

4) R I P A法による作物ウイルス病の簡易検定

中央農業試験場 病虫部 病理科

1. 試験のねらい

作物のウイルス病は、その症状が生理障害や葉害と酷似し肉眼では判別し難い。植物ウイルス病の診断法として近年開発された R I P A法(迅速免疫ろ紙検定法: Rapid Immunofilter Paper Assay)を、ばれいしょ採種圃場における Yモザイク病の検定、および野菜類におけるモザイク病の診断に利用する技術を確立する。

2. 試験の方法

- 1) RIPA法の適切な検定期、検定部位を知るために、作物の時期別および部位別のウイルス検出精度を調査した。
- 2) 現地発病株からウイルスを検出し、検定精度をELISA法と比較した。
- 3) 試薬類および検定サンプルの適切な保存条件について検討した。

3. 試験の結果

RIPA法(表1)によるばれいしょのYモザイク病(病原: PVY)および野菜類のモザイク病(病原: TMV, CMV)の簡易検定技術を確立した。本試験で明らかにした以下の使用方法によってELISA法とほぼ同程度の検定精度が得ることができる。

1) ばれいしょからのPVYの検出

採種圃場におけるPVY感染株の抜き取り作業に活用できる(表2)。

使用方法: 検定期は開花~開花3週間後までとする(図1)。検定部位は、中位葉の複葉内の先端の小葉の葉身基部とし(図2)、1株について2カ所検定する。

2) 野菜類からのTMV、CMVの検出

TMV、CMVによるモザイク病の診断に利用できる(表3)。

使用方法: 検定期は定植2ヶ月までとする。検定部位は、病徴が認められる上~中位葉とし、1株について2カ所検定する。

3) 試薬類および検定サンプルの保存法

(1) 着色ラテックスは、原液で4℃で保存すれば半年間は使用可能である。

(2) 検定ろ紙は、白色ラテックスを固定後、4℃乾燥状態で保存すればほぼ半年間は使用可能である。

(3) 検定用サンプルは、4℃で14日間まで保存可能である。RIPA法の検定時間は約10分で、操作も極めて平易である。また、特別な機材の必要もなく、圃場での検定も可能である。1回の検定に供するサンプル数は10点程度が適当である。

< R I P A法の検定手順 > (口絵写真参照)

- ① チューブに5mm角に切った検定葉を入れる。
- ② 緩衝液中で検定葉を磨碎する。(30秒)
- ③ この磨碎液に5mm幅の検定用ろ紙の先端をつけ、ろ紙の1/2から2/3まで吸いあげる。(2~3分)
- ④ ろ紙を引き上げ、はさみで下端約3mmを切り落とし、着色ラテックスのチューブにつける。ウイルスが含まれていると赤いバンドが検出される。(5~6分)

《用語説明》

- ・ P V Y : ジャガイモYウイルス
- ・ T M V : タバコモザイクウイルス
- ・ C M V : キュウリモザイクウイルス
- ・ E L I S A 法 : 酵素結合抗体法。植物ウイルス病の検定法として広く利用されている。ウイルス検出精度が高く(表1)、一度に多数のサンプルを検定できる。実験室内の機材を必要とし、検定時間は、通常2日間。

表1 RIPA法とELISA法のウイルス検定精度の比較

検定法	検定回数	CMV検出率(%)						
		(希釈)10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
RIPA	7	100(++)	100(++)	100(++)	100(+)	28.6(+)	0	0
ELISA	12	100	100	100	100	75.0	16.7	0

反応帯濃度: (++)極めて明瞭 (+)明瞭 (±)不明瞭、検定サンプル: CMV感染タバコ葉

表2 RIPA法によるばれいしょからのPVYの検出

病徴型	系統	株数	検出率(%)
モザイク	T	77	94.8
	T+O	1	100
	O	0	
	合計	78	94.9
えそ	T	1	0
	T+O	10	90.0
	O	1	100
	合計	12	91.7
計		90	94.4

注)ELISA法でPVYの感染の確認と系統判別を行った試料を供試

表3 RIPA法による野菜類からのTMV, CMVの検出

ウイルス	野菜	株数	検出率(%)
TMV	ピーマン	55	90.9
	シシトウ	12	100
	合計	67	92.5
CMV	ピーマン	33	100
	シシトウ	8	100
	トマト	56	89.3
	メロン	40	92.5
	合計	137	93.4

注)ELISA法でCMVまたはTMVの感染を確認した試料を供試

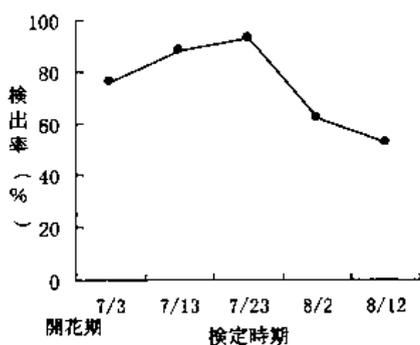


図1 ばれいしょからのRIPA法によるPVY検出率の推移 (ELISA法の検出率を100とした)

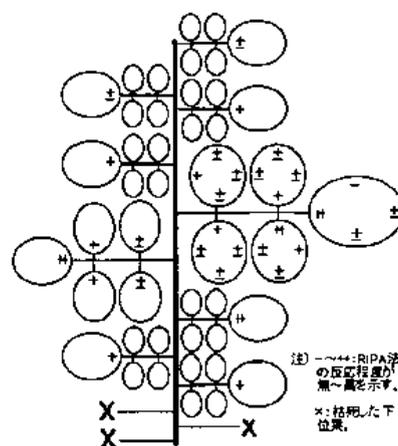


図2 PVY感染ばれいしょの検定部位別の反応