

ニンニクウイルスの発生状況と簡易検定法

1 はじめに

ニンニクの安定生産を行うためには、病害虫に感染していない健全な種球を植え付けることが重要です。現在、ニンニク産地では優良種球の確保と生産コストの低減を目的に、ウイルスフリー球根を導入して種球の栽培を行っています。しかし、周辺圃場からの持ち込み等により、ウイルスに感染し、健全な球根が確保できない恐れがあります。そこで、県内のニンニク産地に発生するウイルスの種類を調査するとともに、簡易なウイルス検定手法について検討しました。

2 技術内容

1) ニンニク栽培圃場におけるウイルス発生状況

最も発生量の多いウイルスは、LYSV（リーキ黄色条斑ウイルス）で、採種圃場および一般栽培圃場のどちらからも高率で発生がみられました。また、LYSVは、積雪前の12月にもニンニクの葉から検出されました（データ省略）。採種圃場で発生しているウイルスは、LYSVとOYDV（タマネギ萎縮ウイルス）の2種類ですが、一般栽培圃場では、この他にチューリップサビダニで伝搬する *Allexivirus* も確認されました（表1）。LYSVおよびOYDVを媒介するアブラムシ類は、植え付け時期である10月から収穫時期にあたる6月まで確認されます（図1）。種球のウイルス感染を防ぐためには、採種圃場は一般栽培圃場からできるだけ離れたところに設置すること、生育期間中にアブラムシ防除を実施することが必要です。

表1 ニンニク栽培圃場で発生するウイルスの種類と発生状況（2016年4月調査）

場 所	栽培種類	調査株数	発病株数	率(%)	検定株数	ウイルス検出株数					
						LYSV 率(%)	OYDV 率(%)	<i>Allexivirus</i> 率(%)	LYSV 率(%)	OYDV 率(%)	<i>Allexivirus</i> 率(%)
永平寺町藤巻1	採種	500	5	1.0	5	3	60.0	0	0.0	0	0.0
永平寺町藤巻2	採種（一年球）	500	10	2.0	9	8	88.9	4	44.4	0	0.0
	採種圃場計	1,000	15	1.5	14	11	78.6	4	28.6	0	0.0
永平寺町藤巻3	一般栽培	200	35	17.5	13	10	76.9	2	15.4	2	15.4
永平寺町中島	一般栽培	400	109	27.3	12	11	91.7	0	0.0	1	8.3
永平寺町大野島	一般栽培	400	75	18.8	15	9	60.0	5	33.3	6	40.0
	一般栽培計	1,000	219	21.9	40	30	75.0	7	17.5	9	22.5

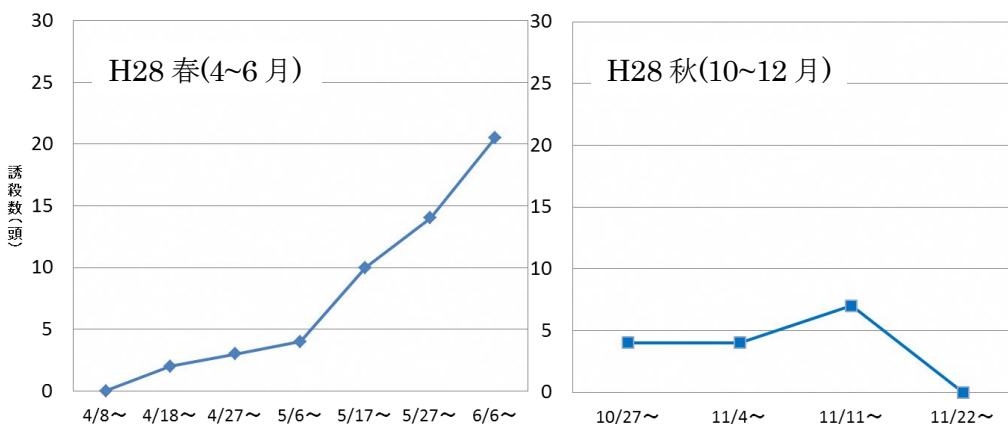


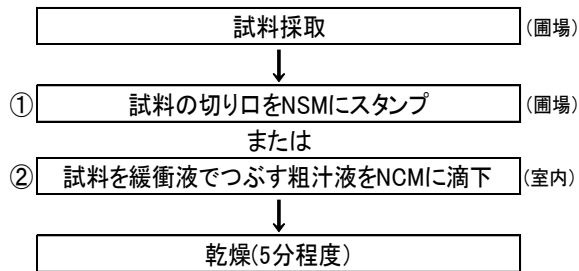
図1 採種圃場でのアブラムシ類の発消長

2) ウイルス検定の手順

(1) 検定方法の特徴

この検定方法は、抗原抗体反応を利用して、ニンニクから採取した試料のウイルス感染の有無をニトロセルロースメンブレン(NCM)上での発色程度で検出する手法です(図2)。本法では、市販(BIOREBA製)の抗血清を用いてLYSV検定を行います。

1. 試料調整(圃場、室内)



2. ウイルス(LYSV)検定

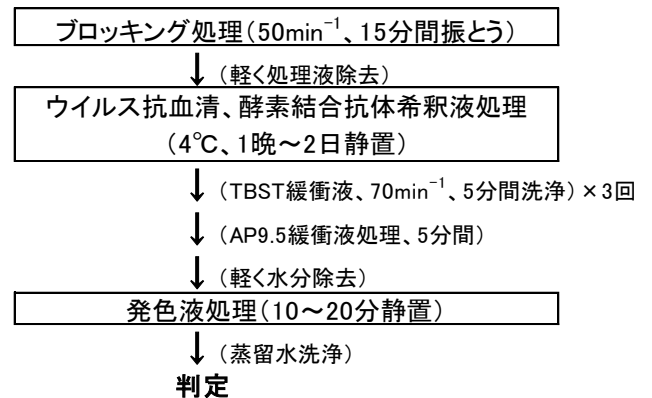


図2 ウイルス検定のながれ

(2) 検定に必要な試薬、消耗品、機器類

ニトロセルロースメンブレン(以下 NCM、BIO-RAD 製 Trans-Blot Transfer Medium、9×12 cm)、ポリ袋、マイクロピペット、プラスチック容器(10 cm×14 cm×4 cm程度、NCMが入る大きさ)、振とう機、冷蔵庫、ポリシーラー、ビニル手袋、ピンセット、ペーパータオルなど

※ 検定に使用する処理液と使用する試薬は表2のとおりです。

表2 検定に用いる処理液の組成

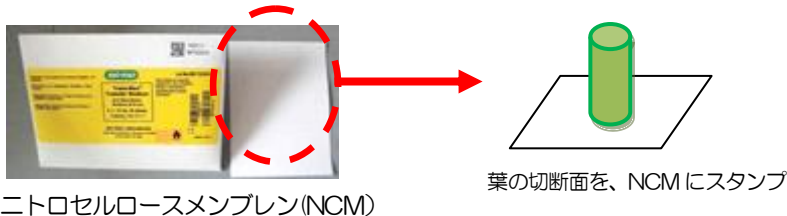
溶液名	保存温度等	使用量 (シート あたりml)	組成
TBS緩衝液	4°C保存		トリスヒドロキシアミノメタン2.4g、塩化ナトリウム29.2g、アジ化ナトリウム0.2g 各試薬を蒸留水で溶解後、塩酸でpH7.5に調整後1Lに調整
ブロッキング液	使用直前に調整	20	牛血清アルブミン(BSA)2g、Triton X-100 2ml、TBS緩衝液100ml
TBST緩衝液	4°C保存	60 (20ml×3回分)	Tween20 0.5ml、TBS緩衝液1L
抗体液	使用直前に調整	1.2	牛血清アルブミン(BSA)0.05g、ポリビニルピロリドン(PVP)0.1g、TBS緩衝液10ml LYSV抗血清2μ l、酵素結合抗体1μ l
AP9.5緩衝液	4°C保存	20	トリスヒドロキシアミノメタン12.1g、塩化ナトリウム5.8g、塩化マグネシウム六水和物1g、 アジ化ナトリウム0.2g、各試薬を蒸留水で溶解後、塩酸でpH9.5に調整後1Lに調整
NBT保存液	-20°C保存		NBT1.5g、ジメチルホルムアミド20ml
BCIP保存液	-20°C保存		BCIP1.0g、ジメチルホルムアミド20ml
発色液	使用直前に調整	2	NBT保存液9μ l、BCIP保存液7μ l、AP9.5緩衝液2ml

注) 緩衝液(TBS、TBST、AP9.5)は毎年作成して使用する

(3) 検定手順

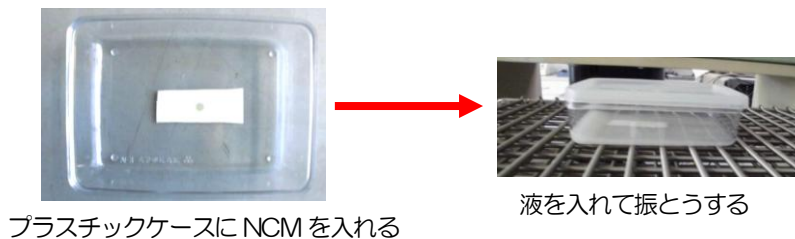
a) 試料調整

- ① NCM は試料数に応じて必要な大きさに切り取り、1 cm 各のマス目を鉛筆などで定規を当てながら引きます。9×12 cm の NCM では 108 サンプル検定可能となります。また NCM を扱う際は、ピンセットまたはビニル手袋で行ってください。
- ② ニンニクの葉をカミソリで切断し、切断面を NCM に押し付けます。または、約 5 mm 角の試料をポリ袋内に入れて 40 μ l の TBS 緩衝液を加えて押しつぶし、2 μ l 滴下します。その後 5 分程度風乾してください。

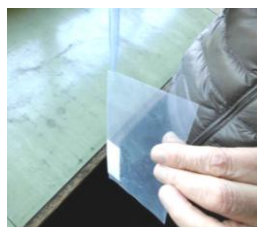


b) ウイルス検定

- ① ブロッキング処理：プラスチックケースに NCM を入れ、ブロッキング液 20ml を加えます。ふたをして、振とう機（スピード約 50 min^{-1} ）で 15 分振とうします。



- ② 抗体液処理：NCM を取り出し、軽くブロッキング液を切った後、ポリ袋の端に入れて、抗体液を NCM 1 シートにつき、1.2ml 入れます。その後、気泡を袋から出して、ポリシーラー機で完全にシールして密封します。さらに指で袋の上をなでて、抗体液を NCM になじませます。袋は冷蔵庫で 1 晩から 2 日間おきます。



NCM を袋の端に入れ、
抗体液を入れる



完全にシールをして密封

- ③ NCM 洗浄：袋から取り出した NCM を、プラスチックケースに入れ、TBST 緩衝液を 20ml 加えます。振とう機（スピード約 70 min^{-1} ）で 5 分間振とうし、抗体液を洗浄します。さらに TBST 緩衝液を交換して 5 分間振とう洗浄を 2 回繰り返します（合計 3 回洗浄します）。

- ④発色液処理：TBST 緩衝液を捨て、AP9.5 緩衝液 20ml を加えて、5 分間振とうします。その後、緩衝液を捨てて完全に乾かさないうちに余分な液体をろ紙等で吸い取り、発色液を NCM に全量滴下して、10～20 分程度反応させます。
- ⑤反応停止：蒸留水で洗浄して反応を止めます。
- ⑥結果の判定：紫色に発色した試料を陽性（ウイルス感染株）、発色がない試料を陰性と判定します（写真 1）。

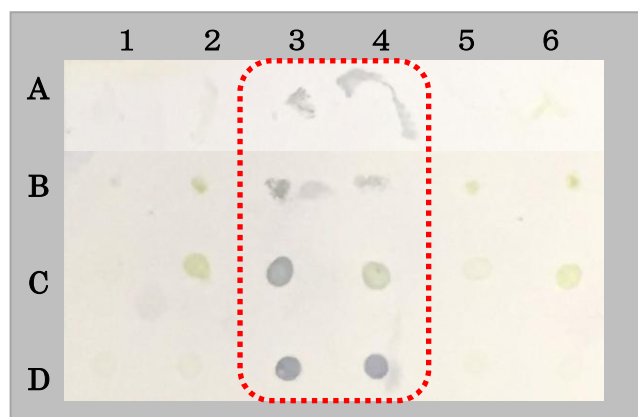


写真 1 ウイルス検出例

- ・ウイルス感染個体は紫色に発色（赤枠部分）
- ・NCM への試料の滴下方法は下記のとおり
- A：葉の切断面を直接 NCM ヘスタンプ
- B：葉を刺した後のつまようじの先を NCM ヘスタンプ
- C：ビニル袋に葉切片と緩衝液を入れて、袋の上から手でつぶし、磨砕液 2 μ l をスポット
- D：葉切片を 10 倍量の緩衝液で磨砕、遠心分離後の上澄液を 2 μ l スポット

3) ウイルス検定に要するコスト

NCM1 枚あたり（約 100 検体）約 2,800 円
 （※検定に要する試薬等コストであり、機器類は含まれていない）

3 留意点など

- 抗血清による診断には、技術習得のために 2 日程度必要となります。
- ニンニク植物体中でのウイルス濃度は、生育時期や葉位によって異なります。本試験では 4 月と 12 月に採取した葉で検定を行っていますが、その他の時期や部位での検出については検討が必要です。
- 本法によってウイルス陽性と判定された個体については、発色の程度にかかわらず早急に処分する必要があります。
- 検定の対象とするウイルスは LYSV であり、OYDV や *Allexivirus* 感染を検定することはできません。

[その他]

研究課題名：ニンニク優良種球採種のためのウイルス検定方法の確立と防除案の策定
 （提案型）

研究期間：平成 28 年度

共同研究者：上志比にんにく生産技術研究会

研究担当者：農業試験場 有機環境部 生産環境 G 福田明美・本多範行