

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：81101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06130

研究課題名(和文) マツ材線虫病の病理解に資する抵抗性クロマツ樹体内の病原体の分布と増殖特性の解明

研究課題名(英文) Distribution and propagation characteristics of *Bursaphelenchus xylophilus* inoculated in grafts of resistant clone of *Pinus thunbergii*

研究代表者

中島 剛 (Nakajima, Gou)

地方独立行政法人青森県産業技術センター・農林部門・主任研究員

研究者番号：60743771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウ(以下、線虫)を接種した生存率の異なる2品種の抵抗性クロマツ接ぎ木苗の樹体内における接種線虫の詳細な分布と生存の有無を枝齢別に調査した。線虫を接種した約半年後の抵抗性クロマツでは、品種の生存率に関わらず、穂木の幹や枝、台木の大部分から線虫DNAが検出されること、穂木の幹の接種位置付近のみから僅かに生存線虫が確認されることを示した。また、接種線虫の樹体内分布の詳細を評価できるイメージング技術の手順を整備した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、抵抗性クロマツでは、品種の生存率に関わらず接種した線虫は樹体内に広く分布するが、接種の半年後には大部分の線虫は死滅していることを示した。このことから、抵抗性品種の選抜時に線虫を接種したクロマツ苗木であっても、接種以降の成長期に伸長したシュートは大部分が線虫非感染であり、これらを接ぎ木の穂木とすることで被害を広げることなく未被害地域に抵抗性クロマツが導入できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed within-tree distribution of *Bursaphelenchus xylophilus* (a pathogen of pine wilt disease) in inoculated grafts of two resistant *Pinus thunbergii* clone with different survival rate of the nematode inoculation. In these grafts, the nematode DNA was detected in most of the scion stems, and rootstocks at about 6 months after inoculation. And only a few live nematodes were extracted near the inoculated position of the scion stems, regardless of the survival rate of the *P. thunbergii* with *B. xylophilus*. In addition, we developed a procedure for imaging techniques that can visualize the details of within-tree distribution of infecting nematodes.

研究分野：森林科学

キーワード：マツ材線虫病 マツノザイセンチュウ 抵抗性クロマツ

## 1. 研究開始当初の背景

日本のクロマツ海岸林はマツノザイセンチュウ(以下、線虫)により引き起こされるマツ材線虫病により深刻な被害を受けている。本病による松枯れの被害は、わが国で最大級の森林病虫害であり、2011年以降、青森県でも被害が散見されるなど、高緯度地域で被害が拡大傾向にある。本病に感受性であるクロマツから構成される海岸林の機能や景観を維持するため、被害地域では線虫が感染しても枯死しにくい特性を有するクロマツ(以下、抵抗性マツ)の選抜と、これを母樹とした採種園産の種子に由来する実生苗の植栽が行われている。抵抗性マツの母樹は、被害林分に残存している健全木やそれらの実生苗に人為的に線虫を接種して選抜するため、未被害地域では本格的な選抜が実施できない。

未被害地域に早期に抵抗性マツを導入することで被害を最小化できると考えるが、選抜時の接種により樹体内に分布・増殖した線虫が長期間生存し、接ぎ木増殖に用いる穂木にも紛れ込む可能性がある。この生存線虫による被害拡大の懸念から、未被害地域に持ち込む抵抗性マツの穂木について線虫非感染であることを確認する必要がある。しかし、抵抗性マツ樹体内の線虫の分布や生存を長期に調査した研究はほとんど実施されていなかった。研究代表者らによる1品種の抵抗性マツ接ぎ木苗を対象とした線虫の接種試験と樹体内分布の調査結果では、接種した線虫のDNAは穂木の幹と台木の大部分で確認されるが、接種以降の成長期に伸長したシュートに線虫が感染している可能性は極めて低いことが示されていた。

## 2. 研究の目的

線虫の接種により選抜された抵抗性マツであっても、非感染部位を接ぎ木の穂木とすることで被害を広げることなく未被害地域に抵抗性マツが導入できる可能性が示されていたが、採種園は25品種以上の母樹から構成されることが望ましいため(他家受粉の確率を高めるため)複数品種の抵抗性マツについて非感染部位を正確かつ効率的に明らかにしていく必要がある。また、抵抗性マツが枯死しにくい原因や、マツが枯死する機序の全体像については十分理解されていない。

そこで本研究では、抵抗性の強さ(線虫接種による生存率)が異なる複数品種の抵抗性クロマツ接ぎ木苗に接種した線虫の(1)マツ樹体内における正確な分布を明らかにすること、(2)詳細な個体数を評価できる手法を整備することを目的に研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) マツ樹体内における線虫の正確な分布の評価:

17品種の抵抗性クロマツ接ぎ木苗を増殖して約1年半育苗した。夏季に線虫の接種を行い、接種の1週間後から10週間後まで、週に1回の頻度で苗木の生死を調査した(写真1)。

このうち、ログランク検定で生存曲線に有意差を認めた2品種について、接種の半年後に各3個体の苗木を採取した。これらの苗木は、枝齢別に切断後、線虫のDNAを検出するLAMP法(線虫が死滅の場合や形態による同定が困難な場合でも感染の確実な判断が可能だが、生死や個体数は確認できない)と線虫の運動性を利用して生存を直接確認するベールマン法(死滅した線虫は検知できない)という特性の異なる2つの分析手法を併用して線虫の分布を調査した。



写真1 マツノザイセンチュウを接種した抵抗性クロマツ接ぎ木苗

( 2 ) 樹体内の線虫の個体数を評価できる手法の整備 :

1 品種のクロマツ接ぎ木苗を増殖して約半年育苗した。夏季に線虫の接種を行い、その 11 日後に苗木を採取し、分析用の試料を作成した。本試料についてイメージング法による可視化を行うため、装置を用いた撮影とソフトウェアによる予備的な画像解析を繰り返し行い、最適な条件を検討した。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) マツ樹体内における線虫の正確な分布の評価 :

ログランク検定で生存曲線に有意差を認めた 2 品種について、接種の約半年後に各 3 個体の生存している苗木を採取した。これらの苗木を枝齢別に切断後、LAMP 法とパールマン法により線虫の樹体内分布を調査した。その結果、何れの品種においても穂木の幹や枝と台木の大部分から線虫 DNA が検出された。また、穂木の幹の接種位置付近のみから僅かに生存線虫が確認された。このことから、抵抗性マツでは品種の生存率に関わらず、線虫は樹体内に広く分布するが、接種の半年後には大部分の線虫が死滅していることが示唆された。今後、残りの各 3 個体の生存している苗木を用いて接種の 1 年半後における同様の分析を行うことで、「品種の生存率に関わらず、接種以降の成長期に伸長した抵抗性マツのシュートは線虫が感染していない」という仮説を証明する予定である。

( 2 ) 樹体内の線虫の個体数を評価できる手法の整備 :

線虫を接種したクロマツをイメージング法により撮影した結果、マツ樹体内における線虫が明瞭に識別された。画像解析で得られた線虫を示す領域の全長や a 値 ( 体長 / 最大体幅 ) は、光学顕微鏡法で計測されたマツノザイセンチュウの第 2 期幼虫から成虫までのそれらの文献値と概ね一致した。このことから本手法ではクロマツ樹体内の全ステージの線虫を識別できたと考えられる。今後、この手法を接種後の時間経過の異なる苗木や抵抗性品種に適用することで、これまでの顕微鏡などを用いた観察では理解が難しかった線虫のマツ樹体内における位置や密度、そして増殖特性を定量的に評価することで、抗性マツが枯死しにくい原因や、マツが枯死する機序の全体像の解明を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島剛・井城泰一・相川拓也・中村克典
2. 発表標題 抵抗性クロマツ接ぎ木苗に接種したマツノザイセンチュウの樹体内分布
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井城 泰一  (Taiichi Iki)  (40370845)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等    (82105)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	相川 拓也  (Aikawa Takuya)  (90343805)	国立研究開発法人森林研究・整備機構   (82105)	
研究協力者	中村 克典  (Nakamura Katsunori)  (40343785)	国立研究開発法人森林研究・整備機構   (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------