

新潟県におけるメロンえそ斑点病の発生

齊藤泰彦・藤巻伸一*・加茂川良弘**・小島 誠

Yasuhiko SAITOU, Shinichi FUJIMAKI, Yoshihiro KAMOGAWA and Makoto KOJIMA :
Occurrence of melon necrotic spot disease in Niigata Prefecture

Summary

Small spherical virus-like particles were found in the dip preparations obtained from melon plants showing severe leaf necrosis in either glasshouses or the fields in Niigata. These particles reacted with an antiserum to melon necrotic spot virus (Hibi, 1985) with immunosorbent electron microscopy. The causal agent was sap transmissible and produced necrotic local lesions on inoculated cotyledons of muskmelon. Based on these facts, the agent was identified to MNSV. After several single-lesion transfers, the virus was purified from fresh cotyledons showing lesions. The yield of virus was relatively high (c. 10~40 μ g/g fresh tissue). An antiserum to this isolate was produced by injection of purified preparations to a rabbit. Serological tests were conducted by indirect ELISA using the IgG (1 μ g/ml) and 1000-fold diluted anti-rabbit goat IgG conjugate. In field survey, the virus was easily detected by the ELISA from muskmelon plants showing necrotic spots on upper leaves or necrosis on lower ones. It is the first report on occurrence of melon necrotic spot disease in Niigata Prefecture.

メロンえそ斑点病は、静岡県においてメロンの新病害として初めて報告されたウイルス病である¹⁾。その後我が国の幾つかの地域でその発生分布が確認され、国外においてもその発生が報告されている²⁾。この病原は、メロンえそ斑点ウイルス (MNSV) であり、土壌中の *Olpidium cucurbitacearum* によって伝搬され、メロンの各部位に様々な壊死を起こすことが知られている²⁾。

新潟県においてはこれまでその発生は報告されていなかったが、数年前よりハウス栽培メロンあるいは露地メロンにおいて下位葉の葉脈に沿って樹枝状の壊死病斑を呈する株が散見され、それらの葉片から直径約 30nm の球形ウイルス様粒子が観察されたことから、本県においてもメロンえそ斑点病の発生の可能性が示唆された。筆者らは本ウイルスの抗血清を作製し、酵素結合抗体法 (ELISA) により新潟県下のメロン栽培圃場を調査した。その結果、本県においてもメロンえそ斑点病の発生が確認されたのでここに報告する。なお本病の同定時に用いた抗 MNSV 血清を分譲して頂いた日比忠明氏 (生物資源研究所)、CMV の検定に御協力下さった佐野義

孝氏 (新潟大学自然科学研究科) 並び数々の便宜を計って下さった桜井精氏をはじめとする新潟県園芸試験場の方々に深く感謝する。

材料および方法

1 ウイルスの分離および増殖

本試験に供試したウイルスは、1986年7月に新潟市西野に於いてメロン (ふかみどり) の下葉に現れていた壊死病斑から、マスクメロンの子葉を用いて単一病斑分離したものである。更に同植物で増殖維持し、接種源は-20°Cで保存した。

2 免疫電子顕微鏡 (ISEM) 法

分離した病斑を抗 MNSV 血清 (日比氏より分譲) を用いた ISEM (トラップデコレーション法)³⁾ で電顕観察した。ホルムバル支持膜 (400メッシュ銅グリット使用) を protein A 及び抗体で処理した後、罹病葉粗汁液に浮かべ、更に抗体処理をし酢酸ウラニルで染色して電顕観察 (JEOL100B, 80KV) を行った。各処理の間に 0.1Mリン酸緩衝液による洗浄を行い、染色前には蒸留水で洗浄した。

3 ウイルスの精製

精製は、Hibi らの方法³⁾ を一部改変した方法で行った。接種4~10日後の子葉を生葉のまま2倍量の67 mMリン酸緩衝液 (5 mM EDTA, 13 mM 2-メルカ

新潟大学農学部 Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-21

*新潟県園芸試験場 Niigata Horticultural Experiment Station, Seirou, Kitakanbara, Niigata 957-01

**新潟県農業改良普及所 Niigata Agricultural Extension Station, Niigata 950

プトエタノールを含む、pH7.2)を加えた乳鉢中で磨砕し、15,000×gで10分間遠心した。上清に0.1倍量のクロホルムを加え、pHを5.3に調整した後、15,000×g、10分間遠心と105,000×g、2時間遠心を行い、粗ウイルス画分を得た。これを10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、10~40%のショ糖密度勾配に重層して58,500×g、180分間遠心後、ISCOフラクショネーター(UA-5)でウイルス画分を回収して、純化試料を得た。

4 抗血清の作製と血清試験

純化ウイルス試料(10~100μg/ml)を用い、筋肉注射(フロイント完全アジュバント使用)と3回の静脈注射を家兎に施し、最終的に力価512倍(重層法)の抗血清を得た。ELISA(間接法⁹⁾)は、得られた抗血清から精製したγ-グロブリンを1次抗体とし、ヤギ抗ウサギ抗体 conjugate (Helix Biotech 社)を2次抗体として行い、その至適条件は10倍に希釈した罹病葉及び健全葉の粗汁液を抗原として決定した。

また圃場調査においては、圃場から採取したえそ症状を示すメロンの葉の粗汁液を10倍に希釈してELISA試験を行った。またCMVについても、抗CMV血清(佐野氏より分譲)を用いてその至適条件⁷⁾(1次抗体0.5μg/ml, 2次抗体の希釈倍率は1000倍)に従ってELISA試験を行った。

なおすべてのELISA試験の結果は、基質添加30分間後にマイクロプレート光度計(MTP-12, コロナ社)で測定したものを基準とした。

結 果

1 ウイルスの分離および同定

分離したウイルスはメロンの子葉に直径1~2mmの褐色の壊死斑を形成し(図版A)、その病斑を用いてISEMを行ったところ抗MNSV血清と反応した。これらのことから本分離株をメロンえそ斑点ウイルス(MNSV)と同定した。

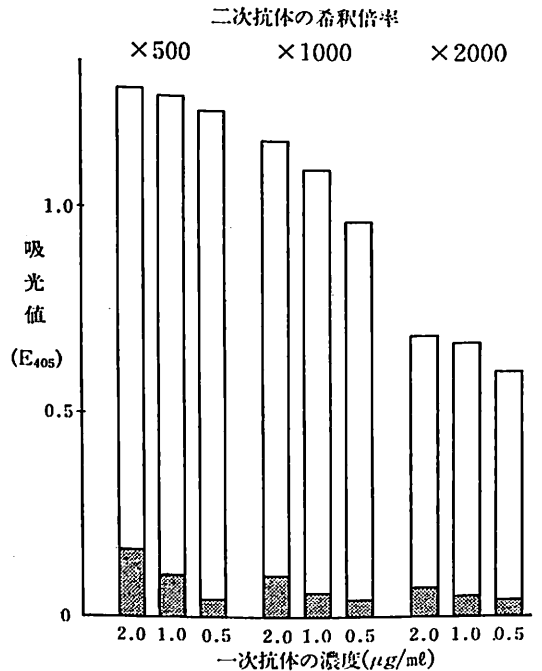
2 ウイルスの精製

本試験で精製したウイルス試料は、ISCOフラクショネーターによる走査像で単一のピークを示し、その画分の紫外吸収曲線は波長260nmで極大、245nmで極小の核たんぱく特有のスペクトルを示した。また電顕観察では直径30nmの球形粒子が観察され、夾雑物は殆ど認められなかった(図版D)。ウイルス収量は罹病葉(生葉)1g当たり10~40μgであった。

3 ELISAの至適条件

圃場調査に先立ち、MNSVの検定のための至適条件

を決定した。罹病葉及び健全葉(マスクメロン)を抗原とした場合、非特異反応が少なく(健全葉での吸光値は0.05以下)十分に反応が得られた1次抗体1μg/ml, 2次抗体の希釈倍率を1000倍を至適条件とした(第1図)。



第1図 ELISAの至適条件

このヒストグラムは、一次抗体の濃度(2.0, 1.0, 0.5μg/ml)と二次抗体の希釈倍率(x500, 1000, 2000)の組み合わせによる健全葉(ドット部)と罹病葉(白色部)の吸光値を示す。

4 ELISAによる圃場調査

新潟市近郊の一般圃場より壊死病斑を示す罹病株(疑似株)を採取し、ELISAによる検定を行った結果、26株中13株に陽性反応が得られた(第1表)。病徴は、上位葉に現われる小白斑点(図版B)及び下位葉に見られる樹枝状病斑(図版C)が主な病徴であったが、特に下位葉に現れた樹枝状病斑からCMVのみが検出された疑似株も見られた。

第1表 新潟市近郊から採集したメロンのELISA試験の結果

| 採集地 | No. | 抗 血 清 | |
|-----|-----|----------------------|-------|
| | | MNSV | CMV |
| 細 野 | 01 | ☆0.319 ¹⁾ | 0.008 |
| | 02 | ☆0.801 | 0.009 |
| | 03 | ☆0.138 | 0.013 |
| | 04 | ☆0.316 | 0.008 |
| | 05 | 0.011 | 0.001 |
| | 06 | 0.046 | 0.000 |

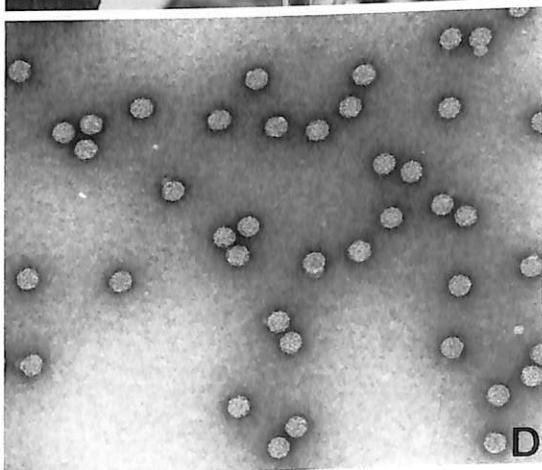
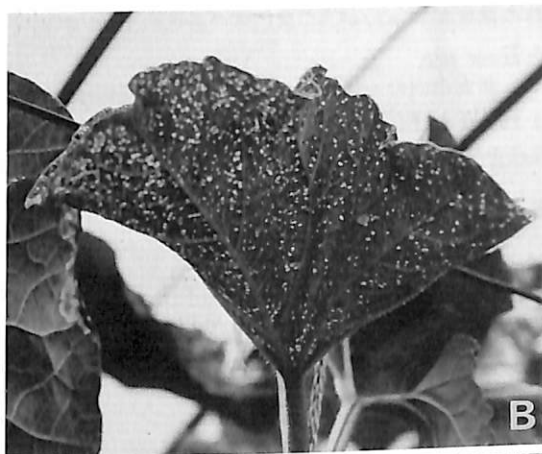
| | | | |
|----|-------|--------|--------|
| 西野 | 07 | ☆0.104 | 0.002 |
| | 08 | ☆0.504 | 0.006 |
| | 09 | ☆0.533 | 0.008 |
| | 10 | 0.043 | 0.019 |
| | 11 | 0.014 | 0.004 |
| | 12 | 0.020 | 0.008 |
| | 13 | 0.014 | 0.010 |
| 14 | 0.024 | 0.007 | |
| 中島 | 15 | ☆0.153 | 0.010 |
| | 16 | ☆0.116 | 0.008 |
| | 17 | ☆0.113 | 0.004 |
| | 18 | ☆0.154 | 0.011 |
| | 19 | ☆0.338 | 0.007 |
| | 20 | ☆0.314 | 0.008 |
| 女池 | 21 | 0.017 | ☆0.830 |
| | 22 | 0.014 | ☆0.830 |
| | 23 | 0.025 | ☆0.947 |
| | 24 | 0.025 | ☆1.075 |
| | 25 | 0.020 | ☆1.114 |
| | 26 | 0.030 | ☆0.774 |

1) E405の吸光値

☆は陽性(吸光値が0.1以下陰性, 0.1以上を陽性とした)

考 察

本試験に用いたウイルス分離株は、メロンの子葉の病徴及び ISEM の結果から MNSV と同定した。その純化試料により作製した抗血清を用いた ELISA 試験で、新潟市内の一般圃場から多くの陽性反応を示した株が発見され、新潟県におけるメロンのえそ斑点病の発生が本試験で初めて確認された。菌類媒介のウイルス病は、チューリップえそ病 (TNV) 8) やテンサイそう根病 (BN YVV) 1) などが知られているが、その媒介菌による伝搬機構については不明な点が多く、またその防除も極めて困難である。圃場では CMV やその他のウイルスによると思われる疑似株も多く、病徴だけで本病を診断するのは難しく土壌伝染性の本病と虫媒伝染性の病害の防除方法の違い等からも本病の診断技術を早急に確立することは重要であると考えられる。



- A 本分離株の汁液接種後、マスクメロンの子葉に生じた局部病斑
- B 圃場で観察された小白斑点の病徴
- C 圃場で観察された樹枝状の病徴
- D 本分離株の純化試料の電顕像(酢酸ウラン染色×100,000)

また最近、MNSV の新系統についての報告⁶⁾もあり、本分離株の理化学的、生物学的性状についての研究を更に進めたい。

摘 要

1 1986年に新潟市の栽培メロンに発生した壊死病斑から直径約 30nm の球形ウイルス粒子が観察され、ISEM による試験を行ったところ、抗 MNSV 血清と陽性の反応を示した。このことから本分離株を MNSV と同定した。

2 単一病斑分離後、ウイルス分離株をマスクメロンの子葉で増殖させ、ウイルスの純化を行った。純化試料は核たんぱく特有のスペクトルを示し直径 30nm の球形粒子が均一に含まれていた。

3 純化試料を用いて家兎に免疫し、力価512倍の抗血清を得た。

4 本抗血清を用いた間接 ELISA の至適条件は一次抗体の濃度が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、二次抗体の希釈倍率が1000倍であった。

5 新潟市内の一般圃場から採取した罹病株（疑似株）26検体を ELISA 検定を行ったところ13株が陽性であった。

介者、*Polymyxa betae* Keskin の生態と防除に関する研究。北海道立農業試験場報告60：1～89。 2) 古木市重郎（1981）メロンえそ斑点病の伝染病学的研究。静岡県農業試験場特別報告14：3～50。 3) Hibi, T.

（1985）Melon necrotic spot virus. Descriptions of plant viruses No. 302。 4) 岸 国平（1960）マスクメロンのバイラス病に関する研究：俗称点々病の病原について。日植病報25：237～238。 5) 小島 誠

（1980）免疫電子顕微鏡法による植物ウイルス病の診断。植物防疫34：111～115。 6) 松尾和敏（1989）メロンえそ斑点ウイルスの新系統。日植病報55：88。 7) 佐野義孝・関川正規・小島 誠（1986）新潟砂丘地における有翅アブラムシの発生消長とダイコンのモザイク病について（第3報）ダイコンから分離されたキュウリモザイクウイルスについて。北陸病虫研報34：45～48。 8)

笹川礼子・名畑晴信・小島 誠（1988）チューリップえそ病に関する電子顕微鏡的観察。北陸病虫研報36：28～31。 9) Somowiyarjo, S., Sako, N. and Nonaka, F. (1985) Application of non-precoated indirect enzyme-linked immunosorbent assay detecting zucchini yellow mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 51：569～575。

（1989年5月15日受領）

引用文献

1) 阿部秀夫（1987）テンサイそう根病のウイルス媒