

[成果情報名]DNAマーカーによるハダニ類のビフェナゼート感受性低下個体群の識別

[要約]ビフェナゼートに対して感受性を低下させたナミハダニとカンザワハダニの個体群では、シトクロム b 遺伝子内の特定部位に変異をもつ個体が存在する。DNA マーカーで変異型個体を検出することで抵抗性個体群を識別できる。

[キーワード]ナミハダニ、カンザワハダニ、薬剤感受性、ビフェナゼート、DNA マーカー

[担当]宮城農園研・バイオテクノロジー開発部、宮城農園研・園芸環境部

[代表連絡先]電話 022-383-8131

[区分]東北農業・共通基盤（病害虫）

[分類]研究成果情報

[背景・ねらい]

ビフェナゼートは、訪花昆虫や天敵への影響が少ないため、多くの作物で殺ダニ剤として使用されているが、ハダニ類において抵抗性の発達が認められるようになってきた。そこで、薬剤検定法よりも迅速にビフェナゼートに対する感受性が低下した個体群を識別できる DNA マーカーを開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 検定は DNA 抽出から検出までおよそ 5 時間で済む（図 1）。ナミハダニのシトクロム b 遺伝子の塩基配列から作成したプライマー（表 1）を用いて PCR 反応させると 160bp の増幅断片が得られる。
2. ナミハダニおよびカンザワハダニの野生型個体では制限酵素 *Sml* I の認識部位が存在するため、PCR 反応で得られた 160bp の増幅断片を *Sml* I で処理すると、増幅産物は 130bp と 30bp に切断される。認識部位に変異が生じると増幅産物が切断されず、160bp の単一バンドのままのため、電気泳動により両者を識別できる（図 2）。同一サンプルに野生型個体とこの変異型個体が混在すると、160bp、130bp および 30bp からなるバンドパターンとなる（図 2）。
3. 野生型個体のみで構成されている個体群の場合、ビフェナゼートに対する補正死虫率は、成虫、卵ともに高いが、変異型個体が存在する個体群では、成虫、卵のいずれかまたは両方で、薬剤感受性の低下が認められる（表 2）。このことから、変異型のバンドが検出された個体群は、ビフェナゼートに対する感受性が低下していると判断できる。

[成果の活用面・留意点]

1. 薬剤検定法に比べ所要時間が短いため、ナミハダニおよびカンザワハダニにおけるビフェナゼート感受性低下個体群の迅速診断に利用できる。
2. 感受性低下個体群を検出する場合には、数十頭をまとめて検定するが、個体ごとの遺伝子型解析も可能である。
3. 作成した CAPS マーカーは、ナミハダニおよびカンザワハダニを対象としている。他の種については検討していない。
4. 感受性低下が著しいナミハダニ個体群では、シトクロム b 遺伝子内にほかの変異がある場合がある（Leeuwen ら、2008）。このため、感受性低下が著しい個体群で変異型が検出されない場合、シトクロム b 遺伝子の塩基配列を解析する必要がある。

[具体的データ]

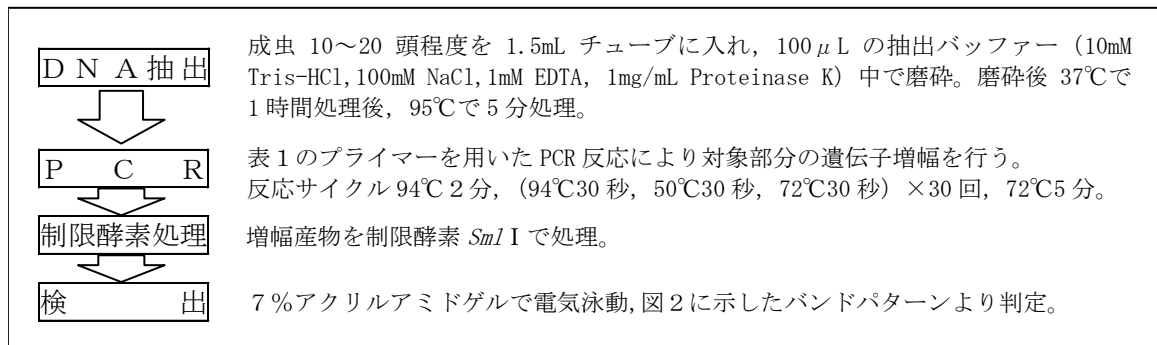


図 1 検定の実施手順

表 1 検定に用いるプライマー

プライマー	塩基配列 (5' -3')
Bif Cytb F	TAGGATCCGCTTTTATTGGG
Bif Cytb R	CGATTTAATGTAGGATTATCAACGG

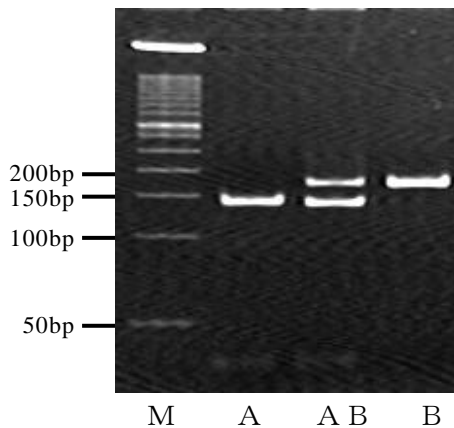


図 2 作成したマーカでの電気泳動像

M : 50bp ラダーマーカー

A : 野生型のみで構成される個体群

AB : 野生型・変異型が混在している個体群

B : 変異型のみで構成される個体群

表 2 供試したハダニ個体群とビフェナゼート(マイトコネフロアブル 1,000 倍)に対する補正死虫率およびマーカー型

個体群	補正死虫率(成虫, 3日後) ^z	補正死虫率(卵, 7日後) ^z	マーカー型 ^y
ナミハダニ 1	85.2%	98.5%	A
ナミハダニ 2	84.7%	91.2%	A
カンザワハダニ 1	91.6%	100.0%	A
ナミハダニ 3	76.0%	97.2%	AB
ナミハダニ 4	55.6%	74.3%	AB
カンザワハダニ 2	84.7%	58.8%	AB
ナミハダニ 5	72.4%	23.5%	B
ナミハダニ 6 ^x	6.9%	2.5%	B

すべてのサンプルは宮城県内の圃場より集団としてサンプリングし, インゲンで数世代累代飼育・増殖した後に薬剤検定を行った。

^z 太字は雌成虫で検定した補正死虫率と, 卵で検定した補正死虫率のうち, 死虫率が低かった試験区

^y A:野生型のみ, B:変異型のみ, AB:野生型・変異型が混在したバンドパターン。

^x 作成したマーカーで検出できる部位以外に, シトクロム b 遺伝子内でアミノ酸配列の変異が生ずる点変異を有する個体が含まれていることが確認された個体群。

(宮城県農業・園芸総合研究所)

[その他]

研究課題名 : 簡易遺伝子鑑定等による病害虫診断法の確立

予算区分 : 県単

研究期間 : 2009~2011 年度

研究担当者 : 板橋建、瀬尾直美、宮田将秀、丹野美和、宮本武彰