

4 レタスビッグベイン病に関わるウイルスの検出

ねらいと成果

レタスビッグベイン病の病原ウイルスは、レタスビッグベインウイルス (LBVV) およびミラフィオリレタスウイルス (MiLV) が報告されている。両ウイルスを逆転写-遺伝子増幅法 (RT-PCR) を用いて高感度に、そして、混合感染した個体でも同時に検出することができた (ひょうごの農林水産技術 No.126参照)。両ウイルスはともに土壌伝染性であるので、発病圃場の早期発見、防除対策の実施とその指導のため土壌診断法を検討した。病土にレタスを移植して、病徴発現前の幼苗からのウイルス検出を行ったところ、早期の検出が可能になった。

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)。
- ④PCR産物を電気泳動して増幅バンドを確認する。

両ウイルスに汚染した土壌を12cmビニールポットに詰めて、本葉4~5枚まで育苗した個体を1ポットに3個体ずつ移植して、18℃、11時間日長の条件で栽培した。移植後7、10、14、21、28、35日目に上位2枚目の葉を採取して3個体 (1ポット) 分を1サンプルとした。各サンプルからRNAを抽出してウイルス検出を行った。健全対照として同様に滅菌土に移植した株を、また、保毒対照としてビッグベイン症状を現したレタスを用いた。

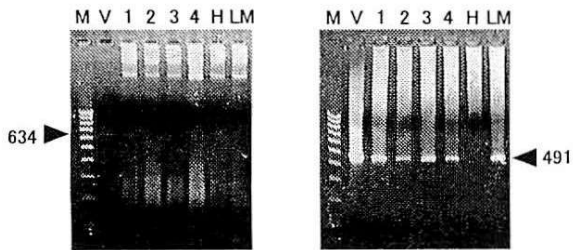
LBVV検出は、RT-PCR産物に対して、はじめに増幅したDNA領域よりもさらに内側を増幅する nested-PCRを用いて行った。その結果、移植10日目にはじめてウイルスが検出され、移植14日目ですべてのサンプルでもウイルスが検出できた (図1、表)。一方、MiLVは、RT-PCRで移植21日目にはじめてウイルスが検出され、移植28日目に4サンプル中2サンプルからウイルスが検出された (図2、表)。しかしながら、MiLVが検出された個体では検出と前後して病徴発現の兆候が見られ、その後ビッグベイン症状が現われた (表)。

以上より、LBVVは病徴発現18日前から、また、MiLVは1週間前から検出できた。

今後の方針

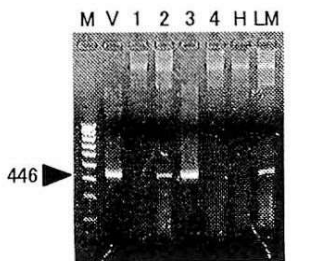
遺伝子診断法による、LBVV、MiLVの土壌からの検出 (植物を用いたトラップ法) を検討する。また、現地圃場の土壌を採取して、ウイルス検出を行い、実際の発生状況と比較して、レタスビッグベイン病に対する土壌診断法を確立する。

松本 純一 (部長 (生工))



A: RT-PCR 634bpを増幅する
B: nested-PCR 491bpを増幅する
M: 分子量マーカー
V: 精製ウイルス
1~4: 汚染土に移植したレタス葉
H: 滅菌土に移植したレタス葉
LM: LBVV, MiLVに混合感染したレタス葉

図1 移植14日後の個体からのLBVV検出



RT-PCR 446bpを増幅する
プライマーの組み合わせを使用
M: 分子量マーカー
V: 精製ウイルス
1~4: 汚染土に移植したレタス葉
H: 滅菌土に移植したレタス葉
LM: LBVV, MiLVに混合感染したレタス葉

図2 移植28日後の個体からのMiLV検出

表 RT-PCRによるウイルス検出と移植後日数の関係

移植後日数	7	10	14	21	28	35
LBVV	RT-PCR	×	×	×	×	—
	nested-PCR	×	△	○	○	—
MiLV	RT-PCR	—	—	×	△	△
病徴	×	×	×	×	△	△

○: 4サンプルすべてで確認
△: 一部のサンプルで確認
×: 確認されたサンプルなし
—: not tested