

3-4 ネギアザミウマ

3-4-1 採集時期について

- (1) 植物の葉や花にネギアザミウマが生息している時期に採集する。

3-4-2 準備するもの

- (1) サンプルング用のチャック付ポリ袋 (例: ユニパック®0.04 タイプ J-4 (340 mm×240 mm×0.04 mm)、(株) 生産日本社) など (図 1)。
- (2) ペーパータオルまたはキムワイブ® (S-200 または M-150、(株) 日本製紙クレシア)。
- (3) クーラーボックス。
- (4) 小型吸引ポンプ (Linicon LV-125、メドー産業 (株)) (図 2)。
- (5) 吸虫管 (先端を切断したマイクロピペット用チップ (1 ml 用) (図 3 の a)、ビニールチューブホース (長さ 1 m 程度、黒色ゴム管 (外径 10 mm) (図 3 の b)、ビニール管 (外径 8 mm) (図 3 の c)、マイクロピペット用チップ (1 ml 用) 中央部 3 cm に切断した先にナイロンメッシュシート (N-305、目合 48 μm、(株) サンプラテック) を貼り付けたもの (図 3 の d) を使って製作したもの)。
- (6) ルーペ (20 倍程度)。
- (7) 実体顕微鏡。
- (8) エタノール 99.5%。
- (9) 面相筆 (極細 1 号)。
- (10) マイクロチューブ (1.5 ml)。



図 1 チャック付ポリ袋



図 2 小型吸引ポンプ

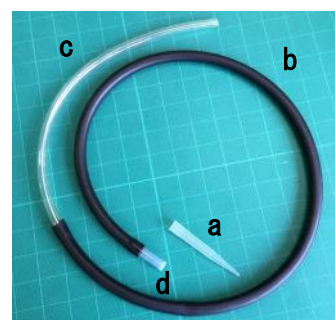


図 3 吸虫管

3-4-3 虫の採集手順

- (1) 圃場内で 10 か所程度の地点を選定する。
- (2) 各地点でネギアザミウマ成虫が生息する植物の葉または花ごと採集する。
なお、ネギアザミウマと他のアザミウマ類を肉眼で識別することは容易ではないので、混発している場合はアザミウマ類成虫をまとめて採集する。
- (3) チャック付ポリ袋 (J-4) に入れ、ペーパータオルまたはキムワイブ®を袋に入れて加湿や結露を防ぐ (図 4)。

- (4) チャック付ポリ袋を閉じてクーラーボックスに入れ、実験室に持ち帰る。



図4 植物の葉・花の採集

3-4-4 虫の種判別手順

- (1) 採集した成虫の一部を 20 倍程度のルーペで確認する。
- (2) 成虫をエタノールに浸漬した後、腹部末端を観察して雌雄を区別する（図 5）。
- (3) 雌成虫の体長、体色、翅の色を観察（表 1）して種を判別する。
- (4) 正確に識別するためには、実体顕微鏡（60～120 倍程度）で確認する。千脇ら（1994）の簡易同定診断法（図 6）を参考にする。



図5 ネギアザミウマの腹部末端（腹面）
左：雄成虫 右：雌成虫

表1 アザミウマ類雌成虫の特徴

	ネギアザミウマ	ミナミキイロ アザミウマ	ミカンキイロ アザミウマ	ヒラズハナ アザミウマ	チャノキイロ アザミウマ
体長	1.1～1.5 mm	1.2～1.4 mm	1.3～1.7 mm	1.3～1.7 mm	0.7～1.0 mm
体色	淡黄色～褐色	黄色	黄土～茶褐色	褐色～黒褐色	黄色
翅の色	透明	翅の毛が黒色	透明	透明	全体が黒色

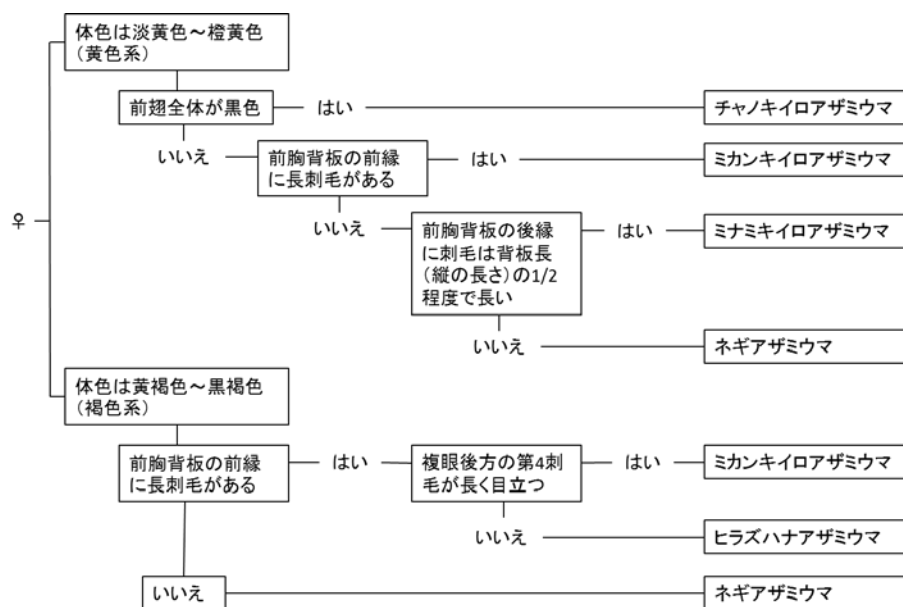


図6 アザミウマ類雌成虫の簡易同定診断法 (千脇ら, 1994 改変)

3-4-5 虫の回収手順

- (1) 吸虫管を小型吸引ポンプに接続する (図7)。
- (2) チャック付ポリ袋から植物の葉や花を取り出し、生息するアザミウマ類成虫を吸引する (図8)。
- (3) エタノールを0.5 ml 入れたマイクロチューブに回収したアザミウマ類成虫を移す。
- (4) 極細の面相筆を用いて葉や花からアザミウマ類成虫を直接移してもよい。
- (5) 遺伝子診断を行うまで-20℃～-30℃の冷凍庫に保存する。



図7 吸虫管と吸引ポンプの接続



図8 アザミウマ類成虫の吸引回収

(執筆：柴尾学)

4-4 ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

ピレスロイド系農薬の有効成分が作用するナトリウムチャンネル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。

ナトリウムチャンネルタンパク質における抵抗性関連のアミノ酸変異は、T929I と K1774N というアミノ酸変異ペアが国内の産雄単為生殖型の個体群で広く確認されている（産雌単為生殖型ではごくわずかにしか確認されていない）。一方、国内の産雌単為生殖型の個体群では M918T と L1014F というアミノ酸変異ペアが過去に報告されているが（Toda and Morishita, 2009 ; 武澤, 2012）、近年では報告例がない（相澤, 2018）。そこで、本遺伝子診断法では、国内で広く確認されている T929I と K1774N の変異ペアにおける T929I 変異の有無を調査することにより、抵抗性の診断を行う。なお、M918T と L1014F の変異ペアを対象とした診断については土田ら（2010）の遺伝子診断法が利用可能である。

T929I と K1774N の変異ペア

遺伝子型	ナトリウムチャンネルのアミノ酸	ナトリウムチャンネル遺伝子上の塩基配列
感受性 (S)	929 番目がトレオニン (T) 1774 番目がリシン (K)	ACC AAG
抵抗性 (R)	929 番目がイソロイシン (I) 1774 番目が アスパラギン (N)	ATC AAC

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

・DNA 抽出用バッファ

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。

- ・ PCR チューブおよびキャップ

<抽出用バッファの調整>

50mL の TE-T バッファを用意する場合は、次の通りに調合する。

1M Tris-Hcl (pH 9.0)	0.5 mL
0.5M 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) チューブにネギアザミウマ雌成虫個体と抽出用バッファ 30 μ L を入れる。虫体をすり潰す必要はない。
- 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ネギアザミウマ成虫

II マルチプレックス PCR

<準備するもの>

- ・ 前項のネギアザミウマ DNA 抽出液
- ・ PCR 酵素
「EmeraldAmp MAX PCR Master Mix」(タカラバイオ/品番 RR300A)
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4 種

TtkdrF3 :5'-CATCTTCGATTTTCATTATAGTGGCG-3'

TtkdrR1 :5'-TTGGACAGGAGCAAGGCAAGGAA-3'

TtT929I_F1 :5'-GGTGCCTTGGGTAAC TTTAT-3'

TtT929I_MSR:5'-AGATAATGATGCACAACACAAAGG-3'

- ・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)
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>

- 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 μ L	37.8 μ L
PCR 酵素	3.0 μ L	63.0 μ L
合計	4.8 μ L	合計 100.8 μ L を 20 本に分注 (複数本分については、必要数+1 の本数分で調製する)

各プライマーについて 100 μ M 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後、100 μ L ずつ等に小分けして-20°C以下で保存する。

	プライマー濃度	
TtkdrF3	5 μ L	1 μ M
TtkdrR1	5 μ L	1 μ M
TtT929I_F1	10 μ L	2 μ M
TtT929I_MSR	5 μ L	1 μ M
10mM Tris-HCl (pH 8.0)	425 μ L	
合計	450 μ L	

- 2) DNA 抽出により得られた各ネギアザミウマ DNA (2 倍希釈) を 1.2 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。

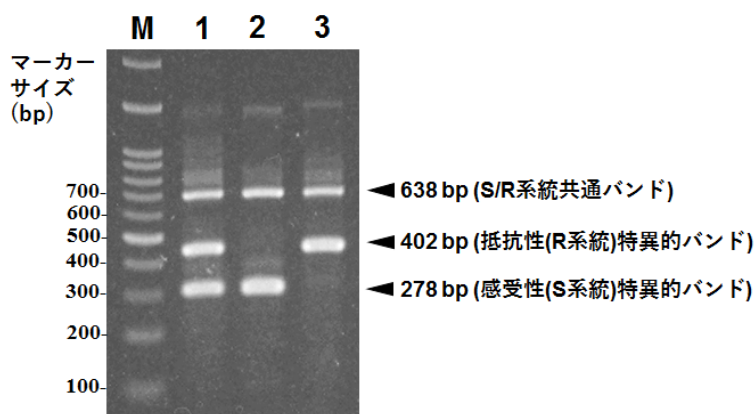
95°C 2分
95°C 15秒
58°C 30秒
68°C 15秒
68°C 5分

} 35 サイクル

III 電気泳動・染色・撮影

- 1) PCR 反応液を 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 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。

IV 結果



レーン No.1 : 「ヘテロ型」 (3 種のバンドがすべて検出される)
レーン No.2 : 「S ホモ型」 (共通バンドと S 系統特異的バンドが検出される)
レーン No.3 : 「R ホモ型」 (共通バンドと R 系統特異的バンドが検出される)
M : サイズマーカー (100 bp ラダー)

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。
以下の数式により、ピレスロイド剤抵抗性遺伝子頻度を算出する。

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

(執筆：上樂明也)

文献

- Toda S. and Morishita M. (2009) Identification of three point mutations on the sodium channel gene in pyrethroid-resistant *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 102: 2296-2300.
- 武澤友二 (2012) 遺伝子診断による北海道空知・上川地方における合成ピレスロイド剤抵抗性ネギアザミウマの発生調査. 北日本病虫研報 63:184-188.
- 相澤美里 (2018) ネギアザミウマの異なる生殖系統における合成ピレスロイド剤抵抗性機構と広域的・局所的分布に関する分子生態学的研究. 香川農試研報 69:1-30.
- 土田 聡、森下正彦、望月雅俊 (2010) 合成ピレスロイド抵抗性ネギアザミウマを識別する遺伝子診断法. 農研機構普及成果情報
<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/fruit/2010/fruit10-08.html>