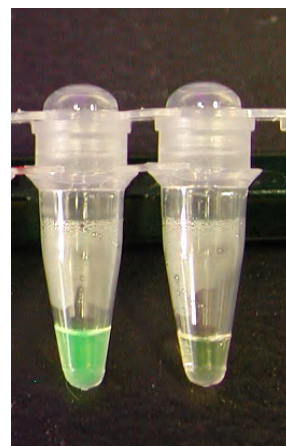
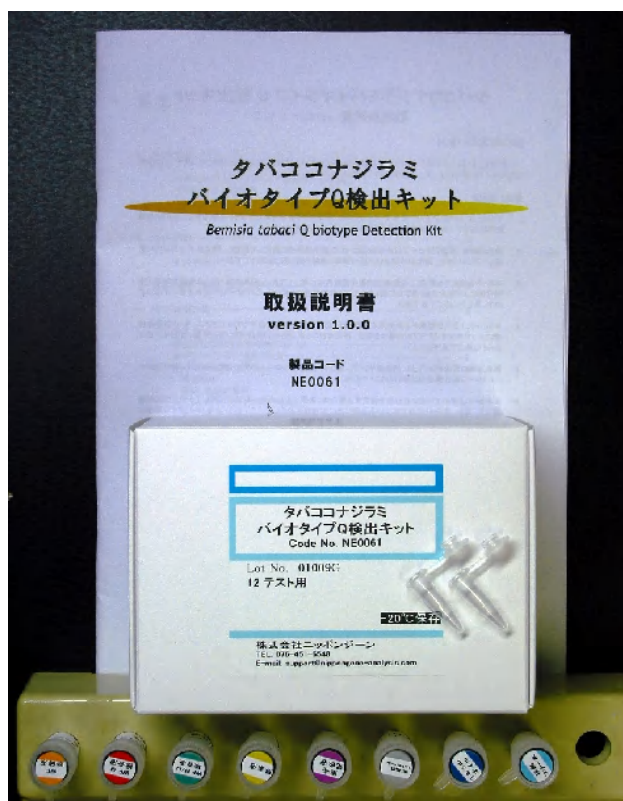


DNA鑑定によるタバコナジラミバイオタイプQの識別



農業総合試験場では、トマト黄化葉巻病などの病気を伝染する新型のタバコナジラミ(バイオタイプQ)をDNA鑑定によって識別する技術を開発しました。

この方法はLAMP法という新しい遺伝子増幅技術を用い、遺伝子レベルで迅速・簡易に診断する方法です。コナジラミをすりつぶして反応液に混ぜ、60℃で1時間保温するだけでバイオタイプが識別できますので、栽培現場で診断し、的確な害虫防除対策に役立てることが可能です。

タバココナジラミ

タバココナジラミ(学名：*Bemisia tabaci*)は、熱帯や亜熱帯地域を中心に発生している体長1mm程度の小さな害虫です(右図)。タバココナジラミは、野菜類や花き類など様々な園芸植物に寄生することが知られていますが、特に、近年、世界中のトマト栽培で大きな問題になっている「トマト黄化葉巻病」などのウイルス病を伝染することが明らかとなり、トマト栽培では最も深刻な害虫となっています。タバココナジラミには、外観では区別できませんが、遺伝子型(DNAの塩基配列の違い)や宿主植物への影響が異なる複数のバイオタイプがあります。国内にはバイオタイプJpL(在来系統)に加え、バイオタイプB(1989年国内初発)、バイオタイプQの3種が生息しています。このうち、2005年に海外から侵入したバイオタイプQは、それまで国内での優先種であったバイオタイプBに替わり、全国的に生息地域が拡大しています。



トマト黄化葉巻病に感染したトマト

バイオタイプQは、トマト黄化葉巻病などのウイルス病を伝染する能力についてはバイオタイプBと同程度ですが、ピリプロキシフェン剤(ラノーテープ)や一部のネオニコチノイド剤(アドマイヤー、モスピラン等)、合成ピレスロイドロイド剤(トレボン等)などの殺虫剤に対する耐性が発達しているという特徴を持っています。特にバイオタイプBに効果の高かったラノーテープに対する効果の違いが顕著です。そのため、ほ場で発生しているタバココナジラミがどのバイオタイプであるかを調べることで、コナジラミを防除する上で大変重要になります。

そこで、農業総合試験場ではタバココナジラミのバイオタイプを現場で簡易かつ迅速に識別できる技術を2008年度に開発し、このたびこの技術を利用した検出キットが商品化されました。これにより、タバココナジラミのバイオタイプ別に使用する薬剤を選択するなど、適確な防除が可能となります。

これまでの技術との違い

開発したLAMP法によるバイオタイプ識別技術は、これまで利用されてきたPCR(ポリマーゼ連鎖反応)法(polymerase chain reaction)やシーケンス法に比べ、飛躍的に簡易で短時間に診断を行うことができるようになりました。下表に示したように、シーケンス法では1週

間、PCR法でも1日かかっていた解析時間を1時間に短縮することができました。また、他の手法では、DNAシーケンサー(シーケンス法)やサーマルサイクラー・電気泳動装置(PCR法)などの機器が必要ですが、LAMP法では、保温器(60℃保温付きの電気ポットでも可)やピペットなどがあれば識別を行うことができるうえ、操作が簡易であることから、農業現場で利用することも可能であると考えられます。

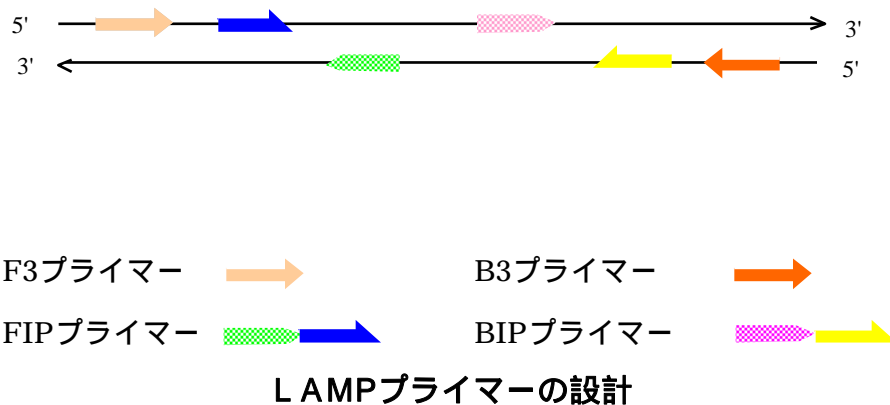
これまでの識別技術とLAMP法を用いた識別技術の特徴

	シーケンス法	PCR法	LAMP法
識別に必要な時間	1週間	1日	1時間
操作性	特別な機器が必要	特別な機器が必要	簡易な機器で可能

LAMP法について

LAMP法はNotomiらによって開発された新しいDNA増幅法です。LAMP法は、「ループ状の構造を保ちながら一定温度でDNAを増幅する」という意味の「Loop-mediated isothermal amplification」の略称で、“Loop”の“L”と“amplification”の“amp”を取って名付けられました。

LAMP法では、図に示したように、増幅のターゲットとする配列からそれぞれ20bp (base pair：塩基対の意味で、20bpは20塩基対分の長さを示しています)程度の領域を6カ所選び、4種類のプライマー(外側のF3とB3プライマー及び内側のFIPとBIPプライマー)を設計します。これらの4種のプライマーにサンプルと*Bst* DNAポリメラーゼを加え、60℃～65℃にインキュベートすることによってLAMP反応を行います。プライマーとは、分析するDNAサンプルに標的とする遺伝子が存在する場合に、その遺伝子を増幅させる働きがあります。このため、バイオタイプQのみに存在する遺伝子を標的遺伝子とし、LAMP反応でその遺伝子が増幅されれば、調査したタバココナジラミはバイオタイプQであることを示し、増幅されなければQ以外のバイオタイプであることを示しています。



LAMP法の長所を以下に挙げます。

60℃～65℃の一定温度で、1時間の反応させることによってDNAを増幅すること

ができる(サーマルサイクラーなど高額な機器は不要)。

増幅の有無を確認するための電気泳動は必要なく、インキュベート終了後の反応液が紫外線照射下で蛍光を発するか否かでDNA増幅の判定できる(電気泳動に必要な機器が不要)。

LAMP反応は植物や昆虫などに含まれている反応阻害物質による影響を受けにくい。そのため、サンプルの精製度が低くても診断が可能である。

このような特徴から、医療・食品流通・農業などの現場で使うことのできる遺伝子診断技術として、様々な研究がなされています。

愛知県農業総合試験場では、LAMP法をいち早く農業場面に取り入れ、病害虫診断を始めとして様々な研究に取り組んできました。中でも「トマト黄化葉巻病診断キット」は2003年に株式会社ニッポンジーンから商品化され、トマトの健全苗の育成や圃場での病害診断など幅広く利用されています。



キット化されている「トマト黄化葉巻病診断キット」

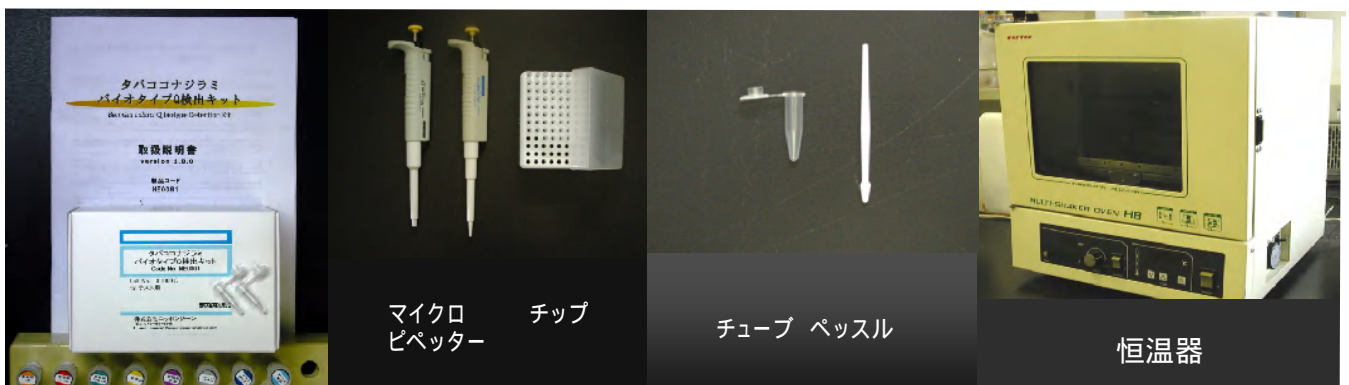
診断に必要なもの

診断を行う場所

なるべく清潔な部屋を用意して下さい。

用意する器具

1. タバココナジラミバイオタイプ検出キット
(株ニッポンジーン、12検体用で17,200円)
2. マイクロピペッター(200 μ L、20 μ L用を1つずつ)とピペッターに合うチップ
3. 1.5mLマイクロチューブ
4. ペッスル、無ければ爪楊枝



マイクロ
ピペッター

チップ

チューブ ペッスル

恒温器

5. 氷(クラッシュアイス)
6. 恒温器または恒温水槽(60℃を保持できる電気ポットなど)
7. 紫外線ランプ(240~260nmまたは350~370nmの波長)

診断

診断するコナジラミの数の1.5mLマイクロチューブを用意し、チューブにWF磨砕液(キットに含まれる)100μLを入れます。

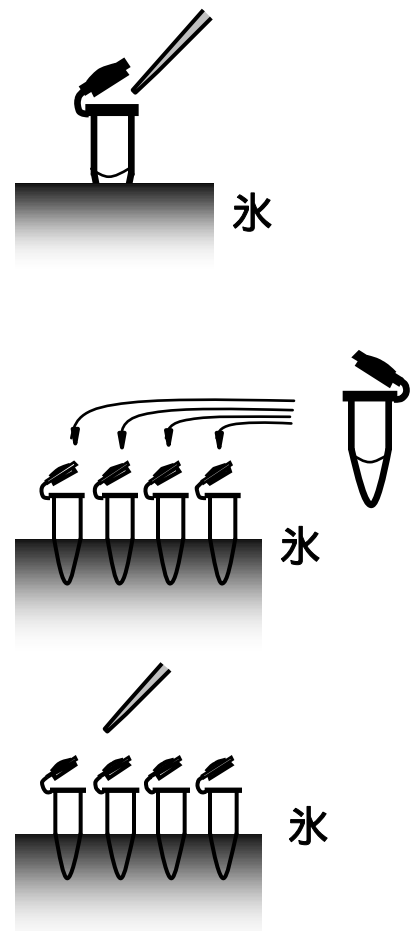
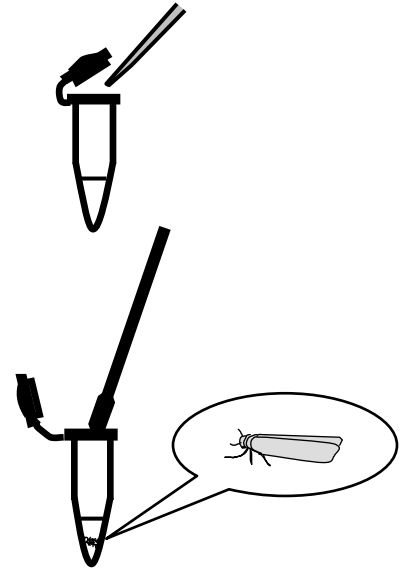
採集したコナジラミを1頭ずつチューブに入れ、ペッスルか爪楊枝ですりつぶします。ペッスルは1頭ずつ取り換えます。

別の1.5mLマイクロチューブを用意し、必要テスト分の反応液をまとめて作製します。

試薬	1テスト分
	反応液
WF検査液	7.2 μL
蛍光発色液	0.4 μL
酵素液	0.4 μL
合計	8.0 μL

で作製した反応液を1テスト分8μLずつキットに含まれるマイクロチューブに分注します。

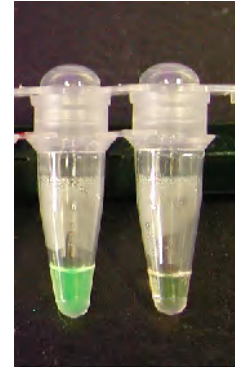
マイクロチューブに、で作製したコナジラミの磨砕液2μLをそれぞれ添加します。1サンプルごとにチップを取り換えます。磨砕液を入れた後、しっかりふたをします。



マイクロチューブを恒温器または恒温水槽に入れ、60℃、1時間保温します。



マイクロチューブを恒温器から出し、ふたを開けずに、紫外線を当てます。鮮やかな緑色の蛍光が認められるのがバイオタイプQです。



注意点

- ・コナジラミを磨碎するペッスルや磨碎液を吸ったチップなどは、1回ずつ使い捨てです。他のコナジラミ用に使わないで下さい。
- ・反応時間を守ってください。60℃で1時間以上置いておくと、誤判定することがあります。すぐに判定を行うことができない場合は、LAMP反応を止めるために、さらに80℃、2分間保温してください。
- ・LAMP反応を行った後のマイクロチューブは絶対に開けず、すぐ廃棄してください。反応液中には極めて多量のDNAが含まれているので、飛散して他のサンプルの反応液に混入すると誤判定を招きます。
- ・反応後のマイクロチューブやチップは、それぞれの地域のプラスチックゴミの捨て方に従ってください。

編集・発行

愛知県農業総合試験場

〒480-1193 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字三ヶ峯1-1

TEL 0561-62-0085 内線322 (企画普及部)

FAX 0561-63-0815 <http://www.pref.aichi.jp/nososi>

問い合わせ 環境基盤研究部生物工学グループ 内線342