【解　説】

マツ材線虫病抵抗性クロマツ苗の効率的な生産技術に関する研究

袴田　哲司[*, 1]

はじめに

マツ材線虫病は、マツノザイセンチュウの侵入により、樹体内で組織や生理状態の異常と通水阻害が生じ、やがて萎凋のため枯死に至る日本で最も重大な樹木病害である（Fukuda et al. 1992 ほか）。その対策として、伐倒駆除や薬剤の予防散布、樹幹注入が広く行われているが、環境に配慮した育種的な対策も検討され、「マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」が展開された（藤本ら 1989）。この事業では、甚大な被害が生じた林分においても生存している個体から苗が増殖され、それらにマツノザイセンチュウを接種する一次および二次の検定を経て、感受性樹種であるアカマツとクロマツの抵抗性クローンが選抜された。これらのクローンで構成された採種園で生産される自然交配種子由来の実生家系苗は、抵抗性が保証されているものではないため、静岡県では山林種苗協同組合連合会が接種検定を行い、抵抗性苗の生産と普及が進められている。東日本大震災以降、今まで以上に海岸防災林の機能向上が期待される中で、クロマツは主役となるべき樹種であるが、現在でも材線虫病の被害は続いていることから、抵抗性苗の需要は増大しており、新たな抵抗性品種の開発や苗木の生産性向上が期待されている。

抵抗性苗の生産過程では、接種検定の作業が加わることで苗木が高価格になるため、接種検定後の生存率を高めることや、生産方法の改良を図ることで苗木の価格を下げる必要がある。強い抵抗性を持つ品種を導入すれば接種検定で生存する苗の割合が高まり生産性が向上するが、新品種の開発には長期間を要する。したがって、速効性を期待するならば、実生苗の抵抗性に関わり接種検定結果に影響する要因を明らかにし、苗の生存率を改善することが重要となる。また、抵抗性確認のための接種検定を省き、より低価格の苗を供給する方法の模索も必要である。そこで、苗へのマツノザイセンチュウの接種による抵抗性評価を省力化するため、樹体から得られる枝片を用いて組織の抵抗性を調査することにより、苗全体の抵抗性評価を試みた。さらに、マツノザイセンチュウの接種検定の際の苗の生存率を高めるため、抵抗性に関連している苗の形態的特徴を明らかにした。加えて、これまで困難だとされていた挿し木増殖について（森下・大山 1972）、高い得苗率が得られる手法を明らかにし、挿し木苗生産の可能性を検証した。

クロマツの組織抵抗性と母樹、実生家系苗の抵抗性

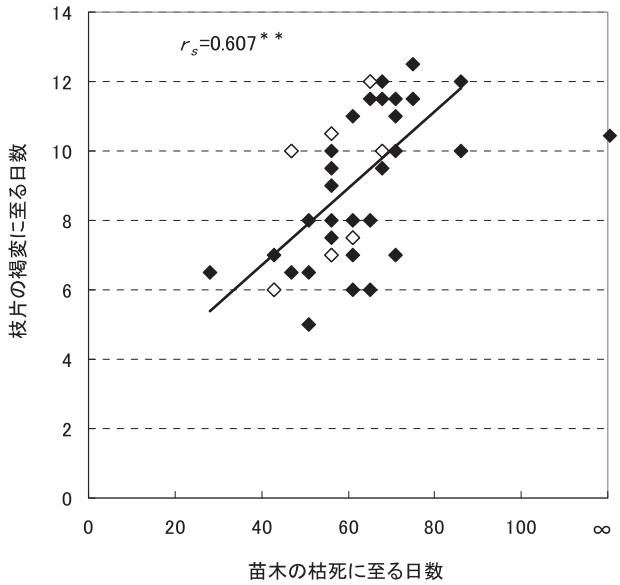
マツ属樹種間における組織学的な変化と樹体の抵抗性との関係では、切り枝や樹皮片で材線虫病に対する抵抗性の樹種間差を再現でき（寶月ら 1994）、感受性樹種では接種点近くの木部柔細胞が壊死するが、抵抗性樹種ではその壊死が少ないとされている（Yamada and Ito 1993）。一方、クロマツやアカマツでは抵抗性個体が見出されているが、それらにマツノザイセンチュウを接種した場合の組織レベルの抵抗性と個体レベルの抵抗性との関係については明らかにされていない。マツ属樹種間で認められる組織レベルの抵抗性と個体レベルの抵抗性の関連がクロマツにおいても認められれば、苗へのセンチュウ接種が省略できる。そこで、マツノザイセンチュウの直接加害に対する組織変性の速さを褐変で評価し、クローンや実生家系間の違いを明らかにするとともに、全身の抵抗性との関連を調べた。

マツノザイセンチュウを接種したクロマツ 3 年生実生苗の組織の変性（枝片の褐変）と個体の枯死との関係を調べたところ、枝片が完全褐変に至る日数と、ポット苗としてガラス室内で育成するという条件下での苗木が枯死に至る日数との間には、有意な正の相関が認

* E-mail: tetsuji1_hakamata@pref.shizuoka.lg.jp
1 はかまた てつじ　静岡県農林技術研究所 森林・林業研究センター

められ（図−1)、組織の褐変が遅いクロマツ実生苗は枯死が遅い傾向にあった（袴田ら 2008)。

一方、抵抗性クロマツの母樹クローンから採取した枝片にマツノザイセンチュウを接種したところ、全体が褐変に至る日数にはクローン間差があり、母樹クローンから得られた半兄弟実生家系苗の組織変性の速さとは有意な正の相関が認められ、病態反応に関する母樹組織の性質がその実生家系苗の組織の性質にある程度は遺伝すると考えられた。しかし、母樹の組織変性の速さおよび実生家系苗の組織変性の速さは、ともに苗畑で検定した実生家系苗の抵抗性強度との相関が低く、全身抵抗性の構成要因として重要ではないことが示唆された（袴田ら 2010)。組織変性が遅い苗は、マツノザイセンチュウによる病徴発現が遅れる傾向にあるが、それは苗の最終的な生存には結びつかず、組織抵抗性よりもセンチュウの移動や増殖を抑える苗全身の抵抗性が苗の健全率に影響していると考えられた。

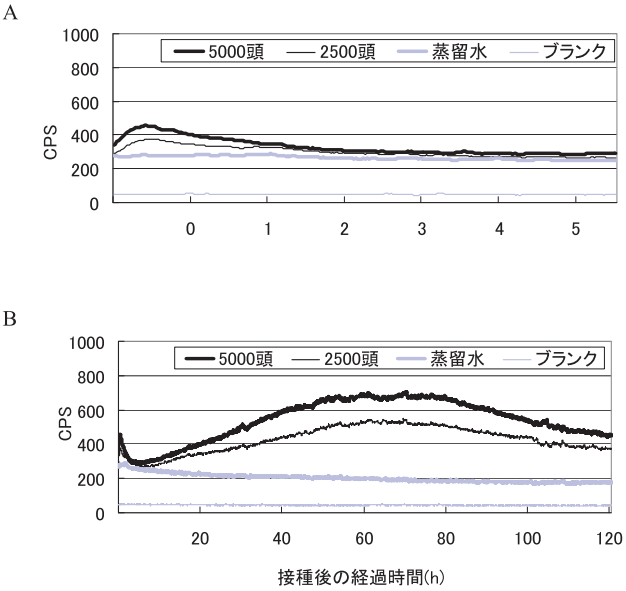


図−1　マツノザイセンチュウを接種したクロマツ苗木が枯死に至る日数と枝片が褐変に至る日数との関係。袴田ら（2008）より描く。相関係数は、接種の 90 日以後も生存した 1 個体を除き算出した。枝片の褐変に至る日数は枝片 2 サンプルの平均値。**は Spearman の順位相関係数に有意性があることを示す（$p < 0.01$)。◆は苗木 1 個体、◇は苗木 2 個体を示す。

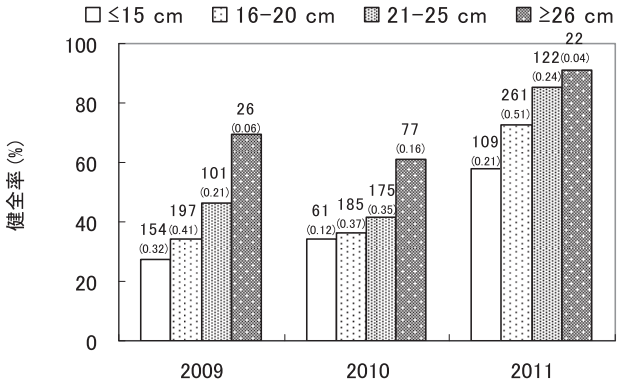
クロマツの組織抵抗性の評価指標としての微弱発光の利用

クロマツやアカマツでは、マツノザイセンチュウの侵入部付近で細胞の崩壊や壊死が認められ、このような病態反応の質的・量的な差が全身的な発病の有無に影響することが示唆されている（Yamada and Ito 1993)。したがって、マツノザイセンチュウ侵入後の組織の変化を的確に把握することは、抵抗性の判定において極めて重要である。これまでに組織や細胞の変性や壊死については、肉眼的観察や試薬染色後の顕微鏡観察のほかに、脂質の過酸化程度や電解質の漏出量なども利用されてきた。しかし、これらの方法は組織の抵抗性を部分的に評価しているだけであり、新たな組織の抵抗性判定の指標が必要である。この一つの候補として植物から発生する微弱発光の利用が考えられる。この微弱発光は生体の生理状態を強く反映し、糸状菌等のエリシター物質に応答した植物の防御反応に付随して発生することが明らかにされている（Iyozumi et al. 2005；加藤ら 2010)。これまでに、マツ属樹種とマツノザイセンチュウとの関係で発生する微弱発光を報告した例はなかったが、これが抵抗性反応を反映するのであれば、マツノザイセンチュウに対する抵抗性の指標として利用できる可能性がある。また、微弱発光検出は非破壊で行えるため、抵抗性の簡易な検定技術としての利用が想定される。そこで、マツ材線虫病抵抗性の新たな検定技術の開発を目的とし、マツノザイセンチュウを接種したクロマツ枝片から発生する微弱発光を調査した。

マツノザイセンチュウを接種した枝片からは、接種後 30 分以内に 1 時間程度持続する微弱発光が、接種の 70 時間後には 100 時間以上持続する微弱発光が認められ、10 日後には枝片全体が褐変した。接種頭数を 2 倍にすると、微弱発光の発生パターンは類似しているものの発光強度が高まった（図−2)。非宿主であるスギでは微弱発光が発生せず、抵抗性のテーダマツでは 19 時間後に微弱発光の高まりが認められ、クロマツと比べると発光強度が低く、かつ早い時間帯に発生、終息した。これらの結果から、この微弱発光はマツノザイセンチュウによるクロマツ組織への加害によって発生すると推察された（袴田ら 2004)。このようなクロマツの組織からは初となる微弱発光の発生は認められたが、現状では組織の防御応答を示すような発光パターンは得られていないため、今後は微弱発光に基づく抵抗性評価の開発が必要である。



図−2　マツノザイセンチュウの接種頭数の違いによる微弱発光の発生パターン。袴田ら（2004）より描く。（A）接種 5 時間後まで、（B）接種 120 時間後まで。CPS は 1 秒当たりのフォトンカウント数を示す（count per second）。



図−3　全供試家系を含めた各年の苗高階級別の健全率。Hakamata et al.（2013）より描く。バーの上の数値は各年における各階級の供試苗数とその比率を示す。

実生苗の形態的特徴と抵抗性との関係

抵抗性クローンで構成される採種園由来の実生苗へマツノザイセンチュウを接種し、その後の病徴が発現せずに健全であった抵抗性苗を出荷する生産方法で、静岡県は全国有数の生産県となっている。しかし、接種作業は、マツノザイセンチュウの培養に手間がかかること、盛夏の接種検定作業が重労働であること、検定により平均で半数程度の個体しか出荷できないことなどの問題があり、その結果として苗木の価格が高くなっている。これを改善するためには、接種検定後の生存率を高め効率化を図り、種苗生産の低コスト化を進める必要がある。生存率には家系や環境条件が影響することが明らかにされているが（戸田 2004）、生存率に影響する苗木の形態的特徴については一部の報告はあるものの（佐々木ら 2002）、明確にはされていない。そこで、多くの家系を用いた複数年の試験を設計し、苗木のサイズや枝数が生存率に与える影響を評価した。

抵抗性クロマツ採種園由来の 16 家系の苗木について、接種試験直前の苗木の苗高、根元径、輪生枝数を測定し、マツノザイセンチュウ接種の 2 ヵ月後に生存率を調査する試験を 3 年間行った。その結果、輪生枝数は生存率に関与する要因ではなかったが、家系（品種）と苗高、根元径が健全率に有意に関与していることが明らかになった。特に、苗高は家系や接種年との交互作用がなく、独立的に関与する要因であった。3 年間とも苗高が大きいほど健全率が高く（図−3）、大きい苗を優先的に接種することで生産効率を高められることが明らかになった（Hakamata et al. 2013）。

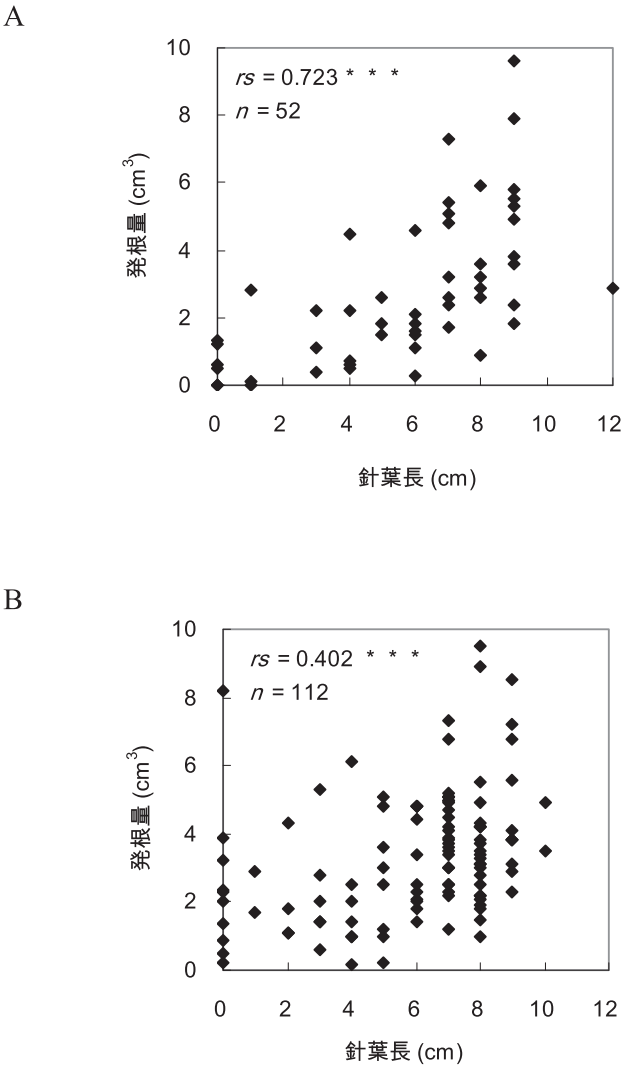
挿し木発根性に関わる要因

実生苗への接種検定で抵抗性苗を生産する方法では、接種検定する年の環境条件によって健全率が異なり（戸田 2004）、抵抗性の強度が安定しないことが指摘されている。また、接種検定にはマツノザイセンチュウを培養する技術も必要で、一部の種苗生産者しか生産できない実情もある。この問題を解決するため、抵抗性が確認された母樹から採穂し、挿し木によって苗木を増殖する方法が試られるようになった（石松 1999）。クロマツは発根が容易ではないとされていたが（森下・大山 1972）、母樹によっては高い発根率が得られ、強い病原力を持つマツノザイセンチュウの接種検定で選抜した母樹から挿し木によって増殖した苗は、抵抗性が高いことも明らかになっている（森ら 2006）。そのため、抵抗性を確認するために苗木の段階で再び接種検定を行う必要がないと考えられ、生産コストを低く抑えられるという試算もあり（大平ら 2009）、新たな生産方法として期待が高まっている。

発根性には母樹が持っている遺伝的な因子や挿し穂の生理的特性が大きく関わっており、品種の違いが発

根性に影響することはこれまでにも明らかにされてきた。しかし、同じ母樹から採取した挿し穂の生理的な状態や形態が発根性に影響すること、例えば母樹の樹冠からの採穂部位、挿し穂の重量や冬芽数が発根能力に影響するかはクロマツでは明確になっていない。一方、挿し穂の新梢から伸びる針葉により発根の確認はできるとされているが（森下・大山 1972）、針葉伸長と発根の量的な関係は未解明である。これらの点を踏まえて抵抗性クロマツの挿し木増殖技術を改善するために、母樹からの採穂部位と挿し穂の生重量や冬芽数が発根率と発根量にどのような影響を与えるかを明らかにするとともに、挿し穂の針葉の伸長程度と発根性との関係についても調査した。

データ解析の結果、挿し穂の生重量や冬芽数は発根率に影響する要因ではなかったが、家系と採穂部位は有意に関与していた。特に採穂部位は他の要因との交互作用が認められず、樹冠下部からの挿し穂は上部からの挿し穂よりも高い発根率が得られた。また、挿し穂の新梢から伸びた針葉の長さは発根量に有意に影響する要因であり、針葉の長さと発根量には有意な正の相関が認められ、これは掘り取り前の根量評価の指標になると考えられた（図−4）。発根性に影響する要因や針葉長と発根量の関係を明確にしたことは、実用的な抵抗性挿し木苗生産に大きく貢献できると考えられた（Hakamata et al. 2016）。

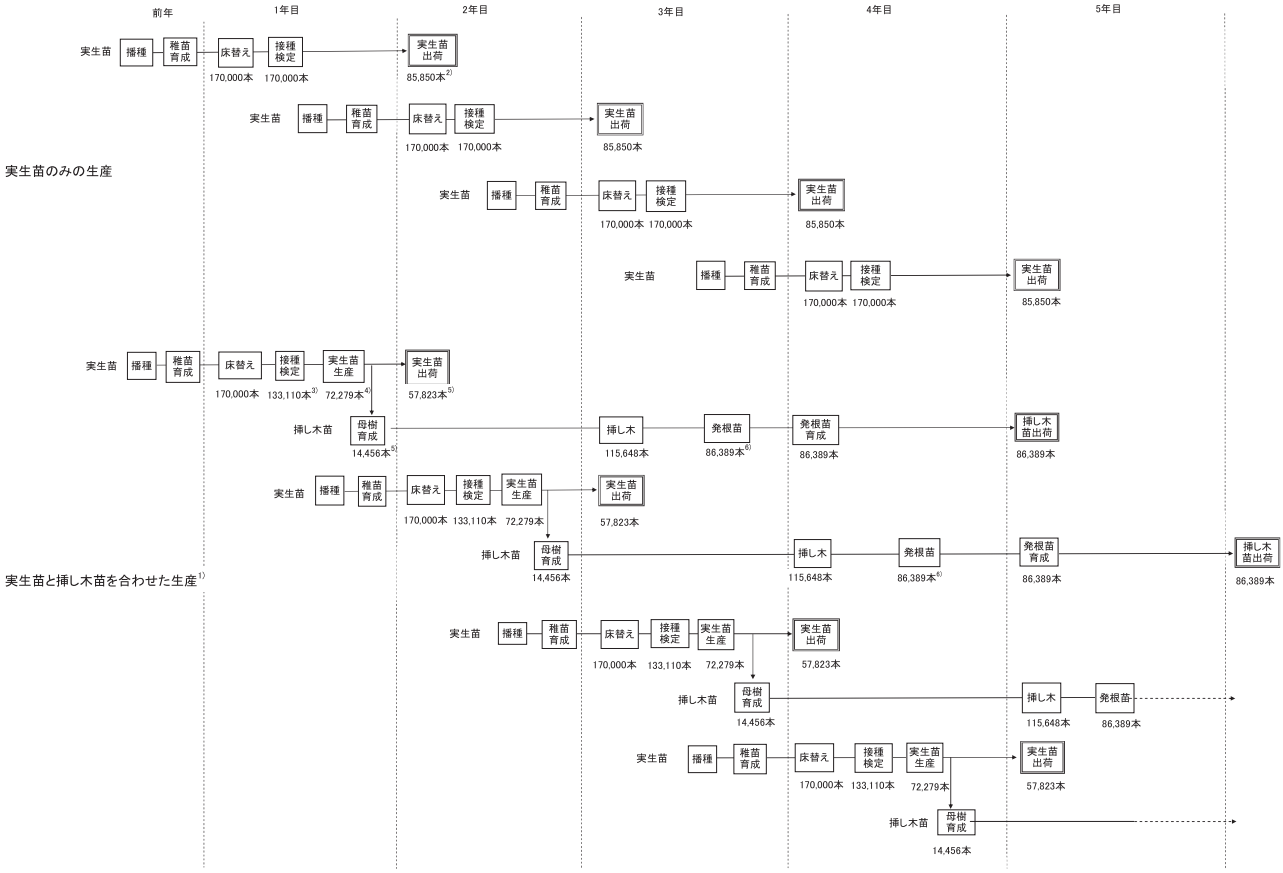


図−4　採穂部位別の針葉の長さと発根量の相関関係。Hakamata et al.（2016）より描く。母樹からの採穂部位別に解析した。（A）採穂母樹の樹冠上部から採取した挿し穂、（B）採穂母樹の樹冠下部から採取した挿し穂。*** は Spearman の順位相関係数で有意性があることを示す（$p<0.001$）。

今後の課題と事業展開への期待

組織レベルで樹体の抵抗性を評価できれば、抵抗性苗の生産を従来よりも簡略化できる。本研究により、クロマツの組織変性と苗の枯死に至る日数との相関関係や、マツノザイセンチュウの加害による微弱発光の発生という新たな知見を得られた。しかし、組織の抵抗性や微弱発光に基づいた全身の抵抗性を評価するまでには至っていない。マツノザイセンチュウの移動や増殖を阻害する苗全身の抵抗性を評価するためには、大きな枝を利用するなど苗全身の抵抗性が反映される組織抵抗性評価方法の構築や、防御応答に基づく微弱発光が検出可能となる接種条件の解明が必要である。

一方、抵抗性苗の生産において、実生苗のサイズが接種検定結果に影響することや、母樹からの採穂部位が挿し木発根率に影響することは、種苗生産の効率化を図る上で重要な情報である。具体的には、小型の苗を接種検定から除外すれば、接種作業を減じることができる。これによって、抵抗性実生苗の生産本数は一時的に少なくなるが、接種検定後の健全実生苗のうち一部を挿し木用の母樹として育成し、実生苗に加えて母樹の下部枝を利用した挿し木苗の生産を行えば、現状の抵抗性苗生産本数を上回ることも期待できる（図−5）。このような生産の効率化により、苗の低価格化と増産が可能となることから、海岸防災林や防潮堤への植栽事業にも貢献できると考えられる。今後は、抵抗性や発根性がより優れる品種の開発や、実生苗への接種作業そのもの改良、下部枝の発生を促進させるような採穂母樹の仕立て方法などを検討していく必要がある。



図−5　抵抗性クロマツ苗の生産性の比較

1）苗高 16 cm 以上の２年生（満 1 年生）実生苗を用いて接種検定により抵抗性苗を生産することに加えて、その抵抗性苗の 20% を挿し木用母樹として挿し木苗を生産することを想定した。本研究で得られたデータに基づく試算とした。
2）静岡県山林種苗協同組合連合会の平均接種本数（170,000 本 / 年）×接種検定での平均健全率（50.5%）。
3）苗高 16 cm 以上の苗を接種検定に用いる（構成比率は 78.3%）。
4）苗高 16 cm 以上の苗数（133,110 本）×苗高 16cm 以上の苗の接種検定での健全率（54.3%）。
5）苗高 16 cm 以上の苗に接種検定した結果として得られる抵抗性実生苗数（72,279 本）の 80%（57,823 本）を出荷し、残りの 20%（14,456 本）は挿し木用母樹として活用。
6）挿し木用母樹（14,456 本）×母樹当たりの挿し穂数（8 本）×樹冠下部枝の平均発根率（74.7%）。

本稿は、2017 年 1 月に名古屋大学大学院生命農学研究科に提出し、同年 2 月に合格となった博士号学位論文の内容を紹介したものである。

引用文献

Fukuda K, Hogetsu T, Suzuki K（1992）Cavitation and cytological changes in xylem of pine seedlings inoculated with virulent and avirulent isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. Journal of the Japanese Forest Society 74: 289–299

藤本吉幸・戸田忠雄・西村慶二・山手廣太・冬野劭一（1989）マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業 −技術開発と事業実施 10 ケ年の成果−. 林木育種センター研究報告 7: 1–84

袴田哲司・加藤公彦・牧野孝宏・山本茂弘（2004）マツノザイセンチュウを接種したクロマツから発生する微弱発光．日本植物病理学会報 70: 162–167

袴田哲司・加藤公彦・山本茂弘（2008）マツノザイセンチュウによるクロマツ組織の変性と個体枯死との関係．日本森林学会誌 90: 257–261

袴田哲司・加藤公彦・山本茂弘（2010）マツ材線虫病抵抗性クロマツの母樹と実生家系苗の組織変性．日

本森林学会誌 92: 16–21

Hakamata T, Kato K, Yamamoto S（2013）Correlation of seedling size and branch number with disease resistance of *Pinus thunbergii* seedlings to *Bursaphelenchus xylophilus*. Forest Pathology 43: 238–244

Hakamata T, Hiraoka Y, Yamamoto S, Kato K（2016）Effect of family, crown position, number of winter buds, fresh weight and the length of needle on rooting ability of *Pinus thunbergii* Parl. cuttings. iForest 9: 370–374

寶月岱造・石田京子・鈴木和夫・勝木俊雄（1994）数種のマツ切り枝及び樹皮片におけるマツノザイセンチュウに対する組織抵抗性．日本林学会誌 76: 471–472

石松 誠（1999）マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの挿し木について．林木の育種「特別号」: 20–23

Iyozumi H, Kato K, Kageyama C, Inagaki H, Yamaguchi A, Furuse K, Baba K, Tsuchiya H（2005）Plant defense activators potentiate the generation of elicitor-responsive photon emission in rice. Physiological Molecular Plant Pathology. 66: 68–74

加藤公彦・本澤洋江・伊代住浩幸・貫井秀樹（2010）6 量体キチンが誘導するエリシター応答反応と過酸化水素との量的関係．日本植物病理学会報 76 : 142–148

森 康浩・宮原文彦・後藤 晋（2006）マツ材線虫病抵抗性挿し木苗の生産における採穂個体へのマツノザイセンチュウ接種検定の有効性．日本森林学会誌 88: 197–201

森下義郎・大山浪雄（1972）さし木技術の実際．森下義郎・大山浪雄編，造園木の手引 さし木の理論と実際 169–276．地球出版，東京

大平峰子・倉本哲嗣・藤澤義武・白石 進（2009）マツ材線虫病抵抗性クロマツのさし木苗生産における密閉ざしの有効性．日本森林学会誌 91: 266–276

佐々木峰子・平岡裕一郎・岡村政則・藤澤義武・秋庭満輝（2002）マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの特性 ー実生後代の諸特性と抵抗性の関係ー．第 113 回日本林学会大会学術講演集 : 649

戸田忠雄（2004）アカマツおよびクロマツのマツ材線虫病抵抗性育種に関する研究．林木育種センター研究報告 20: 83–217

Yamada T, Ito S（1993）Histological observations on the response of pine species, *Pinus strobus* and *P. taeda,* resistant to *Bursaphelenchus xylophilus* infection. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 59: 659–665