

【解 説】

林野庁委託事業「マツノザイセンチュウ抵抗性品種開発技術高度化事業」 の成果の概要

ーマツノザイセンチュウの特性評価とより強い第二世代抵抗性品種開発ー

松永 孝治^{*,1}・渡辺 敦史²

はじめに

マツ材線虫病は日本のマツ林に対して非常に大きな被害を与えてきた森林病虫害であり、それに対する育種の対応として、1978年（昭和53年）に開始されたマツノザイセンチュウ抵抗性育種事業、1992年（平成4年）から開始された東北地方等マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業、2006年（平成18年）から開始されて主に関東育種基本区において取り組まれた抵抗性等緊急対策育種事業といった複数の抵抗性育種事業が推進された。これらの抵抗性育種事業においてマツノザイセンチュウ抵抗性品種が順次開発され、品種数は堅調に増加してきた。最も初期に実施されたマツノザイセンチュウ抵抗性育種事業ではアカマツ（*Pinus densiflora*）92クローン、クロマツ（*P. thunbergii*）16クローンの抵抗性品種が開発され（藤本ら、1989）、これらのクローンが現在各府県の抵抗性品種採種園の主要構成品種となり、抵抗性種苗の生産に大きく寄与している。

これまでの3事業で開発された品種は、野外の被害地から選抜された候補木に複数回の接種検定を行うことにより開発されたものがほとんどであり、これらは「第一世代」の抵抗性品種と位置づけられている。「第一世代」間の交配後代からの選抜による「第二世代」の抵抗性品種は、2011年に最初の2品種が開発された。

林木育種センター、九州大学、岡山県、広島県、山口県が共同で推進した林野庁委託事業「マツノザイセンチュウ抵抗性品種開発技術高度化事業」（2013～2017年度）では、環境、マツ及び線虫の交互作用の解明、マーカーの開発等に取り組み、その成果を反映して「より

強い第二世代」抵抗性品種を開発した。本稿では、本事業で検討された「第二世代」抵抗性品種開発の基準となるマツノザイセンチュウ（*Bursaphelenchus xylophilus*）アイソレイトの検討と品種開発を中心にその概要を紹介する。その他本事業に関して得られた成果については、別途研究論文等を通じて公表する予定である。

第二世代抵抗性品種と選抜基準の検討

第二世代抵抗性品種とは、第一世代抵抗性品種間交配の実生後代から選抜された生物学的な第二世代を意味するが、第一世代よりも高い抵抗性を発揮する品種としても期待されている。マツノザイセンチュウ抵抗性品種開発実施要領には、接種検定に使用する線虫アイソレイトの病原力は「島原」と同等かそれ以上と記載されており、通常「島原」または「Ka-4」が用いられている。抵抗性品種は、これらの線虫の接種後、対照系統よりも生存率等が優れた系統を選抜することになっており、開発される抵抗性品種の抵抗性のレベルは接種検定に用いる線虫の病原力と対照系統の抵抗性のレベルに影響を受けることになる。第二世代抵抗性品種には、第一世代よりも強い抵抗性の発揮が求められるが、従来と同じ方法で選抜した場合、抵抗性品種開発の基準自体は第一世代と同一となり、選抜強度が不十分となることが考えられる。このことから抵抗性品種の性能を高めるためには、従来の線虫よりも強い病原力を示す線虫を改めて被害林分等から探索すると共に、対照とするマツ系統を見直す必要があった。九州育種

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

¹ まつなが こうじ 森林研究整備機構 森林総合研究所林木育種センター九州育種場

² わたなべ あつし 九州大学大学院農学研究院

基本区では、「島原」よりも強い病原力を示す線虫を九州育種基本区内から探索し、さらに複数の線虫系統を混合した「nemaQ」を作出する試みを先行して行っていた(大平ら 2010)。本委託事業では、このような先行事例を参考にしつつ、改めて全国から線虫系統を収集して病原力等を評価した。

線虫の収集と病原力評価

東北・関東・関西・九州の4育種基本区内でマツ材線虫病被害を受けたアカマツ及びクロマツ林を選定し、枯死木 361 個体(東北:110、関東:66、関西:113、九州:86)から材片を採取した(図-1)。収集した材片からベールマン法によって線虫を分離し、186 アイソレイト(東北:51、関東:27、関西:70、九州:38)を作出した。

これらの線虫アイソレイトを、抵抗性クロマツ品種、田辺ク-54号(実生抵抗性ランク2)、三崎ク-90号(ランク4)、波方ク-37号(ランク4)の自然受粉家系の実生苗に接種して病原力を評価した。線虫接種後のマツ

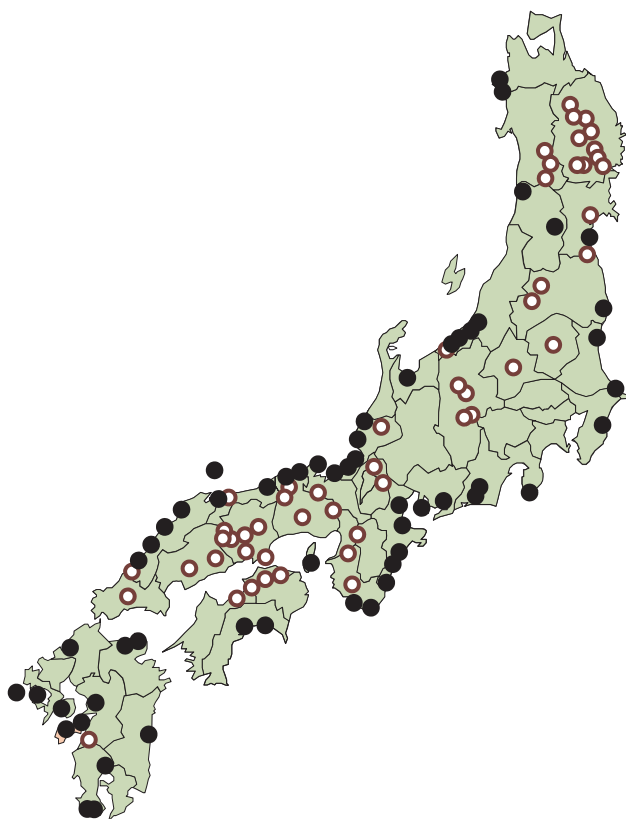


図-1 本事業において確立した線虫アイソレイトの採取地。黒塗りおよび白抜きの円はそれぞれクロマツとアカマツの枯死木を示す。

苗木の生存率や健全率は、気温や降水量といった環境要因の影響を受けることが知られている。ここでは各線虫アイソレイトの採取地域での病原力を評価するため、採取地域の育種場で接種を行った。対照として、島原とKa-4を用いた。その結果、供試した抵抗性品種3家系全体の平均発病率は北からそれぞれ、25、43、77、76%となり、西南地域ほど発病率が高くなる傾向がみられた(図-2)。マツ苗の発病率は接種した線虫アイソレイトによっても大きく異なり、どの育種基本区においても、島原やKa-4より高い発病率を引き起こすアイソレイトが存在した。これら高い発病率を示すアイソレイトを第二世代抵抗性品種開発のための検定の接種源として用いるアイソレイト候補とした。

線虫の増殖特性と環境(温度)との関係性

環境とマツの抵抗性の関係を検討するために、同一の母樹から採取した種子を東北から九州の4育種場で養育して同一の線虫を接種すると、西南日本の育種場で発病率が高い傾向にあり、気温と発病に関係性があった。温度はマツ側の生理状態に影響を及ぼすだけでなく、線虫側の増殖力等にも影響を与えることが知られており、堂園・吉田(1973)は、線虫の増殖力は培養温度を高めると増加することを報告している。このように温度はマツ材線虫の発病過程に非常に重要な要因であると考えられる。

本事業の結果から、低緯度地域から採取されたアイソレイトの増殖至適温度は高い温度帯になる傾向が認められた。この結果は今後の抵抗性品種の開発を推進する上で重要な知見である。つまり、平均温度が高い九州もしくは関西育種基本区とより冷涼な東北育種基本区で高い増殖力を発揮するアイソレイトは異なる可能性を示唆している。そのため、今回全国から収集した線虫アイソレイトの温度特性を評価・分類し、各地域に適した線虫アイソレイトを抽出・利用できる体制を構築することで、これまで以上に適切に抵抗性品種開発が可能になると考えられる。

品種開発に用いる線虫アイソレイトの選定と用法について

各育種場において3家系の抵抗性クロマツに複数の線虫アイソレイトを接種した場合、マツ家系間および

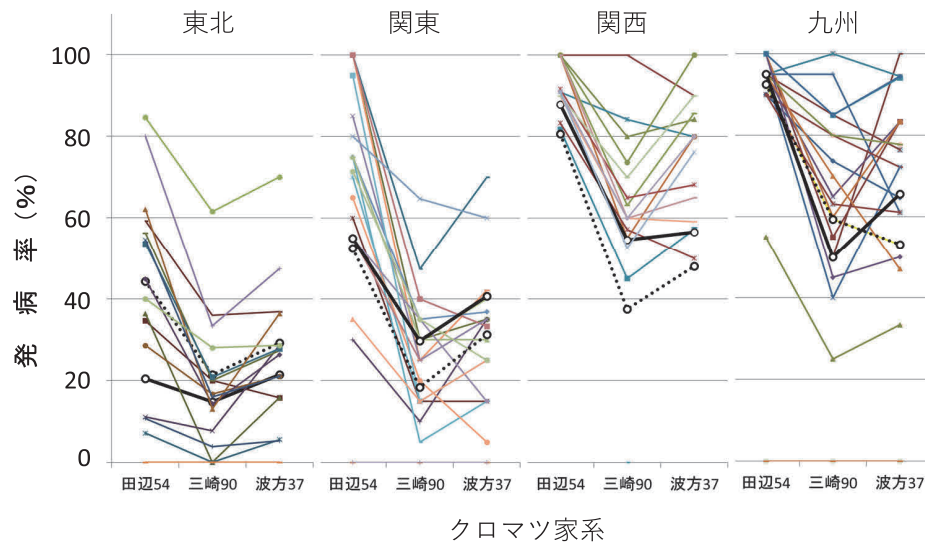


図-2 各育種基本区において採取した線虫アイソレイトを当該基本区の育種場で接種した場合の抵抗性クロマツ3家系の発病率。各折れ線は線虫アイソレイトを示す。黒の実線と破線はKa4と島原を示す。

線虫アイソレイト間で枯死率に変異がみられた(図-2)。マツ家系と線虫アイソレイトの交互作用はそれほど大きくないと考えられたが、マツの家系によって線虫アイソレイトの病原力(発病率)が入れ替わる場合もあった。前述の様に、環境条件、特に気温が毎年変動する苗畑のような条件では、増殖で優位なアイソレイトが年によって異なる可能性があり、複数の線虫アイソレイトを混合して接種に用いることで、様々な抵抗性品種間の交配から生じている第二世代品種の候補木を安定して選抜できると考えられた。

本事業では九州地域および関西地域でそれぞれ、クロマツとアカマツのより強い第二世代品種を開発することとしていたため、九州育種基本区および関西育種基本区においては九州地域と近畿瀬戸内地域から収集されたアイソレイトの病原力を第一世代の抵抗性品種の自然受粉家系を用いて評価し、候補としたアイソレイトから安定した病原力を示すアイソレイトをそれぞれ5つまたは6つ選んだ。これらアイソレイトを混合することを前提に、線虫アイソレイトを個別に大量増殖してから混合する方法と、事前に線虫アイソレイトを等量混合した後に増殖する方法を比較した結果、両者の間でマツ苗木の枯死率に統計的な有意差はなく、労力を考慮すれば事前に混合する手法が簡便と考えられた。

月に「品種開発要領-マツノザイセンチュウ抵抗性品種-」(以下、品種開発要領)を改正し、より強度の高い選抜基準等について追加を行った。主な追加点は、1) 従来の対照系統(品種開発要領に付属の別表1に記載)よりも実生抵抗性の高い系統を含む別表2を整備したこと、2) 対照家系として品種開発要領の別表2の系統を用い、接種源としてKa4あるいはKa4より病原力が高いことが明らかな線虫アイソレイト3種類以上を混和したものをを用いた接種検定による二次検定の方法を定めたことである。また、3) 各地域において接種後1週間ほどの期間の気温が高温で推移することが期待できる時期に接種検定を実施することとした。従来、用いてきた品種開発要領の別表1はこれまでに開発してきた第一世代抵抗性品種と同等レベルの系統を選抜するという観点から、第一世代の中で平均的な実生抵抗性を持ち、十分な種子供給が可能なものを記載していた。今回追加した別表2の系統はより強い品種を選抜するという観点から、第1世代の抵抗性品種の中でも実生抵抗性が高く、また十分な種子供給が可能な系統を記載した。改正した品種開発要領はweb経由で取得できる(林木育種センター2018)。

新たな抵抗性品種の開発

本事業においては、クロマツでは、すでに一次検定に合格していた第一世代抵抗性品種間の交配後代、すなわち第二世代の25系統43個体において接ぎ木増殖を行い、

抵抗性品種開発要領の改正

本委託事業で得られた成果に基づいて、平成29年12

これら接ぎ木クローンに今回新たに収集し、病原力を評価した混合線虫を接種して二次検定を行った。その結果、各クローンの生存率は20～95%で平均は65%であった(図-3)。同一家系内のクローン間においても生存率にはばらつきが見られた。アカマツでも同様の結果が得られた。各クローンの生存率及び健全率等を勘案し、アカマツ、クロマツのそれぞれについて上位10クローンをより強い抵抗性を有するものとして選抜した(このうち、アカマツの1クローンは、平成28年度開発品種を再評価したもの)。これらの第二世代クローンは、平成30年1月26日の平成29年度第2回優良品種・技術評価委員会において、新たに要領に追加したより高い選抜強度の検定に合格した抵抗性品種として認められた。

マツノサイセンチュウ抵抗性育種の今後の展望

今回は紹介できなかったが、本事業ではクロマツにおけるEST情報の収集とDNAマーカー開発を行い、QTL解析に基づいて抵抗性形質と関連するDNA領域の探索を行うことや、Hirao et al. (2012) によって明らかにされた樹体内防御応答に関して、さらに発現遺伝子情報の蓄積を図ったほか、線虫についても遺伝子発現解析を進めた。また、環境要因とマツ、線虫の交互作用を明らかにするために東北から九州の複数個所において共通の試験設計による接種試験や、線虫側の温度感受性と樹体内侵入後の線虫の増殖の関係性の評価にかかる研究など従来の抵抗性育種事業の枠組みに基礎的知

見を加味する取り組みも行った。これらは宿主、病原体、環境間の相互作用に基づくマツ材線虫病の抵抗性育種の必要性に基づいて取り組んだもので、これらの知見は気候変動によるマツ材線虫病の被害拡大への対応策の検討に貢献できると考えられた。

ここでは、より強い第二世代抵抗性品種の開発のために、全国から線虫を収集し、病原力評価を行ったことを紹介した。これらの線虫アイソレイトはマツ材線虫病の最大の被害国である日本において抵抗性育種およびマツ材線虫病研究の推進のための貴重な遺伝資源と考えられる。一方、アカマツとクロマツは第一世代抵抗性品種の開発が進み品種数が増大してきたとはいえ、育種素材としてのリソースの規模はスギと比較すれば極めて少ない。今後、第二世代抵抗性品種開発が本格化すれば、第一世代抵抗性品種リソースはそれほど長い間を要するまでもなく不足することが予想される。第一世代抵抗性品種やその候補木、本事業で作出した品種の候補木等は、いわゆる天然林の遺伝資源とは異なるものの、抵抗性形質のリソースとして重要であり、将来の利用を見据えた保存について検討する必要がある。そのためには林木育種における遺伝資源のあり方や方法論に関する研究を本格的に進めて行く必要がある。

本事業等で開発した第二世代抵抗性品種を採種園に導入するにあたり、同じ採種園に血縁関係にある品種が植栽される場合、近親交配が生じる可能性がある。そのため、近親交配の影響評価やそれを回避するための採種園設計の在り方について検討を進める必要がある。

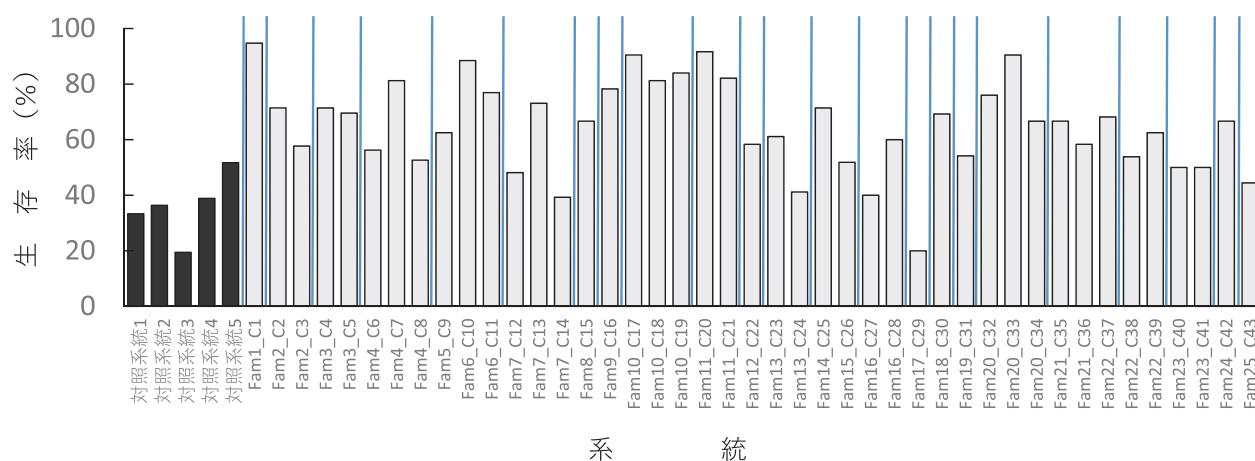


図-3 新たに採取した線虫アイソレイトを接種したクロマツ接ぎ木クローンの生存率。黒棒は対象系統。白棒は品種候補木を示す。異なる家系の間に棒線を配置した。

引用文献

- 堂園安生・吉田成章 (1973) *Botrytis cinerea* 菌上におけるマツノザイセンチュウの増殖に対するロジスティック曲線の適用. 日本林学会誌 56: 146–148
- 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十ヵ年の成果. 林木育種センター研究報告 7: 1–84
- Hirao T, Fukatsu E, Watanabe A (2012) Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. BMC Plant Biology 12: 13
- 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
- 林木育種センター (2018) 国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター品種開発実施要領ーマツノザイセンチュウ抵抗性品種ー. www.ffpri.affrc.go.jp/ftbc/business/sinhijnnsyu/yuryouhinsyu.html (2018 年 6 月 4 日アクセス)