

## 山岳域に生息する属不明アザミウマ (アザミウマ科：アザミウマ亜科)の所属と遺伝的多様性

木目澤友梨恵 (福島大学・共生システム理工学類)  
 兼子伸吾 (福島大学大学院・共生システム理工学研究科)  
 塘 忠顕 (福島大学・共生システム理工学類)

### 要 旨

福島県や長野県の山岳域に分布するアザミウマ亜科の属不明アザミウマ *Gen.sp.*は、形態的特徴から *Thrips genus-group* に属する未記載属の種ではないかと思われる。そこで、*Gen.sp.*の所属の解明を目的として分子系統解析を行った。その結果、*Gen.sp.*は *Thrips alni* に近縁となり、*Thrips* 属とすることが妥当との結果が示唆された。長野県及び福島県から採集された *Gen.sp.*の遺伝的多様性を解析した結果、8つのハプロタイプが認められ、福島県の一部から得られた個体は長野県産の個体と同じハプロタイプを持っていた。ハプロタイプネットワークにおいては、長野県産の *Gen.sp.*の方が福島県産のそれよりも祖先的であり、長野県と福島県でそれぞれ独自に分化した後に、長野県産の個体が再び福島県へと侵入したことが示唆された。

### I. はじめに

アザミウマとは総翅目 (アザミウマ目) に属する体長 1.0~5.0 mm ほどの微小な昆虫であり、これまでに約 6,000 種が記載されている (Gullan and Cranston, 2010)。総翅目は有管亜目と穿孔亜目の 2 亜目に分けられ、有管亜目はクダアザミウマ科 1 科からなり、クダアザミウマ科は、クダアザミウマ亜科とオオアザミウマ亜科の 2 亜科に分けられている。一方、穿孔亜目はアザミウマ科、シマアザミウマ科、メロアザミウマ科を含む計 8 科からなる。8 科の中で最も多くの種を含むアザミウマ科は、アミメアザミウマ亜科、デンドロアザミウマ亜科、セリコアザミウマ亜科、アザミウマ亜科の 4 亜科に分けられている (Mound, 2002a)。そして、4 亜科の中で最も多くの種を含むアザミウマ亜科は、12 の *genus-group* に分けられている (Masumoto, 2009)。

12 の *genus-group* の一つである *Thrips genus-group* はアザミウマ類における最大の

属であり、*Thrips* 属と *Thrips* 属に近縁で 1 属 1 種からなる monotypic な属を含む 16 属からなる (Masumoto and Okajima, 2013)。*Thrips genus-group* に属するアザミウマは、腹部第 5 節から第 8 節の背板側方に微櫛歯を持ち、腹部第 8 節のそれが気門の内側に位置するという固有派生形質を持つ (Mound, 2002b)。その一方で、*Thrips genus-group* に属する *Thrips* 属に近縁な 16 属はそれぞれ固有派生形質により分けられているが、*Thrips* 属は明確な固有派生形質を持たず、*Thrips* 属に近縁な 16 属が持つ固有派生形質を持たないとの特徴で定義されている。

ところで、福島県、山形県、長野県の山岳域からはイネ科植物を寄主とするアザミウマ亜科の属不明のアザミウマ (*Gen.sp.*) の生息が確認されている (塘, 2011, 塘・志賀, 2013, 志賀ら, 2014)。*Gen.sp.*は腹部背板に微櫛歯を持ち、腹部第 8 節のそれが気門の内側に位置することから、*Thrips genus-group* に属するアザミウマであることは間違いない。

しかしながら, *Thrips* genus-group に属する *Thrips* 属以外の属が持つどの固有派生形質も持たず, *Thrips* 属とも後胸背楯板に刻紋がないこと, 雌は腹部第 5 節に微櫛歯がないことにより区別される. そのため, Gen. sp. は *Thrips* genus-group に属する未記載属の種ではないかと思われる (志賀, 2013).

そこで本研究では, アザミウマ亜科の属不明種である Gen. sp. の属解明を目的としてミトコンドリア DNA (mtDNA) の CO I 領域を用いた分子系統解析を行った. 今回は Gen. sp. の所属と遺伝的多様性について得られた結果を報告する.

## II. 材料及び方法

### 1. 材料の採集

*Thrips* genus-group 内の系統解析を行うために *Thrips* genus-group に属する 6 属 19 種のアザミウマと外群として用いるための *Frankliniella intonsa* をビーティング法により採集した (表 1). Gen. sp. は遺伝的多様性の解析を行うために福島県の標高 1,000 m 以上の 11 地点, 長野県の標高 1,300 m 以上の 7 地点から採集した (表 2). 採集したアザミウマは, 99.5%エタノールに保存した.

### 2. DNA 解析

DNA 抽出は, アザミウマを入れた PCR チ

ューブに 0.01%SDS (日本ジーン), 0.1 g/μL Proteinase K (TaKaRa) を含む抽出液を 5 μL 添加し, サーマルサイクラーにより 56°C 60min, 95°C 10min で反応させ, クチクラ内の組織を溶出することにより行った. mtDNA の CO I 領域は Folmer *et al.* (1994) のユニバーサルプライマー (LCO1490 : 5' -GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' および, HCO2198 : 5' -TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3) を用いて PCR 増幅した. PCR 増幅は, Qiagen Multiplex PCR kit (QIAGEN) を用いて, 反応液 8 μL 中に鋳型 DNA を 0.8 μL, 各プライマーを 0.2 μM, Qiagen Multiplex PCR kit (QIAGEN) を 4 μL 含むように調整した. PCR 反応は, サーマルサイクラーを用いて行い, 温度条件は, 初期熱変性 95°C 15min の後, 熱変性 95°C 30sec, アニーリング 45°C 90sec, 伸長反応 72°C 60sec を 40 サイクル行った後, 最終伸長を 60°C 30min とした. 反応終了後, 1.5%アガロースゲル (Agarose LO3, TaKaRa) を用いて電気泳動を行い, 増幅を確認した. 増幅が確認された PCR 産物は, illustra ExoProstar (GE ヘルスケア) を用いて精製した. 精製産物は, オペロンバイオテクノロジー株式会社 (<https://www.operon.jp/>) にシーケンスの解析を依頼した. シーケンスの解析により得られた波形データは Finch TV (<http://www.geospiza.com/finchtv/>) を用いて

表 1. 本研究における分子系統解析に用いたアザミウマ

属	種	採集地点
<i>Ernothrips</i> 属	<i>Ernothrips lobatus</i> Bhatti	福島大学構内
<i>Frankliniella</i> 属	<i>Frankliniella intonsa</i> Trybom	長野県美ヶ原
<i>Microcephalothrips</i> 属	<i>Microcephalothrips abdominalis</i> Crawford	福島大学構内
<i>Stenchaetothrips</i> 属	<i>Stenchaetothrips pleioblasti</i> Masumoto	福島大学構内
	<i>Stenchaetothrips undatus</i> Wang	福島県北塩原村裏磐梯
<i>Thrips</i> 属	<i>Thrips alni</i> Uzel	長野県上高地, 蝶ヶ岳
	<i>Thrips brevicornis</i> Priesner	長野県上高地
	<i>Thrips brunneus</i> Ishida	長野県乗鞍高原, 上高地
	<i>Thrips coloratus</i> Schmutz	長野県美ヶ原
	<i>Thrips flavus</i> Schrank	福島大学構内, 福島県田代山, 長野県乗鞍高原, 上高地, 美ヶ原
	<i>Thrips hawaiiensis</i> Morgan	福島大学構内
	<i>Thrips minutissimus</i> Linnaeus	福島大学構内
	<i>Thrips nonakai</i> Masumoto	福島大学構内 福島県福島市
	<i>Thrips palmi</i> Karny	鹿児島県屋久島町麦生
	<i>Thrips pini</i> Uzel	長野県乗鞍高原, 蝶ヶ岳, 美ヶ原
	<i>Thrips setosus</i> Moulton	長野県美ヶ原
	<i>Thrips tabaci</i> Lindeman	福島大学構内
	<i>Thrips</i> sp.	長野県上高地
<i>Tsutomiothrips</i> 属	<i>Tsutomiothrips ryukyuensis</i> Masumoto	鹿児島県屋久島町麦生
属不明	Gen.sp.	表2に示した

表 2. 本研究における分子系統解析に用いた Gen. sp.のハプロタイプと採集地点

解析個体数	ハプロタイプ	採集県	採集場所	採集地点	標高 (m)
1	B3	福島県	安達太良山	山頂からゴンドラ乗り場	1100-1200, 約1500
1	B3		一切経山	山頂, 浄土平, 酸力平避難小屋までの間の分岐	1850
1	B1		磐梯山	弘法清水	約1620
2	B2			山頂	1816
1	A1		三本槍岳	山頂と前岳分岐の間	1834, 1867
2	A1		帝釈山	田代山との鞍部	1916-1956
2	A1		田代山	猿倉登山口から山頂までの間	1799, 1879
1	B3		燧ヶ岳	柴安嵩山頂	2356
1	B5			柴安嵩と俎嵩との鞍部	2356-2297
1	B3			俎嵩山頂	2346
1	B4	長野県		ガレ場	2210
2	A1		乗鞍高原	位ヶ原山荘横	約2350
2	A1		上高地	槍沢一ノ俣	約1700
1	A3			焼岳登山道沿い	約2000
2	A2			新村橋と横尾山荘の間	約1580-1600
3	A1		蝶ヶ岳	ハイマツ帯になる直前	約2500
2	A1		美ヶ原	茂沢林道入口	約1800
1	A1			山本小屋と王ヶ頭の間	1950-2000

アセンブルを行った。その後、得られた塩基配列の妥当性を確認するため、近縁種の検索を DDBJ から BLAST 検索を利用して行った (NCBI; Altschul *et al.*, 1997)。

### 3. 分子系統解析

得られた塩基配列を MAFFT (Kato and Standley, 2013) によりアラインメントを行った。MEGA5.20 (Tamura *et al.*, 2011) を用いて系統樹作成モデルを探索し、系統樹を最尤法により作成した。ブートストラップテストは 1000 回行った。Buckman *et al.* (2013) の分子系統解析によって *Thrips* genus-group に近縁であることが示された *Anaphothrips* 属, 形態的に *Thrips* genus-group に近縁とされ, Buckman *et al.* (2013) の結果でも最も近縁であることが示された *Taeniothrips* 属, 得られた塩基配列を BLAST 検索した結果, 塩基配列の共通性が高いと判定された *Arorathrips* 属, *Chirothrips* 属, *Frankliniella* 属 (*Frankliniella intonsa* については本研究によって得られた配列) を外群として使用した。

### 4. 遺伝的多様性の解析

得られた Gen. sp. の塩基配列を MAFFT (Kato and Standley, 2013) によりアラインメントし, MEGA5.20 (Tamura *et al.*, 2011) を用

いて Tamura-Nei モデル (Tamura *et al.*, 2011) で平均距離法 (UPGMA 法) により系統樹を作成した。ブートストラップテストは 1000 回行った。*Thrips* genus-group の分子系統解析の結果で Gen. sp. に最も近縁となった *Thrips alni* を外群として使用した。また, MEGA5.20 (Tamura *et al.*, 2011) の Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) でアラインメントし, TCS (Clement *et al.*, 2000) でハプロタイプネットワークを作成した。外群には *Thrips alni* を使用した。

## III. 結果及び考察

### 1. 分子系統解析

mtDNA の CO I 領域の解析から得られた塩基配列を用いて, 最尤法によって系統樹を作成した結果, アザミウマ科の属不明種である Gen. sp. は *Thrips alni* と高いブートストラップ値 (91) で姉妹群であることが支持された (図 1 の矢印)。したがって, Gen. sp. に最も近縁な種は本研究で解析した種の中では *T. alni* が最も近縁な種である (図 1)。

図 1 から分かるように, *Thrips* 属の単系統性は支持されなかった。*Thrips* genus-group に属する *Thrips* 属に近縁な属も *Thrips* 属のクレードに内包されており, 独立属としての妥当性も支持されなかった。これらのことから,

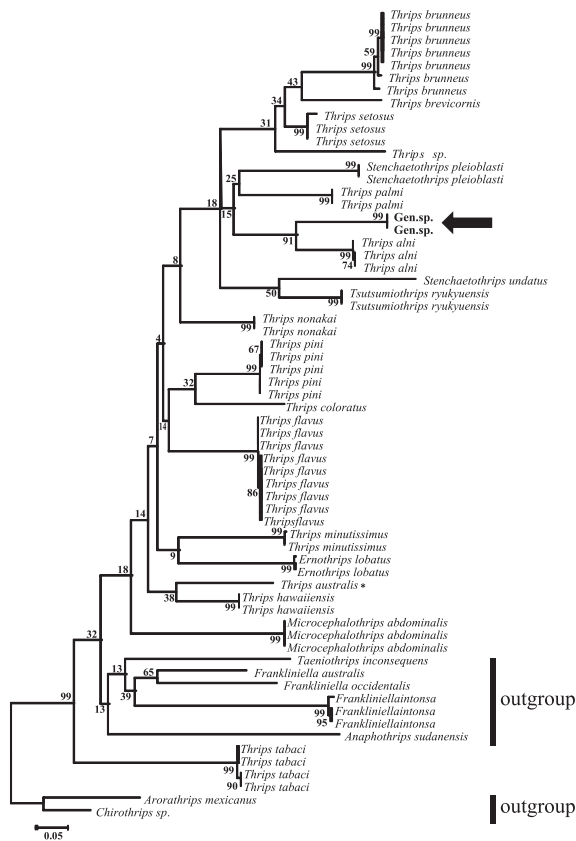


図 1. mtDNA の COI 領域に基づく *Thrips* genus-group の分子系統樹 (最尤法)

現段階では Gen. sp. は *Thrips* 属とすることが妥当であると思われる。 *Thrips* 属には見られない Gen. sp. の特徴である後胸背楯板の刻紋の消失は、 *Thrips* genus-group に属する他の

16 属のどの属にも見られない特徴であり、 Gen. sp. の種としての固有派生形質であるものと考えられる。

## 2. 遺伝的多様性の解析

mtDNA の COI 領域の解析から得られた塩基配列を用いて、平均距離法 (UPGMA 法) によって系統樹を作成した結果、アザミウマ亜科の Gen. sp. は、長野県産 (乗鞍高原, 上高地, 蝶ヶ岳, 美ヶ原) と福島県産 (帝釈山, 田代山, 三本槍岳) からなるクレード I, 長野県の上高地産 (焼岳登山道沿い) のクレード II, 長野県の上高地産 (新村橋と横尾山荘の間) のクレード III, 福島県産 (安達太良山, 一切経山, 磐梯山, 燧ヶ岳) のクレード IV, 福島県の燧ヶ岳産 (ガレ場) のクレード V, 福島県の磐梯山産 (弘法清水) のクレード VI, 福島県の燧ヶ岳産 (柴安嶺と俎嶺鞍部) のクレード VII の 7 つのクレードに分かれた (図 2)。長野県産と福島県産の個体がそれぞれ別のクレードに含まれる場合もあったが (クレード II から VII), 長野県産と福島県産の個体が混在するクレードもあった (クレード I)。ハプロタイプにおいては、Gen. sp. 内において 8 ハプロタイプが認められた (図 3)。これら

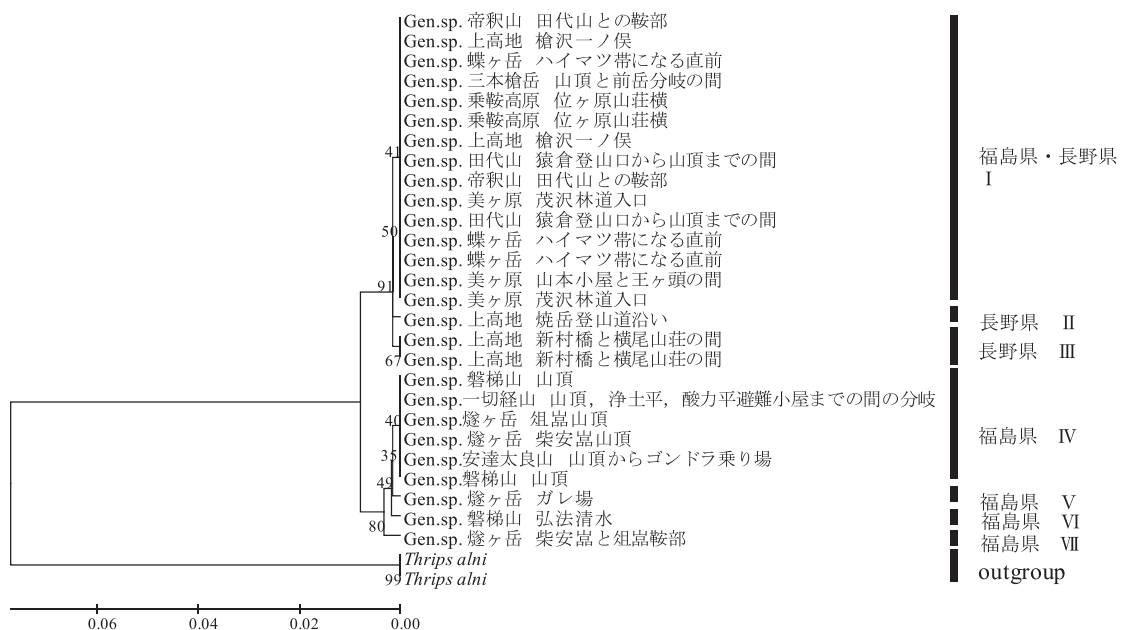


図 2. mtDNA の COI 領域に基づく Gen. sp. の分子系統樹 (UPGMA 法)

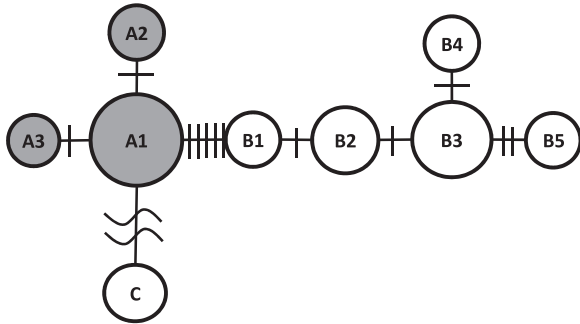


図 3. Gen. sp.のハプロタイプネットワーク

のハプロタイプには、5塩基の置換で区別されるハプロタイプA(A1, A2, A3)とハプロタイプB(B1, B2, B3, B4, B5)が確認された。基本的には長野県で採集された個体からは、ハプロタイプAが検出され、福島県で採集された個体からは、ハプロタイプBが検出された。

しかしながら、クレードIに含まれる福島県の田代山、帝釈山、三本槍岳の3地点から得られた個体は同じくクレードIに含まれる長野県産の個体と同じハプロタイプ(A1)

を持っていた(図4)。外群として用いた長野県産の *Thrips alni* のハプロタイプが長野県産の Gen. sp.に見られるハプロタイプ(A1からA3)とつながることから、福島県産の Gen. sp.よりも長野県産の Gen. sp.の方が祖先的である可能性が高い。図3に示したハプロタイプネットワークは、元々長野県に分布していた Gen. sp.が、福島県へと分布を拡大し、長野県と福島県でそれぞれ独自に分化した後に、長野県産のハプロタイプA1を持つ個体が長野県から福島県に侵入したことを示唆している。

Gen. sp.は福島県と長野県の間における分布が知られておらず、長野県からどのような経路を辿って福島県へ移動してきたかについては不明である。また、Gen. sp.はほとんどの個体が短翅型であり、移動分散能力は極めて低いものと考えられる。稀に長翅型の個体が生じるため、長野県から福島県へと分布を広げてきたのはこのような長翅型の

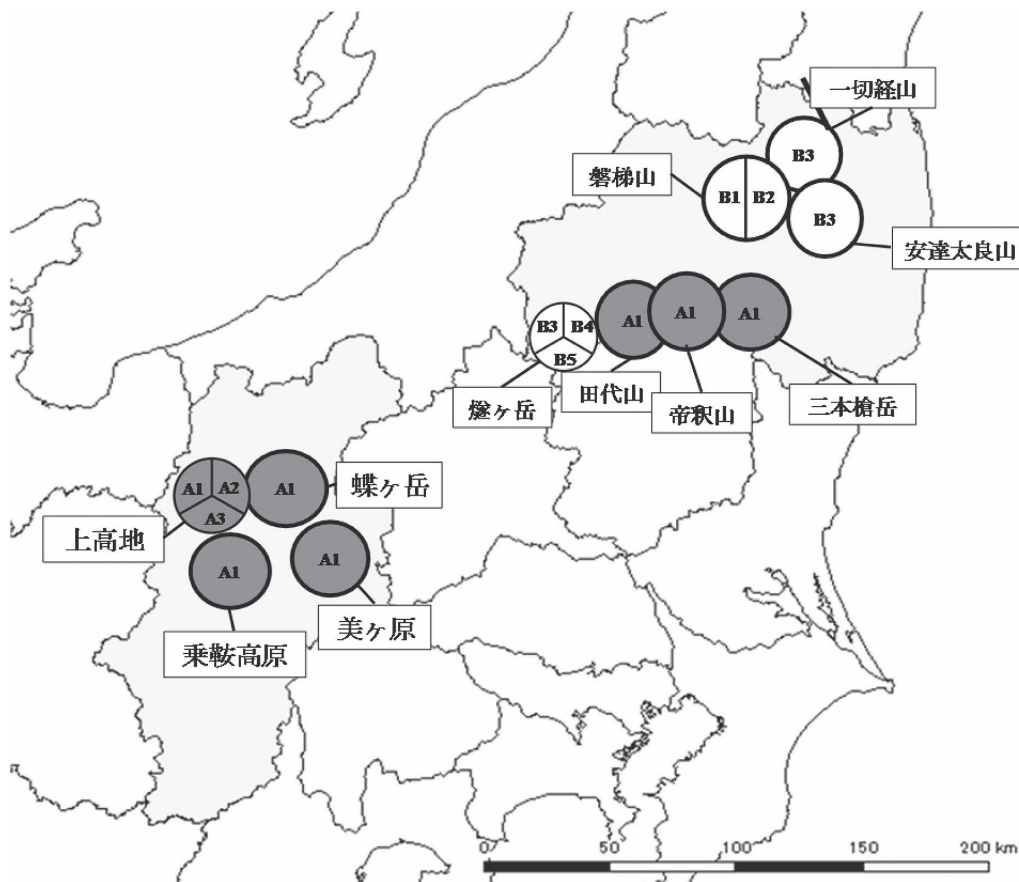


図 4. 長野県と福島県における Gen. sp.のハプロタイプの分布図



個体であったのかもしれない。長野県のハプロタイプ A1 と同一のハプロタイプを持つ福島県産の個体の生息が確認されているのは田代山、帝釈山、三本槍岳と比較的長野県に近い場所である。したがって、長野県から群馬県や新潟県を經由して福島県まで辿り着いた可能性が考えられる。今後は、福島県と長野県の間で群馬県や新潟県の山岳域で本種の分布を確認し、分布していた場合はサンプルを入手し、解析を行う必要がある。

本研究でハプロタイプを解析した地点別のサンプル数は、乗鞍高原は1地点から2サンプル、上高地は3地点から5サンプル、蝶ヶ岳は1地点から3サンプル、美ヶ原は2地点から3サンプルと必ずしも多くはない(表2)。そのため、解析するサンプルを増やすことにより、各ハプロタイプの分布と生息環境の違いについて検討を行う必要がある。しかし、これらの結果は、ハプロタイプの分布についていくつかの示唆を与えると思われる。長野県では本研究で用いたサンプルの採集地点4つ全て(乗鞍高原、上高地、蝶ヶ岳、美ヶ原)からA1のハプロタイプをもつ個体が得られた(図4)。一方、上高地にはA2、A3のハプロタイプをもつ個体も分布し、上高地だけで3つのハプロタイプが認められる結果となった(図4)。全ての採集地点にA1のハプロタイプを持つ個体が分布していることを考えると、長野県内にはA1のハプロタイプを持つ個体が広く分布している可能性が高い。一方、3つの異なるハプロタイプが認められた上高地では、Gen. sp.の分布は不連続であった。A1のハプロタイプを持つ個体は比較的高標高地に分布し、A2のハプロタイプを持つ個体は距離的には近いが、A1のハプロタイプを持つ個体の分布する場所と比べると約100mほど標高の低い場所で、比較的人通りの多い場所に分布している。A3のハプロタイプを持つ個体はA1とA2のハプロタイプを持つ個体が生息する場所とは

梓川をはさんで逆側の高標高地に分布している。このように上高地ではそれぞれが分布する環境が大きく異なる。

福島県では、前述したように、長野県に比較的近い場所に位置する田代山、帝釈山、三本槍岳にはA1のハプロタイプを持つ個体が分布し、北部の一切経山、安達太良山と南部の燧ヶ岳にはB3のハプロタイプを持つ個体が分布する(図4)。そして、北部ではあるが、独立峰である磐梯山にはB1とB2のハプロタイプを持つ個体が分布する(図4)。さらに、燧ヶ岳はA1のハプロタイプを持つ個体の分布する田代山、帝釈山、三本槍岳と距離的には近いにも関わらず、同一のハプロタイプを持つ個体は分布せず、B3以外にB4、B5のハプロタイプを持つ個体が見出された(図4)。このように福島県内におけるハプロタイプの分布は採集地点ごとにまとまらない結果となった(図4)。

福島県産の個体のみに認められたBタイプのハプロタイプは、福島県内の3つの場所(安達太良山、一切経山、燧ヶ岳)から得られた個体が持っていたB3のハプロタイプ以外は、いずれのハプロタイプも1つの場所の個体でしか見出されなかった。福島県の北部(安達太良山と一切経山)と南部(燧ヶ岳)と離れた場所から同一のハプロタイプを持つ個体が得られたことから考えると、福島県内にはB3のハプロタイプを持つ個体が広く分布しているものと思われる。本研究の解析には燧ヶ岳と一切経山、安達太良山の間地域のサンプルは用いていない。福島県内にB3のハプロタイプを持つ個体が広く分布していることを確認するためには、この間の地域でGen. sp.の分布を確認し、分布が確認された場合にはサンプルを確保し、解析を行うことが必要である。

燧ヶ岳の個体には距離的に近い田代山、帝釈山、三本槍岳の個体が持つA1のハプロタイプが見出せなかった。本研究でハプロタイ

プを解析した地点別のサンプル数は、燧ヶ岳は4地点から4サンプル、田代山は1地点から2サンプル、帝釈山も1地点から2サンプル、三本槍岳は1地点から1サンプルであった。したがって、燧ヶ岳からA1のハプロタイプを持つ個体が見出されず、また、田代山、帝釈山、三本槍岳の3地点からB3のハプロタイプを持つ個体が見出されなかったのは、サンプル数が少なかったことに原因があるかもしれない(表2)。今後はより多くの地点からサンプルを集め、各地点におけるサンプル数を増やして解析する必要がある。

### 謝辞

本研究を進めるにあたり、独立行政法人農業生物資源研究所の関根一希さんには有益なご助言を頂きました。また、信州大学理学部生物科学科の東城幸治先生、信州大学大学院総合工学系研究科博士後期課程3年生の鈴木智也さんには、長野県の上高地、乗鞍高原、美ヶ原での採集許可取得及び研究材料の採集にご協力頂きました。本研究室の大学院博士前期課程1年生の志賀澄歌さんには研究材料の採集にご協力頂きました。以上の方々に心より深く御礼申し上げます。

### 引用文献

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, (17), 3389-3402.

Buckman, R.S., L. A. Mound and M. Whiting (2013) Phylogeny of thrips (Insecta: Thysanoptera) based on five molecular loci, *Systematic Entomology*, 38, 123-133.

Clement, M., D. Posada and K. A. Crandall (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies, *Molecular Ecology*, 9,

419-437.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-297.

Gullan, P. J. and P. S. Cranston (2010) *The Insects: An Outline of Entomology, 4th Edition*, 565p, Wiley-Blackwell, Oxford.

Kato, K. and D. M. Standley (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7 improvements in performance and usability, *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772-780.

Masumoto, M. (2009) Taxonomic study of Japanese Thripinae (Thysanoptera, Thripidae), with consideration of supra-generic relationships based on morphological characters, Doctoral thesis, Tokyo University of Agriculture.

Masumoto, M. and S. Okajima (2013) Review of the genus *Thrips* and related genera (Thysanoptera, Thripidae) from Japan, *Zootaxa*, 3678(1), 1-65.

Mound, L.A. (2002a) So many thrips – so few tospoviruses? Marullo, R. and Mound, L.A. eds., *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Thysanoptera*, 15-18, Università degli Studi.

Mound, L. A. (2002b) The *Thrips* and *Frankliniella* genus-group: the phylogenetic significance of ctenidia. Marullo, R. and Mound, L.A. eds., *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Thysanoptera*, 379-386, Università degli Studi.

志賀澄歌 (2013) 福島県内の山岳域におけるイネ科植物から記録されたアザミウマ類 (昆虫綱:アザミウマ目), 福島大学理工

学群共生システム理工学類環境システム  
マネジメント専攻平成 24 年度卒業論文.

Tamura, K., P. Daniel, P. Nicholas, S. Glen, N. Masatoshi and K.Sudhir (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol. Evol.*, 28(10), 2731-2739.

Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, (22), 4673-4680.

塘 忠顕 (2011) 磐梯朝日国立公園特別保護地区のアザミウマ相 (予報), *福島生物*, (54), 41-46.

塘 忠顕・志賀澄歌 (2013) 福島県内の山岳域におけるアザミウマ相 (昆虫綱:アザミウマ目), *共生のシステム*, 13, 116-128.

志賀澄歌・鈴木智也・東城幸治・塘 忠顕 (2014) 山岳域に生息するアザミウマ類 (昆虫綱:アザミウマ目) ~磐梯朝日国立公園と中部山岳国立公園における山岳性アザミウマ相の比較~, *共生のシステム*, 14. 128-136