

## 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

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\*\*\*

那覇植物防疫事務所・\*横浜植物防疫所・\*\*消費・安全局植物防疫課・\*\*\*独立行政法人農業生物資源研究所

Phylogenetic Relationships and Discrimination among 12 *Bactrocera* Species (Diptera: Tephritidae) Based on Sequences of Mitochondrial COII. Shigehito NAKAHARA, Tatsuaki ISHIDA, Toshiyuki DOHINO, Sin-ichiro MIZUNIWA\*, Masashi KANEDA\*\* and Masahiko MURAJI\*\*\* (Naha Plant Protection Station, 2-11-1, Minatomachi, Naha, Okinawa, 900-0001, Japan. \*Research Division, Yokohama Plant Protection Station. \*\*Plant Protection Division, Food Safety and Consumer Affairs Bureau and \*\*\*National Institute of Agrobiological Sciences). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **41**: 15–23 (2005).

**Abstract:** Nucleotide sequences of a 655bp-686bp portion of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit II gene were determined for 14 specimens from 12 *Bactrocera* species. Phylogenetic analysis was performed using 644bp consensus aligned sequences. To examine the position of each species, molecular phylogenetic trees were constructed using various methods. As results, several clades supported by high bootstrap values did not agree with the phylogenetic relationships based on morphological traits. The sequences were also used to detect the diagnostic section of the species. Based on the highly conserved sequences detected among 12 species, new specific PCR primers were designed to amplify diagnostically informative section. PCR products amplified by the new primers were digested by three restriction enzymes: *Taq*I, *Hinf*I and *Dra*I. Simply banding patterns useful for discrimination were detected. Based on the results, a scheme to identify the 12 *Bactrocera* species was proposed.

**Key words:** PCR-RFLP, *Bactrocera*, Phylogenetic analysis, Discrimination, Mitochondria, Cytochrome Oxidase Subunit II

### 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分布し、これまでに500種以上が知られている (WHITE and HANCOCK, 1997)。本属ミバエには農業上の重要害虫が多く含まれている。かつて日本にもミカンコミバエ*Bactrocera dorsalis*とウリミバエ*B. cucurbitae*が生息し南西諸島などで大きな被害をもたらしたが、国や県による根絶防除事業によってそれぞれ1986年と1993年に根絶されている (YOSHIZAWA, 1997)。その結果、現在の日本産*Bactrocera*属はリュウキュウガキミバエ*B. diospyri*、クスノキミバエ*B. hyalina*、サタミバエ*B. pernigra*、テリハボクミバエ*B. calophylli*、ヤエヤマミバエ*B. expansens*、ミカンバエ*B. tsuneonis*、カボチャミバエ*B. depressa*、シマモクセイミバエ*B. matsumurai*、ミスジミバエ*B. scutellata*、イシガキミバエ*B. ishigakiensis*、ヤンバルアカメガシワミバエ*B. sp.*の11種となっている (金田, 1999; 田尾・照屋, 1984; DELFINANDO and HARDY, 1977; SHIRAKI, 1968)。これらは一部を除き、野生植物を寄主としており、農業害虫としての重要性はそれほど高くない。しかし、いずれも卵や幼虫の形態がよく似ており、未熟なステージでの種の識別には専門的な知識が必要となっている。

日本では、ミカンコミバエをはじめ農作物に大きな被

害を及ぼす恐れのあるミバエ類は植物防疫法によって輸入禁止植物の対象害虫に指定されており、その侵入に対しては輸入検疫だけでなく全国の各都道府県においても厳重な警戒がおこなわれている。特に南西諸島では、ミカンコミバエやウリミバエ等の飛来による侵入の可能性が高いことから、誘殺トラップを用いたモニタリングや野外での果実採取等による侵入警戒調査が定期的に行われている。これら調査で発見されたミバエは、通常外部形態によって同定されているが、虫体が破損していたり、卵や幼虫、蛹などの若齢ステージで発見される場合など、同属他種と識別・同定が困難なことが少なくない。

近年、ミバエ類を含め外部形態による識別が困難な様々な昆虫等の種やグループで、Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) を利用した昆虫識別法の開発が試みられている (大類ら, 2000; OSAKABE *et al.*, 2002; 柴尾・村路, 2002; MURAJI and NAKAHARA, 2002)。本研究では、輸入検疫や侵入警戒調査等で発見される可能性の高いミカンコミバエ、ウリミバエ及び*B. latifrons*に加え、近縁な*Bactrocera*属9種のミトコンドリアDNA Cytochrome oxidase subunit II (COII) 領域の塩基配列を明らかにし、遺伝的多様性について考察するとともに、PCR-RFLPによる種識別法の開発を試みたので報告する。

Table 1. Specimens used in this study

Subgenus	Species	Collection localities	Numbers*	Accession Number
<i>Bactrocera</i>	<i>B. dorsalis</i>	Taipei, Taiwan	2 (1)	AB090271
		Taichung, Taiwan	2 (1)	AB090272
	<i>B. diospyri</i>	Bangkok, Thailand	3	
		Ishigaki, Okinawa Pref., Japan	5 (1)	AB090273
		Yonaguni, Okinawa Pref., Japan	2	
		Ishigaki, Okinawa Pref., Japan	6 (1)	AB092572
<i>B. latifrons</i>	Yonaguni, Okinawa Pref., Japan	6 (1)		
	Taipei, Taiwan	3		
	Bangkok, Thailand	3		
<i>Tetradacus</i>	<i>B. tsuneonis</i>	Kunimi, Oita Pref., Japan	4 (1)	AB095918
<i>Gymnodacus</i>	<i>B. calophylli</i>	Nejime, Kagoshima Pref., Japan	4	
		Ishigaki, Okinawa Pref., Japan	2 (1)	AB097081
		Yonaguni, Okinawa Pref., Japan	2	
		Hateruma, Okinawa Pref., Japan	4	
<i>Paratridacus</i>	<i>B. expandens</i>	Miyako, Okinawa Pref., Japan	1	
		Naha, Okinawa Pref., Japan	4 (1)	AB095917
		Yonaguni, Okinawa Pref., Japan	4	
<i>Paradacus</i>	<i>B. depressa</i>	Hateruma, Okinawa Pref., Japan	2	
		Ofunato, Iwate Pref., Japan	2	
		Yokohama, Kanagawa Pref., Japan	2 (1)	AB092483
		Minami-Saku, Nagano Pref., Japan	3	
		Tsushima, Nagasaki Pref., Japan	2	
<i>Zeugodacus</i>	<i>B. cucurbitae</i>	Nago, Okinawa Pref., Japan	1	
		Okinawa Pref., Japan	3 (1)	AB093595
		Yaeyama, Okinawa Pref., Japan	3	
	<i>B. ishigakiensis</i>	Ishigaki, Okinawa Pref., Japan	9 (1)	AB092573
		Yokohama, Kanagawa Pref., Japan	2 (1)	AB095919
	<i>B. scutellata</i>	Naha, Okinawa Pref., Japan	3 (1)	AB095920
		Kunigami, Okinawa Pref., Japan	3	
	<i>B. sp</i>	Gushikawa, Okinawa Pref., Japan	1	
		Okinawa Pref., Japan	1	
Ishigaki, Okinawa Pref., Japan		7 (1)		

\* Numbers indicate the sum of individuals used in this study, but the numerals in parentheses refer to the number of individuals used for sequencing analysis.

本文に先立ち、供試虫をご提供頂いた大分県柑橘試験場 榎原稔氏、横浜植物防疫所 今村哲夫氏、岩泉連氏、門司植物防疫所 坂之内踐行氏、佐々木幹了氏、那覇植物防疫事務所 宮崎勲氏、小橋川嘉一氏にお礼申し上げます。

## 材料及び方法

### 1. 供試虫

本研究で用いたミバエ類の種、採集場所および解析個体数を Table 1 に示す。おもに南西諸島を中心とする日本国内で得られた個体を用いたが、ミカンコミバエについては台湾、タイで採集された個体、ウリミバエでは農林水産大臣の許可を得て横浜植物防疫所と那覇植物防疫事務所です累代飼育されている個体を使用した。また、*B. latifrons* は成田空港において輸入禁止品生果実から発見された個体と沖縄県与那国島で採集された個体を使用した。塩基配列の解析では、台湾産ミカンコミバエ2頭、横浜植物防疫所で累代飼育された沖縄産ウリミバエ1頭、沖縄県与那国島で採集された *B. latifrons* 1頭、その他日本産 *Bactrocera* 属10頭を用いた。また、制限酵素による PCR-RFLP 解析では、各種5~11頭を供試した。なお、供試虫はいずれも DNA 抽出までの間70%~95%エタノール中に保存した。

### 2. DNA抽出

塩基配列の解析に使用する DNA は、供試虫の胸部、腹部、又は脚の一部を材料として、個体ごとに Amersham Biosciences 社製の DNA 精製キット (GenomicPrep Cell&Tissue DNA Isolation Kit) を用いて抽出し、個体ごとに 200  $\mu$ l の滅菌蒸留水に溶解した。また、RFLP 解析に用いた DNA の抽出には BioRad 社製の DNA 精製キット (InstaGene) を用い、個体ごとの使用量は 200  $\mu$ l とした。

### 3. DNA増幅及び塩基配列の決定

ここではミトコンドリア DNA の COII 領域を対象として、PCR によって DNA 断片を増幅し、得られた産物のダイレクトシーケンシングによって塩基配列を決定した。はじめに、SIMON *et al.* (1994) によるユニバーサルプライマー mtD13 (5'-AATATGGCAGATTAGTGCA-3') と mtD20 (5'-GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3') を用いた PCR を実施した。反応容量は 50  $\mu$ l とし、反応ごとに昆虫 DNA 2.5  $\mu$ l、Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造) 0.375  $\mu$ l、dNTP 混合液 (2.5mM) 4.0  $\mu$ l、10 $\times$ PCR 緩衝液 5.0  $\mu$ l、及び1組の PCR プライマー (10pmole /  $\mu$ l) 各 1.25  $\mu$ l を加えた。DNA の増幅反応は Astec 社製のプログラム テンプコントロール システム (PC-700) を用いて行

B. dorsalis (Taipei)	1	ATGACAACATGAGCTGCCCTTGGGCTTCAAGATAGAGCCTCTCCTCTTATGGAAACAAGTTACGCTCTTTTCATGATCAGCG	80
B. dorsalis (Taichung)	1	..... A	80
B. diospyri (Ishigaki-Oki)	1	..... A ..... C ..... T ..... C	80
B. hyalina (Ishigaki-Oki)	1	..... G ..... AA ..... C ..... A ..... T ..... C ..... G	80
B. latifrons (Yonaguni-Oki)	1	..... G ..... A ..... C ..... T	80
B. tsuneonis (Oita)	1	..... C ..... G ..... T ..... C ..... C ..... A ..... G ..... A ..... A ..... C ..... C	80
B. calophylli (Miyako-Oki)	1	..... G ..... C ..... G ..... A ..... T	80
B. expandens (Okinawa)	1	..... G ..... G ..... C ..... G ..... A ..... T ..... C	80
B. cucurbitae (Okinawa)	1	..... T ..... A ..... A ..... T ..... T	80
B. depressa (Yokohama)	1	..... T ..... A ..... A ..... T ..... C	80
B. ishigakiensis (Ishigaki-Oki)	1	..... G ..... T ..... A ..... A ..... T ..... G ..... C ..... T	80
B. scutellata (Okinawa)	1	..... T ..... A ..... A ..... T ..... C ..... T	80
B. scutellata (Yokohama)	1	..... T ..... A ..... A ..... T ..... C ..... T	80
B. sp (Ishigaki-Oki)	1	..... T ..... A ..... G ..... A ..... A ..... T ..... C	80
81	TTTAATAATTTAGTAATAATAGAACATAGTAGGTTATTTAATATTTATATTCTTTAATTCATATACTAACCGAAATCTTTTACAGTGGTCAAACATTGAAATAATTTG	194	
81	.....	194	
81	C ..... G ..... T ..... A ..... T ..... C ..... A ..... T ..... G ..... A ..... C ..... C	194	
81	CC ..... G ..... C ..... T ..... C ..... C ..... T ..... C ..... A ..... A ..... A ..... A ..... C ..... G	194	
81	..... G ..... C	194	
81	AC ..... CC ..... G ..... G ..... G ..... C ..... GC ..... T ..... C ..... A ..... A ..... T ..... C ..... A ..... A ..... C ..... G	194	
81	C ..... C	194	
81	C ..... CC ..... C ..... T ..... C ..... G ..... G ..... T ..... C ..... GA ..... A ..... A ..... G ..... C ..... A	194	
81	. C T ..... TC T ..... G ..... G ..... C ..... A T ..... C ..... G ..... G ..... C G T ..... C ..... C	194	
81	CC T ..... C ..... TC T ..... G ..... CA T ..... C ..... A ..... C ..... G ..... C	194	
81	. C ..... TC T ..... T ..... A T ..... C ..... A ..... AC T ..... C	194	
81	. C ..... TC T ..... T ..... A T ..... C ..... A ..... AG T ..... C	194	
81	. C ..... TC T ..... T ..... A T ..... C ..... A ..... AC T ..... C	194	
81	CC ..... CC T ..... C ..... A ..... G ..... T ..... A T ..... C ..... C ..... A ..... T ..... AC ..... G ..... C ..... C	194	
195	AACGATTCTCCAGCAATTGACTACTATTTATGCTTCCCGTCCGCTTGCATTACTATATCTATTAGATGAAATTAATGAACCGCTCGGTTAGATTAAAGGCTATTGGACACCA	308	
195	.....	308	
195	T ..... C ..... T ..... T ..... G ..... C ..... T ..... A ..... T ..... C ..... T ..... CT ..... T ..... A ..... C ..... A	308	
195	A ..... C ..... G ..... C ..... T ..... A ..... A ..... G ..... TG ..... C ..... CT ..... A ..... A ..... G ..... A ..... A ..... T	308	
195	A ..... G ..... C ..... C ..... T ..... G ..... C ..... C ..... C ..... T ..... T ..... G ..... GC ..... T ..... T ..... C ..... A ..... C ..... A ..... C ..... G	308	
195	A ..... C ..... A ..... G ..... T ..... C ..... G ..... C ..... AC ..... A ..... A ..... GC ..... T ..... T ..... G ..... C ..... C ..... A ..... C ..... A ..... C	308	
195	A ..... T ..... T ..... T ..... C ..... T ..... T ..... G ..... C ..... CT ..... G ..... G ..... C ..... A ..... C ..... A ..... C ..... G	308	
195	C ..... A ..... C ..... C ..... C ..... A ..... A ..... T ..... C ..... GC ..... T ..... T ..... G ..... C ..... T ..... T ..... A ..... TG ..... A ..... C ..... G	308	
195	T ..... T ..... G ..... T ..... A ..... CC ..... T ..... CT ..... G ..... T ..... A ..... A ..... T ..... C	308	
195	A ..... T ..... A ..... TT ..... T ..... T ..... T ..... A ..... CG ..... T ..... GT ..... C ..... G ..... A ..... A ..... A ..... T ..... A ..... T	308	
195	A ..... C ..... A ..... C ..... T ..... T ..... A ..... C ..... T ..... C ..... C ..... T ..... C ..... T ..... A ..... A ..... T ..... A ..... C ..... T ..... T	308	
195	A ..... C ..... A ..... G ..... T ..... T ..... A ..... G ..... T ..... CT ..... GC ..... T ..... C ..... T ..... A ..... A ..... T ..... A ..... C ..... T ..... T	308	
195	A ..... C ..... A ..... G ..... T ..... T ..... A ..... G ..... T ..... C ..... C ..... T ..... G ..... T ..... A ..... A ..... T ..... A ..... C ..... T ..... T	308	
195	A ..... CA ..... TT ..... T ..... A ..... A ..... G ..... C ..... T ..... CT ..... C ..... G ..... C ..... A ..... T ..... A ..... C ..... G ..... C ..... T	308	
309	ATGATATTGAAGTTATGAATATTGAGACTTTATAAACGTTGGAATTTGATTGATATAGTTTCAACTAATGAATTAGCAACAGACGGATTCCGACTTCTAGATGTTGACAACCG	422	
309	.....	422	
309	C ..... T ..... T ..... T ..... A ..... C ..... A ..... AAT ..... T ..... T ..... T ..... T ..... A ..... T ..... T	422	
309	C ..... G ..... C ..... T ..... T ..... C ..... A ..... C ..... G ..... GT ..... TG ..... T ..... T ..... C ..... C ..... T ..... T	422	
309	C ..... T ..... T ..... A ..... G ..... G ..... A ..... CG ..... T ..... T ..... A ..... T ..... G ..... T ..... T	422	
309	C ..... C ..... C ..... C ..... G ..... G ..... A ..... C ..... C ..... C ..... A ..... C ..... C ..... T ..... T ..... TT ..... A ..... C ..... T ..... T	422	
309	G ..... C ..... C ..... C ..... T ..... T ..... A ..... C ..... A ..... C ..... A ..... C ..... T ..... T ..... C ..... A ..... C ..... T ..... C ..... C	422	
309	C ..... G ..... T ..... GG ..... A ..... T ..... T ..... G ..... A ..... G ..... G ..... TG ..... T ..... T ..... C ..... G ..... C ..... A	422	
309	C ..... C ..... T ..... C ..... T ..... A ..... C ..... A ..... C ..... T ..... T ..... T ..... T ..... TT ..... AT ..... C ..... A ..... T	422	
309	G ..... G ..... C ..... C ..... T ..... C ..... T ..... A ..... G ..... A ..... C ..... C ..... C ..... C ..... T ..... T ..... C ..... A ..... T ..... T	422	
309	C ..... T ..... T ..... A ..... A ..... C ..... T ..... T ..... AT ..... A	422	
309	C ..... G ..... T ..... T ..... A ..... A ..... C ..... T ..... T ..... AT ..... C ..... A ..... T	422	
309	C ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A ..... C ..... T ..... AT ..... A	422	
309	C ..... C ..... C ..... T ..... T ..... C ..... A ..... C ..... A ..... A ..... TG ..... G ..... C ..... A ..... C ..... A ..... T ..... T	422	
423	CGTAGTCTTCCATAAAATTCAGAAATTTAGTAACGGTGCAGATGTAATCAGCTGATGAACAGTACCAGCCTTAGGTGTAAGGTAGACGGAAACCCGCTGGTGGATT	536	
423	.....	536	
423	A ..... AT ..... A ..... G ..... T ..... A ..... T ..... C ..... T ..... T ..... G ..... A ..... A ..... A ..... T	536	
423	A ..... T ..... A ..... A ..... C ..... CC ..... A ..... C ..... C ..... T ..... T ..... C ..... TG ..... A ..... T ..... T ..... T ..... A	536	
423	T ..... TA ..... T ..... A ..... C ..... A ..... A ..... C ..... G ..... C ..... C ..... A ..... T ..... T ..... G	536	
423	A ..... A ..... C ..... A ..... AG ..... C ..... G ..... GA ..... C ..... C ..... T ..... T ..... G ..... G ..... G ..... A ..... G ..... CG ..... C ..... G ..... G	536	
423	C ..... G ..... C ..... G ..... A ..... C ..... G ..... C ..... T ..... A ..... C ..... C ..... C	536	
423	A ..... CA ..... C ..... G ..... C ..... C ..... C ..... G ..... A ..... C ..... T ..... T ..... C ..... T ..... AG ..... G ..... T ..... A	536	
423	A ..... A ..... T ..... A ..... A ..... C ..... G ..... T ..... A ..... C ..... T ..... G ..... A ..... A ..... T ..... T ..... T ..... A	536	
423	A ..... A ..... T ..... A ..... C ..... C ..... A ..... C ..... C ..... T ..... T ..... A ..... C ..... CT ..... AC ..... T ..... T ..... C ..... TG	536	
423	A ..... GA ..... A ..... C ..... A ..... T ..... T ..... A ..... T ..... CT ..... A ..... A ..... T ..... T ..... C ..... TG	536	
423	A ..... GA ..... C ..... A ..... C ..... A ..... T ..... T ..... A ..... T ..... GT ..... AC ..... A ..... T ..... T ..... G ..... TG	536	
423	A ..... GA ..... C ..... A ..... C ..... A ..... T ..... T ..... A ..... T ..... GT ..... AC ..... A ..... T ..... T ..... G ..... CG	536	
423	A ..... A ..... T ..... A ..... CC ..... C ..... T ..... T ..... A ..... C ..... GT ..... AC ..... A ..... A ..... C ..... T ..... T	536	
537	AAACCAAACTAATTTGCTAATAAACGGACCTGGATATTTACGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGAGCTAATCACAGATTTATACGCTATTGTAATGAAAAGACTTCG	644	
537	.....	644	
537	T ..... A ..... T ..... T ..... C ..... T ..... C ..... C ..... C ..... T ..... C	644	
537	T ..... A ..... G ..... C ..... G ..... TG ..... G ..... C ..... G ..... C ..... G ..... C ..... CA ..... C	644	
537	T ..... T ..... T ..... C ..... C ..... C ..... G ..... G ..... C ..... G ..... C ..... T ..... G ..... T ..... G	644	
537	T ..... G ..... TA ..... TA ..... G ..... C ..... C ..... G ..... A ..... C ..... C ..... C ..... C ..... T ..... C ..... C ..... A ..... C	644	
537	T ..... T ..... T ..... G ..... GC ..... C ..... C ..... G ..... G ..... G ..... G ..... C ..... G	644	
537	T ..... A ..... T ..... C ..... G ..... C ..... G ..... C ..... A ..... C	644	
537	TT ..... C ..... A ..... T ..... T ..... T ..... C ..... T ..... C ..... A ..... C	644	
537	T ..... A ..... C ..... T ..... C ..... G ..... CC ..... C ..... T ..... C ..... C ..... G ..... C ..... A ..... C	644	
537	T ..... A ..... T ..... A ..... T ..... T ..... T ..... G ..... T ..... T ..... G ..... C ..... A ..... C	644	
537	T ..... A ..... T ..... A ..... T ..... T ..... T ..... T ..... G ..... T ..... T ..... G ..... C ..... A ..... C	644	
537	T ..... A ..... T ..... A ..... T ..... T ..... T ..... T ..... G ..... T ..... T ..... G ..... C ..... A ..... C	644	
537	T ..... A ..... C ..... T ..... T ..... A ..... T ..... T ..... C ..... T ..... C ..... G ..... A ..... C ..... A ..... C	644	

Fig 1. Nucleotide sequences of COII in species used in this study. Nucleotides identical to the reference, *B. dorsalis* (Taipei), are indicated by a dot. The underlined part indicates the new primer designed for *Bactrocera* species.

い、温度条件は90℃5分の熱変性を行なった後、熱変性90℃30秒、アニーリング52℃30秒及び伸長65℃1分30秒の各ステップを40回繰り返す、さらに65℃5分の伸長反応を行なった。PCR産物は宝酒造社製のGFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kitを用いて精製し、Amersham Biosciences社製のThermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Pre-mix Kitを用いてラベルした後、ABI社製の373Sオートシーケンサー (PRISM) を用いて解析し塩基配列を決定した。

#### 4. 塩基配列を用いた解析

本研究で得られた塩基配列データは、コンピューターソフトGenetyxMac Ver.10 (ソフトウェア開発) を用いて整列させた後、MEGA ver.2.0 (KUMAR *et al.*, 1993) による系統解析のために使用した。解析に用いたアウトグループは*Ceratitis capitata* (AJ242872: SPANOS *et al.*, 2000) とし、1000回のBootstrapリサンプリングを実施した。また、得られた塩基配列をもとに、PCR-RFLP解析に使用する新たなプライマーを設計するとともに、GenetyxMac Ver.10を使用して種の識別に利用可能な制限酵素部位の検索を行った。

#### 5. PCR-RFLP解析

ここでは、PCRによって増幅したCOII領域を制限酵素によって処理し、電気泳動によるバンドパターンを多数の個体間で比較した。用いたPCRプライマーはBCO2F1 (5'-GGCCTTCAAGATAGAGCCCTC-3') とBCO2R (5'-CTTTCAATTACAATAG GTAT-3') の2種類で、いずれも本研究で新たに設計したものである。PCR反応条件は、上述のものと同様であるが、反応容量を20  $\mu$ lとし、各試薬等の量を2/5とした。また、アニーリング温度は47℃とした。

制限酵素処理は反応容量を10  $\mu$ lとし、反応ごとにPCR産物2.5~4.5  $\mu$ l、制限酵素0.5  $\mu$ l、10×緩衝液1.0  $\mu$ l (ニッポンジーン社) 及び滅菌蒸留水4.0~6.0  $\mu$ lを混合し、TaqIについては65℃、それ以外は37℃で2時間保温した。これらの試料は100bpラダー (ライフテックオリエンタル社) とともに3.0%のMetaPhor™ Agaroseゲル (BMA Inc.) で電気泳動したのち、エチジウムブロマイド (0.5  $\mu$ g/ml) で染色し、紫外線ランプ (230nm) のもとで写真撮影した。電気泳動の条件は110~120Vで1時間30分~2時間とした。

### 結果及び考察

#### 1. ミトコンドリアDNA COIIの塩基配列の解析

ユニバーサルプライマーを用いたPCRでは、供試した全ての個体から約800bpのDNA断片を増幅できた。PCR産物を用いたダイレクトシーケンスでは、14頭の個体から655bp~686bpの塩基配列を決定することができた。

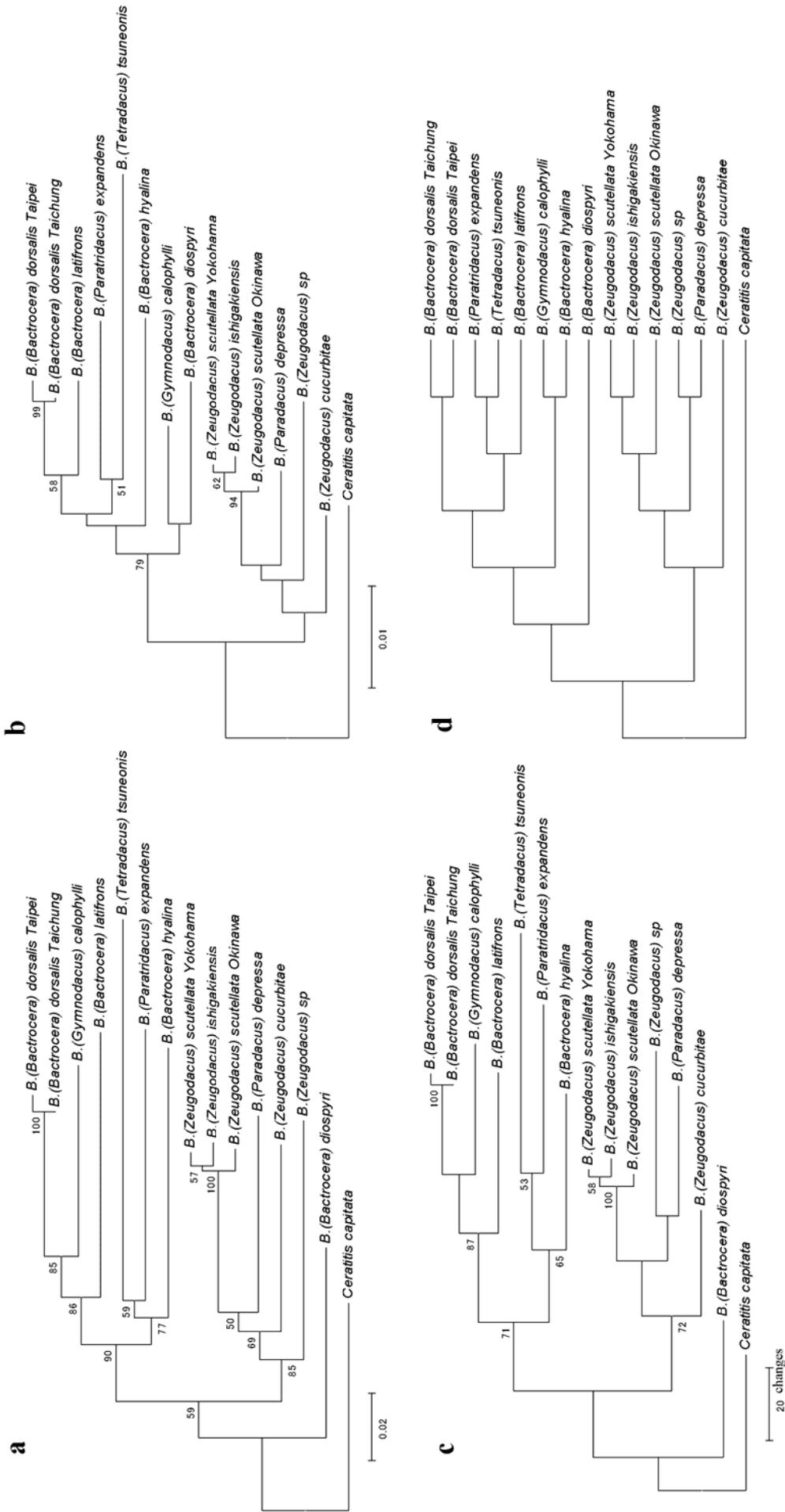
これまでに国際的なDNAデータベースに登録されている他の昆虫の塩基配列との比較の結果、これらはミトコンドリアDNA COII領域であることが確認された。今回得られた塩基配列は、いずれもこれまでに報告のない新しいものなので国際的データベースの一つであるDDBJ (日本DNAデータバンク) に登録し、Accession Numberの交付を受けた (Table 1)。

本解析では上述の塩基配列のうち644bpの部分を使用した (Fig. 1)。これらの塩基組成は、アデニンとチミンに大きく偏っており、その比率は平均64.6% (59.3~67.9) であった。これらの塩基配列を整列させ、変異を示す塩基座位を調べたところ、218のサイトで塩基置換が確認された。しかしながら14個体間で対応する塩基配列の長さに変異はなく、塩基の挿入や欠失は認められなかった。また*B. dorsalis*と*B. scutellata*ではそれぞれ2個体ずつの塩基配列を調べているが、同一種内で前種では3か所、後種では7か所に塩基置換が認められ、種内変異が存在することが明らかとなった。

整列された塩基配列を用いて、コドンのポジションごとの塩基置換率を調べたところ、第1、第2及び第3の各ポジションにおける変異率はそれぞれ17.4%、3.7%、78.9%で第3ポジションが最も高かった。このことは、アミノ酸置換をもたらさない第3ポジションでの塩基置換が最も高頻度で起こるといった一般的な事実 (根井、1987) と一致していた。また、塩基置換が確認された218サイトの34.9%、第3ポジションの10.7%で3種類以上の塩基が認められ、本領域の第3ポジションでは多重置換が生じていることが示唆された。このことから、本DNA領域の進化速度は極めて速く、種または種レベル以下の系統解析に適していることが示唆された。

#### 2. 系統学的解析

本研究で得られた塩基配列をもとに、最大節約法、近隣結合法及びUPGMA法による分子系統樹を作成した。近隣結合法とUPGMA法による系統樹は、Juekes-Cantor法とKimura's 2-parameter法を用いて計算した遺伝的距離にもとづいて作成した。これらの方法によって作成した系統樹の例をFig. 2に示す。最大節約法と近隣結合法では樹形のよく似た系統樹が得られた (Fig. 2 a, c)。これらの系統樹では亜属*Bactrocera*と*Zeugodacus*は、基本的に異なるグループであることを示し、既知の形態学的特徴による分類と一致した。しかし、*B. (Bactrocera) diospyri*は、いずれのグループにも属さず、これら2亜属よりも早くに分岐したものである可能性が示唆された。本種についてはミトコンドリアのrDNA領域の解析においても同様の系統関係が報告されており本研究結果と一致している (MURAJI and NAKAHARA, 2002)。また、これらの系統樹では*Gymnodacus*、*Tetradacus*、*Paradacus*の各亜属は*Bactrocera*亜属と同じグループに、*Paratridacus*亜



**Fig. 2.** Phylogenetic tree of *Bactrocera* species generated by neighbor-joining analysis based on Jukes-cantor distance (a and b) and maximum parsimony analysis (c and d). These four trees were developed using two kinds of data sets including all three codon positions (a and c), as well as including the first and second positions (b and d). Bootstrap values are shown above the branches of clades supported in more than 50% of 1,000 replicates.

属は*Zeugodacus*亜属と同じグループに含まれた。また、*B. (Zeugodacus) isigakiensis*は1968年に新種として記載され、石垣島だけに分布し、形態学的には*B. (Zeugodacus) scutellata*とは別種とされるが (SHIRAKI, 1968)、本領域の解析から両種は極めて近縁な種であると推定された。なお、最大節約法による解析で描かれる系統樹は1つだけであった。

本研究で用いたミバエ類12種では、コドンの第3ポジションで塩基置換が飽和している可能性が示唆された。そのため、通常の分子系統解析では遺伝的距離を過小評価してしまう可能性がある。そこで、コドンの第3ポジションを除いたデータセットについて、Jukes-Cantor法で計算した遺伝的距離をもとにした近隣結合法と最大節約法で系統樹を作成した (Fig. 2 b, d)。これらは基本的にFig. 2 aとcによく似ていたが、Bootstrap値が低く、信頼性のある系統関係を推定することはできなかった。なお、最大節約法では3つの系統樹が描かれたが、トポロジーのみのConsensus Treeを示した。また、UPGMA法による解析でも信頼性のある系統樹は得られなかった。以上のことから、置換速度の速いコドンの第3ポジションによって遺伝的距離を過小評価している可能性はそれほど高くないと考えられた。

本研究で得られた分子系統樹においてBootstrap解析で高い信頼性が認められた部分のいくつかでは、これまでに知られている形態による分類 (WHITE and ELSON-HARRIS, 1992) とは異なる系統関係を示す場合があった。特に解析に用いたミバエ類は、大きく3グループに大別され、亜属ごとに6グループに区分されることはなかった。また、今回の結果では*B. (Bactrocera) dorsalis*、*B. (Bactrocera) hyalina*、*B. (Bactrocera) latifrons*、*B. (Gymnodacus) calophylli*、*B. (Tetradacus) tsuneonis*、*B.*

(*Paratridacus) expandens*の6種は、亜属が異なるにもかかわらず非常に近縁なグループに位置づけられた (Fig. 2 aとb)。今後これらの系統関係をより正確に把握するためには、形態と遺伝子情報の両面からの解析結果を比較検討することが必要であると考えられる。

### 3. PCR-RFLP解析

12種から得られた14の塩基配列について、60種類以上の制限酵素の認識部位を推定し、その比較によりミバエの種間で顕著な差異を示す制限酵素を検索した。その結果、*TaqI*、*HinfI*及び*DraI*で種間差が認められ、これらを組み合わせて用いることで、12種のミバエを識別できる可能性が示唆された。次に、これら3種の制限酵素の認識部位を含むDNA断片をより効率的に増幅するため、本研究で得られた塩基配列をもとに新たなPCRプライマーを設計した (Fig. 1)。これらのプライマーを用いたPCRでは、12種のすべての個体から618塩基のDNA断片を効率よく増幅することが可能となった。このPCR産物を3種類の制限酵素で処理したときに予測されるDNAバンドの長さをTable 2に示した。塩基配列を調べた12個体について、PCR産物について制限酵素処理を行い、電気泳動によってバンドパターンを調べたところ、予測されたとおりの結果を得られることが確認された (Fig. 3)。次に、これらのバンドパターンが種の識別法として有効であることを確認するため、Table 1の全個体 (n = 101) についてPCR-RFLPによるバンドパターンの比較を行った。Table 3に、種ごとに検出されるバンドパターンのタイプを示した。その結果、*B. hyalina*、*B. depressa*、*B. scutellata*及び*B. latifrons*を除く8種のミバエではTable 2で推定されたバンドパターンが検出され、種識別におけるバンドパターンの有効性が示された。これらの種では

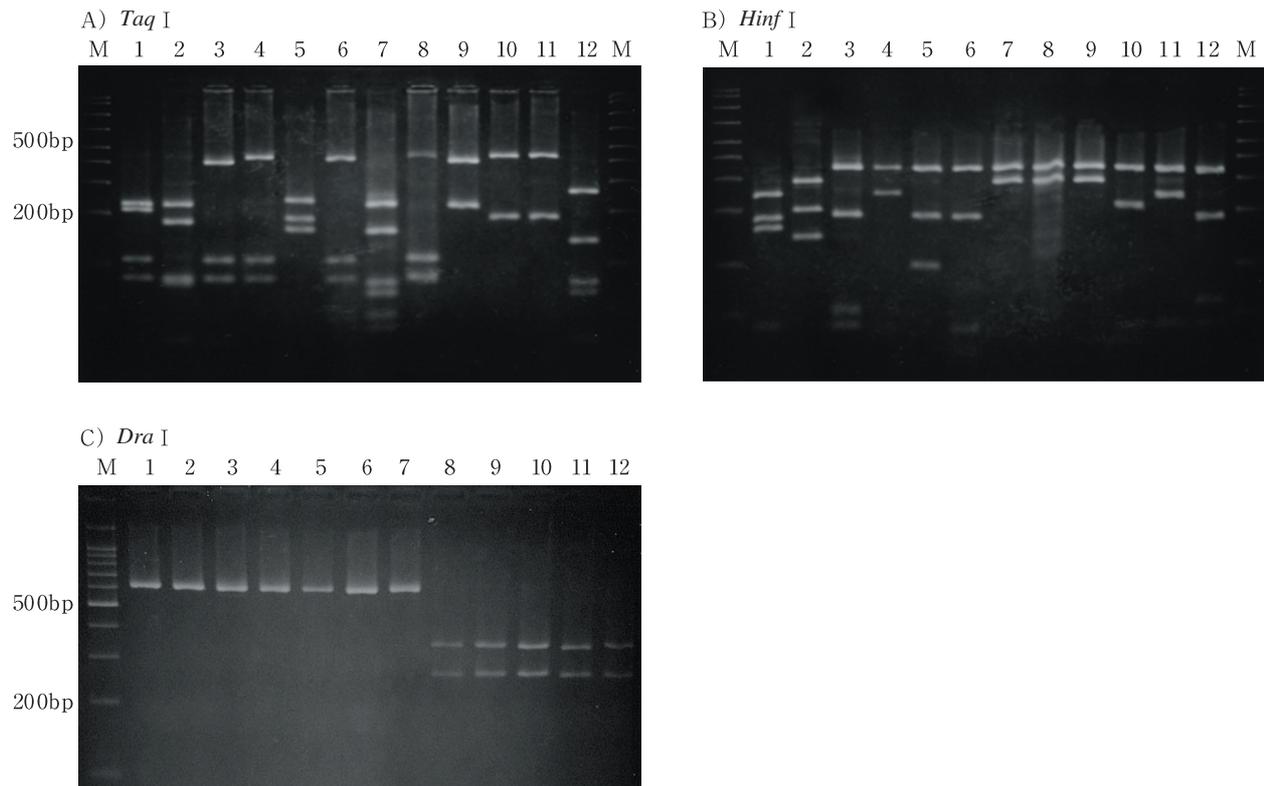
**Table 2.** Restriction fragment length estimated among 14 *Bactrocera* species sequences

<i>TaqI</i> :TCGA	A	264	135	71	65	30	30	16	6
	B	222	156	77	65	46	37	14	
	C	222	177	81	77	30	30		
	D	238	182	161	30	6			
	E	399	107	81	30				
	F	222	207	107	81				
	G	429	101	81	6				
	H	429	182	6					
	I	429	107	81					
	J	399	218						
<i>HinfI</i> :GANTC	A	334	186	40	30	27			
	B	334	186	51	40	6			
	C	334	186	57	40				
	D	334	212	40	31				
	E	243	177	157	40				
	F	334	243	40					
	G	334	186	97					
	H	283	196	138					
	I	334	283						
<i>DraI</i> :AAATTT	A	348	269						
	B	617							

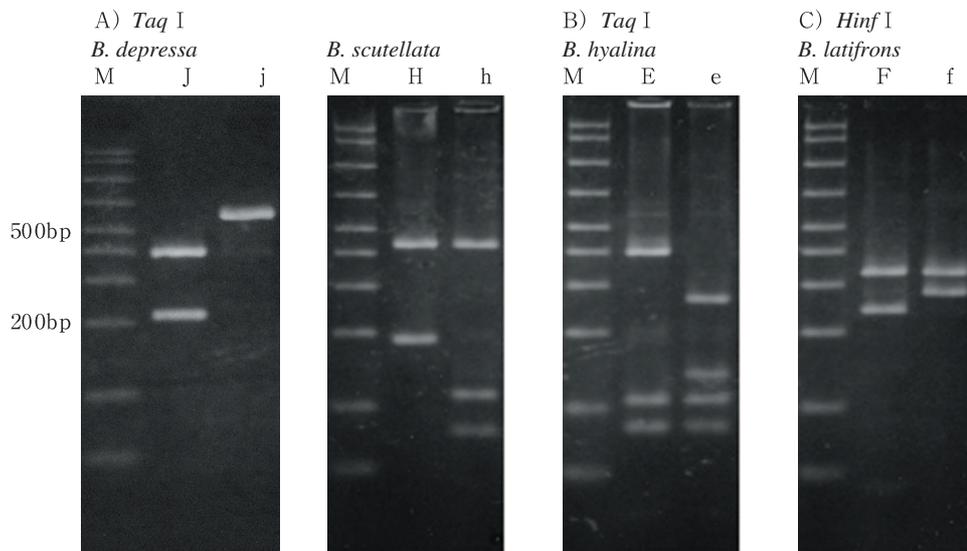
**Table 3.** Banding patterns of mtDNA treated with three restriction enzymes

Species	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	<i>DraI</i>
<i>B. dorsalis</i>	F	E	B
<i>B. diospyri</i>	C	H	B
<i>B. hyalina</i>	E or e*	B	B
<i>B. latifrons</i>	I	F or f*	B
<i>B. tsuneonis</i>	D	G	B
<i>B. expandens</i>	I	A	B
<i>B. calophylli</i>	B	I	B
<i>B. cucurbitae</i>	G	I	A
<i>B. depressa</i>	J or j*	I	A
<i>B. ishigakiensis</i>	H	D	A
<i>B. scutellata</i>	H or h*	F	A
<i>B. sp</i>	A	C	A

Characters A-J refer to restriction fragment patterns defined in Table 2. Asterrisks indicate intraspecific variations.



**Fig 3.** Banding patterns detected among the 12 *Bactrocera* species using PCR-RFLP amplified Mitochondrial DNA and restriction enzymes indicated in Table 2. The Samples were electrophoresed in 3% MetaPhor™ Agarose gel. Lane 1, *B. dorsalis*; Lane 2, *B. diosphyri*; Lane 3, *B. hyalina*; Lane 4, *B. latifrons*; Lane 5, *B. tsuneonis*; Lane 6, *B. expandens*; Lane 7, *B. calophilly*; Lane 8, *B. cucurbitae*; Lane 9, *B. depressa*; Lane 10, *B. ishigakiensis*; Lane 11, *B. scutellata*; Lane 12, *B. sp.* Lane M, 50-2,000bp (A and B) or 100bp (C) -radder.



**Fig 4.** Intraspecific variations detected among four *Bactrocera* four species. Characters J, j, H, h, E, e, F and f refer to restriction fragment patterns defined in Table3. Samples were electrophoresed in 3% MetaPhor™ Agarose gel. Lane M: 50-2,000bp-radder. The restriction fragment lengths are estimated as follows: j: 0.62; h: 0.43, 0.11, 0.07; e: 0.27, 0.14, 0.11, 0.08; f: 0.33, 0.28 (Kb). Restriction fragments shorter than 0.05Kb were ignored.

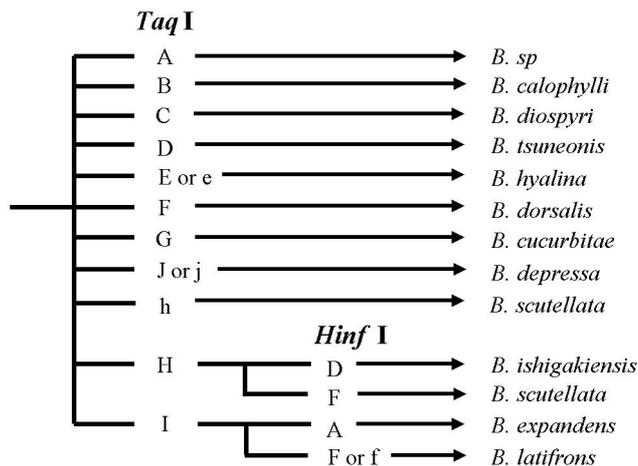


Fig 5. Scheme for the *Bactrocera* species identification based on PCR-RFLP patterns estimated for the DNA fragment. Characters A-j refer to the banding patterns defined in Table 3.

バンドパターンに種内変異は認められなかった。一方、*B. hyalina*、*B. depressa*及び*B. scutellata*では*TaqI*処理時に、*B. latifrons*は*HinfI*処理時にそれぞれTable 2で推定されたバンドパターンとは異なるバンドパターンを示す個体が確認され (Fig. 4 e、j、h、f)、これらの種では個体変異が存在することが明らかとなった。種内変異は、*B. hyalina*では石垣島産の6頭のうち1頭、*B. depressa*では調査した10頭のうち長野県南佐久と岩手県大船渡産の合計5頭、*B. scutellata*では調査した10頭のうち沖縄県那覇産の1頭、*B. latifrons*では調査した12頭のうち台湾産の1頭で検出された。

しかし、これら4種で確認されたバンドパターンe、j、h、fは他種と重複せず、12種ミバエ識別法として暫定的な利用は可能と考えられた。そこで、これらミバエを識別するための簡易的なフローチャートを作成した (Fig. 5)。本図では、はじめに*TaqI*により*B. dorsalis*、*B. diospyri*、*B. hyalina*、*B. tsuneonis*、*B. calophylli*、*B. cucurbitae*、*B. depressa*、*B. sp.*の8種を識別する。このときバンドパターンH又はIが検出された場合は、*HinfI*によって*B. ishigakiensis*、*B. scutellata*、*B. latifrons*、*B. expandens*の4種を識別する。ただし、*TaqI*処理時にバンドパターンhが検出された場合は*HinfI*で処理する必要はなく、その時点で*B. scutellata*と識別できる。また、*DraI*では*Zeugodacus*亜属と*Bactrocera*亜属のそれぞれを中心とする2グループで明瞭に異なるバンドパターンが検出されるため、本酵素を併用することでより正確な識別が可能となる。

MURAJI and NAKAHARA (2002) は、オーストラリアを中心に分布する*Bactrocera*属昆虫を対象に、ミトコンドリアのrDNA領域のPCR-RFLPによって種を識別する方法について報告している。一方、本研究では日本国内に分布する*Bactrocera*を中心に解析しており、侵入警戒調

査で発見される頻度の高い*Bactrocera*への利用価値が高いと考えられる。前者は16SrDNA領域を、後者はCOII領域を利用した識別法であり、両者の整合性については今後さらなる解析が必要である。また、本研究では、使用したサンプル数が、いずれの種も10頭前後と少ないことから、種内変異が*B. hyalina*、*B. depressa*、*B. scutellata*及び*B. latifrons*以外の種でも認められるか、どれほどの頻度で検出されるか、あるいは産地によってその他の変異が存在するかについては明らかではない。そのため今後より正確な分子同定法を確立するためには、さらに多くの個体のバンドパターンを調査し、データを蓄積していくことが必要である。

## 引用文献

- DELFINANDO, M.D. and D. E. HARDY (1977) A Catalog of the Diptera of the Oriental Region. The University Press of Hawaii, Honolulu: 854pp.
- 金田昌士 (1999) リュウキュウガキミバエとテリハボクミバエの学名について. 那覇植物防疫情報 114: 558.
- KUMAR, S., K. TAMURA and M. NEI (1993) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0. The Pennsylvania State University.
- 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.
- 根井正利 (1987) 分子進化遺伝学. 培風館, 東京, pp.433.
- 大類幸夫・松沢春男・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. 日本応用動物昆虫学会誌. 44: 73-79.
- OSAKABE, Mh., T. HIROSE and M. SATO (2002) Discrimination of four Japanese Tetranychus species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-tran-

- scribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Appl. Entomol. Zool.* 37 (3) : 399-407.
- 柴尾学・村路雅彦 (2002) PCR-RFLPによるミカンキイロアザミウマとヒラズナハアザミウマの識別法の開発. 大阪府立農林技術センター研究報告 38: 30-34.
- SHIRAKI, T. (1968) Fruit flies of the Ryukyu Islands. United States National Museum Bulletin 263, Smithsonian Institution Press, Washington: 104pp.
- SIMON, C., F. FRATI, A. BECHENBACH, 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.
- SPANOS, L., G. KOUTROUMBAS, M. KOTSYFAKIS and C. LOUIS (2000) The complete sequence of the mitochondrial genome of the Medfly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 9 (2) :139-144.
- 田尾政博・照屋匡 (1984) 宮古および八重山群島で発見された *Dacus* 属ミバエ 3 種について. 沖縄農業19: 23-31.
- WHITE, I. M. and M. M. ELSON-HARRIS (1992) Fruit flies of Economic Significance: Their Identification and Bionimics. CAB International, Wallingford, UK: 601pp.
- WHITE, I. M. and D. L. HANCOCK (1997) *CABIKEY to the Indo-Australian Dacini Fruit Flies*. CAB International, Wallingford, UK.
- YOSHIZAWA, O. (1997) Successful eradication programs on fruit flies in Japan. *Res. Bull. Pl. Prot. Jpn.* 33 (Suppl.) : 1-10.