

クロマツさし木クローンを用いたマツノザイセンチュウ抵抗性の評価

磯田圭哉 (森林総研森林バイオ研究センター)・松永孝治・大平峰子・倉本哲嗣 (森林総研林育セ九州)

要旨：マツノザイセンチュウ抵抗性の QTL マッピングを行ううえで、最も重要となる抵抗性の評価法を開発するため、さし木クローンへの接種試験を試みた。まず、交配家系の複数個体についてさし木クローンを育成し、人工接種試験による抵抗性の評価を試みたところ、波方ク-37 と田辺ク-54 を親とする家系では、抵抗性スコアの頻度分布がつりがね型となったのに対し、波方ク-37 と三崎ク-90 を親とする家系では、枯損率が低すぎて右肩上がりの頻度分布となり抵抗性の高い個体の評価が十分なされなかった。そこで、評価に最適な接種方法を確立するための基礎情報を得る目的で、線虫の系統と接種方法の違いによる枯損率の差異を調べた。その結果、予想通り病原力が強いとされている線虫アイソレイトでいずれのクローンも枯損率が高くなった。線虫アイソレイトによる各クローンの抵抗性スコアの順位変動はみられなかったことから、線虫アイソレイトを変えることによる接種試験強度の調整が可能であることが示唆された。異なる接種方法の比較では、クローンにより枯損率が高くなるものや低くなるものがあり、一定の傾向は見られなかった。

キーワード：クロマツ, マツノザイセンチュウ, 抵抗性, さし木, クローン

I はじめに

現在、我々は、マツノザイセンチュウ抵抗性に関する QTL マッピングを進めている (3)。QTL マッピングを行ううえで最も重要なのが量的形質の表現型の評価であり、この場合は抵抗性の評価値である。これまで実生苗に対しマツノザイセンチュウ (以下、線虫とする) を接種し、その後の病徴発現の程度等で抵抗性評価を行うことを試みてきたが、病徴が現れた個体はほとんど枯死するため、抵抗性の量的な評価が困難であった。そこで、実生苗をさし木クローン化して枯損率などによる量的な評価を試みた。さらに、さし木苗の病徴および抵抗性評価に関する基礎的な情報を得るため、病原力の異なる線虫 3 アイソレイトと、異なる接種方法による接種を行い、その後のさし木苗の病徴発現を比較した。

II 材料と方法

1. 平成 19 年の試験 平成 18 年 3 月に、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの人工交配家系 4 家系 (波方ク-37×三崎ク-90 : 26 クローン, 三崎ク-90×波方ク-37 : 8 クローン, 波方ク-37×田辺ク-54 : 33 クローン, 田辺ク-54×波方ク-37 : 8 クローン) についてさし木を行った。発根した個体は 3 ヶ月後の 6 月に苗畑に床替えし、3 個体以上活着したクローン (各クローン 3~20 個体, 平均 7.44 個体) を試験に用いた。平成 19 年 7 月に線虫 (島原個体群 (2)) 約 1 万頭を主軸先端部へのはく皮接種法 (以下、先端はく皮法とする) に

より人工接種し、約 5 ヶ月後の 12 月に枯損調査を行った。枯損状態は、1 : 健全, 2 : 半枯れ, 3 : 枯死の 3 段階で評価した。この評価をもとに、半枯れを 1/2 に重みづけした各クローンの抵抗性スコア (P(r)) を

$$P(r) = (2 \times \text{健全率} + \text{半枯率}) / 2$$

として求めた。

2. 平成 20 年の試験 採穂台木化してある抵抗性クロマツ自然交配家系の 16 個体から、平成 19 年にさし木を行い、試験材料を育成した。さし木の方法等は平成 19 年の試験と同様である。なお、ここで用いた採穂台木は、すでに線虫を人工接種し、生き残った個体である。

接種方法の違いが病徴発現に及ぼす影響を明らかにするため、9 クローンについて先端はく皮法と主軸注入法による接種を行った (表-1)。線虫アイソレイトは、島原個体群あるいは SC12 系統を用いた。SC12 系統は、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業の「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」で単離されたものである (松永ら, 未発表)。

次に、線虫アイソレイトの違いが病徴発現に及ぼす影響を検討するため、7 クローンについて、3 種類の線虫アイソレイト (上記 2 系統と茨城県笠間市で単離された Ka4 系統 (1)) を先端はく皮法あるいは主軸注入法により接種した (表-2)。なお、病原力は、島原が最も弱く、次いで Ka4, SC12 が最も強いといわれている (松永ら, 未発表)。平成 20 年 7 月に接種を行い、1 ヶ月後および 2 ヶ月後に枯損調査を行った。これは、線虫ア

Keiya ISODA (Forest Bio-Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 3809-1 Ishi, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301), Koji MATSUNAGA, Mineko OHIRA, Noritsugu KURAMOTO (Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 2320-5, Suya, Koshi, Kumamoto 861-1102) Estimation of resistance to the pine wood nematode using cuttings of *Pinus thunbergii*.

表一. 接種方法の違いによる枯損率の比較試験に用いた各クローンの個体数

クローン	線虫	接種方法	
		先端はく皮法	主軸注入法
M3	島原	8	9
N4	島原	9	10
N5	島原	8	8
T2	島原	9	8
N6	SC12	8	8
N7	SC12	8	8
S2	SC12	8	9
T3	SC12	8	8
T4	SC12	8	9

表二. 線虫アイソレイトの違いによる枯損率の比較試験に用いた各クローンの個体数

クローン	接種方法	線虫アイソレイト		
		島原	Ka4	SC12
M1	先端はく皮法	11	10	12
T1	先端はく皮法	8	8	7
S1	先端はく皮法	13	12	14
M2	主軸注入法	6	5	6
N1	主軸注入法	7	6	7
N2	主軸注入法	11	11	12
N3	主軸注入法	6	7	6

アイソレイトによって、病徴の進展速度に違いがあるかを検討するためである。平成 19 年の試験と同様に各クローンの抵抗性スコアを求めた。

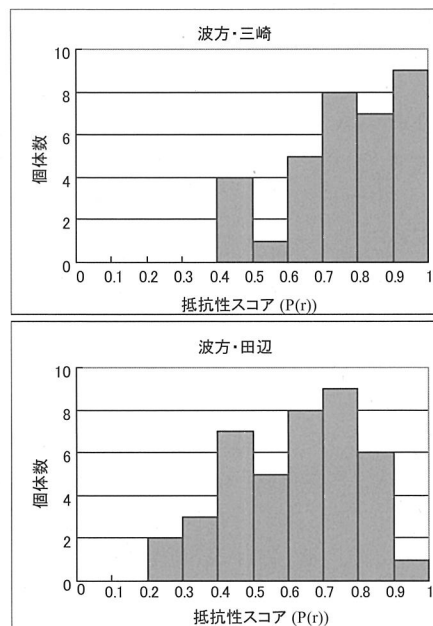
III 結果

平成 19 年の試験では、最終的に健全率 47%、生存率 94%という結果になった(表一三)。クローンごとに求めた抵抗性スコアは、0.25 から 1.00 の間で、平均 0.704 となった。家系ごとの抵抗性スコアの平均値は波方クロー 37×三崎クロー 90 が 0.80、三崎クロー 90×波方クロー 37 が 0.75、波方クロー 37×田辺クロー 54 が 0.65、田辺クロー 54×波方クロー 37 が 0.57 となった。抵抗性スコアの頻度分布を図一に示した。なお、三崎クロー 90×波方クロー 37 と田辺クロー 54×波方クロー 37 はクローン数が少なかったため、正逆交配となる 2 家系をあわせて示した。その結果、波方クロー 37 と三崎クロー 90 を親とした場合は、右肩上がりとなり、波方クロー 37 と田辺クロー 54 を親とした場合つりがね型分布となった。

平成 20 年の試験では、1ヶ月後調査時と2ヵ月後調査時の健全率と生存率を比較すると、島原を接種したときには生存率はあまり変わらないが、健全率が下がり、Ka4 を接種した場合は健全率、生存率ともにあまり低下

表一三. 接種後の健全率と生存率

接種年	調査	線虫	健全率	生存率
H19	5ヶ月後	島原	0.466	0.943
H20	1ヶ月後	島原	0.361	0.984
	2ヶ月後	島原	0.178	0.955
	1ヶ月後	Ka4	0.151	0.865
	2ヶ月後	Ka4	0.138	0.852
	1ヶ月後	SC12	0.096	0.725
	2ヶ月後	SC12	0.040	0.606



図一. 波方クロー 37 と三崎クロー 90 の交配家系(上)および波方クロー 37 と田辺クロー 54 の交配家系(下)における抵抗性スコア(P(r))の頻度分布

は見られず、SC12 の場合には健全率、生存率ともに低下した(表一三)。

接種方法が枯損率に与える影響を見るため、同一クローンへ先端はく皮法と主軸注入法による接種を行ったところ、4クローン(N5, M3, T2, N7)はいずれの方法で接種した場合も同程度の抵抗性スコアを示したが、他の5クローンは値がばらつく傾向にあり、大きな順位変動がみられた(図二)。クローンと接種法を要因とした2元配置の分散分析を行ったところ、クローン間、接種法間ともに有意差は認められなかった。

線虫アイソレイトの違いが病徴発現に与える影響を見るために、同一クローンへ3系統の線虫アイソレイトによる接種を行ったところ、2ヵ月後調査では、いずれのクローンも島原、Ka4、SC12 の順で値が小さくなった(図三)。また、接種方法の試験のときと違い、大きな順位変動は見られなかった。なお、1ヵ月後調査時点で

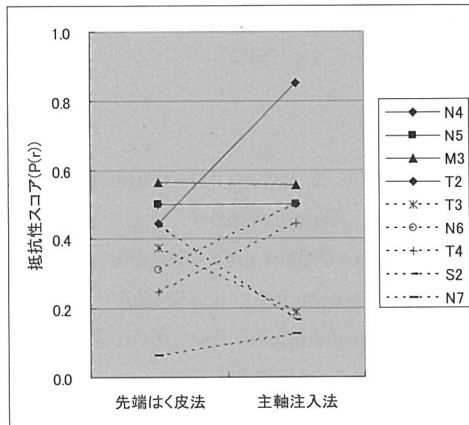


図-2. 各クローンの抵抗性スコア(P(r))の先端はく皮法と主軸注入法による違い。実線のもは島原個体群、点線のもは SC12 を接種。2ヶ月後調査時の結果

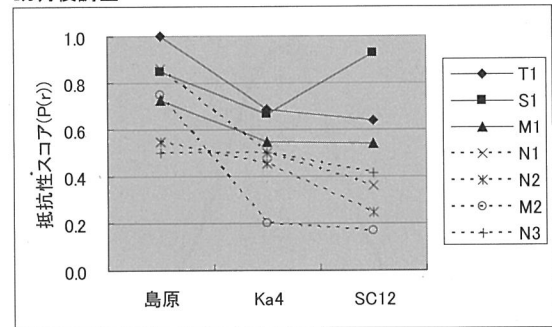
は、島原を接種した場合の値が全体的に高く、また、SC12 を接種したときには値の幅が広がった。2ヶ月後調査結果を用いてクローンと線虫アイソレイトを要因とした2元配置の分散分析を行ったところ、クローン間、線虫アイソレイト間ともに有意差が認められた ($P < 0.05$)。

IV 考察

1. 交配家系における抵抗性評価値の分布 平成19年の試験では、波方ク-37と三崎ク-90あるいは波方ク-37と田辺ク-54を親とした人工交配家系を用いた。親とした抵抗性クロマトは、実生後代の接種検定結果から抵抗性の5段階評価が行われている(5)。波方ク-37、三崎ク-90、田辺ク-54の評価はそれぞれ4、4、2となっており、前2者が抵抗性の高いクローン、後者が抵抗性のやや低いクローンとして位置付けられている。今回のさし木クローンを用いた検定結果でも、前2者の交配家系では高い抵抗性スコアが得られ、田辺ク-54が片親となる家系では低いスコアが得られるという結果となり、これまでも報告されているとおり(4)、抵抗性の高い親同士の交配で抵抗性の高い次代が得られることが示された。

さし木を用いた接種試験の目的は、人工交配により得られた各個体の抵抗性を評価することである。家系内の各個体は全兄弟関係にあり、互いに遺伝的に類似しているが、両親から受け継いだ遺伝子の組合せに基づき、遺伝子型にばらつきが生じる。抵抗性に関しても同様で、同一家系内でも図-4に示したようなばらつきがあることが予想される。今回の結果でも図-1に示したようなばらつきが見られた。特に田辺ク-54を含む家系の場合、

1か月後調査



2か月後調査

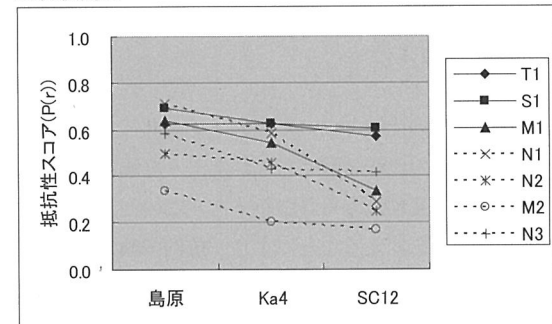


図-3. 1ヶ月後調査時(上)と2ヶ月後調査時(下)での、各クローンの抵抗性スコア(P(r))の線虫アイソレイトによる違い。実線のもは先端はく皮法、点線のもは主軸注入法により接種

つりがね型の分布となり、抵抗性の低い個体から高い個体までの評価ができたと思われる。一方、波方ク-37と三崎ク-90の家系では右肩上がりの分布となったことから、接種試験の強度が弱く、抵抗性の高い個体の評価が十分にできなかったものと考えられる。

2. 接種試験方法の検討 平成20年の試験では、同一クローンに対し、複数の異なる接種試験を行い、接種試験方法の違いによる抵抗性スコアの変動を検討した。まず、先端はく皮法と主軸注入法による抵抗性スコアの比較を行った結果、接種方法間に有意差は認められなかった。しかし、各方法での同一クローンの抵抗性スコアを比較すると、4クローンでは同程度のスコアが得られていたものの、5クローンで大きく異なっていた。しかも、3クローンは主軸注入法で高くなったのに対し、2クローンは逆に低くなっており、大きな順位変動を伴うものとなった。この変動の理由は今のところ不明であるが、接種方法に対するクローンの反応性に違いがある可能性や、どちらかの接種方法に潜在的な問題がある可能性などが考えられるので、今後の検討課題としたい。

3種類以上の線虫アイソレイトによる抵抗性スコアの比較では、病原力の違いがそのまま抵抗性スコアの違いとなって現れた。この試験では、処理が3種類に増えたため、

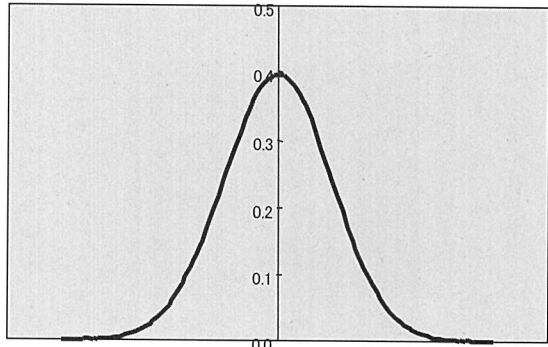


図-4. 人工交配家系における抵抗性のばらつきの頻度分布イメージ

図-4. 人工交配家系における抵抗性のばらつきの頻度分布イメージ

5～6個体での比較となったクローンもあったが(表-2), 接種方法の比較試験で見られたような順位変動を含んだスコアの変動はみられなかった。このことは、線虫アイソレイトを変えることにより、接種試験の強度を調整し、家系の抵抗性レベルに応じた接種試験を行うことが可能であることを示唆している。また、興味深いことに、接種1ヶ月後と2ヶ月後の時点における抵抗性スコアを比較すると、島原を接種した場合1ヶ月後から2ヶ月後にかけて大きな病気の進行がみられたのに対し、Ka4では1ヶ月後にはほぼ進行が終わっていたことが示された。これは、Ka4の方が島原よりも病気の進行が速いことを示唆している。一方、SC12では、1ヶ月で進行が止まったクローンと、1ヶ月から2ヶ月にかけてさらに進行したクローンが混在しており、病気の進行過程がKa4とも異なる可能性が示唆された。今回の結果から、病原力の強さと病気の進行速度の速さには一定の傾向は見られなかったが、線虫アイソレイトにより病気の進行過程に違いがある可能性が示唆された。今後、クローンと線虫アイソレイトの交互作用を調査する場合には、枯損率だけでなく、病気の進行過程も考慮する必要があると考えられる。

3. さし木クローンによる抵抗性の評価 人工交配家系における各個体の抵抗性の強さを、さし木クローンを用いて評価可能であることが示唆された。線虫アイソレイトの比較試験では比較的安定した結果が得られたことから、今回の抵抗性スコアが利用できる可能性が高いと思われる。しかし、接種方法の比較で抵抗性スコアの変動が多く見られたことから、評価値の安定性、信頼性について、より詳細に検討しなければならない。今後、クローンあたりの個体数を増やし、反復を設けるなどして、さし木による抵抗性評価法を確立する必要がある。

本研究の一部は科学研究費補助金(若手研究(B) No. 20780125)によって行われた。

参考文献

- (1) AIKAWA, T., KIKUCHI, T. and KOSAKA, H. (2003) Demonstration of interbreeding between virulent and avirulent populations of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by PCR-RFLP. Appl. Entomol. Zool. 38: 565-569.
- (2) 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カ年の成果一。林育研報 7: 1-84.
- (3) 磯田圭哉・渡邊敦史・倉本哲嗣(2007) 分子遺伝学的手法によるマツノザイセンチュウ抵抗性育種へのアプローチ。林木の育種 224: 13-14.
- (4) 倉本哲嗣・大平峰子・平岡裕一郎・谷口亨・柏木学・井上祐二郎・福田友之・佐藤省二・村山孝幸・植田守・岡村政則・星比呂志・藤澤義武(2007) マツノザイセンチュウ抵抗性マツ交配家系の遺伝解析。日本森林学会大会発表データベース 118: 393.
- (5) 戸田忠雄(2007) 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.