

PCR-RFLPによるアリモドキゾウムシ *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae) のミトコンドリアDNAにおける遺伝的変異

祐成 忍・宮崎 勲・山本卓司・箕浦和重¹⁾

那覇植物防疫事務所,

¹⁾ 名古屋植物防疫所中部空港支所

PCR-RFLP for a Study of Genetic Variation of Mitochondrial DNA in Sweet Potato Weevil *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). Shinobu SUKENARI, Isao MIYAZAKI, Takuji YAMAMOTO and Kazushige MINOURA¹⁾ (Naha Plant Protection Station, 2-11-1 Minato-machi, Naha-shi, Okinawa 900-0001, Japan. E-mail: sukenaris@pps.go.jp. ¹⁾ Chubu Airport Sub-station, Nagoya Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **45**: 53-58 (2009).

Abstract: The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to detect differences of genetic variation in the mitochondrial DNA containing region from the cytochrome oxidase gene subunit I (COI) to subunit II (COII) of sweet potato weevil *Cylas formicarius*. Insect samples were collected from the Ryukyu Islands, the Ogasawara-Islands and Taiwan. These samples were categorized into nine haplotypes which were derived from the PCR-RFLP technique with two pairs of Primer and five restriction enzymes (*Hinc* II, *Dra* I, *Msp* I, *Nde* I and *Mbo* II). Six haplotypes were detected in the Ryukyu Islands, and only one haplotype different from Ryukyu was detected in the Ogasawara-Islands. Ogasawara samples were classified into an independent group. This result suggests that this method can be used as detect the rough invasion source and as an application to detect the differences between wild and sterile insects in eradication project.

Key words: PCR-RFLP, *Cylas formicarius*, genetic variation, mitochondrial DNA

緒 言

アリモドキゾウムシ *Cylas formicarius* (Fabricius) はサツマイモの重要害虫であり、*Ipomoea* 属を中心に30種以上のヒルガオ科植物を加害することが知られている (SUTHERLAND, 1986)。本種はアジア、南北アメリカ、大洋州など世界的に広く分布しているが、日本国内では小笠原諸島、トカラ列島および南西諸島のみに分布している。このため我が国では、本種の侵入・まん延を防止するため植物防疫法により海外の本種発生地域からの寄主植物の輸入を禁止しているだけでなく、国内の発生地域から未発生地域への寄主植物の移動も制限している。

しかし、近年未発生地域である高知県や鹿児島県本土において本種が発見されたことや (藤本ら、2000; 伊藤ら、1999)、本州の一部においても本種の定着が可能であると推定されるなど (杉本ら、2007)、その侵入・まん延のリスクは高いといえる。従って、発生地域外で本種が発見されるなど侵入が疑われる事例が生じた場合に、侵入源ならびにその経路を検出する手法を確立することは検疫上重要である。

同一種内の系統や外見での見分けが困難な近縁種を識別する手法として、しばしば遺伝的変異が利用されてきた。TODA and MURAI (2007) はネギアザミウマ *Thrips tabaci* についてミトコンドリアDNA (mtDNA) のCOI

領域を用いて系統間における遺伝的差を明らかにしており、MURAJI and NAKAHARA (2002) は18種類の *Bactrocera* 属ミバエについて、mtDNAの16Sから12SリボゾームRNAにかけての領域を対象にしたPCR-RFLP法での分類法を示している。本種に関しても、分布地域ごとの個体群間に遺伝的変異が認められるのであれば、その地理的分布を把握することで未発生地域への侵入時にその経路を特定できる有用な手法となりうる。

一方、国内の既発生地域では不妊虫放飼法を中心とした本種の根絶事業が試みられているが、不妊虫と野生虫の区別をするための有効なマーキング手法が確立されておらず、事業の推進における技術的な課題となっている。仮に、遺伝的変異の把握により対象地域の野生虫とは異なる遺伝系統を大量増殖し、不妊虫として放飼することができれば、野生虫と不妊虫を識別する手段として利用できる可能性がある。

ミトコンドリアDNAは核遺伝子と比較して分子進化が速く、種内であっても塩基配列の多型を示す領域が多いため、集団遺伝学的解析に用いられることが多い。また、母性遺伝であるため、解析が比較的容易である。

そこで本研究は、mtDNAのCOIからCOIIにかけての領域を調査し、PCR-RFLP法により本種個体群の遺伝的差を識別可能か明らかにすることを目的とした。

本文に先立ち、小笠原産アリモドキゾウムシの収集にご

尽力いただいた国土交通省小笠原総合事務所の佐藤慎祐氏および、平本貴志氏に厚く御礼申し上げます。また、PCR産物のダイレクトシーケンスをおこなっていただいた横浜植物防疫所種苗担当LMOチーム宿谷珠美氏および、内山 修一氏にも厚く御礼申し上げます。

材料および方法

1. 供試虫

供試虫として2003年から2008年にかけて沖縄諸島、宮古諸島、八重山諸島、小笠原諸島および台湾から採集された成虫を用いた (Table 1)。これらは主としてフェロモントラップ (アリモドキコール、サンケイ化学社製) を用いて採集したほか、サツマイモやノアサガオなどの寄主植物内から採集した。供試虫のうち、台湾産の1個体については、台湾からの旅客が那覇空港に持ち込んだサツマイモより得たため、国名以下の詳細な産地は不明とした (Table 1)。採集した虫体は全てDNAの抽出まで70～90%のエタノールに浸漬した後、-20℃で保存した。

2. DNA抽出、PCRおよび塩基配列の決定

DNAの抽出は虫体の全体を用いてGenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Biosciences社製) で行い、200 μ lの滅菌水に溶解した。RFLP解析で使用するプライマーおよび制限酵素の決定のためのダイレクトシーケンスではプライマー ARICO-1CO2F-1 (5'-TTAGTTCCTCTAATACT) およびプライマー ARICO1CO2R-1 (5'-TTTGCTTGTTAAGACG) (いずれも箕浦ら、未発表) を用い、反応液は1.0 μ lの鋳型DNA溶液、Premix Taq (ExTaq version) (タカラバイオ社製) 25 μ l、2種のプライマー (10 pmol/ μ l) 各1.0 μ lを混合し、滅菌水で容量50 μ lになるように調整した。PCR反応にはプログラムテンプコントロールシステム (PC-818、アステック社製) を用い、92℃ 5分の熱変性の後、熱変性92℃ 60秒、アニーリング48℃ 30秒および伸長72℃ 1分30秒の各ステップを40回繰り返すプログラムとした。得られた反応溶液は1.5% Agarose S (ニッポンジーン社製) を用いて100 bp ラダー (タカラバイオ社製) とともに電気泳動し、目的とするサイズのDNAが増幅されていることを確認した。ゲル、泳動用緩衝液ともにTBE緩

Table 1. Sample data of *C. formicarius* used in this study

Collection site	Year	No. of weevils sequenced (Accession number)	No. of weevils tested
Okinawa			
Okinawa Island	2004-2008	2 (AB470606, AB470607)	27
Sesokojima Island	Motobu Town	2003	8
Kudakajima Island	Nanjyou City	2008	5
Agunijima Island	Aguni Village	2007	6
Tonakijima Island	Tonaki Vilage	2003	2
Kitadaitoujima Island	Kitadaitou Village	2007	6
Minamidaitoujima Island	Minamidaitou Village	2006	2 (AB470613, AB470614)
Ishigakijima Island	Ishigaki City	2003	1 (AB470608)
Haterumajima Island	Taketomi Town	2004	5
Iriomotejima Island	Taketomi Town	2003	4
Yonagunijima Island	Yonaguni Town	2003	7
Miyakojima Island	Miyakojima City	2004	4
Kurumajima Island	Miyakojima City	2004	2
Irabujima Island	Miyakojima City	2004	1
Ogasawara			
Chichijima Island	Ogasawara Village	2004	2 (AB470609, AB470610)
Mukojima Island	Ogasawara Village	2004	1
Hyoutanjima Island	Ogasawara Village	2004	1
Hitomarujima Island	Ogasawara Village	2004	1
Hahajima Island	Ogasawara Village	2007	3
Taiwan			
Taiwan Island	Taitung City	2004	1 (AB470612)
Taiwan Island	-unknown*	2004	1 (AB470611)
Total		9	104

* A sample insect from the sweet potato which was intercepted at Naha airport.

衝液を用いた。供試虫のうち6地点から得られた9個体のPCR産物をGFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences社製)で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社製)とApplied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems社製)を用いて塩基配列を決定した。これらの塩基配列はいずれも国際塩基配列データベースの一つであるDDBJ (DNA Data Bank of Japan)に登録し、Accession Numberの交付を受けた (AB470606 ~ AB470614、Table 1)。

3. RFLP解析

PCR-RFLP解析では決定した塩基配列より設計したPrimer Pair A (A-1: 5'-CCAACTACACTTTGATCATT-AGGおよびA-2: 5'-CTTATGCACTATTCTGCCAT)およびPrimer Pair B (TL2-J-3034: 5'-AATATGGCAGATT-AGTGCAおよびC2-N-3661: 5'-CCACAAATTTCTGAA-CATTGACCA) (SIMON *et al.*, 1994)を用いた。反応液は1.0 μ lの鋳型DNA溶液、Premix Taq (ExTaq version) (同上) 10 μ l、2種のプライマー (10 pmol/ μ l) 各0.5 μ lを混合し、滅菌水で容量20 μ lになるように調整した。温度条件は前述のプログラムのうち、アニーリングを51℃、繰り返しを35回とした。

Primer Pair Aにて得られた増幅産物は確認の後、3種類の制限酵素 (*Hinc* II、*Dra* I、*Msp* I) で、Primer Pair Bの産物については2種類の制限酵素 (*Nde* I、*Mbo* II) (いずれもニッポンジーン社製)でそれぞれ処理した。処理は反応容量を10 μ lとし、反応ごとにPCR産物3 μ l、制限酵素0.5 μ l、10 $\times$ 緩衝液1.0 μ l (ニッポンジーン社製)および滅菌蒸留水4.0 ~ 6.0 μ lを混合し、37℃で2 ~ 3時間保温した。その後、3.0%のMetaPhor[®] Agarose (Lonza社 (旧 Cambrex社) 製)を用いて100bpラダー (タカラバイオ社製)とともに100 Vで1時間電気泳動し、紫外線ランプ

(312nm)のもとで写真撮影し、それぞれのバンドパターンを比較した。

結果および考察

ダイレクトシーケンスによって決定されたmtDNAのCOIからCOIIにかけての約1,800bpの塩基配列を比較し、配列間の差違を識別するためのPrimer Pair Aを新たに設計し、同様にPrimer Pair Bならびに5つの制限酵素 *Hinc* II、*Dra* I、*Msp* I、*Nde* I、*Mbo* IIを選択した。PCRの結果、沖縄産86個体、小笠原産10個体および台湾産8個体の合計104個体について、Primer Pair AでCOIの約560bpを、Primer Pair BでtRNAとCOIIを含む約640bpの増幅を確認できた。これらに対する5種の制限酵素による処理の結果、それぞれのプライマー対-制限酵素の組み合わせごとに2ないし3種類のバンドパターンが確認できた (Table 2、Fig. 1)。これらバンドパターンを個体ごとにとりまとめた結果、今回用いた個体は9種類のハプロタイプに分類された (Table 3)。また、捕獲地域別のハプロタイプについてはFig. 2に示した。沖縄産の個体からはⅢ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、ⅦおよびⅨの6つのハプロタイプが検出された。沖縄本島からはタイプⅢ、ⅤおよびⅨの3種類が検出された。このうちタイプⅢは本島周辺離島ならびに先島諸島に、タイプⅤは本島周辺離島および大東諸島からも検出された。一方で小笠原諸島産の個体は全て同一のハプロタイプ (タイプⅡ)となり、これは今回調査した沖縄および台湾の個体からは検出されなかった。なお、台湾産については地域および個体数が少ないながらも、沖縄県産および小笠原産とは異なる2つのハプロタイプが検出された。

本種の移動能力は高くなく、特に雌は雄に比べて飛行能力が大きく劣る点などから (MORIYA, 1995)、本種の分布様式はすなわちサツマイモなど本種の寄主植物の人為的な移動の結果であると考えられる。今回沖縄から6種類のハプロタイプが検出されたことは、過去における交易など

Table 2. Restriction fragment length estimated by sequences and RFLP pattern among of 9 samples

Primer pair	Restriction enzyme	Fragments lengths (bp)			Banding pattern
Primer Pair A	<i>Hinc</i> II	433	128		a
		358	203		b
		561			c
	<i>Dra</i> I	228	224	109	a
		337	224		b
	<i>Msp</i> I	307	254		a
		561			b
		510	51		c*
Primer Pair B	<i>Nde</i> I	376	265		a
		641			b
	<i>Mbo</i> II	527	114		a
		641			b

*Estimated by compared with the 100bp ladder.

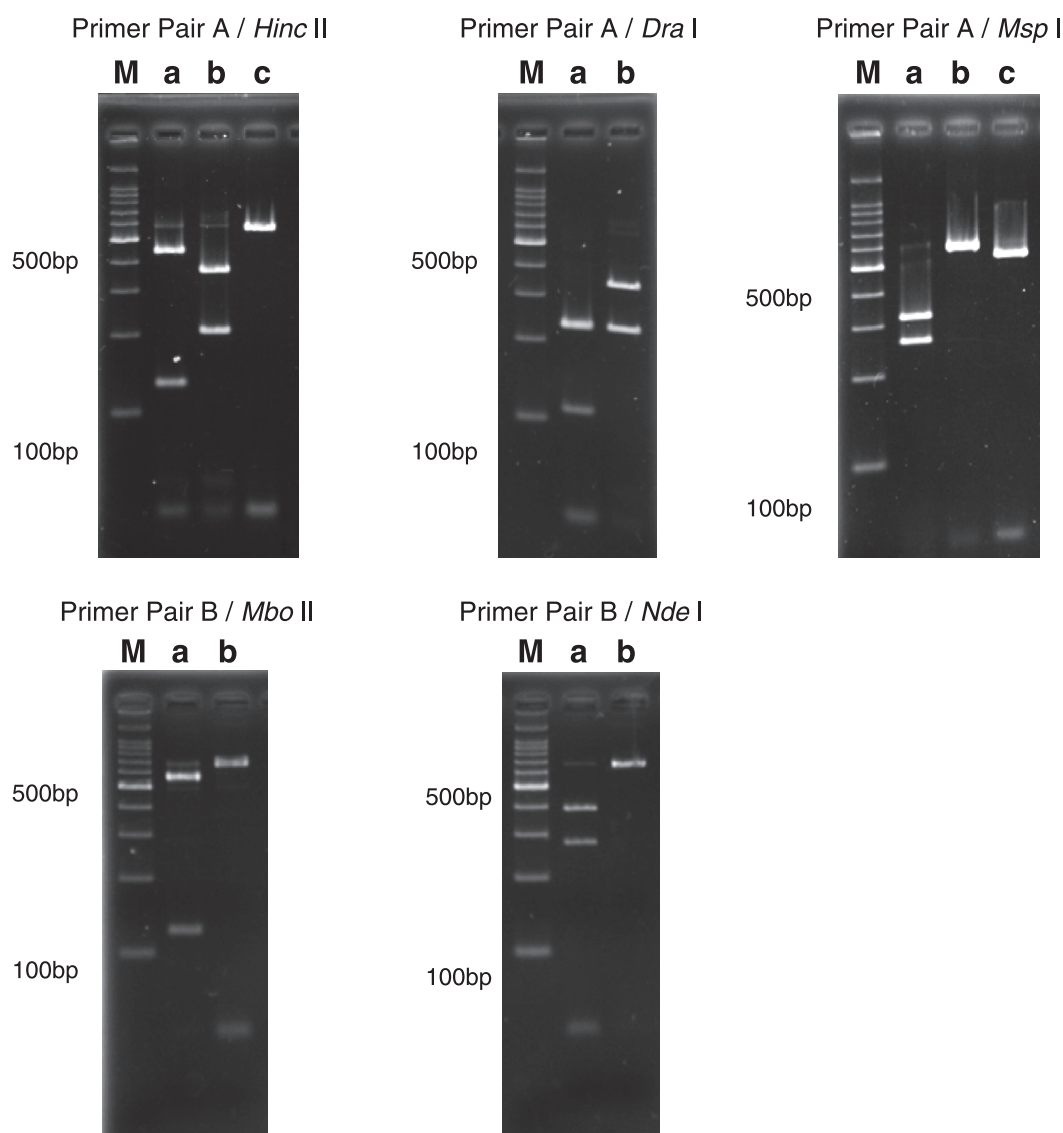


Fig. 1. Banding patterns detected by using PCR-RFLP indicated in Table 2. Samples were electrophoresed in 3% Metaphor[®] Agarose gel. Lane M: 100 bp-ladder.

Table 3. Haplotypes from Banding pattern

Primer pair	Restriction enzyme	Haplotype								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Primer Pair A	<i>Hinc</i> II	a	c	c	b	b	b	b	c	c
	<i>Dra</i> I	a	b	a	a	a	a	a	a	a
	<i>Msp</i> I	b	b	b	c	b	b	b	a	a
Primer Pair B	<i>Nde</i> I	a	a	a	a	b	a	a	a	a
	<i>Mbo</i> II	a	a	a	a	a	a	b	a	b

によってある程度まとまった個体数、あるいは複数回の侵入があった可能性が考えられる。更にその中のいくつかのタイプが広い分布を示すことは、侵入後にも物流に乗って諸島内での分布を広げていったと考えられる。また、沖縄をはじめとする南西諸島では本種寄主植物の移動が現在も原則として制限されていないため、一見独立したように見

える沖縄本島のタイプIXや石垣島のタイプVIIに関しても、諸島内に同一のタイプが存在する可能性が高いといえる。一方で、小笠原諸島からは今回調査した他の地域からは検出されていないハプロタイプ1種のみが検出された。これは、南西諸島とは侵入経路が異なるとするKAWAMURAら(2007)の考えを支持するとともに、小笠原では本種発

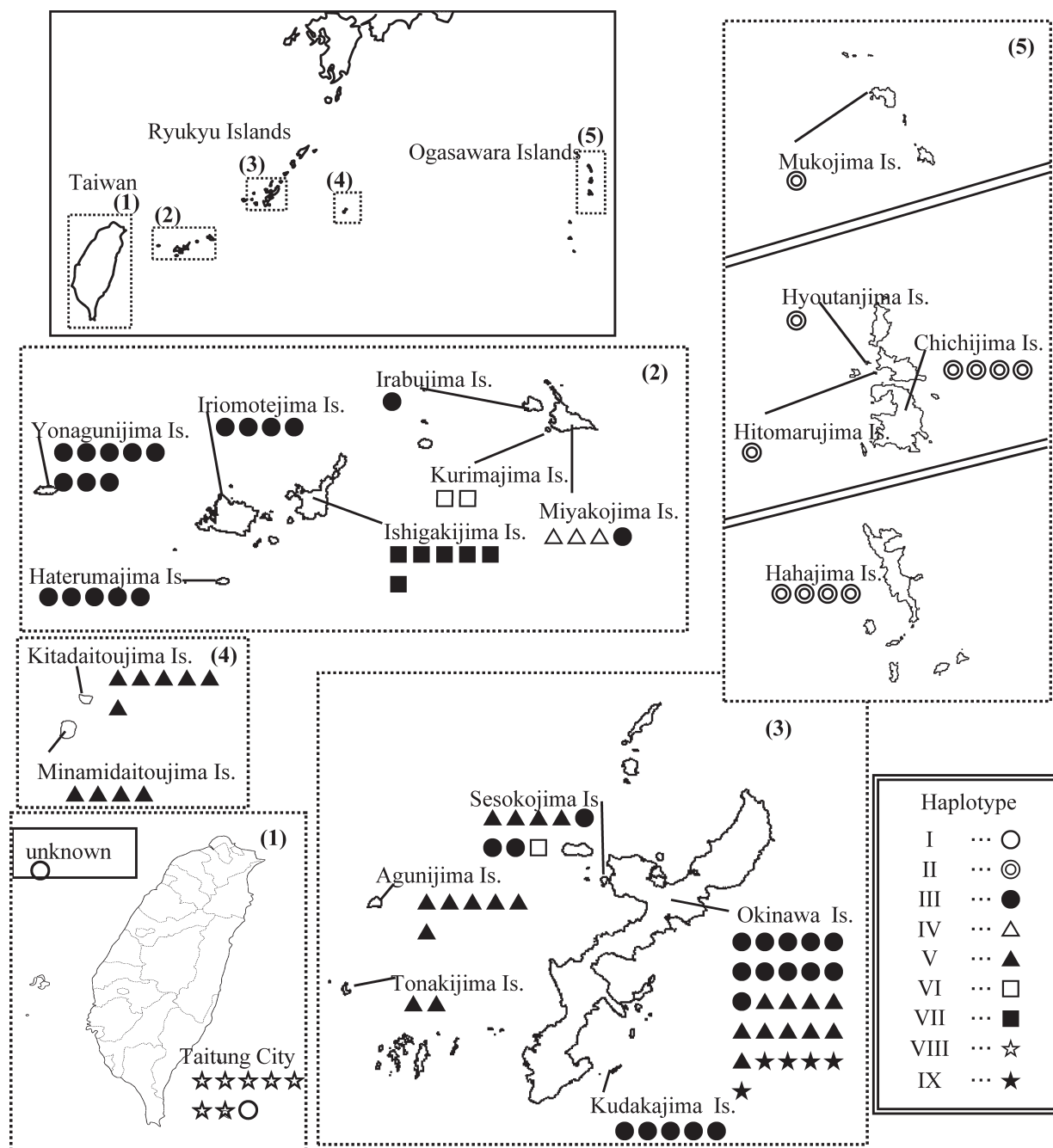


Fig. 2. Geographical Distribution of Haplotype. Each symbol indicates individual sample.

生地との交流機会や規模が小さかったために、侵入機会や侵入時の個体数が南西諸島に比べて少なかったこと、侵入後も諸島内での分布拡大はしたものの、南西諸島や他の分布地域との直接的な遺伝的交流がほとんどないかあっても非常に少なかったことが推察される。

今回判明したハプロタイプの違いを侵入源推定に用いる場合、南西諸島や小笠原諸島といった大まかな地域であれば推定可能であると考えられる。しかし、沖縄県内の島や地域まで特定するといった詳細なレベルでの推定は困難である。今後、より確実な侵入源推定法の作成のためには、国内未収集地域や台湾をはじめとする海外産の個体を含め

た遺伝的差違についてのより詳細な研究が必要とされるとともに、KAWAMURAら（2007）が調査した核リボソームRNA遺伝子のような他の遺伝子領域の変異との組み合わせも考える必要がある。

本種の根絶事業においては、遺伝的に識別可能な部位が見つかったことは、本種の根絶事業において課題となっている放飼不妊虫の識別にハプロタイプの差違を利用できる可能性を提案するものである。すなわち、沖縄での根絶事業には小笠原個体群を、小笠原では沖縄個体群を不妊虫として放飼することで野生虫との遺伝的識別が可能になると考えられる。特に、mtDNAを対象とする点は放飼虫の母

系のみを管理することで特定のハプロタイプを維持できることを示しており、交配により攪乱がおきる核遺伝子を対象とする場合に比べて、系統管理に係る労力を減らすことが可能である。さらに、これら2系統間の識別は1対のプライマー（Primer Pair A）と1種の制限酵素（*Dra* I）を用いるだけで可能である（Table 3）。しかし、ハプロタイプの差違を根絶事業のプロセスへ導入するためには、対象とする系統間に生殖隔離をはじめとする生態の相違が無いこと等を慎重に検証していく必要がある。

引用文献

- 藤本健二・平田建彦・松岡拓穂（2000）近年におけるゾウムシ類の緊急防除（2）高知県室戸市. 植物防疫 **54**: 453-454.
- 伊藤俊介・末吉澄隆・林 義則・中村伸一・山下文男・宮後 優（1999）鹿児島市におけるアリモドキゾウムシの発生と防除. 植防研報 **35**: 35-42.
- 川村清久・豊田秀吉・杉本 毅（2003）RAPD-PCR法によるDNA多型をもとにしたアリモドキゾウムシの識別. 近畿大学紀要 **36**: 13-20.
- KAWAMURA, K., T. SUGIMOTO, K. KAKUTANI, Y. MATSUDA and H. TOYODA（2007）Genetic variation of sweet potato weevils, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Brentidae), in main infested areas in the world based upon the internal transcribed spacer-1 (ITS-1) region. *Appl. Entomol. Zool.* **42**: 89-96.
- MORIYA, S. (1995) A preliminary study on the flight ability of the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Apionidae) using a flight mill. *Appl. Entomol. Zool.* **30**: 224-246.
- MURAJI, M. and S. NAKAHARA (2002) Discrimination among pest species of *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on PCR-RFLP of the mitochondrial DNA. *Appl. Entomol. Zool.* **37**: 437-446.
- 中原重仁・石田龍顕・土肥野利幸・水庭慎一郎・金田昌士・村路雅彦（2005）ミトコンドリアDNA COII塩基配列による*Bactrocera*属ミバエ12種の系統解析と分子分類. 植防研報 **41**: 15-23.
- SIMON, C., F. FRATI, A. BECKENBACH, B. CRESPI, H. LIU and P. FLOOK (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**(6): 651-701.
- 杉本 毅・川村清久・香取郁夫（2007）アリモドキゾウムシの世界的拡散と我が国における定着可能地域の推定. 植物防疫 **61**: 35-40.
- SUTHERLAND, J. A. (1986) A review of the biology and control of the sweet potato weevil *Cylas formicarius* (Fab). *Tropical Pest Management* **32**: 304-315.
- TODA, S. and T. MURAI (2007) Phylogenetic analysis based on mitochondrial COI gene sequences in *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in relation to reproductive forms and geographic distribution. *Appl. Entomol. Zool.* **42**: 309-316.