

## 坊主不知ネギにおけるDIBA法を用いた ウイルス抵抗性系統の選抜

桑田 主税・深見 正信

キーワード：坊主不知ネギ、DIBA法、シャロット潜在ウイルス、ネギ萎縮ウイルス、抵抗性

### I 緒 言

不抽台性の根深ネギの坊主不知ネギは、抽台性根深ネギの端境期にあたる5～6月に出荷され、ネギの周年安定供給には欠くことができない。坊主不知ネギは、株分けによる栄養繁殖で増殖されるため、ウイルス感染による収量低下が問題となる。深見・石井(1991)は、東葛飾地域で栽培されている坊主不知ネギは、調査した27件のすべての圃場でウイルス感染がみられ、それらのほとんどがニンニク潜在ウイルス(GLV)及びネギ萎縮ウイルス(OYDV)の重複感染であることを明らかにした。石井ら(1990)は、茎頂培養によるウイルスフリー化により、1～3割の増収効果が期待できることを報告し、千葉県では1987年から坊主不知ネギのウイルスフリー苗の増殖配付事業を行っている。しかし、ウイルスフリー苗は、導入初期は増収効果が高いが、ウイルスの再感染により、数年で増収効果はなくなり、現地での普及が1～2割程度にとどまっているのが現状である。

こうした中で、ウイルス病に強い品種の育成が望まれており、桑田・成川(2001)は坊主不知ネギの主要系統の抽台促進条件を明らかにし、育種目標に合う組み合わせで効率的に交雑できる手法を確立した。ウイルス病に対する抵抗性は坊主不知ネギにおいても系統間差のあることが知られており、交雑育種によりウイルス病に強い新品種育成が可能である。ウイルス抵抗性系統を効率的に選抜するためには、ウイルス検定を精度高く、簡便に行うことが必要である。血清学的反応を利用したDIBA(Dot Immuno-Binding Assay)法は、簡便で検出感度の高いウイルス検定方法として、広く利用されている(日比, 1984; 深見・石井, 1991; 佐古, 1995)。

本研究では、坊主不知ネギの育種選抜にDIBA法を導入するため、検出感度、サンプルの採取部位について検討した。さらに、DIBA法により坊主不知ネギ交雑実生

間のウイルス感染状況を調べることで、ウイルス病に強い系統を選抜できたので報告する。なお、ニンニク潜在ウイルス(GLV)は、現在ではシャロット潜在ウイルス(SLV)として分類されており(日本病理学会植物ウイルス分類委員会, 2003)、本報告ではSLVとして表記する。

本研究のとりまとめに当たり、当センター松嶋一彦次長に御校閲を賜った。ここに記して深く感謝の意を表す。

### II 材料及び方法

DIBA法による発色反応は、日比(1984)の方法に準じて次のように行った。植物サンプル約30mgに10倍量の緩衝液TTBSを加えて、マイクロチューブホモジナイザーで磨砕した。10,000rpmで5分間遠心した後、上清液2μlをニトロセルロースシート(0.45μm, ADVANTEC社)にスポットした。シートをSLVとOYDVの一次抗体で1時間反応させ、TTBS液で洗浄後、二次抗体のアルカリホスファターゼ標識IgG抗体(BioSource社)で1時間反応させた。洗浄後、NBT/IBCPで反応させて、紫色着色の程度を4段階で評価した。病原ウイルスの一次抗体は深見(1991)が作製したものを、濃度は、SLVが154ng/ml、OYDVが59ng/mlとした。

#### 1. 試験1：DIBA法と生物検定法のウイルス検出感度の比較

坊主不知ネギの植物サンプルとして、感染株には在来ウイルス感染株を、健全株には茎頂培養に由来する「向小金系」のウイルスフリー苗の基株を供試した。2002年11月27日に3個体の感染株から新葉の葉身を採取し、個体ごとに磨砕液(サンプルを10倍量の緩衝液で磨砕した10倍希釈液)を作製して、DIBA法と生物検定法でウイルス検出感度を比較した。試験区は、感染株磨砕液100%、健全株磨砕液に感染株磨砕液を10%混合した汁液(以下、感染株10%混合汁液)、同様に、1%混合汁

液、0.1%混合汁液、0.01%混合汁液及び健全株磨砕液100%の計6水準とした。混合汁液は、感染株磨砕液を健全株磨砕液で10倍ずつ段階的に希釈して作製した。

生物検定法では、検定植物に*Chenopodium quinoa*と*Chenopodium amaranticolor*を供した。緩衝液に0.1M磷酸緩衝液を用いて、上記試験区の通り混合した汁液を検定植物に2葉ずつ接種した。12月13日に局部病斑を4段階に区分して判定した。

## 2. 試験2：ネギにおけるサンプルの採取部位と検出感度

試験1と同じ感染株を用いて、部位別にDIBA法で検定を行った。部位は、新葉・葉身先端部、新葉・葉鞘部、古葉・葉身先端部、古葉・分岐部、古葉・葉鞘部、葉鞘内部の新芽、盤茎、根の8部位とした。2003年1月30日

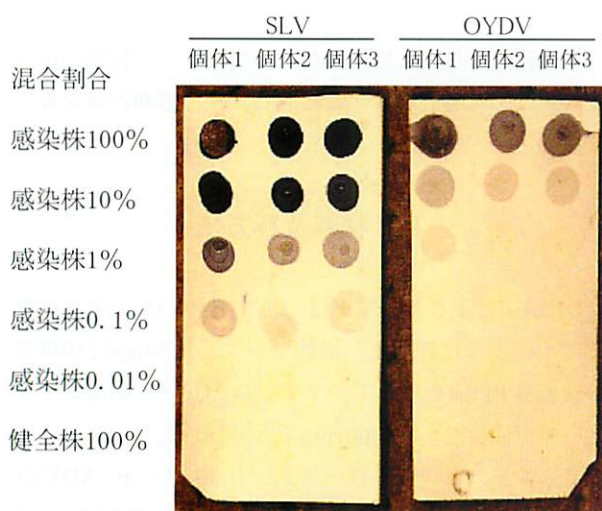


写真1 DIBA法のウイルス検出感度

注) 混合は感染株磨砕液を健全株磨砕液で10倍ずつ段階希釈して行った

に各部位を採取し、検定に供した。反復調査は行わなかった。

## 3. 試験3：育種選抜実生系統のウイルス感染状況

1998年5月交雑、同年7月に播種し、選抜を重ねてきた実生系統の「98YE16」、「98YE38」、「98-53E4」、「98-53E10」、「98-53E12」、「98JE110」、「98JE24」と農総研育成品種「夏婦人」の保存原種系統を供試して、2002年8月1日に新葉を採取し、DIBA法による検定を行った。調査株数は1系統12株とし、各株別にウイルスの検出を行った。なお、実生系統は、1998年の播種・定植から2002年まで、ウイルス感染している他の在来系統と同一圃場で栽培されており、毎年5月と9月に移植を繰り返していた。

## III 結 果

### 1. 試験1：DIBA法と生物検定法のウイルス検出感度の比較

DIBA法と生物検定法のウイルス検出感度を写真1と第1表に示した。SLVを*C.quinoa*、*C.amaranticolor*に接種した場合は感染株を1%以上混合した汁液で病徴を示したのに対して、DIBA法でのSLVは0.1%混合汁液でも着色反応が認められ、検定植物よりも検出感度が高かった。また、DIBA法では3個体間で検出感度のばらつきが小さかった。

OYDVの場合は、検定植物に本来病徴を示さないが、DIBA法では感染株の10%混合汁液まで明瞭な着色反応がみられ、個体1では1%混合汁液でも着色反応が確認できた。

第1表 DIBA法と生物検定法のウイルス検出感度の比較

混合割合	DIBA法			DIBA法			生物検定法					
	SLV			OYDV			<i>C.quinoa</i>			<i>C.amaranticolor</i>		
	個体1	個体2	個体3	個体1	個体2	個体3	個体1	個体2	個体3	個体1	個体2	個体3
感染株100%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+	++
感染株10%	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	+++
感染株1%	++	++	+++	+	-	-	+	++	++	+	-	+
感染株0.1%	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
感染株0.01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
健全株100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注1) 混合は感染株磨砕液を健全株磨砕液で10倍ずつ段階希釈して行った

2) 判定は、-；反応なし、+；輪郭のある軽い着色、++；着色、+++；激しい着色

3) DIBA法は11月27日に検定し、生物検定法は11月27日に接種し、12月13日に病斑を判定した

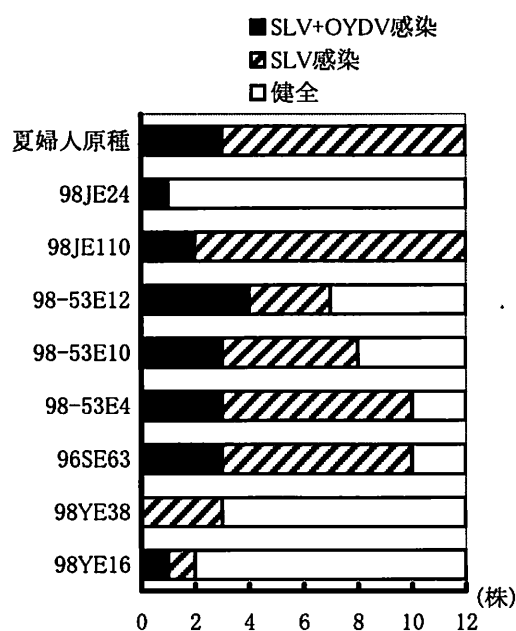
第2表 採取部位別のDIBA法によるウイルス検出感度

採取部位	SLV			OYDV		
	健全株	感染株	感染株10%	健全株	感染株	感染株10%
新葉・葉身先端部	-	+++	+++	-	+++	++
新葉・葉鞘部	-	++	+	-	-	-
古葉・葉身先端部	-	+++	+++	-	+++	++
古葉・分岐部	-	+++	++	-	+	-
古葉・葉鞘部	-	++	+	-	-	-
葉鞘内の新芽	-	++	+	-	-	-
盤茎	-	++	+	-	-	-
根	-	++	+	-	-	-

注1) 感染株10%は、感染株磨砕液を健全株磨砕液に10%混合した

2) 判定は、-；反応なし、+；輪郭のある軽い着色、++；着色、+++；激しい着色

3) 1月30日にサンプリングして検定した



第1図 実生選抜系統のウイルス感染状況

注) 2002年8月に露地栽培株をDIBA法で検定

## 2. 試験2：ネギにおけるサンプルの採取部位と検出感度

採取部位の違いによるDIBA法の検出感度を第2表に示した。SLVでは新葉・葉身先端部と古葉・葉身先端部で最も濃い発色反応を示し、次に古葉・分岐部で濃く、それ以外の組織では発色はやや薄かった。古葉の部位で比較すると、葉身先端部>分岐部>葉鞘部の順で濃かった。

OYDVでは、新葉・葉身先端部と古葉・葉身先端部で濃い発色を示し、古葉・分岐部でわずかな発色を示した。それ以外の部位での発色は認められなかった。

## 3. 試験3：育種選抜実生系統のウイルス感染状況

育種選抜系統のウイルス感染状況を第1図に示した。ウイルスの感染は、すべての系統でみられたが、明瞭な系統間差が認められた。各系統12株調査したところ、「98JE24」、「98YE16」、「98YE38」でウイルス感染株がそれぞれ1株、2株、3株であったのに対し、「98JE110」と「夏婦人原種」は全株がウイルス感染していた。OYDVは単独感染株が無く、すべてSLVとの重複感染であった。健全株は、網室に移植後、11月上旬にDIBA法及び生物検定法による再検定を行ったが、ウイルス感染は認められなかった。

## IV 考 察

坊主不知ネギにおけるDIBA法のウイルス検出感度は、生物検定法よりも高かった。SLVに病徴を示す、今回用いた検定植物の*C.quinoa*、*C.amaranticolor*は、ウイルス感染サンプルの1%混合汁液まで病徴を示したのに対し、SLVのDIBA法は0.1%混合汁液まで検出が可能であった。このことは、ラッキョウ葉において検定植物による方法よりもDIBA法の方が高精度でGLV (SLV) を検出できることを明らかにした佐古(1995)の報告と同様であった。深見(1991)はSLVのDIBA法での検出感度について感染葉の1,280倍希釈まで検出可能であったことを報告した。本試験では、磨砕液での10倍希釈を含めると、10,000倍希釈まで検出可能であり、感度はやや高かった。サンプリング時期や系統などにより植物体中のウイルス濃度は異なると考えられ、このことや抗体の力価が検出感度に影響したものと思われた。

OYDVは、今回の検定植物には病徴を示さず、ネギ類以外の検定植物は報告されていない(米山, 1984)。OYDVに感染したネギでは、5月に明瞭なカスリ症状を示すが、高温期には明瞭な病徴を示さないことも多い。今回の実験において、DIBA法によってウイルス感染サンプル1%混合汁液まで検出が可能であることが明らかとなった。深見(1991)はOYDVのDIBA法での検出感度について感染葉の1,600倍希釈まで検出可能であったことを報告した。本試験では、磨砕液での10倍希釈を含めると、1,000倍希釈まで検出可能であり、検出感度はほぼ一致した。以上のように、DIBA法はSLV及びOYDVのウイルス検定を高精度で行える方法であることが確認された。

次に、DIBA法を用いてサンプルの採取部位毎の発色反応を比較した結果、SLV、OYDVのいずれにおいても、葉の新旧を問わず、葉身の先端で最も明瞭な発色反応を示した。葉鞘部、葉鞘内新芽、盤茎、根での発色反応は不明瞭であった。古葉は同一の葉で部位毎にサンプリングしたが、同一の葉でも葉身先端部>分岐部>葉鞘部の順で発色が濃かった。DIBA法の発色反応は定量性が高く、ウイルス濃度が高いと、濃い発色を示すことから(日比, 1984)、葉身でのウイルス濃度は他の部位に比べて高いと考えられた。このことから、葉身の先端をサンプルに用いることで、精度が高いウイルス検定が可能であることが示された。

実生選抜系統のウイルス検定では、供試したすべての系統でウイルス感染が認められた。4年間にわたって、露地圃場で栽培しており、ウイルス感染株も混在して栽培したため、アブラムシによりウイルス感染したものと考えられる。しかし、その感染率には系統間差があり、8系統中5系統で50%以上の株がSLVに感染していたが、「98YE16」、「98JE24」、「98YE38」は25%以下と少なかった。OYDVの感染はSLVより少なかったが、「98YE38」を除いて感染が認められた。深見ら(1991)によると、ウイルスフリー株を現地農家で栽培した場合、1年で56%の株がいずれかのウイルスに再感染したことを報告している。また、佐古(1990)は、GLV(現SLV)及びOYDVに重複感染した坊主不知ネギに隣接して9月に定植した晩ネギにおいて、翌春にはGLV及びOYDVにそれぞれ17.2%、19.2%の株が感染したことを報告した。ウイルスの分布状況及びアブラムシの防除対策は各圃場により異なるものであり、単純に比較はできないが、4年間で25%以下の感染株率は明らかに低く、ウイルスに強い系統と考えられ、実用的に十分な抵抗性を有していると推察された。今後、ウイルスの人工接種試験や現地試験を行って、抵抗性の強度を検討していく必要がある

と思われた。

ウイルス感染の少なかった3系統の健全株を網室で栽培した後、再度ウイルスの検定を行った結果、ウイルスの感染は認められなかった。坊主不知ネギの育種において、一次選抜では数千系統を扱うために、育成が終了するまで網室内で平行して基核株を維持することは困難である。過去に育成した品種「五月姫」、「夏婦人」(町田, 2003)の親株は育成終了時点ですべてウイルスに感染しており、種苗増殖・配付にあたり、生長点培養によるウイルスフリー化を行った。大越ら(1987)は、生長点培養によるウイルスフリー化において葉身の淡黄化や突起などの変異が一部の個体で認められたことを報告している。このため、生長点培養後に特性検定及び生産力検定などの調査が必要であり、迅速な品種の普及において制限要因となっていた。今回のようにDIBA法で実生由来の健全株を早期に選抜できれば、その後網室内で維持増殖することで、生長点培養を経ないでウイルスフリー苗の増殖・配付が可能であることが示唆された。

DIBA法による検定作業は、100点程度の場合、サンプルを採取してから磨砕上清液をメンブレンにスポットするまでの作業は3~5時間、以後の発色反応は約3時間で行うことができ、非常に簡便である。高価な機械を必要とせず、検定にかかるランニングコストは1点当たり13円程度とコストパフォーマンスの優れた方法である。今回は露地圃場で栽培を続けた系統で選抜を試みたが、人為的なウイルス接種試験と組み合わせて、数百~千個体のスクリーニングを行うことで、高精度のウイルス抵抗性選抜を短期間に行うことができると思われた。

## 摘 要

育種選抜の効率化を図るために、ネギの主要ウイルスであるSLVとOYDVにおいて、血清学的反応を利用したDIBA法のウイルス検出感度を検討するとともに、坊主不知ネギ交雑実生系統のウイルス感染状況を調査した。

1. DIBA法と生物検定法のウイルス検出感度を比較した結果、DIBA法ではSLVにおいて感染株0.1%混合汁液でも着色反応が認められ、検定植物よりも検出感度が10倍高かった。OYDVにおいては、DIBA法では感染株の1%混合汁液まで着色反応が認められた。
2. 採取部位毎にDIBA法によってSLV、OYDVの検定を行ったところ、いずれのウイルスも、葉の新旧を問わず、葉身の先端部で最も濃い発色反応を示し、ウイルス検定の適部位であることが確認された。

3. 育種選抜実生系統8系統のウイルス感染状況をDIBA法で調査した結果、明瞭な系統間差が認められた。5系統で50%以上の株がSLVに感染していたが、「98YE16」、「98JE24」、「98YE38」は25%以下と少なく、これらの3系統はウイルスに強い系統であると考えられた。

### 引用文献

- 石井 勝・大越一雄・実川三郎 (1990). 「坊主不知」ネギの生長点培養によるウイルスフリー化とその実用性 (第2報) フリー化効果. 千葉原農研報. 12: 8-16.
- 深見正信 (1991). Dot-immunobinding assay法(DIA)によるネギ萎縮ウイルス(OYDV)、ニンニク潜在ウイルス(GLV)のネギからの検出. 関東東山病害虫研報. 38: 79-81.
- 深見正信・石井 勝 (1991). 坊主不知ネギにおけるニンニク潜在ウイルス (GLV) およびネギ萎縮ウイルス(OYDV)の発生とそれらの収量に及ぼす影響. 千葉農試研報. 32: 9-17.
- 日比忠明 (1984). DIBA法による植物ウイルスの検出法. 植物防疫. 38: 380-384.
- 桑田主税・成川 昇 (2001). 坊主不知ネギの交雑育種のための抽台促進法. 千葉農試研報. 42: 23-30.
- 町田剛史 (2003). 蔬菜の新品種-ネギ・ワケギ「夏婦人」、「五月姫」. 15: 160.
- 大越一雄・石井 勝・実川三郎 (1987). 「坊主不知」ネギの生長点培養によるウイルスフリー化とその実用性 (第1報) 培養方法及び変異発生の検討. 千葉原農研報. 9: 1-10.
- 佐古 勇 (1990). ネギにおけるニンニク潜在ウイルス (GLV) およびネギ萎縮ウイルス (OYDV) の発生と被害. 近畿中国農業研. 79: 16-20.
- 佐古 勇 (1995). ラッキョウウイルス病の病原ウイルスと発生生態に関する研究. 鳥取園試特報. 5: 1-130.
- 米山伸吾 (1985). 野菜のウイルス病-ネギ・タマネギに発生するウイルス病とその病原ウイルス (植物ウイルス研究所学友会編). 214-216. 養賢堂. 東京.

# Selection of Virus-resistance Variety on Bolting-less Type Welsh Onion “Bouzushirazu” Breeding Using Dot Immuno-Binding Assay

Chikara KUWATA, Masanobu FUKAMI

Key words : bolting-less type Welsh onion, dot immuno-binding assay, SLV, OYDV, resistance

## Summary

To make an efficient selection of virus resistant varieties of the bolting-less type Welsh onion “Bouzushirazu,” we evaluated the detection sensitivity of SLV and OYDV using dot immuno-binding assay and applied the assay to the selection of a Welsh onion variety.

In the detection of SLV, the dot immuno-binding assay was able to detect a positive stain reaction up to 0.1% mixture sap of the infected plant. It was ten times higher than that of the assay of the indicator plant. In the detection of OYDV, the dot immuno-binding assay was able to detect a positive reaction up to 10% mixture sap. Among the organs of the infected Welsh onion plant, the tip of leaf yielded the most clear stain reaction for both the viruses irrespective of the leaf age, and we concluded that it was a sensitive organ for the assay. We found out apparent differences between eight Welsh onion varieties for the assay of SLV and OYDV. In five varieties, more than 50% of the plants were infected with SLV. In the other three varieties, namely, “98YE16,” “98JE24,” and “98YE38,” less than 25% of the plants were infected with SLV. We concluded that these three varieties were resistant to both the viruses.