

日植病報 46 : 487-493 (1980)

Ann. Phytopath. Soc. Japan 46 : 487-493 (1980)

## イネ grassy stunt ウイルスに関する研究 (第1報)

仙北俊弘\*・四方英四郎\*

Toshihiro SENBOKU\* and Eishiro SHIKATA\* : Studies  
on Rice Grassy Stunt Virus. I.

## Abstract

It was shown that *japonica* rice cultivars, Norin No. 8, Mihonishiki, Yukimochi and Kinmaze, were susceptible to rice grassy stunt disease, and that colonies of brown plant-hopper, *Nilaparvata lugens* Stål collected in the fields of Japan were capable of transmitting the disease. The infected *japonica* rice plants developed typical symptoms of the grassy stunt disease, such as severe stunting, excess tillering, yellowish green and narrowing leaves, scattering rusty spots on the leaves, and erect growth. The host range of the causal agent was limited only to rice, and the most Graminea, such as maize, wheat, barley, oat, *Panicum crus-galli* var. *frumentaceum* Hook, *P. milliaceum* L. and *Coix lachryma-jobi* var. *frumentaceum* Makino, were not susceptible to the disease. No evidence of soil- and sap-transmission was obtained in this experiment. The results of insect transmission suggested that the causal agent of the grassy stunt disease was persistently transmitted by the insect vectors. None of the diseased plants which were treated with sulfanilamide-drugs and antibiotics (tetracycline, chloramphenicol and penicillin) through the roots recovered the symptoms, suggesting that the grassy stunt disease was not mycoplasma-like organism, rickettsia or chlamydia origin. About 10% of the insects artificially injected with the extracts from the infected rice, transmitted the disease.

(Received April 25, 1980)

## 緒 言

イネ grassy stunt 病は, Rivera ら<sup>12)</sup> によってフィリピンの国際イネ研究所 (IRRI) の農場で初めて発見され, トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens* Stål) によって媒介されることが明らかにされて以後, rice grassy stunt virus とよばれて今日に至っている. 一方 Bergonia ら<sup>3)</sup> は "rice rosette" として報告している. フィリピンの他にタイ<sup>9)</sup>, スリランカ<sup>1)</sup>, インド<sup>11)</sup> においても類似のイネの病害の発生が報告されており, 最近, 本邦の九州にもその発生が認められた<sup>7)</sup>. これまでに昆虫による媒介様式<sup>12)</sup>, イネ品種間の本病に対する抵抗性<sup>8)</sup>, 種子伝染しないこと<sup>6)</sup>, などが報告されている. また本病原に関して電子顕微鏡による観察<sup>5, 6)</sup>, さらにテトラサイクリン系薬剤の処理<sup>9)</sup>, などが試みられているが, 今日までその病原は明らかにさ

れていない. 最近, Pellegrini and Bassi<sup>10)</sup> は罹病イネの葉の超薄切片を電子顕微鏡で観察し, 直径約 20 nm の球形粒子を観察しているが, その病原性については明らかにされていない. 筆者らは罹病植物から病原性を有する径 20 nm の球形粒子を純化し, また罹病植物体内および保毒虫体内に同じ粒子を確認し, 本病原がウイルスであることを明らかにした<sup>13)</sup>. そこで今回は "イネ grassy stunt ウイルスに関する研究 (第1報)" として本病の媒介虫による伝染様式, 宿主範囲, 薬剤処理試験の試み, さらに媒介虫への注射法による伝染の確認を行ったので報告する.

本研究を行うにあたり, トビイロウンカを分譲下された農林水産省農業技術研究所三橋淳博士, 小山健二氏ならびに農事試験場岸本良一博士, またイネ品種を分譲下さった農林水産省中国農業試験場木村俊彦博士に対し深謝の意を表する.

\* 北海道大学農学部 Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

### 実験材料および方法

フィリピン産のイネ *grassy stunt* 罹病株\* を用い日本産イネ（農林8号，ミホニシキ，ユキモチおよび金南風）に，トビイロウンカ（*Nilaparvata lugens* Stål）を用いて接種し，隔離温室内で継代したものを実験に用いた。接種試験には2～3葉期のイネ幼苗を鉢植えしたもの，または試験管内の幼苗を用いた。試験管内接種後イネ苗をバット内の植土に移植し，発病の有無を観察した。媒介昆虫の飼育，接種および接種苗の育成は，すべて25℃，16時間照明条件下で行った。

**日本産イネへの接種試験** トビイロウンカの1～2令虫に15日間罹病イネ上で獲得吸汁させた後，日本産イネ4品種（農林8号，ミホニシキ，ユキモチ，金南風）の幼苗（2～3葉期）各10株に，それぞれ10頭づつ放飼した。3日間の接種吸汁後殺虫し，発病の有無を観察した。

**土壌伝染** ユキモチ罹病株を植えたプラスチックポット内の土壌にユキモチ，農林8号を播種し，その後の苗の発病の有無を観察した。また，ユキモチ罹病株をプラスチックポット内の土壌にすき込み，2か月後，この土壌に健全ユキモチ幼苗を移植し，その発病の有無を観察した。

**汁液接種** 接種原はユキモチ罹病葉（接種後1か月）5gに1/10Mリン酸緩衝液 pH 7.0，1/20Mトリス緩衝液 pH 7.7 の2種の緩衝液を各5ml加えて磨砕し，その搾汁液を用いた。ユキモチ3～4葉期の幼苗25株にカーボランダム（600メッシュ）をふりかけ，葉身表面に摩擦接種し，発病の有無を観察した。

**虫媒伝染試験** 1). 各地産トビイロウンカの媒介虫率：農業技術研究所三橋淳博士より分譲された神奈川県で採集したもの（神奈川県産），埼玉県鴻巣の農事試験場岸本良一博士より分譲を受けた鴻巣産と鹿児島産の二つのコロニー，農業技術研究所小山健二氏から分譲された赤眼系統の計4種のコロニーを用いた。それぞれのコロニーの1～2令虫を用い，罹病ユキモチ上で3日間獲得吸汁させ，2週間後，試験管内で3日間健全ユキモチ幼苗に単独接種し，苗の発病の有無を観察した。2). 獲得吸汁時間：トビイロウンカの1～2令虫をユキモチ罹病株上で5分～2日間獲得吸汁させた。獲得吸汁時間は5，15，30分，1，3，6，12時間，1，2日とし吸汁後，各々2週間健全苗で飼育し

た後供試虫各1頭を用いて接種（単独接種）した。3). 虫体内潜伏期間：2日間罹病ユキモチ株上で吸汁させた50頭の虫を単独接種し，虫が死ぬまで毎日新しいイネ苗に移しかえた。4). 接種吸汁時間：5日間獲得吸汁させた虫を2週間後健全ユキモチ幼苗に接種吸汁させた。接種時間は30分，1，2，4，6，12時間，1，2日とし単独接種した。上述の2) 獲得吸汁時間，3) 虫体内潜伏期間，および4) 接種吸汁時間に関する供試虫は全て鴻巣産コロニーを用いた。

**宿主範囲** 鴻巣産トビイロウンカをユキモチ罹病株で2週間獲得吸汁させた後，各検定植物1個体につき10頭づつ1週間接種し，その発病の有無を観察した。検定植物としてイネ *Oryza sativa* L. の4品種（農林8号，ミホニシキ，ユキモチ，金南風），トウモロコシ *Zea mays* L.（ゴールデンクロスバンタム），コムギ *Triticum aestivum* L. 2品種（ムカコムギ，マッシュウムギ），オオムギ *Hordeum vulgare* L.（北斗稗），カラスムギ *Avena sativa* L.（オホーツク），ヒエ *Panicum crus-galli* var. *frumentaceum* Hook.，イナキビ *P. milliaceum* L.，ハトムギ *Coix lachrymajobi* var. *frumentaceum* Makino を用い接種後1か月半，発病の有無を観察した後，それぞれの検定植物からイネへ戻し接種を試みた。

**薬剤処理試験** 本実験に供試した薬剤は2種のサルファ剤（スルフイソメゾール，シノミン），クロラムフェニコール剤（ケミセチンサクシネート），テトラサイクリン系剤の2種（テラマイシン，アクロマイシン），ペニシリン（ペニシリンG）の計6種である。健全イネ（H），イネ萎縮ウイルス（RDV），イネ黄萎病（RYD），イネ *grassy stunt*（GS）罹病株について試験を行った。処理方法は各株を水耕培養液で1週間生育させ，各薬液ごとに根部を24時間浸漬した後，再び培養液にもどし4～6週間生育させ病徴の軽減回復の有無を観察した。

**注射法による接種試験** 注射液は本病罹病ユキモチ苗の葉身部5gに等量の1/20Mトリス緩衝液 pH 7.5を加えて磨砕し，それを2重ガーゼでこし3,000 rpm，15分間低速遠心分離後の上清を用いた。また罹病イネ苗上で2週間獲得吸汁させたトビイロウンカ（鴻巣産）200頭（約0.5g）を5mlの1/20Mトリス緩衝液 pH 7.5を加えテフロンホモジナイザーを用いて磨砕し3,000 rpm，15分間遠心分離後の上清をも用いた。なお，これらの操作は，全て冷室（4℃）内で行った。無毒2

\*1969年，フィリピンの国際イネ研究所 Dr. K. C. Ling より分譲された。

令虫を炭酸ガスで麻醉し、実体顕微鏡下でガラス毛细管を用いて腹部に注射した。注射は8°Cで行った。注射虫は25°C, 16時間照明下で2週間健全苗で飼育した後、試験管内健全幼苗(ユキモチ)に3頭ずつ接種し、3日毎に3回、新しい幼苗に移しかえた。

## 実験結果

### 日本産イネへの接種試験

保毒トビイロウンカで接種した日本産イネの4品種各10株中、農林8号では6株、ミホニシキで5株、ユキモチ5株、金南風では4株に発病が観察された。感染植物は、2~3葉期のイネ苗では接種後2週間で新展開葉に、まず主脈周辺の退緑、ついで全葉の脈間退緑が認められる。その後、退緑葉株の分けつが盛んとなり叢生萎縮し、株が直立状になる。葉身の幅は健全株およびイネ黄萎病株に比して細く黄緑色となり、古い葉には灰褐色の rusty spot が観察される。しかし、イネ黄萎病のように葉の完全な黄化、黄白色化はみられず、やや緑色の残った状態になるのが特徴であるが、両者の病徴はかなり類似し、時に区別し難い。ユキモチ罹病株は、他の3品種に比べ葉身がさらに狭くなり、時に糸葉状を呈し感受性が強いように見受けられた(図1, 2)。

### 土壌伝染

ユキモチ罹病株生育土壌にユキモチおよび農林8号の種籾各100粒を播種した。またユキモチ罹病株をすき込んだ土壌に健全幼苗(ユキモチ1~2葉期)を25株移植し、それらの発病の有無を観察した。その結果は、いずれも発病株はみられず、土壌伝染はしないものと思われた。

### 汁液接種

汁液接種の結果は、1/10Mリン酸緩衝液と1/20Mトリス緩衝液で磨砕した汁液を接種したユキモチ25株には、いずれも接種2か月後においても発病は認められなかった。

### 虫媒伝染試験

1) 各地産トビイロウンカの媒介虫率: 4種のコロニー(神奈川産, 鴻巣産, 鹿児島産, 赤眼系統)を用いて媒介虫率を調べた結果を表1に示す。神奈川産で4%, 鴻巣産が16.3%, 鹿児島産11.6%, およびトビイロウンカ赤眼系統で11.7%であった。雌雄による媒介虫率にはあまり大きな差が認められなかった。供試コロニー中、鴻巣産コロニーが比較的高い媒介虫率を示したので以後の実験では鴻巣産コロニーを用いた。

2) 獲得吸汁時間: 実験の結果を表2に示した。全

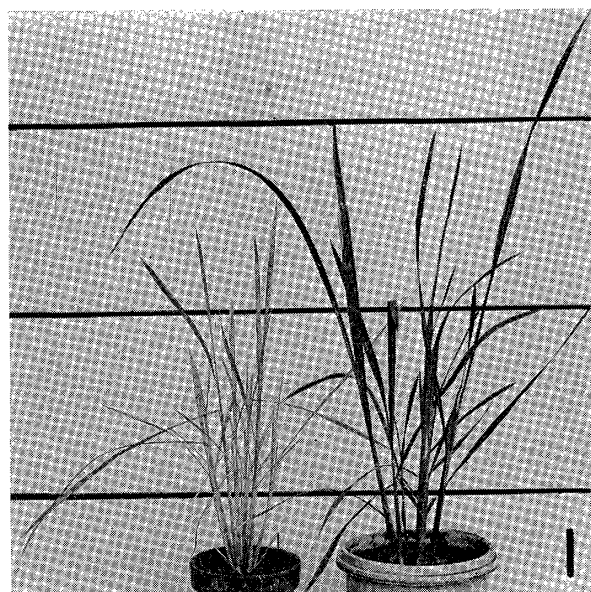


図1. Grassy stunt 病罹病ミホニシキ (左, 接種後1か月). 右; 対照健全株.



図2. Grassy stunt 病罹病ユキモチ (左, 接種後2か月), 右; 対照健全株.

般的に媒介虫率がやや低かったが、最短3時間の獲得吸汁で媒介することがわかった。

3) 虫体内潜伏期間: 供試虫50頭のうち6頭が保毒し、その媒介状態は表3に示すごとく、2日間の獲得吸汁後、10日目から媒介を始める虫もあった。本病の媒介には25°Cの恒温下で平均16日間の虫体内潜伏期間



表 6. 薬剤処理試験<sup>a)</sup>

供試薬剤	濃度 (ppm)	処理株 <sup>b)</sup>	処理株数	病徴回復株数
スルフ イソメゾール	10	H	2	—
		RDV	2	0
		RYD	2	0
		GS	2	0
シノミン	5	H	3	—
		RDV	3	0
		RYD	3	0
		GS	5	0
	10	H	7	—
		RDV	7	0
		RYD	7	0
		GS	9	0
ケミセチン サクシネート	100	H	3	—
		RDV	3	0
		RYD	3	0
		GS	5	0
	200	H	7	—
		RDV	7	0
		RYD	7	0
		GS	9	0
アクロマイシン	200	H	2	—
		RDV	2	0
		RYD	2	1
		GS	4	0
	400	H	5	—
		RDV	5	0
		RYD	5	3
		GS	7	0
テラマイシン	200	H	2	—
		RDV	2	0
		RYD	2	2
		GS	4	0
	400	H	2	—
		RDV	2	0
		RYD	2	2
		GS	4	0
ペニシリン	200	H	3	—
		RDV	3	0
		RYD	3	0
		GS	5	0
	400	H	7	—
		RDV	7	0
		RYD	7	0
		GS	9	0

a) 各濃度で24時間根部浸漬

b) H:健全株, RDV:イネ萎縮病罹病株, RYD:イネ黄萎病罹病株, GS:イネ grassy stunt 病罹病株

表 7. トビイロウンカへの注射法による人工接種試験

注射液	試験番号	注射虫数	注射後2週間生存虫	接種株数	発病株数 (%)
罹病イネ磨 碎搾汁液	1 <sup>a)</sup>	60	13	13	1 (7.7)
	2	60	15	5	1
	3	60	18	6	1
	4	60	30	10	2
罹病イネ吸 汁虫磨碎液	1 <sup>a)</sup>	60	10	10	1 (10.0)
	2	60	15	5	2
	3	60	24	8	2
	4	60	21	7	1

a) 単独接種, 他は1接種株につき3頭づつ接種

## 宿主範囲

イネ4品種, トウモロコシ, コムギ2品種, オオムギ, カラスムギ, ヒユ, イナキビ, ハトムギに接種し, 宿主範囲を調べた結果, イネのみが病徴を示し, 他は病徴が認められず, また戻し接種の結果, ウイルスを回収できなかった(表5)。

## 薬剤処理試験

まず予備試験により各薬剤の, イネ水耕培養で薬害を生じない許容濃度(24時間根部浸漬でイネ苗の枯れない濃度)を確かめた。スルフィソメゾール, シノミンでそれぞれ10 ppm, ケミセチンサクシネート 200 ppm, テラマイシン, アクロマイシンおよびペニシリンでそれぞれ400 ppmであった。各処理濃度につき健全イネ(H)とRDV, RYD, GS罹病株について処理後病徴の回復を観察した結果を表6に示す。RYD罹病株はアクロマイシン, テラマイシンの200, 400 ppmの処理で一時的に明らかな病徴の軽減が認められたが, RDVとGS罹病株はいずれの供試薬剤によっても病徴の軽減, 消滅は認められなかった。

## 注射法による接種試験

罹病イネおよび病株吸汁虫磨碎搾汁液をトビイロウンカに注射法により人工接種した結果, 保毒虫が得られた。単独虫接種ではその媒介率は表7に示すように罹病イネ汁液で7.7%罹病イネ吸汁虫磨碎液で10%であった。なお3頭づつ集団接種した場合の発病率は, それぞれ約19%および25%であった。

## 考 察

本実験の結果, 供試した日本産イネ品種はイネ grassy stunt 病に感受性で, その病徴もフィリピンで報告されたものとほぼ同様であった。本病は土壤伝染および汁液伝染せず, 本邦産トビイロウンカで永続

的に伝染した。その媒介様式は、鴻巣産トビロウソクで25°C恒温下で虫体内潜伏期間は平均16日、獲得吸汁時間、接種吸汁時間はそれぞれ最短3時間および30分であった。この結果は Rivera ら<sup>12)</sup>がフィリピンのトビロウソクで報告した結果とほぼ同様である。媒介虫率は鴻巣産で約16.3%であったが、これは Rivera ら<sup>12)</sup>の26~31%に比べてやや低率であった。その他のコロニーでは鹿児島産、赤眼系統で11~13%で大差はないが、神奈川産は4%と低く前者と大きな差が認められた。本病に対する本邦産各コロニーの親和性の問題は、検定個体数を多くしなければ明確に述べられないにしても、今回の結果から媒介虫率のきわめて低いコロニーもあり、本来大陸由来のトビロウソクにも地域的にウイルス親和性が異なるものかどうか、今後の問題として残された。また性別による媒介虫率の差は認められなかった。本実験の結果は Rivera ら<sup>12)</sup>および Hibino ら<sup>4)</sup>の結果と同様、一度保毒した虫は終生伝染力を有しており、獲得吸汁時間、虫体内潜伏期間、接種吸汁時間等からも永続的ウイルスに類似の伝染様式を示した。

本病の宿主範囲は本実験ではイネのみに発病し、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、カラスムギ、ヒエ、イナキビ、ハトムギには感染しなかった。この結果から本病の宿主範囲はきわめて狭いものと考えられる。イネの品種中、本病に対する抵抗性品種がフィリピンで知られているが<sup>8)</sup>、本邦の供試4品種はいずれも感受性であった。

本病の病原に関しては、その病徴がイネ黄萎病に類似していることから、マイコプラズマ様微生物(MLO)あるいはそれに近いものと考えられたので、テトラサイクリン系薬剤処理、およびクラミジア、リケッチアに対して効果のあるサルファ剤、ペニシリンについても試験を行ったが、いずれも治療効果は認められず MLO、クラミジア、リケッチアによるものとは考えられない。一方、電子顕微鏡による MLO 観察も行なわ

れてきたが<sup>5,6)</sup>、明確な知見を得るにいたらなかった。筆者らの観察でも MLO および類似微生物は検出されていない。最近、Pellegrini and Bassi<sup>10)</sup>は罹病イネ葉の超薄切片像に直径約20nmの球状粒子を特異な筒状構造中に観察し、健全イネ葉にはこのような粒子は存在しなかったと報告しているが、その病原性については明確にされていない。

本病はトビロウソクにより永続的に伝染されることから媒介昆虫への注射法による接種試験を試みた結果、約10%の伝染率が得られ、本病原は虫体内で循環または増殖していることが明らかとなった。これらの知見から本病原はウイルスではないかと推定される。なお罹病植物より純化した径20nmの球形粒子が病原性を有し、また罹病植物内および保毒虫体内に同じ粒子が観察されたことについては近く“イネ grassy stunt ウイルスに関する研究、第2報”として報告する予定である。

#### 摘 要

イネ grassy stunt 病を媒介虫トビロウソク *Nilaparvata lugens* Stål を用いて、日本産イネ4品種(農林8号、ミホニシキ、ユキモチ、金南風)に接種した結果、いずれも感受性で、本病の特徴的病徴である叢生萎縮と株の直立化、葉の黄緑化と細い葉身および rusty spot 等が観察された。本病の宿主範囲はイネのみで、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、カラスムギ、ヒエ、イナキビ、ハトムギには発病しなかった。本病は土壌伝染、および汁液伝染をしない。本病はトビロウソクで永続的に媒介伝染される。テトラサイクリン、サルファ剤、クロラムフェニコール、ペニシリンなど各種薬剤は本病に対して治療効果を示さなかった。罹病葉および罹病イネ吸汁虫磨砕液をトビロウソクに注射した結果、約10%の保毒虫が得られた。

#### 引用文献

1. Abeygunawardena, D. V. W. (1969). *In* The Virus Diseases of the Rice Plant (Proc. Symp. at the IRRI). Johns Hopkins Press, Baltimore. pp. 53-57.
2. Agati, J. A., Sison, P. L. and Abalos, R. (1941) Philippine J. Agr. 12: 197-210.
3. Bergonia, H. T., Capule, N. M., Noverd, E. P. and Calica, C. A. (1966). Philippine J. Plant Ind. 31: 47-51.
4. Hibino, H., Roechan, M., Sudarisman, S. and Tantera, D. M. (1977). Contr. Centr. Res. Inst. Agric. Bogor. 35: 1-15.
5. IRRI (Int. Rice Res. Inst.). (1966). Annual Report for 1966: 302.
6. IRRI. (1968). Annual Report for 1968: 402.

7. 岩崎真人・新海 昭 (1979). 日植病報 45 : 741-744.
8. Ling, K. C., Aguiro, V. M. and Lee, S. H. (1970). Plant Dis. Repr. 54 : 565-569.
9. Ou, S. H. and Rivera, C. T. (1969). *In* The Virus Diseases of the Rice Plant (Proc. Symp. at the IRRI). Johns Hopkins Press, Baltimore. pp. 23-34.
10. Pellegrini, S. and Bassi, M. (1978). Phytopath. Z. 92 : 247-250.
11. Raychaudhuri, S. P., Mishra, M. D. and Ghosh, A. (1967). Plant Dis. Repr. 51 : 300-301.
12. Rivera, C. T., Ou, S. H. and Iida, T. T. (1966). Plant Dis. Repr. 50 : 453-456.
13. 仙北俊弘・石水妙子・四方英四郎・Tiongco, E. R.・Ling, K. C. (1980). 日植病報 46 : 411-412.