

速報

弱病原力候補アイソレイト貝津2の評価*1

伊藤貫太*2・松永孝治*3・山口莉未*2・渡辺敦史*4

伊藤貫太・松永孝治・山口莉未・渡辺敦史：弱病原力候補アイソレイト貝津2の評価 九州森林研究 73：103－106, 2020 マツノザイセンチュウ（以下、線虫）はアイソレイト間で病原力が異なることが知られているが、その要因は不明である。本研究では、アイソレイト間の病原力の差異を決定づける要因の解明に向けて、異なる病原力を示すアイソレイトの病原力および樹体内における増殖力について評価した。二年生クロマツ実生に強病原力アイソレイト Ka4 と弱病原力候補アイソレイト貝津2 を接種し、病徴進展の評価と樹体内における線虫頭数の測定を行なったところ、病徴進展については、貝津2 において発病した個体は少ない傾向にあった。樹体内における線虫頭数については、Ka4 は接種後14日目に爆発的に増殖した一方で、貝津2 は接種後21日目まで緩やかに増殖する傾向にあった。以上のことから、樹体内における線虫の増殖力にはアイソレイトの病原力の違いが影響している可能性が考えられた。

キーワード：マツノザイセンチュウ、貝津2、Ka4、弱病原力

I. はじめに

マツノザイセンチュウ, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle (以下、線虫) はマツ材線虫病を引き起こす病原体である(清原・徳重, 1971)。日本の異なる地域で採取された線虫培養個体群(アイソレイト)には、病原力の多様性が存在することが報告されている(Kiyohara and Bolla, 1990)ものの、アイソレイト間で病原力が異なる要因は明らかにされていない(秋庭, 2006)。アイソレイト間の病原力の強弱を決定づける要因の解明ができれば、線虫の病原因子の特定や、マツ材線虫の発病メカニズムの解明につながると考えられる。

九州大学と森林総合研究所林木育種センターは、第二世代抵抗性クロマツ品種開発に向けて、2013年度より林野庁委託事業であるマツノザイセンチュウ抵抗性品種開発技術高度化事業を共同で実施した。この事業では、全国でより強病原力を示す線虫を探索し、収集した線虫から多様なアイソレイトを作出している。林木育種センター九州育種場では、これらアイソレイトを対象として病原力評価を行っており、アイソレイト貝津2は弱病原力アイソレイトである可能性が提示された(未発表データ)。マツ材線虫病抵抗性マツの品種開発には、強病原力線虫が求められており、弱病原力を示すアイソレイトについてはこれまでの品種開発事業で保存されてこなかった。しかし、アイソレイト間の病原力の強弱を決定づける要因の解明には、多様な病原力を示すアイソレイトが必要である。病原力の強弱に関する要因解明には、ゲノム・遺伝子レベルでの分析を行なう必要があるため、これまで野外での接種検定による枯損率で評価されてきた貝津2の病原力についてはより高い精度で再度評価し、ゲノム・遺伝子レベルでの研究材料として適切か判断する必要がある。

線虫アイソレイトの病原力は、野外における接種検定を経て評

価するのが一般的である。しかし、線虫の増殖速度は温度に依存すること(堂園・吉田, 1974)や、樹体内での線虫の増殖が枯損と関係すること(Yamaguchi *et al.*, 2019)を考慮すれば、様々な環境要因が関与する野外環境において枯損率のみで線虫の病原力を正確に評価することは難しい。前述の高度化事業では、貝津2の病原力は、収集した他アイソレイトと共に評価されており、接種検定個体数自体も少なかった。2018年度には、予備的に貝津2の病原力と樹体内における増殖力を評価した。しかし、使用したクロマツ実生の苗齢が試験間で異なっており、貝津2が弱病原力アイソレイトであると結論づけることは困難であった。

本研究では、一般的な野外における接種検定に加え、人工環境下での接種検定を行なった。さらに、外部病徴を評価するだけでなくYamaguchi *et al.* (2019)が開発した樹体内線虫頭数評価手法を利用して、樹体内での頭数を測定した。これらの結果から、貝津2が弱病原力アイソレイトであるかどうかについて検証した。

II. 材料と方法

2-1. 病徴進展の評価

野外試験には、供試苗として森林総合研究所林木育種センター九州育種場(熊本県合志市須屋)内の苗畑にて播種及び育苗した苗を2019年4月1日に九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市西区元岡)の圃場内苗畑に移植した二年生クロマツ実生212個体(平均苗高 23.8 ± 2.8 cm)を使用した。温度環境を固定した人工環境下の試験では、温度が25℃に固定された九州大学内ファイトロンを利用した。供試苗には、九州大学箱崎キャンパス(福岡県福岡市東区箱崎)にて播種及び育苗後、2019年4月に九州大学伊都キャンパスにてビニールポットに移植した二年生クロマツ実生20個体(平均苗高 18.6 ± 2.6 cm)を使用した。接種

*1 Ito, K., Matsunaga, K., Yamaguchi, R. and Watanabe, A.: Evaluation of Kaizu2, candidate of avirulent population.

*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, 819-0395, 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

検定に利用した線虫（強病原力アイソレイト Ka4 および弱病原力候補アイソレイト貝津2）は *Botrytis cinerea* 上で培養後、ペールマン法により分離し、50 μ L あたり 5,000 頭に調整した。

野外試験では、2019年7月21日に九州大学伊都キャンパス圃場にて、212個体の半分に Ka4 を、残り半分には貝津2の線虫懸濁液 50 μ L をそれぞれ地際部分に接種した（図-1）。接種後70日目に各個体の病徴を5段階で評価（0：健全，1：針葉の下垂・退色，2：針葉の部分的な萎凋，3：部分枯損，4：枯損）した。試験期間中の野外の平均気温は 27.4 $^{\circ}$ C であった。25 $^{\circ}$ C 固定試験では、九州大学伊都キャンパスファイトトロンにおいて二年生クロマツ実生 20 個体を 10 日間順化した後、2019年7月21日に 10 個体に線虫懸濁液（Ka4）50 μ L を、残り 10 個体に線虫懸濁液（貝津2）50 μ L をそれぞれ地際部分に接種した。接種後70日間にわたって、週1~2回各個体の病徴を野外の試験区と同様に5段階で評価した。灌水は両試験区において十分に行なった。

2-2. クロマツ樹体内における線虫頭数の評価

供試苗には、2-1にて25 $^{\circ}$ C 固定試験区で使用した供試苗と同様に育成した二年生クロマツ実生 24 個体（平均苗高 18.6 \pm 2.6 cm）を用いた。九州大学伊都キャンパスファイトトロンにおいて二年生クロマツ実生 24 個体を 10 日間順化した後、2019年7月21日に 12 個体に線虫懸濁液（Ka4）50 μ L を、残り 12 個体に線虫懸濁液（貝津2）50 μ L を、それぞれ地際部分に接種した。

接種後 1・7・14・21 日目（days post inoculation, dpi）に各線虫を接種したクロマツを 3 個体ずつ、接種箇所上部からシュートを採取し、液体窒素中で凍結後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。DNA は線虫接種箇所の直上部 0.1 g から、Yamaguchi *et al.* (2019) の手法に従って抽出し、StepOnePlusTM Real-time PCR System (Applied Biosystems) を利用して、TaqMan quantitative real-time PCR (qPCR) 法による線虫頭数測定に供試した。絶対定量を行なうため、検量線は、線虫 1~10,000 頭の範囲で作成した。マーカーは、シングルコピーの *topoisomerase I* (Huang *et al.*, 2010) を用いた。リアルタイム PCR による測定は、各サンプルにつき 3 反復設けた。

Ⅲ. 結果

3-1. 病徴進展の評価

3-1-1. 野外試験における評価

70 dpi における各個体の病徴を 5 段階で評価した結果を図-2 に示した。Ka4 を接種したクロマツでは、全体のおよそ 72% に当たる 76 個体で病徴が確認された。枯損に至った個体数は、全体の約 43% に当たる 46 個体であった。一方、貝津2を接種したクロマツでは、全体のおよそ 59% に当たる 61 個体で病徴が確認された。枯損に至った個体数は、全体の約 25% に当たる 26 個体のみであった。

3-1-2. 25 $^{\circ}$ C 固定試験における評価

線虫接種後 70 日間にわたる各個体の病徴を 5 段階で評価した結果を図-3 に示した。Ka4 を接種した個体では 14 dpi に初めて病徴が確認され、病徴 3 段階目に至る個体も確認された。その後、ほとんどの個体で急激に病徴が進展し、21 dpi には全体の 80% の個体で病徴が確認された。70 dpi では、全体の 90% の個体で病徴が確認され、70% の個体が枯損に至った。一方、貝津2を接種した個体では 17 dpi に初めて病徴が確認され、24 dpi には病徴 3 段階に至る個体が現れた。その後、緩やかに病徴は進展した。70 dpi では、全体の 70% の個体で病徴が確認され、枯損に至った個体は 30% のみであった。

3-2. クロマツ樹体内における線虫頭数の評価

1・7・14・21 dpi に接種箇所上部 0.1 g から抽出した DNA を利用し、TaqMan qPCR 法によって検出された平均線虫頭数を図-4 に示した。測定された平均線虫頭数は、1 dpi では 49 \pm 10 頭（Ka4）と 30 \pm 6 頭（貝津2）、7 dpi では 692 \pm 83 頭（Ka4）と 607 \pm 335 頭（貝津2）であり、1・7 dpi では両アイソレイト間に差は認められなかった。しかし、14 dpi では 3534 \pm 1704 頭（Ka4）と 887 \pm 243 頭（貝津2）、21 dpi では 3496 \pm 1253 頭（Ka4）と 1275 \pm 607 頭（貝津2）であり、Ka4 では爆発的に増殖した一方で、貝津2では緩やかに増殖する傾向が認められた。

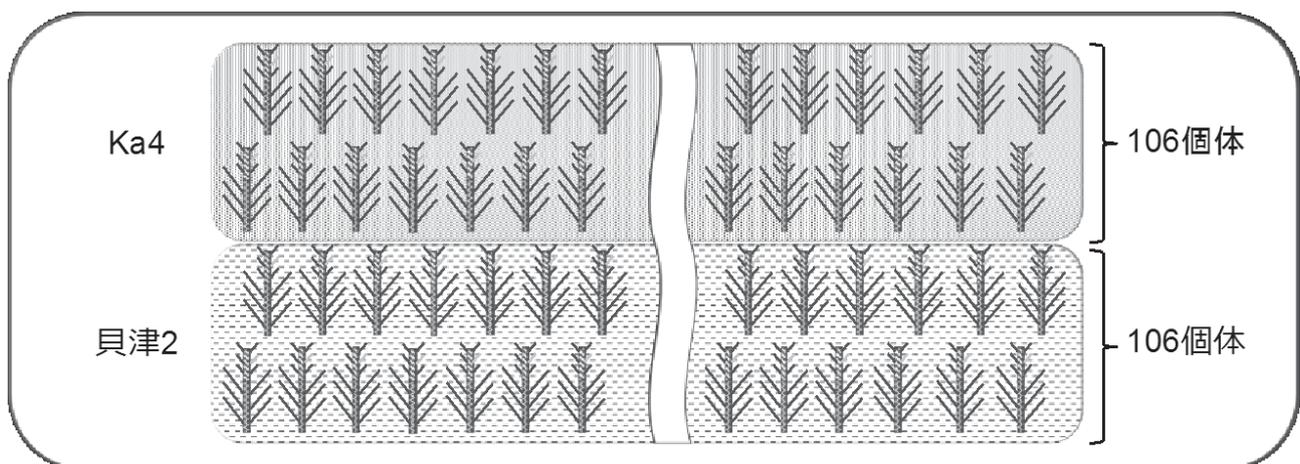


図-1. 野外試験区におけるクロマツ実生の配置図

Ⅳ. 考察

本研究では、野外と25℃固定試験区において、クロマツ実生に強病原力アイソレイト Ka4 と弱病原力候補アイソレイト貝津2を接種した結果、貝津2を接種したクロマツの枯損率は Ka4 と比較して低かった。抵抗性育種事業および2018年に行なった接種試験でも同様の傾向を示していることから、本結果の再現性は高く、貝津2は Ka4 アイソレイトと比較して病原力が低いアイソレイトであると結論づけることができる。

25℃固定試験区において樹体内の線虫頭数測定を行なった結果、1・7 dpi ではアイソレイト間に頭数の差は認められなかった。この結果は、樹体内に侵入し、接種箇所上部まで移動する能力には両アイソレイト間で差がないことを示唆している。しかし、Ka4 は14 dpi に爆発的に増殖し、病徴を示す個体数も線虫頭数の爆発的増加に併せて顕著に増加した。一方、貝津2は21 dpi まで緩やかに増殖しており、病徴を示す個体数も緩やかに増加した。清原・堂園 (1986) は、線虫の培地上での増殖力と病原力には相関があるとし、Jinu *et al.* (2011) は、両者間に相関関係はないとした。小林 (2016) は、貝津2を含む多数の線虫アイソレイトを対象に培地上の増殖力と病原力を評価した結果、両者間に明確な相関関係はないことを明らかにしており、Ka4 と貝津2の間にも大きな相違はなかった。Yamaguchi *et al.* (2019) は、樹体内での線虫頭数を正確に評価できる手法を開発し、樹体内線虫頭数の増加と病徴進展に高い相関があることを明らかにしている。培地上において貝津2と Ka4 間に明確な増殖力の差は認められないことを考慮すれば、供試した2つのアイソレイト間で樹体内での増殖力に差があることが病徴進展の差として現れた可能性が高い。

Hirao *et al.* (2012) は、線虫に対するクロマツ抵抗性品種と感受性個体間の応答を遺伝子発現レベルで評価し、線虫が樹体内に侵入後、防御応答に関連する様々な遺伝子が発現することを報告している。強病原力線虫とされている Ka4 や島原アイソレイト

は、これらクロマツの防御応答に対応し、樹体内での爆発的な増殖を可能にしていることが考えられる。一方で、貝津2ではクロマツの防御応答に対応できず、樹体内での増殖力が抑制されている可能性が考えられる。近年、線虫が宿主に感染した際に発現する様々なエフェクター候補遺伝子群が特定されており (Espada *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2019), これら感染に関与する遺伝子群が樹体内での増殖力の相違に関与している可能性が考えられる。

本研究では、貝津2は Ka4 と比較して病原力が低い線虫アイソレイトであることが示された。今後は、貝津2や Ka4 を含む多様な病原力を示すアイソレイトを利用して、近交系を作出し、ゲノムレベルでの研究を行なうことで病原力に関与する候補遺伝子を特定できると考えられる。本研究の結果から、貝津2は弱病原力アイソレイトとして貴重な遺伝資源に位置づけることができる。

引用文献

- 秋庭満輝 (2006) 日林誌 88: 383 - 391
 堂園安生・吉田成章 (1974) 日林誌 56: 146 - 148
 Espada M *et al.* (2016) Mol Plant Pathol 17 (2)
 Hirao T *et al.* (2012) BMC Plant Biol 12 (13)
 Hu L *et al.* (2019) Mol Plant Microbe Interac
 Huang *et al.* (2010) Eur J Plant Pathol 127: 89 - 98
 Jinu *et al.* (2011) Eur J Plant Pathol 130: 231 - 237
 Kiyohara and Bolla (1990) Forest Sci 36: 1061 - 1076
 清原友也・徳重陽山 (1971) 日林誌 53: 210 - 218
 清原友也・堂園安生 (1986) 日林九支研論 39: 157 - 158
 小林玄 (2016) 九州大学大学院生物資源環境科学府修士論文 (未
 公刊)
 Yamaguchi R *et al.* (2019) For Pathol 49 : e 12518
 (2019年11月8日受付; 2019年12月6日受理)

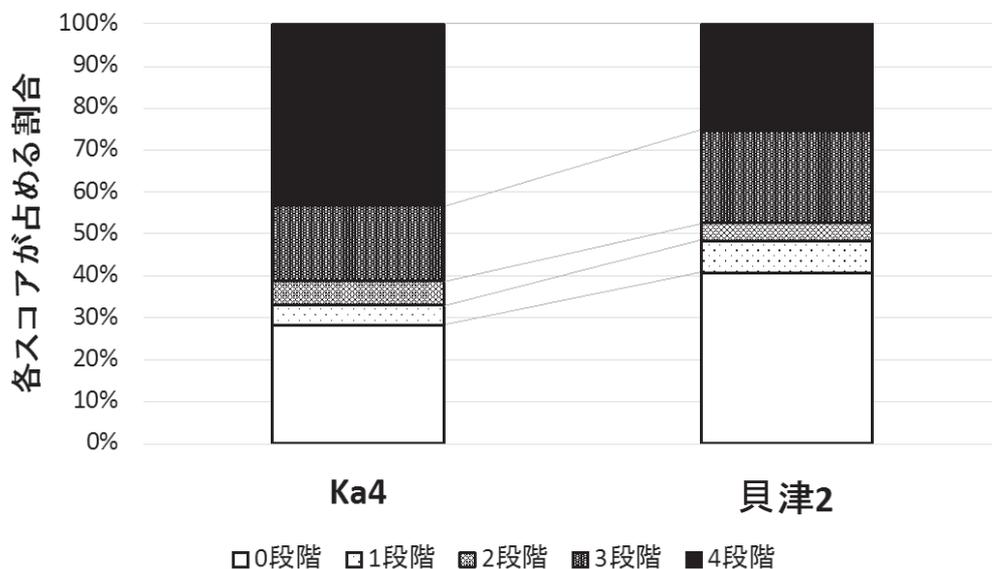


図-2. 野外試験区における線虫アイソレイト Ka4・貝津2接種後70日目の病徴スコアの割合
 病徴を5段階 (0:健全, 1:針葉の下垂・退色, 2:針葉の部分的な萎凋, 3:部分枯損, 4:枯損) で評価した結果を示す。

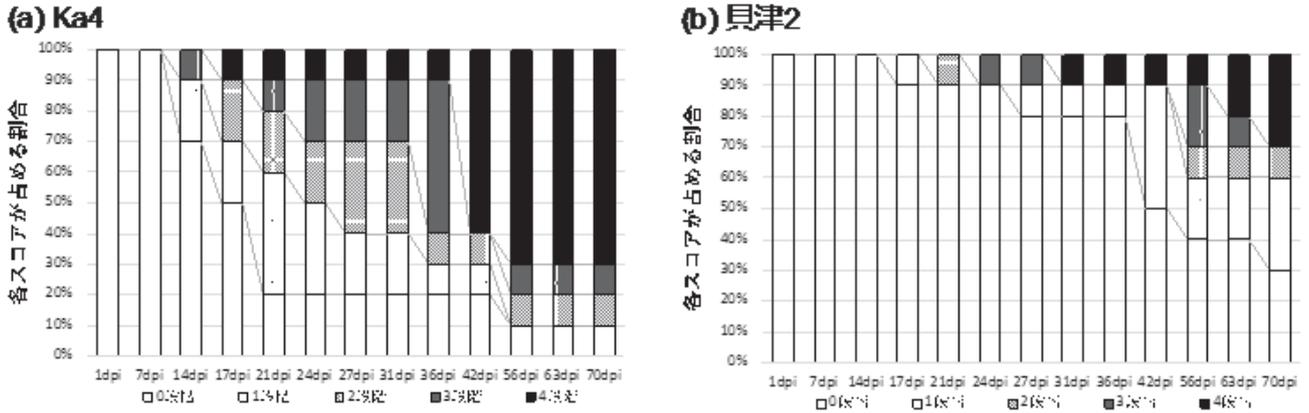


図-3. 25℃固定試験区における線虫アイソレイト Ka 4 (a) および貝津 2 (b) を接種後 70 日間にわたる病徴スコアの割合。各接種後経過日数における病徴を 5 段階 (0:健全, 1:針葉の下垂・退色, 2:針葉の部分的な萎凋, 3:部分枯損, 4:枯損) で評価した結果を示す。

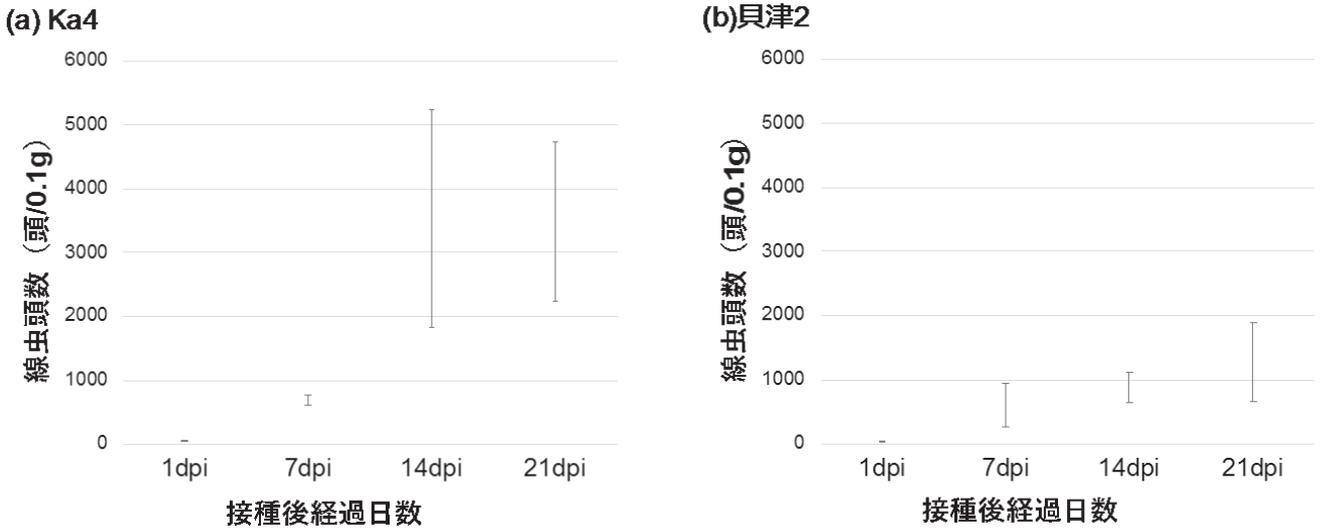


図-4. 線虫アイソレイト Ka 4 (a) および貝津 2 (b) を接種後の樹体内における線虫頭数。各接種後経過日数において、接種箇所直上のクロマツ 0.1 g 内から測定された線虫頭数の平均値および標準偏差を示す。