

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壤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、休眠胞子（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胞子回収とNested RT-PCRによるウイルスの検出（石川・野見山，2004）、抗*Olpidium virulentus* 休眠胞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壤伝染性ウイルス病である微斑モザイク病と条斑病の土壤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、土壤微生物実験法第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チューブで破砕可能な最大量である5gとした。

土壌からの核酸抽出の際、微生物細胞の破砕、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、微生物細胞の破砕には、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

I 土壌試料の採取と調製

1. 1 圃場当たり 5 箇所, 合計 500 g 程度を採取する。
2. 土壌をふるいが通る程度に風乾する。
3. 乳鉢で塊を砕き, すべての土壌試料を 2 mm の篩を通し, 密閉できる容器 (袋) に入れる。
すぐに用いない場合は冷蔵 (4℃) で保存する。

II 土壌試料からの核酸抽出

1. 50 ml チューブ (安井器械, ST-5010PCR, または WATSON, 1342-050S) に 10 g のジルコニアビー
ズ (直径 0.5 mm), 5 g の上記調製済みの土を入れる。
2. 9 ml のリン酸ナトリウム (300 mM, pH7.0) に 500 μ l の 20% SDS 溶液, 500 μ l のグアニジン溶液 (4 M
グアニジンチオシアネート, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA), 2.5 μ l の 2-メルカプトエタノ
ールを加える。
3. マルチビーズショッカー (安井器械) で 3,000 rpm, 60 秒間, 3 回破砕する (もしくは 15 分間ボルテ
ックスする)。
4. 12,000 $\times$ g, 10 分間, 遠心する。
5. 50 ml チューブに上清を回収する。
6. フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を等量添加する。
7. 10 秒間, ボルテックスする。
8. 12,000 $\times$ g, 10 分間, 4℃で遠心する。
9. 50 ml チューブに上清を回収する。
10. 7.5 M 酢酸カリウム溶液を 1/4 量添加する。
11. 10 回転倒混和する。
12. 5 分間静置する。
13. 12,000 $\times$ g, 10 分間, 遠心する。
14. 50 ml チューブに上清を回収する。
15. 等量のイソプロピルアルコール添加し, 遠心する。
16. 70% エタノールを加え, 遠心し, 沈殿を得る。

III 抽出サンプルの精製

1. 試料に Solution SR5 (MO-BIO Laboratories, Inc.) を 1 ml 添加する。
2. 試料を 1.5 ml チューブに移す。
3. ボルテックスする。
4. 65℃, 10 分間静置する。RNA Capture Column (MO-BIO) を 15 ml チューブに設置し, Solution SR5
を 2 ml 添加する。
5. 試料を 20,000 $\times$ g, 1 分間, 4℃で遠心する。
6. RNA Capture Column に遠心後の上清のみを添加する。
7. Solution SR5 を 1 ml 添加する。
8. RNA Capture Column を新しい 15 ml チューブに設置し, Solution SR6 を 1 ml 添加する。
9. 試料を 2 ml チューブに移す。
10. イソプロピルアルコール沈殿を行う。
11. 100 μ l の RNase フリー水を添加後, 65℃で 10 分間静置し, 沈殿を完全に溶解する。
12. 5 μ l を用いて, リアルタイム PCR を行う。
13. DNA を抽出する場合は, DNA Elution Accessory Kit (MO-BIO) のマニュアルに従う。

図-1 土壌からの核酸抽出の手順

II 媒介菌およびウイルスの定量方法

検出定量には, 特異性と検出感度を考慮し, TaqMan real-time PCR 法を用いた。リアルタイム PCR は専用の反応試薬や反応と蛍光検出が一体となった専用の機器を必要とするが, 操作自体は PCR と同様であり, 電気泳

動する手間が省けるため, 初心者でも取り組みやすい。反応試薬もしくはプローブに蛍光物質を用い, PCR 増幅産物がある一定の蛍光強度に達するまでのサイクル数 (Ct 値) で評価する。Ct 値が小さい (核酸の増幅が早い) ほど, PCR 反応に供試した核酸の量が多いと判断する。毎回, 濃度既知の標準試料と一緒に検出することによ

表-1 リアルタイム PCR 用プライマー，プローブの塩基配列

プライマー，プローブ名	塩基配列
MiLBVV-167F	5'-AATTTCTYTWGGTCTCATGACAA-3'
MiLBVV-238R	5'-TTTGCAGATGCYACCATGG-3'
MiLBVV-205T	5'-FAM-ACAGGCTTCTCTTC-MGB-3'
OPv-F	5'-ACGGTGTTCAATTGTTTCGAGTAAC-3'
OPv-R	5'-CGGGTAATCCTACCTGATTGAGA-3'
OPv-FAM	5'-FAM-ACGAACGAAATAAAC-MGB-3'

表-2 各地土壌から分離した *Olpidium* 菌株の由来

種	分離株	栽培地	栽培植物	増殖植物	リアルタイム PCR ^注
<i>Olpidium virulentus</i>	101	山口	キャベツ	マクワウリ	+
	103	山口	ナス	マクワウリ	+
	109	三重	イネ	マクワウリ	+
	111	三重	不明	マクワウリ	+
	121	宮城	特用作物	マクワウリ	+
	123	宮城	野菜	マクワウリ	+
	129	京都	ナス	マクワウリ	+
	201	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	203	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	205	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	208	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	209	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	210	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	212	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	213	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	217	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	218	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	219	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	220	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	222 ms-1	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	Woms-2	富山	ネギ	マクワウリ	+
	LBms-3	兵庫	レタス	マクワウリ	+
	1-1	不明	不明	マクワウリ	+
	2-1	不明	不明	マクワウリ	+
	7 ms-1	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	ES5 ms-1	富山	チューリップ	マクワウリ	+
	Koums-1	高知	レタス	マクワウリ	+

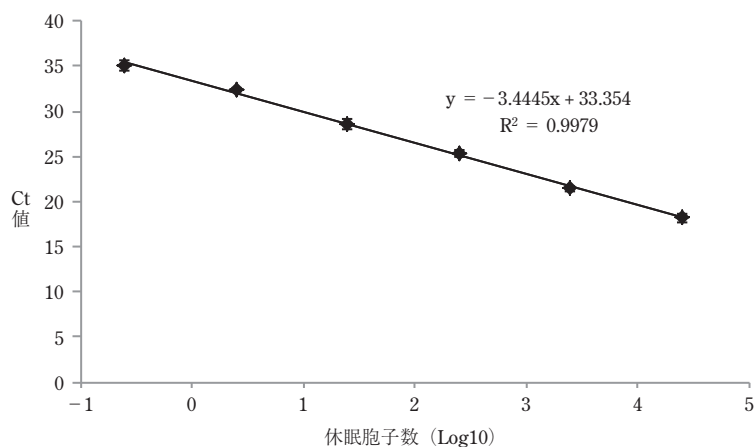
注：a：+ 陽性，- 陰性

表-2 各地土壌から分離した *Olpidium* 菌株の由来 (続き)

種	分離株	栽培地	栽培植物	増殖植物	リアルタイム PCR ^注
<i>O. brassicae</i>		香川	キャベツ	キャベツ	—
<i>O. bornovanus</i>	A	不明	メロン	マクワウリ	—
	C	長崎	スイカ	スイカ	—

注: a: + 陽性, - 陰性

(a)



(b)

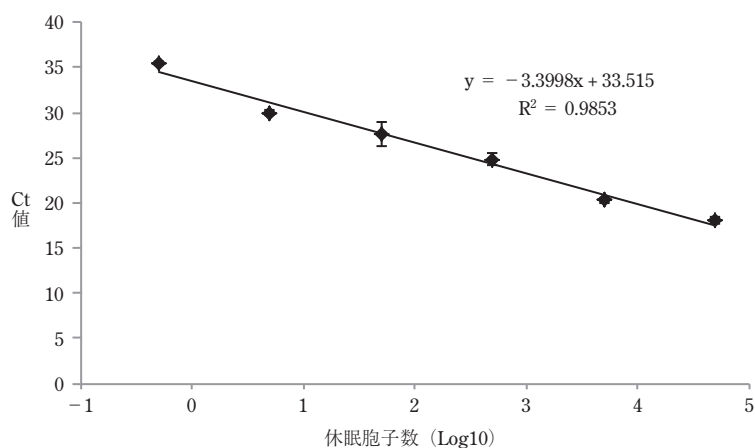


図-2 添加回収試験による DNA 抽出効率の評価

- (a) 休眠胞子から直接抽出した *O. virulentus* DNA のリアルタイム PCR による検出結果.
 (b) 休眠胞子の希釈系列を土壌に添加後, 抽出した *O. virulentus* DNA のリアルタイム PCR による検出結果.
 エラーバーは3反復の標準偏差を示す.

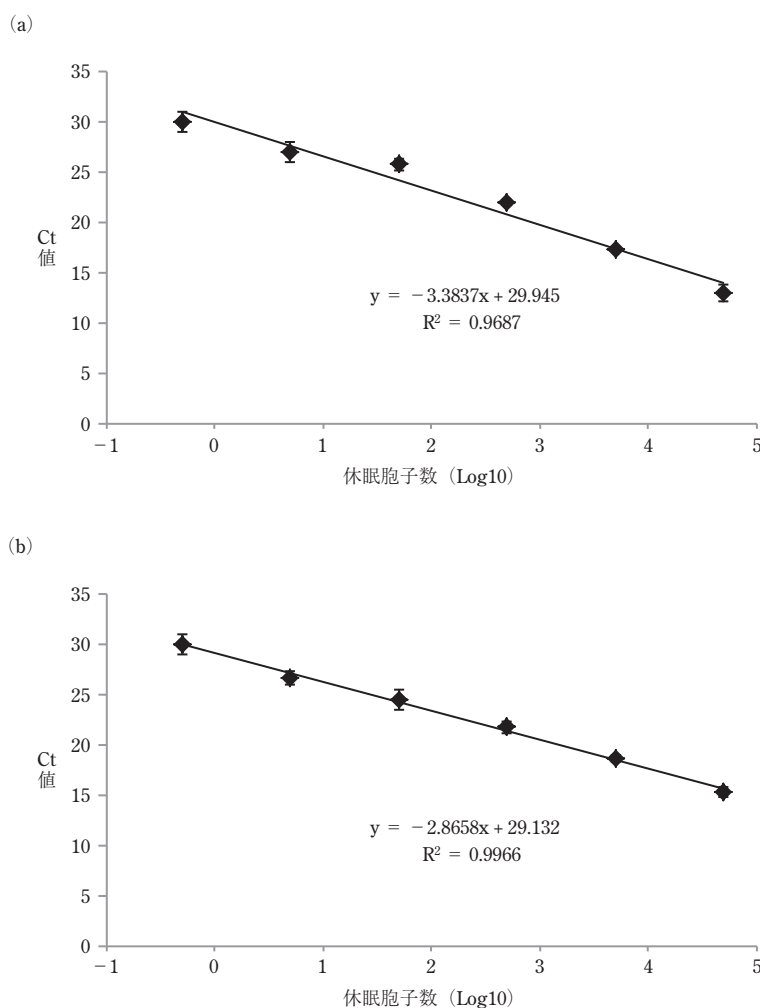


図-3 添加回収試験による RNA 抽出効率の評価

- (a) 休眠胞子から直接抽出した *O. virulentus* RNA のリアルタイム PCR による検出結果.
 (b) 休眠胞子の希釈系列を土壌に添加後、抽出した *O. virulentus* RNA のリアルタイム PCR による検出結果.
 エラーバーは 3 反復の標準偏差を示す.

り、異なる反応間での定量が可能である。ここでは、標準試料として、媒介菌 DNA の検出には休眠胞子から抽出した DNA を、MiLBVV RNA の検出には、プラスミド (pGEM-MiLBVV) を、それぞれ濃度を測定後、希釈系列を作製し用いた。

媒介菌 *Olpidium* spp. は形態、寄主特異性、ウイルス媒介能の違いによって、*O. virulentus*, *O. brassicae*, *O. bornovanus* に分けられる。rDNA-ITS 領域の配列を基にした 3 種を識別可能なマルチプレックス PCR の報告 (HERRERA-VA' SQUEZ et al., 2009) を参考に、*O. virulentus* に特異的なリアルタイム PCR 用プライマー、プローブ

を作成した (表-1)。MiLBVV の検出には、NCBI データベースに登録されている MiLBVV 23 系統の Coat Protein (CP) 領域の配列を基に、表-1 のようなリアルタイム PCR 用プライマー、プローブを作成した。

反応試薬として、媒介菌 DNA の検出には TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) を、MiLBVV RNA の検出には TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems) を用いた。一反応あたり、鋳型となる DNA, RNA をそれぞれ $5\mu\text{l}$ 使用し、各プライマーを終濃度 250 nM, TaqMan プローブを終濃度 900 nM で加え、いずれも $20\mu\text{l}$ の系で反応を行った。

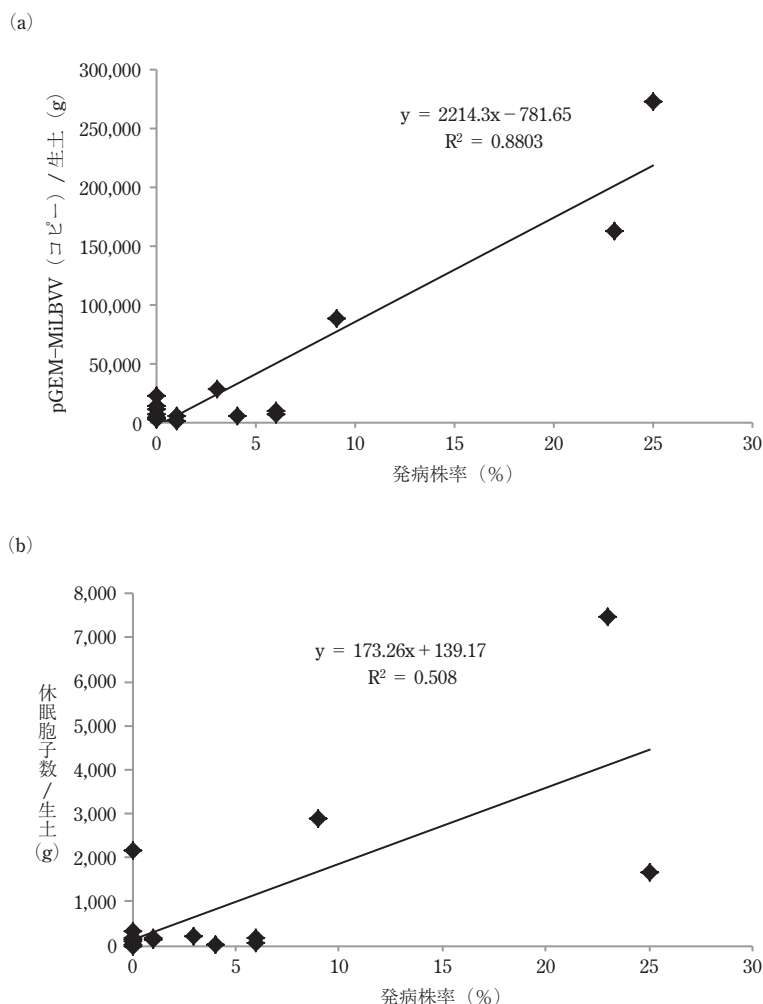


図-4 現地レタス圃場における発病株率と土壌からの媒介菌、ウイルス定量結果の比較 (品種‘シスコピバ’)

- (a) レタスピックベイン病発病株率と土壌中の MilBVV ウイルス RNA 量の比較.
(b) レタスピックベイン病発病株率と土壌中の *O. virulentus* DNA 量の比較.

TaqMan PCR および検出には、StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。反応条件はマニュアルに従い、DNA の場合、50℃、2 分、95℃、20 秒の後、95℃、3 秒、60℃、30 秒を 40 サイクルで行った。RNA の場合、50℃、5 分、95℃、20 秒の後、95℃、15 秒、60℃、1 分を 40 サイクルで行った。

III プライマー、プローブの特異性評価

土壌または栽培植物根から分離した *O. virulentus* 27 菌株 (守川・多賀, 2004), *O. brassicae* 1 菌株 (農研機構 近畿中国四国農業研究センター 野見山孝司氏より分

譲), *O. bornovanus* 2 菌株 (農研機構 中央農業総合研究センター 津田新哉氏より分譲) の感染根から常法によりそれぞれ抽出した DNA を用いて、作成したリアルタイム PCR 用プライマー、プローブの特異性を評価したところ、*O. virulentus* でのみ検出されたことから種特異性が高いと考えられた (表-2)。また、Maccarone et al. (2010) は、ピックベイン症状のレタスから分離した *O. virulentus* 25 菌株の rDNA-ITS 領域の配列を報告しており、それらとの相同性を比較したところ、Nan6 菌株 (accession no. GQ304519) 以外は配列が一致したことから、ウイルス媒介能を持つほとんどの *O. virulentus*

菌株を検出可能であると考えられた。

IV 添加回収試験による核酸抽出効率、検出感度の評価

添加回収試験を行うために、まず *O. virulentus* の休眠胞子を準備した。園芸培土に *O. virulentus* 感染植物根を接種し、約 1 か月間栽培したマクワウリ（品種‘銀泉’）の根を回収し、一定期間冷蔵保存することにより、休眠胞子の形成を促すことができる（守川，2005）。冷蔵保存したマクワウリの根に 4 倍量のイオン交換水を加え、ホモジナイザーで 3,000 rpm, 5 分磨砕した後、300 μ m, 106 μ m のメッシュを通し、480 $\times$ g, 5 分遠心し、上清を捨て新しいイオン交換水を加えて、再度遠心後の沈殿を回収することにより、休眠胞子懸濁液を得た。これを血球計算盤でカウントし、10 倍希釈で 6 段階（ $10^0 \sim 10^5$ 個/ml）に希釈した系列を作製した。この休眠胞子希釈系列それぞれから常法により抽出した DNA と乾熱滅菌土壌（180℃，2 時間）に休眠胞子系列を添加した後に上記手法により抽出した DNA を鋳型に、リアルタイム PCR による検出感度をそれぞれ比較した（図-2）。また、同様の希釈系列を用いて常法により直接抽出した RNA と土壌に添加した後に上記手法により抽出した RNA の検出感度についても比較した（図-3）。RNA の検出には、真核生物に共通の塩基配列である Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control（Applied Biosystems）を用いた。その結果、直接休眠胞子から核酸抽出した場合と土壌に添加後に核酸抽出した場合は、DNA, RNA いずれも検出感度に差がなかったことから、この手法を用いた土壌からの核酸抽出効率は非常に高いと考えられた。

V 現地レタス圃場における発病程度と媒介菌、MiLBVV 検出量との比較

香川県のレタス栽培圃場 16 箇所において、収穫期の発病株率と一作後の土壌中の媒介菌 *O. virulentus* 検出

量、MiLBVV 検出量を比較した。土壌の処理は、一作後の根圏土壌を一圃場につき 5 箇所程度を採取したものを混合し、ふるいが通る程度に乾燥させた後に 2 mm のふるいを通し、核酸の抽出に供試した。

試験の結果、検出される MiLBVV 量と発病株率は相関が高かったが、媒介菌検出量とは相関が低かった（図-4）。媒介菌の増減は寄主植物に依存するため、ビックベイン病の発病程度とは必ずしも一致しないことが明らかになった。このことから、土壌中の MiLBVV 量を指標に圃場の発病リスクを推定できる可能性が示唆された。

おわりに

現在、農食研究推進事業「次世代型土壤病害対策・支援技術の開発」の中で、レタスビックベイン病の圃場の発病リスク評価法として開発を進めている。土壤病害に対しては、定植前に対策を講じる必要があることから、その判断材料となる診断技術として今回開発した技術を活用する予定である。この技術は、他の菌媒介ウイルス病の診断にも応用可能であるほか、診断以外にも個別防除技術による媒介菌やウイルスの残存量の評価等にも活用できると考えている。

謝辞 本研究は、2013～15 年度農林水産省農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（25062C）の支援によって実施した。

引用文献

- 1) HERRERA-VA'SQUEZ, J. et al. (2009): Mycological Research 113: 602～610.
- 2) 星野裕子 (2013): 土壤微生物実験法第 3 版, 日本土壤微生物学会 編, 養賢堂, 東京, p.102～108.
- 3) 石川浩一・野見山孝司 (2004): 研究成果情報, 農研機構 近畿中国四国農業研究センター.
- 4) 岩木満朗ら (1978): 日植病報 44: 578～584.
- 5) MACCARONE, L. D. et al. (2010): Plant Disease 94: 563～569.
- 6) MOMONOL, K. et al. (2015): Plant Pathology 64: 825～830.
- 7) 守川俊幸 (2005): 植物防疫 59: 78～81.
- 8) ———・多賀由美子 (2004): 土と微生物 58: 43～52.
- 9) 野見山孝司 (2013): 植物防疫 67: 379～382.

農林水産省プレスリリース (27.11.16～12.11)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆「平成 27 年度病害虫発生予報第 9 号」の発表について (11/24) /syokubo/151124.html