

## フィリピンのココヤシ寄生虫の DNA 種分類及び集団遺伝解析

愛媛大学 学生会員 ○石谷直渡 愛媛大学 非会員 Serrana, J. M. 愛媛大学, De La Salle University 非会員 Carvajal, T. M. De La Salle University 非会員 Almarinez, B. J. M. De La Salle University 非会員 Barrion, A. T. De La Salle University 非会員 Amalin, D. M. 愛媛大学, De La Salle University 正会員 渡辺幸三

## 1. はじめに

ココヤシの寄生虫である *Aspidiotus rigidus* (Figure 1) は半翅目マルカイガラムシ科に属する体長 1mm 程の昆虫であり、ココヤシを主な宿主とする。寄生されると宿主は果実の実りが悪くなり、ほとんどの場合 6 ヶ月以内に枯れる。2014 年に報告された時点でフィリピン国内の約 210 万本の樹木に感染が広がっており、そのうちの約 65% が枯れ、平均して約 60% の果実収量を低下させた。風や貿易される木材などに付着することで生息地を広げ、自身は単為生殖で繁殖する。現在までにインドネシアとフィリピンの 2 ヶ国で生息が確認されているが、本種はインドネシアからの外来種とされており、2009 年にフィリピンのバタンガス州で初めて確認されて以降、急速に南へと被害の拡大が報告されている。

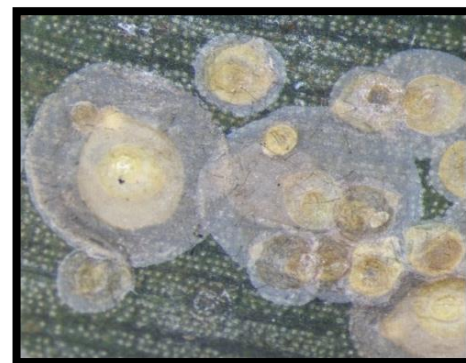


Figure 1 *Aspidiotus rigidus*

フィリピンはココナツの生産量世界第二位の国であり、フィリピン国民のおよそ 50 人に 1 人となる 350 万人がココナツ農家として生計を立てている。しかし、そのほとんどが貧困層に位置しているため、薬剤による防除には経済的な限界があり、最も費用対効果が高い対策は天敵による管理と考えられる。

当初、この被害はフィリピンの在来種の *Aspidiotus destructor* によるものと思われていたが、その後詳細な形態学的解析により本種によるものと判明した。在来種にはフィリピン国内に天敵が数多く存在しているが、本種はフィリピン国内で確認されている効果的な天敵は 1 種のみで、効率的な生物管理が進んでいない。そのため本種の分布や拡大経路を把握し、天敵の効率的な放虫に繋げることが望まれる。本種と在来種は形態学的に非常に似ており形態学的種同定が困難であるが、卵の産み付け方の違いによる生態学的特徴から比較的簡単に種同定ができる。

本研究では生態学的特徴から 2 種を別種と定義できる根拠を得るために、2 種が分子遺伝学的に別種であると示す。また、本種の移動パターンを推定するためにフィリピン北部のルソン島と南部のミンダナオ島・バシラン島の集団の遺伝構造を解析する。

## 2. 研究方法

### 2-1. サンプリング時期・地点・個体数

2014 年 12 月から 2016 年 11 月にかけて、北部ルソン島から 5 地点、南部ミンダナオ島・バシラン島から 2 地点、計 7 地点から 339 個体の *A. rigidus*、22 個体の *A. destructor* をサンプリングした。

(Figure 2)

### 2-2. 遺伝子解析

サンプリングされた計 361 個体はそれぞれホモジナイザーで破砕し、PBS と ATL Buffer を混合した緩衝液内で、56°C で 24 時間 proteinase K 処理を行った。その後フェノール・クロロホルム DNA

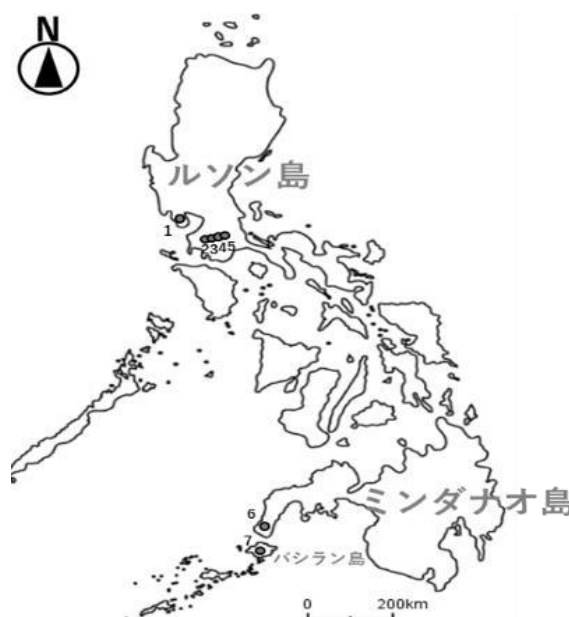


Figure 2 サンプリング地点の分布

抽出法を用い DNA 抽出を行い、抽出した DNA は-20℃で保存した。得られた DNA の濃度は NanoDrop 2000(Thermo)を用いて蛍光測定した。次に、抽出した DNA の全領域からミトコンドリア DNA(mtDNA)の Cytochrome Oxidase subunit I (CO I)領域と核 DNA の Elongation Factor 1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ )領域の 2 つの遺伝子マーカーを選択し、PCR 法により目的領域の増幅をはかった。その後アガロースゲル電気泳動法により DNA 量の増幅を確認した。DNA 量の増幅が確認されたサンプルに対し塩基配列決定を行い、解読が不十分な箇所は補正した。続いてアライメントを行い、CO I 領域は 649bp, EF-1  $\alpha$  領域は 1008bp になるように調整した。次に、MEGA7 を用い、塩基配列決定を行ったサンプルから *A. rigidus* と *A. destructor* 2 種間の塩基置換率及び、*A. rigidus* 同種個体間の塩基置換率を算出した。また、上記で得られた塩基配列データと共に、*A. rigidus* と *A. destructor* と同じ科に属する計 8 種、異なる科に属する 1 種の塩基配列データを NCBI から取得して用い、CO I 領域と EF-1  $\alpha$  領域それぞれで、最尤法による分子系統樹を PhyML 3.1 で作成した。

### 3. 結果

CO I 領域で *A. rigidus* 291 個体、*A. destructor* 12 個体、EF-1  $\alpha$  領域で *A. rigidus* 75 個体、*A. destructor* 3 個体の塩基配列データが得られた。*A. rigidus* の CO I 領域の塩基配列データは NCBI に登録した。

CO I 領域の分子系統樹では (Figure 3) *A. rigidus* が北部と南部の 2 つの遺伝集団に分かれ、遺伝集団間で塩基置換率は 5%であった。また *A. rigidus* と *A. destructor* は 14%の平均塩基置換率で分岐していた。EF-1  $\alpha$  遺伝子領域では、*A. rigidus* で北部から 3 つ、南部から 2 つの、計 5 つのハプロタイプが見られ、ハプロタイプ間の平均塩基置換率は 0.83%であった。また、*A. rigidus* と *A. destructor* は 12%の平均塩基置換率で分岐していた。(Figure 4)

### 4. 考察

2 つの遺伝子マーカーで 2 種間が 10%以上の塩基置換率を持ち、分子系統樹上で異なる系統関係を示したことから 2 種は異なる種であると言えると考えられる。

今回得られた結果からでは *A. rigidus* の移動パターンを推定するのは難しいが、同種個体間の塩基置換率から北部と南部で集団のソースが異なるという新たな発見があった。

CO I 領域で 5%の塩基置換率が生じるにはおよそ 140 万年かかるため、北部で初めて確認された集団が数年で南部へ移動したとするのは難しいと考えられるためである。

### 5. おわりに

- ・ *A. rigidus* の CO I 領域の塩基配列データを新たに NCBI に登録した。
- ・ *A. rigidus* と *A. destructor* の 2 種が分子遺伝学的に別種であると示すことができた。
- ・ 北部と南部の遺伝集団間の遺伝的変異が比較的大きく、集団のソースが異なるという新たな発見があった。

### 参考文献

- ・ Watson, G. W., C. B. Adalla, B. M. Shepard, and G. R. Carner. 2014. *Aspidiotus rigidus* Reyne (Hemiptera: Diaspididae): a devastating pest of coconut in the Philippines. *Agricultural and Forest Entomology*(2015), 17, 1-8.
- ・ FAO. 2014. Oilseeds, Oils, and Meals. Monthly Price and Policy Update, No. 61, July 2014.

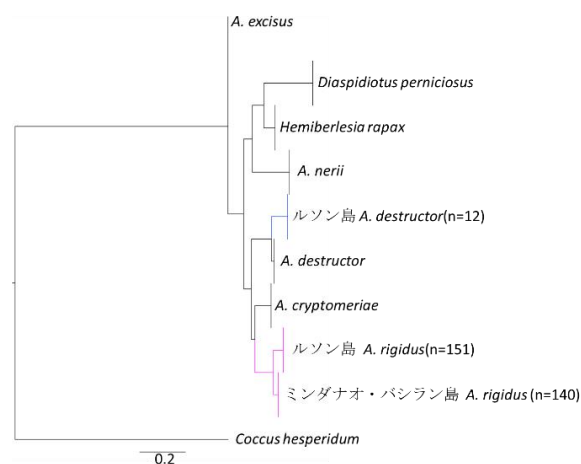


Figure 3 CO I 領域の分子系統樹(n は個体数)

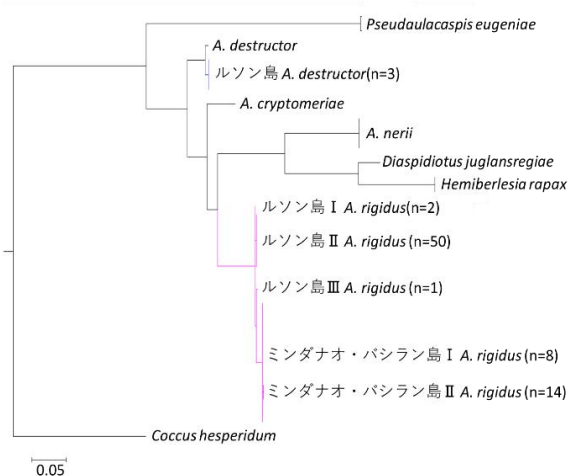


Figure 4 EF-1  $\alpha$  領域の分子系統樹(n は個体数)