

ヘイケボタルとゲンジボタルの核型分析の試み

高見明宏(愛知県名古屋市)

TAKAMI, Akihiro (Nagoya, Aichi Pref.)

(Keywords: ゲンジボタル、ヘイケボタル、染色体数、核型分析、エアドライ法)

1. はじめに

ヘイケボタルとゲンジボタルの核型分析は、今井(1956)によって、広島県三次市産の2種の上陸幼虫を用いた、押しつぶし法によって行われた。その後、井上・山本(1987)が、愛媛県今治市付近の河川から採集した2種の上陸幼虫を用いて、今井(1956)と同じ方法で分析を行った。その結果、ヘイケボタルとゲンジボタルの染色体数は、 $2n=16$ (8種類の染色体が2本ずつある) と $2n=18$ であることが判明した。染色体は、すべて端部

動原体型(Levan et al, 1964)であった。また、2種のホタル類は、1対の性染色体を持ち、雌がXX型・雄がXY型であると報告された(図1)。

その後、ミトコンドリアを用いた遺伝学的解析が行われ、ヘイケボタルとゲンジボタルは、遺伝的に異なる地域個体群に分化していることが明らかにされた(吉川ほか, 2001; 吉川ほか, 2004; 日和・草桶, 2004; Suzuki et al, 2002; 鈴木浩文, 2003)。

しかしながら、ミトコンドリアを用いた解析で

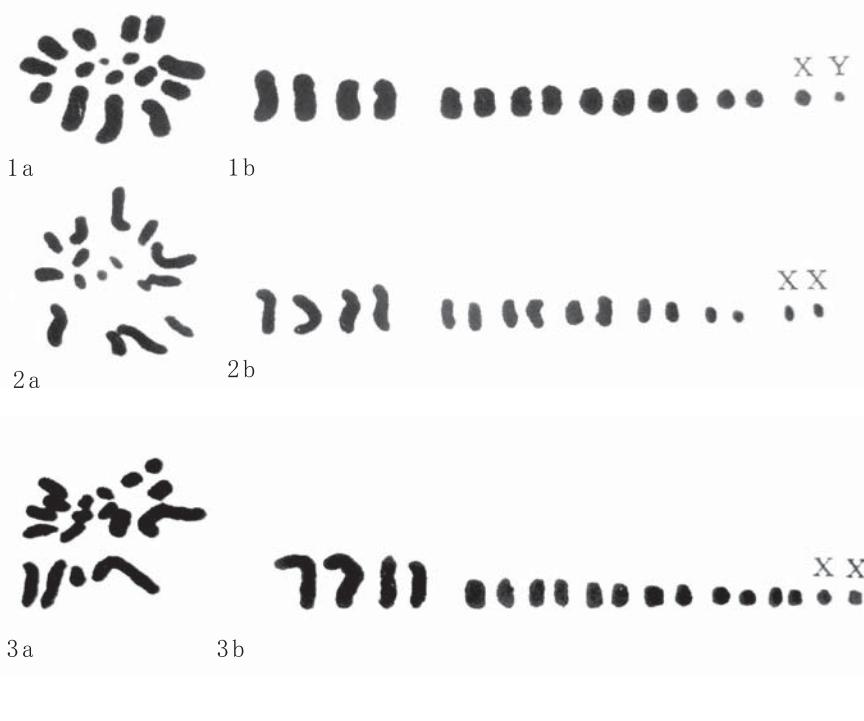


図1 ヘイケボタル(上・中)とゲンジボタルの核型(下)
なお、aは核型を、bはそれらを大きい順に並べたものを示す。
(井上・山本, 1987より引用)

は、分岐年代の推定はできるものの、同一種なのか、別種なのかを判別することはできない。

既報による核型分析では、西日本産ホタル類の上陸幼虫を用いて分析を行っており、大型で成熟した幼虫を得られるものの、降雨時の夜間に幼虫を採集することは、時間的に制約を受け、多数の地点での採集は難しい。また、これまでに、東日本産ホタル類の核型分析は行われていない。

本報では、室内で飼育されている幼虫を対象に、カワニナ類の染色体分析で用いられているエアドライ法（高見, 2013）による分析が可能かどうかを検討したので報告する。

2. 方法

核型分析に用いたのは、愛知県安城市産のヘイケボタル幼虫と愛知県岡崎市産のゲンジボタル幼虫の2令から4令の個体である。

2017年8月と9月に以下に示すカルノア固定を行い、顕微鏡観察は、2017年12月に行った。

幼虫を、 $5 \times 10^{-2}\%$ のコルヒチン水溶液（和光純薬製、一級：細胞分裂を途中で止める薬品）で満たした100mL容スチロール製管ビン中で約20時間個別飼育し、その後、0.065MのKCL溶液（和光純薬製、一級）中で30分間低張処理した後、カルノア固定液（メタノールと酢酸、3対1）で

15分間2回の固定処理を行った。新しいカルノア固定液と交換して100mL容のポリ容器に移し、-15°Cの温度条件で冷凍庫に保存した。

保存した試料から、解剖顕微鏡下でハサミとピンセットを用いて時計皿に、腹部の鰓と分泌腺を切り取り、50%酢酸溶液を数滴加え、解剖用ハサミを用いて一分間刻んだ。それにカルノア固定液を加えて、細胞懸濁液とした。40-45°Cに保温したホットプレート上に紙製キッチンタオルをのせ、その上に99%エタノール液に保管しておいたスライドガラス（各サンプル20-30枚）をよくぬぐって置き、その上にパストールピペットを用いて細胞懸濁液を滴下し、乾燥させた。そのスライドガラスを、4%ギムザ液（和光純薬製）を用いて20分間染色し、イオン交換水で水洗後、デシケータ内で24時間自然乾燥させた。

検鏡は、光学顕微鏡を用いて1000倍で行い、分裂中期にある腕のよく進展した染色体の写真を顕微鏡用デジタルカメラ（ニコン製、DS-Fi1）で試料1個体あたり20細胞以上を撮影した。種毎に、染色体数を計数すると共に、印画紙（KG版：1800倍）にプリントした映像を用いて染色体の腕長を測定し、その比率から各染色体の核型（Levan et al, 1964）を判定した。

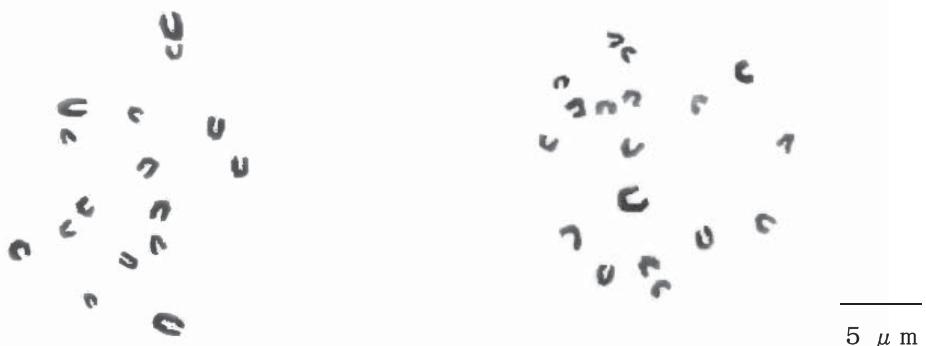


写真1 ヘイケボタル（左:2n=16）とゲンジボタルの染色体（右:2n=18）

3. 結果及び考察

ヘイケボタルとゲンジボタルの染色体を写真1に示す。

染色体数は、既報の通り、前者で $2n=16$ 、後者で $2n=18$ であった。また、染色体は、2種共に、すべて端部動原体型であった。さらに両種ともに2対のやや大型の染色体をもつことも確認された。つまり、本報の手法でも核型分析が可能であることが示された。愛知県産のヘイケボタルやゲンジボタルは、既報のミトコンドリアによる遺伝子解析では、広島県や愛媛県と同じ西日本型とされており、本報の結果もそれと同じであった。

4. 今後の課題

既報のミトコンドリアによる遺伝子解析の区分（東日本型・西日本型等）が、種内変異なのか、別種なのかを本法による核型分析によって判別可能となるかもしれない。ゲンジボタルの3秒型が、2秒型あるいは4秒型のどちらかに由来するかについても判断できるかもしれない。また、染色体がまだ分析されていない、クメジマボタルとの関係も明らかにできるであろう。

5. 引用文献

今井英夫（1956）ホタルと染色体. 遺伝, 10(8) : 32-35.
井上正志・山本秀行（1987）ホタル科の細胞学的

研究 I ヘイケボタルとゲンジボタルの核型. 染色体 II 45:1440-1443.

日和佳政・草桶秀夫（2004）ホタルの分子系統から見た地理的分布と遺伝的分化. 昆虫DNA研究会ニュースレター, (1) : 24-32.

Levan,A. • Fredga,A. • Sandberg,A.A. (1964) Nomenclature of centrometric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

高見明宏（2013）日本産河川棲カワニナ属3種の核型. *Venus* 71(1-2) : 97-103.

Suzuki, H. • Y. Sato • N. Ohba (2002) Gene diversity and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the Genji firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera:Lampyridae). Mol. Phylogenetic Evol., 22: 193-205.

鈴木浩文（2003）日本産水生ボタルの進化史. 月刊海洋, 35(9) : 623-629.

吉川貴浩・井出幸介・窪田康男・中村好宏・武部寛・草桶秀夫（2001）ミトコンドリアND5遺伝子の塩基配列から推定されたゲンジボタルの種内変異と分子系統. 昆虫ニュースシリーズ, 4 (4) : 117-127.

吉川貴浩・井出幸介・窪田康男・中村好宏・武部寛・草桶秀夫（2004）ミトコンドリアND5遺伝子の塩基配列から推定されたヘイケボタルの種内変異と分子系統. 昆虫ニュースシリーズ, 7 (1) : 11-20.