

# 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

誌名	日本応用動物昆虫学会誌
ISSN	00214914
著者	大類, 幸夫 松沢, 春雄 小池, 芳昭 ほか1名,
巻/号	44巻2号
掲載ページ	p. 73-79
発行年月	2000年5月

## 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

大類幸夫\*・松沢春雄\*\*・故小池芳昭\*・吉松慎一\*\*\*

\* 日本たばこ産業株式会社葉たばこ研究所

\*\* 東京農業大学総合研究所

\*\*\* 草地試験場

Discrimination of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) by PCR-RFLP Analysis, and Application to Surveying Occurrence of *H. armigera* in Tobacco Fields of Japan. Yukio Orui (Leaf Tobacco Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., Oyama, Tochigi 323-0808, Japan), Haruo Matsuzawa (NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156-0054, Japan), Yoshiaki Koike (Leaf Tobacco Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., Oyama, Tochigi 323-0808, Japan) and Shin-ichi Yoshimatsu (National Grassland Research Institute, Nishinasuno, Tochigi 329-2793, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 44: 73-79 (2000)

**Abstract:** To discriminate *Helicoverpa armigera* and *H. assulta*, a 557 bp portion of the 16S ribosomal RNA gene of the mitochondrial DNA was analyzed by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Results of nucleotide sequencing of the amplified DNA products from the two species showed that they could be easily discriminated from each other by *Mse*I- or *Vsp*I-digestion of the PCR products. In practice, 227 dried adult specimens of the two species that were identified morphologically in advance were correctly discriminated by the PCR-RFLP patterns with *Mse*I or *Vsp*I. This method was applied to the larvae of *Helicoverpa* species feeding in tobacco fields. Analyses of PCR-RFLP patterns of individual larvae collected at 17 fields in Iwate, Yamagata, Fukushima, Tochigi, Okayama, and Okinawa prefectures, showed that *H. armigera* widely coexists with *H. assulta*. Intraspecific variation in the RFLP patterns was rarely detected.

**Key words:** Identification, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa assulta*, PCR-RFLP, 16S rRNA

### 緒 言

オオタバコガ *Helicoverpa armigera* (Hübner) は野菜、作物および花き等を加害する広食性害虫である。本種は従来マイナーな害虫であったが、1994年の夏から晩秋に西日本で野菜、作物および花き等に多発し、多大の被害もたらされた(吉松, 1995)。しかし、現状では本種に対し、高い殺虫力を示す薬剤に限られていることから(小野本ら, 1996; 奈良井, 1997; 染谷・清水, 1997)、近年難防除害虫として注目されるようになった。

ところが、本種はこれまで重要害虫でなかったこともあり、一般に生態的知見の蓄積は少ない。また、本種は近縁のタバコガ *H. assulta* (Guenée) と外部形態が酷似しており、特に幼虫ステージの識別が難しい。このため野外における食害幼虫を直接同定して両種の寄主植物の範囲を特定したり、広範囲な地域におけるオオタバコガの地理的分布状況および被害植物でのオオタバコガとタバコガ幼虫の構成比等の生態的知見を得ることは困難な状況となっている。現在、野外から採集された幼虫の識別には室内での個

体別飼育によって得られた成虫の外部形態の詳細な観察を行わなければならない(染谷・清水, 1997; 金崎ら, 1997)、時間がかかるのが難点である。今後、早急に有益な生態的知見を蓄積するためには、昆虫の発育ステージに関わらず迅速性が高く正確に種を同定できる新しい技術を開発する必要がある。

近年 DNA レベルでの変異に基づく昆虫種の識別や系統解析法が多用されるようになった。とりわけ PCR (polymerase chain reaction) を用いた方法は、解析に用いる DNA 試料がごく微量であったり、精製純度が低い場合にも利用できることから、微小な昆虫や昆虫体の一部分などを用いた解析に適している。PCR 法では、多くの昆虫で保存性が高いことが知られている塩基配列をプライマー (ユニバーサルプライマー) として設定することによって、これまでに DNA 塩基配列に関する知見が得られていない種についても DNA レベルでの解析を行うことができる。また、PCR を用いた方法のうち PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) は DNA 中における塩基配列の差異を PCR で増幅された DNA の

制限酵素処理による断片の数および長さの変異として検出するもので、多数の検体を一度に処理することが可能であることから多くの個体を解析する方法として適していると考えられる。これまでに野外での生態解明を目的として鱗翅目の *Heliothis virescens* (Guenée) と *H. subflexa* (F.) との戻し交雑個体の識別 (Roehrdanz, 1994), および鞘翅目の4種のマメゾウムシの識別 (Tuda et al., 1995) など幅広い害虫種またはグループで PCR-RFLP を用いた DNA 多型解析例が報告されており、今後、さらに多くの昆虫種へ応用され、それらの生態解明に利用されることが期待される。

本研究では、オオタバコガとタバコガのミトコンドリア DNA (mtDNA) の 16S rRNA 遺伝子の一部領域における塩基配列を決定し、両者の差違を明らかにするとともに、PCR-RFLP 法による2種の識別のために利用可能な制限酵素を明らかにした。また、多数の個体群を用いた解析を実施し、PCR-RFLP パターンと成虫外部形態に基づく同定結果との適合性、および RFLP パターンの種内変異について検討した。さらに、この方法を適用して、これまで日本では知られていなかったタバコ圃場でのオオタバコガの発生を明らかにするとともに、オオタバコガおよびタバコガの出現率の地理的変異を調査した。

本文に入るに先立ち、タバコガ類の標本を提供して頂いた石川県農業総合研究センター 藪 哲男氏、広島県立農業技術センター 林 英明氏、高知県農林水産部 山下 泉氏に深く感謝する。また、現地調査にご協力いただいた福岡県農業総合試験場の嶽本弘之氏ならび実験に当たってご協力を頂いた大内裕美氏に厚くお礼を申し上げる。

## 材料および方法

### 1. 供試虫

PCR-RFLP 法によるバンドパターンをタバコガとオオタバコガを識別するための基準として利用するには、種が特定されている多数の個体を用いた解析を実施し、バンドパターンの種内変異および種間差についてあらかじめ情報を得ておく必要がある。そこで、本研究では Table 1 に示した日本各地のさまざまな地点よりタバコガ類の幼虫を採集し、これらの室内飼育によって得られた成虫を吉松 (1995) に従って同定した。これらの成虫は乾燥標本にし、鋳型 DNA を調製するまでの間、室温で最高2年間保存した。各個体群から1~128個体の標本を用い、個体ごとに触角あるいは脚の一部から鋳型 DNA を調製した。

発育ステージおよび雌雄の違いによる PCR の増幅結果および RFLP パターンの差違の有無を確認するため、栃木県小山市で採集したタバコガ (Population No. 2) を室内飼育することで得られた卵10個体、1齢幼虫10個体、終齢幼虫10個体、雄成虫5個体、雌成虫5個体を対象として RFLP パターンを比較した。

### 2. 鋳型 DNA の調製

卵および1齢幼虫については生きたままの個体、終齢幼虫では99.5%エタノールで室温保存した個体の脚の一部、成虫では乾燥標本の触角または脚の一部のそれぞれを試料として鋳型 DNA の調製を行った。これらの試料は個体ごとに10  $\mu$ l の lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1% IGEPAL CA-630 (Sigma), 100  $\mu$ g/ml proteinase K (宝酒造)) を入れた GeNunc Module No. 2 (Nunc) のウェル中で先端をアルコールランプの炎で丸めたマイクロチップを用いて磨砕した。この磨砕液の1  $\mu$ l

Table 1. Dried adult specimens of *H. armigera* and *H. assulta* used in study

Species	Population No.	Locality		No. of adult samples	Host plant
		Prefecture	City		
<i>H. armigera</i>	1	Fukushima	Nishiaizu	2	tobacco
	2	Tochigi	Oyama	2	?
	3	Ishikawa	?	4	?
	4	Hiroshima	Yuki	5	tomato
	5	Kochi	Kubokawa	3	tobacco
	6	Fukuoka	Fukuoka	5	chrysanthemum
	7	Okinawa	Gusukube	128	tobacco
	8	Okinawa	Shimoji	8	tobacco
	9	Okinawa	Ueno	4	tobacco
<i>H. assulta</i>	1	Fukushima	Nishiaizu	5	tobacco
	2	Tochigi	Oyama	47	tobacco
	3	Kochi	Kubokawa	2	tobacco
	4	Okinawa	Ishigaki	2	tobacco
	5	Okinawa	Gushikami	1	tobacco
	6	Okinawa	Gusukube	9	tobacco

を 50  $\mu$ l の lysis buffer を含む 0.5 ml の遠心チューブに移した。この溶液を 55°C で 1 時間、95°C で 10 分間熱処理したものを PCR 用の鋳型 DNA とし、実験に供試するまで -20°C で保存した。

### 3. プライマーと PCR 増幅

供試したプライマーは Xiong and Kocher (1991) が Simuliidae 科昆虫より 16S rRNA 遺伝子の一部領域を増幅することを目的として *Drosophila yakuba* の塩基配列に基づき設計したものである。センスプライマー (16S Ar) の配列は 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3', アンチセンスプライマー (16S Br) の配列は 5'-CTCCGGTTTG-AACTCAGATC-3' である。

PCR はチューブ当たり 25  $\mu$ l の容量で行い、反応液の組成は 100  $\mu$ M の dNTP, 0.1  $\mu$ M の各プライマー, 1.0 U Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造) および緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) とし、1 反応当たり 5  $\mu$ l の鋳型 DNA 溶液を加えた。反応は、プログラムサーマルサイクラー (PTC-100, MJ Research) を用いて行い、94°C で 1 分、48°C で 1 分、70°C で 2 分のサイクルを 35 回繰り返した後、72°C に 5 分間保った。増幅した DNA は、アガロースゲル電気泳動法で分離・解析するまで -20°C に保存した。

### 4. 増幅した DNA の塩基配列の決定

PCR-RFLP 法によるタバコガとオオタバコガの識別に利用可能な制限酵素を推定することを目的として、各種 1 個体から得られた PCR 産物の塩基配列を比較した。福島県西会津町から採集したタバコガ (Population No. 1), および沖縄県城辺町から採集したオオタバコガ (Population No. 7) の成虫各 1 個体の触角から鋳型 DNA を調製し、PCR を行った。得られた増幅産物は 1% Seakem GTG アガロースゲル (FMC Corp.) を用いた電気泳動により分離し、目的とする DNA 断片をゲルから切り出した後、EASYTRAP Ver. 2 (宝酒造) を用いて精製した。この DNA を鋳型 DNA とし、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) と自動 DNA シーケンサー (ABI 377) を用いて塩基配列を決定した。

### 5. 制限酵素による消化

決定した塩基配列から制限酵素 *MseI* および *VspI* (BRL Life Technologies) で処理した RFLP パターンによりタバコガとオオタバコガの識別が可能と推定された。そこで各個体より得られた PCR 産物についてそれぞれの制限酵素で処理した後、電気泳動を行い、RFLP パターンを調べた。制限酵素処理は、PCR 産物 2.5  $\mu$ l と制限酵素 0.5  $\mu$ l を含む 10.0  $\mu$ l の緩衝液中で実施し、反応条件は 37°C, 24 時間とした。制限酵素処理した PCR 産物の電気泳動には、2.0% MetaPhor アガロースゲル (FMC Corp.) を用い、電極用緩衝液には TBE 緩衝液 (50 mM Tris, 50 mM ホウ

酸, 1 mM EDTA, pH 8.2) を用いた。電気泳動装置には Mupid 2 (コスモバイオ) を使用し、107×60 mm のゲルを用いて室温条件下において 50 V 定電圧で約 1 時間 40 分の泳動を行った。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液 (0.5  $\mu$ g/ml) で染色し、UV 照射下で検出されたバンドパターンを写真撮影した。

### 6. タバコ圃場におけるオオタバコガおよびタバコガの発生調査への応用

1997 年 6 月から 9 月に岩手県 (1 か所)、山形県 (2 か所)、福島県 (2 か所)、栃木県 (3 か所)、岡山県 (1 か所) および沖縄県 (8 か所) の 6 県 17 か所のタバコ圃場 (Table 3) からタバコの収穫後期に摂食中のタバコガ類幼虫を採集し、99.5%のエタノールに漬け、室温で保存した。タバコ圃場 1 か所当たり約 30 頭の幼虫を用いて後脚の一部を切りとり個体ごとに鋳型 DNA を調製した。これらの鋳型 DNA を用いて PCR を実施し、増幅産物の *MseI* および *VspI* による RFLP パターンを調べた。

また、RFLP パターンに後述する変異個体が検出された福島県西会津町のタバコ圃場個体群については、変異個体の構成比を詳細に調査する目的で幼虫を再度採集し、室内での個体別飼育によって得た 119 頭の成虫の RFLP パターンと外部形態を個体ごとに調査した。

## 結 果

### 1. PCR 法による DNA の増幅

*D. yakuba* の塩基配列に基づくプライマーを用いた PCR によってオオタバコガおよびタバコガのサンプルより 16S rRNA 遺伝子の一部領域を増幅することが可能となった。各個体の PCR 産物はアガロースゲル電気泳動において同一サイズの 1 本の DNA バンドを示した。また、新鮮な卵および 1 齢幼虫、99.5%エタノールに保存した終齢幼虫の後脚の一部、成虫の乾燥標本の触角または脚の一部など供試サンプルの発育ステージや保存状態に関わらず、いずれの場合も同様に PCR によって単一の DNA バンドが増幅された。また、室温で 2 年間保存した成虫の乾燥標本でも DNA を増幅することが可能であった。

### 2. 増幅した DNA の塩基配列の決定

アガロースゲル電気泳動の結果、増幅された DNA の長さは、ターゲットとなる DNA の 517 bp にプライマーの長さを加えた 557 bp に一致した。プライマー部分を除く領域の塩基配列を Fig. 1 に示した。オオタバコガとタバコガの間では、98.5%の高い塩基配列の相同性が認められた。本研究により得られたオオタバコガとタバコガの塩基配列をもとに各種の制限酵素の認識部位を推定した結果、*MseI* および *VspI* による RFLP パターンに明確な種間差が存在することが明らかとなった (Table 2)。ここで明らかにしたオオタバコガとタバコガの 517 bp の塩基配

```

ass1 : GTCITTTTGT AAATAATATA AAGTCTAATC TGCCCACTGA TTTAATTATT AAAGGGCTGC AGTATTTTGA
arm1 : .....
71 : CTGTACAAG GTAGCATAAT CATTAGTCAT TTAATTGATG ACTTGTATGA AAGATTGGAT GAGATATATA
71 : .....
141 : CTGTCTCTTA ATTATAATAT AAAATTTAAT TTTTTCAGTA AAAAGCTAAA ATAATTTAAA AAGACGAGAA
141 : .....
211 : GACCCATAG AGTTTTATAA ATTATATTTA TTAAGATTAT TTATAAATTT AATAATTTAAA ATAATTTAAT
211 : .....
281 : TTAATTTGTT GGGGTGACAA AAAAATAAAA ATAACITTTT TTTAATTGAA CATAAATAAG TGAATAATTG
281 : .....
351 : ATCCAATATT ATTGATTATA AGAAAAAATT ACCTTAGGGA TAACAGCGTA ATTTTTTTTT TTAGTTCATA
351 : .....
421 : TAAAAAAAAG AGTTTGGCAC CTCGATGTTG GATTAAGATA AAATTTAAT GCAGAAGTTT AAAATTTTTC
421 : .....
491 : ATCTGTTCGA TCATTAAAAT CITACAT
491 : .....

```

Fig. 1. Partial nucleotide sequences of 16S rRNA gene of *H. assulta* and *H. armigera*. Dots indicate nucleotide identity with *H. assulta*. **ass**: *H. assulta*, **arm**: *H. armigera*. Hatched boxes indicate recognition sites of *VspI*. Double underlines indicate recognition sites of *MseI*.

列は、DDBJ/EMBL/GenBank のデータバンクに登録した。それらのアクセッションナンバーは、タバコガが AB032067, オオタバコガが AB032068 である。

### 3. RFLP パターン

Table 1 に示した日本各地のオオタバコガ成虫の 9 個体群 161 個体およびタバコガ成虫の 6 個体群 66 個体について得られた PCR 産物の *MseI* および *VspI* による RFLP パターンを調べた結果、いずれの種でも個体変異は観察されなかった。いずれの場合もバンドパターンは、塩基配列から推定された種特異的な RFLP パターンと一致していた。オオタバコガの PCR 産物の *VspI* 処理では、278 bp, 212 bp および 67 bp の 3 本のバンド、*MseI* 処理では、172 bp に 1 本、65 bp 以下に多くのバンドを持つパターンを示した。タバコガの PCR 産物は、*VspI* では消化されず 557 bp の単一のバンドパターンを示し、*MseI* 処理では、131 bp に 1 本、62 bp 以下に多くのバンドを持つパターンを示した (Fig. 2)。また、タバコガでは異なる发育ステージや雌雄成虫の間で PCR 産物の *MseI* および *VspI* による RFLP パターンに差違は認められなかった。

### 4. タバコ圃場におけるオオタバコガおよびタバコガの発生調査への応用

調査した各個体の PCR 増幅産物を *MseI* および *VspI* で処理した RFLP パターンを Fig. 3, 各調査地点における

Table 2. Comparison of restriction fragment size (bp) of PCR products of 16S rRNA gene from *H. armigera* and *H. assulta*

Endonuclease	Species	
	<i>H. armigera</i>	<i>H. assulta</i>
<i>VspI</i>	278, 212, 67	no digestion
<i>MseI</i>	172, 65, 62, 52, 45, 33, 25, 18, 14, 14, 12, 12, 10, 7, 7, 5, 4	131, 62, 52, 47, 45, 41, 33, 25, 18, 18, 18, 14, 12, 12, 10, 7, 7, 5

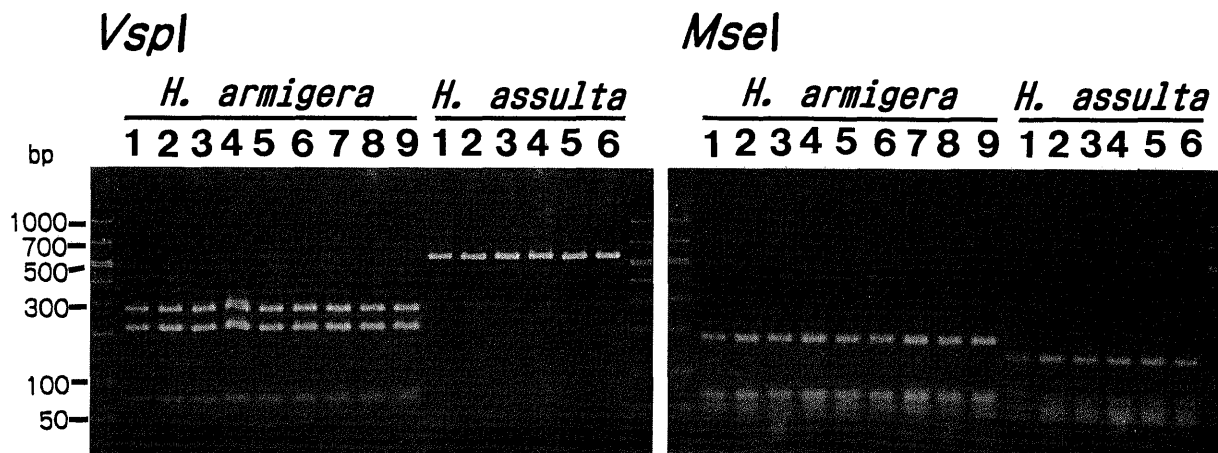


Fig. 2. Restriction fragment patterns of PCR-amplified 16S rRNA gene from *H. armigera* and *H. assulta* on 2.0% MetaPhor agarose gel. Numbers correspond to population Nos. in Table 1. The size marker on both edge lanes is a 1-kb DNA ladder (Gibco BRL).

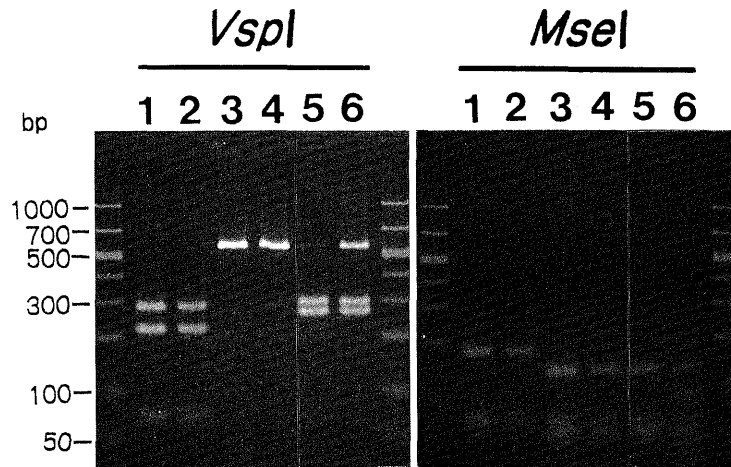


Fig. 3. Restriction fragment patterns of PCR-amplified 16S rRNA gene in larval samples collected at various localities. Species: 1 and 2, *H. armigera*; 3 and 4, *H. assulta*; 5, Aizu type; 6, Kuroiso type. The size marker on both edge lanes is a 1-kb DNA ladder (Gibco BRL).

Table 3. Identification of larvae on tobacco in various localities by PCR-RFLP with *VspI* and *MseI*

Locality		Collection date	No. of larvae	Identification based on restriction fragment patterns with <i>VspI</i> and <i>MseI</i>			
Prefecture	City			<i>H. armigera</i>	<i>H. assulta</i>	Aizu type	Kuroiso type
Iwate	Morioka	? Aug. 1997	30	21 (70.0%)	9 (30.0%)		
Yamagata	Obanazawa	5 Aug. 1997	24		24 (100)		
	Higashine	5 Aug. 1997	18		18 (100)		
Fukushima	Aizubange	8 Aug. 1997	30		28 (93.4)	1 (3.3%)	1 (3.3%)
	Nishiaizu	8 Aug. 1997	28	1 (3.6)	23 (82.1)	1 (3.6)	3 (10.7)
Tochigi	Oyama	11 Aug. 1997	60		60 (100)		
	Kuroiso 1	21 Aug. 1997	29		26 (89.7)		3 (10.3)
	Kuroiso 2	21 Aug. 1997	30		30 (100)		
Okayama	Kurashiki	24 Jul. 1997	28	2 (7.1)	26 (92.9)		
Okinawa	Ishigaki 1	12 Jun. 1997	27	2 (7.4)	25 (92.6)		
	Ishigaki 2	11 Jun. 1997	30	24 (80.0)	6 (20.0)		
	Ishigaki 3	12 Jun. 1997	30	2 (6.7)	28 (93.3)		
	Ishigaki 4	12 Jun. 1997	30	10 (33.3)	20 (66.7)		
	Gusukube 1	9 Jun. 1997	23	20 (87.0)	3 (13.0)		
	Gusukube 2	10 Jun. 1997	30	30 (100)			
	Ueno	10 Jun. 1997	28	26 (92.9)	2 (7.1)		
	Shimoji	10 Jun. 1997	59	52 (88.1)	7 (11.9)		

Aizu and Kuroiso types refer to the restriction fragment patterns in Fig. 3. Data in parentheses represent species composition rate.

各々の RFLP パターンの出現率を Table 3 に示した。沖縄県では、8 地点のすべての調査地点でオオタバコガ型のバンドパターンが検出され、その出現率は 6.7~100% であり、8 地点のうち 5 地点でオオタバコガが優占種であった。なお、石垣市の 4 地点のうち 3 地点でタバコガ型のバンドパターンが優占しており、同一地域においても調査地点により優占種が異なることが示された。沖縄県以外でのオオタバコガ型のバンドパターンの出現率は、岩手県盛岡市で 70.0%、岡山県倉敷市で 7.1%、福島県西会津町で 3.6% であった。山形県東根市および尾花沢市、福島県会

津坂下町、栃木県黒磯市および小山市ではオオタバコガ型のバンドパターンは検出されなかった。

本調査の結果、塩基配列より推定されるタバコガおよびオオタバコガに特異的な RFLP パターンとは異なるバンドパターンが福島県会津坂下町と西会津町の一部個体（以下会津型と称する）および栃木県黒磯市、福島県会津坂下町と西会津町の一部個体（以下黒磯型と称する）で認められた (Fig. 3)。会津型は、PCR 産物の *MseI* 処理ではタバコガの RFLP パターンと同一であるが、*VspI* 処理では、約 300 bp と約 260 bp の 2 本のバンドを持つ異なる RFLP

パターンを示した。一方、黒磯型は PCR 産物の *VspI* 処理では、約 300 bp, 約 260 bp および消化されずに残った 557 bp の 3 本のバンドを持つ RFLP パターンを示し、*MseI* 処理では約 130 bp に 1 本, 約 90 bp に 1 本および 70 bp 以下に多数のバンドを持つ他のいずれとも異なる RFLP パターンを示した。上記の個体群における変異型の出現率はそれぞれの調査個体の 3.3~10.7%であった。

また、RFLP パターンに変異個体が検出された福島県西会津町において再度幼虫を採集し、個体別飼育で得た 119 頭の成虫について RFLP パターンを個体別に調査し、変異個体の構成比を調べた。その結果、会津型の変異パターンを示した個体が 5 個体、オオタバコガ型が 2 個体そしてタバコガ型が 112 個体であり、黒磯型の変異パターンは検出されなかった。会津型の変異パターンを示した個体は外部形態の特徴からタバコガと同定された。

### 考 察

オオタバコガとタバコガの 16S rRNA 遺伝子の一部領域の塩基配列は、98.5%の高い相同性を示したが、*MseI* および *VspI* による RFLP パターンには顕著な差違が認められ、これによって両者を識別することが可能となった。この他のヤガ科タバコガ亜科に属するキタバコガ *Pyrrhia umbra* (Hufnagel) およびツメクサガ *Heliothis maritima* (Graslin) でも *MseI* および *VspI* 処理によって本研究で用いた 2 種と異なる種特異的な RFLP パターンが得られており (吉松・大類, 未発表)、タバコガ類の簡易な同定法として mtDNA の 16S rRNA 遺伝子の一部領域の PCR-RFLP 法が広く活用できることが示唆された。

RFLP パターンを種の識別の基準として利用する場合、種内変異について考慮する必要がある。本研究では、*MseI* および *VspI* による RFLP パターンが通常のオオタバコガおよびタバコガとは異なる会津型および黒磯型が低い頻度で検出された。会津型の個体は成虫の外部形態よりタバコガと判定され、本型はタバコガの種内変異型と考えられた。黒磯型は、*MseI* 処理ではタバコガ亜科の既知のいずれの種とも異なる RFLP パターンを示し、*VspI* 処理した場合、タバコガと会津型両方の特徴を示す RFLP パターンを示した。*VspI* による DNA 断片の長さの合計は塩基配列から予測される PCR 産物の長さの 2 倍であり、1 回の PCR によって 2 種類の DNA 断片が増幅されていることを示唆している。この原因としては寄生生物等の DNA の混入、単一の個体が複数種の mtDNA を有するヘテロプラズミーなどが考えられるが現在のところ不明である。また、*VspI* 断片のみを見た場合、黒磯型は会津型とタバコガ型の両方の特徴を示しており、両者の交雑種である可能性もある。しかしながら、*MseI* による DNA 断片では既知のいずれのタバコガ亜科昆虫とも異なっており、本型

が未知の種である可能性もある。今後は、黒磯型の PCR 産物をクローニングするなどして塩基配列を決定し、本型の特殊なバンドパターンの成因について検討する必要がある。さらに、黒磯型の成虫について形態観察や交配試験などを実施し、本型の個体が未知の種である可能性についても検討する必要がある。しかしながら、本研究で調査した範囲では、変異型を示す個体は、わずかな頻度でしか検出されず、ほとんどの個体がいずれかの種に特異的な RFLP パターンを示したことから、本方法は実用的な種の識別法として問題なく利用できると思われる。

タバコを食害していたタバコガ類の幼虫の調査では、沖縄県と岩手県の採集地においてオオタバコガ型の RFLP パターンが顕著に高い出現率を示した。一方、福島県、岡山県ではオオタバコガ型の出現率は著しく低く、山形県、栃木県では検出されないなど地域によって大きな差が認められた。また、沖縄県石垣市のサンプルでは近隣地域でも調査地点によって種の構成比に大きな差があった。しかし、圃場によって優占種は異なるものの、オオタバコガとタバコガは広い範囲にわたって混棲し、タバコを食害していることが明らかである。金崎ら (1997) は作物を加害している幼虫を採集し室内で羽化した成虫から種を同定することによって、ピーマンとホオズキでタバコガとオオタバコガの両種が混棲していることを確認している。これらのことから、オオタバコガが生息する地域では多くの場合、タバコガとの共通の寄主植物にこの 2 種が混棲し、食害している可能性が高いと考えられる。

オオタバコガは、エンドウ、キク、トマト、レタス、キャベツ、ニンジン、バラ、カーネーション、トルコギキョウ、オクラ、シシトウ、アスパラガスなどの野菜、作物および花きなど多くの植物を加害する広食性害虫である。一方、タバコガは、ナス科作物の主要害虫として知られている (吉松, 1995)。ところが、農林有害動物・昆虫名鑑 (日本応用動物昆虫学会, 1987) によると日本ではタバコガの寄主植物としてナス科植物以外にトウモロコシ、ウリ類、アブラナ科野菜、レタス、カーネーション、セキチク、ナデシコがあげられている。ナス科植物以外のタバコガの寄主植物の記録にはオオタバコガと誤同定されている可能性があり、正確な同定に基づく再調査の必要がある。このような調査を行うには、植物を食害している幼虫を採集し、アルコール保存した個体を PCR-RFLP 法によって種を同定する方法が適していると考えられる。

タバコガ類の幼虫は、共食いの性質があり、中齢以降は個体別に飼育することが必要なため、野外から採集した大量の幼虫を羽化させて成虫で同定するには、多大な手間や期間を要する。また、この方法では幼虫や蛹が羽化前に死亡する場合も多く採集個体すべてを同定することは極めて困難である。一方、PCR-RFLP による同定法は、発育ス

テージや雌雄に関係なく野外から採集でき、室温でアルコール保存した幼虫からでも正確に同定することが可能である。また、乾燥保存した成虫の触角あるいは脚などの一部からの解析が可能なので新たな変異型の RFLP パターンが検出されたとき、残りの部分を用いた形態観察が可能であり、それが別種によるものかあるいは種内変異によるものかを判定することができる。このような特徴から、mtDNA の 16S rRNA 遺伝子の一部領域の PCR-RFLP 解析は、タバコガ類の簡易な識別法として、今後のタバコガおよびオオタバコガの生態解明や防除などに広く利用できると考えられる。

### 摘 要

オオタバコガ *Helicoverpa armigera* とタバコガ *H. assulta* を識別するための方法としてミトコンドリア DNA の 16S rRNA 遺伝子の一部領域の PCR-RFLP について検討した。まず、これら 2 種から増幅された 557 bp の PCR 産物の塩基配列を決定し、種の識別に利用可能な制限酵素を推定した。その結果、これら 2 種は増幅産物の *MseI* あるいは *VspI* 処理により識別できると考えられた。さらに、成虫の外部形態によって同定した日本各地で採集したオオタバコガ成虫 9 個体群 161 個体およびタバコガ成虫 6 個体群 66 個体の乾燥標本について *MseI* および *VspI* による PCR-RFLP パターンを調べた。その結果、RFLP パターンは全ての個体で外部形態による同定結果と一致しており、PCR-RFLP による種同定の有効性が示された。次に、この方法を応用して岩手、山形、福島、栃木、岡山および沖縄県の 17 か所のタバコ圃場から採集したタバコ食害中のタバコガ類幼虫 534 個体について個体ごとの PCR-RFLP パターンを調べたところ、オオタバコガはタバコガと混棲してタバコ圃場に広く分布していることが明らかになった。また、一部の地域では RFLP パターンの変異型がみられたが、その出現頻度は低かった。

### 引用文献

金崎秀司・森貞雅博・山崎康男 (1997) 愛媛県におけるオオタ

- バコガの発生と防除対策. 四国植防 32: 39-45. [Kanasaki, S., M. Morisada and Y. Yamasaki (1997) Occurrence and control of *Helicoverpa armigera* in Ehime Prefecture. *Proc. Assoc. Pl. Protec. Shikoku* 32: 39-45.]
- 奈良井祐隆 (1997) 農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性マニユアル (14) 野菜・花き害虫: オオタバコガ. 植物防疫 51: 488-491. [Narai, Y. (1997) Methods for measurement of susceptibility of agricultural insect pests to insecticides. The tobacco budworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Plant Protect.* 51: 488-491.]
- 日本応用動物昆虫学会 編 (1987) 農林有害動物・昆虫名鑑. 日本植物防疫協会, 東京. 379 pp. [The Japanese Society of Applied Entomology and Zoology (1987) *Major Insect and Other Pests of Economic Plants in Japan*. Japan Plant Protection Association, Tokyo. 379 pp.]
- 小野本徳人・根来淳一・柴尾 学・田中 寛 (1996) 人工飼料浸漬法によるオオタバコガの薬剤殺虫効果. 関西病虫研報 38: 23-24. [Onomoto, N., J. Negoro, M. Shibao and H. Tanaka (1996) Effects of insecticides on the corn earworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) by the artificial diet-dip method. *Proc. Kansai Pl. Prot.* 38: 23-24.]
- Roehrdanz, R. L. (1994) Simple method for monitoring dispersal of *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) backcross sterility genes. *J. Econ. Entomol.* 87: 676-679.
- 染谷 淳・清水喜一 (1997) 千葉県におけるオオタバコガの発生生態と薬剤感受性. 関東東山研報 44: 241-248. [Someya, A. and K. Shimizu (1997) Biology and insecticide susceptibility of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* in Chiba Prefecture. *Proc. Kanto Pl. Prot. Soc.* 44: 241-248.]
- Tuda, M., T. Fukatsu and M. Shimada (1995) Species differentiation of bruchid beetles (Coleoptera: Bruchidae) analyzed by mitochondrial DNA polymorphism. *Appl. Entomol. Zool.* 30: 377-380.
- Xiong, B. and T. D. Kocher (1991) Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome* 34: 306-311.
- 吉松慎一 (1995) 1994年に西日本で多発生したオオタバコガとその加害作物. 植物防疫 49: 495-499. [Yoshimatsu, S. (1995) Outbreaks of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in western Japan in 1994 and its host plants. *Plant Protect.* 49: 495-499.]