

3-2 チャノコカクモンハマキ

3-2-1 採集時期について

わが国において本種成虫は年4~5回発生するが(図1)、地域や年次により発生時期や発生量に違いがある。チャの生産府県では、本種の薬剤防除適期を判断するために、病害虫防除所や農協などがフェロモントラップを設置していることが多い。こうした情報をもとに、本種を採集する地域の発生時期を把握するとともに、適切な時期にフェロモントラップを設置して成虫を採集する。ただし、本種の薬剤防除を実施する前に成虫の採集を行って抵抗性遺伝子診断を実施することが望ましい。

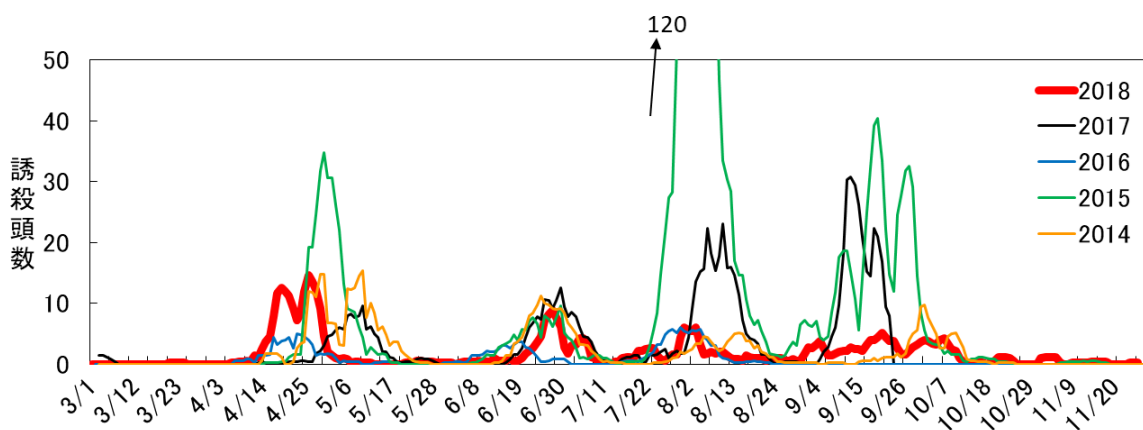


図1 チャノコカクモンハマキ成虫の誘殺状況
(5日移動平均、静岡県茶業研究センター内予察灯)

3-2-2 準備するもの

- (1) チャノコカクモンハマキ用フェロモンルアーおよび粘着式トラップ (いずれも日本植物防疫協会などから購入可能)。
- (2) (1)のフェロモントラップをチャ園に設置するために、粘着式トラップに付属する針金と、必要に応じて園芸用支柱 (長さ1.5~2m程度)などを準備する。

3-2-3 フェロモントラップの設置

- (1) 園芸用支柱などに針金でフェロモントラップを固定し、トラップの下面がチャ摘採面と同程度の高さになるように設置する(図2)。なお、この設置方法は一例であり、本トラップが風で飛ばされないように設置すれば良い。ただし、フェロモンは空気より重いことから、チャ株内の雄成虫がトラップに確実に誘引されるよう摘採面と同程度の高さに設置する(図2、3)。
- (2) 粘着板にフェロモンルアーを固定し、トラップの屋根に挿入する。



図 2 フェロモントラップ設置例 1



図 3 フェロモントラップ設置例 2

3-2-4 粘着板の回収と保存

- (1) 成虫の発生量によるが、抵抗性遺伝子診断に必要となるサンプル数（リスクレベル 1 か 2 かを判断する場合は 80 個体、リスクレベル 2 か 3 かを判断する場合は 16 個体（1-3 参照）が粘着板に誘殺され次第、速やかに回収する（図 4）。なお、粘着板を 1 週間以上設置した場合でもチャノコカクモンハマキ成虫からの DNA 抽出は可能であるが、ナメクジによる捕食被害やカビの発生による DNA 劣化も確認されていることから注意が必要である。
- (2) 抵抗性遺伝子診断を実施するまでの間、回収した粘着板は冷凍庫（-20℃）または冷蔵庫（4℃）で保存する。なお、数ヶ月程度の冷凍保存または 1 ヶ月程度の冷蔵保存であれば、抵抗性遺伝子診断は可能である。

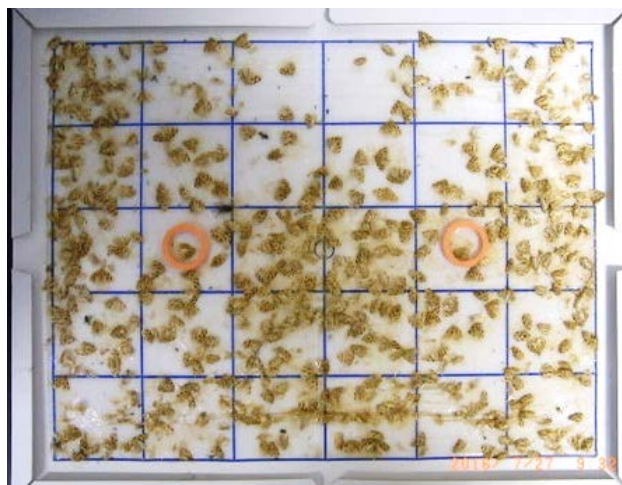


図 4 粘着板に誘殺されたチャノコカクモンハマキ成虫

（執筆：内山徹）

4-2 チャノコカクモンハマキのテブフェノジド剤抵抗性遺伝子診断法

断法

はじめに

DAH 系 IGR 剤の一つであるテブフェノジドはエクダイソン受容体に作用する。抵抗性系統ではエクダイソン受容体の 415 番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変わり、テブフェノジドとの結合親和性が低下することにより感受性が低下する。そこで、415 番目のアミノ酸をコードする受容体遺伝子上の塩基配列(感受性では GCGC、抵抗性では GTGC)を標的として、遺伝子型を判別する。

まず PCR-RFLP 法では、受容体遺伝子上の塩基配列を含むエクダイソン受容体の部分配列を PCR 増幅し、感受性型の塩基配列 GCGC を特異的に切断する制限酵素を用いて診断する。この手法では、抵抗性ホモ、感受性ホモ、抵抗性感受性ヘテロを明瞭に判別し、抵抗性遺伝子頻度算出を行うことが可能である。

次に LAMP 法では、抵抗性型の受容体遺伝子上の塩基配列を特異的に増幅するプライマーを用いて診断する。この手法では、サーマルサイクラーや電気泳動装置などの特殊な機器が不要であるため、抵抗性遺伝子を持つ個体を簡便に検出することが可能である。

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)	415 番目がアラニン (A)	GCGC
抵抗性 (R)	415 番目がバリン (V)	GTGC

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

- ・溶解バッファー (50 mM NaOH, 200 μM EDTA)
- ・中和バッファー (200 mM Tris-HCl, pH 8.0)
- ・PCR チューブおよびキャップ
- ・ビーカー(500 mL-1000 mL)
- ・カッターナイフ
- ・ピンセット

<手順>

(幼虫の場合)

- 1) 幼虫は DNA 抽出するまで、冷凍庫(-20°C)で凍らせておく。1.5 mL チューブ

に1頭ずつ入れて冷凍すると、作業効率が良い。

- 2) 溶解バッファー 100 μ L を PCR チューブに入れる。
- 3) 幼虫の頭部から約 2 mm をカッターナイフで切り、2) に入れる。
- 4) 使用したカッターナイフやピンセットは、サンプルのコンタミネーションを避けるため、毎回蒸留水で洗い水分を拭き取る。
- 5) サーマルサイクラーを用いて 95°C で 10 分間加熱する。
- 6) 中和バッファー 50 μ L を新しい PCR チューブに入れ、5) の上清を 30 μ L 入れる。この抽出液は冷蔵庫(4°C)で保存し、1 週間以内に解析を行う。

(成虫の場合)

- 1) 成虫は DNA 抽出するまでトラップごと、冷凍庫(-20°C)で凍らせておく。成虫の腹部をトラップからピンセットで外し、1 頭ずつチャック付きポリ袋に入れて冷凍すると作業効率が良い。
- 2) 溶解バッファー 100 μ L を PCR チューブに入れる。
- 3) 成虫の腹部をピンセットあるいは爪楊枝の柄を用いて、2) に入れる。
- 4) 使用したカッターナイフやピンセットは、サンプルのコンタミネーションを避けるため、毎回蒸留水で洗い水分を拭き取る。
- 5) サーマルサイクラーを用いて 95°C で 10 分間加熱する。
- 6) 中和バッファー 50 μ L を新しい PCR チューブに入れ、4) の上清を 30 μ L 入れる。この抽出液は冷蔵庫(4°C)で保存し、1 週間以内に解析を行う。

II. PCR-RFLP

<準備するもの>

- ・前項のチャノコカクモンハマキ DNA 抽出液
- ・PCR 酵素「Emerald Amp MAX PCR Master Mix」(タカラバイオ/品番 RR320A)
- ・プライマー2種
RFLP-1F : 5'-TGACGCTATTGTATTGTGGTTTC-3'
RFLP-1R : 5'-CTCAATGACGTAGGCCATG-3'
- ・制限酵素「Hha I」(ニューイングランドバイオラボ/品番 R0139S または R0139L)
- ・滅菌蒸留水
- ・アガロースゲル
- ・DNA 染色試薬 (エチジウムブロマイド、Gel Red 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>

- 1) 以下の組成になるように各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注す

る。

	1 本分	20 本分の場合
Emerald MAX PCR Master Mix	2.5 μ L	50.0 μ L
滅菌蒸留水	1.3 μ L	26.0 μ L
各プライマー(各 10 μ M)	0.26 μ L	5.2 μ L
合計	4.06 μ L	合計 81.2 μ L を 20 本に分注

- 2) DNA 粗抽出により得られたチャノコカクモンハマキ DNA を 1 μ L 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。

94°C	30 秒	} 40 サイクル
98°C	10 秒	
65°C	30 秒	
72°C	30 秒	

III. 制限酵素反応

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

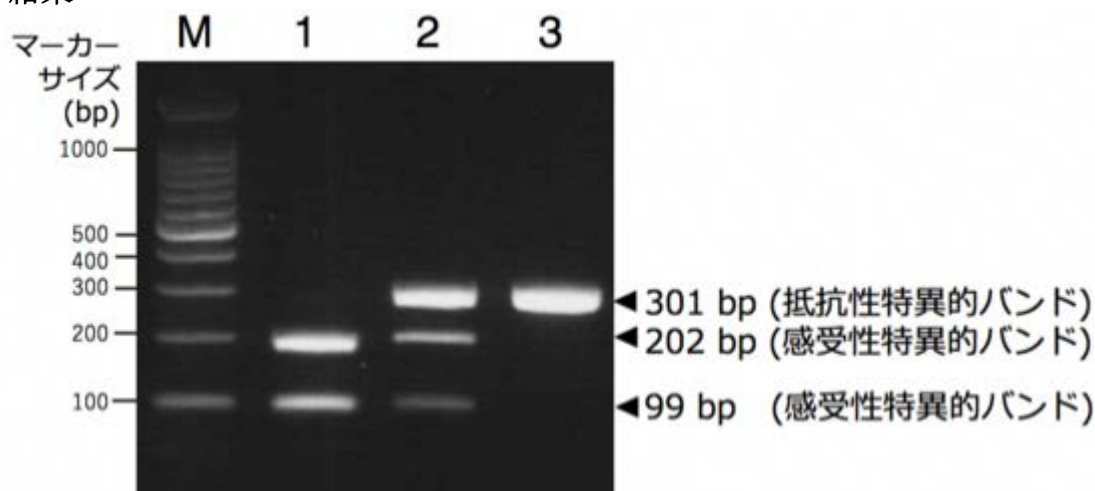
	1 本分	20 本分の場合
HhaI	0.2 μ L	4 μ L
滅菌蒸留水	4.8 μ L	96 μ L
合計	5.0 μ L	合計 100 μ L を 20 本に分注

- 2) チャノコカクモンハマキ PCR 産物を 5 μ L 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、37°C、1 時間反応を行う。

IV. 電気泳動・染色・撮影

- 1) HhaI 処理液にローディングバッファーを加え、2%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 Gel Red (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。

V. 結果



レーン No.1 : テブフェノジド剤感受性ホモ S/S
レーン No.2 : テブフェノジド剤抵抗性感感受性ヘテロ R/S
レーン No.3 : テブフェノジド剤抵抗性ホモ R/R
M : サイズマーカー (100 bp ラダー)

PCR 増幅により、エクダイソン受容体の部分配列である 301 bp が増幅される。制限酵素 HhaI は感受性個体の持つ受容体遺伝子上の塩基配列 (GCGC) を特異的に認識して切断する。

感受性ホモ S/S は、制限酵素による切断により 2 本のバンド (99 bp、202 bp) が検出される。抵抗性ホモ R/R は、制限酵素により切断されないため 1 本のバンド (301 bp) が検出される。抵抗性感感受性ヘテロ R/S は、3 本のバンド (99 bp、202 bp、301 bp) が検出される。

VI. 結果の解析

上述の抵抗性ホモ個体、抵抗性感感受性ヘテロ個体の頻度をもとに、DAH 系 IGR 剤抵抗性遺伝子(A415V)頻度を次式により求める。

$$\text{抵抗性遺伝子頻度(\%)} = \frac{\text{R ホモ型の個体数} \times 2 + \text{ヘテロ型の個体数}}{\text{全個体数} \times 2} \times 100$$

* PCR-RFLP 法でバンドが検出されない個体は除く

VII. LAMP

<準備するもの>

- ・前項のチャノコカクモンハマキ DNA 抽出液
- ・LoopampDNA 増幅試薬キット (栄研化学/品番 LMP204)
- ・Loopamp 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学/品番 LMP221)
- ・プライマー4種 (HPLC 精製グレードの使用が望ましい)

F3 : 5'-GCTGCTGTAATCTAGATATCTCA-3'

B3 : 5'-CCTTGCGGTAGTTGTCG-3'

F1P R : 5'-ACTACTCGGAGCATCATTACCTATCAGCTCTCACATCACATT-3'

B1P R : 5'-TGCGGCGGTACGACGAGCCTGGTTGTTCGCG-3'

- ・滅菌蒸留水
- ・実験器具類 (マイクロピペット、マイクロチップ等)
- ・サーマルサイクラー (恒温水槽・魔法瓶でも代用可)

<手順>

- 1) 以下の組成になるようにプライマーミックスを調製する。

プライマー名 (濃度)	液量
F3 (50 μ M)	2 μ L
B3 (50 μ M)	2 μ L
F1P (50 μ M)	16 μ L
B1P (50 μ M)	16 μ L

- 2) 以下の各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本分	20 本分の場合
2 x Reaction mix	12.5 μ L	250 μ L
プライマーミックス	1.8 μ L	36 μ L
Bst DNA polymerase	1.0 μ L	20 μ L
滅菌蒸留水	6.7 μ L	134 μ L
Fluorescent Detection Reagent	1.0 μ L	20 μ L
	合計 23.0 μ L	合計 460 μ L

- 3) DNA 粗抽出により得られたチャノコカクモンハマキ DNA を滅菌蒸留水で 100 倍希釈し、2 μ L ずつ分注する。

- 4) サーマルサイクラー等で以下の通り反応する。

65°C、90 分

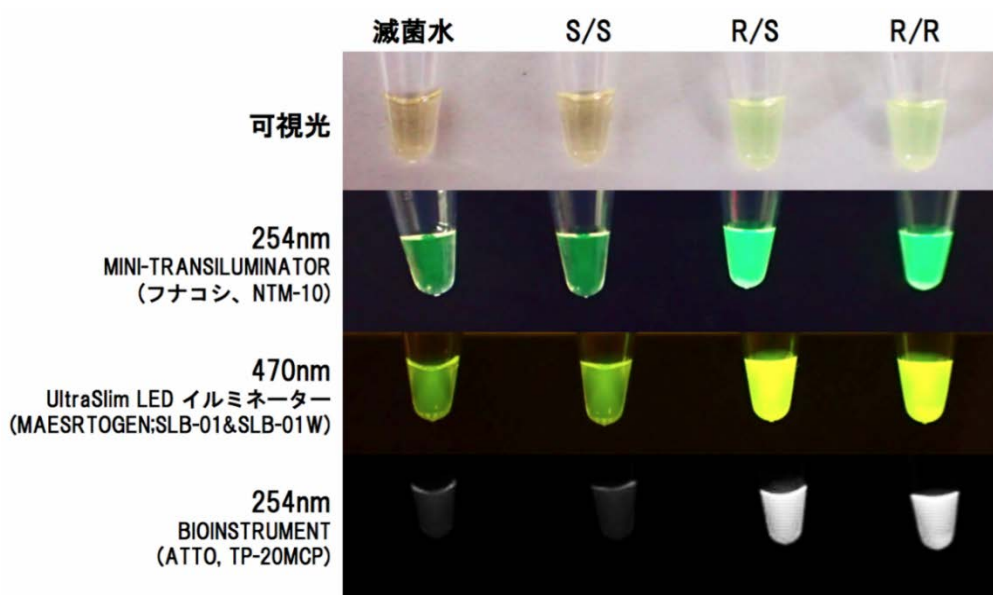
95°C、2 分

VIII. 観察

紫外線を通さない眼鏡や防護面を必ずかけて、短波長(240-260 nm)あるいは長波長(350-370 nm)の紫外線を励起光として反応液の蛍光を観察する。

なお、470 nm の励起光でも R/S、R/R の蛍光は滅菌水、S/S と比較して強く検出された。紫外線照射出力の高い装置では、陰性コントロールも蛍光を発して見えるため、チューブの距離を紫外線照射装置から離し、ネガティブコントロールとの差が見やすい位置に調整する。

IX. 結果



LAMP により、抵抗性型のエクダイソン受容体遺伝子上の塩基配列が特異的に増幅される。Fluorescent Detection Reagent 中に含まれるカルセインは、はじめマンガンイオンと結合して消光しているが、増幅反応の過程において生成するピロリン酸イオンにマンガンイオンを奪われ蛍光を発し、さらに反応液中のマグネシウムイオンと結合することで蛍光が増強される。

すなわち、蛍光が検出されると抵抗性遺伝子が含まれている R/S か R/R であることが示唆される。

X. 結果の解析

本手法では、抵抗性ホモ R/R と抵抗性感受性ヘテロ R/S は判別できないため、DAH 系 IGR 剤抵抗性遺伝子(A415V)頻度は必要に応じて次式で推定する。

$$\text{抵抗性遺伝子頻度(\%)} = \left(1 - \sqrt{\frac{\text{S ホモ型の個体数}}{\text{全個体数}}} \right) \times 100$$

(執筆：浅野美和)