

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15235

研究課題名(和文)環境DNAとメタバーコーディング技術を用いた害虫管理の基盤開発

研究課題名(英文)Fundamental study on environmental DNA based techniques of metabarcoding applied to insect pest managements

研究代表者

三木 衣代(米谷衣代)(Miki, Kinuyo)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：50618593

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):害虫が作物を加害する際に作物上に残した環境DNAを回収する方法について検討した。環境DNAが回収できたかどうかはCOI遺伝子領域の節足動物のバーコード領域を次世代シーケンサーで読むことで検証した。その結果、鉢植えのナス、キャベツ、地植えのキャベツ、水稻上から植物を傷つけることなく害虫や天敵の環境DNAを回収することに成功した。また、作物上に残留している環境DNAの検出に必要な食害期間、害虫の個体数は害虫の種類によって異なることを明らかにした。たとえば、植物に接種後1時間で検出できる場合や害虫が食害後に虫を除去した場合、7日間以上環境DNAが植物上に残留している場合があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

害虫の発消長の調査は害虫発生を抑制する害虫管理に重要である。しかし、害虫の調査には、分類の専門的な知識が必要であることや作物の被害拡大後まで害虫発生が発見されない場合があることなどの問題がある。そこで本研究では、農業生産の現場において害虫管理を効率的に進めるために、最新のDNA解析技術(環境DNAとDNAバーコード)を活用し、高精度・高頻度での昆虫発消長データの収集を可能にする基盤技術開発を行うことで、害虫管理に寄与することで、将来的には食糧の安定供給に貢献する。

研究成果の概要(英文):We developed a new environmental DNA(eDNA) collecting method for the arthropods on crops. DNA barcode region, Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, of the collected eDNA was comprehensively sequenced by a high-throughput sequencer after being extracted, purified, and amplified. As the result, we successfully collected and detected eDNA of pest species and their natural enemies collected from potted eggplant and cabbage and cabbage and rice plant planted directly in the ground. We also investigated the condition of pests when we could collect and detect the eDNA. As the result, it depended on the period of infestation by pest insects, the period after removing pest insects from a plant, and the number of insects feeding on a plant whether the eDNA was detected or not. For example, in some cases, eDNA was detected in an hour after feeding started by pest insects and, in other cases, eDNA was remained on a plant more than 7 days, after the pest insects were removed from the plant.

研究分野：生態学、農学

キーワード：環境DNA メタバーコーディング 害虫管理 植物 動物相互作用 発生予察

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 害虫の発生消長の調査は害虫発生を抑制する害虫管理に重要である。しかし、害虫調査には以下の問題点がある。種同定の決め手が成虫期の特性であるものが多く、卵や若齢期においては、同定が困難である。また、微小であるため発見が難しく、作物の被害が大きくなると目視での害虫の確認が難しい場合や、食痕が確認できてもその由来昆虫を判定できない場合も多い。問題点を解決するため、環境 DNA やメタバーコーディングに注目した。

(2) 環境 DNA とは生物体内から出のち周囲の環境中に残存する DNA の総称である。環境 DNA 解析技術を用いると、絶滅危惧種のように個体数が少なく発見の困難な種について、注目する河川水からその生物の DNA 断片の存在を確認することで、生息判定ができる¹。メタバーコーディング技術では DNA の情報を基盤とした種同定と次世代シーケンサを活用することで一度に大量のサンプルから種の同定を行うことができる²。また、環境 DNA と組み合わせると、ある水域にどれほどの多様な生物種が存在するかを推定することも可能である。このような環境 DNA を用いた研究は DNA の回収が比較的容易である水域や土壌の生物を中心に行われてきた³。一方、陸上植物を利用する昆虫を対象とした場合、ミトコンドリアの COI (cytochrome c oxidase subunit I) 遺伝子が種同定のためのバーコード領域として多様な昆虫分類群においてその有用性が確認されているが⁴、植物上やその内部に残った昆虫 DNA を回収する方法はほとんど確立していない。

2. 研究の目的

本研究で、農業生産の現場において害虫管理を効率的に進めるために、最新の DNA 解析技術 (環境 DNA と DNA バーコード) を活用することにより、高精度・高頻度での昆虫発生消長データの収集を可能にすることを目的とし、植物上にいる害虫が残した環境 DNA に注目して害虫の種類や摂食方法などを考慮して、害虫の環境 DNA を回収する手法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 環境 DNA の回収方法の検討

植物上から植物を傷つけることなく、植物上に残った環境 DNA や植物上から落ちて水田の水の中に溜まった環境 DNA の効率的な回収方法を検討するために、複数の装置を設計、作成して、ポット植え植物、地植え植物、水稲など、栽培形態の異なる作物から環境 DNA の回収を行った。植物上には任意の害虫をのせて植物を加害させた。

(2) 回収・検出効率の検討

アブラムシ類とチョウ目の幼虫を対象に、虫の種類 (加害様式の違い: 吸汁性・咀嚼性など) による検出力の違いを比較した。環境 DNA が回収できたかどうかは COI 遺伝子領域を次世代シーケンサーで読むことで、検証した。

(3) 新手法を用いた農地における害虫の調査法の確立

開発した手法を用いて水稲において害虫の発生・消長データを収集し、従来の調査方法との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 形態および収穫部位の異なるキャベツとナスを対象に植物上にいる害虫が残した環境 DNA を回収する方法について検討した。その結果、鉢植えのナス、キャベツおよび地植えのキャ

ベツ上から植物を傷つけることなく害虫や天敵の環境 DNA を回収することに成功した。検出した節足動物にはアブラムシ、チョウ目の幼虫などの植食者に加えて捕食者、寄生蜂なども含まれていた。また、目視では確認できていなかった微小なコナジラミやハダニも検出された。

(2) 重要害虫であるアブラムシやチョウ目の幼虫を用いて、環境 DNA の回収・検出可能期間や害虫数などを調べた結果、検出に必要な食害期間、食害後の期間、害虫の個体数は害虫の種類によって異なることが示唆された。たとえば、植物に害虫を接種して1時間後に eDNA を検出できる場合や食害後に虫を除去しても、7日間以上 DNA が植物上に残留している場合があることが明らかとなった。

(3) 水稻上と畑に張った水の中から害虫の環境 DNA を回収する方法を検討した。その結果、水稻上からさまざまな種類の節足動物が検出され、イネの害虫も複数種検出された。しかし、水中からは、水生の節足動物などが多く検出された一方で、植物を加害する害虫の環境 DNA を検出することはできなかった。つまり、本研究で開発した植物上から環境 DNA を直接回収する方法の方が、溜まった水から検出しようとするよりも有用であることを示している。

(4) 水稻上からの環境 DNA の回収およびスウィーピング調査による虫の採集を2週間に1度行い、環境 DNA の調査方法と従来の調査方法との相同性を調べた。その結果、多くの虫が実際の調査と同じように検出されていた。しかし、虫全体における各種類の検出割合は DNA 断片数でみた場合と、従来の調査での個体数で調べた場合は一致せず、採集された虫の数と DNA 断片数の関係性は示せなかった。そのため、環境 DNA による調査結果をそのまま発生数に変換するのは難しく時系列解析にかけることが容易ではないが、スウィーピング調査で発見できなかった害虫が eDNA の調査では高頻度で検出されたことは、微小な害虫に対する発生予察にこの技術が貢献できることを示唆している。

引用文献

1. Fukumoto et al. (2015) *Journal of Applied Ecology* 52: 358-365,
2. Thomsen & Willerslev 2015 *Biological Conservation* 183:4-18,
3. Bohmann et al. 2014 *Trends in Ecology and Evolution* 29:358-367,
4. Brandon-Mong et al. 2015 *Bulletin of Entomological Research* 1-11,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 米谷衣代、潮雅之 |
| 2. 発表標題 植物上に残留する節足動物のDNAを検出する方法の開発 |
| 3. 学会等名 第63回応用動物昆虫学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 米谷衣代、神野五基、潮雅之 |
| 2. 発表標題 作物上に残る天敵・害虫のDNAを検出する |
| 3. 学会等名 応用動物昆虫学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 米谷衣代、神野五基、潮雅之 |
| 2. 発表標題 植物上に残された昆虫のDNA抽出方法の開発 |
| 3. 学会等名 日本生態学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| 産業財産権の名称 節足動物の痕跡調査方法および液体回収器 | 発明者 米谷衣代、潮雅之 | 権利者 学校法人近畿大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2019-041686 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究協力者 | 潮 雅之 (Ushio Masayuki) (40722814) | 京都大学・白眉センター・特定准教授 (14301) | |
| 研究協力者 | 三木 健 (Miki Takeshi) (00815508) | 龍谷大学・先端理工学部・教授 (34316) | |