

ユウガオつる割病の種子伝染に関する研究 VI

病原菌の維管束経路による種子保菌経路について

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	国安,克人
発行元	日本植物病理學會
巻/号	46巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 607-614
発行年月	1980年12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



ユウガオつる割病の種子伝染に関する研究 Ⅵ. 病原菌の維管束經由による 種子保菌経路について

国 安 克 人*

Katsuto KUNIYASU*: Seed Transmission of Fusarium Wilt
of Bottle Gourd, *Lagenaria siceraria* Standl. Used for
Root Stock of Watermelon VI. Direct
Invasion of the Causal Fungus Through
Vascular bundles to Seeds

Abstract

The distribution of the causal fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* Matuo et Yamamoto, in the vascular bundles of the loculus and placenta as well as seed coats of infected fruits was studied with the aim of tracing the direct invasion through the vascular bundles to the seeds. The infected fruits which were borne on diseased stems and did not show any decay of tissues but showed discoloration of the principal vascular bundles in the epicarp caused by the causal fungus penetration were used as materials for the observations. Presence of the causal fungus in the loculus and the placenta was confirmed by placing the tissue sections on solid Komada's medium, a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum*, and observing the development of the causal fungus. A distinct vascular bundle extending from the hilum through the raphe was observed in the seed coats. This bundle is known to be one of the anatomical features of the seeds developed from anatropous ovules such as the seeds of bottle gourd. Out of about 1000 seeds harvested from the infected fruits mentioned above, 23 seeds were proved to be infected with the causal fungus. In 6 seeds among the infected seeds, chlamydospores which presumably had originated from the causal fungus were observed in the vessels and in the parenchyma tissues of vascular bundles of the seed coats. Their diameter was 7.6 μm in average. While the diameter of the chlamydospores of the causal fungus cultured on apricot medium was 7.5 μm . Thus both chlamydospores showed nearly identical shape and diameter. The chlamydospores in the seed coats germinated when the infected seeds were incubated on Komada's medium at 25 C for 24 hr. The results mentioned above suggested the possibility of direct invasion of the seeds by the causal fungus through the vascular bundles.

(Received June 30, 1980)

緒 言

ユウガオの種子は果実内で柔組織に深く埋没して形成されるので、果肉が未腐敗の状態では採種に手数を要する。従って果実を圃場又はその周辺で腐敗発酵さ

せて採種する場合が多い。このような果肉の腐敗に伴って、主として果皮部の主維管束に潜伏していた病原菌が果肉内で増殖し、高率な種子保菌に至る経路についてはすでに報告されている^{7,11)}。しかし、果肉が未腐敗の状態でも、発病茎に着果した果実から低率であ

* 農林水産省野菜試験場
Japan

Vegetable and Ornamental Crops Research Station, Ishinden, Tsu 514-01,

るが保菌種子が検出され、この場合には維管束を経由した病原菌による種子の保菌が想定される。しかし、この経路については未だ明らかにされていない。

本報では、維管束經由による種子保菌経路を確認するために、病原菌の移行経路と関連のあるユウガオ果実、種子の各部位の形態およびこれらの部位における菌の分布状態を観察した結果について報告する。

本研究の実施にあたり、終始御指導を頂き、また本稿の御校閲を頂いた野菜試験場環境部病害第2研究室竹内昭士郎室長、栽培部生理第2研究室山田英一室長に深謝の意を表する。

果実および種子の各部位の形態観察

果実内の維管束を経由して病原菌が種子に侵入する経路を明らかにするために、諸文献^{1,3,4,5,6,9,13)}を参考にしながら果実および種子の各部位の形態観察を行った。

果 実

ユウガオの果実は Plate I-2, 3 に示すように子房下位に属する子房から発達し、3心皮よりなり、従って胚珠を含む子室は3室からなっている⁹⁾。ユウガオの雄花には Plate I-1 に示すように倒円錐形或は鐘形のがく基部があり、がく片は5片となっている。雌花も雄花と同じ位置にがく片があるが、がく基部が観察できない。ウリ類の果実は心皮性 (carpellary) および心皮外組織 (extracarpellary tissues) からなるが、この両組織には識別できる形態的差異がないとされている⁴⁾。このことは、雌花ではがく組織と子房の外壁がゆ着し、果皮部の主維管束は心皮性組織に由来するものと、心皮外組織のがくに由来するものとの混在を示していると考えられる。一般的にがく片には維管束を経由してつる割病菌が容易に侵入することが観察されるので、成果での果皮部主維管束も比較的病原菌の侵入を受けやすい部位とみなすことができよう。

ウリ類の果実は Plate I-4 に示すように、子房壁の発達した果皮部 (外果皮、中果皮および内果皮) と胚珠を内蔵する子室組織からなり、この両組織は互いに独立した組織とされている⁴⁾。ユウガオの果実でも Plate I-5 に示すように、果実を輪切りにすると、果皮部と子室を含む組織はナイフなどで切開しなくても容易に剥がし取ることができた。従ってこれらの両組織間には、果柄部以外では維管束の脈絡はないと考えられる。ユウガオ幼苗の一端を切除し (果柄部位)、切断面から 0.5% 酸性フクシン水溶液を吸収させて、果実内の維管束を染色すると、維管束が子室組織全般に

密に分布している状態が観察された。最終的には Plate I-6 に示すように、胎座に分布している一束の維管束によって、種子の hilum の部位で種子に連結している。ユウガオは無柄胚珠種子とされており⁹⁾、珠柄は観察されない。

種 子

ユウガオは倒生胚珠で、種皮内の維管束は胎座との着生点である hilum を始点とし、外種皮の縫線の下に沿って種皮内を一周している⁹⁾。hilum は Plate II-2, 3 に示すように、発芽孔と隣接し、乾燥した種子では柔組織が枯死して空洞化し、その中に道管束が観察された。縫線に沿って種皮を縦断した状態を Plate II-1 に示す。これらの観察結果から、病原菌が維管束を経由して種子に侵入する経路を確かめるためには、子室を含む組織内、胎座および種皮の各維管束部における菌の存在を明らかにする必要があると考えられた。

果実、種子各部位における病原菌の観察

子室組織における病原菌の存在

1. 材料および方法

ユウガオつる割病菌による汚染圃場にユウガオを栽培し、発病株に着果した成果で、果肉の腐敗の認められない果実を選び供試した。供試果実の表面を十分に水洗し、さらに80%エタノールを塗布して表面消毒したのち、果実を縦断して子室部の組織片を切り出した。酵素液として、Cellulase No. C-7502 (Sigma 社製) を緩衝液 (0.05M クエン酸水溶液に 0.2M Na_2HPO_4 水溶液を pH 5.0 となるように加用) に 1% の濃度となるように溶解させた^{2,12)}。まず組織片 40g を腰高ビーカーに入れて酵素液を 100ml 加え、真空ポンプを用いて吸引減圧し、酵素液を十分に浸透させたのち、25°C に 24 時間保持して酵素を作用させた。処理後、軟化した組織片は 32 メッシュの篩の上で水洗し、この篩を通過した部分を 80 メッシュの篩にうけて、さらに水洗した。80 メッシュの篩の上に残ったパルプ状の残渣を 50ml の殺菌水に懸濁させて検鏡すると、道管の組織片が多数観察された。この懸濁液を 1ml ずつとり、ペトリ皿に分注、固化させた培地の表面に均一に注入して、25°C に 3 日間保ち、*Fusarium oxysporum* の生育を観察した。供試培地はジャガイモ寒天培地 500ml に硫酸ストレプトマイシン 30mg を加え、10% 乳酸で pH 3.5 とした。培地上に生育した *Fusarium oxysporum* は、ユウガオ幼苗に接種して病原性を検定した。

2. 実験結果

子室組織をセルラーゼで分解して得た維管束組織片

Table 1. Detection of the pathogen in loculus of diseased fruit before decomposing its mesocarp (No. of colony grown in 10 petri dishes)

Fruit tested	No. of colony of <i>F. oxysporum</i>	No. of colony of the pathogen
A	4	3
B	7	2
C	2	0
D	9	4
E	7	0
F	6	0
G	12	3

Table 2. Detection of the pathogen in placenta of diseased fruit before decomposing its mesocarp

Fruit tested	No. of placenta tested	No. of placenta detected the pathogen	% of placenta detected the pathogen
A	76	4	5.3
B	104	3	2.9
C	39	0	0
D	58	0	0
E	76	0	0
F	77	0	0
G	362	3	0.8

の懸濁液から、希釈平板法に準じて病原菌を検出した結果を Table 1 に示す。供試した7個のうち、4個の果実の子室組織から病原菌が検出された。

ペトリ皿に注入した懸濁液中の維管束組織片を経時的に顕微鏡で観察し、*Fusarium oxysporum* の生育過程を調査した。その結果、Plate I-7, 8 に示すように道管内部に菌体が分布し、その菌体から新しく菌糸が伸長したとみられるもの、道管束にそって菌糸が伸展したとみられるものなどが観察された。これらの菌は、病原性検定の結果、いずれもユウガオつる割病菌であった。以上の結果は、子室組織内で本病原菌が維管束を経由してまん延する可能性を示唆するものと考えられる。

胎座および種子からの病原菌の検出

1. 材料および方法

供試果実から胎座を殺菌したピンセットで摘出し、前項試験と同じ培地に直ちに置床して、25°C、5日間培養し、*Fusarium oxysporum* の分離と、分離菌の病原性を検定した。

種子からの病原菌の検出には、発病株に着果した果実で、果肉の腐敗の認められないものから採種し、水

洗後乾燥させた種子を供試した。供試種子を駒田培地⁸⁾上に置いて、25°C、5日間培養して *Fusarium oxysporum* の分離を行い、さらに分離菌の病原性を検定した。また種子の部位別に菌の検出状態を調査した。

2. 実験結果

胎座からの病原菌の検出結果を Table 2 に示す。供試した7個のうち、3個の果実の胎座から病原菌が検出され、その検出率は0.8~5.3%であった。

種子からの病原菌の検出結果を Table 3 に示す。供試した7個の果実のうち、6個から得た種子に病原菌の存在が認められ、その検出率は0.4~4.2%を示した。種子の部位を先端部（発芽孔のある部位）、中央部、末端部に分けて病原菌の検出状態を調査したが、この試験の範囲では、とくに検出率の高い部位は認められなかった。

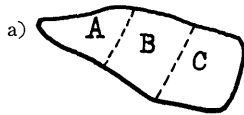
種皮維管束部における病原菌の観察

1. 材料および方法

供試種子は前項試験と同様に、発病株に着果し、果肉の腐敗の認められない果実から採種した。供試種子の種皮を縫線に沿って2分し、それぞれに同一番号を

Table 3. Detection of the pathogen in seed collected from diseased fruit before decomposing its mesocarp

Fruit tested	No. of seed tested	Seed part detected the pathogen ^{a)}						% of seed detected the fungus
		A	B	C	AB ^{b)}	AC ^{b)}	BC ^{b)}	
A	213	3	1	2	0	2	1	4.2
B	250	0	0	0	1	0	0	0.4
C	160	2	0	0	0	0	0	1.3
D	187	0	1	0	0	0	0	0.5
E	320	0	0	0	0	0	0	0
F	130	1	2	0	0	0	0	2.3
G	436	3	1	2	0	1	1	1.8



b) Detection in the both sides.

付した。分割した種皮の一方を駒田培地に置床し、生育してきた *Fusarium oxysporum* の病原性を検定して病原菌保菌種皮を選抜した。病原菌の検出された分割種皮と同一番号を有する他方の分割種皮を病原菌の観察材料とした。菌体の観察を容易にするために、供試種皮をあらかじめ駒田培地上におき、25℃に24時間保って種皮内の菌体を発育させた。

観察材料は久能ら¹⁰⁾の方法に従って導電染色し、臨界点乾燥後、イオンスパッタ被覆法による金蒸着を行って、走査電子顕微鏡で種皮維管束部の菌体を観察した。

種皮内で観察された菌体と比較するために、信州大学より分譲を受けたユウガオつる割病菌 SuF 797 を、アブリコット寒天培地で平面培養し、形成された厚膜胞子を走査電子顕微鏡で観察した。培地をペトリ皿に浅く分注し、25℃で約3週間培養後、培地が乾燥し被膜状となった部位に厚膜胞子が形成された。この部位をカミソリで約5mm角に切り、殺菌水を注いで剥がし、上述の方法で前処理した。

2. 実験結果

供試種子1000粒中から23個の保菌種子が検出され、そのうち6個の種子の種皮維管束部に、ユウガオつる割病菌の厚膜胞子と推定される菌体が多数観察された(Plate II-4)。これらの菌体は、道管と道管の間に埋没しているもの(Plate II-5)、道管の外面上に付着して形成されたもの(Plate II-6)、あるいは菌体が道管内部に分布し、発芽によって菌糸が道管外に伸び出したもの(Plate II-7)などが観察された。

走査電子顕微鏡の倍率表示スケールの長さを基準に

して換算すると、種皮内の菌体の大きさは径7.0~9.6 μm 、平均7.6 μm 、培地上の厚膜胞子(Plate II-8)の大きさは径5.7~10.2 μm 、平均7.5 μm で両者は形態および大きさがほぼ一致する値が得られた。

考 察

果実および種子の各部位の形態観察から、病原菌が維管束を經由して種子に侵入する経路は、「果柄→果柄基部→子室組織→胎座→種子の胎座着生点(へそ)→種皮内維管束」と推定された。本報ではこれらの部位における病原菌の存在や分布を調査することによって、この侵入経路を明らかにしようとした。すでに発病株に着果した成果において、果柄から果柄基部、さらに外果皮直下に分布する主維管束部には道管内を經由して病原菌が比較的容易に侵入することを報告した⁷⁾。当初はこの主維管束が分岐して、最終的に種子に連絡していると考えられたが、果皮部と種子を内蔵する子室組織とは独立した組織であって、相互間に維管束の連絡はないとされ⁴⁾、果実の形態観察の結果、その状態を確かめることができた。また子室組織内、胎座および種子のいずれからも低率ではあるがユウガオつる割病菌が検出され、この部位に病原菌が分布していることを確認することができた。しかし、子室組織内や胎座に分布する菌の形態や、存在部位などについてはさらに検討が必要である。

ユウガオの乾燥種子の種皮を縫線に沿って縦断し、走査電子顕微鏡で観察すると、その縦断面に露出した種皮の維管束部に、菌体が分布する状態を容易に認めることができた。これらの菌体は、あらかじめ病原菌

を保菌していることを確認した種皮の中で観察され、さらに駒田培地に置いた種皮上で、25°C、24時間後に発芽したこと、形状や大きさがユウガオつる割病菌の培養により形成された厚膜胞子とほぼ一致したことから、本病原菌の厚膜胞子と考えられる。これらの厚膜胞子は、道管と道管の間の柔組織に埋没しているもの、道管の外面に付着して形成されたもの、あるいは道管内部に分布すると推定されるものなどが観察された。以上の結果から、道管内およびその周囲の柔組織内を菌が進展し、種子内に侵入する経路のあることが推定された。

摘 要

1. 病原菌が維管束を経由して種子に侵入する経路は「果柄→果柄基部→子室組織→胎座→種子の胎座着生点（へそ）→種皮内維管束」と推定された。これら

の各部位から病原菌が検出された。

2. 果肉未腐敗の罹病株着生果実から採種した供試種子約1000粒の中で、23個の保菌種子が検出され、そのうち6個の種子の種皮維管束に、本病原菌の厚膜胞子らしい菌体が観察された。その形状および大きさは、培地上に形成されたユウガオつる割病菌の厚膜胞子とほぼ一致した。

3. 種皮維管束内での菌体は、道管の外面に付着したもの、道管と道管の間の柔組織に埋没したもの、道管内部に分布すると想定されるもの等が観察された。

4. 以上のように、罹病株に着果し、果肉の腐敗の認められない果実内の各部位から病原菌が検出され、種子からも低率ながら病原菌が検出された。このような果実では、病原菌が維管束を経由して種子に移行するものと推定される。

引用文献

1. Barber, K. G. (1909). Botanical Gazette 47: 263-310.
2. Edmunds, J. E. and Mai, W. F. (1966). Phytopathology 56: 1132-1135.
3. 猪野俊平 (1954). 植物組織学. 内田老鶴圃, 東京. pp. 587-604.
4. Esau, K. (1976). Anatomy of Seed Plants, 2nd Edition. John Wiley and Sons, New York, pp. 429-473.
5. Jones, H. A. and Rosa, J. T. (1928). Truck Crop Plants. McGraw-Hill Book Company, New York, pp. 405-437.
6. 木島正夫 (1972). 植物形態学の実験法. 広川書店, 東京. pp. 260-298.
7. 国安克人・岸 国平 (1977). 日植病報 43: 192-198.
8. 駒田 旦 (1976). 東近農試研報 29: 132-269.
9. 近藤万太郎 (1942). 農林種子学. 養賢堂, 東京. pp. 512-543.
10. Kunoh, H., Watanabe, T., Yamada, M. and Nagatani, T. (1975). Trans. mycol. Soc. Japan 16: 361-365.
11. 竹内昭士郎・小川 奎・野村良邦 (1978). 農事試研報 28: 49-76.
12. 谷 利一 (1965). 香川大学農紀要 18: 1-83.
13. 小倉 謙 (1958). 植物解剖及形態学, 第7版. 養賢堂, 東京. pp. 232.

Explanation of Plates**Plate I.**

1. Staminate flower of bottle gourd
2. Pistillate flower of bottle gourd
3. Transverse section of ovary
4. Transverse section of the fruit
5. Separation of the tissues occluding loculus from fruit wall
f: Fruit wall, t: Tissue occluding loculus
6. Attaching the seed to placenta (arrow)
7. Mycelia spreading from inner part of a vessel obtained from the tissues occluding loculus and incubated on medium
8. Mycelia spreading along vessels obtained from the tissues occluding loculus and incubated on medium

Plate II.

1. Vascular system in the seed coat (middle)
2. Transverse section of the seed at the hilum
HI: Hilum, MI: Micropyle
3. Magnification of hilum
v: Vascular bundle
4. Mass of chlamydospores observed in vascular system of seed coat
5. Chlamydospores embedded in parenchyma of vascular system of seed coat
6. A chlamydospore on a vessel of seed coat
7. Germinating hyphae of a chlamydospore presumably situating in a vessel of seed coat
8. A chlamydospore formed on apricot medium

Plate I

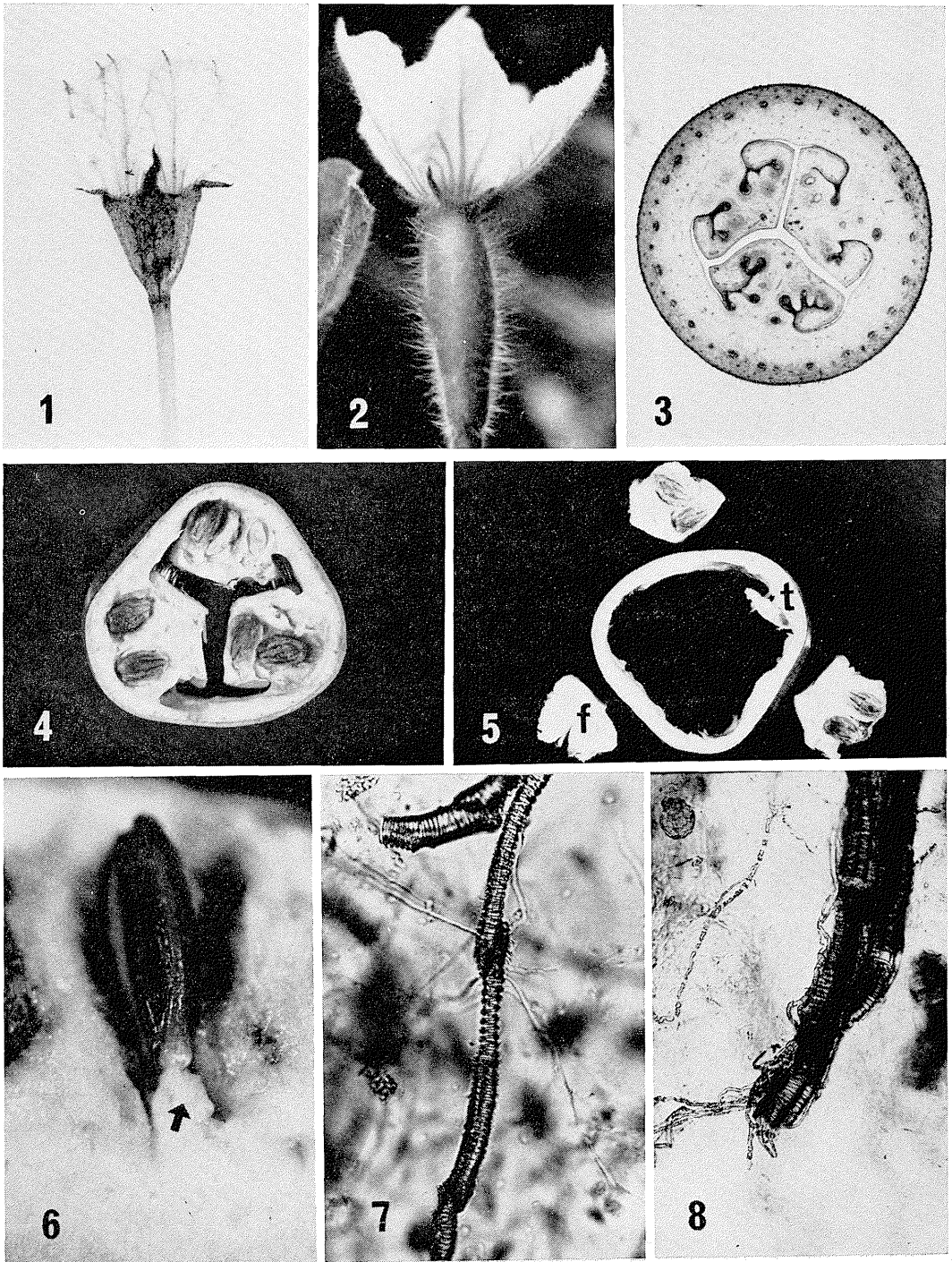


Plate II

