

RIPA法によるトマトかいよう病菌の検出

[要約] トマトかいよう病菌は、RIPA（迅速免疫ろ紙検定）法による市販キットを用いると、細菌懸濁液の濃度が 10^5 cfu/ml 以上で検出が可能である。

農業総合センター園芸研究所

成果
区分

研究

1. 背景・ねらい

近年、茨城県内のトマト産地では立枯性病害であるかいよう病、青枯病、萎凋病等による被害が拡大してきている。これらは互いに病徴が類似しており、診断が難しいことから迅速な診断法を確立する必要がある。

本年度は、トマトかいよう病菌に対して、抗原抗体反応を利用した RIPA（迅速免疫ろ紙検定）法による市販キット（A社製 ImmunoStrip™ Cmm）の検出感度を、ELISA 法と比較し適用性を検討する。

2. 成果の内容・特徴

1) 培養したかいよう病菌の段階希釈液を用いた場合、RIPA 法では 10^5 cfu/ml、ELISA 法では 10^4 cfu/ml 程度の菌を検出できる(表 1)。

2) かいよう病菌を接種して作成した罹病トマト（本葉 4～5 葉展開）から、RIPA 法及び ELISA 法を用いて菌の検出を行うと、発病部近辺の茎や葉において明瞭な陽性反応を示す。また、根や無病徴の葉においても陽性反応を示す。なお、健全トマト株を供試した場合、両手法とも非特異反応は認められない(表 2、図 1)。

3) 現地で発生した立枯株で、かいよう病様症状の株のえそ条斑部、維管束褐変部を RIPA 法で検定したところ陽性反応があり、それ以外の立枯株では陰性を示したことから、現地での簡易診断に RIPA 法が利用できる可能性がある(表 3)。

4) RIPA 法は ELISA 法に比較しやや検出感度が劣るものの、検定時間は 5～30 分程度と ELISA 法の 1～2 日間に比べ迅速である。

3. 成果の活用面・留意点

1) えそ条斑や維管束褐変、菌泥の流出など、明瞭な病徴部位周辺部を供試する。

2) RIPA 法を行う際は、サンプル調整液 3ml に対し、供試部位の重量は 0.15g 程度とする。多過ぎる場合、試験紙が適切にサンプル調整液を吸収できず、検出感度が鈍くなる。

3) 現地で発生したかいよう病株で検出感度を高めるため、今後、多くのかいよう病罹病株で RIPA 法における供試部位を検討する必要がある。

4) トマトかいよう病菌の 1 検体あたりのコストは、RIPA 法で約 1100 円、ELISA 法で約 2300 円である。

4. 具体的データ

表1 RIPA法、ELISA法による菌懸濁液(cfu/ml)からのトマトかいよう病菌の検出

検出法	cmm730099菌株 ¹⁾				cmm301493菌株 ¹⁾			
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
RIPA	++	++	+	-	++	++	+	-
ELISA	++	++	+	+	++	++	+	+

++:明瞭な陽性反応 +:陽性反応 -:陽性反応なし

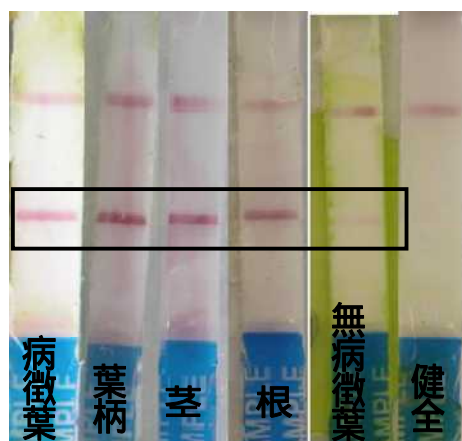
1)農業生物資源ゾーンバンクより入手したかいよう病菌株。

表2 RIPA法、ELISA法による罹病株²⁾からのトマトかいよう病菌の検出

検出法	cmm730099菌株				cmm301493菌株			
	根	茎	葉柄	葉	根	茎	葉柄	葉
RIPA	++	++	++	+	++	++	++	++
ELISA	+	++	++	++	++	++	++	++

++:明瞭な陽性反応 +:陽性反応 -:陽性反応なし

2)10⁶cfu/mlのトマトかいよう病菌懸濁液を刺針接種して作成した罹病トマト。



赤紫色の
陽性バンド出現。

図1 RIPA法による罹病植物体の部位別
トマトかいよう病菌検定結果

表3 現地で発生したトマトの細菌病様症状株に対するRIPA法(かいよう病用)の結果

採集場所	症状	結果	診断結果	備考
鉾田	茎表面に薄茶色のえそ条斑あり。株に黄変はなく、維管束褐変もない。	+	かいよう病	病徴からの診断。(細菌未同定)
鉾田	維管束の褐変や髓部の空洞化。茎の裂開。地際近辺に気根が多数発生。	+	かいよう病	病徴からの診断。(細菌未同定)
鉾田	茎に縦長のえそ条斑。特に上部で激しい。全身で維管束や髓部は褐変。	-	茎えそ細菌病	細菌同定済み
水戸	株全体がしおれ、維管束が褐変。茎切断面から白濁汚汁の流出。	-	青枯病	病徴からの診断及び細菌同定済
鉾田	中段葉が黄化、しおれ症状。維管束褐変なし。	-	生理障害	
結城	茎に水浸状のえそ症状。全身の髓部が褐変。	-	かいよう病菌以外の細菌(同定中)	

+:陽性反応あり -:陽性反応なし

5. 試験課題名・試験期間・担当研究室

トマト難診断・難防除病害虫の分子生物学的診断法と防除技術の開発・平成20~24年度・
病虫研究室