

## 遺伝子解析によるビフェナゼート剤感受性低下ナミハダニ個体群の識別

農業・園芸総合研究所

### 1 取り上げた理由

殺ダニ剤として利用されているビフェナゼートは、訪花昆虫や天敵への影響が少ない点などから、多くの作物で使用されている。一方で、ハダニ類は薬剤抵抗性が発達しやすく防除の問題となっており、ビフェナゼート剤であるマイトコーネフロアブルについても、宮城県内のナミハダニ個体群において抵抗性発達が認められるようになってきた。そこで今回、マイトコーネフロアブル（以下、成分名であるビフェナゼートと表記する）に対して感受性が低下したナミハダニ個体群を識別する遺伝子診断技術を開発したので、参考資料とする。

### 2 参考資料

- 1) 本技術は、遺伝子診断によりビフェナゼートに対して感受性が低下したナミハダニ個体群を識別する技術である。
- 2) 検定には、調査対象とする圃場のナミハダニ発生箇所数点からそれぞれ10～20頭程度採取したものを試料として用い、1集団として検定する。
- 3) 診断作業は、遺伝子抽出、遺伝子増幅(PCR)、増幅産物の制限酵素処理(RFLP)、検出(アクリルアミド電気泳動と染色)から成り(図1)、所用時間はおよそ5時間程度である。そのため、検定当日あるいは翌日には個体群の診断が可能である。
- 4) 判定は、2カ所のDNA点変異部位の検出(制限酵素*Sml*Iおよび*Mae*IIIによる検出)によって行う。まず、*Sml*Iによる検査で、変異型特異的バンド(図2)が検出された場合、ビフェナゼートに対する感受性が低下している個体群であると判定する。次に、これら感受性が低下していると判定された個体群のうち、*Mae*IIIによる検査で、変異型特異的バンド(図2)が検出された場合、ビフェナゼートに対する感受性が特に低下している個体群と判定する。

### 3 利活用の留意点

- 1) ビフェナゼートに対する感受性が低下したナミハダニでは、ミトコンドリアシトクロムb遺伝子の特定部位に点突然変異が生じていることがLeeuwenら(2008)によって報告されている。本技術はその変異箇所を検出する技術である。
- 2) 同一圃場であっても、場所、時期等により、個体群構成が変動している可能性があるため、圃場全体について詳細に調査する場合、採取場所や時期を変えてサンプリングする必要がある。
- 3) 検体には、卵、成虫ともに使用できる。また、死亡後まもなくであれば死亡個体も検体として使用できる。検体は、エタノール(95%以上)中で保存することにより、保存開始から6ヶ月程度まで検定に使用できる。技術としては、ナミハダニ1頭ずつの遺伝子診断も可能である。
- 4) 本技術に必須の機器は、サーマルサイクラー(遺伝子増幅装置、約30万円)、電気泳動装置(約4万円)、小型微量遠心機(約3万円)、紫外線照射装置(約10万円)であり、これらの機器はDNA品種識別を含めた多くの遺伝子診断技術に活用できる。診断に必要な消耗品、試薬類は、1検体あたり、*Sml*Iまでの診断で120円程度、*Mae*IIIまでの診断で300円程度である。
- 5) ビフェナゼートに対する感受性が特に低下しているナミハダニについては、*Mae*IIIで検出できる点突然変異部位以外にも報告されている(Leeuwenら, 2008)。しかし、これらの場合の多くは*Sml*Iで変異型と同様の点突然変異を伴っていることが報告されているため、この場合は感受性が低下している個体群として検出可能である。

(問い合わせ先：農業・園芸総合研究所 バイオテクノロジー開発部 電話022-383-8131)

#### 4 背景となった主要な試験研究

##### 1) 研究課題名及び研究期間

簡易遺伝子鑑定等による病害虫診断法の確立（平成21年～23年度）

##### 2) 参考データ

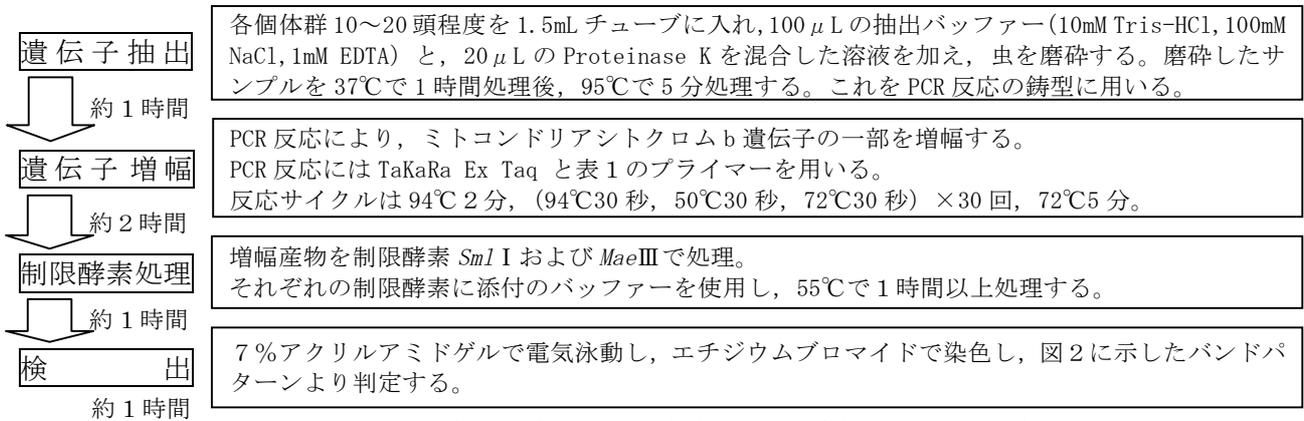


図 1 ビフェナゼート感受性低下個体群識別遺伝子診断の実施手順

表 1 ビフェナゼート感受性低下個体群識別に使用するプライマー

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

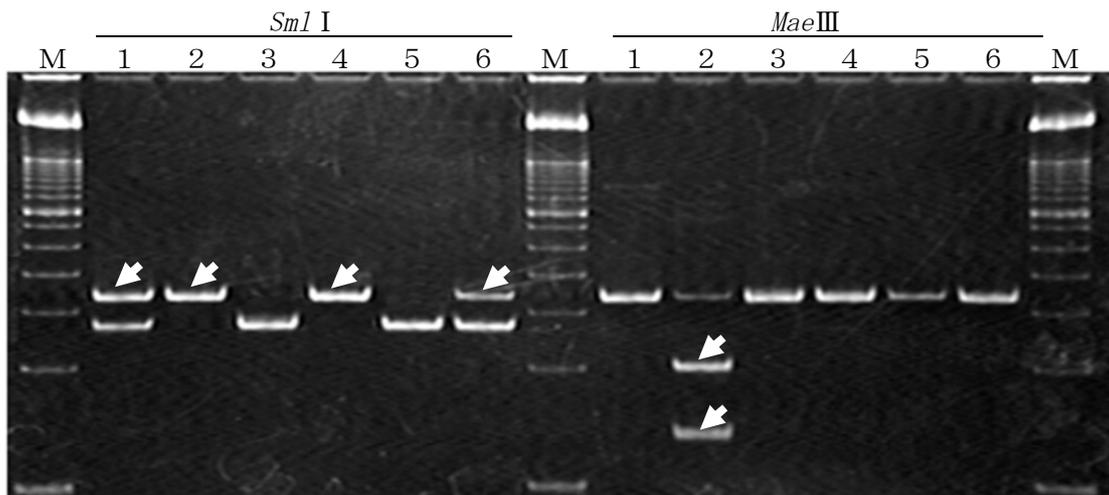


図 2 各個体群における識別マーカー (*Sml* I と *Mae* III) のバンドパターン

M : 100bp プラスラダーマーカー, 1～6 : 個体群の番号

矢印のバンドが変異型のバンド

① *Sml* I のパターン (図左側) で、矢印で示したバンド (変異型特異的バンド) が検出された個体群を、ビフェナゼートに対する感受性が低下している個体群と判定する (個体群 1, 2, 4, 6。これら個体群は、雌成虫のミトコネフロアブル 1,000 倍 (ビフェナゼート 5,000ppm) に対する薬剤検定での補正死亡率が 6.9%～76.0%であった。)

② *Mae* III のパターン (図右側) で、矢印で示したバンド (変異型特異的バンド) が検出された個体群を、ビフェナゼートに対する感受性が特に低下している個体群と判定する (個体群 2。この個体群は、雌成虫のミトコネフロアブル 1,000 倍 (ビフェナゼート 5,000ppm) に対する薬剤検定での補正死亡率が 6.9%であった。)

個体群 2 は、*Sml* I のパターンで変異型特異的バンドを示し、感受性が低下している個体群として判定され、さらに、*Mae* III のパターンで変異型特異的バンドを示したことから、感受性が特に低下している個体群と判定される。

##### 3) 発表論文等 北日本病害虫研究会報第61号(講演要旨, 印刷中)