

オオムギ縞萎縮病の汁液接種検定並びに診断

井上成信・前田孚憲・光畑興二

近年オオムギ縞萎縮ウイルス (BaYMV) ⁷⁾はわが国のみならず、世界各国におけるオオムギに多発して甚大な被害をもたらし、オオムギ栽培上大きな問題になっている^{1,3,5,7)}。それは BaYMV が *Polymyxa graminis* を vector として土壌伝染するウイルスであることに起因している。しかし本病の防除法は確立していないため、その対策には抵抗性品種の導入に頼らざるを得ない現状である。本病の抵抗性品種選抜試験は従来常発地における土壌伝染によって行われてきた。この検定法は試験場所や環境の変動により発病率、病徴の発現に差があり、更に年1回の試験しか出来ないため、反復試験が容易である汁液接種検定法が望まれている。しかし、BaYMV の汁液接種は感染が非常に不安定で常に高率の発病を得ることがなかなか困難と言われている^{8,7,9,13,15,16)}。従って、常時高率に発病させる汁液接種検定法が確立されれば、BaYMV の系統分化の解析及び本病の抵抗性品種の選抜試験や育成、さらに抵抗性遺伝子の解析が飛躍的に進展することが予想される。

本報告は BaYMV の汁液接種検定およびその診断法について、これまでに得られた結果を記述したものである。

BaYMV の抗血清を分譲された農水省九州農試宇杉富雄博士 (現農水省熱帯農業研究センター沖縄支所) に深謝するとともに、本研究を遂行するに当たり、ご協力頂いた当研究所遺伝情報発現部門の安田昭三教授に謝意を表す。

実験材料及び方法

ウイルス源: BaYMV は岡山県児島郡灘崎町のビール麦を栽培する本病常発地の土壌を素焼きポットに入れ、オオムギ夏大根麦を播種し、発病したモザイク病葉から汁液接種によって夏大根麦に分離した。接種発病葉は顕微鏡観察及び生物検定によりムギ類萎縮ウイルス (SBWMV) などの混在がないことを確認し、また BaYMV 抗血清と反応することを確認してから供試ウイルスとした。

土壌伝染試験の病土及び病根: 病土は上記灘崎町のオオムギ縞萎縮病の常発地から、ムギ刈り取り後の6月採土し魚箱に入れて供試した。また病根は本病常発地のオオムギあまぎ2条の刈り取り後の根を採集し、水道の流水で土をていねいによく洗い落として風乾し、殺菌土15kg に対し乾燥病根20g を約1cm の長さに切って混入した。

平成元年12月25日受理

本研究の結果の一部は平成元年10月、日本植物病理学会関西西部会において発表した。また本研究の一部は昭和62年～平成元年度文部省特定研究経費「資源生物機能の解析と制御に関する研究」によって行われた。

汁液接種：病葉を0.005M KCNを加用した0.1 Mりん酸緩衝液 pH 7.0で磨碎して搾汁液を作り、接種源とした。接種は病汁液にカーボランダムを加え、指による常法の擦り付け接種を2回行い、接種直後に接種面をよく水洗した。接種苗は野外に置いて発病させた。

ELISA 法及び DIBA 法：BaYMV に対する抗血清は農水省九州農試宇杉富雄博士（現同熱帯農業研究センター沖縄支所）から分譲されたもの、及び当研究室で純化ウイルスをウサギに筋肉注射して得られたものを用いた。 γ -グロブリンは健全オオムギ葉汁液で吸収した抗血清から、硫酸塩析および DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。

DAS ELISA 法は Clark and Adams²⁾ の方法に従い、 γ -グロブリン濃度 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、コンジュゲート希釈400倍または800倍の条件で行った。

DIBA 法は基本的には Powell¹⁰⁾の方法に準じて行った。ニトロセルロースメンブレン (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad 社) に植物葉組織を TBS で磨碎して得た汁液の $2\mu\text{l}$ をスポットしたのち、TBS に溶解した 2% Triton X-100 および 2% ウシ血清アルブミン溶液に 1 時間浸漬してブロッキングを行った。一次抗体濃度 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 25°C で 1 時間反応させたのち、酵素標識二次抗体 (アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG (Cappel 社) 2,000 倍希釈を 1 時間反応させた。

実験結果及び考察

1. 汁液接種したオオムギの葉数と発病との関係

本病の汁液接種には、常法として殆どオオムギ苗の 1~2 葉期に 1~2 枚の葉に擦り付け接種されている^{1,8,9,11,13)}が、感染率が絶えず変動し常時高い発病率を得ることがなかなか困難である。そこで先ず接種葉数により発病率に違いを生じるかどうかについて調べた。夏大根麦と交-A 品種を用い、1988年12月14日から10日間隔(12月14, 24日, 1月3, 13, 23日)に芽だし2日後のムギ種子をそれぞれ30粒宛魚箱の殺菌土に播種し、ガラス室で育成した。接種時の苗の大きさは1, 2, 3, 4, 5葉期で、汁液接種の葉数を1, 2, 3, 4, 5枚として、2月16日に接種した。接種苗は屋外に置いて発病させた。病徴が最初に見られた頃から3日おきに病徴の発現を調べ、その発病推移を Fig. 1A, B に示した。

その結果、夏大根麦では Fig. 1A に見られるように、3月8日即ち接種20日後に初発病徴が見られ、その後増加したが、接種葉数が多くなる程発病率が高くなる傾向が見られた。その最終発病率は接種葉数1枚区では30%、2枚区で83.3%、3~5枚区では100%であった。交-Aでは Fig. 1B に見られるように、接種26日後頃から初発病徴が見られ、その後増加したが、これも前者と同様接種葉数の多い程発病率が高くなる傾向が見られた。その最終発病率は接種葉数1枚区では20%、2枚区で83.3%、3枚区で90%、4~5枚区では100%の発病率であった。また発病率は各区とも接種約1ヵ月後前後頃まで増加し、それ以後あまり増加しなかった。

これらの結果から、BaYMV をオオムギの幼苗期に汁液接種し高い発病率を得るためには、4~5葉期の苗を用い4枚の葉に、高度の罹病性品種では3枚の葉に汁液接種する必要がある、1~2枚の葉への接種では高い発病率を得にくいことがわかった。安・吉野¹⁶⁾はオオムギ苗令6~7葉期までは、苗令が進むほど感染率が上昇する傾向にあることを報告

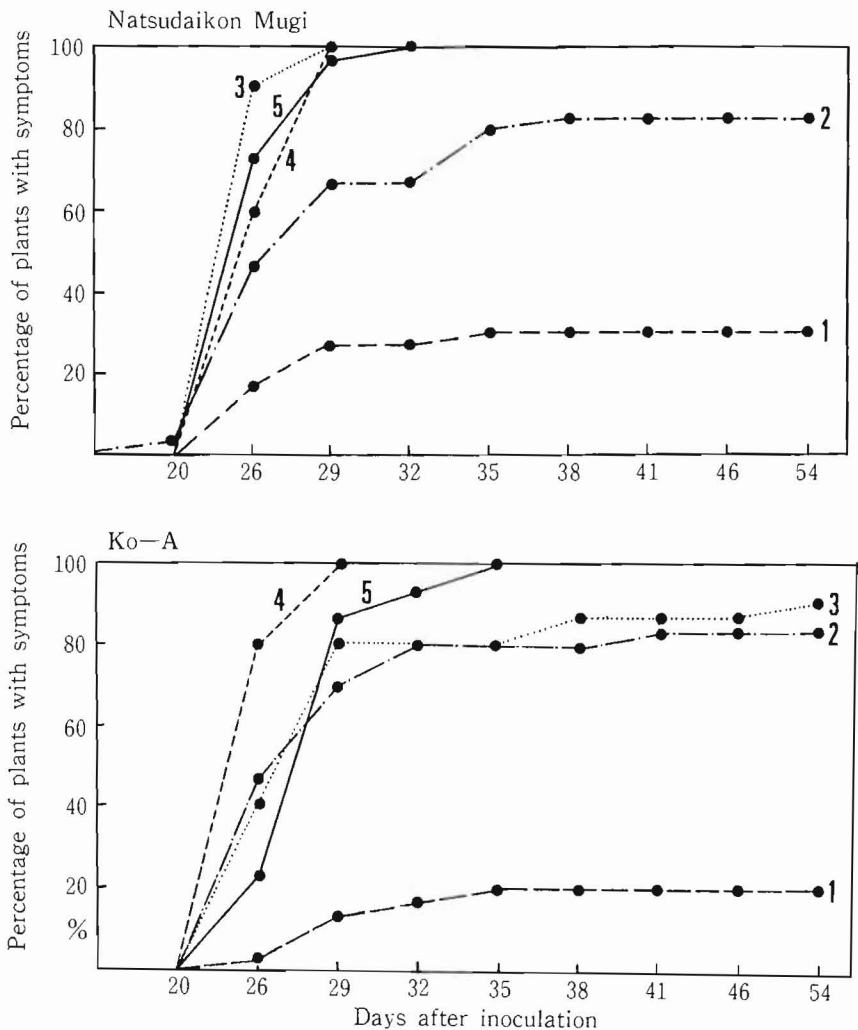


Fig. 1. Percentage of two barley varieties with BaYMV symptoms after mechanical inoculation at the one- to five-leaf stage. BaYMV was inoculated on Feb. 16, 1989. Figures in the graphs indicate number of inoculated leaves.

している。この理由は葉令の違いに起因するウイルス感受性の差異によるものではなく、葉令の高いオオムギでは接種される葉数が多くなるため、結果として接種される葉の総面積が大きくなるために高い感染率が得られたものと推察される。

2. 汁液接種によるオオムギ縞萎縮病抵抗性品種の選抜試験

汁液接種によるオオムギ縞萎縮病抵抗性品種の選抜のための予備試験として、上記方法により67品種に擦り付け接種を行い、網室において発病率を調べた。接種は1品種20株宛供試した。

100%発病した高度の罹病性はクワポリ, 交-A, 夏大根麦, あまぎ2条, エチオピア31, Kagbeni 1, Ullei 19, Nachipundo 2の8品種であった。これに対し晚関取1号, 虎の尾7号, 白大麦, コピンカタギ9号, 半裸2号, 節黒, 長崎早生裸, はがねむぎ, 早生大麦, 二本三, 坊主麦, 畿内1号, 居昌在来, 白胴裸麦, 釜麦, 水原31号, 三穂33, 大治, トルコ38, エチオピア339, Jerusalem 2の21品種は発病しなかった。また, これら以外の品種の感染率は5%~95%の範囲にあった。発病しなかった品種については今後反復接種を行って, 完全な抵抗性品種であるか否かを確認する必要がある。しかし上記の方法により, 汁液接種によって抵抗性品種選抜検定が効率よく出来ることが認められた。なお, 汁液接種で得られた結果と土壌伝染の結果とが必ずしも一致するとは限らない^{8,11)}ので, 最終的には両者を併用するのが望ましいと考えられる。

3. 接種後の温度が感染発病に及ぼす影響

ポリ製小箱に殺菌土を入れ, 夏大根麦を1区10粒宛1989年3月31日に播種して屋外で育成し, 4月13日に2葉期の苗に2葉宛汁液接種を行って, 直ちに1区: 野外に置く, 2区: 6℃, 3区: 8℃, 4区: 10℃, 5区: 12℃, 6区: 14℃に1週間置いてから屋外に出す, 7区: 20℃に2日間置いてから屋外に出す区を設けた。温度処理は日本医化器機製のNK式温度勾配恒温器を用い, 各室とも20W3本照明であった。発病率を調べた結果はTable 1に示した。

その結果, 発病率は接種後の温度10℃区が90%で最も高く, ついで6℃と8℃区が60%, 12℃と14℃区が50%, 野外のみ区が30%であった。20℃区は発病しなかった。本病の感染発病には温度が大きく影響し, 18℃以下で感染し⁷⁾, 感染適温は13~16℃と言われている⁹⁾。また接種後30日間の平均外気温が6℃内外の時発病率が最も高かったとの報告もある¹⁰⁾。本試験の結果では汁液接種後の1週間の温度が10℃のとき最も発病率が高かった。本試験で得られた結果は接種直後の温度が感染の成立に重要な影響を及ぼすことを示しているが, 温度は感染の成立のみならず, 病徴発現にも影響を及ぼすことが考えられるので, 今後これらの点についても検討する必要がある。

Table 1. Effect of temperature after mechanical inoculation on infection of barley var. Natsudaikon Mugi with BaYMV^{a)}.

Temperature	Percentage of infected plants
Outside	30%
6℃ (for 1 wk) →Outside	60
8℃ (for 1 wk) →Outside	60
10℃ (for 1 wk) →Outside	90
12℃ (for 1 wk) →Outside	50
14℃ (for 1 wk) →Outside	50
20℃ (for 2 days) →Outside	0

a) Day of mechanical inoculation: 1989, 4, 13.

4. オオムギ縮萎病の土壌伝染による発病とヒコバエの病徴発現

前年, 殺菌土にオオムギの病根を入れた土と常発地の病土で発病試験を行ったものをそのまま保存しておき, その病土に, 1988年11月24日夏大根麦を播種し, 発病を調べた。さ

らに病徴が見られなかった株については4月21日地上約3~4cmで切り戻しし、生長したそのヒコバエについて病徴を調べた。それらの結果はTable 2に示した。

その結果、土壌伝染試験継続2年次(1年目の試験では発病率が著しく低かった病土)において、病根を混入した病土区では33.9%、72%、病土区では16.1~39.3%の病徴の発現率であった。それらのうち病徴が見られなかった株のヒコバエに病徴が現れ(Plate I-A)、その発病率は病根混入土区で平均17.0%(4/33, 4/14)、病土区で平均31.4%(14/47, 16/40, 5/34, 14/35)であった。ヒコバエに病徴の現れた葉については一部電顕観察した結果BaYMV粒子及び細胞質内封入体の破片(Plate I-B)が見られたが、SBWMVの粒子は見られなかった。

これらの結果から、感染していても病徴の現われない株があること、土壌伝染によるオオムギ抵抗性品種選抜試験を行う場合には、病徴の見られない株ではそのヒコバエについても検査すると、抵抗性品種の選抜をより確実にするものと考えられる。

Table 2. Development of BaYMV symptoms on barley var. Natsudaikon Mugi grown in infested soil and on its sucker after cutting.

Source of Pathogen	Results in 1987	Results in 1988 ^{b)}		
		No. of plants with symptoms (%)	No. of plants with symptoms on sucker (%) ^{c)}	Total infected plants (%) ^{d)}
Roots ^{a)}	0/50	19/56 (33.9)	4/33 (12.1)	41.1
	4/84	36/50 (72.0)	4/14 (28.6)	80.0
Soil of infested field	0/50	9/56 (16.1)	14/47 (29.8)	41.1
	0/50	16/56 (28.6)	16/40 (28.6)	57.1
	5/56	22/56 (39.3)	5/34 (14.7)	48.2
	3/56	21/56 (37.5)	14/35 (40.0)	62.5

a) Dried roots of naturally infected plants were mixed in sterilized soil.

b) The infested soil was kept outside for about 10 months after the experiments in 1987 and reused in 1988.

c) Appearance of BaYMV symptoms on newly emerged suckers after cutting of the symptomless plants.

d) The observed results on March 29, 1989.

5. オオムギ縮萎病のELISA法及びDIBA法による診断

植物ウイルスの感染の有無は病徴観察、電顕観察などの他に血清学的検出法が良く用いられている。本実験においては血清学的検出法のうちELISA法及びDIBA法について検討した。

1) ELISA法による診断

近年、ELISA法はウイルスの検出感度が非常に高い、一度に多量の試料を検定出来るなどの利点を有していることから、種々の作物に発生するウイルスの診断に広く用いられている。本研究においてはELISA法によるBaYMVの検出精度について調べた。

予備実験においてELISA法の検出感度を調べた結果、コーティング抗体(γ -グロブリン)濃度 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、コンジュゲート希釈400倍あるいは800倍の条件で感染葉からのウイルスの検出限界は5,000~10,000倍希釈であり、宇杉ら¹⁴⁾及び高橋ら¹²⁾の報告とほぼ同じ感度であ

った。

(a)感染オオムギの各葉位のウイルス濃度を明らかにするために、常発地及び汁液接種した夏大根麦の感染個体のウイルス濃度を葉位別に ELISA 検定を行った。供試した個体は止葉には病徴が認められなかったが、それより下の葉には病徴がみられた。対照には健全葉及び免疫性品種の木石港の葉を用いた。その結果、ELISA 値は止葉より 2～4 番目、特に 3 番目葉の値が著しく高かったが、病徴の見られなかった止葉でも陽性の値を示した (Fig. 2)。福岡⁴⁾らも ELISA 法による BaYMV の葉位別検出を行っているが、最上葉から第 4 葉目でのウイルスの検出率が最も高いことを報告している。

(b)本病の常発地に播種し、BaYMV 抵抗性品種選抜試験のオオムギ (当研究所遺伝制御研究室試験圃場) について病徴程度を調べると共に、病徴発現品種で無病徴株があるものでは病葉とともに無病徴葉を別々に採集して ELISA 検定を行った。その結果は Table 3 に示した。この結果、病徴を現した葉の ELISA 値は高く陽性であったが、病徴の見られなかった株でも一部陽性を示す株 (3 品種) が認められた。このことは病徴の見られない株で感染しているものがあることを示し、オオムギ縞萎縮病の確実な抵抗性品種を選抜するには宇杉ら¹⁴⁾及び高橋ら¹²⁾の報告と同様 ELISA 法は有効な方法であると言える。

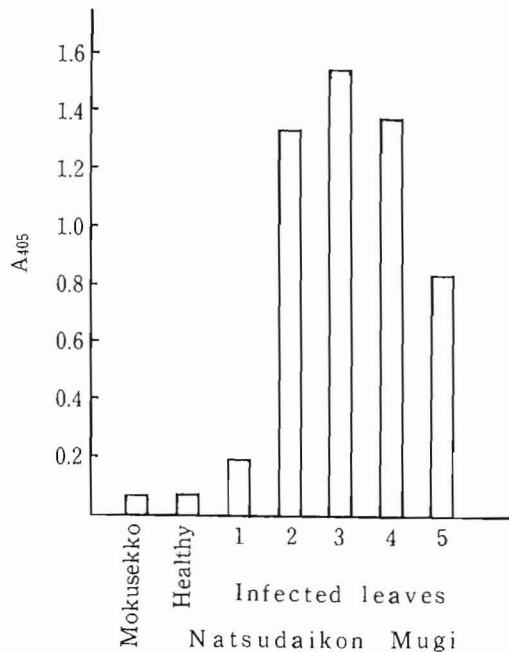


Fig. 2. Comparison for ELISA values of different leaves of naturally infected barley with BaYMV. Numbers 1 to 5 are each leaf (1 : flag leaf, 5 : oldest leaf) of infected var. Natsudaikon Mugi. The four lower leaves (2~5) under flag leaf showed visible symptoms, while the flag leaf (1) had no symptoms. Mokusekko (immune variety) and healthy Natsudaikon Mugi were used as negative control.

Table. 3. Development of BaYMV symptoms on barley varieties grown in the infested field and results of ELISA test.

Variety	Symptom	ELISA values ^{b)}		Variety	Symptom	ELISA values ^{b)}	
		No symptom	With symptom			No symptom	With symptom
Amagi Nijo	0~++++ ^{a)}	0.01	<u>0.87</u>	Haruna Nijo	0~++	0.27	<u>0.78</u>
Natsudaikon Mugi	+++		<u>0.84</u>	Chosen	0	0.09	
Misato Golden	0	0.01		Yoshin-II	0~++	<u>0.39</u>	<u>0.49</u>
Saikai Kawa 31	0	0.07		Komeirazu	0	0.14	
Saikai Kawa 37	0	0.08		T. N.-2	0	0.14	
Saikai Kawa 38	0	0.06		Sonja	0	0.11	
Ishukushirazu	0	0.12		Hungarian	0	0.03	
Hagane Mugi	0	0.03		Ethiopian barley	0	0.04	
Ukei 1-41	0	0.10		Ea-52	0	0.26	
Yokozuna	0	0.11		Hiproly	0	0.25	
Tochikei 144	0	0.08		Taikei R661	0	<u>0.33</u>	
Kawamizuki	0~+++	0.14	<u>0.82</u>	Hagane Mugi (Inst.)	0	0.13	
Aizu 6	0~++		<u>0.65</u>	Mokusekko 3	0	0.20	
Daisen Gold	0~++	<u>0.38</u>	<u>1.06</u>	Mihori Hadaka 3	0	0.27	
Baidori	0	0.15		Ko A	0~++++	0.22	<u>1.44</u>

a) 0: no symptom, ++++: severe symptom.

b) ELISA values of barley var. Amagi Nijo as standards were 0.07 (no symptom), 0.30 (mild symptom) and 1.04 (severe symptom). Underlined ELISA values are regarded as positive.

2) DIBA 法による診断

DIBA 法は ELISA 法に比較して、ウイルスの検出に要する時間が短い、反応液が少量である、反応結果の肉眼判定が容易であるなどの利点を有していることから、各種作物に発生するウイルスの診断に用いられるようになった。ここでは BaYMV の検出に DIBA 法を適用し、その有効性を調べた。実験には土壌伝染により発病した 5 個体 (夏大根麦) および対照として健全個体を用いた。Plate I-C に示すように発病個体は明瞭なピンクのスポットとして発色し、健全個体とは明瞭に区別できた。このように DIBA 法は BaYMV の診断に有効な方法であることが明らかになったが、今後ウイルスの抽出緩衝液の種類、一次抗体及びコンジュゲート濃度、各反応段階における反応条件などについて検討するとともに、ELISA 法との検出感度の比較を行う必要があると考えられる。また、DIBA 法は大量の試料を検定する場合、ELISA 法よりも優れていることから、SBWMV の混在する圃場から採集した多くの個体の診断には特に有効であると考えられる。

摘 要

1. オオムギ品種、夏大根麦と交-A を用い、1, 2, 3, 4, 5 葉期の苗の総ての葉に BaYMV を汁液接種した結果、両品種とも接種葉数が多くなる程発病率が高くなる傾向が見られ、4~5 葉期の幼苗の 4 枚、品種により 3 枚の葉に接種すると高率 (100%) に発病した。この接種法によりオオムギ萎縮病の抵抗性品種選抜試験を行った結果、本法は抵抗性品種選抜に有効であることが明らかになった。

2. 汁液接種後の 1 週間の温度が感染発病に及ぼす影響を調べた結果、発病率は接種後

の温度10℃区が90%で最も高く、ついで6℃と8℃区が60%、12℃と14℃区が50%、野外のみに置いた区が30%であった。なお、20℃区は発病しなかった。

3. オオムギ縞萎縮病の土壌伝染による発病試験を行う場合、病徴の見られない株については切り戻しすると、そのヒコバエの葉に病徴が現れる場合があった。従って、病徴の見られない株ではそのヒコバエについても検査すると、抵抗性品種の選抜をより確実にするものと考えられた。

4. 本病の診断には ELISA 法及び DIBA 法が有効であった。

文 献

1. Adams, M. J., Swaby, A. G., and Macfarlane, I. 1986. The susceptibility of barley cultivars to barley yellow mosaic virus (BaYMV) and its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Ann. appl. Biol.* 109: 561-572.
2. Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virology* 34: 475-483.
3. Hill, S. A. and Evans, E. J. 1980. Barley yellow mosaic virus. *Plant Pathology* 29: 197-199.
4. 福岡忠彦・柏崎 哲・牧野徳彦. 1988. ELISA 法による大麦縞萎縮病抵抗性検定の精度について I. 葉位によるウイルス感染の違い. *育種学雑誌* 38, 別冊 2: 420-421.
5. Huth, W., Lesemann, D. E. and Paul, H. L. 1984. Barley yellow mosaic virus: purification, electron microscopy, serology, and other properties of two types of the virus. *Phytopath. Z.* 111: 37-54.
6. 井上忠男. 1964. 縞萎縮病オオムギに見られる稈状粒子について (予報). *農学研究* 50: 117-122.
7. Inouye, T. and Saito, Y. 1975. Barley yellow mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* 143, 3pp.
8. Kashiwazaki, S., Ogawa, K., Usugi, T., Omura, T. and Tsuchizaki, T. Characterization of several strains of barley yellow mosaic virus. 1989. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 16-25.
9. 草場敏彦・遠山 明・油本武義・建部美次. 1968. 二条オオムギにおけるオオムギ縞萎縮病の生態および防除に関する研究. *鳥取県農試特別報告* 2: 1-208.
10. Powell, C. A. 1987. Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. *Phytopathology* 77: 306-309.
11. 高橋隆平・井上忠男・林 二郎・守屋 勇・平尾忠三・光畑興二. 1968. 大麦の縞萎縮病抵抗性に関する研究, 第2報 品種の抵抗性程度と被害との関係ならびに異なる常発地の病原ウイルスに対する品種反応比較. *農学研究* 52: 65-78.
12. 高橋義行・匠原監一郎・柏崎 哲・土崎常男. 1988. 関東東山病虫研年報 35: 29-30.
13. 宇杉富雄・柏崎 哲・土崎常男. 1985. オオムギ縞萎縮病ウイルスの系統について. *関東東山病虫研年報* 32: 53-55.
14. 宇杉富雄・桑原達雄・土崎常男. 1984. 酵素結合抗体法 (ELISA) によるオオムギ縞萎縮病, コムギ縞萎縮病およびムギ類萎縮病の血清学的診断. *日植病報* 50: 63-68.
15. 安 正純・吉野正義. 1956. 大麦縞萎縮病の人工接種 (予報). *日植病報* 20: 174 (講演要旨).

16. 安 正純・吉野正義. 1964. オオムギ萎縮病に関する生態学的研究. 埼玉農試研究報告 25 : 1-115.

Mechanical Transmission of Barley Yellow Mosaic Virus and Diagnosis of the Virus

Narinobu INOUE, Takanori MAEDA and Koji MITSUHATA

Summary

Seedlings of two barley varieties, Natsudaikon Mugi and Ko A at 1 to 5 leaf stage were inoculated mechanically with sap of barley yellow mosaic virus (BaYMV) infected plants. Infection efficiency rased according to increase of the number of inoculated leaves and a high percentage of the infection (100%) was obtained on the plants inoculated 4 or 5 leaves of 4 or 5 leaf stage seedlings. This method proved to be useful for screening of resistant varieties.

The temperature for one week after mechanical inoculation had influenced the infection of barley and the optimum temperature was 10°C. The percentages of infected plants at various temperatures were as follows : 90% (10°C), 60% (6°C, 8°C) and 50% (12°C, 14°C). The plants kept outside during whole experimental period resulted in 30% of infection rate and none of the plants infected when the plants were kept at 20°C for 2 days after inoculation.

In the soil-transmission tests, some of the symptomless plants developed symptoms on newly emerged suckers after cutting.

ELISA and DIBA methods were effective for serological diagnosis of BaYMV infected plants.

Explanation of plate.

- A : BaYMV symptoms developed on newly emerged sucker after cutting of symptomless barley plants grown in infested soil.
- B : Electron micrograph of cylindrical inclusion in dip preparation of the infected leaf with BaYMV. Bar represents 100nm.
- C : Detection of BaYMV by DIBA method. 1 to 5 are samples of infected barley var. Natsudaikon Mugi grown in infested soil and 6 is healthy plant.

