

平成23年度 成績概要書

研究課題コード： 2106-129201 (重点研究)

1. 研究成果

- 1) **研究成果名**：食用ゆりのウイルスフリー種苗生産のためのユリモットルウイルス（花ゆり系）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**：食用ゆり、エライザ法、ウイルス検査、LMoV（花ゆり系）、LMoV（食用ゆり系）
- 3) **成果の要約**：ユリモットルウイルス（LMoV）（花ゆり系）の大腸菌発現外被タンパク質を免疫して抗体を作製した。同抗体によるエライザ法は食用ゆりの LMoV（花ゆり系）罹病葉から 10^2 倍希釈まで検出でき、検査に最適な採取時期と部位は萌芽6週目の中位葉であった。本法の実用性をウイルスフリー種苗生産現場において確認した。

2. 研究機関名

- 1) **担当機関・部・グループ・担当者名**：中央農試・病虫害部・予察診断G 佐々木 純
- 2) **共同研究機関（協力機関）**：ホクレン農業協同組合連合会

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** 食用ゆりは全国生産量の約99%が北海道で生産される地域特産作物で、その生産額は約12億円と推定される重要品目である。現在、道内で行われているウイルスフリー種苗生産では、既存の抗体で検出困難なユリモットルウイルス（LMoV）（花ゆり系）の対応に苦慮している。
- 2) **研究の目的** LMoV（花ゆり系）の抗体を作製し、エライザ法を用いた食用ゆり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 LMoV（花ゆり系）抗体を作製し、エライザ法を確立する。
 - ・試験項目等 (1) LMoV（花ゆり系）抗体の作製
(2) エライザ法による LMoV（花ゆり系）の検出
- 2) **現地におけるウイルスフリー種苗検査実証試験（ホクレン）**
 - ・ねらい 現地ウイルスフリー種苗生産ほ場において LMoV（花ゆり系）のウイルス検査の実用性について検討する。
 - ・試験項目等 現地ウイルスフリー種苗生産ほ場（原々種および原種ほ）において葉を採取しエライザ検査を行う。

6. 研究の成果

- 1) LMoV（食用ゆり系）抗体に反応の低い LMoV（花ゆり系）は CP 領域アミノ酸配列の 9.1%が異なっていた。LMoV（花ゆり系）はモモアカアブラムシ伝搬試験で食用ゆりに感染した。
- 2) LMoV（花ゆり系）CP 領域の大腸菌発現タンパク質を抗原として家兎に免疫し、LMoV（花ゆり系）抗体を作製した。
- 3) 直接エライザ法（DAS-ELISA 法）による LMoV 検出を試みたところ、花ゆり系罹病葉については LMoV（花ゆり系）抗体は生体重の 10^2 倍希釈まで検出することができたが、食用ゆり系抗体は 10 倍希釈までしか検出できなかった。一方、食用ゆり系罹病葉については、花ゆり系抗体は 10 倍希釈までしか検出できず、食用ゆり系抗体では 10^3 倍希釈まで検出できた。
- 4) 花ゆり系と食用ゆり系の抗体を混合したエライザ法により罹病葉からの検出を試みたところ、両系統共に生体重の 10^2 倍希釈まで検出することができた（図1）。
- 5) 花ゆり系に罹病した食用ゆりのサンプリング時期および部位別による検出限界について検討したところ、萌芽6週間後の中位葉で 10^2 倍希釈まで検出することができた（表1）。萌芽6週間後の中位葉をサンプリングすることで、他の食用ゆりに感染する4種のウイルス（食用ゆり系、PIAMV、LSV、CMV）と同時にウイルス検査が可能となる。萌芽2週間後においても上位葉では 10 倍希釈まで検出できたが、その検出感度は萌芽6週間後に劣った。LMoV（花ゆり系）および（食用ゆり系）共に対応可能な検査法のマニュアルを図2に示した。
- 6) ウイルスフリー種苗生産ほ場において、花ゆり系と食用ゆり系抗体の混合による LMoV 検査を既存の検査に組み込み、その実用性について検討を行った。サンプリングやエライザ検査については、これまで行っているウイルス検査法と同じであり作業上の問題は認められなかった。原々種、原種ほ場のサンプルは、外観による症状は認められず、LMoV は検出されなかった。
- 7) 道内のモザイク症状を示した花ゆり「カサブランカ」13株についてエライザ法による検出を行ったところ、食用ゆり系抗体では4株のみ陽性であったのに対し、花ゆり系抗体ではいずれも陽性となった。花ゆり系抗体は、花ゆりのウイルス診断にも利用可能であった。

*用語解説

- ・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。
- ・直接エライザ法・・・抗原抗体反応を利用し発色させる検定法。標識酵素と結合した抗体で抗原を直接的に検出する。

<具体的データ>

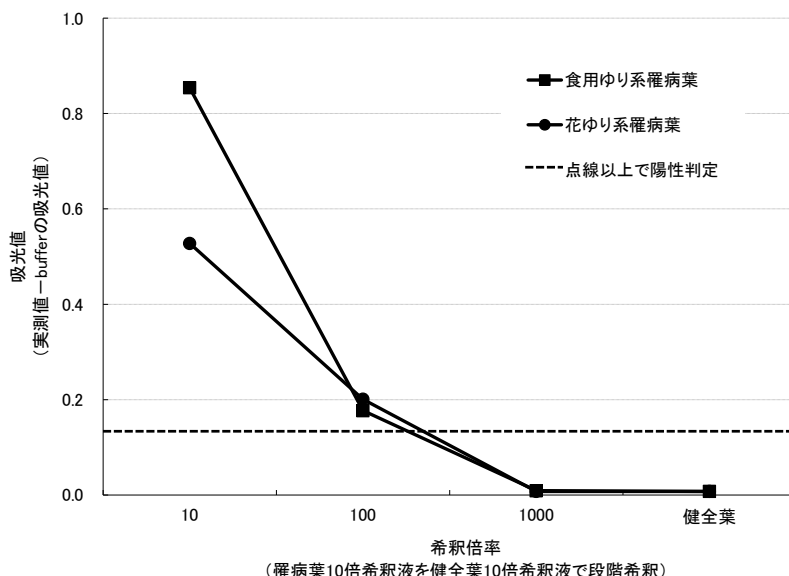


図1 LMoV (花ゆり系) 抗体と LMoV (食用ゆり系) 抗体の混合による LMoV の検出

表1 食用ゆり (萌芽6週間後) からの LMoV (花ゆり系) の エライザ法 (花ゆり系と食用ゆり系抗体の混合) による検出

希釈倍率	サンプル1						サンプル2					
	上位葉		中位葉		下位葉		上位葉		中位葉		下位葉	
	吸光値 ^{a)}	判定 ^{b)}	吸光値	判定	吸光値	判定	吸光値	判定	吸光値	判定	吸光値	判定
10	0.285	+	0.409	+	0.327	+	0.321	+	0.493	+	0.151	+
100	0.070	-	0.144	+	0.109	±	0.061	-	0.145	+	0.029	-

a) 吸光値 = 実測値 - BUFFER の吸光値 (健全の吸光値 - 0.003) b) 吸光値 0.140 以上で陽性

- 1 コーティングバッファーに花ゆり系抗体を最終濃度 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、食用ゆり系抗体を同 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう加えて各ウエルに $200 \mu\text{L}$ 分注し、 37°C 3時間静置する。
- 2 静置終了後、マイクロプレートに PBS-T で 5回洗浄する。

- 1' 萌芽6週間後の中位葉にビニール袋をかぶせて、直接手で触らないように葉の付け根から切り取る。なお、萌芽2週間後に実施する場合には上位葉を用いる。コントロールとして罹病葉と健全葉を用意する。
- 2' 葉の付け根側の約 1cm 片 (約 0.1g) を切り取る (萌芽6週間後のサンプルは最大10個体まで混和可)。
- 3' 10 倍量の PBS-T・ 2% PVP液で磨砕する。

- ① 磨砕サンプルを各ウエルに $200 \mu\text{L}$ 加える。
- ② マイクロプレートに冷蔵 (4°C) で一晩静置する。
- ③ 静置終了後、マイクロプレートに PBS-T で 5回洗浄する。
- ④ コンジュゲート液 LMoV花ゆり系抗体-AP と食用ゆり系抗体-AP を PBS-T・PVP・スキムミルク溶液にそれぞれ最終濃度 1500 倍で加え、各ウエルに $200 \mu\text{L}$ 分注する。 37°C 3時間静置する。
- ⑤ 静置終了後、マイクロプレートに PBS-T で 5回洗浄する。
- ⑥ 基質溶液を $250 \mu\text{L}$ 分注する。
- ⑦ 1時間後に吸光値 (405nm) をプレートリーダーで測定するか、発色 (黄色) の有無を肉眼観察で判定する。

図2 食用ゆりの LMoV エライザ検査マニュアル

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) 本検査法は食用ゆりのウイルスフリー種苗生産における、ウイルス検査法として活用する。また、花ゆりのウイルス診断技術としても活用できる。
- (2) 本試験で作製した LMoV (花ゆり系) のエライザ用抗体は道総研中央農業試験場における「エライザ検定制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