

3-5 ナミハダニ

3-5-1 準備するもの

チャック付きビニール袋（丸めた新聞紙等とハダニ寄生葉が入る大きさ）。

- (1) 新聞紙。
- (2) 小型吸虫管ないしは面相筆、加工パストールピペットを利用した小型吸虫管（生物検定法を参照）などハダニを集める道具。
- (3) 1.5 mL チューブ。

3-5-2 サンプルング方法

- (1) チャック付きビニール袋に、結露防止のための丸めた新聞紙を入れる。
- (2) ハダニが寄生した葉をその袋に入れ、持ち帰る。
- (3) 試験するまでの間、袋に入れたまま室温、もしくは冷蔵庫（5～10℃）で保管する。葉が痛まなければ、ハダニは生きたまま保存可能である。



図1 保管中のハダニ寄生イチゴ

- (4) 小型吸虫管または面相筆などを用いて、保存した葉からハダニの雌成虫を1.5 mL チューブに集める。雌成虫は1本のチューブに100頭以内とすることが望ましい。ハダニを集めた後、チューブを氷などで冷却することでハダニの動きを抑制するとDNA抽出の際にチューブの底にハダニを集めやすく、取り扱いが楽になる。小型吸虫管については刑部（2016）を参照する。

3-5-3 注意点

- (1) ハダニ寄生葉は、吸汁痕だけでなく必ずハダニの寄生を確認してから採集する。被害が著しく褐変・劣化した葉や、ハダニの吐糸が張った葉は、餌質が低下して大部分のハダニ個体が既に離脱していることが多い。周囲の比較的健全な葉に多くのハダニが寄生していることが多い。
- (2) ハダニは移動分散性が低く、同一施設内でも場所によって遺伝的に異なった集団がパッチ状に分布する。そのため、1カ所から大量に採集せず、圃場全体の複数の発生箇所から採集するのが望ましい。
- (3) ハダニ寄生葉を入れたビニール袋は、高温や直射日光を避けて持ち帰る。これらの条件下に置くと、結露が多くなりハダニが水死しやすくなる。そのうえ、葉の劣化が早まることにより、ハダニが葉上から脱出し、ハダニの採集が困難になる。

（執筆：井村岳男）

文献

刑部正博（2016）フィールド&ラボ～知って得する豆知識③～簡単、便利～ハダニ採集用小型吸虫管．植物防疫 70：126-128.

4-5 ナミハダニのキチン生合成阻害剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

発育阻害剤エトキサゾール、ヘキシチアゾクスおよびクロフェンテジンの有効成分が作用するキチン合成酵素（CHS1）の遺伝子変異を検出するプライマーを用いたリアルタイム PCR と制限酵素を使用して診断する（RED- $\Delta\Delta$ Ct 法、Osakabe *et al.*, 2017）。

エトキサゾールにおける抵抗性関連のアミノ酸変異は、I1017F というアミノ酸変異が国内外の個体群で広く確認されている。また、この変異はエトキサゾールのみならずヘキシチアゾクスおよびクロフェンテジン抵抗性にも関連していることが報告されている。一方、I1017F の隣にアミノ酸置換を伴わない同義置換の DNA 変異が存在することも知られている。そこで本遺伝子診断法では、同義置換変異の両タイプに対応する方法で I1017F の変異を判定する。

ハダニは体が小さく、個体ごとの取り扱いには一定の慣れを要する。また、施設栽培では発生しているパッチごとに抵抗性のレベルが異なるため、圃場内から満遍なく採集して抵抗性遺伝子の頻度を推定する方法が望まれる。そこで、A にしたがって、多くのハダニからまとめて抽出した DNA について、リアルタイム PCR を用いて抵抗性遺伝子頻度を推定する (A)。リアルタイム PCR が使用できない場合は、後述の PCR-RFLP 法 (B) により、個体ごとに判定する。

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)	1016 番目がセリン (S)	TCG ATT
	1017 番目がイソロイシン (I)	TCA ATT
抵抗性 (R)	1016 番目がセリン (S)	TCG TTT
	1017 番目がフェニルアラニン(F)	TCA TTT

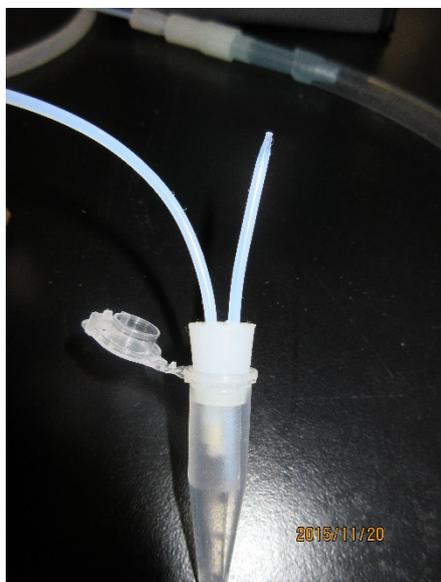
A. RED- $\Delta\Delta$ Ct 法による遺伝子頻度の推定

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

- ・ DNA 抽出用キット
 - ・ DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン/品番 69504)
 - ・ RNase A (キアゲン/品番 19101)
- ・ DNA 精製用キット
 - ・ NucleoSpin gDNA Clean-up XS (タカラ/品番 U0904B)
- ・ TE バッファー (pH 8.0)
- ・ 1.5 ml および 2.2 ml サンプルチューブ

- ペレットミキサー1.5 ml 用 (トーホー/品番 0310000)
- マイクロ吸虫管 (コスモ理研/品番 CR-1410)
- エアーポンプ (ミニポンプ MP Σ 300 (柴田科学) など流量が調節できるものが便利)



※ 購入直後は吸虫管の先端部 (吸い口) が太いため、ライターの火で少し炙って柔らかくなったところを引き延ばして、適当な太さ (内径 0.5 mm 程度) のところでカットする。

<手順>

- 1) ナミハダニ 50 ♀♀をマイクロ吸虫管で1.5 ml サンプリングチューブに集め、氷の上に置く (ハダニの動きが抑制され、後で処理し易くなる)。
- 2) DNeasy Blood & Tissue kit により DNA を抽出する。
 1. Buffer ATL 180 μ L を加え、ペレットミキサーにより摩砕。
 2. Proteinase K 20 μ L を加えて混合。
 3. 56°Cの恒温振とう器で一晩保温。
 4. RNase A (100 mg/ml) を 4 μ L 加え、ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌した後、室温で 2 分間置く。
 5. Buffer AL 200 μ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌。
 6. エタノール 200 μ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌。
 7. サンプルを DNeasy Mini Spin Column に移し、8,000 rpm で 1 min 遠心。
 8. カラムを新しいコレクションチューブに移し、AW1 を 500 μ L 加え、8,000 rpm で 1 min 遠心。
 9. カラムを新しいコレクションチューブに移し、AW2 を 500 μ L 加え、14,000 rpm で 3 min 遠心
 10. カラムを 2.2 ml サンプルチューブに移し、AE 200 μ L を加え、室温で 1 分間置いた後、8,000 rpm で 1 分間遠心して DNA を溶出する。

11. カラムに AE 200 μL を追加し、室温で 1 分間置いた後、8,000 rpm で 1 min 遠心してカラムに残った DNA をさらに溶出する。
 12. 得られた DNA サンプルは冷蔵庫や冷凍庫で保存可能。
- 3) NucleoSpin gDNA Clean-up XS により、得られた DNA を精製・濃縮する。
1. 2) で得られた DNA サンプル (約 400 μL) に TE 400 μL を加える。
 2. NT 200 μL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌。
 3. コレクションチューブにセットしたカラムに①で希釈した DNA 溶液 500 μL を加え、11,000 g で 1 分間遠心。
※ 遠心機の設定が rpm ではなく、g であることに注意。
 4. 溶出液を捨て、残りの DNA 溶液をカラムに加え、11,000 g で 1 分間遠心。
 5. カラムを新しいコレクションチューブに移し、B5 100 μL を加え、11,000 g で 3 分間遠心。
 6. カラムを 1.5 ml サンプルチューブに移し、BE 10 μL を加え、11,000g で 2 分間遠心して DNA を溶出する。
 7. カラムに BE 10 μL を追加し、11,000 g で 2 分間遠心して DNA をさらに溶出する。
 8. サンプルチューブの蓋を開けたまま 90°C のブロックヒーターで 8 分間保温してエタノールを完全に除去する (これによってサンプルの容量は 8~10 μL 程度に減少)。
 9. 得られた DNA サンプルは冷蔵庫や冷凍庫で保存可能。
- 4) DNA サンプルの濃度調整
1. BE をブランクとして、精製した DNA サンプルの濃度を測定する。
 2. Nuclease-free water 等で濃度を 1 ng/ μL に調整する。

II. 制限酵素反応とバッファー交換

<準備するもの>

・制限酵素

・ *Taq*^oI (New England BioLabs/品番 R0149S)

・ *Mlu*CI (New England BioLabs/品番 R0538S)

※ 制限酵素用のバッファー成分はメーカーによって異なり、それが次のリアルタイム PCR に影響する可能性がある。

・バッファー交換用カラム

・ Micro Spin S-200 HR Columns

(GE ヘルスケアバイオサイエンス/品番 27512001)

<手順>

- 1) 以下の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	10 本分の場合
<i>Taq</i> ^α I	1 μL	10 μL
<i>Mlu</i> C I	1 μL	10 μL
10×CutSmart	2 μL	20 μL
滅菌蒸留水	1 μL	10 μL
合計	5 μL	50 μL

- 2) 1 ng/μL に調整した DNA サンプルを 15 μL ずつ PCR チューブに加える。
- 3) サーマルサイクラーにセットし、次の温度反応を行う。

37°C 3 時間 (*Mlu*C I による消化)

65°C 3 時間 (*Taq*^α I による消化)

80°C 20 分 (制限酵素の失活)

- 4) Micro Spin S-200 HR Columns によりバッファーを交換する。
 1. カラム内のゲルろ過担体をボルテックスミキサーで十分攪拌する。
 2. カラムのスクリーキャップを 1/4 開け、下のチップを折り取って付属のチューブにセットし、800 g で 1 分間遠心。
 3. カラムを 2.2 ml サンプルチューブに移し、制限酵素処理後の DNA 溶液を全量加え、800 g で 2 分間遠心。
 4. 溶出した DNA 溶液 (>16μL) を定量 PCR (qPCR) に用いる。

III. インターカレーター法による qPCR

<準備するもの>

- ・リアルタイム PCR 用反応試薬
 - ・ SYBR Fast qPCR Mix (タカラバイオ/ 品番 RR430S)
- ・ CHS1 用プライマー (10 μM)
 - ・ tu03CHS1 cyber 1F: 5'-GGCACTGCTTCATCCACAAG-3'
 - ・ tu03CHS1 cyber 1R: 5'-GTGTTCCCAAGTAACAACGTTC-3'
- ・内部標準 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 用プライマー (10 μM)
 - ・ GAPDH-2F: 5'-GCACCAAGTGCTAAAGCATGGAG -3'
 - ・ GAPDH-2R: 5'-GAACTGGAACACGGAAAGCCATAC -3'

<手順>

- 1) 制限酵素処理した各サンプル (tester) と制限酵素無処理の各サンプル (calibrator) のそれぞれについて、CHS1 および GAPDH 増幅用に以下のよ

うに各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブまたは PCR 用プレートに分注する。

	1 本	10 本分の場合
SYBR Fast qPCR Mix (2×)	10.0 μL	100 μL
プライマーF (10 μM)	0.8 μL	8 μL
プライマーR (10 μM)	0.8 μL	8 μL
滅菌蒸留水	0.4 μL	4 μL
合計	12.0 μL	120 μL

- 2) 制限酵素処理した各サンプルと制限酵素無処理の各サンプル (1 ng/μL) を 8 μL ずつ PCR チューブまたは PCR プレートに加える。
- 3) リアルタイムサーマルサイクラーにセットし、次の温度反応を行う。

95°C	30 秒	(プレヒート)	
95°C	10 秒	←	45 サイクル (PCR 増幅)
62°C	10 秒		
72°C	15 秒		
95°C	10 秒	}	(融解温度解析)
60°C	60 秒		
97°C	1 秒		

- ※ 上記の条件はロシュ社製の LightCycler Nano Software ver. 1.1.0 による事例であるが、PCR 増幅時の各温度の保持時間と融解温度解析の条件は使用するリアルタイム PCR 装置で推奨される時間を使用する。
- ※ データは Ct 値 (機種によっては Cq 値) として得られるため、PCR 後の電気泳動などの作業は不要である。

4) $\Delta\Delta Ct$ 法による抵抗性遺伝子頻度の算出

$$\Delta Ct_{(tester)} = Ct_{(CHS1-tester)} - Ct_{(GAPDH-tester)}$$

$$\Delta Ct_{(calibrator)} = Ct_{(CHS1-calibrator)} - Ct_{(GAPDH-calibrator)}$$

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{(tester)} - Ct_{(calibrator)}$$

$$\text{抵抗性遺伝子頻度} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$Ct_{(CHS1-tester)}$, $Ct_{(GAPDH-tester)}$: 制限酵素処理した DNA の CHS1 および GAPDH の Ct 値
 $Ct_{(CHS1-calibrator)}$, $Ct_{(GAPDH-calibrator)}$: 制限酵素無処理の DNA の CHS1 および GAPDH の Ct 値

IV. 結果

1) 野外採集個体群におけるエトキサゾール抵抗性遺伝子頻度の推定

下の表は圃場で採集されたナミハダニの2つの個体群（AとB）の雌成虫各100個体からそれぞれDNAを抽出し、制限酵素処理後にリアルタイムPCR（Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System；Thermo Fisher Scientific）を用いて抵抗性遺伝子頻度を推定したものの事例である。A個体群におけるエトキサゾール抵抗性遺伝子頻度（ $2^{-\Delta\Delta CT}$ ）は80.7%、B個体群では16.3%と推定された。AおよびB個体群での生物検定では、補正死亡率がそれぞれ11.5%および58.6%となり、大まかに遺伝子診断結果と同様の傾向を示した。

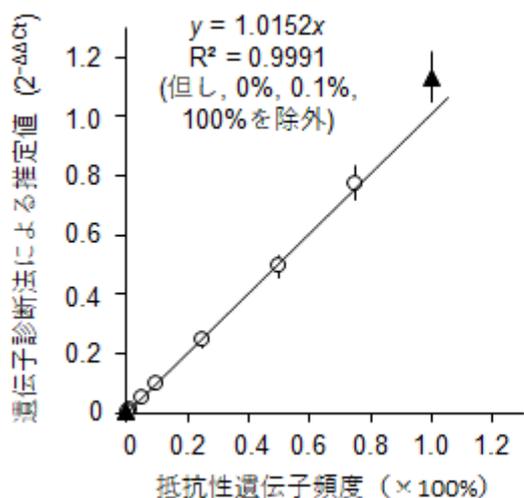
表中の「技術反復」は、ピペティングなどの手作業による誤差を補正する目的で、同じDNAサンプルを使って各2本ずつ反応液を作成し、同じ操作を行ったものである。

個体群	制限酵素 処理	遺伝子	技術 反復	Ct	平均 Ct 値	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
A (100 ♀♀)	有り (tester)	CHS1	1	21.97	21.835	0.125 (e = a - b)	0.31 (g = e - f)	0.807 (h = 2 ⁻⁸)
			2	21.7				
		GAPDH	1	21.75	21.71			
			2	21.67				
	無し (calibrator)	CHS1	1	20.24	20.225	-0.185 (f = c - d)		
			2	20.21				
		GAPDH	1	20.39	20.41			
			2	20.43				
B (100 ♀♀)	有り (tester)	CHS1	1	25	24.935	2.475	2.62	0.163
			2	24.87				
		GAPDH	1	22.48	22.46			
			2	22.44				
	無し (calibrator)	CHS1	1	21.09	21.09	-0.145		
			2	21.09				
		GAPDH	1	21.21	21.235			
			2	21.26				

2) 抵抗性遺伝子頻度検出精度の検証

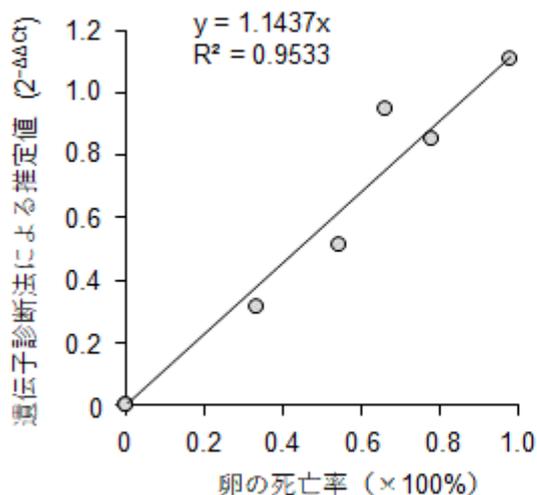
RED- $\Delta\Delta Ct$ 法による抵抗性遺伝子頻度の検出精度を確認するため、エトキサゾール抵抗性と感受性のDNA配列をそれぞれホモに持つ系統を作成した。それぞ

れの系統から DNA を抽出し、濃度調整後にこれらの DNA を混合して診断法を実施し、実際の抵抗性遺伝子頻度 (0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) と診断法による推定値の相関を調べた。その結果、0%, 0.1% および 100% では回帰直線から僅かに外れる傾向が認められた。一方、0.5~75%の間では推定値が実際の抵抗性遺伝子頻度とほぼ一致し ($R^2 = 0.9991$)、回帰直線の傾きもほぼ 1 となった。



Osakabe et al. (2017) Pestic. Biochem. Physiol. (in press) doi: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003 より、改変

エトキサゾール抵抗性の遺伝様式は完全劣性である。そこで次に、処女雌に半数体の雄卵を産卵させて、常用濃度に (50 ppm) よる雄卵の死亡率と親の処女雌における抵抗性遺伝子頻度を比較した。その結果、極めて高い相関が得られたことから、本診断法による推定値は実際の抵抗性遺伝子頻度とほぼ一致すると考えられる。



Osakabe et al. (2017) Pestic. Biochem. Physiol. (in press) doi: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003 より、改変

3) 実験条件の適合性の確認方法

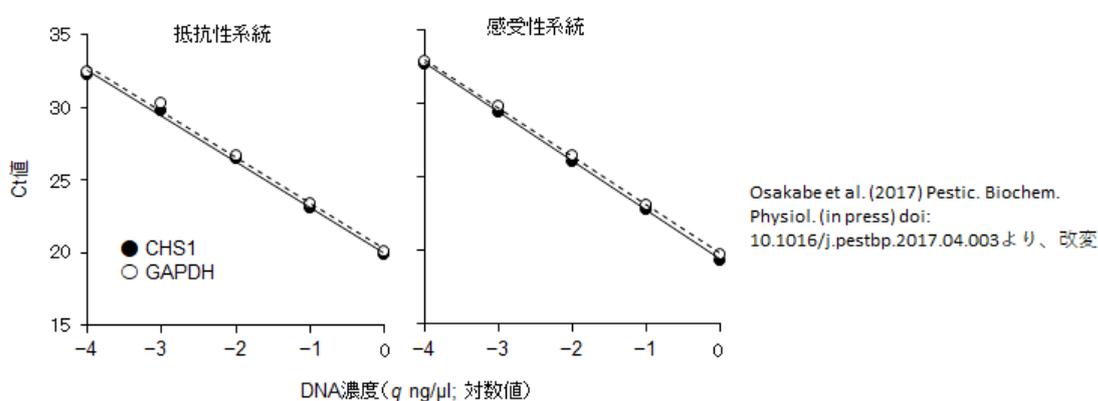
RED- $\Delta\Delta Ct$ 法では検量線は不要であり、CHS1 と GAPDH の増幅の比率が濃度に関わらず一定であることを前提としている。これはプライマーの設計によるところが大きいため、本書と同じ試薬を使用する場合はほぼ問題ないと思われる。しかし、他社製のキットなどを用いる場合には妥当な結果が得られるかどうか、増幅効率の確認をしておくことが望まれる。

ナミハダニ（系統は何でもよい）から抽出した DNA を 1 ng/ μ L に調整し、それを 10 倍ずつ希釈して 0.1~0.0001 ng/ μ L のサンプルを作成する。これらを使ってそれぞれ CHS1 および GAPDH を増幅し、Ct 値を得る。多くのリアルタイム PCR 用の解析ソフトでは検量線を引く機能が付属しているため、マニュアルに従ってそれらを利用すると、下の例のような増幅効率 (e) を自動的に求めることができる。増幅効率は

$$e \times 100 = (E - 1) \times 100(\%)$$

で求めることができ、下の事例では 99.7~107.5% と計算される。増幅効率が 100% のとき、PCR 温度サイクル 1 回につき標的の DNA が 2 倍 ($E=2$) となる。この事例では増幅効率は CHS1 と GAPDH のいずれのプライマーにおいてもほぼ 100% と考えられる。増幅効率が遺伝子間で異なっても回帰直線が互いに平行であれば問題はない。ここでは直線の傾きも遺伝子間でほぼ同等である。

また、ここでは抵抗性系統と感受性系統の両方を示したが、これらでほぼ同じ結果が得られていることから分かるように、抵抗性レベルが不明なサンプルを用いてこの解析を行っても全く問題はない。



Osakabe et al. (2017) Pestic. Biochem. Physiol. (in press) doi: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003 より、改変

抵抗性系統	CHS1: Ct = 3.15log ₁₀ (q)+19.98, E = 2.075, R ² = 0.997	※ E = 1+e (e: 増幅効率)
	GAPDH: Ct = 3.16log ₁₀ (q)+20.27, E = 2.073, R ² = 0.9938	
感受性系統	CHS1: Ct = 3.33log ₁₀ (q)+19.37, E = 1.997, R ² = 1	
	GAPDH: Ct = 3.28log ₁₀ (q)+19.82, E = 2.019, R ² = 0.9996	

文献

Osakabe et al. (2017) Combination of restriction endonuclease digestion with the $\Delta\Delta Ct$

method in real-time PCR to monitor etoxazole resistance allele frequency in the two-spotted spider mite. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 139, 1–8. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003

B. PCR-RFLP 法によるハダニの遺伝子型 (RR, RS, SS) 検出

I. DNA 粗抽出法

<準備するもの>

- 1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)
- 0.5M EDTA (pH 8.0)
- IGEPAL CA-630 (シグマアルドリッチ/品番 I8896)
- 4M 塩化ナトリウム
- Proteinase K (タカラバイオ/品番 9034)
- 0.2 ml PCR チューブ
- ペレットミキサー0.5 ml 用 (トーホー/品番 0310010)

<手順>

- 1). DNA 粗抽出用緩衝液を以下の要領で準備する。

1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)	0.4 mL
0.5M EDTA (pH 8.0)	8.0 ml
IGEPAL CA-630	0.2 mL
4M NaCl	0.1 mL
滅菌蒸留水	31.3 ml
合計	40.0 ml

- 2). DNA 粗抽出用緩衝液 18 μ L に滅菌蒸留水で 2 倍希釈した Proteinase K 2 μ L を加えて混合し、抽出液とする。抽出液は 1 個体あたり 20 μ L を使用するため、抽出する個体数に合わせて混合する量を調整する。
- 3). 小筆等を用いてナミハダニ雌成虫を 0.2 ml の PCR チューブに入れる。チューブを氷上に置くことにより、ハダニの活動が低下するため、後にホモジネートする際に扱い易い。
- 4). ハダニを入れた PCR チューブに抽出液 20 μ L を加え、ペレットミキサーにより摩砕する。
- 5). 摩砕液が入った PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、65°C で 20 分間保温する。その後、Proteinase K を失活させるため、95°C で 10 分間処理した後、次に使用するまで 4°C に保つ。
- 6). 温度反応を終了した摩砕液を滅菌蒸留水で 20 倍に希釈する。希釈したサン

プルは-20°Cで数か月保存が可能である。この方法でのPCR用DNA調整は卵（産卵後1日以上経過）から雌雄成虫までに適用可能である（Arimoto *et al.* 2012）。

文献

Arimoto *et al.* (2012) DNA preparation method in eggs, immature stages, and diapausing females of *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae) for diagnostic PCR-RFLP. *Applied Entomology and Zoology* 47, 295–300. doi: 10.1007/s13355-012-0119-5

II. PCR-RFLP

<準備するもの>

- KoD Fx Neo（東洋紡/品番 KFX-201）
- CHS1 用プライマー（10 μM）
 - TuCHS1-rna3223F: 5'-CAAATAATGTCCGCTTGTTATGCAC-3'
 - TuCHS1-rna3885R: 5'-TTGTGATTCTGAGCCAATTGAATCC-3'
- 制限酵素
 - *Taq*^αI（New England BioLabs/品番 R0149S）
 - *Mlu*CI（New England BioLabs/品番 R0538S）
- 電気泳動用アガロース及びバッファー
- 0.2 ml PCR チューブ

<手順>

1). サンプル当たりのPCR反応液を以下の要領で準備する。

	1 サンプル当たり	20 サンプル分
KoD Fx Neo 2×buffer	10 μL	200 μL
dNTP (2 mM each)	4 μL	80 μL
Forward primer (10 μM)	0.5 μL	10 μL
Reverse primer (10 μM)	0.5 μL	10 μL
KoD FxNeo	0.4 μL	8 μL
滅菌蒸留水	3.6 μL	72 μL
合計	19 μL	19 μL ずつ分注

2). PCR チューブに 19 μL ずつ分注した反応液に DNA 粗抽出液を 1 μL 加え、ボルテックス等で十分攪拌した後、サーマルサイクラーにセットし、以下の条件で増幅反応を行う。

94°C	2分 (プレヒート)	
98°C	10秒	← 40 サイクル (PCR 増幅)
60°C	30秒	
68°C	77秒	
68°C	7分	
4°C	次のステップまで保持	

- 3). 制限酵素処理のため、以下のように各試薬を解析本数分混合して制限酵素混合液を作成する。

	1本	20本分の場合
<i>Taq</i> ^α I	0.1 μL	2 μL
<i>MluC</i> I	0.1 μL	2 μL
10×CutSmart	2 μL	40 μL
滅菌蒸留水	2.8 μL	56 μL
合計	5 μL	100 μL

- 4). PCR 反応が終わったサンプル液 (各 20 μL) に制限酵素混合液を 5 μL ずつ加えて混合する。
- 5). サーマルサイクラーにセットし、次の温度反応を行う

37°C	3時間 (<i>MluC</i> Iによる消化)
65°C	3時間 (<i>Taq</i> ^α Iによる消化)
80°C	20分 (制限酵素の失活)
4°C	次のステップまで保持

- 6). 2%アガロースゲルを用いて 30~50 分間程度電気泳動を行い、エチジウムブロマイド等で染色して観察する。

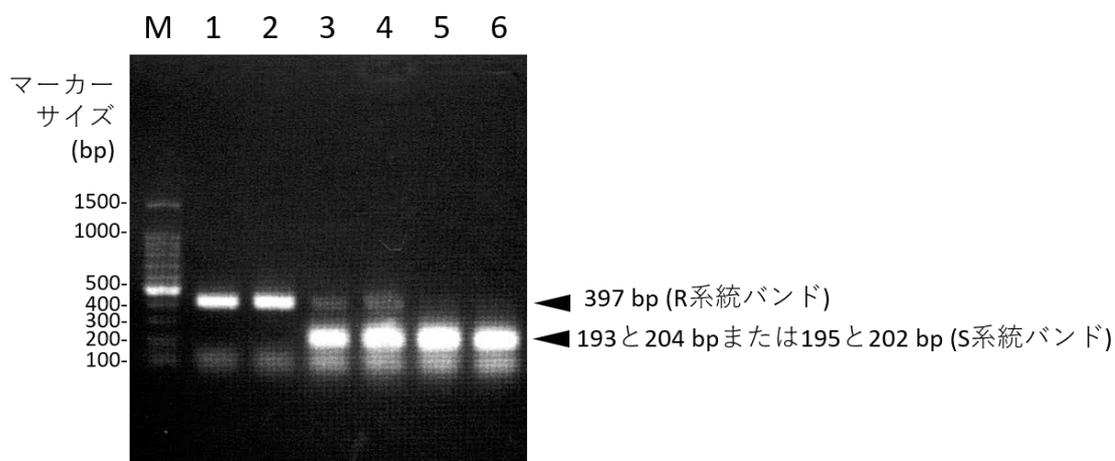
IV. 結果

ここで用いているプライマーによって増幅されるフラグメントのサイズは 653 bp である。Forward primer を含めて、抵抗性と感受性を見分ける *Taq* I もしくは *MluC* I による切断部位までの長さはそれぞれ 193 および 195 bp である。この間には識別部位以外にこれらの制限酵素による認識部位は存在しない。一方、*Taq* I および *MluC* I による切断部位から下流へ 204 および 202 bp の位置に抵抗性と感受性で共通の *MluC* I 切断部位が存在する。さらにそこから reverse

primer の位置までに複数の認識部位が存在し、19~121 bp のフラグメントが発生する。しかし、極めて短いフラグメントは電気泳動で検出されない。

このため、結果的に抵抗性系統では識別部位を含む 397 bp のフラグメントが検出され、一方で感受性系統ではこの 397 bp が切断されて 193 と 204 bp ないしは 195 と 202 bp のフラグメントが検出される。また、ヘテロ個体ではこれらがすべて検出され、遺伝子型の識別が可能である。

図は抵抗性ホモの雌成虫 2 個体と感受性ホモの雌成虫 2 個体ならびにこれら系統間の交配によって得られて F1 雌成虫 (ヘテロ) 2 個体について、個体ごとに電気泳動を行った結果である。ヘテロ個体では 193 と 204 bp ないし 195 と 205 bp のフラグメントが重なった濃いバンドの上に 397 bp のバンドが検出されている。



レーンNo. 1, 2 抵抗性ホモ
レーンNo. 3, 4 ヘテロ
レーンNo. 5, 6 感受性ホモ

(執筆：刑部正博)