

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660281

研究課題名(和文) 寄生蜂の移動分散における寄主の食草の役割

研究課題名(英文) Role of host-food plants on the moving of parasitoid wasps

研究代表者

高林 純示 (Takabayashi, Junji)

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：10197197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、“土着”天敵寄生蜂の経験が、寄主の食草に対する寄生蜂の選好性に及ぼす影響の解析と、寄生蜂の移動分散についてDNAマーカーを用いた解析を試みた。寄生蜂はコナガサムライコマユバチ(KKB)とアオムシサムライコマユバチ(AKB)を用い、食草については3種のアブラナ科植物を用いた。被害植物の匂いに対する選好性は羽化後に匂いを経験した植物種によって変化するが、経験した植物種に関わらず安定的に天敵を誘引する重要な匂いがあることが分かった。また、マイクロサテライトマーカーによる解析で、KKBは全国的に遺伝的分化が検出されなかったが、AKBは全国で遺伝的分化があることが示された。

研究成果の概要(英文)：In many cases, parasitic wasps are attracted to host herbivore-infested plant odors. We focused on *Cotesia vestalis*, a parasitic wasp of diamondback moth larvae, and three crucifer plant species (cabbage, komatsuna and Japanese radish). We examined how the wasp responded to host-infested plant volatiles (HIPVs) of either the same or different plant species when the wasp has experienced HIPVs from one plant species. HIPVs from each plant species differently affected the wasp's subsequent responses to HIPVs. We also investigated genetic variation among local populations of *C. glomerata*, a parasitic wasp of cabbage white butterfly larvae throughout Japan. Bayesian cluster analysis revealed two or three genetic clusters across the locations sampled. The pattern of genetic differentiation, estimated from the microsatellite data, indicated a significant level of difference in genetic structure between Hokkaido populations and other populations.

研究分野：化学生態学

キーワード：移動分散 寄生蜂 寄主食草 マイクロサテライトマーカー アブラナ科植物

1. 研究開始当初の背景

近年生物多様性保護の観点から、農地の周囲に生息する「土着」の天敵を利用することが推奨されている。我々は、京都府中山間地において、アブラナ科作物の害虫であるコナガ幼虫に対する天敵寄生蜂「コナガサムライコマユバチ」を、合成揮発性物質を用いることにより、農地へ誘引することに成功したが、天敵移入のばらつきによる防除効果の不安定さが未解決の問題であった。土着の天敵寄生蜂を有効に活用するためには、その移動分散を詳細に調査し、天敵の涵養源の保全を行うこと、ならびに、涵養源から圃場へ天敵を誘引することが重要であるが、この天敵がどこから来るのかは明らかになっていない。これまでに個体の移動分散を遺伝子マーカーを用いて解析する手法は確立されており、天敵の移動分散については、カブリダニやハナカメムシを対象とした報告もみられる。一方で、寄生蜂は寄主に食害された植物から放出される揮発性成分(匂い)に誘引されるが、誘引性に寄生蜂の被害植物の匂いの経験がかかわっていることがエンドウヒゲナガアブラムシなどで明らかにされている。これらのことから、安定した寄生蜂の誘引性を確保するためには、寄生蜂の移動分散を詳細に明らかにするとともに、被害植物の匂いの経験と誘引性の関係を明らかにすることが重要と考えた。

2. 研究の目的

「土着」天敵の積極的な保護・利用が望まれているが、誘引剤を用いた農地への寄生蜂の誘引においては、天敵移入の不安定さが問題となっている。この問題を解決するためには、天敵の移動分散および、天敵の反応に及ぼす天敵の経験の影響について明らかにすることが重要である。本研究では蔬菜の害虫として重要なチョウ目幼虫に対する天敵寄生蜂に注目した。特に、アブラナ科植物を寄主植物とする2種(コナガとモンシロチョウ)の幼虫にそれぞれ寄生する2種の寄生蜂{コナガサムライコマユバチ(以下コナガコマユバチ)とアオムシサムライコマユバチ(アオムシコマユバチ)}を対象に、個体群間の遺伝子交流を、DNAマーカーを用いて詳細に解析すること、および、寄主の食草であるアブラナ科植物について、被害植物に対する寄生蜂の選好性に、羽化後に経験した植物種の匂いがどのように影響するかを調べることにより、土着天敵の有用性を高める知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 異なる植物種の匂い経験が寄生蜂の匂いの選好性に及ぼす影響

コナガコマユバチの経験処理と3種のアブラナ科植物に対する反応

コナガコマユバチは、羽化時にそれぞれ、コマツナ、キャベツ、ダイコンの被害植物の揮発性物質にさらされた3グループ、および、植物揮発性物質の非存在下で羽化させたグループの計4グループに分けた。

アブラナ科植物に対する選好性は、アクリルボックス(35×25×30cm)を用いて調査した。ボックスの左右両サイドにそれぞれコナガ被害植物と健全植物を置き、両株の中央より寄生蜂を放し、最初にランディングした植物を選好したと評価した。各グループについて、被害コマツナ vs 健全コマツナ、被害キャベツ vs 健全キャベツ、被害ダイコン vs 健全ダイコンの選好性試験を行った。

アブラナ科植物から放出される揮発性物質の分析

で選好性試験に供した3種のアブラナ科植物について、それぞれコナガ幼虫被害株から放出される揮発性成分を、ガスクロマトグラム-質量分析計(GC-MS)を用いて分析した。

(2) DNAマーカーを用いた寄生蜂の遺伝子交流の解析
寄生蜂の採取

コナガコマユバチについては、寄主であるコナガを接種した植物トラップを用いて採取を行った。設置したトラップは2日後に回収し、飼育後寄主より脱出したハチを収集した。採取は2014年に京都市内を中心に行った。

アオムシコマユバチについては、寄主の採取を行い、飼育後寄主より脱出したハチを収集した。アオムシコマユバチは多寄生であるため、寄主1個体から脱出した集団のうち1個体を解析に使用した。採取は2015年に予備的に行い、2016年に大規模な採取を行った。アオムシコマユバチの全国的な採取については、各県の試験場・防除所、大学の昆虫研究者らにご協力いただいた。

ミトコンドリアCOI遺伝子の解析

2種の寄生蜂(コナガコマユバチ、アオムシコマユバチ)の各個体よりQIAGEN社のDNeasy® Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出した。これらのDNAをテンプレートとし、以下に示すユニバーサルプライマーを用いてPCR法を行い、COI遺伝子断片を増幅した。PCR産物について、これらのプライマーを用いてシーケンスを行った。

Forward: C1-J-2195 (5'-TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT-3') (Roehrdanz, 1993)

Reverse: TN2N-3014 (5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3') (Simon et al., 1994)

マイクロサテライトマーカーを用いた解析

コナガコマユバチ、アオムシコマユバチはともに *Cotesia* 属である。そこで、マイクロサテライトマーカーは、すでに *Cotesia* 属で報告のあるものについて、コナガコマユバチについては飼育個体を、アオムシコマユバチについては採取個体を用いて、増幅、DNA断片の長さ、個体間の多型を確認した。マーカーの増幅は QIAGEN 社の Type-it Microsatellite PCR Kit を用いて、PCR 法により行った。さらに、アオムシコマユバチについては個体群ごとの遺伝的多様性の解析と遺伝的構造の推定を予備的に行った。

4. 研究成果

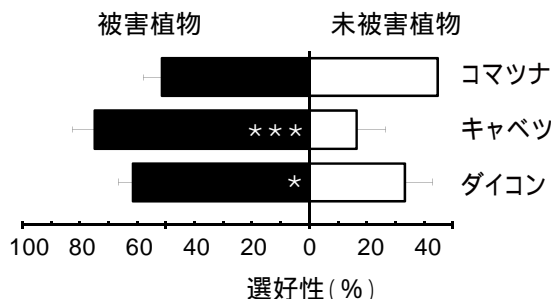
- (1) 異なる植物種の匂い経験が寄生蜂の匂いの選好性に及ぼす影響

3 種のアブラナ科植物に対する選好性

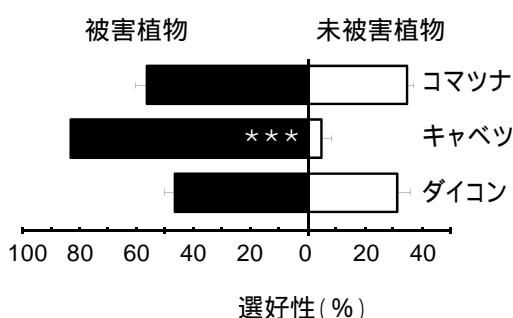
選好性試験は、同種植物のコナガ被害株 vs 未被害株について行った。植物の揮発性物質を経験していないコマユバチはキャベツやダイコンの被害株に選好性を示した。しかし、コマツナでは食害株を有意に選ばなかった (図 1-A)。一方、各植物の揮発性物質を経験させた場合、未経験の時の反応とは異なる反応を示した。キャベツの揮発性物質を経験した場合は、キャベツで被害株に対する反応が有意に強まった一方で、ダイコンとコマツナでは、被害株と未被害株を同様に選好した (図 1-B)。このような経験した揮発性物質への反応の向上はコマツナの揮発性物質を経験した場合でも見られた上、コマツナの場合他の植物種の食害株への有意な選好性が失われずに維持されていた (図 1-C)。また、ダイコンに関しては、揮発性物質を経験したことによるダイコン食害株への反応の有意な向上は見られなかったが、コマツナでは、未被害株より被害株に対して有意な選好性を示すようになった (図 1-D)。つまり、コナガコマユバチは生得的な反応だけでなく、どの植物上で羽化したかにより、反応性を変化させることで、羽化した環境に合わせて寄主探索を行っていると考えられる。また、キャベツ食害株の揮発性物質のように未経験であっても、他の植物種の揮発性物質を経験しても、安定してコマユバチを誘引性できる揮発性物質の存在が明らかとなった。

3 種アブラナ科植物のコナガ被害株の揮発性成分の比較

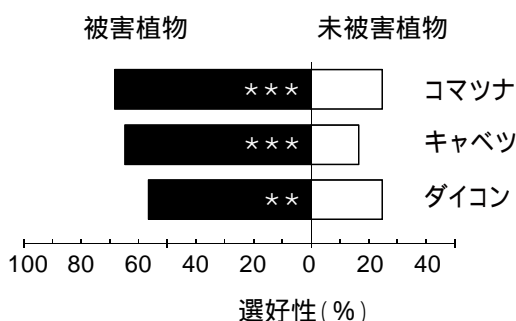
A. 未経験



B. キャベツ経験



C. コマツナ経験



D. ダイコン経験

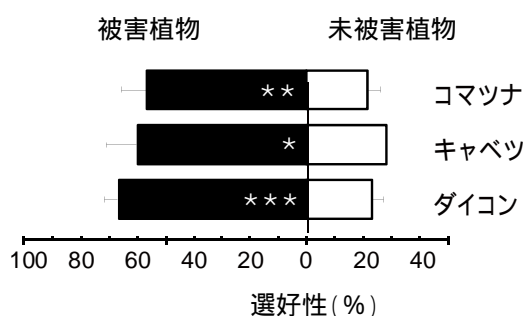


図 1. 羽化直後に、コナガ被害を受けた異なる植物の匂いを受容したコナガコマユバチの 3 種アブラナ科植物 (被害植物 vs 未被害植物) に対する選好性。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

選好性試験に用いた 3 種のアブラナ科植物について、コナガが加害した際に放出される揮発性成分を分析したところ、キャベツからは 31 成分が、コマツナからは 21 成分が、ダ

アイコンからは 16 成分がそれぞれ検出された。植物種による被害株の揮発性成分の組成の違いを統計的に解析したところ、それぞれ有意に異なることが明らかとなった。このことから、このような組成の違いがコマユバチの行動の違いに影響していると考えられる。本成果については、現在投稿(準備)中である。

(2) DNA マーカーを用いた寄生蜂の遺伝子交流の解析

コナガコマユバチのミトコンドリア COI 遺伝子配列の解析

飼育個体を用いてミトコンドリア COI 遺伝子配列の解析を行った。得られた配列を BRAST により相同性検索を行ったところ、既報のコナガコマユバチの COI 遺伝子の配列と高い相同性が認められた。さらに、京都市内 7 箇所の採取個体および北海道札幌市で採取され継代飼育されている個体について COI 遺伝子の配列を解析したところ、これらの間に、配列の違いは認められなかった。

コナガコマユバチのマイクロサテライトマーカーの解析

既報の *Cotesia* 属のマイクロサテライトマーカーについて、飼育個体を用いて増幅を調べたところ、14 個のうち、11 個で増幅が認められた。これらを用いて、京都市内 7 箇所から採取された個体について、解析を行ったところ、京都市内の個体群でマーカーの多型が認められたのは 4 マーカーのみであった。さらに札幌市の個体群についても同様に解析を行ったが、京都市個体群と札幌市個体群の間で変異は認められなかった。の結果は、コナガコマユバチの日本への移入時期が比較的最近であることを示唆している。

アオムシコマユバチの採取

の結果から、コナガコマユバチの遺伝子交流を DNA マーカーで解析することは困難であると考えられた。そこで、遺伝子交流の解析対象を、コナガと同様にアブラナ科作物を食害するモンシロチョウ幼虫に寄生するアオムシコマユバチとした。このハチの寄主であるモンシロチョウは、奈良時代より文書に記載があるとされ、コナガコマユバチよりも移入時期は古いと考えられたためである。アオムシコマユバチは、全国 14 か所から 542 個体(寄主 542 個体分)を採取した(表 1)。

アオムシコマユバチのミトコンドリア COI 遺伝子の解析

予備採取個体を用いて COI 遺伝子配列の解析を行った。得られた配列を BRAST によ

り相同性検索を行ったところ、既報のいくつかの *Cotesia* 属の COI 遺伝子の配列と高い相同性が認められた。アオムシコマユバチの COI 遺伝子配列については未報告であった。さらに、北海道、千葉県、愛知県、京都府(3 か所)、滋賀県、広島県の個体について COI 遺伝子の配列を比較したところ、これらの間には配列の違いは認められなかった。

表1 アオムシコマユバチの採取場所と個体数

No.	地名	個体数(被寄生寄主個体数相当)
1	北海道札幌市	41
2	北海道恵庭市	49
3	北海道夕張郡	87
4	青森県弘前市	17
5	茨城県つくば市	24
6	千葉県袖ヶ浦市	8
7	千葉県鴨川市	7
8	神奈川県平塚市	45
9	愛知県豊川市	12
10	滋賀県大津市	40
11	京都府京都市	35
12	京都府京都市	36
13	和歌山県東牟婁郡	64
14	佐賀県佐賀市	77
計		542

アオムシコマユバチのマイクロサテライトマーカーの解析

既報の *Cotesia* 属のマイクロサテライトマーカー 7 個について、予備採取個体で増幅と多型を確認した。これらのマーカーを用いて、北海道(2 か所)、茨城県、愛知県、京都府、和歌山県、佐賀県の 7 個体群 50 個体について予備的に解析を行った。

個体群ごとの遺伝的多様性を比較したところ、和歌山個体群が多様性が若干低い傾向があったが、個体群間で大きな差はみられず、一時的に集団が小さくなり多様性が失われたということはないと考えられた。また、札幌個体群のみで見られるアリル(Private alleles)が、他の個体群と比較して多い傾向がみられた。これらのことから、最近に少数の個体が北海道へ渡り、ボトルネック効果によって違う遺伝子集団になったのではなく、元から北海道に別の遺伝子集団が存続していた、あるいは本州とは別系統が北海道に侵入したという可能性が示唆された。

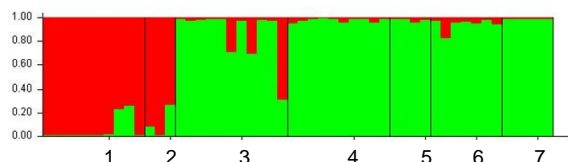
さらに、ベイズ法によるクラスター解析のソフトウェア STRUCTURE を用いて個体単位の解析を行ったところ、7 個体群に対して 2 個または 3 個の遺伝的クラスターが認められた(図 2)。北海道の 2 個体群は、他の個体群と異なるクラスターを形成しており、広域に見た時にアオムシコマユバチには日本

国内で遺伝的分化があることが示唆された。また、本州・九州個体群では、個体群間で共通のクラスターがみられたが、愛知県と茨城県の個体群と、他の個体群ではクラスターの異なる個体も認められ、本州内にも若干の遺伝的分化はあるが混在していると考えられた。今後は全国ならびに地域内での遺伝子交流の解析を進めることにより、寄生蜂の移動分散に関する理解を深め、土着天敵の有効利用に活用していく。

仲島 義貴 (NAKASHIMA, Yoshitaka)
京都大学・生態学研究センター・研究員
研究者番号：80322882

塩尻 かおり (SHIOJIRI, Kaori)
龍谷大学・農学部・講師
研究者番号：10591208

K=2



K=3

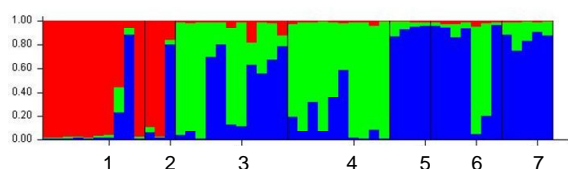


図 2. STRUCTURE 解析によるバープロット

1,2: 北海道、3: 茨城県、4: 愛知県、5: 京都府、6: 和歌山県、7: 佐賀県

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕該当なし

〔学会発表〕該当なし

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ecology.kyoto-u.ac.jp/~junji/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高林 純示 (TAKABAYASHI, Junji)

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：10197197

(2) 研究分担者

米谷 衣代 (YONEYA, Kinuyo)

龍谷大学・理工学部・研究員

研究者番号：50618593

上船 雅義 (UEFUNE, Masayoshi)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：90559775

小澤 理香 (OZAWA, Rika)

京都大学・生態学研究センター・研究員

研究者番号：90597725