

クリタマバチの導入天敵チュウゴクオナガコバチと土着天敵クリマモリオナガコバチの交雑とその検出方法

農業環境技術研究所 ^や 屋 ^ら 良 ^か 佳 ^お 緒 ^り 利

はじめに

クリの重要害虫クリタマバチ *Dryocosmus kuriphilus* YASUMATSU の防除のために、寄生蜂チュウゴクオナガコバチ *Torymus sinensis* KAMIJO が中国から導入・放飼されたことは、伝統的生物的防除の一成功例として挙げられよう。このチュウゴクオナガコバチ放飼に当たっては、当初から（本格放飼は 1982 年）、土着寄生蜂クリマモリオナガコバチ *T. beneficus* YASUMATSU et KAMIJO との交雑に関心が向けられてきた。その最大の理由は、両寄生蜂の形態や生態的特徴（羽化時期）が非常によく似ていたためであろう（図-1）。もし両者の交雑によって不妊化が起これば、防除効果に悪影響を与えうると考えられたのである。このような懸念は、ある程度の防除効果が見られるようになると顧みられなくなった。しかしその後、野外で両寄生蜂の中間的な形態をもつ個体が散見され（青砥・村上，1992；MORIYA et al., 1992）、生物的防除の標的外生物への影響という点から、再び交雑に関心が向けられるようになった。

もともと異所的に生息していた近縁（と思われる）二種が何らかの理由で出合った後に、それらの中間的な特徴をもつ個体が出現すれば、交雑が疑われるのはごく普通の成り行きと思われる。一方、交雑の解析に分子マーカーを利用することも、今や常套手段であろう。しかし、チュウゴクオナガコバチとクリマモリオナガコバチに関しては、分子マーカーを利用してもこれまでは部分的な実態解明にとどまった。なぜなら、クリマモリオナガコバチには羽化時期（羽化消長）が異なる早期・晩期という二つの羽化型が主として認識されているのだが（ÔTAKE, 1987；MURAKAMI, 1988）、これまで利用された分子マーカーでは、クリマモリオナガコバチの晩期羽化型とチュウゴクオナガコバチを識別できなかったためである。そのため後述するように、クリマモリオナガコバチ早期羽化型とチュウゴクオナガコバチの交雑に的を絞っ

た解析しかなされなかった。しかしこのほど、クリマモリオナガコバチ晩期羽化型とチュウゴクオナガコバチとを識別し、その交雑個体（F₁）を検出できる DNA マーカーが確立された（YARA and KUNIMI, 2009）。

本稿では、まず、従来の分子マーカーを利用したクリマモリオナガコバチ早期羽化型とチュウゴクオナガコバチの交雑を中心に解析した研究を概観したい。次いで、クリマモリオナガコバチ晩期羽化型とチュウゴクオナガコバチの交雑個体（F₁）が検出できる DNA マーカーによる、3 者（チュウゴクオナガコバチ、クリマモリオナガコバチ早期羽化型、同晩期羽化型）と、それらの交雑個体（F₁）の識別・検出の手順を説明する。

I チュウゴクオナガコバチとクリマモリオナガコバチの交雑～クリマモリオナガコバチ早期羽化型との場合を中心に～

1 アイソザイム（アロザイム）マーカーによる解析

両寄生蜂の中間的な形態をもつ個体が野外で見られるようになったころは、DNA 解析がまだ今ほど容易ではなく、微小昆虫類の識別にアイソザイム（アロザイム）が盛んに検討された時期であった。両寄生蜂に対しても、未発表を含めればのべ 25 種類の酵素でアイソザイ



図-1 チュウゴクオナガコバチ（左）、クリマモリオナガコバチ（中）雌成虫

産卵管鞘の長さ（または胸部長に対する相対比）の違いで識別してきたが、チュウゴクオナガコバチ放飼後に中間的な個体（右）が見られるようになった。雄成虫は外部形態では識別できない。

Detection of Hybrids between Introduced Parasitoid of the Chestnut Gall Wasp, *Torymus sinensis* and Indigenous One, *T. beneficus* by Allele-Specific PCR. By Kaori YARA

（キーワード：チュウゴクオナガコバチ，クリマモリオナガコバチ，交雑，アリル特異的 PCR）

ム（アロザイム）マーカーとしての有効性が検討されている。そのうちマリクエンザイム（ME）、アデニル酸キナーゼ、アスパラギン酸アミノ転移酵素の3種類で、クリマモリオナゴバチ早期羽化型とそれ以外（チュウゴクオナゴバチかクリマモリオナゴバチ晩期羽化型のいずれか）とを区別できることがわかった（伊澤ら, 1992; 1996; IZAWA et al., 1995; 野田ら, 未発表）。しかしこのことは、チュウゴクオナゴバチとクリマモリオナゴバチ晩期羽化型とを識別できないということでもある。そこで、クリマモリオナゴバチ早期羽化型とチュウゴクオナゴバチ間の交雑を対象にした解析が行われるようになった。

これまでのアイソザイム（アロザイム）による研究では、MEのみが用いられている。なお、以下で紹介する研究の供試個体はすべて、クリタマバチ乾固ゴールから羽化した寄生蜂のうち、肉眼による形態観察でチュウゴクオナゴバチ、クリマモリオナゴバチ、それらの中間形態をもつ個体と判断された雌成虫である。まず、茨城県つくば市で1992年に採集された15雌成虫のうち、2個体（13%）がチュウゴクオナゴバチとクリマモリオナゴバチ早期羽化型のF₁と同じ電気泳動バンドパターン（ゲノタイプ）を示したことから、両者間の交雑が野外で初めて確認された（伊澤ら, 1996）。また、島根県隠岐島で1996年に採集された雌成虫（n = 93）からのF₁ゲノタイプの頻度は8%であった（TODA et al., 2000）。さらに、関東・中部地方の11地点から1991～95年に採集された雌成虫（n = 821, のべ20集団）では、F₁ゲノタイプの頻度は1%であった（YARA et al., 2000）。これらの研究から、クリマモリオナゴバチ早期羽化型とチュウゴクオナゴバチの交雑は野外で起きているが、その頻度は低いことが示唆された。

2 DNAマーカーによる解析

その後MEに代わる分子マーカーとして、核のrDNAのITS2領域と、ミトコンドリアのcytochrome oxidase I (COI) 領域が利用された（YARA et al., 2007）。ITS2では2～4塩基長の違いをDNAシーケンサーレベルの電気泳動により検出し識別する（YARA, 2006）。ITS2はMEより識別能力が高いが、チュウゴクオナゴバチの一部とクリマモリオナゴバチ晩期羽化型が識別できず、この両者間の交雑はMEと同様、検出できない。一方、COIではPCR-RFLPによりチュウゴクオナゴバチ、クリマモリオナゴバチ早期羽化型、同晩期羽化型が識別できる（YARA et al., 2007）が、母系遺伝するミトコンドリア上のマーカーのため、COI単独では交雑解析ができない。しかしこれらを組み合わせた場合、交

雑の検出力はMEより高い。

これらを用いた研究として、長野県小布施町のクリ自生地で1993～2001の各年に採集された雌成虫（n = 418）が解析された（YARA et al., 2007）。結果的にチュウゴクオナゴバチ定着前からの定点・経年調査となった。クリマモリオナゴバチ早期羽化型からチュウゴクオナゴバチへと優占種が置き換わる過程で、ITS2マーカーがF₁タイプの個体は全く出現しなかった。しかし、ITS2がチュウゴクオナゴバチタイプでCOIはクリマモリオナゴバチ早期羽化型タイプが1個体検出された。このことから、両者間の交雑は起こっているが、その頻度は非常に低いと示唆された。

一方、この解析集団からはITS2がチュウゴクオナゴバチタイプでCOIはクリマモリオナゴバチ晩期羽化型タイプも10個体検出された。このことから、チュウゴクオナゴバチとクリマモリオナゴバチ晩期羽化型が野外で交雑していることが初めて示された。さらに、当初3年間（1993～95年）はクリマモリオナゴバチ早期羽化型しか検出されず、その後このような雑種個体（F₁以降）が検出されたことから、別の場所でチュウゴクオナゴバチとクリマモリオナゴバチ晩期羽化型の交雑が生じた後に本調査地へ移動し、その子孫が世代を重ねていることが示唆された。

II チュウゴクオナゴバチとクリマモリオナゴバチの交雑個体（F₁）の検出法～クリマモリオナゴバチ晩期羽化型との場合も含めて～

ここからは、クリマモリオナゴバチ晩期羽化型とチュウゴクオナゴバチの交雑個体（F₁）が検出できるDNAマーカー（YARA and KUNIMI, 2009）を紹介する。まず、チュウゴクオナゴバチ定着前に採集された土着のクリマモリオナゴバチ早期羽化型、同晩期羽化型と、中国で採集されたチュウゴクオナゴバチの核のrDNAのITS1領域のDNA塩基配列を比較したところ、一塩基多型（SNP）が数箇所見られた。そこで、このSNPを検出する方法としてアレル特異的PCRを利用し、これら三者とそのF₁を識別・検出することとした。アレル特異的PCRの原理は、林（2008）にていねいに説明されているが、SNPを特異的に検出するプライマーを設計し、特異的プライマーに対応するSNPがあればPCR反応により増幅する、なければ増幅しないことから、アガロース電気泳動によってバンドの有無すなわちSNPの有無を検出する。例えば、クリマモリオナゴバチ晩期羽化型のSNPを特異的に増幅するプライマー

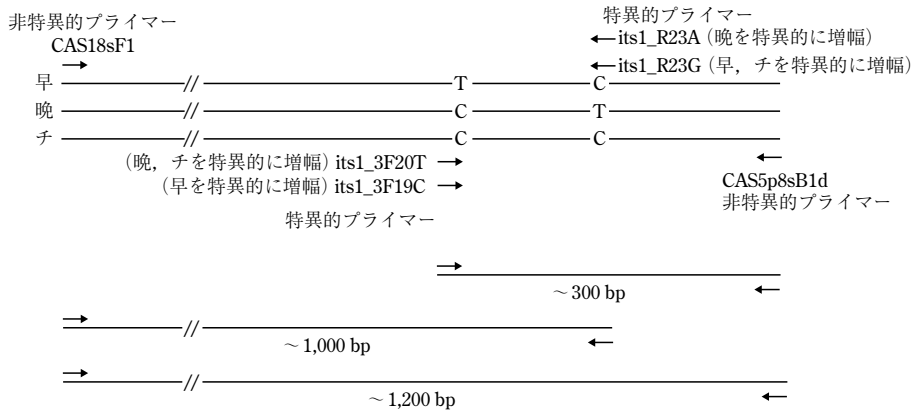


図-2 アリル特異的 PCR によるチュウゴクオナガコバチ (チ), クリマモリオナガコバチ早期羽化型 (早), 同晩期羽化型 (晩) 検出の原理

(its1_R23A) と, ITS1 領域を増幅するための種・羽化型に非特異的なプライマー (CAS18sF1, CAS5p8sB1d) を用いて PCR を行い, アガロース電気泳動で約 1,000 bp のバンドが得られれば, クリマモリオナガコバチ晩期羽化型の ITS1 配列をもった個体と判断される (図-2)。今回は, このように判定された個体がクリマモリオナガコバチ晩期羽化型の ITS1 配列しかもっていないのか, またはチュウゴクオナガコバチの ITS1 配列も持っている (すなわち F1 タイプ) のかを判定するために, 特異的プライマーを its1_R23G に代えた PCR も同様に行い, PCR 産物 (約 1,000 bp) の有無を調べることになる。アリル特異的 PCR による SNP の検出では, プライマーの設計や PCR 反応条件が成否の鍵を握る。そこで, それら諸条件を決定するために, 上述した ITS1 の DNA 塩基配列を解析した供試虫だけでなく, 交雑実験 (MORIYA et al., 1992) により得られた F1 個体や, ME で F1 タイプと判定された個体も供試し, 確認した。そうして確立された実際の手順を以下に詳述する (図-3)。

手順(1) DNA 抽出

筆者は最近では各種キットを利用して抽出している。1 個体全体を用いて最終的に 100 μ l の溶液とし, その 0.5 μ l を 1 回のアリル特異的 PCR (25 μ l 反応系) に使用することを原則としているが, サンプルの状態によっては適宜変更している。キットでなく, 従来の定法 (フェノール抽出, エタノール沈殿) でも構わない。界面活性剤添加と加熱による簡易抽出法でも原理的には問題ないと思われる。

手順(2) 1 回目のアリル特異的 PCR

25 μ l 反応液は, アリル非特異的プライマー CAS18sF1 (5'-TACACACCGCCCGTCGCTACTA-3'),

CAS5p8sB1d (5'-ATGTGCGTTCRAAATGTCGATGTTCA-3') (Ji et al., 2003) およびアリル特異的プライマー its1_R23A (5'-CAAGACAGGGGGTGACAAAAGAA-3'), its1_3F20T (5'-CCGTTAAGTCAAAACACCGT-3') がそれぞれ 0.2 μ M, 1 $\times$ PCR buffer, dNTPs 0.2 mM, Taq ポリメラーゼ 0.65 U, テンプレート 0.5 μ l とする。Taq ポリメラーゼは, 筆者はタカラバイオ株式会社の *TaKaRa Taq*TM Hot Start Version を使用している。反応温度条件は, タッチダウンと 2 ステップを併せたもので, 94 $^{\circ}$ C 1 分の後, 94 $^{\circ}$ C 15 秒 (変性) と 75 $^{\circ}$ C 1 分 (アニーリング・伸長) の反応サイクルから開始し, サイクルごとにアニーリング・伸長温度を 1 $^{\circ}$ C ずつ下げる。65 $^{\circ}$ C に達した 11 サイクル目以降はアニーリング・伸長温度を 65 $^{\circ}$ C のままで 25 サイクル行い, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させる。サーマルサイクラーは, 筆者は Perkin Elmer の GeneAmp PCR System 9600 を使用している。反応後, 1% アガロース電気泳動で PCR 産物を確認し, 約 1,000 bp のバンドが検出されたら手順 (3), 約 300 bp のバンドが検出されたら手順 (4) へ進む。約 1,200 bp のアリル非特異的バンドのみが検出されたらチュウゴクオナガコバチと判定される。

手順(3) 2 回目のアリル特異的 PCR ①

手順 (2) で使用した 4 種類のプライマーを CAS18sF1, CAS5p8sB1d, its1_R23G (5'-CAAGACAGGGGGTGACAAAAGAG-3') の 3 種類のプライマーに変更する以外は手順 (2) と同じ条件で PCR を行う。ここで約 1,000 bp のバンドが検出されたら, クリマモリオナガコバチ晩期羽化型とチュウゴクオナガコバチの交雑個体 (F1) と判定される。約 1,200 bp のバンドのみが検出されたら, クリマモリオナガコバチ晩期羽化型と判定される。

手順(1) DNA抽出

手順(2) プライマー4種 (CAS18sF1/CAS5p8sB1d/its1_R23A/its1_3F20T) でアレル特異的PCR, 電気泳動



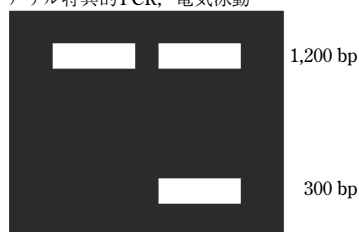
手順(3)へ 手順(4)へ チと判定

手順(3) プライマー3種 (CAS18sF1/CAS5p8sB1d/its1_R23G) でアレル特異的PCR, 電気泳動



晩と判定 F₁ (晩×チ)と判定

手順(4) プライマー3種 (CAS18sF1/CAS5p8sB1d/its1_3F19C) でアレル特異的PCR, 電気泳動



早と判定 F₁ (早×チ)と判定

図-3 ITS1領域のアレル特異的PCRによるチュウゴクオナガコバチ(チ), クリマモリオナガコバチ早期羽化型(早), 同晩期羽化型(晩)および交雑個体(F₁)の検出手順

手順(4) 2回目のアレル特異的PCR②

手順(2)で使用した4種類のプライマーをCAS18sF1, CAS5p8sB1d, its1_3F19C (5'-CGTTAAGTCAAAA-CACCGC-3')の3種類のプライマーに変更する以外は手順(2)と同じ条件でPCRを行う。ここで約300 bpのバンドが検出されたら, クリマモリオナガコバチ早期羽化型とチュウゴクオナガコバチの交雑個体(F₁)と判定される。約1,200 bpのバンドのみが検出されたら, クリマモリオナガコバチ早期羽化型と判定される。なお, YARA and KUNIMI (2009)では, このステップで使用するアレル特異的プライマーを21 merのits1_3F21Cとしていたが, 最近では19 merの上記its1_3F19Cで行っている。

おわりに

現在, チュウゴクオナガコバチとクリマモリオナガコバチ晩期羽化型の交雑の実態解明に向けて, 上記の検出法を利用して解析中であり, 近い将来にその結果をご紹介できればと思う。なお, 今回ご紹介した手法は, 交雑個体(F₁)の検出だけが適用範囲ではない。例えば, 雄成虫や幼虫期の動態や, クリマモリオナガコバチ早・晩期羽化型の分布域の解明等にも有効な手法と考えている。

引用文献

- 1) 青砥 勇・村上陽三 (1992): 九病虫研会報 38: 193 ~ 196.
- 2) 林 敬子 (2008): 植物防疫 62: 334 ~ 338.
- 3) 伊澤宏毅ら (1992): 応動昆 36: 58 ~ 60.
- 4) IZAWA, H. et al. (1995): Appl. Entomol. Zool. 30: 37 ~ 41.
- 5) 伊澤宏毅ら (1996): 応動昆 40: 205 ~ 208.
- 6) Ji, Y. J. et al. (2003): Mol. Ecol. Notes 3: 581 ~ 585.
- 7) MORIYA, M. et al. (1992): Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica 27: 479 ~ 483.
- 8) MURAKAMI, Y. (1988): Appl. Entomol. Zool. 23: 81 ~ 87.
- 9) ÔTAKE, A. (1987): ibid. 22: 600 ~ 609.
- 10) TODA, S. et al. (2000): ibid. 35: 151 ~ 154.
- 11) YARA, K. et al. (2000): ibid. 35: 201 ~ 206.
- 12) ——— (2006): Biol. Control 36: 15 ~ 21.
- 13) ——— et al. (2007): ibid. 42: 148 ~ 154.
- 14) ——— and Y. KUNIMI (2009): Appl. Entomol. Zool. 44: 275 ~ 280.

「農薬概説 (2009)」

監修 農林水産省消費・安全局 農産安全管理課, 植物防疫課

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター B5判 315頁 定価1,890円(本体1,800円) 送料340円
農薬取扱者が知っておかなければならない農薬に関する法令とその解説, 基礎知識についての詳細を掲載。

第1章 作物保護と農薬

第2章 植物防疫行政

第3章 農薬行政

第4章 関係法令 解説

第5章 農薬の一般知識

第6章 施用技術

第7章 農薬のリスクと安全性評価

第8章 農薬の安全・適正使用

第9章 病害虫・雑草とその防除

資料

農薬取締法および関連する法令通知等

お問い合わせとご注文は

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11

TEL 03-3944-1561 FAX 03-3944-2103 HP <http://www.jpnpa.or.jp>