

レタスビックベインミラフィオリウイルスとその媒介菌 *Olpidium virulentus* の土壌からの検出定量方法

富山県農林水産総合技術センター ^{もものい} 桃井 ^{かずみ} 千巳・^{もりわき} 森脇 ^{じょうじ} 丈治*・^{もりかわ} 守川 ^{としゆき} 俊幸

香川県農業試験場 ^{もり} 森 ^{みつ} 充 ^{たか} 隆

兵庫県立農林水産技術総合センター ^{まつ} 松 ^{うら} 浦 ^{かつ} 克 ^{なり} 成

はじめに

レタスビックベイン病は、1973年に国内で初めて発生が確認された(岩木ら, 1978)。*Olpidium virulentus* によって媒介される土壌伝染性ウイルス病害であり、レタスビックベインミラフィオリウイルス (*Mirafiori lettuce big-vein virus*, MiLBVV, 口絵①) によって引き起こされる。レタス栽培の中でも冬期の作型で発生する。初期の病徴は葉が葉脈に沿って退色し、太い葉脈透過の症状が見られる(口絵②)。ひどい場合は玉肥大が悪くなり、結球しないため出荷が困難になる。

媒介菌 *O. virulentus* は耕地土壌に普遍的に存在し、ウイルスを保毒しない場合には、一般に無害であるが、休眠孢子(口絵③)を形成し、土壌中に長期間にわたって存在するため、ひとたびウイルスを獲得すると防除が困難になる。圃場衛生管理、殺菌剤処理、抵抗性品種等の総合防除対策が開発されており、ウイルスを保毒した媒介菌の感染を避けることが防除のポイントになる。

O. virulentus は絶対寄生菌で、人工培地での培養が困難である。これまで、媒介菌やウイルスの動態をとらえるために、土壌からの媒介菌休眠孢子回収とNested RT-PCRによるウイルスの検出(石川・野見山, 2004)、抗*Olpidium virulentus* 休眠孢子抗体を用いた血清学的定量(野見山, 2013)などが報告されている。

富山県では、以前から*O. virulentus* が媒介するチュウリップの土壌伝染性ウイルス病である微斑モザイク病と条斑病の土壌診断法の開発に取り組んできた。その技術を応用し、レタスビックベイン病を対象に香川県や兵庫県と共同で研究を行い、土壌から媒介菌とMiLBVVを

検出・定量する技術を開発した(MOMONOI et al., 2015)。また、現地レタス圃場における発病程度と媒介菌検出量および、MiLBVV検出量との比較を行った結果を紹介する。

I 土壌からの核酸抽出法

土壌からの核酸抽出法には、土壌微生物実験法第3版(星野, 2013)の方法など各種市販キットがある。近年では、土壌から抽出したDNAを用いて、PCRによる診断やDGGEによる微生物性評価等植物病理分野においても利用されている。一方で、核酸抽出の際の反復間のばらつきが大きいことが指摘されており、ポットやドレインベッドレベルでの評価はできても、圃場レベルでの評価法として採用されている例は少ない。そこで、まず核酸抽出に用いる土壌試料量について検討した。過去の報告や市販キットの多くは、核酸抽出に用いる一回の土壌試料量が0.5gであった。それに対し、ウイルス媒介菌である*Polymyxa* spp. や*Spongospora subterranea* における先行研究では、土壌試料量は少なくとも5gとしていた。そこで、実際に現地発病土壌を用いて土壌試料量を比較したところ、0.5gでは反復間のばらつきが大きかったが、5gではそれより少ない傾向にあった(データ略)。そこで、土壌試料量を50mlチューブで破碎可能な最大量である5gとした。

土壌からの核酸抽出の際、微生物細胞の破碎、土壌からの抽出、核酸の精製の三つのステップが重要となる。そこで、微生物細胞の破碎には、ビーズビーティング法を用い、抽出用緩衝液にタンパク質変性やRNase活性阻害剤として、グアニジンチオシアン酸塩、2-メルカプトエタノールを加用し、精製には市販カラム(RNA Capture column, DNA Elution Accessory Kit, 以上MO-BIO)を用いた。核酸の抽出部分は市販キットに頼らないため、土壌の種類によって抽出緩衝液の組成を変えることも可能である。図-1に土壌からの核酸(RNAおよびDNA)抽出の手順を示す。なお、器具や試薬の滅菌は、雑菌の混入を防ぐための必要最低限の滅菌処理(121℃, 20分)のみで十分である。

Quantification of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and its vector, *Olpidium virulentus*, from soil using real-time PCR. By Kazumi MOMONOI, Jouji MORIWAKI, Toshiyuki MORIKAWA, Mitsutaka MORI and Katsunari MATSUURA

(キーワード: レタスビックベイン病, *Mirafiori lettuce big-vein virus*, *Olpidium virulentus*, real-time PCR)

*現所属: 農研機構 九州沖縄農業研究センター