

## 〈資料〉

### 6種類の菌根菌を接種したアカマツ実生苗へのマツノザイセンチュウ接種試験

山原美奈・河合昌孝

マツに対してマツ材線虫病抵抗性付与効果を発揮する菌根菌を見つけ出すため、6種の菌根菌を接種したアカマツ実生苗にマツノザイセンチュウを接種し、枯死経過を観察したところ、アカショウロを接種した苗は、他の菌根菌を接種したものより枯れにくかった。

#### 1. はじめに

マツ材線虫病は、1905年に国内最初の被害が報告されて以降現在に至るまで、各地のマツ林に深刻な枯損被害を及ぼし続ける国内最大の森林被害のひとつであり<sup>1)</sup>、奈良県でも毎年多くのマツが枯損している。マツ材線虫病の被害を食い止めるため、精力的な防除作戦が展開されてきたが、被害拡大は食い止められず、現在では東北地方にまで激害が及んでいる<sup>2)</sup>。しかし、薬剤を用いた防除は標的生物以外の種まで死に追いやるといった問題がある。そこで、病気を媒介するマツノマダラカミキリに対する天敵生物を用いた生物防除法の研究も行われ、昆虫病原菌<sup>3, 4, 5)</sup>や寄生性昆虫<sup>6, 7)</sup>、捕食性昆虫<sup>8)</sup>、あるいは鳥類<sup>9, 10)</sup>などの利用が試みられている。一方で、寄主であるマツの抵抗性を向上させるという防除手段も、抵抗性マツの育種という形で研究、事業が進められ、多くの抵抗性マツが生み出されてきた<sup>11, 12)</sup>。マツの抵抗性を向上させることによる松枯れ防除は、即効性には欠けるものの、薬剤処理に比べると環境への負荷が小さいと予想され、今後重要な研究分野となると考えられる。

マツ類は菌根性樹種であり、根において「菌根」と呼ばれる共生体を形成している。菌根共生は菌が水分や栄養塩類を植物に提供し、植物からは光合成産物が菌へと移送される相利共生であることが知られている<sup>13)</sup>。また、菌根菌の中には宿主植物の病害抵抗性を高めるものもあることが知られており<sup>14, 15)</sup>、これを利用することができれば、菌根性樹種であるマツの病害抵抗性を高められる

可能性がある。そこで今回、健全なマツ林で採集した6種の菌根菌について、マツへの抵抗性付与効果がみられるかどうかを知るため、実験を行った。

#### 2. 材料および方法

##### 2.1 菌根菌

接種には、奈良県保存菌株から、ウラムラサキNLam-1、ホンシメジNS83、コツブタケNPt-3、シャカシメジNLf-8、ショウロ（滋賀ショウロ①）、アカショウロ（京都アカショウロ）の6菌株を用いた(表1)。5℃で冷蔵保存したこれらの菌株を表2に示す2種類の平板培地に移植し、2ヶ月間20～23℃で培養後、十分に成長したコロニーを刻んで液体培地(表2)へ投入した。さらに2ヶ月後、同じ組成の新しい培地で2回洗浄した菌体をブレンダーで破碎し、新しい培地に植え継いだ。3ヶ月後、アカマツ実生苗への接種当日、100mlの三角フラスコで培養していた菌体を、滅菌したイースト水(1g/l)で2回(シャカシメジ、ウラムラサキ、ホンシメジ)または4回(コツブタケ、ショウロ、アカショウロ)洗浄し、新しいイースト水を加えてブレンダーで破碎し、200mlに定容した。これらをそれぞれ100mlずつに分け、片方はそのまま菌根菌接種源とし、他方は121℃で10分間滅菌して冷却後、対照区用の接種源とした。

##### 2.2 アカマツ実生苗

アカマツの種子を市販の台所用洗剤（チャーミーグリーン）とツイン40<sup>®</sup>で洗浄し、30%過酸化水素水で10分間

表1 接種に用いた菌株の由来

種名	菌株名	集場所	分離年月日
ウラムラサキ	NLam-1	奈良県五條市西吉野町西野	2001/10/23
ホンシメジ	NS83	奈良県吉野郡野迫川村	2001/10/14
コツブタケ	NPt-3	奈良県高市郡高取町	2001/ 9/17
シャカシメジ	NLf-8	奈良県吉野郡野迫川村	2001/10/13
ショウロ	滋賀ショウロ①	滋賀県	不明
アカショウロ	京都アカショウロ	京都府	不明

表2 培地の組成(1リットルあたり)

組成 \ 培地	1/5OH+J	mMMN(G5g)	液体培地
グルコース	4g	5g	5g
イーストエキス	0.4g		1g
ハイポネックス?(粉末)	0.1g		0.25g
モルトエキス	3g		
リン酸2水素カリウム		500mg	
酒石酸アンモニウム		500mg	
硫酸マグネシウム7水和物		150mg	
クエン酸鉄アンモニウム		8mg	
塩化カルシウム2水和物		70mg	
塩酸チアミン		0.1mg	
野菜ジュース(注)	10ml	10ml	
寒天	15g	15g	

(注) カゴメ野菜ジュース(トマトミックスジュース 食塩無添加) のろ液

表面殺菌したのち、滅菌パーミキュライト(体積の1/4の蒸留水を加えて121°C、60分間滅菌)を詰めたアイスクリームカップ(口径12cm、高さ10cm、PET製)に播種した。これを植物培養室(室温約22°C)で生育させた。給水には蒸留水を用いた。3ヶ月後、上と同様にして滅菌パーミキュライトを詰めたアイスクリームカップに、1カップあたり15本ずつ移植した。これらも植物培養室に置き、以後週に1回蒸留水を給水した。1ヶ月後、市販の液肥(花工場®2000倍液)を1カップにつき100mlずつ施肥した。約3ヶ月後、これらの苗に菌根菌を接種した。

### 2.3 菌根菌接種

1菌株につき、菌根菌接種区2カップ(30本)、対照区2カップ(30本)の計4カップを用いた。菌根菌接種区には上記菌根菌接種源を、対照区には滅菌した菌糸体破砕液である対照区用接種源を1カップにつき50mlずつ10ml駒込ピペットで実生苗の根元に散布した。接種源散布後、滅菌パーミキュライト(パーミキュライト:蒸留水=4:1、121°C30分オートクレーブ)を1カップにつき250ml加えて接種面を埋めた。これらを再び植物培養室に戻し、過湿にならないように注意して蒸留水を給水しながら約2ヶ月生育させ、線虫接種に用いた。

### 2.4 線虫接種

線虫接種には、強病原性線虫であるマツノザイセンチュウS10系統を用いた。大麦-ボトリチス培地(50ml三角フラスコに大麦10gと蒸留水10mlを入れて121°Cで10分間オートクレーブし、そこに灰色カビ病菌*Botrytis cinerea*をまん延させた培地)で継代培養していた線虫を汲み置き水道水で抽出し、約500頭/20μlになるように線虫液

を調整した。

線虫液調整後すぐ、すべての実生苗の胚軸に、メスで縦に切れ目を入れ、そこに底辺8mm、高さ10mmの三角形に切ったろ紙(ADVANTEC No.2)を挟み込み、線虫接種区では線虫液を20μl(線虫約500頭)ずつ染みこませた。対照区には線虫液の代わりに汲み置き水道水を用いた。

線虫対照区では、汲み置き水道水をそれぞれ線虫接種後約1週間は植物培養室に置き、その後人工気象器へ移して26°Cで2日間置き、その後温度を28°Cまで上げて、以後、枯死経過の観察を行った。給水は週1回、1カップが350gになるように蒸留水で行った。

### 2.5 枯死経過の観察

線虫接種から1週間以内に枯死したものについては、接種作業の失敗による枯死である可能性が高いため、以後の観察からは除外した。実生苗の病徴の進展は、針葉の褪色の程度で表し、子葉以外に全く褪色の見られないものを健全とし、針葉の1/10が褪色、1/5が褪色、1/2以上が褪色の4段階に分けて記録した。

### 2.6 菌根形成確認

枯死経過観察終了後、地下部の4分の1について、根を洗浄し、菌根形成の確認を行った。

## 3 結果

線虫を接種しなかったものは、観察期間を通して全く枯死しなかった。線虫を接種したものについては図1のとおりであった。ウラムラサキ、ホンシメジ、ショウロ、

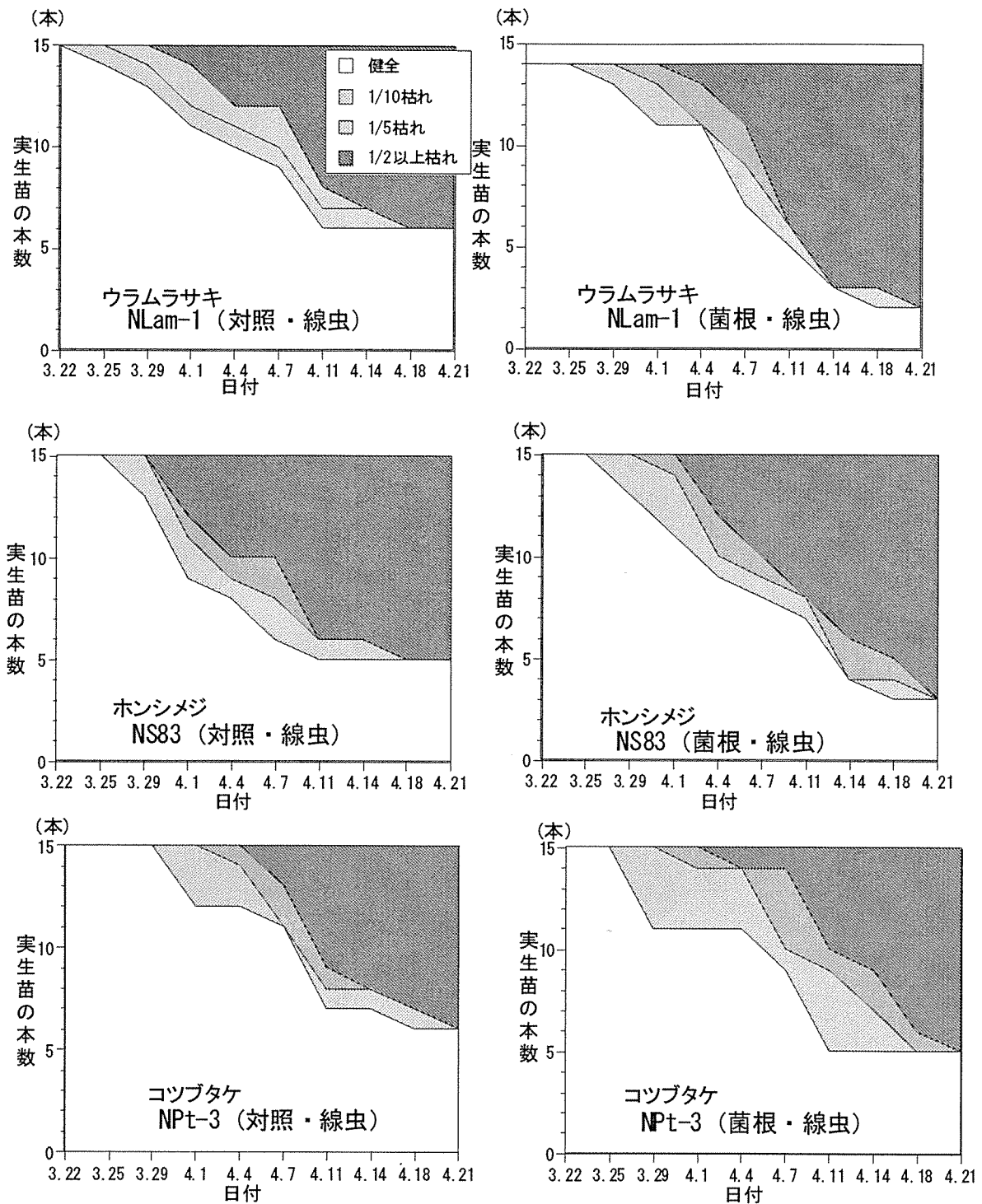


図1 線虫接種後の枯死経過

アカショウロでは、生きた菌糸体を接種した菌根菌接種区の方が、殺菌した菌糸体を接種した対照区より多く枯れた。コツブタケでは両者はほぼ同数が枯れた。シャカシメジでは、菌根菌接種区の方が枯れが少なかったが、両区ともほとんどの苗が枯死した。しかしアカショウロについては、菌根菌接種区でも対照区でも枯れが少なかった。

ショウロ、アカショウロ、ウラムラサキについては菌根の形成が確認されたが、残りの菌については、明瞭な菌根の形成は確認できなかった。

#### 4. 考察

本試験は、マツ材線虫病に対するアカマツの抵抗性を

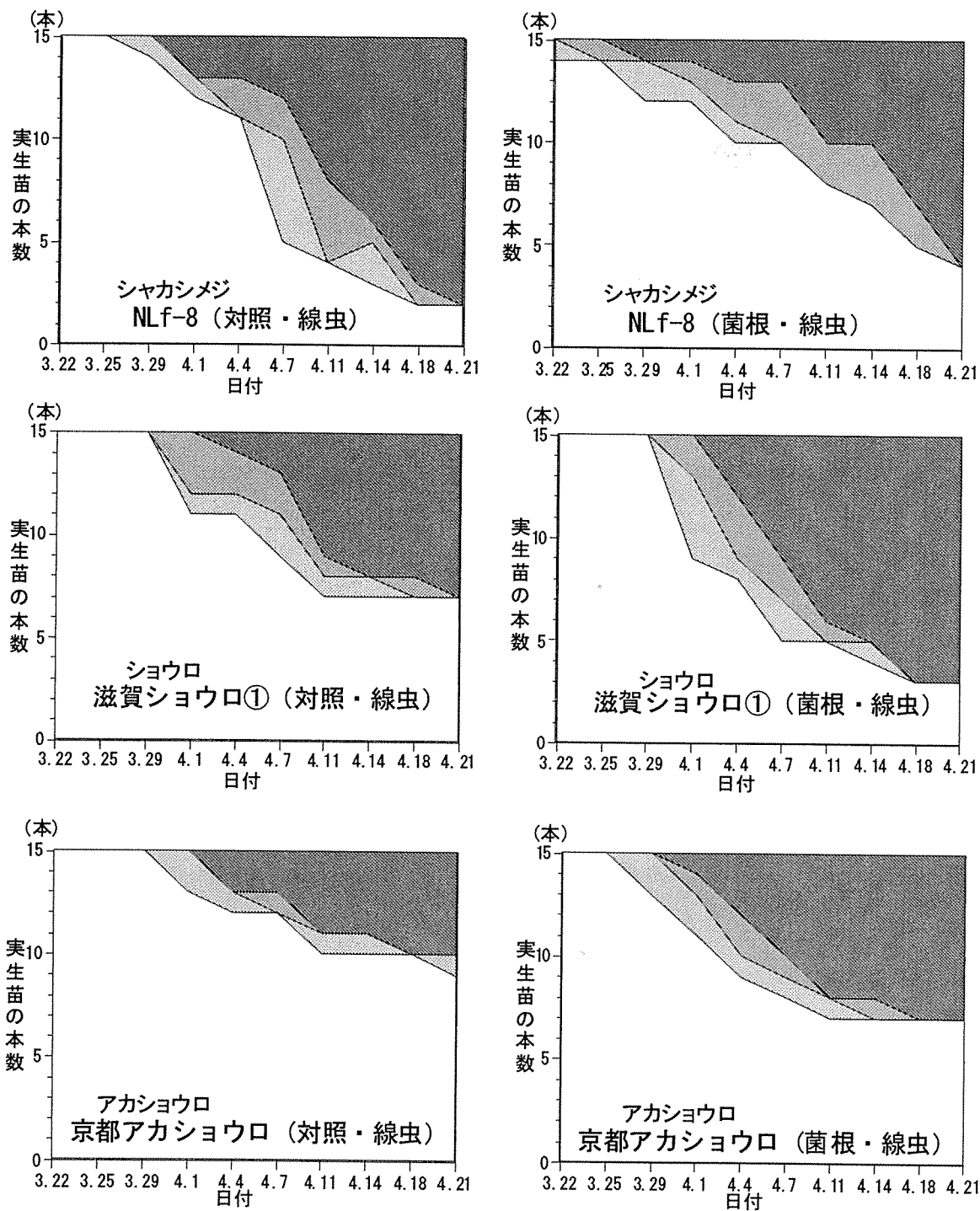


図1 線虫接種後の枯死経過 (つづき)

高める効果を持つ菌根菌を探索するために行ったが、著しい効果を有する菌は確認できなかった。すでに報告されている松枯れと菌根菌を扱った研究は、菌根菌の接種によりマツの耐性が高まることを示唆している<sup>16, 17, 18, 19)</sup>。ところが本研究では逆に、生きた菌根菌を接種することによって、枯れが増加する様子が観察された。既報の多くはクロマツを材料としているため、アカマツとの種間差という事も考えられるが、他に大きな原因として、試

験場所の照度不足が挙げられる。菌根共生は、菌根菌から植物への水分および栄養塩類の移送と植物から菌への光合成産物の輸送で成り立っている<sup>19)</sup>。従って、植物側にとっては生存、成長に必要な無機栄養を提供される代わりに、光合成産物を奪われていることになる。十分な光環境の下では、菌から水分や栄養塩類を得る利益が、光合成産物の一部を奪われる損失を上回るが、光条件が劣悪な場合、損失が利益を上回ることになる。今回、光

条件については12月の屋外(約4600ルクス)と比べても約40分の1という暗い環境(100~160ルクス、14時間明期)で実験を行ったため、実生苗が菌根菌を養うだけの光合成を行えず弱って枯れやすくなったと考えられる。

今回の結果で興味深いのは、アカマツ実生苗の枯損の程度が接種した菌根菌種によって大きく異なるということである。すなわち、アカショウロを接種した実生苗は、生菌を接種したもので約半数が、死菌を接種したものに至っては3分の2が生き残ったのに対し、シャカシメジ接種苗では、生菌接種で4本、死菌接種に至ってはわずか2本しか生き残らなかった。この結果は、アカショウロが、アカマツ実生苗のマツ材線虫病への抵抗性に対し、何らかの影響を与えることを示唆している。さらに、死菌接種でも枯れにくかったことから、アカショウロの菌体抽出物から、マツの抵抗性を高める効果を持つ物質が得られる可能性も考えられる。今後、さらに改良型の試験を行う必要がある。

## 引用文献

- 1) 二井一禎：松枯れは森の感染症，東京，文一総合出版，2003.
- 2) 小林一三：テーマ別セッション「東北地方の松くい虫被害を見直す」，その後の動き～音量不足による被害発生態様の変貌に即した防除対策のための研究方向～．東北森林科学会誌，10，79-81 (2005)
- 3) 村本正博：天敵微生物によるマツノマダラカミキリ駆除試験．日林九支研論集，41，163-164 (1988)
- 4) 細田隆治，五十嵐正俊，伊藤賢介，浦野忠久，小林正秀：キイロコキクイムシを利用した天敵微生物 (*Beauveria brongniartii* 菌) によるマツノマダラカミキリの防除試験 (I) 野外枯死木への放虫試験．日林関西支論，1，265-266 (1992)
- 5) 細田隆治，五十嵐正俊，伊藤賢介，浦野忠久，小林正秀：キイロコキクイムシを利用した天敵微生物 (*Beauveria brongniartii* 菌) によるマツノマダラカミキリの防除試験 (II) 袋丸太への放虫試験．日林関西支論，1，267-268 (1992)
- 6) 阿部剛俊：マツノマダラカミキリへのサビマダラオオホソカタムシ卵の室内放飼試験—寄主の活動と寄生率—．森林応用研究，11，53-54 (2002)
- 7) 三浦美香子，阿部剛俊，岡本安順，中島嘉彦：マツノマダラカミキリに対するクロアリガタバチとサビマダラオオホソカタムシの寄生実験．森林応用研究，9，71-73 (2000)
- 8) 上田明良，藤田和幸，浦野忠久，山田倫章：オオコクヌスト成虫放虫によるマツノマダラカミキリ捕食実験．森林応用研究，8，169-172 (1999)
- 9) 金森弘樹，井ノ上二郎，周藤靖雄：島根県におけるキツツキ類によるマツノマダラカミキリ捕食実験．日林関西支論，2，177-178 (1993)
- 10) 長岐昭彦，富樫均：天敵鳥類のアカゲラを用いたマツノマダラカミキリの駆除．東北森林科学会誌，1，59-61 (1996)
- 11) 田島正啓：マツノザイセンチュウ抵抗性育種，林木育種技術ニュース，20，1 (2004)
- 12) 戸田忠雄，佐々木峰子，岡村政則：マツノザイセンチュウ抵抗性マツ次代検定林の状況 (I) —7年次の生存率と成長—．日林九支研論集，54，51-52 (2001)
- 13) 山田明義：“3. 2菌根共生”．土壤微生物生態学．東京，朝倉書店，2003，44-61.
- 14) Sinclair, W.A.; Sylvia, D.M.; Larsen, A.O.: Disease suppression and growth promotion in Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Forest Science*, 28, 191-201. (1982)
- 15) Sylvia, D.M. ; Sinclair, W.A. : Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fuzarium oxysporum* and on Douglas-fir seedlings. *Phytopathology*, 73, 384-389. (1983)
- 16) 浅井英一郎，山中典和，玉井重信：クロマツ当年生実生苗への菌根菌接種がその後の実生苗へのマツノザイセンチュウ侵入率に与える影響．第117回日林学術講，156 (2006)
- 17) 杉本博之，田戸裕之，立脇真悟，邑田雅博，岡部宏秋：ヌメリイグチの接種が抵抗性クロマツ実生苗の水分生理に及ぼす影響．第115回日林学術講，pp151 (2004)
- 18) 玉田克志，伊藤俊一，更級彰史：有用食用菌根菌によるマツノザイセンチュウ抵抗性苗木の耐性及び抵抗性付加に関する試験．宮城県林試報，38：34~36 (2005)
- 19) 明間民央：クロマツ苗の針葉木部圧ポテンシャルに及ぼす菌根菌接種の影響．九州森林研究，58：162-163 (2005)

(2006年12月13日受理)