

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380201

研究課題名（和文） “土着”天敵とは何か？遺伝子交流からのアプローチ

研究課題名（英文） Investigation of population genetic structure
in indigenous natural enemies

研究代表者

日本 典秀（HINOMOTO NORIHIDE）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター病害虫研究領域・主任研究員

研究者番号：80370675

研究成果の概要（和文）：

農業害虫防除における土着天敵の保護利用の影響範囲をあきらかにするために、土着天敵のマイクロサテライトマーカーを開発し、野外個体群の遺伝的構造を解析することによって移動分散範囲を推定した。アブラムシの捕食性天敵ショクガタマバエにおいては、空間的自己相関がほとんど認められず、また、ミトコンドリアハプロタイプの解析とあわせると、広範囲の移動分散を行っていると考えられた。一方チャ園におけるハダニの天敵ケナガカブリダニにおいては、距離と血縁度の負の相関が認められ、半径50m程度の範囲で交配集団を形成していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To develop conservation biological control programs, microsatellite DNA markers were developed and population genetic structures were analyzed in two indigenous natural enemy species. The aphidophagous gall midge, *Aphidoletes aphidimyza*, showed no spatial autocorrelation patterns, and different mitochondrial haplotypes were widely spread and found in most of population, indicating dispersal range in *A. aphidimyza* was beyond a single field. For predatory mite, *Neoseiulus womersleyi*, showed clear population structure in a tea field; the inhabiting range of *N. womersleyi* was expected within a 100m diameter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：生物的防除、天敵昆虫類、DNAマーカー、マイクロサテライト、個体群構造

1. 研究開始当初の背景

近年、農業害虫防除における化学農薬使用量低減を目指して天敵利用が盛んに行われるようになり、生物農薬として市販される天敵昆虫類の使用量・出荷量は年々伸び続けて

いる。また、圃場周辺の自然環境に分布する土着天敵の利用も模索され、例えば一部の地域では、農家自身が土着天敵を採集・放飼していることも、報道されている。こうした土着天敵の採集・放飼は、2003年3月に施行

された改正農薬取締法において「特定農薬」の一つとして取り上げられ、同一都道府県内に限り採集された天敵を“増殖せずに”放飼することを認めたものである。しかし、実際には採集できる天敵の個体数が害虫防除に効果的なほど多くはないなど、その利用には限界があった。しかし2009年になって、増殖土着天敵の放飼を特定農薬と見なす「特定農薬（特定防除資材）」として指定された天敵の留意事項について」という通達が、農林水産省 消費・安全局長と環境省 水・大気環境局長の連名で出された。したがって、今後、生産者によって採集・増殖された土着天敵の放飼が、各地で行われるようになると予想される。

この2003年改正農薬取締法以降の議論の中で「土着天敵」の用語が散見され、近年では「土着天敵」を冠する様々な応用的研究が進展しつつある。しかし、「土着天敵」の定義はきちんと為されているとは言い難い。「土着天敵」という用語は、日本に分布しない天敵種に当てられた「導入天敵」に対する用語と考えられるが、それであれば「同一都道府県内」に限定する必要はない。該当種が分布する地域であれば、国内すべて土着種と扱って良かる。もちろん、同一種でも地理的変異があり、「土着天敵の増殖・放飼」は大量の個体数を別の地域に持ち込むことになるため、ある程度の歯止めが必要であり、その妥協の産物が「同一都道府県内」であると考えられる。すなわち、特定農薬としての土着天敵について、学術的考察は、これまでまったくなされなかったと言える。そこで、本申請課題では、天敵野外個体群の遺伝子交流範囲の推定、異なる地域間の生殖和合性の検定、それらを用いた他地域からの天敵導入が被導入地域個体群の遺伝子構成に及ぼす影響を、DNA マーカーの開発・利用を通じて定量的に検証することを目指すものである。

2. 研究の目的

(1) 研究材料として、重要害虫であるアブラムシ類の捕食性天敵であるショクガタマバエ *Aphidoletes aphidimyza* を用いる。本種は、日本全国に広く分布する普通種であり、モモアカアブラムシ、ワタアブラムシといった代表的な害虫種を含む幅広い食性を持っている。また、本種のヨーロッパ系統はすでに生物農薬として市販されているため、そのアブラムシ密度抑制効果は実証済みである。したがって、効果が期待でき、土着天敵の利用対象となりやすいと考えられる。

ただし、この市販系統は、分子系統学的に見た場合、我が国の系統と大きくかけ離れており、別種の疑いもある (Shirota et al.

1999)。この点からも、日本の系統の製品化が求められている。したがって、土着天敵の増殖・放飼という観点のみならず、生物農薬の大量放飼ということも予想され、野外個体群の遺伝的組成への影響評価を行うことは急務であると言える。

(2) 研究材料として、重要害虫であるハダニ類の捕食性天敵であるケナガカブリダニ *Neoseiulus womersleyi* を用いる。本種は、日本全国の様々な植生で見られる普通種であり、減農薬・無農薬栽培環境下ではハダニの密度抑制に効果的に働いているとされる。したがって、本種も土着天敵としての利用対象となり得ると考えられる。

本種の種内多型を検出するマイクロサテライトマーカーを作出し、個体群構造の時空間動態を圃場レベルで明らかにすることで、土着天敵とは何かを考察するとともに、保護利用の指針を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ショクガタマバエ 3 齢幼虫 1 個体から全ゲノム DNA を抽出し、Schlötterer (1998) の方法を改変してマイクロサテライト領域の選抜を行った。クローニング後塩基配列を解析して、マイクロサテライト領域の両端にプライマーを設計、PCR による増幅の有無を確認した。

野外個体群は2009年6月、鹿児島県内の圃場において幼虫を採集した。採集した幼虫は実験室に持ち帰り個体別に成虫まで飼育し、雌雄識別後、DNA を抽出した。これらは、ミトコンドリアハプロタイプを検証するために、ミトコンドリア COI 遺伝子部分配列を決定した。

開発されたマイクロサテライトマーカーについて、キャピラリー型ジェネティックアナライザー (Beckman Coulter CEQ8000) を用いてフラグメント解析を行い、この野外個体群の個体別に遺伝子型を決定した。この遺伝子型をもとに、Genepop (Raymond and Rousset 1995)、GenAlEx (Peakall and Smouse 2006)、Structure (Pritchard et al. 2000) などのソフトウェアを用いて遺伝的多様性、血縁度、個体群構造などの解析を行った。

(2) ショクガタマバエと同様の方法で、ケナガカブリダニからマイクロサテライトマーカーの開発を行った。

野外個体群は、三重県茶業研究室のチャ圃場において、2008年の8月から10月にかけて採集されたケナガカブリダニ個体群を供試した。遺伝子型の決定および解析方法は、ショクガタマバエと同様の方法で行い、採集地点間の距離および個体間の血縁度の関係を明らかにした。

(引用文献)

Peakall ROD, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Schlötterer C (1998) Microsatellites: Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach (ed. by AR Hoelzel) IRL Press, Oxford, pp. 237-261.

Shirota Y, Iituka K, Asano J, Abe J, Yukawa J (1999) Intraspecific variations of mitochondrial cytochrome oxidase i sequence in an aphidophagous species, *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae) *Entomological Science* 2: 209-215.

4. 研究成果

(1) 多型を示すマイクロサテライトマーカーを 21 遺伝子座開発した (表 1)。雄よりも雌のほうが, Allelic Richness やヘテロ接合体頻度が高かった。雄ではまったくヘテロ接合体が見られない遺伝子座もいくつか検出され、これらは性染色体上もしくはE染色体上にあるものと推察された。そのため、個体群構造の解析に用いる遺伝子座を選択する際は注意する必要がある。

採集したショクガタマバエ個体群の空間的遺伝的構造を、開発したマイクロサテライトマーカーおよびミトコンドリアハプロタイプで解析した結果、鹿児島県薩摩半島には少なくとも 17 のミトコンドリアハプロタイプが分布するが、大きく 2 つのクレードに分かれた。一方のクレードには一つのハプロタイプだけが見つかり、生物農薬として市販されているものに近似していたが、塩基配列は異なっていた。どちらのクレードも広く分布しており、土着のものであると考えられた。さらに、マイクロサテライトによる解析の結果と合わせると、2 つのハプロタイプ集団での遺伝子交流の程度は比較的少ないと考えられた。

また、マイクロサテライトによる解析の結果、個体群毎のヘテロ接合体頻度は比較的高く、さらに、空間的自己相関の結果では有意に自己相関が見られるのは同じ地点から採集されたもののみであり 100m 程度離れた個体間でも遺伝的類似性が検出されなかった

表 1 作成したショクガタマバエのマイクロサテライトマーカーのプライマー配列 (Hinomoto et al 2012 より改変)

Locus	Primer (5'-3')
(Accession no.)	
<i>AaMS01</i>	F: TCGGCAATTCAATCTATCTGG (AB591708) R: CGACATCTGAATGCAGTGAACA
<i>AaMS02</i>	F: GACAGAAACAGGACGGGAAT (AB591709) R: AAGATTGTGAATAGTTTTCCACTCCA
<i>AaMS04</i>	F: AAATTCGAGGCGCATGTGAT (AB591710) R: GAGTCACCAACCGTTTTTCGTT
<i>AaMS05</i>	F: TCGAATGCATACAAACGCACAT (AB591711) R: ACTTCCAAAATAATTTGTATCAAGTGAAT
<i>AaMS06</i>	F: CCATATTTGCTCCGGAATCTG (AB591712) R: ACATTCGTTGTATCCATCCAAA
<i>AaMS07</i>	F: GCAAAGATGACGACCAATAGCA (AB591713) R: GCTTGGTTAATTTCCAAAGTGC
<i>AaMS09</i>	F: GCAGAAATGATGGTGAATGGA (AB591714) R: AACTGGAGCTACCATTCTGTCAAA
<i>AaMS10</i>	F: AATTCGTGCAATGTGCGGTTA (AB591715) R: GAATGCCTAAAACCACTGCATCTT
<i>AaMS11</i>	F: CAAACTAGAGACGTGTTCCCAAT (AB591716) R: GAATCGAAGTACTCAAAGTCCCAAT
<i>AaMS12</i>	F: TGGTTAACGGAATATGAATAGTAGAAGAA (AB591717) R: CTTTCGTCTCAATGGCTGCAA
<i>AaMS13</i>	F: TTGTGAGAAAAGAAAAGCAACGA (AB591718) R: TACCTGTGTCAGTGTGTGTGG
<i>AaMS14</i>	F: CAATAACAAAAGAAAACAGACAGCTAGAAG (AB591719) R: GCTTGTCTGGCGATCGTCTT
<i>AaMS15</i>	F: CAITCGAATGAAGGAGTGTTCG (AB591720) R: TTTGTTGCAACTCGCTGTTGTT
<i>AaMS16</i>	F: TCAATGATGTGTGCGGTGTTG (AB591721) R: TTGAACCGAGCTCCTTTGAATC
<i>AaMS18</i>	F: ATGCAAAATGATTTTCGACATGG (AB591722) R: AGCCACTGGACAACAGGTACAATTT
<i>AaMS19</i>	F: GGCACATGTTGCTACCACCTA (AB591723) R: CGGTACTGTTCTGTTCACTGTTT
<i>AaMS26</i>	F: ATGAATGAAAAAGAGAAAAGATATTCAGA (AB591724) R: TTTTCCGTTTCGTTTGTCTC
<i>AaMS28</i>	F: ATATTTGACCCGACCGGTTG (AB591725) R: ATTTGAGTGCTTTTGAATGCT
<i>AaMS33</i>	F: TGTTTGTGTATGAAGAGAGTTTCG (AB591726) R: GAATTCITTTCTTTTCGATTTGCTTT
<i>AaMS35</i>	F: TTGTTCCGATGGCAAACCTAG (AB591727) R: CGAACTGATCGACCAGAATAAGAA
<i>AaMS36</i>	F: TCACACTCATGCTGTTTGGATT (AB591728) R: GATTGTTAAGAGCGGAGAGTGCAT

ことから、本種の移動分散範囲は、かなり広いものと推察された。

これらのことから、ショクガタマバエについては、同一地域においても同所的に分布する遺伝的背景の異なる複数の集団が存在しており、広範囲にわたって移動分散を行っていると考えられる。このことから、想定される遺伝子プールは比較的広いものと考えられた。

(2) 多型を示すマイクロサテライトマーカーを 10 遺伝子座開発した (表 2)。これらを用いて、チャ園におけるケナガカブリダニの遺伝的多様性を解析したところ、ヘテロ接合体頻度が期待値と比較して低く、近交係数が高い傾向が検出された。このことから、本種のチャ園における近親交配の度合いは比較的高く、移動分散による遺伝子交流は少ないものと予想された。

続いて個体群構造を調査したところ、このチャ園集団は3つの遺伝的クラスターに由来することが判明した(図1)。各個体のクラスターの割り当てを比較したところ、最も遠い個体群のみ遺伝的組成が異なる傾向が見られた。個体別に血縁度を比較すると、採集された地点が50m以下の場合には個体間の血縁度が高く、距離が離れるにつれ低下した(図2)。

これらのことから、本種はチャ園においては、半径50m程度の範囲に土着していると考えられた。したがって、チャ園で本種を保護利用する場合は、この半径100mが管理単位の基準となるといえる。

表2 作成したケナガカブリダニのマイクロサテライトマーカーのプライマー配列(Hinomoto et al 2011より改変)

Locus	Primer (5'-3')
(Accession no.)	
<i>NwMS801</i>	F: CCTACCGTTAACCTGGCGTA (AB533197) R: GAAAGCGTGAGGAGTGGAAC
<i>NwMS810</i>	F: GGATGAAGAGAGAGCGGAGAAAGTAT (AB533198) R: ACCTCCAITTTCTCTCCTT
<i>NwMS814</i>	F: CGCGAGCGAGCTTGTTTT (AB533199) R: GTCCTCTCCGATCAACACC
<i>NwMS828</i>	F: TTCATCTCTCGACCTCTCC (AB533200) R: GGAGGAACTAGGAGCTGGA
<i>NwMS831</i>	F: CAGAGAACGAGAAGAGATCAGG (AB533201) R: CATCGTCAGACTTTGTCTCTGT
<i>NwMS856</i>	F: CTGGAGCCCTCGAAGTTTA (AB533202) R: GGGCTCGAAAGGTTCAAAA
<i>NwMS861</i>	F: TTCGTGAAATTCGTTGATCG (AB533203) R: AGTGACGAIITTCGCCTCAA
<i>NwMS867</i>	F: TTCGTCTCTGTGGAAGTTG (AB533204) R: AGCGCAATCGCTTCAAAGT
<i>NwMS872</i>	F: ATGGCGATACGACGACAAA (AB533205) R: CGCTCGCTGAACCTCAAATAG
<i>NwMS880</i>	F: CAAGTTTCCAGCTCGGTCAT (AB533206) R: GCAGAAGGAGCTACTGAAGCA

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Hinomoto N, Higaki T, Abe J, Yamane M, Yano E (2012) Development and characterization of 21 polymorphic microsatellite loci in the aphidophagous gall midge, *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae). *Applied Entomology and Zoology* 47: 165-171. 査読有. doi:10.1007/s13355-012-0104-z
- ② Yamane M, Yano E, Matsumoto Y, Yoshioka S, Kawai T, Toyonishi H, Nakamura T (2012) Effect of photoperiod and temperature on the induction of diapause in a Japanese strain of

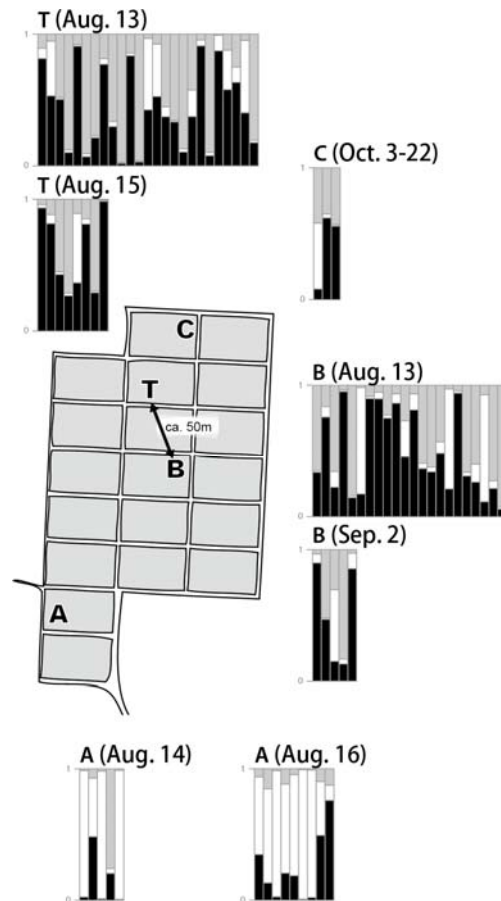


図1 チャ園で採集されたケナガカブリダニの遺伝的構造。A,B,CおよびTは採取地点、棒グラフは各個体の遺伝的組成を示す。(Hinamoto et al 2011より改変)

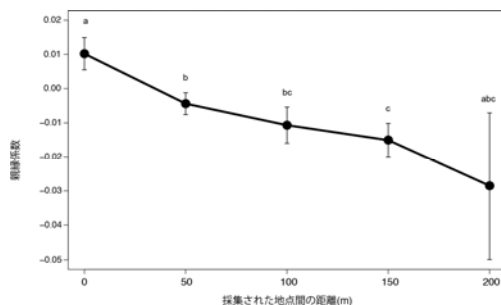


図2 チャ園で採集されたケナガカブリダニの個体間の地理的距離と親縁係数の関係。(Hinamoto et al 2011より改変)

Aphidoletes aphidimyza (Diptera: Cecidomyiidae). *Applied Entomology and Zoology* 47: 17-26. 査読有. doi:10.1007/s13355-011-0084-4

- ③ 日本典秀・榎垣智美・前田太郎・長森茂之・富所康広 (2011) マイクロサテライトDNAマーカーを利用した天敵評価. *植物防疫* 65: 274-279. 査読有.

- ④ Hinomoto N, Todokoro Y, Higaki T (2011) Population structure of the predatory mite *Neoseiulus womersleyi* in a tea field based on an analysis of microsatellite DNA markers. *Experimental and Applied Acarology* 53: 1-15. 査読有.
doi:10.1007/s10493-010-9384-6

安部 順一郎 (ABE JUNICHIRO)
(独) 農研機構・近畿中国四国農業研究センター・水田作研究領域・主任研究員
研究者番号：20450330

[学会発表] (計 12 件)

- ① 松尾和典・後村佳奈子・安部順一郎・湯川淳一, ショクガタマバエ (ハエ目: タマバエ科) に寄生する *Gastrancistrus* 属 (ハチ目: コガネバチ科) の発見と頭部形態に関する考察. 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会, 2012 年 3 月 29 日, 奈良市
- ② 日本典秀・安部順一郎・山根雅史・矢野栄二, ショクガタマバエ地域個体群間の個体群構造. 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会, 2012 年 3 月 28 日, 奈良市.
- ③ 矢野栄二, 植生管理による天敵利用の展望—天敵の放し飼いと行動制御—. 第 21 回天敵利用研究会, 2011 年 12 月 1 日, 奈良市
- ④ 日本典秀, 害虫管理における天敵利用と個体群管理. 個体群生態学会第 27 回大会, 2011 年 10 月 16 日, 岡山市.
- ⑤ 日本典秀・國本佳範・小山裕三, 小ギク圃場周辺におけるケナガカブリダニ個体群構造の時空間的解析. 第 20 回日本ダニ学会大会, 2011 年 9 月 29 日, 高知市.
- ⑥ Hinomoto N, Kunimoto Y, Koyama Y, Species identification and genetic population characteristics of phytoseiid mites around chrysanthemum fields for conservation biological control of spider mites. Third Meeting of IOBC Working Group Integrated Control of Plant-Feeding Mites, 2011 年 9 月 14 日, Český Krumlov, Czech Republic.
- ⑦ 安部順一郎, ショクガタマバエのバンカー法と実用化の展望. 研究集会「バンカー法の研究開発の現状と将来展望」, 2011 年 6 月 8 日, 山口市
- ⑧ 日本典秀・安部順一郎・山根雅史・矢野栄二, ショクガタマバエ野外個体群のミトコンドリア DNA 多型について. 関東東山病虫害研究会第 58 回研究発表会, 2011 年 2 月 25 日, さいたま市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日本 典秀 (HINOMOTO NORIHIDE)
(独) 農研機構・中央農業総合研究センター・病虫害研究領域・主任研究員
研究者番号：80370675

(2) 研究分担者

矢野 栄二 (YANO EIZI)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：30355549