テクニカルノート

LAMP 法によるチャノキイロアザミウマ (アザミウマ目：アザミウマ科) C 系統の識別

土田 聡*・井原 史雄

三代 浩二・中野 亮

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所

Use of the LAMP Method to Discriminate Strain C of *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae). Satoshi TODA,* Fumio IHARA, Koji MISHIRO and Ryo NAKANO NARO Institute of Fruit Tree Science; 2-1 Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 59: 195-198 (2015)

Abstract: Strain C of *Scirtothrips dorsalis* Hood is a novel strain that recently invaded Japan from overseas. To allow simple and rapid identification of this strain, we developed a molecular diagnostic method that uses a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Four primers for the LAMP assay were designed from the nucleotide sequence of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene of strain C. LAMP assay using these primers was consistently successful in distinguishing strain C from strain YT.

Key words: COI; LAMP; *Scirtothrips dorsalis*; strain C; strain YT

チャノキイロアザミウマ *Scirtothrips dorsalis* Hood は、日本ではブドウ、カキ、カンキツ類、チャなどを加害する重要害虫として知られていたが、2008 年にピーマンおよびシシトウを加害する新たな系統が発生し、その被害が問題となった（高知県病害虫防除所、2008）。Toda et al. (2014) は、ミトコンドリア DNA のシトクロムオキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子の分子系統解析により、それらが南方由来と推定される侵入系統であることを明らかにし、C 系統と名付けた。C 系統は現在までに、九州、四国、および関東の合計 11 県において発生が確認され、ピーマン、シシトウ、マンゴー、カンキツ類、トルコギキョウ等で被害を出している（土田、2015）。C 系統はトウガラシ科作物を選好することに加え、殺虫剤に対する感受性を低下させているという報告もあり（春山、2014）、さらなる分布拡大による農業被害の増大が懸念されている。したがって、C 系統の発生を早期に発見することは、適切な防除対策を講じる上で重要である。しかし、本種の種内における形態的形質は連続的であり、形態的特徴による C 系統と日本に在来の系統（YT 系統；Toda et al. (2014) により命名）の識別はできないとされている（Hoddle et al., 2008; Farris et al., 2010）。そこで、筆者らはリボゾーム ITS2 領域の塩基多型に基づき、マルチプレックス PCR 法による C 系統と YT 系統の確実な判別法を開発した（Toda et al., 2014）。本手法は、PCR 法

を用いた簡便な方法である一方、サーマルサイクラーをはじめとする一連の遺伝子解析設備に加え、少なくとも 3-4 時間程度の解析時間を要する。近年、迅速かつ高精度な DNA 増幅手法として、より簡便かつ迅速な Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法が開発され（Notomi et al., 2000）、タバココナジラミパイオタイプ Q（竹内ら、2010）や各種植物病原ウイルス（例えば、Okuda et al., 2005）の検出に用いられている。そこで、本研究では、ミトコンドリア COI 遺伝子の塩基配列に基づく、LAMP 法によるチャノキイロアザミウマ C 系統の簡易判別法を開発したので報告する。本研究において、先に開発したマルチプレックス PCR 法で用いたりボゾーム ITS2 領域を使用しなかった理由は、本種のリボゾーム ITS2 領域は系統内の多型も大きく（Toda et al., 2014）、要件を満たす LAMP プライマーの設計が不可能であったためである。

本文に先立ち、標準サンプルとして用いたチャノキイロアザミウマ YT 系統のサンプリングに協力を賜った大阪府立環境農林水産総合研究所の柴尾学博士、LAMP 反応の濁度計測でご指導を頂いた農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所の松下陽介博士に御礼申し上げる。なお、本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のための技術開発」の成果である。

材料および方法

1. 供試虫

チャノキイロアザミウマ C 系統は、2009 年 9 月に沖縄県沖縄市のマンゴー *Mangifera indica* L. から、YT 系統は、2009 年 8 月に大阪府羽曳野市のブドウ *Vitis × labruscana* L. H. Bailey から採集し、いずれも 99.5% エタノールに液浸して -20°C で保存していた個体を供試した。

2. LAMP プライマーの設計および LAMP 反応

チャノキイロアザミウマ C 系統を識別するための LAMP プライマーを設計するため、Toda et al. (2014) により DNA データベース (DDBJ) に登録されている C 系統（アクセス番号：AB818018-AB818025）および YT 系統（同 AB818026-AB818053）の塩基配列情報を利用した。

C 系統を識別するために必要な 4 種の LAMP プライマーは、ウェブ上の LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア（富士通 Primer Explorer V3, URL: <http://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>）を用いて設計した。設計されたプライマーの塩基配列を Table 1 に示す。

LAMP 反応液の濁度は、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C, 栄研化学) を用いて測定した。LAMP 反応は Loopamp DNA 増幅試薬キット（栄研化学）を用い、20 μl の反応

Table 1. LAMP primers for amplifying COI region of strain C of *Scirtothrips dorsalis*

Primer	Sequence (5'-3')	Location ^a
SdCF3	TTTGATCTGGTATACTTGGATT	23-45
SdCB3	AATTGAAGGTGGTAAAAGTCAA	283-262
SdCFIP	CGTGAGCTGTAACAACAGAGTTATA-TTCGACTTAATCTCCGTGT	140-116, 63-81
SdCBIP	TTGGAGGGTTTGAAATTGATTGG-CGAGGAAATGCTATATCAGGTG	180-203, 243-222

^a Location numbers are based on nucleotide sequence of AB818018 (DDBJ accession number).

液により行った。反応液の組成は、12.5 μ l の 2 $\times$ 反応混合液 (栄研化学)、1 μ l の *Bst* DNA Polymerase (栄研化学)、1 μ l の各プライマー (SdCFIP プライマーおよび SdCBIP プライマーは 40 pmol/ μ l, SdCF3 プライマーおよび SdCB3 プライマーは 5 pmol/ μ l)、2.5 μ l の滅菌水からなり、鋳型 DNA として、後述の方法で抽出した DNA を 0.5 μ l 加えた。

3. LAMP 反応温度の検討

LAMP 反応の最適温度を明らかにするため、60 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C、63 $^{\circ}$ C、および 65 $^{\circ}$ C の 4 温度条件下で増幅効率を比較した。鋳型 DNA は Toda et al. (2014) に従い抽出した。チャノキイロアザミウマを面相筆で 1 頭ずつ 0.2 ml PCR チューブに入れ、10 μ l の磨砕液 (9 μ l の STE バッファー [100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)], および 1 μ l のプロテイナーゼ K (10 mg/ml) を混合) を加えて、先端を熱して加工した 10 μ l ピペットチップ (土田, 2011) を用いて磨砕した。磨砕液は 65 $^{\circ}$ C で 15 分間加熱した後、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、プロテイナーゼ K を失活させた。磨砕液の加熱および LAMP 反応には DNA thermal cycler 2720 (Applied Biosystems) を用いた。

4. DNA 抽出法の検討

STE バッファーとプロテイナーゼ K を用いた粗抽出法よりさらに簡易な DNA 抽出法使用の可能性を探るため、以下の 3 条件で DNA を抽出し、LAMP 反応を行った。

① DNA 抽出試薬 PrepMan-Ultra Sample Preparation Reagent (以下, PrepMan-Ultra) (Applied Biosystems) で磨砕し、99.9 $^{\circ}$ C で 10 分加熱

② 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) で磨砕し、99.9 $^{\circ}$ C で 10 分加熱

③ 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) で磨砕し、非加熱

いずれも、チャノキイロアザミウマを面相筆で 1 頭を 0.2 ml PCR チューブに入れ、10 μ l の上記磨砕液中で磨砕した。磨砕液の加熱には DNA thermal cycler 2720 (Applied Biosystems) を用いた。

5. 蛍光発色反応を利用した目視による増幅確認

前述の反応液から滅菌水を 1 μ l 減じ、蛍光・目視検出試薬 (栄研化学) を 1 μ l 添加して LAMP 反応を行った。処理温度は 63 $^{\circ}$ C とし、90 分後に蛍光発色の有無を目視により確認した。蛍光発色反応の陽性および陰性コントロールとして、LoopampDNA 増幅試薬キット (栄研化学) に同梱のプライマーミックスおよび陽性コントロール DNA を使用した。陰性コントロールでは、鋳型 DNA の代わりに滅菌水を用いた。磨砕液の加熱および LAMP 反応には DNA thermal cycler 2720 (Applied Biosystems) を用いた。

Fig. 1. Real-time turbidity measurements in LAMP reactions under different temperature conditions. DNA extracted from strains C and YT was used under each temperature condition. Because the amplification curves derived from the DNA of strain YT overlapped, only the amplification curve at 63 $^{\circ}$ C is shown.

結果および考察

C 系統から抽出した DNA を鋳型とした場合、反応開始から増幅カーブの立ち上がりまでの時間は 63 $^{\circ}$ C が 28 分と最も早く、60 $^{\circ}$ C が最も遅かった (Fig. 1)。いずれの温度でも、YT 系統から抽出した DNA では 90 分を経過しても増幅は認められなかった。YT 系統の DNA を鋳型とする LAMP 反応で得られる増幅曲線は、全ての温度区でいずれも Abs=0 付近でほぼ同じ軌跡を描いた。図が煩雑になるのを避けるため、ここでは Fig. 1 に 63 $^{\circ}$ C における増幅曲線のみを例として示す。以上のことから、LAMP 反応による C 系統の判別は可能であり、最適な反応温度は 63 $^{\circ}$ C であると判断された。

Fig. 2 に異なる抽出法で得られた DNA を鋳型とした LAMP 反応曲線を示す。Tris-HCl を用いて虫体を磨砕し、熱処理を加えた DNA を鋳型とした場合、DNA 抽出試薬 PrepMan-Ultra により得られた DNA を鋳型とした場合と比較して、より早い増幅カーブの立ち上がりを示した。一方、Tris-HCl による磨砕後に熱処理を加えなかった場合、C 系統の DNA の増幅は認められたものの、増幅カーブの立ち上がりは反応開始から 40 分後以降と遅く、反復間でのばらつきも大きかった (Fig. 2)。したがって、熱処理の省略による DNA 抽出作業工程の簡略化は適当でないと判断された。また、YT 系統を Tris-HCl で磨砕し、熱処理を加えた DNA

Fig. 2. Real-time turbidity measurements in LAMP reactions using DNA extracted by different methods. +Heat and -Heat in parentheses indicate respectively that the template DNA was heated or not heated after homogenization. The LAMP reactions were duplicated for each DNA extraction method. Because the amplification curves derived from the DNA of strain YT overlapped, only one amplification curve is shown.

Fig. 3. Visible detection of the fluorescence chromogenic reaction under visible light. PC, positive control and NC, negative control supplied with the Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical).

においては、90 分を経過しても増幅は認められなかった。YT 系統に関しても 2 回の反復試験を行っているが、増幅曲線の重複を避けるため、1 反応分の曲線のみを示す (Fig. 2)。これらの結果から、簡易 DNA 抽出法として、Tris-HCl で磨砕し、99.9°C で 10 分加熱する方法が有効であると判断された。

LAMP 反応液に蛍光・目視検出試薬 (栄研化学) を混合し、63°C 温度条件下で 90 分間反応させた場合の各反応液の写真を Fig. 3 に示す。C 系統では緑色に発色し、YT 系統では発色しなかった。本条件により、Toda et al. (2014) に供試した C および YT 系統の他個体群の抽出 DNA を用いて LAMP 反応試験を行った結果、いずれも例外なく陽性または陰性反応を示した (データ省略)。LAMP 法の標準的な反応時間である 60 分間の反応でも緑色に発色する C 系統の検体も認められたが、より確実な判定を行うためには、90 分間の反応時間が必要であると判断した。

一方、寄主植物上で C 系統と混発する可能性のあるアザミウマ種として、ミナミキイロアザミウマ *Thrips palmi* Karny, ネギアザミウマ *T. tabaci* Lindeman, ハナアザミウマ *T. hawaiiensis* (Morgan), ミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis*

(Pergande), ヒラズハナアザミウマ *F. intonsa* (Trybom) などが挙げられ、チャノキイロアザミウマのサンプリング時に混入する可能性がある。そこで、これらのアザミウマ種の DNA を用いて LAMP 反応を行い、発色の有無を確認した結果、いずれの種も陽性反応は示さず (データ省略)、別種の混入が偽陽性反応を引き起こす可能性も低いことが示された。

以上の結果より、チャノキイロアザミウマ C 系統は、DNA を Tris-HCl (pH 8.0) で抽出し、99.9°C で熱処理したものを用い、63°C で 90 分間 LAMP 反応させることにより、YT 系統あるいは別種における擬陽性反応の心配もなく、C 系統を確実に識別できることが明らかになった。本研究では DNA 抽出および LAMP 反応にサーマルサイクラーを使用したのが、約 100°C、および 63°C の定温で加熱できる機器により代用可能である。したがって、本法はマルチプレックス PCR による診断に比べ、必要とする設備は少なく、診断時間の短縮も見込まれる点で有用であると考えられる。

LAMP 反応は 4 本の LAMP プライマーに加え、2 本のループプライマーを設計し、反応液に添加することにより、反応速度を速

めることが可能であるとされている (Nagamine et al., 2002)。しかし, LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェアを用いた解析では, C 系統を判別するために有効なループプライマーは設計できないと判定されたため, これ以上の時間短縮は実現できなかった。

引用文献

- Farris, R. E., R. Ruiz-Arce, M. Ciomperlik, J. D. Vasquez and R. DeLeón (2010) *J. Insect Sci.* 10: 26.
- 春山直人 (2014) 関東東山病虫研報 61: 155–158. [Haruyama, N. (2014) *Ann. Rept. Kanto Pl. Prot. Soc.* 61: 155–158.]
- Hoddle, M. S., J. M. Heraty, P. F. Rugman-Jones, L. A. Mound and R. Stouthamer (2008) *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101: 491–500.
- 高知県病害虫防除所 (2008) 平成 20 年度病害虫発生予察特殊報 第 1 号. 2 pp. [Kochi Plant Protection Office (2008) *Special Report on Forecast of Pest Occurrence*. No. 1. Kochi Pref. 2 pp.]
- Nagamine, K., T. Hase and T. Notomi (2002) *Mol. Cell. Probes* 16: 223–229.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
- Okuda, M., M. Matsumoto, Y. Tanaka, S. Subandiyah and T. Iwanami (2005) *Plant Dis.* 89: 705–711.
- 竹内良彦・吉村幸江・福田至朗・大矢俊夫 (2010) 関西病虫研報 52: 143–145. [Takeuchi, Y., Y. Yoshimura, S. Fukuta and T. Ooya (2010) *Ann. Rept. Kansai Pl. Prot.* 52: 143–145.]
- 土田 聡 (2011) 植物防疫特別増刊号 14: 21–25. [Toda, S. (2011) *Plant Prot., Spec. Issue* 14: 21–25.]
- 土田 聡 (2015) 植物防疫 69: 28–32. [Toda, S. (2015) *Plant Prot.* 69: 28–32.]
- Toda, S., T. Hirose, K. Kakiuchi, H. Kodama, K. Kijima and M. Mochizuki (2014) *Appl. Entomol. Zool.* 49: 231–239.