

改良DIBA法による ウイルス病診断法 の開発及び普及

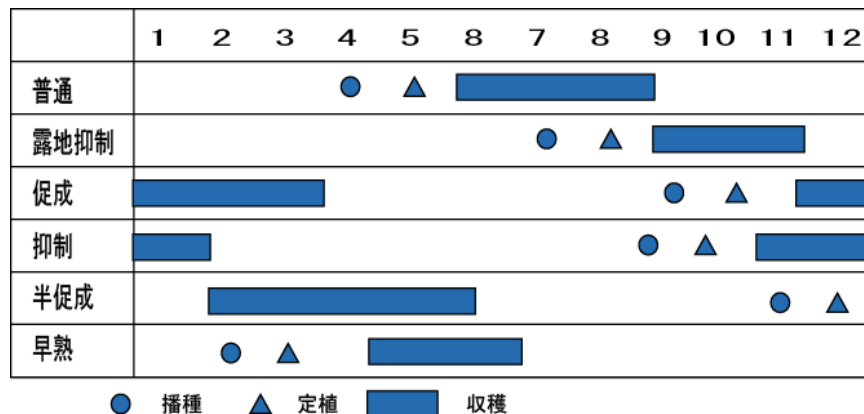


宮崎県総合農業試験場

櫛間 義幸

宮崎県のキュウリ栽培の現状

生産量 全国第1位（全国シェア 12%、 冬春期 21%）



産出額 178 億円
 作付け面積 643 ha
 生産量 63,120 トン
 (2019年度)

黄化えそ病 (MYSV)

現場で問題となっているウイルス病

緑斑モザイク病 (KGMMV)

管理作業によって短期間に蔓延
 土壌に残って伝染する

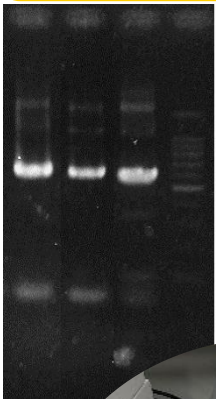


防除が困難な
 スリップスが媒介
 減収する



現場で手軽にできる診断技術が求められている

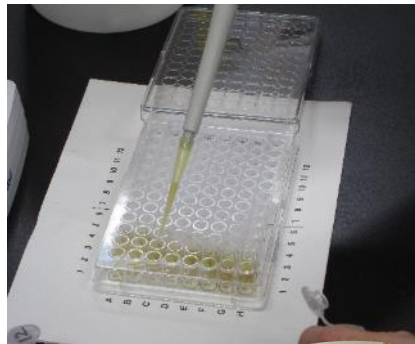
遺伝子診断法 (PCR)



サーマルサイクラー

感度が高い
専用機器が必須
精密な作業
コスト高い

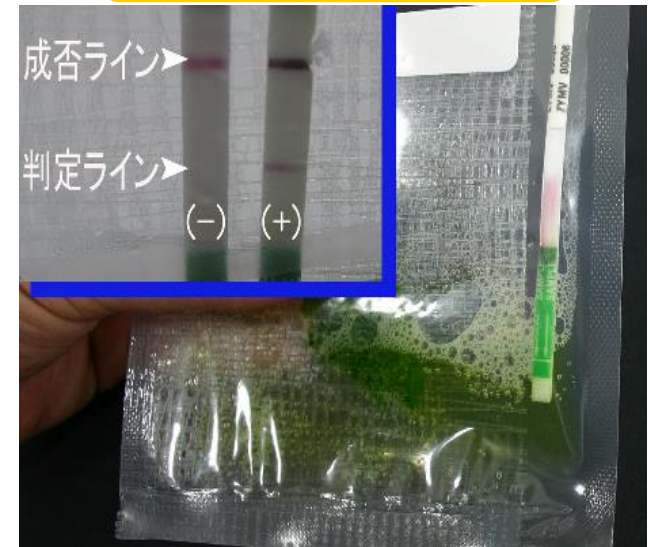
エライザ法 (抗原抗体反応)



プレートリーダー

精密な作業
時間がかかる
専用機器があった方がよい

イムノストリップ法 (抗原抗体反応)

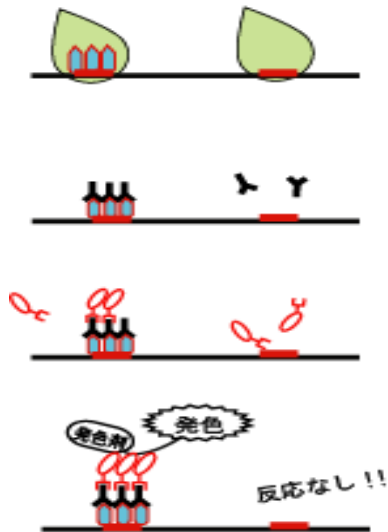


市販品があるが限定的
簡便かつ迅速 (10分)
コストやや割高
1検体/1ストリップ

改良DIBA法の手順

DIBA法の原理

感染植物 健全植物



③ 改良DIBA法キット

- ① A 摩砕液
- ② B ブロック液
- ③ C 洗浄液
- ④ D 発色剤
- ⑤ 抗体液
- ⑥ 検定用シート

手順

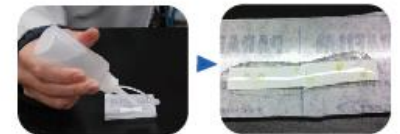
1 磨砕・スポット

0:00 2～4mm角程度に切り出したキュウリ葉片を、パラフィルム等の上で磨砕液（A液）1滴（約20～40μL）を加えて、つまようじの頭などですりつぶし、少量を検定シートにスポットする。5分程度風乾する。



2 ブロック処理（10分）

検定シートをパラフィルム上に置き、シート全体を覆うようにブロック液（B液）を添加し、10分間静置する。



洗浄

小型ガラスシャーレ等に洗浄液（C液）を10～20mlとり、検定シートを浸してすすぎペーパータオル等で洗浄液を吸い取る。5回繰り返す。

0:15 （時間は待たなくてよいので、すすぐ～吸い取るの作業をしっかり繰り返す）



3 抗体処理（20～30分）

検定シートを抗体液（2mL マイクロチューブ）に入れて、20～30分間静置する。室温でよいが、反応適温は37℃なので、低い場合は長めにする。

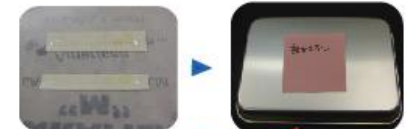


洗浄

0:35

4 発色剤添加（15分）

検定シートをパラフィルム上に置き、シート全体を覆うように発色剤（D液）を添加し、遮光して15分間静置する。



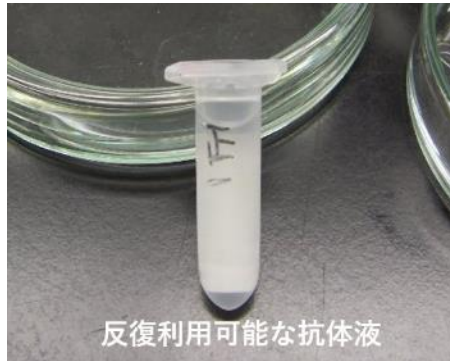
0:50

5 判定

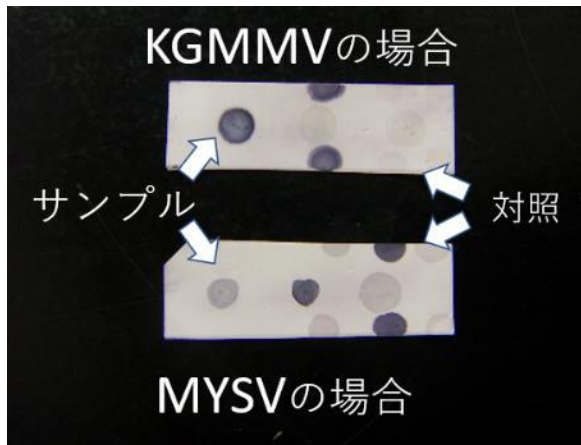
ウイルス感染している場合、青紫～濃紫色を呈する。コントロール（対照）の発色程度と比較して判定する。水ですすいで、ペーパータオル等の上で風乾すれば保存可能。



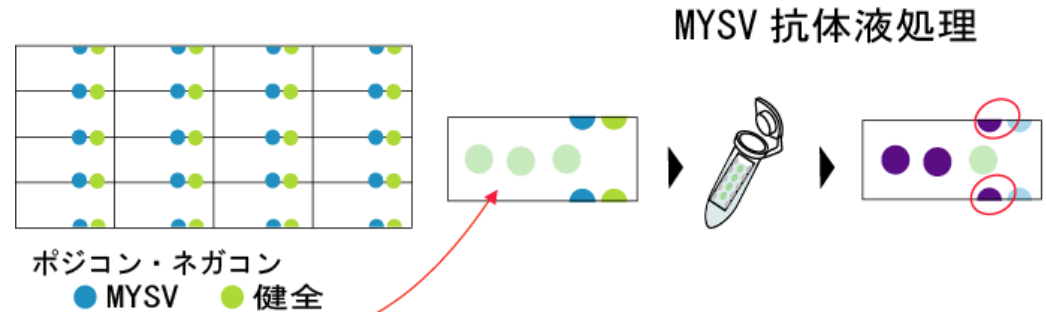
改良DIBA法の工夫点



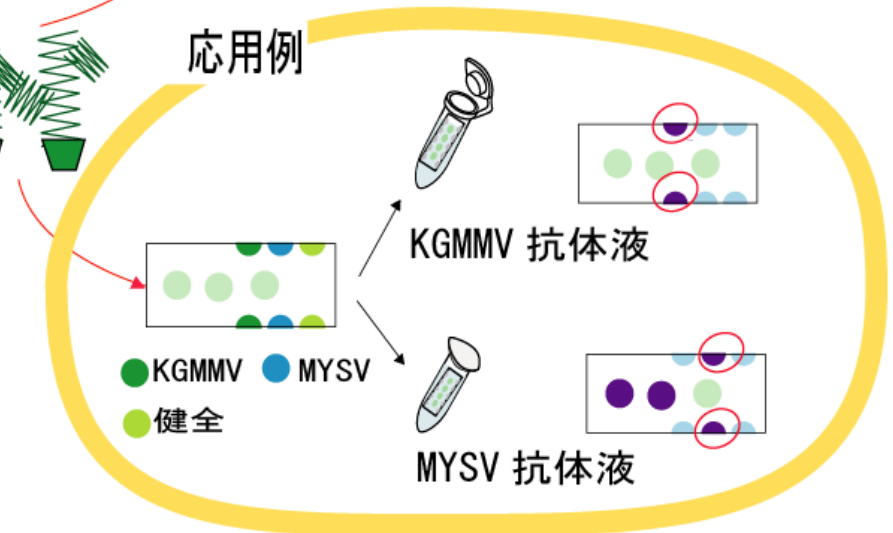
- ① 反応容器の採用と
1～3週間反復利用
できる抗体液



- ② コントロール（対照）の設置
＝判定の目安を表示

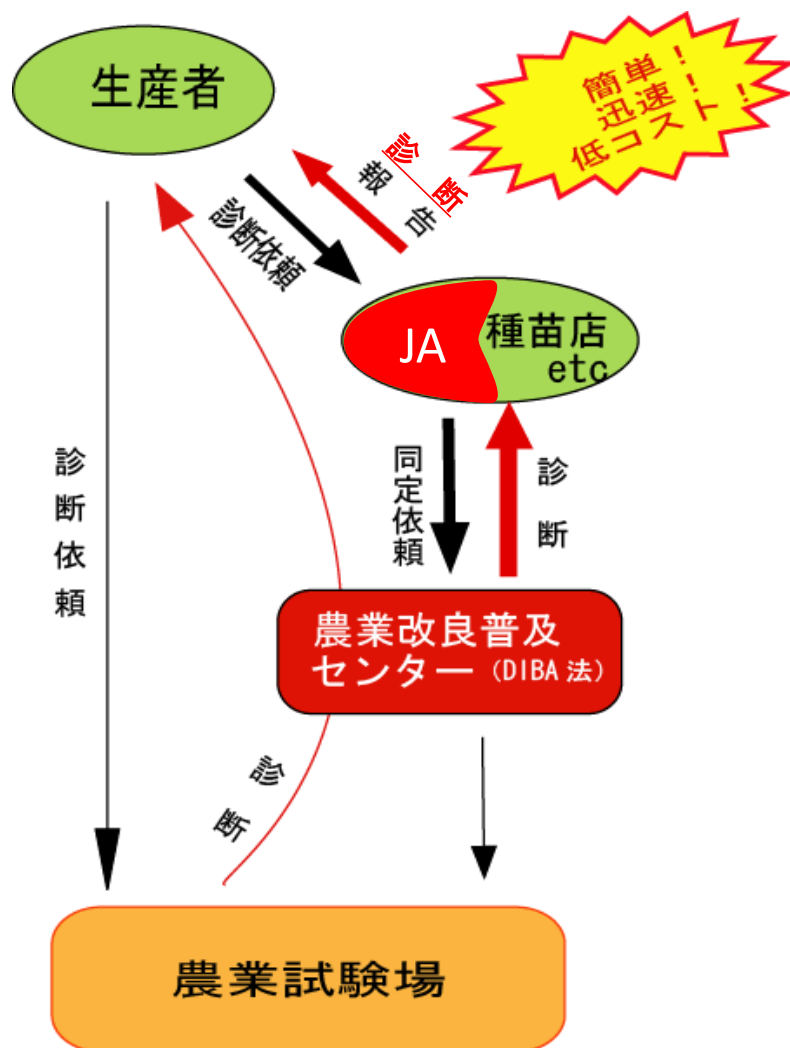


応用例



- ③ 検定シートの作成・配布
1シートで複数サンプル（約5件）の
検定が可能

改良DIBA法によるウイルス診断技術の普及へ



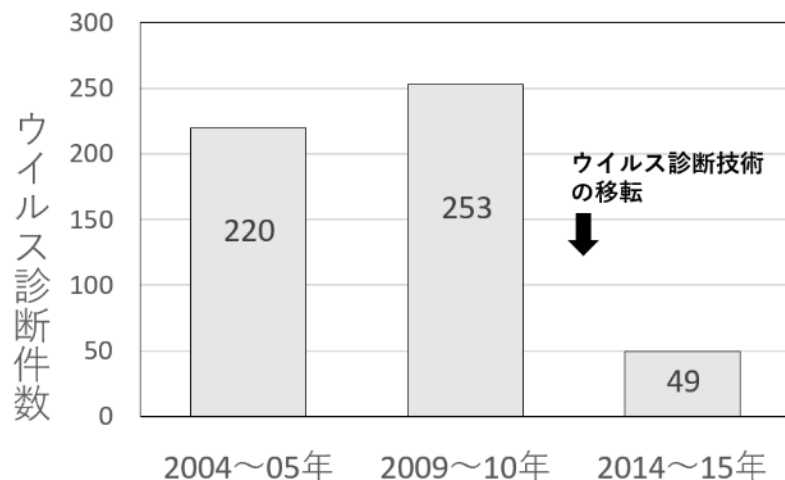
配布キットの改良



実技研修会の実施(技術移転)

改良DIBA法の普及

試験場における診断業務の軽減

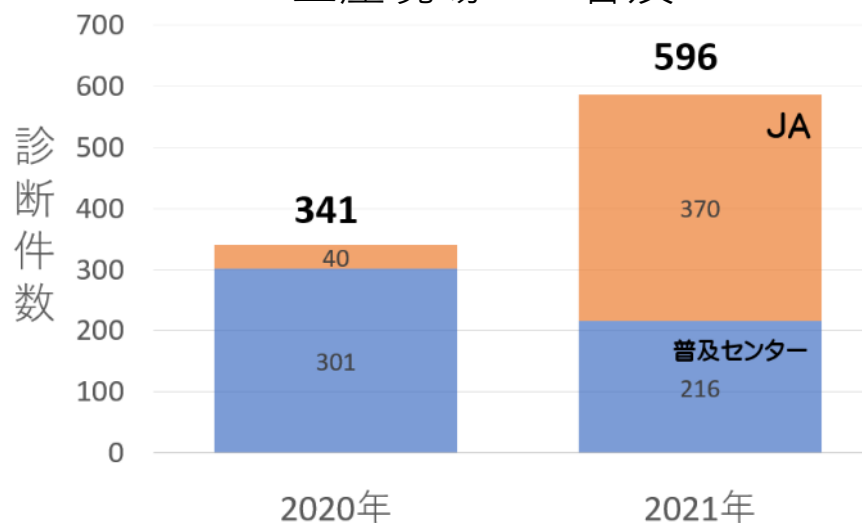


主な診断法との比較

検定方法	検定規模	所要時間	単価/件
改良DIBA法	1～5件	約1時間	50円
DIBA法	1～5件	約2時間	50円
ELISA法	1～96件	1～2日	100円～
RIPA法	1件	約10分	1,100円

現場の活用例

生産現場への普及



改良DIBA法 検定結果シート

No. 普及センター A

年月日	担当名	農場名 (生産者名)	サンプル名 (品種名・生産者名・ロット)	発生状況等		判定結果 (MY/KG)	シート貼り付枚数
				症状	発生場所・発生時期 / 発生回数など		
11/25	田中	JA	モザイク病	モザイク病	11/25	+	1枚
12/2	田中	JA	モザイク病	モザイク病	12/2	+	1枚
12/7	田中	JA	モザイク病	モザイク病	12/7	+	1枚
12/13	田中	JA	モザイク病	モザイク病	12/13	+	1枚

おわりに

- 本診断技術については、九州・沖縄地区植物防疫新任者研修をはじめ、植物病害診断研究会、植物病害診断教育プログラム等において、県外機関等へも広く周知を図っています。
- エライザ法診断薬を流用することで他の多くのウイルス病害に適用が可能と考えられます。
- 現在、本県ではピーマン黄化えそ病（TSWV）への適用拡大を研究中です。
- 本診断技術の開発・普及は、関係職員の研究協力と生物環境部 会計年度任用職員による試薬キットの作成・配布、専門技術員等による実技研修の実施やサポートによるものです。謝意を表します。

ご清聴ありがとうございました。