

菌の侵入に対するスギ生立木辺材の反応に関する研究

—特に反応障壁の形成について—

山 田 利 博⁽¹⁾

YAMADA, Toshihiro : Studies on the Responses of Sugi Sapwood to Fungal Invasion

—Reaction zone barrier formation in differentiated sapwood—

要 旨 : スギを対象として、スギカミキリの被害に伴う材変色あるいは暗色枝枯病菌 *Guignardia cryptomeriae* を接種した場合について、菌の侵入に対する辺材の動的防御機構について調べた。材変色部の特性として、健全辺材に比べて電気抵抗値の低下、K, Ca, Mg 等のカチオンの集積、pH の上昇、カチオン交換容量の増大が認められた。材変色部では、通水障害が生じ、移行帯内層を中心にノルリグナン類やテルペン類が集積していた。ノルリグナンである hinokiresinol やいくつかの未同定物質が抗菌性を示した。菌の侵入は反応帯から移行帯内層で阻止されていた。反応帯や変色辺材の柔細胞は壊死していたが、移行帯ではほとんどの柔細胞が生きていた。移行帯内層を中心に、柔細胞から分泌されたノルリグナン類やテルペン類を含む油滴状物質が仮道管や壁孔を閉塞しているのが観察された。動的防御反応が停止あるいは抑制される条件で *G. cryptomeriae* を接種した場合は菌の進展は速く、菌の進展阻止における動的な防御反応の重要性が示唆された。また、菌の病原力の差異は宿主の動的防御反応との相互関係で決まること、材変色の形状は材要素の形状に加え動的防御機構が関与して決まることが明らかとなった。生立木に *G. cryptomeriae* を接種した場合、変色及び菌の進展は抗菌性物質の集積に伴い接種後 2 週間~1 か月程度で阻止された。

目 次

1 緒 言	71
2 これまでの材の防御機構に関する研究	71
2.1 はじめに	71
2.2 マツノネクチタケによる根株心腐病	72
2.2.1 病気の概要	72
2.2.2 静的防御機構	72
2.2.3 動的防御機構	73
2.3 青変病	76
2.3.1 病気の概要	76
2.3.2 静的防御機構	77
2.3.3 動的防御機構	77
2.4 ニレ立枯病	79
2.4.1 病気の概要	80
2.4.2 静的防御機構	80
2.4.3 動的防御機構	81

2.5 材の防御機構に関する考察	83
3 スギカミキリ加害木における材変色部の特性及び反応	84
3.1 はじめに	84
3.2 材料と方法	85
3.2.1 材変色部の特性	85
3.2.2 材変色部における反応	86
3.3 結 果	89
3.3.1 材変色部の特性	89
3.3.2 材変色部における反応	92
3.4 考 察	101
4 材変色及び菌の進展と動的防御機構の評価	105
4.1 はじめに	105
4.2 材料と方法	105
4.2.1 PDA 培地上での菌の成長速度	106
4.2.2 高圧滅菌丸太及び冷凍処理丸太での菌の進展	107
4.2.3 新鮮丸太での材変色と菌の進展	107
4.3 結 果	108
4.3.1 PDA 培地上での菌の成長速度	108
4.3.2 高圧滅菌丸太及び冷凍処理丸太での菌の進展	109
4.3.3 新鮮丸太での材変色と菌の進展	111
4.3.4 新鮮丸太と生立木との比較	115
4.3.5 菌進展の形状比	116
4.4 考 察	117
5 菌の侵入に対する材の反応	119
5.1 はじめに	119
5.2 材料と方法	119
5.2.1 材変色の進展と組織学的変化	119
5.2.2 生化学的变化	120
5.3 結 果	120
5.3.1 材変色の進展と組織学的変化	120
5.3.2 生化学的变化	124
5.4 考 察	129
6 総合考察	130
6.1 はじめに	130
6.2 材変色部における反応障壁形成	131

6.2.1 反応障壁における化学的变化	133
6.2.2 反応障壁における組織学的変化	134
6.3 動的防御機構の評価	135
6.4 菌の侵入に対する防御反応の誘導	136
謝 辞	138
引 用 文 献	138
Summary	153

1 緒 言

広葉樹、針葉樹を問わず樹木では、形成層ないし材に達する傷害あるいは糸状菌（以下、菌と呼ぶ）や細菌といった微生物の侵入を受けると辺材に変色部が形成される。この変色部には病原菌や腐生菌を含め菌が侵入・定着するが、多くの場合材変色部はある一定の大きさまで拡大した後は、拡大を停止する。そこには材変色の拡大及び菌の進展を阻止する何らかの機構が働いていると考えられる。樹木の辺材の菌の感染に対する主要な防御機構としてスベリン化のような細胞壁の変化 (PEARCE and RUTHERFORD, 1981; PEARCE and WOODWARD, 1986; PEARCE, 1990) やファイトアレキシン様の抗菌性物質の集積 (SHAIN, 1967; KEMP and BURDEN, 1986; PEARCE and WOODWARD, 1986) が知られている。しかしながら、草本植物と比べるとその知見は限られており、特に針葉樹では防御機構の詳細についての研究は少ない。樹木全体を見渡しても、動的な防御反応の重要性を立証した研究はほとんどない。そこで、今まで材の防御機構の研究が行われていなかったスギ (*Cryptomeria japonica* D. DON) を取り上げ、分化した辺材組織の菌の侵入に対する動的防御機構について抗菌性物質の集積を中心に論ずることとする。

スギ生立木の材変色はさまざまな原因により生じるが、主要な原因としてスギカミキリ (*Semanotus japonicus* LACORDAIRE) の食害 (小林・柴田, 1985) や暗色枝枯病 (徳重, 1963; 讃井, 1986b) が挙げられる。この両者は長さ数十 cm あるいはそれ以上の広い範囲の形成層を壊死させる。さらに材内では材変色が形成層の壊死範囲を超えて進行する。その結果、材価の著しい下落を招くため、林業上大きな問題として重要視されている。そこで、本研究は、スギカミキリの食害に伴う材変色にかかわる防御反応及び、暗色枝枯病菌 *Guignardia cryptomeriae* SAWADA を接種した場合の防御反応について明らかにすることを目的とした。

2 これまでの材の防御機構に関する研究

2.1 はじめに

傷害やさまざまな病原体の感染に対する生立木の材の防御機構について多くの研究が行われている。種々の病害の中で材の防御機構が重要な意味をもつ病害として腐朽病、青変病、萎凋病が挙げられる。腐朽病は腐朽菌が感染して材の変色・腐朽を引き起こす病害、青変病は青変菌が感染して材変色を引き起こす病害、萎凋病は材の通導組織を侵すことにより萎凋症状を引き起こす病害である。ここでは、腐

朽病, 青変病, 萎凋病の中でそれぞれ比較的研究が進んでいる例としてマツノネクチタケによる根株心腐病, キクイムシがかかわる *Pinus* 属の青変病, ニレ立枯病を取り上げ, 材の防御機構の研究について概説する。

2.2 マツノネクチタケによる根株心腐病 (annosum root and butt rot)

Heterobasidion annosum (Fr.) BREF. (*Fomes annosus*) による根腐れ, 根株腐れは北半球の温帯, 特に北米, 北欧における針葉樹の経済的に最も重要な病害である (HODGES, 1969)。*H. annosum* は非木本を含め約 200 種の植物に感染するが, 特に針葉樹にとって重要である。被害形態は根腐れ, 根腐れによる倒れ, 根株腐れ, 成長阻害, 枯死が主要なものである。

H. annosum に対する宿主の防御機構は主に *Pinus* 属と *Picea abies* (Norway spruce) において研究された。以下では, 病気の概要を述べた後, これらの樹種における材の防御機構を静的防御機構と動的防御機構の二つに分けて概説する。

2.2.1 病気の概要

本病は, *Abies* (モミ属), *Juniperus* (ビャクシン属), *Larix* (カラマツ属), *Picea* (トウヒ属), *Pinus* (マツ属), *Pseudotsuga* (トガサワラ属), *Tsuga* (ツガ属) 属が主要な宿主であり, 根の枯死と腐朽被害が生じるが, それ以上の被害の進展は宿主によって異なる。*Pinus* 属と *Juniperus* 属のほとんどの種では主に根腐れを起こし, 感染後数か月〜数年で枯れることがある。*Picea* 属, *Abies* 属, *Larix* 属, *Tsuga* 属, *Pseudotsuga* 属は樹齢の低いときには枯死することがあるが, 樹齢が高くなると高さ数 m に及ぶ根株腐朽を起こす。

林内における最初の感染は担子孢子によって始まる。担子孢子は新たな伐根や辺材が露出した傷から感染, 定着して根や幹に侵入する (RISHBETH, 1951 a, 1951 b; STENLID, 1987)。また担子孢子と分生子は雨水とともに土壤中に入り根の傷や切株, 場合によっては無傷の根から侵入する (RISHBETH, 1951 b)。隣接する木への伝播は根の接触, 融合で起こり, 病気は林内で拡大していく (RISHBETH, 1950)。

正常樹脂道をもつ樹種あるいは傷害樹脂道を形成する樹種は感染後に根株, 特に地下部で樹脂を流出する。根の感染部に樹脂の流出を伴う病斑が形成され, 菌が根株に向かって進むにつれて病斑が広がる。辺材内では樹脂の充満した部分が菌の進展に先だって広がる。根に感染した多くの木では地上部に明らかな症状が認められないが, 成長の低下がみられる。

H. annosum のいくつかの系統には病原性に特異性が認められる。例えば *Abies concolor* (white fir), *Pinus ponderosa* (ponderosa pine) からの菌株は他の宿主に対してよりも元々の宿主に対して病原力が強い (WORRALL *et al.*, 1983)。感染にかかわる菌の毒素としてはセスキテルペン毒素の fomanosin (BASSETT *et al.*, 1967) やジヒドロベンゾフラン毒素の fomannoxin が知られている (HESLIN *et al.*, 1983)。

2.2.2 静的防御機構

H. annosum に対する静的防御機構としては健全木の抽出物が検討された。すなわち, *Pinus* 属と *Picea abies* の幹における菌の成長と健全木の樹皮や材の成分とを関連付ける試みが数多くなされた。抽出物の分析と菌の成長や酵素活性に対する生物検定が行われ, いくつかの画分や同定された物質が酵

素活性を阻害した。

例えば, COBB *et al.* (1968) は *Pinus ponderosa* からの樹脂とその揮発性成分であるテルペン類が *H. annosum* の成長を阻害することを見出した。また, *Picea abies* の辺材, 心材, 反応帯, 樹皮の抽出物は *H. annosum* の cellulase, pectinase や laccase 等の酵素活性を阻害した (CERNY, 1973)。 *H. annosum* の成長阻害が *Picea* 属や *Pinus* 属の材にみられる特定の揮発性テルペン類 (例えば α -pinene, β -pinene, 3-carene) で起こることも示された (SCHUCK, 1977; FLODIN and FRIES, 1978; FLODIN, 1979)。

しかし, 抵抗性木と感受性木との間で特定のテルペン成分には量的な差異がみられたにもかかわらず, 生物検定では菌の成長と相関がなかったことや (SCHUCK and SCHÜTT, 1975), *Pinus resinosa* (red pine) の新鮮丸太への接種試験の結果, 新鮮丸太では菌の進展が阻害されなかったことは (THOMPSON *et al.*, 1968), 静的防御機構の重要性が高くないことを示している。

2.2.3 動的防御機構

新鮮な丸太への *H. annosum* の接種試験から材における動的防御反応の重要性が示唆された (THOMPSON *et al.*, 1968)。 *H. annosum* に対する動的な反応としては組織学的には反応帯 (reaction zone), 移行帯 (transition zone) や障壁帯 (barrier zone) 形成が, 化学的には樹脂 (テルペン類を含む), フェノール物質の生産, 集積が挙げられる。

(1) 反応帯及び移行帯

SHAIN (1967, 1971) は *Picea abies* や *Pinus taeda* (loblolly pine) において樹脂やフェノール物質が集積し, 死んだ宿主組織が *H. annosum* の進展より先だって形成されることを見出し, この防御組織とみなされる部位を反応帯 (reaction zone) と呼んだ。反応帯の状態は樹種によって異なり, *Pinus* 属の場合は反応帯に樹脂が充満しているが *Picea abies* の場合はそうではない。これは *Picea abies* では *Pinus* 属ほど樹脂道が発達していないこと, エピセリウム細胞の細胞壁が厚いことを反映していると考えられている。反応帯からは細菌や非菌叢類が低い頻度で分離されるが, *H. annosum* は分離されない (SHAIN, 1967, 1971)。SHAIN (1967) によると化学物質は反応帯における防御機構で最も重要な要素であるが, この障壁は菌にとって永久に通過不可能なものではない。時間の経過とともに菌は次第にこの組織を突破し, 宿主は菌が未だ進展していない部位に新たな防御層を形成し続ける。

反応帯と健全辺材との間には移行帯 (transition zone) と呼ばれる NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) diaphorase 活性等の代謝活性が高く通水の認められない乾燥した組織ができる (SHAIN, 1971)。この組織は乾燥帯 (dry zone) とも呼ばれる。COUTTS (1976, 1977) は *H. annosum* を接種した *Abies grandis* (Grand fir) や *Pinus nigra* var. *maritima* (Corsican pine) の幹の材の放射柔細胞が壊死する過程で乾燥帯が形成されることを報告した。この変化は放射柔組織の代謝の変化を阻害した場合には起こらない。このことは乾燥帯が宿主の動的反応によって形成されることを示している。

この移行帯も防御組織と考えられる報告がある。*H. annosum* を接種した *Picea abies* の根で, 移行帯が成長する菌糸に先立ちあるいは非感染の傷の周りに形成される (STENLID and JOHANSSON, 1987)。彼らは反応帯形成の初期段階としての移行帯を考えており, 移行帯におけるフェノール物質であるリグナ

ン類の集積を報告している。

反応帯や移行帯内の環境要因も防御機構として考慮された。*Picea abies* の反応帯における高い pH は抵抗性に関与している可能性があると考えられた (SHAIN, 1971), *Pinus taeda* の反応帯では pH は高くなく (SHAIN, 1967), 防御機構における pH の重要性は低いであろう。移行帯や反応帯では酸素が少なく二酸化炭素が多いが, *H. annosum* は好気的な環境下でも極めて嫌気的な環境下でも同じように生育する (GUNDERSEN, 1961) ことから, この要素も防御機構としての重要性は低いことが示唆される。

(2) 樹脂及びテルペン類

ここで述べるいわゆる「樹脂」には oleoresin の他, fatty resin やフェノール物質等をも含んでいる場合が多い。従って, 樹脂に帰される防御機構がどの種の物質によるか厳密に特定することはできない。

感染や傷害後の著しい樹脂の充満は *Pinus* 属の材における典型的な反応であり, 防御機構として重要であると考えられている (HART *et al.*, 1975)。*H. annosum* の *Pinus* 属への感染時に樹脂が多量に生産され根や幹の材内部に滲出, 充満することが (SHAIN, 1967; RISHBETH, 1972), 生立木内での *H. annosum* の成長が遅い原因の一つと考えられている。GIBBS (1968) は *Pinus sylvestris* (Scots pine), *Pinus nigra* var. *calabrica* (Corsican pine), *Picea sitchensis* (Sitka spruce), *Pseudotsuga menziesii* (Douglas fir) に対する接種試験の結果から, 感染率と根の材内での成長速度が *Pinus* 属の2種において最低であることを見出し, これは *Pinus* 属での樹脂生産の多さに関連していると考えた。同一樹種においては樹脂の生産は立地条件や水分状態, 優勢の程度に影響され (GIBBS, 1968; RISHBETH, 1972), こうした要因による感受性の差異は樹脂生産の多少で説明できるとされた (GIBBS, 1968)。

H. annosum が感染した *Pinus resinosa* の生きている組織では放射組織に沿って多量の樹脂が詰まっている (SHIGO, 1975)。また, SHAIN (1967) は樹脂とフェノール物質が反応帯のすべての材要素に分布していることを組織化学的に示した。こうした観察は樹脂が傷害や感染後に放射組織で生産されたことを示唆している。

樹脂の抗菌性に関して, BEGA and TARRY (1966) は樹脂は菌の成長や孢子形成に毒性がなく逆に促進すること, 速度は遅いが菌は樹脂が充満した材を通過できることを観察した。しかし, *Pinus* 属の樹脂の揮発成分すなわちテルペン類が *H. annosum* の成長を阻害するという数多くの報告がある (COBB *et al.*, 1968; GIBBS, 1972; RISHBETH, 1972; CERNY, 1973; SCHUCK, 1977; FLODIN and FRIES, 1978; FLODIN, 1979)。また, 感染後の樹脂の生産, 充満はその疎水性と相まって機械的障壁としても重要であるとされる (VERRALL, 1938; RISHBETH, 1972; HART *et al.*, 1975; PRIOR, 1976)。SCHUCK (1980) は物理的障壁が樹脂酸に依存し, 樹脂内のモノテルペンが毒性物質として働くことを示した。

以上のことから, 樹脂による防御機構は樹脂の感染部への滲出による物理的な阻害と, 抗菌性をもつテルペン類の生産による化学的な阻害の両者によると考えられるが, 化学的な阻害要因としては健全辺材にも存在し菌の感染に対して量的に増大するテルペン類よりも, 次に述べるフェノール物質の方が効果的であり重要性が高いと考えられる。

(3) フェノール物質

Pinus 属の健全辺材にはほとんどフェノール物質は含まれていないが (SHAIN, 1967; HILLIS and

INOUE, 1968), 生物的ストレスや非生物的ストレス, 例えば乾燥, 過湿, エチレン, 紫外線によってポリフェノールであるスチルベン類の中のピノシルビン類である pinosylvin と pinosylvin monomethylether が生成する (HART, 1981)。このピノシルビン類は菌の感染に対する辺材の反応として集積すること (JORGENSEN, 1961; RISHBETH, 1972; SHRIMPTON, 1973), また, 傷害材 (樋口ほか, 1967) や反応帯 (SHAIN, 1967; PRIOR, 1976) に集積することが多くの *Pinus* 属で報告されている。ポリフェノールであるフラバノン類の pinobanksin と pinocembrin も傷害材や反応帯に集積する (ERDTMAN, 1949; 樋口ほか, 1967; LOMAN, 1970 a; SHRIMPTON, 1973)。

ピノシルビン類は *H. annosum* の成長を阻害し (SHAIN, 1967; GIBBS, 1972), 感染の広がり と pinosylvin 濃度との間に負の相関がみられる (PRIOR, 1976)。ピノシルビン類の集積は比較的早く, *Pinus nigra* var. *calabrica* への *H. annosum* の接種では接種後 1 週間で検出された (PRIOR, 1976)。こうしたことから, *Pinus* 属の辺材における *H. annosum* の進展阻害は樹脂よりも感染後のピノシルビン類の生成のためと考えられている (SHAIN, 1967; PRIOR, 1976)。また, フラバノン類の pinobanksin や pinocembrin も抗菌性を持っており (SHAIN and MILLER, 1982; YAMADA and ITO, 1993), *Pinus* 属の辺材の防御機構にかかわっていると考えられる。

こうした抗菌性物質の役割については, 抽出成分が検定中に分解する可能性等の検定上の問題のため議論がある (HART, 1981)。大きな問題点はセルロースや他の材の構成成分が腐朽菌に対する抽出成分の毒性を大幅に低下させることである (LOMAN, 1970 b)。しかし, 反応帯と初期腐朽部から抽出成分を取り除くと *H. annosum* による腐朽が促進されることから, SHAIN (1967) はピノシルビン類が抵抗性にかかわっていると結論した。

Picea 属, 特に *Picea abies* においても, 根 (POPOFF *et al.* 1975, JOHANSSON *et al.* 1976) や幹 (SHAIN 1971, SHAIN and HILLIS 1971, CERNY 1973) で *H. annosum* の感染に関連した生化学的変化に関する研究が行われた結果, 反応帯に集積する物質があること, そのうちのいくつかは菌の成長や酵素活性を阻害することが示された。*Picea abies* の健全心材に存在するフェノール物質である hydroxymatairesinol, matairesinol, liovil, conidendrin といったリグナン類は反応帯に集積する (SHAIN and HILLIS, 1971)。反応帯においては特に hydroxymatairesinol の著しい増加がみられ, 健全辺材と腐朽の進んだ材にはリグナン類はほとんど含まれない。これらの他にもいくつかのリグナン類が *H. annosum* が感染した *Picea abies* の辺材でみられる (POPOFF *et al.*, 1975)。hydroxymatairesinol は matairesinol や conidendrin より *H. annosum* に対する阻害活性が強く, *H. annosum* に対する辺材の抵抗性にかかわっているとされる (SHAIN and HILLIS, 1971)。JOHANSSON *et al.* (1976) は *Picea abies* の根の反応帯からのリグナン類を含む抽出物は *H. annosum* の酵素, 特に laccase に対する阻害活性が高いことを報告した。また, 複数の少量成分が存在すると単独の成分の効果の合計よりも効果が高くなることを見出した。こうしたことから *Picea abies* における辺材への *H. annosum* の侵入阻止はリグナン類の生成によって説明される。ただし, hydroxymatairesinol の生成とその抗菌性については議論が分かれている。*H. annosum* に感染した *Picea abies* の根の反応帯に集積したフェノール物質のいくつかは数種の腐朽菌の成長を阻害したが, hydroxymatairesinol はこれらの菌に対して効果を持たな

いと報告され (POPOFF *et al.*, 1975), 他に生成する多くの量的に少ない成分が菌の成長阻害にかかわっていることも推測されている。

以上のように, *H. annosum* に対する防御機構におけるフェノール物質の役割については細部には相反するデータもあるが, 主にスチルベン類やリグナン類などのフェノール物質が中心となり, テルペン類や樹脂酸などとともに化学的な防御機構を担っていると考えられる。

2.3 青変病 (blue stain)

キクイムシが青変菌を運んで生立木の材内に持ち込むと材の青変が起きる。集団的に木を枯死させることもあり, 大きな問題となる。ここでは代表的なものとして mountain pine beetle (MPB, *Dendroctonus ponderosae* HOPKINS)—*Ophiostoma clavigerum* (ROBINS.-JEFF. and DAVIDS.) HARRINGTON (*Ceratocystis clavigera*) 及び southern pine beetle (SPB, *Dendroctonus frontalis* ZIMM.)—*Ophiostoma minus* (HEDGC.) H. and P. SYD. (*Ceratocystis minor*) による *Pinus* 属の青変病に対する材の防御機構についての研究をまとめる。

青変病に対する防御機構を主な対象として, BERRYMAN (1972) は昆虫やその関連菌に攻撃された針葉樹の防御システムを, 一次的樹脂の流出 (静的防御, 構成的防御) と二次的樹脂を伴う反応 (動的防御, 誘導的防御) の 2 種類に整理した。一次的樹脂は健全木に存在する樹脂道由来の樹脂で, 二次的樹脂は傷害や感染後に柔細胞によって生産・分泌された樹脂である。静的及び動的防御システムは独立して働くのではなく協働するとされる (BERRYMAN, 1972; RAFFA and BERRYMAN, 1982)。以下では, 病気の概要を述べた後, 一次的樹脂による静的防御機構, 二次的樹脂による動的防御機構に分けて記述する。MPB と SPB に対する防御機構は基本的に同一と考えられるので, 以下ではまとめて述べる。

2.3.1 病気の概要

MPB はカナダ西部, アメリカ合衆国北西部に発生する (RAFFA, 1988)。最も主要な被害木は *Pinus contorta* (lodgepole pine) であり合衆国では MPB による全枯損木の 95% を占める。2 番目は *Pinus ponderosa* (ponderosa pine) であり, *Pinus monticola* (western white pine) や *Pinus lambertiana* (sugar pine) もときに相当量加害される。その他いくつかの *Pinus* 属も被害を受けることがある。さらに大発生の際には *Picea* 属, *Abies* 属, *Libocedrus* 属も加害される。

MPB は 7~8 月に穿入し, MPB によって運び込まれた青変菌はすぐに師部と辺材で成長し始める。菌は最初放射組織に分布が限られるが, 柔細胞を通して放射方向に広がり, さらに仮道管に侵入する (BALLARD *et al.*, 1982, 1984)。そこで有縁壁孔対やときには仮道管内全体を閉塞する。菌が材内に定着するとその部分で通水が阻害され, 虫の加害後 2, 3 日で孔道より内側の辺材は乾燥し始める。樹液流速の低下もみられる (MILLER *et al.*, 1986)。夏にキクイムシの mass attack を受けた木は翌年の春に葉の色が変わり始めるが, 加害時期と気象条件によってはその年の秋に変色し始めることもある。発生は感染木の小さなグループから始まり, 周囲に拡大する。通常 80 年生以上の林に発生し, 大発生は急速に進展する。被害が発生すると 4~18 年継続して蔓延し, その平均は 8~9 年であった。

MPB は共生菌として酵母—*Pichia pini*, *Hansenula capsulata* 及び *H. holstii* (ROBINSON, 1962)—や青変菌を持つが, 被害には青変菌がかかわっている。青変菌では MPB 及び被害木関連菌として以下

の6種が検討された (RUMBOLD, 1941; ROBINSON, 1962; MATHRE, 1964 a; ROBINSON-JEFFREY and GRINCHENKO, 1964; ROBINSON-JEFFREY and DAVIDSON, 1968; WHITNEY, 1971)。1. *Ophiostoma clavigerum*, 2. *O. huntii*, 3. *O. montium*, 4. *O. minus*, 5. *O. piliferum*, 6. *Ceratocystiopsis minuta*。この内、主要な病原菌は *O. clavigerum* と *O. montium* で、特に *O. clavigerum* は病原力が比較的強く急速に木部と師部に侵入する。これら青変菌は木の枯死にかかわる主要な要因と考えられている (REID *et al.*, 1967; BALLARD *et al.*, 1982, 1984; STROBEL and SUGAWARA, 1986; OWEN *et al.*, 1987)。OWEN *et al.* (1987) や YAMAOKA *et al.* (1990) も *O. clavigerum* の木の枯死における重要性を指摘した。

SPB は、アメリカ合衆国南東部及びメキシコ、中央アメリカの一部で *Pinus* 属に重大な被害をもたらしている (FLAMM *et al.*, 1988)。mass attack の密度が高いときは活力の高い木でさえ枯らすことができる。SPB の加害に対し、*Pinus taeda* と *Pinus echinata* (shortleaf pine) は最も感受性が高く、*Pinus palustris* (longleaf pine) や *Pinus elliottii* (slash pine) はこれらより感受性が低い。

SPB の成虫は樹皮に穿入し、師部を食害し産卵する。虫に運ばれた菌の感染により通水が阻害され (BASHAM, 1970) 木を枯死させる。感染、発病、防御機構は MPB の場合とほぼ同様である。SPB は mycangia を持ち、2 種類の mycangial fungi—*Ceratocystis minor* var. *barrasii* (分生子世代 *Sporothrix* sp.) と未同定担子菌—を持っているが (BARRAS and TAYLOR, 1973)、これらの菌は木の枯死にはほとんどかかわっていない。別の青変菌 *O. minus* (*C. minor*) は成虫の体表で運ばれ (RUMBOLD, 1931)、この菌が木の枯死の主な原因と考えられている (BASHAM, 1970)。

2.3.2 静的防御機構

MPB や SPB の穿入に対し、*Pinus* 属では穿入直後に樹脂道から一次的樹脂の流出が観察される。一次的樹脂による抵抗性には、樹脂自身が物理的障壁となる面とテルペン類や樹脂酸などの化学的成分による面がある (HODGES and LORIO, 1975)。また、*Pinus contorta* の抵抗性木と感受性木の間では健全組織の抽出物の総含量は抵抗性木でやや高いが、モノテルペン類などの抽出物成分の濃度や構成比には差がない (RAFFA and BERRYMAN, 1982, 1983)。このことから、一次的樹脂は抵抗性の差異には寄与していないと判断される。

2.3.3 動的防御機構

Pinus 属の青変病に対する動的防御機構の研究では、二次的樹脂特にテルペン類の生成という生化学的反応に主眼が置かれている。以下では二次的樹脂の起源とその生成についての研究について述べる。

(1) 二次的樹脂の起源

キクイムシと青変菌の攻撃に反応した *Pinus contorta* で2種類の樹脂、一次的樹脂と二次的樹脂はその起源から区別される (REID *et al.*, 1967)。すなわち、一次的樹脂は樹脂道由来であるのに対し、二次的な樹脂は材と師部の柔細胞由来であるとされる。これは以下のように組織学的及び化学的に示される。

O. clavigerum を接種あるいはキトサンで処理した *Pinus* 属の辺材の反応帯では柔組織が樹脂で充滿し仮道管が樹脂によって閉塞される (LIEUTIER and BERRYMAN, 1988 a, 1988 b)。この樹脂が充滿した仮道管は、通常は放射組織に沿ってみられ必ずしも樹脂道とは関連していないこと、また樹脂道に近い

仮道管にはしばしば樹脂がみられないことから、仮道管中の樹脂は柔細胞起源と考えられた (LIEUTIER and BERRYMAN, 1988 b)。Pinus 属の樹脂道内の樹脂の構成成分はほとんどが樹脂酸とモノテルペンである (MUTTON, 1962)。反応組織ではモノテルペン濃度が急速に増大するが、対応する樹脂酸の増加を伴わないことから、テルペン類は樹脂道から移動してきたものではなく新たに生産されたものと考えられている (SHRIMPSON, 1973)。

樹脂成分の構成比にも変化が起こる。O. minus を接種した Pinus taeda の二次的樹脂と一次的樹脂の成分との間でモノテルペン成分 (PAINE *et al.*, 1987)、樹脂酸とモノテルペン成分 (CHENICLET, 1987) の構成比が異なる。樹脂酸の成分の構成比も感染や傷害後に変化する (SHRIMPSON, 1973; HART *et al.*, 1975)。こうしたことから樹脂の集積が単なる樹脂の移動によるものではないことが示唆される。一次的樹脂に比べ二次的樹脂の抗菌性が高いことから、発達した樹脂道を持つ Pinus 属においても感染後の柔細胞の反応と反応産物の仮道管への集積が防御機構として重要であると考えられる。

(2) 二次的樹脂の生成

キクイムシや青変菌の侵入後に宿主の局所的な反応が始まり、樹皮の感染部には樹脂が充満する (STEPHEN *et al.*, 1983)。その周囲の師部や辺材においても樹脂は充満し、宿主細胞は壊死する。こうした反応は青変菌の存在によって促進される (REID *et al.*, 1967)。この樹脂の集積や成分の変化に関して多くの研究がなされた。

MPB に関しては、MPB 及び関連菌の感染により Pinus 属の材にテルペン類の集積が起こることが示された (SHRIMPSON, 1973)。O. clavigerum の接種後壊死した Pinus contorta の師部では抽出物含量が増えるだけでなく、モノテルペンに対するセスキテルペンの比が増大する (RAFFA and BERRYMAN, 1983)。また、接種部に隣接した辺材には次第に樹脂が充満し、テルペン類 (β -phellandrene, 3-carene, α -pinene, camphene, β -pinene, myrcene, limonene, *p*-cymene) 及びフェノール物質 (pinosylvin, pinosylvin monomethylether, pinobanksin, pinocembrin) の集積がみられる (SHRIMPSON and WATSON, 1971)。

SPB に関しては、Pinus taeda や Pinus echinata は傷害や SPB 関連菌の接種に対し反応帯を形成し樹脂の充満や壊死を含む防御反応を起こすことが報告された (COOK and HAIN, 1985, 1986; STEPHEN and PAINE, 1985; PAINE and STEPHEN, 1987)。O. minus を接種した場合はこの反応が促進される (PAINE and STEPHEN, 1987)。反応帯の大きさには処理間で顕著な差異がみられ、単純な傷害では小さいが O. minus 接種で最も大きい (COOK and HAIN, 1985)。師部の反応帯では健全な師部と比較してモノテルペン類の増加がみられ、さらにモノテルペン成分の構成比にも著しい変化が起こる (COOK and HAIN, 1985, 1986)。しかし、接種菌の病原力の違いによってテルペン成分の構成比には差異はなく (COOK and HAIN, 1985)、病原力の違いにかかわらず反応は質的に同一であると考えられる。

二次的樹脂の重要性に関して、REID *et al.* (1967) は MPB や菌の攻撃が成功した木で二次的な樹脂滲出がみられないことを指摘し、一次的な樹脂は感染前に生成しているため感染に対する急速な反応にかかわるものの、二次的な樹脂流出が抵抗性にとって最も重要な要因だと結論した。さらに、MPB 関連菌の接種に対し Pinus contorta の抵抗性個体は感受性個体より量的に多くの樹脂を生産することから

(RAFFA and BERRYMAN, 1982), 一次的樹脂とは異なり二次的樹脂は抵抗性の差異にかかわっていると考えられる。

反応帯では抗菌性を持つ成分が増加している。*Pinus contorta* の反応帯の成分は健全組織の成分とは異なり *O. clavigerum* 及び *O. montium* の成長を阻害する (SHRIMPTON and WHITNEY, 1968)。*C. ips*, *O. minus* 及び *O. piliferum* (*C. schrenkiana*) に対する *Pinus ponderosa* の揮発性成分の抗菌性 (COBB *et al.*, 1968) や, *O. clavigerum* 及び *O. montium* に対する *Pinus contorta* の揮発性成分の抗菌性 (SHRIMPTON and WHITNEY, 1968) が報告されている。BRIDGES (1987) は *Pinus taeda* からの揮発性物質の *O. minus* 等の SPB 関連菌に対する抗菌性を調べ, テルペン類の中でも物質によって抗菌性に大きな差異があることを示した。

また, LIEUTIER *et al.* (1991) は *Pinus contorta*, *Pinus ponderosa*, *Pinus monticola* で *O. clavigerum* 接種, エリシター処理, 傷害によるモノテルペンの変動を調べ, 反応組織でのモノテルペン増大の程度は処理間で異なるがモノテルペンの構成比は処理間で差異がないこと, 樹種によって反応組織での個々のモノテルペン量の増減の方向が異なることを見出した。このことや前述した SPB における COOK and HAIN (1985, 1986) の結果は, 誘導抵抗性におけるモノテルペンの役割は質的というより量的であり, 防御反応におけるモノテルペンの役割が限定されたものであることを示している。

樹脂内に存在すると考えられるその他の物質では, BRIDGES (1987) は *Pinus taeda* から抽出したフェニルプロパノイド類である 4-allylanisole が SPB 関連菌に対して著しく阻害的であることを示した。この物質は病斑組織に多量にみられるが, 感染前に存在する樹脂にはみられない。病斑形成時におけるこの物質の生成は *Pinus taeda* の SPB 及び関連菌に対する抵抗性にかかわっていると考えられる。また, HEMINGWAY *et al.* (1977) は, *O. minus* を接種した *Pinus taeda* の材で縮合型タンニン, カテキン, フラボノール, スチルベン類 (pinosylvin, pinosylvin monomethylether, resveratrol) が増加することを報告している。抗菌性の強さを考慮するとテルペン類以外にもこうした種々のフェノール物質, 特にスチルベン類が防御機構に重要な役割を果たしていると考えられる。

2.4 ニレ立枯病 (Dutch elm disease: DED)

DED は今世紀ヨーロッパ, 北アメリカに蔓延している流行病である。 *Scolytus multistriatus* や *Hylurgopinus rufipes* 等の数種のキクイムシが病原菌を伝搬し, *Ulmus* 属を萎凋させる。この病気に対する抵抗性機構は 60 年以上にわたって研究されてきた。抵抗性種は病原を感染部付近の小さな褐色の条斑のなかに閉じこめる。従って, DED に対する抵抗性は *Ophiostoma ulmi* の動き, 感染を局限する能力による (SINCLAIR and BRENER, 1974; SINCLAIR *et al.*, 1975a; SINCLAIR and LARSEN, 1980; DUCHESNE *et al.*, 1990)。このことは SHIGO and TIPPET (1981) や BONSEN *et al.* (1985) の *Ulmus* 属における観察, さらに非宿主抵抗性の観察によっても示された (RIOUX and OUELLETTE, 1989, 1991a, 1991b)。病徴を示さない *Ulmus* 属では菌は長期間封じ込められる (BANFIELD, 1968; JONES *et al.*, 1978)。こうした菌の局在化は単一の機構に基づくものではなく, 多くの遺伝子に支配される (LESTER and SMALLEY, 1972)。さらに, DED では宿主-寄生者相互作用は複雑であり, 多くの抵抗性要因が相補的に働くという共通認識がみられる (DUCHESNE *et al.*, 1990; RIOUX and OUELLETTE, 1991a)。こうし

た抵抗性機構には、道管の閉塞、組織学的特徴、リグニンとスベリンが関連した区画化、ファイトアレキシンとして働く抗菌性物質がかかわっている。また、最近のデータはタイムリーな動的防御機構の発現が病原の閉じこめに重要であることを示唆している。以下では、まず病気の概要を述べた後、静的及び動的抵抗性機構に分けて記述する。

2.4.1 病気の概要

DED の広範囲の流行は今世紀に 2 回起こった。最初の流行は *Ophiostoma ulmi* (BUISMAN) NANNF. (Syn. *Ceratocystis ulmi*) により、北西ヨーロッパで 1910-1920 年頃始まり、中央ヨーロッパや南西アジア、北アメリカに向け急速に広がった (BRASIER, 1990)。1940 年代にはこの流行はヨーロッパで衰え始めたが、北アメリカではそうした衰えはみられなかった (PEACE, 1960 ; GIBBS, 1978)。現在のより破壊的な流行は病原力の非常に強い *O. novo-ulmi* BRASIER (以前は *O. ulmi* (GIBBS and BRASIER, 1973) に含まれていた) による。この 2 度目の流行は 1940 年代に始まったと信じられている (BRASIER, 1990)。*O. novo-ulmi* は現在 *O. ulmi* の発生範囲の多くでみられ、急速に交替しつつある (BRASIER, 1990, 1991 ; HOUSTON, 1985, 1991)。

本病に対して *Ulmus parvifolia*, *U. pumila* 等のアジア種の *Ulmus* 属は一般に抵抗性が高いが、*U. americana*, *U. glabra*, *U. rubra* 等のヨーロッパと北アメリカの *Ulmus* 属は抵抗性が中程度ないしは低いことが知られている (SMALLEY and GURIES, 1993)。DED では感染後に葉の黄化、萎凋、壊死という典型的な症状が現れ、木の枯死に至る。病徴発現の速さは遺伝的性質、樹勢、樹齡、栄養条件、土壤条件、温度、感染の季節といった多くの要因に依存する。*Ulmus* 属は環孔材で、*U. americana* では流量の 92% が年輪の最外層を通り、年輪の初めにできる大径道管がこの内の 96% を担っている (ELLMORE and EWERS, 1985)。そのためこの部位の道管における通水障害が感受性と関係が深いと推測される (NEWBANKS *et al.*, 1983)。従って、DED の病徴進展と密接な関係があるのがこの大径道管の形成時である。*O. ulmi* は毒素として高分子量のペプチドラムノマンナン (STROBEL *et al.*, 1978) と 7.6 kDa のペプチドである cerato-ulmin (TAKAI, 1974 ; YAGUCHI *et al.*, 1993) を生産する。こうした菌の代謝産物と樹木の生理との相互関係が萎凋症状へ導くのに重要な役割を果たしている。

2.4.2 静的防御機構

DED に対する *Ulmus* 属の静的防御機構としては、組織学的特徴や樹液成分が検討され、組織学的特徴によって宿主の抵抗性の差異が説明されている。

(1) 組織学的特徴

DED に対する感受性の説明には道管の大きさや配置も提案された。これは、菌は壁孔を通してのみ新たな道管に侵入できると考えられていることから、道管の長さや直径、壁孔の数が感受性に影響するという考えに基づくものである (ELGERSMA, 1970 ; McNABB *et al.*, 1970 ; SINCLAIR *et al.*, 1975b)。道管の平均直径は抵抗性個体で小さい (ELGERSMA, 1970 ; SINCLAIR *et al.*, 1975 b)。感受性個体と抵抗性個体との間で道管の長さの違いはなく、また初期の胞子の移動に差異はみられないという報告があるものの (McNABB *et al.*, 1970)、成長が速く道管の大きなニレは感受性が高いことは (SINCLAIR and BRENER, 1974)、道管の大きさが感受性にかかわるという仮説に符合する (SINCLAIR *et al.*, 1975 b)。また、抵抗

性のニレでは柔組織で区切られる道管の束が小さく、横方向への感染の広がりが抑えられるとされる (McNABB *et al.*, 1970)。以上のことは組織学的特徴が防御機構として効果的であることを示している。しかしながら、道管の大きさや分布は柔細胞の分布に反映され、柔細胞による動的防御反応の強度に影響を及ぼす。すなわち、組織学的特徴による抵抗性は動的防御反応を通して発現すると捉えられる。

(2) 樹液成分

U. americana に菌を接種すると窒素化合物量が増加すること、抵抗性木は感受性木より平均して窒素化合物量が多いことから (ELGERSMA, 1967; SINGH and SMALLEY, 1969), 樹液成分が抵抗性に影響すると考えられたこともあるが (SINGH and SMALLEY, 1969), 再現性がなく否定的である。

2.4.3 動的防御機構

動的防御機構としては、化学的变化としてファイトアレキシンである mansonone 類の集積が、組織学的な変化として道管や柔細胞の微細構造の変化が主に検討されてきた。この両者が共働して有効な防御機構を成り立たせていると考えられる。

1) 化学的变化

(1) ファイトアレキシン

Ulmus 属の心材には少量の抗菌的なセスキテルペンフェノール物質である mansonone 類が集積する。mansonone 類は膜の破壊による病原菌のイオンの漏出と呼吸の阻害を起こし (WU *et al.*, 1989), *O. ulmi*, *Verticillium albo-atrum* 等の菌の感染や *O. ulmi* の毒素, 硫酸, エタノール処理といった多くの要因によって集積が誘導され, ファイトアレキシンとされる (OVEREEM and ELGERSMA, 1970; ELGERSMA and OVEREEM, 1971; DUMAS *et al.*, 1983; JENG *et al.*, 1983; BURDEN and KEMP, 1984)。mansonone 類は感染部, 褐変道管からのみ抽出され, その周りの辺材からは検出されない (DUCHESNE *et al.*, 1990)。mansonone 類の集積は *Ulmus* 属に普遍的であり, *U. pumila* (DUCHESNE *et al.*, 1986) や *U. glabra* (BURDEN and KEMP, 1984) で mansonone E, F が, *U. americana* で mansonone A, C, D, E, F, G (DUCHESNE *et al.*, 1985; DUMAS *et al.*, 1983) が集積する。

一方, *O. ulmi* の強病原力系統に対する誘導抵抗性が *U. hollandica* (SCHEFFER *et al.*, 1980) と *U. americana* (HUBBES and JENG, 1981) で報告され, また *U. americana* における抗菌性物質の集積が誘導抵抗性にかかわっているらしいことが示され (JENG *et al.*, 1983), mansonone 類集積に新たな関心が生まれた。その後, 感受性の *U. americana* と抵抗性の *U. pumila* に *O. ulmi* の強病原力と弱病原力の菌株を接種した試験から病原菌の病原力と *Ulmus* 属の抵抗性との関係が解析され, mansonone 類の集積は DED 抵抗性の強弱にかかわっていること, すなわち mansonone 類は感受性木に強病原力菌株を接種した場合に最も遅れ, 抵抗性木で早く多量に集積することが示された (DUCHESNE *et al.*, 1984, 1985, 1986, 1990; PROCTOR and SMALLEY, 1988)。このことは DED に対する防御機構の発現のタイミングが病原の閉じこめにとって重要であることを示している。

また, 強/弱病原力菌株を共接種した場合, *U. americana* では強病原力菌株は mansonone 類集積を抑制したが (DUCHESNE *et al.*, 1985), 抵抗性の *U. pumila* では抑制は働かなかった (DUCHESNE *et al.*, 1984)。こうした結果は *O. ulmi* の病原力が mansonone 類の誘導や抑制とリンクしていることを示し

ている。mansonone 類の集積は急速であり、*U. pumila* の材変色部での mansonone 類濃度は接種 3 日後に周囲の 100 倍に上昇するが (PROCTOR and SMALLEY, 1988), その後 mansonone 類は速やかに分解される (DUCHESNE *et al.*, 1985, 1986)。

以上のことから、DED においては急速な mansonone 類の集積は病原の初期の侵入を遅らせ、障壁帯形成のような他の抵抗性機構が交代するまで防御機構を維持するのに重要であるが、化学的な菌の阻害の役割は一時的であり、菌の局在化には長期間働く他の機構もかかわっている必要があると考えられる。

(2) 成長物質

病気の進展中にオーキシン濃度が増加するが (BECKMAN, 1956), IAA (インドール酢酸) は壁孔膜の可塑性を増大させチロース形成を促進する可能性がある。DED 抵抗性における他のホルモンの役割はほとんど分かっていないが、チロース形成促進と早材形成遅延 (道管が小型になる) に関連すると考えられるいくつかのホルモン様物質が試験され、抵抗性増大がみられている (BECKMAN, 1959; SMALLEY, 1962; EDGINGTON, 1963; BRENER and BECKMAN, 1968)。

2) 組織学的変化

(1) 道管の閉塞

DED は道管病であるので道管閉塞の起こる速度は抵抗性の決定因子とされる。閉塞はチロース、ゲル、菌糸、エンボリズムによる (NEWBANKS *et al.*, 1983)。ELGERSMA (1973) はチロース形成が *U. hollandica* の抵抗性クローンで感受性クローンより速いことを報告した。しかし、強病原力菌株発見後の研究ではチロースと抵抗性との相関はみられず (MACDONALD and McNABB, 1974; ELGERSMA and MILLER, 1977; ELGERSMA and HEYBROEK, 1979), チロースはマイナーな抵抗性機構として述べられている (MACDONALD and McNABB, 1974)。OUELLETTE (1980) は最も感受性の高い期間に *U. pumila*, *U. americana* 及び *U. montana* で病原菌接種後に明らかなチロース形成を観察できなかった。チロースを観察した報告では alveolar reticulum (胞状の網状構造, AR) と取り違えている可能性がある (OUELLETTE and RIOUX, 1992)。

OUELLETTE (1981 a, 1981 b) は感染 *U. americana* の道管と繊維にゲル様の沈着物を報告した。道管内でのゲル (ペクチン質) 形成と同様な構造が半縁壁孔の中にも観察された (RIOUX and OUELLETTE, 1989)。ゲル, AR や関連した被覆物質は感染した道管に最初にみられるものの一つで (OUELLETTE, 1978 b), 酸化重合フェノール物質から成ると考えられる (DIMOND, 1970)。フェノール物質は GAGNON (1967) が罹病ニレの道管で検出した。こうした道管を閉塞する反応はエンボリズムを引き起こすものの、逆に菌の進展を遅延させることで防御機構として有効性が高いと考えられる。

(2) 柔細胞の組織学的変化

組織学的な防御機構としての感染後の柔細胞の微細構造の変化について OUELLETTE によって研究が行われた (OUELLETTE, 1978 a, 1978 b, 1978 c, 1978 d, 1980, 1981 a, 1981 b)。最初の反応は細胞壁の内層での沈着物の増加である。これは壁孔部で始まり、次いで道管に接する側に起こり、最後に細胞全体に広がる。また、バピラ様構造の形成が起こり、これは最終的には細胞内の大部分を占めるに至る。細胞

壁にはスベリン様の層も加わる。続いて同様な層が柔細胞を含む隣接した細胞にできる。感染道管に近づくほど、こうした防御反応は明瞭である。また、このような現象は *O. ulmi* の培養濾液処理の場合も同様に観察される (PIJUT *et al.*, 1990)。こうした微細構造の変化が抵抗性が発現して生存しているニレにおいて見られたことは、これらの変化が防御機構として働いていることを示している。

(3) 障壁帯形成

罹病ニレで現在の障壁帯に相当する細胞群が報告されており (BUISMAN, 1935; BANFIELD, 1968), 障壁帯形成は自然感染した *U. americana* で形成層が壊死しなかったときの防御機構として CODIT (Compartmentalization of Decay in Trees) モデルに基づいて述べられている (SHIGO and TIPPET, 1981)。障壁帯は *U. americana* では感染後 30 日後程度で生じ、感染材全体にわたって通常は不連続に形成される (RIOUX and OUELLETTE, 1991a)。障壁帯にはいくつかのスベリン化した細胞がみられ、不連続的な障壁帯に他の細胞（主に繊維）と一緒に分布している。繊維は内部の壁層がわずかにスベリン化する。また、ほとんどの障壁帯細胞の内部がフェノール物質で充満する。

DED において材での菌の定着を阻止する最初の反応はファイトアレキシンの急速な生産であるが、これは完全な抵抗性を与えるものではなく、障壁帯形成は感受性/抵抗性を説明するのに重要であると考えられる。すなわち、病原菌の閉じこめや病気からの回復には障壁帯形成による感染部の隔離が必須であることが示唆される。

2.5 材の防御機構に関する考察

以上のような重要な病害について、静的防御機構や動的防御機構についての研究が行われた結果、動的防御機構の重要性が高いこと、動的防御機構は化学的な変化と組織学的な変化とが相まって働いていることなどの知見が得られた。しかしながら、動的防御機構の重要性についての評価は十分でなく、定量的な評価が必要である。

静的な防御機構としては、前述した DED の場合や傷害に起因するポプラの材変色の場合など (ECKSTEIN *et al.*, 1979) 組織学的な特徴が抵抗性の差異に関連している例がみられる。組織学的特徴は品種、系統あるいは個体間の感受性の差異にかかわっていると考えられる。

動的防御機構では、組織学的な変化として細胞壁のスベリン化などの微細構造の変化や、針葉樹の場合では抗菌性物質の集積と連動していると推測される仮道管の閉塞が認められる。しかし、こうした抗菌性物質の集積と通導組織の閉塞との関連については詳細に検討されておらず、この点について組織学的及び化学的手法を組み合わせる必要がある。

化学的な変化としては抗菌性物質の集積が最も重要であるが、主要な抗菌性物質の種類は樹種によって異なる。*Pinus* 属ではスチルベン類、*Picea abies* ではリグナン類、*Ulmus* 属ではセスキテルペンである mansonone 類が主要な抗菌性物質である。これらの物質は健全辺材にはほとんど存在しない。この他にテルペン類、樹脂酸など抗菌性は上記の物質より低いものの健全辺材にも存在し、さらに防御反応の誘導により量的に増加する物質もみられる。これらの物質も防御機構に関連していると考えられる。

マツノネクチャケや青変菌が感染した *Pinus* 属や *Picea abies* などの場合は化学的な防御機構は長期間にわたって有効に働いている。しかし、DED の場合は mansonone 類は感染後速やかに集積するが、

その後 mansonone 類の濃度は低下し、長期間にわたる抵抗性は障壁帯形成のような他の機構に依存する。このように、樹種あるいは病気の種類によって動的防御機構における組織学的な面や化学的な面のかかわり方が異なる。

こうした結果を参考に、以下ではスギの辺材の菌に対する防御機構、特に動的防御機構としての組織学的変化、化学的变化及び両者のかかわり、さらに動的防御機構の役割について試験を行った。

3 スギカミキリ加害木における材変色部の特性及び反応

3.1 はじめに

スギにおいても他の樹種と同様、昆虫や動物の食害、病害等さまざまな原因により生立木の材変色が生じる。九州地方におけるスギ生立木の材の変色・腐朽の概要については鈴木ほか (1980)、鈴木 (1981)、鈴木ほか (1984) が、関西地方におけるそれについては大迫ほか (1972)、紺谷 (1977) がすでに述べている。

その材変色の原因の一つとしてスギカミキリが挙げられる。スギカミキリはスギの最も重要な病害虫の一つである (小林・柴田, 1985)。スギカミキリの幼虫はスギ生立木の幹を食害し、その傷から材の変色を引き起こす菌が侵入する。そして、いくつかの非特異的な菌が材変色部に定着する (清原ほか, 1985; 小林ほか, 1986; YAMADA *et al.*, 1987; 小林, 1989)。

生立木の材変色・腐朽部では一般にカチオンの集積による電気抵抗値の低下がみられる (SKUTT *et al.*, 1972; TATTAR *et al.*, 1972; TATTAR and SAUFLEY, 1973)。スギの材変色・腐朽部においても電気抵抗値の低下が知られており (鈴木ほか, 1984)、カチオンの集積が予想される。

また、スギカミキリの食害に起因する材変色・腐朽の広がりには多くの樹種のさまざまな要因による材変色の場合と同様な形態で阻止される。一般的に、材変色の拡大を阻止している機構の一つとしてファイトアレキシンの集積がある (KEMP and BURDEN, 1986)。スギカミキリ等の穿孔性害虫の食害に起因する材変色部においては agatharesinol, hinokiresinol や sequirin-C といったフェノール物質であるノルリグナン類が集積することが知られている (TAKAHASHI *et al.*, 1983; 高橋・荻山, 1985 a, 1985 b, 1986; 島田ほか, 1987)。また、スギの心材成分としてテルペン類 (セスキテルペン類, ジテルペン類及びジテルペンフェノール類) も数多く知られているが (KONDO *et al.*, 1959; 近藤ほか, 1959; KONDO *et al.*, 1960; SUMIMOTO, 1963; NAGAHAMA, 1964 a, 1964 b; 住本ほか, 1964), これらも材変色部に集積する (島田ほか, 1987)。こうした二次代謝産物の中に菌に対する阻害作用を有し、ファイトアレキシンと考えることのできる物質が存在することが推察できる。

そこで、スギカミキリの食害に伴う材の変色をモデルとして、材変色部の特性の中で特にカチオンの集積とその要因について議論し、さらに材に侵入した菌に対する辺材の防御反応について上記の物質の意義及び組織学的変化との関連について検討した。

ところで、材変色部を表す、あるいはそれに関連した用語は今までに数多く提唱されている (SHIGO and HILLIS, 1973)。その中で材変色に対する防御反応に関連した部位を表す用語にはさまざまなものがある。まず、変色辺材と健全辺材との境界部を表す用語として、protective zone (HEPTING and

BLAISDELL, 1936), protection wood (JORGENSEN, 1962), reaction zone (SHAIN, 1967), CODIT (Compartmentalization of Decay in Trees) wall 1~3 (SHIGO and MARX, 1977), green reaction zone (PEARCE and WOODWARD, 1986) がある。特に宿主組織が生きている部位を表す用語としては, intermediate wood (Committee on Nomenclature IAWA, 1957; YAMADA *et al.*, 1988), transition zone (FREY-WYSSLING and BOSSHARD, 1959; SHAIN, 1971), orange reaction zone (PEARCE and WOODWARD, 1986) が挙げられる。また, 傷害後に形成された材との境界を表す用語として, CODIT wall 4 (SHIGO and MARX, 1977), barrier zone (MOORE, 1978; SHORTLE and COWLING, 1978) が挙げられる。

このように多くの用語が使われているため, 使用する用語を統一しておく必要があり, 本論文では Photo 1 に示した用語を使用することとする。変色辺材 (discolored sapwood) と健全辺材 (sound sapwood) の境界を表す用語として, 移行帯 (transition zone) 及び反応帯 (reaction zone) を用いる。なお, 材が変色している部位全体を指す用語として材変色部, 反応帯より内側の部位を指す用語として変色辺材を用いて, 両者を区別することにする。

3.2 材料と方法

3.2.1 では, 材変色部における特性, 特にカチオン集積にかかわる要因を明らかにするために, 電気抵抗値, カチオン濃度, 水素イオン濃度, カチオン交換容量を測定した。また, 含水率, 比重の測定を行うとともに, 定着している菌とカチオン集積との関連を検討した。

3.2.2 では, 材変色部の拡大を阻止している要因を明らかにするために, スギカミキリ被害木に形成された材変色部及びスギ生立木にスギカミキリ被害木から分離した菌を接種して再現した材変色部における反応を調べた。スギカミキリ被害部から菌の分離を試みるとともに, 材変色部における通水阻害及び含水率の変化を調べ, 組織化学的観察を行った。また, 抽出物の分析として抗菌性物質及びその類縁化合物の同定, 定量を行うとともに, そのいくつかの性質として nitro-blue tetrazolium (NBT) 還元能, 菌や宿主細胞に及ぼす影響を調べた。

3.2.1 材変色部の特性

(1) 電気抵抗値

島根県加茂町に植栽されスギカミキリの加害を受けた 16 年生スギの 1~4 年前に食害を受けた部位を電気抵抗値の測定に供し, 鈴木ほか (1984) の方法に従い変色を伴う材の電気抵抗値を測定した。

(2) 含水率とカチオン濃度

含水率とカチオン濃度の測定に供したのは森林総合研究所関西支所に植栽された 9, 13 及び 20 年生実生スギの, 1 年前及び 2~5 年前にスギカミキリの食害を受けた部位であり, 健全辺材, 心材, 反応帯, 変色辺材の各部位から 10~13 か所ずつ試料を採取した。含水率は材のブロックを 105℃ で 48 時間乾燥し重量を測定して求めた。次に, 材のブロックを細断した後, 遠心式の磨砕器で 32 メッシュのふるいを通して充分磨砕した。磨砕した材は硝酸-過塩素酸で分解した (JACKSON, 1958)。そしてカチオン濃度は原子吸光分光光度計で測定した。測定したカチオンは K, Ca, Mg, Na の 4 種類である。

(3) 水素イオン濃度とカチオン交換容量

水素イオン濃度 (pH) とカチオン交換容量 (CEC) の測定に供したのは森林総合研究所関西支所に植栽された 19 及び 20 年生実生スギの 4~7 年前に食害を受けた部位であり、健全辺材、心材、反応帯、変色辺材の各部位から 5~8 か所ずつ試料を採取した。pH の測定は STAMM (1961) の抽出法によった。CEC 測定のためには、材を遠心式の磨砕器で 16 メッシュのふるいを通して磨砕し、PEECH 法 (Soil Conservation Service, 1972) で測定した。異なる pH での可溶性カチオン濃度と CEC の変化を調べるため、材粉をそれぞれ健全辺材と変色部の pH である pH 6.3 と 7.8 の酢酸アンモニウム緩衝液で抽出した。ここでの可溶性及び全カチオン濃度は K, Ca, Mg, Na 濃度の合計として求めた。

(4) 比重

森林総合研究所関西支所に植栽された 19 及び 20 年生実生スギの 4~7 年前に食害を受けた部位の材の比重を調べた。健全辺材、反応帯、変色辺材の各部位から 9~11 か所ずつ試料を採取した。材片を水に浸漬し、重量の変化で材片の体積を求め、乾重と体積の比率から比重を計算した。

(5) 菌の分離

森林総合研究所関西支所に植栽された 9, 13 及び 20 年生実生スギの 1 年前及び 2~5 年前にスギカミキリの食害を受けた部位から菌の分離を試みた。菌の分離は材片を細断し 70% エタノールで洗浄, 0.1% 昇汞で 30~60 秒間表面殺菌し、滅菌水で 2 回洗浄した後、PDA 培地上に移すことで行った。培養は 25℃, 暗黒下で行った。

3.2.2 材変色部における反応

(1) 菌の接種

森林総合研究所関西支所構内に植栽された 18 年生スギに対し菌を 8 月に接種した。接種の 3 及び 6 か月後に伐倒し、以後の試験に供した。薄層クロマトグラフィ (TLC), 高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 分析のための材片は接種木 (*Trichoderma* sp. 接種 3 か月後) から採取した。解剖あるいは抽出のための材片は伐倒直後、あるいは -20℃ で保存後に用いた。接種に用いた菌はスギカミキリの食害に伴う材変色部から分離された *Guignardia cryptomeriae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Trichoderma* sp. である。スギの枝の材を高圧滅菌し、菌を植えた PDA 培地上に置き蔓延させた。各接種木にそれぞれ 4 種の菌を接種した。幹にドリルで接種孔をあけ、菌を蔓延させた枝を接種孔に差し込み、ビニルテープでシールした。

(2) 菌の分離

三重県林業技術センター内に植栽されスギカミキリの食害を受けた 12 年生スギ 2 本、森林総合研究所千代田試験地に植栽されスギカミキリの食害を受けた 10 年生スギ 2 本を伐倒し、材変色部より以下の方法で菌の分離を試みた。材片をアンチホルミン 5 倍液で 3 分間表面殺菌し、PDA 培地上に移した後、25℃, 暗黒下で培養した。

(3) 通水阻害と含水率

関西支所構内に植栽されスギカミキリの食害を受けた 10 年生スギ 2 本を用い、材変色部における通水阻害を調べた。スギカミキリの食害翌年の 11 月に供試木を地際から伐倒し、すぐに切り口を水に漬けた。水中で切り口から幹の円盤を切り離した後、供試木をすばやく 0.5% 酸性フクシン水溶液に移した。

約1日色素液に漬けた後、長さ10cmずつに玉切りし通水パターンを観察した。

三重県林業技術センター内に植栽されスギカミキリの食害を受けた12年生スギ2本、森林総合研究所千代田試験地に植栽されスギカミキリの食害を受けた10年生スギ2本を伐倒し、材変色部の各部位それぞれ3~4か所ずつの含水率を測定した。伐倒木から材変色部を含む厚さ10~20cmの円盤を切りだし、テンションの解放による影響を避けるためその円盤の端を除いてブロックを取り、細かく刻み、秤量瓶に入れ生重を測定し、105℃で一晩乾燥した後、乾重を測定して含水率を計算した。

(4) 組織化学

三重県林業技術センター内に植栽されスギカミキリの食害を受けた12年生スギ2本、森林総合研究所千代田試験地に植栽されスギカミキリの食害を受けた10年生スギ2本及び菌接種木2本を伐倒し、解剖観察に供した。

材のブロックは5%グルタルアルデヒド固定あるいは無固定で用い、滑走型マイクロームで厚さ約25 μ mの切片を作製した。宿主組織と菌糸の生死及び活性を評価するために切片のNAD diaphorase 活性染色を行った (SHAIN, 1967)。NBT還元能は67mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中の0.1% NBTに切片を浸漬して調べた。NBT還元能が酸化還元酵素やスーパーオキシドによるのかどうかをみるために、 NaN_3 やsuperoxide dismutase (SOD) によるNBT還元能の阻害をNBT溶液に10あるいは20mMの NaN_3 あるいは0.02%のSODを加えて調べた。

組織内の脂質の存在位置はNile blue, Sudan black BあるいはSudan IIIで検出した (明日山ほか, 1962; NOBUCHI and HARADA, 1983)。モノフェノールの染色にはMillon氏試薬を用いた (佐野, 1981)。ポリフェノールはジアゾ化 α -アニシジン、ジアゾ化 α -トリジン、ニトロソフェノール試薬を用いて検出した (明日山ほか, 1962)。染色した切片はグリセリンで包埋するか、アルコールシリーズで脱水後カナダバルサムで包埋した。

(5) 抽出と分析

三重県林業技術センター内に植栽されスギカミキリの食害を受けた12年生スギ2本、森林総合研究所千代田試験地に植栽されスギカミキリの食害を受けた10年生スギ2本及び菌接種木2本を伐倒し、材変色部からメタノール抽出物を得た。冷凍保存した材組織は細かく切り刻んだ後、生重の30倍量 (V/W) のメタノールで30℃で3時間抽出して分析に供した。抽出物含量や各物質の含量は材変色部の各部位それぞれ3~4か所ずつの試料から求めた。

また、材変色部にみられる油滴状物質を直接分析するため、マイクロームで作成した切片 (約30 μ m $\times$ 2cm $\times$ 1cm) 内の油滴状物質をマイクロマニピュレータを使用して先端の径が約20~30 μ mのガラス細管で吸い取り、メタノールに溶解してHPLC、ガスクロマトグラフ (GC) による分析に供した。

薄層クロマトグラフ (TLC) : 抽出物をTLCで展開した。用いたプレートは0.5mm厚シリカゲル60 F₂₅₄である。展開液は (i) クロロフォルム-メタノール-水 (80:20:2, v/v/v), (ii) ジエチルエーテル, あるいは (iii) ヘキサン-酢酸エチル (7:3, v/v) を用いた。展開後、紫外線 (254nm) 照射下で、あるいは濃硫酸または飽和バニリン (5% 硫酸中) を噴霧した後110℃で1~2分加熱してスポットを調べた。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) : HPLC は抽出物あるいは TLC で精製した物質の分析に用いた。島津 LC-6 A を用い、分析条件は、カラム ODS, カラム温度 40℃, 溶媒 アセトニトリル-10 mM EDTA 二ナトリウム塩, pH 6.2 (40:60, v/v), 流量: 1.5 ml/分, 島津 SPD-6 A によって 270 nm の紫外吸光で検出した。また, HPLC により抽出物の精製を行った。Waters M45 を用い、条件は、カラム ODS, 溶媒 30~80% メタノール, 流量 5 ml/分, GL サイエンス UV 620 によって 262 nm の紫外吸光で検出した。

ガスクロマトグラフ (GC) : GC は HPLC と同様抽出物の分析に用いた。島津 GC-9 AM を用い、分析条件は、カラム島津 CBP-1 (無極性キャピラリーカラム, OV-1 相当) 長さ 25 m, 内径 0.22 mm, 膜厚 0.25 μ m, カラム温度 150℃ から昇温 4℃/分で 270℃ とした後さらに 30 分, インジェクタ温度 270℃, 検出器温度 295℃, 検出器 FID である。試料は TMS 化後分析に供した。

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) : 抽出物の同定のために GCMS を用いた。GC は Hewlett Packard HP5890, MS は Hewlett Packard HP5970 で、分析条件は、カラム Hewlett Packard HP-1 (無極性キャピラリーカラム, OV-1 相当) 長さ 25 m, 内径 0.2 mm, 膜厚 0.11 μ m, カラム温度 (i) 150℃ から昇温 4℃/分で 270℃ とした後さらに 30 分, (ii) 120℃ から昇温 3℃/分で 270℃ とした後さらに 10 分, あるいは (iii) 70℃ から昇温 2.5℃/分で 270℃ とした後さらに 5 分のいずれか, インジェクタ温度 270℃ である。

核磁気共鳴装置 (NMR) : 一部の抽出物の同定確認のために NMR を用いた。NMR は日本電子 JNM-Eclipse 500 (500 MHz) で測定した。溶媒として CDCl_3 または CD_3OD を用い、ケミカルシフト値は測定溶媒を内部標準とした。

(6) NBT 還元能

NBT 還元能を有する物質の探索のため、移行帯内層 (乾重 60 mg 相当量) からのメタノール抽出物の n-ヘキサン不溶性成分を TLC で分離した。これらの物質と n-ヘキサン可溶性成分を別々にメタノールに溶かした後、濃縮乾固した。残渣に 1 ml の蒸留水に溶かした 1 mg の NBT を加え、さらに 0.1 ml のクロロフォルムを加えた後、37℃ で 30 分間インキュベートした。

(7) 抗菌性物質の検出

抗菌性物質は TLC プレート上で直接検定法で検出した。用いた菌は *Cladosporium herbarum* (OCh-1), *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Guignardia cryptomeriae* である。*C. herbarum*, *F. oxysporum*, *F. solani* の場合は、PDA 培地上に生育した菌叢上に検定用の培養液 (0.1% 酵母エキス, 0.2% ショ糖, 0.1% 寒天) を注ぎ、かき混ぜて孢子懸濁液を得た (Oku *et al.*, 1979)。*G. cryptomeriae* の場合は、PDA 培地上の菌叢をはぎ取り、検定用培養液を加えワーリングブレンダーで攪拌し、菌糸断片の懸濁液を得た。得られた孢子あるいは菌糸断片の懸濁液は 150 メッシュのふるいを通し、試料を展開した後乾燥した TLC プレートに噴霧し、25℃ 高湿下で培養した。*C. herbarum* の場合、阻止斑は数日後に明瞭に認められた。他の菌の場合、3 日間培養した後 TLC プレートに calcofluor white M2R 0.5 mg/ml 0.067 M リン酸緩衝液, pH 8.0 を噴霧し、25℃ で 2 時間おき、360 nm の UV 照射下で観察した (WOODWARD and PEARCE, 1985)。この方法ではプレート上で生育した菌糸は青白い蛍光を発し、阻止

斑は暗い部分として現れる。

(8) 抗菌性物質の宿主細胞に対する作用

健全辺材及び移行帯内層からのメタノール抽出物と精製した hinokiresinol を希釈して 2% エタノールに懸濁し、スギの枝から採取した樹皮片を浸漬、インキュベートした。希釈倍率は材内における濃度を基準とし、対照には 2% エタノールを用いた。処理 1 及び 2 日後、それぞれ各処理 3 樹皮片から切片を作成し、ISHIDA *et al.* (1992) の方法に従い、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色し、顕微鏡観察した。倍率 100 倍で写真撮影した。撮影範囲の師部のうち形成層より 2 年輪の範囲の DAPI 染色核の計数を 3 視野で行った。

3.3 結 果

3.3.1 材変色部の特性

(1) 含水率、電気抵抗値及びカチオン濃度

材変色部の含水率は健全辺材に比べ著しく低かった (Table 1)。場合によっては繊維飽和点 (スギの場合約 30%) とほぼ同じ率まで低下することがあった。反応帯では含水率は健全辺材と変色辺材との中間の値を示した。心材の含水率は健全辺材より低かったが変色辺材よりは高かった。

Fig. 1 に示したように直径に沿って電気抵抗値を測定した。材変色部の値は健全辺材のそれよりも低かった (Fig. 2)。また心材の電気抵抗値も健全辺材より低かった。この結果はスギのさまざまな材変色・腐朽部において認められた電気抵抗値の低下と一致していた (鈴木ほか, 1984)。

変色辺材における K と Mg の濃度はスギカミキリの食害後 1 年以内に増大し始めた (Table 1)。その後、Ca も次第に集積し始めたが、Na 濃度は変化しなかった。反応帯においても変色辺材と同じように K, Mg, Ca 濃度の増大がみられた。食害 1 年後及び 2~5 年後の K 濃度と Mg 濃度との間には高い相関

Table 1. スギカミキリ食害に伴うスギの材変色部の含水率とカチオン濃度
Moisture content and cation concentration in the wood of sugi attacked by the sugi bark borer

食害後の 年数 Year after the attack	部 位 Type of tissue	含水率 Moisture content (%) ^{a)}	カチオン濃度 (ppm) ^{a)} Cation concentration (ppm) ^{a)}			
			K	Ca	Mg	Na
0	健全辺材 Sound sapwood	226 a ^{b)}	1 170 a	970 a	124 a	401 a
	心 材 Heartwood	135 b	3 920 b	940 a	291 b	364 a
1	健全辺材 Sound sapwood	140 a	910 a	980 a	151 a	483 a
	反 応 帯 Reaction zone	72 b	1 590 b	990 a	214 b	417 a
	変色辺材 Discolored sapwood	55 c	1 720 b	980 a	206 b	460 a
2-5	健全辺材 Sound sapwood	191 a	1 020 a	1 060 a	167 a	386 a
	反 応 帯 Reaction zone	131 b	6 870 b	1 600 b	542 b	481 b
	変色辺材 Discolored sapwood	63 c	5 360 c	1 550 b	530 b	387 a

a) 含水率とカチオン濃度は乾重ベースで表す。

Moisture content and concentrations of cations are based on dry weights.

b) 各列でそれぞれの食害後の年数において同じ文字をつけた値の間には有意差がない (P=0.05)。

Within each column, values with the same letter after each period following a beetle attack are not significantly different, p=0.05.

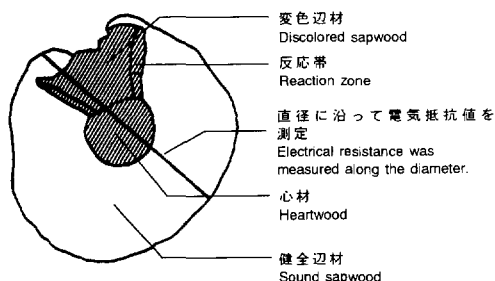


Fig. 1 スギカミキリの食害に伴うスギの材変色部の電気抵抗値測定部位

Cross-section of sugi trunk attacked by the sugi bark borer, indicating the line for electrical resistance measurement

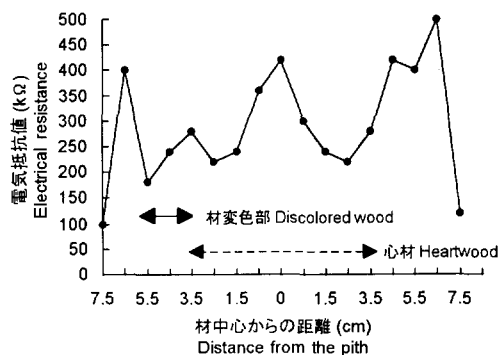


Fig. 2 スギカミキリの食害に伴うスギの材変色部の電気抵抗値の一例

Electrical resistance in the trunk including discolored wood (—) and heartwood (---) of sugi attacked by the sugi bark borer
両端は内樹皮の電気抵抗値を示す。
Both ends of the line indicate the electrical resistance in the inner bark.

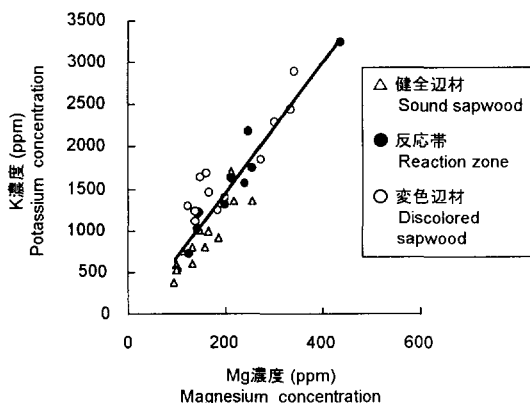


Fig. 3 スギカミキリ食害1年後のスギ材変色部におけるMg濃度とK濃度との相関
Relationship between K and Mg concentrations in the wood of sugi one year after the attack by sugi bark borer
回帰: $Y = 9.17X - 361$, $r^2 = 0.841$. 食害後2~5年の材も同様な相関を示した。
Regression: $Y = 9.17X - 361$, $r^2 = 0.841$. Wood two to five years after beetles attack had a similar relationship.

がみられた。Fig. 3に食害1年後のK濃度とMg濃度との相関関係を示した。

(2) 水素イオン濃度とカチオン交換容量

変色辺材では健全辺材に比べpHが高かった (Table 2)。変色辺材周辺の反応帯ではpHはさらに高

かった。材を一旦乾燥したのちに再度水に浸漬して測定した場合は pH は全体に低くなったが部位間の差異は同じ傾向のままであった。

可溶性及び全カチオン濃度は心材、変色辺材ともに健全辺材より高かった (Table 3)。CEC は変色辺材で最も高く、心材、健全辺材の順に低くなった。変色辺材及び心材では CEC は可溶性カチオン濃度より低かったが、健全辺材では CEC は可溶性カチオン濃度より高かった。抽出液の pH 6.3 と 7.8 との間で可溶性カチオン濃度及び CEC に差異はみられなかった。このことは、カチオン吸着にかかわる材成分の置換基の解離度がこの pH の範囲では変化しないことを示している。

材の円盤を希塩酸に浸漬すると、反応帯及び変色辺材から発泡した。泡は特に反応帯で多かった。希塩酸処理による発泡は変色部、特に反応帯における炭酸塩の集積を示唆している。

(3) 比重

変色辺材の比重は健全辺材のそれと差がなかった (Fig. 4)。反応帯の比重は健全辺材より高かった。材腐朽部ではセルロース、リグニン等の細胞壁成分の分解によって比重は低下する (SHIGO and

Table 2. スギカミキリ食害に伴うスギの材変色部の pH
pH in fresh and in dried-rewetted wood of sugi attacked by the sugi bark borer

部位 Type of tissue		pH	
		新鮮材 Fresh wood	乾燥後の材 Dried-rewetted wood
健全辺材	Sound sapwood	6.31 a ^{a)}	5.26 a
心 材	Heartwood	7.58 b	6.24 b
反 応 帯	Reaction zone	8.75 c	7.17 c
変色辺材	Discolored sapwood	7.77 b	6.66 d

a) 各列で同じ文字をつけた値の間には有意差がない (P=0.05)。

Within each column, values with the same letter are not significantly different, p=0.05.

Table 3. スギカミキリ食害に伴うスギの材変色部のカチオン濃度と CEC の関係
Cation concentration and cation exchange capacity in the wood of sugi attacked by the sugi bark borer

部位 Type of tissue		カチオン濃度 (me/100 g) ^{a)} Cation concentration (me/100 g) ^{a)}			CEC (me/100 g)	
		全体 Total	可溶性 Extractable		pH 6.3	pH 7.8
			pH 6.3	pH 7.8		
健全辺材	Sound sapwood	9.47 a ^{b)}	7.22 a	7.23 a	9.53 a	9.94 a
心 材	Heartwood	20.35 b	16.10 b	16.18 b	13.27 b	13.61 b
変色辺材	Discolored sapwood	25.36 c	22.55 c	22.45 c	17.66 c	18.04 c

a) カチオン濃度は K, Ca, Mg, Na 濃度の合計で求めた。

Cation concentration is a total of K, Ca, Mg and Na concentration.

b) 各列で同じ文字をつけた値の間には有意差がない (P=0.05)。

Within each column, values with the same letter are not significantly different, p=0.05.

SHARON, 1970; SAFFORD *et al.*, 1974)。しかし、スギの腐朽に至っていない材変色部の機械的強度は健全部と変わらないという報告もあり（大迫ほか, 1972）、スギの材変色部では細胞壁成分の分解はほとんど起こっていないと思われる。反応帯の比重が高かった理由としては、何らかの物質が集積していることが考えられる。

(4) 分離菌

スギカミキリ被害木の材変色部及び反応帯からは *Macrophoma sugi* (*G. cryptomeriae*), *Fusarium* spp., *Cryptosporiopsis* sp., *Cytospora* sp. が分離された (Table 4)。健全辺材からは菌は分離されなかった。同じ変色柱の変色辺材と反応帯とでは分離される菌の種類にほとんど差異がなかった。それぞれの変色柱の中での菌相は単純であり、かつ変色柱内での位置による差異はなかった。さらに食害後6か月から5年の間に菌相はほとんど変化しなかった。

非菌叢類と細菌は材の変色を起こす先駆的な侵入者であり、その後腐朽を起こす菌叢類が侵入すると考えられている (ETHERIDGE, 1961; MALOY and ROBINSON, 1968; SHIGO and SHARON, 1968)。食害後の時期がさまざまな材変色部から非菌叢類が共通して分離されたことから、腐朽には至っていないスギの変色材では非菌叢類が優占的であると考えられた。

分離された菌が異なっても、スギカミキリ食害後の時間経過が同じである材変色部の間では各カチオンの濃度に有意差がみられない場合が多かった (Fig. 5)。一方、同じ菌が優占的である材変色部において、食害後の時間経過が異なると集積の遅かった Ca を除いてカチオン濃度が変わった (Fig. 6)。これらの結果はカチオン濃度が菌相とはなく、材変色の進展に関連していることを示唆する。

3.3.2 材変色部における反応

(1) 分離菌

結果を Table 5, 6 に示す。健全辺材からは菌は分離されなかった。分離された主要な菌は *G. cryptomeriae*, *Fusarium* spp., *Cryptosporiopsis* sp., *Phialophora* sp. であり、反応帯と変色辺材からは

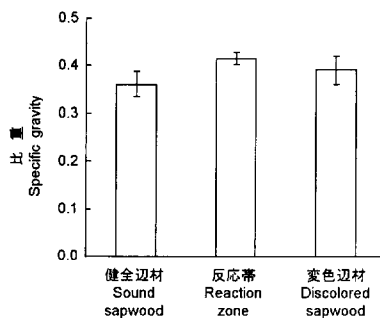


Fig. 4 スギカミキリ食害2～5年後のスギ材変色部の比重

Specific gravity of the wood of sugi 2-5 years after the attack by the sugi bark borer
平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations are presented.

Table 4. スギカミキリ被害に伴うスギの材変色部からの分離菌
Microorganisms isolated from the wood of sugi attacked by the sugi bark borer

被害後の年数 Year after the attack	部位 Type of tissue	供試片数 No. of pieces	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Guignardia cryptomeriae</i>	<i>Cryptospor- iopsis</i> sp.	<i>Cyto- spora</i> sp.	その他の菌 Other fungi	細菌 Bacteria
0.5	健全辺材	Sound sapwood	70						
	反応帯	Reaction zone	20	11 ^{a)}	14		3		
	変色辺材	Discolored sapwood	50	9	11	17		1	7
1	健全辺材	Sound sapwood	80						
	反応帯	Reaction zone	80	9	16	13	5		
	変色辺材	Discolored sapwood	80	18	5	7	2	5	
2~5	健全辺材	Sound sapwood	40						
	反応帯	Reaction zone	40		23			6	6
	変色辺材	Discolored sapwood	40	8	25	4			

^{a)} 表中の値は微生物が分離された材片数を示す。

Values represent the number of pieces from which microorganisms were isolated.

同種の菌が分離された。

(2) 通水阻害と含水率

Photo 1 に通水阻害のパターンを示す。色素液は健全辺材中を上昇したが、健全部から移行帯へは入らなかった。また、材変色部が直接色素液に浸かった場合でさえも移行帯～変色辺材には色素液は入らなかった。これは水が健全辺材と移行帯の境界、また変色辺材、反応帯、移行帯それぞれの内部を通ることができないことを示している。

含水率は移行帯から変色辺材で健全辺材より低く、健全辺材から変色辺材にかけて一貫した勾配を示した (Fig. 7a)。これは材変色部における通水阻害を反映していると考えられる。

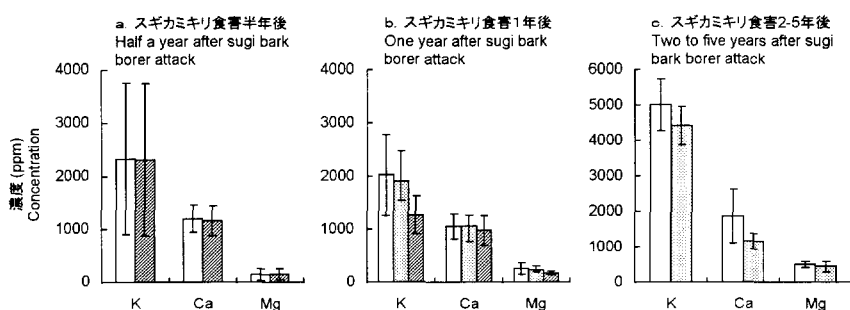


Fig. 5 スギカミキリ食害後の材変色部のカチオン濃度と優占菌との関係

Relationships between cation concentrations and dominant fungus in the discolored region of sugi wood attacked by the sugi bark borer

優占菌 Dominant fungus : *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Guignardia cryptomeriae*

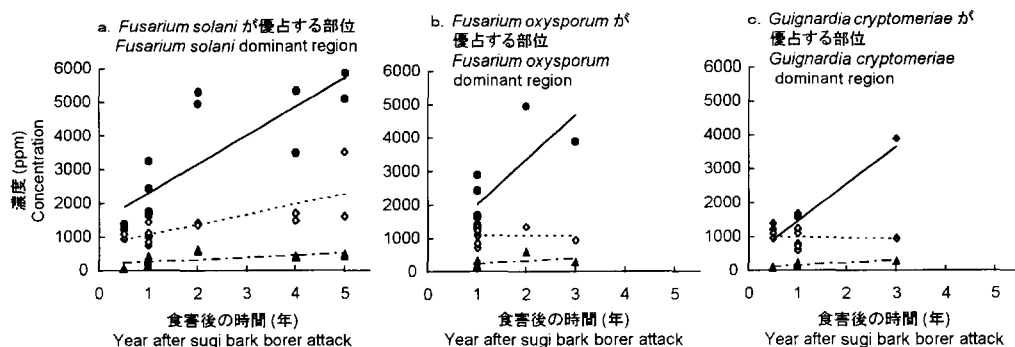


Fig. 6 同種の菌が優占する材変色部におけるカチオン濃度の変化

Changes in cation concentrations in the discolored region of sugi wood where same fungal species dominates

● K, ◇ Ca, ▲ Mg

Table 5. スギカミキリ被害木の変色辺材からの分離菌（三重県林業技術センター）

Fungi isolated from the discolored sapwood of sugi attacked by the sugi bark borer (Mie Prefectural Forestry Research Center)

変色カラム Discolored column	供試片数 No. of pieces	<i>Guignardia cryptomeriae</i>	<i>Cryptospor- iopsis</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	その他の菌 Other fungi
4-1	6		4 ^{a)}			4
4-2	12		5			9
4-3	12	5	2		4	
4-4	6	6				
5-1	6					6
5-2	6	6				
5-4	6			6		

^{a)} 表中の値は微生物が分離された材片数を示す。

Values represent the number of pieces from which microorganisms were isolated.

Table 6. スギカミキリ被害木からの分離菌（森林総合研究所千代田試験地）

Fungi isolated from the discolored sapwood of sugi attacked by the sugi bark borer (Chiyoda Experiment Station, Forestry and Forest Products Research Institute)

変色カラム Discolored column	部位 Type of tissue	供試材片数 No. of pieces	<i>Fusarium solani</i>	<i>Phialophora sp.</i>	その他の菌 Other fungi
93-1 A	健全辺材	Sound sapwood	10		
	反応帯	Reaction zone	10	7 ^{a)}	1
	変色辺材	Discolored sapwood	10	4	2
93-1 B	健全辺材	Sound sapwood	10		
	反応帯	Reaction zone	10	10	
	変色辺材	Discolored sapwood	10	6	1
93-1 D	健全辺材	Sound sapwood	10		
	反応帯	Reaction zone	10	7	
	変色辺材	Discolored sapwood	10	10	3
93-2 A	健全辺材	Sound sapwood	10		
	反応帯	Reaction zone	10	4	
	変色辺材	Discolored sapwood	10	9	1
93-2 B	健全辺材	Sound sapwood	10		
	反応帯	Reaction zone	10	10	
	変色辺材	Discolored sapwood	10	3	
93-2 C	健全辺材	Sound sapwood	10		
	反応帯	Reaction zone	10	9	1
	変色辺材	Discolored sapwood	10	2	2

^{a)} 表中の値は微生物が分離された材片数を示す。

Values represent the number of pieces from which microorganisms were isolated.

(3) 油滴状物質

油滴状の物質が移行帯内層の仮道管を閉塞しているのが観察された (Photo 2, 3)。これはスギカミキリ被害木, 菌接種木の接種後3か月, 6か月後のいずれでもみられた。油滴状物質の分布は放射柔組織と関連していたが, 軸方向柔細胞 (樹脂細胞) との関連はみられなかった。この仮道管中の物質はメタノールで容易に抽出され切片から消失した。従って, 材のメタノール抽出物は油滴状物質の成分を含んでいる。油滴状物質は移行帯内層より量は少ないが反応帯においても観察された。

これら油滴状物質は Nile blue, Sudan black B, Sudan III で染まり, 脂質を含むと考えられた (Photo 2b)。油滴状物質は Millon 氏試薬で染まり, また, そのいくらかはポリフェノールテストで染まった (Photo 2c)。これらの結果は油滴状物質中におけるモノフェノール, ポリフェノールの両者を含むフェノール物質の存在を示している。油滴状物質は NADH (nicotinamide adenine dinucleotide

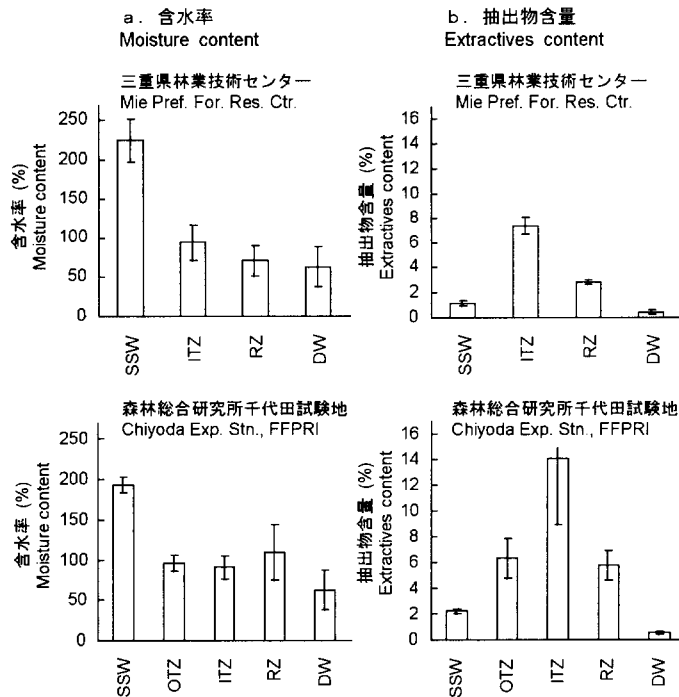


Fig. 7 スギカミキリ被害木の含水率 (a, 左) 及びメタノール抽出物含量 (b, 右)

Moisture content (a, left) and methanol extractives content (b, right) in each part of the wood of sugi attacked by the sugi bark borer

SSW : 健全辺材 Sound sapwood, OTZ : 移行帯外層 Outer transition zone, ITZ : 移行帯内層 Inner transition zone, RZ : 反応帯 Reaction zone, DW : 変色辺材 Discolored sapwood

Mie Pref. For. Res. Ctr. : Mie Prefectural Forestry Research Center

Chiyoda Exp. Stn., FFPRI : Chiyoda Experiment Station, Forestry and Forest Products Research Institute

平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations are presented.

還元型)を加えなくても NBT を還元し, blue diformazan の沈澱が生じた (Photo 2d)。油滴状物質による NBT の還元は NaN_3 や SOD によって阻害されず, NBT の還元が酸化還元酵素やスーパーオキサイドによるのではないことが示唆された。

この油滴状物質は移行帯内層で空間的に連続的に分布していた (Photo 3)。また, 壁孔内にも油滴状物質が認められた (Photo 2b)。

(4) 菌の侵入と宿主組織の生死

菌糸は変色辺材にみられたが, 移行帯や健全辺材にはみられなかった。変色辺材に定着した菌糸の進展は反応帯内の途中までみられ, 移行帯-反応帯の境界や反応帯内部で阻止されていた (Photo 4a)。一部には移行帯内層まで侵入した菌糸が油滴状物質に接している例も観察された。

変色辺材では菌糸は仮道管を通して広がり, 壁孔を通り抜けて隣接した仮道管や柔細胞へ達しており (Photo 4b), このことから仮道管や壁孔が菌の進展の通路として重要であることが示された。菌糸が厚い二次壁を貫通して隣接した仮道管へ達している例も観察された。

移行帯内層のほとんどの放射柔細胞は NAD diaphorase 活性を示した。健全辺材に比べ (Photo 5a), 移行帯ではこの活性が高かった (Photo 5b)。NAD diaphorase 活性は変色辺材~反応帯の菌糸にもみられたが, この部分の柔組織には認められなかった (Photo 5c)。NAD diaphorase 活性から判断して, 変色辺材や反応帯の放射柔組織は壊死しているが, 移行帯内層では生きている柔細胞が多いと考えられた。反応帯でも一部には NAD diaphorase 活性の残っている細胞があった。

(5) ノルリグナン類及びテルペン類の同定

材変色部で増加がみられた主要なノルリグナン類としては, hinokiresinol, agatharesinol, sequirin-C が同定された。これらノルリグナン類の構造式を Fig. 8 に示す。

材変色部で増加がみられた主要なテルペン類としては β -eudesmol, sandaracopimarinol, ferruginol が同定された。これらテルペン類の構造式を Fig. 9 に示す。

(6) ノルリグナン類及びテルペン類の集積

移行帯内層では変色辺材, 反応帯, 健全辺材に比べメタノール抽出物含量が多かった (Fig. 7b)。また, ほとんど着色が視認できない移行帯外層においても抽出物の増加が認められた。

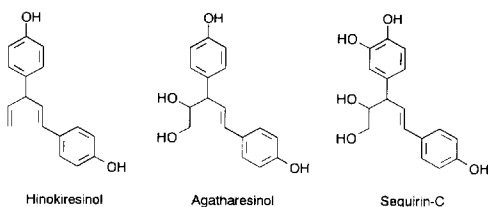


Fig. 8 スギの材変色部にみられる代表的なノルリグナン類

Representative norlignans in the discolored region of sugi wood

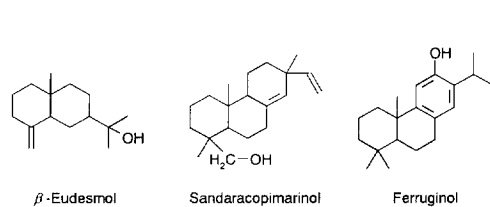


Fig. 9 スギの材変色部にみられる代表的なテルペン類

Representative terpenes in the discolored region of sugi wood

TLC や HPLC による分析の結果, hinokiresinol, agatharesinol, sequirin-C といったノルリグナン類が移行帯内層に集積していることが分かった (Fig. 10)。GC によるノルリグナン類の分析の結果も HPLC 分析結果と同様であった (Fig. 11)。また, ノルリグナン類と推定される未同定物質 (成分Ⅱ) の集積も認められた。GC ではノルリグナン類と同様テルペン類の集積も検出された (Fig. 12)。これらの結果は, TAKAHASHI *et al.* (1983), 高橋・荻山 (1985 a, 1985 b, 1986), 島田ほか (1987) の結果と一致する。

健全辺材や変色辺材ではノルリグナン類やテルペン類の濃度は極めて低くほとんど検出されなかった。これらの多くの成分は移行帯内層で最も濃度が高かったが, 移行帯外層においてもすでに集積がみられた。agatharesinol 及び ferruginol は移行帯外層における濃度も移行帯内層と同様に高かった。ノルリグナン類やテルペン類は, 移行帯内層より濃度は低いものの, 宿主の柔細胞が死んでいる反応帯においても多量に残存していた。

移行帯内層のマイクローム切片から集めた油滴状物質を HPLC で分析したところ, 移行帯内層のメタノール抽出物と似たクロマトグラムが得られ, agatharesinol, hinokiresinol, sequirin-C 及び未同定成分Ⅱを含んでいた (Fig. 10)。sequirin-C は *in vitro* で強い NBT 還元活性を示した。hinokiresinol や agatharesinol も NBT を還元したが, その活性は sequirin-C より弱かった。メタノール抽出物中の n-ヘキサン可溶性成分の活性は hinokiresinol や agatharesinol よりさらに弱かった。油滴状物質は NBT で検出し得ることが分かり, さらに, この NBT 還元活性は油滴状物質中のノルリグナン類, 特に sequirin-C によることが示された。sequirin-C は他のノルリグナン類とともに生成することから,

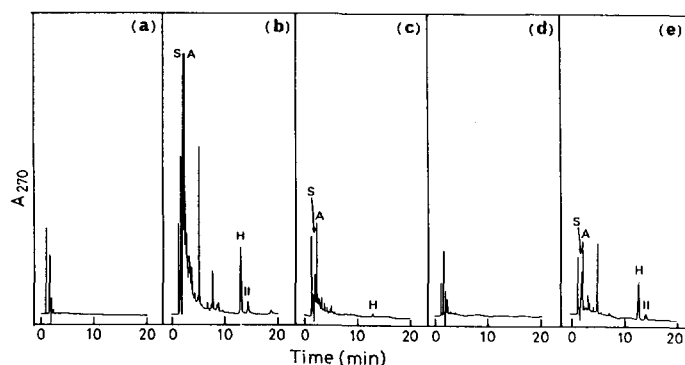


Fig. 10 スギカミキリ食害木の抽出物の高速液体クロマトグラム

HPLC analysis of extract (100 μ g dry weight equivalent) from the wood of sugi attacked by the sugi bark borer

(a) 健全辺材 Sound sapwood; (b) 移行帯内層 Inner transition zone; (c) 反応帯 Reaction zone; (d) 変色辺材 Discolored sapwood; (e) 移行帯内層の油滴状物質 Oil droplet-like deposits in inner transition zone

三重県林業技術センターの試料

Samples from Mie Prefectural Forestry Research Center

S: sequirin-C, A: agatharesinol, H: hinokiresinol, II: 未同定物質 II unidentified compound II

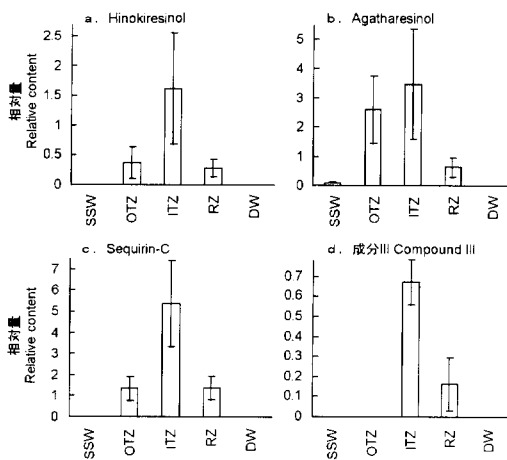


Fig. 11 スギカミキリ被害木のノルリグナン類及び成分Ⅲ含量

Norlignans and unidentified compound III content in the wood of sugi attacked by the sugi bark borer

SSW : 健全辺材 Sound sapwood,

OTZ : 移行帯外層 Outer transition zone,

ITZ : 移行帯内層 Inner transition zone,

RZ : 反応帯 Reaction zone,

DW : 変色辺材 Discolored sapwood

森林総合研究所千代田試験地の試料

Samples from Chiyoda Experiment Station, Forestry and Forest Products Research Institute

相対量は mg 1-naphthol 相当 /g 材乾重の平均 ± 標準偏差で表す。

Means ± standard deviations of mg 1-naphthol equivalent/g wood dry weight are presented as relative contents.

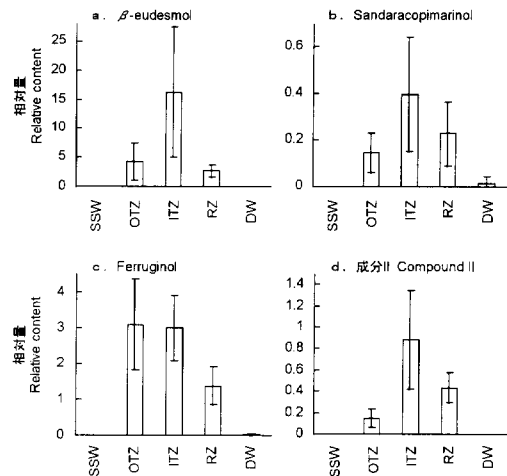


Fig. 12 スギカミキリ被害木のテルペン類及び成分Ⅱ含量

Terpenes and unidentified compound II content in the wood of sugi attacked by the sugi bark borer

SSW : 健全辺材 Sound sapwood,

OTZ : 移行帯外層 Outer transition zone,

ITZ : 移行帯内層 Inner transition zone,

RZ : 反応帯 Reaction zone,

DW : 変色辺材 Discolored sapwood

森林総合研究所千代田試験地の試料

Samples from Chiyoda Experiment Station, Forestry and Forest Products Research Institute

相対量は mg 1-naphthol 相当 /g 材乾重の平均 ± 標準偏差で表す。

Means ± standard deviations of mg 1-naphthol equivalent/g wood dry weight are presented as relative contents.

NBT 染色は切片中のノルリグナン類を検出するのに役立つと考えられる。

(7) ノルリグナン類及びテルペン類の抗菌性

数種類の抗菌性物質が移行帯及び反応帯から検出された。その中の, hinokiresinol, 未同定成分 I, II の *C. herbarum* 及びスギの材変色部から分離された *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. cryptomeriae* に対する TLC 上での検定結果を Table 7, 8 に示す。健全辺材, 変色辺材の抽出物では TLC プレート上に阻止斑は形成されなかった。この他, 未同定成分 III も抗菌性を示した。HPLC で精製した hinokiresinol, 未同定成分 II 及び hinokiresinol 標品 (hinokiresinol は 20 µg で明瞭な阻止斑を形成した) は *C. herbarum* に対して抗菌性を示した。テルペン類と推定される未同定成分 I は分析に用いた HPLC の条件では分離されなかった。しかし, agatharesinol と sequirin-C はテストした菌に対しては

Table 7. スギカミキリ食害に伴うスギの材変色部からの主要な抽出物の抗菌性と 2, 3 の性質
Antifungal activity and characteristics of major extractives from the wood of sugi attacked by the sugi bark borer

成分 Compound	抗 菌 性 Relative antifungal activity				TLC での R _F 値 R _F values		硫酸-バニリン 試薬による呈色 Color reactions with vanillin-H ₂ SO ₄ reagent
	SSW ^{a)}	ITZ	RZ	DW	(i) ^{b)}	(ii)	
I	— ^{c)}	++	—	—	0.97	0.98	紫 purple
II	—	++	—	—	0.81	0.84	紫 purple
Hinokiresinol	—	+++	—	—	0.70	0.77	青 blue
Agatharesinol	—	—	—	—	0.43	0.18	赤 red
Squirin-C	—	—	—	—	0.32	0.10	紫 purple

^{a)} SSW : 健全辺材, ITZ : 移行帯内層, RZ : 反応帯, DW : 変色辺材

SSW : Sound sapwood, ITZ : Inner transition zone, RZ : Reaction zone, DW : Discolored sapwood

^{b)} TLC の展開液は (i) クロロフォルム-メタノール-水 (80 : 20 : 2, v/v/v) 及び (ii) ジエチルエーテル
TLC solvent systems : (i) chloroform-methanol-water (80 : 20 : 2, v/v/v) ; (ii) diethylether

^{c)} *Cladosporium herbarum* OCh-1 に対する TLC 上での阻止斑の大きさで判定

Assessed on inhibition zone size on TLC plates against *Cladosporium herbarum* OCh-1 ; —, no inhibition ; +, ++, +++, increasingly large areas of inhibition

Table 8. スギカミキリ食害木から分離された菌に対する移行帯内層抽出物の抗菌性
Relative inhibitory activity of extractives from inner transition zone of sugi against fungi isolated from discolored sapwood

成分 Compound	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Guignardia cryptomeriae</i>
I	+++ ^{a)}	+++	++
II	+	+	+
Hinokiresinol	+++	+++	+++
Agatharesinol	±	±	—
Squirin-C	±	±	—

^{a)} TLC 上での阻止斑の大きさで判定

Assessed on inhibition zone size on TLC plates ; —, no inhibition ; ±, +, ++, +++, increasingly large areas of inhibition

阻害効果がなかった。また、未同定成分 I には抗菌性を持つ物質が複数種類含まれていた。ferruginol 標品 (1 mg までテストした) はテストした菌に対してほとんどあるいは全く抗菌性がみられず、他のテルペン類の多くにも抗菌性は認められなかった。これらの結果から、スギの材変色部に集積するノルリグナン類やテルペン類の内いくつかは抗菌性を持つが、他のものはほとんど抗菌性を持たず、ノルリグナン類やテルペン類の間で抗菌性に大きな差異があることが分かった。

(8) 抗菌性物質の宿主細胞に対する作用

健全辺材からの粗抽出物は、スギの師部の細胞核の DAPI 染色性に影響を与えなかった (Fig. 13a)。

しかし、移行帯内層からの粗抽出物は DAPI 染色性を失わせ、細胞を壊死させる影響を示した (Fig. 13 b)。その影響は濃度が高くなるに従って大きくなった。hinokiresinol 処理も DAPI 染色性を失わせることが多かったが、その影響は移行帯抽出物処理より小さかった (Fig. 13 c)。hinokiresinol 処理で宿主細胞に対する影響が小さかったのはこの物質が水に対し極めて溶解性が低いことに起因すると思われる。これらの結果は移行帯抽出物の宿主細胞毒性が抽出物中の hinokiresinol 及び他の物質の協働作用によることを示唆している。

3.4 考 察

(1) 材変色部の特性

スギ生立木において材変色はさまざまな要因により生じる。こうした材変色には以下のような菌類が関係している。

物理的傷害による材変色部からは、*Macrophoma*, *Cryptosporiopsis*, *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* 属菌等が分離される (Table 13 参照)。こうした菌は共生菌のように特定の昆虫と特異的な関係をもたない非特異的な菌と考えられる。

スギカミキリの食害に起因する材変色部 (Photo 1) からは *Macrophoma*, *Fusarium*, *Cryptosporiopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phialophora* 属の菌が主に分離される (清原ほか, 1985; 小林ほか, 1986; YAMADA *et al.*, 1987; 小林, 1989)。スギノアカネトラカミキリ加害材からは *Fusarium solani*, *Pestalotiopsis*, *Cryptosporiopsis*, *Phialophora* 属菌が (横沢・金子, 1986; 小林, 1989), スギザイノタマバエ加害材からは黒色菌, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Cryptosporiopsis* 属菌が主に分離される (小林, 1989)。こうした昆虫による加害の場合、関連する菌の種類は傷害による変色の場合と類似していること

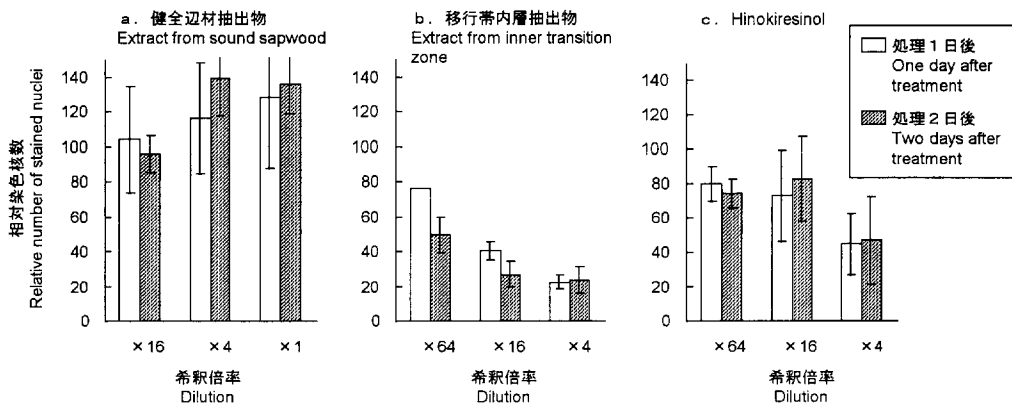


Fig. 13 スギ材からの抽出物のスギ師部細胞に対する影響

Effect of extracts from sugi wood on sugi phloem cells

相対染色核数は無抽出物対照を 100 とし、平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations of relative value to the number of DAPI-stained nuclei in control tissue treated with water are presented. The number of nuclei in control tissue was considered to be 100.

から、これらの菌は非特異的な菌と考えられる。

ニホンキバチの場合は共生菌として *Amylostereum* 属菌を持ち、産卵時に菌が侵入し材変色を引き起こすとされている。本菌の接種によってニホンキバチの加害の場合と同様な材変色が形成される（讃井, 1986a; 山田・奥田, 1987）（Photo 6a）。

哺乳動物の加害による材変色の場合も非特異的な菌が関与していると考えられ、例えばニホンツキノワグマによる剥皮に伴う材変色部からは、*Phialophora*, *Fusarium* 属菌が優占的に検出される（山田文雄ほか, 1992）。

また、材変色は胴枯・枝枯性病害に伴っても発生する。暗色枝枯病によって樹幹の形成層が壊死した場合、菌は内樹皮組織、形成層より材に侵入し、材の変色を引き起こす（Photo 6b）。この材変色部には病原菌の *G. cryptomeriae* が定着している（讃井, 1986b; 讃井・橋本, 1987; 讃井・服部, 1987; 小林ほか, 1988; 高宮, 1991）。赤枯病の胴枯型病斑（伊藤ほか, 1974）や溝腐病（清原・徳重, 1967）における内樹皮の壊死部下の材変色部（Photo 6c）にも病原菌 *Cercospora sequoiae* が定着している。このように胴枯・枝枯性病害によって形成層が壊死した場合、材内にもその病原菌が侵入、定着することは一般的なことと思われる。

本研究においてもこれまでの研究と同様、スギカミキリ加害木の材変色部からは、非特異的と考えられる多くの種類の菌が分離された。これらの菌はスギカミキリの食害に伴う傷から材内に侵入・定着したと考えられる。千代田試験地からの採取木の菌分離試験結果（Table 7）で、本研究での他の分離試験結果と異なり、*G. cryptomeriae* が検出されなかったことは、本菌がスギカミキリの食害による材変色にとって非特異的な菌であり、食害による傷の周囲に存在していなかったことを示唆している。

材の変色・腐朽部は心材と同様死んだ組織であり、その特性は心材と類似する点が多く、さまざまな点で健全辺材とは異なっている。まず、材変色部は一般に通水がなく（MATHRE, 1964b）、このことが材変色部における含水率の低下を招いたと思われる。広葉樹の変色・腐朽部では含水率が上昇することが多く（GOOD *et al.*, 1955; HART, 1965; SHIGO and SHARON, 1968, 1970; SKUTT *et al.*, 1972; TATTAR *et al.*, 1972）、針葉樹でも腐朽部では含水率が高いことが多い（TATTAR *et al.*, 1972; JOHANSSON and THEANDER, 1974; POPOFF *et al.*, 1975）。しかし、材変色部における含水率の低下は針葉樹では一般的である（CAIRD, 1935; COUTTS and DOLEZAL, 1965; SHAIN, 1971; COUTTS, 1976; SHORTLE and OSTROFSKY, 1983）。

生立木の材変色・腐朽部において K, Ca, Mg, Mn 等のカチオン（ミネラル）が集積することが知られている（JOHANSSON and THEANDER, 1974; HART, 1968; SAFFORD *et al.*, 1974）。電気抵抗値を測定することで材の変色・腐朽を検知することができ、また、この電気抵抗値の低下はカチオンの集積によるものとされている（SKUTT *et al.*, 1972; TATTAR *et al.*, 1972; TATTAR and SAUFLEY, 1973）。すなわち、材の電気伝導度はイオンの数と易動度に比例し（LIN, 1965）、繊維飽和点以上の含水率の材では含水率によらず主に K, Ca イオンの濃度に関係するとされる（TATTAR *et al.*, 1972）。

調べたカチオンの中で K, Mg 濃度が顕著に増大したが、材変色・腐朽部でのカチオン種間での集積パターンの相違は SAFFORD *et al.* (1974) によっても報告されている。彼らは Ca と Mn の集積機構が

K のそれとは異なっていると推測した。K 濃度と Mg 濃度との高い相関はこの両者の集積過程が類似していることを示唆する。

心材の電気抵抗値が健全辺材より低いことは心材における K, Mg 濃度が高いことと符合する。正常な心材ではカチオンの集積も起こらず、電気抵抗値も低下しないと報告されているが (HART, 1968; SHAIN, 1971; TATTAR *et al.*, 1972; SHORTLE and OSTROFSKY, 1983), SHORTLE and OSTROFSKY (1983) は *Abies balsamea* (balsam fir) の wet heartwood でカチオンの集積を認めた。本実験に用いたスギの心材は黒心であり、wet heartwood に相当すると思われる。

材変色部の pH の上昇はミネラルの集積に直接起因すると考えられている (GOOD *et al.*, 1955)。従って、スギの反応帯、変色辺材、心材の高い pH はカチオンの集積によって説明できる。材のどの部位でも新鮮材より乾燥後再度水に浸漬した場合の方が pH が低くなったことは、揮発性成分も pH にかかわっていることを示唆する。カチオン濃度は反応帯と変色辺材とで差異がみられなかったにもかかわらず、反応帯の pH が変色辺材より高かったこと、反応帯では新鮮材と一旦乾燥した場合とで大きな pH の差があったことから、反応帯の高 pH はおそらく揮発性成分によるところが大きいと思われる。

変色辺材及び心材における CEC の増大は、不溶性の成分中にカチオンの吸着に使われる負電荷が増加することを示している。従って、CEC の増大はカチオン集積にとって重要と思われる。しかし、材変色や心材形成過程における可溶性カチオン濃度の増大は CEC 増大より大きく、CEC の増大はカチオン濃度増大全体を説明することはできず、カチオン集積には他の要因もかかわっていると考えられる。

他の要因として、材変色部、特に反応帯における無機炭酸塩の集積がいくつかの樹種で知られている (SCHEFFER, 1939; SHAIN, 1971; JOHANSSON and THEANDER, 1974)。スギの材変色部、特に反応帯における炭酸塩の集積が示されたことから、スギの材変色部においてもカチオンは部分的に可溶性の炭酸塩の形で存在することが考えられる。この傍証として、スギの黒心において炭酸塩 (炭酸水素カリウム) の集積が報告された (阿部・小田, 1994)。他の樹種でも材変色部におけるカチオンの集積の原因として無機炭酸塩の集積が考えられている (SCHEFFER, 1939; SHAIN, 1971; JOHANSSON and THEANDER, 1974)。さらにアニオンとしての有機酸の顕著な集積も報告されており (SHEVENELL and SHORTLE, 1986)、これもカチオンの集積にかかわると考えられる。

また、カチオン濃度が菌相によってではなく、材変色の進展に関連していることを示唆する結果が得られた。従って、カチオン濃度と CEC はスギ生立木の材変色の進展の指標として有用であると考えられる。

(2) 材変色部における反応

青変菌による材変色の場合等一部の例を除いて、材変色部は一般に赤、黒褐色になることが多い。この着色には心材フェノール成分の酸化物の関与が大きいと考えられている。このことから材変色部、特に反応帯の高い pH もこの変色を促進していると考えられる。スギでは心材色の場合と同様、sequirin-C を始めとするノルリグナン類がこの材変色部の色に主に関与している (TAKAHASHI, 1981; TAKAHASHI *et al.*, 1983)。従って、材変色部の着色は一般に柔細胞の壊死の過程に起因するものと考えられ、すでに柔組織が死んでいる丸太に菌を接種しても材変色は生じない (周藤, 1994)。

スギの健全辺材にはほとんどみられないノルリグナン類は心材形成や材変色の過程で生成し、老化、傷害、感染によって生成が誘導されるストレス化合物と考えられる (TAKAHASHI, 1981; TAKAHASHI *et al.*, 1983; NOBUCHI *et al.*, 1985; 高橋・荻山, 1985 a, 1985 b, 1986)。hinokiresinol や未同定成分Ⅱ、Ⅲの抗菌性はこれらの物質がファイトアレキシンとして働くことを示唆している。また、未同定成分Ⅰの抗菌性はテルペン類の一部もファイトアレキシンとして働くことを示唆しており、hinokiresinol, 未同定成分Ⅰ、Ⅱ、Ⅲは菌の材変色部への閉じこめに寄与していると考えられる。なお、TLC 板上の阻止斑の大きさから、hinokiresinol 単独でも移行帯内層で菌を閉じこめるのに十分な濃度であると判断される。また、これらの物質は、抽出されたのと同じ材変色部から分離された主要な菌に対しても抗菌性を示したことから、実際にスギカミキリの被害による菌の進展や材変色の拡大を阻止するのに役立っていると判断される。

ゲルペンフェノール類である ferruginol は今回テストした菌に対しては全く阻害効果がなかったが、ferruginol は *Lentinus edodes* 及び *L. lepideus* の菌糸成長に対し阻害効果があることが報告されている (RUDMAN, 1965; 中島ほか, 1980)。菌の種類によってはノルリグナン類と同様、ferruginol も菌の進展の阻害に関与している可能性があろう。

さまざまな原因による形成層の壊死により、材内に菌が侵入して材変色が形成される場合、材の変色は形成層の壊死部分と生きている部分との境界から始まる (Photo 1, 6)。変色の形態は横断面で見ると扇型となることが多いが、辺材の内方にくにつれて半径に沿った線より広がる。また、径断面でも辺材の外層部より内側の方が材変色の範囲が広い。辺材の外層より内層で変色が広がる原因としては辺材外層部の組織の方が若く、防御反応が強力なためと推測される。この考えはスギ辺材外層で抗菌性物質 hinokiresinol を生成する能力が高く、この物質は心材中にはみられないこと (高橋・荻山, 1985 a, 1985 b, 1986) から支持される。こうした辺材の反応帯と心材のフェノール物質間の比率の差異は、マツ類における pinosylvin monomethylether : pinosylvin 比にもみられる (SHAIN, 1967; HILLIS and INOUE, 1968)。pinosylvin は pinosylvin monomethylether よりも *H. annosum* に対する毒性が強く、反応帯における低い pinosylvin monomethylether : pinosylvin 比は防御機構にとって重要であるとされる (SHAIN, 1967)。

NAD diaphorase 活性の存在から判断して、スギではノルリグナン類が集積している移行帯内層の柔細胞は一部を除いて生存していると考えられる。*Acer saccharinum* の orange reaction zone と同様、このスギの移行帯内層は反応帯の元々の概念とは一致しない (SHAIN, 1967, 1971; PEARCE and WOODWARD, 1986)。スギのこのノルリグナン類に富む組織は反応帯よりむしろ SHAIN の概念による移行帯に似ている。しかしながら、*A. saccharinum* の orange reaction zone (PEARCE and WOODWARD, 1986) とは異なり、スギでは移行帯内層への菌の侵入はほとんど観察されない。このことはスギの反応帯が菌の侵入を充分阻害する効果をもつことを示している。移行帯内層における連続した障壁に加え反応帯にも抗菌性物質が相当量残存していることは、菌の進展が反応帯内で抑えられている場合が多いという解剖観察を説明し得る。

病原の感染に対し植物が生産する抗菌性物質であるファイトアレキシンは一般に宿主細胞にも毒性を

持っており、過敏反応における細胞死の原因の一つと考えられている (SHIRAISHI *et al.*, 1975; SKIPP *et al.*, 1977; GLAZENER and VANETTEN, 1978; ISHIGURI *et al.*, 1978)。しかし、hinokiresinol や移行帯内層抽出物がスギの柔細胞に対し毒性を持っているにもかかわらず移行帯内層の柔細胞の多くが生きていることは、移行帯内層の柔細胞が自ら生産したこれらの物質に耐性を持つことを示している。

スギにおいて抗菌性物質を含む油滴状物質が菌糸の通路となる仮道管や壁孔を閉塞し、空間的に連続した障壁を形成していたことは、こうした物質がスギで菌の拡大を阻止していることを示唆する。樹脂の詰まった仮道管が *Pinus resinosa* で見い出されている (TIPPETT and SHIGO, 1980)。また、*Acer saccharum* では材変色部に関連した道管要素が顆粒状あるいはラッカー状の物質で詰まっている (SHARON, 1973)。さらに、*Tsuga heterophylla* の心材でリグナン類を含む沈着物が仮道管を閉塞しているのが観察されている (KRAHMER *et al.*, 1970)。これらの観察から、ここで述べたスギの場合と類似した防御機構が他の樹種でも働いている可能性が考えられる。

4 材変色及び菌の進展と動的防御機構の評価

4.1 はじめに

ここまででスギ生立木の辺材では菌の侵入に対し動的な防御機構が働くことが示唆された。そこで次に、動的防御機構の評価を行うため防御反応を抑制した状態で菌を接種し、その後の菌の進展及び宿主の反応について検討した。

接種菌として暗色枝枯病菌 (*Guignardia cryptomeriae*) を用いた。この菌はスギカミキリの食害に伴って材内に侵入する代表的な菌の一つであり、また、材変色を起因するスギの胴枯・枝枯性病害を起こす菌のなかで最も重要なものの一つである。暗色枝枯病菌はストレス下で侵入し胴枯・枝枯症状及び材変色を引き起こすと考えられている (小林, 1957)。強度のストレス下では枯損被害が発生するが、胴枯性病斑形成の痕跡なしに枯損に至る例が観察されたことから、こうした状況での菌の進展は極めて急速であると考えられる (山田・伊藤, 1992)。そのためスギの防御反応を抑制した状態で菌を接種した場合には、菌や病斑、材変色の進展速度が大きくなることが予想され、生立木と比較することで動的防御機構の評価が可能となる。

動的防御反応を抑制する方法としては通常は熱処理や種々の化学物質が用いられるが、樹木しかも材の場合はこうした処理の効果が材内へ浸透し難いという問題がある。そこで動的防御反応を抑制するため生立木を伐倒し伐倒直後の新鮮な丸太を用いる方法、丸太を冷凍処理あるいは高圧滅菌することで動的な反応を完全に停止させる方法を用いた。そして、接種菌として *G. cryptomeriae* の強病原力菌株、弱病原力菌株を用い、それぞれの処理の間で材変色や菌の進展、組織学的変化について比較し、さらに新鮮丸太と生立木との間で菌の進展速度を比較することによって、動的防御機構の評価を試みた。また、材変色の形状の決定に動的防御反応がかかわっているかどうかを明らかにするために、丸太や生立木での菌の進展範囲の形状比を比較した。

4.2 材料と方法

まず、丸太や生立木材内での菌の進展と比較するために、4.2.1 では PDA 培地上での菌の進展速度を

調べた。次に、各種処理間での比較のために、4.2.2 では高圧滅菌あるいは冷凍処理した丸太に菌を接種した場合の、4.2.3 では新鮮丸太に菌を接種した場合の菌や病斑、材変色の進展及び含水率や成分の変化を調べた。4.2.3 では新鮮丸太における組織学的変化も調べた。用いた菌株を Table 9 に示す。各菌株のスギに対する病原力は山田利博ほか（1992）に示されている。新鮮丸太に対する秋接種及び高圧滅菌丸太に対する接種では、供試菌株として *G. cryptomeriae* のスギに対する強病原力菌株 MA 18 及び弱病原力菌株 MA 19 を用いた。PDA 培地上での菌の成長速度の測定、新鮮丸太に対する春接種及び冷凍処理丸太に対する接種では、強病原力菌株 3 菌株（MA 7, 10, 18）及び弱病原力菌株 4 菌株（MA 3, 8, 19, 21）を用いた。比較のための生立木のデータは、森林総合研究所関西支所実験林に植栽された 8～9 年生実生スギに 9～10 月に MA 18, MA 19 を接種して得た。

4.2.1 PDA 培地上での菌の成長速度

供試菌を PDA 培地上、25℃、暗黒下で前培養し、径 4 mm のコルクボーラで菌糸伸長先端部の菌叢を打ち抜き、ペトリ皿上の PDA 培地に置いた。MA 18, 19 を 10～30℃ まで 5℃ ごとに 5 段階、暗黒下で培養した。各温度 4 回繰り返して、菌糸がペトリ皿全体に蔓延するまで毎日測定した。また、日周の温度変化の影響をみるため、1990、1991 年の 9 月下旬～10 月上旬の日周温度変化に合わせ日平均温度は

Table 9. 接種試験に用いた *Guignardia cryptomeriae* 菌株
Guignardia cryptomeriae isolates used for the inoculation

菌株 Isolate	樹種 Tree species	分離部位 Portion of isolation	場所 Locality	分離年月 Date of isolation
強病原力菌株 Virulent isolate				
MA 7	スギ sugi	スギ枯死枝材部 Wood of dead branch	森林総合研究所 FFPRI ^{a)} , Ibaraki pref.	1987 年 9 月 Sep., 1978
MA 10	ヒノキ hinoki	ウサギによる変色材部 Discolored wood caused by hare	京都府宇治田原町 Ujitawara town, Kyoto pref.	1988 年 5 月 May, 1988
MA 18	スギ sugi	暗色枝枯病患部 Guignardia dieback lesion	森林総合研究所関西支所 Kansai Res. Ctr., FFPRI, Kyoto pref.	1985 年 12 月 Dec., 1985
弱病原力菌株 Avirulent isolate				
MA 3	スギ sugi	傷による変色材部 Discolored wood caused by wounding	森林総合研究所 FFPRI, Ibaraki pref.	1987 年 8 月 Aug., 1987
MA 8	ヒノキ hinoki	漏脂症患部内樹皮 Resinous lesion inner bark	関東林木育種場 NFTBC ^{b)} , Ibaraki pref.	1987 年 5 月 May, 1987
MA 19	スギ sugi	暗色枝枯病患部 Guignardia dieback lesion	滋賀県今津町 Imazu town, Shiga pref.	1985 年 11 月 Nov., 1985
MA 21	ヒノキ hinoki	暗色枝枯病患部 Guignardia dieback lesion	愛媛県宇和島市 Uwajima city, Ehime pref.	1983 年 10 月 Oct., 1983

^{a)} FFPRI, Forestry and Forest Products Research Institute

^{b)} NFTBC, National Forest Tree Breeding Center

18.7℃として、人工気象器内、暗黒下で培養した。6回繰り返して、1, 2, 3日後に菌叢直径を測定した。他の菌株の成長速度は25℃, 暗黒下で培養して測定した。各菌株をそれぞれ5枚のPDA平板培地上に移植し、1, 2, 3日後の菌叢の直径を測定した。

4.2.2 高圧滅菌丸太及び冷凍処理丸太での菌の進展

(1) 高圧滅菌丸太

森林総合研究所関西支所実験林の9年生実生スギの幹から樹皮のついた丸太(長さ約13cm, 直径7~8cm)を9月に採取し、接種のための穴をあけた。試料は高さ約15cmの腰高シャーレ内に入れ、高圧滅菌を1時間行った後、菌を接種した。接種菌は長さ約1cmの爪楊枝を置いたPDA培地上、25℃で培養し、菌糸が充分蔓延した爪楊枝を接種源として、穴に差し込んだ。接種後、25℃で培養し、1, 2, 4, 6日後に各回2本ずつ試料を採取し、冷凍保存した。スライディングマイクロームで厚さ約20~25μmの切片を作成、aniline blueで染色した後、顕微鏡観察を行い最も外側の年輪の範囲で菌の進展を調べた。予備実験では本法の結果は分離試験による菌の進展範囲の推定結果とほぼ一致した。

(2) 冷凍処理丸太

森林総合研究所構内に植栽された15年生実生スギの幹から樹皮のついた丸太(長さ約40cm, 直径3~7cm)を5月に採取した。試料は-25℃で10日間冷凍した。25℃で1日解凍した後、菌を接種した。接種法は高圧滅菌丸太の場合と同様である。接種後25℃で培養し、接種の1, 3日後に各回2本ずつ試料を採取し、冷凍保存した。スライディングマイクロームで厚さ約20~25μmの切片を作成、aniline blueで染色して顕微鏡観察を行った。春接種丸太では、早材が形成中であったので外側の2年輪の範囲で観察や測定を行った。

また、冷凍処理丸太の含水率の測定と抽出物の分析を行った。森林総合研究所千代田試験地に植栽された17年生実生スギの幹から5月に採取した樹皮つき丸太(長さ約17cm, 直径約10cm)に上記の方法で冷凍処理を施し、MA18, MA19を接種した。接種法は高圧滅菌丸太の場合と同様である。接種の3, 6, 9日後に各回2本ずつ試料を採取し、含水率の測定を行った。また、メタノール抽出物含量を求めるとともに抽出物をGCで分析した。方法は3.2.2(5)と同様である。

4.2.3 新鮮丸太での材変色と菌の進展

(1) 秋接種新鮮丸太

森林総合研究所関西支所実験林の9年生実生スギの幹から樹皮のついた丸太(長さ約50cm, 直径6~7cm)を9月に採取し、両端をパラフィルムで封じ、接種のための穴をあけた。そして、直ちに菌を接種した。接種源は高圧滅菌丸太の場合と同様である。接種後、25℃で培養し、3日, 1週間, 2週間及び1か月後に各回2本ずつ試料を採取し、冷凍保存した。丸太は解体して樹皮の病斑、材変色の範囲を測定した。材の変色は材の中心に向かうほど大きくなるが、防御機構との関連を検討するため最も外側の年輪の範囲で測定や以下の観察、分析を行った。さらに、スライディングマイクロームで厚さ約20~25μmの切片を作成、aniline blue, Nile blue, NBTで染色、あるいはNAD diaphorase 活性染色を行った後、顕微鏡観察を行った。また、秋接種新鮮丸太の各部位それぞれ2か所の試料の含水率を測定し、メタノール抽出物含量を求めるとともに抽出物をGCで分析した。方法は3.2.2(5)と同様である。

(2) 春接種新鮮丸太

森林総合研究所構内に植栽された 15 年生実生スギから得た丸太（長さ約 40 cm，直径 4～7 cm）に 5 月に接種を行った。接種法は秋接種新鮮丸太の場合と同様である。接種の 3，7，14 日後に各回 2 本ずつ試料を採取し，冷凍保存した。切片を作成し，aniline blue で染色して光顕観察した。また，光顕観察で見い出された菌が *G. cryptomeriae* であるかどうかを確認するため，材内で接種菌が進展したと推測される部位から菌の分離を試みた。菌の分離は材片をアンチホルミン 5 倍液で表面殺菌したのち PDA 培地上に置き，25℃ で培養することで行った。

4.3 結果

4.3.1 PDA 培地上での菌の成長速度

供試した *G. cryptomeriae* の菌株は PDA 培地上では 1 日に 10～18 mm の速度で成長した (Fig. 14)。これら菌株の病原力の強さと PDA 培地上での成長速度との間には関連は認められない (山田利博ほか，1992)。このことは，*G. cryptomeriae* の病原力は阻害要因がない場合の菌の成長速度とは関係せず，宿主との相互関係で決まることを示唆する。

MA 18 と MA 19 の温度別成長速度は 30℃ の場合を除いて同じような傾向を示した。10～25℃ の範囲では温度の変化とともにほぼ直線的に成長速度が大きくなり，両菌株の間で差異はみられなかった (Fig. 15)。日周温度変化に合わせた培養での成長速度は MA 18 で 26.5 mm/日，MA 19 で 27.2 mm/日で，それぞれ日周の平均温度 18.7℃ での推定成長速度とほぼ一致した。このことから両菌の菌糸伸長は積算温度に比例すると考えられる。

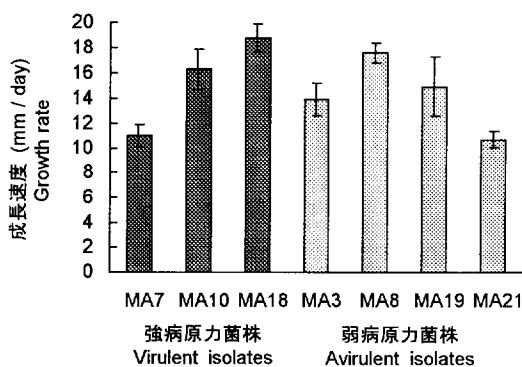


Fig. 14 PDA 培地上での *Guignardia cryptomeriae* の成長速度

Hyphal growth rate of *Guignardia cryptomeriae* isolates on PDA

平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations are presented.

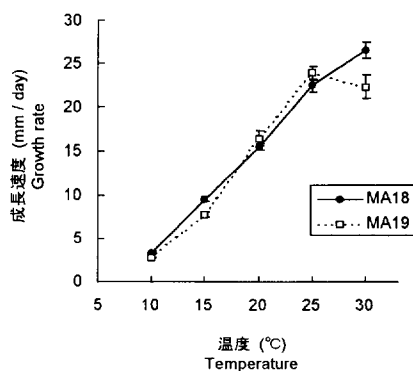


Fig. 15 PDA 培地上での *Guignardia cryptomeriae* の温度別成長速度

Hyphal growth rate of *Guignardia cryptomeriae* isolates at different temperature

平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations are presented.

4.3.2 高圧滅菌丸太及び冷凍処理丸太での菌の進展

(1) 高圧滅菌丸太

高圧滅菌丸太では樹皮の病斑、材変色は生じなかった。高圧滅菌丸太での軸方向の菌の進展速度は、PDA 培地上の場合よりやや遅い程度であった (Fig. 16)。MA 18 と MA 19 とを比較すると、軸方向、接線方向とも材内の進展速度に差異はみられなかった (Fig. 16)。

(2) 冷凍処理丸太

冷凍処理丸太では樹皮の病斑及び材の変色部は形成されなかった。また、軸方向、接線方向とも菌の病原力の違いによって材内の菌の進展速度に差異はみられず、いずれの菌株とも進展は急速であった (Fig. 17)。PDA 培地上での成長と比較したところ、冷凍処理丸太内と PDA 培地上での進展速度はいずれの菌株とも同じ程度であった (Fig. 16, 18)。冷凍処理丸太での菌の進展速度を高圧滅菌丸太と比べても差異はみられなかった (Fig. 16)。

冷凍処理丸太では接種菌が進展していると推測された部位からは *G. cryptomeriae* が優占的に分離された。このことから、菌の進展範囲を測定するための解剖観察で認められた菌糸は *G. cryptomeriae* と判断された。

(3) 冷凍処理丸太の含水率と抽出物

観察期間中、菌定着部及び菌定着部と健全部との境界部の含水率は健全部と比べ差異がなかった (Fig. 19a)。

また、菌定着部と健全部との境界部のメタノール抽出物含量も健全部と比べほとんど差異がなかった (Fig. 19b)。菌定着部の抽出物含量は健全部よりやや低い傾向を示した。生立木の材変色部で増加が認められた各抽出成分のいずれも菌接種冷凍処理丸太では増加が認められなかった。

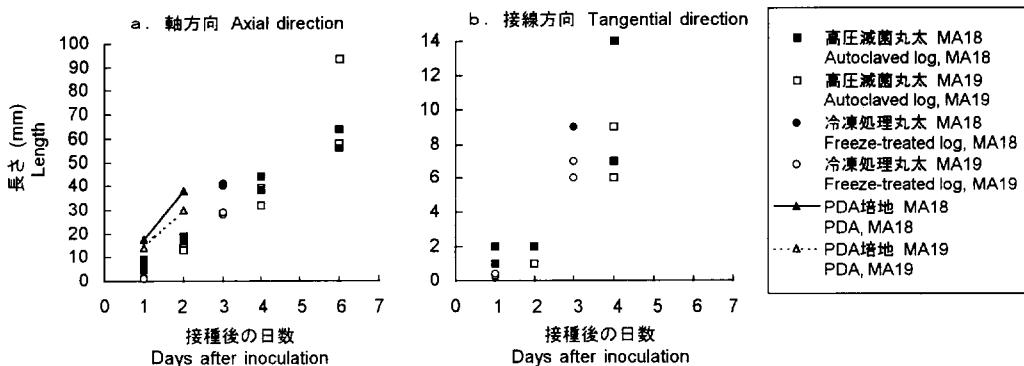


Fig. 16 PDA 培地上と高圧滅菌丸太、冷凍処理丸太での *Guignardia cryptomeriae* の進展

Spread of *Guignardia cryptomeriae* isolates on PDA, in the wood of autoclaved log and freeze-treated log

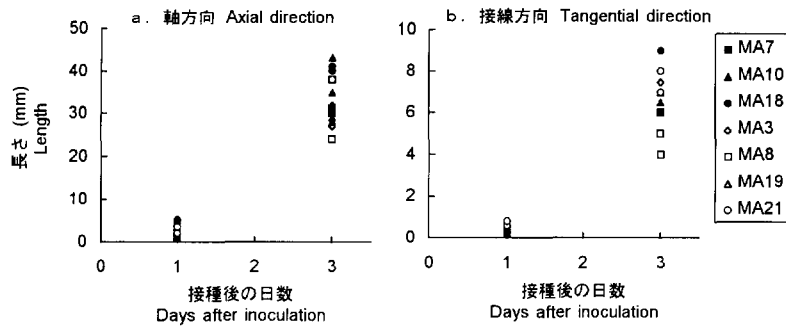
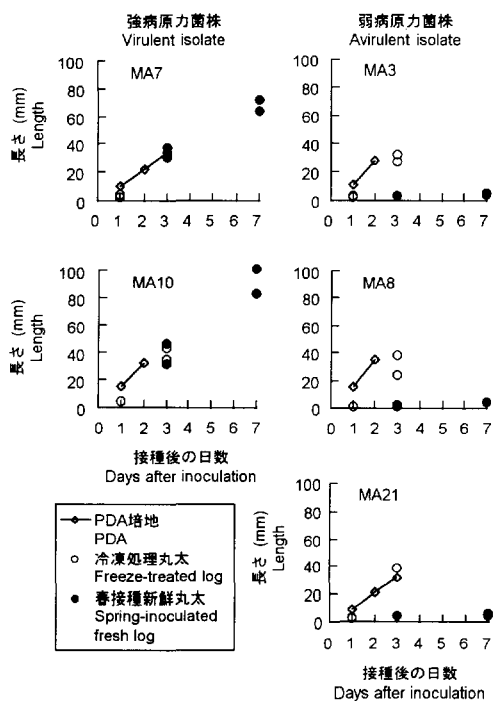
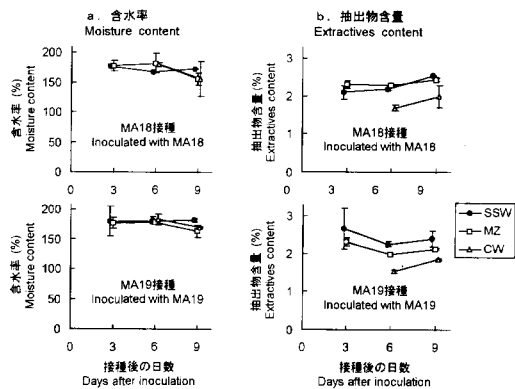
Fig. 17 冷凍処理丸太での *Guignardia cryptomeriae* の進展Spread of *Guignardia cryptomeriae* isolates in the wood of freeze-treated logFig. 18 PDA 培地上と冷凍処理丸太, 春接種新鮮丸太での軸方向の *Guignardia cryptomeriae* 強病原力 (左) 及び弱病原力 (右) 菌株の進展Axial spread of virulent (left) and avirulent (right) isolates of *Guignardia cryptomeriae* on PDA, in the wood of freeze-treated log and spring-inoculated fresh log

Fig. 19 冷凍処理丸太の含水率 (a, 左) 及びメタノール抽出物含量 (b, 右)

Moisture content (a, left) and methanol extractives content (b, right) of freeze-treated log SSW: 健全辺材 Sound sapwood, MZ: 境界部 Marginal zone, CW: Colonized wood 平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations are presented.

4.3.3 新鮮丸太での材変色と菌の進展

(1) 秋接種新鮮丸太

新鮮丸太に秋に菌を接種すると内樹皮に病斑が形成され、反応帯、移行帯は明瞭ではないものの材変色が生じた。病斑や材変色部の着色は宿主の反応によると考えられることから、新鮮丸太では菌の侵入に対し弱いものの確かに防御反応を起こしていることが明らかとなった。

病斑の進展は MA 18 接種では軸方向、接線方向とも接種後 2 週間で停止した (Fig. 20)。MA 19 接種では進展範囲が小さく、進展の停止時期を特定することはできなかった。材変色は MA 18 接種では進展が止まることなく拡大が続けたが、MA 19 接種では進展範囲が小さく停止時期を特定できなかった (Fig. 20)。変色辺材の大きさは病斑の進展が停止するまでは軸方向、接線方向ともほぼ病斑の大きさと一致した。病斑の進展が停止したのに対し、材変色の進展が停止しなかったのは、新鮮丸太における樹皮と材の防御反応の強度の違いによる可能性が考えられる。

秋接種新鮮丸太では、菌の進展範囲は変色辺材の範囲とほぼ一致し、反応帯、移行帯内層を含む材変色部の範囲より小さかった (Fig. 20, 21)。そして、菌の進展速度は高圧滅菌丸太の場合に比べ明らかに

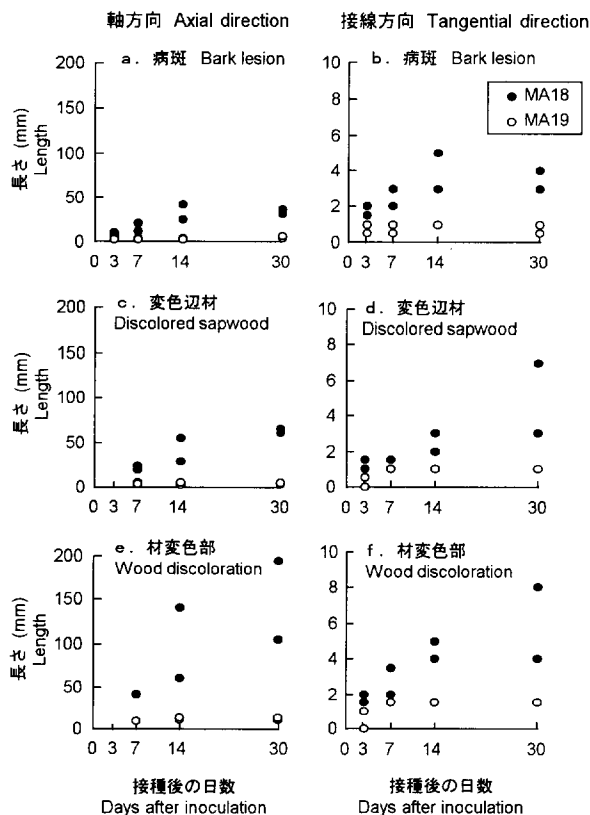


Fig. 20 秋接種新鮮丸太での病斑及び材変色の軸方向 (左) と接線方向 (右) の進展
Axial (left) and tangential (right) spread of bark lesion and wood discoloration in autumn-inoculated fresh log

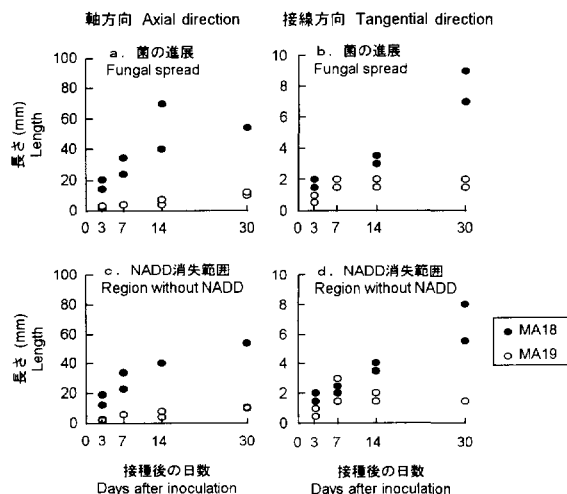


Fig. 21 秋接種新鮮丸太での *Guignardia cryptomeriae* と NAD diaphorase 活性消失範囲の軸方向 (左) と接線方向 (右) の進展

Axial (left) and tangential (right) spread of *Guignardia cryptomeriae* isolates and region without NAD diaphorase activity in the wood of autumn-inoculated fresh log
NADD : NAD diaphorase 活性 NAD diaphorase activity

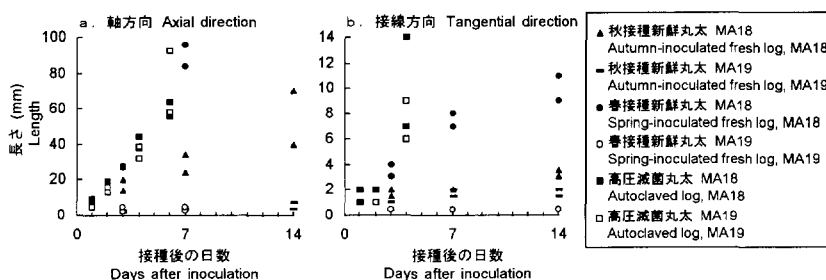


Fig. 22 新鮮丸太での *Guignardia cryptomeriae* の進展

Spread of *Guignardia cryptomeriae* isolates in the wood of fresh log

低下した (Fig. 22)。しかしながら、菌の進展が完全に阻止されることはなかった。MA 19 は MA 18 に比べ著しく進展速度が劣り、軸方向では MA 18 は高圧滅菌丸太の場合の半分近い速度で進展したが、MA 19 は極めてゆっくりとしか進展しなかった。接種 1 か月後には MA 18 は反応帯を越えて進展した。これは丸太であるため宿主の防御反応のための資源が限られていることと、伐倒後 1 か月が経過したため宿主細胞の活性が低下したことにより、新たな防御組織を形成することができなかったためであろう。

NAD diaphorase 活性は健全部では認められたが、観察したどの時期にも菌の進展部及びそのやや先までにおいては活性は消失しており (Fig. 21)、柔細胞の壊死が起こったものと判断された。MA 18 接

種丸太の移行帯内層柔細胞における NAD diaphorase 活性の増大は明瞭ではなかったが、MA 19 接種丸太では接種 1 週間後に明瞭な活性の増大が認められた (Photo 7)。この違いは菌の進展速度の差異によるものと考えられる。aniline blue 染色性の変化は NAD diaphorase 活性の消失より遅かった。接種 1 週間後以降、移行帯内層における NAD diaphorase 活性増大部位より反応帯よりの壁孔やその周囲が aniline blue や Nile blue で染まった (Photo 8a, b)。これは NBT では赤茶～オレンジ色に染まった (Photo 8c)。こうした変化は MA 19 接種丸太で著しかった。NAD diaphorase 活性の増大や aniline blue, Nile blue, NBT で染色される物質の出現は弱いながら防御反応が生じていることを示唆している。また、接種菌の病原力の違いによって防御反応の強度に差異が生じることも示された。

(2) 秋接種新鮮丸太の含水率と抽出物

変色辺材、反応帯、移行帯内層の含水率はいずれも接種 3 日後にはすでに健全部に比べて著しく低下していた。その後、含水率は観察期間の接種 1 か月後まで同程度の値を維持した (Fig. 23a)。新鮮丸太では菌が侵入した部位の含水率が低下したのに対し、冷凍処理丸太では低下しなかったことは、含水率の低下が菌による水分の消費によるものではなく、含水率の低下には生きた宿主細胞の存在が必要なことを示唆している。

変色辺材、反応帯、移行帯内層の抽出物含量は菌接種後もいずれも増加することはない、MA 18 接種丸太では接種後次第に含量が低下した (Fig. 23b)。低下は特に変色辺材で著しかった。材変色部で増加が認められた各抽出成分のいずれも菌接種新鮮丸太では増加が認められなかった。菌の進展が抑制され、組織学的観察では弱い防御反応が検出されたにもかかわらず、抗菌性物質の集積が検出されなかつ

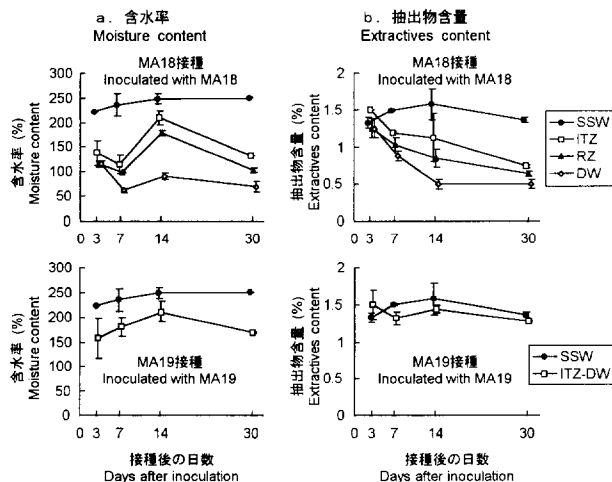


Fig. 23 秋接種新鮮丸太の含水率 (a, 左) 及びメタノール抽出物含量 (b, 右)

Moisture content (a, left) and methanol extractives content (b, right) of autumn-inoculated fresh log

SSW : 健全辺材 Sound sapwood, ITZ : 移行帯内層 Inner transition zone, RZ : 反応帯 Reaction zone, DW : 変色辺材 Discolored sapwood

平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations are presented.

たことは、秋接種新鮮丸太における防御反応が極めて弱いこと、抗菌性物質生成以外の動的防御機構が働いていることを示唆している。

(3) 春接種新鮮丸太

春接種新鮮丸太の材内では強病原力菌株の進展はいずれの菌株の場合も急速であったが、弱病原力菌株の進展はいずれの菌株の場合も著しく阻害されほとんど進展しなかった (Fig. 24)。春接種新鮮丸太材内の菌の軸方向の進展速度は、強病原力菌株の場合は高圧滅菌丸太、冷凍処理丸太や PDA 培地上とほとんど変わらなかった (Fig. 18, 22)。このことは、春接種の場合は新鮮丸太の動的防御機構は強病原

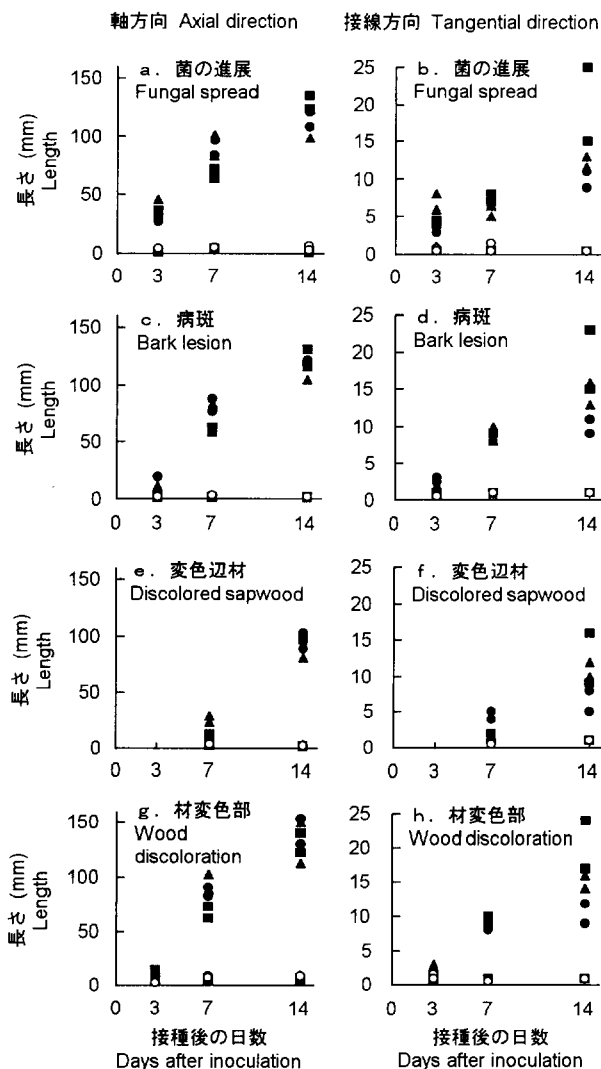


Fig. 24 春接種新鮮丸太での *Guignardia cryptomeriae*, 病斑及び材変色の軸方向 (左) と接線方向 (右) の進展

Axial (left) and tangential (right) spread of *Guignardia cryptomeriae* isolates in the wood, bark lesion and wood discoloration in spring-inoculated fresh log

力菌株の進展を全く阻止していないが、弱病原力菌株に対しては充分効果的に働いていることを示している。

春接種新鮮丸太では秋接種新鮮丸太の場合と同様、内樹皮の病斑と材変色が生じた。病斑や材変色は強病原力菌株接種では急速に進展したが、弱病原力菌株接種ではほとんど進展しなかった (Fig. 24)。強病原力菌株接種では菌の進展範囲は変色辺材の範囲を越え、反応帯や移行帯内層を含む材変色部の範囲とほぼ一致した。これは強病原力菌株の進展が急速であったためと思われる。接種 7 日後の菌の進展範囲が材変色部の範囲より大きかったのは、まだこの時期には材変色が明瞭でなく材変色の範囲を過小評価したためと思われる。弱病原力菌株の進展範囲は材変色部の範囲と変色辺材の範囲の間であり、反応帯あるいは移行帯内層の内部まで菌が進展していたと判断される。

弱病原力菌株接種丸太では接種 3 日後にはすでに、反応帯、移行帯内層で仮道管や壁孔内に aniline blue で染色される物質がみられる例が多かった (Photo 9a)。接種 1~2 週間後になるとこの反応は顕著になった。しかし、強病原力菌株接種ではこれらの反応は遅く、また顕著でなかった (Photo 9b)。

材内の菌糸の状態に関しては、強病原力菌株の場合は PDA 培地上と同様太い菌糸も多数観察されたが、弱病原力菌株の場合は侵入初期のものと思われる褐色化した菌糸を除くと細い菌糸のみであった (Photo 10 a, b)。冷凍処理丸太では菌の病原力の強弱にかかわらず太い菌糸が多数みられた。なお、これらの差異は秋接種新鮮丸太の場合も同様に観察された。

接種菌が進展していると推測された部位からは *G. cryptomeriae* が優占的に分離された。このことから、解剖観察で認められた菌糸は *G. cryptomeriae* と考えられた。

4.3.4 新鮮丸太と生立木との比較

生立木で菌の進展がまだ停止していない接種後 2 週間以内の菌の進展速度と、秋接種新鮮丸太における菌の進展速度 (25°C) とを比較した (Fig. 25)。MA 18 と MA 19 の進展速度には大きな差異があったが、軸方向ではいずれの菌株の進展速度も生立木では新鮮丸太の場合に比べ半分以下であった。接線方向でもいずれの菌株とも生立木での進展速度は新鮮丸太の場合に比べ低かった。

材内における菌の進展が温度の違いでどのように変化するかは調査していないが、菌の温度別成長速

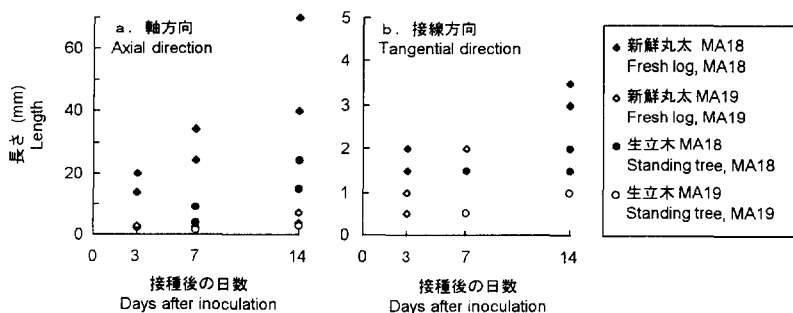


Fig. 25 生立木と秋接種新鮮丸太との初期の *Guignardia cryptomeriae* の進展の比較
Comparison of hyphal spread of *Guignardia cryptomeriae* isolates in the early stage between standing tree and autumn-inoculated fresh log

度、接種時の日周温度での成長速度を考慮して比較すると、新鮮丸太の菌の進展を阻害する能力は生立木に比べて、接線方向ではそれほど劣らないが、軸方向ではかなり低いといえる。このことは菌に対する動的防御機構は反応が弱い場合でも、軸方向よりも接線方向の方が効果的に働くことを意味する。

4.3.5 菌進展の形状比

接線断面でみると紡錘形となる材変色の形状が、材組織の要素の形態による機械的な要因で決まるのか、動的防御反応がかかわって決まるのかを明らかにするために、MA 18 を接種した高圧滅菌丸太、新鮮丸太（秋接種）、生立木（秋接種）及び強病原菌株 3 菌株のいずれかを接種した冷凍処理丸太、春接種新鮮丸太で菌の接線方向の進展範囲に対する軸方向の進展範囲の比率（形状比）を比較した（Table 10）。なお、菌の進展は 0.5～1 mm 単位で測定したため、菌の進展範囲が小さい場合は形状比の誤差が大きくなることから、軸方向の菌の進展範囲が 10 mm 以上の試料のみを計算に用いた。

動的防御機構が働かない高圧滅菌丸太や冷凍処理丸太の形状比は 3.1～9.5（平均値 5.2～6.6）であった。それに対し、動的防御機構が働く新鮮丸太や生立木では形状比は 5.4～29（平均値 9.6～16.6）であり、形状は高圧滅菌丸太や冷凍処理丸太の場合より軸方向に長かった。このことは、動的防御機構は菌の軸方向の進展に対してよりも接線方向の進展に対して効果的に作用し、菌の進展の形状比を大きくする方向に変化させることを示している。材変色の範囲と菌の進展範囲が対応していることから、材変色の形状の決定には、樹皮や材組織の物理的構造に加え、動的防御機構が重要な役割を果たしていると考えられる。

Table 10. 菌糸進展の形状比
Axial-tangential ratio of hyphal spread

処理 Treatments	形状比 ^{a)} Axial-tangential ratio ^{a)}
MA 18 接種（秋接種） ^{b)} Autumn inoculation with MA 18 ^{b)}	
高圧滅菌丸太 Autoclaved log	6.6±2.5
新鮮丸太 Fresh log	14.1±5.6
生立木 Standing tree	16.6±6.1
MA 7, MA 10, MA 18 接種（春接種） ^{c)} Spring inoculation with MA 7, MA 10 or MA 18 ^{c)}	
冷凍処理丸太 Freeze-treated log	5.2±1.4
新鮮丸太 Fresh log	9.6±3.6

^{a)} 菌糸の軸方向の進展/接線方向の進展

Axial spread/tangential spread of hyphae

^{b)} 軸方向の菌糸の進展が 10 mm 以上の 2～10 試料の平均±標準偏差で表す。
Means±standard deviations of 2-10 samples with axial hyphal spread over 10 mm.

^{c)} 軸方向の菌糸の進展が 10 mm 以上の 14～18 試料の平均±標準偏差で表す。
Means±standard deviations of 14-18 samples with axial hyphal spread over 10 mm.

4.4 考 察

結果を Table 11 にまとめた。高圧滅菌丸太や冷凍処理丸太における軸方向の菌の進展速度が PDA 培地上と比較してほとんど差異がなかったことから、材の組織が機械的に菌の進展を阻害することを考慮に入れると、健全辺材に存在する成分は菌の進展を阻害していないといえる。また、機械的な菌の進展阻害はあったとしてもわずかであると判断された。こうしたことから菌の侵入後においては静的な防御機構は効果がないと考えられる。さらに、生立木に比べて防御反応が弱いと考えられる新鮮丸太においても菌の進展が阻害され、通常の防御反応を示す生立木で菌の進展が最も遅かったことから、動的な防御反応が菌の進展を阻止するうえで重要な役割を果たしているものと考えられる。

スギ、ヒノキの暗色枝枯病による被害はストレス下で発生し、枯損被害を起こす場合は壊死病斑は急速に拡大すると考えられる (山田・伊藤, 1992)。新鮮丸太のように防御反応が抑制された場合には宿主内での *G. cryptomeriae* の進展速度が速くなることが明らかになったことは、ストレス下のスギ、ヒノキ生立木においても菌が樹体内で短時間に蔓延することの傍証となる。

防御反応の弱い新鮮丸太で弱病原力菌株の進展が阻害されたのに対し、強病原力菌株の進展の阻害程度は低いあるいは阻害がみられなかったことは、病原力の弱い菌株は抗菌性物質生産のような宿主の防御反応に対する感受性が高く、弱い防御反応によって進展が阻害されるが、病原力の強い菌株は防御反応に対する感受性が低いという可能性があることを示している。ニレ立枯病における病原菌 *Ophiostoma novo-ulmi* の病原力はファイトアレキシン mansonone E に対する耐性とは関連がないという報告もあるが (PROCTOR *et al.*, 1994)、一般に病原菌の病原力の強い系統は宿主のファイトアレキシンに対する耐性が高いとされており (TEGTMEIER and VANETTEN, 1982; KISTLER and VANETTEN, 1984; LUCY *et al.*, 1988; DESJARDINS and GARDNER, 1989, 1991; MIAO and VANETTEN, 1992), *G. cryptomeriae* においても病原力と宿主の抗菌性物質に対する耐性との間に相関があるかもしれない。

Betula alba に感染した *Botryosphaeria dothidea* の場合、水ストレス下の宿主内では菌糸が太いが、ストレスのかかっていない宿主内では菌糸が細いことが報告されている (McPARTLAND and SCHOENEWEISS, 1984)。この原因としては、ストレスのかかっていない場合には細胞壁分解酵素の分泌などの宿主の生化学的な動的防御機構が働くことが挙げられている。スギの材の場合、細い菌糸が観察されたのは菌の進展が阻害された場合であり、宿主-寄生者の関係は抵抗性の場合とみなすことができる。菌糸が細くなったのは、こうした場合に宿主の動的防御反応によって菌の活力が阻害されたことが原因として考えられる。

また、春接種新鮮丸太において、aniline blue で染まる物質の仮道管内での集積は弱病原力菌株を接種した場合に顕著であったが、強病原力菌株を接種した場合には少なかったことから、この反応が春接種新鮮丸太における弱病原力菌株の進展阻止にかかわっていると考えられる。このことは、弱病原力菌株と強病原力菌株との間で防御反応を誘起する活性が異なり、強病原力菌株は宿主の防御反応の発現を抑制している可能性を示唆している。

PEARCE *et al.* (1994) は *Acer pseudoplatanus* の高圧滅菌丸太、新鮮丸太を用いて菌や材変色の進展を調べた。その結果、生立木の辺材ではほとんど進展できない *Ustulina deusta* と辺材の一次的侵入者

Table 11. 丸太への接種試験のまとめ
Summary of the results of inoculation tests on logs

処理 Treatment	宿主組織の状態 Status of host tissue	菌糸進展 Spread of hyphae	軸方向の平均菌糸進展速度 (mm/ 日) Mean axial hyphal growth rate (mm/day)
PDA 培地 PDA		速い (V=AV) ^{a)} Rapid (V=AV) ^{a)}	V : 10.59-18.08, AV : 9.73-16.69
高压滅菌丸太 Autoclaved log	死, 防御反応なし, 成分部分的破壊 Dead, no response, constituents partly destroyed	速い (V=AV) Rapid (V=AV)	V : 9.19, AV : 8.55
冷凍処理丸太 Freeze-treated log	死, 防御反応なし, 成分保持 Dead, no response, constituents preserved	速い (V=AV) Rapid (V=AV)	V : 6.71-9.13, AV : 5.67-7.71
新鮮丸太 (秋接種) Fresh log (Autumn inoc.)	生, 弱い防御反応, 成分保持 Living, weak response, constituents preserved	中程度～遅い (V>AV) Middle-slow (V>AV)	V : 4.46, AV : 0.54
新鮮丸太 (春接種) Fresh log (Spring inoc.)	生, 弱い防御反応, 成分保持 Living, weak response, constituents preserved	速い～遅い (V>AV) Rapid-slow (V>AV)	V : 10.04-11.36, AV : 0.40-0.84
生立木 Standing tree	生, 強い防御反応, 成分保持 Living, strong response, constituents preserved	遅い (V>AV) Slow (V>AV)	V : 1.16, AV : 0.23 ^{b)}

^{a)} V, 強病原力菌株 ; AV, 弱病原力菌株
V, virulent isolate ; AV, avirulent isolate

^{b)} 接種後 2 週間以内の初期の進展速度
Initial growth rate within two weeks after the inoculation

である *Chondrostereum purpureum* の両者とも高圧滅菌丸太では麦芽寒天培地上の場合に比べ進展は阻害されなかった。しかし新鮮丸太では、*C. purpureum* 接種の場合は明瞭な反応帯反応が観察されなかったにもかかわらず、いずれの菌も高圧滅菌丸太に比べ進展が低下した。これらは本論文の結果と符合しており、生立木の辺材内では菌の進展を阻止する上で、静的防御機構ではなく動的防御機構が重要であることを示すものである。

材変色の形状は材要素の形状に規定されるものであり、動的防御機構によって決まるものではないとする考えがある (BODDY and RAYNER, 1983; RAYNER and BODDY, 1988)。確かに、菌の進展が阻害されなかった高圧滅菌丸太や冷凍処理丸太においても、菌の進展範囲は軸方向に長い紡錘形であり、材組織の物理的構造が材変色や菌の進展範囲の形状を決定するのにかかわっていると考えられる。しかし、新鮮丸太や生立木では菌の進展範囲は軸方向にさらに長かった。このことから、動的防御機構が菌や材変色の進展範囲の形状を決定する重要な要因であることが示され、また、動的防御反応は軸方向よりも接線方向に効率的に働くことが明らかとなった。

5 菌の侵入に対する材の反応

5.1 はじめに

ここまででスギの材において菌や材変色の進展を阻止する機構として動的防御機構の重要性が示された。そこで次に、菌侵入後の生立木における防御反応を経時的に明らかにすることを目的として、スギの生立木に病原力の異なる *Guignardia cryptomeriae* の2菌株（強病原力菌株 MA 18, 弱病原力菌株 MA 19）を接種し、菌や材変色の進展経過と材の組織学的な変化や抗菌性物質の集積との関連について検討した。これらの結果から、菌の進展阻止における抗菌性物質集積の役割について考察を加えた。

5.2 材料と方法

森林総合研究所関西支所実験林の8~9年生実生スギに対し9~10月に接種を行った。まず、スギの枝の材部を滅菌後、菌を培養した PDA 培地上に置き接種源を調製した。傷対照には滅菌枝を使用した。ドリルでスギの幹にあけた穴に埋め込み、接種部にはパラフィルムとビニルテープを巻いた。

菌接種後の経時的な材変色や菌の進展と組織学的変化との関連を明らかにするために、5.2.1では材変色部から菌を再分離するとともに、材変色や菌の進展を調べ、さらに材の組織化学的観察を行った。材変色や菌の進展、組織学的変化と化学的変化との関連を明らかにするために、5.2.2では含水率、抽出物含量を求めるとともに、抽出物の分析を行った。

5.2.1 材変色の進展と組織学的変化

接種木を伐倒、解体し、最も外側の年輪の範囲で樹皮の病斑や材変色の大きさを測定後、冷凍保存した。以下の観察、分析は材の柔細胞の齢に起因する防御反応の強度の違いによる誤差を防止するため、最外年輪の範囲で行った。樹皮の病斑や材変色部の大きさの測定は、接種後経過時間ごとにそれぞれ8~24か所の接種部位で行った。冷凍保存した材からスライディングミクロトームで厚さ約20 μ mの切片を作成、顕微鏡観察した。切片は aniline blue, Nile blue, NBT による染色あるいは NAD diaphorase 活性染色を行い、菌糸の進展範囲や組織学的な防御反応を調べた。

菌の分離は、材片をアンチホルミン 5 倍液で表面殺菌したのち PDA 培地上に置き、25℃ で培養することで行った。

5.2.2 生化学的变化

冷凍保存した材から 3.2.2(5)と同じ方法で材成分を抽出した。含水率やメタノール抽出物含量を測定し、抽出物を GC で分析した。分析法は 3.2.2(5)と同様である。接種後の経過時間ごと、部位ごとにそれぞれ 2～3 か所の試料を分析に供した。なお、MA 19 接種木及び傷対照木の接種後 2 週間～1 か月の試料では移行帯内層と反応帯とを区分することが困難であったため、両者を含む同一試料の値を移行帯内層、反応帯の両者の値として図に示した。

仮道管内の油滴状物質を別に分析するために、MA 18、MA 19 接種木の移行帯内層に集積した油滴状物質を 3.2.2(5)と同様にマイクローム切片から吸い取った。油滴状物質は 3.2.2(5)の分析条件により GC で分析した。接種後の早い時期では油滴状物質は少量であるため (Photo 11, 12)、接種後 1 か月以降の試料を用いた。

5.3 結果

5.3.1 材変色の進展と組織学的変化

(1) 分離菌

無傷対照木の辺材からは少数の菌が分離される場合があったが、*G. cryptomeriae* は分離されなかった (Table 12)。傷対照木や菌接種木の健全辺材からも少数の菌が分離されたが、全く分離されない場合も多かった (Table 13)。菌が分離された場合でも *G. cryptomeriae* が検出されることはなかった。傷対照の材変色部 (変色辺材及び反応帯) からは *Pestalotiopsis* sp. が分離されることが多かったほか、*G. cryptomeriae* もしばしば分離された (Table 13)。分離頻度は反応帯より変色辺材の方が高かったが、同じ変色柱内の両者の菌相は類似していた。MA 18 接種木の変色辺材からは *G. cryptomeriae* が優占的に分離され、接種後時間がたっても他の菌はほとんど検出されなかった (Table 13)。MA 19 接種木の材変色部からは *G. cryptomeriae* が高い頻度で分離されたものの、他の菌もしばしば分離され、時間がたつにつれて *Pestalotiopsis* sp. や *Trichoderma* sp. の分離頻度が高くなった (Table 13)。

この MA 18 接種木と MA 19 接種木との差異は、菌の病原力の違いによる可能性がある。すなわち、

Table 12. 無傷対照木からの分離菌

Microorganisms isolated from wood of non-wounded control tree

接種後の時間 Period after inoculation	供試片数 No. of pieces	<i>Guignardia cryptomeriae</i>	<i>Pestalot- iopsis</i> sp.	<i>Tricho- derma</i> sp.	その他の菌 Other fungi	細菌 Bacterium
2 週間 2 weeks	12				4 ^{a)}	
1 か月 1 month	12			1		1
2 か月 2 months	12		1		3	
3 か月 3 months	12					
6 か月 6 months	12		1			

^{a)} 表中の値は微生物が分離された材片数を示す。

Values represent the number of pieces from which microorganisms were isolated.

Table 13. 材変色部からの再分離菌

Microorganisms recovered from wood of sugi inoculated with *Guignardia cryptomeriae*

接種後の時間 Period after inoculation	部位 Type of tissue	傷対照 Wound control						MA 18 接種 Inoculated with MA 18					MA 19 接種 Inoculated with MA 19					
		供試片数 No. of pieces	<i>Guignardia cryptomeriae</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	その他の菌 Other fungi	細菌 Bacteria	供試片数 No. of pieces	<i>Guignardia cryptomeriae</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	その他の菌 Other fungi	供試片数 No. of pieces	<i>Guignardia cryptomeriae</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	その他の菌 Other fungi	細菌 Bacteria
2 週間 2 weeks	SSW ^{a)}	60						60					36		1		4	1
	RZ	60	1 ^{b)}	1	1			60	21	1		1	36	4			2	7
	DW	60	2	26		3		60	36				36	11	1	4	9	4
1 か月 1 month	SSW	40						40					36				4	3
	RZ	40	4	1			1	40	10				36	13				7
	DW	40	5	18				40	21				36	28	1			13
2 か月 2 months	SSW	40						40				1	36		4		3	1
	RZ	40						40	29				36	20	2			2
	DW	40	8	8	1	6	2	40	26				36	24	14	6		9
3 か月 3 months	SSW	40		2		2		40				1	36				1	
	RZ	40						40	13				36	17	3	4	1	1
	DW	40		20		4		40	24				36	8	18	11	2	10
6 か月 6 months	SSW												36					
	RZ												36	13	4	3	3	
	DW												36	15	13	10	1	7
7 か月 7 months	SSW	40						40										
	RZ	40	4	5			1	40	17									
	DW	40	3	33		2	2	40	27			3						
12 か月 12 months	SSW												36					
	RZ												36	17		1	1	
	DW												36	12		16	13	

^{a)} SSW : 健全辺材, RZ : 反応帯, DW : 変色辺材

SSW : Sound sapwood, RZ : Reaction zone, DW : Discolored sapwood

^{b)} 表中の値は微生物が分離された材片数を示す。

Values represent the number of pieces from which microorganisms were isolated.

MA 18の方が定着範囲が広いため、他の菌が接種傷から侵入しても広がることができないのに対し、MA 19接種木では、後述するように材変色部が傷対照と同じ程度に小さく、接種菌の定着範囲が狭いため接種傷から侵入した他の菌が混在したと考えられる。

(2) 材変色と菌の進展

樹皮の壊死病斑の進展は接種後2週間はみられたが、その後は進展が停止したものと判断された (Fig. 26)。従って、樹皮の防御反応は接種後2週間で十分に効果的となったことが示された。MA 18接種の場合と MA 19接種の場合との間で菌の進展停止の時期には差異はみられなかったが、両者の間で接種後2週間以内の病斑の進展速度は大きく異なっていた。その結果、病斑の長さや幅は傷対照が最も小さく、MA 19接種の場合は傷対照よりやや大きい程度であったが、MA 18接種の場合は MA 19接種の場合に比べ数倍に達した (Fig. 26)。

材変色は接種3日後ではまだ肉眼では識別できず、接種1週間後ようやく薄い変色として認められた。材変色の大きさは壊死病斑の大きさと同様、軸方向、接線方向とも MA 18を接種した方が MA 19接種の場合より大きく、MA 19接種の場合は傷のみの対照と大差なかった (Fig. 26)。いずれの菌株の場合も、材変色は接種後1~2週間まではいずれの方向とも急速に進展し、接種後2週間から1か月程度で

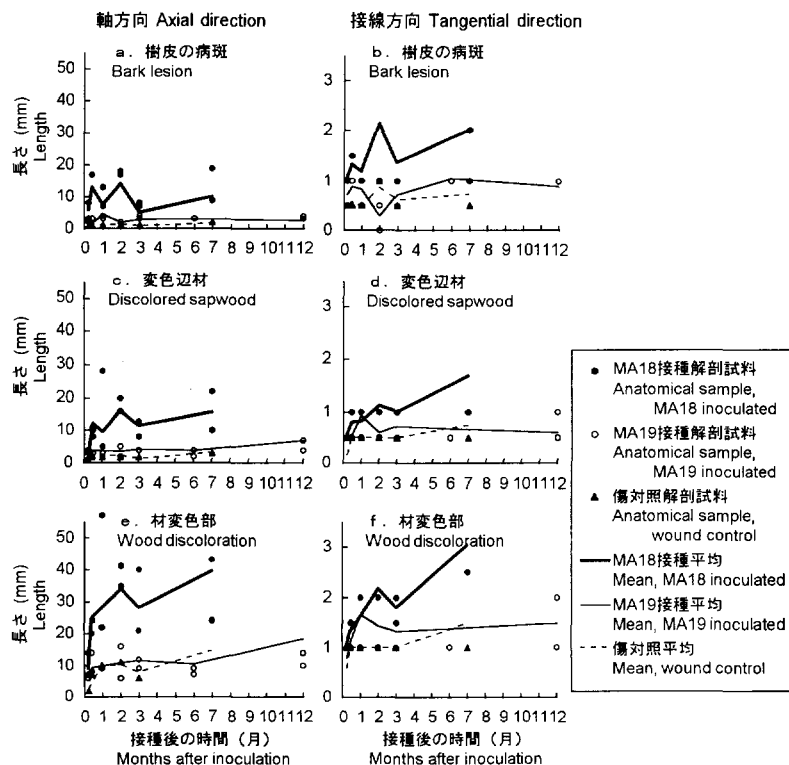


Fig. 26 生立木での樹皮の病斑及び材変色の軸方向（左）と接線方向（右）の進展
Axial (left) and tangential (right) spread of bark lesion and wood discoloration in standing tree

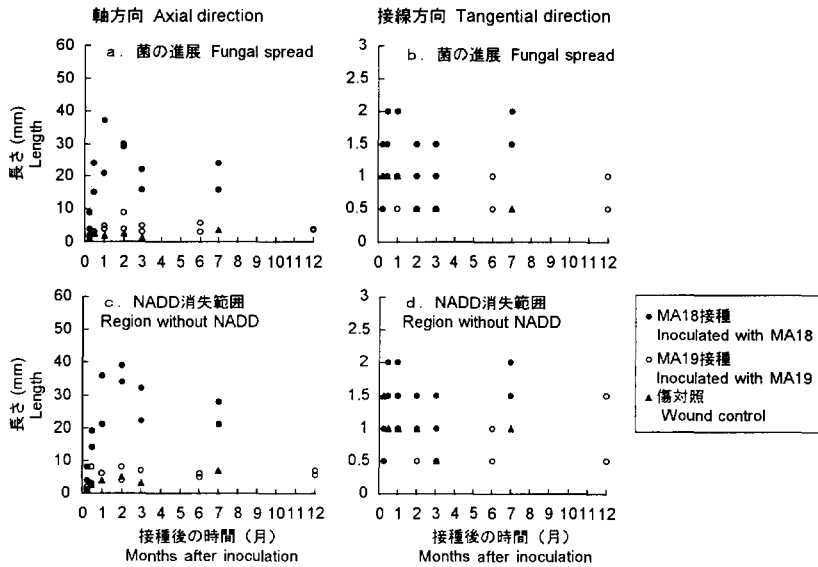


Fig. 27 生立木の材内での *Guignardia cryptomeriae* 及び NAD diaphorase 活性消失範囲の軸方向 (左) と接線方向 (右) の進展

Axial (left) and tangential (right) spread of *Guignardia cryptomeriae* isolates and region without NAD diaphorase activity in the wood of standing tree

NADD: NAD diaphorase 活性 NAD diaphorase activity

その進展は停止した。このように材変色の進展には接種菌株による停止時期の差異はなかったが、進展速度は大きく異なっていた。変色辺材の大きさは病斑と同じかやや大きい程度であり、反応帯や移行帯内層を含む材変色部の大きさは変色辺材の約 2 倍であった。接種点の上下の材変色の大きさを比較すると、ばらつきが大きく上下間で差異はみられなかった。

菌の進展は材変色の進展と同じ傾向を示した。すなわち、いずれの菌株とも接種後 1~2 週間までは急速な進展がみられたが、接種後 2 週間~1 か月で進展は停止した (Fig. 27)。従って、材の防御反応は接種後 2 週間から 1 か月で菌の進展をほぼ完全に阻止するまで効果的となったことが示された。この時期は内樹皮の場合とほぼ同じか、やや遅い程度であった。材変色の大きさと同様、菌糸進展速度及び進展範囲は接種菌株によって異なり、MA 18 接種の場合は MA 19 接種の場合より大きかった。MA 19 接種の場合は、傷のみの場合に傷から侵入したと思われる菌の進展と比べてほとんど差異がなかった。菌の進展範囲は材変色の範囲と対応しており、変色辺材よりは少し大きい材変色部よりは少し小さかった。これは菌が反応帯までは侵入するが移行帯や健全辺材には侵入しないことを反映している。生立木では菌糸は冷凍丸太の場合や強病原力菌株を接種した新鮮丸太の場合より全体に細い傾向があり、また MA 18 と MA 19 との間で菌糸の太さに差異はみられなかった。

材の柔細胞の生死を NAD diaphorase 活性の有無で判断した。NAD diaphorase 活性の消失範囲は菌の進展範囲より少し大きかったがほぼ同じ傾向で推移した (Fig. 27)。すなわち、材の柔細胞は菌の進展に先立って壊死することが明らかとなった。

(3) 油滴状物質の出現と反応障壁の形成

MA 18 接種, MA 19 接種あるいは傷対照のいずれの場合も, 接種後 1~2 週間で放射柔組織と仮道管との間の半縁壁孔に詰まっている, あるいは仮道管内に滲出している油滴状物質が移行帯において観察された (Photo 11)。このことは油滴状物質が移行帯で生成されることを示している。軸方向柔細胞 (樹脂細胞) からの油滴状物質の分泌は観察されなかった。なお, 接種菌の有無や接種菌株の違いによって油滴状物質の生成程度に明瞭な差異は認められなかった。接種後 2 週間程度で油滴状物質は仮道管を閉塞するようになり (Photo 12a), 接種 1 か月後には閉塞は顕著になった (Photo 12b)。このように, 油滴状物質が多数出現する時期と菌の進展が停止する時期とは一致していた。有縁壁孔も接種後 1~2 週間という早い時期に aniline blue, Nile blue で染まったが (Photo 13), その色は油滴状物質に比べると薄かった。この壁孔内の物質が油滴状物質と同じ成分を持っているのかは不明である。油滴状物質が主に分泌される部位は移行帯内層にあたるが, 反応帯においても油滴状物質が観察された。しかし, 変色辺材では油滴状物質はほとんど観察されなかった。この理由として, 菌の進展が停止した時期の変色辺材の範囲では, 菌の進展が急速であったため油滴状物質の生産, 滲出が間に合わなかったことが考えられる。菌の進展停止後の反応帯にあたる部位まで菌が進展した段階で油滴状物質による防御が有効となったのであろう。

NAD diaphorase 活性の増大は接種後 1~2 週間でみられた。活性の増大している部位は移行帯内層で油滴状物質が分泌されている部位と一致した。NAD diaphorase 活性の増大と動的防御反応との関連が示唆される。

5.3.2 生化学的变化

(1) 含水率

健全辺材の含水率は 150~300% であったが, 変色辺材の含水率は材変色が肉眼で識別できた時期, すなわち接種 1 週間後にはすでに 100% 程度に低下していた (Fig. 28a)。これは, 接種後の早い時期から菌の侵入部では通水障害が生じ, 菌は乾燥した材組織内を進展することを示唆する。その後の変色辺材は含水率が低下したままで推移した。移行帯内層や反応帯の含水率も接種 1 週間後には変色辺材に近い値まで低下した。

(2) 抽出物含量

メタノール抽出物含量は接種後 2 週間~1 か月で増加がみられ, 移行帯内層を中心にその後も実験期間中増加が続き, 移行帯内層では接種後 3~7 か月で健全辺材の 5 倍前後に達した (Fig. 28b)。MA 18 接種木の変色辺材では抽出物含量は健全辺材より低くなり, また反応帯の抽出物含量は健全辺材より少し高いだけであった。MA 19 接種木及び傷対照木では MA 18 接種木と異なり, 変色辺材の抽出物含量は健全辺材より高く, 反応帯の含量も移行帯内層のそれに近かった。この理由として材変色部が小さいため, 移行帯内層~変色辺材の各部位を正確に分けることが困難であったことが考えられる。

(3) ノルリグナン類とテルペン類の集積

健全辺材で検出されなかったノルリグナン類, テルペン類を含む成分が接種後移行帯内層を中心に集積した。以下に主要成分についてそれぞれ述べる。

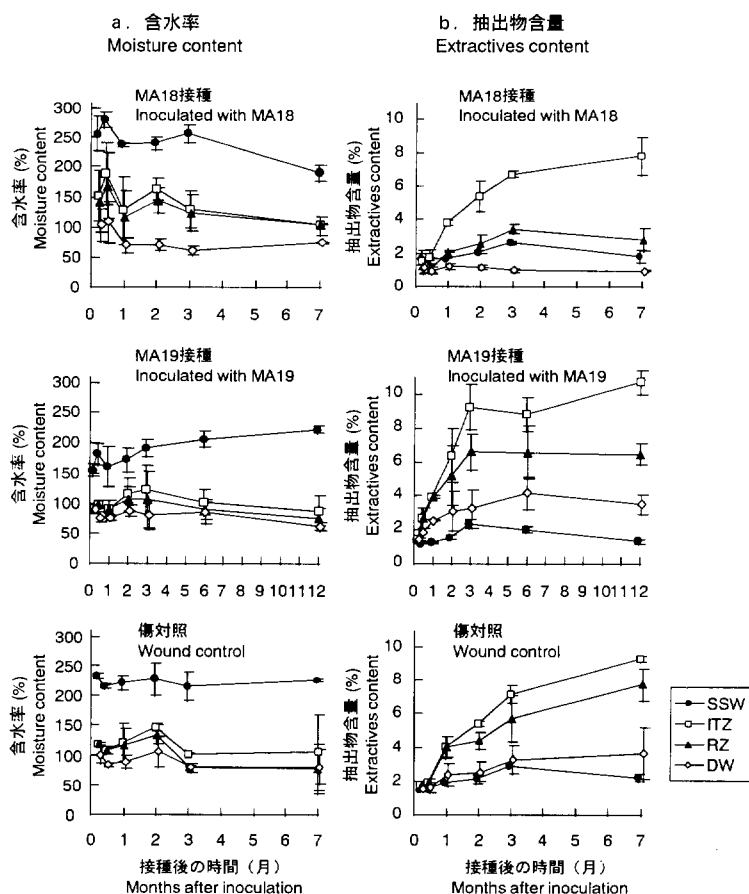


Fig. 28 生立木での含水率 (a, 左) 及びメタノール抽出物含量 (b, 右) の変化
Changes in the moisture content (a, left) and methanol extractives content (b, right) of standing tree

SSW : 健全辺材 Sound sapwood, ITZ : 移行帯内層 Inner transition zone, RZ : 反応帯 Reaction zone, DW : 変色辺材 Discolored sapwood
平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations are presented.

ノルリグナン類 : 抗菌性物質である hinokiresinol は健全辺材からは検出されなかったが, MA 18 接種, MA 19 接種あるいは傷対照のいずれの場合も接種 1 週間後には移行帯内層や反応帯に集積が認められた。hinokiresinol の移行帯内層での濃度は接種 1 週間後ですでに実験期間中のピーク時の約 20% に達していた (Fig. 29 a)。材変色や菌の進展が停止した時期, すなわち接種の 2 週間~1 か月後には hinokiresinol の集積量はピーク時の 30~50% に達した。実験期間中の濃度のピークは接種 2~3 か月後にみられた。また, 抗菌性の高い末同定成分Ⅲの初期の集積も hinokiresinol の場合と同様に速かった (Fig. 29 b)。

agatharesinol の材変色部における集積は, MA 18 接種, MA 19 接種あるいは傷対照のいずれの場合

も接種 1 週間後にわずかながら認められた (Fig. 30 a)。しかし、接種 2 週間後までの集積量はその後の濃度の増加に比べ相対的に少なかった。MA 18 接種, MA 19 接種あるいは傷対照のいずれの場合も, sequirin-C は接種後 2 週間~1 か月でようやく集積が始まり, 上記の他のノルリグナン類より全体に集積は遅かった (Fig. 30 b)。しかし、最終的には移行帯内層における agatharesinol と sequirin-C の濃度は hinokiresinol の濃度の数倍に達した。agatharesinol と sequirin-C は健全辺材からも微量ではあるが検出されることがあった。このように、同じノルリグナン類の中でも抗菌性の高い物質の方が集積

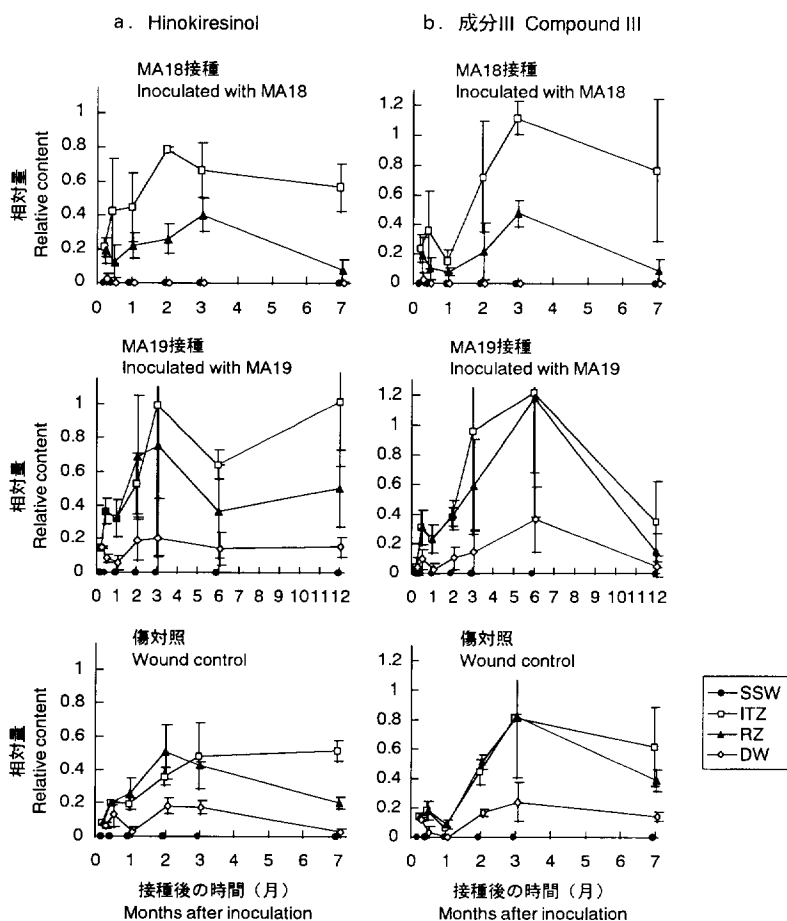


Fig. 29 生立木での hinokiresinol (a, 左) 及び成分Ⅲ (b, 右) 含量の変化

Changes in the concentration of hinokiresinol (a, left) and compound III (b, right) in standing tree

SSW: 健全辺材 Sound sapwood, ITZ: 移行帯内層 Inner transition zone, RZ: 反応帯 Reaction zone, DW: 変色辺材 Discolored sapwood

相対量は mg 1-naphthol 相当 /g 材乾重の平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations of mg 1-naphthol equivalent/g wood dry weight are presented as relative contents.

が速かった。

ノルリグナン類は移行帯内層に最も多く集積し、次に反応帯に多かった。変色辺材や健全辺材ではほとんど検出されなかった。抗菌性の高い hinokiresinol や成分Ⅲの濃度は *G. cryptomeriae* 接種木の方が傷対照より高かったのに対し、抗菌性の低い agatharesinol や sequirin-C の濃度には *G. cryptomeriae* 接種木の方が高いという傾向はなかった。MA 19 接種木と MA 18 接種木との間ではノルリグナン類各成分の集積程度に差異がなく、侵入した菌の病原力とノルリグナン類の集積との間には関連がないことが示唆された。

テルペン類: MA 18 接種, MA 19 接種あるいは傷対照のいずれの場合も, β -eudesmol や ferruginol

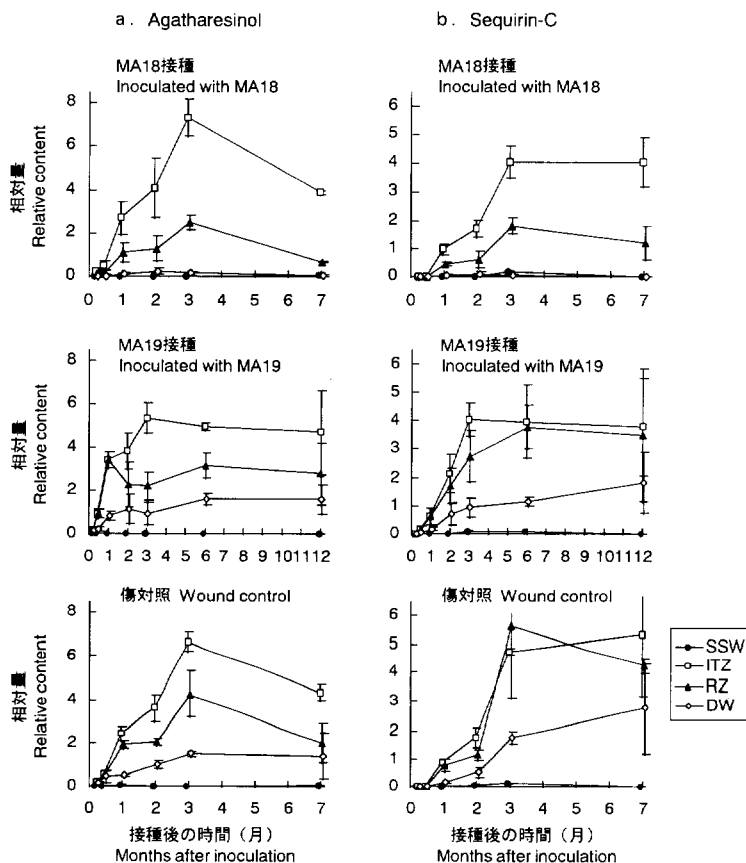


Fig. 30 生立木での agatharesinol (a, 左) 及び sequirin-C (b, 右) 含量の変化

Changes in the concentration of agatharesinol (a, left) and sequirin-C (b, right) in standing tree
SSW: 健全辺材 Sound sapwood, ITZ: 移行帯内層 Inner transition zone, RZ: 反応帯 Reaction zone, DW: 変色辺材 Discolored sapwood

相対量は mg 1-naphthol 相当 /g 材乾重の平均±標準偏差で表す。

Means±standard deviations of mg 1-naphthol equivalent/g wood dry weight are presented as relative contents.

を始めとするテルペン類が移行帯内層を中心に集積した (Fig. 31)。しかし、テルペン類の集積はノルリグナン類より遅く、顕著な集積がみられたのは接種後 1 か月以降であった。その後は時間の経過とともにノルリグナン類に対するテルペン類の比率が高くなった。

(4) 油滴状物質の分析

移行帯内層の油滴状物質を GC で分析したところ、移行帯内層のメタノール抽出物の場合と似たクロマトグラムが得られた。一例を Fig. 32 に示した。主要成分としてはノルリグナン類の hinokiresinol, agatharesinol, sequirin-C 及びテルペン類の β -eudesmol, ferruginol を含んでいた。メタノール抽出物の場合と同様、接種後の時間の経過とともにノルリグナン類に対してテルペン類の構成比が高くなった。しかしながら、個々の成分の構成比はメタノール抽出物とやや異なっていた。油滴状物質の方が比率が高いのはセスキテルペン類と考えられる成分や hinokiresinol で、低いのは agatharesinol や

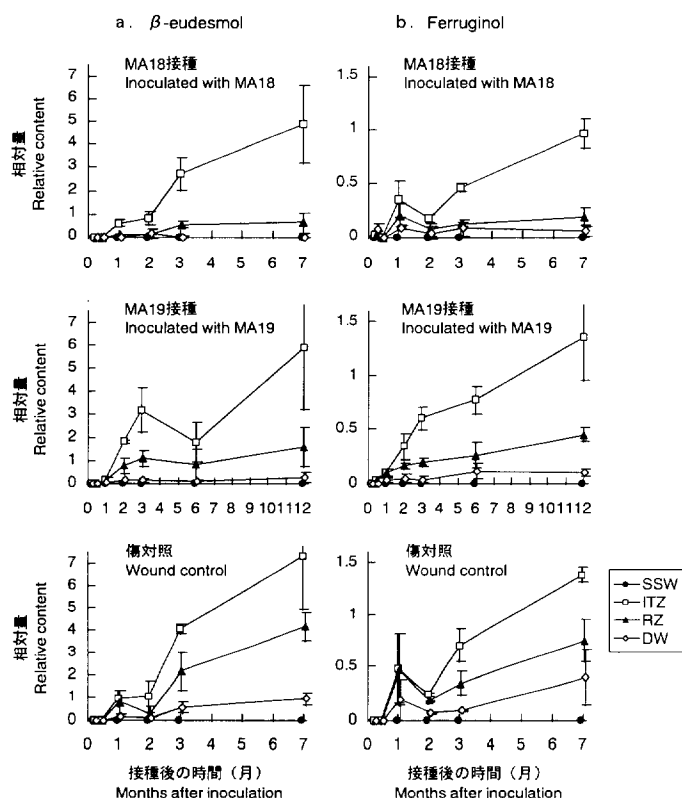


Fig. 31 生立木での β -eudesmol (a, 左) 及び ferruginol (b, 右) 含量の変化

Changes in the concentration of β -eudesmol (a, left) and ferruginol (b, right) in standing tree
SSW : 健全辺材 Sound sapwood, ITZ : 移行帯内層 Inner transition zone, RZ : 反応帯 Reaction zone, DW : 変色辺材 Discolored sapwood

相対量は mg 1-naphthol 相当 /g 材乾重の平均 $\pm$ 標準偏差で表す。

Means $\pm$ standard deviations of mg 1-naphthol equivalent/g wood dry weight are presented as relative contents.

sequirin-Cであった。このことはノルリグナン類やテルペン類の個々の成分の間で移行帯の材組織内における分布に差異があることを示している。メタノール抽出物の構成比と油滴状物質の構成比との差異には接種後の時間の経過による変化はみられなかった。

5.4 考 察

スギ-*G. cryptomeriae* の系においては接種後2週間程度で内樹皮及び辺材の両方で菌の進展が停止し、防御反応が有効となったことが示された。しかしながら、病原力の違い、すなわち病斑や材変色の大きさの違いにかかわらず、進展停止の時期にはMA 18接種の場合とMA 19接種の場合とで差異がみられなかった。これは侵入初期の菌の進展速度に両者の間で大きな差異があったことを示しており、この侵入初期の宿主内での菌の進展速度が病原力を決定する要因であることが示唆さ

れる。すなわち、MA 18は初期の進展速度が大きく、菌の進展より先の部位の防御反応が充分大きくなる前にその部位を突破した。それに対し、MA 19は動的防御反応と推測される理由で初期の進展速度が小さく、突破できないうちに阻止されたと考えることができる。このことから、暗色枝枯病による枝枯、胴枯、枯損被害の発生には、感染初期、2週間程度の菌の急速な進展が必要であることが示唆される。

菌の病原力と防御反応の強度との関係についてみると、*Heterobasidion annosum* 感染の広がりや pinosylvin 濃度との間に負の相関があり (PRIOR, 1976)、ニレ立枯病においても *U. americana* では弱病原力菌株は強病原力菌株より多量の mansonone 類集積を誘導する (DUCHESNE *et al.*, 1984, 1985, 1990)。しかし、ニレ立枯病抵抗性の *U. pumila* では弱/強病原力菌株とも同程度でかつ *U. americana* の場合より多量の mansonone 類集積を誘導することから、抵抗性が強い場合には菌の病原力の強さにかかわらず強い防御反応が誘導されることが示唆される。これはスギ生立木ではMA 18接種の場合とMA 19接種の場合で抗菌性物質集積や組織学的な変化に明瞭な差異がみられなかったのに対し、新鮮丸太ではMA 19接種の場合の方が防御反応の強度が大きかったことと符合する。

ノルリグナン類の中でも抗菌性の高い物質の集積が速かったことは、菌に対する防御機構を考える上で興味深い現象である。しかも、hinokiresinol は心材中にはみられず、辺材に材変色部が形成されたときに生成することから (TAKAHASHI, 1981; TAKAHASHI *et al.*, 1983; 高橋・荻山, 1985a, 1985b, 1986)、辺材の柔細胞は傷害や菌の感染に対し、まずこうした抗菌性物質の生成でもって反応し、その後他のノルリグナン類やテルペン類の生産にシフトする傾向があると考えることができよう。ERDTMAN and HARMATHA (1979) によると、agatharesinol を経て sequirin-C が生成するとされる。

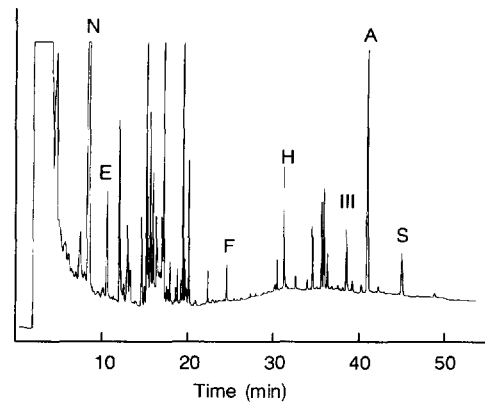


Fig. 32 油滴状物質のガスクロマトグラム

A gas chromatogram of oil droplet-like deposits
MA 18 接種後 2 か月後の例

An example two months after inoculation with
MA 18

N : 1-naphthol (内部標準 internal standard), E :
β-eudesmol, F : ferruginol, H : hinokiresinol,
III : unidentified compound III, A : agatharesinol, S : sequirin-C

sequirin-C の集積が agatharesinol の集積より遅れたことはこの生合成経路を反映しているものと思われる。移行帯外層で agatharesinol の濃度が高いこと、すなわち agatharesinol が移行帯形成の比較的早い時期に集積することも、この生合成経路と矛盾しない。また、hinokiresinol の生合成経路は agatharesinol のそれと並列で独立した位置にある。hinokiresinol の集積が agatharesinol の集積より速いことから、これら 3 種類のノルリグナン類の生合成は比較的独立して制御されていると考えられる。

仮道管を閉塞した油滴状物質からは抗菌性物質を含むノルリグナン類やテルペン類が検出された。接種 1~2 週間後に油滴状物質が材の放射柔細胞から壁孔を経て分泌されるのが観察されたことから、これらの成分は柔細胞から分泌されて壁孔や仮道管内に集積することが強く示唆される。

抗菌性物質の集積は、まだ菌の進展が停止していない接種の 1~2 週間後にすでに認められた。生立木ではこの時期の菌の進展も防御反応が抑制された丸太の場合より遅いが、この理由として生立木における抗菌性物質の集積も可能性として考えられる。そして、生立木では抗菌性物質の濃度の上昇とともに、菌の進展が停止したと考えることができよう。

PEARCE *et al.* (1994) は反応帯（障壁）の反応が傷害のみの場合よりも菌の侵入があることによって誘導・促進されることを示唆した。スギにおいても傷対照の場合よりも菌を接種した場合に反応障壁での抗菌性物質の濃度が高くなったことから、病原菌の存在が材の防御反応を促進したと考えられる。

6 総 合 考 察

6.1 はじめに

本研究は、スギ生立木の辺材に菌が侵入したときの動的防御反応について、組織学的、化学的に明らかにすることを目的とした。

まず初めに、主として「3 スギカミキリ加害木における材変色部の特性及び反応」での議論を受け、6.2 で材変色部における動的防御反応としての反応障壁の形成について考察した。6.2.1 では、反応障壁における化学的变化として、特にファイトアレキシンとしての抗菌性物質の集積の意義について、また、横断面及び径断面での材変色の形状を決定する要因についての考察を行った。6.2.2 では、反応障壁における組織学的な変化として、通導組織の閉塞の意味、特に材に樹脂道を持たないスギにおける意味について考察した。

次に、「4 材変色及び菌の進展と動的防御機構の評価」での議論を受け、6.3 で、まず静的、受動的な防御機構とされる要因を動的防御機構と比較検討し、次に接線断面での材変色の形状や大きさを決定する要因について考察した。

最後に、「5 菌の侵入に対する材の反応」での議論を受け、6.4 で、菌の侵入に対する防御反応の誘導として、菌の侵入後の材変色や菌の進展経過と防御反応との関連について検討し、反応障壁形成、抗菌性物質生成等の防御反応を誘導する要因や、菌の進展阻止における抗菌性物質集積の役割について考察を加えた。

以上のようなスギ辺材における防御機構の概要と主な考察のポイントを Fig. 33 に示した。

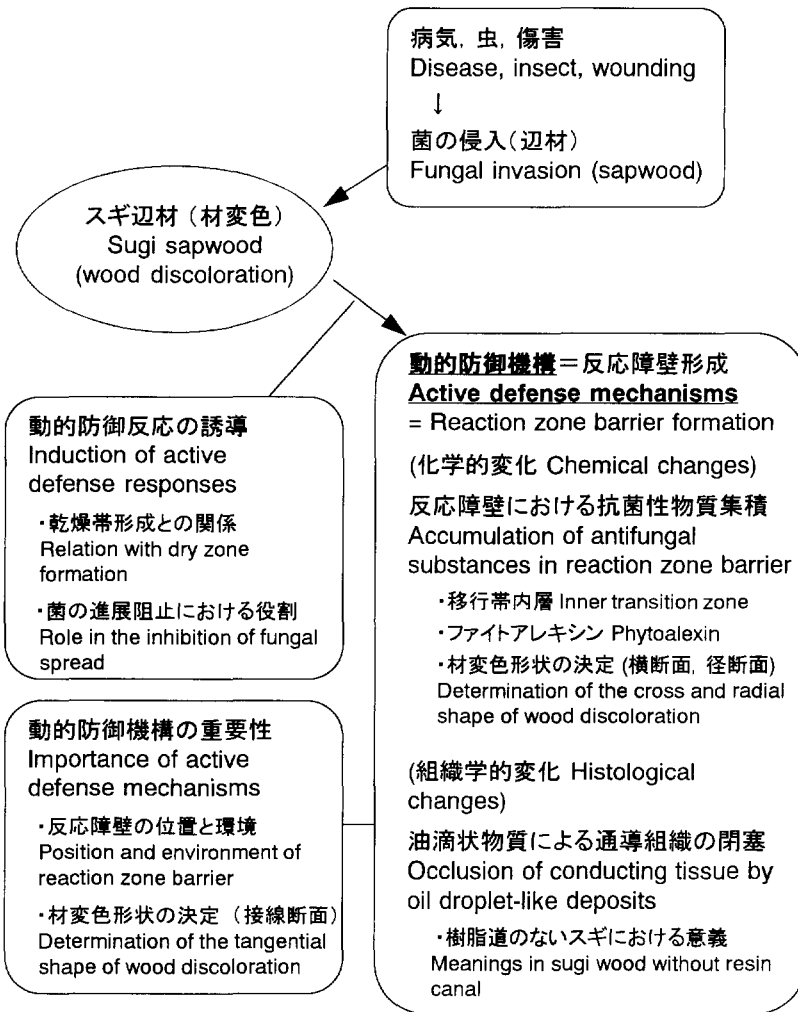


Fig. 33 スギ生立木の辺材における防御機構と主要な考察点

Defense mechanisms of sugi sapwood and several important points for consideration

6.2 材変色部における反応障壁形成

材の変色・腐朽を限定する機作として, SHIGO の CODIT モデル (SHIGO and MARX, 1977; SHIGO, 1984) や SHAIN の反応帯モデル (SHAIN, 1967, 1971; SHAIN and HILLIS, 1971) が知られている。SHIGO and MARX (1977) は材の変色・腐朽を限定する機作として wall 1~4 という障壁からなる CODIT モデルを提唱した (Fig. 34)。その後, CODIT モデルには反応帯モデルを含む種々の静的, 動的防御機構が取り入れられた (SHIGO, 1984)。SHAIN (1967) によって提示された反応帯モデル (Fig. 35) では変色・腐朽材の周囲に形成される反応帯によって変色・腐朽の拡大が阻止されると考えられている。反応帯の最初の概念はフェノール物質が集積した壊死組織であり, 柔細胞のほとんどが生存している移行帯

が健全辺材に接して形成され反応帯を取り囲む。移行帯は NAD diaphorase 活性やエチレン生成等の代謝活性が高く、通水のない乾燥した組織である (SHAIN, 1971; SHAIN and HILLIS, 1972, 1973)。

本論では、CODIT モデルの wall 1 (軸方向の進展に対する障壁) 及び wall 3 (接線方向の進展に対する障壁) に相当する部位における反応について、反応帯モデルを参考にして議論する。また、wall 2 (半径内側方向の進展に対する障壁) についても wall 1, 3 と本質的に同一であり、反応帯モデルを用いると統一的に理解することができる。すなわち、防御反応を担う柔細胞の空間的な分布及び解剖学的な

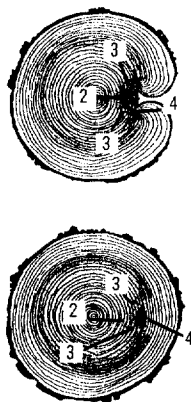
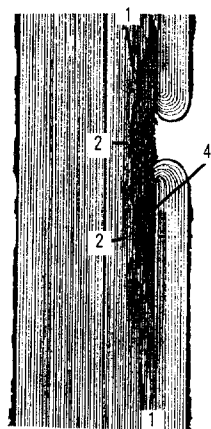
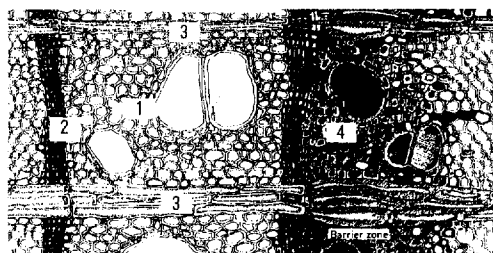


Fig. 34 SHIGO の CODIT モデル

CODIT model proposed by SHIGO

数字は wall (障壁) の番号を表す。wall 1 は軸方向, wall 2 は半径方向, wall 3 は接線方向, wall 4 は外部方向への菌や材の変色・腐朽の進展に対する障壁とされる。wall 1 では、感染後にチロースや沈着物で道管、仮道管が閉塞される。wall 2 は、感染前から存在し、年輪や柔細胞で構成される。wall 3 は、感染前から存在し、放射柔組織で構成される。wall 4 は、感染時に形成層であった部位が分化する際に新たに形成され、柔細胞その他の細胞群からなる。SHIGO and MARX (1977) より改変

Numbers in the figure indicate the numbers of wall. Wall 1, 2, 3 and 4 are barriers to axial, radial, tangential and external spread of fungi or wood discoloration and decay, respectively. Vessels or tracheids become occluded with tyloses or deposits following the infection at wall 1. Wall 2 preexists and is composed of annual ring and parenchyma cells. Wall 3 preexists and is composed of radial parenchyma. Wall 4 is newly formed by the differentiation from cambium at the time of infection, and is composed of several types of cells including parenchyma cells. Modified from SHIGO and MARX (1977)

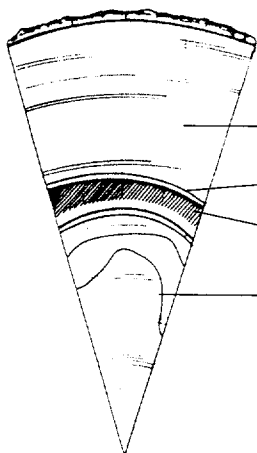


Fig. 35 SHAIN の反応帯モデル

Reaction zone model proposed by SHAIN

(a) 健全辺材, (b) 移行帯, (c) 反応帯, (d) 腐朽部

(a) Sound sapwood, (b) Transition zone, (c) Reaction zone, (d) Decay

材の腐朽の進展は抗菌性物質が集積し、柔細胞が壊死した反応帯で阻止される。移行帯では柔細胞が生存している。SHAIN (1971) より改変

Spread of wood decay is inhibited at reaction zone where antifungal substances accumulated and parenchyma cells are dead. Parenchyma cells are living in transition zone. Modified from SHAIN (1971)

特徴による菌の各方向への進展速度の差異が、材変色・腐朽の形状を決定すると考えることができる。

反応帯形成は傷害やさまざまな微生物の感染を受けた樹木の材における非特異的な反応であるが、SHAIN (1967) の最初の概念に基づく反応帯自身は、感染時にすでに分化していた材部で菌を閉じ込める唯一の障壁ではなく、スギにおいては移行帯も菌の閉じ込めに関与していることが明らかとなった。反応帯はこうした部位を含んだ障壁全体を表す用語としても使用されるが (PEARCE *et al.*, 1994), そこでは厳密な組織学的考慮は払われていない。そこで、ここでは反応帯と移行帯の両者を含む部位を表すために反応障壁という用語を使用する。

6.2.1 反応障壁における化学的变化

化学的防御を担う抗菌性物質は反応障壁における防御機構で最も重要な要素であるとされている。そこで、まず反応障壁の位置、すなわち抗菌性物質集積の部位についてみると、*Pinus taeda* や *Picea abies* では *Heterobasidion annosum* は反応帯まで侵入しない (SHAIN, 1967, 1971) が、*Pinus radiata*-*Amylostereum* の系では病原菌はスチルベン類の集積した部位まで侵入している (SHAIN and HILLIS, 1972)。このように、宿主や菌の組み合わせによって菌がどの部位まで侵入するかが異なる。スギでは *Guignardia cryptomeriae* や *Fusarium* spp. 等の菌は反応帯には侵入するが、移行帯内層まで侵入することは少ない。反応帯は元々は移行帯であった部位であり、スギでは移行帯内層より濃度は低いものの抗菌性物質が残存しており、菌の進展を有効に阻止していると考えられる。

抗菌性物質が反応帯だけでなく、ある場合には移行帯にも集積することは *H. annosum* を接種した *Picea abies* でも報告されている (STENLID and JOHANSSON, 1987)。この場合や本論で検討したスギの場合には、元々の意味での反応帯にあたる単一の部位は存在しない。すなわち、スギではフェノール物質やテルペン類の集積量が最も多かった移行帯内層は、柔細胞が一部を除いて生きており、反応帯とはいえない。スギ心材の周囲の白線帯 (移行帯) においても生きた細胞がみられるが (NOBUCHI and HARADA, 1983), フェノール物質である sequirin-C が集積している (NOBUCHI *et al.*, 1985)。また、放射柔細胞の生存率が辺材の外層から内層にかけて次第に低下する樹種と、心材化する直前まで放射柔細胞のほとんどが生きている樹種とがある (NOBUCHI *et al.*, 1979; 山本, 1982)。こうしたことから、フェノール物質やテルペン類の集積している部位の柔細胞の生死は反応帯形成の段階や樹種によって異なると考えられる。

しかしながら、反応障壁の観察では、抗菌性物質が死んだ組織に集積するという点で共通している。また、この点は一般にファイトアレキシンが壊死した細胞に集積することとも共通する。スギの移行帯内層においてもフェノール物質やテルペン類は生きている柔細胞ではなく、仮道管内に集積した。hinokiresinol や移行帯内層抽出物がスギの柔細胞に毒性を持つことから、仮道管内への抗菌性物質の集積は、菌に対する障壁を形成するうえで巧妙な手段といえる。

ここで hinokiresinol を始めとするノルリグナン類の抗菌性物質がファイトアレキシンであるかどうかについて考えてみたい。一般に、ファイトアレキシンの定義は「微生物に接触した後に植物で合成され集積する低分子の抗菌性物質」である (PAXTON, 1981)。hinokiresinol は感染後に集積する低分子の抗菌性物質であり、ファイトアレキシンと考えるためには、感染後に *de novo* に合成されるかどうか

問題になる。ノルリグナン類はコニフェリルアルコールからリグナンを経て生成するとされることから (ERDTMAN and HARMATHA, 1979; UMEZAWA *et al.*, 1990), たとえ健全辺材に前駆物質が存在してもその量は微量であり, スギにおける hinokiresinol はファイトアレキシンと考えることができる。次に, 横断面及び径断面での材変色の形状と抗菌性物質集積との関連についてみる。樹木では一般に, 心材に集積するフェノール物質が傷害や感染を受けた辺材においても集積する (KEMP and BURDEN, 1986)。しかし, 反応障壁と心材との間で同じような集積のパターンを示すわけではなく, 反応障壁の方が抗菌性の高い物質の割合が多い傾向がある。スギにおいても同様で, 心材は反応障壁に多い hinokiresinol, yateresinol, 1, 4-bis- (*p*-hydroxyphenyl)-butadiene を含まないが, 辺材外層部はこれらの物質を生産する高い能力を持つ (高橋・萩山, 1985 a, 1985 b, 1986)。hinokiresinol が菌に対して高い阻害活性を持つことは, スギの若い材組織が菌の侵入に対する高い動的防御活性を持つことを示している。典型的な材変色の形状は辺材外層より内層の方が接線方向や軸方向に広いが, この形状は辺材外層における動的防御活性が高いことで説明できる。

組織学的変化としてスベリン化についてみると, 軸方向柔細胞におけるスベリン化は障壁帯での防御反応として重要視されている (PEARCE and RUTHERFORD, 1981; PEARCE and HOLLOWAY, 1984; PEARCE and WOODWARD, 1986)。また, スベリン化はいくつかの樹種の反応障壁においても生ずる (PEARCE and RUTHERFORD, 1981; BIGGS, 1987)。しかし, 傷害前に形成された材組織における放射, 軸方向柔細胞の分布は不連続的であり, このことは反応障壁におけるスベリン化の効果が限定されていることを示唆する。BIGGS (1987) は連続的な障壁がスベリン化やチロース等によって形成されると述べている。しかし, 多くの針葉樹ではチロースの欠如と傷害後のスベリン化の範囲が限られていることから (BIGGS, 1987), 針葉樹の材においてはこれらだけでは菌の進展を阻止するには十分でない。従って, 化学的防御機構としての抗菌性物質の役割が重視されよう。

6.2.2 反応障壁における組織学的変化

ここでは, 化学的防御にかかわる物質の集積の組織学的な面について考察する。樹脂様の物質による仮道管の閉塞は多くの針葉樹でみられ, 物理的障壁及び抗菌性物質による化学的障壁として作用し, 菌に対する防御に関与していると考えられている。例えば, *Abies grandis* では樹脂様物質による壁孔の閉塞によって病原の拡大が阻害され (WONG and BERRYMAN, 1977), *Pinus* 属の辺材においても樹脂様物質による仮道管の閉塞が菌の感染やキトサン処理に対する反応として見い出された (SHAIN, 1967; TIPPETT and SHIGO, 1980; HESSBURG and HANSEN, 1987; LIEUTIER and BERRYMAN, 1988 a, b)。この閉塞は材変色の拡大の進行している境界ではみられず (HESSBURG and HANSEN, 1987), 材変色の進展の停止と関連している。

こうした物質の組織学的な起源については, 材に正常な樹脂道を持つ *Pinus* 属や *Picea abies* においても柔組織由来であると考えられている (REID *et al.*, 1967; SHAIN, 1967; SHIGO, 1975; TIPPETT and SHIGO, 1980; LIEUTIER and BERRYMAN, 1988 b)。スギで移行帯内層にみられた油滴状物質は放射柔細胞に由来し, 軸方向柔細胞 (樹脂細胞) からの分泌は観察されなかった。スギの樹脂細胞は放射柔細胞に比べ小型かつ少数でもあり, 防御機構への貢献は小さいと考えられる。スギの材には正常, 傷害樹脂

道ともに存在しないが、スギのように材に樹脂道を持たない樹種においても、放射柔組織の働きによって通導組織の閉塞による障壁が形成されることが見い出されたことは意義が大きい。

針葉樹の反応障壁において仮道管を閉塞している樹脂様物質は広く観察されていたが、その化学分析は行われておらず、*Tsuga heterophylla* (western hemlock) で心材仮道管中の沈着物はリグナン類である matairesinol, hydroxymatairesinol, conidendrin を含むことが知られているのみであった (KRAHMER *et al.*, 1970)。今回、スギの辺材において、移行帯内層の仮道管の沈着物 (油滴状物質) は hinokiresinol のような抗菌性を持つノルリグナン類やテルペン類を含んでおり、仮道管や壁孔といった菌の通路を塞ぎ、空間的に連続した反応障壁を形成することが明らかにされた。仮道管における樹脂様物質が広く観察されることから、反応障壁における柔組織由来のフェノール物質やテルペン類の集積と通導組織の閉塞は樹木の防御機構として一般性であろう。集積した抗菌性物質が菌の進展する通路を塞いでいることが組織学的に裏付けられたことから、反応障壁の形成は材における防御機構として重要性が高い。

6.3 動的防御機構の評価

ここでは静的、受動的な防御機構とされる材内の環境要因と、化学的、組織学的な宿主反応による動的な防御機構とを比較し、それぞれが防御機構として成り立つかどうか、また材変色の形状や大きさを決定する要因となるかどうかを検討する。

まず、材内の環境要因が防御機構として成り立つかどうかを考察する。主に広葉樹において、生立木における菌や腐朽の進展は静的、受動的な機構、特に材内の水分状態で説明されるとする考えがある (BODDY and RAYNER, 1983; LEBEN, 1985)。この説では、辺材における菌の進展に対する抵抗性は、防水層 (water-proofing layer) によって保たれる高い含水率と酸素不足に依存する (BODDY and RAYNER, 1983)。彼らは、水分の多い材内環境は菌にとって好適ではなく、空気の入った組織が好適だとしている。

しかしながら、スギでは移行帯内層は通水がなく含水率が低いにもかかわらず、菌の侵入はほとんどみられない。さらに、*G. cryptomeriae* を接種したスギの冷凍処理丸太では含水率の減少が認められなかったにもかかわらず、菌の進展が速かった。これらの結果は高い含水率は菌の進展阻害にかかわらないことを示している。*H. annosum* が感染した針葉樹の例をみても、通水の認められる辺材は、通水がなく含水率が低い反応帯及び移行帯によって病原菌と隔てられている (SHAIN, 1971; COUTTS, 1976)。

材内の空気に関しては、移行帯では酸素が少なく、二酸化炭素が多いことが予想されるが、*H. annosum* は好氣的な環境下でも、ほとんど嫌氣的な環境下でも生育する (GUNDERSEN, 1961)。こうした抗微生物的な材内環境 (その他にも pH, 養分への到達性や利用性が挙げられる) をみると、阻害物質が欠如している点を除けば、変色辺材は反応帯や移行帯と同様菌に対して阻害的である。しかし、変色辺材に菌が定着していることから、菌の進展阻害における材内の環境要因の影響は大きなものではない。

さらに、防水層と菌に対する障壁との位置関係について考えてみると、針葉樹では、樹脂が充満した材組織は物理的に菌の侵入を防ぐ障壁として働くことが示唆される (VERRALL, 1938; RISHBETH, 1972;

HART *et al.*, 1975)。しかしながら、樹脂が充満した組織と健全辺材との間の移行帯は乾燥しており、樹脂が充満した組織が防水層として働いているわけではない。すなわち、防水層と菌に対する障壁とは位置が一致せず、この両者は全く異なるものである。こうしたことから、針葉樹では材内の水分や空気といった環境要因は主要な防御機構とはなり得ないと考えられる。

次に、接線面でみた材変色や菌の進展範囲を決定する要因についてみる。形成層から離れた方が、また、接線方向よりも軸方向の方が菌の進展が大きいことが、典型的な材変色・腐朽の形状を決定する (SHAIN, 1967)。RAYNER and BODDY (1988) は、CODIT の wall 1~3 の位置や「強さ」が純粹に解剖学的な見地から説明できる、すなわち多くの材要素の形状は軸方向に長く、物理的障害が少ないため軸方向で菌の進展が大きい、と考えている。WONG and BERRYMAN (1977) も同じ考えから仮道管の形状がそのまま軸方向に長い材変色部の形状を説明すると述べている。

確かに、材組織の物理的構造は材変色や菌の進展範囲の形状を決定するのに部分的にかかわっているであろうが、それだけでは菌の病原力の違いによって材変色の大きさが異なることを説明できない。また、宿主組織が生きていることによって菌の進展範囲の形状比が大きくなるという変化を説明できない。こうした現象は動的防御機構の存在を考慮に入れて初めて説明できるものである。BODDY and RAYNER (1983) はまた、辺材内層で材変色の広がりが大きいの、辺材内層で含水率が低く空気が多いためだと説明している。しかし、この現象も動的防御機構によって、すなわち辺材内層で柔細胞の活性が低く防御反応が弱いことによって説明できる。こうしたことから、菌や材変色の進展範囲の形状を決定する要因として、材組織の物理的構造に加え動的防御機構が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

材変色の大きさを決定する要因については、LEBEN (1985) は材内のテンションが主要な要因だと考えた。材変色や菌は接種後急速に進展するが、その後進展速度が低下し、そして停止する。こうした現象は本論で述べたスギの例の他、*Abies grandis* (WONG and BERRYMAN, 1977) や *Platanus acerifolia* (CLERIVET and EL MODAFAR, 1994) でも報告されている。しかし、傷害だけを与えた場合に生じる材変色の範囲は強病原力菌株接種の場合に比べはるかに小さかったことから、テンションはせいぜい傷害のみによって形成された材変色の大きさを説明するに過ぎず、菌接種の場合の初期の急速な材変色の拡大にはかかわっていないと判断される。さらに、材変色や菌の進展速度の低下は宿主の動的な防御反応の誘導によって説明できる。従って、菌の病原力と材の防御反応による菌と宿主との相互作用が、材変色の大きさを決定する主要な要因だと考えられる。

以上のことから、動的防御反応がスギの材の防御に寄与する決定的に重要な要素であり、静的な防御機構の意義は侵入した菌に対しては小さいことが明らかとなった。

6.4 菌の侵入に対する防御反応の誘導

まず防御反応を誘導する機構に関してみると、防御反応の誘導には乾燥帯形成との関連が考えられる。材変色・腐朽部ではテンションが解放され、健全辺材における負圧によって水分が健全辺材側へ移動し、通水のない乾燥帯（移行帯）が形成される (COUTTS, 1976)。COUTTS (1977) は乾燥帯形成には生きている宿主細胞の反応が必要であることをも示した。菌を接種したスギの生立木や新鮮丸太では含

水率が低下し、冷凍処理丸太では低下しなかったことは、COUTTS (1976, 1977) の結果と一致し、乾燥帯形成に生きている宿主細胞の存在が必要なることを示している。*Ceratocystis wageneri* に感染した *Pseudotsuga menziesii* では、ガム質状の沈着物が詰まった仮道管に接した仮道管がピットアスピレーションを起こしており (HESSBURG and HANSEN, 1987)、柔細胞から仮道管への沈着物の漏出も、負圧と相まって、ピットアスピレーションによる通導組織の閉塞を引き起こすと考えられる。また、マツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* に感染したクロマツにおいて、モノテルペン類の生成が不可逆的なキャビテーション、すなわち乾燥帯形成を誘起することが示唆された (KURODA, 1989)。このように材の柔細胞による傷害反応あるいは防御反応が乾燥帯形成にかかわっていると考えられる。これとは逆に、スギでは材の乾燥がノルリグナン類等のフェノール物質の生成を誘起することが報告されていることから (OHASHI *et al.*, 1991)、移行帯におけるキャビテーションが二次的に乾燥によって移行帯内層の油滴状物質の沈着を起こす可能性もある。

防御反応を誘導する物質については、ファイトアレキシンの集積を誘起するエリシター (KEEN, 1975) は宿主-寄生者相互作用によるだけでなく、非生物的ストレス下で宿主自身によっても生産が制御される (DARVILL and ALBERSHEIM, 1984)。病原菌が材内に侵入した場合についてみると、抗菌性物質生産等の防御反応を起こしているスギの柔細胞は直接菌とは接触していないため、防御反応を引き起こす刺激が問題となる。菌の生産する毒性物質が作用している可能性は否定できないが、傷処理のみの対照においても菌接種の場合と同様に抗菌性物質の集積が認められたことは、宿主側のなんらかの刺激が柔組織の壊死部から移行帯へ伝わっていることを示唆している。

菌の進展阻止における抗菌性物質集積の役割についてみると、*G. cryptomeriae* を接種したスギ生立木において材変色や接種菌の進展速度は接種後 2 週間程度で低下した。このことは、抗菌性物質の濃度が増大するとともに菌の進展速度が低下したことを示しており、従って抗菌性物質が直接菌の進展阻害にかかわっていることを示唆している。

病原菌の存在と防御反応の強度との関係についてみると、PEARCE *et al.* (1994) は反応帯の反応が菌の侵入によって傷害のみの場合よりも促進されることを示唆した。スギにおいても病原菌 *G. cryptomeriae* の存在により hinokiresinol の集積量が増加することを示唆する結果が得られた。このことは病原菌の存在が防御反応を促進していることを示している。

化学的防御機構の働いている期間についてみると、ニレ立枯病では急速なファイトアレキシンの集積は病原菌の初期の侵入を遅らせるが、他の抵抗性機構、例えば障壁帯形成、が働くまでの一時的な役割を果たしていると考えられる (RIOUX and OUELLETTE, 1989)。しかし、本論におけるスギの場合や *H. annosum* に感染したマツ類や *P. abies* の場合は抗菌性物質の濃度は高いままで維持されることから、化学的防御機構が感染の初期から始まって長期間機能し続けると考えられる。

以上のことから、スギの材では抗菌性物質集積という化学的防御機構が感染の初期段階から働くことで菌や材変色の進展を遅延させ、さらに進展が停止した後も長期間にわたって効果的に機能し続けると結論された。

謝 辞

本稿は、東京大学学位論文「菌の侵入に対するスギ生立木辺材の反応に関する研究—特に反応障壁の形成について—」（主査：鈴木和夫，1996年9月）をもとにとりまとめたものである。

本研究の端緒を与えられ、さらに本稿を草するに当たり幾多のご教示と激励を賜った東京大学農学部 鈴木和夫教授に深く感謝の意を表するとともに、学位論文の審査をしていただいた東京大学農学部 山崎素直教授，日比忠明教授，古田公人教授，丹下 健助教授に深謝する。また，岡山大学 奥 八郎名誉教授，岐阜大学 大橋英雄教授，山形大学 高橋孝悦助教授，三重県林業技術センター 奥田清貴氏には標品や材料の提供，研究上多くのご教示をいただいた。ここに深謝する。森林総合研究所森林生物部 竹谷昭彦部長，田村弘忠前部長，金子 繁森林微生物科長，田畑勝洋生物管理科長，楠木 学樹病研究室長，渡邊恒雄前腐朽病害研究室長，中島忠一化学制御研究室長を始め，同部の各位，また，森林総合研究所東北支所 伊藤進一郎樹病研究室長，森林総合研究所関西支所樹病研究室及び昆虫研究室の各位，元森林総合研究所四国支所保護研究室長 峰尾一彦氏，熊本県林業研究指導所 宮島淳二氏には終始ご教示とご協力をいただいた。ここに深謝する。

引 用 文 献

- 阿部善作，小田一幸（1994）：スギ心材の黒変現象（第2報）原因物質のひとつとして，炭酸水素カリウムの同定，木材誌，**40**，1126-1130
- 明日山秀文，向 秀夫，鈴木直治（編）（1962）：植物病理実験法，日本植物防疫協会，東京，843 pp.
- BALLARD, R.G., M.A. WALSH and W.E. COLE (1982): Blue-stain fungi in xylem of lodgepole pine: a light-microscope study on extent of hyphal distribution, Can. J. Bot., **60**, 2334-2341
- , ——— and ——— (1984): The penetration and growth of blue-stain fungi in sapwood of lodgepole pine attacked by mountain pine beetle, Can. J. Bot., **62**, 1724-1729
- BANFIELD, W.M. (1968): Dutch elm disease recurrence and recovery in American elm, Phytopath. Z., **62**, 21-60
- BARRAS, S.J. and J.J. TAYLOR (1973): Varietal *Ceratocystis minor* identified from mycelium of *Dendroctonus frontalis*, Mycopath. Mycol. appl., **50**, 293-305
- BASHAM, H.G. (1970): Wilt of loblolly pine inoculated with blue-stain fungi of genus *Ceratocystis*, Phytopathology, **60**, 750-754
- BASSETT, C., R.T. SHERWOOD, J.A. KEPLER and P.B. HAMILTON (1967): Production and biological activity of fomannosin, a toxic sesquiterpene metabolite of *Fomes annosus*, Phytopathology, **57**, 1046-1052
- BECKMAN, C.H. (1956): Production of pectinase, cellulases, and growth-promoting substance by *Ceratostomella ulmi*, Phytopathology, **46**, 605-609
- (1959): Dutch elm disease control with polychlorobenzoic acid, Phytopathology, **49**, 227

- BEGA, R.V. and J. TARRY (1966): Influence of pine root oleoresins on *Fomes annosus*, *Phytopathology*, **56**, 870
- BERRYMAN, A.A. (1972): Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations, *BioScience*, **22**, 598-602
- BIGGS, A.R. (1987): Occurrence and location of suberin in wound reaction zones in xylem of 17 tree species, *Phytopathology*, **77**, 718-725
- BODDY, L. and A.D.M. RAYNER (1983): 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
- BONSEN, K.J.M., R.J. SCHEFFER and D.M. ELGERSMA (1985): Barrier zone formation as a resistance mechanism of elms to Dutch elm disease, *IAWA Bulletin n. s.*, **6**, 71-77
- BRASIER, C.M. (1990): China and the origins of Dutch elm disease: an appraisal, *Plant Path.*, **39**, 5-16
- (1991): *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics, *Mycopathologia*, **115**, 151-161
- BRENER, W.D. and C.H. BECKMAN (1968): A mechanism of enhanced resistance to *Ceratocystis ulmi* in American elms treated with sodium trichlorophenylacetate, *Phytopathology*, **58**, 555-561
- BRIDGES, J.R. (1987): Effects of terpenoid compound on growth of symbiotic fungi associated with southern pine beetle, *Phytopathology*, **77**, 83-85
- BUISMAN, C. (1935): The anatomy of wood of elms infected with *Graphium ulmi*, *Plantenzickten*, **41**, 104-120
- BURDEN, R.S. and M.S. KEMP (1984): Sesquiterpene phytoalexins from *Ulmus glabra*, *Phytochemistry*, **23**, 383-385
- CAIRD, R.W. (1935): Physiology of pines infested with bark beetles, *Bot. Gaz.*, **96**, 709-733
- CERNY, G. (1973): Hemmung einiger Ektoenzyme von *Fomes annosus* (FR.) CKE. durch Holz- und Bastextrakte aus *Picea abies* (KARST.), *Eur. J. For. Path.*, **3**, 214-220
- CHENICLET, C. (1987): Effects of wounding and fungus inoculation on terpene producing systems of maritime pine, *J. Exp. Bot.*, **38**, 1557-1572
- CLERIVET, A. and C. EL MODAFAR (1994): Vascular modifications in *Platanus acerifolia* seedlings inoculated with *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, *Eur. J. For. Path.*, **24**, 1-10
- COBB, F.W., JR., M. KRSTIC, E. ZAVARIN and H.W. BARBER, JR. (1968): Inhibitory effects of volatile oleoresin components on *Fomes annosus* and four *Ceratocystis* species, *Phytopathology*, **58**, 1327-1335
- Committee on Nomenclature, International Association of Wood Anatomists (1957): International glossary of terms used in wood anatomy, *Trop. Woods*, **107**, 1-36
- COOK, S.P. and F.P. HAIN (1985): Qualitative examination of the hypersensitive response of loblolly pine, *Pinus taeda* L., inoculated with two fungal associates of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* ZIMMERMANN (Coleoptera: Scolytidae), *Env. Ent.*, **14**, 396-400
- and ———— (1986): Defensive mechanisms of loblolly and shortleaf pine against attack by southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* ZIMMERMANN, and its fungal

- associate, *Ceratocystis minor*, J. Chem. Ecol., **12**, 1397-1406
- COUTTS, M.P. (1976): The formation of dry zones in the sapwood of conifers. I. Induction of drying in standing trees and logs by *Fomes annosus* and extracts of infected wood, Eur. J. For. Path., **6**, 372-381
- (1977): The formation of dry zones in the sapwood of conifers. II. The role of living cells in the release of water, Eur. J. For. Path., **7**, 6-12
- and J.E. DOLEZAL (1965): *Sirex noctilio*, its associated fungus, and some aspects of wood moisture content, Aust. For. Res., **1** (4), 3-13
- DARVILL, A.G. and P. ALBERSHEIM (1984): Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants, Annu. Rev. Plant Physiol., **35**, 243-275
- DESJARDINS, A.E. and H.W. GARDNER (1989): Genetic analysis in *Gibberella pulicaris*: rishitin tolerance, rishitin metabolism, and virulence on potato tubers, Mol. Plant-Micr. Inter., **2**, 26-34
- and ——— (1991): Virulence of *Gibberella pulicaris* on potato tubers and its relationship to a gene for rishitin metabolism, Phytopathology, **81**, 429-435
- DIMOND, A.E. (1970): Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome, Annu. Rev. Phytopath., **8**, 301-322
- DUCHESNE, L., R.S. JENG and M. HUBBES (1984): Effect of *Ceratocystis ulmi* strain aggressiveness on phytoalexin accumulation in *Ulmus americana* L., Can. J. Plant Path., **6**, 261
- DUCHESNE, L.C., M. HUBBES and R.S. JENG (1986): Mansonone E and F accumulation in *Ulmus pumila* resistant to Dutch elm disease, Can. J. For. Res., **16**, 410-412
- , R.S. JENG and M. HUBBES (1985): Accumulation of phytoalexins in *Ulmus americana* in response to infection by a nonaggressive and an aggressive strain of *Ophiostoma ulmi*, Can. J. Bot., **63**, 678-680
- , ———, ——— and M.B. STICKLEN (1990): Accumulation of mansonones E and F in seedlings of *Ulmus americana* in response to inoculation with *Ophiostoma ulmi*, Trees, **4**, 187-190
- DUMAS, M.T., G.M. STRUNZ, M. HUBBES and R.S. JENG (1983): Isolation and identification of six mansonones from *Ulmus americana* infected with *Ceratocystis ulmi*, Experientia, **39**, 1089-1090
- ECKSTEIN, D., W. LIESE and A.L. SHIGO (1979): Relationship of wood structure to compartmentalization of discolored wood in hybrid poplar, Can. J. For. Path., **9**, 205-210
- EDGINGTON, L.V. (1963): A chemical that retards development of Dutch elm disease, Phytopathology, **53**, 349
- ELGERSMA, D.M. (1967): Factors determining resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*, Phytopathology, **57**, 641-642
- (1970): Length and diameter of xylem vessels as factors in resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*, Neth. J. Plant Path., **76**, 179-182
- (1973): Tylose formation in elms after inoculation with *Ceratocystis ulmi*, a possible resistance mechanism, Neth. J. Plant Path., **79**, 218-220
- and H.M. HEYBROEK (1979): Spread and survival of an aggressive and a non-aggressive strain of *Ophiostoma ulmi* in elms, Neth. J. Plant Path., **85**, 235-240

- and H. J. MILLER (1977) : Tylose formation in elms after inoculation with an aggressive or a non-aggressive strain of *Ophiostoma ulmi* or with a non-pathogen to elms, *Neth. J. Plant Path.*, **83**, 241-243
- and J. C. OVEREEM (1971) : The relation of mansonones to resistance against Dutch elm disease and their accumulation as induced by several agents, *Neth. J. Plant Path.*, **79**, 218-220
- ELLMORE, G. S. and F. W. EWERS (1985) : Hydraulic conductivity in trunk xylem of elm, *Ulmus americana*, *IAWA Bulletin n. s.*, **6**, 303-307
- ERDTMAN, H. (1949) : Heartwood extractives of conifers. Their fungicidal and insect-repellent properties and taxonomic interest, *Tappi J.*, **32**, 305-310
- and J. HARMATHA (1979) : Phenolic and terpenoid heartwood constituents of *Libocedrus yateensis*, *Phytochemistry*, **18**, 1495-1500
- ETHERIDGE, D. E. (1961) : Factors affecting branch infection in aspen, *Can. J. Bot.*, **39**, 799-816
- FLAMM, R. O., R. N. COULSON and T. L. PAYNE (1988) : The southern pine beetle, *In* : BERRYMAN, A. A. (ed.) *Dynamics of forest insect populations. Patterns, causes, implications*, Plenum Press, New York and London, 531-553
- FLODIN, K. (1979) : Effects of monoterpenes on *Fomes annosus* (Fr.) COOKE and its phenol oxidase activity, *Eur. J. For. Path.*, **9**, 1-6
- and N. FRIES (1978) : Studies on volatile compounds from *Pinus silvestris* and their effect on wood-decomposing fungi. II. Effects of some volatile compounds on fungal growth, *Eur. J. For. Path.*, **8**, 300-310
- FREY-WYSSLING, A. and H. H. BOSSHARD (1959) : Cytology of the ray cells in sapwood and heartwood, *Holzforschung*, **13**, 129-137
- GAGNON, C. (1967) : Polyphenols and discoloration in the elm disease investigated by histochemical techniques, *Can. J. Bot.*, **45**, 2119-2124
- GIBBS, J. N. (1968) : Resin and the resistance of conifers to *Fomes annosus*, *Ann. Bot.*, **32**, 649-665
- (1972) : Tolerance of *Fomes annosus* isolates to pine oleoresins and pinosylvins, *Eur. J. For. Path.*, **2**, 147-151
- (1978) : Intercontinental epidemiology of Dutch elm disease, *Annu. Rev. Phytopath.*, **16**, 287-307
- and C. M. BRASIER (1973) : Correlation between cultural characters and pathogenicity in *Ceratocystis ulmi* from Britain, Europe and America, *Nature*, **241**, 381-383
- GLAZENER, J. A. and H. D. VANETTEN (1978) : Phytotoxicity of phaseollin to, and alteration of phaseollin by, cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*, *Phytopathology*, **68**, 111-117
- GOOD, H. M., P. M. MURRAY and H. M. DALE (1955) : Studies on heartwood formation and staining in sugar maple, *Acer saccharum* MARSH., *Can. J. Bot.*, **33**, 31-41
- GUNDERSEN, K. (1961) : Growth of *Fomes annosus* under reduced oxygen pressure and the effect of carbon dioxide, *Nature*, **190**, 649-650
- HART, J. H. (1965) : Formation of discolored sapwood in three species of hardwoods, *Michigan Agr. Exp. Sta. Quart. Bull.*, **48**, 101-116
- (1968) : Morphological and chemical differences between sapwood, discolored sap-

- wood, and heartwood in black locust and Osage orange, For. Sci., **14**, 334-338
- (1981): Role of phytostilbenes in decay and disease resistance, Annu. Rev. Phytopath., **19**, 437-458
- , J.F. WARDELL and R.W. HEMINGWAY (1975): Formation of oleoresin and lignans in sapwood of white spruce in response to wounding, Phytopathology, **65**, 412-417
- HEMINGWAY, R.W., G.W. MCGRAW and S.J. BARRAS (1977): Polyphenols in *Ceratocystis minor* infected *Pinus taeda*: fungal metabolites, phloem and xylem phenols, J. Agric. Food Chem., **25**, 717-722
- HEPTING, G.E. and D.J. BLAISDELL (1936): A protective zone in red gum scars, Phytopathology, **26**, 62-67
- HESLIN, M.C., M.R. STUART, P.O. MURCHU and D.M.X. DONNELLY (1983): Fomannoxin, a phytotoxic metabolite of *Fomes annosus*: in vitro production, host toxicity and isolation from naturally infected Sitka spruce heartwood, Eur. J. For. Path., **13**, 11-23
- HESSBURG, P.F. and E.M. HANSEN (1987): Pathological anatomy of black stain root disease of Douglas-fir, Can. J. Bot., **65**, 962-971
- 樋口隆昌, 島田幹夫, 渡辺孝司 (1967): 心材形成機構に関する研究 (第6報) スギおよびアカマツの人工心材について, 木材誌, **13**, 274-279
- HILLIS, W.E. and T. INOUE (1968): The formation of polyphenols in trees. IV. The polyphenols formed in *Pinus radiata* after *Sirex* attack, Phytochemistry, **7**, 13-22
- HODGES, C.S. (1969): Modes of infection and spread of *Fomes annosus*, Annu. Rev. Phytopath., **7**, 247-266
- HODGES, J.D. and P.L. LORIO, JR. (1975): Moisture stress and composition of xylem oleoresin in loblolly pine, For. Sci., **21**, 283-290
- HOUSTON, D.R. (1985): Spread and increase of *Ceratocystis ulmi* with cultural characteristics of the aggressive strain in northeastern North America, Plant Dis., **69**, 677-680
- (1991): Changes in nonaggressive and aggressive subgroups of *Ophiostoma ulmi* within two populations of American elm in New England, Plant Dis., **75**, 720-722
- HUBBES, M. and R.S. JENG (1981): Aggressiveness of *Ceratocystis ulmi* strains and induction of resistance in *Ulmus americana*, Eur. J. For. Path., **11**, 257-264
- ISHIDA, K., K. SUZUKI and T. HOGETSU (1992): Spreading of nuclear degradation in *Pinus thunbergii* PARL. cuttings under water stress, Plant Cell Physiol., **33**, 897-907
- ISHIGURI, Y., K. TOMIYAMA, A. MURAI, N. KATSUI and T. MASAMUNE (1978): Toxicity of rishitin, rishitin-M-1 and rishitin-M-2 to *Phytophthora infestans* and potato tissue, Ann. Phytopath. Soc. Japan, **44**, 52-56
- 伊藤一雄, 洪川浩三, 小林享夫 (1974): スギの赤枯病に関する病原学的ならびに病理学的研究 (IV) *Cercospora sequoiae* ELLIS et EVERHART (*C. cryptomeriae* SHIRAI) による赤枯病と溝腐病, 林試研報, (268), 81-134
- JACKSON, M.L. (1958): Soil chemical analysis, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 498 pp.
- JENG, R.S., A.C. ALFENAS, M. HUBBES and M. DUMAS (1983): Presence and accumulation of fungitoxic substances against *Ceratocystis ulmi* in *Ulmus americana*: possible relation to induced resistance, Eur. J. For. Path., **13**, 239-244

- JOHANSSON, M., T. POPOFF and O. THEANDER (1976): Effect of spruce root constituents on extracellular enzymes of *Fomes annosus*, *Physiol. Plant.*, **37**, 275-282
- and O. THEANDER (1974): Changes in sapwood of roots of Norway spruce, attacked by *Fomes annosus*. Part I., *Physiol. Plant.*, **30**, 218-225
- JONES, R.K., C.J. KRASS and R.J. SAVA (1978): Isolation of *Ceratocystis ulmi* from 14-year-old annual rings of English elm in California, *Plant Dis. Repr.*, **62**, 994-995
- JORGENSEN, E. (1961): The formation of pinosylvins and its monomethyl ether in the sapwood of *Pinus resinosa* AIT., *Can. J. Bot.*, **39**, 1765-1772
- (1962): Observations on the formation of protection wood, *For. Chron.*, **38**, 292-294
- KEEN, N.T. (1975): Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens?, *Science*, **187**, 74-75
- KEMP, M.S. and R.S. BURDEN (1986): Phytoalexins and stress metabolites in the sapwood of trees, *Phytochemistry*, **25**, 1261-1269
- KISTLER, H.C. and H.D. VANETTEN (1984): Regulation of pisatin demethylation in *Nectria haematococca* and its influence on pisatin tolerance and virulence, *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2605-2613
- 清原友也, 堂園安生, 橋本平一 (1985): スギカミキリ被害に随伴する菌類(I), 日林九支研論集, **38**, 189-190
- , 徳重陽山 (1967): スギ溝腐病組織より赤枯病菌の分離, 日林九支研論集, **21**, 67-68
- 小林一三, 柴田叔弼 (1985): スギカミキリの被害と防除法, わかりやすい林業研究解説シリーズ, No. 77, 林業科学技術振興所, 東京, 88 pp.
- 小林享夫 (1957): スギの暗色枝枯病に関する研究, 林試研報, (96), 17-36
- (1989): スギ, ヒノキ穿孔性害虫の生態と加害 (IV) 加害に伴う材変色, 腐朽に関与する微生物 (I) 加害材から分離, 検出される糸状菌, 森林防疫, **38**, 38-43
- , 林 弘子, 伊藤進一郎, 田端雅進, 中川茂子, 窪野高德 (1988): 千葉県におけるスギ暗色枝枯病の集団発生, 99 回日林論, 527-528
- , 窪野高德, 楠木 学, 林 弘子 (1986): スギ, ヒノキ穿孔性害虫の加害に関連する微生物 (予報) (I) 被害材の糸状菌相, 97 回日林論, 507-508
- KONDO, T., H. IMAMURA and M. SUDA (1959): Wood extractives. Part VIII. On the heartwood constituents of *Cryptomeria japonica* D. DON. (1), *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 233-239
- 近藤民雄, 今村博之, 須田元茂 (1959): スギ樹脂成分の研究 (第1報) フェノール性および中性成分その1., 薬学雑誌, **79**, 1298-1300
- KONDO, T., H. IMAMURA and M. SUDA (1960): Wood extractives. Part IX. A new diterpene alcohol from *Cryptomeria japonica* D. DON, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 65-68
- 紺谷修治 (1977): スギのボタン材に関する研究 (予報), 28 回日林関西支講, 271-274
- KRAHMER, R.L., R.W. HEMINGWAY and W.E. HILLIS (1970): The cellular distribution of lignans in *Tsuga heterophylla* wood, *Wood Sci. Tech.*, **4**, 122-139
- KURODA, K. (1989): Terpenoids causing tracheid-cavitation in *Pinus thunbergii* infected by the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*), *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **55**, 170-178
- LEBEN, C. (1985): Wound occlusion and discolouration columns in red maple, *New Phytol.*, **99**,

485-490

- LESTER, D.T. and E.B. SMALLEY (1972): Response of *Ulmus pumila* and *U. pumila* × *rubra* hybrids to inoculation with *Ceratocystis ulmi*, *Phytopathology*, **62**, 848-852
- LIEUTIER, F. and A.A. BERRYMAN (1988 a): Elicitation of defensive reactions in conifers, In : MATTSON, W.J., J. LEVIEUX and C. BERNARD-DAGAN (eds.) Mechanisms of woody plant defenses against insects. Search for pattern, Springer-Verlag, New York, 313-319
- and ——— (1988 b): Preliminary histological investigations of the defense reactions of three pines to *Ceratocystis clavigera* and two chemical elicitors, *Can. J. For. Res.*, **18**, 1243-1247
- , ——— and J.A. MILLSTEIN (1991): Preliminary study of the monoterpene response of three pines to *Ophiostoma clavigerum* (Ascomycetes: Ophiostomatales) and two chemical elicitors, *Ann. Sci. For.*, **48**, 377-388
- LIN, R.T. (1965): A study on the electrical conduction in wood, *For. Prod. J.*, **15**, 506-514
- LOMAN, A.A. (1970 a): The effect of heartwood fungi of *Pinus contorta* var. *latifolia* on pinosylvin, pinosylvinmonomethyl ether, pinobanksin, and pinocembrin, *Can. J. Bot.*, **48**, 737-747
- (1970 b): Bioassays of fungi isolated from *Pinus contorta* var. *latifolia* with pinosylvin, pinosylvinmonomethyl ether, pinobanksin, and pinocembrin, *Can. J. Bot.*, **48**, 1303-1308
- LUCY, M.C., P.S. MATTHEWS and H.D. VANETTEN (1988): Metabolic detoxification of the phytoalexins maackiain and medicarpin by *Nectria haematococca* field isolates: relationship to virulence on chickpea, *Physiol. Mol. Plant Path.*, **33**, 187-199
- MACDONALD, W.L. and H.S. McNABB (1974): Electron microscope observations of *Ceratocystis ulmi*-induced tylosis development in *Ulmus*, *Eur. J. For. Path.*, **4**, 2-10
- MALLOY, O.C. and V.S. ROBINSON (1968): Microorganisms associated with heart rot in young grand fir, *Can. J. Bot.*, **46**, 306-309
- MATHRE, D.E. (1964 a): Survey of *Ceratocystis* spp. associated with bark beetles in California, *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **22**, 353-362
- (1964 b): Pathogenicity of *Ceratocystis ips* and *Ceratocystis minor* to *Pinus ponderosa*, *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **22**, 363-388
- McNABB, H.S., JR., H.M. HEYBROEK and W.L. MACDONALD (1970): Anatomical factors in resistance to Dutch elm disease, *Neth. J. Plant Path.*, **76**, 196-204
- MCPARTLAND, J.M. and D.F. SCHOENEWEISS (1984): Hyphal morphology of *Botryosphaeria dothidea* in vessels of unstressed and drought-stressed stems of *Betula alba*, *Phytopathology*, **74**, 358-362
- MIAO, V.P.W. and H.D. VANETTEN (1992): Genetic analysis of the role of phytoalexin detoxification in virulence of the fungus *Nectria haematococca* on chickpea (*Cicer arietinum*), *Appl. Env. Microbiol.*, **58**, 809-814
- MILLER, R.H., H.S. WHITNEY and A.A. BERRYMAN (1986): Effects of induced translocation stress and bark beetle attack (*Dendroctonus ponderosae*) on heat pulse velocity and the dynamic wound response of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*), *Can. J. Bot.*, **64**, 2669-2674

- MOORE, K.E. (1978) : Barrier-zone formation in wounded stems of sweetgum, *Can. J. For. Res.*, **8**, 389-397
- MUTTON, D.B. (1962) : Wood resins, *In* : HILLIS, W.E. (ed.) Wood extractives, Academic Press, London, New York, 331-363
- NAGAHAMA, S. (1964 a) : Terpenoids. VII. The isolation of sandaracopimarinol from the wood oil of "Sugi", *Bull. Chem. Soc. Japan*, **37**, 886-887
- (1964 b) : Terpenoids. VIII. Sesquiterpenoids from the wood oil of "Sugi" (*Cryptomeria japonica* D. DON.), *Bull. Chem. Soc. Japan*, **37**, 1029-1032
- 中島 健, 善本知孝, 福住俊朗 (1980) : スギ材中のシイタケ菌阻害成分, *木材誌*, **26**, 698-702
- NEWBANKS, D., A. BOSCH and M.H. ZIMMERMANN (1983) : Evidence for xylem dysfunction by embolization in Dutch elm disease, *Phytopathology*, **73**, 1060-1063
- NOBUCHI, T., S. TAKAHARA and H. HARADA (1979) : Studies on the survival rate of ray parenchyma cells with ageing process in coniferous secondary xylem, *Bull. Kyoto Univ. For.*, **51**, 239-246
- and H. HARADA (1983) : Physiological features of the "white zone" of sugi (*Cryptomeria japonica* D. DON). - Cytological structure and moisture content, *Mokuzai Gakkaishi*, **29**, 824-832
- , H. MATSUNO and H. HARADA (1985) : Radial distribution of heartwood phenols and the related cytological structure in the fresh wood of sugi (*Cryptomeria japonica* D. DON), *Mokuzai Gakkaishi*, **31**, 711-718
- OHASHI, H., N. KATO, T. IMAI and S. KAWAI (1991) : Characterization of physiological functions of sapwood : fluctuation of heartwood extractives in the withering process of Japanese cedar sapwood fed an inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase, *Holzforschung*, **45**, 245-252
- 大迫靖雄, 堤 利夫, 野淵 正, 森田 学 (1972) : 木材の質的生産技術に関する研究 (1) ボタン材について, *京大演報*, **44**, 159-175
- OKU, H., T. SHIRAISHI and S. KUROZUMI (1979) : Participation of toxin in wilting of Japanese pines caused by a nematode, *Naturwissenschaften*, **66**, 210
- OUELLETTE, G.B. (1978 a) : Unusual cell wall layers in elm parenchyma of secondary xylem, *Can. J. Bot.*, **56**, 2109-2113
- (1978 b) : Fine structural observations on substances attributable to *Ceratocystis ulmi* in American elm and aspects of host cell disturbances, *Can. J. Bot.*, **56**, 2550-2566
- (1978 c) : Ultrastructural observations on pit membrane alterations and associated effects in elm xylem tissues infected by *Ceratocystis ulmi*, *Can. J. Bot.*, **56**, 2567-2588
- (1978 d) : Light and electron microscope studies on cell wall breakdown in American elm xylem tissues infected with Dutch elm disease, *Can. J. Bot.*, **56**, 2666-2693
- (1980) : Occurrence of tyloses and their ultrastructural differentiation similarly configured structures in American elm infected by *Ceratocystis ulmi*, *Can. J. Bot.*, **58**, 1056-1073
- (1981 a) : Ultrastructural cell wall modifications in secondary xylem of American elm surviving the acute stage of Dutch elm disease : vessel members, *Can. J. Bot.*, **59**, 2411-2424

- (1981b) : Ultrastructural cell wall modifications in secondary xylem of American elm surviving the acute stage of Dutch elm disease : fibres, *Can. J. Bot.*, **59**, 2425-2438
- and D. RIOUX (1992) : Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch elm disease, *In* : BLANCHETTE, R.A. and A.R. BIGGS (eds.) *Defense mechanisms of woody plants against fungi*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 257-307
- OVEREEM, J.C. and D.M. ELGERSMA (1970) : Accumulation of mansonones E and F in *Ulmus hollandica* infected with *Ceratocystis ulmi*, *Phytochemistry*, **9**, 1949-1952
- OWEN, D.R., K.Q. LINDAHL, JR., D.L. WOOD and J.R. PARMETER, JR. (1987) : Pathogenicity of fungi isolated from *Dendroctonus valens*, *D. brevicomis*, and *D. ponderosae* to ponderosa pine seedlings, *Phytopathology*, **77**, 631-636
- PAINE, T.D., C.A. BLANCHE, T.E. NEBEKER and F.M. STEPHEN (1987) : Composition of loblolly pine resin defenses : comparison of monoterpenes from induced lesion and sapwood resin, *Can. J. For. Res.*, **17**, 1202-1206
- and F.M. STEPHEN (1987) : Fungi associated with the southern pine beetle : avoidance of induced defense response in loblolly pine, *Oecologia*, **74**, 377-379
- PAXTON, J.D. (1981) : Phytoalexins - a working redefinition, *Phytopath. Z.*, **101**, 106-109
- PEACE, T.R. (1960) : The status and development of elm disease in Britain, *For. Comm. Bull.*, No. 33, 1-44
- PEARCE, R.B. (1990) : Occurrence of decay-associated xylem suberization in a range of woody species, *Eur. J. For. Path.*, **20**, 275-289
- and P.J. HOLLOWAY (1984) : Suberin in the sapwood of oak (*Quercus robur* L.) : its composition from a compartmentalization barrier and its occurrence in tyloses in undecayed wood, *Physiol. Plant Path.*, **24**, 71-81
- and J. RUTHERFORD (1981) : A wound-associated suberized barrier to the spread of decay in the sapwood of oak (*Quercus robur* L.), *Physiol. Plant Path.*, **19**, 359-369
- , S. SÜMER, S.J. DORAN, T. A. CARPENTER and L.D. HALL (1994) : Non-invasive imaging of fungal colonization and host response in the living sapwood of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) using nuclear magnetic resonance, *Physiol. Mol. Plant Path.*, **45**, 359-384
- and S. WOODWARD (1986) : Compartmentalization and reaction zone barriers at the margin of decayed sapwood in *Acer saccharinum* L., *Physiol. Mol. Plant Path.*, **29**, 197-216
- PLJUT, P.M., R.D. LINEBERGER, S.C. DOMIR, J.M. ICHIDA and C.R. KRAUSE (1990) : Ultrastructure of cells of *Ulmus americana* cultured in vitro and exposed to the culture filtrate of *Ceratocystis ulmi*, *Phytopathology*, **80**, 764-767
- POPOFF, T., O. THEANDER and M. JOHANSSON (1975) : Changes in sapwood of roots of Norway spruce, attacked by *Fomes annosus*. Part II. Organic chemical constituents and their biological effects, *Physiol. Plant.*, **34**, 347-356
- PRIOR, C. (1976) : Resistance by Corsican pine to attack by *Heterobasidion annosum*, *Ann. Bot.*, **40**, 261-279
- PROCTOR, R.H., R.P. GURIES and E.B. SMALLEY (1994) : Lack of association between tolerance to the elm phytoalexin mansonone E and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*, *Can. J.*

- Bot., **72**, 1355-1364
- and E.B. SMALLEY (1988): Localized accumulation of mansonones E and F in elms following inoculation with *Ophiostoma ulmi*, Can. J. Plant Path., **10**, 371
- RAFFA, K.F. (1988): The mountain pine beetle in western north America, In: BERRYMAN, A.A. (ed.) Dynamics of forest insect populations. Patterns, causes, implications, Plenum Press, New York and London, 505-530
- and A.A. BERRYMAN (1982): Physiological differences between lodgepole pines resistant and susceptible to the mountain pine beetle and associated microorganisms, Env. Ent., **11**, 486-492
- and ——— (1983): Physiological aspects of lodgepole pine wound responses to a fungal symbiont of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae), Can. Ent., **115**, 723-734
- RAYNER, A.D.M. and L. BODDY (1988): Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology, John Wiley & Sons, New York, Brisbane, 587 pp.
- REID, R.W., H.S. WHITNEY and J.A. WATSON (1967): Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* HOPKINS and blue stain fungi, Can. J. Bot., **45**, 1115-1122
- RIOUX, D. and G.B. OUELLETTE (1989): Light microscope observations of histological changes induced by *Ophiostoma ulmi* in various nonhost trees and shrubs, Can. J. Bot., **67**, 2335-2351
- and ——— (1991 a): Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi*. I. Anatomy and histochemistry, Can. J. Bot., **69**, 2055-2073
- and ——— (1991 b): Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi*. II. Ultrastructure, Can. J. Bot., **69**, 2074-2083
- RISHBETH, J. (1950): Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular reference to East Anglian pine plantations. I. The outbreaks of disease and ecological status of the fungus, Ann. Bot., **14**, 365-383
- (1951 a): Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular reference to East Anglian pine plantations. II. Spore production, stump infection, and saprophytic activity in stumps, Ann. Bot., **15**, 1-22
- (1951 b): Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular reference to East Anglian pine plantations. III. Natural and experimental infection of pines, and some factors affecting severity of the disease, Ann. Bot., **15**, 221-246
- (1972): Resistance to fungal pathogens of tree roots, Proc. Roy. Soc. London Ser. B, **181**, 333-351
- ROBINSON, R.C. (1962): Blue stain fungi in lodgepole pine (*Pinus contorta* DOUGL. var. *latifolia* ENGELM.) infested by the mountain pine beetle (*Dendroctonus monticolae* HOPK.), Can. J. Bot., **40**, 609-614
- ROBINSON-JEFFREY, R.C. and A.H.H. GRINCHENKO (1964): A new fungus in the genus *Ceratocystis* occurring on blue-stained lodgepole pine attacked by bark beetles, Can. J. Bot., **42**, 527-532
- and R.W. DAVIDSON (1968): Three new *Europhium* species with *Verticicladiella* imperfect states on blue-stained pine, Can. J. Bot., **46**, 1523-1527

- RUDMAN, P. (1965): The causes of natural durability in timber. Pt. XVIII) Further notes on the fungi toxicity of wood extractives, *Holzforschung*, **19**, 57-58
- RUMBOLD, C.T. (1931): Two blue-staining fungi associated with bark-beetle infestation of pines, *J. Agr. Res.*, **43**, 847-873
- (1941): A blue stain fungus, *Ceratostomella montium* n. sp., and some yeasts associated with two species of *Dendroctonus*, *J. Agr. Res.*, **62**, 589-601
- SAFFORD, L.O., A.L. SHIGO and M. ASHLEY (1974): Gradients of cation concentration in discolored and decayed wood of red maple, *Can. J. For. Res.*, **4**, 435-440
- 佐野 豊 (1981): 組織学研究法—理論と術式— 第6版, 南山堂, 東京, 961 pp.
- 讃井孝義 (1986 a): 宮崎県における造林木の変色と腐朽(Ⅱ) —キバチの産卵後に起る変色—, *日林九支研論集*, **39**, 197-198
- (1986 b): スギ暗色枝枯病の恒常的発生, *森林防疫*, **35**, 156-160
- , 橋本平一 (1987): 宮崎県オビ地方に見られるスギ材の変色, 98 回日林論, 547-518
- , 服部文明 (1987): スギ暗色枝枯病の発生生態, *日林九支研論集*, **40**, 203-204
- SCHEFFER, R.J., H.M. HEYBROEK and D.M. ELGERSMA (1980): Symptom expression in elms after inoculation with combination of an aggressive and a non-aggressive strain of *Ophiostoma ulmi*, *Neth. J. Plant Path.*, **86**, 315-317
- SCHEFFER, T.C. (1939): Mineral stain in hard maples and other hardwoods, *J. For.*, **37**, 578-579
- SCHUCK, H.J. (1977): Die Wirkung von Monoterpenen auf das Mycelwachstum von *Fomes annosus* (Fr.) COOKE, *Eur. J. For. Path.*, **7**, 374-384
- (1980): Monoterpenes and resistance of conifers to fungi, *Proc. Workshop Genet. Host-parasite Interact. Forestry*, 169-175
- and P. SCHÜTT (1975): Die Verteilung flüchtiger Terpene im Fichtenstamm und ihre Bedeutung für die Ausbreitungsresistenz gegenüber *Fomes annosus*, *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **167**, 65-77
- SHAIN, L. (1967): Resistance of sapwood in stems of loblolly pine to infection by *Fomes annosus*, *Phytopathology*, **57**, 1034-1045
- (1971): The response of sapwood of Norway spruce to infection by *Fomes annosus*, *Phytopathology*, **61**, 301-307
- and W.E. HILLIS (1971): Phenolic extractives in Norway spruce and their effects on *Fomes annosus*, *Phytopathology*, **61**, 841-845
- and ——— (1972): Ethylene production in *Pinus radiata* in response to *Sirex-Amylostereum* attack, *Phytopathology*, **62**, 1407-1409
- and ——— (1973): Ethylene production in xylem of *Pinus radiata* in relation to heartwood formation, *Can. J. Bot.*, **51**, 1331-1335
- and J.B. MILLER (1982): Pinoembrin: An antifungal compound secreted by leaf glands of eastern cottonwood, *Phytopathology*, **72**, 877-880
- SHARON, E.M. (1973): Some histological features of *Acer saccharum* wood formed after wounding, *Can. J. For. Res.*, **3**, 83-89
- SHEVENELL, B.J. and W.C. SHORTLE (1986): An ion profile of wounded red maple, *Phytopathology*, **76**, 132-135
- SHIGO, A.L. (1975): Compartmentalization of decay associated with *Fomes annosus* in trunks of

- Pinus resinosa*, *Phytopathology*, **65**, 1038-1039
- (1984): Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves, *Annu. Rev. Phytopath.*, **22**, 189-214
- and W.E. HILLIS (1973): Heartwood, discolored wood, and microorganisms in living trees, *Annu. Rev. Phytopath.*, **11**, 197-222
- and H.G. MARX (1977): Compartmentalization of Decay in Trees, USDA, Agr. Inf. Bull., No. 405, 73 pp.
- and E.M. SHARON (1968): Discoloration and decay in hardwoods following inoculations with Hymenomycetes, *Phytopathology*, **58**, 1493-1498
- and ——— (1970): Mapping columns of discolored and decayed tissues in sugar maple, *Acer saccharum*, *Phytopathology*, **60**, 232-237
- SHIGO, A. and J.T. TIPPETT (1981): Compartmentalization of American elm tissues infected by *Ceratocystis ulmi*, *Plant Dis.*, **65**, 715-718
- 島田謹爾, 西田篤実, 高野 勲, 宇佐見国典 (1987): スギ穿孔性害虫被害材変色部の化学的特異性, 林試研報, (347), 187-201
- SHIRAIISHI, T., H. OKU, M. ISONO and S. OUCHI (1975): The injurious effect of pisatin on the plasma membrane of pea, *Plant Cell Physiol.*, **16**, 939-942
- SHORTLE, W.C. and E.B. COWLING (1978): Development of discoloration, decay, and microorganisms following wounding of sweetgum and yellow-poplar trees, *Phytopathology*, **68**, 609-616
- and A. OSTROFSKY (1983): Decay susceptibility of wood in defoliated fir trees related to changing physical, chemical, and biological properties, *Eur. J. For. Path.*, **13**, 1-11
- SHRIMPTON, D.M. (1973): Extractives associated with wound response of lodgepole pine attacked by the mountain pine beetle and associated microorganisms, *Can. J. Bot.*, **51**, 527-534
- and J.A. WATSON (1971): Response of lodgepole pine seedlings to inoculation with *Europhium clavigerum*, a blue stain fungus, *Can. J. Bot.*, **49**, 373-375
- and H.S. WHITNEY (1968): Inhibition of growth of blue stain fungi by wood extractives, *Can. J. Bot.*, **46**, 757-761
- SINCLAIR, W.A. and W.D. BRENER (1974): Dutch elm disease in clones from white elms resistant and susceptible to *Ceratocystis ulmi*, *Phytopathology*, **64**, 675-679
- and A.O. LARSEN (1980): Localization of Dutch elm disease 10-yr-old white elm clones from resistant parents, *Plant Dis.*, **64**, 203-205
- , J.P. ZAHAND and J.B. MELCHING (1975 a): Localization of infection in American elms resistant to *Ceratocystis ulmi*, *Phytopathology*, **65**, 129-133
- , ——— and ——— (1975 b): Anatomical marker for resistance of *Ulmus americana* to *Ceratocystis ulmi*, *Phytopathology*, **65**, 349-352
- SINGH, D. and E.B. SMALLEY (1969): Nitrogenous carbohydrate compounds in the xylem sap of Ulmaceae species varying in resistance to Dutch elm disease, *Can. J. Bot.*, **47**, 335-339
- SKIPP, R.A., C. SELBY and J.A. BAILEY (1977): Toxic effects of phaseollin on plant cells, *Physiol. Plant Path.*, **10**, 221-227
- SKUTT, H.R., A.L. SHIGO and R.A. LESSARD (1972): Detection of discolored and decayed wood

- in living trees using a pulsed electric current, Can. J. For. Res., **2**, 54-56
- SMALLEY, E.B. (1962): Prevention of Dutch elm disease by treatments with 2,3,6-trichlorophenyl acetic acid, Phytopathology, **52**, 1090-1091
- and R.P. GURIES (1993): Breeding elms for resistance to Dutch elm disease, Annu. Rev. Phytopath., **31**, 325-352
- Soil Conservation Service, USDA (1972): Soil survey investigations report (No. 1). Soil survey laboratory methods and procedures for collecting soil samples, 63pp.
- STAMM, A.J. (1961): A comparison of three methods for determining the pH of wood and paper, For. Prod. J., **11**, 310-312
- STENLID, J. (1987): Controlling and predicting the spread of *Heterobasidion annosum* from infected stumps and trees of *Picea abies*, Scand. J. For. Res., **2**, 187-198
- and M. JOHANSSON (1987): Infection of roots of Norway spruce (*Picea abies*) by *Heterobasidion annosum*. II. Early changes in phenolic content and toxicity, Eur. J. For. Path., **17**, 217-226
- STEPHEN, F.M. and T.D. PAINE (1985): Seasonal patterns of host tree resistance to fungal associates of the southern pine beetle, Z. Angew. Ent., **99**, 113-122
- , ——— and M.P. LIH (1983): Understanding bark beetle/host interactions: a means for improving decision strategies, Z. Angew. Ent., **96**, 257-265
- STROBEL, G.A. and F. SUGAWARA (1986): The pathogenicity of *Ceratocystis montia* to lodgepole pine, Can. J. Bot., **64**, 113-116
- STROBEL, G., N. VANALFEN, K.D. HAPNER, M. MCNEIL and P. ALBERSHEIM (1978): Some phytotoxic glycopeptides from *Ceratocystis ulmi*, the Dutch elm disease pathogen, Biochim. Biophys. Acta, **538**, 60-75
- SUMIMOTO, M. (1963): Cryptomeridiol, the direct precursor of the eudesmane series, Chem. Ind., **1963**, 780-781
- 住本昌之, 伊東洋子, 平位博志, 和田賢一 (1964): クリプトメリジオールの構造, 木材誌, **10**, 81-83
- 周藤靖雄 (1994): *Amylostereum* sp. によるスギ, ヒノキの材変色—林木の生死が変色の発生と菌の生存に及ぼす影響—, 日林関西支論, **3**, 163-164
- 鈴木和夫 (1981): スギ生立木材質の変色と腐朽, 森林防疫, **30**, 112-117
- , 堂園安生, 橋本平一 (1980): 九州におけるスギ生立木材質の変色と腐朽, 91 回日林論, 387-388
- , 吉田成章, 堂園安生, 橋本平一, 小林享夫 (1984): スギ生立木の変色, 腐朽, 特に材の電気抵抗値と検出された菌類, 林試研報, (328), 107-117
- TAKAHASHI, K. (1981): Heartwood phenols and their significance to color in *Cryptomeria japonica* D. DON, Mokuzai Gakkaishi, **27**, 654-657
- 高橋孝悦, 荻山紘一 (1985a): スギ傷害材のフェノール性成分 (第2報). 九州産スギ傷害材のノルリグナン類について, 木材誌, **31**, 28-38
- , ——— (1985b): スギ傷害材のフェノール性成分 (第3報). ハチカミ材, シミ材のノルリグナン類について, 木材誌, **31**, 677-683
- , ——— (1986): スギ傷害材のフェノール性成分 (第4報). 九州産さし木品種アヤスギの norlignan 類について, 木材誌, **32**, 457-461
- TAKAHASHI, K., M. YASUE and K. OGIYAMA (1983): Phenols of "tobigusare" wood, discolored sugi

- (*Cryptomeria japonica* D. DON) sapwood, Mokuzai Gakkaishi, **29**, 806-809
- TAKAI, S. (1974): Pathogenicity and cerato-ulmin production in *Ceratocystis ulmi*, Nature, **252**, 124-126
- 高宮立身 (1991): モトエスギに見られる暗色枝枯病について, 日林九支研論集, **44**, 131-132
- TATTAR, T. A. and G. C. SAUFLEY (1973): Comparison of electrical resistance and impedance measurements in wood in progressive stages of discoloration and decay, Can. J. For. Res., **3**, 593-595
- , A. L. SHIGO and T. CHASE (1972): Relationship between the degree of resistance to a pulsed electric current and wood in progressive stages of discoloration and decay in living trees, Can. J. For. Res., **2**, 236-243
- TEGTMEIER, K. J. and H. D. VANETTEN (1982): The role of pisatin tolerance and degradation in the virulence of *Nectria haematococca* on peas: a genetic analysis, Phytopathology, **72**, 608-612
- THOMPSON, J. H., E. B. COWLING and E. W. ROSS (1968): Changes in moisture content and color of the cambial zone in bolts of pine stemwood during colonization by *Fomes annosus*, Can. J. Bot., **46**, 1533-1537
- TIPPETT, J. T. and A. L. SHIGO (1980): Barrier zone anatomy in red pine roots invaded by *Heterobasidion annosum*, Can. J. For. Res., **10**, 224-232
- 徳重陽山 (1963): スギの幹腐病 (仮称) の発生初期状態について, 74 回日林講, 298-300
- UMEZAWA, T., L. B. DAVIN, E. YAMAMOTO, D. G. I. KINGSTON and N. G. LEWIS (1990): Lignan biosynthesis in *Forsythia* species, J. Chem. Soc., Chem. Commun., No. 20, 1405-1408
- VERRALL, A. F. (1938): The probable mechanism of the protective action of resin in fire wounds on red pine, J. For., **36**, 1231-1233
- WHITNEY, H. S. (1971): Association of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) with blue stain fungi and yeasts during brood development in lodgepole pine, Can. Ent., **103**, 1495-1503
- WONG, B. L. and A. A. BERRYMAN (1977): Host resistance to the fir engraver beetle. 3. Lesion development and containment of infection by resistant *Abies grandis* inoculated with *Trichosporium symbioticum*, Can. J. Bot., **55**, 2358-2365
- WOODWARD, S. and R. B. PEARCE (1985): Methods for visualizing hyaline fungi for the detection of antifungal compounds on thin-layer chromatograms, Plant Path., **34**, 477-480
- WORRALL, J. J., J. R. PARMETER, JR. and F. W. COBB, JR. (1983): Host specialization of *Heterobasidion annosum*, Phytopathology, **73**, 304-307
- WU, W. D., R. S. JENG and M. HUBBES (1989): Toxic effects of elm phytoalexin mansonones on *Ophiostoma ulmi*, the causal agent of Dutch elm disease, Eur. J. For. Path., **9**, 343-357
- YAGUCHI, M., M. PUSZTAI-CAREY, C. ROY, W. K. SUREWICZ, P. R. CAREY, K. J. STEVENSON, W. C. RICHARDS and S. TAKAI (1993): Amino acid sequence and spectroscopic studies of Dutch elm disease toxin, cerato-ulmin, In: STICKLEN, M. B. and J. L. SHERALD (eds.) Dutch elm disease research. Cellular and molecular approaches, Springer-Verlag, New York, 152-170
- 山田文雄, 小泉 透, 伊藤進一郎, 山田利博, 三浦由洋, 田中正己 (1992): ニホンツキノワグマによる剥皮のスギ材質に及ぼす影響, 103 回日林論, 545-546

- 山田利博, 伊藤進一郎 (1992) : 関西地域に発生した暗色枝枯病とスギ, ヒノキの集団枯損, 森林防疫, **41**, 52-56
- YAMADA, T. and S. ITO (1993) : Chemical defense responses of wilt-resistant pine species, *Pinus strobus* and *P. taeda*, against *Bursaphelenchus xylophilus* infection, Ann. Phytopath. Soc. Japan, **59**, 666-672
- 山田利博, 宮島淳二, 伊藤進一郎 (1992) : *Macrophoma* 菌株間のスギに対する病原性および材変色性の差異, 日林誌, **74**, 97-101
- , 奥田清貴 (1987) : ニホンキバチと共生する *Amylostereum* 属菌を接種したスギ, ヒノキ生立木の材の変色, 98回日林論, 515-516
- YAMADA, T., H. TAMURA and K. MINEO (1988) : The response of sugi (*Cryptomeria japonica* D. DON) sapwood to fungal invasion following attack by the sugi bark borer, Physiol. Mol. Plant Path., **33**, 429-442
- , ———, ——— and K. SUZUKI (1987) : Discoloration and cation accumulation in the wood of living sugi trees attacked by the sugi bark borer, J. Jpn. For. Soc., **69**, 121-126
- 山本幸一 (1982) : マツ属放射柔細胞成熟の経年的, 季節的経過, 北大演習林報, **39**, 245-296
- YAMAOKA, Y., R. H. SWANSON and Y. HIRATSUKA (1990) : Inoculation of lodgepole pine with four blue-stain fungi associated with mountain pine beetle, monitored by a heat pulse velocity (HPV) instrument, Can. J. For. Res., **20**, 31-36
- 横沢良憲, 金子 繁 (1986) : スギノアカネトラカミキリ加害材からの糸状菌類の分離と接種試験, 日林東北支誌, **38**, 235-236

Studies on the Responses of Sugi Sapwood to Fungal Invasion
—Reaction zone barrier formation in differentiated sapwood—

YAMADA, Toshihiro⁽¹⁾

Summary

Active defense mechanisms play an important and definitive role in sapwood of woody plants against fungal invasion, though both active and passive mechanisms constitute the defense. Active responses comprise histological and chemical aspects, such as alteration of cell walls and accumulation of antifungal substances, respectively. It is suggested that both aspects act synergistically and provide an effective defense.

This paper describes the chemical defense mechanisms of sugi sapwood against fungal invasion. The results obtained are summarized as follows:

Properties and responses of discolored region of living sugi trees

Changes in the properties of discolored sapwood were investigated in living sugi trees attacked by the sugi bark borer. Concentrations of cations such as K, Ca and Mg increased both in the reaction zone and in the discolored sapwood, and lower electrical resistance due to cation accumulation was observed in discolored sapwood. Discolored sapwood had a greater cation exchange capacity (CEC) than sound sapwood. Therefore, CEC increment supposedly is a factor for cation accumulation. Bacteria and fungi such as *Guignardia cryptomeriae*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, and *Cryptosporiopsis* sp. were isolated from the reaction zone and discolored sapwood. The microflora did not vary significantly from six months to five years after the attack by the beetle. These results suggest that the cation concentration is related to the advance of wood discoloration, but not to the composition of the microflora in the wood.

The responses of sapwood of living sugi trees to fungal invasion following attack by the sugi bark borer were investigated. Water conduction was blocked in the discolored region. Extractives content increased in the transition zone and the reaction zone which surrounded discolored sapwood. Norlignans such as hinokiresinol, agatharesinol and sequirin-C, and terpenes, which were contained in extractives, accumulated in the transition zone and the reaction zone. Concentration of these compounds was highest in the inner transition zone. Hinokiresinol and several unidentified compounds showed inhibitory effects on *Fusarium oxysporum*, *F. solani* and *G. cryptomeriae*, which were isolated from discolored sapwood, and *Cladosporium herbarum*. Because concentration of antifungal compounds was highest in the inner transition zone, in the wood formed prior to the infection, the most effective barrier to fungal invasion is the inner transition zone.

Most of the ray parenchyma cells in the transition zone were still living, though parenchyma cells in the reaction zone and discolored sapwood were dead. Spreading of

Received September 2, 1997

(1) Forest Biology Division

fungal hyphae colonizing discolored sapwood was inhibited in the inner transition zone and the reaction zone. An increase in NAD diaphorase activity was detected in the inner transition zone. Oil droplet-like deposits in tracheid lumina and pits of the inner transition zone were found to occlude many tracheids. The deposits contained phenolic compounds including norlignans, and terpenes. The deposits were also observed in the reaction zone. These results indicate that antifungal compounds found in the transition zone and the reaction zone act as phytoalexins, and that the deposits form a spatially continuous barrier at the margin of the discolored sapwood, and prevent further fungal spread.

Spread of discoloration and fungi in the sapwood of excised stem and evaluation of active defense mechanisms

Virulent isolates and avirulent ones of *G. cryptomeriae* were inoculated into excised stems of sugi. Fungal hyphae of all isolates spread quickly in autoclaved stems and freeze-treated stems, in which active defense responses were not induced. In spring inoculation, hyphae of all isolates spread axially in the excised stems as fast as on potato dextrose agar. Therefore, it is considered that constituents of sound sapwood prior to the infection cannot inhibit fungal spread in the wood. Freshly excised stems with reduced intensity of defense responses interfered with fungal spread except in the case of spring inoculation with virulent isolates, and the fungal spread was most retarded in living trees. Sapwood of fresh stems reacted more intensively to avirulent isolates than to virulent isolates, and the rate of retardation of fungal spread was higher in avirulent isolates than in virulent isolates. These results indicate that active defense responses play an important and definitive role in the inhibition of fungal spread in the sapwood.

The axial-tangential ratio of wood discoloration was higher in living trees and fresh stems than in both autoclaved stems and freeze-treated stems. This suggests that active defense mechanisms are also involved in the determination of the shape of wood discoloration.

Responses of sapwood against fungal invasion

Wood discoloration and fungal hyphae spread quickly during the first two weeks of *G. cryptomeriae*-inoculation in living sugi trees. The spread of both virulent and avirulent isolates was inhibited between two weeks and one month after inoculation, though the spread of wood discoloration and fungi varied depending on the virulence of inoculated fungal isolates.

Within only one week after inoculation, moisture content of the discolored region decreased, and increase in NAD diaphorase activity and secretion of oil droplet-like deposits containing norlignans and terpenes started in the same zone, indicating the induction of defensive responses within one week after inoculation. Extractives content increased between two weeks and one month after inoculation. Antifungal norlignan, hinokiresinol, accumulated quickly, and the concentrations of hinokiresinol reached 20% of peak concentrations one week after inoculation. Agatharesinol, sequirin-C and terpenes accumulated slowly in the reaction zone barrier. These results suggest that the accumulation of inhibitory substances contributes to the retardation of fungal spread within two weeks after infection and the complete prevention thereafter.

The intensity of defense responses did not differ between trees inoculated with isolates of

different virulence. However, concentrations of norlignans and terpenes in the reaction zone barrier were higher in inoculated trees than in wounded trees. This fact suggests the enhanced induction of defense responses by the existence of pathogenic fungi.

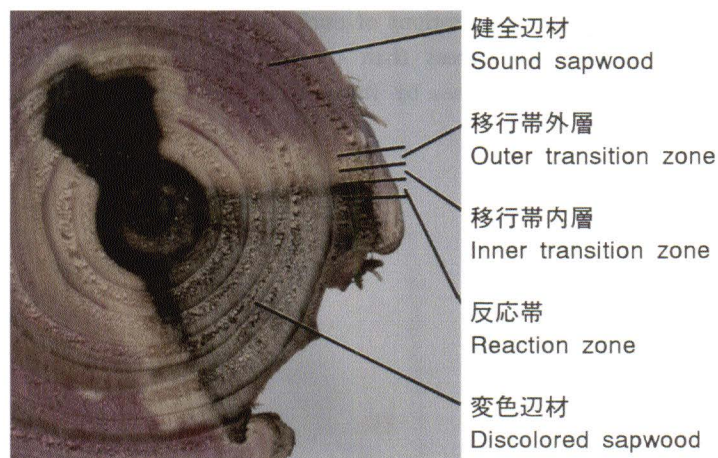


Photo 1. スギカミキリの食害に伴うスギ生立木の材変色

Cross section of sugi infected with fungi following the attack by the sugi bark borer

酸性フクシンにより赤く染まっている部位には通水がある。

Sound sapwood is stained with acid fuchsin, indicating water conductivity.

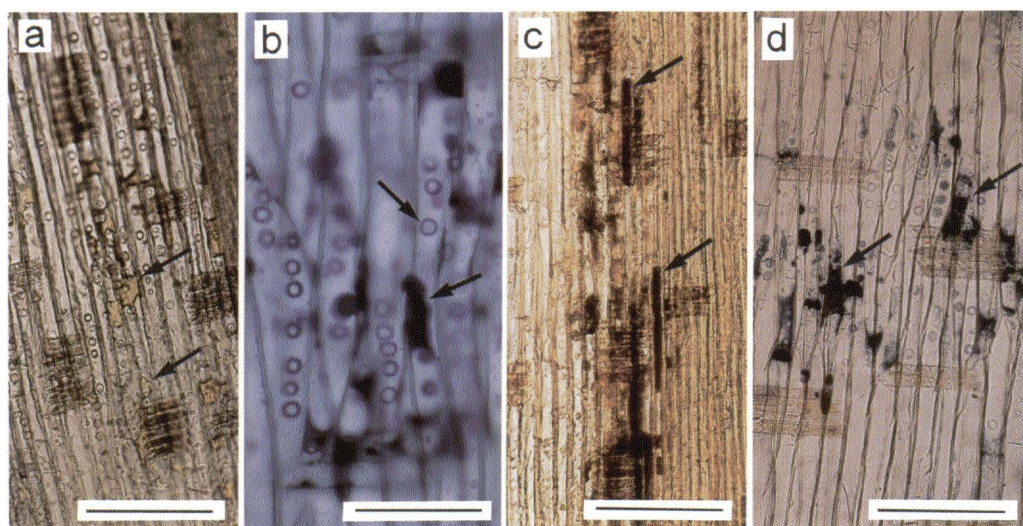


Photo 2. 種々の染色法による移行帯内層の観察

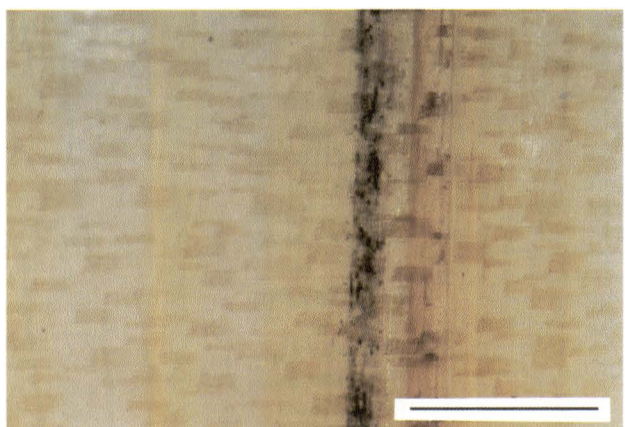
Observation of inner transition zone by several staining method

a. 無染色 ; b. Nile blue 染色 ; c. ポリフェノールの染色 ; d. NBT 染色

a. No staining ; b. Nile blue staining ; c. Staining for polyphenols ; d. NBT staining

矢印はそれぞれの染色法で染まった油滴状物質を示す。バー=200 μ m (a, c, d), 100 μ m (b)

Arrows indicate oil droplet-like deposits stained by each staining method. Bars=200 μ m (a, c, d) or 100 μ m (b)



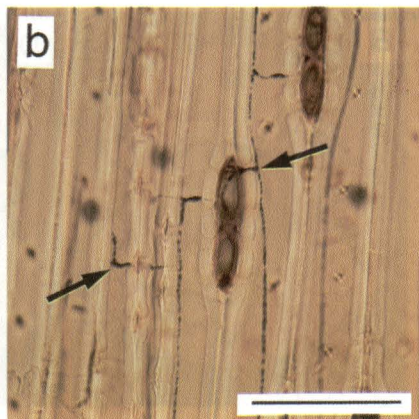
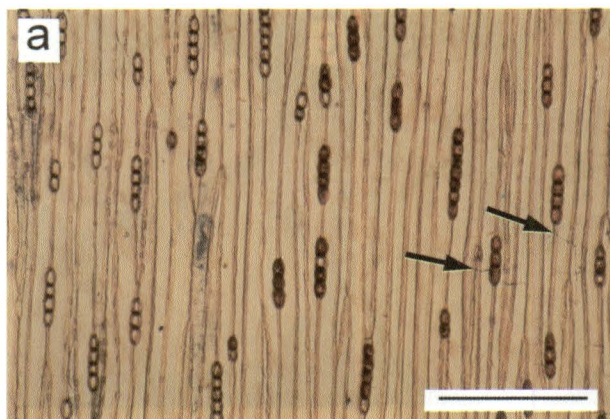
← 健全辺材 → ← 移行帯 外層 移行帯内層 → ↑ ← 反応帯 → ← 変色辺材 →
 Sound sapwood Outer transition zone Inner transition zone Reaction zone Discolored sapwood

Photo 3. 油滴状物質による連続的な障壁

Spatially continuous barrier formed by oil droplet-like deposits

NBT 染色。バー=1000 μ m

NBT staining. Bar=1000 μ m



← 移行帯内層 → ← 反応帯 → ← 変色辺材 →
 Inner transition zone Reaction zone Discolored sapwood

Photo 4. 材変色部の菌糸 (矢印)

Fungal hyphae (arrows) colonizing the discolored sapwood of sugi

a. 移行帯から変色辺材にかけての菌糸, バー=200 μ m ; b. 変色辺材の菌糸, バー=50 μ m

a. Transition zone - discolored sapwood boundary, bar=200 μ m ; b. Discolored sapwood, bar=50 μ m

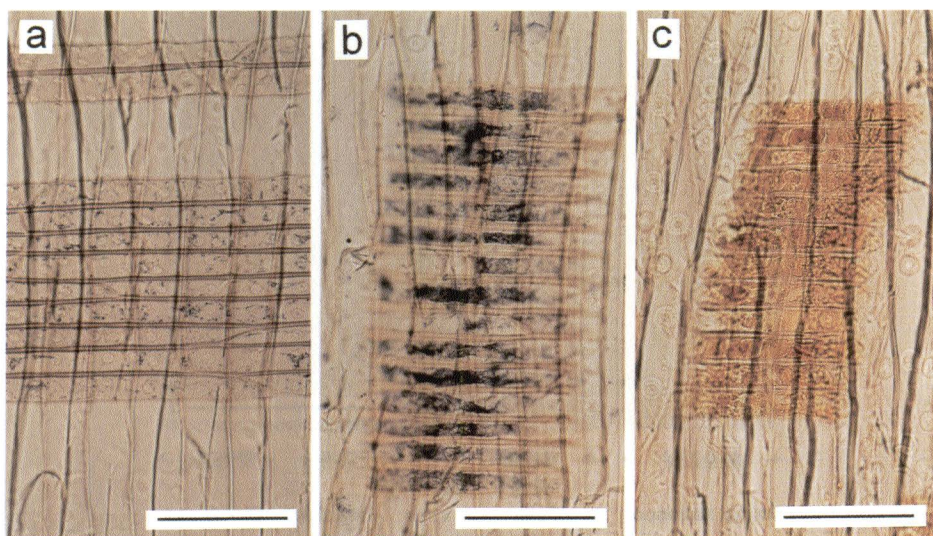


Photo 5. 放射柔細胞の NAD diaphorase 活性
NAD diaphorase activity in xylem ray parenchyma

a. 健全辺材 ; b. 移行帯内層 ; c. 変色辺材

a. Sound sapwood ; b. Inner transition zone ; c. Discolored sapwood

バー = 100 μ m

Bars = 100 μ m

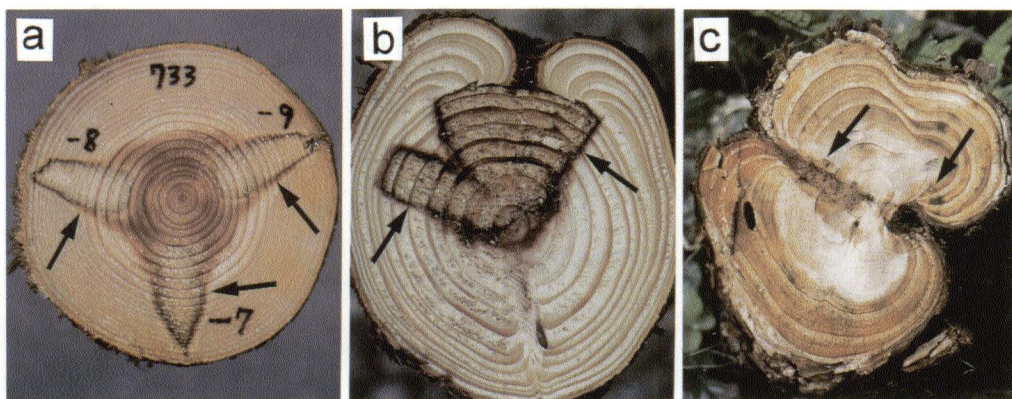


Photo 6. スギ生立木の材変色

Examples of wood discoloration of sugi

a. *Amylostereum* sp. による材変色 ; b. 暗色枝枯病による材変色 ; c. 溝腐病による材変色

a. Wood discoloration caused by *Amylostereum* sp. ; b. Wood discoloration caused by *Guignardia cryptomeriae* ; c. Wood discoloration caused by *Cercospora sequoiae*

矢印は材変色部を示す。

Arrows indicate wood discolored region.

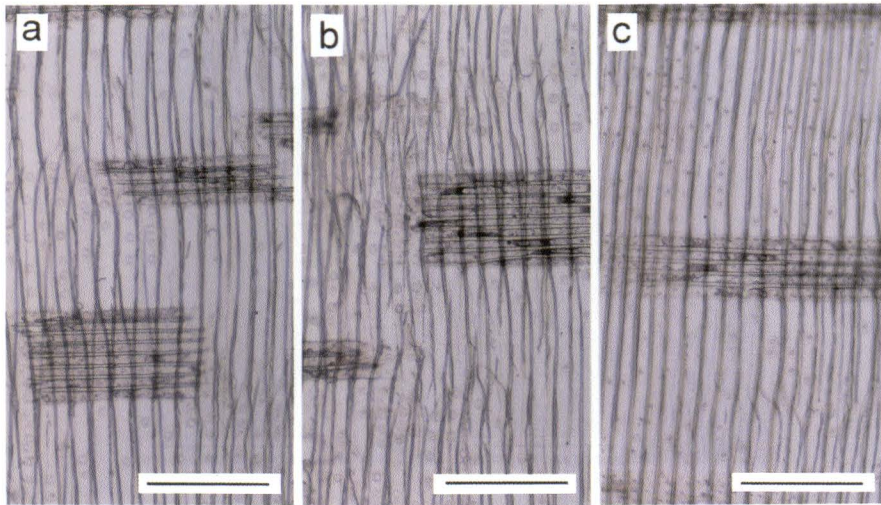


Photo 7. 秋接種新鮮丸太の柔細胞における NAD diaphorase 活性

NAD diaphorase activity in parenchyma cells of autumn-inoculated fresh log

a. 健全辺材 ; b. MA 19 接種 1 週間後 ; c. MA 18 接種 1 週間後

a. Sound sapwood ; b. One week after the inoculation with MA 19 ; c. One week after the inoculation with MA 18

バー = 200 μ m

Bars = 200 μ m

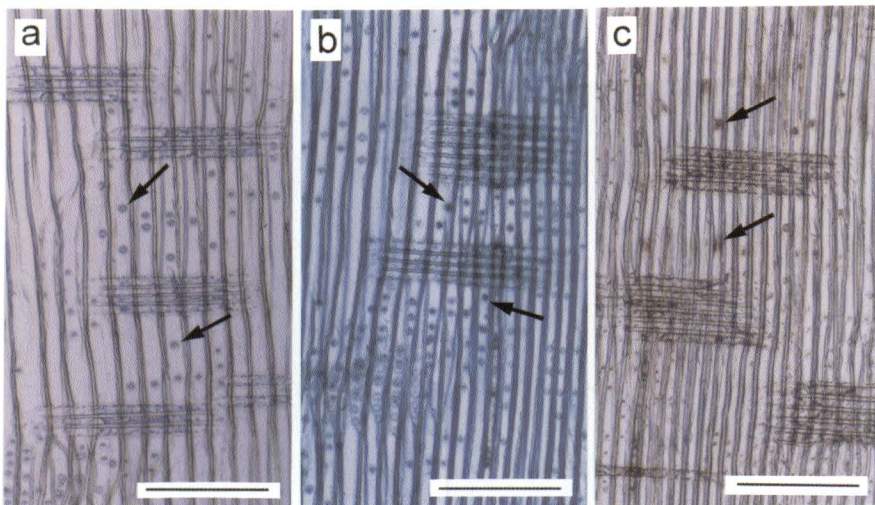


Photo 8. 秋接種新鮮丸太の組織学的観察

Anatomical observations of autumn-inoculated fresh log

a. MA 19 接種丸太における aniline blue 染色 ; b. MA 19 接種丸太における Nile blue 染色 ; c. MA 19 接種丸太における NBT 染色

a. aniline blue staining of MA 19 inoculated log ; b. Nile blue staining of MA 19 inoculated log ; c. NBT staining of MA 19 inoculated log

矢印はそれぞれの染色法で染まった部位を示す。バー = 200 μ m

Arrows indicate materials stained with each dye. Bars = 200 μ m

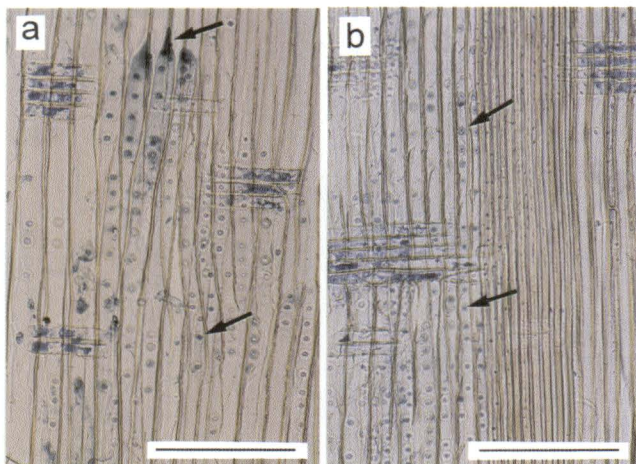


Photo 9. 春接種新鮮丸太の壁孔や仮道管中の aniline blue で染まる物質 (矢印)

Materials (arrows) stained with aniline blue in bordered pits and tracheids of spring-inoculated fresh log

a. MA 8 接種 3 日後 ; b. MA 7 接種 2 週間後

a. Three days after the inoculation with MA 8 ; b. Two weeks after the inoculation with MA 7

バー = 200 μ m

Bars = 200 μ m

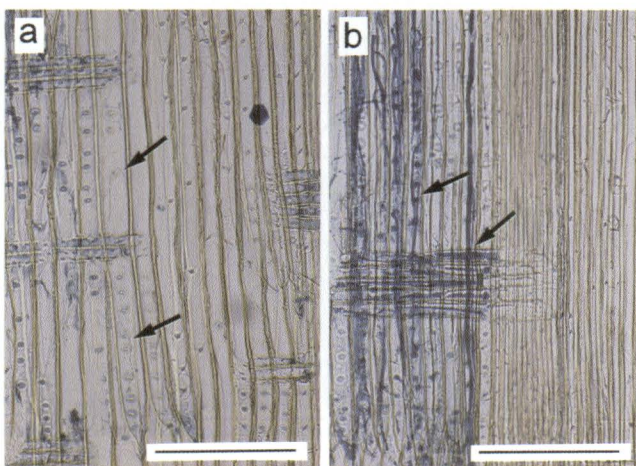


Photo 10. 春接種新鮮丸太における強病原力菌株と弱病原力菌株の菌糸

Hyphae of avirulent and virulent isolates of *Guignardia cryptomeriae* in spring-inoculated fresh log

a. 弱病原力菌株 MA 8 の菌糸 ; b. 強病原力菌株 MA 7 の菌糸

a. Hyphae of avirulent isolate, MA 8 ; b. Hyphae of virulent isolate, MA 7

矢印は aniline blue で染色された菌糸を示す。バー = 200 μ m

Arrows indicate fungal hyphae stained with aniline blue. Bars = 200 μ m



Photo 11. 仮道管への油滴状物質の滲出

Secretion of oil droplet-like deposits into tracheids

MA 19 接種 1 週間後。矢印は Nile blue で染色された油滴状物質を示す。バー=100 μ m
One week after the inoculation with MA 19. Arrows indicate oil droplet-like deposits stained with Nile blue. Bars=100 μ m

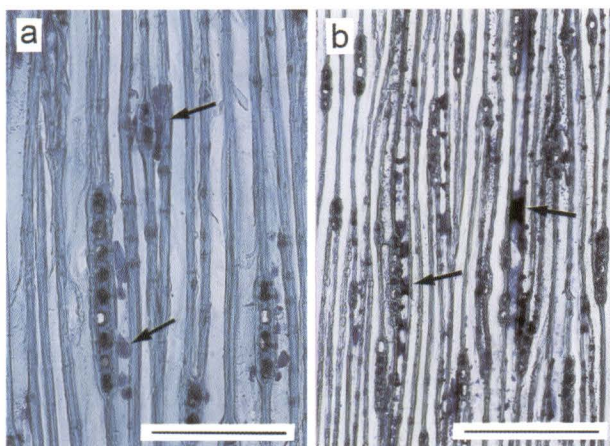


Photo 12. 油滴状物質による仮道管の閉塞

Occlusion of tracheids with oil droplet-like deposits

a. MA 19 接種 2 週間後, バー=100 μ m ; b. 傷対照 1 カ月後, バー=200 μ m

a. Two weeks after the inoculation with MA 19, bars=100 μ m ; b. One month after the wounding, bars=200 μ m

矢印は Nile blue で染色された油滴状物質を示す。

Arrows indicate oil droplet-like deposits stained with Nile blue.

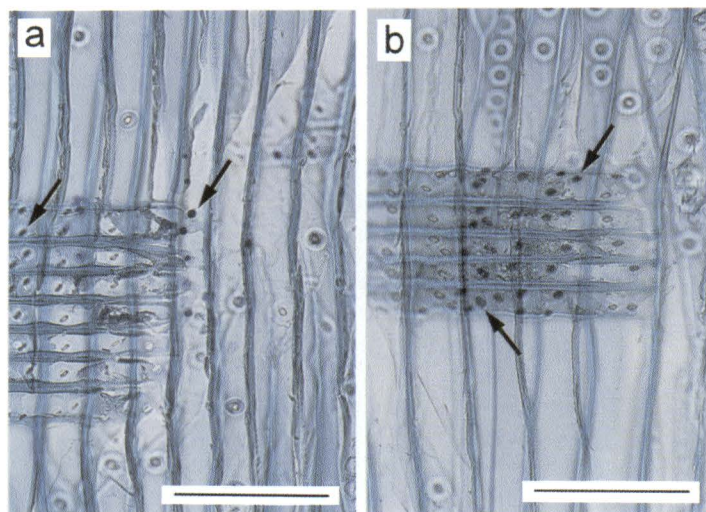


Photo 13. 油滴状物質による壁孔の閉塞

Occlusion of bordered pits with oil droplet-like deposits

a. MA 18 接種 1 週間後 ; b. MA 19 接種 2 週間後

a. One week after the inoculation with MA 18 ; b. Two weeks after the inoculation with MA 19

矢印は Nile blue で染色された油滴状物質を示す。バー = 100 μm

Arrows indicate oil droplet-like deposits stained with Nile blue. Bars = 100 μm