

フザリウムの接種がサトイモのゆ傷組織形成に及ぼす影響

森田隆史*・西野入将浩・前田匡夫・片岡圭子・札埜高志・河瀬晃四郎

京都大学大学院農学研究科附属農場 569-0096 高槻市八丁畷町 12-1

The Effects of Inoculation of *Fusarium* on Periderm Formation in Taro (*Colocasia esculenta* Schott)

Takashi Morita*, Masahiro Nishinoiri, Masao Maeda, Keiko Kataoka, Takashi Fudano and Koshiro Kawase

Experimental Farm, Graduate school of Agriculture, Kyoto University, Takatsuki, 569-0096

Summary

Fusarium 'F959', a pathogenic sensitive strain to taro, was inoculated on 'Celebes'. The inoculated corms were kept in the dark at 25 °C for 15 days. Paraffin sections were made from the inoculated corms and observed cytologically under a light microscope. In control specimens, about 1mm transparent cell layers and meristematic cell layers (normal periderm) were formed under the wound surface. The cells of all transparent layers were significantly lignified. When *Fusarium* was inoculated to the wound, the transparent cell layers expanded to 2-5 mm and were not lignified. It was considered that periderm formation was not normally performed by *Fusarium*.

Further, it was investigated whether delaying the time of inoculation after wounding would influence the response of corm to the pathogen. When the interval between wounding and inoculation was 12 hours or more, there was no expansion of transparent cell layers observed. It was considered that normal periderm formation was facilitated by some kind of defense responses occurring in the tissue of the taro.

キーワード: フザリウム, 木化, サトイモ, 接種, ゆ傷

緒言

サトイモは晩秋に球茎の収穫を行うが、種芋となる球茎は、春の植え付けまで4~5か月に渡って貯蔵する必要がある。このような長期貯蔵下では、しばしば乾腐病とよばれる腐敗症状の発生が問題となる。病原体はフザリウム菌 (*Fusarium solanii*) とされており、'セレベス' など乾腐病が発生しやすい品種では深刻な被害を受けることがあるが、現在のところその防除法は確立していない。

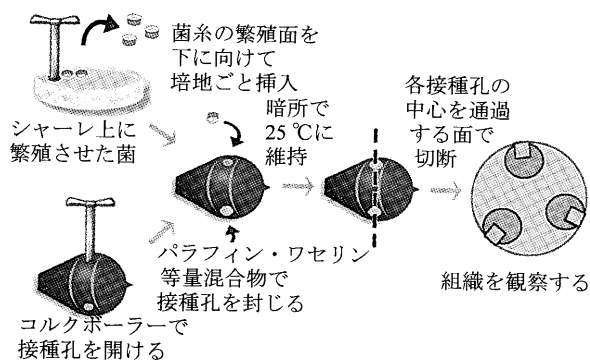
サトイモの球茎やカシュウイモ (*Dioscorea bulbifera*) のむかごではゆ傷組織の形成について観察した報告がある (青葉, 1952; Knoblochら, 1989)。これらのゆ傷組織はほぼ共通した構造を有し、木化した表皮細胞層とその内側の分裂細胞層により構成され、周皮 (periderm) とよばれる。しかしながら、病原性を持つフザリウム菌の存在下でサトイモ球茎がどのようにゆ傷組織を形成するかについては知見がない。また、サトイモの貯蔵中における乾腐病の発生は、何らかの理由で、傷口におけるゆ傷組織の形成が正常に行われていないことが原因である可能性が考えられる。

そこで本実験では、サトイモの長期貯蔵法に関する基礎資料を得るため、サトイモ球茎の表面に傷を付けてフザリウム菌を接種し、その後のゆ傷組織の形成過程を観察した。まず、人為的に傷付けたときに形成されるゆ傷組織の外部および内部の形態を観察した。次に、傷付けから接種までの時間を変えたときのサトイモ組織の反応の変化についても併せて調査した。

材料および方法

接種源として、Richards培地で継代培養し繁殖させたサトイモに対して病原性を有するフザリウム菌株 'F959' を供試した。培地は4 cm径のシャーレに作成し、1%寒天による固形培地とした。継代培養開始から7~10日経過した菌糸を接種源として供試した。接種は以下の手順で行った。すなわち、2001年9月28日および12月7日にサトイモ 'セレベス' の球茎を収穫した。球茎は分離後水洗して付着した土を落とし、常温の室内で表面を乾燥させた。球茎に内径5 mmのコルクボーラーを用いて深さ約5 mmの接種孔を開けた。接種孔の位置は球茎の赤道線上、等間隔に3か所とした。菌糸は培地ごとコルクボーラーを用いて切り取り、菌糸の繁殖面を下にして接種孔に挿入した。対照区では菌糸の代わりにコルクボーラーで切り取ったRichards培地のみを挿入した。接種孔はパラフィンとワセリンの1:1混合物 (w/w) で封じた。球茎は不織布で作成した

2003年1月20日 受付. 2003年8月25日 受理.
本報告の一部は園芸学会近畿支部会平成14年度大会で報告した。
*Corresponding author. E-mail: moritat@ccmfs.meijo-u.ac.jp
現在: 名城大学農学部附属農場 486-0804 愛知県春日井市



第1図 サトイモ球茎へのフザリウム菌接種方法

袋にピートモスを充てん物として入れ、温度 25℃、暗黒条件の恒温器内に保存した(第1図)。

まず、接種7日後に試料を取り出し、接種孔周辺の組織を切り取り、接種孔断面を観察した。また、接種15日後の試料からゆ症組織部分のパラフィン切片を作成した。パラフィン切片をトルイジンブルー O もしくは木化したリグニンを検出するためにフロログルシン-塩酸法で染色した後、光学顕微鏡下で観察した。

次に、球茎に接種孔を開けた後、接種までの時間を遅延させたときのサトイモ組織の反応について調査した。接種孔は上記と同様の手順で開けた。接種孔の上をセロハンテープで一時的にシールし、接種直前まで傷表面が乾かないように保持した。1回目の実験は、接種孔を開けてから0, 1, 3および6日後に接種を行った。それぞれ15日経過させた後、接種部付近の組織を観察した。さらに、2回目の実験では、接種孔を開けてから3時間ごとに、24時間経過するまで計9回の接種区をそれぞれ設け、接種部の周辺組織に形成されたゆ傷組織の大きさを観察した。

結果および考察

コルクボーラーによる傷付け後にフザリウム菌を接種し、その15日目における接種周辺部の外部形態を第2図に示した。対照区および接種区ともに、傷の周辺にゆ傷組織と思われる半透明な細胞層(以下、ゆ傷細胞層と言う)が形成されていた。9月28日に接種を行った場合、半透明なゆ傷細胞層は対照区の数倍に拡大し、周囲には維管束の発達が認められた。一方、12月7日に接種を行った場合、傷口の周辺に白色の病変部が認められた。病変部は半溶解状態になっており、典型的な乾腐症状と考えられた。病変部の外側には9月処理区よりさらに広範囲に透明なゆ傷細胞層が認められ、透明なゆ傷細胞層内では著しい維管束の発達が認められた(第2図)。

ゆ傷組織が形成された周辺の組織をパラフィン切片(縦断面)にして内部形態を観察したところ、対照区のゆ傷組織は、傷表面から約1mmの厚さで細胞壁が著しく肥厚した表皮細胞層と、その内側に5~10層のリグニン化した細胞層(第3図aではトルイジンブルー O で青緑色に染色さ

9月28日処理

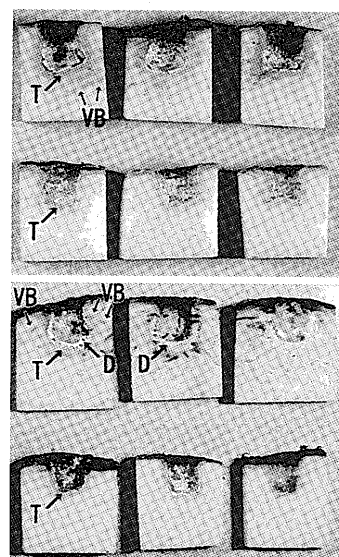
接種区

対照区

12月7日処理

接種区

対照区



第2図 フザリウム菌接種により誘導されたサトイモ球茎における接種周辺部の外部形態(接種15日後)

接種区は球茎表面にコルクボーラーで傷付けた後にフザリウム菌を接種した

対照区はフザリウム菌を接種せず傷付けのみとした

T: ゆ傷組織と思われる細胞層

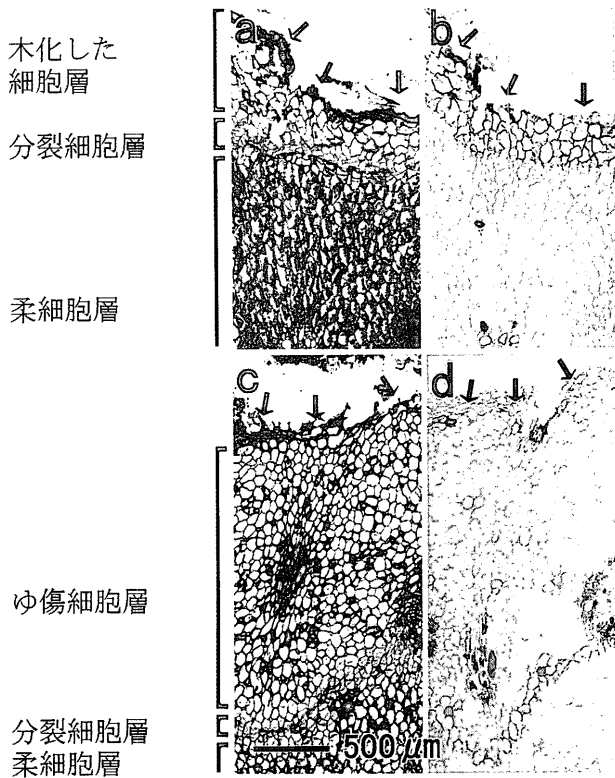
D: フザリウムによる病変部

VB: 維管束

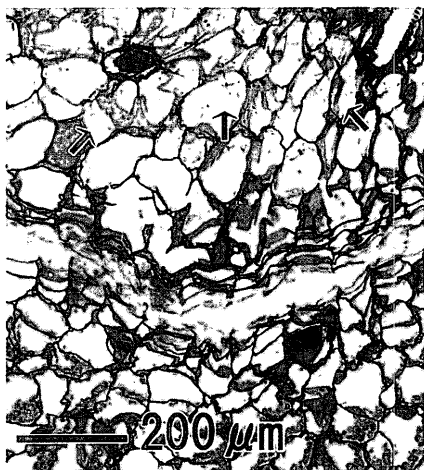
れている部分(O'Brienら, 1964), 第3図bでは赤く染色されている部分。以下、木化細胞層と称す), さらに、その内側には分裂細胞層よりなる周皮で構成されていたことから、対照区の透明なゆ傷細胞層はリグニン化していることが明らかになった。一方、接種区では、透明細胞層が2~5mmにわたって存在し、対照区よりも広範囲であった。この組織内の細胞は、対照区とは異なり、リグニンの蓄積した細胞がほとんど観察されず、細胞間隙が多く細胞壁が薄い柔細胞で構成されていた。細胞の形状も球状であり、デンプン粒は観察されなかった(第3図c, d)。以上の結果から、接種区の透明な細胞層の細胞では、細胞壁を構成するセルロースやペクチン質が分解されて薄いので、水分などを通しやすいものと考えられる。さらに、デンプンが加水分解され、可溶性の糖質が細胞液中に蓄積して、細胞内の浸透圧が高まって外部から水分を吸収した結果、細胞が膨張して球状となり、外見上、組織が半透明にみえたものと推察された。サトイモの球茎組織は傷を受けた場合、木化細胞層とその下の分裂細胞層から成るゆ傷組織を形成し、物理的に外部からの病原体の侵入を防止するものと考えられる。実験期間内では、分裂細胞層より内部に菌糸が侵入することはなかったが、透明な細胞層には菌糸の侵入がみられる場合もあった。このとき、侵入を受けた細胞はトルイジンブルー O により青緑色を呈したことから、リグニン化が進行していたものと考えられる(第4図)。フザリウム菌は侵入以前に何らかの方法によりサトイモ組織の正常なゆ傷組織形成を妨げ、その後、不完全なゆ傷

組織に侵入するものと考えられる。

なお、本実験では単独の球茎を用いて傷付けあるいは接種を受けた場合の柔細胞における反応に注目したが、実際のサトイモの種芋貯蔵では球茎塊のまま貯蔵することが多い。この場合には維管束を通じて、親芋から子芋、そして

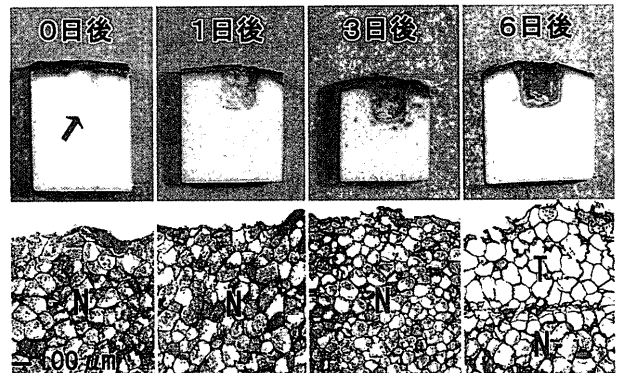


第3図 フザリウム菌接種により誘導されたサトイモ球茎におけるゆ傷組織の内部形態
矢印は傷付け面または接種面を示している
処理から7日後の対照区 (a, b) および接種区 (c, d) のパラフィン切片をトルイジンブルー-O (a, b) で染色した

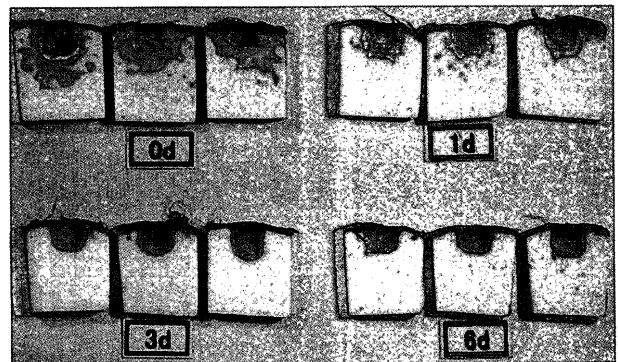


第4図 フザリウム菌のゆ傷組織への侵入接種15日後の様相を示した
矢印は侵入した菌糸を示している

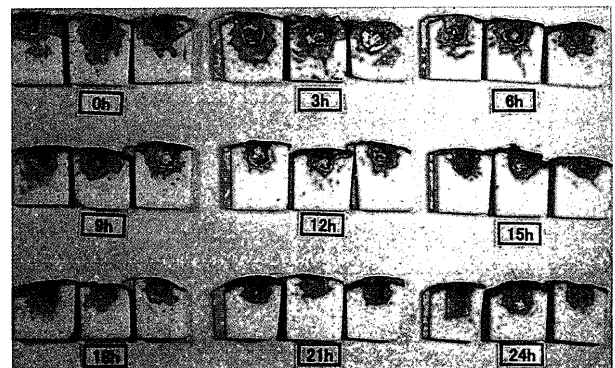
て孫芋へと乾腐病が感染することがある。第2図で接種区のゆ傷組織内に著しい維管束の発達がみられる。縦断切片をみると、第3図において接種区の透明細胞層内に維管束が分化していることが明らかになった。Baayan(1988)はフザリウム菌抵抗性のカーネーションの茎に菌を接種す



第5図 傷付け後のサトイモ球茎における傷付け周辺組織の経日目的変化
N: 正常な柔細胞組織
T: ゆ傷組織と考えられる木化細胞層



第6図 傷付けから接種までの日数の違いがサトイモ球茎のゆ傷組織形成に及ぼす影響
深さ約5 mmの接種孔を開け、0, 1, 3 および 6 日後にフザリウム菌を接種し、接種15日後の形態



第7図 傷付けから接種までの時間の違いがサトイモ球茎組織のゆ傷組織形成に及ぼす影響

ると、導管内が褐色の物質で満たされるが、それはリグニン様物質と考えられると報告している。乾腐病に感染したサトイモ球茎では維管束が赤色を呈することがよく観察されるが、この現象は、感染部の周辺で防御反応としての細胞分裂を起こすために、エネルギーの輸送路としての維管束が発達することと、また、このとき維管束内における防御反応としてリグニン様物質が集積することによるものと考えられる。

次に、傷を付けてから接種までの時間を遅延させると、サトイモ組織にどのような変化が生じるかを観察した。その結果、傷付け後の球茎組織の経日的変化をみたところ、ゆ傷組織の形成は3日後ではまだ観察されず、6日後には明確に認められた(第5図)。そこで、接種孔を開けて1日以上経過してから接種したところ、傷付けのみの場合と同様に1 mm程度の厚さの正常なゆ傷組織が形成され、ゆ傷組織の拡大は観察されなかった(第6図)。さらに、接種孔を開けてから24時間以内に、3時間毎に接種したところ、12時間以上経過して接種した区では傷付けのみの場合と同様の正常なゆ傷組織が形成された(第7図)。従って、サトイモの組織は傷付けから9~12時間経過したときには、ゆ傷組織の形成とは別の方法でフザリウムに対する防御能を獲得していることが示唆された。Punja (1992)らはニンジンの根に傷を付けて24時間後に *Chalara elegans* を接種すると、直ちに接種した場合に比べて菌の侵入率が5分の1に減少したと報告している。またサトイモでは、Masui ら (1989)によってファイトアレキシン活性を持つ物質が見いだされ、この物質は9, 12, 13-トリヒドロキシ-(E)-10-オクタデセン酸であると同定されている。本実験で観察された現象は、このようなファイトアレキシン活性を持つ物質が傷付けの刺激から9~12時間後に生成され、それ以後に接種を受けてもフザリウム菌の活動が抑制されるため、正常なゆ傷組織が形成されたものと推測できる。

本実験の結果より、サトイモは病原体に対して複数の防御手段を持っていることが認められた。すなわち、傷を受けてから9~12時間後には組織内にフザリウム菌の活動を抑制する物質を生成し、4~6日後にはゆ傷組織を形成してフザリウム菌の侵入を物理的に防御すると考えられる。長期貯蔵を行うためには収穫直後に消毒を行い、球茎表面に存在する病原性フザリウムの密度を下げることや、キュアリングなどの方法でゆ傷組織を速やかに形成させることが有効であると考えられる。

摘 要

サトイモに対して病原性を持つ菌株‘F959’をサトイモ‘セレベス’に接種した。接種した球茎は25℃に温度調整した暗所に15日間維持した。球茎からパラフィン切片を作成し、光学顕微鏡を用いて細胞学的に観察した。その結果、対照区では、傷の表面に約1 mmの厚さの透明細胞層が形成され、その下に分裂細胞層が形成された。透明細胞層は著しく木化していた。一方、フザリウムを接種した場合、透明細胞層が2~5 mmの厚さに拡大し、木化は認められなかった。これはフザリウム菌によってゆ傷組織が正常に形成されなかったと考えられた。次に傷付けから接種までの時間を遅延させたときの球茎の反応を観察した。その結果、遅延が12時間以上のときには、透明細胞層の拡大はみられなくなった。これはサトイモ組織に何らかの生理的な防御反応が生じた結果、正常なゆ傷組織が形成可能になったためと考えられた。

謝 辞 本実験に用いたフザリウム菌は元滋賀県立短期大学農業部教授遠山明博士に分譲して戴いたものである。ここに記して深謝する。また本学農場技官榊原俊雄、西川浩次、楠見浩二各氏にはサトイモの栽培に関してお世話になった。ここに記して謝意を表する。

引用文献

- 青葉 高. 1952. 里芋貯蔵に関する研究(第2報). 癒傷について. 農及園. 28: 297-300.
- Baayan, R. P. 1988. Responses related to lignification and intravascular periderm formation in carnations resistant to *Fusarium* wilt. Can. J. Bot. 66: 784-792.
- Knobloch, I., G. Kahl, P. Landre and A. Nougarede. 1989. Cellular events during wounding periderm formation in *Deoscorea bulbifera* bulbils. Can. J. Bot. 67: 3090-3102.
- Masui, H., T. Kondo and M. Kojima. 1989. An antifungal compound, 9,12,13-trihydroxy-(E)-10-octadecenoic acid, from *Colocasia antiquorum* inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. Phytochemistry 28: 2613-2615.
- O'Brien, T. P., N. Feder and M. E. McCully. 1964. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue-O. Protoplasma 59: 69-76.
- Punja, Z. K., S. Chittaranjan and M. M. Gaye. 1992. Development of black root rot caused by *Chalara elegans* on fresh market carrots. Can. J. Plant Pathol. 14: 299-309.