

アシグロハモグリバエ *Liriomyza huidobrensis* (BLANCHARD) (Diptera: Agromyzidae) 2系統の遺伝子診断及び外部形態の比較

高野俊一郎・岩泉 連・中西靖裕・染谷 均・岩崎暁生*

横浜植物防疫所・*北海道立中央農業試験場

Genetic Differentiation and Morphological Comparison between Two Clades of *Liriomyza huidobrensis* (BLANCHARD) (Diptera: Agromyzidae). Shun-Ichiro TAKANO, Ren IWAIZUMI, Yasuhiro NAKANISHI, Hitoshi SOMEYA and Akeo IWASAKI* (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shin-Yamashita Naka-ku, Yokohama, 231-0801, Japan and *Hokkaido Agricultural Experiment Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **41**: 43–46 (2005).

Abstract: Two clades are known to exist within the pea leafminer, *Liriomyza huidobrensis* (BLANCHARD), which is a polyphagous leafmining pest. Populations from California and Hawaii are known as the California clade, whereas populations from South America are known as the South America clade, which has spread around the world. As no morphological differences have been reported, the only way to differentiate these two clades is genetic diagnosis. We conducted PCR-RFLP analysis to differentiate the samples that were newly recorded in Japan or were intercepted at Japanese plant quarantine. The results showed that specimens obtained from Japan, China, Korea, and Taiwan belonged to the South America clade, whereas specimens from California and Mexico belonged to the California clade. We also compared some morphological characters between the two clades. As a result, specimens of the California clade had many acrostichal setulae, longer female ovipositors and male aedeagal apodemes compared to those of the South America clade. Also, the black parts of anepisternum, a lateral sclerite of the thorax, of the California clade were wider.

Key words: *Liriomyza huidobrensis*, clade, PCR-RFLP, differentiation, morphological, plant quarantine, pea leafminer

緒 言

アシグロハモグリバエ *Liriomyza huidobrensis* (BLANCHARD) は広食性のハモグリバエで、世界各国で農作物に被害をもたらしており (PARRELA et al., 1982; SPENCER, 1973; HE et al., 2002)、我が国では、2001年に北海道の一部地域で初めて発見されている (岩崎ら, 2004)。本種にはミトコンドリアDNA及び核DNAの塩基配列の解析により遺伝的に種に近い変異を持つ2つの系統が存在することが知られている。両系統は、米国カリフォルニアとハワイのみに分布が確認されている系統がカリフォルニア系統、原産地の南米大陸および世界各地に侵入個体群の分布が確認されている系統が南米系統と名付けられている。(SCHEFFER, 2000; SCHEFFER and LEWIS, 2001; HE et al., 2002)。両系統の識別は遺伝子診断のみによって可能で、外部形態の差違については明らかにされていない (SCHEFFER and LEWIS, 2001; 岩崎ら, 2004)。両者の生理、生態的な差違についても詳しく検討されていないが、異なる遺伝的背景をもつ両者は薬剤感受性、寄主選好性などが異なる可能性があるため、発見された虫がどちらの系統に属するかを明らかにすることは防除上重要である。また、両者の形態上の相違点について調査することは両系統の簡易な識別に向けた意義

が大きい。

今回我々はミトコンドリアDNAのPCR-RFLP (SCHEFFER et al., 2001)により、最近我が国で発生が確認された個体及び輸入検疫で発見された個体がどちらの系統に属するか調べた。また、両系統の雌雄交尾器を含む外部形態の比較観察を行い、両系統間で若干の違いを認めたので遺伝子型調査の結果と併せて報告する。本試験を実施するにあたり、サンプルの収集に協力いただいた都道府県の職員、各防疫所の職員、貴重なご指導、ご助言をいただいた横浜植物防疫所調査研究部害虫担当の諸氏に、感謝するとともにこの場を借りて心より御礼申し上げます。

材料及び方法

1. 2系統の遺伝子診断

最近我が国で発生が確認された個体及び輸入検疫で発見された個体を用いた (表1)。すべてのサンプルは主としてSPENCER (1973, 1990) の記載を参照し、雄交尾器を含む外部形態を実体顕微鏡下で観察し、*L. huidobrensis*であることを確認した後、遺伝子診断を行った。なお、輸入検疫で発見された個体は飼育し、成虫羽化後に同定した。遺伝子診断を行うまでサンプルは99%エタノール中に保存した。PCR-RFLPは、SCHEFFER et al. (2001)

で報告されている方法と同様に行った。各個体ずつ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、製品のプロトコルに従ってDNAを精製した。PCRによるDNAの増幅反応液は、DNA1 μ l、各プライマー (20 μ mol) 0.5 μ lずつ、dNTP混合液1.6 μ l、反応バッファー2.0 μ l、Taqポリメラーゼ0.15 μ lを加え、滅菌水で総量20 μ lに調節した。PCRプライマーはC1-J-2797 (5'-CCTCGACGT-TATTCAGATTACC-3') とTK-N-3785 (5'-GTTTAA-GAGACCAGTACTTG-3') (SIMON et al., 1994) を用いた。このプライマーにより、ミトコンドリアDNAのCO I からCO II にかかる1031bpの領域が増幅される (SCHEFFER et al., 2001)。PCR反応はASTECC社製 Program Temp Control System PC-707を用い、温度条件は92°Cで2分の熱変性後、熱変性92°Cで1分30秒、アニーリング50°Cで1分30秒、伸長72°Cで2分30秒を35サイクル繰り返し、最後に72°Cで7分の伸長反応を行った後10°Cで保存した。各個体から得られたPCR産物は、南米系統のDNA断片だけを切断する制限酵素EcoRV及びカリフォルニア系統のDNA断片だけを切断する制限酵素SpeI (TOYOBO) (SCHEFFER et al., 2001) で処理した。反応液は1反応当たり5 μ lとし、PCR産物0.5 μ l、制限酵素0.5 μ l、酵素バッファー0.5 μ lを加えて滅菌水により総量を調節し、37°Cで約2時間保温した。DNA断片は1.5%アガロースゲルで電気泳動し、断片長を確認した。電気泳動は100Vで約40分間行い、UV照射下で検出されたバンドパターンを確認した。

2. 外部形態の系統間比較

京浜港及び成田空港における輸入植物検疫検査において、カリフォルニア及びメキシコ産セロリー、レタス、エンドウから幼虫態で発見され、飼育によって得られた成虫標本 (1999-2004年) をカリフォルニア系統のサンプルとして用いた。中国産レタス、カイランサイ、エンドウから幼虫態で発見され、飼育によって得られた成虫

標本 (1999-2004年) 並びに北海道産成虫標本 (2003年) を南米系統のサンプルとして用いた。なお、全てのサンプルは遺伝子診断と同様に、SPENCER (1973, 1990) に基づき *L. huidobrensis* であることを確認した。

予備的な観察において、系統間で若干の相違を認めた①雌産卵器の長さ (図1)、②雄挿入器甲の長さ (図2)、③胸部背面中央部の中剛毛数 (図3)、④胸部側面中胸側板の黒化程度 (図4) について評価した。なお、①、②については成虫標本の腹部を分離し、10%KOH溶液中に数分間浸けた後に交尾器を摘出し、実体顕微鏡下で各部位の長さを測定した。また、④については図4に示したとおり、黒化程度を5段階に区分した。

結果及び考察

1. 2系統の遺伝子診断

PCRによる増幅の結果、57個体全てのサンプルで1031bp付近に1本のバンドが得られた。制限酵素処理の結果、カリフォルニア産11個体及びメキシコ産の9個体から得られたDNA断片は全てSpeIのみによって切断され、420bpと611bp付近にそれぞれ1本のバンドが得られた。日本産33個体、韓国産1個体、中国産2個体、台湾産1個体から得られたDNA断片は全てEcoRVのみで切断され、175bpと856bp付近にそれぞれ1本のバンドが得られた。この結果、カリフォルニア及びメキシコ産個体はカリフォルニア系統、日本、韓国、中国、台湾産個体は南米系統と識別された。このことから、我が国で発生している個体群は、世界各地に分布を広げている個体群と同じ系統であると考えられる。今後は両系統の生理、生態的な差違について明らかにする必要があると考えられる。

2. 外部形態の系統間比較

①雌産卵器の長さを両系統で比較したところ、カリフ

Table 1. Source locality and host information for specimens

Country	Location	Host plant	Date	No.	Clade
Japan	Hokkaido	<i>Callistephus chinensis</i>	30. VII. 2002	5	South America
Japan	Hokkaido	<i>Vaccaria pyramidata</i>	31. VII. 2003	3	South America
Japan	Yamaguchi Prefecture	<i>Cucumis sativus</i>	V. 2003	6	South America
Japan	Miyagi Prefecture	<i>Cucumis sativus</i>	2. VI. 2004	10	South America
Japan	Miyagi Prefecture	<i>Lycopersicon esculentum</i>	28. VI. 2004	5	South America
Japan	Miyagi Prefecture	<i>Allium fistulosum</i>	23. VI. 2004	3	South America
Japan	Aomori Prefecture	<i>Spinacia oleracea</i>	21. VII. 2004	1	South America
Korea*	unknown	<i>Lactuca sativa</i>	1. VII. 2003	1	South America
China*	unknown	<i>Pisum sativum</i>	25. IV. 2003	1	South America
China*	unknown	<i>Brassica oleracea</i>	20. IV. 2004	1	South America
Taiwan*	unknown	<i>Lactuca sativa</i>	5. IV. 2004	1	South America
Mexico*	unknown	<i>Pisum sativum</i>	V. 2003, IV. 2004	9	California
United States*	California	<i>Pisum sativum</i>	VIII. 2002, VII. 2003	4	California
United States*	California	<i>Apium graveolens</i>	20. V. 2003	2	California
United States*	California	<i>Allium fistulosum</i>	1. VIII. 2002, 17. VII. 2003	2	California
United States*	California	<i>Lactuca sativa</i>	26. VII. 2003, 31. VII. 2003	3	California

*Flies were intercepted at plant quarantine in Japan.

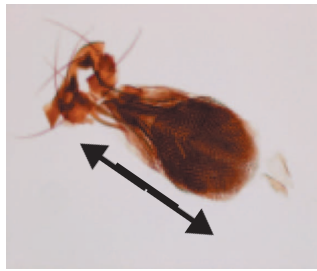


Fig 1. Ovipositor length (Pointed arrow indicates measured length)

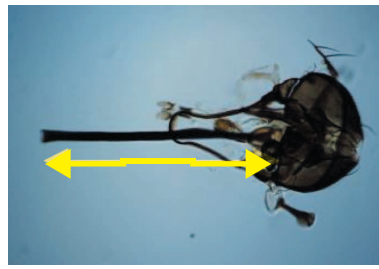


Fig 2. Aedeagal apodeme length (Pointed arrow indicates measured length)

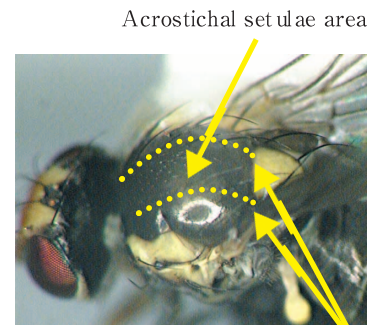


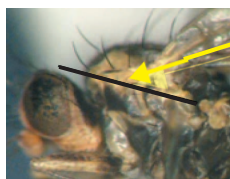
Fig 3. Counted area of the acrostichal setulae



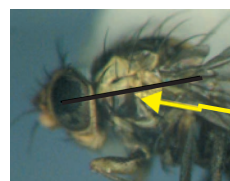
Score 0:
Black part of anepisternum
along the lower margin



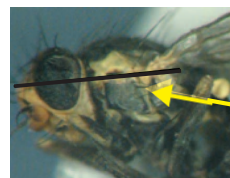
Score 1:
Black part extending from
the lower margin,
but not to anepisternal seta



Score 2:
Black part reaching
anepisternal seta



Score 3:
Black part extending beyond
anepisternal seta,
but not to the upper margin



Score 4:
Black part extending to
the upper margin

Fig 4. Black part score of the anepisternum (Pointed arrows indicate the position of anepisternal seta)

オルニア系統は南米系統に比べて産卵器が長く、差は有意であった(表2)。なお、両系統の翅長に有意差はなかった。②雄挿入器甲の長さを両系統で比較したところ、雌産卵器長と同様に、カリフォルニア系統は南米系統に比べて雄挿入器甲長が長く、差は有意であった(表2)。なお、両系統の翅長に有意差はなかった。③中剛毛数を両系統で比較したところ、雌雄ともカリフォルニア系統は南米系統に比べて中剛毛数が多く、差は有意であった(表2)。雌では、カリフォルニア系統と南米系統の翅長に有意な差はなかったが、雄ではカリフォルニア系統は南米系統に比べ、翅長も長かった。その原因は不明であるが、①、②では両系統雌雄で翅長に有意差がなかったことから、本調査で供試した南米系統雄個体が特異的に小さかったと思われる。④中胸側板の黒化程度の平均スコアを両系統で比較したところ、雌雄ともカリフォルニア系統が南米系統に比べて有意に高く、黒化程度が強かった(表2)。

以上の結果は、異なる遺伝子型を示すアシグロハモグ

リバエ2系統間で、雌雄交尾器サイズを含む外部形態においても差があることを示唆している。今回、調査した形態は、予備的な観察をもとに量的な形質を比較評価したものであるが、これ以外の形態は未調査であり差違が認められる可能性はあると思われる。ただし、統計的に有意な差の認められた形質についても、その変異幅は大きく重複していることから、両系統を的確に識別できる単一の形質は見いだせなかった。また、今回調査した両系統の標本は産地、個体数が限られていることから、今後、より多くの産地、個体数について調査・検証していくことが必要と考えられる。

摘 要

Liriomyza huidobrensis (BLANCHARD) は広食性のハモグリバエで、カリフォルニア及びハワイのみに分布が確認されているカリフォルニア系統と、原産地の南米大陸及び世界各地に侵入個体群の分布が確認されている南米系統の2つの遺伝子系統が存在することが知られてい

Table 2. Comparison of morphological characters for two clades of *Liriomyza huidobrensis*

Morphological characters	sex	California Clade (Specimens from California and Mexico)			South America Clade (Specimens from China and Hokkaido, Japan)		
		No. specimens	Mean	SD	No. specimens	Mean	SD
Ovipositor length (mm)	Female	12	0.37	± 0.20a	15	0.33	± 0.20b
Wing length (mm)			2.17	± 0.13a		2.22	± 0.13a
Aedeagal apodeme length (mm)	Male	10	0.58	± 0.28a	12	0.51	± 0.23b
Wing length (mm)			1.98	± 0.86a		1.95	± 0.64a
No. of acrostichal setulae	Female	27	18.37	± 4.12a	19	13.63	± 3.13b
Wing length (mm)			2.17	± 0.15a		2.15	± 0.14a
No. of acrostichal setulae	Male	18	18.94	± 3.57a	16	12.94	± 4.51b
Wing length (mm)			1.94	± 0.14a		1.74	± 0.14b
Black part score of anepisternum	Female	38	3.29	± 0.46a	26	2.35	± 0.69b
	Male	26	3.27	± 0.45a	17	1.53	± 1.38b

Means followed by different letters indicate significant differences between the two clades (p<0.05 by Mann-Whitney U-test).

る。両系統は遺伝子診断によってのみ識別でき、外部形態の差違については明らかにされていない。我々は、ミトコンドリアDNAのPCR-RFLPにより、最近我が国で発生が確認された個体及び輸入検疫で発見された個体がどちらの系統に属するか調べた。その結果、我が国で発生が確認された個体は全て南米系統であった。輸入検疫で発見された中国、韓国、台湾産個体は南米系統、カリフォルニアとメキシコ産個体はカリフォルニア系統であった。また、南米系統（中国、北海道産）とカリフォルニア系統（カリフォルニア、メキシコ産）の外部形態の比較を行った結果、カリフォルニア系統の方が南米系統と比較して、産卵器長（雌）及び挿入器甲長（雄）が長く、中剛毛本数が多く、中胸側板体色が黒い傾向がみられた。

引用文献

- 岩崎暁生・岩泉 連・高野俊一郎 (2004) 日本におけるアシグロハモグリバエ *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) の新発生 植物防疫58 (1):13-19.
- HE, L., Y. ZHANG., N. XIAO., J. WEI and R. KUANG. (2002) *Liriomyza huidobrensis* in Yunnan, China: current distribution and genetic structure of recently established population. Entomol. Exp. Appl. 102: 213-219.
- PARRELLA, M. P., K. R. ROBB and J. BATHKE. (1982) The influence of selected host plants on the biology of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 75: 1104-1108.
- SCHEFFER, S. J. (2000) Molecular evidence of cryptic species within the *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). J. Econ. Entomol. 93 (4): 1146-1151.
- SCHEFFER, S. J., and M. L. LEWIS. (2001) Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 94 (5): 648-653.
- SCHEFFER, S. J., A. WIJESSEKARA, D. VISSER, and R. H. HALLETT. (2001) Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L. langei* (Diptera: Agromyzidae) Applied to three recent leafminer invasions. J. Econ. Entomol. 94 (5): 1177-1182.
- 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: 651-701.
- SPENCER, K. A. (1973) *Agromyzidae (Diptera) of economic importance*. Junk, The Hague, 418pp.
- SPENCER, K. A. (1990) *Host specialization in the world Agromyzidae (Diptera)*. Kluwer Academic, Dordrecht. 444pp.