

アカスジカスミカメ地域個体群の遺伝的多様性
に関する研究

小林 徹也

2012 年 12 月

目次

序論	1
第1章 遺伝的多様性調査のためのマーカーの整備	10
緒言	10
材料と方法	12
1. ミトコンドリア <i>COI</i> 遺伝子のクローニングとプライマーの設計	12
2. マイクロサテライトマーカーの整備	14
結果	18
1. ミトコンドリア <i>COI</i> 遺伝子のクローニングとプライマーの設計	18
2. マイクロサテライトマーカーの整備	18
考察	26
第2章 全国レベルでの遺伝的多様性の検討	28
緒言	28
材料と方法	29
1. アカスジカスミカメ地域個体群のサンプリング	29
2. ミトコンドリア <i>COI</i> 遺伝子の解析	30
3. マイクロサテライトマーカーの解析	31
4. クラスタリング解析と系統解析による遺伝的構造の推定	32
結果	34
1. アカスジカスミカメ地域個体群のサンプリング	34
2. ミトコンドリア <i>COI</i> 遺伝子の解析	34

3. マイクロサテライトマーカの解析	35
4. クラスタリング解析と系統解析による遺傳的構造の推定	36
考察	64
サンプリング	64
ミトコンドリア DNA	65
マイクロサテライト	68
クラスタリングと遺傳構造	69
本種の加害個体群の由来	70
第3章 限られた地域内での遺傳的多様性の詳細な検討	72
緒言	72
材料と方法	73
1. 対象区域内の高密度サンプリング	73
2. マイクロサテライトマーカの解析	73
3. ミトコンドリア <i>COI</i> 遺傳子の解析	74
結果	76
1. マイクロサテライトマーカの解析	76
2. ミトコンドリア <i>COI</i> 遺傳子の解析	77
考察	88
総合考察	92
摘要	103
謝辞	107
引用文献	109
図表目次	121

序論

カメムシ類がイネの登熟期に籾を吸汁すると、吸汁孔から微生物が侵入して繁殖し、玄米の表面が着色した「斑点米」(Figure 1a)となる(富永, 1973¹¹²)。斑点米の混入した米は等級が下がるため、農家に経済的な損失をもたらす。農産物検査法にもとづく水稻うるち玄米の等級制度では、着色粒混入の割合が0.1%以下で1等米、0.3%以下で2等米、0.7%以下で3等米、それより多いと規格外となる。2009年度産の水稻うるち玄米を例にとると、2等以下に格付けされた米のうちカメムシ類による着色粒が原因だった割合は15.6%であり、収穫された米全体の2.3%が斑点米被害によって落等したことになる(農林水産省総合食料局, 2010⁷⁷)。斑点米とその原因となるカメムシ類の存在は以前から知られていたが、1970年代以降米の品質が重要視されるとともに大きな問題となった(中筋, 1973⁷³)。斑点米の問題はその後一旦沈静化したのが、1999年ころを境に全国で再燃しており、現在も続いている(渡邊・樋口, 2006⁴¹)。斑点米カメムシ類は現在60種以上が知られ(安永ら, 1993¹²²)、主要な斑点米カメムシの種構成は時代とともに変遷している。例えば、1970年代に問題とされた斑点米カメムシ種はホソハリカメムシ、クモヘリカメムシ、オオトゲシラホシカメムシ、トゲシラホシカメムシであったが(岩田・葭原, 1976⁴⁹)、1999年以降の斑点米被害では上記の種に加え、新たに2種のカスミカメが斑点米カメムシ類の主要種に加わっている。中でも、本研究の対象としたアカスジカスミカメ(*Stenotus rubrovittatus* (Matsumura); Figure 1b)は2000年代に入ってから全国で急速に増加し、2010年現在では全国で最も重要な斑点米カメムシとなっている(渡邊・樋口, 2006¹¹⁷; 樋口 2010⁴¹; Figure 2)。アカスジカスミカメは1970年代には斑点米カメムシとしては認識されておらず(樋口, 2010⁴¹)、斑点米被害が最初に報告されたのは1983年である。しかし、その後数年間で本種は宮城県と岩手県における斑点米カメムシの主要種となった(高橋ら, 1985¹⁰⁶; 永野ら, 1988⁷¹; 田中ら, 1988¹¹¹)。一方、1984年には広島県においても本種が斑点米被害をもたらしていることが報告され、その後、この地域においても斑点米カメムシの主要種

となった（林, 1986³⁶; 1997³⁷）。ところが、全国的にみると、1990年代前半まで上記の東北地方太平洋側と広島県周辺以外でアカスジカスミカメが問題とされた地域はなく、本種は限られた地域でのみ斑点米被害をもたらす害虫種であると考えられてきた。本種による斑点米被害の報告が全国で相次いだのは1999年以降で、全国的に複数の斑点米カメムシ種による被害が増加した時期と一致している。例えば、2003年頃から北陸地域ではアカスジカスミカメの分布域の拡大が認められ（渡邊・樋口, 2006¹¹⁷）、同時期に生息密度が極めて低かった北海道でも牧草地で大量に繁殖していることが確認された（柿崎, 2004⁵²）。また、2006年ごろからは、捕獲記録のがほとんどない山形県や斑点米カメムシの原因種としてはマイナーな種とされていた秋田県など東北地方の日本海側においても、本種が多く確認されるようになった他（川崎ら, 2009⁵⁸; 小林・菊地, 2010⁶⁵）、千葉県においても利根川周辺で斑点米カメムシ類の優占種となっていることが確認された（片瀬ら, 2006⁵⁵）。これらの事実から、アカスジカスミカメは土着種であるにもかかわらず、この10年のうちに日本国内の広範囲で密度と斑点米被害を増加した新規の害虫であると言える。

アカスジカスミカメはカスミカメ科に属する体長5 mm程度のカメムシであり、北海道南部と本州全域に分布する。また、海外においては、中国、朝鮮半島、サハリンで採集の記録がある。本種は主にイネ科植物で繁殖し、イネ科植物の穎花を栄養源として好むため、出穂したイネ科植物を求めて寄主植物を頻繁に変える（林・中沢, 1988³⁸）。寄主植物はスーダングラス、イタリアンライグラス、カモガヤ（オーチャードグラス）、スズメノテッポウ、コムギ、イヌビエ、タイヌビエ、メヒシバ、トウモロコシ（加藤・長谷川, 1950⁵⁴; 林・中沢, 1988³⁸; 長澤, 2007⁷²）等である。成虫はこれらイネ科植物の小穂内に産卵するほか、水田内の繁茂したカヤツリグサ科のイヌホタルイとシズイにも産卵する（大友ら, 2005⁸²; 加進ら 2009⁵³）。成虫は雌1匹あたり100–130程度の卵を産み（林, 1986³⁶; 長澤, 2007⁷²; 重久, 2004b⁹⁵; 奥谷ら, 2009⁷⁹）、冬季には休眠卵で越冬を行う。本種の世代数は地域によって異なり、4–5世代（滋賀県; 重久, 2004a⁹⁴）から2–3世代（岩手県; 飯村ら, 2004⁴⁴）である。8月に水田のイネが出穂期を迎えると、水田の周辺で繁殖した本種成虫が水田に侵入し、登熟途中のイネ花の内穎

と外穎の隙間から栄養を吸う（林, 1989³⁹）。吸汁痕からは細菌やカビ類が侵入し繁殖し、玄米の表面が黒色あるいは茶色に着色した斑点米を産生する。

アカスジカスミカメの防除法は、1) 発生源における寄主植物の適切な管理と、2) 水田内に侵入した成虫の薬剤防除である。寄主植物の管理においては、水田周辺のイネ科植物を草刈り等で適切に管理することで本種の増殖を抑え、水田への侵入数を減らすことが本種の防除の基本となる（小野ら, 2007⁸¹; 横田ら, 2007¹²⁵）。しかし、草刈りによって繁殖場所を追い出された成虫が近隣の水田に侵入して被害を与えることから、水田の出穂期の10日前以降は草刈りを行わないことも同時に指導されている。さらに、頻繁な草刈りは高齢化した農家の作業負担が大きいため、これに代わる方法として、水田畦畔の除草剤散布によって同様の効果を上げること成功している県もある（高橋・菊池, 2010¹⁰⁹）。一方、水田内に発生したヒエ、イヌホタルイやシズイ等の雑草も本種の寄主植物となることが明らかにされており、本種の防除においては水田内の雑草の発生を抑えることも重要とされる（後藤, 2000³²; 大友ら, 2005⁸²; 加進ら, 2009⁵³）。特にイヌホタルイは、現在広く普及しているスルホニルウレア系除草剤に対する抵抗性型が出現したことによって、雑草防除後も水田内に残存しやすくなっており、アカスジカスミカメの斑点米被害を増加させる原因のひとつになっている。

出穂期以降の水田に侵入した本種の防除には、殺虫剤の散布が最も効果がある。殺虫剤の散布時期は県によってさまざまに指導されているが、一般的には出穂期以降の1カ月以内に2～3回の散布が基本となる。複数回散布するのは、殺虫剤の残効に対して本種の加害期間が長いためと、本種は品質害虫として低密度でも経済的な被害を出すことから徹底的な防除が必要となるためである。近年、カメムシ類に対する残効が長いネオニコチノイド系殺虫剤が普及したことにより、1回の散布でも本種を効果的に防除できる地域も増えているが（鈴木, 2005¹⁰²）、日本全国で本種をはじめとした斑点米カメムシ類の防除のために大量の農薬が使用されているのが現状である。

この10年間でアカスジカスミカメが多発生し、斑点米被害が増加している原因は明らかにされていないが、現在までの研究を総合すると複数の要因が関与していると考えられる。まず、イネ科牧草の作付の増加（林, 1986³⁶; 田中ら, 2000¹¹¹）、水田周辺に

におけるイネ科植物の繁茂（新山, 2000⁷⁶）、米の生産余剰に伴う休耕田の増加等によるカスミカメムシ類の繁殖地の増加が、本種の密度増加をもたらしているとされる（林, 1986³⁶）。本種の発生源となるイネ科植物が増えてアカスジカスミカメの密度が増加し、増殖した本種成虫が水田へ大量に侵入して斑点米被害が起こしていると考えられるのである。また、伊藤（2004⁴⁸）は、スズメノカタビラ、スズメノテッポウ、メヒシバナなどのイネ科雑草が繁茂する休耕田面積の全国的な増加が、斑点米被害の増加と関連していることを示している。さらに、アカスジカスミカメが、主要な寄主植物であるイタリアンライグラス（*Lolium multiflorum* Lam.）においてよく増殖することは繰り返し報告されており（高橋ら, 1985¹⁰⁸; 林・中沢, 1988³⁸; 柿崎 2004⁵²）、イタリアンライグラスが水田近くで繁茂していると特に斑点米被害が多いとする報告もある（高田ら, 2000¹¹⁰）。イタリアンライグラスは、明治時代に日本に導入された1年生の外来イネ科牧草であり、飼料価値が高く栽培しやすいほか、水田転換畑でも高い収量が得られることから、日本全国で広く栽培されている。さらに、イタリアンライグラスは初期成長が早いため畦畔・道路法面・河川や公園の緑化資材としても大量に利用されてきた。山下（2002¹²⁰）はイタリアンライグラスの栽培品種が野生化して自生集団をいたる所で形成していることを報告し、浅井・興語（2005⁴）はイタリアンライグラスが人為的に導入された緑化資材から逸出して麦作の雑草として問題となっていることを報告している。現在、イタリアンライグラスは全国各地で普通にみられるイネ科植物となっており、イタリアンライグラスの蔓延がアカスジカスミカメの密度増加をもたらしたという説は広く受け入れられている（Yoshioka et al. 2011¹²⁶）。

気象要因が本種の被害増加に影響しているとする報告も多くある。近年の夏の高温と少雨はカスミカメ類の個体数を増加させ（石岡ら, 2000⁴⁷; 新山, 2000⁷⁶）、飛翔活動や吸汁活動を活発化させて被害の増加をもたらすことが指摘されている（川崎ら, 2007⁵⁷）。また、地球温暖化の影響も関与しているとされる。発育零点が低く、有効積算温度が小さいカスミカメムシ類は温暖化によって世代数が増加しやすく、過去40年間の日本における平均気温の1℃の増加によってアカスジカスミカメは世代数を増加させたと予想されている（Kiritani, 2006⁶²; Kiritani, 2007⁶³）。世代数が増えると越冬卵

の数も増え、翌年の本種の発生密度の増加が促されると考えられる。さらに、本種の生息環境では、同じカスミカメ科に属する斑点米カメムシであるアカヒゲホソミドリカスミカメが生息しているケースが多く、2種の割合は地域によって異なるほか、年ごとの変動も大きい（高田ら, 2000¹⁰⁷; 川崎ら, 2009⁵⁸; 小林・菊池, 2010⁶⁵）。アカスジカスミカメとアカヒゲホソミドリカスミカメの競合がアカスジカスミカメの密度増加に関与している可能性もあるが、これについての研究例はほとんどない。

以上のように、アカスジカスミカメがこの10年の間に急速に被害を拡大させ、日本の稲作の主要害虫になった背景には、農業環境の変化があることが推察されるが（林, 1997³⁷; Kiritani, 2007⁶³）、その主要な要因はいまだ明らかにされていない。さらに、どのような変遷を経て、本種がただの虫から局地的な害虫、全国的な害虫と変化していったのについても不明である。

新たな害虫の発生が短期間で広い範囲に生じた場合、その由来が1か所で生じたひとつの加害個体群にあるのか、同時多発的に生じた複数の加害個体群にあるのかによって、被害の拡大の過程は異なることになる。しかし、発消長の観察等従来の生態的研究のみからこれを明らかにすることは困難である。一般的に、土着害虫の地域個体群はそれぞれの地域の環境に適応しているから、加害個体群の拡散は制約を受けると考えられる（Berryman, 1987⁷; Charles & Schneider, 1987¹⁵; de la Poza et al., 2008⁸⁶）。一方、害虫個体群の発生、移動、定着の各段階に問題が生じなければ、加害個体群は周囲に拡散していくと考えられる。本研究では、かつては一部の地域で害虫として問題とされるにすぎなかったアカスジカスミカメが、どのような過程を経て被害地域を拡大させたのかを明らかにするため、日本各地の本種の地域個体群について遺伝的多様性を調査し、これを比較検討することを試みた。

地域個体群は、周囲の個体群から孤立することによって独自の自然選抜や遺伝的浮動の影響を受け、独自の遺伝的多様性を獲得する。一方、他の個体群と遺伝的に交流することで遺伝的多様性の独自性を失う。遺伝的多様性は2つの作用のバランスによって決定されるから、これを解析することで、個体群の由来や歴史、他の個体群との遺伝的交流の度合いなどの情報が得られる（Slatkin, 1985⁹⁸; Roderick 1996⁹⁰）。さらに

害虫種において個体群の遺伝的多様性を解析すれば、加害個体群がどのように生じ、現在、他の個体群とどのように交流しているのかを知ることができる可能性がある。海外からの侵入害虫種においては、原産地や侵入回数、侵入後の分布拡大の過程の解析のために遺伝的多様性の調査がなされ、多くの成果を得てきた (Davies et al., 1999²²; Kolar and Lodge, 2001⁶⁶)。例えば、侵入害虫チチュウカイミバエ (*Ceratitis capitata*) の遺伝的多様性の解析から、カリフォルニアのミバエはラテンアメリカから繰り返し侵入した個体群が混じって新たな個体群を形成していることが明らかになった例などがある (Davies et al., 1999²²)。一方、土着の害虫種において、害虫化のプロセスの研究に遺伝的多様性の解析が利用された例は少ない。土着種の急激な害虫化が起きることがそれほど多くなく、さらに、同時期に広い範囲で害虫化が観察されることはさらに少ないことが、その理由であると考えられる。しかし、土着の害虫種の根絶後の再侵入経路の確認や、防除が有効な範囲の特定、種内のバイオタイプの遺伝的関係の調査などに遺伝的多様性の研究が利用された例はいくつか存在する (Shufrin et al., 2000⁹⁷; Yu et al., 2001¹²⁷; Anstead et al., 2002¹; Salvato et al., 2002⁹²)。例えば、オーストラリアにおける土着種クイーンズランドミバエ (*Bactrocera tryoni*) の遺伝的多様性の調査では、ミバエの常発生地を中心個体群と常発生地の外で時々発生するサテライト状の個体群は遺伝的に分化しており、これらの個体群は常発生地からの移入個体ではなく、近隣の小さな地域個体群から派生した加害個体群であることが明らかされている (Yu et al., 2001¹²⁷)。また、地中海沿岸におけるマツの土着害虫オオギョウレツケムシガ (*Thaumetopoea pityocampa*) の遺伝的多様性の研究では、この種は近年被害地域を拡大しているにもかかわらず、遺伝的に分化した地域個体群が維持されていることが明らかにされている (Salvato et al., 2002⁹²)。地域個体群の遺伝的分化の度合いは種の持つ移動拡散能力と密接に関係しているから、害虫種の場合、防除戦略の設定に深く関わる。上記の2種においては、遺伝的に異なる地域からの侵入はほとんどないと考えられるから、適切な範囲の地域を選び、根絶や密度コントロールを成功させれば、その効果を長く持続させることができると考えられる。さらに、メキシコにおける綿の害虫ワタミハナゾウムシ (*Anthonomus grandis*) では、地域個体群の遺伝的多様

性の研究から根絶事業を行った地域への侵入個体の飛来源を特定し、効果的な防除法を導くことに成功している（Kim ら（2006⁶¹）。一方、加害個体群の遺伝的構造の研究は、Porretta ら（2007⁸⁵）が衛生害虫であるヤブカの 1 種、*Ochlerotatus caspius* で考察したように、集団遺伝学的にひとつの個体群を形成する地域は、一斉に防除を行うのが効果的であるという結論が導かれることもある。

アカスジカスミカメは、日本国内で近年急速に被害地域を拡大させた土着種であり、被害初期における発生地域や、被害の増加の過程などが比較的明らかになっている。これらの害虫化に関する情報と各地の地域個体群の遺伝的多様性の情報を合わせて検討すれば、被害の拡大と個体群の遺伝的变化の関係を明らかにできると考えられる。例えば、各地の個体群に遺伝的な差がほとんど存在しない場合、加害個体群は短時間に一斉に全国に拡大したか、もともと本種の移動性が非常に高いために日本において本種が遺伝的に分化していなかった可能性がある。一方、地域個体群間が遺伝的に分化している場合、遺伝的分化が、地理的な距離と被害年代のどちらと相関しているかが問題となる。遺伝的分化が地理的距離に依存しているが被害の発生年代に関係ない場合、各地の地域個体群は遺伝的交流が制限された条件下で距離依存的に遺伝的に分化し、さらに、それが害虫化後も維持されていることになる。一方、遺伝的分化が地理的な位置関係よりもむしろ被害年代によって説明される場合、斑点米被害の拡大に伴う特定の加害個体群の分布拡大があった可能性が高い。

これらの仮説を検証するため、本研究では、まずアカスジカスミカメの地域個体群を日本全国から数多くサンプリングし、遺伝的多様性を解析して、各地の個体群の遺伝的関係を明らかにした。そして、これを本種による斑点米被害拡大の記録と照らし合わせ、害虫化の過程と要因を明らかにしようと試みた。さらに、研究から明らかになった地域個体群間の遺伝的な境界において、どのような要因が遺伝的交流を妨げているのかを明らかにするため、高密度のサンプリングと遺伝的多様性の解析を行い、地形や気象等との関連を考察した。

a)



b)



Figure 1 a) Rice grains damaged by the Sorghum plant bug, *Stenotus rubrovittatus*.

b) Adult of the *S. rubrovittatus*.

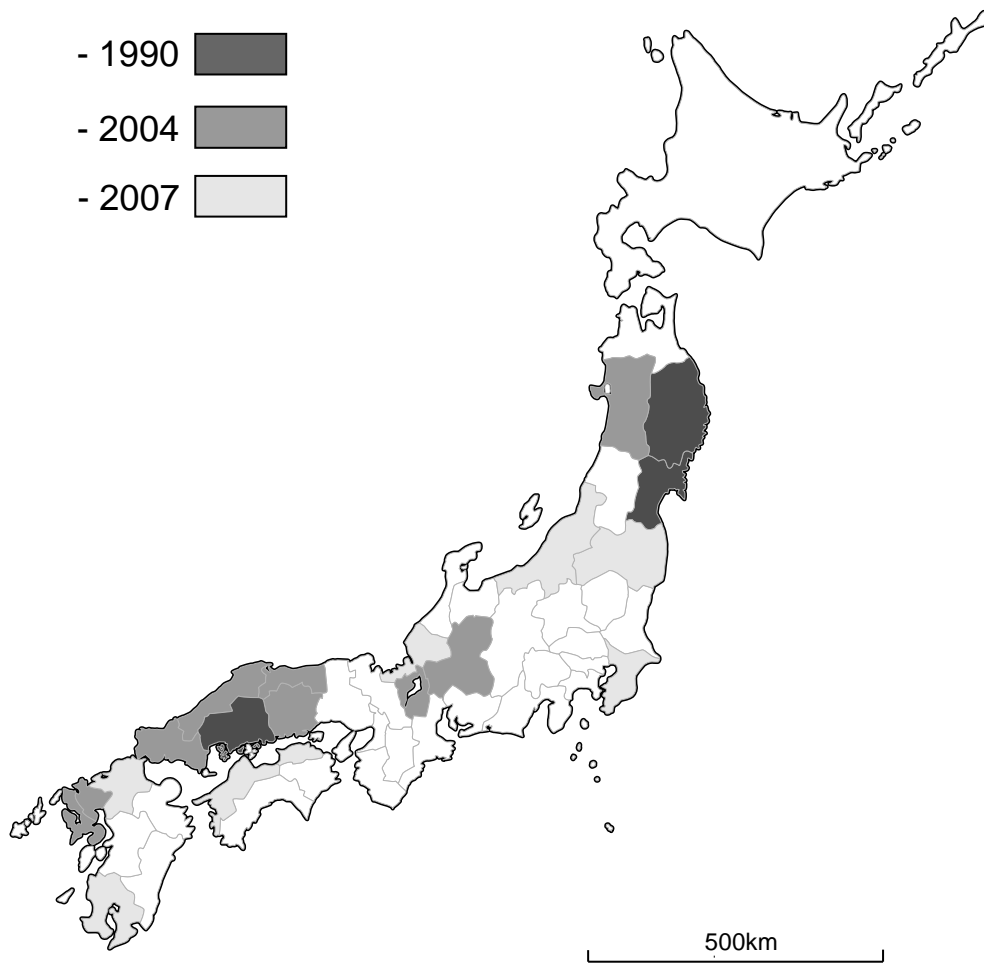


Figure 2 Outbreak years of the sorghum plant bug *Stenotus rubrovittatus* in Japan based on the data from Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.

第1章 遺伝的多様性調査のためのマーカーの整備

緒言

ミトコンドリア DNA

ミトコンドリア DNA は、母性遺伝するため遺伝様式が単純で解析しやすいこと、進化が速く種内変異が大きいこと、組換えがほとんど起きないことから遺伝的多様性の研究に適しており、集団遺伝学における遺伝的多様性の調査において広く使われている (Avice, 1996⁵; Avice, 2000⁶)。本研究ではアカスジカスミカメのミトコンドリア DNA にコードされるチトクローム *c* オキシダーゼサブユニット I (cytochrome *c* oxidase subunit I) 遺伝子 (*COI*) を解析対象とし、同遺伝子の塩基配列を個体ごとに 1,000 塩基以上決定し、各地域個体群の遺伝的多様性を解析することとした。そのためには、まず本種の *COI* をクローニングして種の標準となる塩基配列を決定し、さらに、個体別の塩基配列の決定に必要となる PCR (Polymerase chain reaction) 用のプライマーを設計する必要がある。アカスジカスミカメの *COI* 遺伝子配列についてはこれまで報告がなく、Miridae に属する種についても 1,000bp 以上の *COI* 遺伝子についてはデータベース上に登録がないため、既知の複数の昆虫種の *COI* 塩基配列を参考に degenerate PCR 法によってアカスジカスミカメの *COI* をクローニングすることにした。

マイクロサテライトマーカー

マイクロサテライトは、原核生物と真核生物のゲノム DNA に存在する 1–6 塩基単位の繰り返し配列である。マイクロサテライトの繰り返し数は、DNA の複製時の間違いに由来する多型が存在し (Schlötterer & Tautz, 1992⁹³)、同一の集団由来の個体間においても高い頻度で多型があることと、共優性マーカーであることなどから集団遺伝

学における遺伝的多様性の解析に適している（Estoup & Angers, 1998²⁵）。一方、マイクロサテライトは種特異的に存在するため、新規の生物種においてマイクロサテライトマーカーを利用するためには、まず当該種において新たにマーカーの単離を行う必要がある。マイクロサテライトマーカーの単離は労力がかかる上、ゲノム DNA 上のマイクロサテライトの数は生物種間で異なるために、得られるマーカー数は種によって大きく異なる（Zane et al., 2002¹²⁹）。さらに、単離したマイクロサテライトを集団遺伝学で利用するためには、個々のマイクロサテライトの変異の性質が解析に必要な条件を満たすことを、複数の個体からなる標準個体群であらかじめ確認しておく必要がある。本研究においては、アカスジカスミカメの遺伝的多様性の解析に利用可能なマイクロサテライトマーカーを 8 つ以上単離することとした。新規のマイクロサテライトマーカーを効率よく単離する方法として、FIASCO（First Isolation by Amplified fragment length polymorphism (AFLP) of Sequences Containing repeats; Zane et al., 2002¹²⁹）法がある。FIASCO 法は、ビオチン標識したマイクロサテライト配列の DNA プローブをゲノムライブラリー内のマイクロサテライトを含む DNA 断片とハイブリダイズさせ、マグネットで吸着して回収して、マイクロサテライトとその周辺領域を含む DNA 断片を得る方法である（Figure 3）。

材料と方法

1. ミトコンドリア COI 遺伝子のクローニングとプライマーの設計

COI の全アミノ酸配列が報告されている既知の昆虫種 5 種 *Drosophila yakuba* (GenBank アクセッション番号 P00400, 512 aa)、*Locusta migratoria* (GenBank アクセッション番号 Q36421, 512 aa)、*Ostrinia nubilalis* (GenBank アクセッション番号 AAL66239, 511aa)、*Rhipicephalus sanguineus* (GenBank アクセッション番号 O99818, 512 aa)、*Blattella germanica* (GenBank アクセッション番号 AAB31450, 508 aa) についてアミノ酸配列を比較し、完全に一致した 8–19 アミノ酸残基の位置と、420–444 アミノ酸残基の位置にディジェネレート PCR 用のプライマーを設計した (Figure 4)。設計されたプライマーは COI-DF (5'-ACNAAYCAYAARGAYATYGG-3') と COI-DR (5'-AARTGYTGNGGRAARAANGT- 3') である。

秋田県大仙市四ツ屋の東北農業研究センター敷地内 (39°29' N, 140°30' E) で採集したアカスジカスミカメ成虫から DNA を抽出した。抽出には GenomicPrep Cells and Tissue DNA isolation kit (GE Healthcare) をキットのプロトコルに従って用い、得られた DNA 産物は 100 µL の TE (10 mM Tris-Cl / 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。

アカスジカスミカメの DNA をテンプレートにし、プライマー COI-DF と COI-DR を用いて PCR 法を行い、本種の COI 遺伝子断片を増幅した。PCR は、50–100 ng のゲノム DNA と 0.75 ユニットの *Taq* DNA polymerase, recombinant (インビトロジェン) を、最終濃度が 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.5 µM 各オリゴヌクレオチドプライマーとなるように調製した溶液に加え、全量 30 µL のスケールで行った。反応条件は 94 °C 1 分間を 1 サイクル、94 °C 30 秒間 (熱変性) ・ 49 °C 30 秒間 (アニーリング) ・ 72 °C 2 分間 (伸長反応) を 32 サイクル行った後 72 °C 5 分間を 1 サイクル行った。PCR 終了後の溶液 4 µL を 1.2% のアガロースゲルを用いて DNA マーカー (200 bp DNA Ladder, タカラバイオ) とともに 100 V で 30 分間

電気泳動した。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、波長 275 nm の紫外線の存在下で DNA 増幅の有無とサイズを観察した。

アガロースゲルから目的のサイズの DNA 断片を切り出し、プラスミドにクローニングして大腸菌に導入して、アガロースプレートで分離培養した。クローニングには TOPO TA クローニングキットと大腸菌株 TOP10（インビトロジェン）を用いた。得られた大腸菌のコロニーを M13 プライマー（5'-AGTCACGACGTTGTA-3'）と M13RV プライマー（5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'）で PCR を行って増幅したのち、目的のバンドを精製し、塩基配列を決定した。PCR は、上記の PCR 法を基本にして各プライマー濃度を 0.5 μ M に、反応条件のアニーリング温度を 55 $^{\circ}$ C に、サイクル数を 30 回に変更して行った。DNA の精製は GeneClean III（MP Biomedicals）を用いた。塩基配列の決定は、上記の M13 プライマーおよび M13RV とシーケンス用キット BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いて行い、ジェネティックアナライザー ABI PRISM 310（Applied Biosystems）で塩基配列の解析を行った。それぞれの実験操作は、メーカーのプロトコルに従って行った。

得られたアカスジカスミカメ *COI* 遺伝子の DNA 断片の配列は 1 kbp 以上あり、個体別に配列の全長を解析するためには、分割してジェネティックアナライザーで解析する必要があるため、DNA 配列の内部に 4 つのプライマー（COI-F1, COI-F2, COI-F3, COI-R2）を設計した（Figure 5, Table 1）。まず、両端の 2 つのプライマー COI-F1 と COI-R1 を用いて本種の *COI* 遺伝子断片を増幅し、これらのプライマーと内部の 2 つのプライマー COI-F2, COI-F3 を用いてシーケンスを行った。得られた 4 つの配列は、アセンブルソフトウェア ATSQ（ゼネティックス）を用いて接続し、各個体に固有の *COI* 遺伝子配列とした。

2. マイクロサテライトマーカーの整備

マイクロサテライト配列の単離

マイクロサテライトの単離と評価に用いるアカスジカスミカメ成虫は、秋田県大仙市四ツ屋の東北農業研究センター敷地内で採集した。ゲノム DNA の抽出には GenomicPrep Cells and Tissue DNA isolation kit (GE Healthcare) を用い、プロトコルに従って各成虫から個体別に DNA を抽出した。

このうち 1 個体分の DNA について、制限酵素 *Mse* I (New England BioLabs) で切断したのち、各 DNA 断片の両端に AFLP アダプター (5' -GACGATGAGTCCTGAG-3' / 5' -TACTCAGGACTCAT-3') をライゲートした。ライゲーションには DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (タカラバイオ) をプロトコルに従って用いた。合成産物をテンプレート DNA にして、AFLP プライマー (5' -GATGAGTCCTGAGTAA-3') を用いて PCR を行い、AFLP アダプターで挟まれた DNA 断片を増幅した。PCR は、50–100 ng のゲノム DNA と 0.75 ユニットの *Taq* DNA polymerase, recombinant (インビトロジェン) を、最終濃度が 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0.5 μM 各オリゴヌクレオチドプライマーとなるように調製した溶液に加え、全量 30 μL のスケールで行った。反応条件は 94 °C 1 分間を 1 サイクル、94 °C 30 秒間 (熱変性) ・ 55 °C 30 秒間 (アニーリング) ・ 72 °C 2 分間 (伸長反応) を 30 サイクル行った後、72 °C 5 分間を 1 サイクル行った。

以下の 4 つの DNA プローブ (AC)₁₀, (AG)₁₀, (AC)₁₇, (AG)₁₇ を合成し、それぞれについて 3' 末端をビオチン標識した。ビオチン標識には Biotin 3' End DNA Labeling Kit (PIERCE) を用いた。5×バッファー 5 μL、Biotin-11-UTP 5 μL、TdT 5 μL、合成 DNA プローブ 5 μM に DW (Distilled water) を加えて合計 50 μL の反応液を作り、37 °C で 30 分間反応した後、0.5 M EDTA を 1 μL 加えて反応を終了させた。反応液をクロロホルム・イソアミルアルコールで精製した後 50 μL の DW に溶解した。

これらの標識プローブを、上記の AFLP アダプターで増幅した PCR 産物とハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションは、標識プローブ 25 μL 、PCR 産物 2 μL 、20 \times SSC 10.5 μL 、10% SDS 0.35 μL 、DW 12.15 μL を混合した合計 50 μL の溶液中で 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 分間反応させたのち、室温で冷却して行った。プローブにハイブリダイズした DNA 断片はストレプトアビジンでコーティングされたマグネットビーズ (Roche) を用いて回収した。TEN₁₀₀ 溶液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、100 mM NaCl)、TEN₁₀₀₀ (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、1M NaCl) をそれぞれ 10 mL とストリンジェンシーウォッシュ液 (0.2 \times SSC、0.1% SDS) を 3 mL 調製した。ハイブリダイズ後の溶液 50 μL 、マグネットビーズ 10 μL 、TEN₁₀₀ 溶液 280 μL を混合し室温で 30 分間おいたのち、400 μL の TEN₁₀₀₀ 溶液で 3 回洗浄した後、さらに 400 μL のストリンジェンシーウォッシュ液で 3 回洗浄した。マグネットビーズは 50 μL の TE に溶解した後 95 $^{\circ}\text{C}$ に 5 分間おいてマグネットビーズを沈殿させた後、上清 45 μL を回収してイソプロパノールと酢酸ナトリウムで沈殿させて精製した。得られた DNA は 75% エタノールで洗浄した後、50 μL の DW に溶解した。この DNA を *Mse*I-N プライマー (5'-GATGAGTCCTGAGTAAN-3') を用いて PCR 増幅し、pCR4.2 クローニングベクター (インビトロジェン) にサブクローニングした。得られた大腸菌コロニーから 132 個を選び、M13 と M13RV プライマーを用いてプラスミドに挿入された DNA 断片を PCR 増幅して塩基配列を決定した。

得られた塩基配列を解析し、回収した DNA 断片にマイクロサテライトが含まれるかを調査した。マイクロサテライトを含む DNA 配列について、マイクロサテライトを増幅するためのプライマーを配列内に設計した。プライマーの設計には PRIMER3

(Rozen & Skalestky, 2000⁹¹) を用いた。設計したプライマーを用いてゲノム DNA をテンプレートにして PCR を行った。PCR は上記と同じ反応溶液中で行い、反応条件は 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 分間を 1 サイクル、94 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間 (熱変性) ・ 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間 (アニーリング) ・ 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒間 (伸長反応) を 35 サイクル、72 $^{\circ}\text{C}$ 10 分間を 1 サイクルとした。増幅産物をアガロースゲル電気泳動し、DNA 増幅の有無とサイズを確認した。サイズがプライマー設計時の予測と一致した増幅 DNA 産物については再度クローニングを行い、塩基

配列を決定して DNA 断片の内部に目的のマイクロサテライトモチーフを含むことを確認した。

単離したマイクロサテライトマーカークの評価

マイクロサテライトマーカークを遺伝的多様性の解析に使用するためには、それぞれのマイクロサテライトがゲノム DNA 上からユニークに増幅されること、増幅された DNA 断片の長さが、ジェネティックアナライザーABI PRISM310 で解析可能な約 100–300 bp の範囲内にあること、個体間に十分な多型があること、各マイクロサテライトが遺伝的に連鎖していないことなどの条件を満たす必要がある。今回単離したアカスジカスミカメのマイクロサテライトマーカークがこれらの条件を満たすか否かを評価するため、22 個体からなる大仙市個体群について、マイクロサテライトマーカークの多型を解析した。

各マイクロサテライトマーカークを増幅する 2 つのプライマーのどちらか一方について、5'末端を蛍光色素 6-FAM, HEX, NED の 3 種のうちのひとつで標識した。標識プライマーは 6-FAM と HEX についてはファスマック社で、NED については Applied Biosystems 社で合成した。これらのプライマーを用いて、それぞれのマイクロサテライトをゲノム DNA から PCR 法で個体別に増幅した。PCR 条件は上記と同一とした。DNA の増幅断片長を正確に測定するため、マイクロサテライト配列を含む PCR 増幅産物をサイズマーカーク (GeneScan 500 ROX Size Standard, Applied Biosystems) と混合し、ジェネティックアナライザーABI PRISM 310 で泳動した。泳動には 46 cm のショートキャピラリーと POP-4 ポリマーを使用した。得られた波形を解析ソフトウェア GENESCAN 3.1.2. (Applied Biosystems) で解析し、各 DNA 断片の塩基数を決定した (Figure 6)。

大仙市個体群のマイクロサテライトマーカークの塩基数をすべて集計してデータセットを作成し、GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995⁸⁹) を使用してヘテロ接合度 (Heterozygosity) を推定した。また、これらのマーカークの多型がハーディ・ワインバ

ーグ平衡から逸脱しているか否かを検定した。ハーディ・ワインバーグ平衡からの逸脱する場合は、ヌルアレルが存在する可能性が考えられる。ヌルアレルとは、ゲノム上に存在するにもかかわらず PCR 法で増幅されないマイクロサテライト多型であり、プライマーを設計したマイクロサテライト領域の周辺領域の多型や、長すぎるマイクロサテライト反復によって PCR 増幅が正しく行われないことが原因であると考えられている (Grimaldi & Crouau-Roy, 1997³⁴)。ヌルアレルの割合が高すぎると集団遺伝学的解析の障害となるため、ヌルアレルの有無と割合をソフトウェア MICRO-CHECKER (van Oosterhout et al., 2004¹¹⁴) を用いて推定した。また、各マイクロサテライトが遺伝的に連鎖していないことを確認するため、マイクロサテライト間の連鎖の有無を GENEPOP 3.4 を用いて検定した。

結果

1. ミトコンドリア *COI* 遺伝子のクローニングとプライマーの設計

他の昆虫種の *COI* のアミノ酸配列をもとに設計したディジェネレート PCR 用のプライマー COI-F1 と COI-R1 によって、アカスジカスミカメの DNA から約 1,260 bp の DNA 断片が増幅された。これは、他種の *COI* の配列から予測されたサイズと一致した。クローニング後のシーケンスの結果、この DNA は確かにアカスジカスミカメのミトコンドリア *COI* 遺伝子であると推定された。*COI* 遺伝子の内側に設計された 2 つのプライマー (COI-F1, COI-R1; Table 1) はアカスジカスミカメにおいて予想通り 1,200 bp の DNA 断片を増幅した。この DNA 断片をテンプレートに、プライマー COI-F1, COI-R1 および内側のプライマー COI-F2, COI-F3 のプライマーを用いて得た各シーケンスデータは互いに配列が重なることから、コンピュータ上で接続して 1 つの *COI* 遺伝子配列とした。得られた *COI* 遺伝子断片配列のうち、プライマーとその周辺の領域を除いた 1,032 bp を本研究の解析対象とした。

2. マイクロサテライトマーカの整備

マグネットビーズで回収して配列を決定した DNA 断片 132 のうち、約 70% にあたる 92 は AC, AG または TTC のマイクロサテライトを含んでいた。このうち、同一の遺伝子座に由来するものを除外すると 62 の独立したマイクロサテライトが単離された。さらに、マイクロサテライト配列の両端にプライマーを設計できたものは 27 だった。十分な長さのマイクロサテライトモチーフを持ち、確実に増幅できるマイクロサテライトマーカを 10 個選んだ。大仙市個体群における多型解析の結果、このうち 1 個は多型が存在しなかったため、本種の遺伝的多様性の解析に使用可能と考えられるマイ

クロサテライトマーカーは最終的に9個だった (Table 2)。これらのマイクロサテライトマーカーは GenBank に登録した (アクセッション番号 AB331247–AB331255, AB360388)。

大仙市個体群の解析の結果、各マイクロサテライトマーカーのアリル数は4から28だった。また、ヘテロ接合度は0.27から0.86の間であり、SrA21、SrC13、SrC61の3つについて有意なハーディ・ワインバーグ平衡からの逸脱が認められた ($p < 0.01$)。これらのマイクロサテライトについて各個体の増幅状況を見ると、全くDNAが増幅されない個体が複数存在した。それらの個体においては他のマイクロサテライトの増幅は成功していることから、これら3個のマイクロサテライトについてはヌルアリルの存在が疑われた。MICRO-CHECKER による解析の結果、SrA21は16.0%、SrC13は14.1%、SrC61は14.7%の割合でヌルアリルが存在すると推定された (Oosterhout の推定式、van Oosterhout et al., 2004¹¹⁴)。マーカー間の遺伝的連鎖は観察されなかった ($p > 0.05$)。

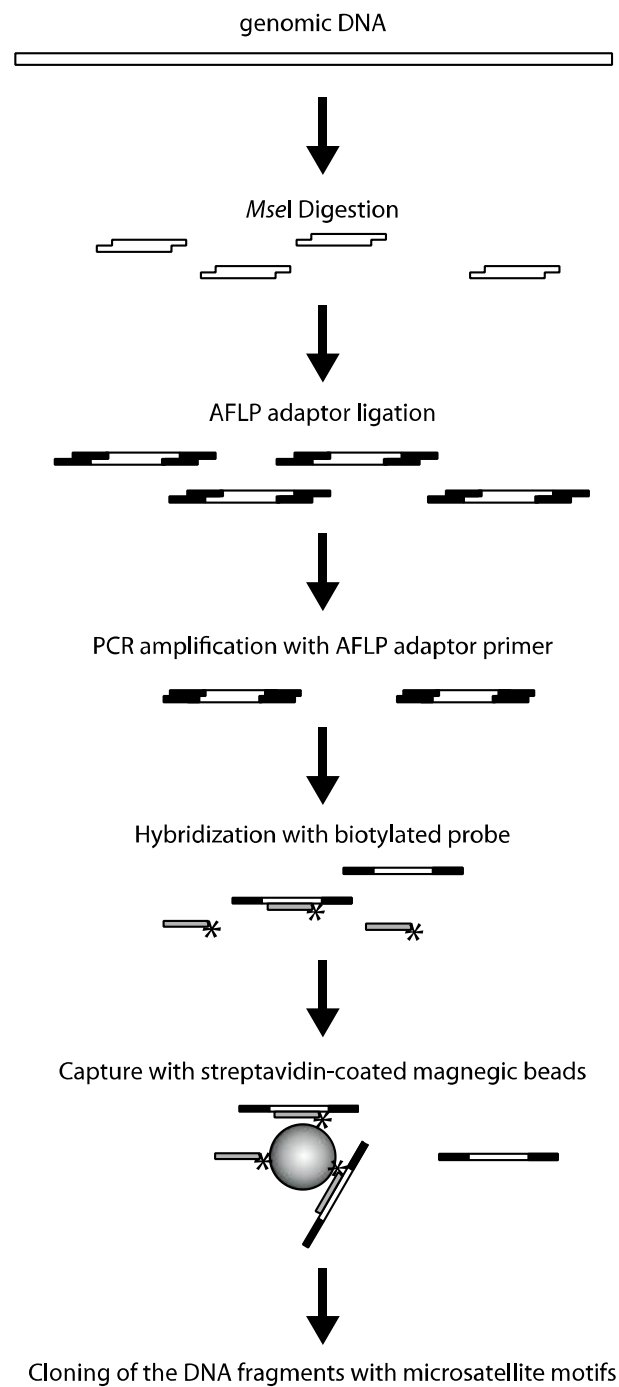


Figure 3 Schematic representation of the development of microsatellite markers for *Stenotus rubrovittatus* using FIASCO (Zane et al. 2002¹²⁹).

a) Forward primer

Location (aa)	...8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19...
Amino acid sequence	S	T	N	H	K	D	I	G	T	L	Y	F
Potential DNA sequence	TCT	ACT	AAT	CAT	AAA	GAT	ATT	GGT	ACT	TTA	TAT	TTT
	TCC	ACC	AAC	CAC	AAG	GAC	ATC	GGC	ACC	TTG	TAC	TTC
	TCA	ACA						GGA	ACA	CTT		
	TCG	ACG						GGG	ACG	CTC		
	AGT									CTA		
	AGC									CTG		
	AGA											
	AGG											
Designed primer	5'-ACN AAY CAY AAR GAY ATY GG-3'											

b) Reverse primer

Location (aa)	...420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431...
Amino acid sequence	V	N	L	T	F	F	P	Q	H	F	L	G
Potential DNA sequence	GTT	AAT	TTA	ACT	TTT	TTT	CCT	CAA	CAT	TTT	TTA	GGT
	GTC	AAC	TTG	ACC	TTC	TTC	CCC	CAG	CAC	TTC	TTG	GGC
	GTA		CTT	ACA			CCA				CTT	GGA
	GTG		CTC	ACG			CCG				CTC	GGG
			CTA								CTA	
			CTG								CTG	
Designed primer	5'-ACN TTY TTY CCN CAR CAY TT-3'											
	3'-TGN AAR AAR GGN GTY GTR AA-5'											

Figure 4 Design of primers for the degenerate PCR to amplify the partial regions of *COI*. Consensus amino acid sequence was obtained from the complete *COI* sequences of five insect species on GenBank.

F1 →
 1 CATTTTTGGG ATATGAGCAG G ATATTAGG AACCTCACTT AGATGAATTA TTCGAATCGA ATTAGGTATA CCAGGATCAT 8
 81 TTATTGGAGA TGATCAAACA TATAATGTAG TAGTAACAGC ACATGCATTT ATCATAATTT TTTTATAGT TATACCAATT 16
 161 ATAATTGGAG GATTTGGAAT TTGATTAGTA CCATTAATAA TTGAGCACC AGATATAGCA TCCCACGAA TAAATAATAT 24
 241 AAGATTTTGA TTATTACCAC CATCAATTAC ATTATTAATT ATAAGTAGAA TTGTTGAAAA TGGGGCAGGA A TGGGATGAA 32
 F2 →
 321 CAGTATACCC ACC TTATCA GCAAATATTT CACATAATGG AGCATCTGTA GATTAGCAA TTTTCTCACT CCATTTAGCA 40
 401 GGAGTATCAT CAATCCTAGG AGCTGTAAAC TTTATTTCAA CTATTATTAA TATACGACCA ACAGCAATAA TTGCTGAACG 48
 481 TATTCCTTTA TTTGTTTGGT CAGTAGGAAT TACTGCATTA TTATTATTAT TATCATTACC AGTATTAGCT GGAGCTATTA 56
 561 CTATATTATT AACAGATCGA AACTTTAATA CATCATTTTT TGACCCAGCA GGAGGAGGAG ATCCAATTCT TTATCAACAT 64
 F3 →
 641 TTATTTTGAT TTTTGGTCA CCCAGAAG T TATATTTTAA TTTTACCAGG ATTCGGATTA ATTTACATA TTGTAAGTCA 72
 721 AGAAAGAGGT AAAAATGAAG CATTTGGTTC ATTAGGAATA ATCTATGCCA TAATAACAAT TGGACTATTA GGATTTATTG 80
 801 TATGAGCACA TCATATATTT ACAGTAGGTA TAGATGTAGA TACACGAGCA TACTTTACAT CAGCAACTAT AATTATTGCT 88
 881 GTACCAACAG GAATTAAGAT TTTTAGATGA TTAGCTACTA TTCATGGCAC TAATATAAAT TATTGAGCAC CGATATTATG 96
 961 AAGATTAGGA TTCATTTTCC TATTCACAAT AGGAGGATTA ACAGGAGTAA TTCTTGCTAA TTCATCAATT GATATTATTT 104
 1041 TACATGATAC ATATTATGTA GTAGCCCAT TACCATTATG TTTATCTAT GGGAGCAGTA TTGCAATTA TTGGAAGATT 112
 *
 1121 TATTCAATGA TATCCATTAT TCACAGGATT AACATTAAAC CCAAATGAC TTAAAA TTCA ATTTTCACT ATATTCAATTG 120
 ← R1
 1201 GTG

Figure 5 DNA sequence of the *Stenotus rubrovittatus* cytochrome oxidase subunit I gene (*COI*). The locations of the primers used in this study are boxed. The 1,032 bp sequence between two asterisks (*) from each individual was analyzed.

Table 1 Four primers used in this study for sequencing the *COI* gene from each individual of *Stenotus rubrovittatus*.

Name	Sequence	Location*	Direction
F1	CATTTTTGGGATATGAGCAGGT	1	Forward
F2	GGATGAACAGTATACCCACCA	314	Forward
F3	TTTTTGGTCACCCAGAAGT	651	Forward
R1	CACCAATGAATATAGTGAAAAATTGA	1,203	Reverse

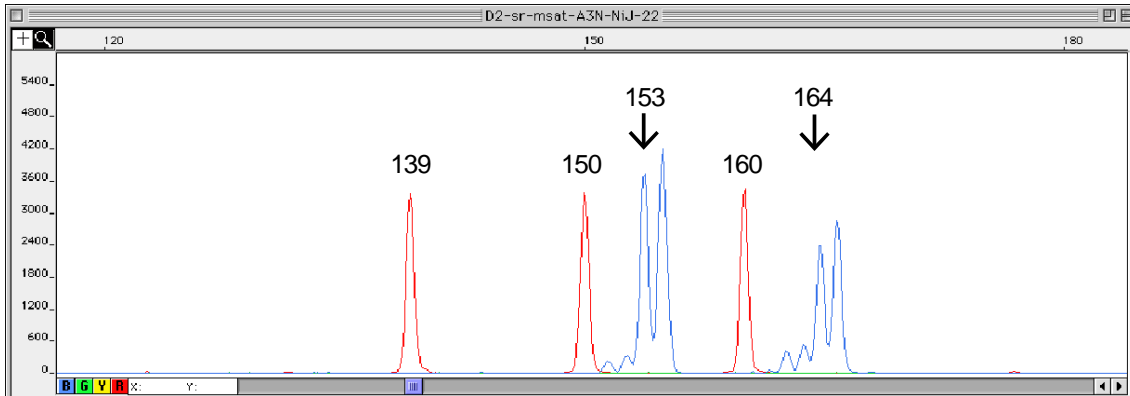


Figure 6 An example of analyses of DNA fragments containing microsatellite using GENSCAN software. Three peaks in red are from the size markers. Two blocks of the blue peaks indicate the two alleles of the microsatellite A3N in a *S. rubrovittatus* adult. Black arrows indicate the exact size of each allele, 153 and 164 respectively.

Table 2 Primer sequences and related information for *Stenotus rubrovittatus* microsatellite loci. N , sample size; N_A , number of alleles; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; Significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium (* $P < 0.01$, ** $P < 0.005$).

Locus	Primer sequence (5'-3') and fluorescent label	Repeat motif	N	N_A	Size Range	H_O	H_E	GenBank Accession no.
SrA03	F: AAATGGGCTAGATTCTTCCT R: [FAM] ATGGTCCTAATGACATCGAC	(CA) ₁₄	22	10	154–170	0.86	0.79	AB331247
SrA21	F: ATATCCATGTGAAAGAACG R: [HEX] CATTTC AACATTTCAGACCA	(AC) ₄ ... (AC) ₇	22	13	147–169	0.59*	0.88	AB331248
SrA32	F: TGGAAGGGACGGTAAAGTAT R: [NED] ATGTTTCGCAATTTGAGACT	(AG) ₈ ... (AG) ₂ (AG) ₂ (AG) ₅	22	6	195–206	0.41	0.59	AB331249
SrA33	F: [FAM] TCGCATATGTCCAAATGAATG R: CTTCTCCGCGTAAAGAGTGC	(GA) ₁₁	22	10	92–114	0.68	0.82	AB331250
SrA38	F: [NED] ATTCCGAATGTTCCCTCCAC R: GTCCACGCACCGTTTAT	(GA) ₂ .. (GA) ₄ .. (GA) ₄	22	2	107–109	0.41	0.50	AB331251
SrC05	F: ACGAATTACTTGATCGTTCCTTG R: [FAM] TGTTTCCTTG TGACGTACCG	(CA) ₃ (CA) ₇	22	4	171–201	0.27	0.25	AB331252
SrC13	F: [HEX] CACGATCAACTGGACAACC R: TCGAAATGCACTCGAGAACC	(AC) ₉ ... (AC) ₆ ... (AC) ₆ .. (AC) ₇	22	20	80–195	0.64**	0.90	AB331253
SrC61	F: TTTCCCTCGAAAGAAACAACA R: [HEX] TCATCGTGACAGGAAAATCAG	(CAA) ₅ ... (CAA) ₂ (CAA) ₃	22	10	212–252	0.57**	0.84	AB331255
SrD38	F: [HEX] TTTTCAATGATATACCTTCAAGTGC R: TCAAATAGGAGGGTTTTTGAGG	(CA) ₉	22	28	63–143	0.82	0.97	AB360388

考察

アカスジカスミカメの遺伝的多様性について、ミトコンドリア DNA と核 DNA の 2 種類の分子マーカーを用いて明らかにするため、ミトコンドリア *COI* 遺伝子のクローニングと核 DNA 上のマイクロサテライトマーカーの整備を行った。

ミトコンドリア DNA は変異の速度が速く、有効集団サイズが核 DNA の $1/4$ と小さいために近年の遺伝的変化を検出しやすい。また、半数体であるためクローニングなしに多型を検出でき、組換えもまれであるため一部の配列の解析からミトコンドリア DNA 全体の進化を推測できる。*COI* はすべての真核生物種のミトコンドリア DNA 上に存在し、多くの生物種でその配列が明らかにされていることから、新規の種からのクローニングが容易であり、得られたデータを他種のデータと比較する際に適している。しかし、本研究では日本国内という地理的に限られた範囲内での遺伝構造の解析となるため、短い塩基長の解析では十分な多型を得られない可能性がある。そのため、1,032 bp という比較的長い領域を解析することで問題の克服を図った。一方、ミトコンドリアは母性遺伝することから、ミトコンドリアの遺伝的多様性は種の進化というよりはむしろ雌の進化を表すに過ぎない。さらに、ミトコンドリア DNA はそれ自身が自然選択を受けるだけでなく、母性伝搬する細胞内共生微生物による間接的な選抜を受けることが知られている。これらの要因から、ミトコンドリア DNA のみから地域個体群の遺伝的解析と考察を行うことは不十分であると指摘がされている (Hurst & Jiggins, 2005⁴²)。

両性遺伝する核 DNA は生物種の遺伝情報の本体であり、集団遺伝学における核 DNA の解析はミトコンドリア DNA と並んで重要である。マイクロサテライトマーカーは共優性マーカーであり、自然選択に対して中立であると考えられること、ゲノム上にランダムに存在することから、種全体の進化をかなり正確に反映すると考えられる。本研究においてアカスジカスミカメから単離した 9 つのマイクロサテライトマーカーは十分なアリル数を持つことから、本種の遺伝的多様性の解析に有効であると考え

えられた。しかし、このうちの3つからはヌルアリルの存在が示唆された。長さが検出できない多型として検出されるヌルアリルの存在は、遺伝的構造の解析の制約となる。ヌルアリルが生じる原因のひとつに、マイクロサテライト周辺の塩基配列に変異があるために設計したプライマーが正しくアニーリングしないことがあげられる

(Grimaldi & Crouau-Roy, 1997³⁴)。ヌルアリルは、多くの生物種のマイクロサテライトマーカーで見つかっており、昆虫種のマイクロサテライトマーカーにおいてもチョウ目やハエ目、バッタ目において特に高い割合で存在する (Orsini et al., 2008⁸³; Chapuis et al., 2008¹⁴)。カメムシ目 (Hemiptera) に属する種においてマイクロサテライトマーカーを単離した研究は多くないが、例えばタバココナジラミ *Bemisia tabaci*

(Hemiptera: Aleyrodidae) においてもヌルアリルが高い割合で検出されている報告があり (Tsagkarakou & Roditakis, 2002¹¹³)、アカスジカスミカメにおいてもヌルアリルを排除することは難しいと考えられる。ヌルアリルを含むマイクロサテライトマーカーは個体間・個体群間の遺伝的分化の推定において、感度を低下させることが問題となる。また、ヌルアリルが存在するマーカーでは、見かけ上ホモ接合度の割合が高くなり、ハーディ・ワインバーグ平衡からの逸脱が検出されやすくなる。ヌルアリルの存在によるヘテロ接合度の偏りは、ボトルネック効果などの生態学的原因によるハーディ・ワインバーグ平衡からの逸脱と区別がつかないため、このようなマーカーを使用して得られた集団遺伝学的解析には注意が必要である (Chapuis & Estoup, 2007¹¹)。一方、Dakin & Avise (2004²¹) は、ヌルアリルの割合について 0.2 以下であれば、集団遺伝学的な解析において大きな悪影響はないとしている。また、ベイズ法によるクラスタリング解析は、伝統的な Wright (1951¹¹⁹) の F 統計量を用いた解析よりもヌルアリルの影響を受けにくい (Orsini et al., 2008⁸³)。アカスジカスミカメの大仙市個体群におけるヌルアリルは最大 16.0% であり、本研究の目的ににも十分使用可能であると考えられる。

第2章 全国レベルでの遺伝的多様性の検討

緒言

日本におけるアカスジカスミカメの分布は九州から北海道南端部である（安永ら，2001¹²³）。本種による斑点米の被害が報告された地域はこれらの分布域全体に分散しているため、斑点米被害の拡大と地域個体群の遺伝的多様性の関係を解析するためには、広範に地域個体群をサンプリングする必要がある。また、サンプリングした地点で本種の生息が初めて確認された時期や、斑点米被害が出現した時期の情報を同時に収集できれば、被害の拡大過程の解析に役立つ。本種は水稻害虫であるが、繁殖場所は水田外のイネ科植物が繁茂している場所であるから、調査は水田の他、水田周囲の雑草地や牧草地も含まれる。採集場所の植生を記録し、サンプルの寄主植物を明らかにしておくことで、寄主植物による系統分化や特定の寄主植物で増殖する加害個体群の発生の可能性（Mopper, 1996⁷⁰）を検証することも可能となる。さらに、本種においては、水田が周囲に存在しないため害虫個体群とは無関係と思われる生息地も確認されている。参考のため、これらも地域個体群のサンプリング場所とした。採集場所は全国にわたるため、それぞれの県の虫害防除関係者の協力を要請した。その際、採集方法やサンプルに関する情報を統一するため、採集の手順を厳密に決定し、記入用のシートを用意しておくなどの工夫を行った。得られたサンプルについて、第1章で開発した DNA マーカーを用いて各サンプルの遺伝的多様性の解析を行い、各サンプリング地点の情報と合わせることで、本種の加害個体群の遺伝的關係と、害虫化のプロセスが明らかになると考えられる。

材料と方法

1. アカスジカスミカメ地域個体群のサンプリング

2005 年 8 月から 2008 年 9 月にかけて、日本国内の 34 地点においてアカスジカスミカメ成虫のサンプリングを行った。2005 年は東北地方における予備的なサンプリングを行い、2006 年は大規模なサンプリングを、2007 年と 2008 年は補足的なサンプリングを行った。サンプリングは各県の試験場・防除所の虫害関係者や、独立行政法人の虫害の研究者にお願いした。ひとつのサンプルに同親由来の個体が多く含まれないよう、成虫は少なくとも 50 m²以上の面積からまんべんなく採集し、成虫のみを解析対象とした。また各サンプルに関する情報を比較可能な形で収集するため、サンプルシートのテンプレートを作成し、サンプリングの協力者にこれを記入してもらうことで必要な情報を確実に収集できるようにした。サンプリングは捕虫網を用いて行い、捕獲後の虫は速やかに 70–100%のエタノールで保存した後、東北農業研究センターに移送して-20℃の冷凍庫で保存した。原則として 20 個体以上解析できる地域個体群について解析を行った。採集地点の植生は採集者の記録をもとに、イタリアンライグラス圃場あるいはイタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* L.) を主体とした雑草地 (L)、その他の雑草地 (G)、水田 (R) の 3 種に分類した。採集地点・年・植生と採集者を Table 3、Table 4 に、日本列島における位置を Figure 7 に示した。

2. ミトコンドリア COI 遺伝子の解析

サンプリングした個体について、第 1 章で記した方法に従ってミトコンドリア COI の塩基配列を個体別に解析し、1,032 bp の塩基配列を得た。これらデータについて以下の集団遺伝学的な解析を行った。各個体群のサンプルについて、Nei のハプロタイプ多様度 (Haplotype diversity; Nei, 1987⁷⁴) と、各組合せの固定指数 (pairwise F_{ST} ; Weir & Cockerman, 1984¹¹⁸) を計算した。計算には ARLEQUIN 3.2 (Excoffier et al., 2007²⁸) を用いた。遺伝的交流と遺伝的浮動が各地域個体群の遺伝構造に与える影響は、遺伝的距離と地理的距離の関係を調査することで知ることができる (Huchinson & Templeton, 1999⁴³)。この解析を行うため、各地域個体群間の遺伝的距離として Slatkin の線形化固定指数 (Linearized F_{ST} ; Slatkin, 1995⁹⁹) を、地理的距離として物理距離 (km) の対数を求めて、それぞれについて 34 列×34 行の距離行列を作成したのち、マンテルテスト (Mantel, 1967⁶⁷) によって 2 つ指標の相関を求めた。線形化固定指数の計算には ARLEQUIN 3.2 を使い、マンテルテストの計算には FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995³³) を用いた。ハプロタイプ多様度は北の個体群ほど高い傾向が見られたので、ハプロタイプ多様度と緯度の Spearman の相関係数を求めた。計算には統計解析ソフト R (R Ver 2.9.0; R Development Core Team, 2005⁸⁸) を用いた。

各個体群が中立的な分子進化を経ているかを調べるため、Tajima の D 検定 (Tajima, 1989¹⁰⁴) と Fu の F_S -test (Fu, 1997³¹) を行った。 D 検定は、多型のあるサイトの数と平均塩基置換数の関係から、サンプルの中立進化からの逸脱を検定する統計的手法で、稀なハプロタイプの数塩基置換と遺伝的浮動の平衡状態と比較して過剰にあるとき、 D は負となる。一方、 F_S 検定は、ハプロタイプ頻度の分布から中立進化からの逸脱を検定する手法である。両検定法はともに集団の急激な拡大や、極端な遺伝的浮動、自然選択の存在を検出できるが、とくに F_S 検定は集団の拡大に対する検出力が高い (Fu, 1997³¹)。これらの検定は ARLEQUIN 3.2 を用いて行った。塩基配列の違いを元にしたハプロタイプ間の関係は、TCS 1.21 (Clement et al., 2000¹⁶) によって可視化した。

3. マイクロサテライトマーカの解析

第1章で開発と評価を行ったマイクロサテライトマーカのうち、A03, A32, A33, A38, C5, C61の6つを用いて個体別に解析を行った。DNA抽出、マイクロサテライト領域の増幅のための標識プライマーとPCR、ジェネティックアナライザーによる泳動と多型解析は、第1章の実験と同一の条件で行った。マーカ間の遺伝的連鎖の有無とハーディ・ワインバーグ平衡からの逸脱はGENEPOPで検定した。ヌルアリの存在する可能性と割合の推定はMICRO-CHECKERで行い、Oosterhoutの推定値(van Oosterhout et al., 2004¹¹⁴)を用いた。アリのヘテロ接合度観測値(Observed Heterozygosity; H_o)とヘテロ接合度期待値(Expected Heterozygosity; H_e)および固定指数 F_{ST} は、ARLEQUINを用いて推定した。各サンプルのアリの多様度から遺伝的多様性を示す指標であるAllelic Richness(R_s ; Kalinowski, 2004⁵⁰)と、各サンプルにおける独自のアリの多様度を表すPrivate Allelic Richness(PR_s , Kalinowski, 2004⁵⁰)はHP-RARE VER. 1.2(Kalinowski, 2005⁵¹)を用いて計算した。HP-RAREは、rarefaction(希薄化) methodを用いることで、サンプルサイズに影響されない指数を推定する。

4. クラスタリング解析と系統解析による遺伝的構造の推定

ベイズ法によるクラスタリング解析

ミトコンドリア DNA、マイクロサテライトおよびこの2つを合わせた多型データについて、各マーカーのアリル頻度に基づいてベイズ式クラスタリングを行った。クラスタリングは BAPS 5.2 (Guillot et al., 2005³⁵; Corander & Marttinen 2006¹⁸) を用いて行い、個体群ごとにプールしたデータに対する処理を行った。解析においては事前のクラスター分けを仮定せず、クラスター数を 2 から 10 までの間 1 きざみで変化させ、それぞれのクラスター数における事後確率を計算して、もっとも高い事後確率を得た値を最適なクラスタリング結果とした。計算は 10 回反復して行った。

系統樹の作製

ミトコンドリア DNA については、*COI* 遺伝子の塩基配列から計算した Pairwise F_{ST} に基に、ソフトウェア PHYLIP に含まれる NEIGHBOR の近隣接合法モデルを用いて系統樹を作成した。マイクロサテライトのデータについては、多型データをもとに Cavalli-Sforza & Edouard's (1967¹¹) の chord distance を求めた。計算は MICROSATELLITE ANALYSER (Dieringer & Schlötterer, 2003²⁴) を用い、10,000 回のブートストラップを行って得た。Chord distance は他の遺伝距離の指数と比較してヌルアリの影響を受けにくい (Chapuis & Estoup, 2007¹²)。得られた行列を NEIGHBOR で処理してそれぞれの系統樹を作成したのち CONSENSE をもちいてコンセンサスツリーを得た。次に、ミトコンドリア DNA と 6 つのマイクロサテライトデータを合わせた解析を行うため、それぞれのマーカーについて個体群別にアレル頻度のデータを作成し、これらを結合し 7 つのマーカーについて系統樹を作成した。PHYLIP に含まれる SEQBOOT でアレル頻度のデータを 10,000 ブートストラップ処理し、NEIGHBOR と CONSENSE を用いてコンセンサスツリーを得た。得られた系統樹は TREEVIEW 1.6.6 (Page, 1996⁸⁴) で可視化した。

AMOVA

ベイズ法によるクラスタリングで同定されたグループ間での遺伝的隔離を検証するため Analysis of Molecular Variance (AMOVA: Excoffier et al., 1992²⁶) を行った。AMOVA は、遺伝的多型の分布を、グループ間、グループ内の個体間、個体間の3つのカテゴリーに分けて解析する。AMOVA の計算は、ARLEQUIN 3.1 を用いて行った。また、サンプリング地点の植生によるグループ分けを行い、植生の異なる採集地の集団の間の遺伝的分化が検出されるか否かも AMOVA で検証した。グルーピングの詳細は Table 5 に示した。

結果

1. アカスジカスミカメ地域個体群のサンプリング

日本におけるアカスジカスミカメの分布域をほぼ網羅する 34 地点について、遺伝的多様性の解析に十分な数の個体数をサンプリングした。34 地点の植生は 20 地点が雑草地、12 地点がイタリアンライグラス、2 地点が水田だった。本種の初確認年が明らかなサンプリング地点はほとんどなかった。

2. ミトコンドリア COI 遺伝子の解析

671 個体（各地域個体群平均 19.7 個体）のミトコンドリア COI の塩基配列を解析した結果、39 のハプロタイプが見つかった。すべてのハプロタイプにおいて塩基の挿入と欠失はなかった。塩基置換は 40 のトランジションと 5 のトランスバージョンからなり、そのうち 9 か所はアミノ酸の置換を伴っていた（Figure 8）。39 のハプロタイプのうち 10 ハプロタイプは異なる個体群で共有されていたが、29 ハプロタイプはそれぞれただひとつの個体群にのみ存在した。塩基配列の差異に基づいたハプロタイプのネットワーク図からハプロタイプは大きく 2 つのグループからなることが明らかになり、それぞれ 20 個と 19 個のハプロタイプからなっていた（Figure 9）。2 つのハプロタイプグループを A 系統、B 系統と名付けてそれぞれの地理的分布を解析した。結果、A 系統に属する COI ハプロタイプを持つ個体はほぼ福島県、新潟県より北にのみ存在しており、北日本と北陸地方に固有のハプロタイプであることが明らかになった。一方、B 系統に属するハプロタイプを持つ個体は、すべての地域個体群に存在した（Table 6, Figure 10）。北日本の個体群は特異的なハプロタイプを数多く持っていた。例えば、ハプロタイプ B2 は 9 個体中 8 個体が東北地方以北に存在し、ハプロタイプ B1, B9 は、

複数個体がすべて北日本に存在した。一方、ハプロタイプ B7 は 7 個体全てが関東地方に存在するなど、関東地方特有の遺伝子型も存在した。南日本に特異的なハプロタイプは少なかった。ハプロタイプ多様度は北日本ほど高く、南に行くほど低かった (Table 7)。検定の結果、ハプロタイプ多様度と緯度との間には正の相関があった (Figure 11a, Spearman の順位相関検定; $R=0.84$, $P<0.0001$)。さらに、ハプロタイプ B 系統に属する個体のみを用いて検定しても同様にハプロタイプ多様度と緯度の間には正の相関があった (Figure 11b, Spearman の順位相関検定; $R=0.50$, $P<0.01$)。全個体群の F_{ST} は 0.442 だった。また、各個体群間の地理的距離と遺伝的距離には相関があり (Figure 12a, $R^2=0.11$, $P<0.001$)、この相関は B 系統に属する個体のみで解析しても同様に認められた (Figure 12b, $R^2=0.07$, $P<0.001$)。しかし、A 系統に属する個体のみの解析では、遺伝的多様性と緯度 ($R=0.05$, $P=0.82$)、あるいは距離 ($R^2=0.19$, $P=0.58$) の相関は認められなかった。

Tajima's D 検定と Fu's F_s 検定の結果どちらも有意の負の値を取り、アカスジカスミカメの個体群は、近年の急激な分布拡大か強い自然選択を経ていると考えられた (Table 8)。これらの検定を A、B 系統それぞれに属する個体のみで行ったところ、同様にそれぞれ負の値を得た (Table 8)。

3. マイクロサテライトマーカーの解析

679 個体 (各地域個体群平均 20.0 個体) についてマイクロサテライトマーカーの多型を解析した。各地域個体群の解析サンプル数、観察されたアリル数の平均、Allelic richness (R_S)、Private allelic richness (PR_S)、ヘテロ接合度観測値 (H_0)、ヘテロ接合度期待値 (H_E) を Table 9 に示した。34 個体群のうち、ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱が観察された個体群は 26 あった。また、調査したのべ 4,074 遺伝子座 (679 個体×6 マーカー) のうち 3.3% に当たる 131 遺伝子座において PCR 法によるマイクロサテライト領域の増幅がまったく見られなかった。非増幅の現象が起きた個体に

においても他のマーカーでは増幅が安定して見られることから、特定のマーカーの増幅が見られないのは DNA の不良によるものではなく、ヌルアリの存在によるものと考えられた。MICRO-CHECKER による解析の結果、ハーディ・ワインバーグ平衡からの逸脱が 5 つのマーカーで観察され、その原因はヌルアリによるものであると推測された。ヌルアリの割合は、0.15 (A32)、0.14 (A33)、0.13 (A38)、0.06 (C5)、0.17 (C61) であった。すべての個体・マーカーから計算した F_{ST} (overall F_{ST}) は 0.0218 であった。北日本の個体群は、南の個体群と比較して、より多くのユニークなアリルを含んでいた。例えば、cluster N の 227 個体中には 12 のユニークなアリルがあるのに対し、cluster S の 370 個体には 8 つしかユニークなアリルがなかった。Allelic richness (R_S) と Private allelic richness (PR_S) は緯度と有意な相関があった (Figure 13; $R=0.38, P<0.05$ (R_S); $R=0.54, P<0.01$ (PR_S))。一方、ヘテロ接合度観測値 (H_0)、ヘテロ接合度期待値 (H_E) と緯度との間には有意な相関はなかった (Figure 13; $R=0.24, P=0.18$)。各地域個体群間の遺伝的距離と地理的距離には有意な相関が認められた (Figure 14; $R^2=0.02, P<0.01$)。

4. クラスタリング解析と系統解析による遺伝的構造の推定

ベイズ法によるクラスタリングの結果、34 の地域個体群はミトコンドリア DNA ではほぼ緯度に沿った 8 つのクラスターに (Figure 15)、マイクロサテライトは 2~3 つに (Figure 16)、両 DNA の統合多型データはそれぞれ 3 つに分類された (Figure 17)。得られた系統樹を図示した (ミトコンドリア: Figure 18、マイクロサテライト:

Figure 19、2 つのマーカーの結合データ: Figure 20)。ミトコンドリアとマイクロサテライトの結合データを用いて得られた 3 つの遺伝的なクラスターはそれぞれ N グループ、S グループ、K グループと名付けた。

作成した系統樹によると日本のアカスジカスミカメは北から南に向かって穏やかに遺伝的に分化しており、また、関東グループはそれとは異なるグループを形成していた。この結果は、ベイズ法によるクラスタリングの結果とほぼ一致した。

AMOVAの結果、グループ間では有意な遺伝的な隔離が確認された。一方、寄主植物間での遺伝的分化は確認されなかった（Table 10）。

Table 3 Collection details of sampled *Stenotus rubrovittatus*

No.	Location	Latitude/longitude coordinates	Plant*	Collection year
1	Kikonai, Hokkaido	41°41'N, 140°26'E	L	2008
2	Shiriuchi, Hokkaido	41°36'N, 140°21'E	L	2008
3	Rokkasho, Aomori	40°57'N, 141°22'E	G	2006
4	Akita, Akita	39°41'N, 140°7'E	G	2007
5	Daisen, Akita	39°29'N, 140°30'E	L	2006
6	Morioka, Iwate	39°45'N, 141°8'E	L	2006
7	Miyako, Iwate	39°38'N, 141°57'E	G	2006
8	Kitakami, Iwate	39°21'N, 141°6'E	L	2005
9	Sinjo, Yamagata	38°44'N, 140°17'E	L	2006
10	Kurihara, Miyagi	38°55'N, 140°43'E	R	2006
11	Tajiri, Miyagi	38°36'N, 141°3'E	G	2005
12	Furukawa, Miyagi	38°34'N, 140°58'E	G	2005
13	Souma, Fukushima	37°48'N, 140°55'E	G	2005
14	Iwaki, Fukushima	37°21'N, 140°44'E	L	2007
15	Sado, Niigata	38°1'N, 138°22'E	G	2006
16	Joetsu, Niigata	37°7'N, 138°16'E	G	2006
17	Toyama, Toyama	36°41'N, 138°16'E	L	2006
18	Kanazawa, Ishikawa	36°39'N, 136°42'E	G	2007
19	Tatebayashi, Gunma	36°15'N, 139°32'E	G	2006
20	Tsukuba, Ibaraki	36°1'N, 140°6'E	L	2006
21	Inashiki, Ibaraki	35°57'N, 140°30'E	G	2006
22	Kitakawabe, Saitama	36°11'N, 139°39'E	L	2006
23	Katori, Chiba	35°51'N, 140°36'E	G	2006
24	Gero, Gifu	35°45'N, 136°56'E	L	2006
25	Gifu, Gifu	35°25'N, 136°46'E	G	2006
26	Adzuchi, Shiga	35°10'N, 136°8'E	G	2006
27	Kasai, Hyogo	34°52'N, 134°53'E	L	2006
28	Kotoura, Tottori	35°30'N, 133°42'E	R	2007
29	Fukuyama, Hiroshima	34°30'N, 133°23'E	G	2006
30	Miki, Kagawa	34°16'N, 134°8'E	G	2006
31	Nakatsu, Oita	33°34'N, 131°14'E	G	2006
32	Kawasoe, Saga	33°13'N, 130°19'E	G	2006
33	Kikuyo, Kumamoto	32°52'N, 130°49'E	G	2006
34	Aya, Miyazaki	31°60'N, 131°15'E	G	2006

* L: Cultivated *Lolium multiflorum*; G: Uncultivated grasses; R:Rice.

Table 4 Japanese names of sampling locations and collectors of *Stenotus**rubrovittatus*.

No.	Location	日本語地名	初確認年	採集者
1	Kikonai, Hokkaido	北海道木古内町	1998 年ころ	柿崎昌志
2	Shiriuchi, Hokkaido	北海道知内町	1998 年ころ	柿崎昌志
3	Rokkasho, Aomori	青森県六ヶ所村	1970 年代	小林徹也
4	Akita, Akita	秋田県秋田市	(2000 年以前)	小林徹也
5	Daisen, Akita	秋田県大仙市	(2000 年以前)	小林徹也
6	Morioka, Iwate	岩手県盛岡市	不明	榊原充隆
7	Miyako, Iwate	岩手県宮古市	不明	榊原充隆、高篠賢二
8	Kitakami, Iwate	岩手県北上市	不明	後藤純子
9	Sinjo, Yamagata	山形県新庄市	2006 年	小林徹也
10	Kurihara, Miyagi	宮城県栗原市	不明	加進丈二、小野亨
11	Tajiri, Miyagi	宮城県大崎市田尻	不明	小野 亨
12	Furukawa, Miyagi	宮城県大崎市古川	不明	小野 亨
13	Souma, Fukushima	福島県相馬市	不明	大谷裕行
14	Iwaki, Fukushima	福島県いわき市	不明	松木伸浩
15	Sado, Niigata	新潟県佐渡市	2000 年	永瀬 淳
16	Joetsu, Niigata	新潟県上越市	2004 年	高橋明彦
17	Toyama, Toyama	富山県富山市	1995 年ころ	吉島利則、菅野亘
18	Kanazawa, Ishikawa	石川県金沢市	不明	濱崎貴史
19	Tatebayashi, Gunma	群馬県館林市	2005 年	船戸 弘
20	Tsukuba, Ibaraki	茨城県つくば市	(2001 年以前)	渡邊朋也
21	Inashiki, Ibaraki	茨城県稲敷市	不明	米山一海
22	Kitakawabe, Saitama	埼玉県北川辺町	不明	江村 薫
23	Katori, Chiba	千葉県香取市	(2001 年以前)	片瀬雅彦
24	Gero, Gifu	岐阜県下呂市	(2000 年以前)	深井雅己
25	Gifu, Gifu	岐阜県岐阜市	2000 年ころ	杖田浩二
26	Adzuchi, Shiga	滋賀県安土町	1996 年ころ	重久眞至
27	Kasai, Hyogo	兵庫県加西市	(2000 年以前)	山下賢一
28	Kotoura, Tottori	鳥取県琴浦町	1990 年代後半	奥谷恭代、渡邊朋也
29	Fukuyama, Hiroshima	広島県福山市	不明	菊地淳志
30	Miki, Kagawa	香川県三木町	(2000 年以前)	香西 宏
31	Nakatsu, Oita	大分県中津市	2001 年	小野元治
32	Kawasoe, Saga	佐賀県川副町	(1984 年以前)	口本文孝
33	Kikuyo, Kumamoto	熊本県菊陽町	不明	竹内博昭
34	Aya, Miyazaki	宮崎県綾町	不明	櫛間義幸、杉村和実

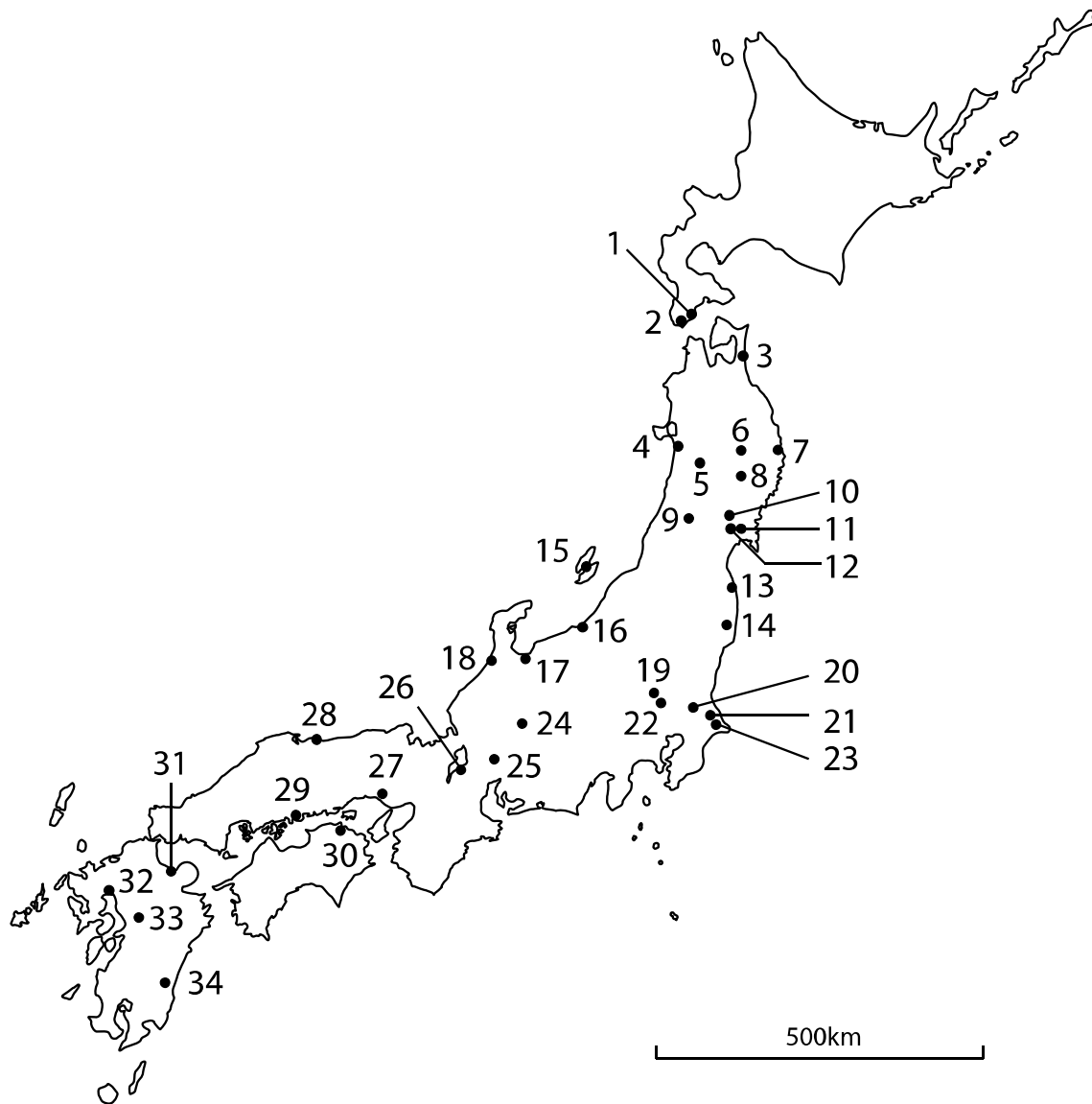


Figure 7 Sampling sites of local populations of *Stenotus rubrovittatus*.

Table 5 Grouping schemes for AMOVA analysis

Populations	BAPS cluster*	Host plants**
1	N	L
2	N	L
3	N	G
4	N	G
5	N	L
6	N	L
7	N	G
8	N	L
9	S	L
10	N	R
11	N	G
12	N	G
13	S	G
14	S	L
15	S	G
16	S	G
17	S	L
18	S	G
19	K	G
20	K	L
21	K	G
22	K	G
23	K	G
24	S	L
25	S	G
26	S	G
27	S	L
28	S	R
29	S	G
30	S	G
31	S	G
32	S	G
33	S	G
34	S	G

* Character indicates one of three clusters (N, S and K) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).

** L: Cultivated *Lolium multiflorum*; G: Uncultivated grasses; R:Rice.

	12	27	40	133	135	153	168	180	208	223	258	306	321	336	351	360	388	409	429	433	480	522	546	552	636	675	682	693	699	715	759	765	774	783	852	858	877	879	882	895	930	1020	1023	1026			
A0	T	A	G	G	A	C	T	A	A	G	C	A	C	A	A	C	C	C	G	G	T	A	A	T	A	T	T	C	C	C	T	A	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
A1																																															
A2	C							G																						T																	
A3																																															
A4																										G								G													
A5																																															
A6																																															
A7				A																											T																
A8					G																																										
A9																									G																						
A10																																															
A11																																															
A12																																															
A13																																															
A14																																															
A15		G																																													
A16																																															
A17																																															
A18																																															
A19																																															
A20																																															
B0						T					T	G		T		T			A		A			G		G		C		C																	
B1						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B2						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B3						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B4						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B5						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B6						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B7						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B8						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B9						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B10						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B11						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B12						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B13						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B14						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B15						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B16						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
B17						T					T	G		T		T			A		A						C		C		C																
		V->M		G->S					I->F V->I:									P->S R->C		V->M																											

Figure 8 Nucleotide substitutions of each haplotype on *Stenotus rubrovittatus* COI. Positions and nucleotides different from the standard haplotype (A0) are shown. Amino acid substitutions due to nucleotide substitution are also shown. Amino acids were abbreviated as follows. A: alanine, C: cysteine, F: Phenylalanine, G: Glycine, I: isoleucine, L: leucine, M: methionine, S: Serine, R: arginine, T: threonine, V: valine.

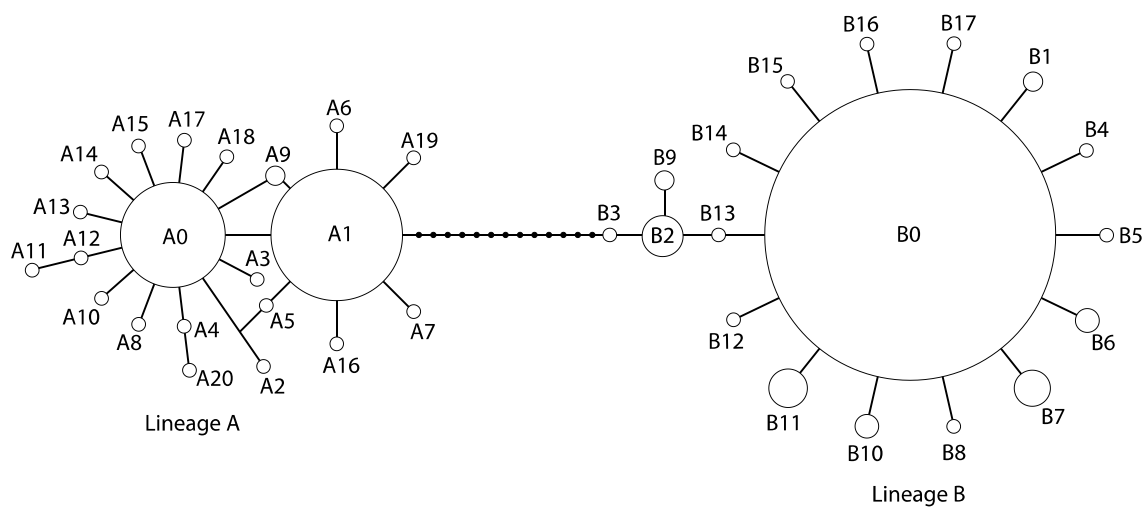


Figure 9 Parsimony network of the 39 haplotypes (A0–A20 and B0–B17) identified in this study for *S. rubrovittatus* COI. The solid circles on the branches represent a single mutational change. Circle area is proportional to haplotype frequency.

Table 6 Mitochondrial DNA haplotype frequencies for *S. rubrovittatus* collected at each sampling location.

Location	A 0	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12	A 13	A 14	A 15	A 16	A 17	A 18	A 19	A 20	B 0	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7	B 8	B 9	B 10	B 11	B 12	B 13	B 14	B 15	B 16	B 17	total	
1	2	9																1	1			1		1																15	
2	8	6																				4		2																1	23
3	3	10															1					6	1	1																22	
4	5	5	1							1				1								8																		20	
5	5	6		1																		10																		22	
6	1	10			1																	8		1																21	
7	1	4									1	1	1									6	1																	15	
8	7	4						1	1	1												5				1														20	
9	1	3																				13		1										3	1					22	
10	4	8																				6		1											1					20	
11	9	8				1	1															5									1									25	
12	8	6	1													1						4		1								1								22	
13	2	5																				12																		20	
14	1	2																				17																		20	
15	1	1																				17						1						3						23	
16	1	3																				13											3							20	
17		1												1								5																		7	
18																						19																		19	
19																						4								2										6	
20																						26																		26	
21																						19		1																20	
22																						2														1				3	
23																						19								5										24	
24																						16													1					17	
25																						24																		24	
26																						19														1				21	
27																						22						1												23	
28		2																				20																1		23	
29																						22							1											23	
30																						22																		22	
31																						17																		17	
32																						24																		24	
33																						22																		22	
34																						18				1		1												20	
Total	59	93	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	455	2	9	1	1	1	1	3	7	1	2	3	8	1	1	1	1	1	1	671

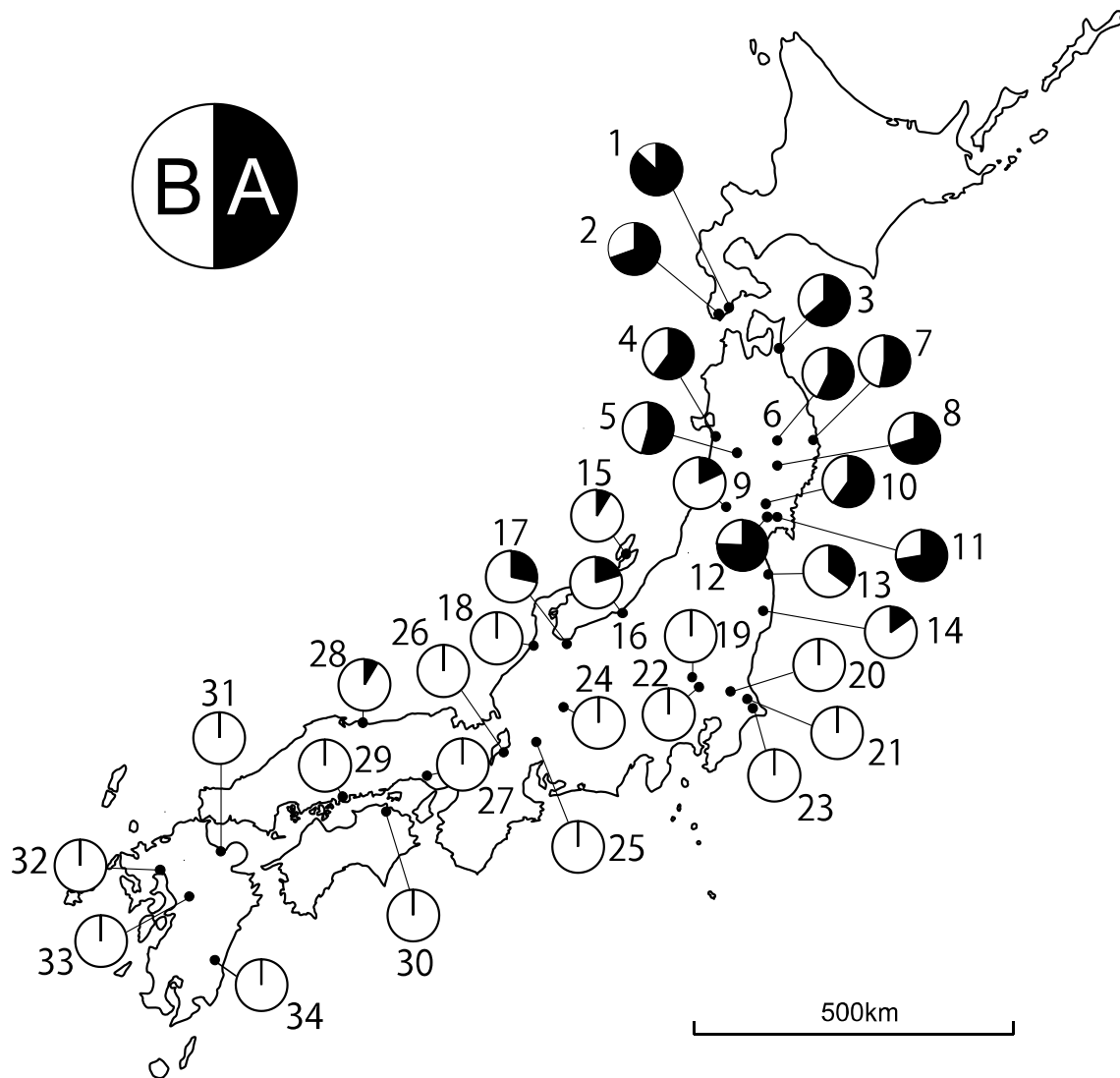


Figure 10 Distribution of the haplotype lineages A and B for *COI* region. Pie charts indicate the frequencies of the haplotype lineages at each sampling location.

Table 7 Summary of polymorphisms of mtDNA *COI* sequences and six microsatellites of *S. rubrovittatus*.

Location	mtDNA <i>COI</i>				
	N_{ic}	N_h	% Lineage A	G_{ST}	π
1	15	6	86.7	0.648	0.00458
2	23	7	69.6	0.802	0.00780
3	22	6	63.6	0.727	0.00852
4	20	5	60.0	0.747	0.00886
5	22	4	54.5	0.697	0.00909
6	21	5	57.1	0.652	0.00904
7	15	7	53.3	0.8	0.00967
8	20	7	70.0	0.805	0.00782
9	22	6	18.2	0.636	0.00571
10	20	5	60.0	0.742	0.00873
11	25	6	76.0	0.753	0.00684
12	22	7	72.7	0.788	0.00747
13	20	4	35.0	0.595	0.00837
14	20	3	15.0	0.279	0.00461
15	23	5	8.7	0.451	0.00309
16	20	4	20.0	0.558	0.00607
17	7	1	28.6	0	0
18	19	3	0.0	0.524	0.00858
19	6	2	0.0	0.533	0.00052
20	26	1	0.0	0	0
21	20	2	0.0	0.1	0.00010
22	3	2	0.0	0.667	0.00065
23	24	2	0.0	0.344	0.00033
24	17	2	0.0	0.118	0.00011
25	24	1	0.0	0	0
26	21	3	0.0	0.186	0.000277
27	23	2	0.0	0.087	0.000084
28	23	3	8.7	0.245	0.00298
29	23	2	0.0	0.087	0.000084
30	22	1	0.0	0	0
31	17	1	0.0	0	0
32	22	1	0.0	0	0
33	24	1	0.0	0	0
34	20	3	0.0	0.195	0.000194

N_i : the number of samples from that locality. N_h : number of haplotypes at that locality, %A: percentage of the haplotypes classified in the lineage A, G_{ST} : haplotype diversity, π : nucleotide diversity.

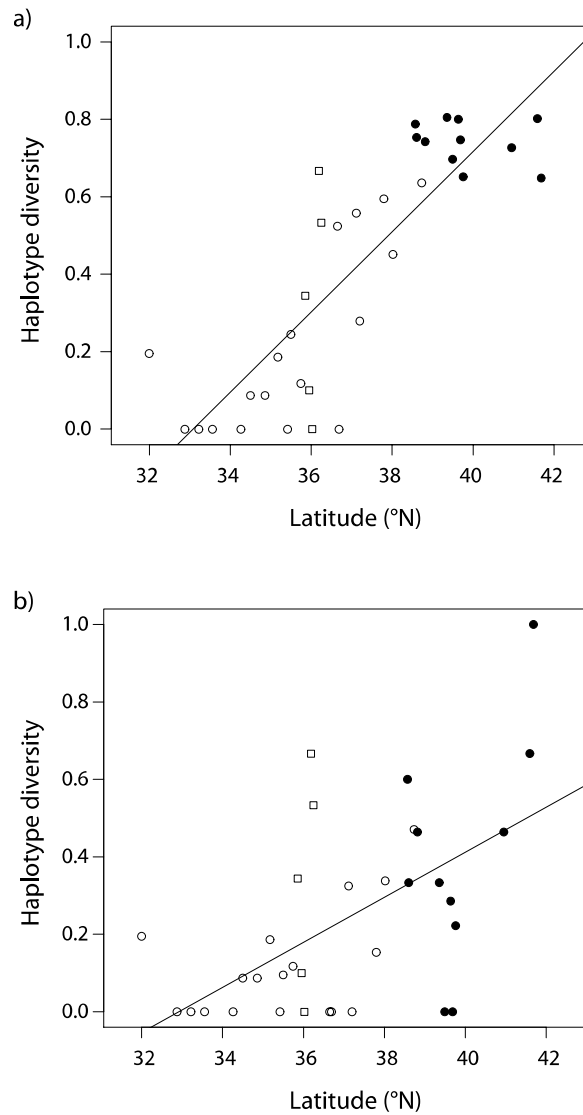


Figure 11 Relationship between the latitude of the sampling locations and Nei's haplotype diversity. a) All individuals, b) Individuals in lineage B alone. Symbols of locations indicate one of three clusters (N, black circles; S, white circles; K, white squares) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program). The regression lines are also drawn.

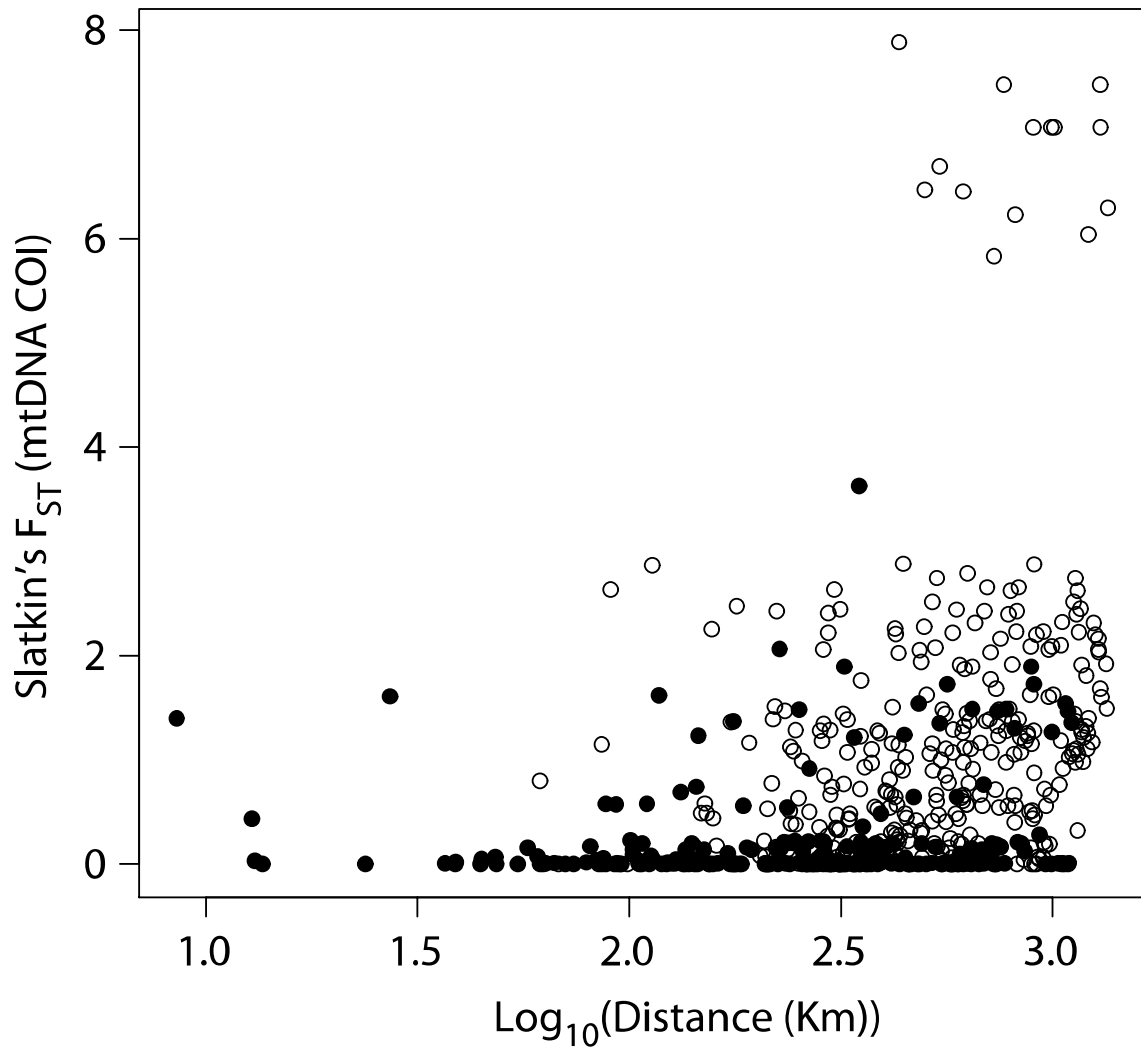


Figure 12 Relationships between log-transformed geographic distance and Slatkin's F_{ST} of mitochondrial *COI* gene. Black circles indicate pairs of locations belonging to the same cluster and white circles indicate pairs belonging to different cluster identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).

Table 8 Summary statistics for neutrality tests and mismatch distributions of *S. rubrovittatus* mtDNA. Cluster N, K and S indicate the genetic cluster identified by Bayesian analysis (See Figure 17). Asterisks (*, **, ***) indicates values that are statistically significant $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively.

Cluster	mtDNA		
	n	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>
All	671	0.25	-0.21*
All (Lineage A)	172	-2.14***	-23.44***
All (Lineage B)	499	-2.16***	-29.07***
N	225	1.20	0.58
N (Lineage A)	148	-2.11**	-21.30***
N (Lineage B)	77	-1.13	-3.14*
K	79	-1.21	-2.54*
S	367	-1.18	-0.73
S (Lineage A)	24	-1.18	-0.19
S (Lineage B)	343	-2.07***	-18.88***

Table 9 Summary of polymorphisms of six microsatellites of *S. rubrovittatus*. N_i : the number of samples from that locality, N_A : number of total alleles, R_s : Allelic richness, PR_s : Private Allelic Richness, H_o : Observed heterozygosity, H_E : Expected heterozygosity. Asterisks (*, **, ***) indicate values that are statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium obtained by the global tests across loci using Fisher's method $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively (Raymond & Rousset, 1995¹¹⁷).

Location	N_i	N_A	R_S	PR_S	H_0	H_E
1	15	4.67	2.66	0.11	0.472	0.544**
2	24	4.83	2.59	0.05	0.436	0.526***
3	23	5.33	2.63	0.1	0.377	0.514***
4	24	5.50	2.74	0.08	0.496	0.576***
5	22	6.17	2.99	0.12	0.535	0.624
6	21	5.83	2.65	0.13	0.410	0.565***
7	14	4.33	2.63	0.09	0.431	0.535
8	17	5.00	2.78	0.13	0.386	0.575***
9	22	4.50	2.78	0.09	0.373	0.602***
10	20	4.67	2.55	0.09	0.436	0.495
11	25	4.83	2.47	0.06	0.352	0.479***
12	22	5.67	2.84	0.09	0.456	0.589***
13	19	4.50	2.66	0.07	0.417	0.555*
14	24	4.33	2.39	0.01	0.473	0.490
15	23	5.33	2.74	0.09	0.490	0.570*
16	19	4.00	2.52	0.02	0.462	0.545
17	7	2.67	2.21	0	0.514	0.451
18	19	4.83	2.45	0.07	0.395	0.478**
19	6	2.83	2.28	0	0.453	0.446
20	25	4.17	2.42	0.02	0.347	0.477***
21	24	4.50	2.48	0.02	0.448	0.526*
22	3	2.50	2.67	0	0.467	0.544
23	24	5.00	2.66	0.09	0.335	0.553***
24	17	4.33	2.47	0.04	0.450	0.497*
25	24	4.67	2.54	0.01	0.340	0.522***
26	21	4.50	2.58	0.03	0.404	0.532***
27	23	5.17	2.75	0.09	0.422	0.555**
28	24	5.00	2.59	0.06	0.367	0.530***
29	23	4.00	2.47	0.01	0.381	0.538**
30	22	4.67	2.59	0.09	0.494	0.539***
31	17	4.00	2.48	0.04	0.451	0.507**
32	22	4.50	2.60	0	0.332	0.544***
33	24	5.00	2.55	0.05	0.334	0.538***
34	20	4.33	2.50	0.03	0.449	0.517***

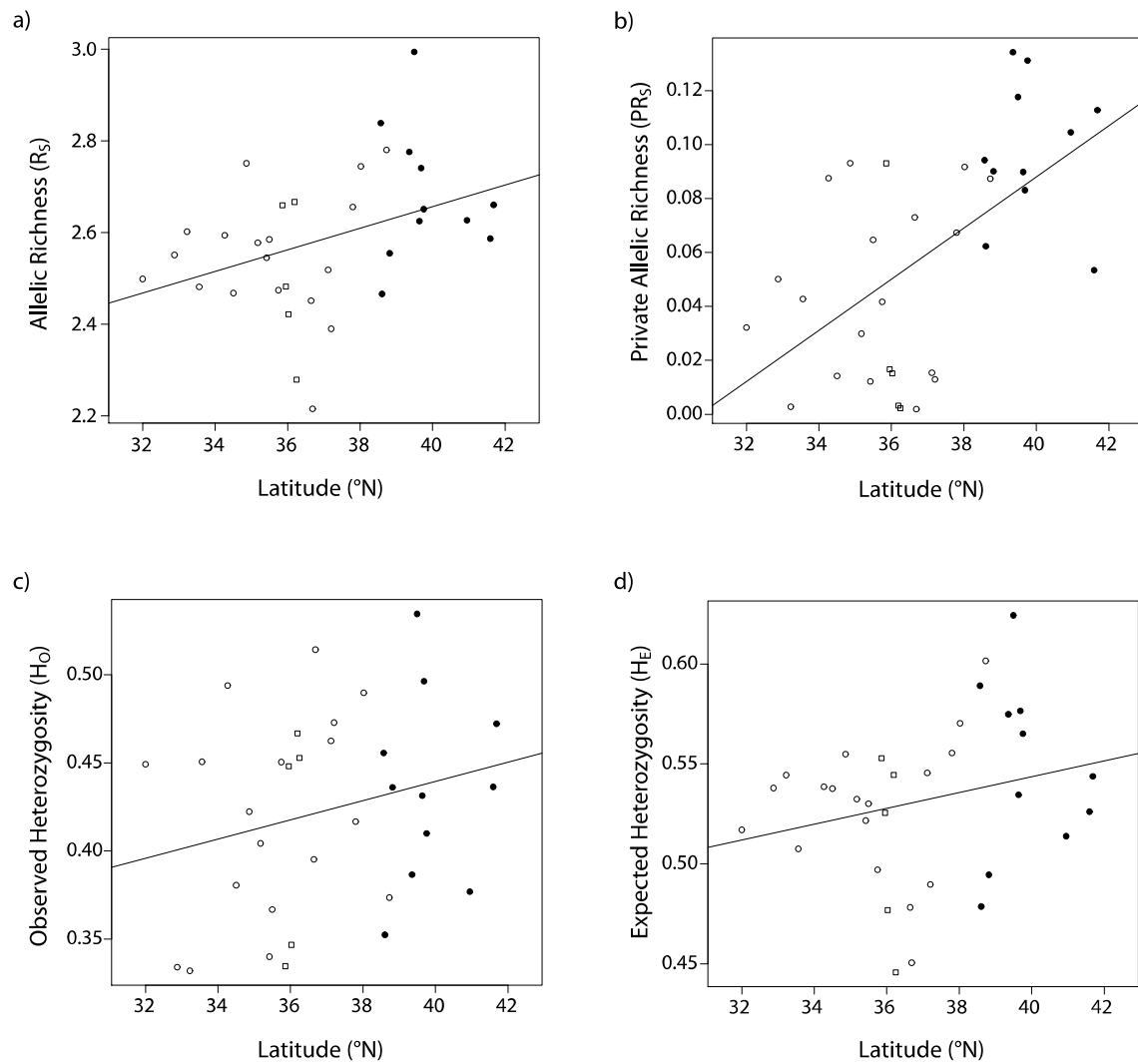


Figure 13 Relationship between the latitude of the sampling locations and genetic diversities. a) Allelic richness, b) Private allelic richness, c) Observed heterozygosity and d) Expected heterozygosity. Symbols of locations indicate one of three clusters (N, black circles; S, white circles; K, white squares) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program). The regression lines are also drawn.

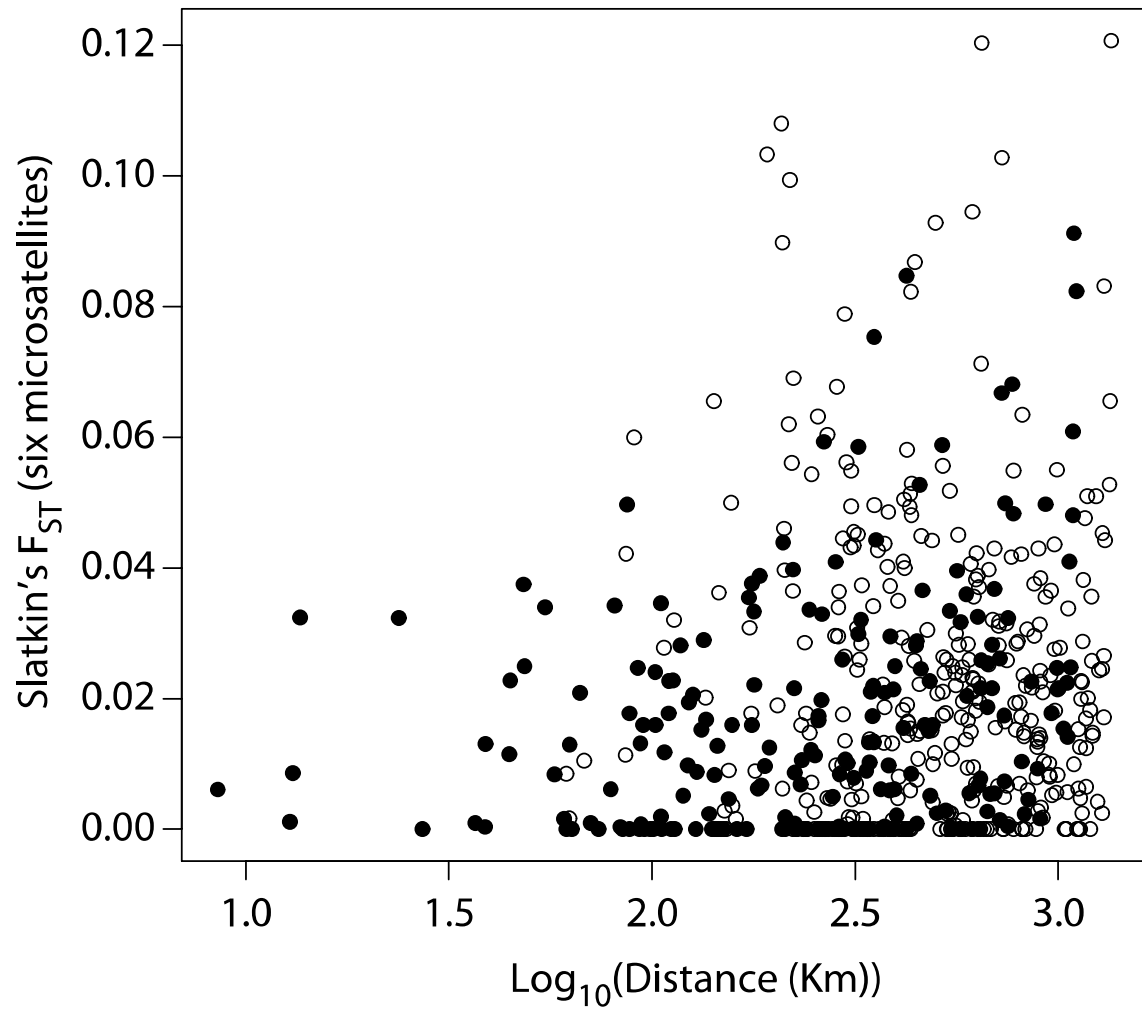
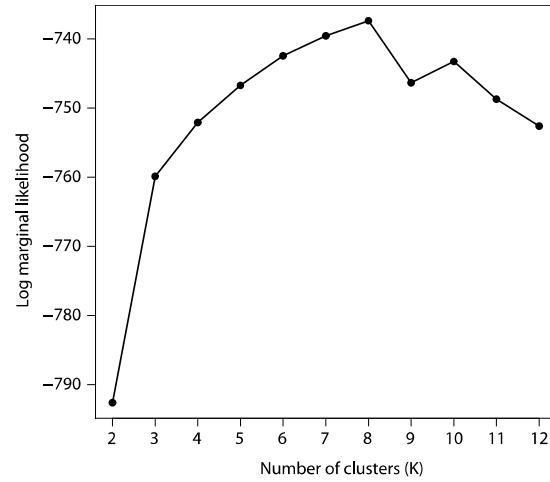


Figure 14 Relationships between log-transformed geographic distance and Slatkin's F_{ST} of six microsatellites. P -values reflect significance of the observed correlations as estimated by a Mantel test (100,000 permutations). Black circles indicate pairs of locations belonging to the same cluster and white circles indicate pairs belonging to different cluster identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).

a)



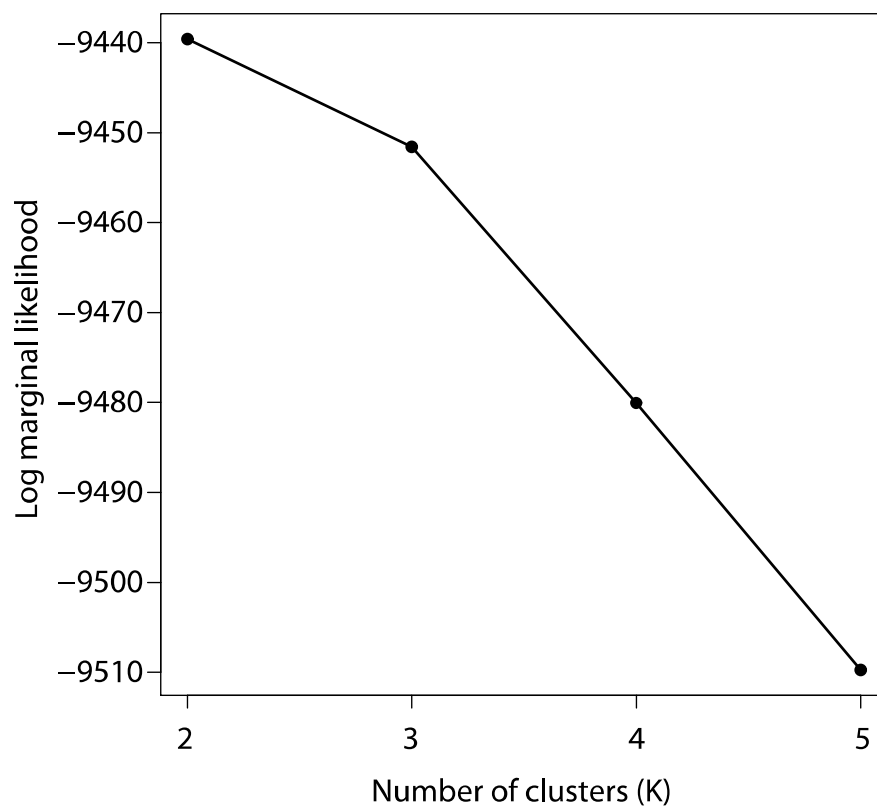
b)



Figure 15 a) Identification of the most likely number of populations defined by the genetic data of mtDNA in *S. rubrovittatus*. Mean log marginal likelihood and associated variance across 10 independent runs was computed with BAPS using the group level option.

b) Distribution of eight genetic clusters of *S. rubrovittatus* of mtDNA identified with BAPS using the group level option in Japan. Locations belonging to the same cluster are surrounded by line or represented with the same mark.

a)



b)



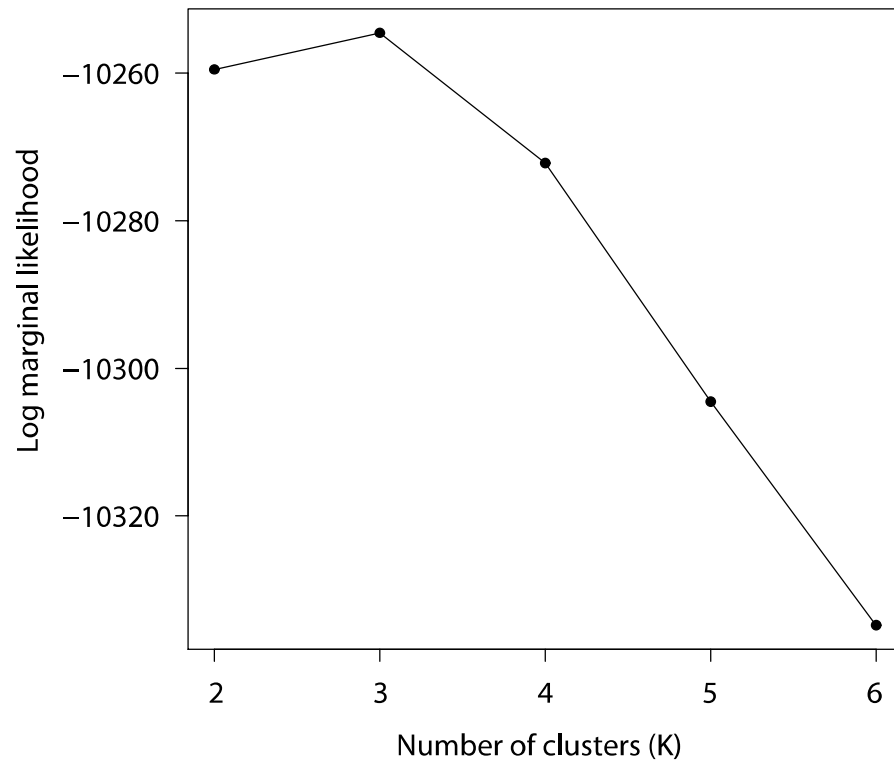
c)



Figure 16 a) Identification of the most likely number of populations defined by the genetic data of six microsatellites in *S. rubrovittatus*. Mean log marginal likelihood and associated variance across 10 independent runs was computed with BAPS using the group level option.

b), c) Distribution of two (b) or three (c) genetic clusters of *S. rubrovittatus* of mtDNA identified with BAPS using the group level option in Japan. Locations belonging to the same cluster are surrounded by line or represented with the same mark.

a)



b)

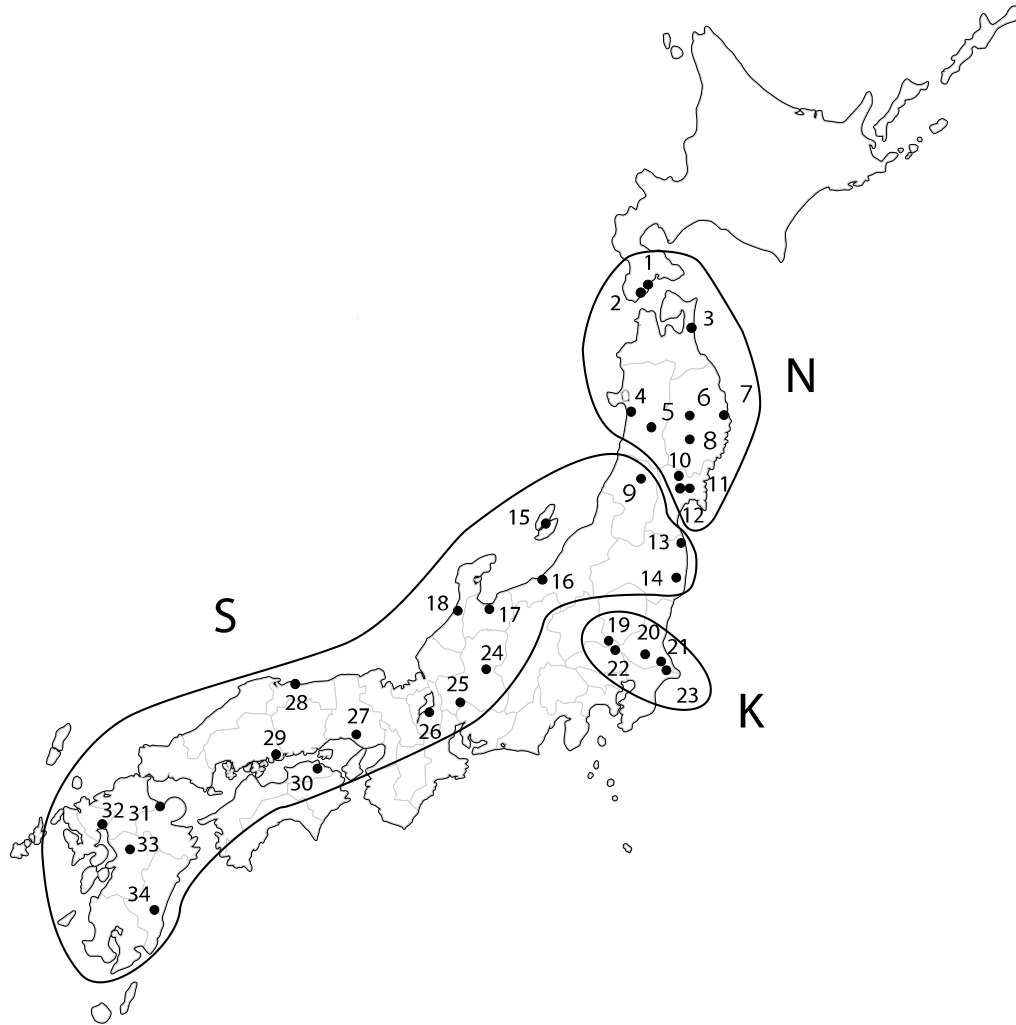


Figure 17 a) Identification of the most likely number of populations defined by the combined genetic data of mtDNA and six microsatellites in *S. rubrovittatus*. Mean log marginal likelihood and associated variance across 10 independent runs was computed with BAPS using the group level option.

b) Distribution of three genetic clusters of *S. rubrovittatus* identified with BAPS using the group level option in Japan. Locations belonging to the same cluster are surrounded by line or represented with the same mark.

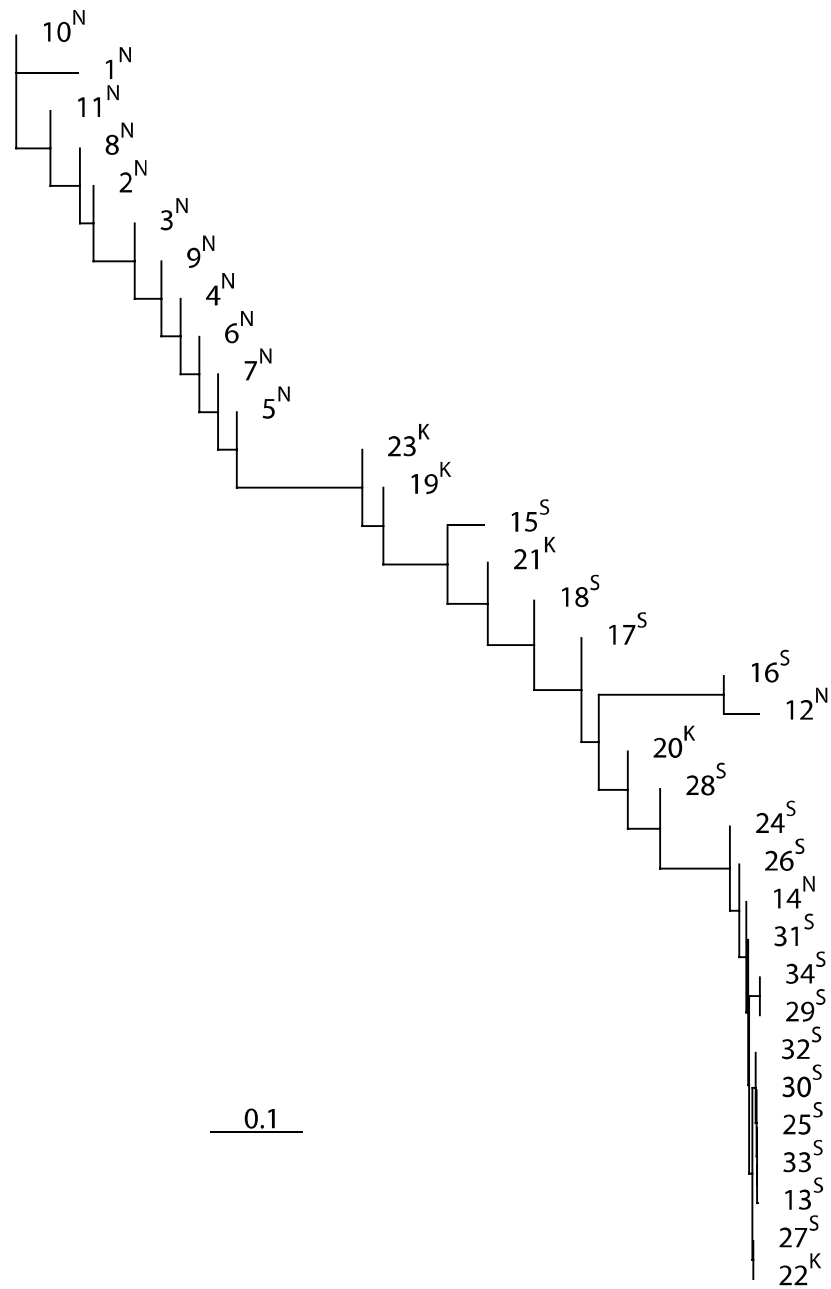


Figure 18 Neighbour-joining tree among *S. rubrovittatus* local populations constructed based on F_{ST} using mitochondrial *COI* sequences. Uppercase character indicates one of three clusters (N, S and K) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).

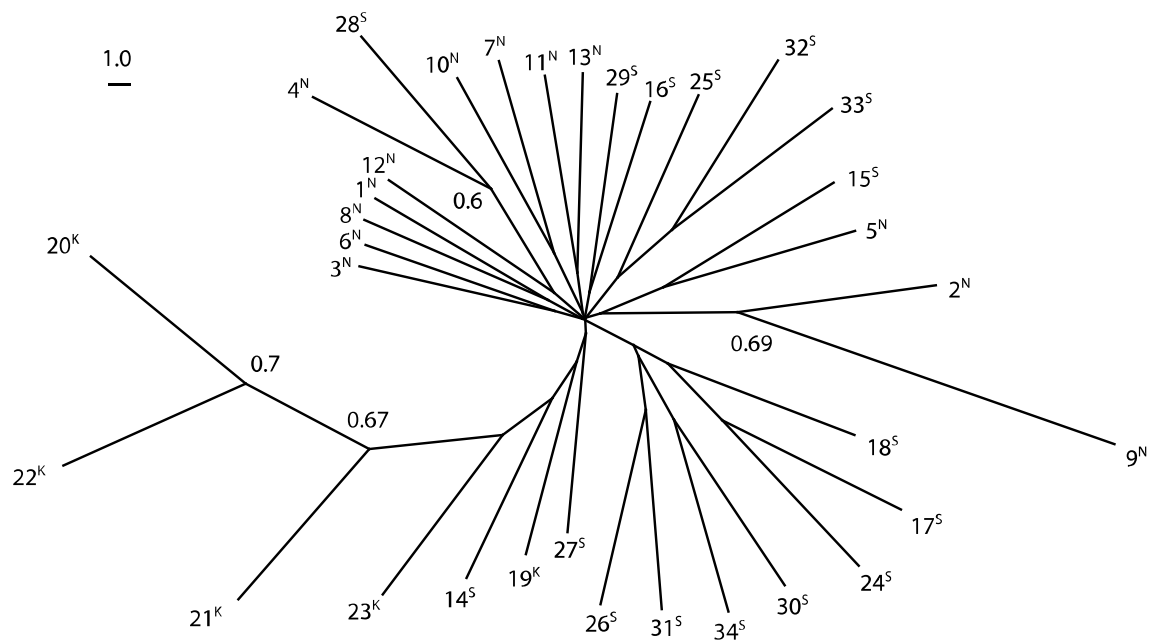


Figure 19 Consensus tree among *S. rubrovittatus* local populations based on Cavalli-Sforza & Edwards' (1967¹¹) chord distances derived from allele frequencies at six microsatellite loci (NJ method of tree construction). Bootstraps over 40% are indicated. Uppercase character indicates one of three clusters (N, S and K) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).

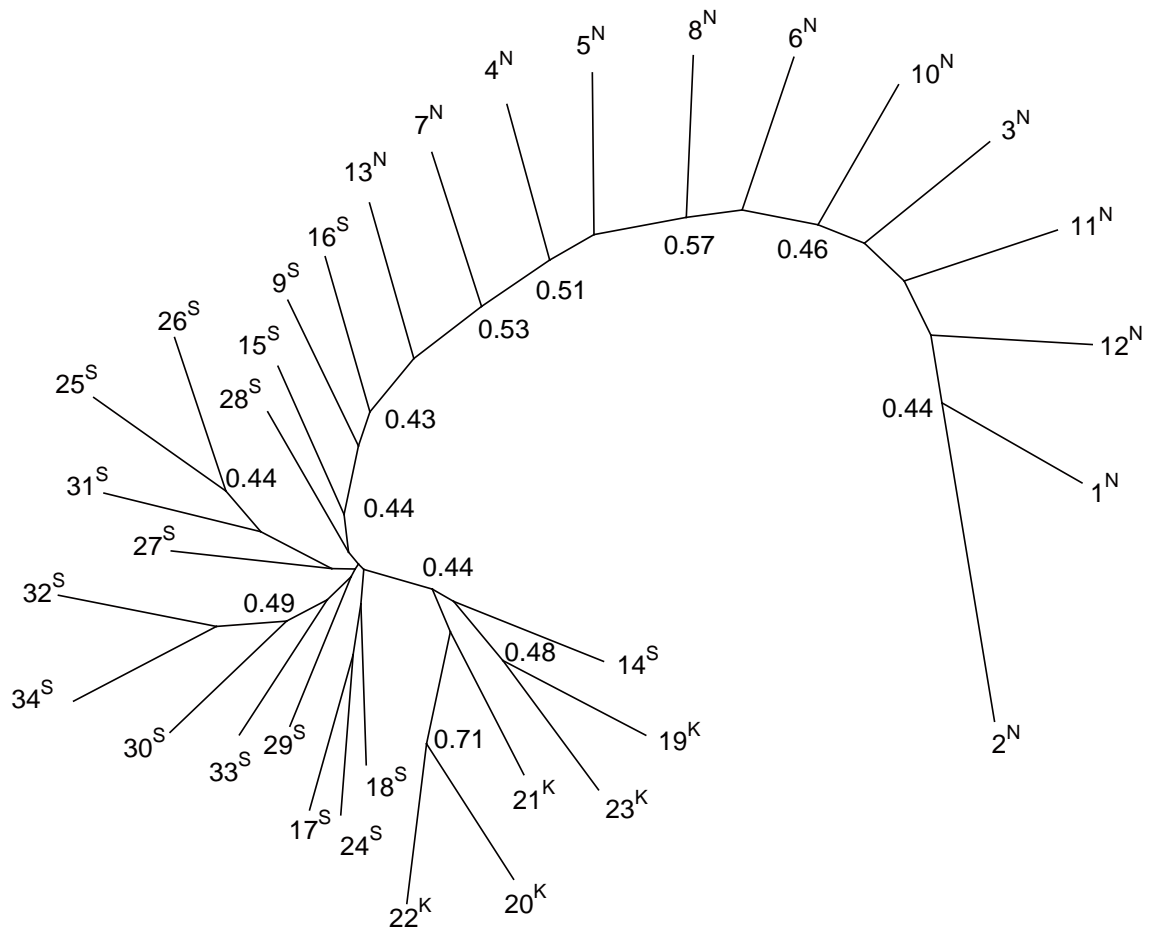


Figure 20 Genetic distance tree among *S. rubrovittatus* local populations constructed using combined mitochondrial *COI* and six microsatellite data. Bootstraps over 40% are indicated. Uppercase character indicates one of three clusters (N, S and K) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).

Table 10 Analysis of molecular variance (AMOVA) partitioned among groups (genetic clusters of populations identified by Bayesian analysis or plants). Percentage of the total variance that is explained by the grouping scenario and fixation indices are indicated. Asterisks (*, **, ***) indicates values that are statistically significant $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively. (F_{CT}), among populations within groups (F_{ST}), and within populations (F_{SC}).

Model	Source of variation	mtDNA		Microsatellites	
		% variation	Fixation indices	% variation	Fixation indices
Among the genetic clusters	Among clusters	54.90	$F_{CT}=0.549^{***}$	1.51	$F_{CT}=0.151^{***}$
	Among populations within clusters	1.78	$F_{SC}=0.0394$	0.96	$F_{SC}=0.00973$
	Within populations	43.32	$F_{ST}=0.567$	97.53	$F_{ST}=0.0247^{**}$
Among host plants	Among host plants	-1.23	$F_{CT}=-0.0123$	0.06	$F_{CT}=0.00057$
	Among populations within plants	45.15	$F_{SC}=0.446$	1.84	$F_{SC}=0.0184^{***}$
	Within populations	56.08	$F_{ST}=0.439$	98.11	$F_{ST}=0.0189^{***}$
Among host plants within N cluster	Among host plants	-1.08	$F_{CT}=-0.0108$	0.22	$F_{CT}=0.00219$
	Among populations within plants	0.69	$F_{SC}=-0.00385$	1.53	$F_{SC}=0.0153^*$
	Within populations	100.39	$F_{ST}=0.00688$	98.25	$F_{ST}=0.0175^{**}$
Among host plants within S cluster	Among host plants	-2.66	$F_{CT}=-0.0266$	0.24	$F_{CT}=0.00237$
	Among populations within plants	14.60	$F_{SC}=0.142$	0.64	$F_{SC}=0.00637$
	Within populations	88.06	$F_{ST}=0.119$	99.13	$F_{ST}=0.295^{**}$

考察

サンプリング

本研究におけるアカスジカスミカメの地域個体群の全国一斉サンプリングの結果、本種は採集を試みたほとんどの県で採集され、日本における分布域をほぼ網羅するサンプルセットが得られた。サンプリングの結果1頭も本種が採集されなかったのは長野県のみであった。長野県においては、2002年に初めて本種の捕獲が報告されているが、県南にわずかに生息が確認されているのみであるという（野口, personal communication）。山形県では長い間本種の生息について記録がなく分布が疑われていたが、2006年、本研究の採集を通じて新庄市および金山町で生息が確認された。その後、山形県の北部ではいくつか地点で本種の生息が確認されている（川崎ら, 2009⁵⁸）。その他の地域においても、採集者による情報によって初発年が確認できた地点も少数ながらあった（Table 4）。記録によると、大まかに本種は北陸地方と東北日本海側では2000年以降に生息が確認された地域が多いが、他の地域では、局所的には古くから生息していたらしい。これらの古い生息地は必ずしもアカスジカスミカメの被害が早期に顕在化した地域と一致せず、青森県六ヶ所村（No.3）のように古くから生息が確認されながら、その場所が農業地帯から離れているために害虫としては認識されていない地点もあった。また、本種の生息密度は場所によって大きく異なり、生息が確認されたものの密度が低かったため、サンプリング個体数が目標とした20個体に届かなかった地点も多数存在した。これらのうち地理的に周囲に代替のサンプリング地点が存在しないものについては、重要な地域個体群サンプルとして解析に供した（北海道木古内町 No.1、群馬県館林市 No.8、富山県富山市 No.27、埼玉県北川辺町 No.22）。本種はイネの重要害虫ではあるが、主な繁殖場所はイネ科植物の繁茂する雑草地であり、水田内で捕獲できるのは本種がイネを加害するイネ出穂後1カ月間に限られる。またこの時期においても、水田内の密度はイ

ネ科植物主体の雑草地や牧草地など本種の繁殖地の密度と比較すればかなり低い。このため、水田内において、集団遺伝学的に解析可能な 20 個体以上の本種成虫を採集できたのは、34 地点中 2 地点（宮城県栗原市 No.10、鳥取県琴浦町 No.28）のみだった。

本種の集団遺伝学的解析を被害の拡大過程と関連して解析するうえで、各サンプリング地点における本種の初確認年は重要な情報である。しかし、先に述べたように、初確認年が明らかなサンプリング地点は少数にとどまる。その他多くのサンプリング地点は本種による斑点米被害が関係者に認知された際にはすでに生息が確認されており、初発生年を正確に知ることは困難であった。さらに、生息の確認は偶然による面も大きく、必ずしも初確認の時期が本種による斑点米被害が顕在化した時期と一致するとは限らない。本研究の目的は、被害の拡大の時期と遺伝的多様性の比較にある。このため、本種の被害の拡大過程については初期については文献情報を、2000 年以降は農林水産省が各県に対して行った斑点米カメムシ類の種構成データを用いることとした（Figure 2）。なお、本種は日本の他、朝鮮半島と中国において発生が確認されているが、ともに密度は低く、本研究の終了時までにはこれら海外のサンプルを入手することはできなかった。

ミトコンドリア DNA

ミトコンドリア DNA は組換えがほとんど起きない。このため 2 系統の大きく配列の事なる *COI* 遺伝子が存在することは、日本のアカスジカスミカメのミトコンドリアは 2 つの系統からなることを意味する。100 万年あたりミトコンドリア DNA は 2.3% 変化するという推定値に基づくと（Brower, 1994⁹）、本種の *COI* 配列の 2 つの系統間の 1.74% の違いから、2 つの系統が 75 万年前に分岐したと推定される。これは、更新世（約 258 万年前から 1 万年前）に相当し、そのほとんどは氷河期である。更新世には地球レベルで気温上昇と低下が繰り返し訪れ、日本列島周辺においても

気候が大きく変動したため、それに伴って植生も大きく変化したと推定されている (Tada, 1998¹⁰³)。変温動物であり気候の変動や植生に分布域を制限される昆虫種においては、この時期に分布域の拡大と縮小が繰り返されたと考えられる。一般的に、分布域が縮小する際には生息可能な環境が島状に取り残され、他の個体群と遺伝的交流が隔離された個体群が複数生じる。周囲から隔離されたそれぞれの個体群はボトルネック効果とその後の遺伝的浮動により、互いに異なる遺伝的多様性を持つようになる。氷河期に起きた遺伝的多様性の変化の痕跡は、現在で多くの生物で確認されており (Hewitt, 2004⁴⁰)、日本においても氷河期の分布域の変化によってミトコンドリアに複数の系統が生じた昆虫種が知られている (Sota et al., 2004¹⁰⁰; Kawai et al., 2006⁵⁶; Aoki et al., 2008³)。本研究で明らかになったアカスジカスミカメの2つの系統も、他の昆虫種と同様のプロセスを経て生じたと考えられる。

しかしながら、本種の遺伝的構造が他の生物種と比較して特徴的なのは、北日本の個体群は遺伝的多様性が高いのに対し、南へ下るほど遺伝的多様性が低くなることである。さらに、北日本においては、本種の AB 2 系統のミトコンドリアはどの地域個体群内でも完全に混じりあっている。このことは、氷河期に隔離され、独自の遺伝的多様性を持った 2 つの個体群が、その後の温暖化による分布域の拡大の際、かなり早い段階で混合したことを意味する。一方、関東から南日本の広い範囲にかけて本種のミトコンドリアが B 系統しか存在しないことから、氷河期以降の本種の分布域の拡大において、A 系統のミトコンドリアを持つ個体群は南日本には広がらなかったことがわかる。このように南北で異なる系統構成が完成するためには、ふたつの過程が想定される。1) 現在の個体群の元となった AB 2 つの地域個体群は氷河期には両方とも北日本で取り残された個体群であり、そのうちの B 系統のみが南日本にも広がった。2) AB 2 つの系統は、氷河期に北日本 (A 系統) と南日本 (B 系統) にそれぞれ隔離されたのち、南日本に隔離された系統 B 北上する過程で北日本の A 系統と合流し、北日本全域に広がった。最初の仮説は、古い個体群は新しい個体群よりも遺伝的多様性が高いという一般的な集団遺伝学における推論に整合しており (Hewitt, 2004⁴⁰)、この説にもとづけば、系統 A は南方への分布拡大の過程で

消滅したと考えられる。系統 B は全国に分布するものの、そのハプロタイプの内訳は北日本ほど遺伝的多様性が高く、南日本のハプロタイプは種類に限られるから、やはり、仮説はよくあてはまる。ミトコンドリア系統 A が北日本にしか存在しないのは、この個体群が南日本へは分布拡大を行わなかったか、拡大過程における遺伝的浮動によってこのハプロタイプが失われたことを示唆する。一方、ふたつめの仮説は、南方系の系統 B が氷河期以降の温暖化によって北方へ分布を拡大したとして説明するが、系統 B の遺伝的多様性が北日本よりも南日本においてむしろ低いこと、系統 A が南方へ広がらなかった理由が説明しにくいなど、ひとつめの仮説より説得力が小さいように思われる。

ミトコンドリアと同じ母性遺伝様式を示すボルバキア等の細胞内共生微生物の選抜によって系統 A が南日本から駆逐されたといういわゆる "Selective Sweep" 現象 (Maynard-Smith and Haigh, 1974⁶⁸) は、本種においては当てはまらないと考えられる。なぜなら、核 DNA の多様性もミトコンドリア DNA と同様の北高南低の特徴を持つが、細胞質不和合はミトコンドリア DNA にしか影響しないため、核 DNA における南北の遺伝的多様性の差は説明できない。また、2つの系統間の交配実験においても正常に後代が発育しており、細胞質不和合は確認されていない (櫻井、personal communication)。

以上まとめると、本種のミトコンドリア DNA の遺伝的多様性は、主に、氷河期時代の分布域の縮小と、その後の気温上昇に伴う分布域の拡大で説明できると考えられる。各サンプリング地点におけるミトコンドリア DNA の遺伝的多様度と地理的距離の関係には強い相関があったが、この関係のグラフは Hutchinson & Templeton (1999⁴³) のケース I に相当する。ケース I では、個体群間の地理的距離が離れるにつれて遺伝的距離も大きくなり、さらにばらつきも大きくなるが、これは、地理的距離が離れると、遺伝的浮動と遺伝的交流の影響がともに大きくなることを示している。

マイクロサテライト

北日本の個体群において、マイクロサテライトの Allelic richness (R_S) と Private allelic richness (PR_S) が高いことは、この地域の個体群の核 DNA の遺伝的多様性が高いことを示しており、ミトコンドリア DNA の解析結果と一致する。また、地理的距離と遺伝的距離の相関が有意である点もミトコンドリア DNA の解析結果と一致する。マイクロサテライトのアリルはミトコンドリア DNA の系統に関係なく分布していることから、氷河期以降の分布拡大によって2つの系統が完全に混じり合ったのち、その後距離に応じた穏やかな遺伝的分化を経たと考えられる。しかしながら、遺伝的多様性の指標であるヘテロ接合度期待値と緯度との間には相関が認められなかった。ボトルネック効果を経た個体群におけるその後のヘテロ接合度期待値の回復速度は個体群に特異的な Private alleles が生じる速度と比較して速いため、氷河期におきた分布域の縮小現象を検出するには感度が低い問題があることが報告されている (Kalinowski, 2004⁴⁹)。アカスジカスミカメにおいても、ヘテロ接合度期待値は分布の拡大と個体数の増加の過程において回復しており、そのために、緯度による違いが検出できなかったと考えられる。マイクロサテライト多型をもとに作成した系統樹は、ミトコンドリアほどには明らかな地域的な特徴を示さなかったが、北日本、関東地方、その他の地域というまとまりは系統樹からも確認され、本種の核 DNA は地域のごとに遺伝的に分化していることは間違いないと考えられる。本研究では6つのマイクロサテライトの多型のみを用いて解析せざるを得なかったが、マイクロサテライトマーカーの数を増やすことで、本種の遺伝的分化の現状をより詳しく知ることができるかもしれない。

クラスタリングと遺伝構造

BAPS を用いたベイズ法によるクラスタリングは、日本における本種の地域個体群をミトコンドリア DNA については緯度に沿った 8 つものグループに分類した一方、マイクロサテライト多型は 2 あるいは 3 つにしか分類しなかった。この違いは、地域個体群の遺伝的特徴の違いを検出する際の 2 種の DNA の解像度の違いを表していると考えられる。母性遺伝を行うミトコンドリアは、有効集団サイズが核 DNA の 1/4 しかないため、遺伝的浮動の影響を核 DNA よりも強く受け、遺伝的な違いが顕著に表れたと考えられるのである。ミトコンドリアにおいて最適とされた 8 のグループ分けは、地理的に分散した遺伝的グループを含んでひとつ含んでいる (Figure 15 b) の▲) 他は、ほぼ遺伝的グループと地理的なグループが 1 対 1 で対応している。また、ミトコンドリア DNA が緯度に沿って南北方向に分化していることは、地域個体群間で遺伝的交流が制約を受けていることを示すだけでなく、その制約の要因もまた緯度に沿って変化する種類のものであることを示す。例えば気温は、変温動物である昆虫の分布域を決定する大きな要因であり、日本列島の平均気温は基本的に緯度に依存する。この点から、平均気温、冬季の最低気温など昆虫の発生活長を決定する要因と本種の地理的個体群の分布の関係は検討に値する。

一方、ミトコンドリア DNA と核 DNA を混合した解析は、本種の個体群を地理的に特徴づけられた 3 つのクラスターに分類した。すなわち北日本群 (N グループ)、関東群 (K グループ)、南日本群 (S グループ) である。興味深いことにミトコンドリアのみの解析からは関東地方の個体群のみからなるグループは検出されず

(Figure 15, Figure 18)、関東地方の個体群は主にマイクロサテライトのデータ解析からのみ得られている。ミトコンドリア *COI* のハプロタイプネットワーク (Figure 9) 上では、関東地方の個体群に特異的なハプロタイプ (B7) が存在するものの、系統樹やクラスタリング解析で関東地方の個体群のみを独立させるほどの強い特徴とはならなかったと推定される。また、南日本の個体群は山形県南部から鹿児島県まで

を含む巨大なグループとなっているが、本種における今までの知見から、少なくともこの個体群の南端と北端では化性が異なることがわかっている。南日本個体群（Sグループ）と名付けたこれらの地域個体群の間に遺伝的差異が本当はないことを確認するためには、マイクロサテライトの数を増やして再度解析することも有効だろう。さらに、本研究では東海地方の個体群のサンプルがなく、関東地方に固有の遺伝的グループが西側にどの程度広がっているのか明らかではない点は今後の検討課題である。今のところ、これら3つのクラスターの境界には、個体の移動を妨げる明らかな地理的障壁を見つけることはできない。地域個体群の遺伝的分化の原因については、気温、寄主植物の分布、本種の年間世代数の違いなどの要因を細かく検討する必要があると考えられる。本種の地域個体群の分布が気温により決定されている可能性については、第3章の研究でさらに詳細に検討した。

本種の加害個体群の由来

本研究から、日本における本種の個体群の遺伝的多様性は地理的なまとまりを持ちつつ互いに分化していることが明らかになった。しかし、遺伝的多様性の地理的なまとまりと、本種による斑点米被害が顕在化した年代の地域差には関係が認められなかった。つまり、斑点米被害の拡大の過程は遺伝的多様性と無関係であると考えられる。これは、侵入害虫のように、被害の初発地とそこからの拡大過程が、遺伝的多様性によって説明されるケースとは明らかに異なっている。まず、1980年代に本種による斑点米被害が初めて顕在化した地域である宮城県と広島県の個体群はそれぞれ遺伝的に異なるクラスターに属しており、明らかに2つの加害個体群の由来は異なる。また、2004年にアカスジカスミカメの発生が報告された千葉県利根川周辺の個体群は、上記の2地域の個体群とも異なる関東地方に特異的なクラスターに属しており、千葉県の加害個体群が他の地域からの侵入個体群である可能性は極めて低く、むしろ関東地方の土着の個体群の個体数が増加したことによって生じた

と考えられる。これらいくつかの証拠から、全国で問題となっている本種による斑点米被害は、特定の地点から加害個体群が全国に広がった結果ではなく、それぞれの地域に土着の個体群が、環境の変化に応じて密度を増して被害を顕在化させた結果生じたと考えられる。

トノサマバッタ (*Locusta migratoria*) における研究では、世界各地の個体群は亜種あるいは地域レベルでの遺伝的な分化を示すが、過去に害虫化したか否かという農業害虫の属性による遺伝的分化は認められない (Chapuis et al., 2008¹³; 2009¹⁴)。また、中国全土のニカメイガ (*Chilo suppressalis*) は地域的に大きく3つのグループに分けられ、これは氷河期に分断された地域個体群に由来し、イネの栽培植物化後もグループが維持されているとされている (Meng et al., 2008⁶⁹)。これらの研究は、土着種の害虫個体群の遺伝的多様性は、密度増加による害虫化が起きても、害虫化以前の遺伝的構造を維持する例を示しており、害虫化は遺伝的な形質よりも局地的な環境変化の影響を強く受けている可能性を示している。本研究によって、土着種の地域個体群の遺伝的多様性は害虫化に伴うさまざまな生態的变化にもかかわらず安定して維持される現象が、日本というより小さい地理的スケールでごく短時間に起きた土着種の害虫化現象においてもあてはまることが明らかになった。

この20年間にアカスジカスミカメは稀な土着種から主要なイネ害虫に変化した。現在本種による斑点米被害は日本全国で確認されているが、本種の密度は地域により大きく異なる (渡邊・樋口, 2006¹¹⁷)。我々の研究結果は、本種の害虫化の原因は、地域的な環境の変化を大きく受けていることを示唆するが、このことは、本種の密度増加の条件が整えば、全国どの場所でも本種の害虫化が起きる可能性を示す。寄主植物の適切な管理など、本種の増加を抑える努力をミクロなスケールで地道に行うことが、本種の被害拡大の防止に有効であると考えられる。

第3章 限られた地域内での遺伝的多様性の詳細な検討

緒言

集団遺伝学の手法を用いて地域個体群の遺伝的多様性を解析し、個体群間の遺伝的分化の様相を明らかにすると、地域個体群の歴史的由来や現在の地域個体群間の遺伝的交流の大きさを知ることができる。特に後者は、生物種の過去数千世代にわたる分布拡大の様相を理解するうえで役立つ。第2章において筆者はアカスジカスミカメの遺伝的構造を解析した。その結果、本種は2000年代に急激に被害地域を拡大した新しい害虫であるにも関わらず、遺伝的に異なる複数のグループが地理的に棲み分けていることが明らかになった。しかし、全国的な被害の拡大と遺伝的分化の維持が両立するメカニズムや、急激な生態の変化にも関わらず遺伝的な隔離が存在し続ける理由を考察するためには、さらに研究を進め、遺伝的交流を妨げる境界の正確な地理的位置と、遺伝的分化がその場所で生じている原因を明らかにする必要がある。

遺伝的分化の境界を特定するためには、対象となる地域に生息する地域個体群の遺伝的構造を詳細に知る必要がある。このため、第2章の解析によってはっきりとした遺伝的境界の存在が認められた福島県と茨城県周辺に対象地域を絞り、本種の遺伝的構造を詳しく解析することにした。解析によって遺伝的境界の正確な位置、境界線の方向と長さ、境界線によって隔てられた個体群間の遺伝的交流の大きさなどを明らかにし、本種地域個体群の分布変化、移動分散に関する知見を得ようと考えたのである。また、該当地域の地形や気候を調査し、遺伝的境界の位置との関係を検討することで、これらの要因が遺伝的境界の形成・維持に貢献しているか否かについても調査を行うことにした。

材料と方法

1. 対象区域内の高密度サンプリング

福島県と茨城県の虫害防除関係者の協力を得て、福島県 11 地点と茨城県 10 地点の計 21 地点から 397 個体のアカスジカスミカメ成虫をサンプリングした。これらの地点は 72 km×200 km (14,000 km²) の範囲にあり、福島県と茨城県における本種の分布域をほぼ網羅している (Table 11、Figure 21)。サンプリング地点の植生は水田かあるいは水田近隣の雑草地だった (Table 11)。茨城県のサンプリング地点 I1 と I2 はともにサンプル数が少なく、距離が 15km と近かったため合わせてひとつのサンプル I1 として扱うこととし、サンプリング地点を I1 と I2 の中央とした。このようにして得た 20 の地域個体群について、遺伝的多様性の解析を行った。

2. マイクロサテライトマーカーの解析

DNA 抽出とマイクロサテライトの解析は、第 2 章の全国レベルの地域個体群の解析と同じ方法で行った。得られたアリル頻度のデータについて、各マーカー間の遺伝的連鎖とハーディ・ワインバーク平衡からの逸脱を検定し、ヌルアリの割合を推定した。各マーカーの遺伝的連鎖とハーディ・ワインバーク平衡からの逸脱は GENEPOP を用いて検定し、ヌルアリの有無と割合の推定には MICROCHCKER を用いた。各地域個体群の遺伝的多様性の指標として、Allelic richness (R_S)、Private allelic richness (PR_S) (Kalinowski, 2004⁴⁹)、ヘテロ接合度観測値 (H_O)、ヘテロ接合度期待値 (H_E) を求めた。また、 R_S と PR_S の推定は HP-RARE を、 H_E と H_O の推定は ARLEQUIN を用いた。次に、各地域個体群の遺伝的多様性 (R_S , PR_S , H_E , H_O) と緯度の相関を調査した。次に地域個体群間の遺伝的距離と地理的距離の関係を調査す

るため、Slatkin (1995⁹⁹) の線形化固定指数と log 変換した地理的距離の間の相関 (Hutchinson & Templeton, 1999⁴³) の有無を解析した。遺伝的多様性の指標と緯度との相関は統計ソフトウェア R を用い、遺伝的距離と地理的距離の関係は FSTAT に実装されているマンテルテストを使用した。

マイクロサテライトのデータから地域個体群間の遺伝距離を計算し、系統樹を作成した。6つのマイクロサテライトのデータについてブートストラップ法により 10,000 個の Nei の遺伝距離 (1983⁷⁵) を求めた。計算には MICROSATELLITE ANALYZER を用いた。このデータを PHYLIP の NEIGHBOR で近隣接合法の系統樹を作成し、CONSENSE を用いてコンセンサスツリーを求めた。系統樹は TREEVIEW で可視化した。

最適な個体群の分類を推定するため、多型データのクラスタリングを行った。クラスタリングには BAPS を用い "spatial clustering of group (個体群の地理的クラスタリング) " オプションを使用して、事前の仮定なしに推定を行った。BAPS は、各個体群の遺伝的データと地理情報をもとに、ベイズ法を用いてクラスタリングの推定を行い、最も事後確率の高いクラスター数と区分けを最適なクラスタリングとする。

クラスタリングの結果得られた 2つのグループについて、ARLEQUIN を用いて AMOVA 解析を行い、グループ間、グループ内個体間、個体間の多型の分布を解析した。

3. ミトコンドリア COI 遺伝子の解析

第 2 章に述べたように、アカスジカスミカメのミトコンドリア COI のハプロタイプは大きく 2つの系統 (A と B) に大別される。2つの系統間の塩基配列の違いは 1.7% と大きく (Figure 8)、中間の配列を持つハプロタイプが全く見つからないこと (Figure 9)、2つの系統の分布が茨城県と福島県周辺を境に大きく異なることから、本解析ではハプロタイプの系統分けのみを行った。

第1章で述べた方法で、プライマーF1とR1を用いて個体別に1,204 bpの遺伝子断片を増幅し、得られたDNA断片を *Bsm* I (New England Biolabs Inc.) で処理した。A系統に属するハプロタイプは218–233塩基の位置にGCATTCの配列を持ち、740–745塩基の位置にGCATTTの配列を持つ。一方B系統に属するハプロタイプは全て218–233塩基の位置にGCATTCを、740–745塩基の位置にGCATTTを持つ。*Bsm* Iは配列GCATTCを認識してDNAを切断するため、系統Aに属する *COI* ハプロタイプの増幅産物は218 bpと986 bpの2つの断片に、系統Bに属する *COI* ハプロタイプは464 bpと740 bpの断片に切断される。制限酵素処理したDNAは1.5%のアガロースゲルで電気泳動を行い、275nmの紫外線の存在下でバンドパターンを観察して、ハプロタイプの系統を判別した。得られたデータに基づき、各個体群のハプロタイプ多様度 (Nei 1987⁷⁴) を計算した。また、ハプロタイプ多様度と緯度の相関を解析した。

結果

1. マイクロサテライトマーカーの解析

397 個体の解析から検出された 6 つのマーカーのアリル数はそれぞれ 17 (A21)、8 (A32)、15 (A33)、2 (A38)、4 (C5)、15 (C61) だった。すべてのマーカーの組合せで遺伝的な連鎖は検出されなかった ($p>0.05$)。各個体群の合計アリル数、 R_S 、 PR_S 、 H_E と H_0 は Table 12 に示した。20 中 15 の個体群でハーディ・ワインバーグ平衡からの有意な逸脱が検出された。ヌルアリルの割合はそれぞれ 0.15 (A32)、0.14 (A33)、0.13 (A38)、0.06 (C5)、0.17 (C61) と推定された。サンプル全体の F_{ST} (overall F_{ST}) は 0.023 だった。緯度と遺伝的多様性の間には、指標 R_S 、 PR_S 、 H_E について有意な相関が認められたが、 H_0 については有意な相関はなかった

(Figure 22)。地域個体群間の遺伝的関係を求めた系統樹では、福島県の個体群と茨城県の個体群が樹の両端に位置しており、南北で遺伝的に分化する傾向が示された (Figure 23)。BAPS によるクラスタリングの結果、個体群は 2 つのクラスターに分けられ、それぞれのサンプリング領域の北側の 8 個体群と南側の 13 個体群からなっていた (Figure 24)。2 つのクラスターの境界は福島県の南部、北緯 37.3 度の位置に東西方向に存在していた (Figure 24)。さらに、AMOVA 解析の結果、F-statistics でこれら 2 つのクラスター間の有意な遺伝的分化が認められた (Table 13)。

2. ミトコンドリア COI 遺伝子の解析

Bsm I は予想通り、2つのハプロタイプ系統を異なるバンドパターンで切断した (Figure 25)。福島県の地域個体群は F11 の 1 地点を除くすべての地点で A 系統と B 系統の両方の COI ハプロタイプを含んでいた。A 系統の割合は最小 15% (F10) から最大 77% (F8) だった (Figure 26)。一方、茨城県の地域個体群からは A 系統に属するハプロタイプは全く発見されなかった。A 系統の分布の南限は福島県と茨城県の県境付近にあった。ハプロタイプ多様度は北の個体群ほど高く、緯度と高い相関を示した (Figure 27)。サンプル全体の F_{ST} (Overall F_{ST}) は 0.31 だった。

Table 11 Sampling sites of *S. rubrovittatus*

City	Address	Code	Latitude (°N)	Longitude (°E)	Vegetation	Collection year
FUKUSHIMA						
Shinchi	Suginome	F1	37.86	140.89	Italian rye	2007
Souma	Narita	F2	37.8	140.92	Wild grasses	2005
Iitate	Itoi	F3	37.66	140.72	Italian rye, etc	2007
Minamisouma	Haramachi	F4	37.61	140.93	Italian rye	2007
Namie	Minamitsushima	F5	37.56	140.75	Italian rye, etc.	2007
Namie	Tatsuno	F6	37.52	140.93	Italian rye, etc.	2007
Tomiooka	Motooka	F7	37.34	141.01	Italian rye	2007
Naraha	Ide	F8	37.3	140.96	Italian rye, etc.	2007
Yabuki	Ipponngi	F9	37.2	140.34	Wild grasses	2007
Iwaki	Ogawamachi	F10	37.2	140.84	Italian rye, etc.	2007
Tanagura	Yatsuki	F11	36.99	140.39	Italian rye, etc.	2007
IBARAKI						
Hitachi-omiya	Shimokose	I1*	36.59	140.33	Wild grasses	2006
Hitachi-ota	Wada	I2*	36.58	140.49	Wild grasses	2006
Mito	Kamikunii	I3	36.44	140.45	Wild grasses	2007
Chikusei	Ebigashima	I4	36.25	140.04	Wild grasses	2006
Ishioka	Kakioka	I5	36.24	140.19	Wild grasses	2006
Omitama	Kamiyosikage	I6	36.22	140.41	Wild grasses	2006
Miho	Yaita	I7	36.02	140.33	Wild grasses	2007
Tsukuba	Kannonndai	I8	36.02	140.11	Italian rye	2006
Inashiki	Sakaijima	I9	35.95	140.5	Wild grasses	2006
Tone	Kanousinndenn	I10	35.86	140.19	Wild grasses	2006

*Samples from the two sites were merged into one local population I1.

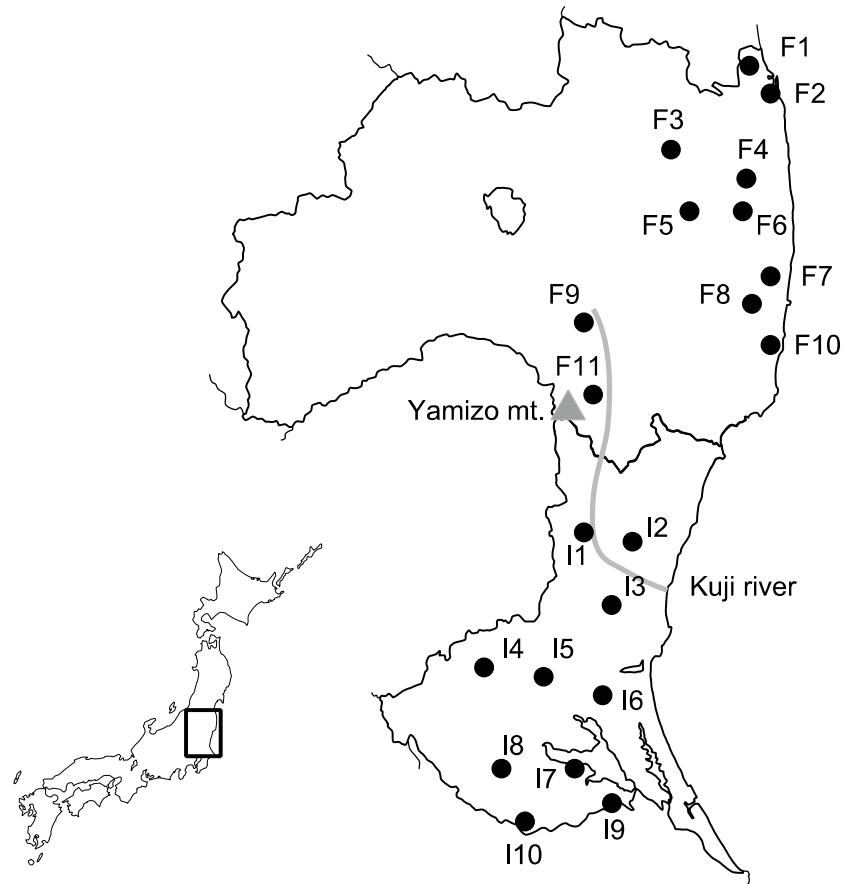


Figure 21 Sampling sites of *S. rubrovittatus* in the study area.

Table 12 Summary of six microsatellites of *S. rubrovittatus* in Fukushima and Ibaraki prefectures.

Site	N	N_A	R_S	PR_S	H_0	H_E
F1	24	6.0	3.72	0.20	0.47	0.57***
F2	19	4.5	2.66	0.07	0.42	0.56*
F3	24	5.5	3.69	0.19	0.55	0.58
F4	24	6.2	2.59	0.13	0.46	0.52
F5	16	4.7	2.63	0.06	0.37	0.56**
F6	24	6.2	2.63	0.09	0.40	0.55***
F7	24	5.5	2.61	0.10	0.36	0.52***
F8	18	5.3	3.91	0.12	0.50	0.66**
F9	7	3.3	2.71	0.05	0.30	0.59***
F10	24	4.5	2.39	0.02	0.47	0.49
F11	24	6.0	2.78	0.29	0.54	0.55
I1	8	4.3	2.69	0.07	0.28	0.54*
I3	15	4.8	2.48	0.04	0.27	0.49***
I4	24	4.7	2.59	0.09	0.44	0.53*
I5	16	3.8	2.36	0.03	0.26	0.49***
I6	24	4.5	2.41	0.03	0.35	0.48***
I7	10	4.3	2.53	0.05	0.44	0.50
I8	24	4.5	2.42	0.03	0.35	0.48***
I9	24	4.5	2.48	0.02	0.45	0.53**
I10	24	6.0	2.56	0.11	0.42	0.51*
Mean	19.9	6.4	2.74	0.09	0.40	0.53
Overall	397	11.0	2.66	2.66	0.47	0.57***

N : the number of samples, N_A : number of total alleles, R_S : Allelic richness,

PR_S : private allelic richness, H_0 : observed heterozygosity, H_E : expected

heterozygosity. Asterisks (*, **, ***) indicate values that are statistically

significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium obtained by the global

tests across loci using Fisher's method $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$,

respectively (Raymond & Rouseest, 1995⁸⁹).

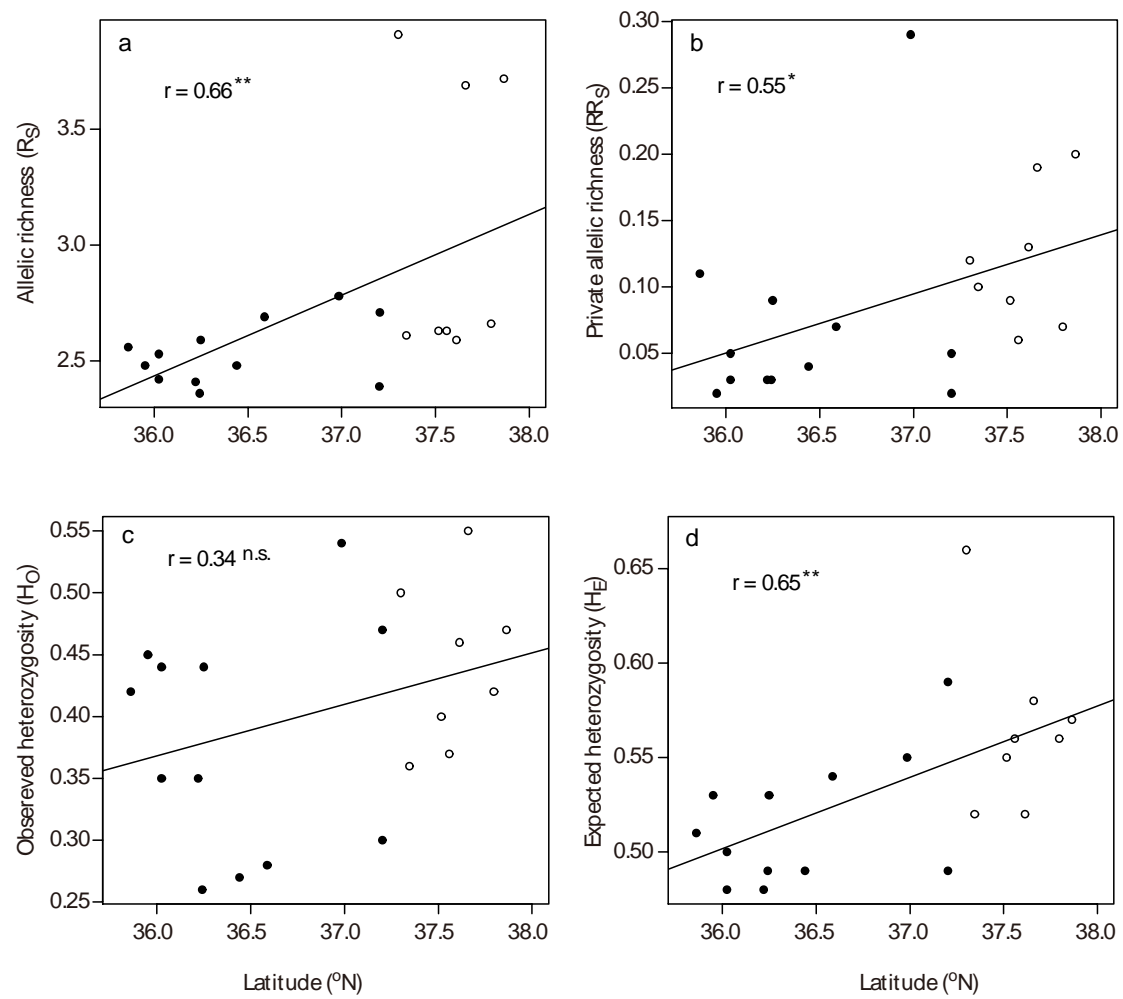


Figure 22 Relationship of the latitude of the sampling locations and genetic diversities of *S. rubrovittatus* (allelic richness and private allelic richness, and observed and expected heterozygosities of six microsatellite loci). Symbols of locations indicate one of two groups (1. white circles; 2. black circles) identified in Bayesian clustering analysis. The regression lines and Spearman's correlations are also shown. Asterisks (*, **, ***) indicate values that are statistically significant $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

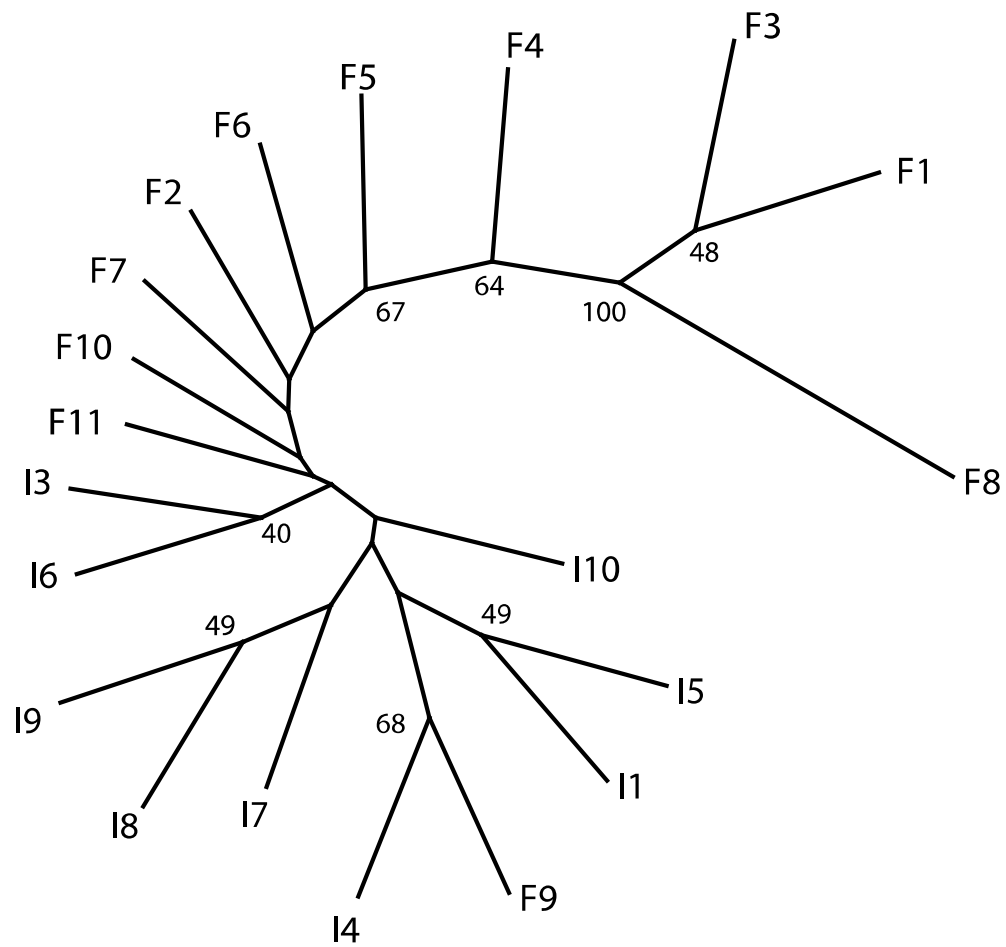


Figure 23 Consensus tree among *S. rubrovittatus* local populations based on Nei's (1983¹¹⁶) genetic distances derived from allele frequencies at six microsatellite loci (NJ method of tree construction). Bootstrap values over 40% are indicated.

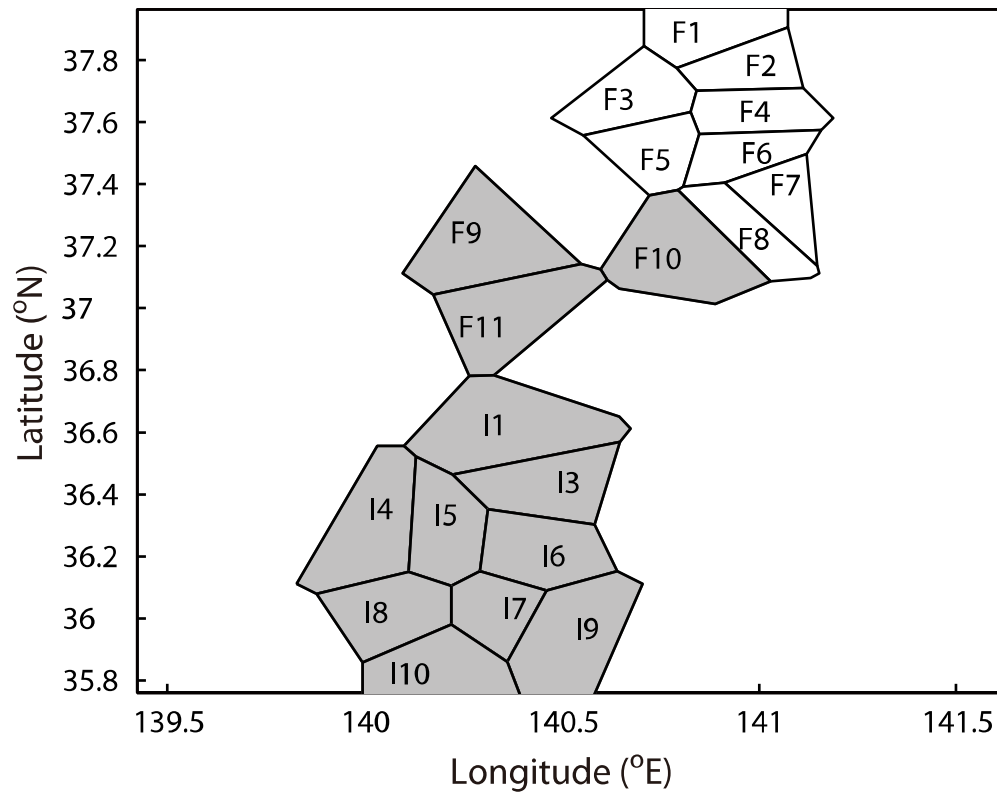


Figure 24 Genetic clustering of local populations in the study area inferred with the program BAPS using microsatellite markers. Different colors represent genetically differentiated populations.

Table 13 Analysis of molecular variance (AMOVA) partitioned among genetic clusters of populations identified by Bayesian analysis) (F_{CT}), among populations within groups (F_{ST}), and within populations (F_{SC}). Percentages of the total variance that were explained by the grouping scenario and fixation indices are indicated. Asterisks (*, **, ***) indicate values that are statistically significant $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively.

Source of variation	% variation	Fixation indices
Among regions	0.42	$F_{CT}=0.004^*$
Among populations within regions	1.40	$F_{SC}=0.014^{**}$
Within populations	98.17	$F_{ST}=0.018^{***}$

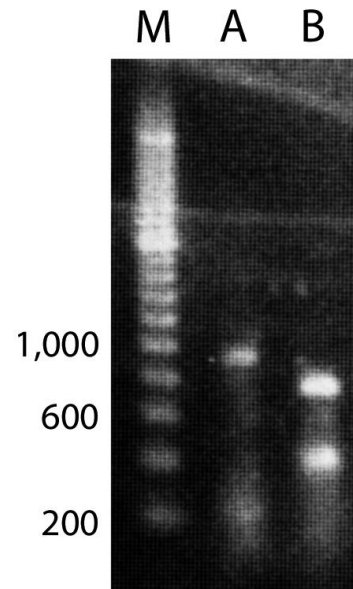


Figure 25 DNA band patterns of mtDNA *COI* of *S. rubrovittatus* digested by *Bsm* I restriction enzyme. A; *COI* lineages A, B: *COI* lineage B, M 200bp DNA ladder.

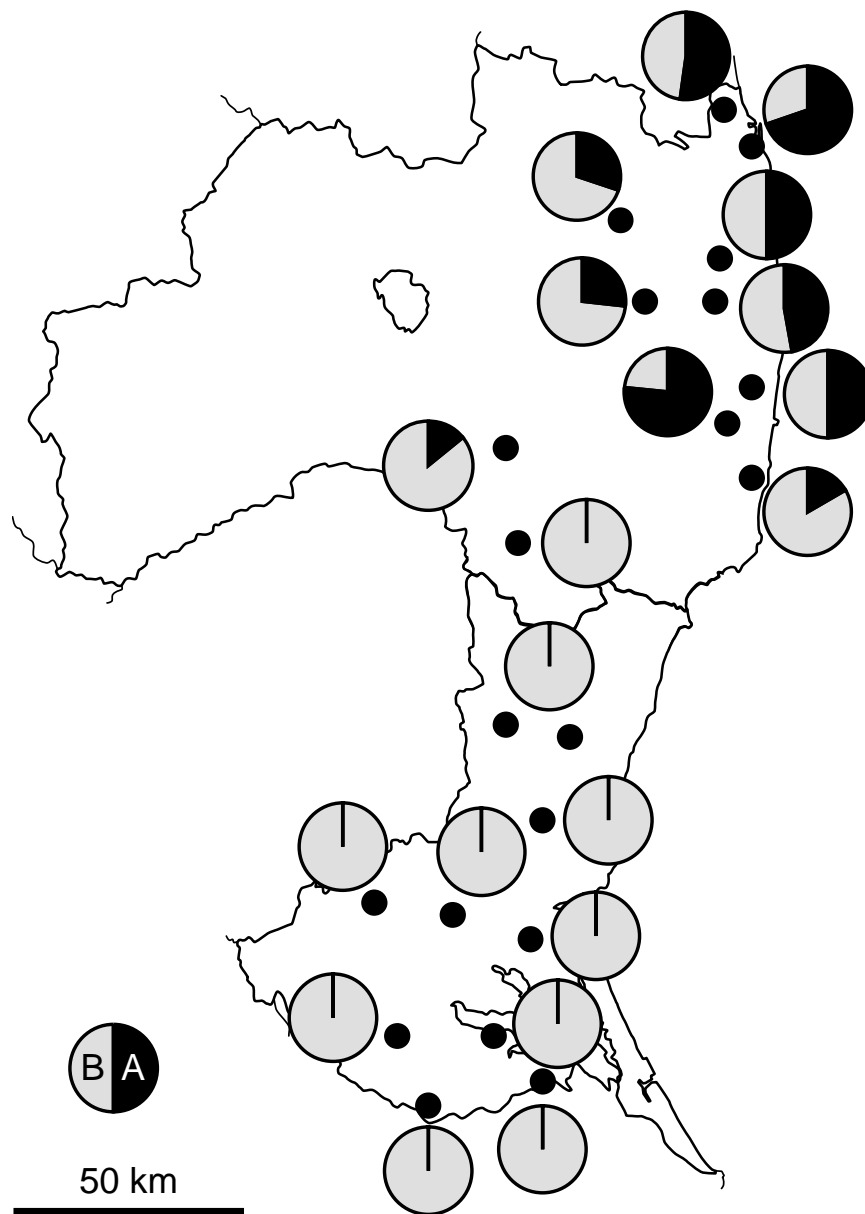


Figure 26 Proportions of the two different mitochondrial lineages within each local population.

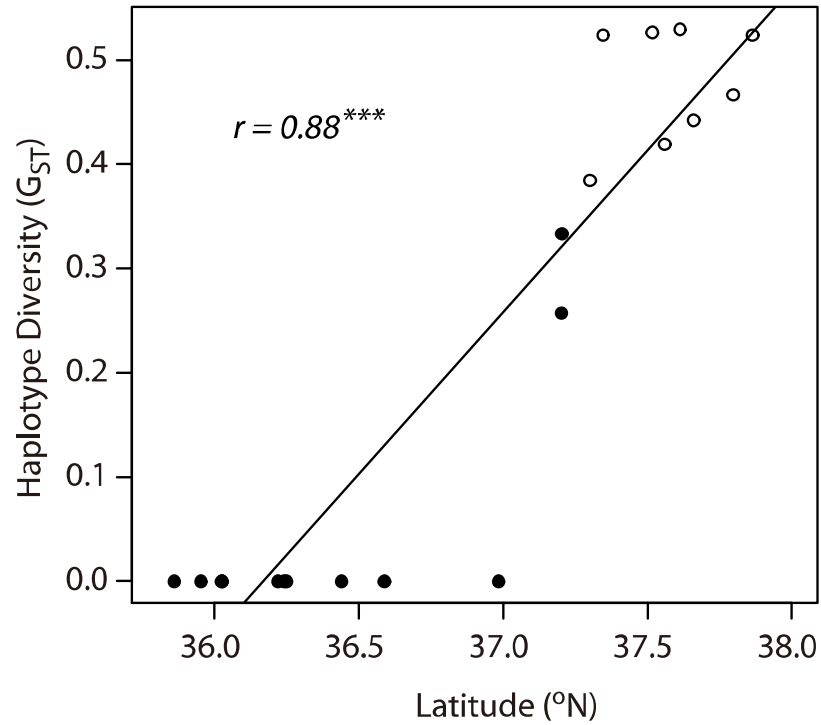


Figure 27 Relationship between the latitude of the sampling locations and genetic diversities of *S. rubrovittatus* mtDNA haplotype diversity. Symbols of locations indicate one of two groups (1. white circles; 2. black circles) identified in Bayesian clustering analysis. The regression lines and Spearman's correlations are also shown. Asterisks (***) indicate values that are statistically significant ($P < 0.001$).

考察

福島県と茨城県における本種の遺伝的構造

マイクロサテライト多型の解析によって、福島県と茨城県のアカスジカスミカメ地域個体群は南北で2つの遺伝的グループに分けられることが明らかになった。これは第2章の全国的な調査で予想された結果に一致した。遺伝的交流の境界は福島県南部に存在し、北緯37.3度付近から東西方向に伸びていると考えられた。境界の南北で分けた2つの遺伝的グループ内には、別のグループに分類されたサンプルはなく、遺伝的境界は明確に2つのグループ間の遺伝的交流を妨げていると考えられた。

ミトコンドリアの解析からは、系統Aの存在の有無によって、やはり両県の個体群は南北で2つに分けられた。系統Aに属するハプロタイプは、境界の南端にあたる地点F9とF10ではそれぞれ30パーセントを占めるものの、F11以南からは全く発見されず、この地点間に明確なミトコンドリアDNAの遺伝的な分断があると考えられた。境界を末端の地点の間にあると仮定すると、ミトコンドリアDNAの境界の位置はマイクロサテライトの解析から同定された境界と比較して15km南に相当する。つまり、F9とF10の2地点のサンプルはマイクロサテライトによる解析では遺伝的に南のグループに含まれるが、ミトコンドリアの系統解析では北のグループに含まれ、両DNAの遺伝的マーカーで違いが生じた。

核DNA上のマーカーとミトコンドリアDNAのマーカーにおいて遺伝的構造が異なることはさまざまに報告されている。この原因として、遺伝様式の違い（DeSalle & Giddings, 1996²³）、塩基置換速度と遺伝的浮動のスピードが両者で異なること、性特異的な行動範囲の違い（Rassmann et al., 1997⁸⁷）などが挙げられている。我々の研究においては2つのグループ間の pairwise F_{ST} は核DNAでは0.004、ミトコンドリアDNAでは0.43である。ミトコンドリアは有効個体群サイズが核DNAの半分であ

ることから、性比を 1:1 であるとして pairwise F_{ST} を補正すると (Crochet, 2000²⁰) 0.16 となり、それでもマイクロサテライトデータから得られた F_{ST} の値と比較してかなり大きい。このことはミトコンドリア DNA の空間的分散が核 DNA より小さい、つまり雌の行動範囲が雄よりも小さいことを反映しているのかもしれない。

2つの遺伝的グループの遺伝的多様性の特徴

核 DNA とミトコンドリア DNA はどちらも、北のグループで南のグループよりも遺伝的多様性が大きい。また、ミトコンドリア DNA では北のグループは2つの系統が混在するのに対し、南のグループは1つの系統しか存在しない。ミトコンドリアの2つ系統は1.7%と非常に大きく塩基配列が異なっており、このことから、2つの系統は氷河期以前に分化して別々の場所に生き残ったものが、氷河期以降の本種の分布拡大によって全国に広がったと考察できる。分布拡大の際に、北部グループの個体群ではこの2つの系統が混じったのに対し、南部のグループでは1つの系統に由来する個体のみが残ったのであろう。マイクロサテライトマーカーの多様度が北の個体群では高く、南の個体群では低いことも上記の仮定と一致する。今回我々が同定した福島県南部にある本種の遺伝的境界は、氷河期終了後の長い時間にわたって遺伝的交流を妨げるバリアとして機能してきた可能性がある。

近年のアカスジカスミカメの害虫化との関係

我々が今回調査した地理的な領域においても、アカスジカスミカメによる被害報告は、2000 年以降急増している。福島県では、2000 年以前はアカスジカスミカメの発生はほとんどなかったが、1999 年から 2002 年にかけて浜通りにおいて本種の個体数の急増が見られ (菊地ら, 2004⁵⁹)、2008 年と 2010 年には水田農家に対する防除警報が県によって発令されている。茨城県においては、アカスジカスミカメによる深刻な斑点米被害は報告されていないが、今回のサンプリングによっても、本種が広く分布していることが確認されている。アカスジカスミカメの害虫化という現

象と、被害地域の拡大という農業上の大きな変化が起きているにもかかわらず、遺伝的に南北で大きく2つに分けられるという事実は非常に興味深い。本種は、イネ科植物を寄主植物とするが、飛翔能力をもち、季節や植物の状態によって寄主植物間を移動する。もし野外において本種の一部の個体であっても長距離の移動をするのであれば、今回測定された遺伝的バリアは簡単に消滅してしまうと考えられる。現実には明らかな遺伝的境界が存在しているから、アカスジカスミカメの近年の密度増加や被害地域の拡大は遺伝的なバリアの維持に影響を与えなかったと考えられる。

遺伝的な境界が生じる要因

個体群間の遺伝的交流を妨げる要因として、地理的な障壁 (Forister et al., 2004³⁰)、気象的な要因 (Zakharov & Hellmann, 2008¹²⁸)、寄主植物等餌の要因 (Mopper, 1996⁷⁰; Carletto et al., 2009¹⁰) などがある。地理的な障壁は物理的に個体群の移動を制限することで遺伝的交流を妨げる。筆者らの調査範囲において地形データと遺伝的境界の位置関係を照らし合わせると、大きな河川や山脈など明確な地理的障壁は発見できないが、地形の影響を示唆する証拠は見つけられる。福島県の内陸部において遺伝的境界の周辺に存在する F9 (矢吹町) と F11 (棚倉町) はどちらも久慈川に沿っている。久慈川はこの両地点の西側に存在する八溝山を源流として南に流れ、茨城県に入ったのちに太平洋に流れ込む。地点 F9、F11 の個体群は久慈川に沿って南の個体群と地形的には連続していることから、両地点の個体群が南のグループに含まれることは地形的な観点からも納得できる。一方、福島県の海岸側の遺伝的境界にあたるいわき市の地点 F10 周辺にはこのような地形的に南北の違いはないように見える。しかし、海側の地域は境界線の南北で気候の違いが大きい。いわき市は福島県でもっとも温暖な地域であり、その気候は東北地方よりもむしろ関東に近い。例えば、1979 年から 2000 年の平均値から計算した平年値を比較すると、いわき市 (地点 F10) の平均気温は 18.2℃で常陸大宮市 (地点 I1、南部グループ) の 18.3℃

に近いが、北部グループの南端に位置する3地点（地点F6、F7、F8）の平均値は17.0℃といわき市と比較してかなり低い。変温動物である昆虫の生活史は気候に大きく左右され、この影響は昆虫の発育を制御する有効積算温度と気温の関係によって説明される。たとえば休眠卵で越冬するアカスジカスミカメの世代数は地域によって異なり、4-5世代（滋賀県; 重久, 2004a⁹⁴）から2-3世代（岩手県; 飯村ら, 2004⁴⁴）である。福島県内においても、発育に必要な有効積算温度を用いて本種の越冬形態である休眠卵を生む臨界日長から世代数を予測すると、世代数はいわき市と浪江町では異なるという（松木、未発表データ）。つまり、北部グループと南部グループの間では気象条件への反応違いにより世代数や発生消長に違いが生じている可能性がある。この違いによって、2つの遺伝的グループの個体間の交配が制限されたり、交配の雑種後代の適応度が低下している可能性は否定できない。気象条件への適応の違いが遺伝的な交流のバリアとなっているか否かについては、現地で発生消長を調査するなどデータを集めてさらに検討する必要がある。

一方、寄主植物が本種の遺伝的交流の妨げになっている可能性は大きくないと考えられる。本種の寄主植物はかなり明らかにされており、スズメノカタビラ、スズメノテッポウ、メヒシバ等の土着のイネ科雑草に加え、栄養が豊富な輸入牧草であるイタリアンライグラスで非常によく繁殖することが知られている（Yoshioka et al, 2011¹²⁶）。イタリアンライグラスは本種が全国的に蔓延した一つの原因とも考えられており、害虫化との関係は深い。しかし、イタリアンライグラスを含めたこれらの寄主植物の分布は福島県と茨城県の間でも大きな違いはない。

まとめると、本種の遺伝的分化の原因には地形的要因と気象要因のふたつが関与していると考えられる。

総合考察

本研究は、この20年間の間に急速にイネへの被害を拡大させたイネ害虫であるアカスジカスミカメについて、被害拡大の過程と要因を、地域個体群の遺伝的多様性の解析から明らかにしようと試みたものである。新たな害虫が出現し、空間的・時間的に変化する過程を Berryman (1987⁷⁾) は、1) 害虫化した種が自力で拡散し永続的に被害を与える、2) 生息環境や遺伝的变化によって密度を増加し害虫化するが拡散はせず、存続も環境に依存する、のふたつに分類した。前者は、侵入害虫においてよく観察され、種の拡散能力と天敵の不在等の好条件によって害虫種が爆発的に増加・拡散する場合である。日本における代表例としては1976年に愛知県に侵入し、10年足らずで全国に発生分布したイネミズゾウムシ（岡田, 1982⁸⁰⁾）がある。また、1989年に侵入が確認されたシルバーリーフコナジラミ、1990年に侵入が確認されたミカンキイロアザミウマのように施設園芸の外来害虫として侵入し、人為的な移動によって瞬く間に全国に定着した害虫種もこれにあたる。一方、後者は、土着種の害虫種によく見られ、被害の程度や拡大もより穏やかである。アメリカにおけるマツの害虫 western pine shoot borer (Stoszek, 1973¹⁰¹⁾) などがその例となる。

土着種の害虫の被害拡大の過程を解析することは、侵入種の拡大の過程を把握するのと比較してはるかに難しい。ある地域で新たに土着の害虫種の被害が確認された場合、被害をもたらした個体群は低密度でその場所に生息していた個体群の性質が変化したものなのか、加害に適した個体群が外部から移動分散によって侵入したのか判断することは困難だからである。また、移動性の土着種において地域個体群間の遺伝的な違いを検出するためには、侵入種と比較して多くの遺伝的なマーカーを使用する必要があると考えられる。

多食性の植食性昆虫は特定の寄主植物に適応した系統を容易に生じることが知られている (Mopper, 1996⁷⁰⁾)。例えばかつて日本の代表的なイネ害虫であったニカメイガは、寄主植物の違いを反映してマコモを食害する系統とイネを加害する系統に

分化している可能性が報告されている (Ishiguro et al., 2006⁴⁵)。土着種であるアカスジカスミカメの寄主植物はイネ科植物に限定されるが (加藤・長谷川, 1950⁵⁴; 林・中沢, 1988³⁸; 長澤, 2007⁷²)、イネ (*Oryza sativa*) 自体は特に好まれる植物ではなく、水田周辺のイネ以外のイネ科雑草が主な発生源である。また、本種による斑点米被害が顕在化した地域では、外来のイネ科牧草であるイタリアンライグラスが増殖源となっていることが繰り返し報告されている (高橋ら, 1985¹⁰⁶; 林・中沢, 1988³⁸; 柿崎 2004⁵²)。このことから、多食性であるアカスジカスミカメにおいて、イタリアンライグラスやイネへの選好性が特に増した系統がある地域で生じ、全国に広がって斑点米被害をもたらしている可能性も考えられるのである。実際、アカスジカスミカメは被害が短期間で急激に拡大したこと (渡邊・樋口 2006¹¹⁷)、活発に飛翔行動を示し、潜在的な飛翔能力は高いと考えられること (安藤 2008¹; 小林 2007⁶⁴)、北陸地方や北海道などそれまで分布が確認されていない、あるいは分布していても密度が非常に低いと考えられていた地域において、この 10 年間で急激な密度増加が確認されたこと (柿崎, 2004⁵²; 樋口, 2010⁴¹) などから、本種による被害の拡大が加害個体群の分布拡大によってもたらされている可能性が提起されてきた。一方、一般的に土着種の地域個体群がそれぞれの地域の環境に遺伝的に適応しているとすれば、他地域からの移入個体は新たな環境に簡単には適応できないから、この制約によって被害の拡大は制限を受けると考えられる (Charles & Schneider, 1987¹⁵)。この仮説に立てば、気象条件など環境がさまざまに異なる日本各地の水田地帯に特定の個体群が容易に分布を拡大できるのかという疑問が生じる。各地の地域個体群を形態や行動で識別することができれば、加害個体群の由来を明らかにすることは可能であると考えられるが、この識別は現在のところ不可能であり、各地で行われている被害状況や発消長の調査からは、加害個体群の分布拡大や移動の実態を把握することは困難である。

アカスジカスミカメの成虫は活発な飛翔行動を示すことから、飛翔時間と飛翔速度を測定して世代あたりの移動範囲を推定し、本種の拡散速度を推定することも試みられた (安藤, 2008¹; 小林・菊池, 2007⁶⁴)。しかし、飛翔能力は移動分散の間接

的なデータに過ぎず、世代を超えた長い時間の分散過程を推定することもできない。このため、この方法は野外における個体群の分布拡大を知るうえでは不十分である。

本研究で用いた DNA マーカーによる遺伝的多様性の解析は、形態では識別できない地域個体群の特徴を認識でき、また、何十世代にもわたる時間単位における個体群の分散と交流の実態を捉えることができるメリットがある。さらに、北海道から宮崎県まで日本における本種の分布域をほぼ網羅するサンプリングができたことから、得られた結果は日本における本種個体群の遺伝構造を正確に反映していると考えられ、本種の被害拡大の過程を推測するうえで極めて有効であった。

まず、本種の日本における遺伝的構造について考察する。全国のアカスジカスミカメからはミトコンドリア DNA の 39 種類のハプロタイプが得られ、その構成には地域個体群間で有意な違いがあった。つまり、各地の地域個体群の遺伝的構造は一樣でなく、いくつかの地域ブロックに分化していることが示された。このことは、本種の加害個体群が短時間に全国に分散して害虫化したという仮説を否定する。また、本種の各地の個体群間の交流は限定的であることを示す。さらに、ミトコンドリア DNA は、互いに塩基配列の大きく異なる 2 つの系統に分けられたが、これは日本のアカスジカスミカメが 2 つの異なる由来を持つことを示す。2 つの系統間の塩基置換の割合から、これらが分岐した年代は氷河期の後期に相当すると推定され、氷河期に日本列島が寒冷化した際に異なる退避地に取り残された 2 つの個体群が、その後の温暖化に伴う分布拡大によって混じり合ったものと考えられた。世界的には、このように氷河期に個体群の隔離と混合が起きた例は昆虫種でも多く知られており、日本においてもいくつか報告の例がある (Sota et al., 2004¹⁰⁰; Kawai et al., 2006⁵⁶; Aoki et al., 2008³)。アカスジカスミカメの寄主植物は主に一年生のイネ科植物であることから、氷河期における植生の変化によってこれら寄主植物の分布域が変化し、本種の生息域もそれに伴って縮小と再拡大を行ったと考えられる。アカスジカスミカメにおいては、ミトコンドリア DNA の 2 つの系統の構成比は北日本と南日本で大きく異なり、北日本は 2 つの系統が同程度の割合で混じり合って個体群を構成しているのに対し、南日本では 1 つの系統しか存在しない。さらに、どちらの

ミトコンドリア系統も北日本の個体群ほど多くのハプロタイプを含み遺伝的多様性が高い。一般に、種の分布域の起源にあたる地域では遺伝的多様性が高く、離れるにつれて遺伝的多様性が低くなるとされている。日本のアカスジカスミカメについてこの理論を当てはめると、2つのミトコンドリア系統はともに北日本を源とし、南方に分布拡大したと推察できる。ミトコンドリア系統 A が北日本にしか存在しないのは、この個体群が南日本へは分布拡大を行わなかったか、拡大過程における遺伝的浮動によってこのハプロタイプが失われたことを示唆する。また、全国に存在するミトコンドリア系統 B において、関西以西の南日本全域で遺伝的多様性がほとんど失われているのは、南方への移動に伴うボトルネック効果によって遺伝的多様性を失った個体群が、短時間に急激な分布拡大を行ったためであると考えられる。

興味深いことに、地域個体群の遺伝的多様性の大きさは現在の本種の生息密度とは一致しない。ミトコンドリア DNA のハプロタイプ多様度は岩手県北上市の個体群が最も高く、2 番目は北海道南部の知内町であった。しかし、分布域の北限にあたる北海道南部ではようやく 1998 年ころから本種の分布が確認され、2003 年に初めて、牧草地で繁殖していることが報告されているに過ぎない（柿崎, 2004⁵²）。また、現在においても牧草地等好適な寄主植物が存在している場所以外では本種の生息密度は高くない。このように、生息地の分布の状況や個体群のサイズのみを見ると、北海道南部の個体群は新規の個体群のように見える。しかし、実際には北海道南部の個体群は遺伝的に多様であるだけでなく、本州の個体群からは検出されない独自のハプロタイプを含んでいる。集団遺伝学的にみると、北海道のアカスジカスミカメ個体群は長い時間この場所で維持されてきた独自の個体群であると考えられる。

ミトコンドリアのハプロタイプの構成から日本各地のアカスジカスミカメ個体群を分類すると、緯度に沿って南北に分化した地理的グループに分けられる。特に福島県と茨城県で行った高密度のサンプルの解析結果から、ミトコンドリア DNA の系統 A は福島県南を東西に走る境界線によってはっきり分布が制限されている様子が明らかになった。このことは、遺伝的交流を妨げる要因が、緯度に沿って変化する要因で決定されている可能性を示す。変温動物である昆虫種の分布域は、気候の影

響を強く受ける。アカスジカスミカメの地域個体群は各地の気象条件に適応しており、異なる気象条件に対応したグループとの遺伝的交流は妨げられている可能性がある。本種の世代数は地域によって異なり、滋賀県では 4-5 世代（重久, 2004a⁹⁴）、岩手県では 2-3 世代（飯村ら, 2004⁴⁴）である。これらは当然それぞれの気象条件に適応した結果であり、世代数の異なるアカスジカスミカメの個体群は、発育零点、有効積算温度、休眠卵の産卵条件等において、他の個体群と異なる状態に最適化されている可能性が高い。世代数が異なる個体群間では、たとえ交配が成立しても後代がその地域の気象条件に対応できず、結果として遺伝的に異なるグループ間の境界が維持されるのかもしれない。南北間で本種の遺伝的な断絶が存在する福島県においては、現在松木伸浩氏によって、福島県各地の個体群の世代数の推定が行われている。本種において世代数の違いが遺伝的分化の要因になっていることが確認できれば、多化性の昆虫種において遺伝的構造を決定する要因として新たな知見となるかもしれない。

ミトコンドリア DNA と核 DNA の結果を合わせて各地の地域個体群をクラスタリングした結果、アカスジカスミカメの全国の個体群は大きく 3 つに分けられることが明らかになった。これは、ミトコンドリア DNA と核 DNA の両方から得られた結論であり、本種の包括的な遺伝的構造を示すと考えられる。各クラスターは地域的にまとまりをもった個体群に分類されたため、それぞれの北日本群、関東群、南日本群と名付けた。これらのグループ内での遺伝的交流は存在するものの、それを越えた交流はまれであることが示された。解析の結果をまとめると、日本におけるアカスジカスミカメの遺伝的構造は氷河期以降の分布拡大によって形成され、現在も地域間の遺伝的分化が維持されている。

アカスジカスミカメは経済的被害の大きい斑点米カメムシ類の 1 種であること、被害の拡大が比較的最近であったことなどから、年次ごとの各地の被害状況を示す情報が存在する。この情報を遺伝的多様性の解析結果と照合することで、本種の被害拡大の過程と要因を推定した。まず、本種が日本で最初に斑点米カメムシとして問題化した場所は宮城県と広島県で、ともに 1980 年代半ばである。集団遺伝学的解

析からこれらの2つの地域個体群は遺伝的に異なるグループに属しており、2つの加害個体群は異なる起源を持つと考えられる。また、この初期の被害が報告されたそれぞれの県に隣接する県に属する個体群は、被害の報告年はずっと遅いにも関わらず、遺伝的に似通ったグループに属している。このことから、本種による初期の斑点米被害をもたらした2つの個体群は、それぞれの地域に土着の個体群であったと考えられる。また、関東地方において本種の増加が確認されるようになったのは上記の2か所と比較して遅く、ようやく2000年代の半ばであるが（片瀬ら, 2007⁵⁵）、関東地方の個体群は初期被害をもたらした宮城県や広島県の個体群とは異なる遺伝的背景を持っていることから、すでに害虫化した地域から関東地方に加害個体群が侵入して増加したとは考えられない。以上の事実から、本種が害虫化の過程で全国レベルの移動分散を通じて被害を拡大させたという仮説は否定される。アカスジカスミカメの被害が全国で増加している原因は、加害個体群が移動分散して被害地域を拡大しているからではなく、それぞれの地域に低密度で生息していた土着の個体群がそれぞれの地域の環境の変化に応じて害虫化したのだと考えられる。

2000年以降にアカスジカスミカメによる斑点米被害が相次いで報告されるまで、水田周辺での本種の密度は低かったと考えられている。しかし、現在では本種は各地でイネ科植物から簡単に採集できる一般的な種となっている。この間の密度の増加は想像を絶する変化であるにもかかわらず、本種の地域個体群の遺伝的特徴が地域ごとに維持されているという事実は興味深い。アカスジカスミカメ地域個体群の遺伝的な独自性は、農業害虫としての劇的な密度増加によっても簡単には破壊されないほど安定していることを示す。

土着の害虫種において、加害個体群の起源を知るために遺伝的多様性を調査した研究は多くないが存在する。オーストラリアの主要な果実害虫であるクイーンズランドミバエ（*Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae)）では、遺伝的多様性の解析の結果、各地に点在する互いに離れた個体群はそれぞれの気候に適応しており、異なる地域間の遺伝子交流はほとんどないことが示されている（Yu et al., 2001¹²⁷）。また、中国全土におけるイネ害虫ニカメイガ *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae)

の遺伝的多様性の調査から、ニカメイガの個体群は3つの大きなグループに分けられ、この遺伝的構造はイネの栽培化の過程と地理的要因によって確立されたとされている (Meng et al., 2008⁶⁹)。さらに、Chapuis ら (2008¹³, 2009¹⁴) は、世界に広く分布し、いくつかの地域で深刻な害虫となっているトノサマバッタにおいては、地域ブロック間の遺伝的分化はあっても、過去の害虫化の有無の違いによる個体群の遺伝的分化は生じていないことを報告している。これらの研究は、害虫の加害個体群が土着の個体群の密度増加によって生じている例を示している。我々の研究結果は、日本列島という限定された地域内で、20年間という短時間で新たに害虫となったアカスジカスミカメにおいても同様の結論が得られることを示した。

本種が害虫化した原因については、発生源となる水田周辺におけるイネ科植物の増加 (林, 1986³⁶; 伊藤, 2004⁴⁸)、温暖化に伴う世代数の増加 (Kiritani, 2006⁶²; Kiritani, 2007⁶³) などの環境要因が疑われている。水田周辺のイネ科植物については、アカスジカスミカメによる斑点米被害が初めて問題になった 1980 年代においてすでに、イタリアンライグラスが本種の密度増加に関与している可能性が指摘されている (高橋ら, 1985¹⁰⁸; 林・中沢, 1988³⁸)。また、2000 年以降の全国各地で本種による斑点米被害が問題となってからも、水田周辺にイタリアンライグラスやヒエ類が繁茂していると水田内での本種の密度が高くなること (高田ら, 2000¹¹⁰)、密度が非常に低い北海道においてもイタリアンライグラスを栽培した牧草地では本種の発生が見られることなどが報告されている (柿崎, 2004⁵²)。さらに、Takada ら (2011¹⁰⁶) は、水田内のアカスジカスミカメ密度は、水田から 400m 以内にあるイタリアンライグラス主体の牧草地の面積と強く相関していることを報告している。イタリアンライグラスは生育が極めて速く広い地域で栽培できるため、明治時代に導入されて以降重要な牧草として全国で利用されており、その面積は 6 万ヘクタールを超える。また、発芽定着が早く、伸長性に優れることから、河川敷・道路法面の緑化資材としても盛んに利用されてきた。その後、イタリアンライグラスは利用地から逸出して日本各地で野草化しており (山下, 2002¹²⁰; 浅井・與語, 2005⁴)、現在では全国どこでも見られるイネ科雑草となっている。従来、アカスジカスミカメが細々と生息

していたイネ科の在来種を中心とした雑草地に導入作物であるイタリアンライグラスが侵入したことで、本種の増殖に適した発生源が生じた可能性は十分に考えられる。このような発生源が水田の近くで増えれば、水田での斑点米被害は当然増加するだろう。事実、複数の植物が混在する環境下ではイタリアンライグラスの密度のみがアカスジカスミカメの密度と相関しているという最近の報告もある（Yoshioka et al., 2011¹²⁶）。本研究における遺伝的多様性の解析では、地域個体群間の遺伝的分化は確認されたものの、植生間の遺伝的分化は検出されていない。同じ地域内では、イタリアンライグラスから採集された個体群とイネ科の在来種から採集された個体群は遺伝的に違いがないと考えられるのである。これらをまとめると、元来マイナーな土着種であったアカスジカスミカメが、水田地帯におけるイタリアンライグラスの蔓延やイネ科植物の増加によって密度を増し、斑点米被害を引き起こすようになったと考えられる。

地球温暖化に伴う気温の上昇もアカスジカスミカメの増加に関与しているとされている（樋口, 2010⁴¹）。Kiritani（2006⁶²）によれば、過去 40 年の間に日本の平均気温は 1℃増加しており、これは発育零点が低く有効積算温度が低いカスミカメムシ類の世代数を増加させた可能性がある。また、気温の上昇は分布の拡大や、冬季死亡率の減少等の影響を通して、本種の密度を増加させている可能性もある。本研究の遺伝的多様性の解析が示すように、本種の地域個体群は全国レベルでは南北に緯度に沿って穏やかに分化しており、また福島県の個体群で示されるように南北ではっきりとした遺伝的分化が認められる地域もある。南北方向に遺伝的交流を妨げる要因ははっきり特定できていないが、昆虫の発育が気温に大きく影響されることを考えれば、本種における遺伝的分化が気温あるいは気温に影響される世代数等の変化によって引き起こされている可能性は高いと考えられる。特に、種分布の北限にあたる地域では、気温の変化が個体群の密度や存続に大きく影響することが知られている（Zakharov et al., 2008¹²⁰）。日本のアカスジカスミカメの分布の北限にあたる北海道南部で 2000 年代から本種の密度が急増していることは、近年の気温上昇によって説明できるかもしれない。さらに、本種の世代数は南日本で 4–5 世代、北日本

で2-4世代と地域によって異なる。世代数の変化する境界地域においては、気温の上昇によって世代数が変化することが予測される。飯村ら（2004⁴⁴）は近年のアカスジカスミカメの増加の原因のひとつとして、冬季の気温の上昇をあげている。卵越冬を行うアカスジカスミカメでは、冬季の気温の上昇によって越冬卵の死亡率が下がり、これが春からの越冬世代の密度の増加の原因になるとしている。気温上昇がアカスジカスミカメの発生量に与える影響を評価することは簡単ではないが、少なくとも上記の理由から、近年の密度増加と無関係ではないと言える。

以上、アカスジカスミカメの近年の増加の原因について、1）寄主植物であるイタリアンライグラス等のイネ科植物の増加と、2）地球温暖化に伴う気温上昇、のふたつの大きな要因について遺伝的多様性の解析結果と絡めて考察した。上記の農業環境の変化は、規模の違いには地域差はあるにしても、現在日本のあらゆる水田地帯で共通してみられる現象である。本種の害虫化を、それまで密度が低く生息していた土着の個体群の密度増加がもたらしているのだとすれば、これらの環境変化が本種の密度増加の原因であるということになる。本種の密度や被害の程度が調査地点により大きく異なることを考慮すると、本種を害虫化させる要因は地域内における上記のようなさまざまな環境要因が影響しており、それらの要因をひとつずつ比較検討していくことで、本種が害虫化した原因が解明できると考えられる。

アカスジカスミカメの遺伝的多様性に関する本研究は、本種の防除の参考となる情報も提供する。現在行われているアカスジカスミカメの防除法は以下の2点に集約される。すなわち、

1）水田周辺に繁茂するイネ科植物を管理してアカスジカスミカメの発生源を取り除き、密度を低下させる。

2）イネの出穂後に水田に侵入したアカスジカスミカメを、1-2回の殺虫剤の散布によって防除し、登熟中の籾への加害を防ぐ。

である。イネ科植物は水田畦畔、休耕田、畑、農道、道路法面、公園、空き地など至る所に存在しアカスジカスミカメの発生源となりうるため（樋口, 2010⁴¹）、管理すべき面積は膨大である。アカスジカスミカメによる斑点米被害報告は2000年以

降全国的に急激に増加したため、密度の増加と分布拡大が混同されてきたように思われる。本研究の結果は、アカスジカスミカメの密度増加は地域内の土着の個体群の増加によってむしろ説明されることを示す。このため、他の地域個体群と遺伝的に隔離された地域内で徹底した発生源の管理を行って本種の密度を下げれば、その効果は長く続くと考えられる。例えば、本研究で関東群に分類される個体群は、千葉県、茨城県、埼玉県、群馬県等の利根川沿いで密度が増加している集団である。これらの地域は 2004 年以降の比較的最近に本種の増加が確認された地域であり、その発生源もイタリアンライグラスを中心としたイネ科植物の繁茂地の周囲であることが明らかになっている。これらの発生源を定期的な除草によって穂が結実しない状態に維持できれば、アカスジカスミカメの繁殖を抑えることができる。地域内全体で本種の密度を 90 年代のレベルに下げられれば、利根川沿いの水田の斑点米被害を解決できる可能性がある。この際、管理する地域の大きさを本種の遺伝的交流の範囲より大きくとれば、効果は安定するだろう。本研究の結果明らかになった遺伝的構造では、それぞれの個体群が大きすぎるため、対象とする地域が複数県にまたがり、管理すべき面積も広がってしまう。これについては、DNA マーカーの数を増やして遺伝的構造の解析の精度を上げることで解決できる可能性がある。解析の精度が上がれば、より近距離の個体群間の遺伝的差異を検出できるようになり、1-数世代の時間での成虫の移動距離の推定や、地点間での 1 年あたりの遺伝的交流の度合いの推定など、生態的に重要な知見に基づいた植生の管理面積の細やかな設定が可能になると考えられる。これは今後の課題である。

さらに、水田に侵入した本種には殺虫剤による防除が行われるが、毎年連続して大量の殺虫剤が散布されることで、殺虫剤抵抗性の発達が懸念される。実際、アカスジカスミカメと並んで斑点米被害の重要種となっているアカヒゲホソミドリカスミカメについては、すでに有機リン系の殺虫剤に殺虫剤抵抗性を発達させた個体群の出現が認められている（石本, 2004⁴⁶; 吉村・越智, 2010¹²⁴）。アカスジカスミカメについても、現在と同様の殺虫剤の散布が続けば、殺虫剤抵抗性の発達も十分に予想される。殺虫剤抵抗性を獲得した個体群がある地点で発生した場合、抵抗性の拡

大をモニタリングし、できるだけ拡大を防ぐ殺虫剤散布の計画を立てる必要がある。本研究の結果から、各地の加害個体群は土着の個体群に由来していると考えられ、殺虫剤抵抗性の個体群がある場所で生じたとしても、抵抗性の個体群が全国に迅速に拡大する可能性は低いと考えられる。

以上、要するに本研究は、日本における重要なイネ害虫の1種アカスジカスミカメについて集団遺伝学的解析を行い、地域個体群の遺伝的構造を明らかにするとともに、本種が短時間で急速に被害を拡大した過程と要因の一端を明らかにしたものである。

摘要

カメムシ類が登熟中のイネを吸汁すると、収穫後の玄米に黒色あるいは茶色の食害痕が残った「斑点米」が形成される。斑点米の混入は米の品質を低下させることから、可能な限り低く抑える必要があるが、このためには斑点米形成の原因となるカメムシ類を防除する必要がある。斑点米の原因となるカメムシ類は多く知られている。中でも、1980年代中ごろから一部の地域で問題となり始めたアカスジカスミカメ (*Stenotus rubrovittatus* (Hemiptera: Miridae)) は 2000 年以降密度が顕著に増加しており、現在では全国各地で斑点米被害を与えるイネの重要害虫となっている。本研究は、アカスジカスミカメによる斑点米被害の拡大の過程と要因を明らかにすることを目的に、日本各地の地域個体群の遺伝的多様性を調査したものである。

アカスジカスミカメ地域個体群の遺伝構造

2005 年から 2008 年にかけて、日本における本種の分布域をほぼ網羅する 34 地点から地域個体群を採集した。これらの個体について、ミトコンドリア DNA についてはチトクローム c オキシダーゼサブユニット I (*COI*) 遺伝子の塩基配列 1,034bp を、核 DNA については 6 つのマイクロサテライトマーカーの多型を解析し、日本のアカスジカスミカメの遺伝的構造を明らかにした。*COI* 遺伝子の解析の結果合計 39 種類のハプロタイプが見つかり、これらを分類したところ、本種のミトコンドリアは塩基配列が大きく異なる 2 つの系統で構成されていることが明らかになった。1 系統は福島県以北の北日本の個体群に存在し、もう 1 系統は全国すべての地域個体群に存在した。塩基配列の違いから 2 つのミトコンドリア系統は更新世にあたる約 75 万年前に分岐したと推定され、現在の分布は氷河期における分布域の縮小とその後の拡大の過程において生じたと考えられた。ミトコンドリア DNA の遺伝的多様度と緯度には有意な相関があり、北日本の個体群ほど高く、南日本の個体群は極めて低かつ

た。また、遺伝的距離と地理的距離の間にも有意な相関があり、本種の地域個体群間の遺伝的交流は地理的距離が離れるほど少ないことが明らかになった。一方、マイクロサテライトマーカーの多型解析の結果、本種の核 DNA はミトコンドリア DNA と同様に北の個体群ほど遺伝的多様度が高い傾向を示し、また、遺伝的距離と地理的距離の間にも相関が認められた。両 DNA において北日本の個体群は高い遺伝的多様性を持つことから、日本における本種の歴史的な起源は北日本にある可能性が示唆された。さらに、遺伝的構造を明らかにするクラスタリング解析の結果、本種の地域個体群は遺伝的に北日本を中心とするグループ、関東を中心とするグループ、南日本を中心としたそれ以外の地域に分布するグループの大きく 3 つに分けられた。このことから、本種の地域個体群はそれぞれの地域に定着しており、グループ間での個体の移動は長い時間制限されてきたことが明らかになった。まとめると、日本における本種の遺伝的構造は氷河期以降の分布拡大によって形成され、現在も地域間の遺伝的分化が維持されている。

全国レベルの調査で明らかになった遺伝的なグループについて、グループ間の境界の正確な位置と遺伝的交流を妨げる要因を明らかにするため、福島県と茨城県内の地域個体群について高密度のサンプリングを行い、遺伝的多様性の解析を行った。その結果、福島県南部の北緯 37.3 度の位置に東西に沿って遺伝的グループの境界が存在した。この境界はミトコンドリア DNA と核 DNA の両方においてこの地域の本種の個体群を南北に 2 分していた。境界周辺には八溝山とその周辺を源流とする久慈川が流れており、関東地方側に属する個体群の北限は久慈川に沿っていることから、地形が遺伝的交流を妨げる要因になっている可能性が示されたほか、平均気温が両グループの境界地点で大きく異なることから、気候条件が両グループを隔てる要因として機能している可能性も示された。本種の世代数は地域により異なり、西日本では 4-5 世代、東北地方では 2-3 世代とされており、世代数や世代数の違いに伴う発生時期の違いが両グループの交流を妨げている可能性もあるが、これは今後の検討課題である。

アカスジカスミカメによる斑点米被害の拡大と遺伝的多様性の関係

次に、アカスジカスミカメの斑点米被害の拡大の過程と、地域個体群の遺伝的多様性の関係を検討した。1980年代に日本で最初に本種による斑点米被害が報告された宮城県と広島県の加害個体群はそれぞれ遺伝的に異なるグループから生じており、異なる起源をもつことが明らかとなった。また、2000年代半ばから斑点米被害が報告され始めた関東地方の比較的新しい加害個体群は、すでに被害が顕在化している東北地方や南日本の地域の個体群とは遺伝的に異なるグループに属し、むしろ近隣の低密度に生息する個体群と遺伝的に近いことがわかった。これらの結果から、近年観察される本種による急激な被害の拡大は、特定の加害個体群が全国に分布を拡大することで生じたのではなく、それぞれの地域に適応している低密度の土着の個体群が、各地域で起きた環境の変化に応じて密度を増加して害虫化したと考えられた。また、水田で採集した個体群と水田周辺のイネ科牧草から採集した個体群間に遺伝的な差は観察されず、寄主植物による遺伝的な分化は生じていないと考えられた。

アカスジカスミカメは、斑点米カメムシの原因種として認識される以前は害虫としてほとんど知られておらず、全国的に生息密度の低い無名種であった。また、その分布域の調査もされていなかったため、斑点米被害が報告されて初めて生息が確認された地点も多く、本種による斑点米被害は本種の分布拡大によって生じているのではないかという推察もなされてきた。しかし、本研究において聞き取り調査を含めたサンプリングを全国的に行ったところ、アカスジカスミカメの分布が斑点米被害の拡大に伴って近年広がったという証拠は得られず、むしろ斑点米被害が顕在化する前から本種は土着種として低密度ながら全国に分布していたと推測された。遺伝的多様性の解析の結果、本種の地域個体群はむしろそれぞれの地域に土着の個体群であり、遺伝的構造は長い時間をかけて形成されたものであると考えられた。さらに、本種が全国的に斑点米カメムシ類の主要種として問題となったのちもこの遺伝構造は維持されていると考えられた。結局、各地で問題化しているアカスジカス

ミカメの加害個体群は、それぞれの地域内に従来から生息していた個体群が密度を増して生じたものであると推察される。

アカスジカスミカメが近年密度を急増させた原因として、減反政策による休耕田の増加や、水田周辺の雑草管理の不徹底によって寄主植物となるイネ科植物が増加したことが第一にあげられている。水田環境の変化が、それまで低密度で生息しているに過ぎなかった土着種であるアカスジカスミカメが増殖する条件が整って発生源となったこと、このような環境の変化が全国各地で同時に起きたことが、本種が近年日本の斑点米カメムシの主要種となった原因であると考えられる。

謝辞

本研究は、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター斑点米カメムシ研究東北サブチームにおいて行われたものである。本研究の遂行に当たり、丁寧なご指導をいただいた同チーム長渡邊朋也博士、サブチーム長榊原充隆博士に心より謝意を表する。また、同櫻井民人博士には共同研究者として多くのご指導をいただいた。また、同研究センター大仙研究拠点の皆様には多大なご協力とご援助をいただいた。特に、佐々木満氏には、技術支援者として多大なご協力をいただいた。同機構北陸農業研究センターの樋口博也博士には国内の斑点米カメムシの研究者を広く知りあう機会を与えていただいた。東京大学農学生命科学研究科害虫学研究室の星崎杉彦博士には、遺伝的多様性のデータの解析について貴重な助言をいただいた。北海道立道南農業試験場の柿崎昌志氏、宮城県古川農業試験場の加進丈二氏、小野亨氏、福島県農業試験場の中村淳氏、大谷裕行氏、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター北陸研究センターの高橋明彦氏、新潟県病虫害防除所の永瀬淳氏、新潟県農業総合研究所作物研究センターの佐藤秀明氏、小湊慶司氏、石本万寿広氏、富山県農業技術センターの吉島利則氏、菅野亘氏、茨城県農業総合研究センターの横須賀知之氏、茨城県病虫害防除所の米山一海氏、埼玉県農林総合研究センターの江村薫氏、岐阜県農業技術センターの市橋秀幸氏、岐阜県病虫害防除所の杖田浩二氏、渡辺博幸氏、矢島幹之氏、深井雅己氏、千葉県農業総合研究センターの片瀬雅彦氏、群馬県農業技術センターの船戸弘氏、石川県農業総合研究センターの濱崎貴史氏、滋賀県農業技術振興センターの重久眞至氏、兵庫県農林水産技術総合センター農業技術センターの山下賢一氏、鳥取県農業試験場の奥谷恭代氏、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センターの菊地淳志氏、香川県病虫害防除所の香西宏氏、福岡県農業総合試験場の堤隆文氏、佐賀県農業技術防除センターの口本文孝氏、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センターの竹内博昭氏、大分

県農林水産研究センターの小野元治氏、宮崎県総合農業試験場の櫛間義幸氏には貴重な地域個体群のサンプルをご提供いただいた。厚くお礼申し上げます。また、青森県の市田忠夫氏には、貴重な青森県の個体群のサンプリング場所を教えていただいたほか、東北地域における本種の生息地や分布についての貴重な情報をお教えいただいた。山形県農業総合研究センターの滝田雅美氏には、貴重な山形県の個体群のサンプリング場所をお教えいただいた。福島県農業総合センターの三田村敏正氏、松木伸浩氏には福島県のアカスジカスミカメの分布や被害の歴史について貴重な情報をいただいた。厚くお礼申し上げます。本研究は、平成 18～平成 20 年度農林水産省プロジェクト「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「斑点米カメムシ発生予察技術の高度化と斑点米被害抑制技術の開発」の予算を利用して行われた。

引用文献

1. 安藤慎一郎 (2008) フライトミルを用いたアカスジカスミカメの飛翔能力の測定. 応動昆大会講演要旨 52: 49.
2. Anstead JA, Burd JD, Shufran KA (2002) Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) clones from cultivated and non-cultivated hosts: haplotype and host associations. Bull Entomol Res 92: 17-24.
3. Aoki K, Kato M, Murakami N (2008) Glacial bottleneck and postglacial recolonization of a seed parasitic weevil, *Curculio hilgendorfi*, inferred from mitochondrial DNA variation. Mol Ecol 17: 3276-3289.
4. 浅井元朗・與語靖洋 (2005) 関東・東海地域の麦作圃場におけるカラスムギ、ネズミムギの発生実態とその背景. 雑草研究 50: 73-81.
5. Avise JC (1996) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
6. Avise JC (2000) Phylogeography; the History of Formation in Species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
7. Berryman AA (1987) The theory and classification of outbreaks. Insect outbreaks (eds Barbosa P, Schults JC), pp. 3-30. Academic Press, San Diego.
8. Brévault T, Carletto J, Linderme D, Vanlerberghe-Masutti F (2008) Genetic diversity of the cotton aphid *Aphis gossypii* in the unstable environment of a cotton growing area. Agric For Entomol 10: 215-223.
9. Brower AV (1994) Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 6491-6495.

10. Carletto J, Lombaert E, Chavigny P, Brevault T, Lapchin L, Vanlerberghe-Masutti F (2009) Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Mol Ecol* 18: 2198-2212.
11. Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analyses: models and estimation procedures. *Evolution* 32: 550–570.
12. Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24: 621-631.
13. Chapuis MP, Lecoq M, Michalakis Y, Loiseau A, Sword GA, Piry S, Estoup A (2008) Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Mol Ecol* 17: 3640-3653.
14. Chapuis MP, Estoup A, Auge-Sabatier A, Foucart A, Lecoq M, Michalakis Y (2008) Genetic variation for parental effects on the propensity to gregarise in *Locusta migratoria*. *BMC Evol Biol* 8: 37.
15. Charles M, Schneider JC. (1987) Genetic change and insect outbreaks. pp. 505-527. in Barbosa, P. Schults, J. C. (Eds.) *Insect outbreaks*. Academic Press, San Diego.
16. Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9: 1657-1659.
17. Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163: 367-374.
18. Corander J, Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Mol Ecol* 15: 2833-2843.
19. Corander J, Sirén J, Arjas E (2008) Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Comput Stat* 23: 111-129.
20. Crochet PA (2000) Genetic structure of avian populations – allozymes revisited. *Mol Ecol* 9: 1943-1469.

21. Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
22. Davies N, Villablanca FX, Roderick GK (1999) Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends Ecol Evol* 14: 17-21.
23. DeSalle R, Giddings LV (1986) Discordance of nuclear and mitochondrial DNA phylogenies in Hawaiian *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6902-6906.
24. Dieringer D, Schlotterer (2003) MICROSATTELITE ANALYZER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3:167-169.
25. Estoup A, Angers B. (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: Carvalho G, editor. *Advances in molecular ecology*. Amsterdam: IOS Press. p. 55–86. (NATO ASI series).
26. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
27. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN, version 3.0: an integrated software package for population genetic data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
28. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007) Arlequin (Version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.
29. Felsenstein J (1993) PHYLIP: Phylogenetic Inference Package, Version 3.5c. Seattle, Department of Genetics, University of Washington.

30. Forister ML, Fordyce JA, Shapiro AM (2004) Geological barriers and restricted gene flow in the holarctic skipper *Hesperia comma* (Hesperiidae). *Mol Ecol* 13: 3489-3499.
31. Fu Yun-Xin (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
32. 後藤純子・伊東芳樹・宍戸 貢 (2000) 水田内におけるヒエ類とアカスジカスミカメ (旧称: アカスジメクラガメ) による斑点米との関係. *北日本病虫研報* 51: 162-164.
33. Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *J Hered* 86: 485-486.
34. Grimaldi MC, Crouau-Roy B (1997) Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences. *J Mol Evol* 44: 336-340.
35. Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261-1280.
36. 林 英明 (1986) アカスジカスミカメの生態と防除. *植物防疫* 40: 321-326.
37. 林 英明 (1997) 斑点米カメムシ発生相の変遷と防除対策. *植物防疫* 51: 455-461.
38. 林 英明・中沢啓一 (1988) アカスジメクラガメの生態と防除に関する研究 第1報 生息場所と発生推移. *広島農試報告* 51: 45-53.
39. 林 英明 (1989) アカスジメクラガメの生態と防除に関する研究 第2報 加害能力と斑点米症状の発現について. *広島県農業試験場報告* 52: 1-8.
40. Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc Lond B* 359: 183-195.
41. 樋口博也 (2010) 斑点米被害を引き起こすカスミカメムシ類の生態と管理技術. *応動昆* 54: 171-188.

42. Hurst GDD, Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc R Soc B* 272: 1525-1534.
43. Hutchinson DW and Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53: 1898-1914.
44. 飯村茂之・齋藤誉志美・後藤純子 (2004) 岩手県におけるアカスジカスミカメの発生消長. *北日本病虫研報* 55: 117-121.
45. Ishiguro N, Yoshida K, Tsuchida K (2006) Genetic differences between rice and water-oat feeders in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). *Appl Entomol Zool* 41: 585-593.
46. 石本万寿広 (2004) アカヒゲホソミドリカスミカメの fenitrothion 抵抗性個体群の発生. *応動昆* 48: 348-352.
47. 石岡将樹・木村利幸・木村勇司 (2000) 1999 年に青森県で多発した斑点米 2. アカヒゲホソミドリカスミカメの多発に影響した気象要因と斑点米の発生特徴. *北日本病虫研報* 51: 158-161.
48. 伊藤清光 (2004) 近年の斑点米カメムシ類の多発生とその原因—水田の利用状況の変化. *北日本病虫研報* 55: 134-139.
49. 岩田俊一・葭原俊夫 (1976) 斑点米を発生させるカメムシ類・全国アンケート調査より. *植物防疫* 30: 127-132.
50. Kalinowski ST (2004) Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv Genet* 5: 539-543.
51. Kalinowski ST (2005) HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol Ecol Notes* 5: 187-189.
52. 柿崎昌志 (2004) 2003 年北海道道南地方のイネ科牧草地等におけるアカスジカスミカメの発生状況調査. 55: 110-112.

53. 加進丈二・畑中教子・小野 享・小山 淳・城所 隆 (2009) イヌホタル
イの存在が水田内のアカスジカスミカメ発生動態および斑点米被害量に与
える影響. 応動昆 53: 7-12.
54. 加藤静夫・長谷川 仁 (1950) スーダングラスの害蟲アカスジメクラガメ.
應用昆蟲 6: 149.
55. 片瀬雅彦・清水喜一・椎名伸二・萩原邦彦・岩井 宏 (2007) 千葉県北部
における斑点米カメムシ類の発生状況. 関東東山病虫研報 54: 99-104.
56. Kawai M, Shoda Kagaya E, Maehara T, Zhou Z, Lian C, Iwata R, Yamane A,
Hogetsu T (2006) Genetic structure of pine sawyer *Monochamus alternatus*
(Coleoptera: Cerambycidae) populations in Northeast Asia: consequences of the
spread of pine wilt disease. Environ Entomol 35: 569-579.
57. 川崎聡明・渡辺和弘・土門 清・小形恵美・吉村具子 (2007) 気象条件がア
カヒゲホソミドリカスミカメの発生に及ぼす影響. 北日本病虫研報 58: 84-
87.
58. 川崎聡明・吉村具子・土門 清 (2009) 山形県におけるアカスジカスミカ
メの近年の発生状況. 北日本病虫研報 60: 163-166.
59. 菊地淳志・菅野洋光・木村利幸・後藤純子・小野 享・新山徳光・滝田雅
美・松木信浩・大場淳司・堀末 登 (2004) 東北地域における斑点米カメ
ムシ類の発生と被害実態調査. 東北農業研究センター研究報告 第 102 号 別
冊 pp180.
60. 菊地淳志・小林徹也 (2010) 畦畔等の植生がアカスジカスミカメの増殖に
及ぼす影響. 北日本病虫研報 61: 107-110.
61. Kim KS, Cano-Rios P, Sappington TW (2006) Using genetic markers and
population assignment techniques to infer origin of boll weevils (Coleoptera :
Curculionidae) unexpectedly captured near an eradication zone in Mexico.
Environ Entomol 35: 813-826.

62. Kiritani K (2006) Predicting impacts of global warming on population dynamics and distribution of arthropods in Japan. *Popul Ecol* 48: 5-12.
63. Kiritani K (2007) The impact of global warming and land-use change on the pest status of rice and fruit bugs (Heteroptera) in Japan. *Global Change Biology* 13: 1586-1595.
64. 小林徹也 (2007) アカヒゲホソミドリカスミカメとアカスジカスミカメの飛翔速度の測定. *北日本病虫研報* 58: 96-98.
65. 小林徹也・菊地淳志 (2010) 牧草地の定点調査におけるアカスジカスミカメとアカヒゲホソミドリカスミカメの発生割合の年次変動. *北日本病虫研報* 61: 111-115.
66. Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol Evol* 16: 199-204.
67. Mantel N (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
68. Maynard-Smith J, Haigh J (1974) The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet Res* 23: 23-35.
69. Meng XF, Shi M, Chen XX (2008) Population genetic structure of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae): strong subdivision in China inferred from microsatellite markers and mtDNA gene sequences. *Mol Ecol* 17: 2880-2897.
70. Mopper S. (1996) Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Tree* 11: 235-237.
71. 永野敏光・藤崎祐一郎・宮田将秀 (1988) 宮城県におけるアカスジメクラガメの発生消長. *北日本病虫研報* 39: 167-169.
72. 長澤淳彦 (2007) アカヒゲホソミドリカスミカメおよびアカスジカスミカメの産卵するイネ科雑草. *北陸病虫研報* 56: 29-31.

73. 中筋房夫 (1973) 稲穂を加害するカメムシ類の発生の特徴と要防除水準. 植物防疫 27: 372-378.
74. Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
75. Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetics trees from molecular data. J Mol Evol 19: 153-170.
76. 新山徳光 (2000) アカヒゲホソミドリカスミカメ. 植物防疫 54:309-312.
77. 農林水産省総合食料局 (2010) 平成 21 年度産米の検査結果.
<http://www.maff.go.jp/j/soushoku/syoryu/kensa/kome/pdf/21km2210.pdf>.
78. Novak SJ (2007) The role of evolution in the invasion process. Proc Natl Acad Sci USA 104: 3671-3672.
79. 奥谷恭代・渡邊朋也・東 政明 (2009) アカスジカスミカメの交尾行動と産卵特性. 応動昆 53: 13-20.
80. 岡田斉夫 (1982) イネミズゾウムシの分布の拡大. 植物防疫 36: 561-565.
81. 小野 亨・加進丈二・城所 隆 (2007) アカスジカスミカメの繁殖地の草刈りと斑点米被害の抑制. 北日本病虫研報 58: 75-79.
82. 大友令史・菅 広和・田中誉志美 (2005) アカスジカスミカメの生態に関する 2, 3 の知見. 北日本病虫研報 56: 105-107.
83. Orsini L, Corander J, Alasentie A, Hanski I (2008) Genetic spatial structure in a butterfly metapopulation correlates better with past than present demographic structure. Mol Ecol 17: 2629-2642.
84. Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12: 357-358.
85. Porretta D, Canestrelli D, Bellini R, Celli G, Urbanelli S (2007) Improving insect pest management through population genetic data : a case study of the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas). J Appl Ecol 44: 682-691.

86. de la Poza M, Farinós GP, Beroiz B, Ortego F, Hernández-Crespo P, Castañera P. (2008) Genetic structure of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) populations in the Mediterranean area. *Environ Entomol* 37: 1354-1360.
87. Rassmann K, Tautz D, Trillmich F, Gliddon C (1997) The microevolution of the Galapagos marine iguana *Amblyrhynchus cristatus* assessed by nuclear and mitochondrial genetic analyses. *Mol Ecol* 6: 437-452.
88. R Development Core Team (2005) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
89. Raymond M and Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248-249.
90. Roderick GK (1996) Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu Rev Entomol* 41: 325-352.
91. Rozen S and Skaletsky H J (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
92. Salvato P, Battisti A, Concato S, Masutti L, Patarnello T, Zane L (2002) Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa-wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Mol Ecol* 11: 2435-2444.
93. Schlötterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211-215.
94. 重久眞至 (2004a) 滋賀県におけるアカスジカスミカメの年間世代数の推定. *関西病虫研報* 46: 77-78.
95. 重久眞至 (2004b) コムギを用いたアカスジカスミカメの継代飼育法. *滋賀農総セ農試研報* 44: 7-12.

96. 重久眞至 (2008) アカスジカスミカメ産下卵の休眠卵率の季節的推移と休眠卵産下に関与する日長・温度条件. 応動昆 52: 229-232.
97. Shufran KA, Burd JD, Anstead JA, Lushai G (2000) Mitochondrial DNA sequence divergence among greenbug (Homoptera: aphididae) biotypes: evidence for host-adapted races. Insect Mol Biol 9: 179-184.
98. Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. Ann Rev Ecol Syst 16: 393-430.
99. Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139: 457-462.
100. Sota T, Hayashi M, Iwai D (2004) Phylogeography of the leaf beetle *Chrysolina virgata* in wetlands of Japan inferred from the distribution of mitochondrial haplotypes. Entomol Sci 7: 381-388.
101. Stoszek KJ (1973) Damage to ponderosa pine plantations by the western pine-shoot borer. J For 71: 710-705.
102. 鈴木敏男 (2005) 岩手県における発生環境（水田雑草，割れ粃の多少）に応じたアカスジカスミカメに対する薬剤散布適期. 北日本病虫研報 56: 102-104.
103. Tada R (1998) Japanese Archipelago of last glacial period. Iden 52: 10-15.
104. Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.
105. Tajima F (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics 123: 597-601.
106. Takada MB, Yshioka A, Takagi S, Iwabuchi S, Washitani I (2012) Multiple special scale factors affecting mirid bug abundance and damage level in organic rice paddies. Biol Control 60: 169-174.
107. 高田 真・田中英樹・千葉武勝 (2000) 岩手県における 1999 年の斑点米多発の実態. 北日本病虫研報 51: 165-169.

108. 高橋富士男・永野敏光・佐藤智美 (1985) 宮城県北部におけるアカスジメクラガメによる斑点米の発生. 北日本病虫研報 36: 38-40.
109. 高橋良知・菊池英樹 (2010) カスミカメムシ類による斑点米被害を低減する畦畔管理技術の検討. 北日本病虫研報 61: 116-120.
110. 高田 真・田中英樹・千葉武勝 (2000) 岩手県における 1999 年の斑点米多発の実態. 北日本病虫研報 51: 165-169.
111. 田中英樹・千葉武勝・藤岡庄蔵・千葉忠男・伊藤正樹・中南 博 (1988) 岩手県における斑点米の発生実態と原因カメムシの種類. 北日本病虫研報 39: 162-166.
112. 富永時任 (1973) 黒しょく（蝕）米の病因について. 植物防疫 27: 379-384.
113. Tsagkarakou A, Roditakis N (2002) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Mol Ecol Notes 3: 196-198.
114. van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4: 535-538.
115. 角田伊一 (1982) 福島県の蝶. 歴史春秋社 273pp.
116. Wallner, W. E. (1987) Factors affecting insect population dynamics: differences between outbreak and non-outbreak species. Annual Rev Entomology 32: 317-340.
117. 渡邊朋也・樋口博也 (2006) 斑点米カメムシ類の近年の発生と課題. 植物防疫 60: 201-203.
118. Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
119. Wright (1951) The genetical structure of populations. Ann Eugenics 15: 323-354.
120. 山下雅幸 (2002) 外来雑草の野生化. 日草誌 48: 161-167.

121. Yamashita M, Iwamoto M, Maruyama K, Ichihara M, Sawada H (2010)
Contrasting infection frequencies of *Neotyphodium* endophyte in naturalized
Italian ryegrass populations in Japanese Farmlands. *Grassland Sci* 56: 71-76.
122. 安永智秀・高井幹夫・山下 泉・川村 満・川澤哲夫 (1993) 日本原色カ
メムシ図鑑 (友国雅章監) . 全国農村教育協会. 東京. 380pp.
123. 安永智秀・高井幹夫・中谷至伸 (2001) 日本原色カメムシ図鑑 第2巻 (安
永智秀・高井幹夫・川澤哲夫編) . 全国農村教育協会. 東京. 350pp.
124. 吉村具子・越智昭彦 (2010) 山形県におけるアカヒゲホソミドリカスミカ
メの MEP および MPP に対する薬剤感受性. 北日本病虫研報 61: 121-124.
125. 横田 啓・鈴木敏男 (2007) 水田畦畔におけるイネ科雑草の出穂程度がアカ
スジカスミカメ密度に及ぼす影響. 北日本病虫研報 58: 88-91.
126. Yoshioka A, Takada M, Washitani I (2011) Facilitation of a native pest of rice,
Stenotus rubrovittatus (Hemiptera: Miridae), by the Non-Native *Lolium*
multiflorum (Cyperales: Poaceae) in an Agricultural Landscape. *Environ Entomol*
40: 1027-1035.
127. Yu H, Frommer M, Robson MK, Meats AW, Shearman DC, Sved JA (2001)
Microsatellite analysis of the Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Diptera:
Tephritidae) indicates spatial structuring: implications for population control. *Bull*
Entomol Res 91: 139-147.
128. Zakharov EV, Hellmann JJ (2008) Genetic differentiation across a latitudinal
gradient in two co-occurring butterfly species: revealing population differences in
a context of climate change. *Mol Ecol* 17: 189-208.
129. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a
review. *Mol Ecol* 11: 1-16.

図表目次

Figure 1 a) Rice grains damaged by the Sorghum plant bug, <i>Stenotus rubrovittatus</i> . b) Adult of the <i>S. rubrovittatus</i>	8
Figure 2 Outbreak years of the sorghum plant bug <i>Stenotus rubrovittatus</i> in Japan based on the data from Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.....	9
Figure 3 Schematic representation of the development of microsatellite markers for <i>Stenotus rubrovittatus</i> using FIASCO (Zane et al. 2002 ¹²⁹).....	20
Figure 4 Design of primers for the degenerate PCR to amplify the partial regions of <i>COI</i> . Consensus amino acid sequence was obtained from the complete COI sequences of five insect species on GenBank.....	21
Figure 5 DNA sequence of the <i>Stenotus rubrovittatus</i> cytochrome oxidase subunit I gene (<i>COI</i>). The locations of the primers used in this study are boxed. The 1,032 bp sequence between two asterisks (*) from each individual was analyzed.....	22
Figure 6 An example of analyses of DNA fragments containing microsatellite using GENSCAN software. Three peaks in red are from the size markers. Two blocks of the blue peaks indicate the two alleles of the microsatellite A3N in a <i>S. rubrovittatus</i> adult. Black arrows indicate the exact size of each allele, 153 and 164 respectively.....	24
Figure 7 Sampling sites of local populations of <i>Stenotus rubrovittatus</i>	40
Figure 8 Nucleotide substitutions of each haplotype on <i>Stenotus rubrovittatus COI</i> . Positions and nucleotides different from the standard haplotype (A0).....	42

Figure 9 Parsimony network of the 39 haplotypes (A0–A20 and B0–B17) identified in this study for <i>S. rubrovittatus COI</i> . The solid circles on the branches represent a single mutational change. Circle area is proportional to haplotype frequency.	43
Figure 10 Distribution of the haplotype lineages A and B for <i>COI</i> region. Pie charts indicate the frequencies of the haplotype lineages at each sampling location.	45
Figure 11 Relationship between the latitude of the sampling locations and Nei's haplotype diversity. a) All individuals, b) Individuals in lineage B alone. Symbols of locations indicate one of three clusters (N, black circles; S, white circles; K, white squares) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program). The regression lines are also drawn.	47
Figure 12 Relationships between log-transformed geographic distance and Slatkin's F_{ST} of mitochondrial <i>COI</i> gene. Black circles indicate pairs of locations belonging to the same cluster and white circles indicate pairs belonging to different cluster identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).	48
Figure 13 Relationship between the latitude of the sampling locations and genetic diversities. a) Allelic richness, b) Private allelic richness, c) Observed heterozygosity and d) Expected heterozygosity. Symbols of locations indicate one of three clusters (N, black circles; S, white circles; K, white squares) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program). The regression lines are also drawn.....	52
Figure 14 Relationships between log-transformed geographic distance and Slatkin's F_{ST} of six microsatellites. P -values reflect significance of the observed correlations as estimated by a Mantel test (100,000 permutations). Black circles indicate pairs of locations belonging to the same cluster and white circles indicate pairs belonging to different cluster identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).	53

Figure 15 a) Identification of the most likely number of populations defined by the genetic data of mtDNA in <i>S. rubrovittatus</i> . Mean log marginal likelihood and associated variance across 10 independent runs was computed with BAPS using the group level option.....	54
Figure 16 a) Identification of the most likely number of populations defined by the genetic data of six microsatellites in <i>S. rubrovittatus</i> . Mean log marginal likelihood and associated variance across 10 independent runs was computed with BAPS using the group level option.	57
Figure 17 a) Identification of the most likely number of populations defined by the combined genetic data of mtDNA and six microsatellites in <i>S. rubrovittatus</i> . Mean log marginal likelihood and associated variance across 10 independent runs was computed with BAPS using the group level option.	59
Figure 18 Neighbour-joining tree among <i>S. rubrovittatus</i> local populations constructed based on F_{ST} using mitochondrial <i>COI</i> sequences. Uppercase character indicates one of three clusters (N, S and K) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).	60
Figure 19 Consensus tree among <i>S. rubrovittatus</i> local populations based on Cavalli-Sforza & Edwards' (1967 ¹¹) chord distances derived from allele frequencies at six microsatellite loci (NJ method of tree construction). Bootstraps over 40% are indicated. Uppercase character indicates one of three clusters (N, S and K) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).....	61
Figure 20 Genetic distance tree among <i>S. rubrovittatus</i> local populations constructed using combined mitochondrial <i>COI</i> and six microsatellite data. Bootstraps over 40% are indicated. Uppercase character indicates one of three clusters (N, S and K) identified in Bayesian clustering analysis (BAPS program).	62
Figure 21 Sampling sites of <i>S. rubrovittatus</i> in the study area.....	79

Figure 22 Relationship of the latitude of the sampling locations and genetic diversities of <i>S. rubrovittatus</i> (allelic richness and private allelic richness, and observed and expected heterozygosities of six microsatellite loci). Symbols of locations indicate one of two groups (1. white circles; 2. black circles) identified in Bayesian clustering analysis. The regression lines and Spearman's correlations are also shown. Asterisks (*, **, ***) indicate values that are statistically significant $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively.....	81
Figure 23 Consensus tree among <i>S. rubrovittatus</i> local populations based on Nei's (1983 ¹¹⁶) genetic distances derived from allele frequencies at six microsatellite loci (NJ method of tree construction). Bootstrap values over 40% are indicated.	82
Figure 24 Genetic clustering of local populations in the study area inferred with the program BAPS using microsatellite markers. Different colors represent genetically differentiated populations.	83
Figure 25 DNA band patterns of mtDNA <i>COI</i> of <i>S. rubrovittatus</i> digested by <i>Bsm</i> I restriction enzyme. A; <i>COI</i> lineages A, B; <i>COI</i> lineage B, M 200bp DNA ladder.	85
Figure 26 Proportions of the two different mitochondrial lineages within each local population.....	86
Figure 27 Relationship between the latitude of the sampling locations and genetic diversities of <i>S. rubrovittatus</i> mtDNA haplotype diversity. Symbols of locations indicate one of two groups (1. white circles; 2. black circles) identified in Bayesian clustering analysis. The regression lines and Spearman's correlations are also shown. Asterisks (***) indicate values that are statistically significant ($P<0.001$).....	87

Table 1 Four primers used in this study for sequencing the <i>COI</i> gene from each individual of <i>Stenotus rubrovittatus</i>	23
Table 2 Primer sequences and related information for <i>Stenotus rubrovittatus</i> microsatellite loci. N , sample size; N_A , number of alleles; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; Significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium ($*P < 0.01$, $**P < 0.005$).....	25
Table 3 Collection details of sampled <i>Stenotus rubrovittatus</i>	38
Table 4 Japanese names of sampling locations and collectors of <i>Stenotus rubrovittatus</i>	39
Table 5 Grouping schemes for AMOVA analysis	41
Table 6 Mitochondrial DNA haplotype frequencies for <i>S. rubrovittatus</i> collected at each sampling location.	44
Table 7 Summary of polymorphisms of mtDNA <i>COI</i> sequences and six microsatellites of <i>S. rubrovittatus</i>	46
Table 8 Summary statistics for neutrality tests and mismatch distributions of <i>S. rubrovittatus</i> mtDNA. Cluster N, K and S indicate the genetic cluster identified by Bayesian analysis (See Figure 17). Asterisks (*, **, ***) indicates values that are statistically significant $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.....	49
Table 9 Summary of polymorphisms of six microsatellites of <i>S. rubrovittatus</i> . N_i : the number of samples from that locality, N_A : number of total alleles, R_S : Allelic richness, PR_S : Private Allelic Richness, H_O : Observed heterozygosity, H_E : Expected heterozygosity. Asterisks (*, **, ***) indicate values that are statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium obtained by the global tests across loci using Fisher's method $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively (Raymond & Rouseest, 1995 ¹¹⁷).	50

Table 10 Analysis of molecular variance (AMOVA) partitioned among groups (genetic clusters of populations identified by Bayesian analysis or plants). Percentage of the total variance that is explained by the grouping scenario and fixation indices are indicated. Asterisks (*, **, ***) indicates values that are statistically significant $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively. (F_{CT}), among populations within groups (F_{ST}), and within populations (F_{SC}).	63
Table 11 Sampling sites of <i>S. rubrovittatus</i>	78
Table 12 Summary of six microsatellites of <i>S. rubrovittatus</i> in Fukushima and Ibaraki prefectures.	80
Table 13 Analysis of molecular variance (AMOVA) partitioned among genetic clusters of populations identified by Bayesian analysis) (F_{CT}), among populations within groups (F_{ST}), and within populations (F_{SC}). Percentages of the total variance that were explained by the grouping scenario and fixation indices are indicated. Asterisks (*, **, ***) indicate values that are statistically significant $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively.	84