令和２年度

（技術名）**スワルスキーカブリダニ組織由来の被食アザミウマ類DNAの抽出及びPCR-RFLP法による種及び系統判別方法**							
（要約）アザミウマ類の種および系統判別手法を応用することにより、スワルスキーカブリダニ組織から被食アザミウマ類DNAの抽出と増幅が可能であり、PCR後にチャノキイロアザミウマの系統判別が、さらに制限酵素処理を行うことでアザミウマ類の種判別ができる。							
農業研究センター・病虫管理技術開発班				連絡先	098-840-8504		
部会名	果樹	専門	作物虫害	対象	マンゴー	分類	研究
普及対象地域							

［背景・ねらい］

天敵製剤であるスワルスキーカブリダニ（以下、スワルスキー）は、アザミウマ類を含む複数種の害虫を捕食することが知られている。スワルスキー放飼条件下では、作物体上で害虫種を含めて複数の捕食対象種が発生するが、スワルスキーがこれらを捕食している様子が確認されることは極めて稀であり、作物体上で実際に捕食している種構成を明らかにすることは困難となっている。一方で、アザミウマ類については PCR-RFLP 法を用いた種および系統判別方法(Toda and Komazaki, 2002; 守屋ら、2018)が確立されている。そこで、本手法を応用することにより、スワルスキーの組織から被食アザミウマ種の DNA を抽出し、PCR-RFLP 法によって種および系統判別が可能か検討する。

［成果の内容・特徴］

１．DNA 抽出溶液は、18 µl の STE バッファー［10 mM NaCl、 1 mM EDTA（pH 8.0）、 10 mM Tris-HCl（pH 8.0）］と２µl の Proteinase K（10 mg/ml）からなる。

２．スワルスキーは１個体ずつピンセットを用いて抽出溶液に導入し、ガスバーナー等で炙り先端を丸く加工した 10µl チップを用いて破砕し、65℃で 15 分間、95℃で５分間温度処理した後に４℃で保持して DNA を抽出する。

３．PCR は表 1 に反応液組成と条件を示す。プライマーはアザミウマ類のユニバーサルプライマーITSF/ITSR およびチャノキイロアザミウマ系統特異的プライマーSdITSF7/SdITSF3 で DNA を増幅する。PCR 反応終了後に 1.5%アガロースゲルを用いて 25 分程度電気泳動を行うと、アザミウマ類のバンドが 500bp 付近に確認され、チャノキイロアザミウマでは C 系統は 190bp、YT 系統は 295bp にバンドが確認される（図上）が、それ以外のアザミウマ類は区別できない。

４．制限酵素処理は表２の反応液組成と条件で実施する。PCR で得られた産物に制限酵素 RsaⅠを 37℃で 60 分処理後、2.0%アガロースゲルを用いて 35 分間電気泳動を行うと、５種アザミウマ類の各種特有のバンドが確認され、それぞれを識別できる（図下）。

［成果の活用面・留意点］

１．今後は、スワルスキーの消化に伴う被食アザミウマ類の DNA 量の経時的変化を明らかにし、マンゴー花穂上でのアザミウマ類の種構成とスワルスキーの捕食アザミウマ種構成を比較し、スワルスキーによるアザミウマ類の捕食生態およびハナアザミウマ類の発生がスワルスキーによるチャノキへの防除効果に与える影響を明らかにする。

２．野菜類など他のスワルスキー利用作物における捕食生態解明にも応用することが出来る。

３．PCR および制限酵素処理は Toda and Komazaki (2002) の手法を一部改変して行っている。

４．検定サンプルは、スワルスキーを放飼しているマンゴー施設において、マンゴー花穂上から採取したサンプルを用いている。

［具体的データ］

表１PCR 反応液組成（左）と反応条件（右）

鋳型DNA抽出液		3.0	μl
AmpliTaq Gold Fast PCR Maste Mix		10.0	μl
各プライマー（10μM）	ITSF	1.0	μl
	ITSR	1.0	μl
	SdITSF7	1.0	μl
	SdITSF3	1.0	μl
滅菌蒸留水		3.0	μl
合計		20.0	μl

	反応温度	反応時間
	95 ℃	10 分
35 回繰り返し	96 ℃	3 秒
	55 ℃	3 秒
	68 ℃	5 秒
	72 ℃	10 秒
	4 ℃	∞

表２制限酵素反応液組成（上）と反応条件（下）

増幅DNA溶液	10.0	μl
Rsa I	0.5	μl
標準添付バッファー	1.0	μl
合計	11.5	μl

反応温度	反応時間
37 ℃	60 分
4 ℃	∞

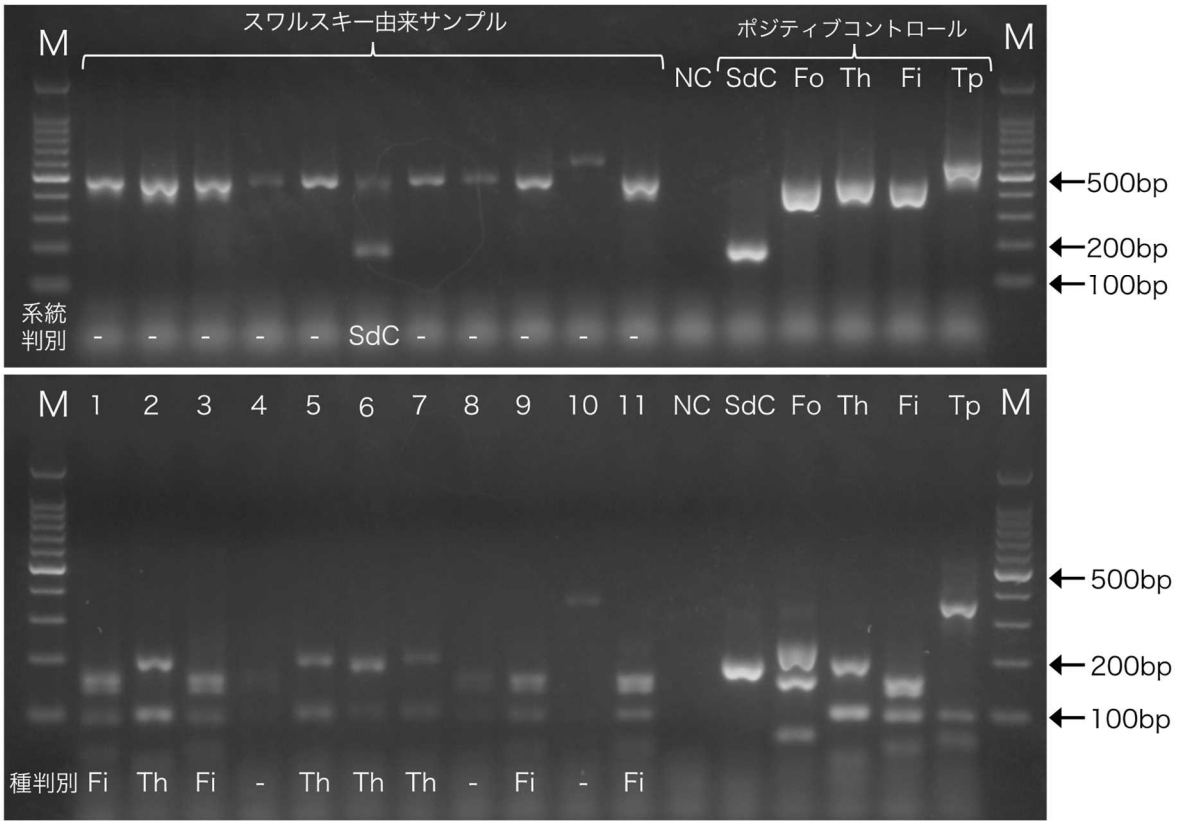

図　スワルスキーより抽出した被食アザミウマ種 DNA の PCR（上）および制限酵素処理後（下）の電気泳動結果

* M: 100bp DNA Ladder マーカー、NC: ネガティブコントロール、SdC:チャノキイロアザミウマ C 系統、Fo:ミカンキイロアザミウマ、Th:ハナアザミウマ、Fi:ヒラズハナアザミウマ、Tp:ミナミキイロアザミウマ、－: 判別不能
なお、チャノキイロアザミウマ YT 系統はごく稀にしか検出されないためポジティブコントロールを導入していない。

［その他］

課題 ID：2018 農 008
研究課題名：先進技術を活用した総合的病害虫・雑草管理技術体系の確立
予算区分：その他（化学農薬削減に向けた病害虫防除技術推進事業）
研究期間（事業全体の期間）： 2018 年度（2018 年～2020 年度）
研究担当者：守屋伸生、喜久村智子、秋田愛子、上里卓己
発表論文等：守屋ら（2019）日本応用動物昆虫学会第 63 回大会