

# 福岡県森林林業技術センター 研究報告

第13号

2012年3月

- ・ マツ材線虫病抵抗性クロマツの増殖法の開発と抵抗性要因の解明  
森 康浩 . . . . . 1~36
- ・ 放置竹林と隣接するヒノキ林でタケに侵入された地点と未侵入地点の土壌  
佐々木 重行 . . . . . 37~46



マツ材線虫病抵抗性クロマツの増殖法の開発と抵抗性要因の解明<sup>1)</sup>

森 康浩

## Development of propagation methods of pine wilt disease resistant Japanese black pines and exploration of their resistance factors

Yasuhiro MORI

森 康浩：マツ材線虫病抵抗性クロマツの増殖法の開発と抵抗性要因の解明 福岡県森林研報 13 : 1 ~ 36, 2012 日本のクロマツ林は、マツノザイセンチュウ（以下、材線虫）が引き起こすマツ材線虫病により壊滅的な被害を被ってきた。被害跡地に植栽するため、材線虫に抵抗性をもつ苗木の需要が高まっている。本研究では、これら抵抗性の苗木を効率的に得るため、クロマツに弱病原性の材線虫を接種して抵抗性の誘導を試みた。しかし、強病原性の材線虫を接種後の発病率はコントロールと差はなく、弱病原性の材線虫を接種による抵抗性の発現誘導は確認できなかった。そこで、強病原性材線虫の3回接種検定により発病しないクロマツから挿し木増殖を行った。得られたクローンに強病原性の材線虫を接種した結果、発病率は2.3%と極めて低かった。さらに、挿し木増殖の効率を高める検討を行った。同じ母樹個体から6年間挿し木を続けた結果、増殖効率は母樹個体のもつ発根能力によって決定されることがわかった。6年間の平均発根率が20%以下の母樹個体群について、挿し穂をエテホン（69.2 μM）に24時間浸漬した後、インドール酪酸（19.7 mM）に10分間浸漬する処理を行った。その結果、平均発根率は56.4%に向上した。本処理により、平均発根率が60%以上の母樹個体群を用いた場合でも83.3%という発根率の向上が確認された。次いで、抵抗性クローンと感受性クローンを用い、抵抗性を決定している因子を探索した。両クローン間で材線虫の移動経路と考えられている皮層および木部樹脂道の数や断面積、樹皮や木部のメタノール抽出物への材線虫の忌避性や誘引性を比較した結果、いずれにも大きな違いはみられなかった。また、分散接種により強制的に材線虫を移動させた状態にしても、抵抗性クローンの発病が促進することはなかった。一方、両クローンの切り枝に材線虫を接種すると、24時間後の材線虫数の分布に差はみられないが、20日後は抵抗性で材線虫が漸減し、感受性では24時間後の19.3倍に増殖した。抵抗性クロマツの木粉と4日間共培養した材線虫を *Botrytis cinerea* に接種し、5日後の材線虫数を比較した。その結果、抵抗性木粉と共培養した材線虫の増殖は、感受性木粉と共培養した場合やコントロールに比べて有意に減少した。

キーワード：クロマツ，マツ材線虫病，マツノザイセンチュウ，挿し木，誘導抵抗性，抵抗性

## I. はじめに

## 1. マツノザイセンチュウ

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Bührer) Nickle, 以下、材線虫) は成虫の体長が約1 mmの植物寄生性線虫である。発育温度は9.5~30℃であり(真宮, 1975), 卵内で1回脱皮した後, 第2期幼虫として孵化し, 3回の脱皮を経て成虫となる。25℃で灰色カビ病菌 *Botrytis cinerea* 上で培養した場合, 1世代に要する時間は4~5日と(真宮, 1975, Wang et al., 2005), 同じAphelenchoidea科の線虫に比べて速い(真宮, 1975)。交尾後, メス成虫は産卵を始め, 30日前後の産卵期間に平均79個, 最多で216個を産卵する(Mamiya

and Furukawa, 1977)。現在まで単為生殖することは確認されていない。成虫の寿命は平均で15日, 最長で32日である(Mamiya and Furukawa, 1977)。幼虫は成育ステージごとに特徴が異なる。孵化した直後の第2期幼虫は体色が淡いが, 摂食に伴い腸内の黒色顆粒が目立つようになる。第3期幼虫は餌と水分が十分にあれば増殖型に, 不足すれば分散型に生育する。分散型3期幼虫は増殖型3期幼虫に比べて, 大型で尾端が丸いなどの形態的特徴をもち, 分散型4期幼虫という口針や中部食道球が退縮し摂食行動をしないタイプになることがある。一方, 増殖型3期幼虫は増殖型4期幼虫となる。両タイプの4期幼虫とも, 成虫に成育し, 上述の生活環を繰り返す(全国森林病虫獣害防除協会, 1997)。

1) 本論文は, 九州大学大学院博士学位論文を転載し, 一部改訂したものである。

## 2. マツ材線虫病による被害

材線虫は植物寄生性であると同時にマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* Hope, 以下カミキリ) の気門に寄生する昆虫寄生性線虫でもある。カミキリは5~6月に活動を始め、マツの新梢を後食するが、その際、材線虫は後食跡からマツ樹体内に侵入する。侵入した材線虫は樹体内で移動および増殖することが知られており、やがてマツは萎凋する。萎凋が激しいとマツはしばしば枯死することがある。このような病状はマツ材線虫病と呼ばれる(真宮, 2003)。

1905年に長崎でマツが枯死したという記録が最初のマツ材線虫病の被害報告とされている(岸, 1995)。その後、1930年代に九州一円、兵庫県、岡山県など西日本を中心に被害は拡大し、1960年代には関東地方にまで至った。近年は東北地方でも多くの被害が確認され、現在、北海道と青森県を除き被害は全国的に広がっている(真宮, 1992)。林野庁(2007)によると、被害量は243万m<sup>3</sup>を記録した1979年がピークとされ、その後、被害量は漸減しているものの、依然として毎年70万m<sup>3</sup>の被害が発生している。本病は日本のみならず、韓国、中国、台湾など東アジアのマツ林にも深刻な被害をもたらしている(Tamura, 1996; Enda, 1997)。さらに近年、ポルトガルでヨーロッパ初の被害報告があり(Mota et al., 1999)、世界的にも深刻な問題になっている。

## 3. クロマツのマツ材線虫病抵抗性育種

クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) は、防風防砂林として全国の海岸林を構成しており、白砂青松は日本の原風景の一つといえる。しかし、クロマツ林はマツ材線虫病により、甚大な被害を受けた。被害対策として、薬剤の散布や樹幹注入などの手法がとられているが、根本的な解決には至っていない。そこで1978年に、本病に対して抵抗性をもつクロマツを生産するため、マツノザイセンチュウ抵抗性(以下、抵抗性)育種事業が開始された(藤本ら, 1989)。西日本各地の激害地の中であって生存したクロマツは抵抗性候補木として、12,739個体が選抜された。候補個体からそれぞれ複数の接ぎ木クローン苗を育成し、これらに対して材線虫の接種検定が行われた。接種8週後に、抵抗性樹種であるテーダマツ (*Pinus taeda* L.) 実生苗と比べ、健全率(接種した本数に対する発病しなかった本数割合)や生存率(接種した本数に対する枯死しなかった本数割合)が同等か

それ以上のクローンが合格とされた。合格クローンに対しては2回目の接種検定が行われた。2回目は選抜基準が若干緩和され、接種6週後の健全率あるいは生存率のどちらかがテーダマツの値の60%以上のクローンが合格とされた。最終的に16クローンのクロマツが選抜された。

福岡県では、抵抗性のクロマツ苗木生産を行うため、これら16クローンを用いて、1988年に小郡市に0.5haの抵抗性クロマツ採種園(以下、採種園)を造成した。この採種園から採取した種子で育成した実生苗は、一般の非選抜の実生苗に比べて接種検定後の生存率が高く(宮原ら, 1994; 後藤・宮原, 2000)、抵抗性が高いと考えられる。しかし、実生苗は個体ごとの遺伝的ばらつきが大きいことから、採種園産実生苗が全て高い抵抗性をもつわけではない。このため、苗木生産現場では採種園産実生苗をそのまま出荷するのではなく、これらに一度接種検定を行い、発病しなかった検定合格苗だけを出荷するようにしている。戸田ら(2002)は、検定合格苗を現地に植栽し、7年後の成長と生存率を検証した。その結果、5割近くの個体がカミキリに食害されていたにも関わらず、生存率は平均95%であった。したがって、採種園産実生苗に接種検定を行うことで、高い抵抗性を持つ苗木が生産できると考えられる。しかし、接種検定に合格するものは30~50%しか得られず、苗木生産手法としては効率が悪いという問題点があった。歩留まりが低いため、福岡県産の検定合格苗の単価は650円と、一般のクロマツ苗よりも約10倍高く、被害跡地への植栽事業は円滑に進んでいない。

一方、検定合格苗がなぜ材線虫を接種しても発病しないのかについては未解明のままである。さらに、自然界に分布する材線虫の病原力が接種検定に用いた材線虫よりも強くなった場合にも、高い抵抗性を発揮して生存し続けるかどうかは不明である。

## 4. 本研究の目的

本研究では、上記1-3で示した抵抗性苗木生産現場での問題点を克服するため、生産効率の高い抵抗性クロマツ苗木生産システムを開発するとともに、その苗木の抵抗性のメカニズムを解明することを目的とした。

Ⅱでは、クロマツ苗木に弱病原性の材線虫を予め接種することで抵抗性を誘導できるかどうかを検討した。

Ⅲでは、接種検定で発病しなかった検定合格苗を

挿し木増殖することで、抵抗性苗木を効率よく得られるかどうかを検討した。

IVでは、クロマツの挿し木クローン増殖効率を調査し、植物ホルモン処理方法の検討によって効率よく挿し木増殖できる方法を検討した。

Vでは、抵抗性要因を解明するため、抵抗性と感受性のクロマツ間での材線虫の挙動の違いを、組織学的あるいは化学的観点から説明しようと試みた。

## II. 弱病原性マツノザイセンチュウの接種による苗木の抵抗性誘導

### 1. 本項の目的

植物の病原体に対する保護戦略の一つとして、非病原性の生物を予め植物に接種して抵抗性を高める誘導抵抗性が注目されている (Heil and Bostock, 2002)。例えば、カリフラワー (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) の芽生えにブロッコリーベと病菌

(*Peronospora parasitica* Pers.) の弱病原性系統を予め接種すると抵抗性が誘導され、子葉における強病原性系統の胞子形成が 49~70%ほど抑制される

(Monot et al., 2002)。植物寄生性線虫に関しても、誘導抵抗性の報告例はある。非病原性のバクテリアを予め植物体に接種しておくことで、バナナネモグリセンチュウ (*Radopholus similis* Cobb.) (Aalten et al., 1998)、シロシストセンチュウ (*Globodera pallida* (Stone) Behrens) (Reitz et al., 2000)、クローバーシストセンチュウ (*Heterodera trifolii* Goffart) (Kempster et al., 2001)、ジャワネコブセンチュウ (*Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood) (Siddiqui and Shaukat, 2004) の感染や正常な生殖を抑えられることが報告されている。また、線虫の接種が線虫に対する抵抗性を誘導する例もある。トマト (*Lycopersicon esculentum* L.) やピレスラム

(*Chrysanthemum cinerariaefolium* Visiani) においては、非親和性のジャワネコブセンチュウやサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita* var. *acrita* Chitwood) を予め接種すると、親和性のあるキタネコブセンチュウ (*Meloidogyne hapla* Chitwood) の増殖が抑制される (Ogallo and McClure, 1995, 1996)。

材線虫に関しても、誘導抵抗性の報告はある。材線虫の病原性は系統間でかなり異なるが (茨木ら, 1978; Kiyohara and Bolla, 1990; Aikawa et al., 2003)、清原 (1981) は弱病原性の材線虫 (以下、弱線虫) をクロマツに予め接種 (以下、前接種) しておく

その後に接種 (以下、後接種) した強病原性の材線虫 (以下、強線虫) により枯死するクロマツの本数割合 (以下、枯死率) が前接種のない場合に比べて低くなることを見出した。その後も実験の条件は異なるが、弱線虫を前接種した場合に後接種により病徴が表れたマツの本数割合 (以下、発病率) や枯死率が低くなるという報告がされてきた (清原, 1989; 清原・山田, 1996; 小坂ら, 2004; Takeuchi et al., 2006)。これらの現象は他の植物の誘導抵抗性と同様に、弱線虫が前接種されることで強線虫に対する抵抗性が誘導されたと解釈されている。

本項では、クロマツ苗木に弱線虫を前接種することで抵抗性を誘導できるかどうかを検証した。

### 2. 採種園産実生苗に対する抵抗性誘導の効果

#### ① 目的

現在、抵抗性のクロマツ苗木生産の現場では満1年生の採種園産実生苗を育成し、すべてに強線虫を接種して抵抗性を検定する。一定期間経過後に発病しなかった検定合格苗だけが抵抗性苗木として出荷されるが、その割合は接種した苗木本数の 30~50%程度と決して高くない。

本節では、採種園産実生苗に弱線虫を前接種することで抵抗性を誘導し、検定合格率が高まるかどうかを調べた。

#### ② 材料と方法

材線虫系統は、前接種用として弱線虫の OKD-1 (Kawazu et al., 1996) と C14-5 (清原, 1989)、後接種用として強線虫 Ka-4 (Aikawa et al., 2003)、Ka-4 より病原性の劣る島原個体群 (佐々木ら, 2001, 2002) を用いた。これらは、大麦培地に培養した *Botrytis cinerea* の菌糸上で、25°C暗黒条件下で 10~14 日間培養した。系統ごとに、ベールマン法 (Thorne, 1961) により回収して実験に供した。

供試した苗木は、顯娃ク-425号、大分ク-8号、田辺ク-54号と、比較のため福岡市早良区の海岸林にある非選抜のクロマツ 2 個体 (No. 1, No. 2) からそれぞれ種子を採取して育成した計 5 家系の満 1 年生自然交配実生苗とした。以下、本項では前者 3 家系を選抜家系、後者 2 家系を非選抜家系とする。

前接種に用いる弱線虫系統の効果をみるため、前接種は OKD-1, C14-5, 滅菌蒸留水 (コントロール) の 3 試験区を設けた。さらに、後接種に用いる材線虫の病原性の影響をみるため、後接種に強線虫 Ka-4 を用いた場合と、これより病原性の劣る島原個体群を用いた場合を組み合わせた。これら 6 つの試験区

を家系ごとに設定し、同じ家系の試験区間では苗木の数ができるだけ同じになるよう苗木を配分した。2006年6月30日に、苗木1個体あたり30,000頭(清原, 1989)の弱線虫を藤本ら(1989)の改良剥皮接種法(本研究で行った接種はすべて本手法によるため、以下、単に「接種した」とする)により主幹地際に(清原, 1984)接種した(前接種)。コントロールは、苗木1個体あたり滅菌蒸留水50 $\mu$ Lを同様に接種した。前接種から33日後の同年8月2日に、苗木1個体あたり10,000頭(清原, 1989)の強線虫を前接種点から3~5cm上部(清原, 1984)に後接種した。後接種から17週後の苗木の病徴を観察した。針葉の褪色や萎凋などの軽微なものから枯死したもので病徴が確認できたものは全て発病として、試験区ごとに発病率と枯死率を求めた。

### ③ 結果と考察

各試験区の後接種17週後の発病率と枯死率を家系ごとに表-1に示す。後接種にKa-4を用いた場合、発病率は選成家系の穎娃ク-425号で55~60%、大分ク-8号で33~50%、田辺ク-54号で47~78%、非選成家系No.1で45~67%、No.2で81~91%であった。島原個体群を用いた場合、穎娃ク-425号で55~65%、大分ク-8号で35~45%、田辺ク-54号で33~43%、非選成家系No.1で27~41%、No.2で52~69%であった。クロマツの家系や後接種した材線虫の系統によって、発病率は大きく異なる傾向が認められた。枯死率も同様の傾向を示した。これは、発病率や枯死率はクロマツの家系によって異なるとする宮原ら(1994)、川内(2000)、後藤・宮原(2000)、後藤ら(2002)の報告を支持する結果であった。また、佐々木ら(2001, 2002)が報告したように、Ka-4は島原個体群より病原性が高いと考えられた。

弱線虫の前接種により発病率や枯死率が有意に抑制されたかどうかをみるため、同じ家系の同じ後接種源ごとに前接種源によって発病の有無や枯死の有無の割合が変わるかを $\chi^2$ 検定により判定した。その結果、ほとんどの場合、前接種源に弱線虫系統を用いても、滅菌蒸留水を用いても、島原個体群またはKa-4によるマツ材線虫病の発病率や枯死率は有意に変わらなかった( $p>0.05$ )。田辺ク-54号にKa-4を後接種した場合、前接種源間で有意な差が認められたが( $p=0.017$ )、むしろコントロールの方の発病率が低かった。本試験では、抵抗性レベルの異なるクロマツを5家系、病原性レベルの異なる強線虫を2系統試したが、すべてのケースで弱線虫の前接種が発病や枯死を抑制する効果はみられなかつ

た。また、発病や枯死までに要する時間も弱線虫接種区と水接種区で変わらず、同じような速度で病徴は進展した(データ非提示)。

次に、供試した全ての苗木の後接種直後の苗高と発病率および枯死率との関係を調べた。発病した苗木の苗高は $30.8\pm 7.6$ cm (mean $\pm$ SD)、発病しなかった苗木は $32.6\pm 7.1$ cm、また、枯死した苗木は $29.5\pm 7.3$ cm、枯死しなかった苗木は $33.2\pm 7.1$ cmであった。このように、発病や枯死した苗木はしなかった苗木に比べていずれも有意に苗高が小さかった( $t$ 検定,  $p<0.01$ )。そこで前接種源別に苗高を調べたところ、OKD-1接種区が $32.3\pm 7.4$ cm (mean $\pm$ SD)、C14-5接種区が $31.9\pm 7.0$ cm、滅菌蒸留水接種区が $30.6\pm 7.8$ cmとなり、むしろ弱線虫接種区の苗木の方が大きかった。したがって、弱線虫による誘導抵抗性がみられなかったのは苗高が小さいことに起因するのではないと結論した。

本試験は、清原(1984, 1989)の報告で誘導抵抗性が認められた接種条件(前接種と後接種の接種頭数、前接種と後接種の接種点の位置、前接種と後接種の時間間隔)を採用した。また、前接種した材線虫系統はKosaka et al. (2001)が誘導抵抗性を確認したOKD-1とC14-5を用いた。このように過去に誘導抵抗性が確認された材料と条件を組み合わせせて試験を行ったが、弱線虫の前接種により苗木の発病や枯死が抑制され、接種検定合格率が高まることはなかった。

## 3. 人工気象室内での誘導抵抗性の検証

### ① 目的

前節2の試験では弱線虫を接種することによる誘導抵抗性は確認されなかった。清原・山田(1996)は、苗木の水分条件など環境要因により誘導抵抗性の発現が変化しているとしている。しかし、既報では環境条件を制御した条件で誘導抵抗性が検証された例はない。本節では、人工気象室内で環境条件を制御し、誘導抵抗性を検証した。

### ② 材料と方法

供試した苗木は、川内ク-290号および前節2で用いた非選抜のクロマツ2個体(No.1, No.2)からそれぞれ種子を採取して育成した計3家系の満1年生自然交配実生苗とした。これらは、野外の苗畑に植栽されたものを2005年12月中旬に径14cmのポットに鉢上げし、2週間直射日光の当たらない屋外で養生させた。その後、ガラス温室で2週間、人工気象室内において温度20 $^{\circ}$ C、12時間日長(明:暗=12



表一 1. 弱線虫の前接種を行って 33 日後に強線虫を接種した場合の苗木の症状

家系	前接種源	後接種源	供試苗木 本数 (本)	苗高 mean ± SD (cm)	後接種後の苗木の症状			
					発病		枯死	
					(本)	(%)	(本)	(%)
顔娃ク-425 (選抜家系)	OKD-1	Ka-4	20	37.0 ± 5.1	11	55.0	7	35.0
	C14-5	Ka-4	20	36.1 ± 5.2	12	60.0	9	45.0
	水	Ka-4	20	35.3 ± 5.3	12	60.0	7	35.0
	OKD-1	島原個体群	20	29.4 ± 4.3	12	60.0	8	40.0
	C14-5	島原個体群	20	27.9 ± 3.8	13	65.0	11	55.0
	水	島原個体群	20	26.4 ± 5.7	11	55.0	11	55.0
大分ク-8 (選抜家系)	OKD-1	Ka-4	18	41.3 ± 3.6	6	33.3	4	22.2
	C14-5	Ka-4	18	41.6 ± 6.7	7	38.9	5	27.8
	水	Ka-4	18	41.8 ± 5.4	9	50.0	6	33.3
	OKD-1	島原個体群	17	42.2 ± 7.3	6	35.3	4	23.5
	C14-5	島原個体群	18	38.6 ± 9.5	7	38.9	6	33.3
	水	島原個体群	18	40.7 ± 6.9	8	44.4	2	11.1
田辺ク-54 (選抜家系)	OKD-1	Ka-4	36	32.9 ± 5.2	26	72.2	21	58.3
	C14-5	Ka-4	35	31.6 ± 4.4	27	77.1	25	71.4
	水	Ka-4	36	26.1 ± 4.8	17	47.2	16	44.4
	OKD-1	島原個体群	35	30.0 ± 5.8	15	42.9	10	28.6
	C14-5	島原個体群	39	29.5 ± 4.7	13	33.3	11	28.2
	水	島原個体群	36	31.6 ± 5.2	15	41.7	9	25.0
No.1 (非選抜家系)	OKD-1	Ka-4	21	27.6 ± 6.4	14	66.7	11	52.4
	C14-5	Ka-4	22	30.3 ± 6.3	10	45.5	8	36.4
	水	Ka-4	22	27.8 ± 5.9	13	59.1	10	45.5
	OKD-1	島原個体群	22	24.3 ± 4.8	6	27.3	5	22.7
	C14-5	島原個体群	22	27.4 ± 7.4	6	27.3	6	27.3
	水	島原個体群	22	27.9 ± 5.8	9	40.9	6	27.3
No.2 (非選抜家系)	OKD-1	Ka-4	22	34.5 ± 6.1	18	81.8	17	77.3
	C14-5	Ka-4	22	28.7 ± 5.4	20	90.9	17	77.3
	水	Ka-4	21	24.7 ± 7.3	19	90.5	19	90.5
	OKD-1	島原個体群	21	29.0 ± 4.2	11	52.4	9	42.9
	C14-5	島原個体群	22	32.3 ± 4.3	15	68.2	12	54.5
	水	島原個体群	21	30.0 ± 6.1	12	57.1	11	52.4

時間：12 時間），相対湿度 70%の条件で 1 週間，温度 28℃，14 時間日長（明：暗＝14 時間：10 時間），相対湿度 70%の条件で 1 週間養生した。このように，

苗木を野外の環境から徐々に人工気象室の環境へと馴らしてから，接種実験を行った。試験区は，①前接種に弱線虫 OKD-1，後接種に強線虫 Ka-4 を用い

た試験区（以下、弱→強）、②前接種に滅菌蒸留水、後接種に強線虫 Ka-4 を用いた試験区（以下、水→強）、③前接種に弱線虫 OKD-1、後接種に滅菌蒸留水を用いた試験区（以下、弱→水）の3つを設けた。いずれの試験区も苗木1個体あたり、OKD-1 は30,000頭、Ka-4 は10,000頭、滅菌蒸留水は50 $\mu$ Lを接種した。各試験区で苗木の家系が偏らないよう、各家系とも弱→強および水→強に8~9個体、弱→水に3~4個体ずつ苗木を配分した。その結果、苗木の供試数は3家系全体で弱→強および水→強が25個体、弱→水が10個体となった。前接種は2006年1月19日に、後接種は29日後の同年2月17日に行った。前接種以降は、温度28 $^{\circ}$ C、14時間日長（明：暗=14時間：10時間）、相対湿度70%の条件に保ち、5~6日おきに苗木1個体あたり300mLの灌水を行った。後接種25日後から65日後まで、6~9日おきに苗木の病徴を観察し、各試験区の苗木の発病率と枯死率を経時的に調査した。

### ③ 結果と考察

各試験区の苗木の発病率と枯死率について、後接種からの時間変化を図-1に示す。ネガティブコントロールの弱→水では全く発病がみられなかったのに対し、弱→強および水→強ではいずれも後接種47日後までにすべての苗木で発病がみられた。また、65日後までに両区ともすべての苗木が枯死した。発病や枯死に至る速さについても弱→強および水→強の間で差は認められなかった。また、苗高を比較すると、弱→強は29.6 $\pm$ 8.5cm (mean $\pm$ SD)、水→強は28.1 $\pm$ 8.4cm、弱→水は27.8 $\pm$ 10.9cmであった。苗高に有意差は認められず（分散分析、 $p>0.05$ ）、弱線虫接種の効果がみられなかったのはコントロールに比べて苗高が小さいためではないと考えられた。このように人工気象室内で環境条件を制御した条件下では、強線虫を接種したすべての苗木が枯死に至り、誘導抵抗性は認められなかった。

## 4. クローン苗を用いた誘導抵抗性の検証

### ① 目的

前節2および3の試験では、いずれも弱線虫を接種したことによる誘導抵抗性は確認されなかった。誘導抵抗性発現の指標である発病率や枯死率はマツ側の遺伝的要因に左右されるが（宮原ら、1994；九州地区林業試験研究機関連絡協議会育種部会、1999；川内、2000；後藤・宮原、2000；後藤ら、2002）、既報ではマツ側の遺伝的由来や処理区とコントロール間の遺伝的ばらつきに配慮された実験は行われて

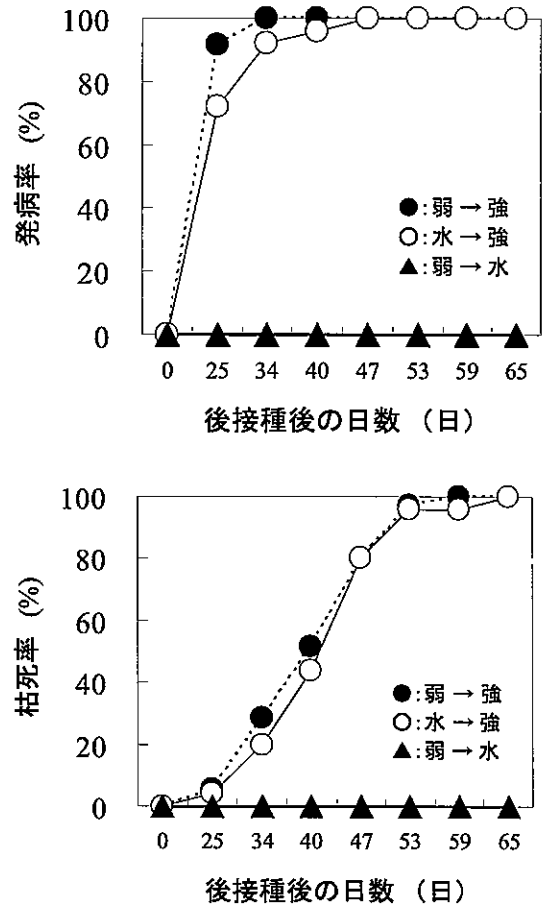


図-1. 弱線虫の前接種を行って29日後に強線虫を接種した場合の苗木症状の時間変化

いない。

本節では、同じ個体から増殖した挿し木苗を弱線虫接種区とコントロールに同数ずつ配分することで両試験区間のクロマツの遺伝的ばらつきを揃え、遺伝的要因が発病率や枯死率に与える影響をできるだけ排除して誘導抵抗性を検証した。

### ② 材料と方法

川内ク-290号と志摩ク-64号から種子を採取し、それぞれ9個体と4個体の計13個体の実生苗を育成した。森ら（2004）の方法で1個体の実生苗から2~6個体ずつ合計40個体（満2年生30個体と満3年生10個体）のクローン苗を挿し木増殖により育成し、試験に供した。前接種源はOKD-1（苗木1個体あたり30,000頭）、滅菌蒸留水（コントロール）の2試験区を設け、両試験区とも後接種には強線虫Ka-4（苗木1個体あたり10,000頭）を用いた。両試験区間でクロマツの遺伝的ばらつきと苗齢が同じになるよう、同じ個体から増殖した同じ苗齢の個体を同数ずつ配分した結果、両試験区とも13クローン



表 2. 弱線虫の前接種を行って 31 日後に強線虫を接種した場合のクローン苗の症状

前接種源	後接種源	苗木本数 (本)	苗木高 mean ± SD (cm)		後接種後の苗木の症状			
					発病		枯死	
					(本)	(%)	(本)	(%)
OKD-1	Ka-4	20	70.5 ±	36.3	16	80.0	6	30.0
水	Ka-4	20	76.8 ±	29.8	14	70.0	6	30.0

20 個体 (満 2 年生 15 個体と満 3 年生 5 個体) ずつとなった。前接種は 2005 年 7 月 30 日に、後接種は 31 日後の同年 8 月 30 日に行った。後接種から 17 週後での苗木の病徴を観察し、苗木の発病率と枯死率を両試験区で比較した。

### ③ 結果と考察

両試験区の後接種 17 週後の発病率と枯死率を表 2 に示す。弱線虫接種区では、20 個体中 16 個体が発病し、そのうち 6 個体が枯死した。これに対して、コントロールの滅菌蒸留水接種区では、14 個体が発病し、そのうち 6 個体が枯死した。 $\chi^2$ 検定の結果、発病および枯死の有無に両試験区で有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。また、苗木高を比較すると、OKD-1 接種区は  $70.5 \pm 36.3 \text{cm}$  (mean ± SD)、滅菌蒸留水接種区は  $76.8 \pm 29.8 \text{cm}$  であった。苗木高に有意差は認められず ( $t$  検定,  $p > 0.05$ )、弱線虫接種の効果がみられなかったのはコントロールに比べて苗木高が小さいためではないと考えられた。このように弱線虫接種区とコントロールとの間でクロマツの遺伝的要因の影響をできるだけ排除した場合でも、両区間で発病率や枯死率に差はなく、誘導抵抗性は認められなかった。

### 5. 本項の小括

多くの植物種で病原体に対する抵抗性が誘導されるとの報告がある (Heil and Bostock, 2002)。材線虫においても清原 (1981) が初めて誘導抵抗性を報告して以来、これを支持する結果がいくつか報告されている (清原, 1989; 清原・山田, 1996; 小坂ら, 2004; Takeuchi et al., 2006)。

本項では誘導抵抗性に着目し、クロマツの苗木に弱線虫を接種することで抵抗性を誘導できるかどうかを検証した。既報で誘導抵抗性が確認された接種条件を採用したにも関わらず、選抜家系および非選抜家系いずれのクロマツでも、予め弱線虫を接種した場合と水を接種した場合で強線虫による発病率や

枯死率に有意差はなかった。このように既報と異なったのは、苗木のサイズが結果に影響を与えただけではなかった。さらに、既報では検討されなかった環境条件あるいは苗木の遺伝的ばらつきを制御した条件下で検証を行ったが、いずれも弱線虫による発病や枯死の抑制効果はみられなかった。本試験の結果と同様に、福田・鈴木 (1993)、加藤・竹本 (2002)、竹本・神原 (2003, 2004) は、弱線虫を前接種したクロマツやアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) に強線虫を後接種しても枯死が抑制されなかったことを報告している。

以上のことから判断して、清原 (1981) が最初に報告した誘導抵抗性は弱線虫を接種すれば普遍的にみられる現象ではないと考えられた。したがって、クロマツの苗木に弱線虫を接種したとしても、接種しなかった場合に比べて抵抗性の高い苗木が得られる可能性は低いと判断された。

### Ⅲ. 接種検定により選抜した抵抗性個体の挿し木クローンの抵抗性

#### 1. 本項の目的

前項 II では、クロマツの苗木に弱線虫を前接種しても抵抗性を誘導できなかったことから、異なる観点から効率的な抵抗性苗木生産を行う必要がある。現行では、遺伝的ばらつきのある採種園産実生苗の中から抵抗性をもつ苗木だけを生産するために、生産のたびに接種検定を行ってきた。しかし、接種検定の合格率は約 30~50% であるため、一定量の抵抗性苗木を得るためにはその 2~3 倍の数の苗木に対して、接種検定を行わなければならない。また、検定で不合格となった苗木は商品にならないが、接種検定に供するまでの間はこのような苗木に対しても育苗経費を投下しなければならない。このように現行の抵抗性苗木生産は決して生産効率が良いとはいえない。そこで、いったん接種検定で選抜した抵抗

から挿し木を行い、1母樹あたり2~9個体、合計90個体の挿し木苗を育成した。これらは、満2年生時の7月下旬に唐津3を1個体あたり6,000頭接種し、接種から6ヵ月以上経過した時点で病徴の進展を観察し、健全、部分枯れ、枯死の3段階に分類した。

### ③ 結果と考察

島原個体群による接種検定に合格した18個体の母樹にKa-4を接種した結果、15個体は発病せず、3個体が発病した(部分枯れ)。次に、発病しなかった15個体に翌年唐津3を接種した結果、9個体は発病せず、6個体が発病した(部分枯れ)。すなわち、島原個体群の接種検定に合格した母樹はその後の2回の接種検定で常に発病しなかった9個体(母樹番号:P1~P9)といずれかの接種検定で発病した9個体(母樹番号:F1~F9)の2つに分けられた。これら2つのグループから得られた挿し木苗の接種結果を表-4に示す。すべての接種検定に合格したグル

ープでは、得られた挿し木苗の発病率が2.3%と非常に低く、グループ内のどの母樹からも接種で枯死する挿し木苗は認められなかった。一方、いずれかの接種検定で不合格となったグループの挿し木苗の発病率は13.0%であり、母樹の一つ(F8)から得られた苗木の一部が枯死した。

近年、九州各地の被害林分から強線虫系統が新たに分離されている(秋庭ら, 2001, 2002, 2003, 2004)。現地に適応する抵抗性苗木を生産するためには、接種検定で通常用いられる島原個体群以外の系統に対する抵抗性も検討しておく必要がある。本試験で用いたKa-4は、採種圃産実生苗に対する発病率が64~78%と島原個体群の53~56%に比べて高い(佐々木ら, 2001, 2002)。また、唐津3の発病率は88~89%とKa-4よりもさらに高い(佐々木ら, 2001, 2002)。このように唐津3は今回用いた3系統の中で最も病原力が強いと考えられるが、3回の接種検

表-4. 3回の接種検定の合格クローンおよび不合格クロンの接種結果

母樹に対する 3回の接種検定結果	クローン 番号	苗木 本数 (本)	接種後のクローン苗の症状			
			発病		枯死	
			(本)	(%)	(本)	(%)
合格	P1	2	0	0.0	0	0.0
	P2	2	0	0.0	0	0.0
	P3	2	0	0.0	0	0.0
	P4	5	0	0.0	0	0.0
	P5	5	0	0.0	0	0.0
	P6	6	0	0.0	0	0.0
	P7	6	1	16.7	0	0.0
	P8	7	0	0.0	0	0.0
	P9	9	0	0.0	0	0.0
	計	44	1	2.3	0	0.0
不合格	F1	2	0	0.0	0	0.0
	F2	2	0	0.0	0	0.0
	F3	2	1	50.0	0	0.0
	F4	5	0	0.0	0	0.0
	F5	5	1	20.0	0	0.0
	F6	6	0	0.0	0	0.0
	F7	7	0	0.0	0	0.0
	F8	8	4	50.0	3	37.5
	F9	9	0	0.0	0	0.0
	計	46	6	13.0	3	6.5

定に合格した個体の挿し木苗は、唐津3に対しても発病率は2.3%と非常に低く抑えられた。したがって、強線虫による接種検定を3回行って母樹を選抜すれば、得られる抵抗性苗木の割合が非常に高くなり、生産効率が改善されると考えられた。

#### 4. 本項の小括

本項では、抵抗性苗木を効率よく得るために、接種検定合格個体から挿し木クローン苗の育成を試みた。得られたクローン苗に接種検定を行った結果、採種園産実生苗に比べて発病率が常に低く、現行よりも抵抗性苗木を効率よく得られることがわかった。しかし、検定合格個体の中にはそのラメートの発病率が3年間とも70%を上回るようなものも認められた。ラメートの発病率には有意な年次相関が認められるため、抵抗性はクローンごとに決定されていることが示唆される。したがって、抵抗性の低い個体が母樹として使用されないよう、母樹に対する接種検定基準を厳しくする必要があった。そこで、一度接種検定で合格した個体に強線虫Ka-4と唐津3を追加接種して、それでも発病しない個体を母樹として選抜した。その結果、選抜された母樹から得られたクローン苗は強線虫唐津3を接種してもほとんど発病することはなかった。これらのことから、複数回の接種検定に合格した個体から挿し木クローン苗を得る手法は、非常に高い抵抗性をもつ苗木を効率的に生産するのに有効な手段であることが示唆された。

### IV. 挿し木発根性の評価と効率的な挿し木増殖方法の開発

#### 1. 本項の目的

前項Ⅲでは、複数回の接種検定に合格したクロマツから挿し木クローンを育成すれば、高い抵抗性をもった苗木を効率よく得られる可能性が示された。しかし、マツ属樹種は挿し木発根性（以下、発根性）が低いとされており（Kozłowski and Pallardy, 1997）、クロマツも挿し木は難しいと指摘されてきた（戸田, 1953; 森下・大山, 1972; 町田, 1973）。また、クロマツは実生繁殖が容易でクローン増殖の必要性も低かったことから、1970年代以降は石松（1998）や後藤ら（1999）が研究を開始するまで、クロマツの挿し木クローンの育成に関する研究はほとんどされてこなかった。このように知見は乏しいものの、現在までに挿し木の時期（石川, 1968; 石松, 1998;

宮崎, 2004）、用土（森・宮原, 2002; 大平ら, 2005）、母樹の樹齢（大山・豊島, 1965）、挿し穂の調製方法（石松, 1999; 佐々木ら, 2004）、挿し穂の処理方法（後藤, 1999; 石松, 1999; 森・宮原, 2002）などと発根性との関係が報告されている。これらの報告によると、春期に樹齢の若い母樹から当年枝を採取し、適度な摘葉と摘芽をした5cm程度の長さの挿し穂を調製し、これをオーキシシン処理した後に、鹿沼土や川砂などの用土に挿し付けることにより発根率の向上が期待される。しかし、選抜する抵抗性個体は個々に発根性レベルが異なると予想され、どのような個体からでも普遍的に高い発根性が得られるかどうかは検討されていない。

本項では、母樹個体ごとの発根性を評価し、発根性の低い個体からでもクローン増殖できるような挿し木手法を検討した。

### 2. 母樹の挿し木発根性の評価

#### ① 目的

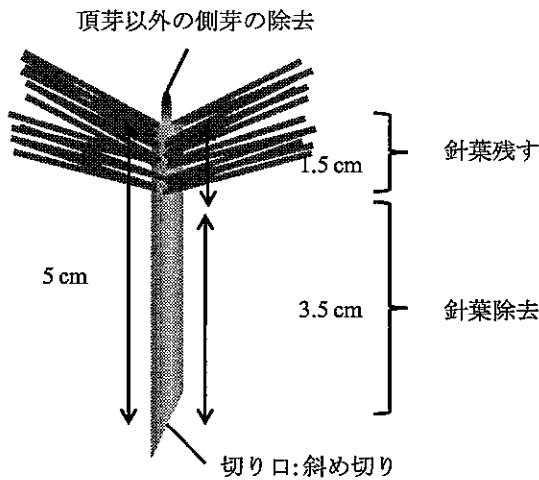
挿し木クローンの増殖に際しては、選抜した母樹から定期的に挿し木を行う必要がある。しかし、これらの母樹から毎年安定的に当年枝を採取し、挿し木増殖が可能かどうかは不明である。

本節では、実生苗30個体を母樹として固定し、6年間毎年1回ずつ同じ条件で挿し木を行い、発根性の個体間変異および年次変動を調べた。

#### ② 材料と方法

川内ク-290号の実生30個体を母樹として用いた。満3年生から満9年生まで（満5年生は除く）過去6年間毎年2月中下旬に、各母樹から5~10本ずつ10~15cm程度の当年枝を採取した。採取した当年枝は、頂芽の根元から5cmの部位をナイフで斜めにカットした。過度の蒸散を抑制するため、切り口から3.5cmまでの針葉をすべて除去した。また、側芽をすべて除去して挿し穂（長さ5cm）を調製した（図-3a）。挿し付け直前にオキシベロン粉剤（有効成分：インドール-3-酪酸（以下、IBA）1.0%、パイエルクロップサイエンス株式会社製）を切り口に塗布した。挿し床は、鹿沼土中粒とバーミキュライト中粒（容積比3:1）の混合土を育苗箱（36cm×51cm×10.5cm：底穴2mm角）に敷き詰めたものとした（図-3b）。灌水は1日4回（3分/回）のガラス室内ミスト灌水とした（図-3b）。いずれの年も挿し付け当年の7月から翌年4月までにすべての挿し穂の発根の有無を調査し、母樹ごとに各年の発根率（挿し付けた挿し穂に対する発根した挿し穂の本数

a) 挿し穂の調製



b) 挿し床および栽培条件

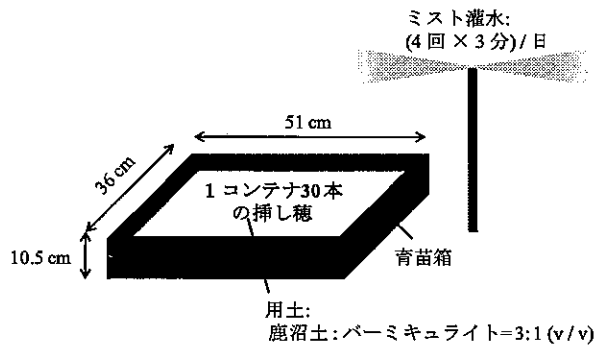


図-3. 挿し木増殖の概略図

割合)を算出し、各母樹の6年間の平均発根率を比較した。

③ 結果と考察

挿し穂の6年間の平均発根率を採取した母樹別に図-4に示す。発根率は母樹個体間で大きくばらつき、平均発根率が82%と高い個体がある一方、6年間全く発根しなかった個体も認められた。平均発根率が50%を超えた個体は4個体、20%未満の個体が12個体と、発根性が低い母樹が多く認められた。

各母樹から採取した挿し穂の発根率について、逆正弦変換値の年次相関を表-5に示す。母樹が3年生時と9年生時の相関係数は0.12と低かったものの、これ以外ほとどの年次間でも0.47~0.67と有意な相関が得られた ( $p < 0.01$ )。したがって、発根の難易は母樹ごとにおおむね決定されており、その傾向は挿し木を行った年が違っていても変わらず安定していることが示唆された。Browne et al. (1997) は、バンクスマツ (*Pinus banksiana* Lam.) では4~30年生

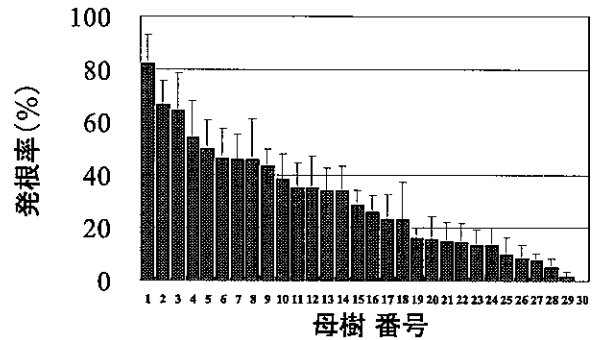


図-4. 母樹による挿し木発根率の違い  
6年間の平均値±標準誤差を示す。

表-5. 母樹別の挿し木発根率の年次相関

母樹齢 (年生)	3	4	6	7	8	9
3	-	-	-	-	-	-
4	0.47 **	-	-	-	-	-
6	0.55 **	0.48 *	-	-	-	-
7	0.55 **	0.67 **	0.61 **	-	-	-
8	0.51 **	0.48 **	0.62 **	0.54 **	-	-
9	0.13 NS	0.59 **	0.54 **	0.54 **	0.49 **	-

数字は相関係数を表す (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , NS: 有意ではない)。

まで6段階の各樹齢階の母樹15個体から挿し木を行った結果、どの樹齢階でも発根率が高い母樹群と低い母樹群に分かれることを報告した。また、大平ら(2007)は、三崎ク-90号と三豊ク-103号の2家系のクロマツ実生苗を母樹として挿し木を行った結果、同じ家系内でも個体ごとに発根率が大きく異なることを観察した。以上のことから、クロマツの挿し穂の発根性は母樹個体ごとに決定される可能性が高いことが示唆された。

3. 挿し木増殖された個体を母樹とした場合の挿し木発根性

① 目的

前節2の試験結果により、挿し穂の発根性は母樹個体の固有の表現型であることが予想された。しかし、この発根性の個体差は遺伝的な要因によるものなのか、環境条件により後天的に獲得されたものかは不明である。

本節ではこれを確かめるために、前節2の試験で得られた挿し木クローンを母樹とは異なる苗畑に移植し、もとの母樹と挿し木クローンの双方から同時に同じ条件で挿し木を行い、その発根性を比較した。

② 材料と方法

前節2で用いた川内ク-290号家系の満10年生実生11個体と、これらを満4年生時に挿し木増殖して得た満6年生の挿し木クローン11個体を母樹として用いた。2005年2月25日にこれらの母樹から同時に当年枝を8~10本ずつ採取し、前節2と同様の方法で長さ5cmの挿し穂を調製した。挿し穂の切り口から3cm程度をオキシベロン液剤(有効成分: IBA19.7mM, バイエルクロップサイエンス株式会社製)に5秒間浸漬し、直ちに前節2と同様の挿し床に挿し付けした。灌水条件も前節2と同様とした。2005年10月21~22日にすべての挿し穂の発根の有無を調査し、同じクローン同士の満10年生実生苗からの発根率と満6年生挿し木苗からの発根率の相関を調べた。

③ 結果と考察

11クローンにおける実生からと挿し木クローンからの発根率の相関を図-5に示す。相関係数は0.83と有意に高く( $p < 0.01$ ), 発根性の高い個体は挿し木クローン化しても高い発根性を保っており、逆に低い個体はクローン化しても発根性は低いことが示された。本試験で母樹として用いた実生個体群とその挿し木クローン群は異なる場所に植栽されており、遺伝子型は同じでも生育環境は異なる。それにも関わらず、高い相関が得られたということから、挿し穂の発根性は母樹個体ごとの遺伝的要因が大きいことが示唆された。

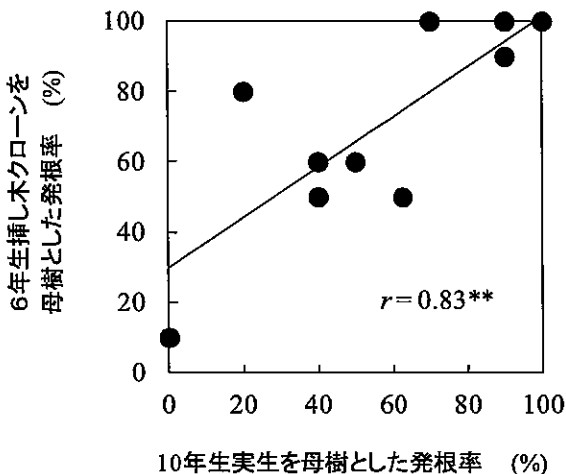


図-5. 実生および挿し木クローンを母樹とした場合の挿し木発根率の相関

r: 相関係数 ( $p < 0.01$ )

4. オキシベロン処理時間が発根率に及ぼす影響

① 目的

前節2および3の結果から、挿し穂の発根性は母樹の遺伝的要因によって大きく左右され、挿し木を行った年が異なっても発根性は維持されることが示された。本節では、接種検定で選抜した個体から採取した挿し穂の発根性を高めるため、挿し穂の処理条件を探索した。

不定根発生には、植物ホルモンの一つであるオーキシシンが中心的な役割を担うといわれており

(Blakesley, 1994; De Klerk et al., 1999), 多くの植物の挿し木に合成オーキシシンであるIBAやNAA

(1-ナフタレン酢酸)が用いられている(Hartmann et al., 1990)。日本では、園芸用のオーキシシン剤として、IBAを有効成分とするオキシベロン(バイエル

クロップサイエンス株式会社製)が市販され、様々な樹木の挿し木に用いられている(上中ら, 1986; 川村, 1988)。

オキシベロンは、タルク粉末にIBAを混合した粉剤と液剤とが市販されているが、粉剤は塗布量を制御することが困難なため、液剤を使って発根促進に効果的な処理条件を検討した。大平(未発表)はクロマツの挿し穂を4段階の濃度のIBA溶液に5秒間浸漬したところ、0.5%(24.6mM)で最も発根率が高くなることを観察した。また、

Henrique et al. (2006)はカリビアマツ(*Pinus caribaea* Morelet)の挿し穂の基部を2,000mg/L(9.8mM), 4,000mg/L(19.7mM), 6,000mg/L(29.5mM)の3段階のIBA溶液に2秒間浸漬して挿し木を行った結果、4,000mg/L(19.7mM)で最も高い90%以上の発根率を得た。オキシベロン液剤の濃度はIBA

0.4%(19.7mM)であり、大平(未発表)やHenrique et al. (2006)の試験で発根率の極大値が得られた濃度と同程度である。

そこで本節では、オキシベロン液剤を希釈せずに原液のまま使い、挿し穂の浸漬時間と発根率との関係を調べた。

そこで本節では、オキシベロン液剤を希釈せずに原液のまま使い、挿し穂の浸漬時間と発根率との関係を調べた。

そこで本節では、オキシベロン液剤を希釈せずに原液のまま使い、挿し穂の浸漬時間と発根率との関係を調べた。

そこで本節では、オキシベロン液剤を希釈せずに原液のまま使い、挿し穂の浸漬時間と発根率との関係を調べた。

そこで本節では、オキシベロン液剤を希釈せずに原液のまま使い、挿し穂の浸漬時間と発根率との関係を調べた。

そこで本節では、オキシベロン液剤を希釈せずに原液のまま使い、挿し穂の浸漬時間と発根率との関係を調べた。

そこで本節では、オキシベロン液剤を希釈せずに原液のまま使い、挿し穂の浸漬時間と発根率との関係を調べた。

② 材料と方法

前節2で6年間の平均発根率が35%以上であった6個体(平均発根率50.1%)から満6年生時に挿し木増殖した6クローンを母樹として用いた。2005年2月22日に各母樹から30本ずつ当年枝を採取した。前節2の方法で長さ5cmの挿し穂を調製し、切り口から3cm程度をオキシベロン液剤(IBA 19.7mM)に浸漬した直後に挿し付けた。浸漬時間は5秒間、10分間、1時間の3段階を設定し、各母樹から調製した30本の挿し穂を10本ずつ割り当てた。挿し床

前節2で6年間の平均発根率が35%以上であった6個体(平均発根率50.1%)から満6年生時に挿し木増殖した6クローンを母樹として用いた。2005年2月22日に各母樹から30本ずつ当年枝を採取した。前節2の方法で長さ5cmの挿し穂を調製し、切り口から3cm程度をオキシベロン液剤(IBA 19.7mM)に浸漬した直後に挿し付けた。浸漬時間は5秒間、10分間、1時間の3段階を設定し、各母樹から調製した30本の挿し穂を10本ずつ割り当てた。挿し床

前節2で6年間の平均発根率が35%以上であった6個体(平均発根率50.1%)から満6年生時に挿し木増殖した6クローンを母樹として用いた。2005年2月22日に各母樹から30本ずつ当年枝を採取した。前節2の方法で長さ5cmの挿し穂を調製し、切り口から3cm程度をオキシベロン液剤(IBA 19.7mM)に浸漬した直後に挿し付けた。浸漬時間は5秒間、10分間、1時間の3段階を設定し、各母樹から調製した30本の挿し穂を10本ずつ割り当てた。挿し床

前節2で6年間の平均発根率が35%以上であった6個体(平均発根率50.1%)から満6年生時に挿し木増殖した6クローンを母樹として用いた。2005年2月22日に各母樹から30本ずつ当年枝を採取した。前節2の方法で長さ5cmの挿し穂を調製し、切り口から3cm程度をオキシベロン液剤(IBA 19.7mM)に浸漬した直後に挿し付けた。浸漬時間は5秒間、10分間、1時間の3段階を設定し、各母樹から調製した30本の挿し穂を10本ずつ割り当てた。挿し床

前節2で6年間の平均発根率が35%以上であった6個体(平均発根率50.1%)から満6年生時に挿し木増殖した6クローンを母樹として用いた。2005年2月22日に各母樹から30本ずつ当年枝を採取した。前節2の方法で長さ5cmの挿し穂を調製し、切り口から3cm程度をオキシベロン液剤(IBA 19.7mM)に浸漬した直後に挿し付けた。浸漬時間は5秒間、10分間、1時間の3段階を設定し、各母樹から調製した30本の挿し穂を10本ずつ割り当てた。挿し床

や灌水条件は前節2と同様の条件で行った。2005年10月19~21日にすべての挿し穂の発根の有無を調査し、母樹ごとに発根率を算出し、母樹6個体の平均を試験区間で比較した。さらに、発根した挿し穂については挿し穂1本あたりの不定根数の平均を試験区間で比較した。

### ③ 結果と考察

オキシベロン浸漬時間と発根率および発根した挿し穂1本あたりの不定根数との関係について図-6に示す。平均発根率は5秒間処理で58%、10分間処理で66%、1時間処理で64%となり、10分間処理が最も高い値を示したが、有意差は認められなかった(対応のある $t$ 検定,  $p > 0.22$ )。一方、平均不定根数は5秒間処理で5.0、10分間処理で7.7、1時間処理で9.9と浸漬時間が長いほど有意に多くなった(対応のある $t$ 検定,  $p < 0.01$ )。不定根の発生部位をみると、5秒間処理ではすべて切り口からのみ発根していたが、10分間処理や1時間処理では切り口の上部2cmほどの部位からも発根しているのがしばしば観察された。太田(1980)は、クロマツ芽生えの胚軸全体をインドール酢酸(IAA)に24時間浸漬したところ、処理濃度が高くなるにつれて切り口付近だけでなく胚軸上部でも発根するようになるとしている。本試験でも、IBAの浸漬時間が長くなるにつれて発根部位が切り口上部へ広がるという同様の現象が観察され、これにより不定根の数が増加したものと考えられた。一方、頂芽の様子をみると、5秒間処理や10分間処理では頂芽の伸長阻害はみられなかったが、1時間処理では発根しても頂芽の伸長がみられないものが多く観察された(データ非提示)。また、発根した挿し穂のうち枯死したものの数を調べると、5秒間処理で0本、10分間処理で1本(発根した挿し穂の1.1%)、1時間処理で8本(発根した挿し穂の9.0%)の個体が枯死していた。シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)やテーダマツにおいて、*in vitro*で芽生えの胚軸の不定根を誘導する場合、培地に添加するIBAの濃度は10~100  $\mu$ M程度である(Greenwood et al., 2001; Ludwig-Müller et al., 2005)。したがって、今回用いたオーキシン濃度は既報と比較して非常に高いと考えられ、高濃度のオーキシンに長時間浸漬することで、頂芽の伸長抑制や枯死など負の影響が出た可能性が考えられた。しかし、樹木の挿し木発根促進を目的に行われるオーキシン処理は、通常、mMオーダーのオーキシンに挿し穂の切り口を数秒間浸漬する処理が行われている。例えば、ライラック(*Syringa*

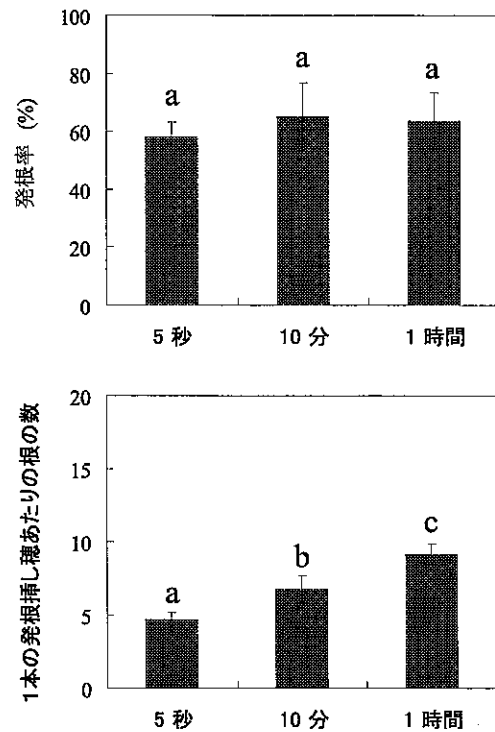


図-6. オキシベロン浸漬時間が発根率(上)および不定根の数(下)に及ぼす影響

平均値±標準誤差を示す ( $n=6$ )。

異なるアルファベット間に有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。

*vulgaris* cv. Madame Lemoine) やレンギョウ

(*Forsythia* × *intermedia* cv. Lynwood) では

3.08mMや12.3mMのIBAを5秒間(Ford et al., 2002)、バンクスマツでは5.4mMのNAAを10秒間(Browne et al., 1997)、テーダマツでは10mMのNAAを3秒間(Dougherty et al., 2004)というオーキシン処理が行われている。本試験のようにmMオーダーのオーキシンを長時間浸漬して発根を誘導した報告例はないが、クロマツの挿し穂をオキシベロン液剤に浸漬する場合、発根率、不定根数、頂芽の伸長、挿し穂の生存という観点から判断して、10分間がより適した処理時間であると考えられた。

## 5. エテホンとオーキシンのコンビネーションが低発根性母樹の挿し穂の発根率に及ぼす効果

### ① 目的

前節4では、挿し穂をオキシベロンの原液に10分間浸漬する処理で高い発根率が得られることがわかった。抵抗性苗木生産に際しては、接種検定で選抜した多くの個体を採穂園に定植し、挿し穂を供給することが想定される。しかし、選抜された抵抗性個体がすべて発根性も高いとは限らないため、採穂



園の多くの個体から挿し木を行ったとしても、特定の母樹からしかクローン増殖できない可能性がある。その場合、得られた抵抗性苗木全体の遺伝的多様性は損なわれ、何らかの病原菌や害虫などに対して一様に被害を受けやすい可能性も考えられる。そこで、発根能力の低い母樹から採取した挿し穂の発根率を向上させる処理方法を検討した。不定根形成にはオーキシシンが中心的な役割を持つことは普遍的な事実であるが、イネ (*Oryza sativa* L. cv Pin Gaew 56) (Lorbiecke and Sauter, 1999) やヤエナリ

(*Phaseolus radiatus* L.) (Pan et al., 2002) では、エチレンが不定根形成を促進することが報告されている。さらに、スイバ (*Rumex palustris* Sm.) はエチレン単独処理で不定根数は増加するが、NAA とともに処理するとエチレン単独処理に比べて不定根数が増加し、逆にオーキシシン阻害剤である NPA (1-ナフチルフタラミン酸) とともに処理すると不定根数は減少することが報告されている (Visser et al., 1996)。また、エチレン非感受性のトマトの変異体である NR (Never ripe) は野生型に比べてオーキシシン濃度依存的な不定根数の増加反応が鈍い (Clark et al., 1999)。これらの報告は、植物の不定根形成に関してオーキシシンとエチレンが相互作用しながら機能する可能性を示している。そこで、オーキシシンとエチレンのコンビネーション処理が挿し穂の発根を促進するかどうかを検討した。気体のエチレンで挿し穂を処理することは実験的な制御が難しいため、加水分解によりエチレンを発生するエテホン (2-クロロエチルホスホン酸) が植物のエチレン応答を調べるのにしばしば用いられる (Suzuki et al., 1998; Wagstaff et al., 2005)。Pan et al. (2002) はヤエナリの挿し穂を9段階のエテホン濃度に24時間浸漬し不定根の数と重量を調べた結果、50  $\mu$ M で極大値を得ている。

そこで本節では、この濃度に近いエテホンに24時間浸漬する処理とオーキシシン (IBA) に10分間浸漬する処理とを組み合わせ、低発根性母樹の挿し穂の発根率が改善されるかどうかを調べた。

## ② 材料と方法

### 試験1 (市販の園芸用薬剤を用いた検討)

前節2で6年間の平均発根率が0~16.1%の低発根性11個体(満11年生)ならびに64.2~82.2%の高発根性3個体(満11年生)の計14個体を母樹として用いた。2006年3月20日に各母樹から30本ずつ当年枝を採取した。前節2の方法で長さ5cmの挿し穂を調製し、各母樹から調製した挿し穂を10本ず

つ以下の3つの試験区に割り当て、処理後直ちに挿し付けた。処理は切り口から3cm程度を①オキシベロン液剤 (IBA 19.7mM) に10分間浸漬後にエスレル10 (有効成分:エテホン10%, 日産化学工業株式会社製, 以下, エスレル) 10,000倍希釈液 (エテホン69.2 $\mu$ M) に24時間浸漬 (以下, IBA→ETH), ②エスレル10,000倍希釈液に24時間浸漬後にオキシベロン液剤に10分間浸漬 (以下, ETH→IBA), ③オキシベロン液剤に10分間浸漬 (コントロール) (以下, IBAのみ) とした。挿し床や灌水条件は前節2と同様の条件で行った。2006年7月21日にすべての挿し穂の発根の有無を調査し、母樹ごとに発根率を算出した。低発根性の母樹グループと高発根性の母樹グループの2つに分けて、それぞれ母樹10個体と母樹3個体の平均発根率を試験区間で比較した。

### 試験2 (標品を用いた検討)

試験1で用いた低発根性の10個体(満12年生)ならびに高発根性の1個体(前節2の平均発根率64.2%, 満12年生)を母樹として用いた。2007年3月12日に各母樹から30本ずつ当年枝を採取した。試験1と同様に長さ5cmの挿し穂を調製し、各母樹から調製した挿し穂を10本ずつ以下の3つの試験区に割り当て、処理後直ちに挿し付けた。処理は切り口から3cm程度を①IBA19.7mM (溶媒:50%エタノール) に10分間浸漬後、エテホン69.2 $\mu$ M (溶媒:蒸留水) に24時間浸漬 (以下, IBA→ETH), ②エテホン69.2 $\mu$ M に24時間浸漬後、IBA19.7mM に10分間浸漬 (以下, ETH→IBA), ③IBA19.7mM に10分間浸漬 (以下, IBAのみ) とした。なお, IBAとエテホンは和光純薬工業株式会社製の標品を用いた。挿し床や灌水条件は試験1と同様の条件で行った。2007年7月16日にすべての挿し穂の発根の有無を調査し、母樹ごとに発根率を算出した。低発根性の母樹グループと高発根性の母樹の2つに分けて、それぞれ母樹10個体の平均発根率と母樹1個体の発根率を試験区間で比較した。

### ③ 結果と考察

試験1において、園芸用薬剤であるエスレルとオキシベロンのコンビネーション処理が挿し穂の発根率に及ぼす効果を図-7に示す。発根性が高い母樹から採取した挿し穂においては(図-7上)、平均発根率はIBA→ETHで93.3%, ETH→IBAで83.3%, IBAのみで76.7%となった。試験区間での有意差はなく(対応のあるt検定,  $p > 0.20$ )、どの試験区でも高い発根性が確認された。一方、発根性が低い母

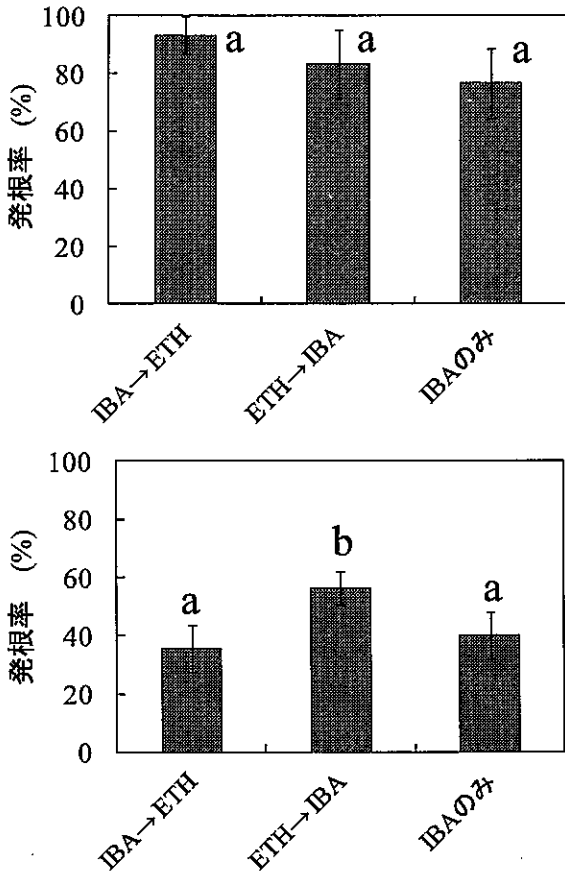


図-7. エスレルとオキシベロンとのコンビネーション処理が挿し穂の発根率に及ぼす効果  
上は高発根性母樹を用いた結果で (n=3)、下は低発根性母樹の結果 (n=11) を示す。  
平均値±標準誤差を示す。  
異なるアルファベット間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

樹から採取した挿し穂においては (図-7 下), 平均発根率は IBA→ETH で 34.0%, ETH→IBA で 58.0%, IBA のみで 40.0% となった。いずれの試験区でも発根性が高い母樹の挿し穂の発根率を上回ることにはなかったが, ETH→IBA では他の試験区に比べて有意に高い発根率が得られた (対応のある  $t$  検定,  $p < 0.05$ )。本試験で用いた発根性が低い母樹はすべて, オキシベロン粉剤処理で評価した場合, 6年間の平均発根率が 0~16.1%であったが, オキシベロン液剤に 10 分間浸漬すると 40.0%に改善された。さらに, エスレル処理を併用することで, 平均発根率は 58.0%に向上した。

試験 2 において, 標品のエテホンと IBA のコンビネーション処理が発根性の低い母樹から採取した挿し穂の発根率に及ぼす効果を図-8 に示す。平均発根率は IBA→ETH で 39.5%, ETH→IBA で 49.4%, IBA のみで 33.5% となった。試験 1 に比べて若干値は減少したものの, 試験 1 と同様に ETH→IBA で発

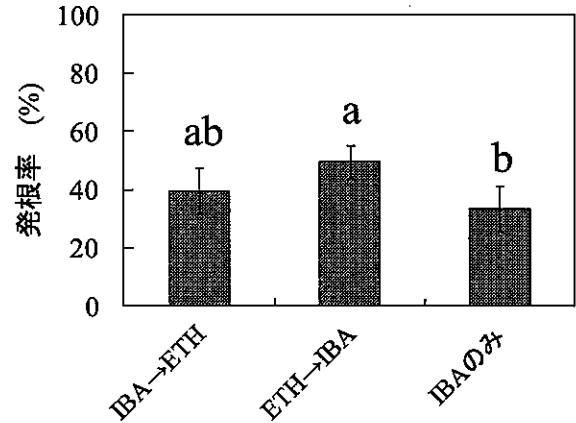


図-8. エテホンと IBA のコンビネーション処理が低発根性挿し穂の発根率に及ぼす効果  
平均値±標準誤差を示す (n=10)。  
異なるアルファベット間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

根率が最も高く, IBA のみに比べて有意に高い発根促進効果を示した (対応のある  $t$  検定,  $p < 0.05$ )。一方, 発根性が高い母樹から採取した挿し穂の発根率は IBA→ETH で 100%, ETH→IBA で 90%, IBA のみで 90%と, 試験 1 と同様にどの試験区でも高い発根性が確認された。このように, 市販の園芸用薬剤であるエスレルやオキシベロンを用いても, それらの有効成分であるエテホンと IBA の標品を用いても, エテホン処理後にオーキシシン (IBA) 処理を行えば, 発根性が低い母樹からでも抵抗性苗木をより効率的に挿し木増殖できると考えられた。予備試験ではあるが, エスレル単独処理を行った場合の発根率は, 蒸留水に同時間浸漬した場合と有意差がなかった (データ非提示)。このことから, エテホンが不定根形成に直接関わっているのではなく, オーキシシンによる不定根形成をエテホンが助長していると考えられた。

## 6. エテホン処理後のインドール酢酸の蓄積が発根率に及ぼす影響

### ① 目的

前節 5 では, 発根性が低い母樹の挿し穂であってもエテホンとオーキシシン (IBA) のコンビネーション処理を行えば, IBA 単独処理に比べて発根が有意に促進されることが確認された。しかし, エテホン処理を加えたことでなぜ発根率が向上したのかというメカニズムは不明である。Stepanova et al. (2005) は, シロイヌナズナにエチレンを処理すると *WEAK ETHYLENE INSENSITIVE 2/ANTHRANILATE SYNTHASE  $\alpha 1$  (WEI2/ASA1)* と *WEI7/ANTHRANILATE*

*SYNTHASE β 1/ (ASB1)* という 2 つのアントラニル酸合成酵素が発現することを観察した。アントラニル酸合成酵素はトリプトファン合成の律速酵素であり、エチレンによりこの酵素が発現するとトリプトファン経路を介して内生オーキシンの IAA のレベルが上昇する (Stepanova et al., 2005)。IAA はクロマツの不定根形成を促進する効果があるので (太田, 1980), エチレンによる内生 IAA レベルの上昇と外から加えられた IBA との相乗効果により、クロマツでも不定根形成が促進される可能性が考えられた。

そこで本節ではこのような仮説が成り立つかどうかを検討するため、エチレン作用阻害剤のチオ硫酸銀錯塩 (STS) (Martinis and Mariani, 1999; Wagstaff et al., 2005) を処理してエチレン応答を阻害した条件下でも、アントラニル酸や IAA を加えれば発根率が回復するかを調べた。

② 材料と方法

川内ク-290 号家系 1 個体 (満 8 年生), 土佐清水ク-63 号家系 2 個体 (満 9 年生), 志摩ク-64 号家系 10 個体 (満 9 年生) の計 13 個体の実生個体を母樹として用いた。2007 年 3 月 12 日に各母樹から 60 本ずつ当年枝を採取した。前節 2 の方法で長さ 5 cm の挿し穂を調製し、各母樹から調製した挿し穂を 10 本ずつ以下の 6 つの試験区に割り当て、処理後直ちに挿し付けた。処理は切り口から 3cm 程度を①エテホン 69.2 μM (溶媒: 蒸留水) に 24 時間浸漬後、IBA19.7mM (溶媒: 50%エタノール) に 10 分間浸漬 (以下, ETH→IBA), ②エテホン 69.2 μM および STS 100 μM の混合液 (溶媒: 蒸留水) に 24 時間浸漬後、IBA19.7mM に 10 分間浸漬 (以下, ETH+STS→IBA), ③エテホン 69.2 μM, STS100 μM および IAA10 μM の混合液 (溶媒: 蒸留水) に 24 時間浸漬後、IBA 19.7mM に 10 分間浸漬 (以下, ETH+STS+IAA→IBA), ④エテホン 69.2 μM, STS100 μM およびアントラニル酸 10 μM の混合液 (溶媒: 蒸留水) に 24 時間浸漬後、IBA19.7mM に 10 分間浸漬 (以下, ETH+STS+ANT→IBA), ⑤IAA10 μM (溶媒: 蒸留水) に 24 時間浸漬後、IBA19.7mM に 10 分間浸漬 (以下, IAA→IBA), ⑥IBA19.7mM に 10 分間浸漬 (以下, IBA のみ) とした。なお、エテホン, IBA, IAA, アントラニル酸は、和光純薬工業株式会社製の標品を用いた。また、STS は試験直前に 0.1M の硝酸銀溶液 (和光純薬工業株式会社製) と 0.1M のチオ硫酸ナトリウム溶液 (和光純薬工業株式会社製) を 1 : 8 の割合で混合して調製した (Wagstaff et al., 2005)。挿し床や灌水条件は前節

2 と同様の条件で行った。2007 年 7 月 16 日にすべての挿し穂の発根の有無を調査し、母樹ごとに発根率を算出した。母樹 13 個体の平均発根率を試験区間で比較した。

③ 結果と考察

各試験区の平均発根率を図-9 に示す。本試験においても、ETH→IBA の平均発根率は 47.5% と IBA のみの 32.3% に比べて有意に高く (対応のある t 検定,  $p < 0.05$ ), エテホンと IBA のコンビネーションによる発根促進効果が再現された。STS を処理するとエチレン受容体 ETR1 に配位していた銅イオン (I) が銀イオンに置換され、エチレン応答が持続的に抑制される (Zhao et al., 2002)。このようにエチレン応答を抑制した ETH+STS→IBA では平均発根率が 39.5% と、ETH→IBA に比べて発根率が低く抑えられた。これらのことから、エテホン処理によるエチレン応答を介して発根が促進されることが示唆された。一方、ETH+STS+IAA→IBA (平均発根率 40.0%) と ETH+STS+ANT→IBA (平均発根率 37.7%) は、ETH+STS→IBA (平均発根率 39.5%) と発根率がほぼ同程度であることから、IAA やアントラニル酸を加えても STS による発根率の減少分を回復できないと考えられた。また、IAA→IBA の発根率は 28.5% と IBA のみよりも低く、IAA と IBA の相乗効果は認められなかった。以上のことから、エテホンと IBA のコンビネーションによる発根促進効果は、少なくともエテホン処理により最終的に IAA の蓄積量が増加したことによるものではないと考えられた。Okushima et al. (2005) はシロイヌナズナの側根形成に *AUXIN RESPONSE FACTOR7*

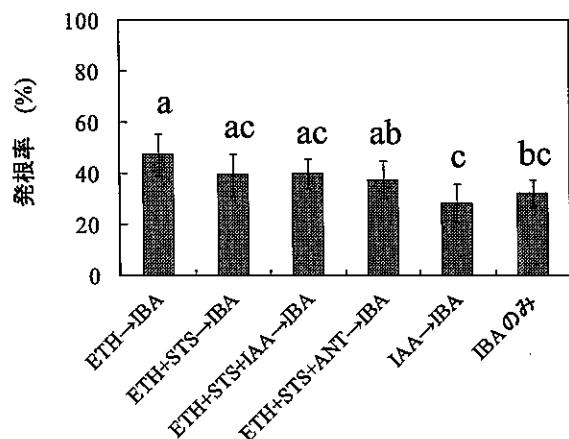


図-9. エテホン処理後のインドール酢酸の蓄積が発根率に及ぼす影響  
 平均値±標準誤差を示す (n=13)。  
 異なるアルファベット間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

(*ARF7*) と *ARF19* という 2 つのオーキシン転写因子の発現が必須であることを示したが、*ARF19* の発現はエチレン処理によって誘導される (Li et al., 2006)。側根形成と不定根形成はともに分化した組織から根が形成されるという点で共通しており、クロマツの不定根形成においてもエチレンがオーキシン応答を促進することで発根が促進された可能性もある。

## 7. 本項の小括

本項では、抵抗性個体の挿し木クローン増殖を行うためクロマツの発根特性を調べ、効率よい挿し木増殖法を検討した。30 個体の母樹から 6 年間毎年 1 回ずつ同じ時期に同じ条件で挿し木を行った。その結果、平均発根率は 0~82% と個体ごとに大きく異なった。また、発根性が高い母樹から挿し木増殖した個体は同様に発根性が高く、発根性には遺伝的要因が大きく影響していることが示唆された。このように、挿し木クローン増殖の効率は母樹の発根性によって決定されると考えられるが、抵抗性個体として選抜された母樹の発根性が必ずしも高いとは言えない。そこで、発根性が低い母樹からでも挿し木増殖できる手法を開発する必要があった。平均発根率が 50.1% の母樹群から採取した挿し穂をオーキシン (オキシベロン液剤に 10 分間浸漬) 処理すると、発根率が 78% に向上した。本処理により、平均発根率が 0~16.1% の母樹群でも 40% の発根率が得られた。さらに、本処理に先行してエテホン処理 (エスレル 10,000 倍希釈液に 24 時間浸漬) を行うと、同じ発根率の低い母樹群でも発根率の向上 (58%) が認められた。この効果は標品のエテホンと IBA を用いた試験でも再現された。このように本章では、エテホンと IBA をコンビネーション処理することで、発根性レベルの異なる多くの抵抗性個体から効率よく挿し木クローン増殖できる可能性を示唆した。本研究の観察結果からは、シロイヌナズナで観察されたようにエチレン処理後に蓄積される IAA

(Stepanova et al., 2005) と IBA が相乗的に不定根形成を促進したということは考えにくい。エテホン処理によるエチレン応答を STS により阻害すると発根率は減少することから、IAA 蓄積以外のエチレン応答が IBA による不定根形成を促進したものと考えられる。近年、植物の表現型の決定にオーキシンとエチレンがクロストークして機能することが示唆されている (Li et al., 2004; Li et al., 2006)。今後は、不定根形成過程においてこれら植物ホルモンがどう

関わり合っているかを詳細に調べ、実用化に結びつける必要がある。

## V. 挿し木クローンで抵抗性レベルを評価したクロマツを用いた抵抗性要因の解明

### 1. 本項の目的

前項までの結果から、抵抗性として選抜した個体の発根性が低くても、エテホンとオーキシン (IBA) のコンビネーション処理によって発根性を改善でき、遺伝的に多様な多くの個体から挿し木苗を増殖できることがわかった。しかし、接種検定で選抜された個体がどのような機構で抵抗性を発現するかは不明のままである。マツの抵抗性要因を解明する研究は、抵抗性樹種 (テーダマツ, リギダマツ (*Pinus rigida* Mill.) など) と感受性樹種 (クロマツ, アカマツ) に材線虫を接種して、樹体内の材線虫の数や分布にどのような違いがあるかを比較することから始まった。その結果、抵抗性樹種では感受性樹種に比べて接種後に樹体全体から再分離される材線虫の数が少ない (堂園ら, 1973; 橋本・堂園, 1975; Oku et al., 1989)。また、大山ら (1989) はクロマツの抵抗性と感受性の接ぎ木クローンに材線虫 10,000 頭を接種した結果、感受性では台木からも穂木からも多くの材線虫が検出されるが、抵抗性レベルが高い穂木からは接種 4 週間後においても乾重 1g あたり 2 頭以下と極端に少ないことを観察した。さらに、Kuroda (2004) はアカマツの抵抗性家系に接種した場合、非選抜家系より乾重 1g あたりの材線虫数が少ない個体が多いことを報告している。このような報告例から、材線虫は感受性のマツの中では増殖するが、抵抗性のマツの中では増殖しないことが示唆される。

一方、Kuroda et al. (1991) は感受性樹種のクロマツの枝に材線虫を接種すると 1 週間後には幹全体から検出されるのに対し、抵抗性樹種のテーダマツでは幹全体に広がるのに 3 週間を要すると報告した。また、Oku et al. (1989) は抵抗性樹種のリギ・テーダマツ (*Pinus rigitaeda* Ined.) と感受性樹種のクロマツから採取した 5 cm 長の切り枝を水の入ったバイアルに立て、上端の切り口から材線虫を接種した。24 時間後に切り枝を通過しバイアルから検出される材線虫数を比較した結果、後者ではバイアルから材線虫は検出されるのに対して、前者では全く検出されなかった。このような報告例から、材線虫は感受性のマツの中では速やかに移動するが、抵抗性の

マツの中では移動が抑制されることが示唆される。以上の報告例から、現在では材線虫の増殖と移動を抑制している要因が抵抗性要因と考えられている。この抵抗性要因を化学的に説明するため、抵抗性と感受性のマツから得られた成分の比較や、成分により材線虫が動かなくなる割合（以下、不動化率）を検定するバイオアッセイが行われてきた。Yamada et al. (1993) は材線虫を接種した抵抗性樹種のテーダマツとストロブマツ (*Pinus strobus* L.)、感受性樹種のクロマツの木部から得られたエタノール抽出物を用いて、不動化率を検定した。その結果、ストロブマツの接種枝の基部由来の抽出物にのみ材線虫を不動化する物質があることを示唆した。この抽出物からはスチルベノイドのピノシルビンモノメチルエーテル、フラバノンのピノセンブリンとピノバンクシンが検出された。また、Hanawa et al. (2001) は Yamada et al. (1993) の用いたストロブマツの樹皮からもスチルベノイドの 3-O-メチルジヒドロピノシルビンとピノセンブリンを検出した。このうち、3-O-メチルジヒドロピノシルビンによる材線虫の不動化率を検定したところ、濃度依存的に不動化率は増加し、250 ppm では 100% に達した。さらに、Suga et al. (1993) は抵抗性樹種のタイワンアカマツ (*Pinus massoniana* Pinus Lambert), ストロブマツ, ダイオウシヨウ (*Pinus palustris* Mill.) と感受性樹種のクロマツ, ヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris* L.) の枝由来のメタノール抽出物を使って同様に不動化率を検定し、抵抗性樹種の不動化活性画分を探索した。その結果、3つの樹種の心材に共通して不動化活性をもつピノシルビンモノメチルエーテルが検出された。しかし、クロマツの抵抗性と感受性個体に材線虫を接種した結果、ピノシルビンとピノシルビンモノメチルエーテルは抵抗性よりもむしろ感受性個体から多く検出されている (梶原, 2007-修士論文)。したがって、スチルベノイドは材線虫不動化活性を持つが、クロマツの抵抗性要因とは密接に関係しない可能性が考えられる。

一方、川口 (2006) は組織学的な観点から、材線虫の移動抑制という抵抗性要因を説明しようとした。波方ク-73号という抵抗性クロマツの家系と非選抜のクロマツから採取した長さ 10 cm の切り枝をバイアルに水挿しし、切り枝上部に材線虫を接種した。接種 3 日後、切り枝を通過しバイアルから検出される材線虫は非選抜よりも抵抗性家系で有意に少なく、抵抗性で材線虫の移動が抑制されていることを確認した。そこでこれらのサンプルについて、材

線虫の初期の移動経路である皮層樹脂道 (Ishida et al., 1993) の断面積を比較した結果、抵抗性家系は非選抜家系に比べて有意に小さく、これによって材線虫の垂直方向の移動が抑制されることを示唆した。

このように抵抗性要因は、抵抗性と感受性間で成分や組織構造を比較しながら探索されてきたが、材料の抵抗性レベルは樹種あるいは家系レベルで判定されてきた。つまり、供試材料が抵抗性樹種、感受性樹種のどちらに属するか、あるいは抵抗性家系、非選抜家系のどちらに属するか、抵抗性家系ならば 5 段階の抵抗性ランクのどの家系に属するか (九州地区林業試験研究機関連絡協議会育種部会, 1999) という基準で判定されてきた。しかし、Ⅲ項 2 の結果からもわかるように、感受性樹種のクロマツの中にも低頻度であるが抵抗性個体は認められる。また、ランクの高い抵抗性家系の中にも感受性個体は認められる。そのため、このような基準で材料の抵抗性と感受性を判定した場合、両グループ間でパラメータに差が検出されても、それが抵抗性と感受性の違いを表しているとは直接言及することはできなかった。

本項では、育成した複数の挿し木苗 (ラメート) に接種検定を行い、ラメートの発病率 (接種したラメートに対する発病したラメートの本数割合) をもってそのクローンの抵抗性レベルを判定した。このように抵抗性レベルを個々に評価したクローンを用いて、材線虫の増殖と移動抑制を決定している抵抗性要因を検討した。

## 2. 同じ家系内の抵抗性個体と感受性個体間の垂直樹脂道数と横断面積の違い

### ① 目的

真宮 (1980) と黒田・真宮 (1986) は材線虫接種後のアカマツとクロマツにおいて、材線虫が樹脂道で検出されることを観察し、材線虫は樹脂道を移動経路としている可能性を示唆した。さらに、Ichihara et al. (2000) はクロマツ苗に材線虫を接種し、3 日後と 7 日後に材線虫がどの組織からどれだけ検出されるかを調べた。その結果、皮層樹脂道と木部の垂直樹脂道や水平樹脂道に最も多く分布することを示した。材線虫は樹体内を移動するのに細胞間隙である樹脂道を利用していると考えられる。川口 (2006) は、特に皮層樹脂道の断面積が抵抗性クロマツ家系では非選抜のクロマツより小さいため、材線虫の移動が抑制されている可能性を示した。しかし、抵抗

性として波方ク-73号を、感受性として母樹不特定の非選抜クロマツの実生苗を用いていることから、両者の遺伝的背景が大きく異なると考えられる。したがって、川口(2006)の観察した皮層樹脂道面積の差は抵抗性と感受性かの違いに直接的に影響したとは結論できない。

そこで本節では、遺伝的背景をできるだけ揃えるため、同じ家系の抵抗性個体と感受性個体を用い、皮層樹脂道面積に差がみられるかどうかを検証した。

## ② 材料と方法

川内ク-290号家系の実生のうち、14個体を材料に用いた。予め個体ごとに育成した複数の満2年生挿し木苗に、1個体あたり島原個体群5,000頭を接種して6ヵ月後の発病率を調べた。その結果、発病率0~15.4%の7個体を抵抗性、92.9~100%の7個体を感受性として2グループに分けた(表-6)。2007年3月9日に各個体(満13年生)の当年枝を任意に1本ずつ選び、頂芽の基部から5.0~5.5cm離れた5mm長さのセグメントを採取した。採取後直ちにFAA(ホルマリン:酢酸:50%エタノール=5:5:90(v/v/v))中で固定した。その後、セグメントをアルコールシリーズで脱水、クロロホルムで透徹、パラフィンで包埋した。包埋サンプルよりスライデ

ィングミクロトームで厚さ20 $\mu$ mの横断面の切片を作製した。切片をキシレンで脱パラフィン後、キシレンをエタノールで置換、サフランインで染色した。染色後はアルコールシリーズで脱水、エタノールをキシレンで置換、カナダバルサムで封入して永久プレパラートを作製した。光学顕微鏡(倍率40倍)を介して取り込んだデジタル画像から、WinROOF(ver 5.03:三谷商事株式会社製)を利用してすべての皮層樹脂道および木部樹脂道の内腔の長径と短径を測定した。 $\pi \times ((\text{長径} + \text{短径}) / 2)^2$ で求めた値を樹脂道の断面積とし、切片ごとに1樹脂道あたりの断面積と全樹脂道の合計断面積を算出した。また、切片の半径と形成層までの半径について、1切片あたり8方向測定し、その平均値をもとに切片の面積、皮層の面積、木部の面積を算出した。1個体につき1切片のデータを求め、抵抗性グループと感受性グループの差を比較した。

## ③ 結果と考察

両グループの各パラメータを表-6に示す。切片全体の面積は抵抗性グループで20.6 $\text{mm}^2$ 、感受性グループで21.2 $\text{mm}^2$ 、そのうち皮層の面積は抵抗性で10.8 $\text{mm}^2$ 、感受性で12.0 $\text{mm}^2$ 、木部の面積は抵抗性で9.8 $\text{mm}^2$ 、感受性で9.2 $\text{mm}^2$ と、観察対象とした面

表-6. 抵抗性および感受性クローンの樹脂道の数と断面積

クローン番号	クローンごとの発病率 (%)		観察対象面積			皮層樹脂道			木部樹脂道			
			切片全体 (mm <sup>2</sup> )	皮層 (mm <sup>2</sup> )	木部 (mm <sup>2</sup> )	数	1樹脂道面積 (×10 <sup>-3</sup> mm <sup>2</sup> )	総樹脂道面積 (×10 <sup>-3</sup> mm <sup>2</sup> )	数	1樹脂道面積 (×10 <sup>-3</sup> mm <sup>2</sup> )	総樹脂道面積 (×10 <sup>-3</sup> mm <sup>2</sup> )	
抵抗性	14-22	15.4	(2/13)	23.5	13.1	10.4	27	20.6	555.4	58	1.01	58.6
	14-23	0.0	(0/7)	16.2	9.1	7.1	18	21.2	381.4	46	0.78	35.8
	14-26	3.3	(1/30)	15.6	6.4	9.2	22	9.7	213.8	55	1.04	57.1
	14-31	14.3	(1/7)	23.8	11.5	12.3	24	15.8	379.9	74	1.26	93.1
	14-33	9.1	(2/22)	23.2	14.6	8.7	40	24.7	986.2	31	1.06	33.0
	14-35	0.0	(0/12)	26.3	12.5	13.7	37	11.8	435.0	77	1.16	89.4
	14-49	11.1	(1/9)	15.3	8.3	7.0	34	14.2	482.0	52	1.06	55.2
	平均	7.6		20.6	10.8	9.8	28.9	16.8	490.5	56.1	1.05	60.3
	標準誤差	2.5		1.8	1.1	1.0	3.1	2.1	91.8	6.0	0.1	8.9
感受性	14-03	93.8	(15/16)	19.2	10.4	8.8	30	10.8	325.2	53	1.02	54.3
	14-07	92.9	(26/28)	20.7	12.1	8.6	22	19.0	417.0	48	1.21	58.1
	14-16	100.0	(16/16)	20.4	11.6	8.8	33	13.9	460.3	49	0.89	43.8
	14-18	100.0	(15/15)	25.4	13.8	11.6	25	26.7	668.2	61	0.86	52.5
	14-29	100.0	(9/9)	16.8	10.9	6.0	36	21.3	767.6	28	1.16	32.6
	14-34	100.0	(17/17)	24.9	12.5	12.4	31	13.7	425.4	101	1.03	103.8
	14-50	100.0	(16/16)	20.7	12.5	8.2	28	19.1	535.7	53	1.05	55.6
	平均	98.1		21.2	12.0	9.2	29.3	17.8	514.2	56.1	1.03	57.2
	標準誤差	1.2		1.2	0.4	0.8	1.8	2.0	58.6	8.4	0.0	8.4

クローンごとの発病率とは、抵抗性の指標で、クローンごとに作成した遺伝的に同じ複数のラメートに材線虫を接種し、発病したラメートの本数割合とした。()内の分子は発病ラメート数で、分母は接種ラメート数を表す。



積はいずれも抵抗性と感受性でほとんど差がないことを確認した ( $t$  検定, 切片全体  $p=0.78$ , 皮層  $p=0.34$ , 木部  $p=0.64$ )。皮層樹脂道の数は抵抗性で 28.9 個, 感受性で 29.3 個, 1 樹脂道の断面積は抵抗性で  $16.8 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ , 感受性で  $17.8 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ , 1 切片あたりの樹脂道の合計断面積は抵抗性で  $490.5 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ , 感受性で  $514.2 \times 10^{-3} \text{mm}^2$  と, いずれも抵抗性と感受性間で有意差は認められなかった ( $t$  検定, 数  $p=0.91$ , 1 樹脂道断面積  $p=0.75$ , 合計断面積  $p=0.83$ )。この結果は, 抵抗性は感受性に比べて 1 樹脂道の断面積や合計断面積が有意に小さいとする川口 (2006) の報告と異なった。川口ら (1998) は材線虫を接種した波方ク-73 号と津屋崎ク-50 号という 2 つの採種園家系について, 同様に皮層樹脂道の形質と病徴進展結果との関係を調べた。その結果, 両家系とも同じ家系内で比較すると発病した個体と発病しなかった個体の間には皮層樹脂道の数や断面積に有意差は認められなかった。したがって, 家系という遺伝的均一性の高いグループ内では, 川口 (2006) の主張するように, 皮層樹脂道の合計断面積の小ささが抵抗性の指標ということではできなかった。これらのことから, 川口 (2006) の観察した皮層樹脂道の合計断面積の差は遺伝的な違いによる可能性があり, これを抵抗性と感受性の違いの直接的原因と結論するには不十分であると考えられた。

さらに, 木部樹脂道の数と断面積についても調べたが, 抵抗性, 感受性ともに樹脂道の数は 56.1 個, 1 樹脂道の断面積は抵抗性で  $1.05 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ , 感受性で  $1.03 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ , 全樹脂道の合計断面積は抵抗性で  $60.3 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ , 感受性で  $57.2 \times 10^{-3} \text{mm}^2$  と, いずれも抵抗性と感受性で有意差はなかった ( $t$  検定, 数  $p=1.0$ , 1 樹脂道  $p=0.79$ , 全樹脂道  $p=0.81$ )。以上の結果から, 垂直方向の樹脂道の数や断面積は抵抗性の直接的原因ではないと考えられた。

### 3. 抵抗性個体および感受性個体からの抽出成分が材線虫の誘引性や忌避性に与える影響

#### ① 目的

前節 2 の結果から, 皮層や木部の樹脂道の数が少ない, あるいは断面積が小さいことが抵抗性と関係している可能性は低いと考えられた。一方, 皮層樹脂道と木部樹脂道の断面積を比較すると, 皮層樹脂道の方が 1 樹脂道あたりの面積で 15~18 倍, 総面積で 8~9 倍とかなり大きい。材線虫の横断面が直径  $25 \mu\text{m}$  (二井, 2003) の円だと仮定すると, 皮層樹脂道 1 個は一度に 19~55 頭の材線虫が通過できる大

きさであるのに対して, 木部樹脂道は 1~3 頭しか通過できない。したがって, 材線虫が樹体内を移動する際は, 皮層樹脂道を利用した方がスムーズに移動ができると考えられる。材線虫の移動抑制が抵抗性要因と仮定すると, 抵抗性では皮層樹脂道を利用しにくいメカニズムが働いているとも考えられた。すなわち, 抵抗性のマツには樹皮に材線虫が忌避する成分が含まれているか, 逆に木部に材線虫を強く誘引する成分が含まれていることで, 材線虫は積極的に皮層へと移動せず, 結果的に移動が抑制されることが考えられた。

本節では, 抵抗性および感受性の樹皮または木部の抽出成分を使って材線虫の誘引性と忌避性を調べ, これにより材線虫の移動経路や移動パターンが左右されるかどうかを検討した。

#### ② 材料と方法

満 2 年生挿し木苗に強線虫唐津 3 を 5,000 頭接種した結果, 9 ラメート中 1 ラメートも発病しなかった発病率 0% のクローン「13-29」を抵抗性として用いた。唐津 3 より病原性の劣る島原個体群 (秋庭ら, 2002) を 5,000 頭接種した結果, 28 ラメート中 26 ラメートが発病した発病率 92.9% のクローン「14-7」を感受性として用いた。両クローンから長さ 21 cm の当年枝を 1 本ずつ採取し, 切り花用の吸水性ポリアルフォーム ( $11 \text{cm} \times 4 \text{cm} \times 4.75 \text{cm}$ , 株式会社東洋クオリティワン製) に 3 cm 深さで挿した。ポリアルフォームは, 予め蒸留水で満たされたプラスチック容器 (約  $40 \text{cm} \times 32 \text{cm} \times 15 \text{cm}$ ) に置き, 底水により吸水させ, 蒸留水を随時補充した。これらを温度  $28^\circ\text{C}$ , 14 時間日長 (明: 暗 = 14 時間: 10 時間), 相対湿度 70% のグロースチャンバー (コイトロン KG-50HLA, 小糸工業株式会社製) 内で 3 日間インキュベートした。その後, 頂端から 3 cm 離れた部位を 2 cm 長さで剥皮し, 強線虫 Ka-4 を 5,000 頭/ $50 \mu\text{L}$  接種した。6 日後に切り枝をサンプリングし, 樹皮と木部に分け, ミルサー (IFM-600D, 岩谷産業株式会社製) で粉碎した。得られた木粉にメタノールを加え, 室温で 24 時間抽出した後, 抽出液をエバポレータで乾固させた。これらに再度メタノールを加え  $10 \text{mg/mL}$  に調製して試料とした。Futai (1979) のバイオアッセイ法を参考に,  $\phi 8 \text{mm}$  の桐山漏斗濾紙に試料を  $10 \mu\text{L}$  ずつスポットし, 風乾にて溶媒を揮発させた後, 1.5% 寒天培地に配置した (図-10)。メタノールを同量スポットした濾紙を溶媒コントロールとして, 何もスポットしない濾紙を Blank とし て配置した。培地中央に設置した 1 cm 角脱脂綿に

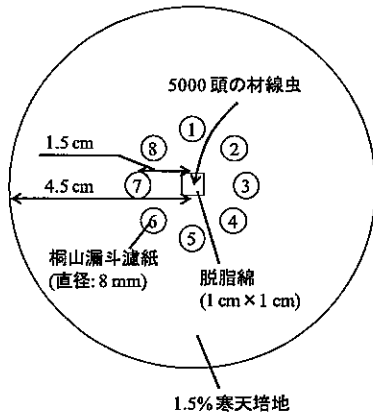


図-10. 材線虫のバイオアッセイの概略図

Ka-4 を 5,000 頭接種した。25℃暗黒下で 24 時間静置した後、φ12mm のコルクボウラーで濾紙とともに濾紙直下の培地を打ち抜いた。得られた培地ディスクと濾紙からベールマン法 (Thome, 1961) で材線虫を分離し、ディスク 1 枚あたりの頭数をカウントした。実験は以下の 3 種類を設定し、それぞれ 3 回ずつ繰り返し行った。各実験における濾紙の位置番号 (図-10) とスポットした試料を以下に示す。

実験 I (抵抗性樹皮 vs 抵抗性木部) : 1=抵抗性樹皮抽出物, 5=抵抗性木部抽出物, 3, 7=メタノール, 2, 4, 6, 8=Blank

実験 II (感受性樹皮 vs 感受性木部) : 1=感受性樹皮抽出物, 5=感受性木部抽出物, 3, 7=メタノール, 2, 4, 6, 8=Blank

実験 III (抵抗性木部 vs 感受性木部) : 1, 5=抵抗性木部抽出物, 3, 7=感受性木部抽出物, 2, 4, 6, 8=メタノール

③ 結果と考察

図-11 に、各実験においてディスク 1 枚あたりから検出された材線虫数を示す。実験 I では、抵抗性クロマツにおける樹皮と木部成分に対する材線虫の反応を調べた。その結果、平均して樹皮成分から 166 頭、木部成分から 260 頭、メタノールから 45 頭、Blank から 72 頭の材線虫が検出された。樹皮と木部成分は溶媒コントロールや Blank よりも有意に多く (LSD 検定,  $p < 0.01$ )、木部成分は樹皮成分より有意に多かった (LSD 検定,  $p < 0.05$ )。したがって、材線虫は抵抗性の樹皮成分に誘引され、木部成分にはさらに強く誘引されたと考えられた。実験 II では、感受性クロマツにおける樹皮と木部成分に対する材線虫の反応を調べた。その結果、平均して樹皮成分から 163 頭、木部成分から 427 頭、メタノール

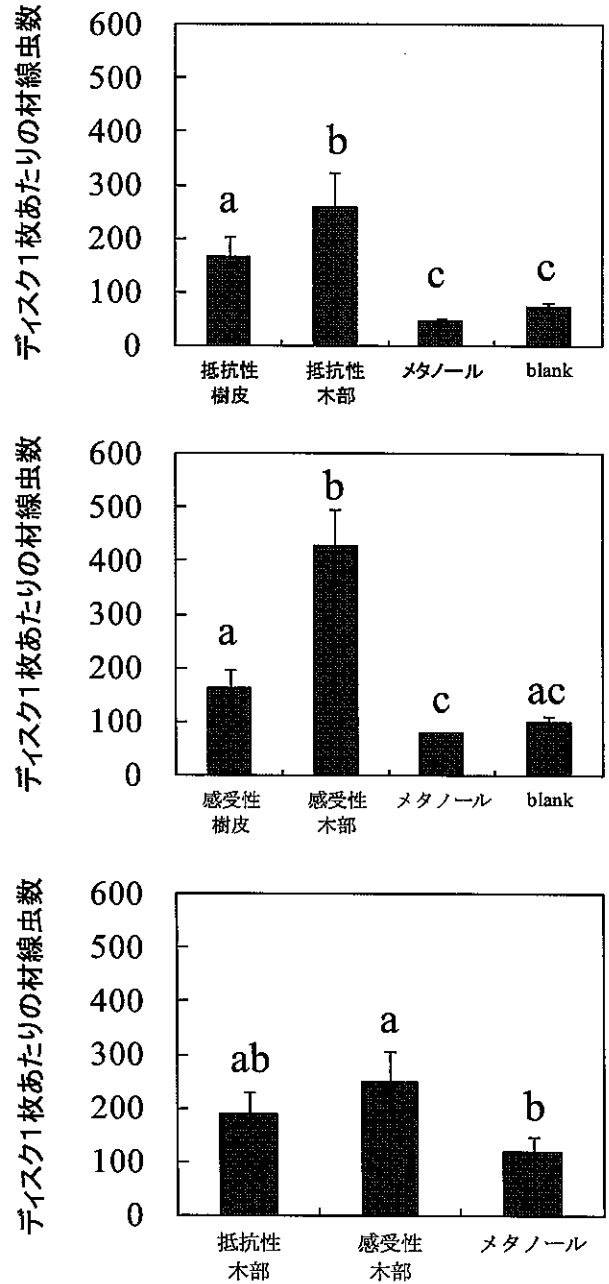


図-11. 材線虫のバイオアッセイにおいて各ディスクから検出された材線虫数上は実験 I、中は実験 II、下は実験 III の結果を示す。平均値±標準誤差を示す。異なるアルファベット間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

ルから 79 頭、Blank から 99 頭の材線虫が検出された。抵抗性の場合と同様に、樹皮と木部成分は溶媒コントロールよりも有意に多く (LSD 検定,  $p < 0.05$ )、木部成分は樹皮成分より有意に多かった (LSD 検定,  $p < 0.001$ )。したがって、感受性でも同様に材線虫は樹皮成分に誘引され、木部成分にはさらに強く誘引されたと考えられた。実験 I と II を

比較すると、樹皮成分は抵抗性も感受性も材線虫の数に差がみられなかったが、木部成分では抵抗性より感受性の方が多かった。そこで実験Ⅲでは、抵抗性と感受性の木部成分同士を直接比較したが、抵抗性と感受性間には有意差はみられなかった (LSD 検定,  $p=0.379$ )。材線虫は樹皮よりも木部成分に誘引されるという傾向に抵抗性と感受性間では差がなかった。また、その誘引活性にも抵抗性と感受性で顕著な差はなかった。したがって、化学的な成分による忌避や誘引効果が、材線虫の移動経路や移動パターンに関与しているわけではないと考えられた。Futai (1979) の報告では、クロマツの樹皮および木部の冷水ならびにエーテル抽出成分を使って、同様にどの成分のディスクから材線虫がどれだけ検出されるかが調べられた。その結果、木部のエーテル抽出成分ディスクからはコントロールに比べて2倍程度多くの材線虫が検出された。また、テーダマツでも同様のバイオアッセイが行われたが (Futai, 1979), やはり木部のエーテル抽出成分ディスクからコントロールに比べて2倍程度多くの材線虫が検出された。以上のように、抵抗性樹種のテーダマツにおいても、感受性樹種のクロマツの抵抗性個体および感受性個体のいずれにおいても、木部の有機溶媒抽出物には材線虫を誘引する成分が含まれていると考えられる。したがって、この誘引活性と抵抗性が密接な関係にある可能性は低いと考えられた。

#### 4. 環状剥皮による皮層の除去が抵抗性発現へ及ぼす影響

##### ① 目的

前節2ならびに3では、抵抗性と感受性で材線虫の移動抑制に寄与すると考えられた因子を比較したが、いずれも有意差は認められなかった。そこで次に、移動抑制が本当に抵抗性に寄与しているかどうかを検証することにした。川口 (2006) は皮層樹脂道の合計断面積と材線虫の移動数との相関を調べた結果、有意な正の相関を得ており ( $r^2=0.427$ ,  $p=0.041$ )、皮層樹脂道の面積が小さければ移動が抑制されることを示唆した。また、Ishida et al. (1993) は中央を環状剥皮した20cm長さのクロマツ切り枝を水挿しして上部木口より強線虫 S6-1 を接種したところ、7日後も環状剥皮部より下側からは材線虫がほとんど検出されないことを観察した。以上のことから、皮層樹脂道を環状剥皮により除去すれば、材線虫の移動を人為的に抑制できると考えられる。

本節では、環状剥皮して材線虫の移動を人為的に

抑制すれば、抵抗性ではないクロマツにおいて材線虫接種後の病徴が抑制されるかどうかを検討した。

##### ② 材料と方法

川内ク-290号家系3個体と志摩ク-64号家系2個体から増殖した満2年生の挿し木苗(5クローン15個体)を用いた。予め個体ごとに育成した複数の満2年生挿し木苗に島原個体群を5,000頭ずつ接種した結果、いずれもラメートの発病率が50%以上であったため、用いたクローンは抵抗性ではないと判断した。試験区間でマツの遺伝的要因に差が出ないように、同じ個体から増殖したラメートを1個体ずつ次の3試験区に分けた。1つ目の試験区では、任意の当年枝中央に2cm幅の環状剥皮を行った後(図-12)、剥皮部から頂芽側へ5cm離れた部位へ強線虫Ka-4を5,000頭/50 $\mu$ L接種した(以下、剥皮-線虫区)。2つ目の試験区では、剥皮-線虫区と同様の方法で環状剥皮し、Ka-4の代わりに滅菌蒸留水50 $\mu$ Lを接種した(以下、剥皮-水区)。3つ目の試験区では、環状剥皮せずに当年枝中央にKa-4を5,000頭/50 $\mu$ L接種した(以下、非剥皮-線虫区)。なお、剥皮-線虫区と剥皮-水区の環状剥皮部は剥皮後ただちにワセリンを薄く塗布した(Ishida et al., 1993)。接種は2006年8月6日に行い、6ヵ月後の2007年2月6日に各試験区の病徴を調査した。また、剥皮-線虫区については、各個体の接種枝の萎凋を確認した接種55~68日後に、剥皮部より頂芽側へ3~6cm離れた部位(接種点含む)と基部側へ3~6cm離れた部位の3cm長さのセグメントを採取した(図-12)。セグメントは樹皮と木部に分け、パールマン

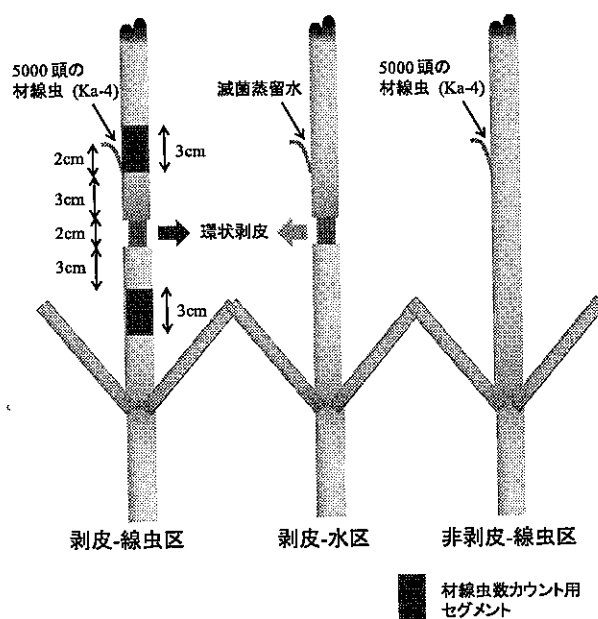


図-12. 環状剥皮試験の概略図

法 (Thorne, 1961) で材線虫を分離し、セグメント 1 個あたりの頭数をカウントした。

### ③ 結果と考察

接種 6 ヶ月後の各試験区の苗木の病徴を表 7 に示す。環状剥皮の有無に関わらず、材線虫を接種した苗木はすべて発病した。そのうち、非剥皮-線虫区では 5 クローン中 2 クローンが枯死し、2 クローンが接種枝以外でも発病がみられた。残りの 1 クローンは接種枝のみで発病がみられた。一方、剥皮-線虫区では 5 クローン中 4 クローンが枯死し、残り 1 クローンも接種枝以外で発病がみられた。このように、剥皮-線虫区の方が非剥皮-線虫区より病徴が進展したものが多く、環状剥皮によって発病を免れたクローンは認められなかった。剥皮-水区では部分枯れや枯死はみられなかったことから、環状剥皮が部分枯れや枯死を促進することはないと考えられた。剥皮-線虫区の接種枝の材線虫分布をみると、環状剥皮部を挟んで接種点と反対側にある部位からも材線虫は検出され、クローン「12-01」のように大量の材線虫が検出される場合もあった。したがって、環状剥皮により皮層を除去しても木部を使って材線虫は移動できると考えられた。また、接種点と反対側の樹皮からも材線虫は検出されたことから、木部から樹皮へ移動することも示唆された。本試験では初期の材線虫の移動抑制は確認していないが、少なくとも皮層除去により材線虫の移動を持続的に抑制することはできず、非抵抗性クロマツの発病が抑制されることもなかった。

## 5. 材線虫の強制的な移動が抵抗性クロマツの抵抗性発現へ及ぼす影響

### ① 目的

前節 4 では、皮層樹脂道が分断されても、材線虫は最終的には木部を通過して移動することが可能であり、非抵抗性クロマツの発病が抑制されることはなかった。しかし、前節 4 では材線虫の初期の移動と抵抗性との関係は明らかにならなかったため、これを検討する必要がある。材線虫の初期の移動を抑制することが抵抗性に寄与すると仮定すれば、材線虫の初期の移動を促進させると抵抗性が失われることが考えられる。

本節ではこれを検証するため、抵抗性クロマツに材線虫を 1 ヶ所接種した場合と、同じ頭数の材線虫を 3 ヶ所に分散して材線虫が初期に移動した状態を模倣した場合とで、その後の病徴進展を比較した。さらに、抵抗性が発揮され発病しなかった個体では、材線虫は最終的に移動が抑制されていたかどうか調べた。

### ② 材料と方法

試料として、川内ク-290 号家系 4 個体、波方ク-73 号家系 1 個体、大瀬戸ク-12 号家系 1 個体、夜須ク-37 号家系 1 個体、志摩ク-64 号家系 1 個体の計 8 個体から増殖した 2~4 年生の挿し木苗 (8 クローン 50 個体) を用いた。予め個体ごとに育成した複数の満 2 年生挿し木苗に島原個体群を 5,000 頭ずつ接種した結果、いずれもラメートの発病率が 20% 未満であったため、これらのクローンを抵抗性と評価した。試験区間でマツの遺伝的要因や苗齢に差が出ないよ

表 7. 環状剥皮試験の苗木の症状および剥皮部両端から再分離された材線虫数

クローン 番号	クローンごとの 発病率 (%)	接種後の症状			剥皮部両端の材線虫数 (剥皮-線虫区)			
		剥皮-線虫区	剥皮-水区	非剥皮-線虫区	頂芽側 (接種側)		基部側	
					樹皮	木部	樹皮	木部
14-02	57.9 (11/19)	部分枯れ+	健全	枯死	26	0	116	9
14-04	87.5 (7/8)	枯死	健全	枯死	2	0	49	36
14-27	63.6 (14/22)	枯死	健全	部分枯れ-	0	0	32	26
12-01	66.7 (2/3)	枯死	健全	部分枯れ+	217	25	3770	1047
12-03	100.0 (3/3)	枯死	健全	部分枯れ+	4	22	4	19

クローンごとの発病率とは、抵抗性の指標で、クローンごとに作成した遺伝的に同じ複数のラメートに材線虫を接種し、発病したラメートの本数割合とした。() 内の分子は発病ラメート数で、分母は接種ラメート数を表す。

部分枯れ+ : 接種枝以外の枝も枯れる症状。

部分枯れ- : 接種枝のみ枯れる症状。

うに、同じ個体から増殖した同じ苗齢のラメートを同数ずつ次の2試験区に分けた。1つ目の試験区では、当年枝の頂芽から3cm, 8cm, 13cmの部位に2cm長さの剥皮傷を3点つけ、頂芽側の剥皮傷に強線虫Ka-4を5,000頭/50 $\mu$ L, 中央と基部側の剥皮傷に滅菌蒸留水50 $\mu$ Lを接種した(以下, 対照区; 図-13)。もう一方の試験区では、同様に3点剥皮傷をつけ、対照区に用いた材線虫懸濁液を3倍希釈したものを50 $\mu$ Lずつすべての剥皮傷に接種した(以下, 分割接種区; 図-13)。接種は2006年8月2~3日に行い、6ヵ月後の2007年2月3日に両試験区の病徴進展を比較した。また、接種50日後の2006年9月21日には、発病個体と健全個体の材線虫の分布を調べるため、双方からクローンと苗齢に差が生じないように3個体ずつを選んだ。選んだ個体からは接種点ごとに5cm長さのセグメント(頂端から3~8cm, 8~13cm, 13~18cm; 図-13)を採取し、ベールマン法(Thorne, 1961)で材線虫を分離し、セグメント1個あたりの頭数をカウントした。

### ③ 結果と考察

接種6ヵ月後の対照区と分割接種区の苗木の病徴を表-8に示す。抵抗性クローンを用いたが、供試した50個体中15個体が発病しており、発病率は30%とやや高かった。これは、供試クローンの抵抗性評価に用いた島原個体群より病原性の高いKa-4(佐々木ら, 2001, 2002)を接種したためと考えられた。両試験区を比較すると、対照区では25個体中4個体で部分枯れ, 2個体で枯死がみられたのに対して、分割接種区では5個体が部分枯れ, 4個体が枯死であった。このようにクローンによっては分割接種により若干病徴が促進されたものもあったが、両試験区で健全個体, 部分枯れ個体, 枯死個体の割合に有意な差はみられなかった( $\chi^2$ 検定,  $p=0.60$ )。つまり、材線虫を強制的に移動させた状態にしても抵抗性クローンの抵抗性が大きく損なわれることはなかった。

次に、両試験区の健全個体と発病個体を3個体ずつサンプリングし、各接種点付近の材線虫の分布を比較した(表-9)。健全個体については、対照区の4年生の14-22で材線虫数はやや多く検出されたものの、それ以外の個体ではどの接種点でも材線虫はほとんど検出されなかった。一方、発病個体については、どの個体のどの接種点でも多くの材線虫が検出された。これらのことから、発病の抑制に関係なく少なくとも少量の材線虫は移動できること、発病が抑制されると材線虫は減少すること、発病する

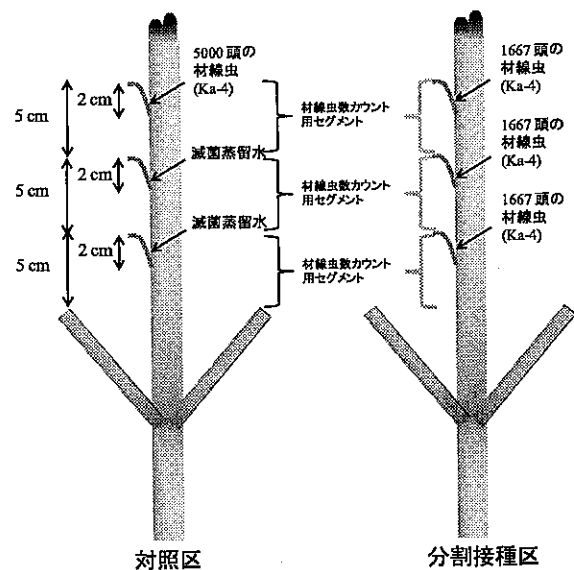


図-13. 分割接種試験の概略図

と材線虫は増殖することが示唆された。発病が抑制された個体では材線虫の増殖が抑制されたことが示唆されるが、移動も抑制されたかどうかは、この試験では確認できなかった。つまり、移動が抑制された状態とは、接種点付近では多くの材線虫が検出され、離れた部位では検出されにくい状態を指すが、発病が抑制された個体(4年生の14-22は除く)では接種点付近でさえも検出されにくくなっていたためである。

以上のように材線虫の移動と抵抗性の関係に注目してきたが、強制的に材線虫を移動させた状態にしても抵抗性発現には大きな影響が及ばないこと、発病しなかった場合、材線虫の移動抑制は不明であるが増殖は抑制されることがわかった。

## 6. 抵抗性個体および感受性個体の切り枝における材線虫の移動と増殖

### ① 目的

前節までに、材線虫の移動を制御すると考えられる因子には抵抗性と感受性で差がないこと、材線虫を強制的に移動させた状態にしても抵抗性クロマツの発病抑制効果に大きな影響を与えないこと、発病が抑制された場合は材線虫の増殖が抑制されることがわかった。

そこで本節では、抵抗性と感受性間での材線虫の移動と増殖との関係を検討することにした。苗木を用いた場合、同じクローンでも枝数や苗高など植物体の形態に個体差が生じる。また、多くの苗木を制御された環境条件下におくことも困難であるため、本試験では切り枝を用いて、制御した環境条件下で

表-8. 分割接種試験の接種結果

クローン 番号	樹齢 (年)	クローンごとの 発病率 (%)	対照区			分割接種区		
			健全 (本)	部分枯れ (本)	枯死 (本)	健全 (本)	部分枯れ (本)	枯死 (本)
14-22	4	15.4 (2/13)	1	1		2		
14-33	4	9.1 (2/22)			2			2
14-49	4	11.1 (1/9)	1	1			1	1
14-26	3	3.3 (1/30)	1				1	
14-33	3	9.1 (2/22)	1	2			2	1
01-01	2	0.0 (0/3)	1			1		
08-48	2	0.0 (0/5)	1			1		
11-49	2	0.0 (0/5)	2			2		
12-10	2	0.0 (0/4)	2			1	1	
14-22	2	15.4 (2/13)	2			2		
14-26	2	3.3 (1/30)	7			7		
合計			19	4	2	16	5	4

クローンごとの発病率とは、抵抗性の指標で、クローンごとに作成した遺伝的に同じ複数のラメートに材線虫を接種し、発病したラメートの本数割合とした。()内の分子は発病ラメート数で、分母は接種ラメート数を表す。

表-9. 分割接種試験で再分離された材線虫数

症状	クローン 番号	樹齢 (年)	対照区			分割接種区		
			上部	中部	下部	上部	中部	下部
健全	14-22	4	403	231	38	3	11	4
	14-22	2	2	3	3	0	0	0
	14-26	2	1	7	6	4	3	0
発病	14-33	4	2,192	983	2,464	4,536	2,736	8,339
	14-33	3	2,298	2,588	11,866	2,681	2,387	5,704
	14-49	3	254	543	4,678	333	268	211

対照区—上部：材線虫 5000 頭を接種したセグメント

—中部：滅菌蒸留水を接種したセグメント

—下部：滅菌蒸留水を接種したセグメント

分割接種区—上部：材線虫 1667 頭を接種したセグメント

—中部：材線虫 1667 頭を接種したセグメント

—下部：材線虫 1667 頭を接種したセグメント

材線虫を接種するモデル試験を行った。さらに遺伝的背景もできるだけ揃えるため、同じ家系内の抵抗性と感受性の材料を用いた。このように考えられるバイアスをできるだけ除いた上で、切り枝内の材線虫の分布を経時的に追跡し、材線虫の移動と増殖と抵抗性との関係を議論した。

## ② 材料と方法

前節 2 で用いた川内ク-290 号家系のうち、抵抗性 2 個体 (14-26, 14-35) と感受性 2 個体 (14-16, 14-34)

(いずれも満 13 年生) から切り枝を採取した。2007 年 2 月 23 日にこれら 4 個体から当年枝を 6 本ずつ採取した。採取後は傷害ストレスをできるだけ与えないよう摘葉は行わず、すべて長さを 21cm に調整した。切り枝を 1 本ずつ前述の吸水性ポーラルフォームに 3 cm 深さで挿した。これらはすべて、予め蒸留水で満たされた 2 個のプラスチック容器 (約 40cm × 32cm × 15cm) に分け置き、底水により吸水させた。蒸留水を切らすことのないように、随時補充した。



これらを温度 28℃, 14 時間日長 (明: 暗=14 時間: 10 時間), 相対湿度 70% のグロースチャンパー (コイトロン KG-50HLA, 小糸工業株式会社製) 内で 4 日間インキュベートした。その後, 頂芽の基部から 2cm 離れた部位を 2cm 長さの剥皮し, 強線虫 Ka-4 を 5,000 頭/50 μL 接種した (図-14)。接種から 24 時間後, 6 日後, 20 日後に, それぞれ各個体から 2 本ずつ任意の切り枝を選んで, 材線虫を分離した。材線虫を分離したのは, 接種点から -3~0cm, 5~8cm, 13~16cm 離れた (接種点を 0 とし, 頂端側を-, 切り口側を+とした) 3 cm 長の 3 つのセグメントとし (図-14), ベールマン法 (Thorne, 1961) で材線虫を分離し, セグメント 1 個あたりの頭数をカウントした。各経過時間の各部位ごとに抵抗性 (2 個体×2 枝=4 セグメント) と感受性 (2 個体×2 枝=4 セグメント) の平均を求め, 抵抗性と感受性間の比較を行った。

③ 結果と考察

接種 24 時間後, 6 日後, 20 日後の材線虫の分布を部位別に図-15 に示す。接種 24 時間後において, 接種点から -3~0cm 離れた部位 (以下, 接種点付近) の材線虫数を比較すると, 抵抗性で平均 94 頭, 感受性で 74 頭と有意差はなかった (*t* 検定, *p*=0.61)。接種点から 5~8cm 離れた部位 (以下, 5~8cm) でも, 抵抗性で 6 頭, 感受性で 17 頭と有意差はなかった (*t* 検定, *p*=0.29)。さらに, 接種点から 13~16cm 離れた部位 (以下, 13~16cm) でも, 抵抗性で 3 頭, 感受性で 7 頭と有意差はなかった (*t* 検定, *p*=0.35)。また, 3 つの部位から検出された合計の平均についても, 抵抗性で 103 頭, 感受性で 97 頭と変わらなかった。このように, 接種 24 時間後では材線虫の分布は抵抗性でも感受性でも接種点付近で多く, 接種点から離れると少ないという分布パターンをとり, 各部位での材線虫数に差はなかった。

接種 6 日後においても, 接種点付近では, 抵抗性で 47 頭, 感受性で 51 頭と有意差は認められなかった (*t* 検定, *p*=0.80)。一方, 5~8cm では, 抵抗性で 16 頭, 感受性で 83 頭と感受性の方が有意に多かった (*t* 検定, *p*=0.004)。13~16cm では, ばらつきが大きかったことから有意差は認められないものの, 抵抗性で 23 頭, 感受性で 286 頭となった (*t* 検定, *p*=0.09)。このように 6 日後の材線虫の分布パターンは, 抵抗性と感受性間で異なった。抵抗性では, 3 つの部位から検出された合計の平均は 85 頭と, 24 時間後より若干減少していた。一方, 感受性では接種点から離れるにしたがい, 材線虫数は多くなる

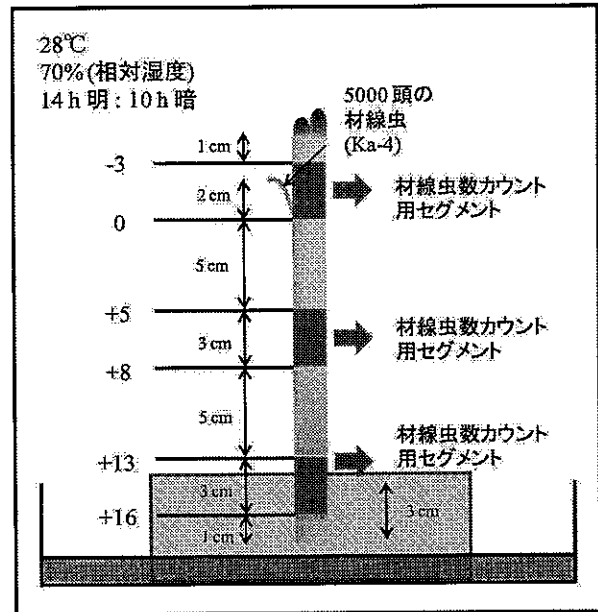


図-14. 切枝接種試験の概略図

傾向にあり, 3 つの部位から検出された合計の平均は 420 頭と, 24 時間後の 4.3 倍に達していた。

接種 20 日後になると, 接種点付近では, 抵抗性で 8 頭, 感受性で 28 頭と有意差はなかった (*t* 検定, *p*=0.50)。5~8cm では, 抵抗性で 7 頭, 感受性で 233 頭と感受性の方が有意に多かった (*t* 検定, *p*=0.0008)。さらに, 13~16cm では, 抵抗性で 41 頭, 感受性で 1,617 頭と感受性の方が著しく多かった (*t* 検定, *p*=0.006)。感受性の 20 日後の分布パターンは, 接種点付近で少なく, 接種点から離れるにしたがい多くなった。3 つの部位から検出された合計の平均は抵抗性で 56 頭と 6 日後に比べて漸減したのに対し, 感受性では 24 時間後の 19.3 倍に達した。以上のように, 24 時間後から 20 日後にかけて, 抵抗性では材線虫は漸減する傾向にあったのに対して, 感受性では材線虫数は明らかに増殖していた。また, 24 時間において材線虫の移動に抵抗性と感受性に差はないこと, 抵抗性では 6 日後の 5~8cm よりも 13~16cm の方が多くの材線虫数が検出されることから, 抵抗性は材線虫の移動抑制ではなく, 増殖抑制と密接に関係していると考えられた。

7. 抵抗性個体および感受性個体から調製した木粉との共培養が材線虫の増殖に与える影響

① 目的

前節までの結果から, 抵抗性のクロマツは材線虫の移動よりも増殖を抑制することで発病を抑制していると考えられた。したがって, 材線虫の増殖を抑

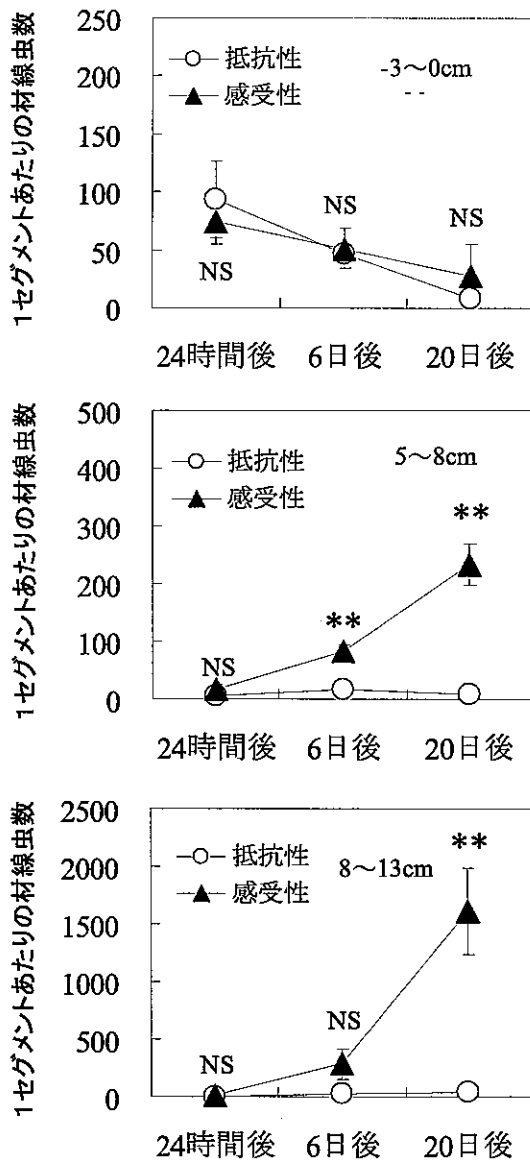


図-15. 切枝における接種後の材線虫数の変化  
 上は接種点から-3~0cm 離れた部位、中は接種点から 5~8cm 離れた部位、下は接種点から 13~16cm 離れた部位での変化を示す。  
 平均値±標準誤差を示す。  
 \*\*: 1%水準で有意な差があることを示す。  
 NS: 有意な差がなかったことを示す ( $p>0.05$ )。

制する因子が抵抗性と密接に関係していると考えられた。これを特定するためには、抵抗性由来と感受性由来の物質を使って材線虫の増殖抑制活性を検定し、活性をもつ因子を絞り込んでいく必要があった。しかし、これまで材線虫の不動化や誘引活性を検定するバイオアッセイ法は確立されていても (Futai, 1979; Yamada et al., 1993; Suga et al., 1993; Hanawa et al., 2001), 増殖抑制活性を検定できる手法は確立されていない。

本節では、材線虫の増殖性を検定するバイオアッセイ法ならびに増殖抑制に関する検討を行うこととした。予備実験として、バッファー内に抵抗性または感受性のメタノール抽出成分と材線虫を加えてインキュベートしたが、抽出成分を加えない Blank でも材線虫は増殖しなかった。この系に *Botrytis cinerea* 菌体やホモジネートを加えても同様に Blank でも材線虫は増殖しなかった。このように液体系のバイオアッセイでは材線虫の増殖を検定することができないと判断し、固体培地でのバイオアッセイを検討した。

② 材料と方法

検定試料は前節 6 の試験で材線虫数に明瞭な違いがみられた、接種 20 日後の抵抗性 14-35 と感受性 14-34 の切り枝から採取した。試料として前節 6 で材線虫検出用のセグメントを採取後、残りの部位を摘葉して-30℃で保存したものを用いた。それぞれ樹皮と木部に分けて液体窒素を用いて粉砕した。これらを 2mL のエッペンドルフチューブに入れ、50mM のリン酸バッファー ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2) を加えて 25  $\mu\text{g}$  (乾燥重量) /  $\mu\text{L}$  の木粉懸濁液を調製した。一方、10~14 日間大麦培地上の *Botrytis cinerea* で増殖させた Ka-4 を、ベールマン法 (Thorne, 1961) で分離して材線虫粗懸濁液を得た。10,000rpm で 2 分間遠心分離して材線虫を沈降させた後、粗懸濁液上清の蒸留水を 10mL の M9 buffer (42.3mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 22mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 85.6mM NaCl, 1.0mM  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.0 : Kikuchi et al., 2004) に交換し、攪拌後に静置した。8 分後に上清に浮遊している体長の小さい材線虫を除去した。再度 10mL の M9 buffer を加え、8 分静置後に、同様に上清を除去した。この操作を 5 回繰り返す、材線虫を洗浄するとともに、懸濁液中の材線虫を体長の大きなものだけに揃えた (梶原, 2007-修士論文)。M9 buffer をリン酸バッファーに交換し、1,000 頭/100  $\mu\text{L}$  に調製した。48 well plate に 1well あたりリン酸バッファーを 700  $\mu\text{L}$ 、材線虫懸濁液 100  $\mu\text{L}$ 、抵抗性または感受性の樹皮または木部由来の木粉懸濁液 200  $\mu\text{L}$  (木粉最終濃度 0.5% (dw/v)) 計 1mL を加え、25℃暗黒条件下で 4 日間共培養した。なお、Blank はリン酸バッファー 900  $\mu\text{L}$ 、材線虫懸濁液 100  $\mu\text{L}$  とした。また、共培養した材線虫の増殖性を検定するため、*Botrytis cinerea* を  $\phi$  5mm のコルクボウラーを用いて  $\phi$  35mm の PDA 培地に接種して培養した。4 日後、well 内を 20 回以上ピペッティングしてよく攪拌した後に材線虫密度を測定し、材線虫 100 頭分に相当する培養

液を4日間培養した *Botrytis cinerea* に接種した。接種後はこれらを 25°C で5日間培養し、増殖した材線虫をペールマン法 (Thorne, 1961) で分離し、シャーレ1枚あたりの頭数をカウントした。なお、実験は5回繰り返した。

### ③ 結果と考察

各木粉懸濁液で共培養後に、*Botrytis cinerea* 菌叢上で5日培養後の材線虫数を図-16に示す。その結果、シャーレ1枚あたり平均頭数はBlankで6,670頭、抵抗性の樹皮で6,309頭、抵抗性の木部で3,676頭、感受性の樹皮で5,670頭、感受性の木部で9,048頭となった。Blankとの差をみると、抵抗性の木部は有意に少なく、感受性の木部は有意に多かった

(LSD検定,  $p < 0.05$ )。また、樹皮は抵抗性も感受性もBlankとの有意差は認められなかった (LSD検定,  $p > 0.05$ )。したがって、抵抗性個体の木部には増殖を抑制する要因が、逆に感受性個体の木部には増殖を促進する要因が含まれている可能性が示唆された。清原 (1989) は、病原性レベルの異なる材線虫を *Botrytis cinerea* 菌叢に100頭ずつ接種し、系統別に6日後の材線虫数をカウントした。その結果、強病原性の3系統では平均10,400頭、弱病原性の3系統では平均2,700頭と、マツに対する病原性と *Botrytis cinerea* 菌叢上での増殖率とが密接に関係していることを示した。また、Wang et al. (2005) も *Botrytis cinerea* 菌叢上での増殖率と病原性が密接に結びつくことを報告した。一方、病原性とマツ樹体内での増殖率も密接な関係にあり、マツの中で弱線虫は増殖できず、強線虫は増殖が可能である (Fukuda et al., 1992; Ikeda and Kiyohara, 1995)。これらのことから、*Botrytis cinerea* 菌叢上での増殖性をもって、マツ樹体内での増殖性を検定できることが示唆される。したがって、本バイオアッセイ系で増殖抑制活性要因を探索できれば、それによってマツの抵抗性要因も解明できる可能性が高い。今回の結果から、材線虫接種20日後の抵抗性個体の木部に増殖抑制活性因子が含まれると考えられる。木粉にしているため、木部の組織学的構造が要因である可能性は低く、木部成分が材線虫の増殖に影響を与えたと考えられる。Wang et al. (2005) は、材線虫の増殖にはライフスパンの長さ、産卵の持続期間の長さ、メスの産卵数の多さが影響することを報告した。このような材線虫の増殖に関係するパラメータ、もしくは材線虫の性行動などに抵抗性個体の木部の成分が影響を与えたのかもしれない。今後は、木部成分をメタノールなどの有機溶媒で抽出し、残渣木粉と抽

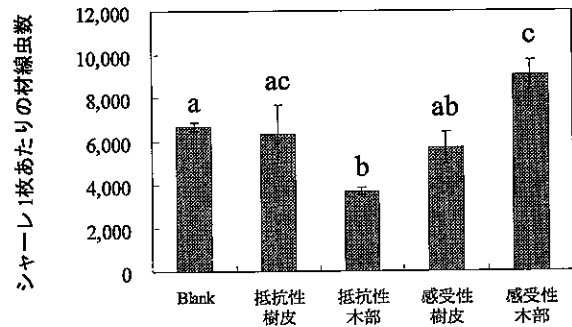


図-16. 各木粉懸濁液で共培養後に *Botrytis cinerea* 菌叢上で5日間培養した材線虫数平均値±標準偏差を示す。異なるアルファベット間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

出前の木粉を使ってバイオアッセイを試み、増殖抑制活性画分を探索していく必要がある。

### 8. 本項の小括

本項では、抵抗性の要因を解明するため、抵抗性と感受性のクロマツ間を比較することにより、材線虫の移動と増殖の抑制を決定している因子を探索した。比較に用いた材料は、すべて挿し木クローンを育成し、接種検定により個々の抵抗性レベルを評価した上で検討を行った。その結果、移動抑制に関係が深いとされてきた皮層樹脂道の数や断面積は、同じ家系内の抵抗性グループと感受性グループ間で比較すると差がみられなかった。また、皮層樹脂道を分断して材線虫の初期の移動を妨害しても、最終的な材線虫の移動までは抑制できず、発病が抑制されることもなかった。したがって、皮層樹脂道の数や大きさが抵抗性を大きく左右している可能性は低いと考えられた。抵抗性と感受性のメタノール抽出成分を用いて、材線虫の誘引や忌避活性を調べた。その結果、両者とも樹皮より木部で誘引活性が強いというパターンをとり、抵抗性と感受性の木部成分同士を直接比較しても、両者の誘引活性に大きな違いはみられなかった。このように抵抗性と感受性の化学的要因の差が材線虫の移動に及ぼす影響も小さいと考えられた。さらに、材線虫を分散接種することにより強制的に移動させた状態にしたが、抵抗性個体の抵抗性が大きく喪失することもなかった。また、切り枝を用いることによって様々なバイアスを除いたモデル実験においても、抵抗性と感受性間の接種24時間後の初期の移動には差はみられなかった。このように、一貫して抵抗性と材線虫の移動抑制には

- (1999) ヒノキ精英樹・抵抗性マツ特性表. 58pp, 熊本.
- Kosaka, H., Aikawa, T., Ogura, N., Tabata, K., and Kiyohara, T. (2001) Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: the induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode. *Eur. J. Plant Pathol.* 107 : 667-675.
- 小坂 肇・相川拓也・菊地泰生・清原友也 (2004) 弱病原力マツノザイセンチュウを2回接種したマツの誘導抵抗性. 115回日林学術講 : 727.
- Kozłowski, T. T., and Pallardy, S. G. (1997) *Growth control in woody plants.* Academic Press, Toronto.
- 黒田慶子・真宮靖治 (1986) マツノザイセンチュウの無菌クロマツ稚苗内における行動. *日林論* 97 : 471-472.
- Kuroda, K., Yamada, T., and Ito, S. (1991) *Bursaphelenchus xylophilus* induced pine wilt: Factors associated with resistance. *Eur. J. For. Path.* 21 : 430-438.
- Kuroda, K. (2004) Inhibiting factors of symptom development in several Japanese red pine (*Pinus densiflora*) families selected as resistant to pine wilt. *J. For. Res.* 9 : 217-224.
- Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J. M., and Ecker, J. R. (2004) Convergence of Signaling Pathways in the Control of Differential Cell Growth in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 7 : 193-204.
- Li, J., Dai, X., and Zhao, Y. (2006) A role for auxin response factor 19 in auxin and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140 : 899-908.
- Lorbiecke, R., and Sauter, M. (1999) Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. *Plant Physiol.* 119 : 21-29.
- Ludwig-Müller, J., Vertocnik, A., and Town, C. D. (2005) Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *J. Exp. Bot.* 56 (418) : 2095-2105.
- 町田英夫 (1973) さし木のすべて. 261pp, 誠文堂新光社, 東京.
- 真宮靖治 (1975) マツノザイセンチュウの発育と生活史. *日本線虫学会誌* 5 : 16-25.
- Mamiya, Y., and Furukawa, M. (1977) Fecundity and reproductive rate of *Bursaphelenchus lignicolus*. *Jpn. J. Nematol.* 7 : 6-9.
- 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 (5) : 176-183.
- 真宮靖治 (2003) マツ枯れの原因—マツ材線虫病. (線虫の生物学, 石橋信義編, 東京大学出版会, 東京). 181-196.
- 宮原文彦・佐々木重行・小河誠司 (1994) 採種園産抵抗性クロマツの自然交雑実生苗のザイセンチュウ抵抗性. *日林九支研論* 47 : 125-126.
- 宮崎潤二 (2004) 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 (IV) —挿し付け時期と発根率—. *九州森林研究* 57 : 311-312.
- Monot, C., Pajot, E., Corre, L. D., and Silue, D. (2002) Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by avirulent isolates. *Biol. Cont.* 24 (1) : 75-81.
- 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). *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苗木生産における挿し木技術の有効性. *日林誌* 86 (2) : 98-104.
- 森 康浩・宮原文彦・後藤 晋 (2006) 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. *福岡県森林林業技術センター研究報告* 7 : 1-19.
- 森下義郎・大山浪雄 (1972) さし木の理論と実際. 367pp, 地球出版, 東京.
- Martinis, D. D., and Mariani C. (1999) Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 11 : 1061-1071.
- Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K., and Sousa, E. (1999) First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematol.* 1 (8) : 727-734.
- Ogalló, J. L., and McClure, M. A. (1995) Induced resistance to *Meloidogyne hapla* by other *Meloidogyne* species on tomato and pyrethrum plants. *J. Nematol.* 27 : 441-447.
- Ogalló, J. L., and McClure, M. A. (1996) Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematodes in tomato. *Phytopathology* 86 : 498-501.
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K.,

- Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* 17 : 444-463.
- 大平峰子・倉本哲嗣・平岡裕一郎・岡村政則・藤澤義武 (2005) クロマツのさし木発根性と成長に及ぼす用土および施肥の影響. 九州森林研究 58 : 155-156.
- 大平峰子・宮原文彦・森 康浩・宮崎潤二・真崎修一・山田康裕・白石 進 (2007) さし木繁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.
- Oku, H., Shiraishi, T., and Chikamatsu, K. (1989) Active defense as a mechanism of resistance in pine against pine wilt disease. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn* 55 : 603-608.
- 太田 馨 (1980) さしほの発根に関する研究 (I) クロマツのメバエのさしほの発根におよぼす IAA の影響. 日林誌 62 : 117-127.
- 大山浪雄・豊島昭和 (1965) マツ属のさし木の発根能力とその増進法. 林試研報 179 : 99-125.
- 大山浪雄・白石進・高木哲夫 (1986) マツノザイセンチュウ病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.
- Pan R., Wang J., and Tian, X. (2002) Influence of ethylene on adventitious root formation in mung bean hypocotyl cuttings. *Plant Grow. Regul.* 36 : 135-139.
- Reitz, M., Rudolph, K., Schroder, I., Hoffmann-Hergarten, S., Hallmann, J., and Sikora, R. A. (2000) Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 3515-3518.
- 林野庁 (2007) 平成 19 年版森林・林業白書. 165pp, (社) 日本林業協会, 東京.
- 佐々木峰子・秋庭満輝・戸田忠雄・岡村政則 (2001) マツノザイセンチュウ個体群の病原力とクロマツ家系の関係. 林育セ九青年報 29 : 51-54.
- 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—. 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.
- Siddiqui, I. A., and Shaikat, S. S. (2004) Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *J. Phytopathol.* 152 : 48-54.
- Stelzer, H. E., and Goldfarb, B. (1997) Implementing clonal forestry in the southeastern United States : SRIEG satellite workshop summary remarks. *Can. J. For. Res.* 27 : 442-446.
- Stepanova, A. N., Hoyt, J. M., Hamilton, A. A., and Alonso, J. M. (2005) A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17 : 2230-2242.
- Suga, T., Shinji, O., Munesada, K., Ide, N., Kurokawa, M., Shimizu, M., and Ohta, E. (1993) Endogenous pine wood nematicidal substances in pines, *Pinus massoniana*, *P. strobus* and *P. palustris*. *Phytochemistry* 33 (6) : 1395-1401.
- Suzuki, K., Suzuki, N., Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. (1998) Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting. *Plant J.* 15 (5) : 657-665.
- 竹本雅晴・神原照生 (2003) マツ材線虫病に対する誘導抵抗性に関する試験. 平成 13 年度香川森セ業報 34 : 17-20.
- 竹本雅晴・神原照生 (2004) マツ材線虫病に対する誘導抵抗性に関する試験. 平成 14 年度香川森セ業報 35 : 11-13.
- Takeuchi, Y., Kanzaki, N., and Futai, K. (2006) How different is induced host resistance against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, by two avirulent microbes? *Nematol.* 8 : 435-442.
- Tamura, H. (1996) Pine wilt disease in Korea. *For. Pest* 45 : 28-31.
- Thorne, G. (1961) *Principles of nematology*. McGraw-Hill, New York.
- 戸田良吉 (1953) マツ類のサシキについて—総合抄録—. 林試研報 65 : 61-85.

- 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.
- Visser, E. J. W., Cohen, J. D., Barendse, G. W. M., Blom, C. W. P. M., and Voesenek, L. A. C. J. (1996) An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant physiol.* 112 : 1687-1692.
- Wagstaff, C., Chanasut, U., Harren, F. J. M., Laarhoven, L.-J., Thomas, B., Rogers, H. J., and Stead, A. (2005) Ethylene and flower longevity in *Alstoemeria*: relationship between tepal senescence, abscission and ethylene biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56 (413) : 1007-1016.
- Wang, Y., Yamada, T., Sakaue, D., and Suzuki, K. (2005) Variations in life history parameters and their influence on rate of population increase of different pathogenic isolates of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematol.* 7 (3) : 459-467.
- Yamada, T., and Ito, S. (1993) Chemical defense responses of wilt-resistant pine species, *Pinus strobus* and *P. taeda*, against *Bursaphelenchus xylophilus* infection. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 59 : 666-672.
- 全国森林病虫獣害防除協会 (1997) 松くい虫 (マツ材線虫病) - 沿革と最近の研究 -. 274pp, 協文社, 東京.
- Zhao, X.-C., Qu, X., Mathews, D. E., and Schaller, G. E. (2002) Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Plant physiol.* 130 : 1983-1991.



## 放置竹林, 侵入竹林およびヒノキ林の土壌特性<sup>1)</sup>

佐々木重行

### Differences of soil characters from non-managed bamboo (*Phyllostachys heterocycla* f. *pubescens*) plantation to adjacent hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) stand

Shigeyuki SASAKI

佐々木重行：放置竹林, 侵入竹林およびヒノキ林の土壌特性 福岡県森林研報 13: 37~44, 2012

本研究では, 放置竹林, 隣接するヒノキ林への侵入竹林および未侵入のヒノキ林で土壌調査を行った。表層土壌の根量は, 放置竹林, 侵入竹林がヒノキ林より多かった。細孔隙, 全孔隙はヒノキ林が放置竹林, 侵入竹林より多かったが, 保水性の指標である粗孔隙では差がなかった。採取時含水率は, 放置竹林, 侵入竹林ではヒノキ林より低く, 粗孔隙に水がほとんど無い状態であった。このことから, 放置竹林, 侵入竹林では, 浸透能が低い可能性や浸透しても水が竹林外へ速やかに移動する可能性が示唆された。土壌pH, 交換性塩基 (Ca) 濃度については, 放置竹林, 侵入竹林でヒノキ林より高い意向を示し, タケの侵入によってこれらの成分は比較的短期間で変化すると考えられた。

キーワード：放置竹林, 侵入竹林, ヒノキ林, 土壌特性, 土壌孔隙, 交換性塩基

#### I. はじめに

福岡県の竹林面積は, 平成22年度福岡県林業統計要覧 (福岡県農林水産部 2011a) によると11,855haとなっている。平成元年の竹林面積は12,146ha (福岡県水産林務部 1990a) であり, 過去20年間大幅な変化は見られない。一方, 福岡県の平成元年のタケノコおよびモウソウチク材の生産量はそれぞれ29,607t, 395,000束 (福岡県水産林務部 1990b) であったものが, 平成22年はそれぞれ13,226t, 60,400束とこの約20年間で大幅に減少している。(福岡県農林水産部 2011b)。近年のタケノコ, 竹材生産量の減少は, 生産者の高齢化や安価な中国産タケノコの輸入や, 竹製品がプラスチックなどの代替品に置き換わったことによると考えられる。このような, タケノコ・竹材の需要の減少により, 管理を放棄された竹林いわゆる放棄竹林が増加している。管理されていた竹林が管理を放棄されたことにより, タケが隣接するスギ, ヒノキの人工林や里山の広葉樹林へと侵入するいわゆる侵入竹林が分布を拡大している (鳥居ら1997, 鳥居1998, 山本ら 2004, 片野田 2003)。福岡県でも隣接する林分へのタケの侵入は見られ, 西川ら (2005) が県内の2町で空中写真を利用して竹林面積の変化を研究した報告によると, およそ30年で1.3~1.7倍に増加したとしている。隣

接する林分に侵入したタケはスギ, ヒノキを枯死させること (山本ら2004) や, 広葉樹林に侵入した場合は高木層だけでなく, 低木層においても種類, 本数ともに減少し, 生物多様性の低下を危惧する報告がある (脇元ら 2001)。

管理放棄竹林や放棄竹林からのタケの拡大による隣接林分への侵入は, 樹木を枯死させるだけでなく, 水土保持機能や崩壊防止機能などの公益的機能を変化させることが危惧される (鳥居ら1997, 日浦ら2004)。森林の水土保持機能を中心とした公益性を検討する場合, 土壌に関する研究が必要であるが, これまで竹林の土壌についての研究はいずれもタケノコ生産や竹材生産を目的とした管理された栽培竹林で調査されたものがほとんどで (西尾1982, 西尾1983など), 放置竹林での例は少ない (西田1987)。

竹林の公益的機能を評価するためには土壌孔隙や土壌硬度など土壌物理性の指標を用いて検討する必要があるが, これに関しては藤本 (2004), 日浦ら (2004), 豊原ら (2005) の管理竹林での報告がある。しかし, タケが侵入した人工林の土壌を研究した事例は横尾ら (2005) の報告がある程度で少ない。

そこで, 管理を放棄された竹林とそれに隣接するヒノキ林でタケが侵入した部分とまだタケの侵入が見られない部分での土壌の物理的, 化学的特性

1) 本研究は, 県単研究課題「森林立地に関する研究」の中で実施した。

の違いについて検討した。

II. 調査地の概要と調査分析方法

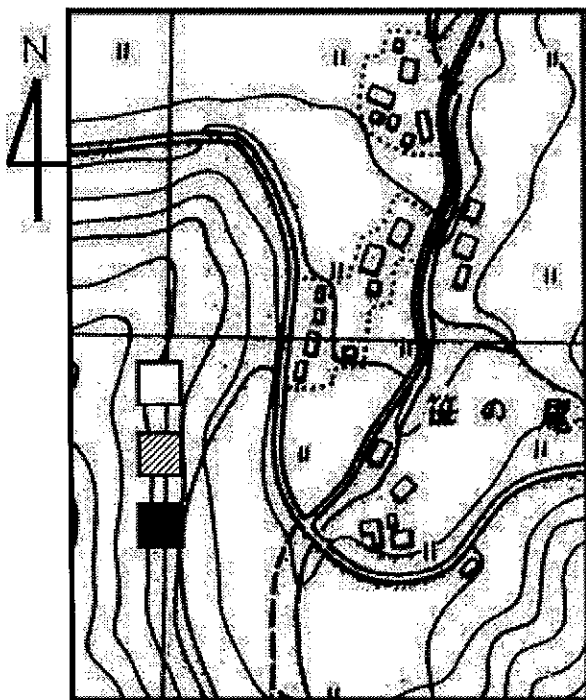
1. 調査地の概要

調査は、福岡県うきは市で、同一の平衡斜面上にある10年以上管理を放棄されたモウソウチクの放置竹林と、それに隣接したヒノキ林でモウソウチクに侵入された侵入竹林およびモウソウチクがまだ侵入していないヒノキ林で行った。調査地は、泥質砂質片岩（福岡県 1987）であった。調査したプロットは、同一平衡斜面上にあり、それぞれの調査プロットの中心は20~30m離れている（図-1）。

侵入竹林は、竹林に隣接したヒノキ林縁から約10m入った地点、ヒノキ林はタケが侵入した最先端から約20m入った地点を中心とした。調査プロットでは放置竹林、侵入竹林は10m×10m、ヒノキ林は15m×15mの広さで毎木調査を行った。タケの高さについては23本を伐倒して竹棹長を測定し、胸高直径との関係を求め（図-2）、胸高直径（X）から竹棹長（Y）を次式から推定した。

$$Y=11.034 * \ln(X)-9.4633$$

各調査プロットの本数密度、平均樹高、平均胸高直径、材積を表-1に示す。



■ 放置竹林 ▨ 侵入竹林 □ ヒノキ林

図-1. 調査位置図

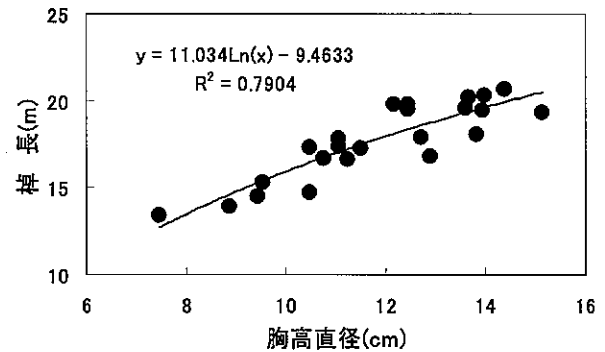


図-2. 胸高直径と竹棹長の関係

表-1. 調査林分の概況

調査林分	胸高直径 (cm)	樹高 (m)	本数密度 (本/ha)	材積 (m <sup>3</sup> /ha)
放置竹林	11.7	17.6	7,800	
侵入竹林				
タケ	12.5	18.1	2,875	
ヒノキ	19.5	17.0	1,733	480
ヒノキ林	21.0	17.7	1,623	605

2. 土壌調査および土壌試料採取と分析方法

①土壌調査と試料採取

土壌調査は、各プロットの四隅と中心の計5箇所で行った。調査は土壌断面の記載を行うとともに、各調査箇所、土壌表面0cmと深さ5cm, 10cm, 20cm, 30cm, 40cm, 50cm, 60cmにおいて山中式土壌硬度計（プッシュコーン、大起理化学工業株式会社製）で土壌硬度を測定した。土壌硬度は、硬度計の数値(mm)を用いて表示した。

土壌試料は、土壌断面調査を行った箇所、採取した。土壌の化学性分析の試料は深さ0~5cm, 5~10cm, 15~25cm, 35~45cm, 55~65cmから採取した。孔隙解析のための土壌は100mlの土壌円筒を用いて、0~5cm, 15~20cmの深さで採取した。

②分析方法

土壌pHは、風乾細土10gに脱イオン水50mlを加え、ガラス電極(Φ35 BECKMAN製)法で測定した。炭素および窒素含有率の分析は、風乾細土を0.5mmの円孔ふるいで全通しCNコーダ(MT-700 YANACO製)で行った。交換性塩基(Ca, Mg, K)濃度は、風乾細土5gに1M酢酸アンモニウム液(pH 7.0)を100ml加え、1時間振とう後、No. 6のろ紙でろ過し、原子吸光光度計(AA6400 島津製作

所製)で分析した(岸和田1997)。

土壌の孔隙は、以下のように求めた。採取した採土円筒を浸水し、全孔隙に水が入った状態で重量を測定し、飽水重量とした。次に、加圧板法で多容量土壌pF測定器(DIK3420大起理化工業株式会社製)によりpF2.7の採土円筒重量を測定し、飽水重量から差し引いて求めた。粗孔隙は円筒容積100mlに対するpF2.7以下の水分重量の割合(w/v%)とした。細孔隙は円筒容積100mlに対するpF2.7以上の水分重量の割合(w/v%)とし、この細孔隙と粗孔隙の和を全孔隙(w/v%)とした。採取時含水率は、採土円筒容積に対する採取時の水分重量の割合(w/v%)とした。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 土壌断面の硬度、土壌孔隙、採取時含水率および根量

放置竹林、侵入竹林、ヒノキ林の土壌は、いずれもA層が20cm以下であった。A層には団粒構造がみられたが、一部粒状構造や堅果状構造もみられた。いずれも土壌型は適潤性褐色森林土偏乾亜型(B<sub>0</sub>ω)，土性は殖壤土(CL)であった。調査時の土壌の水湿状態は、放置竹林、侵入竹林ではやや乾、ヒノキ林では潤であった。土壌硬度を図-3に示す。ヒノキ林では深さ毎の平均土壌硬度は表層0cmでは4.88mmで、深くなるほど硬くなり、深さ60cmでは12.96mmであった。放置竹林の土壌硬度は表層ではヒノキ林と変わらないが、深さ10cm~30cmでは、10.84~12.16mmで、統計的な有意差はなかったが、ヒノキ林、侵入竹林より硬い傾向が見られた。一方、侵入竹林では、ヒノキ林、放置竹林の中間の値かヒノキ林と同程度であった。深さ40cm以下では、侵入竹林の深さ60cmを除いてほぼ同じ硬度であった。

放置竹林、侵入竹林、ヒノキ林の深さ0~5cm、15~20cmの平均孔隙組成と平均採取時含水率を図-4、5に示す。全孔隙は、深さ0~5cm、15~20cmのいずれにおいてもヒノキ林が高く、放置竹林で低く、侵入竹林はその中間であった。深さ0~5cm、15~20cmの細孔隙(pF2.7以上)は、ヒノキ林では28.68%、30.41%、侵入竹林では24.10%、25.42%、放置竹林では23.57%、24.62%でヒノキ林が多く、侵入竹林、放置竹林はほぼ同じであった。深さ0~5cm、15~20cmの粗孔隙(pF2.7以下)は、放置竹林42.29%(37.59~45.97%)、40.50%(37.62~42.69%)、侵入竹林では37.68%(26.27~45.07%)、36.95%

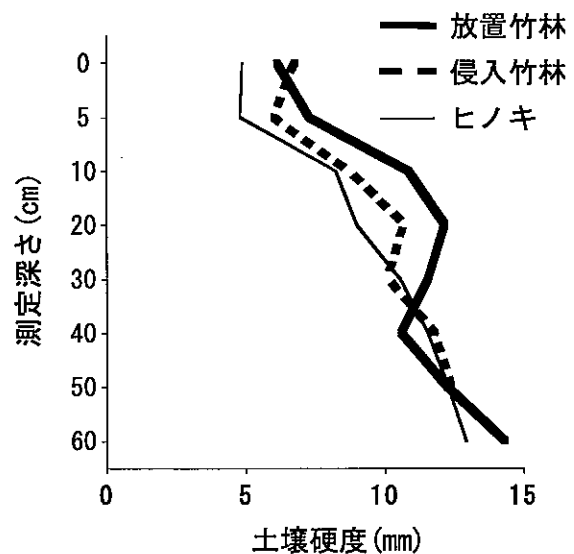


図-3. 深さによる土壌硬度の変化

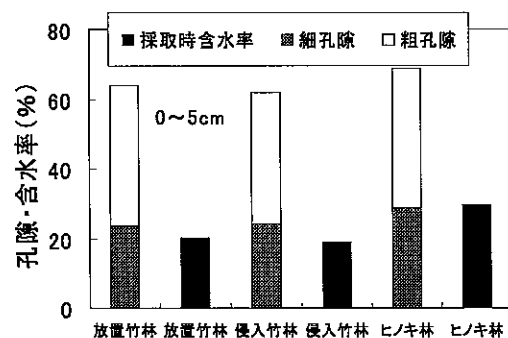


図-4. 孔隙組成と採取時平均含水率(0~5cm)

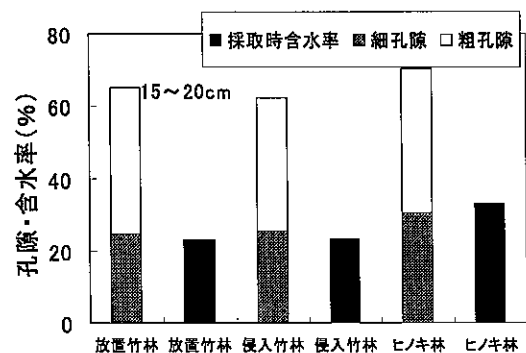


図-5. 孔隙組成と採取時平均含水率(15~20cm)

(32.56~46.27%), ヒノキ林では40.22% (33.07~45.24%), 39.81%(33.31~44.78%)であり、いずれの深さでも放置竹林、ヒノキ林、侵入竹林の順で高かった。全孔隙、粗孔隙、細孔隙について放置竹林、侵入竹林、ヒノキ林の林種別の分散分析を行ったが、

深さ0~5cmでは放置竹林, 侵入竹林, ヒノキ林の間に有意差は認められなかった。深さ10~15cmでは粗孔隙では有意差は認められなかったが, 全孔隙, 細孔隙ともヒノキ林が放置竹林と侵入竹林よりも有意に高かった (いずれも $p < 0.05$ )。深さ0~5cmと15~20cmでの採取時平均含水率は, 放置竹林では20.03%, 22.99%, 侵入竹林では19.12%, 23.34%, ヒノキ林では29.60%, 32.93%であった。いずれの深さでも採取時含水率は放置竹林と侵入竹林では差が無くヒノキ林の約2/3と低かった。平均値の多重比較を行ったところ放置竹林・侵入竹林とヒノキ林間で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

深さ0~5cm, 15~20cmの採土円筒中の平均根量を図-6, 7に示す。深さ0~5cm, 15~20cmの円筒内の平均根重量は, 放置竹林では5.99g/100ml, 3.47g/100ml, 侵入竹林では3.29g/100ml, 2.25g/100ml, ヒノキ林では1.50g/100ml, 0.41g/100mlであり, 平均値の多重比較を行ったところ, いずれも放置竹林が侵入竹林・ヒノキ林より有意に多かった ( $p < 0.05$ )。

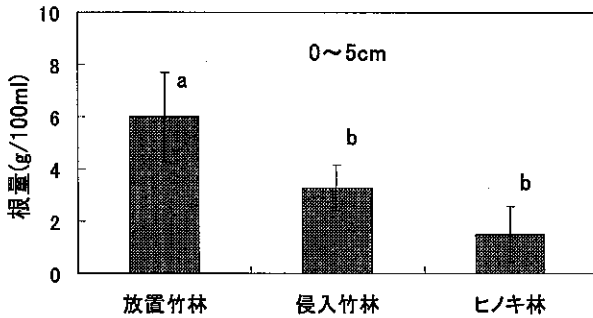


図-6. 土壌円筒内の根量 (0~5cm)  
バーは標準偏差  
異なるアルファベットは危険率1%以下で有意差有り

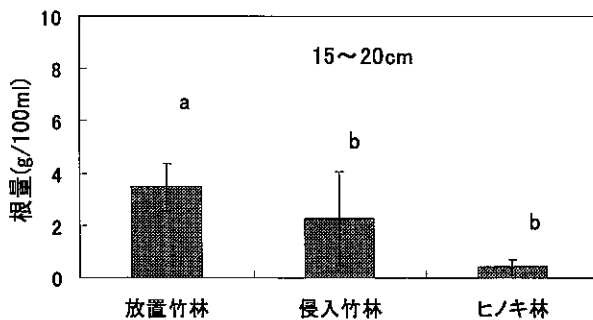


図-7. 土壌円筒内の根量 (15~20cm)  
バーは標準偏差  
異なるアルファベットは危険率1%以下で有意差有り

## 2. 土壌の化学性

炭素, 窒素の深さ別の含有率を図-8, 9に示す。

深さ0~25cmまでは, 炭素, 窒素含有率とも放置竹林, ヒノキ林, 侵入竹林の順で高かった。深さ30cmより深くなると, 放置竹林, 侵入竹林, ヒノキ林の平均炭素, 窒素含有率は大きな差はなかった。放置竹林, 侵入竹林, ヒノキ林の炭素, 窒素含有率について深さ5~10cmと15~25cmではいずれも放置竹林と侵入竹林間では有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

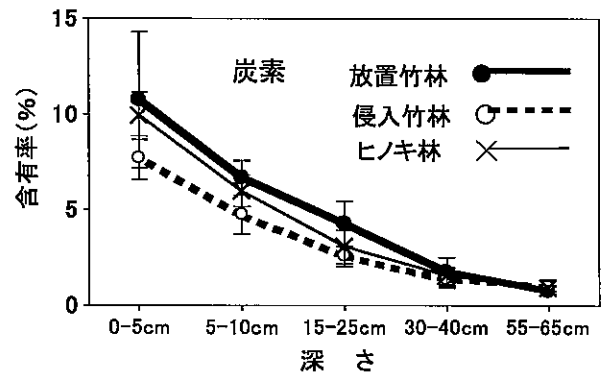


図-8. 炭素の深さ別含有率  
バーは標準偏差

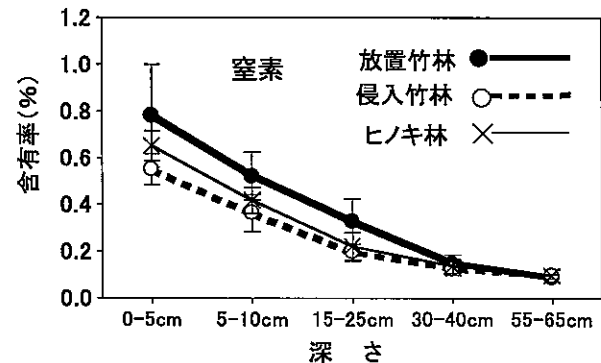


図-9. 窒素の深さ別含有率  
バーは標準偏差

深さ毎の土壌pHの平均値を図-10に示す。平均土壌pHは, いずれの深さでも放置竹林が高く, 次いで侵入竹林, ヒノキ林の順であり, 深さ0~5cm, 55~60cmを除いて放置竹林・侵入竹林はそれぞれヒノキ林との間で有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。ヒノキ林の平均土壌pHは, 深くなるほど高くなり深さ55~65cmでは4.48となった。放置竹林の平均土壌pHは深さ55~60cmでも4.60であり, 変動はあるものの深さには依存しなかった。

次に, 交換性Ca, K, Mg, の深さ別の濃度を図-11, 12, 13に示す。交換性Caの平均濃度は0~25cmまでは放置竹林, 侵入竹林, ヒノキ林の順で

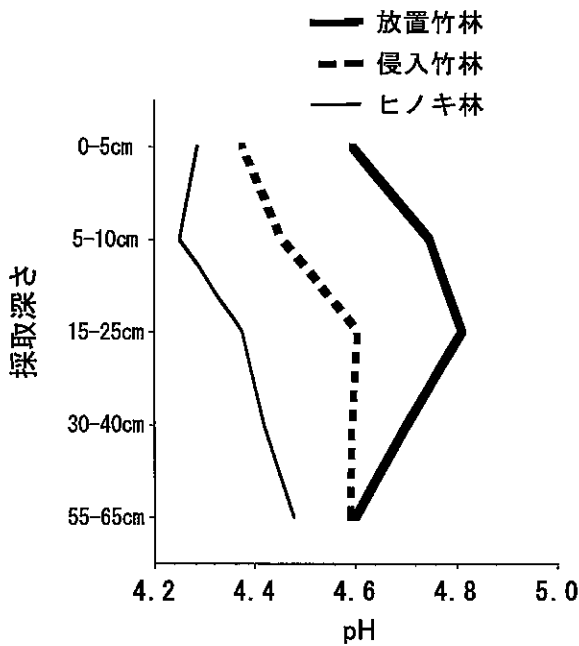


図-10. 採取深さ毎のの土壌 pH

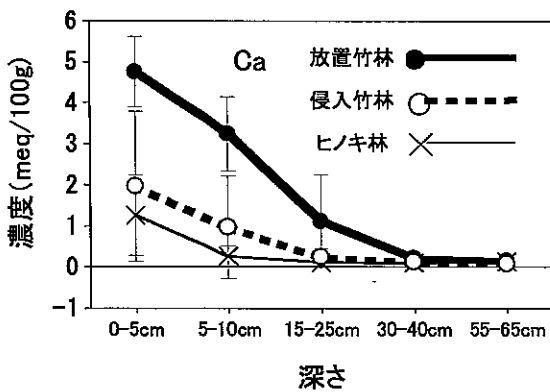


図-11. 交換性 Ca の深さ毎の濃度  
バーは標準偏差

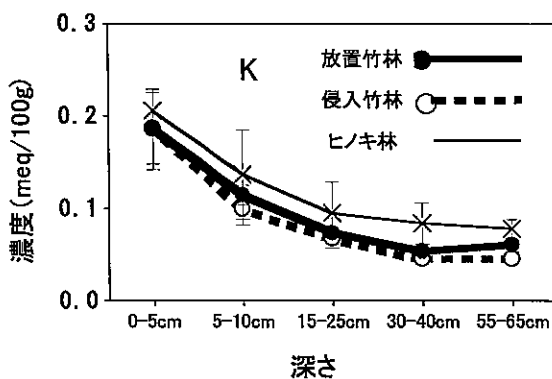


図-12. 交換性 K の深さ毎の濃度  
バーは標準偏差

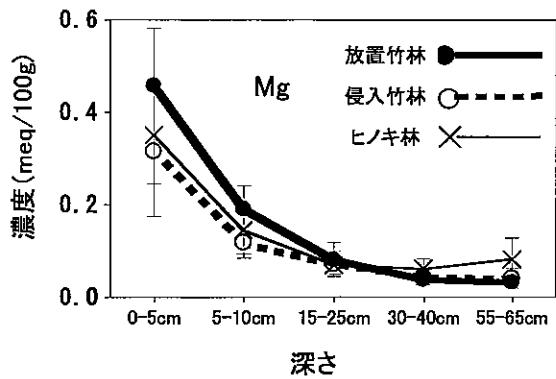


図-13. 交換性 Mg の深さ毎の濃度  
バーは標準偏差

高く、深さ0~5cmと5~10cmでは、放置竹林が侵入竹林、ヒノキ林より有意に高かった ( $p < 0.05$ )。深さ30~40cm, 55~65cmでは3者間に大きな差はなかった。

交換性Kの平均濃度は、いずれの深さでもヒノキ林が高く次いで、放置竹林、侵入竹林の順であったが、有意差がなかった ( $p > 0.15$ )。

交換性Mgの平均濃度は、いずれの深さでも放置竹林、侵入竹林、ヒノキ林で差がなかった。

#### IV. 考察

##### 1. 土壌の物理性

タケは一般に地下茎の伸張によって拡大する。土壌円筒内の根量は深さ0~5cm, 15~20cmとも放置竹林が多く、ヒノキ林で少なく、侵入竹林ではその中間であった。放置竹林、侵入竹林の根はほとんどが竹の地下茎であった。侵入竹林の深さ15~20cmの根量は2.25g/100mlで、侵入竹林の立竹密度とほぼ同じ無肥培竹林の深さ10~20cmにおける根量2.4g/100ccとほぼ同じ値であった(西尾 1983)。横尾ら(2005)は隣接した竹純林、侵入竹林、ヒノキ純林調査した地下茎は立竹密度が高いほど多くなる傾向があったとしている。これらのことから、放置竹林からタケが隣接林分へ侵入する場合、侵入竹林での根量は、放置竹林と隣接林分の間になると考えられる。

土壌の水源かん養機能を評価する際の指標として土壌孔隙が用いられる。この孔隙は粗孔隙 (pF0~pF2.7)と細孔隙 (pF2.7~pF4.2)に分けられる。この孔隙のうち粗孔隙は重力水と毛管移動水からなり保水性の評価に有効であるとされる(有光 1987)。今回の調査で表層部分の深さ0~5cm, 15~20cmで

の粗孔隙は放置竹林では平均で42.29%と40.50%、侵入竹林では平均で37.68%と36.95%であった。また、ヒノキ林での粗孔隙は、深さ0~5cm、15~20cmでは平均でそれぞれ40.22%、39.81%であった。今回得られた粗孔隙は侵入竹林で幾分低かったものの放置竹林、侵入竹林、ヒノキ林で大きな差が見られなかった。日浦ら(2004)は放置竹林、侵入竹林、管理竹林で調査した土壌表層部分の粗孔隙は31~59% (平均40%)、細孔隙は25~35% (平均30%)であったと報告しており、今回の放置竹林、侵入竹林の粗孔隙とほぼ同じであった。竹下ら(1977)が九州本島の森林で調査した地形と堆積区分別に求めた土壌表層であるA<sub>1</sub>層の粗孔隙は平均37.4~44.6%であったとしている。今回得られた粗孔隙は、放置竹林、侵入竹林、ヒノキ林で差が見られず、竹下ら(1977)の報告とほぼ同じ範囲にあった。これらのことから、粗孔隙から見た保水性は、放置竹林や侵入竹林と森林では大きく違わないと考えられた。また、土壌硬度も深さ30cm以上ではヒノキ林が幾分柔らかかったが、侵入竹林、放置竹林と有意差はなかった。また、表層だけでなく深さ40cm以下では放置竹林で一部硬い層があったが、侵入竹林、ヒノキ林との差は見られなかった。土壌硬度は土壌の孔隙と密接な関係があり、土壌硬度が柔らかいと粗孔隙も増加するとされる(竹下ら1977)ことから、表層だけでなく下層でも3者の粗孔隙は大差がないと考えられる。細孔隙はヒノキ林が放置竹林、侵入竹林より高かった。これは、放置竹林、侵入竹林の土性が壤土であったのに対して、ヒノキ林では、やや粘土が多い植質壤土であったため、細孔隙が多かったと考えられた。

深さ0~5cm、15~20cmでの採取時含水率は、放置竹林では20.03%、22.99%、侵入竹林では19.12%、23.34%といずれの深さでも両者で差はなかったが、ヒノキ林の29.60%、32.93%よりは有意に低かった。今回測定したヒノキ林では深さ0~5cm、15~20cmでの採取時含水率はそれぞれの深さの細孔隙28.69%、30.42%よりも高かった。一方、放置竹林の深さ0~5cm、15~20cmの採取時含水率は細孔隙23.57%、24.62%より低く、また、侵入竹林でも採取時含水率は細孔隙24.10%、25.42%よりも低かった(図-4, 5)。横尾ら(2005)も放置竹林、侵入竹林の土壌含水率は隣接するヒノキ林より低かったとしている。通常、雨によって供給された水は土壌中の孔隙の大きい部分から小さい部分へと移動し、乾燥は孔隙の大きい部分から水が無くなり進行

すると考えられる。自由水であるpF1.8以下の水はもちろんであるが、放置竹林、侵入竹林においては、保水性に関わる粗孔隙(pF2.7以下)に水がほとんど無い可能性がある。孔隙で差がないにもかかわらず、竹林の土壌が乾燥している原因として、表層がタケの落葉に覆われて表面流が多く(豊原ら2005、横尾ら2005)土壌への浸透が少ない可能性があることや、落葉腐植層が撥水性をもつことで水が土壌へ浸透しないこと、あるいはタケそのものの蒸散量がヒノキより多いこと(横尾ら2005)が言われている。竹林では、竹棹流下量の割合が多く、遮断量の割合が小さい分配特性をもつため降水の到達が多いとされている(服部ら1989)。これらのことから、放置竹林ではヒノキ林に比べて降水は林地表面への到達量が多いが、地表面に到達しても、落葉腐植層に阻まれ土壌まで浸透せず、表面流となって流出する可能性があると考えられた。また一方で、藤本(2004)は、土壌表層の透水性が隣接するヒノキ林より竹林の方が高かったとしている。これは、水が土壌に浸透したとしても、高い透水性により竹林の土壌から他へ速やかに移動することが考えられる。これらのことから水源かん養機能に關与する基本的な土壌の粗孔隙は変わらないが、放置竹林、侵入竹林ではヒノキ林より林内に供給される降水は多いが、粗孔隙に貯留される水がより速く無くなる可能性も示唆された。また、侵入竹林の土壌水分環境は放置竹林と類似した土壌水分環境になると考えられる。今回は表層部分の解析で比較対象もヒノキ林だけであるが、竹林や侵入竹林の土壌の水源かん養に係わる土壌特性を明らかにするためには、様々な侵入過程にある林分や土壌の下層部の孔隙解析、経時的な土壌水分の変化、他樹種の土壌特性との比較、浸透能の測定などが必要である。

## 2. 土壌の化学性

今回ヒノキ林の0~5cmの土壌における炭素、窒素含有率はそれぞれ9.22%、0.65%で、九州地域のヒノキ林表層土壌の炭素、窒素含有率8.12%、0.50%(佐々木ら2001)より幾分高いものの、河田(1989)が示した一般的な森林の表層土壌の炭素、窒素含有率7~25%、0.3~1.0%の範囲内にあり、平均的なヒノキ林の炭素、窒素含有率と考えられる。今回、放置竹林はヒノキ林の炭素、窒素含有率より高かった。西田(1987)も、炭素、窒素含有率を比較した例では、モウソウチク林がスギ林よりいずれも高かったとしている。このことから、竹林では施肥が行

われる影響もあるが、スギ林やヒノキ林と比較して炭素、窒素含有率が高いと考えられる。今回測定した、放置竹林、侵入竹林の深さ0~5cm, 5~10cmの表層土壌のpHはそれぞれ4.60, 4.75と4.38と4.46であった。これまでの報告では、竹林の表層土壌pHは管理竹林、肥培竹林、放置竹林と形態はそれぞれ異なるが、4.4(西尾1982), 4.6と4.3(西尾1983), 4.12(西田1987), 4.2(酒井ら1997), 5.2(横尾ら2005)となっており、これらの報告の範囲にあった。

交換性Ca濃度は深さ0~10cmまでは放置竹林が侵入竹林、ヒノキより濃度が高かった。交換性K濃度は3者で差がなかった。これまで測定された竹林の表層土壌の交換性塩基の濃度は、西田(1987)が放置竹林で交換性Ca, Kでそれぞれ0.93meq/100g, 0.88meq/100gと報告している。西尾(1982)が肥培された管理竹林で調査した交換性Ca, Mg, Kの濃度は深さ5~10cmではそれぞれ, 7.0meq/100g, 0.7meq/100g, 0.54meq/100g, 深さ20~30cmでは4.8meq/100g, 0.3meq/100g, 0.38meq/100gであったと報告している。また、西尾(1983)が施肥と無施肥の管理竹林の表層土壌の交換性塩基を測定した交換性Caは4.99meq/100g, 2.79meq/100g, 交換性Mgは1.15meq/100g, 0.99meq/100gであった。今回測定した交換性Ca, Mg濃度はほぼ、これらの値の範囲にあった。また、交換性K濃度は西尾(1982)の値より低かったが、これは放置竹林と施肥された竹林との違いと考えられる。また、土壌pHが放置竹林、侵入竹林での順で高く、ヒノキ林で低かったのは、交換性塩基の主要部分を占める交換性Ca濃度が放置竹林、侵入竹林で高くヒノキ林で低かったためと考えられる。酒井ら(1997)によると、マダケ林、モウソウチク林の林内雨、樹幹流は広葉樹二次林のものより交換性陽イオンの供給量が多かったとしている。このことから、放置竹林、侵入竹林ではヒノキ林より交換性Ca濃度が高くなったと考えられる。タケの侵入速度が約2m/年とすると(鳥居1998)、侵入竹林の調査地点はヒノキ林縁から10~20m入った地点であったことから、調査地点に到達するまでに5~10年かかったと考えられる。つまり、侵入竹林の土壌は、侵入されてから5~10年の割と短い期間で変化すると考えられる。

#### IV. まとめ

隣接した放置竹林、侵入竹林、ヒノキ林での土壌の物理性と化学性を調査した。深さ20cmまでの土壌表層での根量は放置竹林、侵入竹林、ヒノキ林の

順に多かった。細孔隙と全孔隙はヒノキ林が多かったが、水源かん養機能の指標となる粗孔隙では大きな差がなかった。しかし、採取時の含水率は放置竹林、侵入竹林で低く、乾燥しており、保水性に係わる粗孔隙に水がわずかしかない可能性があった。これは、降水が厚い落葉層に阻まれ浸透しづらいか、あるいは、浸透しても、土壌の高い透水性により竹林外へと速やかに排出される可能性が考えられた。竹林の水源かん養機能を明らかにするためには、今後、浸透能や経時的な土壌水分の変化などを調査する必要がある。

土壌のpHは、放置竹林、侵入竹林がヒノキ林より高かった。これは、土壌の交換性塩基の主要部分を占める交換性Caの濃度が放置竹林、侵入竹林でヒノキ林より高かったためと考えられた。これらのことから、放置竹林からヒノキ林へタケの侵入があった場合、土壌孔隙などの物理性の変化は少ないが、土壌pHや交換性Caは、タケの侵入後比較的早い時間で変化すると考えられた。

#### 引用文献

- 有光一登(1987) 森林土壌の保水の仕組み. pp. 199, 株式会社創文, 東京
- 藤本浩平(2004) 高知県内における竹林土壌の特性について (I) -隣接する森林との透水性の比較-. 第115回日林学術講: 543
- 福岡県(1987) 土地分類基本調査日田・八方ヶ岳. 50pp. 福岡県
- 福岡県水産林務部(1990a) 平成元年度福岡県林業統計要覧. 213pp, 福岡県
- 福岡県水産林務部(1990b) 福岡県林業の動向と課題 -平成元年度県林業白書-. 102pp, 福岡県
- 福岡県農林水産部(2011a) 平成22年度福岡県林業統計要覧. 156pp, 福岡県
- 福岡県農林水産部(2011b) 福岡県森林・林業の動向 -平成22年度林業白書-. 31pp, 福岡県
- 服部重昭・阿部敏夫(1989) 竹林における降雨遮断特性. 水利科学 186(4): 35-53
- 日浦啓全・有川崇・デュラドルガ(2004) 都市周辺山麓の放置竹林の拡大に伴う土砂災害危険性. 日本地すべり学会誌 41(4): 323-334
- 片野田逸郎(2003) 蒲生町西浦地域における竹林拡大の実態. 九州森林研究56: 82-87
- 河田弘(1989) 森林土壌学概論. 399pp. 博友社. 東京
- 岸和田國彦(1997) 交換性陽イオン・陰イオン. (土



- 壤環境分析法. 土壤環境分析法編集委員会編, 博友社, 東京). 215-222
- 西田豊昭 (1987) 竹林土壌の化学的性質 (I) 竹林土壌とスギ林土壌の相違. *Bamboo Journal* 5 : 79-81
- 西川僚子・村上拓彦・吉田茂二郎・光田靖・長島啓子・溝上展也 (2005) 隣接する土地被覆別にみた竹林分布変化の特徴. *日林誌* 87(5) : 402-409
- 西尾敏 (1982) 竹林 (筍林) の土壌について—深さと化学性—. *日林九支研論* 35 : 127-128
- 西尾敏 (1983) 肥培竹林の土壌と葉内成分について. *日林九支研論* 36 : 175-176
- 酒井佳美・只木良也 (1997) マダケ林とモウソウチク林における樹幹流と林内雨の成分特性. *Bamboo Journal* 14 : 28-35
- 佐々木重行・桑原康成・高宮立身・春海賢一・横尾謙一郎・水久保孝英・前迫俊一・漢那賢作 (2001) 酸性雨等森林被害モニタリング第1期における九州地区の特徴. *森林立地* 43(2) : 45-52
- 竹下敬司・高木潤治 (1977) 暖帯林地の水保全環境に関する土壌及び地形的研究. *福岡県林試時報* 26 : 1-51
- 鳥居厚志・井鷲裕司 (1997) 京都府南部地域における竹林の分布拡大. *日本生態学会誌* 47 : 31-41
- 鳥居厚志 (1998) 空中写真を用いた竹林の分布拡大速度の推定—滋賀県八幡山および京都府男山における事例—. *日本生態学会誌* 48 : 37-47
- 豊原裕子・土屋智・逢坂興宏 (2005) 密度の異なる竹林試験区における地表流出と土壌浸食. *中部森林研究* 53 : 213-216
- 脇元理恵・田崎和江 (2001) 竹の侵入が環境に及ぼす影響—植生と土壌の特徴—. *金沢大学理学部附属植物園年報* 24 : 11-27
- 山本哲朗・楠木覚士・鈴木素之・島重章 (2004) 現地調査と航空写真に基づく山口県内の竹林分布とその周辺環境への影響. *土木学会論文集* 76 : 107-112
- 横尾謙一郎・酒井正治・今矢明宏 (2005) ヒノキ人工林に侵入した竹が林分構造と土壌に与える影響. *九州森林研究* 58 : 195-198



---

---

福岡県森林林業技術センター研究報告 第13号

平成24年3月23日発行

発行 福岡県森林林業技術センター  
〒839-0827 福岡県久留米市山本町豊田1438-2  
TEL 0942-45-7870  
FAX 0942-45-7901

印刷 信光社印刷有限公司  
〒839-0065 福岡県朝倉市一木32-1  
TEL 0946-22-2831  
FAX 0946-26-1186

---

---

**Development of propagation methods of pine wilt disease resistant  
Japanese black pines and exploration of their resistance factors**  
Yasuhiro MORI

1~36

**Differences of soil characters from non-managed bamboo(*Phyllostachys heterocykla*  
f. *pubescens*) plantation to adjacent hinoki(*Chamaecyparis obtusa*) stand**  
Shigeyuki SASAKI

37~44

福岡県行政資料	
分類番号 PF	所属コード 4706205
登録年度 23	登録番号 0005