

ダイズモザイクウイルスにおける弱毒系統の選抜

吉田晋弥*・塩飽邦子*・曳野亥三夫**・渡辺和彦*

要 約

兵庫県の丹波地域で栽培される黒ダイズ「丹波黒」は、ダイズモザイクウイルスに対する抵抗性遺伝子を持たないため、高率で感染が認められる。そこで、ダイズモザイクウイルスの弱毒ウイルス株の選抜利用により、効率的な防除法の確立を試みた。

- 1 多紀郡内の栽培圃場より採取したモザイク症状の無い多数の黒ダイズ個体から、ELISA法によりダイズモザイクウイルスが検出された。これらの感染個体由来のウイルスから局部病斑分離法により弱毒株 (2-21-19) を選抜した。
- 2 得られた弱毒株 (2-21-19) のSMV系統の判別品種に対する反応は、A系統と同様であった。
- 3 ダイズ「兵系黒3号」の初生葉に弱毒株 (2-21-19) を1次接種した場合、10日後に接種したダイズモザイクウイルス (A, B, C, 各系統) に対して干渉効果を示した。
- 4 弱毒株 (2-21-19) を接種したダイズ「兵系黒3号」より得た種子を播種して育成した個体を、ELISA法により検定した結果、供試した48個体すべてで、種子伝染が認められなかった。
- 5 弱毒株 (2-21-19) を接種したダイズ「兵系黒3号」の圃場における生育および収量への影響について調査した結果、有意な影響は認められなかった。

以上の結果から、ダイズモザイクウイルス弱毒株 (2-21-19) は、採種圃での無毒種子生産への利用が期待される。

Isolation of Attenuated Soybean Mosaic Virus

Shinya YOSHIDA, kuniko SHIWAKU, Isao HIKINO
and Kazuhiko WATANABE

Summary

The black soybean "Tanbaguro" cultivated in Tanba area of Hyogo prefecture has not a resistance gene toward soybean mosaic virus, and thus the rate infection is high. An attenuated virus of soybean mosaic virus was examined here as a means for effective protection.

- (1) Soybean mosaic virus was detected by ELISA in black soybean plants with no mosaic symptoms from Taki-gun. An attenuated virus (2-21-19) was selected from soybean mosaic virus in these black soybean plants by the single-lesion isolation method.
- (2) The attenuated virus (2-21-19) was found equivalent to the A strain of soybean mosaic virus on soybean differential varieties.
- (3) This virus provided a cross-protection from three soybean mosaic virus strains A, B and C, when challenge inoculation was carried out 10 days after the first inoculation on young primary leaves of the soybean "Hyokeikuro3gou".
- (4) No soybean mosaic virus detected in 48 progeny plants of the soybean "Hyokeikuro3gou" previously inoculated with the present virus (2-21-19).
- (5) Inoculation of this virus was found to have no effect on "Hyokeikuro3gou" growth.

キーワード：黒ダイズ, ダイズモザイクウイルス, 弱毒ウイルス

1997年8月29日受理

* 中央農業技術センター ** 北部農業技術センター

緒 言

丹波黒ダイズは、兵庫県多紀郡篠山町を中心とした地域特産として、全国的にも高い評価を受けている。この黒ダイズは、地域ごとに選抜と自家採種が行われており、白ダイズのような系統的な交配育種は行われていない。それ故に、栽培上での特性は、多くの面で改善が求められている。とくに、黒ダイズは、ダイズモザイクウイルス(SMV)に対する抵抗性遺伝子を持たないため、8月上旬には、多数の個体でSMVの感染が認められ、地域によっては、90%以上の株率に至っている¹⁾。そこで、SMVの防除を目的として、栽培圃場より採取したSMVの系統を分離し、弱毒系統を選抜したので報告する。

なお、本研究は、平成5年度から3カ年に渡って実施された病害虫広域型防除推進特別対策事業の一環として取り組んだ。また、研究の実施に当たって、現兵庫県加古川農業改良普及センター・明石支所の萬谷信宏氏、兵庫県篠山農業改良センターの高澤充洋氏ならびに篠山町農業協同組合および丹波農業協同組合の各位に種々の御協力をいただいた。深く感謝の意を表す。

材料及び方法

1 栽培圃場におけるSMV株の採取と弱毒株の選抜

7月中旬に多紀郡内を対象に4地区13筆の圃場1筆あたり20株の黒ダイズについて、SMVによるモザイク症状の調査を行った。調査結果を基に、無病徴の黒ダイズ個体の小葉を採取し、SMVの保毒の有無をモノクローナル抗体(2-1-E6)を用いた2抗体サンドイッチ酵素結合抗体法(ELISA)により検定した²⁾。SMVの保毒が確認された黒ダイズ葉に0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.2)を加えて磨砕して接種源とした。この磨砕液をダイズ品種「ヒュウガ」の初生葉にカーボランダムを用いて汁液接種し、その病徴を調査した。なお、病徴調査は、温度を20~25℃、日長を16時間に調整したガラス温室内で実施した。

2 局部病斑分離系統の作出と選抜

SMV感染ダイズ汁液をダイズ品種「白豆」に接種し、約2週間後に形成された局部病斑を切り出し分離した。この局部病斑分離株をダイズ品種「ヒュウガ」に接種し、その病徴を調査し、選抜を行った。なお、局部病斑分離株接種ダイズは、約1週間後に展開した第一本葉における葉脈透化およびELISA法により感染の有無を検定した。

3 ダイズ組織中のSMV濃度の比較

ダイズ葉磨砕液をダルベコ・リン酸緩衝食塩水(PBS)により段階希釈し、ELISA法による反応の後、SMV濃度に対して410nmの吸光度が直線的に比例する領域においてその吸光度を比較した。

4 弱毒ウイルス株の系統判別

高橋ら³⁾の方法に基づき、ダイズ4品種(Harosoy, 奥羽13号, ヒュウガ, 白豆)の初生葉に接種後1週間目に葉脈透化の確認を行い、2週間後に接種葉および全身の病徴を肉眼観察した。

5 干渉効果の検定

ガラスハウス内で育成したダイズ「兵系黒3号」の初生葉に弱毒株を1次接種し、10日後に第1本葉にSMV各系統(A, B, C)を2次接種した。2次接種後2週間目に全身の病徴を観察するとともに、ELISA法によりウイルス濃度の比較を行った。なお、ELISA検定は、SMVのAおよびB系統については、2-1-E6抗体を用い、C系統に対しては2-1-D6抗体を用いた。なお、各処理区当たり、無毒種子から育成した10個体のダイズを供試した。

6 弱毒株の種子伝染率の調査

SMVを接種したダイズ「兵系黒3号」6個体から得た種子を播種し、初生葉における病徴の観察およびELISA法による保毒の有無を検定した。

7 弱毒株接種ダイズの圃場における病徴と生育特性の調査

播種後約2週間目のダイズ「兵系黒3号」の初生葉に

表1 多紀郡内の黒ダイズにおけるモザイク病の発生とSMVの保毒状況

地域名	調査圃場	7月17日		8月17日	
		発病個体率 ¹⁾	保毒個体率 ²⁾	発病個体率 ¹⁾	保毒個体率 ²⁾
A	7	12.1	49.4	35.7	98.6
B	2	7.5	27.1	35.0	95.0
C	3	30.0	45.8	41.7	93.3
D	1	0.0	33.3	10.0	100.0
平均	13	14.6	43.9	35.0	97.3

注1) 1筆当たり20株の病徴調査

2) ELISA法により保毒が確認された個体

表2 無病徴ダイズの保毒するSMVを接種したダイズ「ヒュウガ」の病徴

発病の程度 ¹	2週間目 ²	3週間目 ²
I	10	59
II	31	11
III	24	1
IV	7	1
計	72	72

注1) I:モザイク, 巻葉, 縮葉
 II:モザイク, 巻葉
 III:軽微な巻葉
 IV:無病徴

2) 接種後の日数および株数

SMVを接種し, 1 処理区25株, 2 反復で圃場に定植し病徴および生育特性を調査した。

なお, SMVの接種試験に用いたダイズは, SMVを保毒しないことを確認した個体の後代より得た種子から発芽させた個体を用いた。

結 果

1 現地圃場からのSMV弱毒株の選抜

平成4年度において, 多紀郡内栽培圃場での黒ダイズにおけるモザイク病の発病率は, 7月17日調査では, 平均で14.6%であったが, ELISA検定では, 43.9%が保毒

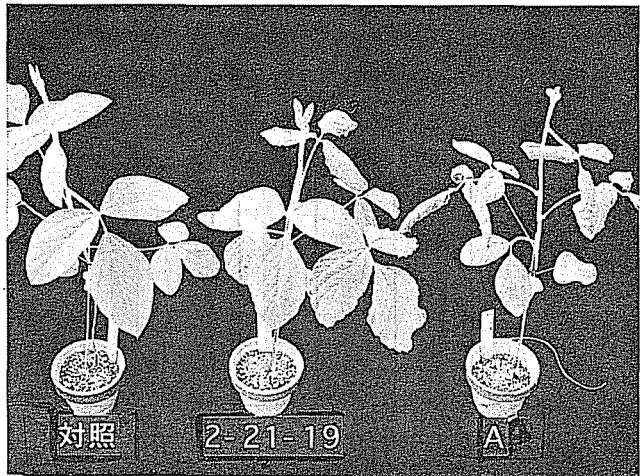


図1 SMV接種ダイズ「ヒュウガ」での病徴

対照: 無接種

2-21-19: 局部病斑分離弱毒株

A: A系統

していた。また, 8月17日調査では, モザイク病発病率が35.0%, ELISA検定では, 90%が保毒しており, 発病率および保毒率ともに倍増していた(表1)。

7月17日に採取した無病徴葉の内, ELISA検定により保毒が確認された磨碎汁液をダイズ品種「ヒュウガ」に接種し, その病徴を観察した結果, 接種後2週間目では, 約半数の株が無病徴または, 軽微な葉巻症状のみであったが, 3週間目では, 大半の株が顕著なモザイク症状を

表3 圃場採取SMV(2-21)の局部病斑分離株接種ダイズ「ヒュウガ」の病徴

SMVの系統	接種病斑数	保毒株数 ¹	2週間目 ²				3週間目 ²			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
2-21	21	17			17		12	5		
強毒株(A系統)	4	4	1	3		2	2			

注1) ELISA法によりSMVの検出された株数

2) 接種後の病徴別株数

I:モザイク, 巻葉, 縮葉 II:モザイク, 巻葉 III:軽微な巻葉 IV:無病徴

表4 弱毒株(2-21-19)のSMV系統判別品種に対する反応

SMVの系統	Harosoy		白豆		奥羽13号		ヒュウガ	
	L	S	L	S	L	S	L	S
2-21-19	-,ns	-	ns	-	-,ns	-	-	m
A	ns	-	ns	-	ns	-	-	m
B	-,ns	m,ns	ns	m	ns	-	-	m
C	-,ns	ns	ns	-	-	m	-	m

注) L:接種葉の病徴, S:全身の病徴

m:葉脈透明→モザイク, ns:えそ斑点, -:無病徴

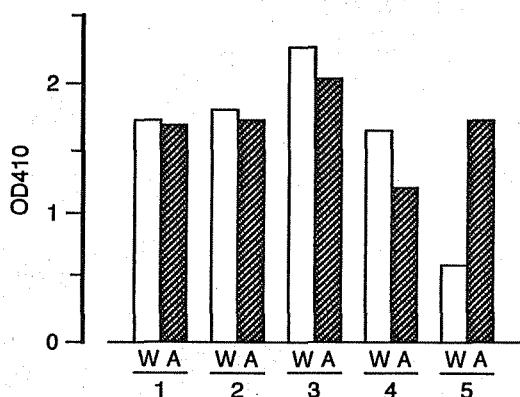


図2 SMV接種後3週間目におけるダイズ「兵系黒3号」の各葉位におけるウイルス濃度の分布
W:弱毒株(2-21-19) A:強毒(A)系統
1~5:本葉の葉位

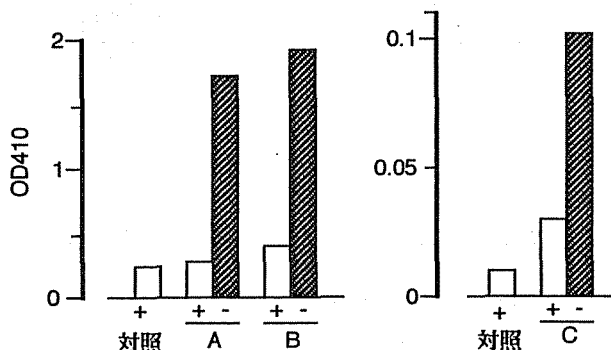


図3 弱毒株(2-21-19)の1次接種の有無によるウイルス濃度の比較
+, -: 1次接種の有無
A: A系統 B: B系統 C: C系統

表5 弱毒株(2-21-19)のSMV各系統に対する干渉効果

SMVの系統	1次接種の有無	観察された病徴
A	+	無病徴または、軽微なモザイク
	-	顕著なモザイクおよび縮葉
B	+	軽微なモザイク
	-	顕著なモザイク
C	+	無病徴
	-	顕著なモザイクおよび縮葉
対照		無病徴または、軽微なモザイク

示した(表2)。しかし、初期に軽微な葉巻症状を示し、その後症状が消失する株(2-21)が見いだされた。そこで、この株を弱毒候補株と見なして、局部病斑分離により安定した弱毒化株の確立を試みた。弱毒候補株(2-21)を接種した白豆の初生葉に形成された21の局部病斑の磨砕汁液をダイズ品種「ヒュウガ」に接種した結果、17株の接種ダイズで感染が認められた。これらの保毒ダイズにおける病徴の推移を調査した結果、接種後3週間目において5分離株で比較的軽微な病徴を示した(表3)。その中で、特に症状が軽微だった2-21-19の分離株を弱毒株とした(図1)。

2 弱毒株(2-21-19)の特性

弱毒株(2-21-19)と従来から知られているSMV各系統との関係を知るために、系統判別品種ダイズに対する反応を調査した。その結果、SMV各系統(A, B, C)は、高橋らの報告と同葉の症状を示し、SMV弱毒

表6 弱毒株(2-21-19)の種子伝染率

SMVの系統	供試個体数(A)	発症個体数 ¹	保毒個体数(B) ²	(B/A) %
2-21-19	48	0	0	0
強毒株(A系統)	48	8	8	16

注1) 初生葉におけるモザイク症状を示した固体
2) ELISA検定により保毒が認められた固体

株はA系統に近い反応を示した(表4)。

弱毒株(2-21-19)の特徴として、接種ダイズにおける病徴が接種後の日数経過により弱くなる傾向を示し、ダイズ個体内でのウイルス濃度の分布に変化があることが予想された。そこで、各葉ごとのSMV濃度の分布をELISA法により調査した結果、最も新しい展開葉では、強毒株(A系統)に対して、有意にSMV濃度が低かった(図2)。

弱毒株として最も重要な特性は、強毒株に対する干渉効果である。そこで、弱毒株を1次接種したダイズに強毒系統(A, B, C)を2次接種し、その病徴を観察した。その結果、強毒系統の感染による症状は、認められないか、軽いモザイク症状しか示さなかった(表5)。一方、弱毒株を接種していないダイズ個体に同時に強毒系統(A, B, C)を接種した場合、顕著な縮葉、巻葉を伴う比較的明瞭な病徴を示した。また、最上位展開葉におけるSMV濃度は、1次接種の有無により明らかな差が認められた(図3)。

SMVは、種子伝染性ウイルスとして知られているが、

表7 SMV接種ダイズ「兵系黒3号」の圃場での病徴と保毒率

SMVの系統	調査個体数	保毒個体率 (%) ¹⁾	病徴の程度 ²⁾				
			—	±	+	++	+++
2-21	40	63	18	16	6	0	0
強毒株 (A系統)	40	75	9	8	17	6	1
無接種	40	50	29	6	4	0	1

注1) ELISA法による保毒検定

2) モザイク症状の程度を— (無) ~+++ (高) の5段階で表示

表8 ダイズ品種「兵系黒3号」におけるSMV接種の生育および収量に及ぼす影響

SMVの系統	調査個体数 (n)	主茎長 (cm)	主茎節数	分枝数	茎の太さ (mm)	粒数 (個/n)	子実重 (g/n)	百粒重 (g)
2-21	40	63±5	19±1	11±2	16.1±1.3	133±46	102±36	77±4
強毒株 (A系統)	40	64±6	19±1	10±2	16.4±2.1	127±63	99±48	78±3
無接種	40	65±5	18±2	11±4	15.8±2.1	105±41	82±36	77±3

注) 表中の数字は、調査個体の平均値および標準偏差を示した

得られた弱毒株の種子伝染性を強毒株 (A系統) と比較した。その結果、強毒株 (A系統) では、供試した48個体中8個体 (16%) で種子伝染が認められたのに対して弱毒株では、供試した48個体中ウイルスを保毒する個体は無かった (表6)。

得られたSMV弱毒株 (2-21-19) を圃場で栽培されるダイズに接種して生育および収量等に対する影響を調査した。SMV接種ダイズにおけるSMVの保毒率および病徴は、定植後3週間目に調査した (表7)。各処理区における、保毒率は、無接種区でも50%の値を示した。一方、SMV接種ダイズの保毒率は、無接種区よりは、高い値を示したが、100%で無かったことから、擦り付け接種によるSMVの感染が完全では無かったと思われる。病徴については、強毒株 (A系統) 接種ダイズでは、調査個体中の60%で顕著なモザイク症状が認められたのに対して、弱毒株接種ダイズでは、明らかな症状が認められたのは、15%であった。弱毒株接種による生育および収量への影響については、無接種区との差は、ほとんど認められなかったが、強毒株 (A系統) 接種ダイズで個体間変動が大きくなるのに対して、弱毒接種ダイズでは、比較的変動が小さくなる傾向を示した (表8)。

考 察

ダイズにおけるウイルス病の多くは、種子伝染性であることが知られている。特にSMVは高率で種子伝染が

認められ、これが初期における汚染源であると考えられる。それ故に、SMVの防除は、生育初期において、媒介昆虫であるアブラムシの防除とともに、SMVを保毒していない種子の使用が重要である。白ダイズにおいては、SMVの感染による褐斑の発現が知られており、種子伝染率の高いと思われる個体あるいは種子の選別は、この褐斑粒率による評価がある程度可能であると考えられる。しかし、黒ダイズの場合は、こうした観点からのSMV保毒種子率の低減化が困難であることが、SMVの防除を難しいものとしている。そこで、丹波地域においては、平成4年度からELISA検定によるSMV保毒個体の除去と寒冷紗ハウスによる無毒種子の増殖に取り組んでいるが、採種圃等においてSMVの汚染を防ぐためには、弱毒ウイルスの利用による防除が不可欠である。

SMVの弱毒ウイルスについては、Kosakaら³⁾による作出の報告がある。弱毒ウイルスの作出には、亜硝酸やUV処理あるいは、高温処理が用いられる場合が多いが、Kosakaらは、弱毒株 (Aa15-M2) を15°Cでの低温処理後のSMVから分離している。このことは、ウイルスの遺伝子レベルでの変異の誘発以外に、SMVの集団に内在していた変異株が選抜された可能性も考えられる。一方、特別な処理を行わずに、野外から採種したウイルス株からの弱毒ウイルスの選抜例としては、カンキツリステザウイルス (CTV)⁴⁾ やキュウリモザイクウイルス (CMV)⁷⁾ のSR系統等の報告がある。今回選抜した

SMVの弱毒株も栽培圃場から採取し、選抜した。従来から、丹波地域においては、黒ダイズ種子は、自家採種によって維持されてきており、優良種子の選抜の過程において病原性の低いSMV株を保毒する種子が選抜されてきた可能性が考えられる。

今回得られたSMV弱毒株は、丹波地域の黒ダイズで多く認められるSMVのAおよびB系統に対して干渉効果を持つこと、および種子伝染率が低いことから採種圃における無毒種子の生産に有効であると考えられる。また、黒ダイズの生育、収量に及ぼす影響については、今回の試験では、明確な差は、認められなかったが、弱毒株を接種した個体間での生育の変動が少なくなる傾向が認められた。曳野ら²⁾は、SMVの感染の有無により選別したダイズ個体間の生育・収量特性の比較において、SMV保毒個体で個体間変動が大きくなることを報告しており、今回の結果もこの報告に準じた結果となった。このことから、弱毒株による生育安定に対する効果が期待され、生産圃場での利用も考えられる。しかし、弱毒株の接種に当たっては、カーボランダムを用いた擦り付け接種で行っており、労力的な点および、作業者による接種効率の違い等があり、接種法の改善が今後の課題として残されている。

引用文献

- (1) 相野公孝・川瀬譲・坂本庵・曳野亥三夫(1985): 丹波黒大豆におけるSoybean Mozaic Virus (SMV) に関する研究 第1報, SMVが生育, 収量に及ぼす2, 3の影響: 兵庫県農業総合センター研究報告 33, 37-40
- (2) 曳野亥三夫・相野公孝・須藤健一・井上浩一郎(1984): ウイルス検定を行った大豆「丹波黒」の生育と収量: 兵庫県農業総合センター研究報告 32, 67-70
- (3) Kosaka, K. and T. Fukunishi (1993): Attenuated isolates of soybean mozaic virus derived at a low temperature: Plant Disease 77, 882-886
- (4) 佐々木篤(1967): 広島県下のハッサクが保毒するTristezaウイルスの弱毒系統: 日植病報 33, 162-167
- (5) 高橋幸吉・田中敏夫・飯田格・津田保昭(1980): 日本におけるダイズのウイルス病と病原ウイルスに関する研究: 東北農業試験場研究報告 62, 1-130
- (6) 吉田晋弥・内藤雅文・塩飽邦子・渡辺和彦(1994): ダイズモザイクウイルスにたいするモノクローナル抗体の作出と利用: 兵庫農技研報(農業) 42, 7-12
- (7) 善林六郎・花田薫・岩木満郎・渋川三郎(1983): ホウレンソウに萎縮症状を起こすキュウリモザイクウイルスの1系統(CMV-SR): 日植病報 49, 716-719