

メロン幼苗利用による土中のメロンえそ斑点ウイルス およびその媒介菌の検出法

松尾 和敏・内川 敬介
(長崎県総合農林試験場)

A method for detection of *Melon necrotic spot virus* and its vector in infested soil using young melon seedlings. Kazutoshi Matsuo and Keisuke Uchikawa (Nagasaki Prefectural Agricultural and Forestry Experiment Station, Isahaya, Nagasaki 854-0063)

Key words : detection, melon, *Melon necrotic spot virus*, *Olpidium radicale*, soil

緒 言

メロンえそ斑点病は、メロンえそ斑点ウイルス (*Melon necrotic spot virus*, MNSV) を病原とするウイルス病で、汁液伝染および土中に生息する菌類の *Olpidium radicale* Schwartz & Cook を介して種子伝染や土壌伝染をする。本病の発生地ではほとんどが土壌伝染であるため、防除が困難で発生を繰り返している圃場が多い (松尾, 2002)。本病を的確かつ効率的に防除するためには、本媒介菌の性状や土中における動態ならびに病原ウイルスとの相互関係などを明らかにする必要があるが、本菌は絶対寄生菌であるため、人工培地を用いた菌の分離検出や培養はできず、また、MNSV についても土中からの検出法が未確立であるため、これらの土中における詳細な動態は解明されていない。さらに、本病の防除試験や有効な防除素材の検索は主に圃場レベルで行われており (福原・角田, 2002, 古木, 1981, 井上ら, 1998, 松尾・菅, 1993, 吉田・後藤, 1987)、西南暖地のハウス栽培においては、本病は半促成栽培において発生しやすく、抑制栽培では発病程度が極めて低い (松尾, 1991) ことから、防除試験の実施は、半促成栽培期の年 1 回に限られている。

そこで、これらの動態解明や有効な防除素材の検索効率化に資するため、メロン幼苗を利用した土中における MNSV や *O. radicale* の検出法を検討したので、ここにその概要を報告する。

材料および方法

1. メロンの育成期間と根部における *O. radicale* ならびに MNSV の感染増殖

本病汚染土壌をつめたビニルポット (径 9 cm) に本

葉 1 枚期のアールスメロン (品種: ベネチア夏 I) を植え付け、25℃定温の人工気象器 (小糸工業社製, KG-50MLA 型, 照明 8,000~12,000LUX, 14 時間) 内で育成した。植え付け 1 週間後から 5 週間後まで、1 週間ごとに 3 株ずつ各根部を流水中で泥がほとんどなくなるまで十分に水洗し、根部における *O. radicale* と MNSV の感染増殖状況を調査した。*O. radicale* については、根部の中ほどの任意な細根における寄生の有無や器官の種類を、染色せずにそのまま光学顕微鏡下で観察した。また、MNSV については、その水洗した根部に付着した水分をペーパータオルで除去し、上部から 3 分の 1 あたりの一部 (0.2~0.5g) を切り取って、10 倍量の 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で磨砕し、その磨砕液をカーボラダム法により第 1 本葉展開期のメロン (品種: ベネチア夏 I) の子葉に汁液接種して、局部病斑の発生の有無により本ウイルスの感染を検定した。なお、汚染土壌は、2001 年半促成栽培における本病 (病原ウイルス系統: MNSV-NH) 発生圃場 (松浦市調川町, 細粒黄色土) から 7 月 10 日に採取し、15℃定温で風乾保存後 8 月 11 日に供試した。さらに、試験には大きな夾雑物を除去し、土壌粒子の大きさを概ね揃えるため、4.75mm 目のふるいにかけて用いた。

2. メロンの育成温度と根部における *O. radicale* ならびに MNSV の感染増殖

1 と同様にメロン幼苗を植え付けて 20, 25 および 30℃定温の人工気象器 (日本医科器械製作所製, LH-200-RDCT 型, 照明 5,500~6,500LUX, 14 時間) 内で育成し、植え付け 1 週間後から 3 週間後まで、1 週間ごとに各 3 株ずつ根部を水洗して、根部における *O. radicale* と MNSV の感染増殖状況を調査した。調査方法は 1 と同じであるが、MNSV については、生物検定のほか、根

部の100倍粗汁液をサンプルとして、DAS-ELISA 検定（抗血清：日本植物防疫協会作製）を行った。また、随時生育状況を観察するとともに、葉数を調査した。なお、汚染土壌は2002年半促成栽培における本病（病原ウイルス系統：MNSV-NH）発生圃場（松浦市御厨町、褐色低地土）から6月21日に採取し、15℃定温で風乾保存後同様にふるいにかけて8月12日に供試した。ELISA 検定の対照として用いる健全根は、試験場内の無発病土壌（淡色黒ボク土）をオートクレープしたものに同様にメロン幼苗を植え付け、25℃で育成して得た。

結 果

1. メロンの育成期間と根部における *O. radiale* ならびに MNSV の感染増殖

O. radiale は、第1表に示すようにメロンを植え付けて1週間後、根中に遊走子のうがまれに認められ、次第に増加して3週間後に最も多くなった。また、3週間後には休眠胞子が認められ始めて、4週間後には遊走子のうより割合が高くなり、その後は同様な傾向で推移した。

MNSV は、植え付け2週間後に感染が認められたが、その後の増殖量は生物検定では判然としなかった。

第1表 えそ斑点病汚染土壌に植え付けたメロン根部における *Olpidium radiale* およびメロンえそ斑点ウイルスの感染増殖推移^{a)}

植付期間 (週)	反復	<i>O. radiale</i> ^{b)}		MNSV ^{c)}	メロンの生 育ステージ
		遊走子のう	休眠胞子		
1	a	-	-	0	本葉2枚期
	b	-	-	0	
	c	+	-	0	
2	a	++	-	11	本葉3枚期
	b	++	-	2	
	c	++	-	30	
3	a	+++	++	1	本葉5枚期
	b	+++	++	2	
	c	+++	++	8	
4	a	++	++	NT	本葉7枚期
	b	++	++	NT	
	c	++	++	NT	
5	a	++	+++	NT	本葉9枚期
	b	++	+++	NT	
	c	++	+++	NT	

a) 育成温度：25℃定温

b) -：認めない，+：認める，++：容易に認める，+++：容易にかつ多量に認める

c) メロン子葉2枚当たりの局部病斑数，NT：未試験

2. メロンの育成温度と根部における *O. radiale* ならびに MNSV の感染増殖

20, 25および30℃で育成した場合の *O. radiale* ならびに MNSV の感染増殖推移とメロンの生育ステージを第2表に示した。*O. radiale* は、メロンを植え付けて1週間後、30℃において遊走子のうがまれに認められ、2週間後には全温度区で遊走子のうが認められた。3週間後には全温度区で休眠胞子も認められ始めて密度がさらに高くなり、増殖量は両器官合わせて30℃が最も多く、次いで25℃、20℃の順であった。

MNSV の感染は、生物検定によって植え付け1週間後25℃で、ELISA 検定では同じく1週間後に20℃と25℃で検出された。また、2週間後には ELISA 検定により全温度区で検出されて、3週間後は全体としてウイルス濃度が高まり、温度別では25℃が最も多く、次いで20℃、30℃の順であった（第1図）。

メロンの生育は、30℃が最も良く、次いで25℃、20℃の順であり、根量も地上部の生育に比例していた。

考 察

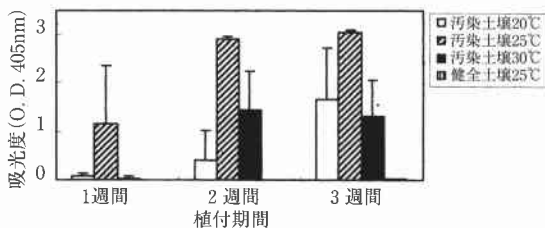
これまで、古木（1981）が、MNSV と *O. radiale* の遊走子を含む液中でマスクメロンの水耕栽培を行い、遊走子のう、休眠胞子ならびに MNSV の根部感染を栽培3週間後に認めているが、本研究では、土中における MNSV やその媒介菌である *O. radiale* の簡易な検出法を確立するため、メロン幼苗を汚染土壌に植え付けて人工気象器内で育成し、その期間と温度について検討した。その結果、両者とも植え付け1週間後には根部から検出されて次第に増加するが、20, 25および30℃の中では、MNSV は25℃、*O. radiale* は30℃が増殖適温であることが判明し、25℃で3週間以上の育成で、両者を同時に検出できることが明らかになった。育成温度との関係については、Teakle and Thomas（1985）のキュウリを用いた *O. radiale* の遊走子の増殖量試験において、20℃、30℃、35℃の育成温度下では30℃で最もよく増殖し、次いで20℃、35℃の順という結果とほぼ同じ傾向であった。

以上のことから、メロン幼苗を植え付け後、25℃で3週間育成すると、根部から MNSV と *O. radiale* を同時かつ容易に検出できることが明らかになり、本検出法は土中におけるこれらの動態解明や土壌消毒の効果確認のほか、抵抗性品種や台木の検定ならびに拮抗微生物の選抜など、本病に対する防除素材の検索にも活用できると思われる。また、人工気象器を利用することにより、これらが年間を通して実施可能となり、効率化が大いに図られる。これまで、井上ら（1997）が人工気象器を用い

第2表 えそ斑点病汚染土壌に植え付け後各種温度で育成したメロン根部における *Olpidium radicale* とメロンえそ斑点ウイルスの感染増殖推移

植付期間 (週)	育成温度	反復	<i>O. radicale</i> ^{a)}	MNSV ^{b)}		メロンの生 育ステージ ^{c)}
				ELISA 検定	生物検定	
1	20℃	a	—	0.015	0	NT
		b	—	0.152	0	NT
		c	—	0.052 (0.075)	0 (0)	NT
	25℃	a	—	2.471	1	NT
		b	—	0.085	0	NT
		c	—	0.859 (1.138)	1 (0.7)	NT
	30℃	a	+	0.035	0	NT
		b	—	0.031	0	NT
		c	—	0.039 (0.035)	0 (0)	NT
2	20℃	a	+	0.013	0	2.2
		b	+	0.090	0	2.2
		c	+	1.102 (0.402)	0 (0)	2.5 (2.3)
	25℃	a	+	2.929	4	3.5
		b	+	2.970	4	4.0
		c	+	2.852 (2.917)	9 (5.7)	4.0 (3.8)
	30℃	a	++	0.655	0	6.2
		b	++	2.272	1	6.5
		c	+	1.417 (1.448)	10 (3.7)	6.2 (6.3)
3	20℃	a	++	2.422	2	3.5
		b	++	0.898 (1.660)	4 (3.0)	4.0 (3.8)
		c	++	3.077	5	4.5
	25℃	a	++	3.007	4	5.0
		b	++	3.078 (3.054)	17 (8.7)	5.2 (4.9)
		c	+	1.198	4	8.5
	30℃	a	++	0.654	1	7.5
		b	+++	2.106 (1.319)	1 (2.0)	8.2 (8.1)
		c	+++			

- a) 遊走子のうと休眠胞子を合わせたもので、寄生程度は第1表に同じ
 b) ELISA 検定：吸光度 (O.D.405nm), 対照の健全根の吸光度：植え付け1週間後0.008, 2週間後0.004, 3週間後0.014, 生物検定：メロン子葉2枚当たりの局部病斑数
 c) 本葉枚数, () はいずれも a, b, c の3反復の平均値



第1図 えそ斑点病汚染土壌に植え付け後各種温度で育成したメロン根部からのメロンえそ斑点ウイルスのELISA検出

て、23~28℃の恒温恒湿で照明17時間条件下で育成することにより、汚染土壌に播種して7日後からMNSVを検出できるとしているが、本研究では、ウイルスの増殖量と媒介菌の寄生度の両面から検出に適する育成温度や期間を明らかにしたことにより、検出の精度がより高まった。また、メロンの生育を揃えるためや土壌灌注剤の効果検定に利用するには、検定土壌に直接播種するより、幼苗を植え付ける方がより安定した明瞭な結果が得られると思われる。

なお、本研究に用いたMNSVの系統は、MNSV-NHであり、わが国にはこの他病原性等が異なるMNSV-NKとMNSV-Sが分布している(松尾, 2002)が、こ

れら3系統のメロン体内での増殖性は25℃の定温条件下ではほぼ同じ(松尾, 未発表)であることから, 本検出条件は他の2系統にも適用できると思われる。また, 媒介菌 *O. radiale* の系統分化については, これまで報告はないが, 本研究では一地域の土壌だけを用いており, 土壌の種類によっては *O. radiale* の増殖性に差異が生じ, 検定用メロンの育成期間など最適条件が若干変わる可能性もあることから, 防除素材の効果検定等に当たっては, 必ず予備試験を行い, 検定時にはポジティブコントロールとネガティブコントロールを設ける必要がある。

さらに, 検出には, 両者に対して感受性が高いアールスメロンやアールス系ネットメロンの品種を用い, 活着性やその後の管理面などから本葉1枚期頃の幼苗が適している。また, ビニルポットで試験する場合, 用いるポットは容量や取り扱い易さから径9~10.5cm位が適し, 防除素材の効果検定などにおいては, メロンの生育や防除効果等のバラツキが生じるのを防ぐため, 土壌は一定の大きさ(4~5mm目)のふるいにかけて用いることが必要と思われる。

本検出法では, MNSVの検出を根部から行っているが, これに付着した水分の除去に手間を要することから, より簡便化するため, 今後胚軸(地際部茎)からの検出の可能性について検討が必要である。さらに, *O. radiale* の寄生度については, 肉眼による光顕観察で大まかに区分しているだけであるので, 客観的にかつ数値化できるような調査方法の確立が必要である。

摘 要

えそ斑点病汚染土壌をつめたビニルポットにメロン幼苗を植え付け, 人工気象器内で20, 25および30℃で育成したところ, 根部において媒介菌である *O. radiale* は光顕観察により30℃で1週間後, MNSVもELISA検定により25℃で1週間後に検出された。その後, いずれも増殖し, *O. radiale* の増殖量は, 30℃で最も多く, 次いで25℃, 20℃の順であったが, MNSVは25℃が最も多く, 次いで20℃, 30℃であった。*O. radiale* の器官別では, 25℃で管理すると1週間後には遊走子のうが認められて

次第に増加し, 3週間後には休眠胞子も検出され始めて, 4週間後以降は休眠胞子の方が割合が高くなった。以上のことから, メロン幼苗を汚染土壌に植え付け, 25℃で, 3週間育成すると, 根部から *O. radiale* とMNSVを同時かつ容易に検出できることが明らかになった。本検出法は, 土中におけるこれらの動態解明や土壌消毒の効果確認のほか, 抵抗性品種の検定や拮抗微生物の選抜など, 本病に対する防除素材の検索などに活用できると思われる。

引 用 文 献

- 福原宏行・角田佳則(2002)クロルピクリン・D-Dくん蒸剤によるメロンえそ斑点病の防除。今月の農業46(4):40-45。
- 古木市重郎(1981)メロンえそ斑点病の伝染病学的研究。静岡農試特別報告14:1-94。
- 井上 興・片川 聖・角田佳則・鍛冶原寛(1998)メロンえそウイルス(MNSV)に対するウリ科植物の抵抗性と台木を用いた防除。山口農試研報49:32-40。
- 井上 興・亀谷満朗・角田佳則・鍛冶原寛(1997)メロンえそ斑点病汚染土壌に栽培した植物の根からのウイルスの検出。日植病報63:525(講要)。
- 松尾和敏(1991)メロンえそ斑点病の発生生態と防除に関する研究第1報 発生分布と発生様相。長崎総農林試研報(農業)19:1-21。
- 松尾和敏(2002)暖地ハウスメロンにおける「えそ斑点病」の発生生態学的研究。長崎総農林試特研報(農業)3:1-110。
- 松尾和敏・菅 康弘(1993)メロンえそ斑点病に対する土壌消毒剤と輪作の防除効果。九病虫研会報39:43-47。
- Teakle, D. S. and B. J. Thomas (1985) Effect of heat on zoospore motility and multiplication of *Olpidium radiale* and *O. brassicae*. Ann. appl. Biol. 107:11-15。
- 吉田幸二・後藤忠則(1987)メロンえそ斑点病の防除方法。北海道農試研報148:75-83。

(2003年3月11日受領; 6月5日受理)