

4 遺伝子増幅法によるレタスビッグベイン病の病原ウイルスの検出

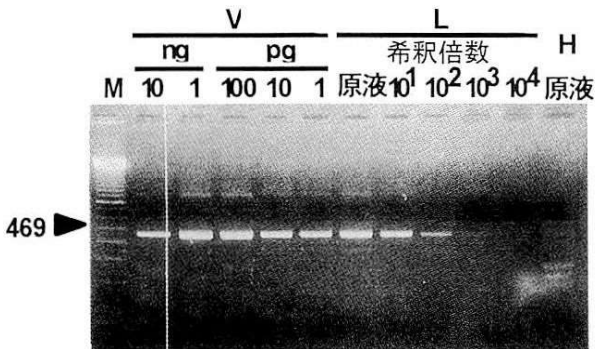
ねらいと成果

レタスビッグベイン病の病原ウイルスとしては土壌伝染性のレタスビッグベインウイルス (LBVV) が報告されている。さらに最近、新たな病原ウイルスとして、同じく土壌伝染性のミラフィオリレタスウイルス (MiLV) も報告された。淡路地域におけるビッグベイン症状のレタスではこの両ウイルスの存在が認められている。そこで、両ウイルスの効率的な検出を試みて、逆転写-遺伝子増幅法 (RT-PCR) を行ったところ、LBVV、MiLV とともに高感度に検出できた。また、両ウイルスが混合感染した個体からも LBVV、MiLV を区別して検出することができた。

内容

RT-PCR を行うために LBVV 遺伝子、MiLV 遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計した。

RT-PCR によるウイルス検出の手順は次のとおりである。①レタスからウイルス RNA を抽出・精製する。②ウイルス RNA を鋳型にして逆転写酵素とプライマーを用いて相補 DNA を合成する (RT)。③相補 DNA を鋳型にして DNA 合成酵素を用いてプライマーに挟まれた DNA 領域を増幅する (PCR)。



プライマー：LBW 用、469bb を増幅
 M：分子量マーカー
 V：精製ウイルスから抽出した RNA
 L：感染レタス葉から抽出した RNA
 H：健全レタス葉から抽出した RNA
 1 ng は10億分の 1 g、1 pg は1兆分の 1 g
 原液は0.2 g の葉より抽出して
 100 μl の蒸留水に溶解

図1 LBW の検出限界の検討

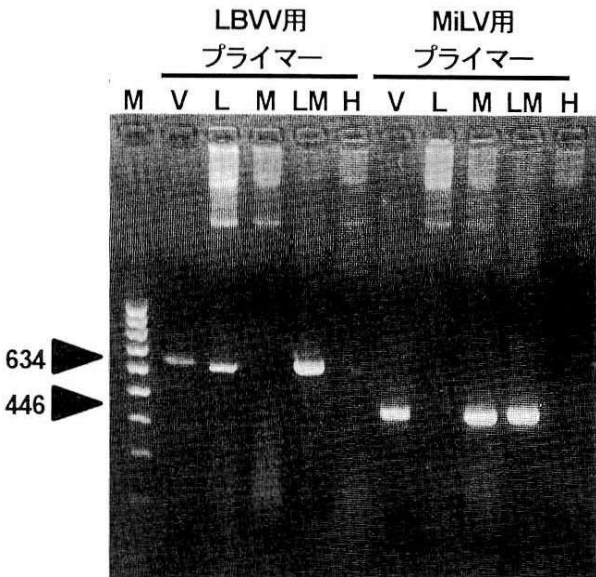
④PCR 産物を電気泳動して増幅バンドを確認する。

試験の結果、LBVV はウイルス RNA 1 pg (1 兆分の 1 g) まで、感染レタスの葉0.2 g から抽出した RNA では1,000倍希釈まで検出可能であった (図1)。感染レタスの根からも検出可能であった。そして、LBVV 用プライマーは LBVV が存在する試料のみ特異的な増幅バンドを検出した。MiLV 用プライマーについても同様であった (図2)。以上より RT-PCR は植物組織内の濃度が低いと考えられる LBVV、MiLV それぞれの検出に適している。

今後の方針

植物組織内の濃度が低い LBVV、MiLV を検出できることから、症状発現前のレタス幼苗検定による早期ウイルス診断への適用を試みる。

松本 純一 (部長 (生工))



LBW 用プライマー：634bb を増幅
 MiLV 用プライマー：446bb を増幅
 M：分子量マーカー
 V：精製ウイルス (両ウイルスとも含む) から抽出した RNA
 L：LBW 感染レタス葉から抽出した RNA
 M：MiLV 感染レタス葉から抽出した RNA
 LM：両ウイルス感染レタス葉から抽出した RNA
 H：健全レタス葉から抽出した RNA

図2 LBW、MiLV それぞれの検出