

## 野外でのマツノザイセンチュウ接種において接種後の降雨が影響するタイミング

Effect time between inoculation and precipitation on the effectiveness of *Bursaphelenchus xylophilus* on pines in an artificial inoculation test at an open-air nursery

山野邊太郎\*1

Taro YAMANOBE\*1

\*1 森林総合研究所林木育種センター

Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Hitachi 319-1301

**要旨**：マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業における抵抗性個体のスクリーニングにおいては、野外の苗畑で育成した多数のマツ個体にマツノザイセンチュウを人工接種する必要がある。しかし、発病に適した人工接種の時期は7月上旬～7月下旬で、その大半が梅雨にあたる。マツノザイセンチュウは水懸濁液の状態では接種されることから、接種後に降雨があった場合、接種部位から接種源が流亡することが危惧される。本報告では、接種と降雨の間隔がどの程度であれば接種が有効になるかを検証するため、夏季に線虫接種を行った後に接種部位に水を流す処理を行い、冬季に生存率を調べ、水を流さない場合と比較した。120分後から10分後の流水は生存率に影響を及ぼさなかったが接種直後の流水は生存率を高めた。このことから、野外におけるマツノザイセンチュウ接種による抵抗性個体のスクリーニングにおいて、接種に引き続くような降雨がない範囲において、接種後の降雨が影響することはきわめてまれであると推察された。

**キーワード**：人工接種，流水処理，生存率，アカマツ，クロマツ

**Abstract**: Artificial inoculation of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii* with *Bursaphelenchus xylophilus* in an open-air nursery is necessary for screening resistant clones from an enormous number of candidates because green houses have limited space capacity as compared to an open-air nursery. The appropriate season for a higher incidence of infection by artificial inoculation is around July. In Japan, this is the season when the temperature reaches above 25 °C, which promotes pine wilt disease; additionally, it is rainy. Precipitation following inoculation could trigger the failure of the artificial inoculation because the inoculum is an aliquot of water suspension of the nematodes that could be washed away from the inoculation point. This could result in a higher survival rate, thus skewing results. To determine the sufficient interval between inoculation and precipitation for effective inoculation, the time between inoculation and water flow was measured in relation to the development of an infection. Water flow immediately following inoculation lead to a higher survival rate than artificial inoculation without water flow, whereas water flow 10 minutes to 120 minutes after inoculation did not affect survival rates compared to artificial inoculation without water flow. We determined that a sufficient interval between the inoculation and precipitation for effective inoculation to screen resistant clones is 10 minutes or more.

**Key-word**: Artificial inoculation, Water flow treatment, survival rate, *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii*

## I はじめに

日本のマツノザイセンチュウ抵抗性育種における抵抗性個体のスクリーニングでは、毎年、多数のアカマツ個体およびクロマツ個体に、マツノザイセンチュウを水懸濁液の接種源に調整し、露出させた木部に滴下し接種している(以下、「人工接種」)。マツ材線虫病は気温 25℃以上において発病が促進されるため(3), 人工接種をビニルハウス等の保温しやすい施設内で行うことで高い発病率を得ることができる。しかし、施設内での人工接種に固

執すると、施設の面積により年度ごとの接種本数が抑制され、抵抗性育種事業の進捗が滞りがちになる。近年では、日本各地のマツノザイセンチュウ抵抗性育種担当者の知見の蓄積により、7月中を目途に、天気予報を活用し、接種前後に気温が高くなる時間が多くなるタイミングを見計らい人工接種を行うことで、露地の苗畑に植栽したマツにおいても安定的に高い発病率が確保できるようになってきている。

一方、7月はその大半が梅雨時期のため、人工接種に

対する降雨の影響については、露地における接種の試行段階から何点か危惧がされる点があった。まず、施設内接種において灌水による生存率が高まる事例があり(6)、降雨による被接種マツ個体への水分供給で感受性個体の淘汰圧が下がることが危惧された。この点については倉本ら(5)によって接種後8週間および接種前後21日間の降水量は、接種試験における生存率に影響しない結果が示され、問題にならないことがわかった。次に、接種直前に相当量の降雨があると、被接種マツ個体の皮層に水分が多く含まれた状態になり、この水分が呼び水になって滴下した接種源の大部分が露出させた木部の外へ流れ出てしまう点である。この点については、危惧でなく実際に起こる現象であり、現在のところ生存率への影響が確認されたことはないが、降雨がない時間の継続に伴って皮層に含まれる水分が低下することを待ち、一部接種木を供試し、滴下した接種源が露出させた木部の外へ漏れださなくなることを確認してから接種による抵抗性個体のスクリーニング作業を開始することで対応している。さらに、接種後の降雨により接種部位上で流水が発生し、接種したマツノザイセンチュウが露出させた木部から流れ出てしまう点も危惧されてきた。戸田(7)には、降雨前1時間を目安に接種を終えることが指南されているが、この記述は、接種30分後に接種部位を水で洗い、こぼれ落ちた水の中に少数の生存線虫と多数の死亡線虫を確認した経験を保守的にとらえたことによっている(戸田、私信)。この点について、実際の接種試験による判断が行われてきていない。

本研究では、上記の接種終了の目安について、接種試験における生存率で検証した。

## II 材料および方法

試験の概要を表-1に示す。試験は2002年、2003年および2006年に行った。試験はいずれも国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター関西育種場(岡山県勝田郡勝央町)構内で行った。試験に用いた被接種マツはいずれも林木育種センターで公表している優良品種を母樹とする自然交配家系であるが、

紙面の都合上略号で記載する。これら被接種マツは2年3ヶ月生の夏季にマツノザイセンチュウを接種した。流水処理は、接種後一定の時間が経過した後に接種部位に水を流す処理を行い、水を流さない場合(以下、「通常」と比較した。接種から流水処理までの間隔については、家系毎に、処理する個体順を決め、接種および流水処理各々について開始と終了の時刻を記録した。接種と流水処理の開始時刻間および終了時刻間の時間差を算出し、最小値および最大値をそれぞれ最短および最長の間隔であったと仮定すると、120分後流水処理(以下、「120分後」)は115分後~131分後(最短~最長、以下同じ)、60分後流水処理(以下、「60分後」)は56分後~72分後、10分後流水処理(以下、「10分後」)は8分50秒後~10分53秒後の範囲であった。処理後の被接種マツは、露地の場合は灌水せず、ガラス室内の場合は用土全体が濡れる程度の灌水を週2回行い、観察まで養生した。観察は、外観がすべて褐変しているものを枯死、それ以外を生存として記録した。

2002年は120分後と60分後についてそれぞれ通常と比較した。被接種マツはクロマツとしその家系は、120分後では波方37号、波方73号、小浜30号および田辺54号、60分後では、穎娃425号、三崎90号、大瀬戸12号、志摩64号および津屋崎50号を使用した。家系と処理の組み合わせごとの供試本数は、35~66本であった(表-1)。接種および流水処理は苗畑の露地において25本/m<sup>2</sup>で育成したマツに行った。流水処理は家系内の本数を問わず1家系あたり18Lの水道水をジョウロを用いて、接種部位にかけた。接種および流水処理は2002年8月5日に行い、同年11月25日に観察した。

2003年は60分後と10分後に通常と比較した。被接種マツはクロマツとしその家系は、波方37号、波方73号、三崎90号、津屋崎50号および田辺54号とし、家系と処理を直交させた。家系と処理の組み合わせごとの供試本数は、9~11本であった(表-1)。接種および流水処理は、素焼きの8号鉢に2本植えしガラス室で育成したマツに行った。流水処理は駒込ピペットで1本あたり20mlの滅菌水を滴下した。接種および流水処理は2003

表-1. 試験概要(家系数(家系内本数))

Table 1. Design of test (No. of family (No. of subjects per family))

接種年	樹種	植栽	施設	処理						
				通常	120分後	60分後	10分後	直後	疑似	無処理
2002	クロマツ	苗畑	露地	9(42-64)	4(46-62)	5(35-66)				
2003	クロマツ	素焼鉢	ガラス室	5(9-11)		5(9-11)	5(9-11)			
2006	アカマツ	素焼鉢	露地	4(16)		4(12-16)	4(16)	4(16)	4(8)	4(8)

年7月23日に行い、2004年1月5日に観察した。

2006年は60分後、10分後、接種直後について通常と比較した。また、ネガティブコントロールとして水を擬似的に接種する処理(以下、「擬似」と接種も流水処理もしないマツ(以下、「無処理」)も準備し、観察した。被接種マツはアカマツとしその家系は、新居浜7号、大分203号、佐賀関118号および総社39号とし、家系と処理を直交させた。家系と処理の組み合わせごとの供試本数は、60分後、10分後、接種直後および通常が12~16本、擬似および無処理が8本であった(表-1)。接種および流水処理は、素焼きの8号鉢に2本植えし露地で育成したマツに行った。流水処理は駒込ピペットで1本あたり20mlの滅菌水を滴下した。接種および流水処理は2006年7月31日に行い、2006年12月12日に観察した。

解析は、2002年は流水処理ごとに、他は年ごとにデータセットを作成し(2006年の擬似および無処理は解析対象から除外)、応答変数を被接種マツ個体の生死、説明変数を流水処理(通常を含む、固定効果)ならびに家系(変量効果)とする一般化線形混合モデルで行った(Rバージョン3.4.1, lme4パッケージのglmer、誤差構造は二項分布を仮定)。家系については切片として関与するモデル(以下、「m1」)、傾きとして関与するモデル(以下、「m2」)および、切片と傾き双方に独立して関与するモデル(以下、「m3」)の3通りを試行し、AIC最小のものを採用した(4)。採用されたモデルについてはPearsonの $\chi^2$ と残差自由度からDispersion Parameterを算出し過分散の傾向の有無について確認を行った(2)。また、逸脱度検定を行い、処理に有意差が検出された際には、2処理間の総当りの逸脱度検定で得られるp値を用いて、False Discovery Rate(Benjamini & Hochberg(7))によりFamily-wise error rateが $p < 0.05$ となる処理の組み合わせを多重比較により検出した。

### III 結果および考察

2006年の試験における擬似および無処理においては枯死が認められなかったことから、2006年の試験の枯死は線虫により引き起こされたことが確かめられた(図-4)。おそらく、2002年および2003年の試験にもこのことは当てはまると推察される。

解析モデルは、すべてにおいてm1が採用され、そのDispersion Parameterは、2002年の60分後、2002年の120分後、2003年および2006年でそれぞれ0.99, 0.95, 1.04 および 0.98で、二項分布に仮定されているDispersion Parameter=1に近かった。このことから、仮定した誤差構造は妥当なものだと判断された。

2002年の試験では、120分後および60分後ともに、通常との差異は認められなかった(逸脱度検定、120分後で $\chi^2_{(d.f.=1)} = 0.02$  ( $p=0.88$ ) (図-1)、60分後で $\chi^2_{(d.f.=1)} = 3.39$  ( $p=0.07$ ) (図-2))。2003年の試験では、流水処理間に差は認められなかった(逸脱度検定、 $\chi^2_{(d.f.=2)} = 0.56$  ( $p=0.76$ )、図-3)。2006年の試験では、流水処理間に差が認められ(逸脱度検定、 $\chi^2_{(d.f.=3)} = 57.80$  ( $p < 0.005$ ))、2処理間の比較で、接種直後の流水は他の処理より生存率が高くなった(Family wise-error rate,  $p < 0.05$ ) (図-4)。

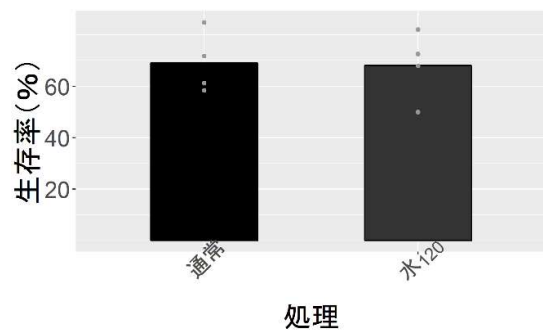


図-1. 2002年における通常接種(通常)と接種120分後流水処理(水120)との生存率の違い棒グラフおよび点がそれぞれ処理ごとの平均生存率と各家系の生存率である。

Fig.1 Difference in survival rates between no water flow and water flow 120 minutes after inoculation in 2002.

Bars and dots are average of survival rates in the same treatment of water flow and survival rates of each family within the same treatment of water flow, respectively.

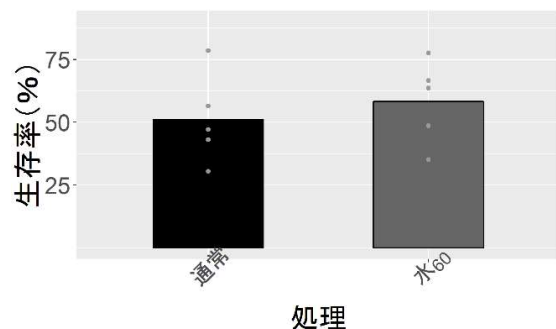


図-2. 2002年における通常接種(通常)と接種60分後流水処理(水60)との生存率の違い棒グラフおよび点がそれぞれ処理ごとの平均生存率と各家系の生存率である。

Fig.2 Difference in the survival rates between no water flow and water flow 60 minutes after inoculation in 2002.

Bars and dots are the average survival rates in the same treatment and family within the same treatment of water flow, respectively.

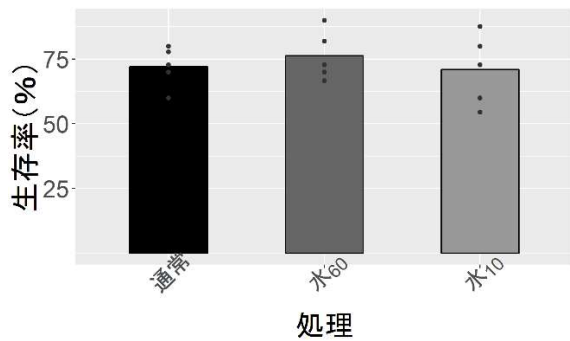


図-3. 2003年における通常接種(通常), 接種60分後流水(水60)および接種10分後流水(水10)における生存率の違い

棒グラフおよび点がそれぞれ処理ごとの平均生存率と各家系の生存率である。

Fig.3 Difference in survival rates between no water flow, water flow 60 minutes after inoculation, and water flow 10 minutes after inoculation in 2003.

Bars and dots are the average survival rates for the same treatment and family within the same treatment of water flow, respectively.

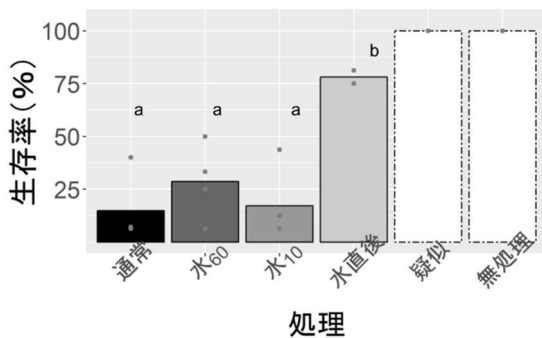


図-4. 2006年における通常接種(通常), 接種60分後流水処理(水60), 接種10分後流水処理(水10), 接種直後流水処理(水直後), 水接種(疑似)および無処理における生存率の違い

棒グラフおよび点がそれぞれ処理ごとの平均生存率と各家系の生存率である。同じアルファベット間に有意差は認められない。

Fig.4 Difference in survival rates between no water flow, water flow 60 minutes after inoculation, water flow 10 minutes after inoculation, and water flow immediately following inoculation.

Bars and dots are the average of survival rates for the same treatment of water flow and each family within the same treatment of water flow, respectively.

Survival rates with the same letter are not significantly different.

これらのことから、接種直後に強い降水がない限り、降雨により接種部位上での流水が発生し、接種したマツノザイセンチュウが露出させた木部から流れ出て、生存率が高くなることはおそらくないと推察された。よって、戸田(7)による降雨前1時間を目安に接種を終える指南は妥当であることが確認された。近年では雨雲レーダーによる降水予測がインターネットで容易に閲覧できるため、接種試験中に降水予測を確認し、降水予測の誤差を保守的にとらえたとしても降雨30分前を目安として接種作業を終えれば、梅雨の合間の降水のない時間帯を有効に活用して、より効率的な抵抗性個体のスクリーニングが行えると期待される。

**謝辞:** 元林木育種センター九州育種場の戸田忠雄氏には、降雨前の目安作成の推移について情報提供をいただいた。森林総合研究所林木育種センター関西育種場の諸氏には材料育成、試験補助について多大なご協力をいただいた。以上の方々に、厚く御礼申し上げます。

#### 引用文献

- (1) BENJAMINI, Y., HOCHBERG, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57: 289-300
- (2) 大東健太郎 (2010) 線形モデルから一般化線形モデルへ(GLM)へ. *雑草研究* 55: 268-274
- (3) 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. *日林講* 84: 334-335
- (4) 久保拓弥 (2012) データ解析のための統計モデリング入門. 岩波書店, 東京: 267pp
- (5) 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
- (6) 大山浪雄・川述公弘・斎藤明 (1975) マツノザイセンチュウ接種クロマツ苗の発病に及ぼす土壌乾燥の影響. *日林九支研論* 28: 107-108
- (7) 戸田忠雄 (2000) 抵抗性マツを生産するための材線虫の培養技術と接種技術. *林木育種センター九州育種場年報* 28: 50-61