ブドウにおける VA 菌根の形態的特徴と時期による変動¹

河合義隆²・手塚修文・山本幸男

名古屋大学農学部 464 名古屋市千種区

Morphological Characteristics and Seasonal Variation of VA-mycorrhiza in Grapevine

Yoshitaka KAWAI, Takafumi TEZUKA and Yukio YAMAMOTO

School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464

Summary

Mycorrhizae of grapevine 'Kyoho' were investigated. Morphological characteristics, VA mycorrhizal infection and seasonal variation were studied by comparison with diseased roots.

Mycorrhizae observed in newly formed roots were typical vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizae having vesicles and arbuscules. The vesicles were 20–70 μ m in diameter. Most of them were ovate or spherical, but some were irregular in shape. The arbuscules were surrounded by a membrane. More vesicles were formed between October and December than in any other period, while more arbuscules were formed in July and August.

VA mycorrhizal fungi showed autofluorescence which could be observed without staining by using a fluorescence microscope. The volume of VA mycorrhizal fungi infecting the host plant increased after October. An endophyte, similar to *Rhizoctonia*, also existed in the root.

Pathogenic fungi (*Rosellinia necatrix* and *Helicobacidium mompa*) killed the host cell and host plant by attacking only epidermal cells, whereas VA mycorrhizal fungi penetrated into the inner root tissues without causing cell or plant death. Infection by VA mycorrhizae was apparently different to that by pathogens.

緒 言

前報(4)において、我が国に栽培されている園芸植物の菌根観察を行い、そのほとんどが VA 菌根であることを報告した。本報では、特に VA 菌根が多くみられたブドウに注目し、更に詳細な菌根観察を行ったので報告する。

ブドウの菌根の報告は古くは1900年に Stahl によって菌根菌と宿主との関係が報告されており、その後 Possingham & Oblink (7) がオーストラリアの, Deal ら (2) がニューヨークのブドウの菌根についてそれぞれ報告をしている。我が国では、ブドウは生食用品種が多く栽培されており、重要な果樹の一つであるが、菌根菌と宿主との関係についてはほとんど調べられていない。こ

の関係を明らかにすることはブドウ栽培の面からも重要なことである。

この報告ではブドウ菌根の形態的特徴を報告するとともに、根組織内における菌根菌量の時期による変動並びにブドウ罹病根における病原菌の侵入状態と比較した菌根菌の侵入について述べる。

材料及び方法

1. 菌根観察

名古屋大学農学部の圃場において栽培されている3年生のブドウ「巨峰」(*Vitis vinifera* L. $\times$ *Vitis labruscana* Bailey) の自根樹及び「テレキ 5C」(*Berlandieri* $\times$ *Riparia*, Teleki 5C) 台の接木樹の根について菌根観察を行った。

菌根の顕微鏡観察は、以下のように行った。根を適宜圃場より採取し、水道水で注意深く洗浄し、可能な限り土を取り去った。FAA (70%エタノール：ホルマリン：氷酢酸=90：5：5 V/V) で固定した後、染色を行った。

¹ 1985年7月23日 受理

この研究の概要は昭和56年度園芸学会春季大会に報告した。

² 現在 神戸大学農学部

染色は前報の方法(4)に従って行い、染色した切片をスライドガラスに載せ、ラクトフェノールを数滴たらし、カバーガラスをかけて顕微鏡で観察した。顕微鏡観察は、光学顕微鏡と蛍光顕微鏡にて行った。蛍光顕微鏡による観察はオリンパス社製の落射型で行い、Violet 励起を使用し、励起フィルターにはBG-3, UG-5を、接眼フィルターにはY-475を使用した。

菌根菌量の評価は次の様にして行った。根の横断切片を顕微鏡下に置き、皮層全面積を10としてそのなかでの菌根菌の占有面積の割合を10段階評価で表した。

2. 罹病根の観察

ブドウ(品種:巨峰)の新梢を採取して、中性洗剤で洗い、75%エタノールに数秒浸漬し、滅菌水で3度洗い、有効塩素濃度5%の次亜塩素酸ナトリウムを20倍に希釈したものに15分間浸漬し、最後に滅菌水で十分に洗った。このようにして殺菌した新梢をIAA (1 mg/l)を含んだMS培地に植え付け、発根を促した。発根した苗をMS培地の無機養分のみを含んだ寒天培地に移植した。10日後に病原菌を接種した。接種した病原菌は、白紋羽病菌(*Rosellinia necatrix*)と紫紋羽病菌(*Helicobaculum mompa*)である。接種は、純粋培養した病原菌菌糸を白金耳で根に軽くつけることによって行った。接種した根の顕微鏡観察は菌根の場合と同様に行った。

結果及び考察

1. VA菌根の発生と外部形態

VA菌根は、'巨峰'自身の根にも台木'テレキ5C'の根にも認められ、嚢状体と分岐体を形成する典型的なVA菌根であった。VA菌根と菌根でない根を比較すると、外部形態には相違がみられず、菌が侵入しているにもかかわらず健全根と外観は同じであった。そのためにVA菌根の判別には常に根を切片にして、顕微鏡によって観察する方法を採らざるを得なかった。スベリン化していない場合に、菌根は比較的明るい黄色を呈しているという報告(3)があるが、ブドウの新根では識別できなかった。根粒菌は根に侵入して根粒を形成し、外生菌根はHartigネットを形成し、フォーク状、サンゴ状などの形態をとる(5)が、VA菌根の場合、侵入による外観的な変化はみられなかった。

菌の侵入は新しく形成された根に多くみられ、前年度に形成された根は崩壊やリグニン化のために観察不能の状態であり、観察ができた根ではすべて菌根菌の侵入がみられなかった。新しい根における菌の侵入は先端部で多くみられた。

2. VA菌根菌の特徴及び侵入

VA菌根菌の菌糸は不定形で、大きさは径8~10 μm の太さのものから、径2~3 μm の細いものまであり、太い菌糸には所々に三角形の突起状のものが観察された。

Fig. 1. Microscopic-observations of VA mycorrhizae in grapevine.

1. Infection of VA mycorrhizal fungi to the epidermal cell of grapevine root. Bar is 20 μm . AP: appressorium
2. Vesicles formed in the cortex of grapevine. Bar is 20 μm .
3. Arbuscules enclosed by a membrane (M) which looks like the host cell membrane. Bar is 20 μm .
4. Nucleus (N) surrounded with arbuscule. Bar is 5 μm .

また、ほとんどの菌糸は隔膜 (Septum) を持っており、一部の細い菌糸に隔膜があるのがみられる程度であった。

菌の侵入は細胞間隙と細胞内の2通りの侵入がみられ、春ごろの根では細胞内侵入が多くみられたが、それ以後、細胞間隙を菌糸が伸びているのが観察された。ただし、ここで言う細胞内侵入とは細胞壁を貫通して内部に侵入している状態のことを指し、原形質膜を貫通しているか否かは定かではない。侵入は皮層組織にとどまり、内皮より内側の中心柱への侵入及び根の生長点への侵入はなかった。侵入の際、表皮上で付着器のような膨らみを形成しているものも観察された (第1図-1)。侵入した菌糸は、皮層組織で嚢状体 (第1図-2) と分岐体 (第3図-3) を形成した。嚢状体は菌糸の先端が袋状になったもので、小さい粒状のものや、液胞状のものが観察された。菌糸と嚢状体の接続部には、隔膜はみられず、内容物は続いていた。嚢状体の形は球形から卵形と様々で、径は約 $20\sim70\mu\text{m}$ であった。細胞間隙と細胞内のどちらにも形成がみられた。嚢状体の役割はまだ十分には明らかにされていないが、胞子または養分の貯蔵器官と考えられる。分岐体は菌糸の先端が多数分岐した構造をしており、「木立ち」や「カリフラワー」のような形に見えた。ブドウの分岐体は、菌糸の先端に粒状のものが集合した状態のものが多く観察され、菌糸の枝分かれの状態のはっきりしている分岐体は少なかった。これらの分岐体は細胞間隙の菌糸から枝分かれした菌糸が細胞内で更に複次分岐したもので養分の受け渡しに関与している組織と考えられる。袋状の膜に包まれた分岐体 (第1図-3) や、分岐体が核の回りを囲んでいるもの (第1図-4) も観察された。この分岐体を包んでいる膜は宿主の細胞膜と思われる。分岐体は7月から8月、嚢状体は10月から12月の根において多く形成されているのがみられた。

3. VA 菌根の蛍光顕微鏡による観察

酸性フクシン・ラクトフェノールで染色した切片を蛍光顕微鏡で観察することにより、皮層組織内への菌の侵入状況が確認できた (第2図)。皮層組織内では、菌の侵入部分は侵入していない部分に比べ、強い蛍光がみられた。侵入部位の蛍光は菌糸体から発せられており、赤色を呈していたが、20~30分間励起光を照射し続けると退色して白色に変化した (第3図)。酸性フクシンで染色しないで、ラクトフェノールまたは水酸化カリウムで透明にした切片でも同様に白色の蛍光が観察された。すなわち菌根は自家蛍光によって観察できる。また、菌糸や嚢状体に青白い蛍光を発するものが観察された。これ

Fig. 2. Fluorescent microscope observation of VA mycorrhiza stained by acid-fuchsin lactophenol. Fluorescence (FL) with red color shows VA mycorrhizal fungi in cortex. Bar is $100\mu\text{m}$. EP: epidermis

Fig. 3. Fluorescence (bright portions) of VA mycorrhizal fungi in cortex after red color faded. Bar is $25\mu\text{m}$.

Fig. 4. Relative estimation of infection of VA mycorrhizal fungi from April to December.

は、VA菌根菌の細胞質の部分と思われるが、みられないものもあり、菌の齢や菌根の状態と何らかの関係があるものと推測される。

4. VA菌根菌量の時期別推移

第4図はVA菌根菌の皮層組織における占有率を月ごとに相対的に評価したものである。植物体が活動している4月から12月までの変化を追跡してみると、6月と9月は占有率が小さいが10月以降急激に増加した。このような変動は、ブドウの根が活動している時期では菌の侵入は一定の割合に抑えられており、根の活動が低下してくるにつれて菌の侵入を抑えることができなくなり、このような結果をもたらしたものと考えられる。侵入した菌は、皮層組織の崩壊によりそのままの状態では越冬できず、終局的には根との関係を断たれてしまう。よって、菌は何らかの方法で土壤中で越冬して次の年に形成される根に再び侵入して、共生関係をつくるものと思われる。

5. 他の内生菌

‘巨峰’自身の根で、VA菌根菌とは異なる型の内生菌(第5図)が観察され、その存在については前報(4)で報告した。ここでは形態について更に述べる。この内生菌は菌糸に隔膜があり、細胞内に侵入した菌糸は隔膜で仕切られた単位で球形をなしていた。その球形の大きさは径5~10 μ mであった。細胞への侵入点や隣り合った細胞の間の菌糸の接続部では菌糸がくびれていた。Nicolson(6)が報告している牧草の根にみられた*Rhizoctonia*様の内生菌に似ていた。このほか、Blaich(1)はブドウの‘リパリア’で外生菌根の形成について報告しているが、峰、‘テレキ5C’の根には外生菌根は認められなかった。

6. 罹病根との比較差異

白紋羽病菌は接種後2~3日で根の回りに肉眼で確認

できるコロニーを形成し、1週間後には植物体を覆うものまで現れた。一方、紫紋羽病菌は接種後12日目に肉眼で確認できるコロニーを形成した。それぞれ菌に犯された根は、表面が変色し、根自体が柔らかくなり枯死した。菌糸は根の表面で繁殖して根を覆っていたが、VA菌根菌のように根の内部までは侵入していなかった(第6図)。紫紋羽病菌を接種した根において、表皮細胞に付着器を形成しているのが観察された。この付近の細胞は、細胞質が変色し粒状になって両端にわかれており、明らかに死んでいた。VA菌根の場合には、病原菌のような細胞死は起らず、菌の侵入による根の枯死などもみられず、外観は健全根と相違がなかった。病原菌は無菌状態で培養しているブドウに接種されており、自然状態でのVA菌根菌の感染と直接には比較できないが、VA菌根菌は病原菌に比べ、侵入においても植物根に悪影響を与えないと考えられる。

摘 要

ブドウ‘巨峰’の菌根について、形態的特徴や菌の侵入及びその季節的変動を調べた。また、罹病根との比較も行った。

菌根は新しく形成された根に観察され、典型的なVA菌根であった。嚢状体は径20~70 μ mで卵形及び球形のものが多かったが、なかには不規則な形のものも観察された。分岐体は袋状の膜に包まれていた。嚢状体は10月から12月の根に、分岐体は7月から8月の根において多く形成された。VA菌根菌は自家蛍光を持っており、蛍光色素を用いないで蛍光顕微鏡で侵入が観察できた。菌の侵入量は10月以降に増加する傾向がみられた。まれに*Rhizoctonia*様内生菌も観察された。

罹病根における病原菌の侵入に比しVA菌根菌の根への侵入は根の内部にまで多くの菌糸が侵入していた

Fig. 5. Endophyte observed in the cortex of 'Kyoho' root. It was different from VA mycorrhiza but similar to the *Rhizoctonia* which Nicolson reported. Bar is 25 μ m.

Fig. 6. Root of cultured 'Kyoho' attacked by pathogenic fungi (*Helicobasidium mompa*). *H. mompa* did not penetrate into cortex. Bar is 200 μ m.

が、細胞死や枯死などは起きておらず明らかに罹病根とは様相が異なっていた。

謝 辞 本研究の遂行上、サンプリング等に関して御援助頂いた名古屋大学農学部技官鳥居鎮男氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. BLICH, R. 1977. Versuche zur künstlicher Mykorrhizabildung bei *Vitis riparia*. *Vitis* 16 : 32—37.
2. DEAL, D. R., C. W. BOOTHROYD and W. F. MAI 1972. Replanting of vineyards and its relationship to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Phytopathology* 62 : 172—175.
3. GERDEMANN, J. W. 1968. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6 : 397—418.
4. 河合義隆・手塚修文・山本幸男. 1986. 本邦における園芸植物の菌根. 園学雑. 54 : 477—482.
5. MARX, D. H. and S. V. KRUPA 1978. Ectomycorrhizae. p. 401—442. In : Y. R. DOMMERGUES and S. V. KRUPA (eds.) *Developments in agricultural and managed-forest ecology 4. Interactions between non-pathogenic soil and microorganisms and plants.* Elsevier-Scientific Publishing Co. New York.
6. NICOLSON, T. H. 1959. Mycorrhiza in the Gramineae. I. Vesicular-arbuscular endophytes with special reference to the external phase. *Trans. brit. Mycol. Soc.* 42 : 421—438.
7. POSSINGHAM, J. V. and J. G. OBLINK 1971. Endotrophic mycorrhiza and the nutrition of grapevines. *Vitis* 10 : 120—130.