

PCR-RFLP によるミカンコミバエ種群 *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) の識別

II. *B. dorsalis* complex (フィリピン産個体群) と *B. dorsalis* (台湾産個体群) の遺伝的変異

中原 重仁・加藤 治夫・金田 昌士・杉本 民雄

横浜植物防疫所

村路 雅彦

蚕糸・昆虫農業技術研究所

Identification of *Bactrocera dorsalis* complex species (Diptera: Tephritidae) by PCR-RFLP Analysis II. A Study of genetic variation in *B. dorsalis* complex (Philippines population) and *B. dorsalis* (Taiwan population). Shigehito NAKAHARA, Haruo KATO, Masashi KANEDA, Tamio SUGIMOTO (Yokohama Plant Protection Station), Masahiko MURAJI (National Institute of Sericultural and Entomological Science). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 37: 71-75 (2001).

Abstract: PCR-RFLP analysis was performed using a 1.6 kb portion of the mitochondrial D-loop and flanking regions obtained from 82 individuals of Philippines population of *B. dorsalis* complex and 79 individuals of Taiwan population of *B. dorsalis*. The amplified fragment was digested with three restriction enzymes and its electrophoretic pattern was investigated. As a result, 2, 7, and 10 different banding patterns were detected from analyses using enzymes *Sau* 3A I, *Dra* I, and *Ssp* I, respectively, indicating genetic heterogeneity in both of the two populations. Of 17 patterns detected using *Dra* I and *Ssp* I, only two were shared between the two populations. When the results of PCR-RFLP analyses performed using three enzymes were combined, it was revealed that there is no common haplotype between Philippines population and Taiwan population.

These results suggested that each of species have unique nucleotide sequences in mtDNA analyzed in this study.

Key words: *Bactrocera dorsalis* complex, PCR-RFLP, mitochondrial DNA, D-loop, genetic variation

緒 言

Bactrocera 属のミバエ類は、東南アジアと太平洋地域を中心に生息し、これまでに500種以上が知られている (WHITE & HANCOCK, 1997)。このうちのミカンコミバエ種群 *Bactrocera dorsalis* complex はミカンコミバエ *Bactrocera dorsalis* とその同胞種66種以上からなり、経済的重要害虫とされるものも少なくない (DREW & HANCOCK, 1994)。一部の種についてはベニスと産卵管の長さによる簡易な識別法も報告されているが (IWAHASHI, 1999, IWAIZUMI, 1997), 近似種が多いこと、形態的特徴に個体差があることなどから種の同定が困難な場合が多い。一方日本では、ミカンコミバエは1986年に根絶されたが (YOSHIZAWA, 1997, 那

覇植物防疫事務所, 1986, 沖縄県ミバエ対策事業所, 1996), その後も毎年侵入警戒調査トラップにミカンコミバエ種群の昆虫が誘殺されており、ミカンコミバエまたはその近縁種の侵入の危険性が指摘されている。これらの侵入源、侵入経路については様々な議論がなされているが、いまだ解明されていない。以上のことからわれわれは、外部形態に替わる、より正確な種および系統の識別のための指標を開発することを目的として PCR-RFLP による DNA 多型の応用について検討してきた。これまでの累代飼育虫を用いた解析では、ミカンコミバエのミトコンドリア DNA (mtDNA) の D-loop 領域の塩基配列にはいくつかの遺伝的変異があることが確認され、またそれらは系統解析のためのマーカーとして利用できる可能性が示唆

された(中原ら 1999)。しかし、同一地域内での変異の程度、それらの出現頻度については不明であった。本調査では、横浜植物防疫所成田支所の輸入検疫現場で発見された台湾とフィリピンのミカンコミバエ種群を対象として mtDNA の D-loop region の RFLP 解析を行い、個体群における遺伝的多様性を調べた。これらの結果をもとに、PCR-RFLP の種や個体群の識別への応用について検討した。本文に先立ち供試虫の収集に御協力いただいた成田支所第 1 PTB 及び第 2 PTB 旅客担当の皆様にお礼申し上げる。

材料及び方法

供試虫

1997年から1999年の間に横浜植物防疫所成田支所において、フィリピン産輸入禁止品から発見されたミカンコミバエ種群 83頭及び台湾産の輸入禁止品から発見されたミカンコミバエ97頭を用いた。フィリピン産個体は3種類の生果実計13件から発見された雌個体であり、形態による種識別を試みたが困難な個体も多く、全体をフィリピン産個体群として扱った。これらは一時凍結で保存した後、99.5%以上の濃度のエタノールに保存した。台湾産個体は5種類の生果実計10件から発見された雌雄の個体であり、乾燥標本として保存されていたものを使用した。

DNA 抽出

PCR に用いた DNA は、種同定のため腹部を切除した虫体の一部を材料として、個体ごとにアマシャムファルマシア社製の DNA 精製キット (Genomic Prep Cell & Tissue DNA Isolation Kit) を用いて抽出した。得られた DNA は、個体ごとに200 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。

PCR

PCR による DNA の増幅は反応容量を20 μ l とし、各反応ごとに昆虫 DNA 1 μ l, TaqDNA ポリメラーゼ(宝酒造) 0.15 μ l, dNTP 混合液 (2.5mM) 1.6 μ l, 10 $\times$ PCR 緩衝液2.0 μ l, および2種類の PCR プライマー (10pmole/ μ l) 各0.5 μ l を加えた。PCR プライマーは一般に用いられているミトコンドリア DNA 増幅用のユニバーサルプライマー (5' TGGGGTATGAACCCAGTAGC3') (SIMON *et al.* 1994) とミバエ用に新たに合成したプライマー (5' TAGGGTATCTAATCCTAGTT3') (村路, 未発表) を使用した。DNA の増幅反応はアステック社製のプログラムテンプコン

トロールシステム PC-800を用いて行い、90℃, 5分の熱変性のあと、熱変性90℃, 30秒, アニール52℃, 30秒および伸長65℃, 1分30秒の各ステップを30回繰り返す、さらに65℃, 5分の伸長反応を行なった後4℃で保存した。得られた PCR 産物は1.5%アガロースゲルを用いて DNA サイズマーカー (ライフテックオリエンタル社) とともに電気泳動し、目的とする大きさの DNA が増幅されていることを確認した。なお、泳動用緩衝液には1 $\times$ TBE 緩衝液 (0.45M Tris, 0.45M ホウ酸, 0.5M EDTA, pH8.4) を用いた。

PCR 産物の制限酵素による切断

PCR によって増幅された DNA について3種類の制限酵素 (*Dra* I, *Sau* 3A I, *Ssp* I) (ニッポンジーン社) のそれぞれによる断片パターンを調べた。制限酵素処理は反応容量を10 μ l とし、1反応ごとに1.5ml のサンプリングチューブに PCR 産物 3 μ l, 制限酵素 0.5-1.0 μ l, 10 $\times$ 緩衝液1.0 μ l (ニッポンジーン社), および滅菌蒸留水5.5 μ l を加え、ウォーターバスを用いて37℃で2時間保温した。得られた試料は100bp ラダー (ライフテックオリエンタル社) とともに3.0%のアガロースゲル (MetaPhor TM Agarose, FMC Corp.) で電気泳動したのち、エチジウムブロマイド (0.5 μ g/ml) で染色し、紫外線ランプ (230nm) のもとで写真撮影した。電気泳動条件は80-70V で2時間30分~3時間とした。

結果及び考察

PCR による DNA 増幅

2組のプライマーを用いた PCR によって、フィリピン産個体では供試した83頭のうち82頭から、台湾産個体では97頭のうち79頭から12SrRNA の一部、D-loop region の全域および数個の tRNA を含む、約1.6kb のミトコンドリア DNA 断片が増幅された。台湾産ミカンコミバエ97頭のうち18頭から DNA が増幅されなかった理由については、サンプルが乾燥後2年経過しており、DNA が損傷していたことが考えられる。

制限酵素による RFLP 解析

1) 3種類の制限酵素による RFLP パターン

Table 1 に *Dra* I, *Sau* 3A I, *Ssp* I のそれぞれの制限酵素処理によって検出されたバンドパターンと、DNA サイズマーカーとの比較により推定された各制限断片の長さを示す。本表では、識別が困難な0.1kb 以下のバンドは省略した。また、両個体群における各々

Table 1. The electrophoretic patterns, numbers and lengths of restriction fragments of D-loop region after treatment with 3 restriction enzymes.

Restriction enzymes	Recognition sequence	Type	Number of fragments	Restriction fragments lengths(kb)						
<i>Dra</i> I	TTTAAA	A	4	0.53,	0.37,	0.33,	0.21,	0.10		
		B	4	0.37,	0.33,	0.21,	0.16,	0.10		
		C	4	0.38,	0.34,	0.32,	0.21,	0.10		
		D	4	0.37,	0.33,	0.21,	0.13,	0.10		
		E	4	0.37,	0.24,	0.21,	0.16,	0.10		
		F	3	0.50,	0.37,	0.21,	0.10			
		G	4	0.46,	0.37,	0.31,	0.21,	0.10		
<i>Sau</i> 3 A I	GATC	A	4	0.48,	0.46,	0.40,	0.21,	0.10		
		B	3	0.60,	0.48,	0.46,	0.10			
<i>Ssp</i> I	AATATT	A	7	0.31,	0.26,	0.24,	0.15,	0.13,	0.11,	0.10, 0.10
		B	7	0.31,	0.26,	0.21,	0.15,	0.13,	0.11,	0.10, 0.10
		C	6	0.35,	0.31,	0.26,	0.15,	0.13,	0.10,	0.10
		D	6	0.31,	0.28,	0.26,	0.21,	0.11,	0.10,	0.10
		E	6	0.47,	0.26,	0.24,	0.11,	0.10,	0.10	
		F	5	0.47,	0.37,	0.21,	0.17,	0.13,	0.10	
		G	5	0.47,	0.32,	0.26,	0.13,	0.10,	0.10	
		H	6	0.47,	0.28,	0.21,	0.13,	0.11,	0.10,	0.10
		I	4	0.47,	0.39,	0.36,	0.13,	0.10		
		J	6	0.48,	0.26,	0.18,	0.13,	0.11,	0.10,	0.10

Fragments sizes are approximate, estimated by direct comparison to the 100 bp ladder resolved by agarose. The number of fragments indicate above 0.1kb, below the it was omitted.

のバンドパターンの出現頻度を Fig 1 に示した。*Dra* I と *Ssp* I では解析に用いた全ての個体よりそれぞれ 7 種類と 10 種類のバンドパターンが検出された。各々の制限酵素を用いた解析で、タイプ B のバンドパターンを示す個体は、フィリピン産個体群と台湾産個体群の両方で認められたが、これらを除く他の全てのバンドパターンは、いずれか一方の集団に特異的に検出された。フィリピン産個体群の *Dra* I による処理では、B と G の 2 タイプが認められ、いずれも 4 本の明瞭な DNA バンドを示した。タイプ B の出現頻度は 70.7% であった。これに対し台湾産個体群では 6 タイプが認められ、このうちタイプ A が最も多く 59.5%、次いでタイプ B が 21.5% であった。また、タイプ C ~ F の出現頻度はいずれも 10% 未満であった。

また、B, D, E, および F の各タイプでは DNA 断片の合計サイズが実際の PCR 産物の合計サイズより著しく小さいこと、また 0.37kb のバンドが他のバンドよりも太く明瞭に検出されたことから、同一サイズの DNA 断片が複数存在すると考えられた。

Ssp I を用いた解析では、フィリピン産個体群では

A, C, D の各タイプを除く 7 種類のバンドパターンが検出され、このうちタイプ E を示す個体が最も多く 48.8%、次いでタイプ B と F が 20.7% であった。また、タイプ G ~ J の出現頻度はそれぞれ 10% 未満であった。一方、台湾産個体群では、タイプ A が最も多く 77.2%、次いでタイプ B が 11.4%、タイプ C は 10.1%、タイプ D は 1.3% であった。

Sau 3 A I による DNA 多型検出感度は低く、フィリピン産個体群では全ての個体、台湾産個体群では 88.6% の個体がタイプ A を示した。

2) 3 種類の制限酵素によるハプロタイプ

3 種類の制限酵素を用いたバンドパターンの検出結果を組み合わせることにより、個体ごとのミトコンドリア DNA のハプロタイプを決定し、各ハプロタイプの出現頻度を比較した (Fig2.)。その結果、フィリピン産個体群では BAE の組み合わせが 48.8% と最も多く、次いで BAB と GAF が 20.7% であり、この 3 種のハプロタイプが全体のおよそ 90% を占めた。これに対し台湾産個体群では AAA が最も多く 57%、次いで

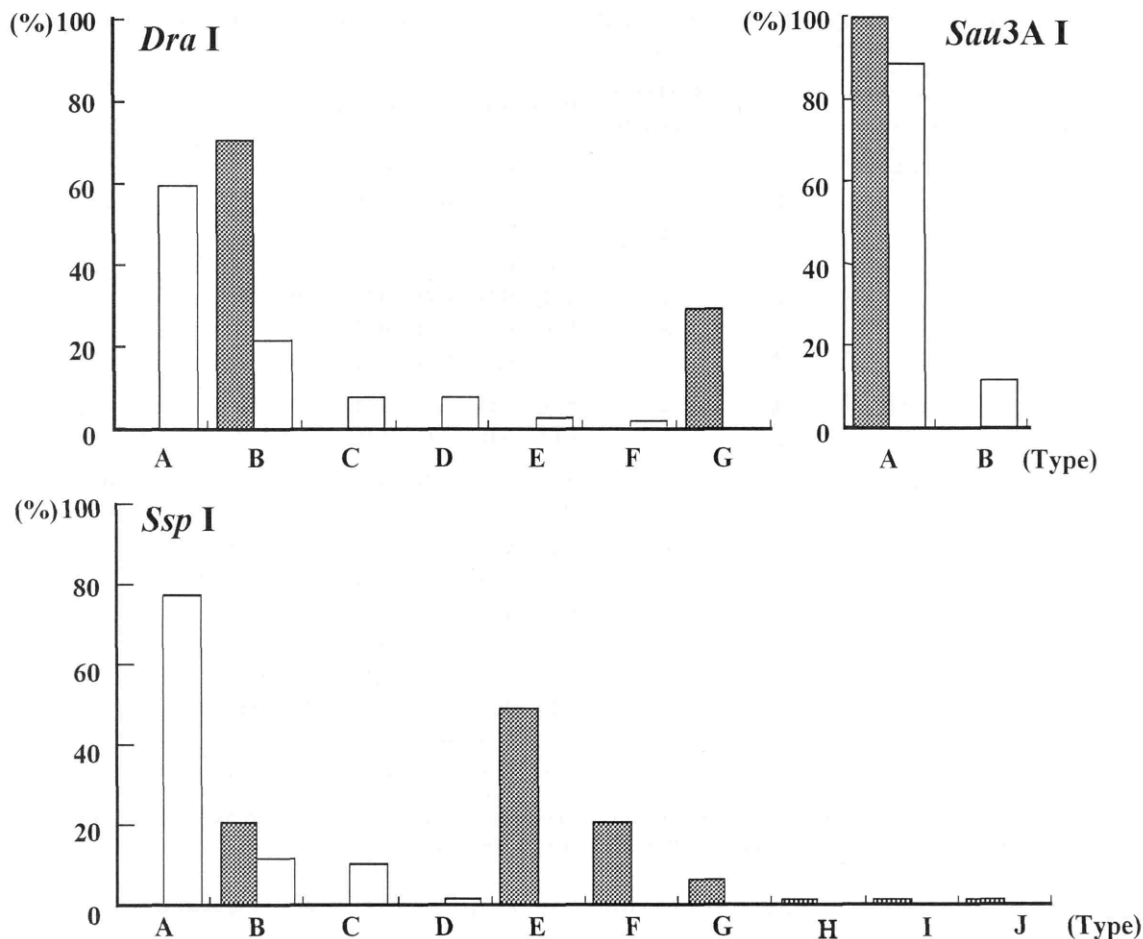


Fig 1. Comparison of frequencies of restriction patterns treated with 3 enzymes between two populations.
 ■: Philippines population □: Taiwan population

BAA が17.7%, CAC と DAB が7.6%であった。これらのハプロタイプでフィリピン産個体群と台湾産個体群に共通するものは認められなかった。また、台湾産個体群はフィリピン産個体群よりハプロタイプの種類が多く、遺伝的に多様な個体を含んでいることが明らかとなった。

今回の調査では、フィリピンのミカンコミバエ種群には同一地域にミトコンドリア DNA 塩基配列に遺伝的多型をもつ個体が存在することが明らかとなった。また、これらの2集団の間では、3酵素によるハプロタイプに共通するものがないことから、台湾及びフィリピン産個体群の間では過去にミバエの遺伝的交流はほとんどないか、あるいは頻度が著しく低いことが示唆された。また、このことは mtDNA の D-loop の PCR-RFLP がミカンコミバエ種群の個体群の識別に利用

できる可能性も示唆している。しかしながら、今回用いたサンプルは旅客によって持ち込まれた果実から発見されたものであり、産地等の詳細なデータがなく、フィリピン産個体群全体のハプロタイプをどの程度カバーしているかについては不明である。また、フィリピンには *B. philippinensis* と *B. occipitalis* の2種が分布するとされるが、形態による識別が困難であったことから種とハプロタイプとの関係を明確にすることはできなかった。フィリピン個体群については再度2種の識別を試みハプロタイプとの関係を調査するとともに、種識別における他領域の利用の可能性についても調査を行う予定である。

G. E. GASPERICH ら (1997) は NADH デヒドロゲナーゼのサブユニット遺伝子について、また、M. HE and D. S. HAYMER (1999) は核の G6pdh 遺伝子に

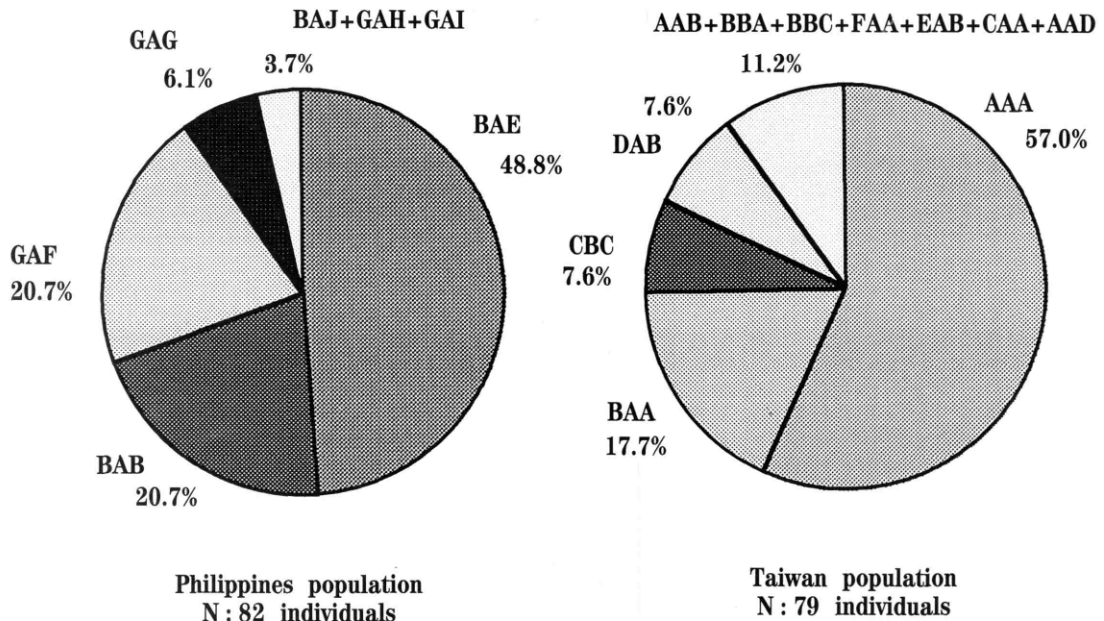


Fig 2. Frequency of haplotypes determined combining the results of PCR-RFLP analyses performed using three different restriction enzymes. Sequence of the alphabet follows restriction enzymes, *Dra* I - *Sau*3A I - *Ssp* I.

ついて、世界各地のチチュウカイミバエのサンプルを解析し、種内変異のパターンを基に分布拡大経緯および侵入源を推定している。同様の解析をミカンコミバエ種群の昆虫に適用するためには、分布地域全域についてのデータを集積することが不可欠である。今後はフィリピン、台湾のより多くの地域に由来する個体についてのデータを蓄積するとともに、東南アジア各地の各種個体群について解析を進めることにより、ミカンコミバエ種群の侵入時における侵入源推定技術としての実用化をはかりたい。

引用文献

- DREW, R.A.I., and D.L. HANCOCK. (1994) The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Asia. *Bull. Entomol. Res.* 2: 68 (supple.2).
- IWAIZUMI, R., KANEDA, M., and O. IWAHASHI (1997) Correlation of length of terminalia of males and females among nine species of *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) and differences among sympatric

- species of *B. dorsalis* complex. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90(5): 664-666.
- GASPERICH, G.E., G.S. JANISETE, H. HO-YOEN, A.M. BRUCE, J.S. GARY and S.S. WALTER (1997) Population Genetic Structure of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) and Implications for Worldwide Colonization Patterns. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90(6): 790-797.
- M. HE and D.S. HAYMER (1999) Genetic relationships of populations and the origins of new infestations of the Mediterranean fruit fly. *Molecular Ecology* 8: 1247-1257
- 中原重仁, 真崎誠, 金田昌士, 杉本民雄, 村路雅彦 (1999) PCR-RFLP によるミカンコミバエ種群 *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae: Dacinae) の識別 I. ミトコンドリア DNA の D-loop の解析 植防研報36
- 那覇植物防疫事務所 (1986) 八重山群島におけるミカンコミバエ駆除確認調査の記録 p71
- O. YOSHIZAWA (1997) Successful eradication programs fruit flies in japan. *Res. Bull. Prot. Japan* Supplement to No.33: 1-10
- 沖縄県ミバエ対策事業所 (1996) ミカンコミバエ根絶後の再侵入と対策 p166