

## 桜島で捕獲されたマツノマダラカミキリから抽出された マツノザイセンチュウの病原性

曾根 晃一<sup>1)</sup>・北田 義幸<sup>1)</sup>・榊原 あおい<sup>2)</sup>・田中 幸記<sup>1)</sup>・畑 邦彦<sup>1)</sup>・佐藤 嘉一<sup>3)</sup>

1) 鹿児島大学農学部生物環境学科

2) 鹿児島大学大学院農学研究科生物生産学専攻

3) 鹿児島県林業試験場

## Virulence of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer) Nickle, Extracted from the Japanese Pine Sawyer, *Monochamus alternatus* Hope, Collected on Sakurajima Island

SONE Koichi<sup>1)</sup>, KITADA Yoshiyuki<sup>1)</sup>, SAKAKIBARA Aoi<sup>2)</sup>,  
TANAKA Koki<sup>1)</sup>, HATA Kunihiko<sup>1)</sup> and SATO Yoshikazu<sup>3)</sup>

1) Department of Environmental Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065

2) Department of Agricultural Sciences and Natural Resources, Graduate School of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065

3) Kagoshima Prefecture Forest Experiment Station, 182-1 Kamikyutoku, Kamou, Aira, Kagoshima 899-5302

(平成14年9月30日 受理)

### Summary

In order to examine the virulence of the pinewood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer) Nickle, we inoculated PWN extracted from the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* Hope, collected in pine stands on Sakurajima Island (Sakurajima population) and a virulent isolate (Ka-4) into susceptible *Pinus thunbergii* seedlings in August 2000 and July 2001. By January 2001, 30 % and 17 % of the seedlings inoculated with Ka-4 and the Sakurajima population in August 2000 had been killed, respectively, and the difference in the percentages of wilted seedlings was statistically significant. However, the total percentage of wilted seedlings by September 2001 did not differ significantly between the isolates (Ka-4: 59%, Sakurajima population: 47%). The oleoresin flow began to decrease 4 days after inoculation of both isolates of PWN and to stop 2 weeks after inoculation. Xylem dysfunction occurred 4 and 6 weeks after inoculation in Ka-4 and the Sakurajima population inoculated seedlings, respectively. PWN were extracted from most wood chips sampled from the trunks of inoculated seedlings 2 weeks after inoculation in 2001. The density of PWN extracted from 1 cm<sup>3</sup> wood chip sample did not differ significantly between the isolates. From these results, we can conclude that the virulence of the Sakurajima population is sub equal to the virulent isolate, Ka-4. A weak virulence of the Sakurajima population might not explain the 2-3 year delay in the invasion of pine wilt disease from the severely damaged pine stands on Ohsumi Peninsula and its prevalence in the eastern area of Sakurajima Island.

Key words: Pinewood nematode, Virulence, Sakurajima Island

キーワード: マツノザイセンチュウ, 病原力, 桜島

## はじめに

マツ材線虫病は、マツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* Hope) (以後、単にカミキリと称す) を主とする媒介昆虫が伝搬するマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle) (以後、単にセンチュウと称す) により引き起こされる萎凋病で、林野庁の集計では、平成13年度は北海道と青森県を除く45都府県で約91万m<sup>3</sup>のマツが枯損した。鹿児島県でも大隅半島の垂水市や桜島を中心に、民有林の枯損量は25,600m<sup>3</sup>に達している。以前は、桜島のマツは枯れないと言われてきたが、1994年に島の西側で、島外からの被害材の持ち込みが原因と見られる枯損が発生した。その被害は一旦終息したかに思われたが、1997年に再び島の西側と北西部でマツ材線虫病による枯損が発生した。それらの地域に比べ島の東側における被害の発生と拡大は遅れ、カミキリの供給源と見なされる大隅半島の垂水市海潟や牛根麓などのクロマツ林分では1997年までに非常に激しい枯損が生じていたにもかかわらず、まとまった被害は、1998年に大隅半島と桜島が陸続きになっている桜島口付近に初めてみられ、その後急激に北上した(曾根ら 2002)。

マツ自体のマツ材線虫病の抵抗性と発病には、センチュウの系統 (isolate) の病原性、寄主植物の遺伝的抵抗性の他に温度や降水量などの環境要因が関与している (Bedker and Blanchette 1988)。これらの要因のほかに、マツ材線虫病の蔓延には、センチュウを保有したカミキリの生息状況も影響を与えている (Togashi 1988)。鹿児島大学農学部森林保護学研究室では、桜島におけるマツ材線虫病の蔓延に関する要因についてさまざまな調査を行ってきた。久保ら (1998) は苗畑に植栽された桜島産クロマツ3年生稚樹に対するセンチュウ接種試験を行い、桜島産クロマツの枯死率はいわゆる抵抗性品種に比べ有意に高く、桜島に生育するクロマツの遺伝的抵抗性は強くないことを確かめている。Ookuma *et al.* (1999) は、隣接する大隅半島では大変激しい被害が発生していた1997年と1998年に、被害があまり見られなかった桜島東部のクロマツ林分でも、センチュウを保有したカミキリを多数捕獲している。そして、(1) 桜島にはカミキリが生息していなかったか生息密度が大変低い、(2) カミキリのセンチュウ保有率が大変低い、(3) カミキリのセンチュウ保有数が大変少ないということが、桜島の東側での被害発生の遅れの原因である可能性は低いと結論している。

Kiyohara and Bolla (1990) は、日本各地の激害林分で採集されたセンチュウの接種試験を行い、センチュウの系統間で病原性に著しい差があることを認めている。もし、桜島で活動しているセンチュウの病原力が低ければ、病徴の

進展が遅れ、微害林分から激害林分への移行も遅れることが期待される。しかしながら、これまで桜島で活動中のセンチュウの病原力は調査されていない。そこで、桜島南東部の大隅半島との境界付近で捕獲したカミキリから分離したセンチュウをクロマツ稚樹に接種し、病原力の強さを強病原系統のセンチュウKa-4と比較した。

## 材料及び調査方法

### 1. センチュウとクロマツ

接種するセンチュウは、2000年6月と2001年6月にサンケイ式昆虫誘引器を改良したカミキリ生け捕り用トラップ (中村ら 1999) により桜島南東部の大正溶岩台地上に生育するクロマツ林内で捕獲した複数のカミキリから抽出したもの (以後、桜島個体群と称す) と、病原力を比較するための対照として、独立行政法人森林総合研究所線虫研究室で累代飼育されている強病原系統のセンチュウKa-4 (Kosaka *et al.* 2001) を用いた。接種に先立ち、鹿児島大学農学部森林保護学研究室において、PDA培地上で培養した*Botrytis cinerea*を餌として増殖させた。

供試木は、1998年に鹿児島県種苗生産組合から購入したクロマツ3年生苗を、鹿児島市郡元に位置する鹿児島大学郡元キャンパス内の鹿児島大学農学部附属演習林本部実験苗畑に植栽したもので、マツ材線虫病に対する抵抗性があるとされている品種ではない。

### 2. 接種による枯損

2000年8月25日に、桜島個体群とKa-4それぞれについて0.1ccあたり10,000頭に調整したセンチュウ懸濁液0.1ccを5年生クロマツ稚樹100本ずつ、また、コントロールとして、蒸留水0.1ccを20本の稚樹に対し、地上50cm~80cmの高さの樹幹に剥皮接種法で接種した。2001年9月に測定した桜島個体群とKa-4の接種木の平均地際直径は、それぞれ2.3±0.7(S.D.) cm、2.7±0.6(S.D.) cmであった。接種後の樹脂の滲出能と接種木の枯死などの異変を、2000年8月29日、9月12日、9月27日、10月20日、11月2日、11月16日、12月9日、2001年1月19日、および9月8日に調査した。樹脂の滲出に関しては、樹幹にピンを刺し、回目の調査時に、そこからの滲出状況を以下の5段階で記録した。

レベル4：刺したピンの針元から樹幹をつたって流れている

レベル3：刺したピンの針元から流出し、玉状になっている

レベル2：ピンを刺した部位の外樹皮表面まで滲出している

レベル1：刺したピンの針先に付着している

レベル0：滲出が完全に停止している

### 3. 接種後のセンチウの分散・増殖とそれともなう通水阻害

2001年7月25日に、桜島個体群および2000年の接種試験で発生した枯死木から抽出・培養したKa-4を0.1ccあたり5,000頭に調整したセンチウ懸濁液0.1ccをそれぞれ6年生クロマツ稚樹12本、コントロールとして蒸留水0.1ccを4本の稚樹に対し、地上20cmの部位の樹幹に剥皮接種法で接種した。

接種から1週間、2週間、4週間および6週間後に、桜島個体群とKa-4接種木各3本と蒸留水を接種したコントロール木1本を地際部で伐倒し、地際から20cm、50cm、80cm、110cm、140cmの部位から、上下10cmずつ計20cmの樹幹を採取した。水分通導阻害の発生状況を調査するために、採取した材片の中央10cm分を切り出し、材片の下端を1%の酸性フクシン溶液に48時間浸漬し、材の染色状態をチェックした。水分通導が正常に行われている部分の材は赤紫色に染まり、阻害されている部分の材は染色されない(写真-1)。今回、材片の上部は樹脂の漏出のため染色されなかったため、染色状態のチェックは、材片の下から3cmの部位で行った。また採取した材片の残りの部分は、両端の直径と長さを測定後細かく切り刻み、ベールマン法により室温下で24時間センチウを抽出した。そして、顕微鏡下でセンチウ頭数を計数した。計数したセンチウ頭数をベールマン法に供した材片の体積で除し、材1cm<sup>3</sup>あたりのセンチウ密度を求めた。

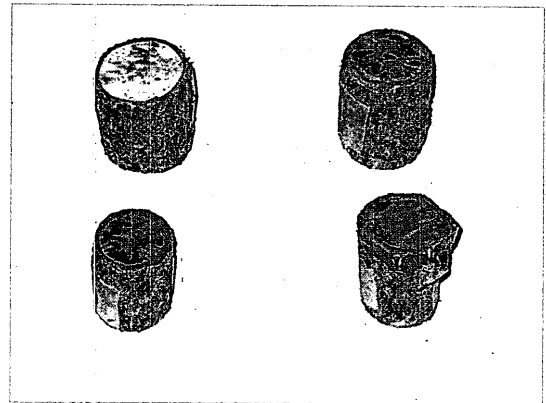


写真-1 通水阻害が発生したクロマツ稚樹の木部  
染色されず白のまま残っている部分で通水阻害が発生している。

Photo 1 Xylem dysfunction in PWN-inoculated seedlings of *Pinus thunbergii*  
Xylem dysfunction occurs in unstained areas in the trunk sections.

### 4. データ解析

Ka-4接種木と桜島個体群接種木の間での枯死率の比較には $\chi^2$ 検定を、材内センチウ密度の比較にはt検定を用いた。

### 結 果

蒸留水を接種したコントロール木は、調査期間を通して全て健全な状態で生存した。2000年の桜島個体群接種木では、接種19日後の9月12日までに1本、接種4週間後の10月20日までに全部で3本、そして2001年1月19日までに全部で17本が枯死した。また、2001年9月8日までに新たに

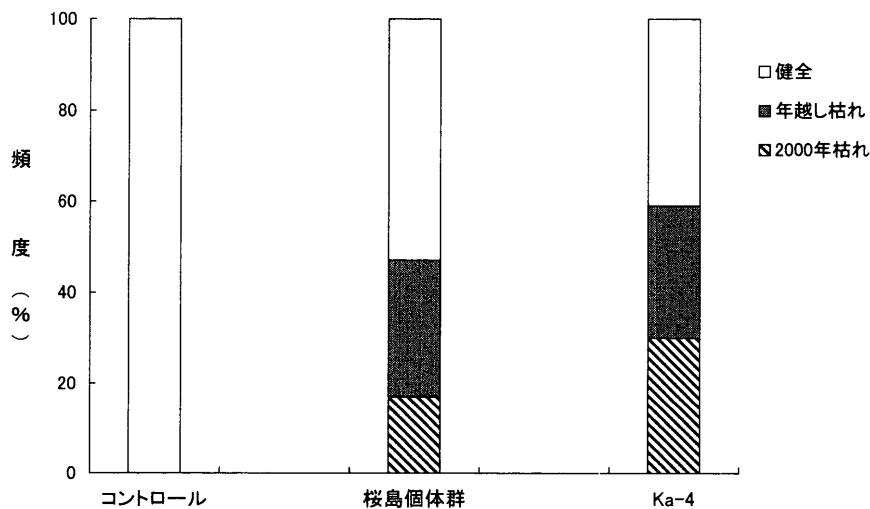


図-1. センチュウ接種による枯死木の発生状況

Fig.1 Wilting of *Pinus thunbergii* seedlings inoculated with the two PWN isolates

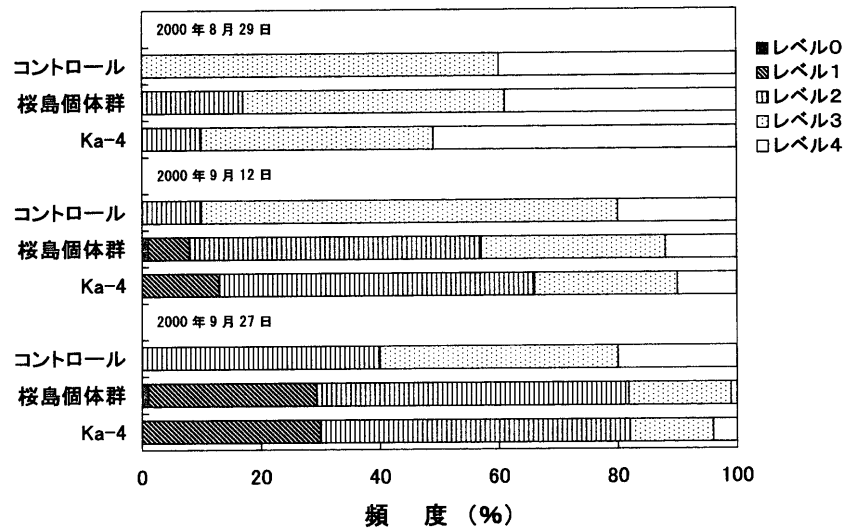


図-2. センチュウ接種後の樹脂滲出状態の経時変化

Fig. 2 Temporal changes of oleoresin flow in control and PWN-inoculated seedlings of *Pinus thunbergii*

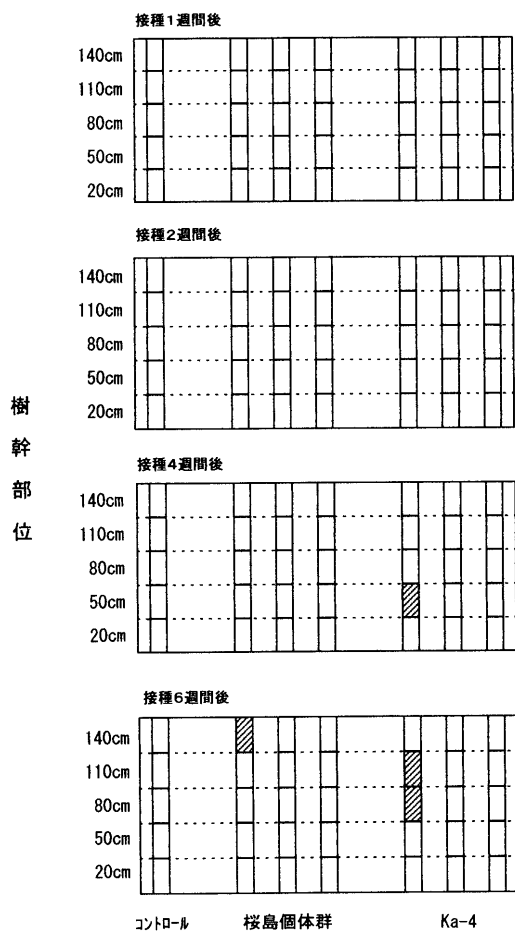


図-3. センチュウ接種後の樹幹における通水障害の発生状況  
斜線部は通水障害が生じたことを示す。

Fig. 3 Dysfunction of xylem in PWN-inoculated seedlings of *Pinus thunbergii*  
Shaded areas show the occurrence of dysfunction of xylem.

30本の接種木の枯死が確認された。一方、Ka-4接種木では、2000年10月20日までに4本、2001年1月19日までに全部で30本が枯死した。そして、2001年9月8日までに、新たに29本が枯死した(図-1)。桜島個体群接種木とKa-4接種木の間で、2000年の枯死率に有意差が認められたが<sup>5</sup>( $\chi^2=4.700$ ,  $P=0.03$ )、2001年にいわゆる年越し枯れを起こした接種木の割合や2001年9月までの総枯死率には、有意差はみられなかった(年越し枯れ： $\chi^2=0.448$ ,  $P=0.504$ , 総枯損： $\chi^2=2.890$ ,  $P=0.09$ )。

接種木の枯死が見られるようになった2000年9月末までの期間中、コントロール木の樹脂滲出能は、季節の進行とともに徐々に低下し、接種2週間後の9月12日には20%、1ヶ月後の9月27日には40%でレベル2を記録した。接種木では、接種4日後にKa-4接種木の10%、桜島個体群接種木の17%でレベル2を、接種2週間後にはKa-4接種木の13%、桜島個体群接種木の8%でレベル1またはレベル0を記録した。さらに、接種1ヶ月後には、いずれのセンチュウ接種木でも、約30%の個体の樹脂滲出能はレベル1または0であった。Ka-4接種木と桜島個体群接種木の間で、樹脂滲出能低下の著しい差は見られなかった(図-2)。

2001年の桜島個体群接種木での通水障害は、接種6週間後に3本の供試木のうち1本の140cm部でのみ見られた。Ka-4接種木では、接種4週間後に1本の50cm部で、6週間後に1本の80cm部と110cm部の2カ所で通水障害が確認された(図-3)。

接種後のセンチュウの樹体内での分布状況は、桜島個体群とKa-4で同じ様な経時変化を示した。すなわち、接種1週間後では、センチュウは限られた部位からのみ検出され

たが、2週間目以降では、ほとんど全ての部位から検出されるようになった(図-4)。桜島個体群とKa-4のいずれも、サンプル材1cm<sup>3</sup>あたりの平均センチウ抽出数は、

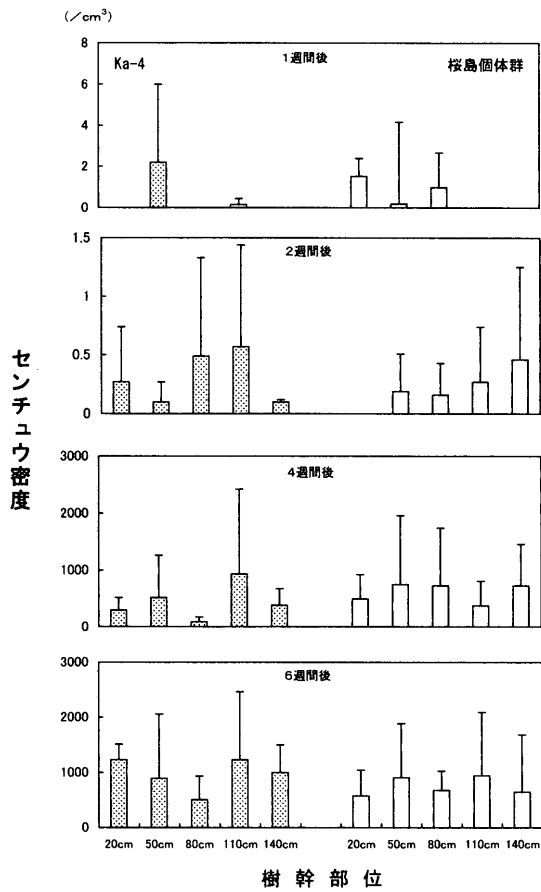


図-4. センチュウ接種後のセンチウの樹体内での分布状況  
縦線は標準偏差を示す。

Fig. 4 Distribution of PWN in trunks of PWN-inoculated seedlings of *Pinus thunbergii*  
Vertical lines show standard deviation.

接種1週間目から2週間目にかけてわずかに減少した後、次の2週間で著しく増加するという傾向を示した。しかし、桜島個体群では4週間目から6週間目にかけてセンチウ数はほとんど増加しなかったのに対し、Ka-4では約5倍に増加した(図-5)。いずれの調査日においても、センチウ数はサンプル間の変動が大きく、系統間で有意な差は見られなかった(1週間後： $t=1.398$ ，2週間後： $t=0.445$ ，4週間後： $t=0.656$ ，6週間後： $t=0.885$ ，いずれも $P>0.05$ )。

### 考 察

マツ材線虫病の発病や病徴の進展は、基本的にはセンチウの病原力と寄主植物の抵抗性により決定されているが、寄主植物の抵抗性は、その遺伝的な性質のほか、寄主植物の生理的条件に影響を与える環境条件によっても変化すると考えられる。寄主植物の生理条件に影響を与える重要な環境要因として、温度と水分条件があげられる。これまでに、清原(1973)は高温下でセンチウ接種木の枯死の前兆が早まることを、鈴木(1984)は水分ストレスが強いと病徴の進展が促進されることを報告している。また、高温少雨の夏にはマツ枯損量が著しく増加したことが報告されている(小林 1978, 1979)。したがって、高温や少雨のような強い環境ストレス下の寄主植物では、病原性がそれほど強くないセンチウの接種でも枯損が発生しやすく、環境ストレスが強い場合に比べ、ストレスが弱い場合の方が、センチウの病原性の違いは検出しやすいと考えられる。

センチウの病原力を調査するための接種試験は、6月から7月の梅雨明け頃に行われることが多い。一方、今回の試験では、2000年のセンチウ接種の実施が8月25日と、通常実施されている時期より約1ヶ月遅れた。接種以降気温は徐々に低下し、降水量不足による著しい土壌乾燥は生じ

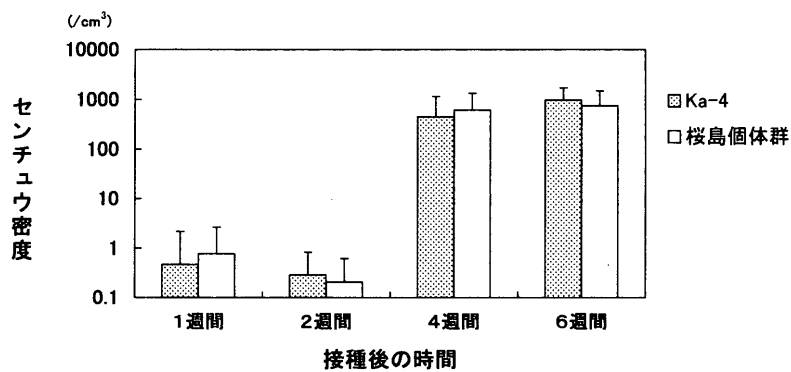


図-5. 樹体内でのセンチウ密度の経時変化  
縦線は標準偏差を示す。

Fig. 5 Temporal changes of PWN density in PWN-inoculated seedlings of *Pinus thunbergii*  
Vertical lines show standard deviation.

なかった。したがって、寄主植物の物理的環境要因によるストレスは弱かったと考えられる。実際、2000年の接種試験においては、センチュウ接種による病徴の発現や進展は、通常の梅雨明け直後の接種に比べ遅かった。一方、2001年の接種は、これまで実施されてきた多くの接種試験と同様に、7月下旬に行った。2001年は7、8月は高温小雨が続き、両月の月平均気温は例年より約1℃高く、降水量は例年の約1/3にとどまった（鹿児島気象台調べ）。したがって、2000年の接種試験では、接種したセンチュウ個体群間に病原性に差があるとすれば、その差はより明確に現れたと考えられる。これに対し、2001年の接種試験では、寄主植物は強くストレスを受け、センチュウの病原力があまり強くなくても接種木は枯死する可能性が高くなったため、センチュウの病原力の差が接種木の枯死率や病徴の発現の差に反映されにくかったのではないかと考えられる。

2000年のセンチュウ接種試験においては、総枯死率といわゆる年越し枯れの割合には、センチュウ間で有意差はなかったが、2001年1月までの枯死率は、Ka-4の方が桜島個体群より13%ほど高く、その差は有意であった。しかし、2001年に実施した試験では、水分通導障害や接種木内でのセンチュウの移動や繁殖には、桜島個体群とKa-4間で著しい差は認められなかった。2000年夏と2001年夏の気象条件ならびに両年度の接種条件を考慮すると、2000年の結果にみられた枯死率の差が、Ka-4と桜島個体群間の病原力の違いを敏感に反映したものと考えられる。ただし、Ka-4の病原力は強い（Kosaka et al. 2001）ので、桜島個体群の病原力がKa-4より弱いといっても、その差は寄主植物にあまりストレスがかからない状態でのみ枯死率に差が出る程度のもので、絶対的な病原力が弱いというわけではないと考えられる。

マツ枯死木やカミキリから抽出されるセンチュウの病原性は、単木ごと、カミキリの個体ごとに著しく異なるが（Kiyohara and Bolla 1990）、今回の実験に供試した桜島個体群は複数のカミキリから抽出したセンチュウを同一培地上で増殖したもので、その病原力は、桜島南東部のクロマツ激害林分で活動するカミキリに付着したセンチュウの病原力をほぼ代表しているのではないかと考える。そうであれば、1997から1999年にかけての桜島東南部（桜島と大隅半島の接している地域）一帯でのマツ材線虫病の蔓延の遅れは（曾根ら 2002）、そこで活動するセンチュウの病原力が著しく弱かったためとは考えられず、カミキリの大隅半島からの飛来数や当地における生息数、さらにはクロマツの生理的条件などの要因が原因であったと思われる。

## 謝 辞

本研究を行うに際し、独立行政法人森林総合研究所森林生物部線虫研究室からKa-4系統のセンチュウを提供していただいた。記して感謝します。

## 引用文献

- Bedker, J. P. and Blanchette, R. A. (1988) Mortality of Scots pine following inoculation with the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Can. J. For. Res. 18: 574-580.
- 清原友也 (1973) マツノザイセンチュウを接種したクロマツ苗の発病に及ぼす温度の影響. 84回日林講 334-335.
- Kiyohara, T. and Bolla, R. I. (1990) Pathogenetic variability among populations of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. For. Sci. 36: 1061-1076.
- 小林一三 (1978) 関西地方における昭和52年度夏の異常気象と松くい虫被害. 森林防疫 27: 75-78.
- 小林一三 (1979) 関西地方における2年連続の異常気象と松くい虫被害の激化. 森林防疫 28: 80-84.
- Kosaka, H., Aikawa, T., Ogura, N., Tabata, K., and Kiyohara, T. (2001) Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: the induced resistance of pine trees by other avirulent isolates of the nematode. European J. Plant Pathol. 107: 667-675.
- 久保蘭恵・曾根晃一・川内博文・辻稔 (1998) マツノザイセンチュウ抵抗性と材線虫の初期侵入個体数. 鹿大演研報 26: 37-41.
- 中村克典・曾根晃一・大隈浩美 (1999) サンケイ式昆虫誘引器を改良したマツノマダラカミキリ生け捕り用トラップ. 応動昆 43: 55-59.
- Ookuma, H., Sone, K., Nakamura, K., Tajitsu, H., Sato, Y. (1999) Pine wilt disease on Sakurajima Island - Why not epidemic? Proc. Intern. Symp. Sustainability of Pine Forests in relation to Pine Wilt and Disease. 242-246.
- 曾根晃一・畑邦彦・佐藤嘉一・中村克典 (2002) 桜島におけるマツ材線虫病の侵入、拡大とその防除. 森林防疫 51: 141-146.
- 鈴木和夫 (1984) マツの水分生理状態と材線虫病の進展. 林試研報 325: 97-126.
- Togashi, K. (1988) Population density of *Monochamus alternatus* adults (Coleoptera: Cerambycidae) and incidence of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). Res. Popul. Ecol. 30: 177-192.

## 要 約

桜島南東部のクロマツ林で捕獲したマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* Hope) から抽出したマツノザイセンチュウ (以後、単にセンチュウと称す) (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer) Nickle) (桜島個体群) を苗畑に植栽されているクロマツ稚樹へ接種し、枯死率、樹脂滲出能、通水阻害の発生、センチュウの樹体内での分布状況について、強病原性とされているKa-4系統と比較した。2000年8月25日に行った接種試験では、桜島個体群接種木のうち2001年1月までに17%、2000年9月までに47%の個体が枯死した。2000年の枯死率は、Ka-4 (30%) に比べ有意に低かったが、総枯死率 (59%) では有意差がなかった。いずれのセンチュウ接種木でも、樹脂滲出能が接種4日後から低下する個体が見られ、2週間後には滲出を停止した個体が見られた。2001年7月25日に実施した接種試験では、接種木の通水阻害はKa-4で接種後4週間目に、桜島個体群では接種後6週間目に生じたが、通水阻害の発生頻度に差はなかった。接種2週間後に、センチュウはサンプルしたほとんど全ての材片から抽出された。また、材片中のセンチュウ密度は、接種後1週間目から2週間目にかけて減少したが、その後増加に転じた。桜島個体群とKa-4間で、材片中のセンチュウ密度に有意差はなかった。これらの結果から、桜島に生育するセンチュウの病原力は、強病原性とされているKa-4ほどは強くないが、その差は樹木にあまりストレスがかからない状態でのみ枯死率に差が生じる程度であると考えられた。桜島に生息するセンチュウの病原力の低さが、桜島南東部での被害発生が大隅半島の激害発生と比較して2～3年遅れた主な原因であったとは考えられなかった。