

果樹の微小害虫類の分子系統解析と種判別法

—*Panonychus* 属ハダニ類とアザミウマ類について—

独立行政法人農業技術研究機構果樹研究所ブドウ・カキ研究部 と だ 聡

はじめに

果樹全般を加害する害虫の中で一般に難防除害虫といわれるものとしてまず思いつくのが、ハダニ類、アザミウマ類、アブラムシ類といった体サイズの極めて小さな害虫たちである。これら微小害虫は、一般的に発育期間が短く、増殖率が高くなる傾向にあることから、防除の徹底が難しく、薬剤の散布回数が多くなりがちである。これにより各種殺虫剤に対して感受性を低下させている例も数多い。さらに、微小であるということは種の判別に高度な専門技術と多大な労力を必要とする。このことは、圃場内外における移動分散など、発生生態の解明にも大きな困難をもたらす結果になっている。

筆者は微小害虫を中心に、様々な角度からDNA多型を利用した解析を進めてきた。その中から、本稿ではハダニ類の分子系統解析と分子マーカーを用いたアザミウマ類の種判別法について得られた知見を紹介したい。

I *Panonychus* 属ハダニの分子系統解析

日本産 *Panonychus* 属ハダニは10年ほど前まではミカンハダニ (*P. citri*) とリンゴハダニ (*P. ulmi*) の2種が記載されているにすぎなかった。その後、リンゴハダニからササ、ハルニレに寄生する系統がそれぞれニホンササハダニ (*P. bambusicola*)、エルムハダニ (*P. thelytokus*) として (EIHARA and GOTOH, 1991; 1992)、またミカンハダニの休眠系統とされてきたものがクワオオハダニ (*P. mori*) として別種記載された (EIHARA and GOTOH, 1992)。さらに1996年にはミカンハダニのモクセイに寄生する系統がモクセイハダニ (*P. osmanthi*) として新たに記載されている (EIHARA and GOTOH, 1996)。

生物種間の系統関係は形態レベルに始まり、核酸・タンパク質などの分子レベルまで、様々なレベルの形質に基づいて推定することが可能である。ダニ類においても NAVAJAS et al. (1992) による *Tetranychus* 属ハダニの解析をはじめとし、数多くの分子レベルでの系統解析が

行われてきている。日本産 *Panonychus* 属においては、OSAKABE and SAKAGAMI (1994) がマウスのリボゾームDNAをプローブとしたサザンハイブリダイゼーション法によりRFLP解析を行い、果樹害虫として重要な3種、すなわちミカンハダニ、クワオオハダニ、リンゴハダニの系統関係を推定した。その結果、得られた系統関係は分類学的位置付けとよく適合したものであった。しかし、形態データの中には胴背毛の長さのようにRFLP解析により得られた系統関係を支持するものがある一方、必ずしもすべての形質が同様の傾向を示しているとは言い難い (刑部・斎藤, 1991)。

そこで、筆者らはDNA塩基配列に基づく分子系統解析を行い、異なる角度から *Panonychus* 属ハダニの系統関係を検証した (TODA et al., 2000)。解析にはOSAKABE and SAKAGAMI (1994) が系統関係を推定した3種に、その後新種記載されたモクセイハダニを加えた4種を用いた。なお、クワオオハダニに関しては寄生性の分化ならびに生殖的不和合の可能性が考えられる二つの系統 (鳥取系統および札幌系統) (OSAKABE, 1993) を解析に加えた。解析に用いたのは比較的進化速度が速く、変異に富んでいるとされているミトコンドリアDNAのシトクロムオキシダーゼ遺伝子のサブユニットI (CO I) である。

系統解析にはシーケンスを決定したCO I領域の一部を用いた。総塩基数はすべての種、系統で546塩基対であった。ミカンハダニでは配列が1塩基異なる二つのハプロタイプ (T型およびG型) の存在が明らかとなったため、それぞれを単独のOTUとして解析に加えた。外群には *Tetranychus* 属のナミハダニを用いた。データは系統解析ソフト (PHYLIP) に入力し、最尤法および近隣結合法の2とおりの方法で系統解析を行った。

図-1に得られた分子系統樹を示す。異なる解析方法で得られた二つの系統樹の樹型は一致していた。また各々の枝に付けられた値は、それぞれの枝の分岐の信頼度を示すブートストラップ確率であるが、いずれの値も95%以上と高く、高い信頼度が得られた (図-1)。

これらの系統樹からミカンハダニとモクセイハダニが極めて近縁な関係にあるということが分かる。ミカンハダニ、リンゴハダニおよびクワオオハダニの交雑ではい

Molecular Phylogeny and Species Discrimination of Small Insect Pests on Fruit Trees. By Satoshi TODA

(キーワード: *Panonychus* 属, アザミウマ, CO I, ITS 2, 分子系統解析, 種判別法, PCR-RFLP)

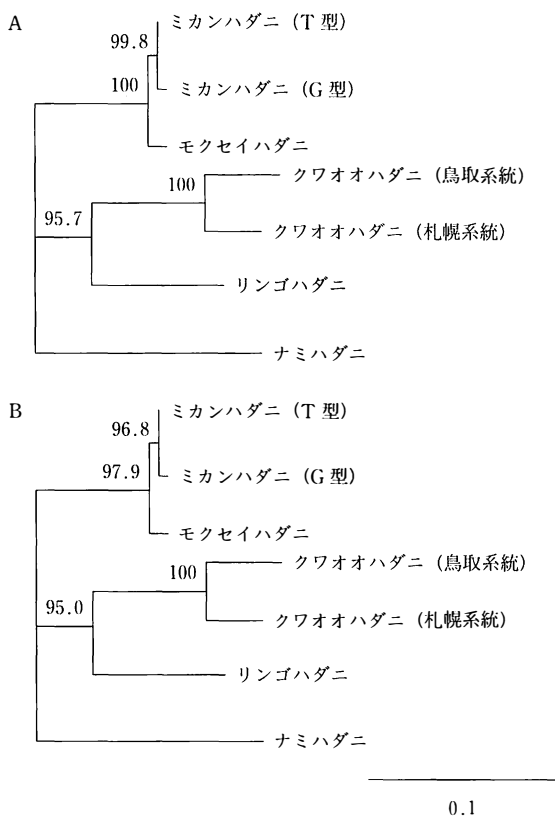


図-1 近隣結合法(A)および最尤法(B)により得られた *Panonychus* 属ハダニの CO I 分子系統樹
各枝の数字は、ブートストラップ確率(%)

ずれの組み合わせにおいても次世代に雄のみを出現させる (McGREGOR and NEWCOMER, 1928; TAKAFUJI and FUJIMOTO, 1985; 国本ら, 1991)。これら *Panonychus* 属ハダニは産雄単為生殖を行うことから、これら三者の間には明白な生殖的隔離が存在していることが分かる。これに対し、モクセイハダニとミカンハダニの交雑試験の結果、不妊ではあるものの両方向で次世代雌が出現した (OSAKABE and KOMAZAKI, 1996)。これらの結果は CO I 分子系統樹における遺伝的距離の近さを裏付けるものとして注目される。

前述のように、クワオオハダニはミカンハダニから別種として記載された種であり、また胴背毛および RFLP データからリングハダニとの類縁度は低いと考えられている。しかし、CO I の塩基配列データに基づく系統樹では、クワオオハダニはミカンハダニよりもむしろリングハダニに近縁であることが示唆された。さらに、クワオオハダニの二つの系統の遺伝的距離はミカンハダニとモクセイハダニの種間よりも大きいという興味深い結果も得られた。両系統には寄生性の違いや生殖隔

離も認められることから、将来分類学的な再検討がなされる可能性もあると考えられる。

今回推定された *Panonychus* 属ハダニ 4 種の系統関係は CO I という単一遺伝子の分子データによるものである。しかし、種の系統関係を知るためには、いくつかの遺伝子を解析し、その結果を総合的に評価することが必要である (長谷川・岸野, 1996)。筆者らはリボソーム DNA の ITS 2 領域を用いて同様の解析を行い、CO I と同様のトポロジーを得ている (TODA et al., 1999)。ただし、本領域は塩基置換率が著しく大きく、適当なアウトグループを設定することができなかったためルートを欠いた系統樹となっている。したがって、より精度の高い *Panonychus* 属ハダニの系統関係を推定するためには、これらとは別の適当な遺伝子を解析する必要があるだろう。

また、今回の解析には *Panonychus* 属ハダニ 6 種のうちニホンササハダニ、エルムハダニの 2 種が含まれていない。これら 2 種はともにリングハダニから別種記載されたものであるが、分子データから推定される系統関係が果たして形態に基づく分類学的位置付けを支持するのかどうかという大変興味深い問題が残されている。

II 果樹アザミウマ類の種判別法

1 研究の背景

アザミウマ類は野菜、花き、果樹などの農作物に甚大な被害をもたらす大害虫である。実際に作物を加害するアザミウマは 27 種を数え、うち果樹害虫とされているのは 11 種である (梅谷・工藤, 1988; 土屋ら, 1992)。これらは一部の種を除き、形態による識別は容易ではない。千脇ら (1994) は触覚の配色など実体顕微鏡下で識別可能な形質を用いた簡易な種判別法を考案した。しかし、雌成虫の判別が比較的容易であるのに対し、雄成虫では刺毛の位置関係など微細な構造を手がかりにする必要があり、難度は高いものとなる。さらに幼虫では MIYAZAKI and KUDO (1986) により 2 齢幼虫の検索表が報告されているものの、高度な判別技術を要し、また 1 齢幼虫は形態では判別できない。しかし、例えばミカンキイロアザミウマ (*Frankliniella occidentalis*) やミナミキイロアザミウマ (*Thrips palmi*) は多くの薬剤に対して感受性を低下させていることから、種により有効な薬剤が異なる場合があり、種を正確に判別し、より適切な薬剤散布を行う必要がある。これは必要以上の薬剤散布を防ぎ、環境負荷を低減することのみならず、さらなる薬剤抵抗性の発達を回避する意味でも重要である。さらに種を幼虫段階で判別することは適切かつ迅速な防除

対策を立てる上でも必要であり、また寄主範囲を調査する際にも有効である。

形態によらない種判別法としては、村井(1990)によりエステラーゼアイソザイムを利用する方法が報告されているが、筆者らはアイソザイムに比べサンプルの保存方法などが容易なDNAを利用した新たな種判別法の確立を目指した。

果樹害虫として知られていて、特に幼虫段階での判別が困難な8種、すなわちヒラズハナアザミウマ、ハナアザミウマ、ピワハナアザミウマ、キイロハナアザミウマ、ネギアザミウマ、ミナミキイロアザミウマ、ダイズウスイロアザミウマ、およびチャノキイロアザミウマ(梅谷・工藤, 1988)に加え、1990年代初めに我が国で初発生が確認されて以来、果樹害虫としての地位を固めつつあるミカンキイロアザミウマ(福田ら, 1991; 増井, 1998)を加えた合計9種について、DNAマーカーを用いた種の判別法を検討し、確立した(TODA and KOMAZAKI, 投稿中)。

種判別に利用した遺伝子はリボゾームRNAの2つのサブユニット(5.8Sおよび28S)をコードする領域に挟まれたInternal Transcribed Spacer 2(ITS2)である。この領域はアミノ酸非コード領域で、変異に富むことから、近縁種間の比較には適していると考えられる(HILLIS and DIXON, 1991)。上記9種アザミウマのITS2領域はTODA and KOMAZAKI(投稿中)により設計されたアザミウマに特異的なプライマーでPCR増幅可能である。個体単位に抽出したDNAを鋳型としたPCR増幅産物の断片長には種によって変異があった。しかし、一部の種を除いては電気泳動像から種を判別することは難しい。そこで、PCR増幅産物を制限酵素*Rsa*Iで消化する。*Rsa*Iの認識部位は種により特徴的であり、消化により得られたDNA断片の電気泳動像から全9種の判別が可能である(図-2)。得られたパターンには発育ステージや雌雄の別による変化は認められなかった。また、それぞれの種において調査した3~5地域個体群間で、ハナアザミウマを除く8種については変異は検出されなかった。ハナアザミウマでは二つの異なるRFLPパターンが検出されたが、いずれも他の8種のパターンとは異なり区別が可能であった。これらの結果は幼虫1頭からでも正確に9種のアザミウマを判別できることを意味している。

農作物あるいは花き類の輸入量増大に伴い、海外の難防除害虫の侵入の危険性も増大している。アザミウマ類においても、今現在我が国で未発生の種も数多く、中には*Scirtothrips citri*や*Frankliniella schultzei*のように

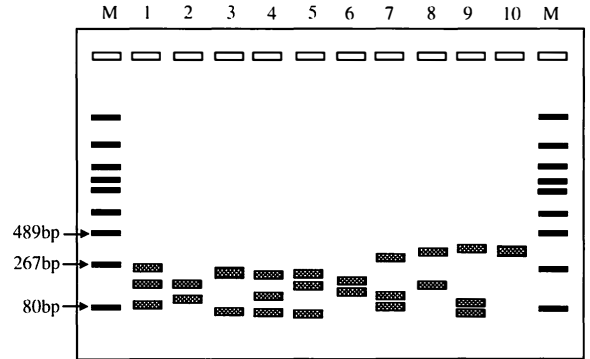


図-2 *Rsa*IによるITS2領域PCR産物のRFLPパターン

1:ミカンキイロアザミウマ 2:ヒラズハナアザミウマ 3:ハナアザミウマ(I型) 4:ハナアザミウマ(II型) 5:ピワハナアザミウマ 6:キイロハナアザミウマ 7:ネギアザミウマ 8:チャノキイロアザミウマ 9:ミナミキイロアザミウマ 10:ダイズウスイロアザミウマ M:pHYマーカー。

果樹害虫として重要であり、かつ各種殺虫剤への感受性を低下させている難防除種も含まれている(MORSE and BRAWNER, 1986; VIERBERGEN, 1995)。

最近ドイツにおいて農業害虫となっている数種アザミウマ類について、やはりリボゾームDNAのITS2領域を使った種判別が試みられている。その大部分は日本には分布していない種であるが、解析に用いられたアザミウマのITS2シーケンスはジーンバンクに登録されており、閲覧が可能である。塩基配列が分かれば制限酵素によるRFLPパターンも予測することができる。また逆に筆者らにより得られた9種アザミウマの塩基配列もジーンバンクに登録しており(AB063334-AB063343)、相互に利用することができる。このような分子生物学的手法はあくまで形態による種判別を抛り所として成り立っている技術であることはいうまでもない。しかし、豊富な経験と知識に基づく熟練を要する種判別技術を補う技術としては有効であり、植物検疫上でも非常に有意義であると考えられる。

おわりに

本稿では二つの異なる果樹害虫の分類群について行った遺伝子解析について紹介した。これらの研究の過程で、それぞれの解析において一部の種で種内変異が検出され、それらの情報をもとに、さらに新たな目的に向けた研究が展開されている。

まず、ミカンハダニで明らかとなったCO IのハプロタイプはPASA法により分子マーカーとして利用可能

であることが示された (TODA et al., 2001)。ミカンハダニの分子マーカーとしてエステラーゼアイソザイム (OSAKABE, 1991) やマイクロサテライト (OSAKABE et al., 2000) がすでに報告されている。これらを組み合わせることにより、抵抗性遺伝子の広がりや予測など、本種の個体群動態や構造の解明に役立つものと期待されている。

ハナアザミウマは形態の変異が大きな種であり、体色が異なるタイプ (淡色型および暗色型)、あるいは触覚の節数の異なるタイプ (7 節および 8 節) の存在が知られている (NAKAHARA, 1985; PALMER and WETTON, 1987)。筆者らはハナアザミウマで検出された種内変異について、さらに調査を進め、ITS 2 および CO 1 塩基配列により厳密には本種が 3 タイプに分かれることを明らかにしている (土田・駒崎, 2001)。これら三つのタイプ間の遺伝的交流の有無、あるいは遺伝子型と体色・触覚節数など表現型の異なるタイプとの関連の調査は現在進められているところである。これらの形質が関連づけられたとき、ハナアザミウマにおいても分類上の再検討の必要性が生じるかもしれない。

以上のような分子生物学的研究は、遺伝的に異なる種あるいは系統が混在している分類群の解明に貢献するであろう。またそれにより薬剤感受性や寄主特異性など、農業上重要な性質の異なるものが混在しているがゆえに効率性を欠いていた可能性のある防除法に、新たな方向性を提示することが期待される。

最後に、本稿の執筆にあたって有益なご助言をいただいた当研究所リング研究部刑部正博博士および同ブドウ・カキ研究部駒崎進吉博士に深謝する。

引用文献

- 1) 千脇健司ら (1994): 植物防疫 48: 521~523.
- 2) EIARA, S. and T. GOTOH (1991): Int. J. Acarol. 17: 9~12.
- 3) ——— (1992): Appl. Entomol. Zool. 27: 107~115.
- 4) ——— (1996): J. Acarol. Soc. Jpn. 5: 17~25.
- 5) 福田 寛ら (1991): 関東病虫研報 38: 231~233.
- 6) 長谷川政美・岸野洋久 (1992): 分子系統学, 岩波書店, 東京, 257 pp.
- 7) HILLIS D. M. and M. T. DIXON (1991): Quart. Rev. Biol. 66: 411~429.
- 8) 国本佳範ら (1991): 応動昆 35: 103~108.
- 9) 増井伸一 (1998): 植物防疫 52: 172~175.
- 10) MCGREGOR E. A. and E. J. NEWCOMER (1928): J. Agric. Res. 36: 157~181.
- 11) MIYAZAKI M. and I. KUDO (1986): AKITU 79: 1~26.
- 12) MORSE J. G. and O. L. BRAWNER (1986): J. Econ. Entomol. 79: 565~570.
- 13) 村井 保 (1990): 植物防疫 44: 229~232.
- 14) NAKAHARA S. (1985): Proc. Entomol. Soc. Wash. 87: 864~870.
- 15) NAVAJAS M. et al. (1992): Exp. Appl. Acarol. 15: 211~218.
- 16) OSAKABE Mh. (1991): Appl. Entomol. Zool. 26: 307~312.
- 17) ——— (1993): ibid. 28: 189~197.
- 18) 刑部正博・斎藤 裕 (1991): 果樹試報 21: 95~115.
- 19) OSAKABE Mh. and Y. SAKAGAMI (1994): Insect Mol. Biol. 3: 63~66.
- 20) ——— and S. KOMAZAKI (1996): Appl. Entomol. Zool. 31: 397~406.
- 21) ——— et al. (2000): Exp. Appl. Acarol. 24: 385~395.
- 22) PALMER J. M. and M. N. WETTON (1987): Bull. Ent. Res. 77: 397~406.
- 23) TAKAFUJI A. and H. FUJIMOTO (1985): Res. Popul. Ecol. 27: 361~372.
- 24) TODA S. et al. (1999): 4th International Symposium on Population Dynamics of Plant-Inhibiting Mites Abstracts: p. 27.
- 25) ——— et al. (2000): Exp. Appl. Acarol. 24: 821~829.
- 26) ——— et al. (2001): J. Acarol. Soc. Jpn. 10: 37~41.
- 27) 土田 聡・駒崎進吉 (2001): 応動昆大会講要 45: 69.
- 28) TODA S. and S. KOMAZAKI (投稿中).
- 29) 土屋雅利ら (1992): 植物防疫 46: 437.
- 30) 梅谷敏二・工藤 巖 (1988): 農作物のアザミウマ, 全国農村教育協会, 東京, 422 pp.
- 31) VIERBERGEN G. (1995): Thrips Biology and Management, Plenum Press, New York, pp. 119~132.

発行

日本植物防疫協会

作物病原菌研究技法の基礎

〈分離・培養・接種〉 大畑 貫一 他編

B5判 342頁 定価8,360円(本体7,962円+税) 送料340円

植物病理学の実験では病気の生態を熟知し、対象となる病気を思うように発病させることが重要です。本書は病原菌の分離・培養・保存・接種・発病調査法および薬剤の効果検定法を、第一線で活躍されている方々に執筆していただいた実験の手引書です。

ご購入は、直接本会「出版情報グループ」に申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい

(株)日本植物防疫協会 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11 Tel(03)3944-1561 Fax(03)3944-2103