

スギマルカイガラムシのエステラーゼアイソザイム変異

誌名	日本応用動物昆虫学会誌
ISSN	00214914
著者	宮ノ下, 明大 田付, 貞洋 草野, 忠治
巻/号	35巻4号
掲載ページ	p. 317-321
発行年月	1991年11月

スギマルカイガラムシのエステラーゼアイソザイム変異

宮ノ下明大*1)・田村貞洋**・草野忠治***・藤井宏一****

*筑波大学大学院環境科学研究科

**東京大学農学部

***筑波大学農林学系

****筑波大学生物科学系

Variation of Esterase Isozymes in *Aspidiotus cryptomeriae* KUWANA (Homoptera: Diaspididae). Akihiro MIYANOSHITA²⁾ (Master's Degree Program in Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan), Sadahiro TATSUKI (Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan), Tyuzi KUSANO (Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan) and Koichi FUJII (Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **35**: 317-321 (1991)

The variation in esterase isozymes of three host races of *Aspidiotus cryptomeriae* KUWANA, associated with *Cryptomeria japonica*, *Torreya nucifera* and *Taxus cuspidata*, was analyzed by polyacrylamidegel electrophoresis. Comparisons were also made between collection years and among localities within each host race. Since full isozyme bands could not be obtained by analyzing individual insects, analysis was conducted using homogenates of 20 adult females collected from the same host tree at one time. Sixteen isozyme bands were separated when all three host races were combined. Some esterase bands varied in frequency between years and among localities even within a host race but others were very stable and characteristic of the host races. The race associated with *C. japonica* had 14 bands and band No. 7 was thick with high frequency; the *T. nucifera* race had 15 bands and band No. 11 appeared with high frequency, and band No. 3 was thick; the *T. cuspidata* race had 14 bands and band No. 15 was thick with high frequency. These results suggest the presence of differentiated host specificity in *A. cryptomeriae*.

Key words: esterase isozyme, *Aspidiotus cryptomeriae*, host race, Homoptera, Coccoidea

緒 言

スギマルカイガラムシ *Aspidiotus cryptomeriae* KUWANA は、イチイ科、イヌガヤ科、マツ科、スギ科、ヒノキ科など広範囲の針葉樹を加害する林業害虫として扱われてきた。しかし、本種には、いくつかの形態の異なる個体群が存在することが報告されている (TAKAGI, 1957; 渡辺・高木, 1967; 河合, 1980)。また、著者らの調査でもスギ寄生個体群とカヤ寄生個体群には形態と寄生性に明らかな差異があり、これらが host race を形成し、独立した種に分化している可能性が示されている (MIYANOSHITA et al., 投稿準備中)。本報では、スギ寄生個体群、

カヤ寄生個体群および、イチイ寄生個体群についてエステラーゼのアイソザイムを検出したので、その比較結果を報告する。本文に先立ち、有益な助言、指導をいただいた筑波大学農林学系の戒能洋一博士、東京農業大学農学部の河合省三助教授に厚く御礼申し上げる。また、電気泳動法について、指導していただいた森林総合研究所遺伝分析研究室の津村義彦博士、本稿を校閲いただいた東京大学農学部の石川幸男博士に感謝の意を表す。

材料および方法

実験には、スギ (*Cryptomeria japonica* D. DON), カヤ (*Torreya nucifera* SIEB. et ZUCC.), イチイ (*Taxus cuspidata*

1) 現在 東京大学農学部害虫学研究室

2) Present address: Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1991年5月24日受領 (Received May 24, 1991)

1991年7月25日登載決定 (Accepted July 25, 1991)

SIEB. et ZUCC.) の各寄生個体群の抱卵前後の雌成虫を用いた。供試虫の採集は1989年と1990年の7月に複数の地域から行った (Table 1)。平板ポリアクリルアミドゲ

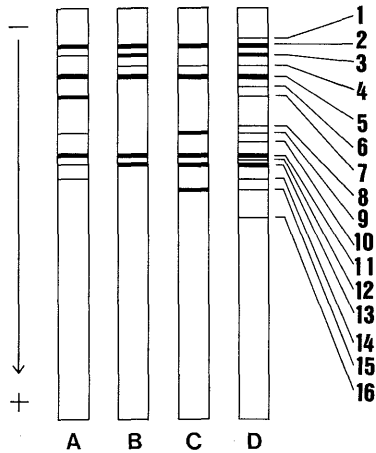


Fig. 1. Comparison of band patterns of esterase isozymes in three host races of *A. cryptomeriae* (1990). A: *Cryptomeria japonica* race, B: *Torreya nucifera* race, C: *Taxus cuspidata* race, D: All bands found in three host races combined. Bands with a frequency greater than 0.70 are presented (A~C). Broader bands indicate higher activity.

ル垂直電気泳動法には, DAVIS (1964) と ORNSTEIN (1964) に従い, 7.5% 分離ゲル, 3.75% 濃縮ゲルを使用した。泳動は 5°C, 30 mA で 150 分行った。酵素の抽出には, 各寄生個体群の雌成虫 20 個体をまとめて, 100 μ l の抽出液 (0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 4 mM DTT, 0.5% Tween 80, 40% Sucrose) を加え, ガラス製のマイクロホモジナイザー (遠心タイプ) でよくすりつぶした。得られた磨砕液の 20 μ l ずつを 1 回の分析試料として 4 回泳動した。ただし, 泳動パターンは, すべての場合に 4 回とも同一であった。スギ寄生個体群では 19 試料, カヤ寄生個体群では 24 試料, イチイ寄生個体群では 7 試料について分析を行った。一つの試料に 20 個体を使用したのは, 1 個体ずつの分析では, バンドの識別が不明瞭であったためである。エステラーゼの基質には, 0.1 M α -ナフチルプロピオネート, 0.1 M α -ナフチルアセテート, 染色にはファーストブルー RR 塩を用いた。泳動終了後, 洗浄したゲルをセロハン紙で両側からはさみこみ, ガラス板に張り付け乾燥させて保存した。

結 果

はじめに, 2 年にわたり複数の地域から採集したスギ寄生個体群とカヤ寄生個体群の結果を比較する。エステラーゼアイソザイムのバンドは, スギ寄生個体群で 14

Table 1. Frequency of esterase isozyme bands in three host races of *A. cryptomeriae*

Band number	Host race/Locality/Year								
	<i>C. japonica</i> race				<i>T. nucifera</i> race			<i>T. cuspidata</i> race	
	Hino, Tokyo	Tanashi, Tokyo	Yorii, Saitama	Tsukuba, Ibaraki	Hino, Tokyo	Kawasaki, Kanagawa	Sapporo, Hokkaido		
1990(120) ^{a,b}	1990(20) ^b	1989(80) ^c	1989(160) ^d	1989(120) ^e	1990(60) ^b	1989(220) ^f	1990(80) ^b	1990(140) ^g	
1	0.16	0.00	0.00	0.00	0.34	0.00	0.36	0.25	0.14
2	0.66	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.86*
3	1.00*	1.00*	0.75*	1.00*	0.67	1.00*	0.64	1.00*	0.43
4	0.33	0.00	0.00	0.00	0.33	1.00*	0.45	1.00*	0.86*
5	1.00*	1.00*	1.00*	1.00*	0.67	1.00*	0.82*	1.00*	1.00*
6	0.33	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.27	0.00	0.29
7	0.66	1.00*	1.00*	1.00*	0.33	0.00	0.27	0.00	0.00
8	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00
9	1.00*	1.00*	0.00	0.25	0.33	1.00*	0.18	1.00*	0.86*
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.09	0.25	0.14
11	1.00*	1.00*	0.25	0.25	0.33	1.00*	1.00*	1.00*	0.86*
12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.14
13	0.83*	1.00*	1.00*	0.75*	1.00*	1.00*	0.55	0.75*	0.86*
14	0.83*	1.00*	0.50	0.38	0.67	1.00*	0.45	1.00*	0.14
15	0.00	0.00	0.00	0.38	0.50	0.00	0.27	0.00	1.00*
16	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14

^a Number of insects used in parenthesis, ^b Collected on Jul. 05, ^c Jul. 14, ^d Jul. 15, ^e Jul. 24, ^f Jul. 16, ^g Jul. 02.

* Frequency greater than 0.70.

本, カヤ寄生個体群で15本を認めた。両者合わせて計16本のバンドを確認し, 泳動原点(陰極)より順番にバンド1~バンド16まで番号を付けた(Fig. 1, D)。各寄生個体群におけるバンドの地域別出現頻度をTable 1に示す。両者に常に出現したバンド, また, 各寄生個体群に特有なバンドはなかった。しかし, バンドの出現頻度には寄生個体群間で明らかに差が見られた。スギ寄生個体群はバンド10, 12, カヤ寄生個体群はバンド16がまったく見いだされなかった。

スギ, カヤ両寄生個体群で出現頻度が高いバンド(頻度0.70以上)を中心に個体群間の差を比較した。地域別にみると, スギ寄生個体群は, 東京都, 埼玉県, 茨城県でバンド2, 3, 5, 7, 13を高頻度で共有していた。また, 東京都日野市では, バンド1, 4, 6, 8, が低頻度で出現したが他の地域ではまったく出現しなかった。茨城県つくば市ではバンド15, 16が出現したが, 他の地域ではまったく出現しなかった。カヤ寄生個体群は, 東京都, 神奈川県で高頻度に共有したバンドは2, 5, 11, 13であった。神奈川県ではバンド8が低頻度に出現するが, 他の地域ではまったく出現しなかった。次に, 年別にみると, バンド7は, スギ寄生個体群においては, 1989年は二つの地域で両方とも頻度1.00, 1990年も二つの地域で頻度0.66と1.00であり比較的高かった。しかし, カヤ寄生個体群は1989年は2地域で頻度0.33と0.27, 1990年は2地域とも頻度ゼロであり両年とも頻度0.70を越えることはなかった。バンド11は, カヤ寄生個体群で2年連続, 高頻度に現れたが, スギ寄生個体群では頻度0.70を越えたのは1年のみであった。バンドの濃さに注目すると, スギ寄生個体群はバンド2, 5, 7, 11, カヤ寄生個体群はバンド2, 3, 5, 11, 13が濃くなっており, 寄生個体群間で酵素活性の高いアイソザイムに違いがあることが示された。

イチイ寄生個体群では, 1990年に北海道札幌市で採集した個体のみの結果であるが, バンド14本が認められ, バンド7, 8がまったく見いだされなかった。また, バンド2, 4, 5, 9, 11, 13, 15が高頻度に現れ, バンド2, 5, 9, 11, 13, 15が濃くなっていた。とくに, バンド15が常に出現しとくに濃くなっておりスギ, カヤ両寄生個体群と異なっていた。

三つの個体群を合わせてみると, バンド2, 5, 13が高頻度に出現し, バンド8, 12, 16は低頻度の出現であった。

考 察

本実験の電気泳動においては, スギ寄生個体群は合計

380個体, カヤ寄生個体群は合計480個体, イチイ寄生個体群は合計140個体を用いた。これらの中には採集した年や地域の異なる個体群も含まれているから, スギマルカイガラムシのもつエステラーゼアイソザイムの検出可能なバンドは, ほぼ検出されていると考えられる。しかし, 20個体をまとめて1試料として泳動しているので, そのなかの1個体だけが特定のアイソザイムをもっているとしても, そのバンドが出現する可能性がある。すなわち, 個体別の分析の場合よりバンドの出現頻度が高い値となる可能性があることを留意しなければならない。また, 個体別のバンドのパターンは, 今回のように20個体ずつまとめて検出したものより変異が大きくなる可能性がある。さらに, 個体別の泳動であると, バンドは通常, 複数がリンクして出現・消失するので, そのパターンを示すことや, そこから遺伝子座を推定することが可能である。しかし, 本実験のように集団を試料とした場合, 結果をバンドパターンとして比較するには適していない。そこで, 各バンドの出現頻度を寄生個体群ごとに比較した。

スギ, カヤ各寄生個体群ごとのバンドの出現頻度は, 年, 地域によって差があった。また, 出現頻度がゼロのバンドが寄生個体群ごとに異なっていた。NUR (1978) は, コナカイガラムシ科(Pseudococcidae)の*Pseudococcus obscurus*で九つの酵素において, 地域ごとに対立遺伝子の頻度に差があることを示している。また, ALSTAD and CORBIN (1990) はマルカイガラムシ科(Diaspididae)のblack pineleaf scale (*Nuculaspis californica*)について三つの酵素, 酸性フォスファターゼ(ACP), グルコース-6-リン酸イソメラーゼ(GPI), リンゴ酸酵素(ME)の対立遺伝子頻度を等電点電気泳動法で調べた。その結果, 同一寄主木(*Pinus ponderosa*)の異なった枝上でのデーム間, 隣接する寄主木間, 離れた場所の寄主木間でいざれも対立遺伝子頻度が有意に異なっていることをハーディ-ワインベルグ均衡のずれから示した。ハーディ-ワインベルグ均衡のずれは, 近親交配, 同類交配, 集団の細分化, 自然淘汰といったいくつかの要因によって生じると考えられている。上記の*N. californica*のように, 非常に短い距離でも対立遺伝子頻度に差があることを考えると, 本実験による年や地域によってバンド出現頻度が異なったことを説明できるかもしれない。スギマルカイガラムシの雌成虫はまったく移動できない。また, 雄成虫は有翅虫となるが微小でひ弱なため, 自力での長距離移動はむずかしいと思われ, その寿命は平均13時間と短いことから(宮ノ下, 未発表), 他集団との

任意交配が妨げられ、近親交配的な影響が現れやすいのかもしれない。寄主植物でみると、スギ寄生個体群のバンド7は、年や地域に関係なく高頻度に出現し、活性が高い。カヤ寄生個体群は、バンド11は比較的出現頻度が高く、バンド3の活性が高いことが特徴である。以上の特徴によって両寄生個体群間に差を認めることができる (Fig. 1)。著者らは、スギ寄生個体群とカヤ寄生個体群は形態と寄生性に差があることを確認しており (MIYANOSHITA et al., 投稿準備中)、エステラーゼアイソザイムのスギ、カヤ両寄生個体群間の差異は、寄主に対する特殊化を示していると思われる。イチイ寄生個体群についても、バンド15は頻度と活性が高く先の両個体群と異なっている可能性がある (Fig. 1)。また、イチイ寄生個体群は、これまで著者らは秋田県と北海道から採集しているだけであり、関東地方ではイチイが存在してもいまのところ寄生が確認できず、スギ、カヤ両寄生個体群と比べて分布が北に偏っている可能性がある。したがって、アイソザイムにも地理的な影響が出ているのかもしれない。なお、スギ、カヤ両寄生個体群は同所的に発生する場合があります、その分布域は重複していると思われる。

このように、同一種においてアイソザイムのバンドが異なることについては、多くの報告がある。たとえば、ダニ類の休眠系統と不休眠系統でのバンドの頻度と活性の差異 (刑部, 1984; OSAKABE, 1987) や食性によるバンドの差異 (SMITH and HUBBES, 1986; WILLIAMS and SHAMBAUGH, 1988; GOTOH et al., 1991) がある。

カイガラムシ類のアイソザイムの研究では、NUR (1978) が、クワコナカイガラムシ属 (*Pseudococcus*) の5種について20種類の酵素でそのアイソザイムを比較し、80%以上の酵素で種間の差があることを報告している。また、形態が非常に類似している同胞種間でも差があると報告している。このことは、形態が似ているスギマルカイガラムシの各寄生個体群間でエステラーゼアイソザイムに差がみられた本結果と同様である。河合ら (1972) は、エステラーゼアイソザイムの差で、形態が酷似するクワコナカイガラムシ (*Pseudococcus comstocki*) とミカンヒメコナカイガラムシ (*P. citriculus*) の2種の識別を試みた。その結果、卵、1, 2 齢幼虫、3 齢雌幼虫、雄の蛹、雌雄成虫の各ステージでそれぞれの種特有のバンドが認められ、2種が完全に識別可能なことがわかった。この結果は興味深い、さらに、複数の地域から得た同種の個体群間での差の有無も合わせて検討することが必要であろう。

アブラムシ、ハダニ、アザミウマ類では個体単位でアイソザイムの検出が行われている (TAKADA, 1979; 刑部, 1984, 1986; 高田, 1987; 村井, 1990)。WARD et al. (1982) や刑部 (1989) も指摘しているが、材料が微小なことによるタンパク質量の不足から、個体単位のアイソザイムの検出がむずかしい場合がある。今回の手法ではスギマルカイガラムシの個体単位のアイソザイムは明瞭には検出できなかった。本種の雌成虫は体長が0.6~0.7 mm程度で非常に扁平である。カイガラムシ類のアイソザイムの検出は、おもに体が大きく、体液が多いコナカイガラムシ類で行われているのが現状である。今後、マルカイガラムシ類のように、成虫においてさえ1 mmに達しない種類でも、個体単位で明瞭なアイソザイムを検出する方法の確立が必要であり、現在、本種で検討中である。

摘 要

スギマルカイガラムシ *Aspidiotus cryptomeriae* KUWANA のスギ寄生個体群、カヤ寄生個体群およびイチイ寄生個体群について雌成虫のエステラーゼのアイソザイムを検出し比較した。1989年と1990年に複数の地域から供試虫を採集し比較したところスギ、カヤ両寄生個体群からは合わせて16本のバンドが確認できた。これらのうち、両者に常に出現したバンド、または各寄生個体群に特有のバンドはなかったが、出現頻度ゼロのバンドが両者で異なっていた。また、年や地域によってバンドの出現頻度が異なっていた。

三つの寄生個体群に共通して高頻度 (0.70 以上) に現れたバンドは2, 5, 13であり、共通して活性が高く現れたバンドは2, 5, 11であり、これらはスギマルカイガラムシの主要バンドであると思われる。

スギ寄生個体群では15本のバンドを確認し、バンド7が高頻度に出現しなおかつ活性が高くバンド10, 12が検出されなかった。カヤ寄生個体群では15本のバンドを確認しバンド11が比較的出現頻度が高く、バンド3の活性が高いことが特徴でありバンド16が検出されなかった。イチイ寄生個体群については、1990年のみの結果であるが、14本のバンドを確認しバンド4, 9, 15が高頻度に出現し、バンド9, 15の活性が高くバンド7, 8が検出されなかったことがスギ、カヤ両寄生個体群と異なっていた。

これらの結果は、各寄主植物に対するスギマルカイガラムシの特殊化を示していると思われる。しかし、本実験は20個体をまとめて試料として用いており、個体単

位のアイソザイムの検出によって、さらに検討することが必要であろう。

引用文献

- ALSTAD, D.N. and K.W. CORBIN (1990) Scale insect allozyme differentiation within and between host trees. *Evol. Ecol.* **4**: 43—56.
- DAVIS, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404—427.
- GOTOH, T., Y. ISHIKAWA, K. TAKAYAMA and M. SUZUKI (1991) Differences in esterase zymograms between non-diapausing and diapausing individuals of the hawthorn spider mite, *Tetranychus viennensis* ZACHER (Acari: Tetranychidae). *Appl. Ent. Zool.* **26**: 153—155.
- 河合省三 (1980) 日本原色カイガラムシ図鑑. 東京: 全国農村教育協会, 445 p.
- 河合 孝・小原隆三・榎原 保 (1972) クワコナカイガラムシとミカンヒメコナカイガラムシの生理および形態的差異について. 鳥取大学農学部研究報告 **24**: 6—12.
- 村井 保 (1990) アザミウマ類のアイソザイムによる識別法. *植物防疫* **44**: 27—30.
- NUR, U. (1978) Electrophoretic comparison of enzymes of sexual and parthenogenetic mealybugs (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Va. Polytech. Inst. State Univ. Res. Div. Bull.* **127**: 69—84.
- ORNSTEIN, L. (1964) Disc electrophoresis-I: Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 321—349.
- 刑部政博 (1984) カンキツおよびナシ寄生のミカンハダニのエステラーゼ Zymogram 型. *応動昆* **28**: 1—4.
- 刑部政博 (1986) ミカンハダニのエステラーゼアイソザイム. *植物防疫* **40**: 26—29.
- OSAKABE, M. (1987) Difference of esterase isozymes between nondiapausing and diapausing strain of citrus red mite, *Panonychus citri* (McGREGOR) (Acarina: Tetranychidae). *Appl. Ent. Zool.* **22**: 577—584.
- 刑部政博 (1989) ハダニ類の変異—タンパク分析によるアプローチ. *植物防疫* **43**: 362—366.
- SMITH, S.M. and M. HUBBES (1986) Isozyme patterns and biology of *Trichogramma minutum* as influenced by rearing temperature and host. *Entomol. exp. appl.* **42**: 249—258.
- TAKADA, H. (1979) Esterase variation in Japanese population of *Myzus persicae* (SULZER) (Homoptera: Aphididae), with special reference to resistance to organophosphorus insecticides. *Appl. Ent. Zool.* **14**: 245—255.
- 高田 肇 (1987) 電気泳動法によるアブラムシの遺伝的変異の検出—モモアブラムシを中心にして—. *植物防疫* **41**: 10—14.
- TAKAGI, S. (1957) A revision of the Japanese species of the genus *Aspidiotus*, with descriptions of a new genus and a new species. *Insecta Matsumurana* **21**: 31—40.
- WARD, P.S., I.A. BOUSSY and D.E. SWINGER (1982) Electrophoretic detection of enzyme polymorphism and differentiation in three species of spider mites (*Tetranychus*) (Acari: Tetranychidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **75**: 595—598.
- 渡辺千尚・高木貞夫 (1967) 森林のカイガラムシ類について—特に針葉樹を加害するカイガラムシ類—. *森林防疫ニュース* **16**: 2—6.
- WILLIAMS, R.N. and G.F. SHAMBAUGH (1988) Grape phylloxera (Homoptera: Phylloxeridae) biotypes confirmed by electrophoresis and host susceptibility. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **81**: 1—5.