

虫体を破碎しない簡易凍結 DNA 抽出法による 粘着板から回収したタバココナジラミ成虫の トマト黄化葉巻ウイルス保毒虫検定

農研機構 野菜花き研究部門
野菜病害虫・機能解析研究領域

おおにし じゅん とよだ しゅうこ きたむら としお たけだ みつよし
大西 純・豊田 周子・北村 登史雄*・武田 光能

はじめに

トマト黄化葉巻病はトマト黄化葉巻ウイルス（以下、TYLCV）を病原とするウイルス病で、タバココナジラミにより永続的に媒介される昆虫媒介性ウイルスである。国内では1996年に初発生が確認され（Kato et al., 1998）、その後西日本から関東地域、南東北地域にまで拡大し、2014年度までに38都府県において発生が報告されている。TYLCVを保毒した成虫は終生にわたりウイルスを高率に媒介し続けることから、施設内においてタバココナジラミが低密度に発生していても本病の発生は拡大する傾向にある。したがって、タバココナジラミの発生動向を調査することは本病の対策では特に重要である。

黄色粘着板はタバココナジラミなどの害虫の発生動向を調査する際に活用され、栽培圃場内や周辺に設置して定期的にモニタリング調査することにより防除対策を適宜実施するのに有用である。一方で、タバココナジラミがTYLCVを保有しているか否かを識別することは、栽培している地域内における本病の発生状況を把握するうえで重要である。タバココナジラミのTYLCV保毒虫検定では、PCR法による遺伝子診断法が常用されている。しかし、PCR法による検定作業では、タバココナジラミを破碎してDNAを抽出し、PCR反応に供試するために、こうした作業工程に時間がかかり、またある程度の習熟が必要であった。

筆者らは粘着板に捕殺されたタバココナジラミを対象としてTYLCVの保毒虫検定とそのための虫体を破碎しない簡易凍結DNA抽出法を検討した。本法により、習

熟が必要であった虫体の破碎とDNA抽出の簡便化が可能となり、PCR検定によりウイルスを高感度に検出し、かつウイルス系統の判別とコナジラミ類のバイオタイプ判定も同時に実施することが可能となった。本稿では、本法の特徴と検定手順を概説するとともに、黄色粘着板を活用したウイルス検出の研究事例を紹介し、さらに発生予察における活用の可能性も展望したい。

I 虫体を破碎しない簡易凍結 DNA 抽出法

昆虫からDNAを抽出する方法は、虫体を抽出用の緩衝液などを用いて破碎してDNAを精製する方法や市販の試薬や精製キットが知られているが、様々な記事でも紹介されているので本稿では割愛する。

本稿で紹介する虫体を破碎せずにDNAを抽出する方法は、PCR検定をするために試料をすり潰したりせずにDNAを抽出する方法である（豊田ら、2014）。非破壊的なDNA抽出法は既に様々な方法が報告されており、これらはDNAを抽出した後も同一の試料を証拠標本として形態観察または保管することを目的に考案された。外部形態を損傷させないよう工夫された非破壊的なDNA抽出法の事例として、博物館で保存されている古い貴重な標本を用いて、抽出したDNAサンプルでmtCOI領域をPCRにより増幅し、塩基配列を解析した例も報告されている（Thomsen et al., 2009）。本稿で紹介する方法は、外部形態の保存を主な目的としないが、微小害虫であるタバココナジラミを同時に多数扱う際に手間となる虫体の破碎を省き、簡便化することを目的としている。本法の手順を図-1に、作業の様子を図-2に示す。筆者らは保毒虫検定に用いるタバココナジラミをアセトンに浸漬して室温で保管している。この方法で保管すると、虫体のDNA抽出が良好で、かつ数か月間保管していてもPCR検定の結果に齟齬が生じないことを確かめている。アセトンに浸漬した成虫を取り出してろ紙などの上に置き、十分に乾燥させてアセトンを揮発させる。成虫1頭を0.2 mlのPCRチューブに入れ、-80℃で2時間凍結させる。液体窒素であれば数秒間凍結させるだけでもよく、同様な結果が得られる。凍結後にチュ

A Non-destructive and Simple DNA Extraction Method for Detection of TYLCV from Individual Viruliferous Whiteflies Collected from a Sticky Trap Plate. By Jun OHNISHI, Shuko TOYODA, Toshio KITAMURA and Mitsuyoshi TAKEEDA

（キーワード：簡易凍結 DNA 抽出法、粘着板、タバココナジラミ、トマト黄化葉巻ウイルス、TYLCV）

*現所属：農研機構 九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域