

博士論文（要約）

日本におけるマツノザイセンチュウの病原力と遺伝的多様性

およびヤクタネゴヨウの保全に関する研究

秋庭 満輝

目次

第1章 序論	1
第2章 マツ林から新しく分離されたマツノザイセンチュウが抵抗性クロマツ 5 家系に示す病原 力	10
第3章 新たに材線虫病が侵入した地域におけるアカマツ林の被害動態とマツノザイセンチュ ウの病原力	24
第4章 日本におけるマツノザイセンチュウの遺伝的多様性	
第 4.1 節 核とミトコンドリアの遺伝子の DNA 配列による解析	50
第 4.2 節 マイクロサテライトマーカーによる解析	66
第5章 マツ材線虫病に対する絶滅危惧種ヤクタネゴヨウの保全	
第 5.1 節 ヤクタネゴヨウ成木のマツ材線虫病に対する感受性	99
第 5.2 節 ヤクタネゴヨウからのマツノマダラカミキリ成虫の脱出とマツノザイセンチュウ 保持状況	107
第6章 総合考察	117
要旨	121
謝辞	125
引用文献	126

第1章 序論

マツ材線虫病

マツ材線虫病はマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle) を病原体とするマツ類の伝染病である (清原・徳重, 1971; Mamiya, 1983; 岸, 1988; Mota and Vieira, 2008; Zhao *et al.*, 2008)。マツノザイセンチュウは北米原産であり、20 世紀初頭に日本に侵入したとみられる (de Guiran and Bruguier, 1989)。1905 年に長崎県長崎市で発生したクロマツの集団枯損 (矢野, 1913) が本病の初めての記録と考えられており、以降被害は拡大し、現在では北海道を除く全都府県で本病の発生が認められている。日本での被害量はピーク時の 1979 年度の 243 万 m³ (被害材積) と比較すると減少はしているが、それでもなお 2016 年度に 44 万 m³ の被害量を記録している (林野庁, 2017)。本病は、当初は日本だけで発生している地域的な病害と見なされたが、1982 年に中国で本病が発生したのに続き (Cheng *et al.*, 1983)、1985 年に台湾 (Tzean and Jan, 1985)、1988 に韓国 (Yi *et al.*, 1989) と東アジアに拡大した。1999 年にヨーロッパのポルトガルで発生が認められ (Mota *et al.*, 1999)、2008 年にスペインに侵入した (Abelleira *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2011)。材線虫病は世界各地で植物検疫の対象に指定されており、現在では世界的に重要な病害となっている。

マツノザイセンチュウは、東アジアではマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* Hope) およびカラフトヒゲナガカミキリ (*M. saltuarius* (Gebler))、ヨーロッパでは *M. galloprovincialis* (Oliver) の成虫によって伝搬され、主にカミキリ成虫の後食時に健全なマツに侵入する (Mamiya and Enda, 1972; 森本・岩崎, 1972; 佐藤ら, 1987; Sousa *et al.*, 2001)。マツノザイセンチュウの原産地である北米では、*M. carolinensis* (Olivier) などのヒゲナガカミキリ属

(*Monochamus*) の成虫によって伝搬され、カミキリ成虫の産卵時に衰弱又は枯死したマツの樹体内に侵入する (Wingfield and Blanchette, 1983; Akbulut and Stamps, 2012)。

日本のマツ属植物の材線虫病に対する感受性

日本には、クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.)、アカマツ (*P. densiflora* Siebold et Zucc.) およびリュウキュウマツ (*P. luchuensis* Mayr) の二葉松類と、ハイマツ (*P. pumila* (Pall.) Regel)、ヒメコマツ (*P. parviflora* Siebold et Zucc. var. *parviflora*)、キタゴヨウ (*P. parviflora* Siebold et Zucc. var. *pentaphylla* (Mayr) A. Henry)、チョウセンゴヨウ (*P. koraiensis* Siebold et Zucc.) およびヤクタネゴヨウ (*P. amamiana* Koidz.) の五葉松類の 8 種のマツ属植物が自生する (大井, 1978; 林, 1960)。それらのうち、ハイマツとチョウセンゴヨウは材線虫病が発生しない高緯度地方または高標高地に分布することから (林, 1960)、本病の発生地域にはマツ属 6 種が天然分布することになる。

長崎で集団枯損の発生以来、アカマツとクロマツの天然林や人工林で本病による激しい被害が発生してきた (岸, 1988)。清原・徳重 (1971) はマツ属 9 種へのマツノザイセンチュウの接種試験を行い、マツノザイセンチュウが本病の病原体であることを明らかにしたが、その中で、クロマツ、アカマツおよびリュウキュウマツが本病に感受性であることを証明した。その後、1973 年にリュウキュウマツの自生地である沖縄県で本病の発生が確認され (国吉, 1974; 我如古, 1974)、現在でも奄美大島から沖縄本島にかけての南西諸島のリュウキュウマツ林で被害が発生し続けている (岩ら, 2010; 玉城ら, 2015)。

五葉松類では、接種試験によりヒメコマツとチョウセンゴヨウが本病に感受性であることが報告され (二井・古野, 1979)、その後ヒメコマツの自生地とチョウセンゴヨウの造林地で本病の発生が記録された (佐倉ら, 1978; Futai,

2003)。なお、ハイマツとキタゴヨウが本病に対して感受性かどうかは明らかにされていない。

上述の通り、クロマツなどの 5 種は材線虫病に対して感受性であるが、ヤクタネゴヨウの感受性の程度については明らかにされていなかった。ヤクタネゴヨウは屋久島と種子島のみに分布し (Koidzumi, 1924; 初島, 1938; Yahara *et al.*, 1987; Katsuki and Farjon, 2013)、近い将来における野生での絶滅の危険性が高い種として絶滅危惧種 IB 類に指定されている (環境省, 2017)。1980 年代からヤクタネゴヨウの自生地での枯死被害が報告され (林ら, 1984; 林, 1988; 山本・明石, 1994)、枯死原因を特定するとともに早急に保全対策を講じる必要性が指摘された。現地の調査から材線虫病が枯死要因である可能性が高いと判断されたが (Nakamura *et al.*, 2001)、そのことは証明されていなかった。

世界のマツ属植物の材線虫病に対する感受性

清原・徳重 (1971) は、テーダマツ (*P. teada* L.) などの外国産マツ属 6 種に対してマツノザイセンチュウの接種試験を行い、これらの樹種は材線虫病に対して抵抗性であると判断した。その後、京都市に植栽されたカイガンショウ (*P. pinaster* Aiton) の集団枯死被害が発見され、外国産マツ属の中にも本病に感受性の種が存在することが明らかになった (峰尾・紺谷, 1973)。

二井・古野 (1979) は、京都大学の 2 つの試験地に植栽された外国産マツ属 25 種を含むマツ属 30 種に対してマツノザイセンチュウを接種し、マツ属各種の材線虫病に対する感受性または抵抗性の程度について調査した。また、古野ら (1993) は、同じ試験地の外国産マツ属の成木についてマツノザイセンチュウの自然感染による枯死経過を調査し、北米原産種の中で西部原産のマツ属に材線虫病に対して感受性の種が多いのに対し、東部原産のマツ属には抵抗性の種が多いこと、アジアとヨーロッパ原産のマツ属に感受性の種が含まれることを

明らかにした。

前述の通り、東アジアとヨーロッパにマツノザイセンチュウが侵入・定着して材線虫病が発生しているが、中国と韓国ではクロマツ、アカマツ、チョウセンゴヨウの他に、タイワンアカマツ (*P. massoniana* Lamb.)、アブラマツ (*P. tabuliformis* Carrière)、タカネゴヨウ (*P. armandii* Franch.) などが被害を受けている (Yang, 2003; Woo *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2013)。ポルトガルとスペインではカイガンショウのみで被害が発生していたが (Vicente *et al.*, 2012)、近年、ヨーロッパクロマツ (*P. nigra* J. F. Arnold) の被害が報告された (Inácio *et al.*, 2015)。

マツノザイセンチュウと近縁種

マツノザイセンチュウが属する *Bursaphelenchus* 属内に 125 種が認められている (Kanzaki and Giblin-Davis, 2018)。植物病原性の種はヤシ赤輪病 (red ring disease) の病原体である *B. cocophilus* (Cobb) Baujard (Griffith, 1987) とマツノザイセンチュウのみであり、大部分の種が糸状菌食性の線虫である。形態および分子系統解析により、*Bursaphelenchus* 属内のグループ分けがされており、マツノザイセンチュウは近縁種であるニセマツノザイセンチュウ (*B. mucronatus* Mamiya et Enda) などとともに *xylophilus* group に含まれる (Ryss *et al.*, 2005; Braasch *et al.*, 2009)。このグループの線虫は、*Monochamus* 属のカミキリをベクターとしているものが多い (Kanzaki and Giblin-Davis, 2018)。

ニセマツノザイセンチュウはユーラシア原産の線虫である。日本では、マツノマダラカミキリ、カラフトヒゲナガカミキリ、シラフヒゲナガカミキリ (*M. nitens* (Bates)) およびシラフヨツボシヒゲナガカミキリ (*M. urussovi* (Fischer)) がニセマツノザイセンチュウのベクターとして記録されている (遠田, 1972; Mamiya and Enda, 1979; Jikumaru and Togashi, 1995; Togashi *et al.*, 2008;

Kanzaki and Akiba, 2014)。マツノザイセンチュウが侵入して以来、マツ材線虫病の発生地ではニセマツノザイセンチュウを分離することが困難となっていることから、本病の発生地ではニセマツノザイセンチュウからマツノザイセンチュウへの置換が進んでいることが示唆されている（岸, 1988; 真宮, 2006; Togashi and Jikumaru, 2007)。接種試験によりニセマツノザイセンチュウが被陰されたアカマツ苗木を枯死させることが報告されているが（Kanzaki and Futai, 2006)、健全なマツ成木を枯死させるほどの強い病原力は持たない（Mamiya and Enda, 1979)。

マツノザイセンチュウの病原性の分化と病原力の変異

マツノザイセンチュウは種内に病原性と病原力（注：章末の定義を参照）に関して多様な変異を持つことが知られている。アメリカ合衆国北部のバルサムモミ (*Abies balsamea* (L.) Mill.) 枯死木からメス成虫の尾端に鋭い突起 (mucron) を持つ線虫が分離され、同様な突起を持つニセマツノザイセンチュウとの異同が問題となったが、交配試験と DNA 塩基配列情報から、これらがマツノザイセンチュウであることが確かめられた（Wingfield *et al.*, 1983; Iwahori *et al.*, 1998; Bechenbach *et al.*, 1999)。マツ属から通常分離されるメス成虫の尾端が丸いマツノザイセンチュウ (R 型) に対して、これらを M 型と称する。ヨーロッパアカマツから分離された R 型とバルサムモミから分離された M 型のマツノザイセンチュウをヨーロッパアカマツ (*P. sylvestris* L.)、レジノーサマツ (*P. resinosa* Aiton) およびバルサムモミに接種すると、R 型はマツ属のみに病原性を示すのに対し、M 型はバルサムモミのみに病原性を示した（Wingfield *et al.*, 1983)。また、ヨーロッパアカマツとストロブマツ (*P. strobus* L.) それぞれに異なった病原性を示す 2 つのパソタイプが報告されている（Bolla *et al.*, 1986)。以上のことから、北米ではマツノザイセンチュウの種内に病原性の分化

が生じている可能性がある。なお、これまでに日本国内から M 型のマツノザイセンチュウが検出された記録はない（秋庭, 2006）。

日本国内では、マツノザイセンチュウの病原力に種内変異があることが報告されている（Kiyohara and Bolla, 1990）。日本各地から分離されたマツノザイセンチュウの 37 アイソレイトをクロマツまたはアカマツの苗木に接種したところ、アイソレイトによって 0~100%の枯死率を示したが、各アイソレイトの分離源および採集地と病原力との間には傾向は認められなかった（Kiyohara and Bolla, 1990）。日本から分離されたマツノザイセンチュウの強病原力と弱病原力のアイソレイトについて全ゲノム配列を解読し、一塩基多型（single nucleotide polymorphisms: SNPs）に基づいて解析したところ、強病原力と弱病原力のアイソレイト間で遺伝的に分化していることが明らかになった（Palomares-Rius *et al.*, 2015）。このことから、Palomares-Rius *et al.* (2015) は、マツノザイセンチュウの原産地から日本への侵入が複数回あった可能性を示唆している。

マツ材線虫病の防除と抵抗性育種

マツ材線虫病の防除のために、これまでに様々な手段が講じられてきた。媒介者のカミキリ類を対象とする殺虫剤の空中散布または地上散布、枯死木の伐倒と薫蒸などが実施されているほか、マツノザイセンチュウを対象とした殺線虫剤の樹幹注入が行われている（吉田, 2006）。これら以外の手法として、マツノザイセンチュウに対して抵抗性を持つマツ（抵抗性マツ）の育種が進められている（藤本ら, 1989; 戸田, 2004; Nose and Shiraishi, 2008）。

抵抗性マツ育種のための接種検定用の線虫として、マツノザイセンチュウの複数のアイソレイトの中から増殖力と病原力が高いアイソレイトである「島原」が選択された（藤本ら, 1981）。材線虫病によるクロマツまたはアカマツの激害

林の中で残存している成木を抵抗性マツの候補木とし、それらの接ぎ木苗に「島原」を接種することにより、アカマツ 92 クローンとクロマツ 16 クローンが抵抗性マツとして選抜された（藤本ら, 1989）。これらの抵抗性マツが材線虫病の防除法として有効であるかどうか確かめるために、被害地に分布するマツノザイセンチュウの性質を常に把握する必要がある。侵入病原体は、原産地から複数の多様な系統が侵入した場合、それらの交配により病原力が強くなることが菌類などで知られている（Brasier, 2001）。もし、原産地から異なる系統のマツノザイセンチュウが侵入した場合、新たな系統の出現により日本のマツノザイセンチュウがより強病原力化する可能性がある。また、抵抗性マツは「島原」のみの接種検定の結果にもとづいて選抜されたものであるため、病原性が分化したマツノザイセンチュウが存在した場合、抵抗性が打破されることが考えられる。

本研究の目的および本論文の構成

本論文では、日本に存在するマツノザイセンチュウの病原性および病原力の現状を把握するとともに、ヤクタネゴヨウの保全のための知見を得ることを目的に、以下のように実施した。

第 2 章では、九州各地の枯死木から分離したマツノザイセンチュウを抵抗性グレードの異なる抵抗性クロマツに接種することにより、日本のマツ林に現存するマツノザイセンチュウに病原性の分化が生じているか、病原力の程度はどのくらいなのかを検討した。

第 3 章では、材線虫病が侵入してまもないアカマツ林において、10 年間ににおけるマツの発病状況を明らかにすると同時に、林内に存在するマツノザイセンチュウの病原力を明らかにした。病原力の決定は第 2 章の結果に基づき抵抗性マツを利用して行った。また、マツ林における枯損動態についてはこれまでモデル化されてきたが、それを実証した長期間の観察例は少ない。そこで、本章の

結果をモデルにあてはめた。

第2章と第3章で九州の野外から分離されたマツノザイセンチュウの病原性および病原力を調査したが、日本全国に存在するマツノザイセンチュウの性質を把握するためにはさらに広範囲の線虫について調査する必要がある。しかし、労力と接種用マツの本数の面から、全てについて接種試験を行うのは困難である。それに変わる方法として病原力と連鎖する遺伝マーカーを用いた解析が考えられるが、そのような遺伝マーカーはまだ発見されていない。そこで、第4章では病原力と関連は不明であるが多型性が認められる遺伝マーカーを用いて、日本全国のマツノザイセンチュウの遺伝的多様性を調べた。第4.1節ではバーコード領域としても頻繁に利用される核のリボゾーム遺伝子のITS領域とミトコンドリアのシトクロムcオキシダーゼ遺伝子サブユニットIのDNA塩基配列を用いて解析し、第4.2節ではより詳細な解析が可能であるマイクロサテライトマーカーを用いて解析を行った。両手法ともに海外のマツノザイセンチュウで得られているデータとの比較が可能であり、日本国内の多様性の評価だけでなく、原産地からの侵入また新被害地への移動経路の推定が可能となる。

第5章では、絶滅危惧種ヤクタネゴヨウの衰退要因を特定して本種の保全に貢献することを目的とした。第5.1節では、ヤクタネゴヨウの成木の材線虫病に対する感受性の程度を明らかにするため、マツノザイセンチュウのヤクタネゴヨウに対する接種試験を行った。さらに、第5.2節ではヤクタネゴヨウ枯死木からのマツノマダラカミキリ成虫の脱出消長とマツノザイセンチュウの保持数について調査した。

第6章では、第2章から第5章までに得られた情報を基に、日本に分布するマツノザイセンチュウの病原力と遺伝的多様性について考察した。また、ヤクタネゴヨウの保全について言及した。

用語の定義

植物病理学の分野では、病原体が宿主植物に病気を引き起こす過程で発揮する性質全体を「病原性 (pathogenicity)」とし、病原性を宿主に侵入して抵抗性に打ち勝つ能力である「侵略力 (aggressiveness)」と宿主を発病させる能力である「病原力 (virulence)」としてわけられる場合がある (眞山・難波, 2010)。この場合、「病原力」は質的な意味を持つ。一方、virulence は古くから病気を起こす能力の程度を示す量的な意味で使用されてきた (Holliday, 1989)。また、海外では aggressiveness は量的な意味の病原力と同等に使用されてきた経緯があり (Vanderplank, 1963)、この場合 aggressiveness とその日本語訳である侵略力とは必ずしも同一のことを示していない。このように、これらの用語の使用に混乱が認められる。そこで、本論文では Holliday (1989) の定義に従い、病原性 (pathogenicity) を「病原体が宿主に対して病気を起こす能力」という質的な意味で用い、病原力 (virulence) を「病原体が病原性を持つ場合のその病気を起こす程度」という量的な意味で用いる。すなわち、マツノザイセンチュウがあるマツの種または家系に病気を起こす能力を持つ場合に「病原性がある」とし、その強弱を「病原力が強い、弱い」というように表す。

また、植物病原体の種内に、ある植物の異なる種または同一種内の異なる品種に対して異なる病原性を示す系統が存在することがある。マツノザイセンチュウの場合、マツ属とバルサムモミに対して異なる病原性を示すアイソレイトが存在することが報告されているが (Wingfield *et al.*, 1983)、その場合、マツノザイセンチュウ種内に「病原性の分化」が生じていると表す。

第2章 マツ林から新しく分離されたマツノザイセンチュウが抵抗性クロマツ 5家系に示す病原力

マツ属樹種は世界中に 100 種以上知られている (Farjon, 2005)。材線虫病に対する感受性または抵抗性の程度はマツ属の種によって大きく異なる (二井・古野, 1979)。クロマツとアカマツは感受性の高い樹種であるが、感受性の程度は種内でも個体により異なり、中には抵抗性を示す個体が存在する (大庭ら, 1977)。このことにより、昭和 53 年度から昭和 59 年度まで「マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」として本病に対する抵抗性マツの選抜育種が進められた (藤本ら, 1989; 戸田, 2004; Nose and Shiraishi, 2008)。まず、選抜育種の接種検定用の線虫として、複数のアイソレイトの中から増殖力と病原力が高いアイソレイトである「島原」が選択された (藤本ら, 1981)。本病の激害林で生残しているマツ個体から枝を採取し、これを用いて作製した接ぎ木苗に対して「島原」を接種しても健全であるものから抵抗性マツが選抜された。その結果、アカマツ 92 クローンとクロマツ 16 クローンを抵抗性マツとして選抜され、これらを母樹とする採種園が造成された (藤本ら, 1989)。母樹から採種された自然受粉種子由来のマツを「家系」とし、西日本において 10 年間にわたり実施された「島原」の接種試験の結果から、それぞれの家系の抵抗性グレードが決定された (戸田, 2004)。なお、グレードは 1 から 5 までの 5 段階評価であり、グレード 5 が最も抵抗性が強い。

1990 年に熊本県の天草森林組合で抵抗性マツの生産が事業化されて以降、日本各地で抵抗性マツが生産されるようになり、海岸林や街路樹など様々な用途で植栽されるようになった (鳥羽瀬ら, 1993)。しかし、これらの植栽された抵抗性マツが材線虫病の発生地域で枯死する事例も報告されている (山田・杉本, 2007)。第 1 章で述べたように、マツノザイセンチュウは種内に病原力の変異が

認められており、海外では病原性の分化が生じていることも報告されている (Wingfield *et al.*, 1983; Bolla *et al.*, 1986; Kiyoohara and Bolla, 1990)。また、日本侵入後の長期間の間に、より強病原力の系統が出現する可能性もある。現在植栽されている抵抗性マツは「島原」という一つの線虫アイソレイトのみを用いて選抜されてきたものであることから、これらが野外に実際に存在するマツノザイセンチュウに対しても抵抗性を有するかどうかは確認されていない。また、農作物を中心に病害に対する抵抗性作物の育種が行われているが、様々な病原線虫で抵抗性を打破する系統の出現が問題となっている (Starr *et al.*, 2002)。抵抗性マツについてもマツノザイセンチュウに病原性の分化が生じれば同様に問題となるであろう。また、「島原」で選ばれた抵抗性マツを枯死させうる線虫系統がもともと存在する可能性もあるが、それらについての研究事例はない。

本章では、1) 抵抗性マツが野外から分離されたマツノザイセンチュウに対してどのくらいの抵抗性を持つか、2) マツノザイセンチュウの種内に抵抗性マツに対する病原性の分化が生じていないか、を確かめるために、九州各地の本病による被害木から新たに分離されたマツノザイセンチュウのアイソレイト 25 株を用いて、抵抗性クロマツ 5 家系に対する接種試験を実施した。

なお、第 2 章の内容の一部は、Akiba *et al.* (2012) として発表した。

2.1 材料および方法

供試線虫

マツノザイセンチュウのアイソレイト (培養個体群) 25 株を供試した (表 2-1)。そのうち 19 株については、1996 年から 1999 年にかけて九州各地のマツ属樹種の枯死木の材または枯死木から脱出したマツノマダラカミキリから分離された線虫から新たに確立した。佐賀県唐津市虹ノ松原、鹿児島県南さつま市吹上

浜、鹿児島県鹿児島市寺山からは複数の株を用い、それ以外について 1 地区につき 1 株を用いた。新たなアイソレイトの確立は以下の手順で行った。1 本の枯死木から充電式電気ドリル（ドリルビットの直径 15 mm）を用いて採集された材片の約 20 g（生重）、または鋏で細断されたマツノマダラカミキリ 1 頭からベールマン法（Southey, 1986）により室温（20～30℃）で 24 時間抽出した。抽出されたマツノザイセンチュウの幼虫 10 頭を 3%乳酸で殺菌処理（竹内, 2014）した後に 6 cm シャーレ内のポテトデキストロース寒天培地（potato dextrose agar; PDA）上で培養した *Botrytis cinerea* Pers. 上に移し、25℃で培養した。数週間後に線虫の増殖が確認されたものについて、試験管内の大麦（米粒麦；はくばく，中央市）培地上で培養した *B. cinerea* 上に移植してアイソレイトとし、アイソレイトの確立後に森林総合研究所九州支所または九州育種場で 1 年に 1 度の間隔で継代して保存した。その他に、各種の試験・研究に頻繁に使用されている強病原力アイソレイト（Ka-4, S6-1, S10, T4 および島原）と弱病原力アイソレイト（C14-5）を比較のために用いた（Kosaka *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Aikawa and Kikuchi, 2007）。これらをおよび大麦粒で培養した *B. cinerea* の菌糸上に移植し、25℃で 3 週間培養した後にベールマン法により室温で 2 時間抽出した。抽出後の線虫を殺菌水を用いて 100,000 頭 / ml の濃度に調整したものを接種源とした。

供試植物

マツ材線虫病に対する抵抗性が異なる 5 家系のクロマツの 1.5 年生苗を供試した。抵抗性グレードは顚娃 425 が 2、夜須 37 と三崎 90 が 3、波方 37 が 4、波方 73 が 5 であり、数値の高い方の抵抗性が高い（戸田, 2004）。九州育種場の抵抗性マツ採種園に植栽された抵抗性クロマツクローン母樹に自然交配して結実した球果より採集した種子を 1999 年 3 月に圃場に播種し、翌年の 3 月に床替

えて 20 cm の間隔で植栽した。試験デザインとしてクロマツ家系を主試験区、線虫アイソレイトを副試験区とした分割区法 (split-plot design) を採用し、1 試験区を 4 本幅で植栽したマツ 12 本として 3 反復 (ブロック) 実施した。合計で 4,680 本のマツを供試した。

接種試験と発病の評価

2000 年 8 月 1 日に接種を行った。マツ苗木の幹の下部の樹皮をナイフで約 1 cm の長さに削ぎ、小さな鋸で木部に傷をつけ、その部分に線虫懸濁液 50 μ l (5,000 頭) をピペットで滴下した。乾燥を防ぐため、接種部分にパラフィルム (Parafilm; Pechiney Plastic Packaging, Chicago) をまきつけ、フィルムの上下をビニールテープで留めた。対照として、線虫液のかわりに同量の滅菌水を接種した。病徴進展について接種後 10 月 10 日までは 1 週間毎、その後 12 月 5 日までは 2 週間毎、さらに 2001 年 1 月 16 日に調査した。それぞれの調査日に、針葉の変色の様子を記録し、全ての針葉が褐色に変色した時点で枯死したものと判断した。また、1 本以上の枝の針葉が褐変しているが木全体としては枯死していないものを部分枯れと判断した。

統計解析

接種後 18 週目の接種木に対する枯死木と部分枯れ木を合わせたものの割合を被害率、枯死木の割合を枯死率とした。被害率と枯死率をアークサイン変換したものについて分散分析を行い、それぞれの家系間の被害率と枯死率について Tukey-Kramer の多重比較を行った。解析は、R version 3.4.1 (R core team, 2017) を用いて行った。

2.2 結果

弱病原力アイソレイトである C14-5 を波方 37 に接種した場合を除き、全ての線虫アイソレイトとクロマツ家系の組み合わせについて病徴の進展が認められた。最も早い場合、接種 1 週間後に針葉の変色の開始が認められ、接種後 12 週目（10 月 24 日）にかけて病徴が進行した。そのほとんどが接種後 18 週目までに枯死したが、接種翌年においても完全に枯死せずに部分枯れとなり生残する個体があった。対照区では針葉の変色は認められなかった。

接種後 18 週目における被害率は、線虫アイソレイト間（ANOVA, $P < 0.0001$; 表 2-2）またはクロマツ家系間（ANOVA, $P = 0.0029$; 表 2-2）において有意に異なっていたが、線虫アイソレイトとクロマツ家系間の交互作用は認められなかった（ANOVA, $P = 0.3867$; 表 2-2）。それぞれのクロマツ家系内で見た場合、線虫アイソレイト間に被害率に大きな変動が認められた。クロマツ家系の被害率は、穎娃 425 が 62.3%、夜須 37 が 61.0%、波方 73 が 55.9%、三崎 90 が 45.1%、波方 37 が 40.6%であった。接種後 18 週目における枯死率は、線虫アイソレイト間（ANOVA, $P < 0.0001$; 表 2-3）またはクロマツ家系間（ANOVA, $P = 0.0042$; 表 2-3）において有意に異なっていたが、線虫アイソレイトとクロマツ家系間の交互作用は認められず（ANOVA, $P = 0.288$; 表 2-3）、被害率と同様の傾向を示した。

抵抗性マツ育種事業で検定用として使用されているアイソレイト島原を接種した場合、全てのマツ家系に発病が認められ、被害率と枯死率はそれぞれ 22.2～74.2%（表 2-4）と 19.4～74.2%（表 2-5）であった。線虫のアイソレイト間で被害率または枯死率を比較した場合、島原と強病原力の 4 アイソレイト（Ka-4、S6-1、S10 および T4）との間に有意な差は認められなかった。しかし、野外で新しく採集されて確立されたアイソレイトの中に、島原を接種した場合より

も枯死率が有意に高いものが存在した。特に、唐津 3 の枯死率が高く、それぞれの家系に対しての枯死率が 77.8~100.0%に達した。弱病原力のアイソレイトである C14-5 を接種した場合、クロマツ 4 家系において枯死率が最も低かった。また、野外のアイソレイトの中でも枯死率が異なり、C14-5 と同等の枯死率しか示さないアイソレイト（宮崎 2）が存在した。

2.3 考察

樹木病害の防除を考慮するにあたり、その構成要素として重要な手段となるのが抵抗性育種である（Carson and Carson, 1989; Snieszko, 2006）。抵抗性育種を進めるにあたり、野外における病原体の病原力などの特性を把握することが重要である。さらに、病原体の病原性や病原力は変異や選択などにより変化することがあることから、開発された抵抗性樹種が野外の森林に存在する病原体に対しても効果があるかどうかをモニタリングすることも重要である。

第 1 章で述べたように、北アメリカ大陸では形態の異なるタイプ（R 型と M 型）のマツノザイセンチュウが存在し、病原性が分化したパソタイプが存在する可能性が示唆されている（Wingfield *et al.*, 1983; Bolla *et al.*, 1986）。これまで、日本では R 型のマツノザイセンチュウのみが分離されており、病原性の分化についても知られていない（秋庭, 2006）。しかしながら、日本においても現存するマツノザイセンチュウ個体群の進化または北アメリカからの新しい系統のマツノザイセンチュウの侵入などにより、病原性または病原力が変化する可能性がある。清原ら（1977）は、クロマツとアカマツ精英樹の苗木に対してマツノザイセンチュウ 4 アイソレイトを接種し、マツ属 2 種に対する病原性の分化は認められないが、マツの種間に感受性の差があり、アカマツよりもクロマツの方が枯死しやすいことを示した。本試験では、被害率または枯死率に関して線虫ア

イソレイトとクロマツ家系との間に交互作用が認められなかったことから、マツノザイセンチュウのアイソレイト間に抵抗性クロマツ家系に対する病原性の分化が生じていないことが示された。これまで抵抗性クロマツの選抜のための検定用線虫として「島原」という 1 つのアイソレイトのみが使用されてきた。もし病原性が分化していれば、開発された抵抗性木を野外に植栽した場合に別の系統のマツノザイセンチュウには抵抗性を発揮しないことが考えられる。しかし、本試験の交互作用が認められなかったという結果は、「島原」だけでも抵抗性を評価できることを示すことから、これまでの接種検定結果にもとづく抵抗性マツ育種の妥当性が改めて示されたといえる。

一方、線虫アイソレイトの病原力には大きな変異が認められ（表 2-4, 5）、マツノザイセンチュウの種内に病原力の変異が認められるというこれまでの報告（茨木ら, 1978; 藤本ら, 1981; Kiyohara and Bolla, 1990）が再確認された。また、唐津、吹上では、同一林分内の異なるクロマツ個体またはマツノマダラカミキリ個体から分離された線虫アイソレイト間に病原力の変異が認められ（表 2-4, 5）、Kiyohara and Bolla（1990）の結果と一致した。「島原」は 18 アイソレイトの中から病原力の強さと増殖力の大きさから抵抗性検定用として選択されたものである（藤本ら, 1989）。「島原」が最初に使用された試験が 1977 年に実施されていることから（茨木ら, 1978）、「島原」は 1977 年以前にアイソレイトとして確立されたことが想定される。マツノザイセンチュウの培養株が長期間の継代保存により病原力が低下するということが報告されているが（清原, 1976）、「島原」はアイソレイトの確立から年月が経っているにもかかわらず比較的強い病原力を維持しているといえる。実際、抵抗性マツ育種事業において長期間にわたり「島原」が使用されているが、接種検定の結果から「島原」の病原力が低下していないことが確認されている（戸田, 2004）。本試験では、「島原」は強病原力として各種試験に用いられている 4 アイソレイト（Ka4, S6-1, S10,

T4)と同程度の病原力であったが、野外から新たに採集されたアイソレイトの中に「島原」よりも病原力が強いアイソレイト（例えば唐津 3）が存在した。「島原」が選択された時には感受性のマツが使用されたが（藤本ら, 1981）、本試験では抵抗性のクロマツを使用したことから、「島原」以上の病原力を持つアイソレイトを検出することができたと考えられる。本研究により、現時点で「島原」よりも病原力が強いマツノザイセンチュウが野外に存在することが初めて確かめられた。「島原」の接種結果をもとに育種された抵抗性マツが「島原」より病原力の強いマツノザイセンチュウが存在する場所に植栽された場合、より病原力の強いマツノザイセンチュウの感染により発病・枯死する可能性がある。それゆえに、今後抵抗性育種を進めるに当り、より病原力の強い線虫で検定することにより、より抵抗性の高いマツを生産することが考えられる。しかし、その場合、検定に合格するマツの個体数が減少することから、1 本当りのマツの価格も上昇することが想定される。よって、庭園や街路樹などより強い抵抗性が求められる場合には「唐津 3」などのより病原力の強いアイソレイトを検定用として用いるなど、現場の状況に応じて検定用の線虫を変えることが考えられる。

日本のマツノザイセンチュウの強病原力アイソレイト（S10, Ka4 など）と弱病原力アイソレイト（C14-5 と OKD1）は、リボゾーム RNA 遺伝子の ITS 領域とヒートショックプロテイン 70A 遺伝子の配列で区別できることから（Iwahori *et al.*, 1998; Takemoto and Futai, 2007）、それぞれ別の起源を持つ可能性があることが示唆されており、日本国内のマツノザイセンチュウの種内の遺伝的な多様性が高いことが考えられる。日本においてマツノザイセンチュウは冷涼な地域である東北から亜熱帯気候である南西諸島までの幅広い環境条件下に分布する。また、野外条件下ではマツノザイセンチュウがそれぞれの地域の気候に適応し、それらが抵抗性マツの抵抗性に影響している可能性もある。本研究では九州から分離されたマツノザイセンチュウについてクロマツへの病原

力を検討したが、今後、日本中の様々な地域に分布するマツノザイセンチュウの病原力または遺伝的多様性について調査する必要がある。

表 2-1. 供試したマツノザイセンチュウのアイソレイト.

アイソレイト	採集場所	採集位置	分離年	分離源(宿主)
五月 3	福岡県宗像市	N33.853 E130.507	1997	クロマツ
唐津 1, 3, 4, 5, 11	佐賀県唐津市	N33.443 E130.007	1997	クロマツ
天草 3	熊本県苓北町	N32.477 E130.090	1997	クロマツ
玖珠 2	大分県玖珠町	N33.301 E131.158	1997	アカマツ
椎葉 2	宮崎県椎葉村	N32.315 E131.137	1998	アカマツ
宮崎 2	宮崎県宮崎市	N31.984 E131.480	1997	クロマツ
吹上 1, 4, 9, 15	鹿児島県南さつま市	N31.465 E130.305	1997	マツノマダラカミキリ
寺山 1, 2, 10	鹿児島県鹿児島市	N31.659 E130.605	1998-1999	ヤクタネゴヨウ
種子 1	鹿児島県西之表市	N30.630 E131.011	1997	ヤクタネゴヨウ
屋久 1	鹿児島県屋久島町	N30.3 E130.5	1996	ヤクタネゴヨウ
Ka4	茨城県笠間市	-	1994	アカマツ
S6-1	茨城県水戸市	-	1975	マツノマダラカミキリ
S10	島根県安来市	-*	1982	アカマツ
T4	岩手県一関市	-	1992	アカマツ
島原	長崎県島原市	-	1976 頃	アカマツ
C14-5	千葉県一宮町	-	1984	マツノマダラカミキリ

* -は採集位置の詳細が不明であることを示す

表 2-2. マツノザイセンチュウのアイソレイトを接種されたクロマツ家系の率の分散分析.

要因	自由度	平均平方	<i>F</i> 値	<i>P</i> 値
クロマツ家系	4	1.17	10.44	0.0029
線虫アイソレイト	25	1.62	45.42	< 0.0001
家系 × アイソレイト	100	0.04	1.05	0.3867

表 2-3. マツノザイセンチュウのアイソレイトを接種されたクロマツ家系の枯死率の分散分析.

要因	自由度	平均平方	<i>F</i> 値	<i>P</i> 値
クロマツ家系	4	1.32	9.32	0.0042
線虫アイソレイト	25	1.59	45.10	< 0.0001
家系 × アイソレイト	100	0.04	1.09	0.288

表 2-4. マツノザイセンチュウを接種された抵抗性クロマツ 5 家系の被害率.

アイソレイト	クロマツ家系の被害率 (%)									
	夜須 37		三崎 90		波方 73		波方 37		顚娃 425	
五月 3	80.6	abc *	63.9	abcde	77.8	abcd	72.2	ab	97.2	ab
唐津 1	33.3	cdef *	33.3	bcdef	11.6	ef	33.3	abcd	30.6	efgh
唐津 3	88.9	a	83.3	a	86.1	ab	86.1	a	100.0	a
唐津 4	75.0	abcde	69.4	ab	56.8	abcde	58.3	abc	77.8	abcde
唐津 5	58.3	abcde	44.4	bcdef	42.2	abcde	50.0	abc	55.6	cdefgh
唐津 11	88.9	abc	68.4	abcd	91.7	a	75.0	ab	86.1	abcd
天草 3	27.8	defg	8.3	fgh	27.8	cdef	16.7	cde	41.7	defgh
玖珠 2	47.2	abcdef	33.3	bcdef	38.9	abcdef	29.3	bcde	47.2	cdefgh
椎葉 2	86.1	abc	63.9	abcde	80.6	abcd	74.0	ab	88.9	abc
宮崎 2	9.1	fg	8.3	fgh	16.7	ef	5.6	de	11.9	hi
吹上 1	91.7	ab	69.4	abc	80.6	abc	41.7	abcd	80.6	abcde
吹上 4	80.6	abcd	69.4	abc	77.8	abcd	55.6	abc	86.1	abcd
吹上 9	75.0	abcde	27.8	bcdefg	63.9	abcde	30.6	bcde	69.4	abcdef
吹上 15	19.9	efg	36.1	bcdef	30.6	def	5.6	de	25.0	fghi
寺山 1	86.1	ab	65.4	abcde	75.0	abcd	58.3	abc	86.1	abcd
寺山 2	80.6	abcd	63.9	abcde	69.4	abcde	55.6	abc	66.7	bcdef
寺山 10	77.8	abcd	61.1	abcde	80.6	abcd	59.8	abc	80.3	abcde
種子 1	44.4	bcdef	24.0	cdefg	47.2	abcde	13.9	cde	61.1	cdefg
屋久 1	44.4	bcdef	41.7	bcdef	44.4	abcde	25.3	bcde	55.6	cdefgh
Ka4	83.1	abcd	55.6	abcde	62.9	abcde	50.0	abc	66.7	bcdef
S6-1	44.4	bcdef	23.0	defgh	33.3	bcdef	25.0	cde	69.4	bcdef
S10	75.0	abcde	60.4	abcde	63.9	abcde	41.7	abcd	83.1	abcd
T4	47.2	abcdef	27.8	bcdefg	42.4	abcde	11.1	cde	50.0	cdefgh
島原	72.2	abcde	22.2	efgh	74.2	abcd	41.7	abcd	55.6	cdefgh
C14-5	8.3	fg	2.8	gh	22.2	ef	0.0	e	11.1	hgi
対照	0.0	g	0.0	h	0.0	f	0.0	e	0.0	i

*クロマツ家系内で、同一のアルファベットのアイソレイト間では被害率に有意な差が認められないことを示す (Tukey-Kramer test; $p = 0.05$)。

表 2-5. マツノザイセンチュウを接種された抵抗性クロマツ 5 家系の枯死率.

アイソレイト	クロマツ家系の枯死率（％）										平均
	夜須 37		三崎 90		波方 73		波方 37		颯娃 425		
五月 3	77.8	abcde *	63.9	abc	77.8	abc	72.2	ab	97.2	ab	77.8
唐津 1	30.6	defgh	19.4	cdefg	11.6	ef	25.0	bcde	25.0	defg	22.3
唐津 3	88.9	a	77.8	a	86.1	a	83.3	a	100.0	a	87.2
唐津 4	75.0	abcdef	66.7	ab	51.0	abcde	52.8	abc	75.0	abcd	64.1
唐津 5	55.6	abcdef	41.7	abcde	36.6	abcdef	47.2	abc	52.8	cdef	46.8
唐津 11	86.1	abc	65.7	abc	86.1	a	72.2	ab	83.3	abc	78.7
天草 3	27.8	efgh	8.3	defg	25.0	bcdef	16.7	cde	41.7	cdef	23.9
玖珠 2	44.4	bcdefg	33.3	bcdef	38.9	abcdef	29.3	bcde	44.4	cdef	38.1
椎葉 2	86.1	abcd	58.3	abc	77.8	abcd	74.0	ab	86.1	abc	76.5
宮崎 2	9.1	gh	8.3	efg	16.7	ef	2.8	de	11.9	fg	9.7
吹上 1	91.7	abc	69.4	ab	80.6	a	41.7	abcd	80.6	abc	72.8
吹上 4	80.6	abcde	69.4	ab	77.8	ab	52.8	abc	86.1	abc	73.3
吹上 9	75.0	abcdef	25.0	bcdefg	63.9	abcde	30.6	abcde	69.4	abcd	52.8
吹上 15	19.9	fgh	36.1	bcde	30.6	cdef	2.8	de	25.0	defg	22.9
寺山 1	86.1	ab	62.6	abc	75.0	abcd	58.3	abc	86.1	abc	73.6
寺山 2	80.6	abcde	63.9	abc	66.7	abcde	55.6	abc	66.7	bcd	66.7
寺山 10	77.8	abcde	61.1	abc	80.6	a	59.8	abc	80.3	abc	71.9
種子 1	44.4	bcdefg	24.0	bcdefg	47.2	abcde	13.9	cde	61.1	cde	38.1
屋久 1	44.4	bcdefg	38.9	abcde	38.9	abcdef	22.5	bcde	55.6	cdef	40.1
Ka4	83.1	abcde	41.7	abcde	62.9	abcde	41.7	abcd	66.7	bcd	59.2
S6-1	41.7	cdefg	23.0	bcdefg	22.2	dfe	22.2	cde	63.9	bcd	34.6
S10	69.4	abcdef	49.2	abcd	61.1	abcde	36.1	abcd	83.1	abc	59.8
T4	44.4	bcdefg	25.0	bcdef	42.4	abcde	8.3	cde	47.2	cdef	33.5
島原	69.4	abcdef	19.4	cdefg	74.2	abcd	38.9	abcd	55.6	cdef	51.5
C14-5	8.3	gh	2.8	fg	19.4	ef	0.0	e	11.1	efg	8.3
対照	0.0	h	0.0	g	0.0	f	0.0	e	0.0	g	0.0

*クロマツ家系内で、同一のアルファベットのアイソレイト間では枯死率に有意な差が認められないことを示す (Tukey-Kramer test; $p = 0.05$)。

第3章 新たに材線虫病が侵入した地域におけるアカマツ林の被害動態とマツノザイセンチュウの病原力

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第4章 日本におけるマツノザイセンチュウの遺伝的多様性

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第5章 マツ材線虫病に対する絶滅危惧種ヤクタネゴヨウの保全

第5.1節 ヤクタネゴヨウ成木のマツ材線虫病に対する感受性

ヤクタネゴヨウ (*Pinus amamiana* Koidz.) は 鹿児島県の屋久島と種子島のみに自生する五葉松類の一種である (Koidzumi, 1924; 初島, 1938; Yahara *et al.*, 1987)。本種は Koidzumi (1924) により新種記載され、初島 (1938) により中国に分布するタカネゴヨウ (*P. arandii* Franch.) の変種として *P. arandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatus. とされたが、近年は独立種である *P. amamiana* として扱われている (Farjon, 2005; Katsuki and Farjon, 2013; Ohba, 2013)。生存個体数は屋久島で 2000 個体、種子島で 300 個体程度と推定されており (金谷ら, 2007)、近年の個体数の減少の傾向から日本版レッドデータブックにおいて絶滅危惧種 IB 類 (EN) に指定されている (環境省, 2017)。なお、絶滅危惧種 IB 類は「近い将来における野生での絶滅の危険性が高いもの」であり、絶滅を回避するためには何らかの保全対策が必要とされる。そのために、まずは個体数減少の原因を明らかにする必要がある (Primack, 1995)。これまで、ヤクタネゴヨウの個体数の減少の要因として、母樹や花粉親となる成木数の減少による近交弱勢 (林, 1988; 金指ら, 1988)、種子の発芽率の低下等の繁殖特性の劣化 (千吉良, 1995; 金谷ら, 1996, 1998)、そして、マツ材線虫病の被害 (林ら, 1984; 山本・明石, 1994) があげられている。

1990 年代に屋久島および種子島においてヤクタネゴヨウのモニタリング調査が行われた結果、両島ともにヤクタネゴヨウの減少傾向が明らかになった (山本・明石, 1994; Kanetani *et al.*, 2001)。さらに、自生地または植栽されたヤクタネゴヨウの衰弱木と枯死木からマツノザイセンチュウが分離され、枝にマツノマダラカミキリの後食痕が認められたことから、マツ材線虫病が個体数減少

の主要な原因となっている可能性が示唆された (Nakamura *et al.*, 2001)。しかし、本病以外の原因で衰弱または枯死したマツにマツノマダラカミキリの産卵時にマツノザイセンチュウが伝搬されることも考えられることから (Wingfield, 1983)、マツ材線虫病が枯死要因となるかについて明らかにするためには、ヤクタネゴヨウに対するマツノザイセンチュウの接種試験を行い、コッホの法則を満たす必要がある (Agrios, 1997)。

材線虫病に対するヤクタネゴヨウの感受性については、これまでにいくつかの研究例がある。寺下・松本 (1986) はヤクタネゴヨウの 3 年生苗木にマツノザイセンチュウの接種を行い、ヤクタネゴヨウが枯死することを示した。しかし、成木では抵抗性とされる樹種でも苗木ではマツノザイセンチュウの接種により枯死することが知られていることから (Bedker *et al.*, 1987)、苗木の試験のみではヤクタネゴヨウが感受性であるかどうか判定できない。戸田ら (2001) は苗畑で植栽されたヤクタネゴヨウ (3~25 年生) に接種試験を行ったところ、胸高直径 3cm 以下の個体は接種後 10 週目で高い枯死率を示すのに対し、25 年生の個体は接種後 4 ヶ月目でも枯死しないことを示した。しかし、戸田らの試験では線虫の接種頭数と接種回数が一定ではなく、成木 (25 年生) の供試数も 2 個体と少ない。また、アカマツやクロマツでは線虫感染の翌年に枯死する現象 (いわゆる年越し枯れ) が知られているが (陣野ら, 1987)、接種後 4 ヶ月しか観察を行っておらず、この結果のみからヤクタネゴヨウの感受性の程度を評価することは困難である。

ヤクタネゴヨウは個体数が少ないことから、試験に利用できるような成木は少ないが、幸運にも森林総合研究所九州支所実験林にヤクタネゴヨウが植栽されていた。そこで、材線虫病に対するヤクタネゴヨウの感受性の程度を把握することを目的に、ヤクタネゴヨウの成木に対してマツノザイセンチュウの接種試験を行った。

なお、第 5.1 節の内容は、Akiba and Nakamura (2005)として報告した。

5.1.1 材料および方法

森林総合研究所九州支所に植栽された 20 年生のヤクタネゴヨウ成木 10 本と 10 年生のクロマツ成木 5 本を供試した。ヤクタネゴヨウは鹿児島県鹿児島市の磯庭園に植栽された個体から採集された種子由来であり、実験林の南西方向の傾斜 16° の斜面に 2 m 間隔で植栽されており、平均樹高が 9.0 m、平均胸高直径が 20.2 cm であった (図 5-1)。また、クロマツは苗畑に植栽され、平均樹高が 5.4 m、平均胸高直径が 7.5 cm であった。ヤクタネゴヨウとクロマツの植栽地の距離は約 300 m であった。

マツノザイセンチュウの強病原力アイソレイト S10 を第 2 章と同様の方法で培養し、200 頭/ 0.1 ml または 20,000 頭/ 0.1 ml の密度に調整して接種源に用いた。接種は 1998 年 7 月 16 日に行った。10 本のヤクタネゴヨウのうち、任意の 4 本ずつに 1,000 頭 (低密度区) また 100,000 頭 (高密度区) の線虫を接種した。1 本の個体に対して樹冠部に達する枝を 5 本任意に選び、枝の 1 年生の部分に第 2 章と同様な方法で傷をつけ、低密度区では枝 1 本につき 200 頭/ 0.1 ml、高密度区では 20,000 頭/ 0.1 ml の線虫懸濁液を 0.1 ml 接種した。対照として、2 本のヤクタネゴヨウに対して同量の殺菌水を接種した。また、ヤクタネゴヨウの感受性の程度を比較するため、5 本のクロマツに対して低密度区 (クロマツ 1 本あたり 1,000 頭) と同様に接種した。

接種された個体について定期的に観察し、変色した針葉の割合と樹幹の樹脂滲出能を記録した。樹脂滲出能は小田 (1967) の方法を参考とし、調査時に樹幹部に直径 5 mm のコルクボーラーで木部に達する傷をつけ、次回の調査時に傷からの樹脂の滲出の程度を記録した。調査は接種 1 週間前 (7 月 9 日) から 9 月

24 日までは 1 週間毎、その後 12 月 3 日までは 2 週間ごとに行い、さらに翌年の 3 月まで 1 カ月毎に行った。全ての針葉が赤褐色に変色した場合、その個体が枯死したものと判断した。

接種後 16 週目の 11 月 5 日に樹幹を観察し、マツノマダラカミキリの幼虫の生息状況を調査した。また、接種翌年の 1 月 6 日に供試木の樹幹からハンドドリル（直径 15 mm 長さ 130 mm のドリルビット）を用いて材片を採集し、ベールマン法により室温（20～25℃）、24 時間の条件で線虫を抽出した。

5.1.2 結果

本試験では、線虫を接種された個体の全てが接種後 33 週目（接種翌年 3 月）までに枯死した（図 5-2）。10 万頭を接種されたヤクタネゴヨウの 1 個体では、接種後 2 週目に 5 本の接種枝の中の 1 本の針葉が下垂しているのが認められた。これが最も早く認められた病徴であった（図 5-3）。

高密度接種区のヤクタネゴヨウでは、接種後 2～3 週目に接種枝の針葉の下垂と変色が始まり、そのうち 3 個体は接種後 5～6 週目に樹幹部の樹脂滲出が停止した。それらの個体は樹脂滲出の停止の 1 週後に全体の旧葉の変色が始まり、接種後 8～12 週目に全ての針葉が褐変して枯死したと判断された。1 個体については樹脂滲出の停止時期が上述の 3 個体よりも遅れ（接種後 10 週目）、最終的に接種後 29 週目（翌年 2 月）に枯死した。

低密度接種区のヤクタネゴヨウでは、接種後 5 週目までは病徴の発現は認められず、接種後 6 週目になって初めて 1 個体の接種枝の針葉の下垂が認められた。この個体は接種後 12 週目に枯死した。その他の個体は接種後 8 週目以降に針葉の変色が始まり、うち 2 個体では接種枝の針葉の変色と全体の針葉の変色が同時に始まった。これらは、接種後 20～33 週目に枯死した。そのうち 2 個体に

については、接種の翌年に枯死する「年越し枯れ」となった。高密度接種区と比較し、低密度接種区では病徴の進展が遅れる傾向が認められた。しかし、両区の間には、線虫接種から枯死までの時間について有意な差は認められなかった (Mann-Whitney U -test, $U = 3.5$, $P = 0.194$)。対照区の水のみを接種されたヤクタネゴヨウでは、期間を通じて針葉の変色または樹脂滲出の停止といった病徴は認められなかった。

ヤクタネゴヨウ低密度区と同じ頭数の 1000 頭の線虫を接種されたクロマツでは、接種後 3 週目に樹幹部の樹脂滲出が停止し、接種後 4~5 週目に全体の針葉の変色が始まった。ヤクタネゴヨウのように接種枝の変色が先行することにはなかった。接種後 6 週目に全個体が枯死した。ヤクタネゴヨウの低密度接種区と比較すると、クロマツの方が枯死までの時間が有意に短かった (Mann-Whitney U -test, $U = 0.0$, $P = 0.007$)。

ヤクタネゴヨウの高密度区と低密度区のそれぞれについて、個体の胸高直径と枯死までの時間との間に相関は認められなかった (Spearman の順位相関, 高密度接種区 $P = 0.600$, 低密度接種区 $P = 0.800$)。一方、クロマツでは、胸高直径に関わらず全個体が接種後 6 週目に枯死した (図 5-4)。

接種後 16 週目に全個体の樹幹を観察したところ、接種 7 週目 (9 月 3 日) までに樹幹の樹脂滲出が停止して接種後 12 週目までに枯死したヤクタネゴヨウ 4 個体 (高密度区 3 個体と低密度区 1 個体) とクロマツ 4 個体の樹幹からフラスが排出されていることが認められ、これらにマツノマダラカミキリの幼虫が生息していることが確認された (図 5-2)。それら以外の個体については、試験終了時の翌年 3 月までマツノマダラカミキリの幼虫の生息は確認されなかった。

接種翌年 (1 月 6 日) に線虫を接種されたヤクタネゴヨウとクロマツから線虫を分離したところ、全個体からマツノザイセンチュウが再分離された。

5.1.3 考察

マツ材線虫病は屋久島と種子島におけるヤクタネゴヨウの近年の個体数減少の原因の一つと考えられてきた（林ら, 1984; 山本・明石, 1994; Nakamura *et al.*, 2001）。寺下・松本（1986）はマツノザイセンチュウの接種によりヤクタネゴヨウの3年生苗が枯死することを示した。また、戸田ら（2001）は接種試験により直径3cm以下の小径木が枯死することを示した。しかし、これらの結果は必ずしも野外に生育する成木に対してもそのまま当てはまるわけではない。例えば、北米に生育するレジノーサマツでは、接種試験で苗木は枯死するが、成木はマツノザイセンチュウに対して抵抗性であることが報告されている（Wingfield *et al.*, 1986; Bedker *et al.*, 1987）。本試験では、野外に生育するヤクタネゴヨウの20年生成木に対してマツノザイセンチュウを接種したところ、低密度接種区が高密度接種区よりも病徴進展の早さは遅いものの、最終的には接種された個体全てが接種後33週目までに枯死した（図5-2）。マツノザイセンチュウを10,000頭以上保持しているマツノマダラカミキリは、マツ1本当たり最大で750頭の線虫を伝搬することが知られている（Togashi, 1985）。さらに、接種された全ての線虫が樹体内に侵入するわけではないことから、本試験の低密度区での接種頭数（1,000頭）は野外でも十分おこりうる状況を反映しているといえる。枯死したヤクタネゴヨウからマツノザイセンチュウが再分離されてコッホの原則を満たしたことにより、本試験の結果からヤクタネゴヨウは材線虫病に対して感受性であり、自生地でもマツノマダラカミキリによって伝搬されたマツノザイセンチュウの感染により枯死している可能性が高いといえる。

材線虫病に対する感受性の程度はマツ属の種間で大きな差があり、その中でもクロマツは特に感受性が高い（抵抗性が弱い）種の一つである（Bedker *et al.*, 1987; 清原・徳重, 1971; 二井・古野, 1979; Yang and Wang, 1989）。本試験で

は、ヤクタネゴヨウとクロマツを比較した場合、ヤクタネゴヨウがクロマツよりも病徴進展が遅く、最終的に全個体が枯死したものの枯死までに長い時間を要した。クロマツの供試個体の方がヤクタネゴヨウより胸高直径が小さかったことが結果に影響した可能性も考えられたが、ヤクタネゴヨウとクロマツの種内では胸高直径と枯死までの日数の間に相関は認められなかった。このことから、個体のサイズの違いは病徴進展の早さにそれほど大きな影響を与えていなかったと考えられた。

線虫を接種されたクロマツでは樹幹の樹脂滲出の停止が最初の病徴であった。一方、ヤクタネゴヨウでは接種部位より先端の枝の針葉の変色が最初に認められ、その後に樹幹部の樹脂滲出の停止と全身的な針葉の変色が続いた。ストローブマツやレジノーサマツなどの抵抗性の樹種の成木にマツノザイセンチュウを接種した場合、個体としては枯死しないが、本試験のヤクタネゴヨウで見られたのと同様に接種部位より先端の枝が枯死することが報告されている(二井・古野, 1979; Bedker *et al.*, 1987)。このことは、ヤクタネゴヨウがクロマツよりも材線虫病に対して抵抗性を持つことを示唆しているのかもしれない。また、自生地では、部分的に枝が枯死するという病徴が表れてから枯死するまで2年以上かかるということがしばしば観察されている(金谷整一, 私信)。以上のことから、ヤクタネゴヨウは材線虫病には感受性であるが、クロマツよりは抵抗性を持つと考えられる。

本試験では、接種後7週目(9月3日)までに樹幹部の樹脂滲出が停止したヤクタネゴヨウまたはクロマツにマツノマダラカミキリ幼虫の生息が認められたが、それ以降に樹脂滲出が停止したマツにはマツノマダラカミキリの幼虫の生息は確認できなかった。マツノマダラカミキリの産卵期間は6月から10月頃であり、九州での産卵の最盛期は7月頃であるが(岩崎・森本, 1973; 岩崎ら, 1978)、野外では9月を過ぎると産卵数が少なくなることが報告されている(岸, 1977)。

そのことから、9月中旬以降に全身的な発病（樹幹部の樹脂滲出の停止）が認められたマツにはマツノマダラカミキリが産卵する確率が低いことが考えられる。

ヤクタネゴヨウが材線虫病に対して少しでも抵抗性を持つならば、自生地においても、発病時期が遅れるヤクタネゴヨウ個体が多くなることが考えられる。そのような枯死木はマツノマダラカミキリの産卵対象にならず、次年度の材線虫病の感染源にならないことから、ヤクタネゴヨウのみの集団では材線虫病の流行を維持するほどマツノマダラカミキリの密度が高くないのかもしれない。クロマツは発病時期が早く、マツノマダラカミキリの産卵対象になる枯死木も多いことから、ヤクタネゴヨウへの感染源として、クロマツの存在が重要であると考えられる。屋久島ではクロマツとヤクタネゴヨウの分布は一部重っているが、クロマツは主に標高の低い海岸に分布し、ヤクタネゴヨウはより標高の高い山地に分布する（金谷ら、1997）。屋久島では、1997年以降クロマツの枯死被害は続いているにもかかわらず、ヤクタネゴヨウの枯死被害は認められていない。これに対して、クロマツとヤクタネゴヨウが近接して分布する種子島では、両種とも枯死被害が継続している。種子島では、材線虫病によって枯死したクロマツの個体数が増加して感染源の密度が高まり、それらから脱出したマツノマダラカミキリを通してマツノザイセンチュウが近傍のヤクタネゴヨウに感染し、近年のヤクタネゴヨウの個体数減少を引き起こしていると考えられる。ヤクタネゴヨウの保全のためにはヤクタネゴヨウだけを防除するのではなく、周辺に位置するクロマツ林を激害化させないことが重要であると考えられた。

第 5.2 節 ヤクタネゴヨウからのマツノマダラカミキリ成虫の脱出とマツノザイセンチュウ保持状況

前節の接種試験によって枯死したヤクタネゴヨウの一部に、マツノマダラカミキリの産卵痕と幼虫が排出したフラスが確認された。ヤクタネゴヨウの自生地である屋久島と種子島では、ヤクタネゴヨウの枯死木にマツノマダラカミキリ幼虫の穿孔は確認されておらず、ヤクタネゴヨウ枯死木が感染源として重要であるかどうかは明らかにされていなかった。また、ヤクタネゴヨウがマツノマダラカミキリ幼虫の寄主植物(食樹)であるという記録はない(大林・新里, 2007)。そこで、マツノマダラカミキリの産卵痕のあるヤクタネゴヨウを屋内網室に入れ、成虫の脱出時期とマツノザイセンチュウ保持数を調査した。

なお、第 5.2 節の内容は、秋庭ら (2000)として報告した。

5.2.1 材料および方法

1998 年 7 月 16 日にマツノザイセンチュウを接種されて枯死したヤクタネゴヨウ (20 年生) の中でマツノマダラカミキリ幼虫の生息が確認された枯死木のうち、3 本の枯死木を 1999 年 4 月 26 日に地際部で伐倒し、約 1m の長さで玉切りにした。これらの丸太を森林総合研究所九州支所内の屋内網室に搬入し、壁に立て掛けた。その後 5 月から 8 月まで毎日網室内を観察し、脱出したマツノマダラカミキリ成虫の頭数、性、体長(触角を除く頭部から尾端までの長さ)を記録した。脱出したカミキリは少量の水を入れた乳鉢に入れ、鋏で切断後乳棒を使い原形をとどめない程度にすりつぶし、それらからベールマン法により室温 (20~30℃) で 48 時間、線虫類を抽出した。抽出された線虫を光学顕微鏡下で観察し、マツノザイセンチュウの耐久型幼虫 (Kanzaki *et al.*, 2016) の同定を行った。

ヤクタネゴヨウ枯死木内にマツノザイセンチュウが生存していることを確認するため、1998 年の 11 月と 1999 年の 4 月に上記枯死木の樹幹より前節と同様な方法で材片を採集し、ベールマン法による線虫の抽出を行った。

5.2.2 結果

調査期間を通じ、ヤクタネゴヨウ丸太からオス 68 頭、メス 45 頭の合計 113 頭のマツノマダラカミキリの成虫が脱出した（表 5-1、図 5-5）。オス成虫の脱出初日は 6 月 1 日、50%脱出日は 6 月 17 日であり、7 月 21 日に脱出を終了した。また、メス成虫の脱出初日は 6 月 3 日、50%脱出日は 6 月 22 日であり、7 月 13 日に脱出を終了した。オス成虫とメス成虫を合わせると 50%脱出日は 6 月 17 日であり、脱出のピークは脱出期間の前半にあった。

オス成虫の体長（平均 \pm SD）は $25.1 \text{ mm} \pm 2.6 \text{ mm}$ 、メス成虫の体長は $25.7 \text{ mm} \pm 2.2 \text{ mm}$ であった（表 5-1）。また、脱出した成虫全体の 7.1%からマツノザイセンチュウが分離され、最高保持数は 103 頭であった。なお、1998 年 11 月と翌年 4 月に全てのヤクタネゴヨウ個体から採集された材片からマツノザイセンチュウが検出された。このことから、この時点で枯死木内にマツノザイセンチュウが生存していたことが確認された。

5.2.3 考察

アカマツとクロマツからのマツノマダラカミキリの脱出消長についてはこれまでに数多く報告されている。九州における脱出初日は 5 月上～中旬、50%脱出日は 6 月中旬頃である（岸, 1988）。本研究におけるヤクタネゴヨウからのマツノマダラカミキリの 50%脱出日はアカマツ・クロマツからのそれとほぼ同様で

あることから、マツノマダラカミキリの脱出消長に樹種の違いは影響しないと考えられた。なお、ヤクタネゴヨウにマツノマダラカミキリが産卵して翌年に脱出したことを観察したのは本報告が初めてであり、ヤクタネゴヨウはマツノマダラカミキリ幼虫の寄主植物となることが明らかになった。

線虫を保持するマツノマダラカミキリ成虫の割合（保持率）は 7.1%と低かった。これまでに 1 頭のマツノマダラカミキリが 10 万頭以上のマツノザイセンチュウを保持していることが報告されているが（岸, 1988）、今回の最高保持頭数は 103 頭と非常に少なかった。材の含水率が低くなるとマツノマダラカミキリのマツノザイセンチュウ保持頭数が少なくなることが知られている（Togashi, 1989）。本研究では供試丸太を雨があたらない屋内網室の中に設置し、期間中は灌水を行わなかったため、供試丸太の含水率が低くなっていた可能性がある。一方、アカマツ・クロマツと比べて、ヤクタネゴヨウでは材の構造や化学成分などの樹種特異的な要因により樹体内のマツノザイセンチュウ密度が低くなり、マツノザイセンチュウがマツノマダラカミキリによって持ち出されにくいことも考えられる。しかし、ヤクタネゴヨウの樹体内のマツノザイセンチュウの分布等については明らかにされていない。線虫保持頭数の少なさが含水率の影響か、それともヤクタネゴヨウという樹種の影響によるのかを明らかにするには、さらに調査数を増やして検証する必要がある。

本研究により、ヤクタネゴヨウ枯死木に産卵されたマツノマダラカミキリはクロマツやアカマツに産卵された場合と同様に正常に発育して羽化脱出すること、脱出したマツノマダラカミキリ成虫はマツノザイセンチュウを保持し得ることが明らかになった。なお、本研究で産卵が認められたヤクタネゴヨウは 9 月上旬までに樹幹部の樹脂滲出が停止した個体であり、木が衰弱・枯死する時期とマツノマダラカミキリの産卵時期が合致したと考えられる。このように、自生地である屋久島と種子島においても、クロマツと同様の時期に枯死したヤクタネ

ゴヨウはマツノマダラカミキリの産卵対象木になると考えられる。本研究では脱出成虫のマツノザイセンチュウ保持率・保持数がともに少なかったが、野外で材の含水率が大幅に低下しない場合には保持線虫数が多くなる可能性がある。その場合、自生地で枯死したヤクタネゴヨウが感染源となる可能性がある。これらのことを考慮すると、野外で枯死したヤクタネゴヨウについても伐倒・薫蒸などの駆除処理を実施することが望ましいといえる。

表 5-1. ヤクタネゴヨウから脱出したマツノマダラカミキリ成虫の体長、体重およびマツノザイセンチュウ保持状況.

	脱出数 (頭)	体長 (mm)*	体重 (mg)*	マツノザイセンチュウ保持状況	
				保持率 (%)	平均保持数 (頭)†
オス	68	25.1 (19-30)	446.4 (59-1020)	5.9	38.0 (8-103)
メス	45	25.7 (21-29)	478.9 (106-804)	8.9	4.0 (1-10)
全体	113	25.3 (19-30)	459.3 (59-1020)	7.1	18.0 (1-103)

*: 括弧内は体長また体重の最小値と最大値を示す。

†: マツノザイセンチュウを保持していた個体の保持数の平均。括弧内は保持数の最小値と最大値を示す。



図 5-1. マツノザイセンチュウを接種されたヤクタネゴヨウの接種後10週目の病徴.
右側の健全木は対照(水接種)である。

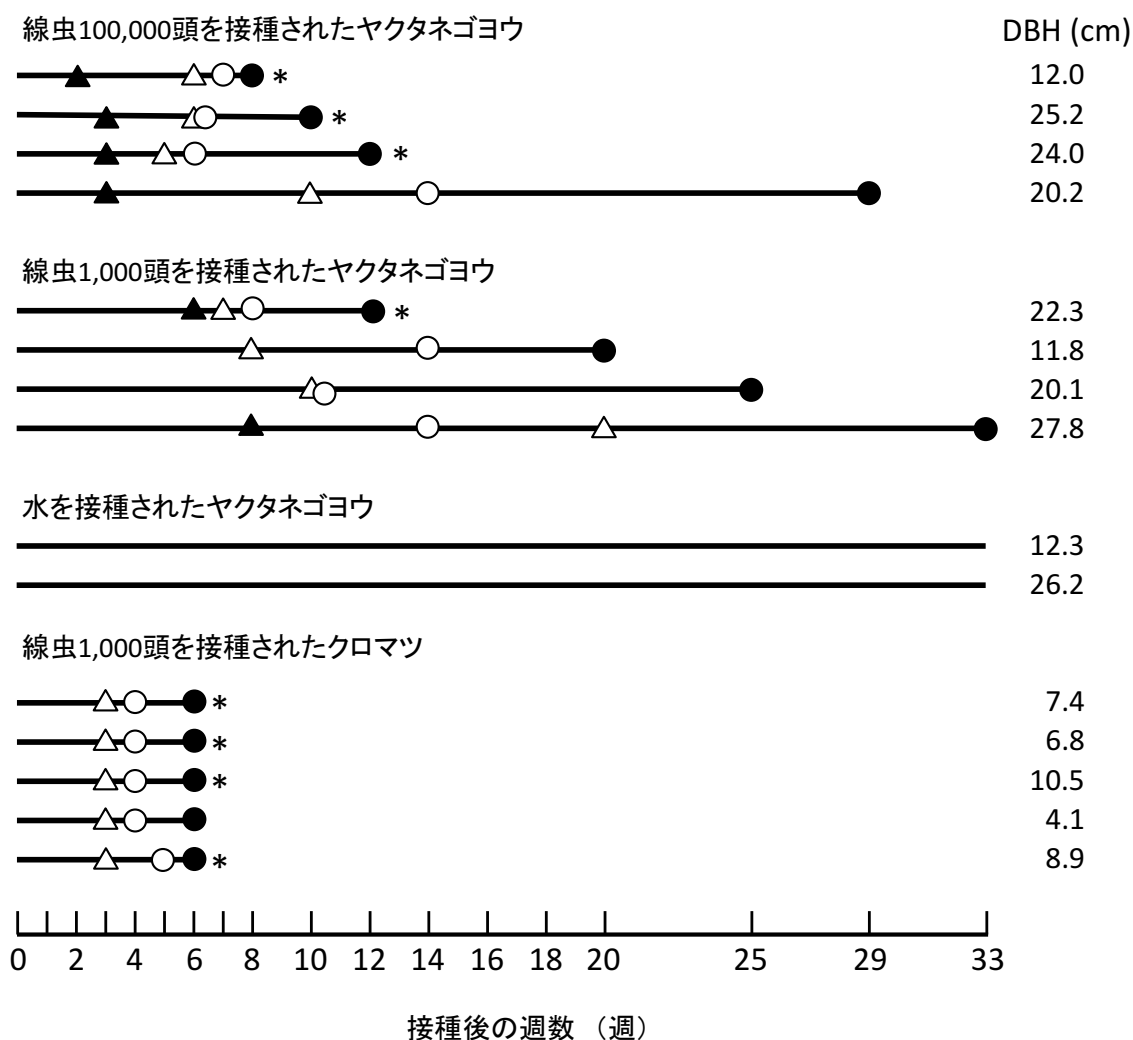


図 5-2. マツノザイセンチュウを接種されたヤクタネゴヨウおよびクロマツの病徴進展。横棒はマツ個体を示す。
 △は樹脂滲出能の停止、▲は接種枝の針葉の変色の開始、○は接種枝以外の針葉の変色の開始、●は全ての針葉が褐変(=枯死)を示す。*は接種後16週目に樹幹にマツノマダラカミキリ幼虫の生息が認められたことを示す。水を接種されたヤクタネゴヨウでは試験期間中に病徴の進展は認められなかった。



図 5-3. マツノザイセンチュウを接種されたヤクタネゴヨウにおいて最初に認められた病徴. 接種された枝の接種部分(矢印)より先の部分が枯死した。

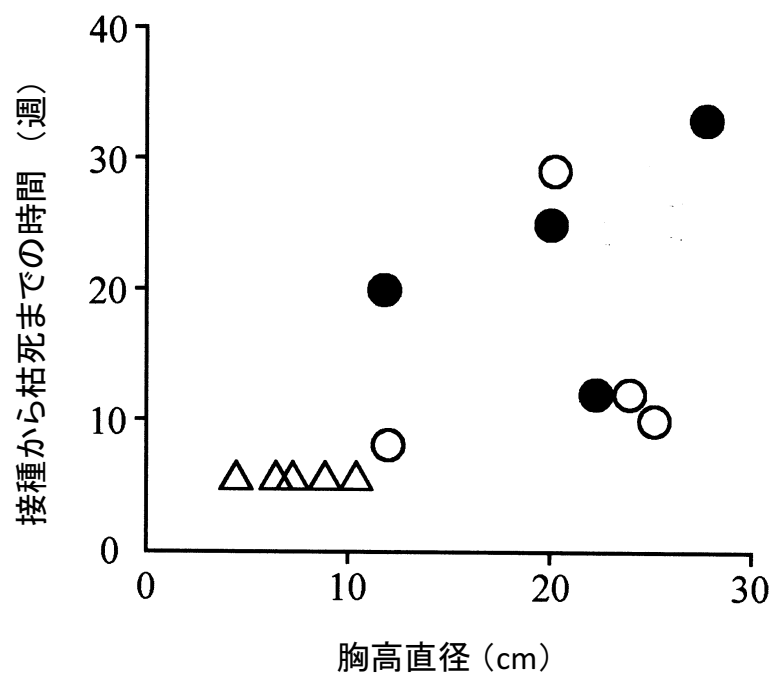


図 5-4. マツノザイセンチュウを接種されたヤクタネゴヨウおよびクロマツの大きさ (胸高直径) と枯死までの時間との関係.

●は1,000頭の、○は100,000頭のマツノザイセンチュウを接種されたヤクタネゴヨウ、△は1,000頭のマツノザイセンチュウを接種されたクロマツの各個体を示す。

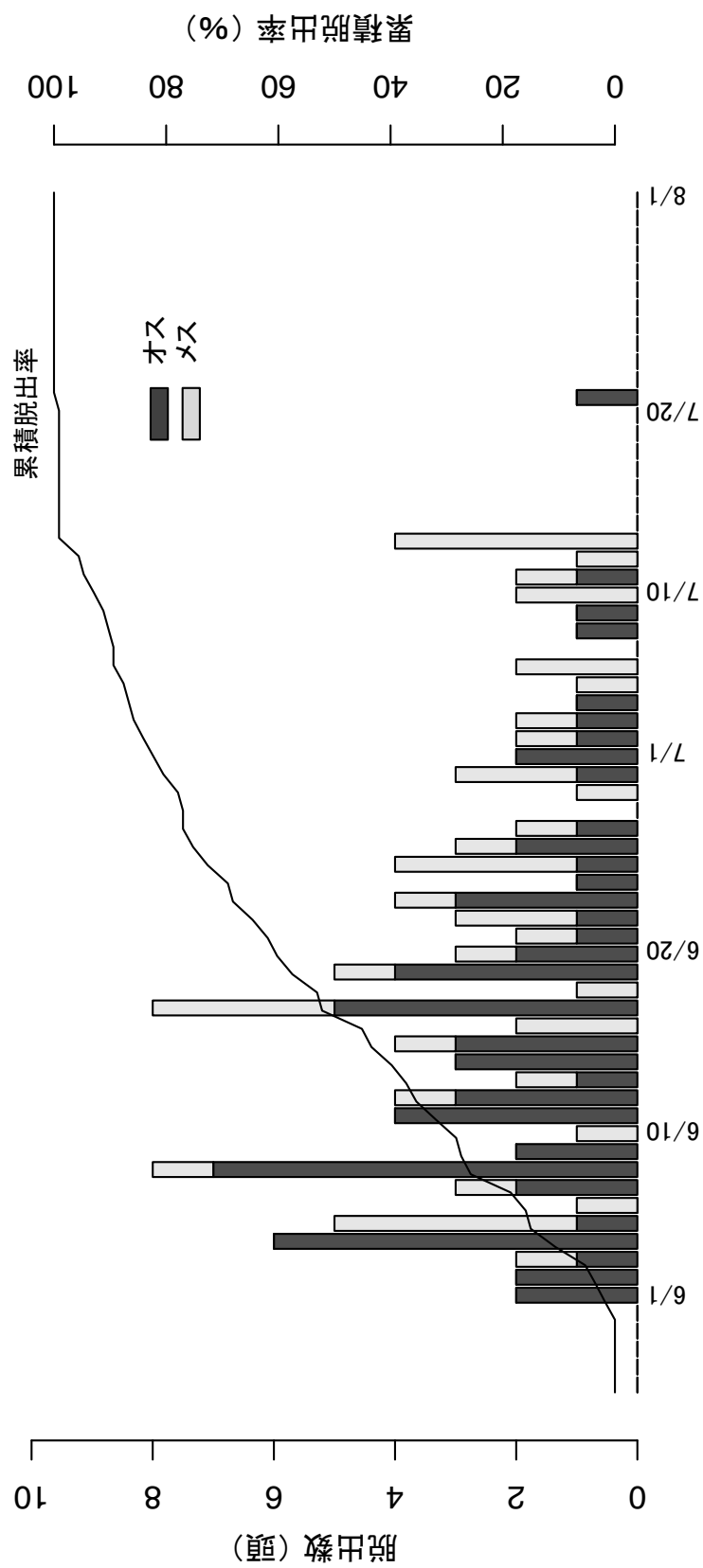


図 5-5. 屋内網室に設置されたヤクタネゴヨウ丸太からのマツノマダラカミギリ成虫の脱出消長.

第6章 総合考察

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

要旨

マツ材線虫病は北米原産のマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle) を病原体とするマツ類の伝染病であり、ヒガナガカミキリ属 (*Monochamus*) の成虫によって伝搬される。マツノザイセンチュウは 20 世紀初頭に日本に侵入し、現在でもマツ林に激しい被害を引き起こしている。本病は日本以外に中国、台湾、韓国、ポルトガルおよびスペインに侵入し、世界的に重要な病害となっている。

原産地の北米では、マツノザイセンチュウの種内に形態的に異なる系統が存在し、これらに病原性の分化が生じている可能性がある。日本に本病が侵入して 100 年以上経つが、その間に、原産地から複数回の侵入があった可能性があるが、現在どのような性質のマツノザイセンチュウが日本国内に存在しているかは明らかにされていない。また、絶滅危惧種であるヤクタネゴヨウの自生地で本種の枯死被害が顕在化し、保全対策の構築のために枯死原因の特定が求められた。そこで、本論文では、日本に存在するマツノザイセンチュウの病原性および病原力の現状を把握するとともに、ヤクタネゴヨウの保全のための知見を得ることを目的とした。

第 2 章では、九州各地のマツ林で枯死したマツまたはマツノマダラカミキリから確立されたマツノザイセンチュウのアイソレイトを抵抗性グレードの異なる抵抗性クロマツ 5 家系の苗木に対して接種し、その病原力を調べた。その結果、マツの枯死率に関して、マツノザイセンチュウのアイソレイト間と抵抗性マツの家系間で有意な差が認められたのに対し、線虫アイソレイトとクロマツ家系の間に交互作用は認められなかった。マツノザイセンチュウの種内にクロマツ家系に対する病原性の分化が認められないことを意味することから、マツノザイセンチュウの 1 つのアイソレイトを用いた従来の抵抗生育種の方法が妥当

であることを示した。また、抵抗性育種の検定用として使用されているアイソレイト「島原」の病原力は、強病原力アイソレイトとして知られる **Ka4** などの病原力と同等であった。一方で、新しく確立されたマツノザイセンチュウの中に「島原」よりも強い病原力を持つアイソレイトが存在した。そのことから、島原以上の病原力を持つアイソレイトを用いた育種の必要性について指摘した。

第 3 章では、宮崎県椎葉村の新たに材線虫病が侵入したアカマツ林（標高約 600 m）に試験地を設定し、マツ林の被害動態と林内の枯死木から分離され確立されたマツノザイセンチュウのアイソレイトの病原力を調べた。調査当初は多数の枯死木が発生したが、徐々に枯死数が減少した。抵抗性クロマツに対する接種試験により、林内の枯死木から確立されたマツノザイセンチュウは全て強病原力であることが明らかになった。強病力のマツノザイセンチュウが存在しても被害が激害化しなかったことから、マツノザイセンチュウの病原力は被害動態に影響せず、マツの密度または温度などの要因が影響していることが示唆された。また、初めて材線虫病が発生するマツ林では強病原力のマツノザイセンチュウが優占する可能性が考えられた。

第 4 章では、日本全国のマツノザイセンチュウの遺伝的多様性を調査することを目的に、マツ枯死木から確立されたマツノザイセンチュウの 223 アイソレイトのリボゾーム遺伝子の ITS 領域とミトコンドリアのシトクローム c オキシダーゼサブユニット I 遺伝子 (COI) の DNA 配列からハプロタイプを決定した。その結果、ITS で 6 つ、COI で 13 のハプロタイプが見つかった。ITS については、ハプロタイプ R1 と R2 で全体の 85% を占めた。COI については、全体で 4 つのグループにわけられた。異なるグループのハプロタイプはそれぞれ異なる原産地に由来すると考えられることから、これまでに複数回の侵入イベントがあった可能性が示唆された。ITS ではマツノザイセンチュウ侵入後の期間が長い近畿と九州の塩基多様度が高く、1970 年代以降にマツノザイセンチュウが侵

入した東北と北陸の塩基多様度が低かった。また、東北と北陸などの東日本でハプロタイプ数が少なく、東日本に存在するハプロタイプは西日本にも存在した。ITS と COI の対応関係には決まったパターンは認められず、それぞれの ITS と COI のハプロタイプの頻度に応じて組み合わせが出来る傾向があった。それらのことから、これまで西日本に複数回のマツノザイセンチュウが侵入し、それらが交配し、その一部が東日本に拡大したことが推察された。国外の公共データベースに登録されているアイソレイトとの系統解析の結果、中国、韓国およびポルトガルのアイソレイトの中で一つのアイソレイトから ITS と COI の両方の配列がわかっている例では全てハプロタイプ R2 と C1a または C1d の組み合わせであった。日本のアイソレイトの 1/4 が同じ組み合わせであることから、海外に侵入したマツノザイセンチュウの起源が日本由来である可能性が示唆された。また、日本のアイソレイトについてマイクロサテライトマーカーによる解析を実施して Structure 解析を行ったところ、クラスター数 $K=3$ が示唆された。東北から北陸にかけての東日本のアイソレイトが 2 つのクラスターから構成される傾向であるのに対し、近畿以西の西日本ではそれらに加えてもう一つのクラスターが混ざっていた。そのことから、ハプロタイプの結果と同様に、西日本から東日本にマツノザイセンチュウが拡大したことが示唆された。

第 5 章では、ヤクタネゴヨウの材線虫病に対する感受性の程度を把握するために、ヤクタネゴヨウ成木に対して 10 万頭または 1000 頭のマツノザイセンチュウを接種した。10 万頭を接種されたヤクタネゴヨウでは、接種後 2 週目に最初の病徴が認められ、接種後 29 週目までに全てが枯死した。1000 頭を接種されたヤクタネゴヨウでは、10 万頭を接種された場合よりも病徴進展が遅れる傾向があったが、最終的には接種後 33 週目までに全てが枯死した。比較のために 1000 頭のマツノザイセンチュウを接種されたクロマツは、接種後 6 週目までに全て枯死した。ヤクタネゴヨウの最初の病徴は、線虫を接種された枝の枯死であ

り、これはマツノザイセンチュウを接種された抵抗性樹種に見られる反応と同一であった。これらのことから、ヤクタネゴヨウは材線虫病に感受性であるが、クロマツよりも抵抗性を持つことが示唆された。次に、接種試験により発生したマツノマダラカミキリが産卵しているヤクタネゴヨウの丸太を屋内網室に設置し、マツノマダラカミキリの脱出消長とマツノザイセンチュウ保持数を調査した。6月から7月にかけて、オス 68 頭、メス 45 頭の合計 113 頭のマツノマダラカミキリ成虫が脱出した。成虫全体の 7.1%がマツノザイセンチュウを保持しており、最高保持数は 103 頭であった。ヤクタネゴヨウがマツノザイセンチュウの感染によって枯死すること、枯死木がマツノマダラカミキリの産卵対象木となり枯死木から脱出したマツノマダラカミキリ成虫がマツノザイセンチュウを保持することが明らかになったことから、自生地で枯死したヤクタネゴヨウの防除の必要性を指摘した。

第 6 章では、第 2 章から第 5 章までに得られた情報をもとに、日本のマツノザイセンチュウの病原力と遺伝的多様性について考察した。また、ヤクタネゴヨウの保全について言及した。さらに、冷涼な地域では材線虫病防除の強度を下げる可能性があるが、そのためには新たなモデルの構築とさらなる被害動態のデータの取得が必要であることを指摘した。

謝辞

東京大学大学院農学生命科学研究科の富樫一巳教授には、本論文の構成ならびに内容についてご指導いただきました。本論文の主査をしていただくことを快くお引き受けいただきましたことについて、厚くお礼申し上げます。東京大学大学院農学生命科学研究科の福田健二教授、久保田耕平准教授、松下範久准教授、東京大学アジア生物資源環境研究センターの練春蘭准教授には、本論文の内容についてご助言を賜りました。

本研究を遂行するにあたり、多くの方々のご協力をいただきました。元林木育種センター九州育種場の戸田忠雄博士、関西育種場四国保存園増殖園の岡村正則氏、林木育種センターの大平峰子博士には、九州育種場の圃場を使用する許可をいただき、抵抗性マツについて詳細な情報をご教示いただきました。接種試験をするにあたり、森林総合研究所九州育種場と九州支所の職員の皆様には多大なご協力をいただきました。宮崎県椎葉村の黒木紀氏にはアカマツ林を試験地として使用させていただきました。元宮崎県森林技術センターの讃井孝義博士、森林総合研究所の大丸裕士博士と小川泰浩博士、鳥取大学地域学部の永松大博士には試験地の設定にご協力いただきました。森林総合研究所九州支所の金谷整一博士には、ヤクタネゴヨウの有益な情報をいただきました。森林総合研究所の佐橋憲生博士、同北海道支所の石原誠博士、同東北支所の中村克典博士には、各種の調査に同行していただいたほか、論文執筆にあたり多くの貴重なご意見をいただきました。森林総合研究所の下田典子氏、松本敦子氏、赤坂阿海氏と同九州支所の福島洋子氏には線虫のアイソレイトの管理と DNA 実験にご助力いただきました。また、各都府県の研究機関の皆様には線虫分離のためのマツ材片を送付していただきました。

以上の方々に、深く感謝いたします。

引用文献

- Abelleira, A., Picoaga, A., Mansilla, J. P. and Aguin, O. (2011) Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. *Plant Disease* 95: 776.
- Agrios, G. N. (1997) *Plant pathology*, 4th edn. Academic Press, San Diego.
- Aguayo, J., Adams, G. C., Halkett, F., Catal, M., Husson, C., Nagy, Z. Á., Hansen, E. M., Marcais, B and Frey P. (2013) Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis*. *Phytopathology* 103: 190–199.
- Aikawa, T. and Kikuchi, T. (2007) Estimation of virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) based on its reproductive ability. *Nematology* 9: 371–377.
- Aikawa, T., Kanzaki, N. and Maehara, N. (2013) ITS-RFLP pattern of *Bursaphelenchus xylophilus* does not reflect nematode virulence. *Journal of Forest Research* 18: 384–388.
- 秋庭満輝 (2006) マツノザイセンチュウの病原性と病原力の多様性. 日本森林学会誌 88: 383–391.
- 秋庭満輝・中村克典・石原 誠 (2000) ヤクタネゴヨウ枯損丸太からのマツノマダラカミキリの羽化脱出とマツノザイセンチュウ保持状況. 日本林学会九州支部研究論文集 53: 103–104.
- Akiba, M. and Nakamura, K. (2005) Susceptibility of adult trees of the endangered species *Pinus armandii* var. *amamiana* to pine wilt disease in the field. *Journal of Forest Research* 10: 3–7.
- Akiba, M., Ishihara, M., Sahashi, N., Nakamura, K., Ohira, K. and Toda, T. (2012)

- Virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* isolated from naturally infested pine forests to five resistant families of *Pinus thunbergii*. Plant Disease 96: 249–252.
- Akbulut, S. and Stamps, W. T. (2012) Insect vectors of the pinewood nematode: a review of the biology and ecology of *Monochamus* species. Forest Pathology 42: 89–99.
- Avise, J. C. (2000) Phylogeography, the history and formation of species. Harvard University Press, London.
- Bandelt, H.-J., Forester, P. and Rohal, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37–48.
- Beckenbach, K., Blaxter, M. and Webster, J. M. (1999) Phylogeny of *Bursaphelenchus xylophilus* species derived from analysis of ribosomal internal transcribed spacer DNA sequences. Nematology 1: 539–548.
- Bedker, P. J., Wingfield, M. J. and Blanchette, R. A. (1987) Pathogenicity of *Bursaphelenchus xylophilus* on three species of pine. Canadian Journal of Forest Research 17: 51–57.
- Bolla, R. I., Winter, R. E. K., Fitzsimmons, K. and Linit, M. J. (1986) Pathotypes of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Journal of Nematology 18: 230–238.
- Braasch, H., Burgermeister, W. and Gu, J. (2009) Revised intra-genetic grouping of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Aphelenchoididae). Journal of Nematode Morphology and Systematics 12: 65–88.
- Brasier, C. M. (2001) Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. Bioscience 51: 123–133.
- Carson, S. D. and Carson, M. J. 1989. Breeding for resistance in forest trees - a quantitative genetic approach. Annual Review of Phytopathology 27: 373–395.
- Cheng, H., Lin, M., Li, W. and Fang, Z. (1983) The occurrence of a pine wilting disease

- caused by a nematode found in Nanjing (in Chinese). Forest Pest Disease 4: 1–5.
- 千吉良 治 (1995) ヤクタネゴヨウの種子の充実率と発芽率 (I) 日本林学会論文
集 106: 303–304.
- de Guiran, G. and Bruguier, N. (1989) Hybridization and phylogeny of the pine wood
nematode (*Bursaphelenchus* spp.). Nematologica 35: 321–330.
- Derycle, S., Remerie, T., Bacleljau, T., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Vincx, M. and
Moens, T. (2008) Phylogeography of the *Rhabditis (Pellioditis) marina* species
complex: evidence for long-distance dispersal, and for range expansion and
restricted gene flow in the northeast Atlantic. Molecular Ecology 14: 3306–3322.
- Dormann, C. F., Gruber, B. and Fründ, J. (2008) Introducing the *bipartite* package;
analysing ecological networks. R News 8: 8–11.
- Dutech, C., Barrès, B., Bridier, J., Robin, C., Milgroom, M. G. and Ravigné, V. (2012)
The chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse
origins in an invasive plant fungal pathogen. Molecular Ecology 21: 3931–3946.
- Earl, D. A. and Holdt, B. M. (2012) Structure Harvester: a website and program for
visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method.
Conservation Genetics Resources 4: 359–361.
- 遠田暢男 (1972) マツノザイセンチュウの媒介昆虫と保持数. 日本林学会関東
支部大会講演集 24: 31.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudelt, J. (2005) Detecting the number of clusters of
individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14:
2611–2620.
- Excoffier, L. and Kischer, H. E. L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of perform
population genetics analyses under Linus and Windows. Molecular Ecology
Resources 10: 564–567.

- Farjon, A. (2005) Pines: Drawings and descriptions of the genus *Pinus*, 2nd edn. Brill, Leiden.
- Ferris, V. R., Ferris, J. M. and Faghihi, J. (1993) Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* 16: 177–184.
- Figueired, J., Simoes, M. J., Gomes, P., Barroso, C., Pinho, D., Conceicao, L., Fonseca, L., Abrantes, I., Pinheiro, M. and Egas, C. (2013) Assessment of the geographic origins of pinewood nematode isolates via single nucleotide polymorphism in effector gene. *PLoS ONE* 8: e83542.
- Fonseca, L., Cardoso, J. M. S., Lopes, A., Pestana, M., Abreu, F., Nunes, N., Mota, M. and Abrantes, I. (2012) The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Madeira Island. *Helminthologia* 49: 96–103.
- 藤本吉幸・戸田忠雄・西村慶二・山手廣太・冬野劫一 (1989) マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業 —技術開発と事業実施 10 か年の成果—. 林木育種場研究報告 7: 1–84.
- 藤本吉幸・戸田忠雄・田島正啓・大山浪雄・白石 進 (1981) 抵抗性育種から見たマツノザイセンチュウの加害性の変異. 第92回日本林学会大会発表論文集: 293–294.
- 古野東洲・中井 勇・上中幸治・羽谷啓造 (1993) 上賀茂および白浜試験地における外国産マツのマツ枯れ被害 —マツ属のマツノザイセンチュウに対する抵抗性—. 京都大学農学部演習林集報 25: 20–34.
- Futai, K. (2003) Role of asymptomatic carrier trees in epidemic spread of pine wilt disease. *Journal of Forest Research* 8: 253–260.
- 二井一禎・古野東洲 (1979) マツノザイセンチュウに対するマツ属の抵抗性. 京都大学農学部演習林報告 51: 23–26.

- 我如古光男 (1974) 沖縄本島に侵入したマツノザイセンチュウ. 森林防疫 23: 42–44.
- Griffith, R. (1987) Red ring disease of coconut palm. Plant Disease 71: 193–196.
- Gross, A., Hosoda, T. and Queloz, V. (2014) Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Molecular Ecology 23: 2943–2960.
- Gu, J., Braasch, H., Burgermeister, W. and Zhang, J. (2006) Records of *Bursaphelenchus* spp. intercepted in imported packaging wood at Ningbo, China. Forest Pathology 36: 323–333.
- Gu, J., Wang, J., Braasch, W., Burgermeister, W. and Schröder, T. (2011) Morphological and molecular characterisation of mucronate isolates ('M' form) of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). Russian Journal of Nematology 19: 103–120.
- Hakamata, T., Kato, K. and Yamamoto, S. (2013) Correlation of seedling size and branch number with disease resistance of *Pinus thunbergii* seedlings to *Bursaphelenchus xylophilus*. Forest Pathology 43: 238–244.
- 初島住彦 (1938) タカネゴエフとアマミゴエフに就て. 日本林學會誌 20: 392–400.
- 林 重佐 (1988) ヤクタネゴヨウ (アマミゴヨウ) の保護と保存. 林木の育種 147: 11–13.
- 林 重佐・馬田英隆・高橋素子 (1984) ヤクタネゴヨウ松の絶滅抑止に関する森林育種学的研究 I. ヤクタネゴヨウの実態. 鹿児島大学農学部演習林報告 12: 67–77.
- 林 弥栄 (1960) 日本産針葉樹の分類と分布. 農林出版, 東京.
- Holliday, P. (1989) A dictionary of plant pathology. Cambridge University Press, Cambridge.

- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, E. S. and Bolback, J. P. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310–2314.
- Huelsenbeck, J. P., Larget, B., Miller, R. E. and Ronquist, F. (2002) Potential application and pitfall of Bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology* 51: 673–388.
- 茨木親義・大庭喜八郎・戸田忠雄・橋本平一・清原友也 (1978) 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. 日本林学会九州支部研究論文集 31: 211–212.
- Inácio, M. L., Nóbrega, F., Vieira, V., Bonifácio, L., Naves, P., Sousa, E. and Mota, M. (2015) First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *Forest Pathology* 45: 235–238.
- 岩 智洋・河野雄一・牛之濱輝幸・緒方 淳 (2010) 鹿児島県奄美大島における松くい虫被害の拡大と小規模伐採技術の検討. 亜熱帯森林・林業研究会発表論文集 2010: 18–21.
- Iwahori, H., Tsuda, K., Kanzaki, N., Izui, K. and Futai, K. (1998) PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. *Fundamental and Applied Nematology* 21: 655–666.
- 岩崎 厚・森本 桂 (1973) マツノマダラカミキリに関する研究 (II) —産卵痕数からの密度推定—. 日本林学会九州支部研究論文集 26: 207–208.
- 岩崎 厚・森本 桂・今給黎靖夫 (1978) マツノマダラカミキリに関する研究 (XXVII) —支場実験林における産卵と誘殺経過の年次変動—. 日本林学会九州支部研究論文集 31: 257–258.
- Jikumaru, S. and Togashi, K. (1995) A weak deleterious effects of the avirulent pinewood nematode, *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae), on the longevity of its vector, *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae).

Applied Entomology and Zoology 30: 9–16.

Jung, J., Han, H., Ryu, S. H. and Kim, W. (2010) Microsatellite variation in the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer) Nickle in South Korea. *Genes & Genomics* 32: 151–158.

金指あや子・中島 清・河原孝行 (1998) ヤクタネゴヨウの遺伝資源保全研究. *林木の育種* 188: 24–28.

Kanetani, S., Akiba, M., Nakamura, K., Gyokusen, K. and Saito, A. (2001) The process of decline of an endangered tree species, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, on the southern slope of Mt. Hasa-dake in Yaku-shima Island. *Journal of Forest Research* 6: 307–310.

金谷整一・荒田洋一・池亀寛治・手塚賢至・秋庭満輝・中村克典 (2014) ヤクタネゴヨウに樹幹注入した殺線虫剤のマツ材線虫病予防効果と樹体内有効成分濃度. *樹木医学研究* 18: 111–117.

金谷整一・玉泉幸一郎・伊藤 哲・齋藤 明 (1997) 屋久島波紗岳周辺におけるヤクタネゴヨウの分布様式. *日本林学会誌* 79: 160–163.

金谷整一・玉泉幸一郎・齋藤 明・伊藤 哲 (1996) 屋久島波紗岳周辺におけるヤクタネゴヨウの球果および種子の生産量. *日本林学会九州支部研究論文集* 49: 49–50.

金谷整一・細山田三郎・玉泉幸一郎・齋藤 明 (1998) 寺山自然教育研究施設におけるヤクタネゴヨウの種子散布. *鹿児島大学教育学部研究紀要 自然科学編* 49: 95–104.

金谷整一・池亀寛治・手塚賢至・寺川眞理・湯本貴和 (2004) 種子島におけるヤクタネゴヨウの新群生地が発見. *保全生態学研究* 9: 77–82.

金谷整一・中村克典・秋庭満輝・寺川眞理・池亀寛治・長野広美・浦辺菜穂子・浦辺 誠・大山末広・小柳 剛・長野大樹・野口悦士・手塚賢至・手塚田

- 津子・川上哲也・木下大然・斉藤俊浩・吉田明夫・吉村充史・吉村加代子・平山未来・山田恵美・稲本龍生・穴井隆文・坂本法博・古市康廣 (2005) 種子島木成国有林におけるマツ材線虫病で枯死したヤクタネゴヨウの伐倒駆除. 保全生態学研究 10: 77–84.
- 金谷整一・吉丸博志・中村克典・秋庭満輝・手塚賢至・池亀寛治 (2007) 屋久島と種子島におけるヤクタネゴヨウの保全の現状について. 材木の育種 特別号: 33–36.
- 環境省 (2017) 【維管束植物】環境省レッドリスト 2017. <http://www.env.go.jp/press/files/jp/105449.pdf> (2017年10月31日閲覧)
- Kanzaki, N. and Akiba, M. (2014) Isolation of *Bursaphelenchus mucronatus kolymensis* from *Monochamus nitens* from Japan. Nematology 16: 743–745.
- Kanzaki, N. and Futai, K. (2002) A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group. Nematology 4: 35–41.
- Kanzaki, N. and Futai, K. (2006) Is *Bursaphelenchus mucronatus* a weak pathogen to the Japanese red pine? Nematology 8: 485–489.
- Kanzaki, N. and Giblin-Davis, R. M. (2018) Diversity and plant pathogenicity of *Bursaphelenchus* and related nematodes in relation to their vector bionomics. Current Forestry Reports 4: 85–100.
- Kanzaki, N., Maehara, N., Akiba, M., Tanaka, S. R. and Ide, T. (2016) Morphological characters of dauer juveniles of three species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. Nematology 18: 209–220.
- Katoh, K., Misawa, K., Kume, K. and Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. Nucleic Acids Research 30: 3059–3066.

- Katoh, K. and Toh, H. (2008) Recent development in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286–298.
- Katsuki, T. and Farjon, A. (2013) *Pinus amamiana*. The IUCN Red List of Threatened Species. e.T34180A2849479
- 岸 洋一 (1977) 茨城県におけるマツノマダラカミキリの世代数について. *森林防疫* 26: 97–98.
- 岸 洋一 (1988) マツ材線虫病 —松くい虫— 精説. トーマス・カンパニー, 東京.
- 清原友也 (1976) マツノザイセンチュウの継代培養による病原性の低下. *日本線虫研究会誌*. 6: 56–59.
- Kiyohara, T. and Bolla, R. I. (1990) Pathogenic variability among populations of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Forest Science* 36: 1061–1076.
- 清原友也・橋本平一・藤本吉幸 (1983) マツノザイセンチュウの病原力の変異. *日本林学会九州支部研究論文集* 36: 189–190.
- 清原友也・橋本平一・大庭喜八郎・西村慶二 (1977) アカマツおよびクロマツ精英樹の母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. 第88回日本林学会大会発表論文集: 329–330.
- 清原友也・徳重陽山 (1971) マツ成立木に対する線虫 *Bursaphelenchus* sp.の接種試験. *日本林学会誌* 53: 210–218.
- Koidzumi, G. (1924) Contributiones ad cognitionem flora Asia orientalis. The botanical magazine, Tokyo. 38: 87–113.
- Kosaka, H., Aikawa, T., Ogura, N., Tabata, N. and Kiyohara, T. (2001) Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: the induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematodes. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 667–675.

- 国吉清保 (1974) マツノザイセンチュウによる被害沖縄に発生. 森林防疫 23: 40–42.
- Librado, P. and Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Mallez, S., Castagnone, C., Espada, M., Vieira, P., Eisenback, J. E., Harrel, M., Mota, M., Guillemaud, T. and Castagnone-Sereno, P. (2013) First insights into the genetic diversity of the pinewood nematode in its native area using new polymorphic microsatellite loci. *PLoS ONE* 8: e59165.
- Mallez, S., Castagnone, C., Espada, M., Vieira, P., Eisenback, J. E., Harrel, M., Mota, M., Aikawa, T., Akiba, M., Kosaka, H., Castagnone-Sereno, P. and Guillemaud, T. (2015) Worldwide invasion prutes of the pinewood nematode: What can we infer from population genetics analuses? *Biological Invasion* 17: 1199–1213.
- Mamiya, Y. (1983) Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology* 21: 201–220.
- 真宮靖治 (2006) ニセマツノザイセンチュウの国内における地理的分布 —調査記録にもとづく分布実態—. 森林防疫 55: 3–11.
- Mamiya, Y. and Enda, N. (1972) Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica* 18: 159–162.
- Mamiya, Y. and Enda, N. (1979) *Bursaphelenchus mucronatus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees. *Nematologica* 25: 353–361.
- 眞山滋志・難波成任編 (2010) 植物病理学. 文永堂出版, 東京.
- Metge, K., Braasch, H. and Burgermeister, W. (2006) Interspecific variation in ITS rDNA of *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) of different groups.

- Russian Journal of Nematology 14: 147–158.
- 峰尾一彦・紺谷修治 (1973) マツノザイセンチュウによるフランスカイガンショウの被害. 森林防疫 22: 227–229.
- 森本 桂・岩崎 厚 (1972) マツノザイセンチュウ伝播者としてのマツノマダラカミキリの役割. 日本林学会誌 54: 177–183.
- Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K. and Sousa, E. (1999) First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. Nematology 1: 727–734.
- Mota, M., Takemoto, S., Takeuchi, Y., Hara, N. and Futai, K. (2006) Comparative studies between Portuguese and Japanese isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Journal of Nematology 38: 429–433.
- Mota, M. and Vieira, P., eds. (2008) Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht.
- Nakamura, K., Akiba, M. and Kanetani, S. (2001) Pine wilt disease as promising causal agent of the mass mortality of *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima in the field. Ecological Research 16: 795–801.
- Nose, M. and Shiraishi, S. (2008) Breeding for resistance to pine wilt disease. In: Zhao, K. Futai, J. R. Sutherland, and Y. Takeuchi, eds. Pine wilt disease. B. G. Springer, Tokyo, pp. 334–350.
- Nose, M., Shiraishi, S., Miyahara, F., Ohira, M., Matsunaga, K., Tobase, M., Koyama, T. and Yoshimoto, K. (2009) Ribosomal DNA haplotype distribution of *Bursaphelenchus xylophilus* in Kyushu and Okinawa islands, Japan. Journal of Nematology 41: 194–202.
- 小田久五 (1967) 松くい虫の加害対象木とその判定法について. 森林防疫 16: 263–266.

- Ohba, H. (2013) 764. *Pinus amamiana*, Pinaceae. Curtis's Botanical Magazine 30: 158–165.
- 大庭喜八郎・西村慶二・戸田忠雄・立仙雄彦 (1977) マツノザイセンチュウの人工接種による母樹別マツ苗の生存率. 日本林学会九州支部研究論文集 30: 69–70.
- 大林延夫・新里達也編 (2007) 日本産カミキリムシ. 東海大学出版会, 秦野
- 大平峰子・宮原文彦・森 康浩・大川雅史・宮崎潤二・真崎修一・吉本貴久雄・佐々木義則・山田康裕・三樹陽一郎・田上敏彦・小山孝雄・宮里 学・鳥羽瀬正志・黒田慶子・岡村正則・松永孝治・白石 進 (2010) クロマツの第二世代マツ材線虫病抵抗性種苗生産システムの構築. 林木の育種 235: 1–5.
- 大井次三郎 (1978) 改訂増補版 日本植物誌 顕花編. 至文堂, 東京.
- Palomares-Rius, J. E., Tsai, I. J., Karim, N., Akiba, M., Kato, T., Maruyama, H., Takeuchi, Y. and Kikuchi, T. (2015) Genome-wide variation in the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and its relationship with pathogenic traits. BMC Genomics 16: 845.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. (2012) GenALEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research- an update. Bioinformatics 28: 2537–2539.
- Pereira, F., Moreira, C., Fonseca, L., van Asch, B., Mota, M., Abrantes, I. and Amorim, A. (2013) new insights into the phylogeny and worldwide dispersion of two closely related nematode species, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. PLoS ONE 8: e56288.
- Primack, R. B. (1995) A primer of conservation biology. Sinauer Associates, Sunderland.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.

- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing.
<https://www.R-project.org/>.
- 林野庁 (1984) マツの枯損防止新技術に関する総合研究. 林野庁, 東京.
- 林野庁 (2017) 「平成 28 年度森林病虫害被害量」について
<http://www.rinya.maff.go.jp/j/press/hogo/170927.html> (2017 年 10 月 31 日閲覧)
- Robertson, L., Cobacho Arcos, S., Escuer, M., Santiago Merino, R., Esparrago, G., Abelleira, A. and Navas, A. (2011) Incidence of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhrer, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematology* 13: 755–757.
- Rutherford, T. A., Mamiya, Y., Webster, J. M. (1990) Nematode-induced pine wilt disease: factors influencing its occurrence and distribution. *Forest Science* 36: 145–155.
- Ryss, A., Vieira, P., Mota, M. and Kulinich, O. (2005) A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology* 7: 393–458.
- 佐倉詔夫・石原 猛・糟谷重夫・長谷川茂・岸 洋一 (1978) 東京大学千葉演習林内・スミ沢における天然性ヒメコマツ林の現状について. 第 89 回日本林学会大会発表論文集: 403–404.
- 佐藤平典・作山 健・小林光憲 (1987) カラフトヒゲナガカミキリ (*Monochamus saltuarius* (Gebler)) によるマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle) の媒介能力に関する試験. 日本林学会誌 69: 492–496.
- Shi, J., Chen, F, Luo, Y. Q., Wang, Z. and Xue, B. Y. (2013) First isolation of pine wood nematode from *Pinus tabulaeformis* forests in China. *Forest Pathology* 43: 59–66.

- Snieszko, R. A. (2006) Resistance breeding against nonnative pathogens in forest trees - current successes in North America. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: S270–S279.
- Sousa, E., Bravo, M. A., Pires, J., Naves, P., Penas, A. C., Bonifacio, K. and Mota, M. (2001) *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) associates with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3: 89–91.
- Southey, J. F. (1986) Laboratory methods for work with plant and soil nematodes, 6th edn. HMSO, London.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Starr, J. L., Cook, R. and Bridge, J., eds. (2002) Plant resistance to parasitic nematodes, CABI Publishing, Wallingford.
- Susoy, V., Herrmann, M., Kanzaki, N., Kruger, M., Nguyen, C. N., Rodelsperger, C., Roseler, W., Weiler, C., Giblin-Davis, R. M., Ragsdale, E. J. and Sommer, R. J. (2016) Large-scale diversification without genetic isolation in nematode symbionts of figs. *Science Advances* 2: e1501031.
- Takemoto, S. and Futai, K. (2007) Polymorphism of Japanese isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae), at heat-shock protein 70A locus and the field detection of polymorphic populations. *Applied Entomology and Zoology* 42: 247–253.
- 竹谷昭彦・奥田素男・細田隆治 (1975) マツの激害型枯損木の発生環境 —温度からの解析—. *日本林学会誌* 57: 169–175.
- 竹内祐子 (2014) 昆虫等便乗性線虫の培養・保存法. 水久保隆之・二井一禎編, 線虫学実験. 京都大学学術出版会, 京都, pp. 102–104.

- 玉城雅範・伊藤俊輔・喜友名朝次 (2015) 沖縄県におけるマツノザイセンチュウによる被害推移と防除対策について. 森林遺伝育種 4: 131–134.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725–2729.
- Tanabe, A. S. (2007) Kakusan; a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. Molecular Ecology Notes 7: 962–964.
- Tanaka, R., Kikuchi, T., Aikawa, T. and Kanzaki, N. (2012) Simple and quick methods for nematode DNA preparation. Applied Entomology and Zoology 47: 291–294.
- 寺下隆喜代・松本憲二郎 (1986) ヤクタネゴヨウに対するマツノザイセンチュウの病原性. 日本林学会九州支部研究論文集 39: 159–160.
- 鳥羽瀬正志・中村健作・宮島淳二・戸田忠雄 (1993) マツノザイセンチュウ抵抗性種苗の生産 (I) —天草森林組合におけるスーパーマツの生産—. 日本林学会九州支部研究論文集 46: 81–82.
- 戸田忠雄 (2004) アカマツおよびクロマツのマツ材線虫病抵抗性育種に関する研究. 林木育種センター研究報告 20: 83–217.
- 戸田忠雄・千吉良治・久保田権・中島勇夫 (2001) ヤクタネゴヨウのマツノザイセンチュウ接種結果. 林木の育種 198: 29–32.
- Togashi, K. (1985) Transmission curves of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) from its vector, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), to pine trees with reference to population performance. Applied Entomology and Zoology 20: 246–251.
- Togashi, K. (1989) Factors affecting the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by newly emerged adults of *Monochamus*

- alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). Applied Entomology and Zoology 24: 379–386.
- Togashi, K. and Jikumaru, S. (2007) Evolutionary change in a pine wilt system following the invasion of Japan by the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Ecological Research 22: 862–868.
- Togashi, K., Nakamura, K. and Takahashi, F. (1992) An Index of susceptibility of pine stands to pine wilt disease. Applied Entomology and Zoology 27: 341–347.
- Togashi, K. and Shigesada, N. (2006) Spread of the pinewood nematode vectored by the Japanese pine sawyer: modeling and analytical approaches. Population Ecology 48: 271–283.
- Togashi, K., Taga, Y., Iguchi, K. and Aikawa, T. (2008) *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) vectored by *Monochamus urussovii* (Coleoptera: Cerambycidae) in Hokkaido, Japan. Journal of Forest Research 13: 127–131.
- Tzean, S. S. and Jan, S. T. (1985) The occurrence of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Taiwan. Proc. 6th ROC Symposium on Electron Microscopy 38–39.
- Valadas, V., Laranjo, M., Barbosa, P., Espada, M., Mota, M. and Oliveira, S. (2012) The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Portugal: possible introductions and spread routes of a serious biological invasion revealed by molecular methods. Nematology 14: 899–911.
- Valadas, V., Laranjo, M., Mota, M. and Oliveira, S. (2013) Molecular characterization of Portuguese populations of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* using cytochrome b and cellulase genes. Journal of Helminthology 87: 457–466.
- Vanderplank, J. E. (1963) Plant diseases: Epidemics and control. Academic Press, New York.

- Vicente, C., Espada, M., Vieira, P. and Mota, M. (2012) Pine wilt disease: a threat to European forestry. *European Journal of Plant Pathology* 133: 89–99.
- Vieira, P. Burgermeister, W., Mota, M., Metge, K. and Silva, G. (2007) Lack of genetic variation of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal revealed by RAPD-PCR analyses. *Journal of Nematology* 39: 118–126.
- Wang, Y., Yamada, T., Sakaue, D. and Suzuki, K. (2005) Variations in life history parameters and their influence on rate of population increase of different pathogenic isolates of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology* 7: 459–467.
- Wingfield, M. J. (1983) Transmission of pine wood nematode to cut timber and girdled trees. *Plant Disease* 67: 35–37.
- Wingfield, M. J., Bedker, P. J. and Blanchette, R. A. (1986) Pathogenicity of *Bursaphelenchus xylophilus* on pines in Minnesota and Wisconsin. *Journal of Nematology* 18: 44–49.
- Wingfield, M. J. and Blanchette, R. A. (1983) The pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Minnesota and Wisconsin: insect associates and transmission studies. *Canadian Journal of Forest Research* 13: 1068–1076.
- Wingfield, M. J., Blanchette, A. and Kondo, E. (1983) Comparison of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* from pine and balsam fir. *European Journal of Forest Pathology* 13: 360–372.
- Woo, K. S., Lee, D. H., Koo, Y. B. and Yeo, J. K. (2008) Inoculation of seven pine species or hybrid seedlings with Korean isolates of pinewood nematode under greenhouse conditions. *Annals of Forest Science* 65: 811.
- Yahara, T., Ohba, H., Murata, J. and Iwatsuki, K. (1987) Taxonomic review of vascular plants endemic to Yakushima Island, Japan. *Journal of the Faculty of Science*,

University of Tokyo. Sect. 3, Botany 14: 69–119.

山田隆信・杉本博之 (2007) 山口県における植栽後のマツノザイセンチュウ抵抗性マツのマツ材線虫病による枯死について. 林木の育種 特別号: 25–28.

山本千秋・明石孝輝 (1994) 稀少樹種ヤクタネゴヨウの分布と保全について (予報). 第 105 回日本林学会講演要旨集: 750.

Yang, B. J. (2003) The history, dispersal and potential threat of pine wood nematode in China. In: Mota, M. and Vieira, P., eds. The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Brill, Leiden, pp. 21–24.

Yang, B. and Wang, Q. (1989) Distribution of the pinewood nematode in China and susceptibility of some Chinese and exotic pines to the nematode. Canadian Journal of Forest Research 19: 1527–1530.

矢野宗幹 (1913) 長崎県下松樹枯死原因調査. 山林公報 4 付録: 1–14.

Ye, W. and Giblin-Davis, R. M. (2013) Molecular characterization and development of real-time PCR assay for pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Parasitaphelenchidae). PLoS ONE 8: e78804.

Ye, W., Giblin-Davis, R. M., Braasch, H., Morris, K. and Thomas, W. K. (2007) Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution 43: 1185–1197.

Yi, C. K., Byun, B. H., Park, J. D., Yang, S. I. and Chang, K. H. (1989) First finding of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle and its insect vector in Korea (in Korean with English abstract). Research Reports of Forest Research Institute (Seoul) 38: 141–149.

吉田成章 (2006) 研究者が取り組んだマツ枯れ部除 —マツ材線虫病防除戦略の提案とその適応事例—. 日本森林学会誌 88: 422–428.

- Zhang, K., Liu, H., Sun, J., Liu, J., Fei, K., Zhang, C., Xu, M., Sun, J., Ma, X., Lai, R., Wu, Y. and Lin, M. (2008) Molecular phylogeny of geographical isolates of *Bursaphelenchus xylophilus*: implications on the origin and spread of this species in China and worldwide. *Journal of Nematology* 40: 127–137.
- Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R. and Takeuchi, Y., eds. (2008) *Pine Wilt Disease*. Springer, Tokyo.
- Zheng, J., Subbotin, S. A., He, S., Gu, J. and Moens, M. (2003) Molecular characterisation of some Asian isolates of using PCR-RFLPs and sequences of ribosomal DNA. *Russian Journal of Nematology* 11: 17–22.
- 陣野好之・滝沢幸雄・佐藤平典 (1987) 寒冷・高地地方におけるマツ材線虫病の特徴と防除法. 林業科学技術振興所, 東京.
- Zhou, Z.-H., Sakaue, D., Wu, B.-Y. and Hogetsu, T. (2007) Genetic structure of populations of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, the pathogen of pine wilt disease, between and within pine forests. *Phytopathology* 97: 304–310.