【原著論文】

人工交配による強制他殖がヒメコマツ実生苗のマツ材線虫病抵抗性に及ぼす影響

米道　学[*,1]・鈴木　祐紀[2]・塚越　剛史[2]・里見　重成[2]・軽込　勉[2]・
久本　洋子[2]・後藤　晋[1]・山田　利博[2]

Effects of outcrossing by artificial pollination on resistance against pine-wood nematode of *Pinus parviflora* var. *parviflora* seedlings

Takashi Yonemichi[*,1], Masanori Suzuki[2], Takeshi Tsukagoshi[2], Shigenari Satomi[2],
Tsutomu Karukome[2], Yoko Hisamoto[2], Susumu Goto[1] and Toshihiro Yamada[2]

要旨：千葉県の房総丘陵に位置する東京大学千葉演習林には、ヒメコマツ天然個体が隔離分布している。近年、個体数が急激に減少しているが、その要因としてマツ材線虫病の影響が指摘されている。現在、マツ材線虫病抵抗性を有するヒメコマツ実生苗の作出が検討されているが、天然個体の自然交配では自殖が多いため、実生苗のマツ材線虫病抵抗性が弱まっていることが懸念される。そこで本研究では、ヒメコマツ天然個体の自然交配苗と人工交配苗に強病原性マツノザイセンチュウ（Ka-4）を接種し、接種後の生存率を比較した。天然個体（荒樫沢13）の自然交配苗の生存率は0％であったが、同じ個体を片親とする人工交配苗（前沢1×荒樫沢13）では65％と有意に高かった。また、樹高や地際径は、自然交配苗の方が有意に小さく、自殖による近交弱勢の影響が示唆された。一方、もう一つの天然個体（荒樫沢3）の自然交配苗の生存率は50％で、同じ個体を片親とする人工交配苗（前沢5×荒樫沢3）の生存率45％と有意な違いがなく、樹高や地際径も同等であった。以上の結果から、ヒメコマツ天然個体の中には、人工交配を行うことで近交弱勢を回避し、次世代のマツ材線虫病抵抗性を向上できるものがあると考えられた。

キーワード：近交弱勢、孤立木、自殖、接種検定、房総丘陵

Abstract: *Pinus parviflora* var. *parviflora* is naturally distributed and forms isolated small populations over the University of Tokyo Chiba Forest in the Boso hills, Chiba Prefecture. These populations have recently declined probably due to pine wilt disease. Production of *P. parviflora* var. *parviflora* seedlings which is resistant to pine-wood nematode has been currently planned. However, open-pollinated seedlings derived from natural mother trees are often resulted from selfing, which might make them more susceptible to pine wood nematode. In this study, we inoculated virulent nematode isolate (Ka-4) into open-pollinated seedlings and crossed-pollinated (outcrossed) seedlings, and then compared their survival rates. The survival rate

[*] E-mail: yonemichi@uf.a.u-tokyo.ac.jp
[1] 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林教育研究センター　Education and Research Center, The University of Tokyo Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-Ku, Tokyo113-8657, Japan
[2] 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林千葉演習林　The University of Tokyo Chiba Forest, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 770, Amatsu, Kamogawa, Chiba 299-5503, Japan
2014年10月3日受付、2015年1月5日受理

of open-pollinated seedlings from one natural tree Arakashizawa-13 was 0 %, whereas that of cross-pollinated seedlings of which one parent was the same tree (Maesawa-1 × Arakashizawa-13) was significantly high (65 %). The height and root collar diameter for the open-pollinated seedlings were significantly smaller than those for the cross-pollinated seedlings. In contrast, the survival rate of open-pollinated seedlings from the other natural tree (Arakashizawa-3) was not significantly different from that of cross-pollinated seedlings of which one parent was the same tree (Maesawa-5 × Arakashizawa-3). Either of the height and root collar diameter did not show significant difference between these seedlings. Thus, it was assumed that there should be natural trees which can produce seedlings without inbreeding depression by aritificial pollination and increase resistance to pine-wood nematode.

Keywords: inbreeding depression, isolated tree, selfing, inoculation test, Boso Hills

はじめに

千葉県房総丘陵に位置する東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林千葉演習林（以下、千葉演習林とする）には、ヒメコマツ *Pinus parviflora* var. *parviflora* が天然分布している。千葉演習林では、1978年から天然個体の生育調査を行い、当時は200個体以上の個体を確認した。しかし、2010年現在ではそれらの約90％が枯死し、危機的な状況となっている（米道ら2014）。この急激な個体数減少の要因の一つとして、マツ材線虫病が挙げられている（尾崎ら2005）。そこで千葉演習林では、天然個体から種子を採取し、次世代の実生苗を育成するとともに、マツ材線虫病抵抗性を持つ実生苗の作出を検討している。

千葉演習林内に現存する天然生ヒメコマツは個体数が少ない上に、互いに離れて生育しているため、自然交配種子に自殖が多い（Iwasaki et al. 2013）。そのため千葉演習林内の天然生ヒメコマツでは種子の充実率が低いが、人工交配によって強制的に他殖させることで充実率を向上させることができる（池田ら2005）。

一般に、針葉樹で自殖によって得られた実生苗は、近交弱勢の影響で生存率や成長が低下する（Husband and Schemske 1996）。したがって、千葉演習林内に生育するヒメコマツ天然個体由来の自然交配実生苗に近交弱勢が生じている可能性がある。アカマツとクロマツでは，自殖家系においてマツ材線虫病抵抗性の低下が知られており（倉本ら2006；戸田ら1997）、ヒメコマツにおいても実生苗の抵抗性が低下している可能性がある（軽込ら2013；米道ら2014）。その場合、強制他殖となる人工交配を行えば、次世代のマツ材線虫病抵抗性が回復できると考えられる。しかし、これまで人工交配がヒメコマツ実生苗のマツ材線虫病抵抗性に及ぼす影響について検討した例はない。そこで本研究では、ヒメコマツ天然個体の自然交配苗と人工交配苗、対照として抵抗性が低いと考えられる未選抜の一般クロマツ実生苗にマツノザイセンチュウを接種し、接種後の生存率を比較した。

材料と方法

接種に用いたのは、5年生のヒメコマツ実生苗で、天然個体由来の自然交配苗2家系、人工交配苗6家系の合計8家系である。1家系当たりの接種本数は7～20本である。

人工交配に用いた母樹は、千葉演習林内の集植所に定植された個体で、花粉親には千葉演習林を含む房総丘陵の天然個体を用いた。対照として、5年生の一般クロマツ自然交配実生苗を用いた。クロマツ苗の樹高は平均58.4cm、地際直径は平均15.2mmであった。

マツノザイセンチュウの接種は千葉演習林内の札郷苗畑において、2011年と2012年の梅雨明け後に2年続けて行った。1年目の接種日は、2011年7月14日、2年目は2012年8月7日である。接種にはマツノザイセンチュウの強病原性アイソレートKa-4を用い、苗木1本当たり5,000頭を剥皮接種した。

接種後の生存率は、2012年の10月に調査した。生存率は、1年目の接種個体数に対して2年間の接種で生存した個体の割合とした。天然個体である荒樫沢13由来の自然交配苗および同じ個体を片親とする人工交配苗（前沢1×荒樫沢13）の生存率が同じかどうかについて、フィッシャーの正確確率検定で求めた。もう一つの天然個体である荒樫沢3由来の自然交配苗と同じ個体を片親とする人工交配苗（前沢5×荒樫沢3）についても同様に検定した。

また、1年目の接種数日前に各実生苗の樹高と地際

直径を測定した。樹高と地際直径については、家系間で有意差があるかどうかを調べるためにTukey HSD法による多重比較を行った。統計解析には、R ver. 2.15.0（R Develop ment Core Team 2012）を用いた。

結　果

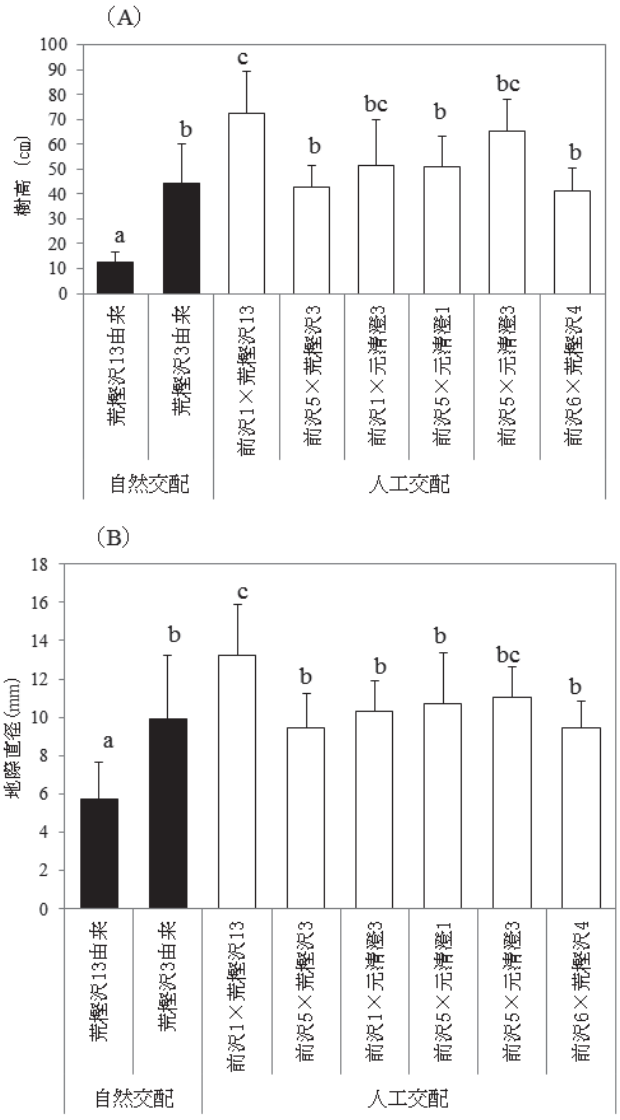
接種後の生存率は、天然個体から得られた自然交配苗は荒樫沢13由来が0 %、荒樫沢3由来が50.0 %であった。人工交配苗はそれぞれ45.0 - 82.4 %で平均64.1 %、一般クロマツ苗は27.8 %であった（表−1）。天然個体である荒樫沢13に由来する自然交配苗の生存率（0 %）と同じ個体を片親とする人工交配苗（前沢1×荒樫沢13）の生存率（65.0 %）を比較した結果、1 %水準で有意に人工交配苗の方が高かった。

一方、天然個体である荒樫沢3に由来する自然交配苗の生存率（50.0 %）は同じ個体を片親とする人工交配苗（前沢5×荒樫沢3）の生存率（45.0 %）と統計的に有意な違いはなかった。人工交配苗は、全て一般クロマツよりも生存率が高かった。樹高と地際直径に関して家系間で多重比較した結果を図−1に示す。自然交配である荒樫沢13由来は他のすべての家系と比べて、樹高と地際直径が有意に小さかった。一方、荒樫沢3由来は一部の人工交配家系（前沢1×荒樫沢13）を除くと、他のすべての人工交配家系と有意な差がなかった。

表−1　ヒメコマツ自然交配苗と人工交配苗の接種結果

樹種	交配	家系	接種本数	生存本数（%）
ヒメコマツ	自然交配	荒樫沢 13 由来	7	0　(0)
		荒樫沢沢 3 由来	12	6 (50.0)
	人工交配	前沢 1×荒樫沢 13	20	13 (65.0)
		前沢 5×荒樫沢 3	20	9 (45.0)
		前沢 1×元清澄 3	17	14 (82.4)
		前沢 5×元清澄 1	20	15 (75.0)
		前沢 5×元清澄 3	20	12 (60.0)
		前沢 6×荒樫沢 4	14	8 (57.1)
クロマツ*	自然交配	（購入）	18	5 (27.8)

*未選抜の一般クロマツ。



図−1　自然交配および人工交配の各家系での苗の平均樹高（A）と平均地際直径（B）。エラーバーは標準偏差を、異なるアルファベットは5 %水準で有意差があることを示す。

考　察

ヒメコマツのマツ材線虫病抵抗性は一般クロマツよりも高く、一般アカマツと同程度だとされる（戸田1997）。本研究では、天然産の1家系（荒樫沢13由来）は0 %で一般クロマツの27.8 %よりも低かったが、天然林産のもう1家系（荒樫沢3由来；50.0 %）と人工交配家系は45.0 - 82.4 %と高かった（表−1）。

一般に、針葉樹では、自殖で生じた種子の充実率は著しく低くなり、発芽してもその後の成長が他殖よりも劣る近交弱勢を示すことが多い（Husband and

Schemske 1996)。房総丘陵のヒメコマツは孤立木が多く（米道ら2014)、分子マーカーを用いた調査でも種子および野外実生で高い自殖率が推定されている（Iwasaki et al. 2013；礒辺ら2014)。したがって、今回用いた天然個体由来の実生苗の中には、自殖によって生じた苗も少なくなかったと考えられる。

天然個体である荒樫沢3と荒樫沢13で人工交配の効果が異なったことについて検討するために、荒樫沢のヒメコマツの分布状況を調べた。その結果、2012年現在、荒樫沢3の周囲10 m以内に、他のヒメコマツ成木1個体が存在するのに対し、荒樫沢13の周囲200 m以内にはヒメコマツ成木は存在しなかった。実際、分子マーカーを用いた研究でも、荒樫沢3の自然交配種子は自殖率40 %であるのに対し、荒樫沢13の自然交配種子は自殖率100 %であった（Iwasaki et al. 2013)。このことからも、荒樫沢3より荒樫沢13の自然交配実生は自殖によって生じたものが多かったことが推察される。そのため、荒樫沢13の方が人工交配による強制他殖によって得られる効果が大きい可能性がある。したがって、人工交配の効果は天然個体の分布状況によって異なり、孤立木ほど影響が大きくなることが推察される。

以上の結果から、千葉演習林内のヒメコマツ天然個体由来の実生苗の中には、マツ材線虫病抵抗性が低い家系が存在するが、人工交配による強制他殖を行うことによって抵抗性を引き上げることができる可能性が示唆された。

謝　辞

本研究を行うに当たり、ヒメコマツの種子採取と育苗について、元千葉演習林の池田裕行氏にご協力いただいた。ヒメコマツ保全協議会（千葉県環境生活部自然保護課 2010）には人工交配等の作業協力を頂いた。英文要旨の作成には、演習林教育研究センターの三浦直子博士に助言を頂いた。ここに深く感謝する。なお本研究は、（公社）ゴルフ緑化促進会と平成23年度科学研究費助成事業（奨励研究）課題番号23925031の助成を受けて行われた。

引用文献

尾崎煙雄・藤平量郎・池田裕行・遠藤良太・藤林範子（2005）垂直分布下限のヒメコマツ．森林科学45: 63−68

千葉県環境生活部自然保護課（2010）千葉県ヒメコマツ回復計画．23

Husband BC, Schemske DW (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. Evolution 50: 54–70

池田裕行・藤平量郎・遠藤良太・佐瀬 正・尾崎煙雄（2005）房総丘陵におけるヒメコマツの保全 ー人工交配による種子の稔性向上ー. 林木の育種「特別号」: 10−13

礒辺山河・齋藤央嗣・遠藤良太・久本洋子・軽込 勉・逢沢峰昭・大久保達弘（2014）ヒメコマツ個体群の遺伝的多様性．日本森林学会大会学術講演集125: 104

Iwasaki T, Sase T, Takeda S, Ohsawa AT, Ozaki K, Tani N, Ikeda H, Suzuki M, Endo R, Tohei K, Watano Y (2013) Extensive selfing in an endangered population of *Pinus parviflora* var. *parviflora* (Pinaceae) in the Boso Hills, Japan. Tree Genetics and Genomes 9: 693−705

軽込 勉・米道 学・塚越剛史・里見重成・梁瀬桐子・久本洋子・山田利博（2013）房総半島におけるヒメコマツ実生苗のマツ材線虫病抵抗性について．日本森林学会大会学術講演集124: 227

倉本哲嗣・大平峰子・岡村政則・谷口 亨・平岡裕一郎・佐藤省治・福田友之・柏木 学・井上祐二郎・藤澤義武（2006）抵抗性クロマツ交配家系を用いたマツノザイセンチュウ抵抗性に関する遺伝解析．日本森林学会大会学術講演集117: 505

R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, http://www.R-project.org/（2015年6月1日アクセス）

戸田忠雄（1997）松くい虫（マツ材線虫）ー沿革と最近の研究ー. 全国森林病虫獣害防除協会，東京

戸田忠雄・千吉良治・宮田増男（1997）クロマツ×アカマツ交雑種のマツノザイセンチュウ抵抗性の向上の事例．日林九支研論集50: 41−42

米道 学・塚越剛史・里見重成・軽込 勉・久本洋子・後藤 晋・山田利博（2014）東京大学千葉演習林におけるヒメコマツの現状とマツ材線虫病抵抗性．森林遺伝育種3: 185−188