

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22380081

研究課題名(和文) 抵抗性の急激な増加がマツ材線虫病の流行に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Effects of rapid increase in host resistance on pine wilt disease epidemics

研究代表者

富樫 一巳 (Togashi, Katsumi)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30237060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：病原線虫マツノザイセンチュウの1分離株を用いた場合、任意の接種数によってマツ家系の抵抗性の程度が評価されること、病原線虫の毒性と昆虫への乗り移りに関わる遺伝子は核にあること、線虫が昆虫に乗り移るときに大きな選択が働くことが示された。病原線虫の遺伝子型は同じでも毒性の表現型が異なる場合、その毒性と伝播力の間に正の相関があることが示された。台湾産マツノマダラカミキリでは、環境条件の悪化に伴って休眠率が減少する現象が見つかった。モデルによって、抵抗性の異なるマツの空間分布が林の抵抗性に影響することが示された。

研究成果の概要(英文)：Pine wilt is the disease caused by the pinewood nematode, which is vectored by the insect, *Monochamus alternatus*. When different numbers of nematodes of a virulent isolate were inoculated on open-pollinated seedlings of resistant pine trees, logistic regression on the seedling mortality showed that inoculating a given number of nematodes could evaluate the resistance level of mother trees. Hybrids of pathogenic and non-pathogenic nematode species showed that nuclear genes were related to boarding of nematodes on beetle bodies. Two nematode populations that shared genetic background but had different virulent expressions indicated a positive correlation between the virulence and transmission. Taiwanese vector showed that the probability of inducing diapause increased as the environmental conditions were getting worse. Simulation model indicated that spatial distribution pattern of different resistant pine trees affected the stand resistance against the disease epidemic.

研究分野：森林動物学

キーワード：林学 マツノザイセンチュウ 抵抗性 毒性 媒介昆虫 ニセマツノザイセンチュウ マツノマダラカミキリ スクリーントラップ

1. 研究開始当初の背景

マツ材線虫病は外来の伝染病であり、東アジアとポルトガルで大量のマツを枯らしている。この病気はマツノザイセンチュウによって引き起こされ、日本では主にマツノマダラカミキリによって媒介される。本病の防除のために種々の技術が開発された。その一つが抵抗性マツの選抜育種であった。抵抗性マツの苗木による人工林(抵抗性マツ林)は病気の発生を予防すると考えられたが、その流行が西日本各地の抵抗性マツ林で起こるようになった。

伝染病の流行には、宿主の抵抗性、病原体の毒性(病気による死亡率)と伝播力(感染力)が大きく関係する(Anderson 1991, May & Nowak 1995, Laine & Tellier 2008)。抵抗性品種の導入のように全宿主の抵抗性を同時に高めた場合、前述の要素間によって基礎繁殖率が最大になるように病原体の毒性が変化したり(Anderson 1991)、毒性の大きな変異が維持されたりする(May & Nowak 1995)。3要素の中で伝播力は宿主の空間分布に依存するので、宿主の抵抗性の変異やその空間分布によって、毒性の増加を抑制できる可能性を示唆する。

マツの抵抗性(感受性)は発病の閾値(発病に必要な侵入線虫数)と発病までの時間(潜伏期間)によって表すことができるが、抵抗性マツの選抜育種では発病の閾値を上昇させるための選抜を行っており、潜伏期間に注意は払われてこなかった。潜伏期間が長くなれば、発病期間(産卵対象木の発生期間)と媒介昆虫の産卵期間の重なりは減少し、翌年の媒介昆虫成虫の発生数は抑制され、流行は起こりにくい。しかしながら、流行に及ぼす潜伏期間の定量的評価は行われてこなかった。また、病原線虫の毒性と伝播力およびマツの抵抗性のそれぞれの構成要素間に関係があると推定されるが(Aikawa et al 2003)、これまでの材線虫病の研究では、毒性、伝播力および抵抗性の関係の情報は断片的であり、量的関係(上に凸、下に凸あるいはS字型など)を表すものではなかった。さらに、実際の林ではマツの空間分布と媒介昆虫の個体群動態に依存して本病の流行パターンは変化すると考えられるが、マツ林を対象にして抵抗性を評価する研究はこれまでなかった。また、本病の系は複雑であるため、抵抗性の変更が流行に及ぼす影響を評価するためには、複数の林分を対象にした数学モデルの作成が必要であるが、これまで作成されなかった。

2. 研究の目的

本研究では、材線虫病抵抗性マツ林における材線虫病流行を生態学的に理解し、1林分内のマツの抵抗性が流行に及ぼす影響を明らかにするために、以下の研究をおこなう。

マツの抵抗性(発病の閾値と発病までの平均時間)と病原線虫の毒性の関係を苗畑の接種実験によって明らかにする。その場合、マツの抵抗性のパラメータとして発病の閾値、発病までの平均時間とそのばらつき、および枯死率を測定する。病原線虫の毒性と伝播力の関係を明らかにするために、()材から昆虫への乗り移り能力と線虫の毒性の関係、()媒介昆虫からマツへの伝播の時間的パターンと線虫の毒性の関係を実験室で調べる。林における簡易な媒介昆虫密度調査法を確立し、抵抗性マツ林における抵抗性発現の阻害要因を統計学的に明らかにする。そのために、抵抗性マツ林での媒介昆虫密度、線虫の毒性、発病木の時間的空間的変動を調べる。

上述の()の結果を組み込んだシミュレーションモデルを作成し、抵抗性が林分内の材線虫病流行に及ぼす影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) マツの抵抗性と病原線虫の毒性の関係
異なる毒性の病原線虫の分離株を抵抗性の異なるクロマツ家系の苗に、300から30000頭まで頭数を変えて接種して、毎週樹脂浸出能(一部の苗)を、晩秋から冬に枯死率を調査した。

(2) 病原線虫の毒性と伝播力の関係
Aikawa et al (1997)の方法を用いて、毒性の異なる病原線虫が媒介昆虫に乗り移る数を調べた。また、そのような成虫を飼育して、マツ枝への伝播線虫数の時間的パターンを調べた。さらに、媒介昆虫の効率的供給を図るために、マツ小丸太を用いて台湾産マツノマダラカミキリをマツ小丸太で1頭飼育して、発育調節機構を調べた。

(3) 簡易な媒介昆虫密度調査法の確立
粘着物質を塗布した網をスクリーントラップという。誘引物を含まない粘着物質を塗布したスクリーントラップによって媒介昆虫の生息密度を推定し、林内の成虫の動態を調べた。

(4) 抵抗性マツ林における抵抗性発現の阻害要因の解明

抵抗性マツ林で媒介昆虫密度、木の樹脂浸出能、枯死木について媒介昆虫の寄生と線虫密度推定を行い、線虫の毒性調査を行った。

(5) シミュレーションモデルの作成と流行の予測

二つのマツ抵抗性パラメータ(発病の閾値と潜伏期間)を含む材線虫病流行のシミュレーションモデルを作成し、抵抗性の異なるマツの林内分布が材線虫病の流行に及ぼす効果を模擬計算した。

4. 研究成果

(1) マツの抵抗性と病原線虫の毒性の関係
病原線虫の1分離株(島原)を用いて、抵抗性クロマツの6家系と精英樹2家系の苗に、

接種数を変えて接種した。その結果、どの家系でも接種数が増加するにつれて、枯死率は増加した。そして、50%の枯死を引き起こす線虫数(LD50)は抵抗性の高いクラスほど多かった(図1)。logistic 回帰分析によって、枯死率は接種数とクロマツ家系によって有意に影響されるが、それらの交互作用の影響はなく、任意の接種数によって家系の抵抗性の程度が評価されることが示された。このことは、現在の選抜育種事業の方法が合理的であることを示している。

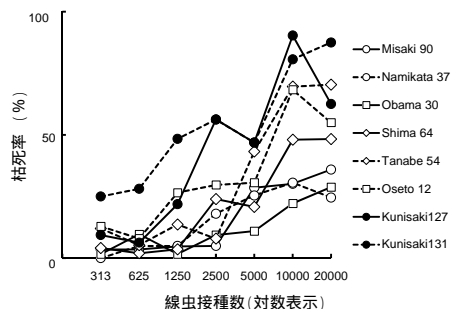


図1. 抵抗性クロマツ家系の苗の枯死率に及ぼす病原線虫の接種密度

発病(樹脂滲出能の停止)までの平均時間(潜伏期間)と病原線虫の毒性の関係を明らかにするために、毒性の異なる病原線虫(T-4とSc9)を抵抗性クロマツ2家系(波方ク-37と田辺ク-54)に接種し、樹脂滲出能の停止時期を調査した。その結果、潜伏期間は線虫の毒性に影響されることが示された。つまり、毒性の高い病原線虫が接種されると、潜伏期間が短くなることを示された。

抵抗性クロマツの5家系と精英樹1家系(感受性)に対して、Sc9の1500頭を接種して、潜伏期間を調べた。その結果、枯死率(感受性)と潜伏期間の間に負の相関の傾向のあることが示された。つまり、抵抗性の高い(発病の閾値の高い)家系ほど、潜伏期間が長くなる傾向が示唆された。

発病の閾値と潜伏期間の間に及ぼす病原線虫の毒性の影響を明らかにするために、抵抗性クロマツの6家系と精英樹2家系(感受性)に対して、毒性の異なる病原線虫分離株の唐津3と宮津を4段階の濃度で接種して、枯死率と潜伏期間を調べた。その結果、毒性に関係なく、家系の枯死率(感受性)と潜伏期間の間に負の相関の傾向のあることが示された。

毒性の異なる病原線虫の2分離株(強毒性のSc9と中毒性の島原)の重複感染の効果を明らかにするために2分離株の比率を1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1に調整し、抵抗性クロマツの1家系の1.5年生実生苗に接種した。その結果、LD50(50%の実生を枯らす線虫数)は中毒性線虫が19000頭、強毒性線虫が8400頭、前者と後者の比率が1:3, 1:1, 3:1の時それぞれ5900頭, 5500頭, 7200頭であると推定され、毒性の多様性は林分の枯死率

を高めると推定された。このため、林分内の木間の抵抗性の多様性は林分の枯死率をさらに高めると推定された。さらに、枯死苗から線虫個体群を確立し、翌年に毒性を調べたところ、5個体群間の枯死率に差はなかった。分離株の島原は長い期間室内で飼育され、その間に毒性が低下した可能性があった。ところが、宿主体内で増殖すると、毒性が回復することが示された。

毒性の異なる4分離株の病原線虫を、抵抗性の程度の異なるクロマツ8家系の苗に、5段階の線虫数で接種したところ、枯死率はクロマツ家系、線虫分離株、接種数および分離株×接種数の統計モデルのAICが最小になり、マツの枯死に線虫の毒性と接種数の交互作用が影響を与えることが示された。

(2) 病原線虫の毒性と伝播力の関係

毒性の差を顕著にするために、病原線虫Smb(遺伝子をBxと略記)と非病原線虫Srf(遺伝子をBmと略記)の雑種由来線虫を実験に用いたところ、SrfとSmb×Srf由来(核Bm, 細胞質Bx)の線虫はマツノマダラカミキリ成虫に乗り移ることができなかったが、SmbとSrf×Smb由来(核Bx, 細胞質Bm)の線虫は平均210頭と43頭が媒介昆虫に乗り移った。さらに興味深いのは、媒介昆虫から分離された雑種由来個体群の約400頭の線虫は全てBmのrDNAしか持っていなかった。これらのことから、病原線虫の毒性と昆虫への乗り移りに関わる遺伝子は核にあること、昆虫への乗り移りのときに大きな選択が働くことが示された。

病原線虫の毒性と媒介昆虫への乗り移り能力の関係を明らかにするために、九州で最近発見された極めて毒性の強い分離株Sc9, 強毒性分離株T-4および無毒性分離株OKD-1を用いて実験をおこなった。その結果、毒性の強い順にカミキリの平均線虫保持数が多くなった。3分離株とも、蛹室周囲の線虫数が多くなるにつれて、保持線虫数は多くなった。また、OKD-1よりSc9とT-4の線虫1頭あたりの乗り移り確率は高かったが、Sc9とT-4のそれに違いはなかった。材内の線虫密度はSc9がT-4より有意に高いため、毒性と平均保持線虫数の間に正の相関が生じたことが分かった。

病原線虫の毒性と伝播数の時間的パタンの関係を明らかにするために、近年発見された極めて毒性の強い病原線虫Sc9を保持する媒介昆虫を実験的に作成し、マツ枝への伝播線虫数を数えながら飼育した。その結果、線虫初期保持数が千頭台である昆虫からの伝播のピークは日齢20~25で、その時の平均伝播数は111.3であった。この値は従来の値より高いとはいえなかった。

毒性の低下した培養線虫の分離株(島原)を樹体内で増殖すると、毒性の回復が見られた。共分散分析によって、分散型幼虫のうち分散型4期幼虫になった割合と媒介昆虫の線

虫初期保持数は、毒性の回復した分離株が有意に高いことが示された。つまり、病原線虫の遺伝子型は同じでも毒性の表現型が異なる場合、その毒性と伝播力の間に正の相関があることが示された。

台湾産マツノマダラカミキリ幼虫の一部は、25 光周期16L8Dの条件下で発育を停止した。それらを10 , 8L16Dの条件下に140-154日間置いたところ、発育を再開し、随意休眠を行うことが示された。さらに、長さ20cmのマツ小丸太で1頭飼育をすると、利用可能な餌量（樹皮面積）が減少するにつれて、休眠確率が低下することが示された。このように、環境条件の悪化に伴って休眠率が減少する現象はこれまで見つかっておらず、これが初めての報告になった。

(3) 簡易な媒介昆虫密度調査法の確立

木に衝撃を与えて落下したマツノマダラカミキリ成虫数とスクリーントラップの捕獲成虫数の間には正の相関があった。つまり、トラップによって相対密度が示されることが分かった。

林分内の媒介昆虫（マツノマダラカミキリ成虫）の垂直分布を明らかにするために、樹高13mの林の林冠内と林冠下に、粘着式スクリーントラップを設置した。林冠下より林冠内で6倍多くの成虫が捕獲され、その中では雄の割合が高かった。木に衝撃を与えてカミキリを捕獲すると性比は1:1であったので、雌より雄の飛翔活動性が高いことが示された。

簡易な媒介昆虫密度調査法を確立するために、生残木が全て枯れる林分で媒介昆虫の成虫個体群の特性を調べた。その結果、脱出成虫密度が35,000頭/haと推定される林で、トラップ(合計面積10m²)に1042頭の成虫が捕獲され、性比は季節的に雄に偏った性比から雌に偏った性比に変化した。

材線虫病によってマツ林から健全木が完全に失われた時、その翌年に発生する媒介昆虫成虫の個体群密度は8月以後0になった。発生初期の飛翔個体の性比は雄に偏ったが、その後1:1に近づいた。

大発生の前には媒介昆虫の翼荷重と産卵前期間の間に関係はなかったが、大発生年に産卵された媒介昆虫の産卵前期間は翼荷重が増加するにつれて短くなった。

(4) 抵抗性マツ林における抵抗性発現の阻害要因の解明

山口県内の抵抗性の1マツ林ではトラップで媒介昆虫11頭が捕獲されても、枯死木は出現しない年があった。過去5年間の2林分の調査結果と合わせると、媒介昆虫密度がある閾値を越えないと、病気が発生しないことが示唆された。

2012年に抵抗性マツ林で分離された線虫13株を2家系の実生苗に接種したところ、枯死率はマツの家系だけでなく、分離株によって有意に異なった。1株だけの毒性が低かったの

で、林内の毒性の空間分布について言及することは難しかった。

(5) シミュレーションモデルの作成

林分が抵抗性の同じマツから構成されている場合、シミュレーションモデルによって、発病閾値が高くなるにつれて、林の抵抗性は高くなることが示された。また、潜伏期間が短くても長くても、林の抵抗性は高くなったが、その機構に違いがあった。

抵抗性の異なる2家系のマツを混在するように植栽するよりも、それぞれがまとまるように植栽するほうが、林の抵抗性が高まった。林の抵抗性の程度は、発病閾値だけでなく、潜伏期間によっても影響を受けた。

<引用文献>

- Aikawa, T., N. Maehara, K. Futai and K. Togashi (1997) A simple method for loading adult *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) with *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Appl Entomol Zool* 32: 341-346.
- Aikawa, T., K. Togashi and H. Kosaka (2003) Different developmental responses of virulent and avirulent isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), to the insect vector, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Environ Entomol* 32 (1): 96-102
- Anderson RM (1991) Populations and infectious-disease – Ecology or epidemiology. *J Anim Ecol* 60: 1-50.
- May RM & Nowak MA (1995) Coinfection and the evolution of parasite virulence. *Proc R Soc London B* 261: 209-215.
- Laine A-L & Tellier A (2008) Heterogeneous selection promotes maintenance of polymorphism in host-parasite interactions. *Oikos* 117:1281-1288.

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9件)

- Aikawa, T., N. Niko, H. Anbutsu and K. Togashi (2014) Prevalence of laterally transferred *Wolbachia* genes in Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology* 49: 337-346. DOI 10.1007/s13355-014-0256-0
- Togashi, K. (2014) Effects of larval food shortage on diapause induction and adult traits in Taiwanese *Monochamus alternatus alternatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 151: 34-42.

DOI: 10.1111/eea.12165
Liao, S.-M., S. Kasuga and K. Togashi (2014) Suppressive effects of *Bursaphelenchus mucronatus* on pine wilt disease development and mortality of *B. xylophilus*-inoculated pine seedlings. *Nematology* 16: 219–227.
DOI:10.1163/15685411-00002760
Togashi, K. (2013) Nematode-vector beetle relation and the regulatory mechanism of vector's life history in pine wilt disease. *Formosan Entomologist* 33: 189-205.
Sugimoto, H. and K. Togashi (2013) Canopy-related adult density and sex-related flight activity of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) in pine stands. *Applied Entomology and Zoology* 48: 213–221.
DOI 10.1007/s13355-013-0175-5
Togashi, K., K. Nakamura and S. Jikumaru (2012) Effects of spring-killed pine trees on the epidemics of pine wilt disease. *Applied Entomology and Zoology* 47: 311-318.
DOI 10.1007/s13355-012-0121-y
Kasuga, H. and K. Togashi (2012) Nine-month persistence of *Bursaphelenchus xylophilus* in living *Abies sachalinensis* and *Picea jezoensis* seedlings and nematode reproduction in the stem sections. *Nematology* 14: 547-554.
DOI:10.1163/156854111X612865
Taga, Y., S. Goto, K. Matsunaga and K. Togashi (2011) Temporal changes in characteristics of populations originating from interbreeding between *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Nematology* 13: 701-712.
DOI:10.1163/138855410X543166
Matsunaga, K., H. Maezono, S. Tamaki and K. Togashi (2011) Inhibition response of *Pinus densiflora* clones to *Bursaphelenchus xylophilus* systemic dispersal and their resistance to pine wilt disease. *Nematology* 13: 653-659.
DOI:10.1163/138855410X535732

〔学会発表〕(計17件)

杉本博之・富樫一巳，材線虫病抵抗性アカマツ・クロマツの残存木の抵抗性発現と年次変化，第122回日本森林学会大会，2011年3月27日，静岡大学（静岡県静岡市）

富樫一巳・杉本博之・松永孝治，極めて毒性の強いマツノザイセンチュウのアイソレイトの媒介昆虫乗り移り能力，第123回日本森林学会大会，2012年3月28日，宇都宮大学（栃木県宇都宮市）

富樫一巳，マツノマダラカミキリ台湾産亜種の随意休眠とその誘起を阻害する生態的要因，第124回日本森林学会，2013年3月26日，岩手大学（岩手県岩手市）
富樫一巳・福田美貴，台湾産マツノマダ

ラカミキリの休眠と成虫形質に対する密度効果の解析，第125回日本森林学会，2014年3月29日，大宮ソニックシティ（埼玉県さいたま市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富樫一巳 (TOGASHI, Katsumi)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：30237060

(2) 研究分担者

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・主任研究員
研究者番号：40415039

杉本博之 (SUGIMOTO, Hiroyuki)

山口県農林総合技術センター・林業技術部・専門研究員
研究者番号：00522244

(4) 研究協力者

廖思米 (LIAO, Si-Mi)
春日速水 (KASUGA, Hayami)
軸丸祥大 (JIKUMARU, Shota)
井口和信 (IGUCHI, Kazunobu)