

マツ成木におけるマツノザイセンチュウの樹体内分布

— 病徴発症初期における効率的な検出のために —

¹秋田県立大学 ²森林総合研究所 東北支所
○中林優季¹ 相川拓也² 松下通也¹ 星崎和彦¹

1. はじめに

マツ材線虫病の診断は、枯死木の材片からマツノザイセンチュウが検出されるかどうかに基づき、一般に、幹の胸高付近から採取した材片のみで行われる。寒冷地のマツ材線虫病の特徴に、病徴の進行が遅いことがある（陣野ら, 1987; Ohta et al., 2012）。そのため、樹体内での材線虫密度のばらつきが大きく、材線虫の感染木であっても検出されにくいことが予想される（図 1）。したがって、寒冷地においても幹の胸高付近から採取した材片のみで本病の診断が十分か検討する必要がある。

マツノザイセンチュウの一般的な検出法は、顕微鏡下でマツノザイセンチュウを確認するベルマン法（真宮ら, 2004）である。近年開発された本病の診断キット（㈱ニッポンジーンより販売）は、マツノザイセンチュウの僅かな DNA が材片に残ってさえいれば、ベルマン法で材線虫を検出できなかったマツであってもマツノザイセンチュウを高感度で検出できる可能性がある（Kikuchi et al., 2009; 相川ら, 2010）。しかしながら本キットの適用研究は、Kanetani et al.

（2011）、木村ら（2011）などの例に限られている。また、いずれの事例でも、診断キットの正確かつ効率的な適用法については検討されていない。

そこで本研究では、(1) 検出方法（ベルマン法と診断キット）と、(2) 材片採取部位（枝と幹、枝葉の色、幹の高さ）の比較から、マツノザイセンチュウの効率的な検出のための材片のサンプリングデザインについて検討した。

2. 方法

秋田市下新城中野（北緯 39°48′、東経 140°02′）に位置する秋田県立大学秋田キャンパス周辺のマツ林において、2012 年 8~9 月にかけてマツ枯死木の探索を行い、病徴の進行度合いに合わせて供試木を 4 本選んだ（No. 1~4）。その際、①針葉変色を確認、②茶葉枝と緑葉枝が混在（病徴発症初期）、③胸高部の樹脂の滲出がほぼ停止、以上 3 つの条件を満たすマツ成木を供試木とした。また、病徴の進行について、発見から伐採までの期間毎月一度の頻度で、針葉の色を観察し樹冠に占める茶葉の割合を記録した（表 1）。

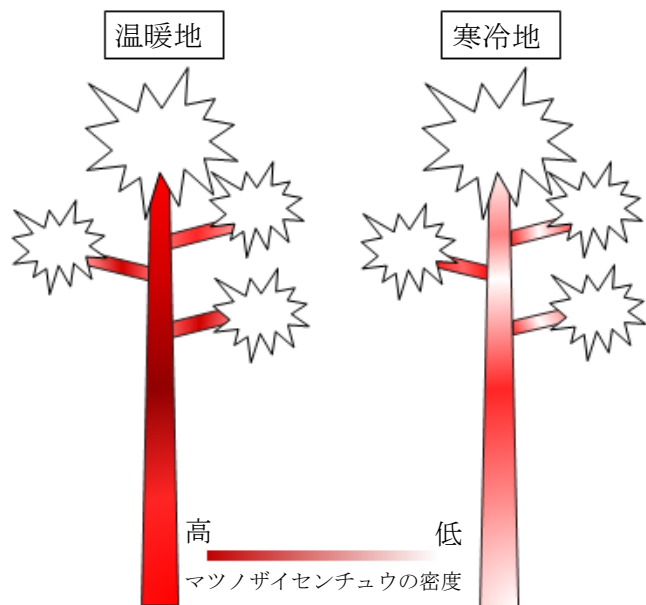


図 1. 温暖地と寒冷地における樹体内のマツノザイセンチュウのばらつきの違い

表 1. 供試木の概要および経過観察

供試木	樹種	8月25日		9月25日		10月29日		11月21日	
		樹高 (m)	DBH (cm)	茶葉割合** (葉色*) (%)	茶葉割合 (葉色) (%)	茶葉割合 (葉色) (%)	茶葉割合 (葉色) (%)		
No. 1	<i>Pinus densiflora</i>	12.5	23.6	b, g 50	b 100	b 100	b 100	b 100	
No. 2	<i>P. thunbergii</i>	18.4	23.2	b, y, g 50	b, y 90	b 100	b 100	b 100	
No. 3	<i>P. thunbergii</i>	16.7	30.9	b, g 60	b, g 60	b, g 80	b, g 80	b, g 80	
No. 4	<i>P. thunbergii</i>	20.1	33.4	-*** -	b, g 60	b 100	b 100	b 100	

* b (brown: 茶色)、y (yellow: 黄色)、g (green: 緑色) を示す。

** 針葉のうち茶色の葉の割合。

*** No. 4 は9月23日に発見したため、8月25日の記述がない。

供試木の変色確認後2週間以内に、枝では緑葉枝と茶葉枝よりそれぞれ4か所ずつ、幹では1、4、7mの高さよりそれぞれ4か所ずつ、供試木あたり計20か所から材片を採取した(図2)。各採取部位につき、ベルマン法で材片乾重1gあたりのマツノザイセンチュウの密度を求めた。また、ベルマン法と診断キットそれぞれでマツノザイセンチュウの検出率を求めた。

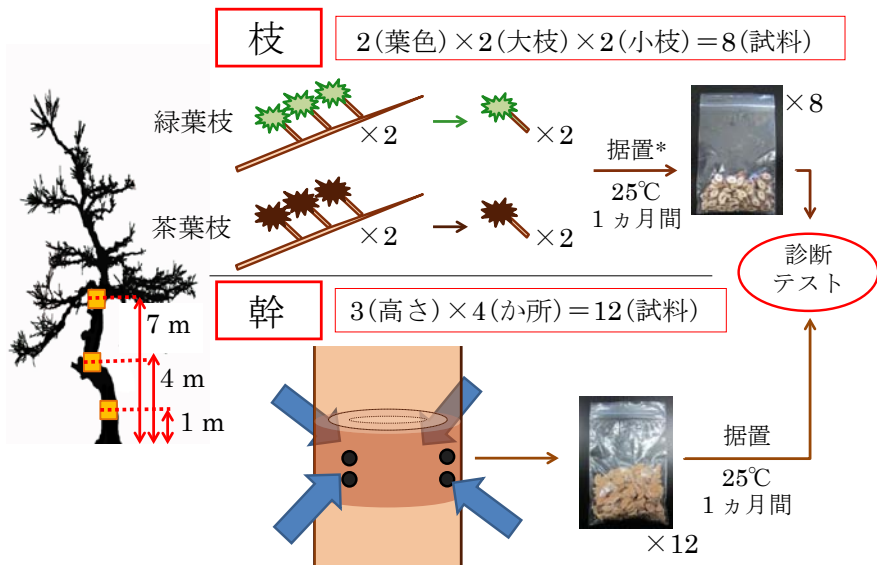


図 2. サンプルングから診断テストまでの流れ

* 線虫類を好適環境に置くことで、線虫類の増殖を促す。マツノザイセンチュウを検出しやすくするために一般的に行われている方法。

ベルマン法は試料につき1回ずつ、診断キットは4テストずつ行った。供試木ごとに線虫密度のばらつきが大きかったため、データ解析にはこれらのばらつきを柔軟に考慮できる一般化線形混合モデルを用いた。

表 2. ベルマン法と診断キットの検出率

供試木	ベルマン法		診断キット	
	検出数*	検出率(%)**	検出数	検出率(%)
No. 1	19	95.0	20	100.0
No. 2	3	15.0	7	35.0
No. 3	14	70.0	18	90.0
No. 4	17	85.0	20	100.0
全体	53	66.3	65	81.3

* マツノザイセンチュウが確認できた試料数。

** 検出率は供試木あたりの試料数(20)のうちの検出数の割合。全体での試料数は80。

3. 結果

(1) 検出方法の比較

1 供試木内 (例えば供試木 No. 1) であっても、採取した試料の線虫密度は、枝では2から769、幹では0から89と大きなばらつきがあった。

ベルマン法、診断キットでマツノザイセンチュウを検出できた試料の数はそれぞれ53(66.3%)、65(81.3%)

であり(表2)、ベルマン法よりも診断キットの方が検出率が高かった ($p = 0.004$)。また、どの供試木においても診断キットの方が検出率が高かった(表2)。さらに、ベルマン法では

マツノザイセンチュウを検出できなかった 27 試料のうち 14 試料では、診断キットによりマツノザイセンチュウが検出された。一方で、ベルマン法でマツノザイセンチュウを検出できた 53 の試料のうち診断キットで検出できなかったのは、わずか 2 試料のみであった。

(2) 材片採取部位の比較

① 部位 (枝 vs. 幹) 間の比較

診断キットを用いた検出率は、枝よりも幹の方が有意に高かった(枝: 55.5% vs. 幹: 78.1%; $p < 0.001$)。幹における供試木あたりの診断キットの平均検出率は、No. 2 (27%) を除き、88~100% であった (No. 1: 88%, No. 2: 27%, No. 3: 100%, No. 4: 98%) (図 3-A)。一方、ベルマン法によるマツノザイセンチュウの密度については、枝と幹とで有意差は認められなかった(枝: 197.4 vs. 幹: 143.0; $p = 0.48$)。

② 葉色 (緑葉枝 vs. 茶葉枝) 間の比較

ベルマン法では供試木によって緑葉枝のみでマツノザイセンチュウが検出されたものや茶葉枝のみで検出されたものがあるなど、線虫密度に一定の傾向は見られなかった(図 3-B)。また、ベルマン法による線虫密度について葉色間で有意な差は認められず(緑葉枝: 293.2 vs. 茶葉枝: 101.7; $p = 0.96$)、診断キットを用いた検出率についても有意な差は認められなかった(緑葉枝: 60.9% vs. 茶葉枝: 50.0%; $p = 0.30$)。

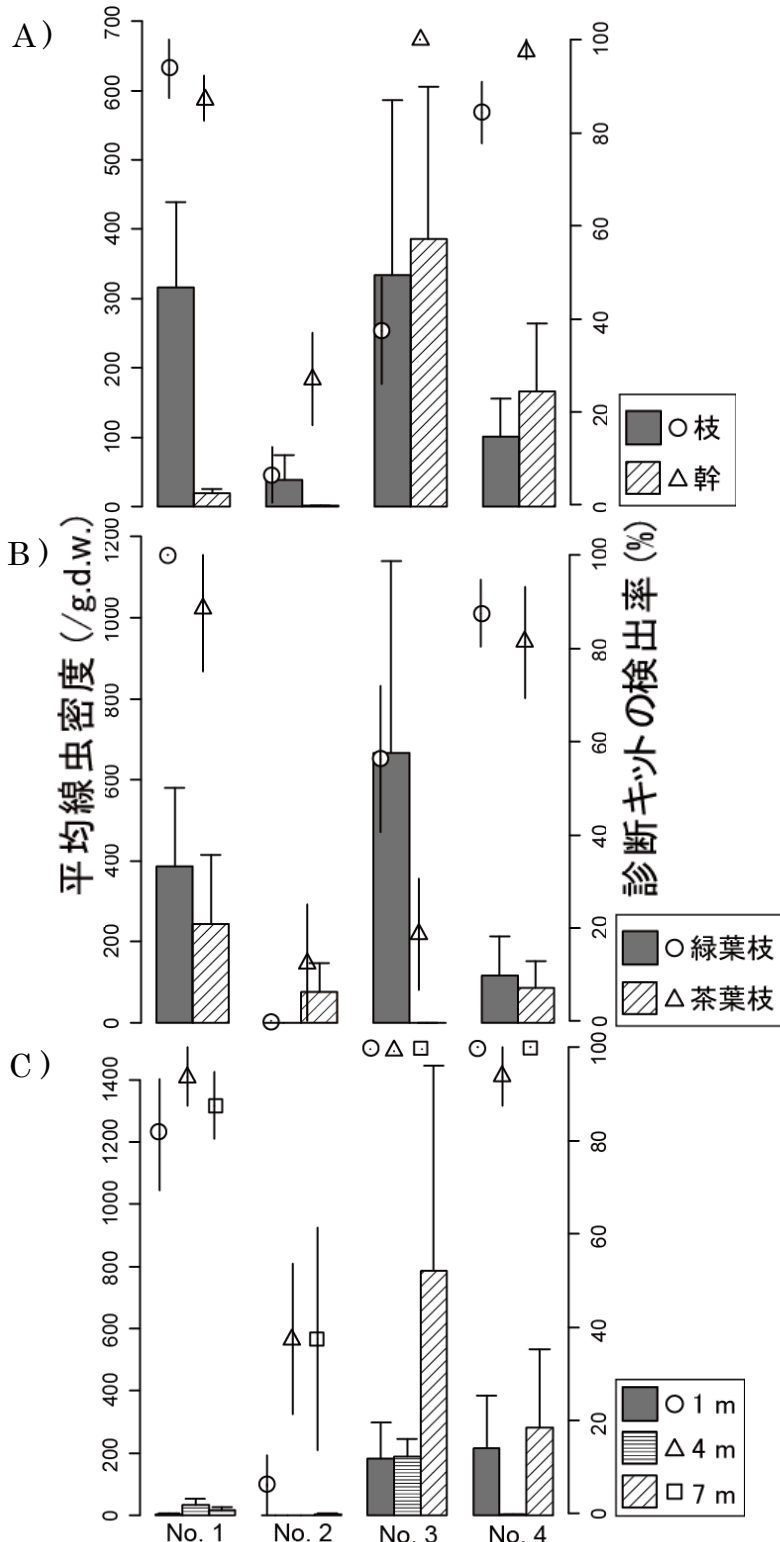


図 3. マツノザイセンチュウの線虫密度と診断キットの検出率の結果

A) 枝 vs. 幹、B) 緑葉枝 vs. 茶葉枝、C) 1 m vs. 4 m vs. 7 m の比較。棒グラフは線虫密度、○△□は診断キットの検出率を示す。エラーバーは標準誤差。

③高さ（1 m vs. 4 m vs. 7 m）間の比較

幹材片について高さ間で比較したところ、診断キットの検出率は1 mよりも4 m、7 mの方がやや高かった（1 m: 71.9% vs. 4 m: 81.3% vs. 7 m: 81.3%; $p = 0.072$ ）（図 3-C）。しかし、1 m 部位では診断キットでも検出頻度の極めて低い供試木もあった（図 3-C）。またベルマン法については、高さ間で有意な差が認められ（ $p < 0.001$ ）、高さ1 m（100.3）と比べて、4 mでは線虫密度が低く（56.8）、7 mでは高かった（271.8）。

4. 考察

(1) 検出方法の比較

従来のベルマン法と診断キットを比較したところ、診断キットの方が検出率が全体的に高かった。また、本研究ではベルマン法でマツノザイセンチュウを検出することができなかった試料であっても、診断キットで検出することができた。これらは、相川ら（2010）や木村ら（2011）が指摘しているように、診断キットによってマツノザイセンチュウが高感度で検出できることを示している。一方で、ベルマン法で検出されたにも関わらず、診断キットで検出できなかった試料もわずかながらあった。これは、診断キット1テストあたりに用いる材片が2枚（約0.12 g）にすぎず、材片内にマツノザイセンチュウがいなかったことが原因として示唆される（Kikuchi et al., 2009; 相川ら, 2010; Kanetani et al., 2011）。検出頻度の低い供試木については、誤った診断（偽陰性）を招く可能性もあるため、試料あたりのテスト数を増やしてもよいと考えられる。

(2) 材片採取部位の比較

枝よりも幹の高い部位で診断キットの検出率が高かった結果から、マツノザイセンチュウを効率的に検出するためには、幹の上部からの材片採取が望ましいと考えられる。採取してきた枝からマツノザイセンチュウが侵入したかどうかは枝材片の検出率に大きく影響していると考えられる。そのため、マツノザイセンチュウの移動経路の集合先である幹の方が侵入部位の枝よりもマツノザイセンチュウの検出率が高くなったと考えられる。また、幹について上部の方が検出率が高くなったのは、マツノザイセンチュウが枝（樹冠部）から侵入し、樹体内を下降してきたため、上部で線虫密度が高く、検出率も高くなったと考えられる。

材片の採取方法については、幹において、診断キットによる検出率やベルマン法による線虫密度のいずれも供試木内の試料で方位間よりも供試木間で大きくばらついたこと、また1本の供試木（No. 2）を除いて幹での検出率はほぼ100%であったことから、採取する際の方位についてはランダムであってよいと考えられる。しかしながら、線虫密度の低かった供試木 No. 2 で検出率がばらついた本研究の結果や、方位によって検出の有無が異なったという先行報告もあることから（Kanetani et al., 2011）、マツノザイセンチュウの密度が低い供試木に対しては、同じ高さであっても数ヵ所から材片を採取することが望ましいといえる。

5. まとめ

本研究では、枝よりも幹の高い部位でマツノザイセンチュウの検出率が高かったこと、診断キットの方が従来のベルマン法よりも検出率が高かったことから、幹の高い部位から材片を採取し、診断キットを用いることでマツノザイセンチュウを効率的に検出できるというこ

とが示された。

また、診断キットを用いて、供試木につき 80 テストの診断を行うために筆者が要した時間は 7~8 時間程であった。ベルマン法では材片から線虫類を分離する時間だけでも 24~48 時間を要する。さらに、分離後に顕微鏡下でマツノザイセンチュウを正確に同定する必要がある。この同定には、専門知識、あるいは専門知識を有する人のもとでのトレーニングが必要である（相川ら, 2010）。これらを考慮すると診断キットは、ベルマン法に比べて時間的にも労力的にも有用といえよう。したがって診断キットを用いた診断は、本研究の論点でもあるマツノザイセンチュウの効率的な検出という点において有効な検出法であるといえる。

引用文献

- 相川拓也・神崎菜摘・菊池泰正 (2010) マツノザイセンチュウの DNA を利用した簡易なマツ材線虫病診断ツール“マツ材線虫病診断キット”について. 森林防疫 59: 60-67
- 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. わかりやすい林業研究解説シリーズ 86, 林業科学技術振興所, 東京, 75pp
- Kanetani, S., Kikuchi, T., Akiba, M., Nakamura, K., Ikegami, H. and Tetsuka, K. (2011) Detection of *Bursaphelenchus xylophilus* from old discs of dead *Pinus armandii* var. *amamiana* trees using a new detection kit. For. Path. 41: 387-391
- Kikuchi, T., Aikawa, T., Oeda, Y., Karim, N. and Kanzaki, N. (2009) A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. Phytopathol. 99: 1365-1369
- 木村公樹・相川拓也・山本貴一・前原紀敏・市原 優・今 純一・中村克典 (2011) 青森県蓬田村に発生したマツ材線虫病被害木におけるマツノザイセンチュウの検出および媒介昆虫の加害状況. 東北森林科学会誌 16: 7-11
- 真宮靖治・二井一禎・小坂 肇・神崎菜摘 (2004) 材線虫 (日本線虫学会編, 線虫学実験法. 日本線虫学会, 茨城) pp.134-153
- Ohta, K., Hoshizaki, K., Nakamura, K., Nagaki, A., Ozawa, Y., Nikkeshi, A., Makita, A., Kobayashi, K. and Nakakita, O. (2012) Seasonal variations in the incidence of pine wilt and infestation by its vector, *Monochamus alternatus*, near the northern limit of the disease in Japan. J For. Res. 17: 360-368