

# 病原体を接種して萎凋させたアカマツ実生からの 病原体の再分離およびマツノザイセンチュウの 分離系統間の病原性の差の原因

河津 一儀・金子 昇・平岡 享子・山下 秀昭  
神崎 浩  
(生物資源開発学講座)

Reisolation of the Pathogens from Wilted Red Pine Seedlings Inoculated with  
the Bacterium-carrying Nematode, and the Cause of Difference  
in Pathogenicity among Pine Wood Nematode Isolates

Kazuyoshi Kawazu, Noboru Kaneko, Kyoko Hiraoka  
Hideaki Yamashita and Hiroshi Kanzaki  
(Department of Bioresources Chemistry)

This paper shows that aseptic red pine seedlings inoculated with the aseptic nematode (AOKD-3) carrying the bacterium (*Bacillus cereus* strain HY-3) wilt while those inoculated separately with the aseptic nematode (AOKD-3) and the bacterium (HY-3) do not. These findings indicate that the phenylacetic acid producers accompanying the nematode are the pathogen of the pine wilt, conforming to Koch's four principles. The fact that the weakly pathogenic isolate of nematode cannot so effectively wilt the seedling as the strongly pathogenic isolate, no matter how pathogenic a bacterium accompanies it, suggests that inherent characters such as mobility and propagation of the nematode are also important for the nematode to wilt the seedling.

Key words : Koch's principle, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Bacillus cereus*,  
*Bacillus megaterium*, pathogen of pine wilt

## 緒 言

著者らはすでに、マツノザイセンチュウの強病原性分離系統から、アカマツ実生を萎凋させる細菌、*Bacillus cereus* strain HY-3, *B. subtilis* strain HY-16, および *B. megaterium* strain HY-17を単離し、これらの細菌が生産する松萎凋毒物質は、共通してフェニル酢酸であること、およびフェニル酢酸のクロマツ3年生苗への投与によって、クロマツ苗がマツ材線虫病に特徴的な化学症状、すなわち安息香酸の急激な生成を起こすことから、マツ材線虫病の真の病原体はマツノザイセンチュウによって搬入されるフェニル酢酸生産細菌であることを提唱し

た<sup>1-4)</sup>。そこで、強病原性分離系統のマツノザイセンチュウ OKD-3 を無菌にして、無菌状態で生育させたアカマツ実生に無菌条件下で接種した場合には、実生は萎凋しないことを示すことによって、本萎凋病の真の病原体はフェニル酢酸生産細菌であることを立証した<sup>5)</sup>。しかし、このフェニル酢酸生産細菌のみを、アカマツ実生に接種しても、実生は萎凋しなかった<sup>4)</sup>ので、マツノザイセンチュウに保持させて接種する実験をする必要が生じた。

本報では、無菌にした強病原性分離系統のマツノザイセンチュウ<sup>5)</sup>に、フェニル酢酸生産細菌を保持さ

Received October 1, 1998

せて、無菌アカマツ実生に接種すれば、無菌にする前の強病原性分離系統と同様の萎凋性を示すことを実証し、さらに萎凋した実生からセンチウおよびフェニル酢酸生産細菌を再分離することによって、フェニル酢酸生産細菌を保持したマツノザイセンチウがマツ材線虫病の病原体であることを証明した。一方、マツノザイセンチウには病原性を異にする分離系統があり、その一つである弱病原性分離系統 OKD-1 もまた、フェニル酢酸低生産性細菌を保持していた<sup>6)</sup>。その OKD-1 に、フェニル酢酸高生産性細菌を保持させて接種しても、その萎凋率は強病原性分離系統 OKD-3 の萎凋性のレベルには達しなかった。

したがって、萎凋すなわち、マツ材線虫病の発現には、フェニル酢酸生産細菌のマツノザイセンチウへの随伴に加えて、マツノザイセンチウの各分離系統の固有の性質、たとえば運動性(移動力)、増殖力あるいはフェニル酢酸生産細菌への親和性などが関与している可能性を強く示唆した。

### 材料と方法

#### 強病原性分離系統 OKD-3

1994年に、岡山大学半田山自然教育研究林内の当年枯損クロマツ木片から得た分離系統<sup>3)</sup>で、押麦に生育させた *Botrytis cinerea* 菌(以下、*B. c.* 菌と略称する)を食餌として継代培養したものを用いた。

#### 強病原性分離系統 OKD-3 の無菌化

強病原性分離系統 OKD-3 を、既報<sup>5)</sup>のとおり無菌化し、無菌センチウ AOKD-3 を得た。試験管中の押麦に生育させた *B. c.* 菌を食餌として継代培養を行い、接種試験に供するためには、200ml 三角フラスコ内に調製した Czapek-Dox-agar 培地上の *B. c.* 菌叢上で26°C、1週間増殖させて、無菌的にペールマン法で集めて用いた。

#### フェニル酢酸生産細菌の洗浄生菌体の調製

フェニル酢酸生産細菌の斜面培養(nutrient broth 培地)から1白金耳の菌体を10mlの nutrient broth (NB)液体培地(φ25×200mm試験管)に植菌し、28°C、暗黒下、48時間往復振盪培養する。遠心分離によって集めた菌体に滅菌水を加えて懸濁し菌体を洗浄する。再度遠心分離して得た菌体を滅菌水10mlに懸濁し、610nmでの吸光度を測定し、検量線から菌数を求め、所定菌数の菌体懸濁液を調製した。

#### アカマツ実生への接種試験

フェニル酢酸生産菌の菌体懸濁液とマツノザイセンチウ懸濁液を100μlずつ混和し、1時間静置し、センチウに細菌を保持させる。この混合液25μl(10<sup>6</sup> cellsのフェニル酢酸生産細菌およびマツノザイセンチウ250頭を含む)を、それぞれ既報の方法に従って無菌<sup>5)</sup>あるいは有菌<sup>4)</sup>のアカマツ実生に接種した。26°C、16L/8Dの条件下に7日間保ち、1、3、5、7日目に萎凋本数を記録した(Table 1, 3, 4)。1試験区には、実生5本を用い、6回の繰り返し試験を行った。菌体を保持させないセンチウ250頭/25μlおよび滅菌水25μl接種区を対照区とした。

#### フェニル酢酸生産細菌を保持させた強病原性分離系統の無菌センチウ(AOKD-3)を接種した無菌アカマツ実生からのフェニル酢酸生産細菌およびマツノザイセンチウの再分離

フェニル酢酸生産細菌を保持させた強病原性分離系統の無菌センチウ(AOKD-3)を無菌アカマツ実生に接種後3日目に、萎凋した実生の接種点を中心として子葉および胚軸それぞれ15mmまでの部分およびそれ以外の部分とに分別し(Fig. 1)、各半量を試験管(φ25×200mm)に入れた10mlのNB液体培地に懸濁し、28°C、暗黒下で、2日間往復振盪(毎分170ストローク)培養した。得られた培養液が清澄であれば、その部位は無菌であると判定した。白濁して菌の増殖が認められた部位の培養液は遠心分離(9000×g, 5分)し、上清を1N塩酸でpH4.0に調整した後、酢酸エチルで抽出した。この酢酸エチ

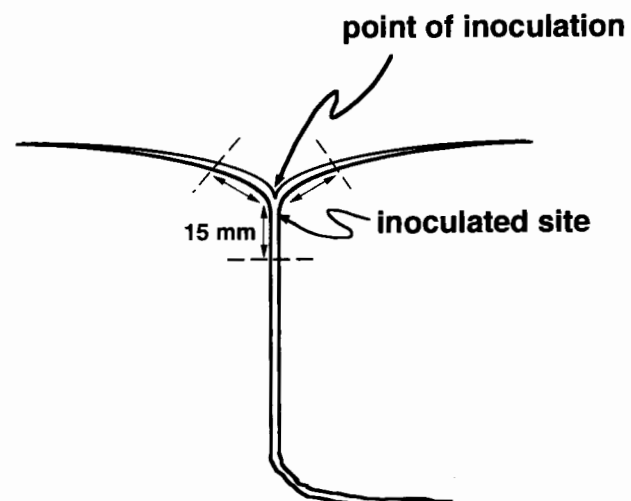


Fig. 1 Inoculation site of the red pine seedling.

ル可溶部について、GC-MS<sup>7)</sup>によって、フェニル酢酸の存否を確認した。

両部位の残りを、さらに細断し、ペトリ皿内の Czapek-Dox-agar 培地で生育させた *B. c.* 菌叢上に置き、暗黒下、26°Cで1週間培養して、センチュウの増殖の有無を確認した。

#### マツノザイセンチュウ弱病原性分離系統 OKD-1

1984年に、岡山大学半田山自然教育研究林内の枯損クロマツ木片から分離したマツノザイセンチュウを PDA (potato-dextrose-agar) 培地に生育させた *B. c.* 菌を食餌として継代培養を続けるうちに病原力を失った分離系統<sup>3)</sup>であり、既報<sup>3)</sup>のとおり、試験管

中の押麦に繁殖させた *B. c.* 菌を食餌として継代培養した。

### 結果と考察

著者らはすでに、無菌化した強病原性分離系統 AOKD-3 を無菌的に接種したアカマツ無菌実生は萎凋しないことを示した<sup>5)</sup>ので、今回は無菌にした OKD-3 (AOKD-3) に、再びフェニル酢酸生産細菌を保持させて、アカマツの無菌実生に接種し、萎凋することを確認するとともに、萎凋した実生から病原体を再分離しなければならない。そこで、無菌にした OKD-3 (AOKD-3) に、フェニル酢酸生産性が最も低い HY-3 株を保持させて、アカマツの無菌実生に接種したところ萎凋率は80%となり、OKD-3 単独接種の際の萎凋率に匹敵した (Table 1)。この際、接種3日後には、実生が萎凋するので、萎凋した実生から病原体とみなしているセンチュウとフェニル酢酸生産細菌の再分離を試みたところ、接種部以外の部位からも両者が再分離され、それらの部位における存在を確認することができた (Table 2)。なお、無菌センチュウのみを接種して萎凋しなかった実生からは、センチュウを回収できたが、細菌の存在を認めることはできなかった (Table 2)。

以上の結果、フェニル酢酸生産細菌は、単独では実生を萎凋させないが、センチュウが保持して搬入することによって、はじめて病原性を発現することが、さらに立証されるとともに、フェニル酢酸生産細菌を保持したマツノザイセンチュウの病原性がコッホ氏の四原則にのっとり確認されたことになる。

著者らは、はじめフェニル酢酸生産細菌のセンチュウへの随伴が本病の発現に必要な十分条件と考えて

Table 1 Wilting ratios of red pine seedlings inoculated with aseptic pathogenic nematode isolate (AOKD-3) and pathogenic *B. cereus* strain HY-3

Inoculum	Day <sup>a)</sup>	Wilting Ratio			
		1	3	5	7
AOKD-3+HY-3	Run				
	I	0/5	4/5	4/5	4/5
	II	0/5	4/5	4/5	4/5
	III	0/5	5/5	5/5	5/5
	IV	0/5	4/5	4/5	4/5
	V	0/5	4/5	4/5	4/5
VI	0/5	5/5	5/5	5/5	
Average 26/30=87%					
AOKD-3	I	0/5	0/5	0/5	0/5
	II	0/5	0/5	0/5	0/5
	III	0/5	0/5	0/5	0/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
Average 0/30=0%					
HY-3	I	0/5	0/5	0/5	0/5
	II	0/5	0/5	0/5	0/5
	III	0/5	0/5	0/5	0/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
Average 0/30=0%					
Sterilized Water	I	0/5	0/5	0/5	0/5
	II	0/5	0/5	0/5	0/5
	III	0/5	0/5	0/5	0/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
Average 0/30=0%					

a) Day after inoculation

Table 2 Reisolation of the nematode as well as the phenylacetic acid (PA) producer from wilted aseptic red pine seedlings inoculated with aseptic nematode (AOKD-3) carrying *B. cereus* strain HY-3

Inoculum	Parts	Nematode	PA-producer
AOKD-3+HY-3	Inoculated site	+ <sup>b)</sup>	+
	Other parts <sup>a)</sup>	+	+
AOKD-3	Inoculated site	+	- <sup>c)</sup>
	Other parts	+	-

a) Parts other than inoculated site

b) Reisolated

c) Undetected

いたが、弱病原性センチュウ OKD-1 といえどもフェニル酢酸生産細菌を保持しているので、フェニル酢酸生産細菌 3 菌株のうち、フェニル酢酸生産性が最も低い *B. cereus* HY-3 株を、保持させてアカマツ実生に接種したところ、萎凋率は 30% であり OKD-1 のみを接種した際の萎凋率に比べ、差があると判定できなかった (Table 3). そこで、フェニル酢酸

生産性が高く生育が速い *B. megaterium* HY-17 株を保持させて接種したところ、萎凋率は 57% となった (Table 4). しかし、この結果は、OKD-3 を接種した際に比べ 1% の危険率で有意差が認められた。弱病原性分離系統のセンチュウは、フェニル酢酸生産細菌を保持してもなお、強病原性分離系統に比べ萎凋率は低いことが明らかである。このことは、マ

Table 3 Wilting ratios of red pine seedlings inoculated with weakly pathogenic nematode isolate (OKD-1) and pathogenic *B. cereus* strain HY-3

Inoculum	Wilting Ratio				
	Day <sup>a)</sup>	1	3	5	7
	Run				
OKD-1+HY-3	I	0/5	2/5	3/5	4/5
	II	0/5	1/5	3/5	3/5
	III	0/5	1/5	2/5	2/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
	Average 9/30=30%				
HY-3	I	0/5	0/5	0/5	1/5
	II	0/5	0/5	0/5	0/5
	III	0/5	0/5	0/5	0/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
	Average 1/30=3%				
OKD-1	I	0/5	0/5	1/5	1/5
	II	0/5	2/5	3/5	3/5
	III	0/5	1/5	3/5	3/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
	Average 7/30=23%				
OKD-3	I	0/5	1/5	3/5	3/5
	II	0/5	4/5	5/5	5/5
	III	0/5	3/5	4/5	5/5
	IV	0/5	2/5	3/5	3/5
	V	0/5	5/5	5/5	5/5
	VI	0/5	1/5	3/5	3/5
	Average 24/30=80%				
Sterilized Water	I	0/5	0/5	0/5	0/5
	II	0/5	0/5	0/5	0/5
	III	0/5	0/5	0/5	0/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
	Average 0/30=0%				

a) Day after inoculation

Table 4 Wilting ratios of red pine seedlings inoculated with weakly pathogenic nematode isolate (OKD-1) and pathogenic *B. megaterium* strain HY-17

Inoculum	Wilting Ratio				
	Day <sup>a)</sup>	1	3	5	7
	Run				
OKD-1+HY-17	I	0/5	3/5	3/5	3/5
	II	2/5	2/5	2/5	2/5
	III	0/5	1/5	2/5	3/5
	IV	0/5	3/5	3/5	3/5
	V	2/5	3/5	3/5	3/5
	VI	0/5	3/5	3/5	3/5
	Average 17/30=57%				
HY 17	I	0/5	0/5	0/5	0/5
	II	0/5	0/5	0/5	0/5
	III	0/5	0/5	0/5	0/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
	Average 0/30=0%				
OKD-1	I	0/5	1/5	1/5	1/5
	II	0/5	0/5	0/5	0/5
	III	0/5	0/5	0/5	0/5
	IV	0/5	1/5	1/5	1/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
	Average 2/30=7%				
OKD 3	I	0/5	1/5	2/5	4/5
	II	0/5	4/5	5/5	5/5
	III	0/5	3/5	5/5	5/5
	IV	0/5	2/5	3/5	4/5
	V	0/5	2/5	4/5	4/5
	VI	0/5	1/5	3/5	5/5
	Average 27/30=90%				
Sterilized Water	I	0/5	0/5	0/5	0/5
	II	0/5	0/5	0/5	0/5
	III	0/5	0/5	0/5	0/5
	IV	0/5	0/5	0/5	0/5
	V	0/5	0/5	0/5	0/5
	VI	0/5	0/5	0/5	0/5
	Average 0/30=0%				

a) Day after inoculation

ツノザイセンチュウの病原性には、フェニル酢酸生産細菌が随伴するか否かだけでなく各分離系統の固有の性質たとえば、移動力、増殖力などが大きく関与していると推定できる。

### 要 約

著者らはすでに、マツ材線虫病の真の病原体はマツノザイセンチュウによって搬入されるフェニル酢酸生産細菌であることを提唱し、さらに無菌化した強病原性分離系統のマツノザイセンチュウ AOKD-3 を接種した無菌アカマツ実生は萎凋しないことを示すことによって、本萎凋病の真の病原体はフェニル酢酸生産細菌であることを立証した。

本報では、無菌にした OKD-3 (AOKD-3) に、再びフェニル酢酸生産細菌を保持させてアカマツの無菌実生に接種すれば、萎凋することを確認するとともに、萎凋した実生からセンチュウおよびフェニル酢酸生産細菌を再分離することによって、フェニル酢酸生産細菌を保持したマツノザイセンチュウの病原性をコッホ氏の四原則にのっとして確認した。

一方、マツノザイセンチュウの弱病原性分離系統は、フェニル酢酸生産細菌を保持してもなお、強病原性分離系統に比べ萎凋率が低いことを明らかにした。したがって、萎凋すなわち、マツ材線虫病の発現には、フェニル酢酸生産細菌のマツノザイセンチュウへの随伴に加えて、マツノザイセンチュウの各分離系統の固有の性質、たとえば運動性（移動力）、増殖力などが大きく関与していることを強く示唆し

た。

### 文 献

- 1) 河津一儀：マツノザイセンチュウ感染による樹体成分の変動。日本農芸化学会誌, **64**, 1262-1264 (1990)
- 2) 河津一儀：線虫病に罹病した半田山の松から分離したマツノザイセンチュウに随伴するバクテリア。平成3年度岡山大学教育研究学内特別経費研究成果報告書 都市近郊林(半田山)の自然特性およびその環境保全機能に関する研究(VI), pp. 67-72, 岡山大学農学部(1992)
- 3) 河津一儀：マツ材線虫病の病原毒素。化学と生物, **36**, 120-124 (1998)
- 4) 河津一儀・山下秀昭・小林昭雄・神崎 浩：マツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* に随伴する松萎凋性細菌の単離とその毒性代謝物。岡山大学農学部学術報告, **87**, 1-7 (1998)
- 5) Kawazu, K. and N. Kaneko: Asepsis of the pine wood nematode isolate OKD-3 causes it to lose its pathogenicity. Jpn. J. Nematol., **27**, 76-80 (1997)
- 6) Kawazu, K., H. Zhang, H. Yamashita and H. Kanzaki: Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and phenylacetic acid production. Biosci. Biotech. Biochem., **60**, 1413-1415 (1996)
- 7) Kawazu, K., H. Zhang and H. Kanzaki: Accumulation of benzoic acid in suspension cultured cells of *Pinus thunbergii* Parl. in response to phenylacetic acid administration. Biosci. Biotech. Biochem., **60**, 1410-1412 (1996)