

リンゴ栽培における重要害虫であるシンクイムシ類の識別と ナミハダニの遺伝的構造に関する分子生物学的研究

羽田 厚*1

目 次

第I章 緒言	1
第II章 リンゴ園地に生息する3種シンクイムシ類のMultiplex PCRによる識別	2
II-1. はじめに	2
II-2. 材料と方法	5
II-2-1. 供試虫	5
II-2-2. 分子生物学的手法	5
II-3. 結果	7
II-4. 考察	7
第III章 岩手県内のリンゴ園地に生息するナミハダニ個体群の遺伝的構造に殺ダニ剤散布の有無が及ぼす影響	9
III-1. はじめに	9
III-2. 材料と方法	10
III-2-1. 供試個体群	10
III-2-2. DNA抽出	10
III-2-3. マイクロサテライト遺伝子座の増幅	10
III-2-4. 個体群構造の解析	11
III-3. 結果	11
III-3-1. マイクロサテライトDNAマーカーの解析	11
III-3-2. 遺伝的距離と地理的距離の相関	11
III-4. 考察	13
第IV章 総合考察	14
摘要	16
謝辞	17
引用文献	17
Summary	21

第 I 章 緒 言

岩手県におけるリンゴ経営体10aあたりの平均的な農業経営費は229千円であるが、そのうち農業薬剤費はおよそ17%にあたる39千円であり、大きなコストを占めている(農林水産省平成19年度品目別経営統計 <http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/noukei/hinmoku/>). このことは、害虫防除の高効率化により農業薬剤費の低減が可能になれば、リンゴ生産者の所得向上に直接つながる

ことを示している。日本応用動物昆虫学会(2006)によると、リンゴへの加害が報告されている動物・昆虫は300種を超えるが、通常の防除対象となる害虫は20種程度である。その中でも、果実を直接加害するシンクイムシ類と、葉への吸汁加害が著しく、かつ薬剤抵抗性の発達によって防除が難しいハダニ類には、特に重点的な防除対策が必要とされている。本研究は、これらリンゴ栽培における重点防除害虫の岩手県内における分布、加害状況および地域個体群の構造を分子生物学的手法によって解析し、リンゴ生産現場における防除作業のより高度な体系化、高効率化を目指す際に必要となる基礎的知見を得ることを目的とした。

第II章では、Multiplex PCRによるシンクイムシ類の識別法を開発し、その手法を用いて加害種の種構成を調査した。日本国内において、リンゴを加害するシンクイムシ類は主にシンクイガ科のモモシンクイガ *Carposina sasakii* (Matsumura)、ハマキガ科のナシヒメシンクイ *Grapholita molesta* (Busck) およびスモモヒメシンクイ *Grapholita dimorpha* Komai の3種であるが、これら3種のシンクイムシ類の若齢幼虫を形態的特徴から見分けることは困難である(図1~5)。モモシンクイガは日本のリンゴ栽培における最重点防除害虫であり、輸出検疫対象害虫でもあることから、近年のリンゴ輸出振興政策を遂行するにあたって、若齢幼虫でも確実に識別出来る手法の開発の意義は大きい。また近年、岩手県においてもスモモヒメシンクイと思われるシンクイムシ類による果実被害が増加する傾向にあるが、同属であるナシヒメシンクイの幼虫とスモモヒメシンクイの幼虫を形態で識別することは非常に困難である。しかし、この2種は越冬場所や新梢への加害の有無等、生態的特徴が異なることから(坂神・工藤 2009)、効率的に防除するためには加害種の識別が極めて重要である。つまり、シンクイムシ類幼虫を速やかに識別できる診断手段を確立することは、シンクイムシ類防除の高効率化とリンゴ輸出政策の安定化のために有用である。

そこで、3種のシンクイムシを確実に簡易に識別する方法として、ミトコンドリアDNAのcytochrome oxidase subunit I (COI) 領域の塩基配列の相違を検出できるPCRプライマーの作成を目標とした。近年では、ミトコンドリアDNAの塩基配列に基づいた昆虫の分類や系統学的な研究が盛んに行われている(Muraji et al. 2010)。特にCOI領域の塩基配列は、

*1 環境部 病理昆虫研究室(現 花巻農林振興センター農業振興課)

害虫の識別に最もよく用いられており、いくつかの先行研究事例がある (Scheffer et al. 2001; Barcenas et al. 2005; 上田 2006; Matsuda et al. 2012, 2013). 本章では Multiplex PCR によるモモシクイガ、ナシヒメシクイおよびスモモヒメシクイの識別法を開発し、複数の野外個体群を用いて実用性を評価した。

第III章では、県内のリンゴ園地に生息するナミハダニ *Tetranychus urticae* Koch 個体群の遺伝的構造に及ぼす殺ダニ剤散布の影響について調べた結果をとりまとめた。ナミハダニは様々な農産品目を加害する害虫であるが、2016年3月現在、Arthropod Pesticide Resistance Database (<http://www.pesticideresistance.org/>) によると薬剤に対する感受性低下事例が最も多い害虫であり、特に施設栽培品目や果樹園地での被害が大きい。岩手県内各地のリンゴ園地においても、他のリンゴ生産県と同様に複数の殺ダニ剤に対して感受性の低下したナミハダニ個体群が生息している (羽田 2008)。このためリンゴ生産者は、作用点の異なる複数の殺ダニ剤を防除に用いざるを得ず、防除コスト増大の原因となっている。薬剤感受性低下個体群が県内に広く分布している原因は不明であるが、可能性として、1) 種苗生産圃のようなある特定の地点で出現した薬剤感受性低下個体群が、苗木等を経由して県内各地に広がる、または 2) 各園地に生息する地域個体群において独立に薬剤感受性低下個体群が出現して、それぞれの園地で優占しているという2通りが考えられる (Van Leeuwen et al. 2010)。

ナミハダニや他種のハダニ類の個体群動態の解析に、近年最も一般的に用いられている遺伝子マーカーはマイクロサテライトDNAである (Navajas and Fenton 2000; Carbonnelle et al. 2007; Uesugi et al. 2009a, b; Hinomoto et al. 2011; Sun et al. 2012)。マイクロサテライトDNAマーカーを用いた先行研究の結果によると、ナミハダニ個体群の遺伝的構造には寄主植物の栽培方法、周辺の植生等を含めた農地の環境が大きく寄与していることが示されている。また農地では、殺ダニ剤の散布がナミハダニ個体群に致命的な影響を及ぼすため、ナミハダニの個体群動態は殺ダニ剤の散布頻度や種類によって大きく影響されるものと考えられている。そこで第III章では、岩手県内各地のリンゴ園地で採集したナミハダニ個体群のマイクロサテライトDNAをマーカーとして個体群構造を解析し、薬剤感受性低下個体群が県内に広く分布するに至った過程を考察した。

これらの結果を踏まえて、第IV章の総合考察では、分子生物学的手法を用いることによって実際にリンゴ生産現場での害虫防除が高効率化できることや、今後の発展が期待できることについて考察した。

第II章 リンゴ園地に生息する3種シクイムシ類の Multiplex PCR による識別

II-1. はじめに

1920年代から現在に至るまで、リンゴ栽培における最重点防除害虫は果実を内部から食害するシクイムシ類であり、現在でもリンゴ栽培における害虫防除総コストの約半分はシクイムシ類を対象としたものである (川嶋 2008)。日本国内において、リンゴを加害するシクイムシ類は主にシクイガ科のモモシクイガ、ハマキガ科のナシヒメシクイとスモモヒメシクイの3種である (図1~5)。この3種のうち、リンゴ栽培における最重点防除対象となる種は依然としてモモシクイガである。さらに近年、農林水産省では生果実の輸出促進に力を入れているが、モモシクイガは二国間協議によって検疫条件が定められている輸出検疫対象害虫であることから (<http://www.maff.go.jp/pps/j/search/detail.html>)、リンゴ輸出振興政策を遂行するにあたって、本種若齢幼虫を確実に同定出来る手法の開発は必須要件である。



図 1. モモシクイガにより加害されたリンゴ幼果



図 2. リンゴ被害果内のモモシクイガ幼虫

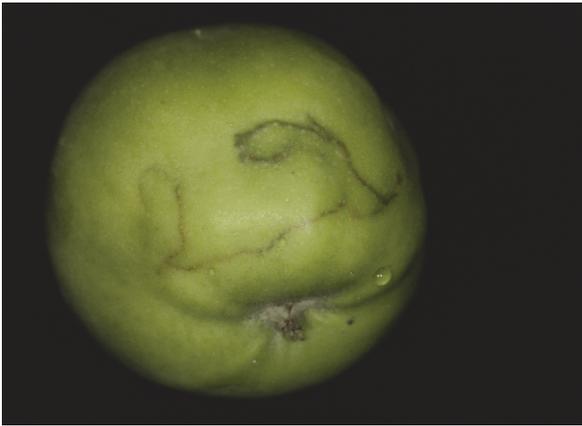


図 3. スモモヒメシンクイあるいはナシヒメシンクイによって加害されたリンゴ果実



図 4. スモモヒメシンクイあるいはナシヒメシンクイによって加害されたリンゴ果実

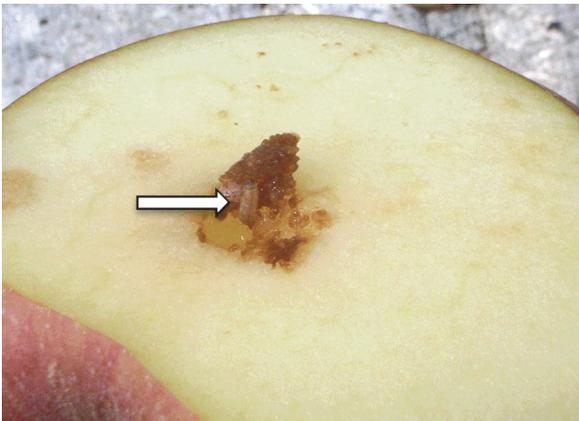


図 5. 被害果内部の幼虫 (スモモヒメシンクイあるいはナシヒメシンクイ)

一般的にシンクイムシ類幼虫を形態学的特徴によって識別することは困難であるが、近年になってナシヒメシンクイやスモモヒメシンクイによる被害が増加傾向にあることが報告されている(奥ら 1988; 渡辺・結城 1993; 高梨ら 2009)。岩手県内のリンゴ園地においても近年、これらのシンクイムシ類による被害果の発生が多くはないものの散見されている(図 6)。しかし、スモモヒメシンクイとナシヒメシンクイの幼虫を形

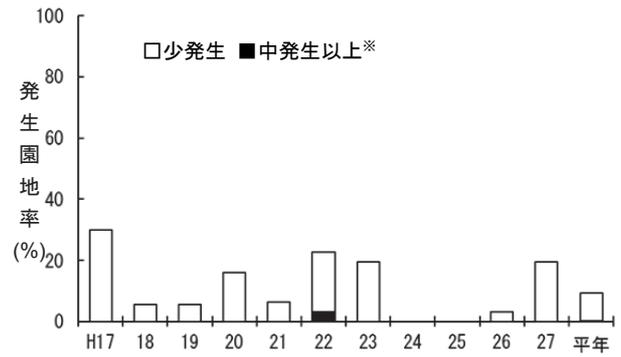


図 6. シンクイムシ類の年次別発生状況 (岩手県病害虫防除所 2016)

※発生程度は発生予察事業の調査実施基準(農林水産省消費・安全局植物防課 平成 27 年 4 月 1 日)による

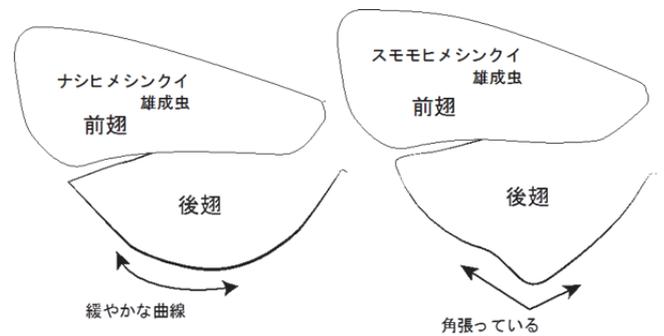


図 7. ナシヒメシンクイとスモモヒメシンクイ雄成虫の後翅外縁部の形態 (坂神・工藤 2009)

態で識別することは非常に困難であり、この2種を確実に識別するためには交尾器または雄成虫の後翅の観察(図7)が必要である(Komai 1979)。スモモヒメシンクイとナシヒメシンクイでは越冬場所や新梢への加害の有無等、生態的特徴が異なるため(表1)、これら2種のシンクイムシ類を効率的に防除するためには加害種の識別が極めて重要である。このように、リンゴを加害する3種のシンクイムシ類幼虫を確実に、簡易に、かつ速やかに識別する手法の開発は防除の効率化を考える際の必須要件である。

モモシンクイガ、スモモヒメシンクイ、ナシヒメシンクイはいずれも発生期間が長く、成虫がフェロモントラップに誘殺される時期も5月から9月まで続くため、加害種を識別するには、被害果から取り出した幼虫を確実に識別する必要がある。被害果から採集した幼虫が老齢であった場合、表1に示したように、腹脚の鉤爪の数や尾叉の有無を確認することによって、モモシンクイガをスモモヒメシンクイあるいはナシヒメシンクイと識別することは可能であるが、前述したようにスモモヒメシンクイとナシヒメシンクイの幼虫を形態で識別することは非常に困難である。また被害果から採集した幼虫が若齢であった場合、3種のシンクイムシ類を形態で識別することは極めて難しい。そこで本研究では、この3種のシンクイムシ類幼虫を

表1. 日本のリンゴ栽培において問題となる3種のシンクイムシ類の特徴
(駒井1976; 坂神・工藤 2009; 駒井ら 2011)

和名	モモシンクイガ	ナシヒメシンクイ	スモモヒメシンクイ
加害樹種	リンゴ、モモ、ナシ等多くの樹種		スモモ、ブルーベリー、リンゴ、ナシ (アンズ、オウトウ、ウメ、ネクタリン、ボケ、クサボケ)
加害部位	果実	果実、新梢 (芯折れ)	果実
越冬形態	幼虫 (まゆ内) 土中	幼虫 (まゆ内) 樹皮下、枝の隙間	幼虫 (まゆ内) 土中?
産卵場所	果実がくあ部に集中	果実および新梢先端	果実
卵の形態	縦長の球形、上部に枝上突起 乳黄色のち朱紅色～橙黄色		平べったい楕円形 乳白色
食入部	卵の近くから食入 極小さな穴が残り、果汁がしみ出すことがある	—	卵からやや離れたところから食入 食入部はモモシンクイガのものより判りにくい
夏世代の蛹	加害果を脱出して土中で蛹化 繭室を作らない 開帳: 15-19mm	加害果を脱出して樹皮下、枝の隙間等で蛹化 繭室を作らない 開帳: 10-16mm	加害果内または果実外で蛹化 繭室を作る場合が多い 開帳: 11-14mm
成虫の形状	翅の左右に三角型の黒斑 下唇が突き出す	全体に暗黒色	ナシヒメシンクイと酷似するが、雄の後翅外縁部の形態が異なる(図7参照)
老齢幼虫の特徴	腹脚の鉤爪: 15-20本 尾叉を欠く	腹脚の鉤爪: 30-45本 尾叉を有する	腹脚の鉤爪: 28-40本 尾叉を有する

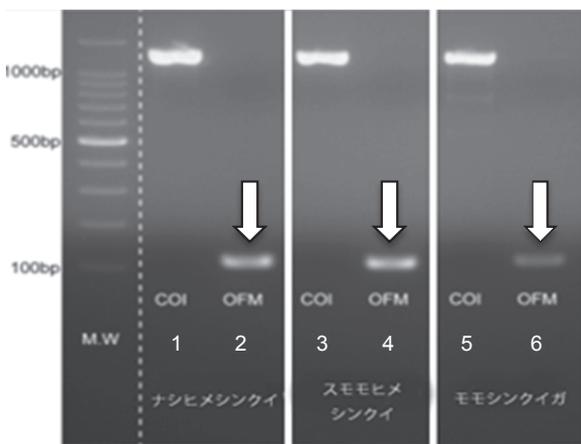


図 8. Barcenas et al. (2005)によるナシヒメシンクイに特異的なプライマーと、ポジティブコントロールとして用いたCOI領域のユニバーサルプライマーCJ-J-1718とTL2-N-3014 (Simon et al. 1994) のバンドパターン

図中の白矢印は、Barcenas et al. (2005)のプライマーによるバンドを示す
M.W.:DNA分子量マーカー (TAKARA 100bp DNA Ladder, TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)
レーン 1:ユニバーサルプライマー (Simon et al. 1994) で増幅したナシヒメシンクイ DNA
レーン 2:Barcenas et al. (2005) のプライマーで増幅したナシヒメシンクイ DNA
レーン 3:ユニバーサルプライマー (Simon et al. 1994) で増幅したスモモヒメシンクイ DNA
レーン 4:Barcenas et al. (2005) のプライマーで増幅したスモモヒメシンクイ DNA
レーン 5:ユニバーサルプライマー (Simon et al. 1994) で増幅したモモシンクイガ DNA
レーン 6:Barcenas et al. (2005) のプライマーで増幅したモモシンクイガ DNA

DNAの塩基配列で識別する方法の確立を目的とした。

近年では、ミトコンドリアDNAの塩基配列に基づいた昆虫の分類および系統学的な研究が盛んに行われている (Muraji et al. 2010). 特にミトコンドリアDNAのCOI領域の塩基配列は、害虫の識別に最もよく用いられており、ハモグリバエ類 (Scheffer et al. 2001)、コナジラミ類 (上田 2006)、ハダニ類 (Matsuda et al. 2012, 2013) などの先行研究がある。シンクイムシ類に対しては、Barcenas et al. (2005) により、北米で果実を加害するシンクイムシ類であるコドリガ *Cydia pomonella* (Linnaeus)、ナシヒメシンクイ、ハマキガ科の *Grapholita prunivora* (Walsh) と *Grapholita packardi* Zeller を識別できるPCRプライマーセットが示されている。Barcenas et al. (2005) の論文が出た時点では、スモモヒメシンクイの塩基配列がデータベースに登録されていなかったため、この論文で示されたプライマーがスモモヒメシンクイのDNAにアニーリングするかどうかは不明であったが、ナシヒメシンクイとスモモヒメシンクイを確実に識別できるのであれば、日本で問題となっているシンクイムシ類を識別するためのプライマーを開発する出発点として有用であると考えられた。そこで、Barcenas et al. (2005) によって示されたプライマーを用いて、ナシヒメシンクイ、スモモヒメシンクイ、そしてモモシンクイガを識別できるかどうかを検討した。Barcenas et al. (2005) のプライマーはナシヒメシンクイに特異的にアニーリングするように設計されているため、PCR産物のバンドがナシヒメシンクイのみに確認できれば、他の2種との識別が可能になる。しかし試験を実施したところ、3種のシンクイムシすべてにおいて同じサイズのPCR産物のバンドが確認された (図8;レ

表 2. シンクイムシ類3種の供試虫の採集記録

供試種	採取地点	供試 個体数	生育 ステージ	由来	栽培品目
ナシヒメシンクイ					
	岩手県北上市	20	成虫	野外採集	リンゴ
	長野県須坂市	20	成虫	飼育系統	
	長野県須坂市	16	幼虫	飼育系統	
	青森県黒石市	11	成虫	野外採集	リンゴ
	青森県南部町	5	成虫	野外採集	スモモ
	鳥取県北栄町	5	成虫	野外採集	ニホンナシ
	鳥取県湯梨浜町	12	成虫	野外採集	ニホンナシ
スモモヒメシンクイ					
	岩手県北上市	16	成虫	野外採集	リンゴ
	岩手県花巻市	6	成虫	野外採集	リンゴ
	長野県須坂市	11	成虫	飼育系統	
	長野県須坂市	24	幼虫	飼育系統	
	青森県南部町	4	成虫	野外採集	スモモ
モモシンクイガ					
	岩手県北上市	7	成虫	野外採集	リンゴ
	岩手県北上市	2	幼虫	野外採集	リンゴ
	青森県黒石市	1	成虫	野外採集	リンゴ
	青森県南部町	2	成虫	野外採集	スモモ
	岩手県盛岡市	6	幼虫	飼育系統	

ーン2, 4, 6). すなわち, 日本で問題となるシンクイムシ類の識別にBarcenas et al. (2005) によって示されたプライマーをそのまま応用することは不可能であることが分かった. そこで, 本研究では日本で採集したモモシンクイガ, ナシヒメシンクイおよびスモモヒメシンクイのDNAのCOI領域の塩基配列を決定し, COI領域の種間多型を把握した上で3種の相違を確実に捉えられ, かつ簡便に識別できるように, 同一条件でPCR反応を進行できるMultiplex PCRプライマーを設計した. 設計したプライマーの実用性は, 日本国内の果樹園地で採集した複数の野外個体および飼育系統を用いた実証試験によって評価した. また, 平成23年と27年には岩手県内のリンゴ園地で採集したシンクイムシ類によるリンゴ被害果から得た幼虫に基づいて, 加害種の種構成を調査した.

II-2. 材料と方法

II-2-1. 供試虫

識別用のPCRプライマーの設計および実証のための供試虫は, 野外で採集するか, または飼育系統の個体を用いた(表2). ナシヒメシンクイとスモモヒメシンクイの野外採集成虫は, 果樹園に設置した合成性フェロモントラップに誘殺された雄成虫の後翅外縁部の形態を確認することで識別して供試した. モモシンクイガの野外採集幼虫は, 老齢幼虫を被害果から採集して, 腹脚の鉤爪の数を比較することによりナシヒメシンクイおよびスモモヒメシンクイと識別して供試した(駒井 1976;駒井ら 2011).

さらに岩手県内のリンゴ園地に発生しているシンクイムシ類の加害種を識別するために, 平成23年9月に48個体, 平成27年9月に4個体の幼虫を採集して, 実証試験を行った. これらの幼虫はDNAを抽出する前に, 形態によって識別した(II-2-2を参照).

II-2-2. 分子生物学的手法

鋳型 DNAは, 以下に記載するプロトコルにしたがって抽出した. 成虫は直接DNA抽出に供試した. 幼虫は前処理としてまず半分に切断し, 蒸留水ですすぎ, ろ紙に挟み込んで押しつぶし, 内容物を除去する行程を3回繰り返して行ってから, 残った表皮をDNA抽出に供試した. この前処理により, モモシンクイガの野外採集幼虫をハマキガ科の2種から識別するための腹脚の鉤爪の検鏡が容易になった.

供試虫は1個体ずつ1.5mLのマイクロチューブに入れ, 100µLのPrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) を加えてベッスルで磨砕し, 100°Cで20分間加熱した後, 室温になるまで放冷した. 放冷後, 12,000×g で 5分間遠心分離し, 上清を新しい1.5mLのマイクロチューブに移し, TE solution (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) で5倍に希釈したものを鋳型DNA溶液として用いた.

COI領域を増幅する共通のフォワードプライマーとして, CJ-J-1718:5' -GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3', リバースプライマーとしてTL2-N-3014:5' -TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3' (Simon et al. 1994)を用いた. PCRは, 20µL中に 2µLの10× Ex Taq buffer, 200µMのdNTPs, 0.5UのTaKaRa Ex Taq (TAKARA BIO INC.), 0.2µMのプライマーおよび1µLの鋳型DNA溶液を含む反応液を用いた. サーマルサイクラーはABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Inc, CA, U.S.A.)を用い, PCRの条件は94°Cで5分間保持した後, 94°Cで30秒間の変性, 60°Cで30秒間のアニーリング, 72°Cで120秒間の伸長を35サイクル, 最後に72°Cで5分間の伸長とした.

塩基配列を決定するため, 岩手県北上市で採集したナシヒメシンクイおよびスモモヒメシンクイ, 青森県黒石市で採集したモモシンクイガに由来するそれぞれ6個体からのPCR産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A.) でクローニングし, それぞれ3クローンをBig Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でラベリングし, キャピラリー電気泳動装置ABI model 3130x (Applied Biosystems)を用いたSanger法で塩基配列を決定した.

表 3. シンクイムシ類の識別に用いた COI 領域の DNA 断片の塩基配列

供試種	塩基配列 5'-3'*			プライマー名
(1-30 bp)				
ナシヒメシンクイ	GGAGGATTTG	GAAATTGATT	AGTTCC <u>AT</u> TA	
スモモヒメシンクイ	GGAGGATTTG	GAAATTGATT	AGTTCC <u>TC</u> TT	GdCOI-F2L
モモシンクイガ	GGAGGATTTG	GAAATTGATT	AGTTCC <u>AT</u> TA	
(281-320 bp)				
ナシヒメシンクイ	TTAATATACG	<u>ACCA</u> AATAAT	<u>ATATC</u> <u>TT</u> TAG	<u>AT</u> CAAATACC
スモモヒメシンクイ	TTAATATACG	<u>ACCA</u> AATAAT	<u>ATATC</u> <u>TT</u> TAG	<u>AT</u> CAAATACC
モモシンクイガ	TTAATA <u>TACG</u>	<u>ATT</u> AATAAT	<u>TTATC</u> <u>ATT</u> IG	<u>AC</u> CAAATACC
(821-860 bp)				
ナシヒメシンクイ	CAGTTGGAGG	ATTA <u>AC</u> <u>T</u> GG <u>T</u>	GTA <u>AT</u> <u>C</u> TTAG	CTAA <u>C</u> TCTTC
スモモヒメシンクイ	CAGTTGGAGG	ATTA <u>AC</u> <u>T</u> GG <u>T</u>	GTA <u>AT</u> <u>T</u> TTAG	CCAA <u>T</u> TCTTC
モモシンクイガ	CTGTAGGAGG	ATTA <u>C</u> <u>A</u> GG <u>A</u>	GTA <u>G</u> <u>T</u> TTAG	CTAA <u>T</u> TCTTC

*下線部は Multiplex PCR のプライマーとして用いた部位
反転部位は種間で塩基配列が異なる部位



図 9. シンクイムシ類の識別に用いた COI 領域の DNA 断片の概略図

矢印は種特異的なプライマーのアニーリング部位を示す

CJ-J-1718 : COI 領域のユニバーサルフォワードプライマー (Simon et al. 1994)

TL2-N-3014 : COI 領域のユニバーサルリバースプライマー (Simon et al. 1994)

GdCOI-F2L : 本研究で設計したスモモヒメシンクイに特異的なフォワードプライマー

CsCOI-F6 : 本研究で設計したモモシンクイガに特異的なフォワードプライマー

GmCOI-F3 : 本研究で設計したナシヒメシンクイに特異的なフォワードプライマー

得られた塩基配列からPCRのエラーや個体変異箇所を除外し、ナシヒメシンクイ、スモモヒメシンクイ、モモシンクイガのCOI領域の1,342bpのDNA断片の塩基配列を決定した。決定した塩基配列はDNA Data Bank of Japan (DDBJ) にそれぞれaccession numbers AB603521, AB603522およびAB603523で登録した。決定した塩基配列はアライメントし、International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) に登録されているナシヒメシンクイの配列データ (GU096464-8) と、モモシンクイガの配列データ (GQ888512-4) とも比較して多型を検出した。種内の多型の影響を受けず、それぞれの種間で塩基配列に相違があり、かつアガロースゲル電気泳動のバンドパターンの目視による識別を容易にするため、PCR産物のサイズが十分に異なる部位を選抜し、ナシヒメシンクイ、スモモヒメシンクイ、モモ

シンクイガに特異的な3種のフォワードプライマーとして、GmCOI-F3, GdCOI-F2L, CsCOI-F6を設計した (表3, 図9)。

設計したプライマーの実用性を評価するために、表2に示した異なる地域から採集したシンクイムシ類を用いて実証試験を行った。実証試験は、3種それぞれに特異的な3種のフォワードプライマー (GmCOI-F3, GdCOI-F2L, CsCOI-F6) と、3種共通のリバースプライマー (TL2-N-3014) を識別用プライマーミックスとして、Multiplex PCRによって行った。プライマーを除く反応液組成および条件は、前述のCOI領域を増幅した際の方法と同様である。Multiplex PCR産物は2.5% Agarose S (ニッポンジーン) を用いた電気泳動によって分離し、バンドパターンを目視することによって3種のシンクイムシ類の識別を行った。

II-3. 結果

3種のシンクイムシ類に対してCJ-J-1718とTL2-N-3014のユニバーサルプライマーを用いてPCRを行ったところ、1,342 bpの単一のPCR産物が増幅された(図10; レーン1, 3, 5)。一方、本研究で設計した識別用プライマーミックスを用いた Multiplex PCRを行ったところ、それぞれの種に特異的なサイズのバンドが検出された(図10; レーン2, 4, 6)。PCR産物の正確なサイズを塩基配列のデータから算出すると、ナシヒメシンクイは1,056bp、スモモヒメシンクイは1,340bp、モモシンクイガは513bpであり、それぞれ数百bp単位でサイズが異なるため、電気泳動後のアガロースゲルを染色し、トランスイルミネーターで励起させたバンドパターンを目視するだけで3種は十分に識別可能であった。

本研究で供試したすべての個体、つまりナシヒメシンクイ89個体、スモモヒメシンクイ61個体、モモシンクイガ18個体(表2)は、識別用プライマーミックスを用いた Multiplex PCRによって、正確に識別することができ、かつ外部形態で同定した結果とも良く一致した。供試した個体の中には、COI領域の塩基配列に個体変異と思われる多型がいくつか検出されたが、プライマーのアニーリング部位には影響しなかった。また、合成性フェロモントラップで採集した成虫の中には、誘殺後10日以上経ってからDNAを抽出した状態の悪いサンプルもあったが、いずれも十分に識別可能であった。

岩手県内のリンゴ園地で発生しているシンクイムシ類の種を識別したところ、平成23年9月に採集した48個体は47個体がスモモヒメシンクイ、残る1個体がモモシンクイガであった。

平成27年9月に採集した4個体はすべてスモモヒメシンクイであった。モモシンクイガについては、外部形態で同定した結果とも一致した。いずれの年次も、ナシヒメシンクイによる果実被害事例は確認されなかった。調査個体数が少ないため、現在も継続調査中であるが、岩手県におけるナシヒメシンクイによるリンゴ果実への加害は極めて少なく、まれな事例であると推測された。

II-4. 考察

本研究では、北米における果樹栽培で問題となるシンクイムシ類をPCR法で識別したBarcenas et al. (2005) によって示された手法を参考にして、日本のリンゴ栽培で問題となる3種のシンクイムシ類(ナシヒメシンクイ、スモモヒメシンクイ、モモシンクイガ)を識別する手法を開発した。Barcenas et al. (2005) によって示されたプライマーは、日本で問題となる3種のシンクイムシ類の識別には応用できなかったため、まず日本で採集したモモシンクイガ、ナシヒメシンクイおよびスモモヒメシンクイのDNAのCOI領域の塩基配列を決定し、COI領域の種間多型を把握した上で3種の相違を確実に捉え、かつ簡便に識別できるように、同一条件でPCR反応を進行できる Multiplex PCRプライマーを設計した。設計した識別用プライマーミックスを用いた Multiplex PCRを行うことにより、日本のリンゴ園地で主に問題となる3種のシンクイムシ類の識別が可能であることを示した。

DNAバーコーディングによる種の識別のためのPCRプライマーを設計する際に最も確実な方法は、入手できたすべて

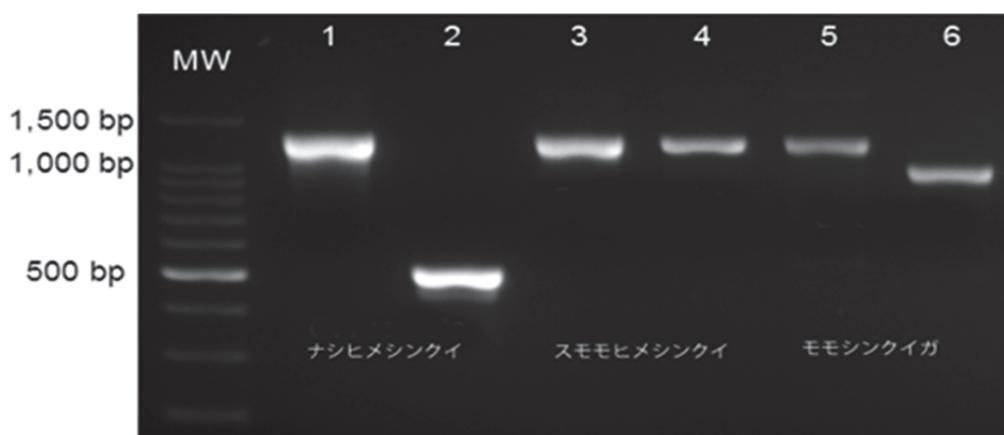


図 10. 本研究で開発し、設計したプライマーミックスを用いた Multiplex PCR 産物とポジティブコントロールとして用いたユニバーサルプライマー(Simon et al. 1994)のバンドパターン

- MW : DNA 分子量マーカー (TAKARA 100bp DNA Ladder)
 レーン 1 : ユニバーサルプライマーで増幅したナシヒメシンクイ DNA
 レーン 2 : 識別用プライマーミックスで増幅したナシヒメシンクイ DNA
 レーン 3 : ユニバーサルプライマーで増幅したスモモヒメシンクイ DNA
 レーン 4 : 識別用プライマーミックスで増幅したスモモヒメシンクイ DNA
 レーン 5 : ユニバーサルプライマーで増幅したモモシンクイガ DNA
 レーン 6 : 識別用プライマーミックスで増幅したモモシンクイガ DNA

表 4. 岩手県内各地のリンゴ園地で採集したナミハダニの殺ダニ剤感受性 (2008)

採取地域	採集市町村	個体群コード	上段:有効成分 中段:IRAC Mode of action classification group No. 下段:処理濃度									
			アセキノシル	エトキサゾール	ミルベメクチン	酸化フェンブタズ	ピフェナゼート	クロルフェナピル	BPPS	シフルメフェン	スピロメフェン	
			20B 150mg/L	10B 100mg/L	6 10mg/L	12B 480mg/L	UN 200mg/L	13 100mg/L	12C 300mg/L	25A 200mg/L	23 150mg/L	
県北部	一戸町	KT	○	△	○	○	×	○	×	○	○	
	二戸市	YD	○	×	○	○	△	○	○	○	○	
	岩手町1	IK1	○	○	○	○	×	○	○	○	○	
	岩手町2	IK2	○	×	○	○	○	○	○	○	○	
	軽米町	KN	△	○	○	○	○	○	○	○	○	
県中部	滝沢市	MT	○	×	△	△	△	○	○	○	○	
	盛岡1	KK	×	×	×	△	△	○	○	○		
	盛岡2	MI	○	△	△	○	×	○	○	○		
	盛岡3	HG	○	×	○	×	×	○	△	○		
	盛岡4	OO	○	×	○	×	○	○	○	○		
	矢巾町	HM	○	○	△	△	○	○	○	○		
	紫波町	NG	○	×	○	○	△	○	×	○		
	花巻市1	GD	△	×	○	×	△	△	○	○		
	花巻市2	TK	×	×	×	△	△	△	○	○		
	花巻市3	TW	○	×	△	×	△	○	×	○		
	花巻市4	NR1	×	×	×	×	×	△	○	○		
	北上市1	NR2	×	×	△	○	○	○	○	○		
	北上市2	SR	○	○	○	○	○	○	○	○		
	県南部	奥州市1	TM	○	×	○	○	○	○	○	○	
奥州市2		IN	○	×	△	○	×	○	○	○		
一関市1		OH	△	×	○	○	△	○	○	○		
一関市2		IC	○	×	○	○	○	○	△	○		
一関市3		TR	○	×	△	○	○	○	○	○		
一関市4		OK	○	×	○	△	△	○	○	○		
一関市5		FJ	○	×	○	×	×	○	○	○		
花泉町		KZ	×	×	○	○	○	○	○	○		
沿岸部		宮古市1	MY1	○	×	○	○	○	○	△	○	
		宮古市2	MY2	○	×	○	○	○	○	○	○	

記号は以下の通り ○:[殺卵および殺幼虫率] > 95%、△:95% > [殺卵および殺幼虫率] > 90%、×:[殺卵および殺幼虫率] < 90% 空白:未検定

の個体のCOI領域の塩基配列を決定し、種内の多型を可能な限り把握した上でPCRプライマーを設計する方法であるが、本研究ではモモシンクイガ、ナシヒメシンクイおよびスモモヒメシンクイの各6個体から3クローンずつ塩基配列を比較してプライマーを設計し、複数の野外および飼育個体を用いて実用性を実証する方法をとった。この方法で設計した場合、今回採集した個体以外の個体でも識別可能かどうかの問題となるが、現在までのところ、識別不可能な個体は確認されていない。今後もリンゴを加害するシンクイムシ類で、本研究で設計したMultiplex PCRプライマーを用いた識別が不可能な個体が発見された場合、ユニバーサルプライマーのCJ-J-1718とTL2-N-3014 (Simon et al. 1994) を用いてCOI領域を増幅し、塩基配列を確認することが必要となる。

なお、本研究で設計したMultiplex PCRプライマーを用いて、山形県のモモ・スモモ混植園地においてそれぞれの加害種の種構成を調べた事例が報告されている(阿部ら 2013)。それによると、モモ被害果から採集されたシンクイムシ類幼虫133個体中9個体がモモシンクイガ、124個体がナシヒメシンクイであり、スモモヒメシンクイの発生はなかった。また、スモモ被害果から採集されたシンクイムシ類幼虫174個体中16個体がモモシンクイガ、8個体がナシヒメシンクイ、150個体がスモモヒメシンクイであった。この園地では、モモ

樹列とスモモ樹列間の距離が4mと極めて近かったにもかかわらず、寄主植物によって加害種の種構成が明確に異なっていたことが報告されている。

本研究ではリンゴ栽培で問題となる3種のシンクイムシ類を識別することを目的としてMultiplex PCRプライマーを設計したが、その他のチョウ目害虫に対しては未検討である。例えば、極めてまれな事例であるが、過去にリンゴコシンクイ *Grapholita inopinata* (Heinrich) のリンゴへの寄生が報告されている (Tanaka et al. 2005)。今回の調査では、リンゴコシンクイのサンプルは入手できず、DNA data bankにも塩基配列が登録されていなかったため、本研究で設計したMultiplex PCRプライマーがこの種に適用できるかどうかは確認できていない。しかし、リンゴコシンクイのリンゴへの寄生事例は1953年以降報告されていない。このことから、今回設計した識別用Multiplex PCRプライマーを用いた手法は、害虫の発生予察や被害解析を業務として行う各県の病害虫防除所や輸出検疫の場面においても、形態での識別が困難な若齢幼虫を迅速かつ確実に識別できる有効な手法になると考えられる。

第三章 岩手県内のリンゴ園地に生息するナミハダニ個体群の遺伝的構造に殺ダニ剤散布の有無が及ぼす影響

III-1. はじめに

ナミハダニは様々な農業品目を加害する害虫であると共に, Arthropod Pesticide Resistance Database (<http://www.pesticideresistance.org/>) および Sparks and Nauen (2015) によると, 薬剤に対する感受性低下事例が最も多い害虫でもあり, 2016年4月現在で94の農薬成分に対する抵抗性の発達が報告されている. 特に, 施設栽培品目や果樹園地での被害が大きい. 岩手県内のリンゴ園地はもちろんのこと, 日本におけるリンゴ生産の最大産地である青森県やその他のリンゴ生産県において, いずれも複数の殺ダニ剤に対して感受性の低下したナミハダニ個体群が生息している (木村ら 2005; 羽田 2008). このためリンゴ生産者は年間に2~3回, 複数の作用点の異なる殺ダニ剤をハダニ防除に用いざるを得ず, 防除コスト増大の原因となっている. 殺ダニ剤に対する感受性が低下するメカニズムは, 殺ダニ活性によって高感受性個体がほぼ絶滅し, 低感受性個体を選抜されることであるため, ある園地に生息するナミハダニ個体群の殺ダニ剤感受性は, その園地における過去の殺ダニ剤散布実績に強く影響される. 岩手県内のリンゴ園地では, 基本的に地域の農業協同組合単位で使用農薬を検討・決定して防除暦を作成し, その防除暦に基づいて各園地および防除組織が防除を実施していることから, 各種の殺ダニ剤に対する感受性については, 地域あるいは園地ごとに特徴や傾向が異なるものと予想された. しかし, 表4は岩手県内各地で採集したナミハダニ個体群における実用濃度による各種殺ダニ剤に対する感受性を2008年に検定した結果 (羽田 未発表) であるが, 採集したほとんどの個体群はエトキサゾールに対する感受性が著しく低下していた. つまり, 県内のほとんどの地域でエトキサゾールに対する感受性が低下したナミハダニ個体群が優占して生息していることを意味している. また, アセキノシルやピフェナゼートのように, どの地域で採集した個体群も, ある程度感受性低下個体群が含まれている事例もあった. このように, 殺ダニ剤に対する感受性の低下は, 県内でほぼ一様な挙動を示しているように見える. この原因については不明であるが, 考えられる可能性として, 1) 種苗生産圃のようなある特定の地点で出現した薬剤感受性低下個体群が, 苗木等を経由して県内各地に広がること, または 2) 各園地に生息する地域個体群ごとに独立に薬剤感受性が低下した個体群が出現して, それぞれの園地で優占しているという2通りを挙げることができる (Van

Leeuwen et al. 2010).

本章では岩手県内各地で採集したナミハダニ個体群の動態を解析することによって, 殺ダニ剤に対して感受性の低下した個体群が県内全域に生息する過程を推測した. ナミハダニや他種のハダニ類の個体群動態の解析に, 近年最も一般的に用いられている遺伝子マーカーはマイクロサテライトDNAであり, 多くの先行研究事例がある (Navajas and Fenton 2000; Carbonnelle et al. 2007; Uesugi et al. 2009a, b; Hinomoto et al. 2011; Sun et al. 2012). マイクロサテライトDNAマーカーの利点は, 進化速度が速いために個体群構造の検出能が高いこと, 個体群がたどってきた集団遺伝学的な過程を捉えられること, 薬剤感受性等, 農地での生残率に寄与する遺伝子と連鎖していなければニュートラルなマーカーとして利用できること等がある. Uesugi et al. (2009a, b) は, 温室栽培のバラに生息するナミハダニ個体群は局所個体群に分化しており, 遺伝的多様性が高いものの, 露地のリンゴ園地に生息するナミハダニ個体群は比較的長距離を移動し, 遺伝的流動が大きいことを示した. 一方 Sun et al. (2012) は中華人民共和国において, 農地のナミハダニ個体群は遺伝的多様性が低く, 距離による遺伝的隔離が有意であることを示した. これらの研究は, ナミハダニ個体群の遺伝的構造が種固有の一定なものではなく, 寄主植物の栽培方法や周辺の植生等を含めた農地の環境が大きく寄与し, 変化することを示している. それに加えて, 殺ダニ剤の散布はナミハダニ個体群に致死的な影響を及ぼすことから, 殺ダニ剤を定期的に散布している農地では, ナミハダニ個体群の動態が殺ダニ剤の散布頻度や有効成分の種類に強く影響される (Osakabe et al. 2009). また Goka (1999) は, 寄主植物の植生パッチサイズと年生の違いがナミハダニ個体群の殺ダニ剤抵抗性の発達に影響すること, すなわち果樹や永年性作物に生息するナミハダニ個体群は殺ダニ剤抵抗性が発達しやすく, 一年生草本では発達しにくいことを考察している.

そこで本章では, 殺ダニ剤の使用体系が異なるいくつかの園地, すなわち化学合成殺ダニ剤を定期的に散布している商業的リンゴ園地8地点, 殺ダニ剤を散布していない試験用のリンゴ園地1地点, 化学合成殺ダニ剤を定期的に散布しているリンゴ種苗生産圃1地点, および気門封鎖作用の殺ダニ剤が定期的に散布されているホップ園地1地点から採集したナミハダニ個体群の個体群構造を解析することによって, 殺ダニ剤感受性低下個体群が県内全域に生息している原因を推測することを目的とした.

Ⅲ-2. 材料と方法

Ⅲ-2-1. 供試個体群

ナミハダニ黄緑型雌成虫は、商業的リンゴ園地8地点 (AF, KJ, KK, KW, MZ, NG, OT および TK), 殺ダニ剤試験用のリンゴ園地1地点 (IA), リンゴ種苗生産圃1地点 (SY), およびホップ園地1地点 (EH) から採集した (表5, 図11). 採集期間は2012年8月31日から9月24日であった. すべてのリンゴ園地でわい性台木が用いられており, 栽植密度は樹間が2.5-3m, 列間が4-5mであった. 樹齢は10年生以上であり, 樹間の枝同士が触れあっていたため, ハダニの樹間の移動は歩行と空中の両方が起こり得る状態であった. 商業的リンゴ園地と種苗生産圃では, 毎年定期的に殺ダニ剤が散布されている. 殺ダニ剤試験用のリンゴ園地では1997年に栽植されて以来, 定期的な散布は実施されていない. ホップ園地では, 気門封鎖作用の殺ダニ剤のみが散布されている. ナミハダニ個体群の構造を解析するために, 3列以上のリンゴ樹

列からサンプリングした. AFおよびMZ園地では, ナミハダニの発生密度が低かったために, 2樹列からのサンプリングにとどまった (表5). 葉あたり1~2個体のナミハダニ雌成虫をサンプリングし, 99.5%エタノールに浸漬して-20°Cで保存し, DNAの抽出に供試した.

Ⅲ-2-2. DNA抽出

ナミハダニ雌成虫は 1 個体ずつ 1.5mL のチューブに入れ, 液体窒素中で凍結させ, 20 μ L の PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent と 2~3 個のジルコニアビーズ(ϕ 1.5 mm) を添加し, Multi-Beads Shocker (Yasui Kikai Corporation, Osaka, Japan) で磨砕した. 磨砕したサンプルは 100°C で 20 分間煮沸した後, 室温になるまで放冷した. その後, 14,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し, 上清を TE solution で 5 倍に希釈したものを鋳型 DNA 溶液として用いた. 鋳型 DNA 溶液は使用時まで 4°C で保存した.

表 5. ナミハダニ採集地点の概況

採集地点	個体群コード	緯度	経度	採集日付	用いられる殺ダニ剤の種類と頻度	採集した樹列数	供試個体数
商業的 リンゴ園地	KW	39.6876° N	141.2368° E	2012年8月31日	化学合成殺ダニ剤 年間2-3回	6	53
	NG	39.5759° N	141.2119° E	2012年8月31日		4	49
	AF	39.2356° N	141.1708° E	2012年9月3日		2	26
	TK	39.7579° N	141.0980° E	2012年9月4日		4	37
	MZ	39.1375° N	141.1661° E	2012年9月13日		2	21
	KK	39.6311° N	141.1927° E	2012年9月14日		3	38
	OT	39.6159° N	141.2007° E	2012年9月14日		4	54
	KJ	39.3537° N	141.1071° E	2012年9月19日		4	54
試験用 リンゴ園地	IA	39.3540° N	141.1001° E	2012年9月19日	なし	4	66
リンゴ種苗 生産圃	SY	39.2286° N	141.0169° E	2012年9月24日	化学合成殺ダニ剤 年間2-3回	5	23
ホップ園地	EH	39.2052° N	141.1744° E	2012年9月11日	気門封鎖作用の殺ダニ剤 年間6-7回	8	113

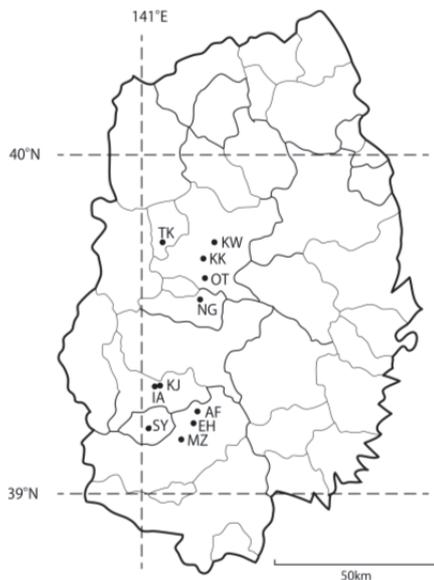


図 11. 岩手県各地のナミハダニ採集地点

AF, KJ, KK, KW, MZ, NG, OT および TK は商業的リンゴ園地, IA は試験用リンゴ園地, SY は種苗生産圃, EH はホップ園地

Ⅲ-2-3. マイクロサテライト遺伝子座の増幅

4つのマイクロサテライト遺伝子座を増幅するプライマー, TuCA12, TuCA25, TuCT04 およびTuCT18を用いた (Uesugi and Osakabe 2007) (表6). PCRは, 5 μ L中に0.2 μ Mの各プライマー, 2.5 μ LのType-it Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Netherlands), 0.5 μ Lの鋳型 DNAを含む反応液を用いたMultiplex PCRにより行った. サーマルサイクラーは, iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories)を用い, PCRの条件は95°Cで5分間保持した後, 95°Cで1分間, 52°Cで90秒間, 72°Cで30秒間を40サイクル行い, 最後に60°Cで30秒間の伸長を行った. フラグメント解析は, 1 μ Lの Multiplex PCR産物, 10 μ LのHi-Di Formamide, 0.5 μ Lの GeneScan-600LIZ Size Standard (Applied Biosystems) を用い, キャピラリー電気泳動装置ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で行った. 得られたデータから, Peak scannerソフトウェア (Applied Biosystems) を用いてフラグメント解析を行った.

表 6. ナミハダニのマイクロサテライト遺伝子座の増幅に用いたプライマー

マイクロサテライト遺伝子座	プライマーの配列 (5'-3')	蛍光標識	反復配列	計算上の対立遺伝子サイズ (bp)	対立遺伝子サイズの範囲 (bp)	対立遺伝子数	遺伝子座あたりの対立遺伝子数 (n* = 21)
TuCA12	F: GATTGTGGTCGTTGGTTTC R: GATCAACTCAAAAAGGATAACGGTTG	6-FAM	(CA) ₇	276	267-279	3	3
TuCA25	F: AATGTGTTGGTTGTTACGAAAGTG R: TTGGTCAAAAGCCGGTTACAG	VIC	(TC) ₁₃	164	155-169	7	5.56
TuCT04	F: CGTCATCATTGCCGTCATTTTAC R: GGAGCCGTTCAAGAGAGTG	NED	(CT) ₈	149	140-152	5	4.04
TuCT18	F: CTTGATGCTAGTGATACAACG	PET	(CT) ₉	296	291-307	6	4.3

*本研究で用いた最少の個体数(21)を用いて算出した

III-2-4. 個体群構造の解析

連鎖不平衡(linkage disequilibrium) 解析には, GENEPOP web versionソフトウェア (Raymond and Rousset 1995) を用いた. 遺伝子座あたりの対立遺伝子頻度 (frequency of each allele per locus), ヘテロ接合度の観察値 (observed heterozygosity: HO) と理論値 (unbiased expected heterozygosity: HE) は, GenALEX 6.5 ソフトウェア (Peakall and Smouse 2012)を用いて算出した. 対立遺伝子数 (numbers of alleles), アレリックリッチネス (allelic richness), 遺伝的多様性 (gene diversity; Nei 1973) および近交係数 (inbreeding coefficient : FIS; Weir and Cockerham 1984) は, GENEPOP および FSTAT 2.9.3 ソフトウェア (Goudet 1995) を用いて算出した. 近交係数のハーディ・ワインベルグ平衡からのずれ (deviation of FIS from the Hardy-Weinberg equilibrium) は個体ごとに対立遺伝子を1,000回並べ替えて算出した. ペアワイズFST値 (Pairwise FST values: Weir and Cockerham 1984)は, GenALEXソフトウェアを用い, 個体群ごとに9,999回並べ替えて算出した. 距離による遺伝的隔離(isolation by distance)もGenALEXソフトウェアを用い, $F_{ST}/(1-F_{ST})$ と対数変換した地理的距離(km, ln-transformed) (Rousset 1997)を比較し, その相関は10,000回並べ替えたMantel testにより解析した.

個体群間の遺伝的な関連性を調べるため, POPULATIONS 1.2.32 ソフトウェア (Langella 1999) によりクラスター解析を実施した. 遺伝的距離とCavalli-Sforza chord distance (Dc; Cavalli-Sforza and Edwards 1967) を, 個体ごとに1,000回ブートストラップ抽出を行って算出し, neighbor-joining algorithm に基づく系統樹を作成した. さらに, 個体群構造を個体レベルで推定するため, 共通の祖先から過去に分化したであろう集団を供試個体の遺伝子型から推定し, 推定集団へ割り振るSTRUCTURE解析を, STRUCTURE 2.3.1ソフトウェア (Pritchard et al. 2000) を用いて実施した. 複数の推定集団の特徴を持つ個体に対しては, 対立遺伝子頻度と 관련된混合モデル (Falush et al. 2003) に基づき, 推定集団の混合割合を算出した. 推定集団の数:K値は, Evanno et al. (2005) の方法に基づき,

STRUCTURE HARVESTER ソフトウェア (Earl and vonHoldt 2012) を用いて ΔK 値を算出し, 最適なK値を推定した. 得られたデータはClumpp 1.1.2ソフトウェア (Jakobsson and Rosenberg 2007) を用いて集計し, Distruct 1.1ソフトウェア(Rosenberg 2004) を用いてグラフ化した.

III-3. 結果

III-3-1. マイクロサテライトDNAマーカーの解析

リンゴ園地およびホップ園地から採集したナミハダニ534個体の遺伝子型および個体群の遺伝的パラメータを決定した (表7). すべての個体群は, 4つのマイクロサテライト遺伝子座すべてにおいて多型を示し, 個体群間の連鎖不平衡も観察されなかった. 観察されたアレリックリッチネスは2.75 (SY) から4.35 (KW) であり, Hoは0.323 (SY) から0.519 (KK), 遺伝的多様性は0.519 (SY) から0.676 (KK)であった.

AFおよびMZ個体群を除くすべての個体群において, 近交係数は有意に0より高かったことから($P < 0.01$), 今回調べたナミハダニ個体群では任意交配よりも近親交配が優占していることが示された. 2樹列からしか採集していないAFとMZ個体群で観察された近交係数は, 3樹列以上からサンプリングした個体群と比較して低かった. また, 化学合成殺ダニ剤を使用していない園地由来の個体群 (IAおよびEH) で観察された近交係数は, その他の9園地由来の個体群のものより低く, このことは化学合成殺ダニ剤の継続的な使用がナミハダニ個体群の近親交配の頻度を上昇させていることを示唆していた (表7).

III-3-2. 遺伝的距離と地理的距離の相関

供試した 11 個体群の総当たりによる 55 組のペアワイズ F_{ST} 値は 0.011 から 0.162 まで変異し, KJ-TK を除くすべての組み合わせについて, 個体群間の差異は有意であった (表 8). 最も高いペアワイズ F_{ST} 値は SY-MZ で観察された 0.162 であり, 最も低いペアワイズ F_{ST} 値は IA-KJ で観察された 0.011 であった.

地理的な分布と個体群間の遺伝的な差異との相関を調べるため, 個体群間の $F_{ST}/(1-F_{ST})$ を, 対数変換した地理

表 7. 岩手県内11地点で採集したナミハダニ二個体群の遺伝子型および遺伝的パラメータ

個体群 コード	総対立 遺伝子数	遺伝子座 あたりの		遺伝的多様性		
		対立遺伝子数	$H_O^a)$	$H_E^b)$	(Mean \pm SE ^{c)})	$F_{IS}^d)$
AF	19	3.42	0.48	0.549	0.55 \pm 0.052	0.127
KJ	24	4.09	0.389	0.641	0.604 \pm 0.036	0.396**
KK	23	4.13	0.519	0.674	0.676 \pm 0.056	0.232**
KW	29	4.35	0.424	0.664	0.666 \pm 0.055	0.363**
MZ	22	3.75	0.464	0.575	0.577 \pm 0.035	0.196
NG	23	3.98	0.439	0.59	0.591 \pm 0.064	0.258**
TK	23	4.22	0.466	0.611	0.613 \pm 0.040	0.240**
IA	21	3.76	0.5	0.603	0.644 \pm 0.033	0.172**
SY	14	2.75	0.323	0.515	0.519 \pm 0.042	0.378**
EH	22	3.29	0.461	0.545	0.546 \pm 0.049	0.155**

AF, KJ, KK, KW, MZ, NG, OTおよびTKは商業的リンゴ園地、IAは試験用リンゴ園地、SYは種苗生産圃、EHはホップ園地で採集した個体群

a) H_O : ヘテロ接合度の観察値

b) H_E : ヘテロ接合度の理論値

c) SE: 標準誤差

d) F_{IS} : 近交係数

近交係数のハーディ・ワインベルグ平衡からのずれは、個体ごとに対立遺伝子を1,000回並べ替えて算出した
** : $P < 0.01$

表8. ペアワイズ F_{ST} 値(左下)と地理的距離(右上, km)との比較

	KW	NG	AF	TK	MZ	KK	OT	KJ	IA	SY	EH
KW	-	12.61	50.59	14.17	61.44	7.34	8.57	38.78	38.95	54.38	53.9
NG	0.045**	-	38.01	22.45	48.87	6.36	4.54	26.31	26.52	42.06	41.33
AF	0.046**	0.06**	-	58.41	10.87	44.03	42.36	14.26	14.51	13.34	3.36
TK	0.038**	0.047**	0.053**	-	69.18	16.23	18.05	44.94	44.93	59.2	61.77
MZ	0.068**	0.060**	0.093**	0.033**	-	54.9	53.23	24.53	24.66	16.37	7.55
KK	0.021**	0.042**	0.082**	0.047**	0.081**	-	1.84	31.72	31.86	47.19	47.36
OT	0.036**	0.017*	0.064**	0.026*	0.046**	0.025**	-	30.23	30.4	45.81	45.69
KJ	0.033**	0.033**	0.048**	0.012	0.029**	0.049**	0.029**	-	0.61	15.6	17.7
IA	0.044**	0.061**	0.074**	0.020*	0.050**	0.056**	0.051**	0.011**	-	15.88	17.48
SY	0.110**	0.097**	0.088**	0.110**	0.162**	0.100**	0.096**	0.110**	0.132**	-	13.84
EH	0.073**	0.089**	0.120**	0.101**	0.083**	0.089**	0.083**	0.087**	0.092**	0.155**	-

ペアワイズ F_{ST} 値は個体群ごとに9,999回並べ替えて算出した

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

的距離と比較した結果(図12), これらの間には正の相関が認められた(Mantel test, $P < 0.05$, $R^2 = 0.12$).

neighbor-joining algorithm に基づく系統樹も同様に, 地理的距離の近い個体群は, 遺伝的距離が近いことを示していた(図13). KW-KKのサンプリング地点は地理的に近く(7.34km), ブートストラップ値は99であった. また, 同様に地理的に近いMZ-EH(7.55km), NG-OT(4.54km)およびAF-SY(13.34 km)はそれぞれ97, 87および81であった. しかし, 地理的にさらに近い(0.61km)ものの, 殺ダニ剤使用体系が異なる試験用のリンゴ園地IAと商業的リンゴ園地KJ由来の個体群ではブートストラップ値が46であり, また3.36kmしか離れていない商業的リンゴ園地AFとホップ園地EH由来の個体群は別のクラスターに属していることから, 遺伝的距離はお互いに遠い関係にあることが示された.

STRUCTURE 解析を実施するため, 各個体が過去に分化したであろう推定集団数:K値を2から30まで変化させ, Evanno et al. (2005) の方法に基づき ΔK 値を算出し, 最適なK値を推定した結果, $K=2$ の時の ΔK 値が最も高いことから, 供試個体は2つの推定集団に割り振ることが最適であった

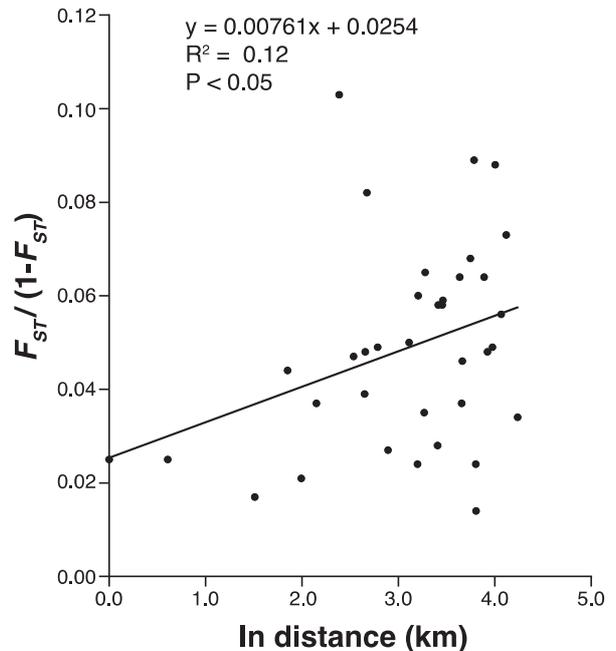


図 12. 岩手県内 11 地点で採集したナミハダニ二個体群で観察された $F_{ST}/(1-F_{ST})$ 値と、対数変換した地理的距離 (km) との相関の Mantel test による解析

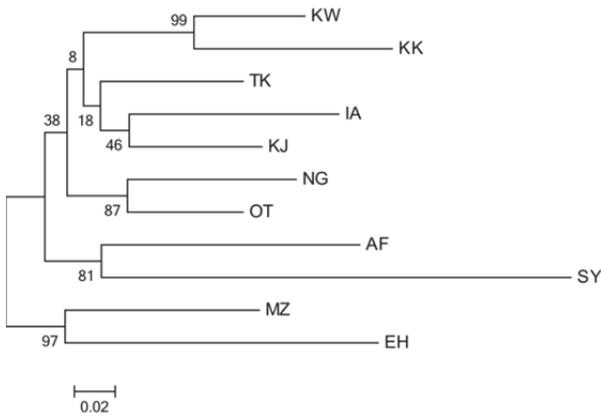


図 13. 岩手県内の 11 地点で採集したナミハダニ個体群の Neighbor-joining algorithm に基づく系統樹

各ノードの数値はブートストラップ値を示す

(図14). K値を2としてSTRUCTURE解析を実施した結果を図15に示した. EH個体群の多くの個体はバープロットが黒の推定集団に割り振られたが, その他の個体群はバープロットが白と黒の2つの推定集団に割り振られた. このことは, ホップ園地に由来するEH個体群は, リンゴ園地由来の個体群とは過去の分布変遷が異なる可能性が高いことを示している.

III-4. 考察

本章では, 岩手県内各地で採集したナミハダニ個体群の遺伝的構造を解析することにより, 殺ダニ剤感受性低下個体群が県内全域に生息する過程を推測した. 岩手県内で栽培されているリンゴ種苗のほぼすべてが1カ所の種苗生産園で栽培され, 各地のリンゴ園地に販売されている. この状況において, 種苗生産園に殺ダニ剤感受性が低下したナミハダニ個体群が生息していれば, 県内各地の商業的リンゴ園地に生息するナミハダニ個体群の遺伝的多様性は低くなることが予想された. それに加えて, もし1カ所の種苗生産園に由来する殺ダニ剤感受性低下個体群が各地商業的リンゴ園地に生息しているのであれば, それらの個体群はすべて種苗生産園に生息するナミハダニ個体群と遺伝的に近縁な個体群であると予想できた. 本章で調査した11個体群はすべて遺伝的に独立しており, $R=0.12$ と弱いながらも有意な距離による遺伝的隔離が確認された(図12). また, SY個体群は岩手県内で唯一の種苗生産園に由来する個体群であるが, この個体群は遺伝的に他の個体群と独立していた(図13). このことから, 種苗生産園由来の個体群が県内各地に生息するナミハダニ個体群の共通の祖先になっている可能性は非常に低く, 表4で示したような広範囲での殺ダニ剤に対する感受性の低下は, 各地の個体群で独立に起こってい

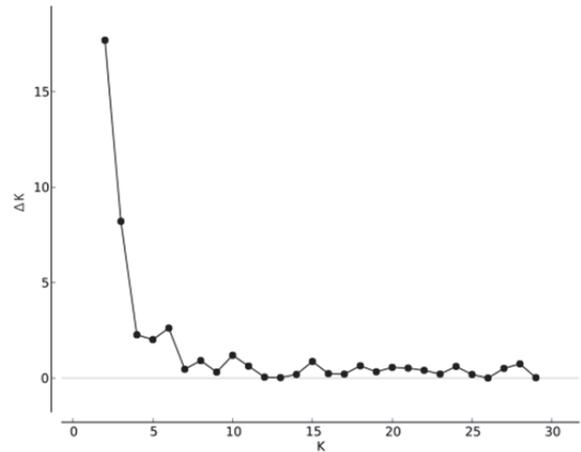


図 14. Evanno et al. (2005)の方法に基づき, STRUCTURE HARVESTER ソフトウェア (Earl and vonHoldt 2012) を用いて算出した ΔK 値

ると推察された.

殺ダニ剤の過度な使用は個体群密度を極端に下げ, 強いボトルネック効果によって個体群の遺伝的多様性の低下を引き起こす (Sabater-Munoz et al. 2012). 本章で得られたデータは, 商業的リンゴ園地に由来するナミハダニ個体群 (表7; KJ, KK, KW, NG, OTおよびTK) の近交係数が, 化学合成殺ダニ剤を使用していない園地に由来するナミハダニ個体群 (IAおよびEH) と比較して高いことから, 任意交配よりも近親交配が優占していることを示していた. 商業的リンゴ園地の中で, AFとMZ個体群では比較的低い近交係数が観察されたが, これらの個体群はサンプル数が少なく (それぞれ26および21個体), かつ2樹列からのサンプリングであったために, 正確に評価できていない可能性が考えられた.

種苗生産園で採集したSY個体群では, 化学合成殺ダニ剤の定期的な散布に加えて, 毎年掘り採られ, 生息するナミハダニ個体群密度が極端に低下することに起因する強いボトルネック効果によって, 商業的リンゴ園地のナミハダニ個体群と比較して低いアレルリッチネスが観察されたと考えられる. また, ホップもリンゴ種苗と同様に毎年刈り取られ, 地上部がなくなる. ホップ園地で採集されたEH個体群もSY個体群と同様に, 低いアレルリッチネスが観察された. しかしEH個体群は, 殺ダニ剤を定期散布していないリンゴ園地のIA個体群と同様に, 低い近交係数を示した. このような違いが生じる原因の一つとして, ホップ園地とリンゴ園地では殺ダニ剤の使用体系が異なることがあげられる. ホップに対しては農薬取締法上, 作物に適用のある殺ダニ剤が少ないため, 気門封鎖作用の殺ダニ剤 (プロピレングリコール乳剤等) が多く使われている. 気門封鎖作用の殺ダニ剤の利用や刈り取りと掘り取りによる地上部の除去は, ナミハダニの遺伝子型に関係なく個体群密度を低下させるが, 化学合成

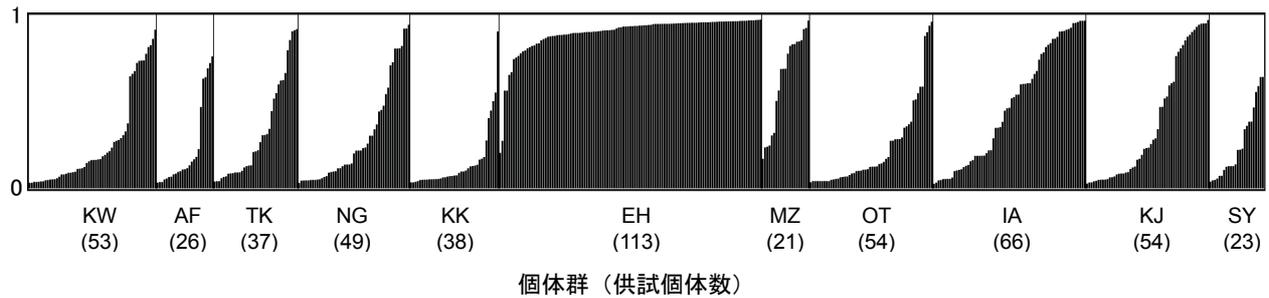


図 15. 岩手県内の 11 地点で採集したナミハダニ個体群 534 個体を 2 つの推定集団に割り振って実施した STRUCTURE 解析

x 軸は一つのバープロットが単一の個体に相当し、y 軸は個々の 2 つの推定集団への割り振り確率である
バープロットの黒白は各推定集団の割合を示す

殺ダニ剤は感受性個体のみの密度を極端に低下させ、結果として感受性低下個体群が優占することになる。このことによって、同じように毎年地上部が除去されるリンゴ種苗(SY)とホップ園地(EH)に生息するナミハダニ個体群であっても、両園地における殺ダニ剤による選択圧の相違に基づく遺伝的構成の偏りの違いによって、EH個体群の近交係数がSY個体群よりも低くなっているのではないかと考えられる。

また、地理的に近い地点から採集したEH個体群とMZ個体群は、Neighbor-joining algorithmに基づく系統樹(図13)では同じクラスターに属していたが、個体ごとに2つの推定集団に割り振るSTRUCTURE解析を実施すると、EH個体群はMZ個体群だけではなく、すべてのリンゴ園地由来の個体群と過去の分布変遷が異なる可能性の高いことが示された(図15)。前述したように、寄主植物の種の違いや植栽様式は、寄生するハダニ個体群の動態に大きな影響を及ぼすことが示されている(Gotoh et al.1993;Navajas 1998;Goka 1999; van den Boom et al.;2003 Nishimura et al. 2007)。このことから、EH個体群とリンゴ園で採集した個体群の構造の相違には、使用されている殺ダニ剤だけでなく、リンゴとホップという寄主植物や植栽様式の相違も影響しているものと考えられる。

化学合成殺ダニ剤の使用直後は、ハダニ個体群の密度は極端に低下する。しかし、極少数の個体が生き残り、次世代の始祖個体群となるため、遺伝的多様性が低下すると考えられる。この場合、生き残った始祖個体群は当然殺ダニ剤に対する感受性の低い個体の頻度が高いことから、次世代以降は結果的に殺ダニ剤感受性の低い個体群となる。本章で得られたデータも、定期的に化学合成殺ダニ剤を使用している商業的リンゴ園地由来のナミハダニ個体群では、IAやEHといった化学合成殺ダニ剤を定期散布されていないナミハダニ個体群より近交係数が高いことが示されたことから、化学合成殺ダニ剤を繰り返し使用することがナミハダニ個体群に対して強いボトルネックとして作用し、殺ダニ剤感受性の低い個体群が優占することによって、全県的な殺ダニ剤

感受性の低下が起こっていると考えられる。

第IV章 総合考察

病害虫防除の高効率化を考えるにあたって、加害種の識別と加害個体群の動態はともに非常に重要である。第II章では、日本国内において、リンゴを加害する主なシンクイムシ類であるモモシンクイガ、ナシヒメシンクイ、スモモヒメシンクイの3種を識別できるMultiplex PCRを開発した。モモシンクイガは日本のリンゴ栽培における最重点防除害虫であり、輸出検疫対象害虫でもあることから、近年のリンゴ輸出振興政策を遂行するにあたって、若齢幼虫でも確実に同定出来るMultiplex PCRの開発は、極めて有用であると考えられる。この手法の有効性を確認するため、岩手県病害虫防除所の協力を得て、岩手県内各地のリンゴ園地で発生しているシンクイムシ類による被害果をサンプリングし、Multiplex PCRを用いて加害種を識別したところ、平成23年9月に採集した48個体は47個体がスモモヒメシンクイ、残る1個体がモモシンクイガであった。平成27年9月に採集した4個体はすべてスモモヒメシンクイであった。いずれの年次も、ナシヒメシンクイによる果実被害事例は確認されなかった。調査個体数が少なかったため、現在も野外採集個体を用いた識別調査は継続中であるが、岩手県におけるナシヒメシンクイによるリンゴ果実への加害は極めて少なく、まれな事例であると推測される。

ナシヒメシンクイとスモモヒメシンクイの寄主植物範囲は未だ明らかではないが、本研究で用いた識別用プライマーを用いて山形県のモモ・スモモ混植園地でそれぞれの加害種構成を調べた事例では、モモ被害果から採集されたシンクイムシ類幼虫133個体中9個体がモモシンクイガ、124個体がナシヒメシンクイであり、スモモヒメシンクイの発生はなかった。また、スモモ被害果から採集されたシンクイムシ類幼虫174個体中16個体がモモシンクイガ、8個体がナシヒメシンクイ、150個体がスモモヒメシンクイであり、寄主植物によって加害種の種構成が明確に異なることが報告されている(阿部ら

表9. 岩手県における殺ダニ剤の使用体系 (岩手県 2016)

防除体系	休眠期～ 発芽2週間後	落花期	6月		7月		8月			9月		防除のポイント
			中旬	下旬	上旬	中旬	下旬	上旬	中旬	下旬		
通常の防除体系 (ナミハダニ、リンゴハダニ共通)			☆			○						新梢葉での発生量が要防除水準に達した時期に防除を開始する。
			☆				○					
				☆			○					
特別散布	春先にリンゴハダニの越冬卵が多い場合	マシン油乳剤	■									特別散布後は通常の体系でナミハダニと同時防除する。
	花そう葉でハダニ類の発生が見られる場合		●									落花期に特別散布し、その後通常の体系で防除する。
	8月下旬以降ナミハダニの発生が多い場合								△もしくは			越冬成虫が出現するまでに特別散布を行う。
	8月下旬以降リンゴハダニの発生が多い場合								●			越冬卵が出現するまでに特別散布を行う。
備考	☆: 基幹防除剤 (ダニサラフロアブル、ダニゲッターフロアブル、スターマイトフロアブル、ダニコングフロアブルから1剤を選択する) ○: 補充防除剤 (カネマイトフロアブル、オマイト水和剤、コロマイト乳剤、マイトコーネフロアブルから1剤を選択する) △: コテツフロアブル ■: リンゴハダニ防除剤 (サンマイト水和剤、ピラニカ水和剤、パロックフロアブルから1剤を選択する) ●: 粘着くん水和剤またはアカリタッチ乳剤の2回散布 注1: マシン油乳剤、粘着くん水和剤、アカリタッチ乳剤を除く全ての殺ダニ剤は連用せず、複数年を単位としたローテーション散布を行うこと。 注2: オマイト水和剤は8月以降の使用に限る。 注3: マシン油乳剤(95%)は休眠期のみ使用できる。											

2013).

本研究で設計した識別用プライマーミックスを用いた Multiplex PCRを行うことにより、日本のリンゴ園地で主に問題となる3種のシンクイムシ類の識別が可能であることを示したが、その他のチョウ目害虫に対しては未検討である。例えば、極めてまれな事例であるが、リンゴコシンクイのリンゴへの寄生が報告されている (Tanaka et al. 2005)。リンゴコシンクイのサンプルは入手できなかったため、今回の Multiplex PCRがこの種に適用できるかどうかは確認していない。しかし、リンゴコシンクイのリンゴへの寄生事例は、1953年以降報告されていないことから、今回設計した識別用プライマーミックスを用いた Multiplex PCR は、害虫の発生予察や被害解析を業務として行う各県の病害虫防除所や輸入および輸出検疫の場面においても、迅速かつ確実に加害種を識別する上で十分に有効な手法である。横浜植物防疫所の Amano and Higo (2015)は、北米産果実の輸入検疫に用いるため、本研究の手法を参考にして輸入検疫対象であるコドリガを北米に生息する他のハマキガ科害虫である *Archips argyrospila* (Walker), *A. rosana* (L.), *Argyrotaenia franciscana* (Walsingham), *Cacoecimorpha pronubana* (Hübner), *Choristoneura rosaceana* (Harris), *Epiphyas postvittana* (Walker), ナシヒメシンクイ, *G. packardii* Zeller, *G. prunivora* (Walsh), *Pandemis pyrusana* (Kearfott), *Spilonota ocellana* (Denis and Schiffermüller)から識別するためのプライマーセットを実用化している。今後、種特異的な PCRプライマーを用いたDNAバーコーディングによって加害種を識別する方法は、使用目的に応じて発展させることが可能である。一例を挙げれば、果樹害虫の識別や予察を目的とする場合は、本研究で設計したモモシンクイガ、ナシヒメシンクイ、スモモヒメシンクイ以外のチョウ目害虫であるリンゴコ

シンクイや、モモとスモモを加害するモモノゴマダラノメイガ *Conogethes punctiferalis* (Guenee, 1854), ナシを加害するナシマダラメイガ *Ectomyelois pyrivorella* (Matsumura) 等に特異的なプライマーセットを設計して組み合わせれば、リンゴに限らず様々な果実を加害するチョウ目害虫に対して、網羅的に識別できる手法を発展させることができると考えられる。

第III章では、岩手県内のリンゴ園地に生息するナミハダニ個体群の遺伝的構造に及ぼす殺ダニ剤散布の影響について検討した。岩手県内のリンゴ園地においても、表 4に示した通り、複数の殺ダニ剤に対して感受性が低下したナミハダニ個体群の発生が確認されている。岩手県内のリンゴ園地では、基本的に地域の農業協同組合単位で使用農薬を検討・決定して防除暦を作成し、その暦に基づいて各園地や防除組織が防除を実施していることから、各種の殺ダニ剤に対する感受性の低下については、地域ごとに異なるものと予測していたが、実際には地域的な偏りは観察されず、全県的に感受性低下個体群が発生していた。この原因について、1)種苗生産圃のようなある特定の地点で出現した薬剤感受性低下個体群が、苗木等を経由して県内各地に広がる、または 2)各地域の個体群において独立に薬剤感受性低下個体群が出現する、という2通りの仮説を立てて検証した (Van Leeuwen et al. 2010)。本章で調査した11個体群は、すべて遺伝的に独立しており、弱いながらも有意な距離による遺伝的隔離が確認された (図12)。また、SY個体群は岩手県内で唯一の種苗生産圃に由来する個体群であるが、この個体群は遺伝的に他の個体群と独立していた (図13)。このことから、種苗生産圃由来の個体群が、県内各地に生息するナミハダニ個体群の共通の祖先になっている可能性は非常に低く、表4で示したような広範囲での殺ダニ剤に対する感受性の低

下は、各園地の個体群で独立に起こっていると考えられた。

なお、岩手県内のリンゴ園地では、使用する殺ダニ剤が特定のものに偏ることによって、その剤に対する感受性低下個体群の出現を誘導していたことから、感受性低下個体群の出現を遅延させるため、各種の殺ダニ剤を基幹防除剤と補完防除剤に分け、それぞれを複数年単位でローテーションする防除体系を指導している(表9)。このローテーション体系を実践し続けた場合、数年後には各殺ダニ剤の総使用回数が、すべての園地でほとんど同じになってしまう。表4に示したように、県内全域において各種殺ダニ剤に対する感受性が低下していた原因として、各殺ダニ剤をすべての園地で規則正しくローテーション使用することによって、各殺ダニ剤の総使用回数が各地域でほとんど同じになったためもあると考えられる。それゆえ、今後はこのようなローテーション散布ではない、新たなハダニ類の防除対策を考える必要がある。つまり、薬剤感受性低下個体群の出現をいかにして遅らせるかが最大のポイントである。岩手県で実施されている殺ダニ剤のローテーション使用体系は、元来は感受性低下個体群の出現を遅らせる手段として1985年頃から指導されてきた防除体系である(鈴木 2010)。しかし薬剤感受性低下個体群の出現を遅らせる対策として薬剤のローテーション体系を実施する前提として、薬剤による選択圧がかからない条件下において、薬剤感受性低下個体が感受性個体と比較して生育速度が遅い等の原因によって淘汰され、薬剤感受性低下個体の密度が低下して、個体群の薬剤感受性が回復することが理論的な基礎条件になっている(鈴木 2012)。残念ながら、実際に感受性の回復が確認された事例は少ない(山本 2015)。このことは、岩手県で実施されている殺ダニ剤のローテーション使用体系が、特定の殺ダニ剤に対する感受性低下個体群の出現および蔓延を遅延させている、という目的は達成しているものの、薬剤感受性低下個体群の出現を遅らせる対策としては理にかなったものではないと考えられる。また本研究で得られたデータは、殺ダニ剤に対する感受性低下個体群が、各園地のナミハダニ個体群において独立に出現していることを示していた。すなわち各園地のナミハダニ個体群の薬剤感受性は、薬剤散布履歴に最も影響される。このことから、殺ダニ剤に対する感受性低下個体群の出現を遅らせ、薬剤コストを抑え、高い防除効果を得るためには、園地ごとに定期的に薬剤感受性をモニタリングし、効果の高い殺ダニ剤のみを優先的に使用する方法が優れているといえる。薬剤のローテーション散布については、感受性低下個体群がすでに出現している剤を使わざるを得ない状況を生み出す可能性があることを考えると、少なくとも防除暦によってローテーションを強制すべきではないと思われる。

る。

殺ダニ剤に対する抵抗性管理を考える上で、本研究で観察されたもう一つの興味深い現象は、ホップ園地で採集されたEH個体群と種苗生産圃で採集されたSY個体群の近交係数の相違である。表7に示したように、化学合成殺ダニ剤を用いている種苗生産圃で採集されたSY個体群の近交係数は商業的リンゴ園地と同等であり、任意交配より近親交配が優占していた。一方、気門封鎖作用の殺ダニ剤が用いられているホップ園地で採集されたEH個体群の近交係数は試験用リンゴ園地と同等に低かった。ハーディ・ワインベルグ平衡からのずれが有意であることから、EH個体群もSY個体群と同じく任意交配より近親交配が優占していたが、その程度は低いことが示された。つまり、ホップとリンゴという寄主植物の違いは考慮しなければならないが、毎年地上部がなくなる条件下に生息しながら、EH個体群はSY個体群と比較すると、より任意交配の頻度が高いと考えられた。ホップ園地で頻繁に用いられる気門封鎖作用の殺ダニ剤は物理的作用によってハダニ密度を下げるため、遺伝的多様性を低下させることはなく、もちろん薬剤感受性低下個体群を出現させることもない。残効期間が極端に短いことは欠点であるが、リンゴ園地においても気門封鎖作用のある殺ダニ剤を効果的に用いたハダニ類の防除体系を考えていくことは、殺ダニ剤に対する感受性低下個体群の出現を遅らせるために重要であると考えられる。

摘 要

リンゴ栽培において、果実を直接加害するシンクイムシ類と、葉への吸汁加害が著しく、かつ薬剤抵抗性の発達により防除が難しいハダニ類には、特に重点的な防除対策が必要とされている。本研究は、これら重点防除害虫の岩手県内における分布・加害状況および地域個体群の遺伝的構造を分子生物学的手法によって解析し、リンゴ生産現場における防除作業のより高度な体系化、高効率化を目指す際に必要となる基礎的知見を得ることを目的とした。

日本国内において、リンゴを加害するシンクイムシ類は主にシンクイガ科のモモシンクイガ *Carposina sasakii* (Matsumura)、ハマキガ科のナシヒメシンクイ *Grapholita molesta* (Busck) およびスモモヒメシンクイ *Grapholita dimorpha* Komaiの3種であるが、これら3種のシンクイムシ類の若齢幼虫を形態的特徴から見分けることは困難である。そこで、ミトコンドリアDNAのcytochrome oxidase subunit I (COI) 領域の1,342 bpの塩基配列を決定し、3種のシンクイムシ類を識別できるPCRプライマーを作成した。作成したプ

プライマーを用いたMultiplex PCR法では、複数の地点から採集した野外個体および飼育個体を確実に識別することが可能であった。ナシヒメシンクイによる果実被害事例は確認されなかったことから、現在も野外採集個体を用いた識別調査を継続中であるが、岩手県におけるナシヒメシンクイによるリンゴ果実への加害は極めて少なく、まれな事例であると推測された。本研究で設計したプライマーを用いたMultiplex PCR法は、害虫の発生予察や被害解析や輸出検疫の場面においても、迅速かつ確実にシンクイムシ類を識別できる有効な手法であると考えられる。

ナミハダニ *Tetranychus urticae* Kochは様々な農業品目を加害する害虫であるが、薬剤に対する感受性低下事例が多い難防除害虫でもある。岩手県内各地のリンゴ園地においても、複数の殺ダニ剤に対して感受性の低下したナミハダニ個体群が生息している。この薬剤感受性低下個体群が県内に広く分布している原因として、1)種苗生産圃のようなある特定の地点で出現した薬剤感受性低下個体群が、苗木等を経由して県内各地に広がった、あるいは 2)各園地に生息する地域個体群から、個別に薬剤感受性低下個体群が出現して優占したという2通りの仮説が考えられた。そこで、殺ダニ剤の使用体系が異なる地点から採集したナミハダニ11個体群（商業的リンゴ園地から8個体群、試験用リンゴ園地から1個体群、リンゴ種苗生産圃から1個体群、ホップ園地から1個体群）を供試し、それらの個体群構造について4遺伝子座のマイクロサテライトDNAをマーカーとして解析し、薬剤感受性低下個体群が県内に広く分布するに至った過程を考察した。商業的リンゴ園地とリンゴ種苗生産では定期的に化学合成殺ダニ剤が散布されており、試験用リンゴ園地では移植後殺ダニ剤は散布されていない。ホップ園地では気門封鎖作用の殺ダニ剤が散布されている。供試した11個体群はすべて遺伝的に独立しており、有意な距離による遺伝的隔離が確認された。また、供試した岩手県内で唯一の種苗生産圃に由来する個体群は、遺伝的に他の個体群と独立していた。このことは、薬剤感受性低下個体群が苗木等を経由して県内各地に広がった可能性が低いことを示していた。また、化学合成殺ダニ剤を散布している園地に由来するナミハダニ個体群の近交係数は、殺ダニ剤を散布していない園地や気門封鎖作用の殺ダニ剤を散布している園地に由来するナミハダニ個体群より高かったことから、化学合成殺ダニ剤の散布はナミハダニ個体群に強いボトルネック効果を引き起こし、速やかな薬剤感受性低下の一因となっていることが示唆された。従って、殺ダニ剤に対する感受性低下個体群の出現を遅らせ、薬剤コストを抑え、高い防除効果を得るためには、園地ごとに定期的に薬剤感受性をモニタリングし、効果

の高い殺ダニ剤のみを優先的に使用する方法が優れていると考えられた。また、薬剤感受性低下個体群が出現することのない気門封鎖作用の殺ダニ剤を効果的に用いたハダニ類の防除方法の開発も、今後の課題の一つである。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻および本論文のご校閲を賜った茨城大学農学部後藤哲雄教授に深謝の意を表す。また本論文作成にあたり、ご指導を賜った茨城大学農学部北嶋康樹准教授、東京農工大学大学院岩淵喜久男教授に感謝の意を表す。COI領域のDNA塩基配列の決定、プライマー設計に関して終始ご指導いただいた関根健太郎博士（岩手県生物工学研究センター、現所属：琉球大学）に感謝の意を表す。マイクロサテライトDNAの取扱と個体群動態の解析手法ならびに論文の作成に関して終始ご指導いただいた日本典秀博士（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）に感謝の意を表す。

渡邊奈央氏と金子政夫氏（長野県果樹試験場）、石栗陽一氏と村井智子氏（青森県産業技術センター りんご研究所）、中田健氏（鳥取県農林研究所）、そして柳沼勝彦博士（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門リンゴ研究領域）には、シンクイムシ類のサンプリングに際してご協力をいただいた。岩手県内各地のリンゴ園の園主の方々には、快く園内を調査させていただき、ナミハダニのサンプリングに際してご協力をいただいた。記して感謝の意を表す。

引用文献

- 阿部篤智・佐々木泰子・伊藤慎一（2013）樹種複合園におけるモモ・スモモ果実から確認したシンクイムシ類の加害種構成。北日本病虫研報 64, 203-206
- Amano, T., Y. Higo (2015) A convenient diagnostic polymerase chain reaction method for identifying codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) among tortricid pests in cherries imported from western North America. Appl Entomol Zool 50, 549-553
- Barcenas, N.M., T.R. Unruh, L.G. Neven (2005) DNA diagnostics to identify internal feeders (Lepidoptera: Tortricidae) of pome fruits of quarantine importance. J Econ Entomol 98, 299-306
- Carbonnelle, S., T. Hance, A. Migeon, P. Baret, S. Cros-

- Arteil, M. Navajas (2007) Microsatellite markers reveal spatial genetic structure of *Tetranychus urticae* (acari: Tetranychidae) populations along a latitudinal gradient in Europe. *Exp Appl Acarol* 41, 225-41
- Cavalli-Sforza, L.L., A.W.F. Edwards (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 19, 233-257
- Earl, D.A., B. vonHoldt (2012) Structure harvester: A website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour* 4, 359-361
- Evanno, G., S. Regnaut, J. Goudet (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-20
- Falush, D., M. Stephens, J.K. Pritchard (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587
- Goka, K. (1999) The effect of patch size and persistence of host plants on the development of acaricide resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* 23, 419-427
- Gotoh, T., J. Bruin, M.W. Sabelis, S.B.J. Menken (1993) Host race formation in *Tetranychus urticae*: Genetic differentiation, host plant preference, and mate choice in a tomato and a cucumber strain. *Entomol Exp Appl* 68, 171-178
- Goudet, J. (1995) Fstat (version 1.2): A computer program to calculate f-statistics. *J Hered* 86, 485-486
- 羽田 厚 (2008) 岩手県のリンゴ園地におけるナミハダニ多発発生要因の解析. 今月の農業 化学工業日報社 52, 23-28
- Hinomoto, N., Y. Todokoro, T. Higaki (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
- 岩手県 (2016) 平成 28 年度岩手県農作物病害虫・雑草防除指針 p.237
- 岩手県病害虫防除所 (2016) 平成 27 年度 植物防疫事業年報
- Jakobsson, M., N.A. Rosenberg (2007) Clump: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806
- 川嶋浩二 (2008) モモシクイガの生態に関する基礎的研究. 青森県農林総研りんご試研報 35, 1-51
- 木村佳子・石栗陽一・櫛田俊明 (2005) 青森県のリンゴにおけるリンゴハダニおよびナミハダニの薬剤抵抗性の実態. 北日本病虫研報 56, 194-197
- 駒井古実 (1976) モモ, リンゴ, ナシの果実に食入するシクイムシ類の見分け方. 植物防疫 日本植物防疫協会 30, 245-252
- Komai, F. (1979) A new species of genus *grapholita treitschke* from Japan allied to the oriental fruit moth, *grapholita molesta* (busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Appl Entomol Zool* 14, 133-136
- 駒井古実・吉安 裕・那須義次・斉藤寿久 (2011) 日本の鱗翅類 東海大学出版会 p.710
- Langella, O. (1999) Populations 1.2.32. Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). Available at <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- Matsuda, T., N. Hinomoto, R. N. Singh, T. Gotoh (2012) Molecular-based identification and phylogeny of *Oligonychus species* (Acari: Tetranychidae). *J Econ Entomol* 105, 1043-1050
- Matsuda, T., C. Fukumoto, N. Hinomoto, T. Gotoh (2013) DNA-based identification of spider mites: molecular evidence for cryptic species of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). *J Econ Entomol* 106, 463-472
- Muraji, M., Y. Hirai, T. Akino, S. Wakamura, H. Yasui, N. Arakaki, A. Nagayama, T. Ando, S. Tanizaki, Y. Hokama (2010) Relationship among local populations of the white grub beetle, *Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae), detected by phylogenetic analysis based on the mitochondrial DNA sequence. *Appl Entomol Zool* 45, 289-296
- Navajas, M. (1998) Host plant associations in the spider mite *Tetranychus urticae* (acari: Tetranychidae): Insights from molecular phylogeography. *Exp Appl Acarol* 22, 201-214
- Navajas, M., B. Fenton (2000) The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: A review. *Exp Appl Acarol* 24, 751-774
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3321-3323
- 日本応用動物昆虫学会 (2006) 農林有害動物・昆虫名鑑 増補改訂版 pp.166-170

- Nishimura, S., N. Hinomoto, A. Takafuji (2007) The Genetic Variations among Populations of *Tetranychus kanzawai* Complex (Acari: Tetranychidae) Indicated by Using Mitochondrial, Ribosomal, and Microsatellite DNA Markers. *J Acarol Soc Jpn* 16, 109-119
- 奥 俊夫・大平喜男・若公正義 (1988) スモモのシクイムシ *Grapholita dimorpha* KOMAI の生態に関する予備的知見. *果樹試報 C* 15, 49-64
- Osakabe, M., R. Uesugi, K. Goka (2009) Evolutionary aspects of acaricide-resistance development in spider mites. *Psyche J Entom* 2009, 1-11
- Peakall, R., P.E. Smouse (2012) Genalex 6.5: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28, 2537-9
- Pritchard, J.K., M. Stephens, P. Donnelly (2000) Inference of structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959
- Raymond, M., F. Rousset (1995) Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86, 248-249
- Rosenberg, N.A. (2004) Distruct: A program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4, 137-138
- Rousset, F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from f-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145, 1219-1228
- Sabater-Munoz, B., S. Pascual-Ruiz, M.A. Gomez-Martinez, J.A. Jacas, M.A. Hurtado (2012) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Tetranychus urticae* and cross amplification in other Tetranychidae and Phytoseiidae species of economic importance. *Exp Appl Acarol* 57, 37-51
- 坂本泰輔・工藤 晟 (2009) ひと目でわかる果樹の病虫害—第三卷(改訂版)— 日本植物防疫協会 pp.58-80
- Scheffer, S., A. Wijesekara, D. Visser, R. Hallett (2001) A molecular method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L. Langei* (diptera: Agromyzidae) applied to three recent leafminer invasions. *J Econ Entomol* 94, 1177-1182
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, P. Flook (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87, 651-701
- Sparks, T.-C., R. Nauen (2015) IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol* 121, 122-128
- Sun, J.-T., C. Lian, M. Navajas, X.-Y. Hong (2012) Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* koch (acari:Tetranychidae). *BMC genomics* 13,
- 鈴木敏男 (2010) リンゴを加害するハダニ類の発生動向と殺ダニ剤の変遷. *岩手農研セ研報* 10, 113-126
- 鈴木芳人 (2012) 殺虫剤抵抗性管理の原理. *植物防疫 日本植物防疫協会* 66, 380-384
- Tanaka M., K. Abe, N. Saito, S. Sato, Hisataka M, Kaimai K, Okazaki K (2005) Survey on the occurrence of *Grapholita inopinata* (Heinrich) (Lepidoptera: Tortricidae) at some areas in Aomori Fukushima and Miyagi prefectures. *Res Bull Pl Prot Jpn* 41, 25-30
- 高梨祐明・土師岳・足立嘉彦・新井朋徳・井原史雄・望月文昭 (2009) 岩手県中部におけるスモモヒメシクイの発生消長と寄主植物. *北日本病虫研報* 60, 253-258
- 上田重文 (2006) タバココナジラミバイオタイプ Q の簡易識別法. *九病虫研会報* 52, 44-48
- Uesugi, R., M. Osakabe (2007) Isolation and characterization of microsatellite loci in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (acari: Tetranychidae). *Mol Ecol Notes* 7, 290-292
- Uesugi, R., Y. Kunimoto, M. Osakabe (2009a) The fine-scale genetic structure of the two-spotted spider mite in a commercial greenhouse. *Exp Appl Acarol* 47, 99-109
- Uesugi, R., T. Sasawaki, M. Osakabe (2009b) Evidence of a high level of gene flow among apple trees in *Tetranychus urticae*. *Exp Appl Acarol* 49, 281-290
- van den Boom, C., T. van Beek, M. Dicke (2003) Differences among plant species in acceptance by the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *J Appl Entomol* 127, 177-183
- Van Leeuwen, T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, W. Dermauw, L. Tirry (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important acari: A review. *Insect Biochem Mol Biol* 40, 563-572
- 渡辺和弘・結城昭一 (1993) ナシヒメシクイ成虫の発生時期予測. *北日本病虫研報* 44, 164-166
- Weir, B.S., C.C. Cockerham (1984) Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38,

1358-1370

山本敦司 (2015) ケーススタディから殺ダニ剤抵抗性マネジメントを考える. 農業および園芸 養賢堂 90, 320-333

Molecular approaches to identifying apple moths and to clarifying the genetic structure of the two-spotted spider mite in apple orchards

Hiroshi HADA

Summary

There are two main pests in apple orchards of Iwate Prefecture, both extremely difficult to control. One is the group of fruit moths (Lepidoptera), whose internally feeding larvae directly attack the fruit, and the other is the leaf-feeding spider mites (Acari) that rapidly develop resistance to various kinds of chemicals. In this study, we first clarified the identification of three apple moth species, which are difficult to discriminate based on larval morphology alone: oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck), *Grapholita dimorpha* Komai, and peach fruit moth, *Carposina sasakii* Matsumura. Because their ecology (e.g., overwintering sites and feeding habits) is critically different, the first step of effective control is to accurately and easily identify the species using multiplex PCR (polymerase chain reaction). Next, we analyzed the genetic structure of populations of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) collected throughout Iwate Prefecture, to clarify how this particularly voracious mite developed simultaneous resistance to various acaricides. The results of this study will provide basic knowledge to effectively control both pests.

For the multiplex PCR method to differentiate the three Japanese fruit moth species, a 1,342-bp fragment of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) was sequenced in each species. The species showed consistent and diagnostic differences in the region of the COI gene, from which three species-specific forward primers were designed. The forward primers along with one universal reverse primer were used to selectively amplify DNA from specimens of diverse geographic origin for each corresponding target species. This method enabled easy, immediate, and accurate identification of these internally feeding Lepidoptera in apples and other fruits.

Many *T. urticae* populations in apple orchards of Iwate Prefecture are resistant to multiple acaricides. Here, we investigated the simultaneous development of acaricide resistance in various mite populations, assessing their genetic structure. In principle, two scenarios are possible: (1) acaricide resistance developed in one or a few populations with a common geographical origin (e.g., an apple tree nursery) and subsequently spread widely, or (2) acaricide resistance developed in many geographically distant populations. To this end, we used four microsatellite loci to analyze the genetic structure of 11 *T. urticae* populations collected from eight commercial apple orchards, one apple tree nursery, one experimental apple orchard, and one hop farm. In the commercial orchards and nursery, acaricides were used 2-3 times every year; in the experimental apple orchard, acaricides were not used after transplantation; and in the hop farm, a propylene glycol emulsion was used 6-7 times per year.

Our data showed that all 11 mite populations were genetically differentiated and that distance affected the genetic structure of mite populations (i.e., populations were more different with increasing distance). Additionally, the population collected from the nursery was genetically distinct from all other populations. These results indicated that mite populations were indigenous to the respective orchard and did not originate from the nursery. Our data also showed that F_{IS} values were higher in populations collected from commercial orchards in which acaricides were applied frequently than in those collected from orchards in which chemical acaricides were not applied, suggesting that recurrent chemical treatments increased the frequency of inbreeding in *T. urticae* populations. Overall, the results showed that the recurrent chemical treatments have a strong bottleneck effect on *T. urticae* populations, which probably accelerated the development of acaricide resistance. Thus, acaricide resistance is likely to develop in many geographically distant mite populations repeatedly. It is therefore important to monitor acaricide sensitivity of *T. urticae* populations in individual orchards to fine-tune effective spider mite control.

