

ナミハダニの休眠性とアロザイムに関する 生態遺伝学的研究

1995

五箇公一

目次

第1章 序論	1
第2章 ナミハダニの生活史の概要および遺伝学的知見	4
(1) 種	4
(2) 発育・増殖および食性	4
(3) 発生消長	5
(4) 休眠性	7
(5) 遺伝学的知見	9
第3章 ナミハダニの休眠性の遺伝学的研究	11
3.1 緒言	11
3.2 材料と方法	13
(1) 個体群	13
(2) 休眠誘起条件と休眠性の判定	13
(3) 休眠および非休眠性系統の選抜	15
(4) 交雑	15
3.3 結果	17
(1) 休眠性系統と非休眠性系統の相反交雑	17
(2) 休眠抑制遺伝子の変異	19
1.相反交雑	19
2.戻し交雑	23
(3) 休眠抑制遺伝の母性効果のメカニズム	25
3.4 考察	32
第4章 電気泳動法によるナミハダニのアロザイム変異の研究	37
4.1 緒言	37
4.2 材料と方法	39
(1) 個体群	39
(2) 系統	39
(3) 交雑	44

(4) 電気泳動のサンプル調整	44
(5) 電気泳動法	44
4.3 結果	45
(1) アロザイム遺伝子分析	45
1. エステラーゼ	45
2. MDH	47
3. PGI	52
4. まとめ	52
(2) 地域個体群間のアロザイム変異	54
1. 果樹・バラ寄生の個体群における変異	54
2. 草本性植物寄生の個体群における変異	61
4.4 考察	61
第5章 総合考察	69
謝辞	73
摘要	74
引用文献	77

第1章 序論

生物の示す遺伝的変異は、大きく二つのカテゴリーに分けられる。一つは生物の生存に大きな影響を与えると考えられる適応形質の変異であり、もう一つは生物の生存にはほとんど影響しないと考えられる適応中立形質の変異である。適応形質は常に厳しい環境の自然選択にさらされており、その変異を調べることにより自然選択による種や個体群の遺伝的分化を知ることができる。一方、適応中立形質は自然選択に中立かそれに近いため、その変異は移動や遺伝子浮動のような機会的要因によって支配される。従って、そのような形質の変異を調べることは、過去の地史的な経過によって生じた遺伝的分化を知る手がかりとなる。

農業害虫の多くは、農耕地という餌資源は豊富であるが極めて攪乱の大きい人為的環境を舞台に進化し、適応してきたと考えられる。それ故、農業害虫種の生活史の進化や分化に関する基礎的情報は、それらに対する防除体系を構築する上でも重要な意味をもち(Sara, 1990)、そのような情報を得るために対象とする害虫種の様々な適応および適応中立形質の遺伝的変異の研究が不可欠である。

多様な農業害虫の中でハダニ類は体長が0.5mm前後の微小な動物であるが、数多くの農作物の吸汁害虫としてその被害は世界的に問題となっている。我が国で特に大きな被害をもたらしているハダニ類としては、*Tetranychus* 属のナミハダニ *T. urticae* Koch、カンザワハダニ *T. kanzawai* Kishida、アシノワハダニ *T. ludeni* Zacher や、*Panonychus* 属のミカンハダニ *P. citri* (McGregor)、クワオオハダニ *P. mori* Yokoyama、リンゴハダニ *P. ulmi* (Koch) 等が挙げられる。これらのうち本研究で研究対象としたナミハダニは、その寄主植物が極めて多岐にわたり、また増殖率も非常に高く、ハダニ類の中でも特に重要度の高い農業害虫である。

ナミハダニは、我が国ではもともと北日本に発生する休眠種と考えられていた。しかし、1970年代に入って、四国、九州や本州の西南暖地においても発生が顕著になってきたこ

とが数多くの現場の研究者によって指摘され、本種は最近になって北方より分布を拡大してきたと考えられている(後藤・真梶、1981)。しかし、それを裏付ける量的な情報はこれまで呈示されていない。

ハダニ類ははねを持たず、サイズも小さいため移動能力が乏しい。また、世代期間が短く、半数-倍数性の繁殖様式をとることから近親交配が起き易いと考えられている(Hussey and Parr, 1963; Cone et al., 1971; Helle and Overmeer, 1973)。ハダニ類のこのような生態的・遺伝的特性は、集団を細分化し、集団間の遺伝的分化を生じさせやすい(刑部、1989)。全国に発生が認められるナミハダニが過去にその分布を拡大しているとするれば、その過程で地域個体群間になんらかの遺伝的分化が生じている可能性が高い。逆に、この遺伝的分化を調べることでナミハダニの分布拡大の過程を解明する手がかりが得られると期待される。

ナミハダニの重要な適応形質の変異として休眠性の変異があり、我が国のナミハダニにはこの休眠性に地理的変異が存在することが明らかにされている(後藤・真梶、1981; Takafuji et al., 1991)。この休眠性の変異は自然選択のなかで獲得されてきた遺伝的変異の一つと考えられるが、その遺伝的制御機構に関する研究例はナミハダニに限らず、ハダニ類においては極めて限られている。

一方、ハダニ類は微小なため、形態形質に適応中立的な遺伝マーカーを求めるのは極めて困難である。1960年代より開発されたゲル電気泳動法は、遺伝学的・生化学的情報を得るために数多くの生物に適用されてきた。特に、この手法により検出されるアロザイム変異は基本的には適応中立と考えられ、遺伝子座を特定することにより対立遺伝子の頻度という概念を用いて定量化することができる。この分析技術をナミハダニに対して適用し、アロザイム変異を遺伝的マーカーとして用いれば各個体群間の遺伝的変異を定量化し、個体群間の遺伝的分化の程度が明らかになるものと期待できる。

そこで本研究では、ナミハダニの適応形質である休眠性と適応中立形質であるアロザイムという二つの形質に関する遺伝的変異を詳細に解析し、日本におけるナミハダニの遺伝

的分化の実態を捉えることを目的とした。本論文第2章では、ナミハダニの生活史の概要とこれまでの遺伝学的研究について述べた。第3章では、休眠性の地理的変異の遺伝的背景に関する基礎的情報を得る目的で休眠性の異なる系統を用いて交雑実験を行い、休眠性の遺伝的制御機構を明らかにした。第4章では、ナミハダニの適応中立な遺伝的マーカーとして電気泳動法によりいくつかのアロザイム変異を検出し、それらの遺伝子頻度を様々な地域個体群について調べて個体群間の遺伝的分化の程度を明らかにした。第5章の総合考察では、休眠性とアロザイムという二つの形質の遺伝的研究に基き、ナミハダニの遺伝的分化の実態を総合的に解析し、分化をもたらした要因について考察した。

第2章 ナミハダニの生活史の概要および遺伝学的知見

(1) 種

ナミハダニはダニ目(Acari)、前気門亜目(Prostigmata)、ハダニ科(Tetranychidae)に属する。本種には、黄緑色型(green form)と赤色型(red form)の二型が存在する。二型とも世界に広く分布するが、黄緑色型は冷温帯を中心に分布し、赤色型はより温暖な地域に分布する。両型間には雌成虫の体色以外に顕著な形態的差異はないが、黄緑色型は休眠性を有してカーネーションに寄生できないのに対し、赤色型は休眠性をもたずカーネーション寄生性を有するという生態的差異があり(Van de Bund and Helle, 1960)、さらに両型間には妊性のあるF₂が生じないという遺伝的不稔性が認められる(Boudreaux, 1956; Parr and Hussey, 1960; Van de Bund and Helle, 1960; Jordaan, 1977)。そのため二型は別種と考えられ、ナミハダニ(=黄緑色型)およびニセナミハダニ *T. cinnabarinus* (Boisdual) (=赤色型)として区別されてきた。しかし、実際には黄緑色型個体群にも休眠性を持たないものが存在し(後藤・真梶, 1981; Takafuji et al., 1991)、また、カーネーション寄生の黄緑色型個体群も報告されており、両型間の生態的差異の基準ははっきりしない。さらに、ヨーロッパにおける交雑実験で二型の遺伝的不稔性は不完全であることが判明したこと(Dupont, 1979)から、現在、この二型は分類学上、同一種とみなされている(江原, 1989)。しかし、野外での二型間の遺伝子交流については否定的な意見もあり(五箇ら, 未発表)、二型の区別に関する問題は未解決の段階である。

本研究で扱ったのはすべてナミハダニの黄緑色型である。

(2) 発育・増殖および食性

ナミハダニをはじめとするハダニ類は、卵、幼虫、第一若虫、第二若虫のステージを経て成虫となる。幼虫から成虫までの各ステージ間にはそれぞれ第一、第二、第三静止期(活動を停止する期間)があり、静止期のあと脱皮して成長する。卵から成虫までの発育期

間は温度の影響を強く受け、また、寄主植物によっても異なるが、25℃では9.2～12.1日間しかかからない(Saito, 1979; Carey and Bradley, 1982; Kondo and Takafuji, 1985; 中尾、1992)。

ナミハダニの繁殖様式はハダニ亜科に共通して見られる産雄単為生殖(arrhenotoky)であり、ハプロイド($n=3$)の未受精卵は雄に、ディプロイド($2n=6$)の受精卵は雌に発育する。交尾は原則として初回のもののみが有効であり、2回目以後別の雄が交尾してもその精子は受精できないことがアルビノをマーカーとした交雑実験で証明されている(Helle, 1967)。このため、雄は処女雌を確保する必要があり、第三静止期の雌に対してガーディング行動を示す。すなわち、雄は、雌が第三静止期から成虫に脱皮した直後に交尾できるよう、あらかじめ第三静止期雌の周辺で待機する(Potter et al., 1976a, b)。また、雄が第三静止期の雌に誘引されるのは、雌の放出するフェロモンの働きによる(Cone et al., 1971)。

ナミハダニの1雌あたりの総産卵数は25℃で51.9～178.6にものぼり、増殖ポテンシャルを示す内的自然増加率 (intrinsic rate of natural increase) r_m は0.196～0.292で、ハダニ類の中でも最も高い部類に入る(Saito, 1979; Carey and Bradley, 1982; Kondo and Takafuji, 1985; 中尾、1992)。

ナミハダニの寄主植物は、リンゴ、ナシ、オウトウ、モモ、ブドウ、カキ等の落葉果樹、インゲン、ダイズ、ナス、キュウリ等の蔬菜類、バラ、キク、カーネーション等の花卉類、ホップ、クワ、ワタと多岐にわたり、農業害虫としての重要度の高さを示している。

(3) 発生消長

ナミハダニは主に農耕地で発生するため、その個体群の発生消長は生息する地域の気象条件はもとより寄主植物の種類や栽培環境によって大きく異なり、また、薬剤散布など人為的攪乱要因にも大きく影響される。

果樹園やバラ園などの永年作物の圃場はナミハダニにとって比較的安定した生息環境であり、個体群の発生消長には大まかな地域的および季節的パターンが存在する。北海道や

東北のような冷涼な地域の個体群では、真夏時に発生のピークを示す一山型が一般的である(Croft and McGroarty, 1977; Gotoh, 1986a)。例えば、札幌の果樹園内のアカフサスグリでは、ナミハダニは4月下旬から5月上旬にかけて新芽の開裂とともに産卵を開始し、6月後半より個体数が増加して8月下旬にピークに達する。その後個体数は気温の低下とともに減少し、11月の落葉とともに発生は認められなくなる(Gotoh, 1986a)。一方、比較的温暖な西南日本では、初夏と秋に発生のピークを示す二山型が一般的である(Takafuji and Kamibayashi, 1984; Takafuji and Tsuda, 1992; 内田, 1982)。岡山県のナシ園では、5月はじめ頃からナシ葉上での発生がはじまり、5月から6月下旬まで指数的に増加してピークに達する。その後、個体数は急激に減少し、7月から8月の間は低密度で推移して9月に再び密度が回復し始め、10月下旬に二回目のピークをむかえる。このような二山型の発生パターンはカンキツのミカンハダニ(古橋, 1980; 大橋, 1984)やセイタカワダチソウのアシノワハダニ(Takafuji, 1980)でも認められるが、真夏に個体数が減少するのは、高温と乾燥によるハダニの発育障害および寄主の生理的劣化による寄主からの多数の個体の分散によるものと考えられている(Takafuji and Kamibayashi, 1984; 高藤, 1992)。これら果樹園やバラ園のナミハダニ個体群は秋の落葉にともない、北方のものは休眠に入り、樹皮下や下草に移動して越冬する(Croft and McGroarty, 1977; 内田, 1980, 1982)。一方、南方の果樹園では、非休眠個体が秋から春にかけて季節的に推移する園内の下草を次々と利用しながら個体群を維持する(Takafuji and Kamibayashi, 1984)。このように、果樹園およびバラ園ではナミハダニの発生は連続的である。

一方、野菜や花卉等の一年生草本の寄主の多くは栽培期間が短く、ナミハダニにとって一時的な餌資源であり、個体群の発生も一時的であることが多い。また、これらの寄主でのナミハダニの発生源は苗などによる持ち込みや、圃場周辺の雑草などからの侵入によるものが多い(前川ら, 1987; 井上, 1990; 森下, 1992)。

(4) 休眠性

ハダニ類は、リンゴハダニ、クワオオハダニ、カンザワハダニのように休眠性をもつ種とミカンハダニやアシノワハダニのように休眠性を持たない種に分けられる。このような種による休眠性の有無は、それぞれの種の分布域の気候や利用できる寄主植物のフェノロジーと密接に結びついていると考えられる。ナミハダニは従来休眠性を有する北方種と考えられていたが、我が国では休眠性の地理的変異が著しく、北方の個体群では休眠性が強いが西南日本では休眠性が全くないものもみられる(後藤・真梶、1981; Takafuji et al., 1991)。

ナミハダニの休眠性は外因性休眠 (facultative diapause) で、卵から第二若虫までの発育期に低温短日を経験すると休眠が誘起され、成虫態で休眠に入る。ただし、ナミハダニの休眠は雌のみで行われ、雄は休眠できない。非休眠雌の体色は淡黄緑色であるが、休眠雌は鮮やかなオレンジ色を呈する。これは休眠誘起により増加した体内脂質にβ-カロチンが蓄積するためである(Veerman, 1974; Veerman and Helle, 1978)。休眠に入った雌は産卵と摂食を停止する。さらに休眠にともなう生理的变化として、酸素消費量が非休眠時の1/5以下になり、また、体内の脂質や糖類の含有量が増加する(McEnroe, 1961)。これにより耐寒性が増していると考えられ(Stenseth, 1965; Veerman, 1985)、湿度が90%以上であれば6°Cで120日以上も生存が可能である(Parr and Hussey, 1966)。

ナミハダニの休眠誘起を制御している環境要因として、光周期、温度および栄養条件が挙げられる(Parr and Hussey, 1966)。ナミハダニの光周反応は長日型で、臨界日長より短日で休眠個体が出現する。臨界日長には地理的変異が存在し、また、同一個体群でも誘起温度によって異なる(Parr and Hussey, 1966; 後藤・真梶、1981)。光周反応では光周期の受容色素としてβ-カロチンが重要な役割を果たしている(Veerman and Helle, 1978; Veerman, 1980)。

温度は休眠発現に影響し、高温は発現を阻止し、低温ほど休眠を発現しやすい(Van de Bund and Helle, 1960; Takafuji et al., 1991)。また、明期が低温である場合より暗期が低

温であったほうが休眠発現率が高い(Veerman, 1977a)。休眠発現に対する温度の影響は光周期がともなって初めて生じるものであり、全暗状態では温度をどのように変化させても休眠雌は出現しない(Veerman, 1977a)。

栄養条件が休眠誘起に関与する例として、リンゴハダニ(Lees, 1953)やトドマツノハダニ *Olygonychus unuguis* (真梶, 1975)では、高温長日条件下でも葉が古くなったり、加害によって葉の生理条件が悪化すると休眠が誘起されることが知られるが、ナミハダニでは栄養条件が休眠発現に影響を及ぼすのは低温短日の休眠誘起条件の時に限られる(Parr and Hussey, 1966)。

休眠覚醒には発育零点以下の低温処理が必要とされるが、ナミハダニの休眠覚醒に必要な低温処理日数には個体群間で差異がある(Parr and Hussey, 1966)。また、休眠覚醒には日長条件も強く影響する。Veerman (1977b)のよれば、オランダのナミハダニでは長日(16時間日長)で低温処理(4°C)した場合、わずか8日間で50%の個体が17°Cで覚醒した。一方、短日で低温処理を施すと50%覚醒させるのに54日間必要であった。休眠覚醒に日長が関与する生態的意義は、越冬中に偶発的な温度の上昇に遭遇しても休眠を維持できることにある。

我が国のナミハダニの野外における休眠誘起は、札幌のアカフサスグリの個体群では8月下旬頃から(Gotoh, 1986a)、鳥取のナシでは9月下旬頃から(内田, 1980)、京都や奈良の野外バラでは10月上旬頃から始まる(Takafuji et al., 1991)。一方、休眠覚醒は札幌では11月に既に始まっており、2月中頃にはほとんどすべての個体の覚醒が終了している(Gotoh, 1986b)。鳥取では11月に、また、京都の個体群でも12月に覚醒が始まっており、それぞれ2月初めまでにはほぼ覚醒が終了している(内田, 1980; 高藤, 1992)。すなわち、野外ではナミハダニの休眠は厳冬期までに終了していることになるが、雌成虫は休眠覚醒後もしばらくは耐寒性を維持していると考えられる。

(5) 遺伝学的知見

ナミハダニをはじめとするハダニ類は、遺伝学的研究の材料としては好適な要素をいくつか含んでいる。ひとつは世代期間が短いため短期間で複数の世代にわたる遺伝様式を調べることができ、親子交雑も容易に行える。また、サイズが小さく、増殖率が高いことから比較的小さなスペースで大量の個体を飼育することができ、さらに、半数体(haploid)の雄では優性、劣性いずれの形質も直接表現されることから頻度の低い変異も検出できる可能性が高い。反面、サイズが小さいために形態的な変異を識別することが難しいという欠点をもつ。

これまでナミハダニを材料とした遺伝学的研究は、上述の利点を生かした交雑実験によるものが大半を占める。特に、オランダを中心とする西欧では異なった個体群や系統間で交雑した結果、次世代の性比や妊性が低下するという遺伝的不和合性(genetic incompatibility)に関する研究報告が数多い(Boudreaux, 1963; Helle and Pieterse, 1965; Overmeer, 1967; Overmeer and Van Zon, 1976; de Boer, 1980, 1981, 1982; Young et al., 1985)。こうした現象はナミハダニ個体群間に遺伝的分化が生じていることを示唆するものといえるが、これまで、わが国ではナミハダニの遺伝的不和合性に関する報告はない。

ナミハダニの形質の遺伝を扱った研究では色素異常と薬剤抵抗性に関するものがある。これまでにナミハダニではalbinoやlemonと命名された7つの色素異常が発見されている(Ballantyne, 1969; Veerman, 1974)。これらの変異は、野外あるいは室内個体群から突然変異として発見され、固定されたものである。Helle (1967)はalbino遺伝子をマーカーとしてナミハダニの交尾の有効性を調べている。

ハダニ類における薬剤抵抗性の発達は極めて迅速に起こり、その遺伝様式を調査することは防除上の観点からも重要である。ナミハダニにおいても様々な薬剤に対する抵抗性の遺伝様式が明らかにされている(Taylor and Smith, 1956; Helle, 1962, 1965; Dittrich, 1963a,b,c; Van Zon et al., 1964; Schulten, 1966; Ballantyne and Harrison, 1967; Overmeer, 1967; McEnroe and Kot, 1968; Overmeer and Harrison, 1969; Herne and

Brown, 1969; Overmeer and Van Zon, 1973; Rizzieri et al., 1988; Herron and Rophail, 1993)。これまでの報告では、ほとんどの薬剤抵抗性が単一遺伝子座支配であることが示されている。

これら色素異常や薬剤抵抗性は、いずれも人為的に選択された特殊な遺伝形質であるが、ナミハダニの遺伝的分化の程度を解明するためには自然環境中でみられる形質に着目し、その遺伝的変異を調査する必要があると思われる。しかし、ナミハダニの野外個体群における遺伝的変異の研究例は少なく、休眠性の地理的変異に関する報告に限られ、また、休眠性の遺伝的制御機構の研究もオランダのHelle (1968)とIgnatowicz and Helle (1986)の二例しかない。

一方、様々な害虫種で電気泳動により分離されるタンパクや酵素変異をマーカーとして種内、種間の遺伝的分化の程度を推定することが試みられている(Wagner and Selander, 1974; Berlocher, 1984)。ハダニ類においてもこの技術が導入され、系統間や個体群間の差をアイソザイムパターンで検出する研究が行われているが(Ogita and Kasai, 1965; 武久・田中, 1967; 田中ら, 1972; Kuwahara et al., 1981; 桑原, 1982; 刑部, 1984; Osakabe, 1987; Osakabe et al., 1993; Osakabe and Sakagami, 1993a, b)、検出されたバンドについて遺伝子座を特定し、遺伝子分析を行った例は Osakabe (1991)によるミカンハダニのエステラーゼに関する研究に限られる。ナミハダニでは、これまで数種の酵素でザイモグラムが検出されており、エステラーゼ (Sula and Weyda, 1983; Goka and Takafuji, 1992)、MDH (Ward et al., 1982)およびPGI (Grafton-Cardwell et al., 1988; Goka and Takafuji, 1992; Gotoh et al., 1993; Hinomoto and Takafuji, 1994)に個体レベルで変異が存在することが確認されているが、遺伝子座および対立遺伝子の数の特定を含めた遺伝子分析に関する詳細な報告はみられない。

第3章 ナミハダニの休眠性の遺伝学的研究

3.1 緒言

ハダニ類の休眠は、不適な環境に対する高い抵抗力の獲得とともにその生活環を寄主植物のフェノロジーと季節的に同調させるという適応的意義をもつ。休眠性は個体群が直面する地域の気候条件などによって強い自然選択を受けており、分布域の広いナミハダニには休眠性に関する様々な種内変異が存在する。

昆虫種では休眠発現の臨界日長と緯度の関係について数多く論じられてきたが(Danilevskii et al., 1970)、ナミハダニでも古くから旧ソ連などでの研究例があり、緯度が約3度上がるにつれて臨界日長が1時間長くなる(Parr and Hussey, 1966参照)。一方、我が国のナミハダニの地域個体群では臨界日長だけでなく、休眠率(休眠発現する個体の割合)にも著しい地理的変異が存在する(後藤・真梶、1981; Takafuji et al., 1991)。すなわち、北海道や東北北部の個体群では100%近い休眠率を示すが、緯度が下がるにつれて休眠率は低くなり、西南暖地では全く休眠性を示さないものも存在する。

さらに、我が国のナミハダニの休眠率には寄主植物の種類や、その栽培環境によっても個体群間に変異が存在する(高藤ら、1989a; Takafuji et al., 1991; So and Takafuji, 1992)。特に、奈良県などの中緯度地域では個体群間の変異が大きく、ハウスなどの半制御環境下のイチゴ、ナス、キクなどの一年生草本で発生する個体群では、バラや果樹等で発生する個体群に比べて休眠率が低い傾向にあり(高藤ら、1989a; Takafuji et al., 1991)、また、緯度や高度がほぼ同じ地域の同じ寄主植物であっても個体群間に大きな変異が存在する(高藤ら、1989a)。このことから高藤ら(1989a)は、ナミハダニ個体群の休眠性は温度や日長条件だけでなく、寄主植物の種類や個体群間の移動交流、個体群の侵入してからの時間的経過などが複雑に関与して決定されていると考察している。

このように我が国のナミハダニ個体群には、休眠性に関する遺伝的変異がかなり豊富に存在する。特に休眠率に変異が存在することから、ナミハダニ地域個体群には休眠抑制の

遺伝子が存在し、その遺伝子座の数や遺伝子頻度が個体群間で大きく異なると考えられる。この遺伝学的基礎情報の解明が、本種の休眠性の複雑な地理的変異の実態を明らかにしていくうえで不可欠である。しかし、ハダニの休眠性の遺伝学的研究例は、これまでオランダでのHelle(1968)とIgnatowicz and Helle(1986)に限られる。

Helle(1968)は、ナミハダニの室内系統から兄弟姉妹交雑により多数の純系を選抜した。これらの系統が様々な光周反応を示したことから、ナミハダニの個体群内には休眠性の遺伝的変異が存在するものと考え、人為的に選抜した高い休眠性を示す系統(HR)と休眠性の低い系統(LR)を交雑し、“HR”は“LR”に対して優性であることを示した。

Ignatowicz and Helle(1986)は、先のHelle(1968)と同じナミハダニの室内系統から2つの非休眠系統ND₁およびND₂を選抜し、交雑実験を更に詳細に行い、“休眠”は“非休眠”に対して完全優性であること、休眠抑制因子は一遺伝子座支配であること、ND₁とND₂の休眠抑制遺伝子是对立遺伝子の関係にある異なる遺伝子であること、そしてND₁の休眠抑制の遺伝制御には母性効果がはたらくことを示した。これらオランダにおける研究では、非休眠系統は休眠性の極めて高い室内系統から人為的に選抜されており、日本より寒冷なオランダにおいては非休眠(休眠抑制)遺伝子は一種の致死的突然変異として捉えられている。一方、日本のナミハダニでは野外個体群においても休眠性の変異が豊富であり、休眠性を全く有さない個体群も存在することから、ナミハダニの休眠性に関する遺伝的背景は日本とオランダでは大きく異なると考えられる。従って、日本のナミハダニの休眠性についても、その遺伝的メカニズムを解明し、オランダでの研究結果と比較してみる必要がある。

そこで本研究では、日本の5つの地域からナミハダニ個体群を採集し、これらの個体群から休眠性の高い系統と複数の低い系統を選抜してそれらの間で交雑実験を行い、日本産ナミハダニの休眠性の遺伝的メカニズムを調べた。

3.2 材料と方法

(1) 個体群

Table 1は、交雑実験のための系統を選抜するのに用いた5個体群の採集データとそれらの休眠率を示す。札幌、茨城および岡山個体群は野外圃場より採集し、静岡および奈良個体群はガラス室内より採集した。各個体群は、ナガウズラマメ (*Phaseorus vulgaris* L.) のリーフディスクで25°C-16L8Dの条件下で飼育維持した。これらの個体群の18°C-9L15Dにおける休眠率を調べると、札幌個体群は96%と高い値を示し、茨城個体群は32%という中間的な休眠率を示した。これに対して奈良個体群は完全に休眠性が欠失し、岡山および静岡個体群もほぼ完全な非休眠性の個体群であった。このように5個体群間には、明らかに休眠性の差異が認められた。

(2) 休眠誘起条件と休眠性の判定

ナガウズラマメのリーフディスクに各ストックカルチャーよりランダムに選んだナミハダニ雌成虫を接種し、25°C-16L8Dの条件下で3日間産卵させた。リーフディスク1枚あたりの接種数は最高20匹までとした。卵はそのまま15°C、18°Cおよび20°Cのいずれかの低温短日(9L15D)条件に移して成虫まで飼育して休眠誘起させ、全個体が成虫になって1週間後に体色によって休眠に入ったかどうかを判定した。すなわち外観上、体色が鮮明な朱色を呈した個体を休眠個体とし、黄緑色で胴背面に黒斑点を有するものを非休眠個体とした。この判定基準に従って区別できない中間的な個体については同じ条件下でさらに3日間、個体別に1.5×1.5cm²のリーフディスクに移して観察し、体色の変化および産卵の有無で休眠性を判定した。

Table 1. Collection records of *T. urticae* populations used in the present study and their diapause incidence at 18°C-9L15D

Location of population	Latitude & longitude	Date of collection	Host plant	% diapause (no. of females examined)
Sapporo (Hokkaido)	(43° N, 141° E)	Jul. 21, 1987	Red current	96.0 (70)
Kashihara (Nara)	(34° N, 136° E)	Apr. 25, 1985	Strawberry (glasshouse)	0 (164)
Ami (Ibaraki)	(36° N, 140° E)	Jul. 23, 1986	Pear	32.0 (75)
Okayama (Okayama)	(36° N, 134° E)	Apr. 20, 1987	Pear	5.5 (120)
Iwata (Shizuoka)	(35° N, 138° E)	May. 1, 1987	Strawberry (glasshouse)	2.0 (111)

(3) 休眠および非休眠性系統の選抜

1. 休眠性系統D：本系統は札幌個体群より選抜した。18°C-9L15Dで休眠に入った雌成虫のみ約100個体を選抜し、3週間5°Cで冷却して休眠覚醒させ、25°C-16L8Dへ移して増殖させた。この選抜を2~3世代ごとに3回行った。その後、25°C-16L8Dで累代飼育した。得られた系統は18°C-9L15Dで平均97%の高い休眠率を示した(Table 2)。

2. 非休眠性系統ND₁~ND₁₀：非休眠系統10系統は、それぞれ奈良、茨城、岡山および静岡の各個体群から以下の方法で選抜した。まず、茨城個体群より40の純系を10世代にわたる兄弟姉妹交雑により作出し、その中から完全に休眠性が欠失した3系統を選抜した。これらを非休眠性系統ND₁、ND₂およびND₃とした。非休眠性の奈良個体群からは三つの純系を選抜し、これらをND₄、ND₅およびND₆とした。同様に岡山の個体群から二つの(ND₇およびND₈)、そして静岡個体群から二つ(ND₉およびND₁₀)の非休眠性系統を選抜した。得られたすべての系統は全く休眠性を示さなかった(Table 2)。

(4) 交雑

1. 相反交雑：休眠性系統または非休眠性系統の第二若虫雌20個体をリーフディスクに接種し、25°C-16L8Dに放置した。全個体が成虫になった後、交雑相手の系統の雄成虫を10個体接種して交雑させ、同一条件下で3日間産卵させた。得られたF₁卵は9L15Dの15°C、18°Cまたは20°Cのいずれかに移し、成虫まで飼育し休眠誘起させた。

2. 戻し交雑：相反交雑で得られたF₁雌の親系統(DあるいはND)への戻し交雑は、1個体ずつの交雑で行った。F₁の第二若虫雌を2×2cm²のリーフディスクに1個体ずつ接種して、25°C-16L8Dで飼育した。成虫化したのを確認してから交雑相手の雄成虫を1個体接種して交雑させた。3日間産卵させて得られた卵(B₁)を上記と同じ条件下で休眠誘起させた。産卵に使用した雌成虫は新しいリーフディスクへ移し、再び3日間産卵させ、1匹の雌からできるだけ多くの卵を得るようにした。

Table 2. Diapause incidence at 18°C-9L15D of the inbred lines of *T. urticae* used in crossing experiments

Line	Location of original population	% Diapause (No. of females examined)
D	Sapporo	97.0±3.8 ^a (70,106,54)
ND1		0 (170)
ND2	Ibaraki	0 (89)
ND3		0 (101)
ND4		0 (131)
ND5	Nara	0 (170)
ND6		0 (161)
ND7		0 (98)
ND8	Okayama	0 (133)
ND9		0 (103)
ND10	Shizuoka	0 (128)

^a Mean ± SD.

3. 連続戻し交雑 : Helle (1968)および Ignatowicz and Helle (1986)によれば、休眠性系統と非休眠性系統の相反交雑において、F₁の休眠率に交雑の方向による有意差が生じるケースがある。この休眠性の遺伝制御に認められる母性効果のメカニズムの一つとして、細胞質の差が考えられる。そこで本研究では、細胞質の影響を捉えるために連続戻し交雑による系統間の核-細胞質置換を行った。相反交雑で得られたF₁の第二若虫雌を1個体抽出し、2×2cm²のリーフディスクに接種して25°C-16L8Dで飼育した。成虫になったのを確認してから雄親系統の雄を1個体接種し、交雑させた。3日間雌に産卵させて得られた卵を25°C-16L8Dで飼育し、再び第二若虫雌をランダムに1個体抽出し、戻し交雑を行った。この戻し交雑を5-6世代繰り返して行い、核細胞質置換系統を選抜した。

3.3 結果

(1) 休眠性系統と非休眠性系統の相反交雑

Dと10のND系統との相反交雑で得られたF₁の休眠率をTable 3に示した。Dと茨城個体群から選抜したND₁、ND₂およびND₃との相反交雑ではF₁の休眠率には交雑の方向による有意差は認められず、いずれも90%以上の休眠率を示した。一方、Dと奈良個体群から選抜したND₄、ND₅およびND₆との交雑では、F₁の休眠率は母親がDのときは82%~91%の高い値を示したが、母親がNDのときは36%~54%の値を示した。すなわちF₁の休眠率に交雑の方向による有意差が認められた。同様に、DとND₇~ND₁₀の交雑でも相反交雑間でF₁の休眠率に有意差が生じ、いずれも母親がDの場合のほうが高い値を示した。

これより、D系統の休眠性形質は、茨城個体群由来のND₁、ND₂およびND₃の非休眠性(休眠抑制)形質に対して完全優性であると考えられた。一方、その他の個体群から選抜した非休眠性系統ND₄~ND₁₀の休眠抑制の遺伝制御には母性効果が働いていることが示された。

Table 3. Diapause incidence at 18°C-9L15D of the F₁ hybrids from reciprocal crosses between a diapausing strain (D) and 10 non-diapausing strains (ND₁-ND₁₀).

Cross	% Diapause (No. of females examined)	Statistical test of differences between reciprocal crosses
D × ND ₁	94.6 (149)	NS
ND ₁ × D	91.7 (60)	
D × ND ₂	97.2 (107)	NS
ND ₂ × D	91.4 (324)	
D × ND ₃	91.9 (186)	NS
ND ₃ × D	91.6 (191)	
D × ND ₄	91.0 (78)	a
ND ₄ × D	35.5 (156)	
D × ND ₅	82.2 (546)	a
ND ₅ × D	42.1 (105)	
D × ND ₆	85.6 (131)	a
ND ₆ × D	53.7 (175)	
D × ND ₇	88.0 (210)	a
ND ₇ × D	67.0 (60)	
D × ND ₈	85.3 (243)	a
ND ₈ × D	77.6 (49)	
D × ND ₉	88.7 (106)	a
ND ₉ × D	56.4 (117)	
D × ND ₁₀	91.1 (45)	a
ND ₁₀ × D	51.9 (33)	

a; Significant ($p < 0.05$; χ^2 -test)

(2) 休眠抑制遺伝子の変異

上記の相反交雑では、母親がDであればF₁の休眠率はいずれも高い値を示した。Ignatowicz and Helle (1986)も、休眠性系統と二つの非休眠性系統を用いた交雑試験で同様の結果を得ており、非休眠性系統の休眠抑制遺伝子は同一のものと結論している。しかし、この実験では休眠誘起を一つの低温(18°C)短日条件でしか行っていない。実際にはナミハダニの休眠発現は温度の影響を強く受け、休眠誘起の温度によって休眠発現率は変化する。休眠発現に対する温度の影響には個体群間・個体群内で変異が認められており(Takafuji et al., 1991)、休眠抑制に関する遺伝子型によって休眠発現の温度感受性に違いが生じるものと考えられる。そこで、F₁の休眠誘起の温度条件を変化させ、温度による休眠性あるいは休眠抑制の発現の違いを調べ、非休眠系統の休眠抑制遺伝子に変異が存在するかどうかを調べた。また、同様に戻し交雑からのB₁の休眠率も異なった温度条件で調べ、休眠抑制の遺伝様式をさらに詳細に調べた。これらの交雑実験では非休眠性系統は、上記の相反交雑において休眠抑制の遺伝制御に母性効果が全く認められなかったND₁~ND₃(茨城個体群由来)と、それとは対照的に母性効果が強く働いたND₄およびND₅(奈良個体群由来)を用いた。

1. 相反交雑

Table 4 に本実験に使用した休眠性系統Dと非休眠性系統ND₁~ND₅の3つの温度条件における休眠率を示した。Dは、実験期間中の8世代にわたる調査の結果、15°Cおよび18°Cでは95%以上の休眠率を示し、20°Cでは80%以上の休眠率を示した。一方、ND₁~ND₅は、3つの温度条件すべてにおいて全く休眠性を示さなかった。

Table 5とFig. 1に、Dと各ND系統の相反交雑で得られたF₁の休眠率を示した。DとND₁およびND₂の相反交雑のF₁の休眠率は、15°Cおよび18°Cでは90%以上、20°Cでも80%以上の高い値を示し、交雑の方向による有意差は認められなかった。DとND₃からのF₁の休眠率にも交雑の方向による有意差は認められなかった。ただし、15°Cおよび18°Cでは

Table 4. Diapause incidence of the *T. urticae* strains used in crossing experiments at 3 temperature conditions under 9L15D.

Strain	Original population	Generation	% Diapause (No. of females examined)		
			15°C	18°C	20°C
D	Sapporo	1	96.2 (702)	100.0 (158)	83.4 (199)
		2	87.9 (393)	96.4 (823)	80.6 (594)
		3	98.7 (519)	96.6 (1270)	88.6 (615)
		4	100.0 (626)	99.0 (593)	91.9 (708)
		5		94.5 (434)	
		6		99.3 (268)	
		7		98.4 (507)	
		8		98.3 (977)	
		Total	95.6 (2240)	97.8 (5030)	86.1 (2116)
ND1	Ibaraki	-	0 (101)	0 (170)	0 (101)
ND2	Ibaraki	-	0 (174)	0 (180)	0 (342)
ND3	Ibaraki	-	0 (351)	0 (187)	0 (196)
ND4	Nara	-	0 (170)	0 (131)	0 (170)
ND5	Nara	-	0 (161)	0 (170)	0 (130)

Table 5. Diapause incidence of F₁ hybrids from reciprocal crosses between D and ND at 3 temperature conditions under 9L15D

Cross	% Diapause (No. of females examined)			
	15°C		18°C	20°C
D × ND ₁	91.4 (186)		94.0 (474)	89.7 (445)
ND ₁ × D	93.9 (244)		91.0 (613)	80.0 (90)
D × ND ₂	99.4 (172)		98.7 (785)	82.9 (292)
ND ₂ × D	97.8 (174)		99.8 (469)	88.9 (217)
D × ND ₃	98.6 (174)		95.5 (189)	** 2.4 (283)
ND ₃ × D	95.5 (161)		90.9 (177)	** 0 (170)
D × ND ₄	83.5 (547) *	**	56.0 (377) *	** 1.0 (224)
ND ₄ × D	53.7 (175)	**	27.6 (181)	** 2.2 (278)
D × ND ₅	81.0 (433) *	**	65.9 (492) *	** 0 (696)
ND ₅ × D	66.1 (127)	**	37.5 (736)	** 0 (147)

* Significant differences ($p < 0.05$; χ^2 -test) between reciprocal crosses

** Significant differences ($p < 0.05$; χ^2 -test) between temperatures

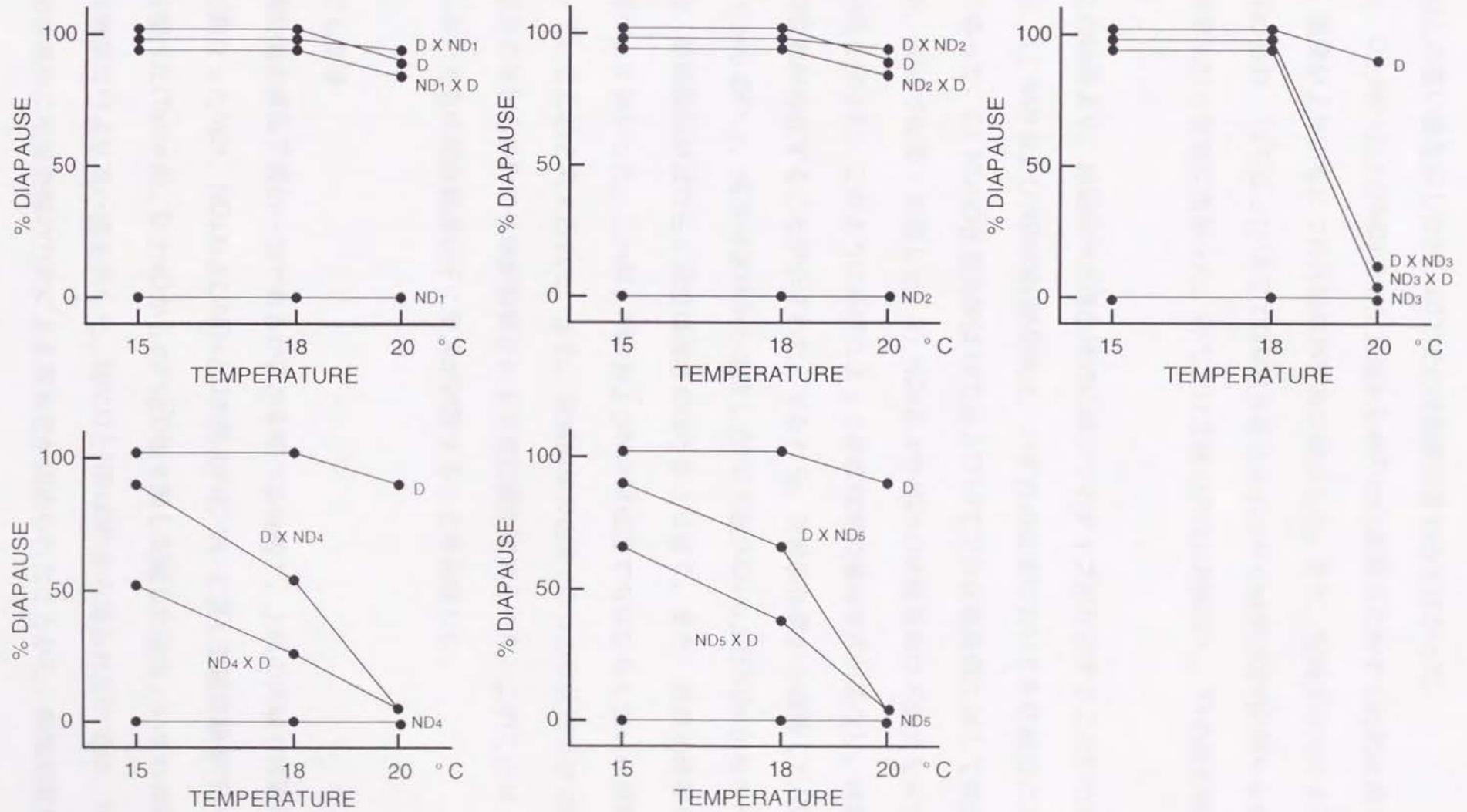


Fig. 1. Diapause incidence of F1 hybrids from reciprocal crosses between D and ND.

90%以上の高い値を示したが、20℃での休眠率はきわめて低かった。

一方、DとND₄およびND₅の相反交雑からのF₁の休眠発現に対する誘起温度の影響が著しく、温度が上昇するにつれ休眠率が有意に減少した。また、交雑の方向による影響も有意に認められ、15℃および18℃ではD雌から生まれたF₁の休眠率がND雌から生まれたF₁の休眠率よりも有意に高かった。20℃では交雑の方向に関係なく、F₁の休眠率は0%であった。

以上の結果より、休眠抑制の遺伝様式には3つのタイプが存在することが示された。すなわち、1) ND₁およびND₂の休眠抑制は、いずれの温度においても休眠性に対し完全な劣性であった。2) ND₃の休眠抑制は15℃および18℃では休眠発現に対して完全な劣性であるが、20℃では強く発現した。3) ND₄およびND₅の休眠抑制は不完全な劣性であり、母性効果を伴った。このように系統によって休眠抑制の遺伝様式が異なり、休眠抑制遺伝子には変異が存在することが示された。すなわち、茨城個体群から選抜したND系統(ND₁~ND₃)からのF₁と、奈良個体群から選抜したND系統(ND₄およびND₅)からのF₁を比較した場合、休眠抑制がはたらく温度は後者のほうがより低く、また、温度の休眠発現に対する影響がより強かった。これは、ND₄およびND₅は低温でもはたらく強い休眠抑制遺伝子をもっているためと考えられた。また、茨城個体群由来の3つの非休眠系統の間にも、Dとの相反交雑からのF₁の休眠が抑制される温度に差が認められた。このことは、同一個体群内においても休眠抑制遺伝子に変異が存在することを示唆した。

2. 戻し交雑

休眠抑制の遺伝子座が一つであるか否かを調べる目的で、上記の実験で休眠抑制の遺伝様式が異なったND₁、ND₃およびND₄とDの間のF₁について戻し交雑実験を行い、B₁の休眠率を調べた(Table 6)。DとNDからのF₁とD雄で戻し交雑した場合、いずれの温度でもB₁の休眠率はF₁より高い値を示した。特にDとND₄のF₁から得られたB₁では、15℃および18℃の休眠率に相反交雑の方向による有意差が認められたことから、母性効果がB₁世代

Table 6. Diapause incidence of the B₁ progeny from backcrosses at 3 temperature conditions under 9L15D^a

Cross	15°C		18°C		20°C	
	% Diapause ^b	No. of crosses (No. of females examined)	% Diapause ^b	No. of crosses (No. of females examined)	% Diapause ^b	No. of crosses (No. of females examined)
(D×ND ₁)×D	91.1± 6.4	11 (203)	94.9± 6.2	18 (818)	82.9± 4.0	13 (435)
(ND ₁ ×D)×D	93.5± 3.2	19 (451)	88.0±10.7	9 (211)	87.1± 5.0	28 (808)
(D×ND ₁)×ND ₁	89.8± 8.8	25 (537)	86.9±10.4	16 (706)	31.3± 9.3	6 (120)
(ND ₁ ×D)×ND ₁	89.9± 2.0	4 (148)	83.4± 8.9	11 (413)	42.3±17.0	20 (1045)
(D×ND ₃)×D	96.1± 2.0	10 (250)	88.4± 7.9	20 (572)	65.8±20.1	25 (565)
(ND ₃ ×D)×D	89.9± 1.9	11 (259)	78.8± 4.1	8 (160)	56.7±12.6	9 (266)
(D×ND ₃)×ND ₃	86.1± 3.9	22 (509)	26.7±14.9	10 (277)	7.5± 8.2	32 (717)
(ND ₃ ×D)×ND ₃	82.3± 0.4	8 (189)	13.5±12.1	24 (843)	0± 0	37 (1174)
(D×ND ₄)×D	87.1± 8.6	23 (569)	74.9±14.2	47 (1915)	35.0± 9.8	14 (358)
(ND ₄ ×D)×D	72.4±13.2	8 (230)	57.2±14.5	20 (540)	25.3±14.5	12 (348)
(D×ND ₄)×ND ₄	17.2±15.1	15 (400)	12.3±14.0	59 (1776)	2.8± 3.3	11 (370)
(ND ₄ ×D)×ND ₄	7.1± 7.2	10 (244)	0± 0	15 (324)	0± 0	35 (968)

^a Backcrosses were performed as single pair crosses.

^b Mean±SD.

にも影響することが示された。

F₁雌×ND雄の交雑から、休眠抑制が一遺伝子座支配であるか否かを判定できる。一遺伝子座支配であるならば、遺伝子型の1:1分離により、B₁の休眠率はF₁の休眠率の50%の値を示すことになる。(D-ND₁のF₁)×ND₁の交雑ではB₁の休眠率の期待値は、15°C、18°Cおよび20°Cでそれぞれ46%、46%、42%となった。しかし、実測値は、20°Cにおいては期待値と有意差はなかった(t-test、p>0.05)が、15°Cと18°Cで期待値より有意に(p<0.05)高い値を示した。

また、(D-ND₃のF₁)×ND₃の交雑においては、B₁の休眠率は15°Cでは1:1分離の期待値よりも有意(p<0.05)に高い値を示し、18°Cでは有意(p<0.05)に低い値を示した。(D-ND₄のF₁)×ND₄の交雑では、B₁の休眠率の期待値は交雑の方向によって異なった。(D♀×ND₄♂)×ND₄♂の交雑では、B₁雌の15°C、18°Cおよび20°Cでの休眠率の期待値はそれぞれ42%、28%、0.5%である。また、(ND₄♀×D♂)×ND₄♂の交雑では、27%、14%、1.1%である。しかし、得られた休眠率はすべて、これらの期待値より有意(p<0.05)に低かった。

以上より、ND₁、ND₃およびND₄の3つの非休眠性系統の休眠抑制はすべて複数遺伝子座の支配を受けていることが明らかになった。

(3) 休眠抑制遺伝の母性効果のメカニズム

上記の交雑試験から、いくつかの非休眠性系統の休眠抑制において遺伝制御に母性効果はたらくことが示された。特に、休眠性が極めて低いか、あるいは完全な非休眠の個体群から選抜された非休眠性系統においてその効果が顕著であった。母性効果が生じる原因として、細胞質因子および染色体の優先的分離等の染色体レベルのものと考えられる。いずれの因子(細胞質か核か)が関与しているかを明らかにする方法として、連続戻し交雑によって核細胞質置換した系統を用いた交雑実験が有効である。連続戻し交雑は、細胞質親(雌)と核親(雄)の交雑から出発して、得られた子孫雌に核親雄を交雑させることを繰り返し

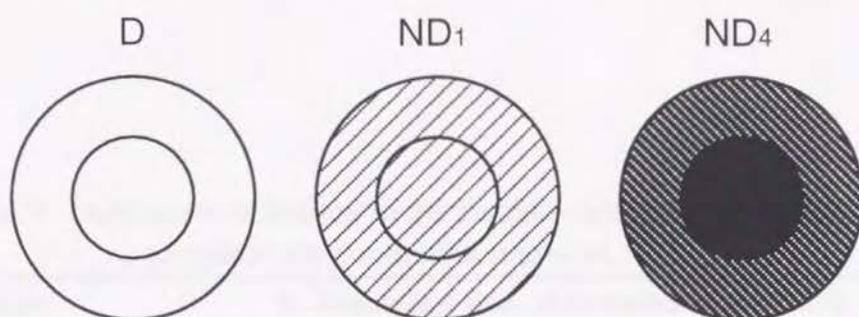
返すことで細胞質親の核を核親のものに置換する方法である。核は置換されても細胞質は母親からしか遺伝しないため、最初の母親の細胞質が保持される。従って、連続戻し交雑から得られた系統は、雌由来の細胞質と雄由来の核をもちあわせた核細胞質雑種となり、この系統を用いた交雑実験から細胞質の効果を調べることができる。

本実験では、母性効果を示さないND₁および強い母性効果を示すND₄の二つの対照的な非休眠性系統と休眠性系統Dを用いて連続戻し交雑を行い、いくつかの核細胞質置換系統を選抜し、細胞質因子の存在を調べた。Fig. 2には親系統と核細胞質置換系統の核と細胞質の遺伝的構成を、Table 7にはこれらの系統の15℃、18℃および20℃における休眠率を示した。核が非休眠性系統由来の(n-ND₄, c-ND₁)、(n-ND₄, c-D)および(n-ND₁, c-ND₄)の3系統は完全な非休眠性であった。一方、核が休眠性系統由来の(n-D, c-ND₄)系統は92%以上の休眠率を示した。これらより、核細胞質置換系統の休眠性形質は核親系統とほぼ同じであることが明らかだった。

これらの核細胞質雑種系統と、D系統およびND₄系統との相反交雑から得られたF₁の休眠率をTable 8およびFigs. 3~6に示した。まず、D♀×(n-ND₄, c-ND₁)♂からのF₁の休眠率(Fig. 3左b)とD♀×ND₄♂からのF₁の休眠率(Fig. 3左a)の間にはすべての温度で有意差は認められず(χ^2 -test, $p>0.05$)、このことは、核細胞質置換系統(n-ND₄, c-ND₁)の雄の核遺伝子型がND₄のものと同じであることを裏付けた。

一方、(n-ND₄, c-ND₁)♀×D♂からのF₁の休眠率(Fig. 3左c)と、ND₄♀×D♂からのF₁の休眠率(Fig. 3左d)を比較すると、15℃および18℃で前者の方が有意に($p<0.05$)高い値を示した。二つの交雑を比較すると、いずれも母親の核遺伝子型はND₄で雄親はDである。そして母親の細胞質は前者ではND₁由来、後者ではND₄由来である。すなわち、両交雑から得られたF₁の休眠率の違いは、細胞質の置換によって生じたものと結論される。同様に、ND₄の細胞質をDで置き換えた系統(n-ND₄, c-D)♀とD♂を交雑させて得られたF₁の15℃および18℃における休眠率は、ND₄♀×D♂のF₁の休眠率より有意に($p<0.05$)高くなり、同様の結論が導かれた(Fig. 4)。

PARENTAL STRAINS



NUCLEO-CYTOPLASM HYBRIDS

(n: nucleus, c: cytoplasm)

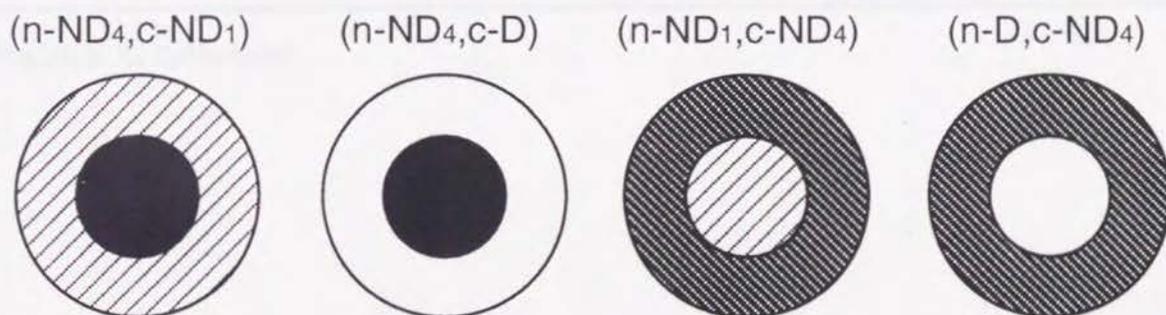


Fig. 2. Genetic constitution of parental strains and nucleo-cytoplasm hybrids.

Table 7. Diapause incidence of the nucleo-cytoplasm hybrids at 3 temperature conditions under 9L15D

Nucleo-cytoplasm hybrid ^a	% Diapause (No. of females examined)		
	15°C	18°C	20°C
(n-ND ₄ , c-ND ₁)	0 (183)	0 (98)	0 (471)
(n-ND ₄ , c-D)	0 (459)	0 (162)	0 (255)
(n-ND ₁ , c-ND ₄)	0 (369)	0 (125)	0 (176)
(n-D, c-ND ₄)	- -	92.9 (337)	92.7 (260)

^a n: nucleus, c: cytoplasm.

Table 8. Diapause incidence of the F₁ hybrids from reciprocal crosses between D or ND₄ and the nucleo-cytoplasm hybrids at 3 temperature conditions under 9L15D

Cross ^a	% Diapause (No. of females examined)		
	15°C	18°C	20°C
D × (n-ND ₄ , c-ND ₁)	77.6 (107)	50.0 (280)	0.3 (315)
(n-ND ₄ , c-ND ₁) × D	62.8 (293)	42.9 (329)	0 (156)
(n-ND ₄ , c-D) × D	83.1 (604)	56.2 (708)	1.1 (441)
(n-ND ₁ , c-ND ₄) × D	95.7 (299)	49.6 (125)	36.5 (277)
(n-D, c-ND ₄) × ND ₄	54.1 (307)	41.2 (503)	0.4 (236)

^a n: nucleus, c: cytoplasm.

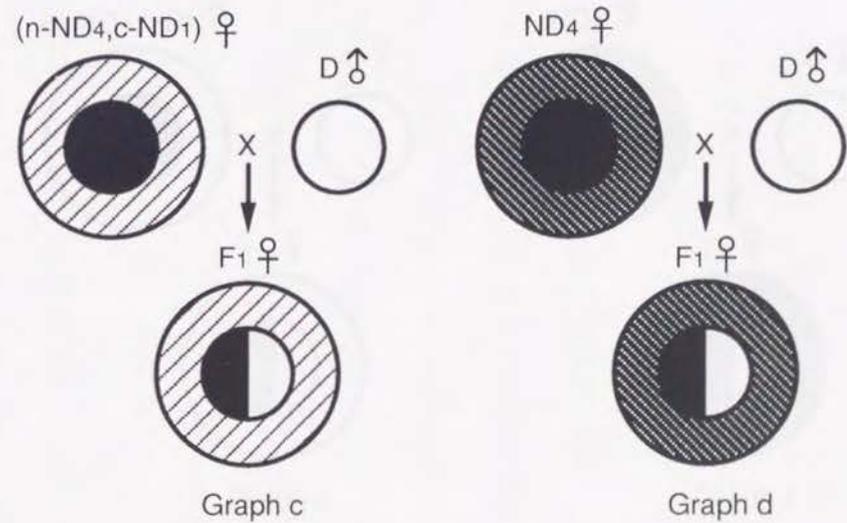
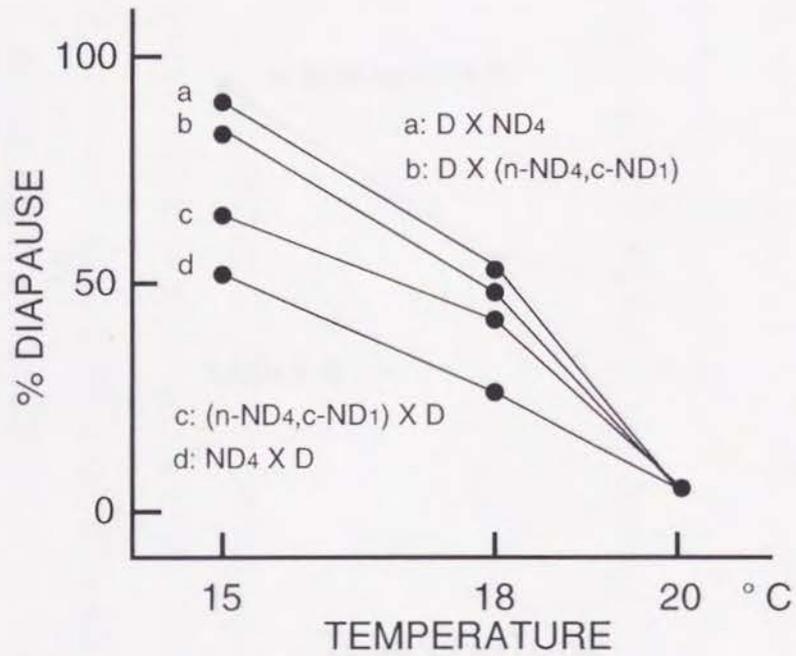


Fig. 3. Diapause incidence of hybrids from crosses between D and (n-ND4, c-ND1), and their genetic constitutions.

n: nucleus, c: cytoplasm

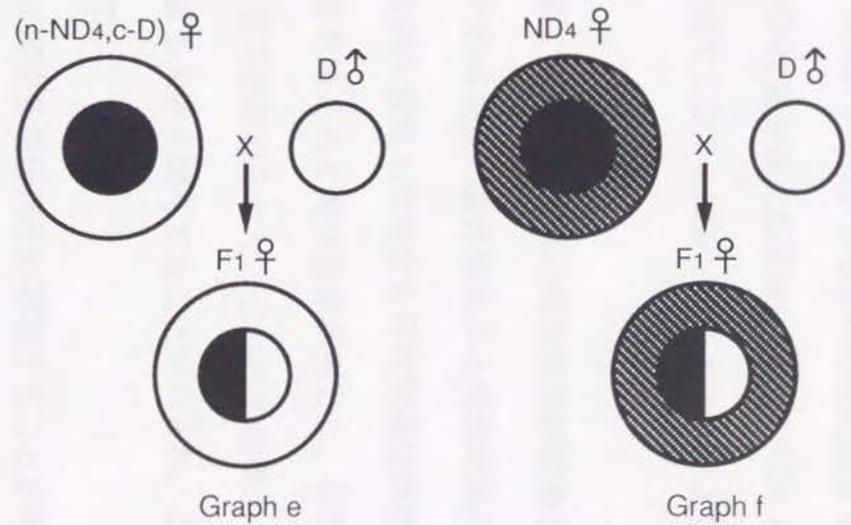
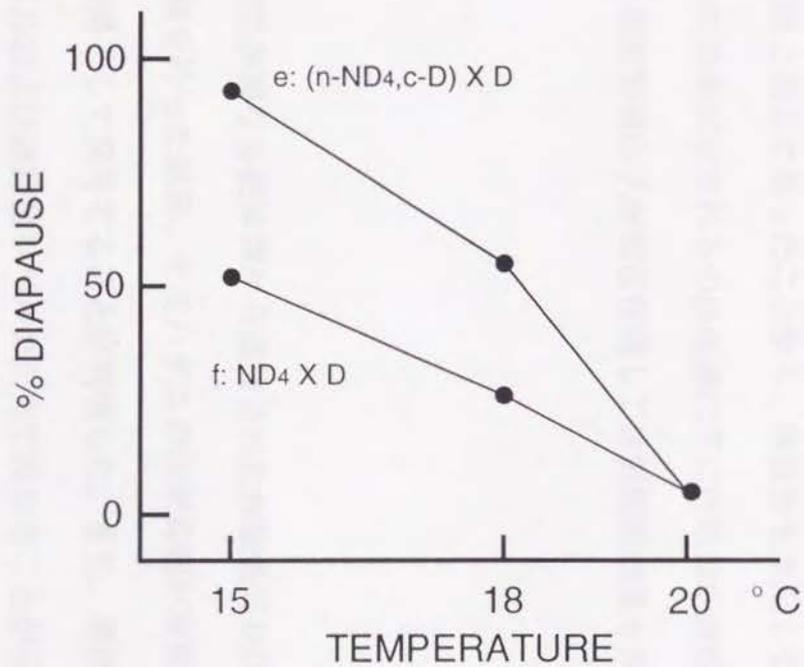


Fig. 4. Diapause incidence of hybrids from crosses between D and (n-ND4, c-D), and their genetic constitutions.
n: nucleus, c: cytoplasm

次に、ND₁の細胞質をND₄の細胞質に置き換えてD♂と交雑させて得られたF₁の休眠率は、18℃および20℃ではND₁♀×D♂からのF₁の休眠率より有意に低く(p<0.05)(Fig. 5)、また、D♀の細胞質をND₄に置き換えた系統(n-D, c-ND₄)♀とND₄♂を交雑させると、F₁の休眠率は15℃および18℃でD♀×ND₄♂のF₁の休眠率よりも有意に低く(p<0.05)なった(Fig. 6)。

このように、休眠抑制の遺伝制御に強い母性効果が認められたND₄の細胞質を母性効果の認められなかったND₁の細胞質に置き換えると母性効果が消失した。同様に、ND₄の細胞質を休眠性系統Dのものに置換した場合も母性効果は認められなくなった。また、逆にND₁の細胞質をND₄に置き換えると母性効果が生じた。Dの細胞質をND₄に置き換えた場合にも、F₁の休眠率に低下が認められた。これらの結果より、ND系統の休眠抑制には核遺伝子だけでなく細胞質も大きく関与することが示され、この細胞質遺伝が母性効果の主要因であると結論された。

細胞質にも休眠抑制に関する遺伝因子が存在することが判明したが、核細胞質置換系統の休眠性が核親の系統と同じであったことから、休眠性を支配しているのは核遺伝子である。細胞質の休眠抑制効果が示されるのは核遺伝子に休眠抑制遺伝子が存在する場合であり、細胞質と核の休眠抑制遺伝子が相互作用して休眠抑制効果を発現していると考えられた。

3.4 考察

本研究では、休眠性が異なる個体群から選抜された休眠性系統Dと複数の非休眠性系統NDを用いて交雑実験を行った結果、ナミハダニの休眠抑制が複数遺伝子座支配であること、細胞質も母性効果として関与することが判明した。また、非休眠性系統間で休眠抑制の遺伝様式が核レベルおよび細胞質レベルの双方で異なることが示された。この系統間の差異には、それぞれの系統を選抜するのに用いた個体群の遺伝的背景の違いが反映された

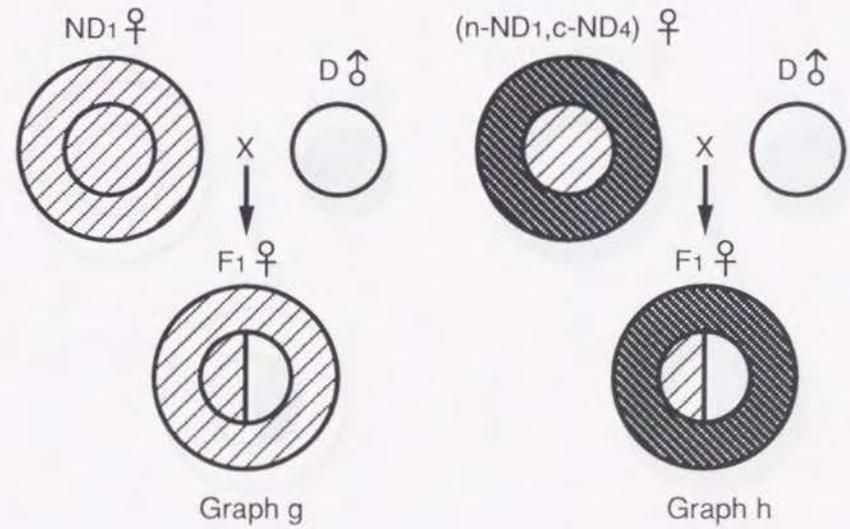
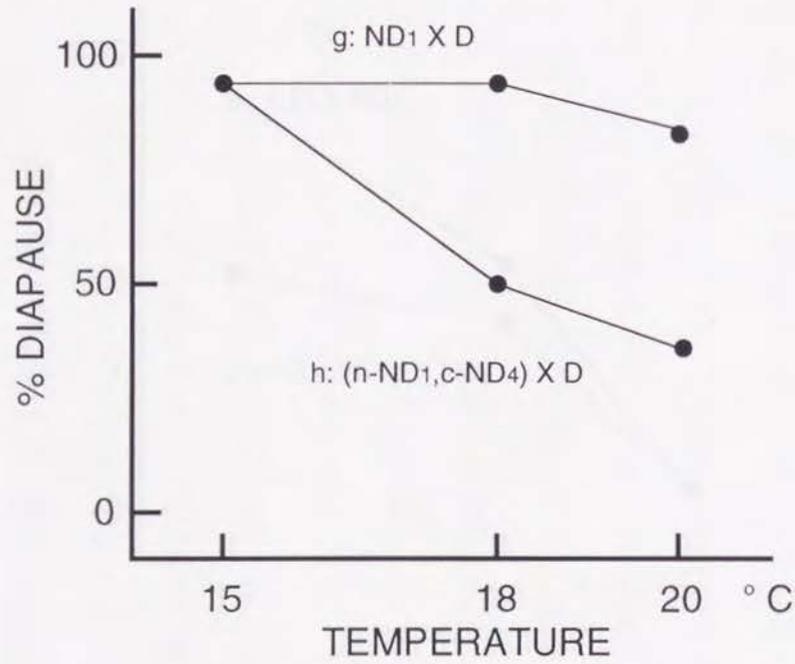


Fig. 5. Diapause incidence of hybrids from crosses between D and (n-ND1, c-ND4), and their genetic constitutions.
n: nucleus, c: cytoplasm

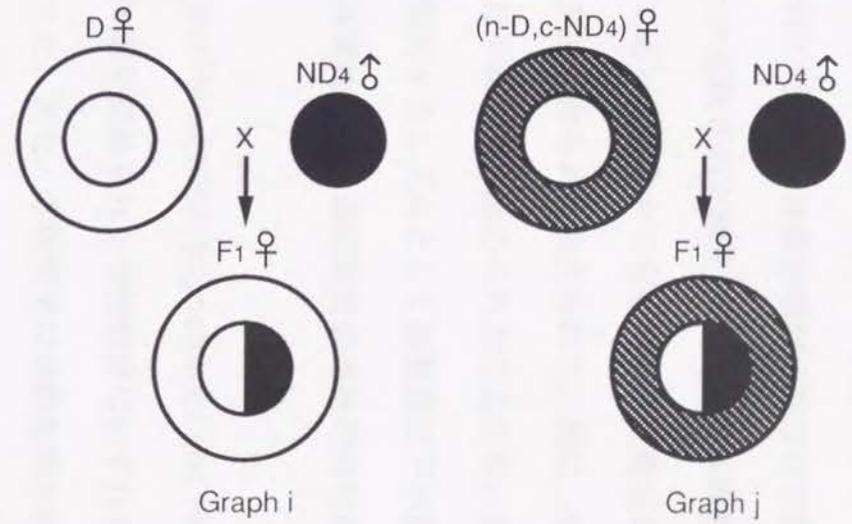
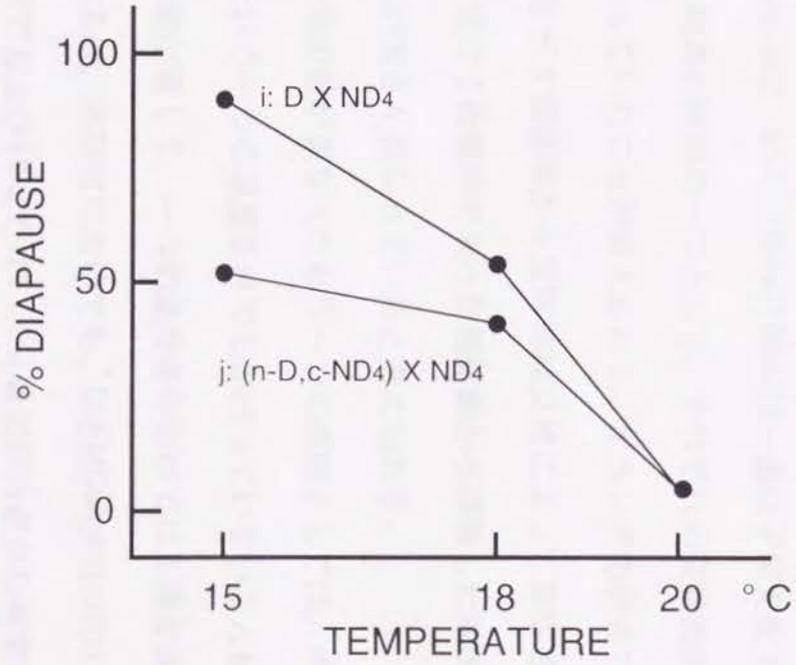


Fig. 6. Diapause incidence of hybrids from crosses between (n-D, c-ND4) and ND4, and their genetic constitutions.
n: nucleus, c: cytoplasm

ものと考えられる。すなわち、ND₁~ND₃では休眠抑制が休眠性に対して完全劣性であり、母性効果が全く認められなかったが、これらの系統が選抜された茨城個体群は、中程度の休眠率を示していた。それに対して、休眠抑制が不完全な劣性で、顕著な母性効果が認められたND₄~ND₁₀の各々が選抜された奈良、岡山および静岡の個体群は、もともとほぼ完全な非休眠性の個体群であった。各々の個体群の生息環境の強い選択圧の結果、個体群間に休眠抑制因子の変異が生じたものと考えられた。特に、細胞質効果は休眠性が極めて低い個体群から選抜された系統で強く認められたことから、非休眠性個体群では、休眠抑制がより強く発現する遺伝的メカニズムとして細胞質因子が備わっていると考えられ、細胞質因子はナミハダニの休眠性という適応形質の遺伝的分化の経緯を探る上で重要な指標となり得る。

以上の結果を、オランダのHelle(1968)やIgnatowicz and Helle(1986)の結果と照らし合わせてみるとオランダ個体群で認められた母性効果はいずれも、本研究で用いた個体群と比較してはるかに小さかった。また、本研究では休眠抑制が複数遺伝子座支配であることが示されたが、Ignatowicz and Helle(1986)は一遺伝子座支配であると結論している。これらの研究結果の相違の原因の一つとして、それぞれの交雑実験に使用した系統の遺伝子組成が著しく異なっていたことが考えられる。オランダの研究で用いられた非休眠性系統は100%の休眠率を示す個体群から兄弟姉妹交雑によって選抜された系統であり、生息環境による選択圧を受けて休眠性を失った個体群から選抜した本研究の非休眠性系統とは休眠抑制の遺伝様式が大きく異なっていると考えられる。

休眠抑制の遺伝子座の数が異なったもう一つの原因としては、オランダでの実験では休眠性の判定を18℃という一つの温度条件でしか行っていないことが挙げられる。休眠発現には誘起温度の影響が著しく、一つの温度条件だけでは正確な遺伝様式はとらえられないと考えられる。例えば、本研究においても、DとND₃のF₁にND₃を戻し交雑して得られたB₁の休眠率は、15℃および18℃では1:1分離の期待値から有意に異なったが、20℃では期待値に近い値を示した(Table 6)。従って、オランダでの交雑実験においても、さら

に低温あるいは高温の休眠誘起では、本研究と同様に複数遺伝子座支配という結果が得られる可能性が高い。

いずれにしても、我が国のナミハダニの休眠抑制遺伝子は細胞質も含めてオランダのものより抑制効果が著しく強い。また、我が国では個体群間にも休眠抑制遺伝子の変異が存在し、非休眠性の個体群ほどその効果が強いと考えられた。このことは本種の休眠抑制遺伝子の変異に大まかな方向性があることを示唆しており、これら休眠抑制の変異をさらに詳細に解析することにより、ナミハダニの遺伝的分化の方向性を知る手がかりが得られることが期待される。

第4章 電気泳動法によるナミハダニのアロザイム変異の研究

4.1 緒言

ナミハダニの休眠性は秋から春にかけての個体群の維持に関わる重要な適応形質であり、当然その変異には個体群をとりまく環境条件による強い淘汰が働いており、休眠性の地理的変異は環境の異質性によって生じた遺伝的分化の結果である。遺伝的変異にはこのような適応形質の変異とは別に適応中立形質の変異がある。適応中立形質は自然選択に対して中立か、それに近いため、その変異はビン首効果や遺伝子浮動などの機会的要因によって支配される。我が国のナミハダニにおける近年の分布拡大の過程で、適応中立形質についても何らかの分化が生じている可能性が高い。

ゲル電気泳動法(Gel electrophoresis)は電荷と分子量の異なるタンパク分子を分離する方法で、これにより酵素・タンパクレベルでの変異の検出が可能となった。特に、この方法で検出される遺伝的変異は、遺伝子座を特定することにより、対立遺伝子頻度という概念を用いて定量化することができ、形態形質変異の検出が困難な農業害虫の個体群間の差異を捉えるのにも重宝されてきた(Sluss and Graham, 1979; Bartlett, 1981; McDonald et al., 1985)。

ハダニ類における電気泳動法の応用例としては、Ogita and Kasai (1965)がミカンハダニおよびナミハダニでエステラーゼ、酸性ホスファターゼおよびアミラーゼを寒天ゲル電気泳動法により検出したのが最初である。その後、武久・田中(1967)および田中ら(1972)がミカンハダニで、また、Kuwahara et al (1981)および桑原(1982)がカンザワハダニでエステラーゼアイソザイムと薬剤抵抗性との関係について調査している。さらに、刑部(1984)およびOsakabe(1987)がミカンハダニの電気泳動法による分析を個体レベルで行い、休眠系統と非休眠系統のエステラーゼザイモグラムに普遍的かつ顕著な差が存在することを報告し、後に休眠系統が別種のクワオオハダニとして分離される根拠のひとつとな

った。同様に、Gotoh and Ishikawa (1992)は、それまで同種と考えられていたリングハダニ、ニホンササハダニ *P. bambusicola* Ehara et Gotoh および エルムハダニ *P. thelytokus* Ehara et Gotoh をエステラーゼザイモグラムによって容易に識別できることを示し、電気泳動法により分離されるアイソザイムが種の識別に有効であることを実証した。

ナミハダニでは Sula and Weyda (1983) がヨーロッパの個体群間および個体群内でエステラーゼアイソザイムに顕著な多型がみられることを報告しており、また、Ward et al (1982) はナミハダニを含めた3種の *Tetranychus* 属のMDHの遺伝子分析を行い、その遺伝子頻度を個体群ごとに求めている。一方、わが国での電気泳動法によるナミハダニのアイソザイム多型の検出や個体群間の変異を調べた例は、Goka and Takafuji (1992)に限られる。Goka and Takafuji (1992)は、日本各地より採集した10個体群についてエステラーゼとPGIの変異を調べ、エステラーゼに著しい変異を認めたが、その遺伝様式を明らかにできず、個体群間の遺伝的分化の程度を捉えるには至らなかった。

そこで本章では、まずナミハダニのいくつかの酵素多型を電気泳動法で検出し、交雑実験によってその遺伝子分析を行い、遺伝的マーカーとなりうるアロザイム遺伝子座を特定した。次に、日本各地の地域個体群について各遺伝子座の遺伝子頻度を調べ、それらの遺伝子頻度を基に個体群間の遺伝的距離を求め、それらの遺伝的分化の程度を定量化した。その際、ナミハダニ個体群の形成および維持過程が寄主植物の種類や栽培条件で異なることに着目した。まず、果樹園やバラ園などでは下草も含めて餌資源が安定しており、そこに生息するナミハダニは個体群を連続維持することができる。それに対して、主にガラス室やビニルハウスなどの半制御環境下に栽培される野菜や花卉等の一年生草本の寄主の多くは一時的に栽培され、そこでのナミハダニ個体群の発生も一時的で不連続なものである。このような寄主の餌資源としての安定度の違いによる個体群の発生および維持過程の違いは、個体群の遺伝子組成に大きく影響すると考えられる。そこで本研究では、果樹園およびバラ園から採集した個体群と一年生性草本植物から採集した個体群とを分けて解析した。

4.2 材料と方法

(1) 個体群

個体群は、1993年の春から1994年の秋にかけて48の落葉性果樹園およびバラ園から、および42の一年生草本作物圃場から採集した(Table 9)。草本作物のほとんどは無加温のビニルハウスやガラスハウス等の半制御環境下で栽培されていた。各個体群から雌成虫を採取し、電気泳動に供試するまで-85℃で保存した。調査個体数は一つの酵素につき30～36個体としたが、採集した個体群から十分な数の雌成虫が得られなかった場合は鉢植えインゲン苗に接種し、25℃-16L8Dで1-2世代増殖させたものを電気泳動に供試した。

(2) 系統

果樹またはバラ寄生の奈良(No.40)、岡山(No.42)および大分(No.48)個体群と草本寄生の静岡(No.18)個体群(Table 9)をアロザイムの遺伝子分析に使用した。本研究で検出したエステラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)およびホスホグルコイソメラーゼ(PGI)の泳動帯(バンド)パターンから、奈良個体群はこれらすべての酵素で多型であり、岡山および大分個体群はエステラーゼアイソザイムの一部とMDHおよびPGIで単型に近いことが示された。また、静岡個体群はすべての酵素で単型であった。これらの個体群のそれぞれから12の純系を5世代にわたる兄弟姉妹交雑により作出し、その中からバンドパターンが完全に単型である系統を選抜した。すなわち、エステラーゼの一つの遺伝子座と推定されるEst-4についてバンドの易動度が異なる二つの系統(SおよびF系統)をそれぞれ静岡、岡山個体群から選抜した。同様に、エステラーゼの別の遺伝子座と推定されるEst-5についても二つの系統を静岡および大分個体群から選抜し、MDHの二系統は静岡および岡山個体群から、PGIの二系統は奈良および静岡個体群から選抜した(Table 10)。

Table 9. Collection records of *T. urticae* populations from (A) fruit trees and roses, and (B) herbaceous hosts used in the present study

Code	Locality		Date	Host Plant	
	Prefecture	City			
(A) 1	Hokkaido	Naganuma	13 Jul.	1994	Apple
2	Aomori	Kuroishi	21 Jul.	1993	Apple
3		Namioka	26 Aug.	1993	Apple
4		Kuroishi	26 Aug.	1993	Apple
5		Itayagi	26 Aug.	1993	Apple
6		Hirosaki	26 Aug.	1993	Apple
7		Hirosaki	26 Aug.	1993	Apple
8		Onoe	26 Aug.	1993	Apple
9		Hiraga	26 Aug.	1993	Apple
10		Gonohe	30 Aug.	1993	Peach
11		Gonohe	30 Aug.	1993	Pear
12		Sannohe	30 Aug.	1993	Cherry
13	Akita	Senbata	26 Aug.	1993	Apple
14		Omori	27 Aug.	1993	Apple
15		Yokote	27 Aug.	1993	Apple
16		Hiraga	27 Aug.	1993	Apple
17		Hiraga	2 Sep.	1993	Plum
18		Inagawa	31 Aug.	1993	Apple
19		Inagawa	31 Aug.	1993	Plum
20	Iwate	Kitagami	1 Sep.	1993	Apple
21	Yamagata	Sagae	17 Sep.	1993	Plum
22		Tendo	21 Sep.	1993	Apple
23	Miyagi	Natori	1 Sep.	1993	Apple
24	Fukushima	Fukushima	30 Aug.	1993	Apple
25		Date	30 Aug.	1993	Cherry
26		Fukushima	30 Aug.	1993	Peach
27	Toyama	Uozu	30 Aug.	1993	Apple
28		Toyama	3 Oct.	1993	Pear
29		Toyama	3 Oct.	1993	Pear
30		Toyama	3 Oct.	1993	Pear
31		Toyama	3 Oct.	1993	Pear
32		Toyama	3 Oct.	1993	Pear
33	Nagano	Nakano	20 Aug.	1994	Apple
34		toyota	20 Aug.	1994	Apple
35		Sango	20 Aug.	1994	Apple
36	Ibaraki	Hachigo	1 Nov.	1993	Pear
37	Chiba	Chiba	22 Jun.	1993	Pear
38		Ichihara	25 Jun.	1993	Pear
39	Kyoto	Kyoto	20 Aug.	1993	Rose
40	Nara	Kashihara	18 Aug.	1993	Rose

Table 9 (continued)

41	Tottori	Tottori	13	Sep.	1994	Pear
42	Okayama	Okayama	12	Jul.	1993	Pear
43	Hiroshima	Fukuyama	12	Nov.	1993	Rose
44	Yamaguchi	Yamaguchi	24	Oct.	1993	Apple
45		Yamaguchi	24	Oct.	1993	Apple
46		Yamaguchi	24	Oct.	1993	Apple
47		Yamaguchi	3	Sep.	1994	Apple
48	Oita	Ajimu	31	Oct.	1993	Apple
(B) 1	Hokkaido	Kamikawa	8	Oct.	1993	Cucumber
2		Asahikawa	6	Oct.	1993	Soybean
3		Sapporo	8	Sep.	1993	Hop
4	Aomori	Kuroishi	26	Aug.	1993	Soybean
5		Onoe	26	Aug.	1993	Kidney bean
6		Owani	26	Aug.	1993	Eggplant
7	Iwate	Kitagami	1	Sep.	1993	Cucumber
8		Kitagami	1	Sep.	1993	Gentian
9	Yamagata	Sagae	17	Sep.	1993	Chrysanthemum
10	Miyagi	Natori	1	Sep.	1993	Crown daisy
11	Toyama	Toyama	3	Oct.	1993	Eggplant
12		Toyama	3	Oct.	1993	Eggplant
13		Toyama	3	Oct.	1993	Strawberry
14		Toyama	3	Oct.	1993	Cucumber
15		Toyama	3	Oct.	1993	Eggplant
16		Toyama	3	Oct.	1993	Kidney bean
17	Saitama	Hisayoshi	17	Jun.	1993	Kidney bean
18	Shizuoka	Shimizu	14	Jul.	1993	Eggplant
19		Kakegawa	17	Jun.	1993	Eggplant
20		Iwate	7	Jun.	1993	Kidney bean
21	Nara	Kashihara	18	Aug.	1993	Taro
22		Kashihara	30	Aug.	1993	Chrysanthemum
23		Kashihara	30	Aug.	1993	Eggplant
24		Heguri	18	Aug.	1993	Chrysanthemum
25		Yamato	18	Aug.	1993	Eggplant
26		Sakurai	18	Aug.	1993	Eggplant
27		Sakurai	18	Aug.	1993	Eggplant
28		Sakurai	18	Aug.	1993	Strawberry
29		Sakurai	18	Aug.	1993	Eggplant
30	Wakayama	Hidaka	25	Jun.	1993	Watermelon
31	Tokushima	Nanishi	5	Oct.	1993	Eggplant
32	Tottori	Daiei	26	Jul.	1994	Watermelon
33	Okayama	Sanyo	22	Apl.	1993	Chrysanthemum
34		Okayama	23	Aug.	1993	Chrysanthemum
35		Okayama	24	Sep.	1993	Chrysanthemum
36		Kamifusa	17	Sep.	1993	Carnation

Table 9 (continued)

37	Hiroshima	Fukuyama	12	Nov.	1993	Chrysanthemum
38	Yamaguchi	Ube	8	Nov.	1993	Soybean
39		Ube	8	Nov.	1993	Chrysanthemum
40		Ube	10	Dec.	1993	Strawberry
41		Ube	1	Jul.	1994	Corn
42	Kagoshima	Makurazaki	10	Sep.	1993	Chrysanthemum

Table 10. Inbred strains of *T. urticae* used in cross experiments

Locus	Strain	Original population	Genotype in females
Esterase Est-4	S-strain	Shizuoka	S/S homozygous
	F-strain	Okayama	F/F homozygous
Est-5	S-strain	Shizuoka	S/S homozygous
	F-strain	Oita	F/F homozygous
MDH	S-strain	Shizuoka	S/S homozygous
	F-strain	Okayama	F/F homozygous
PGI	S-strain	Nara	S/S homozygous
	F-strain	Shizuoka	F/F homozygous

(3) 交雑

それぞれの酵素遺伝子座について選抜された二系統間で交雑実験を行い、酵素変異の遺伝子分析を行った。交雑実験はすべて25°C-16L8Dで行った。

1. 相反交雑：二つの系統のうち一方の第二若虫雌一匹を2×2cm²のインゲンリーフディスクに接種した。雌が成虫化したのを確認してから交雑相手の系統の雄成虫一匹を接種して交雑させ、3日間産卵させた。得られたF₁卵は成虫になるまで飼育した。この交雑に使用した雌雄の親とF₁雌成虫は、電気泳動に供試するまで-85°Cで凍結保存した。

2. 戻し交雑：相反交雑で得られたF₁の第二若虫雌一匹を2×2cm²のインゲンリーフディスクに接種した。雌が成虫化したのを確認して相反交雑で使用した二系統のうち一方の系統の雄成虫を接種して交雑させ、3日間に産まれた卵は成虫(B₁)になるまで飼育した。B₁雌成虫は電気泳動に供試するまで-85°Cで凍結保存した。

(4) 電気泳動のサンプル調整

酵素調整液は、0.1%トリトンX-100と0.002%ブロモフェノールブルーを含む32%ショ糖液を使用した。保存した雌と雄をそれぞれ10μlと5μlの酵素調整液で一匹ずつホモジェナイズしたものを酵素液として電気泳動に供試した。

(5) 電気泳動法

ポリアクリルアミドを支持体としたスラブ式ゲル電気泳動法を使用した。ゲル(厚さ1mm×幅100mm×高さ80mm)は分離用ゲルと濃縮用ゲルの二層で構成され、それぞれ0.05%と0.1%のトリトンX-100を含んだ。また、アクリルアミドの濃度は分離用ゲルが6.5%で濃縮用ゲルが2.5%であった。泳動はゲル一枚あたり20mAの定電流で5°Cに冷却しながら行った。

本研究で検出した酵素は、エステラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)およびホスホグルコイソメラーゼ(PGI)の3つであった。エステラーゼ泳動帯はゲルを1-ナフチルアセテート

0.02%を含む0.2Mリン酸バッファー(pH6.8)に室温で30分間浸漬した後、Fast Blue BB塩0.4%水溶液に1時間浸漬して検出した。MDHは0.0008%DLリンゴ酸ナトリウム、0.0001% NAD^+ 、0.02%NBTおよび0.006%PMSを含む0.1Mトリス塩酸バッファー(pH8.8)にゲルを1時間浸漬して検出した。PGIは0.01M塩化マグネシウム、0.2unit/mlグルコース6リン酸脱水素酵素(酵母製)、0.0004% NADP^+ 、0.02%NBTおよび0.006%PMSを含む0.1Mトリス塩酸バッファー(pH8.0)にゲルを1時間浸漬して検出した。すべての染色反応は7%酢酸にゲルを移すことで停止させた。

4.3 結果

(1) アロザイム遺伝子分析

1. エステラーゼ

エステラーゼザイモグラムは雌成虫1個体からは明瞭に検出されたが、雄成虫では活性が弱く、検出は困難であった。雌成虫のザイモグラムは5つの泳動帯に分離され、それぞれをEst-1からEst-5と命名した(Fig. 7)。Est-3はバンド数が多く、これまでも全部で15のバンドタイプが報告されている(Goka and Takafuji, 1992)が、本研究で検出されたパターンも複雑であり、遺伝様式を明らかにすることはできなかった。

Est-4泳動帯は奈良個体群で多型が認められた。そのザイモグラムから易動度の小さいバンド(S=slow)が一本のもの、易動度の大きいバンド(F=fast)が一本のもの、およびこれらのバンド二本(SおよびF)を示すものの3つのタイプの表現型が検出された。これらのバンドパターンから、Est-4は二つの対立遺伝子をもつ一遺伝子座支配の単量体酵素であると推測された。ここで推測された二つの対立遺伝子をEst-4^SおよびEst-4^Fと命名した。一本のバンドを示した個体はホモ接合体(Est-4^S/Est-4^SおよびEst-4^F/Est-4^F)であり、二本のバンドを示した個体はヘテロ接合体(Est-4^S/Est-4^F)と考えられた。Est-5泳動帯はやや活性

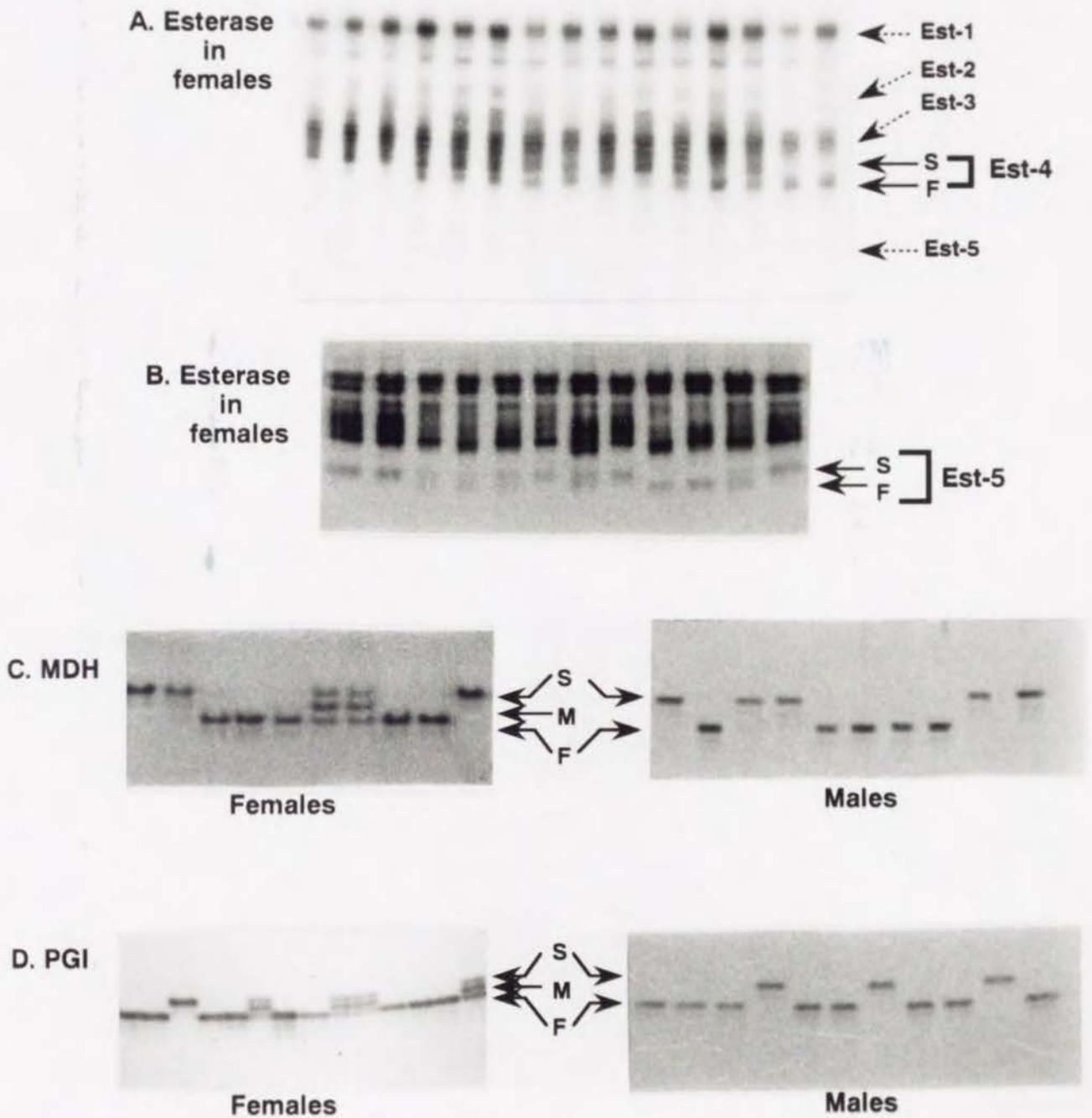


Fig. 7. Polyacrylamide zymograms of four enzymes in *T. urticae*, showing the banding patterns at Est-4 (A) and Est-5 (B) of esterase, and MDH (C) and PGI (D).

が弱く、易動度が大きいいため、泳動時間を短くすることでバンドを明瞭に検出することができた。この泳動帯も奈良個体群で多型が認められ、Est-4と同様のバンドパターンを示した。すなわち、易動度の小さいバンド(S)が一本のもの、易動度の大きいバンド(F)が一本のもの、そしてこれらのバンド二本(SおよびF)を示すものの3タイプが検出され、Est-5も二つの対立遺伝子(Est-5^SおよびEst-5^F)をもつ一遺伝子座支配の単量体酵素であることが推測された。

交雑実験によりEst-4およびEst-5の遺伝様式を明らかにした。Est-4のバンドパターンが固定した二つの系統(SおよびF系統)を選抜し(Table 10)、これらの系統間で相反交雑を行った結果、F₁雌はすべてヘテロ接合体と推定される二本のバンドを示した(Table 11, Fig. 8)。また、F₁雌と親系統の雄との戻し交雑からのB₁における表現型は、ホモ接合体とヘテロ接合体が1:1に分離した(χ^2 -test, $p > 0.05$) (Table 11)。同様に、Est-5についても単型の二つの系統を選抜し(Table 10)、交雑実験を行った結果、相反交雑のF₁と戻し交雑からのB₁のバンドパターンおよびその分離比はEst-4の場合と同様であった(Table 11, Fig. 9)。これらの交雑実験より、Est-4とEst-5の遺伝子座はそれぞれ二つの伴優性の対立遺伝子に支配されていることが証明された。

2. MDH

奈良個体群の雌成虫のMDHザイモグラムは3つのタイプのバンドパターンを示した(Fig. 7)。すなわち、易動度の小さいバンド(S)を一本示すもの、易動度の大きいバンド(F)を一本示すもの、およびSとFとその中間の易動度を示すバンド(M=middle)の3本を示すものであった。また、MDHは雄成虫1個体からも明瞭に検出することができた。そのザイモグラムにはSまたはFのバンドを一本示す二つのタイプが認められ、3本のバンドを示すタイプは検出されなかった。兄弟姉妹交雑で選抜したS系統とF系統との相反交雑からのF₁雌は、すべて3本のバンドを示す個体であった(Fig. 10)。また、F₁雌と親系統の雄との戻し交雑からのB₁雌の表現型は、バンドが3本のもものと雄親と同じバンドが一本のもものと

Table 11. Inheritance data for allozymes of Est-4, Est-5, MDH and PGI in *T. urticae*

Parental genotype	No. of mating pairs	Observed and expected (in parentheses) ratios in offspring genotype		χ^2
Est-4				
SS X F	2	SF: 24(24.0)		-----
FF X S	2	SF: 21(21.0)		-----
SF X S	2	SS: 15(13.0)	SF: 11(13.0)	0.615*
SF X F	2	SF: 15(14.0)	FF: 13(14.0)	0.143*
Est-5				
SS X F	2	SF: 24(24.0)		-----
FF X S	2	SF: 24(24.0)		-----
SF X S	2	SS: 15(17.0)	SF: 19(17.0)	0.471*
SF X F	2	SF: 18(20.5)	FF: 23(20.5)	0.610*
MDH				
SS X F	2	SF: 24(24.0)		-----
FF X S	2	SF: 24(24.0)		-----
SF X S	2	SS: 17(15.0)	SF: 13(15.0)	0.533*
SF X F	2	SF: 15(16.5)	FF: 18(16.5)	0.273*
PGI				
SS X F	2	SF: 24(24.0)		-----
FF X S	2	SF: 24(24.0)		-----
SF X S	2	SS: 23(20.0)	SF: 17(20.0)	0.900*
SF X F	2	SF: 22(20.0)	FF: 18(20.0)	0.400*

* No significant (χ^2 -test, $p > 0.05$) differences between observed and expected ratios.

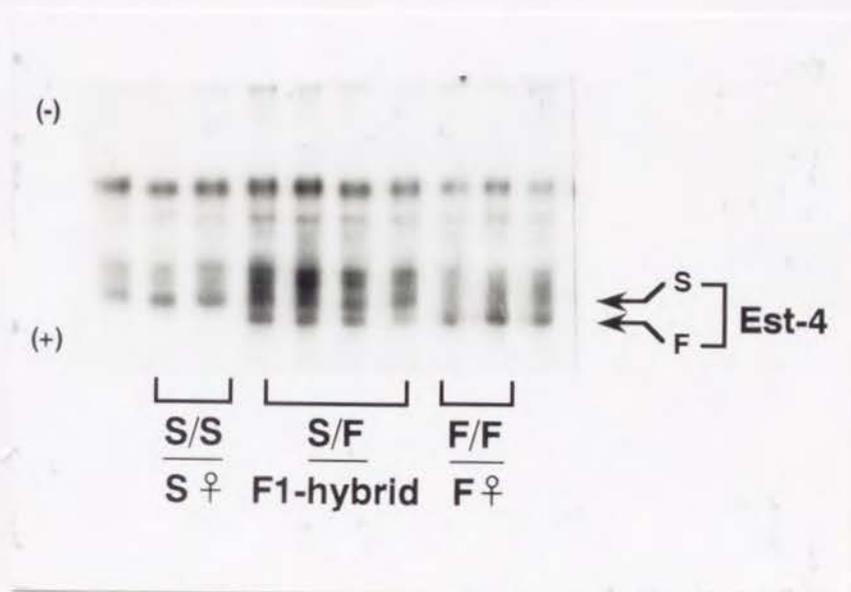


Fig. 8. Phenotypes of the Est-4 in parent females of two inbred strains (S and F) and the F₁-hybrids between the two. Each genotype is listed below each zymogram.



Fig. 9. Phenotypes of the Est-5 in parent females of two inbred strains (S and F) and the F₁-hybrids between the two. Each genotype is listed below each zymogram.

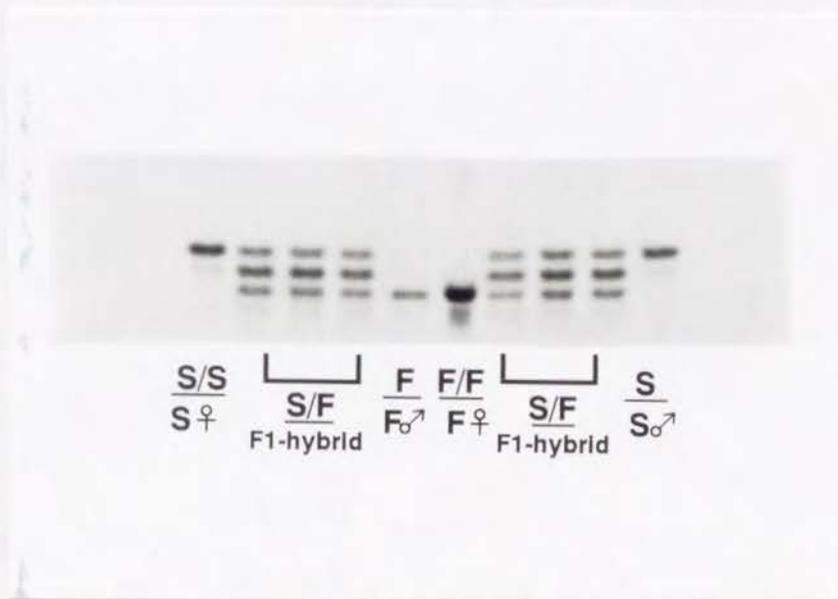


Fig. 10. Phenotypes of the MDH in parent females and males, and their F₁-hybrids. Each genotype is listed below each zymogram.

が1:1の分離比で検出された($p>0.05$)(Table 11)。これらの結果から、MDHは二つの伴優性対立遺伝子(MDH^SおよびMDH^F)をもつ一遺伝子座支配の二量体酵素であることが判明した。

3. PGI

奈良個体群の雌成虫から検出されたPGIザイモグラムは、MDHと同様の3つのタイプのバンドパターンを示した(Fig. 7)。すなわち、一本の易動度の小さい(S)、または大きい(F)バンドを示すものと、SとFおよびその中間の易動度のバンド(M)の3本のバンドを示すものの3タイプである。そして、PGIの表現型を固定させた二系統(SおよびF系統)間の相反交雑や戻し交雑はMDHの場合と同様の結果を示した(Fig. 11, Table 11)ことから、PGIも二つの伴優性対立遺伝子(PGI^SおよびPGI^F)をもつ一遺伝子座支配の二量体酵素であることが判明した。

4. まとめ

本研究では電気泳動法により、Est-4、Est-5、MDHおよびPGIの4つの遺伝子座について遺伝子分析を行った。交雑実験の結果から、これらの遺伝子座はすべて常染色体上にあり、伴優性の対立遺伝子によって制御されている、いわゆるアロザイムであることが判明した。また、バンドパターンからEst-4およびEst-5は単量体酵素で、MDHおよびPGIは二量体酵素であることも示された。これらのアロザイムではその表現型から遺伝子頻度を求めることが可能であり、ナミハダニ個体群の遺伝的差異を定量化するうえでの有効な遺伝的マーカーとなりうると結論された。

(11) 遺傳變異性研究の分子遺伝学

1. 遺傳変異性研究の分子遺伝学

本研究は、*PGI* 遺伝子の多型性を明らかにし、その遺伝的変異性を解析することを目的とした。本研究では、*PGI* 遺伝子の多型性を明らかにし、その遺伝的変異性を解析することを目的とした。本研究では、*PGI* 遺伝子の多型性を明らかにし、その遺伝的変異性を解析することを目的とした。

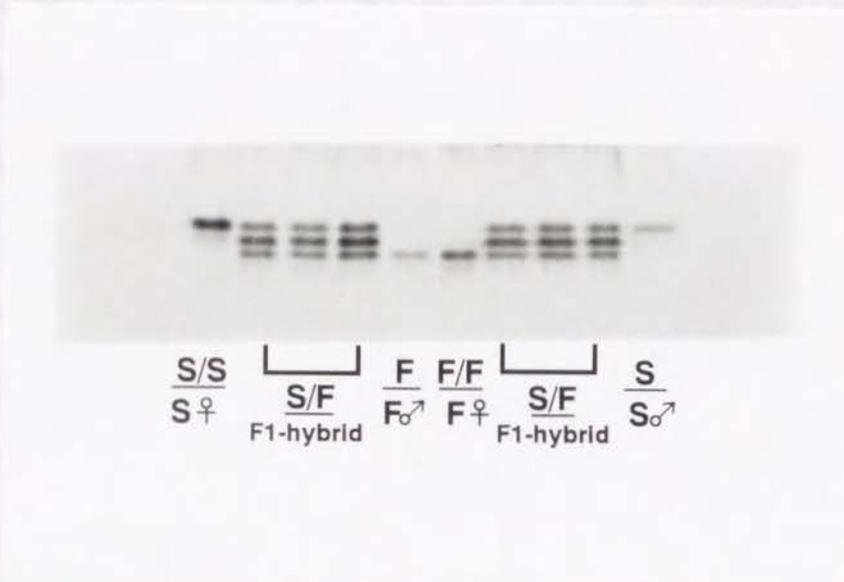


Fig. 11. Phenotypes of the PGI in parent females and males, and their F1-hybrids. Each genotype is listed below each zymogram.

(2) 地域個体群間のアロザイム変異

1. 果樹・バラ寄生の個体群における変異

Est-4の対立遺伝子頻度には明瞭な緯度による傾斜は認められなかった(Fig. 12)。しかし、S遺伝子の頻度が東北地方の日本海側の個体群(No.1~14)と中部日本の日本海側の個体群(No.27~32)で高く、逆に東北地方の太平洋側(No.10~12, 20~26)や西南日本の個体群(No. 40~48)ではF遺伝子頻度が高かった。一方、Est-5の対立遺伝子頻度には大まかな地理的傾斜が認められた(Fig. 13)。S遺伝子頻度は北方(北海道と東北地方)の個体群で高く、その頻度は緯度が下がるにつれて低くなる傾向が示された。また、MDHの遺伝子頻度にも明瞭な地理的傾斜が認められ(Fig. 14)、東北地方と中部日本の日本海側の個体群ではF遺伝子の頻度が高く、逆にこれらの地域の太平洋側ではSの頻度が高かった。そして、西南日本の個体群ではさらにSの頻度が高かった。一方、PGIではほとんどの個体群でF遺伝子に固定されているか、それに近い対立遺伝子頻度を示した(Fig. 15)。

個体群間の遺伝的分化を定量的に捉えるために各遺伝子座の遺伝子頻度よりNei (1978)の遺伝的距離を求め、それに基づいてUPGMA法によりデンドログラムを作成した。その結果、調査した48個体群は3つのグループに大別された(Fig. 16)。これらのグループをそれぞれ A、BおよびCと命名し、Fig. 17にはこれら3グループの地理的配置を示した。グループAは北日本と中部日本の日本海側の個体群で構成されており、グループBはこれらの地方の太平洋側の個体群で構成されていた。また、グループCは、西南地域の個体群で構成されていた。以上の結果より、果樹・バラ寄生の個体群では3つの地理的グループ間に遺伝的分化が生じていることが示された。

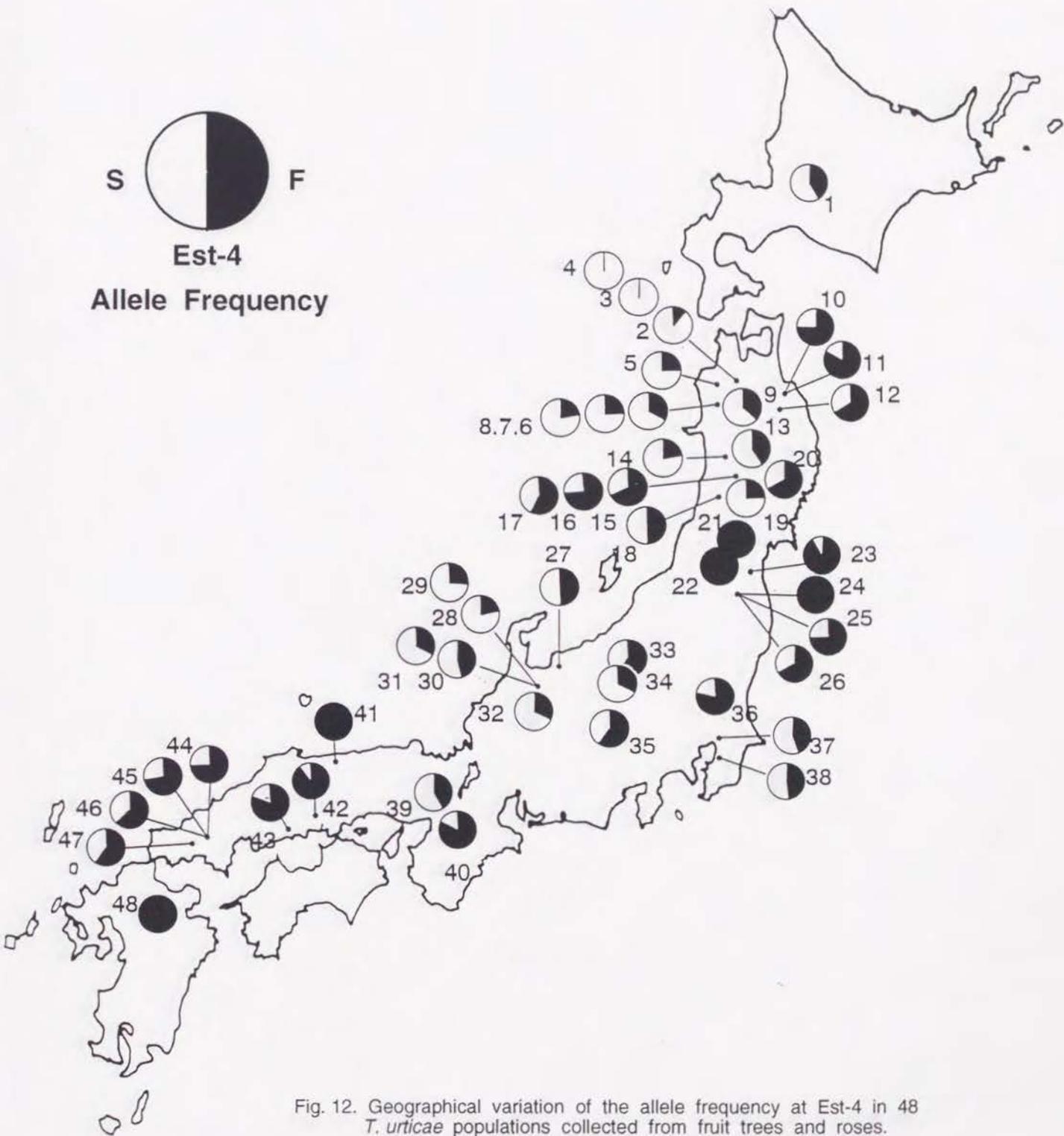
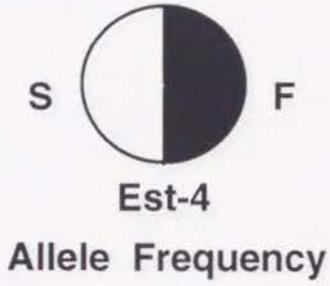


Fig. 12. Geographical variation of the allele frequency at Est-4 in 48 *T. urticae* populations collected from fruit trees and roses.

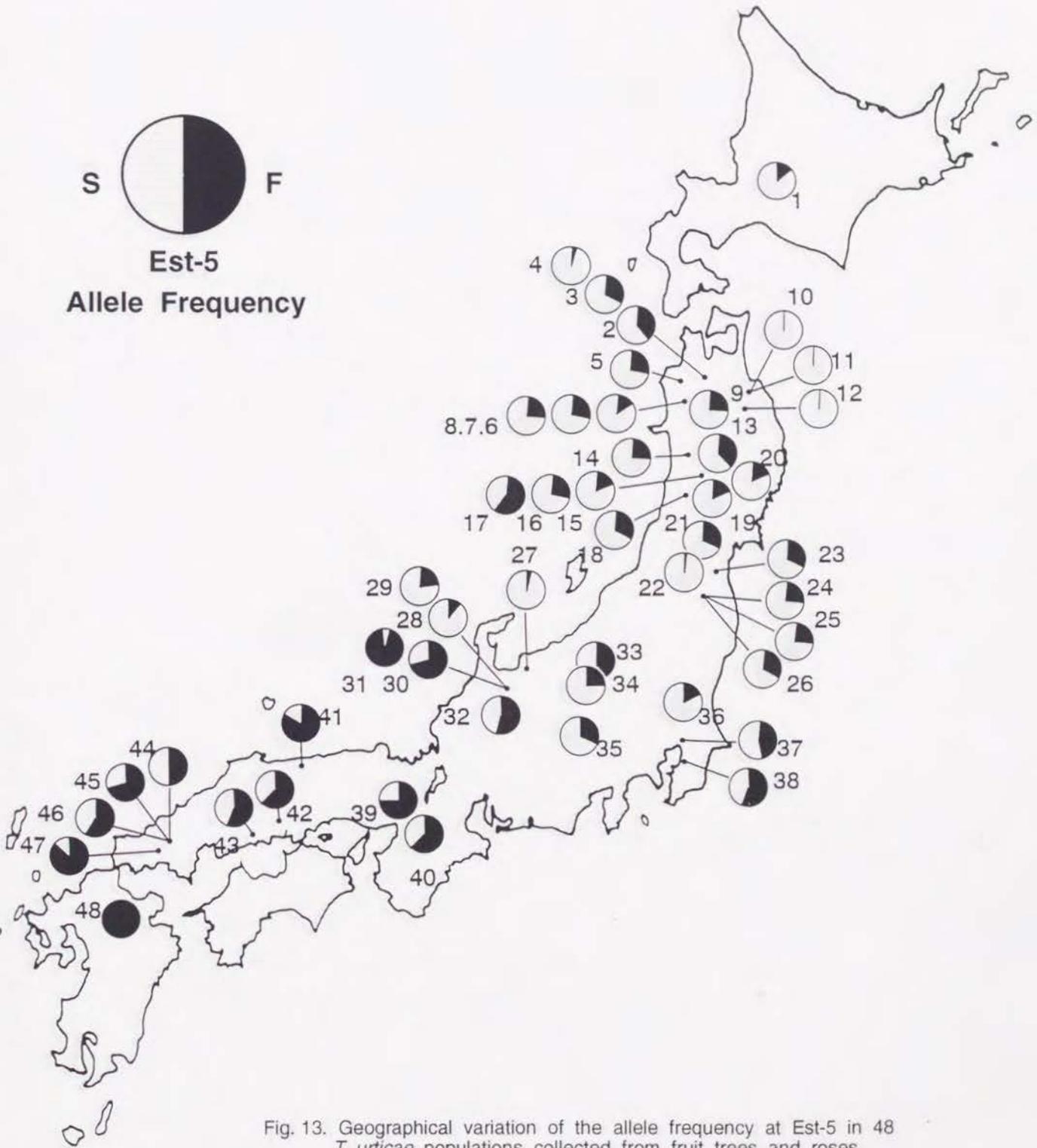
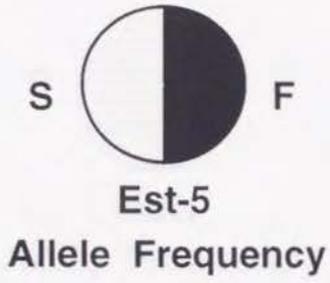


Fig. 13. Geographical variation of the allele frequency at Est-5 in 48 *T. urticae* populations collected from fruit trees and roses.

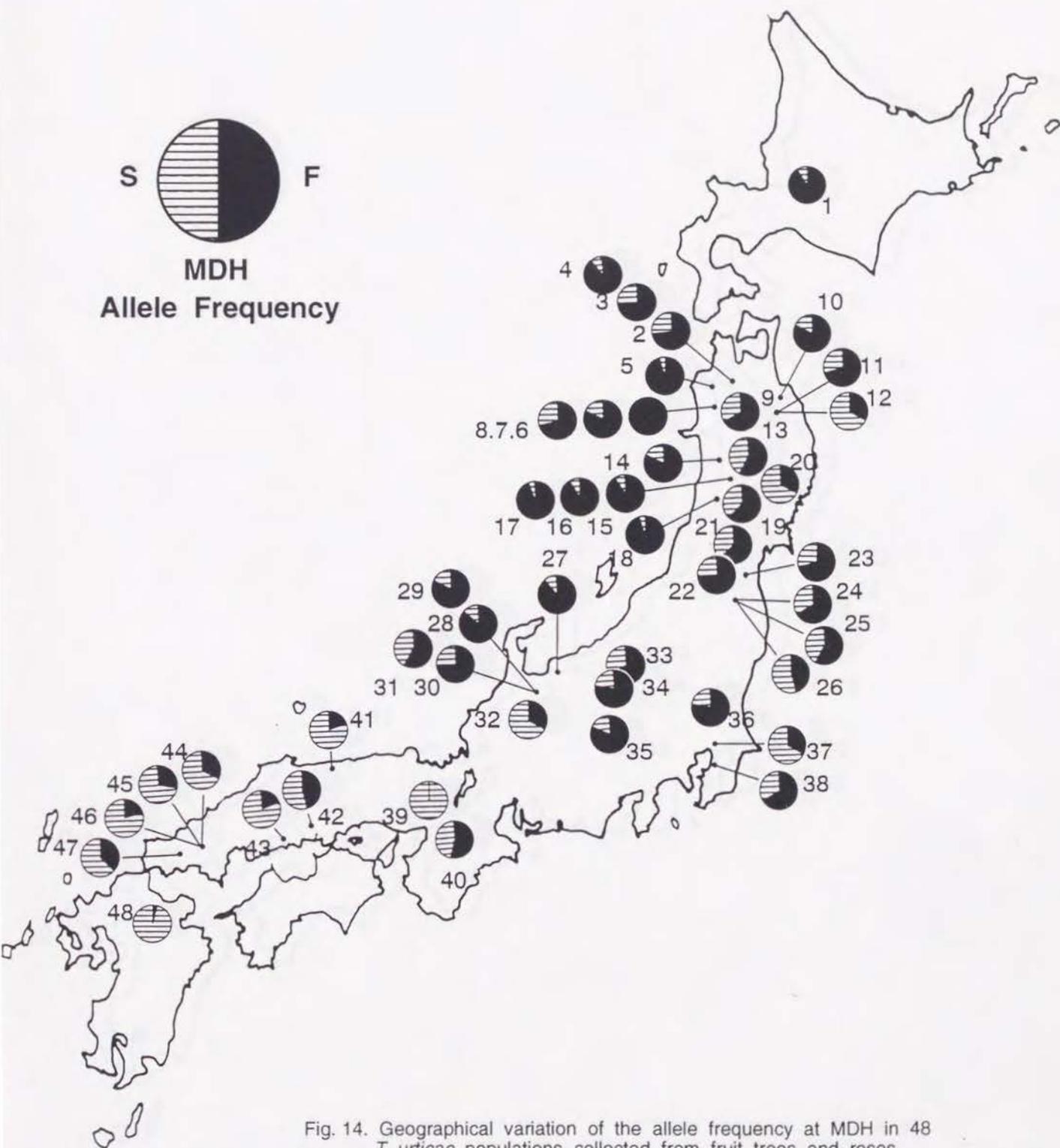


Fig. 14. Geographical variation of the allele frequency at MDH in 48 *T. urticae* populations collected from fruit trees and roses.

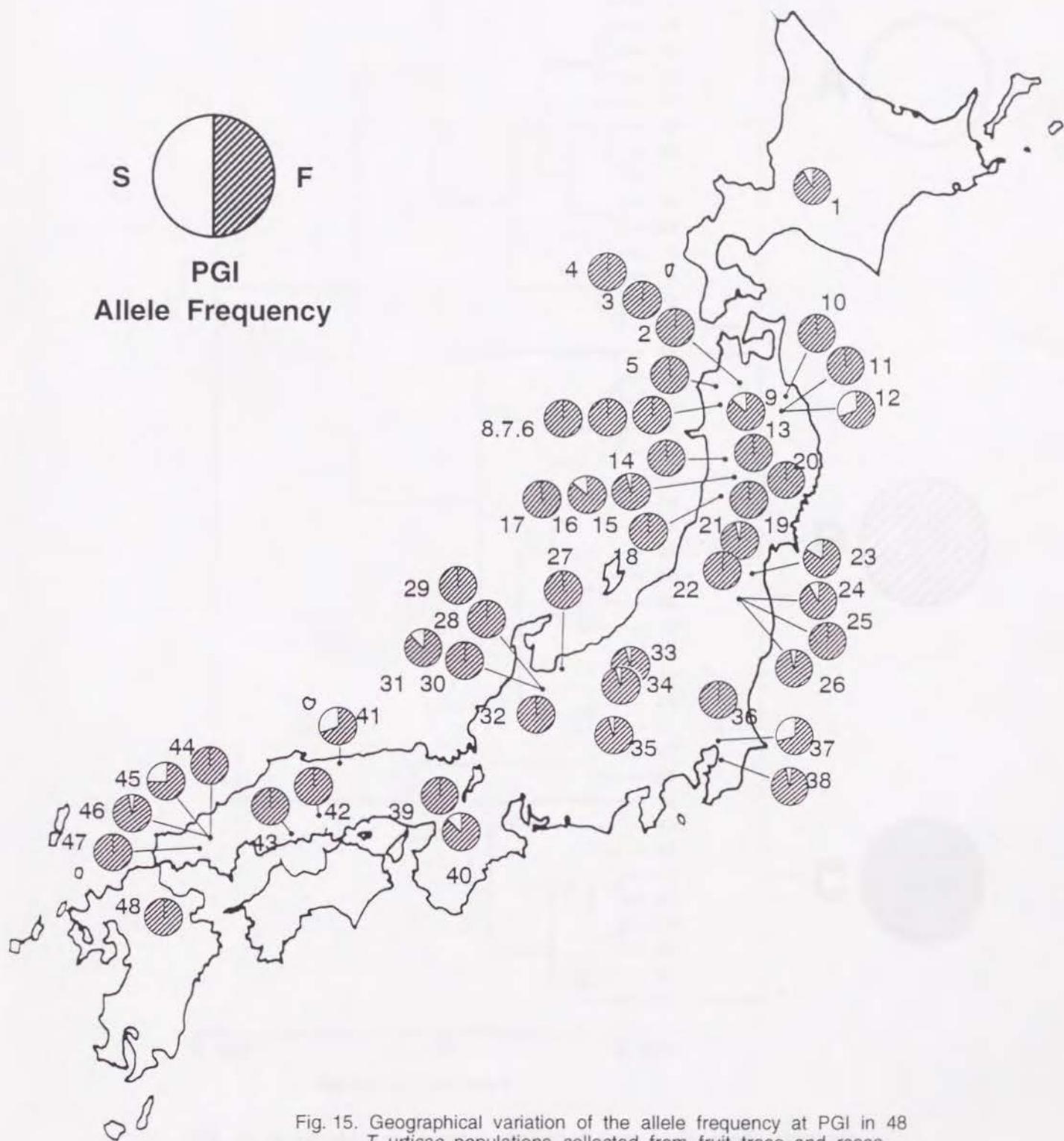


Fig. 15. Geographical variation of the allele frequency at PGI in 48 *T. urticae* populations collected from fruit trees and roses.

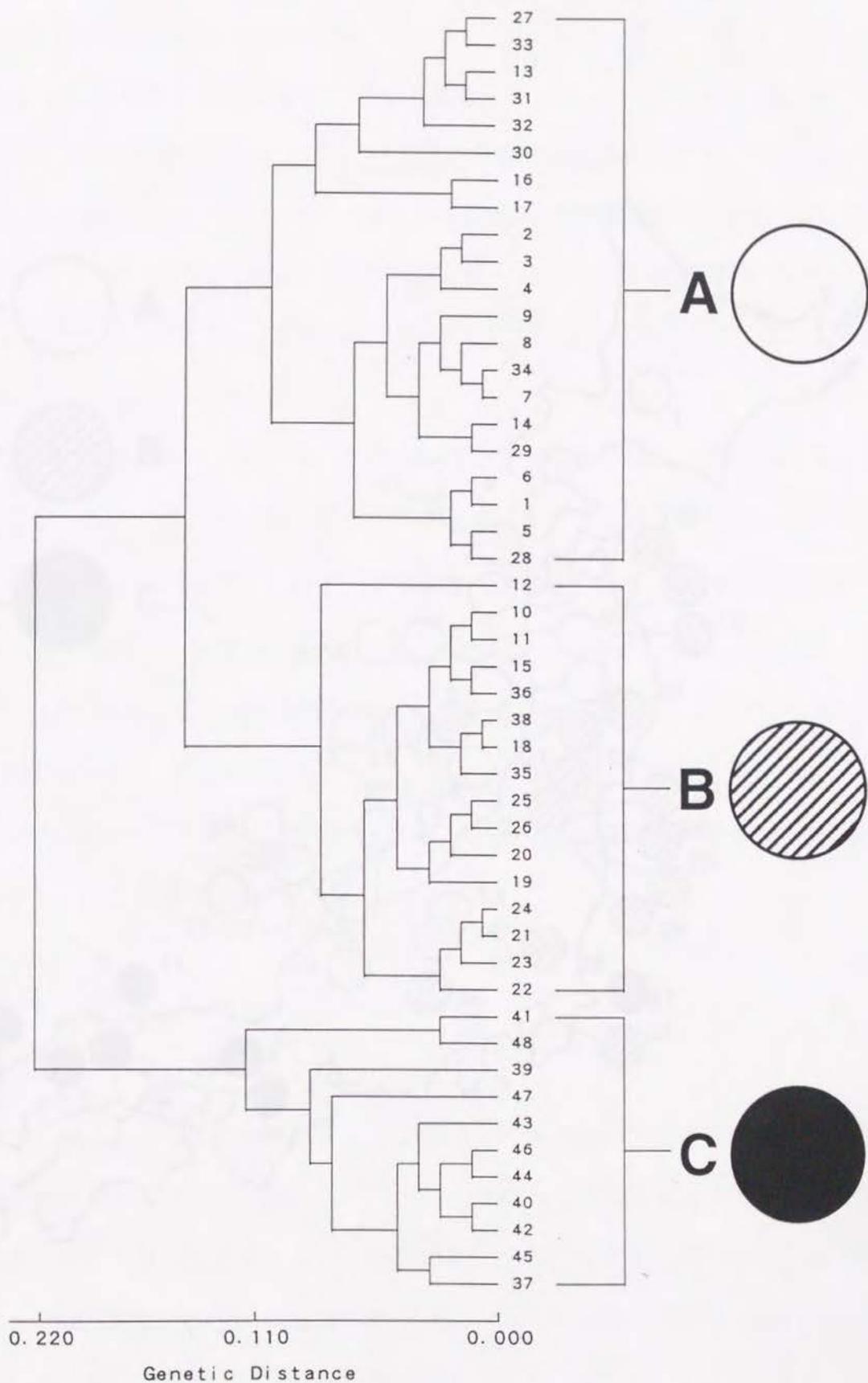


Fig. 16. A UPGMA phenogram generated from Nei's genetic distance for populations collected from fruit trees and roses.

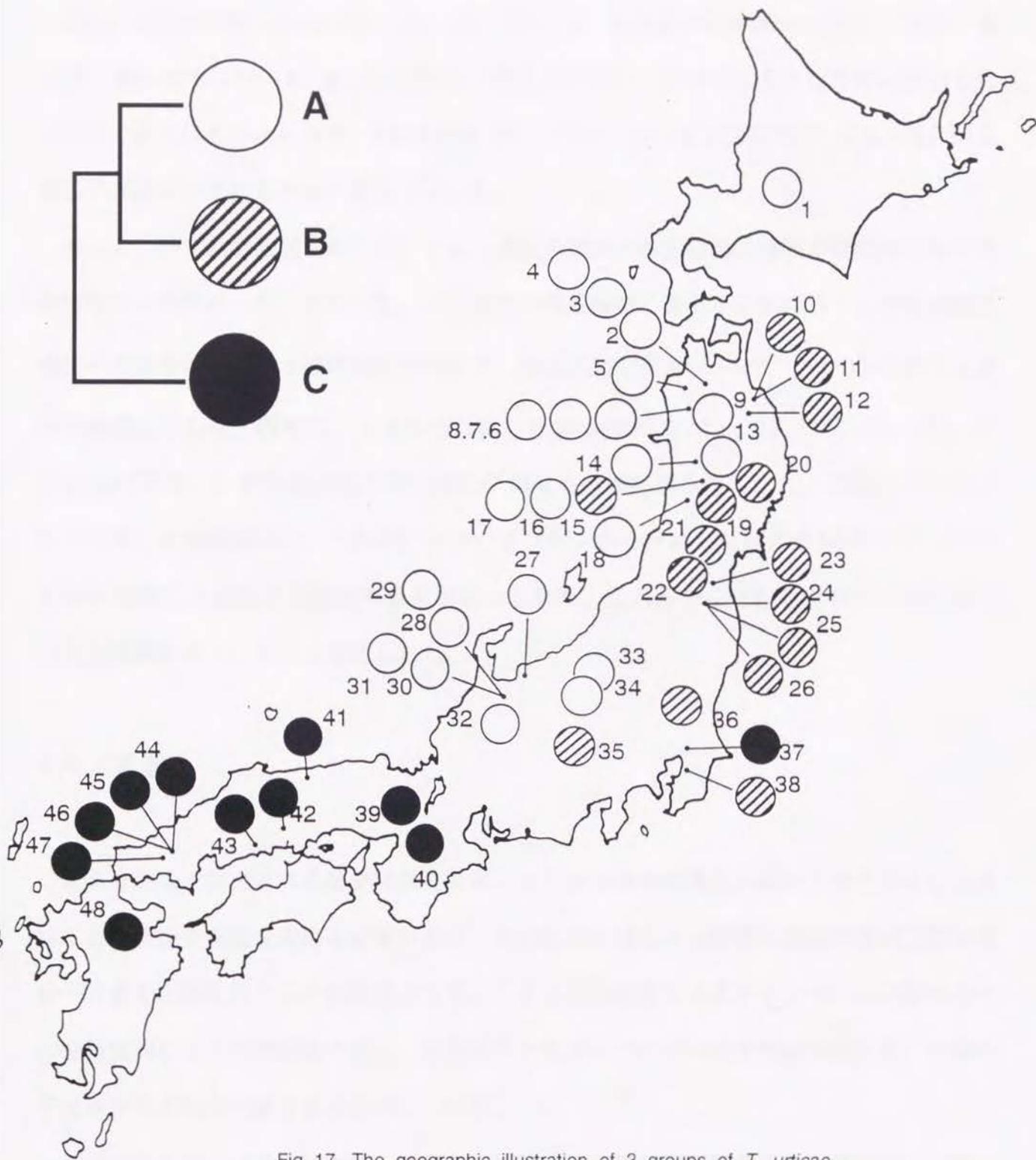


Fig. 17. The geographic illustration of 3 groups of *T. urticae* populations derived from the phenogram in Fig. 16.

2. 草本性植物寄生の個体群における変異

草本植物寄生の42個体群を調べた結果、いずれの遺伝子座についても遺伝子頻度には明確な地理的パターンは認められず、また、地理的に近接する個体群間でも、遺伝子頻度に著しい差異が認められた(Figs. 18–21)。例えば、青森県の個体群No.4およびNo.5、富山県の個体群No.11~16、および奈良県の個体群No.21~29はそれぞれ地理的に近接した個体群であるにもかかわらず、Est-4 (Fig. 18)、Est-5 (Fig. 19)およびMDH (Fig. 20)の対立遺伝子頻度はいずれも大きく異なっていた。

さらに、いずれの遺伝子座についても、遺伝子頻度と寄主植物の種類の間には明確な相関は認められなかった。すなわち、同じ種類の寄主植物に寄生する個体群でも特定の対立遺伝子頻度を示すという傾向は認められず、個体群間で有意(χ^2 -test, $p < 0.05$)に異なる遺伝子頻度を示した。例えば、ナスから採集した個体群No.6、11、12、15、23、25、29および31では、いずれの遺伝子座の遺伝子頻度も有意に異なっていた。同様にキュウリから採集した個体群No.1、7および14や、インゲンから採集した個体群No.5、16、17および20の間にも遺伝子頻度の有意差が認められた。これらのことからアロザイム変異には寄主特異性はないものと考えられた。

4.4 考察

電気泳動法で検出される酵素変異を指標として個体群間の遺伝的距離を推定するには個体ごとに遺伝子頻度を求める必要があり、そのためにはそれら酵素の遺伝子座の決定と遺伝子分析を正確に行うことが前提となる。つまり電気泳動によるアイソザイムの検出とその分析は異なった研究段階であり、検出された変異については必ず交雑実験に基いた遺伝子分析がなされるべきである(刑部、1989)。

ナミハダニは体が小さいため、これまで個体レベルでの酵素変異の検出例は極めて限られてきた。例外的にエステラーゼは活性が強く、比較的検出が容易なためハダニ類でも古

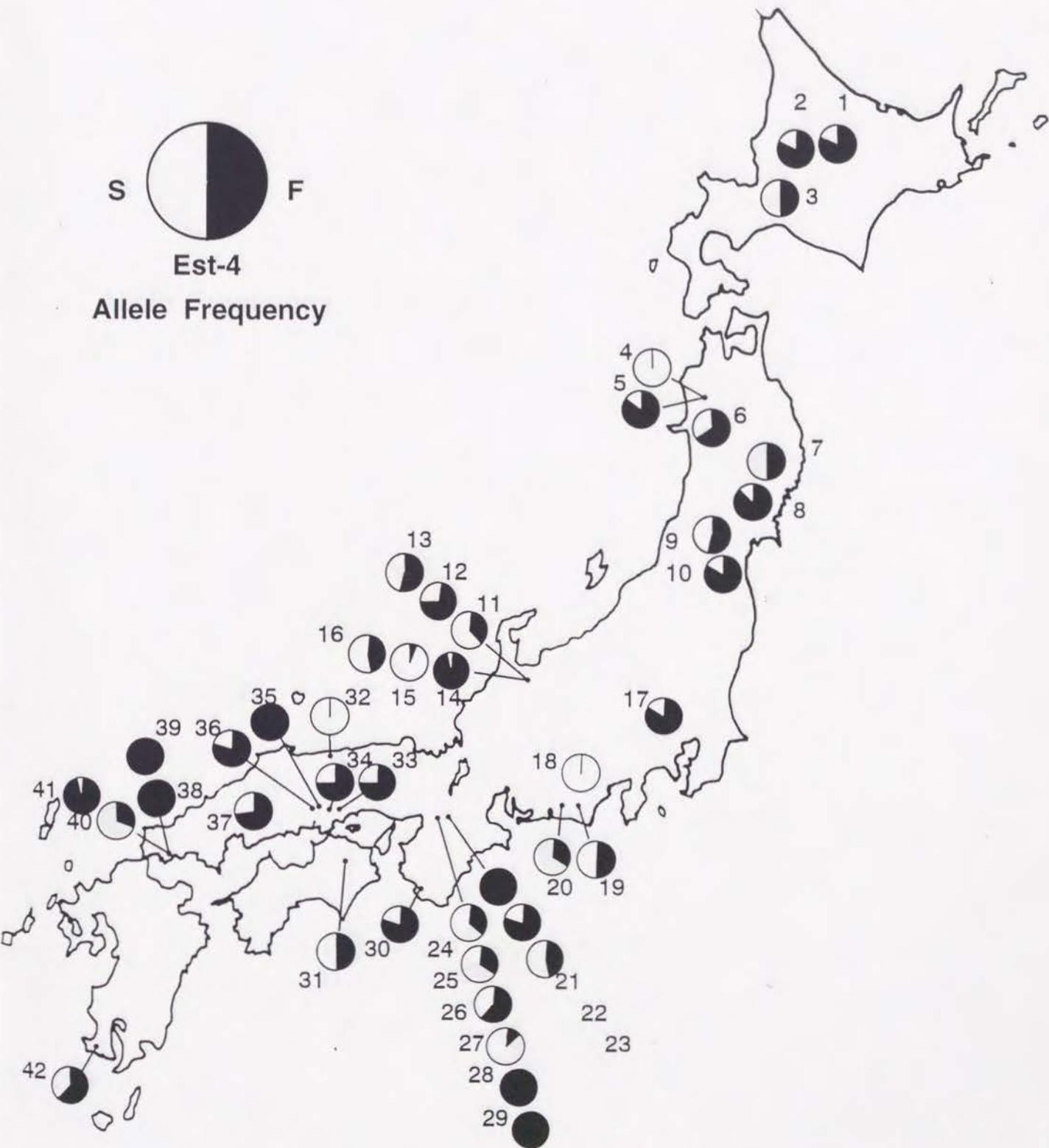
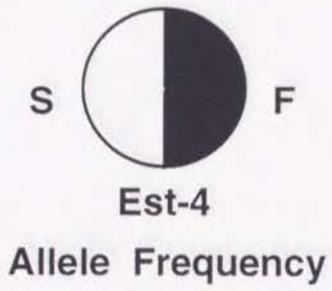


Fig. 18. Geographical variation of the allele frequency at Est-4 in 42 *T. urticae* populations collected from herbaceous hosts.

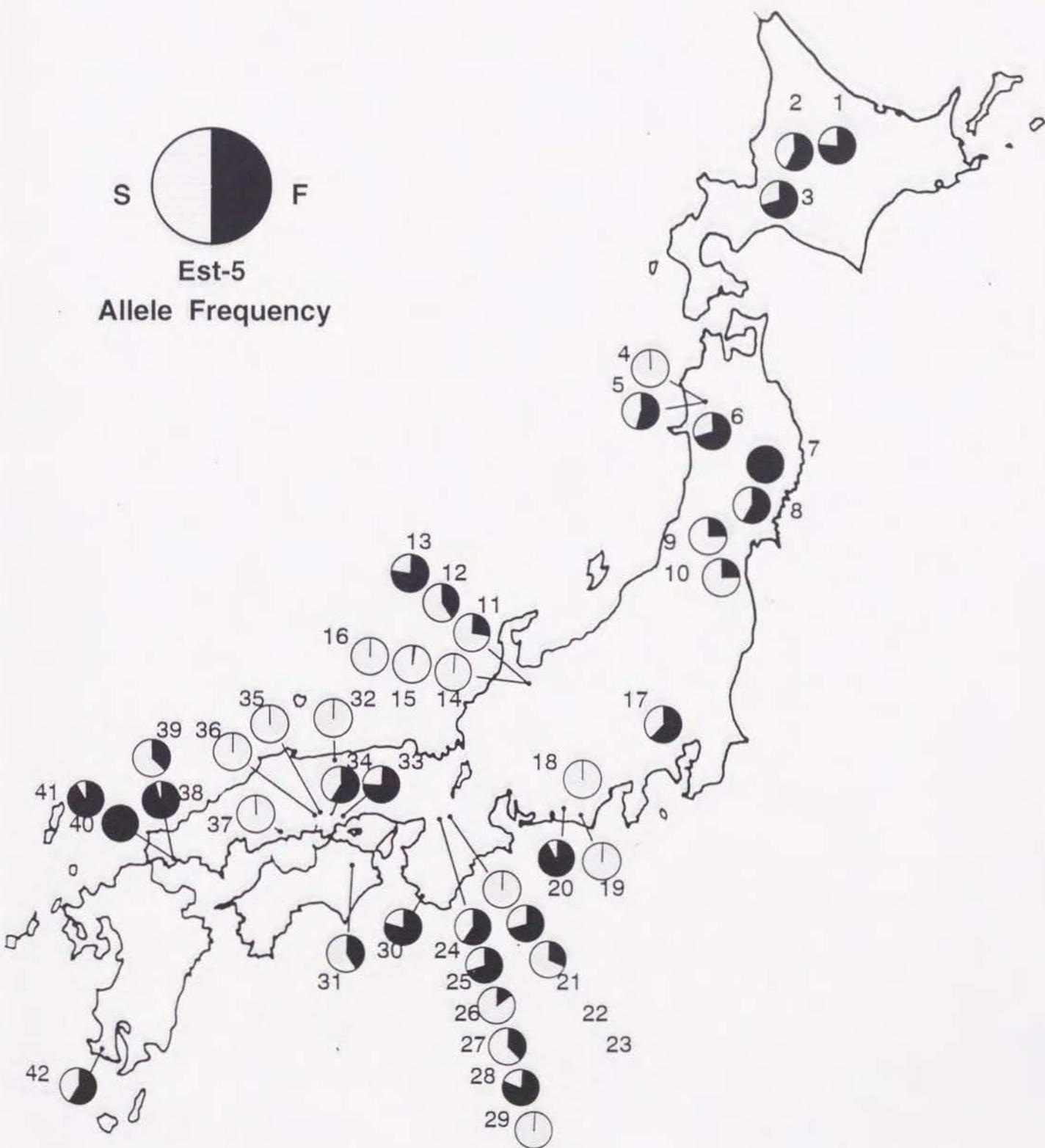
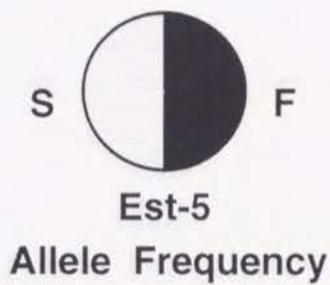


Fig. 19. Geographical variation of the allele frequency at Est-5 in 42 *T. urticae* populations collected from herbaceous hosts.

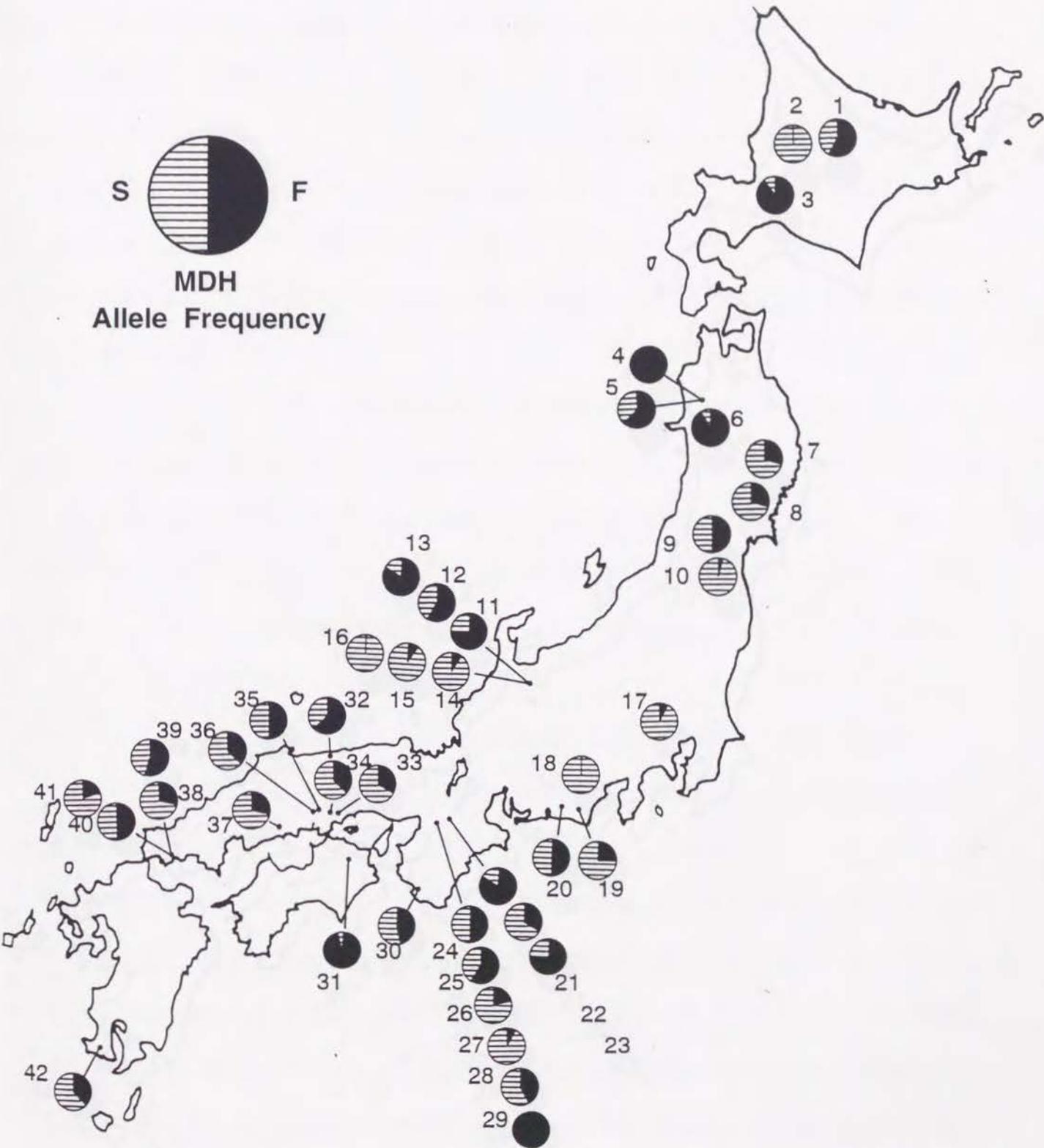


Fig. 20. Geographical variation of the allele frequency at MDH in 42 *T. urticae* populations collected from herbaceous hosts.

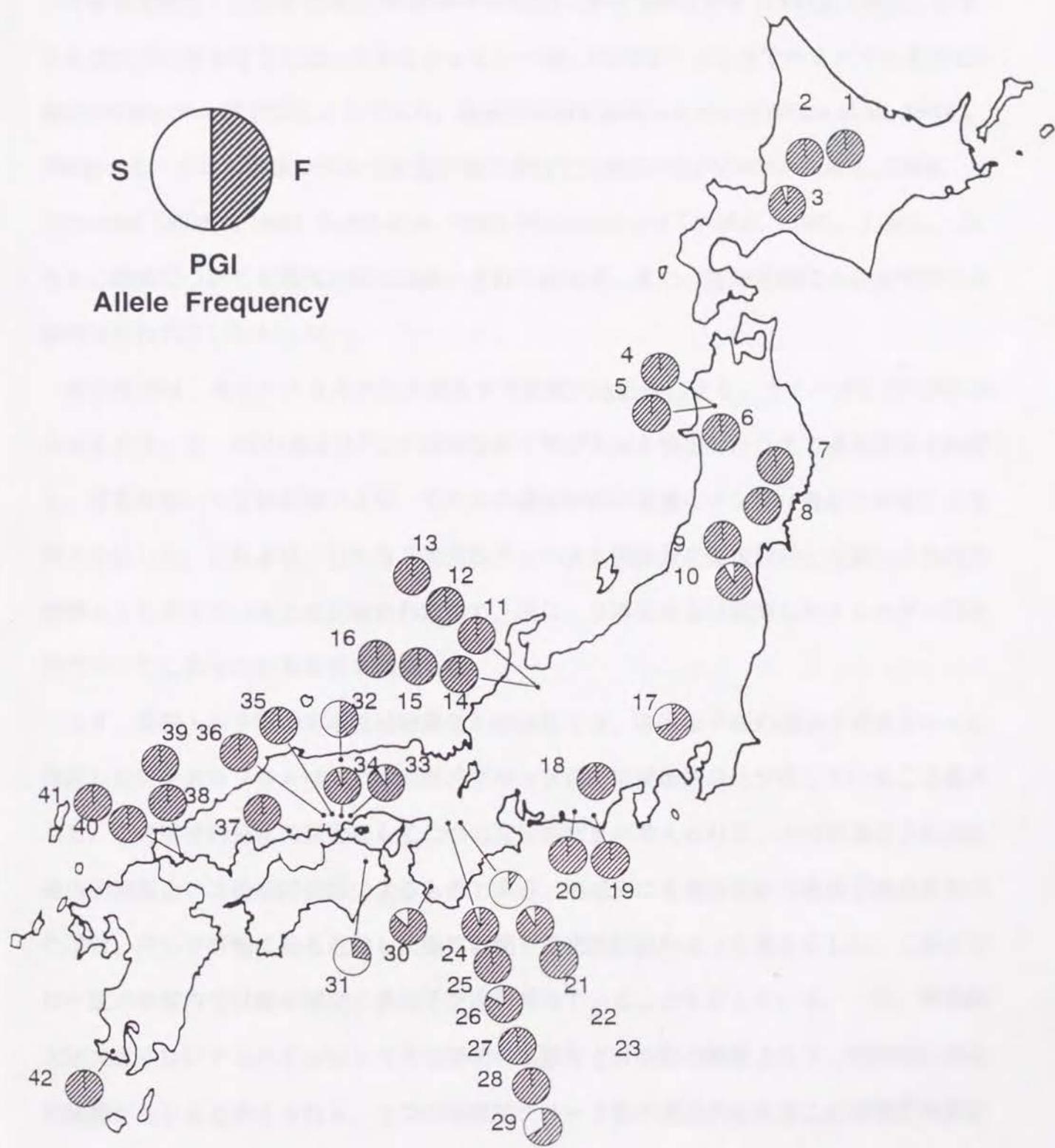


Fig. 21. Geographical variation of the allele frequency at PGI in 42 *T. urticae* populations collected from herbaceous hosts.

くからアイソザイム多型が調べられていた(Ogita and Kasai, 1965)。しかし、数多くのバンドの中から遺伝子座を特定し、遺伝子分析を行った例はOsakabe (1991)がミカンハダニのエステラーゼで調べたものに限られた。ナミハダニについても個体レベルでエステラーゼ変異を検出した例はあるが(Sula and Weyda, 1983; Goka and Takafuji, 1992)、いずれも遺伝子分析を行うにはいたらなかった。一方、MDHはアメリカでナミハダニを含む3種の*Tetranychus*属で検出されており、遺伝子分析も試みられている(Ward et al., 1982)。PGIもナミハダニの個体レベルで多型が検出されている(Grafton-Cardwell et al., 1988; Goka and Takafuji, 1992; Gotoh et al., 1993; Hinomoto and Takafuji, 1994)。しかし、これら二酵素についても電気泳動法は統一されておらず、また、交雑試験による遺伝様式の解明は行われていなかった。

本研究では、ポリアクリルアミドのスラブ式電気泳動法により、ナミハダニの1個体からエステラーゼ、MDHおよびPGIの鮮明なザイモグラムを検出したうえで遺伝子座を特定し、純系を用いた交雑実験により、それらの遺伝様式が正常なメンデル遺伝であることを明らかにした。これより、これら3酵素がナミハダニ個体群の遺伝的分化を調べるための指標として適していることが示されたので、次に、日本各地より採集したナミハダニ個体群についてこれらの酵素変異を調査した。

まず、果樹・バラ等の木本性植物寄生の個体群では、各遺伝子座の遺伝子頻度をもとに作成したデンドログラムは3つの地理的グループの間に遺伝的分化が生じていることを示した。この遺伝的分化の原因として二つの遺伝的背景が考えられる。一つは遺伝子交流と遺伝的隔離という機会的要因によるものである。地域別に各遺伝子座の遺伝子頻度を調べた場合、同じ平野部にある近接した個体群間では比較的似かよった値を示した。このことは一定の地域内では個体群間に遺伝子交流が起きていることを示している。一方、移動能力が大きいナミハダニにとって地域間の山脈などは移動の障壁となり、地域間に遺伝的隔離が生じると考えられる。3つの地理的グループ間の遺伝的分化はこの地理的障壁による隔離によるものと考えられた。

もう一つの地域間の遺伝的分化の原因として、アロザイム変異が各地域の環境による自然選択の影響を受けている可能性が挙げられよう。アロザイムを支配する遺伝子の大部分は選択中立と考えられている(Kimura, 1968, 1979; King and Jukes, 1969; Kimura and Ohta, 1971)。しかし、昆虫ではエステラーゼアロザイムパターンと有機リン系殺虫剤抵抗性との関連を指摘する報告が数多くなされており(Ozaki and Koike, 1965; Ozaki et al., 1966; Pasteur and Sinegre, 1975; Georghiou and Pasteur, 1978, 1980; Sawicki et al., 1978; Georghiou et al., 1980; Takada, 1979, 1986; Devonshire, 1989; Prabhakaran and Kamble, 1993, 1994; Saito, 1993)、ハダニ類においてもカンザワハダニでエステラーゼアロザイムパターンとマラチオン分解活性および抵抗性との関係について(Kuwahara et al., 1981; 桑原, 1982)、また、ミカンハダニではエステラーゼパターンとフェンカプトン抵抗性との関係について報告されている(武久・田中, 1967; 田中ら, 1972)。最近では、Osakabe and Sakagami (1993a)が日本の9地域より採集したミカンハダニ個体群についてエステラーゼの α -Est1 と呼ばれる遺伝子座の対立遺伝子頻度を調べた結果、九州地域の個体群と本州の個体群の間で遺伝子頻度に差が認められた。彼らは、この地域差が有機リン剤による選択圧のかかりかたの違いによって生じたものと考察している。しかしナミハダニでは、今回調査した酵素遺伝子座と選択圧との関係は不明である。今後、この点についての詳細な調査が必要である。

木本植物の場合とは対照的に、一年生草本植物寄生の個体群ではアロザイム遺伝子頻度に全く地理的なパターンは認められなかった。また、いずれの遺伝子頻度も寄主植物の種類には直接影響されないことが示された。これら二つのグループ間のアロザイム変異における地理的パターンの違いは、ナミハダニの生息環境の安定度に起因すると考えられる。すなわち、果樹園やバラ園では園内の下草も含めて生息環境が安定しており、ナミハダニ個体群は継続的に維持される。これに対して、草本性の植物の多くは栽培期間が限られ、収穫とともに生息場所に攪乱が生じ、そこに発生するナミハダニ個体群に対しても大きな攪乱が生じる。このような生息場所では少数の侵入個体が発生源となり、個体群は一時的

に形成されるにすぎない。このような場合、個体群の遺伝子頻度は侵入個体の遺伝子型によって大きく左右される、いわゆる創始者効果が強くはたらく。また、侵入個体は苗に付着して運搬されるなど、人為的要因により個体が遠距離を移動することが多いと思われる。従って、限られた地域内においても個体群の地理的起源は多様であり、遺伝子頻度の分布パターンはパッチワーク状になったと考えられる。おそらく木本植物においても人為的要因による個体の移入は起きていると思われる。しかし、果樹などの場合、さきにも述べたとおり既に定着している個体群が維持され、また、個体群間で遺伝子交流がある程度成り立っており、一定の地域内で比較的大きな分集団が形成されていると考えられることから、侵入個体の遺伝子はその地域全体の遺伝子頻度に与える影響は極めて小さいと考えられる。

このような寄主植物の栽培環境の違いがナミハダニ個体群の遺伝子組成に影響を及ぼす現象は、個体群間の遺伝的不和合性でも認められている。Overmeer and Van Zon (1976) は、オランダの近接するガラス室から採集した個体群間に著しい生殖不和合が生じていること報告した。これに対して、de Boer(1980)がオランダの砂丘地帯で、Overmeer and Van Zon (1976)が調べたほぼ同じ面積の地域から野生雑草に発生する個体群を調べた結果、個体群間に顕著な生殖不和合は認められなかった。de Boer (1980)は、野生のナミハダニはガラス室のものに比べ、人為的な攪乱の影響を受けずに個体群を安定して維持でき、一定地域内であれば遺伝子交流があり、そのため個体群間で遺伝子組成の均一化が生じて生殖不和合が起きにくいと考察している。

以上の寄主植物の種類によって個体群の遺伝的構造の安定性が異なるとする推測は、各地域個体群のアロザイム遺伝子頻度の変化を長期にわたって調べることにより証明することができよう。

第5章 総合考察

本研究では、ナミハダニの休眠性の異なる系統間での交雑実験により、その休眠性の遺伝的メカニズムを調べた結果、休眠発現は複数遺伝子座の核遺伝子と細胞質因子によって制御されていることが明らかになった。さらに、これら双方の遺伝因子には個体群によって変異が存在することが明らかになった。休眠性の制御が複数遺伝子座支配である例はいくつかの昆虫種にもみられ(Slifer and King, 1961; Hogan, 1966; Masaki, 1963, 1965; 安藤・宮、1968; Raina et al., 1981; Sims, 1983; Hoy, 1975; Parker and Tepedino, 1982)、節足動物に広くみられる遺伝様式と考えられる。一方、Ignatowicz and Helle (1986)はオランダ産ナミハダニの休眠性は一遺伝子座支配であることを報告しており、本研究結果と異なっている。しかし、同一種内で休眠性の遺伝制御様式に変異があることはいくつかの昆虫種でも知られる(Danks, 1987)。休眠制御に細胞質因子が関与していることについてはウリハムシモドキ *Atrachya menetriesi* (Falderman) の卵休眠(安藤・宮、1968)やトノサマバッタ *Locusta migratoria* (Linnaeus) の卵休眠(Tanaka, 1994)でも示唆されているが、これまでそのメカニズムを詳細に調べた例はなく、本研究の結果は休眠性の遺伝制御に関する新しい知見である。

オランダのように高緯度域では休眠性はナミハダニの個体群維持に不可欠であり、そこに生息する個体群は高い休眠性を示すが、我が国のナミハダニの休眠性の強さには著しい種内変異があり、それ故、その遺伝制御機構もオランダ個体群とくらべてはるかに複雑である。本研究で明らかにしたナミハダニの休眠性が複数遺伝子座支配であるという事実によって、その変異の遺伝的背景をうまく説明することが可能である。我が国のナミハダニ個体群間には休眠率だけでなく、休眠発現させる誘起温度に顕著な変異が認められる(Takafuji et al., 1991)。すなわち、北海道や東北北部の個体群では、15°Cおよび18°C-9L15Dでは95%以上が、20°Cでも80%以上が休眠に入るが、逆に西南日本の個体群では15°Cでもほとんど休眠性を示さない。一方、京都や奈良などの中緯度地域の個体群では

休眠発現におよぼす温度の影響が顕著で、15℃では高い休眠率を示すが18℃から20℃にかけて休眠率が著しく低下する。この事実は個体群間に休眠抑制に関する遺伝子組成に変異が存在することを示し、中緯度地域の個体群には個体群内にも休眠抑制に関する遺伝的変異が大きいことを示唆する。事実、京都の野外バラ園の個体群から抽出した個体を近親交配させることによって得られた系統間には休眠性の強さに著しい変異が認められ (Takafuji et al., 1991)、この個体群が休眠抑制に関する多様な遺伝子型をもつ個体によって構成されていることが示された。このTakafuji et al. (1991)の休眠性変異の研究と本研究の遺伝制御機構の結果を統合すると、我が国のナミハダニには個体群間・内に多様な休眠抑制の遺伝子型が存在し、それら遺伝子型の頻度によって各個体群の休眠性の強さが決定されていると結論される。すなわち、冬の寒さが厳しい北の個体群では休眠抑制遺伝子の頻度がきわめて低く、高い休眠率を示し、逆に、西南日本の個体群では休眠抑制遺伝子の頻度が高く、誘起温度が低い場合でも休眠率は低い。一方、中緯度地域の個体群では休眠抑制の遺伝子型が多様で、休眠率や休眠発現の閾値温度の個体による変異が大きく、個体群全体では中程度の休眠率が示されるであろう。これら中緯度地域の個体群では、その遺伝的多様性により、秋の休眠誘起時の温度などに反応して休眠発現率を柔軟に調節していると考えられる。

本研究から、休眠性に関与する細胞質因子にも種内変異が存在することが明らかにされた。特に、休眠性を有する個体群から選抜した非休眠性系統には細胞質効果が認められないが、ほぼ完全な非休眠の個体群由来の非休眠系統には強い効果があり、我が国の個体群には細胞質レベルでの分化が起きていると思われる。暖地の個体群では、休眠抑制の核遺伝子頻度が高いことに加えて細胞質因子が存在することにより、より強い休眠抑制効果が発揮されるであろう。この細胞質レベルの分化が休眠性に関する方向性選択により生じたものか、それとも南方の個体群の起源が違ふことによるのかを明らかにするためには、さらに多くの個体群を対象に個体群間・内の細胞質因子の変異を調べるとともに、異なった発生環境で実際に細胞質因子の選抜が起こるかを実験的に調べる必要がある。

本研究ではナミハダニのアロザイム変異について詳細に解析し、個体群間の遺伝的分化の定量化を試みた。その結果、我が国のナミハダニ個体群にはアロザイム遺伝子頻度に著しい地理的変異が存在した。そして果樹・バラ寄生の個体群と一年生草本寄生の個体群では、この地理的変異のパターンが明らかに異なった。ナミハダニのような広食性種のアロザイム変異を調べる場合、その変異に対する寄主植物の影響を考慮に入れなければならない。そのような影響には、寄主植物の成分などが生理的ストレスとして直接的な選択圧となる場合が考えられ、数種の昆虫で寄主植物の種類の変化にともなってアロザイム変異が変化することが野外および室内で実証されている(Sell et al., 1975; Sluss et al., 1978; Sluss and Graham, 1979; Ahmad et al., 1989; McDonald et al., 1990)。しかし本研究で得られたデータからは、ナミハダニのアロザイム遺伝子頻度と寄主植物の種類の間には相関は認められなかった。ナミハダニの場合、寄主の種類によってアロザイム変異のパターンが異なるのは、寄主植物の成分に起因する選択圧のためではなく、寄主の種類によってハダニに対する餌資源としての安定度が異なり、そのために個体群の遺伝子組成に対する移動や遺伝子浮動などの機械的要因の作用が異なるためと考えられた。

ハダニ類の移動は人為的輸送を除けば歩行と風による分散に限られ、移動距離には当然、限度があり、個体群の隔離が生じやすい。安定した果樹園およびバラ園個体群では、一定の地域内では分集団が形成されるが、山脈などで隔てられた地域間に遺伝的隔離が生じており、特に北方と南方の地理的な分化が進んでいた。このことは、西南日本の個体群が近年に北方から分布を拡大してきたとする考えを必ずしも裏づけるものではなく、むしろ北方と南方の個体群の侵入経路や時期の違いを意味するとも考えられる。

一方、草本性寄生の個体群の場合、一時的にしか発生できないため個体群間の長期的な遺伝子交流は成り立たず、また、発生過程で遺伝子浮動をとまなうことが多いと考えられ、限られた地域内においても個体群間に著しい分化が生じていた。人為的要因による移入もこれら草本寄生の個体群の分化の主要因のひとつといえよう。高藤ら(1989b)は、奈良県下の様々な地域と作物についてナミハダニの発生状況を調査し、本種は奈良盆地の中南部

を中心に多く発生しているが、北部や東部の山間地では発生が少ないことを示し、施設栽培の多い奈良盆地の都市近郊農業地帯に作物の苗とともに人為的に侵入したと考察している。本研究でも、奈良県より採集した多数の個体群のアロザイム変異を調べたが、個体群間に遺伝子頻度の著しい差異が認められ、この地域の個体群の侵入源が様々な地域にわたっていることが示唆された。

以上の研究結果を総合すると、我が国のナミハダニの休眠性およびアロザイムという二つの全く質的に異なる形質の両方に個体群間・内に多様な変異が存在し、特に安定した環境に定着している個体群では北方と南方の間で遺伝的分化が進んでいると考えられた。ただ、本種の移動には人為的要因が複雑に絡んでいるため、その分布拡大は一元的には捉えられない点が課題として残った。

ナミハダニが今後も分布を拡大するとすれば、その過程で個体群の遺伝的変異に何らかの変化が生じ、新たな分化がもたらされることが予測される。本研究で得られた休眠性およびアロザイムの遺伝的基礎情報をもとに、さらに個体群の遺伝的変異の解析を続けることにより、本種の分化の方向性をより明確に把握することができると期待される。

謝辞

本研究を進め、論文として取りまとめるにあたり、懇切な御指導ならびに御鞭撻を終始頂いた京都大学大学院農学研究科生態情報開発分野高藤晃雄教授に深く感謝の意を表します。先生には、私が学生時代に研究者として歩み始めたときより今日にいたるまで、常に研究の師として、研究者としての姿勢を教えていただきました。京都大学農学部昆虫学研究室久野英二教授には、貴重な御教示と御批判を頂きました。同研究室の大崎直太博士、西田隆義博士には、数々の有益な御助言や激励を頂きました。また、同研究室の先輩、後輩の諸氏からも有形、無形の御援助を賜りました。心から感謝いたします。

京都大学農学部遺伝学研究室大西近江教授および宮下直彦助教授には、集団遺伝学に関する貴重な御教示を頂きました。同研究室の池田達哉博士ならびに安井康雄氏には遺伝学の実験技術に関して多くの御助言を頂きました。農水省果樹試験場安芸津支場刑部正博博士には、研究上はいうにおよばず、私的なことも含め多くの御激励、御批判および御協力を頂きました。また、奈良県果樹振興センター井上雅央博士をはじめ、各地の大学ならびに試験場の皆様の御協力のもとに、実験材料であるナミハダニの採集を行うことができました。深く感謝いたします。

最後に、宇部興産株式会社宇部研究所農薬研究部竹中充章研究部長、小畑登紀夫博士、堤内清志主任研究員、大岡朗主任研究員には、入社時より多くの御激励と御協力を頂きました。また、同研究部の皆様方からも暖かい励ましを賜りました。ここに厚くお礼を申し上げます。

摘要

世界的な重要農業害虫であるナミハダニは、我が国ではもともと北日本に発生する休眠種と考えられていた。近年、本種は西南日本での発生が顕著になっており、北方から南方へ分布を拡大してきたと考えられているが、それを裏付ける量的な情報はこれまで呈示されていない。ナミハダニが過去にその分布を拡大しているとするれば、その過程で地域個体群間になんらかの遺伝的分化が生じている可能性が高い。そこで本研究では、ナミハダニの休眠性における地理的変異の遺伝的背景を明らかにする目的でその遺伝的制御機構を調べた。さらに、個体群間の遺伝的分化の程度を推測するために適応中立形質であるアロザイムの遺伝的変異も解析し、これら二つの形質の変異を照らし合わせて、我が国におけるナミハダニの遺伝的分化の解明を目指した。

休眠性の遺伝学的研究

1. 札幌から採集した個体群から休眠性の高い系統Dを選抜し、茨城、奈良、岡山および静岡の個体群から完全に非休眠の系統ND₁~ND₁₀を選抜した。DとNDの相反交雑では、茨城個体群から選抜したND₁~ND₃を用いた場合、F₁の18°C-9L15Dの休眠率は交雑の方向に関わらず90%以上の値を示し、休眠性は非休眠性（休眠抑制）に対して完全優性であることが判明した。一方、奈良、岡山および静岡の個体群から選抜したND₄~ND₁₀を用いた場合、交雑の方向によってF₁の休眠率に有意差が認められ、これらのND系統の休眠抑制の遺伝制御に母性効果がはたらくことが明らかになった。

2. 休眠抑制の遺伝制御に母性効果を示さなかったND₁~ND₃（茨城個体群由来）と顕著な効果を示したND₄およびND₅（奈良個体群由来）を用いて休眠性系統Dとの相反交雑をさらに行い、休眠誘起時の温度条件を変えてF₁の休眠発現率の変化を調べた。その結果、系統によって休眠発現に対する誘起温度の効果に差がみられ、特にND₄およびND₅を用いたF₁では温度の影響が大きかった。このことは個体群間・内で休眠抑制遺伝子に変異が存

在することを示し、さらにF1と親系統の雄との戻し交雑によってB1の休眠率を調べた結果、いずれの交雑でも単一遺伝子座支配の期待値とは有意に異なる値を示し、休眠抑制は複数遺伝子座支配であることが判明した。

3. Dと、休眠抑制の遺伝制御に母性効果が認められなかったND1、および顕著な母性効果がみられたND4を用いて連続戻し交雑を行い、いくつかの核細胞質置換系統を選抜した。これらの系統を用いて交雑を行った結果、細胞質の置換によりF1の休眠率が変化し、母性効果は細胞質因子によるものと結論された。

以上の結果より、ナミハダニの休眠性は核遺伝子と細胞質因子によって制御されており、核および細胞質レベルの双方で遺伝的変異が存在することが明らかになった。この複雑な遺伝様式により、個体群間・内に休眠性に関する多様な遺伝子型が存在し、それにより複雑な休眠性の地理的変異が生じると考えられた。

アロザイム変異の研究

1. ナミハダニのアロザイム変異をスラブ式ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検出した。多型が認められた酵素は、二つのエステラーゼ (Est-4, Est-5)、MDHおよびPGIで、遺伝子分析の結果、これらの酵素遺伝子座はそれぞれ二対立遺伝子を持つことが明らかになった。

2. これらの酵素 (アロザイム) 遺伝子座の対立遺伝子頻度を日本各地の野外個体群について調べた。ナミハダニにとって安定した寄主である果樹およびバラ寄生の個体群では、各遺伝子座の対立遺伝子頻度におおまかな地理的パターンが認められた。さらに、遺伝子頻度より個体群間の遺伝的距離を求め、デンドログラムを作成した結果、これらの個体群は3つの地理的グループに大別され、特に北方と南方の個体群間に分化が生じていることが示唆された。一方、一年生草本植物寄生の個体群では、いずれのアロザイム変異についても地理的パターンは認められず、近接する個体群間でも対立遺伝子頻度が大きく異なる場合が多くあった。これは、草本植物の多くが一時的に栽培され、ナミハダニにとっては

不安定な餌資源であり、個体群の遺伝子組成に人為的攪乱要因が強く影響するためと考えられた。

以上の結果から、我が国のナミハダニには休眠性およびアロザイムの二つの形質に関して個体群間・内に著しい変異が存在し、個体群間の遺伝的変異が大きいことが示された。本種の移動には人為的要因が複雑に絡んでいるため、その分布拡大のプロセスは一元的には捉えられないが、特に、安定した環境に定着している個体群では北と南で分化が進んでいることが示唆された。

引用文献

- Ahmad, S., C. Capps and R. S. Pardini (1989) Response of the antioxidant enzymes of the cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*) larvae to superoxide-generating plant prooxidants, quercetin and xanthoxin. *J. Cell. Biol.* 107: 4182.
- 安藤喜一・宮慶一郎 (1968) 休眠・非休眠系統間の交配によるウリハムシモドキの休眠性について. 岩手大農報 9: 87-96.
- Ballantyne, G. H. (1969) Genetic fine structure and complementation at the albino locus in spider mites (*Tetranychus* species: Acarina). *Genetica* 40: 289-323.
- Ballantyne, G. H. and R. A. Harrison (1967) Genetic and biochemical comparisons of resistance between strains of spider mites (*Tetranychus* species: Acari). *Entomol. Exp. Appl.* 10: 231-239.
- Bartlett, A. C. (1981) Isozyme polymorphism in populations of the pink bollworm. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74: 9-13.
- Berlocher, S. H. (1984) Insect molecular systematics. *Ann. Rev. Entomol.* 29: 403-433.
- Boudreaux, H. B. (1956) Revision of the two-spotted spider mite complex, *Tetranychus telarius* (Linnaeus). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 49: 43-48.
- Boudreaux, H. B. (1963) Biological aspects of some phytophagous mites. *Ann. Rev. Entomol.* 8: 137-154.
- Carey, J. R. and J. W. Bradley (1982) Developmental rates, vital schedules, sex ratios and life tables for *Tetranychus urticae*, *T. turkestanii* and *T. pacificus* (Acarina: Tetranychidae) on cotton. *Acarologia* 23: 333-345.
- Cone, W. W., L. M. McDonough, J. C. Maitlen and S. Burdajewicz (1971) Pheromone studies of the two-spotted spider mite. I. Evidence of sex pheromone. *J. Econ. Entomol.* 64: 355-358.
- Croft, B. A. and D. L. McGroarty (1977) The role of *Amblyseius fallacis* (Acarina: Phytoseiidae) in Michigan apple orchards. *Res. Rep. Mich. Agr. Stn.* No. 333 1-22.
- Danilevskii, A. S., N. I. Goryshin and V. P. Tyshchenko (1970) Biological rhythms in terrestrial arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 15: 201-244.

- Danks, H. V. (1987) *Insect Dormancy: An Ecological Perspective*. 192-201pp. Biological Survey of Canada, Ottawa.
- de Boer, R. (1980) Genetic affinities between spider mite *Tetranychus urticae* (Acarina: Tetranychidae) populations in a non-agricultural area. *Entomol. Exp. Appl.* 28: 22-28.
- de Boer, R. (1981) Genetic affinities between spider mite *Tetranychus urticae* (Acarina: Tetranychidae) populations in a non-agricultural area II. *Entomol. Exp. Appl.* 30: 63-67.
- de Boer, R. (1982) Partial hybrid sterility between strains of the arrhenotokous spider mite, *Tetranychus urticae* complex. *Genetica* 58: 23-33.
- Devonshire, A. L. (1989) The role of electrophoresis in the biochemical detection of insecticide resistance. *Electrophoretic Studies on Agricultural Pests* (eds. Loxdate, H. D. and J. den Hollander), *Systematics Association Special Volume*. No. 39. Clarendon Press, Oxford. 363-374pp.
- Dittrich, V. (1963a) Genetics and dynamics of organophosphate resistance in strains of *Tetranychus urticae*. *Advances in Acarology 1* (ed. J. A. Naegele). Cornell Univ. Press, New York. 238-247pp.
- Dittrich, V. (1963b) A recessive factor for organophosphate resistance in populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus telarius*. *J. Econ. Entomol.* 56: 182-184.
- Dittrich, V. (1963c) Investigations on OP-resistance of two genetically differing populations of *Tetranychus urticae* K. *Entomol. Exp. Appl.* 6: 10-20.
- Dupont, L. M. (1979) On gene flow between *Tetranychus urticae* Koch, 1866 and *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) Boudreaux, 1956 (Acari: Tetranychidae): synonymy between the two species. *Entomol. Exp. Appl.* 25: 297-303.
- 江原昭三 (1989) 最近におけるハダニ類の分類研究の進展. 植物防疫 43: 357-361.
- 古橋嘉一 (1980) ミカンハダニの個体群動態に関する研究. 静岡柑試特報 4: 1-56.
- Georghiou, G. P. and N. Pasteur (1978) Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *J. Econ. Entomol.* 71: 201-205.
- Georghiou, G. P. and N. Pasteur (1980) Organophosphate resistance and esterase pattern in a natural population of the southern house mosquito from

California. *J. Econ. Entomol.* 73: 489-492.

Georghiou, G. P., N. Pasteur and M. K. Hawley (1980) Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase B in *Culex quinquefasciatus* from California. *J. Econ. Entomol.* 73: 301-305.

Goka, K. and A. Takafuji (1992) Enzyme variations among Japanese populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Appl. Entomol. Zool.* 27: 141-150.

Gotoh, T. (1986a) Annual life cycle of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae), on *Ribes rubrum* L. in Sapporo: the presence of non-diapausing individuals. *Appl. Entomol. Zool.* 21: 454-460.

Gotoh, T. (1986b) Termination pattern of diapause in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) in Sapporo. *Appl. Entomol. Zool.* 21: 480-481.

Gotoh, T. and Y. Ishikawa (1992) Separation of *Panonychus ulmi*, *P. thelytokus* and *P. bambusicola* (Acari: Tetranychidae) by esterase zymograms. *Appl. Entomol. Zool.* 27: 598-601.

後藤哲雄・真梶徳純 (1981) 日本産ナミハダニ *Tetranychus urticae* Koch の休眠誘起の臨界日長とその地理的変異. 応動昆 25:113-118.

Gotoh, T., J. Bruin, M. W. Sabelis and S. B. J. Menken (1993) Host race formation in *Tetranychus urticae*: genetic differentiation, host plant preference, and mate choice in a tomato and a cucumber strain. *Entomol. Exp. Appl.* 68: 171-178.

Grafton-Cardwell, E. E., J. A. Eash and J. Granett (1988) Isozyme differentiation of *Tetranychus pacificus* from *T. urticae* and *T. turkestanii* (Acari: Tetranychidae) in laboratory and field populations. *J. Econ. Entomol.* 81: 770-775.

Helle, W. (1962) Genetics of resistance to organophosphorous compounds and its relation to diapause in *Tetranychus urticae* Koch. *Tydschr. Plziekt.* 68: 155-195.

Helle, W. (1965) Resistance in the Acarina: mites. *Advances in Acarology 2* (ed. J. A. Naegele). Cornell Univ. Press, New York. 71-93pp.

Helle, W. (1967) Fertilization in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Entomol. Exp. Appl.* 11: 101-113.

Helle, W. (1968) Genetic variability of photoperiodic response in an arrhenotokous

- mite (*Tetranychus urticae*). *Entomol. Exp. Appl.* 11: 101-113.
- Helle, W. and W. P. J. Overmeer (1973) Variability in tetranychid mites. *Ann. Rev. Entomol.* 18: 97-120.
- Helle, W. and A. H. Pieterse (1965) Genetic affinities between adjacent populations of spider mites. *Entomol. Exp. Appl.* 8: 305-308.
- Herne, D. H. C. and A. W. A. Brown (1969) Inheritance and biochemistry of OP resistance in a New York strain of the two-spotted spider mite. *J. Econ. Entomol.* 62: 205-209.
- Herron, G. A. and J. Rophail (1993) Genetics of hexythiazox resistance in two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Exp. Appl. Acarol.* 17: 423-431.
- Hinomoto, N. and A. Takafuji (1994) Studies on the population structure of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, by allozyme variability analysis. *Appl. Entomol. Zool.* 29: 259-266.
- Hogan, T. W. (1966) Physiological differences between races of *Teleogryllus cmmodus* (Walker) (Orthoptera: Gryllidae) related to a proposed genetic approach to control. *Aust. J. Zool.* 14: 245-251.
- Hoy, M. A. (1975) Hybridization of strains of the gypsy moth parasitoid, *Apanteles melanoscelus*, and its influence upon diapause. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68: 261-264.
- Hussey, N. W. and W. J. Parr (1963) Dispersal of the glasshouse red spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acarina, Tetranychidae). *Entomol. Exp. Appl.* 6: 207-214.
- Ignatowicz, S. and W. Helle (1986) Genetics of diapause suppression in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Exp. Appl. Acarol.* 2: 161-172.
- 井上雅央 (1990) 襟状の折り返しを備えたビニル障壁 "ダニがえし" によるハダニの移動防止策. *応動昆* 34: 49-53.
- Jordaan, L. C. (1977) Hybridization studies on the *Tetranychus cinnabarinus* complex in South Africa (Acari: Tetranychidae). *J. Entomol. Soc. S. Afr.* 40: 147-156.
- Kimura, M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura, M. (1979) Model of effectively neutral mutations in which selective

- constraint is incorporated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 3440-3444.
- King, J. L. and T. H. Jukes (1969) Non-Darwinian evolution: random fixation of selectively neutral mutations. *Science* 164: 788-798.
- Kondo, A. and A. Takafuji (1985) Resource utilization pattern of two species of tetranychid mites (Acarina: Tetranychidae). *Res. Popul. Ecol.* 27: 145-157.
- 桑原雅彦 (1982) カンザワハダニのアセチルコリンエステラーゼと非特異的エステラーゼの性質. 応動昆 26: 288-293.
- Kuwahara, M., T. Miyata, T. Saito and M. Eto (1981) Relationship between high esterase activity and in vitro degradation of ^{14}C -Malathion by Organophosphate-resistant and susceptible strains of the kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acarina: Tetranychidae), and their inhibition with specific synergists. *Appl. Entomol. Zool.* 16: 297-305.
- Lees, A. D. (1953) Environmental factors controlling the evocation and termination of diapause in the fruit tree red spider mite *Metatetranychus ulmi* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Ann. Appl. Biol.* 40: 449-486.
- 前川達也・井上雅央・中西喜徳 (1987) ホウレンソウ雨除け栽培におけるハダニの発生状況. 関西病虫研報 29: 40.
- Masaki, S. (1963) Adaptation to local climatic conditions in the Emma field cricket (Orthoptera: Gryllidae). *Kontyu* 31: 249-260.
- Masaki, S. (1965) Geographic variation in the intrinsic incubation period: a physiological cline in the Emma field cricket (Orthoptera: Gryllidae: *Teleogryllus*). *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* 11: 59-90.
- McDonald, I. C., J. L. Krysan and O. A. Johnson (1985) Genetic variation within and among geographic populations of *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78: 271-278.
- McDonald, I. C., J. L. Krysan and O. A. Johnson (1990) Studies of electrophoretic variation in *Diabrotica* as influenced by the age, sex, or diet of adult beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 1192-1202.
- McEnroe, W. D. (1961) The control of water loss by the two-spotted spider mite (*Tetranychus telarius*). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 54: 883-887.
- McEnroe, W. D. and J. Kot (1968) Evolution of OP resistance and fitness in a hybrid swarm of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Ann.*

- 森下正彦 (1992) 畦畔雑草からスイカ圃場へのハダニの移動. 応動昆 36: 25-30.
- 中尾弘志 (1992) 薬剤抵抗性チリカブリダニ (DAS系統) 利用による施設野菜ハダニ類の生物的防除に関する研究. 北海道農試報 78: 1-75.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ogita, Z. and T. Kasai (1965) A microtechnique for enzyme separation of individual spider mites with thin layer electrophoresis. *SABCO J.* 1: 117-120.
- 大橋弘和 (1984) 和歌山県におけるミカンハダニの薬剤抵抗性発達に及ぼす薬剤の輪用及び混用の効果. 果樹ハダニ類の薬剤抵抗性に関する研究. (岩田俊一・野村健一・奥代重敬・菅原寛夫・田中学・津谷武樹 編) 日本植物協会. 48-53pp.
- 刑部正博 (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.
- 刑部正博 (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.
- Osakabe, Mh. (1987) Difference of esterase isozymes between non-diapausing and diapausing strains of the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 22: 577-584.
- Osakabe, Mh. (1991) Genetic analysis of esterases in the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 26: 307-312.
- Osakabe, Mh. and Y. Sakagami (1993a) Estimation of genetic variation in Japanese populations of the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) on the basis of esterase allele frequencies. *Exp. Appl. Acarol.* 17: 749-755.
- Osakabe, Mh. and Y. Sakagami (1993b) Protein differences detected by two-dimensional electrophoresis among local populations of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 28: 497-502.
- Osakabe, Mh. and Y. Saito and Y. Sakagami (1993) Protein differences detected by two-dimensional electrophoresis in the species complex of *Schizotetranychus celarius* (Banks). *Exp. Appl. Acarol.* 17: 757-764.

- Overmeer, W. P. J. (1967) Genetics of resistance to tedian in *Tetranychus urticae* Koch. *Arch. Neer. Zool.* 17: 295-349.
- Overmeer, W. P. J. and R. A. Harrison (1969) Genetical studies of resistance to tetradifon in New Zealand populations of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *N. Z. J. Sci.* 12: 904.
- Overmeer, W. P. J. and A. Q. Van Zon (1973) Genetics of dicofol resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Z. Angew. Entomol.* 73: 225-230.
- Overmeer, W. P. J. and A. Q. Van Zon (1976) Partial reproductive incompatibility between populations of spider mites (Acarina: Tetranychidae). *Entomol. Exp. Appl.* 20: 225-236.
- Ozaki, K. and H. Koike (1965) Naphtyl acetate esterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler, with special reference to the resistant colony of the organophosphorus insecticide. *Appl. Entomol. Zool.* 9: 53-59.
- Ozaki, K., Y. Kurosu and H. Koike (1966) The relation between malathion resistance and esterase activity in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler. *SABCO J.* 2: 98-106.
- Parker, F. D. and V. J. Tepedino (1982) Maternal influence on diapause in the alfalfa leafcutting bee (Hymenoptera: Megachilidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 407-410.
- Parr, W. J. and N. W. Hussey (1960) Further studies on the reproductive isolation of geographical strains in the *Tetranychus telarius* complex. *Entomol. Exp. Appl.* 3: 137-141.
- Parr, W. J. and N. W. Hussey (1966) Diapause in the glasshouse red spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) : a synthesis of present knowledge. *Hort. Res.* 6: 1-21.
- Pasteur, N. and G. Sinigre (1975) Esterase polymorphism and sensitivity to dursban organophosphorus insecticide in *Culex pipiens* populations. *Biochem. Genet.* 13: 789-803.
- Potter, D. A., D. L. Wrensch and D. E. Johnston (1976a) Guarding, aggressive behaviour, and mating success in male two-spotted spider mites. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69: 707-711.
- Potter, D. A., D. L. Wrensch and D. E. Johnston (1976b) Aggression and mating

success in male spider mites. *Science* 193: 160-161.

Prabhakaran, S. K. and S. T. Kamble (1993) Activity and electrophoretic characterization of insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach. *J. Econ. Entomol.* 86: 1009-1013.

Prabhakaran, S. K. and S. T. Kamble (1994) Subcellular distribution and characterization of esterase isozymes from insecticide-resistant and -susceptible strains of German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 541-545.

Raina, A. K., R. A. Bell and W. Klassen (1981) Diapause in the pink bollworm: preliminary genetic analysis. *Insect Sci. Appl.* 1: 231-235.

Rizzieri, D. A., T. J. Dennehy and T. J. Glover (1988) Genetic analysis of dicofol resistance in two populations of the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from New York apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 81: 1271-1276.

Saito, T. (1993) Insecticide resistance of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphidae) VI. Qualitative variations of aliesterase activity. *Appl. Entomol. Zool.* 28: 263-265.

Saito, Y. (1979) Comparative studies on life histories of three species of spider mites (Acarina: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 14: 83-94.

Sara, V. (1990) Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. *Ann. Rev. Entomol.* 35:421-426.

Sawicki, R. M., A. L. Devonshire, A. D. Rice, G. D. Moore, S. M. Petzing and A. Cameron (1978) The detection and distribution of organophosphorus and carbamate insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulz.) in Britain in 1976. *Pestic. Sci.* 9: 189-201.

Schulten, G. G. M. (1966) Genetics of resistance to parathion and demeton-S-methyl in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina). *Genetica* 37: 207-217.

Sell, D. K., G. S. Whitt and W. H. Luckmann (1975) Esterase polymorphism in the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie): a survey of temporal and spatial allelic variation in natural populations. *Biochem. Genet.* 13: 885-898.

真梶徳純 (1975) クリにおけるトドマツノハダニの越冬卵産付時期と休眠誘起条件. 応動昆 19: 105-111.

- Sims, S. R. (1983) Inheritance of diapause induction and intensity in *Papilio zelicaon*. *Heredity* 51: 495-500.
- Slifer, E. H. and R. L. King (1961) The inheritance of diapause in greenhopper eggs. *J. Hered.* 52: 39-44.
- Sluss, T. P. and H. M. Graham (1979) Allozyme variation in natural populations of *Heliiothis virescens*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 317-322.
- Sluss, T. P., E. S. Rockwood-Sluss, R. Patana and H. M. Graham (1978) Dietary influenced allozyme differences between laboratory populations of *Heliiothis virescens*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 71: 367-371.
- So, P.-M. and A. Takafuji (1992) Local variation in diapause characteristics of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Oecologia* 90: 270-275.
- Stenseth, C. (1965) Cold hardiness in the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Entomol. Exp. Appl.* 8: 33-38.
- Sula, J. and F. Weyda (1983) Esterase polymorphism in several populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Experientia* 39: 78-79.
- Takada, H. (1979) Esterase variation in Japanese populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphidae) with special reference to resistance to organophosphorus insecticides. *Appl. Entomol. Zool.* 14: 245-255.
- Takada, H. (1986) Genotypic composition and insecticide resistance of Japanese populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hom., Aphidae). *Z. Angew. Entomol.* 102: 19-38.
- Takafuji, A. (1980) Population dynamics of some phytophagous mites and their predators on goldenrod *Solidago altissima* L. I. Seasonal trends in population numbers and spatial distributions. *Res. Popul. Ecol.* 21: 197-216.
- 高藤晃雄 (1992) ナミハダニの休眠性における変異(1). 植物防疫 46: 430-433.
- 高藤晃雄・井上雅央・小田道宏 (1989a) 奈良県に発生するナミハダニ個体群の休眠性. 応動昆 33: 134-139.
- 高藤晃雄・井上雅央・小田道宏 (1989b) 奈良県下のナミハダニの発生分布. 応動昆 33: 156-159.
- Takafuji, A. and M. Kamibayashi (1984) Life cycle of a non-diapausing population

- of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch in a pear orchard. *Res. Popul. Ecol.* 26: 113-123.
- Takafuji, A. and Y. Tsuda (1992) Coexistence of *Tetranychus urticae* with different diapause capacities: a mathematical model. *Exp. Appl. Acarol.* 14: 251-260.
- Takafuji, A., P.-M. So and N. Tsuno (1991) Inter- and intra-population variations in diapause attribute of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, in Japan. *Res. Popul. Ecol.* 33: 331-344.
- 武久喬・田中学 (1967) 寒天薄層電気泳動法によるミカンハダニ薬剤抵抗性の検定法について. 九州病害虫研報 13: 126-132.
- Tanaka, H. (1994) Geographic variation of embryonic diapause in the migratory locust, *Locusta migratoria* L. (Orthoptera, Acrididae), in Japan. *Jpn. J. Ent.* 62: 629-639.
- 田中学・井上晃一・喜多香理 (1972) ミカンハダニの薬剤抵抗性に関する研究. IX E1エステラーゼ活性泳動帯によるCMP剤(Phenkaptan)抵抗性の検定法に関する遺伝的実証. 園芸試報 D7: 39-44.
- 内田正人 (1980) ナシを加害する鳥取産ナミハダニとカンザワハダニの休眠誘起条件と休眠雌出現時期並びに越冬離脱時期. 応動昆 24: 175-183.
- 内田正人 (1982) ナシ園におけるハダニ類の発生と被害に関する研究、特に休眠性の生態的特性. 鳥取果試特報 2: 1-63.
- Taylor, E. A. and F. F. Smith (1956) Transmission of resistance between strains of two-spotted spider mites. *J. Econ. Entomol.* 49: 858-859.
- Van de Bund, C. F. and W. Helle (1960) Investigation on the *Tetranychus urticae* complex in Northwest Europe (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Exp. Appl.* 3: 142-156.
- Van Zon, A. Q., W. P. J. Overmeer and W. Helle (1964) Resistance to tedion in haploid and diploid offspring of *Tetranychus urticae* Koch. *Entomol. Exp. Appl.* 7: 270-276.
- Veerman, A. (1974) Carotinoid metabolism in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 47: 101-116.
- Veerman, A. (1977a) Aspects of the induction of diapause in a laboratory strain of the mite *Tetranychus urticae*. *J. Insect Physiol.* 23: 703-711.

- Veerman, A. (1977b) Photoperiodic termination of diapause in spider mites. *Nature* 266: 526-527.
- Veerman, A. (1980) Functional involvement of carotinoids in photoperiodic induction of diapause in the spider mite, *Tetranychus urticae*. *Physiol. Entomol.* 5: 291-300.
- Veerman, A. (1985) Diapause. *Spider mites. Their biology, natural enemies and control 1A* (eds. W. Helle and M. W. Sabelis). Elsevier, Amsterdam 279-316pp.
- Veerman, A. and W. Helle (1978) Evidence for the functional involvement of calotinoids in the photoperiodic reaction of spider mites. *Nature* 275: 234.
- Wagner, R. P. and R. K. Selander (1974) Isozymes in insects and their significance. *Ann. Rev. Entomol.* 19: 117-138.
- Ward, P. S., I. A. Boussy and D. E. Swincer (1982) Electrophoretic detection of enzyme polymorphism and differentiation in three species of spider mites (*Tetranychus*) (Acari: Tetranychidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 595-598.
- Young, S. S. Y., D. L. Wrensch and M. Kongchuensin (1985) Geographic variations and combining abilities in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Entomol. Exp. Appl.* 39: 109-113.