

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780161

研究課題名(和文)クロマツの材線虫病抵抗性発現に環境要因が及ぼす影響

研究課題名(英文)The effect of environmental factors on pine wilt disease resistance in *Pinus thunbergii*

研究代表者

松永 孝治 (Matsunaga, Koji)

独立行政法人森林総合研究所・九州育種場・主任研究員

研究者番号：40415039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：環境要因がクロマツの材線虫病抵抗性に及ぼす影響を明らかにするため、遺伝的な抵抗性の異なるマツ実生苗にマツノザイセンチュウ(以下、線虫)の接種実験を行った。光強度の異なる条件下でクロマツ家系の苗木に線虫を接種し、苗木の枯死は光強度とクロマツ家系間の違いによって影響を受けること、それらの交互作用は認められないこと、比較的軽度の光強度の低下によっても抵抗性が低下すること、接種以前の宿主の光環境への応答状態が抵抗性に影響することを示した。また、気温の異なる条件下で同様の接種実験を行い、高温条件では遺伝的な抵抗性に関係なくほとんどの苗が枯損し、遺伝的な抵抗性の発現が温度環境に依存していることが示された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the effect of environmental factors on resistance performance of *Pinus thunbergii*, I conducted several inoculations with *Bursaphelenchus xylophilus* to *P. thunbergii* seedlings that have various level of genetically resistance. Inoculation test under different light intensities showed that 1) seedling mortality were affected by light intensity and pine family but not associated with their interaction, 2) reduction of resistance performance induced by relatively slight deterioration of light condition, 3) host plant physiology states acclimatized to light condition were also affected to resistance performance. In addition, I performed a similar inoculation experiment under a different condition of the temperature. Almost all seedlings were dead under high temperature condition irrespective of their genetic background. This result suggested that resistance performance of resistance families were dependent on temperature environment.

研究分野：林木育種

キーワード：クロマツ マツ材線虫病 抵抗性 環境要因 光強度 気温

1. 研究開始当初の背景

日本のクロマツ林に著しい被害を与え続けているマツ材線虫病の対策として、林木育種センターは抵抗性育種を進め多数の抵抗性品種を創出している。これらの抵抗性品種から得られた種子は各県の種苗業者によって養苗され、抵抗性マツとして海岸地域等に植栽されている。

これまでに、クロマツの抵抗性は遺伝的な形質であること、抵抗性の発現の程度(線虫接種後の生存率)は年によって変化することが明らかになっている。一方、材線虫病に対するマツの感受性は光条件・土壌含水率・気温等の環境要因によって影響を受けることが知られている。これらの事実は、抵抗性マツであっても特定の環境ではその抵抗性を十分に発現できず、材線虫病によって枯損する可能性を示唆する。抵抗性マツが植栽されている現在、抵抗性マツの抵抗性発現に影響する環境要因とそれらの要因の影響の大きさを把握することは、今後の抵抗性マツ林の植栽・管理方針や抵抗性育種戦略を考えるために非常に重要であると考え、本研究の着想にいたった。

2. 研究の目的

本研究の目的は抵抗性マツの抵抗性発現に影響を及ぼす環境要因を明らかにすること、影響を及ぼす要因があればその程度を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では苗畑や人工気象器内の異なる環境下で遺伝的に管理されたクロマツ苗に対してマツノザイセンチュウ(以下、線虫)を接種することで、クロマツの遺伝的な抵抗性と環境要因の関係を明らかにする。

(1) 光環境が抵抗性に及ぼす影響

3段階の光強度(H24)

抵抗性の発現に及ぼす光環境の影響を明らかにするため、抵抗性の自然受粉4家系(波方73, 波方37, 志摩64, 田辺54)と精英樹(感受性)の自然受粉4家系(県川辺37, 県南松浦112, 県南高木102, 県肝属39)の2年4ヶ月生の苗に線虫を接種して、その後の病徴進展を調べた。光条件は寒冷紗により接種2週間前から3段階(被陰なし, 50%被陰, 80%被陰)に変えた。

線虫はアイソレイトSC9を用い、各苗に5,000頭接種し、針葉の変色割合を隔週で調べた。全針葉が変色した苗を枯死とした。

線虫接種から苗が枯死するまでの時間を目的変数、抵抗性の違いと光強度の全6組合せをグループ変数として、カプラン・マイヤー法によって生存曲線を推定し、ボンフェローニの方法でP値を補正したLogrank検定によってグループ間の生存曲線を多重比較した。その後、クロマツ家系、光強度およびそれらの交互作用を共変数としたCox回帰によってモデル選択を行った。

6段階の光強度(H25)

抵抗性の発現に及ぼす比較的軽度の光強度の低下の影響を明らかにするため、抵抗性および精英樹のクロマツ各2家系(波方37, 田辺54および南高来102, 南松浦111)と被陰の程度が異なる寒冷紗を用いて接種実験を行った。接種2週間前から光環境を6段階(65, 50, 40, 30, 15, 0%被陰)に変え、接種直前に苗高を測定した。線虫はアイソレイト島原を用い、各苗に5,000頭接種した。その後病徴の進展を目視によって隔週で観察し、すべての針葉が変色した苗を枯死とした。接種後枯死までの期間を説明変数、家系、光強度およびそれらの交互作用を説明変数、苗高を共変数として、Cox回帰でモデル選択を行った。また、光強度と枯損率の関係を示すため、抵抗性と精英樹の各群について、光強度と接種12週後の枯損率の相関係数(Spearmanの順位相関)を求めた。

中期的な被陰履歴の影響(H26)

クロマツ針葉の被陰環境への応答と抵抗性の関係を明らかにするため、抵抗3家系(三崎90, 波方37, 田辺54)と精英樹2家系(福岡2, 南松浦111)の自然受粉家系の実生苗に、前期(6月上旬~7月上旬)と後期(7月上旬~8月上旬)で自然光と寒冷紗による被陰(50%被陰)をくみ合わせた4種の処理区(光光, 光陰, 陰光, 陰陰)を設定して育苗した。その後、各処理の各家系について針葉を採取し、針葉長, 針葉幅, 乾燥重量を測定した。また、針葉の密度の指標(乾燥重量/(針葉長さ×針葉幅))(g/mm²)を算出した。その後各苗木に線虫を人工接種して枯死過程を調べた。

針葉の各形質は家系と処理区およびそれらの交互作用を要因とした2元配置の分散分析とTukeyのHSD法によって調整した多重比較で平均値の差を検定した。枯死の発生に影響する要因を明らかにするため、接種11週後の苗木の枯死の有無を目的変数、家系と処理区およびそれらの交互作用を説明変数としたロジスティック回帰を行った。

部分的な光強度の低下(H25)

抵抗性クロマツ, 大瀬戸12の自然受粉家系の2年生苗に対して、個体の全体を被陰する処理区(全被陰区)、個体の半分を被陰する処理区(半被陰区)、および被陰しない処理区(無被陰区)を設け、線虫の人工接種を行った。この時、半被陰区の苗について、被陰されている枝に接種する個体(半被陰区陰下接種)と被陰されていない枝に接種する個体(半被陰区光下接種)に分けた。この実験では全ての被陰処理は同一規格の寒冷紗(50%被陰)を用いて行った。接種は線虫アイソレイト島原を5,000頭接種した。接種3か月後に各苗の病徴進展を目視によって評価し、針葉の変色がみられた個体を発病したと判断した。各処理区30本の苗木(10本×3反復)を用い、処理区間で発病率を比較するために一元分散分析とボンフェローニの補正を用いた多重比較を行った。

(2) 気温が抵抗性に及ぼす影響

2段階の温度 (H25)

自然受粉した抵抗性2家系(波方 37, 三崎 90)と精英樹2家系(福岡2, 国東 131)の2年生苗を人工気象装置内で1か月程度養成し, 線虫を接種した。気象室内の光条件は 14L10D, 約 30000lx 空中湿度は 75%とした。気温は高温区で昼間と夜間それぞれ 35 と 30, 常温区では 30 と 25 とした。土壌含水率をモニタリングして, 含水率が 15%以下になった場合に十分な灌水をおこなった。

線虫接種後, 定期的に各苗の病徴を目視で調査し, 全針葉が変色した個体を枯死とした。枯死までの時間を目的変数, 家系と温度処理区を説明変数として Cox 回帰を行った。

3段階の温度 (H26)

抵抗性の波方 37と精英樹の福岡 2 の自然受粉家系のポット苗を人工気象装置をもちいて3つの異なる温度条件で育成した。気温は高温区(昼 36-夜 31()), 中温区(28-23), 低温区(20-15)の3処理区を設けた。その他の条件は3処理区で同様(14L10D, 約 30000lx, 空中湿度:75%, 常時底面より給水)とした。線虫接種後, 毎週各苗の枯死を判定した。接種後枯損までの経過時間を目的変数, 家系と温度の全6組合せをグループ変数として, カプラン・マイヤー法によって生存曲線を推定し, ポンフェローニの方法で P 値を補正した Logrank 検定によってグループ間の生存曲線を多重比較した。

4. 研究成果

(1) 光環境が抵抗性に及ぼす影響

3段階の光強度 (H24)

被陰なしでは接種4週後から苗が枯死し, 接種8週後に枯死率は 51%になった。50%被陰と80%被陰では, どちらも接種2週後から苗が枯死し, 接種8週後にはそれぞれ 88%と99%の苗が枯死した。抵抗性と精英樹の接種8週後の枯死率はそれぞれ, 被陰なしで 39%と63%, 50%被陰で 84%と94%, 80%被陰で 99%と100%であった。Logrank 検定の結果, 6つのグループは生存曲線が互いに有意に異なる4つの集団(抵抗性-被陰なし; 抵抗性-50%被陰, 精英樹-被陰なし; 抵抗性-80%被陰, 精英樹 50%被陰, 精英樹 80%被陰)に分かれた(図1)。

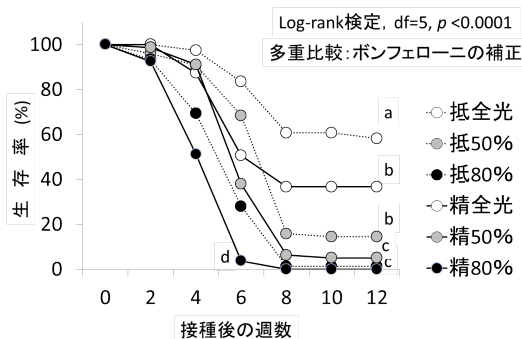


図1 3段階の光条件下における抵抗性と精英樹クロマツ家系の線虫接種後の枯損過程 Cox 回帰によってモデル選択した結果, クロ

マツ家系と被陰処理を要因としたモデルの AIC が最も低くなった。これらの結果から, 光条件の悪化によって, 抵抗性家系および精英樹家系の生存率が低下し, 枯死時期が早くなること, つまり抵抗性マツであっても光条件の悪化で抵抗性の発現が阻害されること, また, 被陰条件下でも抵抗性マツは精英樹より枯損しにくいことが示唆された。

6段階の光強度 (H25)

線虫接種4週以降, 枯損苗が発生し, 最終的に全体の80%の苗が枯損した。光強度が 100, 85, 70, 60, 50, 35%と低下するに従い, 抵抗性家系の接種 12 週後の平均枯損率は 60, 67, 77, 68, 77, 88%と次第に増加する傾向にあった(図2)。

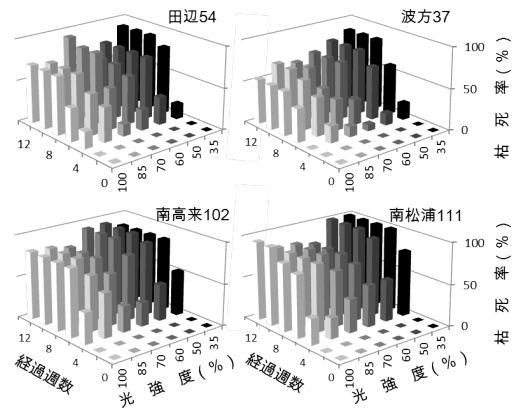


図2 各光強度において線虫接種したクロマツ家系の枯死率の時間変化

一方, 精英樹家系は全体的に枯死率が高いためか(南高来 102 および南松浦 111 の平均枯損率: 86%および88%), 光強度と枯死率の間に抵抗性家系ほどの明瞭な関係は見られなかった。

Cox 回帰によるモデル選択の結果, 家系, 光強度, 苗高を説明変数としたモデルが最適なモデルとして選択された。最適なモデルによって Cox 回帰分析を行った結果, 最も枯死率の高かった精英樹南松浦 111 を対照とした場合, 抵抗性家系の波方 37 と田辺 54 のハザード比は 0.39 (0.22-0.56 (95%信頼区間)) と 0.43 (0.25-0.61) となり, 1 より有意に小さかった。この結果は抵抗性家系は様々な光強度下において, 精英樹家系より枯死率が低いことを示唆する。

また, 光強度について, 100%を対照とした場合, 50%と 35%のハザード比は 1.67 (1.45-1.87) と 1.72 (1.51-1.93) となり, 1 より有意に大きかった。

また, 抵抗性家系における光強度と接種 12 週後の枯死率の間の順位相関係数は -0.83 ($n = 6, P = 0.06$), となり, 精英樹家系の相関係数は -0.54 ($n = 6, P = 0.30$)であった(図3)。

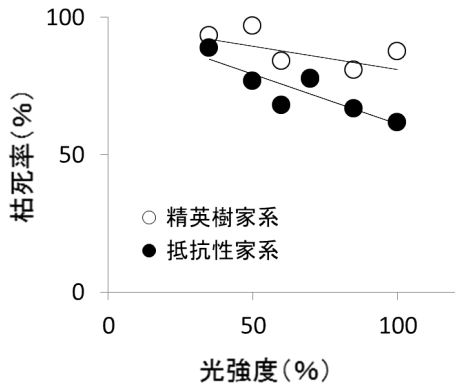


図3 光強度と線虫接種したクロマツ苗の枯死率の関係

これらの結果は光強度が低くなるほどクロマツは材線虫の感染に対して枯損しやすい傾向があることを示唆し、特に光強度が50%以下では統計的に有意に枯死率が増加することが示された。先行研究は自然光の30%に被陰した条件で苗木の枯損率が増加することを示しているが(川口・玉泉, 2006), 本研究はより軽度の被陰によっても枯死率が増加することを示した。精英樹家系の相関係数の絶対値が抵抗性家系に比べて小さかったのは、全体的な枯死率が高く、光強度間の差が十分に現れなかったためかもしれない。

中期的な被陰履歴の影響(H26)

針葉長・針葉幅・乾燥重量は光光区で大きく、光陰・陰光区、陰陰区の順に値が小さくなり、家系間差は、ほとんど認められなかった。分散分析の結果、針葉長、針葉幅、乾燥重量のすべてで処理区間に有意差が認められたが、家系間差および処理と家系の交互作用は針葉幅のみで認められた。

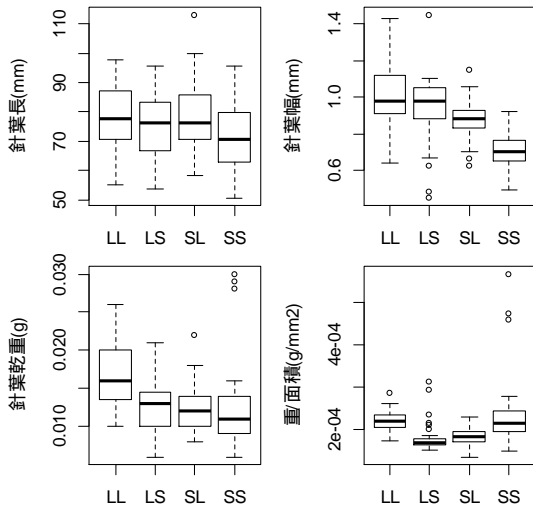


図4 異なる光環境下のクロマツ針葉の形質(LL 光光区, LS 光陰区, SL 光陰区, SS 陰陰区)

針葉幅で認められた交互作用は光陰区における波方 37 の針葉幅が小さかったことに起因していると考えられたが、その他の形質において処理と家系の交互作用が認められなかった。そ

のため、針葉の形態の光に対する反応は家系に依存せず、概ねどの家系においても同様の反応を示すと考えられた。針葉の密度の指標は光光区と陰陰区で大きく、陰光区と光陰区で有意に低かった。

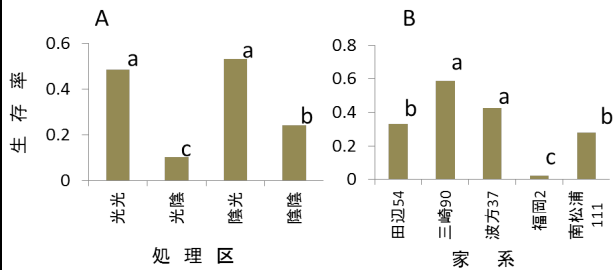


図5 異なる被陰環境下で線虫接種したクロマツ実生苗の生存率

(A: 各処理区の生存率, B 各家系の生存率, 異なる文字の付いたカラムの生存率は互いに有意に異なる)

接種 11 週後の枯死の発生は家系と処理区間で有意に異なったが、それらの交互作用は有意でなかった。そのため、以降、交互作用を除いたモデルで再解析した結果を示す。生存率は光光区と陰光区で有意に高く、ついで陰陰区となり、光陰区が有意に低かった(図5)。家系生存率は三崎 90 と波方 37 で有意に高く、福岡 2 で有意に低かった。この結果は、接種直前の光環境だけでなく、それ以前の光環境による決まる植物の状態や光環境の変化の方向性が抵抗性の発現に影響することを示唆した。

部分的な光強度の低下(H25)

実験全体の枯死率が低かったため、発病率について解析を行った。無被陰区と全被陰区ではそれぞれ 23%と 53%の苗が発病した。一方、半被陰区光下接種と半被陰区陰下接種はそれぞれ 30%と 53%の苗が発病した(表)。

表 部分被陰した苗の発病率

光条件	接種	本数	発病率
自然光	あり	30	0.23 bc
自然光	なし	30	0.00 c
半分被陰	光下あり	30	0.30 ab
半分被陰	陰下あり	30	0.53 a
半分被陰	なし	30	0.00 c
全被陰	あり	30	0.53 a
全被陰	なし	30	0.00 c

この結果は、部分的に被陰された苗の陰部の枝の抵抗性は、全体を被陰された苗と同程度となることが示唆した。また、部分的に被陰された苗の被陰されていない部分の枝の抵抗性は、全く被陰されていない苗の枝と有意に異なるとは言えないことが示唆された。

(2) 気温が抵抗性に及ぼす影響

2段階の温度

高温区では接種3週後に枯損が生じ、常温区では4週後から枯損が生じた(図6)。Cox 回帰に

よるモデル選択の結果、家系と温度処理のみのモデルが最も AIC が低くなった。最適なモデルで解析した結果、最も枯死率が高い福岡2を対照とした場合、国東 131, 三崎 90, 波方 37 のハザード比は 0.53 (95%信頼区間, 0.31-0.92), 0.40(0.23-0.70), 0.46(0.27-0.80)で有意に 1 より小さくなった。また常温区を対照とした場合、高温区の高ハザード比は 1.67(1.12-2.47)で有意に 1 より大きく、高温区で枯死率が有意に高いことが示された。また、家系と温度処理の交互作用が最適モデルに含まれなかったことから、温度の影響は家系ごとに異なるというよりはすべての家系に同様に影響すると考えられた。

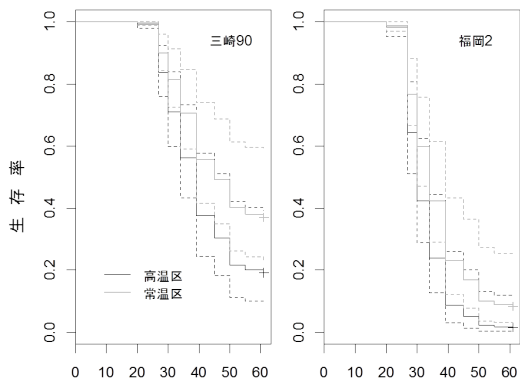


図6 異なる温度条件下における三崎 90 と福岡2の実生苗の線虫接種後の生存曲線

3段階の温度

両方の家系において、高温区の苗は接種4週後に枯損し始め、最終的にほぼすべての苗木が枯損した。低温区の苗は調査期間中枯損しなかった。中温区の苗は感受性の場合5週後に枯損し始め、最終的にすべての苗が枯損した。一方、抵抗性の場合7週後に枯損し始め、最終的な枯損率は44%であった。Logrank 検定を行ったところ、生存曲線は互いに有意に異なる3つのグループに分かれた(低温-波方 37, 低温-福岡2; 中温-波方 37; 中温-福岡2, 高温-波方 37, 高温-福岡2)(図7)。

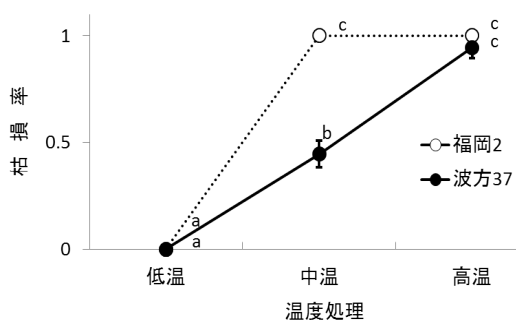


図7 異なる温度条件で線虫を接種した抵抗性の異なる実生苗の枯損率

本研究では様々な光環境および温度環境で抵抗性の程度が異なるクロマツ実生家系に対して線虫を接種した。全体の傾向として、環境の悪化(光強度の低下, 気温の上昇)に

伴い、線虫接種後の苗木の生存率は低下した。これは従来の知見と一致する結果である。また、抵抗性について遺伝的に改良されていない精英樹だけでなく、抵抗性クロマツも環境の悪化によって線虫接種後の生存率が低下した。ただし各環境において、抵抗性クロマツは精英樹クロマツより高い生存率を示した。

光環境についての実験の統計解析において、光環境とクロマツ家系の相互作用が認められなかったため、光環境の影響と遺伝的な抵抗性が抵抗性の発現に及ぼす影響は比較的単純な関係であると考えられた。つまり、光強度が低下するほど、また遺伝的な抵抗性が低いほど、材線虫病によって枯損しやすいと考えられた。

気温についての接種実験は光環境度の実験と同様に、気温が高いほど、また遺伝的な抵抗性が低い程、材線虫病によって枯損しやすいことを示した。また、気温が一定以上の環境では、遺伝的な抵抗性に関係なくほとんどの苗が枯損することが示された。

本研究は自然受粉した実生苗を用いた実験系である。そのため、結果は実際に造林に用いる苗の性質を示していると考えられる。一方、抵抗性品種開発の場面においては、各個体の持つ個々の抵抗性遺伝子が改良の対象になる。そのような視点を持ち、クローン苗を用いた研究を行えば、環境と遺伝的な抵抗性の交互作用が検出される可能性もあると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

松永孝治、千吉良治、武津英太郎、倉原雄二、倉本哲嗣、光強度の違いが抵抗性クロマツの材線虫病抵抗性に及ぼす影響、九州森林研究、査読有、68 巻、2015、141-144

〔学会発表〕(計 2 件)

松永孝治、千吉良治、武津英太郎、倉原雄二、倉本哲嗣、光強度の違いが抵抗性クロマツの材線虫病抵抗性に及ぼす影響、第 70 回九州森林学会大会、2014 年 10 月 25 日、佐賀大学(佐賀県、佐賀市)

松永孝治、千吉良治、武津英太郎、倉原雄二、高橋誠、クロマツ実生苗におけるマツノザイセンチュウ抵抗性の発現に及ぼす光環境の影響、第 124 回日本森林学会大会、2013 年 3 月 26 日、岩手大学(岩手県、盛岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 孝治 (MATSUNAGA Koji)

独立行政法人森林総合研究所 林木育種センター九州育種場・主任研究員

研究者番号：40415039

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

千吉良 治 (CHIGIRA Osamu)

独立行政法人森林総合研究所 林木育種
センター九州育種場・育種研究室長