

事 項	にんにくのウイルスフリー苗生産のための大量検定法		
ね ら い	<p>にんにくに発生するウイルスは、リーキエローストライプウイルス (LYSV)、タマネギ萎縮ウイルス (OYDV)、シャロット潜在ウイルス (SLV)、ダニ伝搬性ウイルス4種 (GVA、GVB、GMbMV、GVD) の7種類であることが明らかとなった。これらを同時に検定できる抗血清を作製し、ティッシュプロット法によるウイルスフリー苗の簡便な大量検定法を確立したので普及に移す。</p>		
指 導 奨 励 内 容	<p>1 検定法の特徴</p> <p>(1) にんにくに発生する7種のひも状ウイルスを同時に検出できる。</p> <p>(2) にんにくの全生育期間の茎葉及び収穫後のりん片組織のいずれでもウイルス検定が可能である。</p> <p>(3) 従来のダイバ (DIBA) 法より、検出感度は高い。</p> <p>2 検定法</p> <p>(1) にんにくの葉またはりん片をカミソリで切断する。</p> <p>(2) 切断面をニトロセルロースメンブレン (NCMろ紙) に押し付けた後、NCMろ紙を風乾する。プラスチックケースにNCMろ紙を入れる。</p> <p>(3) 前洗浄液に浸し、10分間振とうする。</p> <p>(4) 前洗浄液を捨て、NCMろ紙を蒸留水ですすいで、液を捨てる。</p> <p>(5) ブロッキング液に浸し、15分間振とうする。</p> <p>(6) ブロッキング液を捨て、ウイルス抗血清希釈液に浸し、15～20分間振とうする。</p> <p>(7) NCMろ紙を蒸留水ですすいだ後、洗浄液を加えて5分間振とうする。洗浄液を交換し、5分間振とうを、さらに2回繰り返す。</p> <p>(8) 酵素標識抗体希釈液に浸し、15分間振とうする。</p> <p>(9) NCMろ紙を蒸留水で軽くすすいだ後、洗浄液を加えて5分間振とうする。洗浄液を交換し、5分間振とうを、さらに2回繰り返す。</p> <p>(10) 基礎用緩衝液に交換し、5分間振とうする。</p> <p>(11) 基質液を加え、発色させる。</p> <p>(12) ウイルス感染株は、断面全体または維管束部が発色する。</p> <p>3 検定上の留意事項</p> <p>(1) NCMろ紙は、直接手で触ってはならない。</p> <p>(2) ウイルス抗血清希釈液および酵素標識抗体希釈液は、再利用が可能である (酵素標識抗体希釈液は3週間位で新しいものと交換する)。</p>		
期待される効果	ウイルス感染株を植え付け前や萌芽直後に発見することにより、ウイルスフリー苗生産を継続できる。		
普及上の注意事項	<p>検定用のウイルス抗血清はグリーンバイオセンターで受注後配布するが、それ以外の試薬類は本法を利用する各機関で用意する。</p> <p>抗血清による診断には技術修得のため、数日の簡単な研修が必要である。</p>		
担 当	青森県グリーンバイオセンター 微生物工学研究部	対 象 地 域	県下全域
発 表 文 献 等	平成11年度 青森県グリーンバイオセンター試験成績書		

【根拠となった主要な試験結果】

表1 にんにくウイルスフリー用抗血清(VF99As)の
各種ウイルスへの反応
(平成11年 青森グリーンバイオ)

供 試 材 料	供 試 抗 血 清
	VF99As
LYSV	+
OYDV	+
SLV	+
GVA	+
GVB	+
GMbMV	+
GVD	+
健全葉	-

- 注1) +：明瞭な反応、-：反応しない
 2) 抗血清は健全成分吸収除去処理後、2000倍希釈で用いた。
 3) ティッシュプロット法で行った。

表2 にんにくウイルスフリー用抗血清(VF99As)の希釈条件 (平成11年 青森グリーンバイオ)

供 試 材 料	抗 血 清 の 希 釈 倍 数 (×)				
	1000	2000	3000	5000	8000
ウイルス混合感染葉	+	+	+	+	+
健 全 葉	(+)	(+)	(±)	-	-

- 注1) +：明瞭な反応、±：痕跡程度の反応、-：反応なし、()：非特異的反応
 2) 抗血清は健全成分で吸収除去処理しないで用いた。
 3) ティッシュプロット法で行った。

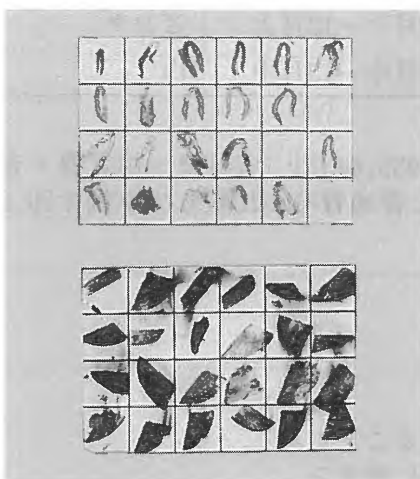


写真1 ティッシュプロット法による
ウイルス検定
(平成11年 青森グリーンバイオ)
注) 上：にんにく葉断面、下：りん片断面

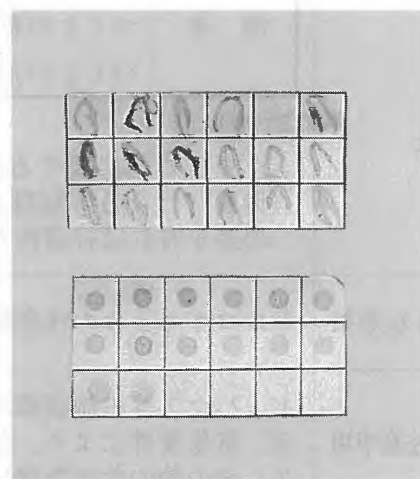


写真2 ティッシュプロット法とDIBA法の
ウイルス低濃度感染株の比較
(平成11年 青森グリーンバイオ)
注) 上：ティッシュプロット法
下：DIBA法 (従来法)