激害型マツ枯損病と毒素†

奥 八 郎

(岡山大学農学部)

わが国全土を席卷した激害型マツ枯損病は、経済的、環境的重要性以外に、古くからわが国の民族の文化に深くかかわってきた樹木の病害である点からも国民の大きな関心事であった。この重要性ゆえに、林業試験場を中心としたプロジェクト研究によって、防除の基礎となる学問分野、病原、媒介昆虫の解明、発生生態などが徹底的に研究され、防除法が開発された。しかし、殺虫剤を空中散布して媒介昆虫を撲滅するこの方法は、環境汚染などの面で議論を呼んだ。一方その枯損機構やマツの抵抗性機構などに関しては、なお不明な点が多く残されている。枯損機構としては、一応、樹体内に侵入した病原センチュウが、柔組織細胞や樹脂細胞を破壊するためとされた^(1,2,3)。しかし、真宮⁽¹⁾は、詳細な組織解剖学的観察の結果、センチュウのまだ存在しない部位においても、感染を受けたマツの細胞が変性していることを報じている。このことは、センチュウの感染によって生成する何らかの物質（毒素）が病徴発現に関与している可能性を示す。さらに、急激な枯死が毒素に基因するニレのオランダ病に似た枯れ方も、毒素の関与を暗示する。

本論文は、著者の研究室で行った研究を中心に、本病に関する毒素についてレビューした。

1. 罹病マツに生成する毒素

2～3年生のアカマツ (*Pinus densiflora*)、クロマツ (*P. thunbergii*)⁽⁴⁾、ヨーロッパアカマツ (*P. sylvestris*)⁽⁵⁾などにマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) を接種し、病徴が表れ始めた頃には、葉からも木部からも水溶性の毒素が検出される。粗毒素画分を3年生クロマツの新梢から吸収させると、本病の病徴と非常によく似た症状を呈して枯死する⁽⁴⁾。健全マツにはこのような物質は存在しない。この予備実験の結果に基づ

き、天然に罹病したアカマツから枯損毒素の抽出・同定を行った。

抽出・精製各段階の毒性は、播種後約1カ月のアカマツあるいはクロマツ実生苗の茎に軽くカミソリで傷をつけ、その部分にパラフィルムで液受けを作り、20 μ l の被検液を加えて16, 24, 48時間後に萎凋の程度を調べた。

(1) 葉から分離された毒素

罹病マツの葉を70%メタノールで室温下に抽出し、濃縮後シリカゲルカラムクロマトを繰返すことにより2種類の毒素を結晶状に得た。これらの物質は、理化学的性状および、市販の試薬との比較によりそれぞれ安息香酸、カテコールと同定された^(6,7)。

(2) 木部からの抽出・同定

罹病マツの枝を細切、粉碎したのち、70%メタノールに冷浸、抽出、濃縮後シリカゲルカラムクロマトを繰返し、2種類の毒素を結晶状に、他の1種類を無色油状物として得た。結晶のうち1種は安息香酸であったが、他の2種は、機器分析の結果、結晶が dihydroconiferylalcohol、油状物が 8-hydroxycarvotanacetone と推定されたので、両者を合成して比較し、上記の推定が正しいことを確認した^(6,7)。すなわち、われわれの研究では、罹病マツの葉から catechol (CA), benzoic acid (BA) を、また木部から BA, dihydroconiferylalcohol (DCA) および 8-hydroxycarvotanacetone (8-HCA) を毒素として分離同定した。ただし、8-HCA の絶対配位は得られた量が少ないため決定できなかった。

Bolla ら⁽⁷⁾は、罹病した *P. sylvestris* から、アルカリ性下でクロロフォルム抽出することにより2種類の毒素を得た。その1つは筆者らと同じ 8-HCA⁽⁶⁾、他の1つは 10-hydroxyverbenone^(6,8) と同定された。河津ら^(9,10)は、BA の生成は、ザイセンチュウの感染に特異的であり、これはグルコースエステルになって解毒されることを明らかにしているが、詳細は本誌に別にレビューされると

† Phytotoxins in Pine Wilt Disease.
Hachiro OKU (Laboratory of Plant Pathology,
Faculty of Agriculture, Okayama University,
Tsushimanaka, Okayama 700)

表 1 罹病マツより分離した毒素の3年生アカマツに対する毒性

毒 素	葉の褐変あるいは萎凋をおこす最少量あるいは濃度	
	切断主幹より	接断新梢より
Benzoic acid	100 ppm	>5 mg ^a
Catechol	500 ppm	10 mg
Dihydroconiferylalcohol	試験せず	50 mg
8-Hydroxycarvotanacetone	>100 ppm ^b	10 mg

^a 難溶性のため 5 mg 以上のテストはできなかった。

^b サンプル少量のため 100 ppm 以上のテストはできなかった。

思うので省略する。

このように、激害型枯損マツから 5 種類の毒素が分離同定されている (図 1)。

2. 毒素の生理活性

われわれの同定した 4 種類の 3 年生アカマツに対する毒性は表 1 のとおりである。これらのうち、BA と 8-HCA は病原センチュウを接種したときに見られる病徴と非常によく似た症状を示した。

播種後 1 カ月の実生苗を用いた検定では、いずれの毒素も概して罹病性樹種に対して強いが、天然における樹種の抵抗性の差を毒性の差に帰するには十分でなかった。Shaheen ら⁽¹¹⁾が、罹病した *P. sylvestris* から筆者と同様の方法で抽出した粗毒素を、2 年生の苗木を用いて検定した結果、罹病性の *P. sylvestris* が最も早く枯れ、次いで抵抗性の *P. strobus*、免疫性の *P. jeffreyi* は枯れなかった。

著者らの同定した毒素の間には強い協力作用が認められた。Bolla ら⁽⁵⁾も、10-HB と、単独では毒性を示さなかった異常代謝産物との間に毒性の協力作用が見られる

ことを報告している。

これらの毒素はまた、病原センチュウに対しても種々の活性を示す。Balla ら⁽¹¹⁾は罹病した *P. sylvestris* から抽出した粗毒素が病原センチュウや青変菌の増殖を阻害することから、ファイトアレキシンとみなした。筆者らの同定した 4 毒素の病原センチュウの増殖に対する影響を図 2 に示した。8-HCA はマツに対しては D-体のほうが毒性が強いが、センチュウに対しては L-体のほうが強い。また、マツに対して低濃度で毒性を示す CA と BA はセンチュウに対する阻害活性が弱く、これらのことは、これらの毒素の作用点が、マツとセンチュウでは異なることを示していて興味深い。いずれの毒素も低濃度においてセンチュウの増殖を促進する⁽¹²⁾。

天然のアカマツ (15~25 年生) に病原センチュウを接種し、経時的に材のなかに生成する 4 種の毒素について定量したところ、50 日後にはいずれの毒素も生理活性濃度に達していた。河津ら⁽⁹⁾は、苗木に接種した場合、3 日後に BA が検出されたが、天然の立木においても接種 20 日後に BA と 8-HCA が検出され、とくに BA は 50 日後には 300 µg/g 材に達していた⁽¹²⁾。

3. 罹病性のクロマツに特異的に生成する毒素

上記の毒素の研究過程において、樹体中に生成する毒素の種類、量とも感染後の時期によって変化することを知った。したがって、より重要な毒素を見逃している可能性もある。筆者らは、マツの根冠細胞を用いることにより、迅速、鋭敏に毒性を検出できることを知り、この方法によって、接種により罹病性のクロマツに特異的に生成する毒素を見出した⁽¹³⁾。ただし現在のところ化合物の同定には至っていない。

検定用根冠細胞は、吸水脱脂綿で発芽させた実生苗 (約 1 週間) の根部を少量の殺菌水中で振盪することにより得られる。生細胞は fluorescein diacetate で生体染色すると蛍光顕微鏡下で蛍光を発するが、毒素に加害さ

図 1 罹病マツから分離・同定された毒素

a) 無処理区 (濃度 0) との間に有意差あり ($p=0.05$)

b) " " 有意差なし (")

図 2 罹病マツより分離・同定した毒素のマツノザイセンチュウ増殖に及ぼす影響 (試験管内培地に毒素を入れ、培養した *B. cinerea* 上にセンチュウを増殖させた)

れた死細胞は蛍光を発しない。

3年生のクロマツ (罹病性) とリキダマツ (抵抗性) の主幹の樹皮内皮に病原センチュウを接種すると、クロマツにのみ 4～8 日後に強い毒素が生成する。TLC で分画後、現在までに得た 4 毒素と比較したが、いずれにも該当せず、目下同定を急いでいる。本毒素も強い殺線虫性を有する。センチュウ接種後早い時期に、しかも罹病性樹種に特異的に生成することから、枯損に対して第 1 義的役割を果たしている可能性が考えられる。

4. 他の毒素

以上、センチュウに感染したマツに見出される毒素のほかに、Odani ら⁽¹⁴⁾は病原センチュウの生産するセルラーゼが萎凋の原因であるという。諸岡⁽¹⁵⁾は、罹病後樹体内に増殖する糸状菌のうち、*Phomopsis* sp. の生産する 6 α , 7 β , 9 γ -trihydroxy-8 (14), 15-isopimaridien-20, 6- γ -lactone を枯損の原因物質として注目している。Kuroda ら⁽¹⁶⁾は、感染後に見られるマツの水分蒸散の低下は、過剰に生産されたテルペン類がガス状に仮導管を閉塞することを報告している。

5. ま と め

激害型マツ枯損病に毒素が関与していることを示す予備実験を基に、毒素の探索、同定、生理活性の研究が行われたが、研究が進むに連れて多数の毒素が同定され、

真の枯損の原因はますます複雑な様相を呈してきた。同定されたいずれの毒素もマツに毒性を示すので、どれが主な働きをするのか現在の判定は困難であるが、これらの毒素が協力してマツを枯らすのかもしれない。しかし、感初期にセンチュウの接種によってのみ生成する安息香酸、また、罹病性のクロマツに接種したときのみ特異的に生成する未同定の毒素も感染初期にできることから、第 1 義的な役割を果たしている可能性が高いと思われる。これらと他の毒素や仮導管を閉塞するテルペン類の増産などとの相関関係を明らかにすることにより、快刀乱麻の解決が得られるのではないかと期待している。

本研究のうち筆者らの部分については、三共株式会社農薬研究所、富田和男博士、上田隆之氏、岡山大学農学部白石友紀助教授ならびに学生諸君に絶大なる協力をいただいた。深く感謝の意を表する。また、研究費の多くを、文部省科学研究費 (No. 58030029, 59560046, 61304021) によったことを付記しあわせて感謝する。

- (1) 真宮靖治：森林防疫，24，192 (1975)。
- (2) K. Suzuki and T. Kiyohara：Eur. J. For. Pathol., 8, 97 (1978)。
- (3) 鈴木和夫：森林防疫，28，90 (1979)。

- (4) H. Oku, T. Shiraishi and S. Kurozumi : *Naturwissenschaften*, **66**, 210 (1979).
- (5) R. Bolla, F. Shaheen and R. E. K. Winter : *Proceedings 1982 National Pine Wilt Workshop*, ed. by E. Appleby and R. B. Malek, 1982, p. 17.
- (6) H. Oku : *Proceedings 1982 National Pine Wilt Workshop*, ed. by E. Appleby and R. B. Melek, 1982, p. 11.
- (7) T. Ueda, H. Oku, K. Tomita, K. Sato and T. Shiraishi : *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **50**, 166 (1984).
- (8) R. I. Bolla, F. Shaheen and R. E. K. Winter : *Proceedings of US-Japan Seminar, The Resistance Mechanisms of Pines against Pine Wilt Disease*, ed. by V. Dropkin, 1984, p. 119.
- (9) 河津一儀, 川井 悟 : *農化*, **57**, 117 (1983).
- (10) 河津一儀, 川井 悟 : 日本農芸化学会蔵田基金小集会要旨, 1986, p. 17.
- (11) R. Bolla, F. Shaheen and R. E. K. Winter : *J. Nematol.*, **16**, 297 (1984).
- (12) H. Oku, H. Yamamoto, H. Ohta and T. Shiraishi : *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, **51**, 303 (1985).
- (13) 奥 八部, 白石友紀, 志和將一 : 森林防疫, 印刷中.
- (14) K. Odani, S. Sasaki, Y. Nishiyama and N. Yamamoto : *J. Jpn. For. Soc.*, **67**, 366 (1985).
- (15) 諸岡信久 : 山中啓編, 昭和 63 年度科研 (総合 A) 報告書, 激害型松枯れの発生機構およびその抑制に関する総合研究, 1989, p. 57.
- (16) K. Kuroda, T. Yamada, K. Mineo and H. Tamura : *Proceedings 5th International Congress of Plant Pathology*, 1988, p. 355.