

タバココナジラミ：バイオタイプQの簡易遺伝子診断法

農業・園芸総合研究所

1 取り上げた理由

タバココナジラミ：バイオタイプQは、平成18年に宮城県で初確認されたが、それ以前に侵入したバイオタイプBと形態的な差がないため、肉眼や顕微鏡を使った識別はできない。その識別には主にPCR-RFLP法による遺伝子診断（上田，2006）が用いられているが、遺伝子抽出法の簡略化、遺伝子増幅領域の変更、及び判定に用いる制限酵素の変更を行い、操作及び判定の確実性を高めたので普及情報とする。

2 普及情報

- 1) タバココナジラミのバイオタイプQとBを識別できる。
- 2) 検体は、成虫、または葉に寄生した幼虫を用いる。
- 3) 採取する検体数は、発生1か所当たり4検体程度とし、1個体ずつ検定する。
- 4) 診断作業は、遺伝子抽出、遺伝子増幅(PCR)、増幅産物の制限酵素処理(RFLP)、検出(アガロースゲル電気泳動と染色)から成り(図1)、バイオタイプQとBのミトコンドリア遺伝子領域制限酵素切断片の違いによって判定する(表2、図2)。所要時間は合計約5時間である。
- 5) 制限酵素は2種以上用いる。数多く用いるほど、より正確な識別が可能になる。

3 利活用の留意点

- 1) 本技術は、農作物有害動植物発生予察事業等で利用する。
- 2) タバココナジラミは、トマト黄化葉巻病やウリ類黄化症(退緑黄化病)の病原ウイルス(いずれも本県未確認)を媒介する。
- 3) 遺伝子抽出液は、冷蔵(4℃)で1年以上保存できる。
- 4) 本技術に必須の機器は、サーマルサイクラー(遺伝子増幅装置、約70万円)、アガロースゲル電気泳動装置(約4万円)、小型微量遠心機(約3万円)、紫外線照射装置(約13万円)であり、これらの機器はDNA品種識別を含めた多くの遺伝子診断技術に活用できる。
- 5) 1反応当たりの消耗品経費は約100円である。
- 6) タバココナジラミの形態であるにもかかわらず、表1のプライマーで目的サイズの遺伝子増幅産物が得られないもの、及び遺伝子増幅産物は得られるが、表2の制限酵素切断片長多型に一致しないものは、Q及びB以外のバイオタイプの可能性があるため、昆虫汎用プライマー(Simonら、1994)等による遺伝子増幅とDNAシーケンサーによる塩基配列の決定が必要である。

4 背景となった主要な試験研究

1) 研究課題名及び研究期間

遺伝子解析による品種識別と病害診断技術の開発 (平成16~20年度)

3) ウイルス病等診断技術の開発

2) 参考データ

遺伝子抽出 被害1株当たり4個体程度を採取(幼虫の場合は付着した葉ごとでよい)
検体に20 μ lのPrepMan Ultra(アプライドバイオ)を加えてペッスルで潰す
100 μ lのTE緩衝液を加えた後、10分間煮沸する

遺伝子増幅 PCR法により、ミトコンドリアCOI遺伝子の一部(673塩基)を増幅する
約2時間 表1のプライマーとTakara ExTaqを用い、30 μ lの反応液で40サイクル行う
プログラムは、変性95 $^{\circ}$ C, 30秒/アニール55 $^{\circ}$ C, 30秒/伸長72 $^{\circ}$ C, 1分

制限酵素処理 増幅産物5 μ lずつマイクロチューブに分注
約1時間 表2の制限酵素液を含む反応液5 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間消化

検出 2%アガロースゲル電気泳動, エチジウムブロマイド染色
約1時間 表2の断片長と照らし合わせて判定

図1 検定作業の流れ

表1 ミトコンドリアCOI遺伝子の増幅に用いるプライマー

5'プライマー: BemisiaF1	gaggtatttgggaaggttggg
3'プライマー: BemisiaR1	ttacaccaagcttaaatcttac

表2 遺伝子増幅産物の制限酵素切断片長(塩基対)

制限酵素名	バイオタイプQ	バイオタイプB
<i>Eco</i> T14I	457, 216	673
<i>Hinc</i> II	673	407, 266
<i>Hha</i> I	340, 333	673
<i>Cfr</i> 13I	461, 212	673
<i>Taq</i> I	565, 108	414, 151, 108
<i>Hinf</i> I	628, 45	582, 46, 45

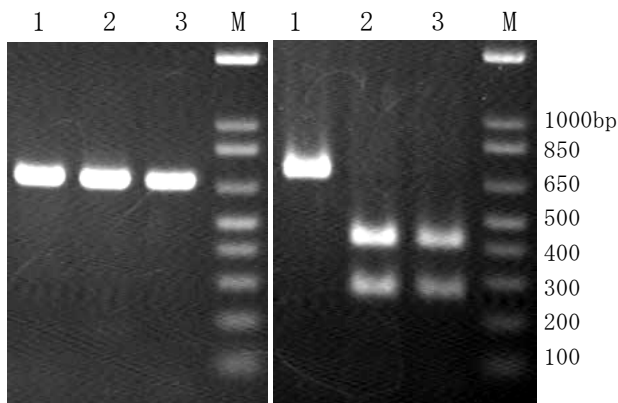


図2
遺伝子増幅産物(左図)と
制限酵素*Hinc*II切断片(右図)
のアガロース電気泳動パターン
レーン1: バイオタイプQ
レーン2, 3: バイオタイプB
レーンM: 分子量マーカー

3) 発表論文等 なし