

# 輸入植物検疫で発見される *Tetranychus* 属ハダニ類の PCR-RFLP による識別法

農林水産省横浜植物防疫所 <sup>ありもと まこと さとう まさる</sup> 有本 誠・佐藤 雅  
 京都大学大学院農学研究科 <sup>うえすぎ りゅうじ おさかべ まさひろ</sup> 上杉 龍士\*・刑部 正博

## はじめに

*Tetranychus* 属のハダニは、ナミハダニ *T. urticae*、カンザワハダニ *T. kanzawai* 等多くの重要な農業害虫種を含む。現在、世界で149種 (MIGEON and DORKELD, 2006)、日本で13種が報告されている (EHARA, 1999; 江原・山口, 2001; EHARA and OHASHI, 2002; EHARA and GOTOH, 2007)。近年の農業生産物の輸入の増加により、日本の輸入植物検疫における外国産のハダニの発見も増加しており、発見される種のほとんどは *Tetranychus* 属に含まれる (真崎, 1991; 2001; 真崎ら, 1991; 金田・真崎, 1994; 真崎・北村, 2004)。このため、我が国に未発生の *Tetranychus* 属ハダニ類の侵入防止が植物検疫上の重要課題になっている。

輸入植物検疫では、日本未発生で我が国の農林業に新たな被害をもたらすおそれの高い検疫有害動物種と、日本既発生で我が国の農林業に新たな影響を及ぼさないと考えられる非検疫有害動物種の両方が発見されるため、植物検疫措置の実施にあたってはこれら両方の種の正確な同定が必要不可欠である。従来、ハダニの種同定は成虫の形態的特徴に基づいて行われており、*Tetranychus* 属では雄成虫の挿入器の形態を精査する必要がある (PRITCHARD and BAKER, 1955; TUTTLE et al., 1976; MEYER, 1987; BAKER and TUTTLE, 1994; EHARA, 1999)。しかし、ハダニの性比は雌に偏っているため (SABELIS, 1991)、輸入植物検疫で発見されるほとんどの個体は雌成虫である。また、同じ植物体に複数種の *Tetranychus* 属のハダニが混在する場合もある。このため、発生種を正確に判定するには、多くのハダニを個別に飼育して後代で雄を出現させてから種を同定する必要がある。この方法では判定に時間が掛かることに加え、植物検疫に従事する多くのマンパワーを消費してしまう。このため、輸入植物検疫

において発見される *Tetranychus* 属の迅速かつ正確な同定を可能にする新技術の開発が望まれる。

OSAKABE et al. (2002) は、リボソーム DNA の内部転写スパーサー (ITS) 領域をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅し、PCR 増幅産物を制限酵素で切断して得られる断片長の多型 (RFLP) を日本産の *Tetranychus* 属4種間で比較し、この PCR-RFLP 法によりこれらの種を雌成虫1個体を用いて識別できることを示した。その後、OSAKABE et al. (2008) はこの PCR-RFLP 法を日本産 *Tetranychus* 属11種に適用してそれらの識別法を確立した。

輸入植物検疫では、*Tetranychus* 属の卵、幼若虫および休眠雌成虫のみが発見されることがある。そのため、我々はこれまでに、日本産ナミハダニの卵、幼虫、第1若虫、第2若虫および休眠雌成虫を用いて、DNA抽出法と ITS 領域の PCR 増幅等を検討した。その結果、*Tetranychus* 属のこれらの発育ステージに対しても、この PCR-RFLP 法を個体ごとに適用できることが判明した (ARIMOTO et al., 2012)。

今回、我々は日本の輸入植物検疫で発見された外国産 *Tetranychus* 属の種判別にこの ITS 領域を用いた PCR-RFLP 法が適用可能か検証し (ARIMOTO et al., 2013)、その有用性を明らかにしたので紹介したい。

## I PCR による *Tetranychus* 属ハダニ個体群の ITS 領域 DNA の増幅と塩基配列決定

PCR には、*Tetranychus* 属14種の夏型雌成虫を用いた (表-1)。これらは過去に日本の輸入植物検疫で発見された種 (真崎, 1991; 2001; 真崎ら, 1991; 金田・真崎, 1994; 真崎・北村, 2004) をほぼ網羅している。このうち、輸入植物検疫で発見された外国産の材料は10種の180個体群で、日本未発生種5種 (*T. lambi*, *T. pacificus*, *T. turkestanii*, *T. merganser*, および *T. malaysiensis*) を含む。なお、過去に輸入植物検疫で発見されていたが、本研究の実施期間中には輸入植物検疫で発見されなかった日本既発生種については、日本産の材料を用いた。

解析に先立ち、各個体群の既交尾の雌成虫1個体をインゲンマメのリーフディスクで個別に飼育し、得られた雄成虫および雌成虫のプレパラート標本を作製し、形態

Diagnostic PCR-RFLP of *Tetranychus* Species (Acari : Tetranychidae) Intercepted at Japanese Plant Quarantine. By Makoto ARIMOTO, Masaru SATOH, Ryuji UESUGI and Masahiro OSAKABE (キーワード: *Tetranychus* 属, ITS, リボソーム DNA, PCR-RFLP, 種の識別)

\* 現所属: 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所

表-1 材料に用いた *Tetranychus* 属の産地、個体群数および個体数

種名 (和名)	RFLP <sup>a)</sup>			シークエンス <sup>b)</sup>	
	個体群数	個体数	産地, 個体群数	産地	個体群数
<i>T. lambi</i>	2	3	ニュージーランド (2)	ニュージーランド	1
<i>T. pacificus</i>	2	4	米国 (2)	米国	1
<i>T. turkestanii</i>	2	5	米国 (1), スペイン (1)	米国	1
<i>T. urticae</i> (green form) (ナミハダニ (黄緑型))	116	134	オーストラリア (3), ブラジル (3), 中国 (11), コロンビア (10), デンマーク (1), エクアドル (7), エチオピア (2), インド (29), 日本 (2), ケニア (4), 韓国 (4), マレーシア (3), ネパール (1), オランダ (5), ニュージーランド (10), スリランカ (2), 台湾 (3), 米国 (12), ウガンダ (1), ベトナム (3)	ウガンダ	1
<i>T. urticae</i> (red form) (ナミハダニ (赤色型))	33	47	中国 (3), コロンビア (4), エクアドル (4), エチオピア (2), インド (1) イスラエル (1), 日本 (1), ケニア (5), メキシコ (1), 南アフリカ (4), スペイン (2), 台湾 (1), トルコ (4)	スペイン	1
<i>T. kanzawai</i> (カンザワハダニ)	20	21	日本 (5), マレーシア (2), シンガポール (1), 台湾 (10), タイ (2)	台湾	1
<i>T. truncatus</i> (イシイナミハダニ)	2	2	中国 (1), 台湾 (1)	中国	1
<i>T. piercei</i> (ミヤラナミハダニ)	5	5	インドネシア (1), 日本 (2), マレーシア (1), タイ (1)	マレーシア	1
<i>T. phaselus</i> (サガミナミハダニ)	2	2	日本 (2)	日本	1
<i>T. neocaledonicus</i> (ナンセイナミハダニ)	1	4	日本 (1)	日本	1
<i>T. merganser</i>	3	3	メキシコ (3)	メキシコ	1
<i>T. ludeni</i> (アシノワハダニ)	6	6	コロンビア (1), 日本 (3), ニュージーランド (1), 米国 (1)	コロンビア	1
<i>T. evansi</i> (ミツユビナミハダニ)	1	3	日本 (1)	日本	1
<i>T. malaysiensis</i>	2	2	フィリピン (2)	フィリピン	1
<i>T. okinawanus</i> (ナンゴクナミハダニ)	2	4	日本 (2)	日本	1

a) 各個体群 1 ~ 19 個体を用いた。

(ARIMOTO et al., 2013 を改変)

b) 各個体群 1 個体を用いた。

的特徴に基づき種を同定した。同定後、各個体群について最初の 1 個体の雌成虫に由来する 1 ~ 19 個体の子孫の雌成虫について DNA 分析を行った。PCR による ITS 領域の増幅には、プライマー rD02 (forward), 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3' (HINOMOTO and TAKAFUJI, 2001), および HC2 (reverse), 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3' (NAVJAS et al., 1994) を用いた。材料, 方法の詳細については, ARIMOTO et al. (2013) を

参照いただきたい。

*Tetranychus* 属 14 種 15 個体群の各雌成虫 1 個体を用いた (表-1), ITS 領域の PCR 産物をダイレクトシークエンスした。プライマー配列を含む PCR 産物のサイズは, ナンゴクナミハダニ (1,424 bp) 以外はすべて 1,200 bp 前後で (表-2), 電気泳動のみによる識別は困難であった。なお, それぞれの種の PCR 産物の塩基配列は, DDBJ/EMBL/GenBank データベースにおいて Acces-

sion Nos. AB738743-57 により入手できる。

## II ITS領域の制限酵素認識部位の解析とPCR-RFLPの有効性の検証

得られたITS領域の塩基配列における制限酵素の認識部位および断片長を解析することによりバンドパターンを推定し、種の識別に有用な4種類の制限酵素 (*Rsa* I, *Hinf* I, *Dra* I, および *Mbo* II) を選択した。各酵素による断片長の算出結果は、表-2に示す通りである。表-2で場合分けしたバンドパターンを基に、14種をITS領域のPCR-RFLP法により識別するためのフローチャートを作成した(図-1)。

図-2は *Tetranychus* 属14種15個体群の各雌成虫1個体のITS領域のPCR産物を、図-1に示した4種類の制限酵素により処理して得られた断片を3.5%アガロースゲルで電気泳動したバンドパターンである。解析に用いた、*Tetranychus* 属14種199個体群245個体(表-1)において、*T. pacificus* の2個体群が *Rsa* Iによる消化の後にわずかに異なるバンドパターンを示した事例を除き、

種内変異は観察されず、図-1において提案したフローチャートが本研究に用いた14種すべての識別に適用できることが明らかになった。

以上から、OSAKABE et al. (2002; 2008) により開発されたITS領域を用いたPCR-RFLP法は、日本未発生種5種 (*T. lambi*, *T. pacificus*, *T. turkestanii*, *T. merganser*, および *T. malaysiensis* 口絵①~⑤) を含む、主に日本の輸入植物検疫で発見された *Tetranychus* 属14種の識別に有用であることが確認できた。

## おわりに

現在、植物防疫所では、輸入植物検疫において、特定の国・植物から発見される *Tetranychus* 属の種の識別に、このPCR-RFLP法を適用することとしている。PCR-RFLP法は、未知種のサンプルが入手できなくても、その塩基配列データがあれば、事前に制限酵素処理における断片長を解析し、バンドパターンを推定可能な技術である。したがって、本研究で用いていない日本未発生種の *Tetranychus* 属についても、塩基配列データが入手で

表-2 *Tetranychus* 属のPCR産物, 断片長 (bp) およびバンドパターン

種名	PCR産物 <sup>a)</sup>	<i>Rsa</i> I		<i>Hinf</i> I		<i>Dra</i> I		<i>Mbo</i> II	
		バンドパターン	断片長 <sup>b)</sup>	バンドパターン	断片長 <sup>b)</sup>	バンドパターン	断片長 <sup>b)</sup>	バンドパターン	断片長 <sup>b)</sup>
<i>T. lambi</i>	1, 198	A	622, 291, 114, 111	A	399, 377, 345	A	471, 358, 225, 144	A	637, 334
<i>T. pacificus</i>	1, 202	B	502, 353, 347	B	555, 211, 175, 157	B	756, 391	B	629, 356, 116
<i>T. turkestanii</i>	1, 208	B	504, 359, 345	C	563, 209, 157	C	700, 398, 110	C	410, 363, 214, 117
ナミハダニ (黄緑型)	1, 206	C	505, 356, 183, 162	C	561, 209, 157	D	811, 395	C	410, 360, 214, 118
ナミハダニ (赤色型)	1, 206	C	505, 356, 183, 162	C	561, 209, 157	D	811, 395	C	410, 360, 214, 118
カンザワハダニ	1, 203	B	503, 355, 345	C	558, 209, 157	D	809, 394	C	410, 359, 214, 116
イシイナミハダニ	1, 205	B	503, 357, 345	C	559, 209, 158	D	809, 396	B	624, 361, 116
ミヤラナミハダニ	1, 220	B	511, 359, 350	D	570, 295, 157	D	822, 398	B	629, 363, 124
サガミナミハダニ	1, 213	D	512, 353, 175, 173	E	621, 293, 157	D	821, 392	B	628, 357, 124
ナンセイナミハダニ	1, 205	E	834, 350	F	533, 300, 159	E	757, 209, 180	D	630, 236, 118, 117
<i>T. merganser</i>	1, 223	F	463, 325, 207, 152	G	630, 292, 208	F	575, 398, 188	D	636, 239, 124, 120
アシノワハダニ	1, 196	G	501, 344, 308	H	359, 195, 192, 148	B	756, 383	C	409, 348, 220, 118
ミツユビナミハダニ	1, 204	B	515, 351, 338	I	563, 215, 147	B	767, 379	E	420, 344, 220, 119
<i>T. malaysiensis</i>	1, 267	H	460, 381, 360	D	579, 306, 162	G	847, 420	F	647, 385, 134
ナンゴクナミハダニ	1, 424	I	488, 280, 235, 210, 173	J	630, 217, 191, 168	H	808, 369, 115	G	721, 499, 148

<sup>a)</sup> PCR産物の長さはフォワードおよびリバースプライマーを含む。

<sup>b)</sup> 100 bpより短い断片は無視した。

(ARIMOTO et al., 2013 を改変)

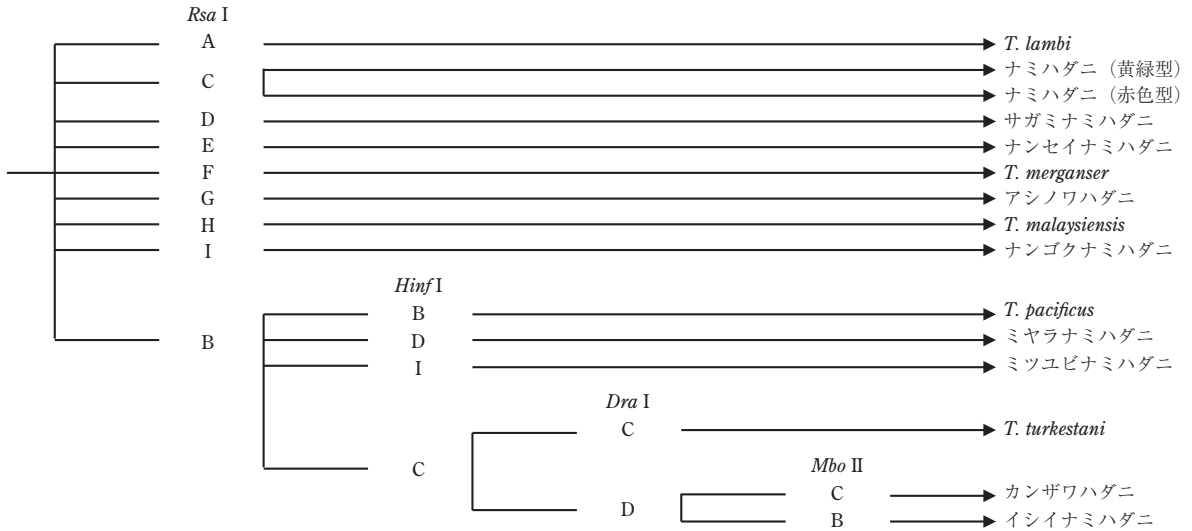


図-1 ITS 領域の推定された PCR-RFLP パターンに基づく *Tetranychus* 属の種の識別のためのフローチャート  
A-1 は表-2 で定義したバンドパターンを参照。 (ARIMOTO et al., 2013 を改変)

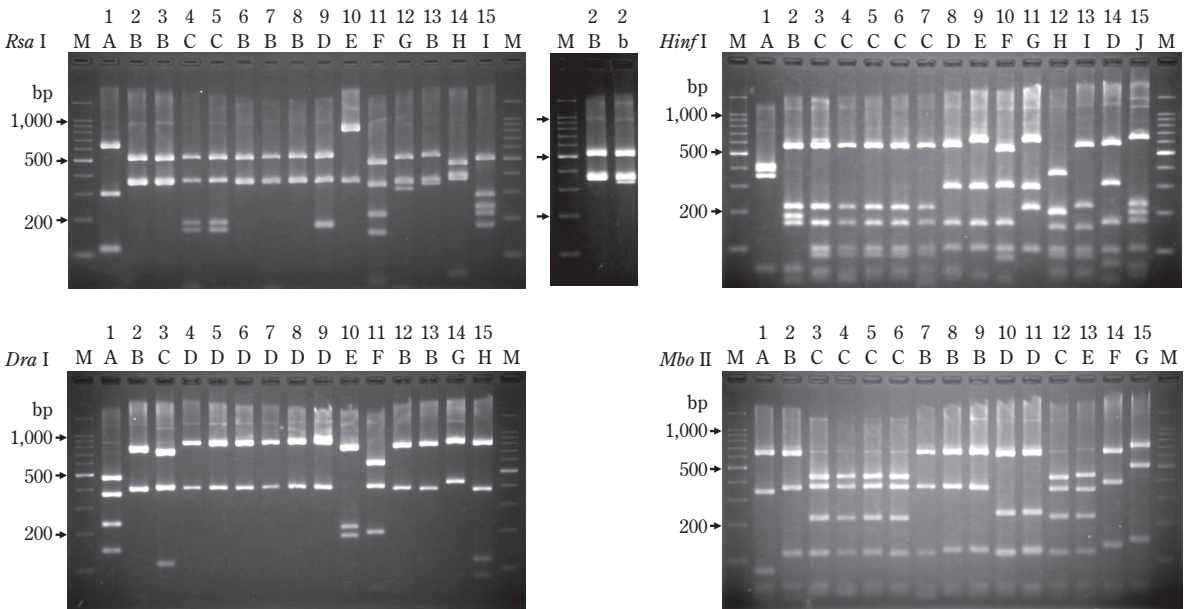


図-2 *Tetranychus* 属の PCR-RFLP バンドパターン

1, *T. lambi*; 2, *T. pacificus*; 3, *T. turkestani*; 4, ナミハダニ (黄緑型); 5, ナミハダニ (赤色型); 6, カンザワハダニ; 7, イシイナミハダニ; 8, ミヤラナミハダニ; 9, サガミナミハダニ; 10, ナンセイナミハダニ; 11, *T. merganser*; 12, アシノワハダニ; 13, ミツユビナミハダニ; 14, *T. malaysiensis*; 15, ナンゴクナミハダニ.

M, 100-bp ラダー DNA サイズマーカー. A ~ J は表-2 で定義したバンドパターンを参照.

文字 b は種内変異を示す. 断片長は次のように推定された: b; 502, 353, 326 (bp). 100 bp より短い断片は無視した.

(ARIMOTO et al., 2013 を改変)

きれば、バンドパターンを調査して、識別対象種を拡大することが可能である。今後はこれらのデータを蓄積することにより、輸入植物検疫において発見される *Tetranychus* 属の種の識別に本技術を使用する際の有用性を高めることができると考えられる。

最後に、茨城大学農学部の後藤哲雄教授には、実験室系統のハダニの提供および *T. merganser* の同定をしていただき、心から感謝している。また、各植物防疫所の植物防疫官の方々には、輸入植物検疫で発見されたハダニを採集していただき、お礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) ARIMOTO, M. et al. (2012): Appl. Entomol. Zool. **47**: 295 ~ 300.
- 2) ——— et al. (2013): J. Econ. Entomol. **106**: 661 ~ 668.
- 3) BAKER, E. W. and D. M. TUTTLE (1994): A Guide to the Spider mites (Tetranychidae) of the United States, Indira Publishing House, West Bloomfield, Michigan, 347 pp.
- 4) EHARA, S. (1999): Species Divers. **4**: 63 ~ 141.
- 5) ——— and K. OHASHI (2002): Acta Arachnol. **51**: 19 ~ 22.
- 6) ——— and T. GOTOH (2007): Zootaxa **1646**: 51 ~ 58.
- 7) 江原昭三・山口卓宏 (2001): 植物防疫 **55**: 268 ~ 272.
- 8) HINOMOTO, N. and A. TAKAFUJI (2001): Exp. Appl. Acarol. **25**: 355 ~ 370.
- 9) 金田昌士・真崎 誠 (1994): 植防研報 **30**: 125 ~ 126.
- 10) 真崎 誠 (1991): 同上 **27**: 87 ~ 92.
- 11) ——— (2001): 同上 **37**: 111 ~ 116.
- 12) ———・北村 寿 (2004): 同上 **40**: 119 ~ 125.
- 13) ———ら (1991): 同上 **27**: 107 ~ 114.
- 14) MEYER, M. K. P. S. (1987): Entomology Mem. Dep. Agric. Wat. Supply Repub. S. Afr. **69**: 1 ~ 175.
- 15) MIGEON, A. and F. DORKELD (2006): Spider Mites Web: a Comprehensive Database for the Tetranychidae. <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>
- 16) NAVAJAS, M. et al. (1994): Exp. Appl. Acarol. **18**: 351 ~ 360.
- 17) OSAKABE, Mh. et al. (2002): Appl. Entomol. Zool. **37**: 399 ~ 407.
- 18) ——— et al. (2008): J. Econ. Entomol. **101**: 1167 ~ 1175.
- 19) PRITCHARD, A. E. and E. W. BAKER (1955): Pacif. Coast Entomol. Soc. Mem. Ser. **2**: 1 ~ 472.
- 20) SABELIS, M. W. (1991): The Acari: Reproduction, Development and Life-history Strategies, R. Schuster and P. W. Murphy (eds.), Chapman and Hall, London, UK, p. 23 ~ 49.
- 21) TUTTLE, D. M. et al. (1976): Int. J. Acarol. **2**: 1 ~ 102.