

【第3回森林遺伝育種学会奨励賞受賞研究】

マツノザイセンチュウ抵抗性育種と普及に関する研究

松永 孝治^{*1}

はじめに

この度は栄誉ある賞を授与していただき、誠にありがとうございます。ご推薦くださいました森林総合研究所林木育種センター星比呂志育種部長、森林総合研究所林木育種センター九州育種場倉本哲嗣育種課長および選考に携わっていただいた多くの先生方に厚く御礼申し上げます。また、今回受賞の対象となった研究は東京大学の富樫一巳先生、共同研究者の林木育種センターの大平峰子主任研究員や高橋誠育種第一課長、山田浩雄課長をはじめとする林木育種センターの多くの方々にご指導、ご支援いただき、進めることができたものです。この場をお借りして心より御礼申し上げます。

私は広島大学在学時に富樫一巳先生の研究室に在籍してマツ材線虫病に出会い、当時は病気の生態を明らかにするという観点から、育種センターに就職してからは抵抗性マツの育種という観点から、その克服に向け研究に取り組んできました。大学の研究室はマツ材線虫病をマツ(宿主)・カミキリ類(媒介者)・線虫(病原体)の3つの生物とそこに影響する環境要因からなる系として捉え、野外で生じている現象を調査、実験を通じて記述し、理解することを目的としていました。私はその中でマツと線虫の関係を主な対象として研究に取り組んできました。今回受賞対象となったのは「マツノザイセンチュウ抵抗性育種と普及に関する研究」であり、受賞対象となった研究の2つ(Matsunaga and Togashi 2009; Matsunaga et al. 2011)はマツの感受性(あるいは抵抗性)と線虫の移動能力を、アカマツ(*Pinus densiflora*)の切枝を通過する線虫数を計数する手法によって評価した研究です。また、受賞対象となった別の2つの研究は開発した抵抗性品種の評価・普及に関するもので、後代検定によるクロマツ追加選抜品種の実生抵抗性の評価(松永ら2011)とクロマツ(*P. thunbergii*)のさし木生産効率を向上させるためにさし穂と採穂台木の形態的要因を

解析した研究(松永ら2009)です。ここではこれらの研究の概要を説明します。

研究の背景

アカマツ・クロマツ等のマツ類は古くから日本人に親しまれ、我々の生活に深く結びついてきた。アカマツは内陸のやせた土地にも生育できる先駆樹種であり、伝統的な木造建築の梁に利用され、その林分ではマツタケが生産されている。クロマツは海岸林を構成する主要な樹種であり、防潮・防砂等の公益的な機能や津波に対する減災機能を発揮すると考えられている。しかしながら、日本のマツ林は北海道を除く全国でマツ材線虫病による深刻な被害を受け続けている。マツ材線虫病に対する直接的な対応策として伐倒駆除・予防散布・樹幹注入等の防除法が確立されている。その一方で、発病機構の解明やアカマツやクロマツの抵抗性育種が進められているが、発病機構には未解明なところも多く、それらを理解することで抵抗性機構も明らかとなり、抵抗性育種による改良効果が向上すると考えられる。

切枝の通過線虫数によるマツノザイセンチュウ(*Bursaphelenchus xylophilus*)の感染に対するアカマツの感受性の季節変化

マツノザイセンチュウは媒介昆虫がマツを摂食する際に生じる傷口からマツ樹体に侵入し、感染初期には皮層および木部の樹脂道を通してマツの全身に分散することが知られている(例えば、真宮1975)。そのため、材線虫病の発病過程において、線虫の移動と、線虫の移動阻害はそれぞれ線虫の病原性とマツの抵抗性に関連すると考えられる。Oku et al. (1989)は強抵抗性の樹種リギテーダマツと感受性のクロマツの切枝を用いた実験を行い、切枝を煮沸すると、枝を通過する線虫数が

* E-mail: makoji@affrc.go.jp

¹ まつなが こうじ 森林総合研究所林木育種センター九州育種場

増加すること、また枝が長くなると通過線虫数が減少すること、抵抗性の高い樹種では線虫の通過が阻害されることを示した。この研究結果を受け、アカマツの切枝と複数の線虫アイソレイトを用いて通過実験を行い、アカマツの切枝を通過する線虫数は線虫アイソレイトの内的な移動能力、マツ切枝の線虫分散阻害能力およびマツの阻害作用に対する線虫の感受性によって説明できることが示されていた (Togashi and Matsunaga 2003)。また、アカマツ複数個体の複数の部位から枝を採取して通過実験を行い、マツ個体間で通過線虫数が異なることが示されていた (Matsunaga and Togashi 2004)。

Matsunaga and Togashi (2009) はマツの抵抗性判定が容易になると考えられる、マツの感受性が高まる季節を明らかにするために、1年半にわたって定期的に採取したアカマツの切枝に複数の線虫アイソレイトを用いて通過実験を行った。その結果、通過線虫数は夏季 (8月) と冬季 (12～2月) にピークが現れ、夏季のピークの方が大きいこと、季節変化はアイソレイト間に類似性があることを示した。また、この研究は線虫の発育段階ごとの通過数を調べ、通過数は卵と増殖型第2期幼虫で低く、その他の発育段階で高いことを示した。

マツノザイセンチュウの樹体内分散に対するアカマツクローンの阻害反応とそのマツ材線虫病抵抗性

マツ材線虫病対策の一環として、国立研究開発法人森林総合研究所林木育種センターは関係機関と連携してマツノザイセンチュウ抵抗性育種事業を1970年代から実施しており (藤本ら1989)、2016年3月までにアカマツとクロマツでそれぞれ225と171の抵抗性品種を開発している。品種開発は複数回の接種検定 (候補木の苗木に線虫を人為的に接種する検定手法) によってマツの抵抗性を判定するが、広大な苗畑と育苗の労力と経費が必要であり、通常8～9年程度の期間を要する。

切枝を用いた線虫の通過実験の結果は、抵抗性の高い樹種で通過数が少ないこと (Oku et al. 1989)、またアカマツ個体間で通過数に変異があることを示していた (Matsunaga and Togashi 2004)。そのため、もしアカマツの線虫通過阻害能力に遺伝的な変異があり、線虫の感染に対する抵抗性と密接に関連があった場合、線虫分散の阻害能力と抵抗性の間に正の相関が期待される。そこで抵抗性アカマツ15クローンと精英樹アカマツ2クローンの切枝を用いて通過実験を行い、抵抗性と分散阻害の関係性を調べた。その結果、抵抗性クローンの切枝を通過した線虫数は精英樹クローンの切枝を通過した線虫数より有意に少なく、線虫の分散阻害が抵抗

性品種の抵抗性機構に含まれることを示唆した。一方、通過線虫数と抵抗性クローンの実生抵抗性 (品種の自然受粉家系の苗木への線虫接種によって評価された抵抗性の相対的な指標) の間に相関関係は認められなかった。相関が認められなかった理由として、実生抵抗性が抵抗性クローン自身の抵抗性を反映していない、実験に用いた切枝の長さ (5.0cm) が抵抗性アカマツクローン間の阻害反応の差異を検出するためには短すぎる、苗木によって判定された抵抗性と成木の抵抗性との関係が弱い、抵抗性アカマツの抵抗性の変異を生じさせている抵抗性機構が線虫の分散阻害とは異なる等の可能性が考えられた。

切枝を用いた抵抗性の選抜が可能であれば、育種に必要な時間や費用を削減できると考えられる。今回の結果は、切枝を用いて抵抗性に関係すると考えられるマツの分散阻害能力を評価できることを示唆したが、実際の育種事業に適用するためにはさらなる研究が必要である。

アカマツ・クロマツは他殖性であり、また発根性が悪いとされていることから、造林用の苗は主として抵抗性品種を植栽した抵抗性採種園由来の種子を用いて生産されている。種子による苗木生産は種子の豊凶によってその安定性が影響を受けるものの、特別な施設も必要なく、養苗技術もすでに確立されている。しかし、抵抗性採種園から得られる実生苗の抵抗性は母樹や花粉親となる品種の違いによって変動することが知られている。そのため、採種園産種苗の抵抗性を向上させるには、各品種の実生抵抗性 (子供の抵抗性に基づく親の評価値) を評価して、実生抵抗性が高い品種で採種園を構築する必要がある。このように実生後代に基づく親の抵抗性情報は、生産集団および育種集団 (次世代化に用いる母材料) の選定、改良を効果的に進める上で欠くことのできない情報である。一方、さし木は選抜した個体と同一の遺伝子型を持つ苗を増殖できることから、安定した抵抗性を持つ種苗の生産を目指して、抵抗性クロマツのさし木による種苗生産の取り組みが行われている (大平ら2010)。ここでは2003年に九州地域で追加選抜された抵抗性クロマツ品種の実生抵抗性の評価 (松永ら2011) とクロマツさし木苗の生産効率向上に向けた取り組み (松永ら2009) について紹介する。

追加選抜したマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの自然受粉家系の抵抗性評価

1970年代に始まる抵抗性育種事業は当初、マツ材線

虫病被害林分において残存した健全な個体から穂を採取して接木苗を育て、線虫を接種して残存木自身の抵抗性を検定する手法が採られ、1985年までに16の抵抗性クロマツ品種(初期16クローン)を開発していた。これらの品種の自然受粉家系への線虫接種が九州各県および九州育種場で実施され、初期16クローンの相対的な抵抗性が評価され、特性表にまとめられて公表されている。1995年以降、九州育種場は抵抗性採種園の改良と育種母材料の確保を目的として、各県と共同でクロマツの追加選抜を進めた。その際、被害林分の残存木から球果を採取して、その実生苗を育て候補木とし、線虫を接種して抵抗性を評価する手法が実施された。その成果として2003年に17クローン、2006年に18クローンの抵抗性クロマツ品種を追加選抜している。松永ら(2011)は2003年に追加選抜した品種の1~4年間の接種結果を取りまとめ抵抗性を評価した。

初期16クローン、2003年に追加選抜された13クローン(17クローンの内種子を採取できたクローン)、クロマツ精英樹21クローンおよび野外の材線虫病被害林分の32個体から1~4年間にわたって自然受粉種子を採取して播種し、苗畑で養育した。その後、15ヶ月生の各苗に5000頭の線虫を接種し、8週後の生存率を調査した。接種年、反復、家系等を要因とした線形モデルで解析したところ、初期クローン、追加選抜クローン、精英樹、野外林分由来の苗の生存率はそれぞれ、45、44、25、16%となり、抵抗性品種の家系は精英樹や野外林分由来の苗より有意に生存率が高かった。この結果は二つの異なる手法によって選抜された抵抗性品種集団が同等の抵抗性を有することを示唆する。これらの選抜手法を比較した場合、残存木からの接ぎ穂の収集は球果の豊凶に左右されないという利点があるものの、球果の収集に比べて候補木1個体の収集に必要なコストが大きくなる。そのため、実生後代を候補木とする選抜によっても同程度の抵抗性を有する品種が得られるという事実は、追加選抜の省力化につながる有益な知見であった。また、初期16クローンと追加選抜クローンの各品種の生存率は同程度に大きくばらつくことが示された。この結果は、初期クローンと追加選抜クローンの中から抵抗性の高いクローンを絞り込んだ採種園を造成することで、更に抵抗性の高い種苗を供給できることを示唆する。

さし穂サイズと採穂台木の形態的要因がクロマツさし木苗の生産効率に与える影響

既存の研究によって、クロマツのさし木は選定後に

発生する萌芽枝をさし穂として利用することで、発根率が上昇することが知られていたが、どのような形態の萌芽枝がさし木に適しているか、またどのように選定すれば、さし木に適した萌芽枝を誘導できるかは明らかとなっていなかった。そのため、松永ら(2009)はマツのさし木に適した穂の形態および台木の形態とそこから生じる萌芽枝の関係を明らかにすることで、さし木苗の得苗率の向上と、さし穂の質・量を高める選定方法のあり方が見えてくると考え、二つの実験を行った。

一つ目の実験はさし穂の形態と発根性の関係を明らかにするために、5家系の5~6年生クロマツ各1個体から約10本の選定枝を無作為に選び、そこから発生している長さ1cm以上の萌芽枝をすべて採取し、最大長が5cmになるようにさし穂を調整してさし木を行った。これらの採穂台木は毎年高さ50cm程度で切りそろえていた。各さし穂の長さや直径をさしつけ直前に測定し、さし穂の長さ、直径および個体(台木)を要因とした解析を行ったところ、短く細い穂で発根率が高くなること、個体間で発根率に大きな変異があることが明らかとなった。

この実験は一般にクロマツの穂は小さい方が発根しやすいという結果を示した。しかしながら、この性質は水分環境によって影響を受ける可能性がある。例えば、本実験はミスト灌水条件下で行っていたため、さし床や空気中には十分な水分があったが、乾燥しがちな環境では穂のサイズが小さい方が乾燥しやすいため、結果として発根率が低下する可能性もあると考えられる。また、サイズの異なる穂をさし木して無施肥で2年間育成した場合、さし穂のサイズと得られた苗の大きさに正の相関がみられた(松永孝治 未発表)。これらの結果からクロマツはさし穂のサイズは小さいほど発根率がよいが、小さすぎると得苗率が低下するため、得苗率を最大化する最適な中間的なサイズが存在すること、その最適な中間サイズは個体によって異なることが推測される。実際の苗木生産の現場において採穂台木の管理をクローン別に行うことは困難と考えられるため、採穂作業時には各生産現場の環境・設備に合わせて、一定の直径以下の萌芽枝を採取するという基準を設ける方法が実際的であると考えられる。

二つ目の実験は萌芽枝の数とサイズに影響する採穂台木の形態的要因を明らかにするために、4年生クロマツ採穂台木5家系各3個体について剪定枝の形態(発生萌芽枝数、剪定枝の長さ、直径、高さ、萌芽発生部位(萌芽帯)の長さ)とそこから生じた萌芽枝の形態(長さ、

直径、剪定面からの距離)を調査して解析した。重回帰モデルで stepwise 法による変数選択を行った結果、剪定枝の萌芽枝数は萌芽帯の長さ、剪定枝の直径によって、萌芽枝の長さの平均値と萌芽枝の直径の平均値は剪定枝の直径に強く影響された。これらの結果から、太い枝を剪定すると長く太い萌芽枝が多数、細い枝を選定すると短く細い萌芽枝が少数得られると考えられる。そのため、適度なサイズの萌芽枝を得るためには、剪定枝も適度なサイズ(直径)に管理する必要がある。実際に連年台木の選定を行っていくと、枝が次第に細くなり、さし木に不適なほど萌芽枝が細くなる場合がある。そのような場合には枝を間引き、育成させて適切なサイズまで太らせる必要があるだろう。クロマツの採穂台木の仕立て方にはまだ不明な点が多く、今後さらに知見を積み重ねて体系立てていく必要があると考える。また、分散分析の結果、萌芽枝数、剪定枝の直径および萌芽帯の長さは家系間に有意差があった。この結果は選定方法等の技術的な手法以外に、家系の選抜といった育種的な手法によっても萌芽枝数の改良が可能であることを示唆した。

おわりに

マツ材線虫病は3つの生物と環境要因からなる複雑な系で、その理解が材線虫病の防除や抵抗性育種に欠かせない。これらの分野には今後も取り組むべき課題が多数あり、これからも研究に取り組み、成果を発信することで森林遺伝育種分野の発展に貢献していきたい。

引用文献

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一技術開発と事業実施10か年の成果一。林木育種センター研究報告7:1-84

真宮清治 (1975) 感染初期におけるマツ樹体内でのマツノザイセンチュウの動態。第86回日本林学会講演要旨集:285-286。

Matsunaga K, Togashi K (2004) Among-tree difference in inhibition of systemic dispersal of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Pinus densiflora*. *Applied Entomology and Zoology* 39: 271-277

Matsunaga K, Togashi K (2009) Seasonal change in susceptibility of *Pinus densiflora* to *Bursaphelenchus xylophilus* infection, determined from the number of nematodes passing through branch sections. *Nematology* 11: 409-418

Matsunaga K, Hiroko M, Tamaki S, Togashi K (2011) Inhibition response of *Pinus densiflora* clones to *Bursaphelenchus xylophilus* systemic dispersal and their resistance to pine wilt disease. *Nematology* 13: 653-659

松永孝治・大平峰子・倉本哲嗣 (2009) さし穂サイズと採穂台木の形態的要因がクロマツさし木苗の生産効率に与える影響。日本森林学会誌91:348-353

松永孝治・大平峰子・倉本哲嗣・倉原雄二・星比呂志・山田浩雄・小山孝雄・宮里学 (2011) 追加選抜したマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの自然受粉家系の抵抗性評価。九州森林研究64:84-86

Oku H, Shiraiishi T, Chikamatsu K (1989) Active defense as a mechanism of resistance in pine against pine wilt disease. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 55: 603-608

大平峰子・宮原文彦・森康浩・大川雅史・宮崎潤二・真崎修一・吉本貴久雄・佐々木義則・山田康裕・三樹陽一郎・田上敏彦・小山孝雄・宮里学・鳥羽瀬正志・黒田慶子・岡村政則・松永孝治・白石進 (2010) クロマツの第二世代マツ材線虫病抵抗性種苗生産システムの構築。林木の育種235:1-5

Togashi K, Matsunaga K (2003) Between-isolate difference in dispersal ability of *Bursaphelenchus xylophilus* and the vulnerability to inhibition by *Pinus densiflora*. *Nematology* 5: 559-564