

3-3 ワタアブラムシ

3-3-1 採集時期について

寄主植物あるいは作物の栽培形態により差はあるが、ワタアブラムシの発生ピークは春季および秋季にある。したがって、有翅虫の発生・分散ピークも同時期となることから、トラップによるサンプリングもこの時期に行うと効率的に有翅虫を得ることができる。地域により気象条件も異なるが、春季は 5～6 月、秋季は 9～10 月に採集を行う。トラップには、黄色水盤あるいは黄色粘着板を用いる。ここでは、黄色コンテナを用いた水盤トラップによるワタアブラムシ有翅虫採集方法について解説する。

3-3-2 準備するもの

- ・黄色コンテナ（三菱樹脂製 S-4-Y、273 mm×176 mm×133 mm、容量 3.8 L）を必要数準備し、底から 7 cm（2 L）の位置にマジックで線を引いておく。
- ・ママレモン（ライオン（株）製：店頭に置いていない場合は注文）。
- ・蛇口付ポリタンクに入れた水道水（20 L 程度で 10 か所分）。
- ・コンクリートブロック（基本ブロック）。
- ・50ml 遠沈管（プラスチック製）。
- ・目の細かい小型あく取り網（百元ショップで売っているものが便利）。
- ・深さ 2 cm 程度の直径 8 cm プラスチック容器（直径 9 cm では操作しにくい）。
- ・エタノール 99.5%（希釈すると比重が増えて虫が沈殿しにくい）。
- ・ふるい（網目 2 mm）。
- ・面相筆（2 号）。
- ・マイクロチューブ（1.5ml）。

3-3-3 黄色水盤の設置

- (1) 3 日間降雨がないと予想される日を選ぶ。
- (2) 対象圃場の端で見晴らしの良い場所を選ぶ。
- (3) コンクリートブロックを置き、その上に水盤を設置する（図 1）。
- (4) 遠沈管の目盛でママレモンを 10 ml 測り、水盤に入れる。
- (5) ポリタンクから水道水を、水盤にあらかじめ引いた線まで入れる。
- (6) このまま、3 日間置いておく。



図 1 黄色水盤の設置



図 2 虫の回収-1

3-3-4 虫の回収手順

- (1) あく取り網に、水盤から直接流し込み捕獲虫を漉しとる（図 2）。
- (2) プラスチック容器にエタノールを 35 ml 入れ、そこに捕獲虫を移す（図 3）。
- (3) プラスチック容器から、遠沈管にエタノールごと捕獲虫を移す（図 4）。
- (4) 移りきらなかった捕獲虫は、エタノールの上澄みを戻し再度移す。

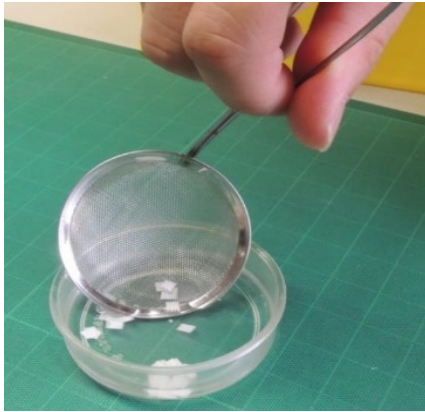


図 3 虫の回収-2



図 4 虫の回収-3

- (5) 持ち帰った試料から、ふるい（網目 2 mm）で大きな雑害虫を除去する。
- (6) エタノールを 0.5 ml 入れたマイクロチューブに面相筆でアブラムシ類を移す。
- (7) 遺伝子診断を行うまで冷凍して保存する。

3-3-5 ワタアブラムシの選別

黄色水盤では多種多様な昆虫類が捕捉される。また、アブラムシ有翅虫もワタアブラムシ以外に数多くの種が誘引・捕捉される。したがって、黄色水盤から回収するサンプルからワタアブラムシを選別する必要がある。

宗林（2008）によると、ワタアブラムシ有翅虫（胎生雌虫）の特徴は、触覚第 3 節に 4～7 個の二次感覚器をそなえ、腹部背面第 7・8 節に帯状紋があり、腹部側面には 4 個の大型斑紋があるとされている。しかし、ワタアブラムシを含む *Aphis* 属は外観的な特徴に乏しく、体色が濃緑色のワタアブラムシでは腹部の斑紋の有無が確認しづらい場合がある（杉本, 2008）。また、個体の大きさにより斑紋の発達程度に差が生じ、一般的に小型の個体ほど斑紋が消失する傾向にある（杉本, 2008）。したがって、実態顕微鏡下での観察ではある程度の誤判定は避けられず、正確な種判別にはプレパラートを作成して観察する必要があることから、短時間の観察でワタアブラムシのみを選別することは極めて困難である。

一方、近縁種を含む他種アブラムシおよび他種昆虫類から抽出した DNA を用い、ネオニコチノイド抵抗性遺伝子診断を行った結果、擬陽性反応を示す事例は確認されていない。そこで、作業の効率性という観点から、本ガイドライン案では厳密なワタアブラムシの同定は断念し、以下の形態的特徴による大まかな選別を行って遺伝子診断に供することとし、類似種の混入も可とすることとする。

- (1) 触覚の長さ：体長を超えない。
- (2) 角状管の色、形状：黒色～暗褐色、円筒形か先端に向いやや細くなる。
- (3) 尾片の色：黒色ではない（灰は可）。
- (4) 胸部の色：黒色。
- (5) 翅脈に沿った部分は透明。

しかしながら、個体数の絞り込みにより遺伝子診断の検体数を減らすことができ、より少数の個体による解析で診断の精度を高めることができることから、もし労力的に可能であれば、杉本（2008）を参照して形態を精査し、可能な限り他種アブラムシを排除することを推奨する。



図5 ワタアブラムシの形態

（執筆：岡本崇）

文献

宗林正人(2008)果樹のアブラムシ類. アブラムシ類の見分け方. 日本植物防疫協会, 東京. pp.21-37

杉本俊一郎(2008)主要アブラムシの有翅虫による見分け方. アブラムシ類の見分け方. 日本植物防疫協会, 東京. pp. 68-80

4-3 ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

ネオニコチノイド系農薬の有効成分が作用するニコチン性アセチルコリ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)	81 番目がアルギニン (R)	AGA
抵抗性 (R)	81 番目がスレオニン (T)	ACA

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

- PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent
(アプライドバイオシステムズ／品番 4318930)
- PCR チューブおよびキャップ
- ホモジナイザー
 個体単位：マイクロチップ等
 集団単位：ディスポーザブルホモジナイザー
 「バイオマッシャー II」(株) ニッピ／品番 320103)
- 恒温器 (サーマルサイクラー等)



図1 マイクロチップの
先端加工



図2 バイオマッシャー II (ニッピ社 HP より)

<手順>

(個体単位の場合)

- 1) チューブにアブラムシと PrepManUltra 20~30 μ L を入れ、マイクロチップ等の先端で虫体をすり潰す。マイクロチップの先端を火で炙り、図1のように球状に丸めておくと潰しやすい。
- 2) 100℃ (サーマルサイクラーを使用する場合は 99.9℃) で 10 分間加熱。
- 3) 室温に戻したサンプルは遺伝子解析までの間、-20℃以下で保存する

(集団単位の場合)。

- 1) バイオマッシャー II (図 2) のチューブ内にアブラムシ (～50 個体) と PrepMan Ultra 100 μL を入れ、付属の攪拌棒を用いて虫体をすり潰す。
- 2) 100°C (サーマルサイクラーを使用する場合は 99.9°C) で 10 分間加熱。
- 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。

II マルチプレックス PCR

<準備するもの>

- ・前項のアブラムシ DNA 抽出液
- ・「EmeraldAmp PCR Master Mix」(タカラバイオ/品番 RR300A)
- ・プライマー3 種
Agb1MarkerF103 : 5'-TGTGTTTTACTTGTTACAGAACGAA-3'
Agb1MarkerR103 : 5'-GTTTCCTCCCTTTTAAGCGATA-3'
Agb1MF15 : 5'-AAATCGAAGGTTTGGTTGAC-3'
- ・滅菌蒸留水
- ・TAE 緩衝液
- ・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
EmeraldAmp PCR Master Mix	10.0 μL	200 μL
滅菌蒸留水	6.0 μL	120 μL
Agb1MarkerF103 (20 μM)	1.0 μL	20 μL
Agb1MarkerR103 (20 μM)	1.0 μL	20 μL
Agb1MF15 (20 μM)	1.0 μL	20 μL
合計	19.0 μL	合計 380 μL を 20 本に分注

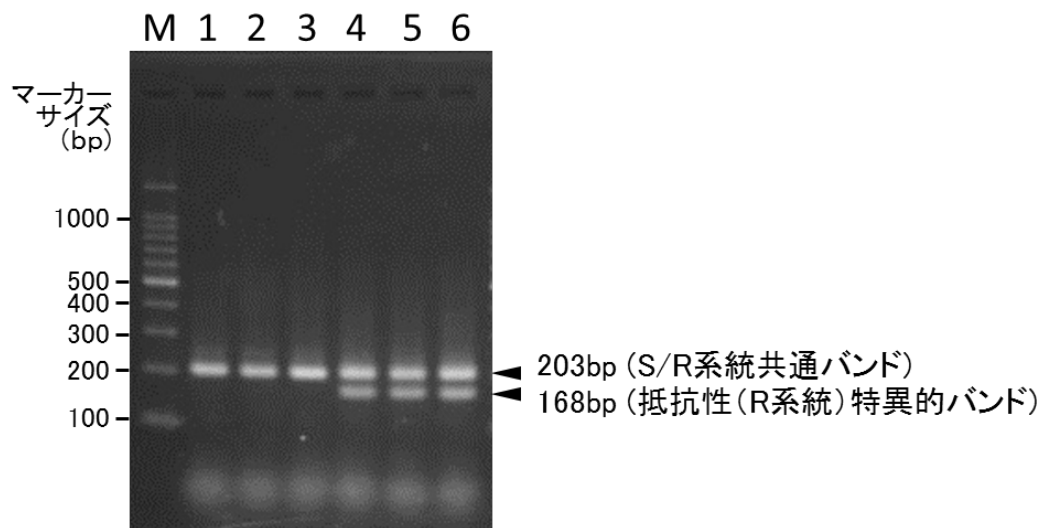
- 2) DNA 粗抽出により得られたアブラムシ DNA を 1.0 μL ずつ分注する。
- 3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

94°C	3 分	
94°C	30 秒	} 35 サイクル
52°C	30 秒	
72°C	1 分	
72°C	7 分	

III 電気泳動・染色・撮影

- 1) PCR 反応液を 3%アガロースゲルで 25～30 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。

IV 結果



レーン No.1-3：ネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断陰性
 レーン No.4-6：ネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断陽性
 M：サイズマーカー（100-bp ラダー）

サンプリング方法の項で示したとおり、トラップで捕捉された有翅虫ではワタアブラムシの正確な同定が極めて困難であることから、遺伝子診断においては他種の混入もやむなしとする。したがって、個体群における抵抗性遺伝子頻度の算出は行わず、168 bp の抵抗性（R 系統）特異的バンドの出現の有無により、個体群内に抵抗性個体が存在するか否かの診断を行う。

タンポポアブラムシ *Aphis taraxacicola* などの近縁種でも 203 bp の S/R 系統共通バンドは出現しうるが、168 bp のバンドが出現することはない。アブラムシ有翅虫に類似するハエ目、ハチ目などの他の昆虫類においても 168 bp のバンドの出現は認められていない。
 （執筆：土田聡）