

ソラマメより分離されたクローバ葉脈黃化 ウイルス (CYVV) の性状

笠谷孝英・岩崎真人・山本孝彌
(四国農業試験場)

Some properties of clover yellow vein virus (CYVV) isolated from a broad bean plant (*Vicia faba*). by Takahide SASAYA, Mabito IWASAKI and Takashi YAMAMOTO. (Shikoku National Agricultural Experiment Station, 1-3-1 Senyucho Zen- tsuji, Kagawa 765)

A virus, designated 90-1, isolated from a broad bean plant (*Vicia faba*) with severe necrosis and mosaic symptoms in Shikoku-island was compared with some isolates of clover yellow vein virus (CYVV) and bean yellow mosaic virus (BYMV), and identified as CYVV. The virus was infectious to 16 species in 6 families and induced severe necrosis and mosaic symptoms in most species, such as, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba* and *Pisum sativum*. In agar gel diffusion test, immunoelectron microscopy, and enzyme-linked immunosorbent assay using antisera against CYVV 90-1 and BYMV 90-2, CYVV 90-1 was serologically more closely related to CYVV than BYMV.

緒 言

ソラマメは冬作物として四国地域の多くで栽培されており、特に、瀬戸内沿岸の愛媛県および香川県で古くから栽培されている。しかし、近年、ウイルス病の発生が問題となり、特に春先から収穫期にかけ、えぞ症状をともなった激しいモザイクを示すソラマメ株が多く見られる。また、多発生の圃場では収穫が皆無となる場合も多い。このようなウイルス病の発生は四国地域のみならず、東北地方でも報告されており、東北地方の太平洋沿岸ではソラマメの栽培が不可能となっているところも出ている(御子柴ら, 1991, 中村ら, 1991)。

ソラマメに感染してこのようなえぞ症状を引き起こすウイルスとしては、ソラマメえぞモザイクウイルスとインゲンマメ黄斑モザイクウイルス(BYMV)のN系統があるが、BYMVと性状の似たクローバ葉脈黃化ウイルス(CYVV)もあり、BYMVとCY

VVの異同については不明のままである。

そこで本研究では、このようなえぞ症状をともなった激しいモザイク症状を示したソラマメ株より病原ウイルスを分離し、性状を明かにするとともにその同定を行った。

材料および方法

供試ウイルス

1990年5月香川県善通寺市においてえぞ症状を示したソラマメ株を採取し、*Chenopodium amaranticolor*で3回局部病斑分離し、病原ウイルス(CYVV 90-1)を分離した。なお、CYVV 90-1はソラマメ(*Vicia faba*)あるいは*Nicotiana benthamiana*に継代接種を行い維持した。また、CYVV 90-1以外に、CYVV-I 89-1(Chun et al., 1990), BYMV 90-2(笠谷ら, 1993), BYMV 90-3(笠谷ら, 1993), BYMV-B(V124)(井上, 1968)およびBY

MV-N (P180) (井上, 1968) も実験に供試した。

宿主範囲

CYVV 90-1 感染ソラマメ葉を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を加え磨碎し、10科28種の植物にカーボランダムを用いて汁液接種した。1週間後に接種葉の特徴、2~3週間後には上位葉の病徵を観察した。また、病徵の観察されなかったものは *C. amaranticolor* に戻し接種を行い、ウイルス感染の有無を確認した。なお、本接種試験は 20~30°C の温度制御温室で行い、5月~9月中旬までは寒冷紗被覆を行った。

ウイルス粒子の電子顕微鏡観察

CYVV 90-1 感染ソラマメ葉を 2% リンタングステン酸 (pH 7.0) を用いてネガティブ染色し、ウイルス粒子を電子顕微鏡観察した。

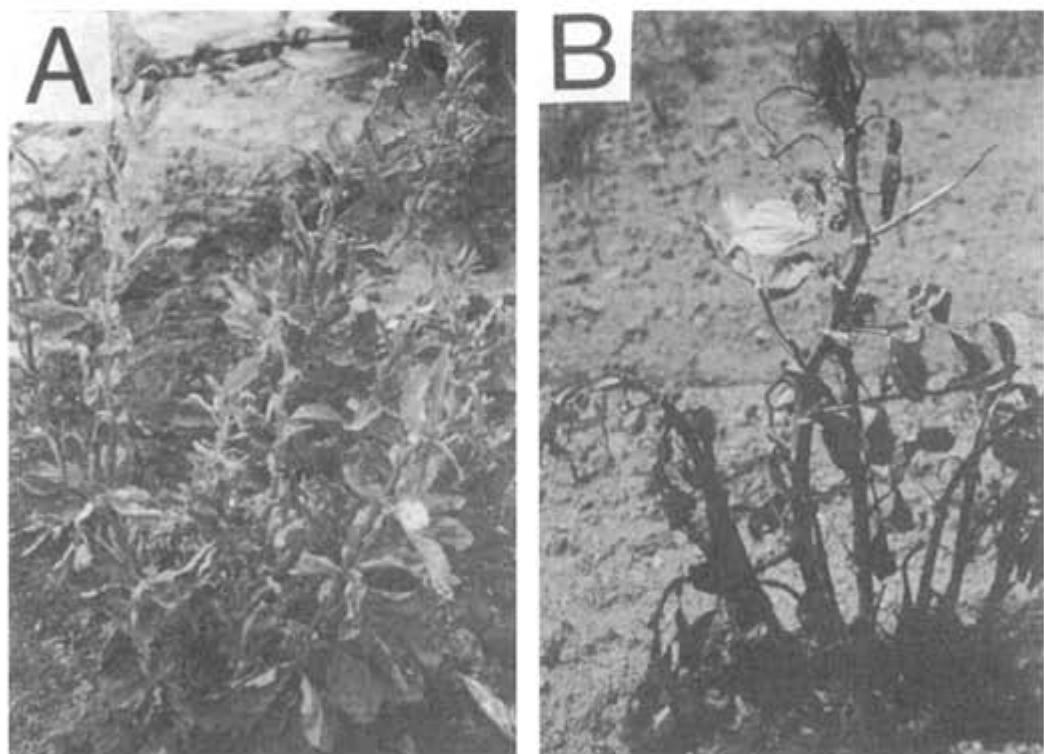
粗汁液中の安定性

CYVV 90-1 感染ソラマメ葉粗汁液を各処理後、*C. amaranticolor* に接種し、10葉の病斑数

を調べた。希釈限界試験は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 10^2 ~ 10^6 倍まで 5段階希釈した。不活性化温度試験は 10倍希釈した粗汁液を 5°C 間隔で 40~65°C に設定した湯煎中で 10 分間処理した。保存限界試験は 10倍希釈した粗汁液を室温で 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 日間保存した。

ウイルスの純化および抗血清の作製

ウイルスの純化は UYEDA et al. (1975) の方法を一部改変して以下のようにして行った。ウイルス感染ソラマメ凍結葉を 3 倍容の 0.05 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0.5% メルカプトエタノールを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.0) で磨碎し、2重のガーゼで搾汁後、1/2 倍容の四塩化炭素で 3 分間攪拌し、遠心分離 ($1,000 \times g$, 10 分間) した。その上清に 2% Triton-X および 4% ポリエチレングリコール (#6000) を加え、4°C で 20 分間攪拌、40 分間静置後、遠心分離 ($4,000 \times g$, 10 分間) した。その沈澱を 0.5 M 尿素加用 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁させ、2 回分画遠



第1図 園場におけるCYVV感染ソラマメ

Aは2月の激しいモザイク症状を示したソラマメ

Bは収穫期前のえそ症状を示したソラマメ

心 ($10,000 \times g$, 10分間と $108,500 \times g$, 90分間) した。分画遠心後, 10%~40%のシェークロー
ス密度勾配遠心 (Hitachi SRP-28SAローター,
24,000 rpmで120分間) した。ウイルスバンドを
分取後, 遠心分離で沈澱させ, これを0.01Mリン
酸緩衝液 (pH 7.4) で懸濁したものを純化ウイ
ルスとした。

CYVV 90-1 抗血清は純化ウイルス (合計
8.6 mg/頭) を家兔に2週間間隔で3回, それ
ぞれ等量のFreund's complete Adjuvantを加えて
筋肉注射し, さらに2回1週間間隔で静脈注射し,
最後の注射から1週間後に全採血により得た。作
製した抗血清の力値は重層法で1/512であった。
また, 本実験ではBYMV 90-2に対する抗血清
も使用した (笹谷ら, 1993)。

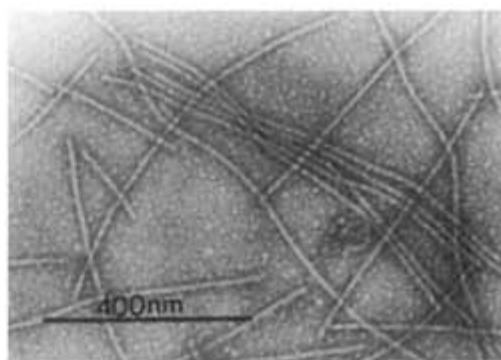
血清試験

寒天ゲル内二重拡散法, 免疫電子顕微鏡法およ
び酵素結合抗体法 (ELISA) で本ウイルスの血
清学的関係を調べた。

寒天ゲル内二重拡散法は0.01Mリン酸緩衝液
(pH 7.8) に0.85%塩化ナトリウム, 0.04%ア
ジ化ナトリウムを加えた0.85%アガロースゲルを
用い, 抗原としてはCYVVあるいはBYMVの純化
試料 (0.65 mg/ml) に0.5%となるようラウリル
硫酸ナトリウムを加えたものを用いた (Uyeda
et al., 1975)。また, 抗体はCYVV 90-1 抗
血清あるいはBYMV 90-2 抗血清を1/2に希釈
したもの用い, 1ウエルあたりの抗原および
抗体量は20 μlとし, 反応は4°Cで3日間行った。

免疫電子顕微鏡法はデコレーション法で行った
(奥田ら, 1992) CYVVあるいはBYMV感染ソラ
マメ葉粗汁液に数分間浮かべたグリッドを, 128,
256, 512, 1,024倍に希釈したCYVV 90-1 抗血
清あるいはBYMV 90-2 抗血清で5分間処理した。処
理後, 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗浄し, 2%
リンタングステン酸 (pH 7.0) 染色後, 電子顕微鏡
観察した。なお, 血清反応はウイルスと血清の反
応程度により一から十の4段階に分け調べた。

ELISAはCLARK et al. (1977) のダブルサ
ンドイッチELISA (DAS-ELISA) に従い,
ヤーグロブリンのコーティングは37°Cで4時間, 試
料の処理は4°Cで1晩, 酵素標識抗体処理は37°C
で4時間とした。発色は基質添加後25°Cで1時間



第2図 CYVV 90-1 感染ソラマメ葉のネガテ
イブ染色によるウイルス粒子の電子顕微
鏡観察
バーは400 nmを示している。

静置し, 蒸留水で5倍に希釈後, 波長405 nmの
オートリーダー (MTP-32 コロナマイクロプレ
ートリーダー) で測定した。また, ヤーグロブリ
ン濃度および酵素標識抗体希釈倍率は, CYVV
90-1 抗血清を用いたELISAでは1.0 μg/ml
と400倍, BYMV 90-2 抗血清を用いたELISA
では2.5 μg/mlと400倍とした。

結 果

圃場での病徵

圃場での本ウイルスの症状は, 気温の低い1月~3
月にかけ葉脈透化をともなった鮮やかなモザイク症
状を示し, 株全体が萎縮するが, この時期はえそ
症状はあまり示さなかった (第1図-A)。しかし,
気温が上昇するにつれ葉脈えそや茎えそが生
じ, 収穫前にはほとんどの株が枯死してしまった
(第1図-B)。また, 定植間際に感染したものは
えそをともなった激しいモザイク症状を呈し,
年内に枯死してしまった。

宿主範囲

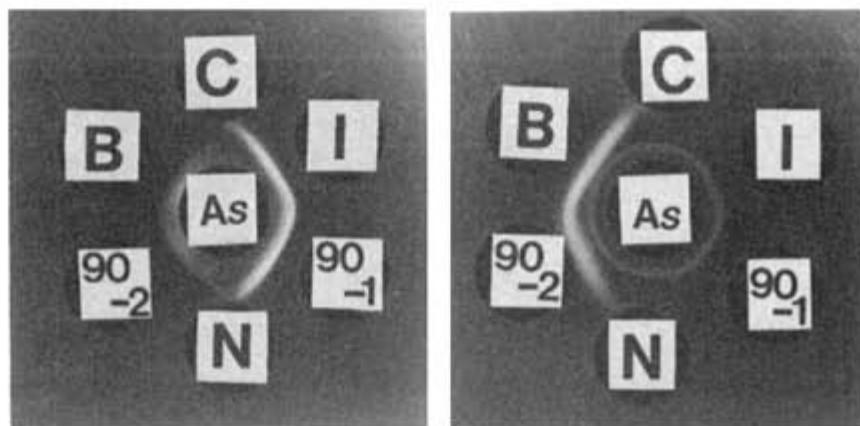
CYVV 90-1を10科28種の植物に汁液接種した
ところ, 6科16種の植物に感染が確認された。
第1表に示すようにマメ科植物以外にもナス科や
アカザ科の植物に全身感染を示し, 宿主範囲の比
較的広いウイルスであった。また, 全身感染を示
す植物では激しいモザイクやえそ症状を示すもの
が多くかった。

本ウイルスによるソラマメの病徵は, 接種後3
~5日後に接種葉にえそ斑点を生じ, 接種後5

第1表 CYVV 90-1 の宿主範囲

植物名(品種名)	病徵	
	接種葉	上位葉
アブラナ科		
ハクサイ	- (-)	- (-)
ウリ科		
キュウリ	NS	- (-)
カボチャ	CS	- (-)
ナス科		
<i>Nicotiana tabacum</i> (Xanthi-nc)	CS	- (-)
<i>N. benthamiana</i>	CS	CS, Mo, N, NS
<i>N. clevelandii</i>	CS	CS, Mo, NS
<i>N. glutinosa</i>	- (-)	- (-)
トマト	- (-)	- (-)
アカザ科		
<i>Chenopodium quinoa</i>	NS	CS, Mo, N, NS, VN
<i>C. amaranticolor</i>	NS	CS, Ma, Mo, N, NS, VN
ヒユ科		
センニチコウ	- (+)	- (-)
ザクロソウ科		
ツルナ	CS	- (-)
キク科		
ヒヤクニチソウ	- (-)	- (-)
ヒルガオ科		
アサガオ	- (-)	- (-)
イネ科		
トウモロコシ	- (-)	- (-)
マメ科		
インゲンマメ	CS, NS	CS, Mo, N, NS, Str, VN
エンドウ (30日絹莢)	CS, NS	CS, Mo, N, NS, Str, VN
エンドウ (ウイスコンシンパークション)	- (-)	- (-)
ソラマメ	CS, NS	CS, Mo, N, NS, Str, VN
ササゲ	- (-)	- (-)
アズキ	- (-)	- (-)
ダイズ	- (-)	- (-)
シロクローバ	- (+)	- (-)
アカクローバ	- (-)	- (-)
クリムソンクローバ	- (+)	Ma, Mo, N, Stu, VN
コモンベッヂ	NS	Mo, N, Str, VN
レンゲ	- (+)	Mo, N, Str, VN
スィートピー	- (+)	Mo, N, Str, VN
アルファアルファ	- (-)	- (-)

注) CSは退緑斑点, Maは奇形, Moはモザイク, Nはえぞ, NSはえぞ斑点, Strは条えぞ, VNは葉脈えぞ, -は無病徵, (-)は戻し接種マイナス, (+)は戻し接種プラスを示した.



第3図 CYVV 90-1抗血清（左）またはBYMV 90-2抗血清（右）を用いた寒天ゲル内二重拡散法による血清反応

Asは抗血清、Cはリン酸緩衝液（pH 7.2）、IはCYVV-189-1、90-1はCYVV 90-1、NはBYMV-N（P180）、90-2はBYMV 90-2、BはBYMV-B（V124）をそれぞれ示した。

～10日後には上位葉に葉脈えそ、えそ斑点をともなった激しいモザイク、茎えそやトップネクロシスを生じ、2～3週間で株全体が枯死してしまった。同様の症状はエンドウやインゲンマメでも観察されたが、バーフェクションタイプのエンドウには感染が確認されなかった。

ウイルス粒子の形態と大きさ

本ウイルスは長さが750 nm、幅13 nmの屈曲をともなうひも状の形態をしていて（第2図）。

粗汁液中の安定性

CYVV 90-1の希釈限界は $10^4 \sim 5 \times 10^4$ 、不活化温度は60～65°C、保存限界は5～7日間であった。

血清試験

寒天ゲル内二重拡散法により、CYVV 90-1抗血清はCYVV 90-1およびCYVV-189-1と沈降線を生じ、その沈降線は融合した。また、BYMV 90-2とBYMV-B（V124）とは弱い沈降線を生じ、その沈降線は融合した。しかし、BYMV-N（P180）とは沈降反応を示さなかつた（第3図-A）。一方、BYMV 90-2抗血清はBYMV 90-2およびBYMV-B（V124）と強く反応し、沈降線は融合したが、CYVV 90-1、CYVV-189-1およびBYMV-N（P180）とは反応しなかつた（第3図-B）。

次に、免疫電子顕微鏡法によりCYVVおよびBYMVの各分離株と4段階に希釈したCYVV 90-1抗血清あるいはBYMV 90-2抗血清との反応を調べた。その結果、CYVV 90-1抗血清は各希釈段階でCYVVの2分離株と++～+++で反応したが、BYMVの4分離株およびBYMV-N（P180）は512倍までしか反応が認められなく、その反応程度は+～++であった。BYMV 90-2抗血清を用いた場合、BYMVの4分離株は各希釈段階で+～++で反応したが、CYVVの2分離株は512倍希釈までしか反応しなかつた。一方、BYMV-N（P180）はBYMV 90-2抗血清とは全く反応しなかつた（第2表、第4図）。

CYVV 90-1抗血清およびBYMV 90-2抗血清を用いたDSA-ELISAにより、純化ウイルスあるいはソラマメ感染葉でのCYVV 90-1とBYMV 90-2の反応を比較した。その結果、CYVV 90-1抗血清を用いたDSA-ELISAでは、純化ウイルスおよび感染葉とともに、CYVV 90-1は強く反応したが、BYMV 90-2でも弱い反応が認められた。一方、BYMV 90-2抗血清を用いたDSA-ELISAでは、BYMV 90-2は強く反応し、CYVV 90-1でもBYMV 90-2の半分程度の発色が認められた（第5図、第6図）。また、CYVV 90-1抗血清を用いたDAS

第2表 CYVV 90-1 抗血清あるいはBYMV 90-2 を用いた免疫電子顕微鏡法によるCYVVとBYMVの各分離株の血清反応

分離株	抗血清の希釈倍率							
	CYVV 90-1				BYMV 90-2 ^{a)}			
	128	256	512	1024	128	256	512	1024
CYVV 90-1	+++ ^{b)}	+++	+++	++	++	++	+	-
CYVV-189-1	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
BYMV-N(P180) ^{c)}	++	++	+	-	-	-	-	-
BYMV 90-2	+	+	+	-	+++	+++	+++	++
BYMV 90-3	++	+	+	-	+++	+++	++	+
BYMV-B(V124)	+	+	+	-	+++	+++	+++	+

a) 笹谷ら(1993)より一部再掲した。

b) 反応の強さにより4段階に分け、+++は強い反応、++は中程度の反応、+は弱い反応、-は反応無しとした。

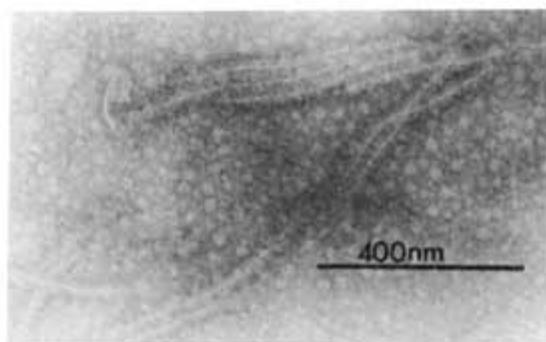
c) BYMV-N(P180)は井上(1968)によりBYMVのえそ系統と分類されたが、現在はCYVVとされている(Chun *et al.*, 1992)。

-ELISAによるCYVV 90-1の検出限界は、純化ウイルスでは10 ng/ml(第5図)。感染葉では10⁴倍希釈(第6図)。BYMV 90-2抗血清を用いたDAS-ELISAによるBYMV 90-2の検出限界は、純化ウイルスで10 ng/ml(第5図)、感染葉では10⁴倍希釈であった(第6図)。

考 察

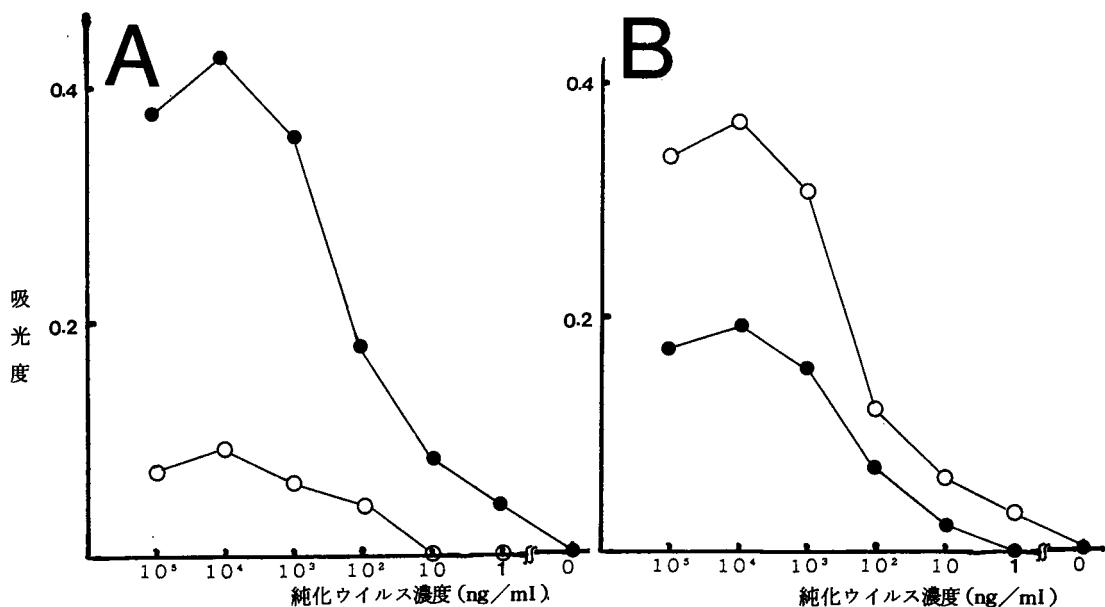
CYVVはpotyvirusのBYMVサブグループに属すウイルスで、マメ科に広く発生している。BYMVサブグループに属すウイルスにはBYMV、CYVV、エンドウモザイクウイルス(PMV)、ホワイトルーピンモザイクウイルス(WLMV)がある(BARNETT *et al.*, 1987, HAMPTON *et al.*, 1992)。日本ではCYVVとBYMVの発生が確認されており(大木, 1992), CYVVとBYMVは宿主範囲や血清関係が互いに似ているために識別するのが難しい。日本においても、CYVVははじめBYMVの1系統とされていたが、宿主植物の反応および他系統との血清関係(奥田ら, 1992), コートタンパクの塩基配列の相異性(UYEDA *et al.*, 1991)によりクローバ葉脈黄化ウイルス(CYVV)と分類されている。

今回えそ症状をともなった激しいモザイクを示



第4図 CYVV 90-1 抗血清を用いたCYVV 90-1 感染ソラマメ葉の免疫電子顕微鏡観察
バーは400 nmを示している。

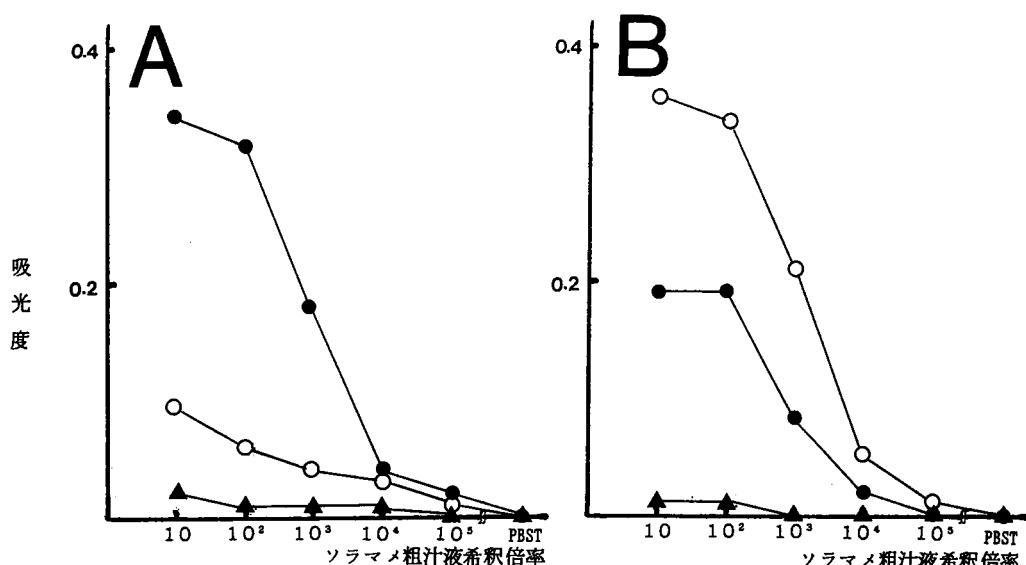
したソラマメ株より分離した90-1株を他のCYVVやBYMVの分離株と比較した。その結果、宿主範囲において90-1株はソラマメ、エンドウおよびインゲンマメに激しいえそ症状を生じさせ、マメ科以外にも数種の植物に感染する点より、CYVVの1分離株と考えられた。また、寒天ゲル内二重拡散法、免疫電子顕微鏡法およびDAS-ELISAを用いて血清学的関係を比較したところ、CYVV 90-1 抗血清はCYVV分離株と強く反応し、90-1はCYVVの1系統であると結論された。なお、今回供試したP180分離株は井上



第5図 CYVV 90-1 抗血清またはBYMV 90-2 抗血清を用いたDAS-ELISAによる純化CYVV

90-1 およびBYMV 90-2 の反応

AはCYVV 90-1 抗血清を用いたDAS-ELISA, BはBYMV 90-2 抗血清を用いたDAS-ELISAで, ●は純化CYVV 90-1, ○は純化BYMV 90-2 の吸光値で3回の平均値を示した。



第6図 CYVV 90-1 抗血清またはBYMV 90-2 抗血清を用いたDAS-ELISAによるCYVV 90-

-1 あるいはBYMV 90-2 感染ソラマメ葉の反応

AはCYVV 90-1 抗血清を用いたDAS-ELISA, BはBYMV 90-2 抗血清を用いたDAS-ELISAで, ●はCYVV 90-1 感染葉, ○はBYMV 90-2 感染葉, ▲は健全葉の吸光値で3回の平均値を示した。

ら (1968) によりはじめBYMV-Nとされ、現在はCYVVと考えられているが (CHUN *et al.*, 1990), 血清反応において他のCYVVとは若干

異なっており、さらに検討が必要であった。

CYVVによるソラマメのウイルス病の発生は今回初めて確認され、本ウイルスによると考えられ

る症状は四国全域で発生が確認された。本ウイルスの発生率は10数パーセントでそれほど高くなかったが、圃場内のソラマメすべてが感染し、収穫が皆無の圃場も2, 3観察された。また、ソラマメでは本ウイルスとBYMVの両ウイルスが発生しており、両ウイルスを特異的に検出する方法を開発する必要があるが、両ウイルスは宿主範囲や血清関係が互いに似ているため識別するのが難しい。本報においてもCYVVとBYMVは血清学的差異が認められたが、両者を明確に識別することは困難であった。

本ウイルスの発生はソラマメ以外でも、インゲンマメつる枯病の病原ウイルスとして、北海道（菅野ら, 1980）、福島県（奥田ら, 1992）および千葉県（長井ら, 1985）で報告されている。また、インパチエンス（CHUN et al., 1990）、エビネ（INOUE et al., 1988）、スターチス（井上ら, 1985）、リンドウ（梶ら, 1993）などの花き類でも重要なウイルス病となっており、感染植物には激しいえそ症状やモザイク症状を生じさせ商品価値を著しく損ねる。本ウイルスの伝染源は圃場周辺のマメ科雑草（奥田ら, 1992）が考えられており、圃場周辺の感染植物の処理が本病害の防除を行う上で重要である。

摘要

四国地域のえそ症状をともなった激しいモザイクを示したソラマメよりひも状ウイルスを分離し、10科28種の植物に接種したところ、マメ科を中心にして6科16種の植物に感染し、ソラマメ、インゲンマメ、エンドウにはえそ症状をともなった激しいモザイクを生じさせた。本ウイルスに対する抗血清を作製し、本抗血清とBYMV 90-2に対する抗血清を用いて、寒天ゲル内二重拡散法、免疫電子顕微鏡法およびDAS-ELISAにより、他のCYVVやBYMV分離株と血清学的関係を比較した。その結果、本ウイルスはBYMV分離株よりはCYVV分離株と強く反応した。以上の結果から、本ウイルスをCYVVと同定した。

引用文献

BARNETT, O. W., RANDLES, J. W. and BURROWS, P. M. (1987) : Relationships amo-

ng Australian and North American isolates of the bean yellow mosaic potyvirus subgroup. *Phytopathology*, 77 : 791~799.

CHUN, X. B., OHKI, S. T., OSAKI, T. and INOUE, T. (1990) : Clover yellow vein virus and a carlavirus isolated from *Impatiens sultani* in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 56 : 557~560.

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. Virol.*, 34 : 475~483.

HAMPTON, R. O., SHUKLA, D. D. and JORDAN, R. L. (1992) : Comparative potyvirus host range, serology, and coat protein peptide profiles of white lupin mosaic virus. *Phytopathology*, 82 : 566~571.

INOUE, N., MAEDA, T. and MITSUHATA, K. (1988) : A strain of clover yellow vein virus isolated from *Calanthe* sp. *Acta Hort.*, 234 : 61~68.

井上成信・前田季憲・飯野尚之・光畠興二(1985) : Statice (*Limonium sinuatum*) から分離されたclover yellow vein virusの1系統. 日植病報, 51 : 354~355 (講要).

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, 51 : 103~116.

井上忠男(1968) : 本邦のマメ科植物に発生するPVY群ウイルスの寄生性の比較ならびに判別植物によるウイルス検索法. 農学研究, 52 : 11~29.

梶 和彦・夏秋知英・奥田誠一・藤澤一郎(1993) : リンドウえそ萎縮病病原インゲンマメ黄斑モザイクウイルスえそ系 (BYMV-N) とクローバ葉脈黄化ウイルス (CYVV) の関係について. 日植病報, 59 : 763 (講要).

菅野 徹・上田一郎・仙北俊弘・四方英四郎(1980) : インゲンマメ(大福)の蔓枯症状について. 日植病報, 46 : 101 (講要).

御子柴義郎・藤沢一郎・本多一郎(1991) : やませ地帯の春まきソラマメウイルス防除試験. 北

- 日本病虫研報, 42 : 57 ~ 60 .
- 中村茂雄・本藏良三 (1991) : 宮城県内で発生したソラマメえぞモザイク症の病原ウイルス. 北日本病虫研報, 42 : 53 ~ 54 .
- 大木 理 (1992) : 日本に発生する植物ウイルス一覧. 植物防疫, 特別増刊号, : 17 ~ 30 .
- 奥田誠一・長谷川睦己・夏秋和英・梶 和彦・夏秋啓子・寺中理明 (1992) : 福島県で発生したインゲンマメつる枯病の病原ウイルス (クローバ葉脈黄化ウイルスについて). 日植病報, 58 : 298 ~ 304 .
- UYEDA, I., KOJIMA, M. and MURAYAMA, D. (1975) : Purification and serology of bean yellow mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 41 : 192 ~ 203 .

UYEDA, I., TAKAHASHI, T. and SHIKATA, E. (1991) : Relatedness of the nucleotide sequence of the 3'-terminal region of clover yellow vein potyvirus RNA to bean yellow mosaic potyvirus RNA. Intervirology, 32 : 234 ~ 245 .