

フィリピン産アスパラガスから発見されるヤガ科4種の PCR-RFLP法による識別法の開発

荒川賢良*・高橋 学**・中原重仁***・藤本克文****・吉田優二*****

横浜植物防疫所調査研究部

The Development of PCR-RFLP for Discrimination of Four Noctuidae Species (Lepidoptera: Noctuidae) Associated with Asparagus *Asparagus officinalis* L. Imported from Republic of the Philippines. Kenryo Arakawa*, Gaku Takahashi**, Shigehito Nakahara***, Katufumi Fujimoto****, and Yuji Yoshida***** (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10 Shin-yamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan; * Tokyo Sub-station, Yokohama Plant Protection Station ** Haneda Airport Substation, Yokohama Plant Protection Station, *** Nagoya Plant Protection Station, **** Ogasawara General Office, Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism, ***** Narita Sub-station, Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **48**: 55-58 (2012).

Abstract: The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for discrimination of four Noctuidae species (*Helicoverpa armigera* (Hübner), *Spodoptera litura* (Fabricius), *Spodoptera exigua* (Hübner), *Mythimna separata* (Walker)) that were found on asparagus *Asparagus officinalis* L. imported from the Republic of the Philippines was studied. A 762 bp portion of mitochondrial DNA cytochrome oxidase gene subunit I region (CO I) was determined for all four species. Comparisons of restriction patterns estimated from the sequences obtained in this study suggested that PCR-RFLP using a restriction enzyme *AluI* can be used to discriminate all four species.

Key words: mitochondrial DNA, cytochrome oxidase subunit I, *Helicoverpa*, *Spodoptera*

緒 言

近年、輸入植物の種類や輸出国の増加、国際流通の迅速化等に伴い、国内に未発生の病害虫が侵入するリスクが増大していることから、農林水産省は輸入植物検疫の見直しを行い2011年3月7日に「植物防疫法施行規則」等の改正を行った。これにより、検疫有害動植物として取扱うもの、リスク評価が終了しておらず暫定的に検疫有害動植物として取扱うもの、検疫の必要がないもの（非検疫有害動植物）に区分され、輸入検疫で発見された害虫に対して検疫措置（くん蒸等）の必要性の有無等を決定するためにも迅速かつ正確な種の同定の必要性が高まっている。

一方で、輸入検疫で青果物等から発見される害虫類は、卵や幼虫といった同定困難な態で発見されることがあるが、同定可能な態まで飼育を行うにはある程度の期間を必要とし、飼育の途中で寄生蜂等の理由により死亡してしまう個体も多く、種の同定まで至らないことも多い。さらに、輸入される青果物の品目によっては、品質保持や流通上の理由により、消毒や貨物の停滞をできる限り避けたいとの輸入者側の要望も強く、発見される害虫の態や齢期に関係なく、短時間で種を識別するための検疫技術の開発・導入が望まれている。

日本に輸入されている野菜類のなかで、アスパラガス *Asparagus officinalis* L.はチョウ目ヤガ科昆虫の卵や幼虫が発見される頻度が高い。特にフィリピン産アスパラガスでは、過去10年間に検疫有害動物であるオオタバコガ *Helicoverpa armigera* (Hübner) 及びシロイチモジヨトウ *Spodoptera exigua* (Hübner) と、非検疫有害動物であるハスモンヨトウ *S. litura* (Fabricius) 及びアワヨトウ *Mythimna separata* (Walker) のヤガ科4種が発見されているが、卵や若齢幼虫で発見される頻度も高く、種の識別が困難な場合が少なくない。

そこで、本調査では、フィリピン産アスパラガスから発見されるヤガ科4種のミトコンドリアDNA CO I遺伝子領域における遺伝的差異について調査するとともに、外部形態による識別が困難な種やグループの識別法として有用な成果が得られているPCR-RFLP法（大類ら, 2000; Osaka *et al.*, 2008; Muraji and Nakahara, 2002）を用いたヤガ科4種の識別法について検討した。

材料及び方法

1. 供試虫

本調査では、フィリピン産アスパラガスから発見されるヤガ科のオオタバコガ (*H. armigera*)、ハスモンヨトウ (*S.*

*現在、東京支所、**現在、羽田空港支所、***現在、名古屋植物防疫所、****現在、国土交通省小笠原総合事務所、*****現在、成田支所

Table 1. Specimens used in this study.

Species	Collection year	Number of specimens	Geographical origin of specimens
			Country (Locality)
<i>Helicoverpa armigera</i>	2007–2008	7	Australia
	2002, 2005	2	China
	2007	2	Italy
	2009	1	Japan (Kochi Prefecture)
	2002–2003	3	New Zealand
	2003, 2005–2009	39	Philippines
	2007	1	South Africa
	2003, 2006–2007	3	Taiwan
Total		58	
<i>Spodoptera litura</i>	2007	2	China
	1997, 2003	2	India
	2004	1	Indonesia
	2003	1	Japan (Unknown)
	2008	2	Japan (Chiba Prefecture)
	2002	1	Korea
	2005	1	Lao PDR
	2007	1	Malaysia
	2002	2	New Zealand
	2006, 2008–2009	9	Philippines
	2004	1	Singapore
	2001, 2003	2	Taiwan
	2003	3	Thailand
	2004	1	Vietnam
Total		29	
<i>Spodoptera exigua</i>	2001–2003	4	USA
	2004–2005	2	China
	2003	1	Kenya
	2002	1	Mexico
	2003	1	Taiwan
	2004	1	Thailand
	2009	1	Philippines
Total		11	
<i>Mythimna separata</i>	2007	1	China
	1999	1	Japan (Nagasaki Prefecture)
	2009	1	Japan (Unknown)
	Unknown	1	Philippines
Total		4	

litura)、シロイチモジヨトウ (*S. exigua*)、アワヨトウ (*M. separata*) の計4種を対象とし、輸入検疫で野菜類から発見された幼虫及び成虫（幼虫で発見し、飼育羽化させた個体）及び日本国内で採集した成虫を用いて調査を行った (Table 1)。なお、供試虫はDNAを抽出するまでの間、乾燥あるいは99.5%エタノールに浸漬した状態で横浜植物防疫所調査研究部（新山下庁舎）第1庁舎1階昆虫標本室（乾燥標本）又は同庁舎同定室の冷凍庫内（液浸標本）に保管した。

2. DNAの抽出及びPCR増幅

成虫または幼虫の脚の一部を試料として Osakabe *et al.* (2002) の方法を用いてDNA抽出を行った。PCRによるDNAの増幅は反応容量を25 μ lとし、反応ごとに鋳型DNA溶液3 μ l、EX Taq DNA Polymerase（タカラバイオ）0.1 μ l、dNTP混合液（25mM）1.6 μ l、10 $\times$ EX Taq緩衝液2.5 μ l、PCRプライマー（10pmol/l）各1.0 μ l、及び滅菌蒸留水 15.8 μ lを加えた。PCRプライマーは日本DNAデータバンク（DNA Data Bank of Japan; DDBJ）に登録されていたオオタバコガ、ハスモンヨトウの塩基配列を比較し、ミトコンドリアDNAのCO I 遺伝子領域中に

Table 2. Restriction fragment lengths of the amplified CO I region of the mtDNA of 4 Noctidae species digested with *AluI*, estimated by sequence and RFLP pattern.

Banding pattern	Fragment lengths (bp)	Species	Accession number
A	466 235 51 42 30 15	<i>Helicoverpa armigera</i>	AB643665
B	417 235 51 49 42 30 15	<i>Helicoverpa armigera</i>	AB643667
C	316 235 150 51 42 30 15	<i>Helicoverpa armigera</i>	AB643666
D	265 180 147 139 108	<i>Spodoptera litura</i>	AB643668
E	258 198 147 139 54 30 13	<i>Spodoptera exigua</i>	AB643669
F	237 235 180 57 51 49 30	<i>Mythimna separata</i>	AB643670

新たに設計したForward Primer: NocF6 (5'-GTTTGTAG-CAGGTGCTATTACTA-3') 及びReverse Primer: NocR5 (5'-CGTTGATTAATTAAGATTCTC-3') 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-818を用いて行い、94°Cで5分の加熱後、熱変性 (94°C 30秒)、アニーリング (48°C 30秒) 及び伸長 (65°C 1分) の各ステップを1サイクルとして35回繰り返し、さらに65°Cで5分の伸長反応を行った後4°Cで保存した。なお、アニーリング (48°C 30秒) から伸長 (65°C 1分) までの温度上昇は1秒あたり0.5°Cに設定して行った。得られたPCR増幅産物は1.5%アガロースゲル (Type II -A, Sigma-Aldrich) を用いてDNAサイズマーカー (100bp DNA Ladder, タカラバイオ) とともに電気泳動 (100V, 40min) し、エチジウムブロマイド染色により、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、ゲル及び泳動用緩衝液には1×TAE緩衝液を用いた。

3. PCR増幅産物の精製及び塩基配列の決定

PCR増幅産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。シーケンス反応物はDye-Ex 2.0 Spin kit (QIAGEN) を用いて精製した後、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。また、ヤガ科4種の識別に利用可能な制限酵素が存在するか確認するため、コンピューターソフトGENETYX Ver.7 (Genetyx Corp.) により塩基配列の比較を行った。なお、これらの塩基配列は国際塩基配列データベースであるDDBJに登録した (アクセッションナンバー AB643665 ~ 643670, Table 2)。

4. RFLP解析

制限酵素消化は反応容量を10 µlとし、1反応ごとに0.5mlのサンプリングチューブにPCR増幅産物5 µl、制限酵素 (*AluI*, タカラバイオ) 0.1 µl、10×緩衝液1.0 µl、及び滅菌蒸留水3.9 µlを加え、37°Cで2時間以上処理することで行った。処理後の反応液はDNAサイズマーカー (100bp Ladder, タカラバイオ) とともに2.5%アガロースゲル (Type II -A, Sigma-Aldrich) を用いて電気泳

動 (100V, 50min) し、エチジウムブロマイド染色により、RFLPパターンの確認を行った。確認は紫外線ランプ (230nm) のもとで行った。なお、ゲル及び泳動用緩衝液には1×TAE緩衝液を用いた。

結果及び考察

PCR法で増幅したミトコンドリアDNAのCO I遺伝子領域は、プライマー部分を含めて約840bpであった。フィリピン産野菜類から得られたオオタバコガ、ハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ、アワヨトウ各1個体を用いて塩基配列を決定し、種の識別に利用可能な制限酵素について検討した。その結果、制限酵素*AluI*によるRFLPパターンが種間で異なっており、種の識別に利用できる可能性が示唆された (Table 2)。そこで、実際にフィリピン産野菜類から発見された個体 (Table 1. 中の、オオタバコガ39個体、ハスモンヨトウ9個体、シロイチモジヨトウ1個体、アワヨトウ1個体) のPCR増幅産物を、制限酵素*AluI*で処理し、予測されたRFLPパターンが検出されるか否かについて調査した。調査の結果、ハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ及びアワヨトウは塩基配列から予測されたRFLPパターンD、E、Fをそれぞれ示したが、オオタバコガでは予測されたRFLPパターンAとは別に2種類 (B、C) のRFLPパターンを示した (Fig. 1)。このため、RFLPパターンB及びCを示した各1個体についても塩基配列を決定した。

PCR-RFLP法では、様々な種において個体群等の違いにより複数のRFLPパターンを示すことが報告されている (大類ら, 2000; 祐成ら, 2009; 川村ら, 2009; 中原ら, 2005)。今回、4種の中で供試虫数の多いオオタバコガで3種類 (A ~ C) のRFLPパターンが確認されたが、RFLPパターンの増加は、種の識別やRFLPパターンを判断するために必要なコントロールの選択を困難にし、識別法として確立するための大きな問題となる。このためフィリピン以外の国から発見された個体を供試虫 (Table 1.) としてRFLPパターンの確認を行った。この結果、新たなRFLPパターンを示す種はなく、またオオタバコガの各RFLPパターンの検出頻度は、全供試虫 (8カ国58個体) のうち、Aが87.9% (8カ国51個体)、Bが5.2% (フィリピン1個体及びオーストラリア2個体)、Cが6.9% (フィリピン2個体、ニュージーランド1個体及び中国1個体) であった。

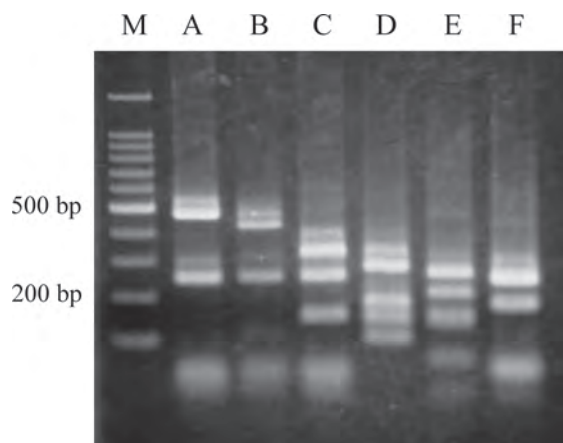


Fig. 1. Restriction fragment patterns of the amplified CO I region of the mtDNA of 4 Noctuid species digested with *AluI*. Lanes: A–C, *Helicoverpa armigera*; D, *Spodoptera litura*; E, *S. exigua*; F, *Mythimna separata*; M, 100 bp ladder.

今回の調査結果から、ミトコンドリアDNA CO I遺伝子領域のPCR-RFLP法によりこれら4種を識別できる可能性が示唆された。今後、本技術をフィリピン産アスパラガスから発見されるヤガ科4種の識別法として確立するためには、フィリピン産を中心にさらに供試虫数を増やしてRFLPパターン及び各RFLPパターンの検出頻度について調査する必要がある。

また、本調査ではフィリピン産アスパラガスから発見されるヤガ科4種を対象に調査を行ったが、その他の国々から輸入されるアスパラガスからは対象種以外のヤガ科も発見されている。2009年に各国から輸入されたアスパラガスから発見されたヤガ科（対象種除く）は*Helicoverpa punctigera*、*Heliothis virescens*、*Spodoptera frugiperda*、*Copitarsia turbata*など7種にのぼるため（植物防疫所統計レポート, 2009）、今回対象とした4種以外のヤガ科についても遺伝子情報を蓄積しておくことが望まれる。

摘 要

フィリピン産アスパラガスから発見されるヤガ科4種（オオタバコガ、ハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ、

アワヨトウ）を識別するために、PCR-RFLP法を用いた識別法について検討した。本調査ではミトコンドリアDNAのCO I遺伝子領域762bpの塩基配列を決定し、PCR増幅産物を制限酵素*AluI*で処理した。その結果、4種間でバンドパターンが異なっており、PCR-RFLP法により4種を識別できる可能性が示唆された。

引用文献

- 川村清久・大野 豪・原口 大・小濱継雄 (2009) PCR-RFLP法によるアリモドキゾウムシの沖縄系統と小笠原系統の識別. 応動昆 **53**(2): 60–63.
- 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**(3): 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 CO II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.
- 大類幸夫・松沢春雄・小池芳昭・吉松慎一 (2000) オオタバコガとタバコガのPCR-RFLP法による識別および日本のタバコ圃場におけるオオタバコガの発生調査への応用. 応動昆 **44**(2): 73–79.
- Osakabe, Mh., T. Hirose, and M. Sato (2002) Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Appl. Entomol. Zool.* **37**(3): 399–407.
- Osakabe, Mh., Y. Kotsubo, R. Tajima, and N. Hinomoto (2008) Restriction Fragment Length Polymorphism Catalog for Molecular Identification of Japanese *Tetranychus* Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* **101**(4): 1167–1175.
- 祐成 忍・宮崎 勲・山本卓司・箕浦和重 (2009) 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における遺伝的差異. 植防研報 **45**: 53–58.
- 植物防疫所統計レポート (2009) 2009（平成21）年植物検疫統計15. 輸入植物検査病菌・害虫発見記録 (1) 品目別・国別発見記録. <<http://www.maff.go.jp/pps/j/tokei/index.html>>, <accessed 2011-10-21>