤散布24時間後に得られた(図. 6-47~6-50)。すなわち、菌糸細胞質が著しく凝集した結果、いわゆる原形質分離に類似した現象が認められた(図. 6-48~6-50)。

図. 6-47~6-50に示した菌糸の電顕像から明らかなように、菌糸は細胞質の顕著な凝集を生じ、原形質膜、リボゾームおよび種々の細胞内小器官はまったく消失していた。菌糸の細胞壁内層は著しく膨潤しており(図. 6-47, 6-50)、高電子密度に変性した細胞質はわずかに細胞壁近くに偏在していた(図. 6-47)。菌糸は不定形に著しく変形し、全体的に収縮していた(図. 6-48)。また、菌糸細胞質の大部分が消失するため、菌糸細胞内はほとんど空虚となっていた(図. 6-49~6-50)。なお、本実験では試料作製の過程で有機溶媒を用いているが、有機溶媒によって散布された精製マシン油乳剤は溶出されるため、試料上に付着している精製マシン油乳剤を明瞭に観察することは困難であった。しかし、まれに菌糸細胞壁上に散布された精製マシン油乳剤の一部が残存していると判断される電顕像(図. 6-47~6-78矢印)が得られた。

### (3) 本剤を散布した場合の表皮細胞内の吸器 (図. 6-53~6-54)

第2章, 第5節の実験結果から, 本剤にはキュウリ葉内における浸透移行性の作用はないであろうと結論された。このことを再確認するため, すでに吸器を形成している接種4日後に本剤をキュウリ子葉に散布し, その1日後の表皮細胞内の吸器について超薄切片を作成し微細構造を観察した。

本剤を散布していない正常な吸器の微細構造については, すでに前述した通りである。一方, 本剤を散布したキュウリ子葉表皮細胞内の吸器は, 子葉表皮細胞上の菌糸と異なり, 正常な吸器に比べて微細構造的に顕著な変化は認められず, また, 吸器が死滅していると判断される電顕像は得られなかった。しかし, 本剤を散布した場合, 吸器の内部には無散布に比較して大きな液胞が発達している傾向が見られた (図. 6-53~6-54)。

#### 第4節 考察

うどんこ病菌に対する殺菌剤の作用についてはこれまで種々の作用点が知られている。Hommaら (1981a) は炭酸水素ナトリウムのキュウリうどんこ病菌に対する作用として分生胞子の発芽阻害と病原性の喪失を報告している。また、大豆レシチンの本菌分生胞子の離脱阻害 (Hommaら 1977) , プチオベートによる発芽管および菌糸の伸長抑制と発芽管の先端膨化 (川瀬ら 1976) , ポリオキシン複合体 B による本菌発芽管, 2次菌糸の膨化, 菌糸の異常分岐および伸長抑制 (石崎ら 1977) などが報告されている。

本菌に対する殺菌剤の予防的作用としては、植物体上に付着した分生胞子の発芽阻害, 発芽管の伸長阻害および吸器の形成阻害があげられる。一方、治療的作用としては、感染後植物体上に形成された菌叢からの菌糸伸長阻害、吸器の機能停止, 分生胞子形成阻害, 分生胞子の離脱阻害および病原性の喪失などがある。

本実験で精製マシン油乳剤散布を行なった場合、スライドグラス上のうどんこ病菌分生胞子は、薬剤散布後水分が蒸発するとともに分散していた油滴が集合して被膜を形成するが、この被膜形成時に分生胞子が被膜内にとりこまれることが光学顕微鏡による観察から明らかとなった。被膜内の分生胞子は、時間の経過とともに収縮現象を生じるが、収縮した分生胞子は、蒸留水を散布して被膜を取除いても再び膨潤することとはなかった。また、薬剤散布1日後に蒸留水を散布すると分生胞子の周囲に形成された被膜は消失することはほとんどなく、多くの分生胞子は被膜に囲まれた状態で、このような分生胞子は発芽しなかった。本剤が阻害作用を示さないキュウリ灰色かび病菌やイネごま葉枯病菌の場合は、精製マシン油乳剤の散布により、分生胞子は収縮するものの薬剤散布10日間放置後蒸留水を散布しても、収縮した分生胞子の形態は本来の形に復元し、ごま葉枯病菌の場合は被膜内でも発芽する分生胞子が観察された。

本剤がうどんこ病菌にのみ有効性を示すのはこの点にあると考えられた。そこで、水圧を利用した実験を行なった結果、ごま葉枯病菌や灰色かび病菌の分生胞子は、水深 30 cm, 30 分間処理を行なっても形態的变化はほとんど観察されなかった。しかしながら、うどんこ病菌の分生胞子は、5 cm, 5 分間処理で形態的变化が観察され、30 cm, 30 分間処理では多くの分生胞子は収縮し、形態的に健全な分生胞子であっても発芽するものはごくまれであった。すなわち、本菌は耐圧力が小さい病原菌であり、このことが被膜の縮小によって生じる圧力によって影響を受け、その結果収縮するものと考えられた。

そこで、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を使用して詳細な観察を行なった。福富ら (1969) は生物細胞および葉上の薬剤粒子の分布状況を観察する目的で走査型電子顕微鏡を利用することは有効であると述べている。走査型電子顕微鏡により種々の病原菌の形態を観察した結果については多数の報告があるが、それらの固定法については報告によって異なる。竹内 (1976) はダイコン萎黄病菌、高橋ら (1975) はナシ赤星病菌、本間 (1984) はキュウリうどんこ病菌の観察にいずれもホルマリンの蒸気固定を行なっているが、分生胞子の変形および陥入が生じている。一方、Ishizakiら (1975) は固定操作を行わず凍結乾燥を適用して、ナシ黒斑病菌の観察を行なっているが、ホルマリンの蒸気固定の場合と同様、発芽管の表面に凸凹が生じている。白井ら (1975) は、ダイコンべと病菌の分生胞子および発芽管を観察するためグルタルアルデヒド液により固定を行なっているが、やはり全体的な変形や局所的な陥入が生じている。

本実験においては、まず走査型電子顕微鏡によるキュウリ子葉とうどんこ病菌の観察方法について種々検討した。その結果、これまで報告されている観察方法では分生胞子および菌糸の変形が生じ、薬剤のキュウリうどんこ病菌におよぼす影響を観察す

るには不相当と判断された。Hart (1979) は、植物体上に広がる油滴を観察するため液体窒素に試料を浸漬し、しかも試料台を冷却 (-100~-120℃) する方法を紹介している。そこで、Hart (1979) の方法に準じて試料を液体窒素に浸漬し、クライオシステムを利用して観察した結果、キュウリ葉、病原菌の表面構造はいずれも平滑で、収縮、変形、陥入などはほとんどなく、ほぼ満足すべき電顕像が得られた。

本剤散布後にうどんこ病菌を接種するとキュウリ葉上に被膜が存在していても菌糸は対照区と同様に平滑な表面構造を呈していた。しかし、本剤を接種直後に散布した場合、うどんこ病菌の分生胞子に顕著な形態異常を生じた。キュウリ葉上でもスライドグラスを使用した実験と同様に被膜に包囲されて収縮している分生胞子が多く観察された。さらに、本菌は活物寄生菌であり人工培養が不可能であるため、スライドグラス上では観察が困難である菌糸および分生子梗上の分生胞子におよぼす本剤の影響についてはキュウリ子葉上で電顕観察した。上記の収縮現象は接種源の分生胞子だけに限らず分生胞子から伸長した菌糸および分生子梗上に形成される分生胞子についても認められた。また、菌糸伸長時に本剤を散布した場合本来膨潤している菌糸は被膜によって圧縮されているような形態を呈した。分生子梗形成時に本剤を散布すると、蒸留水を散布した場合に見られる直立した分生子梗および分生胞子は観察されず、本剤の作用により多数の分生胞子は集合し、各分生胞子は収縮現象を生じていた。第5節、第6項の結果からすると収縮した分生胞子は、被膜に覆われているので、離脱が困難になり、しかも病原性を喪失していると考えられる。

Hommaら (1977) は、キュウリに大豆レシチン液を散布後うどんこ病菌を接種すると、菌糸先端部に被膜が形成されるが、分生子梗形成後に大豆レシチン液を散布すると分生子梗が屈折してたれ下がることを報じている。しかし、大豆レシチンには、分生胞子を凝集させるような作用は認められていない。したがって、精製マシン油乳剤

は大豆レシチンよりもキュウリうどんこ病菌に対してより強い阻害作用を示すものと考えられる。

本剤の作用によって収縮した菌糸を切載し透過型電子顕微鏡で観察すると、菌糸の細胞質と細胞壁に微細構造的変化が明らかに認められた。菌糸を横断に切載すると正常な菌糸はほぼ円形を呈し、細胞は原形質で充満し細胞内小器官が充満していた。本剤散布によって生じた初期的な現象として菌糸は円形～やや不定形に変形し、細胞質の液胞化が生じ、ミトコンドリアや原形質網状体が消滅した。薬剤散布24時間後にはこれらの変化がさらに進行した。菌糸細胞質は凝集し、細胞内小器官はまったく消失し、原形質は高電子密度に変性して原形質膜分離に類似した現象を生じ、菌糸細胞内はほとんど空虚となっていた。つまり、菌糸はすでに死滅に至ったと推定される結果が得られた。一方、細胞壁の変性も顕著に認められた。菌糸の細胞壁内層は膨潤し、菌糸は不定形に著しく変形して全体的に収縮していた。このような菌糸の変性は、走査型電子顕微鏡では被膜に取囲まれた菌糸が全体的に収縮を生じている電頭像として観察された。

池上ら(1967)は、静水圧の病原菌におよぼす影響を検討し、水圧の影響は病原菌の種類によって異なることを報告している。つまり、イネごま葉枯病菌は $1000\text{ kg/cm}^2$ , 10分間処理では形態変化はほとんどなく、耐圧力の大きい病原菌であるとしている。堀野ら(1968)はイネごま葉枯病菌の菌糸細胞壁は3層からなり平均 $0.8\text{ }\mu\text{m}$ であるとしている。一方、キュウリうどんこ病菌の菌糸細胞壁は前述したように2層からなり、細胞壁の厚さは $0.1\sim 0.2\text{ }\mu\text{m}$ であった。Dekhuizenら(1969)は本菌の分生胞子の細胞壁は2層からなり $0.2\text{ }\mu\text{m}$ であり、菌糸の細胞壁も2層で $0.15\text{ }\mu\text{m}$ の厚さであると報告している。キュウリうどんこ病菌以外のうどんこ病菌の細胞壁もほぼ同じ構造であることが報告されている。Akaiら(1966)は



バラうどんこ病菌 *S. pannosa* の菌糸細胞壁は2層からなり0.16  $\mu\text{m}$ の厚さであるとしている。Knoh (1972) はムギうどんこ病菌である *Erysiphe graminis* も2層の細胞壁構造を保有し他の病原菌に比べて細胞壁の厚さは薄いと報告している。本菌は上述したような細胞壁を有するため、ごま葉枯病菌に比べて圧力に対する影響を受けやすいものと推察される。

本剤のうどんこ病菌に対する主な殺菌作用は、上記の点にあると考えられる。つまり、薬剤散布によってキュウリうどんこ病菌に付着した被膜は自然状態で徐々に縮小し、この被膜の縮小による圧力は本菌の細胞壁を部分的に変形させ、同時に細胞内では細胞質の液胞化やミトコンドリア等の細胞内小器官の消滅現象が生じる。ついには細胞質は凝集するとともに菌糸全体が収縮し死滅に至るものと推察される。しかしながら、細胞質の変性が被膜の縮小による細胞壁の収縮によってもたらされるものかについては、さらに実験が必要と考えられる。

一方、本剤はキュウリ組織内に形成される吸器に顕著な作用は認められず、また、吸器が死滅していると判断される電頭像は得られなかった。しかし、本剤を散布した場合、吸器の内部には無散布に比較して大きな液胞が発達している傾向が見られた。Dekhuizenら (1969) は *S. fuliginea* の吸器には様々な大きさの液胞が観察されることを報告しており、本剤を散布しなかった正常な吸器でも小さい液胞が発達していたので、液胞が本剤散布の直接的な影響によって生じたものと断定することは難しいと思われる。子葉表皮細胞上の菌糸は本剤によって強く影響を受け死滅していたものが多かったので、侵入糸によって菌糸と連絡している吸器に本剤が間接的に作用したものでないかと考えられる。また、本剤を散布した場合、吸器内に発達した液胞には多数の小胞構造と電子密度の高い未知の物質が含まれていた。本剤散布と無散布における吸器、樹状突起の内部にはいずれもリボゾームや細胞内小器官を含む細胞質が充

満しており、吸器全体の形態についても両者の間に明らかな差は観察されなかった。さらに、本剤散布と無散布における吸器の細胞壁，吸器囊膜および基質についても微細構造的に差異は認められなかった。

以上の形態的観察から明らかなように、表皮細胞内に形成された吸器に対する本剤の影響はほとんど認められなかった。このことは、本剤のキュウリ葉内での浸透移行性の作用はないとした第2章，第5節の結果を支持した。

表. 6-1 精製マシン油乳剤の各病原菌の分生孢子発芽におよぼす影響

供試薬剤	濃度 (ppm)	発芽率 (%) <sup>1)</sup>		
		キュウリ うどんこ病菌 <sup>2)</sup>	キュウリ 灰色かび病菌 <sup>2)</sup>	イネ ごま葉枯病菌 <sup>3)</sup>
精製マシン油 乳剤	10000	0.0	91.0	89.7
蒸留水	-	32.6	87.3	90.7

1) : 接種24時間後に測定した。

2) : セイヨウカボチャの子葉表皮細胞上で実施した。

3) : スライドガラス上で実施した。

表. 6-2 各病原菌の分生孢子的形態におよぼす水圧の影響

処理区		収縮分生孢子率 (%)		
水深 (cm)	処理時間 (分)	キュウリ うどんこ病菌	キュウリ 灰色かび病菌	イネ ごま葉枯病菌
5	5	19.1	- <sup>1)</sup>	-
	10	23.6	-	-
	30	31.6	-	-
10	10	78.0	-	-
	30	87.9	0.4	0.0
20	10	84.1	-	-
	30	89.7	0.2	0.0
30	10	91.3	-	-
	30	91.7	0.3	0.0
対照	-	8.0	0.2	0.0

1) : 未調査。

表. 6-3 各病原菌の分生孢子発芽におよぼす水圧の影響

処理区		発芽率 <sup>1)</sup> (%)		
水深 (cm)	処理時間 (分)	キュウリ うどんこ病菌	キュウリ 灰色かび病菌	イネ ごま葉枯病菌
5	5	11.7	- <sup>2)</sup>	-
	10	9.1	-	-
	30	8.9	-	-
10	10	6.2	-	-
	30	4.9	96.0	99.2
20	10	3.2	-	-
	30	1.5	74.5	99.0
30	10	0.5	-	-
	30	0.3	64.6	97.3
対照	30	36.7	94.4	99.2

1) : 外見健全な分生孢子のみを対照として発芽率を調査した。

2) : 未調査。

図. 6-1 精製マシン油乳剤10000ppm液散布直後のキュウリうどんこ病菌の分生孢子(C)と油滴(MO)。

(光学顕微鏡 66倍)

図. 6-2 薬剤散布40分後の被膜形成と収縮した分生孢子。

分生孢子的周囲に被膜(OF)が形成され一部の分生孢子(C)に収縮(矢印)が認められる。

(光学顕微鏡 66倍)

図. 6-3 薬剤散布90分後の収縮した分生孢子。

被膜に囲まれた部分が縮小し、ほとんどの分生孢子(C)が収縮(矢印)している

(光学顕微鏡 66倍)

図. 6-4 薬剤散布90分後に蒸留水を散布した場合の分生孢子。

分生孢子周辺の被膜は消失したが分生孢子的のほとんどは収縮したままの状態である。

(光学顕微鏡 66倍)

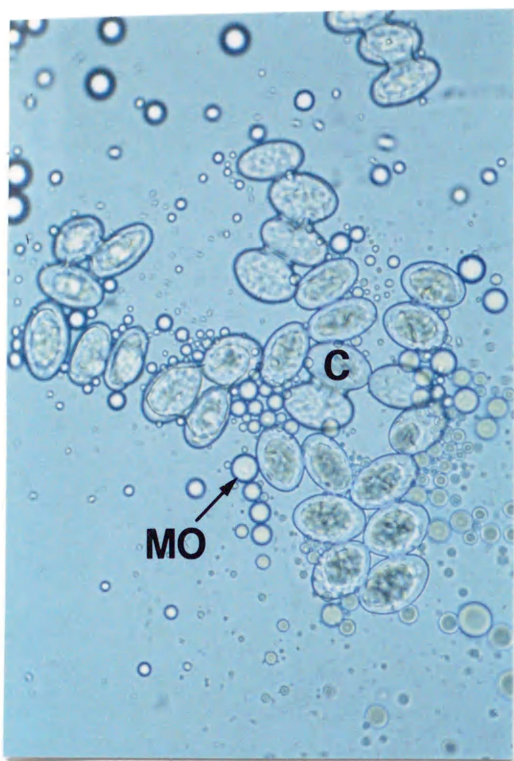


图. 6-1

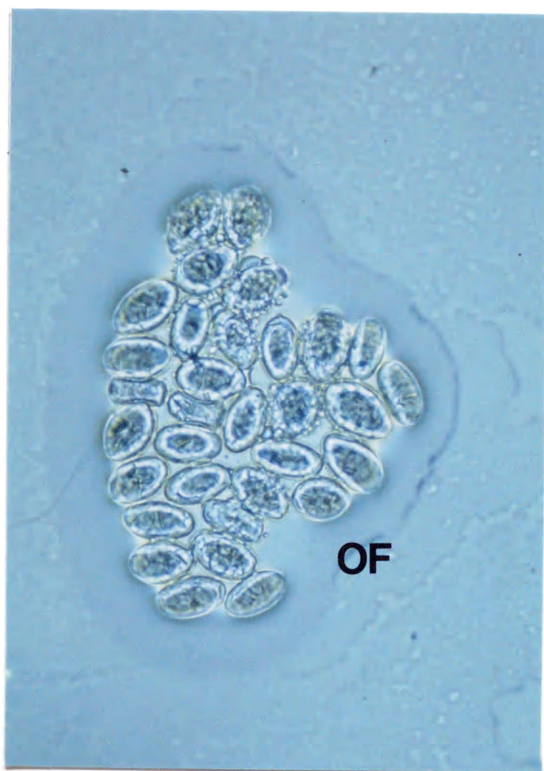


图. 6-2

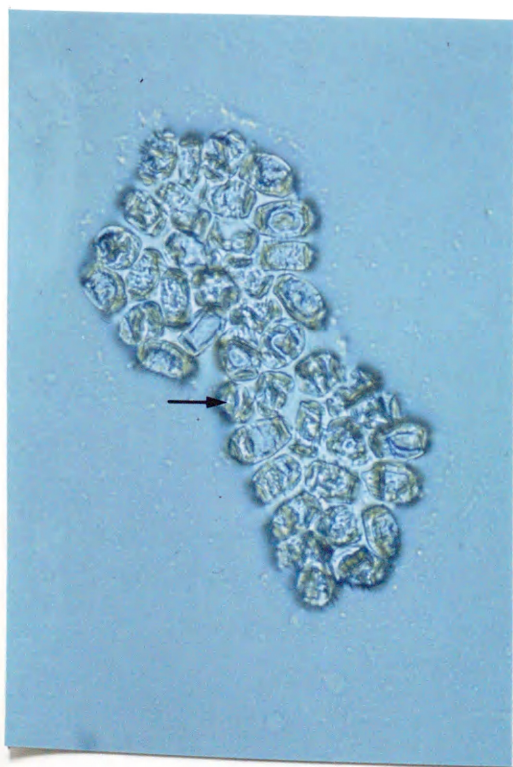


图. 6-3



图. 6-4

図. 6-5 薬剤散布90分後に蒸留水を散布し20℃, 24時間後保持した後の分生孢子。

被膜は消失しているが収縮したままの分生孢子 (C) が認められる。

(光学顕微鏡 66倍)

図. 6-6 薬剤散布後20℃, 24時間自然乾燥させた分生孢子。

被膜内 (OF) に存在する分生孢子は収縮している。

(光学顕微鏡 66倍)

図. 6-7 スライドガラス上で発芽した無処理区に分生孢子。

(光学顕微鏡 66倍)

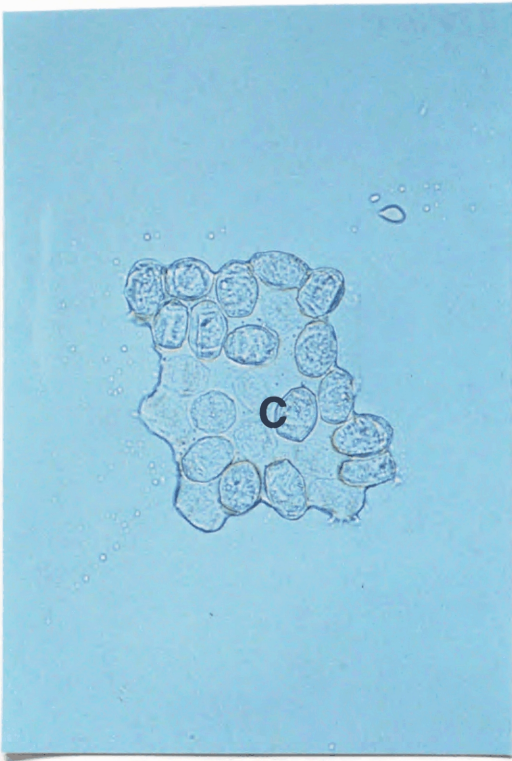


图. 6-5



图. 6-6



图. 6-7



- 図. 6-8 精製マシン油乳剤10000ppm液散布直後の  
キュウリ灰色かび病菌の分生孢子(C)と油滴(MO)。  
(光学顕微鏡 66倍)
- 図. 6-9 精製マシン油乳剤の被膜形成直前(薬剤散布40分後)。  
分生孢子の周囲に多数の油滴(MO)が観察される。  
(光学顕微鏡 66倍)
- 図. 6-10 被膜(OF)に覆われたキュウリ灰色かび病菌の分生孢子(C)。  
薬剤散布90分後の分生孢子は収縮(矢印)している。  
(光学顕微鏡 132倍)
- 図. 6-11 薬剤散布90分後に蒸留水を散布し24時間静置した状態。  
被膜(OF)が付着しているが分生孢子(C)は発芽し、  
菌糸(H)を伸長させている。  
(光学顕微鏡 80倍)

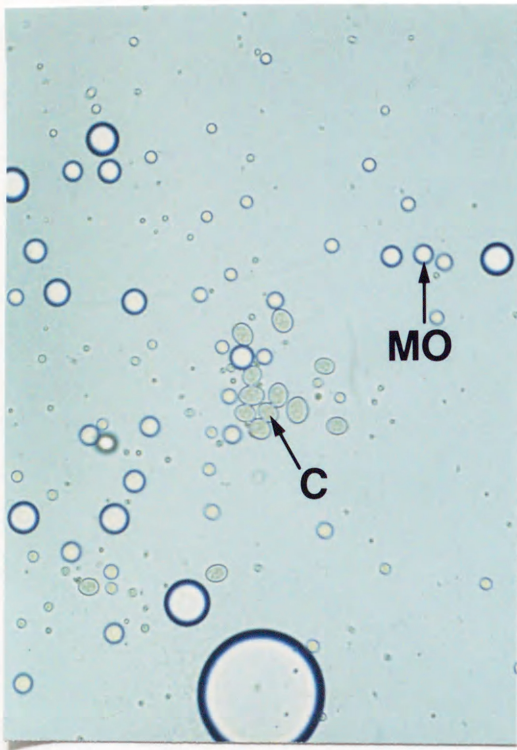


图. 6-8

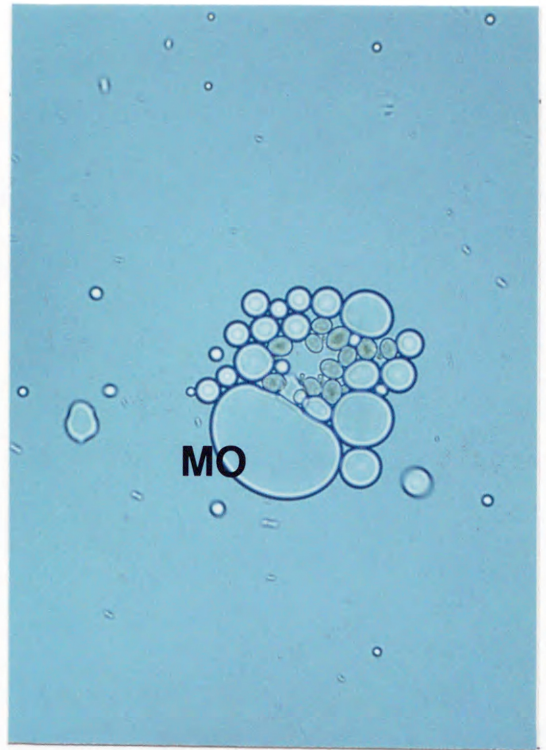


图. 6-9

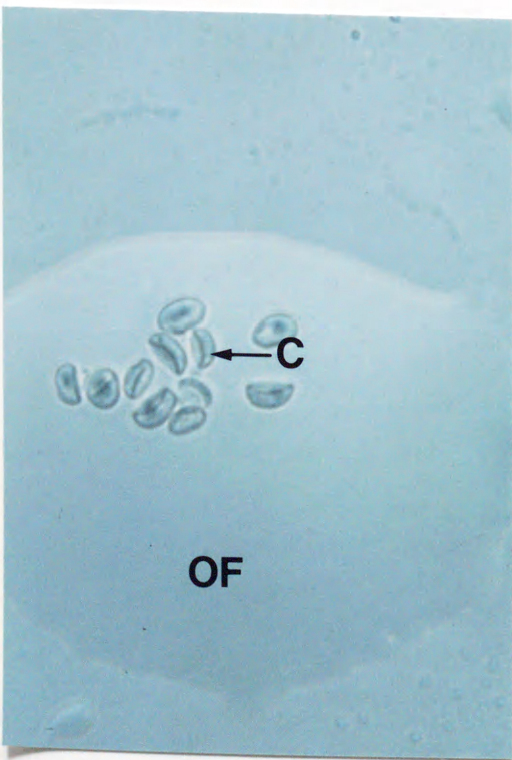


图. 6-10

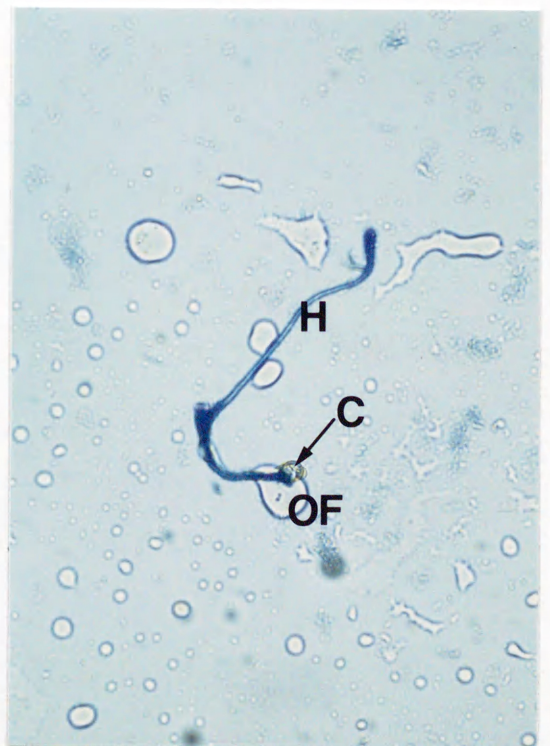


图. 6-11

図. 6-12 セイヨウカボチャ子葉の裏面表皮細胞に接種後、精製マシン油乳剤 10000 ppm 液を散布し、薬液乾燥後蒸留水を散布し 24 時間静置した灰色かび病菌の分生孢子。

菌糸 (H) を伸長させた分生孢子 (C 矢印) と被膜 (OF)。

(光学顕微鏡 66倍)

図. 6-13 セイヨウカボチャ子葉の裏面表皮細胞に接種した灰色かび病菌の分生孢子 (C) と菌糸 (H 矢印)。

(光学顕微鏡 66倍)

図. 6-14 被膜形成直前 (薬剤散布 40 分後) の状態。

イネごま葉枯病菌の分生孢子 (C) と周囲の油滴 (MO)。

(光学顕微鏡 33倍)

図. 6-15 被膜に覆われたごま葉枯病菌の収縮した分生孢子 (C)。

(光学顕微鏡 33倍)

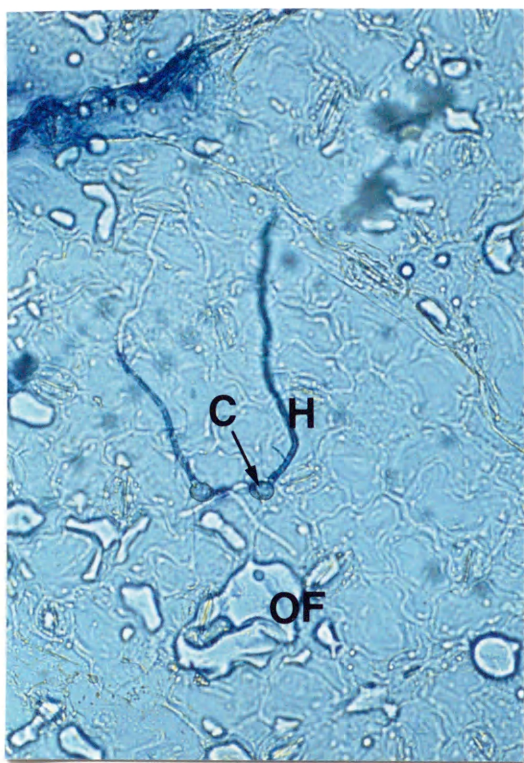


图. 6-12

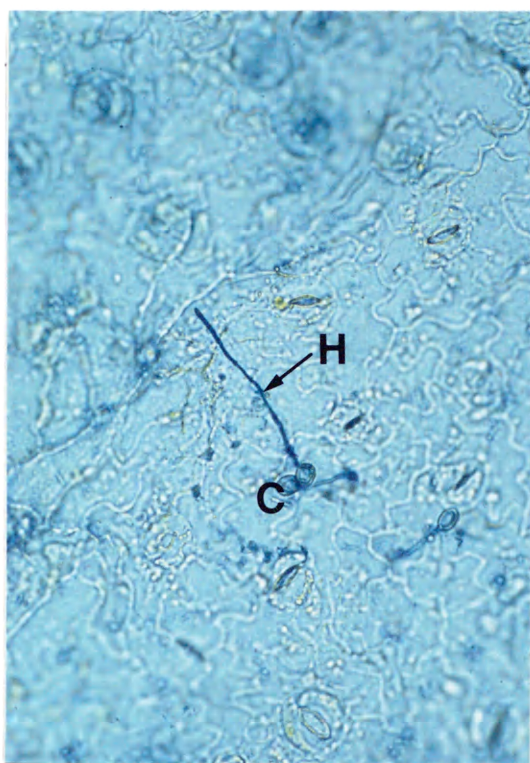


图. 6-13

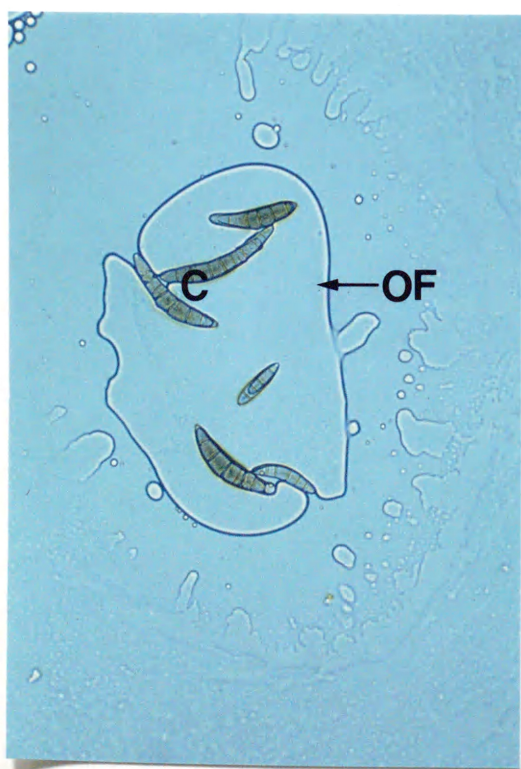


图. 6-14



图. 6-15

図. 6-16 スライドガラス上に置床後精製マシン油乳剤10000ppm液を散布し、薬液乾燥後蒸留水を散布し湿室としたペトリ皿に24時間静置したイネごま葉枯病菌の分生孢子。  
被膜 (OF) 内で発芽する分生孢子 (C) と菌糸 (H)。  
(光学顕微鏡 66倍)

図. 6-17 スライドガラス上に置床後薬剤を散布し、湿室としたペトリ皿に24時間静置したイネごま葉枯病菌の分生孢子。  
被膜 (OF) 内で発芽する分生孢子 (C) と菌糸 (H)。  
(光学顕微鏡 33倍)

図. 6-18 スライドガラス上で発芽したイネごま葉枯病菌の分生孢子。  
(光学顕微鏡 66倍)

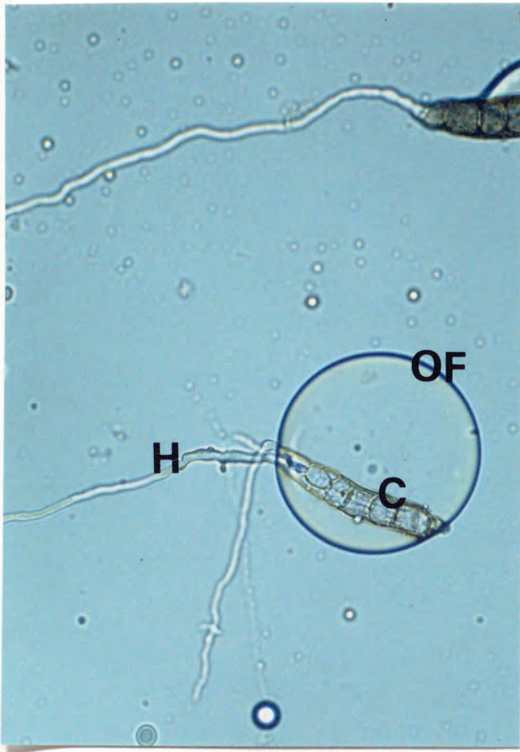


图. 6-16



图. 6-17

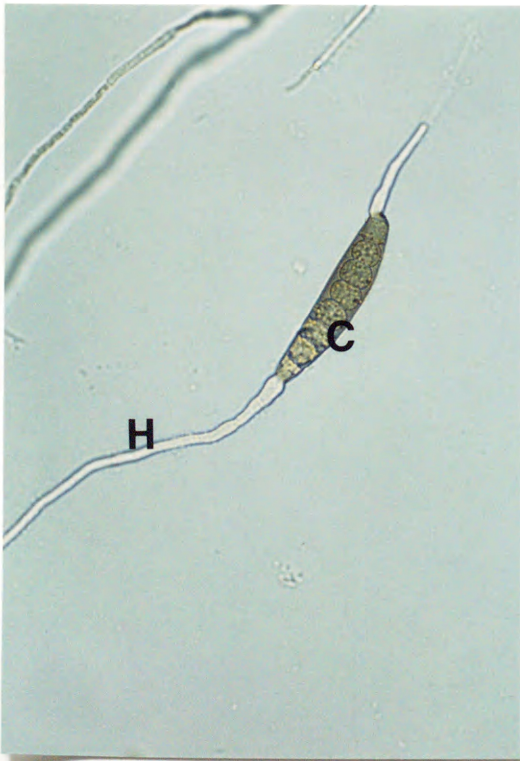


图. 6-18