

新潟県におけるダイズウイルス病に関する研究  
(第3報) ダイズ褐斑粒の発生とダイズモザイクウイルスの感染時期

高野直行・小島 誠・原沢良栄\*・藤巻雄一\*

Naoyuki TAKANO, Makoto KOJIMA, Ryohei HARASAWA\* and Yuichi FUJIMAKI\*: Studies on soybean virus diseases in Niigata Prefecture (3) Relationship between the occurrence of mottling on seeds and the infection timing of soybean mosaic virus

Summary

The present paper deals with the relationship between the host age of soybean plants when they were inoculated with SMV and the occurrence of mottling on their seeds. Mottling appeared on seeds of inoculated plants even though its percentage and pattern were variable depending on timing of infection. Highest percent age of mottling with typical radial pattern around the hilum of seeds was observed when plants had been inoculated at their flowering stage. This was also confirmed by a field examination. Seed transmission and occurrence of viral antigen in the embryos of fully dried seed materials were confirmed in the plants inoculated at their early leaf stages.

前報<sup>3,4)</sup>で触れたように、現在新潟県ではダイズ種子の品質低下につながる褐斑粒の発生が重要視され、その原因究明と防除対策の確立が急がれている。本試験では、ダイズモザイクウイルス(SMV)の感染と褐斑粒発生との関係を明らかにすべく、接種時期を変えてウイルスの感染時期と褐斑粒の発生率および紋様との間に何らかの関係があるかどうかを確かめた。同時に、圃場における自然感染条件の元で、病徴の出現時期と褐斑粒の発生状況との関係を調査し、接種試験の結果と比較検討した。また、完熟種子の一部を無作為に選び、ウイルス抗原の検出も試みた。供試したSMV-B系統は飯塚典男氏(北海道農試)から、またダイズ種子(十勝長葉)は番場宏治氏(北海道中央農試)からそれぞれ分譲して頂いた。ここに記してお礼申し上げる。

材料及び方法

1 接種試験

本試験では、供試ウイルスとしてSMV-B系統(北海道農試より分譲)を、供試ダイズ品種として本ウイルス系統に感受性の十勝長葉(北海道中央農試より分譲)

をそれぞれ用いた。61年5月25日にダイズをワグナーポットに播種して2本立とし、50%遮光の網室で栽培した接種は1区2ポットの4個体とし、初生葉(6月16日)第1葉(6月24日)、第2葉(7月1日)、第3葉(7月8日)、第4葉(7月12日)、第5葉(7月16日)、第6葉(7月21日)、第7葉(7月29日)の8区に分け各葉位の複葉が展開したときにウイルスを接種した。接種には凍結罹病葉を用い、5倍量の0.1Mりん酸緩衝液(pH7.0)とともに磨砕して粗汁液とした。対照区として無接種区を設けた。

2 圃場における自然感染試験

5月25日に播種したダイズを第1葉展開期に圃場に移植し、アブラムシ無防除の条件で試験した。予め初生葉にウイルスを接種したダイズを畝の中央に1本仕立て20cm間隔に3株設置し、その両側に健全ダイズを1本仕立て30株ずつ20cm間隔で植え、同一の配置で2畝用意した。その後、1週間毎に病徴観察しウイルスの感染の拡大を確認した。

3 酵素結合抗体法(ELISA)によるウイルスの検出

8区に分けて接種したダイズ個体で結実した完熟種子の一部を無作為に選んで、1晩浸漬したあと種皮、胚および子葉の各組織に分け、30倍量のPBS-tweenでそれぞれ磨砕した。遠心分離によって得られた上清を供試抗原として、前報<sup>4)</sup>で述べた至適条件下でELISAによるウイ

ルスの検出を試みた。検出手順はClark and Adams<sup>1)</sup>の方法に準じた。

4 種子伝染試験

上述の8接種区から得た完熟種子の一部をそれぞれプランターに播種して、展開葉における病徴発現の有無を観察して種子伝染率を求めた。

結 果

1 ウイルス感染時期と褐斑粒発生との関係

初生葉展開期から第7葉展開期までの8区に分けて接種した全てのダイズ個体に褐斑粒が発生していることが確かめられた。一方、対照区の無接種区では褐斑粒の発生は認められなかった。同一接種区の個体間において褐斑粒の発生程度に明らかな差異は見出されず、開花期以降(第5葉展開期以後)に接種した区で発生率が著しく高まった。とくに開花中期に当る第6葉展開期に接種した区では褐斑粒の発生率は100%を示した(第1表)。

第1表 接種時期別にみた褐斑粒発生状況

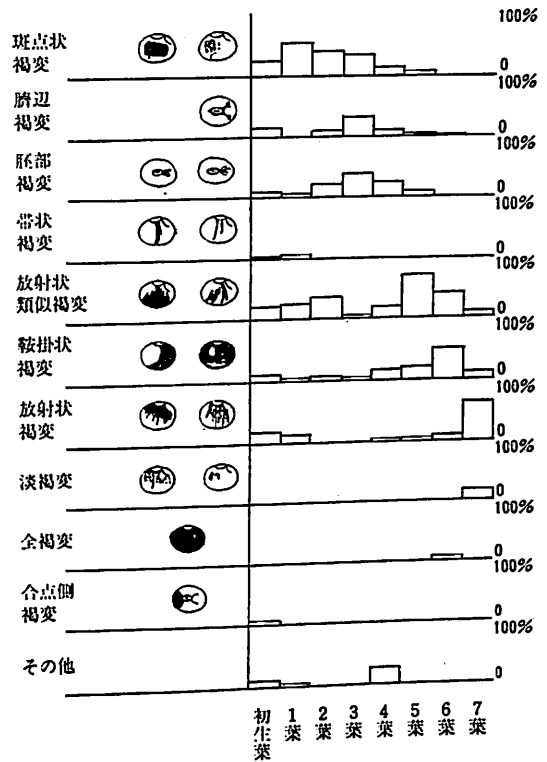
接種時期	個 体 番 号				計	発生率 (%)
	I	II	III	IV		
初生葉	15/17	29/92	37/43	19/33	100/185	54.1
第1葉	6/30	17/41	11/23	14/28	48/122	39.3
第2葉	1/4	8/24	16/38	—	25/66	37.9
第3葉	33/45	20/36	22/44	19/42	94/167	56.3
第4葉	28/35	36/40	27/35	30/44	121/154	78.6
第5葉	65/66	28/34	43/43	—	136/143	95.1
第6葉	44/44	34/34	39/39	62/62	179/179	100
第7葉	26/47	35/42	27/27	58/58	146/174	83.9

分母：調査粒数，分子：褐斑粒

褐斑粒の紋様を第1図に示すように11の型に類別し、接種区ごとにどの型の紋様がどの程度発生しているかを調査した。その結果を第1図に示す。SMVによる褐斑粒の典型的な斑紋とされる放射状褐変<sup>5)</sup>は、第7葉期に接種した区で最も多く見られた。また、全褐変や鞍掛状褐変のような重度の斑紋は第6葉期に接種した区に多く、臍辺や胚部褐変のような比較的軽度の斑紋型は開花前、とくに第3、4葉期に接種した区に多く見られた(第1図)。

2 圃場における自然感染試験

圃場へ移植した8週間後の観察において、全ての株で発病していることが確認された。罹病個体で結実した完熟種子を乾燥調整後、褐斑粒の調査をしたところ、全ての株でその発生が確認された。褐斑粒の発生率はいずれの株でも50%以上と高く、圃場全体では84.3%に達した。病徴が観察された時期別に褐斑粒の発生率を比較すると



第1図 接種時期別の褐斑粒の斑紋型の類別とその頻度

移植1~2週間後の生育前期に比べ6~7週間後の生育後期においてやや高い傾向が認められた(第2表)。この傾向は前述の接種試験の結果とよく一致した。また、

第2表 病徴の発現時期別にみた褐斑粒の発生率

病徴発現時期	1	2	3	4	5	6	7	8(週)
平均 (%)	86.1	74.8	73.3	79.4	87.9	91.2	91.6	75.4

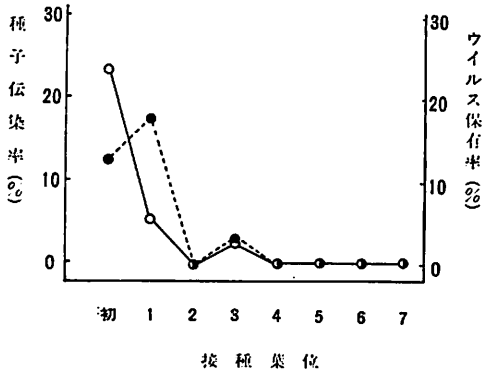
畝の中央に感染源を移植し、毎週病徴発現の有無を観察。各週毎に罹病株をマークし、いつ発病したかを個体別に記録しておいた。

接種試験の結果と同様に放射状褐変は遅く感染した株に多く見出され、軽度の斑紋は初期から中期にかけて感染した株でより多く認められた。一方、開花期を過ぎた生育末期に感染した株では褐斑粒の発生はほとんど見られなかった。

3 種子伝染と ELISA 検定

生育時期別にウイルスを接種した個体の種子を無作為に選び、ELISA 検定に供した。全ての接種区で種皮からウイルス抗原を直接検出することはできなかったが、胚からは初生葉接種区で40粒中5粒(12.5%)、第1葉接種区で40粒中7粒(17.5%)、また第3葉期接種区で42粒中1粒(2.4%)の確率でそれぞれ検出された。一

方、これらと同一集団の種子を播種したところ、初生葉接種区で34粒中8粒(23.5%)、第1葉接種区で18粒中1粒(5.5%)、第3葉接種区で36粒中1粒(2.8%)でそれぞれ種子伝染が認められた。以上、ELISAの結果と種子伝染の結果を一括して第2図に示す。第2図のと



第2図 接種時期別にみた次代種子伝染率とウイルス保有率  
○—○ 発芽実験による種子伝染率  
●—● ELISAによる胚検定でのウイルス保有率

おり、胚のウイルス分布量と実際の種子伝染率との間に密接な相関が見出され、生育初期に接種した区で種子伝染率が高まることが判明した。

## 考 察

ウイルス感染時期の相違によるダイズ褐斑粒の紋様の差異について越水・飯塚<sup>5)</sup>の報告があげられる。彼らの報告によれば、播種7週間後の宿主にダイズ萎縮ウイルス(SSV)を接種した場合ウイルスに特有な輪紋を呈する褐斑粒がより多く生じ、2週間後および3週間後の接種では斑点状および放射状の斑紋が多く生じたことを指摘している。しかし、SMVを接種した場合にはこのような一定の関係が見出されないと報告している。ところが本実験において、生育初期にSMVを接種した個体で斑点状の褐斑粒がより多く生じ、開花期の接種で放射状褐変を示す褐斑粒がより多く発生することから、SMVとSSVによる褐斑粒発生機構には差異がなく、基本的には同一であると考えられる。ただし、網室と圃場での試験において生育後期(開花中後期)の感染で放射状褐変が多発するものの、褐斑粒全体の発生率が圃場でより高いことからその発生にはウイルス感染以外の要因が関与すると想定され、今後詳細な検討を重ねてこれらの点

を明らかにしたい。

なお、本実験においてELISAによって完熟種子からSMVを直接検出する手法が確立された。本法は反応が鋭敏で少量の試料でも目的が達成できるので、今後種子伝染の判定など実用場面への応用が期待される。生育初期に接種した個体の子実では典型的な症状を示さない反面、胚中のウイルス濃度が高く実際の種子伝染率も高いことが確認された。一方、生育後期に接種した個体では典型的な放射状褐斑粒が多発するものの、胚組織でウイルスが検出されず種子伝染も皆無であったことから、種子伝染と放射状褐斑粒の発生とは全く異なる機構にもとづくものと推考される。Iwaiらも品種ヒュウガとSMV-BおよびD系統とを用いた実験で、褐斑粒発生と種子伝染には相関がないことを報告している<sup>2)</sup>。

## 摘 要

- 1) ダイズ褐斑粒とSMVの関係を明らかにするために網室で隔離栽培した宿主に定期的に病原を接種したところ、褐斑粒の発生は開花期以降の接種で高まることが判明した。
- 2) 得られた褐斑粒を11の斑紋型に類別し、接種時期別にその発生頻度を調査した。SMV感染に特異的とされる放射状褐斑粒の発生は開花後期でとくに多く見出された。
- 3) 圃場試験においても網室試験と同様に後期感染になるほど放射状褐斑粒が多発し、その発生率は網室試験よりも高まった。
- 4) 完熟種子からウイルス抗原を直接検出するELISA法を確立した。
- 5) 生育初期に接種した個体からの子実のうち、胚組織でウイルス抗原が検出される頻度が比較的高く、次代への種子伝染率も高いことが判明した。

## 引用文献

- 1) Clark, M.F. and Adams, A. N. (1977) J. gen. Virol. 34: 475~483. 2) Iwai, H., Ito, T., Sato, K., and Wakimoto, S. (1985) Ann. Phytopath. Soc. Japan 51: 475~481. 3) 藤巻雄一・原沢良栄・矢尾板恒雄・小島 誠(1987)北陸病害虫研報 35: 投稿中 4) 小島 誠・高野直行・原沢良栄・藤巻雄一(1987)北陸病害虫研報 35: 投稿中 5) 越水幸男・飯塚典男(1963)東北農試研報 27: 1~103.

(1987年8月21日受領)