

令和4年度 成績概要書

課題コード（研究区分）： 2102-124411（重点研究）

1. 研究課題名と成果の要約

- 1) 研究成果名：にんにくの新規ウイルス検査法（FDA法）によるウイルスフリー種苗管理技術（研究課題名：新規ウイルス検査法を導入した道産にんにくのウイルスフリー種苗管理技術）
- 2) キーワード：にんにく、ウイルス、FDA法、防虫ネット
- 3) 成果の要約：FDA法は道内に発生する重要なにんにくのウイルス2種と1属を高感度・短時間で同時検出することが可能であり、種苗の検査に活用することでウイルスフリー種苗の供給が可能となる。また、防虫ネットによる被覆栽培は、種苗の増殖過程におけるアブラムシ媒介性ウイルスの再感染対策として効果が高い。

2. 研究機関名

- 1) 代表機関・部・グループ・役職・担当者名：花・野菜技術センター・研究部・生産技術グループ・主査・佐々木 純
- 2) 共同研究機関（協力機関）：上川農業試験場・研究部・生産技術グループ、北海道大学、ホクサン（株）（空知農業改良普及センター中空知支所（以下「農業改良普及センター」は略）、同南東部支所、石狩本所、後志北後志支所、胆振本所、檜山本所、上川富良野支所、網走本所、十勝北部支所、十勝西部支所、農業試験場駐在技術普及室（花野セ・上川・農研本部・道南・十勝・北見）、（一社）フード特区機構）

3. 研究期間：令和元～3年度（2019～2021年度）

4. 研究概要

1) 研究の背景

北海道のにんにく栽培は輸入量の減少と国内需要の増加から生産増加に向けた動きが強まっている。しかし、道内では自家種苗による生産のため、種々のウイルスに感染しており、生産拡大の阻害要因となっている。その対策にはウイルスフリー種苗利用が最も効果的で、ウイルスフリーをチェックするための高精度なウイルス検査法やウイルスフリー種苗の再感染回避技術の確立が不可欠である。

2) 研究の目的

ウイルスフリー種苗の増殖体制の構築に不可欠なウイルス検査法と再感染回避技術を確立する。

5. 研究内容

1) にんにくのウイルス発生実態調査（R1～R2年度）

- ・ねらい：道内のにんにく生産地におけるウイルスと媒介虫の発生実態を明らかにし、FITC Detection before Array (FDA) 法用プライマー設計のため、得られたウイルス遺伝子の配列解析を行う。
- ・試験項目等：各地のにんにくについて発病調査を行い、確認したウイルス遺伝子の系統解析を行う。また、現地における媒介虫（アブラムシ・チューリップサビダニ）の発生について調査を行う。

2) 高精度かつ迅速なウイルス検査法の開発と実用化（R1～R3年度）

- ・ねらい：にんにくに感染する複数のウイルスを高感度で同時かつ迅速に検出可能なFDA法を開発する。さらに同時に検出可能な時期・サンプル部位を明らかにする。
- ・試験項目等：FDA法用増幅プライマー、アレイ搭載用DNA等を検討し、FDA法のキットを開発する。FDA法と、既報のRT-PCR法について比較検討する。

3) 効率的なウイルスフリー種苗生産のためのウイルス再感染回避技術の確立（R1～R3年度）

- ・ねらい：媒介虫によるウイルスの再感染を防止する技術を確立する。
- ・試験項目等：黄色水盤などによる媒介虫（アブラムシ・チューリップサビダニ）の発生調査、媒介虫の発生推移調査、防虫ネットによる隔離時期と各ウイルスの感染状況調査、収量等。

6. 研究成果

1) 道内のにんにくの主要栽培地（17市町村、のべ54圃場）では、概ね全ての圃場でウイルスによる全面的なモザイク等の症状の発生が認められ、確認されたウイルスはアブラムシ媒介の既知のリーキ黄色条斑ウイルス（LYSV）とタマネギ萎縮ウイルス（OYDV）に加え、チューリップサビダニ媒介の道内未確認であるallexivirusであった（表1）。以上の2種と1属のウイルスが道内のにんにく栽培において重要と考えられた。道内未確認であるチューリップサビダニについては、その発生を確認できなかったが、今後も同害虫が寄生した種苗の移入等により侵入するリスクは高く、警戒が必要と考えられた。

2) LYSV、OYDV、allexivirusの同時検出可能なFDA法による2種と1属の同時検出法を確立した。その検出感度は、一次判定では抽出RNAの $10^2 \sim 10^3$ 希釈まで検出可能で、二次判定ではさらに10倍感度が高い。RT-PCR法に比較すると、LYSVとOYDVについては10倍 $\sim 10^3$ 倍程度高く、allexivirusは同等であった。RNA抽出を含む判定時間は3～4時間（一次判定）から最長24時間（二次判定を含む）と短い（図1）。FITC法による一次判定で擬陽性の場合は、二次判定を実施する。一次判定までは持ち運び可能なPCR機器の導入により自動車内での野外診断も可能である。一次判定キット（抽出用カラム・試薬とFITC-RT-PCR試薬）のコストは1点約500円（実費）と安価である。本方法の検出時期は5月（生育期）が適し、7月（収穫期）は感度が低い。サンプリングは、最上位展開葉の一枚下の葉が比較的感度が高く、他の葉位や培養苗からの検出も可能である。

3) 防虫ネット（目合0.8mm）の融雪後からの被覆処理は、農繁期後の6月初めからの被覆よりもウイルス感染率を低く抑制し、無被覆と比較すると86%以上ウイルス感染率を低下させた（図2）。防虫ネットによる被覆栽培は、アブラムシ媒介性ウイルスの再感染対策として効果が高い。また、有翅アブラムシの飛来は5月下旬から11月上旬まで見られ、10～11月に設置したウイルスフリー株のトラップでウイルス感染が認められたことから（データ略）、秋に萌芽するホワイト種では、播種後から11月上旬頃まで防虫ネットによる被覆（降雪前に撤去）する必要があると考えられた。

4) 本成果の導入によるウイルスフリー種苗を使用することで一球重は5割増となることから、飛躍的な収量性向上が見込まれ(図3)、ピンク種では種苗として利用可能な総苞重の増加も期待できる(感染株比139%(R2年):データ略)。

<具体的データ>

表1 道内主産地のにんにく圃場サンプルからのLYSV、OYDV、allexivirusの検出

地域名	サンプル数	検出ウイルス		
		LYSV	OYDV	allexivirus
空知	9	8	1	3
石狩	4	2	1	3
後志	9	9	8	0
胆振	3	2	1	0
檜山	5	5	0	1
上川	7	6	2	2
オホーツク	14	11	7	7
十勝	14	7	7	2
合計	65	50	27	18

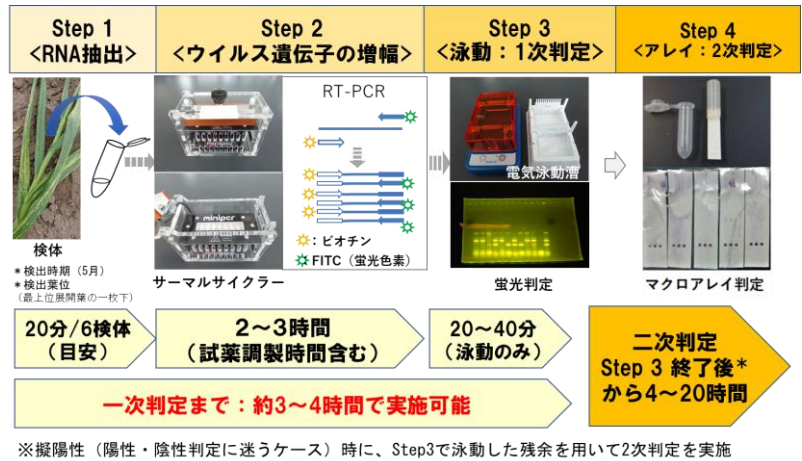
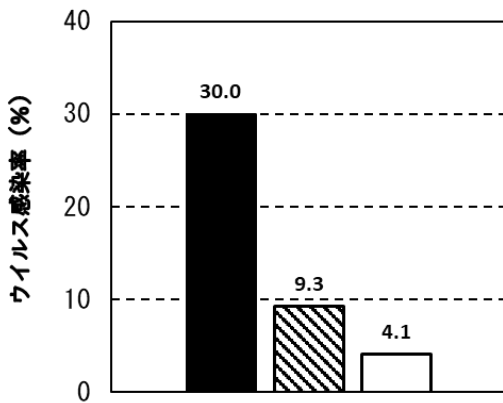


図1 FITC Detection before Array (FDA) 法による診断(診断フローと作業時間)



■無被覆 □被覆(6/1~) □被覆(融雪後4/6~)



LYSV感染株
平均一球重68.0g、球径6.4cm
(推定収量*: 952kg/10a)

ウイルスフリー株
平均一球重100.9g、球径7.3cm
(推定収量*: 1413kg/10a)

*10a当たり14000株として推定

図2 防虫ネット(目合0.8mm)被覆によるウイルス(LYSV、OYDV)の再感染回避効果(ホワイト種: R3年)

図3 にんにくのウイルスフリー化による増収効果(ピンク種: R2年)

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

(1) FDA法は、にんにくのウイルスフリー化事業者および種苗生産団体(JA・農業生産法人)によるウイルスフリー種苗のウイルス検査に活用する。

一次判定用キットはホクサン(株)より販売予定である。二次判定用マクロアレイはホクサン(株)より受注生産、もしくは同社による二次判定の受託診断を実施する予定である。

(2) 防虫ネットによる被覆栽培は、目合いが0.8mm目の防虫ネットを使用し、種苗生産団体(JA・農業生産法人)によるウイルスフリー種苗の生産および生産者による種苗の増殖にウイルス再感染対策として活用する。

2) 残された問題とその対応

8. 研究成果の発表等

- 1) にんにくセミナー (花・野菜技術センター 令和3年WEB開催)
- 2) Sasaki, J. et al. (2022) The Plant Pathology Journal Vol.38 p383-394
- 3) Jayasinghe, W. H. et al. (2021) Journal of General Plant Pathology Vol.87 p178-183
- 4) 佐々木大介ら(2021) 北日本病害虫研究会報 第72号 p125-129

【用語解説】

・FITC Detection before Array (FDA) 法:

蛍光標識(FITC)プライマーとマクロアレイ用ビオチン標識プライマーにより、RT-PCR法で得た増幅産物を電気泳動で蛍光により一次判定、擬陽性(泳動像が不鮮明など陽性・陰性の判定に迷うケース)の場合には、残りの増幅産物をマクロアレイでビオチン標識により二次判定を実施する。

- ・ホワイト種: 福地ホワイト系など。秋に播種後、萌芽・生育した状態で越冬。珠芽は利用しない。
- ・ピンク種: 北海道在来系。秋に播種、越冬後に萌芽。総苞内の珠芽は一部で種苗に利用されている。