

対馬のトウヨウミツバチの系統的位置 —働き蜂の翅形態形質による多変量解析—

高橋 純一, 吉田 忠晴

はじめに

現在日本では、在来種のミツバチを使って養蜂を営んでいる地域はごく限られている。そのような中で、今日なお養蜂が盛んな地域の一つに長崎県対馬地方があげられる(図1)。現在のところ対馬で飼養されている蜂群数はおおよそ2000群ほどで、明治になって導入されたセイヨウミツバチ(*Apis mellifera*)を使った養蜂は全く行なわれていない(吉田, 2000)。また、対馬は地理的に日本と朝鮮半島の間位置する大陸島で、大陸由来の生物が生息しており生物地理学的にみても大変興味深い生物相をなしている地域でもある。これらの生物と同様にここに生息するミツバチは、日本本土に生息するニホンミツバチ(*A. c. japonica*)がどのように日本列島に侵入しその分布を広げてきたのかを明らかにする上で大変重要な地域のひとつである。なぜなら、過去に日本列島に進出し分布を広げる上でニホンミツバチの祖先は大きく3つのルートから侵入してきた可能性が予測される。ひとつは台湾から南西諸島を北上するルートで、もうひとつは沿海州から北海道を經由して南下するルート、そして朝鮮半島から対馬を經由して九州に侵入し南北に分かれるルートである。日本列島は最終氷期の後に起きた海面上昇によりユーラシア大陸と対馬および下北半島に海峡ができたことにより地理的隔離が生じ現在に至っているが、大陸集団から分化したと考えられるニホンミツバチの祖先種にあたる大陸由来のトウヨウミツバチの特徴を今もなお残している可能性があるからである。さらに、トウヨウミツバチの形態形質の比較解析を行い東南



図1 対馬で行なわれている伝統的な養蜂

アジア一帯に生息する本種を *A. c. cerana*, *A. c. indica*, *A. c. himalaya*, *A. c. japonica* の4亜種に分けた Ruttner によれば、対馬に生息するミツバチと本州に生息するニホンミツバチとの間で形態的に異なる特徴がいくつかあることを指摘している(Ruttner 1986)。また、ミトコンドリアDNAの制限酵素断片解析によっても対馬のミツバチは、本州や九州の集団よりも韓国の集団との類似性が高いことが明らかになっている(Deowanish et al., 1996)。これらの結果から推測すると、対馬に生息するミツバチは、ニホンミツバチよりもむしろ朝鮮半島から中国にかけて分布するトウヨウミツバチ(*A. c. cerana*)に系統的に近縁である可能性が推測された。

そこで今回我々は、韓国、対馬および本州、九州に生息するトウヨウミツバチの働き蜂の翅の形態形質の比較を多変量解析法という統計処理による解析を行ない、対馬に生息するミツバチが日本および韓国どちらの集団と類似性が高いのか、そしてどの程度集団間に形態変異が存在しているのかについて解析を行なった。



図2 標本の採集地域

材料及び方法

採集地点

解析に使用した働き蜂は1999年から2001年にかけて日本国内では7地域、長崎県対馬、熊本県八代市、福岡県博多市、山口県山口市、京都府宇治市、石川県小松市、埼玉県久喜市、また韓国では南原市からの合計8地域で、それぞれ自然営巣を行なっているコロニーから合計206個体の働き蜂を解析に使用した。サンプルの採集場所および個体数は図2に示した。

形質の測定法

各個体につき測定に使用した翅形態形質は、

表1 翅の11形態形質の平均値と略号

形質	略号	N	平均±標準偏差(mm)
前翅の長さ	FwL	206	8.79±0.181
前翅の幅	FwW	206	2.97±0.078
径室の長さ	RcL	206	3.16±0.072
径室の幅	RcB	206	0.41±0.024
翅室aのM _{3+4a} の第1脈節の長さ	M _{3+4a}	206	0.65±0.492
後翅の長さ	HwL	206	5.93±0.159
後翅の幅	HwW	206	1.63±0.058
翅鉤の長さ	EH	206	1.14±0.068
翅鉤の数	NH	206	18.27±1.292
径脈基部の長さ	ML	206	1.42±0.044
中央脈の長さ	VL	206	1.18±0.053

Ruttner(1978) と Verma and Matsu(1984) で使われてる部位のうち11形質を使用した。測定した形質の名称および略号を表1に、測定部位は図3に示した。また表1には各形質の平均値と標準偏差を示した。測定に使用した翅は、胴体から切り離しプレパラート標本を作製した後、双眼実体顕微鏡下に設置したマイクロメーターによって測定をした。以降の図表では、測定された形質に対して表1に示された略語を用いる。

統計処理

統計解析はJMP (SAS Institute, 1995) および Statistica (1997) を用いて行なった。全ての測定値は、自然対数に変換をした。形態形質を扱う場合、対数変換は以下の二つの点で不可欠である。対数化しない測定値を分析に用いると、集団感で形質のばらつきが同じであっても、分散値は平均値の差に影響されて異なる値をもつ。このような性質は集団間での等分散性を要求される解析に対して不都合である。そのため対数化することにより、各変量に対して平均値から独立した分散値を得ることができる。さらに対数化された変量の分散は測定尺度に影響を受けない。また正規分布を前提とした解析に用いるために、対数変換をおこなうと正規性からのずれに対して頑健ではない判別分析などにも好ましい結果をもたらす。そこで

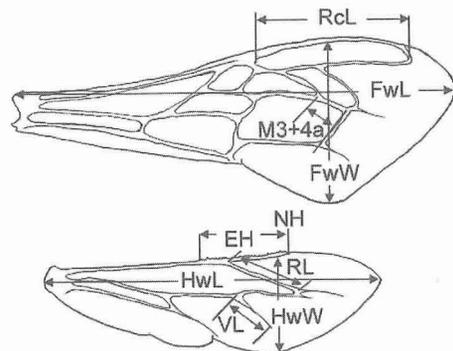


図3 トウヨウミツバチの翅の11形態形質の測定箇所

結果および考察

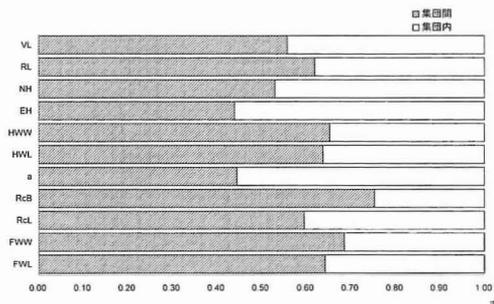


図4 11形質それぞれの集団内・間分散成分の相対比

まず全ての各集団において、対数化された各形態的変量が実際に正規分布に従うか否かを明らかにするために、対数化された全ての測定値(11形質×8集団)のそれぞれに対してSapiro-Wilkの正規性の検定を行なった。また、集団間の遺伝的分化を有無について類推するために形質の相関行列に基づいた主成分分析(principal component analysis)を行なった。そして集団間の形態的差異の程度を知るために判別分析(discriminant analysis)を行なった。この解析に先立って集団間で形質の分散共分散行列の同質性を検定し、有意な差が認められる場合には判別式に集団ごとの分散共分散行列が用いられ、認められない場合には全ての個体をプールした分散共分散行列を用いることにした。さらにこのような集団間の形態の相違に各形質がどれだけ寄与しているのかを知るために正準判別分析(canonical discriminant analysis)を行なった。主成分分析では全体のばらつきを最大化するのに対して正準判別分析は集団内のばらつきに対する集団間のばらつきを最大化する変量の全形質を線形結合することによって作成される。これらの翅の形態形質に類似した集団をグループ化する目的で階層的クラスター分析を行なった。集団間の形態類似度を示す距離係数にはマハラノビスの汎距離(Mahalanobis' generalized distance)を用いた。この値を全ての集団間で求めたのち、UPGMA法によって樹状図を作成した。

8集団の各11形質に対して、Sapiro-Wilkの正規性の検定を行なったところ、合計88変量のうち、72変量は(82%)正規分布から有意に異なることが明らかになった(有意水準 $P=0.05$)。したがって、正規性を前提にしたいくつかの解析は、こうしたデータに対して十分頑健性を示すと考えられる。集団間分散成分と集団内分散成分を各形質ごとに計算し百分率で示した(図4)。集団間分散成分と集団内分散成分の比は、RcBにおいて最も大きかった。この結果は、RcBが他の形質に比べて集団間で分化の程度がより大きいことを示している。また、EHと M_{3+4a} を除いたこの他の形質も集団内よりも集団間の方が相対的に大きな分散成分を示していることから、集団間の分化の解析に利用することができると考えられた。

主成分分析の結果を表2に示した。第1・第2主成分によって全体の46%が説明することができた(表2)。第1主成分の係数は11形質すべてにおいて正の値を示し、EH、 M_{3+4a} 、NHを除いた形質において大きな正の値を示している。この結果は、これらの形質の値が増加した場合、第1主成分スコアもそれに伴って増加することを示している。したがって第1主成分はサイズの指標になると考えられる。第2主

表2 トウヨウミツバチの働き蜂の11形質の相関係数から計算した各形質の主成分分析及び集団平均の結果

形質	第1主成分	第2主成分	集団	第1主成分	第2主成分
FwL	0.636	0.063	韓国南原市	-1.366	-0.518
FwW	0.792	0.434	埼玉県久喜市	0.471	0.146
RcL	0.757	0.135	福岡県博多市	0.428	0.484
RcB	0.701	0.444	石川県小松市	0.008	-0.185
M_{3+4a}	0.186	-0.115	京都府宇治市	1.033	-0.787
HwL	0.568	-0.558	山口県山口市	-0.265	-0.365
HwW	0.766	0.012	熊本県八代市	-0.438	0.714
EH	0.100	0.120	長崎県対馬	0.637	0.450
NH	0.260	-0.273			
ML	0.687	-0.140			
VL	0.474	-0.660			
説明済	3.814	1.276			
寄与率	0.347	0.116			

表3 マハラノビスの汎距離による判別分析から各集団に判別された個体数と正答率

集団	正答率(%)	韓国	埼玉県	福岡県	石川県	京都府	山口県	熊本県	対馬
韓国南原市	97.5	39	0	0	1	0	0	0	0
埼玉県久喜市	65.0	0	13	0	1	0	0	0	6
福岡県博多市	47.1	0	0	8	0	1	0	0	8
石川県小松市	80.0	1	1	0	16	1	1	0	0
京都府宇治市	70.0	0	0	0	1	14	2	0	3
山口県山口市	75.0	3	0	0	0	1	15	0	1
熊本県八代市	65.0	0	1	1	2	1	1	13	1
長崎県対馬	67.3	1	4	3	2	3	0	3	33

成分では、前翅の形質が正を後翅の形質が負を示す傾向がみられた。このことから、これらの形質は一般の翅サイズとは独立した形質で前翅に関連した主成分であると考えられた。つまり第2主成分は、前翅の形質と後翅の形質の相対的なばらつきを示していることが考えられた。表2には、第1・第2主成分スコアの集団平均値を示した。これらの値は、一元分散分析により、集団間で有意な差が見られた ($P < 0.01$)。この結果から集団間にはサイズだけではなく前翅と後翅の相対値にも集団間で変異が存在することが予測された。

8集団の間で分散-共分散行列に有意な差が認められなかったため、(χ^2 検定, 有意確率 $P = 0.09$)、判別分析では、こみにした分散-共分散行列を用いた。各集団の判別率は、47%から98%のメンバーが正しく本来の集団に判別さ

表4 トウヨウミツバチの働き蜂の11形質から計算した正準判別分析及び集団平均の結果

形質	第1正準変量	第2正準変量	集団	第1正準変量	第2正準変量
FwL	0.254	0.642	韓国南原市	-3.062	0.361
FwW	0.301	-0.139	埼玉県久喜市	1.077	0.821
RcL	-0.069	0.104	福岡県博多市	0.879	-0.144
RcB	0.647	-0.406	石川県小松市	-0.431	-0.555
M3+4a	-0.045	0.323	京都府宇治市	1.175	-0.198
HwL	0.282	0.441	山口県山口市	-0.881	-1.589
HwW	0.371	-0.154	熊本県八代市	0.259	1.721
EH	-0.046	-0.209	長崎県対馬	1.705	0.403
NH	-0.031	-0.379			
ML	0.010	0.316			
VL	-0.211	0.074			
固有値	2.943	1.129			
累積確率	0.591	0.818			

れた(表3)。この結果は、各集団の形態がわずかに重複しあっているものの、形態的な独立性をかなりの程度保有していることを示している。

正準判別分析の結果を表4に示した。はじめの2つの正準変量を示した。集団間のばらつきを最もよく示す第1正準変量としてはFwL, FwW, HwL, HwW, RcB, VLの係数が大きな値を示している。これらの値が集団間の形態的差異に最も強く寄与していることが推察された。その他の値は係数の絶対値が小さいことから、集団間の形態的差異に対する寄与度が相対的に低いことが推察された。この結果から第1正準変量スコアの大きい個体ほど、相対的に大きな前翅および後翅を持つことになる。第2正準変量ではFwL, M3+4a, HwL, MLが大きな正の値を、RcBとEH, NHが大きな負の値を示している。これらの形質間での相対的なサイズ増加のばらつきを示し、これらのサイズが集団間の類別に寄与することが推測された。表4には第1・第2正準変量スコアの集団平均値を示した。第1正準変量と第2正準変量による座標づけの結果を図5aに示した。図5bには、同じ集団内に属する個体は楕円で囲んだ(75%信頼限界)。75%信頼限界はミツバチの集団間の生態型や亜種間のグルーピングに使われている指標である(Ruttner 1988)。第1・第2正準変量ともに韓国を除いた日本の集団同士は互いに大きく重なりあっていた。一方韓国集団は、第1・第2正準変量ともに日本の集団とは大きく離れていた。また、地理的に近い対馬と韓国集団間は第1正準変量において最も離れていた。図6にはクラスター解析の結果を示し

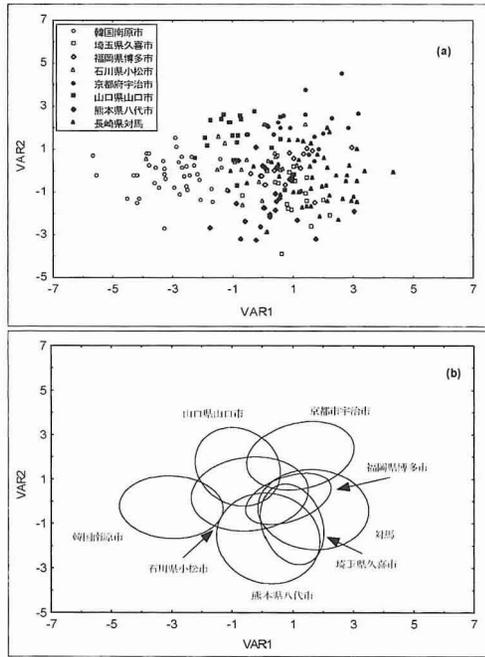


図5 (a) 第1・第2正準スコアに基づいた8集団の個体の散布図
(b) 第1・第2正準スコアに基づいた8集団ごとの区分け(75%信頼限界による)

た。8集団は、韓国と日本の集団の2つのクラスターに分かれた。しかしながら、日本集団の間には結合距離と地理的關係との間に明瞭な関係を見出すことはできなかった。韓国と対馬のあいだでも同様であった。今回の結果から、地域集団間における形態的類似度は地理的距離との明確な対応が見られなかった。

以上の結果から、トウヨウミツバチの働き蜂の翅形質には、多くの地理的変異的存在することがこれらの分析を通じて明らかになった。対馬と韓国に生息するトウヨウミツバチの間には、翅形質において一般的にミツバチの形態比較で用いられている亜種間レベルの差(75%)に値する大きな差異が検出された。これにより、対馬集団は韓国のトウヨウミツバチとは形態的に異なることが明らかになった。また、翅形質のいくつかは集団間で大きくばらついており、とくに RcB は集団を分ける重要な形質となっていた。しかしながら、今回の解析では集団間の形質と地理的距離の間には一貫した傾向を見出すことができなかった。また韓国と対馬の集団の間には、ミトコンドリアDNAの制限酵素断片解析で得られたような近縁性を支持する結果は得ることができなかった一方で対馬集団は、翅形質において日本本土のニホンミツバチの集団と極めて形態的類似性が高いことが今回の結果から明らかになったため、対馬のミツバチはニホンミツバチ亜種のグループに含めることが妥当であると考えられた。以前に Ruttner (1988) が少数の標本に基づいて行なった多変量解析による結果では、対馬集団が日本の本土集団とは形態的に異なり少なくとも生態型として扱うことを提起していたが、今回の我々の結果からはこれを支持することができな

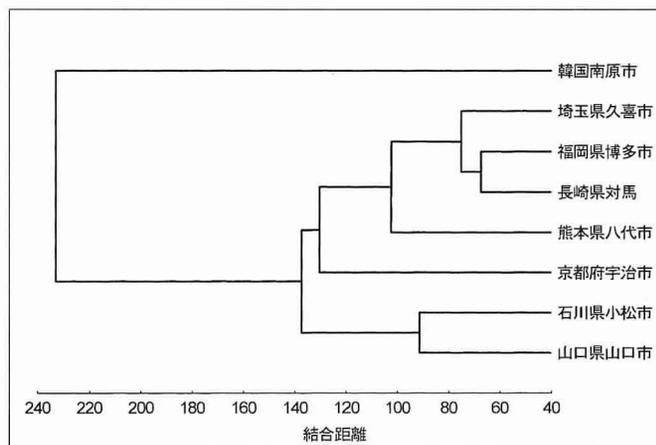


図6 マハラノビスの汎距離に基づいた8集団のUPGMA法によるクラスター分析

かった。しかしながら、ミトコンドリア DNA の非制限領域の塩基配列の比較解析からは、対馬集団には日本本土の集団と異なるハプロタイプが存在している (Takahashi et al., submitted) ことから、対馬集団を生態型として扱うかどうかに関しては今後更に多くの形態形質を用いた解析と分子レベルでの解析による検討が必要である。これまでもニホンミツバチの集団間の地理的変異に関する研究は、いくつか行なわれてきたがそれらは少数の標本であったり、あるいは個々の形質を個別に比較解析したものであったため、ミツバチの集団間の変異パターンを明らかにするには不十分であった (Akahira and Sakagami 1959a, b, c; 岡田ら, 1956; Ruttner 1986; 1988)。なぜなら、ミツバチは高度に社会化された組織であり、環境の変化に対して自ら調節する能力を持つことから、他の昆虫類よりも環境的な影響を受けにくいことが推測される。このようなミツバチの微少な地理的変異を検出する研究に対しては、多変量解析法は非常に有効であることから、今後更にこのような問題に対してこれらの解析法を用いた研究が進展することが期待される。

謝 辞

北海道大学の秋元信一博士、東京大学の立田晴記博士、大野豪氏には解析を進める上で有益な助言をしていただいた。また、標本を採集するにあたりソウル大学の K. S. Woo 教授、北海道大学の広永輝彦氏、養蜂家の福田道弘氏、野口耕治氏、大浦勝毅氏、竹谷源太郎氏、富沢章氏には大変お世話になった。この場をかりてお礼申しあげたい。

(高橋: 〒194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1 玉川大学大学院農学研究科昆虫学研究室, 吉田: 玉川大学ミツバチ科学研究施設)

引用文献

- Akahira, Y. & S. F. Sakagami 1959a. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ.10(2): 353-362.
 Akahira, Y. & S. F. Sakagami 1959b. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool. 14:175-184.

- Akahira, Y. & S. F. Sakagami 1959c. Annotationes. Zoologicae. Japanese. 32(1): 35-42.
 Dewonish, S., J. Nakamura, M. Matsuka and K. Kimura 1996. Apidologie 27:407-413.
 Mattu V. K. & L. R Verma. 1984. J. Apic. Res. 23(1):3-10.
 岡田一次, 酒井哲夫, 長谷川操. 1956. 昆虫 (2): 145-154.
 Ruttner, F. 1986. ミツバチ科学 7(1): 1-4.
 Ruttner, F. 1988. Biogeography and taxonomy of honey bees. Springer-Verlag. Berlin. 284pp.
 吉田忠晴. 2000. ニホンミツバチの飼育法と生態. 玉川大学出版部. 東京. 135pp.

JUN-ICHI TAKAHASHI¹⁾ and TADAHARU YOSHIDA²⁾. Phylogenetic position of Tsushima Island honeybee-Multivariate analysis using wing morphological characters of the worker-. *Honeybee Science* (2002) 23(3): 115-120. 1) Laboratory of Entomology, Graduate School of Agriculture, Tamagawa University, 2) Honeybee Science Research Center, Tamagawa University, Machida, Tokyo, 194-8610 Japan.

Tsushima Island honeybee is continental Island between South Korea and Japan. A phylogenetic position of this honeybee unrevealed that belong to either ecotype of *Apis cerana japonica* or *A. cerana* from South Korea, and that this island honeybee is a key to investigate origin Japanese honeybee *A. c. japonica* on biogeography. We examined morphological differentiation between eight population of *Apis cerana* with worker's wings using multivariate morphometrics. Principle component analysis and factor analysis showed that eight populations differed significantly from one another on 75% confidence limited level. Discriminant analysis showed that 47-97% of population members were correctly classified into the original populations. An UPGMA dendrogram constructed from a cluster analysis are shown two branches, one that consist of the Tsushima island and the other Japanese populations, and the other that consist of the only South Korea population. These results suggest that Tsushima island population combines the subspecies *A. c. japonica*.