

(研究報告)

## 切り枝を用いたアカマツの材線虫病抵抗性評価手法の検討

亀井幹夫・軸丸祥大<sup>1)</sup>・吉岡 寿

亀井幹夫・軸丸祥大・吉岡 寿: 切り枝を用いたアカマツの材線虫病抵抗性評価手法の検討, 広島県林技セ研報 42: 16~23, 2011. マツノザイセンチュウ抵抗性 3 クローンと天然更新したアカマツ前年枝由来の切り枝にマツノザイセンチュウ (以下, 線虫) を接種し, 切り枝を通過した線虫数, 一定の培養期間後に切り枝から分離される線虫数を調べた。12月に採取した切り枝では, 抵抗性アカマツの切り枝を通過した線虫数は天然更新アカマツよりも少ない傾向が確認された。しかし, 1月から9月にかけて採取した切り枝ではそのような傾向が認められなかった。また, 切り枝から分離される線虫数は, 培養日数が1日または3日の場合に天然更新アカマツと比べて抵抗性アカマツの方が少ない傾向が確認された。しかし, 通過線虫数と同じく, 試験を行う季節による傾向の違いがみられた。これらの結果から, 時期は限定されるものの切り枝を用いることで, アカマツ成木の抵抗性を簡易に評価できることが示唆された。

[キーワード] マツ材線虫病, マツノザイセンチュウ, アカマツ, 切り枝, 抵抗性

1) 現在 広島県立総合技術研究所農業技術センター

### 1 はじめに

広島県のマツ林面積は全国一であり, 県民の日常生活に密着した身近な森林である。かつては県民の豊かな生活環境を醸成し, マツタケ生産林としても農林家を潤す大きな存在であったが, 近年は, 松くい虫被害やそれに伴う経営意欲の減退等により荒廃しており, その再生が県土保全や景観保全の面からも大きな行政課題となっている。現在でも, 本県では年間3万 m<sup>3</sup>前後の枯損被害が継続して発生しているが, その蔓延を抑える有効な対策は見出し得ていない。

本県マツ林の主要構成樹種であるアカマツはマツノザイセンチュウ (以下, 線虫) に対して感受性が高い<sup>2)</sup>が, 抵抗性を示す個体が混在しており, 激害林分で生き残った個体から抵抗性アカマツの選抜育種が進められている<sup>17)19)</sup>。マツ林を構成するマツ成木の材線虫病に対する抵抗性が事前に分かれば, その程度に応じて将来の管理方針がより効率的に決定でき, 防除の効率化につながると考えられる。現状ではマツの抵抗性を評価するために, 多数の接木苗木を用いた線虫接種試験を苗畑

で行う必要がある。苗畑における接種試験には多大な労力と時間がかかるため, それに代わる方法の開発が望まれている。

マツ材線虫病に対する抵抗性を持つマツの樹体内ではさまざまな物理的・生理化学的な要因により線虫の移動分散や増殖が妨げられると考えられている<sup>4)18)</sup>。切り枝でも抵抗性の種間差を再現できるとされており<sup>5)</sup>, 強度抵抗性のマツ樹種の切り枝で線虫の移動が制限されたとの報告がある<sup>14)</sup>。また, マツ材線虫病に対する感受性が高いクロマツの切り枝でも, 当年生枝の皮層樹脂道の断面積合計が小さい抵抗性家系では線虫の通過が少ない傾向があると報告されている<sup>6)</sup>。一方, Aikawa and Kikuchi (2007)<sup>1)</sup>は, クロマツの切り枝に毒性の異なる線虫アイソレイトを接種して5日間培養した後に切り枝から分離される線虫数を調べ, 線虫の増殖能力とその毒性には関係があることを示した。これらのことは, 切り枝内での線虫の通過や増殖を調べることで, その切り枝を採取したマツの抵抗性を評価できる可能性があることを示唆している。しかし, アカマツについて抵抗性の

レベルと切り枝内での線虫の通過や増殖とに関係があるかを調べた研究はない。

そこで本研究では、切り枝を用いた抵抗性評価手法の開発を目指し、抵抗性の異なるアカマツの切り枝に線虫を接種して、抵抗性と切り枝を通過する線虫数、一定の培養期間後に切り枝から分離される線虫数との関係を調査した。

## 2 方法

### 2.1 供試したアカマツと枝の採取

試験には広島県の抵抗性マツ採種園（庄原市川西町）に植栽されている抵抗性アカマツ3クローン（総社ア-39号（以下、総社39）、備前ア-137号（以下、備前137）および真備ア-58号（以下、真備58））と三次市志幸町で天然更新したアカマツを用いた。供試した抵抗性マツはマツノザイセンチュウ抵抗性育種事業によってマツ材線虫病に対する抵抗性を有するとして選抜された個体からのクローンであり、供試クローンの抵抗性評点は総社39が5、備前137が4、真備58が2である<sup>16)</sup>。抵抗性評点とは、各クローンから自然受粉により得られる実生苗に線虫を接種し、その後の生存率に基づいて、各クローンの抵抗性を5段階（点数が大きいほど抵抗性が高く、最高は5）で評価したものである。ここでは関西育種基本区版の評点を示した。なお、天然更新マツは抵抗性に関して無選抜のマツである。

供試する枝は、それぞれのマツから無作為に採取した後、直ちにクーラーボックスに入れて旧広島県立総合技術研究所林業技術センター（三次市十日市町：現在、同センター三次高平施設）へ持ち帰り、試験に使用するまで5℃で保存した。各処理について無作為に選んだ10本の切り枝をそ

れぞれ供試した。なお、採取した切り枝に線虫が感染していないことを確認するため、線虫接種試験とは別に切り枝を25℃、全暗、湿度100%の条件で2週間程度培養した後に、ベールマン法を用いて線虫が遊離してこないことを確認した。

### 2.2 切り枝を通過する線虫数

#### 2.2.1 供試材料の検討

切り枝の年生や供試する線虫アイソレイトが切り枝を通過する線虫数に及ぼす影響を調べた。2006年12月6日に枝を採取し、2006年12月8日に切り枝への線虫の接種を行った。各供試木の当年枝および前年枝から長さ約6cmの切り枝を作成し、両端をメスで薄くスライスした。その後直ちに、切り枝を3mlの蒸留水が入ったサンプル瓶に立て、上端部に200頭（8μl）の線虫懸濁液（島原もしくはKa-4:灰色カビ病菌で1週間程度培養、全ステージを含む）を接種した（写真1）。接種後、切り枝は25℃、全暗、湿度100%の条件で24時間静置した。24時間後にサンプル瓶から切り枝を取り出し、蒸留水中の線虫を計数した。

#### 2.2.2 枝採取時期が通過線虫数に及ぼす影響

切り枝を通過する線虫数に枝を採取する時期が及ぼす影響を2007年度、2008年度に調べた。枝の採取日は2007年5月15日、2007年8月6日、2007年12月17日、2008年2月25日、2008年9月1日、2008年12月1日、2009年1月6日、2009年2月2日とし、それぞれの採取日の翌日に切り枝に対する線虫の接種を行った。供試した枝は前年枝であり、接種線虫には強病原性のアイソレイトであるKa-4を用いた。方法は2.2.1と同様としたが、2008年9月以降の試験ではサンプル瓶の蒸留水は4ml、接種する線虫の培養期間は2週間程度とした。



写真-1 切り枝への線虫の接種(通過)

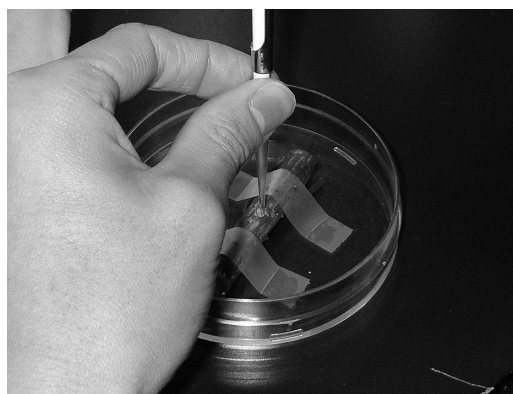


写真-2 切り枝への線虫の接種(培養)

### 2.3 培養後に切り枝から分離される線虫数

枝を採取する時期および培養する日数が切り枝から分離される線虫数に及ぼす影響を調べた。2007年12月17日、2008年2月25日、2008年6月9日、2008年9月1日、2008年12月1日に枝を採取し、それぞれの採取日の翌日に切り枝に対

する線虫の接種を行った。試験は Aikawa and Kikuchi(2007)<sup>1)</sup>を参考に次の方法で行った。各供試木の前年枝を長さ約5cmに切断後、中央部に径4mmのドリルで深さ4mm程度の穴を開けて、両端をパラフィンで封じた。その後直ちに、切り枝を径9cmのプラスチックシャーレに1本ず

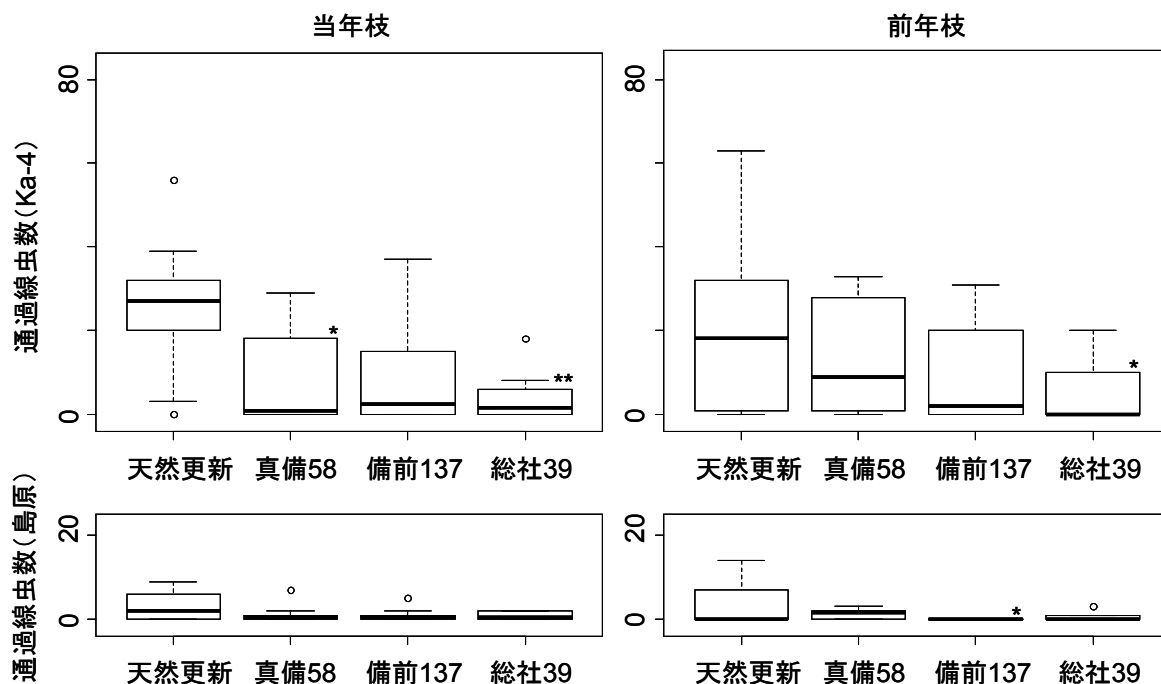


図-1 切り枝の年生と線虫アイソレイトの違いが切り枝を通過する線虫数に及ぼす影響(2006年12月)  
 図中の記号は天然更新マツと各抵抗性マツとの対比較(Steelの検定(片側検定))の結果を示す  
 (\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ )

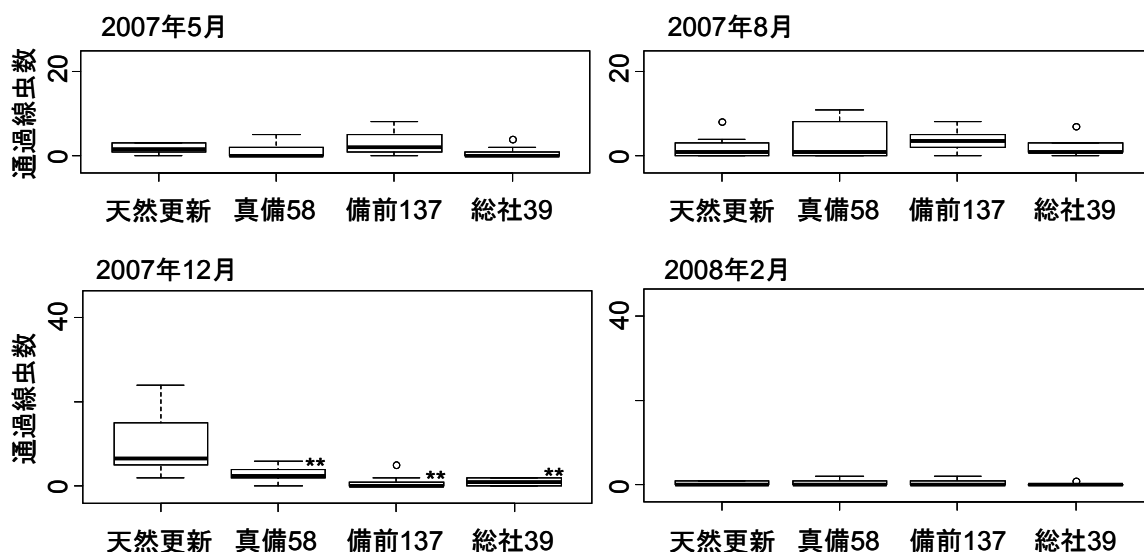


図-2 切り枝を通過する線虫数に及ぼす枝の採取時期の影響(2007年度)

図中の記号は天然更新マツと各抵抗性マツとの対比較(Steelの検定(片側検定))の結果を示す(\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ )

つ横向きに置き、中央部の穴に200頭(8 $\mu$ l)の線虫懸濁液(Ka-4:灰色カビ病菌で2週間程度培養、全ステージを含む)を接種した(写真2)。接種後、切り枝は25 $^{\circ}$ C、全暗、湿度100%の条件で培養した。所定の日数培養した後にシャーレから切り枝を取り出して、川口(2006)<sup>6)</sup>の方法(25 $^{\circ}$ C、48時間)で線虫を分離し、蒸留水中に遊離した線虫数を計数した。

切り枝内で線虫を培養する日数は2007年12月、2008年2月に採取した枝ではAikawa and Kikuchi(2007)<sup>1)</sup>にしたがって5日としたが、結果に示すとおり抵抗性と分離された線虫数に関連がみられなかった。そのため培養日数を変えて試験を行うこととし、2008年6月の試験では7日、2008年9月の試験では1日・3日・7日、2008年12月の試験では1日・3日とした。

## 2.4 データ解析

切り枝を通過する線虫数、培養後に切り枝から分離される線虫数ともに、Steelの検定(npmc; R ver. 2.12.1<sup>15)</sup>)によって、天然更新マツと各抵抗性マツクロンの対比較(片側検定)を行った。

## 3 結果

### 3.1 切り枝を通過する線虫数

#### 3.1.1 供試材料の検討

異なる線虫アイソレイトを用いた試験では、Ka-4を接種した場合、天然更新マツに比べて抵抗性マツの切り枝は通過線虫数が少ない傾向があった(図1上段)。この傾向は当年枝、前年枝の両方で確認された。一方、島原を接種した場合、切り枝を通過した線虫数は少なく、前年枝を供試したときに天然更新マツと備前137との間で有意な

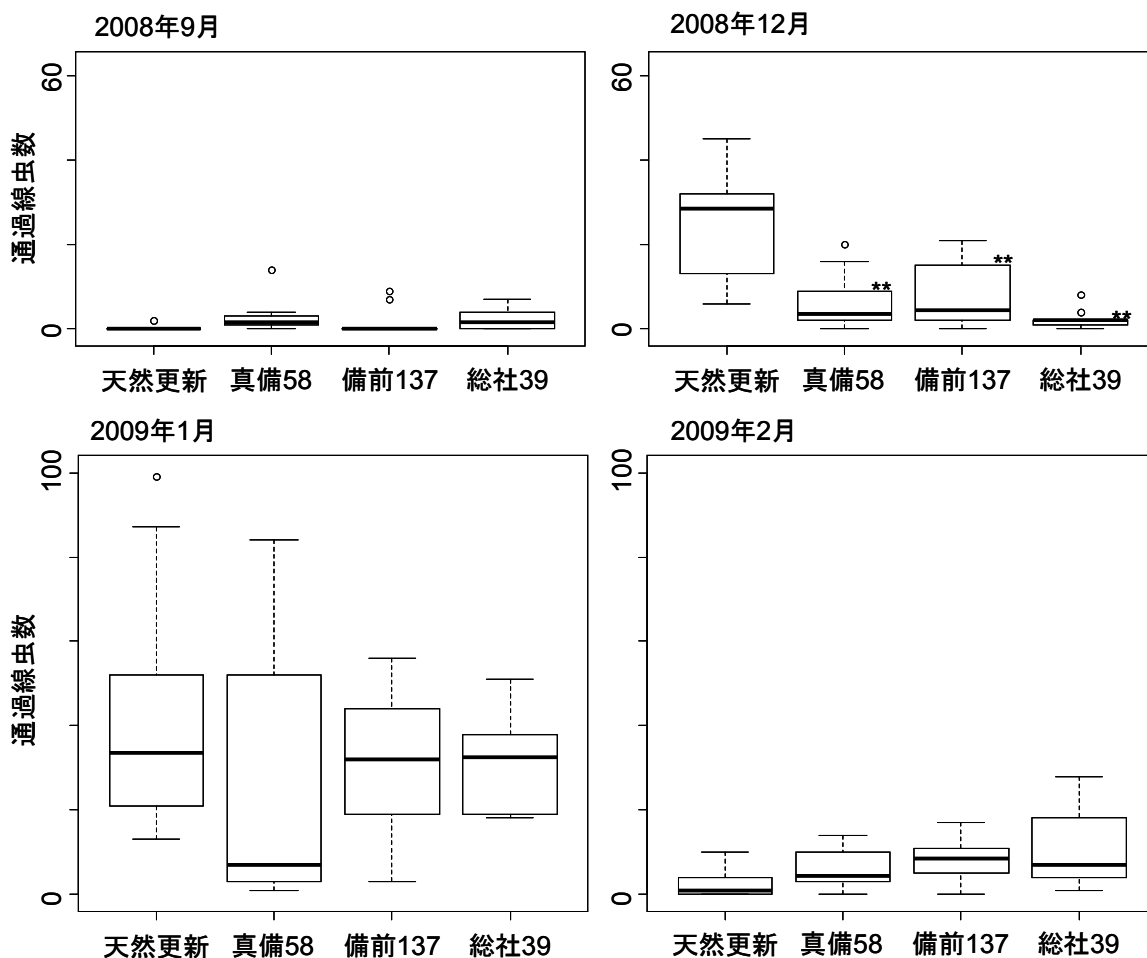


図-3 切り枝を通過する線虫数に及ぼす枝の採取時期の影響(2008年度)  
 図中の記号は天然更新マツと各抵抗性マツとの対比較(Steelの検定(片側検定))の結果を示す(\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ )

差があったのみであった (図 1 下段)。

### 3.1.2 枝採取時期が通過線虫数に及ぼす影響

2007 年度, 2008 年度の試験結果を図 2, 図 3 にそれぞれ示した。2007 年度, 2008 年度ともに, 天然更新マツに比べて抵抗性マツの切り枝で通過線虫数が有意に少ない傾向が確認されたのは 12 月に行った試験のみであった。

### 3.2 培養後に切り枝から分離される線虫数

培養日数を 5 日または 7 日とした場合には, 抵

抗性マツの切り枝内の線虫数が天然更新マツの切り枝内と比べて有意に少ない傾向は確認できなかった (図 4, 5)。

培養日数を 1 日または 3 日にした場合, 供試時期と培養日数により, 切り枝から分離された線虫数と抵抗性との関係には違いがみられた (図 6)。2008 年 9 月の試験では, 培養日数を 3 日とした場合に, すべての抵抗性マツの切り枝から分離された線虫数が天然更新マツの切り枝から分離され

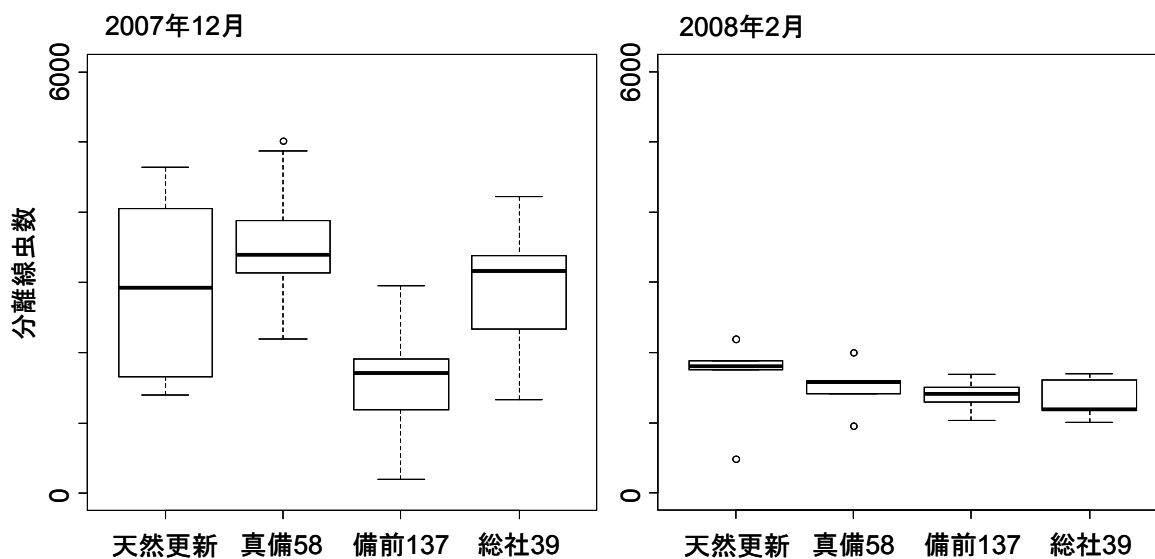


図-4 5日間培養した後に切り枝から分離される線虫数

図中の記号は天然更新マツと各抵抗性マツとの対比較 (Steelの検定 (片側検定)) の結果を示す (\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ )

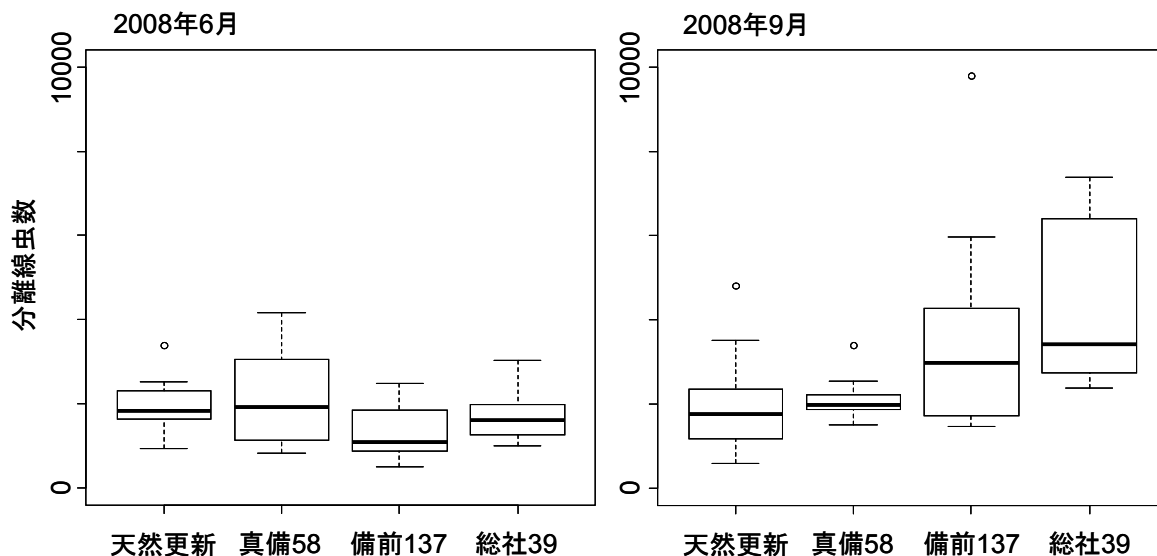


図-5 7日間培養した後に分離される線虫数

図中の記号は天然更新マツと各抵抗性マツとの対比較 (Steelの検定 (片側検定)) の結果を示す (\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ )

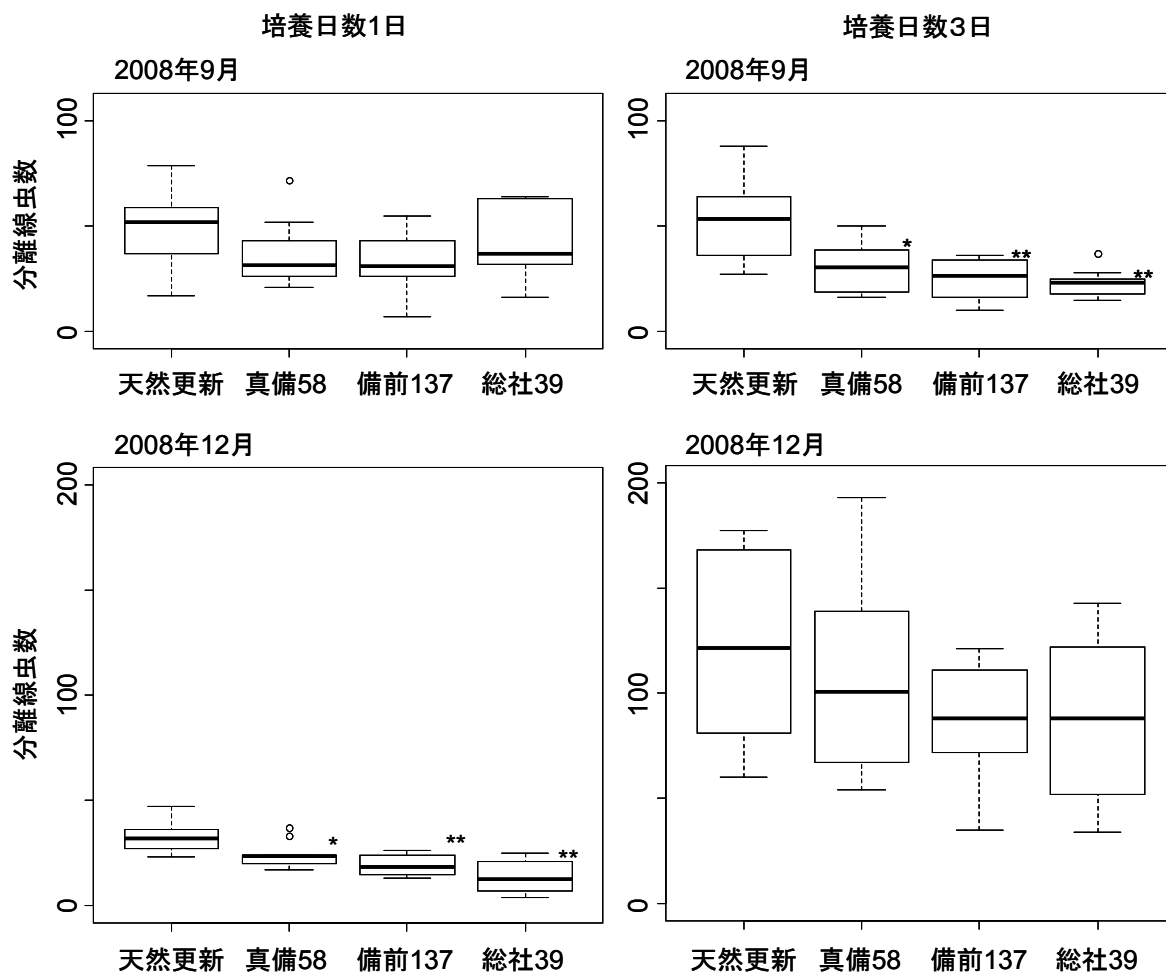


図-6 1日または3日間培養した後に切り枝から分離される線虫数

図中の記号は天然更新マツと各抵抗性マツとの対比較(Steelの検定(片側検定))の結果を示す(\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ )

線虫数と比べてそれぞれ有意に少なかったが、培養日数を1日とした場合には天然更新マツと各抵抗性マツの間には有意な違いはなかった。一方、2008年12月の試験では、培養日数を3日とした場合には天然更新マツと各抵抗性マツとで有意な違いは確認されなかったが、培養日数を1日とした場合には、抵抗性マツの切り枝から分離された線虫数が天然更新マツの切り枝から分離された線虫数と比べて有意に少ない傾向が確認できた。

#### 4 考察

抵抗性が異なるアカマツ間で切り枝を通過する線虫数は異なっており、抵抗性マツでは天然更新マツよりも少ない傾向が確認された。これまでの研究では、切り枝でも強度抵抗性の樹種<sup>14)</sup>や抵抗性クロマツ<sup>6)</sup>で線虫の移動分散が妨げられること

が示されてきたが、本研究の結果は Matsunaga and Togashi(2004)<sup>11)</sup>が示唆したように切り枝を通過した線虫数によってアカマツの抵抗性のレベルを再現できることを示唆している。また、1日または3日培養した切り枝から分離される線虫数についても、抵抗性マツでは天然更新マツよりも少ない傾向が確認された。このことは線虫接種後一定期間培養した切り枝から分離される線虫数によっても、アカマツ成木の抵抗性を評価できることを示唆している。しかしながら、切り枝を用いたアカマツ成木の抵抗性評価手法の確立には次の3つの課題がある。

第1の課題として抵抗性評価が可能な時期が限定されることが挙げられる。本研究において切り枝を通過する線虫数は12月でのみ抵抗性マツと天然更新マツとで有意な違いが確認された。

Matsunaga and Togashi(2009)<sup>12)</sup>においてもマツの切り枝を通過する線虫数が季節によって異なることは示されているが、通過線虫数が多い時期は8月と12月から2月であり、本研究の結果とは若干の差異がある。また、一定の培養期間後に切り枝から分離される線虫数と抵抗性の関係にも試験時期により傾向が変化する可能性があることが本研究で確認された。切り枝を通過する線虫数や一定の培養期間後に切り枝から分離される線虫数に季節による違いが認められる原因は明確でないが、気温や光環境、土壤水分など物理環境の季節変動とそれに伴うマツ樹体内での物理的・生理化学的な性質の変化の影響を受けたもの<sup>11)</sup>と考えられる。なお、同一個体でもすべての枝の性質が均一でない場合があることを示唆している報告<sup>3)</sup>もあるが、切り枝内の線虫の移動には切り枝の方位や高さによる差はないこと<sup>11)</sup>から、供試時期による枝の採取位置の違いが与える影響は小さいと考えられる。いずれにしても、切り枝を用いた抵抗性評価手法の確立には評価可能な時期の確定とそれをもたらずメカニズムの解明が望まれる。

第2の課題として、供試した抵抗性マツのクローン数が少ないことが挙げられる。本研究では、アカマツの抵抗性3クローンと選抜を受けていない天然更新アカマツを用いた。抵抗性クロマツでは1年生苗から線虫の活動を抑制する家系や、齢があがると線虫の活動を強く抑制する家系があることが明らかにされている<sup>8)</sup>。抵抗性マツ樹種の抵抗性機構は全て共通とはいえないこと<sup>18)</sup>から、アカマツの他の抵抗性クローンについても調査を行い、切り枝内での線虫の通過や増殖と材線虫病抵抗性との関係について、その普遍性を検討することが求められる。加えて、本研究では天然更新したアカマツを感受性マツであると仮定して供試したが、その感受性について客観的な評価はなされていない。将来的には、感受性であることが確認されたアカマツを維持し、それらから供試材料を得る事が必要である。

第3の課題として、一定の培養期間後に切り枝から分離される線虫数を指標としてアカマツ成木の抵抗性を推定する場合、切り枝内の線虫の通過に着目した試験に比べて調査事例が少ないことや最適な試験条件が確定していないことが挙げられる。本研究の結果から、線虫を接種した切り枝を培養する日数が1日もしくは3日の場合、抵抗性

アカマツから分離される線虫数は天然更新したアカマツと比べて有意に少なくなることがあったが9月と12月で傾向が一定しなかった(図6)。調査事例を積み重ねることで、この方法を用いたマツ成木の抵抗性評価の妥当性や調査適期が明らかになるものと考えられる。なお、培養する日数が1日もしくは3日の場合、これらの切り枝から分離される線虫数は接種頭数に比べて少なかった。真宮(1975)<sup>10)</sup>などに示されているように、マツ苗木に接種された線虫の密度は、接種後しばらく低下し、その後増加に転じて、針葉の萎凋・変色が認められる頃にピークを迎える。培養日数が1日もしくは3日の切り枝から分離される線虫数が接種頭数より少ないことは苗木などで認められる現象と同じ機構が切り枝でも発現している可能性を示唆している。一方、線虫を接種した切り枝の培養日数が5日以上になると、多数の線虫が分離され抵抗性マツと天然更新したマツの間に一定の傾向が認められなくなった(図4, 5)。このことは能勢ら(2007)<sup>13)</sup>による抵抗性クロマツと非抵抗性クロマツの切り枝を用いた結果と同様である。この現象は、丸太や切り枝では成木に比べて新たな養分、エネルギーの供給がないため、時間とともに抵抗反応が打ち破られる<sup>18)</sup>との解釈で説明される。

アカマツやクロマツの切り枝を材料として、マツ材線虫病の抵抗性メカニズムの解明を目指した研究は主として1980年代に始まったが、最近再び注目を集めている<sup>3)7)9)</sup>。本研究で扱った切り枝を通過する線虫数や接種後一定期間培養した後に切り枝から分離される線虫数のほかにも、クロマツの節数の多寡が抵抗性に影響する可能性が示唆されている<sup>7)</sup>。これらのアプローチについて、それぞれの妥当性を検証し、必要に応じて複数の指標を組み合わせることで、切り枝を用いたマツ成木の抵抗性推定手法が完成する可能性があり、今後の展開が期待される。

近年、本県におけるマツ材線虫病防除費用は減少傾向にあり、将来的にも大幅な増加は期待しづらい。一方で、本県におけるマツ材線虫病の被害は依然として高いレベルで推移している。本研究で取り組んだ切り枝を用いたマツ成木の抵抗性評価手法を確立し、それを用いて林分の抵抗性を評価することで、各林分について防除の要否や優先順位の新たな判断基準を付与することが可能にな

る。限りある防除費用をより効率的に活用するためにはこの判断基準が果たす役割は多大であると考えられる。

## 謝辞

本研究の課題設定や研究のスムーズな遂行にご尽力いただいた故 時光博史前次長、池田作太郎元森林環境部長、岡部茂次長をはじめ、枝の採取など試験にご協力いただいた方々に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Aikawa, T. and Kikuchi, T. (2007) Estimation of virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) based on its reproductive ability. *Nematology* 9:371-377.
- 2) 二井一禎・古野東洲 (1979) マツノザイセンチュウに対するマツ属の抵抗性. 京都大学農学部演習林報告 51:23-36.
- 3) 袴田哲司・加藤公彦・山本茂弘 (2010) マツ材線虫病抵抗性クロマツの母樹と実生家系苗の組織変性. 日本森林学会誌 92:16-21.
- 4) 原 直樹・竹内祐子 (2006) マツ材線虫病発病機構解明への組織学的アプローチ. 日本森林学会誌 88:364-369.
- 5) 寶月岱造・石田京子・鈴木和夫・勝木俊雄 (1994) 数種のマツの切り枝および樹皮片におけるマツノザイセンチュウに対する組織抵抗性. 日本林学会誌 76:471-472.
- 6) 川口エリ子 (2006) クロマツ切り枝における皮層樹脂道の形質とマツノザイセンチュウの移動との関係. 日本森林学会誌 88:240-244.
- 7) 川口エリ子・市原 優 (2010) クロマツの節におけるマツノザイセンチュウの移動抑制. 日本森林学会誌 92:1-7.
- 8) 黒田慶子・大平峰子・岡村政則・藤澤義武 (2007) マツ材線虫病抵抗性クロマツ家系の苗木における線虫分布と増殖. 日本森林学会誌 89:241-248.
- 9) 黒田慶子・川口エリ子・宮原文彦 (2008) 材線虫病抵抗性クロマツ組織の線虫移動阻害に関わる形質. 第119回日本森林学会大会学術講演要旨集 A21.
- 10) 真宮靖治 (1975) マツ樹体内におけるマツノザイセンチュウ個体群の消長. 森林防疫 24:192-196.
- 11) Matsunaga, K. and Togashi, K. (2004) Among-tree difference in the inhibition of systematic dispersal of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Pinus densiflora*. *Applied Entomology and Zoology* 39:271-277.
- 12) Matsunaga, K. and 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.
- 13) 能勢美峰・白石 進・宮原文彦・大平峰子 (2007) Real-time PCR法による抵抗性クロマツ16クローンのマツノザイセンチュウ増殖特性評価. 第118回日本森林学会大会学術講演要旨集 O12.
- 14) Oku, H., Shiraiishi, T. and Chikamatsu, K. (1989) Active defense as a mechanism of resistance in pine against pine wilt disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55:603-608.
- 15) R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- 16) 玉城 聡 (2008) マツノザイセンチュウ抵抗性家系のランキングと採種園の改良. 独立行政法人森林総合研究所林木育種センター関西育種場だより 57:3-5.
- 17) 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.
- 18) 山田利博 (2006) マツノザイセンチュウに感染したマツ類にみられる生化学的反応. 日本森林学会誌 88:370-382.
- 19) 吉岡 寿 (2006) マツノザイセンチュウ抵抗性マツ実生後代の抵抗性能. 広島県立林業技術センター研究報告 38:45-61.