

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

中 原 重 仁・真 崎 誠
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: Dacinae) by PCR-RFLP Analysis. I. A Study of Variation in Mitochondrial DNA D-loop Region. Shigehito NAKAHARA, Makoto MASAKI, Masashi KANEDA, Tamio SUGIMOTO (Yokohama Plant Protection Station) and Masahiko MURAJI (National Institute of Sericultural and Entomological Science). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **36**: 37-41 (2000).

Abstract: Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR (PCR-RFLP) products was performed to identify asian species of *Bactrocera dorsalis* complex (*Bactrocera dorsalis*, *B. papayae*, *B. carambolae*, *B. philippinensis*, *B. kandiensis*) kept at Yokohama plant protection station. As a result of the polymerase chain reaction with universal primers, a DNA fragment of 1.6 kb was obtained that contains 12SrRNA and tRNA genes in both ends as well as D-loop region. RFLP patterns of PCR products obtained from 9 strains of *Bactrocera dorsalis* complex were treated with 17 restriction enzymes and compared each other. The result was that 23 restriction fragment patterns were observed by 9 restriction enzymes, and *B. kandiensis* was distinguished clearly by the five restriction patterns of the amplified products.

Key words: *Bactrocera dorsalis* complex, PCR-RFLP, Mitochondrial DNA, D-loop region, Identification

緒 言

ミバエ科 *Bactrocera* 属はアジア、オーストラリアを中心に分布する双翅目昆虫の一群であり、一部はヨーロッパ南部、アフリカにも分布することが報告されている (WHITE and ELSON-HARRIS, 1992)。ミバエ科昆虫の多くが幼虫時代を果実あるいは植物の茎に寄生して发育するが、*Bactrocera* 属ミバエもその例外ではなく、いくつかの種は、マンゴウ等の生果実を加害する経済的に重要な害虫とされている。DREW & HAN-KOCK (1994) は、*Bactrocera dorsalis* とその近縁種が *Bactrocera dorsalis* complex を形成しており、以前は 1 種とされていた *Bactrocera dorsalis* は、複数の種を含むグループで、それらは現在、アジアで 54 種、オー

ストラルリアで 14 種が分布していることを報告した。

Bactrocera dorsalis complex は、日本においても植物防疫法で輸入禁止品を決定する上での検疫有害動物として侵入を警戒している害虫であるが、これらは外部形態が非常によく似ており、特に雄のみでは識別・同定が困難な種を含んでいる。そこで本研究では、外部形態に替わりうる、より正確な種識別のための指標を開発することを目的として、横浜植物防疫所で累代飼育中の *Bactrocera dorsalis* complex 5 種 9 系統のミトコンドリア DNA の D-loop region の RFLP を明らかにするとともに、各種ミバエの識別法開発のための比較を行なったので報告する。

材料及び方法

DNAの抽出およびPCRによる増幅

農林水産大臣の許可を得て、横浜植物防疫所調査研究部で累代飼育中の5種9系統のミバエ類 (Table 1) より個体ごとに抽出したDNAを試料として、PCR法によってミトコンドリアDNAのD-loopおよびその周辺領域の増幅を行なった。DNAの抽出は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) を使用し、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 (2.5 mM) 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 (10 pmole/ 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'TGGGGTATGAACCCAGTAGC 3') (Simom *et al.*, 1994) とミバエ用に新たに合成したプライマー (5'TAGGGTATCTAATCCTAGTT 3') (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°C 5分の熱変性のあと、熱変性90°C 30秒, アニーリング52°C 30秒および伸長65°C 1分30秒の各ステップを30回繰り返す、さらに65°C 5分の伸長反応を行なった後4°Cで保存した。得られたPCR産物は制限酵素による解析を実施する前に、1.5%アガロースゲルで100 bpラダー (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, pH

8.4)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17種類の制限酵素 (*Alu* I, *Ase* I, *Bcl* I, *Dde* I, *Dra* I, *Eco* R I, *Eco* R V, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Pst* I, *Rsa* I, *Sau* 3A I, *Ssp* I, *Taq* I, *Xba* I) (ニッポンジーン社) のそれぞれによる切断パターンを調べた。また、5種9系統のミバエ類の比較から明らかな制限酵素断片長多型を示した *Bcl* I, *Dra* I, *Sau* 3A I, *Ssp* I, *Xba* I の5種類の酵素については、DNAサイズマーカーとの比較から各DNA断片の長さを推定し、サンプル間での詳細なバンドパターンの比較解析を行なった。制限酵素処理は反応容量を10 μ lとし、1反応ごとに1.5 ml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, および10 $\times$ 緩衝液1.0 μ l (ニッポンジーン社), 滅菌蒸留水5.5 μ lを加え、37°Cで2時間保温することで実施した。制限酵素で処理したDNAは100 bpラダー (ライフテックオリエンタル社) とともに2.0%のアガロースゲル (MetaPhor™ Agarose, FMC Corp.) で電気泳動した。電圧は80-70Vで2時間~2時間30分行った。DNA断片は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。

結果及び考察

制限酵素によるRFLP解析

5種9系統のミバエ類を用いたPCRによって12SrRNAの一部、数個のtRNAおよびD-loop regionの全領域を含む、約1600bpのミトコンドリアDNA断片が増幅された。この得られたPCR産物につ

Table 1. *Bactrocera dorsalis* complex species used in this study

Species	Locality	Code
<i>B. dorsalis</i>	Okinawa island, Okinawa, Japan	BD-Ok
	Amami-oshima island, Kagoshima, Japan	BD-Am
	Chichijima island, Ogasawara, Tokyo, Japan	BD-Og
	Taiwan (Narita Airport, Japan)*	BD-Tw
	Thailand (Narita Airport, Japan)*	BD-Th
<i>B. philippinensis</i>	Philippines (Narita Airport, Japan)*	BPh
<i>B. carambolae</i>	Malaysia (Narita Airport, Japan)*	BC
<i>B. papayae</i>	Malaysia (Narita Airport, Japan)*	BPpa
<i>B. kandiensis</i>	Katunayake, Sri-Lanka	BK

*Interception at Narita Airport, Chiba, Japan.

Table 2. Species-specific, strains-specific and non-specific typing of restriction fragments obtained from *Bactrocera dorsalis* complex

Restriction enzyme	Species								
	BK	BC	BP _a	BPh	BD-Th	BD-Tw	BD-Ok	BD-Am	BD-Og
<i>Alu</i> I	●	△	△	△	△	△	△	△	△
<i>Ase</i> I	●	△	△	△	△	◆	△	△	△
<i>Bcl</i> I	△	□	□	□	□	□	△	△	△
<i>Dde</i> I	△	△	△	△	△	△	△	△	△
<i>Dra</i> I	●	△	△	□	□	□	◇	◇	◇
<i>EcoR</i> I	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>EcoR</i> V	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Hinf</i> I	△	△	△	△	△	△	△	△	△
<i>Hind</i> III	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Hae</i> III	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Msp</i> I	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pst</i> I	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Rsa</i> I	—	△	△	△	△	△	△	△	△
<i>Sau3A</i> I	△	□	□	□	□	□	△	△	△
<i>Ssp</i> I	●	△	△	□	□	◆	◇	◇	◇
<i>Taq</i> I	●	△	△	△	△	△	△	△	△
<i>Xba</i> I	△	□	□	△	△	△	△	△	△

●: species-specific restriction fragment, ◆: strains-specific restriction fragment,
△, □, ◇: non-specific restriction fragment, —: no restriction fragment.

いて、17 種類の制限酵素 (Table 2) による断片パターンを比較した。その結果 6 種類の酵素 (*EcoR* I, *EcoR* V, *Hind* III, *Hae* III, *Msp* I, 及び *Pst* I) では同一の長さの単一の DNA バンドのみが認められ、解析に用いたミバエ類では PCR 産物中にこれら制限酵素の認識配列は存在しないことが明らかとなった。また、*Dde* I と *Hinf* I ではそれぞれ 2 本と 3 本の DNA バンドが検出されたが、バンドパターンに種及び系統による違いは認められなかった。これらの制限酵素を除く他の 9 種類では明らかな制限酵素断片長多型が認められ、特にスリランカ産 *B. kandiensis* では *Alu* I, *Ase* I, *Dra* I, *Rsa* I, *Ssp* I, 及び *Taq* I の 6 種類の酵素で種特異的なバンドパターンが認められた。また、*B. dorsalis* の種内変異について見たところ、*Ase* I, *Bcl* I, *Dra* I, *Sau3A* I および *Ssp* I の 5 種類の制限酵素で種内変異が認められ、*Ase* I および *Ssp* I では台湾産系統に特異的なバンドパターンが認められた。しかし、国内の沖縄、奄美、小笠原の 3 系統では産地によるバンドパターンの違いは検出されなかった。また、異なった種間ではマレーシア産 *B. carambolae* とマレーシア産 *B. papayae* が同じバンドパターンを示し、同様にタイ産 *B. dorsalis* とフィリピン産 *B. philippinensis* の間に

もバンドパターンの差は認められなかった。

多型が検出された酵素のうち、5 種類の酵素 (*Bcl* I, *Dra* I, *Sau3A* I, *Ssp* I, *Xba* I) についての詳しい結果を Table 3 に示した。なお、Table 3 は制限酵素切断片のあるものを + で、ないものを - で示しており、長さの識別が困難な 100 bp 以下のバンドは省略した。すべてのサンプルから合計 39 種類の断片を確認することができ、このうち 33 種類の制限酵素切断片長に多型を検出した。5 種類の酵素の中では *Ssp* I による切断片が最も多く 16 であり、ついで *Dra* I が 10 であった。さらに *Ssp* I による 16 の切断片のうち、およそ 94% にあたる 15 の切断片で多型が認められ、D-loop region における *Ssp* I 認識配列の多さと変異検出における利用価値の高さが示唆された。

5 種 9 系統の遺伝的相同性

Table 3 に示した結果をもとに、2 サンプル間で共通するバンドの比率から各系統の遺伝的相同値を計算した (Table 4)。

スリランカ産 *B. kandiensis* は、他の 4 種との遺伝的相同性をもっとも低く、東南アジア産の他の種とは離れた関係にあることが示された。また、*B. caram-*

Table 3. DNA fragments obtained after endonuclease digestion of the D-loop regions of the mtDNA from *Bactrocera dorsalis* complex species

Restriction enzyme Fragment size	Ssp I																Dra I										Bcl I				Sma I					Xba I			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
<i>B. kandiensis</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>B. carambolae</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. papayae</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. philippinensis</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>B. dorsalis</i> (Thai)	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>B. dorsalis</i> (Twn)	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>B. dorsalis</i> (Oki)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>B. dorsalis</i> (Ama)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>B. dorsalis</i> (Oga)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-

+ : restriction fragment, - : no restriction fragment

The numbers in the table indicate different kinds of restriction fragments obtained from each species.

Table 4. Homology values of restriction fragment patterns among 5 taxa 9 strains of *Bactrocera dorsalis* complex

	BK	BC	BP	BPh	BD-Th	BD-Tw	BD-Ok	BD-Am	BD-Og
BK									
BC	0.27								
BP	0.27	1.00							
BPh	0.31	0.54	0.54						
BD-Th	0.31	0.54	0.54	1.00					
BD-Tw	0.30	0.58	0.58	0.86	0.86				
BD-Ok	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39	0.43			
BD-Am	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39	0.43	1.00		
BD-Og	0.32	0.39	0.39	0.39	0.39	0.43	1.00	1.00	

The values shown are the ratios of homologous restriction fragments to total fragment numbers obtained through digestion by 5 enzymes.

bolae と *B. papayae* は全く同じバンドパターンが観察された。これら2種は同所的に分布し、外部形態的には産卵管とペニスの長さの違いから識別することができるが (IWAIZUMI *et al.*, 1997), 本領域の解析では違いが見られず、遺伝的にはかなり近縁な関係にあることが示唆された。同様に、タイ産 *B. dorsalis* とフィリピン産 *B. philippinensis* も同じバンドパターンを示し、違いがみられなかった。これら2種は分布地域が重なっておらず (DREW & HANCOCK, 1994), 産卵管とペニスの長さも異なるが、本実験ではその違いを検出できなかった。一方、*B. dorsalis* は、同一種でありながら、タイ、台湾、日本 (沖縄、奄美、小笠原) でかなり異なったバンドパターンを持っていることが示された。また、今回用いた台湾産 *B. dorsalis* は、国内産の *B. dorsalis* と比べてタイ産 *B. dorsalis* との間で高い相同性を示した。今回の実験では、種内の変異が検出されたにもかかわらず、種間の変異が検出されず、

種の識別・同定に利用できる明確な結果は得られなかった。今回行なった17種類の制限酵素による解析では領域全体の6%程度にあたるおよそ100塩基についての情報しか得られておらず、制限酵素認識部位以外に存在する多型について解析していないため、今後は塩基配列についてさらに詳しく調べる必要がある。同種内での系統解析は、*B. xanthodes* は18SrRNA (HOEBEN *et al.*, 1996) で、*Rhagoletis* 属ではミトコンドリアDNAのCOII (SMITH and BUSH, 1997) でも行われており、*B. dorsalis* complex についてもミトコンドリアDNAのD-loopの解析を進めると同時にこれ以外の領域について引き続き実験を行なう予定である。

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).
- HOEBEN, P., L.J. DANIEL, JING Ma and R.A.I. DREW (1996) The *Bactrocera* (Notodacus) *xanthodes* (Broun) species complex (Diptera: Tephritidae): comparison of 18S rRNA sequence from Fiji, Tonga and Vanuatu specimens suggest two distinct strains. *Aust. J. Entomol.* **35**: 61-64.
- YONG, H.S. (1995) Genetic differentiation and relationship in five taxa of the *Bactrocera dorsalis* complex (Insecta: Diptera: Tephritidae). *Bull. Entomol. Res.* **85**: 431-435.
- IWAIZUMI, R., M. KANEDA 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.
- 北川 修 (1991) 集団の進化 種形成のメカニズム 東京大学出版会 p 43-53.
- 大類幸夫 (1997) ジャガイモシストセンチュウおよび *Heterodera* 属シストセンチュウ4種のPCR-RFLP解析による識別。 *Jpn. J. Nematol.* **27**(2): 67-75.
- SIMON, C., F. FRATI, A. BECHENBACH, B. CRESPI, H. LIU and P. FLOOK (1994) Evolution, weighting, and Phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**(6): 651-701.
- SMITH, J.J. and G.L. BUSH (1997) Phylogeny of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequence of mitochondrial cytochrome oxidase II. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**(1): 33-43.
- WHITE I.M. and M.M. ELSON-HARRIS (1992) Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. CAB International, Wallingford, UK, 601p.