

平成21年 6月15日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780128
 研究課題名 (和文) 日本侵入100年後のマツノザイセンチュウの遺伝的構造と生物学的特性の解明
 研究課題名 (英文) Genetic structure and biological property of *Bursaphelenchus xylophilus*
 研究代表者
 秋庭 満輝 (AKIBA MITSUTERU)
 独立行政法人森林総合研究所・森林微生物研究領域・主任研究員
 研究者番号：50353553

研究成果の概要：

東北地方から沖縄島までのマツノザイセンチュウのアイソレイトを作製し、ミトコンドリア COI 遺伝子の部分配列と AFLP 法による解析を行った。COI 遺伝子の解析の結果、5つのハプロタイプが存在し、その77%がひとつのハプロタイプであった。AFLP法では、距離的に離れているアイソレイト間で同じパターンが認められ、マツノザイセンチュウが長距離間で移動した可能性があることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：森林病理学

科研費の分科・細目：林学・林学・森林工学

キーワード：マツ材線虫病、マツノザイセンチュウ

1. 研究開始当初の背景

マツ材線虫病 (いわゆるマツ枯れ) はマツノザイセンチュウを病原体とするマツの伝染病であり、日本の森林に大きな被害を与えている。本病は北米原産の侵入病害であり、20世紀はじめに長崎県で発生して以来被害を拡大し続け、現在では北海道と青森県を除く日本全域で発生している。

本病は宿主であるマツ、病原体であるマツノザイセンチュウおよび伝搬者 (ベクター) であるマツノマダラカミキリの3種類の生物

が関与する病害であり、伝搬者が存在する侵入病害の進化についてのモデルとなりうる病害である。

原産地である北米では異なる特徴を持つ系統のマツノザイセンチュウが存在することが知られている。日本へは北米から複数回の侵入があったものと推定される上、侵入後の100年間の間に変異していることも考えられ、日本国内でも複数の系統のマツノザイセンチュウが存在していることが予想される。また、マツノザイセンチュウは東北から沖縄までの環境が大きく異なる地域に定

着していることから、被害拡大の過程でその地域独自の環境（特に温度）に適応してきた可能性もある。

2. 研究の目的

日本各地のマツノザイセンチュウの遺伝的構造を明らかにすることにより、日本国内におけるマツノザイセンチュウの系統の現時点での分布状況を明らかにすること、それらの系統の生物学的特性（温度特性）を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マツノザイセンチュウのアイソレイトの作製

比較的近年に材線虫病が侵入した被害最先端地域である東北地方（岩手、秋田、山形、宮城）と、材線虫病被害の歴史の古い地域である九州地方（鹿児島）、中国四国地方（島根、広島、山口、徳島、愛媛、高知）、近畿中部地方（石川、京都）のマツ林からクロマツ、アカマツの枯死木の材片を採集した。また、隔離された離島である鹿児島県種子島のクロマツ、ヤクタネゴヨウ枯死木からも材片を採集した。近畿地方と中国四国地方の材片採集には、各府県の林業試験研究機関の研究員の協力を得た。これらの材片からマツノザイセンチュウを分離し、アイソレイト（培養個体群）を作製した。これらのほかに、継代培養している沖縄島のアイソレイトも使用した。

(2) ミトコンドリア COI の部分配列の解析
作製されたマツノザイセンチュウの 52 アイソレイトから DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、ミトコンドリアの cytochrome oxidase subunit I (COI) 遺伝子の部分配列を PCR 法により増殖後に Bigdye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシークエンスし、塩基配列を比較した。

(3) AFLP 解析

マツノザイセンチュウ 47 アイソレイトから AFLP 法による解析を行った。抽出された DNA を制限酵素 (EcoRI と MseI) で切断後アダプターを付着させ、一時増幅をした。さらに、EcoRI-TG と MseI-CAA、EcoRI-TG と MseI-CAC、および EcoRI-TA と MseI-CAC の 3 組のプライマー対を用いて選択的増幅（二次増幅）を行った。増幅産物を Genetic Analyzer (ABI 3100) で解析し、50～500 bp の範囲に明瞭に認められるピークを記録した。

(4) アイソレイトの温度特性

東北地方の 4 アイソレイト、九州地方の 2 アイソレイト、沖縄島の 2 アイソレイトについて、異なる温度条件化で培養し、菌糸上の増殖力について調査した。

4. 研究成果

(1) マツノザイセンチュウのアイソレイトの作製

東北地方から九州地方までの約 100 地点の 200 本の枯死木から材線虫を分離し、アイソレイトを作製した。

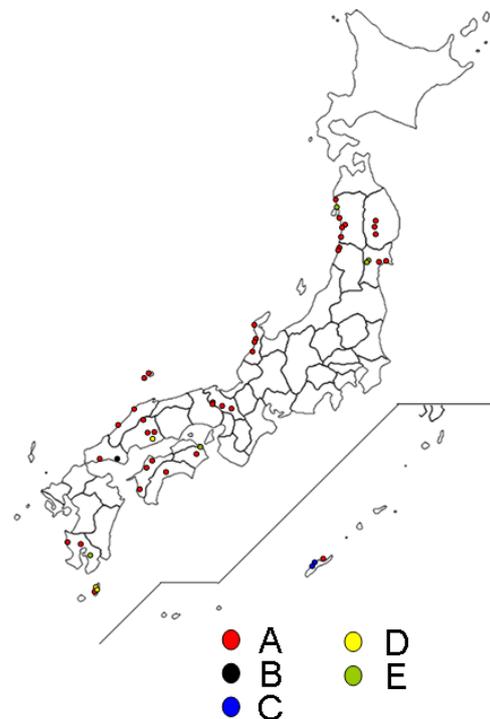


図1 ミトコンドリア COI ハプロタイプの分布

(2) ミトコンドリア COI の部分配列の解析

プライマー COI-F1 と COI-R2 で挟まれた部分の 658 bp の塩基配列情報を得た。658 bp 中の 23 bp (3.5%) の部分で多型が認められ、全部で 5 つのハプロタイプ (A~E) にわかれた (図1)。52 アイソレイト中 40 アイソレイトがハプロタイプ A であり、東北から沖縄島まで分布した。ハプロタイプ B は山口県の 1 アイソレイトのみからなり、ハプロタイプ C は沖縄の 2 アイソレイトのみであ

った。ハプロタイプ Dには種子島と広島のア
イソレイトが属し、ハプロタイプ Eには東北
と九州、四国のアイソレイトが含まれた。種
子島という隔離された離島内にもいても、ハ
プロタイプ A と D が存在し、同様に沖縄島
においてもハプロタイプ A と C が存在した。
沖縄島のハプロタイプ A と C とはそれぞれ被
害拡大の過程が異なることから、それぞれ沖
縄島への侵入経路が異なる可能性がある。

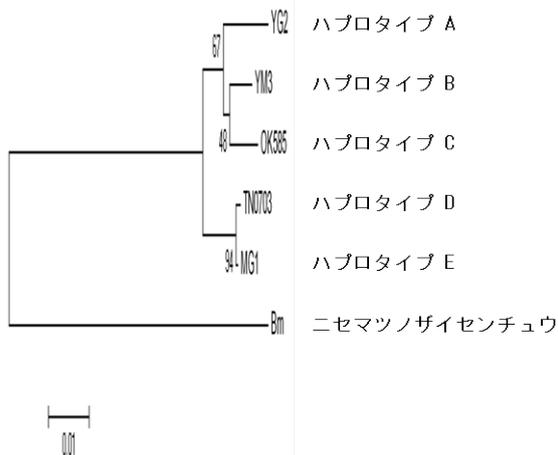


図2 ミトコンドリア COI の部分配列に基
づくマツノザイセンチュウ 5 ハプロタイプの
系統樹 (NJ 法)

(3) AFLP 解析

マツノザイセンチュウの 47 アイソレイト
を用いて解析を行った結果、3つのプライマ
ー対で 165 個のマーカーを得た。そのうち
148 個のマーカーが多型であった。ミトコン
ドリア COI の場合と異なり、大部分のアイソ
レイトが独自の AFLP パターンを示した。し
かし、いくつかのアイソレイトでまったく同
じパターンを示すものがあつた。山形県の 3
アイソレイトはそれぞれ近傍のマツ林から
分離されたものであるが、すべて同一のパ
ターンを示したことから、これらは同一の系
統が拡大していったことを示すと考えられ
た。また、東北と愛媛県、島根県と愛媛県
という距離的に離れている地域間のアイソ
レイトで同じパターンを示すものがあつた。
材線虫病が被害材の移動等の人為的な影響
で分散されることが多いことを考慮すると、
これらはマツノザイセンチュウが長距離で
移動したことを示すのかもしれない。

47 アイソレイトは、東北から中国の 39
アイソレイト、九州 (鹿児島県と種子島) の
6 アイソレイト、沖縄の 2 アイソレイトの
3つの地理的なグループにわかれた (図 3)。
沖縄の 2 アイソレイトは COI のハプロタイ
プ C

に属するが、東北から中国と九州のグル
ープには複数のハプロタイプが含まれた。
これら 3つのグループは、それぞれ侵入経
路が違う可能性がある。しかし、東北から
中国のグループ内では、明確な地理的な
分化はおきていないようであつた。これ
は、材線虫病の拡大がマツノマダラカ
ミキリの飛翔という自然の分散と、被害
材の移動という人為的な分散によってい
ることを反映している可能性がある。

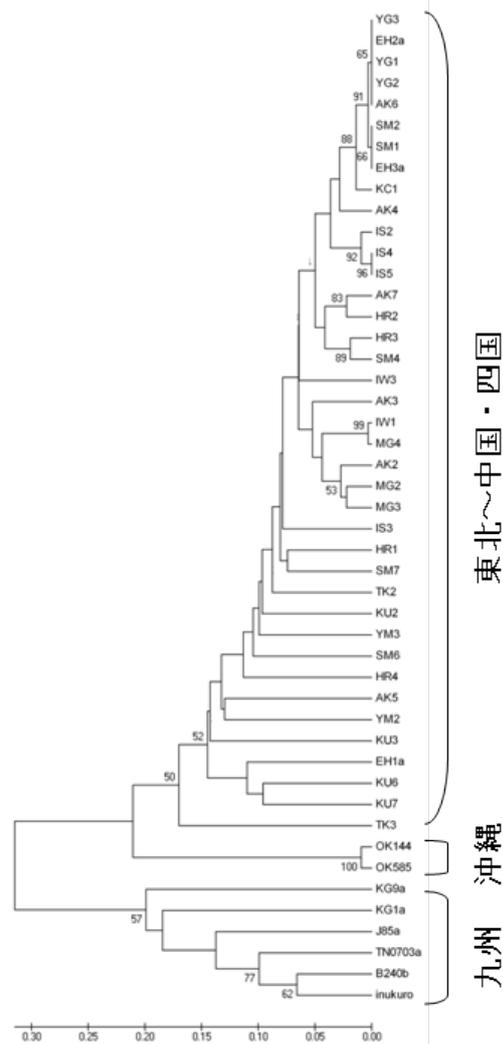


図3 マツノザイセンチュウ 47 アイソレ
イトの AFLP データに基づく系統樹 (UPGMA
法)

(4) アイソレイトの温度特性

8 アイソレイトを異なる温度条件で培養
した結果、これらのアイソレイトの増殖力
の温度特性に差異はなかつた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

秋庭満輝、マツノザイセンチュウの病原性と病原力の多様性、日本森林学会誌、88、383-391、2006、査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋庭 満輝 (AKIBA MITSUTERU)

独立行政法人森林総合研究所・森林微生物
研究領域・主任研究員

研究者番号：50353553