

クビアカツヤカミキリ識別 CAPS マーカーの開発

1. 成果の要約

ももやサクラ等を加害する特定外来生物クビアカツヤカミキリ（以下、クビアカという）を他種カミキリムシ類と識別するため CAPS マーカーを開発した。クビアカ以外のももやサクラに寄生する可能性のあるカミキリムシ類 22 種を用いてマーカーの適用性を検証した結果、クビアカと同一のバンドパターンを示す種は認められなかった。このため、本マーカーを活用することで、カミキリムシ類に関する専門的知識を有さなくても、精度の高い識別が可能になると考えられた。

2. キーワード

クビアカツヤカミキリ、識別、CAPS マーカー

3. 試験のねらい

クビアカは特定外来生物であり、本種の被害樹では薬剤防除や脱出防止措置、伐倒等の適切な防除対策が必要となる。さらに、伐倒木内にも幼虫が寄生している可能性があるため、処分時には焼却やチップ化、くん蒸等の殺虫処理を要する。このため、ももやサクラ等で本種の疑いがあるカミキリムシ類被害が認められた場合、種の確実な識別が求められる。しかし、カミキリムシ類幼虫はいずれも形態的特徴が類似し識別が難しいことに加え、クビアカは外来種のため外部形態や簡易識別法に関する知見が少なく、特に若中齢期幼虫の識別は専門家であっても難しい。そこで、カミキリムシ類に関する専門的知識が無くても確実かつ比較的簡便に種の識別が可能な DNA 配列に基づいた識別マーカーの開発を試みた。

4. 試験方法

(1) CAPS マーカーの開発

供試虫として、佐野市のもも園で採集されたクビアカ 17 頭と、同様にももへの寄生が確認されたウスバ、ゴマダラの各 2 頭ずつを用いた。PCR プライマーとして Simon ら (2006) の TW-J1301 および Simon ら (1994) の C2-N3389 を改変したものをを用いてミトコンドリア DNA の COI (cytochrome oxidase subunit I) 領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法で配列を決定した。得られた塩基配列から、クビアカと他種を識別可能な制限酵素および切断部位を探索し、当該部位を包含するように PCR プライマーを設計し、CAPS マーカーとした。

(2) マーカー実用性の検証

クビアカ以外の種として、ももやサクラ等の寄生植物から得られる可能性がある一次性（生立木に寄生）および二次性（衰弱木や枯死木に寄生）カミキリムシ類 22 種、カミキリムシ以外の枝幹害虫としてタマムシおよびコスカシバの 2 種、合計 69 個体について、マーカーによる PCR 増幅の可否と制限酵素処理後の切断断片長を調査した。また、マーカーの PCR 産物をダイレクトシーケンス法で解析し、塩基配列を決定することで、切断断片長の実数値を求めた。

5. 試験結果および考察

(1) CAPS マーカーの開発

COI 領域の 706~1193 塩基目までの 488bp を増幅し、制限酵素 AluI で切断することで、ももで発生する主要なカミキリムシ類 3 種を識別可能な CAPS マーカーを開発した（表-1）。なお、供試したクビアカ 17 頭は COI 領域の一部配列（1521bp）によって 2 つのハプロタイプ（7 頭および 10 頭）に分けられたが、マーカーの切断断片長は同一であり、識別上の問題とはならなかった。

(2) マーカー実用性の検証

クビアカ以外の種へのマーカー適用性を検証した結果、PCR による増幅はカミキリムシ類 16 種で認められた。制限酵素処理後の切断断片長は、13 種では種内多型は認められなかったが、ミヤマ、ゴマフ、ナガゴマフの 3 種では各 2 パターンの多型を示した（表-2）。タマムシ、コスカシバおよび 6 種のカミキリムシ類では PCR で正常な増幅が確認できないか、サブバンドが認められた。このように、正常な増幅が認められた種では、種に特異的な切断断片長が認められたことから、本マーカーは複数種が混発する状況下での種の識別に有用であると考えられた。

（担当者 研究開発部 病理昆虫研究室 春山直人）

表-1 クビアカツヤカミキリ識別 CAPS マーカー

	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	制限酵素	増幅 産物
Forward	2195-TcAb-CF1 ^{a)}	TGATTCTTTGGACAYCCHGAAGT	AluI	488bp
Reverse	TcAb-CR1	GGATATCATTGWACWAGICCTGC		
反応 ^{b)} 条件	(98°C・30秒) ⇒ (98°C・10秒, 50°C・5秒, 68°C・1秒) ×30 サイクル ⇒ (68°C・3分) ⇒ AluI 添加 (規定量) ⇒ (37°C・3時間)			

a) Simon ら (1994) を改変.

b) PCR 用酵素として KOD One PCR Master Mix (株東洋紡) を使用. 反応液組成は PCR 用酵素のマニュアルに準じた.

表-2 CAPS マーカーによる供試虫の PCR 増幅可否および切断断片長

和名	学名	供試 個体数	PCR 増幅	切断断片長
クビアカツヤカミキリ	<i>Aromia bungii</i>	17	○	57,160,271
ゴマダラカミキリ	<i>Anoplophora malasiaca</i>	5	○	66,94,118,210
ウスバカミキリ	<i>Megopsis sinica</i>	8	○	488
ノコギリカミキリ	<i>Prionus insularis</i>	1	○	30,40,160,258
ミヤマカミキリ	<i>Massicus raddei</i>	6	○	108,160,220
			○	160,328
クビアカトラカミキリ	<i>Xylotrechus rufilius</i>	3	○	82,118,128,160
クロトラカミキリ	<i>Chlorophorus diadema</i>	1	○	70,160,258
エグリトラカミキリ	<i>Chlorophorus japonicus</i>	2	○	48,70,168,202
キイロトラカミキリ	<i>Grammographus notabilis notabilis</i>	3	—	—
ウスイロトラカミキリ	<i>Xylotrechus cuneipennis</i>	3	○	40,94,354
ヒメヒゲナガカミキリ	<i>Monochamus subfasciatus</i>	1	○	42,48,66,160,172
ヤツメカミキリ	<i>Eutetrappa ocelota</i>	2	○	30,36,48,51,54,57,94,118
リンゴカミキリ	<i>Oberea japonica</i>	1	○	48,48,54,66,70,94,108
ルリカミキリ	<i>Bacchisa fortunei</i>	2	—	—
ホソカミキリ	<i>Distenia gracilis</i>	5	—	—
ルリボシカミキリ	<i>Rosalia batesi</i>	1	—	—
ゴマフカミキリ	<i>Mesosa japonica</i>	3	○	48,54,66,72,118,130
			○	40,48,54,66,72,78,130
カタシロゴマフカミキリ	<i>Mesosa hirsuta</i>	1	○	105,181,202
ナガゴマフカミキリ	<i>Mesosa longipennis</i>	5	○	42,48,54,66,66,94,118
			○	40,42,48,54,66,66,78,94
キマダラミヤマカミキリ	<i>Aeolesthes chrysothrix chrysothrix</i>	2	—	—
ニセビロウドカミキリ	<i>Acalolepta sejuncta</i>	2	—	—
キボシカミキリ	<i>Psacotheta hilaris</i>	3	○	40,54,78,94,222
クワカミキリ	<i>Apriona japonica</i>	3	○	30,40,42,66,130,180
タマムシ	<i>Chrysochroa fulgidissima</i>	1	—	—
コスカシバ	<i>Synanthedon hector</i>	5	—	—

※サンプル収集および同定については栃木県立博物館の栗原主任研究員にご協力いただいた。