

ワタアブラムシの種内分化を DNA 解析してわかったこと

(独)農研機構 果樹研究所 ^{こま}駒 ^{ざき}崎 ^{しん}進 ^{きち}吉

は じ め に

ワタアブラムシはワタ、野菜、果樹等の多くの作物を加害する世界的に分布する重要害虫である。1980 年代からは殺虫剤抵抗性の発達が問題となり、有機リン、カーバメート、合成ピレスロイドの各種薬剤に対する抵抗性が発達した。1990 年代に入って、ネオニコチノイド剤が使用されるようになり防除における大きな問題ではなくなったが、抵抗性の発達には注意をしておくことが必要である。また、施設内では寄生蜂や捕食性天敵、糸状菌の利用による生物的防除法の研究も進んでいる。寄主範囲は非常に広く 116 科 912 種にもおよび、寄主選好性、生活環型、薬剤感受性、植物ウイルスの伝搬性等に大きな種内変異が見られる。これらの形質の変異と、遺伝子に見られる変異にどのような関連があるかを調べ、本種の遺伝的な構造を明らかにすることが、正確な発生予察や、よりよい防除法の開発のために重要であると考えられる。また、本種の表現型の多様性はどのような進化的な要因でもたらされたのかを、遺伝的な変異という観点から探ることは、学問的にも興味深いものである。いまだその全貌は明らかになっていないが、これまでの研究の内容を以下に紹介する。

I リボゾームの ITS2 領域の変異と寄主選好性、生活環型、薬剤抵抗性の関連について (KOMAZAKI and TODA, 2008)

日本各地で採集して、実験室で飼育した 38 のクローンをを用いて、ナス、キュウリ、ウンシュウミカン、ニホンナシでの増殖率を指標にした寄生性、短日条件 (8L16D, 15°C) での両生世代の出現様式による生活環型、合成ピレスロイド (フェンプロパトリン)、有機リン剤 (フェニトロチオン)、カーバメート剤 (ピリミカール) に対する感受性と ITS2 領域の塩基配列を調べた。

寄生性については、ナス寄生性 16、キュウリ 11、ウンシュウミカン 12、ナシ 16、いずれでも増殖しないもの 3 であった。ナスとキュウリではそれぞれの一方にし

か寄生しないものが大半であったが 2 クローンは両方で増殖し、これらはナシでも増殖した。寄主植物の組合せではキュウリとウンシュウミカン 3、キュウリとナシ 5 (うち 2 はナスでも増殖) ナシとウンシュウミカン 7 (うち 2 はナスでも増殖)、ナスのみ 8、キュウリのみ 3、ナシのみ 2、ウンシュウミカンのみ 2 で、4 種すべてで増殖したものはなかった。この結果から、ナスとキュウリの寄生性により分かれるグループは存在したが、その他の寄主への選好性の強いクローンも存在し、ナスとキュウリに寄生できるクローンも存在することが明らかになった。

生活環型は完全生活環型 12 (うち 3 は無翅の親から両性型が産出されるタイプ)、不完全生活環型 14 (うち 4 は雄産出型)、中間型 6 クローンであった。残りの 6 クローンは生活環型の実験条件では飼育できなかったため生活環型は不明であった。

薬剤感受性は、フェニトロチオン抵抗性 3 (うち 2 はピリミカールにも抵抗性)、フェンプロパトリン抵抗性 9 (すべてピリミカールにも抵抗性)、ピリミカール抵抗性 24 (うちピリミカールのみ抵抗性 12)、いずれにも感受性 9 クローンであった。これら薬剤に対する抵抗性は交差している場合とそうでない場合があった。

ITS2 の塩基配列から得られた系統樹とこれらの結果を合わせると、系統樹の信頼度が全体に高くないことから不確実な部分が多かったが、アカネのクローンは遺伝的に特異であること、ムクゲのクローンはお互いに比較的近い関係にあること、キュウリまたはナスに寄生するクローンは違ったまとまりを形成すること、また、キュウリとナス両方に寄生できるクローンはお互いに比較的近縁でナスグループに近いことなどが推察された。

II ミトコンドリアの COI (チトクローム酸化酵素のサブユニット I) の塩基配列の種内変異と近縁種との比較 (KOMAZAKI et al., 2010)

ワタアブラムシと同属 (*Aphis*) のダイズアブラムシ、ユキヤナギアブラムシ、マメアブラムシ、マメクロアブラムシ、ギシギシアブラムシ、キョウチクトウアブラムシと近縁属 (*Toxoptera*) のハゼアブラムシ、外群として別族 (*Macrosiphini*) のエンドウヒゲナガアブラムシとモモアカアブラムシの COI の塩基配列を読んで比較

Intra-Specific Variation of *Aphis gossypii* Inferred from DNA Analysis. By Shinkichi KOMAZAKI

(キーワード: リボゾームの ITS2 領域, ミトコンドリアの COI 領域, マイクロサテライト)

し系統樹を作成した。その結果は図-1 に示したように、*Aphis* 属の中ではユキヤナギアブラムシが始めに分岐し、次にマメアブラムシで、その他は別のグループを形成した。ワタアブラムシとダイズアブラムシ、ギシギシアブラムシとマメクロアブラムシは近縁関係にあった。また、ハゼアブラムシもこのグループ内に位置し、ほかの *Toxoptera* 属の種での研究でも同様の結果が得られており、*Toxoptera* 属の分類的な位置については再考が必要であろう。各々の種の纏まりははっきりしており、COI の遺伝子を用いた種の判別は可能であることも示された。ユキヤナギアブラムシに見られる二つの系統(駒崎, 1988) は、この結果では明瞭に分かれなかった。

塩基の変異性はダイズアブラムシとキョウチクトウアブラムシでは小さく、マメアブラムシとマメクロアブラムシでは大きくなり、ワタアブラムシの塩基配列の変異性とハプロタイプの変異性は、ここで調べたほかの種に比べて特に大きいということはなく、COI の塩基配列にはワタアブラムシの多様性は反映されていないという

結果になった(表-1)。

ワタアブラムシに見られた七つのハプロタイプは、表-2 に示した寄主から採集されたもので、ハプロタイプ 1 は多様な寄主植物から採集された。

ワタアブラムシについて、塩基配列のデータベース検索を行い、COI のバーコード領域を用いて種内の系統関係を検討した結果、日本で見られた七つのハプロタイプのうち、ツルクサに寄生していたハプロタイプは、ヨーロッパの *Aphis frangulae* に次いで、ほかのハプロタイプとは離れた位置にあった(図-2)。アカネの個体はこれに比べてよりほかのサンプルとの距離は近いものであった。

ITS2 や COI といった領域の変異とワタアブラムシの多様な表現型の変異とは、一部では関連が認められたものの、明瞭な関連は見いだせなかった。これらの領域から得られる系統関係と表現型の多様性とは関連していなかったことになる。したがって、寄生性、薬剤抵抗性、生活環型については、それぞれに直接関連する遺伝子の

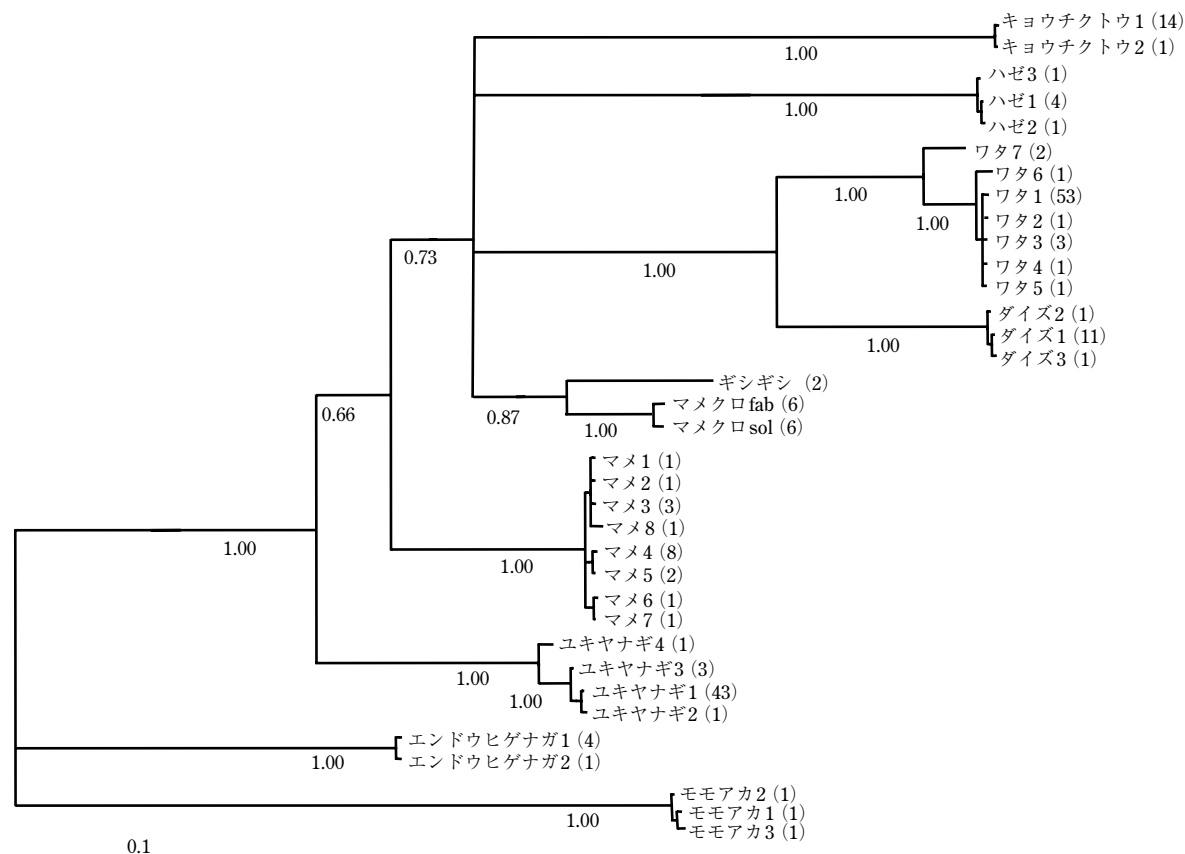


図-1 COI の塩基配列による Bayes 法による系統樹
括弧内の数字は個体数 (KOMAZAKI et al., 2010 より改変)。

表-1 *Aphis* 属の塩基とハプロタイプの変異度

種名	個体数	塩基の変異度 <i>Pi</i> (SD)	ハプロ タイプ数	ハプロタイプの変異度 <i>Hd</i> (SD)
ワタアブラムシ	60	0.00149 (0.00081)	7	0.277 (0.076)
ダイズアブラムシ	13	0.00020 (0.00011)	3	0.295 (0.156)
ユキヤナギアブラムシ	48	0.00081 (0.00053)	4	0.197 (0.075)
マメアブラムシ	18	0.00217 (0.00031)	8	0.791 (0.087)
マメクロアブラムシ	12	0.00244 (0.00028)	2	0.545 (0.062)
キョウチクトウアブラムシ	15	0.00009 (0.00007)	2	0.133 (0.112)

KOMAZAKI et al., 2010 より改変。

表-2 ワタアブラムシのハプロタイプごとの寄主植物 (括弧の中は個体数)

ハプロタイプ	寄主植物
Agos1	カンキツ (7), ナシ (13), カキ (2), ブドウ (2), イチゴ (4), ジャガイモ (2), ナス (3), トマト (1), キュウリ (4), メロン (1), キク (1), ムクゲ (2), ハイビスカス (3), ナズナ (2), ホトケノザ (1), イヌノフグリ (1), ヤブガラシ (1), マサキ (1)
Agos2	ウンシュウミカン (1)
Agos3	キク (2), 不明 (1)
Agos4	ツルウメモドキ (1)
Agos5	ナズナ (1)
Agos6	アカネ (1)
Agos7	ツユクサ (2)

KOMAZAKI et al., 2010 より改変。

変異を調べる必要があると考えられた。そこで、薬剤抵抗性関連遺伝子の変異を調べた結果、アセチルコリンエステラーゼ遺伝子と神経軸索のナトリウムチャンネル遺伝子に起こった点突然変異が、薬剤抵抗性と関連することが明らかになった (Toda et al., 2004; 土田・駒崎, 2007)。寄生性は、薬剤抵抗性とは異なり、単一遺伝子で決定されているものではないと考えられる。昆虫では、いくつかの遺伝子領域や共生微生物の存在との関連が研究され、1 から数個の少数の遺伝子の関連が報告されている。寄生性に関連して、解毒酵素の発現誘導、植物の防御物質に対する反応等の研究成果が蓄積されつつあるので、それらの成果を利用した解析も必要であろう。寄生性を同じくする個体・クローンは系統的にまとまりのあるグループとして存在しているのかも検討課題であると考えられる。

本種のように寄主範囲の広いアブラムシについては、すでに示したように、すべての個体が広い寄主範囲を持つ *generalist* ではなく、いろいろな寄主植物に特化した *specialist* の系統も存在していることが考えられる。果

樹園でのワタアブラムシの個体群の遺伝構成はどのようになっているのかを明らかにするため、次にマイクロサテライト (あるいは SSR: Simple Sequence Repeats) マーカーを用いて園場での個体群の遺伝子構造の変化を解析した。マイクロサテライトは遺伝子の反復配列部分の反復回数によるサイズの違いから遺伝子座の対立遺伝子を検出する方法であり、遺伝子型の違いを個体単位で検出でき、分子生態学的な研究に多数応用されている。

III 日本の果樹園で発生する個体群の遺伝的構造について (KOMAZAKI et al., 2011)

愛媛 (ウンシュウミカンとナシ)、鳥取 (ナシで 2 年間)、長崎 (ウンシュウミカン) の三つの地点で果樹園からワタアブラムシの発生時期の 5 ~ 6 月に 3 ~ 5 回のサンプリングを行った。事前にくいつかのコロニーの全個体を調べて、それぞれのコロニーの個体は同じ遺伝子型で構成されていることを確かめたうえで、各回に原則として 30 コロニーからそれぞれ 1 個体を抽出して、七つのマイクロサテライト領域のサイズを測定して遺伝子型を調べた。全体では 500 個体の調査から合計で 89 の遺伝子型が見られた。

各調査時における遺伝子型頻度を用いた多様性指数は、ナシ園場では変動して一定の傾向にはならなかったが、ウンシュウミカン園場では徐々に減少した (表-3)。ナシでは少数の継続して増殖する遺伝子型と、おそらく園場外からの侵入により新たに加入した遺伝子型の混在により多様度が変動したのに対して、ウンシュウミカンでは新たな遺伝子型の侵入は見られるが、そのような遺伝子型は継続して増殖せずに、ミカンに適合した型が選択されて増殖する効果が大きいためではないかと考えられた。これらの果樹園での多様度はこれまでに調べられた北アフリカ、ヨーロッパ、東南アジアの個体群と比較して、かなり大きかったことから、日本の個体群の持つ多様な生活環が、個体群の多様性を高めていることが推

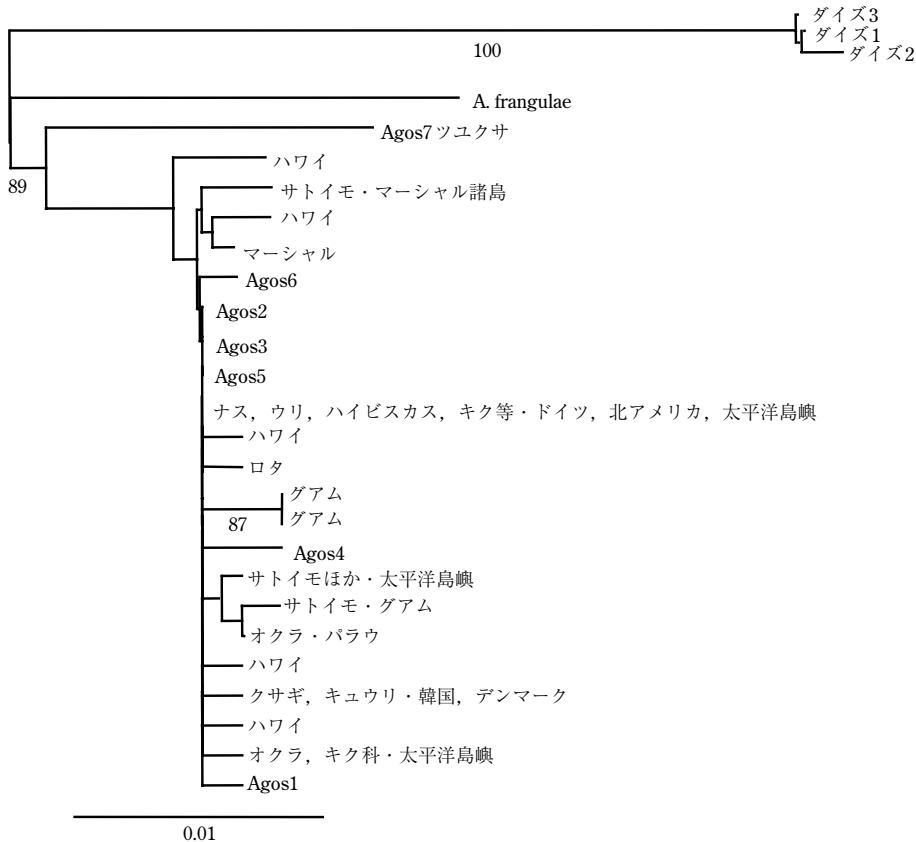


図-2 ワタアブラムシの COI バーコード領域を用いた系統樹 (NJ 法)
(KOMAZAKI et al., 2010 より改変).

表-3 ワタアブラムシの各サンプリング時の遺伝子型の
Shannon-Wiener の多様度

個体群	サンプル回数				
	1 回	2 回	3 回	4 回	5 回
ナシ・鳥取 2003	2.480	2.819	1.974		
ナシ・愛媛 2003	0.970	2.137	1.139	1.568	2.128
ナシ・鳥取 2001	1.518	1.947	1.276		
ミカン・愛媛 2003	2.554	2.056	1.186		
ミカン・長崎 2003	1.756	1.400	1.165		

KOMAZAKI et al., 2011 より改変.

測された。

これらの遺伝子型のほぼ半数は 1 回しか観測されないものであり、残りは 2 回以上のサンプリング標本に現れ、六つの遺伝子型は 20 サンプル以上に現れた。そのうち 15 遺伝子型は違った地域や年、違った果樹園で出現した (表-4)。これらの個体は同じ時期に違った場所で出現していること、違った年次に同じ場所で出現して

いること、また、完全生活環型の遺伝子型は毎年 1 回交雑により組みかえられてしまうことから、これらの遺伝子型を持つ系統は不完全生活環型であると推察された。これらのうちには薬剤抵抗性遺伝子をもつものとそうでないものが見られた。

ナシの個体群には、鳥取の圃場で年を超えて存続する遺伝子型 (この内 a, b, c は愛媛でも出現した) と同じときに鳥取と愛媛のナシ圃場で見られた遺伝子型 (g, m, n, a, b, c), 愛媛でナシとウンシュウミカン圃場で見られた型 (i, j, l), 鳥取または愛媛のナシ圃場と長崎のウンシュウミカンで見られた型 (h, k, o) があった。これらのことからナシに寄生する不完全生活環型の生活史を持つ適応度の高いクローンの存在が示唆され、これらのうちには薬剤抵抗性関連遺伝子を持っているものがあつた。また、I 章で行った寄生性に関する研究と同様に、ナシとウンシュウミカンに寄生する遺伝子型も見られ、これも不完全生活環型を持つと考えられた。また、鳥取のナシ圃場の近くのスイカ畑から採集したコ

表-4 違った個体群に出現したワタアブラムシの遺伝子型

遺伝子型	合成ピレ スロイド <i>Super-kdr</i>	ピリマー <i>Ace2</i>	出現回数	寄主・地域・年 (個体数)
ナシで年次を超えて出現した遺伝子型				
a	S	R	43	ナシ・鳥取 2001 (1), ナシ・鳥取 2003 (7), ナシ・愛媛 2003 (35)
b	R	R	43	ナシ・鳥取 2001 (8), ナシ・鳥取 2003 (1), ナシ・愛媛 2003 (34)
c	S	R	7	ナシ・鳥取 2001 (2), ナシ・鳥取 2003, ナシ・愛媛 2003 (4)
d	S	R	15	ナシ・鳥取 2001 (2), ナシ・鳥取 2003 (13)
e	S	R	3	ナシ・鳥取 2001 (1), ナシ・鳥取 2003 (2)
f	S	R	2	ナシ・鳥取 2001 (1), ナシ・鳥取 2003 (1)
地域や寄主を超えて出現した遺伝子型 (2003)				
g	R	R	52	ナシ・鳥取 2003 (12), ナシ・愛媛 2003 (40)
h	S	S	11	ナシ・鳥取 2003 (4), ミカン・長崎 2003 (7)
i	S	S	9	ナシ・鳥取 2003 (1), ナシ・愛媛 2003 (1), ミカン・愛媛 2003 (7)
j	S	R	26	ナシ・愛媛 2003 (3), ミカン・愛媛 2003 (23)
k	S	S	21	ナシ・愛媛 2003 (1), ミカン・長崎 2003 (20)
l	S	R	4	ナシ・愛媛 2003 (3), ミカン・愛媛 2003 (1)
m	R	R	4	ナシ・鳥取 2003 (3), ナシ・愛媛 2003 (1)
n	S	S	3	ナシ・鳥取 2003 (1), ナシ・愛媛 2003 (2)
o	R	R	2	ナシ・愛媛 2003 (1), ミカン・長崎 2003 (1)

R と S はそれぞれ抵抗性と感受性を示す。対立遺伝子のいずれかが抵抗性のものを R とした。

KOMAZAKI et al., 2011 より改変。

ロニーの遺伝構成は単純で一つの遺伝子型から構成されており、ほかの圃場では見られない遺伝子型であり、海外で報告されているウリ科に寄生する遺伝子型とも異なっていた。

各遺伝子型の個体がどのようにグループ分けできるかを、STRUCTURE というプログラムを用いて解析した (図-3)。観測された遺伝子型がいくつかの遺伝的に違ったまとまり (クラスター) から構成されているかと、各遺伝子型がそれぞれのクラスターの遺伝子をどのくらい受け継いでいるかを推定するためのプログラムである。解析した結果、各遺伝子型は八つのクラスター (A~H) に分かれ、三つのグループ (グループ 1~3) が 10 回の試行で常に現れた遺伝的にまとまりのあるグループであった。その他の遺伝子型はそれぞれのクラスターの混合となり、混合割合も不安定であったので、これらの遺伝子型についてはその由来や構成は不明であった。安定的に現れた三つのグループのうち二つ (グループ 1 と 2) は鳥取のナシ 2003 と愛媛のミカン 2003 にのみそれぞれ現れた遺伝子型で、地域と寄主に特化した地域個体群の存在が予測された。残りの一つ (グループ 3) は愛媛と鳥取の、ミカンとナシに見られた遺伝子型で構成されており、そのうち一つの遺伝子型 (i) は、ナシで愛媛と鳥取で、愛媛のミカンでも現れた遺伝子型であった。こ

のグループはナシとミカンで共通に見られる遺伝子型の存在を示していると考えられた。

同じ圃場の連続したサンプル間の遺伝的な構成に有意な違いが見られなかったので、同じ圃場での同じ年の連続したサンプリングを個体群の遺伝的変異を解析する単位とした。この単位を用いて解析すると 2003 年の個体群ではすべてヘテロ接合度が有意に少なく、2001 年のサンプルでは、任意交配との違いは見られなかった。農業上重要なアブラムシのいくつかの種では、完全生活型におけるヘテロ接合度の減少と不完全生活型でのヘテロ接合度の増加が関連づけられていることから、これらの個体群では不完全生活型のほかに完全生活型の存在も推定される。

この研究ではいくつかの遺伝子型は多数回にわたりサンプリングされたが、それぞれの果樹園では、アフリカのワタ畑に見られたようなスーパークロニックな、長年にわたり常に優先する遺伝子型は存在しなかった。このことは我が国におけるワタアブラムシの遺伝的な多様さと、果樹園を含む農業の規模が比較的小さく、農業環境が多様であること両方と関連するのであろう。また、完全生活型の存在が、毎年交雑による新たな遺伝子型を生み出すことによって多様性を高めていることは間違いないが、春から夏の間繰り返される単為生殖によっ

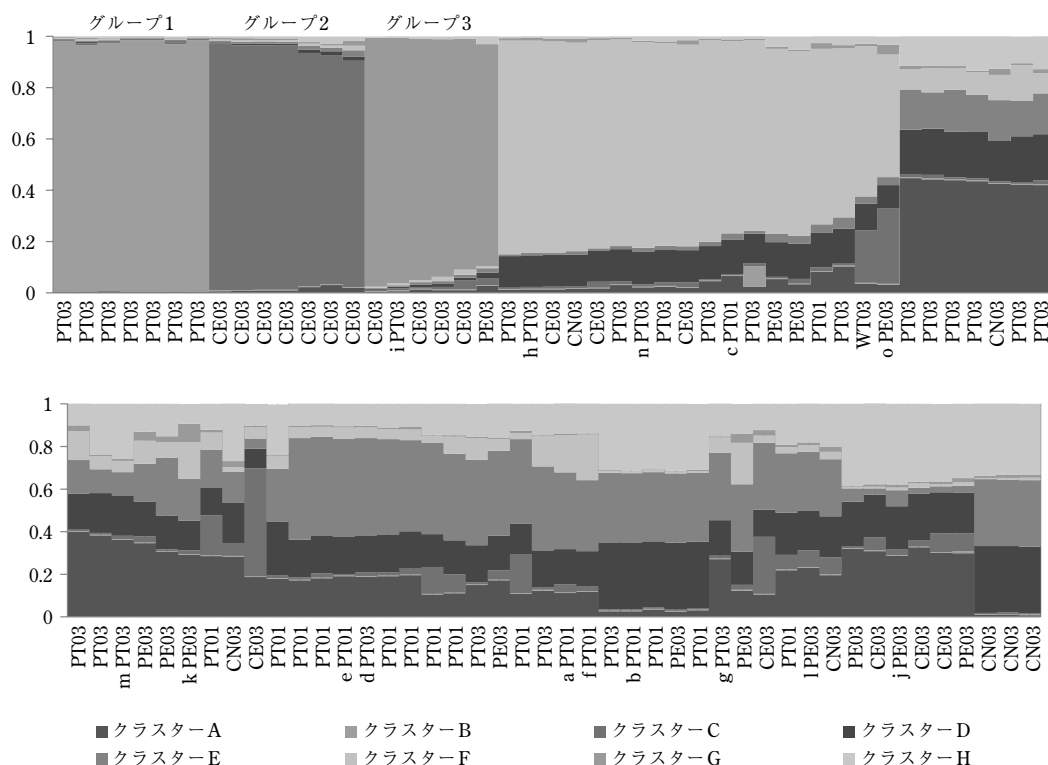


図-3 STRUCTURE での解析結果

P: ナシ, C: ウンシュウミカン, W: スイカ, T: 鳥取, E: 愛媛.

アルファベットの小文字は表-4 の遺伝子型.

(KOMAZAKI et al., 2011 より改変).

て、これらの遺伝子型が、各種の環境で淘汰されていく過程によって、遺伝子型の存続と消失がコントロールされているものと考えられる。この過程を明瞭に示すにはさらなる研究が必要であろう。

引用文献

- 1) 駒崎進吉 (1988): 植物防疫 42: 24 ~ 29.

- 2) KOMAZAKI, S. and S. TODA (2008): Ann. Entomol. Soc. Am. 101: 565 ~ 572.
 3) ——— et al. (2010): ibid. 103: 916 ~ 924.
 4) ——— et al. (2011): Entomol. Exp. Appl. 140: 171 ~ 179.
 5) TODA, S. et al. (2004): Insect Mol. Biol. 13: 549 ~ 553.
 6) 土田 聡・駒崎進吉 (2007): 応動昆虫中国支会報 49: 7 ~ 12.

(新しく登録された農業 17 ページからの続き)

- メタミトロン水和剤 ※処方変更
 22999: ハーブラック WDG (マクテシム・アガン・ジャパン) 11/11/30
 メタミトロン: 70.0%
 てんさい (移植栽培): 一年生広葉雑草
 てんさい (直播栽培): 一年生広葉雑草
- ジメテナミド P・ペンディメタリン乳剤 ※新混合剤
 23000: モーティブ乳剤 (BASF ジャパン) 11/11/30
 ジメテナミド P: 19.7%, ペンディメタリン: 23.1%
 とうもろこし: 一年生雑草
 飼料用とうもろこし: 一年生雑草
- イマゾスルフロン・ピリミノバックメチル・プロモブチド 粒剤 ※新混合剤
 23001: オサキニ 1 キロ粒剤 (住友化学) 11/11/30

イマゾスルフロン: 0.90%, ピリミノバックメチル: 0.60%, プロモブチド: 9.0%

直播水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ, ヒルムシロ, セリ

- グルホシネート P ナトリウム塩液剤 ※新製剤
 23003: クサキール ZERO シャワー (北興産業) 11/11/30
 グルホシネート P ナトリウム塩: 0.15%

樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, のり面, 鉄道等): 一年生雑草, 多年生雑草

- フルルプリミドール粒剤 ※新製剤
 23004: のびない君 (日本農薬) 11/11/30
 フルルプリミドール: 0.50%
 樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, のり面等): 雑草の伸長抑制, 一年生雑草, 多年生広葉雑草