

# マツ材線虫病抵抗性クロマツ苗の効率的な生産技術に関する研究

名古屋大学大学院生命農学研究科

生物圏資源学専攻

生物システム保全学講座

森林保護学研究分野

袴田 哲司

2017 年 2 月

# マツ材線虫病抵抗性クロマツ苗の効率的な生産技術に関する研究

## 目 次

第Ⅰ章 緒論 .....	1
1. 研究の背景	
2. 既往の研究	
3. 研究の目的	
第Ⅱ章 クロマツの組織抵抗性と母樹，実生家系苗の抵抗性 .....	8
1. はじめに	
2. 材料および方法	
(1) マツノザイセンチュウを接種した枝片の組織変性	
(2) 枝片の組織変性とポット苗の枯死	
(3) 採種園の抵抗性母樹と実生家系苗の組織変性	
(4) 枝片の組織変性と実生家系苗の抵抗性	
3. 結果	
(1) マツノザイセンチュウを接種した枝片の組織変性の推移	
(2) 枝片の組織変性とポット苗の抵抗性との関係	
(3) 抵抗性母樹と実生家系苗の組織変性	
(4) 枝片の組織変性と実生家系苗の抵抗性強度，生存率との関係	
4. 考察	
第Ⅲ章 クロマツの組織抵抗性評価指標としての微弱発光 .....	24
1. はじめに	
2. 材料および方法	

- (1) 枝片サンプルへのマツノザイセンチュウの接種方法と微弱発光の測定
- (2) マツノザイセンチュウの接種頭数と微弱発光
- (3) 接種源の違いと微弱発光
- (4) 樹種の違いと微弱発光

### 3. 結果

- (1) マツノザイセンチュウの接種頭数と微弱発光の発生パターン
- (2) 接種源の違いと微弱発光の発生パターン
- (3) 樹種の違いと微弱発光の発生パターン

### 4. 考察

## 第IV章 クロマツ実生苗の形態的特性と抵抗性との関係 ..... 33

### 1. はじめに

### 2. 材料および方法

- (1) 供試家系と苗のサイズ, 輪生枝数の測定
- (2) マツノザイセンチュウの接種と生存・枯死の調査
- (3) データ解析

### 3. 結果

- (1) 抵抗性クロマツの家系別健全率
- (2) 接種検定苗の苗高と健全率
- (3) 接種検定苗の根元径と健全率
- (4) 接種検定苗の輪生枝数と健全率
- (5) 抵抗性に関与する要因

### 4. 考察

## 第V章 クロマツの挿し木発根性に関係する要因 ..... 47

### 1. はじめに

## 2. 材料および方法

- (1) 抵抗性クロマツの材料
- (2) 挿し穂の準備と挿し付け，挿し床の環境
- (3) 針葉の長さ，発根の有無，発根量の測定
- (4) データ解析

## 3. 結果

- (1) 発根の有無に影響する要因
- (2) 発根量に影響する要因

## 4. 考察

第VI章 総合考察 .....	58
謝辞 .....	65
摘要 .....	66
引用文献 .....	72

## 第 I 章 緒論

### 1. 研究の背景

マツ材線虫病は、マツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* Hope) によって伝播されるマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle) がマツ属樹種の樹体内へ侵入することにより生じる (清原・徳重 1971)。本病は病原体であるマツノザイセンチュウが樹体内を移動、増殖する過程で、マツ側の組織や生理状態の異常が生じ、水分通導阻害による水ストレスが引き起こされ (Ikeda and Suzaki 1984 ; Kuroda et al. 1988 ; Ikeda and Kiyohara 1995), やがて萎凋のため枯死に至る日本で最も重大な樹木病害である (Fukuda et al. 1992 ; Kuroda 1991 ; 真宮 1990)。日本では 1905 年に長崎県で発見されて以来 (矢野 1913), 感受性の高いクロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) やアカマツ (*P. densiflora* Sieb. et Zucc.) を中心に全国的な広がりを見せ, 1979 年には全国の被害材積が 240 万 m<sup>3</sup> を越え, その後減少したとはいえ, ここ数年も 70~90 万 m<sup>3</sup> の被害が続いている。現在では北海道を除く全都府県で被害が報告されており (二井・佐橋 2006), 東アジアの国々でも本病の被害が発生しているほか (La et al. 1998), ポルトガルでもマツノザイセンチュウの侵入は確認されており (Mota et al. 1999), ヨーロッパでの主要マツ属樹種であるオウシュウアカマツ (*P. sylvestris* L.) やフランスカイガンショウ (*P. pinaster* Ait.) などが感受性樹種であるため (二井・古野 1979), その被害拡大が懸念されている。

古くからマツ枯れの被害に対しては, 被害立木の伐倒, 被害丸太の薬剤処理, 殺虫材の散布などが行われてきたが, 病気の原因がマツノザイセンチュウであること (清原・徳重 1971), その媒介者がマツノマダラカミキリであることが明らかにされて以来 (Mamiya and Enda 1972 ; 森本・岩崎 1972), 行政的に様々な対応がとられ, 松くい虫特別措置法が 1977 年に制定された。その後, 1982 年に松くい虫被害対策特別措置法となり, さらに 1987 年と 1992 年に同法が改正された。これらにより, 化学的方法による伐倒駆除や緊急伐倒駆除, 物理的方法による特別伐倒駆除や補完伐倒駆除, 薬剤の空中散布や地上散布による特別防除などが行われてきたが (田畑 1997), 現在では, 伐倒駆除や薬剤の予防散布, 樹幹注入が広く実行されている (吉田 2006)。このような状況の中で, 育種的な対策も検討され, 被害の大きい西日本で 1978~1984 年に「マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」が展開された。この事業により, アカマツで 92 クローン, クロマツで 16 クローンが抵抗性品種として選抜され, それ

らのクローンで構成された採種園が各地で造成された（藤本ら 1989；戸田 1997；戸田・寺田 2001；戸田 2004）。しかし、事業で選抜された抵抗性マツとはいえ、その抵抗性の発現機構は未だ全容が明らかでなく、これらの採種園で生産された自然交配種子から育成した実生家系苗も抵抗性が保証されているものではない。そのため、マツノザイセンチュウを接種しても発病しない実生苗を抵抗性苗として扱い（鳥羽瀬ら 1993）、その苗は主に海岸保安林の修復や公共事業等の造林に用いられている（戸田・寺田 2001）。静岡県でも 1990 年から西日本の抵抗性クロマツクローンを導入し、浜松市浜北区に採種園を造成して 1999 年から抵抗性クロマツの生産と普及を本格的に開始した。1999 年には富士市今宮にも採種園を造成し、得られた種子を使って静岡県山林種苗協同組合連合会が育苗と接種検定を行い、健全であった抵抗性苗を出荷する生産方法で、現在では年間約 60,000～90,000 本の抵抗性苗を「静岡エースくろまつ」として生産・販売し、全国有数の生産県となっている。また、被害地域の北上に伴い、「東北地方等マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」（1992～2001 年度）も進められ、抵抗性品種が追加されている（東原ら 2007）。2016 年時点で、全国においてアカマツで 220 品種、クロマツで 144 品種が登録された。接種検定後に健全であった個体の次代検定林では、7 年次の生存率が大半の家系で 90%前後であることも報告されており（戸田ら 2002）、抵抗性マツの植栽は環境に配慮した有効な材線虫病対策となっている。2011 年の東日本大震災以降、今まで以上に海岸防災林の機能を高めることが求められる中で、クロマツは主役となるべき樹種であるが、現在でも材線虫病の被害は続いていることから、抵抗性苗の需要は増大しており、新たな抵抗性品種の開発や苗木の生産性向上が期待されている。

## 2. 既往の研究

1905 年に長崎県で記録された枯損被害が、我が国におけるマツ材線虫病の最初の記録とされている（矢野 1913）。その後、西日本から東北地方まで被害が拡大していく中で、マツノザイセンチュウがマツの枯損に関連することが示され（清原・徳重 1969）、9 種のマツ属樹種への接種試験によりマツ材線虫病の病原体はマツノザイセンチュウであることが明らかになった（清原・徳重 1971）。翌年には、日本におけるマツノザイセンチュウを伝播する最も重要な媒介者は、マツノマダラカミキリであることが判明した（Mamiya and Enda 1972；森本・岩崎 1972）。

マツノザイセンチュウは、マツノマダラカミキリが後食した当年～1 年生枝の傷からカミキリの体を離れてマツの樹体内に侵入し、若い苗木では主に皮層と木部の樹脂道を移動経路として分散する（真宮 1990 ; Ichihara et al. 2000）。成木では樹幹部の皮層樹脂道が分断されているため、木部の樹脂道が主な移動経路となる。マツノザイセンチュウの摂食により、樹脂を分泌するエピセリウム細胞や、柔細胞の壊死などの組織破壊が認められるようになり（Ishida et al. 1993）、やがて樹脂滲出が停止する。発病の初期からマツの組織は反応し、仮導管にキャビテーション（空洞化）が生じ、これにより数週間のうちに水分通導が阻害され、やがて水分の供給不足が原因となって針葉の退色などを伴って枯死する（Kuroda 1991）。キャビテーションの原因としては、仮導管や壁孔を閉塞する物質や（Kuroda 1989 ; Sasaki et al. 1984）、揮発性のテルペン類が考えられている（Kuroda 1989）。

また、マツノザイセンチュウに対するマツの生体反応として、マツ細胞の損傷程度を反映していると考えられるエチレン生成の増大（森・井上 1986 ; Fukuda et al. 1994）、放射柔細胞中のタンニン系物質を含む液胞の出現や（Nobuchi et al. 1984）、活性酸素を除去する物質と推察されるタンニンの集積（二井 1984b ; Futai 2003）、細胞膜系の損傷を示す脂質過酸化とそれに付随するパーオキシダーゼ活性の増大（Yamada 1987）、電解質の漏出（鄭ら 1993 ; 小松・鈴木 2006）、呼吸の増大（森・井上 1983 ; 橋本 1979）などが生じる。

本病は萎凋病であり、水ストレスが病気に対する感受性を高めるため（Kozlowski et al. 1991）、夏の乾燥は病気の進行を早め、高い枯死率を引き起こす（大山ら 1976 ; Mamiya 1983 ; 鈴木 1984）。人工接種により、マツノザイセンチュウ侵入後の病徴発現に影響する温度、降水量（土壌水分）などの環境条件が調べられ、25～30℃でセンチュウの増殖と苗木の枯死が顕著になり（清原 1973）、平均気温が高く降水量が少ない年の接種検定は健全率が低下すると報告されている（鳥羽瀬ら 1993）。また、接種検定の生存率と接種前後の累積降水量には相関があることなども報告されているが（戸田 1997）、その一方で、接種後 8 週間および接種前後 21 日間の降水量と生存率には相関がないとの結果もあり（倉本ら 2010）、降水量については明確な結論に至っていない。

樹体の抵抗性のメカニズムとして、マツ材線虫病に対して抵抗性のある樹種や個体では、さまざまな物理的・生化学的な要因が作用してマツノザイセンチュウの移動や分散が阻害され、病徴が全身に及ぶことを抑制していると考えられている（原・竹内 2006）。また、マツ

ノザイセンチュウの病原力が発揮されるには、宿主樹体内で増殖することが必須であるため（秋庭, 2006）、移動・分散に加えて、増殖を抑える機構が抵抗性に関わる重要な要因となる（Mori et al. 2008）。抵抗性のテーダマツでは樹体内でのマツノザイセンチュウの移動が不活発で増殖が少なく、仮導管の排水減少は局所的には起こるが、樹液流動は維持されるので枯死しにくい（Kuroda et al. 1991）。また、苗木主軸枝片におけるマツノザイセンチュウの通過数が感受性のクロマツよりもリギ・テーダマツ（強抵抗性のリギダマツと抵抗性のテーダマツとの雑種）で少ないことが明らかにされ、これは動的な抵抗性によるものだと考えられている（Oku et al. 1989）。さらに、抵抗性のマツでは樹皮に素早い変色が認められ、侵入に対する抵抗性反応が速いことや、木部の感受性の低さが指摘されている（山田 1997; 原・竹内 2006）。抵抗性樹種のストローブマツやテーダマツでは、マツノザイセンチュウを接種すると、侵入部位の周辺で形成層の破壊と壊死、皮層樹脂道の閉塞が起こるが、師部や皮層の壊死部周囲に素早く傷害周皮が形成されるため、木部ではほとんど反応が起きない（Yamada and Ito 1993a）。このように、非親和性の組合せで接種を行った場合は、マツノザイセンチュウの移動や加害が接種点付近に限定されることが共通の特徴である（原・竹内, 2006）。しかし、一方で、マツ属のなかで抵抗性機構は樹種によって異なることが示唆されている（山田 1997; 山田 2006）。マツノザイセンチュウの増減に影響する生化学的な抵抗性要因として、ストローブマツでは、センチュウ接種の1週間後にセンチュウを不動化する化学物質が認められたが、テーダマツやクロマツでは不動化活性は認められていない（Yamada and Ito 1993b）。これとは逆に、マツノザイセンチュウに対する増殖促進効果がある $\beta$ -ミルセンの存在が明らかになっているが、 $\beta$ -ミルセン含量が多い樹種や個体ほど抵抗性が弱いという報告と（Ishikawa et al. 1987）、 $\beta$ -ミルセン含量は抵抗性に関係しないという報告があり（Kuroda 1991）、 $\beta$ -ミルセンに関しては結論に至っていない。

マツ属樹種の中でもクロマツやアカマツは高度感受性樹種であるが（清原・徳重 1971; 二井・古野 1979）、抵抗性には個体変異が認められ、マツノザイセンチュウが感染しても生存する個体が存在する（大庭ら 1977）。マツノザイセンチュウを接種しても生存するクロマツやアカマツの個体では、他の抵抗性樹種と同様に発現する病徴が限定され、木部中央部にのみ通水障害や柔細胞の部分的な変性が発生する（池田ら 1994）。マツノザイセンチュウが分泌するセルラーゼは、マツ材線虫病の病徴を発現させる有力物質と考えられているが（Odani



et al. 1985), クロマツやアカマツの抵抗性個体は, 内樹皮の pH が 4.1 以下と低く, セルラーゼ (至適 pH は 6.5) の活性を阻害すると推察されている (大山・福島 1982; 大山ら 1986)。また, 光の条件が悪い場合や庇陰下では病徴進展が促進されること (金子・陳野 1986; 川口・玉泉 2006), あるいは夏季の水ストレスと水分通道阻害の拡大によって光合成が低下すると病気が進展期に移行することから, 抵抗性機構は光合成に依存する可能性が示唆されている (Fukuda, 1997; 福田, 1999)。このような抵抗性個体の抵抗性戦略に加え, 樹体や組織の構造的な特性も抵抗性に関与する。非選抜のクロマツでは, 分枝数が多くなることによりマツノザイセンチュウの移動経路である樹脂道が複雑な構造になることから, マツノザイセンチュウの移動が阻害されることが明らかにされている (川口・市原 2010)。同様に, 抵抗性アカマツ 2 家系の 4 年生苗では, 非選抜苗よりも分枝数が多く, マツノザイセンチュウの樹体内での分散が抑えられることが示唆されている (Kuroda 2004)。また, クロマツでは切り枝でのマツノザイセンチュウの通過性がクローンや家系で異なることが解明され, 皮層樹脂道の断面積合計や平均断面積が, 非選抜のマツよりも抵抗性クロマツの実生家系苗 (波方-73 号) で小さく, マツノザイセンチュウの移動が抑制される (川口 2006)。

弱病原性のマツノザイセンチュウの前接種により, 抵抗性樹種のみならずアカマツ, クロマツ, リュウキュウマツでも全身誘導抵抗性の発現が認められ (清原 1985; 酒井ら 2007), 抵抗性機構の解明や本病の防除にも大きく貢献することが期待されている (小坂 2003)。弱病原性マツノザイセンチュウだけが抵抗性を誘導するわけではないので (清原 1989; 清原 1990), 抵抗性誘導物質の探索も重要である。

抵抗性マツ育種事業では, マツ材線虫病の激害地で生存したクロマツやアカマツから抵抗性の候補木が選抜され, 接ぎ木増殖した個体での接種検定の結果により, 抵抗性クローンが開発された。これらのクローンで構成された抵抗性マツ採種園を造成し, ここから得られた種子からの実生家系苗にマツノザイセンチュウの接種を行って, 抵抗性マツ種苗の生産が行われている。マツノザイセンチュウ接種後の病徴発現に家系間差があることも明らかにされており, 残存率や健全率に基づいて, 実生家系苗の相対的な抵抗性強度が暫定的に示されている (九州地区林業試験研究機関連絡協議会 1999)。静岡県においても 5 年間の接種検定の結果, 抵抗性強度に家系間差があることが明らかにされた (山本ら 2003)。なお, マツノザイセンチュウの病原力には種内変異があることから (Kiyohara and Bolla 1990), この事業

ではマツノザイセンチュウの病原性や増殖力の調査を行い、強病原力の島原個体群が選抜・利用された。実生後代の特性は、抵抗性に加えて、樹高、着花、種子生産、雑種性も調べられている（戸田 1997）。

接種検定時の労力が苗木の価格に反映されるため、抵抗性マツは1本当たり500円程度になる場合もある（山本ら 2003）。そのため、省力化によりコストを抑えた抵抗性マツ種苗の生産を目指して、抵抗性の強い品種を挿し木によって増殖する技術が検討された（石松 1999）。挿し木増殖における問題点として、抵抗性の母樹から作出した挿し木苗でも、マツノザイセンチュウの接種で枯死する個体が発生することが指摘されているが、これについては抵抗性機構の解明を待たなくてはならない。接種検定を行って抵抗性を確認した個体を母樹として挿し木を行うと、38～56%の発根率が得られること（森ら 2006b）、発根の難易は遺伝的に決定されていること、電熱温床で挿し床を加温すると発根率が有意に上昇することなどが明らかにされている（森ら 2004；森ら 2006a）。ビニールハウス内の密閉挿し、梅雨時期床替えにより、抵抗性挿し木苗1万本を生産する場合には、実生家系苗への接種検定による抵抗性苗の生産に比べて、経費を10%削減できると試算されている（大平ら 2009）。

### 3. 研究の目的

依然としてマツ材線虫病の被害が続いているため、薬剤使用の必要がなく環境負荷が少ないと考えられる抵抗性マツに対する期待は大きい。抵抗性マツの種苗生産事業では、クロマツやアカマツの抵抗性クローンで構成された採種園由来の2年生（満1年生）苗にマツノザイセンチュウを接種し、健全であった個体を出荷している。しかし、マツノザイセンチュウの培養に手間がかかり、接種検定は盛夏の重労働であるうえ、平均で半数程度の苗が枯死するため（戸田 1999）、一般の種苗生産よりも多くの労務がかかる（鳥羽瀬ら 1993）。その結果、苗木が高価格になるため、接種検定後の健全率を高めることで苗木の価格を下げる必要がある。その一つの方法として、抵抗性の低い家系苗を産するクローンを除去し、強い抵抗性を持つクローンを採種園に導入することが提案されている（戸田 1999）。これを実施すれば接種検定での健全率が上昇し、抵抗性苗の生産性が高まることになるが、新たに導入したクローンが安定的に結実するまでには7～8年を要する。したがって、速効性を期待するならば、枝数等の実生苗の形態的特徴の中から、抵抗性に関与する要因を明らかにし、その形態

的特徴を持つ苗を中心に接種検定を行って、接種検定での健全率を高めることが重要となる。また、抵抗性確認のためのコストのかかる接種検定を省き、より低価格の苗を供給する方法の模索も必要である。

そこで、本研究では、海岸防災林や防潮堤で需用が高まっているクロマツを対象として、マツ材線虫病に対する抵抗性を有する苗木の安価で効率的な生産技術を開発することを目的とする。まず、接種検定を省略して苗のコストダウンを図る技術として、①苗の一部の組織を用いた抵抗性評価方法の開発を試みる。次に、接種検定における苗の健全率を高めるため、②苗の形態的特徴と抵抗性との関係を解明し、形態的特徴に基づいて、接種検定にかけべき苗の選抜方法を確立する。さらに、接種検定を省略しコストダウンを図る方法には、抵抗性個体の挿し木増殖法(接種検定が不要)もあるが、この方法には発根性に課題があるため、③挿し木増殖における発根の改善技術の開発を行う。以上の三つの技術を組み合わせることにより、マツ材線虫病抵抗性苗の新しい生産システムの開発を目指すこととする。

具体的には、①苗の一部の組織を用いた抵抗性評価方法の開発では、マツの枝片を用いた簡便な方法で組織の抵抗性を評価し、さらに、組織と苗全体の抵抗性との関係を調べることで、組織の抵抗性評価に基づき抵抗性苗を選抜する可能性について明らかにする。本研究では、組織の抵抗性評価法として、褐変程度と微弱発光を取り上げる。特に、植物と病原体の相互作用によって発生する微弱発光は、植物の防御応答に関連することが報告されているが(Makino et al 1996; 牧野 1998)、マツ類に関してはその応用例は皆無となっている。また、②苗の形態的特徴と抵抗性との関係の解明では、現在行われている抵抗性苗生産事業における苗の生産効率を高めるため、マツノザイセンチュウ接種後の実生苗の健全率に影響する苗の形態的特徴を明らかにする。接種検定後の健全率には、家系や環境条件が影響することが明らかにされているが、苗のサイズや輪生枝数といった形態的特徴については明確にされていないため、それらの形態的特徴と苗の抵抗性との関係を家系や環境条件も含めて解析する。さらに、③挿し木増殖における発根の改善技術の開発では、挿し木の発根性に影響する要因を明らかにし、生産性の改善を目指すこととする。

## 第Ⅱ章 クロマツの組織抵抗性と母樹、実生家系苗の抵抗性

### 1. はじめに

マツ属は樹種によってマツノザイセンチュウ侵入後の組織学的な変化が異なる。テーダマツ、ストロブマツなどの抵抗性樹種では木部柔細胞の壊死が少ないが (Yamada and Ito 1993a), 感受性樹種であるクロマツやアカマツでは、マツノザイセンチュウの侵入の初期段階で、侵入部付近のエピセリウム細胞の崩壊や柔細胞の壊死が認められ (Mamiya 1985; Ishida et al. 1993; Yamada and Ito 1993a), 7日後になると接種点から数 cm 離れた皮層樹脂道や皮層組織も褐変する (Ichihara et al. 2000)。このようなマツノザイセンチュウの直接加害により発生すると考えられる病態反応の質的・量的な差が、樹体全身の発病に影響することが示唆されている (Mamiya 1985; 真宮 1990; Yamada and Ito 1993a; Fukuda 1997)。また、感染後の組織変化が侵入部位に限られるか、樹体全体に広がるかが枯死を決定する要因であると推察されている (原・竹内 2006)。さらに、木部における水分通導阻害は、発病の前期にマツノザイセンチュウの移動によって生じるものであり、木部柔細胞の変性によるものであることが示唆されている (Fukuda et al. 1992; 福田 1999)。このように、組織の変化がその後の病徴進展に大きく関わることから、マツノザイセンチュウ侵入後の組織の変化を的確に把握することは、マツ材線虫病の発病メカニズムの解明において重要であるばかりでなく、抵抗性品種の開発や評価の指標にもなる (楠本ら 2010)。

マツ属樹種間における組織学的な変化と樹体全身の抵抗性との関係では、切り枝や樹皮片で材線虫病に対する抵抗性の樹種間差を再現でき (寶月ら 1994), 感受性樹種では接種点近くの木部柔細胞が壊死するが、抵抗性樹種では木部柔細胞の壊死が少ないことが報告されている (Yamada and Ito 1993a)。一方、感受性樹種であるクロマツやアカマツにおいても抵抗性個体は見出されており、現在、選抜された抵抗性クローンで構成される採種園由来の苗に接種検定して生存した個体を、抵抗性マツとして出荷している (戸田・加藤 1999)。しかし、このような手法で生産される抵抗性マツの抵抗性機構は未解明であり、それらにマツノザイセンチュウを接種した場合の組織レベルの抵抗性と個体レベルの抵抗性との関係については明らかにされていない。マツ属樹種間で認められる組織と個体の抵抗性の関係と同様に、感受性樹種においても組織の病態反応の差が全身的な抵抗性に影響するのであれば、マツノザイセンチュウの直接加害による組織変性の速さも全身の発病に関係する要素の一つであると

考えられ、組織の抵抗性を評価することで苗への接種検定を省略できる可能性がある。

これまでにさまざまな手法で、組織や細胞の変性や壊死について評価が行われており、間接的な手法には、脂質の過酸化程度(Yamada 1987)や電解質の漏出量などの調査がある(鄭ら 1993 ; 小松・鈴木 2006)。一方、直接的な方法として、顕微鏡による組織破壊の観察(真宮 1980 ; Yamada 1987 ; Fukuda et al. 1992 ; Ishida et al. 1993 ; Yamada and Ito 1993a), DAPI 染色による樹皮片組織細胞の生死判定(Ishida et al. 1992 ; 寶月ら 1994)などが行われるが、組織の褐変・変色程度(Ishida and Hogetsu 1997 ; Ichihara et al. 2000)を肉眼的に観察する方法でも、組織変性の調査は行われている。そこで本章では、マツノザイセンチュウが引き起こすクロマツの組織レベルのダメージを褐変で評価し、組織変性の経時的な変化や、クローンまたは実生家系間での組織変性の速さの違いを明らかにするとともに、クロマツ苗木全身の抵抗性程度との関係について検討した。

## 2. 材料および方法

### (1) マツノザイセンチュウを接種した枝片の組織変性

静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター(静岡県浜松市浜北区)で行っている抵抗性クロマツ実生家系苗へのマツノザイセンチュウ接種検定の結果から、抵抗性母樹により実生苗の健全率が大きく異なること、すなわち各抵抗性家系の抵抗性程度には大きな差があることが判明している(山本ら 2003)。また、抵抗性マツの特性表においてもそれは明らかである(九州地区林業試験研究機関連絡協議会 1999)。試験に供試する実生苗の抵抗性程度の分布を大きくする必要があるため、山本ら(2003)の調査で抵抗性家系の中で抵抗性程度が弱かった三崎-90号、弱から中程度の志摩-64号、田辺-54号、颯娃-425号、波方-37号および強度の抵抗性を持つ小浜-30号の6本の抵抗性母樹を、構内の抵抗性クロマツ採種園(藤本ら 1989)の中から選定した。なお、調査時において6本の抵抗性母樹は20年生前後で、平均樹高 5.4m、平均根元径 24.6cm、および平均胸高直径 19.6cmであった。

選定した6本の抵抗性母樹の枝片の抵抗性を調査するために、2007年8月下旬に長さ10cm、直径約10mmの当年生枝を4本ずつ採取した。それぞれを長さ5.0cmに二分し、マツノザイセンチュウ接種用と滅菌蒸留水処理用として24本ずつの枝片を準備した。それらの木部の接線断面を露出させるため、皮層樹皮下を軸方向に切除し、褐変調査用の枝片サンプルとした(図

2-1)。乾燥防止のため滅菌蒸留水を含ませた濾紙を敷いた径 6cm のプラスチックシャーレに、作成した枝片サンプルを 1 本ずつ入れ、キュアリングのため、24℃の暗所に約 20 時間静置した。その後、マツノザイセンチュウ 2,500 頭（接種液 25  $\mu$  l）を 24 本の枝片の切除面全体に広がるように接種した。マツノザイセンチュウ接種液として、*Botrytis cinerea* 菌上で培養した強病原力の島原個体群（戸田 1997）をベールマン法により分離し、滅菌蒸留水で 100 頭/ $\mu$  l の濃度に調整したものをを用いた。島原個体群は抵抗性苗の生産事業において接種検定に用いている個体群である。残りの 24 本の枝片には、対照として滅菌蒸留水 25  $\mu$  l を処理した。マツノザイセンチュウ接種後または滅菌蒸留水処理後、枝片サンプルを 24℃の暗所に静置し、表 2-1 の基準（指数 0～5 の 6 段階）に従って接種の 11 日後までそれぞれのサンプルの褐変程度の調査を行い、枝片全体が褐変するまでの日数を記録した。マツノザイセンチュウ区と蒸留水区の褐変程度は Mann-Whitney の *U*-検定により比較した。

## （2）枝片の組織変性とポット苗の枯死

前述の抵抗性母樹由来の 3 年生自然交配実生苗、三崎-90 号 8 個体、志摩-64 号 7 個体、田辺-54 号 8 個体、潁娃-425 号 6 個体、波方-37 号 5 個体、小浜-30 号 10 個体の計 44 個体（平均苗高 43cm、平均根元径 7.1mm）を供試した。同構内の苗畑に仮植しておいたこれらの苗木を、2006 年 4 月中旬に直径 17cm、高さ 15cm のポリポットに植栽した。2006 年 8 月中旬に、ポット苗の当年生主軸から直径 5～6mm、長さ 5cm の枝片を 1 個体につき 2 本ずつ採取し、褐変調査用の枝片サンプルを調製した。これらにマツノザイセンチュウを 2,500 頭（接種液 25  $\mu$  l）接種し、接種の 13 日後まで前述と同様に褐変の調査を行った。調査日ごとの褐変程度および褐変に至る日数は、1 個体につき 2 本の枝片サンプルの平均値とした。

枝片サンプル調製のため主軸を採取した後のポット苗 44 個体には、主軸の地際部をナイフで剥皮し、枝片サンプルに接種したものと同一マツノザイセンチュウ 5,000 頭（接種液 50  $\mu$  l）を接種した。なお、苗への接種は枝片への接種と同日に行った。これらの苗木を雨のかからないガラス室内に静置し、1 週間に 1 度の灌水を行った。接種の 90 日後まで苗木の病徴を観察し、枯死に至る日数を記録した。

枝片が完全褐変に至る日数と苗木の枯死に至る日数、枝片の調査日ごとの褐変程度と苗木の枯死に至る日数を、それぞれ Spearman の順位相関係数( $r_s$ )を用いて解析し、枝片のダメ

ージとポット苗の枯死との関係を検討した。

### (3) 採種園の抵抗性母樹と実生家系苗の組織変性

抵抗性クロマツ採種園に植栽されている 15 クローン，すなわち，田辺-54 号，三豊-103 号，三崎-90 号，吉田-2 号，波方-37 号，波方-73 号，夜須-37 号，土佐清水-63 号，志摩-64 号，津屋崎-50 号，小浜-30 号，大瀬戸-12 号，大分-8 号，川内-290 号，穎娃-425 号のそれぞれから，ランダムに A, B, C の 3 ラメットを選定し，計 45 本を試験対象母樹とした。当採種園造成時の 1990 年の時点でクロマツとされていた小浜-24 号も同園に植栽されているが，2003 年に抵抗性アカマツに変更されたため供試しなかった。また，抵抗性アカマツとして選抜されたもののクロマツに変更された備前-143 号は，当採種園には植栽されていないため供試しなかった。同一環境下に存在する非選抜クロマツであれば比較対照樹とすることができるが，同採種園内およびその周辺には非選抜のクロマツが存在しなかったため，非選抜のクロマツも供試しなかった。なお，試験対象とした母樹は，平均樹高 7.0m(範囲 5.8～8.6m)，および平均胸高直径 23.4cm(範囲 13.9～37.0cm)であった。

2009 年 1 月下旬に，それぞれの母樹において東南西北の方向に伸びている当年生枝の先端から枝片を 1 本ずつ採取し，実験室に持ち帰った後に前述と同様に長さ 5cm の褐変調査用の枝片サンプルを作成した。枝片中央部の平均直径は 8.4mm (範囲 5.9～11.7mm)であった。径 6cm のプラスチックシャーレに乾燥防止のため滅菌蒸留水を含ませた濾紙を敷き，作成したサンプルを 1 本ずつ入れ，24℃の暗所に約 24 時間静置しキュアリングを行った。その後，マツノザイセンチュウ 2,500 頭（接種液 25  $\mu$ l）を枝片の切除面全体に接種した。その後，枝片サンプルを 24℃の暗所に静置し，皮層，木部を含めて切除面全体が完全に褐変に至る日数を調査して，組織変性の速さを評価した。

母樹枝片の褐変に至る日数は，各ラメットについて 4 方位の枝片のデータから平均値を求めた。母樹をランダムに選定したため，その数値について一元配置の分散分析を行い，クローン間の比較を行った。また，各ラメットについて 4 方位の枝片間のばらつきを調べるために，標準偏差を求めた。さらに，枝片のサンプリング方法による影響を考え，ラメットと枝を採取した方位について二元配置の分散分析を行い，ラメットの植栽位置と共にサンプリング方法の的確性を評価した。

また、母樹クローンと同じ 15 家系を対象とした抵抗性クロマツ採種園産種子由来の 3 年生（満 2 年生）自然交配実生家系苗において、津屋崎-50 号と三崎-90 号はそれぞれ 11 個体、他の 13 家系はそれぞれ 12 個体ずつ、計 178 個体を供試した。苗畑に植栽しておいたこれらの平均苗高は 66.4cm（範囲 33~112cm）、平均根元径は 17.8mm（範囲 8.7~26.2mm）であった。2007 年 7 月中旬に主軸の先端部分を切り取り、実験室に持ち帰って、厚さ約 2mm の輪切り状の主軸切片サンプルを作成した（図 2-2）。本試験では、マツノザイセンチュウ接種による苗の生存調査に対する影響を最小限にするため、主軸の採取部分はできる限り小さくした。母樹枝片と同じ手順で、マツノザイセンチュウ 500 頭を切片の片方の木口面全体に接種し、サンプルの木口両面が完全に褐変に至る日数を調査した。主軸切片を採取した後の苗には、主軸の地際部をナイフで剥皮し、マツノザイセンチュウ 5,000 頭を接種し、10 月中旬に生存個体数を調査した。

3 年生実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数も、母樹枝片の褐変に至る日数と同様に一元配置の分散分析により実生家系苗間の比較を行った。

#### （４）枝片の組織変性と実生家系苗の抵抗性

組織変性の遺伝性を調査するため、採種園の母樹と実生家系苗とで相関解析を行った。すなわち、母樹枝片の褐変に至る日数と実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数との関係、母樹枝片または実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数と実生家系苗の抵抗性強度との関係をそれぞれのクローンまたは家系の平均値を用いた Spearman の順位相関係数（ $r_s$ ）により解析した。実生家系苗の抵抗性強度は、九州地区で調査した特性表の抵抗性強度と（九州地区林業試験研究機関連絡協議会 1999）（以下、九州の抵抗性強度）、本試験と同じ採種園由来の実生家系苗から判定した抵抗性強度（山本ら 2003）（以下、浜松の抵抗性強度）を用いた。また、実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数と 3 年生実生家系苗の生存率との関係を、同様に Spearman の順位相関係数により解析した。

### 3. 結果

#### （１）マツノザイセンチュウを接種した枝片の組織変性の推移

6 本の抵抗性クローンから調製した枝片サンプルは、作成した時点では形成層から皮層の



部分が緑色を呈していた。蒸留水区における枝片サンプルの褐変程度は、接種の7日後まで指数0～1であり、11日後においても完全に褐変するものはなかった（図2-3）。一方、マツノザイセンチュウ区では接種の3日後から褐変が進行し始め、接種の4～8日後にかけて急激な変化が観察された。接種の9日後には全枝片サンプルが完全に褐変した。接種の3日後からは、蒸留水区とマツノザイセンチュウ区との間に有意な差（ $p < 0.01$ ）が認められた。

## （2）枝片の組織変性とポット苗の抵抗性との関係

マツノザイセンチュウを接種した抵抗性クロマツ苗は、接種の28日後から枯死する個体が確認され、接種の86日後までに44個体のうち43個体が枯死した（図2-4）。残る1個体は接種の90日以後も生存し、以下の解析からは除いた。マツノザイセンチュウを接種した枝片サンプルでは、接種の3日後から組織の一部で褐変が始まり、5日以後には全体が褐変した枝片が確認され、13日後にはすべての枝片サンプルが完全に褐変した。枝片が褐変に至る日数と苗木の枯死に至る日数との間には有意な正の相関（ $n=43$ ,  $r_s=0.607$ ,  $p < 0.01$ ）が認められた（図2-4）。同様に、クロマツ苗木の枯死に至る日数と調査日ごとの枝片の褐変程度には、枝片への接種の5日後に5%水準で、また6～11日後には1%水準で有意な負の相関が認められた（表2-2）。

調査期間内で枝片の褐変指数が5になる個体が最も多かった日は、接種の10日後の7個体であった。これらには、接種の6日後までは褐変が認められず、以後、急激に褐変する枝片や、3日後から褐変が認められ、以後段階的に進行していく枝片などがあり、褐変指数の経時的変化は一様ではなかった（図2-5）。

## （3）抵抗性母樹と実生家系苗の組織変性

抵抗性母樹の枝片にマツノザイセンチュウを接種した場合、接種の7日後には枝片全体が褐変に至るサンプルが現れ、接種の27日後までにはすべてのサンプルが褐変した。褐変に至る日数の全サンプル平均は、接種の12.5日後であった。褐変に至る日数のクローン平均は7.9～19.3日の範囲にあり、有意なクローン間差が認められた（ $p < 0.01$ ）（図2-6）。吉田-2号、川内-290号、夜須-37号、土佐清水-63号はそれぞれのクローンの3ラメットの平均が11日以内であったのに対し、波方-37号、大瀬戸-12号は、褐変に至る日数の3ラメット平

均がどちらも 19 日以上だった。その他の 9 クローンは、3 ラメットの平均が 11.2~14.5 日であった。

供試した 15 クローンのうち、12 クローンは 3 本のラメット間で枝片の褐変に至る日数に大きな違いが認められなかった。しかし、夜須 $\kappa$ -37 号のラメット C、三豊 $\kappa$ -103 号のラメット C、三崎 $\kappa$ -90 号のラメット C は、それぞれのクローンにおける他の 2 本のラメットよりも枝片の褐変に至る日数が 6 日以上も長く、また、大瀬戸 $\kappa$ -12 号は 3 本のラメット間に大きなばらつきが認められた。一方、各ラメットにおける 4 方位の枝片には、津屋崎 $\kappa$ -50 号のラメット A、大瀬戸 $\kappa$ -12 号のラメット A、B や波方 $\kappa$ -37 号のラメット A、B で、標準偏差が 3.0 以上のばらつきがあった。分散分析の結果、褐変に至る日数には枝片の方位による差は認められなかった。さらに、採種園内において、枝片の褐変に至る日数が速いラメットと遅いラメットが特定の範囲に集まることはなかった。これらのことから、組織変性の速さに対する枝の採取方法の影響は低いと判断された。

苗畑に植栽した抵抗性実生家系苗の主軸切片にマツノザイセンチュウを接種した場合、接種の 5 日後には切片全体が褐変に至るサンプルが現れ、接種の 15 日後までにはすべてのサンプルが褐変した。褐変に至る日数の全サンプル平均は、接種の 9.0 日後であった。褐変に至る日数の家系平均は 7.3~11.1 に分布していて、有意な家系間差があった ( $p < 0.01$ ) (図 2-7)。夜須-64 号 と小浜-30 号は平均で 7.5 日以内に褐変したが、大瀬戸-12 号、三崎-90 号、波方-37 号は平均で 10 日以上を要した。標準偏差の小さい家系は三豊-103 号の 1.4 で、大きい家系は志摩-64 号の 3.4 であった。

#### (4) 枝片の組織変性と実生家系苗の抵抗性強度、生存率との関係

実生家系苗の組織変性の速さと母樹の組織変性の速さとの相関解析を行った結果、両者の間には正の相関 ( $n=15$ ,  $r_s=0.579$ ,  $p < 0.05$ ) が認められた (図 2-8)。しかし、母樹の組織変性の速さと実生家系苗抵抗性強度との相関は低く、九州の実生家系苗抵抗性強度とは  $r_s=0.024$  ( $n=15$ )、浜松の実生家系苗抵抗性強度とは  $r_s=0.059$  ( $n=15$ ) で有意性は認められなかった (表 2-3)。また、実生家系苗の組織変性の速さと九州および浜松の実生家系苗抵抗性強度との相関も弱く、それぞれ、 $r_s=0.118$  ( $n=15$ )、 $r_s=0.111$  ( $n=15$ ) で有意性はなかった。実生家系苗の組織変性の速さとそれらの切片を採取した苗の生存率との相関も弱く、 $r_s$

$= -0.098$  ( $t=15$ ) で有意性はなかった。

#### 4. 考察

クロマツへマツノザイセンチュウを接種した場合、接種点周辺では接種の3日後には皮層樹脂道における柔細胞が崩壊し始め (Ishida et al 1993), 6 日後にはそれが接種枝に広がる (Mamiya 1985)。そして, 7 日後には皮層樹脂道や皮層組織が大きなダメージを受け (Ichihara et al. 2000), 以後, 木部柔細胞, 形成層の順に細胞が壊死することが明らかにされている (Ishida et al. 1993)。このような組織学的変化が拡大して, 全身の枯死に発展することが知られている (Fukuda et al. 1992 ; 山田 2006)。これまでの報告により, 側枝にマツノザイセンチュウを接種した場合, 感受性のクロマツでは接種点近くの木部柔細胞が壊死するが, 抵抗性のマツ属樹種では木部柔細胞の壊死が少ないことが明らかにされている (Yamada and Ito 1993a)。さらに, このような抵抗性の樹種間差は切り枝や樹皮片へのマツノザイセンチュウの接種によっても再現される (寶月ら 1994)。これらの結果から, マツノザイセンチュウを接種した組織は, 抵抗性が強いマツ属樹種ではダメージが少なく, 感受性の樹種では壊死しやすいことが明らかであるが, これが同一種内における抵抗性の個体差にまで及ぶ現象であるかは確認されていない。

本研究で, 抵抗性のクロマツ母樹から調製した枝片サンプルに滅菌蒸留水を処理した場合は, 褐変の進行程度が小さかったが, マツノザイセンチュウを接種すると褐変が徐々に進行し, 接種の9日後にはすべてのサンプルが褐変した。このような組織の褐変経過は, これまでに明らかにされたマツノザイセンチュウの作用によるクロマツ組織の経時的な変性 (Mamiya 1985 ; Ishida et al. 1993 ; Ichihara et al. 2000) と概ね一致すると考えられた。さらに, クロマツは, 抵抗性採種園の母樹となるクローンであっても, マツノザイセンチュウに対して組織が完全な抵抗性を持たないことが明らかになった。また, 組織が褐変に至る日数にはクローン間差が認められたが, サンプルを採取した枝の方位などの影響は小さく, 採種園の特定の範囲に枝片の褐変が速い母樹や遅い母樹が集中していないことから判断しても, これはクローンの特性であり, 環境の影響は低いと考えられた。さらに, 採種園から得られる半兄弟の実生家系間にも, マツノザイセンチュウによる組織変性の速さに差が認められた。もし, 個体によってマツノザイセンチュウの活性や増殖を阻害する化学物質等 (Yamada

and Ito 1993b ; Kuroda et al. 1991) の質や量に違いがあるのならば、それが組織変性の速さの違いとなって現れ、苗木の枯死にも影響してくる可能性がある。

このような組織レベルの抵抗性で個体の抵抗性の強弱を判別できれば、アカマツやクロマツ苗の一部の組織を使った室内での抵抗性検定が可能になり、気象条件に左右されない結果が期待できる。そのため、本章において苗木全身の抵抗性と組織のダメージとの関係を解析した結果、組織レベルで壊死が遅い場合は、マツノザイセンチュウ接種後の苗の生存期間が長い傾向にあった。本研究で供試したものと同一抵抗性クロマツ家系苗の屋外での接種検定では、1997～2002年の平均生存率は62.1%であったが(山本・袴田 未発表)、ポット苗を使った本試験での平均生存率は2.3%と非常に低かった。アカマツポット苗の温室内での接種検定でも、苗畑での試験に比べて生存率が低くなっており(Kishi 1995)、温室内でのポット苗の試験では高温+水分ストレスが露地条件より強く、それが苗の生存率を低下させると推察される。本研究での低い生存率もガラス温室内でのポット使用に起因すると考えられた。このような厳しい条件下で、供試したポット苗のほとんどが最終的に枯死したとはいえ、枯死に至る日数には2ヶ月近い差があり、接種後に速く枯死する個体よりも長い期間生存する個体のほうが抵抗性が強いと推察できる。同様に、マツノザイセンチュウ接種後に枝片が完全に褐変するまでの期間が長ければ、組織の抵抗性も強いと考えられる。これらのことから、マツノザイセンチュウに対する組織レベルの抵抗性はポット苗における個体レベルの抵抗性に貢献していると考えられた。

この試験では、比較的早い時期から褐変が生じる枝片や、それより遅れて急激に褐変が進行する枝片など、組織が完全に褐変するまでには様々なパターンが存在したが、これが原因となり、枝片の褐変程度は、枝片全体が褐変に至る日数よりも、苗木の枯死に至る日数との相関が低くなったと考えられた。また、枝片の褐変が遅いにもかかわらず苗木が早く枯死する場合や、逆に枝片が速く褐変する割に枯死が遅れる苗木もいくつか認められた。これは、苗木の抵抗性は組織の抵抗性のみに依存しないことを示している。その要因として可能性が高いのは、マツノザイセンチュウの通過の難易である。切り枝でのマツノザイセンチュウの移動調査から、皮層樹脂道が通路となり(平井ら, 1994)、その断面積が大きいほど抵抗性が低く(川口 2006)、このような量的な形質が抵抗性レベルと関連することが示唆されている(Oku 1989)。さらに、マツの分枝によりマツノザイセンチュウの移動が妨げられ、分枝の量

が抵抗性に関与することも報告されている (Kuroda 2004)。これらはマツノザイセンチュウに対する抵抗性の要因として、量的形質や形態的特徴が、苗木全身の抵抗性に関わる可能性を示している。しかし、逆に、非選抜のクロマツでは、節の形態や輪生枝数によるマツノザイセンチュウの移動抑制のみでは、個体の生死は決定づけられないと考えられている (川口・市原 2010)。これは、枝の先端部のみが枯れる部分枯れを示す個体では、枯死部分ではマツノザイセンチュウが検出されるが、健全部分では検出されないことから、マツノザイセンチュウの移動よりも増殖の難易が枯死には重要な要因と推察されるからである。

採種園で母樹としているクローンの枝片の褐変に至る日数と実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数との間には、有意な正の相関が認められたことから、母樹クローンの組織変性の速さがその子供である実生家系苗の組織変性の速さに、ある程度は引き継がれていると考えられた。しかし、母樹および実生家系苗の組織変性の速さは、苗畑で検定した実生家系苗の抵抗性強度、すなわちマツノザイセンチュウ接種後の生存率との相関が低いことが判明した。この結果から、マツノザイセンチュウに対する組織変性の速さは、苗の生存を支配する抵抗性要因として重要ではないことが示唆された。つまり、組織変性が遅い苗は、マツノザイセンチュウによる病徴発現が遅れる傾向にあるが、それだけでは苗の生存に結びつかないと推察された。組織の抵抗性に加えて、マツノザイセンチュウの移動や増殖を抑えるために、苗木全身で発揮される抵抗性が苗の生存に関与していると考えられた。

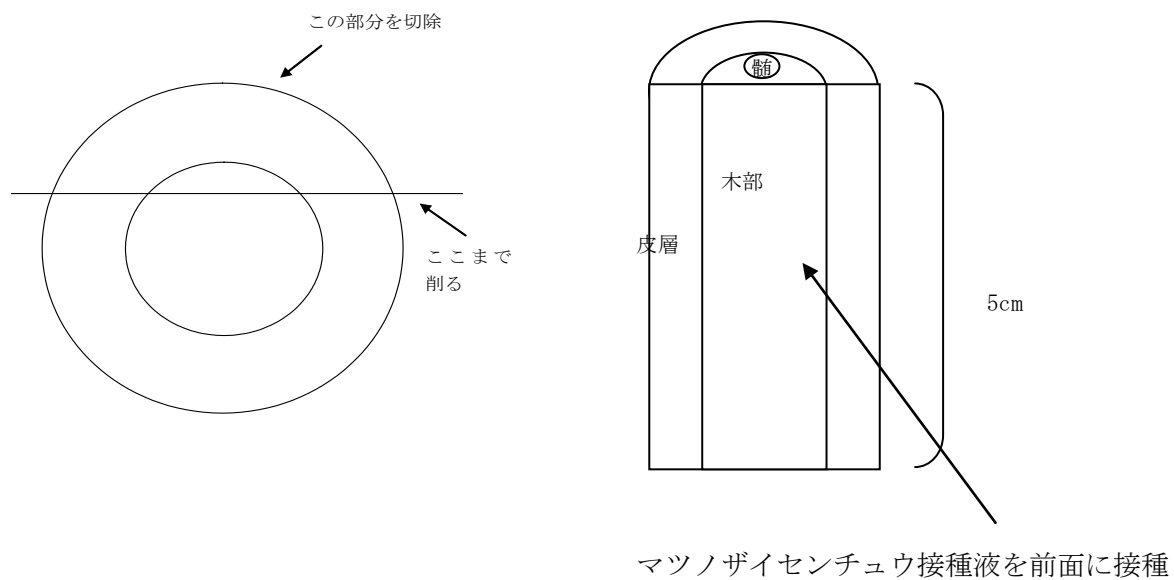


図 2-1 クロマツ枝片の調製

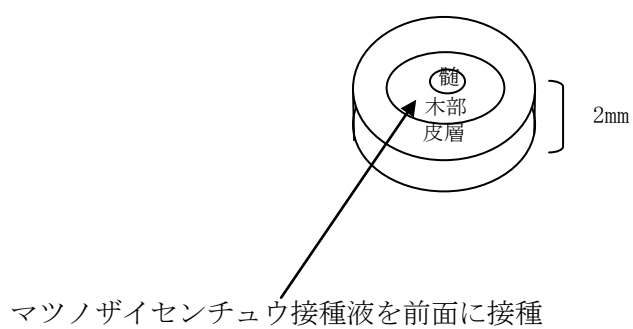


図 2-2 クロマツ切片の調製

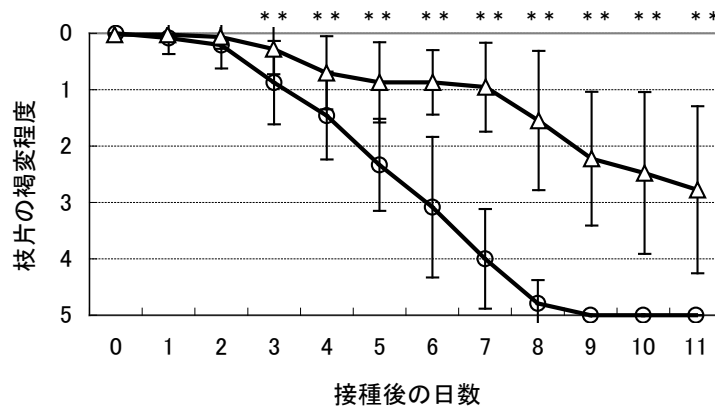


図 2-3 マツノザイセンチュウを接種した枝片の褐変の経時的変化

マツノザイセンチュウ区 (○) 蒸留水区 (△)

6 クローン (三崎-90 号, 志摩-64 号, 田辺-54 号, 頼娃-425 号, 波方-37 号, 小浜-30 号) の平均値で表示。エラーバーは標準偏差を示す。\*\*は Mann-Whitney の  $U$ -検定でマツノザイセンチュウ区と蒸留水区との間に 1%水準で有意性があることを示す。

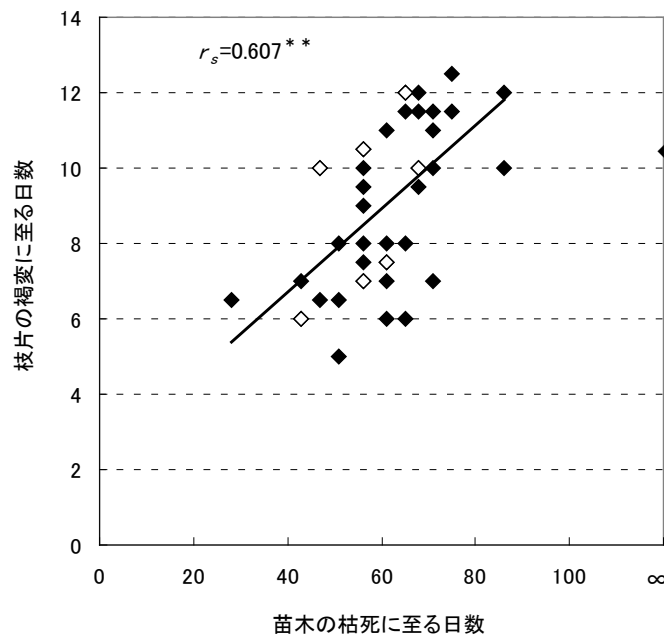


図 2-4 マツノザイセンチュウを接種したクロマツ苗木が枯死に至る日数と枝片が褐変に至る日数との関係

相関係数は、接種の 90 日以後も生存した 1 個体を除き算出した。枝片の褐変に至る日数は枝片 2 サンプルの平均値。\*\*は Spearman の順位相関係数に 1%水準で有意性があることを示す。◆は苗木 1 個体, ◇は苗木 2 個体を示す。

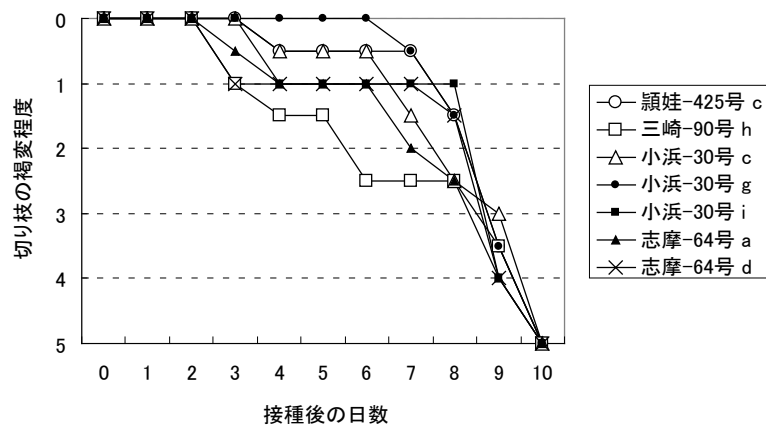


図 2-5 マツノザイセンチュウ接種 10 日後に完全褐変した枝片の経日的褐変状況

家系名の後のアルファベットは、10 日後に完全褐変した枝片の識別記号を示す

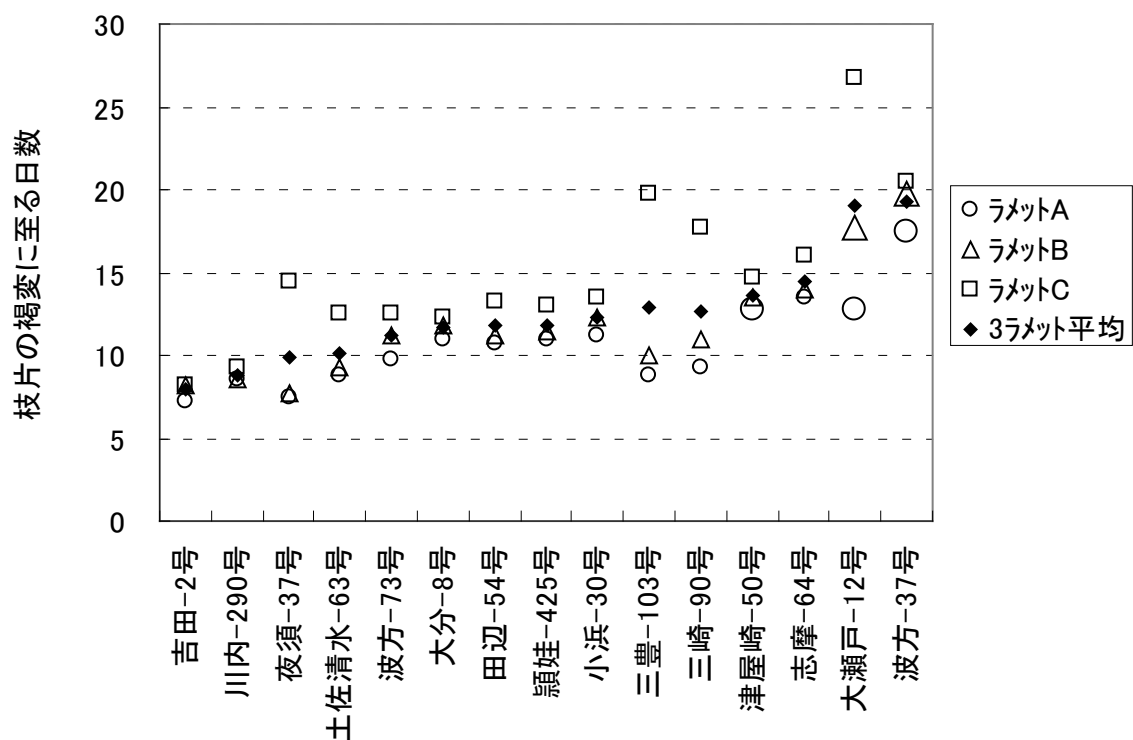


図 2-6 抵抗性クロマツの母樹枝片の褐変に至る日数

一元配置の分散分析により、クローン間に 1%水準で有意差あり。4 方位の枝片の標準偏差が 3.0 以上のラメットは、プロットのサイズを大きく表示した（例：津屋崎-50 号のラメット A など）。



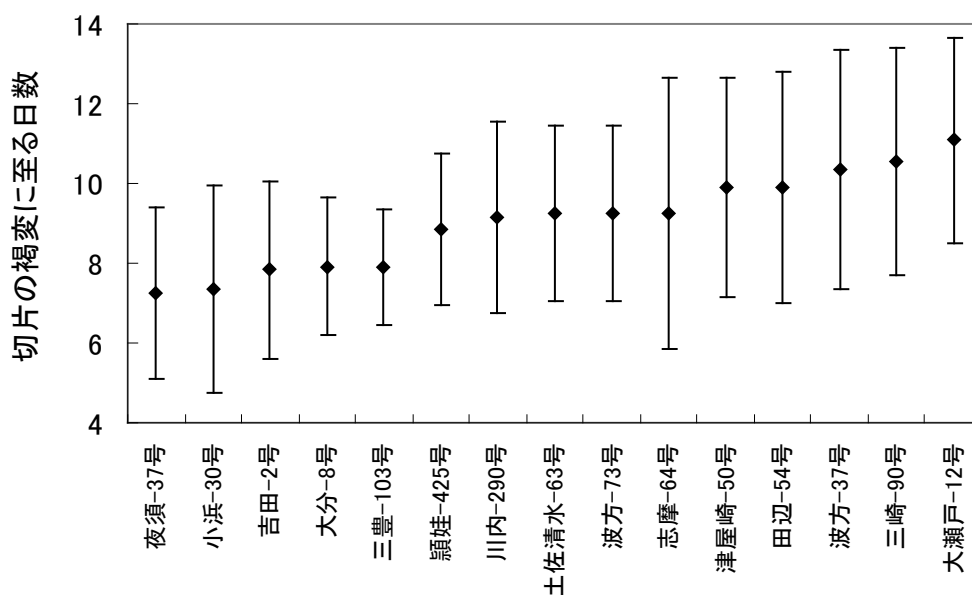


図 2-7 抵抗性クロマツの実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数

家系ごとに 11~12 個体の平均値。エラーバーは標準偏差を示す

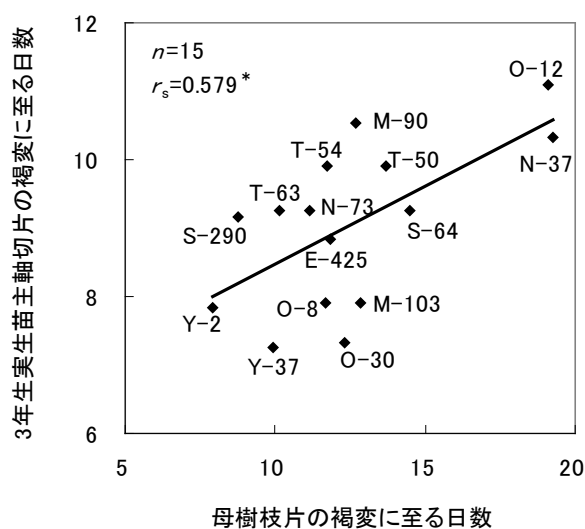


図 2-8 抵抗性クロマツの母樹枝片の褐変に至る日数と 3 年生実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数との関係

母樹枝片の褐変に至る日数は各クローン 3 ラメットの平均値。3 年生（満 2 年生）実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数は各家系 11~12 個体の平均値。\*は、Spearman の順位相関係数に 5%水準で有意性があることを示す。

田辺-54 号は T-54, 三豊-103 号は M-103, 三崎-90 号は M-90, 吉田-2 号は Y-2, 波方-37 号は N-37, 波方-73 号は N-73, 夜須-37 号は Y-37, 土佐清水-63 号は T-63, 志摩-64 号は S-64, 津屋崎-50 号は T-50, 小浜-30 号は O-30, 大瀬戸-12 号は O-12, 大分-8 号は O-8, 川内-290 号は S-290, 顥娃-425 号は E-425 で表示。

表 2-1 病徴の判定基準

指数	病 徴 ※
0	0 %
1	1- 20 %
2	21- 40 %
3	41- 60 %
4	61- 80 %
5	81-100 %

※病徴は枝片の断面積当たりの褐変化した面積の割合 (%)

表 2-2 枝片の褐変程度と苗木の枯死に至る日数との順位相関係数

枝片への接種後日数	Spearman の順位相関係数 (n=43)
1	—
2	—
3	0.134 ns
4	0.125 ns
5	-0.361 *
6	-0.407 **
7	-0.496 **
8	-0.514 **
9	-0.505 **
10	-0.524 **
11	-0.556 **
12	-0.232 ns
13	—

\*\*, \*, ns, はそれぞれ Spearman の順位相関係数に 1%水準で有意性があること, 5%水準で有意性があること, 有意性がないことを示す。接種の 1~2 日後はすべての枝片で指数 0, 接種の 13 日後はすべての枝片で指数 5 のため, 相関係数は算出できない。

表 2-3 抵抗性クロマツの組織変性と実生家系苗の抵抗性強度との関係

組織変性の指標	実生家系苗抵抗性強度の		Spearman の 順位相関係数
	判定地域または生存率	家系数	
母樹枝片の褐変に至る日数	九州	15	0.024 ns
	浜松	15	0.059 ns
実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数	九州	15	0.118 ns
	浜松	15	0.111 ns
	苗生存率	15	-0.098 ns

ns は、Spearman の順位相関係数に有意性がないことを示す。抵抗性強度とは抵抗性評価の指数を意味し、九州のデータから算出した指数（九州地区林業試験研究機関連絡協議会 1999）、浜松のデータから算出した指数（山本ら 2003）を用いて、母樹枝片の褐変に至る日数や実生家系苗主軸切片の褐変に至る日数との相関を求めた。

### 第三章 クロマツの組織抵抗性評価指標としての微弱発光

#### 1. はじめに

本研究では、苗へのマツノザイセンチュウの接種による抵抗性の判定を簡略化するため、第Ⅱ章で、褐変調査に基づいた組織レベルの抵抗性と苗全体の抵抗性との相関を調査した。しかし、褐変調査に基づく組織の抵抗性は苗全体の枯死に関係しないことが明らかになり、苗の枯死に相関する新たな組織レベルの抵抗性指標を開発する必要性が生じた。

その一つの候補として、植物の防御応答に付随して発生する微弱発光の利用が考えられる。生体が発する微弱発光は1955年に発見され(Colli et al. 1955)、生体の生理状態を強く反映するため(Chwirot 1998)、薬学、医学、生物学などに利用できると考えられてきた(Popp et al. 1981)。植物の病害に関連する研究では、ウイルスが感染したササゲ葉で細胞死の直前に微弱発光が高まることや(江原 1994)、キチンエリシターなどを処理したイネから、防御応答にリンクして微弱発光が発生することが報告され(Iyozumi et al. 2005 ; Kageyama et al. 2006)、植物の防御応答に付随した微弱発光の存在が明らかになっている。キチンエリシターによって誘導されるイネ培養細胞からの微弱発光は二峰性で、エリシター処理の約30分後と1~3時間後に発光のピークが認められる。防御応答に付随した微弱発光のピーク時間は、植物種と病原菌等の組み合わせによって異なると考えられるが、現在まで報告されたものは24時間以内となっている(江原 1994 ; Iyozumi et al. 2002 ; Iyozumi et al. 2005 ; 影山ら 2007)。さらに、キチンエリシターとイネ培養細胞の系では、微弱発光の発生に至るシグナル伝達経路が明らかにされた(Kageyama et al., 2006 ; 加藤ら, 2010)。キチンエリシターを認識した細胞では、情報伝達物質のフォスファチジン酸が生成して、その下流にシグナルを伝達し、最終的には、NADPoxidase や Peroxidase 等の酵素反応によって生成する活性酸素種にリンクして微弱発光が発生する。これに加え、サツマイモでは防御応答時に発生する微弱発光のスペクトル変化の特徴も解明されている(Iyozumi et al. 2002)。

これまでに、マツ属樹種とマツノザイセンチュウとの関係において発生する微弱発光を報告した例はないが、これが細胞の過敏感細胞死や抗線虫物質の生成といった病理学的な変化を伴う植物の防御応答を反映するのであれば、マツノザイセンチュウに対する抵抗性の指標として利用できる可能性がある。微弱発光検出には特別な試薬が必要ではなく、非破壊で行なえるため、抵抗性の簡易な検定技術としての利用が想定される。そこで、マツ材線虫病抵抗性の新た

な簡易検定技術の開発につなげるため、本章ではマツノザイセンチュウを接種したクロマツ枝片から発生する微弱発光の特性を調査した。

## 2. 材料および方法

### (1) 枝片サンプルへのマツノザイセンチュウの接種方法と微弱発光の測定

各試験に供試した各樹種成木の当年枝から直径約 8mm、長さ 5cm の枝片を準備し、その表面の皮層を木部が現れるまで、厚さ約 3mm 切除した（Ⅱ章 図 2-1）。径 6cm のプラスチックシャーレに、乾燥を防止するため滅菌蒸留水を含ませた濾紙を敷き、作成したサンプルを 1 本ずつ入れた。キュアリングのため、23℃の暗所に約 20 時間静置した後、皮層の切除面に病原性が確認されているマツノザイセンチュウ島原個体群（戸田 1997）を切除面全体に広がるように接種した。マツノザイセンチュウは *Botrytis cinerea* 菌上で培養し、ベールマン法により分離したものを滅菌蒸留水に所定の濃度に懸濁して接種に使用した。微弱発光の測定には、波長感度域 270～570nm の光電子増倍管を備えたフォトンカウンターPCX-100（浜松ホトニクス社製）を用い、23℃で測定を行った。各サンプルの 1 回の測定時間は 2～5 秒とし、120～140 時間に渡って、その測定を連続的に繰り返した。測定結果はすべて 1 秒当りの微弱発光（フォトン）カウント数（CPS）に換算し、3 反復間の平均値で示した。

### (2) マツノザイセンチュウの接種頭数と微弱発光

非選抜の 20 年生クロマツ 1 個体の当年枝からサンプル 3 本を前述のように作成し、それらのうち 2 本に 100 頭/ $\mu$ l と 50 頭/ $\mu$ l の濃度に調整したマツノザイセンチュウ接種液をそれぞれ 50  $\mu$ l ずつ接種して、マツノザイセンチュウ 5,000 頭および 2,500 頭接種区を作成した。対照として滅菌蒸留水 50  $\mu$ l を同様に処理した。同一個体の別の当年枝から作成したサンプルにも同様の接種を行い、3 反復で試験を実施した。また、サンプルを入れないシャーレ（ブランク）も準備した。各区について、微弱発光を約 120 時間に渡り測定した。第 1 ピークと第 2 ピークのそれぞれのピークが高まる時間帯で、フォトンカウント数について Scheffe の多重比較検定を行い、試験区間の比較を行った。

### (3) 接種源の違いと微弱発光

100 頭/ $\mu$ l の濃度のマツノザイセンチュウ接種液を作成し、接種に使用した。前項で使用したクロマツと同一個体の当年枝から作成したサンプル 4 本に、3000 頭の生きているマツノザイセンチュウ（生マツノザイセンチュウ区）、 $-60^{\circ}\text{C}$ で凍結して死滅させた 3000 頭のマツノザイセンチュウ（死マツノザイセンチュウ区）、マツノザイセンチュウの接種液を遠沈した上澄液 30  $\mu$ l（上澄液区）、および滅菌蒸留水 30  $\mu$ l（蒸留水区）をそれぞれ処理した。同一個体の別の当年枝サンプルにも同様な処理をして 3 反復とし、微弱発光を約 140 時間に渡り測定した。次に、フォトンカウント数について Scheffe の多重比較検定を行い、試験区間の比較を行った。また、接種源の違いによるクロマツ枝片の反応の違いもあわせて検証するために、測定終了後にサンプルを装置から取り出して  $23^{\circ}\text{C}$ に保持し、皮層切除面の褐変面積割合を調査した。調査は、生マツノザイセンチュウによる褐変が皮層切除面の全面に及んだ接種 10 日後に行った。

#### （４）樹種の違いと微弱発光

前項で使用したものと同一のクロマツ、抵抗性樹種である 50 年生のテーダマツ (*Pinus taeda* L.) 1 個体およびマツノザイセンチュウの非宿主である 15 年生のスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) 1 個体のそれぞれの当年枝からサンプルを作成し、100 頭/ $\mu$ l の濃度に調整したマツノザイセンチュウ 3000 頭（接種液 30  $\mu$ l）を接種した。樹種ごとに蒸留水区も設定した。各区 3 反復で約 135 時間に渡り微弱発光を測定した。

### 3. 結果

#### （１）マツノザイセンチュウの接種頭数と微弱発光の発生パターン

クロマツ当年枝から得られたサンプルの各処理区は、ブランクに比べていずれも発光強度が高かったが、蒸留水処理区では発生する微弱発光はほぼ一定の強度で推移し大きな変化は認められなかった（図 3-1）。マツノザイセンチュウ接種区では、接種後 30 分以内で第 1 ピークが現れ、接種の 70 時間後には第 2 ピークが認められた。微弱発光が増大している時間は第 1 ピークでは 1 時間程度と短かったが、第 2 ピークは 100 時間以上に及んだ。5000 頭接種区は 2500 頭接種区と比べて微弱発光の発生パターンは類似していたが、2500 頭接種区よりも接種後 30 分以内に現れる第 1 ピークで 80CPS 程度、70 時間前後の第 2 ピークで 160CPS 程度高い発光強

度を示した。多重比較検定の結果、この発光強度の差は第1ピークが5%水準で、また第2ピークも5%水準で有意であった。

## (2) 接種源の違いと微弱発光の発生パターン

第1ピークは、蒸留水区では明瞭ではなかったが、生マツノザイセンチュウ、死マツノザイセンチュウおよび上澄液区では認められた(図3-2)。また、生マツノザイセンチュウ区では、接種71時間後に720CPSの第2ピークが認められた。しかし、死マツノザイセンチュウおよび上澄液区では、蒸留水区よりも70~120CPS発光強度が高まったが、これらは多重比較検定による有意差はなく、明瞭な第2ピークは認められなかった。接種から10日後、生マツノザイセンチュウを接種したサンプルの皮層切除面全体が褐変した時点では、他の区の褐変割合は25%以下で、その程度は小さかった(表3-1)。

## (3) 樹種の違いと微弱発光の発生パターン

非宿主であるスギのサンプルにマツノザイセンチュウを接種すると、第1ピークおよび第2ピークともに認められず、微弱発光は測定期間を通して漸減する傾向にあった。これは蒸留水を処理したものとほとんど同じ発生パターンであった(図3-3 A, B)。

抵抗性樹種であるテーダマツでは、マツノザイセンチュウ接種の十数分後に第1のピーク(600CPS)が現れ、19時間後には第2のピーク(590CPS)が認められた(図3-3 C, D)。この発生パターンはクロマツのものと類似していたが図3-3 E, F)、クロマツと比較して第2ピークは発光強度が低く、かつ早い時間帯に発生した。

## 4. 考察

これまでに、暗所に適応させたハウレンソウの葉や分離した葉緑体、クロレラなどから微弱発光の発生が確認されている(Hideg et al. 1990 ; Hideg and Inaba 1991 ; Lavorel 1980)。本研究での蒸留水処理区の発光強度はブランクよりも明らかに高く、クロマツからもこれらの植物と同様に微弱発光が発生することが明らかになった。

マツノザイセンチュウを接種したクロマツの枝片では接種後30分以内に第1ピークが現れ、およそ70時間後に第2ピークを示すというパターンが認められた。この第2ピークは、生マ

ツノザイセンチュウの接種でのみ認められ、かつ、接種頭数が多いほどピークは高まった。これらの結果から、この微弱発光はクロマツとマツノザイセンチュウとの間に起こる何らかの相互作用によって発生すると考えられた。現在までに報告された植物の防御応答に基づく微弱発光は、防御応答の比較的初期に生成する活性酸素種にリンクして発生する可能性が高いため (Abeles 1986 ; 加藤ら 2010), その発光ピークは防御応答誘導処理の 24 時間以内となっている (江原 1994 ; Iyozumi et al. 2002 ; Iyozumi et al. 2005 ; 影山ら 2007)。本研究での第 2 ピークの出現時間はこれよりも大幅に遅く、防御応答とは別の要因による可能性が高い。その要因として考えられることは、マツノザイセンチュウによるクロマツ組織への加害である。これは、生マツノザイセンチュウの接種でのみ、加害の結果生じるクロマツ組織の強い褐変が観察されたこと、さらに、死マツノザイセンチュウや上澄液の処理では第 2 ピークが認められなかったことから想定される。一方、微弱発光は生体の生理的变化によっても高まることが知られているが (Chwirot 1998), クロマツではマツノザイセンチュウ接種後の生理的变化の一つとして、エチレン生成量が接種の 3 日後には増大することから (森・井上 1986), こうした生理的变化も微弱発光の発生要因としての可能性があると考えられた。

微弱発光の増大にはマツノザイセンチュウによるクロマツ組織の加害に関連するという推察は、スギではマツノザイセンチュウを接種しても微弱発光の発生が蒸留水処理区と変わらないことや、抵抗性樹種であるテーダマツではクロマツほどの微弱発光の増大が認められないことから支持される。スギにマツノザイセンチュウを本研究と同様な方法で接種しても、接種の 10 日後まで褐変はほとんど認められなかったことが予備実験で確認されている。また、スギへマツノザイセンチュウを接種しても発病は認められない (清原・徳重 1971)。このことから、センチュウの組織への加害とそれによる損傷はスギではほとんど起こらないために、接種したスギからの微弱発光が高まらなかったと推察できる。一方、マツノザイセンチュウを接種するとテーダマツはクロマツと同様にエチレンを生成するが (森・井上 1986), 皮層部樹脂道の封鎖によりマツノザイセンチュウのすばやい封じ込めが起き、木部柔細胞の壊死がクロマツよりも少ないことが指摘されている (Yamada and Ito 1993a)。このような反応の速さの違いや壊死の程度が、テーダマツとクロマツの第 2 ピークの高さの違いに関連している可能性がある。

生マツノザイセンチュウのみならず、死マツノザイセンチュウや上澄液の接種でも第 1 ピークは認められることから、マツノザイセンチュウ由来の物質によりクロマツに何らかの生体反



応が誘起され、この微弱発光が発生するものと考えられた。ここで、各区の第1ピークの高さが異なっていたが、本研究ではそれについて詳細を明らかにできなかった。しかし、マツノザイセンチュウ由来でクロマツに発光を誘導する物質の種類や濃度が、試験区ごとに異なることが原因となっている可能性はある。イネではエリシター物質を処理すると、その処理の数時間以内に微弱発光が増大することが報告されている(Iyozumi et al. 2005; Kageyama et al. 2006)。もし、死マツノザイセンチュウや上澄液に抵抗性を誘導するエリシターが含まれていれば、第1ピークはイネの場合と同様にエリシターに起因するとも考えられる。しかし、一方で、マツノザイセンチュウの代謝産物や体構成成分はクロマツの抵抗性誘導に大きな役割を果たさないという報告があり(清原, 1985)、微弱発光の第1ピークがエリシターの作用と関連するかについては更なる検討が必要である。さらに、仮に第1ピークがエリシターの作用を反映しているとしても、発光強度が弱く、かつ、予備実験で抵抗性の強弱と無関係にクロマツから検出されるため、それを指標とした抵抗性の評価は困難であると判断された。

現在までに、植物と病原菌・害虫との相互作用により微弱発光の増大が確認されたものは、ササゲ・キュウリモザイクウイルス(江原, 1994)、サツマイモ・モザイクウイルス菌(Iyozumi et al. 2002)、トウモロコシ・ハスモンヨトウ(Yoshinaga et al. 2006)、リマ・メナミハダニ(岡部・甲斐 2010)などである。本研究により、マツノザイセンチュウをクロマツ枝片に接種すると、それらの相互作用により微弱発光が増大するという新たな知見が得られた。しかし、抵抗性評価に利用可能な防御応答を反映した発光パターンは得られておらず、現状では微弱発光に基づく抵抗性評価はできていない。この一つの原因として、本研究でのマツノザイセンチュウの接種では、それにより誘導される防御応答を示す細胞の数が多くなく、微弱発光の強度が弱すぎて検出できないことが考えられる。この解決には、防御応答を示す細胞数を増加させるセンチュウ接種方法の考案や、防御応答を誘導するセンチュウ由来のエリシター物質の探索とその利用が考えられ、今後、検討する必要がある。

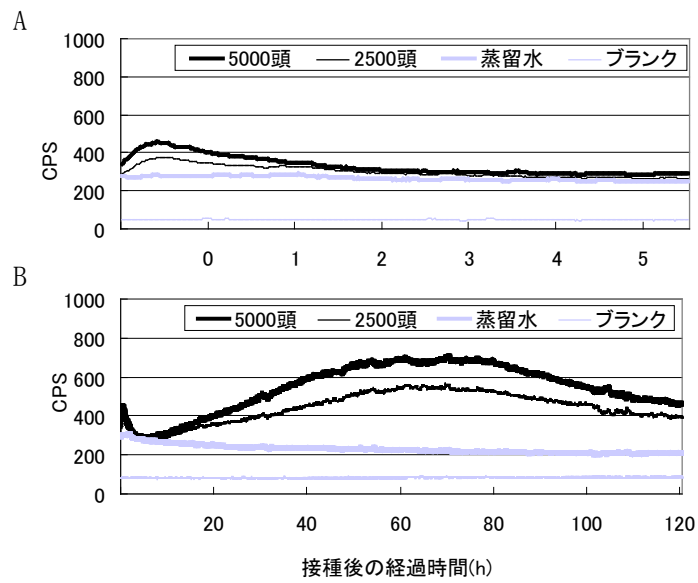


図 3-1 マツノザイセンチュウの接種頭数の違いによる微弱発光の発生パターン

(A) 接種 5 時間後まで (B) 接種 120 時間後まで

CPS は 1 秒当たりのフォトンカウント数を示す (Count per second)

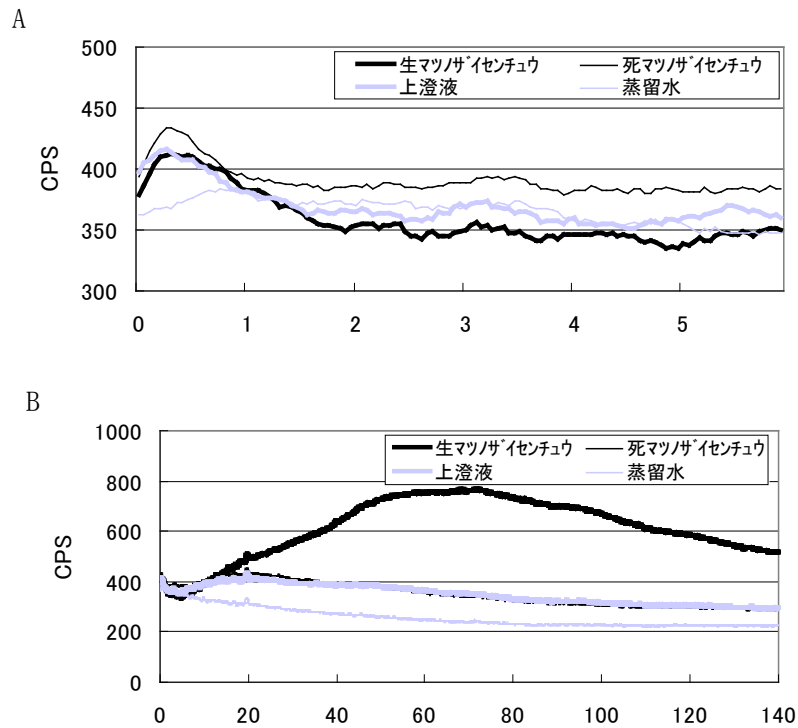
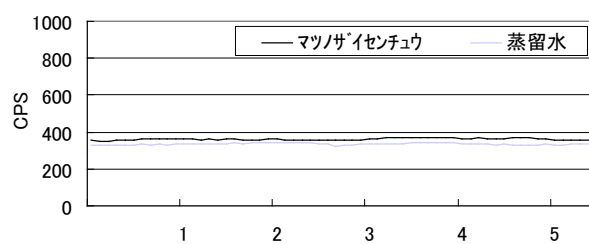


図 3-2 接種源の違いによる微弱発光の発生パターン

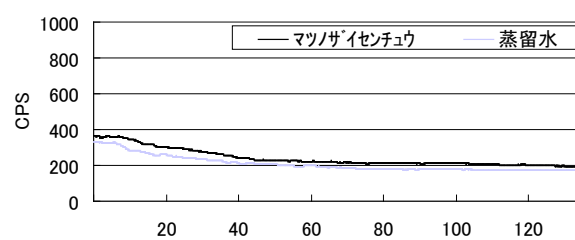
(A) 接種 5 時間後まで (B) 接種 140 時間後まで

## スギ

A

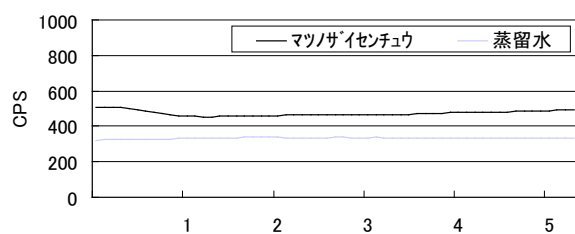


B

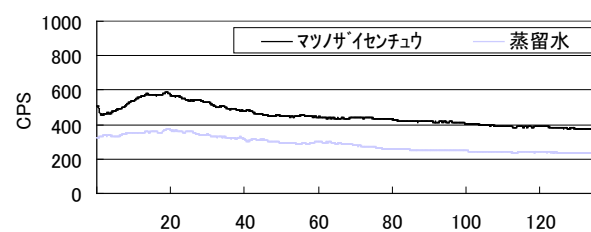


## テーダマツ

C

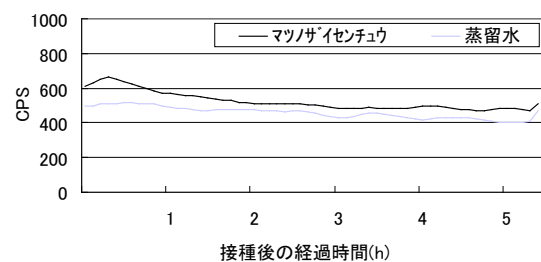


D



## クロマツ

E



F

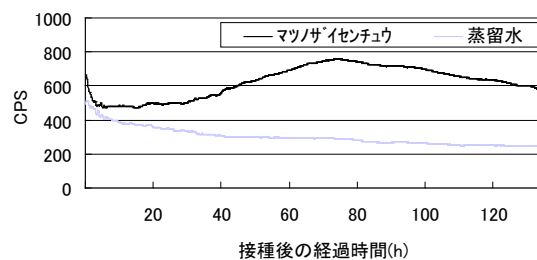


図 3-3 スギ，テーダマツおよびクロマツにマツノザイセンチュウを接種した場合の微弱発光の発生パターン

(A) スギ，接種 5 時間後まで (B) スギ，接種 135 時間後まで (C) テーダマツ，接種 5 時間後まで (D) テーダマツ，接種 135 時間後まで (E) クロマツ，接種 5 時間後まで (F) クロマツ，接種 135 時間後まで

表 3-1 接種源の違いによるクロマツ枝片の褐変程度

接種源	10 日後の褐変程度 <sup>※)</sup>		
	枝 1	枝 2	枝 3
生マツノザイセンチュウ	+++	+++	+++
死マツノザイセンチュウ	±	±	—
上澄液	±	±	±
蒸留水	±	—	—

※) 皮層切除面接種面の褐変割合を調査し、褐変程度として表した。

— : 0%, ± : 1~25%, + : 26~50%, ++ : 51~75%, +++ : 76~100%

## 第IV章 クロマツ実生苗の形態的特性と抵抗性との関係

### 1. はじめに

日本で甚大な被害を及ぼしているマツ材線虫病の対策として、マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業が進められた（藤本ら 1989；戸田 1997；戸田・寺田 2001）。感受性のアカマツやクロマツの中にも、マツノザイセンチュウを接種しても枯れない個体が存在することに基づき（大庭ら 1977）、この事業で選抜された抵抗性のアカマツとクロマツのそれぞれについて採種園が造成された。そこから得られた種子から育成された実生苗にマツノザイセンチュウの接種検定を行い、健全であったものを抵抗性苗として生産と普及が図られている。現在もマツ材線虫病の被害が続いている中で、東日本大震災以降は、海岸防災林の機能を高めるために、特にクロマツの需用が高まっており、その抵抗性苗の増産が求められている。

マツノザイセンチュウ接種後の苗の病徴発現には、温度、降水量、土壤水分などの環境条件が影響することが知られており、土壤が乾燥しやすい夏季にマツの枯死率が高まること（大山ら 1976）、苗の生存率と接種前後の累積降水量の間に相関があることなども報告されている（戸田 1997）。一方、マツノザイセンチュウ接種後の病徴発現に家系間差があることも明らかにされており、生存率や健全率によって、実生家系苗の相対的な抵抗性強度が暫定的に示されている（九州地区林業試験研究機関連絡協議会 1999；山本ら 2003）。

アカマツやクロマツにおいても、抵抗性を発揮する個体や家系では（大庭ら 1977）、マツノザイセンチュウが侵入しても樹体内で移動しにくく、その後の増殖が抑制される。したがって、マツノザイセンチュウ接種後に健全である個体は、移動・分散と増殖を抑制する何らかの要因が作用していると考えられる。マツノザイセンチュウの活性や増殖を阻害する化学物質については、樹種間で検討されているが（Yamada and Ito 1993b；Kuroda et al. 1991）、同一樹種内での比較は行われていないため、これについては今後明らかにしていく必要がある。一方、苗全身の抵抗性発現には、マツノザイセンチュウの移動を阻害する組織構造や一定以上の苗サイズが必要だと考えられており（山田 2006）、これらの要因について同一樹種内での比較が進められた。例えば、構造上の要因として、クロマツの抵抗性家系苗では非選抜苗よりも樹脂道の断面積が小さいこと（川口 2006）、アカマツでは、多くの分枝によりマツノザイセンチュウの移動経路となる樹脂道が複雑になることで、センチュウの移動が抑制されることが指摘されている（Kuroda 2004）。また、苗木のサイズに関しては、苗高の低いクロマツ苗は接種検定後

に枯死しやすいこと（袴田・近藤 2000；黒田ら 2007），同様に，クロマツの同一家系内の比較ではあるが，根元直径が細い苗は枯死しやすいことが報告されている（佐々木ら 2002）。さらに，樹齡（樹高）が上がるとマツノザイセンチュウの活動を抑制する家系もあり，選抜や検定時に供試苗の樹高や樹齡についても考慮が必要だと指摘されている（黒田ら 2007）。

これらの報告により，苗木の大きさや形態的な特徴は抵抗性発現の重要な要因であると予想される。もし，これらの要因が接種検定の結果に影響するのであれば，その形態的特徴を有する苗を選別し，優先的に接種検定に用いることにより，接種検定での健全率の改善が期待できる。しかし，これまでの報告は，抵抗性マツとして選抜された実生家系苗の中の極少数の家系と非選抜苗の比較であり，多くの抵抗性家系で比較検討した例はない。そこで本章では，西南日本で選抜された抵抗性クロマツの実生 15 家系について，接種時における苗木のサイズと分枝の数に着目し，健全苗と病徴発現苗（黒田ら 2007）との比較を行った。

## 2. 材料および方法

### （1）供試家系と苗のサイズ，輪生枝数の測定

抵抗性クロマツ 15 家系，すなわち，田辺-54 号，三豊-103 号，三崎-90 号，吉田-2 号，波方-37 号，波方-73 号，夜須-37 号，土佐清水-63 号，志摩-64 号，津屋崎-50 号，小浜-30 号，大瀬戸-12 号，大分-8 号，川内-290 号，願娃-425 号と非選抜家系を試験対象家系とした。抵抗性クロマツの種子は，静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター（静岡県浜松市浜北区）の抵抗性クロマツ採種園から採種した。非選抜家系の種子は，浜松市南区の中田島海岸のクロマツ林から採種した。播種から 11 ヶ月後の 2009 年 3 月上旬に，これらの実生家系苗を同センターの苗畑へ床替えし，同所で育苗した。志摩-64 号と非選抜家系はそれぞれ 29 個体，その他の 14 家系はそれぞれ 30 個体の計 478 個体を供試した。2009 年 7 月下旬（播種から 15.5 ヶ月後）に実生家系苗の苗高，根元径，輪生枝数を調査した。苗高の測定には竹尺を用い，根元径はデジタルノギスにより直交する 2 方向を測定し，その平均値を求めた。

同じ抵抗性家系について 2010 年には 29～32 個体を 3 月中旬（播種から 11.5 ヶ月後）に，2011 年には 22～36 個体を 3 月中旬（播種から 11.5 ヶ月後）に苗畑に床替えし，2009 年と同様の試験を行った。ただし，2010 年の非選抜家系の種子は静岡県大井川町のクロマツから採種したものとした。

## (2) マツノザイセンチュウの接種と生存・枯死の調査

2009 年, 2010 年, 2011 年のそれぞれの 7 月下旬に, 供試苗 478 個体, 498 個体, 514 個体の主軸地際部をナイフで剥皮し, 100 頭/ $\mu$ l の濃度に調整した強病原力マツノザイセンチュウ島原個体群 (戸田 1997) 5000 頭 (接種液 50  $\mu$ l) をマイクロピペットで接種した。マツノザイセンチュウは, 第 II 章と同様の方法で増殖した。接種日における最高気温は 2009 年, 2010 年, 2011 年のそれぞれで 29.5, 34.6, 23.0°C であった。各年の接種から 2 ヶ月後の 9 月下旬に苗を観察し, 病徴の発現が認められない健全苗, 葉の変色や一部の枯死が認められた苗, 枯死苗に分類した。変色および一部枯死苗と枯死苗を合わせて病徴発現苗として扱った (黒田ら 2007)。

## (3) データ解析

接種試験結果の全体的な傾向を把握するために, 全家系を含む苗の形態と抵抗性についてデータ解析した。接種試験を行った年ごとに, すべての供試苗をサイズと輪生枝数で階級別に分類した。すなわち, 苗高で 4 階級 ( $\leq 15$  cm, 16-20 cm, 21-25 cm,  $\geq 26$  cm) に分類し, 各階級で健全率を求めた。同様に, 根元径で 4 段階 ( $\leq 3.0$  mm, 3.1-4.0 mm, 4.1-5.0 mm,  $\geq 5.1$  mm), 輪生枝数でも 4 段階 (0 本, 1 本, 2 本,  $\geq 3$  本) に分類し, 階級別の健全率を求めた。なお, 区分する際に各階級で 20 個体以上となるように考慮した。供試した各家系の健全率 (%) は 健全苗数/供試苗数 $\times 100$  で算出した。加えて, 各家系内における健全苗と病徴発現苗で, 苗高, 根元径, 輪生枝数について, Mann-Whitney の  $U$  検定で比較した (家系内での比較分析)。

苗の抵抗性に影響する要因を明らかにするため, 統計ソフトウェア 'R' (version 2.15.1.) を用いて, 説明変数を環境要因 (接種年), 家系, 苗高, 根元径, 輪生枝数とし, 病徴発現の有無を目的変数として, ロジスティック回帰分析を行なった。病徴発現の有無は二項分布なので, リンク関数は 'logit' とした。

$$\text{logit (病徴発現の有無)} = \beta_0 + \beta_1 \times \text{接種年}_i + \beta_2 \times \text{家系}_i + \beta_3 \times \text{苗高}_i + \beta_4 \times \text{根元径}_i + \beta_5 \times \text{輪生枝数}_i \quad (1)$$

ここで,  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$  は, それぞれ, 切片, 接種年, 家系, 苗高, 根元

径，輪生枝数の効果を示す。

解析によって導かれる分散分析では Type II 検定を使い，逸脱度を算出し（今泉 2010），説明変数のすべての組合せについて交互作用も求めた。 $p$  値から判断した有意性によって，目的変数に対する各説明変数の影響を判断した。

### 3. 結果

#### （1）抵抗性クロマツの家系別健全率

接種検定による健全率は 3 年間で大きく異なった。2009 年は，非選抜家系を含む供試した 16 家系の健全率は 10.0～80.0% の範囲にあり，全苗の平均は 36.4% であった（図 4-1）。2010 年の健全率は 13.8～83.9% で全苗平均は 41.8%，2011 年は 40.9～100.0% で全苗平均は 73.3% であった。2009 年は津屋崎-50 号，波方-73 号，土佐清水-63 号が健全率の高い家系で，いずれも 60% 以上であり，川内-290 号，穎娃-425 号，波方-37 号は健全率が低く，これらは 15% 以下であった（表 4-1）。同年の非選抜家系は健全率 17.2% であった。2010 年に健全率の高かった家系は波方-73 号，小浜-30 号，波方-37 号で，大分-8 号，夜須-64 号は健全率が低かった（表 4-2）。2011 年は過去 2 年よりも健全率が高く，特に波方-73 号は 100% であった（表 4-3）。この年に健全率 50% を下回った家系は大瀬戸-12 号のみであった。

#### （2）接種検定苗の苗高と健全率

2009 年における 16 家系 478 個体の接種検定直前の苗高は 7～35cm で，全苗の平均は 18.0cm であった。15cm 以下に階級分けした苗の健全率は 27.3% で，苗高の階級が大きくなるにしたがい健全率も上昇し，26cm 以上の階級では 69.2% に達した（図 4-2）。穎娃-425 号と小浜-30 号の苗高は，病徴発現苗の平均値が健全苗の平均値よりも大きかったが，他の 14 家系では健全苗の平均値が病徴発現苗よりも大きく，津屋崎-50 号と大瀬戸-12 号は Mann-Whitney の  $U$  検定で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )（表 4-1）。

2010 年と 2011 年の全苗の平均苗高はそれぞれ 20.8cm と 18.6cm で，2009 年の平均よりも大きかった。2009 年の傾向と同様に，2010 年と 2011 年においても苗高が大きくなるにしたがい健全率は高まった（図 4-2）。2010 年は 11 家系，2011 年は 14 家系で健全苗の平均苗高が病徴



発現苗よりも大きかった。このうち数家系では有意差が認められた(表 4-2, 3)。

### (3) 接種検定苗の根元径と健全率

2009 年の全苗の根元径は 2.0~7.4mm に分布しており, それらの平均は 4.21mm であった。根元径 3.0mm 以下の階級では健全率が 16.7%であったが, 根元径が大きい階級になるほど健全率が高まり, 5.1mm 以上の個体では 53.3%であった(図 4-3)。潁娃-425 号, 三崎-90 号, 吉田-2 号, 小浜-30 号以外の家系では, 健全苗の平均根元径は病徴発現苗の平均根元径を上回っており, このうち大瀬戸-12 号は有意差が認められた( $p < 0.05$ ) (表 4-1)。

2010 年と 2011 年も根元径が大きくなるにしたがい健全率が高まった。2010 年は, すべての家系で健全苗と病徴発現苗の平均根元径に有意差がなかった(表 4-2)。2011 年は, 5 家系のみで健全苗の平均根元径が病徴発現苗を有意に上回った( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) (表 4-3)。

### (4) 接種検定苗の輪生枝数と健全率

供試したすべての苗の輪生枝数は, 2009 年が 0~5 本で平均 0.5 本, 2010 年が 0~6 本で平均 1.7 本, 2011 年が 0~5 本で平均 1.0 本であった。全年において, 1 本以上の輪生枝を持つ苗の健全率は輪生枝を持たない苗の健全率よりも大きかった(図 4-4)。しかし, 2009 年と 2010 年においては, 輪生枝数が増加しても必ずしも健全率は大きくならなかった。各年において, 数家系でのみ健全苗の輪生枝数は病徴発現苗のそれを有意に上回った(表 4-1, 2, 3)。

### (5) 抵抗性に関与する要因

3 年間のすべての家系を含む全データのロジスティック回帰分析の結果, 接種年, 家系, 苗高, 根元径の  $p$  値は, それぞれ  $< 2.2 \times 10^{-16}$ ,  $< 2.2 \times 10^{-16}$ , 0.0138, 0.0047 であり, これら 4 つの要因はマツノザイセンチュウ接種後の苗の抵抗性に関与していた(表 4-4)。しかし, 輪生枝数は抵抗性に関与していなかった( $p > 0.05$ )。環境(接種年)と家系の交互作用が有意で( $p < 0.05$ ), これは, 家系の抵抗性は年によって変動することを示していた。同様に, 根元径と接種年の交互作用が有意であったことから( $p < 0.05$ ), 根元径の影響は環境によって変わることが示唆された。

#### 4. 考察

第Ⅱ章では、マツノザイセンチュウ接種後のクロマツ枝片の褐変に至る日数、すなわち、組織変性の速さにはクローン間差や家系間差があることを明らかにしたが、その性質は、ポット苗の枯死に至る日数には影響するものの、苗畑における接種検定の結果としての苗全身の抵抗性とは相関が低く、抵抗性強度の家系間差を決める重要な要因ではないと考えられた。これまでの研究から、抵抗性樹種は感受性樹種よりも、また、感受性樹種の抵抗性家系は非選抜苗よりもマツノザイセンチュウの移動と増殖が抑制されることが明らかにされている (Kuroda et al. 1991 ; 川口 2006 ; 黒田ら 2007)。したがって、マツノザイセンチュウ侵入後の個体の最終的な生存あるいは枯死を決定する要因を明らかにするためには、組織レベルで発揮される抵抗性よりも移動・分散と増殖を抑制する全身的な機構の解明が重要であり、その量的あるいは質的な違いが健全率や生存率の家系間差につながると考えられる。このような全身的な抵抗性機構の発揮には、センチュウの移動を阻害する組織構造や一定以上の苗サイズが必要であると推察されている (山田 2006)。したがって、苗木の生存や枯死に関わる要因の中でも、苗のサイズや形態的特徴の影響をまず把握しておく必要があるが、これらの要因は測定が容易であるにもかかわらず、マツノザイセンチュウ接種後の苗木の病徴発現との関係は詳細に分析されていないかった。

本研究では、全供試家系の平均健全率が3年間の試験で36.4~73.3%と大きく変動し、加えて健全率の家系別順位も接種試験を行った年ごとに異なった。このような傾向は、戸田(1997)の報告と一致しており、クロマツ1年生苗の抵抗性は環境の影響を強く受ける結果となった。健全率に対する苗のサイズの影響については、佐々木ら(2002 私信)によると、クロマツ家系とマツノザイセンチュウ分離株の24組み合わせ中21組合せで、接種検定時の2年生(満1年生、播種から16ヵ月後)苗の根元径は、健全苗が枯死苗よりも大きいことが観察されている。しかし、半分以上の組合せで、苗高と健全率の間には関係は認められなかったとしている。森ら(2007)は、健全苗は病徴発現苗よりも有意に苗高が大きいと報告しているが、この中ではクロマツ家系の影響については触れていない。これから判断すると、接種検定における苗の健全率と苗高や根元径との関係について、家系を考慮した結論付けとなっていないと考えられ、より詳細なデータ解析が必要である。本研究では、各接種年において家系内の分析により、健全苗と病徴発現苗の苗高または根元径を比較したところ、いくつかの家系のみが有意であった

が、これまでの研究から予測されるとおり、この方法では明確な結論を出すことができなかった。

ロジスティック回帰分析は、複数のパラメーターを同時に解析することができ、目的変数に影響する説明変数を明らかにするのに役立つ（森ら 2007）。この手法でデータ解析すると、環境要因（試験年）、家系、苗高、根元径が有意に苗木の抵抗性に関与していた。戸田(1997)は、接種検定の生存率は家系間と環境要因によって異なることを明らかにしており、家系と環境の交互作用があることも示唆している（戸田ら 1993）。本研究の分析結果は、このような示唆を強く支持するものであった。また、根元径は環境要因と有意な交互作用が認められたが（ $p<0.05$ ）、苗高は他の要因との交互作用がなく、2年生（満1年生）苗の苗高は、マツノザイセンチュウ接種検定時の抵抗性に独立的に関与していると結論付けられた。したがって、苗高は、マツノザイセンチュウの接種検定にかけると苗を選別するための適切な指標になると考えられた。

マツノザイセンチュウの樹体内での移動と増殖は、アカマツやクロマツの病徴発現に関連しており（Kuroda 2004；黒田ら 2007）、苗の節における輪生枝数が多いと皮層樹脂道が湾曲し、この構造はマツノザイセンチュウの移動を制限すると考えられている（川口 2006）。例えば、アカマツの抵抗性 2 家系の 4 年生苗では、非選抜の苗よりも多くの輪生枝が着生しており（Kuroda 2004）、主軸に多くの枝が着くことにより樹脂道が複雑な配置となっている。さらに、輪生枝数の多い 5 年生の非選抜苗では、葉の退色が遅れる傾向にあると報告されている（川口・市原 2010）。しかし、16 家系を用いた 3 年間に渡るデータをロジスティック回帰分析した本試験の結果では、クロマツ 2 年生（満 1 年生）苗の輪生枝数は抵抗性とは関係がなかった。4～5 年生苗よりも 2 年生（満 1 年生）苗では輪生枝着生部位の樹脂道の構造が複雑でない可能性もあるが、Mori et al. (2008) は、マツノザイセンチュウの樹体内での移動が遅いことよりも、増殖の抑制が結果的には抵抗性に結び付くことを示している。本研究の結果は、Mori et al. (2008) の考えを反映しているものと推察された。

3 年間に渡る本研究の結果、苗高 26cm 以上の苗は、接種検定において 60%以上の健全率を示したことから、接種検定には苗高の大きい 2 年生（満 1 年生）苗から優先的にかけることが望ましいと考えられた。苗高は測定が簡単に行えるため、接種検定での健全率の改善を容易に行うことができ、抵抗性実生苗の生産性向上に繋がることが期待される。しかし、苗の抵抗性

機構は全容が解明されておらず，成木になってからの抵抗性発揮についても明らかではなく，10 年生前後での調査も必要とされている（黒田 2007）。そのため，この試験の結果は 2 年生（満 1 年生）苗のみに適用すべきである。

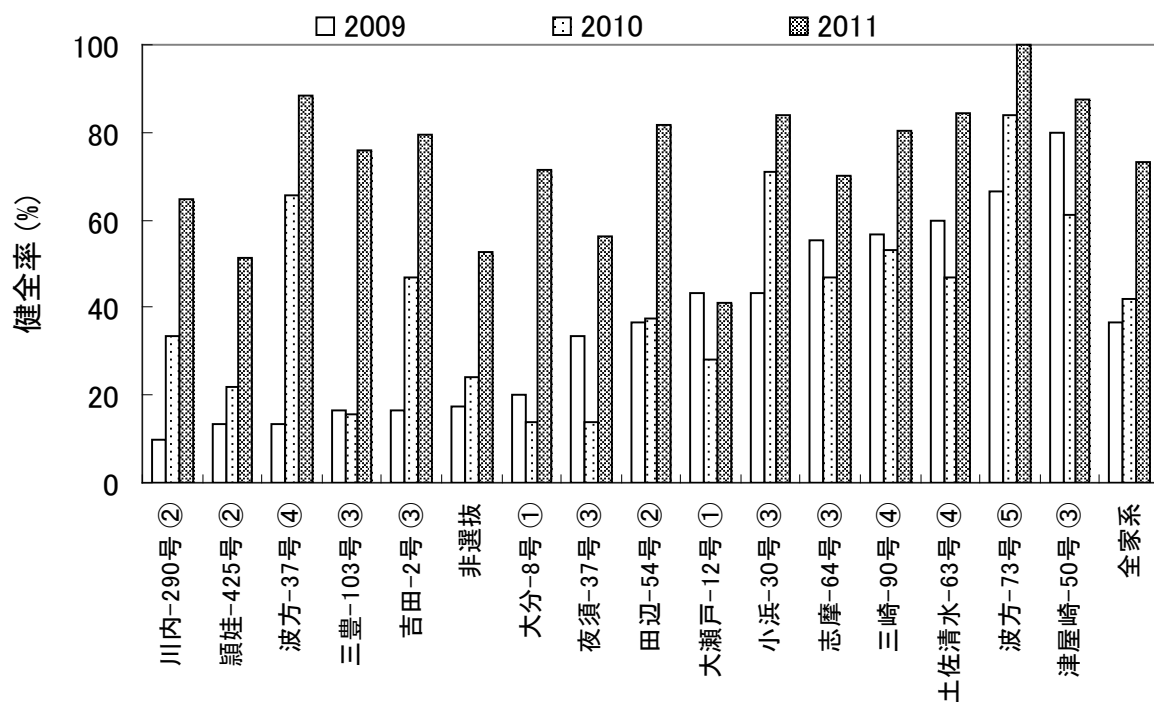


図 4-1 マツノザイセンチュウを接種した 2 年生（満 1 年生）抵抗性クロマツ家系苗の健全率

○内の数値は相対的な抵抗性評価（5 が最も抵抗性が強い 九州地区林業試験研究機関連絡協議会, 1999）

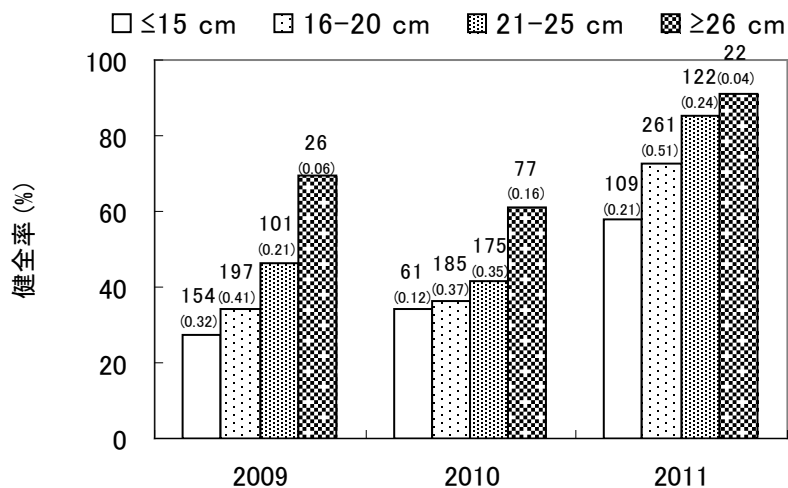


図 4-2 全供試家系を含めた各年の苗高階級別の健全率

バーの上の数値は各年における各階級の供試苗数とその比率

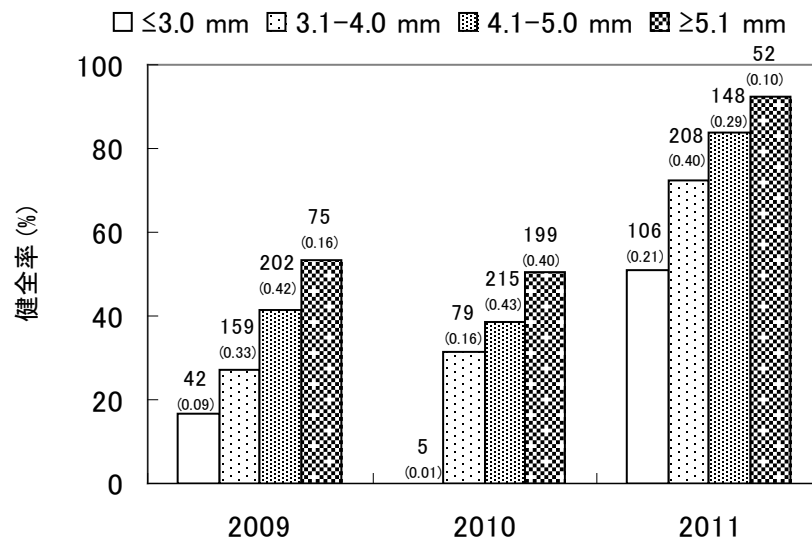


図 4-3 全供試家系を含めた各年の根元径階級別の健全率

バー上の数値は図 4-2 と同じことを示す

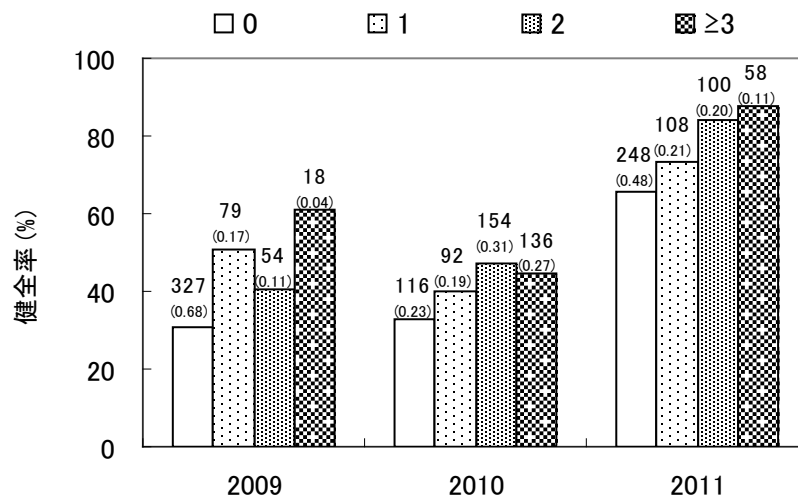


図 4-4 全供試家系を含めた各年の輪生枝数別の健全率

バー上の数値は図 4-2 と同じことを示す

表 4-1 2009 年の試験における家系別の健全率，樹高，根元径，輪生枝数

家系	供試数	健全率 (%)	樹高		根元径		輪生枝数	
			健全苗	病徴発現苗	健全苗	病徴発現苗	健全苗	病徴発現苗
川内-290 号	30	10.0	19.3 ± 3.5	19.1 ± 4.2	5.27 ± 0.77	4.36 ± 0.81	1.7 ± 1.2	0.4 ± 0.6*
頼娃-425 号	30	13.3	13.8 ± 1.9	16.5 ± 3.2*	3.98 ± 0.26	4.13 ± 0.66*	0.3 ± 0.5	0.04 ± 0.2
波方-37 号	30	13.3	16.5 ± 3.1	15.7 ± 3.4	3.94 ± 0.96	3.52 ± 0.73	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.5
三豊-103 号	30	16.7	21.6 ± 6.3	17.1 ± 5.0	4.32 ± 0.52	3.83 ± 0.85	0.2 ± 0.5	0.1 ± 0.4
吉田-2 号	30	16.7	17.6 ± 3.3	15.9 ± 3.4	3.32 ± 0.32	3.41 ± 0.70	0.2 ± 0.4	0.6 ± 0.9
非選抜	29	17.2	17.4 ± 2.7	15.8 ± 4.6	4.34 ± 0.55	4.07 ± 0.89	0.8 ± 1.1	0.4 ± 0.6
大分-8 号	30	20.0	17.2 ± 6.2	16.8 ± 3.9	4.34 ± 0.79	4.32 ± 0.67	1.0 ± 0.9	0.7 ± 0.9
夜須-37 号	30	33.3	19.8 ± 3.1	17.2 ± 3.6	4.27 ± 0.64	3.78 ± 0.75	0.5 ± 0.7	0.1 ± 0.3*
田辺-54 号	30	36.7	18.5 ± 3.7	15.9 ± 4.6	4.28 ± 0.57	3.72 ± 0.78	1.3 ± 1.7	0.3 ± 0.7
大瀬戸-12 号	30	43.3	20.5 ± 4.0	18.4 ± 2.3*	4.98 ± 0.62	4.32 ± 0.52*	0.5 ± 0.8	0.2 ± 0.5
小浜-30 号	30	43.3	18.9 ± 4.4	19.8 ± 4.4	4.56 ± 0.96	4.64 ± 0.81	0.8 ± 0.9	0.9 ± 1.1
志摩-64 号	29	55.2	17.9 ± 6.1	17.8 ± 5.7	4.71 ± 1.15	4.36 ± 1.02	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.6
三崎-90 号	30	56.7	21.0 ± 6.0	20.7 ± 6.6	3.82 ± 0.74	4.18 ± 0.80	0.2 ± 0.5	1.0 ± 1.2*
土佐清水-63 号	30	60.0	18.2 ± 3.8	16.2 ± 3.9	4.10 ± 0.56	4.05 ± 1.01	0.94 ± 1.1	0.92 ± 1.5
波方-73 号	30	66.7	19.7 ± 3.9	18.9 ± 4.0	5.16 ± 0.73	4.82 ± 1.20	1.15 ± 0.9	1.2 ± 1.1
津屋崎-50 号	30	80.0	21.7 ± 4.6	17.0 ± 2.5*	5.00 ± 0.74	4.13 ± 0.54	0.8 ± 1.0	0.3 ± 0.8

各家系における健全苗と病徴発現苗の有意差： \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Mann-Whitney の  $U$ 検定)

表 4-2 2010 年の試験における家系別の健全率，樹高，根元径，輪生枝数

家系	供試数	健全率 (%)	樹高		根元径		輪生枝数	
			健全苗	病徴発現苗	健全苗	病徴発現苗	健全苗	病徴発現苗
川内-290 号	30	33.3	25.6 ± 3.7	23.6 ± 3.7	5.25 ± 0.90	5.26 ± 0.91	1.8 ± 1.3	2.0 ± 1.2
顚娃-425 号	32	21.9	26.1 ± 4.6	22.0 ± 4.2*	5.16 ± 0.72	4.79 ± 0.81	1.4 ± 1.1	1.2 ± 1.2
波方-37 号	32	65.6	21.8 ± 3.7	21.9 ± 3.0	4.91 ± 0.69	5.18 ± 0.63	1.7 ± 1.2	2.5 ± 1.2
三豊-103 号	32	15.6	22.4 ± 3.5	18.3 ± 4.3*	5.22 ± 0.95	4.78 ± 0.96	1.0 ± 1.7	1.5 ± 1.3
吉田-2 号	32	46.9	23.3 ± 4.4	22.3 ± 3.4	4.83 ± 0.76	4.47 ± 0.49	1.5 ± 1.3	1.8 ± 1.6
非選抜	29	24.1	20.0 ± 4.0	20.0 ± 4.4	5.12 ± 0.76	4.55 ± 0.86	2.7 ± 1.1	1.3 ± 1.1*
大分-8 号	29	13.8	20.8 ± 3.8	18.0 ± 3.2	4.94 ± 0.93	4.46 ± 0.78	1.3 ± 1.0	1.6 ± 1.1
夜須-37 号	29	13.8	26.3 ± 4.9	20.2 ± 3.0*	5.13 ± 0.64	4.71 ± 0.69	2.0 ± 1.4	1.4 ± 1.2
田辺-54 号	32	37.5	17.8 ± 3.1	17.4 ± 3.1	4.49 ± 0.63	4.55 ± 0.78	1.92 ± 0.7	1.90 ± 1.8
大瀬戸-12 号	32	28.1	21.6 ± 4.5	22.0 ± 3.4	4.76 ± 0.80	4.96 ± 0.71	1.3 ± 1.3	2.3 ± 1.2
小浜-30 号	31	71.0	23.1 ± 5.0	22.2 ± 3.2	5.08 ± 0.86	5.09 ± 0.80	1.7 ± 1.2	1.6 ± 1.3
志摩-64 号	32	46.9	16.3 ± 3.7	17.4 ± 3.1	4.35 ± 0.89	4.24 ± 0.68	1.5 ± 1.3	0.8 ± 1.1
三崎-90 号	32	53.1	23.7 ± 5.0	23.1 ± 3.6	5.20 ± 0.68	5.11 ± 0.75	2.1 ± 1.2	1.7 ± 1.6
土佐清水-63 号	32	46.9	20.2 ± 3.0	18.2 ± 2.9	4.80 ± 0.64	4.61 ± 0.58	1.9 ± 0.8	1.7 ± 0.9
波方-73 号	31	83.9	20.7 ± 4.7	20.8 ± 3.6	5.59 ± 0.99	5.44 ± 0.78	2.4 ± 1.1	2.0 ± 1.4
津屋崎-50 号	31	61.3	21.7 ± 4.1	17.8 ± 4.4*	4.99 ± 0.60	4.20 ± 0.84	1.7 ± 1.2	1.5 ± 1.0

凡例は表 4-1 と同じ



表 4-3 2011 年の試験における家系別の健全率，樹高，根元径，輪生枝数

家系	供試数	健全率 (%)	樹高		根元径		輪生枝数	
			健全苗	病徴発現苗	健全苗	病徴発現苗	健全苗	病徴発現苗
川内-290 号	34	64.7	19.1 ± 3.6	17.8 ± 3.0	4.10 ± 0.91	3.55 ± 0.66	0.8 ± 1.0	0.6 ± 0.7
願娃-425 号	35	51.4	18.2 ± 2.9	16.6 ± 3.4	3.73 ± 0.86	3.16 ± 0.76	1.0 ± 1.0	0.5 ± 0.8
波方-37 号	34	88.2	20.4 ± 4.0	17.3 ± 3.8	4.06 ± 0.86	3.25 ± 0.97	0.8 ± 0.9	0.5 ± 0.6
三豊-103 号	33	75.8	20.5 ± 3.7	17.6 ± 5.1	4.41 ± 0.88	3.58 ± 1.02	1.9 ± 1.5	1.0 ± 1.1
吉田-2 号	29	79.3	21.3 ± 3.8	17.0 ± 3.2*	4.20 ± 0.69	3.62 ± 0.69*	1.30 ± 1.4	1.33 ± 1.5
非選抜	36	52.8	20.4 ± 3.9	19.1 ± 3.4	4.16 ± 0.66	3.53 ± 0.75	1.3 ± 1.3	0.9 ± 0.9
大分-8 号	35	71.4	20.4 ± 3.3	17.0 ± 3.8*	3.88 ± 0.62	3.34 ± 0.91	1.3 ± 1.2	1.0 ± 0.7
夜須-37 号	32	56.3	19.6 ± 4.7	18.1 ± 4.1	3.59 ± 0.97	2.83 ± 0.84*	0.8 ± 1.0	0.4 ± 0.9
田辺-54 号	33	81.8	17.3 ± 3.0	16.5 ± 5.0	3.72 ± 0.79	3.43 ± 0.82	1.0 ± 1.1	0.3 ± 0.5
大瀬戸-12 号	22	40.9	19.0 ± 2.5	15.0 ± 2.6*	4.29 ± 0.83	3.08 ± 0.61**	2.1 ± 1.3	0.2 ± 0.6**
小浜-30 号	31	83.9	19.7 ± 2.8	17.8 ± 3.6	4.25 ± 0.96	3.70 ± 1.26	1.4 ± 1.4	1.6 ± 1.5
志摩-64 号	30	70.0	18.7 ± 3.0	15.9 ± 1.5*	3.79 ± 0.79	3.02 ± 0.50*	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0*
三崎-90 号	36	80.6	19.4 ± 4.0	16.1 ± 3.1*	4.10 ± 0.83	3.51 ± 0.88	0.6 ± 0.9	0.3 ± 0.8
土佐清水-63 号	32	84.4	17.0 ± 3.2	15.6 ± 2.4	3.38 ± 0.68	2.52 ± 0.31**	0.7 ± 0.9	0.0 ± 0.0
波方-73 号	30	100.0	19.1 ± 3.9	-	4.32 ± 0.89	-	1.7 ± 1.1	-
津屋崎-50 号	32	87.5	16.9 ± 3.1	17.5 ± 2.5	3.59 ± 0.96	3.89 ± 1.08	1.0 ± 1.3	0.8 ± 1.0

凡例は表 4-1 と同じ

表 4-4 クロマツ苗の抵抗性に影響する要因のロジスティック回帰分析

(タイプ II 検定 分散分析表)

説明変数	逸脱度	自由度	有意確率 $\text{Pr}(> \chi^2)$
環境 (年次) (E) ***	203.871	2	$< 2.2 \times 10^{-16}$
家系 (F) ***	174.557	15	$< 2.2 \times 10^{-16}$
苗高 (H) *	6.063	1	0.0138
根元径 (D) **	8.007	1	0.0047
輪生枝数 (B)	0.277	1	0.5989
E $\times$ F*	44.907	30	0.0394
E $\times$ H	2.868	2	0.2383
E $\times$ D*	7.773	2	0.0205
E $\times$ B	0.259	2	0.8786
F $\times$ H	15.853	15	0.3919
F $\times$ D	10.332	15	0.7983
F $\times$ B	13.297	15	0.5794
H $\times$ D	0.033	1	0.8556
H $\times$ B	1.503	1	0.2202
D $\times$ B	0.444	1	0.5050

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

## 第V章 クロマツ挿し木発根性に関係する要因

### 1. はじめに

依然としてクロマツに甚大な被害をもたらしているマツ材線虫病の対策の一つとして、抵抗性クロマツの植栽が全国各地で事業的に行われている。抵抗性クロマツの実生苗とは、抵抗性クローンで構成された採種園由来の種子を播種・育苗し、それらにマツノザイセンチュウを接種して健全であった個体、すなわち抵抗性を確認した苗である。しかし、接種検定は夏季の高温下の作業となるうえ、健全率が平均 50%前後であり（戸田 1999）、その結果として苗木の価格が一般の苗に比べて高くなっている。また、接種検定する年の環境条件によって健全率が大きく異なることから（戸田 2004）、抵抗性の強度が安定していないことも指摘されている。これらの問題を改善するため、抵抗性が確認された苗木を母樹として、挿し木苗を増殖する方法が試られるようになった。クロマツは発根が容易ではないとされていたが（森下・大山 1972）、母樹によっては高い発根率が得られることが確認され（森ら 2004）、接種検定で生存した苗木を母樹とした挿し木苗にマツノザイセンチュウを接種した場合、健全率が高いことも明らかになっている（森ら 2006b）。そのため、苗の抵抗性を確認するために再び接種検定を行う必要がなく、実生苗検定と比較して生産コストが低く抑えられるという試算もあり（大平ら 2009）、抵抗性苗の新たな生産方法として期待されている。

クロマツの挿し木発根性には、用土の種類、発根促進剤の処理、挿し床や周囲の温湿度、照度などの外的な環境要因も影響するが、母樹が持っている遺伝的な要因や挿し穂の生理的特性も大きく関わっている。この中で、同じ母樹から採取した挿し穂でも、生理的な状態の違いが発根性に影響することが知られており、この現象は‘topophysis’と呼ばれている（Dodd and Power 1988）。その一例として、母樹の樹冠下部から採取した挿し穂は上部から採取した挿し穂よりも、発根性が高いことがいくつかの針葉樹で認められている（Foster et al. 1984 ; Morgenstern 1987 ; 前田ら 1997 ; Peer and Greenwood 2001）。さらに、同じ母樹の似たような樹冠位置から得られた挿し穂でも、その形状の違いによって発根率が異なることが知られている（Henry et al. 1992）。例えば、クロマツでは挿し穂の長さと基部の直径が発根性に影響することや（大平ら 2006 ; 渡部 2006）、挿し穂からの冬芽の摘芽により発根率が高まることが報告されている（佐々木ら 2004）。しかし、宮崎(2003)はクロマツ挿し穂の冬芽の摘芽は発根率に影響しないとしており、冬芽除去の効果は未だに明確にはなっていない。また、元々着

生している冬芽の数や挿し穂の重量、母樹樹冠からの挿し穂の採取部位などの要因について、クロマツは詳細に調査されていない。このような樹冠からの採穂部位や挿し穂の形態的特徴と発根性の関係を明らかにすることは、抵抗性クロマツの挿し木増殖方法の改善につながると期待される。

マツ類の挿し木では、発根しないうちは、挿し穂の冬芽が伸びて新梢となっても、そこから針葉は長く伸びない（森下・大山 1972）。この現象により、掘り取り前に発根の有無が容易に判別できると言われているが、発根した挿し穂を適切な時期に移植するためには、挿し穂の発根量を推定する必要がある。掘り取らないで発根したかを判別する手法として、挿し穂を上方に引っ張って抵抗があり、根とともに用土が持ち上がるものを発根したと見なす引き抜き法（森・宮原 2002）が提案されている。しかし、この方法は挿し穂に負荷がかかる上、発根量を把握することができないため、充分な方法であるとは言えない。もし挿し穂の針葉の伸びで発根量が推定可能であれば、針葉の伸びを観察するだけで十分な発根であるかを判定でき、より優れた方法となる。

これらの点を踏まえてクロマツの挿し木増殖技術を改善するために、本章では母樹からの採穂部位と挿し穂の生重量や冬芽数がクロマツ挿し木の発根率と発根量にどのような影響を与えるかを明らかにした。また、挿し穂の新梢から伸びる針葉の伸長程度と発根量との関係についても調査した。

## 2. 材料および方法

### （1）抵抗性クロマツの材料

抵抗性クロマツとして選抜されたクローンで構成されている採種園の母樹のうち、波方-37号、波方-73号、志摩-64号、田辺-54号、土佐清水-63号、津屋崎-50号から得られた自然交配種子を2010年3月に播種し、得られた苗を2011年3月に静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター（浜松市浜北区根堅）の苗畑に移植し、2年間育成した。これらのうち、1家系当たり17～19本の苗を試験用の採穂母樹とした（表5-1）。

### （2）挿し穂の準備と挿し付け、挿し床の環境

挿し木試験は2013年に行った。クロマツの挿し付けに適する2月中旬に（大平ら2007）、1

家系につき 17～19 本の剪定していない採穂母樹の樹冠上部からランダムに 25 本、下部からもランダムに 25 本、合わせて 50 本の挿し穂を採取し、6 家系で合計 300 本を準備した。採穂母樹の樹高は約 50～100cm であった。

挿し穂の長さは約 5cm とし、軸部に着生した上部 2cm の針葉を残し、それより下部の針葉は取り除いた。基部の返し切りを行い、各挿し穂の生重量、冬芽数を測定した（表 5-1）。採穂母樹の樹冠下部よりも樹冠上部は輪生枝の成長が旺盛なため、生重量や冬芽数は樹冠上部の挿し穂で大きくなった。

挿し穂を 4000ppm インドール酪酸水溶液に 5 秒間浸し（佐々木ら 2004）、これを育苗箱（縦 47cm、横 33cm、高さ 9cm）内の十分に吸水させた微粒鹿沼土（粒径約 2～3mm）に垂直に挿し付けた。挿し穂の調整と挿し付けは採穂の翌日までに行ない、密度は 1 箱につき 36 本とした。

挿し付けが終了した育苗箱をガラス室内のベンチ上に置き、日中は 25～30 分間隔で 25～30 秒のミスト灌水を行い、クロマツは陽樹であるため遮光はしなかった。灌水や光環境の違いを回避するため、育苗箱を 1 週間に 1 回の割合でローテーションした。試験期間中のガラス室内の気温は -2.0～40.7℃ であった。

### （3）針葉の長さ、発根の有無、発根量の測定

挿し付け後には、挿し穂の冬芽は徐々に伸長し新梢となる。この新梢から発生した最も長い針葉の長さを 10 月初旬（挿し付けの約 8 ヶ月後）に測定した。その後、挿し穂を育苗箱から掘り取り、発根の有無を確認した。これまでのクロマツ挿し木の研究では発根率に焦点を当てたものが多いが、この指標だけで発根性を評価するのは不十分である。発根量は挿し木苗の成長に影響するため、重要な指標だと考えられる（Struve et al. 1984）。そのため、挿し木苗の根量を測定した。まず、根系に付着した鹿沼土を水道水で十分に洗い流した後、タオルで水分を吸い取った。その後、水道水を 80ml 入れたメスシリンダ（100ml 容量）に根系部分を沈めて、増加する水量から根の体積を推定した（Kathiravan et al. 2009）。

### （4）データ解析

発根の有無（発根率）に関わる要因を明らかにするため、6 家系 300 本の挿し穂について、統計ソフトウェア ‘R’（version 2.15.1.）でロジスティック回帰分析を行なった。発根の有

無を応答変数とし、母樹の家系、母樹樹冠からの採穂部位、挿し穂の生重量、挿し穂の冬芽数を説明変数とした。発根の有無は二項分布であるため、‘Logit’をリンク関数として、次のようなモデル式を構築した。

$$\text{logit (発根の有無)} = \beta_0 + \beta_1 \times \text{家系}_i + \beta_2 \times \text{採穂部位}_i + \beta_3 \times \text{生重量}_i + \beta_4 \times \text{冬芽数}_i \quad (1)$$

ここで、 $\beta_0$   $\beta_1$   $\beta_2$   $\beta_3$   $\beta_4$  は、それぞれ、切片、家系、採穂部位、生重量、冬芽数の効果を示す。

また、発根が認められた 164 個体については、発根量に関するデータ解析を行なった。発根量を応答変数とした一般化線形モデル式を構築し、発根量はガンマ分布を示すため、リンク関数を‘log’とした。家系、採穂部位、生重量、冬芽数、新梢から伸びた最も長い針葉の長さを説明変数とした。

$$\log (\text{発根量}) = \beta_0 + \beta_1 \times \text{家系}_i + \beta_2 \times \text{採穂部位}_i + \beta_3 \times \text{生重量}_i + \beta_4 \times \text{冬芽数}_i + \beta_5 \times \text{針葉長}_i \quad (2)$$

ここで、 $\beta_0$   $\beta_1$   $\beta_2$   $\beta_3$   $\beta_4$   $\beta_5$  は、それぞれ、切片、家系、採穂部位、生重量、冬芽数、最も長い針葉長の効果を示す。

発根の有無と発根量について、それぞれロジスティック回帰分析と一般化線形モデルの解析をした後、応答変数に有意に影響する説明変数について、さらにデータ解析を進めた。発根の有無（発根率）については、母樹の樹冠の上部から採取した穂と下部から採取した穂について  $\chi^2$  検定で比較した。次に、母樹からの採穂部位ごと（樹冠上部、樹冠下部）に、発根量と最も長い針葉の長さとの相関を Spearman の順位相関係数で解析した。さらに、挿し穂の生重量に基づいて、挿し穂をほぼ同数となるように 3 階級（軽：55 本，中：55 本，重：54 本）に区分し、階級ごとに発根量と最も長い針葉の長さとの Spearman の順位相関係数を求めた。

### 3. 結果

#### （1）発根の有無に影響する要因

ロジスティック回帰分析の結果、母樹の家系 ( $p < 0.001$ ) と樹冠からの採穂部位 ( $p < 0.001$ ) は発根の有無 (発根率) に有意に関与する要因であった (表-2)。採穂部位は他の説明変数との交互作用が有意ではなかったが、家系は挿し穂の生重量と冬芽数のそれぞれについて有意な交互作用が認められた ( $p < 0.001$ )。

6 家系の発根率は 34.0～76.0% の範囲にあり、全家系 300 本の挿し穂の平均は 54.7% であった (表-1)。発根率は樹冠下部から取った挿し穂の発根率が 74.7% で、上部から採ったさし穂の 34.7% よりも 2 倍以上大きく、 $\chi^2$  検定で有意差が認められた ( $p < 0.001$ )。

## (2) 発根量に影響する要因

発根量の家系別平均は 2.60～3.41cm<sup>3</sup> で、供試した 6 家系の全平均は 3.17cm<sup>3</sup> であった (表-1)。一般化線形モデル (GLM) による解析の結果、挿し床からの掘り取り時に、挿し穂の新梢から伸びた最も長い針葉の長さは、発根量に有意に関与する要因であった ( $p < 0.001$ ) (表 5-2)。しかし、家系、樹冠からの採穂部位、挿し穂の生重量、冬芽数は発根量に関与する要因ではなかった。針葉の長さとは採穂部位、針葉の長さと生重量には有意な交互作用が認められたことから (それぞれ  $p < 0.05$ )、さらに解析を進めた。針葉の長さと発根量の相関係数は、母樹の樹冠上部から採取した挿し穂で  $r_s = 0.723$ , ( $p < 0.001$ )、樹冠下部から採取した挿し穂で  $r_s = 0.402$ , ( $p < 0.001$ ) となり、それぞれ有意であった (図 5-1 A, B)。また、挿し穂の生重量が軽い階級で  $r_s = 0.317$  ( $p < 0.05$ )、中位の階級で  $r_s = 0.446$  ( $p < 0.01$ )、重い階級で  $r_s = 0.700$  ( $p < 0.001$ ) となり、いずれも有意性が認められた (図 5-2 A, B, C)。これらの解析により、針葉の長さと発根量との間に有意な正の相関があることを確認できた。

## 4. 考察

挿し木増殖において高い得苗率を得るためには、高い発根能力を有する母樹から採穂することが重要である。クロマツでは家系によって発根能力に差があることが知られているが (大平ら 2006)、これは他のマツ属樹種においても同様である (Baltunis et al. 2005)。本研究においても、これらの報告から予想されるとおり、採穂母樹の家系間で発根率は異なった。一方、造林木として重要な樹種では、母樹からの採穂部位は挿し木を成功させる重要な要因の一つとなっている。米ツガ (*Tsuga heterophylla* (Raf.) Sang. - Foster et al. 1984)、メタセコイ

ア (*Metasequoia glyptostroboides* - 小笠原・四手井 1966), クロトウヒ (*Picea mariana* (Mill.) B. S. P - Tousignant et al. 1995), フラセリーモミ (*Abies fraseri* (Pursh) Poir - Rosier et al. 2006), カラマツ属の樹種 (*Larix* spp. - Peer and Greenwood 2001), ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* - 前田ら 1997) では, 採穂母樹の樹冠下部から採取した挿し穂が高い発根率を示すと報告されている。本試験で採穂母樹としたクロマツは3年生であり, これらの報告にある他の樹種よりも若齢でサイズが小さい母樹だと考えられるが, それでも他の樹種と同様に樹冠からの採穂部位は有意に, そして独立的に発根率に関与しており, 樹冠下部の挿し穂は上部の挿し穂よりも発根率が高い結果となった。

クロマツ以外の針葉樹で, 樹冠からの採穂部位によって発根能力が異なるのは, さまざまな成長促進物質や発根阻害物質の量的な影響によるものと考えられている。例えばメタセコイアでは, 樹冠下部から採取した発根能力の高い挿し穂は植物ホルモンの量が多いとされている (小笠原・四手井 1966)。ヒノキでは, 発根を抑制すると考えられるタンニンが下部枝で少ないと報告されている (橋詰・谷口 1981)。Browne et al. (1996) は, バンクスマツ (*Pinus banksiana* Lamb.) において, 母樹樹冠からの採穂部位によって挿し穂の栄養状態が異なることを見出している。さらに, Tousignant et al. (1995) は, 樹冠の部位によって植物組織の生理的な熟度が異なることを指摘しており, 樹冠上部は熟度が進み, 下部は生理的に幼齢段階に近いとしている。コウヤマキ (*Sciadopitys verticillata* (Thunb.) Sieb. et Zucc.) では, 庇陰された採穂母樹から得られる挿し穂は発根率が高まり, 挿し穂に当たる日光は発根性に対して負の効果を及ぼすことが示唆されている (Yates et al. 2006)。

本研究において, 樹冠上部と下部から採取した挿し穂で発根率が大きく異なった理由は明らかではないが, クロマツでも樹冠の位置によって成長促進物質や発根阻害物質の量が異なり, 生理的な熟成度が異なる可能性はある。また, 下部枝の庇陰や挿し穂の養分の状態が影響しているかもしれない。今後, 発根性に影響するこれらの要因を調査していく必要があるが, 本研究の結果から, 3年生のクロマツ母樹においては, 樹冠下部からの採穂が発根率を高めるために有効であることが示された。しかし, Browne et al. (1996) は, バンクスマツのさまざまな樹齢の母樹を使った挿し木試験で, 樹冠下部の挿し穂の発根率は必ずしも上部の挿し穂よりも高くないことを報告している。クロマツにおいても, より樹齢の高い母樹を使つての確認試験が必要である。



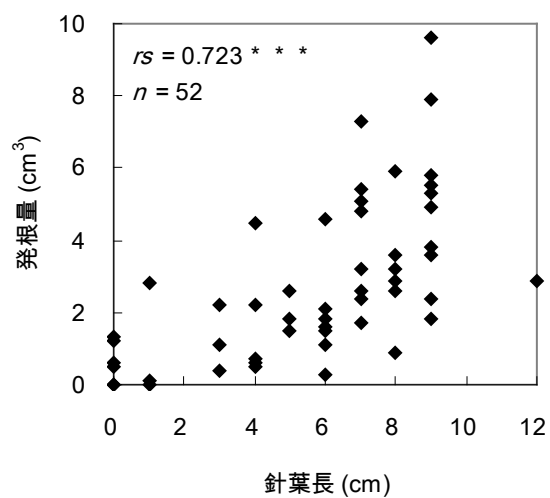
効率的な挿し木増殖には、適切なサイズの挿し穂を用いることが重要となっている (Kathiravan et al. 2009)。大平ら (2006) は、クロマツの小サイズの挿し穂 (平均穂長 3.9cm, 平均基部直径 3.8mm) は、中サイズ (平均穂長 7.0cm, 平均基部直径 4.5mm) や大サイズ (平均穂長 12.3cm, 平均基部直径 7.6mm) の挿し穂よりも高い発根率であったことを報告している。本試験では、5cm 長の挿し穂の生重量が発根に与える影響を調査したが、挿し穂の生重量は発根率のみならず発根量にも影響していなかった。大平ら (2006) の報告には、挿し穂の生重量は記載されていないので、本研究における生重量との比較は正確にはできない。しかし、挿し穂の長さと基部の直径から判断して、本研究よりも幅広い範囲の生重量の挿し穂を扱っていると考えられる。このような違いが結果の違いに影響していると推察された。

挿し穂からの冬芽除去の影響について過去に 2 つの報告があるが (宮崎 2003, 佐々木ら 2004), 本研究では、発根率や発根量への冬芽数の影響は認められず、クロマツにおいて冬芽の除去は発根率に影響しないという宮崎 (2003) の結果を支持するものであった。

Rosier et al. (2006) は、バージニアマツ (*Pinus virginiana* Mill.) で、挿し付け時の挿し穂の一次針葉の長さは発根率と発根した根の長さに関係することを見出した。森下・大山 (1972) は、たとえ新梢が伸びても、発根していないマツの挿し穂では針葉が伸びないことを指摘している。これらの知見に加えて、本研究では、クロマツにおいて若い母樹を利用した場合には、掘り取り時の最も長い針葉の長さが発根量と相関することを明らかにした。この結果は、針葉の葉長は、掘り取りしなくても発根量を予測できる優れた指標であることを示している。これに基づき、適切な時期に挿し穂の掘り取りや移植をすることが可能となり、発根苗の育成を改善することができる。

以上のように本章では、若いクロマツ母樹からの挿し木において、発根性に影響する要因および針葉の成長と発根量の関係を明らかにした。クロマツの挿し木増殖は困難だとされていたが、これらの結果は、実用的なクロマツの挿し木苗生産に大きく貢献できると考えられた。

A



B

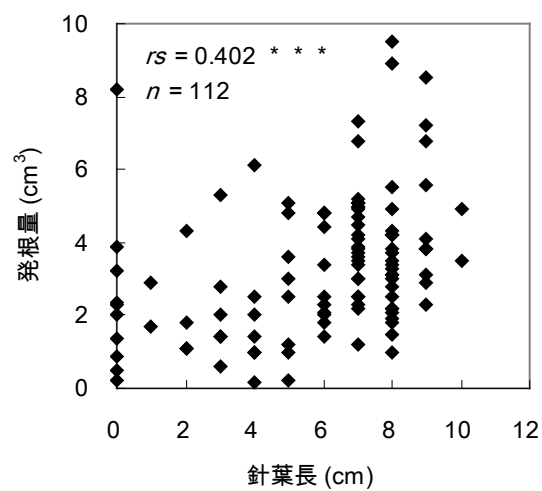
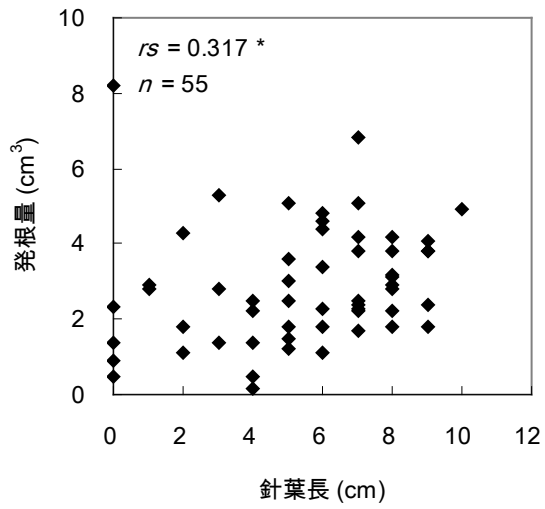


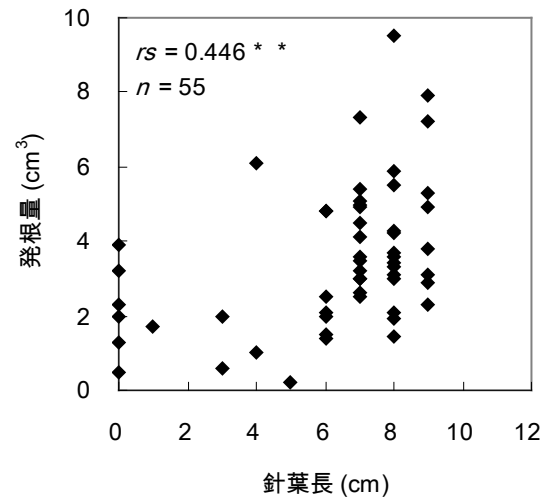
図 5-1 採穂部位別の針葉の長さと発根量の相関関係

母樹からの採穂部位別に解析した。(A) 採穂母樹の樹冠上部から採取した挿し穂, (B) 採穂母樹の樹冠下部から採取した挿し穂 \*\*\*は Spearman の順位相関係数で有意性があることを示す ( $p < 0.001$ )。

A



B



C

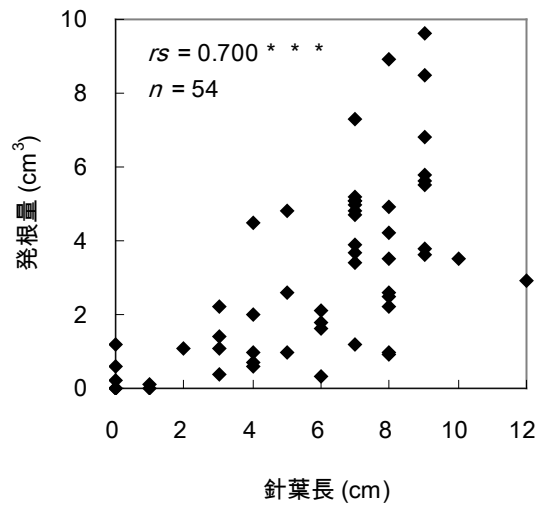


図 5-2 挿し穂生重量別の針葉の長さとの発根量の相関関係

挿し穂の生重量で 3 階級に分けて解析した。(A) 軽い階級, (B) 中位の階級, (C) 重い階級

Spearman の順位相関係数で, \*, \*\*, \*\*\* はそれぞれ, ( $p < 0.05$ ), ( $p < 0.01$ ), ( $p < 0.001$ ) で有意性があることを示す。

表 5-1 クロマツ挿し木試験のデータ

母樹の家系	母樹数	上部枝					下部枝					全体	
		挿し穂数	生重量(g)	冬芽数	発根率 (%)	発根量 (mm <sup>3</sup> )	挿し穂数	生重量(g)	冬芽数	発根率 (%)	発根量 (mm <sup>3</sup> )	発根率 (%)	発根量 (mm <sup>3</sup> )
波方-37号	18	25	8.5 ± 2.3	4.7 ± 1.5	60.0	2.20 ± 1.73	25	6.7 ± 1.8	3.1 ± 1.4	92.0	4.19 ± 1.79	76.0	3.41 ± 2.00
波方-73号	18	25	7.2 ± 2.7	4.6 ± 1.4	36.0	3.05 ± 2.84	25	4.8 ± 1.6	3.1 ± 1.5	80.0	3.34 ± 2.12	58.0	3.25 ± 2.32
志摩-64号	19	25	6.7 ± 2.9	4.1 ± 1.6	40.0	3.52 ± 2.79	25	5.5 ± 1.6	3.6 ± 1.5	88.0	3.04 ± 1.58	64.0	3.19 ± 2.00
田辺-54号	17	25	7.9 ± 2.0	5.3 ± 1.4	16.0	1.95 ± 1.92	25	5.1 ± 1.7	3.2 ± 1.8	84.0	2.73 ± 1.32	50.0	2.60 ± 1.41
土佐清水-63号	18	25	4.7 ± 1.6	4.0 ± 1.6	24.0	2.67 ± 1.88	25	4.7 ± 1.4	3.0 ± 1.5	44.0	3.40 ± 1.78	34.0	3.14 ± 1.79
津屋崎-50号	18	25	7.6 ± 2.8	4.6 ± 1.6	32.0	2.91 ± 1.93	25	6.3 ± 1.9	4.6 ± 1.7	60.0	3.52 ± 2.60	46.0	3.31 ± 2.36
合計 (平均)	108	150	7.1 ± 2.7	4.6 ± 1.6	34.7	2.75 ± 2.20	150	5.5 ± 1.8	3.4 ± 1.6	74.7	3.37 ± 1.89	54.7	3.17 ± 2.01

2013年2月の第3週に挿し付け、33～34週後に掘り取り調査した。  
 平均値 ± 標準偏差で示した。

表 5-2 発根の有無と発根量に関するロジスティック回帰分析と一般化線形モデルによる解析結果 (タイプ II 検定 分散分析表)

応答変数	説明変数	逸脱度	自由度	有意確率 $\text{Pr}(>\chi^2)$
発根の有無	家系 (F) ***	34.533	5	$1.865 \times 10^{-6}$
	母樹樹冠からの採穂部位 (C) ***	40.292	1	$2.187 \times 10^{-10}$
	挿し穂の生重量 (W)	1.715	1	0.190
	挿し穂の冬芽数 (B)	1.729	1	0.188
	F $\times$ C	5.599	5	0.347
	F $\times$ W ***	20.978	5	0.001
	F $\times$ B ***	24.188	5	$1.998 \times 10^{-4}$
	C $\times$ W	0.010	1	0.921
	C $\times$ B	0.936	1	0.333
	W $\times$ B	0.058	1	0.810
発根量	家系 (F)	2.269	5	0.811
	母樹樹冠からの採穂部位 (C)	2.035	1	0.154
	挿し穂の生重量 (W)	0.039	1	0.843
	挿し穂の冬芽数 (B)	0.224	1	0.636
	針葉の長さ (N) ***	48.221	1	$3.809 \times 10^{-12}$
	F $\times$ C	4.884	5	0.430
	F $\times$ W	3.125	5	0.681
	F $\times$ B	4.585	5	0.469
	F $\times$ N	6.220	5	0.285
	C $\times$ W	0.569	1	0.451
	C $\times$ B	0.634	1	0.426
	C $\times$ N*	4.890	1	0.027
	W $\times$ B**	8.160	1	0.004
	W $\times$ N*	6.093	1	0.014
	B $\times$ N 5	1.572	1	0.210

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

## 第Ⅵ章 総合考察

依然としてマツ材線虫病の被害が続いている中で、海岸防災林の機能を高めるためには、抵抗性クロマツの植栽は有効である。そのため、本研究ではマツ材線虫病抵抗性苗の効率的な生産方法の開発を行い、その結果得られた研究成果及び今後の課題について、全体を取りまとめたものを図 6-1 に示した。

抵抗性のクロマツやアカマツは、マツ材線虫病の激害地で生き残った個体を接ぎ木増殖し、一次検定では抵抗性樹種のテーダマツの 8 週間後の健全率または生存率と同等かそれ以上、二次検定では 6 週間後の健全率または生存率がテーダマツの 60%以上という基準で選抜されている（戸田 1997）。これに合格し、品種として認定されたクローンで構成される採種園由来の実生苗の抵抗性は一様ではなく、家系によって異なり、その抵抗性強度は多くの場所における複数年次の調査により評価されている（九州地区林業試験研究機関連絡協議会 1999；山本ら 2003）。この評価は母樹となっているクローンそのものの抵抗性強度を示しているものではないが、クローンの抵抗性強度にも差異があり、それらの組織レベルの変性の速さにも違いがあることは十分に予想される。本研究では、マツノザイセンチュウ接種後のクロマツ枝片の褐変に至る日数で、組織変性の速さを評価したが、クローンと実生家系苗との間には組織変性の速さに正の相関が認められることから、これは遺伝的な性質であると考えられた。

この組織レベルの抵抗性を指標として樹体全身の抵抗性が評価可能であれば、苗畑で盛夏に行なう接種検定作業を簡略化できるため、本研究では、組織の抵抗性と全身の抵抗性との関係を検討した。その結果、組織変性の速さは、ポット苗を使った試験での苗木の枯死に至る日数と相関していたが、苗畑での接種検定による最終的な健全率や、九州地区林業試験研究機関連絡協議会（1999）による実生家系苗抵抗性強度とは相関が認められなかった。この結果から、組織の抵抗性よりもマツノザイセンチュウの移動・増殖を阻害する全身的な抵抗性機構が、苗の健全率に影響していることが示唆された。また、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの選抜を、組織からの微弱発光の測定によって行う新たな評価手法の開発を試みたところ、クロマツ組織からは初となる微弱発光の発生が認められた。発光はマツノザイセンチュウによる加害が主原因であり、組織のダメージを微弱発光で捉えることが可能であった。しかし、マツノザイセンチュウに対する組織の防御応答を反映する発光パターンは現状では得られておらず、微弱発光測定によるマツノザイセンチュウ抵抗性の判定は困難であった。

組織を用いた抵抗性評価では、クロマツの組織変性と苗の枯死に至る日数との相関関係や、センチュウの加害による微弱発光の発生という新たな知見を得られたが、組織の抵抗性に基づき苗全身の抵抗性を評価することはできなかった。接種検定における苗の健全率に強く影響するのは、マツノザイセンチュウの移動・増殖を阻害する抵抗性機構であるため、組織の抵抗性評価で苗全身の抵抗性を評価するためには、①マツノザイセンチュウ抵抗性の全貌解明、②例えば、大きな枝を利用した、苗全身の抵抗性が反映される組織抵抗性評価方法の構築が必要である（図 6-1）。また、微弱発光の利用に関しては、防御応答に基づく微弱発光が検出可能となる接種条件の解明が、今後、必要と考えられる。

全身的な抵抗性機構が発現するためには、マツノザイセンチュウの移動や増殖を阻害する組織構造と一定以上の苗サイズが必要と考えられている（山田 2006）。本研究では、2年生（満1年生）苗の結果ではあるが、苗高が抵抗性に影響するとの結論が得られた。マツノザイセンチュウの樹体内での分散と増殖は病原力の発揮に不可欠であるが（秋庭 2006）、苗高が大きい苗ではセンチュウの分散に時間を要し、その間にマツ組織の防御反応によって、マツノザイセンチュウの活動や増殖が抑制されることが期待される。実際に、樹齢（樹高）の上昇にともない、マツノザイセンチュウの移動と増殖が抑制される家系が報告されている（黒田ら 2007）。本研究の結果もこのような理由によるものと推察された。

一方、組織構造については、節の輪生枝の数が多いと皮層樹脂道の構造が複雑になり、それによってマツノザイセンチュウの通過が抑制されることなどの報告がある（川口 2006；川口・市原 2010）。これらの報告からは、輪生枝数が多いことにより抵抗性が高まると予想されるが、黒田ら（2007）の報告では、2～3年生（満1～2年生）のクロマツ8家系において、病徴発現が少ない家系で枝が多い傾向は認められていない。また、逆に、抵抗性クロマツの5家系間の比較で、枝数が少ないほど発病率が低いという報告もある（佐々木ら 2002）。このように、少数の家系を用いたこれまでの報告では、枝数と病徴発現との関係が明らかにできていないため、本研究では家系数を16に増やして3年間にわたる検討を行った。その結果、2年生（満1年生）苗の輪生枝数は抵抗性とは関係しないことが明らかになった。しかし、マツの抵抗性は生育段階によって変化するという報告がある（黒田 2007）。その上、マツ材線虫病の激害地で生存していた個体は、幹が大きく曲がったり、二又で樹形の悪い個体が高い割合を占めている場合もあり（古野ら 1984；古野 1987）、これは形態的な特徴が抵抗性に関与していることを示

唆している。したがって、クロマツにおいて、マツノザイセンチュウ抵抗性への輪生枝数の関与について、その全体像を明らかにするためには、樹体サイズを考慮する中で枝数と抵抗性の関係を解明する必要がある。

接種検定による抵抗性苗の生産において、接種検定での健全率に影響する要因を明らかにすることは、生産性の向上を図る上で重要である。生産現場では2年生苗（満1年生苗）に接種検定を行っているが、本研究により、この時点での健全率に関与する要因として、環境条件（接種年）、家系、苗高、根元径の4要因が明らかになった。接種検定は苗畑で行うため、これらのうち気温や降水量といった環境要因を人為的にコントロールすることは困難であり、また、抵抗性が強い品種を採種園に導入するには時間がかかる。しかし、家系別に苗を育成し、サイズの大きい苗から優先的に接種することは、現場で直ぐに対応可能である。静岡県の実生現場では、抵抗性採種園産種子をすべて混合して扱っているため、家系別に育苗していない現状ではあるが、これを家系別に管理し、健全率の高い家系を優先的に接種検定に用いることで抵抗性苗の生産性を高めることが可能となる。また、苗高や根元径は家系との交互作用が認められなかったため、家系を区別していない現状のままでも、大きい苗を選択して接種検定すれば、健全率の向上が期待できる。しかしながら、接種検定における苗の健全率は、調査した2009年には、最も健全率が高かった3家系苗においても、60～80%の値であった（表4-1）。今後、現在よりもマツノザイセンチュウに対する抵抗性を高めた品種を育成し、苗の健全率を高めることが求められる（図6-1）。

抵抗性クロマツの挿し木増殖は一部の地域や県で行われているが、クロマツは発根が困難だと考えられていたことから（森下・大山 1972）、現状では広く普及していない。しかし、実生苗への接種検定による抵抗性苗生産は、マツノザイセンチュウの培養・増殖に設備や技術を必要とし、苗畑の接種にも経験が必要なことから、すべての種苗生産者が対応できるものではない。挿し木増殖ならば一般の種苗生産者が取り組むことができ、高まる需要に応えるためにも、抵抗性実生苗に加えて増産していく必要がある。本研究では、挿し木の発根率に関わる要因として、家系および母樹樹冠からの採穂部位を明らかにし、さらに、発根量と新梢から伸びた針葉の長さに正の相関があることを解明した。これらのことから、接種検定での健全率を高める方法と同様に、まずは家系別の母樹管理が必要であり、発根率の高い家系苗から採穂することで生産性を高めることが可能となる。大平ら（2009）は、発根率33.7%を前提として、実生



苗よりも低コストとなる挿し木苗生産方式を提示している。それ以上の発根率が得られる家系を用いれば、より低コストでの抵抗性挿し木苗の生産が可能となる。また、採穂部位は他の要因の影響を受けない独立的な要因であることが明らかになったため、家系を考慮することなく下部枝を優先的に採穂することでも、発根率を改善できる。さらに、新梢から伸びた針葉の長さを観察することで、発根量を推察できるという新たな知見が得られたため、適切な時期に発根した挿し穂を挿し床から苗畑やポットへ移植することが可能となり、苗の生育が改善され、最終的な得苗率が高まることが期待される。多くのマツ属樹種の場合、採穂する母樹の樹齢が高まると発根性が低下することが知られているため（森下・大山 1972 ; Browne et al. 1996 ; Peer and Greenwood 2001）、クロマツにおいても母樹齢の問題は残されているが、本研究の成果は、抵抗性挿し木苗の普及に大きく貢献できるものと考えられる。今後は、挿し木苗の普及を加速するため、①発根性に優れる品種の開発、②下部枝の発生を促進させる採穂母樹の仕立て方法の開発を行うことが求められる（図 6-1）。

静岡県山林種苗協同組合連合会での実生苗接種検定本数は、ここ数年、170,000 本/年程度である。これに本研究で得られた接種検定での平均健全率 50.5%を乗じると、85,850 本/年の抵抗性苗が従来方式では生産されることになる。これを比較対象として、本研究成果に基づき、実生苗と挿し木苗の両者を活用する抵抗性苗生産方式を構築し、その生産効率について比較した（図 6-2）。なお、接種検定を行う苗畑の地力や施肥条件によって苗のサイズは異なるが、本研究で得られたデータに基づく試算とした。家系の区別も重要であるが、各家系の採穂量や苗木生産本数が把握できていないため、現状の生産に準じて家系の考慮はしなかった。

第Ⅳ章の結果により、満 1 年生実生苗で高さ 15cm 以下のものは健全率が低いので、接種検定から除外する場合、検定に供試する苗高 16cm 以上の苗数は、その構成比率 78.3%から 133,110 本となる。これに、3 年間の試験で得られた、16cm 以上の苗の接種検定での平均健全率 54.3%を乗じると、本方式では 72,279 本の抵抗性苗が生産される。これは従来方式で生産される 85,850 本の 84%の本数であり、抵抗性苗の生産本数は少なくなるが、接種をする手間は 78%に減少するので、効率自体は高まっている。ここで、16cm 以上の苗への接種検定で得られた 72,279 本の 20%に当たる 14,456 本を挿し木用の母樹に毎年回して、実生苗に加えて挿し木苗の生産も合わせて行なうことにすると、毎年、57,823 本の実生抵抗性苗しか生産できない。挿し木に関しては、2 年目は母樹がまだ小さいので、挿し穂が確保できないが、3 年

目になれば母樹から 8 本程度の下部枝は得られるため、14,456 本の 8 倍の 115,648 本の挿し付けが可能となる。これに、下部枝の発根率 74.7%を乗じると 86,389 本の挿し穂が発根することになり、この苗をさらに 1 年間育成し、5 年目の春には出荷可能となる。本方式では、準備期間である 1～4 年目は 57,823 本の実生苗しか生産できないが、5 年目以降は 57,823 本の実生苗に 86,389 本の挿し木苗が加わり、合計 144,212 本となる。従来方式では、毎年、85,850 本の実生苗の生産量であるが、本方式では、その約 1.7 倍の生産が可能となる。ちなみに、1 本の抵抗性苗の生産に要する人工数は、従来方式は 0.0219 人工であるが、本方式では 0.0185 人工となり、従来方式の 85%となる見込みである。

以上のように、本研究で得られた効率的な生産技術を活用した新しいシステムを導入することで、抵抗性苗の増産が期待でき、それが苗の低価格化にもつながることから、海岸防災林や防潮堤への抵抗性苗植栽事業にも貢献できると考えられる。

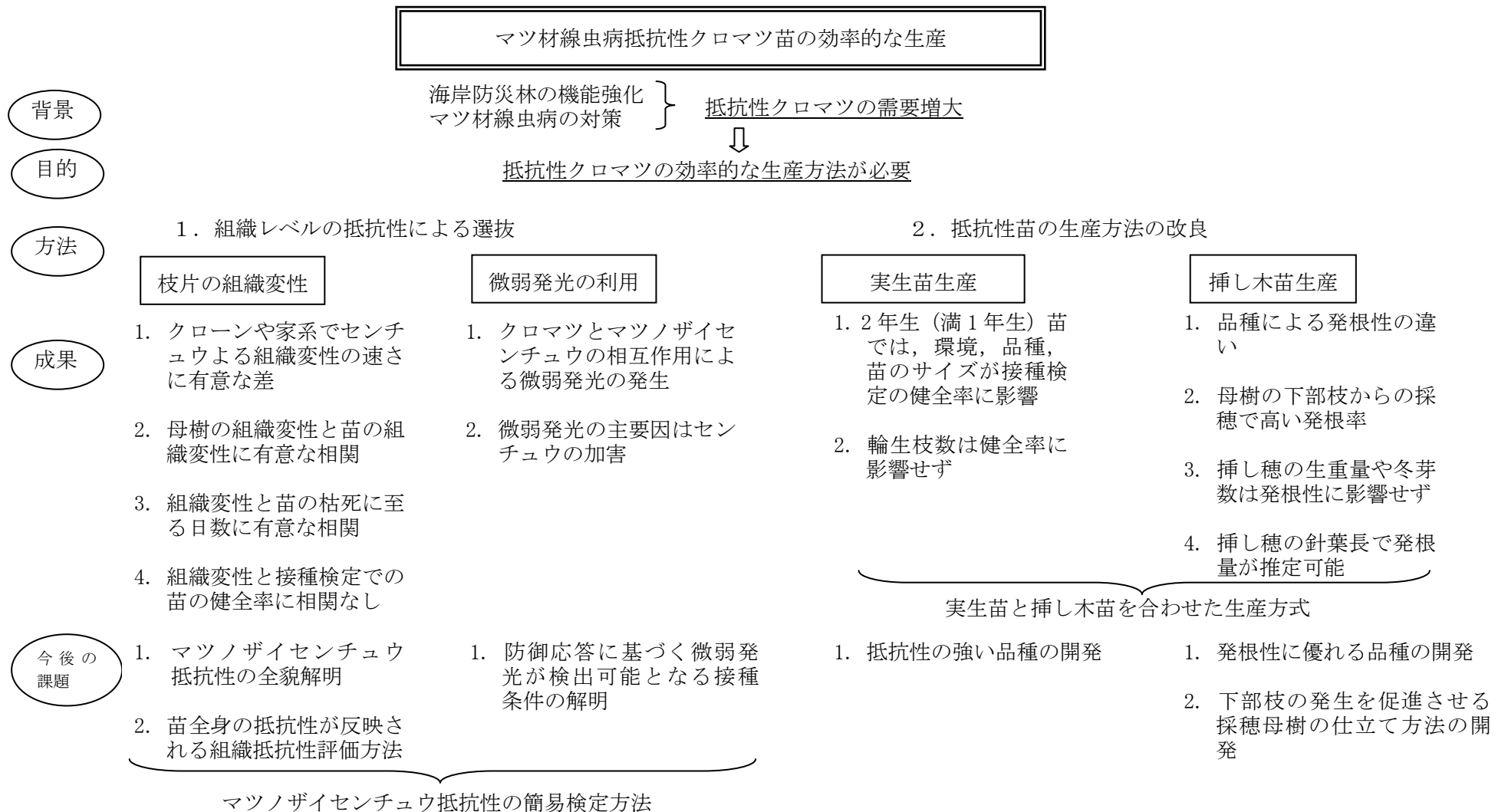
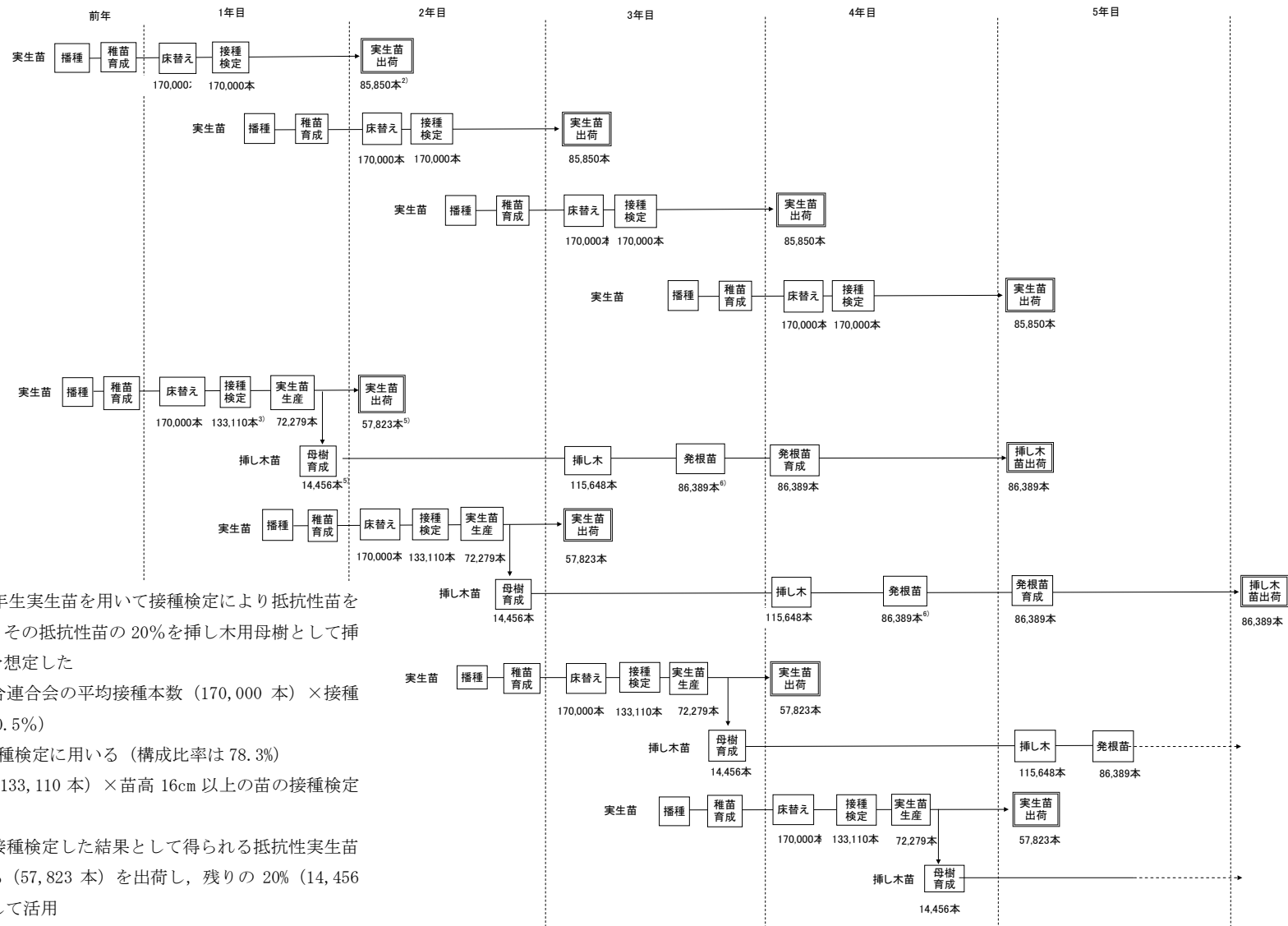


図 6-1 マツ材線虫病抵抗性クロマツ苗の効率的な生産方法と今後の課題



- 1) 苗高 16cm 以上の満 1 年生実生苗を用いて接種検定により抵抗性苗を生産することに加えて、その抵抗性苗の 20%を挿し木用母樹として挿し木苗を生産することを想定した
- 2) 静岡県山林種苗協同組合連合会の平均接種本数 (170,000 本) × 接種検定での平均健全率 (50.5%)
- 3) 苗高 16cm 以上の苗を接種検定に用いる (構成比率は 78.3%)
- 4) 苗高 16cm 以上の苗数 (133,110 本) × 苗高 16cm 以上の苗の接種検定での健全率 (54.3%)
- 5) 苗高 16cm 以上の苗に接種検定した結果として得られる抵抗性実生苗数 (72,279 本) の 80% (57,823 本) を出荷し、残りの 20% (14,456 本) は挿し木用母樹として活用
- 6) 挿し木用母樹 (14,456 本) × 母樹当たりの挿し穂数 (8 本) × 樹冠下部枝の平均発根率 (74.7%)

図 6-2 抵抗性クロマツ苗の生産効率の比較

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、名古屋大学大学院生命農学研究科森林保護学研究室の肘井直樹教授には、的確かつ丁寧なご指導をいただきました。心から感謝の意と敬意を表します。また、名古屋大学大学院生命農学研究科の川北一人教授、戸丸信弘教授、柘植尚志教授、梶村 恒准教授には、多くの貴重なご意見をいただきました。厚く御礼申し上げます。

静岡県農林技術研究所森林・林業研究センターの河合征彦センター長、伏見裕之技監、近藤晃森林育成科長、池田潔彦木材林産科長には、日頃からの業務に対するご支援をいただき、また、星川健史主任研究員をはじめとする同センターの皆様には、研究に関するご協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

森林総合研究所林木育種センターの星比呂志育種部長、高橋 誠育種第一課長、加藤一隆育種第二課長、平岡裕一郎室長、山野邊太郎室長、大平峰子氏、関西育種場の三浦真弘室長、東北育種場の井城泰一室長、東京大学大学院の井出雄二教授、三重大学大学院の松田陽介教授、九州大学大学院の渡辺敦史准教授、岐阜県立森林文化アカデミーの玉木一郎博士には、本研究に関して多くのご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

静岡県山林種苗協同組合連合会の橋本和男会長ほか種苗組合の皆様、静岡県西部農林事務所天竜農林局の浅見一浩班長には、苗木の育成・生産事業において大変お世話になりました。

静岡県立農林大学校の山本茂弘主幹には、日頃から研究へのご協力をいただいたうえ、植物との対話の必要性を身を持って示していただきました。深く感謝の意を表します。

静岡県沼津工業技術支援センター長の加藤公彦博士には、静岡県農林技術研究所や静岡県経済産業部研究調整課の時代から約 15 年間にわたり、本論文に関連するすべての研究についてご指導いただき、また、論文作成に関する助言や日頃の励ましの言葉など、親身になってご指導をいただきました。心から感謝の意と敬意を表します。

## 摘要

### マツ材線虫病抵抗性クロマツ苗の効率的な生産技術に関する研究

#### 1. 背景と目的

マツ材線虫病は、マツノザイセンチュウ(*Bursaphelenchus xylophilus*)の侵入により、樹体内で組織や生理状態の異常と通水阻害が生じ、やがて萎凋のため枯死に至る日本で最も重大な樹木病害である。その対策として、伐倒駆除や薬剤の予防散布、樹幹注入が広く行われているが、環境に配慮した育種的な対策も検討され、「マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」が展開された。この事業では、甚大な被害が生じた林分においても生存している個体から接木苗または実生苗を増殖し、それらにマツノザイセンチュウを接種する一次および二次の検定を経て、感受性樹種であるアカマツ(*Pinus densiflora*)とクロマツ(*P. thunbergii*)の抵抗性クローンが選抜された。これらのクローンで構成された採種園で生産される自然交配種子由来の実生家系苗は、抵抗性が保証されているものではないため、接種検定を行い、抵抗性苗の生産と普及が進められている。東日本大震災以降、今まで以上に海岸防災林の機能を高めることが求められる中で、クロマツは主役となるべき樹種であるが、現在でも材線虫病の被害は続いていることから、抵抗性苗の需要は増大しており、新たな抵抗性品種の開発や苗木の生産性向上が期待されている。

抵抗性苗の生産過程では、接種検定の作業が加わることで苗木が高価格になるため、接種検定後の生存率を高めることで苗木の価格を下げる必要がある。強い抵抗性を持つ品種を導入すれば接種検定で生存する苗の割合が高まり生産性が向上するが、新品種の開発には7~8年を要する。したがって、速効性を期待するならば、実生苗の抵抗性に関わり接種検定結果に影響する要因を明らかにし、苗の生存率を改善することが重要となる。また、抵抗性確認のための接種検定を省き、より低価格の苗を供給する方法の模索も必要である。そこで、苗へのマツノザイセンチュウの接種による抵抗性評価を省力化するため、枝片を用いて組織抵抗性を評価することにより、苗全体の抵抗性評価を試みる。さらに、マツノザイセンチュウの接種検定の際の苗の生存率を高めるため、抵抗性に関連している苗の形態的特徴を明らかにする。加えて、これまで困難だとされていた挿し木増殖について、高い得苗率が得られる手法を明らかにし、挿し木苗生産の可能性を検証する。

## 2. クロマツの組織抵抗性と母樹、実生家系苗の抵抗性

マツ属樹種間における組織学的な変化と樹体の抵抗性との関係では、切り枝や樹皮片で材線虫病に対する抵抗性の樹種間差を再現でき、感受性樹種では接種点近くの本部柔細胞が壊死するが、抵抗性樹種ではその壊死が少ないことが報告されている。一方、クロマツやアカマツでは抵抗性個体が見出されているが、それらにマツノザイセンチュウを接種した場合の組織レベルの抵抗性と個体レベルの抵抗性との関係については明らかにされていない。マツ属樹種間で認められる組織レベルの抵抗性と個体レベルの抵抗性の関連がクロマツにおいても認められれば、苗へのセンチュウ接種が省略できる。そこで、マツノザイセンチュウの直接加害に対する組織変性の速さを褐変で評価し、クローンや実生家系間の違いを明らかにするとともに、全身の抵抗性との関連を調べた。

抵抗性の程度が異なるクロマツ 6 家系について、マツノザイセンチュウを接種した 3 年生実生ポット苗の組織の変性と個体の枯死との関係を調べたところ、マツノザイセンチュウを接種した枝片は最終的にはすべて褐変し、組織レベルで完全な抵抗性を持つ苗木は存在しなかった。しかし、枝片が完全褐変に至る日数と苗木の 98% が枯死する厳しい条件下での苗木が枯死に至る日数との間には、1% 水準で有意な正の相関が認められ、マツノザイセンチュウを接種した場合、組織の褐変が遅いクロマツ実生苗は枯死が遅い傾向にあった。

一方、抵抗性クロマツの母樹 15 クローンの枝片にセンチュウを接種したところ、全体が褐変片に至る日数にはクローン間差があり、母樹クローンから得られた半兄弟実生家系苗の組織変性の速さとは有意な正の相関が認められ、病態反応に関する母樹組織の性質がその実生家系苗の組織の性質にある程度は遺伝すると考えられた。しかし、母樹の組織変性の速さおよび実生家系苗の組織変性の速さは、ともに苗畑で検定した実生家系苗の抵抗性強度との相関が低く、全身抵抗性の構成要因として重要ではないことが示唆された。組織変性が遅い苗は、マツノザイセンチュウによる病徴発現が遅れる傾向にあるが、それは苗の生存に結びつかず、組織抵抗性よりもセンチュウの移動や増殖を抑える苗全身の抵抗性が苗の健全率に影響していると考えられた。

## 3. クロマツの組織抵抗性の評価指標としての微弱発光の利用

クロマツやアカマツでは、マツノザイセンチュウの侵入部付近の組織にエピセリウム細胞の

崩壊や柔細胞の壊死が認められ、このような病態反応の質的・量的な差が全身的な発病の有無に影響することが示唆されている。したがって、マツノザイセンチュウ侵入後の組織の変化を的確に把握することは、抵抗性の判定において極めて重要である。これまでに組織や細胞の変性や壊死についてはさまざまな手法で評価が行われ、肉眼的観察や試薬染色後の顕微鏡観察のほかに、脂質の過酸化程度や、電解質の漏出量なども利用されてきた。しかし、これらの方法は組織の抵抗性を部分的に評価しているだけであり、新たな組織の抵抗性判定の指標が必要であった。この一つの候補として植物から発生する微弱発光の利用が考えられた。この微弱発光は生体の生理状態を強く反映し、糸状菌等のエリシター物質に応答した植物の防御反応に付随して発生することが明らかにされている。これまでに、マツ属樹種とマツノザイセンチュウとの関係において発生する微弱発光を報告した例はなかったが、これがマツノザイセンチュウに対するマツの抵抗反応を反映するのであれば、マツノザイセンチュウに対する抵抗性の指標として利用できる可能性がある。微弱発光検出には特別な試薬を必要としなく非破壊で行なえるため、抵抗性の簡易な検定技術としての利用が想定される。そこで、マツ材線虫病抵抗性の新たな検定技術の開発を目的とし、マツノザイセンチュウを接種したクロマツ枝片から発生する微弱発光を調査した。

マツノザイセンチュウを接種した枝片からは、接種後 30 分以内に 1 時間程度持続する微弱発光が、接種の 70 時間後には 100 時間以上持続する微弱発光が認められ、10 日後には枝片全体が褐変した。センチュウ接種頭数を 2 倍にすると、微弱発光の発生パターンは類似しているものの発光強度が高まった。非宿主であるスギでは微弱発光が発生せず、抵抗性のテーダマツでは 19 時間後に微弱発光の高まりが認められ、クロマツと比べると発光強度が低く、かつ早い時間帯に発生、終息した。これらの結果から、この微弱発光はマツノザイセンチュウによるクロマツ組織への加害によって発生すると推察された。本研究により、クロマツの組織からは初となる微弱発光の発生は認められたが、現状では組織の防御応答を示すような発光パターンは得られていないため、微弱発光に基づく抵抗性評価はできなかった。

#### 4. 実生苗の形態的特徴と抵抗性との関係

実生苗へマツノザイセンチュウを接種し、その後健全であった抵抗性苗を出荷する生産方法で、静岡県は全国有数の生産県となっている。しかし、種苗生産組合が行っている作業は、マ



ツノザイセンチュウの培養に手間がかかること、盛夏の接種検定作業が重労働であること、検定により平均で半数程度の個体が枯死してしまうことなどの問題があり、その結果として苗木の価格が一般の苗に比べて高くなっている。これを改善するためには、接種検定時の生存率を高め効率化を図り、種苗生産の低コスト化を進める必要がある。接種検定後の生存率には家系や環境条件が影響することが明らかにされているが、生存率に影響する苗木の形態的特徴については明確にされていない。そこで、多くの家系を用いた複数年の試験を設計し、苗木のサイズや枝数が生存率に与える影響を評価した。

抵抗性クロマツ採種園由来の 16 家系の苗木について、接種試験直前の苗木の苗高、根元径、輪生枝数を測定し、センチュウ接種の 2 ヶ月後に生存率を調査する試験を 3 年間行った。ロジスティック回帰分析で、輪生枝数は生存率に関与する要因ではなかったが、家系（品種）と苗高、根元径が健全率に有意に関与していることが明らかになった。特に、苗高は家系や接種年との交互作用がなく、独立的に関与する要因であった。3 年間とも苗高が大きいほど健全率が高く、大きい苗を優先的に接種することで生産効率を高められることが明らかになった。

## 5. 挿し木発根性に関わる要因

実生苗への接種検定で抵抗性苗を生産する方法では、接種検定する年の環境条件によって健全率が異なり、抵抗性の強度が安定しないことが指摘されている。また、接種検定にはマツノザイセンチュウを培養する技術も必要で、一部の種苗生産者しか生産できない実情もある。この問題を解決するため、抵抗性が確認された母樹から採穂し、挿し木によって苗木を増殖する方法が試られるようになった。クロマツは発根が容易ではないとされていたが、母樹によっては高い発根率が得られ、強い病原力を持つマツノザイセンチュウの接種検定で生存した母樹から挿し木によって増殖した苗は、抵抗性が強いことも明らかになっている。そのため、抵抗性を確認するために苗木の段階で再び接種検定を行う必要がなく、接種検定により生産した苗と比較して生産コストが低く抑えられるという試算もあり、抵抗性苗の新たな生産方法として期待されている。

挿し木苗生産を成功させるためには、挿し穂の高い発根能力が不可欠となるが、発根性には母樹が持っている遺伝的な因子や挿し穂の生理的特性が大きく関わっている。品種の違いが発根性に影響することはこれまでも明らかにされてきたが、同じ母樹から採取した挿し穂の生

理的な状態や形態が発根性に影響すること、例えば母樹の樹冠からの採穂部位、挿し穂の重量や冬芽数が発根能力に影響するかはクロマツでは明確になっていない。一方、挿し穂の新梢から伸びる針葉により発根の確認はできるとされているが、針葉伸長と発根の量的な関係は未解明である。これらの点を踏まえて抵抗性クロマツの挿し木増殖技術を改善するために、母樹からの採穂部位と挿し穂の生重量や冬芽数が発根率と発根量にどのような影響を与えるかを明らかにするとともに、挿し穂の針葉の伸長程度と発根性との関係についても調査した。

ロジスティック回帰分析の結果、挿し穂の生重量や冬芽数は発根率に影響する要因ではなかったが、家系と採穂部位は有意に関与していた。特に採穂部位は他の要因との交互作用が認められず、いくつかの針葉樹と同様に樹冠下部からの挿し穂は上部からの挿し穂よりも高い発根率が得られた。一般化線形モデルによる解析の結果、挿し穂の新梢から伸びた針葉の長さは発根量に有意に影響する要因であり、針葉の長さとは有意な正の相関が認められ、これは掘り取り前の根量評価の指標になると考えられた。発根性に影響する要因や針葉長と発根量の関係を明確にしたことは、実用的な抵抗性挿し木苗生産に大きく貢献できると考えられた。

## 6. 今後の課題と事業展開への期待

組織レベルで樹体の抵抗性を評価できれば、抵抗性苗の生産を従来よりも簡略化できる。本研究では、クロマツの組織変性と苗の枯死に至る日数との相関関係や、マツノザイセンチュウの加害による微弱発光の発生という新たな知見を得られた。しかし、組織の抵抗性や微弱発光に基づいた全身の抵抗性を評価するまでには至らなかった。マツノザイセンチュウの移動や増殖を阻害する苗全身の抵抗性を評価するためには、大きな枝を利用した苗全身の抵抗性が反映される組織抵抗性評価方法の構築や、防御応答に基づく微弱発光が検出可能となる接種条件の解明が必要である。

一方、抵抗性苗の生産において、実生苗のサイズが接種検定結果に影響することや、母樹からの採穂部位が挿し木発根率に影響することは、種苗生産の効率化を図る上で重要な情報である。具体的には本研究成果の導入により、小型の苗を接種検定から除外すれば、接種作業を78%に減じることができる。これによって、抵抗性実生苗の生産本数は少なくなるが、接種検定後の健全実生苗のうち20%を挿し木用の母樹として育成し、実生苗に加えて母樹の下部枝を利用した挿し木苗の生産を行えば、5年後には現状の抵抗性苗生産本数を上回ると試算さ

れる。このような生産の効率化により、苗の低価格化と増産化が可能となることから、海岸防災林や防潮堤への植栽事業にも貢献できると考えられる。今後は、抵抗性や発根性がより優れる品種の開発や、実生苗への接種作業そのもの改良、下部枝の発生を促進させるような採穂母樹の仕立て方法などを検討していく必要がある。

## 引用文献

- Abeles FB (1986) Plant chemiluminescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 49–72
- 秋庭満輝 (2006) マツノザイセンチュウの病原性と病原力の多様性. *日林誌* 88: 383–391
- Baltunis BS, Huber DA, White TL, Goldfarb B, Stelzer HE (2005) Genetic effects of rooting loblolly pine stem cuttings from a partial diallel mating design. *Can. J. For. Res.* 35: 1098–1108
- Browne RD, Davidson CG, Gobin SM (1996) Effects of crown position and plant age on rooting of Jack pine long shoot cuttings. *Tree Planters' Note.* 47(3): 100–104
- Chwirot BW (1998) Do we always need to know molecule origin of light emitted by living system? In: Cang JJ, Fisch J, Popp FA (ed), *Biophotons*, 109–120, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherland
- Colli L, Facchini U, Guidotti G, Dungani R, Orsenigo M, Sommariva O (1955) Further measurement on the bioluminescence of the seedlings. *Experimentia* 11: 479–481
- Dodd RS, Power AB (1988) Clarification of the term topophysis. *Silvae Genetica* 37(1): 14–15
- 江原淑夫 (1994) ウイルスに対する植物の応答. *ウイルス* 44: 55–60
- Foster GS, Campbell RK, Adams WT (1984) Heritability, gain, and C effects in rooting western hemlock cuttings. *Can. J. For. Res.* 14: 628–638
- 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 ケ年の成果—. *林育研報* 7: 1–84
- Fukuda K, Hogetsu T, Suzuki K (1992) Cavitation and cytological changes in xylem of pine seedlings inoculated with virulent and avirulent isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *J. Jpn. For. Soc.* 74: 289–299
- Fukuda K, Hogetsu T, Suzuki K (1994) Ethylene production during symptom development of pine-wilt disease. *Eur. J. For. Path.* 24: 193–202
- Fukuda, K (1997) Physiological process of the symptom development and resistance mechanism in pine wilt disease. *J. For. Res.* 2: 171–181

- 福田健二(1999) マツ材線虫病の病徴進展における生理的变化. 樹木医学研究 3 : 67-74
- 古野東州・大畠誠一・上中幸治 (1984) マツ枯れ激害地—白浜試験地における天然性アカマツ, クロマツの枯損と生存木について—. 京大演報 56 : 32-47
- 古野東州 (1987) 松くい虫激害地におけるマツの枯損と生存木. 森林防疫 428 : 194-197
- 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. 京大演報 51 : 23-36
- 二井一禎 (1984b) マツノザイセンチュウ, ニセマツノザイセンチュウの樹体内動態とタンニン量の変化. 日林論 51 : 473-474
- Futai K (2003) Abnormal metabolites in pine wood nematode-inoculated Japanese black pine. Jpn. J. Nematol. 33: 45-56
- 二井一禎・佐橋憲生 (2006) 21 世紀の“マツ枯れ” 研究の展望. 日林誌 88 : 363
- 袴田哲司・近藤 晃 (2000) 静岡県におけるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの導入試験—接種検定の成績—. 日林学術講 111 : 250
- 橋本平一 (1979) 材線虫接種後のクロマツの呼吸量の変化. 日林九支研論 32 : 261-262
- 橋詰隼人・谷口紳二 (1981) 低台式採穂園方式によるヒノキ優良木家系の挿木増殖および挿穂の生理的齢と挿木の発根性との関係に関する二, 三の研究. 鳥大演報 13 : 1-17
- 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. 日林誌 88 : 364-369
- Henry PH, Blazich FA, Hinesley LE (1992) Vegetative propagation of eastern redceder by stem cuttings. HortScience 27(12): 1272-1274
- Hideg E, Kobayashi, M, and Inaba, H (1990) Ultraweak photoemission from dark- adapted leaves and isolated chloroplast. Febs Lett. 275: 121-124.
- Hideg, E, and Inaba, H (1991) Biophoton emission (ultraweak photoemission) from dark adapted spinach chloroplast. Photochem. Photobiol. 53: 137-142.
- 東原貴志・蓬田英俊・今野幸則・須田邦裕・渡部公一・伊藤信治・金子岳夫・小澤 創 (2007) マツノザイセンチュウ抵抗性候補木の選抜および接種検定結果 —東北地方(岩手県, 宮城県, 秋田県, 山形県, 新潟県および福島県)における平成4年度から17年度までの実行結果—. 日育研報 23 : 319-413

- 平井さおり・福田健二・寶月岱造・鈴木和夫 (1994) クロマツ当年生枝におけるマツノザイセンチュウの移動. 日林論 105 : 481—482
- 寶月岱造・石田京子・鈴木和夫・勝木俊雄 (1994) 数種のマツ切り枝及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. 日林誌 76 : 471—472
- Ichihara Y, Fukuda K, Suzuki K (2000) Early symptom development and histological changes associated with migration of *Bursaphelenchus xylophilus* in seedling tissue of *Pinus thunbergii*. Plant Dis. 84: 675—680
- Ikeda T, Suzaki T (1984) Influence of pine-wood nematodes on hydraulic conductivity and water status in *Pinus thunbergii*. J. Jpn. For. Soc. 66: 412—420
- 池田武文・戸田忠雄・田島正啓 (1994) マツノザイセンチュウ抵抗性の異なるクロマツとアカマツ家系のマツノザイセンチュウ侵入に対する組織学的反応. 日植病報 60 : 540—542
- Ikeda T, Kiyohara T (1995) Water relations, xylem embolism and histological features of *Pinus thunbergii* inoculated with virulent or avirulent pine wood nematodes *Bursaphelenchus xylophilus*. J. Exp. Bot. 46: 441—449
- 今泉智通 (2010) R を用いた一般化線形モデル (仮説検定編) : 割合データを例に. 雑草研究 55(4) : 275—286
- Ishida K, Suzuki K, Hogetsu T (1992) Spreading of nuclear degradation in *Pinus thunbergii* Parl. Cuttings under water stress. Plant Cell Physiol. 33: 897—907
- Ishida K, Hogetsu T, Fukuda K, Suzuki K (1993) Cortical responses in Japanese black pine to attack by pine wood nematode. Can. J. Bot. 71: 1399—1405
- Ishida K, Hogetsu T, (1997) Role of resin canals in the early stages of pine wilt disease caused by pine wood nematode. Can. J. Bot. 75: 346—351
- Ishikawa M, Kaneko A, Kaishiwa T, Watanabe, H (1987) Participation of  $\beta$ -myrcene in the susceptibility and / or resistance of pine trees to the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Agric. Biolo. Chem. 51: 3187—3191
- 石松 誠 (1999) マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの挿し木について. 林木の育種「特別号」: 20—23
- Iyozumi H, Kimihiko K, Makino, K (2002) Spectral shift of ultraweak photon emission from

- sweet potato during a defense response. Photochem. Photobiol. 75: 322–325
- Iyozumi H, Kato K, Kageyama C, Inagaki H, Yamaguchi A, Furuse K, Baba K, Tsuchiya H (2005) Plant defense activators potentiate the generation of elicitor-responsive photon emission in rice. Physiol. Mol. Plant Pathol. 66: 68–74
- Kageyama C, Kato K, Iyozumi H, Inagaki H, Yamaguchi A, Furuse K, Baba K (2006) Photon emissions from rice cells elicited by *N*-acetylchitoooligosaccharide are generated through phospholipid signaling in close association with the production of reactive oxygen species. Plant. Physiol. Biochem. 44: 901–909
- 影山智津子・加藤公彦・稲垣栄洋・伊代住浩幸・古瀬勝美・馬場康司 (2007) 病害抵抗性誘導物質の前処理により増強される各種エリシター応答発光の特性. 日植病報 73 : 15–20
- 金子 繁・陳野好之 (1986) 異なる光条件下におけるアカマツ苗木材線虫病進展の差異. 日林誌 68 : 208–209
- 加藤公彦・本澤洋江・伊代住浩幸・貫井秀樹 (2010) 6 量体キチンが誘導するエリシター応答反応と過酸化水素との量的関係. 日植病報 76 : 142–148
- Kathiravan M, Ponnuswamy AS, Vanitha C. (2009) Determination of suitable cutting size for vegetative propagation and comparison of propagules to evaluate the seed quality attributes in *Jatropha curcus* Linn. Natural Product Radiance 8: 162–166
- 川口エリ子 (2006) クロマツ切り枝における皮層樹皮道の形質とマツノザイセンチュウの移動との関係. 日林誌 88 : 240–244
- 川口エリ子・玉泉幸一郎 (2006) 庇陰処理下におけるクロマツ苗のマツ材線虫病の病徴進展とマツノザイセンチュウの動態. 日林誌 88 : 342–347
- 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. 日林誌 92 : 1–7
- Kishi Y (1995) Resistance breeding. In: The pinewood nematode and the Japanese pine sawyer, 182–187. Thomas company limited, Tokyo.
- 清原友也・徳重陽山 (1969) マツ枯木中に生息する線虫, *Bursaphelenchus* sp. 日林誌 51 : 193–195
- 清原友也・徳重陽山 (1971) マツ生立木に対する *Bursaphelenchus* sp. の接種試験. 日林誌

53 : 210—218

清原友也(1973) マツノザイセンチュウを接種したクロマツ苗の発病に及ぼす温度の影響. 日林論 84: 334—335

清原友也(1985) マツ材線虫病における誘導抵抗性について. 森林防疫 34: 99—102

清原友也(1989) マツ材線虫病の病原学的研究. 林試研報 353: 127—176

清原友也(1990) マツ材線虫病における誘導抵抗性. 日本農芸化学会誌 64: 1251—1253

Kiyohara T, Bolla RI (1990) Pathogenic variability among populations of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. For. Sci. 36: 1061—1076

小松雅史・鈴木和夫(2006) マツノザイセンチュウ接種クロマツ組織の壊死過程における電解質漏出現象. 樹木医学研究 10: 25—35

小坂 肇(2003) マツ材線虫病における誘導抵抗性研究の現状と課題. 森林防疫 52: 163—169

Kozlowski TT, Kramer PJ, Pallady SG (1991) The physiological ecology of woody plants. Academic Press, San Diego

倉本哲嗣・平岡裕一郎・大平峰子・岡村政則・藤澤義武 (2010) マツノザイセンチュウ接種検定後の抵抗性クロマツ自然交配家系の生存率と接種前後の期間および開花期間の降水の関係. 日林誌 92 : 120—123

Kuroda K, Yamada T, Mineo K, Tamura H (1988) Effects of cavitation on the development of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 54: 606—615

Kuroda K (1989) Terpenoids causing tracheid-cavitation in *Pinus thunbergii* infected by the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 55: 170—178.

Kuroda K, Yamada T, Ito S (1991) *Bursaphelenchus xylophilus* induced pine wilt : Factors associated with resistance. Eur. J. For. Pathol. 21: 430—438

Kuroda K (1991) Mechanism of cavitation development in the pine wilt disease. Eur. J. For. Pathol. 21: 82—89

Kuroda K (2004) Inhibiting factor of symptom development in several Japanese red pine (*Pinus densiflora*) families selected as resistant to pine wilt. J. For. Res. 9: 217



- 黒田慶子(2007) 抵抗性マツを利用したマツ枯れ防除に期待する－発病および抵抗性メカニズムに関する研究成果から－. 林木の育種 224 : 11－12
- 黒田慶子・太平峰子・岡村政則・藤澤義武 (2007) マツ材線虫抵抗性クロマツ家系の苗木における線虫分布と増殖. 日林誌 89 : 241－248
- 楠本 大・米道学・村田政穂・渡辺敦史・磯田圭哉・平尾知士・山田利博(2010) 材線虫抵抗性マツ類における組織の反応と線虫の分布・増殖. 樹木医学研究 14 : 98-100.
- 九州地区林業試験研究機関連絡協議会 (1999) ヒノキ精英樹・抵抗性マツ特性表. 九州地区林業試験研究機関連絡協議会, 35－58
- La YJ, Moon YS, Yeo WH, Shin SC, Bak WC (1998) Recent status of pine wilt disease in Korea. In: Futai K, Togashi K, Ikeda T (ed), Sustainability of pine forests in relation to pine wilt and decline, 232－241. Shokado, Kyoto
- Lavorel J (1980) A study of dark luminescence in chlorella. Background luminescence, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-triggered luminescence and hydrogen peroxide chemiluminescence. Biochim. Biophys. Acta. 590: 385－399
- 前田雅量・吉野 豊・前田千秋 (1997) ヒノキの個体内変異－採穂の高さによるさし木の発根と初期成長の違い－. 森林応用研究 6: 183－184
- Makino T, Kato K, Iyozumi H, Honzawa H, Tachiiri Y, Hiramatsu M (1996) Ultraweak luminescence generated by sweet potato and *Fusarium oxysporum* interactions associated with a defense response. Photochem. Photobiol. 64: 953－956
- 牧野孝宏 (1998) 植物・病原菌相互作用による生物フォトンの生成. 植物防疫 52: 526－529.
- Mamiya Y, Enda N (1972) Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). Mematologica 18: 159－162
- 真宮靖治 (1980) マツノザイセンチュウの接種による当年生アカマツ苗の発病とその病態解剖. 日林誌 62: 176－183
- Mamiya Y (1983) Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. Ann. Rev. Phytopathol. 21: 201－220

- Mamiya Y (1985) Initial pathological changes and disease development in pine trees induced by the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 51: 546–555
- 真宮靖治 (1990) マツノザイセンチュウの樹体内動態とマツの発病経過. 農化 64: 1243–1246
- 宮崎潤二 (2003) マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの挿し木による増殖(Ⅲ)－育苗コストを抑えるための挿し木方法等の検討－. 九州森林研究 56: 188–189
- Morgenstern EK (1987) Methods for rooting larch cuttings and applications in clonal selection. The Forestry Chronicle 63: 174–178
- 森下義郎・大山浪雄 (1972) さし木技術の実際. 造園木の手引き さし木の理論と実際, 169–276. 地球出版, 東京
- 森 徳典・井上徹雄 (1983) マツノザイセンチュウ接種苗の幹の呼吸. 日林論 94: 307–308
- 森 徳典・井上徹雄 (1986) マツノザイセンチュウによるマツ樹幹のエチレン生成とその誘導因子としてのセルラーゼ. 日林誌 68: 43–50
- 森 康浩・宮原文彦 (2002) クロマツの挿し木増殖における発根条件の検討(Ⅱ)－用土, 前処理, 電熱温床の効果－. 九州森林研究 55: 134–135
- 森 康浩・宮原文彦・後藤 晋 (2004) クロマツのマツ材線虫病抵抗性種苗生産における挿し木技術の有効性. 日林誌 86: 98–104
- 森 康浩・宮原文彦・後藤 晋 (2006a). マツ材線虫病抵抗性クロマツの挿し木苗生産システムの開発. 福岡県森林研報. 7: 1–19
- 森 康浩・宮原文彦・後藤 晋 (2006b) マツ材線虫病抵抗性挿し木苗の生産における採穂個体へのマツノザイセンチュウ接種検定の有効性. 日林誌 88: 197–201
- 森 康浩・宮原文彦・堤 祐司・近藤隆一郎 (2007) クロマツの遺伝的要因を考慮した弱病原性マツノザイセンチュウの前接種による誘導抵抗性の検証. 日林誌 89: 401–406
- Mori Y, Miyahara F, Tsutsumi Y, Kondo R (2008) Relationship between resistance to pine wilt disease and the migration or proliferation of pine wood nematode. Eur. J. Plant. Pathol. 122: 529–538
- 森本 桂・岩崎 厚 (1972) マツノザイセンチュウ伝播者としてのマツノマダラカミキリの役割.

日林誌 54: 177-183

Mota MM, Braasch H, Bravo MA, Penas AC, Burgermeister W, Metge K, Sousa E (1999) First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. Nematology. 1: 727-734

Nobuchi T, Tominaga T, Futai K, Harada H (1984) Cytological study of pathological changes in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) seedlings after inoculation with pine-wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Bull. Kyoto. Univ. For. 56: 224-233

Odani K, Sasaki S, Nishiyama Y, Yamamoto N (1985) Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematodes— Cellulase as a possible candidate of the pathogen. J. Jap. For. Soc. 67: 366-372

小笠原健二・四手井綱英(1966) 林木のさしきに関する研究—とくに, 植物ホルモンのバランスと発根との関係. 京大演報 35: 19-38

大平峰子・倉本哲嗣・平岡裕一郎・岡村政則・谷口 亨・藤澤義武(2006) クロマツのさし木発根性に及ぼすマツ材線虫病抵抗性, 穂作りおよびさし木環境の影響. 林育研報 22: 25-34

大平峰子・真崎修一・宮原文彦・森 康浩・山田康裕・宮崎潤二・白石 進(2007) さし木増殖によるマツ材線虫病抵抗性クロマツ苗生産技術の開発. 林木の育種「特別号」: 29-32

大平峰子・倉本哲嗣・藤澤義武・白石 進 (2009) マツ材線虫病抵抗性クロマツのさし木苗生産における密閉さしの有効性. 日林誌 91: 266-276

大山浪雄・川述公弘・鈴木和夫・末吉幸満 (1976) アカマツとクロマツのマツノザイセンチュウ感受性の及ぼす土壌乾燥の影響. 日林九支研論 29: 219-220

大山浪雄・福島 勉 (1982) マツノザイセンチュウ抵抗性マツの内樹皮液 pH. 日林九支研論 35: 109-110

大山浪雄・白石 進・高木哲夫 (1986) マツノザイセンチュウ抵抗性マツのつぎ木クローンにおける抵抗性要因の解析. 林木の育種 140: 17-21

大庭喜八郎・戸田忠雄・西村慶二・岩下礼治・松永健一郎 (1977) マツノザイセンチュウの人工接種による母樹別マツ苗の生存率. 日林九支研論 30: 67-68

岡部弘高・甲斐昌一 (2010) バイオフォトンと生体情報計測. 光学 39: 326-333

- Oku H, Shiraishi T, Chikamatu K (1989) Active defense as mechanism of resistance in pine against pine wilt disease. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 55: 603–608
- Peer KR, Greenwood MS (2001) Maturation, topophysis and factors in relation to rooting in *Larix*. *Tree Physiol.* 21: 267–272
- Popp FA, Ruth B, Bahr W, Bohm J, Grab P, Grolig G, Rattemeyer M, Schmidt HG, Wulle P (1981) Emission of visible and ultraviolet radiation by active biological system. *Collective Phenomena* 3: 187–214
- Rosier CL, Frampton J, Goldfarb B, Blazich FA, Wise FC (2006) Improving the rooting capacity of stem cuttings of Virginia pine by severe stumping of parent trees. *South. J. Appl. For.* 30: 172–181
- 酒井康子・小坂 肇・秋庭満輝(2007) 弱病原力マツノザイセンチュウの前接種によるリュウキユウマツのマツ材線虫病に対する誘導抵抗性. *日林誌* 89: 102–106
- Sasaki S, Odani K, Nishiyama Y, Hayashi Y (1984) Development and recovery of pine wilt disease studied by tracing ascending sap flow marked with water soluble stains. *J. Jpn. For. Soc.* 66: 141–148
- 佐々木峰子・平岡裕一郎・岡村政則・藤澤義武・秋庭満輝 (2002) マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの特性—実生後代の諸特性と抵抗性の関係—. 第 113 回日林学術講: 649.
- 佐々木峰子・倉本哲嗣・平岡裕一郎・岡村政則・藤澤義武 (2004) クロマツのさし木発根性に及ぼす摘葉・摘芽の影響. *日林誌* 86: 37–40
- Struve DK, Talbert JT, McKeand SE (1984) Growth of rooted cuttings and seedlings in a 40-year-old plantation of eastern white pine. *Can. J. For. Res.* 14: 462–464
- Tousignant D, Villeneuve M, Rioux M, Mercier S (1995) Effect of tree flowering and crown position on rooting success of cuttings from 9-year-old black spruce of seedling origin. *Can. J. For. Res.* 25: 1058–1063
- 鈴木和夫 (1984) マツの水分生理状態と材線虫病の進展. *林試研報* 325: 97–126
- 田畑勝洋(1997) 被害の推移と行政の対応. 田村弘忠ほか編, マツノザイセンチュウ抵抗性マツの育成(松くい虫(マツ材線虫病)—沿革と最近の研究—, 1-17. 全国森林病虫獣害防除協会, 東京

- 鳥羽瀬正志・中村健作・宮島淳二・戸田忠雄(1993) マツノザイセンチュウ抵抗性種苗の生産  
(I) 一天草森林組合におけるスーパーマツの生産ー. 日林九支研論 46:81-82
- 戸田忠雄・田島正啓・西村慶二・竹内寛興 (1993) 九州におけるマツノザイセンチュウ抵抗性  
育種 ー抵抗性クローンの選抜後の研究経過ー. 林育研報 11:37-88
- 戸田忠雄 (1997) マツノザイセンチュウ抵抗性マツの育成. 田村弘忠ほか編, 松くい虫(マツ  
材線虫病) ー沿革と最近の研究ー, 168-274. 全国森林病虫獣害防除協会, 東京
- 戸田忠雄 (1999) マツノザイセンチュウ抵抗性の向上に関する研究. 林木の育種 192: 1-4.
- 戸田忠雄・加藤一隆 (1999) 精英樹など育成品種の特性(4) ー西日本におけるマツノザイセ  
ンチュウ抵抗性品種ー. 林木の育種 192: 35-41
- 戸田忠雄・寺田貴美雄 (2001) 林木育種プロジェクト(3), マツノザイセンチュウ抵抗性  
育種事業. 林木の育種 198: 39-43
- 戸田忠雄・栗延 晋・佐々木峰子 (2002) マツノザイセンチュウ抵抗性マツの次代検定林にお  
ける7年次の成長と生存率. 日林誌 84: 188-192
- 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. 林育研  
報 20: 83-217
- Yamada T (1987) Lipid peroxidation during the development of pine wilt disease. Ann.  
Phytopathol. Soc. Jpn. 53: 523-530
- Yamada T, Ito S (1993a) Histological observations on the response of pine species, *Pinus*  
*strobus* and *P. taeda*, resistant to *Bursaphelenchus xylophilus* infection. Ann.  
Phytopathol. Soc. Jpn. 59: 659-665
- Yamada T, Ito S (1993b) Chemical defense responses of wilt-resistant pine species, *Pinus*  
*strobus* and *P. taeda*, against *Bursaphelenchus xylophilus* infection. Ann.  
Phytopathol. Soc. Jpn. 59: 666-672
- 山田利博 (1997) マツの発病機構とマツの反応. 田村弘忠ほか編, 松くい虫(マツ材線虫病)  
ー沿革と最近の研究ー, 65-94. 全国森林病虫獣害防除協会, 東京
- 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. 日林誌  
88: 370-382
- 山本茂弘・袴田哲司・近藤 晃 (2003) 静岡県におけるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ

- 実生家系苗の接種検定試験結果. 静林技セ研報 31 : 7-16
- 矢野宗幹(1913) 長崎県下松樹枯死原因調査. 山林公報第 4 号付録 : 1-14
- Yates D, Earp B, Levy F (2006) Propagation of *Sciadopitys verticillata* (Thunb.) Sieb. & Zucc. by stem cuttings and properties of its latex-like sap. HortScience 41: 1662-1666
- 吉田成章 (2006) 研究者が取り組んだマツ枯れ防除-マツ材線虫病防除戦略の提案とその適用事例-. 日林誌 88 : 422-428
- Yoshinaga N, Kato K, Kageyama C, Fujisaki K, Nishida R, Mori N (2006) Ultraweak photon emission from herbivory injured maize plants. Naturwissenschaften 93: 38-41
- 渡部公一 (2006) クロマツ実生苗木を用いた挿し木の発根促進方法. 山形県森研セ研報 30 : 29-33
- 鄭 燁・福田健二・鈴木和夫 (1993) 材線虫病罹病組織からの電解質の漏出. 日林論 104 : 639-640