

マツ材線虫病診断法の変遷

誌名	日本森林学会誌
ISSN	13498509
著者	竹内, 祐子
巻/号	101巻1号
掲載ページ	p. 17-25
発行年月	2019年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



マツ材線虫病診断法の変遷 —潜在感染木への適用可能性—

竹内 祐子^{*、1}

目の前にマツがある。立木でも丸太でもいい。果たしてこれは、マツ材線虫病キャリアだろうか。防除現場における伐倒駆除対象木の選定に際して、あるいは港・空港など梱包材を含むマツ材を輸出・輸入する水際で、マツ材線虫病診断が求められる場面は多い。マツ材線虫病をはじめとする樹木病害の症状は一般に重複していることが多く、厳密に診断を行うためには病原体の検出・同定が必要となる。本病においても、1971年に病原体がマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) という線虫であると特定されて以降、診断対象から病原体を分離し、あるいは分離せずに検出し同定するための手法が様々に開発されてきた。本稿ではマツ材線虫病の診断法、言い換えればマツノザイセンチュウの検出同定法の歴史を紹介し、各法の長所・短所を概説するとともに、明確な外部病徴を伴わないいわゆる潜在感染木への適用可能性について実際の調査事例を交えながら検証する。

キーワード：検索表、分子生物学的手法、形態、マツノザイセンチュウ、種同定

Yuko Takeuchi-Kaneko^{*、1} (2019) Transition of Diagnostic Methods of Pine Wilt Disease: Application Possibility to Symptomless Infection. J Jpn For Soc 101: 17-25 Assume that there is a pine tree/log in front of you. How do you know whether it is healthy or infected with pine wilt disease? There are several cases requiring diagnosis of pine wilt disease, for example screening of pine trees for eradication and at the port of entry of pine logs and/or packing materials. As symptoms of tree diseases including pine wilt disease often resemble each other, it is necessary for accurate diagnosis to detect and identify the pathogen from the suspicious subject. Thus a lot of morphological or molecular biological techniques have been developed to detect and identify the pathogenic agent, the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) with or without isolation from the subject since it was identified as pathogen in 1971 by Kiyohara and Tokushige. This paper reviews the history of detection and identification methods of the pine wood nematode, namely, diagnosis of pine wilt disease, and discusses their applicability to trees without obvious symptoms, so called latent carriers or asymptomatic trees with case examples.

Key words: key, molecular biological technique, morphology, pine wood nematode, species identification

I. はじめに

本病の病原体であるマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) は北米原産の外来種だが、自生するマツ属樹種の大半が本病感受性であり、土着のマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus*) が媒介昆虫となる日本においては、感染個体を早期に診断することが病気の蔓延を未然に防ぐ上で肝要となる。また、マツノザイセンチュウはEU諸国をはじめ40カ国以上で検疫対象に指定されており、針葉樹の木材および梱包材に関して輸出前の熱処理 (材芯温度56度で30分以上) や植物検疫証明書の添付など厳しい検疫基準が設けられている。未発地域への侵入を未然に防いだり、偽陽性による貿易損害を軽減したりするためにも、木材および木材梱包材中に紛れたマツノザイセンチュウの迅速かつ確実な検出技術の重要性は高い。

対象が動物であるか植物であるかに関わらず、感染症の病原体を特定する際の指針となるものにコッホの原則 (Koch's Postulates) がある。曰く、①その病気に感染した生物から常に特定の微生物が見出され、②その微生物は分離して純粋培養可能であり、③それを感受性生物に感染させたときに病気が再現され、④その病巣部から再び同じ微生物が分離されれば、その微生物が病気の原因であるという考え方である。マツ材線虫病の病原体がマツノザイセン

チュウであると特定された際にも、まさにこのコッホの原則を満たすことが確認された (清原・徳重 1971)。現在、本病の診断をする際には、基本的には対象のマツ (立木もしくは丸太) から病原体を分離し、それがマツノザイセンチュウであることを同定すればよい (図-1)。

II. サンプルング法

マツ樹体内で線虫を検出可能なのは針葉、球果、種子を除く全身の、特に心材よりも辺材の材組織である。対象となるマツ立木もしくは丸太の材組織 (材片やかんな屑を含む) の採取は、自活性線虫の混入を避けるために樹皮を取

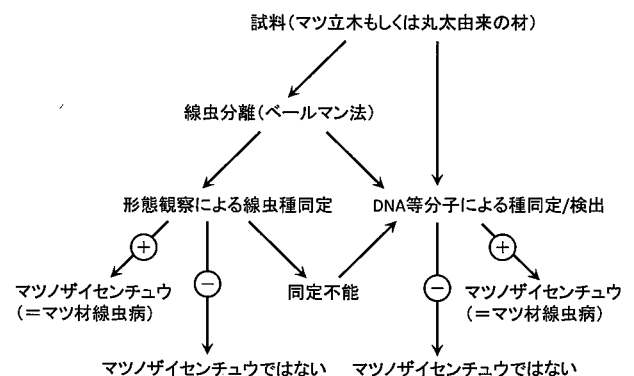


図-1. マツ材線虫病診断の流れ

*連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: yuuko@kais.kyoto-u.ac.jp

¹ 京都大学大学院農学研究科 〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町 (Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8502, Japan)

(2017年12月15日受付: 2018年4月3日受理)

り除いてから、剪定ばさみ、成長錐、電動ドリルその他の器具を使用して行う。この際、その後の検出診断プロセスで生きた線虫を対象とする場合は、線虫が熱で死ぬのを避けるために電動ドリルの掘削速度に注意する必要がある。また、DNA や RNA ベースの線虫検出を行う場合は、試料間のクロスコンタミネーションによる偽陽性のリスクを軽減するために器具の滅菌、洗浄に細心の注意を払わねばならない。

樹体内における線虫分布には時間的にも空間的にも偏りがある。樹体内への侵入後、感染初期の段階では線虫の増殖は抑制されており、感染部位付近の皮層に留まっているが、病徴進展期になると皮層および木部の樹脂道を通して全身へと移行し、個体数は爆発的に増加する (Fukuda 1997)。したがって、材試料からの線虫検出率および頭数は採取時期や場所によって大きく変動する。採取時期にもよるが、線虫の検出率を向上させるためには侵入経路の形跡すなわち媒介昆虫の後食痕 (あるいは摂食痕, 相川 2006; 神崎・竹本 2012) ならびに産卵痕付近をサンプリングした方がよい (石黒・相川 2016)。また、媒介昆虫フェロモン疑似物質に対するマツノザイセンチュウの化学走性を利用して、局在性をあらかじめ向上させてからサンプリングを試みた事例もある (Zhao *et al.* 2007)。

III. 材組織からの線虫分離

採取した材組織中にマツノザイセンチュウが存在するか否か診断するためには、基本的には線虫分離と線虫同定という二段階の作業を行う。

試料からのマツノザイセンチュウの分離・抽出には、線虫の運動性を利用したバールマン法 (Baermann 1917) が用いられる。これは漏斗にろ紙をセットして水で満たしたものに試料を仕掛け、一定時間静置した後に、能動的にろ紙を透過し、かつ重力によって下方へと沈降した線虫を回収する手法である。線虫密度が低いことが予想される場合は、抽出に先立って前培養を行い、予め試料中の線虫個体数を増加させることが推奨される (据え置き法; 橋本・清原 1972; Schröder *et al.* 2009)。その場合は樹皮を取り除き、湿度を保った状態でプラスチック製袋等に密閉して 25 度で 2~3 週間静置した後に抽出作業を行う。こうして得られた線虫懸濁液にはマツノザイセンチュウ以外の線虫が含まれている可能性があるため、引き続き形態的特徴もしくは DNA 等の分子生物学的特徴に基づいて線虫種同定作業を行う必要がある。

IV. 形態的特徴による線虫同定

材試料、特に腐朽の進んだ材試料から抽出された線虫懸濁液には複数の線虫種が混在する場合がある。この懸濁液を検鏡に供し、成虫の形態的特徴から検索表 (表-1) に従って種を同定する。なお、懸濁液中に幼虫しか存在しない場合は、灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) 等の食餌菌上で一定期間培養した後に同定に供する。マツ樹体内に生息する線虫群集のなかで自活性線虫の多くは口針を持たないため容易に区別できるが、口針を持つ植食性および菌食性線虫だけでも膨大な

数の線虫種が存在する。特にマツノザイセンチュウを含む Aphelenchoididae 科に属する線虫は、一部の昆虫寄生者を除いて比較的形態的特徴が少なく、*Bursaphelenchus* 属だけでも約 125 種 (5 亜種含む) 存在することから (神崎 私信), 同定には専門的な分類学的知識が不可欠となる。例えば、近縁種ニセマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus mucronatus*), や *Bursaphelenchus fraudulentus* との識別は一般に雌成虫の尾端形状 (特に尾端突起の有無) によって行うが (Mamiya and Enda 1979; Ryss *et al.* 2005), これはマツノザイセンチュウの中でも種内変異が大きく、北米産アイソレイトなどで突起がみられるほか (Wingfield *et al.* 1983), 枯死木から分離された雌成虫のなかには典型的な丸まった尾端ではなく、わずかに尖ったものや短い突起を有する個体が存在することが知られる (ただし、マツノザイセンチュウでは分散型 4 期幼虫以外の全幼虫ステージで尾端が丸く、培養して増殖させた場合にも雌成虫の尾端は典型的な丸まった形状となる, 新井ら 2009)。またフランスで分離された *Bursaphelenchus* 属線虫はマツ樹に対して弱い病原性を示したものの形態観察からは同定が難しく (de Guiran *et al.* 1985), マツノザイセンチュウとニセマツノザイセンチュウ双方と交配可能であったため (de Guiran and Bruguier 1989), マツノザイセンチュウおよび近縁種の定義に議論が生じた (このあたりの経緯については岩堀・二井 (1995) が詳しい)。

V. 分子生物学的特徴による線虫同定 —手法の変遷—

1984 年フィンランドにおいてアメリカから輸入したマツ材チップからマツノザイセンチュウが発見されたこと (Rautapää 1986) を端緒として、北欧 3 カ国とアメリカ、カナダ、日本との間で針葉樹材の禁輸措置をめぐる攻防が生じた。ヨーロッパにはフランスカイガンショウ (*Pinus pinaster*) やヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris*) など本病感受性マツが広く自生しており、また潜在的な媒介者となり得る *Monochamus* 属カミキリも存在するなど日本同様に本病感染・拡大の素地がある。警戒感が高まるのも無理はなかった。これに対し、マツノザイセンチュウは北米やヨーロッパのような冷涼な気候条件下では深刻な枯損被害を発生させないのではないかと指摘がなされた (Rutherford *et al.* 1990)。同時期にフランスで分離された *Bursaphelenchus* 属線虫はマツノザイセンチュウであり、実はヨーロッパには既に同種が日和見的に生息しているのではないかと (この推測については後に否定される。後述。) 禁輸措置は妥当なものであるのか? 政治的な思惑に加えて、形態的特徴による種同定に対する限界感もあって、分子生物学的手法に基づく同定技術の開発が急速に進められるようになった。

1. タンパク質ベースの線虫同定

1980 年代、新たなマツノザイセンチュウの識別・同定法としてまず開発されたのはタンパク質ベースのアイソザイム解析だった。これは、酵素タンパク質のアミノ酸配列の違いを電荷の違いに基づいて電気泳動の移動度の差として検出する手法であり、遺伝子型を反映したいわば「間接的な遺伝

表-1. マツノザイセンチュウ同定のための検索表

Bursaphelenchus 属 'xylophilus' グループへの検索		
1	ティレンクス型口針, 咽頭部には中部食道球あり。 ドリライムス型口針, 中部食道球をもたない。	2 Bx ではない
2	中部食道球に弁板あり。 中部食道球に弁板なし。	3 Bx ではない
3	陰門後部に単独の生殖腺。 陰門の両側に二つの生殖腺。	4 Bx ではない
4	中部食道球は極めて発達し, 卵形~円形~方形。側面の観察により, 口針節球後方に背部食道腺口および腹側に湾曲した食道管腔は認められない。 中部食道球は小さく紡錘状~円形であり, 側面からの観察で口針節球後方に背部食道腺口および腹側に湾曲した食道管腔が認められる。	5 Bx ではない
5	食道腺が背側で腸と部分的に重なる。 食道腺球が腸に隣接する。	6 Bx ではない
6	口針節球をもつ (ただし小さい)。 口針節球をもたない	7 Bx ではない
7	雄成虫の尾端が小さく明瞭な尾翼をもつ (背腹面で観察しやすく, 実体顕微鏡でも観察可能)。 雄成虫は尾翼をもたない。	8 Bx ではない
8	成熟雌の陰門は体の比較的前寄りにあり (V=70~80%)。雄の尾端は強く湾曲する。 成熟雌の陰門は体の後方にあり (V=85~90%)。雄の尾端は強く湾曲しない。	9 Bx ではない
9	側帯に4本の側帯溝をもつ。雌が明瞭な陰門蓋を伴う; 交接刺は強い弓形である。 側帯, 生殖器の特性は上記と異なる。	Bursaphelenchus 属 'xylophilus' グループ Bx ではない
マツノザイセンチュウへの検索		
1	雌の尾部は円筒状~やや円筒状で短い (c'値<4**)。 雌の尾部は円錐状で長い (c'値≥4**)。	2 Bx ではない
2	雌の尾部は円筒状で, 尾端突起はないもしくは小さい。 雌の尾部はやや円筒状で, 必ず尾端突起をもつ。	3 4
3	雌の尾端は幅広く丸まり尾端突起をもたない。個体群によっては長さ2μm以下 (ごくまれに3.4μmまで)の小さい隆起をもつ。排泄口は神経環の位置にあり, 陰門蓋は直線状。 材から分離した標本: 雌の尾端は幅広く丸まる。尾端突起はないが小型の微突起をもつ場合もある。陰門蓋は内側に折れ曲がり, 半分は深く食い込む。排泄口は中部食道球付近もしくは後方にある。培養標本: 雌の尾部は円錐状で先細るか細く丸まり, 長さ1~2μmの突出部をもつこともある。	Bx (R; round-tail) 型 Bx ではない
4	交接刺の長さは湾曲部に沿って平均<34μm。 交接刺の長さは湾曲部に沿って平均40 (34~44) μm。交接刺の中央部は長くほぼ直線状であり, 雌は明瞭な糸状の長さ2~4μmの尾端突起をもつ。	5 Bx ではない
5	雌の尾端突起は尾部から連続的につながる。 雌の尾端突起は尾部の中心からずれる。	Bx ではない 6
6	排泄口は中部食道球付近もしくは前方にある。尾端突起の形態は様々であり, 長さ4 (3~5) μm, 尾部の中心からややずれる。交接刺の condylus は後方の湾曲部から張り出し, 交接刺導片 (capitulum) は陥没しない。 排泄口は中部食道球付近もしくは後方にある。雌の尾端突起は長さ2.2~3.0 μm と短い。雄の交接刺の condylus は後方の湾曲部からやや張り出し, 交接刺導片 (capitulum) は明確にはくぼまない。	ニセマツノザイセンチュウ (<i>B. mucronatus kolymensis</i>)*** Bx (M; mucronate) 型***

Bursaphelenchus 属への検索表は EPPO (2013), マツノザイセンチュウ (表中「Bx」)への検索表は Braasch and Schönfeld (2015) より抜粋。*V 値, 頭端 (唇部前縁) から陰門までの距離の体長に対する百分率。**c' 値, 尾長を肛門部の体幅で割った比率 (尾長/尾部体幅)。***ニセマツノザイセンチュウのヨーロッパ型 (*Bursaphelenchus mucronatus kolymensis*; Braasch et al. 2011) と, 主に北米で分離されているマツノザイセンチュウの M (mucronate) 型, とを明確に識別するためには, 分子生物学的な種同定 (Gu et al. 2011) を行うことが推奨される。また, 菌叢上での培養により, 雌成虫の尾端形状に変異が生じる可能性がある (新井ら 2009)。

子マーカー」である。エステラーゼ, セルラーゼ, アスパラギン酸トランスアミナーゼなど各種酵素を対象とした解析により, マツノザイセンチュウの種内変異 (清原ら 1981), ニセマツノザイセンチュウとの識別 (de Guiran et al. 1985; Odani et al. 1985b), それら2種を含む *Bursaphelenchus* 属線虫間での識別 (Kiyohara and Bolla 1990) が可能であることが示された。

しかし, タンパク質ベースの場合, 線虫試料の採取時期および保存条件によって結果が左右される上に, 得られる多型の数にも限りがある。宿主との相互作用に関連した病原性の主体としてタンパク質に着目した研究が増える一方 (Odani et al. 1985a; Shinya et al. 2010, 2013 など), 種同定のツールとしてのタンパク質研究は徐々に減少し, やがてより直接的に DNA 多型を調べる方法にとって代わられることとなった。

2. DNA ベースの線虫同定

1980年代後半に入って DNA ベースの種同定手法が開発され始めた当初, 主流だったのはマツノザイセンチュウ特異的プローブを利用して DNA の検出を行うもので, 制限酵素処理をしたゲノム DNA を電気泳動した後にハイブリダイズを行うサザンブロッティング法 (Bolla et al. 1988; Kiyohara and Bolla 1990; Abad et al. 1991; Tarès et al. 1992; Harmey and Harmey 1993) もしくは同法とドットブロッティング法との併用 (Webster et al. 1990; Tarès et al. 1993) である。その過程で, 日本のマツノザイセンチュウ系統がアメリカ系統に近いことや (Tarès et al. 1992), 前述のフランス系統がニセマツノザイセンチュウであるとのコンセンサスができた (Webster et al. 1990; Braasch et al. 2011)。やがて, プローブの標識に放射性同位体ではなくジゴキシゲニン (DIG) が使われるようになって汎用性が向上するとともに (Abad 2000), DNA 抽出を

経ずにつぶした1頭の線虫体を直接特異的プローブで検出する手法 (Tarès *et al.* 1994) が開発されるなど、より応用可能性を視野に入れた研究が増えて行った。

同時期に起こった技術的な革新も大きく影響した。1987年に発表されたPCR (polymerase chain reaction) 法 (Mullis and Faloona 1987) によってDNAの特異的な増幅が可能になると、少量の試料で、より標的部位を絞ったDNAの識別が可能になった。上記のサザンブロット法では特異的プローブをハイブリダイズさせる全ゲノムは抽出量以上に増やすことができなかつたが、特定の領域を増幅するPCRプロセスが間に入ることで、元のDNAに質もしくは量の制限がある場合でも試験に供することができるようになった。特に、PCR産物を制限酵素処理した後の断片長パターンを用いて識別するPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法は幅広い研究者に受け入れられ、マツノザイセンチュウおよび近縁の様々な線虫種についても、様々な制限酵素を用いた膨大な断片長パターンの知見が蓄積された (Braasch *et al.* 1995; Iwahori *et al.* 2000; Liao *et al.* 2001; Zheng *et al.* 2003; Burgermeister *et al.* 2009)。その中で、決定版と言っているのがBurgermeister *et al.* (2009) だろう。マツノザイセンチュウを含む *Bursaphelenchus* 属44種を対象にリボゾーマルDNAのITS (internal transcribed spacer) 領域を標的としたPCR-RFLP解析を行い、5種の制限酵素断片パターンのいわば「照会用プロファイル」を紹介している。これを用いることで、マツ材から抽出された *Bursaphelenchus* 属線虫は高い確率で種レベルの同定が可能となった。応用的側面に注目するなら、Iwahori *et al.* (2000) も非常に重要な論文である。卵を含む各生育ステージの線虫1頭をろ紙でつぶしたものを利用し、それを直接供してPCR-RFLP解析を行うことに成功した。また、試料の保存法についても検討しており、蒸留水中で室温もしくは凍結、エタノール中で室温、各種保存液 (ホルマリンやエタノール、グルタルアルデヒド、TAF含む) 中において室温条件で保存した後解析を行った結果を比較することで、蒸留水中凍結試料およびエタノール保存試料では1カ月以上実験材料として利用可能であることを確認した。また同時にフィールドのアカマツ (*Pinus densiflora*) 被害木から抽出した線虫を実際に診断に利用し、有効性を確認している。この段階で、線虫が1頭でも分離できればマツノザイセンチュウかどうか診断することが可能となったわけである。PCRベースの手法としては、他に、標的部位を絞らないランダムプライマーを用いたRAPD (random amplified polymorphic DNA) 法があるが、再現性に難があり、またホモとヘテロを区別できない優性マーカーであるためRFLPなどの共優性マーカーに比べて分析精度に劣る。再現性の問題をクリアするために、マツノザイセンチュウとニセマツノザイセンチュウのRAPD断片から種特異的な断片をクローニングし、両種を識別可能な特異的プライマーを設計することで種特異的SCAR (sequence-characterized amplified region) マーカーを開発した事例もあるが (Chen *et al.* 2011)、マツノザイセンチュウの場合、種同定よりもむしろ種内変異を調べる際に

利用された事例が多いようだ (Irdani *et al.* 1995; Metge and Burgermeister 2006; Vieira *et al.* 2007)。

一方で、PCR-RFLP法よりもより簡便に結果を得ようと、Liao *et al.* (2001) はマツノザイセンチュウで増幅、ニセマツノザイセンチュウで非増幅のITS領域を標的としたプライマーを新規設計し、PCRだけで種の識別が可能であることを示した。併せてPCR-RFLP法で種内変異の少ない制限酵素を選抜し、基本的にはPCRで種の識別、必要に応じてPCR-RFLPを行うことを推奨している。この研究を端緒に、制限酵素処理を経ずにPCRで直接マツノザイセンチュウの検出、識別を行う研究が様々に発展することになった。以降の報告例を表2にまとめる。標的部位としてはリボゾーマルDNAが圧倒的に多いが (Kang *et al.* 2004; Matsunaga and Togashi 2004; Takeuchi *et al.* 2005; Zhuo *et al.* 2011)、ヒートショックプロテイン70遺伝子 (Leal *et al.* 2005) やサテライトDNA (Cardoso *et al.* 2012) を標的としたものもある。このうち、Zhuo *et al.* (2011) では、5種類のプライマーを使用してマツノザイセンチュウ、ニセマツノザイセンチュウ、*Bursaphelenchus doui* の3種を同時に検出可能なmultiplex one-step PCR法が開発され、実用的な利用可能性が大幅に向上した。

PCR法による種同定の精度が高まると、次に注目が集まったのは定量性である。2000年代半ば、高感度でしかも高精度に特定のDNA断片を定量的に検出することが可能なリアルタイムPCR法を利用してマツノザイセンチュウを特異的に検出しようという動きが広まった。PCR法のように反応後の電気泳動や染色・検出等の作業を行う必要もないため、作業効率の向上も期待された。リアルタイムPCR法は、SYBR Green Iなど、二本鎖DNAに結合して蛍光を発する試薬を利用したインターカラー法と、蛍光標識したプローブを利用したプローブ法とに大別されるが、マツノザイセンチュウのために開発された手法はそのほとんどが高い特異性を誇るプローブ法である。培養線虫および被害材由来の線虫懸濁液からDNAを抽出して定量に供したCao *et al.* (2005) を皮切りに数々の論文が発表され (Leal *et al.* 2007; Takeuchi and Futai 2009; Kang *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010; Filipiak and Hasiów-Jaroszewska 2016)、線虫DNA量の検出限度は1 pgまで向上した (François *et al.* 2007)。ただし、一般的に死線虫のDNAもある程度の期間は検出可能であり (後述)、また土壤中に含まれる反応阻害物質の影響などからリアルタイムPCRによる線虫数の推定は過剰評価になる傾向が認められることが指摘されている (Huang *et al.* 2017)。マツノザイセンチュウの場合も同様の結果が出ているほか (Takeuchi and Futai 2009)、条件によっては偽陽性が出るケースがあるなど (Anthoine and Chappé 2013)、定量目的で使用するには注意が必要である。

このリアルタイムPCRを検疫現場に応用しようとしたのがYe and Giblin-Davis (2013) である。マツノザイセンチュウの原産地として針葉樹材の輸出に制約の多いアメリカ合衆国では、ノースカロライナ州に公的な線虫の検査機関があり、アメリカ合衆国農務省動植物検疫局植物保護検疫所の依頼を受けて針葉樹材の証明書発行業務を行って

表-2. 分子生物学的手法による種同定法・診断法リスト

	標的部位	線虫分離	識別対照*	備考
PCR				
Liao <i>et al.</i> (2001)	rDNA ITS 領域	要	Bm	線虫 1 頭から DNA 抽出。
Abad (2000)	MspI satDNA	要		プライマーをビオチン標識して PCR 産物を抗原抗体反応で検出する PCR-ELISA。
Kang <i>et al.</i> (2004)	5S rDNA IGS 領域	要	Bm	
Matsunaga and Togashi (2004)	rDNA ITS 領域	要	Bm	
Takeuchi <i>et al.</i> (2005)	rDNA ITS 領域	不要	Bm, クロマツ	2 セットのプライマー用いた nested PCR。
Leal <i>et al.</i> (2005)	Hsp 70 遺伝子	要		
Hu <i>et al.</i> (2011)	不明	不要		
Zhuo <i>et al.</i> (2011)	rDNA ITS 領域	要	Bm, Bd	5 種のプライマー用いた multiplex PCR。
Cardoso <i>et al.</i> (2012)	MspI satDNA	不要		
Real-time PCR				
Cao <i>et al.</i> (2005)	rDNA ITS 領域	要	Bm, Bf, Btu, Ce	プローブ法。
Leal <i>et al.</i> (2007)	Hsp 70 遺伝子	要	Bm, Bc, Bd, Bf, Bs, Bh, Bth	プローブ法。
François <i>et al.</i> (2007)	MspI satDNA	不要	Bm	プローブ法。プライマー開発時には他に 9 種の <i>Bursaphelenchus</i> 属線虫使用。
Takeuchi and Futai (2009)	β -tubulin 遺伝子, rDNA ITS 領域	不要	-	インターカレーター法。
Kang <i>et al.</i> (2009)	5S rRNA 遺伝子	要	Bm	インターカレーター法。
Huang <i>et al.</i> (2010)	DNA topoisomerase 遺伝子	要	Bm, Bh, <i>Seinura wuae</i>	プローブ法。
Ye and Gibling-Davis (2013)	rDNA ITS 領域	要	<i>Bursaphelenchus</i> 属線虫 22 種含む 97 個体群	プローブ法。線虫ユニバーサルな反応と Bx 特異的の反応を組み合わせた duplex real-time PCR。
LAMP				
Kikuchi <i>et al.</i> (2009)	rDNA ITS 領域	不要	<i>Bursaphelenchus</i> 属線虫 10 種含む 21 個体群, <i>Botrytis cinerea</i> , クロマツ, アカマツ	マツ材線虫病診断キットのベースに。
Kang <i>et al.</i> (2015)	Pectate lyase 3 遺伝子	要	Bm, Bd, Bt	使用機器の精度が低い場合に蛍光指示薬としてカルセインの添加を推奨している。
RT-PCR with high resolution melting (HRM)				
Filipiak and Hasiów-Jaroszewska (2016)	rDNA ITS 領域	要	Bm	PCR 産物が熱変性により二本鎖から一本鎖に分離する現象を蛍光強度で検出し、塩基配列の多様性を評価する手法。断片長が同一の場合でも Bx と Bm との識別可能。Real-time PCR はインターカレーター法。
RT-PCR, RT-real-time PCR				
Leal <i>et al.</i> (2013)	Hsp 70 遺伝子	要	Bm, Bc, Bd, Bf, Bs, Bh, Bth	逆転写後に増幅反応を行うことで生線虫のみ検出。Real-time PCR はインターカレーター法。
RT-LAMP				
Leal <i>et al.</i> (2015)	Bx-expb-1 遺伝子	不要	Bm, Bc, Bd, Bf, Bs, Bh, Bth	逆転写後に増幅反応を行うことで生線虫のみ検出。

*Bc, *B. conicaudatus*; Bd, *B. doui*; Bf, *B. fraudulentus*; Bh, *B. hofmanni*; Bm, *B. mucronatus*; Bs, *B. singaporensis*; Bth, *B. thailandae*; Btu, *Bursaphelenchus tusciae*; Ce, *Caenorhabditis elegans*

る。2013 年当時、中国への輸出に関するものだけでもマツ材 3,934 サンプルを検査、うち 233 について報告書を作成するという膨大な業務だったことから、リアルタイム PCR (プローブ法) を利用した簡便かつハイ・スループットな診断法が開発された。材から分離した線虫懸濁液から DNA を抽出し、それを鋳型としてマツノザイセンチュウのリボゾーム DNA の ITS 領域を標的とした反応と、線虫共通の SSU (small subunit) を標的とした反応を同時に行い、両者を別々の蛍光色素で標識したプローブによって検出できるようにした。この duplex-real-time PCR により、線虫の有無とその中にマツノザイセンチュウが存在するかどうかを同時に判別することができ、偽陰性のリスクを軽減できる。*Bursaphelenchus* 属 13 グループ中 9 グループに及ぶ 22 種を含む、実に 97 の線虫個体群を用いて特異性と感度を確認している。抽出された線虫懸濁液中に、生育ステージに関わりなく、生きたマツノザイセンチュウが 1 頭でもいれば検出可能であり、輸出規制の「ゼロ・トレランス方

式」に合致するとしている。

また、より汎用性を高めるためにサーマルサイクラーを必要としない LAMP 法 (loop-mediated isothermal amplification: Notomi *et al.* 2000) による線虫検出法も開発された。これは標的遺伝子の 6 領域に対して設計した 4 種類のプライマーセットを使用した増幅反応で、プライマー結合部位にループ構造が生じるように設計することで 1 本鎖であるループ部分には熱変性なしにプライマーの結合が可能になることを利用したものである。酵素は通常の PCR で用いられる Taq ポリメラーゼなどとは異なり、伸長過程にある二本鎖を解離しながら相補鎖を合成する鎖置換活性の高い BstDNA polymerase を使用し、定温で短時間のインキュベーションにより反応を進行させる。Kikuchi *et al.* (2009) は、マツノザイセンチュウのゲノム DNA 上の 4 遺伝子を標的にプライマーを設計し、偽陽性のリスクが低いリボゾーム DNA の ITS 領域に設計したプライマーセットを選抜した。さらに陽性の反応産物を検出する蛍光標識プローブを付加

することで、目視による陽性／陰性の判別を可能にした。この手法では約 0.12 g の材サンプルからベールマン法による線虫抽出を経ずに直接マツノザイセンチュウを検出できる(後述)。なお、この手法をもとにしたマツ材線虫病診断キット(ニッポンジーン)が 2009 年 6 月に発売され、一般にも入手可能になった(相川ら 2010)。

3. 材内のマツノザイセンチュウ検出に向けた動き

線虫の能動的な活動を利用して遊出するベールマン法は必ずしも 100% のマツノザイセンチュウが抽出可能なわけではなく、漏斗を含む抽出器具への附着によるロスも大きい(真宮 1975)。蛍光標識レクチンを用いた実証試験でも、2 日間のベールマン抽出後に 24~30% のマツノザイセンチュウが試料中に残留していたことが確認されている(Son and Moon 2013)。このため線虫密度の低い試料や凍結試料には適さず、また時間や労力など制限要因も多い。

分子生物学的手法を利用することで、材から線虫抽出を経ずにマツノザイセンチュウを直接検出しようという構想は早くからあった。Harmey and Harmey (1993) は、新規開発した DNA プロブを用いて、マツノザイセンチュウに感染したヨーロッパアカマツからの線虫検出を試みた。結果は失敗に終わったものの、同じ領域を標的とした PCR 用プライマーを開発しており、今後より迅速かつ特異性の高い検出手法の開発が可能になるだろうと述べている。リアルタイム PCR による線虫検出法を開発した Cao *et al.* (2005) も、ベールマン法による線虫分離を経ずに材からの検出を試みるも失敗したことに言及している。その後、材に含まれる PCR 阻害物質を除去するために電磁ビーズ(Leal *et al.* 2005) やシリカ膜(Burgermeister *et al.* 2005) を利用した手法が開発され、やがて実際に材内の線虫を直接 PCR (Takeuchi *et al.* 2005; Hu *et al.* 2011; Cardoso *et al.* 2012)、リアルタイム PCR (François *et al.* 2007; Takeuchi and Futai 2009)、LAMP 法(Kikuchi *et al.* 2009) によって検出した成功例が報告されるようになった。特に LAMP 法では材からの DNA 抽出過程で粉碎の必要がなく精製不要なため、DNA の損失リスクが少なく 20 分という短時間で結果を得ることができる。また、Kanetani *et al.* (2011) は枯損からかなり時間の経過したヤクタネゴヨウ (*Pinus armandii* var. *amamiana*) の丸太に LAMP 法による診断キットを適用し、枯損後少なくとも 6 年経過した場合でも遡及的検出が可能であることを示した。

材内の線虫が検出できるようになり検疫現場での実用化も視野に入ってきたことで、次なる目標としてクローズアップされつつあるのは「生きた線虫」の検出である。基本的に DNA ベースの手法は線虫の生死にかかわらず検出可能な DNA さえあれば結果が得られるが、植物防疫上の規制対象はあくまで生きた線虫のみであるため、生きた線虫だけを検出しようと RNA ベースの手法も開発されつつある。Leal *et al.* (2013) は、抽出した RNA を逆転写反応させた cDNA を PCR およびリアルタイム PCR (インターカレーター法) の鋳型とすることで、生きた線虫の検出に成功した。プライマーは、ゲノム DNA が混入した場合でも増幅産物長が異なるように (PCR)、あるいは増幅しない

ように (リアルタイム PCR)、新たに設計された。EU 加盟国をはじめ多くの国では、針葉樹およびその加工品を輸入する際に加熱処理(中心温度が 56°C 以上で 30 分以上)済みであることを要求しているが、Leal らはこの加熱処理を行った 2 週間後の感染丸太からマツノザイセンチュウを分離・検出してみたところ、RNA ベースではすべて陰性の結果が得られたものの DNA ベースでは陽性反応を示すサンプルがあったことを指摘している。ただし、この時点では材からベールマン法により線虫を抽出した上で核酸抽出を行っており、材から直接生きた線虫を検出したのではなかった。その後、Leal *et al.* (2015) はより簡便な検出法として RNA ベースの LAMP 法を開発した。標的遺伝子であるエクспанシン遺伝子 (*Bx-expb-1*) のイントロンを含む領域にプライマーを設計することで、ゲノム DNA は増幅しないよう工夫している。サンプルの凍結粉碎や RNA 抽出の手間と時間はかかるものの、cDNA 合成と LAMP 反応を 1 ステップで行うことで検出反応自体は 30 分で完了する。この手法では、加熱処理後 2~4 日で線虫は検出されなくなったとしている。この手法では約 4 g の木片から直接 RNA を抽出しており、材から生きた線虫を直接検出した初めての事例となった。

VI. 分子生物学的手法によるマツ材線虫病診断 —潜在感染木への応用—

DNA ベースのマツノザイセンチュウ検出法の大きな利点は、線虫密度が極めて小さい場合でも採取したサンプル中に線虫が含まれていれば検出できることにある。すなわち、マツノザイセンチュウ感染間もない時期の線虫密度が低い場合や線虫の分布が偏っている場合、東北地方など冷涼な気候に多い、感染時期が遅いなどの理由で病徴の進展が翌年以降に持ち越される年越し枯れ木(Nakamura-Matori 2008)、あるいは線虫側の病原力と宿主側の抵抗性との兼ね合いによって発病することなく潜在感染化したような無病徴の感染木、すなわち潜在感染木(Futai 2003)などにも適用できる可能性がある。

Takeuchi and Futai (2007) は、PCR 産物を鋳型に再度 PCR を行う nested PCR により検出感度を向上した Takeuchi *et al.* (2005) の手法を用いて、実際の野外林分において調査を行った。数年来マツ材線虫病被害が続いている鳥取県のクロマツ (*Pinus thunbergii*) 林分と石川県のアカマツ林分を対象に調査地を設け、本病感染シーズン前に、外部病徴および樹脂分泌量の調査を行った上でマツノザイセンチュウの感染診断を行った。その結果、クロマツ林の 2 つのプロットで 70.4% および 23.1%、アカマツ林で 11.5% の試験木がマツノザイセンチュウ陽性反応を示し、かつ外部病徴も樹脂分泌の異常も全く認められなかった個体はそれぞれ 23% および 15%、3% を占めたとした。それらの個体は潜在感染木であったと考えられるが、特にクロマツの潜在感染木の中には同年秋に行った調査でも外部病徴ならびに樹脂分泌の異常を示さない個体が複数認められており、無病徴のまま数年単位で生存し続けている可能性がある」と指摘している。後に Ribeiro *et al.* (2012) が指摘

したように、Takeuchi *et al.* (2005) の報告した nested PCR のうち最初の PCR を省略してもマツノザイセンチュウ検出能は十分高く、nested PCR 用プライマーを用いて 2 回目の PCR のみを行うことで労力とコストを削減し、調査規模を拡大することも可能だろう。

また Hoshizaki *et al.* (2016) は、マツ材線虫病被害が比較的穏やかな秋田県内の 60~90 年生アカマツ・クロマツ混交林において、市販のマツ材線虫病診断キットを使用した感染診断を行った。調査地は冷涼な気候であり、感染シーズンは 7 月後半から 10 月前半までに及ぶため発病までのタイムラグがあると予想されることから、潜在感染木が存在するだろうとの想定のもとでのことだった。人工的にマツノザイセンチュウを接種したが外部病徴も樹脂分泌の異常も示さなかった生残マツ個体と、一時的な針葉退色後に回復した本病感染が疑われるマツ個体を対象に調査を行った結果、前者では 3 個体中 2 個体、後者では 18 個体中 6 個体でマツノザイセンチュウ陽性という高い検出結果が出た。しかし、個体単位では 38% のマツ個体で陽性だったのに対し、サンプル単位では 1.5% のみ、マツノザイセンチュウ陽性個体に限っても 3.8% のサンプルでしか陽性結果が得られず、その分布は高所に集中していた。媒介昆虫による線虫感染が発生したと考えられる高所から樹幹部まで線虫が移動して来なかった要因として、低温 (Rutherford *et al.* 1990; Ichihara *et al.* 2000)、マツノザイセンチュウの病原力の低さ (Ichihara *et al.* 2000)、分枝の多さ等マツ組織内の物理的障害 (川口・市原 2010)、宿主マツ側の抵抗性 (Kuroda 2004) などの影響を挙げている。Hoshizaki らはこの結果から、潜在感染木の存在は看過すべきでなく継続的なモニタリングを行うことが必要だろうと述べている。

VII. おわりに

マツノザイセンチュウ検出法の変遷をマツ材線虫病診断との関連で紹介してきたが、検出法が利用される場面はそれだけではない。中島ら (2016, 2017) は、抵抗性マツ育種においてマツノザイセンチュウが生残していない器官を接ぎ木の穂木とすべきであると提唱し、LAMP 法 (マツ材線虫病診断キット) を導入して感染位置を特定する試みを継続的に続けている。また山口ら (2017) は、線虫接種後の線虫頭数の推移をリアルタイム PCR 法により推定するとともに、宿主クロマツにおける感染特異的 (PR) 遺伝子群の発現様式を調査し、両者に正の相関が認められたことおよび樹体内の線虫が一定頭数に達すると枯損に至る可能性が高いことを報告している。分子生物学的手法に基づくこれらの検出法は凍結試料にも適用可能であり、またサンプル量も少なく済むため、今後も様々な研究に応用される機会が増えるだろう。

また、VI. で紹介した二つの研究例からも、分子生物学的手法を利用したマツノザイセンチュウ検出法は潜在感染を含む実際の感染診断に有効であると言える。最近では PCR 機器、リアルタイム PCR 機器、インキュベーターのいずれも小型化されて持ち運び可能となっており、それぞれ PCR 法、リアルタイム PCR 法、LAMP 法ベースの線虫

検出を研究室だけでなくあらゆる場所で行うことが可能になったと考えることができるだろう。ただし、試料採取にはより細心の注意を払う必要が求められる。通常、分子生物学的手法ベースの診断で使用されるのは 0.1 g 単位の微量サンプルであり、これは検査対象に与える物理的損傷を最小限に抑えることが可能なため、生立木や丸太自体が商品である輸出入材を対象とする場合には大きなアドバンテージとなる。しかし、一方で材内の線虫分布には大きな偏りがあるため、試料中に線虫が含まれているかどうかは確率の問題になってくる。こういった診断法を行う際には、微量サンプルを試験対象の複数個所から採集して混合したものを試験に供したり (Kanetani *et al.* 2011)、試料採取に先立ってマツノザイセンチュウの局在を高めておいたり (Zhao *et al.* 2007)、あるいは酸性フクシン染色による一次スクリーニングを実施することによって試験すべき試料を予め選抜した上で適用する (Wang *et al.* 2010) などの工夫が必要となるだろう。

近年では、既報の診断法について有効性を検証する動きも始まっている (Anthoine and Chappé 2013 など)。これまでに開発された数々の検出技術を取捨選択して組み合わせることで、現場のニーズにより合致した、迅速かつ正確なマツ材線虫病診断法がさらに改良されていくことが期待される。

引用文献

- Abad P, Tares S, Brugier N, De Guiran G (1991) Characterization of the relationships in the pinewood nematode species complex (PWNSC) (*Bursaphelenchus* spp.) using a heterologous unc-22 DNA probe from *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* 102: 303-308
- Abad P (2000) Satellite DNA used as a species-specific probe for identification of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bull OEPP/EPPO Bull* 30: 571-574
- 相川拓也 (2006) マツノザイセンチュウの伝播機構—どのように媒介昆虫へ乗り移りそして離脱するのか—. *日林誌* 88: 407-415
- 相川拓也・神崎菜摘・菊地泰生 (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
- Anthoine G, Chappé A-M (2013) Validation of a real time PCR assay for the detection of *Bursaphelenchus xylophilus* in targeted matrices in the framework of national survey. In: *Pine Wilt Disease Conference*, Schröder T (ed) Braunschweig, 31-32
- 新井利行・神崎菜摘・秋庭満輝 (2009) マツノザイセンチュウの「尾端突起」. *森林防疫* 58: 68-69
- Baermann G (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum-(Nematoden)-Larven in Erdproben. *Mededelingen uit het Geneeskundig Laboratorium te Weltevreden*: 41-47
- Bolla RI, Weaver C, Winter REK (1988) Genomic differences among pathotypes of *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Nematol* 20: 309-316
- Braasch H, Schönfeld U (2015) Improved morphological keys to the species of the *xylophilus* group of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *Bull OEPP/EPPO Bull* 45: 73-80
- Braasch H, Burgermeister W, Pastrik KH (1995) Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD-PCR. *Nachr Dtsch Pflanzenschutzd* 47: 310-314
- Braasch H, Gu J, Burgermeister W (2011) *Bursaphelenchus mucronatus kolymensis* comb. N.—new definition of the “European” type of *B. mucronatus*. *J Nematode Morphol System* 14: 77-90
- Burgermeister W, Metge K, Braasch H, Buchbach E (2005) ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russ J Nematol* 13: 29-42
- Burgermeister W, Braasch H, Metge K, Gu J, Schröder T, Woldt E (2009) ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of

- Bursaphelenchus* species. *Nematology* 11: 649-668
- Cao AX, Liu XZ, Zhu SF, Lu BS (2005) Detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 95: 566-571
- Cardoso JMS, Fonseca L, Abrantes I (2012) Direct molecular detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood, bark and insect vector. *Eur J Plant Pathol* 133: 419-425
- Chen F-M, Negi S, Ye J-R (2011) A SCAR molecular marker to distinguish *Bursaphelenchus mucronatus* from the pinewood nematode, *B. xylophilus*. *For Pathol* 41: 376-381
- de Guiran G, Lee MJ, Dalmasso A, Bongiovanni M (1985) Preliminary attempt to differentiate pinewood nematodes (*Bursaphelenchus* spp.) by enzyme electrophoresis. *Revue Nématol* 8: 85-91
- de Guiran G, Bruguier N (1989) Hybridization and phylogeny of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus* spp.). *Nematologica* 35: 321-330
- EPPO (2013) EPPO standards PM 7/4(3) Diagnostics. *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bull OEPP/EPPO Bull* 43: 105-118
- Filipiak A, Hasiów-Jaroszewska B (2016) The use of real-time polymerase chain reaction with high resolution melting (real-time PCR-HRM) analysis for the detection and discrimination of nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. *Mol Cell Probes* 30: 113-117
- François C, Castagnone C, Boonham N, Tomlinson J, Lawson R, Hockland S, Quill J, Vieira P, Mota M, Castagnone-Sereno P (2007) Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Mol Plant Pathol* 8: 803-809
- Fukuda K (1997) Physiological process of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease. *J For Res* 2: 171-181
- Futai K (2003) Role of asymptomatic carrier trees in epidemic spread of pine wilt disease. *J For Res* 8: 253-260
- Gu J, Wang J, Braasch H, Burgermeister W, Schröder T (2011) Morphological and molecular characterisation of mucronate isolates ("M" form) of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Russ J Nematol* 19: 103-120
- Harmey JH, Harmey MA (1993) Detection and identification of *Bursaphelenchus* species with DNA fingerprinting and polymerase chain reaction. *J Nematol* 25: 406-415
- 橋本平一・清原友也 (1972) マツノザイセンチュウの樹体内生息と移動について. 83 回日林講: 329-331
- Hoshizaki Y, Nakabayashi Y, Mamiya Y, Matsushita M (2016) Localized within- and between-tree variation in nematode distribution during latent state of pine wilt disease makes the disease status cryptic. *Forest Pathol* 46: 200-205
- Hu YQ, Kong XC, Wang XR, Zhong TK, Zhu XW, Mota MM, Ren LL, Liu S, Ma C (2011) Direct PCR-based method for detecting *Bursaphelenchus xylophilus*, the pine wood nematode in wood tissue of *Pinus massoniana*. *For Pathol* 41: 165-168
- Huang D, Yan D, Gudmestad N, Skantar A (2017) Quantification of *Paratrichodorus allius* in DNA extracted from soil using TaqMan Probe and SYBR Green real-time PCR assays. *Nematology* 19: 987-1001
- Huang L, Ye J-R, Wu X-Q, Xu X-L, Sheng J-M, Zhou Q-X (2010) Detection of the pine wood nematode using a real-time PCR assay to target the DNA topoisomerase I gene. *Eur J Plant Pathol* 127: 89-98
- Ichihara Y, Fukuda K, Suzuki K (2000) Early symptom development and histological changes associated with migration of *Bursaphelenchus xylophilus* in seedling tissues of *Pinus thunbergii*. *Plant Dis* 84: 675-680
- Irdani T, Marinari A, Bogani P, Ambrogioni L, Caroppo S, Buiatti M (1995) Molecular diversity among pine wood *Bursaphelenchus* populations detected by RAPD analysis. *Redia* 78: 149-161
- 石黒秀明・相川拓也 (2016) マツノマダラカミキリの産卵痕を経由したアカマツ枯死木へのマツノザイセンチュウの侵入. *日林誌* 98: 124-127
- 岩堀英晶・二井一禎 (1995) 線虫の分類における DNA 分析技術の利用—マツノザイセンチュウの場合—. *日本線虫学会誌* 25: 1-10
- Iwahori H, Kanzaki N, Futai K (2000) A simple, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-aided diagnosis method for pine wilt disease. *For Pathol* 30: 157-164
- Kanetani S, Kikuchi T, Akiba M, Nakamura K, Ikegame H, Tetsuka K (2011) Detection of *Bursaphelenchus xylophilus* from old discs of dead *Pinus armandii* var. *amamiana* trees using a new detection kit. *For Pathol* 41: 387-391
- Kang JS, Choi KS, Shin SC, Moon IS, Lee SG, Lee SH (2004) Development of an efficient PCR-based diagnosis protocol for the identification of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Nematology* 6: 279-285
- Kang JS, Moon IS, Lee SG, Shin SC, Lee SH (2009) Rapid and accurate prediction of the frequencies of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* in mixed nematode samples using real-time species-specific PCR. *Nematology* 11: 289-299
- Kang JS, Kim A-Y, Han HR, Moon YS, Koh YH (2015) Development of two alternative Loop-mediated isothermal amplification tools for detecting pathogenic pine wood nematodes. *For Pathol* 45: 127-133
- 神崎菜摘・竹本周平 (2012) *Bursaphelenchus* 属線虫の植物病原性と媒介者の生活史特性の関連. *日林誌* 94: 299-306
- 川口エリ子・市原 優 (2010) クロマツの節におけるマツノザイセンチュウの移動抑制. *日林誌* 92: 1-7
- Kikuchi T, Aikawa T, Oeda Y, Karim N, Kanzaki N (2009) A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology* 99: 1365-1369
- 清原友也・徳重陽山 (1971) マツ生立木に対する線虫 *Bursaphelenchus* sp. の接種試験. *日林誌* 53: 210-218
- 清原友也・白石 進・上中久子・鈴木和夫 (1981) マツノザイセンチュウの酵素多型. *日林九支研論集* 34: 183-184
- Kiyohara T, Bolla RI (1990) Pathogenic variability among populations of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *For Sci* 36: 1061-1076
- Kuroda K (2004) Inhibiting factors of symptom development in several Japanese red pine (*Pinus densiflora*) families selected as resistant to pine wilt. *J For Res* 9: 217-224
- Leal I, Green M, Allen E, Humble L, Rott M (2005) An effective PCR-based diagnostic method for the detection of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) in wood samples from lodgepole pine. *Nematology* 7: 833-842
- Leal I, Green M, Allen E, Humble L, Rott M (2007) Application of a real-time PCR method for the detection of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine. *Nematology* 9: 351-362
- Leal I, Foord B, Allen E, Campion C, Rott M, Green M (2013) Development of two reverse transcription-PCR methods to detect living pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood. *For Pathol* 43: 104-114
- Leal I, Allen E, Foord B, Anema J, Reisle C, Uzunovic A, Varga A, James D (2015) Detection of living *Bursaphelenchus xylophilus* in wood, using reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *For Pathol* 45: 134-148
- Liao JL, Zhang LH, Feng ZX (2001) Reliable identification of *Bursaphelenchus xylophilus* by rDNA amplification. *Nematol Mediterr* 29: 131-135
- 真宮靖治 (1975) マツノザイセンチュウのベルマン法による抽出効率. *森林防疫* 24: 115-119
- Mamiya Y, Enda N (1979) *Bursaphelenchus mucronatus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees. *Nematologica* 25: 353-361
- Matsunaga K, Togashi K (2004) A simple method for discriminating *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by species-specific polymerase chain reaction primer pairs. *Nematology* 6: 273-277
- Metge K, Burgermeister W (2006) Intraspecific variation in isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) revealed by ISSR and RAPD fingerprints. *J Plant Dis Protect* 113: 275-282
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
- 中島 剛・井城泰一・山野邊太郎・相川拓也・中村克典 (2016) 接種後2ヶ月経過したクロマツ接木苗におけるマツノザイセンチュウの分布. 第127回日本森林学会大会学術講演集 P1-142
- 中島 剛・井城泰一・山野邊太郎・相川拓也・中村克典 (2017) 接種後1年4ヶ月及び2年4ヶ月経過した抵抗性クロマツ接木苗におけるマツノザイセンチュウの分布. 第128回日本森林学会大会学術講演集 P2-261
- Nakamura-Matori K (2008) Vector-host tree relationships and the abiotic environment. In: *Pine Wilt Disease*, Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y (eds) Springer, 144-161
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: e63
- Odani K, Sasaki S, Nishiyama Y, Yamamoto N (1985 a) Early symptom

- development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematode-cellulase as a possible candidate of the pathogen. *Jpn For Soc* 67: 366-372
- Odani K, Sasaki S, Yamamoto N, Nishiyama Y, Tamura H (1985b) Differences in dispersal and multiplication of two associated nematodes, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* in pine seedlings in relation to the pine wilt disease development. *J Jpn For Soc* 67: 398-403
- Rautapää J (1986) Experiences with *Bursaphelenchus xylophilus* in Finland. *Bull OEPP/EPPO Bull* 16: 453-456
- Ribeiro B, Espada M, Vu T, Nóbrega F, Mota M, Carrasquinho I (2012) Pine wilt disease: detection of the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) as a tool for a pine breeding programme. *For Pathol* 42: 521-525
- Rutherford TA, Mamiya Y, Webster JM (1990) Nematode-induced pine wilt disease: Factors influencing its occurrence and distribution. *For Sci* 36: 145-155
- Ryss A, Vieira P, Mota M, Kulinich O (2005) A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology* 7: 393-458
- Schröder T, McNamara DG, Gaar V (2009) Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *Bull OEPP/EPPO Bull* 39: 179-188
- Shinya R, Morisaka H, Takeuchi Y, Ueda M, Futai K (2010) Comparison of the surface coat proteins of the pine wood nematode appeared during host pine infection and *in vitro* culture by a proteomic approach. *Phytopathology* 100: 1289-1297
- Shinya R, Morisaka H, Kikuchi T, Takeuchi Y, Ueda M, Futai K (2013) Secretome analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* reveals the tangled roots of parasitism and its potential for molecular mimicry. *PLoS ONE* 8(6): e67377
- Son JA, Moon Y-S (2013) Efficiency of the Baermann funnel technique as revealed by direct counts of pine wood nematodes in pine tissue. *Nematology* 15: 125-127
- Takeuchi Y, Kanzaki N, Futai K (2005) A nested PCR-based method for detecting the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood. *Nematology* 7: 775-782
- Takeuchi Y, Futai K (2007) Asymptomatic carrier trees in pine stands naturally infected with *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology* 9: 243-250
- Takeuchi Y, Futai K (2009) Diagnosis and quantification of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner), in wood of *Pinus thunbergii* with real-time PCR. *Nematol Res* 39: 9-16
- Tares S, Abad P, Bruguier N, de Guiran G (1992) Identification and evidence for relationships among geographical isolates of *Bursaphelenchus* spp. (pinewood nematode) using homologous DNA probes. *Heredity* 68: 157-164
- Tarès S, Lemontey J-M, de Guiran G, Abad P (1993) Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA sequence specific for the phytoparasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Gene* 129: 269-273
- Tarès S, Lemontey J-M, de Guiran G, Abad P (1994) Use of species-specific satellite DNA from *Bursaphelenchus xylophilus* as a diagnostic probe. *Phytopathology* 84: 294-298
- Vieira P, Burgermeister W, Mota M, Metge K, Salva G (2007) Lack of genetic variation of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal revealed by RAPD-PCR analyses. *J Nematol* 39: 118-126
- Wang XR, Kong XC, Jia WH, Zhu XW, Ren LL, Mota MM (2010) A rapid staining-assisted wood sampling method for PCR-based detection of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in *Pinus massoniana* wood tissue. *For Pathol* 40: 510-520
- Webster JM, Anderson RV, Baillie DL, Beckenbach K, Curran J, Rutherford TA (1990) DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. *Revue Nematol* 13: 255-263
- Wingfield MJ, Blanchette A, Kondo E (1983) Comparison of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine and balsam fir. *Eur J For Pathol* 13: 360-372
- 山口莉未・松永孝治・平尾知士・渡辺敦史 (2017) クロマツ防衛応答とマツノザイセンチュウの挙動との関連性—リアルタイムPCRを利用した時空間的解析—。第128回日本森林学会大会学術講演集 K8
- Ye W, Giblin-Davis RM (2013) Molecular characterization and development of real-time PCR assay for pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *PLoS ONE* 8(11): e78804
- Zheng J, Subbotin SA, He S, Gu J, Moens M (2003) Molecular characterization of some Asian isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* using PCR-RFLPs and sequences of ribosomal DNA. *Russ J Nematol* 11: 17-22
- Zhao L, Wei W, Liu X, Kang L, Sun J (2007) A novel rapid sampling method for pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Can J For Res* 37: 1867-1872
- Zhuo K, Luo M, Cui RQ, Liao JL (2011) A multiplex one-step PCR method for the simultaneous identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. doui*— three species within the *xylophilus* group. *For Pathol* 41: 66-69