

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およびオンシツコナジラミ判別法の開発

津金胤昭・大井田 寛・久保周子¹・清水喜一*
(千葉県農業総合研究センター・*千葉県農林水産部農業改良課)

Development of a Multiplex PCR Assay for Identification of *Bemisia tabaci* Biotype B, Biotype Q and *Trialeurodes vaporariorum*

Taneaki TSUGANE², Hiroshi OIDA, Chikako KUBO and Kiichi SHIMIZU

摘 要

2004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は薬剤感受性が低く、全国的に被害が拡大しているトマト黄化葉巻ウイルスの媒介者になることから、トマト栽培における重要害虫となっている。しかし、タバココナジラミバイオタイプQは、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、共通の農作物に発生するタバココナジラミバイオタイプB、バイオタイプQおよびオンシツコナジラミを判別するために、マルチプレックスPCR用プライマーセットを開発した。本プライマーセットを用いたPCRによって、タバココナジラミバイオタイプBでは313 bpと250 bp、バイオタイプQでは313 bpと116 bp、オンシツコナジラミでは417 bpのDNA断片が増幅される。

タバココナジラミ *Bemisia tabaci* は、トマトをはじめ、キュウリやナスなど多くの農作物を加害し、吸汁害やすす病の原因となるだけでなく、さまざまなウイルス病を媒介して大きな被害をもたらす。タバココナジラミには多数のバイオタイプの存在が知られており (Perring, 2001; De Barro et al., 2005), 国内では、土着系統の個体群 (松井, 1993) の他にバイオタイプB (大戸, 1990) およびバイオタイプQ (Ueda and Brown, 2006) の存在が確認されている。2004年に国内への侵入が初めて確認されたタバココナジラミバイオタイプQは薬剤感受性が著しく低下した系統であり、近年大きな被害を起こしているトマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) の媒介者となることから、その防除対策の確立が急務となっている。

千葉県では、1989年にタバココナジラミバイオタイ

プBの発生 (河名ら, 1990) が、2005年にバイオタイプQの発生 (大井田ら, 未発表) が確認されている。現地では、1つのバイオタイプだけでなく、両バイオタイプやオンシツコナジラミが混在して発生する事例も認められている。タバココナジラミの発生生態の解明や防除対策の確立、また適切な防除法の選択のためには、生態や生理、薬剤感受性が異なるバイオタイプを判別しなければならない。しかし、バイオタイプは形態では判別できないため、アイソザイム分析やDNA解析による判別が行われてきた (Perring, 2001)。

これまでに、タバココナジラミバイオタイプBとバイオタイプQを簡易に判別するために、RAPD-PCR法 (Khasdan et al., 2005) およびPCR-RFLP法 (Khasdan et al., 2005; 上田, 2006) が開発されている。しかし、RAPD-PCR法は、検出されるDNA断片数が多いために

1 現在 千葉県千葉農林振興センター

2 Address: Chiba Prefectural Agriculture Research Center, Daizenno-cho 808, Midori-ku, Chiba-shi, Chiba 266-0006, Japan
2007年5月10日受領
2007年8月14日登載決定

解析に手間がかかり、場合によっては再現性に問題がある。一方、PCR-RFLP法は、制限酵素処理のために時間とコストがかかり、切断が不十分な場合には解析が困難なことがある。また、農業現場での診断への利用を想定すると、タバココナジラミだけでなく、共通する農作物に発生し、実際に診断に持ち込まれることがあるオンシツコナジラミ *Trialeurodes vaporariorum* についても判別できる必要がある。しかし、これまでにタバココナジラミとオンシツコナジラミを簡易に判別する方法は開発されていない。そこで、本研究では、1回のPCR反応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およびオンシツコナジラミを安定して判別できるマルチプレックスPCRプライマーセットを開発した。

本試験の実施にあたり、千葉県農林水産部農業改良課の野々宮弘明氏、千葉県印旛農林振興センターの風戸治子氏、中臺敬子氏、千葉県農業総合研究センターの藤平俊子氏にご協力いただいた。厚くお礼申し上げます。

材料および方法

1. タバココナジラミバイオタイプQ、バイオタイプBおよびオンシツコナジラミのmtCOI遺伝子領域の塩基配列の決定

供試材料として、タバココナジラミは千葉県内7ヶ所(柏市、山田町、佐倉市、松戸市、船橋市、市原市、旭市)、オンシツコナジラミは県内5ヶ所(柏市、佐倉市、野田市、本埜村、千葉市)で、2005年12月から2006年3月に採集した成虫を使用した。各採集地について1個体からDNAを抽出した。1.5 mlのプラスチックチューブに供試虫1個体と50 µlの抽出バッファー(200 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS)(Khasdan et al., 2005)を入れてペッスルで虫体を粉碎し、これに50 µlの3M 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)および100 µlのクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1, v/v)液を加えて混合した。室温(20~25 °C)で15,000 rpm, 15分間の遠心分離を行った後、上清を新しい1.5 mlチューブに移し、100 µlのイソプロパノールを加え、イソプロパノール沈殿によりDNAを回収した。DNAは70%エタノールで洗浄した後、乾燥し、10 µg/mlのRNase Aを含む12 µlのTEバッファー(10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)に溶解した。抽出したDNAを鋳型として、PCRによりミトコンドリアチトクロームオキシダーゼ(mtCOI)

遺伝子領域のDNAを増幅した。タバココナジラミでは、Fröhlich et al. (1999)のプライマー、C1-J-2195 MTD-10 (TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT), L2-N-3014 MTD-12 (TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA)をPCRに使用した。オンシツコナジラミではDNAデータベース'GenBank'に登録されているオンシツコナジラミmtCOI遺伝子領域の塩基配列AJ550183から新たに設計したプライマー、AJ550183_65F (ATTGAAGTCTTTGGAAGCCTC), AJ550183_514R (AAACTGGGAAAGAAGAAGGTTAAA)を使用した。反応溶液は、抽出したコナジラミの全DNA抽出液5 µl, 3 µMプライマー各5 µl, 10 × PCR buffer 5 µl, 2.5 mM dNTPs 4 µl, 5 U/µl TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) 0.25 µl, および滅菌蒸留水 25.75 µlを混合したものとした。反応温度条件は、95 °C 2分間の熱変性後、95 °C 30秒間・52 °C 30秒間・72 °C 1分間を35サイクル繰り返し、72 °C 5分間の伸長反応を行うものとした。シーケンス反応は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(プロメガ社製)を用いて精製したPCRの増幅産物を鋳型にし、PCRに使用したプライマーとBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用い、キットのプロトコールに従って行った。シーケンス反応産物を用い、DNAシーケンサーABI377 (アプライドバイオシステムズジャパン社製)によって塩基配列を決定した。

2. タバココナジラミバイオタイプQ、バイオタイプBおよびオンシツコナジラミの判別プライマーセットの作成

DNA データベース'GenBank'に登録されているタバココナジラミバイオタイプQ (AB204579, AB204586-AB204588), バイオタイプB (AB204577, AB204578, AB204580-AB204585) およびオンシツコナジラミ (AF110708, AJ550183) のmtCOI遺伝子領域の塩基配列と前述の方法により決定した県内で採集したコナジラミ類のmtCOI遺伝子領域の塩基配列間の相同性を、遺伝情報処理ソフトウェアGENETYX (ゼネティックス社製)を用いて調べた。塩基配列の相同性をもとに、県内で採集したコナジラミ類をタバココナジラミバイオタイプQ、バイオタイプBまたはオンシツコナジラミに判別した。このようにして得られた各コナジラミ類の配列をアラインメント解析し、それぞれについてコンセンサス配列を作成した(第1図)。コンセンサ

ス配列は、遺伝情報処理ソフトウェアGENETYXでアラインメントし、異なる塩基についてはAまたはCをMで、AまたはGをRで、CまたはGをSで、AまたはTをWで、CまたはTをYで表すことによって作成した。コンセンサス配列を用いて三者の判別に利用できるPCRプライマーセットを設計した。まず、タバコナジラミまたはオンシツコナジラミのmtCOI遺伝子領域を特異的に増幅できるプライマーセットとして、両者で異なる配列を3'末端に配置したプライマーBtCOIF、BtCOIR、TvCOIF、およびTvCOIRを設計した(第1表)。タバコナジラミパイオタイプQおよびバ

イオタイプBの判別用には、上田(2006)においてパイオタイプ判別に利用している制限酵素部位を標的として、Hayashi et al. (2004)の方法により3'末端から3塩基目にミスマッチを配置した1塩基多型検出プライマーを設計した(第1表)。すなわち、パイオタイプQを特異的に増幅するプライマー(BtQCOIF)は、3'末端の塩基をCに、3'末端から3番目の塩基をAとし、パイオタイプBを特異的に増幅するプライマー(BtBCOIR)は、3'末端の塩基をAに、3'末端から3番目の塩基をCとし、前者はBtCOIRと後者はBtCOIFとの間でPCR産物が増幅するように設計した

BtBCOI	1: GTTTCTCATCTAATCAGCAGTGAGGCTGGAAAATTAGAGGTATTTGGAAGGTTGGGTATA	60
BtQCOI	1: GTTTCTCATTTAATTAGCAGCGAGGCTGGAAAATTAGAGGTATTTGGAAGGTTGGGSATA	60
TvCOI	1: ATTTCTCATCTTATTAGTGCTGAGGCGGGGAAAATTGAAGTCTTTGGAAGCCTCGGTATA	60
	BtCOIF →	
BtBCOI	61: ATTTATGCTATATTGACTATTGGTATTTCTAGGGTTTATTGTTTGAGGTCATCATATATTC	120
BtQCOI	61: ATTTATGCTATATTGACTATTGGTATCTTAGGGTTTATTGTTTGAGGACATCATATATTT	120
TvCOI	61: <u>ATTTACGCTATAGTAACTATMGGTGTGTTGGGGTTTATTGTTTGGGACATCATATATTT</u>	120
	← TvCOIF	
BtBCOI	121: WCAGTTGGAATAGATGTAGATACTCGAGCTTATTTCACTTCAGCCACTATAATTATTGCT	180
BtQCOI	121: ACAGTTGGAATAGATGTAGATACTCGAGCTTATTTCACTTCAGCTACTATGATTATTGCC	180
TvCOI	121: ACTGTAGGAATGGATGTGGACACTCGCGCTTACTTTACTTCTGCTACTATAATTATTGCT	180
BtBCOI	181: GTTCCCACAGGAATTAATAATTTTTAGTTGGCTTGCTACTTTGGGTGGAATAAAGTCTAAT	240
BtQCOI	181: GTTCCTACAGGAATTAATAATTTTTAGTTGGCTTGCTACTTTGGGTGGAATAAAGTCCAAT	240
TvCOI	181: GTTCCTACTGGAATTAATAATTTTCAGTTGACTTGCGACCTTGGGGGGCGC---GCCTTTG	237
BtBCOI	241: AAATTAAGRCCTCTTGGCCTTTGATTTACAGGATTTTTATTTTATTACTATAGGTGGG	300
BtQCOI	241: AAATTCAGGCCCTTGGCCTTTGATTTACAGGATTTTTATTTTATTACTATAGGTGGA	300
TvCOI	238: <u>TCATTTAATCCCTTACTTCTTGTTTACTGGATTTTTATTTCTTTTACTTTAGGGGGT</u>	297
	← BtQCOIF BtBCOIR	
BtBCOI	301: TTAACTGGAATTATTCTTGGAATTCCTCTGTAGATGTGTGTCGCATGACACTTATTTT	360
BtQCOI	301: TTAACTGGAATTATTCTTGGAATTCCTCTGTAGATGTGTGTTGCATGACACTTATTTT	360
TvCOI	298: CTCACAGGGGTGATTTGGGTAATCTTCTGTGGATGTTGTCATGATACTTACTTT	357
	← BtCOIR	
BtBCOI	361: GTTGTTGCACATTTTCATTATGTTTTATCAATAGGAATTATTTTGGCTATTGTAGGAGGA	420
BtQCOI	361: GTTGTTGCACATTTTCATTATGCTTTATCAATAGGAATTATTTTGGCTATTGTAGGAGGA	420
TvCOI	358: GTTGTTGCTCATTTTCACTATGTTTTATCTATGGGGATTATTTTCGCTATTATAGGGGGT	417
BtBCOI	421: GTYATCTATTGATTTCCACTAATCTTAGGT-TTAACCTTAAATAATTATAGATTGGTGTC	479
BtQCOI	421: GTTATCTATTGATTTCCATTAATCTTGGGC-TTAACCTTAAATAATTATAGCTTGGTGTC	479
TvCOI	418: CTTGTGTTTTGATTTCCATTGGTAGTAGGAGTTAAGTTTAAATTTTAAACCTTCTTCTTTC	477
	← TvCOIR	

第1図 タバコナジラミパイオタイプB、パイオタイプQおよびオンシツコナジラミのmtCOI遺伝子領域のコンセンサス塩基配列のアラインメントとマルチプレックスPCRプライマーの結合位置

注) 矢印がプライマーの結合位置とDNAの合成方向を示す。コンセンサス塩基配列においては、MはAまたはCを、RはAまたはGを、SはCまたはGを、WはAまたはTを、YはCまたはTを、-はギャップを表す。コンセンサス塩基配列の作成に使用した塩基配列および作成法については、材料と方法2に記載した。

(第1図)。

3. マルチプレックスPCR法によるコナジラミ類の判別

2006年5月から2007年2月に、県内でタバココナジラミおよびオンシツコナジラミの成虫と老齢幼虫を採集し(第2表)、開発したマルチプレックスPCR法を用いて判別を行った。反応溶液は、1と同様の方法でコナジラミから抽出した全DNAの1/8量に相当する1.5 µl, 3 µM プライマー6種類各1 µl, 10×PCR buffer 1 µl, 2.5 mM dNTPs 0.8 µl, 5 U/µl TaKaRa Taq Hot Start Version(タカラバイオ社製) 0.05 µl, および滅菌蒸留水 0.65 µlを混合したものとした。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ものとした。3%アガロース(分子生物学用, SIGMA社製)ゲル電気泳動によりPCR産物を分離し、DNA断片長を確認した。

第1表 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	TGGAAAATTAGAGGTATTTGGAAGGTTG
BtCOIR	CACATCTACAGAAGARTTACCAAGAATAAT
BtQCOIF	TGGAATAAAGTCCAATAAATTCAGGACC
BtBCOIR	AAATCCTGTAAATCAAAGGCCACGA
TvCOIF	AAGCCTCGGTATAATTTACGCTATAGTA
TvCOIR	GGTTAAAATTTAAACTTACTCTACTACC

第2表 千葉県内で採集したタバココナジラミバイオタイプB, バイオタイプQおよびオンシツコナジラミのマルチプレックスPCR法およびPCR-RFLP法による判別

採集地	植物	採集年月 (年/月)	個体数	マルチプレックスPCR法			PCR-RFLP法	
				Bt-Q	Bt-B	Tv	Bt-Q	Bt-B
一宮町	トマト	2006/5	5	0	5	0	0	5
白子町	ナス	2006/5	8	8	0	0	8	0
千葉市若葉区	トマト	2006/5	6	6	0	0	6	0
佐倉市	トマト	2006/5	6	3	0	3	3	0
大網白里町	トマト	2006/5	4	4	0	0	4	0
山武市	キュウリ	2006/5	2	2	0	0	2	0
我孫子市	トマト	2006/7	3	3	0	0	3	0
我孫子市	ナス	2006/7	2	2	0	0	2	0
東金市	キュウリ	2006/7	2	2	0	0	2	0
長生村	トマト	2007/2	6	0	0	6	-	-

注) Bt-Q: タバココナジラミバイオタイプQ, Bt-B: タバココナジラミバイオタイプB, Tv: オンシツコナジラミ,

-: データ無し

マルチプレックスPCR法の有効性を検証するために、供試個体の残りのDNA抽出液を用いて、PCR-RFLP法(上田, 2006)による判別を行い、マルチプレックスPCRの結果と比較した。

結果および考察

千葉県内7ヶ所で採集したタバココナジラミのmtCOI遺伝子領域の塩基配列(776 bp)を、DNAデータベース'GenBank'に登録されているタバココナジラミの配列と比較したところ、松戸市、船橋市、旭市および山田町の個体の配列は、広島県三原市(AB204588)、鹿児島県宮之城町(AB204586)および鹿児島県大口市(AB204587)の個体の配列と、柏市、佐倉市および市原市の個体の配列は、熊本県西合志町(AB204579)の個体の配列と完全に一致した。一致した配列はいずれもバイオタイプQのものであることから、供試したタバココナジラミは、バイオタイプQであることが確かめられた。

また、県内5ヶ所で採集したオンシツコナジラミについてmtCOI遺伝子領域の塩基配列(420 bp)を、'GenBank'に登録されているオンシツコナジラミの配列と比較したところ、全ての個体の配列がレユニオン島(フランス領)産オンシツコナジラミの配列(AJ550183)と完全に一致し、供試個体がオンシツコナジラミであることを遺伝子情報からも確認することができた。

タバココナジラミバイオタイプQ, バイオタイプBおよびオンシツコナジラミのmtCOI遺伝子領域コンセ

ンサス配列から設計した特異的プライマーを用いて、県内で採集したコナジラミ類のDNAを鋳型に、マルチプレックスPCRを試みた。増幅産物を3%アガロースゲルにより電気泳動したところ、設計したプライマーで増幅されることが予想されたDNA断片長と一致して、タバココナジラミでは313 bpに、オンシツコナジラミでは417 bpに相当するDNA断片が確認できた(第2図)。さらに、タバココナジラミバイオタイプQでは116 bpに、バイオタイプBでは250 bpに相当するDNA断片が認められた。また、電気泳動像には、明確な非特異的増幅産物やプライマーダイマーは認められなかった。このことから、本プライマーを用いたマルチプレックスPCRにより、タバココナジラミバイオタイプQ、バイオタイプBおよびオンシツコナジラミの判別が可能であると考えられた。

開発したマルチプレックスPCR法により、安定的にコナジラミ類の判別ができることを確認するために、採集地域や時期、発生植物が異なる成虫と老齢幼虫を用いて実験を行った。その結果、2つの方法によるタバココナジラミバイオタイプQおよびバイオタイプBの判別結果は完全に一致し(第2表)、マルチプレックスPCR法によっても安定的に判別できることが明らかとなった。

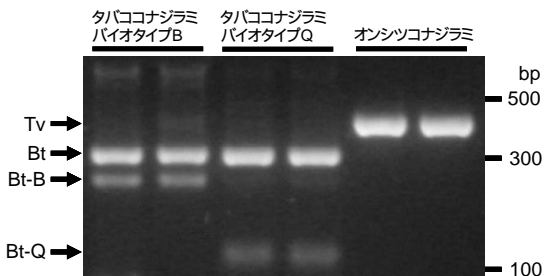
これまでにRAPD-PCR法やPCR-RFLP法を用いた、タバココナジラミバイオタイプBとバイオタイプQを判別するための分子生物学的手法が開発されてきた(Khasdan et al., 2005; 上田, 2006)。筆者らが開発したマルチプレックスPCR法は、これらの方法よりも安

定した結果が得られ、時間やコストの削減につながった。さらに本法は、現場から診断依頼サンプルとして持ち込まれる可能性のあるオンシツコナジラミを判別できるプライマーも加えているため、タバココナジラミにオンシツコナジラミが混入していた場合の判別にも対応可能である。また、国内には土着系統のコナジラミが存在しているが(松井, 1993)、塩基配列から日本土着系統(バイオタイプJpL)と確認された千葉県産コナジラミを材料に本マルチプレックスPCR法を行った場合、タバココナジラミバイオタイプB、バイオタイプQおよびオンシツコナジラミで得られるDNA断片と類似したサイズのDNA断片が生じないことを、塩基配列と実験から確認している(津金, 未発表)。したがって本マルチプレックスPCR法は、トマトやキュウリに発生する主要なコナジラミ類を判別するために、非常に有用な方法であると言える。

異なるバイオタイプは、形態に差異はないが、生態や生理に異なった特徴を持っている。そのため、薬剤感受性や寄主植物の範囲、病原体の媒介性など、農業上問題となる特性にも差があると考えられている。今後は、タバココナジラミの総合的防除法の確立に向け、千葉県内で発生する個体群のバイオタイプと生態や薬剤感受性等の特性の関係を解明しなければならない。

引用文献

De Barro, P. J. et al. (2005) Bull. Entomol. Res. 95 : 193 - 203 .
 Frohlich, D. R. et al. (1999) Mol. Ecol. 8 : 1683 - 1691 .
 Hayashi, K. et al. (2004) Theor. Appl. Genet. 108 :



第2図 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およびオンシツコナジラミの判別

注) Tv : オンシツコナジラミ, Bt : タバココナジラミ, Bt-B : タバココナジラミバイオタイプB, Bt-Q : タバココナジラミバイオタイプQにそれぞれ特異的な増幅DNA断片。オンシツコナジラミおよびタバココナジラミバイオタイプQのサンプルは千葉県佐倉市で、タバココナジラミバイオタイプBのサンプルは一宮町で、2006年5月に採集した。

- 1212 - 1220 .
- 河名利幸ら (1990) 関東病虫研報 37 : 209 - 211.
- Khasdan, V. et al. (2005) Bull. Entomol. Res. 95 : 605 - 613 .
- 松井正春 (1993) 植物防疫 47 : 118 - 119 .
- 大戸謙二 (1990) 植物防疫 44 : 264 - 266 .
- Perring, T. M. (2001) Crop Protection 20 : 725 - 737 .
- 上田重文 (2006) 九病虫研会報 52 : 44 - 48 .
- Ueda, S. and J. Brown (2006) Phytoparasitica 34 : 405 - 411 .