

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850035

研究課題名(和文)DNAバーコードによる日本産キジラミ類の簡易同定手法の確立

研究課題名(英文)Establishment of a simple identification system for Japanese jumping plant lice through DNA barcode

研究代表者

井上 広光(INOUE, Hiromitsu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門ブドウ・カキ研究領域・主任研究員

研究者番号：80414663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本産キジラミ類(カメムシ目：キジラミ上科)のDNAバーコードによる簡易識別技術を確立するため、6科30属123種895個体についてミトコンドリアDNA COI領域714塩基対の配列情報を得た。これらの種では、種内変異(塩基置換率)は平均0.1%、ほとんどの種で最大でも1%以内に収まり、属内における種間変異の3.2～29.0%(平均で約16%)よりも十分に小さく、DNAバーコードによって日本産キジラミ類の種の識別が可能であることがわかった。しかし、ごく一部の形態種では3%を超える種内変異が見られ、隠蔽種の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：With the aim of establishing a simple identifying system for the Japanese species of jumping plant lice (Hemiptera: Psylloidea) through DNA barcode, 714 bp mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) sequences were obtained from 895 individuals of 123 Japanese psyllid species of 30 genera, 6 families. Among the most species analyzed in this study, the mean and maximum of intraspecific COI differences (p-distance) were 0.1% and 1.0%, respectively. In contrast, the COI differences between congeneric species were 3.2-29.0%. It was shown that psyllid species can be distinguished through the use of COI DNA barcode, except in cases of some of the morphological species.

研究分野：農学

キーワード：DNAバーコーディング キジラミ 同定・識別 隠蔽種 ミトコンドリアCOI領域 分子分類

1. 研究開始当初の背景

キジラミ類(カメムシ目キジラミ上科)は、全長2~5mmの微小な植食性昆虫で、世界で8科3,000種以上、日本からは7科157種の既知種が知られる。キジラミ類は多くの農業害虫種を含むが、同じカメムシ目のアブラムシ類やカイガラムシ類にあるような日本産全種を収録した図鑑類や主要な種を簡易に識別するための手引き書等が整備されておらず、専門の分類研究者以外にとっては種の識別が非常に難しい昆虫群である。

近年、国外から新たな果樹害虫キジラミ類の侵入発生が相次いでおり、2011年には中国と台湾で最重要ナシ害虫として知られるチュウゴクナシキジラミが西日本の栽培ナシ園で多発生したほか、2012年には四国の一部地域で栽培ビワに破滅的な被害をもたらす日本未記録のキジラミ類が新規に発生した。これらの侵入害虫の発生県では、黄色粘着トラップ等による発生予察調査が行われているが、上記のようにキジラミ類の簡易識別法は確立されていないため、地方試験研究機関や普及組織の職員等が同定を試みようにも手立てがないのが現状である。

キジラミ類以外の害虫や天敵昆虫においても、分類・同定の能力を有する専門家は著しく不足しており、専門家以外にも簡易に種の識別を可能にする態勢の構築が急務となっている。このような状況の中で、DNAバーコードによる同定・識別手法が現状打開の切り札として注目されている。DNAバーコーディングは、データベース化された既知の生物のDNA塩基配列情報との相同性によって種を識別するもので、特に形態的特徴が乏しく同定が困難な生物群について、形態学的な知識や経験を必要としない生物の簡易識別に利用されている。動物界では、バーコード領域としてミトコンドリアDNA上のCOI(チトクロームc酸化酵素サブユニット)領域の一部が用いられている。しかし、キジラミ類でバーコード領域の塩基配列情報が世界的なデータベースに登録されているのは、世界でわずか30種、日本産ではただ1種のため(2012年10月現在)現状ではこの簡易同定システムを日本産キジラミ類の識別に利用することができない。

2. 研究の目的

本研究では、形態による種の識別が難しい種群や、標徴形質に乏しい幼生期においても簡易で正確な種の識別を可能にするための基盤として、日本産キジラミ類の既知種の大半(目標は既知種の約9割)を網羅するDNAバーコード情報を蓄積・整備する。さらに、害虫防除に関わる農業試験研究分野はもとより、植物防疫行政のほか、環境影響評価や生物多様性研究等の分野に向けた、キジラミ類の簡易同定を支援する態勢の整備を上位目標とする。

3. 研究の方法

(1)本研究の開始に先立って1998~2012年の間に研究代表者が収集した日本産キジラミ類の99.5%エタノール液浸標本を、最新の分類体系に沿って同定・整理し、解析可能な種のリストを作成する。未収集の種については全国で調査採集を行い、網羅率の向上に努める。

(2)証拠標本を残すために非破壊的にDNAを抽出するための条件を検討し、外骨格は永久プレパラート標本とする。抽出したDNAについて、ミトコンドリアDNAのCOI領域の上流側約700塩基をPCR増幅し塩基配列を決定するため、既報のユニバーサルプライマーの使用を主軸として、PCR酵素や温度条件など各種条件を検討する。

(3)DNAバーコードと形態種が1対1対応するかどうかを検証し、キジラミ類の種の識別におけるDNAバーコーディングの有効性を明らかにする。さらに、形態種あるいは種群ごとにCOI領域の塩基配列情報による系統解析を行い、形態に基づく従前の分類体系との整合性を検証する。

4. 研究成果

(1)1998~2012年の間にDNA解析用99.5%エタノール液浸標本を収集した日本産既知種は93種だった。その後本研究で2013~2015年の間に北海道から南西諸島まで国内各地で調査を行い(図1)、新たに28種の既知種を収集できたため、最終的にDNA解析用サンプルを収集した日本産既知種は7科33属121種となった。これは、日本産キジラミ類のすべての科にわたり、既知属34属の約97%、既知種157種の約77%に当たる。加えて、本研究で日本未記録種(未記載種を含む)59種を収集・確認したことから、日本産キジラミ類の全サンプルは合計180種となった(表1)。なお、研究の過程で発見された果樹害虫の未記載種を新種ビワキジラミとして記載した(図2; Inoue et al., 2014)。

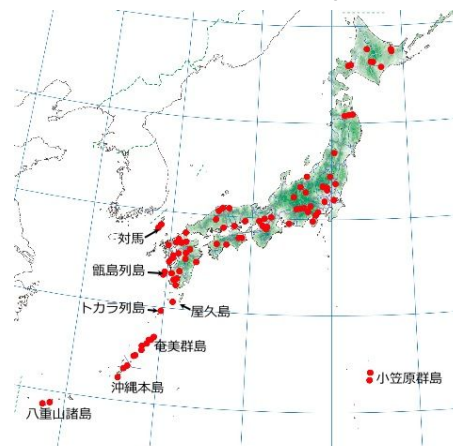


図1 本研究におけるサンプル収集地点



図2 栽培ビワを加害する侵入害虫ビワキジラミの成虫(左)と幼虫(右)

表1 本研究で収集した日本産キジラミ類 DNA 解析用サンプルの属・種数

科 Family	属 Genus		種 Species		網羅率(%)
	既知数	収集済*	既知数	収集済*	
タデキジラミ科 Aphalaridae	5	5	15	11 (1)	73.3
ヒメキジラミ科 Calophyidae	2	2	7	6	85.7
ネツタイキジラミ科 Carsidaridae	3	3	4	3	75.0
ヒゲトキジラミ科 Homotomidae	2	2	4	4	100.0
ヒラズキジラミ科 Liviidae	4	4	7	6 (1)	85.7
キジラミ科 Psyllidae	9	9	72	58 (40)	80.6
トガリキジラミ科 Trioziidae	9	8 (2)	48	33 (17)	68.8
計 Total	34	33 (2)	157	121 (59)	77.1

* 括弧内は未同定(未記載or国内未記録)の属・種数で、外数分類体系はBurckhardt & Ouvrard (2012)に準拠

(2) DNA 抽出には市販のキット(キアゲン社 DNeasy Blood & Tissue Kit)を使用した。タンパク質分解酵素(Proteinase K)処理を48時間以上行うJohnson et al. (2004)の手法によって、虫体を破壊することなく解析に必要な十分量のDNAを抽出できた。DNA抽出後の外骨格は、水酸化カリウム処理によって体内残渣を除去した後、脱水処理、カナダバルサムで封入する通常的手法によって、永久プレパラート標本を作成できた。

(3) 予備的に7科25属29種について、ミトコンドリアDNAのCOI領域約700塩基をPCR増幅するための条件を既報プライマーを中心に検討した結果、多くの節足動物で標準的に使用されるユニバーサル(汎用)プライマー(Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003)では増幅成功率が最大で約38%と低かった。そこで、キジラミ科リングキジラミ属数種のCOI領域の解析のために設計された既報のプライマー(Kuznetsova et al., 2012)を使用して条件検討したところ、60%を超える種についてPCR増幅に成功した。あわせて、最も古い1998年採集(2013年の抽出まで99.5%エタノール中で常温保管)の標本も使用できることがわかった。

(4) 収集した全180種のうち1,886個体についてDNAを抽出し、うち6科30属123種(うち35種は日本未記録種・未記載種)の計895個体のバーコーディング領域の塩基配列情報を得た。これは日本産既知種の約56%の種をカバーする。塩基配列を解析できた種のデータを使用して、広くキジラミ類に汎用可能なプライマーの設計を試みたが、キジラミ上科全体で高度に保存された配列部位は見つからなかったため、キジラミ類に特異的な汎用プライマーの開発は難しいと考えら

れた。本研究内でPCR増幅に失敗して塩基配列を解析できなかった種については、今後、個別にプライマーを設計するなどの対策が必要である。

(5) 形態に基づいて同定された種におけるCOI領域714塩基の種内変異(塩基置換率)は平均0.1%、後述する3種を除き最大でも1%(約7塩基の変異に相当)以内に収まり、同属内における種間変異の範囲3~29%(約23~207塩基程度の変異に相当;平均で約16%)よりも十分に小さいことが判明した。後述するような隠蔽種の存在が強く疑われる種群を除き、DNAバーコードと形態種は塩基置換率1%以内で1対1対応すると考えることができ、バーコード領域の塩基配列情報で日本産キジラミ類の種の識別が可能であることがわかった(図3)。

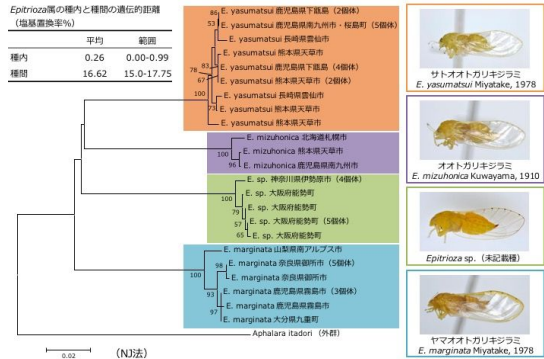


図3 オトガリキジラミ属の既知種3種と本研究で発見された未記載種1種のバーコーディング領域の塩基配列に基づく分子系統解析

(6) これまでのデータから、キジラミ類では塩基置換率2%~3%程度の範囲内に種を分かつ閾値があると考えられた。また、多くの種では、種内の地域個体群間の変異幅と種内変異の範囲が重なり、バーコード領域の塩基配列情報から種内の地域個体群を明瞭に区別することはできなかった(図4)。

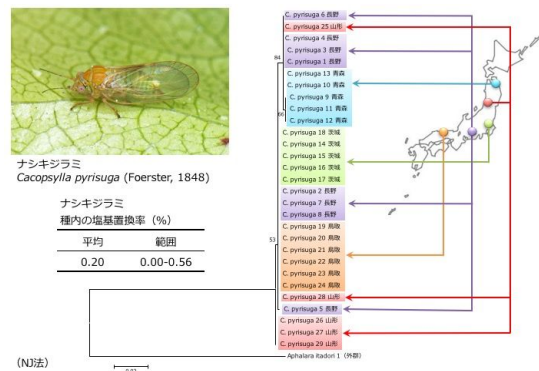


図4 ナシキジラミ地域個体群のバーコーディング領域に基づく分子系統解析

(7) グミキジラミ(キジラミ科)では、北海

道・東北地方産と九州本土産の地域個体群間で平均約2.7%、最大で約3.4%の変異があり、さらに上記の本州・九州産と鹿児島県甕島列島産との間では平均約4.3%、最大で約4.5%の変異(約32塩基の変異に相当)がみられたことから、本種内に隠蔽種が存在し、上記3地域の個体群はそれぞれ異なる種であることが強く示唆された(図5)本種群の詳細については、今後国内のより多くの地域個体群を収集して、形態と遺伝子の両面から詳細な分類学的再検討が必要である。

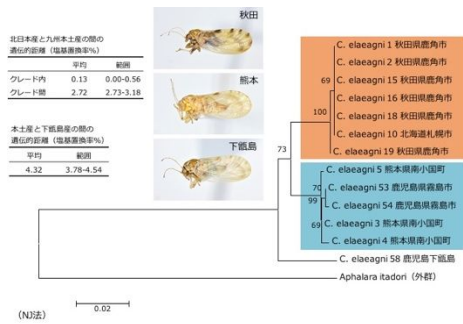


図5 “グミキジラミ”地域個体群のバーコーディング領域に基づく分子系統解析

(8) トゲキジラミおよびヨモギキジラミ(ともにタデキジラミ科)でも、種内でそれぞれ6.1%および27.7%の大きな変異が観測された。この要因は不明であるが、1%を超える種内変異が見られたのは各種とも1個体のみであったことから、少なくとも変異が大きすぎる後者に関しては、サンプルの取り違いやコンタミネーションといった解析時の操作上のミスに起因した可能性が高い。

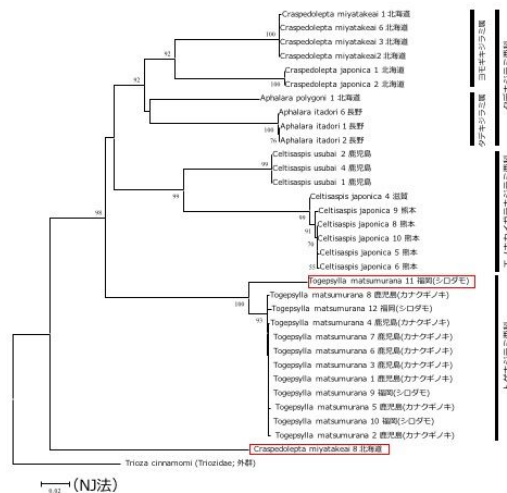


図6 タデキジラミ科内のバーコーディング領域に基づく分子系統解析。赤枠の2個体は種内で大きな変異が見られた

(9) キジラミ類のDNAバーコーディングは、他の昆虫類に比べ、世界的にみても遅れているといえる。多くの昆虫で共通して使用されるユニバーサルプライマーが適合しない種が多いこともその理由の一つと考えられた。本

研究の開始当初は、日本産キジラミ類の既知種のうち、90%に当たる約140種についてバーコード情報を得ることを目標としていた。しかし、本研究で解析に成功したのは、日本産既知種の約56%(88種)にとどまっている。今後カバー率を向上させるには、未収集種の入手に加えて、サンプル収集済みながら塩基配列解析に成功していない種について、プライマー等の解析条件を個別に検討する必要がある

(10) キジラミ類ではDNAバーコードと形態種が高い精度で対応し、これを種の識別に利用できることを明らかにしたことが本研究の最大の成果である。寄主植物が不明であったり、生息域がきわめて限られているなどの理由により、サンプルの入手がきわめて困難な種が少なからず残されていることから、日本産種のほぼ全種をカバーするデータを蓄積するには今後十年単位の時間がかかると見込まれる。しかしながら、本研究の成果をベースとして、キジラミ類の遺伝子情報の解明を国際的に進めていくなどすれば多方面への展開が可能である。特に、続発する侵入害虫種の国内への侵入と定着を未然に防ぐための、輸入植物検疫の現場で迅速かつ正確に害虫種を識別する技術の開発に本成果は大きく寄与すると見込まれる。そのためには、アジア地域の近隣諸外国と連携・協調して国際的にデータを集積することが必要である。

<引用文献>

Burckhardt, D, Ouvrard, D. 2012. A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). Zootaxa 3509: 1-34.

Inoue, H, et al. 2014. *Cacopsylla biwa* sp. nov. (Hemiptera: Psyllidae): a new pest of loquat *Eriobotrya japonica* (Rosaceae) in Japan. Applied Entomology and Zoology 49: 11-18.

Johnson, K.P. et al. 2004. Multiple origins of parasitism in lice. Proceedings of the Royal Society of London (B) 271: 1771-1776.

Folmer, O. et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3: 294-299.

Hebert, P.D.N. et al. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society London B 270: 313-321.

Kuznetsova, V.G. et al. 2012. *Cacopsylla fraudatrix* sp.n. (Hemiptera: Psylloidea) recognized from testis structure and mitochondrial gene *COI*. Zootaxa 3547:

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- 宮武 頼夫、井上 広光. 2016. アオギリオオキジラミの本州および九州からの新記録. *Rostria* (日本半翅類学会誌) (59):21-24. 査読無
- Inoue, H, Nakanishi, T, Kaneda, T. 2014. *Cacopsylla biwa* sp. nov. (Hemiptera: Psyllidae): a new pest of loquat *Eriobotrya japonica* (Rosaceae) in Japan. *Applied Entomology and Zoology* 49: 11-18. 査読有
DOI:10.1007/s13355-013-0217-z
- 宮武 頼夫、松本 浩一、井上 広光. 2014. キジラミ類(カメムシ目)の絵解き検索. 環境アセスメント動物調査手法(日本環境動物昆虫学会) 24:15-59. 査読無

〔学会発表〕(計10件)

- 井上 広光. 日本産キジラミ類のDNAバーコーディング(カメムシ目:キジラミ上科). 日本昆虫学会第75回大会. 2015年9月21日. 九州大学箱崎キャンパス(福岡県福岡市)
- 井上 広光, 松本浩一, 宮武頼夫. キジラミ類の最近の話題. 日本昆虫学会第75回大会. 2015年9月20日. 九州大学箱崎キャンパス(福岡県福岡市)
- 井上 広光. 日本産キジラミ類のDNAバーコーディングと種の識別. 日本応用動物昆虫学会第59回大会. 2015年3月28日. 山形大学小白川キャンパス(山形県山形市)
- 井上 広光. 日本から新種記載された侵入害虫ビワキジラミ(カメムシ目:キジラミ科). 日本昆虫学会第74回大会. 2014年9月15日. 広島大学東広島キャンパス(広島県東広島市)
- 井上 広光. 農業害虫としてのキジラミ類:特に近年侵入した害虫種、警戒すべき種. 日本応用動物昆虫学会第58回大会. 2014年3月27日. 高知大学朝倉キャンパス(高知県高知市)
- 井上 広光. トロエンキジラミ(半翅目:キジラミ科)の正体. 日本昆虫学会第73回大会. 2013年9月16日. 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)

〔図書〕(計4件)

- 青木 重行、藤沼 聡、林 正美、井上 広光、石川 忠、紙谷 聡志、榎本 雅身、松本 浩一、宮武 頼夫、宮崎 昌久、大原 直道、佐野 正和、田中 宏卓、碓井 徹、山田 量崇、山本 亜生、安永 知秀、吉澤 和徳. 2016. 権歌書房. 日本昆虫目録第4巻(準新翅類)

- 井上 広光. 2015. ビワを激しく加害する新種の侵入害虫ビワキジラミ. 果樹研究所ニュース 44号. 2. 査読無.
http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/476c21bb90bb725ac89144584373a7ac.pdf
- 井上 広光. 2014. ビワを加害する新種の侵入害虫ビワキジラミ. 植物防疫(日本植物防疫協会) 69巻. 97-101. 査読無
- 井上 広光. 2014. ビワを激しく加害する新害虫ビワキジラミ. 果実日本(日本園芸農業協同組合連合会) 70巻3号. 23-26. 査読無

〔その他〕

ホームページ等

http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/fruit/2013/13_045.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

- 井上 広光 (INOUE, Hiromitsu)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・ブドウ・カキ研究領域・主任研究員
研究者番号: 80414663

(2)研究協力者

- 宮武 頼夫 (MIYATAKE, Yorio)
松本 浩一 (MATSUMOTO, Koichi)