

## 学 位 論 文 要 旨

植物検疫で問題となるハダニ類及びマイマイガ類の  
分子生物学的手法による簡易識別法の開発

Development of a simple molecular identification method of spider mites and gypsy moths,  
both problematic in plant quarantine

有本 誠

ARIMOTO Makoto

日本の植物検疫では、害虫が形態による種の同定が困難な卵や幼虫等の発育ステージで発見され、迅速な検疫措置の決定ができないことが問題となっている。本研究では、輸入植物検疫及び輸出植物検疫で種の同定が問題となっている代表的な分類群を対象として遺伝子診断による種の識別の有用性を検討した。

輸入植物検疫で種の同定が問題になっている分類群の一つとして、ハダニ科 *Tetranychus* 属を対象とした。同属の種を同定するためには雄成虫の挿入器の形態を観察する必要があるが、輸入植物検疫では非休眠雌成虫、休眠雌成虫、幼若虫または卵のみが発見されることが多い。そこで、核リボソーム RNA の ITS 領域を用いた PCR-RFLP 法による種の識別が可能かどうかを検討した。最初に休眠雌成虫、幼若虫及び卵の DNA 調整法を *Tetranychus* 属の代表的な種であるナミハダニ *Tetranychus urticae* Koch を用いて開発した。その結果、休眠雌成虫及び第 2 若虫では、1 個体のハダニをプラスチックペッスルで磨砕する方法が、第 1 若虫、幼虫及び産卵後 24°C で 48 時間以上経過した卵では、線虫 1 個体からの DNA 調整法として開発されたろ紙片で磨砕する方法が有効であり、PCR-RFLP に利用可能な DNA テンプレートを調整できることを明らかにした。次に、日本の輸入植物検疫で発見された主要な種である *Tetranychus* 属ハダニ 14 種について、PCR-RFLP 法の適用の可否を検討した。主として輸入植物検疫で発見された 14 種 199 個体群 245 個体について検討した結果、14 種すべてを正確に識別できた。これらの結果から、ITS 領域を用いた識別手法は輸入植物検疫で発見される *Tetranychus* 属の種の識別に有用であると考えられた。

輸出植物検疫で種の同定が問題となっているもう一つの分類群として、ドクガ科 *Lymantria* 属を対象とした。日本から記録されている *Lymantria* 属 13 種の中で、4 種 [マイマイガ *Lymantria dispar japonica* (Motschulsky)、エゾマイマイ *Lymantria umbrosa*

(Butler)、シロシタマイマイ *Lymantria albescens* Hori and Umeno、及びコシロシタマイマイ *Lymantria postalba* Inoue] がアジア型マイマイガに指定されている。近年、米国、カナダ、チリ、ニュージーランド及びオーストラリア政府が船舶に産卵された卵塊によるアジア型マイマイガの侵入を警戒している。*Lymantria* 属の卵塊は種間で形態が非常に類似しているため、形態学的に種を識別することができない。そこで本研究では、まず日本の港湾で発見される可能性が高いアジア型マイマイガ 4 種を含む 7 種を対象として、ミトコンドリア DNA を用いた PCR-RFLP 法による識別技術を開発した。主に日本の港湾で採集された 45 個体群 291 個体で検定した結果、7 種すべてを正確に識別できた。植物検疫では、種の識別結果に高い信頼性が求められるため、異なる遺伝子領域を用いた識別法によって識別結果を二重に点検することが望ましい。そこで、上記の 7 種に分布域と寄主植物が限られているものの飛翔に優れている 1 種 [オオヤママイマイ *Lymantria lucescens* (Butler)] を加えた 8 種を対象として、核リボソーム RNA の ITS2 領域を用いた PCR-RFLP 法による種の識別の有効性を検討した。主に日本の港湾で採集された 8 種 54 個体群 330 個体で検定した結果、2 組 4 種 (*L. dispar japonica* と *L. umbrosa*、*L. albescens* と *L. postalba*) を除いて、正確に種を識別できた。これらの結果から、ITS2 領域を用いた識別手法は日本の港湾で発見される可能性が高い *Lymantria* 属の種の識別に有用であると考えられた。検討対象である *Lymantria* 属 8 種の識別は、ミトコンドリア DNA と ITS2 領域の 2 つの PCR-RFLP 法を同時に検討することで確実となることを示した。

本研究では、*Tetranychus* 属及び *Lymantria* 属の遺伝子診断技術を 1) 識別対象種の選定、2) 種の識別に有用な遺伝子領域の選定及び識別技術の開発、3) 検疫の現場で採集されるサンプルを用いた識別技術の検証という 3 段階の手順により確立した。この手順を踏むことにより、植物検疫で問題となる他の分類群についても、遺伝子診断による識別技術を確立できると考えられる。