

試験研究成果普及情報

部門	病害虫	対象	研究
課題名：PCR を用いたタバココナジラミバイオタイプ Q の判別法			
[要約] トマトの重要害虫であるタバココナジラミバイオタイプ Q、バイオタイプ B 及びオンシツコナジラミについて、抽出した DNA を鋳型とした PCR を行い、増幅される DNA 断片長を測定することにより、安定して判別することができる。			
キーワード： タバココナジラミ、オンシツコナジラミ、バイオタイプ Q、トマト黄化葉巻病、TYLCV			
実施機関名 主 査 農業総合研究センター・生物工学部・遺伝子工学研究室 協力機関 農業総合研究センター・生産環境部・病理研究室、 応用昆虫研究室			
実施期間 2006 年度～2007 年度			

[目的及び背景]

タバココナジラミは、全国的に被害が拡大しているトマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) の媒介者になることから、トマト栽培における最重要害虫となっている。平成 16 年に国内で発生が確認されたタバココナジラミバイオタイプ Q は、薬剤感受性が低いため大きな問題となっているが、従来から発生しているバイオタイプ B と形態で判別することができない。そこで、タバココナジラミバイオタイプ B とバイオタイプ Q とを判別し、しかも、これらと形態的に類似しているオンシツコナジラミとも区別できるマルチプレックス PCR 用プライマーセットを開発する。

[成果内容]

- 1 タバココナジラミバイオタイプ B、バイオタイプ Q 及びオンシツコナジラミを判別できる PCR 用プライマーセットを開発した。
- 2 コナジラミ類 (幼虫・蛹・成虫) から DNA を抽出し、開発したプライマーセットを用いて PCR を行うことにより、タバココナジラミバイオタイプ B、バイオタイプ Q 及びオンシツコナジラミを安定して判別することができる。
- 3 コナジラミ類 1 個体から定法に従い DNA を抽出し、表 1 に記載したプライマーセットを用いて、表 2 に記載した反応液組成で PCR 反応を行う。PCR 産物を、3% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、DNA 断片長を測定する (図 1)。DNA 断片長から、バイオタイプまたは種を判別する (図 1)。

[留意事項]

DNA の分解を防ぐため、検定には凍結保存した個体または生体を使用する。また、実験の成功率は低下するが、乾燥した個体からの判別も可能である。

[普及対象地域]

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表1 マルチプレックスPCRに用いたプライマーの塩基配列

プライマー名	配列
BtCOIF	TGGAATAATTAGAGGTATTTGGAAGGTTG
BtCOIR	CACATCTACAGAAGARTTACCAAGAATAAT
BtQCOIF	TGGAATAAAGTCCAATAAATTCAGGACC
BtBCOIR	AAATCCTGTAAATCAAAGGCCACGA
TvCOIF	AAGCCTCGGTATAATTTACGCTATAGTA
TvCOIR	GGTAAAATTTAAACTTAACTCCTACTACC

表2 反応液組成

成分	液量(μl)
滅菌蒸留水	0.65
10x PCRバッファー	1.00
2.5 mM dNTPs	0.80
3 μM BtCOIF	1.00
3 μM BtCOIR	1.00
3 μM BtQCOIF	1.00
3 μM BtBCOIR	1.00
3 μM TvCOIF	1.00
3 μM TvCOIR	1.00
鋳型DNA	1.50
5U/μl Taq DNA polymerase	0.05
合計	10.00

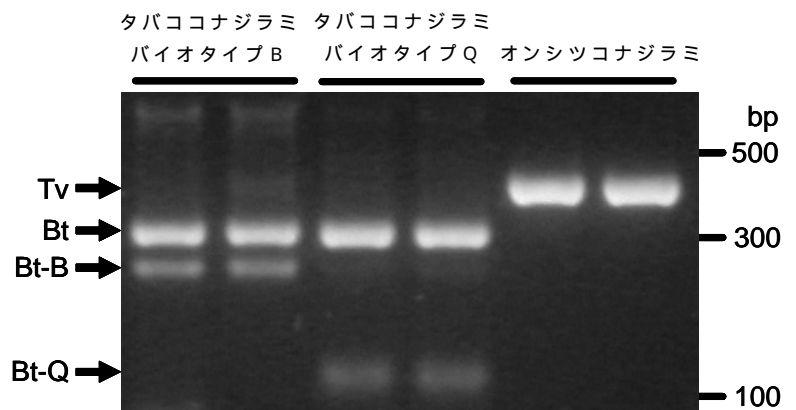


図1 マルチプレックスPCRによるタバココナジラミバイオタイプB、バイオタイプQ及びオンシツコナジラミの判別

注1) 反応温度条件は、95 2分間の熱変性後、95 30秒間・55 30秒間・72 30秒間を40サイクル繰り返し、72 5分間の伸長反応を行う

注2) DNA polymeraseとして、TaKaRa Taq Hot Start Version(タカラバイオ社製)を使用する

注) タバココナジラミでは313 bp(Bt)に、オンシツコナジラミでは417 bp(Tv)に相当するDNA断片が確認でき、さらに、タバココナジラミバイオタイプQでは116 bp(Bt-Q)に、バイオタイプBでは250 bp(Bt-B)に相当するDNA断片が確認できる

[発表及び関連文献]

- ・津金胤昭・大井田寛・久保周子・清水喜一．2007．マルチプレックスPCRを応用したタバココナジラミバイオタイプQ、バイオタイプB及びオンシツコナジラミ判別法の開発．関東病虫研報．54：159-164．

[その他]