

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380178

研究課題名(和文) 選抜育種による北海道産マルハナバチの高受粉能力系統の作出

研究課題名(英文) Development of strains of a native bumblebee in Hokkaido with a high pollinating ability by selective breeding

研究代表者

野村 哲郎 (NOMURA, Tetsuro)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：50189437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：北海道産マルハナバチを用いた高受粉能力系統の作出に向けて、以下の研究を行った。(1)家畜育種において利用されてきたBLUP法をハチ類の育種に利用できるように拡張した。(2)系統造成中に定期的に野外から個体を導入する場合を想定し、選抜による遺伝的改良量と系統内の近交係数を予測する理論を開発した。(3)外来種セイヨウオオマルハナバチのミトコンドリアDNAのCOI領域の個体間変異を調査し、本種の北海道集団は強いボトルネック効果を受けていることを明らかにした。(4)道内5か所で採集したエゾオオマルハナバチの翅脈を計測して多変量解析を施し、本種には顕著な地理的分化が認められないことを示した。

研究成果の概要(英文)：Following studies were carried out: (1) Taking genetic and reproductive peculiarities in bumblebees, the theory for predicting breeding values by BLUP was explored. (2) Efficiency of selective breeding in a partially isolated bee strain was theoretically evaluated in terms of the inbreeding coefficient and genetic gain by selection. (3) Genetic variation and geographical divergence in Hokkaido populations of a foreign species, *Bombus terrestris*, and a native species, *B. hypocyrtus sapporoensis*, were assessed by analyzing COI region of mtDNA. It was shown that genetic variation of *B. terrestris* is much smaller than *B. h. sapporoensis*, presumably because the population of former species has been passed through bottlenecks at several times during the domestication in Europe and invasion into Japan. (4) Wing morphology of *B. h. sapporoensis*, was investigated to evaluate the amount of geographical divergence.

研究分野：動物育種

キーワード：受粉昆虫 マルハナバチ 選抜育種 BLUP法 分子遺伝

1. 研究開始当初の背景

マルハナバチ類は訪花性の高い昆虫で、ミツバチとは異なり花蜜を分泌しない植物の花にも盛んに訪花する特徴を持つ。そのため、マルハナバチ類はナス科作物の作付け農地をはじめ、世界中の農業の現場で受粉昆虫(ポリネーター)として用いられてきた。日本でも1991年からハウス栽培用農作物のポリネーターとして、ヨーロッパ・アフリカ原産のセイヨウオオマルハナバチ (*Bombus terrestris*) が導入されるようになり、その輸入量は年々増加してきた。本種は北海道を中心としたトマト栽培の施設などで広く用いられ、ホルモン剤を用いない高品質な農作物の生産に貢献してきた。ところが、本種の導入以降、一部の個体がハウスから逃げ出し、野外に帰化する問題が発生した(鷲谷、1998)。本種は繁殖力が強く、近縁の在来マルハナバチ類や他の在来動植物で構成される生態系に影響を与えることが危惧されたため、2006年には特定外来生物に指定され、現在はその利用が制限されている。

北海道には、在来マルハナバチの全種のうち半数にあたる11種が分布おり、日本で最もマルハナバチの種多様性が高い地域である。そのなかには多数の固有種も含まれており、これらの在来マルハナバチは北海道の固有の生態系において極めて重要なニッチを占めている(木野田ら、2013)。在来の動植物で構成される生態系を保全しながら、在来マルハナバチを用いた環境調和型のポリネーション事業を展開することが必要である。そのためには、道内に分布する在来マルハナバチのなかから新たにポリネーターとして好適な種を見出し、高受粉能力を有する系統を作出する必要がある。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、本研究は北海道に広く分布し、人工条件下で飼育・繁殖が可能なエゾオオマルハナバチ (*B. hypocrita sapporoensis*) を材料とし、分子ならびに統計遺伝学的手法に基づく選抜育種を適用してセイヨウオオマルハナバチの代替種として利用し得る高受粉能力を有する系統を作出することを目的として企画した。

3. 研究の方法

(1) 選抜手法の確立

BLUP法による育種価の推定値に基づく選抜 (BLUP選抜) は、家畜の育種に利用され、目覚ましい改良成果を上げてきた選抜手法である。BLUP選抜をマルハナバチの系統造成に利用するために、半倍数性の性決定様式や父性の不確定性を考慮した理論の拡張を行う。

(2) 選抜の基礎集団の造成と選抜の実施

選抜により十分な遺伝的改良量を得るためには、基礎集団 (選抜開始時の集団) に多量の遺伝変異が含まれる必要がある。そこで、

春季に北海道の広域にてエゾオオマルハナバチの女王蜂を採集し、京都産業大学の研究施設に持ち帰り、200個体程度を飼育用巣箱に導入する。飼育条件下で成熟した巣のうち、働き蜂の個体数が多く営巣規模 (コロニーサイズ) の大きなもの上位20巣程度を選抜し、そこから次世代の新女王蜂と雄蜂を取り出してネット内で交尾させる。このような選抜と交配を2世代程度繰り返し、コロニーサイズと血統情報が蓄積された時点で、BLUP選抜を数世代実施して系統を造成する。

(3) 飼育技術の改良

これまでの予備的飼育において、エゾオオマルハナバチは飼育中の餌の交換などで生じる振動に対して極めて敏感であり、振動による刺激が原因となり、営巣を放棄する可能性があることが確認されている。そこで、振動を極力抑える飼育容器を開発する。

(4) 系統造成中の近親交配の回避

マルハナバチをはじめとするハチ類では、通常、2倍体は雌になるが、性決定遺伝子がホモ接合体になると2倍体の雄が生じる。2倍体の雄は、繁殖能力を持たず、ほとんどが発育の初期の段階で死亡する。このためハチ類では近親交配による性決定遺伝子のホモ接合体は、コロニーサイズを著しく小さくさせる可能性がある。そこで、系統造成中に系統を完全閉鎖するのではなく、定期的に外部から血縁のない個体を導入する必要がある。このような場面を想定して、選抜による遺伝的改良量と近交係数の上昇を予測するための理論を開発する。

(5) 地理的変異の調査

エゾオオマルハナバチの北海道集団において地理的変異が大きい場合には、受粉系統から逃亡した個体による野外集団の遺伝的攪乱が懸念される。そこで、北海道で広範囲に採集したエゾオオマルハナバチを材料として、外部形態およびmtDNAの変異を解析し、地理的変異を調査する。

4. 研究成果

(1) 選抜手法の確立

育種価のBLUPを与える式 (混合モデル方程式) に含まれるA行列 (実際にはその逆行列) の計算に際して、ハチ類に固有の2つの問題が生じる。以下で、それらの問題と本課題で採用した解決法について述べる。

① 半倍数性の性決定

ハチ類では、雌 (女王とワーカー (働き蜂)) は、受精卵から発生するが、雄は未受精卵から発生するので、哺乳類などの家畜とは遺伝子の伝達様式が異なる。しかし、半倍数性生物における遺伝子伝達は、哺乳類の性染色体 (X染色体) 上の遺伝子の伝達と同じ様式である。そこですでに開発されているX染色体上の遺伝子に関するA行列とその逆行列の計算法 (Fernando and Grossman, 1990) を応用して、この問題を解決した。

② 父性判定における不確定性

マルハナバチにおいては、女王が複数の雄と交尾する種が知られている。この場合、生まれてきた雌の母親(女王)は確定できるが、父親を確定することはできない。

同様の問題は、牛の繁殖においても生じることがある。たとえば、東北地方を中心に飼養されている和牛の一品種である日本短角種は山野に雌牛群と「まき牛」と呼ばれる雄牛を放牧し、自然交配が行われる。通常は、1頭の雄牛を放牧するため、生まれてくる子牛の父親を確定できるが、複数の雄を放牧した場合には、子牛の父親を確定できない(なお、哺育行動から子牛の母親は容易に特定できる)。家畜育種の分野では、このような場面に対応するために、平均A行列が開発されている(Henderson, 1988)。ハチ類の育種においても、平均A行列を利用することで父性判定における不確定性の問題を解決した。

(2) 選抜の基礎集団の造成と選抜の実施

平成24-26年の4月から6月に、旭川市、富良野市、中標津町、中湧別町でエゾオオマルハナバチの女王蜂を採集し、各年100個体前後を実験室内で飼育し、営巣を試みた。室内に導入した女王蜂のうち、産卵に至ったものは約30%、ワーカーの生産に成功したものは約10%、繁殖虫(女王蜂、雄蜂)を生産したものは約5%であり、系統造成の基礎集団として十分な規模を確保することはできなかった。この過程で、産卵に至らなかった女王蜂の多くは、野外でコバチによる寄生を受けていたため、初期に死亡したものであった。また産卵は確認できたが、ワーカーの生産に至らなかった女王蜂の多くは、営巣の途中で育児を放棄したものであった。育児の放棄は、餌の交換時に生じる振動などの刺激が原因と考えられた。

(3) 飼育技術の改良

飼育中の餌の交換時に生じる振動を最小化するために、アクリル製の飼育ケースを開発した(写真1)。この飼育ケースは、上部の蓋がスライド式になっており、蓋の開閉に際して振動が生じないように設計されている。ワーカーや繁殖虫の生産に至った女王蜂は、すべてこの飼育ケースで飼育した女王蜂であった。



写真1 アクリル製飼育ケース

(4) 系統造成中の近親交配の回避

系統造成中の近交度の上昇を軽減するための方策として、造成中の系統に定期的に野

外から雄を導入する場面を想定して、選抜による改良効率と近交係数の変化を試算した。

図1には、種々の隔離の程度における10世代までの近交係数の変化を示した。系統が完全に隔離されている場合($\beta=1.0$)には、10世代目の近交係数は17%を超えたが、隔離が不完全になるにしたがって近交係数は低く保たれた。隔離係数(β)が0.8のときには、10世代目の近交係数は12%程度に抑えられた。このように野外から毎世代、雄を介して外来の遺伝子の流入があることは近交係数を低く保つうえで有効に働く。

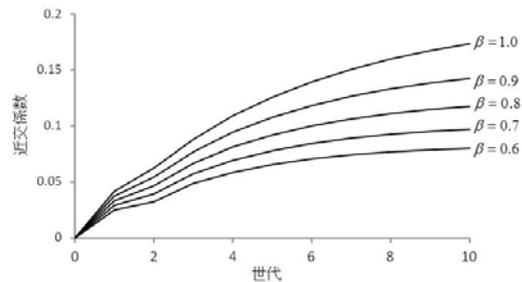


図1 様々な隔離係数(β)の下での近交係数の変化

種々の隔離の程度における10世代までの集団平均の変化を、図2に示した。系統の隔離が不完全な場合($\beta < 1.0$)には、遺伝的改良量は系統が完全に隔離されている場合($\beta=1.0$)よりも低下し、上記の2つの効果のうち後者がより大きく働くことを示している。しかしながら、80%程度の隔離が可能の場合($\beta=0.8$)の10世代までの累積改良量は22.2kgであり、これは完全な隔離が達成できた場合($\beta=1.0$)の累積改良量の約72%に相当する。このことは、系統の隔離が不完全であっても適切な選抜計画の下では十分な遺伝的改良が達成できる可能性を示唆している。

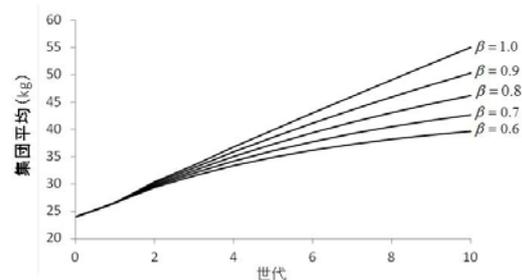


図2 様々な隔離係数(β)の下での集団平均の変化

(5) 地理的変異の調査

道内11か所(図3)で採集したエゾオオマルハナバチ(計149個体)および道内8か所(図4)で採集したセイヨウオオマルハナバチ(計175個体)から抽出したmtDNAのCOI領域について遺伝変異を調査した。エゾオオマルハナバチについては、14種類のハプロタイプを検出した。産地別に見ると、いずれの

産地においてもメジャーハプロタイプ（ハプロタイプ1）の出現頻度が80%を超えていた。マイナーハプロタイプの出現には、産地間に若干の違いが認められるが、総じて大きな地理的分化は認められなかった。

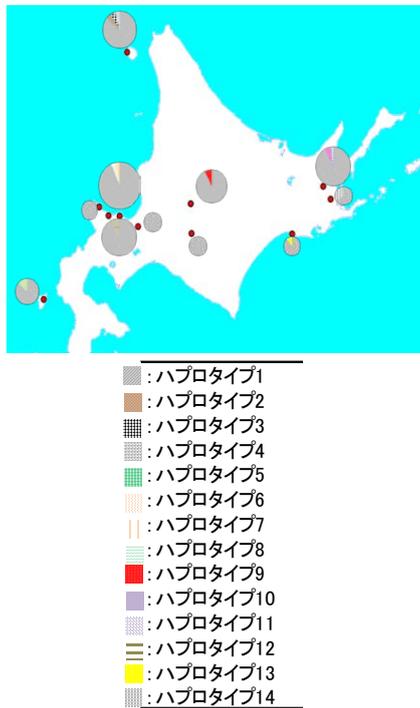


図3 エゾオオマルハナバチのCOIハプロタイプの分布

一方、北海道で分布を拡大しているセイヨオオマルハナバチについては、原産地であるヨーロッパおよび中東では12種のハプロタイプが検出されているが、北海道集団では3種のハプロタイプ（ハプロタイプ1がメジャーハプロタイプ、ハプロタイプ2と3がマイナーハプロタイプ）しか検出されなかった。このことは、本種の北海道集団が強いボトルネック効果を受けた集団であり、極めて遺伝変異が小さい集団であることを示している。なお、北海道集団で検出されたハプロタイプ2は、原産地では確認されていないハプロタイプであった。

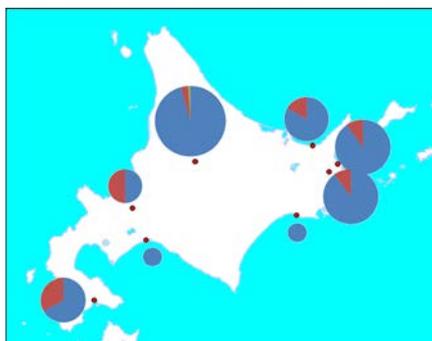


図4 セイヨオオマルハナバチのCOIハプロタイプの分布

道内5か所（図5）で採集したエゾオオマルハナバチ（計46個体）の右翅の翅脈を14部位について計測し、多変量解析によって外部形態から見た地理的分化を調べた。クラスター分析の結果（図5）から、エゾオオマルハナバチは、外部形態に関しても顕著な地理的分化が存在しないことが示唆された。

クラスター分析

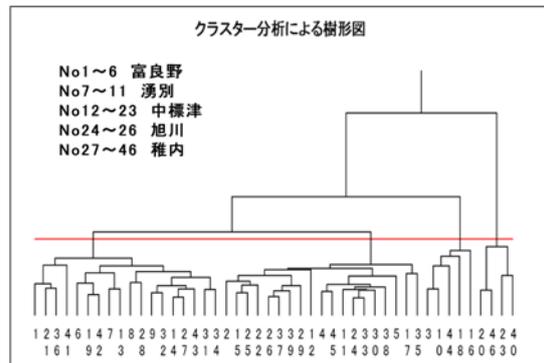


図5 クラスター分析の結果

以上の結果から、エゾオオマルハナバチを花粉媒介昆虫として利用する場合、1つの系統を全道で利用しても、野外集団の遺伝的攪乱の可能性は低いものと考えられた。ただし今後、マイクロサテライト、SNPなど核内の遺伝子についても同様の解析を進める必要がある。

<引用文献>

- ① 鷲谷いづみ、保全生態学からみたセイヨオオマルハナバチの侵入問題（〈特集〉移入生物による生態系の攪乱とその対策）、日本生態学会誌、第48巻、第1号、1998、73-78
- ② 木野田君公、高見澤今朝雄、伊藤誠夫、「日本産マルハナバチ図鑑」、2013、北海道大学出版
- ③ Fernando R.L., and M. Grossman (1980) Genetic evaluation with autosomal and X-chromosomal inheritance, Theor. Appl. Genet, 80:75-80
- ④ Henderson C.R. (1988) Use of an average numerator relationship matrix for multiple-sire joining, J. Anim. Sci. 66:1614-1621

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4件）

- ① 野村哲郎、高橋純一、竹内 剛（2014）不完全な繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率の評価. 京都産業大学先端科学技術研究所所報, 第13号, 17-23. 査読無.

- ② 高橋純一 (2014) 日本におけるミツバチの減少原因について－本当にミツバチは消えたのか－. 環境と健康. 27:12-21. 査読無.
- ③ 野村哲郎、高橋純一、竹内 剛 (2013) ハチ類の育種への BLUP 法による選抜の導入. 京都産業大学先端科学技術研究所所報, 第 12 号, 45-57. 査読無.
- ④ 高橋純一、竹内 剛、松本耕三、野村哲郎 (2013) ミツバチおよびマルハナバチにおける微胞子虫の浸潤調査. 京都産業大学先端科学技術研究所所報, 第 12 号, 59-67. 査読無.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 哲郎 (NOMURA, Tetsuro)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：5 0 1 8 9 4 3 7

(2) 研究分担者

高橋 純一 (TAKAHASHI, Junichi)
京都産業大学・総合生命科学部・准教授
研究者番号：4 0 5 3 0 0 2 7

土田 浩治 (TSUCHIDA, Koji)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：0 0 2 5 2 1 2 2

佐藤 正寛 (SATO, Masahiro)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種繁殖領域・上席研究員
研究者番号：7 0 3 7 0 6 5 8