

## インゲンマメ黄斑モザイクウイルスによるヘアリーベッチモザイク病と クローバ葉脈黄化ウイルスによるえそ萎縮病 (新称)

笹谷孝英・藤原伸介\*・小金澤碩城\*\*

(四国農業試験場)

Mosaic and Necrotic Stunt Diseases of Hairy Vetch (*Vicia villosa* Roth.) Caused by Bean Yellow Mosaic Virus and Clover Yellow Vein Virus

By Takahide SASAYA, Shinsuke FUJIHARA\* and Hiroki KOGANEZAWA\*\*

(Shikoku National Agricultural Experiment Station, Zentsuji, Kagawa 765-8508: Present address, \*National Agricultural Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305-8666; \*\*Chugoku National Agricultural Experiment Station, Fukuyama, Hiroshima 721-8514)

In 1996, two types of virus-like symptoms (mosaic symptom and necrotic stunt symptom) on hairy vetch (*Vicia villosa* Roth.) were observed in the fields of Shikoku National Agricultural Experiment Station in Zentsuji. On the bases of host reactions, particle morphology and serological reactions using polyclonal plus monoclonal antibodies against bean yellow mosaic virus (BYMV) and clover yellow vein virus (CIYVV), the causal agent of hairy vetch mosaic was identified as BYMV, and that of hairy vetch necrotic stunt was as CIYVV.

### 緒 言

ヘアリーベッチ (*Vicia villosa* Roth.) は青刈り、干し草およびサイレージ用として世界中で栽培されているマメ科牧草である (花野ら, 1998)。また、ヘアリーベッチは地伏性であるため、果樹園の草生栽培や耕作放棄地での雑草防除にも用いられている (Bugg *et al.*, 1991; 花野ら, 1998)。1996年、香川県のヘアリーベッチの圃場にウイルス症状が発生した。症状はモザイク症状を示すものと、激しいえそ症状を示し株全体が萎縮するものと2種類が観察された。日本におけるヘアリーベッチのウイルス病については日野 (1960) が報告しているが、ウイルスの種の同定はされていない。後に、井上 (1964) は日野が報告したウイルスはインゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV)

と注記しているが詳しい同定については述べていない。このようにヘアリーベッチのウイルス病については不明な点が残されている。そこで、香川県で発生したヘアリーベッチのモザイク症状と激しいえそ症状を示す病原ウイルスの同定を行ったのでここに報告する。

### 材料および方法

#### 供試ウイルス

善通寺市の四国農業試験場内のモザイク症状を示したヘアリーベッチあるいはえそ萎縮症状を示したヘアリーベッチから病原ウイルスの分離を試みた。モザイク症状あるいはえそ萎縮症状を示したヘアリーベッチから、*Chenopodium amaranticolor* により3回局部病斑分離を行い、それぞれBHV株およびCHV株を分離した。また、血清

現在: \*農業研究センター, \*\*中国農業試験場

学的性状を比較するためにBYMVの3分離株 (BYMV-90-2, BYMV-PおよびBYMV-O), クローバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV) の2分離株 (CIYVV-90-1およびCIYVV-92-3) も用いた (Sasaya *et al.*, 1998)。

#### ウイルス粒子の電子顕微鏡観察

BHV株あるいはCHV株感染ソラマメ葉粗汁液を2%リンタングステン酸 (pH 7.0) で染色して、ウイルス粒子を電子顕微鏡観察した。

#### 宿主範囲と病徴

BHV株あるいはCHV株感染ソラマメ葉を0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) を加え磨砕し、カーボラシムを用いて第1表に示した8科23種の植物に汁液接種した。なお、接種試験は5月~6月にかけて寒冷紗被覆した温室内で行い、温度は20~25℃に制御した。また、病徴を示さなかったものは*C. amaranticolor*に戻し接種し、ウイルス感染の有無を確認した。

#### 血清試験

ACP (indirect antigen-coated plate) - ELISA (Sasaya *et al.*, 1995) および TAS (triple antibody sandwich)-ELISA (Sasaya *et al.*, 1997) の2種のELISAを用いて、ウイルス分離株間の血清反応を比較した。抗原はウイルス感染ソラマメ葉の100倍希釈液を用い、抗体はポリクローナル抗体の場合は $10^4$ 倍希釈、モノクローナル抗体の場合は培養液の $10^2$ 倍希釈液を用いた。なお、ACP-ELISAにはBYMV-90-2, BYMV-P, BYMV-O, CIYVV-90-1およびCIYVV-92-3に対するポリクローナル抗体, TAS-ELISAにはBYMV-90-2に対するモノクローナル抗体4種類 (MAb-1F3, MAb-2C4, MAb-4G8およびMAb-2B4), CIYVV-90-1に対するモノクローナル抗体4種類 (MAb-1C8, MAb-2H8, MAb-3G9およびMAb-5F2), およびCIYVV-92-3に対するモノクローナル抗体1種類 (MAb-2D6) を用いた。

## 結果及び考察

#### 原寄主の病徴

モザイク症状のアリベッチは葉脈に沿って細い濃淡のあるモザイクあるいは弱い退緑斑点を示すが、えそを示し枯死することはなかった。一方、えそ萎縮症状のヘアリーベッチは葉脈沿いにえそ

をともなった激しいモザイク症状を示し、株全体が萎縮した。また、茎えそを生じ枯死することもあった。両症状とも春先に発生が多く、5月から6月にかけて症状が激しくなった。

#### 電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察

ウイルス粒子の形態は、BHV株およびCHV株とも*Potyvirus*特有の長さが750nmのひも状であった (図省略)。

#### 宿主範囲と病徴

BHV株とCHV株の宿主範囲とその病徴を第1表に示した。接種した8科23種中BHV株は4科13種, CHV株は7科19種の植物に感染した。なお、BHV株あるいはCHV株を接種したヘアリーベッチでは、圃場で発生した症状が再現された (第1図)。また、CHV株の宿主範囲はBHV株より広く、しかも感染植物の病徴は激しかった。BHV株とCHV株はともにソラマメ (*Vicia faba*), インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) およびエンドウ (*Pisum sativum*) のアラスカ品種には全身感染したが、エンドウのウイスコンシンパーフェクション品種には感染しなかった。これら判別植物の反応より両ウイルス株はBYMVあるいはCIYVVであると推定された。

次に、BHV株とCHV株の宿主範囲と病徴をBYMV-90-2, BYMV-P, BYMV-O, CIYVV-90-1およびCIYVV-92-3 (井上, 1964; Sasaya *et al.*, 1997; Sasaya *et al.*, 1998) と比較した。BHV株の宿主範囲と病徴はBYMV-Oとよく似ていたが、BYMV-90-2およびBYMV-Pとは若干異なっていた。一方、CHV株の宿主範囲と病徴はCIYVV-90-1とよく似ており、CIYVV-92-3とは若干異なっていた。CHV株はキュウリ (*Cucumis sativus*), タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc), センニチコウ (*Gomphrena globosa*) およびヒャクニチソウ (*Zinnia elegans*) に局部感染したが、BHV株はこれらの植物に感染しなかった。また、CHV株はゴマ (*Sesamum indicum*) とシロクローバ (*Trifolium repens*) に全身感染したが、BHV株はこれらの植物に感染しなかった。以上より、判別植物の反応からはBHV株とCHV株はそれぞれBYMVとCIYVVであると考えられた。

第1表 BHV株とCHV株の宿主範囲

植物名 (品種名)	病 徴 <sup>a)</sup>	
	BHV	CHV
キュウリ	- / - <sup>b)</sup>	NS / -
ペポカボチャ	- / -	- / -
<i>Nicotiana benthamiana</i>	o / Mo	o / Mo, N
<i>N. clevelandii</i>	o / o	CS / Mo
<i>N. glutinosa</i>	- / -	- / -
タバコ ( <i>Xanthi nc</i> )	- / -	CS / -
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	CS / -	NS / Mo, N
<i>C. quinoa</i>	CS / -	NS / CS, NS
ハウレンソウ	o / o	NS / Mo, N
センニチコウ	- / -	CS / -
ツルナ	o / -	CS / -
ヒャクニチソウ	- / -	CS / -
ゴマ	- / -	NS / NS, N
ダイズ	- / -	- / -
インゲンマメ		
(本金時)	CS / Mo	NS / LN, Mo, N
(ケンタッキーワングー)	NS / Mo, N	NS / LN, Mo, N
(マスターピース)	CS / Mo	NS / LN, Mo, N
(トップクローブ)	CS / Mo	NS / LN, Mo, N
エンドウ		
(アラスカ)	o / Mo	NS / LN, Mo, N
(ウイスコンシンパーフェクション)	- / -	- / -
シカクマメ	o / Mo	CS / Mo, N
クリムソクローバ	CS / Mo	NS / Mo, N
アカクローバ	o / Mo	o / Mo
シロクローバ	- / -	o / Mo
ササゲ	- / -	- / -
ソラマメ	o / Mo	NS / LN, Mo, N
ヘアリーベッチ	o / Mo	NS / LN, Mo, N, Stn

- a) CS, 退緑斑点; LN, 枯死; Mo, モザイク; N, えそ; NS, えそ斑点; o, 無病徴感染; Stn, 萎縮; -, 非感染  
 b) 接種葉/上位葉



第1図 BHV株(左)あるいはCHV株(右)接種ヘアリーベッチ

#### 血清試験

ポリクローナル抗体を用いたACP-ELISAの結果, BYMV-90-2, BYMV-PあるいはBYMV-Oに対する抗血清に対して, BHV株はCHV株, CIYVV-90-1およびCIYVV-92-3より強く反応した。同様に, CIYVV-90-1あるいはCIYVV-92-3に対するポリクローナル抗体に対して, CHV株はBHV株, BYMV-90-2, BYMV-PおよびBYMV-Oより強く反応した(第2表)。モノクローナル抗体を用いたTAS-ELISAにおいて, BHV株とCHV株はいずれもPotyvirusのBYMVサブグループ特異的なモノクローナル抗体(MAb-5F2)と反応した。BHV株は4種類のBYMV-90-2に対するモノクローナル抗体中2種類(MAb-1F3とMAb-4G8)と反応したが, MAb

-5F2以外のCIYVVに対するモノクローナル抗体とは反応しなかった。CHV株はCIYVVの系統1に対して特異的なモノクローナル抗体(MAb-1C8)と反応したが、BYMV-90-2に対する4種類のモノクローナル抗体およびCIYVVの系統2に対して特異的なモノクローナル抗体(MAb-2D6)とは反応しなかった(第3表)。

以上の宿主範囲と血清試験より、BHV株とCHV株はそれぞれBYMVとCIYVVであると同定された。

以前、我々は日本に発生するBYMVはインゲンマメの反応で4つのPathotypeに分かれることを報告した(Sasaya *et al.*, 1998)。BHV株はインゲンのPathotypeに対する判別品種すべてに

全身感染したことより、PathotypeIVに属するBYMVであると判断される。また、日本に発生するCIYVVは宿主範囲と血清反応で2つの系統に分かれることが明らかとなっている(Sasaya *et al.*, 1997)。CHV株は *N. clelandii*, *C. amaranicolor*, *C. quinoa* およびシロクローバに全身感染し、かつ、CIYVVの系統1に対して特異的なモノクローナル抗体と反応したが、系統2に対して特異的なモノクローナル抗体とは反応しなかったことより、CIYVVの系統1に属すると考えられた。

日野はモザイク症状を示したヘアリーベッチよりウイルスを分離し、モザイク病を提案している(日野, 1960)が、分離したウイルスがインゲン

第2表 ポリクローナル抗体を用いたACP-ELISAによる血清試験

分離株	ポリクローナル抗体				
	BYMV-90-2	BYMV-P	BYMV-O	CIYVV-90-1	CIYVV-92-3
BHV	0.48 <sup>a)</sup>	0.62	0.56	0.45	0.48
CHV	0.17	0.29	0.12	1.21	1.12
BYMV-90-2	1.26	0.53	0.54	0.65	0.68
BYMV-P	0.39	0.78	0.34	0.59	0.37
BYMV-O	0.20	0.54	0.98	0.34	0.35
CIYVV-90-1	0.28	0.21	0.28	1.15	1.08
CIYVV-92-3	0.08	0.12	0.10	0.95	1.43
健全ソラマメ葉	0.00	0.03	0.01	0.01	0.02

<sup>a)</sup> 基質を加えて室温で2時間後に405nmの吸光度を測定

第3表 モノクローナル抗体を用いたTAS-ELISAによる血清試験

分離株	モノクローナル抗体								
	BYMV-90-2				CIYVV-90-1				CIYVV-92-3
	1F3	2C4	4G8	2B4	1C8	2H8	3G9	5F2	2D6
BHV	0.45 <sup>a)</sup>	0.04	0.11	0.00	0.02	0.00	0.01	0.27	0.00
CHV	0.06	0.05	0.04	0.05	0.74	0.28	0.81	0.28	0.03
CIYVV-90-1	0.74	0.00	0.00	0.02	0.69	0.87	0.83	0.79	0.00
CIYVV-92-3	0.04	0.02	0.01	0.05	0.00	0.41	0.02	0.38	0.89
BYMV-90-2	0.98	1.00	0.78	1.04	0.02	0.01	0.83	1.05	0.00
BYMV-P	0.52	0.00	0.19	0.76	0.01	0.28	0.17	0.29	0.00
BYMV-O	0.00	0.00	0.01	0.54	0.01	0.00	0.02	0.44	0.00
健全ソラマメ葉	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.01

a) 基質を加えて室温で2時間後に405nmの吸光度を測定

マメやソラマメに感染せず、しかも、マメ科以外の植物に感染しなかったと報告している。これら宿主範囲の違いから、BHV株とCHV株は日野が分離したウイルスとは異なるウイルスであると考えられる。

BYMVやCIYVVには病原性の異なる多くの系統が報告されている（井上, 1964；Sasaya *et al.*, 1997；Sasaya *et al.*, 1998）。しかも、BYMVとCIYVVは宿主範囲や血清反応などの性状が互いに似ているために分類・同定が困難であった。しかし、今回用いた判別植物の反応およびモノクローナル抗体を用いた血清試験により両者を識別することが可能となり、ヘアリーベッチのモザイク症状およびえそ萎縮症状の病原ウイルスをそれぞれBYMVとCIYVVと同定した。ヘアリーベッチでは未報告の病害であるため、それぞれモザイク病およびえそ萎縮病と命名することを提案する。

### 摘 要

1996年、善通寺市の四国農業試験場内の圃場のヘアリーベッチにモザイク症状とえそ萎縮症状が発生した。宿主範囲、粒子の形態およびインゲンマメ黄斑モザイクウイルス（BYMV）およびクローバ葉脈黄化ウイルス（CIYVV）に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた血清試験でヘアリーベッチのモザイク症状とえそ萎縮症状の病原ウイルスをそれぞれCIYVVとBYMVと同定した。

### 引 用 文 献

Bugg, R. L., M. Sarrantonio, J. D. Dutcher

and C. Phatak Sh (1991) : Understory cover crops in pecan orchards : Possible management systems. *Am. J. Altern. Agric.*, 6 : 50~62.

花野義雄・藤井義晴・佐藤健次・遅澤省子・藤原伸介 (1998) : ヘアリーベッチを用いた四国地域の耕地雑草制御—1993年~1997年場内試験並びに現地圃場調査からの考察一. 四国農試報告, 62 : 45~70.

日野稔彦 (1960) : ヘアリーベッチのモザイク病. 日植病報, 25 : 21.

井上忠男 (1964) : 本邦のマメ科植物に発生するウイルスの種類およびこれらの判別方法. 農学研究, 50 : 103~116.

Sasaya, T., Y. Nozu and H. Koganezawa (1998) : Biological and serological comparisons of bean yellow mosaic virus (BYMV) isolates in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 64 : 24~33.

Sasaya, T., T. Shimizu, Y. Nozu, M. Nishiguchi, N. Inouye and H. Koganezawa (1997) : Biological, serological, and molecular variabilities of clover yellow vein virus. *Phytopathology*, 87 : 1014~1019.

Sasaya, T. and T. Yamamoto (1995) : Improvements in non-precoated indirect enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of three potyviruses infecting cucurbitaceous plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 61 : 130~133.