

系統保存ニンニク株に含まれる2種のウイルスのELISAによる検出

岩井 久・満嶋孝子・衛藤威臣*・荒井 啓

(植物病理学研究室・*蔬菜園芸学研究室)

平成元年8月1日 受理

Detection of Two Viruses from Garlic Clones by ELISA

Hisashi IWAI, Takako MITSUSHIMA,

Takeomi ETOH* and Kei ARAI

(Laboratory of Plant Pathology, *Laboratory of Vegetable Crops)

緒 言

鹿児島大学農学部蔬菜園芸学研究室では、種子繁殖型ニンニクの探索を目的として、原産地と思われる中央アジアや、地中海沿岸などからニンニクおよびその近縁種を採集し系統保存を行っている⁹⁻¹²⁾。

近年、この圃場でニンニクの葉にモザイク症状や、葉の捻れるものが多く観察されるようになり (Fig. 1, 2), 収量が低下してきた。極端な場合には、種球の確保が困難なものもでてきて、系統保存の難しい株が増えてきた。これら保存株の葉をDN法⁸⁾で電顕観察すると、ひも状で、長さ650~800nmで屈曲したものと屈曲の少ないすくなくとも2種類の粒子が認められる例が多かった (Fig. 3)。

ニンニクは栄養繁殖で継代するため、一旦病害に侵された株では、次代にもその病原が受け継がれる可能性が高く、ニンニクの育種や栽培を行う場合の問題点となっている。特に、ウイルスやマイコプラズマ様微生物 (MLO) の感染を受けると、球根の外観によって罹病状況を識別するのは極めて困難で、植え付けてから葉や花に症状が出現するまで感染の有無が判らない。また、ウイルス等が潜在感染している場合には汚染株を植え付けることになり、これらが年々収量が低下している一因にもなっている。また、これらの汚染株から他の株へと二次感染することも考えられ、保存中に株に感染しているウイルス等の存在を知ることは、重要なことと思われる。

さきに、荒井ら²⁾は本圃場内の奇形花を生ずるニ

ンニク株からMLOを見だし、本邦における初記載として報告した。しかし、多数の系統についてウイルス汚染状況の調査はまだ行われていない。そこで筆者らは、これら系統保存中の株に含まれるウイルスをELISA法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 酵素結合抗体法)⁶⁾によって調査した。

ニンニクの病原ウイルスとしてはニンニクモザイクウイルス (GMV)^{5,7,17,18,20,26-28)}、ニンニク潜在ウイルス (GLV)^{5,7,16,17,20)}、ネギ萎縮ウイルス (OYDV)^{4,5,15)}、タバコモザイクウイルス (TMV)¹⁹⁾等が知られているが、本実験ではGLVとOYDVに対する抗血清を用いて両ウイルスの検出を試みた。

材 料 と 方 法

1. 供試ニンニク系統の来歴ならびにニンニク近縁種

供試したニンニクの来歴とその系統数は、スペイン産 (20系統)、イタリア産 (19系統)、フランス産 (14系統)、ソ連 (モスクワ) 産 (13系統)、ソ連領中央アジア産 (34系統、ならびに本地域で発見された捻性株より得た実生株114系統)、日本産 (47系統)、中国産 (9系統) およびその他の地域産 (33系統) である。

ニンニク近縁種として調査したのは、アサツキ、シャロット、タマネギ、チャイブ、ニラ、ネギ、ノビル、リーキ、ワケギ、*Allium longispathum*, *A. longicuspis*, *A. vineale*, それに *A. sp.* (未同定) である。近縁種のうちシャロットはインドネシア産で、最後の *Allium* 属4種はそれぞれ、ハンガリーの個人のコレクション、モスクワ植物園 (ソ連)、キュー植物園

本論文の概要は昭和63年度九州病害虫研究会において発表した。



Fig. 1. Twisted leaves (arrows) on garlic clones.

Fig. 2. Mosaic symptoms on leaves.

(イギリス), フルンゼ植物園 (ソ連) から導入されたもので, その他は日本産である。

2. 供試葉の採取

ニンニクならびに近縁種の種球を既報¹²⁾と同様の方法で1987年秋, 学内圃場に20個ずつ定植した。ニンニクの種球は大きく二通りに分けられた。一つは諸外国より導入後, 一旦圃場に定植して得た2年目のもの, もう一つは中央アジアで発見された捻性株の種子より育てた株を, 次年度圃場で栄養繁殖して得たものである。1988年5月, 各系統および種について無作為にえらんだ2個体から, 完全に展開した若葉を0.5gずつ採取した。これらをポリエチリン袋に入れ-50℃で保存し, 適宜実験に用いた。

3. 供試抗血清および ELISA 法

本実験で使用した GLV および OYDV の抗血清は鳥取県園芸試験場の佐古勇氏より分譲されたものである。GLV はニンニクより分離したものを一寸ソラマメで増殖したもの, OYDV はネギの自然発病株からそれぞれのウイルスが純化され抗血清が作製された。

ELISA は, Clark and Adams の方法⁶⁾にはほぼ準じて行った。まず, ポリスチレンプレート (Limbro EIA microtitration plate/96 flat bottom well, Flow Laboratories) のウエルに, それぞれの血清より精製した IgG (γ -globulin) を $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で $200\mu\text{l}$ ずつ添加し, 37℃で4時間整置して結合させた。つぎ

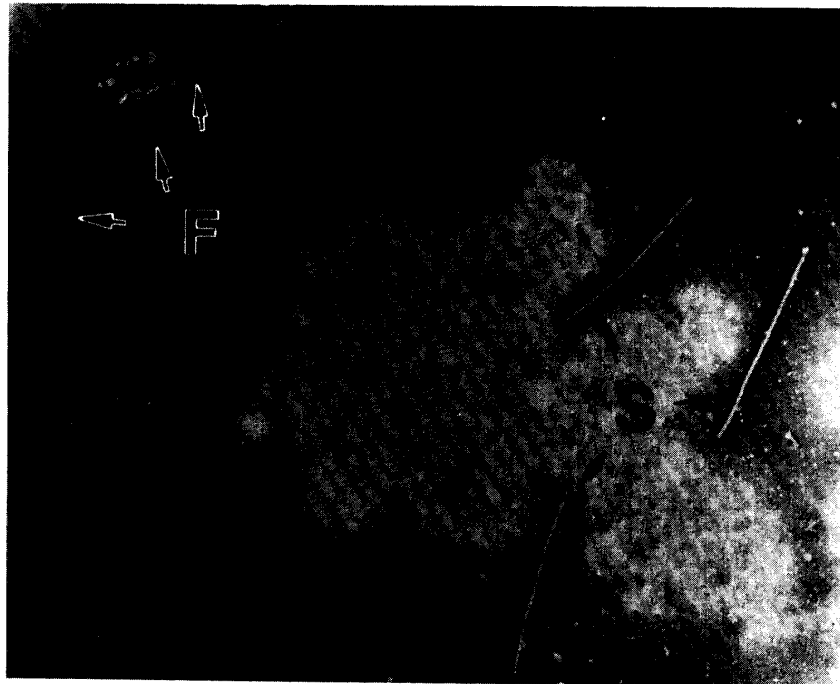


Fig. 3. Electron micrograph of two types of particles [flexuous (F) and straight (S) rods] by direct negative staining method. $\times 30,000$

に PBST (Tween 20 を含んだ Phosphate buffer saline) で 4 回洗浄することにより未結合の IgG を除去後、抗原液を添加した。抗原液には、2 個体分の採取葉 1 g に PBST 10ml を加え乳鉢で磨砕した液の上清を用いた。検定区は各試料につき、3 ウェルずつ設置し、対照区としては、既報の方法²⁹⁾で作出したウイルスフリーニンニク株の磨砕液を 6 つのウェルにそれぞれ入れ 4℃ で一晩静置した。さらに 4 回洗浄後、それぞれの IgG にたいして作成した酵素 (Alkaline phosphatase, grade I, Boehringer Mannheim) 結合抗体を 200 倍希釈濃度で添加し 37℃ で 3 時間静置した。これらをさらに 4 回洗浄後、基質 (*p*-nitrophenil phosphate, Sigma 104, Sigma) を 1 mg/ml 濃度で添加し、27℃ で 1.5 時間静置し発色させた。発色後、水酸化ナトリウム溶液 (3N 濃度) を各ウェルに 50 μ l ずつ添加して反応を停止し、マイクロプレートリーダー (CLS-962, Cambridge Life Sciences) を用いて 405nm における吸光度を測定した。

各試料 3 ウェルの平均を求め、測定値の誤差を考慮して、対照区の吸光度 (平均値 0.013) の 3 倍以上のものを陽性とした。

結 果

調査したニンニク株を総括すると、全 189 系統の 76% に当る、145 系統が GLV, OYDV いずれかの抗血清に対し陽性の反応を示し、ウイルス汚染率が高いことが示された。また、OYDV 抗血清のみに対して陽性を示した系統は全体の 6% と極めて低かった。この傾向は地域別にまとめた場合にも同様に見られた (Table 1, 2)。

ニンニク収集系統の来歴別に検出結果を述べる。スペイン産では、50% の系統でウイルスが検出されず、他の地域と比較しても感染率は極めて低かった。また、GLV, OYDV 双方の抗血清に対して陽性の反応を示した系統が全体の 20% と低いことも特徴的であった。イタリア産では、全体の 84% からウイルスが検出されており、感染率が高いことが示された。フランス産では、72% からウイルスが検出され、感染率は高いが OYDV 抗血清のみに陽性を示した株を認められなかったことが特徴的であった。ソ連 (モスクワ) 産も、全体の 85% と高い感染率を示した。ニンニクの原産地と推定されるソ連領中央アジアのものも、全体の 88% がウイルスに感染しており、GLV, OYDV 両方の抗血清に陽性を示す株が 61% に

Table 1. Detection of viruses by ELISA from the leaves of garlic clones collected from seven regions in the world and grown at the farm of Kagoshima University.

Serological relation to		Garlic clones from						
		Spain	Italy	France	USSR (Moscow)	USSR (Central Asia)	China	Japan
GLV	OYDV							
+	+	4 (20) *	10 (53)	6 (43)	7 (54)	21 (61)	4 (45)	10 (21)
+	—	4 (20)	5 (26)	4 (29)	3 (23)	7 (21)	3 (33)	21 (45)
—	+	2 (10)	1 (5)	0 (0)	1 (8)	2 (6)	1 (11)	4 (9)
—	—	10 (50)	3 (16)	4 (29)	2 (15)	4 (12)	1 (11)	12 (25)
Total		20	19	14	13	34	9	47

*1: The results of detection were divided into positive (+), more than and negative (—), less than the threefold value of healthy leaf absorbance.

*2: Figure in brackets indicates percentage of virus detected clones.

Table 2. Detection of viruses by ELISA from the leaves of garlic clones collected from the world and grown at the farm of Kagoshima University.

Serological relation to		Origins of garlic clones (Number)					Total (%)
		GLV	OYDV				
+	+	Netherlands (1)	Hungary (4)	Yugoslavia (1)	Korea (1)		14 (42)
		Taiwan (1)	USA (1)	Mexico (1)	Argentina (1)	Fiji (3)	
+	—	Hungary (5)	Indonesia (1)	Korea (1)	Fiji (2)	Haiti (1)	10 (30)
—	+	Argentina (1)					1 (3)
—	—	Sweden (1)	Hungary (2)	Taiwan (1)	USA (2)	Chile (1)	8 (25)
		Argentina (1)					

*1: See Table 1.

Table 3. Detection of viruses by ELISA from the leaves of allied species of garlic

Clones	Serological relation to					Total
	GLV	+	+	—	—	
	OYDV	+	—	+	—	
Leek		10	5	8	13	36
Welsh onion		2	1	2	0	5
Onion		1	0	0	0	1
Shallot		0	1	0	0	1
Rakkyou		1	1	0	0	2
<i>A. fistulosum</i> var. <i>caespitosum</i> (Wakegi)		1	2	0	0	3
<i>A. Schoenosprasum</i> (Asatuki)		0	1	0	0	1
Chive		2	0	0	0	2
Chinese chive		0	1	1	0	2
<i>A. grayi</i>		0	1	0	0	0
<i>A. longicuspis</i>		1	1	0	0	2
<i>A. longispatum</i>		1	0	0	0	1
<i>A. vineale</i>		1	0	0	0	1
<i>A. sp.</i> (unidentified)		0	1	1	2	4
Total number (%)		20 (32)	15 (24)	12 (19)	15 (24)	62

*: See Table 1.

Table 4. Detection of viruses by ELISA from the leaves of garlic seedlings

	Serological relation to GLV (left) and OYDV (right)								Total
	+*	+	+	-	-	+	-	-	
Number of seedlings	56		36			6		16	114
(%)	(49)		(32)			(5)		(14)	

*: See Table 1.

達していた。中国産は調査個体数が少なく顕著な傾向は認められなかったが、感染率は高いものと推定された。日本産では、75%の系統がGLV, OYDVいずれかの抗血清に対し陽性の反応を示した。また、GLV抗血清のみに反応したものが45%と他の地域に比べて多かった (Table 1)。その他の地域から収集したニンニク系統では系統数が少ないため、地域別の特徴は示されなかったが、OYDV抗血清単独に反応したのはアルゼンチン産1系統のみで、全体的な傾向は前述の7地域に似通っていた (Table 2)。

つぎに、ニンニク近縁種の結果を述べる。リーキのウイルス感染率は66%で、ニンニクに比較してやや低かった。また、OYDV抗血清のみに陽性の反応を示す株が22%を占め、ニンニクの場合(6%)に比べて非常に高かった。リーキ以外のニンニク近縁種を総括すると、全体の92%からウイルスが検出されており、ニンニクに比較して感染率がかかなり高いことが示された。また、両抗血清に対し陰性を示した系統は、リーキと *A. sp.* のみであった。さらにGLVは過去に記載された宿主^{13,24,25)}に加え、今回新たにタマネギ、チャイブ、ニラ等からも検出された (Table 3)。

実生ニンニク株からの検出結果も系統保存株の結果とほぼ同様の傾向を示し、OYDV抗血清のみに反応した株は極めて少なかった (Table 4)。

考 察

近年、各地のニンニク栽培地でモザイク病による生産力低下が問題になっている。本学蔬菜園芸学研究室が学内圃場で系統保存中のニンニクにも、かすり模様のモザイク症状や、葉の捻れが認められるものが多く、鱗茎の肥大程度も初年度に比較して低下してきた。

本実験の結果、本学部で保存しているニンニクの大部分のものが2種の抗血清に反応するウイルスに

汚染されていることが判明した。Table 1, 2に示したように、2種の抗血清に対する反応パターンは、収集地が異なってもほぼ同じ傾向を示した。すなわち、日本産、スペイン産を除き、両方の抗血清に陽性を示すものが43~61%と一番多く、OYDV抗血清単独に反応した系統は0~11%と極めて少なかった。また、日本産ニンニク株では、両抗血清に陽性を示した系統が21%と、他の地域に比べて少ないように思われたが、GLVの汚染率が45%と最も高かった。スペイン産ニンニク株については、50%のものが両方のウイルスまたはいずれかのウイルスに感染していたが、両方のウイルスに感染していない系統も多く、もしもこれらのなかにウイルスに抵抗性の系統があるとすれば、それを選抜出来る可能性があると思われた。本実験の結果で実生ニンニクのウイルス汚染率も極めて高いように思われた (Table 4)。この原因として両ウイルスの伝搬について考えてみると、GLVは汁液感染するが、種子伝染、ベクターによる伝染は知られていない。一方OYDVは汁液伝染、種子伝染(低率)、ベクターによる伝染をいずれも行う。Table 4でGLV単独感染株が36%、OYDV単独感染株が6%であった。このことから本圃場では、種子伝染の可能性も否定できないが、なんらかの接触伝染でウイルスが2次的に広がっていくものと推定された。

ニンニクから見いだされるウイルスとして、国内ではニンニクモザイクウイルス (Garlic mosaic virus, GMV)^{1,26~28)}、ニンニク潜在ウイルス (Garlic latent virus, GLV)²⁰⁾、タバコモザイクウイルス (Tobacco mosaic virus, TMV)¹⁹⁾が報告されており、国外では上記のほか Onion yellow dwarf virus (OYDV)^{4,15)}、Onion mosaic virus (GLVの同一異名と思われる)²³⁾、Tobacco rattle virus¹⁴⁾等のウイルスが記録されている。

GLVは粒子が屈曲の少ないひも状で、長さ650~700nmであることから、Carlavirus (Carnation la-

tent virus) group に, GMV は屈曲したひも状で, 長さ750nm 前後であることから, Potyvirus (Potato virus Y) group に属するものと考えられている^{17,26)}. このうち GLV については分離用宿主 (一寸ソラマメ), 検定植物ならびに純化法が確立されており²⁰⁾, 抗血清によるスクリーニングによって, ネギ, ラッキョウ, ワケギ, ノビル, アサツキ等の各種ネギ属植物にも自然感染することが報告されている^{13,24,25)}. しかし GMV については, 単独感染したニンニクが極めて少なく, 大抵の場合 GLV と重複感染していること²⁰⁾, 有効な分離用宿主が見つからないことなどから, 抗血清の作製に至っていない. さらに Potyvirus group 内の位置付けも不明確のままである¹⁷⁾. 一方, OYDV は GMV と同じ Potyvirus group に属し, 国内ではネギの黄化萎縮病やスイセン, タマネギ, ニラ, 鑑賞用アリウム等のモザイク症状に関連して報告されている^{21,22,30,31)}が, わが国ではニンニクモザイク株の原因とは考えられていなかった. GMV と OYDV を別種とするか, 同種内の系統とするかは今後の検討に待たれる¹⁷⁾が, 我孫子らが分離した GMV の系統は OYDV, Narcissus yellow stripe virus, PVY の抗血清とは反応しなかった¹⁾. しかしながら, 国外ではニンニクでも OYDV の報告がなされている^{3,4)}. このような観点から考えると本実験で OYDV 抗血清と反応したものは OYDV と考えられるが, OYDV 抗血清と反応する他のウイルス系統に汚染されている可能性も否定できない. この点はさらに検討しなければならない. そのためには GMV の純化が急務の課題と言える.

本実験で調査したニンニク株の多くは国外より導入されたもので, もともと OYDV に汚染されていたとも考えられるが, 系統保存中に2次感染したことも充分考えられる. いずれにしてもニンニクの良系統を作出するためには生長点培養等でウイルスのフリー化を行うとともに種子繁殖型の系統選抜が必要不可欠であることが本実験結果より示唆された.

謝辞 本実験を行うにあたり貴重な抗血清を提供いただいた鳥取県園芸試験場, 佐古勇氏に謝意を表します.

文 献

- 1) 我孫子和雄・渡辺康正・西 泰道: ニンニクモザイク病に関する研究 I 病原ウイルス. 野菜試報, A, 7, 139-147 (1980)
- 2) 荒井 啓・森 一浩・衛藤威臣: ニンニクで見出されたマイコプラズマ様微生物. 日植病報, 55, 81 (1989) (講要)
- 3) Bos, L.: Onion yellow dwarf virus. CMI/AAB Descr. Plant Viruses, 158 (1976)
- 4) Brierley, P. and Smith, F. F.: Reaction of onion varieties to yellow dwarf virus and three similar viruses isolated from shallot, garlic, and narcissus. Phytopathology, 36, 292-296 (1946)
- 5) Cadilhac, B., Quiot, J. B., Marrou, J. and Leroux, J. P.: Mise en évidence au microscope électronique de deux virus différents infectant l'ail (*Allium sativum* L.) et l'échalote (*Allium cepa* L. var. Ascalonicum). Ann. Phytopathol., 8, 65-72 (1976)
- 6) Clark, M. F. and Adams, A. N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay. J. gen. Virol., 344, 475-483 (1977)
- 7) Delecote, B. and Lot, H.: Viroses de l'ail: I. — Mise en évidence et essais de caractérisation par immunoelectromicroscopie d'un complexe de trois virus chez différents populations d'ail atteintes de mosaïque. Agronomie, 1, 763-770 (1981)
- 8) 土居養二・鳥山重光・與良 清・明日山秀文: ダイレクト・ネガティブ染色法による感染植物組織からのウイルス粒子の検出. 日植病報, 35, 180-187 (1969)
- 9) Etoh, T.: Accomplishment of microsporogenesis in a garlic clone. Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ., 19, 55-63 (1983)
- 10) Etoh, T.: Studies on the sterility in garlic, *Allium sativum* L. Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ., 21, 77-132 (1985)
- 11) Etoh, T.: Fertility of the garlic clones collected in Soviet Central Asia. J. Japan Soc. Hort. Sci., 55, 312-319 (1986)
- 12) Etoh, T., Noma, Y., Nishitarumizu, Y. and Wakamoto, T.: Seed productivity and germinability of various garlic clones collected in Soviet Central Asia. Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ., 24, 129-139 (1988)
- 13) 深見正信・本吉総男・本多要八郎: 千葉県で栽培される分けつネギ「坊主しらす」に発生したニンニク潜在ウイルスについて. 関東病虫研報, 34, 79-80 (1987)
- 14) Graichen, K.: *Allium* as natural hosts of nematode transmissible viruses. Arch. Phytopath. PflSch., 11, 399-403 (1975)
- 15) Graichen, K. and Leistner, H.-U.: Onion yellow dwarf virus causes garlic mosaic. Arch. Phytopath. PflSch., 23, 165-168 (1987)
- 16) 井上成信・前田孚憲・光畑興二: 鑑賞用 *Allium ampeloprasum* から分離された garlic latent virus について. 日植病報, 48, 114 (1982) (講要)
- 17) 井上忠男: ニンニク潜在モザイクウイルス, ニンニクモザイクウイルス. 與良清他編. 植物ウイルス事典, p. 331-333, 朝倉書店, 東京 (1983)
- 18) La, Y. J.: Studies on garlic mosaic virus. Korean J. Plant Prot., 12, 93-107 (1973)
- 19) 李治遠・上田一郎・四方英四郎: ニンニクにより分離されたタバコモザイクウイルスについて. 日植病報, 48, 394 (1982) (講要)
- 20) 李龍雨・山崎省三・尾崎武司・井上忠男: ニンニクに見出される2種のひも状ウイルス (garlic latent virus) ならびにニンニクモザイクウイルス (garlic mosaic virus). 日植病報, 45, 723-734 (1979)
- 21) 中曾根渡・岡田清嗣・草刈真一: ネギの黄化萎縮株から分離されたひも状ウイルスについて. 日植病報, 54, 108 (1988) (講要)
- 22) 野田千代一・井上成信: 鑑賞用アリウムから分離された

- onion yellow dwarf virus について. 平成元年度日植病大会予稿集, p. 253 (1989)
- 23) Razuyazkina, G. M.: Onion mosaic virus and its distribution in the field. *All-Union Inst. Pl. Path., Moscow, USSR*, 69-76 (1973)
- 24) 佐古 勇・尾崎武司・井上忠男: DIBA 法によるラッキョウ及びネギからの GLV の検出. 日植病報, **53**, 108 (1987) (講要)
- 25) 佐古 勇・尾崎武司・井上忠男・中曾根渡: DIBA 法による各種ネギ属植物の GLV (garlic latent virus) 検出および発生状況. 日植病報, **54**, 109 (1988) (講要)
- 26) 佐古宣道: ニンニクのウイルス病 (予報) その発生とウイルス様粒子の検出. 日植病報, **42**, 101 (1976) (講要)
- 27) 佐古宣道: ニンニクのウイルス病 (第1報). 日植病報, **42**, 383 (1976) (講要)
- 28) 佐古宣道・長尾記明: ニンニクのウイルス病 (第2報) ニンニクモザイク病葉の微細構造. 日植病報, **43**, 114 (1977) (講要)
- 29) Walkey, D. G. A., Webb, M. J. W., Bolland, C. J. and Miller, A.: Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem tip culture. *J. Hort. Sci.*, **62**, 211-220 (1987)
- 30) 山下修一: ネギ萎縮ウイルス. 與良清他編. 植物ウイルス事典, p. 390-391, 朝倉書店, 東京 (1983)
- 31) 吉野正義・安 正純: ネギ萎縮病の生態に関する研究. 埼玉農試研報, **26**, 1-67 (1965)

Summary

Garlic clones and several *Allium* spp. collected from a few regions of the world [Spain, Italy, France, USSR (Moscow), Soviet Central Asia, China, Japan and so on] and put under maintenance at a farm of Kagoshima University, were tested by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), using GLV (Garlic latent virus) and OYDV (Onion yellow dwarf virus) as antisera, and were surveyed to fix the rates of viral infection.

The results obtained are as in the following: Of 189 garlic clones, 145 (77%) clones showed positive reactions to either or both of the two antisera. No more than 12 clones (6%) reacted only to OYDV serum. Relatively low viral infection rates were noted in the Spanish and Japanese garlic clones. In leek the GLV-infection rate was 66%, being slightly lower than that of garlic, and 22% of the leek clones reacted only to OYDV serum. Onions, chives and Chinese chives were found to be the natural hosts of GLV, respectively.