

[成果情報名]レタスビッグベイン病を媒介する *Olpidium virulentus* の血清学的定量法

[要約]レタスビッグベイン病を媒介する *Olpidium virulentus* の休眠胞子を認識する抗体を用いた DAS-ELISA により、感染レタス根内の休眠胞子数を推定できる。休眠胞子数を計測した罹病感染根は、土壤中での媒介菌の密度と発病程度との関連解析に活用できる。

[キーワード]DAS-ELISA、*Olpidium virulentus*、休眠胞子、媒介菌、レタスビッグベイン病

[担当]環境保全型農業システム・環境保全型野菜生産

[代表連絡先]電話 084-923-4100

[研究所名]近畿中国四国農業研究センター・水田作研究領域

[分類]研究成果情報

[背景・ねらい]

土壌生息菌 *Olpidium virulentus* が病原ウイルスを媒介するレタスビッグベイン病の発病機構を把握するためには、同菌の土壤中の密度、ウイルス保毒率、ウイルス伝搬能などの関与を調査する必要がある。しかし、*O. virulentus* は絶対寄生菌であり、人工培地を用いた希釈平板法を採用できず、顕微鏡観察による計測も困難であることから、土壌中菌密度を人為的に調整する良い方法はない。そこで、媒介菌と発病程度との関係性評価研究の基礎として活用できるモデル土壌の作成のため、本菌の休眠胞子を認識する抗体を用い、感染レタス根中の休眠胞子数を血清学的に定量し、土壌中の菌密度を規定できる手法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 休眠胞子認識抗体 IgG を用いた DAS-ELISA (図 1) では、サンプル (感染株細根の乾燥粉末または精製した休眠胞子) を直径の異なる 2 種類のジルコニアビーズ ($\phi 0.5$ mm および $\phi 3.0$ mm) で破砕 (例: 安井器械社製マルチビーズショッカー®で 3,000 rpm、60 秒、2 回処理) することにより調製する。精製した休眠胞子では 1 個/サンプル溶液 100 μ L から検出ができる (図 2 a)。また、抗体を媒介菌未感染の健全レタス根で事前に吸収処理することにより、レタス由来成分との反応は抑えられる (図 2 b)。
2. ビーズ破砕した精製休眠胞子の希釈系列を用いた DAS-ELISA により得られる S 字曲線データ (図 3 a) は、logit-log 変換法を用いて簡易に直線化 (図 3 b) でき、これを検量線として、同様に処理した感染根内の休眠胞子数を推定できる。
3. ウイルス保毒休眠胞子を定量した感染根を接種源として土壌に混和することにより、土壌中の媒介菌 (休眠胞子) 密度を任意に調整することができ、土壌中の媒介菌密度と発病程度との関係性の評価に活用できる (図 4)。

[成果の活用面・留意点]

1. 土壌や作付体系など種々の条件下での発病パターンを解析することにより、要防除水準の設定や土壌の物理的・化学的・生物的特性の防除への影響評価が可能となり、土壌中の媒介菌密度から発病リスクを評価する土壌診断技術の開発に寄与できる。
2. 土壌中の媒介菌密度を調整することにより、土壌消毒技術の効果検証、抵抗性レタス品種の選抜、媒介菌株のウイルス媒介能の評価に活用できる。
3. 土壌を直接 DAS-ELISA に供した場合には、非特異反応が強く生じるために媒介菌の定量は困難である。
4. 休眠胞子の精製および休眠胞子認識抗体の作製については、2012 年度研究成果情報「レタスビッグベイン病の媒介菌 *Olpidium virulentus* に特異的な抗体の作製法」(http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/warc/2012/153a2_01_02.html)を参照。

[具体的データ]

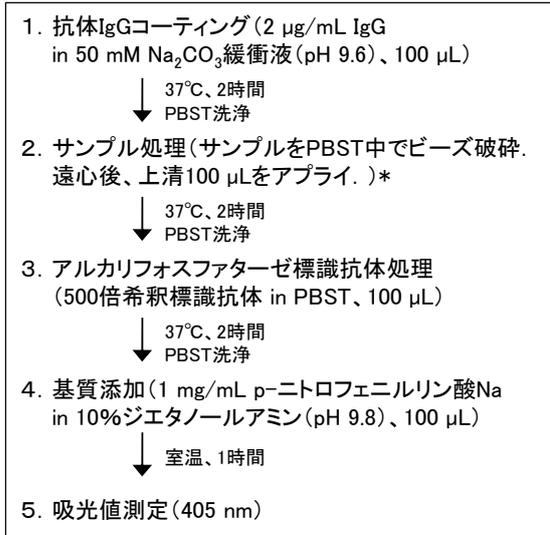


図1 DAS-ELISA のプロトコル

*乾燥細根粉末 500mg または精製休眠孢子 7万個を PBST500μL 中でビーズ破碎。6,100 × g、30 秒間遠心後、上清回収。

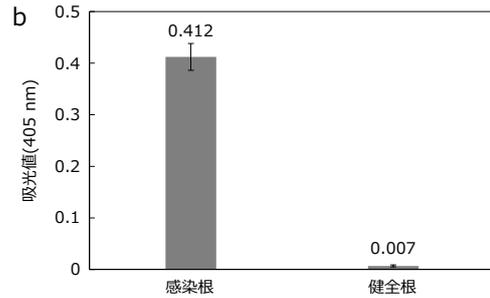
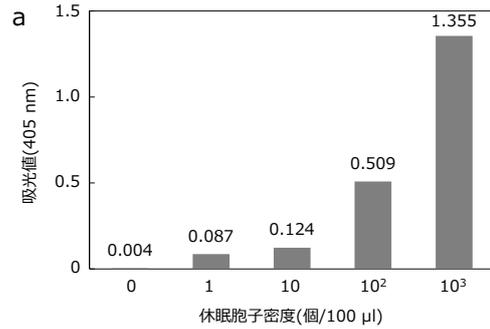


図2 休眠孢子(a)およびレタス根(b)を用いた DAS-ELISA プロファイル

吸収処理: 健全レタス根を破碎懸濁した PBST 中で 37°C、2時間反応後、遠心して沈殿除去。エラーバー: 3反復の標準偏差。

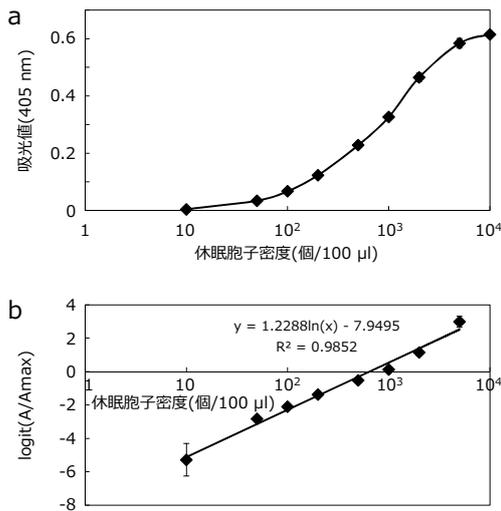


図3 logit-log 変換法を用いた検量線の作成 (a: 変換前、b: 変換後)

$\text{logit}(A/A_{\text{max}}) = \ln [(A/A_{\text{max}})/(1 - A/A_{\text{max}})]$
(A: 各濃度での吸光値、A_{max}: 最大濃度での吸光値)。エラーバー: 3反復の標準偏差。

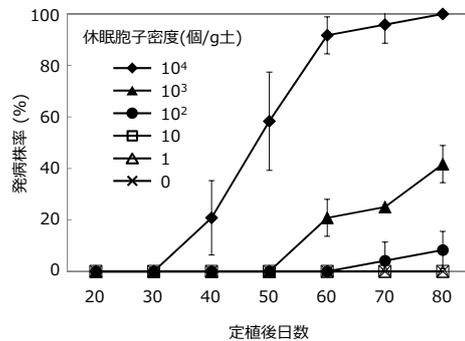


図4 土壌中の媒介菌密度 (個/g 土、土壌水分含量: 30%) と発病株率の推移

試験区: 播種1ヶ月苗定植 (品種: シスコ、1区8株)。エラーバー: 3反復の標準偏差。

(野見山孝司)

[その他]

中課題名: 土壌病虫害診断と耕種的防除技術開発による野菜の環境保全型生産システムの構築

中課題番号: 153a2

予算区分: 交付金

研究期間: 2011~2014 年度

研究担当者: 野見山孝司、笹谷孝英、関口博之、富岡啓介、大崎秀樹、竹原利明、竹下稔 (九州大院農)、古屋成人 (九州大院農)、土屋健一 (九州大院農)

発表論文等: Nomiyama K. *et al.* (2015) J. Gen. Plant Pathol. 受理