ユズのかいよう性こ斑症および類似症状の組織学的観察

矢野 隆*・二宮敬和・清水康雄

愛媛県立果樹試験場鬼北分場 798-13 愛媛県北宇和郡広見町興野々

Anatomical Observation on Ulcerous Kohansho and Similar Disorders on the Peel Surface of Yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) Fruit

Takashi Yano*, Yoshikazu Ninomiya and Yasuo Shimizu

Ehime Fruit Tree Experiment Station, Kihoku-Branch, Okinono Hiromi-cho, Kitauwa-gun, Ehime 798-13

Summary

Two typical symptoms of ulcerous Kohansho, the convex and concave types, frequently appear on the flavedo of Yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) fruit. The external appearances of these two symptoms and similar disorders caused by painting with crushed peel juice or pricking with a thorn were compared by histochemical examination.

1. In cross sections of the ulcerous Kohansho, a fan-shaped, degenerated region and the central vascular bundles on the same side of the fruit were always observed.

The convex type symptom at first appeared as a blackish, oily spot which changed to a milky white spot and finally, to a brown, convex spot. Histochemical analysis revealed that the region consisted of small, irregularly shaped cells surrounding the degenerated region in whose margins, the cell walls were lignified and suberized layers were observed. The concave injury was accompanied by small, irregularly shaped cells which were lignified but the suberized layers were not noticeable.

2. In regions damaged by painting with crushed peel juice, the degenerated part was not fan-shaped and the degeneration proceeded parallel to the epidermis. Vascular bundles were not observed in the degenerated region.

3. Areas damaged by pricking with a thorn remained clear even after lignification and suberization of the tissue had advanced so that it is possible to distinguish that injury from that caused by ulcerous Kohansho.

These observations led us to conclude that the degenerating processes in the typical ulcerous Kohansho differed histologically from those caused by crushed peel juice or mechanical injury.

緒 言

ユズのかいよう性こ斑症は、ユズ果実の生育期に発生する不規則円形の果皮障害である。本症はユズ栽培地帯全域でみられ、外観を著しく損なうため、ユズを経済栽培する上で大きな障害となっている。倉田ら(1977)は発生生態について報告し、本症を最終的な外観形態、発生時期等から2つの症状、即ち凸型症状

と凹型症状に大別している。前者は7月から9月にかけてみられ、油胞周囲組織のやや窪んだ症状として発現し、隆起、変色の後、褐色かさぶた症状に移行するタイプ、後者は、9月下旬頃から収穫期までみられ、窪んだままでその後の隆起を伴わないタイプとしている。本症の発生原因については、主に Citrus tristeza virus (CTV) との関係から検討されているが、CTV を病原とする結論にはいたっていない(倉田ら, 1977; 牛山ら, 1977)。この理由として、本症の外観症状には前述した2つの症状があり、凹型症状の発生と CTV によるステムピッチングの発生に相関がみら

1996年8月28日 受付. 1997年1月8日 受理.

本報告の一部は平成3年度日本植物病理学会関西西部会で発表した。

*現在：愛媛県立果樹試験場

れないこと、CTV フリー樹においても若干ながら発生が認められたこと（未発表）などが挙げられる。さらに、トゲ傷、果皮粗汁の付着等により類似した症状が形成されるため、一般栽培条件下において外観症状のみによる分類では発生原因の異なった幾つかの症状を同一のものとしている可能性があることなどもその一因と考えられる。このため、本症の発生原因を探索する上では、類似症状も含めて詳細に分類しておく必要があると考えられる。そこで、本報告では本症状および外観が最も類似していると考えられる果皮粗汁付着症状、トゲによる付傷症状の外観形態及び組織形態について発達程度毎に組織化学的に観察し各々の類別を試みた。

材料および方法

1. 供試材料

供試樹は在来種で、現地圃場でかいよう性こ斑症およびステムピッチングの発症度がともに中程度(51.1, 47.0)であり、CTV エライザ検定陽性の樹から採穂し、これをカラタチ実生苗に接木した。3年間育苗後、ビニールポットに移植した5年生樹を用いた。供試樹の育成、管理はすべて場内網室内で行った。

供試樹の果実に自然発生および処理後発生した症状部を第1表の通り観察し、採取試料とした。

2. 果皮粗汁付着部の組織変性

網室内で育成していた外観健全なユズ果実に、他の果実の果皮より圧迫漏出させた果皮粗汁をそのまま果皮に塗り付け（8月1日）、その後の処理部位の外観症状を随時観察した。また、組織断面を観察するため、果皮粗汁無処理の果実、処理後20時間、40日後の果実について組織化学的観察を行った。

トゲによる付傷後の組織変性

網室内の外観健全果実に対して、ユズのトゲ先端部

で約2~3mmの深さの刺し傷を、油胞を除いて近接して数ヶ所作り（8月1日）、処理部の外観を随時観察した。また、処理後40日の果実について組織化学的観察を行った。

3. 組織化学的観察法

果皮表皮部から約5×5×8mm³の試料を切り取り固定用試料とした。なお、各試料には果皮表面、アルベド、フラベド層が含まれるように採取した。試料をFAA（ホルマリン5:氷酢酸5:50%エタノール90）固定液で24時間固定した。常法に従って、水洗、エタノール脱水後、キシレン誘導、パラフィン（融点48℃）誘導を行い、回転式ミクロトームを用いて10~12μmの連続切片とした。脱パラフィン、脱キシレンを行い50%エタノールに置換した後、染色を行った（小野・鈴木, 1962）。また、以下の組織化学的染色によって試料組織の物質組成を検討した。

1) リグニン反応（平井ら, 1953; 鈴木, 1957）

2%フロログルシンの50%エタノール溶液1分間浸漬後、40%硫酸に1分間浸漬。

2) スベリン反応（小野・鈴木, 1962）

スタンブラックB:0.1%スタンブラックBの70%エタノール溶液で20分染色後70%エタノール溶液で5分間脱色。

スタンⅢ:スタンⅢのエタノール飽和溶液に等量のグリセリンを加えた溶液で60分間染色。

3) ペクチン反応（Jensen, 1962; 小野・鈴木, 1962）

0.02%ルテニウムレッド水溶液で60分間染色。

結 果

1. 各症状の外観形態

凸型症状は7月上旬の幼果の時点から発生し始め、油胞周囲組織が陥没した黒色の円形油浸状斑として発現した（第1-1図）。その後約5日で、症状部は乳白

Table 1. Ulcerous Kohansho and similar disorders.

Symptom or Treatment		Surface appearance ^z	Sampling time
Early convex type	(Blackish oily spot)	—	Early Aug.
Middle 〃	(Light brown spot)	+	〃
Late 〃	(Brown spot)	++	〃
Concave type		—	Early Oct.
Non-treated peel	(Healthy tissue)	±	Middle Aug.
Spot formed after the treatment with crushed peel juice ^y		—	〃
Spot formed after the treatment with crushed peel juice ^x		++	〃
Spot formed by the thorn pricking ^x		++	Middle Sept.

^z —: concave, ±: flat, +: convex, ++: prominently convex

^y Sampled after 20 hours. ^x Sampled after 40 days

色の斑点症状に移行し、淡褐色に変わった後、隆起し始め (第 1-4 図)、約 1 ヶ月後には褐色のかいよう状隆起症状となった (第 1-7 図)。

凹型症状は 9 月上旬から収穫期 (10 月下旬) までの間発生が認められ、油胞周囲組織の陥没した淡褐色～淡黄色斑点のまま果実は成熟状態となった (第 2-1, 2, 3 図)。

一方、健全な生育期の果皮に、他の果皮粗汁を塗布したところ、凸型症状と同様の黒色油浸症状が発生し、約 5 日後には乳白色斑点に移行した (第 3-1 図)。さらに、処理 40 日後までには褐色の隆起症状へと移行した (第 3-2 図)。トゲによる刺し傷でも、果皮粗汁を塗布した症状と同様の外観症状の発達を示した (第 3-3 図)。

2. 凸型症状の組織化学的観察

最も初期の症状である黒色油浸状の症状では、表皮からアルベド層にかけて扇状に変性が起こり (第 1-2 図)、変性部では細胞内容物が凝集していた (第 1-3 図)。また、扇状変性域の内部末端には、常に維管束が観察された (第 1-2, 5, 8 図)。症状の発達と共にこの変性域は表層細胞より壊死したが、変性域の周縁細胞はフロログルシン硫酸法により赤色に染色され、細胞壁はリグニン化していた (第 1-5 図)。この染色細胞層の周囲では、壁の薄い不整形な小細胞が多数観察された (第 1-6 図)。その後、斑点は隆起したが (第 1-7 図)、不整形の小細胞層は 10～20 細胞層にまで発達しており、この不整形小細胞層と扇型変性域との間にはスダン黒により黒青色に染まるスベリン化層も観察された (第 1-8 図)。隆起がさらに進んだ症状では、3～4 層のスベリン化層が発達していた。不整形小細胞層中には細胞壁の肥厚化した厚膜細胞群が観察された (第 1-9 図)。

3. 凹型症状の組織観察

凹型症状も、凸型症状と同様に表皮からアルベド層にかけて扇型の変性域があり、その内部末端には常に維管束が観察された (第 2-4, 5 図)。変性域周縁ではスダン黒により黒色に染まる細胞層が確認された (第 2-4 図)。この細胞層は、フロログルシン硫酸法によっても濃染した (第 2-6 図)。これらの染色層直下の、2～4 層の細胞域では不整形小細胞層が確認されたが、凸型症状でみられた多層にわたる不整形小細胞層、スベリン化層、厚膜細胞群等は観察されなかった (第 2-4～6 図)。

4. 果皮粗汁塗布、トゲ傷による症状

果皮粗汁塗布処理 20 時間後の果皮組織では、表皮からフラベド層にかけて、表皮と平行に組織変性域がみられ、凸型斑初期症状と同様に細胞内容物が凝集していた (第 3-5, 6 図)。処理後 40 日目の隆起した症状では、壊死層の下にスベリン化層が形成され、その直下では、10～20 細胞層で不整形小細胞層が観察された (第 3-7 図)。また、不整形小細胞層の内部ではフロログルシン硫酸反応で濃染する厚膜細胞群が観察された (第 3-8 図)。トゲ傷処理果の組織変化は果皮粗汁処理果と類似しており、傷痕部を取り囲むようにスベリン化層、不整形小細胞層、厚膜細胞群等が認められた (第 3-4 図)。ただし、これらの人為的傷害部の組織変性域においては、維管束組織は観察されなかった (第 3-4, 7 図)。

考 察

カンキツ類の果実生育期に発生する果皮障害の発生原因については、従来様々な説が提唱されている。真鍋・安岡 (1982) は、各種カンキツ類の果実に対して、果皮粗汁や個々の果皮オイル成分を直接処理して類似症状を発生させ、果実の成熟期に発生するこはん症は、果皮オイルの成分変化、果皮組織の物理的、生理的性質の変化を素因とし、急激な環境条件の変化に起因する生理障害であると想定している。また、ポンカンにおいてはヒメヨコバイ類の吸汁による果皮障害の発生も報告されている (河野・長浜, 1970; 橋元・宮路, 1988)。一方、本症と類似した症状を呈するイヨカンかいよう性虎斑病は、CTV-Seedling Yellows 系統の感染によって発生することが明らかにされている (大森ら, 1985)。

このように、露地栽培条件下では品種、果実生育ステージによって様々な果皮障害が発生するため、発生原因の究明に当たっては類似症状との明確な類別を行っておく必要がある。

本報告では、ユズかいよう性こ斑症、類似症状について組織学的な見地における各種症状の類別を試みた。

ユズかいよう性こ斑症の凸、凹型両症状の最終的な組織変性と人為的傷害部の組織変性を比較すると組織変性域の形態が明らかに異なった。つまり、かいよう性こ斑症では果皮表面に向けて広がった扇状の変性域が形成されたのに対し、果皮粗汁塗布処理では果皮表面から一定の深さで平坦な変性域を示した。また、トゲ付傷処理では稀に扇状の変性域を示すものもあるが、その中心部には明瞭な傷痕部が観察された。さらに、

かいよう性こ斑症の扇状変性域の内部末端には常に維管束組織が観察されたのに対し、人為的傷害部では観察されなかった。ただし、これらの人為的傷害部の組織変性域内部に偶発的に維管束組織が存在する可能性は否定できないが、組織変性域の形態、維管束組織の存在場所を確認すれば、かいよう性こ斑症と人為的傷害の判別は可能と考えられた。なお、師部細胞局在性ウイルスであるCTVが病原とされているイヨカンかいよう性虎斑病の組織観察では扇状の組織変性域および組織変性部での維管束組織の存在は報告されていない(赤井ら, 1969)。

凸型症状の最も初期に起こる扇状変性域の細胞内容物凝集は、果皮粗汁塗布処理果皮でも観察された。このようなカンキツ果皮組織における初期段階での組織変性およびこれに続いて起こる変性域周辺のリグニン化は、幾つかのカンキツ果皮病斑部でも観察されており(Akai, 1951; 赤井ら, 1969; Arimoto et al., 1982; Baba・Asada, 1970)、これらの一連の反応はカンキツ果皮の局所的な組織損傷に対する細胞防衛反応の1つであろうと考えられた。

一方、かいよう性こ斑症の凸、凹型両症状については凹型症状の初期症状が確認されていないので両者の初期段階での比較は行えないが、両症状の最終的な組織変化を比較すると、扇状の組織変性域が観察される点、変性域の内部末端で維管束組織が観察される点で類似していた。しかし、凹型症状は組織変性域周辺の不正形小細胞層が極薄く、その周囲にスベリン化層も観察されない点で異なっていた。凸型症状ではこれらの組織変化が起こる時点で隆起を伴っており、これらの2つの組織変化が症状部の隆起に大きく関与しているものと考えられた。凹型症状が隆起症状を示し得ない原因としては、倉田ら(1977)も指摘したとおり、この症状が9月以降に発生するので、凸型症状が発生する7~9月に比べて果皮組織が活発な反応を示し得ないためと考えられる。これらのことから、凸型および凹型症状は同様な発生過程をたどって形成されたものである可能性が高いと考えられた。

また、今回の観察で、かいよう性こ斑症変性域の内部末端で常に維管束組織が観察され、人為的傷害部の組織変性部では維管束組織が観察されなかったことから、かいよう性こ斑症と維管束組織のかかわりが強く示唆されたが、この組織変性の発生過程については次のようなことが考えられた。1) 果皮表面から進んできた障害が維管束組織で終結した。2) 維管束組織か

ら障害が発生し、表皮組織方向へ拡大した。しかし、1)については今回観察した人為的傷害のように外部および表皮部に起因する組織変性が扇状に終結する可能性は低く、その終結位置に必ず維管束組織が存在する可能性も低いと考えられるが、偶発的にそれらが再現される可能性は否定できない。また、2)については従来、ユズのかいよう性こ斑症が師部局在性ウイルスであるCTVとの関連で論じられていることから本症発生過程である可能性は高いと考えられるが、組織変性域内部末端の維管束、特に師部細胞の状態、および師部細胞の障害と周辺細胞壊死との関連性等を明らかにする知見、CTVフリー樹でも外観、組織変性の類似した症状が発現した事(未発表)を解明する手がかりは、今回の観察では得られなかった。これらの2つの可能性とその発生原因についてはCTVの感染の有無、感染CTVの系統および症状の発消長とあわせて、今後さらに検討する必要がある。

摘 要

ユズのかいよう性こ斑症(以下、こ斑症と略す)には凸型と凹型の2つの症状があり、一般栽培条件下ではこれと類似した幾つかの症状も混在する。これらの症状の類別を図るため、外観症状と対比して組織化学的観察を行った。

こ斑症の組織変性域の形態は、果皮表面に向けて広がった扇状の組織変性域を示すのに対し、果皮粗汁塗布処理では表皮と平行に平坦な組織変性域を示し、トゲ付傷処理ではトゲ傷痕が変性域内に明瞭に残った。さらに、こ斑症では扇状組織変性域の内部末端に常に維管束組織が存在したが、人為的傷害部では観察されなかった。これらのことより、こ斑症と人為的傷害については、変性域の形態、維管束組織の有無、およびその存在場所を確認することで両者を分類することが可能であった。

発生時期を異にする凸型、凹型の両症状の最終的な組織変化を比較すると、両者ともに扇状の変性域が形成され、その内部末端には常に維管束組織が存在していたが、凹型症状については不正形小細胞層の発達が少なく、スベリン化層の形成も認められなかった。

謝 辞 本稿をまとめるにあたり、三重大学生物資源学部久能 均博士には終始御教示を頂いた。また、愛媛大学農学部門屋一臣博士には本稿の御校閲を頂いた。ここに記して深謝の意を表する。

Fig. 1. External appearances and cross sections of the convex type symptom of ulcerous Kohansho formed on the peel of Yuzu fruit. (1) An oily blackish spot of the early symptom (arrow). (2-3) Cross sections of the early symptom. (2) A fan-shaped degenerated region in the exocarp (small arrows). Vascular bundles are observed at the margin of the fan-shaped region. (3) The coagulated cytoplasm of cells in the fan-shaped, degenerated region. (4) A light brown spot of the middle-stage symptom. (5-6) A cross section of the middle-stage symptom. (5) The marginal layer of the degenerated region stained red by phloroglucinol: H_2SO_4 (arrow). (6) Small cells of irregular shapes in the marginal layer of the necrotic region. (7) The symptom of the ulcerous epidermal brown spots at a late stage of degeneration. (8-9) A cross section of symptom at a late stage of degeneration. (8) Small cells of irregular shapes observed in 10 to 20 cell layers below the cork layer. (9) A fan-shaped necrotic region and cork layer and sclerotic cells were observed in the flavedo. CL: cork layer. CC: coagulated cell. FD: fan-shaped. ISC: small, irregularly shaped. OG: oil gland. SC: sclerotic cell. VB: vascular bundle. Bars represent 30 μm .

Fig. 2. External appearances and cross sections of the concave type symptom of ulcerous Kohansho formed on the peel of Yuzu fruit. (1, 3) Light brown spots on a mature fruit. (2) Light yellow spots on a mature fruit. (4-6) A cross section of the concave type symptom. (4) The marginal layer of a necrotic region stained black by Sudan Black-B (arrow). (5) The marginal layer of the necrotic region stained brown by Sudan-III (arrow). (6) The marginal layer of the necrotic region stained red by phloroglucinol: H_2SO_4 (arrow). The abbreviations are same as those in Fig. 1.

Fig. 3. External appearances and cross sections of spots after the treatment of crushed peel juice or pricked with a thorn. (1) A milky white spot (5 days after the treatment) caused by crushed peel juice. (2) A raised brown spot, 40 days after the treatment caused by crushed peel juice. (3) A milky white spot, 5 days after thorn pricking treatment. (4) A cross section of brown, raised spot, 40 days after thorn pricking treatment. Necrotic region, cork layer, sclereids and small, irregularly shaped cells are observed in the flavedo. (5) A cross section of a non-treated peel. (6) A cross section of a spot, 20 hr after treatment caused by crushed peel juice. The cell cytoplasm has coagulated. (7, 8) A cross section of a spot, 40 days after treatment caused by crushed peel juice. Necrotic region, cork layer, sclerotic cells and small, irregularly shaped cells in the flavedo. E: epidermis. N: necrotic region. W: wound. The other abbreviations are same as those in Fig. 1.

引用文献

- Akai, S. 1951. On the anatomy of necrotic lesions on leaves and stems of plants affected by pathogenic fungi. Mem. Fac. Agr. Kyoto Univ. 61 : 1-30.
- 赤井重恭・白石雅也・浅田泰次・福富雅夫. 1969. 伊予柑果かいよう性虎斑病の解剖学的観察. 日植病報. 35 : 16-20.
- Arimoto, Y., Y. Honma and T. Misato. 1982. Studies on melanose and citrus stem-end rot by *Diaporthe citri* (Faw) Wolf. Part 3. Mode of reaction in citrus fruit and leaf against infection of *D. citri*. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 48 : 559-569.
- Baba, H. and Y. Asada. 1970. Comparative anatomy and ultrastructure of some diseases appearing on peels of citrus fruits. Mem. Coll. Agr. Ehime Univ. 15 : 1-19.
- 橋元祥一・宮路克彦. 1988. ヒメヨコバイ類による被害痕類似の果皮障害について. 九病虫研報. 34 : 194-196.
- 平井篤造・工藤和一・小岩龍衛. 1953. 馬鈴薯葉巻病の検定並びに診断法. 植物防疫. 7 : 113-114.
- Jensen, W. A. 1962. Botanical Histochemistry. p.201-205. W. H. Freeman & Company, San Francisco and London.
- 河野通昭・長浜正照. 1970. ミドリヒメヨコバイの加害によるボンカン果実のこはん様症状について. 九病虫研報. 16 : 75-77.
- 倉田宗良・黒原春男・川村 満. 1977. ユズ果実に発生する虎斑様症状. 高知農林技研報. 9 : 57-63.
- 真鍋 礼・安岡 研. 1982. 成熟期に発生するカンキツ果実のコハン症. 園学要旨. 昭51秋 : 92-93.
- 大森尚典・橘 泰宣・佐川正典・矢野 隆. 1985. Tristeza virus (seedling yellows) の感染によるイヨカンかいよう性こ斑症の発現. 日植病報 (講要). 51 : 81.
- 小野小三郎・鈴木直治. 1962. 病態解剖. p. 381-420. 明日山秀文他編. 植物病理実験法. 日本植物防疫協会. 東京.
- 鈴木直治. 1957. 甘藷紫紋羽病に関する研究Ⅳ. 農技研報. C 8 : 69-131.
- 牛山欽司・室伏 豊・杉田喜一・持田芳雄. 1977. 神奈川県におけるカンキツステムピッチング病の被害実態. 神奈川園試報. 24 : 9-15.