株枯病菌を接種したイチジク苗木における病徴の進展過程 (2) 宿主細胞の防御反応と内部病徴に関する解剖学的検討

隅田 皐月¹・梶井 千永²・森田 剛成³・黒田 慶子^{1*}

ABSTRACT

SUMIDA, S.¹, KAJII, C.², MORITA, T.³ and KURODA, K.^{1*} (2016). Disease development in *Ficus carica* seedlings after inoculation with *Ceratocystis ficicola*. (2) Microscopic analysis of the host-pathogen interaction and internal symptoms. Jpn. J. Phytopathol. 82: 310–317.

Ceratocystis ficicola is causing serious wilt disease in many fig orchards in Japan. To elucidate the mechanisms of disease development, we inoculated fig cuttage seedlings with the pathogen and periodically harvested stems for light microscopy to examine the distribution of *C. ficicola* and responses of host cells before the start of wilt symptoms. As shown by yellow to brown staining of the xylem in fig stems, secondary metabolism was activated in axial and ray parenchyma cells adjacent to hyphae, then the metabolites were secreted into vessels. Above 5 cm from the inoculated holes, few or no hyphae were observed, and accumulation of secondary metabolites was not extensive. When leaf wilting started, hyphae were abundant in the discolored xylem in which secondary metabolites had accumulated. In contrast, the cambium was not necrotic before the wilt symptoms. Symptoms developed as follows: (1) Hyphae of the pathogen elongate in vessels and invade the adjacent parenchyma cells. (2) Secondary metabolism is activated in parenchyma cells. (3) Dark brown discoloration occurs in xylem when the secondary metabolites are produced, and vessels become dysfunctional in the discolored areas. (4) Water supply to leaves decreases, and the wilt symptom starts.

(Received October 30, 2015; Accepted March 28, 2016)

Key words: *Ceratocystis ficicola*, *Ficus carica*, wilt disease, xylem dysfunction, secondary metabolites

諸 言

イチジク株枯病（以下、本病）は、日本全国の主要なイチジク産地で発生しており、イチジク成木を枯死に至らしめることから、深刻な病害であると位置付けられる（梶谷, 1992; 清水ら, 1999）。株枯病菌（*Ceratocystis ficicola*, 以下本菌）に感染した個体は、地際部の主幹や主枝に不規則な大型円形の茶褐色～黒褐色の病斑が生じ、葉の黄変および萎凋が生じた後、やがて落葉枯死することが報告されている（瓦谷・三輪, 2012; 清水ら, 1999; 外側ら, 1999）。本菌は土壌伝染が主因と言われてきたが、近年アイノキクイム

シによる虫媒伝染の可能性が指摘された（梶谷, 1996）。しかし、生産現場では、本病の被害に気付いた時点ではアイノキクイムシの加害から月日が経過しており、感染が土壌由来なのかアイノキクイムシ由来なのか判別できないことがある（新田ら, 2005）。そのためか、アイノキクイムシによる伝染の可能性を含めず、土壌伝染木であることを前提とした報告が多い（清水ら, 1999）。本病への対策として抵抗性台木や薬剤を活用した防除技術が開発されている（細見, 2009; 清水ら, 1999）が、現状では発病阻止は困難である（森田ら, 2012）。今後、より効果的な防除技術を開発するには、基礎的知見として感染から発病までの仕組みの解

¹ 神戸大学大学院農学研究科（〒 657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1） Graduate School of Agriculture, Kobe University, 1-1 Rokkodai, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

² チョーヤ梅酒株式会社（〒 583-0841 大阪府羽曳野市駒ヶ谷 160-1） Choya Umeshu CO. LTD., 160-1 Komagatani, Habikino-shi, Osaka 583-0841, Japan

³ 広島県立総合技術研究所農業技術センター果樹研究部（〒 739-2402 広島県東広島市安芸津町三津 2835） Fruit Tree Research Division, Agricultural Technology Research Center, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, 2835 Mitsu, Akitsu-cho, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-2402, Japan

* Corresponding author (E-mail: kurodak@garnet.kobe-u.ac.jp)

明が必要であると考えた。

アイノキクイムシの本病への関与については懐疑的な見方もあったが、森田ら (2012) はアイノキクイムシの宿主への穿入と圃場内の本病被害拡大状況を追跡し、穿入後に萎凋症状が発生していることを示した。さらに Kajii *et al.* (2013) は、萎凋開始時点のアイノキクイムシ穿入部の顕微鏡観察によって、外部病徴の発現と内部病徴の進展との関係を探り、アイノキクイムシの孔道に沿って病原菌が分布を拡大していること、孔道形成が木部の変色拡大を助長していることを明らかにした。また、本病における養菌性クイムシの関与や樹幹木部の変色という特徴は、森林のナラ類やカシ類に集団枯死を引き起こすブナ科樹木萎凋病 (ナラ枯れ) に見られる現象と類似していることを指摘した。ナラ枯れの発病過程について、黒田・山田 (1996) は、「病原菌の作用により、樹幹のある高さで水平方向に変色部が広がり、通水機能が全面的に停止する部位が出現し、その部位より上部の水の供給が滞ることで萎凋に至る」と説明している。Kajii *et al.* (2013) はこのような病徴進展の類似性から、本病を萎凋病であると指摘した。しかし、萎凋が開始したイチジク自然感染木の観察だけでは、萎凋に至るまでの内部病徴を経時的に追跡できなかった。

そこで筆者らは、イチジク苗木の幹部への有傷接種実験を行った。森田ら (2016) はまず、本菌接種苗木では接種2~3週間後に葉の萎凋症状が発現し枯死に至ったこと、萎凋および枯死個体には接種した *C. ficicola* の子のう殻が形成されたことから、本菌の接種により発病・枯死したことを確認した。さらに、接種苗木における通水機能の変化に関して、根から色素液を吸わせて観察を行った結果、葉の萎凋開始時には通水機能が著しく低下していることを確認し、この現象が感染により起こったものであると推察した。また、通水機能低下個体では接種部位付近の木部で変色部が広がっていた。この変色部は自然感染・枯死木に常に観察される (Kajii *et al.*, 2013)。これは一般に傷害心材と呼ばれ、微生物等や傷に対する防御反応として樹木組織内で二次代謝産物の生成が活発になることで形成され、通常の心材と同様に通水機能は失われていることがわかっている (Hillis, 1987)。このことから、木部に変色部が広がり通水機能が低下し、枝葉への水分供給が滞ったと推測した。

このように、本菌がイチジクの通水機能の低下に関与することが森田ら (2016) により示されたが、本菌による影響で褐変が生じたのかは肉眼観察だけでは明確に説明できない。つまり、本菌が宿主細胞に及ぼす影響については不明なままであり、光学顕微鏡により観察する必要があった。本研究では森田ら (2016) と同じ接種苗木を供試し、「変色

部」および「通水停止範囲」では何が起きているのか、そして発病に至るまでの現象やその仕組みについて検討した。本供試木は、主幹組織への感染が起こった場合を想定した主幹部への有傷接種を行っている。褐変の拡大については、接種点付近の木部で著しかったため (森田ら, 2016)、特に接種部位を中心に解剖を行った。なお、土壌伝染の場合の侵入経路と発病までのプロセスについては、隅田ら (2016) を参照されたい。樹木細胞の反応については、二次代謝産物の生成にあたり柔細胞類内の貯蔵糖類量が減少することや、道管内には充填物がみられることなどが報告されている (Holbrook and Zwieniecki, 2005) ので、それらに注目して観察を行った。

材料と方法

供試木への接種と採取および試料処理 イチジク品種「蓬菜柿」の2年生苗を供試木とした。その一部には、森田ら (2016) の研究に用いた供試木を含む。2011年6月7日に一年枝をポット内に充填した培土 (ハイポネックス® 培養土) に挿し木し、2012年9月の接種日まで育成した。苗木の総本数は40本であり、接種時の供試木の平均樹高は103 cm、平均茎径は17 mmであった。株枯病菌 (広島 cf06 株) を PDA 平板培地で2~3週間前培養 (25°C 全暗) して形成された菌叢上に、滅菌爪楊枝 (長さ7 cm、径2.2 mm、0.5% 酵母エキス含有 PDB 培地に浸漬しオートクレープ処理) を静置して約15日間培養し、接種源とした。2012年9月5日、苗木主幹部に病原菌の接種を以下のように実施した。苗木の主幹中心部に電動ドリルで貫通穴 (直径3 mm) を4ヶ所開けて、穴に爪楊枝を突き通すことで接種した (Fig. 1)。

Fig. 1. Diagram of inoculation of *Ficus carica* with *Ceratocystis ficicola* and anatomy (i, ii). i: Cross and radial sections adjacent to the uppermost inoculation hole. ii: Cross section at center of inoculation area.

また、対照区として無傷無接種木、滅菌爪楊枝を刺した有傷無接種木を準備した。本菌接種木は、接種4日後および7日後以降42日後まで7日間隔で各2~4本を採取した。対照の有傷無接種木と無傷無接種木は接種当日、3週間後、6週間後に2~4本採取した。

光学顕微鏡試料の作製および観察方法 栽培ポットから抜き取った供試木を約5 cmの長さに切断した状態でFAA(40%ホルマリン：酢酸：50%エタノール=5：5：90 v/v)に浸して固定し、以下の手順でプレパラートを作製した。試料片を12時間程度水洗した後に、滑走式ミクロトーム(リトラトーム REM-710：大和光機工業)を用いて厚さ20 μ mの切片を作製した。本菌の侵入に反応して生成された宿主細胞の着色物質を観察するために、無染色切片のプレパラートを作製した。また、宿主細胞の生死やでんぷん粒の貯蔵の有無、菌糸の分布を観察するために、PAS・トルイジンブルー二重染色(Feder and O'Brien, 1968)を行った。作製したプレパラートは光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE Ni-u)で観察し、デジタルカメラ(Canon EOS 60D, Canon EOS Kiss X70)で撮影した。

光学顕微鏡観察および画像解析 宿主内での本菌の接種位置からの分布拡大状況を微細なレベルで把握するために、接種4日後、7日後、14日後、21日後、有傷無接種21日後各3~4個体を対象とし、爪楊枝の接種穴部分を含む横断面およびその面に直角の放射断面3×3 mmの範囲(Fig. 1-i)を顕微鏡で観察した。また、本菌の侵入による宿主細胞の反応を把握するため、前述の範囲において、二次代謝の活性化に起因する着色物質の蓄積や、二次代謝エネルギーとして消費されるでんぷん粒の分布を観察した。3×3 mm

の範囲内をさらに50×50の区画(1区画60×60 μ m)に分け、画像処理ソフトウェア(Photoshop)を用いて、以下の手順で感染の影響の有無を記録した。①菌糸または孢子がみられた区画、②宿主細胞に感染への反応があり着色等がみられる区画、③変化が認められない区画とした。これらの区画を色分けし、細胞の着色面積および菌糸の分布面積を图示した。

加えて、葉に萎凋症状が発現した段階についても接種部(Fig. 1-ii)を顕微鏡で詳細に観察し、宿主細胞の状態を有傷無接種と対比して把握した。

また、森田ら(2016)が子のう殻の形成によって確認した本菌の分布範囲は接種点から上下方向に10 cm程度であったことから、接種部から垂直方向に5 cmおよび10 cm離れた位置における本菌の分布と宿主細胞の変化について顕微鏡で観察し、接種部位の変化との関連や、接種点から離れた位置で見られる時間的な差などについて検討した。

結 果

接種部における本菌の分布と宿主細胞の反応の経時的变化

接種4日後、7日後、14日後、21日後個体の接種穴部分を含む横断面および放射断面3×3 mm(Fig. 1-i)の範囲内における菌糸や孢子の分布と、宿主細胞の二次代謝活性化に起因する着色物質の分布を詳細に観察した結果、以下のような傾向がみられた。

まず、菌糸や孢子の分布は、接種4日後には横断面にも放射断面にも観察されなかった(Fig. 2c, d)。接種7日後でも、横断面では菌糸や孢子は観察されなかったが(Fig. 2e)、放射断面では接種穴から0.5 mm離れたところまで菌糸が認め

Fig. 2. Distribution of hyphae and secondary metabolites around the inoculation holes (Fig. 1, i) in the tissue of *F. carica*. Light grey: Fig tissue without metabolites, dark grey: distribution of secondary metabolites, black: distribution of hyphae. a, b: Light micrographs (LMs). c-l: Traces of hyphae and secondary metabolite distribution from LMs. These are representative of 3 or 4 seedlings.

Fig. 3. Distribution of hyphae around the inoculation holes (Fig. 1, i) in sections stained with periodic acid-Schiff's reagent and toluidine blue O.

a: Hyphae in vessels and surrounding axial parenchyma cells, ray parenchyma cells and fiber cells, 7 days after inoculation (dai).

b: Hyphae observed in axial parenchyma cells and fiber cells apart from vessels, 14 dai.

AP, axial parenchyma cells; F, fiber cells; H, hyphae; R, ray parenchyma cells; V, vessels.

られた (Fig. 2f). 菌糸は道管内および隣接する軸方向柔細胞、放射柔細胞、木部繊維内に観察された (Fig. 3a). 接種 14 日後には、横断面では菌糸や胞子が接種穴に接する部位で認められる程度であり (Fig. 2g), 放射断面では接種穴から 1.5~3 mm 離れたところまで認められた (Fig. 2h). 菌糸は道管内のほか、道管から離れた軸方向柔細胞、放射柔細胞、木部繊維にも観察された (Fig. 3b). 接種 21 日後には、横断面では 14 日後と同様に菌糸や胞子が接種穴に接する部位で認められる程度であり (Fig. 2i), 放射断面では接種穴から 3 mm 離れた部分まで菌糸や胞子が観察され、観察範囲内の分布密度は 14 日後よりも高かった (Fig. 2j). 菌糸は道管内のほか、道管から離れた軸方向柔細胞、放射柔細胞、木部繊維にも観察された。

二次代謝活性化に起因する着色物質の分布は、接種 4 日後には、横断面では接種穴から 1 mm (Fig. 2c), 放射断面では 3 mm (Fig. 2d) 離れた範囲まで認められた。軸方向および放射柔細胞内に黄色い二次代謝物質の蓄積が観察され、隣接する道管の壁が黄色く着色していた (Fig. 4a). 接種 7 日後には、二次代謝活性化による着色物質の分布は、横断面では接種穴から 1 mm (Fig. 2e), 放射断面では 3 mm (Fig. 2f) の範囲に認められ、接種 4 日後よりも観察範囲内の着色の分布密度が高かった。また、4 日後と同様に、軸方向および放射柔細胞内に黄色い二次代謝物質の蓄積があったほか、道管だけでなく木部繊維の壁が黄色く着色していた (Fig. 4b). 接種 14 日後には、二次代謝活性化による着色物質の

分布は、横断面では接種穴から 1 mm (Fig. 2g), 放射断面では 3 mm (Fig. 2h) の範囲に認められた。着色は菌糸の周囲を囲むように分布しており、接種 7 日後よりも観察範囲内の着色の分布密度が高い傾向にあった。軸方向および放射柔細胞のほか、木部繊維内や道管内に黄色~褐色の物質の充填が観察された (Fig. 4c, d). 接種 21 日後には、二次代謝活性化による着色物質の分布は、横断面では接種穴から 1~2 mm の範囲 (Fig. 2i), 放射断面では観察範囲全体に広がっており接種 14 日後よりも着色の分布密度が高い傾向にあった (Fig. 2j). 一方で、付傷のみで菌を接種していない有傷無接種個体を観察したところ、付傷 21 日後の二次代謝活性化による着色物質の分布は、横断面では付傷穴から 1 mm の範囲 (Fig. 2k), 放射断面では 1.5 mm の範囲を中心に認められた (Fig. 2l). 付傷部付近の軸方向および放射柔細胞、木部繊維、道管内に黄色い物質が観察された。観察範囲内の着色の分布密度は、横断面では接種 14 日後と同程度であり、縦断面では接種 14 日後よりも低い傾向にあった (Fig. 2l). また、観察した各時系列の接種個体、有傷無接種個体全てにおいて、接種および付傷穴隣接部の、穴開け時にドリルで破壊された柔細胞類の内部には有色の物質の蓄積は認められなかった。

二次代謝エネルギーとして消費されるでんぶん粒について観察したところ、接種 4 日、7 日、14 日後および 21 日後の試料では、二次代謝物質の蓄積が見られない柔細胞内にはでんぶん粒が密に存在しているのが認められた (Fig. 4e). 一方、黄色~褐色の二次代謝物質が認められた柔細胞内には、でんぶん粒は認められなかった (Fig. 4f).

外部病徴発現時における接種部の宿主細胞の状態

接種 21 日後の萎凋開始個体の接種部 (Fig. 1-ii) 木部に変色広がっており (森田ら, 2016), 顕微鏡で観察すると、菌糸が道管、木部繊維、軸方向および放射柔細胞内に観察され、菌糸が認められた細胞およびその周囲の細胞内に、二次代謝活性化に起因する黄色~褐色の着色物質が観察された (Fig. 5a). また、道管内にはクロースの充填が認められた。菌糸の侵入がある細胞および着色物質の蓄積された柔細胞は、核が縮小あるいは認められないこと、菌糸が細胞内を充填していることなどから、すでに壊死していることは明らかであった。変色部に隣接する形成層および師部の柔細胞は、核が認められないことや褐変などから壊死が明らかであったが、変色部と隣接していない形成層細胞内には、核が存在しているものが多くみられた (Fig. 4g). 変色が認められなかった木部では、軸方向および放射柔細胞に淡褐色の着色物質が認められたが、菌の分布は観察されなかった。

Fig. 4. Secondary metabolites stained around inoculation holes (Fig. 1, i) and nucleus in cambial cells at inoculation area (Fig. 1, ii).

a: Accumulation of yellow secondary metabolites in axial parenchyma cells and staining of cell walls of the surrounding vessels, 4 days after inoculation (dai). b: Accumulation of yellow secondary metabolites in axial parenchyma cells, ray parenchyma cells and staining of cell walls of fiber cells, 7 dai. c: Accumulation of brown secondary metabolites in axial parenchyma cells, ray parenchyma cells, and fiber cells, 14 dai. d: Dense accumulation of yellow to brownish secondary metabolites in vessels, 14 dai. e: Starch in ray parenchyma cells without accumulation of secondary metabolites, 14 dai. f: Ray parenchyma cells with accumulation of secondary metabolites, 14 dai. Starch staining was not observed. g: Nucleus in cambial cells at start of leaf wilting. AP, axial parenchyma cells; F, fiber cells; H, hyphae; N, nucleus; R, ray parenchyma cells; SM, secondary metabolites; ST, starches; V, vessels. a–d: No stain applied. e–g: Sections were stained with periodic acid-Schiff's reagent and toluidine blue O.

付傷 21 日後の有傷無接種個体では、付傷部 (Fig. 1-ii) 付近には肉眼で認められる変色はほとんどなく (森田ら, 2016), 顕微鏡で観察すると軸方向柔細胞, 放射柔細胞に淡

褐色の着色が認められる程度であった (Fig. 5b)。なお、色素水の根からの吸入により、付傷による著しい通水阻害はなかったことがわかっているが (森田ら, 2016), 色素水に

Fig. 5. Secondary metabolites at inoculation area (shown in Fig. 1, ii).

a: Brownish secondary metabolites in axial and ray parenchyma cells and vessels at start of leaf wilting, 21 days after inoculation (dai).

b: Xylem tissue without secondary metabolites in noninoculated control sample, 21 days after wounding.

AP, axial parenchyma cells; F, fiber cells; H, hyphae; R, ray parenchyma cells; T, tyloses.

より赤く染色されなかった範囲では、ほぼ全ての道管内でチロースの充填が観察された。一方で、赤く染色された通水のある範囲では、道管内にチロースの充填はほとんど観察されなかった。

子のう殻の形成部位における宿主細胞の反応

接種部から 5 cm および 10 cm 上部、つまり試料採取後に子のう殻の形成によって本菌の分布が確認された部位を顕微鏡で観察した。接種 7 日後の接種部から 5 cm 離れた本菌検出部位では、ごく局所的に道管内に菌糸が観察された (Fig. 6)。また、着色物質の蓄積は軸方向柔細胞およびその周囲の道管内腔に、ごく局所的に認められた。接種部から 10 cm 離れた本菌検出部位では、主幹横断面および放射断面の切片上では菌糸は確認できなかった。宿主細胞内における着色物質の蓄積も明瞭には認められなかった。

萎凋が開始した個体では、5 cm および 10 cm 上部で菌糸が道管内のほか、軸方向および放射柔細胞内に観察され、二次代謝に起因する着色物質が軸方向および放射柔細胞、道管、木繊維内にみられた。しかし、前述の接種部 (Fig. 5a) でみられるほどに着色物質の蓄積範囲は広がっていなかった。

考 察

森田ら (2016) は、株枯病菌 *C. ficicola* を接種した苗木内で菌の分布や木部の変色が拡大するとともに外部病徴である葉の萎凋が開始することを明らかにし、それらの萎凋個体から *C. ficicola* を再検出して、この菌が発病・枯死に関わっていることを示した。また、苗木の組織内部で起こる木部の褐変現象が自然感染木で観察される現象 (Kajii *et al.*, 2013) と共通していると報告した。本研究では、同じ試料を顕微鏡で観察することにより、株枯病菌の伸長、分布と宿主細胞の変化、それらと水分通導の停止および萎凋との関係について森田ら (2016) の結果と突き合わせながら詳細に記載した。

Fig. 6. Hyphae (H) in vessels 5 cm from the inoculation area, 7 days after inoculation.

接種した菌の動態や宿主への生理的な影響については、まず、3×3 mm の狭い範囲で観察した結果から以下のことが明らかになった。接種 7 日後には、菌糸は筒状の道管の開口部から侵入し垂直方向に伸長していたのに対して、横断切片上で菌糸の分布が確認できなかった。これは、本菌が接種穴から水平方向に伸長していなかったことを示している。道管のような空洞が水平方向にはないため、菌糸が水平方向に伸長するには多くの細胞壁を突破する必要がある、菌糸の伸長が物理的に困難であったと考えられる。7 日後の放射断面で放射柔細胞への菌糸の侵入が認められたことから、水平方向への伸長は放射柔細胞を介して可能ではあるが、道管を介する伸長よりも頻度が極めて低いと考えられる。接種 14~21 日後は、水平方向よりも垂直方向の菌の分布密度増加およびこれに伴う二次代謝活性化による着色範囲の拡大が顕著であった。有傷無接種 21 日後でも着色物質が観察され、付傷に対する反応と考えられたが、同時

期の接種個体と比較すると着色範囲は狭く、接種個体では傷よりも菌に対する防御反応として着色範囲が拡大していると考えられた。また、有傷無接種 21 日後と接種 14 日後を比べると、水平方向では同程度の着色範囲であるのに対し、垂直方向では後者の方が着色範囲が広い。このことから、接種 14 日後の時点で菌が宿主細胞に及ぼす影響が表れており、特に菌の分布密度が高くなりやすい垂直方向においてそれが顕著であることがわかった。

上記の防御反応に関して、細胞レベルの知見としては以下のことが明らかになった。宿主の生細胞である放射柔細胞および軸方向柔細胞の反応に注目すると、接種 4 日後には黄色の物質の蓄積があり、7 日後には隣接する道管や木繊維の壁も着色していたことから、柔細胞から生成物が周囲に滲出したことがわかる。また、7 日後には菌糸が道管内から軸方向柔細胞と放射柔細胞内に壁孔を通じて侵入している。本菌は生きた柔細胞にも侵入できること (Kajii *et al.*, 2013) から、細胞内容を吸収して利用していると推測された。なお、二次代謝の活性化が起こっていても柔細胞内に侵入していることから、生成物の防御効果が不十分な可能性があると考えられた。21 日後まで、日数を経るにつれて細胞内の着色物質は軸方向および放射柔細胞に形成され、しかも色が淡黄色から黄色、褐色へと濃色に変化していたことから、防御反応の範囲の拡大と同時に、生成物の濃度の上昇や酸化・重合などの化学変化が進んだと推測された (Hillis, 1987)。

Holbrook and Zwieniecki (2005) は、生細胞である柔細胞は傷害を受けると、防御反応としてスベリンやフェノール等の二次代謝産物を生合成・蓄積するとともに、柔細胞内に貯蔵されていた糖類量は減少すると報告している。本研究においても、着色物質の蓄積が認められた柔細胞内ではでんぷん粒の消失が確認され、でんぷんは防御物質生産のための代謝に使われたと考えられる。なお、接種および付傷穴の隣接部では柔細胞類に着色物質の蓄積がなく、でんぷん粒が消失していなかったのは、ドリルによる穴開けの際の物理的破壊によって細胞が壊死し、二次代謝の活性化に関与しなかったためと考えられる。

葉の萎凋が開始した時期に森田ら (2016) によって肉眼レベルで判断された木部の変色部は、本研究で観察された二次代謝物質に起因する着色範囲と対応していた。これらは虫媒伝染で萎凋したイチジクで Kajii *et al.* (2013) が観察した褐色～黒褐色の変色および細胞内の着色物質と同じである。従って、木部の変色は病原菌の活動に対する宿主柔細胞の防御反応によって形成された傷害心材であり、道管は通水機能が停止している (Hillis, 1987)。また、変色部は、

葉の萎凋開始時点で接種部の横断面に広範囲に広がっていることが確認されたが、水平方向に菌の分布が拡大することで横断面全体に変色が拡大したというよりも、複数の接種穴から垂直方向に菌が拡大し、結果としてある横断面に菌および変色の分布が集まったと推測された。森田ら (2016) の 1 点および 2 点有傷接種による予備試験では横断面上全体に変色が広がらず枯死樹が発生しなかったことから、水平方向への変色拡大は活発でないと考えられる。なお、形成層および師部の柔細胞は、葉の萎凋が開始した段階でも、変色部に接した部位以外では生存と判断されるものが多数であった。一部の形成層や師部の壊死が樹木の枯死を引き起こすことはなく (鈴木, 1999)、本病における萎凋の要因とは考えられない。

接種部以外に、森田ら (2016) により菌の存在が確認された範囲を観察した結果、接種部では菌の分布密度が高かった一方で、5 cm 離れた部位では菌の分布が一部の道管およびその周囲の細胞のみと局所的であった。菌糸は空洞である道管内を介して容易に分布を広げるが、細胞壁や生細胞の防御反応を突破し分布密度を増加させるには日数がかかると考えられる。接種 7 日後に、接種部から 10 cm 離れた菌検出部位で菌糸などが観察されなかったのは、極めて菌の分布密度が低かったからだと推測された。以上のことから、枯死に至る要因として重要なことは、防御反応による傷害心材形成部位、つまり通水停止部位が主幹の横断面上で広がることであり、それが接種点付近のような局所的な現象であっても十分であると結論づけられる。

株枯病菌を接種していない有傷無接種個体では、傷に対する防御反応がわずかに観察されたが、通水機能の停止および枯死が発生しなかったことから (森田ら, 2016)、本研究程度の物理的傷害だけでは枯死に至らしめるほどの防御反応や通水阻害は起こらないと言える。一方、ドリルでの付傷により物理的に通水が停止した部位でもチロース充填が認められた。チロースが充填された道管はすでに通水停止していることが知られているため (島地・伊東, 1982; Zimmermann, 1983)、充填された道管は通水停止していると言える。

森田ら (2016) の通水機能の解析と、本研究による内部病徴の細胞レベルの観察結果から、株枯病菌接種によるイチジク枯死の仕組みは、以下のように推測される。①接種穴から、本菌の菌糸が主に道管を介して伸長する。②道管周囲の柔細胞類は防御反応を起こし、黄～茶褐色の物質がそれらの細胞で生産され、細胞外へ分泌される。それによって木部が変色し (傷害心材)、変色部では道管の通水機能が停止する。③本菌の分布密度の上昇にともなって変色部が

拡大し、接種部付近の横断面で通水停止部分が増加する。④葉に届く水分量が著しく減少し、葉に萎凋症状が発現して枯死に至る。萎凋個体では感染部位を中心に通水機能が全面停止したことが明らかになった。この仕組みは、ナラ枯れで示された「通水の停止した変色部の拡大により、樹幹のある高さにおいて通水機能が全面停止する」という発病プロセス（黒田・山田，1996）と合わせて類似している。隅田ら（2016）の土壌伝染における発病プロセスの研究により、土壌伝染であっても主幹部の通水機能の停止と共に葉の萎れが観察された。根の細胞に一部の壊死はあったが、伝染経路に関わらず本病の発病要因として、通導要素の機能が阻害されて通水停止に至ることが重要であると推測される。しかし、土壌伝染における発病プロセスについては今後も詳細に検討する必要がある。

謝 辞

本研究の一部はJSPS 科研費 JP25292089 の助成を受けて行いました。

摘 要

イチジク株枯病は、我が国のイチジク栽培地域で蔓延している病害であり、枯死を引き起こす。本研究では、株枯病菌接種苗木の光学顕微鏡観察により、宿主細胞内での本菌の分布、本菌が宿主細胞に及ぼす影響について検討し、通水機能停止の過程について考察した。接種7日後個体では、接種部において菌糸が接種穴と隣接する道管およびその周囲の軸方向柔細胞、放射柔細胞、木部繊維内に観察された。二次代謝の活性化に起因する着色物質は、菌糸の周囲の軸方向柔細胞、放射柔細胞内および道管と木部繊維の細胞壁にみられた。接種部より5 cm 離れた部位では、菌糸が道管および周囲の柔細胞に局所的に観察された。着色物質の蓄積も、接種部と比較するとごくわずかであった。萎凋開始個体の接種部では、肉眼観察で確認された木部の変色部において、菌糸が道管、木部繊維、軸方向および放射柔細胞、髓の細胞内に観察された。また、菌糸が認められた細胞およびその周囲の細胞内に、黄色～褐色の着色物質が観察された。形成層細胞内には、核が存在しているものが多く観察され、細胞の生存が認められた。従って、形成層の壊死を経て葉の萎凋が起こったとは考えられない。森田らの通水機能の解析と、本研究による内部病徴の細胞レベルの観察結果から、本菌接種によるイチジク枯死の仕組みは、以下のように推測される。①接種穴から、本菌の菌

糸が主に道管を介して伸長する。②道管周囲の柔細胞類は防御反応を起こし、黄～茶褐色の物質を生産して分泌する。③本菌の分布拡大により変色部が拡大し、接種部付近の横断面で通水停止部分が増加する。④葉に届く水分量が著しく減少し、萎凋症状が発現して枯死に至る。

引用文献

- Feder, N. and O'Brien, T.P. (1968). Plant microtechnique: Some principles and new methods. *Am. J. of Bot.* 55: 123–139.
- Hillis, W.E. (1987). *Heartwood and Tree Exudates*, pp. 157–162, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- Holbrook, N.M. and Zwieniecki, M.A. (2005). *Vasacular Transport in Plants*, pp. 470–471, Elsevier Academic Press, San Diego, CA, U.S.A.
- 細見彰洋 (2009). 抵抗性台木を用いたイチジク株枯病の防除. *農林水産技術研究ジャーナル* 32: 31–33.
- Kajii, C., Morita, T., Jikumaru, S., Kajimura, H., Yamaoka, Y. and Kuroda, K. (2013). Xylem dysfunction in *Ficus carica* infected with wilt fungus *Ceratocystis ficicola* and the role of the vector beetle *Euwallacea interjectus*. *IAWA J.* 34: 301–312.
- 梶谷裕二 (1992). 福岡県に初発生したイチジク株枯病について. *日本植物病理学会報* 58: 111–112. (講要)
- 梶谷裕二 (1996). アイノキクイムシによるイチジク株枯病伝搬の可能性. *日本植物病理学会報* 62: 275. (講要)
- 瓦谷光男・三輪由佳 (2012). 農業総覧 原色病害虫診断防除編 7. pp. 23–30, 農山漁村文化協会, 東京.
- 黒田慶子・山田利博 (1996). ナラ類の集団枯損にみられる辺材の変色と通水機能の低下. *日本林学会誌* 78: 84–88.
- 新田浩通・森田剛成・岩崎由香・水主川桂宮 (2005). クイムシによるイチジク株枯病の伝搬事例. *関西病虫研報* 47: 95–98.
- 森田剛成・原 敬和・見世大作・軸丸祥大 (2012). アイノキクイムシが介在したイチジク株枯病の激害化事例. *関西病虫研報* 54: 29–34.
- 森田剛成・軸丸祥大・黒田慶子 (2016). 株枯病菌を接種したイチジク苗木における病徴の進展過程 (1) 木部の通水阻害と萎凋症状の関係. *日植病報* 82: 301–309.
- 島地 謙・伊東隆夫 (1982). 図説木材組織. pp. 32–33, 地球社, 東京.
- 清水伸一・三好孝典・越智政勝・橘 泰宣 (1999). 愛媛県におけるイチジク株枯病の発生とチオファネートメチル・トリフルミゾール水和剤による防除. *愛媛果樹試験報* 13: 27–35.
- 隅田阜月・森田剛成・黒田慶子 (2016). イチジク株枯病菌 *Ceratocystis ficicola* の土壌から宿主への侵入経路の解明. *樹木医学研究* 20: 30–31.
- 鈴木和夫 (1999). 樹木医学. pp. 76–82, 朝倉書店, 東京.
- 外側正之・増井伸一・野村明子・増井 (塩崎) 弘子 (1999). イチジク株枯れ症状の発生と防除. *静岡柑試研報* 28: 51–62.
- Zimmermann, M.H. (1983). *Xylem structure and the ascent of sap*. p. 143, Springer-Verlag, Berlin.