

速報

異なる接種密度で接種した際の
クロマツ樹体内におけるマツノザイセンチュウの頭数評価^{*1}山口莉未^{*2}・松永孝治^{*3}・渡辺敦史^{*4}

山口莉未・松永孝治・渡辺敦史：異なる接種密度で接種した際のクロマツ樹体内におけるマツノザイセンチュウの頭数評価 九州森林研究 71: 63-66, 2018 クロマツ実生苗において、異なる接種密度で接種し、侵入頭数をリアルタイム PCR 法・SYBR Green アッセイで評価した。その結果、接種密度が高いほど侵入頭数は多くなる傾向にあった。次に、異なる温度試験区で2段階の濃度に調整した線虫をクロマツに接種後、時系列に沿って樹体内の線虫頭数を評価したところ、接種密度と温度が高いほど頭数は増加していた。経過観察を行ったところ、病徴は接種密度に関わらず、温度が高い試験区においてより進展する傾向にあった。以上のことから、接種密度はクロマツ樹体内における線虫の侵入頭数と増殖頭数に影響を与えるとともに、接種後の外気温によって、接種密度が線虫の増殖とマツの病徴進展に及ぼす効果は異なることが示唆された。

キーワード：クロマツ、マツノザイセンチュウ、接種密度

I. はじめに

マツ材線虫病は、マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*, 以下、線虫) によって引き起こされる我が国最大の樹病であり、本病の発病メカニズムを明らかにするために、マツに対する線虫の接種試験が精力的に行われてきた。これまでの接種試験から、接種密度が高くなるほどアカマツおよびクロマツにおいて針葉変色(枯死)に至る本数が多くなること(岸, 1999)や、抵抗性クロマツ自然交配家系においても枯死率が高くなる傾向にあること(松永ほか, 2009)が報告されている。本病では、線虫の移動・増殖に伴って病徴が進展することが示されている(Fukuda, 1997; Ichihara *et al.*, 2000)ため、接種密度の差異は樹体内での線虫の増殖頭数に関与すると考えられる。しかし、異なる接種密度で接種した場合に、実際にどの程度の線虫が樹体内へ侵入し、経過時間に伴って増殖するのかについての知見は少ない。本研究では、クロマツを対象に、異なる接種密度で接種を行い、樹体内への侵入頭数とその後の増殖頭数を評価した。線虫頭数の評価には、従来用いられてきたバールマン法ではなく、Takeuchi and Futai (2009)の手法を改変したリアルタイムPCR法・SYBR Green アッセイを適用した。これは線虫を含む木片から抽出されたDNAのうち、線虫のDNA量に基づいて、木片中の線虫頭数を推定する手法である。さらに、各条件下においてクロマツの病徴進展の経過観察を行い、増殖頭数と病徴進展の関連性について考察した。

II. 材料と方法

1. リアルタイムPCR法による樹体内頭数評価

リアルタイムPCRの検量線のスタンダードサンプルには線虫20・100・500・2,500・12,500頭と木片生重1.5gをそれぞれ混合したものを用いた。サンプルは液体窒素中でオートミル(Tokken Inc., Japan)を用いて破碎した。破碎器中にIsolation buffer(向井・山本, 1997)を3mL加え、そのうち300 μ Lを3回採取し、それぞれを以降のDNA抽出に用いた。これらの溶液に全量が1.5mLになるようにさらにIsolation bufferを追加し、混和後、遠心分離することで上清を除去した。Isolation buffer処理後、DNeasy(Qiagen, Germany)のプロトコルに従ってDNAを抽出した。DNAは100 μ Lの超純水に溶解した。

抽出されたDNAは、StepOnePlus Real-time PCR System(Applied Biosystems, USA)に供試した。マーカーは*topoisomerase I*(Huang *et al.*, 2010)を使用した。反応溶液は16 μ L溶液(SYBR[®]Green Master Mix 10 μ L, primer 1 μ L, water 5 μ L)に、2.5倍希釈した各DNA 4 μ Lを加え、総量を20 μ Lに調整し、95 $^{\circ}$ Cで20秒加温後、40サイクル(95 $^{\circ}$ C 3秒, 60 $^{\circ}$ C 30秒)の条件で増幅させた。

以下の2および3で採取したサンプルについても同様の手法でDNA抽出とリアルタイムPCR分析を行った。

2. クロマツ樹体内における線虫侵入頭数の評価

材料にはクロマツ2年生実生苗15個体(平均苗高20.5 \pm 3.2cm)を用いた。線虫(Ka4アイソレート)は、*Botrytis cinerea*上で培養後、バールマン法により分離し、50 μ Lあたり10,000・5,000・2,500・1,250・625頭の5段階に調整した。2017年8月2日に野外条件下で、各苗の地際から約5cmの部分に線虫懸濁液50 μ Lを剥皮法にて接種した。接種は各接種密度あたり3反復行った。接種後1日目に、苗木を地際から採取し、液体窒素

^{*1} Yamaguchi, R., Matsunaga, K. and Watanabe, A. : Evaluation of the number of pine wood nematode in Japanese Black Pine inoculated with different concentration.

^{*2} 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biores. And Bioenvir. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, 812-8581, Japan

^{*3} 森林総合研究所林木育種センター九州育種場 Kyushu Regional Breed. Office, Forest Breed. Ctr., For. & Forest Prod. Res. Inst., Koshi, Kumamoto 861-1102, Japan

^{*4} 九州大学大学院農学研究院 Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka, 812-8581, Japan

中で凍結させ、-25℃で保存した。分析には各苗の接種部位を中心とした計1.5gの木片（直径4.5±0.9mm、軸方向9.1±3.6cm、接種部位を除く）を供試した。

3. クロマツ樹体内における線虫増殖頭数の評価

材料にはクロマツ3年生実生苗30個体（平均苗高54.8±7.0cm）を用いた。線虫は、50μLあたり10,000頭と625頭に調整し、2016年8月18日に30℃および25℃一定のファイトトロンにおいて接種した。接種は、2接種密度（10,000頭/625頭）×5時点（1・5・7・10・14日目）×3反復行った。接種後、各時点において接種部位を含む約12cmを採取し、液体窒素中で凍結させ、-25℃で保存した。分析には接種部位の両端から計1.5gの木片を供試した。

4. 線虫接種後におけるクロマツの経過観察

材料にはクロマツ3年生実生苗18個体（平均苗高61.5±10.9cm）を用いた。線虫は、50μLあたり10,000・2,500・625頭に調整し、2016年7月14日に30℃および25℃一定のファイトトロンと野外において接種した。接種は、各接種密度あたり2反復行った。接種後21日目まで、毎日病徴進展を4段階で評価（0：異常なし、1：針葉の変色、2：部分枯れ、3：枯損）した。期間全体の野外の平均気温は28.7℃であった（気象庁、2016）。

Ⅲ. 結果

1. リアルタイムPCR法による樹体内頭数評価

クロマツ木片1.5gと線虫20~12,500頭までを段階的に混合したサンプルから作成された検量線を図-1に示した。検出された蛍光のシグナル強度の閾値と増幅曲線の交点であるCt（Threshold Cycle）値と、線虫頭数間で高い相関（R² = 0.960）が認められた。この結果は、1.5gの木片中における線虫頭数を20~12,500頭の範囲で高精度に測定できることを示している。そこで、作成された検量線を以降の頭数測定に用いた。

2. クロマツ樹体内における線虫侵入頭数の評価

10,000頭から625頭まで段階的に濃度調整した線虫をクロマツに接種後、1日目に樹体内で検出された頭数を表-1に示した。侵入頭数は、10,000頭接種時には約300 - 560頭であり、接種密度が低くなるに従って60 - 120頭、40 - 510頭、40 - 60頭、0 - 20頭と減少する傾向にあった。侵入率はいずれの接種密度においても、一部を除き1-7%程度であった。

3. クロマツ樹体内における線虫増殖頭数の評価

30℃および25℃試験区において、10,000頭と625頭の線虫をそれぞれクロマツに接種後、1・5・7・10・14日目に接種部位近傍の木片中から検出された線虫頭数を図-2に示した。接種後1日目において、いずれの温度試験区でも、10,000頭接種時に検出された線虫頭数は多く、その後の増殖頭数も多い傾向にあった。10,000頭接種時の30℃試験区では、接種後10日目以降、本手法による測定可能範囲の上限となる12,500頭を超える線虫

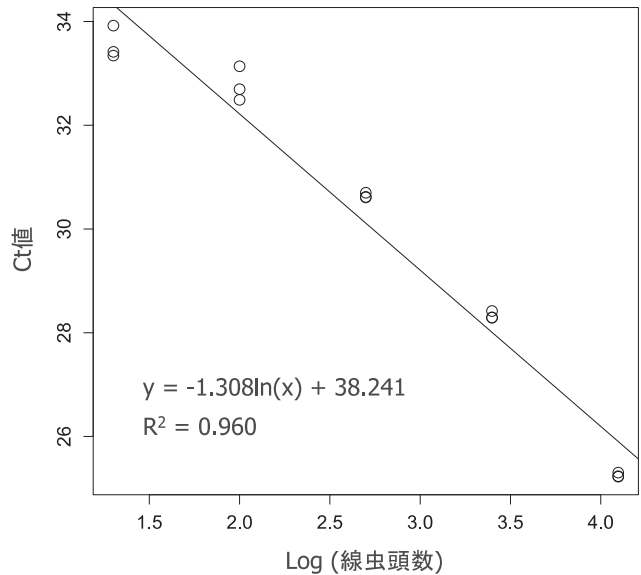


図-1. 線虫頭数と Ct (Threshold Cycle) 値の関係性
各プロットは、リアルタイム PCRにおける technical replicate (n = 3) の平均値を示す。

表-1. クロマツ樹体内における線虫侵入頭数測定結果

接種頭数	個体番号	平均頭数※	標準偏差※	侵入率 (%)
10,000	1	543.5	10.8	5.4
	2	555.2	9.2	5.6
	3	303.4	21.7	3.0
5,000	1	110.4	17.4	2.2
	2	59.3	9.0	1.2
	3	119.8	10.9	2.4
2,500	1	42.5	12.2	1.7
	2	509.4	10.0	20.4
	3	169.2	31.9	6.8
1,250	1	52.0	4.4	4.2
	2	58.9	12.1	4.7
	3	36.9	8.9	3.0
625	1	16.0	6.1	2.6
	2	13.6	4.3	2.2
	3	3.3	0.5	0.5

※リアルタイム PCRにおける technical replicate (n = 3) の平均頭数と標準偏差をそれぞれ示す。

が検出された。625頭接種時には、30℃試験区では接種後5日目以降に線虫は顕著に増殖する傾向にあったが、25℃試験区ではそのような傾向は認められなかった。

4. 線虫接種後におけるクロマツの経過観察

30℃および25℃試験区、野外において10,000・2,500・625頭の線虫に感染させたクロマツの経過観察を行った結果を表-2に示した。接種後7日目まではいずれの個体においても外部形態に変化は認められず、接種後10日目に30℃試験区と野外において一部の個体で針葉の変色が確認された。接種後14日目以降は

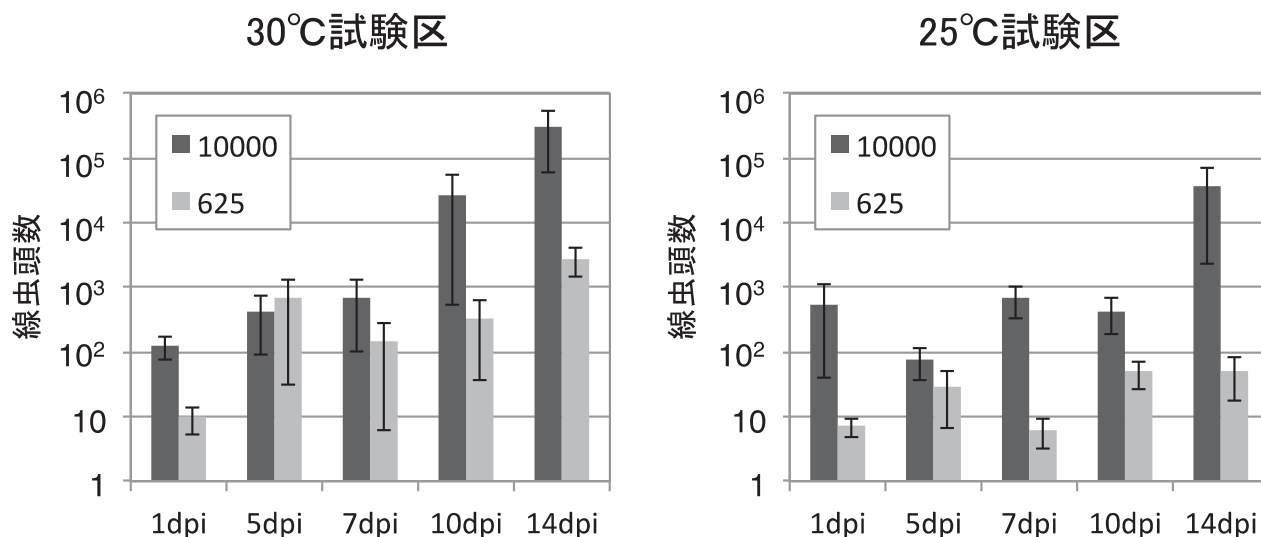


図-2. クロマツ樹体内における線虫頭数測定結果

各温度試験区と接種密度において、接種後経過日数(day post inoculation: dpi) ごとの線虫頭数を対数軸で示す (n = 3)。

表-2. 線虫に感染したクロマツの病徴進展

試験区	接種頭数	個体番号	苗高 (cm)	接種後経過日数 (day post inoculation, dpi) における病徴*				
				7	10	14	18	21
30℃	10,000	1	63	0	0	1	3	3
		2	61.5	0	0	1	1	2
	2,500	1	65	0	0	1	1	2
		2	50	0	0	1	2	3
	625	1	48.5	0	1	2	3	3
		2	70	0	0	1	1	1
25℃	10,000	1	56	0	0	0	0	0
		2	77.5	0	0	1	1	1
	2,500	1	65	0	0	1	1	2
		2	50	0	0	0	0	0
	625	1	48.5	0	0	1	1	1
		2	70	0	0	1	1	1
野外	10,000	1	62.5	0	0	1	2	3
		2	48	0	1	2	2	3
	2,500	1	72	0	0	1	2	2
		2	54	0	1	1	2	2
	625	1	73.5	0	0	1	2	2
		2	49	0	0	0	1	3

※ 4段階で評価 (0: 異常なし, 1: 針葉の変色, 2: 部分枯れ, 3: 枯損) し, 数値が高いほど濃い色で示す。

全ての試験区と接種密度で病徴が認められ, 接種後 21 日目には 30℃ 試験区と野外において多くの個体が部分枯れもしくは枯損に至った。25℃ 試験区については, 接種後 32 日目まで経過観察を行ったが, 枯損に至ったのは 2,500 頭接種の 1 個体のみであった (data not shown)。

IV. 考察

本研究では, Takeuchi and Futai (2009) の手法を改変したり

アルタイム PCR 法・SYBR Green アッセイを用いることで, 木片 1.5 g 中の線虫を 20~12,500 頭の範囲で高精度に評価する手法を確立した。これは, 理論的には木片 1 g あたり線虫を約 13 頭から検出可能であることを示している。これまでの SYBR Green アッセイを用いたりアルタイム PCR 法では, 0.1 g の木片から線虫頭数測定を行っているため, 主軸全体の線虫頭数の評価を行うためには複数箇所からのサンプリングを行う必要があった。本手法では, 1.5 g の木片中の線虫頭数測定を行うことができるため, 主軸全体での増殖過程をより高い精度で追跡できるだ

けでなく、コストと労力の軽減にも寄与する。

本研究で確立したリアルタイム PCR 法を用いて侵入頭数を評価したところ、侵入率は 1-7% 程度であり、接種密度が高いほど侵入頭数は多くなる傾向にあった。接種密度が高いほど、発病に至るマツは多くなる（岸, 1999; 松永ほか, 2009）ことから、樹体内での線虫の初期頭数の多寡はその後の病徴進展の程度に影響を及ぼすものと考えられる。本研究では、外気温の異なる試験区で、2 段階の接種密度で接種後のクロマツ樹体内の線虫頭数を時系列に沿って評価したところ、いずれの接種密度においても 30℃ 試験区で線虫は顕著に増殖していた（図-2）。さらに、線虫に感染したクロマツの病徴進展を評価したところ、いずれの接種密度においても、30℃ 試験区と野外で病徴は進展する傾向にあった（表-2）。先行研究においても、外気温が高いほどマツ樹体内における線虫の増殖は顕著となり（Melakeberhan *et al.*, 1992; Ichihara *et al.*, 2000）、マツの枯死率は上昇すること（Sikora and Malek, 1991）が報告されている。これらのことから、マツ樹体内に侵入した頭数が少ない場合であっても、外気温が高い条件下では線虫は顕著に増殖し、マツの病徴は進展する可能性があると考えられる。しかし、接種後 14 日目では、樹体内における線虫頭数は、30℃ 試験区の 625 頭接種時よりも 25℃ 試験区の 10,000 頭接種時において多い傾向にあった（図-2）が、経過観察を行った結果、25℃ 試験区では、いずれの接種密度でもほとんどの個体が枯損に至らなかった（表-2）。植物の病気は、宿主と病原体の要因に加え、温度や湿度、光条件等の環境条件である誘因によってその程度が左右される（大木, 2007）。従って、外気温が樹体内における線虫の増殖だけではなく、クロマツ側の

生理等にも作用することで、線虫に対するマツの耐性に影響を及ぼした可能性が考えられる。

謝辞

本研究の一部は林野庁委託事業「マツノザイセンチュウ抵抗性品種開発技術高度化事業」にて実施した。

引用文献

- Fukuda K (1997) J For Res 2: 171-181
 Huang et al. (2010) Eur J Plant Pathol 127: 89-98
 Ichihara Y *et al.* (2000) Plant Dis 84: 675-680
 岸 洋一 (1999) 日林誌 81: 330-333
 気象庁 (2016) 気象庁ホームページ, <http://www.jma.go.jp/jma/menu/menureport.html>, 参照 2016-07-14~08-03 (2016 年 8 月 20 日利用)
 松永孝治ほか (2009) 九州森林研究 62: 122-123
 Melakeberhan H et al. (1992) Nematologica 38: 80-87
 向井 譲・山本直樹 (1997) 細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 7, 須磨春樹, 秀潤社, 東京, 58
 大木 理 (2007) 植物病理学, 東京化学同人, 東京, 22
 Sikora E J and Makek R B (1991) J Nematol 23: 188-193
 Takeuchi Y and Futai K (2009) Nematol Res 39: 9-16
 (2017 年 11 月 2 日受付; 2018 年 2 月 1 日受理)