

## ●重点研究

## 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

平成20～22年（3年間）

中央農業試験場

共同（協力）機関 JAびっぴ町（上川農業改良普及センター本所）

## Abstract 概要

上川管内中央部では株分けのねぎ（千本ねぎ）が地域の特産作物として定着しています。しかし、ネギ萎縮ウイルス（SYSV）による萎縮病が発生して大きな問題となっています。株分けのねぎは栄養繁殖で増殖させるため、ウイルスが一度生産体系に蔓延してしまうと除去することは困難で、現地では対応に苦慮しています。生産体系からウイルスを除去する最も有効な対策はウイルスフリー苗の利用です。そこで、ウイルスフリー苗生産を行うため、苗のウイルス検査に不可欠なエライザ検査キットを開発し、生産現場におけるウイルス検査の実証試験を行いました。まず、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ました。本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す。サンプリング時期は7月下旬から9月上旬まで、検定部位は十分に展開した新葉の先端から10cm以上を切り取り、切り口側を用います。現地ウイルスフリー苗生産ほ場において本法によるウイルス検査を行ったところ、外観症状では確認できなかったウイルス罹病株を検出できました。

## Results 成果

## 1 ネギ萎縮ウイルス（SYSV）による被害



図-1 SYSVによる黄化症状



図-2 SYSVによる萎縮症状

## 2 SYSV検査キットの開発

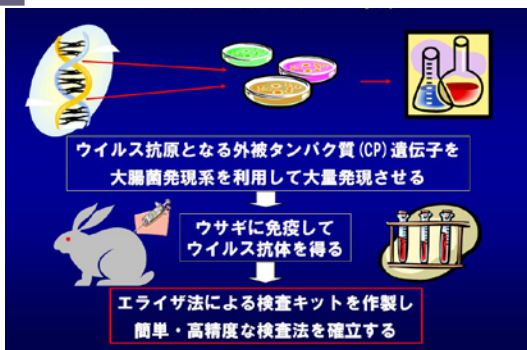


図-3 大腸菌発現系を利用したエライザ検査キット開発の流れ

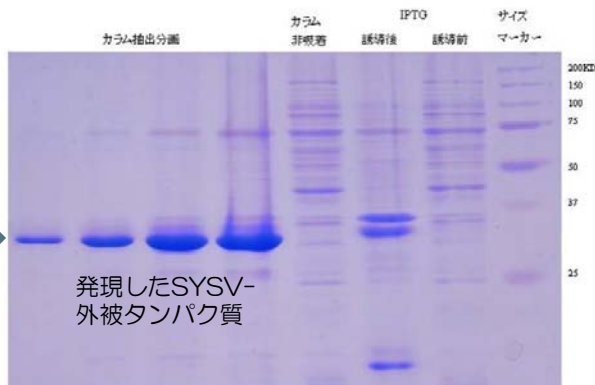


図-4 大腸菌発現系によるウイルスタンパク質の発現

Results 成果

3 ねぎ（千本ねぎ）のエライザ検査マニュアル

①	十分に展開した葉を先端から約10cmの部分をサンプリング
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（2 μg/ml）を各ウエルに200 μl分注。
⑦	PBS-Tで5回洗浄
⑧	2次抗体（抗ウサギIgG-ヒツジ抗体-AP）3,000倍希釈液を各ウエルに200 μl分注。37℃3時間静置
⑨	PBS-Tで5回洗浄
⑩	基質溶液を250 μl分注。1時間後に吸光度（405nm）を測定する（検査時期 7月下旬～9月上旬まで）

図-5 ねぎ（千本ねぎ）のエライザ検査マニュアル



図-6 エライザ検査による陽性サンプルの発色

4 ウイルスフリー苗生産ほ場におけるウイルス検査の実証



図-7 ねぎ（千本ねぎ）のウイルスフリー苗生産ほ場



図-8 JAびっぴ町によるウイルス検査

表-1 ウイルス検査実証試験（2010）

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

a) JAびっぴ町千本ネギ部会ウイルスフリー苗生産ほ場

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

Activities 業績

【研究成果入手先】

道総研農業研究本部の「農業技術情報広場」で、本成果に関する概要（pdf）を公開。

<http://www.agri.hro.or.jp/center/kenkyuseika/iippan23.html>

Dissemination 普及

■JAびっぴ町千本ネギ生産部会においてウイルスフリー苗生産のための、ウイルス検査法として導入されました。

Contact 問い合わせ

農業研究本部 中央農業試験場

病虫部 予防診断グループ

【電話】 0123-89-2001（代表）

【メール】 central-agri@hro.or.jp

【ウェブ】

<http://www.agri.hro.or.jp/center/index.html>