

平成21年 6月29日現在

研究種目 若手研究 (B)
 研究期間: 2006~2008
 課題番号: 18780040
 研究課題名 (和文) マイクロサテライトマーカーを用いたヒメハナカメムシ個体群間の遺伝子交流の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of population structure of *Orius* bugs using microsatellite markers
 研究代表者 日本 典秀 (HINOMOTO NORIHIDE)
 独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニット
 主任研究員
 研究者番号: 80370675

研究成果の概要:

ヒメハナカメムシ類は微小重要農業害虫アザミウマ類の捕食性天敵として知られる。種内多型に富んだマイクロサテライトマーカーの作出・解析を行い、地理的距離と遺伝的分化の程度を F_{st} 値を用いて比較すると、タイリクヒメハナカメムシでは有意な正の相関が見られたが、ナミヒメハナカメムシでは見られなかった。このことから、タイリクヒメハナカメムシのほうが移動分散能力に劣り、遺伝子交流範囲も狭いものと推察された。

交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	600,000	0	600,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野: 応用昆虫学

科研費の分科・細目: 農学・応用昆虫学

キーワード: 天敵昆虫, マイクロサテライト, 遺伝的多様性, DNA マーカー, 移動分散,

ヒメハナカメムシ, 個体群構造, 生物農薬

1. 研究開始当初の背景

近年、野外に放たれたクワガタなどの輸入昆虫と土着種との交雑が報告され、外来種による遺伝子汚染の危険性が指摘されている。また保全生態学的見地からは、たとえ同種の個体群であっても、地理的に離れた場所への人為的移動は遺伝的攪乱を引き起こすという懸念がある。

一方、農業現場では、化学農薬の代替手段として天敵昆虫などの生物農薬が市販され、農家や消費者のニーズにあわせて急速に使用量、使用面積が増加しつつある。その中で

も特に、2001年に生物農薬として市販開始されたタイリクヒメハナカメムシ *Orius strigicollis* は微小重要農業害虫アザミウマ類の捕食性天敵として知られ、各地の施設栽培野菜で使用されている。また、本種はわが国に土着の昆虫でもあり、野外でも普通に見られる。したがって、本種においても生物農薬として大量増殖・放飼された系統が、施設外に分散して定着したり、野外個体群との交配を通じて遺伝的攪乱を起こすという懸念がある。このような可能性を検証するためには、本種の定着性・分散性、野外個体群間の遺伝

子交流、生物農薬と野外個体群との遺伝的な違いの検証が定量的に行われることが望まれている。

また、わが国野外での本種の分布地域は関東以西の海岸部に限られ、その分布制限要因は冬期の寒さにあることが明らかになっているが、近年の気候の温暖化現象に伴い、その分布を北方に広げてきたと考えられている(清水ら, 2001)。わが国には *Orius* 属のヒメハナカメムシ類は他にも分布しているが、これら近縁種は広範囲に分布しており、本種の分布域が制限されていることは、比較生態学的見地からも興味深い。本種の分布拡大過程を詳細に解析することが、種間競争の解明や地球温暖化の影響を明らかにするためには、必須である。

2. 研究の目的

タイリクヒメハナカメムシおよび近縁種(主にナミヒメハナカメムシ)の野外個体群の遺伝的多様性、個体群間の遺伝的分化を定量的に解析して野外個体群間の遺伝子交流を解明する。このために、DNA マーカーとしてマイクロサテライトマーカーをそれぞれの種について開発する。また、生物農薬として市販されている系統についてもその遺伝的多様性を調査し、生物農薬特異的な対立遺伝子の検出を行なう。以上の解析結果から、本種の分散様式、放飼した生物農薬の野外への定着の有無と野外個体群への遺伝的影響の程度、さらには分布拡大過程の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マイクロサテライトマーカーの開発

ヒメハナカメムシ成虫 1 個体からゲノム DNA を抽出した後、制限酵素で適当な長さに切断して両端にリンカーを接続、リンカー配列をもとにしたプライマーを用いて PCR 増幅したものを 1 次ライブラリーとする。この 1 次ライブラリーから、マイクロサテライト配列を持つ合成オリゴをプローブとしてゲノム中のマイクロサテライト領域を選抜する。選抜した領域はプラスミドを用いてクローニングし、塩基配列を解読後、マイクロサテライト配列の両端にプライマーを設計する。

作成したプライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲル上で増幅産物の確認を行う。増幅が認められた場合は、片方のプライマーを蛍光ラベルしたものをを用いて PCR を行い、キャピラリー型ジェネティックアナライザーによって増幅産物のタイピングが可能かどうかを確認する。これらのスクリーニング結果を経て、使用可能なプライマーセット(=遺伝子座)を確定する。

(2) 野外個体群の採集

秋期(10~11月)のセイタカアワダチソウ

群落では、花序に発生するアザミウマ類を求めて集合するヒメハナカメムシ類が大量に採集可能である(清水ら, 2001)。他の植物上での観察が困難なこの時期のセイタカアワダチソウ上のヒメハナカメムシ類を採集することは、その地域の個体群の遺伝的構成を調査する上で、最も効率的かつ効果的である。また、ほぼ全国に分布するセイタカアワダチソウで採集することは、植物の影響を受けずに定量的に遺伝的構成を解析できる点でも優れている。

(3) マイクロサテライト遺伝子頻度の解析

採集した個体から DNA 抽出を行い、マルチプレックス PCR 法(Hinomoto et al., 2004)によって種の識別を行なったのち、種ごとにマイクロサテライト遺伝子頻度の解析を行なう。作成したマイクロサテライトマーカーを蛍光プライマーを用いて PCR 増幅、キャピラリー型ジェネティックアナライザーでフラグメント解析を行ない、増幅断片長を得る。これらを対立遺伝子として個体群ごとに遺伝子頻度を集計し、遺伝的多様性を個体群ごとに得るとともに、個体群間の遺伝子交流の程度や移動分散個体数を F_{ST} 等のパラメータを用いて推定し、さらに種間比較も行なう。また、市販の生物農薬についても同様の解析を行ない、特異的遺伝子座の検出や遺伝子頻度の野外個体群との比較を通じて、生物農薬の野外個体群への遺伝的影響の有無を検証する。

4. 研究成果

(1) タイリクヒメハナカメムシ野外 7 個体群および生物農薬系統 2 系統の遺伝的多様性を、マイクロサテライトマーカー 6 遺伝子座(表 1)を用いて測定したところ、生物農薬では有意に多様性が低下していることが明らかになった(図 1)。これは、飼育開始時の創始者効果や飼育時のボトルネック、遺伝的浮動などの影響であると考えられた。生物農薬の特異性は、野外での定着を検出するのに役立つものと期待できる。

表 1 作成したタイリクヒメハナカメムシのプライマー情報

Locus name	primers	Core repeat*	Accession number
OstNS001	F: CTCCACCAAAATTTCTCAAGG R: CAGTCGATGAACGTGAAGG	(GA) _n GG(GA) _n	AB240210
OstNS003	F: CAAACCTCAACTCCCATCA R: GCTCATCTCAACCCATCCAG	(GA) _n	AB240211
OstNS009	F: TTTACCTTGGGCGAGTACCTT R: CGTTAATTTGGGGGAATTG	(TC) _n	AB240212
OstNS010	F: CGATCCGTAACAGGTACATCC R: GTCCCATGGTATTCGAGGTC	(CT) _n	AB240213
OstNS014	F: CAACCCCAACCTTTCTCAA R: GCGCAATGACCAAGTTCAC	(GA) _n	AB240214
OstNS016	F: TAAGGCAAAATCCGAATG R: GAGTCCGGGTCCTTACAT	(GA) _n	AB240215

* From sequenced clone.

(2) タイリクヒメハナカメムシのマイクロサテライト遺伝子頻度から算出した固定指数 F_{ST} は、全ての野外個体群-生物農薬の組

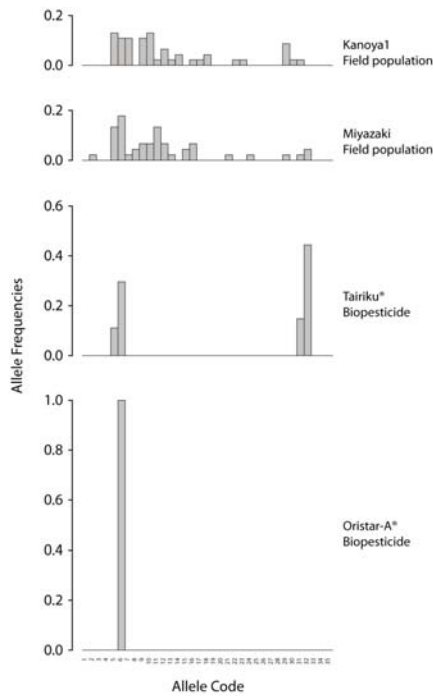


図1 野外2 個体群と、生物農薬2 個体群のマイクロサテライト2 遺伝子座の対立遺伝子頻度例

み合わせで有意に0より大きく、生物農薬がボトルネックや遺伝的浮動により偏った遺伝的組成になっていることが推察された(表2)。周辺にタイリクヒメハナカメムシが分布しない土浦の個体群は、他の個体群と遺伝的に異なり、ボトルネックあるいは遺伝的浮動の影響を受けて特異な遺伝子構成を持つことが推察された。また、南九州の個体群間では有意差が検出されず、比較的広範囲にわたって遺伝的に均質であり、潜在的な遺伝子プールの地理的範囲が広いことが推察された。

表2 個体群間の固定指数 F_{ST} (上) および G-test の結果(下)。枠で囲った九州個体群間では有意な遺伝的分化は検出されなかった。

	Tsuchiura	Kanagaya	Yonago	Shimomi	Miyazaki	Kanoya1	Kanoya2	Tairiku ^a	Oristar-A ^b
Tsuchiura		0.038*	0.045**	0.081**	0.048**	0.062**	0.054**	0.103**	0.453**
Kanagaya	**		0.011 ^{NS}	0.025 ^{NS}	0.002 ^{NS}	0.026*	0.015 ^{NS}	0.070**	0.432**
Yonago	***	NS		0.036**	0.000 ^{NS}	0.019 ^{NS}	0.011 ^{NS}	0.063**	0.384**
Shimomi	***	**	***		0.012 ^{NS}	0.003 ^{NS}	0.015 ^{NS}	0.103**	0.398**
Miyazaki	***	NS	NS	NS		0.010 ^{NS}	-0.002 ^{NS}	0.066**	0.394**
Kanoya1	***	**	***	NS	NS		-0.003 ^{NS}	0.087**	0.375**
Kanoya2	***	NS	**	NS	NS	NS		0.078**	0.409**
Tairiku ^a	***	***	***	***	***	***	***		0.477**
Oristar-A ^b	***	***	***	***	***	***	***	***	

F_{ST} and G-statistics were calculated based on allele frequencies after correction of null alleles. Significance levels were determined by 10,000 and 36,000 permutations, respectively. NS, not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

- (3) タイリクヒメハナカメムシの遺伝的多様性を南九州、中京、北関東の3地域で比較したところ、北方ほど遺伝的多様性が低く、本種が温暖化にしたがって分布を北上させてきたことが伺えた(表3)。
 (4) ナミヒメハナカメムシ 13 クローン (遺

表3 タイリクヒメハナカメムシ野外個体群のマイクロサテライト3 遺伝子座の Allelic richness の比較。平均値は地域間で有意差あり ($P < 0.03$)。

Code		Locus 1	Locus 2	Locus 3	All
北関東		4.046	12.425	7.675	7.593
126F	市川	4.000	12.000	12.000	
236F	鎌倉谷	5.090	14.180	7.748	
316F	土浦03	3.810	11.912	5.778	
347F	我孫子	4.326	10.348	7.281	
348F	稻宍	5.284	11.403	7.673	
421F	土浦04	1.297	10.302	5.210	
432F	大宮海岸	4.340	12.086	5.645	
434F	大洗	4.142	9.866	6.292	
457F	三浦	1.873	12.017	7.086	
464F	鹿嶋	2.273	12.837	8.685	
中京		4.520	14.795	10.529	9.253
206F	豊田	5.015	13.914	9.830	
346F	羽島	3.590	12.478	11.601	
341F	岐阜	4.621	12.893	10.196	
343F	海津	2.906	15.451	7.798	
346F	八間	2.973	17.045	7.280	
南九州		6.659	15.639	10.794	10.414
226F	鹿屋	8.000	17.000	10.000	
225F	鹿屋	4.760	14.170	10.170	
228F	新宮	7.471	15.982	10.302	
231F	宮崎	4.478	13.608	9.136	

伝子座) の増幅確認を行ない、うち8 遺伝子座がヌル対立遺伝子が少なく、実用に耐えることを明らかにした。ヘテロ接合体頻度の高いものでは、ヌル対立遺伝子頻度が低い傾向が見られた(図2)。

- (5) ナミヒメハナカメムシ8 遺伝子座に加え、

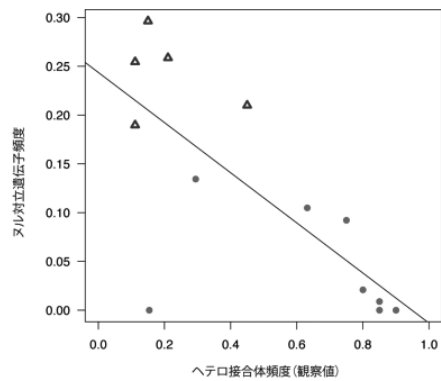


図2 ナミヒメハナカメムシ野外個体群のヘテロ接合体頻度とヌル対立遺伝子頻度の関係

新規1 遺伝子座およびタイリクヒメハナカメムシの5 遺伝子座 (Hinomoto et al., 2006) の増幅確認を、コヒメハナカメムシを加えた3 種9 個体群で行った。異種で開発したマーカーのヌル対立遺伝子頻度は同種のもの比べて約2 倍あり、種を超えたマーカーの利用は注意を要することがあきらかになった。
 (6) タイリクヒメハナカメムシが分布する地域と分布しない地域で、高さの異なる花から採集したヒメハナカメムシ類群集の種構成を調査したところ、タイリクヒメハナカメムシが分布しない地域では、低位置でナミヒ

メハナカメムシ、中～高位置でコヒメハナカメムシが圧倒的に優先していた(図3)。一方、タイリクヒメハナカメムシが分布する地域では、どの高さからもタイリクヒメハナカメムシが採集された(図3)。これらのことから、タイリクヒメハナカメムシが分布拡大に伴い、ナミヒメハナカメムシとコヒメハナカメムシのニッチェに割り込んできたと考えられた。

(7) 地理的距離と遺伝的分化の程度をマイクロサテライトマーカー遺伝子頻度を用い

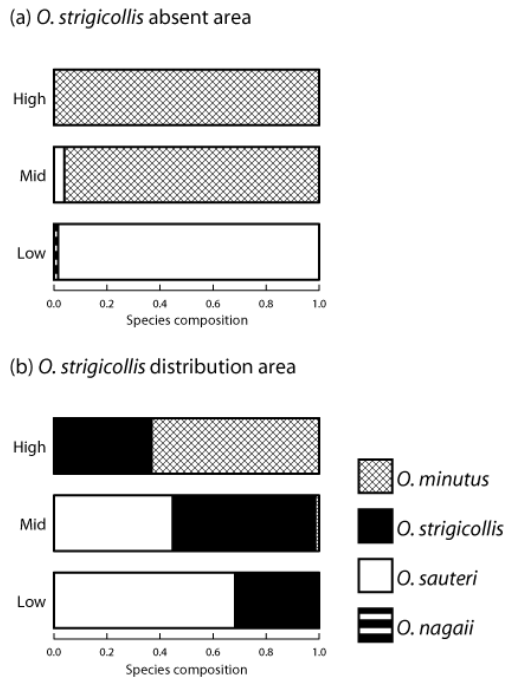


図3 タイリクヒメハナカメムシが分布しない地域(a)と、分布する地域(b)でのヒメハナカメムシ類種構成

た F_{ST} 値を用いて比較すると、タイリクヒメハナカメムシでは有意な正の相関が見られた(図4)が、ナミヒメハナカメムシでは見られなかった。このことから、タイリクヒメハナカメムシのほうが移動分散能力に劣り、遺伝子交流範囲も狭いものと推察された。

(8) これらのことを併せて考察すると、タイリクヒメハナカメムシは南方より温暖化の影響で分布を北上させ、コヒメハナカメムシおよびナミヒメハナカメムシのニッチェに侵入したと考えられた。また、生物農薬システムの放飼が各地で行われているが、潜在的な遺伝子プールが広範囲にわたるため、放飼系統の影響は軽微と考えられ、地理的距離と遺伝的距離の関係からは、生物農薬の定着の影響は見られなかった。また、タイリクヒメハナカメムシは比較的分散能力が低いと考えられ、このことが内陸部などに分布を拡大でき

ない要因と考えられた。

5. 主な発表論文等

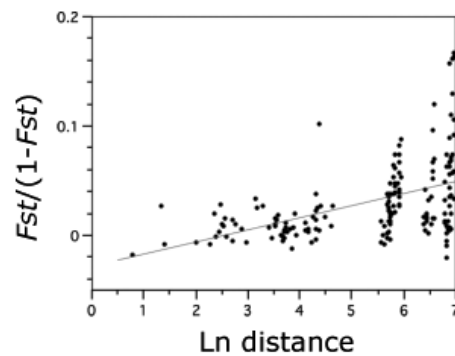


図4 タイリクヒメハナカメムシ野外個体群間の地理的距離と F_{ST} の関係

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Hinomoto N, Nagamori S, Kakimoto K, Shimizu T, Higaki T, Muraji M, Noda T, Kawasaki K (2009) Molecular identification and evaluation of *Orius* species (Heteroptera: Anthocoridae) as biological control agents. *Japan Agricultural Research Quarterly*. (in press)
- ② Hinomoto N, Higaki T, Noda T (2006) Genetic diversity in field and commercial populations of *Orius strigicollis* (Poppius) (Heteroptera: Anthocoridae) measured by microsatellite markers. *Applied Entomology and Zoology* 41:499-506.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日本 典秀 (HINOMOTO NORIHIDE)

農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・
昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニット・主任研究員

研究者番号: 80370675