

平成19年度試験研究成果書

区分	指導	題名	TPI(Tissue Printing Immunoassay)法によるキュウリホモプシス根腐病の簡易診断			
[要約]TPI法(tissue printing immunoassay)はキュウリホモプシス根腐病の簡易・迅速な検出法として利用できる。						
キーワード	キュウリ	ホモプシス根腐病	TPI	病害虫部	病理昆虫研究室	

1 背景とねらい

キュウリホモプシス根腐病は、しおれ初期(図4)には根に偽子座(黒色帯状病斑、図3)がほとんど見られない。この場合は、根の褐変部位から病原菌を分離をするか、水分を含んだ状態で室温で放置するなど偽子座の形成を確認して診断しているが、これらの方法では、7-10日程度の期間が必要となる。このため、大量の検体を簡便かつ迅速に検定することが可能なTPI法が本病の診断に適用可能か検討した。

2 成果の内容

- (1)一次抗体に抗ホモプシス-ウサギ IgG ポリクローナル抗体を、二次抗体にヤギ抗ウサギIgG(H+L)AP抗体を用いたTPI法により、キュウリホモプシス根腐病を迅速(3~5時間程度)かつ容易に検出できる(表1, 図2, 5, 6)。
- (2)TPI法の操作マニュアルは図1のとおり。

<p>抗原の濾紙への吸着 爪楊枝の頭を、剃刀で輪切りにした根の上から押しつけて汁液を濾紙につける</p> <p>一次抗体の抗原への結合 濾紙を一次抗体(抗ホモプシス-ウサギ IgG ポリクローナル抗体)を加えた液に浸漬し、抗原と結合させる</p> <p>酵素結合二次抗体の一次抗体への結合 濾紙を二次抗体(ヤギ抗ウサギIgG(H+L)AP抗体)を加えた液に浸漬し、一次抗体に結合させる</p> <p>基質・発色剤の添加 濾紙を基質(BCIP)と発色剤(NBT)を加えた液に浸漬し、酵素反応(アルカリフォスファターゼ)を行なう</p> <p>発色・効果の判定 陽性の場合には紫~黒色に発色するので、発色程度を肉眼で調査する</p>

図1 キュウリホモプシス根腐病のTPI法による診断・操作マニュアル(概要)

3 成果活用上の留意事項

- (1)診断する根の状態(乾燥したもの、腐敗したものなどは基本的に診断不能)により擬陽性が出ることもある。このため、判定結果が判然としなかったサンプルについては、TPI法の他に偽子座を形成させる方法や培地法による確定診断ができるような体制を取ることが望ましい。
- (2)診断には根の褐変部位や黒変部位を用いる。
- (3)一次抗体(抗ホモプシス-ウサギ IgG ポリクローナル抗体)は東北農業研究センター分譲のものを、二次抗体(ヤギ抗ウサギIgG(H+L)AP抗体)はバイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製のものを使用した。

4 成果の活用方法等

- (1)適用地帯又は対象者等
病害虫防除所、中央農業改良普及センター(県域普及グループ)
- (2)期待する活用効果
キュウリホモプシス根腐病の診断作業の省力化が図られる。

5 当該事項に係る試験研究課題

(H17-27)ホモプシス根腐病解決による露地夏秋キュウリ安定生産技術の確立〔H17~19、国庫委託〕

6 参考資料・文献

- (1)中澤(那須)ら(1999).Tissu Printing Immunoassayを用いた*Ralstonia solanacearum*の検出.日植病報65:549-552.
- (2)永坂ら(2007).ELISAによるホモプシス根腐病菌のキュウリ苗からの検出.日植病報73:50.

7 試験成績の概要（具体的なデータ）

表1 キュウリホモプシス根腐病の診断結果

診断サンプル	TPI法	培地法
二戸	-	-
二戸	-	-
紫波	+	+
紫波	+	+
花巻	+	+
花巻	±	-
北上	+	+
北上	±	-
金ヶ崎	+	+
金ヶ崎	+	+
遠野	+	+
大船渡	+	+
大船渡	+	+
花泉	+	+
罹病根(陽性対照)	+	+
無病苗(陰性対照)	-	-

培地法で菌が検出できたものはすべてTPI法でもキュウリホモプシス根腐病と診断できた

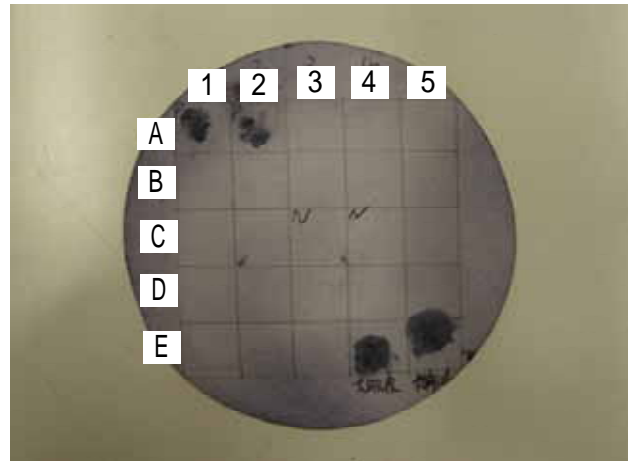


図2 TPIによる診断事例
(濃く着色した部位のあるマスが陽性反応)



図3 根部に形成された偽子座（黒色帯状病斑）



図4 しおれ初期の根
(若干の褐変のみで、偽子座の形成が見られない場合が多い)



図5 スタンプの準備
スタンプ用の濾紙、爪楊枝と剃刀、検体を用意



図6 スタンプ（抗原の濾紙への吸着）の方法
爪楊枝の頭を輪切りにした根の上から押しつけて汁液を濾紙につける。サンプルが複数ある場合は、濾紙にマス目をきっておくと扱いやすい。