群馬県のナラ枯れを起こしたカシノナガキクイムシは在来か近年移入の個体群か—遺伝解析に基づく検証—

岡崎 千聖¹・逢沢 峰昭^{*,1}・森嶋 佳織²・福沢 朋子²・大久保達弘¹

群馬県では県北部のみなかみ町において 2010 年に初めてナラ枯れが発生した。このような飛び地的被害を起こしたカシノナガキクイムシ個体群の由来について、隣接県から近年自然または人為的に移入した、遠方から人為的に移入した、在来由来の三つの仮説が考えられた。もし、移入個体群であれば遺伝的多様性の低下や遺伝的に遠い系統がみられると予想される。本研究ではこれらの仮説を遺伝解析に基づいて検証した。みなかみ町およびナラ枯れの起きている近隣 6 県において、カシノナガキクイムシ試料を採集し、核リボソーム DNA、ミトコンドリア DNA および核マイクロサテライト (SSR) を用いて遺伝解析を行った。核リボソーム DNA および核 SSR の遺伝構造解析の結果、群馬個体群は福島や新潟と同じ日本海型の北東日本タイプに属したことから、南西日本から人為的に移入したものではないと考えられた。また、ミトコンドリア DNA と核 SSR を用いて各個体群の遺伝的多様性を調べた結果、群馬個体群の遺伝的多様性は低くはなく、他個体群と違いはなかった。よって、群馬個体群は近年の移入由来ではなく、在来由来と考えられた。

キーワード：遺伝的多様性、遺伝構造、ミトコンドリア DNA、核マイクロサテライト、28S リボソーム DNA

Chisato Okazaki,¹ Mineaki Aizawa,^{*,1} Kaori Morishima,² Tomoko Fukuzawa,² Tatsuhiro Ohkubo¹ (2018) Indigenous or Recently Migrated Population?: The Origin of *Platypus quercivorus* Population Causing Japanese Oak Wilt in Gunma Prefecture, Inferred from Genetic Analyses. J Jpn For Soc 100: 116–123 Mass mortality of oak by Japanese oak wilt disease is caused by an ambrosia beetle vector, *Platypus quercivorus*. In northern Gunma Prefecture, a geographically isolated mass mortality occurred in Minakami in 2010 for the first time. We hypothesized three origins of the beetle population causing the isolated mass mortality: (1) a population recently migrated naturally or artificially from near or neighboring prefectures, which might exhibit a low genetic diversity due to founder effect; (2) a recently artificially migrated population from a distant area, which might have genetically different lineages and a low genetic diversity due to founder effect; and (3) an indigenous population, which exhibits a relatively high genetic diversity. We examined these hypotheses using variations of nuclear ribosomal DNA (rDNA), mitochondrial DNA (mtDNA), and nuclear microsatellite (nSSR) for Gunma and six other neighboring or nearby prefecture populations. Genetic structures of rDNA and nSSR showed that the Gunma population belonged to a northeastern Japanese Sea of Japan-side lineage, as had neighboring prefecture populations, indicating that the Gunma population did not recently migrate from a distant area with different lineages through human activity. Genetic diversity of mtDNA and nSSR indicated that the Gunma population exhibited a moderate genetic diversity, similar to the other populations. Therefore, we concluded that the Gunma population might have originated from an indigenous population.

Key words: genetic diversity, genetic structure, mitochondrial DNA, nuclear microsatellite, 28S rDNA

I. はじめに

カシノナガキクイムシ *Platypus quercivorus* (以下、カシナガと呼ぶ) の穿入に伴う、樹幹内への病原菌 *Raffaelea quercivora* の伝播によって発生するナラ類の集団枯損被害 (以下、ナラ枯れと呼ぶ) が、1980 年代から日本海側を中心に増加し、内陸部や太平洋側にも拡大し、被害面積は年々増加した (伊藤・山田 1998)。現在、全国的なナラ枯れの被害量自体は減少しているものの、新たに発生した地域や被害量が増加している地域もみられる (林野庁 2015)。

ナラ枯れ被害の拡大速度は主に 2 km/年とされるが (布川 1993; 小林・荻田 2000), その具体的な仕組みはまだはっきりしない。被害地から十数 km も離れた無被害地で飛び地的に被害が発生することもあり (小林・上田 2001; 布川 2001; 佐藤ら 2004), その原因としていくつかの仮説が考えられている。例えば、カシナガが風に乗って大量移動し、その年にナラ枯れ被害を引き起こしたという仮説で

ある (在原ら 2008)。あるいは、風に乗って少数のカシナガが移動し、その年はナラ枯れを引き起こすことなくナラ類に穿入する。そして、次年度以降に急激にカシナガの個体数密度が上昇し、ナラ枯れを引き起こしたという仮説である (在原ら 2008)。一方、無被害地に低密度で生息していた在来のカシナガの個体数密度が、何らかの理由によって急激に上昇し、ナラ枯れを引き起こしたという仮説 (小林・野崎 2009) も考えられている。前 2 者の仮説ではナラ枯れ被害拡大においてはカシナガの長距離移動の影響が大きいと考えられている。ここでカシナガの飛翔行動は繁殖期の 6 月上旬～10 月下旬と比較的長期にわたる。しかし、寄主木を脱出した後、約 70% の成虫が飛翔開始 2 週間で新たな寄主木へ穿孔する (在原ら 2008)。このため、個々の成虫の飛翔期間は短いことが予想される。さらに、キクイムシ科甲虫は寄主木の探査に視覚もしくは嗅覚を用いる (Bernays and Chapman 1994) とされ、また、林分単位における被害木の推移は前年の被害木周辺に集中するという報

*連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: aizawam@cc.utsunomiya-u.ac.jp

¹ 宇都宮大学農学部森林科学科 〒321-8505 栃木県宇都宮市峰町 350 (Department of Forest Science, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine-machi, Utsunomiya, Tochigi 321-8505, Japan)

² 東京農工大学大学院連合農学研究科環境資源共生科学専攻 〒321-8505 栃木県宇都宮市峰町 350 (Department of Symbiotic Science of Environment and Natural Resources, United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 350, Mine-machi, Utsunomiya, Tochigi 321-8505, Japan)

(2018 年 3 月 21 日受付: 2018 年 6 月 16 日受理)

告もある（小林・上田 2005）。したがって、カシナガは実際にはそれほど大きな長距離移動はしないか、あるとしても稀であろう。

群馬県では2010年に県北部に位置する利根郡みなかみ町湯檜曾で初めてナラ枯れ被害が報告され（浅野 2011）、現在も県内ではみなかみ町でのみ被害が継続している。上述のカシナガの移動に関する先行研究を考慮すると、群馬県へのカシナガの由来について三つの仮説が考えられる。一つ目は新潟県などの近隣県から、近年、カシナガが群馬県に自然移入あるいは人為的に移入したという仮説である。みなかみ町に隣接する新潟県南魚沼郡湯沢町などでは2004年から大きなナラ枯れ被害が発生している（布川 2007）。新潟・群馬県境には標高1,500 m以上の谷川連峰が存在するものの、群馬県の被害地と最も近い新潟県湯沢町の被害地は直線距離にして約10 kmである。加えてナガキクイムシ科の *Platypus apicalis* の最大飛行距離が2 km（Milligan 1982）であることや、群馬県での被害の初発元年（2010）の南魚沼郡湯沢町からみなかみ町への卓越風はみなかみ町方面に向かう北西の風向であったことから（福沢 未発表）、新潟県のカシナガが段階的あるいは機会的に群馬県へ自然移入した可能性が考えられる。また、林野庁（2015）はナラ枯れ被害地域からシイタケのほだ木などで被害木が移動することで未被害地において被害が発生する可能性を指摘している。したがって、新潟県などの近隣県からの近年の人為的移入に由来する可能性も考えられる。二つ目は同じくほだ木などを介してカシナガが南西日本などの遠方から近年人為的に移入したという仮説である。三つ目は、在来個体群に由来するという仮説であり、上の二つの仮説が支持されなかった場合、この仮説が考えられる。

これらの仮説の検証には、遺伝解析が有効と考えられる。一般的に移入や分布拡大などで生じた少数個体を起源とする個体群の遺伝的組成の変化は創始者効果（founder effect）と呼ばれ、創始者効果は遺伝的多様性の減少をもたらす（Frankham *et al.* 2002）。したがって、もし、近隣県の個体群から少数の個体が群馬県に移入し、それを元に個体群が拡大したのであれば、群馬県個体群の遺伝的多様性は低くなると予想される。反対に、群馬県の遺伝的多様性が他

個体群と比較して低くない場合は、群馬県に在来した個体群に由来することが示唆される。また、日本のカシナガは核のリボソームDNAを用いた遺伝解析により日本海型と太平洋型に分かれる（Hamaguchi and Goto 2010）。さらに、核のマイクロサテライト（SSR）マーカーを用いた遺伝解析により、日本海型の系統は糸魚川静岡構造線より北東にみられるタイプと南西に広がるタイプに分かれることが示されている（Shoda-Kagaya *et al.* 2010）。これらの先行研究では群馬県のカシナガ個体群は解析されていないが、これらDNAの地理的遺伝構造を調べることで、群馬県のカシナガ個体群が糸魚川静岡構造線より南から人為的に移入したかどうか検証できると考えられる。また、カシナガに対してミトコンドリアDNAを用いた報告はないが、例えば、スギカミキリ *Semanotus japonicus* ではミトコンドリアDNAの地理的な違いが認められている（Shoda *et al.* 2003）。したがって、カシナガのミトコンドリアDNAを調べることで、群馬県のカシナガ個体群の由来に関する情報が得られる可能性がある。

本研究では群馬県のカシナガ個体群の由来に関する三つの仮説、すなわち（1）近年、近隣県から自然移入あるいは人為的に移入した、（2）近年、南西日本などの遠い系統のカシナガが人為的に移入した、（3）在来個体群由来である、について、核リボソームDNA、ミトコンドリアDNA、核SSRのそれぞれを対象とした遺伝解析を基に検証することを目的とした。

II. 調査地および調査方法

1. 試料採集

群馬県においてはみなかみ町（土合および湯原）のカシナガ試料を用いた（表-1）。また、日本におけるカシナガ被害の報告（林野庁 2017）を基に、近年、ナラ枯れが発生しており、かつ群馬県みなかみ町へのカシナガの移入の可能性のある隣接3県（新潟県、福島県、長野県）およびこれら3県に隣接する3県（山形県、静岡県、岐阜県）の合計6県のカシナガ個体群の試料を用いた（表-1）。試料採集にはペットボトル製トラップ、自作の吊り下げ式簡易型屋根付き Flight Interception Trap（渡辺 2009）、透明および

表-1. 遺伝解析に供したカシノナガキクイムシ試料

Information on *Platypus quercivorus* samples used for genetic analyses.

Locality	Population Code	Latitude (N)	Longitude (E)	Alt. (m)	N			Collection method†	Year collected
					rDNA	mtDNA	nSSR		
Nishikawa, Yamagata Pref.	YA	38°25'06.70"	140°05'40.20"	532	9	14	21	ST	2017
Tadami, Fukushima Pref.	FU	37°20'05.46"	139°18'38.85"	475	8	11	13	FIT/FUT	2017
Yuzawa, Niigata Pref.	NI	36°53'10.36"	138°51'52.61"	600-900	10	17	32	FIT	2016
Minakami, Gunma Pref.	GU	36°49'50.78"/	138°57'11.58"/	735/564	8	16	24	FUT	2016
		36°45'51.48"	138°57'47.17"						
Otari, Nagano Pref.	NA	36°49'23.07"/	137°55'05.68"/	584/686	8	16	21	ST/FUT	2017
		36°45'44.34"	137°54'25.58"						
Hida, Gifu Pref.	GI	36°25'26.16"	137°21'04.80"	782	0*	2	10	Log	2014
Shizuoka, Shizuoka Pref.	SH	34°57'34.73"	138°27'13.62"	62	9	16	24	TWT	2017
Total					52	92	145		

*Unsuccessfully amplified; †ST, trap with cross barriers and a water basin with propylene glycol; FUT, funnel trap; FIT, self-made flight interception trap with water cups with propylene glycol based on the method of Watanabe (2009); Log, newly emerged adults from logs were collected; TWT, trunk window trap.

黒色衝突板トラップ（株式会社サンケイ化学）、ファンネルトラップ、Trunk Window Trap および被害丸太からの羽化トラップを用いた（表-1）。ペットボトル製トラップ、飛翔トラップ、黒色衝突板トラップおよびファンネルトラップの誘引剤にはカシナガコール L（株式会社サンケイ化学）を使用した。また、ミトコンドリア DNA の系統解析の外群として用いるため福島県でルイスナガキクイムシ *Platypus lewisi* を 2 頭採集した。採集試料の同定は、Nobuchi (1973) を基に腹部の突起の形状、胸節のマイカンギアの有無と形態から行った。その後、99.5% エタノールの入った 1.5 mL チューブに入れ、DNA 抽出まで冷蔵庫（4°C）で保存した。

2. 遺伝解析

実体鏡下でマイクロ剪刀を用いてカシナガの胸節を切り出し、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。抽出プロトコルは、上記キットのマニュアルに従った。抽出した DNA の濃度は NanoDrop One（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて測定し、TE バッファーを用いて 10 ng/ μ L に希釈・調整した。

まずカシナガの遺伝構造を調べるため、リボソーム DNA とミトコンドリア DNA の部分領域の塩基配列を決定した。PCR 増幅の悪かった岐阜県個体群を除いて、リボソーム DNA の 28S 領域については各個体群 8~10 個体、ミトコンドリア DNA の COI 部分領域については各個体群 11~17 個体を解析に供した（表-1）。リボソーム DNA については、28S-01 (Forward) と 28SR-inter2 (Reverse), 28S-inter1 (Forward) と 28SR-01 (Reverse) の 2 組のプライマー (Kim *et al.* 2000; Hamaguchi and Goto 2010) を用いて PCR を行った。ミトコンドリア DNA については、動物の DNA バーコーディングに用いられているプライマー (Herbert *et al.* 2003) の LCO1490 (Forward) と HCO 2198 (Reverse) を用いた。PCR 反応液は全量が 15 μ L となるように試薬調整した。内訳は 10 ng 鋳型 DNA, 1 $\times$ PCR バッファー, 0.2 mM の各 dNTP, 1.5 mM の $MgCl_2$, 0.5 μ M の Forward および Reverse の各プライマー, 0.5 U *Taq* polymerase (Promega) である。PCR 増幅は 28S リボソーム DNA およびミトコンドリア DNA について、それぞれ以下の条件で行った。リボソーム DNA では予熱を 94°C で 3 分間行った。その後、1 サイクルにつき熱変性を 94°C で 1 分、アニーリングを 60°C で 1 分、伸長を 72°C で 1 分 30 秒とし、それを 35 サイクル行った。サイクル終了後の伸長は 72°C で 5 分とした。ミトコンドリア DNA では、予熱を 94°C で 1 分間、1 サイクルにつき熱変性を 94°C で 45 秒、アニーリングを 50°C で 45 秒、伸長を 72°C で 1 分とし、それを 35 サイクル行った。サイクル終了後の伸長は 72°C で 10 分とした。PCR 増幅には、GeneAmp PCR system 2720 (Applied Biosystems) を用いた。得られた PCR 産物を 2% アガロースゲルで泳動し、目的領域のみ DNA 増幅がみられた PCR 産物について ExoSAP-IT (Affymetrix) を用いて精製を行った。その後、ABI PRISM BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と、28S リボソーム DNA については、28SR-01 のプライマー以外の 3 本のプライマー、ミトコンドリア DNA については PCR に使用したプライマー (LCO1490 と

HCO 2198) を用いてシーケンス反応を行った。その後、反応液を宇都宮大学ゲノミクス教育研究センターに提出し、DNA オートシーケンサー ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) による解析を委託した。取得した DNA の塩基配列は目視および BIOEDIT7.2.5.0 (Hall 1999) を用いて整理 (アライメント) した。各個体間の塩基配列のマルチプルアライメントは CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) を用い、その後手動で調整した。28S リボソーム DNA については、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されている Hamaguchi and Goto (2010) のカシナガの 28S リボソーム DNA 塩基配列 (accession no.: AB478192) を参照してアライメントした。

さらに、カシナガの地理的遺伝構造を調べるため、Hamaguchi *et al.* (2011) がカシナガで開発した 6 遺伝子座の核 DNA の SSR マーカーを用いた解析を行った。各個体群 10~32 個体を解析に供した（表-1）。PCR は、Type-it Microsatellite Kit (Qiagen) を用いて、反応液の全量が 4 μ L になるように試薬調整した。内訳は 10 ng の鋳型 DNA, 1 $\times$ Type-it Multiplex PCR Master Mix, 0.2 μ M の Forward および Reverse の各プライマーである。なお、各プライマーのうち Forward プライマーを蛍光色素 (NED, FAM, VIC または PET) で標識した。PCR 増幅は Type-it Microsatellite Kit に従い反応条件を設定した。予熱を 95°C で 5 分間行った後、1 サイクルにつき熱変性を 95°C で 30 秒、アニーリングを 60°C で 1 分 30 秒、伸長を 72°C で 30 秒とし、これを 28 サイクル行った。サイクル終了後の伸長は 60°C で 30 秒とした。PCR 増幅には GeneAmp PCR system 2720 を用いた。その後、反応液を宇都宮大学ゲノミクス教育センターに提出し、DNA オートシーケンサー ABI3500 Genetic Analyzer によるフラグメント解析を委託した。解析により得られたデータは、GeneMapper ver.4.1 (Applied Biosystems) を用いて増幅断片のサイズから、各サンプルの遺伝子型を決定した。

3. データ解析

ミトコンドリア DNA のハプロタイプ間の系統関係は、Network ver.5.0 (Bandelt *et al.* 1999) の Median-joining 法で評価した。外群としてルイスナガキクイムシを用いた。また、Arlequin ver.3.5 (Excoffier and Lischer 2010) を用いて遺伝子多様度および塩基多様度を算出した。また、個体群内と個体群間の遺伝的分化の程度を分子分散分析 (Analysis of Molecular Variance; AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) によって評価した。

核 SSR マーカーで得られたデータについては、GenAlEx ver.6.4 (Peakall and Smouse 2006) を用いて各遺伝子座で観察された対立遺伝子数 (N_A), ヘテロ接合度の観察値 (H_O), ヘテロ接合度の期待値 (H_E), 近交係数 (F_{IS}), 個体群間の分化の指標値の F_{ST} , G_{ST} および G'_{ST} (Hedrick 2005) を算出した。また、GenAlEx を用いて、各遺伝子座の F_{IS} , F_{ST} , G_{ST} および G'_{ST} の 0 からの逸脱の有意性を検定した。さらに、CERVUS ver.3.0.7 (Kalinowski *et al.* 2007) を用いて、ヌル対立遺伝子の推定確率 [F (Null)] を算出した。

各個体群における遺伝的多様性を評価するため、FSTAT ver.2.9.3.2 (Goudet 2001) を用いて、ヘテロ接合度の期待値

(H_E) およびアレリックリッチネス (A_r) を算出・比較した。なお、アレリックリッチネスは最小個体数 (岐阜個体群の $N=10$) に基づいた値で示した。各個体群におけるこれらの値の違いは、Steel-Dwass の多重比較検定を用いて評価した。

カシナガの地理的遺伝構造を明らかにするため、GenAlEx を用いた主座標分析 (Principal Coordinate Analysis) および STRUCTURE ver.2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) を用いた STRUCTURE 解析を行った。STRUCTURE 解析上の設定は、各供試個体の採集地情報を事前確率として考慮した LOCPRIOR モデル (Hubisz *et al.* 2009), 混合 (admixture) モデルおよび F モデル (Allele frequency correlated model; Falush *et al.* 2003) を用い、burn-in period を 20,000 回、MCMC のシミュレーションの繰り返し数を 10,000 回とした。また、1 から 7 までの各クラスター数 (K) について 10 回の反復計算を行った。最適クラスター数 K は、STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012) を用いて、Evanno *et al.* (2005) の ΔK を指標とする方法と、 K に対するデータの対数尤度 $P(X|K)$ の変化を調べ、対数尤度の上昇変化が緩やかになりかつ主要な遺伝構造を捉える最小の K を探索する方法 (Pritchard *et al.* 2010) の二つで評価した。さらに、最適クラスター数において、10 回の計算結果を CLUMPP ver.1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) および Distruct ver.1.1 (Rosenberg 2004) を用いて一つに統合した。なお、CLUMPP において各 K の 10 回の各ラン間の類似性を示す SSC 値が出力されるが、最適クラスター数のこの値が 0.9 以上 (例えば Wang *et al.* 2007) であるか確認した。さらに、近年の急激な個体群サイズの縮小 (ボトルネック) の有無を Bottleneck ver. 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996; Piry *et al.* 1999) を用いて調べた。ボトルネックを受けた個体群は、稀なアレルが急速に減少する。一方で、ヘテロ接合度はこの影響をほとんど受けない。そのため、ボトルネックを受けた個体群では、アレル数を基に求められる突然変異と遺伝的浮動の平衡状態にあるときのヘテロ接合度 (H_{eq}) に対して、実際のヘテロ接合度 (H_e) が大きくなる (ヘテロ接合度の過剰, $H_e > H_{eq}$; Cornuet and Luikart 1996; Luikart and Cornuet 1998)。これを無限対立遺伝子モデル (IAM) と、IAM とステップワイズ突然変異モデル (SMM) の中間の二相モデル (TPM: IAM が 30%; SMM が 70%) の二つのモデルにおいて、Wilcoxon sign-rank test で片側検定した。ただし、解析個体数の少ない岐阜個体群 ($N=10$) は解析から除いた。また、各個体群間の遺伝的分化について、Arlequin を用いてペアワイズ F_{ST} で評価した。

III. 結 果

1. 28S リボソーム DNA およびミトコンドリア DNA の系統

PCR 増幅が成功しなかった岐阜個体群を除く 6 県 52 個体の 28S リボソーム DNA の塩基配列 (932 bp) を決定した。その結果、二つの遺伝子型が検出された (表-2)。51 個体は Hamaguchi and Goto (2010) の Type 1 であった。残りの 1 個体は 2 座位がヘテロ型である点で、Type 1 と異なる遺伝子型であり、本研究では、Type 1b と名づけた (表-2, JSTAGE 電子付録付表-1)。28S リボソーム DNA の塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にアクセス・

表-2. カシノナガキクイムシの 28S リボソーム DNA の塩基配列 (932 bp) の塩基置換を基に決定した遺伝子型

28S ribosomal DNA genotypes determined based on the substitutions of the sequences (932 bp) of *Platypus quercivorus*.

Genotype	Position		N
	211	787	
Type 1 [#]	C	G	51
Type 1b [†]	Y	R	1
			52

N, number of rDNA genotypes observed; Y=C/T; R=G/A; [#]Genotype name used in the study by Hamaguchi and Goto (2010; accession no.: AB478192); [†]newly defined in this study.

ナンバー LC375252–LC375253 で登録した。

全 7 県の 92 個体についてミトコンドリア DNA の COI 部分領域の塩基配列 (658 bp) を決定した。その結果、25 の塩基置換サイトで識別される 20 のハプロタイプが検出された (表-3, JSTAGE 電子付録付表-1)。得られたミトコンドリア DNA の塩基配列は、DDBJ にアクセス・ナンバー LC375254–LC375275 で登録した。ハプロタイプ頻度 (JSTAGE 電子付録付表-1) をみると、ハプロタイプ M1 の頻度が最も高く全体の 37% を占めた。ハプロタイプネットワークをみると、最も出現頻度の高い M1 から一斉放散したハプロタイプが目立ち、同一の系統ないし近い系統が地域ごとにまとまることはなかった (図-1)。AMOVA の結果、有意ではあるものの個体群間の遺伝的分化は小さかった ($F_{ST}=0.088$, $p<0.001$)。このようにミトコンドリア DNA には、群馬のカシナガが移入か在来かを検証する上で必要な明瞭な地理的遺伝構造はみられないことがわかった。

ミトコンドリア DNA の遺伝子多様度および塩基多様度は、解析個体数が少なかった岐阜個体群 ($N=2$) を除くと、それぞれ 0.728~0.883 と 0.00270~0.00434 であった (表-4)。これらと比較して、群馬個体群の値は 0.792 および 0.00350 と中庸であり、他の個体群と比較して遺伝的多様性が低いとはいえなかった。

2. 核 DNA の SSR データ解析

遺伝解析に使用した全 7 県の 145 個体において検出された 6 遺伝子座の核 SSR マーカーの特性を表-5 に示した。各遺伝子座で検出された対立遺伝子数 (N_A) は 8~12 であり、各遺伝子座のヘテロ接合度の観察値 (H_O) は 0.463~0.778, 各遺伝子座のヘテロ接合度の期待値 (H_E) は 0.487~0.726 であった。 F_{IS} は -0.073~0.048 で 0 からの逸脱はみられなかった ($P>0.05$)。 F_{ST} は 0.030~0.057, G_{ST} は 0.006~0.035 および G'_{ST} 0.020~0.156 で、0 からの逸脱は有意であった。ヌル対立遺伝子の推定確率 [F (Null)] は -0.002~0.057 と小さく、ヌル対立遺伝子は無視できると考えられた。各個体群におけるヘテロ接合度の期待値 (H_E)、アレリックリッチネス ($A_{r[10]}$) はそれぞれ 0.653~0.701 および 4.167~5.377 であり、多重比較検定の結果、いずれの値においても各個体群間に有意な差はみられなかった ($P>0.05$)。主座標分析の結果、北東グループ (群馬, 新潟, 山形および福島) の個体群と南西グループ (長野, 静岡および岐阜) の個体群の二つの地域群に明確に区別された

表-3. カシノナガキイムシのミトコンドリア DNA の COI 部分領域の塩基配列 (658 bp) の塩基置換を基に決定したハプロタイプ
Mitochondrial DNA haplotypes determined based on the substitutions of the partial COI sequences (658 bp) of *Platypus quercivorus*.

Haplotype	Position																										N
	79	184	205	262	274	304	325	328	346	370	376	406	412	415	433	466	472	487	505	508	538	548	553	580	637		
M1	T	T	C	A	A	G	T	A	A	C	T	T	A	G	G	G	C	A	C	C	G	T	A	C	C	34	
M2	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	12	
M3	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10	
M4	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	5	
M5	.	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	
M6	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	
M7	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	
M8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	3	
M9	.	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	2	
M10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	2	
M11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	2	
M12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	2	
M13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	2	
M14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	1	
M15	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
M16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
M17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
M18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
M19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
M20	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	
92																											

Dot (.) indicates the same base to that of M1 at the same position; N, number of mtDNA haplotypes observed.

図-1. カシノナガキイムシのミトコンドリア DNA の COI 部分領域のハプロタイプネットワーク

Median-joining network inferred from partial COI sequences of mitochondrial DNA of *Platypus quercivorus*.

Open squares indicate missing haplotypes; dot lines indicate an unresolved network, including 41 missing haplotypes; the circle size of each haplotype is approximately proportional to the frequency of the haplotype; bar on each node indicates substitution site; population codes correspond to those shown in Table 1.

表-4. カシノナガキイムシ個体群のミトコンドリア DNA の COI 部分領域および 6 遺伝子座の核マイクロサテライトの遺伝的多様性

Genetic diversity of *Platypus quercivorus* populations assessed using partial COI sequences of mitochondrial DNA and six nuclear microsatellite loci.

Population Code	mtDNA		nSSR		Bottleneck test (P-value)	
	H	π	H_E	$A_{r[10]}$	IAM	TPM
YA	0.802 (0.091)	0.00361 (0.00234)	0.660 (0.126)	4.949 (0.865)	0.344	0.922
FU	0.836 (0.089)	0.00293 (0.00203)	0.680 (0.112)	5.296 (0.657)	0.422	0.922
NI	0.728 (0.083)	0.00270 (0.00184)	0.701 (0.129)	5.377 (0.784)	0.281	0.578
GU	0.792 (0.089)	0.00350 (0.00226)	0.697 (0.139)	5.324 (1.068)	0.219	0.422
NA	0.858 (0.057)	0.00323 (0.00212)	0.687 (0.077)	5.289 (0.852)	0.578	0.945
GI	1.000 (0.500)	0.00152 (0.00215)	0.653 (0.122)	4.167 (1.329)	-	-
SH	0.883 (0.061)	0.00434 (0.00270)	0.683 (0.075)	4.424 (0.784)	0.039	0.219

Population codes correspond to those shown in Table 1; H, haplotypic diversity; π , nucleotide diversity; H_E , expected heterozygosity, $A_{r[10]}$, allelic richness based on the minimum sample size of 10 diploid individuals; -, not tested because of small sample size.

(図-2)。また, STRUCTURE 解析の結果, ΔK および対数尤度 $P(X|K)$ は $K=2$ のときにいずれも最大となった (JSTAGE 電子付録付図-1)。10 回の各ラン間の類似度を示す SSC 値は, $K=2$ で 0.958 (個体データ) および 0.969 (個体群データ) であったが, $K=3$ では, いずれのデータも SSC 値は 0.80 以下であった。したがって, 本研究では K

=2を最適クラスターと判断した。 $K=2$ のとき、糸魚川静岡構造線（図-3の灰色ライン）を境に、クラスターIはその北東側に位置する山形、福島、新潟および群馬の個体群で優占し、クラスターIIは構造線上およびその南西側の長野、静岡および岐阜の個体群で優占していた（図-3）。

近年のボトルネックの有無を調べた結果、静岡個体群のIAM ($P=0.039$) 以外は、いずれの個体群・モデルにおいてもボトルネックは検出されなかった ($P>0.05$; 表-4)。

各個体群間のペアワイズ F_{ST} 値は、福島と長野個体群のペアを除いて、糸魚川静岡構造線をまたぐ個体群ペアにおいてすべて有意であった（表-6）。糸魚川静岡構造線の北東側に位置する四つの個体群間では、山形と新潟個体群間を除いて有意な遺伝的分化はみられなかった（表-6）。群馬と新潟個体群間においても遺伝的分化はみられなかった（ペアワイズ $F_{ST}=0.00002$, $P>0.05$; 表-6）。このように、カシナガにみられた遺伝的分化は主として糸魚川静岡構造線をまたぐ個体群間で生じていた。

IV. 考 察

先行研究によれば、日本のカシナガは28S リボソーム DNA の遺伝構造に基づいて日本海型と太平洋型に分かれ（Hamaguchi and Goto 2010）、日本海型のカシナガは、さらに、核の SSR マーカーを用いた遺伝解析により、糸魚

表-5. 使用した6遺伝子座の核マイクロサテライトマーカーの特徴
Characteristics of six nuclear microsatellite loci used for genetic analyses.

Locus	N_A	H_O	H_E	F_{IS}	F_{ST}	G_{ST}	G'_{ST}	$F_{(Null)}$	Dye
Pq2988	10	0.463	0.487	0.048	0.056**	0.031**	0.068**	0.057	FAM
Pq3003	10	0.654	0.652	-0.003	0.030	0.006	0.020	0.026	FAM
Pq3313	8	0.711	0.716	0.007	0.044*	0.020*	0.086*	0.042	VIC
Pq3422	9	0.702	0.703	0.001	0.035	0.011	0.043	0.023	NED
Pq3423	12	0.727	0.685	-0.062	0.056**	0.033**	0.126**	0.001	NED
Pq3469	9	0.778	0.726	-0.073	0.057**	0.035**	0.156**	-0.002	PET
Overall				-0.017	0.046**	0.023**	0.079**		

N_A , number of alleles per locus; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; F_{IS} , inbreeding coefficient within individuals; F_{ST} and G_{ST} , measures of genetic differentiation among populations; G'_{ST} , Hedrick's standardized measure of genetic differentiation; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; significance was tested using 999 permutations; $F_{(Null)}$, null allele frequencies; Dye, fluorescence dye.

図-2. カシノナガキクイムシの6遺伝子座の核DNAのマイクロサテライトマーカーを用いた主座標分析の結果

Result of principal coordinate analysis for *Platypus quercivorus* using six nuclear microsatellite loci.

Population codes correspond to those shown in Table 1.

川静岡構造線を境に北東日本タイプと南西日本タイプに分かれる（Shoda-Kagaya *et al.* 2010）。28S リボソーム DNA の解析の結果、本研究で用いた解析個体群は群馬県を含めていずれも日本海型であった。さらに核 SSR の遺伝構造解析の結果、群馬個体群は、新潟、福島および山形の個体群とともに糸魚川静岡構造線の北東に広がるタイプに属することが明らかとなった（図-3）。新潟および山形が北東タイプに属することは、Shoda-Kagaya *et al.* (2010) の結果と一致していた。これらのことから二つ目の仮説である群馬県へ遠い系統である太平洋型や日本海型の南西タイプのカシナガが移入したのではないことが示唆された。

前述したように、一般的に分布拡大などで生じた少数個体を起源とする個体群の遺伝的多様性は創始者効果によって減少がみられる。また、ミトコンドリア DNA は半数体であるため、二倍体の核 DNA マーカーよりも遺伝的浮動の影響を強く受けやすく（Sinclair *et al.* 1999）、ミトコンドリア DNA は核 DNA に比べて4倍の速度で遺伝的多様

図-3. STRUCTURE 解析によって推定したクラスター数 ($K=2$) におけるカシノナガキクイムシの遺伝構造

Genetic structure of *Platypus quercivorus* obtained using STRUCTURE analysis.

Each individual is represented by a thin horizontal line at the number of cluster ($K=2$). The thick gray line indicates the Itoigawa-Shizuoka Tectonic Line; population codes correspond to those shown in Table 1.

表-6. 核 SSR の6遺伝子座を用いて推定した各個体群間の遺伝的分化（ペアワイズ F_{ST} ）

Population Pairwise F_{ST} estimated using six nuclear microsatellite loci.

	YA	FU	NI	GU	NA	GI	SH
YA	—						
FU	0.00509	—					
NI	0.01982*	-0.00037	—				
GU	0.01154	-0.00519	0.00002	—			
NA	0.02137*	-0.00615	0.01995**	0.02012**	—		
GI	0.06542***	0.04973***	0.04127***	0.06024**	0.03807*	—	
SH	0.04361***	0.02744***	0.05037***	0.04489***	0.00307	0.03888***	—

Population codes correspond to those shown in Table 1; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; the values in the box indicate those obtained between populations located on both sides of the Itoigawa-Shizuoka Tectonic Line.

性が減少するといわれている(井鷲・陶山 2013)。したがって、群馬県のカシナガが近隣県からの近年の自然あるいは人為的な移入個体群であるならばミトコンドリア DNA の遺伝的多様性は低下すると予想される。しかし、本研究の結果、群馬個体群の核 SSR およびミトコンドリア DNA の遺伝的多様性は、他の個体群と比較して低くなく(表-4, 5), Shoda-Kagaya *et al.* (2010) が核 SSR マーカーを用いて調べた東北から北陸までのカシナガの遺伝的多様性の値と同程度であった。また、近年のボトルネックは検出されなかった。このことから、一つ目の仮説である群馬県のカシナガが近隣県からの近年の自然移入あるいは人為的に移入した個体群でもないことが示唆される。

したがって、三つ目の在来個体群由来の仮説が支持される。ただ、本研究で群馬と新潟の個体群間の遺伝的分化がみられなかったことから、より長い時間(世代)スケールでみると、群馬個体群は在来由来であっても、両個体群間の分化後の時間は比較的浅いか、何らかの遺伝的な交流が保たれていることが示唆される。一方、本研究の結果、静岡県個体群のみで有意なボトルネックが検出された(表-4)。静岡県内では県西部から東に向かって徐々にナラ枯れが拡大したこと(静岡県 2016)を考慮すると、静岡県個体群については、近隣から近年移入した可能性も否定できない。

以上から、群馬県のナラ枯れを起こしたカシナガは在来であることが示唆された。ナラ枯れ被害が発生するためには一定数のカシナガ成虫数が必要とされることから(江崎ら 2009), 2010 年に群馬県でナラ枯れが初発する以前からおそらく在来のカシナガが生息していたが、個体数密度が低かったために被害が起きなかったものと考えられる。群馬県において個体群密度が高まった要因についてははっきりしないが、水上が多雪地域であることを考慮すると、要因の一つとして気象要因が考えられる。冬季の材内におけるカシナガ幼虫の生存率は積雪期間が長くなると低下するとされる(松浦・中島 2011)。また、カシナガの穿入孔は樹幹下部ほど多い(小林・野崎 2003)。気象庁みなかみ観測所の3月の最深積雪(1990~2018年)は平均110 cm であるが、2007年、2009年および2010年は80 cm 以下の年が続いた(気象庁 2018)。このためカシナガ幼虫の生存率が下がらず、成虫の個体群密度が高く維持されたのかもしれない。

これまで発生したナラ枯れ被害の中には、例えば、静岡県の伊豆地方(加藤 2014; 澤田ら 2014; 静岡県 2016)、神奈川県箱根町および三浦市(神奈川県 2017)、千葉県鴨川市(千葉県 2017)のように前年の被害地から10 km 以上離れた場所や、周辺で被害のない場所で飛び地的に発生した被害も多い。伊豆地域では、隣接地である富士地域でカシナガが確認されていないことから伊豆地域の個体群は独立した個体群である可能性が高いとされた(加藤 2014)。本研究より、群馬県のナラ枯れが在来のカシナガによって起きたことが示唆されたことを考慮すると、これら無被害地で突然発生したナラ枯れも在来個体群のカシナガにより引き起こされた可能性も考慮すべきであろう。従来、ナラ枯れ被害発生予測は、主として被害地からのカシ

ナガの移動による拡大を前提として行われてきた。しかし、本研究の結果に基づく、Shoda-Kagaya *et al.* (2010) が指摘するように、近隣での被害の有無や前年の被害地との距離に関わらず、未被害のナラ類が分布する地域におけるカシナガの生息の有無の調査が、被害予防の観点から重要と考えられる。なお、カシナガが在来であっても、ナラ菌が何らかのかたちで近年移入した、あるいは病原性が高まったことでナラ枯れ被害が発生した可能性も考えられる。しかし、本研究では、ナラ菌の由来まで調べることはできなかった。この点については今後の課題である。

謝 辞

本研究の試料採集にあたって、群馬県林業試験場の伊藤英敏氏、山形県森林研究研修センターの齊藤正一氏、小谷村キハダ生産組合の山口真保呂氏、岐阜県森林研究所の大橋章博氏、静岡県農林技術研究所森林・林業センターの加藤徹氏、福島県只見町役場の中野陽介氏、只見町ブナセンター、宇都宮大学農学部森林科学科森林生態学・育林学研究室の諸氏のご協力をいただいた。森林総合研究所森林昆虫研究領域の北島博氏より、試料採集地の情報を提供していただいた。宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの相蘇春菜博士にはシーケンス解析とフラグメント解析をしていただいた。本原稿の査読者の方々より有益なコメントをいただいた。以上の方々に心より御礼申し上げます。

引用文献

- 在原登志雄・松崎 明・斎藤直彦・石井洋二(2008) ナラ類集団枯損に関する防除技術の開発。福島県林業研究センター報告 41: 47-116
- 浅野浩之(2011) 群馬県でナラ枯れ被害が発生。群馬県林業試験場 <http://www.pref.gunma.jp/07/p13700231.html> (2018.5.9 閲覧)
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48
- Bernays EA, Chapman RF (1994) Host-plant selection by phytophagous insects. Springer
- 千葉県(2017) ナラ枯れ(カシノナガキクイムシ)の情報提供に御協力願います。千葉県農林水産部森林課 <https://www.pref.chiba.lg.jp/shinrin/documents/chirasi.pdf> (2018.5.4 閲覧)
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUSTRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUSTRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour* 4: 359-361
- 江崎功二郎・加藤賢隆・鎌田直人(2009) 樹幹表面におけるカシノナガキクイムシの初期侵入分布。日林誌 91: 208-211
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUSTRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564-567
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press [Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA 西田睦(訳)(2007) 保全遺伝学入門。文一総合出版]
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98
- Hamaguchi K, Goto H (2010) Genetic variation among Japanese

- populations of *Platypus quercivorus* (Coleoptera: Platypodidae), an insect vector of Japanese oak wilt disease, based on partial sequence of nuclear 28S rDNA. *Appl Entomol Zool* 45: 319-328
- Hamaguchi K, Kato K, Esaki K, Kamata N (2011) Isolation and characterization of 10 new microsatellite loci in the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. *J For Res* 16: 518-521
- Hebert PDN, Cywinska A, Baall SL, deWaard JR (2003) Biological identification through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Bio Sci* 270: 313-321
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 25: 1633-1638
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour* 9: 1322-1332
- 伊藤進一郎・山田利博 (1998) ナラ類集団枯損被害の分布と拡大. *日林誌* 80: 229-232
- 井鷲裕司・陶山佳久 (2013) 生態学者が書いた DNA の本 メンデルの法則から遺伝情報の読み方まで. 文一総合出版
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16: 1099-1106
- 神奈川県 (2017) ナラ枯れについて. <http://www.pref.kanagawa.jp/cnt/f537128/> (2018.5.4 閲覧)
- 加藤 徹 (2014) 静岡県におけるカシノナガキクイムシの分布拡大. 静岡県農林技術研究所研究報告 (森林・林業編) (7): 63-69
- Kim CG, Zhou HZ, Imura Y, Tominaga O, Su ZH, Osawa S (2000) Pattern of morphological diversification in the *Leptocarabus* ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as deduces from mitochondrial ND5 gene and nuclear 28S rDNA sequences. *Mol Biol Evol* 17: 137-145
- 気象庁 (2018) みなかみ, 年ごとの値, 詳細 (雪). http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/annually_a.php?prec_no=42&block_no=1019&year=2017&month=&day=&view=a4 (2018.5.8 閲覧)
- 小林正秀・野崎 愛 (2003) ミズナラにおける地上高別のカシノナガキクイムシの穿入孔数と成虫脱出数. *応用森林研究* 12: 143-149
- 小林正秀・野崎 愛 (2009) ナラ枯れ被害をどう防ぐのか—被害のメカニズムと防除法—. 京都府林業試験場
- 小林正秀・萩田 実 (2000) ナラ類集団枯損の発生経過とカシノナガキクイムシの捕獲. *森林応用研究* 9 (1): 99-103
- 小林正秀・上田明良 (2001) ナラ類集団枯損発生直後の林分におけるカシノナガキクイムシの穿入と立木の被害状況 (II) —京都府和知町と京北町における調査結果—. *森林応用研究* 10 (2): 79-84
- 小林正秀・上田明良 (2005) カシノナガキクイムシとその共生菌が関与するブナ科樹木萎凋枯死—被害発生要因の解明を目指して—. *日林誌* 87: 435-450
- Luikart G, Cornuet JM (1996) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv Biol* 12: 228-237
- 松浦嵩遠・中島春樹 (2011) 「ナラ枯れ」 Q & A. 富山県農林水産総合研究センター森林研究所研究レポート 2: 1-16
- Milligan RH (1982) Evidence for an aggregating pheromone in *Platypus apicalis* (Coleoptera: Platypodidae). In *Insect Pheromones and Their Application*. N. Z. Department of Scientific and Industrial Research Entomology Division Report 2: 37-50
- Nobuchi A (1973) The Platypodidae of Japan (Coleoptera). *Bull Gov For Exp Sta* 256: 1-22
- 布川耕市 (1993) 新潟県におけるカシノナガキクイムシの被害とその分布について. *森林防疫* 42: 210-213
- 布川耕市 (2001) 新潟県におけるナラ類集団枯損被害の地域分布および標高分布. *新潟県森林研報* 43: 33-49
- 布川耕市 (2007) 新潟県におけるナラ類集団枯損被害の地域分布と拡大経過. *新潟県森林研報* 48: 21-32
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90: 502-503
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Pritchard JK, Wen X, Falush D (2010) Documentation for structure software: Version 2.3. https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/structure_doc.pdf (2018.6.11 閲覧)
- 林野庁 (2015) ナラ枯れ被害対策マニュアル改訂版 <http://www.rinya.maff.go.jp/j/hogo/higai/pdf/naragaremanyual2.pdf> (2018.3.6 閲覧)
- 林野庁 (2017) 病害虫や動物被害から森林を守る! ナラ枯れ被害 <http://www.rinya.maff.go.jp/j/hogo/higai/naragare.html> (2018.3.6 閲覧)
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4: 137-138
- 佐藤 明・野堀嘉裕・高橋教夫・斎藤正一 (2004) GIS を用いた山形県朝日村におけるナラ類集団枯損の地理的特徴解析. *東北森林学会誌* 9: 13-20
- 澤田晴雄・辻 和明・辻 良子・小林徹行・井上広喜・鴨田重裕・鎌田直人 (2014) 東京大学樹芸研究所青野研究林におけるカシノナガキクイムシ穿入木の発生状況. *中部森林研究* 62: 55-58
- 静岡県 (2016) 静岡県ナラ枯れ被害対策ガイド. <https://www.pref.shizuoka.jp/sangyou/sa-850/naragaregaido2016.pdf> (2018.5.8 閲覧)
- Sinclair WT, Morman JD, Ennos RA (1999) The postglacial history of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Mol Ecol* 8: 83-88
- Shoda E, Kubota K, Makihara H (2003) Geographical structuring of mitochondrial DNA in *Semanotus japonicus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl Entomol Zool* 38: 339-345
- Shoda-Kagaya E, Saito S, Okada M, Nozaki A, Nunokawa K, Tsuda Y (2010) Genetic structure of the oak wilt vector beetle *Platypus quercivorus*: inferences toward the process of damaged area expansion. *BMC Ecol* 10: 21
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) The CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C, Mazzotti G, Poletti G, Hill K, Hurtado AM, Labuda D, Klitz W, Barrantes R, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Llop E, Rothhammer F, Excoffier L, Feldman MW, Rosenberg NA, Ruiz-Linares A (2007) Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet* 3: e185.
- 渡辺昭彦 (2009) 吊り下げ式簡易型屋根付き FIT とその作り方. *甲虫ニュース* 166: 7-9