



Title	ベッコウタケ接種に対する生立木樹幹二次木部の反応
Author(s)	上田, 幹朗; 堀, 千明; 玉井, 裕 他
Citation	Mokuzai gakkai shi : 木材学会誌, 64(1), 1-9 https://doi.org/10.2488/jwrs.64.1
Issue Date	2018-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72353
Rights	© 2018 一般社団法人 日本木材学会
Type	journal article
File Information	64_1.pdf



ベッコウタケ接種に対する生立木樹幹二次木部の反応^{*1}

上田幹朗^{*2}, 堀 千明^{*3, 4}, 玉井 裕^{*3}, 山岸祐介^{*3},
宮本敏澄^{*3}, 佐野雄三^{*3}

Changes in the Secondary Xylem of the Living Stem
of Four Tree Species in Response to Inoculation
with *Perenniporia fraxinea*^{*1}

Mikio UETA^{*2}, Chiaki HORI^{*3, 4}, Yutaka TAMAI^{*3},
Yusuke YAMAGISHI^{*3}, Toshizumi MIYAMOTO^{*3} and Yuzou Sano^{*3}

This study aimed to clarify the factors that influence tree susceptibility to infection by the white-rot fungus *Perenniporia fraxinea*, by inoculating it into stems of four tree species at butt and breast height, and comparing the alterations in the xylem three to five months after inoculation. The four tree species include *Robinia pseudoacacia*, *Cerasus sargentii*, *Ulmus davidiana* var. *japonica* and *Picea glehnii*; the former two species are easily infected by this fungus, whereas the latter two species are not. Polymerase chain reaction (PCR) analysis detected the inoculated fungus only in the butt xylem of *R. pseudoacacia* and *C. sargentii* and the cell walls in the butt xylem tissues of these species were eroded by hyphae. Other xylem alterations (e.g., water accumulation and cell occlusion) differed among tree species, whereas no apparent difference was observed between butt and breast height. For example, water accumulation occurred in the discolored wood tissues around the inoculated holes in both *R. pseudoacacia* and *U. davidiana* var. *japonica*, while dehydration occurred in the light-colored wood tissues around the inoculated hole in *P. glehnii*. In the vicinity of the inoculation holes, resin deposits formed in *P. glehnii*, whereas cell occlusions by tyloses/gums occurred in the other three species. These results suggest that susceptibility to *P. fraxinea* infection differs not only among tree species but also between heights above ground. It is likely that no particular response to fungal inoculation in the xylem tissues of these four tree species is closely associated with their susceptibility to the infection by *P. fraxinea*.

Keywords : susceptibility to infection, white-rot, *Perenniporia fraxinea*, inoculation test, xylem.

ベッコウタケ（以下同菌）に感染する頻度が高いと報告されているハリエンジュ、エゾヤマザクラ、同じく低いとされるハルニレ、アカエゾマツの各立木樹幹の地際部と胸高部に同菌を接種し、菌糸の蔓延状況や材組織で生じる反応を比較した。接種孔付近の材組織には、ハリエンジュ、ハルニレでは濃い変色と水分の集積、アカエゾマツでは淡色化と脱水など、樹種毎に特徴的な変

^{*1} Received May 26, 2017; accepted July 28, 2017. 本研究の一部は第66回日本木材学会大会（2016年3月、名古屋）、第48回日本木材学会北海道支部研究発表会（2016年11月、札幌）で発表した。

^{*2} 北海道大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

^{*3} 北海道大学大学院農学研究院 Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

^{*4} 北海道大学大学院工学研究院 Research Faculty of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060-8628, Japan

Corresponding author: Y. Sano (pirika@for.agr.hokudai.ac.jp)

化が生じたが、地上高による違いは見られなかった。接種した菌はハリエンジュ、エゾヤマザクラの地際部からのみ検出された。菌糸による細胞壁の分解も両種の地際接種部の変色材では認められた。接種孔近傍の材組織において、アカエゾマツでは樹脂の堆積、他の広葉樹3種では細胞閉塞物の堆積が観察された。以上から、同菌に対する抵抗性は樹種間、地上高間で異なると言える。また、同菌に対する抵抗性と水分集積などの材組織で生じる反応との間に明確な関連性はないと考えられる。

1. 緒 言

べっこうたけ病は白色腐朽菌であるベッコウタケ (*Perenniporia fraxinea* (Bull.) Ryvarden) によって広葉樹に引き起こされる根株腐朽病の一つである。立木の樹勢衰退や枯死の原因となるだけでなく、突発的な倒伏を引き起こすことがあるため、最近では街路樹管理上特に注意すべき病害となっている¹⁻⁴⁾。べっこうたけ病は、特にハリエンジュ (*Robinia pseudoacacia* L.)、サクラ類 (*Cerasus* spp.) に多く発生するが、針葉樹には発生例がないと報告されている^{1, 2, 5)}。ただし、その罹病によって著しい樹勢の衰退や枯死にまで至るのはハリエンジュ等の海外からの導入種に多く、サクラ類等の在来種では一般に枯死にまで至ることはないとも言われている⁶⁾。こういった宿主選択および宿主の抵抗性発現のメカニズムはベッコウタケに限らず、立木腐朽菌全般について未解明の点が多い。

樹木の木部には立木腐朽の拡大を阻止する様々な防御機構が備わっていると考えられている。一般に、樹幹が外傷を受けると、傷口周辺の材組織の外縁部が反応帯 (reaction zone) と呼ばれる変色を伴う心材様の組織に転じる^{7, 8)}。反応帯では、構成細胞の内腔に閉塞物が堆積する、あるいは抗菌性物質が沈着するなどの組織学的、化学的变化が起こることにより、壊死した組織から健全な辺材部への腐朽菌の侵入を抑制すると考えられている⁷⁻⁹⁾。また、高含水率の辺材や外傷に応じて多湿化した材部は、嫌気的環境となるため、好気性の木材腐朽菌の侵入を抑制する機能があるという見解も報告されている^{10, 11)}。これら生立木の木部において予め存在する、あるいは二次的に誘導され、腐朽に対して防御機能をもつと考えられる水分環境や組織学的な変化の中で、どの要素がベッコウタケの定着や蔓延を抑制するのに有効なのかは明らかにされていない。

そこで本研究では、第一に、べっこうたけ病に感染する頻度が高い樹種と低い樹種では人為的に接種したベッコウタケの蔓延のしやすさに違いがあるのか、および同一樹幹内でもその蔓延のしやすさは地上高により異なるのかを検討するため、感染頻度の

違い⁶⁾から同病に対する抵抗性が低いと推察されるハリエンジュ、エゾヤマザクラ (*Cerasus sargentii* Rehder) と、同じく高いと推察されるハルニレ (*Ulmus davidiana* Planch. var. *japonica* (Rehder) Nakai), アカエゾマツ (*Picea glehnii* (F.Schmidt) Mast.) を対象として樹幹の地際部と胸高部にベッコウタケの接種試験を行った。第二に、ベッコウタケの定着・蔓延のしやすさを左右する宿主の防御反応を明らかにするため、各樹種の接種部分における水分分布の変化や解剖学的な特徴を比較した。

2. 実験方法

2.1 供試木

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター苫小牧研究林に生育するハリエンジュとエゾヤマザクラ、アカエゾマツ、および同大学同センター札幌研究林に生育するハルニレそれぞれ1本を供試木とした (Table 1)。供試木には被圧されておらず枝痕や外傷の少ないものを選んだ。

Table 1. List of sample trees.

Species	Height (m)	DBH (cm)	Site
<i>Robinia pseudoacacia</i>	11.0	10.5	TEF
<i>Cerasus sargentii</i>	13.4	15.0	〃
<i>Picea glehnii</i>	12.0	14.0	〃
<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	10.5	13.0	SEF

Notes: DBH: diameter at breast height, TEF: Tomakomai Experimental Forest of Hokkaido University, SEF: Sapporo Experimental Forest of Hokkaido University.

2.2 接種用種菌の調製

2015年5月26日、北海道大学構内 (札幌市) のハリギリ (*Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz.) 成木の地際に発生していたベッコウタケ子実体の一部を採取し、0.01%アンピシリンを含むポテトデキストロース寒天培地上に置いた。3日間室温で培養した後、菌叢の先端部を新たな培地に移植した。1週間後、培地上に高さ×幅×奥行き = 8 mm × 8 mm × 40 mm サイズの滅菌 (オートクレーブによる

121℃, 15分)したブナ木片(辺材)を置き, 3週間室温で培養したものを接種試験に用いた¹²⁾。

2.3 接種

ハルニレには2015年7月3日, 他の3樹種には同7月1日に接種した。接種箇所と雨除けの庇の装着箇所(胸高部接種孔の数cm上部)の外樹皮表層を削り落として平滑にした。胸高および地上高30cm(以下, 地際)の南北両側の樹幹表面から樹心に向けて直径13mm・深さ4~6cmの接種孔をドリルであけ, ベッコウタケを蔓延させた木片を挿入した(以下, 接種部)。コントロールとして, 胸高の接種部より10cm下と地際の接種部より10cm上の東西どちらか一方から同様の孔をあけ, 滅菌したブナ木片をそれぞれ1か所ずつ挿入した(以下, コントロール部)。木片挿入後, 70%エタノールで滅菌したアルミホイルを被せたシリコ栓[®](信越ポリマー)を全ての孔に詰め, さらに栓が外れるのを防ぐため粘着テープで補強した。雨水の流入を防ぐため, 胸高部の接種箇所のすぐ上にプラスチック漏斗(直径30cm)を円錐台形に加工して作った庇を粘着テープで装着し, さらに充填材(セメダイン株式会社, スーパーシール)で目止めした。地際部は根張りによる凹凸のため装着が難しかったので, 庇を設けなかった。

2.4 試料の採取

ハリエンジュ, エゾヤマザクラ, アカエゾマツは2015年10月13日, ハルニレは同12月2日に試料を採取した。雨除けの庇を撤去後, 地際から伐倒し, 接種部を中心とした50cm長の丸太を玉伐りした。各丸太の切断面をアルミホイルとビニールシートで防水し, 実験室まで搬送した。翌日, 各丸太の接種部から上へ3cmの範囲を光学顕微鏡(光顕)による組織観察用試料, 同じく下へ7cmの範囲を軟X線写真法¹³⁾による水分観察用試料とし, 円板を採取した。その後直ちに軟X線写真の試料作製・撮影を行い, 光顕用の試料については湿らせたキムタオル[®](日本製紙クレシア)に包み一旦冷蔵(4℃)しておき, 軟X線写真撮影後直ちに, もしくはその翌日に処理した。

2.5 軟X線写真法による水分分布の観察

接種孔を含む幅5cmの範囲を円板より割り取り, 2~3mm厚の木口の薄片試料を円のご盤で製材した。これを遮光パックに密封されたX線フィルム(富士フィルム, X-RAY FILM FR)上に置き, X線発生装置(Softex, IE型)により管電圧20kV, 管電流5mA, 照射時間4分, 照射距離1.8mでX線を照射し, 生材状態での軟X線写真を撮影後直ちに

それら試料の木口面接写写真も撮影した。その後, 実験室内にて常温下で気乾させ, 同一条件で軟X線写真撮影を行った。生材および気乾状態の軟X線写真, 接写写真を対照することにより, 接種孔付近で生じる材色の変化や水分分布の変化を調べた。

2.6 DNA解析

接種用種菌を調製する際に得たベッコウタケの菌糸体からDNeasy[®] Plant Kit (QIAGEN)のプロトコールに従いDNAを抽出した。得られたDNAを鋳型として, ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により5.8S rDNAを含むITS領域を増幅した。プライマーセットはITS1-FとITS4-B¹⁴⁾を使用した。PCR条件は94℃2分(1回), 94℃30秒・55℃1分・68℃1分(30回)で反応終了後, 4℃を保持した。

ベッコウタケを接種した立木組織片についてはAmpdirect Plus 酵素セット(SHIMADZU)のプロトコールに従って, ベッコウタケITS領域の検出を試みた。組織片は, 軟X線写真撮影に用いた気乾材中の接種孔より接線方向に数mm離れた位置の変色材および淡色材から得た。PCR反応液30μlに組織片(2mm×2mm×4mm)を浸し, 95℃10分(1回), 94℃30秒・50℃30秒・72℃1分(30回), 72℃7分(1回)の条件でPCRを行った。プライマーセットはITS1-FとITS4-B¹⁴⁾を使用した。増幅が認められない場合は, 一次PCR産物をテンプレートとしてITS1, ITS4¹⁵⁾プライマーセットを用いてNested PCRを行った。

それぞれのPCR産物について1.5%アガロースゲル電気泳動により, 増幅を確認した後, 精製したものを株式会社マクロジェンジャパンに依頼し, ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。ABI BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Biosystems)のプロトコールに従い, BioRad DNA Engine Dyad PTC-220 Peltier Thermal Cycler 中でシーケンス反応をかけた。シーケンサーはABI 3730xl Analyzerを用いた。得られた塩基配列は, BLAST 検索によりベッコウタケであることを確認した後に, DDBJ (DNA Data Bank of Japan)に登録した。

2.7 光学顕微鏡観察

円板より, 深さから判断して穿孔時心材であったと考えられる部分を除いた接種孔付近の変色材から正常な辺材(以下, 辺材)を含む範囲を割り取り, FAA溶液(ホルマリン: 酢酸: 50%エタノール=5:5:90)で3日間固定した。水洗(水道水に1時間以上浸漬×6回)の後, 30%エタノールに浸して保存した。滑走式ミクロトーム(大和光機, LS-

113 大型滑走式ミクロトーム)を用いて15~25 μm 厚の切片を作製した。1%トルイジンブルーの2~3倍希釈液で5分間染色を行い、水洗後、エタノールシリーズで脱水した。さらに、リモネン(ファルマ社, ヘモディー)に浸してから樹脂(応研商事,

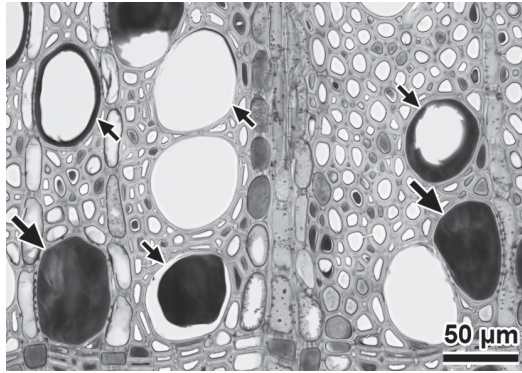


Fig. 1. Transverse section of discolored wood of *Cerasus sargentii*. Large arrows: vessels in which lumina are completely occluded; small arrows: vessels in which lumina is partially occluded.

ビオライト)で封入し、永久プレパラートを作製した。

エゾヤマザクラの変色材については、各接種部、コントロール部の木口切片上で25か所無作為に撮影した光顕画像(放射方向×接線方向=450×333 μm)を用いて、全道管数に対する閉塞された道管数の割合を算出した。閉塞された道管は、内腔が完全に閉塞されているものと部分的に閉塞されているものの2型に分け(Fig. 1), それぞれを1, 0.5として数えた。

3. 結 果

3.1 材組織における変色と水分分布の変化

樹種毎に特徴的な変化が見られたが、同一樹種の接種部とコントロール部および地際部と胸高部では材色や水分分布の変化の仕方に差異は見られなかった。ハリエンジュでは、接種孔付近の材が濃色に変化し、その変色材に水分が集積していた(Fig. 2A)。エゾヤマザクラにおいても、同様の変色が生じ、穿孔時辺材であった部分の変色材の外縁部の狭い部分に水分のわずかな集積がみられた(Fig.

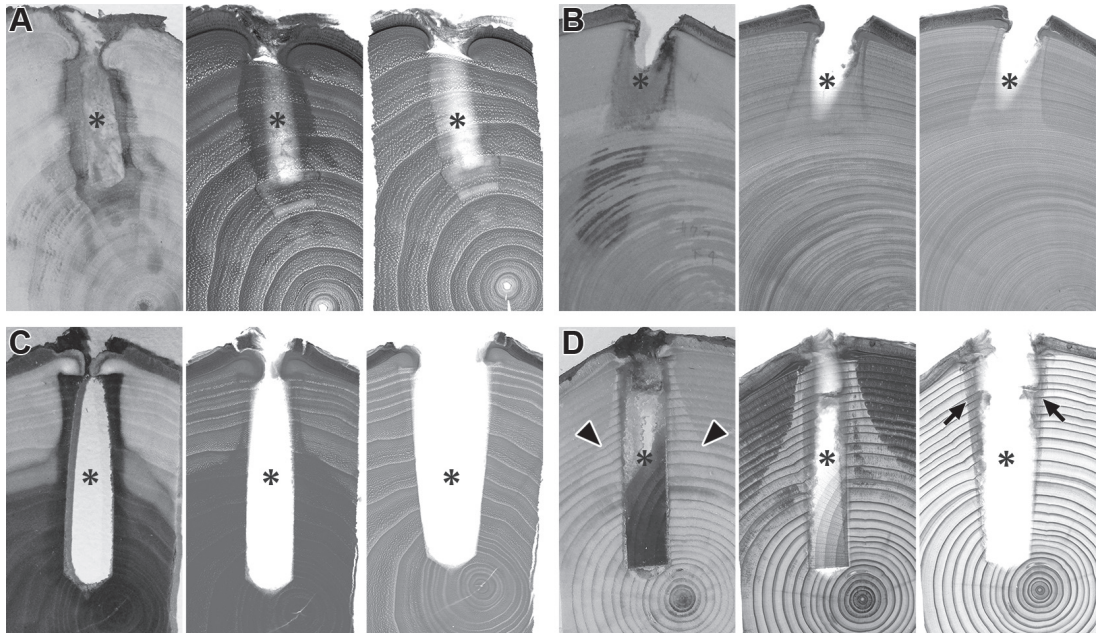


Fig. 2. Sets of soft X-ray photographs (center: green state, right: air-dried) and visible light images (left: green state) of sections including inoculation holes (asterisks). (A) *Robinia pseudoacacia*. (B) *Cerasus sargentii*. (C) *Ulmus davidiana* var. *japonica*. (D) *Picea glehnii*. Arrow heads: light colored wood, arrows: x-ray absorption of resin.

Notes: Decayed/intact wood blocks for inoculation are visible in inoculation holes for *R. pseudoacacia* and *P. glehnii* (A, D). Inoculation hole was not exactly bored in horizontal direction for *C. sargentii* (B). Inoculation holes in air-dried sections are widened in *U. davidiana* var. *japonica*. and *P. glehnii* because of anisotropic shrinkage (C, D).

2B)。ハルニレでは、同様の変色が生じ、その変色材に水分がわずかに集積していた (Fig. 2C)。アカエゾマツでは、穿孔により通常の心材と同様な淡色材が誘発された。接種孔の近傍の組織では、褐変が

生じ、X線吸収が認められた。このX線吸収は気乾状態でも認められることから、水以外の物質集積に由来すると考えられる。水分の集積は淡色材中の一部に認められたが、大部分では水分集積に由来するX線吸収は認められず心材と同程度にまで脱水していた (Fig. 2D)。

3.2 接種した菌の検出

Table 2 に示した各サンプルからの Nested PCR 産物を電気泳動にかけた結果を Fig. 3 に示す。増幅が認められたサンプル 1, 2, 3, 4, 5, 10 についてシーケンス解析を行った結果、サンプル 1 (ハリエンジュの地際接種部) と 5 (エゾヤマザクラの地際接種部) がベッコウタケ、他の 4 サンプルは子囊菌と同定された (Table 3)。

3.3 光学顕微鏡観察

3.3.1 ハリエンジュ

地際接種部の変色材において、放射柔細胞、道管要素、木部繊維および軸方向柔細胞の内腔に菌糸が観察された。菌糸による細胞壁の分解も随所で認められた (Fig. 4A)。一方、辺材では菌糸は観察されなかった。また、変色材と辺材の境界部付近では菌糸は見られなかったが、放射柔細胞、木部繊維、晩材部の小径道管および軸方向柔細胞にトリイジンブルーで強く染色される閉塞物が観察された (Fig. 4B, C)。変色材、辺材とも、両者の境界部から離れると、閉塞物は認められなかった。

胸高接種部では、変色材で地際接種部と同様に菌糸が観察された。しかし、地際接種部で認められたような細胞壁の分解は見られなかった。また、変色材と辺材の両方において、晩材の小径道管に閉塞物がみられ、早材の大径道管にはチロースが認められた。

コントロール部では、菌糸は地際部の変色材の中でも孔の近傍に限って認められ、胸高部ではどの材部でも観察されなかった。また、地際・胸高部とも胸高接種部と同様に細胞閉塞物が観察された。

Table 2. List of samples used for PCR.

Sample No.	Species	Sampling point	
1	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Bu	In
2			Co
3		BH	In
4			Co
5	<i>Cerasus sargentii</i>	Bu	In
6			Co
7		BH	In
8			Co
9	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	Bu	In
10			Co
11		BH	In
12			Co
13	<i>Picea glehnii</i>	Bu	In
14			Co
15		BH	In
16			Co

Notes: PCR: polymerase chain reaction, Bu: butt, BH: breast height, In: xylem near the inoculation hole, Co: xylem near the control hole.

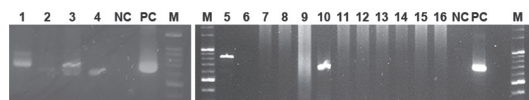


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of Nested PCR products amplified with primers targeting basidiomycetous ITS regions.

Notes: PCR: polymerase chain reaction, NC: negative control (distilled water), PC: positive control (*Lepista nuda* (Accession No.: LC144835)), M: molecular standard. 1-16 correspond to the sample numbers in Table 2.

Table 3. Fungi detected from each sample.

Sample No.	Putative species	Score	Identity	Taxa	Accession No.
1	<i>Perenniporia fraxinea</i>	1102	556/556 (100%)	B(W)	LC224332
2	<i>Fusarium solani</i>	954	484/485 (99%)	A	LC224333
3	<i>Fusarium solani</i>	1019	517/518 (100%)	A	LC224334
4	<i>Fusarium solani</i>	955	485/486 (99%)	A	LC224335
5	<i>Perenniporia fraxinea</i>	1130	592/597 (99%)	B(W)	LC224330
10	<i>Ascomycetes</i> sp.	950	552/572 (96%)	A	LC224331

Notes: B(W): White rot basidiomycete, A: Ascomycetes. Sample numbers correspond to the sample numbers in Table 2.

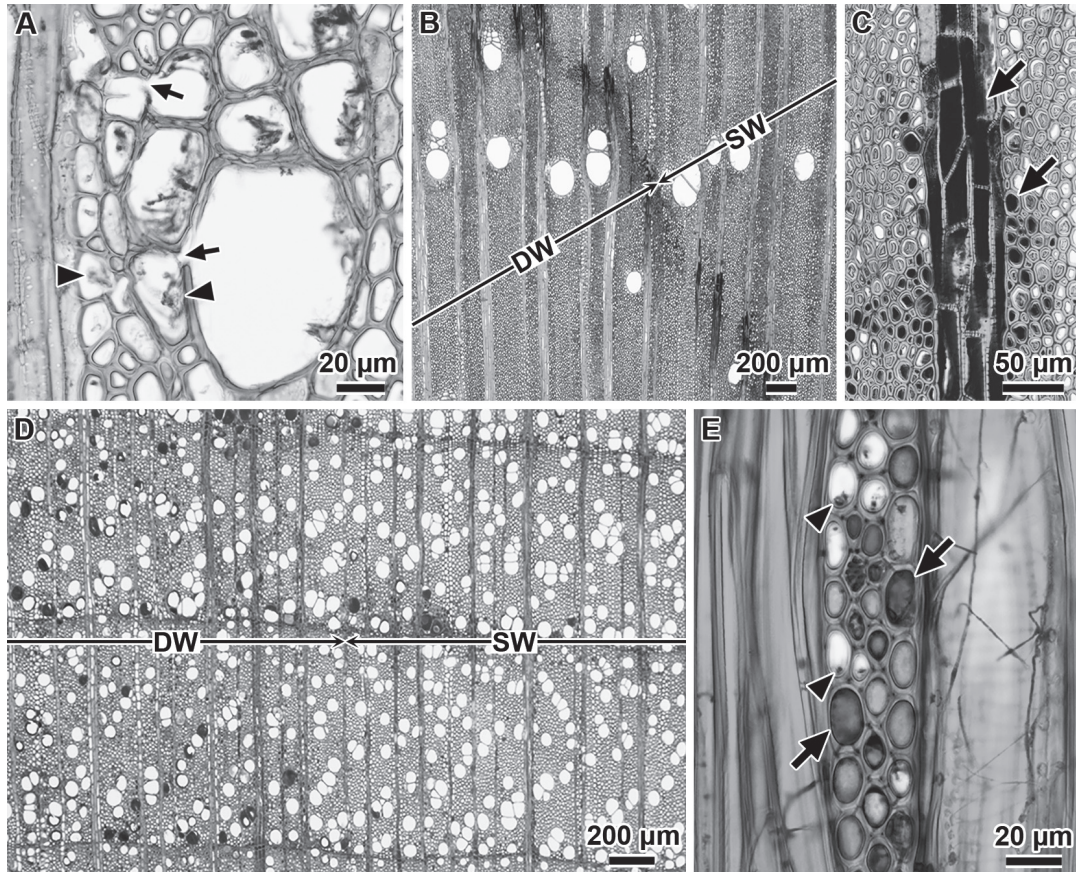


Fig. 4. Light micrographs showing xylem near the butt inoculation hole in *Robinia pseudoacacia* (A-C) and *Cerasus sargentii* (D, E). (A) Xylem elements of walls eroded by hypha found in discolored wood. (B, D) Boundary between discolored wood and sapwood, including the area around the boundary. (C) Cell occlusion in ray parenchyma cells and wood fibers found in the boundary. (E) Hypha in ray parenchyma cells found in discolored wood.

Notes: (A-D) Transverse sections, (E) Tangential section. Large arrows: occluded ray parenchyma cells and/or wood fibers, small arrows: eroded cell walls, arrow heads: hypha. DW: discolored wood, SW: sapwood.

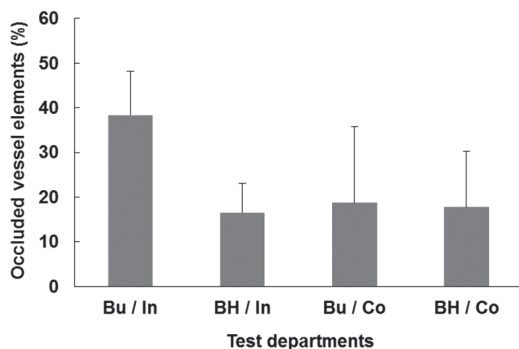


Fig. 5. Percentage of occluded vessel elements in discolored wood of *Cerasus sargentii*.

Notes: Bu: butt, BH: breast height, In: xylem near the inoculation hole, Co: xylem near the control hole, Bars: standard deviation.

3.3.2 エゾヤマザクラ

地際接種部では、変色材で放射柔細胞、道管要素および木部繊維の内腔に菌糸が観察され、細胞壁の分解も散見された。一方、辺材ではどの構成要素にも菌糸が見られなかった。変色材の全域で放射柔細胞、道管および木部繊維にトルイジンブルーで青く染色される閉塞物が観察され、特に辺材との境界付近で多く見られた (Fig. 4D)。変色材の内容物をもたない放射柔細胞、閉塞されていない道管要素および木部繊維の内腔には菌糸が非常に高い頻度で見られた (Fig. 4E)。道管閉塞の程度は地際コントロール部よりも有意に高かった (Fig. 5)。辺材では変色材の近傍で一部の道管や木部繊維に閉塞物がみられた他には、放射柔細胞に限って閉塞物が数多く認め

られた。

胸高接種部では、変色材・辺材ともに細胞閉塞物や菌糸の存否は地際接種部と同様であったが、細胞壁の分解は認められなかった。道管閉塞の程度は地際接種部よりも有意に低かった (Fig. 5)。

コントロール部では、地際部の孔の近傍において菌糸がみられ、胸高部では観察されなかった。地際・胸高とも、変色材と辺材の細胞閉塞物は接種部と同様に観察された。

3.3.3 ハルニレ

地上高の違い、接種の有無に関わらず、変色材でも正常な辺材でも菌糸は観察されなかった一方で、細胞閉塞物は観察された。閉塞物の有無とタイプには変色材と辺材の間で大きな違いはみられず、ともに放射柔細胞と軸方向柔細胞にはトルイジンブルーで強く染色される不定形の閉塞物が散見され、道管にはチロースが認められた。木部繊維に閉塞物は観察されなかった。

3.3.4 アカエゾマツ

地上高の違い、接種の有無に関わらず、菌糸は水以外の物質が集積していると考えられる接種孔近傍の褐変した材組織内では認められたが、通常の心材と同様な低含水率の淡色材と辺材では認められなかった。接種孔近傍の褐変材部、淡色材部、および辺材部とも、広葉樹でみられたような細胞閉塞物は観察されなかった。

4. 考 察

結果を Table 4 にまとめた。本研究では、べっこうたけ病に感染する頻度が高い樹種と低い樹種では接種したベッコウタケの蔓延のしやすさに違いがあるのか、および同一樹幹内でもその蔓延のしやすさは地上高により異なるのかを検討するため、感染頻度の高い二樹種と低い二樹種を対象として樹幹の地

際部と胸高部に同菌の接種試験を行った。断定するには供試木数を増やし確認する必要があるが、感染頻度の違いに対応した明瞭な傾向がみられた。接種したベッコウタケはハリエンジュ、エゾヤマザクラから検出された一方でハルニレ、アカエゾマツからはされなかったことと、ハリエンジュ、エゾヤマザクラの変色材ではベッコウタケ菌糸による細胞壁の分解が観察されたのに対し、ハルニレ、アカエゾマツではそれが見られなかったことから、ベッコウタケに感染する頻度が高い樹種は、同頻度が低い樹種と比べて生立木の材に侵入したベッコウタケが蔓延しやすいと言える。さらに、ベッコウタケが検出された2種とも、地際では検出されたのに対して胸高ではされなかったこと、地際では菌糸による細胞壁の分解が観察された一方で胸高では認められなかったことから、ベッコウタケは同一樹幹内において地表からの高さによって蔓延のしやすさが大きく異なることが考えられる。これまでも、べっこうたけ病の罹患しやすさに樹種間差があることは知られていた⁶⁾。また、自然下ではベッコウタケは地下部で感染すると考えられており、子実体はもっぱら地際付近に発生し、地上高の高い部位には見られない⁶⁾。しかし、接種試験でそのような樹種間差、地上高による差異を示した報告例は見当たらない。

さらに本研究では、ベッコウタケの蔓延のしやすさを樹種間で左右する要素を検討するため、接種処理により生じる木部の水分分布の変化、および接種処理により変色材など各材部の木部構成細胞で生じる閉塞物の堆積について調べた。しかし、本結果からベッコウタケの蔓延しやすさの種間差を決定づける要因を明らかにすることは難しい。高含水率の辺材や外傷に応じて多湿化し嫌氣的環境となった材部は、木材腐朽菌の侵入を抑止する機能があると言われている^{10, 11)} が、本研究では接種したベッコウタ

Table 4. Summary of results.

	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Cerasus sargentii</i>	<i>Ulmus davidiana</i>	<i>Picea glehnii</i>
Change in water distribution around inoculation holes	Accumulated	Partly accumulated	Accumulated	Dehydrated
Detection of <i>P. fraxinea</i>	Detected only butt	Detected only butt	ND	ND
Cell occlusion ^{a)}	Occurred (Rp, V, F, Ap)	Occurred (Rp, V, F)	Occurred (Rp, V, Ap)	ND ^{b)}
Eroded cell wall by hypha	Observed at butt	Observed at butt	ND	ND

Notes: ND: not detected, Rp: ray parenchyma cell, V: vessel element, F: wood fiber Ap: axial parenchyma cell.

^{a)} Amorphous substances that were stained strongly with toluidine blue O. ^{b)} Xylem cells were probably occluded by resin, which were removed in sample preparation for light microscopy.

ケが検出された箇所とされなかった箇所で、水分分布の変化に明瞭な違いは確認されなかった。そのため、本部組織の水分環境がベッコウタケの蔓延しやすさの種間差を大きく左右することは考え難い。光顕で観察された細胞閉塞物に関しては、ハリエンジュ、エゾヤマザクラにおいて、菌糸が認められた変色材の中でも閉塞物が充満した細胞内腔には菌糸が侵入しているのが観察されなかったこと、および変色材の中でも閉塞物を含む細胞が頻出する辺材との境界近くから辺材にかけての材部では菌糸が観察されなかったことから、細胞閉塞物は接種により材に侵入したベッコウタケの辺材部への広域にわたる蔓延を抑止していたと考えられる。このことは、反応帯の構成細胞の内腔における閉塞物は化学的、物理的に健全な辺材部への腐朽菌の侵入を抑止するというこれまでの見解⁷⁻⁹⁾と一致する。しかし、その有無がベッコウタケの検出の結果と一致しないことから、細胞閉塞物の存否も同菌に対する抵抗性の種間差を生む主因子とは言い難い。その因子を解明するためには、細胞閉塞物の組成などの質的な違いを今後詳細に究明する必要がある。

ベッコウタケに対する抵抗性が低いハリエンジュとエゾヤマザクラの個体内において、接種したベッコウタケが地際では検出されたが胸高で検出されなかった理由についても、本研究からは有力な手がかりを得ることが出来なかった。地際と胸高部で、接種孔付近の本部での水分分布の変化および細胞閉塞物の有無に明瞭な違いは認められなかった。特にエゾヤマザクラでは、ベッコウタケが検出された地際接種部の方が、検出されなかった部位よりも道管が高頻度で閉塞されていることを示す結果も得られている。これらのことから、材内の水分状態と細胞閉塞物の堆積状態がベッコウタケの蔓延しやすさの地上高差の原因とは言い難い。また、樹種間差の要因の可能性として想定される抗菌性を有する細胞閉塞物に関しても、同一樹幹内の本部組織において生合成される細胞閉塞物の種類が地際と胸高で異なることは考え難い。今後、この地上高差の要因を解明するためには、本菌の成育に影響を及ぼす可能性のある材内環境要素（ガス組成など）について地下部と地上部で詳しく比較するとともに、ベッコウタケの生活史や他の微生物との競争、棲み分けについてもより詳しく解明する必要がある。

接種したベッコウタケが検出されたハリエンジュとエゾヤマザクラの地際接種部で見られた水分分布の変化や細胞閉塞物は、この部位に特異的ではなく、コントロール部および同菌が検出されなかった接種

部でも認められた。したがって、宿主の木部組織で見られたそれらの現象は、ベッコウタケの侵入に応じて特異的に生じたものではなく、傷害応答として起こったものと言える。ただし、エゾヤマザクラの地際接種部では地際コントロール部よりも閉塞された道管要素の割合が有意に高かった。これまでに、反応帯における反応は菌の侵入によって傷害のみの場合よりも量的に増大する場合があることが報告されている^{9, 16)}。本研究においてエゾヤマザクラの地際接種部で認められた閉塞された道管の多さもそれと同様の現象であると考えられる。

本研究では、ベッコウタケに対する抵抗性発現機構について手掛かりを得るために、木材腐朽菌に対する生立木の抵抗性に寄与すると考えられている本部組織の反応の中でも特に多湿化による嫌氣的環境化^{10, 11)}、本部構成細胞の閉塞⁷⁻⁹⁾の2点に絞って調べたが、アカエゾマツではどちらの反応も認められなかった。しかし、アカエゾマツでは本部構成細胞の閉塞と同様の現象が確実に起こっていると考えられる。アカエゾマツでは軟X線写真で接種孔近傍の材組織に樹脂に由来すると考えられる褐変およびX線吸収が見られ、この部分では、樹脂などが細胞を閉塞していたと考えられる。だが、プレパラート作製過程でエタノール等に溶出したカトルイジンプルーで染色されなかったため、観察されなかったと思われる。アカエゾマツでは光顕で淡色材および辺材に菌糸が観察されず、Nested PCRでも菌類関連DNAが全く検出されなかった。このことから、接種孔近傍に堆積する樹脂中には強力な抗菌成分が含まれ、菌類の侵入に対する極めて有効な障壁となっており、広葉樹でみられた濃色の変色材にこの部分が相当すると考えられる。

謝 辞

サンプル採取にご協力をいただきました北海道大学苫小牧研究林の榎本浩志、五十嵐進両氏、実験試料作製のご指導をいただきました北海道大学農学研究の佐々木義久氏にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 清水淳子, 福田健二, 池本三郎: いずみ野駅前通桜並木におけるベッコウタケの分布, 樹木医学研究 13(2), 83-84 (2009).
- 2) 中達正人, 高橋由紀子, 松下範久: ベッコウたけ病罹病イヌエンジュの樹体内における菌類の空間分布, 樹木医学研究 19(1), 48-49 (2015).

- 3) Giordano, L., Sillo, F., Guglielmo, F., Gonthier, P. : Comparing visual inspection of trees and molecular analysis of internal wood tissues for the diagnosis of wood decay fungi. *Forestry* **88**(4), 465-470 (2015).
- 4) Guglielmo, F., Bergemann, S. E., Gonthier, P., Nicolotti, G., Garbelotto, M. : A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees. *J. Appl. Microbiol.* **103**(5), 1490-1507 (2007).
- 5) 伊藤一雄 : “樹病学大系Ⅲ”, 農林出版, 東京, 1974, pp.143-145.
- 6) 阿部恭久 : 腐朽病害の発生生態. “樹木医学の基礎講座”, 樹木医学会編, 海青社, 大津, 2014, pp.210-224.
- 7) Shain, L. : Resistance of sapwood in stems of loblolly pine to infection by *Fomes annosus*. *Phytopathology* **57**, 1034-1045 (1967).
- 8) Shain, L., Hillis W. E. : Phenolic extractives in Norway spruce and their effects on *Fomes annosus*. *Phytopathology* **61**, 841-845 (1971).
- 9) 山田利博 : 菌の侵入に対するスギ生立木の辺材の反応に関する研究 - 特に反応障壁の形成について -. 森総研研報 **375**, 69-162 (1998).
- 10) Boddy, L., Rayner A. D. M. : Origins of decay in living deciduous trees : the role of moisture content and a re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytol.* **94**, 623-641 (1983).
- 11) Shigo, A. L. : “A new tree biology: facts, photos, and philosophies on trees and their problems and proper Care”, Shigo & Trees Associates, Durham, 1986, pp.324-339.
- 12) Deflorio, G., Johnson, C., Fink, S., Schwarze, F. M. W. R. : Decay development in living sapwood of coniferous and deciduous trees inoculated with six wood decay fungi. *For. Ecol. Manage.* **255**(7), 2373-2383 (2008).
- 13) Nakada, R., Fujisawa, Y., Yamashita, K., Hirakawa, Y. : Changes in water distribution in heartwood along stem axes in *Cryptomeria japonica*. *J. Wood Sci.* **49**(2), 107-115 (2003).
- 14) Gardes, M., Bruns, T. D. : ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**(2), 113-118 (1993).
- 15) White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J. W. : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. “PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications”, Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. ed., Academic Press Inc, NY, 1990. pp.315-322.
- 16) Pearce, R. B., Sumer, S., Doran, S. J., Carpenter, T. A., Hall, L. D. : Non-invasive imaging of fungal colonization and host response in the living sapwood of sycamore (*Acer pseudo-platanus* L.) using nuclear magnetic resonance. *Physiol. Mol. Plant Path.* **45**(5), 359-384 (1994).