

学 位 論 文 要 旨

氏 名	川口エリ子
題 目	クロマツの形態学的特徴とマツノザイセンチュウの移動抑制 (Morphological characteristics of <i>Pinus thunbergii</i> and inhibition of <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> migration)

マツ材線虫病抵抗性マツの育種や選抜にあたっては、抵抗性メカニズムを解明し、抵抗性の指標となるマツの特徴を明らかにすることが求められている。これまでに、抵抗性が強い樹種や家系ではマツノザイセンチュウ（以下、線虫）の移動や繁殖といった動態が抑制されることが知られている。そのため、これら線虫の動態を抑制する要因の解明を通して、抵抗性のメカニズムや抵抗性の指標となる特徴を明かにできる可能性がある。なかでも、マツ樹体内に侵入直後の線虫の移動は、その後の病徴進展に重要な意味を持つ。そこで、本研究では、クロマツの若枝を材料に、節間部と節とに分けて、線虫の主な移動経路である皮層樹脂道を中心に、マツの形態と線虫の移動との関係を調べた。

節間部については、抵抗性マツおよび非選抜マツの当年枝を用いて皮層樹脂道の数およびサイズと線虫の移動との関係について調べた。その結果、皮層樹脂道の断面積合計が小さい切り枝では、通過線虫数が少なかった。さらに、抵抗性マツでは、非選抜マツよりも皮層樹脂道の断面積合計が小さく、通過線虫数が少なかった。これらのことから、線虫は移動経路である皮層樹脂道の断面積合計が小さいと移動しにくく、クロマツでは線虫の移動を介して皮層樹脂道の断面積合計がマツ材線虫病抵抗性に関与している可能性が示唆された。また、非選抜マツを用いて、節間部の皮層樹脂道の断面積合計の個体間差および個体内差を調べた。その結果、個体間差に比べ個体内差は小さく、個体間の相対的な大小関係は年次に関わらず維持されていた。これらの結果から、皮層樹脂道の断面積合計は、個体や家系の抵抗性レベルを表す指標として、抵抗性育種への応用が期待される。

節については、非選抜マツを材料として、当年枝基部の節における皮層樹脂道の形態や、節を経由しての線虫の移動について調べた。通過線虫数は、節のある切り枝では、節のない切り枝に比べ少なかった。節の皮層樹脂道は、軸方向に走る直線的な節間部に比べ、走行が複雑で数が少なく、断面積も小さかった。これらのことから、節では皮層樹脂道の形態が複雑になり、線虫の移動が抑制されていると考えられた。また、節における輪生枝数が多い切り枝では、通過線虫数が少なかった。さらに、苗木での接種実験では、輪生枝数の多い苗木ほど病徴発現が遅れていた。したがって、輪生枝が多い苗木では、節での線虫の移動抑制が、病徴発現を遅らせたと考えられた。

本研究を通して、クロマツの皮層樹脂道のサイズや走行、節における輪生枝数といった形態的特徴が、線虫の移動に影響を及ぼすこと、そのことが苗木の病徴発現や抵抗性にも関与することが明らかとなった。これらの知見は、苗の形状や樹体の一部のサンプルによる個体の抵抗性の診断や抵抗性個体の選抜の省力化への道を拓くと期待される。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Kawaguchi Eriko

題 目 Morphological characteristics of *Pinus thunbergii* and inhibition of *Bursaphelenchus xylophilus* migration
(クロマツの形態学的特徴とマツノザイセンチュウの移動抑制)

For breeding and selection of resistant pine trees to pine wilt disease, it is essential to clarify resistance mechanism and to find the characteristics that represent resistance level. In resistant pine species and families, the inhibition of nematode activities; migration and reproduction within tree, have been reported. Therefore, clarification of the inhibition factors of these activities may be essential to understand the resistance mechanism. After infection, the nematodes migrate mainly through cortical resin canals (CRC) and the migration of nematodes in its early stage is an important factor in symptom development of pine wilt disease. In this study, the relationship between the Morphological characteristics of CRCs of Japanese black pine and the nematode migration were investigated to reveal how these characteristics of CRCs represent the resistance level of pine trees to pine wilt disease.

The relationships between the number and size of CRCs and nematode migration were investigated using the internodes of current shoots of resistance and non-selected pine seedlings. The number of nematodes that passed through a shoot cutting decreased with the total sectional area of CRCs. Additionally, the total sectional area of CRCs and the number of nematodes that passed through were significantly smaller in resistant pines than non-selected pines. These results suggest that the total sectional area of CRCs may relate with resistance to pine wilt disease.

The total sectional area of CRCs differed among seedlings but did not differ between shoot aspects. The order of total sectional area of CRCs among seedlings and families did not change among years. These results show that the total sectional area of CRCs might be genetically determined and can be applied to selection breeding of resistance as a useful index of the resistance level of individual pine trees or families.

In the node, fewer nematodes passed through the shoot cuttings with a node than those without node. CRCs ran more complex in and near a node. The number and the size of CRCs were smaller in nodes than in the internodes. These CRC characteristics were promising factors to evaluate the degree of the inhibition of nematode migration. The number of nematodes passed through a node was smaller if a larger number of whorled branches deviated from the node. The foliage discoloration began later in the seedlings with larger number of whorled branches than those with fewer whorled branches. These results suggest that the inhibition of nematode migration in the nodes with many whorled branches may result into the delayed symptom development of pine wilt disease.

In conclusion, the Morphological characteristics of Japanese black pine such as size and running pattern of CRCs and the number of whorled branches, which affected nematode migration, can determine the resistance level of individual pine trees and pine families to pine wilt disease. The Morphological characteristics of CRCs can be applied to diagnose of the resistance level of individual pine trees and pine families, which results into laborsaving for selection of resistant pine trees.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	川口エリ子
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 曾根晃一
	副査 鹿児島大学 教授 津田勝男
	副査 鹿児島大学 准教授 畑邦彦
	副査 鹿児島大学 准教授 坂巻祥孝
	副査 佐賀大学 准教授 吉賀豊司
審査協力者	
題目	クロマツの形態学的特徴とマツノザイセンチュウの移動抑制 (Morphological characteristics of <i>Pinus thunbergii</i> and inhibition of <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> migration)
<p>アカマツやクロマツの集団枯損を引き起こすマツ材線虫病は、わが国では最も重要な森林病害で、現在も毎年70万m³におよぶマツが枯死している。マツ材線虫病の防除対策として、薬剤の空中散布、被害材の伐倒・破砕、くん蒸、殺線虫剤の樹幹注入など様々な処置が講じられている。近年、環境に負荷の少ない天敵を用いた生物的防除とともに、クロマツやアカマツのマツ材線虫病に対する抵抗性の家系間差に基づいて選抜された抵抗性マツの植栽が進められている。抵抗性マツの選抜育種にあたっては、抵抗性のメカニズムの解明と抵抗性の指標となるマツの特徴を明らかにすることが求められている。これまでに、抵抗性の樹種や家系では、マツノザイセンチュウ（以下線虫）の移動や繁殖が抑制されていることが知られ、マツの樹体内に侵入直後の線虫の動態は、その後の病徴の進展に重要な意味を持つことが報告されている。そこで、学位申請者は、マツの樹体内に侵入直後の線虫の主な移動経路である皮層樹脂道の構造と線虫の移動の関係を明らかにし、マツ材線虫病に対する抵抗性を容易に判断するための指標となるマツの形態的特徴を明らかにしようとした。</p> <p>まず、クロマツの枝を節と節間部に分け、節間部の線虫の移動と皮層樹脂道の数とサイズ</p>	

の関係を調査し、抵抗性マツでは抵抗性非選抜マツ（以下非選抜マツ）より皮層樹脂道の断面積合計が小さく、線虫の移動も少ないことを明らかにし、クロマツでは線虫の移動に影響を及ぼしている皮層樹脂道の断面積合計が、マツ材線虫病抵抗性に関与している可能性を導いた。また、非選抜マツを用いて、節間部の皮層樹脂道の断面積合計の個体間差および個体内差を調べた結果、個体間差に比べ個体内差は小さく、個体間の相対的な大小関係は年次に関わらず維持されていたことから、皮層樹脂道の断面積合計は、個体や家系にとって固有の有望な抵抗性マツの指標として、個々の樹木のマツ材線虫病抵抗性の判定への利用できることを明らかにした。

次に、非選抜マツの当年枝の節間や当年枝基部の節における皮層樹脂道の形態を観察し、節を経由しての線虫の移動について調査した。その結果、節のある切り枝での通過線虫数は、節間での通過線虫数に比べ少ないことを明らかにした。皮層樹脂道は節間では軸方向に直線的に走っているが、節の部分では、皮層樹脂道の走行は複雑になり、樹脂道数が減少し、断面積も小さくなることを見つけた。また、節における輪生枝数が多い切り枝では、通過線虫数が少なく、苗木を用いた線虫接種実験では、輪生枝数が多い苗木ほど病徴発現が遅れていた。これらのことから、節では皮層樹脂道の形態が複雑になり、線虫の移動が抑制されていること、輪生枝が多い苗木では、節での皮層樹脂道の形態がより複雑になり、線虫の移動がさらに抑制され、その結果、病徴発現が遅れたと結論した。これらの結果をもとに、クロマツの形態的な特徴を用いた簡便なマツ材線虫病に対する抵抗性の指標の選定と、そのマツ材線虫病に対する抵抗性クロマツの選抜育種への応用について考察した。

以上のように、クロマツの形態的特徴と樹体内でのマツノザイセンチュウの移動の関係を明らかにした本研究は、わが国の最も重要な森林病害であるマツ材線虫病に対する抵抗性選抜育種の発展に大きく貢献するものと考えられた。特に、クロマツの節間部や節における皮層樹脂道のサイズや走行といった形態的特徴が、線虫の移動に影響を及ぼすこと、そのことが苗木の病徴発現や抵抗性にも関与するという知見は、苗の形状や樹体の一部のサンプルによる個体の抵抗性の診断や抵抗性個体の選抜の省力化への道を拓くと期待される。

したがって、審査員一同は、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値があるものと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	川 口 エ リ 子
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 曾 根 晃 一
	副査 鹿児島 大学 教授 津 田 勝 男
	副査 鹿児島 大学 准教授 畑 邦 彦
	副査 鹿児島 大学 准教授 坂 卷 祥 孝
	副査 佐 賀 大学 准教授 吉 賀 豊 司
審査協力者	
実施年月日	平成 2 2 年 1 月 2 8 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (<input checked="" type="radio"/> 口答) ・ 筆答	
<p>主査および副査は、平成 2 2 年 1 月 2 8 日 (木曜日) の公開審査会において、学位論文申請者に対し学位申請論文についての説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には、別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>また、筆記により、外国語 (英語) の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに見識を有し、博士 (農学) の学位を与えるに足る十分な資格を持つものと認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	川 口 エ リ 子
<p>Q:マツの成長と輪生枝数の関係は？</p> <p>A:当年生新梢では、マツが成長するにつれて輪生枝数は増加する。</p> <p>Q:実験に使用した線虫はどのようなものか？</p> <p>A:島原系統の線虫を使用した。この系統は、継代培養され、抵抗性マツの選抜の接種試験に通常利用されているものである。この線虫は、病原性が強いグループに属している。</p> <p>Q:使用した線虫のステージは？ステージにより病原性が異なるのでは？</p> <p>A:今回は、菌で培養した増殖型の線虫を使用した。野外では、カミキリにより運搬された分散型第IV期幼虫（耐久型）が、マツの樹体内に侵入する。耐久型の方が繁殖型より病原性が強いという報告がある。</p> <p>Q:枝の中を通過できなかつた線虫はどうなるのか？</p> <p>A:枝の中を移動できなくても、そこでの条件が良ければ増殖し、マツを枯らすことがある。一方、条件が悪化したり、もともと条件が悪かったりすれば、線虫はその場所で死亡していくので、やがては消滅する。</p> <p>Q:線虫がマツの樹体内に侵入し、最初にエピセリウム細胞を破壊してから樹木の生理機能が停止するまでに、どのようなことが生じているのか？</p> <p>A:線虫はエピセリウムを破壊しながら樹脂道内を移動する。そして樹体内を移動する際、柔組織をはじめ様々な組織を破壊する。初期の組織破壊は局所的であるが、線虫の移動に伴い、組織の破壊は拡大する。最近の知見では、形成層の破壊が枯死に繋がると考えられている。</p> <p>Q:輪生枝数はどのような形で育種に使用できる？</p> <p>A:輪生枝数が少ないと線虫の移動が妨げられない。抵抗性マツに比べ、抵抗性非選抜マツでは線虫の移動が盛んである。したがって、輪生枝数を抵抗性がない可能性が高い個体を選抜する初期のスクリーニングに利用できると考えている。</p> <p>Q:輪生枝数と最終的なマツ苗木の枯死率の間に有意な関係はみられなかったが、これについてどのように考えているか？</p> <p>A:輪生枝数の異なる節を通過する線虫数、または速度に違いがあるのかもしれない。輪生枝数が多い節では、通過する線虫数が少ない、または通過速度が遅いと考えられる。その場合でも、通過後に線虫が増殖したり、通過線虫数が時間経過とともに増加し、輪生枝数の少ない節の通過数とは変わらなくなったりすれば、マツの枯死率は輪生枝数の差にかかわらず等しくなる。線虫接種数を変えると、輪生枝数の影響がより明らかになるかもしれない。</p>	

Q:カミキリは幹に産卵するが、産卵痕から線虫が侵入することはないのか？

A:ゼロではないが、侵入数は後食痕からのものに比べ、著しく少ない。産卵痕からの侵入時には、マツは枯死寸前、または枯死後であるので、線虫の侵入の発病への効果はない。

Q:今回用いたクロマツの家系は波方73だけであるが、今回の結果は、この家系に限られたものなのか？

A:波方73以外のクロマツ抵抗性家系でも、同様の実験を行っている。他の抵抗性家系でも、線虫の樹体内移動が少ない、皮層樹脂道のサイズが小さい、節では樹脂道の走行が複雑になる、樹脂道のサイズが節間より小さい、樹脂道数が少なくなるといった、今回と同様の結果が得られている。したがって、今回の結果は、特定の家系に限定されたものではないと考えている。

Q:抵抗性として考えられる要因は何か？

A:抵抗性に関係しているのは、マツの樹体内に侵入した線虫の移動と増殖で、抵抗性樹種や家系では、移動や増殖が抑制されている。これらのことには、本論文で扱った形態的な特徴のみならず、樹体内の化学成分も関与している。抵抗性樹種では、線虫の繁殖や移動を抑制する化学物質が見ついている。形態的な特徴と化学成分の差が、複雑に絡み合っており、抵抗性を決定していると考えられる。

Q:感受性マツで、抵抗性マツのような化学成分についての情報はあるのか？

A:アカマツでは移動抑制成分が見ついているが、クロマツでは今のところない。したがって、樹体内の移動の差は、物理要因で生じていると考えて良いのではないかと。

Q:カミキリが後食する際滲出する樹脂（松ヤニ）は、線虫の侵入に影響を与えるのか？

A:樹脂が固まると線虫は侵入できない。滲出後すぐに樹脂の表面にできた薄い膜なら、線虫はそれを破って侵入できる。

Q:樹脂道の形状の差が個体内より個体間で大きかったが、生育環境が異なってもいえるか？

A:異なる生育場所で確かめたが、同じ傾向が認められた。ただ、極端に生育環境が異なると今回とは違う傾向がみられる可能性は否定できない。

Q:枝を通過した線虫は、接種した線虫だけか？

A:事前にチェックし、実験に使用した枝には線虫がいなかったのを確認している。

Q:線虫の移動の方向は？

A:通常は下の方向へ移動する。侵入後時間が経過すると、上方に移動する個体もみられる。節をまたいだ上方への移動は、節での皮層樹脂道の形状と重力の関係で困難だと思われる。

Q:枝を上下逆さにして実験したらどうなるか？

A:是非行ってみたい。興味深いデータが得られると思う。