

マツ材線虫病の病原学的研究

清 原 友 也⁽¹⁾

Tomoya KIYOHARA : Etiological Study of Pine Wilt Disease

要 旨: まつくい虫の寄生・加害を誘発するマツ樹の衰弱の原因を、樹病学的側面から究明する過程において、マツ枯死木から *Bursaphelenchus* 属の線虫が検出された。KOCH の原則に照らして線虫の病原性を検討した結果、本種が激害型マツ枯損の病原であることを確認した。本種の学名には、1934 年アメリカで記載された *B. xylophilus* (STEINER and BUHRER) NICKLE 1970 が採用され、和名としてマツノザイセンチュウが提唱された。

本線虫の病原性に関して調査・研究を行った結果、病原力において著しい種内変異が認められた。病原力の地理的変異は認められなかったが、林分間変異および同一林分内の枯死木間変異が顕著であった。交配試験の結果、病原力は遺伝的形質であることが推測された。今後、病原力の遺伝様式を明らかにする必要がある。

弱病原線虫をマツに前接種すると、前接種のない対照木に比べ枯死率が軽減する、いわゆる誘導抵抗性の現象が明らかになった。誘導される抵抗性の度合は前接種する線虫密度に依存し、前・後接種の時間間隔の影響を受けた。

目 次

I 章 緒言	128
II 章 マツ枯損に関与する病原線虫 <i>Bursaphelenchus</i> sp. の発見と KOCH の原則に基づくその病原性の確認	130
1 節 線虫発見の経緯	130
2 節 KOCH の原則に基づく <i>Bursaphelenchus</i> sp. の病原性の確認	130
1 項 マツ罹病木における <i>Bursaphelenchus</i> sp. の寄生確認	132
2 項 健全植物に対する <i>Bursaphelenchus</i> sp. の接種試験	133
3 項 接種木からの線虫再分離	139
4 項 接種源の検討	139
5 項 その他の <i>Bursaphelenchus</i> 属線虫類の接種試験	140
6 項 考察	141
3 節 病原線虫の学名について	142
4 節 II 章の考察	143
III 章 <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> の病原力	143
1 節 <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> の病原力の種内変異	144
1 項 病原力の地理的変異	144
2 項 林分間および林分内における病原力の変異	149
3 項 同一枯死木内における病原力の変異	150
4 項 単一雌系統間の病原力の変異	151
5 項 母樹別系統苗に対する線虫の病原力	152

2 節 病原力に関連する線虫諸性質の検討	154
1 項 <i>Botrytis cinerea</i> 菌上における強・弱病原線虫の増殖比較	154
2 項 マツ樹体内における強・弱病原線虫の増殖比較	155
3 項 <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> の病原力とアイソザイムの関係	156
4 項 交配による病原力の変化	160
3 節 弱病原線虫の前接種による病原力発現の抑制—誘導抵抗性—	161
1 項 抵抗性誘導因子の検討	161
2 項 抵抗性の誘導に及ぼす前接種密度の影響	162
3 項 抵抗性の誘導に及ぼす前・後接種の時間間隔の影響	162
4 節 III 章の考察	163
IV 章 総括ならびに今後の研究の展望	165
引用文献	167
Summary	173
図版説明	

I 章 緒 言

わが国には 8 種のマツが知られるが、その中でアカマツ (*Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC.) およびクロマツ (*P. thunbergii* PARL.) が代表的な樹種で広く各地に分布している。単にマツと呼ぶとき、この 2 種の中のいずれか、あるいは双方を指している場合が多い。マツは立地に対する要求度が低く、他の樹種が育ちにくい瘠悪な土壤条件でもよく育成する。この特性により古くから天然更新、人工造林によって多くのマツ林が育成され、スギ、ヒノキとともに林業経営上重要な地位を占めてきた。

マツはまた、林業経営上のみならず森林生態学的見地からも重要な役割を果たしている。火山噴出物の堆積地、山火事、山崩れなど疎開地にいち早く侵入育成し森林再生に先駆的役割を果たしているのもマツ樹である。一方、海岸沿線にあっては暴風、防潮および飛砂防備林として家屋、農作物を守り、山地崩壊の防止に役立つなど公益的機能面も見逃せないものがある。

かように私達の生活にかけがえのないマツが永年に亘って枯れつづけている。近年その被害は一層激甚をきわめ、東北地方にまで拡大している。この集団枯損によって幾多の経済林が惨害を被っているばかりでなく、各地の名勝地のマツもこの悪疫の犠牲となって消え去りつつある。

マツ枯損の発生は今世紀の初頭にさかのぼる。矢野の報告⁸⁵⁾によると、長崎市周辺のマツ林における 1905 年頃からの集団枯損、また福岡県遠賀郡の海岸では 1906 年頃からの被害が記録されている。

長崎市での被害は一度は根絶できたが 1925 年に佐世保で発生した被害は、海軍の要塞の中であつたため根絶できず 1935 年から激害となり拡大し始めた。1939 年には熊本県や宮崎県のパルプ工場を中心に被害が発生し以後拡大していった¹⁷⁾。

また、1921 年頃から兵庫県相生町に始まった被害は国有林や貯木場周囲の壮齢林に発生し、1934 年の干ばつと暴風により被害は拡大したといわれる⁶⁶⁾。以上のように、初め局地的であつた被害が

流行病の様相を呈して海岸線に沿って拡がり、現在では内陸にまで侵入・拡大し各地のマツ林に壊滅的被害をおよぼしている。激害型マツ枯損被害は、今や林業上の問題にとどまらず社会問題として一般の関心もさわめて高い。

マツ枯損の原因は、枯死木に寄生している穿孔性甲虫類と想定され 1940 年代から調査・研究が始められた。穿孔性甲虫類は松くい虫と呼ばれるようになり主要種の加害時期、産卵時期などが調べられた。松くい虫類の寄生生態に関する 1960 年代の研究から、重要な問題点が指摘された。それは、松くい虫類は樹脂滲出量の少なくなったマツに選択的に産卵・加害するもので、樹脂滲出機能に影響をおよぼすようなマツの生理的衰弱の原因が存在するという示唆であった^{57)~60)}。

これとは別に、被害木と餌木を併用した調査から、マツ生立木が何か重大な影響を受けて生理的に異常になったために松くい虫の産卵・加害を招くとする見解も示されていた²³⁾。森林昆虫学者によって提示された「マツの生理的異常」の原因解明に向けて、各分野の研究者が参画し 1968 年プロジェクト研究が発足した²²⁾。著者らは樹病研究者の一員としてこのプロジェクトに参加し、マツに生理的衰弱をもたらす病原菌の探索を目的として研究に着手した。研究途上、マツ枯死木に寄生している線虫、*Bursaphelenchus* sp. を見いだした。

本論文では、第Ⅱ章において、永年しょうけつを極めて激害型マツ枯損の病原を KOCH の原則に基づいて *Bursaphelenchus* sp. と確定した試験の結果を示し、第Ⅲ章では、本線虫の病原性に関して論議するが、特に病原力の変異に主眼をおいて試験と考察を行う。研究の一部についてはすでに公表した^{24)~44)49)70)80)}。

本文に先立ち、本稿を草するに当たり幾多のご教示とご激励を賜った東京大学農学部教授 濱谷稔夫博士、助教授 鈴木和夫博士の両先生に深く感謝の意を表する。

本研究を遂行するに当たり、多大なご高配とご激励をいただき、さらに本稿のご校閲を賜った林業試験場保護部長 横田俊一博士に深謝する。同線虫研究室長 真宮靖治博士には研究上多くのご教示と論議をいただいた。

本研究の端緒を与えられ、終始ご薫陶とご教示を賜った前鹿児島大学農学部教授 故徳重陽山博士に衷心より感謝する。林業試験場九州支場 尾方信夫前支場長、橋本平一保護部長、楠木 学樹病研究室長ならびに研究室各位および昆虫研究室の各位には終始ご教示とご協力を仰いだ。

林業試験場保護部の樹病科および昆虫科の多くの方々からご教示をいただいた。特に、樹病研究室長小林享夫博士にはご指導いただいた。同造林部遺伝育種第 4 研究室 白石 進博士にはアイソザイムの研究でご教導いただいた。あわせてお礼を申しあげる。

実験を行うに際し、試験地と試料をご提供いただいた熊本営林局および管内営林署ならびに九州林木育種場に深謝する。線虫の採取にあたっては各県林業試験場の関係各位、林業試験場本・支場の関係各位に多大なご高配をいただいた。ここに深く感謝する。

最後に、線虫の系統維持と培養試験にご指導とご協力を惜しまれなかった前林業試験場九州支場 堂園安生主任研究官に心からお礼を申し述べる。

Ⅱ章 マツ枯損に関与する線虫 *Bursaphelenchus* sp. の発見と KOCH の原則に基づくその病原性の確認

松くい虫の寄生・加害を誘発するマツの生理的衰弱の原因を樹病学的側面から追究する研究過程において、マツの根部組織から線虫の一種、*Bursaphelenchus* sp. が検出された⁸⁰⁾。本章では線虫発見の経緯ならびに KOCH の原則に照らして証明した、線虫のマツに対する病原性を記述する。

1 節 線虫発見の経緯

材料と方法

マツ樹の生理的衰弱の原因は根の障害に由来するとの想定のもとに、根に寄生・加害する菌類を探索する目的で菌の分離と分離された菌類のマツに対する病原性を検討した。九州各地の被害林から枯死木または枯死過程にあるマツ類を任意に選び、根および根圏土壌から試料を採取し、糸状菌を対象に分離試験を 1967～1969 年に行った。根の場合には根株またはこれから分岐した一次根を供し木質部から一辺約 5 mm のブロックを作り、その表面をアルコールランプで火炎消毒した後、PSA 培地（水 1000 ml 中：ジャガイモ 200 g の煎汁、しょ糖：30 g、寒天：20 g）上に定置し 25℃ 下で分離を行った。土壌からの菌の分離は CHAMBELL⁶⁾ の方法に順じた。分離された菌類の病原性を確認するため、殺菌土壌（直径 10 cm の素焼き鉢中）に生育させたクロマツ芽生え（20 日生）に対して無傷接種をするとともに、林業試験場九州支場苗畑（以下、林試九州支場苗畑と呼ぶ）に植栽された 3 年生クロマツの根に対して有傷接種を行った（1968 年 7 月 15 日）。

結果と考察

根および根圏土壌から多くの糸状菌が分離された。その中の主要なものを Table 1 に示した。これらの菌類をクロマツ芽生えに接種した場合に若干の立枯を誘起する菌類が認められた（Table 1）。しかし、3 年生クロマツに対する有傷接種においては、強い病原性を示す菌はなく、接種部位に若干の変色を起こす 1～2 の菌（*Cylindrocarpon* sp., 不明菌）を見たのみで、クロマツを衰弱させようような菌類は検出されなかった（Table 1）。分離された菌類を光学顕微鏡下で観察中に数種の菌の菌叢上にある種の線虫がおびただしく繁殖しているのに気付いた⁸⁰⁾。特に *Pestalotia* sp. や青変菌類上での繁殖が顕著であった。同定の結果、観察された線虫は *Bursaphelenchus* 属に所属するもので、いずれの菌叢上のものも同一種であることを確認した。この線虫を用いてクロマツ芽生え（30 日生）および 12 年生クロマツと 18 年生アカマツに対し 1969 年 7 月 20 日に接種したところ Table 2 に示す結果がえられた。以上の結果から、*Bursaphelenchus* sp. がマツに対して病原性を有する示唆をえた。

Bursaphelenchus 属の線虫で高等植物に寄生し加害性を示すとする既往の報告はなされていないので、KOCH の原則に従って本線虫の病原性を確かめる必要性が生じた。

2 節 KOCH の原則に基づく *Bursaphelenchus* sp. の病原性の確認

ある寄生性疾患の病原を確定するためには一般に KOCH の原則が満足される必要がある。KOCH

Table 1. 病木の根または根圏土壌から分離された主要な糸状菌とマツに対する病原性
Fungi isolated from roots or rhizosphere of diseased trees and their pathogenicity to seedlings of *P. thunbergii*.

菌 名 Fungi	病 原 性 ⁽¹⁾ Pathogenicity to pines		備 考 Notes
	20 日生 20 - day - old	3 年生 3 - year - old	
<i>Pythium</i> sp.	+	—	根圏土壌から分離 Isolated from rizosphere
<i>Pythyum</i> sp.	—	—	
<i>Fusarium</i> sp.	—	—	
<i>Fusarium</i> sp.	+	—	根から分離 Isolated from roots
<i>Fusarium</i> sp.	—	—	
<i>Rhizoctonia</i> sp.	—	—	
<i>Cylindrocarpou</i> sp.	+	±	根から分離 Isolated from roots
<i>Pestalotia</i> sp.	—	—	
青 変 菌 Blue stain fungi	—	—	<i>Ceratocysits</i> sp. etc.
黒 色 菌 Unknown	—	±	根から分離 Isolated from roots

Note) (1) : += 若干の立枯 Slight wilting, ± = 接種部に若干変色 Slight discoloration around wound made for inoculation, — = 病変なし No symptom.

Table 2. マツ類に対する *Bursaphelenchus* sp. の接種試験
Inoculation of seedlings and samplings of pine with *Bursaphelenchus* sp.

樹 種 Species	樹 齢 Age (yr)	接種法 Method	マツ本数 Number of pines		備 考 Notes
			接 種 Inoculated	枯死 Dead	
クロマツ <i>P. thunbergii</i>	0	無 傷 Unwound	50	0	30 日生芽生え 30-day-old seedlings
クロマツ <i>P. thunbergii</i>	12	有 傷 Wound	3	2	地際に穿孔接種 Inoculated at base of trunk
アカマツ <i>P. densiflora</i>	18	有 傷 Wound	5	3	病木材片の打ち込み Insertion of infested wood into trunk

Note) いずれの対照区にも枯死なし No disease in each control.

の原則を HORSFALL & DIMOND¹⁸⁾ に従って記すと以下のとおりである

- 1) 予測される病原が病気または症候群に常に随伴する
- 2) 予測される病原を純粹に分離・培養できその性質を調べることができる
- 3) 予測される病原を健全な植物に接種すると同じ病気または症候群が発現する

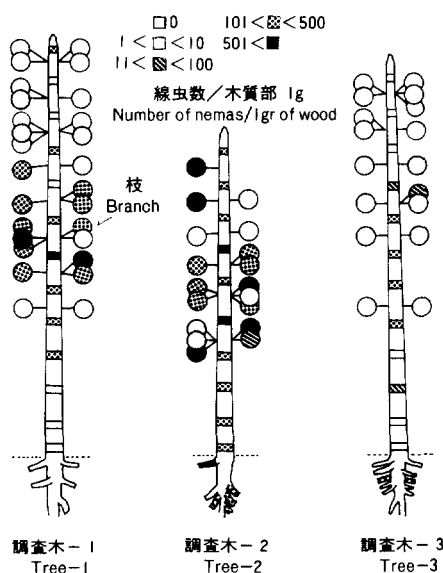


Fig. 1. 供試木における *Bursaphelenchus* sp. の寄生状態
Distribution of *Bursaphelenchus* sp. within diseased pine trees.

4) 接種によって発病した宿主から接種したのと同じ病原体を再分離できる

マツ枯死木から検出される *Bursaphelenchus* sp. が KOCH の原則を満足できるか否かを明らかにするための以下の諸試験を行った。

I 項 マツ罹病木における *Bursaphelenchus* sp. の寄生確認

材料と方法

Bursaphelenchus sp. が罹病木に普遍的に寄生しているかどうかを調べるため (KOCH の原則 1) 1968 年 9~12 月に九州一円のマツ枯損被害地から試料を採取し、線虫の検出を行った。Table 3 に示す 48 か所の林分から枯死木または枯死過程にあるマツを 1~6 本ずつ選んだ。これら供試木の根から一次根を 2~4 本ずつ (長さ 20~40 cm) 採取し線虫分離用試料とした。試料をよく水洗し木質部を中心に 2~4 g を供し、BAERMANN 法⁷⁹⁾ で 24 時間分離し、

線虫の同定と計数を実体顕微鏡および光学顕微鏡下で行った。

結果と考察

調査結果を Table 3 に示した。48 調査林分のうち 46 林分 (96%) から *Bursaphelenchus* sp. が検出された。調査本数でみると 99 本中 83 本 (84%) から分離された。樹種別にみるとクロマツ 60 本中 50 本 (83%), アカマツ 38 本中 32 本 (84%) で両樹種間に検出率の差は認められなかった。供試したリュウキュウマツ (*P. luchuensis* MAYR) 1 本からも線虫が検出された。

つぎに、マツの器官および組織別にみた線虫の寄生状態を明らかにするため、数個体を供試して線虫の分離を上記の方法で行った。器官別の分離結果を Fig. 1 に示した。供試木の樹齢は 13~16 年生で平均樹高 8.6 m, 平均胸高直径は 7.2 cm であった。外観の症状は, No. 2 が完全な枯死木, No. 3 は初期萎凋木で, No. 1 は両者の中間的症状であった。いずれの供試木においても、線虫は針葉を除く樹体全般にわたって寄生しており、病徴の進んだ個体ほど寄生密度が高かった。樹幹からの検出頻度が高いのに比べ根からの頻度は低い傾向を示した。線虫は内樹皮、木質部の双方に生息していたが、木質部の生息数が一般に多かった。

以上の調査から、九州一円のマツ枯損被害地のほとんどの罹病木に線虫 *Bursaphelenchus* sp. が寄生し寄生部位は針葉を除く樹体全般におよぶことが示された。マツ本数別にみた線虫検出率はやや低い、これは根を調査対象にしたことによるもので、地上部も合わせて調べるならば検出率はさらに高まるものと考えられる (Fig. 1)。

2 項 健全植物に対する *Bursaphelenchus* sp. の接種試験

Bursaphelenchus sp. のマツに対する病原性を明らかにするため (KOCH の原則 3), 培養線虫ならびに自然下で採取した線虫を用いて野外マツ林分で接種試験を行った。

材料と方法

培養線虫接種試験: 接種源に用いた線虫は, 1969 年 7 月 15 日, 鹿児島県川内市寄田町で発生したクロマツ枯死木から分離し, 継代培養したものである。分離した線虫から 20 頭を抽出し, ストレプトマイシン (500 ppm) で 10 分間表面殺菌し菌叢上に移し増殖させた。この個体群を基本 culture とし, 以後は随時に subculture を行い供試した。線虫の培養には Table 1 に示した *Pestalotia* sp. を用い, PSA 培地 (9 cm ペトリ皿) に生育させ, これに線虫を移植し培養した。25°C 下で約 1 週間培養した後 BAERMANN 法で菌叢より分離し接種源を作成した。

接種試験は熊本県植木町に所在する熊本営林署打越国有林 (アカマツ天然林, 樹齢: 16~24 年生, 平均樹高: 9.0 m, 平均胸高直径: 9.8 cm, 標高: 170 m) で行った。供試木地際の 3 方向に直径 12 mm のハンドドリルで深さ 2~3 cm の穴をあけ, これに線虫けん濁液 (1 ml) を注入し穴をスチロール栓で封じた。接種頭数は 1 穴に約 1 万, 計 3 万頭であった。対照木には同様の方法で殺菌水を注入した。

1970 年 6 月 27 日に接種を行い, 接種後ほぼ 1 か月毎に樹脂滲出量の調査と外部病徴を観察・記録した。樹脂滲出量の調査は小田の方法⁶⁰⁾を若干変更して用いた。

耐久型幼虫の接種試験: 本線虫の自然感染はカミキリムシ類によって伝播される耐久型幼虫 (分散型 4 期幼虫²¹⁾) によって起こる⁵⁰⁾。この試験は耐久型幼虫の病原性を培養線虫の病原性と比較するためと, 耐久型幼虫の接種密度とマツの発病・枯死の関係を知らねばならぬために行った。

マツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* HOPE) 50 頭の虫体から BAERMANN 法で耐久型幼虫を分離し殺菌水で 5~6 回洗浄した。これで, 1 ml 当たり 30, 300, 3000, 30000 頭の接種源を作成した。接種試験は上記した打越国有林 (以下, 植木試験地と呼ぶ) および熊本県芦北町の民有林 (クロマツ人工林, 樹齢: 14 年生, 平均樹高: 8.4 m, 平均胸高直径: 8.8 cm, 標高: 60 m) (以下, 湯浦試験地と呼ぶ) の 2 林分ではほぼ同条件で行った。各密度に 10 本のマツを供試し, 接種法と病徴の調査は上記培養線虫の場合に準じたが, 接種穴は 1 個とした。湯浦および植木試験地の接種日は 1972 年 6 月 8 日および同年 6 月 23 日であった。

時期別接種試験: 本線虫の病原性が発現する時期を知るため, 1970 年 2 月から 10 月まで植木試験地において, 供試木当たり 3 万頭の培養線虫を毎月下旬に 10 本のアカマツに対し接種し, 発病経過を調べた。接種法等は上記と同様とした。

結果と考察

培養線虫接種試験: 培養線虫を接種した 20 本のアカマツにおける病徴発現の推移を個体別に Table 4 に示した。樹脂滲出量は接種後 1 か月までに著しく低下した。しかし, この時期にはまだ何ら外部病徴は発現せず樹脂滲出量の異常によってのみ発病を知ることができた。約 2 か月が経過すると樹脂の滲出はほとんど認められなくなり, 様々な病徴を呈する個体が接種木に現れた。1

Table 3. 自然罹病木における *Bursaphelenchus* sp. の寄生調査 (九州, 1968)
 Inspection of *Bursaphelenchus* sp. for naturally diseased pine trees (Kyushu, 1968)

番号 No.	調 査 地 Collection site		樹 種 Species	調査本数 No. examined	線虫検出本数 No. with nemas
1	福岡県 Fukuoka Pref.	甘 木 市 Amagi C.	<i>P. densiflora</i>	2	2
2		玄 海 町 Genkai T.	<i>P. thunbergii</i>	2	2
3		津 屋 崎 町 Tsuyazaki T.	Do.	2	1
4		福 岡 市 Fukuoka C.	<i>P. densiflora</i>	2	2
5		志 摩 町 Sima T.	Do.	2	2
6		北 九 州 市 Kitakyushu C.	Do.	2	2
7		北 九 州 市 Kitakyushu C.	Do.	2	2
8		黒 木 町 Kuroki T.	Do.	2	2
9		串 崎 町 Kusizaki T.	<i>P. thunbergii</i>	2	2
10		福 岡 市 Fukuoka C.	<i>P. densiflora</i>	2	2
11	長 崎 県 Nagasaki Pref.	三 和 町 Sanwa T.	<i>P. thunbergii</i>	2	2
12		三 和 町 Sanwa T.	Do.	2	1
13		西 彼 町 Seihi T.	<i>P. densiflora</i>	2	2
14		大 瀬 戸 町 Ooseto T.	Do.	2	1
15		西 彼 町 Seihi T.	<i>P. thunbergii</i>	2	2
16		小 佐 々 町 Kosasa T.	<i>P. densiflora</i>	2	2
17		鹿 町 町 Sikamachi T.	Do.	2	1
18		田 平 町 Tabira T.	<i>P. thunbergii</i>	2	1
19		田 平 町 Tabira T.	Do.	1	1
20		松 浦 市 Matsuura C.	<i>P. densiflora</i>	2	1
21		北 有 馬 町 Kitaarima T.	<i>P. thunbergii</i>	2	1
22		南 串 山 町 Minamikushiyama T.	Do.	2	0
23		福 江 市 Fukue C.	<i>P. densiflora</i>	3	2
24		諫 早 市 Isahaya C.	<i>P. thunbergii</i>	2	2

25	佐賀県 Saga Pref.	西有田町 Nishiarita T.	<i>P. densiflora</i>	2	1
26		伊万里市 Imari C.	<i>P. thunbergii</i>	2	2
27		唐津市呼子 Karatsu C.	Do.	2	2
28		唐津市鎮西町 Karatsu C.	Do.	2	2
29		唐津市佐志町 Karatsu C.	<i>P. densiflora</i>	2	2
30		唐津市鏡町 Karatsu C.	Do.	2	2
31		相知町 Oochi T.	<i>P. thunbergii</i>	3	3
32	大分県 Ooita Pref.	直川町 Naokawa T.	<i>P. thunbergii</i>	2	2
33		大分市 Ooita C.	Do.	2	2
34		香々地町 Kagachi T.	Do.	2	2
35		本耶馬溪町 Honyabakei T.	<i>P. densiflora</i>	1	1
36		本耶馬溪町 Honyabakei T.	Do.	1	1
37	熊本県 Kumamoto Pref.	熊本市 Kumamoto C.	<i>P. thunbergii</i>	3 (1)	3 (1)
38		湯浦町 Yunoura T.	Do.	3	3
39		芦北町 Ashikita T.	<i>P. densiflora</i>	3	1
40		水俣市 Minamata C.	<i>P. thunbergii</i>	6	4
41	宮崎県 Miyazaki Pref.	高鍋町 Takanabe T.	<i>P. densiflora</i>	2	2
42		佐土原町 Sadohara T.	<i>P. thunbergii</i>	2	2
43		南郷町 Nangou T.	Do.	2	2
44		日向市 Hyuuga C.	Do.	2	2
45	鹿児島県 Kagoshima Pref.	大隅町 Oosumi T.	<i>P. thunbergii</i>	1	0
46		志布志町 Shibushi T.	Do.	1	1
47		蒲生町 Gamou T.	Do.	1	1
48		川内市 Sendai C.	Do.	2	2
合計 Total				99	83

Nate) (1): リュウキュウマツ1本を含む Include a tree of *P. luchuensis*.

Table 4. 線虫接種木の個体別病徴発現の経過
Disease development on individual trees inoculated with *Bursaphelenchus* sp.

区分 Plot	接種木 Tree No.	調 査 月 日 Date of examination				線虫再分離 Reisolation
		6 / 27	7 / 22	8 / 22	9 / 25	
接 種 区 Inoculated	1	(+++) ⁽¹⁾	(±) Ha ⁽²⁾	(-) Ha	枯死 D	(3)
	2	(+++)	(±) Ha	枯死 D	枯死 D	
	3	(+++)	(±) Ha	(±) Ha	枯死 D	
	4	(+++)	(±) Ha	(-) Wn	枯死 D	
	5	(+++)	(±) Ha	枯死 D	枯死 D	
	6	(+++)	(±) Ha	(-) Wn	枯死 D	
	7	(+++)	(±) Ha	(-) Wn	枯死 D	
	8	(+++)	(±) Ha	(-) Dn	枯死 D	
	9	(+++)	(±) Ha	枯死 D	枯死 D	
	10	(+++)	(±) Ha	(-) Dn	枯死 D	
	11	(+++)	(±) Ha	(-) Ha	枯死 D	
	12	(+++)	(±) Ha	(-) Wn	枯死 D	
	13	(+++)	(±) Ha	(-) Wn	枯死 D	
	14	(+++)	(±) Ha	(-) Dn	枯死 D	
	15	(+++)	(±) Ha	(-) Wn	枯死 D	
	16	(+++)	(±) Ha	枯死 D	枯死 D	
	17	(+++)	(±) Ha	枯死 D	枯死 D	
	18	(+++)	(-) Ha	(-) Wn	枯死 D	
	19	(++)	(±) Ha	(±) Ha	枯死 D	
	20	(+++)	(±) Ha	枯死 D	枯死 D	
対 照 区 Cont. (sterile water)	1	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	
	2	(+++)	(+)	(+++)	(+)	
	3	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	
	4	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	
	5	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	
	6	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	
	7	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	
	8	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	
	9	(+++)	(+)	(+++)	(+++)	
	10	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	

Note) 接種月日 Date of inoculation: 1970. 6. 27 (1) 樹脂滲出量 Grade of oleoresin exudation from punch wound: (++++) = 多く流下 Abundant, (++) = やや流下 Slight flow, (+) = 穿底に集積 Gathering in the botom of wound, (±) = 点状 Granular, (-) = 無滲出 Resinless (2) 外部病徴 External symptom: Ha = 外見健全 Healthy in appearance, Wn = 針葉やや萎凋 Slight wilting of needles, Dn = 1 - 3 年生針葉の変色 Discoloration of 1 - to 3 - year - old needles, D = dead, (3): += 再分離 *Bursaphelenchus* sp. were reisolated.

～3年生葉が黄褐色に変色するもの、当年葉が萎凋下垂するもの、全葉が赤褐色に変色しているものなどの外部病徴が観察された。この時期にはまだ外部病徴の認められない個体もあったが、すべての接種木が3か月後の9月25日までに枯死した。一方、殺菌水を注入した対照木にはほとんど

発病は認められなかった。1~2の個体に一時的に樹脂滲出量の異常が認められたが、樹脂量(+)の異常にとどまりそれ以上進展しなかった。

耐久型幼虫接種試験：耐久型幼虫を接種した湯浦および植木試験地の供試木に発現した病徴と枯死に至る推移は、培養線虫を接種した場合とほとんど変わらなかった。密度別に接種した両試験地の試験の結果を発病の推移および最終枯死本数として、それぞれ Fig. 2 と Table 5 に示した。接種密度の高さに対応して樹脂滲出異常がはやく発現し、発生本数も多くなった。この傾向は両試験地に共通して現れ、最終枯死本数も接種密度の高さに応じて多い傾向を示した。

時期別接種試験：時期別に培養線虫を接種した供試木の発病・枯死経過を Fig. 3 に示した。2~8月の接種で枯死木が発生したが、9および10月の接種では枯死は起こらなかった。2~5月接種木の6月における樹脂滲出異常木の発生本数をみると、おのおの1本、2本、4本および8本となっており、接種時期の早いものほど発病木が少数であった。換言すると、夏期に近い接種ほど樹脂滲出の異常が発生しやすく、発生までの時間も短かった。7月接種では1か月以内にすべての供試木に樹脂滲出の低下ないし停止が認められた。そして接種時期の遅速に関係なく枯死の発生は8月以降に起こった。

本接種試験によって *Bursaphelenchus* sp. の強い病原性および線虫感染によって宿主植物に発現する病徴が明らかにされた。初期病徴として現れる樹脂滲出量の急激な低下ないし停止 (Plate 1, B) は本病の最も特徴的な病徴の一つである。松くい虫類の寄生・加害を誘発するマツ樹の生理的衰弱の指標とされて来た樹脂滲出量の低下^{57)~60)} は、本線虫の寄生によって発現する病徴と考えられた。

樹脂滲出量の停止に引き続いて現れる1~3年生葉が黄化し (Plate 1, C) ついで全針葉が下垂、変色 (Plate 1, D) する症状もまた一つの特徴的な病徴であった。接種木に現れるこれらの病徴

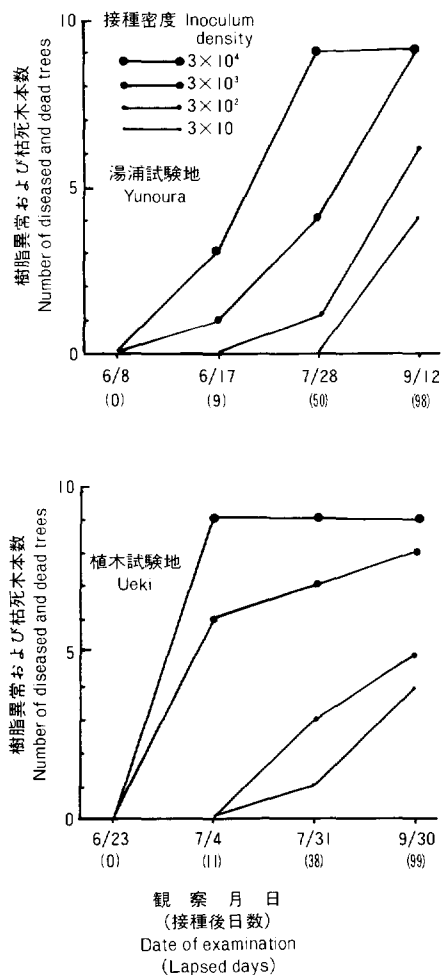


Fig. 2. 密度別に接種したマツの発病経過 (耐久型幼虫接種)

Disease developments of pine trees inoculated with different inoculum densities (inoculum: dauel larvae).

Table 5. 線虫接種密度とマツ枯死本数の関係
Relationship between inoculum density and pine wilt incidence.

試 験 地 Experimental stand	線虫区分 Nematode	接 種 密 度 Inoculum density			
		3×10	3×10^2	3×10^3	3×10^4
湯 浦 Yunoura	耐久型幼虫 Dauei larvae	4	4	9	9
植木-2 Ueki-2	耐久型幼虫 Dauei larvae	2	2	7	9
	合計 Total	8	8	16	18

Nate) 接種本数 Number of inoculated trees : 各区 10 本 10 trees/plot.

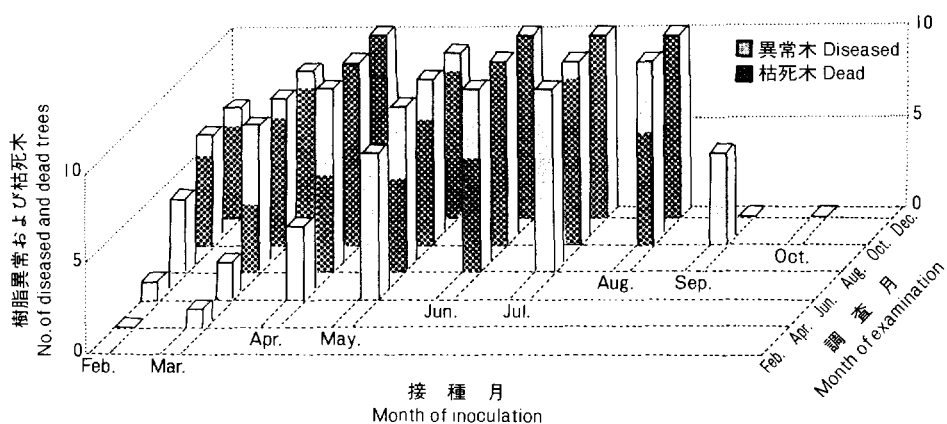


Fig. 3. *Bursaphelenchus* sp. の月別接種試験 (1970)
Monthly inoculation of red pines with *Bursaphelenchus* sp. (1970).

は、試験地外の自然罹病木に現れた病徴の推移と一致していた。

培養線虫および耐久型幼虫を接種した場合の宿主植物に発現する病徴ならびに発病枯死率に大差はなかった。したがって、培養線虫と耐久型幼虫の病原性に基本的な相違はないものと考えられた。線虫を接種したアカマツ（植木試験地）およびクロマツ（湯浦試験地）における病徴は共通しており、枯死本数においても大差はなかった。自然条件下においても両樹種の発病経過や枯死率に大きな相違は認められないので、本試験の結果は自然の発病状況を再現したといえる。

線虫を密度別に接種すると、密度の高まりとともに樹脂異常の発現がはやく、発現本数も多くなった。しかし、枯死時期については密度間に著しい相違は認められず、すべて8月以降に枯死が発生した。30頭という低密度接種においてもかなりの枯死木が発生したことは注目される（Table 5）。

線虫の時期別接種試験によって、病徴の発現と進行に関し興味ある現象が認められた。すなわち、

樹脂滲出異常は、接種時期のはやいものでは梅雨期の6月にかなりの接種木に発生した。しかし、樹脂異常の発現時期がいかにも早くても枯死の発生は8月以降になって初めて起こった。この事実は、マツを枯死に至らせる線虫の作用が発揮されるための宿主の生理条件の変化が8月前後になって初めて生ずることを暗示している^{70)~72)}。

3 項 接種木からの線虫再分離

材料と方法

接種によって発病枯死したマツから接種したのと同じ *Bursaphelenchus* sp. が再分離されるか否かを確認するため（KOCH の原則 4）、2 項における試験（Table 4）の供試木 20 本について胸高部から適宜材片を採取し、この中の 1~2 g を供試して線虫の分離を行った。また、2 供試木について 1 項で述べた方法で樹体各部から分離した。

結果と考察

調査した 20 本の枯死木のすべてから線虫が再分離された（Table 4）。詳細な調査を行った 2 供試木については、上記した樹体内分布（Fig. 1）と同様に枝、樹幹、根のすべてから線虫が分離された。

4 項 接種源の検討

Bursaphelenchus sp. の axenic culture は難しいと思われたので、既述のように *Pestalotia* sp. を用いた monoxenic culture を接種源として供試した。2 項の培養線虫接種試験の接種源中には線虫以外に *Pestalotia* sp. およびその代謝産物も含まれている。この試験ではこれら諸因子をマツに個別に処理し、それらのマツに対する影響の有無を確かめた（KOCH の原則 3 の確認）。

材料と方法

試験地および接種方法等は 2 項での試験に準じた。接種源を次の 5 種類とした。1) 線虫、2) *Pestalotia* sp., 3) 線虫と *Pestalotia* sp., 4) 3) の培養ろ液、5) 殺菌水（対照）。1) は三重にした新しいモスリン布地で培養線虫を分離することで *Pestalotia* sp. フリーの線虫が得られた。2) では 2×10^5 /ml の孢子けん濁液をつくり、3 ml を供試木当たり接種した。3) は 1) と 2) の混合液とした。4) には通常培養のろ過液（東洋ろ紙 No. 1）3 ml を毎木供試した。5) には殺菌水 3 ml を用いた。

結果と考察

試験結果を Table 6 に示した。接種源に線虫を含む区、すなわち 1) 区の線虫のみ、3) 区の線虫と *Pestalotia* sp. を接種したアカマツには速やかに樹脂滲出量の低下が起こり、2 項の諸試験で示されたと同様な外部病徴が発現して 10 月 22 日までに全供試木が枯死した。両区の供試木の病徴推移には全く相違は認められなかった。

一方、*Pestalotia* sp., 培養ろ液および殺菌水で処理した区においては、*Pestalotia* sp. 処理区の枯死 1 本を除いてほとんど病変は起こらなかった。樹脂滲出量（+）を示す供試木は対照区を含め 2~3 本認められたが、樹脂異常の進展はなく回復した。*Pestalotia* sp. 接種区に発生した枯死木を調査したところ多くの *Bursaphelenchus* sp. が検出された。したがってこの枯死原因は

Table 6. 接種源中の病原要因の吟味
Effect of inoculum components involved in nematode-*Pestalotia* culture on pine trees.

接 種 源 Component	接 種 本 数 No inoculated	異常および枯死本数 Number of plants	
		異 常 木 Diseased	枯 死 木 Dead
1) 線虫単独 ⁽¹⁾ Nematode alone ⁽¹⁾	10	10	10
2) <i>Pestalotia</i> 単独 ⁽²⁾ <i>Pestalotia</i> alone ⁽²⁾	10	3	1
3) 線虫 + <i>Pestalotia</i> Nematode + <i>Pestalotia</i>	10	10	10
4) 培養ろ液 ⁽³⁾ Filtrate of 3) ⁽³⁾	10	3	0
5) 対照 (殺菌水) Cont. (Sterile water)	10	2	0

Nate) 接種月日 Date of inoculation: 1970. 7. 24, 調査月日 Date of examination: 1970. 10. 22, (1): 3×10^4 頭 3×10^4 nemas, (2): 胞子 6×10^4 個 6×10^4 spores, (3): 線虫 - *Pestalotia* sp. の培養ろ液 Filtrates from nematodes - *Pestalotia* sp. cultures on PSA.

自然感染による本線虫関与のものと判断された。

5 項 その他の *Bursaphelenchus* 属線虫類の接種試験

材料と方法

マツ枯損木からは、上記接種試験によって病原性が認められた *Bursaphelenchus* sp. のほかに数種の *Bursaphelenchus* 属の線虫類が検出された。これらの線虫類のマツに対する病原性の有無を確かめるため接種試験を行った。線虫の培養は既述した方法に従った。供試植物として林試九州支場苗畑に植栽された4年生クロマツおよびアカマツを用いた。供試木の主幹地際にナイフで木質部に達する切り込みをつけ、これに約3万頭を含む線虫けん濁液 (0.1 ml) を滴下し、セロテープで被覆した。各線虫につきクロマツおよびアカマツ各10本を供して、1972年7月21日に接種し常法で病徴を調べた。

結果と考察

接種試験の結果を Table 7 に示した。供試したどの線虫もクロマツおよびアカマツに対して病原性を示さなかった。接種後3か月間病徴の観察を行ったが樹脂滲出異常、外部病徴ともに発現しなかった。

マツ枯損木からは *Bursaphelenchus* 属の線虫以外にも数多くの線虫類が検出されることが、枯損木を調査する過程で明かになった。その中で口針を備えた主要なものを記すと、*Seinura* spp., *Aphelenchoides* spp., *Parasitaphlenchus* spp., *Cryptoaphelenchus* spp., *Deladenus*

Table 7. マツ枯死木より分離された *Bursaphelenchus* 属線虫類とマツに対する病原性
Bursaphelenchus nematodes isolated from wilted pine trees and their pathogenicity
to healthy pines.

種 Species	検出頻度 ^{a)} Frequency	伝 播 昆 虫 Vector insect	病原性 ^{b)} Pathogenicity
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ¹⁾	++	マツノマダラカミキリ <i>Monochamus alternatus</i> HOPE	—
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ²⁾	+	ビロードカミキリ <i>Acalolepta fraudatrix</i> BATES	—
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ³⁾	+	キイロコキクイムシ <i>Cryphalus fulvus</i> NIJIMA	—
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ⁴⁾	+	キイロコキクイムシ <i>Cryphalus fulvus</i> NIJIMA	—
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ⁵⁾	+	クロコブゾウムシ <i>Niphades variegatus</i> ROELOFS	—
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ⁶⁾	+	マツキボシゾウムシ <i>Pissodes nitidus</i> ROELOFS	—
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ⁷⁾	+	不 明 Unknown	—
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ⁸⁾	+	不 明 Unknown	—
<i>Bursaphelenchus</i> sp. ⁹⁾	+	不 明 Unknown	—

Nate) 1): *B. mucronatus* 2) - 9): 未記載種 Undescribed a): ++ かなり多い Relatively frequent, + 少ない Not frequent b): — なし Nonpathogenic

spp., *Nothotylenchus* sp., *Neotylenchus* sp. 等の線虫類である。これらの中で糸状菌で培養できるものは培養した線虫を、培養不能の線虫では枯死木から分離したものを直接用いて *Bursaphelenchus* 属の線虫と同方法で同時期に接種したが、いずれもクロマツおよびアカマツに対して病原性を示さなかった。

6 項 考 察

以上 5 項目の試験によって、罹病木における *Bursaphelenchus* sp. の普遍的な寄生が確認され、*Bursaphelenchus* sp. の培養線虫および自然条件下での感染態ステージである耐久型幼虫の接種による病気の再現、接種罹病木よりの線虫の再分離を確認することができた。本線虫の接種によってマツに発現する病徴ならびに時期別接種によって確認された枯死時期は、自然罹病木の発生状況と一致した。この結果から、日本各地に多発している激害型マツ枯損の病原を *Bursaphelenchus* sp. と推定してよいと考えた。

本試験に供試した線虫の培養に当たっては、上記のように線虫の表面殺菌を十分行ったが、供試した線虫に細菌が随伴しているか否かについては詳細な検討を行っていない。田村・真宮⁷³⁾は、本線虫には 3 種の細菌が随伴していることを報告し、さらに線虫を無菌化する方法を示した。TAMURA⁷⁶⁾は、上記 3 種の細菌と無菌線虫をクロマツ稚苗と 3 年生アカマツに接種し、細菌類は

稚苗に対しては病原性を示したが、3 年生アカマツには影響を示さなかったとし、無菌線虫は 3 年生アカマツを枯死させたと報告している。

BASHAM⁴¹⁾ は *Ceratocystis* 属の青変菌類をテーダマツ (*P. taeda* L.) の苗木および幼木に接種し、4 種はマツを萎凋・枯死させたと報告している。この実験は非常に過酷な条件下(幼木の場合 35~40 cm 幅の環状剥皮)で行われていて正常なマツに対する病原性が明らかにされていない。また、樹脂に関する病徴記載がなされていない。角田ら⁸²⁾ は、*Ceratocystis* 菌の一種(後に菌名変更)が接種された 5 年生アカマツに病原性を示しこれを枯死させたと報じ、激害型マツ枯損の病原であると示唆した。この報告では、接種木の樹幹各部から樹脂を噴出するとしており、樹脂滲出量が急激に低下する自然条件下の激害型マツ枯損木と病徴の一致点がみられない。青島・林³⁾ は数種の青変菌をアカマツ生立木に接種した結果、接種部位からの樹脂の異常流出を認めたが、樹勢には影響しなかったと報告している。

小林ら⁴⁵⁾ は、ニトベキバチ (*Sirex nitobei* MATSUMURA) と糸状菌 (*Amylostereum* (Fr.) BOIDIN) との密接なる共同加害によるマツの枯損を報告している。この枯損の場合、被害木の樹幹に白色点状の樹脂の流出固結をみるのが特長とされる。

東北地方などの海岸林では、子のう菌の一種ツチクラゲ (*Rhizina undurata* Fr. ex Fr.) の加害によるマツ類の群状枯損が知られている⁶⁷⁾。つちくらげ病は山火事や焚火跡から発生する特徴があり感染木の根部を腐朽し枯死させるといわれる。以上、マツ類を枯死させる原因として *Bursaphelenchus* sp. 以外に数事例が示されているが、これらを激害型マツ枯損の病原と考えるには条件が満たされておらず、*Bursaphelenchus* sp. が激害型マツ枯損を説明できる唯一の病原であるといえる。

3 節 病原線虫の学名について

Bursaphelenchus 属は FUCHS によって創設された属で分類学的には Tylenchida 目 Aphelenchoididae 科に所属する。1960 年までに、約 20 種が記載報告されている¹⁵⁾。著者らは、これら既知種と本種の形態的ならびに生態的性質を比較した結果、該当種がなくこれを新種とみなし、*Bursaphelenchus lignicolus* MAMIYA and KIYOHARA, 1972 と命名発表し⁴⁹⁾ 和名としてマツノザイセンチュウを提唱した⁴⁸⁾。

その後、アメリカにおいても *B. lignicolus* に類似する線虫がマツ類の枯損と関連して発見されるにおよび⁹⁾ 本邦産線虫との異同およびアメリカにおける過去の記載種との種間関係が問題となってきた。この節では本線虫の学名についてその変遷の過程を説明する。

STEINER & BUHRER⁶⁸⁾ は、1929 年アメリカの Texas 州 Orange 郡で得た青変菌の寄生しているダイオウマツ (*P. palustris* MILL.) 材片から一種の線虫を検出した。その後もダイオウマツやエキナータマツ (*P. echinata* MILL.) から分離された青変菌などの菌叢上に同種の線虫が繁殖しているのを確認している。1934 年に彼等はこの線虫を *Aphelenchoides xylophilus* STEINER and BUHRER, 1934 と命名し発表した。線虫が材と密接に関連していることから彼等はこの線虫を timber nema と呼んだ。1970 年 NICKLE⁶⁵⁾ は、Aphelenchoidea 上科の属について検討を

行った結果、この *A. xylophilus* を *Bursaphelenchus* 属に移して、*Bursaphelenchus xylophilus* (STEINER & BUHRER, 1934) NICKLE, 1970 と改名した。

アメリカにおける *Bursaphelenchus* 属線虫の検出にともなって日本産線虫との照合がなされ両者の形態的一致が確認された⁵²⁾。NICKLE ら⁵⁶⁾ はさらに日本産とアメリカ産線虫の間で交配試験を行って、自由に交配繁殖することを知り、これとともに、*B. xylophilus* の原標本および液浸標本の形態が調べられ、原記載に記されていない雌の陰門蓋および雄の尾翼もこれら標本において確認された。さらに原標本の形態と *B. lignicolus* の記載の一致することが明らかにされた。以上の研究を背景に NICKLE ら⁵⁶⁾ は *B. xylophilus* を再記載し *B. xylophilus* と *B. lignicolus* は同一種であるとみなした。これにより、日・米両国においてマツ類の急性萎凋病を原因している病原線虫の学名には、先名権により *B. xylophilus* が採用されることになり *B. lignicolus* はその異名とされた。本研究においても、マツノザイセンチュウの学名として以後 *B. xylophilus* を用いる。

4 節 II 章の考察

本章では激害型マツ枯損に随伴している線虫 *Bursaphelenchus* sp. を検出するに至った経緯を述べ、KOCH の原則に基づく諸試験から本線虫の病原性を論述した。試験結果から、本線虫 *B. xylophilus* は激害型マツ枯損の病原体と結論できる。*Bursaphelenchus* 属の線虫は entomophilic nematode (昆虫好性線虫) の中の 1 グループを構成する種群で、甲虫類と phoretic (便乗的または運搬的) な関係をもつ線虫に位置づけられている⁶³⁾⁶⁵⁾。ほとんどの既知種が甲虫類の虫体や彼等が寄生している枯死木の孔道や frass から検出記載されており、植物寄生種としては *Bursaphelenchus* 属の中で本種が最初の報告である。本属の線虫として 1981 年までに約 40 種の報告⁷⁷⁾ があるが、植物寄生性という観点からこれらの線虫に検討を加える必要があるとともに、今後新たに検出される種についても植物に対する病原性を検証することが大切と考える。

樹木に寄生し短期間のうちに宿主を萎凋枯死させる線虫としては本種のほかに、西インド諸島でココヤシ (*Cocos nucifera* L.) をはじめとするヤシ類の red ring disease の病原線虫である *Rhadinaphelenchus cocophilus* (COBB, 1919) GOODEY, 1960 が報告されている¹⁴⁾。

本線虫に感染したココヤシの樹幹内部には、赤色の変色が ring 状に発現するのが内部病徴の大きな特徴で病名もこの病徴に由来する。罹病木は、はじめ下葉が黄化する外部病徴を示すが、これは全葉におよび 3~4 か月後には赤褐色を呈して萎凋枯死する¹²⁾。線虫の伝播にはゾウムシの一種 *Rhynchophorus palmarum* L. が主要な役目を果している¹⁶⁾。病気の発生は周年にわたるが、降雨の少ない 12~3 月に多発する傾向を示す¹⁶⁾。

III 章 *Bursaphelenchus xylophilus* の病原力

II 章においては、激害型マツ枯損を起因している病原線虫を見いだした経緯とその病原性を立証する実験結果を中心に述べた。この章では本線虫の病原性の分化について論議するが、特に、病原

力の種内変異について、さまざまな視点から検討を加えた。

病原体が植物に病気を起こす性質は病原性 (pathogenicity) と呼ばれるが、病原性は侵害力 (agressiveness) と病原力 (virulence) に分けられる¹³⁾。前者は病原が植物体に侵入し定着するまでに発揮する能力をさし、後者は宿主を発病させる能力とされる。大内⁶²⁾によると「病原性とはある条件下で特定植物に疾病を原因する能力であって、種その他の分類上の単位の属性であり、病原力とは個々の系統・分離株などの病原性の程度を表すのが一般的である」としている。本研究でも病原性および病原力という術語を上記の概念で用いるが、本報の場合、線虫を接種したマツの枯死本数または枯死率で病原力を表示した。

1 節 *Bursaphelenchus xylophilus* の病原力の種内変異

植物病原体の中には病原性に種内分化が起こり、生態型 (forma speciales) や race を形成しているものが少なくない。植物寄生線虫においても寄生性の分化は、クキセンチュウ (*Ditylenchus dispaci* (KÜHN) FILIPJEV) をはじめネコブセンチュウ類 (*Meloidogyne* spp.), シストセンチュウ類 (*Heterodera* spp.) などで知られていて数多くの race の報告がある⁶⁹⁾。

本節では *B. xylophilus* の病原性の分化に関する研究の一環として、病原力の変異に主眼をおいて調査・試験を行いその結果をとりまとめた。

1 項 病原力の地理的変異

材料と方法

1972 年、熊本県、千葉県など数林分から分離した線虫を同条件でクロマツ苗木に接種した結果、線虫の病原力が採取地によって異なることが示唆された³³⁾。そこで、1975～1982 年に全国各地の被害林 (Fig. 4, Table 8) からマツ枯死丸太またはマツノマダラカミキリを各林分につき 5 個体採取した。これらの丸太またはマツノマダラカミキリから線虫を分離し、その中の 20～50 頭を抽出し II 章 2 節 2 項の方法に準じて培養個体群を作成した。本報ではこれら培養個体群のことを isolate と呼称する。線虫の病原力に地理的な変異があるか否かを確かめるため、上記各林分から 1 isolate を供試してクロマツ苗木に同条件で接種し病原力を比較した。接種頭数は苗木当たり約 5000 頭とし苗木主幹の中～上位部に II 章 2 節 5 項の方法で接種した。以下、試験方法は同様である。

1977 年 7 月 23 日に九州林木育種場苗畑 (2 年生クロマツ)、1982 年 7 月 14 日に林試九州支場苗畑 (3 年生クロマツ) において 1 区 10 本植 3 回反復乱塊法で試験した。3 か月後に調査し枯死率を求め、これを逆正弦変換し t 検定を行った。以下、試験および検定法は同様である。

結果と考察

試験結果を Fig. 5 に示した。1977 年と 1982 年に共通して用いたいくつかの isolate の病原力にはほとんど相違が認められなかったので、両年の結果を一括して図に示した。その場合は両年の平均値で示した。

線虫の病原力はマツ枯死率でみると、0～100% と幅広い変異を示した。これを地域的にみると東北地方から中部日本にかけて病原力の強い isolate の出現頻度がやや高い傾向を示している。

しかし、極端に病原力の弱い場合もあり、変異について一定の傾向は認められなかった。供試 isolate の宿主頻度はアカマツおよびクロマツについて同程度であったが、宿主の種類と線虫の病原力の間に一定の関係は認められなかった。分離源に供したマツの樹齢と線虫の病原力の間にも一

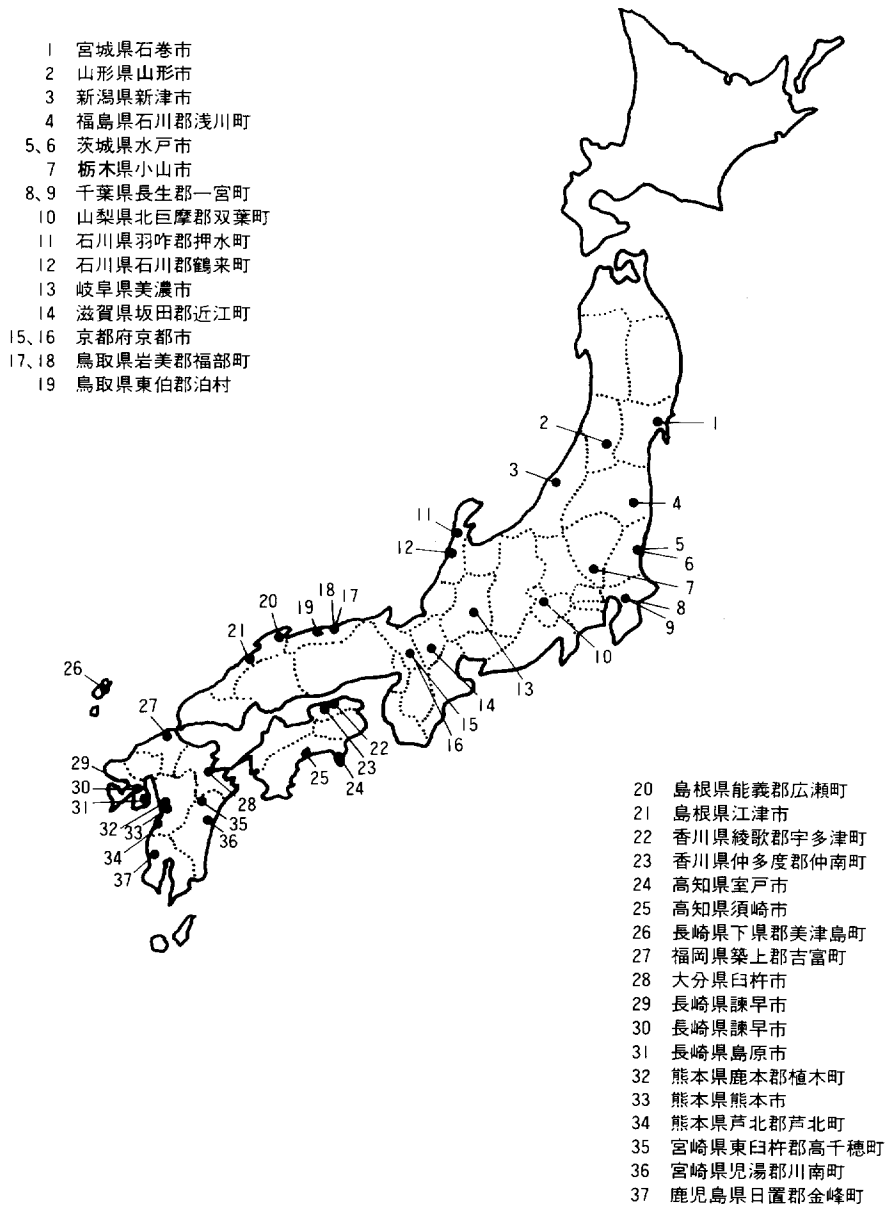


Fig. 4. 病原力を調べた線虫の採取位置

Distribution map of collection sites for isolates of *B. xylophilus* assayed for virulence.

Table 8. 供 試 線
List of *B. xylophilus* isolates

番 号 Isolate No.	採 取 地 Collection site	採 取 源 Source	採 取 年 Collected in
1	宮城県石巻市 Miyagi Pref. Ishinomaki C.	枯 死 木 Dead tree	1982
2	山形県山形市 Yamagata Pref. Yamagata C.	枯 死 木 Dead tree	1982
3	新潟県新津市 Niigata Pref. Niitu C.	枯 死 木 Dead tree	1982
4	福島県石川郡浅川町 Fukushima Pref. Asakawa T.	枯 死 木 Dead tree	1982
5	茨城県水戸市 Ibaraki Pref. Mito C.	カミキリ ⁽¹⁾ Vector ⁽¹⁾	1975
6	茨城県水戸市 Ibaraki Pref. Mito C.	カミキリ Vector	1975
7	栃木県小山市 Tochigi Pref. Oyama C.	枯 死 木 Dead tree	1982
8	千葉県長生郡一宮町 Chiba Pref. Ichinomiya T.	カミキリ Vector	1975
9	千葉県長生郡一宮町 Chiba Pref. Ichinomiya T.	カミキリ Vector	1975
10	山梨県北巨摩郡双葉町 Yamanashi Pref. Futaba T.	枯 死 木 Dead tree	1982
11	石川県羽咋郡押水町 Ishikawa Pref. Oshimizu T.	枯 死 木 Dead tree	1982
12	石川県石川郡鶴来町 Ishikawa Pref. Tsuruki T.	枯 死 木 Dead tree	1975
13	岐阜県美濃市 Gifu Pref. Mino C.	枯 死 木 Dead tree	1982
14	滋賀県坂他郡近江町 Shiga Pref. Oomi T.	枯 死 木 Dead tree	1982
15	京都府京都市 Kyoto Pref. Kyoto C.	カミキリ Vector	1975
16	京都府京都市 Kyoto Pref. Kyoto C.	カミキリ Vector	1975
17	鳥取県岩美郡福部町 Tottori Pref. Fukube T.	枯 死 木 Dead tree	1975
18	鳥取県岩美郡福部町 Tottori Pref. Fukube T.	枯 死 木 Dead tree	1975
19	鳥取県東伯郡泊村 Tottori Pref. Tomari V.	枯 死 木 Dead tree	1982
20	島根県能義郡広瀬町 Shimane Pref. Hirose T.	枯 死 木 Dead tree	1982
21	島根県江津市 Shimane Pref. Ezu C.	カミキリ Vector	1975
22	香川県綾歌郡宇多津町 Kagawa Pref. Utazu T.	枯 死 木 Dead tree	1982
23	香川県仲多度郡仲南町 Kagawa Pref. Nakaminami T.	カミキリ Vector	1975
24	高知県室戸市 Kouchi Pref. Muroto C.	枯 死 木 Dead tree	1982

虫 の 来 歴
investigated for virulence.

樹 種 Original host	林 齢 Stand age	林 型 Stand type	被 害 型 Grade of Damage
<i>P. densiflora</i>	30	人 工 林 Plantation	中 Moderate
Do.	30	天 然 林 Natural	激 Severe
Do.	33	人 工 林 Plantation	中 Moderate
Do.	30	天 然 林 Natural	微 Slight
Do.	— ⁽²⁾	天 然 林 Natural	—
Do.	—	天 然 林 Natural	—
Do.	35 ~ 40	天 然 林 Natural	激 Severe
Do.	—	—	—
Do.	—	—	—
Do.	20	天 然 林 Natural	中 Moderate
<i>P. thunbergii</i>	17 ~ 22	天 然 林 Natural	激 Severe
—	—	—	—
<i>P. densiflora</i>	60 ~ 70	天 然 林 Natural	激 Severe
Do.	70 ~ 80	天 然 林 Natural	激 Severe
—	15 ~ 20	天 然 林 Natural	激 Severe
—	15 ~ 20	天 然 林 Natural	激 Severe
<i>P. thunbergii</i>	20	天 然 林 Natural	—
Do.	20	—	—
Do.	20	人 工 林 Plantation	激 Severe
<i>P. densiflora</i>	—	天 然 林 Natural	—
—	—	—	—
<i>P. thunbergii</i>	35	天 然 林 Natural	激 Severe
—	—	—	—
<i>P. thunbergii</i>	17	人 工 林 Plantation	—

Table 8. つづき

番 号 Isolate No	採 取 地 Collection site	採 取 源 Source	採 取 年 Collected in
25	高知県須崎市 Kouchi Pref. Suzaki C.	—	1975
26	長崎県下県郡美津島町 Nagasaki Pref. Mitsushima T.	枯 死 木 Dead tree	1981
27	福岡県築上郡吉富町 Fukuoka Pref. Yoshitomi T.	カミキリ Vector	1981
28	大分県臼杵市 Ooita Pref. Usuki C.	枯 死 木 Dead tree	1975
29	長崎県諫早市 Nagasaki Pref. Isahaya C.	カミキリ Vector	1978
30	長崎県諫早市 Nagasaki Pref. Isahaya C.	カミキリ Vector	1978
31	長崎県島原市 Nagasaki Pref. Shimabara C.	枯 死 木 Dead tree	1975
32	熊本県鹿本郡植木町 Kumamoto Pref. Ueki T.	枯 死 木 Dead tree	1975
33	熊本県熊本市 Kumamoto Pref. Kumamoto C.	カミキリ Vector	1975
34	熊本県芦北郡芦北町 Kumamoto Pref. Ashikita T.	カミキリ Vector	1975
35	宮崎県東臼杵郡高千穂町 Miyazaki Pref. Takachiho T.	カミキリ Vector	1976
36	宮崎県児湯郡川南町 Miyazaki Pref. Kawaminami T.	カミキリ Vector	1976
37	鹿児島県日置郡金峰町 Kagoshima Pref. Kinpou T.	枯 死 木 Dead tree	1981

Note) (1): マツノマダラカミキリ *Monochamus alternatus* (2): 不明 Unknown

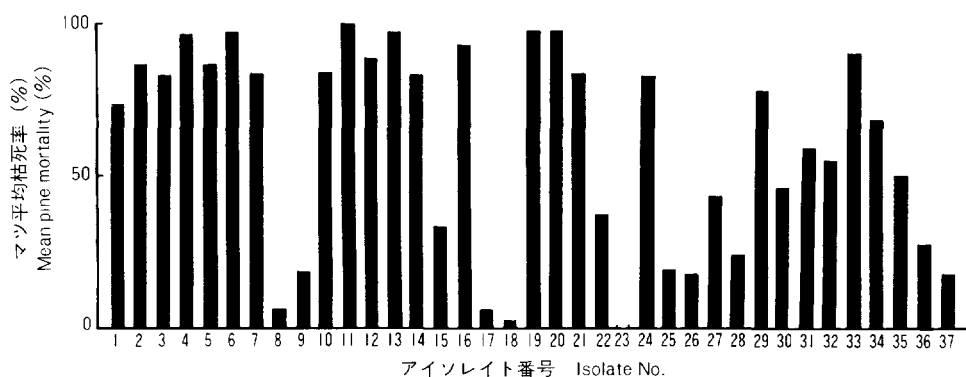


Fig. 5. 日本各地の被害林から分離した *B. xylophilus* の病原力の比較
Comparison of virulence among *B. xylophilus* isolates obtained from various infested pine stands in Japan.

3回反復乱塊法による試験 Test of randomized block design with 3 replicates.

Table 8. つづき

樹 種 Original host	林 齢 Stand age	林 型 Stand type	被 害 型 Grade of Damage
—	—	—	—
<i>P. thunbergii</i>	12	人 工 林 Plantation	激 Severe
—	—	—	—
<i>P. thunbergii</i>	20	—	激 Severe
—	—	—	—
—	—	—	—
<i>P. densiflora</i>	—	天 然 林 Natural	—
Do.	20 ~ 30	天 然 林 Natural	微 Slight
Do.	—	天 然 林 Natural	中 Moderate
<i>P. thunbergii</i>	—	人 工 林 Plantation	激 Severe
—	—	—	—
—	—	天 然 林 Natural	—
<i>P. thunbergii</i>	18	人 工 林 Plantation	激 Severe

定の関係はなかった。また、病原力は線虫の分離源がマツであるかマツノマダラカミキリであるかに関係しなかった。

2 項 林分間および林分内における病原力の変異

材料と方法

1 項の試験において線虫の病原力は分離した林分によって著しく異なることが示唆された。この試験は、1 林分内における病原力の変異の実態を明らかにするため、4 林分からそれぞれ 5 isolate を供試して病原力を調べた (Table 9)。接種試験は林試九州支場苗畑に植栽されたクロマツ 2 年生苗木を用いて 1983 年 7 月 28 日に常法で行った。

結果と考察

試験結果を Fig. 6 に示した。まず、病原力の林分内変異についてみると、林分 A での線虫の病原力は分離した枯死木によって著しく異なった。林分 D については、線虫の分離源はマツノマダラカミキリであったが、A 林分と同様の病原力の変動が認められた。B および C 林分での変動は A、D に比べ小さかったが isolate 間に有意な差が認められた ($p=0.05$)。

病原力の差を林分間について検討すると林分間にも有意な差が認められた ($p=0.05$)。この試

Table 9. 供 試 線 虫 の 来 歴
List of pine stands and nematodes investigated for virulence.

林 分 Stand	採 取 地 Collection site	採 取 源 Source	採 取 年 Collected in
A	長崎県美津島町 Nagasaki Pref. Mitsushima T.	枯 死 木 Dead tree	1981
B	熊本県熊本市 Kumamoto Pref. Kumamoto C.	カミキリ ⁽¹⁾ Vector ⁽¹⁾	1981
C	鹿児島県金峰町 Kagoshima Pref. Kinpoo T.	枯 死 木 Dead tree	1981
D	沖縄県恩納村 Okinawa Pref. Onna V.	カミキリ Vector	1981

Note) (1) : マツノマダラカミキリ *Monochamus alternatus*

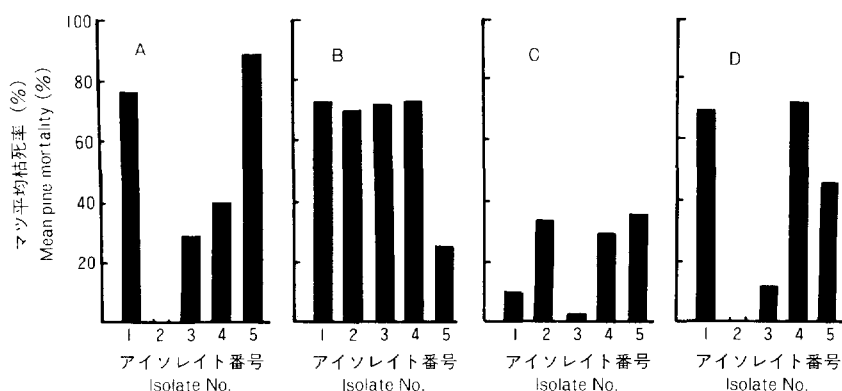


Fig. 6. 同一林分内の枯死木またはカミキリ別に分離した線虫の病原力の比較
Comparison of virulence among 5 isolates of *B. xylophilus* obtained from different trees or vector insects in the same pine stand.
A—D: 林分番号 Stand number A & D: 枯死木からのアイソレート Isolate from dead tree, B & D: カミキリからのアイソレート Isolate from vector insect.
3 回反復乱塊法による試験 Test of randomized block design with 3 replicates.

験から、線虫の病原力は 1 林分内においても著しく異なる場合のあることが示された。林分内の変異は isolate の起源が枯死木かマツノマダラカミキリかに関係しなかった。

3 項 同一枯死木内における線虫の病原力の変異

材料と方法

病原力の変異が 1 枯死木内において認められるか否かを調べるため、枯死木 2 本を供試し試験を行った。供試木は熊本県河内町で採取した 15 年生クロマツ 2 本（平均樹高：6.2 m，平均胸高直径 6.6 cm）である。供試木樹幹の地際から梢頭部にかけて等間隔に 5 か所から試料をとり、線虫を分離して常法で isolate を作成し供試した。林試九州支場苗畑の 3 年生クロマツを用い、1985 年 7 月 12 日に接種し、同年 10 月 12 日に試験結果を調べた。

結果と考察

試験結果を Fig. 7 に示した。供試木-1 から分離した 5 isolate の接種によるマツ枯死率は 78～97% と変動が小さく、主幹部位による線虫の病原力に有意な差はなかった ($p=0.01$)。供試木-2 では枯死率の変動がやや大きくて 28～50% を示した。しかし、統計的有意差はなかった ($p=0.05$)。両木の線虫の病原力を 5 isolate の平均値と比較したところ病原力の差は顕著であった ($p=0.01$)。

以上の結果から、同一枯死木内に生息する線虫の病原力には著しい相違はなく、変異は枯死木を単位に生じていることが推察された。将来さらに、供試木を増して現象の普遍性を検討する必要がある。

4 項 単一雌系統間の病原力の変異

材料と方法

この試験では、線虫の病原力の個体変異を推定する目的で、1 頭のマツノマダラカミキリに集合している線虫集団を対象にして、これから単一雌系統を作成しその病原力を調べた。林試九州支場実験林で採取した 3 頭のマツノマダラカミキリを供試し各個体から 9 単一雌系統を作成した。虫体から分離したすべての耐久型幼虫を殺菌水で数回洗浄し、常法で表面殺菌した後 *B. cinerea* 菌上に放虫し、25℃ 下に 24～48 時間安置した。この間に成虫へ脱皮・交尾し抱卵している雌 1 頭を無作為に分離し、これから増殖した個体群を単一雌系統とした。接種試験は、1982 年 7 月 30 日に林試九州支場苗畑に植栽された 2 年生クロマツに対し常法で行った。

結果と考察

試験結果を Fig. 8 に示した。いずれのマツノマダラカミキリから分離された場合も、単一雌系統間に病原力の有意な差はなかった ($p=0.05$)。このことから 1 頭のマツノマダラカミキリに集

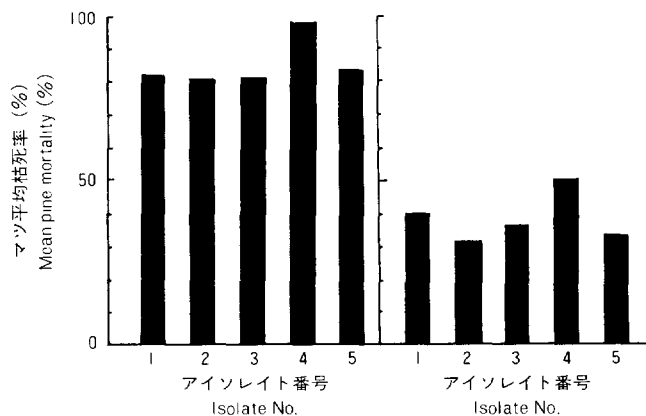


Fig. 7. 1 枯死木の主幹各部から分離した線虫の病原力の比較

Comparison of virulence among isolates of *B. xylophilus* obtained from 5 parts in a single tree bole.

採取位置 Sampling position: 地際 (1)→梢頭 (5) Base (1)→Top (5)

3 回反復乱塊法による試験 Test of randomized block design with 3 replicates.

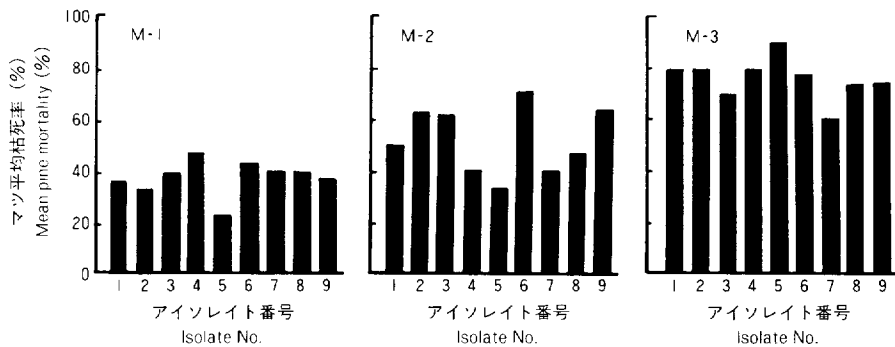


Fig. 8. マツノマダラカミキリ単位に作成した単一雌系統の病原力の比較
Comparison of virulence among iso-female lines of *B. xylophilus* obtained from a single vector insect.

M1～M3: カミキリ個体番号 Vector insect number

3回反復乱塊法による試験 Test of randomized block design with 3 replicates.

Table 10. 供試線虫の来歴
List of *B. xylophilus* isolates investigated.

Isolate	採取地 Collection site	採取源 Source	採取年 Collected in
S-10	島根県広瀬町 Shimane Pref. Hirose T.	枯死木 Dead tree	1982
S6-1	茨城県水戸市 Ibaraki Pref. Mito C.	カミキリ ⁽¹⁾ Vector ⁽¹⁾	1975
Ok-2	沖縄県恩納村 Okinawa Pref. Onna V.	カミキリ Vector	1981
C14-5	千葉県一宮町 Chiba Pref. Ichinomiya T.	カミキリ Vector	1975

Note) (1): マツノマダラカミキリ *Monochamus alternatus*

合している線虫集団はほぼ同等の病原力をもった個体で構成されていることが推測された。病原力をマツノマダラカミキリ単位でみると、病原力に差違が認められた ($p=0.05$)。

5 項 母樹別系統苗に対する線虫の病原力

材料と方法

既述の接種では、混合種子より育苗したクロマツを供試しており、遺伝的には多様な苗木群であった。そこでクロマツおよびアカマツ母樹別系統苗に対して、すでに病原力の明らかな線虫 isolate を接種し、マツ家系・線虫の相互反応を調べた。

クロマツ: 九州産クロマツ精英樹の母樹別系統苗 (3 年生) を用いた。各系統ともそれぞれの isolate につき 16 本を供した。

アカマツ: 東北産アカマツ精英樹の母樹別系統苗 (1 年生) を供試し、各 isolate につき 28 本

用いた。クロマツ、アカマツともに林試九州支場苗畑に植栽されたものである。

接種に供した線虫の来歴を Table 10 に示した。1984 年 7 月 15 日に常法で接種し、同年 11 月 20 日に結果を調べ、 χ^2 検定で解析を行った。

結果と考察

クロマツおよびアカマツについての試験結果をおおの、Table 11 と Table 12 に示した。まず、クロマツについてみると、病原力の強い線虫を接種した場合、ほとんどの母樹別系統において 80% 以上の枯死率を示した。しかし、川内 2、川辺 39 で低い枯死率を示した。弱病原線虫 Ok-2、C 14-5 接種区の結果をみると、一般に低い枯死率であった。C 14-5 区で枯死率のバラツキが少ないのに比べ Ok-2 ではバラツキが大きかった。

アカマツへの接種結果をみると、強病原線虫の樹種区では 43~83% の枯死率を示し、全般的にクロマツより低い枯死率であった。この中でも水沢 106、二戸 103 など一段と枯死率が低かった。弱病原線虫の接種区では全般的に低い枯死率を示した。Ok-2 では若干の枯死木が発生したが、C 14-5 接種ではほとんどのマツ家系で枯死率 0% であった。今回の接種試験から、強・弱病原線虫に対する反応において、マツ家系間に著しい相違はないものと考えられた。この試験では弱い isolate である Ok-2 がクロマツ数家系の苗木に対して強い病原力を示したが、この点に関しては再検討の必要がある。

既述の病原力の検定には主としてクロマツ苗木を用いており、アカマツに対する線虫病原力の

Table 11. クロマツ母樹別系統苗に対する強・弱病原力線虫の接種
Pathogenicity of virulent and avirulent isolates to open-pollinated seedlings from elite trees of *P. thunbergii*

母 樹 名 Mother tree	枯 死 本 数 と 枯 死 率 (%) No. dead trees (% mortality)			
	強 病 原 力 Virulent		弱 病 原 力 Avirulent	
	S 6-1	S-10	Ok-2	C 14-5
川 内 C Sendai	15 (94)	16 (100)	16 (100)	3 (9)
川 内 2 Sendai	7 (44)	10 (63)	2 (13)	1 (6)
肝 付 13 Kimotsuki	13 (81)	16 (100)	0 (0)	2 (13)
川 辺 10 Kawanabe	15 (94)	15 (94)	10 (63)	7 (44)
川 辺 33 Kawanabe	15 (94)	15 (94)	4 (25)	5 (31)
川 辺 39 Kawanabe	15 (94)	10 (63)	13 (81)	4 (25)
川 辺 55 Kawanabe	16 (100)	16 (100)	5 (31)	2 (13)

Note) 供試本数 : 各区 16本 Number of inoculated plants : 16 plants / plot.

Table 12. アカマツ母樹別系統苗に対する強・弱病原力線虫の接種
Pathogenocity of virulent and avirulent isolates to open-pollinated seedlings from
elite trees of *P. densiflora*.

母 樹 名 Mother tree	枯 死 本 数 と 枯 死 率 (%) No dead trees (% mortality)			
	強 病 原 力 Virulent		弱 病 原 力 Avirulent	
	S 6 - 1	S - 10	Ok - 2	C14 - 2
岩 手 103 Iwate	22 (79)	17 (61)	1 (4)	0 (0)
岩 手 104 Iwate	22 (79)	19 (68)	4 (14)	2 (7)
水 沢 101 Mizusawa	19 (68)	17 (61)	4 (14)	1 (4)
水 沢 105 Mizusawa	16 (57)	21 (75)	4 (14)	0 (0)
水 沢 106 Mizusawa	13 (46)	12 (43)	1 (4)	0 (0)
中新田 107 Nakaniida	23 (83)	21 (75)	0 (0)	0 (0)
二 戸 103 Ninohe	13 (46)	14 (50)	1 (4)	0 (0)
乙 供 104 Ottomo	20 (71)	18 (64)	5 (18)	0 (0)

Note) 供試本数 : 各区 28 本 Number of inoculated plants : 28 plants /plot.

知見が少ない。本試験によって、強・弱病原線虫と宿主の相互反応は、クロマツとアカマツにおいて基本的には異なるものと推察された。

2 節 病原力に関連する線虫諸性質の検討

本線虫の病原力には微弱なものから強力なものまで著しい変異のあることが前節の試験から明らかにされた。病原力において強弱を示す線虫間に生理・生化学的あるいは生態的相違があるか否かを明かにする目的で、*B. cinerea* 菌上およびクロマツ樹体内における強・弱病原線虫の比較増殖試験と数種類の酵素のアイソザイム分析を行った。さらに、病原力の遺伝性についても検討を加えた。

1 項 *Botrytis cinerea* 菌上における強・弱病原線虫の増殖比較

材料と方法

供試した線虫 isolate のうち K 48-15 と I-3 を除く 4 isolate は前節 5 項の試験に用いた isolate と同じものである。K 48-15 は 1975 年香川県仲南町で、I-3 は同年石川県鶴来町で採取した試料から分離したものである。

いずれも初期頭数を約 100 頭とし、25℃ 下でⅡ章 5 節 1 項に示した方法で試験した。本種の *B. cinerea* 菌上における増殖曲線⁹⁾ から判断して接種 6 日後の個体数を比較した。

結果と考察

接種 6 日後のペトリ皿当たりの個体数（3 回反復の平均値）を Table 13 に示した。病原力の強い線虫の場合、約 100 頭の線虫が、いずれも 1 万頭前後の個体数に達した。一方、病原力の弱い線虫の個体数は 3 isolate の平均値でみると約 2700 頭で強 isolate の 1/4 に過ぎない。最も増殖力の劣る C 14-5 では、1/10 以下の個体数にとどまった。

本試験から、マツに対する線虫の病原力の強弱と菌叢上における増殖力の強弱との関連性を示唆する結果が得られた。しかし、さらに多くの isolate を供試して調べてみると、病原力と増殖力の間に必ずしも高い相関は認められなかった²⁰⁾。宿主植物上における増殖力と病原力の関係については多くの植物寄生線虫について論議されているが、菌叢上の増殖力と植物に対する病原力の関係を論じた研究はほとんど見当たらず今後の課題であろう。

2 項 マツ樹体内における強・弱病原線虫の増殖比較

材料と方法

1 項の試験に供試した isolateの中から S 6-1 および Ok-2 を用いて強・弱病原線虫の樹体内における比較増殖試験を行った。林試九州支場苗畑に植栽された 4 年生クロマツの中から生育良好なもの 120 本を選んで S 6-1 および Ok-2 におおの 60 本を供試した。供試木最上位の枝 2 本に対し、各枝約 1 万頭の培養線虫を常法で 1983 年 7 月 10 日に接種した。接種後 5 日間隔で無作為に 5 本の枝を基部から切りとり、針葉を除いて線虫を分離した。

結果と考察

4 年生クロマツの接種枝内における強・弱病原線虫の個体数推移を試料 1 g 当たりの平均線虫数として Fig. 9 に示した。約 1 万頭接種した S 6-1 および Ok-2 の 5 日後に枝全体から分離された線虫数はそれぞれ平均 1100 頭 (852/g) および 205 頭 (134/g) であった。S 6-1 の個体群密度は以後急速に増加し 25 日後には試料 1 g 当たり 5000 頭以上に達した。一方、Ok-2 の密度は上昇せ

Table 13. 強・弱病原力線虫の増殖力の比較
Comparison of reproductive potential between virulent and avirulent isolates.

病 原 力 Virulence	Isolate	線 虫 頭 数 (6 日 後) No. nemas /plate (6 days)
強 Virulent	S 6 - 1	11,900
	S - 10	10,900
	I - 3	8,500
	平均 Mean	10,400
弱 Avirulent	C 14 - 5	850
	K 48 - 15	4,800
	Ok - 2	2,600
	平均 Mean	2,700

Note) 接種頭数：各区約 100 頭 (25 °C , *B. cinerea* 菌上で試験)
Inoculum : ca. 100 nemas each (tested on *Botrytis cinerea* cultures on PSA at 25 °C).

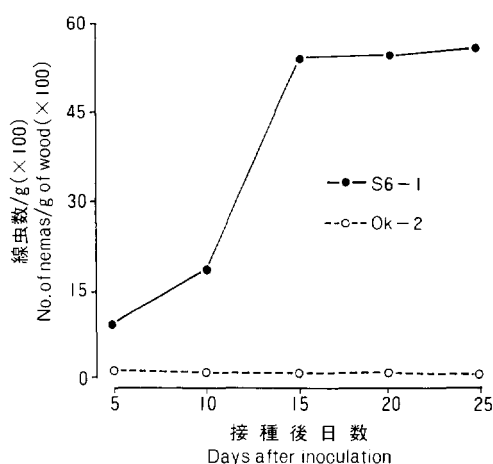


Table 14. 電気泳動を行った酵素種
Enzymes investigated for electrophoresis.

略 称 Abbreviation	酵 素 名 Name of enzyme
A c p	酸性フォスファターゼ Acid phosphatase
A D H	アルコール脱水素酵素 Alcohol dehydrogenase
E s t	エステラーゼ Esterase
G O T	アスパラギン酸アミノ基転移酵素 Aspartic transaminase
L a p	ロイシンアミノペプチダーゼ Leucyl aminopeptidase
M D H	リンゴ酸脱水素酵素 Malate dehydrogenase

Fig. 9. クロマツ樹体内における強・弱病原線虫の増殖比較 (5回の平均)

Comparative population trend between virulent and avirulent isolate of *B. xylophilus* (a mean of 5 replicates).

S6-1: 強病原力 Virulent,
Ok-2: 弱病原力 Avirulent

ず横ばいしないし減衰状態を示した。

個体数の増加が認められない Ok-2 の個体群密度も 1 g 当たり 100 頭前後とかなり高い。これは接種部位の線虫数も含むため、これを除くと線虫密度は 5 頭/g で推移した。S6-1 の場合、接種部を除いても 1 g 当たり 1000 頭以上を示した。

主軸における個体数推移は追跡しなかったが、接種枝 1 本を切らずに据置いた 30 本のマツの枯死数についてみると、S6-1 区では 28 本 (93%) であったのに対し、Ok-2 では 2 本 (7%) の枯死であった。このことから、主軸においても接種枝の場合と同様の個体数推移があったものと考えられる。

以上の結果から、線虫のマツに対する病原力は、宿主内における線虫の増殖の成否と密接に関わっていることが推察された。

3項 *Bursaphelenchus xylophilus* の病原力とアイソザイムの関係

材料と方法

本種の病原力が線虫酵素のザイモグラムによって判別可能かどうか、また近似種との種の識別が可能かどうかを調べるため 6 酵素種のアイソザイムについて検討を加えた (Table 14)。供試した線虫種は、形態的に類似している *B. xylophilus*, *B. mucronatus* およびマツ枯死木から分離した *Bursaphelenchus* sp. の 3 種である。3 種の線虫に用いた isolate の来歴を Table 15 に示した。各線虫を *B. cinerea* を用いて常法で培養した後 BAERMANN 法で分離し、蒸留水で 6~7 回

洗浄した。遠沈して濃厚懸濁液をつくり、この液から、0.5 ml (約 88 万頭) をマイクロチューブに分取し、ただちに真空凍結乾燥した。これに 100 μ l のしょ糖液を加え、ガラスビーズによる方法⁶⁴⁾で磨砕した。磨砕後 30000 $\times$ g, 0°C 下で 40 分間遠心分離し、その上清 10 μ l を電気泳動用試

Table 15. アイソザイム分析に供試した線虫 isolate
Nematode isolates of 3 *Bursaphelenchus* species used for electrophoresis of enzyme.

種 Species	Isolate No	採 取 地 Collection site	採 取 年 Collected in
<i>B. xylophilus</i>	A	茨城県水戸市 Ibaraki Pref. Mito C.	1975
	B	島根県広瀬町 Shimane Pref. Hirose T.	1982
	C	石川県鶴来町 Isikawa Pref. Tsuruki T.	1975
	D	熊本県植木町 Kumamoto Pref. Ueki T.	1975
	L	熊本県河内町 Kumamoto Pref. Kawachi T.	1985
	M	石川県鶴来町 Ishikawa Pref. Tsuruki T.	1975
	N	茨城県水戸市 Ibaraki Pref. mito C.	1975
	O	島根県広瀬町 Shimane Pref. Hirose T.	1982
	P	熊本県芦北町 Kumamoto Pref. Ashikita T.	1975
	Q	千葉県沼南町 Chiba Pref. Shounan T.	1975
	R	香川県宇多津町 Kagawa Pref. Utazu T.	1975
	S	鹿児島県川内市 Kagoshima Pref. Sendai C.	1969
	T	沖縄県恩名村 Okinawa Pref. Onna V.	1975
<i>B. mucronatus</i>	E	長崎県島原市 Nagasaki Pref. Shimabara C.	1973
	F	大分県久住町 Ooita Pref. Kujuu T.	1971
	G	鹿児島県喜入町 Kagoshima Pref. Kiire T.	1973
	H	千葉県一宮町 Chiba Pref. Ichinomiya T.	1975
<i>Bursaphelenchus</i> sp.	I	鹿児島県霧島町 Kagoshima Pref. Kirishima T.	1973
	J	大分県久住町 Ooita Pref. Kujuu T.	1975
	K	鹿児島県名瀬市 Kagoshima Pref. Naze C.	1973

Note) A-K: (Fig. 10), L: (Fig. 11)

M-T: (Fig. 12)

料とした。

電気泳動は、平板アクリルアミドゲル垂直電気泳動法により、DAVIS⁷⁾の原法に従い、7% 分離ゲル、3% 濃縮ゲルを使用し 4℃ 下において 12.3 mA/cm² の定温・定電流下でほぼ 40 分間行った。染色は青木・永井²⁾に従った。

結果と考察

まず、3 種の線虫の各酵素のザイモグラムについて検討した (Fig. 10)。アスパラギン酸アミノ

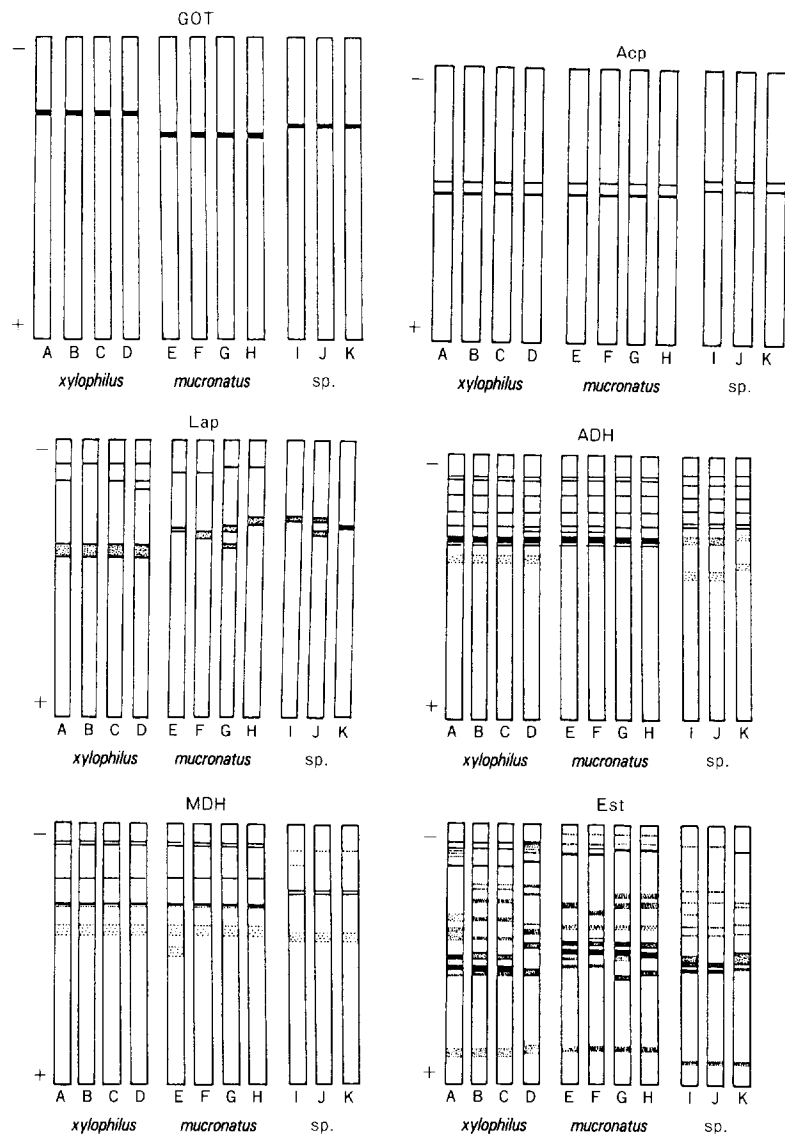


Fig. 10. *Bursaphelenchus* 属線虫類の 6 酵素種のザイモグラム
Electrophoretic zymograms of 6 enzymes with *Bursaphelenchus* species.

基転移酵素についてみると、3種とも単一のバンドであり、種内変異が認められなかった。種ごとにみると、バンドの位置は明瞭に異なっており種の識別には好適な酵素種と考えられた。酸性フォスファターゼもバンド数が少なく種内変異がほとんど認められなかった。この酵素の場合については、*B. xylophilus* と *B. mucronatus* のザイモグラムにほとんど差異がないのに対し *Bursaphelenchus* sp. は微妙な位置の違いをみせた。アルコール脱水素酵素およびリンゴ酸脱水素酵素にもあまり大きな種内変異は認められず、*B. xylophilus* と *B. mucronatus* のザイモグラムの間にも基本的な違いはなかった。ロイシンアミノペプチダーゼには種内でも変異が認められるとともに種間でも著しく異なっていた。調査した酵素の中では、エステラーゼが最も大きなザイモグラムの変異を示し、バンドの数も多く出現した。これは3種の線虫に共通した現象であった。種内変異が著しいエステラーゼに関して *B. xylophilus* のザイモグラムにさらに以下の検討を加えた。

Ⅲ章1節3項において病原力を検定した線虫を供試し、エステラーゼのザイモグラムに検討を加えた (Fig. 11)。同一枯死木の5か所から採取した線虫間にはほとんどザイモグラムに変異が認められず、ほぼ同じパターンを示した。この現象は2供試木に共通していた。一方、供試木間には明らかなザイモグラムパターンの差異が認められた。エステラーゼザイモグラムが同一枯死木内の線虫では共通していること、枯死木間では異なるという事実は、既述した病原力の変異の様相と符合していて興味深い。

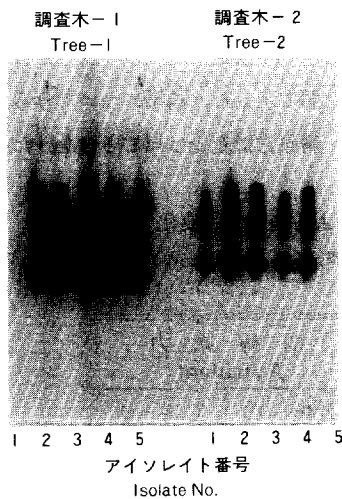


Fig. 11. マツ枯死木の異なる部位から分離した線虫のエステラーゼザイモグラム (図7参照)

Esterase zymograms of *B. xylophilus* isolates obtained from 5 different parts of a single tree bole (see Fig. 7).

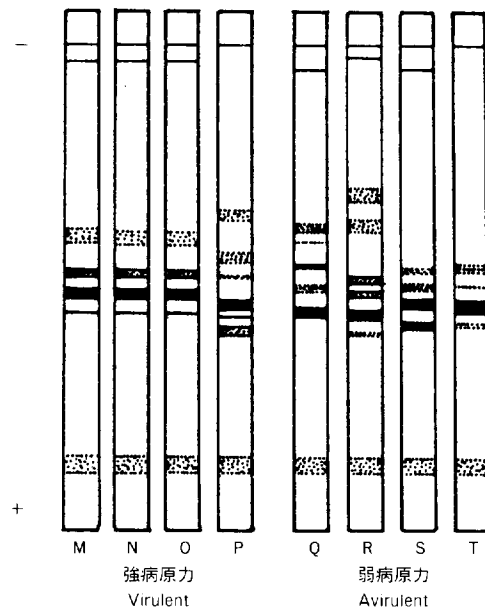


Fig. 12. 強・弱病原線虫のエステラーゼザイモグラム

Esterase zymograms of virulent and avirulent isolates of *B. xylophilus*.

つぎに、線虫の病原力とエステラーゼザイモグラムの間に関連性があるかどうかについて検討を加えたので、その結果を Fig. 12 に示した。病原力の強いグループの中の M, N, O には共通したザイモグラムが現れた。一方、病原力の弱い線虫グループでは isolate 間に著しい違いが認められ共通するところが少なかった。したがってエステラーゼザイモグラムによって線虫の病原力の強弱を直接判定することは困難と考えられた。しかし、強病原線虫のうちで 3 isolate のザイモグラムが共通している点は注目される。M, N, O の採取地はそれぞれ石川県、茨城県、島根県と互いに離れているにもかかわらず同一のパターンを示したことは興味深い。今後はそれぞれの場所から多くの isolate を供試し同一林分内の変異と対比しながら解析を進める必要があろう。

4 項 交配による病原力の変化

材料と方法

著しい種内変異が認められる *B. xylophilus* の病原力が遺伝的形質であるか否かを知るため、強・弱病原線虫間の交配を行い、その子孫の病原力がどう変化するかを調べた。強・弱それぞれ 2 isolate (Table 16) を供試して完全ダイアレルクロスを行った。各 isolate から未交尾の雌 (4 期幼虫のとき隔離) または若い雄 1 頭を任意に抽出し、他の雄または雌と交配した。交配によって増殖した子孫を接種源として病原力を検定した。

林試九州支場苗畑に植栽された 3 年生クロマツを用い 1 区 10 本植 3 回反復乱塊法で 1982 年 7 月 15 日に接種を行った。

結果と考察

試験結果を Table 16 に示した。交配に用いた親集団の病原力 (マツ枯死率) は表の脚注に示した。交配による子孫の病原力と両親の病原力の有意差を検定 (χ^2 検定) し両親の双方と有意差がある時は中で示し、どちらかと有意差がないときは強または弱で示した。結果についてみると、強 $\times$ 強 = 強, 弱 $\times$ 弱 = 弱という結果が正逆交配ともに得られ、病原力に変化は起こらなかった。弱 $\times$

Table 16. 強・弱病原力線虫の交配による病原力の変化
Virulence of progenies from diallel crossing among virulent and avirulent isolates.

♂ \ ♀	強 病 原 力 Virulent		弱 病 原 力 Avirulent	
	S-10	S6-1	K48-15	C14-5
S-10	—	強 ⁽¹⁾	強	弱
S6-1	強	—	強	強
K48-15	強	強	—	弱
C14-5	強	中	弱	—

Note) 親 isolate の病原力 (マツ枯死率 %) Virulence of parent isolates (% mortality of pines): S-10 = 80%, S6-1 = 77%, K48-15 = 0%, C14-5 = 0%, (1): 強 = virulent, 弱 = avirulent, 中 = intermediate.

×強♂という4組み合わせのうち3組み合わせでは強となったが、1組み合わせでは弱であった。強♀×弱♂の場合、3組み合わせで強であったが、他の1組み合わせでは中となり両親の中間的な病原力を示した。

この交配試験によって本線虫の病原力は遺伝的形質であることが示唆された。今後は遺伝様式の解明が必要である。

3節 弱病原線虫の前接種による病原力発現の抑制—誘導抵抗性—

既述の試験から、本線虫の自然集団内における弱病原線虫の存在が示された。弱病原線虫の出現機構や集団におよぼす影響など究明すべき課題が残されているが、本節では弱病原線虫の前接種による発病抑制、いわゆる誘導抵抗性に関する若干の知見をとりまとめた。

1項 抵抗性誘導因子の検討

材料と方法

予備試験³⁶⁾においてクロマツに病原力の弱い線虫を事前に接種しておく、後に強病原線虫を接種してもマツは対照区に比べ枯れにくくなる現象を見いだした。本試験では、抵抗性の誘導に働く要因を検出するため、クロマツに前処理をし、後に強病原線虫を接種し枯死率を比較した。誘導された抵抗性の評価は、処理区と対照区（強病原線虫のみの接種）との枯死本数の有意差の検定を行った（ χ^2 検定）。以下、検定法は同様である。前接種用の線虫に K-48（香川県産）を、後接種には既述の S6-1 を用いた。

抵抗性を誘導する可能性のあるものとして、生きた線虫、虫体成分（磨砕液、熱殺虫体）、線虫

Table 17. 抵抗性の誘導に作用している要因の検討
Some factor (s) responsible for induction of resistance.

前 処 理 Pretreatment	接 種 本 数 No. inoculated	枯 死 本 数 No. dead	枯死率 (%) % death
a) 熱殺 K-48 ¹⁾ Heat-killed K-48	20	18	90
b) 破碎 K-48 ¹⁾ Disrupted K-48	20	19	95
c) K-48 培養ろ液 Culture filtrate	20	18	90
d) 傷のみ Wound alone	20	18	90
e) 生存 K-48 Live K-48	20	2	10 **
f) 無処理 Cont. (chall. alone)	20	19	95
g) 生存 K-48 ²⁾ Live K-48	20	2	10

Note) S6-1 (1×10^4) で30日後に後接種 Challenged 30 days after pretreatment with 1×10^4 nemas of S6-1 isolate. 1): 3×10^4 頭に相当, Equivalent to 3×10^4 nemas. 2): 後接種なし No challenge inoculation.
** : 1%で有意 Significant at 1% level

の代謝産物（培養ろ液）、前接種のための切り傷などを想定し Table 17 に示す前処理を行った。
1981 年 6 月 10 日に前処理をし、約 1 か月後に S6-1（1 万頭）で後接種を行った。

結果と考察

結果を Table 17 に示した。生きた線虫を前接種した区を除いて、対照区との間に有意な差は認められず（ $p=0.05$ ）、抵抗性の誘導には寄与していないことが知られた。K-48 の生きた線虫を前接種したときのみ抵抗性が誘導され、対照区に比べ枯死本数の軽減が認められた。このことから、抵抗性の誘導には弱病原線虫の生きた個体が必要と考えられた。

2 項 抵抗性の誘導に及ぼす前接種密度の影響

材料と方法

前接種する線虫密度と誘導される抵抗性の程度を知るため、前接種密度につき 30 頭から 3 万頭までの 4 段階とした。約 2 か月後に強病原線虫 1 万頭を後接種した。本試験には林試九州支場実験林に植栽された 18 年生クロマツを供試し各密度に 10～14 本を用いた。前接種を樹幹地際に後接種を胸高部にそれぞれ行った。前・後接種の年月日は 1982 年 6 月 24 日と同年 8 月 23 日であった。

結果と考察

試験結果を接種当年（1982 年 10 月）と翌年（9 月）のデータを併記して Table 18 に示した。ただし、翌年に再度後接種は行わなかった。当年のデータでみると、300 頭以上の前接種でかなりの誘導効果が現れている。しかし、300 および 3000 頭の前接種では誘導抵抗性は十分でなく、翌年には生存率の減少がみられ対照区との有意差が認められなくなった。一方、30000 頭区では翌年生存率は減少せず抵抗性が誘導されたものと考えられた。

3 項 抵抗性の誘導に及ぼす前・後接種の時間間隔の影響

材料と方法

Table 18. 抵抗性の誘導に及ぼす前接種密度の影響

Effect of inoculum density of avirulent K-48 on the degree of induced resistance.

前 接 種 密 度 Inoculum size of K-48	接 種 本 数 No. inoculated	枯 死 本 数 No. dead	枯 死 率 (%) % death
0 ¹⁾	11	10 (10)	91 (91)
3 × 10	10	9 (9)	90 (90)
3 × 10 ²	14	5 (12)	36 (86)
3 × 10 ³	14	3 (9)	21 (64)
3 × 10 ⁴	14	4 (4)	29 (29) **
3 × 10 ⁴ 2)	14	2 (2)	14 (14)

Note) S6-1 (1×10^4) で 60 日後に後接種 Challenged with 1×10^4 nemas of S6-1 isolate 60 days after preinoculation

1) : 後接種のみ Challenge alone 2) : 前接種のみ Inducer alone

() : 翌年のデータ Next year's data, **: 1% で有意 (翌年データ)

Significant at 1% level (next year's data)

Table 19. 前・後接種の時間間隔と誘導抵抗性の関係
Effect of time intervals between preinoculation and challenge on degree of induced resistance.

間隔 (日) Interval (day)	接種本数 No. inoculated	枯死本数 No. dead	枯死率 (%) % death
0 ¹⁾	10	10	100
5	10	4	40 **
10	20	5	25 **
21	10	1	10 **
30	20	1	5 **
60	20	8	40 **
90	20	5	25 **
120	20	8	40 **
S 6-1 のみ	20	19	95
S 6-1 alone			
K-48 のみ	20	1	5
K-48 alone			

Note) 接種密度 Inoculum density: 前接種 Preinoculation (isolate K-48) = 3×10^4 ,
後接種 Challenge (isolate S 6-1) = 1×10^4 , 1): 同時接種 Simultaneous
inoculation with K-48 and S 6-1, **: 1%で有意 Significant at 1% level.

抵抗性が誘導されるために必要な時間と一度誘導された抵抗性が持続する時間を把握する目的で、前・後接種の時間間隔を異にして試験を行った。この試験は1980年と1982年に林試九州支場苗畑に植栽された4年生および5年生クロマツをそれぞれ使って行った。後接種する日時をあらかじめ定め、これより所定の日数さかのぼって前接種をした。1980年および1982年の後接種の日はそれぞれ7月28日および7月23日であった。前・後接種の部位はそれぞれ地際および樹幹の中位部とした。

結果と考察

1980年と1982年の結果を一括してTable 19に示した。弱・強病原線虫を同時に接種した場合、弱病原線虫による発病抑制効果は全く認められなかった。前・後接種の間に時間間隔を置くと30日までは時間に応じて抵抗性の誘導効果が高まった。以後、誘導された抵抗性は時間の経過とともに漸減する傾向を示した。前接種後少なくとも120日間はかなりの抵抗性が持続された。植物病の誘導抵抗性の中でも持続時間の長い方とされる37日⁵⁾に比べてもはるかに長い持続時間といえよう。

4節 III章の考察

III章においては、*B. xylophilus*の病原性の変異に関する研究の一環として病原力の変異について検討を加えた。変異の実態を把握する手段として、調査対象範囲を順次狭めていく方法をとった。まず、線虫の病原力を全国規模で調査したが、病原力の強弱が特定の地域にかたよっている現象はみられなかった。しかし、病原力の変異はきわめて顕著で、病原力をマツ枯死率で表示すると0~100%という幅広いものであった。

1 林分内における線虫の病原力の変異について検討した結果、線虫を採取したマツ枯死木またはマツノマダラカミキリによって線虫の病原力に著しい相違が認められた。しかし、同一枯死木内または1頭のマツノマダラカミキリに生息している線虫集団内にはほとんど病原力の変異が認められなかった。このことは、線虫の一定集団を単位として病原力に変異が生じていることを推察させるが、未だ調査例が少ないのでさらに追試が必要であろう。

病原力において、本線虫の自然集団内に、かように顕著な変異が存在する事実はきわめて興味ある現象といえるが、変異の生成機構や維持機構については未だ不明である。植物寄生線虫類の病原性の種内変異については幾多の研究がなされているが、宿主選択性を異にする系統、いわゆる biological race あるいは pathotype と呼ばれる寄生性の分化を論じたものから、本報のように isolate 間の変異⁵³⁾⁸¹⁾を論述したものまで、線虫の病原性ないし病原力の種内変異の様相は多岐にわたっている⁶⁹⁾。

病原力の強・弱の背景となっている線虫の生理・生態的性質が明らかになると、多くの isolate につき病原力を推定でき、本種の集団構造を病原力という視点から解析することが可能となろう。さらに、宿主・寄生者相互関係の解明にも寄与するものと考えられる。このような観点から、線虫の増殖力と病原力の間に関連性があるか否かに検討を加え、また線虫酵素のザイモグラムによって病原力を判別できるかどうかを調べた。

B. cinerea 菌上における増殖力と病原力の関係をみると、相関が認められる場合も少なくなかったが、相関を示さない事例もかなりあり、*in vitro* の増殖力で的確に病原力を推定することは困難と思われた。*in vivo* における増殖力と病原力の間には密接な関係があり、強病原線虫は宿主体内でよく増殖したが弱病原線虫は増殖できなかった。この実験結果は一方で、マツ材線虫病の発現と進行には宿主体内における線虫の増殖が必要な条件であることを示唆している³⁶⁾。

本線虫の酵素の中で種内多型を示したエステラーゼのザイモグラムと病原力の関係を検討したが、この酵素に関する限りアイソザイムパターンと病原力の間に一定の関係を見いだすことはできなかった。他の線虫では多種類の酵素のアイソザイムの解析によって種内 race を識別した例¹⁹⁾もあり糸状菌では病原力とザイモグラムに関連づけられるとする報告¹⁾も最近なされている。本種についてもさらに多種の酵素について病原力とアイソザイムの関係をみる必要があると考えられる。

種内交配実験の結果、本種の病原力は遺伝性の形質であると推定された。今後、病原力の遺伝様式を解明してゆくことは、病原力に変異が生ずる仕組みや弱病原線虫が自然集団中に維持されている機構などを知る上において一定の貢献を果すものと考えられる。

多くの農作物の病害において、誘導抵抗性に関する研究⁸³⁾が盛んに行われている現状を鑑みて、マツ材線虫病においても弱病原線虫を利用した抵抗性誘導について検討を加えた。弱病原線虫を前接種することによってマツに抵抗性が誘導され、強病原線虫の接種による枯死率が対照区に比べ著しく軽減された。抵抗性の誘導機構は未だ明らかでないが、抵抗性の誘導には生きた弱病原線虫が必要なこと、前接種してから一定の時間が必要なこと、前接種の線虫密度に依存すること等の試験結果が得られた。これらの結果から、弱病原線虫に反応した宿主の代謝ないし生理条件の変化が抵

抗要因の一つになっているものと推察される。

IV章 総括および今後の研究の展望

本研究は、日本各地で永年にわたり猛威をふるっている激害型マツ枯損の病因を探索する目的で行われた。マツ樹の病的現象は、根部の障害に起因するとの想定にたち、病木の根および根圏土壌からの病原菌の探索と病原性の確認に努めた。*Fusarium* sp. をはじめとする多くの糸状菌が分離されたが、これらは有傷接種した3年生クロマツに対してほとんど病原性を示さず、生理的衰弱をひき起こさなかった。研究途上、マツ枯死木に普遍的に寄生している *Bursaphelenchus* 属の線虫を発見するに至り、その病原性を検討した結果、本線虫が激害型マツ枯損を起因する病原線虫であることを確認した。

Bursaphelenchus 属の線虫は従来、昆虫に随伴する線虫群とみなされ、植物寄生種として顧みられることはなかった。本属の中で初めて植物への加害性を確認した本試験の結果は、植物寄生線虫学上一つの意義をもつものと考えられる。昆虫と phoretic な関係をもつ線虫類は *Bursaphelenchus* 属に限らず Tylenchida 目の中に数多い⁶³⁾。今後、これらの線虫類についても植物への寄生性という見地から見直しをする必要があろう。

本線虫の学名は変遷を経て *B. xylophilus* が採用されるに至った。*B. xylophilus* は1930年代にアメリカにおいてすでに記載されていた種であることが明らかになった。本種とその近縁種である *B. mucronatus* の種間関係について研究者間に異論が存在する⁵¹⁾⁵²⁾⁷⁸⁾。本種の起源を探る上においても、種を同定する場合にも、形態学のみならず線虫の生態および生理・生化学的側面からの研究が重要であると考えられる。その一つとして本報で試みたアイソザイムの検討は、線虫の種の起源や種内分化の研究に有効な手段を与えるものと思われる。

B. xylophilus の感染によって引き起こされるマツ枯損はその病徴からみて急性の萎凋病であると考えられた。作物の萎凋病と線虫との関係については多くの報告があるが、大半は線虫と菌類あるいは細菌類との複合病としての萎凋病を論じており、本病のように線虫単独による萎凋性病害の報告例は少ない。

本種は菌食性であるという食性上の特性を備えている。線虫は一般に自活性から菌食性へそして植物寄生性へという進化の過程をたどるものと考えられている⁴⁶⁾。したがって、寄生性の進化という観点からは、本種も植物寄生種の前段階に位置することになる。諸岡ら⁵⁴⁾は菌食性である *B. xylophilus* が急激に食性をかえマツの組織を摂食することはあり得ないとし、病原としての *B. xylophilus* に疑問を抱いている。しかし、広汎な農作物を宿主としている *Ditylenchus destructor* THORNE¹¹⁾ やハセンチュウの仲間である *Aphelenchoides fragariae* (RITEMA Bos) CHRISTIE および *A. besseyi* CHRISTIE のように菌食性であると同時に高等植物への寄生能力を獲得し多くの作物に重大な疾病をもたらしている線虫種も少なくない⁷⁹⁾。*B. xylophilus* も菌食生活を営みつつマツへの寄生能力を獲得する方向へ進化したものと推察される。

TAMURA & MAMIYA⁷⁴⁾⁷⁵⁾ によるマツおよびアルファルファのカルス細胞での本種の培養の

成功は、高等植物への寄生性を示す重要な証拠を提示しているものといえよう。MAGGENTI⁴⁷⁾ は線虫類の寄生性の進化を考察する中で、*B. xylophilus* および *R. cocophilus* の寄生性の進化についても論究している。

本線虫の病原性と生理・生態的性質が明らかにされたので、つぎに本報では線虫の病原力に主眼をおいてさまざまな局面における変異の実態を把握することに努めた。本種には病原力においてきわめて顕著な種内変異があり、マツをほとんど枯らし得ない病原力の微弱なものから、接種したマツの大半を速やかに枯らす強病原力の線虫まで認められた。

まず、病原力の地理的変異に検討を加えた結果、地理的にみて病原力に一定の傾向は認められなかった。一方、林分単位で線虫の病原力をみると、林分間に明らかな相違が認められた。さらに 1 林分内の枯死木間にも生息する線虫の病原力に大きな相違があった。同一枯死木内の線虫はほぼ同等な病原力をもった集団であることが確認され、病原力の変異は結局枯死木を単位に生じていることが推定された。

このような病原力の顕著な変異が生ずる機構、弱病原線虫が自然集団中に維持される仕組みや集団におよぼす影響等については未だ不明であり、今後の検討課題である。著者は、数年間の継代培養によって *B. xylophilus* の病原力が低下する一事例を報告³¹⁾ したが、継代による病原力の低下が普遍的な現象であるか否か、自然条件下においても室内の継代培養に類した事象が起きているか否かについては明らかでない。交配試験の結果、病原力は遺伝的形質であることが判明した。さらに遺伝様式を明らかにし、変異の生成機構を解明する必要がある。

病原力の基盤となっている線虫の生理・生態的性質の一端を明らかにするため、線虫の増殖力および線虫酵素のザイモグラムが病原力と対応するか否かに検討を加えた。まず、*in vitro* における増殖力と病原力の関係を調べたところ、一部の isolate については相関が認められたが、対応しない場合もあり、*in vitro* の増殖力から直接病原力を推定することは困難と考えられた。マツ樹体内における線虫の増殖力と病原力の相関についてみると密接な関係が認められ、強病原線虫は樹体内でよく増殖し宿主を枯死に至らせた。一方、弱病原線虫の樹体内増殖はほとんどなく宿主は枯死しなかった。

病原力と線虫酵素のザイモグラムの関係をみるため、アイソザイム多型を示したエステラーゼについて検討を加えた結果、本酵素のザイモグラムと病原力には必ずしも高い相関は認め難かった。*Radopholus similis* (COBB) THORNE では供試した 8 酵素のうち aldolase ならびに lactate dehydrogenase のザイモグラムによって種内 2 race を明確に識別している¹⁹⁾。*B. xylophilus* についてもこれらの酵素を供試して病原力との関連性を検討する必要がある。本線虫の分泌するセルラーゼが病原機構の一翼を担っているとする報告⁶¹⁾ もなされており、病原力との関連性において本酵素の研究も進める必要がある。

本研究では、問題を病原力に絞り race または pathotype については論及しなかった。アメリカでの研究によると、バルサムファー (*Abies balsamea* (L) MILL.) およびレジノーサマツ (*P. resinosa* AITON) のおのおのを特異的に加害する、いわゆる race の存在が報告されている⁸⁴⁾。

また本邦でも抵抗性樹種とされているテーダマツの激しい被害¹⁰⁾が報じられており、これが病原性を異にする pathotype の存在を示すものかどうか究明すべき問題が生じてきている。本種の病原性の変異は今後、国内外を通じて重要な検討課題となることが予測される。

線虫の病原性ないし病原力の発現に関する一要因として、誘導抵抗性の現象が明らかにされた。本課題は抵抗性機作に関連して興味深い。

引用文献

- 1) ALFENAS, A.G.: Isozyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. Can. J. Bot., **62**, 1756~1762, (1984)
- 2) 青木幸一郎・永井 裕: 最新電気泳動法. 広川書店, 671 pp., (1978)
- 3) 青島清雄・林 康夫: 松くい虫とマツの青変について. 森林防疫, **13**, 103~105, (1964)
- 4) BASHAM, H.G.: Wilt of loblolly pines inoculated with blue-stain fungi in the genus *Ceratocystis*. Phytopathol., **60**, 750~754, (1970)
- 5) CARUSO, F.L. and KUĆ, J.: Induced resistance of cucumber to anthracnose and angular leaf spot by *Pseudomonas lachrymans* and *Colletotrichum langenarium*. Physiol. Plant Pathol., **14**, 191~201, (1979)
- 6) CHAMBELL, W.A.: A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soils. Plant Dis. Rep., **33**, 134~135, (1949)
- 7) DAVIS, B.J.: Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Science, **121**, 402~427, (1964)
- 8) 堂園安生・吉田成章: *Botrytis cinerea* 菌上におけるマツノザイセンチュウの増殖に対するロジスチック曲線の適用. 日林誌, **56**, 146~148, (1974)
- 9) DROPKIN, V.H. and FOUNDIN, A.S.: Report of the occurrence of *Bursaphelenchus lignicolus*-induced pine wilt disease in Missouri. Plant Dis. Rep., **63**, 904~905, (1979)
- 10) 海老根翔六: マツノザイセンチュウによるテーダマツ林の枯損動態 (1). 92 回日林論, 379~380, (1981)
- 11) FAULKNER, L.R. and DARLING, H.M.: Pathological histology, hosts, and culturing of the potato nematode. Phytopathol., **51**, 778~786, (1961)
- 12) FENWICK, D.W.: Red ring disease of coconut palm. pp. 89~98, In: Nematodes of tropical crops. Ed. by Peachey, J.E. C.A.B., New York, 355 pp., (1969)
- 13) GÄUMANN, E.: Principles of plant infection. Authorized English Edition by Brierley, W.B. Crosby Lockwood & Son, LTD., London, 543 pp., (1950)
- 14) GOODEY, J.B.: *Rhadinaphelenchus cocophilus* (COBB, 1919) n. comb. the nematode associated with "red ring" disease of coconuts. Nematologica, **5**, 98~102, (1960)
- 15) GOODEY, J.B.: The classification of the Aphelenchoidea FUCHS, 1937. Nematologica, **5**, 111~126, (1960)
- 16) HAGLEY, E.A.C.: The role of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, as a vector of red ring disease of coconuts. I. Results of preliminary investigations. J. Econ. Ent., **56**, 375~380, (1963)
- 17) 日高義実: 九州における松の虫害について. 赤松施業法研論集 (林学会発行), 261~272,

- (1943)
- 18) HORSFALL, J.G. and DIMOND, A.E.: The pathogen: the concept of causality. pp. 1 ~ 17 In: Plant Pathology Vol. II. Ed. by HORSFALL, J.G. and DIMOND, A.E., Academic Press, New York, 715 pp., (1960)
 - 19) HUETTEL, R.N., DIKSON, D.W. and KAPLAN, D.T.: Biochemical identification of the two race of *Radopholus similis* by strach gel electrophoresis. J. Nematol., **15**, 338~344, (1983)
 - 20) 茨木親義・大庭喜八郎・戸田忠雄・橋本平一・清原友也: マツノザイセンチュウ 23 系統のクロマツ苗木に対する病原性のちがい. 日林九支研論, **31**, 211~212, (1978)
 - 21) ISHIBASHI, N. and KONDO, E.: Occurrence and survival of the dispersal forms of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* MAMIYA & KIYOHARA. Appl. Ent. Zool., **12**, 293~302, (1977)
 - 22) 伊藤一雄: 特別研究 “まつくいむしによるマツ枯損防止に関する研究” の発足にあたって. 森林防疫, **17**, 139~142, (1968)
 - 23) 片桐一正・越智鬼志夫・小島圭三・宇賀三郎: 松くい虫防除のための空中散布に関する基礎調査 (1) 設計, 調査方法および樹幹面への付着状況. 76 回日林講, 402~403, (1965)
 - 24) 清原友也: マツ材線虫の侵入と繁殖. 81 回日林講, 255~256, (1970)
 - 25) 清原友也・徳重陽山: マツ生立木に対する線虫 *Bursaphelenchus* sp. の接種試験. 日林誌, **53**, 210~218, (1971)
 - 26) 清原友也: クロマツ生立木に対するマツ材線虫の接種. 日林九支研論, **24**, 243~244, (1971)
 - 27) 清原友也: 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, (1973)
 - 28) 清原友也・堂園安生・橋本平一・小野 馨: マツノザイセンチュウの接種密度と加害力. 日林九支研論, **26**, 191~192, (1973)
 - 29) 清原友也・鈴木和夫: マツノザイセンチュウの樹体内分散. 日林九支研論, **28**, 171~172, (1975)
 - 30) 清原友也・鈴木和夫: マツ樹体内におけるマツノザイセンチュウの季節的消長. 86 回日林講, 296~298, (1975)
 - 31) 清原友也: マツノザイセンチュウの継代培養による病原性の低下. 日線虫研誌, **6**, 56~59, (1976)
 - 32) 清原友也・鈴木和夫: マツノザイセンチュウの接種時期と接種後の個体数推移. 87 回日林論, 227~228, (1976)
 - 33) 清原友也: マツノザイセンチュウ系統間の増殖および病原性の比較. 日林九支研論, **30**, 241~242, (1977)
 - 34) 清原友也・鈴木和夫: クロマツ樹体内におけるマツノザイセンチュウの季節的消長 (II). 日林九支研論, **30**, 243~244, (1977)
 - 35) 清原友也・橋本平一・大庭喜八郎・西村慶二: アカマツおよびクロマツ精鋭樹別系統に対するマツノザイセンチュウ 4 系統の病原性. 88 回日林論, 329~330, (1977)
 - 36) KIYOHARA, T. & SUZUKI, K.: Nematode population growth and disease development in the pine wilting disease. Eur. J. For. Pathol., **8**, 285~292, (1978)
 - 37) 清原友也: マツノザイセンチュウの走査型電子顕微鏡による観察. 日林九支研論, **32**, 257~258, (1979)

- 38) 清原友也：マツノザイセンチュウ弱病原性線虫の前接種による強病原性線虫の加害性の抑制 (予報). 92 回日林論, 371~373, (1981)
- 39) KIIYOHARA, T.: Sexual attraction in *Bursaphelenchus xylophilus*. Jpn. J. Nematol., 11, 7~11, (1982)
- 40) 清原友也：マツ材線虫病における誘導抵抗性. 日林九支研論, 35, 161~162, (1982)
- 41) 清原友也・橋本平一・藤本吉幸：マツノザイセンチュウの病原力の変異. 日林九支研論, 36, 189~190, (1983)
- 42) 清原友也：マツ材線虫病に対する誘導抵抗性一抵抗性誘導の樹種間比較一. 日林九支研論, 37, 171~172, (1984)
- 43) KIIYOHARA, T.: Pine wilt resistance induced by prior inoculation with avirulent isolate of *Bursaphelenchus xylophilus*. pp. 178~184, In: Proceedings of the United State-Japan seminar: The resistance mechanisms of pines against pine wilt disease. University of Missouri-Columbia, 196 pp., (1984)
- 44) 清原友也：マツ材線虫病における誘導抵抗性について. 森林防疫, 34, 2~5, (1985)
- 45) 小林享夫・佐々木克彦・遠田暢男：冬期のマツ枯損に関与するキバチ (*Sirex*)-糸状菌 (*Amylostereum*) 相互の関係. 日林誌, 60, 405~411, (1978)
- 46) MAGGENTI, A.R.: Nemic relationship and the origins of plant parasitic nematodes. pp. 65~80, In: Plant parasitic nematodes Vol. I Ed. by ZUCKERMAN, B.M., MAI, W.F. & ROHDE, R.A., Academic Press, New York, 345 pp., (1971)
- 47) MAGGENTI, A.R.: General nematology. Springer-verlag, New York, 372 pp., (1981)
- 48) 真宮靖治・清原友也・徳重陽山：マツの材組織中にみられる *Bursaphelenchus* 属線虫の 1 種, マツノザイセンチュウ (仮称). 15 回日応動昆大会, 28, (1971)
- 49) MAMIYA, Y. & KIIYOHARA, T.: Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and histopathology of nematode-infested trees. Nematologica, 18, 120~124, (1972)
- 50) MAMIYA, Y.: Pine wood nematodes, *Bursaphelenchus lignicolus* MAMIYA and KIIYOHARA, as a causal of pine wilt disease. Review of plant protection research, 5, 46~60, (1972)
- 51) MAMIYA, Y. and ENDA, N.: *Bursaphelenchus mucronatus* n. sp. from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees. Nematologica, 25, 353~361, (1979)
- 52) 真宮靖治：アメリカ合衆国におけるマツノザイセンチュウの発見. 森林防疫, 29, 54~58, (1980)
- 53) MARTIN, W.J.: Parasitic race of *Meloidogyne incognita* and *M. incognita* var. *acrita*. Plant Dis. Rep., Suppl., 227, 86~88, (1954)
- 54) 諸岡信久・角田 広・辰野高司：マツの立枯れ病に関与する糸状菌類の研究. 防菌防黴誌, 11, 423~431, (1983)
- 55) NICKLE, W.R.: A taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidea (FUCHS, 1937) THORNE, 1949 (Nematoda: Tylenchida). J. Nematol., 2, 375~392, (1970)
- 56) NICKLE, W.R., GOLDEN, A.M., MAMIYA, Y., and WERGIN, W.P.: On the taxonomy and morphology of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (STEINER & BUHRER, 1934) NICKLE, 1970. J. Nematol., 13, 385~392,

(1981)

- 57) 西口親雄・村上 力：アカマツ樹脂圧の変動と松くい虫による枯損について—激害型林分と慢性微害型林分の比較—。日林誌, **52**, 131~133, (1970)
- 58) 日塔正俊・加藤幸雄・山根明臣・遠田暢男：マツ類の穿孔虫に関する研究—穿孔虫の産卵対象木についての一考察—。77 回日林講, 376~379, (1966)
- 59) 日塔正俊・野淵 輝・遠田暢男・山根明臣・古田公人：マツ類の穿孔虫に関する研究—加害対象木の判定と季節的推移, 枯損との関係。80 回日林講, 274~276, (1969)
- 60) 小田久五：松くい虫の加害対象木とその判定方法について。森林防疫ニュース, **16**, 263~266, (1968)
- 61) ODANI, K., SASAKI, S., NISHIYAMA, Y. and YAMAMOTO, N.: Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematodes. J. Jap. For. Soc., **67**, 366~372, (1985)
- 62) 大内成志：感染と遺伝子。51~61, 植物病理化学最近の進歩, 同刊行会, 226 pp., (1978)
- 63) POINER, Jr.G.O.: Entomogenous Nematodes. E.J. Brill, Leiden, 317 pp., (1975)
- 64) RICHARDS, W.C. and TAKAI, S.: A microtube technique for disrupting microquantities of fungal spores. Analytical Biochemistry, **100**, 240~243, (1979)
- 65) RÜHM, W.: Die Nematoden der Ipiden. Parasit. Schriftreihe, **6**, 1~437, (1956)
- 66) 佐多一至：兵庫県下に於いて激害を加えつつある松樹の穿孔虫類とその駆除予防の関する考察。兵庫県林試, 53 pp., (1942)
- 67) 佐藤邦彦：マツ類の群状枯損を起こす「つちくらげ」病とその防除対策。森林防疫, **25**, 81~87, (1976)
- 68) STEINER, G and BUHRER, E.M.: *Aphelenchoides xylophilus* n. sp. a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. J. Agric. Res., **48**, 949~951, (1934)
- 69) STURHAN, D.: Biological race. pp. 51~69, In: Plant Parasitic Nematodes vol. II. Ed. by ZUCKERMAN, B.M., MAI, W.F. and ROHDE, R.A., Academic Press, New York, 347 pp., (1971)
- 70) SUZUKI, K. and KIYOHARA, T.: Influence of water stress on development of pine wilting disease caused by *Bursaphelenchus lignicolus*. Eur. J. For. Path., **8**, 97~109, (1978)
- 71) 鈴木和夫：マツの材線虫病の発現機作。森林防疫, **28**, 90~94, (1979)
- 72) 鈴木和夫：マツの水分生理状態と材線虫病の進展。林試研報, 325, 97~126, (1984)
- 73) 田村弘忠・真宮靖治：マツノザイセンチュウの無菌化。日線虫研誌, **3**, 30~33, (1973)
- 74) TAMURA, H. and MAMIYA, Y.: Reproduction of *Bursaphelenchus lignicolus* on alfalfa callus tissues. Nematologica, **21**, 449~454, (1975)
- 75) TAMURA, H. and MAMIYA, Y.: Reproduction of *Bursaphelenchus lignicolus* on pine callus tissues. Nematologica, **25**, 149~152, (1979)
- 76) TAMURA, H.: Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus* and associated bacteria to pine seedlings. Jpn. J. Nematol., **13**, 1~5, (1983)
- 77) TARJAN, A.C. and ARAGON, C.B.: An analysis of the genus *Bursaphelenchus* FUCHS, 1937. Nematologica, **12**, 121~144, (1982)
- 78) TERASHITA, T.: Experimental crossing between *Bursaphelenchus lignicolus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. Men. Fac. Kagoshima Univ., **17**, 103~106, (1981)

- 79) THORNE, G.: Principle of nematology. McGraw-Hill Book Company Inc., New York, 553 pp., (1961)
- 80) 徳重陽山・清原友也: マツ枯死木中に生息する線虫 *Bursaphelenhus* sp. 日林誌, **51**, 193~195, (1969)
- 81) TRIANTAPHYLLOU, A.C.: Variation in perineal patterns and host specificity of *Meloidogyne incognita*. Phytopathol., **50**, 724~735, (1960)
- 82) 角田 広・諸岡信久・辰野高司: マツ枯損に関与する糸状菌に関する研究 (第1報). マイコトキシン, **12**, 36~39, (1980)
- 83) WHEELER, H.: Plant pathogenesis. Springer-Verlag, Berlin, 106 pp., (1975)
- 84) WINGFIELD, M.J., BLANCHETTE, A. and KONDO, E.: Comparison of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* from pine and balsam fir. Eur. J. For. Pathol., **13**, 360~372, (1983)
- 85) 矢野宗幹: 長崎県下松枯死原因調査. 山林公報 4 (付録), 1~4, (1913)
- 86) YIK, C.P. and BIRCHFIELD, W.: Observation on the morphology of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. J. Nematol., **13**, 376~384, (1981)

Etiological Study of Pine Wilt Disease

Tomoya KIYOHARA⁽¹⁾

Summary

A severe pine wilt disease has been devastating many forests of Japanese red pine (*Pinus densiflora* SHIEB. et ZUCC.) and Japanese black pine (*P. thunbergii* PARL.) in our country. The first written record of the disease dates back to 1913 when YANO described a mass death of black pines near Nagasaki city in Kyushu. His descriptions of the disease symptoms correspond well to those of the present disease. Since then, the disease has been invading and expanding to many pine forests and is now prevalent almost all over the country except for Aomori prefecture and Hokkaido island.

The cause of pine death has been ascribed to the attacks by pine bark beetles and wood-boring beetles belonging to Cerambycidae, Curculionidae, Scolytidae and so forth. Intensive studies on the parasitic biology of those beetles have been conducted by forest entomologists and led to the conclusion that target pine trees have already been weakened by an unknown cause prior to attacks by the insects. To clarify the cause of pine weakening, a research project team was started in 1968. We joined the project as forest pathologists.

During the course of pathological study, we found a species of *Bursaphelenchus* nematode multiplying on cultures of fungi isolated from wilted pines. In this paper, results of experiments proving the pathogenicity of this nematode are reported. Pathogenic variability within the species is also investigated and its significance is discussed in relation to the epidemiology of pine wilt disease.

I. Discovery of a pathogenic nematode and proof of its pathogenicity

(1) Intensive isolation trials have been made from wilted pine roots and rhizosphere to discover the cause of pine weakening. Many kinds of fungi were isolated from them; of those, some species including *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Cylindrocarpon* sp. caused some wilting of 20-day-old *P. thunbergii* seedlings. (Table 1). A few fungi also caused some discoloration of roots of 3-year-old plants in wound inoculations, but they were unable to weaken or kill the plants (Table 1).

As stated above, we noted a species of *Bursaphelenchus* nematode reproducing on cultures of several fungi isolated from the diseased pines, such as *Pestalotia* sp., *Fusarium* spp. blue stain fungi and so on. Preliminary inoculation suggested pathogenicity of this nematode on pine plants (Table 2). To determine if the nematode, *Bursaphelenchus* sp. is a causal agent of pine wilt disease, we must follow the scientific principles known as KOCH's postulate.

Received August 24, 1987

(1) ex. Kyushu Branch Station (Kyushu Research Center)

(2) Dead or dying pine trees from 48 damaged stands in Kyushu were inspected for the presence of *Bursaphelenchus* sp. 96% of the examined stands were infested with the nematode and 84% of 99 examined trees were parasitized by *Bursaphelenchus* sp. (Table 3). Detailed examinations on 3 representative trees revealed that nematodes were present throughout all the organs and tissues of a wilted pine tree except for the foliage (Fig. 1).

(3) A series of inoculation tests to healthy pine trees was conducted to elucidate the pathogenicity of this nematode. When 20 red pine trees of 16 to 24 years of age were inoculated with 30×10^4 monoxenically cultured nematodes, all inoculated trees wilted and died within 3 months, showing characteristic disease development (Table 4). The symptoms which appeared on the inoculated trees can be summarized as follows; a reduction of oleoresin exudation flow in the early stage of disease development (Plate 1, B). This flow reduction may be characteristic of the disease, since Pine plants usually exhibit resinosis symptoms when infected by other pathogens such as fungi; the cessation of oleoresin exudation was observed over the subsequent several weeks, when the plants displayed an external symptom of yellowing and wilting of foliage. The discoloration of foliage usually appeared first on older needle leaves (Plate 1, C). The desiccation of wood is a characteristic of this stage; death of diseased trees occurred 2 to 3 months after inoculation. The brown wilted foliage remained on the tree. The symptoms observed on inoculated trees were identical to those of naturally diseased trees.

(4) From all inoculated dead trees, *Bursaphelenchus* sp. was reisolated (Table 4). The identity of the recovered nematodes to the original inoculant was confirmed by microscopical observations.

(5) Since the inoculum used in the above inoculation was prepared from *Pestalotia*-nematode cultures, it is suspected of containing several factors responsible for pathogenicity other than the nematode itself. In this respect, each component involved in the inoculum was tested for pathogenicity. Neither spore suspension of *Pestalotia* sp. or filtrates from nematode-*Pestalotia* cultures showed any effect on pine trees, even if injected into the base of the trunk. Only inoculum containing nematodes resulted in wilting and the death of inoculated trees, demonstrating the strong pathogenicity of *Bursaphelenchus* sp. to pine trees (Table 6).

(6) Pathogenicity of dauer larvae which are infective stage juveniles in nature was tested and compared with that of cultured nematodes by inoculating trees of *P. thunbergii* and *P. densiflora*. In addition, the effect of the inoculum concentration on the speed of the disease development and wilt incidence was investigated using dauer larvae that were extracted from vector insects, *Monochamus alternatus* HOPE. As a result of testing, pathogenicity of both cultured nematodes and dauer larvae was found to be essentially the same (Table 5). The inoculum concentration greatly affected the disease development and wilt incidence. The higher the inoculum concentration, the greater the occurrence of pine death (Fig. 2).

(7) Monthly inoculations in a red pine stand showed that the summer inoculation resulted in a more rapid disease development and a higher mortality of host trees

than did the spring inoculation (Fig. 3). It is interesting to note that irrespective of the time of year at inoculation, pine death occurred only after August. This fact suggests that the environmental conditions, which predispose pines to death, arise around August.

(8) Nine other *Bursaphelenchus* species, which had been isolated from wilted pines, were tested for pathogenicity. None of the species caused either wilting or death of the pines, even if inoculated in mid summer (Table 7).

From the above experiments the following evidence was obtained: a) Consistent association of *Bursaphelenchus* sp. with dead pines throughout the damaged stands. b) Characteristics of the symptoms and death which appeared on pine trees inoculated with *Bursaphelenchus* sp. coincide with those on naturally diseased trees. c) *Bursaphelenchus* sp. was reisolated from all inoculated dead trees. These facts could fulfill KOCH's postulate and lead to a conclusion that the nematode, *Bursaphelenchus* sp. is a principal causal agent of pine wilt disease prevailing in our country.

(9) Based on the pathogenicity and morphological characters, we identified this nematode as a new species and named *Bursaphelenchus lignicolus* MAMIYA and KRYOHARA, 1972 and proposed pine wood nematode as a general name. In 1979, the occurrence of pine wood nematode was reported in the United States as to pine mortality.

In the meantime, *Aphelenchoides xylophilus* STEINER and BUHRER, 1934 (later changed to the *Bursaphelenchus*) had been described as occurring in blue-stained pine logs in the United States. A study by NICKLE et al, who conducted a morphological comparison and mating test between Japanese and American nematodes, indicated that they are the same species. Based on a further comparative study between old specimens of *B. xylophilus* and the current species, they synonymized *B. lignicolus* with *B. xylophilus*. Thus, *B. xylophilus* will be used as a scientific name of this nematode in the following chapters.

II. Pathogenic variability of *B. xylophilus*

A preliminary inoculation trial with several isolates collected from some pine stands suggests that *B. xylophilus* is considerably variable with respect to pathogenicity or virulence to pine plants. A study on pathogenic variability of this nematode was, therefore, initiated. Emphasis is mainly placed on variation in virulence of nematodes in various situations. Virulence, as used in this paper, refers to the percentage of trees killed following inoculations of *B. xylophilus* isolates.

(1) A total of 37 isolates from infested stands in different geographical areas were tested for virulence on 2 or 3-year-old seedlings of *P. thunbergii*. A large variation in virulence was found; pine mortality ranging from 0 to 100% of the inoculated trees (Fig. 5). Variation seems to be continuous, though the distribution frequency of highly virulent nematodes is relatively high.

(2) Comparison among 5 isolates within each of 4 different pine stands demonstrated that the virulence of nematodes markedly varies not only depending on pine stands but also on individual wilted trees or vector insects in a given stand

(Fig. 6).

(3) Variability in virulence of *B. xylophilus* was not found among isolates derived from 5 different parts of trunk in a single tree (Fig. 7). Nine iso-female lines, each of which is progeny of one gravid female, from each of the 3 vector insects showed similar virulence to pine plants (Fig. 8). Variation occurred again among both the examined trees or the insects (Fig. 7, 8).

(4) Using 2 virulent and 2 avirulent isolates, inoculation tests were made on open-pollinated seedlings from elite trees of *P. thunbergii* and *P. densiflora*. In general, both virulent isolates caused high mortality of seedlings from each family of the two pine species, though the percentage of mortality in *P. thunbergii* is usually higher than that in *P. densiflora*. In the inoculation with avirulent isolates, mortality of seedlings was consistently low in the case of *P. densiflora*. But, in *P. thunbergii*, the mortality values varied from family to family (Table 11, 12).

(5) In order to know whether or not the biological and biochemical nature of nematodes is related to their virulence, the reproductive potential of the nematodes was investigated on fungal cultures of *Botrytis cinerea* PERS. and within host plants. Isozyme analysis of nematodes differing in virulence was also made by electrophoresis on polyacrylamide gels.

There is a tendency toward highly virulent nematodes generally having higher reproductive potential on fungal cultures (Table 13). The rate of reproduction, however, is not always correlated to the level of virulence (Fig. 9). Therefore, it is thought to be difficult to directly estimate the virulence of the given isolate only from reproductive rates on fungi. Within host trees, virulent populations steadily developed and caused pine trees to die. On the other hand, populations of avirulent isolate failed to develop, resulting in no symptom development or pine death (Fig. 10).

Of the 6 enzymes examined, isozyme patterns of aspartic transaminase and leucyl aminopeptidase are invariable among isolates within a species but are distinguishable between species, being useful for differentiation of species. The most variable zymograms within a species were observed in esterase (Fig. 11). However, no close relationship between esterase isozyme patterns and virulence level was detected (Fig. 13).

(6) To know heritability of virulence, single pair mating tests were carried out using 2 virulent and 2 avirulent isolates. The virulence of progeny from each mating was evaluated for virulence by statistical comparison with that of the parents. From the result, the virulence of *B. xylophilus* could be a heritable trait (Table 16).

(7) Using a combination of a virulent and an avirulent isolate, some experiments of induced resistance were carried out under field conditions. When pine plants were preinoculated with avirulent nematodes, they became much more resistant against the virulent isolate and escaped mortality. Living avirulent nematodes are necessary for the induction of resistance (Table 17). The protective effect increased with increasing inoculum concentration of preinoculation (Table 18). The degree of induced resistance depends on time intervals between the inducer and challenge

inoculation (Table 19).

III. Discussion and conclusion

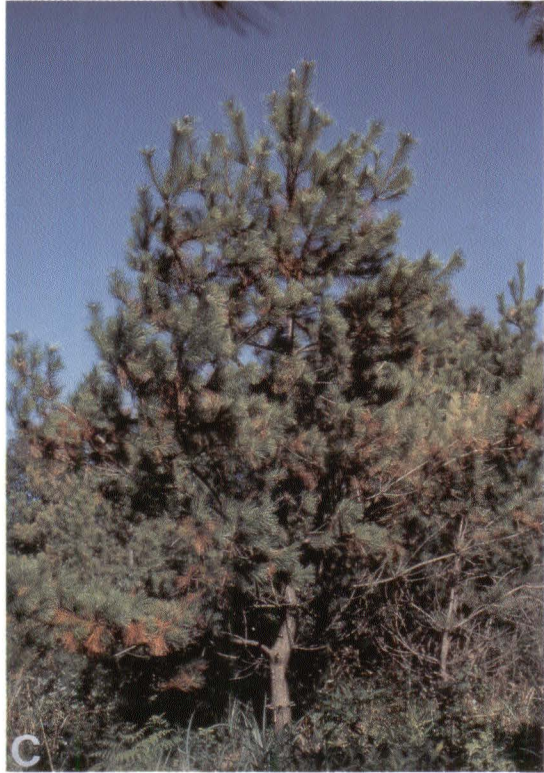
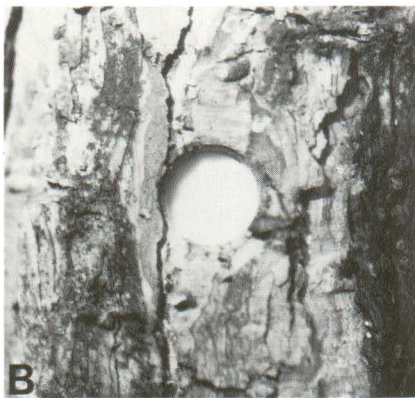
The present study demonstrates that *B. xylophilus* is a causal agent of pine wilt disease which had been attributed to attacks by pine bark beetles for a long time. This species is first recorded as a plant-parasitic form in the genus *Bursaphelenchus* and the only nematode to kill woody plants in a shorter period, except for *Rhadinaphelenchus cocophilus* (COBB) J.B.GOODNEY which is a pathogen producing red ring disease of coconut palms in West Indies.

The reduction in oleoresin exudation which appeared in the early stage of nematode infection is a very characteristic symptom of this disease, since pine plants generally exhibit a symptom of unusual resin flow when infected by other pathogens such as fungi. The discovery of the mechanism of induction of the symptom may contribute to a better understanding of the physiological role of oleoresin for pine plants.

From this study, a marked variation in virulence was shown among populations of *B. xylophilus* in various situations. Variation seems to occur depending on pine stands and/or individual diseased trees from which nematodes were isolated. It is important to elucidate the cause and mechanism of pathogenic variability from a standpoint of population genetics of *B. xylophilus* and an analysis of epidemics in pine wilt. Virulence is thought to be a heritable trait from a mating test. Further studies on genetics of pathogenicity in *B. xylophilus* are necessary for successful breeding of resistant pines.

Instead of inoculations, the establishment of a more simple and exact method to estimate virulence may be of use to determine virulence of a large number of isolates and also to analyze *B. xylophilus* populations. In this respect, further studies on the physiological and biological nature relative to pathogenicity are needed in the future.

A phenomenon of induced resistance was recognized in sequential inoculations with avirulent and virulent isolates. This is an interesting subject for studying both the resistance mechanism and pathogenesis of pine wilt disease.



A: 無接種木からの樹脂滲出 (穿孔1時間後)

Flow of oleoresin from uninoculated healthy tree (1 hour after inoculation)

B: 接種木における樹脂滲出の停止 (接種20日後)

Cessation of oleoresin exudation from punch wound of inoculated tree (20 days after inoculation)

C: 接種木における1-3年生葉の変色 (接種36日後)

Discoloration of 1 to 3-year-old needles on inoculated tree (36 days after inoculation).

D: 接種木の萎凋と枯死 (接種68日後)

Wilting and death of inoculated tree (68 days after inoculation).