

# 九州地域におけるマツノサイセンチュウ集団の遺伝的多様性と遺伝的構造

誌名	日本森林学会誌
ISSN	13498509
著者名	張, 涵泳 沖井, 英里香 後藤, 栄治 宮原, 文彦 宮崎, 潤二 前田, 一 古澤, 英生 宮里, 学 吉田, 茂二郎 白石, 進
発行元	日本森林学会
巻/号	101巻2号
掲載ページ	p. 88-93
発行年月	2019年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 九州地域におけるマツノザイセンチュウ集団の遺伝的多様性と遺伝的構造

張 涵泳<sup>1</sup>・沖井英里香<sup>2</sup>・後藤 栄治<sup>\*,2</sup>・宮原文彦<sup>3</sup>・宮崎潤二<sup>4</sup>  
前田 一<sup>5</sup>・古澤英生<sup>6</sup>・宮里 学<sup>7</sup>・吉田茂二郎<sup>2</sup>・白石 進<sup>2</sup>

九州の8地域に生息するマツノザイセンチュウの遺伝的多様性と遺伝的構造の解明を10個のEST遺伝子座の塩基配列多型を用いて行った。九州全域の遺伝子分化係数 ( $G_{ST}$ ) は0.53で、全遺伝子多様度 ( $H_T=0.63$ ) の半分以上が地域集団間に存在し、集団間に大きな差異があった。8地域集団の  $H_T$  は0.12~0.59であり、多様性に富んでいたのは、川内、新富、松浦、唐津 (0.59, 0.57, 0.56, 0.55) で、地域集団内における  $G_{ST}$  (0.43, 0.35, 0.25, 0.25) も高く、被害木内集団 (亜集団) 間に大きな差違があった。一方、多様性が特に低いのは、天草、宮崎 (0.12, 0.18) で、その  $G_{ST}$  も小さく (0.01, 0.02)、亜集団間の違いは極めて小さかった。これらの2集団の形成には、ボトルネック/創始者効果が影響していることが示唆された。九州では地域集団が保有する多様性の二極化が進行していると思われる。

キーワード：マツノザイセンチュウ、遺伝的多様性、遺伝的構造、塩基配列多型、九州地域

Hanyong Zhang,<sup>1</sup> Erika Okii,<sup>2</sup> Eiji Gotoh,<sup>\*,2</sup> Fumihiko Miyahara,<sup>3</sup> Junji Miyazaki,<sup>4</sup> Hajime Maeda,<sup>5</sup> Hideo Furusawa,<sup>6</sup> Manabu Miyazato,<sup>7</sup> Shigejiro Yoshida,<sup>2</sup> Susumu Shiraishi<sup>2</sup> (2019) Genetic Diversity and Genetic Structure of Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) Populations in the Kyushu Region. *J Jpn For Soc* 101: 88–93 The genetic diversity and genetic structure of *B. xylophilus* in 8 populations of the Kyushu region were elucidated using the nucleotide polymorphism of 10 EST loci. Considerable genetic differences among regional populations were observed with the gene differentiation ( $G_{ST}$ ) of 0.53, which showed that more than half of the total gene diversity ( $H_T=0.63$ ) was possessed among regional populations. The  $H_T$  values of 8 regional populations were between 0.12 and 0.59. Sendai, Shintomi, Matsuura, and Karatsu populations were rich in gene diversity (0.59, 0.57, 0.56, and 0.55), and their high  $G_{ST}$  (0.43, 0.35, 0.25, and 0.25) indicated that the genetic compositions were notably different among the populations within damaged trees (subpopulations). On the other hand, in Amakusa and Miyazaki populations, extremely low gene diversity (0.12 and 0.18) and small  $G_{ST}$  (0.01 and 0.02) were confirmed, which showed that little genetic difference existed among subpopulations. It seemed that a bottleneck effect or founder effect had a great impact on the formation of these regional populations. The genetic diversity of the regional populations was polarized in Kyushu.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*, genetic diversity, genetic structure, nucleotide polymorphism, Kyushu

## I. はじめに

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle; 以下、材線虫) は強い病原性と伝染力をもつ植物寄生線虫であり、1971年にマツ材線虫病 (以下、材線虫病) の病原体であることが確認された (清原・徳重 1971)。その伝播と発病のスピードが速いことから、世界のマツ林に甚大な被害を引き起こしている (Suzuki 2002)。被害が発生している国々ではさまざまな防除や検疫制度を実施しているが、その拡大をくい止めることができていない (Hu *et al.* 2011)。

今日、活発な国際貿易や経済交流により、材線虫病の伝播リスクは高まっており、伝染の拡大制御や未感染地域への伝播を防ぐために、材線虫の伝播ルートや分布拡大についての理解が不可欠である。材線虫の伝播には近距離間で

の媒介昆虫 (カミキリ類) や遠距離間での人間活動 (木材の移動) など複数の要因が関与している (Jones *et al.* 2008)。材線虫集団は複雑な遺伝的構造を形成していると思われ、これを解明するためには、材線虫の集団遺伝学的見地からの研究が必要である。

DNA分子マーカーは集団遺伝学的解析に必須なツールとなっている (Sunnucks *et al.* 2000)。近年、材線虫の遺伝解析のための分子マーカーがいくつか開発されている。PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) マーカー (Iwahori *et al.* 1998; Takemoto and Futai 2007)、RAPD (random amplified polymorphic DNA) マーカー (Zhang *et al.* 2008)、SSR (simple sequence repeat) マーカー (Zhou *et al.* 2007; Jung *et al.* 2010; Mallez *et al.* 2013) などが開発されてきた。また、rDNAのITS領域のSNP (single nucleotide polymorphism, 一塩基多型) を用いたハプロタイプ分析

\*連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: eiji.gotoh@agr.kyushu-u.ac.jp

<sup>1</sup>九州大学大学院生物資源環境科学府 〒819-0385 福岡県福岡市西区元岡744 (Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 744 Moto-oka, Nishi-ku, Fukuoka, Fukuoka 819-0385, Japan)

<sup>2</sup>九州大学大学院農学研究院 〒819-0385 福岡県福岡市西区元岡744 (Faculty of Agriculture, Kyushu University, 744 Moto-oka, Nishi-ku, Fukuoka, Fukuoka 819-0385, Japan)

<sup>3</sup>福岡県農林業総合試験場資源活用研究センター 〒839-0827 福岡県久留米市山本町豊田1438-2 (Institute of Agricultural and Forest Resource, Fukuoka Agriculture and Forestry Research Ctr., 1438-2 Toyoda, Yamamoto-machi, Kurume, Fukuoka 839-0827, Japan)

<sup>4</sup>佐賀県林業試験場 〒840-0212 佐賀県佐賀市大和町池上3408 (Saga Prefectural Forestry Exp. Stn., 3408 Ikenoue, Yamato-cho, Saga, Saga 840-0212, Japan)

<sup>5</sup>長崎県農林技術開発センター 〒854-0063 長崎県諫早市貝津町3118 (Nagasaki Agricultural and Forestry Exp. Stn., 3118 Kaidu-machi, Isahaya, Nagasaki 854-0063, Japan)

<sup>6</sup>宮崎県林業技術センター 〒883-1101 宮崎県美郷町西郷田代1561-1 (Miyazaki Prefectural Forest Exp. Stn., 1561-1 Tashiro, Saigo, Misato, Miyazaki 883-1101, Japan)

<sup>7</sup>鹿児島県森林技術総合センター 〒899-5302 鹿児島県始良市蒲生町上久徳182-1 (Kagoshima Prefecture Forest Exp. Stn., 182-1 Kamigyutoku, Kamou-cho, Aira, Kagashima 899-5302, Japan)

(2018年9月14日受付; 2018年12月25日受理)

(Nose *et al.* 2009) も行われている。これらの DNA 分子マーカーはわが国における材線虫の集団遺伝学的研究に利用されており、Zhou *et al.* (2007) は SSR マーカーを用いて関東地域における遺伝的多様性の解明を行った。また、Nose *et al.* (2009) は九州地域における地域集団の系統解析を行っている。

SNP は生物ゲノム中に広く分布し、変異サイトが豊富であり、この特性を利用した SNP マーカーはジェノタイプングが簡単、正確などの多くの利点を有することから、第三世代の分子マーカーとして近年最も注目されている (Vignal *et al.* 2002)。SNP の探索にはゲノムの塩基配列情報が不可欠であるが、材線虫においては既に全ゲノム塩基配列が決定されている (Kikuchi *et al.* 2011)。また、発現遺伝子配列解析から多数の EST (Expressed Sequence Tag) が DNA データベースに登録されており、材線虫においても SNP 情報の活用が可能となっている。

アジアやヨーロッパに分布する材線虫は侵入生物である。侵入生物は一般的な特徴として侵入過程で遺伝的多様性が徐々に減少するとされている (Tsutsui *et al.* 2000; Sakai *et al.* 2001)。材線虫の分布には経済活動も大きく関与しており、自然分布とは異なる遺伝的構造を形成することが予測される。そこで本研究では、複数の SNP 情報を反映している EST 遺伝子座の塩基配列多型を用いて、アジアで最初の侵入地である九州地域における材線虫の遺伝的多様性を定量的に評価することによって、材線虫集団の遺伝的構造の解明を試みた。

## II. 材料と方法

2012~2014 年に、九州地域の唐津 (佐賀県)、松浦 (長崎県)、天草 (熊本県)、新富、宮崎、日南 (宮崎県)、川内、指宿 (鹿児島県) の 8 箇所の被害林分 (地域集団) から材線虫を収集した。1 本の被害木から単離した材線虫集団を 1 アイソレート (以下、亜集団) とした。各地域集団における亜集団数は表-1 のとおりである。8 地域集団の合計 107 亜集団である。各被害木からの木片の採取は、胸高部位の樹皮 (約 20 cm × 20 cm) を剥離した後、直径 16 mm の電動ドリルを用いて 5 箇所から行い、よく混合した。材線虫の単離は Baermann funnel 法 (Iwahori and Futai, 1993) で行った後、*Botrytis cinerea* Pers. を培養したオオムギ培地

表-1. マツノザイセンチュウの調査地および供試したマツ被害木数

The sampling sites of pine wood nematode and the number of damaged pine trees used in this study.

Population (Code, Kanji)	Locality	No. of pine trees
Karatsu (Ka, 唐津)	Karatsu, Saga Pref.	6
Matsuura (Ma, 松浦)	Matsuura, Nagasaki Pref.	15
Amakusa (Am, 天草)	Kamiamakusa, Kumamoto Pref.	6
Shintomi (Sh, 新富)	Shintomi, Miyazaki Pref.	14
Miyazaki (Mi, 宮崎)	Miyazaki, Miyazaki Pref.	18
Nichinan (Ni, 日南)	Nichinan, Miyazaki Pref.	17
Sendai (Se, 川内)	Satsumasendai, Kagoshima Pref.	15
Ibusuki (Ib, 指宿)	Ibusuki, Kagoshima Pref.	16
Total		107

でインキュベート (25°C で 10~20 日間) した。なお、オオムギ培地の調整はオオムギと同量 (W/W) の蒸留水を試験管に入れ、オートクレーブで滅菌 (121°C · 20 分) して行った (日本線虫学会 2004)。線虫を培地から分離した後、蒸留水に懸濁し、4°C で保存した。DNA の単離・精製は Nose *et al.* (2009) に従い、一つの亜集団から 1 個の PCR 用の鋳型 DNA を得た。

PCR に用いたプライマー対の設計には、DDBJ データベース (<https://www.ddbj.nig.ac.jp/index.html>) から取得した材線虫 EST (Kikuchi *et al.* 2007) の塩基配列情報を使用した。表-2 に示したプライマー対を用いて、マルチプレックス PCR を行った。PCR には Takara Multiplex V2.0 キット (Takara) を使用した。反応液が 25  $\mu$ L になるように、鋳型 DNA 50 ng, primer mix (1  $\mu$ M) 5  $\mu$ L, 2 × Multiplex PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup>, dNTP plus) 12.5  $\mu$ L, Multiplex PCR Enzyme Mix 0.125  $\mu$ L を調整した。PCR は Agilent SureCycler 8800 (Agilent Technologies) を用いて、94°C · 1 分の後、94°C · 30 秒, 55°C · 30 秒, 72°C · 30 秒のサイクルを 30 回行い、最後に 72°C · 10 分の伸長を行った。PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動し、100~300 bp の DNA 断片を切り出し、MagExtractor-PCR & Gel Clean up (TOYOBO) で精製した後、ライブラリーを作製し、すべてのライブラリーを等量混合して、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq System (Illumina)) での分析に供した。なお、次世代シーケンサーに用いた分析試料は、TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いて作製し、シーケンス操作は、Illumina 社の操作マニュアルに従って行った。

シーケンシングにより得られた塩基配列データ (Phred クオリティスコアが Q20 以上のデータのみを使用) は、まず、遺伝子座別に分類され、さらに各亜集団に分けられた。各遺伝子座で観察された塩基配列多型をもとに対立遺伝子を設定し、各亜集団における対立遺伝子頻度を求めた。これから遺伝子多様度 ( $H_T$ ,  $H_S$ ), 遺伝子分化係数 ( $G_{ST}$ ) (Nei 1987) および遺伝距離 ( $D$ ) (Nei 1972) を算出した。また、多様性の低い集団におけるボトルネック効果の検証は Tajima's  $D$  (Tajima 1989) を用いて行った。なお、Tajima's  $D$  は DnaSP (Librado and Rozas 2009) で算出した。

## III. 結 果

次世代シーケンサーで塩基配列を取得した結果、十分な情報量 (各遺伝子座の亜集団当たりのリード数 (塩基配列数) が 50 以上) が得られたのは表-2 に示す 10 EST 遺伝子座であった。各遺伝子座における亜集団当たりの塩基配列数と対立遺伝子数 (1% 以上の出現頻度をもつ対立遺伝子の数と出現したすべての対立遺伝子の数) は表-2 のとおりである。各遺伝子座の亜集団当たりの取得塩基配列数の平均値と標準偏差は  $116.0 \pm 33.8$  (pX070) ~  $201.2 \pm 63.9$  (pX144) であった。また、表-3 ( $H_T$ ) に示すように各遺伝子座の遺伝的変異性は九州地域全体では、0.487 (pX021) ~ 0.790 (pX155) で、平均 0.628 であった。

10 遺伝子座を用いて九州 5 県の 8 地域集団 (表-1) における各亜集団の遺伝的多様性を Nei (1987) の遺伝子多

表-2. マツノサイセンチュウの10推定遺伝子座のPCR増幅に用いたプライマー対の塩基配列と塩基配列数、対立遺伝子数  
The PCR primer sequences of the 10 putative loci, the numbers of the effective sequences, and the detected alleles in pine wood nematode.

Locus	Sequences of primer pair	No. of sequences*	No. of alleles**	Accession No. of DDBJ
pX021	Fw: TTGTAACCTCCTGACAACCTCGCTCAC Rv: TTATGGTCGGATCTTATCTTGCTCTC	146.3 ± 48.3	4 (64)	CJ982155
pX043	Fw: TTATGCCAACATCTCATAAACAGACTTCG Rv: TTCCAACCAACGTAGAGGAGACTC	137.4 ± 40.4	6 (58)	CJ984741
pX047	Fw: TTGAGTCATTTGGCAAGAGGACTTCA Rv: TTGTACTTGAAGTCAAACCTTCCACGAG	140.3 ± 38.7	5 (32)	CJ983640
pX070	Fw: TTGTCCAAATCGGAAACGCCTG Rv: TTCTTTCCGGTGATCAGTTGCTC	116.0 ± 33.8	6 (42)	CJ984816
pX079	Fw: TTAAAGGACGGCACCAACCCACA Rv: TTGCTCGTCTCGGTACTGACCTG	134.9 ± 39.6	9 (16)	CJ984251
pX130	Fw: TTGCGGTTCAACTGATCCTACATCGAC Rv: TTATCTCCAGATCCCGAGCCAC	157.5 ± 47.3	4 (51)	CJ984817
pX143	Fw: TTAGTTGGTCAAAGCAAACGCTCA Rv: TTAATGACGCCACGACAGCAC	143.5 ± 51.3	3 (41)	CJ983461
pX144	Fw: TTATCGTTCATTATGAGATTGCCGTTG Rv: TTACAATCTGATTCCGCAAGTCCA	201.2 ± 63.9	7 (41)	CJ983946
pX155	Fw: TTGACAAGCCCGACCAACAGC Rv: TTACCTGAATAGTCCAGCCGAGA	181.2 ± 53.6	7 (36)	CJ982187
pX194	Fw: TTGCTAGTTTGTCTCCAATCCGA Rv: TTGTCCCTTCGAGGTCTTCCGA	132.7 ± 41.7	6 (43)	CJ979751

\* Values indicate the average number and the standard deviation of effective sequences per subpopulation. \*\* Value indicates the number of alleles with a frequency of 1% or more, while the value in the parentheses indicates the number of all alleles.

表-3. 10推定遺伝子座から推定されたマツノサイセンチュウの遺伝的多様性 ( $H_T$ ,  $H_S$ ) と遺伝的集団構造 ( $G_{ST}$ )  
Genetic diversity ( $H_T$ ,  $H_S$ ) and genetic population structure ( $G_{ST}$ ) of pine wood nematode estimated from 10 putative loci.

Locus		Population							Whole Kyushu	
		Ka	Ma	Am	Sh	Mi	Ni	Se		Ib
pX021	$H_T$	0.377	0.345	0.245	0.408	0.237	0.302	0.400	0.664	0.487
	$H_S$	0.342	0.325	0.242	0.295	0.234	0.272	0.209	0.521	0.305
pX043	$H_T$	0.558	0.628	0.257	0.572	0.227	0.547	0.763	0.138	0.623
	$H_S$	0.457	0.439	0.256	0.380	0.224	0.293	0.421	0.130	0.325
pX047	$H_T$	0.540	0.477	0.005	0.496	0.129	0.346	0.615	0.126	0.668
	$H_S$	0.248	0.289	0.005	0.289	0.128	0.231	0.270	0.118	0.197
pX070	$H_T$	0.493	0.507	0.000	0.495	0.152	0.324	0.757	0.167	0.686
	$H_S$	0.232	0.400	0.000	0.399	0.150	0.277	0.409	0.157	0.253
pX079	$H_T$	0.780	0.514	0.023	0.707	0.014	0.451	0.723	0.131	0.744
	$H_S$	0.571	0.354	0.023	0.437	0.014	0.234	0.484	0.126	0.280
pX130	$H_T$	0.364	0.541	0.180	0.616	0.204	0.433	0.482	0.199	0.584
	$H_S$	0.277	0.458	0.180	0.447	0.202	0.360	0.280	0.190	0.299
pX143	$H_T$	0.521	0.539	0.140	0.517	0.169	0.344	0.366	0.319	0.524
	$H_S$	0.420	0.442	0.139	0.282	0.168	0.226	0.200	0.300	0.272
pX144	$H_T$	0.596	0.685	0.164	0.529	0.143	0.356	0.675	0.374	0.614
	$H_S$	0.563	0.516	0.163	0.314	0.141	0.257	0.400	0.350	0.338
pX155	$H_T$	0.752	0.724	0.064	0.798	0.304	0.670	0.526	0.194	0.790
	$H_S$	0.573	0.480	0.063	0.542	0.293	0.471	0.260	0.190	0.359
pX194	$H_T$	0.555	0.680	0.156	0.537	0.179	0.359	0.597	0.357	0.561
	$H_S$	0.461	0.505	0.156	0.322	0.176	0.247	0.446	0.342	0.332
Average	$H_T$	0.554 <sup>a</sup>	0.564 <sup>a</sup>	0.123 <sup>c</sup>	0.567 <sup>a</sup>	0.176 <sup>c</sup>	0.413 <sup>b</sup>	0.590 <sup>a</sup>	0.267 <sup>c</sup>	0.628
	$H_S$	0.414	0.421	0.123	0.371	0.173	0.287	0.338	0.243	0.296
Coefficient of gene differentiation ( $G_{ST}$ )		0.252	0.254	0.006	0.346	0.015	0.306	0.428	0.092	0.529

$H_T$ , total gene diversity of population;  $H_S$ , average gene diversity within population. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, and <sup>c</sup> indicate significant differences of three groups at  $p < 0.01$  by Kruskal-Wallis test.

様度から評価した (図-1 (A))。亜集団の平均値を各集団の遺伝子多様度 (表-3 の  $H_S$ ) とした。地域集団の遺伝子多様度は 0.123 (天草) ~ 0.421 (松浦) で、平均値は 0.296 であった。最も遺伝的多様性に富んでいたのは、松浦で  $0.421 \pm 0.196$ , 次いで唐津の  $0.414 \pm 0.092$  であった。また、

新富 ( $0.371 \pm 0.136$ ), 川内 ( $0.338 \pm 0.135$ ) も高い多様性を示した。一方、遺伝的多様性が低かったのは、天草 ( $0.123 \pm 0.018$ ), 宮崎 ( $0.173 \pm 0.022$ ) であった。この2集団に対し Tajima's  $D$  を用いてボトルネックの検証を行った結果、天草では8個の有効遺伝子座のうちの7遺伝子座

で有意な負の歪み (6 遺伝子座で 0.1% レベル, 残りの 1 遺伝子座で 5% レベル) が, 宮崎では 10 個の有効遺伝子座のうちの 8 遺伝子座で有意な負の歪み (全ての遺伝子座で 0.1% レベル) が認められた。この負の歪みはボトルネックを受けた集団で観察される。また, 亜集団の平均対立遺伝子頻度から算出した地域集団の遺伝子多様度 (表-3 の  $H_T$ ) は, 0.123 (天草) ~0.590 (川内) の範囲にあった。

被害木レベルで最も多様性が高かったのは, 松浦の一つの亜集団で 0.660 であった。この地域集団では, 16 亜集団中 6 集団で 0.6 を超え, 多様性の高い材線虫集団が数多く認められた。また, 新富でも 0.6 を超えるものが 1 亜集団あった。一方, 天草の各亜集団の多様度は 0.091~0.142 であり, 供試 6 集団のすべてが極めて低い値を示した。また, 宮崎の多様度は 0.134~0.212 で, 18 集団のすべてで低かった。唐津の 6 集団の値は 0.330~0.541 と全集団が同様の多様度を示した。各地域集団における亜集団間の遺伝的組成の違いを評価するために, 亜集団のすべての組合せの遺伝距離 (表-4) を算出し, その平均値を集団の遺伝的差異の尺度とした (図-1 (B))。川内 ( $0.647 \pm 0.661$ ) が最も高く, 次いで新富 ( $0.488 \pm 0.456$ ) であった。一方, 天草 ( $0.001 \pm 0.000$ ) と宮崎 ( $0.003 \pm 0.002$ ) の平均遺伝距離は極めて小さかった。図-2 に平均遺伝子多様度と平均遺伝距離の関係を示した。当然のことながら, 遺伝的多様性が極めて低い地域集団 (天草, 宮崎, 指宿) では, 平均遺伝距離も極めて小さかった (全 8 集団では有意な正の相関 ( $r^2 = 0.781^*$ ))。しかし, 遺伝的多様性が高い地域集団 (松浦, 唐津, 新富, 川内) では, 地域集団の遺伝的多様性が高くなるにつれて亜集団間の遺伝的差異も大きくなるといった傾向は認められなかった (4 集団では負の相関 ( $r^2 = -0.991^{**}$ ))。

個々の地域集団における遺伝的構造を評価するために, 全遺伝子多様度 ( $H_T$ ) とその中の亜集団の遺伝子多様度の平均値 ( $H_S$ ) から遺伝子分化係数 ( $G_{ST}$ ) を算出した (表-3)。川内の  $G_{ST}$  が 0.428 と最も大きく, 次いで新富の 0.346 であった。一方, 天草と宮崎の  $G_{ST}$  はそれぞれ 0.006, 0.015 で極めて小さい値であった。九州全体の  $G_{ST}$  は 0.529 であった。

IV. 考 察

本研究では, 次世代シーケンサーで得られる EST 遺伝子座の全塩基配列変異を捉え, その多型から対立遺伝子を検出した。その結果, 本研究で使用した 10 個の遺伝子座の変異性はいずれも高かった (平均 0.628 (0.487~0.790), 表-3)。これは, 多くの研究でよく用いられる SNP, SSR などの DNA マーカーが塩基配列上の特定のサイトの変異のみを捉える (Tautz and Renz 1984; Brookes 1999) のに対し, 塩基配列上のすべての変異を活用できることによると思われる。本研究のように調査個体の対立遺伝子頻度のみを取得する場合には有効な手法と考える。すでに豊富な EST 塩基配列情報が報告されており (Kikuchi *et al.* 2007), 遺伝子座数を増やすことは容易であることから, 今後の材線虫の集団遺伝学的研究においてより詳細な知見がもたらされるものと思われる。

地域集団が保有する遺伝的多様性を遺伝子多様度 (Nei, 1987) を用いて評価した結果 (表-3 の  $H_T$ ), 地域集団間に大きな違い (0.123~0.590) が認められ, 多様性が高い 4 集団 (唐津 (0.554), 松浦 (0.564), 新富 (0.567), 川内 (0.590)); 多様性が中程度の日南 (0.413), 多様性が低い 3 集団 (天草 (0.123), 宮崎 (0.176), 指宿 (0.267)) の 3 グループに分かれた。Kruskal-Wallis 検定 (Kruskal

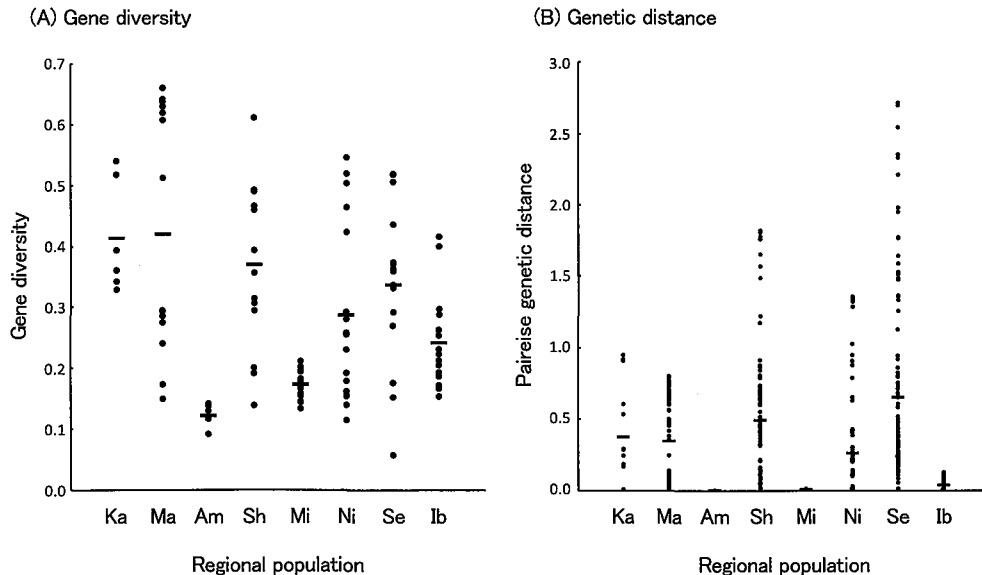


図-1. マツノザイセンチュウにおける被害木内集団 (亜集団) の遺伝的多様性 ((A) Gene diversity) と亜集団間の遺伝的差異 ((B) Pairwise genetic distance) in 8 regional populations of pine wood nematode.

"-" indicates the average gene diversity (A) or the average pairwise genetic distance (B) in each regional population.

表-4. マツノザイセンチュウにおける8地域集団の集団間および集団内の遺伝距離 ( $D$ )The average pairwise genetic distances ( $D$ ) between and within 8 regional populations of pine wood nematode.

Population	Ka	Ma	Am	Sh	Mi	Ni	Se	Ib
Ka	0.370 ± 0.321							
Ma	0.386 ± 0.277	0.340 ± 0.299						
Am	0.664 ± 0.242	0.608 ± 0.254	0.001 ± 0.000					
Sh	0.418 ± 0.222	0.478 ± 0.297	0.689 ± 0.261	0.488 ± 0.456				
Mi	0.375 ± 0.221	0.528 ± 0.342	0.563 ± 0.014	0.413 ± 0.457	0.003 ± 0.002			
Ni	0.362 ± 0.218	0.485 ± 0.319	0.613 ± 0.186	0.404 ± 0.442	0.227 ± 0.285	0.262 ± 0.334		
Se	1.024 ± 0.511	1.153 ± 0.657	1.083 ± 0.373	1.058 ± 0.610	1.540 ± 0.821	1.242 ± 0.730	0.647 ± 0.661	
Ib	1.214 ± 0.371	1.269 ± 0.920	1.686 ± 0.249	1.380 ± 0.868	2.581 ± 0.534	1.913 ± 0.777	0.947 ± 0.588	0.034 ± 0.029

Values indicate the average and the standard deviation of the pairwise genetic distances. Diagonal element indicates the distance within a population, and element below the diagonal indicates the distance between populations.

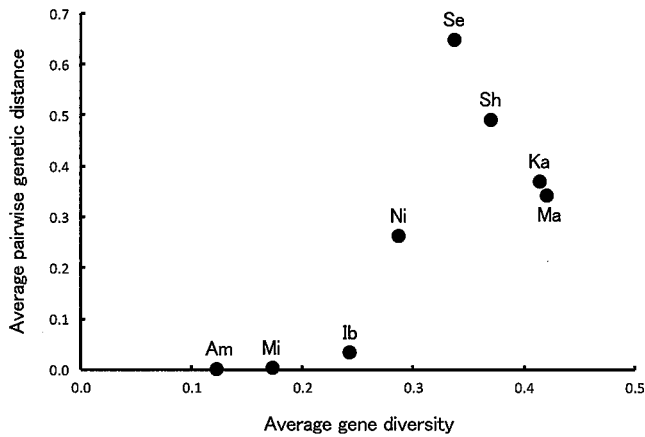


図-2. マツノザイセンチュウの8地域集団の遺伝的多様性 (Average gene diversity) における差違と亜集団間の遺伝的組成 (Average pairwise genetic distance) における差違との関係  
Relationship between the average gene diversity and the average pairwise genetic distance among subpopulations in 8 regional populations of pine wood nematode.

and Wallis 1952) においてこれらの3グループ間に1%レベルの有意差があった。Zhou *et al.* (2007) は、四つのSSRマーカーを用いて関東の3集団 (田無 (Tanashi), 筑波 (Tsukuba), 千葉 (Chiba)) の遺伝的多様性の評価を行い、多様性に富んだ集団 (筑波, 千葉) と多様性が極めて乏しい集団 (田無) のあることを報告している。これらのことから、材線虫の地域集団には多様性の高い集団と多様性の極めて低い集団がごく普通に存在することが示唆された。九州全域における集団の遺伝的構造を遺伝子分化係数 ( $G_{ST}$ ) で解析した結果、全遺伝子多様度 ( $H_T=0.628$ ) のうち、半分以上の変異 ( $G_{ST}=0.529$ ) が地域集団間に存在しており (表-3)、地域集団間に存在する遺伝的差異が極めて大きいことが示された。岸 (1988) は、過去の被害記録をもとに九州への材線虫の伝播経路を報告している。それによると長崎, 佐世保, 日南, 始良の4箇所から侵入した四つのルートがあるとしており、これは Nose *et al.* (2009) のrDNAの多型解析からも支持されている。今回明らかになった高い  $G_{ST}$  値は、北米から系統的に異なる材線虫集団が九州に侵入し、その影響が今なお強く残っていることを示している。

多様性が高かった地域集団 (唐津, 松浦, 新富, 川内) では、亜集団が保有する多様性に大きな違いが認められた

(図-1(A))。さらに、亜集団間の遺伝距離 (唐津 0.370, 松浦 0.340, 新富 0.488, 川内 0.647) が大きく (表-4, 図-1(B)), 亜集団の遺伝的組成にも大きな違いのあることが明らかとなった。高い多様性が保持されていたこれらの4地域集団では、全遺伝変異の25~43%が亜集団間に存在し (表-3)、亜集団間の遺伝距離も大きい (表-4)。Zhou *et al.* (2007) による関東での調査でも、多様性が高かった筑波と千葉の集団内の遺伝距離が大きいことが明らかになっている。材線虫の媒介者であるマツノマダラカミキリ成虫によって、次のマツ個体に伝播された材線虫個体群の遺伝的組成には、その成虫が脱出した被害木内の材線虫集団の遺伝的組成が強く反映されることから、個々のカミキリによって伝播される材線虫集団にも、変異性の高いものから低いものまで、様々なレベルのものがあると想定される。このことは、個々のカミキリが運ぶ材線虫集団について調査することにより明らかにできると思われる。さらに、個々のマツへの伝播に関与した媒介者の数や後食行動の違い (Zhou *et al.* 2007) 等も複雑に関係して、亜集団間に大きな遺伝的組成の違いが生じたと考える。

一方、多様性が低い天草, 宮崎, 指宿の  $G_{ST}$  (それぞれ 0.006, 0.015, 0.092) は極めて小さく、地域集団にある遺伝変異のほぼすべてが個々の亜集団内に保有されていた (表-4)。また、これらの地域集団では亜集団間の遺伝距離 (天草 0.001, 宮崎 0.003, 指宿 0.034) も小さく (表-4, 図-1(B)), 亜集団の遺伝的組成が類似していた。材線虫病の被害を強く受けた地域では、マツ林の衰退により材線虫の個体数も激減する。このような状況下で細々と生きながらえた (ボトルネック効果 (Bonnell and Selander 1974) を受けた) 小集団が、マツ林の再生とともに再び分布を広げた場合には多様性の低い集団が形成される。また、ごく少数の媒介者によって近隣の地域から新たに自然伝播された場合には、創始者効果 (Mayr 1954) の影響を受ける。一方、材線虫の分布拡大には、自然伝播の他に人為による移入が大きいとされており (Leal *et al.* 2013)、人為的拡大により新たに持ち込まれた材線虫集団の遺伝的多様性が低い場合にも創始者効果は起こる。Zhou *et al.* (2007) は、調査した関東の3地域集団のうち、多様性が極めて低い集団 (田無) の存在を報告し、これには市街化でマツ林の分断化が進行したことによる創始者効果や遺伝的浮動が影響したとしている。本研究で多様性が低かった天草と宮崎の集団では、Tajima's  $D$  による検証でボトルネックを受けているこ

とが示された。関東と九州とともに極めて多様性の低い集団の存在が明らかになったことから、わが国における地域集団の形成にはボトルネック効果/創始者効果の影響も大きく働いていると思われる。今回、最も多様性の低かった天草のサンプリングサイトは、2006~2007年にサンプリングが行われた Nose *et al.* (2009) の研究での天草上島 (Kamishima, Amakusa) と同一地域である。当時ここでは、九州で主として出現した7種類のrDNAハプロタイプのうちの4ハプロタイプが検出され、九州の中でも多様性に富んだ集団であった。この地域は2009年以降、材線虫病の激害に見舞われた。この大規模なマツ林の消滅によりそれまでの材線虫の集団サイズは著しく縮小したと推測され、その後はボトルネック効果を強く受けた集団が存続したと思われる。

九州の材線虫集団には、遺伝的に極めて多様性に富む集団がある一方で、多様性が皆無に近い集団も多く存在していることが明らかとなった。前述の天草での現象のように、過去には多様性を保有していた地域集団であっても、多様性の減少に遭遇した集団も少なくないと思われる。とりわけ、九州はアジアで最初の材線虫の侵入地とされ、1905年の長崎への侵入 (矢野 1913) からすでに一世紀が経過しており、九州のマツ林が材線虫病の被害に曝されてきた歴史は他の地域に比べて長い。この長年にわたる度重なる材線虫病被害の歴史が材線虫の地域集団が保有する多様性の二極化を顕在化させたと考えられる。

これまで、材線虫集団の遺伝的多様性と遺伝的構造についての定量的な評価はほとんど行われてこなかった。本研究では、集団遺伝学的解析手法を用いて、九州全域、地域集団、亜集団の各階層で保持されている遺伝的多様性を定量化し、集団構造を解析することによって、材線虫の地域集団の遺伝的特性に大きな違いのあることを明らかにした。今日、材線虫病は北海道を除く全国に拡大している。材線虫の拡大過程における集団の遺伝的多様性と構造を詳細に解明するためには、全国規模での定量的な調査が必要である。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、長崎県農林技術開発センターの深堀博太郎氏、天草地域森林組合の鳥羽瀬正志氏、宮崎県林業技術センターの黒木逸郎氏、鹿児島県森林技術総合センターの新原修一氏には、材線虫病の被害情報の提供と材線虫の収集に多大なご協力をいただいた。また、松永孝治氏 (森林総合研究所 林木育種センター九州育種場) には、材線虫の単離・管理についてご指導いただいた。これらの方々的心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- Bonnell ML, Selander RK (1974) Elephant seals: Genetic variation and near extinction. *Science* 184: 908-909  
 Brookes A (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186  
 Hu YQ, Kong XC, Wang XR, Zhong TK, Zhu XW, Mota MM, Ren LL, Liu S, Ma C (2011) Direct PCR-based method for detecting *Bursaphelenchus xylophilus*, the pine wood nematode in wood tissue of *Pinus massoniana*. *For Pathol* 4: 165-168  
 Iwahori H, Futai K (1993) Lipid peroxidation and ion exudation of pine callus tissues inoculated with pinewood nematodes. *Jpn J Nematol* 23: 79-89  
 Iwahori H, Tsuda K, Kanzaki N, Izui K, Futai K. (1998) PCR-RFLP and

- sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. *Fund Appl Nematol* 21: 655-666  
 Jones JT, Moens M, Mota M, Li HM, Kikuchi T (2008) *Bursaphelenchus xylophilus*: Opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions. *Mol Plant Pathol* 9: 357-368  
 Jung JW, Han H, Ryu SH, Kim W (2010) Microsatellite variation in the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle in South Korea. *Genes Genomics* 32: 151-158  
 Kikuchi T, Aikawa T, Kosaka H, Pritchard L, Ogura N, Jones JT (2007) Expressed sequence tag (EST) analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Mol Biochem Parasitol* 155: 9-17  
 Kikuchi T, Cotton JA, Dalzell JJ, Hasegawa K, Kanzaki N, *et al.* (2011) Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS Pathog* 7: e1002219  
 岸 洋一 (1988) マツ材線虫病—松くい虫—精説。トーマス・カンパニー  
 清原友也・徳重陽山 (1971) マツ生立木に対する線虫 *Bursaphelenchus* sp. の接種試験。日林誌 53: 210-218  
 Kruskal WK, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 47: 583-621  
 Leal I, Foord B, Allen E, Champion C, Rott M, Green M (2013) Development of two reverse transcription-PCR methods to detect living pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood. *For Pathol* 43: 104-114  
 Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452  
 Mallez S, Castagnone C, Espada M, Vieira P, Eisenback JD, Mota M, Guillemaud T, Castagnone-Sereno P (2013) First insights into the genetic diversity of the pinewood nematode in its native area using new polymorphic microsatellite loci. *PLoS One* 8: e59165  
 Mayr E (1954) Change of genetic environment and evolution. *In: Evolution as a process*. Huxley J (ed) George Allen & Unwin Limited, London  
 Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106: 283-292  
 Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York  
 日本線虫学会 (2004) 線虫学実験法。日本線虫学会  
 Nose M, Shiraishi S, Miyahara F, Ohira M, Matsunaga K, Tobase M, Koyama T, Yoshimoto K (2009) Ribosomal DNA haplotype distribution of *Bursaphelenchus xylophilus* in Kyushu and Okinawa islands, Japan. *J Nematol* 41: 194-202  
 Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annu Rev Ecol Syst* 32: 305-332  
 Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol* 5: 199-203  
 Suzuki K (2002) Pine wilt disease - a threat to pine forest in Europe. *Dendrobiology* 48: 71-74  
 Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 (3): 585-595  
 Takemoto S, Futai K (2007) Polymorphism of Japanese isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae), at heat-shock protein 70A locus and the field detection of polymorphic populations. *Appl Entomol Zool* 42 (2): 247-253  
 Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12: 4127-4138  
 Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5948-5953  
 Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34: 275-305  
 矢野宗幹 (1913) 長崎県下松樹枯死原因調査。山林広報 4: 1-14  
 Zhang KY, Liu H, Sun J, Liu JR, Fei K, Zhang CX, Xu MX, Sun J, Ma XY, Lai R, Wu YD, Lin MS (2008) Molecular phylogeny of geographical isolates of *Bursaphelenchus xylophilus*: implications on the origin and spread of this species in China and worldwide. *J Nematol* 40: 127-137  
 Zhou Z, Sakaue D, Wu B, Hogetsu T (2007) Genetic structure of populations of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, the pathogen of pine wilt disease, between and within pine forests. *Phytopathology* 97: 30-310