九病虫研会報 52：44-48（2006）
Kyushu Pl. Prot. Res. 52：44-48（2006）

タバココナジラミバイオタイプQの簡易識別法

上田　重文
（九州沖縄農業研究センター）

Simple and Rapid Detection by mtCOI PCR-RFLP to distinguish the Q biotype of *Bemisia tabaci*. Shigenori Ueda（National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan）

The Q biotype of *Bemisia tabaci*（Genn.）was first identified in Japan in 2004 by nucleotide sequence analyses of the mitochondrial cytochrome oxidase I（mtCOI）gene（Ueda and Brown, 2006）. The morphological characters of *B. tabaci* are not definitive for differentiating biological variants or biotypes. In this report, a simple, rapid method for the identification of the Q biotype without mtCOI gene sequencing analysis is presented. The mtCOI PCR products（866 bp）from the Q biotype were digested with *Eco*T14I（*Sty*I）into two fragments of 555 bp and 311 bp, while the PCR products from the B biotype were cleaved with *Stu*I into two fragments of 560 bp and 306 bp. The PCR-RFLP method described here is sufficient for distinguishing populations of the Q biotype in a number of samples obtained from fields.

Key words : *Bemisia tabaci*, identification, Q biotype, sweet potato whitefly,

緒　　言

タバココナジラミ *Bemisia tabaci*（Gennadius）は，世界各地の熱帯，亜熱帯地域を中心に様々な植物を宿主として生息している。また，様々な野菜類や園芸植物に寄生する害虫としてのみならず，ベゴモウイルスの媒介昆虫としても広く知られている（Brown and Bird, 1992；Brown，2000）。現在本種は，数多くのバイオタイプ（biotype）や遺伝的に異なる変異体（variant）等に分類されており，種としての *B. tabaci* は，種複合体（species complex）という認識が一般化している（Brown et al., 1995；Brown，2000；Perring，2001）。バイオタイプの同定は，形態学的な識別が極めて困難であるため，エステラーゼ解析, RAPD-PCR によるバンドパターンの差違を利用した方法や，ribosomal intergenic transcribed spacer 1（ITS 1），ミトコンドリアチトクロームオキシダーゼ I（mtCOI）遺伝子領域の塩基配列のわずかな違いを利用した分子生物学的分類法等が利用されている（Liu et al., 1992；Brown，2000；De Barro et al., 2000）。特に mtCOI 遺伝子領域は世界各地で採集された個体群に関する豊富な塩基配列データが蓄積されていることから，有効なバイオタイプ同定法の一つとして広く用いられている。

1989年頃にタバココナジラミバイオタイプB *B. tabaci* B biotype（*B. argentifolii*（Bellows & Perring））の海外から国内への侵入が初確認された（大戸，1990）。バイオタイプBは，タバココナジラミの国内新系統として，寄生したカボチャに白化症（外間ら，1993）やトマトに着色異常症を発生させた（西東・尾崎，1991；松井，1992）。その後，本種の発生被害は，薬剤や天敵利用による防除法の開発とその普及によって減少していた。しかし，1996年に，静岡，愛知，長崎各県下でトマト黄化葉巻病が発生した（Kato et al., 1998；大貫ら，2004）。バイオタイプBは病原のトマト黄化葉巻ウイルス *Tomato yellow leaf curl virus*（TYLCV）を高率で媒介することから，現在薬剤と物理的資材を併用するなどのさらに効果の高いタバココナジラミに対する防除法の開発が進められている。

Guirao et al.（1997）が，イベリア半島でバイオタイプBとは異なる（non-B）個体群（バイオタイプQ *B. tabaci* Q biotype）が地域的に優占種となりつつあることを報告した。その後，バイオタイプQはイベリア半島に留まらず，イスラエル，イタリア，ギリシャ，モロッコ等の地中海沿岸地域及び中国，アメリカ合衆国，メキシコ，韓国で次々と発生が確認されている（Brown et al., 2005; Palumbo et al., 2001; Nauen et al., 2002; Horowitz et al., 2005; Zhang et al., 2005; Lee et al., 2005）。

日本では，筆者らが2004年に西日本各地から採集したタバココナジラミ個体群についてmtCOI領域の塩基配列と分子系統解析を行った。その結果，三原（広島），宮之城，大口（鹿児島）および西合志（熊本）から採集された4個体群が，当時日本で発生が確認されていないバイオタイプQ個体群であり，国内各地に既に定着している可能性が高いことを報告した（上田，2005；Ueda and Brown, 2005; Ueda and Brown, 2006）。

バイオタイプQは，ピリプロキシフェンやネオニコチノイド系の薬剤に対する感受性が低下している特徴を有していることが報告されていた（Nauen et al., 2002; Horowitz et al., 2005）。国内個体群についても調査の結果，両薬剤に対する感受性が低下した個体群が存在することが既に報告されている（樋口ら，2005；松浦，2006）。

バイオタイプQの同定には，mtCOI塩基配列などの解読による遺伝子診断法が最も確実な方法であるが，設備，時間とコストを要するため，農業現場での同定作業には適さない。そのため，バイオタイプQの簡易識別法として，バイオタイプに特異的な制限酵素部位を利用したmtCOI領域のPCR-RFLP法を考案したので報告する。

材料および方法

1．虫体からの核酸抽出

コナジラミからの核酸抽出は，下記の方法で行った。1.5mlチューブ内で虫体をペッスルまたはチップ先を用いて30μlの磨砕バッファー（50mM Tris-HCl，（pH 7.0），100mM NaCl，10mM EDTA，1％ SDS）を加えてよく磨砕した。さらに，170μlの磨砕バッファーを加え攪拌後，100μlのTE飽和Phenol，100μlのクロロホルム・イソアミルアルコール（24：1）を加え，3分間激しく攪拌した。室温で3分間，12,000回転で遠心分離後，回収した上清（約180μl）に1/10量の3M酢酸ナトリウム溶液と3倍量の99%エタノールを加え攪拌後，20分間-30℃に静置した。4℃で5分間14,000回転で遠心処理後，回収した沈殿物を70%エタノールで洗浄し減圧乾燥後，滅菌蒸留水（30μl）で懸濁してPCR反応に供試した。

2．PCR-RFLP法によるバイオタイプQおよびBの識別

タバココナジラミmtCOIのPCR反応はFrohlich et al.（1999）の方法に準じて行った。PCR反応は，Ex *Taq* polymerase（Takara）を用いて，96℃3分間の後，96℃30秒，52℃30秒，72℃1分を30サイクル，72℃5分を1サイクルで行った。増幅に使用したプライマーを下記に示す。

C 1-J-2195 MTD-10（TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT）

L 2-N-3014 MTD-12（TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A）

増幅したPCR産物は，精製後，pGEMT-Easy（Promega）にクローニングした後，塩基配列および分子系統解析を行うことでバイオタイプを同定した（Ueda and Brown, 2006）。

海外各地よりDDBJ/EMBL/GenBankデータベースに登録されているバイオタイプQ個体群（Spain（SP95）（Accession number, AY057139），Spain 1（AY596950），Spain 2（AF164676），Morocco（AJ517769），Israel（AY518191），Turkey（AF342776），Sudan（SC 1）（AF110706），YN-China（AY518189），BJ2-China（AY589499））およびバイオタイプB個体群（Arizona（AZB）（AF110696），Texas（AF164675），Israel（ISC 1）（AF110701），France（AJ550170），Argentina（ARG 4）（AF340215），Reunion（12-3a）（AJ550174），BJ 3-China（AY582867），SH2-China（AY550274））に国内12個体群（AB204577-AB204588（Ueda and Brown, 2006））を加えたmtCOI配列データを用いて，アライメント解析した上で，両バイオタイプ内で保存されている制限酵素部位（RES）を検索した。見出された各バイオタイプに特異的なRESの候補の中から，制限酵素としての切断能が高くかつ切断後の各断片がエチジウムブロマイド染色後に明瞭に識別できるRESがある酵素として，バイオタイプQについて*Eco*T14I（*Sty*I），バイオタイプBについて*Stu*Iを選択し，PCR-RFLP（PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism）法に用いた。

第1表　PCR-RFLP解析に用いたタバココナジラミ個体群

個体群名	採集地	採集年	採集時の寄生植物
松戸（JP MAT）	松戸市（千葉県）	2004	ピーマン
浅羽（JP ASA）	袋井市（静岡県）	2004	ナス
倉敷（JP KUR）	倉敷市（岡山県）	2004	トマト
三原（JP MIH）	三原市（広島県）	2004	トマト
愛南（JP AIN）	愛南町（愛媛県）	2004	トマト
合志91（JP KOS91）	合志町（熊本県）	1991	採集植物不明，熊本農研で累代飼育
鹿児島（JP KAK）	鹿児島市（鹿児島県）	2004	トマト
大口（JP OKC）	大口市（鹿児島県）	2004	トマト
宮之城（JP MYJ）	宮之城市（鹿児島県）	2004	メロン

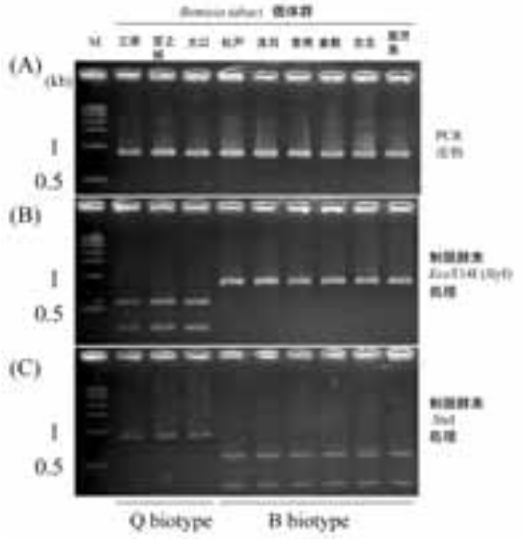
PCR-RFLPによるバイオタイプQおよびBの識別試験は以下の方法で行った。塩基配列解析によりバイオタイプを同定した個体群（第１表）のcDNAまたは精製した虫体核酸溶液を鋳型にして上述の方法でPCRを行った。制限酵素反応は，PCR反応溶液（５μl）に10倍濃度の制限酵素バッファー（２μl），制限酵素（0.5μl），滅菌蒸留水（12.5μl）を加えて懸濁し，37℃で１時間反応させた後，１％アガロースゲル電気泳動を行いDNA断片の泳動像により，バイオタイプを識別し，塩基配列解析で得られている結果と比較した。

結果および考察

バイオタイプQおよびバイオタイプB由来の９個体群の核酸を鋳型にC１-J-2195 MTD-10及びL２-N-3014 MTD-12プライマーを用いてmtCOI領域をPCRすると，塩基配列に基づくといずれも866 bpの増幅断片が得られる。各PCR増幅断片を制限酵素*Eco*T14I（*Sty*I），*Stu*Iを用いて消化すると，供試サンプルがバイオタイプQに由来する場合*Eco*T14I（*Sty*I）のみで555 bpと311 bpの２断片に切断される。一方，バイオタイプBに由来する場合*Stu*Iのみで560 bpと306 bpの２断片に切断されることが推定された。

本試験では，実験に供試した全個体群で目的のサイズのPCR増幅断片が確認された（第１図A）。さらに，各増幅断片を*Eco*T14I（*Sty*I），*Stu*Iを用いて消化した結果，三原，宮之城，大口の３個体群は，*Eco*T14I（*Sty*I）のみで推定分子量の２断片に切断された（第１図B）。一方，他の松戸，浅羽，愛南，倉敷，合志，鹿児島の６個体群は，*Stu*Iのみで同様に推定分子量の２断片に切断された（第１図C）。したがって，本PCR-RFLP法を用いて三原，宮之城，大口の３個体群はバイオタイプQと，他の６個体群はバイオタイプBであると判定された。本結果は，塩基配列解析によるバイオタイプの同定結果と完全に一致した。バイオタイプQ－B間の塩基配列の相同性は約94%，各バイオタイプ内個体群間の塩基配列の相同性は99%以上の保存性がある。明らかに，両バイオタイプの本領域の遺伝的差異は大きく離れており，本方法による誤同定率はかなり低いものと推測される。したがって，mtCOI遺伝子領域を用いた塩基配列解析に基づく本PCR-RFLP法は，塩基配列の解読を行わずに，バイオタイプQおよびBを簡便に識別することが可能である。

日本には，バイオタイプQおよびBが国内に侵入し発生する以前より，ダイズ，サツマイモやスイカズラなど



第１図 *Bemisia tabaci* 個体群のmtCOI領域のPCR-RFLPによるバイオタイプの簡易同定．（A）mtCOI特異的プライマー（Frohlich et al.,1999）を用いて増幅したPCR産物の泳動像．（B）各PCR産物（A）を制限酵素*Eco*T14I（*Sty*I）で処理後の泳動像．（C）各PCR産物（A）を制限酵素*Stu*Iで処理後の泳動像．
Lane M；サイズマーカー，三原；JP MIH（Acc.no. AB204588），宮之城；JP MYJ（AB204586），大口；JP OKC（AB204587），松戸；JP MAT（AB204582），浅羽；JP ASA（AB204583），愛南；JP AIN（AB204577），倉敷；JP KUR（AB204584），合志；JP KOS91（AB204578），鹿児島；JP KAK（AB204580）（Ueda and Brown, 2006）．

に寄生し，野外越冬可能な土着系統のコナジラミ個体群の存在が報告されている（宮武，1980；松井，1993）。また，Lee and De Barro（2000）は，日本産個体群のITS１領域の塩基配列を解析した結果，日本にはバイオタイプＢに属する個体群以外に遺伝的に異なる四国由来の個体群と石垣島由来の個体群が存在することを示唆した。日本土着系統のmtCOI解析はこれまで行われていなかったため，筆者らは関東地方以西の地域及び南西諸島各地からタバココナジラミを収集し個体群調査を現在行っている。現時点までに収集，解析した本州及び九州産の土着系統個体群のmtCOIPCR断片内には，*Eco*T14I，*Stu*I両制限酵素部位は確認されていない（私信）。

バイオタイプＱは国内でその存在が報告された2005年以降，作物生産において重要な農業問題の一つとなっている。北アメリカや地中海諸国など，既に発生が確認された諸外国でも同様で，バイオタイプＱ防除に関する取り組みは，現在国際的な重要課題の一つと言っても過言ではない状況である。農業研究および行政各機関の連携協力等による早急な取り組みが望まれる。

摘　　要

2004年に国内で初めてタバココナジラミバイオタイプＱ *Bemisia tabaci* Q biotypeの発生が確認された。バイオタイプ間の形態学的な識別が困難であるため，バイオタイプの同定にはミトコンドリアチトクロームオキシダーゼＩ（mtCOI）遺伝子領域を用いた塩基配列解析に基づく方法が用いられている。圃場から採集した個体群サンプルのバイオタイプ判別を簡易かつ短時間で行うために，PCR-RFLPを用いた識別法を考案した。mtCOI遺伝子領域を特異的プライマーでPCR増幅後，制限酵素*Eco*T14I（*Sty*I）または*Stu*Iを用いて増幅断片を消化すると，バイオタイプＱでは*Eco*T14I（*Sty*I）のみで555 bpと311 bpの２断片に，バイオタイプＢでは*Stu*Iのみが560 bpと306 bpの２断片にそれぞれ特異的に切断され，バイオタイプＱおよびＢを識別できる。

引　用　文　献

Brown, J. K.（2000）Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-*Begomovirus* complexes Virus Res. 71：233-260.

Brown, J. K. and J. Bird （1992）Whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin: past and present. Plant Dis. 76：220-225.

Brown, J. K., T. J. Dennehy, B. DeGain, D. Rogan, G. Harpold, F. Byrne and R. Nichols（2005）First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci*（Gennadius）in the U.S.A. and resistance to insecticides in an Arizona population. European Whitefly Studies Network: http://www.whitefly.org/whiteflyforum/forum_posts.asp?TID=32&PN=1.

Brown, J. K., D. R. Frohlich and R. C. Rosell（1995）The sweetpotato or silverleaf whitefies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? Annu. Rev. Entomol. 40：511-534.

De Barro, P. J., F. Driver, J. W. H. Trueman and J. Curran（2000）Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci*（Gennadius）using ribosomal ITS1. Mol. Phylogenet. Evol. 16：29-36.

Frohlich, D. R., I. Torres-Jerez, I. D. Bedford, P. G. Markham and J. K. Brown（1999）A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. Mol. Ecol. 8：1683-1691.

Guirao, P., F. Beitia and J. L. Cenis（1997）Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci*（Hemiptera: Aleyrodidae）. Bull. Entomol. Res. 87：587-593.

樋口聡志・曽我一生・行徳　裕・横山　威（2005）シルバーリーフコナジラミ成虫の薬剤感受性検定法．第49回応動昆要旨　118（講要）

外間也子・松井正春・河野伸二・渡嘉敷唯助（1993）タバココナジラミ新系統の放飼により発生した各種野菜の異常症．関東病虫研報　40：217-219.

Horowitz, A. R., S. Kontsedalov, V. Khasdan and I. Ishaaya.（2005）Biotype B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. Arch. Insect Biochem. Physiol. 58：216-225.

Kato, K., M. Onuki, S. Fuji and K. Hanada.（1998）The first occurrence of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato（*Lycopersicon esculentum* Mill.）in Japan. Ann. Phyopathol. Soc. Jpn. 64：552-559.

Lee, M. H., S. K. Kang, S. Y. Lee, H. S. Lee, J. Y. Choi, G. S. Lee, W. Y. Kim, S. W. Lee, S. G. Kim and K. B. Uhm（2005）Occurrence of the B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* in Korea. Korean J. Appl. Entomol. 44：169-175.（In Korean with English summary.）

Lee, M. L. and P. J. De Barro（2000）Characterization of different biotypes of *Bemisia tabaci*（Gennadius）

(Homoptera; Aleyrodiae) in South Korea based on 16S ribosomal RNA sequences. Korean J. Entomol. 30：125-130.

Liu, H. Y., S. Cohen and J. E. Duffus. (1992) The use of isozyme patterns to distinguish sweet potato whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes. Phytoparasitica 20：187-194.

松井正春（1992）タバココナジラミの吸汁によるトマト果実の着色異常．応動昆　36：47-49.

松井正春（1993）タバココナジラミの最近における発生と防除．植物防疫　47：118-119.

松浦　明（2006）宮崎県におけるタバココナジラミバイオタイプQの発生と防除対策．今月の農業　50（2）：57-61.

宮武頼夫（1980）日本産コナジラミ類総目録．Rostria 32：291-327.

Nauen, R., N. Stumpf and A. Elbert (2002) Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Pest Manag. Sci. 58：868-875.

大戸謙二（1990）タバココナジラミの発生とその見分け方．植物防疫　44：264-266.

大貫正俊・小川哲治・内川敬介・加藤公彦・花田　薫（2004）九州で発生したトマト黄化葉巻ウイルスの分子的特徴とその特異的検出．九沖農研報告　44：55-77.

Palumbo, J. C., A. R. Horowitz and N. Prabhaker (2001) Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. Crop Prot. 20：739-765.

Perring, T. M. (2001) The *Bemisia tabaci* species complex. Crop Prot. 20：725-737.

西東　力・尾崎　丞（1991）タバココナジラミによって起こるトマト果実の着果異常　農業および園芸　66：747-748.

上田重文（2005）シルバーリーフコナジラミの biotype 及びタバコ巻葉ウイルスに対する媒介能．九病虫研会報　51：123（講要）.

Ueda, S. and J. Brown (2005) Molecular trails of *Tomato yellow leaf curl virus* and vector insect *Bemisia tabaci* introduced into Japan. IUMS2006 232-V（講要）.

Ueda, S. and J. Brown (2006) First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase I sequence analysis. Phytoparasitica 34：405-411.

Zhang, L. P., Y. J. Zhang, W. J. Zhang, Q. J. Wu, B. Y. Xu and D. Chu (2005) Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. J Appl. Entomol. 129：121-128.

（2006年３月27日受領；８月10日受理）