

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23405012

研究課題名(和文) 東南アジアで進行中のニジュウヤホシテントウの食草変換：その時間的・空間的動態

研究課題名(英文) Spatio-temporal dynamics of host-shift in *Henosepilachna vigintioctopunctata* now in progress in Southeast Asia

研究代表者

片倉 晴雄 (Katakura, Haruo)

北海道大学・ - ・名誉教授

研究者番号：40113542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000 円、(間接経費) 4,500,000 円

研究成果の概要(和文)：フィールド調査、食性実験、DNA解析により、東南アジアで進行中のニジュウヤホシテントウのナス科食からマメ科ムラサキチョウマメモドキ(以下、チョウマメ)への食草の変換・拡大の時空間的動態を調べた。スダ陸塊主要部ではチョウマメ利用集団が広く見られ、現在も東部に向けて分布域を拡大していると推定された。一方、DNA解析の結果は、チョウマメ利用が各地で独立に生じた事を示唆している。テントウ集団のナス科食とチョウマメ食への分化もしくはナス科食からチョウマメ食への転換の兆しは不明瞭であり、チョウマメ利用が広範に見られる地域においてもテントウはチョウマメに十分に適応してはいない。

研究成果の概要(英文)：On the basis of field observations, food choice tests, rearing experiments and an analysis of mitochondrial DNA sequences, we studied spatio-temporal dynamics of host changes of *Henosepilachna vigintioctopunctata* in Southeast Asia. The primary host plants of this species are considered to be solanaceous plants. However, the populations utilizing an introduced legume "centro" were widespread in the southern part of the Malay Peninsula, Java, Sumatra, and western Kalimantan. They were not common or absent in more eastern areas. The DNA analysis suggested multiple origins of the centro-feeding trait in solanum-feeding populations in Southeast Asia. No convincing evidence was obtained for the divergence of *H. vigintioctopunctata* along the two host plants, or for the host change from solanum to centro. Even the centro-feeding populations showed an extended larval period and small body size on centro, suggesting that they were not yet fully adapted physiologically to this plant.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生物多様性・分類

キーワード：ニジュウヤホシテントウ 東南アジア 寄主特異性 生態的種分化 食草変換

1. 研究開始当初の背景

(1) 食植性昆虫は種数にして全生物の4分の1を占めるといわれており、その種分化過程の解明は、生物多様性の起源の相当部分の理解につながる。我々はこれまでにマダラテントウ類とその食草の系を用いて、食植性昆虫の「食草の変換」が同一地域における複数種の共存に大きな役割を果たすのみならず、ほぼ完全な生殖隔離を一度にもたらす「種分化そのもの」であることをいくつかの近縁集団の比較によって明確に示した。また、「食草の変換」は単に新しい食草を認知し摂食出来るかという生理的なレベルの解析で理解できるような単純な現象ではなく、食植性昆虫の生活史全般にわたってさまざまなかたちで影響を及ぼす複合的現象である事も明らかにしつつある。しかし、従来の研究は食草変換が完了した後の新旧食草に依存する集団間の関係について明らかにしたのみで、食植性昆虫の寄主変換プロセス自体に関しては依然としてよく分かっていない。そこで、本研究計画では、アジア熱帯において現在食性を変換しつつあるニジュウヤホシテントウ (*Henosepilachna vigintioctopunctata*) を材料としてこの問題の解明に取り組むこととした。

(2) ニジュウヤホシテントウはアジアからオセアニアにかけて広く分布するナス科植物の害虫だが、実際には日本からインドシナ半島にかけての暖温帯から亜熱帯に分布する種と、インドシナ半島南部からインドネシアにかけての熱帯域に分布する種の2種の姉妹種を含む。本研究で対象に据えたのは、このうち後者(以下、「ニジュウヤホシテントウ」)である。我々の先行研究によって、ジャワ島西部(ボゴール)、スマトラ島西部(パダン)、マレー半島南部のクアラルンプールにおいて、1990年代始めまでに既にニジュウヤホシテントウがナス科植物と移入植物であるマメ科のムラサキチョウマメモドキ (*Centrosema molle*、以下、チョウマメと略記)を併用していたこと、同一地域のナス類とチョウマメに依存するテントウ集団の間には食草選好性や体サイズに違いがある事、ボゴールではその後の短期間にチョウマメへの適応が進行している事、さらに、ジャワ島やバリ島にはチョウマメへの様々な適応段階にあると思われる集団が存在する事が次々に明らかにされていた。チョウマメのインドネシアへの導入はおそらく19世紀で、1920年代にはジャワで野生化しており、緑肥としても広く使用されていた。従って、ニジュウヤホシテントウがチョウマメに出会ってから少なくとも80年以上が経過していることになる。しかし、本種によるチョウマメの加害が注意を引くようになったのは1980-90年代であり、かなり長期にわたる未利用の時期を経て、近年急速にその利用が各地に広がったことが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、ニジュウヤホシテントウとその食草の系を用い、特定集団の食性の継続的な調査とインドネシアおよびマレー半島における食草利用状況の地理変異の調査を組み合わせ、新規食草であるムラサキチョウマメモドキへの適応の時間的・空間的動態を明らかにする事を目的とした。その上で、新規食草への適応に關与する遺伝的形質の性質やその起源、それが集団内に広まって行くプロセスを具体的に把握する事を意図した。特に、チョウマメを利用する能力があらかじめニジュウヤホシテントウ集団に潜在していたのか、それとも近年獲得したもののなのか、チョウマメの利用は単一起源か複数地域で独立に生じたのか、という問いに答える事を旨とした。先行研究によってニジュウヤホシテントウの寄主変換は著しく速く進行している事が示唆されており、長期にわたって毎年少数の集団を調査し、その結果を統合しても、それが特定の時点における地理変異の様相を反映しているとは限らない。以上の理由から、本研究課題では短期間に集中して地理変異の様相を把握することに重点を置いた。

3. 研究の方法

実験には旧来のナス科食草の代表として、東南アジアに広く分布し、ニジュウヤホシテントウの主要な食草となっているスズメナスビ (*Solanum torvum*) を用い、野外調査においてもスズメナスビとチョウマメへの加害状況に重点を置いた。なお、以下ではスズメナスビおよびチョウマメから採集した個体およびその子世代をそれぞれスズメナスビ系統、チョウマメ系統と呼ぶ。

(1) 対象地域：インドネシアを中心としたアジア熱帯域(マレー半島、ボルネオ、スマトラ、ジャワ、スラウェシ、バリ)

(2) フィールドにおける調査：まず、各地に実際に赴き、ニジュウヤホシテントウのチョウマメの利用状況を野外調査で、各地のテントウ集団の食性の概要を現地地実施する簡便な食草選択試験(スズメナスビとチョウマメの葉を個別の成虫に同時に与えておよそ24時間後の摂食量を計量し、比較する)によって明らかにした。

(3) 室内実験：ボゴールの動物学研究所において以下の飼育実験を実施した。

ボゴールのスズメナスビ系統およびチョウマメ系統を対象として2種植物による幼虫飼育を行い、2種類の植物上での成育能力を示すパラメータ(生存率、成育日数、蛹化時の体重など)を解析し、スズメナスビ利用能力とチョウマメ利用能力との間、および、幼虫期と成虫期といった異なる成育ステージにおける成育パラメータ間の遺伝的関連性(遺伝相関)の有無を検討した。

先行研究の過程で、ニジュウヤホシテントウの幼虫をチョウマメで飼育する際に、与える葉の新旧が幼虫の生存率などに影響を与える可能性が示唆されていた。そこで、ポゴールのチョウマメ系統を用いて、チョウマメ、スズメナスビの葉の新旧が成虫の選好性と幼虫の生存にどのような影響を及ぼすかを調べた。

各地の代表的集団を選び、2種食草上での成育能力を調査、比較した。

(4) *Henosepilachna* 属他種のチョウマメ摂食能力：各地においてニジュウヤホシテントウと同時に他の *Henosepilachna* 属の種がナス科植物から採集された。これらの種についてもニジュウヤホシテントウと同じ手順で成虫の選好性を調査した。

(5) DNA解析：フィールド調査で採集したサンプルのミトコンドリア COI (シトクロームオキシダーゼサブユニット 1) 遺伝子の塩基配列 (652bp 領域) を用いて、異なった食草を利用している集団間の関係を集団遺伝学的手法で解析し、食性の地理変異の様相とあわせて寄主変換が繰り返し生じたかどうかを検討した。

4. 研究成果

得られたサンプルの解析はまだ進行しているので、ここでは现阶段で得られた結果について報告する。

(1) チョウマメ利用の地理的なパターンの概要：本調査では、マレー半島2地域、スマトラ2地域、カリマンタン(ボルネオ)3地域、スラウェシ3地域、ジャワ2地域、バリ島の計13地域で分布調査を実施した(図1)。それぞれの地域では、最小で8地点(北スマトラ)、大半の地点では、十数地点以上で調査を行っている。ナス類(スズメナスビ

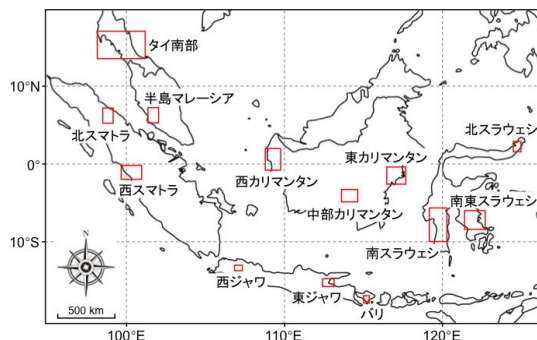


図1. 調査地域

を含む)はすべての調査地域に分布していた。チョウマメも全調査域で分布を確認したが、標高の高い地域では少ない傾向が認められた。ニジュウヤホシテントウによる2種食草の利用状況には以下の傾向が見られた。

ナス類への加害はすべての地域で広く認められた。一方、チョウマメへの加害はマレ

ー半島、スマトラ、ジャワ、カリマンタン西部、バリでは頻りに認められたが、中部・東部カリマンタンとスラウェシでは稀であり、特に北スラウェシではチョウマメを加害する集団を確認する事は出来なかった。

チョウマメ利用集団は一般に低地で多く観察され、頻りにチョウマメの利用が観察された地域(例えば西ジャワ、西スマトラ)でも、標高が高くなるにつれて少なくなった。

(2) 成虫の食草選好性：採集した成虫を個別に小型容器に入れ、スズメナスビとチョウマメの葉を一晩与え、摂食量を測定したのち、チョウマメとナスの摂食量の差を摂食量の合計で割った値を求め、チョウマメ選好性の指標とした。チョウマメのみを摂食した場合、+1、ナスのみの場合、-1となる。図2に、チョウマメから採集した573個体とスズメナスビから採集した884個体の実験結果を要約する。

スズメナスビ系統は平均すると強いスズメナスビ選好性を示すが、例外的に強いチョウマメ選好性を示す個体も含まれていた(図2下)。また、チョウマメを利用する頻度が低いスラウェシや中部・東部カリマンタンにおいてスズメナスビから採集した個体は、他地域の個体に比して幾分チョウマメ選好性が低い。

チョウマメ系統ではチョウマメ選好性は大きくばらついたが、平均値ではスズメナスビよりもチョウマメを好む傾向が示された(図2上)。チョウマメ系統のチョウマメ選好性にはスズメナスビ系統に見られたような選好性の地理的傾向は認められない。

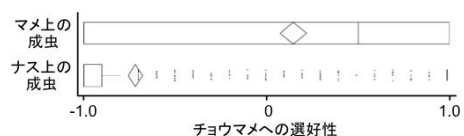


図2. ムラサキチョウマメモドキおよびスズメナスビから採集した成虫の食草選好性。2種の食草を同時に与え、一晩自由に摂食させた。横軸は全摂食量に対するムラサキチョウマメモドキの摂食量。ボックスは中央値および上下側4分位点、ひし形は平均値と95%信頼区間、ドットは外れ値を示す。

(3) 成虫の体サイズ

体サイズの指標として、チョウマメ系統成虫703個体とスズメナスビ系統成虫880個体の前胸幅を測定した結果を図3に示す。

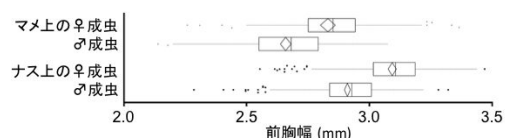


図3. ムラサキチョウマメモドキおよびスズメナスビから採集された成虫の体サイズ(前胸幅)。ボックスは中央値および上下側4分位点、ひし形は平均値と95%信頼区間、ドットは外れ値を示す。

雌雄ともにチョウマメ系統はスズメナスビ系統よりも小さい。ただし、後者には小型の個体が一部含まれていた。

体サイズは東に向かうほど、また標高が高くなるほど大きくなる傾向がある。

(4) 幼虫の生存

各地域から選んだ集団の幼虫を2種食草で飼育し、羽化率や羽化に至る日数、蛹体重など、それぞれの植物上での成育のパラメータを求めた。ここでは、西スマトラ（パダン）、西ジャワ（ボゴール）、東ジャワ（スラバヤ）、バリ、東カリマンタン（バリクパパン）のニジュウヤホシテントウ集団をスズメナスビおよびチョウマメで飼育した場合の生存率を示す（図4）。ボゴールとバリに関しては複数年にわたり同一地点集団を調べた結果、パダンに関しては、異なった年に近隣の地点で採集した集団を調べた結果を示した。

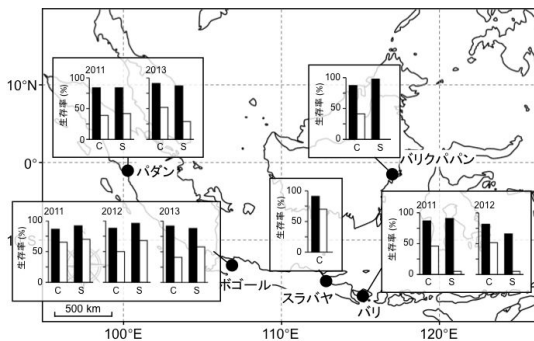


図4 . スズメナスビおよびチョウマメで飼育したときの幼虫の生存率（羽化率）。同一地域で複数年次にわたって調べた結果には年号を付した。図中のSとCはそれぞれスズメナスビ系統とチョウマメ系統の幼虫。黒バーはスズメナスビで飼育、白はチョウマメで飼育した結果。

スズメナスビ上での生存率は、採集した地域、植物にかかわらず高い値を示し、常にチョウマメ上での生存率を上回っていた。

スズメナスビ系統とチョウマメ系統のスズメナスビ、チョウマメ上での生存率は、パダンおよびボゴールの集団ではあまり違いが認められなかった。その一方、東方の地域（バリクパパン、バリ）では、スズメナスビ系統とチョウマメ系統のスズメナスビ、チョウマメ上での生存率に顕著な違いが認められ、チョウマメ系統のチョウマメ上での生存率は他地域と変わらなかったが、スズメナスビ系統のチョウマメ上での生存率は著しく低かった。

(5) チョウマメの葉の新旧がニジュウヤホシテントウの摂食に及ぼす影響

成虫の選好性（図5）：スズメナスビの葉の新旧はテントウの選好性に目立った影響を与えなかった。一方、チョウマメの葉の新旧は成虫の選択に強い影響を与え、成虫は新

葉を好んだ。

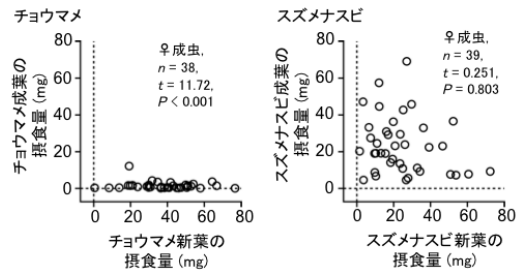


図5 . チョウマメまたはスズメナスビの新旧の葉を同時に与えた際のニジュウヤホシテントウ雌成虫の摂食量。各プロットは成虫1個体の摂食量を示す。検定は対応のあるt検定による。

幼虫の成育（図6）：スズメナスビの葉の新旧はテントウの成長に影響を与えない。一方、チョウマメの場合には、幼虫期の生存には葉の新旧は影響しないが、蛹化する時点で成葉での生存率が急減し、結果としてごく一部の個体しか羽化できなかった。

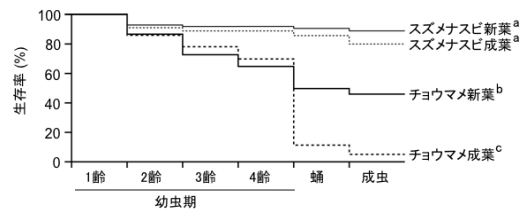


図6 . チョウマメまたはスズメナスビの新旧の葉でニジュウヤホシテントウの幼虫を飼育した際の生存曲線。異なるアルファベットを付したものに有意差がある（一般化 Wilcoxon テストの後、Holm の補正）。生存曲線は Kaplan-Meier 法で作成。

(6) *Henosepilachna* 属他種のチョウマメ摂食能力

ナス科植物を加害する *Henosepilachna* 属他種として、*H. diffinis*（カリマンタン）、*H. sumatrensis*（マレーシア）、*H. enneacticta*（スマトラ、ジャワ）、*H. sp. 10*（スラウェシ）の4種の成虫にスズメナスビとチョウマメを同時に与え、どちらを好むかを調べたところ、すべての種で、一部の個体がチョウマメを摂食した。このうち *H. diffinis* では幼虫の成育の可否も調べられており、一部の幼虫がチョウマメで3令まで成長した（図7）。

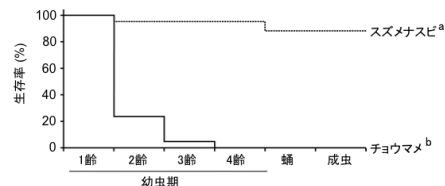


図7 . チョウマメまたはスズメナスビで *Henosepilachna diffinis* の幼虫を飼育した際の生存曲線（Kikuta et al. 2013, *Treubia* 40:39-46 から改変して引用）。異なるアルファベットを付したものに有意差がある（一般化 Wilcoxon テスト）。生存曲線は Kaplan-Meier 法で作成。

(7) ミトコンドリア COI 遺伝子

現在までに、9地点（クアラルンプール、北スマトラ、西スマトラ、西ジャワ、東ジャワ、バリ、東カリマンタン、北スラウェシ、南スラウェシ）から得た計48集団664個体の解析を終えた。

ニジュウヤホシテントウの集団はある程度地理的に分化している事が示された（図8）。すなわち、マレー半島とスマトラ、ジャワ、スラウェシ、カリマンタンのそれぞれにおいて、ネットワーク上で近隣に位置するハプロタイプで構成される特徴的な遺伝的構造が認められる。唯一の例外はバリの集団で、ネットワーク上に散在する多様なハプロタイプを持ち、遺伝的多様性が高い。

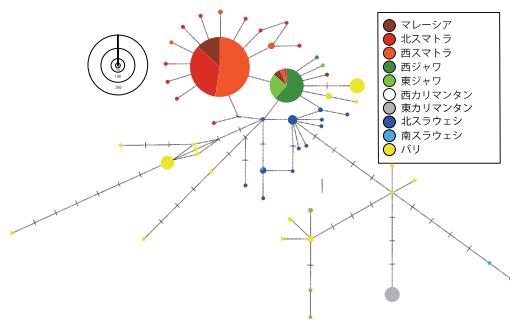


図8.ミトコンドリア COI 遺伝子部分配列のハプロタイプネットワーク（地域別色分け）

異なった食草上から採集された個体の間に食草に対応した遺伝的差異は認められない（図9）。

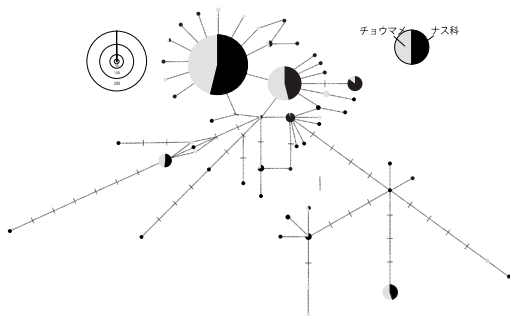


図9.ミトコンドリア COI 遺伝子部分配列のハプロタイプネットワーク（食草別色分け）

(8)まとめと考察

時・空間的動態：チョウマメは調査対象域全域で確認されたが、チョウマメ食は調査域の西部で広く見られ、調査域東部に位置するカリマンタン東部・中部やスラウェシではほとんど見られない。成虫の選好性および幼虫の2種植物上での成育能力もこれと一致し、西部の集団ではスズメナスビ系統もチョウマメ系統もチョウマメ利用能力が高いが、調査域の東部では、稀に存在するチョウマメ系統のチョウマメ利用能力は他地域と変わらないものの、スズメナスビ系統はチョウマ

メを好まず、成育能力も低い。また、バリ島には様々な程度のチョウマメ利用能力を持つ集団が存在する。さらに、ロンボク島以東の小スンダ列島ではチョウマメは存在するもののニジュウヤホシテントウによる加害は認められていない（Fujiyama et al. 2013, *Treubia* 40: 25-30）。また、南スラウェシおよび中部ジャワでは、過去10年ほどの間にチョウマメの分布とテントウによるその利用が年を追って拡大している事を示唆する観察がなされている。以上から、チョウマメ利用は現在東に向かって広がりつつあるようにみえる。

食草幅の拡大が、寄主特異的集団への分化が：マレー半島のクアラルンプール、スマトラ島パダン、ジャワ島ボゴールでは1990年代からチョウマメの利用が観察されており、当時はスズメナスビ系統がチョウマメを好まないのに対して、チョウマメ系統はスズメナスビとチョウマメのいずれも良く摂食する事が報告されている。それからおよそ20年が経過した現在、これらの地域ではスズメナスビ系統とチョウマメ系統の間に当初観察されていた違いは減少しているように見える。すなわち、これらの地域ではスズメナスビ系統とチョウマメ系統の分化は進行せず、地域集団全体がスズメナスビ利用能力を落とす事なくチョウマメを併用する方向に変化したと考えられる。

チョウマメ利用能力の起源：チョウマメを利用する能力がチョウマメと出会った後に生じたのか、あらかじめニジュウヤホシテントウに何らかの形で内在していたのか、という問題は本研究が解明を目指した課題の一つであった。今回確認されたナス科食の他種における潜在的なチョウマメを摂食する能力の存在（Kikuta et al. 2013, *Treubia* 40: 39-46）は、この能力がナス科食のアジア産 *Henosepilachna*（我々の分子系統解析によって一つの系統群に属する事が判明している）に共通していた事を示唆する。恐らく何らかの理由によりニジュウヤホシテントウのみがチョウマメを利用する能力を顕在化させ、さらにこの植物への適応を進めているのであろう。こうした能力が保持されていたメカニズムについては推定の域を得ないが、何らかの適応的な遺伝子の多面発現が、それらの遺伝子と強く連鎖していた可能性が考えられる。また、どのような要因がチョウマメ食を促したのかも現時点では不明である。いずれの問題の解明も、今後の重要な研究課題である。

チョウマメへの適応：チョウマメの利用が広汎に見られるものの、ニジュウヤホシテントウのチョウマメへの適応は未だに不十分である。最もチョウマメ依存の顕著な集団（例えばボゴールのチョウマメ系統）でも、チョウマメによる飼育では生存率はスズメナスビ飼育にくらべて低く、成体に至った個体には成育遅延と体サイズの小型化がみら

れた。また、チョウマメの若い葉しかうまく利用出来ない。チョウマメに対する適応が現在も進行中なのか、何らかの理由によって現状で停滞しているのかは不明である。

チョウマメ食害は単一起源か、複数回起源か：ミトコンドリア遺伝子の解析の結果、ニジュウヤホシテントウには地域集団の遺伝的分化が見られ、各地のスズメナスビ系統とチョウマメ系統の間には遺伝的な違いが見られなかった。この事は、チョウマメ系統が複数回独立に生じた事を強く示唆する。チョウマメ食がたった一度だけ生じ、その後、この性質が各地に広がったという説を支持するデータは全く得られなかった。

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2件)

N. Fujiyama, H. Ueno, S. Kahono, S. Hartini, K. W. Matsubayashi, S. Kikuta, H. Katakura, Extent of use of the novel fabaceous host *Centrosema molle* by *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) in Nusa Tenggara, Indonesia. *Treubia* 40: 25-38 (2013) 査読有り

S. Kikuta, N. Fujiyama, S. Kahono, N. Kobayashi, S. Hartini, H. Katakura, Potential ability of the *Solanum*-feeding ladybird beetle *Henosepilachna diffinis* (Coleoptera; Coccinellidae) to use the introduced fabaceous plant *Centrosema molle* in East Kalimantan, Indonesia. *Treubia* 40: 39-46 (2013) 査読有り

[学会発表](計9件)

藤山 直之、加藤 徹、小路 晋作、菊田 尚吾、村田 拓也、Sih Kahono、Rosli Hashim、Yaowaluk Monthum、片倉 晴雄、東南アジアで進行中のニジュウヤホシテントウの寄主範囲拡大、1. 寄主利用にみられる地理的変異。第61回日本生態学会大会、2014年3月17日、広島国際会議場

村田 拓也、加藤 徹、藤山 直之、小路 晋作、菊田 尚吾、Sih Kahono、片倉 晴雄、東南アジアで進行中のニジュウヤホシテントウの寄主範囲拡大、2. 集団の遺伝的構造。第61回日本生態学会大会、2014年3月17日、広島国際会議場

菊田 尚吾、藤山 直之、Sih Kahono、片倉 晴雄、東南アジアで進行中のニジュウヤホシテントウの寄主範囲拡大、3. 新規食草の葉令が蛹化率に及ぼす影響。第61回日本生態学会大会、2014年3月17日、広島国際会議場

菊田 尚吾、藤山 直之、Sih Kahono、片倉 晴雄、ニジュウヤホシテントウの寄主範囲拡大：

葉の新旧で適合性が異なる新規食草の利用が導く変化。第60回日本生態学会大会

2013年3月7日、静岡市

藤山 直之、Sih Kahono、片倉 晴雄、インドネシアにおける食植性テントウムシ研究の経緯と現状、国際シンポジウム「インドネシアの昆虫多様性 北大とポゴール博物館の共同研究」、2013年02月11日、札幌市

菊田 尚吾、藤山 直之、Sih Kahono、片倉 晴雄、ニジュウヤホシテントウの寄主範囲拡大：葉の新旧で異なる新規食草の適合性および野外での利用状況。日本昆虫学会第72回大会、2012年9月17日、町田市

N. Fujiyama, S. Kikuta, S. Koji, S. Kahono, T. Katoh, H. Katakura, Spatial variation in novel host-use by a herbivorous ladybird beetle: Situation across SE Asia. First Joint Congress on Evolutionary Biology, 2012年7月7日 Ottawa, Canada

S. Kikuta, N. Fujiyama, S. Koji, S. Kahono, D. Dwibadra, H. Katakura, Spatial variation in novel host use by a herbivorous ladybird beetle:

Inter-population differences at a fine scale First Joint Congress on Evolutionary Biology, 2012年7月7日 Ottawa, Canada

S. Kikuta, N. Fujiyama, S. Kahono, S. Koji, H. Katakura, Host range expansion of the phytophagous ladybird beetle *Henosepilachna vigintioctopunctata*.

第59回日本生態学会・第5回東アジア生態学会連合大会、2012年3月20日 滋賀県大津市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片倉 晴雄 (KATAKURA, Haruo)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：40113542

(2) 研究分担者

藤山 直之 (FUJIYAMA, Naoyuki)

北海道教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：90360958

加藤 徹 (KATOH, Toru)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80374198

小路 晋作 (KOJI, Shinsaku)

金沢大学・地域連携推進センター・博士研究員

研究者番号：10447683