

【解 説】講 座

林木育種の現場の ABC (15) マツノザイセンチュウの接種検定

藤澤 義武^{*,1}・倉本 哲嗣²

はじめに

ニレ立ち枯れ病、クリ胴枯れ病、五葉マツ類発疹さび病を世界三大樹病と呼ぶが、我が国における最も深刻な樹病はマツ材線虫病であろう。これを含めて世界四大樹病とも言うそうだが、世界的にも深刻な樹病としてとらえられるようになってきた。

マツ材線虫病は、我が国の代表的な景観である白砂青松だけではなく、古都の点景として、さらには薪山、マツタケ山として重要な里山のマツを次々と消滅させている。今や、北海道を除いた各地で蔓延しているのは周知の通りである。マツ材線虫病はかつて「松くい虫」や「松枯れ」と呼ばれ、明治時代に長崎と北九州で発生が認められていたが、徳重と清原によってその正体が1 mmにも満たないマツノザイセンチュウであることが明らかにされたのは、それから60年以上経過した1969年であった。これに続いて大庭は産地・系統別に育成したアカ・クロマツの苗木にマツノザイセンチュウを接種し、生存率に違いを生じることを示し、マツ材線虫病に対する抵抗性育種の可能性を示した。これらの成果を基に今に続く「マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」が1978年に始まった。現在では、抵抗性個体の選抜の中心は東北地方や日本海側地域に移るとともに、西日本地域ではより抵抗性の高い次世代の抵抗性品種の育成に力が注がれている。東日本大震災で壊滅した海岸林の復興にも本事業の成果は活用されており、抵抗性マツの植栽を基本とすることになっている。このマツノザイセンチュウ抵抗性育種の基盤とも言える抵抗性を評価するための「接種検定」を解説する。

接種源の準備

ボトリチスの増殖

接種源であるマツノザイセンチュウを増殖するには、まず、その餌であるボトリチス (*Botrytis cinerea*、灰色カビ病の病原) を準備する。ボトリチスは糸状菌であり、その培養にはPSA (Potato Sucrose Agar) もしくはPDA (Potato Dextrose Agar) を用いるのが一般的である。ともに寒天培地にジャガイモのエキスと糖類を加えたものであり、果糖を加えるのがPSA、蔗糖を加えるのがPDAであるが、ジャガイモには男爵芋が推奨される。これは、調理用としてはデンプン質が多いために煮崩れし易い男爵芋の欠点だが、エキスの採取では利点となることによる。PDA培地は医学・衛生関連の検査などで需要が多く、出来合いのものが日水製薬などから発売されている。これは精製水に溶かしてオートクレーブで加熱・滅菌するだけで直ちに使用できる。しかし、寒天末が1本4,000円程度であるのに比べ、1本7,000～8,000円とかなり高価である。一方、PDA、PSAを自分で調製する場合は、次のとおり。

ジャガイモの皮を剥き、1 cm角程度に切ったものを200 g用意し、1 Lの蒸留水で20分程度煮て、これをガーゼ等で濾過する。濾過した煮汁は蒸留水を加えて1 Lにし、これに果糖、もしくは蔗糖を20 g、寒天20 gを加え、攪拌、加熱して溶解させる。これをシャーレに適量分注して、120℃でオートクレーブ滅菌する。

こうしてできた培地に元種として森林総合研究所等の研究機関から入手したボトリチスをごく少量ずつ白金耳 (とは言っても主にニクロム製だが…) で掻き取って培地に擦りつけ、25℃に設定したインキュベーターで9日～2週間程度培養する。白金耳はその都度ガスバー

* E-mail: yochan53@agri.kagoshima-u.ac.jp

¹ ふじさわよしとけ 鹿児島大学農学部

² くらもとのりつぐ 森林総合研究所林木育種センター九州育種場

ナーの酸化炎でしっかりと赤熱するまで加熱して滅菌する。これは、線虫を移植する場合も同様である。なお、培地を滅菌した後は、分注などの作業を全てクリーンベンチの中で行うことは言うまでも無い。雑菌の混入(コンタミ)が無く、増殖が成功すると、シャーレ一面にボトリチスが灰白色のフェルト状に広がる。この状態でマツノザイセンチュウを移植しても良いが、培地が平面なので増殖効率が低い。このため、PDA、PSA 培地ではボトリチスの元種の増殖を行い、これを次に示す麦培地に移植して材線虫の増殖を図る。麦培地は培養面が立体となるので増殖率が高い。

マツノザイセンチュウの増殖

シャーレを準備する(通常は直径9cmのものを使用する)。通常1シャーレ当たり100万頭を目処として、増殖数を算定し、シャーレを準備する。すなわち、1万頭接種であれば、1シャーレ当たり100本の接種が可能であるが、分注する際の漏れなどによって接種作業では相当量の無駄が生じるので、これに備えて材線虫の懸濁液は必要量の倍程度を用意しなければならない。また、コンタミによる増殖の失敗、材線虫の洗い出し時における漏れなどを考慮し、さらに倍程度を用意する。したがって、必要量の2×2で4倍程度を目処としてシャーレ数を決定する。すなわち、100本に1万頭/本を接種するのであれば、4枚のシャーレを用意する必要がある。ただし、技術が向上し、コンタミを完全に無くすることができれば、1シャーレ当たり最大200万頭程度、平均でも150万頭程度の増殖を見込むことができる。この場合、それぞれの増殖見込みによって、増殖数を適宜減らすことができる。しかしながら、苗木の準備に必要な年月と実施可能期間が限定されていることなどを考慮すると、材線虫の不足によってこれらを無駄にしないように、できるだけ余裕を持って増殖しておくのが良い。

次に麦培地を調製する。直径9cmのシャーレであれば、20gの麦と2～3%蔗糖もしくは果糖の水溶液18mLを入れる。麦は丸麦、押し麦、いずれでも良い。これをオートクレーブによって120℃、20分程度蒸気滅菌した後、ただちに排気してさらに20分程度蒸気滅菌する。これによって、滅菌をより完全にするとともに、麦飯に蒸し上げた状態とする。蒸気滅菌したシャーレ群はクリーンベンチの中で冷却し、ボトリチスを移植する。ボトリチスの移植は前述したPDA培地などと同様であり、PDA培地で増殖したボトリチスの種を白金耳で少量掻き取って麦培地になすりつける(図-1)。なすりつけはシャーレの中央部付近に1箇所が良いが、2、3箇所

所になすりつけるとより確実である。こうして、移植を終えたシャーレを25℃に設定したインキュベーターの中で9日前後培養すると全体にボトリチスが蔓延する。このとき、コンタミのあったシャーレは取り除く。コンタミのあった麦培地は黒ずんでいたりと、濡れたようになって、菌糸がまばらである。

こうして、ボトリチスが一面に蔓延したシャーレに材線虫を移植する(図-2)。移植にはPDA培地などで保存していた元種を用いるが、コンタミの無い健全なもののみを使用するのは言うまでもない。材線虫の元種を培地ごと白金耳で少量掻き取り、培地に移植する。このとき、シャーレをポリフィルムなどで密閉しない。これは、材線虫の呼吸を確保するためである。こうして材線虫を移植したシャーレは25℃に設定したインキュベーターで10日前後培養する。すると、シャーレ内はボトリチスの菌糸が消えて濃い褐色となり、シャーレの上蓋にも黄色い汚れのように材線虫が増殖しているのを確認することができる。これが増殖のピークである。



図-1 十分に滅菌した麦培地にボトリチスを移植する



図-2 ボトリチスが十分に増殖した麦培地にマツノザイセンチュウを移植する

さらに数日培養すると、上蓋から外へ流れ出るようになり、大量に増殖したように見えるが、この時点になると死滅しているものも多く、活性のある材線虫は少なくなるので注意する。ちなみに、この状態で検鏡すると、膨潤して活性がなくなった材線虫が多数を占めることが分かる。

マツノザイセンチュウ懸濁液の調製

材線虫の洗い出し：材線虫の増殖が終わると、接種源である懸濁液の調製に入る。シャーレからの洗い出しは、増殖後ただちに行うのが最良である。洗い出しまでの時間調整するためにシャーレを冷蔵庫で保存すると、コンタミによって材線虫の頭数が減少するだけではなく、腐朽によって麦が細片化し、夾雑物が増加するので好ましくない。したがって、増殖のスケジュールは接種予定日から逆算し、綿密に計画しておかなければならない。また、材線虫の懸濁液の調製は接種検定日の直前、すなわち、当日に行うのが理想である。

培地から材線虫を取り出すのは、基本的には線虫の有無や成育密度を調べるときに用いる「ベールマン漏斗法」と同様である。すなわち、ロートに培地のシャーレを入れ、水で材線虫を洗い出す。具体的な手順は次のとおり。

できるだけ多くのシャーレを処理するために大型のロートを用意する。直径30cmのロートで7～8枚のロートを処理できる。このロートにシリコンゴムのチューブを取り付け、口をピンチコックで止める。ロートはかなり大きなものであるが、あまり大きくなりすぎるとロート上面からピンチコックで止めた取り出しまでの距離が大きくなるために水圧が過大となり、水漏れやチューブの離脱の発生などで取り扱いに苦慮することがある。このロートの内面に2枚重ねのガーゼで覆ったステンレス製のザルを入れる。次に、シリコンチューブをピンチコックで止水したうえで、蒸留水をロートの7～8分目くらいまで満たす。この中で、シャーレを洗い出す。シャーレはまず上蓋に付着した材線虫を洗浄瓶の蒸留水で洗い落とした後、静かに裏返してロートの中に沈める（図-3）。このとき、培地の麦がシャーレから拡散しないように注意する。ロート内の水に浸漬した後、2時間程度で培地の材線虫は80%程度が洗い出されるとされる（戸田 2004）。これ以上の時間をかけた場合、採取率は向上するが、培地が水に溶け出すことによって夾雑物も増加する。洗い出された材線虫はベージュ色の混濁液となってゴムチューブに溜まっており、これをピンチコックで流量を調整しながら流し、メスシリンダーなどで受け取る（図-4）。ここで液をこ



図-3 ロートにセットしたザルとガーゼにシャーレを浸漬してマツノザイセンチュウを洗い出す

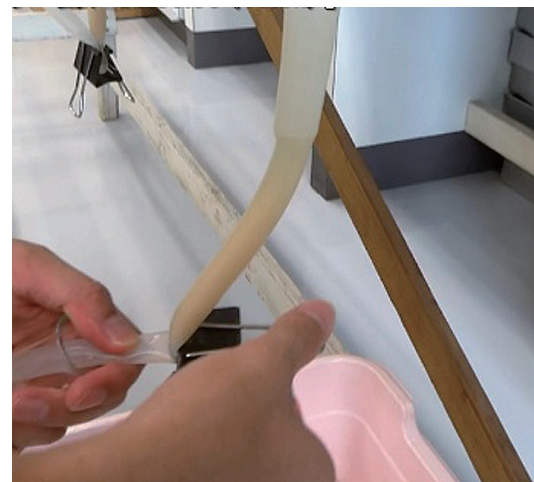


図-4 培地から離脱したマツノザイセンチュウがチューブに沈殿している様子

ぼすとこれまでの作業が無駄になるので、ピンチコックは慎重に操作する。

採取した材線虫の懸濁液には培地に由来する細片化した麦の粒子などを含むので、これをできるだけ取り除く。その手順は次のとおり。容量が採取量の3倍程度あるフラスコなどを用意し、そこに採取した懸濁液を入れるとともに、蒸留水を加えて3倍量程度にする。こうすると、底に材線虫がたまるので、麦汁で濁った上澄みを取り除き、さらに蒸留水を加えて3倍程度にする（図-5）。この作業を2～3回繰り返すと麦の粒子をかなり取り除くことができる。麦汁を取り除いておかないと、懸濁して材線虫の頭数の計測が困難になる。

頭数調整：接種時の頭数が例えば1mL当たり1万頭になるように、懸濁液の濃度、すなわち、材線虫の密度を調整する。原液の状態の懸濁液では、材線虫の密度が高く、計数が困難なので、適当な濃度に希釈する。まず、

原液をスターラなどによって良く攪拌する。このとき、材線虫の活性に影響しないように、スターラであれば完全に攪拌できる最低限の回転速度で攪拌し、回転数



図-5 懸濁液の下部にマツノザイセンチュウが沈殿していく様子

を上げすぎないようにする。この状態で持続しながら、中層部からピペットで懸濁液を定量採取し、これを別途用意したフラスコ等で水の中にキラキラ線虫がうごめく程度にさらに希釈する。このときの希釈倍率を控えておき、希釈液を良く攪拌しながら、血球計数盤などによって単位体積当たりの頭数を計測する。これを希釈率で除して原液の単位体積当たりの頭数に換算する。この作業を5回繰り返す、最大値と最小値を除いた3回の測定値を平均して原液の濃度とし、これをもとに接種時の濃度に調整する。

濃度調整済み懸濁液の保存：調整済みの懸濁液はただちに接種検定に用いるのが良いが、天候その他の条件で順延しなければならないこともある。その時には、冷蔵庫（4～5℃）で1週間程度は保存可能とされている（戸田 2004）。ただし、呼吸による酸欠に気をつけなければならない。濃度を調整した容器には、設定濃度になる水面の位置をマジックなどで書き込んでおき、接種の際に水分を補給し、攪拌すれば設定した濃度が得られる様にしておく。この状態で、材線虫が沈殿した状態の上澄みを1日2回入れ替える。水を入れ替えるよりはポンプで空気を送り込んだ方がよいように考えるが、材線虫の活動が過度に刺激されることで、かえって活力が落ちるとされる。いずれにしても、1週間以上保存すると水圧の影響その他で急激に活力を失うので、懸濁液の状態での保存はできるだけ短時間に押さえるようにする。

こうして、接種源の準備が終わると、いよいよ接種検定となる。

接種検定の実施

作業準備

前日までに、マイクロピペット、剥皮用の鋸、管瓶、剪定ばさみ、クーラーボックスなどの作業用具を用意するとともに、刃を研ぐなど完全な状態に整備しておく。また、作業用具は必要数量に加えて十分な予備を用意しておくのは言うまでもない。

当日は、前日までに用意しておいた作業用具を再確認するとともに、接種源の準備を行う。接種源である材線虫の懸濁液は作業開始2時間前以前に冷蔵庫から出し、実体顕微鏡で材線虫の活性を確認するとともに、当初調整しておいた濃度かどうかを再度確認する。確認を終えたら、濃度調整時同様に回転速度に留意してスターラで継続的に攪拌しながら食紅を加える。食紅は接種の有無を確認するために用い、一般的にはジベレリンに添付されている処理確認用の食紅を用いる。食紅が材線虫の活性に影響を与えないことは、マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業が始まった当初に確認されている（藤本ら 1989）。このこともあるので、採種園等でジベレリン処理をした折には、食紅は捨てず別途保存しておく。こうして濃度を調整したうえで食紅を加えた懸濁液を、スターラで継続的に攪拌しながら検定作業員に配付する50ml程度の管瓶に分注する（図-6）。

接種検定

接種検定はこれまでに各種の方法が試みられてきたが、作業が容易で比較的確実に接種できることから、剥皮法が一般的である（藤本ら 1989）。剥皮法は、苗木の接種部位に鋸の背部を研いで作った刃で3～5cm程度を皮の一部が樹体につながった状態で剥皮し、剥皮部を鋸でかき傷をつけ、ここに定量の懸濁液を接種する方法である。通常は2名一組で作業し、一名が剥皮して接種箇所を準備するとともに他方がマイクロピペットで接種する。このとき、剥皮は苗木の活性に影響しない程度に切り込むことが肝要であり、接種担当者は接種に際して、分注された管瓶を常に良く振り、材線虫を沈殿させないようにする。間違っても上澄みを接種することがないように、特に専門家以外が接種検定に参加する際にはこの点を常に強調しておかなければならない。また、分注した管瓶は接種に用いるまでクー



図-6 接種用にネジロ瓶へ分注した様子

ラーボックスなどに冷温で保存しておく。

接種後、接種漏れがないか一個体ずつ確認する。食紅は懸濁液の接種の有無を確認するためのものであり、剥皮してあっても赤く染まっていないものは未接種であることを示す。未接種の個体には黄色などのカラーテープを先端部にくくりつけるなどして表示し、別途編成した接種組み合わせが順次接種していく。

なお、分注した懸濁液は活性が低下するため、接種検定当日のみ使用し、残ったものは必ず廃棄し、翌日以降には絶対に用いないようにする。

生存率と健全率の調査

接種後、生存率と健全率を調査する。調査方法は「国立研究開発法人森林総合研究所林木育種センター品種開発実施要領-マツノザイセンチュウ抵抗性品種-」に示されており、概要を次に示す。

接種後、原則として接種後4週間後から2週目ごとに10週目まで調査を行うこととなっているが、必要な場合は調査期間を延長することができる。調査は次に示す規準に従い、個体毎に目視評価する。

1. 健全苗：無被害のもの。
 2. 部分枯苗：健全苗及び枯死苗以外のもの。
 3. 枯死苗：枯死のもの及び生存の見込みのないもの。
- なお、調査結果は次の定義に従って取りまとめる。

生存率＝調査本数に対する健全苗と部分枯苗の合計本数の百分率

健全率＝調査本数に対する健全苗の本数の百分率

抵抗性は抵抗性の規準となる対照系統の結果に対する P 値を次の式に従って計算し、 P 値がマイナスとなった場合に対照系統よりも抵抗性が高いと判断する。

$$P = [(A - a) / A] \times 10 + [(B - b) / B] \times 5$$

ここで、 A : 対照系統の生存率 (%)、 a : 候補系統の生存率 (%)、 B : 対照系統の健全率 (%)、 b : 候補系統の健全率 (%) である。

なお、マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業として接種検定を実施する場合には、接種源とする材線虫の系統及び対照とするマツの系統については、先述した事業実施要用に示されているので、それに従う。

まとめ

マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業は開始以来、40年近くが経過し、アカマツが220、クロマツが144の抵抗性品種が開発された(2015年現在)。しかし、東北地方では特にクロマツで十分な品種数を確保できていない。また、早くから被害を受けていた西日本ではより抵抗性の高い品種が求められている。その一方で、マツノザイセンチュウの加害メカニズムや抵抗性のメカニズムについては、ここに至ってようやく明らかになりつつあるところである。したがって、これからも当分の間、抵抗性は接種検定によって評価せざるを得ない。我が国の海岸部の環境の保全に欠かすことができないクロマツは、東日本大震災の復興においてその重要性がさらに高まっている。一方、東北地方では抵抗性品種の数が十分ではない。これらによって、炎天下、さらに暑い温室の中でのつらい接種作業を続けていかなければならないが、我が国の貴重なマツを将来に引き継いでいくために必要不可欠であると考えるなら、意義あるものと楽しむことさえできよう。

引用文献

- 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
- 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か年の成果－. 林木育種センター研究報告 7: 1-84