

量的シーケンシングを用いたカブリダニの種構成推定法

岡山大学資源植物科学研究所 その 園 だ 田 しょう 昌 じ 司

はじめに

ハダニは果樹栽培における難防除害虫である。岡山県のモモ圃場では、クワオオハダニ *Panonychus mori* とミカンハダニ *P. citri* が最も重要なハダニとされてきた(藤本・平松, 1995)。クワオオハダニは殺ダニ剤に対する感受性が高いが、ミカンハダニのいくつかの系統はヘキシチアゾクスや酸化フェンブタチンに対して高いレベルの抵抗性を示すことが報告されてきた(藤本・平松, 1995)。これまで岡山県のモモ圃場において、*Tetranychus* に属するハダニの報告はなかったが、筆者らによる2008年からの調査では、カンザワハダニ *Tetranychus kanzawai* の発生が少なからず認められた。カンザワハダニは様々な殺ダニ剤に対し、高いレベルの抵抗性を示すことが報告されており(刑部, 1968; KUWAHARA et al., 1982; KUWAHARA, 1982; 1984; MIZUTANI et al., 1988; GOKA, 1998; Aiki et al., 2005), 今後の発生量に注意する必要がある。

これまでハダニ防除は殺ダニ剤を中心として行われてきた。しかしながら、殺ダニ剤への過度の依存により、様々な農作物で抵抗性の発達が問題となっている。ハダニの潜在的な生物学的抑制因子とみなされてきたカブリダニは、一般に、殺虫剤に対する感受性が高いが(真梶・足立, 1978), ケナガカブリダニ *Neoseiulus womersleyi* では合成ピレスロイド剤などの殺虫剤に抵抗性を発達させた系統が報告されている(MOCHIZUKI, 1994; FUNAYAMA, 2010)。また、生物学的防除資材として市販されているミヤコカブリダニ *Neoseiulus californicus* でも殺虫剤に対する耐性の高い系統が知られている(AMANO et al., 2004)。今後ハダニ防除において、カブリダニの有効利用を進め、殺ダニ剤への過度の依存を避けるためには、カブリダニの種構成に関する情報が重要である。

日本では90種のカブリダニが知られている(江原・後藤, 2009)。カブリダニの種構成を明らかにするためには発生種の同定作業が必要である。カブリダニを形態学的な特徴に基づいて同定するためには、スライド標本

を作り、雌成虫体内の受精のうや胴背毛を観察することが必要であるが、この作業は手間がかかるのに加え、サンプルの状態やカブリダニの性、発育段階によっては同定できないことがある。ミトコンドリア DNA やリボゾーム DNA 等の塩基配列情報はカブリダニの同定に有用であるが(NAVJAS et al., 1999; JEYAPRAKASH and HOY, 2002), 個体ごとの塩基配列決定や PCR-RFLP といった手法は野外で採集された多量のサンプルの種構成を調べる場合には不適である。そのため、カブリダニの種構成を推定するための新たな技術の開発が求められていた。量的シーケンシングは、ヒトの遺伝病(DASGUPTA et al., 2003; ROLLINSON et al., 2004) や殺虫剤抵抗性(KWON et al., 2008) にかかわる一塩基多型の頻度を調べる手法として広く用いられてきた。本稿では、量的シーケンシングを用いたカブリダニの種構成推定法について紹介する。また、本手法を用いて岡山県のモモ圃場においてカブリダニの調査を行った結果についても報告する。

本文に先立ち、本研究にご協力いただいた日本典秀博士(農研機構・中央農業研究センター)、豊島真吾博士(農研機構・野菜茶業研究所)、岸本英成博士(農研機構・果樹研究所)に心より感謝の意を表したい。

I 岡山県のモモ圃場に生息するカブリダニの予備的調査

種構成推定法の開発にあたってまず、岡山県のモモ圃場に生息する主なカブリダニ種について知る必要があった。そこで、複数のモモ圃場において採集されたカブリダニの一部を豊島博士に依頼して同定していただいた。その結果、岡山県のモモ圃場に生息する主なカブリダニは、ミヤコカブリダニ、コウズケカブリダニ *Euseius sojaensis*, ニセラーゴカブリダニ *Amblyseius eharai*, ケナガカブリダニ, ミチノクカブリダニ *Amblyseius tsugawai* の5種であることが明らかとなった。そこで、種構成推定法はこれら5種を対象として開発することとした。

II カブリダニのリボゾーム DNA の塩基配列

日本博士よりカブリダニの28SリボゾームDNAの塩基配列および同定に有用な領域を増幅するためのプライマー情報を提供していただいた(rD43: 5'-gacccgctgaacttaagcat-3'; rD13 dp: 5'-cgtgttcaagacgggtcaataact-

Method to Estimate Phytoseiid Mite Species Composition using Quantitative Sequencing. By Shoji SONODA

(キーワード: モモ圃場, カブリダニ, ハダニ, 種構成, 量的シーケンシング)

3')。岡山県のモモ圃場で採集された5種のカブリダニのゲノムDNAを鋳型として、rD43とrD13 dpを用いたPCRを行った。増幅された728塩基対のPCR産物をクローニングし、塩基配列を決定した。5種のカブリダニのリボゾームDNAの塩基配列をClustalW (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)を用いて比較し、それぞれの種ごとに塩基配列が他の4種とは異なる部位(種特異的塩基配列部位)を探索した。種構成推定に必須の作業であるダイレクトシーケンシングにおける利便性(1回の分析ですべての部位を解析できることが望ましい)を考え、492番目、624番目、652番目、662番目、705番目の塩基をそれぞれ、ミヤコカブリダニ、ニセラーゴカブリダニ、ミチノクカブリダニ、コウズケカブリダニ、ケナガカブリダニの種特異的塩基配列部位とした。

III 種構成推定の手順

本手法で推定される種構成は各カブリダニの生物量(DNA量)を反映したものであり、個体数を反映したものではないことをあらかじめ断っておく。DNAの抽出法やPCRの条件等の詳細についてはSONODA et al. (2012)を参照していただきたい。以下におおまかな手順について記す。

(1) 野外で採集されたカブリダニよりゲノムDNAを抽出し、rD43とrD13 dpを用いてPCRを行う。

(2) PCR産物のダイレクトシーケンシングをプライマー(rD25: 5'-gggaaagttaaagaactc-3')を用いて行う。rD25の塩基配列は5種で完全に保存されており、最初の種特異的塩基配列部位(492番目の塩基)から

150塩基対以上離れた上流域に位置する。

(3) 図-1にダイレクトシーケンシングの結果を例示した。ミヤコカブリダニとコウズケカブリダニの種特異的塩基配列部位において二つのピークが、その他の3種の部位では単独のピークのみが検出されている。このことは、この解析に用いたカブリダニサンプルにはミヤコカブリダニとコウズケカブリダニが含まれていたことを意味する。この場合、ミヤコカブリダニとコウズケカブリダニのたまかな割合は以下の計算式により推定される。種特異的塩基配列部位におけるピークはPhotoshop CS3 ver. 10.0.1 (Adobe)を用いて計測した。

ミヤコカブリダニの割合 = ミヤコカブリダニのピークの数値 ÷ (ミヤコカブリダニのピークの数値 + ミヤコカブリダニ以外の種のピークの数値)

コウズケカブリダニの割合 = コウズケカブリダニのピークの数値 ÷ (コウズケカブリダニのピークの数値 + コウズケカブリダニ以外の種のピークの数値)

しかしながら、それぞれの種特異的塩基配列部位におけるピークは異なる蛍光色素でラベルされたジデオキシスクレオチドターミネーターの取り込み効率の違いなどの影響を受けると予想される。そのため、上記計算式で得られた割合(実測値)の補正が必要となる。

IV 実測値の補正

それぞれの種のリボゾームDNA断片が組み込まれたプラスミドを鋳型として、rD43とrD13 dpを用いた

ミヤコカブリダニ

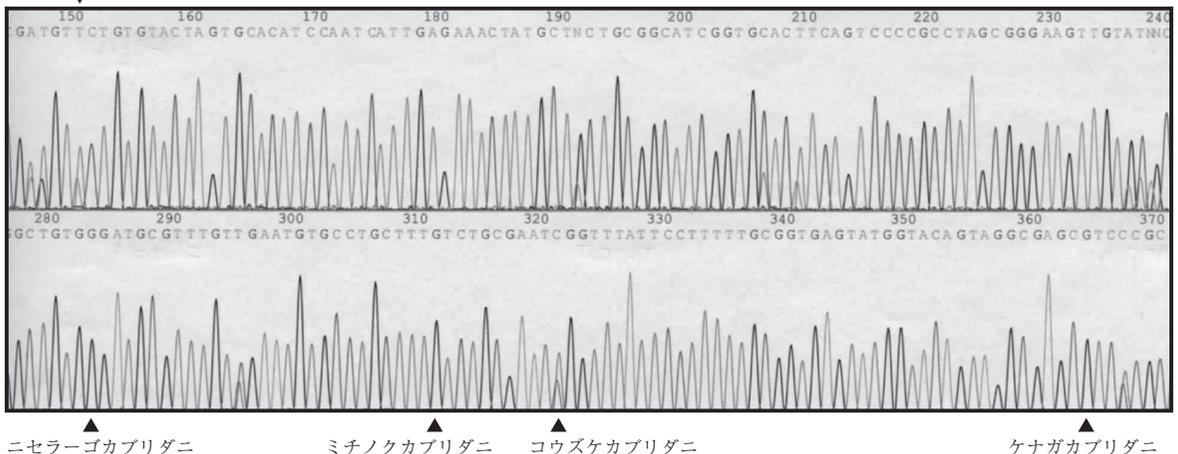


図-1 カブリダニサンプルより増幅されたPCR産物のダイレクトシーケンシングにおける種特異的塩基配列部位

PCRを行った。PCR産物はQIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc.) を用いて精製した。ある1種のPCR産物を他の4種の産物と1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1となるように混合し、標準サンプルとした。rD25を用いて標準サンプルのダイレクトシーケンシングを行った。

二つのピークが出現する種特異的塩基配列部位において算出された実測値を、予想値に対してプロットし、SIGMA plot ver. 11.2 (Systat Software Inc.) を用いて直線および二次元回帰式を求めた。得られた重相関係数(r^2)はそれぞれ、0.9870～0.9987, 0.9882～0.9988であった。後者の値が高かったため、実測値の補正には二次元回帰式を用いることとした。それぞれの種の二次元回帰式は以下のとおりである。

$$\begin{aligned} \text{コウズケカブリダニ} & y = 0.1 + 103.7x - 4.2x^2 \\ \text{ニセラーゴカブリダニ} & y = 4.3 + 103.8x - 10.8x^2 \\ \text{ミヤコカブリダニ} & y = 1.5 + 97.6x - 0.6x^2 \\ \text{ケナガカブリダニ} & y = 3.1 + 84.2x + 10.7x^2 \\ \text{ミチノクカブリダニ} & y = 3.7 + 83.4x + 10.4x^2 \end{aligned}$$

種ごとに算出された補正值の合計は100%とはならない。そのためデータとして公表する際には合計が100%となるように再度補正を加えた。目視による実測値が0もしくは1.0の場合は、上記の回帰式にあてはめることなく、0%もしくは100%として扱った。

V 種構成推定法の検証

本手法の有効性を検証するために、既知の濃度のミヤコカブリダニとケナガカブリダニのゲノムDNAを1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1で混合して、試験に供した。期待される割合、50%:50%, 33.3%:66.7%, 20%:80%, 66.7%:33.3%, 80%:20%に対し、推定された割合は50.9%:49.1%, 34.8%:65.2%, 20.3%:79.7%, 69.6%:30.4%, 79.4%:20.6%であった。以上の結果は、本手法によりカブリダニの種構成が一定の信頼性をもって推定できることを示唆している。

VI 岡山県のモモ圃場におけるカブリダニの種構成の推定

本手法を用いて、防除圧の異なる11のモモ圃場におけるカブリダニの種構成を調査した。各調査圃場の場所、使用された殺虫・殺ダニ剤の散布回数と成分数、面積を表-1に示した。圃場Aと圃場Bは赤磐市の岡山県農業総合センター内の実験圃場である。その他の圃場は赤磐市もしくは倉敷市の一般圃場である。圃場Bは無防除圃場である。圃場Iと圃場IVはそれぞれ、JAS認

表-1 調査モモ圃場の殺虫・殺ダニ剤散布と面積

場所	圃場名	散布回数 (成分数)	面積 (m ²)
赤磐1	圃場A	3 (4)	308
	圃場B	0 (0)	420
赤磐2	圃場1	3 (3)	420
	圃場2	10 (14)	810
	圃場3	3 (3)	987
倉敷	圃場I	0 (0)	2,440
	圃場II	6 (7)	4,000
	圃場III	10 (11)	400
	圃場IV	4 (4)	2,900
	圃場V	13 (14)	1,400
	圃場VI	10 (14)	1,500

定有機栽培圃場、岡山県認定特別栽培圃場である。圃場Aと圃場Bでは除草剤バスタ液剤、圃場IIIでは除草剤ブリグロックスLが使用された。その他の圃場では乗草刈機による除草が行われた。

各圃場において調査木として5樹を設定し、1樹あたり20葉(赤磐市の5圃場における最初の3回、倉敷市の6圃場における最初の4回の調査は10葉)、合計100葉(赤磐市の5圃場における最初の3回、倉敷市の6圃場における最初の4回の調査は50葉)を採取した。葉上のハダニとカブリダニはハダニ払い落とし器(大起理化学工業株式会社)を用いて回収した。カブリダニを性や発育ステージにかかわらずに計数し、DNA抽出に供した。調査は2010年5月から2010年10月まで、赤磐市の5圃場と倉敷市の6圃場を2週間ごと周期を違えて行った。

本手法によって推定されたカブリダニの種構成を図-2に示した。赤磐1では初夏にコウズケカブリダニの割合が高かったが、秋にはニセラーゴカブリダニが高い割合で捕獲されるようになった。赤磐2の圃場1と圃場3では、8月初旬にミヤコカブリダニ、ニセラーゴカブリダニ、コウズケカブリダニが捕獲されたが、10月にはニセラーゴカブリダニのみが捕獲された。倉敷の有機栽培圃場(圃場I)では夏の間コウズケカブリダニの割合が高かった。圃場Vでは夏から秋にかけてニセラーゴカブリダニの割合が高くなった。圃場IIと圃場IIIでは9月上旬にミヤコカブリダニの割合が高くなった。圃場IVでは9月上旬にニセラーゴカブリダニ、コウズケカブリダニ、ミヤコカブリダニが捕獲されたが、10月にはニセラーゴカブリダニのみ捕獲された。圃場VIでは常にミヤコカブリダニが優占種であった。

本研究により、①岡山県のモモ圃場におけるカブリダ

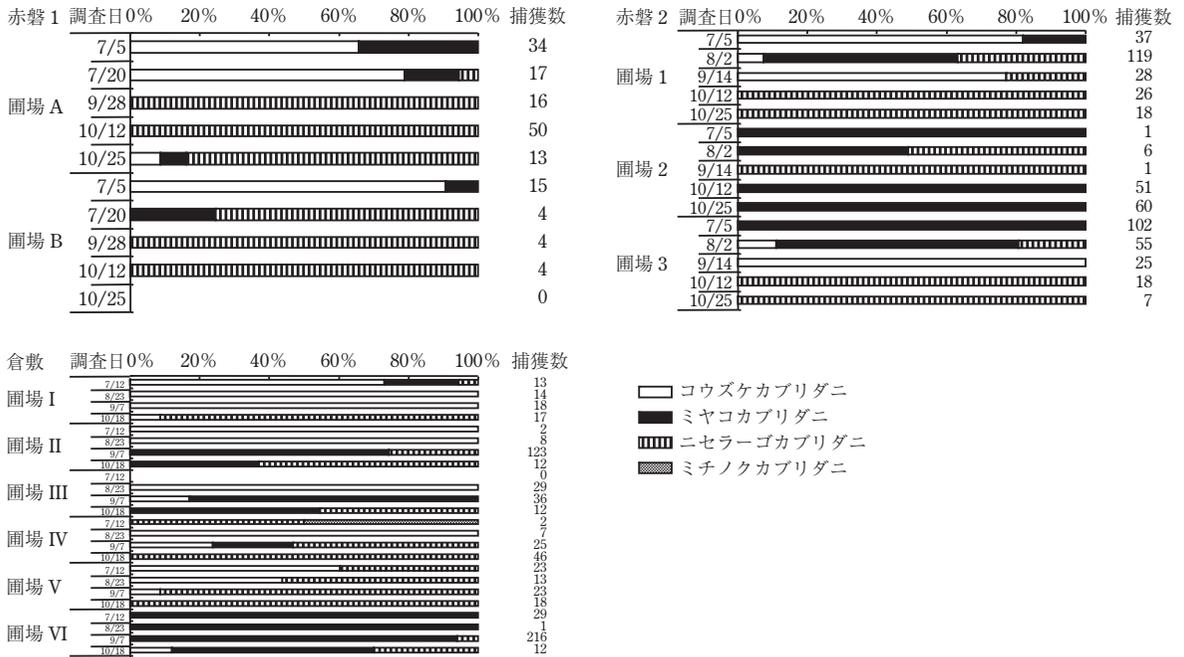


図-2 防除圧の異なる岡山県のモモ圃場におけるカブリダニの種構成

ニの種構成は季節によって変化すること、②カブリダニの種構成は圃場間で異なることが示された。圃場 B、圃場 1、圃場 3、圃場 I のような防除圧の低い圃場では、季節の変化に伴いニセラーゴカブリダニの割合が高くなった。圃場 2、圃場 VI のような防除圧の高い圃場ではミヤコカブリダニの割合が高かったが、同様に防除圧の高い圃場 V ではミヤコカブリダニの優占は見られなかった。このことは、薬剤散布だけではカブリダニの種構成を説明できないことを示している。今後は本手法を用いて、カブリダニの種構成に下草の植生やハダニをはじめとする節足動物が及ぼす影響について解析を進めていく予定である。

おわりに

本手法の開発を思い立ったいきさつについて述べたい。筆者は平成 20 年度から平成 23 年度にかけて行われた農林水産省委託プロジェクト「農業に有用な生物多様性の指標及び評価方法の開発」に参画させていただいた。このプロジェクトの目的は、防除圧の異なる果樹や野菜等の圃場において、ピットホールトラップをはじめとする様々な手法を用いて昆虫相の調査を行い、防除圧の低い圃場で優占的に捕獲される昆虫を指標として、各圃場の環境保全型農業への取り組みを評価しようとする

ものであった。最終的には指標とはならなかったものの、筆者が担当したモモ圃場における指標としてカブリダニは有力候補の一つであった。そのため、当時筆者にとってカブリダニの同定は至上課題であった。豊島博士をはじめ複数のカブリダニ研究者との会話から、カブリダニの同定には個体ごとにスライド標本をつくる必要があることを学んだ。カブリダニの形態学的な特徴に基づく「植物ダニ類の見分け方」(江原ら, 2007) の習熟を試みたが、すぐに断念した。カブリダニの同定について諦めかけていたところ、Si Hyeock Lee 博士(韓国ソウル大学)のグループが、量的シーケンシングを用いて、アタマジラミ *Pediculus humanus capitis* 個体群中のピレスロイド剤抵抗性遺伝子の頻度を推定した論文(Kwon et al., 2008) が思い浮かんだ。これは、ピレスロイド剤抵抗性にかかわるナトリウムチャネル遺伝子の一塩基置換部位における抵抗性型の塩基と感受性型の塩基のピークを比較し、アタマジラミの個体群内における抵抗性遺伝子の頻度を推定したものであった。もし、各カブリダニ種において特異的な塩基配列部位を見いだすことができれば量的シーケンシングを用いてカブリダニの種構成を推定できるのではないかと考えた。しかし、そのためにはカブリダニの同定に有用な塩基配列情報が必要である。日本博士に相談させていただいたところ、豊島博士、岸本博士

とともに収集したカブリダニの同定に有用な 28S リボゾーム DNA の塩基配列情報を提供して下さるといふ。日本博士からのデータ提供から種構成推定法の確立まではさほど時間はかからなかった。本手法の開発における彼らの貢献は計り知れない。

カブリダニの生物量に基づく種構成推定法が確立されたとはいえ、今後もスライド標本に基づくカブリダニの同定の重要性は変わらない。それでも本手法は、一度に多量のサンプルを処理できる、同定のための知見や技術を必要としないという利点をもつ。また、種特異的塩基配列部位が見つかる限り、解析対象種に制限はない。やや難があるとすれば、補正式の算出が少々厄介な点であるが、補正式なしでも特定のカブリダニの存在確認と大まかな割合の推定は可能である。また、本手法には塩基配列決定のプロセスが含まれているが、現在は塩基配列決定の作業を安価で請け負う業者も多く、PCR 器さえ備えていれば大型の高額機材は必ずしも必要としない。用途に応じて本手法を活用していただければ幸いである。

引用文献

- 1) AIKI, Y. et al. (2005): Pestic. Biochem. Physiol. **82**: 154 ~ 161.
- 2) AMANO, H. et al. (2004): J. Acarol. Soc. Jpn. **13**: 65 ~ 70.
- 3) DASGUPTA, R. K. et al. (2003): Blood **102**: 2345 ~ 2350.
- 4) 江原昭三ら (2007): 植物ダニ類の見分け方, 植物防疫協会, 東京, 120 pp.
- 5) ————・後藤哲雄 (2009): 原色植物ダニ検索図鑑, 全国農村教育協会, 東京, 349 pp.
- 6) 藤本博明・平松高明 (1995): 日本ダニ学会誌 **4**: 103 ~ 111.
- 7) FUNAYAMA, K. (2010): Appl. Entomol. Zool. **46**: 103 ~ 110.
- 8) GOKA, K. (1998): Exp. Appl. Acarol. **22**: 699 ~ 708.
- 9) JEYAPRAKASH, A. and M. A. HOY (2002): Biol. Control **25**: 136 ~ 142.
- 10) KUWAHARA, M. (1982): Appl. Entomol. Zool. **17**: 486 ~ 493.
- 11) ———— (1984): Bull. Natl. Inst. Agric. Sci., Ser C **39**: 1 ~ 75.
- 12) ———— et al. (1982): Appl. Entomol. Zool. **17**: 82 ~ 91.
- 13) KWON, D. H. et al. (2008): J. Med. Entomol. **45**: 912 ~ 920.
- 14) MIZUTANI, A. et al. (1988): Appl. Entomol. Zool. **23**: 251 ~ 255.
- 15) MOCHIZUKI, M. (1994): ibid. **29**: 203 ~ 209.
- 16) NAVAJAS, M. et al. (1999): Exp. Appl. Acarol. **23**: 851 ~ 859.
- 17) 刑部 勝 (1968): 日本応用動物昆虫学会誌 **12**: 18 ~ 22.
- 18) ROLLINSON, S. et al. (2004): Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **13**: 795 ~ 800.
- 19) 真根徳純・足立年一 (1978): 果樹試報 **E2**: 99 ~ 108.
- 20) SONODA, S. et al. (2012): Exp. Appl. Acarol. **56**: 9 ~ 22.

登録が失効した農薬 (24.4.1 ~ 4.30)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録失効年月日。

〔殺虫剤〕

- DDVP 乳剤
4759: 日曹ホスピット乳剤 (日本曹達) 12/04/27
- CYAP 粉剤
10861: 三共サイアノックス粉剤 (三井化学アグロ) 12/04/20
- アセフェート液剤
16042: 武田オルトラン液剤 (住友化学園芸) 12/04/25
- ホスチアゼート液剤
20346: 石原アオバ液剤 (石原産業) 12/04/21

〔殺虫殺菌剤〕

- ベンフラカルブ・ジクロシメット粒剤
20374: デラウスオンコル粒剤 (住友化学) 12/04/28
- MEP・ジクロシメット粉剤
20379: ホクコーデラウススミチオン粉剤 DL (北興化学工業) 12/4/28
- MEP・ジクロシメット粉剤
20380: 三共デラウススミチオン粉剤 DL (ホクサン) 12/04/28
- ジノテフラン・ジクロシメット粉剤
21043: デラウススタークル粉剤 DL (三井化学アグロ) 12/04/8

〔殺菌剤〕

- ジクロシメット粉剤
20363: ホクコーデラウス粉剤 DL (北興化学工業) 12/04/28
- ジクロシメット水和剤
20366: ホクコーデラウスフロアブル (北興化学工業) 12/04/28

〔除草剤〕

- MDBA 液剤
8149: [DIC] バンバール-D 液剤 (日本曹達) 12/04/25
- ジメタメトリン・ピラゾレート・プレチラクロール粒剤
17036: クサホープ 95D 粒剤 (三井化学アグロ) 12/04/26
- 17039: クミアイクサホープ 95D 粒剤 (クミアイ化学工業) 12/04/26
- グリホサートイソプロピルアミン塩液剤
19623: ランドマスタープロ (日産化学工業) 12/04/08
- カフェンストール・ダイムロン・ベンスルフロメチル水和剤
19631: 三共ラクダー H フロアブル (三井化学アグロ) 12/04/10
- トリアジフラン・ハロスルフロメチル水和剤
20340: 出光セットアップ DF (出光興産) 12/04/12
- グルホシネート液剤
21061: バスタ液剤 0. 2 (バイエルクロップサイエンス) 12/04/22
- オキサジクロメホン・クロメプロップ・ブロモブチド・ベンスルフロメチル粒剤
21677: ホームランキングジャンボ (デュボン) 12/04/05

〔その他〕

- サキメラノルア剤
18712: サキメラノール (サンケイ化学) 12/04/27