

# アブラムシの種内分化に関する分子生物学的手法による最近の研究動向

独立行政法人農業技術研究機構果樹研究所 <sup>こま</sup> 駒 <sup>ざき</sup> 崎 <sup>しん</sup> 進 <sup>きち</sup> 吉

## はじめに

アブラムシに限らず、多くの害虫種では、その種内に寄生性や、休眠性などの生活史特性、薬剤抵抗性などに関して異なった形質を持つ系統が存在する。これらの系統は、「バイオタイプ」という呼ばれ方をすることも多い。このバイオタイプについては、明確な定義があるわけではなく、おもに寄主選択性と関連した、虫害抵抗性の植物品種との関連などで使われていることが多い。これらの例の多くは、系統 (race, strain) と言い替えても問題がないと考えられる。バイオタイプについては、Eastop (1973) によると、形態学的な差以外で特徴づけられ、生活史、寄主嗜好性、摂食行動、ウイルスの伝播性、殺虫剤に対する抵抗性などの違いで、遺伝的に決定されているものとされている。種よりも下位にくる単位であるが、分類学的な位置づけは、明瞭でない。

種内に大きな変異の見られるワタアブラムシなどの害虫は、種群として扱う必要があり、種という境界が明確でない。種や亜種の判別の基準には、生殖的な隔離の程度が用いられるが、アブラムシでは単為生殖を続ける不完全生活環型があり、そのような基準で判断することが難しい。

一方、近年分子生物学的手法の発達により、DNA レベルでの解析が、比較的身近な方法となってきた。この方法は、種内の遺伝的な変異や構造を定量的にはかれるため、適当な DNA の領域を選べば、目的とする変異の

量を、それぞれの系統やバイオタイプ間で比較できることになる。このような視点から、アブラムシにおける種内分化の研究の現状をまとめてみた。

## I 系統またはバイオタイプについて

アブラムシで、系統やバイオタイプとして報告されているのはムギミドリアブラムシ (*Schizaphis graminum*)、アルファルファアブラムシ (*Therioaphis trifolii*)、モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)、コンドウヒガナガアブラムシ (*Acyrtosiphon kondoi*)、*Russian whea taphid* (*Diuraphis noxia*)、*Amphorophora idaei*、*Sitobion avenae*、ブドウネアブラムシ (*Dakutulospharia (Viteus) vitifoliae*)、リングワタムシ (*Eriosoma lanigerum*)、ホップイボアブラムシ (*Phorodon humili*)、*Aphis fabae*、ワタアブラムシ (*Aphis gossypii*)、ユキヤナギアブラムシ (*Aphis spiraeicola*)、エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*)、マメアブラムシ (*Aphis craccivora*) など 20 種以上に及ぶ。このうち、ワタアブラムシ、モモアカアブラムシ、*Aphis fabae* など、種群として扱われるものも多く、これらでは、種や亜種、種内系統の境界がはっきりしなくなっている。このような種以下の分類単位として、BLACKMAN (1995) は種分化の過程にあるものとして semispecies といった概念を提唱している。表に代表的なアブラムシでの分化の様子をまとめた。

表 主要アブラムシにおける種内分化の指標とされる形態・形質

エンドウヒゲナガアブラムシ ( <i>Acyrtosiphon pisum</i> )
寄主嗜好性(寄主植物上での増加, 生存率, 産子数, 温度と増殖の関係), 体長, 体重, 体色, ウイルスの伝播能力, 組み合わせによる有翅虫の出現率, 逃避行動, 代謝率, 栄養要求性
モモアカアブラムシ ( <i>Myzus persicae</i> )
体色, 日長反応(生活環型), 寄主嗜好性, 薬剤抵抗性, 染色体異常: 染色体の転座, エステラーゼ型, 活性, タンパクの泳動パターン, ウイルス伝播能力, 低温耐性, 温度と発育の関係
ワタアブラムシ ( <i>Aphis gossypii</i> ): ( <i>Aphis frangera</i> group)
生活環型, 薬剤抵抗性, 寄主嗜好性, エステラーゼ型, 活性
ムギミドリアブラムシ ( <i>Schizaphis graminum</i> )
寄主嗜好性(抵抗性品種への加害), 温度と増殖との関係, 産子数, 寿命, 染色体長, 形態(多変量解析), 吸汁行動, 排泄量, アイソザイムパターン, ミトコンドリア DNA の違い, 日長反応

## II 分子生物学的手法による種内変異の研究

### 1 手法について

#### (1) アイソザイムまたはアロザイム

同じ働きを持つ酵素群を、ポリアクリルアミドゲルなどを用いた電気泳動法でサイズや電荷によって分離し、適当な基質を用いて染色して、そのバンドパターンを比較する。DNAの解析に比較すると、得られる変異の量が少ない。

#### (2) RAPD-PCR

10塩基程度の短いランダムな配列をもったプライマーを用いて、増幅条件をゆるくして（アニール温度を下げて）PCRを行い、多くの増幅断片を得ることによって、差を見つけようという方法である。

#### (3) PCR-RFLP

遺伝子の特定部分を特異的なプライマーを用いて増殖し、この増幅産物を制限酵素で消化して、その結果得られる断片のサイズを比較する方法。

#### (4) 特定の遺伝子部分の塩基配列の比較

特定の遺伝子部分の塩基配列を決定して比較する。ミトコンドリアの遺伝子（チトクロームオキシダーゼ (COI, II) など）やリボゾームRNAをコードする遺伝子（rDNAのサブユニットやITS領域）などが使われることが多い。

#### (5) その他

制限酵素処理と遺伝子の特定部分とのハイブリダイゼーションを組み合わせたRFLP、制限酵素処理とPCRを組み合わせたAFLPや反復配列の繰り返し数の変異を用いた、マイクロサテライト遺伝子の解析なども利用できる。

### 2 研究の現状

① *Sitobion avenae* では、繰り返し配列 (GATA の 4 回の反復配列) をプローブとして制限酵素処理した DNA とのザザンハイブリダイゼーションにより多型を検出して個体識別し、コムギを好むクローンが存在すること (BARRO et al., 1995 a), 南イングランドのコムギ畑の個体群では変異が小さく、道ばたで採集した個体群間には大きな地理的変異が存在することが明らかとなった (BARRO et al., 1995 b)。RAPD-PCR により、コムギとオーチャードグラスに寄生する個体群は、春にはバンドパターンの違いが大きかったが、季節が進むにつれ小さくなり、これはオーチャードグラスからコムギへの移動が起こるためと考えられた (BARRO et al., 1995 c)。また近縁種の判別にも用いられ、*S. avenae* と *S. fragariae* の判別に、mt-DNA の ND1 と cyt b 領域の PCR 増

幅、RAPD-PCR、四つのマイクロサテライト遺伝子は、どれも判別に有効であった (FIGUEROA et al., 1999)。日本のムギヒゲナガアブラムシ (*S. akebie*) を含めた検討もされている。

② アルファルファアブラムシでは、オーストラリアのアルファルファとクローバーに寄生する系統を、寄主上での生育と増殖、形態、クチクラの炭化水素の組成、核型に加えて、RAPD-PCR とミトコンドリアのチトクロームオキシダーゼ (COI, II) の塩基配列を決定して、比較した。そうすると、寄生性、形態、RAPD、mt-DNA の結果はよく一致し、mt-DNA の増幅断片を制限酵素で消化することによって (PCR-RFLP)、二つの種内系統を明瞭に区別することができた (SUNNUCKS et al., 1997)。

③ ムギミドリアブラムシでは、rDNA の RFLP によって、越冬個体群のクローンの多様性を判定した (SHUFRAN and WILDE, 1994)。また rDNA は多重遺伝子であるが、その単位をつなぐスペーサー領域 (IGS) を用いた RFLP によって、バイオタイプ E とされる個体にも多くのクローンが含まれることを示した (SHUFRAN et al., 1992)。mt-DNA の COI 領域の塩基配列によって、アメリカの 11 のバイオタイプは三つの群に分かれ、そのうち一つのグループがソルガムとコムギに見られるバイオタイプによって形成され、他の二つは作物では少ないバイオタイプを含むこと、また一つのバイオタイプは別種と想定されることが明らかとなった (SHUFRAN et al., 2000)。

④ *Amphorophora idaei* では、rDNA の IGS 領域の RFLP によって、バイオタイプに特有のパターンは得られなかった (BIRCH et al., 1994)。

⑤ *Diuraphis noxia* では、アロザイムには変異が小さく、同じ個体群内、とくに最近侵入した国の中では変異が見られなかったが、RAPD-PCR では十分な変異が見られ、これを用いて、中東と南ロシアの個体群間に大きな差が見られることが明らかになった (PUTERKA et al., 1993)。

⑥ *Elatobium abietinum* は、イギリスとニュージーランドに侵入したが、RAPD と IGS の PCR によって比較した結果、歴史の古いイギリスでの遺伝的変異が大きかった (NICOL et al., 1998)。

⑦ モモアカアブラムシでは、イギリスの個体群を用いた IGS 領域の RFLP 解析によって、276 クローンで 80 の遺伝子型 (genotype) が判別でき、これらの遺伝子型は寄主との関連は見られないこと、また主要なクローンが個体群の大半を占めることなどが明らかになった

(FENTON et al., 1998)。Myzus persicae 種群の3種を核型、薬剤抵抗性に関するカルボキシルエステラーゼ (EST 4) 遺伝子のメチル化の有無で判別でき、さらに二つのアロザイムと11のマイクロサテライト遺伝子座を用いて3種の類縁関係を推定し、*M. persicae* と *M. nicotiana* が近縁であり、これと *M. antirrhinii* の類縁は遠いことを示した (TERRADOT et al., 1999)。

⑧ホップイボアブラムシでは、殺虫剤抵抗性に関連するカルボキシルエステラーゼと6-PGDを用いて、1次～2次寄主の寄主転換や夏に起こる移動の距離が30 km以下であることが推定された (LOXDALE et al., 1998)。

⑨Aphis fabae 種群では、酵素の電気泳動によって18種のアブラムシを17の遺伝子座によって判別できることが示された (JORG and LAMPEL, 1996)。

⑩ムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) では、カナダの29個体群について、29の酵素の51遺伝子座について調べたが、三つの遺伝子座で多型が見られたのみであり、1次、2次寄主上でのヘテロ接合度には違いが見られた (SIMON and HEBERT, 1995)。フランスの個体群でもアロザイムの変異は小さかったが、ヨーロッパでの生活環型の違いは、mt-DNAのND1と共生微生物のプラスミド遺伝子のPCR-RFLPおよび、RAPD-PCRによって見分けられた (SIMON et al., 1996)。スペインの148のクローンで、mt-DNAのATに富む領域と共生微生物のプラスミドをプローブとして、RFLPで解析し、完全生活環型と不完全生活環型が区別できた (Martinez-Torres et al., 1996)。mt-DNAのND1遺伝子をPCR-RFLPによって二つのタイプに分け、これらがフランスの個体群では、生活環型とリンクしていた (MARTINEZ-TORRES et al., 1997)。RAPD-PCRの結果、生活環型とリンクしたマーカーが見つかり、その断片の塩基配列を解析して新たなプライマーを設計し、配列特異的な増幅断片を作り (SCAR)、その対立遺伝子の分布と、この領域の塩基配列の変異を調べ、単為生殖の起源を探った (SIMON et al., 1999)。

⑪Rhopalosiphum maidis ではカナダの個体群にはアロザイムの32の遺伝子座に変異が見られず、北アメリカ、ヨーロッパ、アフリカのクローンでは、染色体数には寄主植物に対応した変異が見られたが、mt-DNAのND1領域のPCR-RFLPでは変異がなかった (SIMON et al., 1995)。

⑫エンドウヒゲナガアブラムシでは、ペプチダーゼを用いて、それぞれの対立遺伝子頻度がアルファルファとクローバーの個体群間で異なり、分化していることを示した (VIA, 1999)。イギリスの個体群において、三つの

寄生性で分かれるバイオタイプから29のクローンをを用いて、mt-DNAと共生微生物のプラスミドをRFLP解析し、mt-DNAのATに富む領域とND3-ND5領域にはサイズの変異が見られ、プラスミドには3クローンで変異が見られた (BIRKLE and DOUGLAS, 1999)。フランスの15クローンをアロザイムとRAPD-PCRにより遺伝子型に分け、それぞれの遺伝子型のアブラムシ抵抗性のアルファルファ上での分布を明らかにした (BOURNOVILLE et al., 2000)。

⑬Trama 属の3種のアブラムシの核型とrDNAの染色体上の位置の数を染色体へのハイブリダイゼーションによって調べ、核型の種内変異の大きいことが示された (BLACKMAN et al., 2000)。

⑭ブドウネアブラムシでは、摂食行動、繁殖率、加害性などによって分けられるアメリカの二つのバイオタイプとそれ以外の個体を用い、RAPD-PCRによって遺伝的な違いを調べ、バイオタイプは違った遺伝的背景を持つことを示した (FONGET et al., 1995)。ヨーロッパの103個体群とアメリカの6個体群をAFLP-PCRで比較した結果、北緯43度を境界とする北方系と南方系に分かれ、これらは生活環型を反映しているものと推測され、また地域的な変異は寄主間の変異よりも大きく、寄主による分化はないことも示された (FORNECK et al., 2000)。アリゾナとニューヨークの個体群をRAPD-PCRによって比較すると変異が大きく、アリゾナでは地域個体群のまとまりが見られたが、ニューヨークの個体群では見られなかった (LIN et al., 1999)。ミズーリで2種の野生のブドウから採集した個体をRAPD-PCRによって解析した結果、変異は大きかったが、寄主間や地域的な差は見られなかった (DOWNIE, 2000)。

⑮フタアブラムシでは、オーストラリアの個体群では、アロザイムの変異は見られたが、バイオタイプは判別できなかった (Woolら, 1995)。日本の個体はRAPD-PCRによって、キュウリ寄生とナス寄生の二つのグループに分けられたが、生活環型と薬剤抵抗性はそれぞれのグループとは独立して現れた (KOMAZAKI and OSAKABE, 1998)。フランス、ラオス、ポルトガルの個体群をRAPD-PCRによって比較し、ウリ科に寄生する個体群とそうでないものに大きく別れることを示した (VANLERBERGHE-MASUTTI and CHAVINGNY, 1998)。マイクロサテライトを用いて、ハウス内の個体群では、春から夏では、時間の経過につれて遺伝的多様性が減ることが示された (FULLER et al., 1999)。

## おわりに

以上に示したように、DNAを用いた様々な解析法は、種や個体群の遺伝的な構造を明らかにするうえで、非常に有力な手段となっている。このような手法は、昆虫だけでなくほぼすべての生物に適用可能である。また手法自体も、生物全体を対象として様々な新しい方法が開発されている。今後これらの方法を用いた研究の進展が、種や種内系統の進化、個体群の動態に関する新しい知見をもたらすものと期待される。

## 引用文献

- 1) BIRCH, A. N. E. et al. (1994) : *Insect Molecular Biology* 3: 239~245.
- 2) BIRKLE, L. M. and A. E. DOUGLAS (1999) : *Heredity* 82: 605~612.
- 3) BLACKMAN, R. L. (1995) : *Bull. Entomol. Res.* 85: 1~4.
- 4) ——— et al. (2000) : *Heredity* 84: 254~260.
- 5) BOURNOVILLE, R. et al. (2000) : *Bull. Entomol. Res.* 90: 33~39.
- 6) De BARRO, P. J. et al. (1995 a) : *Molecular Ecology* 4: 375~382.
- 7) DOWNIE, D. A. (2000) : *ibid* 9: 505~514.
- 8) FENTON, B. et al. (1998) : *ibid* 7: 1475~1487.
- 9) FIGUEOA, C. et al. (1999) : *Entomol. Exp. Appl.* 92: 217~225.

- 10) FONG, G. et al. (1995) : *Molecular Ecology* 4: 459~464.
- 11) FORNECK, A. et al. (2000) : *Genome* 43: 669~678.
- 12) FULLER, S. J. et al. (1999) : *Molecular Ecology* 8: 1867~1877.
- 13) JÖRG, E. and G. LAMPEL (1996) : *J. Appl. Ent.* 120: 7~18.
- 14) KOMAZAKI, S. and Mh. OSAKABE (1998) *Aphids in natural and managed ecosystems*, Universidad de Leon, Leon, 83~89.
- 15) LIN, H. et al. (1999) : *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 376~381.
- 16) LOXDALE, H. D. et al. (1998) : *Bull. Entomol. Res.* 88: 513~526.
- 17) MARTINEZ-TORRES, D. et al. (1996) : *Molecular Ecology* 5: 659~670.
- 18) ——— et al. (1997) : *Bull. Entomol. Res.* 87: 161~167.
- 19) NICOL, D. et al. (1998) : *ibid.* 88: 537~543.
- 20) PUTERKA, G. J. et al. (1993) : *Heredity* 70: 604~618.
- 21) SHUFRAN, K. A. and WILDE, E. (1994) : *Bull. Entomol. Res.* 84: 105~114.
- 22) ——— et al. (2000) : *Insect Molecular Biology* 9: 179~184.
- 23) SIMON, J.-C. et al. (1996) : *Heredity* 76: 305~313.
- 24) ——— et al. (1999) : *Molecular Ecology* 8: 965~973.
- 25) SUNNUCKS et al. (1997) : *Bull. Entomol. Res.* 87: 425~436.
- 26) TERRADOT, L. et al. (1999) : *ibid.* 89: 355~363.
- 27) VANLERBERGHE-MASUTTI, F. and P. CHAVINGNY (1998) : *Molecular Ecology* 7: 905~914.
- 28) VIA, S. (1999) : *Evolution* 53: 1446~1457.

## 中央だより

## ○「残留農薬基準」の改正について

厚生省は平成12年12月4日付けで食品衛生法に規定されている「食品、添加物等の規格基準（残留農薬基準）」の一部（下記）を改正した。

フルトラニル剤の米（玄米をいう。）：1.0 ppmを2.0 ppmに、ばれいしょ：0.2 ppmを0.5 ppmに改められた。

ペンディメタリン剤の米（玄米をいう。）：0.05 ppmを0.2 ppmに、さとうきび：0.05 ppmを0.1 ppmに改められた。

メトリブジン剤のそば、とうもろこし、ライ麦及び上記以外の穀類：0.05 ppmを0.1 ppmに、えんどう：0.05 ppmを0.1 ppmに改められた。

酸化フェンブタスズ剤のえんどう：0.5 ppmを2.0 ppmに、そら豆及び上記以外の豆類：0.5 ppmを2.0 ppmに、おうとう（チェリーを含む）：5.0 ppmを10 ppmに、アボガド、キウイ、グアバ、なつめやし、パイナップル、パッションフルーツ、パパイヤ、マンゴー：2.0 ppmを5.0 ppmに、バナナ：5.0 ppmを10 ppmに、いちご：3.0 ppmを10 ppmに、ラズベリー：2.0 ppmを10 ppmに、なす：2.0 ppmを6.0 ppmに改められた。

クロルベンジレート剤のオレンジ（ネーブルオレンジを含む）、グレープフルーツ：1.0 ppmを5.0 ppmに、みかん：2.0 ppmを5.0 ppmに、ライム、レモン及び上記以外のかんきつ類果実：1.0 ppmを5.0 ppmに改

められた。

クロフェンテジン剤のクランベリー、ハックルベリー、ブラックベリー、ブルーベリー、ラズベリー、上記以外のベリー類果実：1.0 ppmを2.0 ppmに改められた。

ピリミカーブ剤のかんしょ：0.10 ppmを0.50 ppmに改められた。

フルシトリネート剤のきゅうり（ガーキンを含む）：0.50 ppmを1.0 ppmに、えだまめ：0.50 ppmを2.0 ppmに改められた。

## ○農薬安全使用基準の一部改正について

農林水産省は、農薬の安全適切な使用の確保を図るため、農薬取締法に基づき農薬安全使用基準を平成12年12月4日付けで一部改正した。

## 1. 農薬残留に関する安全使用基準

## (1) 新規設定：15農薬

エトキサゾール剤、ジアフェンチウロン剤、ピメトリン剤、フェンプロパトリン剤、ルフェヌロン剤（殺虫剤：5農薬）、アシベンゾラルSメチル剤、シプロジニル剤、テトラコナゾール剤、プロクロラズ剤（殺菌剤：4農薬）、イマザモックスアンモニウム塩剤、クレトジム剤、シアナジン剤、ターバシル剤、デスメディファム剤、ブタクロール剤（除草剤：6農薬）

## (2) 追加・変更：37農薬

## ① 作物の追加（9農薬）

アクリナトリン剤、オキサミル剤、ジフルベンズロン剤、ピラクロホス剤、フルシトリネート剤（殺虫剤：5農薬）、フルトラニル剤（殺菌剤：1農薬）、グリホサー（35ページに続く）