カンザワハダニのアロザイム遺伝子分析

五箇 公一*・高藤 晃雄**

* 宇部興産

** 京都大学大学院農学研究科

Genetic Analysis of Allozymes in the Kanzawa Spider Mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA. Kouichi GOKA (Ube Industries, Ltd., Ube, Yamaguchi 755, Japan) and Akio TAKAFUJI (Laboratory of Ecological Information, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-01, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **40**: 250-252 (1996)

Abstract: Genetic variations of esterase, malate dehydrogenase and phosphoglucosomerase in the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA, were studied by polyacrylamide gel electrophoresis. Based on their banding patterns, three dimeric enzyme loci were detected: Est-4, MDH and PGI. Est-4 and MDH exhibited two alleles, and PGI three alleles. The allele frequencies in these loci varied among populations. These three loci will be useful gene markers for studying the genetic divergence of *T. kanzawai*.

Key words: *Tetranychus kanzawai*, allozyme, electrophoresis, genetic divergence

カンザワハダニ *Tetranychus kanzawai* KISHIDA はナミハダニ *T. urticae* KOCH とならぶ広食性のハダニで、本種による様々な農作物に対する被害は深刻な問題となっている。その分布は日本全土だけでなく、香港、台湾、フィリピンなどの東アジアでも発生が認められる(江原, 1980)。本種は成虫休眠を行い、わが国のチャに寄生する個体群に休眠性の地理的変異が存在する(望月, 1995)。また、本種はさまざまな薬剤に対して抵抗性を示し、その抵抗性の程度やスペクトルには個体群間で差異がある(刑部, 1967, 1972; 浜村, 1985; 小澤, 1994; 上遠野, 1995)。さらに寄主の異なる個体群間に生殖隔離が生じていることも報告されている(五味・後藤, 1994)。これらのことから本種の個体群間には遺伝的分化が進んでいることが示唆されるが、その実態を全国的規模で調査した例はない。

近年、ハダニ類では電気泳動法により分離されるアイソザイムを用いて同一種の系統間や種間の差を捉える研究が進展してきている(WARD et al., 1982; SULA and WEYDA, 1983; 刑部, 1984; OSAKABE, 1987, 1991; GOKA and TAKAFUJI, 1992; GOTOH and ISHIKAWA, 1992; GOTOH et al., 1993)。とくに、ナミハダニでは四つのアロザイム(GOKA and TAKAFUJI, 1995 a)における遺伝子頻度を指標として日本各地の個体群間の遺伝的分化の程度と地理的パターンが明らかにされている(GOKA and TAKAFUJI, 1995 b)。本手法を用いればカンザワハダニ個体群間の遺伝的差異も定量化化することができると期待される。

そこで本研究では、カンザワハダニの有効な遺伝的マーカーの確立を目的として電気泳動法によるアロザイム検出を一個体レベルで行い、遺伝子分析を行った。さらに採集地や寄主植物が異なる個体群のアロザイム遺伝子頻度を調べ、地理的変異や寄主の違いによる変異の存在の可能性を調べた。

本文に入るに先立ち、ハダニの採集にご協力頂いた農水省野菜茶業試験場望月雅俊氏、沖縄県ミバエ対策事業所小浜継雄氏および沖縄県農業試験場守屋成一氏、および種の同定を頂いた茨城大学農学部後藤哲雄博士に感謝の意を表する。

材料および方法

1. 個体群

本研究に用いた個体群は、いずれも野外圃場より採集した(Table 1)。各個体群から雌成虫を採取し、電気泳動に供試するまで -85°C で保存した。調査個体数は一つの酵素につき20~40個体とした。これらの個体群のうち、予備実験で多くの酵素変異が検出された静岡県金谷町の個体群(No. 1)を酵素遺伝子座の遺伝子分析に用いた。

2. 電気泳動のサンプル調整

酵素調整液は0.1%トリトン X-100 と0.002%プロモフェノルブルーを含む32%ショ糖液を使用した。保存した雌成虫を10 μl の酵素調整液で1匹ずつホモジェナイズしたものを酵素液として電気泳動に供試した。

3. 電気泳動法

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法はGOKA and TAKAFUJI (1995 a)の方法に従った。ゲル(厚さ1 mm×幅200 mm×高さ180 mm)は分離用ゲルと濃縮用ゲルの二層で構成され、それぞれ0.05%と0.1%のトリトン X-100を含んだ。また、アクリルアミドの濃度は分離用ゲルが6.5%で濃縮用ゲルが2.5%であった。泳動はゲル1枚あたり25 mAの定電流で5 $^{\circ}\text{C}$ に冷却しながら行った。

本研究で検出した酵素は、エステラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)およびホスホグルコイソメラーゼ(PGI)の三つであった。エステラーゼおよびPGI泳動帯の検出法はGOKA and TAKAFUJI (1992)の方法に、そしてMDHの検出法はGOKA and TAKAFUJI (1995 a)の方法に準じた。

結果および考察

1. エステラーゼの遺伝子分析

カンザワハダニのエステラーゼアイソザイムについてはKUWAHARA et al. (1981)および桑原(1982)が有機リン剤抵抗性との関係について調べているが、個体レベルのアイソザイム検出は行われていない。本研究では、雌成虫1個体から検出された

Table 1. Collection records of *T. kanzawai* populations used in the present study

Code	Locality		Latitude & longitude	Date of collection	Host plant
	Prefecture	City			
1	Shizuoka	Kanaya	(35°N, 138°E)	10 Jul. 1994	Tea
2	Hiroshima	Fukuyama	(34°N, 133°E)	12 Nov. 1993	Rose
3	Yamaguchi	Ube	(34°N, 131°E)	20 Aug. 1993	Eggplant
4		Ube	(34°N, 131°E)	15 Nov. 1994	Mulberry
5		Toyota	(34°N, 131°E)	2 Nov. 1994	Pear
6	Okinawa	Nakijin	(27°N, 128°E)	5 Aug. 1995	China ramie
7		Nago	(27°N, 128°E)	5 Aug. 1995	Peach
8		Ishigaki	(24°N, 124°E)	13 May 1994	Sweetpotato

Fig. 1. Polyacrylamide zymograms of esterase in adult females of *T. kanzawai*. Each genotype of Est-4 is listed below each zymograms. Fig. 2. Polyacrylamide zymograms of MDH in adult females of *T. kanzawai*. Each genotype is listed below each zymograms.

エステラーゼザイモグラムは四つの泳動帯に分離され、それぞれを Est-1 から Est-4 と命名した (Fig. 1)。これらのうち Est-3 および Est-4 に多型が認められたが、Est-3 はバンドパターンが複雑であり、遺伝子分析を行うことは困難であった。Est-4 はそのバンドパターンから、易動度が小さいバンドを支配する遺伝子 *s* (=slow), および易動度が大きいバンドを支配する遺伝子 *f* (=fast) の二つの対立遺伝子をもつ一遺伝子座支配の二量体酵素であると考えられた。すなわち易動度の小さいあるいは大きいバンドを 1 本のみ示す個体はホモ接合体 (*s/s* あるいは *f/f*) であり、易動度が小さいバンド、大きいバンドおよびその中間の易動度をもつバンドの合計 3 本のバンドを示す個体はヘテロ接合体 (*s/f*) であると考えられた。

Fig. 3. Polyacrylamide zymograms of PGI in adult females of *T. kanzawai*. Each genotype is listed below each zymograms.

2. MDH の遺伝子分析

カンザワハダニの MDH ザイモグラムはナミハダニ (GOKA and TAKAFUJI, 1995 a) と同様のバンドパターンを示し、*s* および *f* の二つの対立遺伝子に支配される二量体酵素であると考えられた (Fig. 2)。

3. PGI の遺伝子分析

PGI ザイモグラムも 1 本のバンドのみを示す個体と 3 本のバンドを示す個体が検出されたことから二量体酵素であるが、対立遺伝子は三つ存在すると考えられた (Fig. 3)。これらの遺伝子は、最も易動度の大きいバンドを支配するものを *f*、最も易動度の小さいバンドを支配するものを *s*、そしてその中間の易動度をもつバンドを支配するものを *m* と命名した。

4. 各地域個体群のアロザイム遺伝子頻度

各地域個体群について、上記三つのアロザイム遺伝子座の遺伝子頻度を調べた (Table 2)。いずれの遺伝子座についてもいくつかの個体群で多型が認められ、またそれらの対立遺伝子頻度には個体群間で差異があった。特に PGI では山口県 (No. 3~5) や沖縄県 (No. 6~8) の同一地域に近接する個体群間にも著しい遺伝子頻度の差が認められた。これらのことからカンザワハダニの個体群内および個体群間のアロザイム変異はかなり大きいことが示された。

以上より、電気泳動により分離されるエステラーゼ (Est-4)、MDH および PGI は、カンザワハダニ個体群内・間の遺伝的変

Table 2. Allele frequencies for Est-4, MDH and PGI in *T. kanzawai* populations (see Table 1)

Locus	Allele	Population							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Est-4	<i>s</i>	0.450	0.075	—	—	0.025	0.500	—	—
	<i>f</i>	0.550	0.925	1.000	1.000	0.975	0.500	1.000	1.000
MDH	<i>s</i>	0.575	1.000	1.000	0.850	1.000	0.950	0.950	0.550
	<i>f</i>	0.425	—	—	0.150	—	0.050	0.050	0.450
PGI	<i>s</i>	0.050	—	—	—	0.300	—	1.000	—
	<i>m</i>	0.900	1.000	1.000	0.475	0.700	1.000	—	1.000
	<i>f</i>	0.050	—	—	0.525	—	—	—	—

異を調べるうえでの有効な遺伝的マーカーとなることが示された。ただし、エステラーゼについては、多くのバンドが検出され、複数の遺伝子座が関与していると考えられることから、Est-4 泳動帯が一遺伝子座支配であることはナミハダニ (GOKA and TAKAFUJI, 1995 a) の場合と同じく、交雑実験によって確かめる必要がある。また、PGI についても本研究では三つの対立遺伝子の存在が示されたが、*s/f* の遺伝子型の個体は検出されておらず、やはり、今後、交雑実験によって詳細に遺伝様式を調査しておく必要がある。

本種はナミハダニと同様に寄主範囲が広く、寄主植物の種類や栽培条件によっても個体群の遺伝子組成は大きな影響を受けると考えられる (GOKA and TAKAFUJI, 1995 b)。今後、より多くの地域および寄主植物から個体群を採集し、これらのアロザイム遺伝子頻度を調べ、休眠性や生殖的隔離などの生態的・遺伝的特性と照らしあわせることにより、本種の遺伝的分化の実態を明らかにすることができると期待される。

引用文献

江原昭三 (1980) 日本ダニ類図鑑。東京：全国農村教育協会，562 pp.
GOKA, K. and A. TAKAFUJI (1992) *Appl. Entomol. Zool.* **27**: 141-150.
GOKA, K. and A. TAKAFUJI (1995 a) *Appl. Entomol. Zool.* **30**: 529-535.

GOKA, K. and A. TAKAFUJI (1995 b) *Appl. Entomol. Zool.* **30**: 567-579.
五味 康・後藤哲雄 (1994) 日本ダニ学会誌 **3**: 42. [講要]
GOTOH, T. and Y. ISHIKAWA (1992) *Appl. Entomol. Zool.* **27**: 598-601.
GOTOH, T., J. BRUIN, M.W. SABELIS and S.B.J. MENKEN (1993) *Entomol. Exp. Appl.* **68**: 171-178.
浜村徹三 (1985) 茶研報 **62**: 26-32.
上遠野富二夫 (1995) 関東病虫研報 **42**: 247-250.
桑原雅彦 (1982) 応動昆 **26**: 288-293.
KUWAHARA, M., T. MIYATA, T. SAITO and M. ETO (1981) *Appl. Entomol. Zool.* **16**: 297-305.
望月雅俊 (1995) 日本ダニ学会誌 **4**: 42. [講要]
刑部正博 (1984) 応動昆 **28**: 1-4.
OSAKABE, Mh. (1987) *Appl. Entomol. Zool.* **22**: 577-584.
OSAKABE, Mh. (1991) *Appl. Entomol. Zool.* **26**: 307-312.
刑部 勝 (1967) 茶技研 **35**: 60-65.
刑部 勝 (1972) 茶試研報 **8**: 1-95.
小澤朗人 (1994) 茶試研報 **79**: 1-14.
SULA, J. and F. WEYDA (1983) *Experientia* **39**: 78-79.
WARD, P.S., I.A. BOUSSY and D.E. SWINGER (1982) *Ann. Entomol. Soc. Am.* **75**: 595-598.