上住 泰 (1988) 農作物のアザミウマ (梅谷 献二・工藤 巖・宮崎 昌久 編). 全国農村教育協会, 東京, pp. 313–314. [Uezumi, Y. (1988) In *Pest thrips in Japan* (K. Umeya, I. Kudo and M. Miyazaki, eds.). Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai

Publishing, Tokyo, pp. 313–314.]
Van Dijken, F. R., M. T. A. Dik, B. Gebala, J. de Jong and C. Mollema (1994) *J. Econ. Entomol.* 87: 1312–1317.

チャノキイロアザミウマで検出された フェンプロパトリン水和剤抵抗性に 関与するナトリウムチャンネル遺伝子の 点突然変異と PCR-RFLP 法による 抵抗性個体の判別

横山 朋也^{1,*}・鹿島 哲郎¹・土田 聡²

¹茨城県農業総合センター園芸研究所

²農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所

Point Mutations of the Sodium Channel Gene Associated with the Fenpropathrin Resistance in *Scirtothrips dorsalis* and Discrimination of Resistant Individuals using the PCR-RFLP Assay. Tomoya YOKOYAMA,^{1,*} Tetsuro KASHIMA¹ and Satoshi TODA² ¹Horticultural Research Institute Ibaraki Agricultural Center; 3165-1 Ago, Kasama, Ibaraki 319-0292, Japan. ²NARO Institute of Fruit Tree Science; Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 58: 59–62 (2014)

Abstract: We analyzed part of the sodium channel gene to clarify the molecular mechanism involved in the pyrethroid resistance of the yellow tea thrips (*Scirtothrips dorsalis*), and found two amino acid mutations (T929I and L1014F) known as pyrethroid-resistant factors in several other insects. The L1014F mutation was shared with all the tested thrips from a field colony. On the other hand, the T929I mutation was found only in individuals which survived in pyrethroid treatment of agriculturally recommended concentration. This might suggest that pyrethroid resistance of *S. dorsalis* in the field is conferred by both mutations. We developed the PCR-RFLP assay using *Mbo*I to distinguish pyrethroid-resistant individuals.

Key words: Yellow tea thrips; pyrethroid; *kdr*; PCR-RFLP

神経細胞の興奮はナトリウムチャンネルが開閉することで伝わるが、合成ピレスロイド剤 (以下、合ピレ剤) はナトリウムチャンネルが閉じるのを阻害する (Rinkevich et al., 2013) ことで、昆虫にノックダウンと呼ばれる速効性と致死性をもたらす (園田, 2012)。合ピレ剤は、有機リン系剤やカーバメート系剤に対し抵抗性を示す害虫に対しても速効的に作用し、また残効性が高いため、広範な害虫に対して多用された。その結果、アザミウマ目ではミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis* Pergande

(Forcioli et al., 2002) やネギアザミウマ *Thrips tabaci* Lindeman (Morishita, 2008)、ミナミキイロアザミウマ *Thrips palmi* Karny (Bao and Sonoda, 2012) 等で抵抗性が発達してきた。合ピレ剤に対する抵抗性は、ノックダウン抵抗性 (*kdr*) と呼ばれ、作用点であるナトリウムチャンネルの構造変化による薬剤との親和性の低下によって付与されると考えられている (Soderlund and Knipple, 2003)。これまでの研究により、30 種を超える害虫でノックダウン抵抗性に関与するナトリウムチャンネルにおけるアミノ酸変異が報告されている (Rinkevich et al., 2013)。例えば、アザミウマ目では、ミカンキイロアザミウマ (Forcioli et al., 2002) におけるアミノ酸番号 929 番目 (以下、アミノ酸番号はイエバエの *Vssc1* 遺伝子の番号に準拠) のスレオニンからイソロイシンへの変異 (T929I) と 1014 番目のロイシンからフェニルアラニンへの変異 (L1014F) が検出されている。ネギアザミウマ (Toda and Morishita, 2009) では、918 番目のメチオニンからスレオニンへの変異 (M918T)、929 番目のスレオニンからイソロイシンへの変異 (T929I)、ロイシンからフェニルアラニンへの変異 (L1014F) が検出されている。ミナミキイロアザミウマ (Bao and Sonoda, 2012) では 929 番目のスレオニンからイソロイシンへの変異 (T929I) が検出されている。また、ネギアザミウマ (Toda and Morishita, 2009) では M918T と L1014F との組み合わせが、T929I 単独の変異よりさらに強い抵抗性を付与していることが明らかとなっている。

チャノキイロアザミウマ *Scirtothrips dorsalis* Hood は、チャや果樹類などの木本類を加害する害虫であり、果樹では温州ミカンやブドウ、カキの重要害虫として知られている。本種のナシへの寄生は以前から確認されていたが (日本応用動物昆虫学会, 2006)、近年、ナシ栽培において、これまで問題とならなかった本種による新梢葉の褐変、萎縮等の被害が認められ対応に苦慮している。本種はこれまで、ベルメトリン水和剤の殺虫効果がやや低い (柴尾・田中, 2008) との報告があるものの、室内飼育による系統の確立や維持、大量増殖が困難であるため、薬剤感受性の低下に関する詳細な報告は少なく、抵抗性メカニズムに関する研究はない。最近、茨城県のナシ個体群において各種薬剤を用いた防除試験や、薬剤感受性検定において、本種の合ピレ剤に対する感受性が低いことが確認されている (横山ら, 未発表)。

防除薬剤を選択する際には、発生初期段階における少ないサンプル数でも判別可能な簡易で正確なモニタリング方法が必要である。ほ場で発生している害虫の薬剤に対する感受性を把握するためには、バイオアッセイ法を用いるのが一般的であるが、バイオアッセイ法では供試虫が薬剤以外の要因により死亡する、発生初期では十分な供試虫が得られない等の短所がある。また、採集した個体を飼育、増殖すると、野外個体群本来の薬剤感受性とは異なってしまう可能性がある。一方、遺伝子診断法では薬剤の効果以外の死亡要因を排除でき、発生初期段階で粘着板に捕殺された少数の死亡虫からでも抵抗性遺伝子の検出が可能等の長所がある。

本研究では、Forcioli et al. (2002) の方法にならい、チャノキイロアザミウマの野外個体群にフェンプロパトリン水和剤を処理し、生存虫および死亡虫のナトリウムチャンネル遺伝子の塩基配列を比較することにより、遺伝子型と薬剤感受性との関係を明らかにした。あわせて、フェンプロパトリン水和剤抵抗性個体を判別するためのシーケンスによらない遺伝子診断法の開発を行った。

材料および方法

1. 供試虫および薬剤による処理

本来であれば合ピレ剤感受性系統、抵抗性系統を確立し試験を行うべきであるが、チャノキイロアザミウマは室内飼育による系統の確立や維持、大量増殖が困難であるため、野外から採集した個体群を薬剤処理し供試した。薬剤による処理は以下の手順で行った。2012年7月に茨城県笠間市（園芸研究所）のナシ園からチャノキイロアザミウマの雌成虫68頭を採集した。一方、直径2cmのナシ葉片をフェンプロパトリン（ロディー水和剤）100ppmの薬液に10秒間浸漬した後、十分風乾した。スチロール製容器（内径2.5cm、高さ5cm）にろ紙片（1cm角）、薬液に浸漬したナシ葉片、採集したチャノキイロアザミウマを入れた後、開口部を薄膜フィルムで密封して25°C、16L8D条件下に置き、処理1日後に死亡虫および生存虫に仕分けし、解析までの間99.5%エタノールで保存した。

2. cDNA合成およびゲノムDNAの抽出

雌成虫1頭からRNeasy® Mini Kit（Qiagen）を用いて全RNAを精製した。cDNAはPrime Script® II 1st strand cDNA Synthesis kit（Takara Bio）を用いて合成した。

ゲノムDNAはフェンプロパトリン100ppmで処理した供試虫を用いて、死亡虫13頭、生存虫43頭について個体単位で抽出した。チャノキイロアザミウマ雌成虫を1頭ずつ0.2ml PCRチューブに入れ、磨砕液（9μlのSTEバッファー（100mM NaCl, 1mM EDTA [pH 8.0], 10mM Tris-HCl [pH 8.0]）、1μlの10mg/ml プロテナーゼKを混合したもの）中でホモジナイズし、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient（Takara Bio）を用い55°Cで15分間、95°Cで5分間熱処理を行ったものをDNAサンプルとした。

3. PCR

cDNAおよびゲノムDNAを鋳型とし、他のアザミウマ目昆虫で合ピレ剤抵抗性への関与が報告されているアミノ酸変異

を含むナトリウムチャンネルのドメインIIS4～IIS6領域をkdrF（5'-TAYTTYCARGARGGITGGA-3'（Miyazaki et al., 1996）およびkdr2-R（5'-GGAGAGATTGGAAGACCCAAAA-3'（Forcioli et al., 2002））を用いて増幅した。PCR反応液は、2μlのMgCl₂（25mM）、2.5μlのdNTP（2mM）、各1μlのプライマー（20pm/μl）、0.5μlの鋳型DNA、0.1μl（5U）のAmpliTaq Gold™ DNAポリメラーゼ（Applied Biosystems）および2μlの10×AmpliTaq Gold緩衝液を混合し、全量で20μlになるように滅菌蒸留水で調整した。PCR反応にはTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient（Takara Bio）を用い94°Cで9分間保った後、95°Cで30秒間、52°Cで30秒間、72°Cで1分間のサイクルを35回繰り返し、最後に72°Cで7分間保った。

4. 塩基配列の決定

cDNAおよびゲノムDNAより増幅されたPCR産物は、1.5%SeaKem® GTG™ アガロースゲルによる分画後、ゲルより切り出し、DNA回収用カートリッジNucleoSpin® Gel and PCR Clean-up（Takara Bio）を用いて回収した。シーケンス反応は前述のプライマーkdrFおよびkdr2-R、Prism™ Ready Reaction BigDye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit ver.3.1（Applied Biosystems）を用いて行った。塩基配列はPRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いてダイレクトシーケンス法で決定した。得られた塩基配列情報を基にチャノキイロアザミウマのナトリウムチャンネル遺伝子に特異的なプライマー、SdksrF（5'-AGTTTTCAAGCTTGCCAAAGTCGT-3'、SdksrR（5'-TGGAGAGATTGGAAGACCCAAAATT-3'）を設計した。

5. 合ピレ剤抵抗性個体判別法の開発

PCR-RFLP法による遺伝子診断法を開発するため、変異部分を含むナトリウムチャンネル遺伝子に特異的な断片長パターンを生じる制限酵素を検索した。その結果、制限酵素MboIが抵抗性個体の判別に有効であることが明らかとなった。前述したチャノキイロアザミウマのナトリウムチャンネル遺伝子に特異的なプライマー、SdksrFおよびSdksrRを用いたPCR法で得られたPCR産物20μlに、MboI 0.5μl（5U）を添付のバッファーとともに加え、37°Cで2～3時間消化した。消化したPCR産物は2%アガロースゲルによる分画後、エチジウムブロマ이드溶液で染色し、UV照射下で断片長パターンを観察した。

結果および考察

PCRの結果、cDNAからは404bpのDNAフラグメントが増幅された。一方、死亡虫および生存虫のゲノムDNAから増幅されたフラグメントのサイズは484bpであり、cDNA配列との比較の結果、80bpのイントロン（135塩基～214塩基）が挿入されていることが明らかとなった。シーケンス解析により得られたプライマーおよびイントロン部分を除く356bpの塩基配列ならびに推定アミノ酸配列をFig. 1に示した（GenBank/EMBL/DBJアクセッション番号：AB842271～AB842272）。得られた塩基配列は、Toda and Morishita（2009）により示された合ピレ剤感受性系統のネギアザミウマ（アクセッション番号：AB499848）と、Bao and Sonoda（2012）により示された合ピレ剤抵抗性および感受性系統

GG	CCC	ACG	CTC	AAC	TTG	CTC	ATC	TCA	ATC	ATG	918
	P	T	L	N	L	L	I	S	I	M	
II S4											
GGC	CGG	ACC	ATG	GGT	GCC	TTG	GGT	AAC	TTG	ACC	929
G	R	T	M	G	A	L	G	N	L	T	
Mbol(GATC)↓											
TTT	GTA	TTG	TGT	ATC	ATT	ATA	TTC	ATC	TTC	GCC	
F	V	L	C	I	I	I	F	I	F	A	
II S5											
GTG	ATG	GGT	ATG	CAG	CTC	TTC	GGC	AAA	AAC	TAC	
V	M	G	M	Q	L	F	G	K	N	Y	
TAT	GAC	AAC	GTC	GAC	AAA	TTT	CCG	GGA	GGA	GAA	
Y	D	N	V	D	K	F	P	G	G	E	
ATG	CCT	CGA	TGG	AAC	TTC	ATT	AAC	TTC	ATG	CAT	
M	P	R	W	N	F	I	N	F	M	H	
TCC	TTC	ATG	ATA	GTC	TTC	CGG	GTG	CTG	TGT	GGA	
S	F	M	I	V	F	R	V	L	C	G	
GAG	TGG	ATA	GAG	TCC	ATG	TGG	GAC	TGC	ATG	CTG	
E	W	I	E	S	M	W	D	C	M	L	
GTC	GGA	GAC	TGG	TCG	TGC	ATC	CCC	TTC	TTC	CTA	
V	G	D	W	S	C	I	P	F	F	L	
Mbol↓											
GCT	ACT	GTA	GTG	ATC	GGC	AAC	TTT	GTG	GTT	TTG	
A	T	V	V	I	G	N	F	V	V	L	
II S6											
AAC	CTT	TTC	CTT	GCC	TTG	CTT	TTG	TCC			
N	L	F	L	A	L	L	L	S			
1014											

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the sodium channel gene from *Scirtothrips dorsalis* died on fenpropathrin treatment (100 ppm). Amino acid positions 918, 929 and 1014 (numbered according to the sodium channel of *Musca domestica*) are boxed. Domains IIS4–IIS6 are underlined.

のミナミキイロアザミウマのアミノ酸配列 (アクセッション番号: AB742424) と 89% 一致した (データ未公表)。

死亡虫および生存虫の塩基配列から推定されたアミノ酸配列を比較した結果, 929 番目のアミノ酸に変異が確認された (Table 1)。当該コドンの塩基配列は, 死亡虫 13 頭では感受性型のスレオニン (T) をコードする ACC であったのに対し, 生存虫のうち 18 頭は抵抗性型のアミノ酸イソロイシン (I) をコードする ATC のホモ接合体, 25 頭が ACC と ATC のヘテロ接合体であった。一方, 解析に用いた死亡虫および生存虫 56 頭の 1014 番目のアミノ酸は全て抵抗性型のアミノ酸フェニルアラニン (F) をコードする TTT のホモ接合体であり, 感受性型のアミノ酸ロイシン (L) をコードするコドン配列は検出されなかった。これは, これまでに, ナトリウムチャネルのドメイン IIS4–IIS6 領域におけるアミノ酸変異によって, コナガ (Schuler et al., 1998) やミカンキイロアザミウマ (Forcioli et al., 2002) で合ピレ剤に抵抗性を示すことが証明されているものと同一の, いわゆる T929I および L1014F (*kdr*) であった。しかし, 本研究ではネギアザミウマ (Toda and Morishita, 2009) 等で合ピレ剤への抵抗性の関与が報告されている M918T (*super-kdr*) を持つ個体は検出されなかった。

Fig. 2 に T929I を検出するための *Mbol* を用いた PCR-RFLP 法による泳動像を示した。Mbol の認識部位は 929 番目の変異部分の 1 カ所に加え, 両方に共通の 1 カ所が存在し, 感受性を表すスレオニン (T) をコードする ACC のホモ接合体では 410 bp と 74 bp

Table 1. Codon and deduced amino acid sequences corresponding to the T929I and L1014F sites of the sodium channel gene from *Scirtothrips dorsalis*; Fenpropathrin 100 ppm processing

Response of insects to fenpropathrin (100 ppm)	Codon (Amino acid)		No. of individuals
	929 ^a	1014	
Dead	ACC (T) ^b	TTT (F)	13
Survived	ATC (I)	TTT (F)	18
	ACC (T)/ATC (I)	TTT (F)	25

^aNumbering according to the sodium channel of *Musca domestica*.

^bT: Threonine, I: Isoleucine, F: Phenylalanine.

Fig. 2. Restriction patterns of the sodium channel gene fragments amplified from *Scirtothrips dorsalis*, using *Mbol*. Lanes 1 and 2, homozygotes for T929; lanes 3 and 4, heterozygotes; lanes 5 and 6, homozygotes for I929. M represents 100 bp DNA ladder size marker.

に, 抵抗性を示すイソロイシン (I) をコードする ATC のホモ接合体では 326 bp, 84 bp および 74 bp に切断される。しかし本研究で用いたアガロースゲルでは 100 bp 以下のフラグメントは検出できないので, それぞれ 410 bp と 326 bp のフラグメントが検出される。一方, ヘテロ接合体では 410 bp と 326 bp の 2 本のフラグメントが検出されると推定された。PCR により増幅された 484 bp の DNA フラグメントを *Mbol* により消化した結果, ホモ接合体では 410 bp もしくは 326 bp のフラグメントが 1 本, ヘテロ接合体では両方の 2 本のフラグメントが確認された。この結果, PCR-RFLP 法により, チャノキイロアザミウマのフェンプロパトリン水和剤抵抗性個体判別が可能であると考えられた。

茨城県で作成している赤ナシ無袋栽培病害虫参考防除例では, 7 月中旬, 8 月上旬および 8 月中旬に, チャバネアオカメムシ *Plautia crossota stali* Scott 等の果樹カメムシ類や果実収穫直前のナシヒメシクイ *Grapholita molesta* (Busck) 等のシンクイムシ類対策に, 合ピレ剤が掲載されている。この時期はほ場におけるチャノキイロアザミウマの密度が高く, 合ピレ剤抵抗性チャノキイロアザミウマを遺伝子診断により発生初期の段階でモニタリ

グできれば、リサージェンスを考慮して合ピレ剤の使用を控えるか他系統の剤に切り替える等、薬剤選択時の参考にすることができると考えられる。

引用文献

- Bao, W. X. and S. Sonoda (2012) *Appl. Entomol. Zool.* 47: 443–448.
- Forcioli, D., B. Frey and J. E. Frey (2002) *J. Econ. Entomol.* 95: 838–848.
- Miyazaki, M., K. Ohyama, D. Y. Dunlap and F. Matsumura (1996) *Mol. Gen. Genet.* 252: 61–68.
- Morishita, M. (2008) *Appl. Entomol. Zool.* 43: 25–31.
- 日本応用動物昆虫学会 (2006) 農林有害動物・昆虫名鑑. 171 pp. [The Japanese Society of Applied Entomology and Zoology (2006) *Major Insect and Other Pests of Economic Plants in Japan.* 171 pp.]
- Rinkevich, F. D., Y. Du and K. Dong (2013) *Pestic. Biochem. Physiol.* 106: 93–100.
- Schuler, T. H., D. Martinez-Torres, A. J. Thompson, I. Denholm, A. L. Devonshire, I. R. Duce and M. S. Williamson (1998) *Pestic. Biochem. Physiol.* 59: 169–182.
- 柴尾 学・田中 寛 (2008) 関西病虫研報 50: 171–172. [Shibao, M. and H. Tanaka (2008) *Annu. Rep. Kansai Plant Prot.* 50: 171–172.]
- Soderlund, D. M. and D. C. Knipple (2003) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 563–577.
- 園田昌司 (2012) 植物防疫 66: 162–167. [Sonoda, S. (2012) *Plant Prot.* 66: 162–167.]
- Toda, S. and M. Morishita (2009) *J. Econ. Entomol.* 102: 2296–2300.