

3-6 イネウンカ類

3-6-1 採集時期について

トビイロウンカやセジロウンカのような長距離移動性イネウンカの場合には、可能な限り日本に飛来した直後の飛来個体群の成虫を採集するのが望ましい。飛来個体群が採集できない場合には、殺虫剤を使用していない水田（試験水田の無防除区などでもよい）で次世代以降の成虫を採集する。次世代以降の成虫の場合には、水田内の広い範囲から偏りなく採集するように心がける。

ヒメトビウンカの場合には、特に採集時期にこだわらなくてよいが、越冬後成虫の時期に採集して感受性検定を行うことで、検定結果を当年の水稻作における薬剤防除に生かすことができる。

3-6-2 準備するものと採集方法

一般的な捕虫網、白色のトレイ、吸虫管などを準備する。採集法は捕虫網を用いたすくい取り法や、白色トレイに払い落としのあとに吸虫管を用いて虫を吸い取って集める。野外から採集したウンカには、寄生蜂などの天敵に寄生されている個体があるため、採集後にこれらの天敵に寄生されている個体は完全に除去することが望ましい。

採集した虫は、芽出しイネ苗を入れた容器などに入れて持ち帰り、遺伝子診断を行うまでは冷凍して保存する。

採集後、実験室内で増殖してから遺伝子診断を行う必要がある場合には、室内でウンカを飼育する。飼育方法については、薬剤感受性検定マニュアル（九州沖縄農業研究センター, 2017）の中に詳細が記載されているので、それを参照する。

（執筆：松村正哉）

文献

九州沖縄農業研究センター（2017）イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル.

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/072957.html

4-6 トビイロウンカのイミダクロプリド剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性の主要因として解毒分解酵素 CYP6ER1 遺伝子の高発現が原因であることが明らかになり、高発現型 CYP6ER1 遺伝子は通常発現型 CYP6ER1 遺伝子と配列が異なることが明らかになった。

両者の遺伝子配列は複数箇所では異なっているが、特に高発現型遺伝子では通常発現型遺伝子の開始コドンから 1124-1127 塩基の領域に通常発現型と比較して 3 塩基欠失 ($\Delta 3$) が存在し、この結果高発現型遺伝子 (以下 $\Delta 3$ 型遺伝子) ではこの部位に新たに制限酵素 Sma I 配列が形成される。このことから $\Delta 3$ 周辺の配列を PCR で増幅し Sma I で切断することによって、通常型 (Sma I で切断されない) と $\Delta 3$ 型 (Sma I で切断される) の電気泳動のバンドパターンの違いで、 $\Delta 3$ 型遺伝子の検出が可能である。

N 型配列 : **AAATATCCCGCTGCGCCAGT**
 $\Delta 3$ 型配列 : **AAATATCCCG--G-GCCAGT**
網掛け部分の塩基が欠失で生じた Sma I 認識配列(CCCGGG)

また、 $\Delta 3$ 周辺の DNA 配列の違いに着目し、 $\Delta 3$ 型の配列のみを増幅するプライマーを追加して $\Delta 3$ 型を特異的に検出することが可能なマルチプレックス PCR によっても $\Delta 3$ 型遺伝子の検出が可能である。

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

- ・ TE (pH 8.0) (ニッポンジーン/品番 314-90021 もしくは同等品)
- ・ Triton-X (ナカライテスク/品番 35501-02 もしくは同等品)
- ・ PCR チューブおよびキャップ

<手順>

(個体単位の場合)

- 1) TE に 0.1%濃度になるように Triton-X を加え、これを DNA 抽出用バッファーとする。
- 2) 遺伝子診断に供試する個体数に応じて 0.2 mL 8 連 PCR チューブもしくは PCR 用 96 ウェルプレートの各チューブ・ウェル毎に 1 個体ずつ虫を入れる。8 連

チューブではキャップを、96 ウェルプレートでは各ウェルにキャップもしくはプレート全体をシールで密閉し、遺伝子診断に供試するまで-30°Cにて凍結する。

- 3) ゲノム抽出はウンカ個体を凍結した後に行う。8 連 PCR チューブ各チューブもしくは 96 well プレート各ウェルにウンカ 1 個体と DNA 抽出用 buffer を 100 μ L 入れてサーマルサイクラーで 95°C 15 分間加熱する。加熱後 4°C に冷却する。ゲノム抽出したサンプルを長期保存する際には-30°Cで凍結する。

II PCR-RFLP

II-1.PCR 反応

<準備するもの>

- ・ I 項のトビイロウンカ DNA 抽出液
- ・ PCR 酵素「*TaKaRa Ex Taq*[®]」(TaKaRa/品番 RR001A)
本製品には 10X *Ex Taq* バッファー (20 mM Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture (各 2.5 mM) が標準添付
- ・ プライマー 2 種
N, delta3_dF1 : 5'-GTCGTCTGCAAACAATGTCTTTCAGATC-3'
N, delta3_dR1 : 5'-ACCAATACAATATCGAGGTCCCTCAC-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
10x ExTaq buffer	2.0 μ L	40 μ L
滅菌蒸留水	13.2 μ L	264 μ L
dNTP (2.5 mM each)	1.6 μ L	32 μ L
プライマー		
N, delta3_dF1(10 μ M)	1.0 μ L	20 μ L
N, delta3_dR1(10 μ M)	1.0 μ L	20 μ L
ExTaq	0.2 μ L	4 μ L
合計	19.0 μ L	合計 380 μ L を 20 本に分注

- 2) DNA粗抽出により得られたトビイロウンカ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	2分	}	40 サイクル
94°C	30秒		
68°C	1分		
68°C	3分		

II-2. 制限酵素反応

- 1) 各試薬を解析本数分混合し、PCRチューブに分注する。

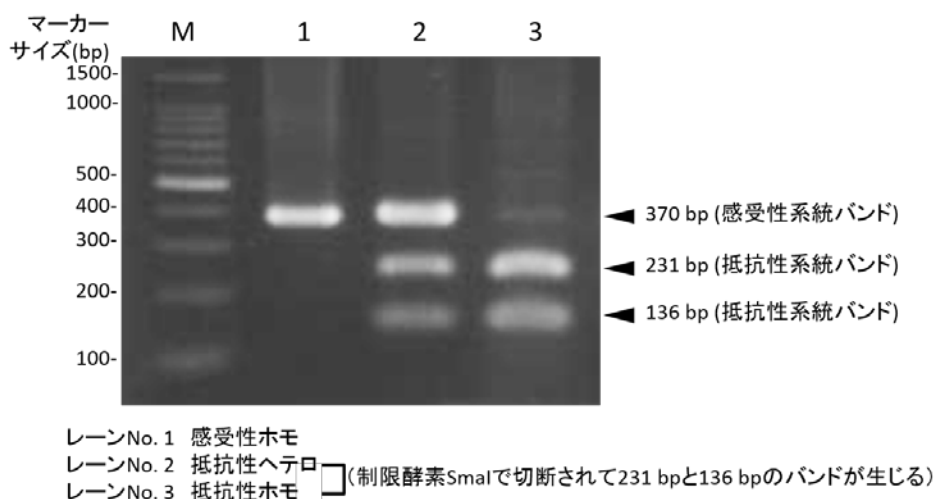
	1本分	20本分の場合
10xT buffer	2.0 μL	40 μL
滅菌蒸留水	5.6 μL	112 μL
0.1% BSA	2.0 μL	40 μL
制限酵素 <i>Sma</i> I	0.4 μL	8 μL
合計	10.0 μL	合計 200 μL を 20 本に分注

- 2) PCR反応液を10.0 μL分注し、キャップを閉め、30°Cで1時間反応する。

II-3. 電気泳動・染色・撮影

- 1) 制限酵素反応液8 μLを2.5%アガロースゲルで20~30分間100 Vで電気泳動し、エチジウムブロマイド(EtBr)あるいはGel Red (Biotium/品番41003)等で染色後、バンドパターンを撮影する。

II-4. 結果



以下の数式により、抵抗性遺伝子頻度を算出する。

$$\text{抵抗性遺伝子頻度} = \frac{\text{抵抗性ホモの個体数} \times 2 + \text{抵抗性ヘテロの個体数}}{\text{全個体数} \times 2} \times 100$$

III マルチプレックス PCR

III-1. PCR 反応

<準備するもの>

- ・ I 項のトビイロウンカ DNA 抽出液
- ・ PCR 酵素「*TaKaRa Ex Taq*[®]」(TaKaRa/品番 RR001A)
本製品には 10X *Ex Taq* バッファー (20 mM Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture (各 2.5 mM) が標準添付
- ・ プライマー 3 種
N, delta3_dF1-2 : 5'-GTCGTCTGCAAACAATGTCTTTTCAGAAC -3'
N, delta3_dR1 : 5'-ACCAATACAATATCGAGGTCCCTCAC-3'
delta3_dR1 : 5'-CGAAATGTTGAGGAAATATCCCGGG-3' (Δ3 型遺伝子
検出用)
- ・ 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
10x ExTaq buffer	2.0 μL	40 μL
滅菌蒸留水	12.2 μL	244 μL
dNTP (2.5 mM each)	1.6 μL	32 μL
プライマー		
N, delta3_dF1-2 (10 μM)	0.2 μL	4 μL
N, delta3_dR1 (10 μM)	0.8 μL	16 μL
delta3_dR1 (10 μM)	2.0 μL	40 μL
ExTaq	0.2 μL	4 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トビイロウンカ DNA を 1.0 μL ずつ分注する。

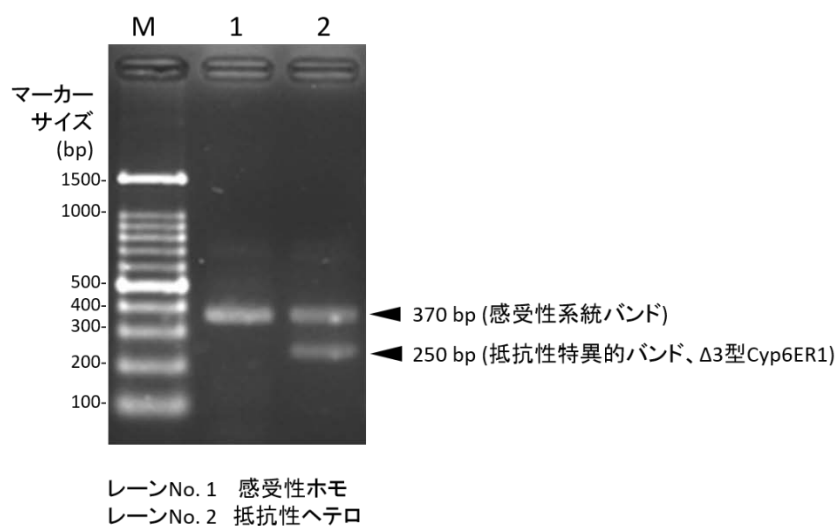
3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

94°C	2分	} 33 サイクル
94°C	30秒	
68°C	1分	
68°C	3分	

III-2. 電気泳動・染色・撮影

- 1) 制限酵素反応液 8 μ L を 2.5%アガロースゲルで 20~30 分間 100V 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。

III-3. 結果



(執筆：秋月岳)