

3-1 コナガ

3-1-1 採集時期について

地域や年によって採集数の違いはあるが、春から秋にかけて圃場近辺に設置した粘着式フェロモントラップに捕獲される成虫個体を用いる。ただし抵抗性遺伝子診断の性格上、対象作物の作期前に採集を行うことを推奨する（夏秋どり作物なら春期にコナガ成虫を採集する）。

3-1-2 準備するもの

- (1) 日本植物防疫協会などで発生予察用資材として販売しているコナガ用フェロモンルアーおよび粘着式トラップ（粘着板・屋根）を利用する。供試虫を剥離する労力を減らすために、粘着物質が少ないタイプの粘着板が好ましい。
- (2) 粘着式トラップ設置のための資材（コンクリートブロックや園芸用ポールなど）。

3-1-3 粘着式フェロモントラップの設置

- (1) 粘着式トラップの下面が、地面から 30～50 cm の高さになるように設置する（図 1）。
- (2) 粘着板にフェロモンルアーを設置し、トラップの屋根に挿入する。
- (3) 粘着板の回収（図 2）は、挿入後 7 日以内に行う。
- (4) 日光の紫外線による捕殺コナガの核酸劣化に注意する。直射日光下においたトラップにおいても遺伝子診断に利用可能であるが、トラップを日陰に設置する、またはトラップ屋根に日よけを設置するなど措置が好ましい。
- (5) 回収した粘着板ごと冷蔵庫（冷暗乾燥条件）で保管する。遺伝子診断に利用するまでの保管期間は半年以内のものが好ましいが、それより長期間保管しても利用可能である。



図 1 粘着式フェロモントラップの様々な設置例

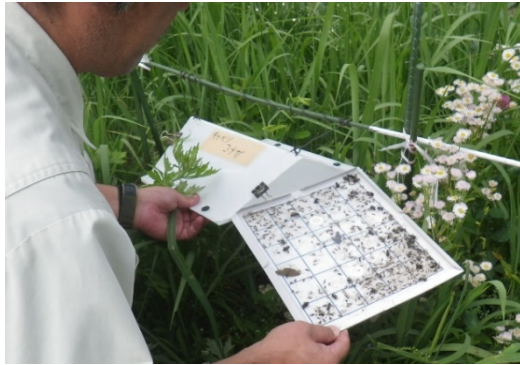


図2 粘着板の回収

3-1-4 コナガサンプルの剥離

- (1) ドラフト内で粘着板に付着したコナガ成虫にノルマルヘキサン (0.5~2mL) を滴下し、粘着物質を溶解する (図3)。コナガに類似したコガ類等との混同に注意する (図4)。
- (2) 爪楊枝 (サンプルごとに使い捨て) を使ってコナガを剥離する。
- (3) 剥離したコナガサンプルを DNA 抽出用マイクロチューブに移す。虫体は多少崩れても問題ないが、なるべくチューブの底に押し込める。
- (4) コナガサンプルが入ったチューブは冷凍庫 (-20℃) で保管する。

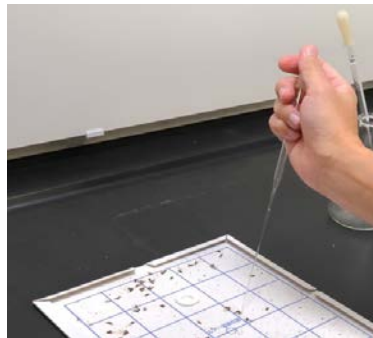


図3 コナガ成虫剥離のためのヘキサンの滴下



図4-1 粘着板に付着したコナガ (上) およびネギコガ (下)



図4-2 粘着板に付着したコナガ

3-1-5 その他

圃場から生きた成幼虫を直接採集したものを利用したい場合、採集した成幼虫をバイアル瓶などにまとめて99.5%エタノール溶液に浸漬し、冷暗所で保管する方法もある。この場合、上記トラップによる捕殺成虫よりも核酸の保存状態が良いものが採集できるという利点があるが、サンプリングの時空間的偏りが生じる場合がある。圃場から広く満遍なく、また複数日に分けて採集を行うとよい。

(執筆：上杉龍士)

文献

上杉龍士 (2017) 粘着トラップから回収したコナガ成虫を用いた薬剤抵抗性遺伝子診断の可能性. 植物防疫 71(3): 148-153.

4-1 コナガのジアミド剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

ジアミド系農薬の有効成分が作用するリアノジン受容体タンパク質の遺伝子変異を検出するプライマーを使用して診断する。

遺伝子型	受容体のアミノ酸	受容体遺伝子上の塩基配列
感受性 (S)	4946 番目がグリシン (G)	GGG
抵抗性 (R)	4946 番目がグルタミン酸 (E)	GAG または GAA

診断は、上記の感受性型および抵抗性型の有無を一回の PCR で同時に判定する手順と感受性型と抵抗性型の判定を二回の PCR に分けてそれぞれ判定する手順がある。実施環境によっては、前者の手順では、電気泳動結果における各遺伝子型のバンドの有無の判定が難しい場合がある。そのような場合には、後者の手順で診断を実施することを推奨する。

1 DNA 抽出法

<準備するもの>

- DNA 抽出用バッファ ((1)、(2)のいずれかを用意)
 - (1) TE-T バッファ(以下の試薬を用いて調整する)
 - 1 M Tris-HCl (pH 9.0) (ニッポンジーン/品番 314-90381)
 - 0.5 M EDTA (pH 8.0) (ニッポンジーン/品番 311-90075)
 - 20% Triton X-100 (ケイマンケミカル/品番 600217)
 - 滅菌蒸留水 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (サーモフィッシャー/品番 10977015)TE-T バッファの組成は次の通りとする。
10 mM Tris HCl (pH 9.0), 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100
TE-T バッファは室温で保存可能。
 - (2) PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (サーモフィッシャー/品番 4318930)
- PCR チューブおよびキャップ

<抽出用バッファの調整> (PrepMan® を用いる場合は不要)

50 mL の TE-T バッファを用意する場合は、次の通りに希釈する。

1 M Tris-HCl (pH 9.0)	0.5 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.1 mL
20% Trion X-100	0.25 mL
滅菌蒸留水	49.15 mL
合計	50.0 mL

<手順>

(個体単位で実施)

- 1) チューブにコナガ成虫個体と抽出用バッファ 100 μ L を入れる。虫体をすり潰す必要はない。PrepMan 使用時に空気の層ができる場合にはボルテックスを繰り返し、空気の層が無いことを確認する。
- 2) サーマルサイクラーで 95°C 、15 分間加熱する。
- 3) 室温に戻したサンプルは遺伝子解析までの間、-20°C 以下で保存する。



PCR チューブの抽出バッファに浸したコナガ成虫個体

2 マルチプレックス PCR

<準備するもの>

- ・前項のコナガ DNA 抽出液
- ・次のいずれかの PCR 酵素（ホットスタート対応の(1)を推奨する）
 - (1)「EmeraldAmp PCR Master Mix」（タカラバイオ／品番 RR300A）
 - (2)「EmeraldAmp MAX PCR Master Mix」（タカラバイオ／品番 RR320A）
 - (3)「Quick Taq HS DyeMix」（東洋紡/品番 DTM-101）いずれの製品も、プライマー、鋳型 DNA を加えるだけで PCR が実施可能
- ・プライマー5種
 - px_ryr_G4946E_F :5'-AGACTGGCGCTACCAAGTGT-3'
 - px_ryr_G4946E_R :5'-CCCGTTATGCGTGACAGACT-3'
 - px_ryr_G4946E_MR_F :5'-TGTTGGACGTGGCWGTAGA-3'
 - px_ryr_G4946E_MS_R :5'-ATAGTCCTCANNGTCTTGACCC-3'
 - px_ryr_G4946E_MS_F :5'-TGTTGGACGTGGCWGTAGG-3'(px_ryr_G4946E_MS_R は 1 回の PCR で判定する手順でのみ使用し、px_ryr_G4946E_MS_F は 2 回の PCR で判定する手順でのみ使用する。その他のプライマーは各手順で共通して使用する)
- ・滅菌蒸留水 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (サーモフィッシャー/品番 10977015)
- ・0.5x TBE 緩衝液 (44.5 mM Tris、44.5 mM ホウ酸、1 mM EDTA) (ニッポンジーン/品番 318-90041) (10 倍希釈して用いる)

本診断法では低分子の DNA 断片(65 bp)が含まれるため、アガロース粉末の溶解には前述の TAE 緩衝液ではなく、TBE 緩衝液を用いることを推奨する。
- ・アガロースゲル
- ・DNA 染色試薬 (エチジウムブロマイド、GelRed 等)
- ・実験器具類 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチップ等)

<手順>

(抵抗性型と感受性型の判定を一回の PCR で同時に行う場合)

1) 以下の組成になるように各試薬を解析個体数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本分	20 本分の場合
プライマーミックス	1.8 μL	37.8 μL
PCR 酵素	3.0 μL	63.0 μL
合計	4.8 μL	合計 100.8 μL を 20 本に分注

(複数本分については、必要数+1 の本数分で調整する)

各プライマーについて 100 μM に溶解したものを用意した場合、次のように希釈してプライマーミックスを調整する。

(プライマーミックスは 100 μL ずつ等に小分けして -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する)

		プライマー濃度
px_ryr_G4946E_F	2.5 μL	0.5 μM
px_ryr_G4946E_R	2.5 μL	0.5 μM
px_ryr_G4946E_MR_F	25.0 μL	5.0 μM
px_ryr_G4946E_MS_R	50.0 μL	10.0 μM
Tris または滅菌蒸留水	420.0 μL	
合計	500.0 μL	

(Tris は 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) または 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))

希釈は Tris の使用を推奨する。

- 2) DNA 抽出により得られた各コナガ DNA(10 倍希釈)を 1.2 μL ずつ分注する。
3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

95 $^{\circ}\text{C}$	2 分	} 35 サイクル
95 $^{\circ}\text{C}$	15 秒	
55 $^{\circ}\text{C}$	15 秒	
68 $^{\circ}\text{C}$	10 秒	
68 $^{\circ}\text{C}$	5 分	

(抵抗性型と感受性型の判定を二回の PCR に分けて行う場合)

- 1) 以下の組成になるように各試薬を解析個体数分混合し、PCR チューブに分注する。これを2セット分用意する(抵抗性型判定用と感受性型判定用)。

	1 本分	20 本分の場合
プライマーミックス	1.2 μL	25.2 μL
PCR 酵素	3.0 μL	63.0 μL
合計	4.2 μL	合計 88.2 μL を 20 本に分注

(複数本分については、必要数+1 の本数分で調整する)

各プライマーについて 100 μM に溶解したものを用意した場合、次のように希釈してプライマーミックスを調整する。

(プライマーミックスは 100 μL ずつ等に小分けして -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で保存)

(抵抗性型の判定実施分) 以下の 3 プライマーを利用

	液量	プライマー濃度
px_ryr_G4946E_F	2.5 μL	0.5 μM
px_ryr_G4946E_R	5.0 μL	1.0 μM
px_ryr_G4946E_MR_F	25.0 μL	5.0 μM
Tris または滅菌蒸留水	467.5 μL	
合計	500.0 μL	

(感受性型の判定実施分) 以下の 3 プライマーを利用

	液量	プライマー濃度
px_ryr_G4946E_F	2.5 μL	0.5 μM
px_ryr_G4946E_R	5.0 μL	1.0 μM
px_ryr_G4946E_MS_F	5.0 μL	1.0 μM
Tris または滅菌蒸留水	487.5 μL	
合計	500.0 μL	

(Tris は 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) または 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))

希釈は Tris の使用を推奨する。

- 2) DNA 抽出により得られた各コナガ DNA(20 倍希釈)を 1.8 μL ずつ分注する。
DNA の希釈は Tris-HCl (10 mM Tris-HCl (pH 9.0) または 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) または滅菌蒸留水を用いる。Tris の使用を推奨する。

- 3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

(抵抗性型判定用と感受性型判定用についてそれぞれ実施する)

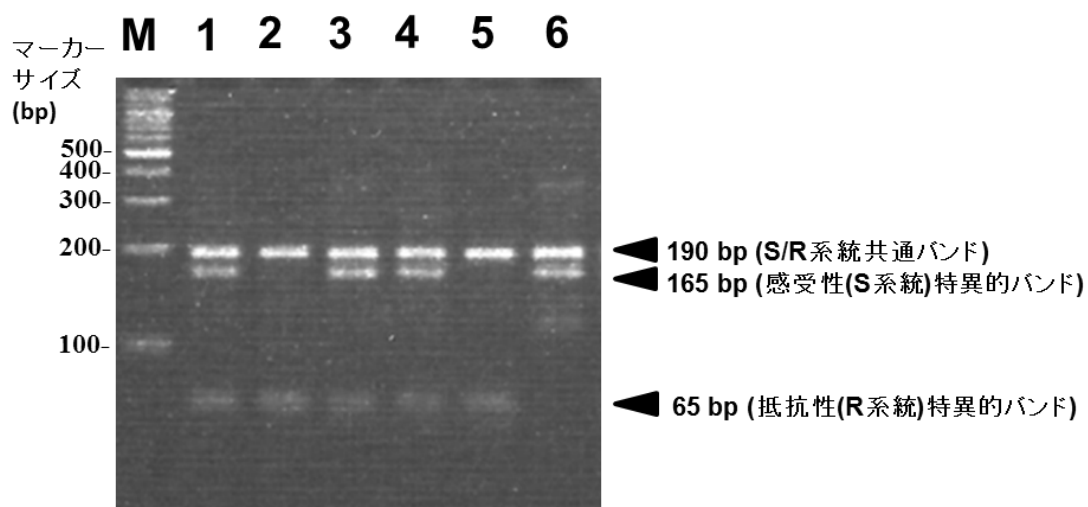
95 °C	2 分	} 35 サイクル
95 °C	15 秒	
58 °C	5 秒	
68 °C	10 秒	
68 °C	5 分	

3 電気泳動・染色・撮影

- 1) PCR 反応液を 3% アガロースゲルで 20~30 分間 100 V で電気泳動する。
- 2) エチジウムブロマイド (EtBr) あるいは GelRed (Biotium / 品番 41003) 等で染色する。
- 3) UV を照射し、バンドパターンを撮影する。

4 結果

(抵抗性型と感受性型の判定を一回の PCR で同時に行う場合)



レーン No.2,5 : ジアミド剤抵抗性ホモ(R ホモ型)

レーン No.1,3,4 : ジアミド剤抵抗性感受性ヘテロ(ヘテロ型)

レーン No.6 : ジアミド剤感受性ホモ(S ホモ型)

M : サイズマーカー (100 bp ラダー)

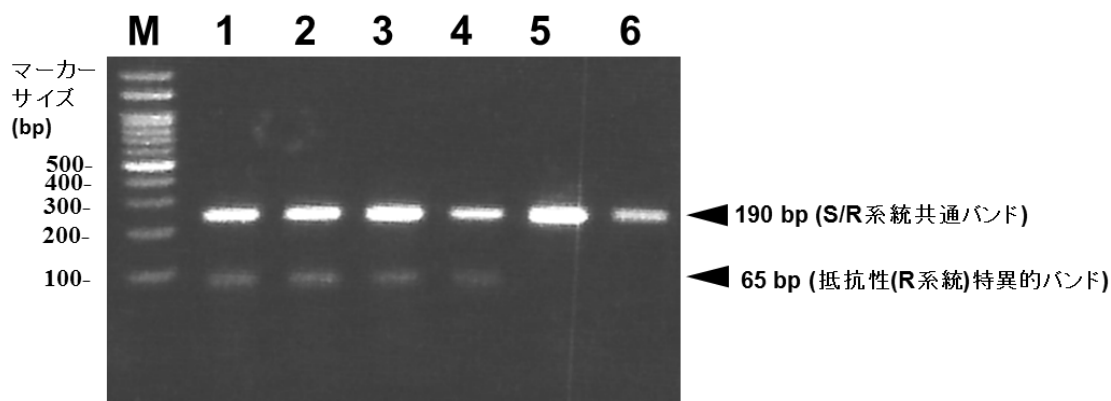
以下の数式により、ジアミド剤抵抗性遺伝子(G4946E)頻度を算出する。

$$\text{G4946E 遺伝子頻度} = \frac{\text{R ホモ型の個体数} \times 2 + \text{ヘテロ型の個体数}}{\text{全個体数} \times 2} \times 100$$

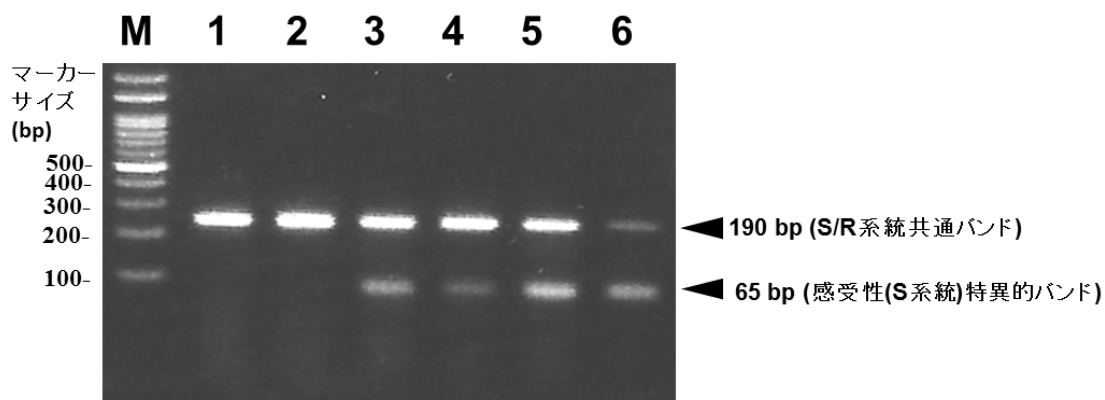
上記の 6 個体の内訳は、R ホモ型が 2 個体、ヘテロ型が 3 個体、S ホモ型が 1 個体であるため、G4946E 遺伝子頻度は $((2 \times 2 + 3) / 6 \times 2) \times 100 = 58.3\%$ となる。
なお、共通バンドが未検出の個体については判定対象外として除外する。

(抵抗性型と感受性型の判定を二回の PCR に分けて行う場合)

(1) 抵抗性型の判定



(2) 感受性型の判定



(EmeraldAmp PCR Master Mix 使用時には、上図のように、バンドの位置が陰極側(上方向)に若干ずれる傾向がある)

レーン No.1,2: ジアミド剤抵抗性ホモ(R ホモ型)

レーン No.3,4: ジアミド剤抵抗性感受性ヘテロ(ヘテロ型)

レーン No.5,6: ジアミド剤感受性ホモ(S ホモ型)

M: サイズマーカー (100 bp ラダー)

上記の 6 個体の内訳は、R ホモ型が 2 個体、ヘテロ型が 2 個体、S ホモ型が 2 個体であるため、G4946E 遺伝子頻度は $((2 \times 2 + 2) / 6 \times 2) \times 100 = 50\%$ となる。

なお、共通バンドが未検出の個体については判定対象外として除外する。

(執筆: 上樂明也)