

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07329

研究課題名(和文)異なる環境下でのカブリダニ個体群構造の違いから考える土着天敵保護利用

研究課題名(英文) Conservation biological control inferred by population structure of phytoseiid mites

研究代表者

日本 典秀 (HINOMOTO, Norihide)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：80370675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ハダニ類、アザミウマ類などの土着天敵として期待されているカブリダニ類の保護利用を有効に行うために、マイクロサテライトマーカーを用いた個体群構造解析によって、圃場内における動態を詳細に解明した。無農薬チャ園、モモ園では明確な個体群構造が見られ移動分散範囲が限定されている一方で、露地小ギク圃場では均一であった。このことから、永年作物圃場では定住性が高い一方、草本性作物圃場では頻繁な移動分散が起こっていると考えられた。収穫・伐採・除草・薬剤散布などの攪乱要因があると移動分散が促進されることが示唆されたことから、人為的な攪乱を組み合わせることで、効率的な防除体系を構築できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to conserve and to enhance the capacity of phytoseiid mites as native natural enemies, population genetic structure of them were investigated by using microsatellite DNA markers. In an organic tea field and peach orchards, clear population structure was detected, suggesting they inhabit within narrow range. In contrast, genetic uniformity was observed in chrysanthemum fields. These results suggest that their dispersal can be enhanced by artificial disturbance.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：カブリダニ 個体群構造 マイクロサテライト 移動分散 土着天敵 保全的生物的防除

1. 研究開始当初の背景

近年、ハダニ類、アザミウマ類などの微小害虫が、とくに化学薬剤への抵抗性を発達させたことにより、難防除害虫となっており、対策に苦慮する農家が増えている。施設園芸においては、チリカブリダニ、ミヤコカブリダニ、スワルスキーカブリダニなどが製剤化・販売され、害虫防除において一定の効果が上がっている。一方、それら生物農薬として販売される天敵昆虫類・ダニ類の使用は、農薬登録によって、ほぼ施設に限定されている。そのため、露地作物圃場におけるカブリダニ類を利用した生物的防除は、未だ十分に確立されているとは言えない状況である。しかし近年、露地圃場に天敵誘引作物を混植するなどの植生管理技術によって、土着天敵の保護利用も始められている。たとえば、露地ナス圃場にマリーゴールドを植栽することによって、害虫ミナミキロアザミウマの捕食性天敵として有名なヒメハナカメムシ類の密度が高まり、効果的に害虫アザミウマ密度を抑制可能であることが示されている。

一方で、カブリダニ類にも、ハダニ類やアザミウマ類などの捕食性天敵として有名な種が数多く知られている。減農薬環境下で土着カブリダニの密度が上昇する事例も報告されており、今後の土着天敵利用においてはカブリダニ類の保護利用も大きな選択肢の一つである。しかし、飛翔可能な天敵昆虫類とは異なり、近距離は歩行移動が中心とされるカブリダニ類の、圃場内における動態を詳細に解明した事例はない。したがって、植栽管理などを行うにあたって、どの程度の範囲で、どのような配置で管理すればよいかの定量的指針は得られていない。そこで、本研究課題では、分子マーカーを用いた個体群構造の解明を通じて、これらの解決策を探る。

2. 研究の目的

カブリダニ類はハダニ類、アザミウマ類などの微小害虫の捕食性天敵として有望視されている。数種が生物農薬として市販されているが、近年は植生管理などを通じた土着個体群の保護利用も、注目されている。一方で、圃場におけるカブリダニ類の移動分散過程はこれまでに十分には明らかにされておらず、どのような範囲で、どのように植生管理を行えばカブリダニの保護増強が行えるかは経験則によるものであった。本研究課題では、マイクロサテライトマーカーを用いて管理方法・作物の異なる圃場でカブリダニ個体群構造を比較することによってカブリダニの移動分散様式を明らかにし、土着天敵の保護利用における定量的指針策定に資するものである。

3. 研究の方法

本研究では、ハダニ類の捕食性天敵として

有望視され、木本・草本いずれの環境下にも生息するケナガカブリダニを主な材料とする。チャ園、果樹園、花卉園など露地圃場においてケナガカブリダニを採集し、DNA塩基配列を用いて種の同定を行うとともに、マイクロサテライトマーカーを用いて個体別に遺伝子型を決定する。個体間の血縁度や個体群の遺伝的多様性、個体群間の遺伝的分化を、栽培環境や採集地点間の距離と比較することにより、環境が及ぼす個体群構造への影響を解析する。

(1) DNAによるケナガカブリダニ識別技術の開発

DNA塩基配列による種の識別技術は、DNAバーコーディングとして知られるが、本手法で用いるミトコンドリアCOI増幅に用いるPCRプライマーは、カブリダニ類ではしばしば有効に働かない。代表者らはすでに農業環境に発生するカブリダニ数種の核ゲノム・リボソームRNA遺伝子領域(rDNA)の塩基配列を明らかにしており、これを用いて種の識別が可能かどうか検討した。

あわせて、多数個体の塩基配列を解析して種同定を行うのは、費用・労力の両面でコストがかさむため、PCRによって同定できるよう、マーカーを開発した。具体的には、上記rDNAのケナガカブリダニ特異的変異がある領域にプライマーを設計し、他のカブリダニ種とは異なる電気泳動バンドパターンを示すプライマーを設計した。

(2) チャ園における解析

代表者らはすでに農業利用チャ園におけるケナガカブリダニの個体群構造を明らかにしている(Hinomoto et al. 2011)。そこでは、ケ

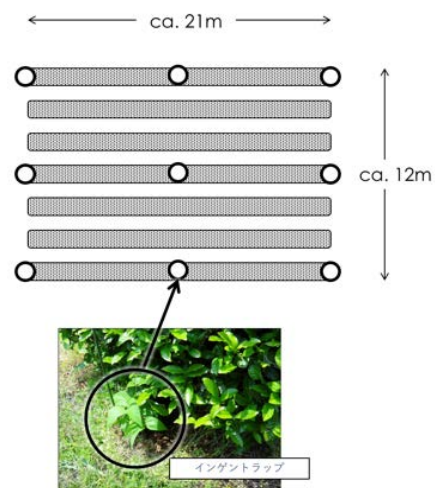


図1 調査を行ったチャ園とインゲントラップの配置。図上網掛け四角はチャ畝、白丸はインゲントラップを示す。インゲントラップ(図下)はチャ畝の下部に設置した。

ナガカブリダニの生息環境は半径 50m 程度の範囲に限定され、それ以上の距離間で採集された個体間の血縁度は非常に低いことを明らかにした。そこで、よりカブリダニ個体群への影響が少ないと予想される無農薬チャ園において、同様の解析を実施した。10 年以上農薬散布を行っていない実験チャ園 (約 250m²) 内にインゲントラップ (國本ら, 2009) を 9 つ設置 (図 1) し、概ね 2 週間に 1 回収してカブリダニ類を得た。採集されたカブリダニ類雌成虫から個体ごとに DNA を抽出、個体ごとに rDNA の塩基配列を決定した。ケナガカブリダニと同定された個体は、マイクロサテライトマーカー (表 1, Hinomoto et al. 2011) を用いてフラグメント解析を行い個体別に遺伝子型を決定し、Genepop (Rousset 2008) および SPAGeDi (Hardy and Vekemans 2002) を用いて個体間の血縁度と採集地点間の距離、個体群の遺伝的多様性の経時的変化などを得られたデータから算出し、解析を行った。

表1 解析に使用した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)

Locus	Primer
<i>NwMS801</i>	5'-CCTACCGTTAACCTGGCGTA-3' 5'-GAAAGCGTGAGGAGTGGAAAC-3'
<i>NwMS831</i>	5'-CAGAGAACGAGAAGAGATCAGG-3' 5'-CATCGTCAGACTTTGTTCTGT-3'
<i>NwMS872</i>	5'-ATGGCGATACGACGACAAA-3' 5'-CGCTCGCTGAACTCAAATAG-3'
<i>NwMS880</i>	5'-CAAGTTTCCAGCTCGGTCAT-3' 5'-GCAGAAGGAGCTACTGAAGCA-3'

(3) 果樹園における解析

対象害虫となるハダニ類では、果樹園において、施設栽培と比較して移動分散の程度が高いことが知られている (Uesugi et al. 2009ab)。カブリダニ類でも同様のことが起こっているか検証するために、果樹園における解析を実施した。果樹園における下草管理がカブリダニの個体密度に影響することが知られている (Funayama and Sonoda 2014 など) が、それが移動分散に与える影響については未知である。そこでモモ園を対象に、下草管理の異なる果樹園において、下草および樹上からカブリダニを採集し、下草-樹上、もしくは樹間の遺伝的差異をマイクロサテライトマーカーの遺伝子型で比較することにより、下草の有無が及ぼす異動分散への影響を解析した。得られたカブリダニ類は、リボゾーム DNA 塩基配列により種の同定を行った後、ケナガカブリダニについてマイクロサテライト解析を実施した。

(4) 花卉圃場における解析

永年作物であるチャや果樹と異なり、花卉類は地上部のほとんどを収穫され、攪乱の多

表2 露地小ギク圃場周辺に設置したインゲントラップで採集されたカブリダニ類の種構成。

種名	個体数	割合
<i>Neoseiulus wormersleyi</i>	90	74.4%
<i>Amblyseius orientalis</i>	16	13.2%
<i>Amblyseius eharai</i>	8	6.6%
<i>Neoseiulus californicus</i>	3	2.5%
<i>Neoseiulus longispinosus</i>	1	0.8%
<i>Neoseiulus makuwa</i>	1	0.8%
<i>Phytoseiulus persimilis</i>	1	0.8%
<i>Typhlodromus vulgaris</i>	1	0.8%

い栽培環境である。そこで、永年作物と比較するために、露地小ギク圃場において個体群構造の解析を行った。露地小ギク圃場 4 箇所周囲にインゲントラップを設置し、約 10 日おきに 3 回収した。得られたカブリダニ類は、リボゾーム DNA 塩基配列により種の同定を行った後、ケナガカブリダニについてマイクロサテライト解析を実施した。解析には、ソフトウェア structure (Pritchard et al. 2000) を用いた。得られた結果をもとに、収穫・除草・薬散などの攪乱要因が個体群構造へ与える影響を解析した。

(5) 土着個体群管理への総合的考察

上記で得られたデータから、栽培管理体系とカブリダニの移動分散の影響を総合的に解析し、害虫防除に効率的な植生管理デザインを考察した。

4. 研究成果

(1) DNA によるケナガカブリダニ識別技術の開発

カブリダニ 21 種のリボゾーム DNA 領域の塩基配列の解析を行ったところ、ITS1 および ITS2 領域の変異は種間における識別に十分で

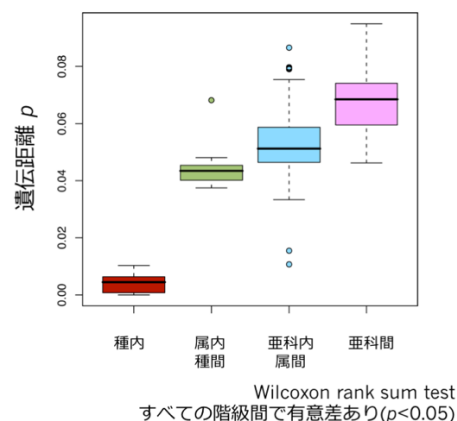


図2 カブリダニ類のリボゾームDNAの分類階級ごとの遺伝距離の比較

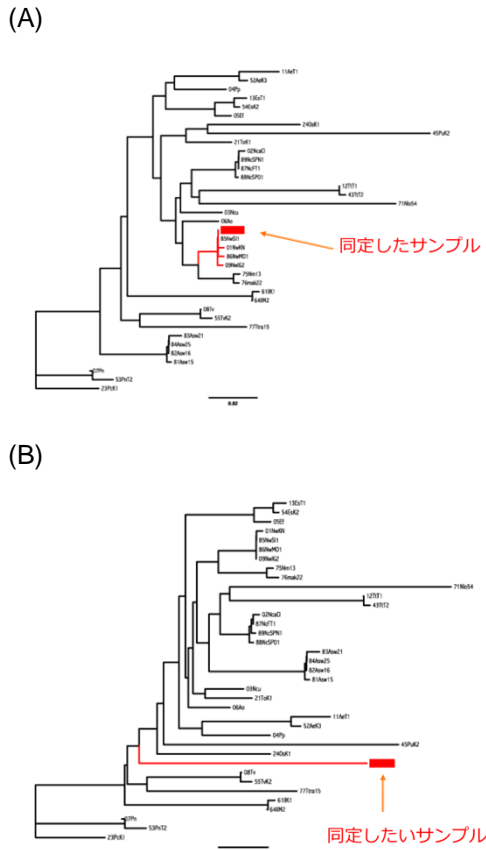


図3 DNA塩基配列に基づく系統樹解析による種同定結果の例。(A)同定可能な結果、(B)同定不可能な結果。

あることが明らかとなった(図2)。さらに、18S、5.8S、28Sなどの保存領域上にプライマーを設計することによって、種を問わず増幅可能であることも明らかとなった。これにより、未知種の塩基配列を解読することによって種の同定を行うことを試みた。まず、既知種21種の配列と同時にローカル環境下に構築したデータベースに対してBLAST検索を実施することで同定を行えるか検討したが、相同性の閾値は種・解読できた塩基配列長・塩基配列の品質などによって左右され、一定の結果を得ることは困難と考えられた。そこで、得られた配列を既知21種の配列とともに分子系統学的解析を行うことを試みた。その結果、種ごとに明確に判別できるクラスターを形成することが明らかとなり、本方法で種の識別が可能であることが明らかとなった(図3)。本方法の利点は、解析した種が、DNA情報が得られていない未知種であった場合には未知種と判断できることである。

一方で、塩基配列の解析を野外から得られた個体全てに対して1個体ずつ実施することは困難であることから、主な対象となるケナガカブリダニの同定を容易にするためのケナガカブリダニ特異的PCRマーカーの作成を行った。カブリダニ21種のリボゾームDNA領域

の塩基配列の解析にもとづき、ITS領域にケナガカブリダニ特異的プライマーを作成した。PCR後アガロースゲル電気泳動によって、ケナガカブリダニのみ増幅することが確認できた。

(2) チャ園における解析

無農薬チャ園で採集されたカブリダニ類の解析を実施した。カブリダニ類をリボゾーム塩基配列によって同定した結果、7月にはケナガカブリダニが優占した。ただし、チャ園中心部ではケナガカブリダニは採集されず、周辺部からの移入と考えられた。マイクロサ

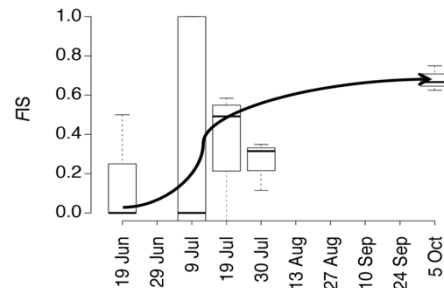


図4 チャ園で採集されたケナガカブリダニ個体群の近交係数 F_{IS} 。

テライト解析の結果、個体間の血縁度ははじめ低く、以後上昇した(図4)ことから、移入個体の定着・同系交配を繰り返したものと考えられた。

同時期に採集された個体間の血縁度(kinship coefficient, Loiselle et al. 1995)は、5m離れたトラップ間の個体でも極めて低く、チャ園内での移動分散が稀であることが示唆された。

(3) 果樹園における解析

果樹園(モモ園)から得られたサンプルについての解析を行った。それに先立ち種構成の調査を行ったところ、ケナガカブリダニ、続いてミヤコカブリダニが優占することが明らかとなった。ケナガカブリダニの樹間の個体間の遺伝的分化は大きく、樹ごとに個体群を形成していると考えられた。また、樹下の温存植物とモモ上の個体間の遺伝的分化も見られたが、樹間と比較すると遺伝的に近く、温存植物と樹上の遺伝子交流が示唆された。

(4) 花卉圃場における解析

奈良県内の露地小ギク圃場におけるケナガカブリダニの個体群構造について、マイクロサテライトマーカーを用いて解析を行った。4箇所の露地小ギク圃場周囲にインゲントラップ(國本ら, 2009)を設置、約10日間隔で3回収して得られたカブリダニ類メス成虫から個体ごとにDNA抽出を行い、リボゾームDNA

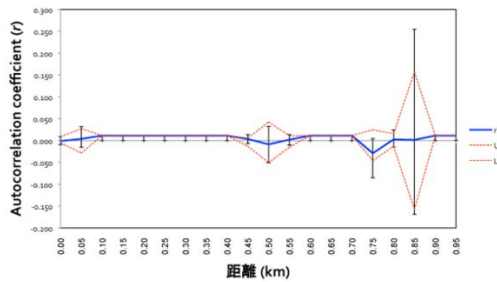


図5 露地小ギク圃場周辺のインゲントラップによって採集されたケナガカブリダニの空間的遺伝的自己相関

塩基配列を用いた簡易種同定を実施した。その結果、回収されたカブリダニ類の7割以上がケナガカブリダニであり(表2)、次いでトウヨウカブリダニ、ニセラーゴカブリダニが得られた。ケナガカブリダニについてマイクロサテライト解析を行ったところ、圃場内の遺伝的多様性は比較的高いものの、圃場間も含めた空間的自己相関は得られず(図5)、明確な遺伝的構造は検出できなかった。さらに、調査期間中に遺伝的組成の入れ替わりが見られた。このことから、収穫や周辺除草など頻繁な攪乱が行われる草本性作物圃場においては、ケナガカブリダニの移動分散が促進されて、遺伝的な均質化が起こったものと考えられた。

(5) 土着個体群管理への総合的考察

翅を持たず頻繁な長距離移動を行わないと考えられるカブリダニ類は、基本的に定住的であり、狭い範囲で交配集団を形成していると考えられる。一方で、収穫・伐採・除草・薬剤散布などの攪乱要因があると、移動分散が促進されることも示唆された。害虫管理に土着カブリダニ個体群を用いる際には、天敵温存植物の利用や下草管理が有効であることが知られている(富所・磯部 2010, Funayama et al. 2015 など)。しかし、移動分散範囲が限られているカブリダニ類を圃場全体に有効に拡散させるためには、温存植物の配置を増やすことが必要になり、現実的ではない。そこで、人為的な攪乱を組み合わせることで、効率的な防除体系を構築できると考えられる。

引用文献

- Funayama K, Komatus M, Sonoda S, Takahashi I, Hara K (2015) Management of apple orchards to conserve generalist phytoseiid mites suppresses two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* 65: 43-54.
- 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. *Exp Appl Acarol* 53: 1-15.

國本 佳範, 仲摩 朋葉, 天野 洋, 高藤 晃雄 (2009) カキ圃場でのハダニ類に対する土着天敵相, 特に下草管理が土着天敵類の発生に及ぼす影響. *日本ダニ学会誌* 18: 7-16.

Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Notes* 8: 103-106.

Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2: 618-620.

Uesugi R, Kunimoto Y, Osakabe M (2009) The fine-scale genetic structure of the two-spotted spider mite in a commercial greenhouse. *Exp Appl Acarol* 47: 99-109.

Uesugi R, Sasawaki T, Osakabe M (2009) Evidence of a high level of gene flow among apple trees in *Tetranychus urticae*. *Exp Appl Acarol* 49: 281-290.

Funayama K, Sonoda S (2014) *Plantago asiatica* groundcover supports *Amblyseius tsugawai* (Acari: Phytoseiidae) populations in apple orchards. *Appl Entomol Zool* 49: 607-611.

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

富所 康広, 磯部 宏治 (2010) 天敵温存植物で増殖したケナガカブリダニによるチャのカンザワハダニの密度抑制効果. *日本応用動物昆虫学会誌* 54: 1-12.

Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot* 82: 1420-1425.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

- ① Hinomoto N, Sato Y, Yara K, Shimoda T Population structure of the phytoseiid mite, *Neoseiulus womersleyi*, in an experimental organic tea field. IOBC Meeting of the Working Group "Integrated Control of Plant-Feeding Mites" (2017)
- ② Hinomoto N, Shimoda T. Monitoring population dynamics and structure of phytoseiid mites in orchards and tea

fields. The 1st International Workshop of IOBC-APRS-Predatory Mites as Biological Control Agents Work Group (2016)

- ③ 日本 典秀、川口 悦史、下田 武志. マイクロサテライトマーカによるモモ園のケナガカブリダニ移動分散評価と保護強化について. 第 24 回日本ダニ学会大会. (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日本 典秀 (HINOMOTO, Norihide)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員
研究者番号：80370675