

# マツ材線虫病における通道障害進展過程の MRI を用いた多点観察

2009年3月 自然環境学専攻 76720 外岡 遼

指導教員 教授 福田健二

キーワード ; マツ材線虫病, 通道障害, MRI

## I.はじめに

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer) Nickle.) を病原とするマツ材線虫病は、感染木に通道障害を引き起こし枯死に至らせる典型的な萎凋病である。病徴は大きく前期と進展期に分けられ、これまで感染木の解剖により本病における病徴進展について多くの知見が得られてきた(Fukuda 1997)。しかし、病徴進展パターンには個体差があるため、多くの個体を破壊して得られたデータから病徴進展過程を推測することには限界がある。そこで Utsuzawa et al. (2005)は、コンパクト MRI による同一個体における通道障害進展の非破壊経時観察手法を確立した。しかし、この報告は樹幹の一断面の観察にとどまっており、通道障害の樹軸方向での進展様式を立体的にとらえることはできていない。本研究では、クロマツ(*Pinus thunbergii* Parl.)苗の樹幹に沿って、撮像部位を上下方向に可動なコンパクト MRI を開発し、得られた木部断面画像を上下で比較することで、マツ材線虫病における通道障害の三次元的分布を明らかにすることを目的とした。

## II.材料と方法

本研究で用いたコンパクト MRI システムの永久磁石(0.3T)は上下方向に手動で移動可能な滑車台に置かれている。直径 2cm の U 字型 RF コイルを永久磁石に取り付けることにより、供試木における撮像部位の移動や供試木の取り外しを可能にした。

実験 1 では 3 年生クロマツ苗 2 個体を対象に、1 年生主軸の上部、当年分枝下 2cm から 3cm の部位に木部に達する切り込みを入れ、1 個体には線虫懸濁液を接種し(1V-1)、もう 1 個体には蒸留水を接種した(1C-1)。2008 年 7 月 11 日に接種を行い、その後、各供試木の当年生分枝下 2cm を撮像部位 0cm とし、以下 20cm 下位まで 1cm 間隔でコンパクト MRI による撮像を行った。

実験 2 では 3 年生クロマツ 3 個体を対象に、当年生主軸中央部付近から下に木部に達する切り込みを入れ、2 個体には線虫懸濁液を接種し(CV-1,2)もう 1 個体には蒸留水を接種した(CC-1)。2008 年 8 月 15 日に接種を行い、その後、各供試木の当年生主軸における線虫接種点を 0yr 0cm、当年生分枝下 2cm の 1 年生主軸を 1yr 0cm とし、当年生枝においては 0cm から上下 5cm を 1cm 間隔で、分枝部をまたいで 1yr 0cm より 10cm 下位までを 1cm 間隔で MRI により撮像した。

## III.結果と考察

本研究により、初めてマツ材線虫病における通道障害進展過程を立体的、経時的にとらえることができた。

すべての供試木において、接種時の切り込みの影響がはっきりと認められたが、対照個体(1C-1、CC-1)では、接種部位以外の木部の水分分布はほとんど変化がなかった。線虫を接種した個体(1V-1、CV-1、CV-2)では接種から 3~4 日目までには接種傷の影響をこえる木部通道障害が観察された。また、最終的にすべての観察部位において、ほぼすべての通道

組織で通道障害が一斉に拡大した。

実験 1, 2 より、マツ材線虫病におけるマツ木部での通道障害進展様式には、形成層から髄までの放射方向上に通道障害領域が連続的につながっているもの(集塊エンボリズム)と、樹幹全体で散在的に発生し拡大する通道障害(散在エンボリズム)の 2 種類に区別できた。実験 1, 2 ともに、接種部位から集塊エンボリズムの拡大が見られた。

Fukuda et al. (2007)は病徴進展期に見られる水ポテンシャルの急激な低下は、木部通道組織内で一気に水分が失われるランナウェイエンボリズムによるとし、木部最外層の水分通道の停止は進展期における特徴としているが、接種部位から連続して拡大する集塊エンボリズムは、線虫接種初期から木部最外層においてもみられた。また、1V-1 においては、集塊エンボリズムは接種部位から下部へいくにつれ、時計回りに位置が移動した。Fukuda et al. (2007)は急激な通道障害の拡大は接種部位から樹幹基部へと拡大することを示し、通道障害は横断面上で時計回りに拡大した。これらは、接種部を含む枝では、病徴前期から連続した拡大を示す集塊エンボリズムが生じており、これがランナウェイエンボリズムの原因となる可能性が示している。さらに、集塊エンボリズムは、木部通道組織の構造により、拡大しやすい方向があることが示唆された。

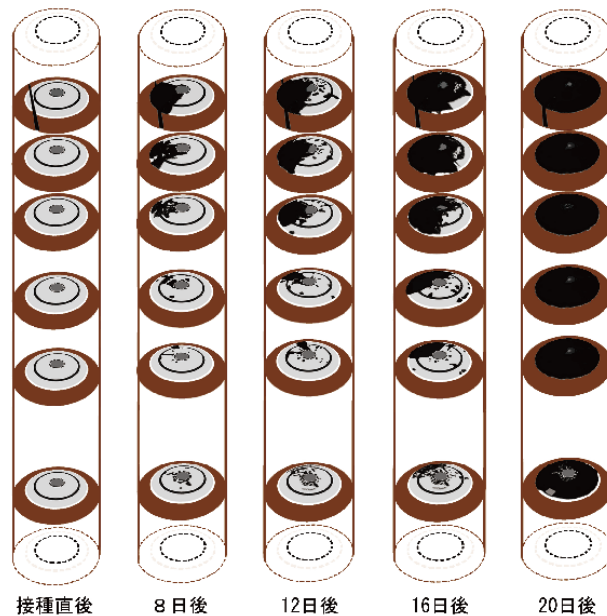


図. マツ材線虫病におけるマツ樹幹での通道障害進展様式の立体的模式図  
黒色部が通道障害を表す

#### IV.参考文献

- Fukuda, K. (1997) Physiological change of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease. *J. For. Res.* 2:171-181.
- Fukuda, K., Utsuzawa, S., and Sakaue, D. (2007) Correlation between acoustic emission, water status and xylem embolism in pine wilt disease. *Tree Physiol.* 26: 969-946.
- Utsuzawa, S., Fukuda, K., and Sakaue, D. (2005) Use of magnetic resonance microscopy for the nondestructive observation of xylem cavitation caused by pine wilt disease. *Phytopathology.* 95: 737-743.

# Multipoint slice imaging of MRI for observation of axial xylem cavitation development in the pine wilt disease.

Mar. 2009, Department of Natural Environmental Studies, 76720, Sotooka Ryo

Supervisor; Professor, Fukuda Kenji

Keywords; Pine Wilt Disease, cavitation, embolism, MRI

## 1.Introduction

Pine wilt disease, caused by the pinewood nematode(PWN) (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer) Nickle.) is one of the most serious tree epidemics in Japan and eastern Asia. This disease is known to induce xylem dysfunction in infected pines to death. The development of disease symptoms has been divided into two stages (early stage and advanced stage) and intensively studied by destructive methods (Fukuda 1997). However, destructive methods make it impossible to continuously observe symptom development in the same individual. Utsuzawa et al. (2005). have demonstrated that cavitation caused by pine wilt disease could be monitored nondestructively using compact MRI. However, their observation was limited to one transverse section of xylem. To clarify the development of cavitation caused by pine wilt disease, we took multipoint slice imaging of MRI along a stem of Japanese black pine(*Pinus thunbergii* Parl.) and monitored time course of the three-dimensional development of embolisms along the xylem axis.

## II .Material and methods

A permanent magnet(0.3T) of the compact MR microscope system used in this study was on the pulley block which could be risen and fallen by hand, and attached with U-shaped RF coil (2-cm inner diameter)

Two potted 3-year-old Japanese black pine seedlings were used in the experiment 1. One seedling was inoculated with pinewood nematodes (S-10) suspension into a wound on a 1-year shoot (1V-1), and the other was inoculated with distilled water (1C-1) as a control. Both inoculations were conducted on 2008/7/11. After inoculation, the water distribution in the xylem of a 1-year-old stem was monitored with a multipoint slice imaging of MRI.

Three 3-year-old seedlings were used in experiment 2. Two seedlings were inoculated S-10 suspension into a wound on a current-year shoot (CV-1,2). and the other was inoculated distilled water (CC-1) . The wound was made on a current-year shoot. All inoculations were conducted on 2008/8/15. After inoculation, the water content in the xylem of a 1-year-old stem and current-year shoot were monitored with a multipoint slice imaging of MRI.

## III.Result and discussion

This is the first report of continuous observation of the three-dimensional development of cavitation caused by pine wilt disease.

In the control seedlings(1C-1, CC-1),we observed almost no change in the MR images. In all inoculated seedlings(1V-1, CV-1, CV-2) , the expansion of embolism beyond the wound was observed by 3-4 days after inoculation. Finally, embolism expanded drastically and occupied entire xylem in all the monitoring points.

Our MR observations have showed that there were two kinds of enlargement of embolism, namely,

‘Cluster embolism’ and ‘Straggly embolism’: Cluster embolism means embolism which is enlarged continuously from cambium to pith.; Straggly embolism means embolism which generates straggly.

In the advanced stage, abrupt decreases in water potential resulting in death are thought to reflect runaway embolism, and the cavitation of the outermost xylem is thought to be the key of the development from the early to the advanced stage. (Fukuda 1997, Fukuda et al. 2007). However, in this study, cluster embolism enlarged to outermost xylem from the early stage. It moved clockwise as it went downward. Fukuda et al. (2007) showed clockwise enlargement of the embolism area, and downward cavitation development. These results suggested that cluster embolism appeared to be the starting point of runaway embolism, and cluster embolism had some structural trends to expand easily.

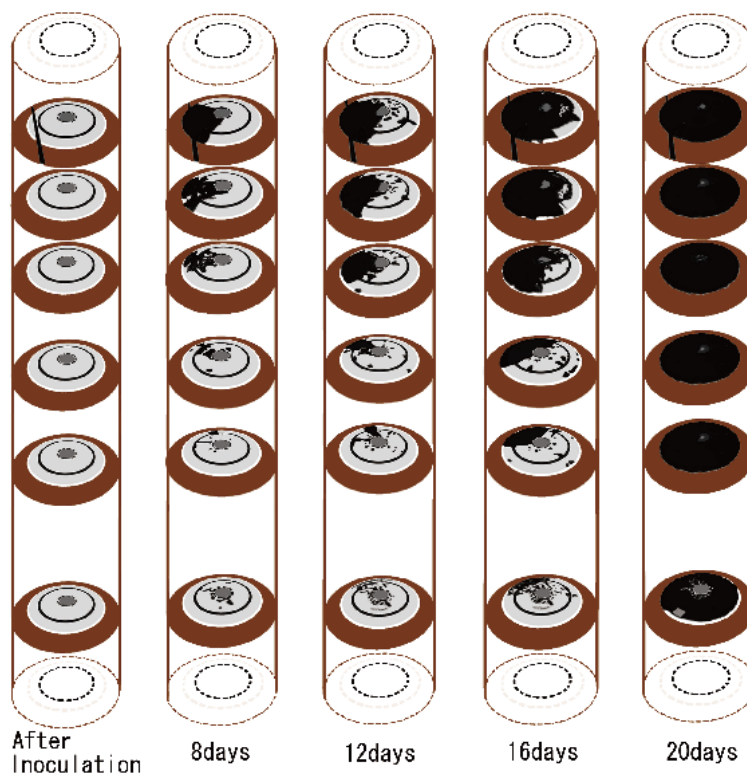


Fig. Three-dimensional cavitation development caused by pine wilt disease at 1-year-old stem. Cavitated xylem appears as dark patches.

#### IV. References

- Fukuda, K. (1997) Physiological change of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease. *J. For. Res.* 2:171-181.
- Fukuda, K., Utsuzawa, S., and Sakaue, D. (2007) Correlation between acoustic emission, water status and xylem embolism in pine wilt disease. *Tree Physiol.* 26: 969-946.
- Utsuzawa, S., Fukuda, K., and Sakaue, D. (2005). Use of magnetic resonance microscopy for the nondestructive observation of xylem cavitation caused by pine wilt disease. *Phytopathology.* 95: 737-743.