

[成果情報名]粘着板に捕獲された媒介虫を一度に剥離・回収し IYSV を検出するマス検定法

[要約]マス検定法は、粘着板に捕獲されたアイリスイエロースポットウイルスを媒介するネギアザミウマ個体群の IYSV 保毒の有無を、DAS-ELISA 法により容易に検出できる。

[キーワード]マス検定法、IYSV、ネギアザミウマ、粘着板、DAS-ELISA 法

[担当]農業研究部・病理昆虫室

[代表連絡先]電話 089-993-2020

[研究所名]愛媛県農林水産研究所、近畿中国四国農業研究センター、香川県農業試験場、徳島県立農林水産総合技術センター農業研究所

[分類]普及成果情報

## [背景・ねらい]

アイリスイエロースポットウイルス (IYSV) による病害は、ネギやニラで甚大な被害が報告されている。ネギ・タマネギえそ条斑病の発生地域に隣接する未発生地域では、病原ウイルスの侵入をいち早く確認するための新たな発生予察技術が求められている。

そこで、侵入警戒モニタリングトラップの粘着板に捕獲されたネギアザミウマから、血清診断法を用いた当該個体群のウイルス保毒虫検定法 (マス検定法) を開発する。

## [成果の内容・特徴]

1. 粘着板に捕獲されたネギアザミウマなどの微小昆虫は、市販の粘着物質溶解液に、粘着板ごと浸漬することで容易に回収できる (図 1)。
2. アザミウマ類と大型昆虫は、剥離時間 (アザミウマ類は約 1 ~ 2 分) により分別し、微小昆虫は、浮遊する昆虫と沈殿するアザミウマ類などで分別する (図 1)。
3. 回収したネギアザミウマなどをまとめて 1.5ml マイクロチューブ内で磨砕し、5% ブロッキングワンを含む PBST を加えてマス検定試料とする (図 1)。
4. 検定は、DAS-ELISA 法で行い、基質添加 1 時間後にウイルス保毒の判定 (陽性反応: 黄色、陰性反応: 無色透明) を目視で行う (図 1)。
5. 粘着板に捕獲された保毒虫から、IYSV が検出可能な限界日数は、屋外で概ね 7 日までである (図 2)。
6. ネギアザミウマ無毒虫 (成虫) 500 頭に、媒介能を確認した保毒虫 (成虫) 1 頭相当分を混入した比率でも、IYSV が検出できる (表 1)。
7. ネギアザミウマ個体群を、個体別に DAS-ELISA 法で検定し IYSV が検出できない場合でも、マス検定では検出精度が高まる (表 2)。
8. 本検定法は、ある地域のネギアザミウマ個体群の IYSV 保毒の有無を容易に検出でき、侵入警戒調査の方法として有効である。

## [普及のための参考情報]

1. 普及対象: IYSV 被害の作物がある現地の指導機関 (JA、普及センター) など
2. 普及予定地域: IYSV 侵入警戒地域および発生地域
3. その他:
  - 1) 沈殿する微小昆虫は、アザミウマ類と一緒に 1.5ml マイクロチューブに回収する。
  - 2) 検定試料は速やかに検定する。検定しない場合は、冷凍 (-30℃) で保存する。
  - 3) 判定は、基質添加 1 時間後に目視で行うため、吸光度計などは特に必要ない。
  - 4) ネギアザミウマの捕獲量が少ない場合 (30 頭以下/粘着板) は、複数枚の粘着板を 1 試料とする。また、捕獲量が多い場合 (500 頭以上/粘着板) は、剥離前に粘着板を分割するか、剥離後の 1.5ml マイクロチューブ回収時に小分けする。
  - 5) 本検定法では、保毒虫率を把握することはできない。
  - 6) 本検定法では、Agdia 社の IYSV エライザキットを使用する (図 1)。

[具体的データ]

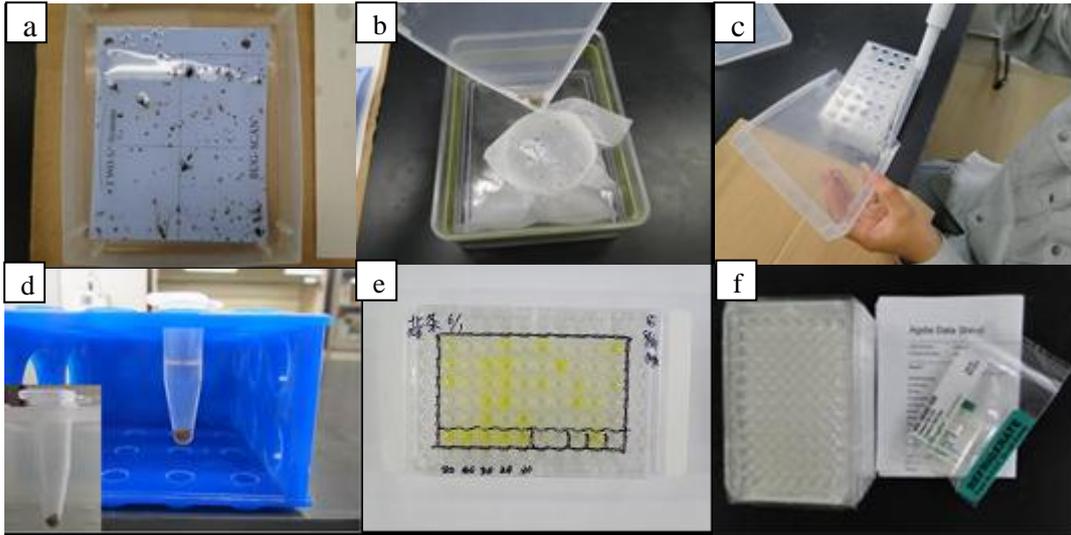
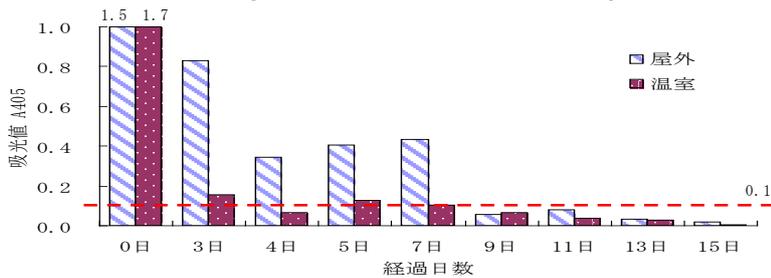


図1 マス検定の方法

- a : 粘着板を容器に入れ、粘着物質溶解液に浸漬
- b : 余分な粘着物質溶解液及び浮遊する虫をあらかじめ除去
- c : 沈殿しているアザミウマ類をマイクロピペットで 1.5ml マイクロチューブに回収
- d : 静置後、余分な上澄み液を除去したものが検定試料
- e : 基質添加 1 時間後に目視で発色を確認（陽性：黄色、陰性：無色透明）
- f : Agdia 社の IYSV エライザキット（IgG200 倍、コンジュゲート 200 倍で使用）



設置方法：発病圃場から採集した個体群（保毒虫率約 20%）を粘着板に各 50 頭ずつ附着させ、防虫ネットで覆い、屋外及び温室に設置。  
上記期間設置後に各 50 頭/1.5ml マイクロチューブに回収し、DAS-ELISA 法によりマス検定を実施。  
無毒虫をブランクとして 0.1 以上（目視で黄色と認識できる）を陽性と判定。  
粘着板設置日：2011 年 8 月 22 日

図2 粘着板設置からの IYSV の検出可能日数（高温期）

表1 マス検定におけるIYSV検出精度

ネギアザミウマ(供試頭数)		陽性反応の有無 <sup>1)</sup>		
無毒虫(成虫)	保毒虫 <sup>2)</sup>	(1回目)	(2回目)	(3回目)
100頭		+	+	+
200頭		+	+	+
300頭	1頭相当分 <sup>3)</sup>	+	+	+
400頭		+	+	+
500頭		+	+	+

表2 ネギアザミウマ個体群<sup>1)</sup>からのIYSV検出<sup>2)</sup>

粘着板設置日数(温室)	供試頭数	個別検定	マス検定
0日		+ <sup>3)</sup>	+
3日目		-	+
5日目	各50頭	-	+
7日目		-	+
9日目		-	-
11日目		-	-

1) + : 陽性反応 - : 陰性反応

無毒虫をブランクとして0.1以上（目視で黄色と認識できる）を陽性と判定

2) 保毒虫は生物検定により媒介能を確認したものを使用

3) 保毒虫15頭を磨砕した一定濃度の磨砕液を15試験区に所定量分注

1) 発病圃場から採集した個体群（保毒虫率約20%）を粘着板に付け温室に設置

2) + : 陽性反応 - : 陰性反応

無毒虫をブランクとして0.1以上（目視で黄色と認識できる）を陽性と判定

3) 個別検定において、(0日) 7/50頭で陽性確認

[その他]

(芝 章二)

研究課題名：四国4県連携によるIYSVの緊急防除対策技術の開発

予算区分：実用技術

研究期間：2010～2012年度

研究担当者：芝 章二、楠元智子、黒田 剛、石川浩一（近中四農研）、相澤美里（香川農試）、渡邊丈夫（香川農試）、米本謙悟（徳島農技セ）、中野昭雄（徳島農技セ）