ユウガオつる割病の種子伝染に関する研究

II. ユウガオ種子の保菌経路について

国 安 克 人*・岸 国 平**

Katsuto KUNIYASU and Kunihei KISHI : Seed Transmission of *Fusarium* Wilt of Bottle Gourd, *Lagenaria siceraria* Standl., Used as Rootstock of Watermelon.

II. The Seed Infection Course from the Infected Stem of Bottle Gourd to the Fruit and Seed.

Abstract

The percentage of seed infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* Matuo et Yamamoto, was estimated as 2.0-16.8 in the seed lots assessed by sowing them in soil and observing symptom appearance on the seedlings. The seed infection varied according to seed lot originated from different mother fruit. The seeds tested were collected from diseased fruits after allowing their mesocarps to decompose completely in the fields following the routine method practiced by seed collectors for market. The pathogenic fungus was isolated from various parts of infected plant in order to clarify the route by which the fungus moved from diseased stem to the seeds. The fungus was detected consistently from the discolored xylem tissues of stems and peduncles. In unripe fruits, the invasion of the fungus was restricted to the base of peduncle, and no fungus was detected from any other part of the young fruit. In mature fruits borne on the diseased stem, however, brownish discoloration was found in the principal vascular bundles and the fungus was readily isolated from those parts. It was also isolated from tissue sections obtained from the mesocarp including finer vascular bundles as well as from the seeds. The result shows the possibility of direct invasion of the pathogen to the seeds through the vascular bundles. But the level of infected seed resulting from such direct invasion was quite low as a whole. With advance of maturity of diseased fruit, the fungus latent mostly in the discolored vascular bundles multiplied saprophytically within the decaying mesocarp and then penetrated subsequently into seed coats. Some of them penetrated even into embryos. High rate of seed infection, 16.8-46.7%, resulted from decomposition of mesocarps. The fungus was deep-seated in the seed-coats from its epidermis to parenchyma tissues in the forms of mycelia and chlamydospores. On the contrary, the fungus adhering to the surface of seed coats was very low in its population, and almost all of them died out during its storage for 4 months.

(Received January 20, 1977)

緒 言

筆者らは1974年以来、野菜病害の種子伝染について研究を開始し、現在までにユウガオつる割病⁷⁾、キュウ

ウリつる割病⁸⁾などについての実験結果を報告して来た。

ユウガオつる割病に関しては、前報⁷⁾において、市販種子の中に2~5%の割合で同病菌を保菌する例が

* 農林省野菜試験場 Vegetable and Ornamental Crops Research Station, Ishinden, Tsu, Mie, Japan.

** 農林省農林水産技術会議事務局 Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council, Ministry of Agriculture and Forestry, Tokyo, Japan.

あり、これがもとで種子伝染による発病が起ること及びその発病は接木操作中の伝染によって増幅される危険性のあることを明らかにした。1974, 1975の両年、日本各地において発生したユウガオ台スイカの萎ちょう枯死は種子伝染によるユウガオつる割病が原因であったことが関連諸報告^{4) 11) 14) 16) 17)}及び筆者ら⁷⁾の報告によって明らかにされた。しかしながら一般に種子伝染の証明のためには、市販種子における事例の証明だけでは不十分であり、発病株から得られたことが明らかな種子を用い、その事実を証明することが必要である。そこで本報においては、まず人工接種によって確実に本病に罹病させた株から採種し、種子伝染の事実を証明するとともに、本病における種子伝染の機構、すなわち根から侵入した病原菌の種子に至る過程ならびに種子上における病原菌の生存の状態等を明らかにしようとした。

実験材料及び方法

有機水銀剤によって種子消毒したユウガオ種子を、1974年5月7日に殺菌土には種し、6～7葉期になった苗を6月4日にユウガオつる割病菌接種は場に定植した。8月上旬ころより発病が認められ始めたので (Fig. 1), これらの発病株を順次実験に供した。な

Fig. 1. Infected plant of bottle gourd.

お供試したユウガオつる割病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* Matuo et Yamamoto⁹⁾ はすべて野菜試験場病害第2研究室保存の Lg 740101を用いた。

種子伝染の証明 発病株の中で比較的病勢の進展がおそく、果実の成熟まで生命を保った株から果実を得、ユウガオ採種地で行われている慣行に従い、果皮に数個の穴をあけ、果肉が完全に腐敗するまでは場に放置した。9月上旬に果別に採種し、比較的稔実良好な4果分の種子を種子伝染による発病の検定試験に供した。すなわち約7か月間デシケータに入れて4℃下で貯蔵し、1975年4月4日にまず殺菌上には種し、子葉の完全展開期に至った幼苗を、ユウガオの栽培歴の全くないほ場に定植し、以後約2か月半、本葉6～7葉期になって新たな発病株が認められなくなるまで観察を続けた。

発病株各部位からの病原菌の分離 病茎及び果梗からの場合は、厚さ3mm程度の輪切状の組織切片を、幼果の場合は、果頸部、果中央部及び果頂部の3部位より、果皮と果肉部の境界部に分布する維管束を含め約5mm立方に切取った組織片を、また成熟果の場合は、果梗、果梗基部、果実頸部、果中央部、果頂部の各部位から、主維管束を含む果皮部、維管束支脈を含む果肉部から約5mm立方に切取った組織片を、まずアルコール及び昇汞水を用いて常法により表面殺菌を行い、培地を分注したペトリ皿に置床し、25℃で5～7日間培養した。培地は特に断わる場合のほかはすべて駒田⁵⁾の報告したフザリウム菌選択分離培地を用いた。腐熟した成熟果の場合は、供試箇所は末腐熟の成熟果と同様としたが、果肉部においては、変色は認められるが組織の崩壊していない部位から約1cm角の組織片を切取り、常法により表面殺菌を行ったのち、殺菌ナイフで切片内部よりさらに小切片を切取り、これを直ちに培地上において菌の検出を行った。種子の場合は、腐熟果、末腐熟果を問わず、殺菌ピンセットを用い、果肉内部から種子を抜き取り、表面殺菌することなく直ちに培地上において菌の検出を行った。

分離したフザリウム菌の病原性の検定 選択分離培地によってフザリウムと判定された菌そうが得られた場合は、各組織片からそれぞれ1株、他の試験管に分離培養し、さらにジャガイモ寒天培地を分注したペトリ皿に25℃、約1週間培養後、ペトリ皿1個当たり30mlの殺菌蒸留水を注ぎ、綿棒で培そう表面をこすって孢子ならびに菌糸片の懸濁液を作り、これを接種

源として子葉完全展開期のユウガオ幼苗各3本の根に浸漬接種した。接種苗は直ちに殺菌土に移植し、約2週間後病徴を観察し、子葉または本葉の葉脈黄化および萎ちょう枯死の症状を示した場合をもって病原性ありとした。

種子表面からの菌体の検出 200mlの三角フラスコに30mlの0.05%素寒天液を入れ、その中に供試種子を各30粒ずつ入れ、振とう器(300rpm)に30分間かけて強振し、その中から1mlずつ5点取ってフザリウム菌選択分離培地を分注した5個のペトリ皿のそれぞれに均一に注ぎ、平板法によって菌量を調査した。供試した種子は自家採種の保菌種子5点、市販種子1点及び人工汚染種子1点とした。人工汚染種子はユウガオつる割病菌を25℃で10日間振とう培養し、顕微鏡1視野(150倍)当たり平均160個の孢子懸濁液と

したもの浸漬して十分攪拌し、3日間風乾させて作製した。採種後の貯蔵期間と菌検出との関係を知るために、1か月毎に5か月後まで貯蔵したそれぞれの種子から上述の方法で菌の分離を行った。

実験結果

種子伝染の証明 Table 1 に示したように、4本の罹病株に成った各1個の果実から採種した種子を、それぞれ144, 146, 155, 101粒は種し、約2か月半の間に2.8, 11.6, 16.8, 2.0%の発病が認められた。同時に用いた市販種子からも126本中7本、5.6%が発病した。これによって、前報⁷⁾において推定した本病の種子伝染が、実験的にも明らかに証明されたことになる。

Table 1. Disease incidence by sowing the seeds harvested from diseased fruits after complete decomposition of their mesocarps

Seed lot tested	No. of seeds germinated	Periodical observation on disease incidence				Total no. of diseased plants	% of diseased plant
		May 11 -20	May 21 -31	June 1 -10	June 11 -20		
Seeds harvested from diseased fruit							
No. 1	144			1	3	4	2.8%
No. 2	146	3	10	2	2	17	11.6
No. 3	155	5	17	3	1	26	16.8
No. 4	101		1		1	2	2.0
Seeds on market	126		4		3	7	5.6

Date of sowing; April 4.

罹病株各部位における病原菌の分布

茎 0.5m 毎に調べた結果、主茎では茎基部から3m、側枝では主茎部から1.5m離れた部位からも病原菌が検出され、罹病株においてはほぼ全茎にわたって菌の分布が認められた。

幼果 果梗および果梗基部までは菌の分布が認められたが、それより内部からは調査果実のいずれからも菌が検出できなかった。

成熟果 果実には果皮の内側に、果梗部の維管束と直接連結する約20本の太い維管束が縦方向に走っており、果肉を通過して種子に至る維管束はいずれもこれと連結している。この太い維管束を以下主維管束と呼ぶことにする。罹病株から得られた成熟果のうち、この主維管束が顕著にかつ変している果実9個について

(Fig. 2) 組織各部からの病原菌の検出を行った。その結果 Table 2 に示すように、果梗、果梗基部、果皮部(主維管束部を含む)からはほぼ例外なく高率に本病原菌が分離された。主維管束部の徒手切片を作り、顕微鏡で観察すると Fig. 3 に示したように多くの菌体が観察された。末腐熟果の果肉部から得た組織切片からも低率ではあったが病原菌が検出された。また供試した9果実のうち2果から摘出した種子の一部から病原菌が検出された。これらの結果から、主維管束部から果肉内の維管束支脈を経由して種子に病原菌が侵入し得ると推定された。

腐熟した成熟果 腐熟の進行中の果実内部の維管束は主維管束のみでなく、果肉内に分布する支脈までも顕著にかつ変し、なかには組織が崩壊しているもの

Table 2. Detection of the pathogenic fungus in diseased fruit before decomposing its mesocarp

Fruit tested	Peduncle	Base of peduncle	Outer mesocarp including principal vascular bundle			Mesocarp including finer vascular bundle			Seed
			Peduncle end side	Middle part	Stylar end side	Peduncle end side	Middle part	Stylar end side	
No. 1	4/10	4/10	2/4	2/4	0/4	5/9	0/11	0/12	5/10
No. 2	4/10	3/13	3/7	1/7	0/7	0/10	0/10	0/10	3/10
No. 3	10/12	7/11	4/4	0/4	2/4	0/11	2/10	0/10	0/12
No. 4	2/10	2/10	6/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/16
No. 5	5/10	1/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
No. 6	10/10	2/10	2/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/20
No. 7	4/10	0/10	2/10	3/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/20
No. 8	4/10	3/10	3/10	1/10	1/10	0/10	1/10	0/10	0/20
No. 9	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/20

Numerator is the numbers of tissue fragments in which the pathogenic fungus was detected; denominator is the numbers of tissue fragments tested.

Fig. 2. Infected fruit of bottle gourd showing browish discoloration of its xylem tissues.

も認められた。このような維管束を果肉を含めてかき取り顕微鏡で観察すると、果肉内に菌糸が充満し、フザリウム菌の胞子の形成も認められた。また腐熟した5果の果肉汁液を接種源とし、ユウガオの幼苗に接種したところ、全株が発病し、このような果実では本病原菌が果肉内で増殖していることが明らかとなった。腐熟の進行中の果実の各部位からの菌の検出結果はTable 3に示した。腐熟果においては果梗、果梗基部、果皮部主維管束はもとより、果肉部においても被

Fig. 3. Pathogenic fungus observed in discolored principal vascular bundles of infected bottle gourd fruit.

検組織片からはほぼ例外なく病原菌が検出された。供試した種子からも、最低16.7%, 最高46.7%の割合で病原菌が検出され、供試した5果実すべてから保菌種子が得られた。

保菌種子における病原菌の生存部位及び形態

調製後の種子において、病原菌が生存する形態としては、種子表面に胞子あるいは菌糸の形で付着している場合と、種子の組織内に寄生している場合とが考えられる。この両者について明らかにするため、前者については0.05%素寒天液とともに振とうし、落ちて来る菌体を検出する方法をとり、後者についてはミクローム切片を作り、直接検鏡する方法をとった。

種子表面に付着した菌体の検出 Table 4に示したように、罹病果より採種した自家採種種子では、種子表面に単に付着しているとみられるフザリウム菌

Table 3. Detection of the pathogenic fungus in diseased fruit decomposing its mesocarp

Fruit tested	Extent of decomposing mesocarp of the fruit ^{a)}	Peduncle	Base of peduncle	Mesocarp including principal vascular bundle	Mesocarp including finer vascular bundle		Seed
					Middle part	Stylar end side	
No. 1	I	2/10	8/10	7/10	1/10	0/10	5/30
No. 2	II	10/12	9/15	2/20	2/9	2/16	9/30
No. 3	III	3/10	4/10	3/10	7/10	1/10	14/30
No. 4	IV	11/11	9/18	24/27	3/21	12/20	8/30
No. 5	V	6/10	10/10	4/10	2/10	6/10	13/30

a. I ; one fourth of the fruit was decayed, II ; one third was decayed III ; one second was decayed, IV ; two third was decayed, V ; three fourth was decayed.

Table 4. Detection of the pathogenic fungus seated on the surface of seed coat by means of plate-count technique and quantitative^{a)} shifting of the fungus during storage of the seeds

Seed lot tested	No. of fusarial colonies appeared on a plate						Pathogenicity test	
	Duration of storage (month)						No. of isolate tested	No. of pathogenic isolate
	0	1	2	3	4	5		
Seeds harvested from diseased fruit								
No. 1	7	3	3	0	0	0	10	0
No. 2	2	1	1	0	0	0	13	1
No. 3	19	2	0	0	0	0	20	2
No. 4	5	2	0	0	0	0	15	3
No. 5	66	10	2	0	0	0	20	10
Seeds inoculated artificially	1480	159	8	2	0	0	10	10
Seeds on market	0	0	2	0	0	0	2	0

a : Thirty seeds were immersed in 30 ml of water and shaken vigorously for 30 minutes to remove the fungal bodies adhering to the seeds. Then one ml of the suspension was poured evenly into a petri dish with Komada's medium, a selective isolation medium for *Fusarium oxysporum*.

は、採種直後においては少量ながら検出され、その中にはユウガオつる割病菌も低率ながら含まれていた。しかし1か月間の貯蔵後では菌の検出数が顕著に減少し、3か月以降ではほとんど検出できなくなった。ユウガオの種子をユウガオつる割病菌孢子懸濁液に浸漬し、乾燥させて作製した人工汚染種子においてもこれと同様の傾向が認められ、接種直後の種子からは極めて多数のユウガオつる割病菌が検出されたが、4か月間の貯蔵後では全く検出されなくなった。市販種子からはこの方法ではフザリウム菌は全く検出されなかった。

種皮内部に潜伏する菌体の観察 前述の実験の過程で、最も高い保菌率を示した果実の種子を用い、種子1個ずつを2等分し、それぞれの片方を病原菌の分離試験に供した。供試した種子の中で、フザリウム菌が分離されかつ病原性が確認されたものの他の半分を観察に供した。観察に当っては、ユウガオの種皮は硬いため、瀧元の示した方法¹⁵⁾ によって軟化処理を施したのち常法によりパラフィンに埋蔵し¹²⁾、ミクローム切片を作製して検鏡した。

その結果、Fig. 4 に示したように、種皮の表皮下層から種皮深部の海綿状組織⁶⁾ に至るまで、菌糸のまん

Fig. 4. Mycelia and chlamydospores of the pathogenic fungus invading tissues of seed coat.

延が認められ、また厚膜胞子の形成もしばしば認められた。

考 察

前報⁷⁾において、菱ちょう枯死問題を起こしたと同じ品種の市販ユウガオ種子が、つる割病菌を保菌しかつ種子伝染によって2～5%の割合で発病したことを報告したが、本報では、人工接種によって確実に本病にかからせた株からとった種子が、やはり種子伝染によって発病することを明らかにした。これによって本病の種子伝染の事実は、完全に証明し得たものと思われる。

本病の発病株では、病原菌は茎葉部及び果梗部までは維管束を経由して速やかに移行することが観察されたが、幼果の段階では果実内には菌の存在が認められなかった。茎や果梗などでは若いものから菌が検出される点からみて、幼果では果梗基部から果実内への菌の侵入が何らかの原因で阻止されるのではないかと推定された。同様な現象はキュウリつる割病¹⁸⁾でも報告され、筆者らもナス半枯病、トマト菱ちょう病において観察している（未発表）。本問¹⁾ 2)はカンキツ黒点病では未熟果の間は果梗基部に抗菌性物質が蓄積され、化学的に菌の伸長が阻止されるが、成熟の進行とともにこの抗菌性物質が消失し、このために果実内への菌の移行を許し、軸腐症状が起こることを明らかにした。本病の場合も、果実が成熟すると、果梗維管束から果実の主維管束に菌が移行し、果肉及び種子にまで菌が達することを明らかにした。ユウガオの場合は、その原因がカンキツの場合のように化学的な理由

によるものかどうか明らかでないが、今後解明すべき興味ある問題と考えられる。

罹病果実内部における病原菌の分布調査から種子保菌に至る2つの経路が想定された。1つの経路は果肉の腐敗を伴わず、果梗部維管束から果皮部の主維管束に菌が侵入し、主維管束から分岐し果肉内部に分布する維管束支脈を経由して種子に達する経路である。この経路のあることはTable 2に示したように未腐熟の成果で、維管束支脈の分布する果肉部切片からも低率ながら本菌が分離され、更に調査果実9個のうち2果から得た種子からも本菌が分離されたことから間接的な証明を得た。道管を経由して種子に直接菌が侵入する経路についてはまだ十分に追跡し得なかったため今後さらに観察して行きたい。

第2の経路は、罹病果の果肉が過熟の状態に達すると、主として主維管束部に潜伏していた病原菌が果肉内で腐生的に増殖し、種皮の表皮に達し、種皮深部からさらに1部は胚部にまで侵入する経路である。果肉の腐熟過程にある病果から直接採種した場合にはTable 3に示すように培地上における菌の検出率は32.6%に達し、同種子のは種によって本葉2～3葉期の幼苗期で16.0%の発病が認められた。このことから果肉の腐熟によって高率な種子保菌が起因されることが明らかとなった。フザリウム菌が過熟した果肉内で腐生的に増殖することは、キュウリつる割病菌を接種したキュウリの果実でも認められている^{10) 13)}。

ユウガオは硬果皮型果実³⁾の典型で、特殊な採種方法がとられている。慣行として行われている採種方法は、着果後60日以上経過した果実に穴を開け、果肉が完全に腐敗するまでは場に放置したのち種子を腐敗汁とともに容器に流し出し、水洗し乾燥させて調整している。従ってユウガオの市販種子の保菌は前述した第2の保菌経路が主体となっていると考えられる。果肉の腐敗を伴わない採種方法をとれば種子保菌率は低下するという試験結果が得られたが、実際採種場面では果肉を腐敗させず採種することは労力的に困難のようである。このように果肉の腐敗を伴う採種方法が行われている限り、高率な保菌種子が生産される可能性が高いので、一方においては完全な種子殺菌法の確立が望まれる。

種皮の表面に単に付着している菌体は比較的少なく、しかも貯蔵中に比較的早期に死滅することが判明した。小玉ら⁴⁾も種子表面から病原菌を分離したが、0.7%と低率であったとしている。これらの結果からユウガオつる割病の保菌種子では、種皮の表面に単に付着している菌体は比較的少なく、種皮の組織内部及び胚部に存在する菌体が問題となってくるようである。種皮の組織内では厚膜胞子の形成が認められ、この形態では比較的長期間生存し得るものと想定され、これらの菌体が種子伝染による発病の主要な伝染源となっている。

摘 要

1. 罹病株に着果した果実の果肉を、採種現地で行われている方法に順じて完全に腐敗させたのちに採種し、7か月間貯蔵した種子を殺菌土には種した結果、2.0~16.8%の幼苗が発病し、本病の種子伝染を確認し得た。

2. 罹病株においてはほぼ全茎にわたって病原菌の分布が認められた。幼果では果梗及び果梗基部までは菌の分布が認められたが、幼果内部では菌が検出でき

ず、果梗基部で菌の移行が抑制される傾向がみられた。未腐熟の成果では果梗、果梗基部及び主維管束を含む果皮部からは高率に本病原菌が分離された。維管束支脈の分布する果肉部や種子からも低率ながら病原菌が検出された。果肉の腐熟の進行中である果実では果実内のほぼ全域から病原菌が検出され、種子からも高率に本病原菌が分離された。

3. 罹病株及び果実各部位からの本病原菌の検出結果から、種子保菌経路は、果実内の道管を経由して直接種子に侵入する場合と、果肉の腐敗に伴って果実道管内に潜伏していた病原菌が果肉中で増殖し種子に侵入する場合の2つの経路が認められた。ユウガオ採種現地では果肉を腐敗させたのちに採種が行われている関係から市販種子では後者による種子保菌が主体となると推定される。

4. 種子表面に単に付着している菌体は極めて少なく、しかも3~4か月間の貯蔵期間内でほとんど死滅した。種皮の組織内では表皮下層から種皮深部の海绵状組織に至るまで菌糸あるいは厚膜胞子が観察され、これらの菌体が種子伝染による発病の主要な伝染源となっている。

引 用 文 献

1. 本間保男・高橋広治・見里朝正 (1975). 日植病報 41: 251 (講要).
2. 本間保男・有本裕・見里朝正 (1974). 同上 40: 180 (講要).
3. 岸国平 (1976). 植物防疫 30: 27-30.
4. 小玉孝司・芳岡昭夫・福井俊男 (1975). 日植病報 41: 96 (講要).
5. 駒田旦 (1977). 東海近畿農試研報 29: 132-269.
6. 近藤萬太郎 (1942) 農林種子学. 養賢堂, 東京, pp. 534~538.
7. 国安克人・岸国平 (1977). 野菜試報 A3: 97~108.
8. 国安克人・岸国平 (1976). 日植病報 42: 343 (講要).
9. Matuo, T. and I. Yamamoto (1967). Trans. Mycol. Soc. Japan 8: 61-63.
10. 向秀夫・鍵渡徳次・陶山一雄・湯沢久男 (1975). 関東病虫研報 22: 40.
11. 長井雄治・竹内妙子 (1975). 同上 22: 41-42.
12. 西山市三 (1949). 細胞遺伝学研究法, 養賢堂, 東京, pp. 2~50.
13. 小川奎・竹内昭士郎 (1975). 日植病報 41: 265 (講要).
14. 岡田大・川越仁・後藤重喜 (1976). 同上 42: 104 (講要).
15. 瀧元清透 (1956). 微生物学及植物病理学実験法. 養賢堂, 東京, pp. 208.
16. 田中澄人 (1975). 植物防疫 29: 45-49.
17. 米山伸吾・竹内昭士郎・野村良邦 (1973). 関東病虫研報 20: 28-29.