

平成22年度 岩手県農業研究センター試験研究成果書

区分	指導	題名	マルチプライマーPCR法による3種シンクイムシの種識別
[要約] スモモヒメシンクイとナシヒメシンクイの幼虫およびりんごの最重点防除害虫であるモモシンクイガ幼虫を簡易、迅速、確実に識別できるPCRプライマーを開発した。			
キーワード	マルチプライマーPCR	シンクイムシ類	環境部 病理昆虫研究室

1 背景とねらい

日本でりんごを加害するシンクイムシ類は主にハマキガ科のナシヒメシンクイ *Grapholita molesta* (Busck)、スモモヒメシンクイ *Grapholita dimorpha* (Komai) およびシンクイガ科のモモシンクイガ *Carposina sasakii* (Matsumura) の3種である。モモシンクイガは依然として日本のりんご栽培における最重点防除害虫であるが、近年ではスモモヒメシンクイによる加害が増加傾向にある。

シンクイムシ類の食入は若齢幼虫の時期に起こるが、形態的特徴によるシンクイムシ類の同定は一般的に難しい。また、ナシヒメシンクイとスモモヒメシンクイを識別するためには成虫まで飼育する必要がある、かなりの時間と労力を要する。そのため、シンクイムシ類の発生調査および予察のためには、若齢幼虫を速やかに識別可能な診断手段が必要である。

そこで本研究において、種特異的なプライマーを用いたPCR法によるシンクイムシ類の診断方法を確立する。

2 成果の内容

- (1) 表1に示したプライマーを混合してPCR法を行い、産物をアガロースゲル電気泳動に供すると、種ごとに明確に分子量の異なるバンドパターンが得られる(図1)。
- (2) 検体は1個体ずつ用い、一般的な手順に従ってDNA抽出、PCRを行う。
- (3) 別途同定済みのナシヒメシンクイ(89検体)、スモモヒメシンクイ(49検体)、モモシンクイガ(18検体)について診断を試行したところ、識別率は100%となり、例外は認められていない(表2)。
- (4) 以上のことから、本法を用いることにより3種のシンクイムシ類を簡易、迅速、確実に識別することが可能となる。

3 成果活用上の留意事項

- (1) 本研究は(財)岩手生物工学研究センターと共同で行った。
- (2) 本法の実施に必要な主な機器は、サーマルサイクラー、アガロースゲル電気泳動装置、トランスイルミネーターである。消耗品経費は、96検体を処理した場合、約¥70/検体である。
- (3) 本法の実施にかかる時間は、DNA抽出に約30分、PCRに約2時間、電気泳動による検出に約30分、合計約3時間である。

4 成果の活用方法等

- (1) 適用地帯又は対象者等
病虫害防除所および果樹害虫研究機関
- (2) 期待する活用効果
シンクイムシ類の識別が確実になり、発生予察や分布の正確な調査が行われる。

5 当該事項に係る試験研究課題

(H22-04) ハダニ類を主体としたりんご病虫害防除体系の最適化(H22~26 国庫補助)

6 研究担当者

羽田 厚、関根 健太郎 ((財)岩手生物工学研究センター)

7 参考資料・文献

- (1) Barcenas N. et. al (2005) DNA diagnostics to identify internal feeders (Lepidoptera: Tortricidae) of pome fruits of quarantine importance. *J. Econ. Entomol.* 98: 299-305.
- (2) 川嶋 (2008) モモシクイガの生態に関する基礎的研究. 青森県農林総研りんご試験報. 35: 1-51.
- (3) Komai F. (1979) A new species of genus *Grapholita* Treitschke from Japan allied to the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Appl. Ent. Zool.* 14: 133-136.
- (4) 奥ら (1988) スモモのシクイガ *Grapholita dimorpha* Komai の生態に関する予備的知見. 果樹試験報. 15: 49-64.
- (5) Simon C. et.al (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol. Soc. Am.* 87 651-701.

8 試験成績の概要 (具体的なデータ)

表1 診断に用いるプライマーの塩基配列

塩基配列 5'-3'	
5'プライマー	
ナシヒメ特異的	AGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTC
スモモヒメ特異的	GATTAAGTGGTGTAATCTTAGCTAAC
モモシン特異的	TACGAATTAATAATTTATCATTGAC
3'プライマー	
3種共通	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA
Simon et al.(1994)による	

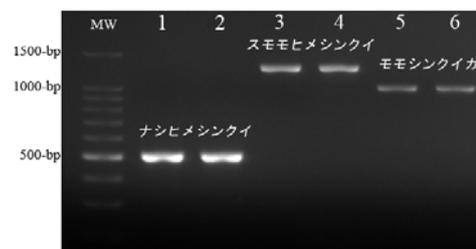


図1 2.5%アガロースゲル電気泳動による PCR 産物のバンドパターン

表2. 試行に用いた検体の地理的由来と識別の可否

種名	採取地点	由来	検体数	成育 ステージ	識別の可否
ナシヒメシクイ	岩手県 北上市	野外採取(フェロモントラップ)	20	成虫	
	長野県 須坂市	室内飼育系統	20	成虫	
	長野県 須坂市	室内飼育系統	16	幼虫	
	青森県 黒石市	野外採取(フェロモントラップ)	11	成虫	
	青森県 南部町	野外採取(フェロモントラップ)	5	成虫	
	鳥取県 北栄町	野外採取(フェロモントラップ)	5	成虫	
	鳥取県 湯梨浜町	野外採取(フェロモントラップ)	12	成虫	
スモモヒメシクイ	岩手県 北上市	野外採取(フェロモントラップ)	16	成虫	
	岩手県 花巻市	野外採取(フェロモントラップ)	6	成虫	
	長野県 須坂市	室内飼育系統	11	成虫	
	長野県 須坂市	室内飼育系統	12	幼虫	
	青森県 南部町	野外採取(フェロモントラップ)	4	成虫	
モモシクイガ	岩手県 北上市	野外採取(フェロモントラップ)	7	成虫	
	岩手県 北上市	野外採取(被害果より採取)	2	幼虫	
	青森県 黒石市	野外採取(フェロモントラップ)	1	成虫	
	青森県 南部町	野外採取(フェロモントラップ)	2	成虫	
	岩手県 盛岡市	室内飼育系統	6	幼虫	