

## 平成22年度 成績概要書

研究課題コード： 129201 (重点研究)

### 1. 研究成果

- 1) 研究成果名：ねぎ(千本ねぎ)のウイルスフリー苗生産のためのウイルス検査法  
(予算課題名：地域特産作物の安定生産を阻害する種苗伝染性ウイルスの検査技術の開発)
- 2) キーワード：ねぎ、エライザ法、ウイルス検査、SYSV
- 3) 成果の要約：株分けのねぎ(千本ねぎ)のネギ萎縮ウイルス(SYSV)の外被タンパク質遺伝子を大腸菌発現させて得た抗原を家兎に免疫して抗体を作製した。同抗体によるエライザ法は罹病葉から $10^2$ 倍希釈まで検出することが可能であった。現地ウイルスフリー苗生産ほ場においてエライザ法によるウイルス検査を行ったところ、有効性が実証された。

### 2. 研究機関名

- 1) 担当機関・部・グループ・担当者名：中央農試・病虫部・予察診断G 佐々木 純
- 2) 共同研究機関(協力機関)：JAびっふ町(上川農業改良普及センター本所)

3. 研究期間：平成20～22年度 (2008～2010年度)

### 4. 研究概要

- 1) 研究の背景 比布町、旭川市、愛別町では株分けのねぎが地域の特産作物として定着しているが、栄養繁殖性作物であるためネギ萎縮ウイルス(SYSV)による被害が発生し対応に苦慮している。
- 2) 研究の目的 大腸菌発現系で効率的にウイルス抗原を作製し、エライザ法に不可欠な抗体を作製する。これによりエライザ法を用いた種苗のウイルス検査法を確立する。

### 5. 研究方法

- 1) ウイルス抗体の作製とエライザ法の確立(中央農試)
  - ・ねらい SYSVの外被タンパク質(CP)領域の遺伝子を大腸菌発現ベクターに導入し、大腸菌内で大量発現させ抗原を得る。抗原を家兎に免疫して得た抗血清からエライザ法によりSYSVを検出する。
  - ・試験項目等 (1)ウイルス抗体の作製 (2)エライザ法によるSYSVの検出
- 2) 感染要因の解明(中央農試、JAびっふ町)
  - ・ねらい ウイルスフリー苗を現地ほ場に設置し、ウイルスの感染と発病の推移を調査する。
  - ・試験項目等 現地ほ場にウイルスフリー苗10株ずつを寒冷しゃ被覆(T-300テイジンテトロン)および露地で設置し、サンプルを1ヶ月おきに採取してウイルスを検出した。
- 3) 現地におけるウイルスフリー苗検査実証試験(JAびっふ町、中央農試)
  - ・ねらい 現地ウイルスフリー苗生産ほ場においてSYSVのウイルス検査について検討する。
  - ・試験項目等 現地ウイルスフリー苗生産ほ場(ハウス4棟)のエライザ検査を行う。
    - (1)維持ほ場(1棟990株)(10株を1サンプルとして)の全株検査
    - (2)増殖ほ場(3棟合計約3000株)同一株由来の全134集団をロット検査

### 6. 研究の成果

- 1) SYSV比布分離株のCPを大腸菌発現ベクター(pColId)に導入し、大量発現および精製を行ったところ、His<sub>6</sub>-Tag付加SYSV-CP発現タンパク質を得ることができた。
- 2) 発現タンパク質を抗原として、家兎に免疫を行ったところ60mlの抗血清を得た。
- 3) 抗血清を精製して得られたSYSV-CP抗体を用いて、SYSV罹病葉からの間接エライザ法(PTA法)による検出を試みたところ、病徴のある葉からは $10^3$ 倍希釈、無病徴の葉から $10^2$ 倍希釈まで検出することができた(表1)。検定部位には十分に展開した新葉の先端から10cm以上を切り取り、切り口側を適量切り取って用いる必要がある。
- 4) サンプルング時期について検討したところ、7月下旬から9月上旬までと考えられた。
- 5) 現地激発ほ場に露地で設置したウイルスフリー苗は定植約2ヶ月後には10株全てからウイルスが検出された。一方、寒冷しゃ被覆を行った株ではウイルス感染は抑制された。
- 6) 現地におけるウイルスフリー苗検査実証試験を行ったところ、維持ほ場の1検体が陽性と判定され、増殖ほ場は全て陰性であった(表2)。陽性株は生育期間中およびサンプルング時には病徴を確認できなかった。株ごとに再検定を行ったところ、1株のみウイルスが検出された。本方法は現地ウイルスフリー苗ほ場のサンプルを用いたウイルス検査でも有効であった。本検査のマニュアルと利用場面を図1および図2に示した。

#### \*用語解説

- ・間接エライザ法・・・抗原抗体反応を利用し発色させる検定法。抗原と結合した抗体を2次抗体で標識し、間接的に検出する。
- ・外被タンパク質・・・ウイルス粒子の外側を覆うタンパク質で、抗体を作製する場合は同タンパク質が抗原と認識される。

<具体的データ>

表1 SYSV-CP由来抗体によるねぎ（千本ねぎ）の部位別のSYSV検出限界

部位 <sup>a)</sup>	希釈検出限界
葉（先端） （病徴有）	10 <sup>2</sup>
	10 <sup>3</sup>
	10 <sup>2</sup> ~10 <sup>3</sup>
葉（中間） （病徴無）	10
	10 <sup>2</sup>
	10 <sup>2</sup>
葉（鞘ぎわ） （葉鞘）	10 <sup>2</sup>
	10 <sup>2</sup>
下位葉 （黄化・先端枯死）	ND <sup>b)</sup> ~10
根	10 <sup>2</sup>
茎盤	10

a) 葉（約30cm）を10cmごとに3分割

b) ND：不検出

- ① 十分に展開した葉を先端から約10cmの部分を実験
- ② 切り口側約1cm片（約0.1g）切り取る（最大10サンプルまで混和可）
- ③ ユニパック内で10倍量のコーティングバッファーで磨砕し、各ウエルに200μl分注
- ④ マイクロプレートを冷蔵で一晩静置
- ⑤ PBS-Tで5回洗浄
- ⑥ SYSV抗体（2μg/ml）を各ウエルに200μl分注 37℃3h静置
- ⑦ PBS-Tで5回洗浄
- ⑧ 2次抗体（抗ウサギIgG-ヒツジ抗体-AP）3000倍希釈液を各ウエルに200μl分注し、37℃3h静置
- ⑨ PBS-Tで5回洗浄
- ⑩ 基質溶液を250μl分注 1h後に吸光値（405nm）を測定（検査時期 7月下旬~9月上旬まで）

表2 エライザ検査の実証試験（平成22年）

	検査株数	エライザ	
		検定数	陽性数
維持ほ場 <sup>a)</sup>	990	99 <sup>b)</sup>	1
増殖ほ場 <sup>a)</sup>	402	134 <sup>c)</sup>	0

a) JA ウイルスフリー苗維持・増殖圃場

b) 10株分を混ぜて1サンプルとして検定

c) 1集団（20~30株）から3株サンプリングし1サンプルとして検定

図1 ねぎ（千本ねぎ）のエライザ検査マニュアル

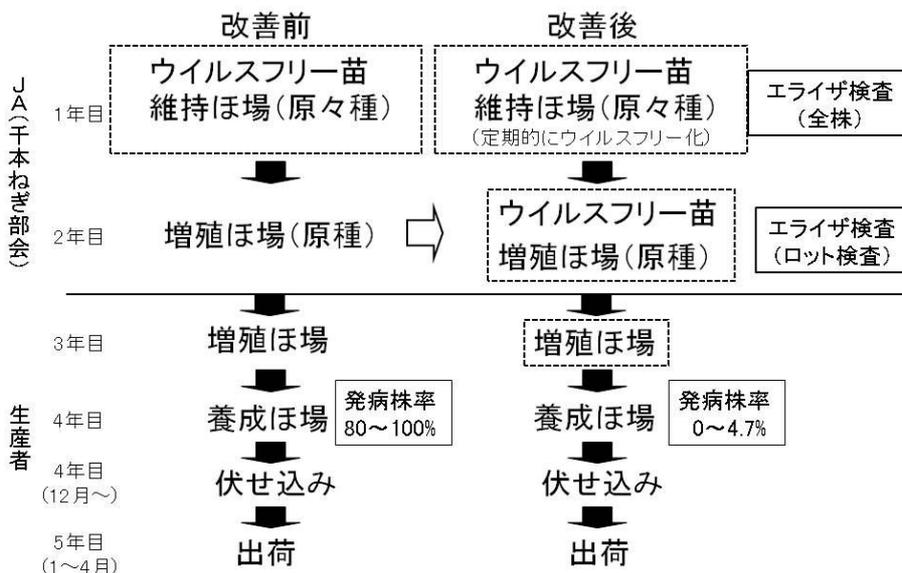


図2 種苗生産の改善と本試験で得られたウイルス検査法の利用場面

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) ねぎ（千本ねぎ）のSYSVに対するエライザ法はウイルスフリー苗生産において、ウイルス検査法として活用する。
- (2) 本試験で作製したSYSVのエライザ用抗体は道総研中央農業試験場における「エライザ検定用抗体キットの管理および提供要領」に基づき、配布可能である。

2) 残された問題とその対応