HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アカクローバーから分離したインゲン黄斑モザイクウイルス（Bean yellow mosaic virus）の一系統について
Author(s)	久米, 宏毅; 田中, 貞之; 村山, 大記
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(4), 435-448
Issue Date	1970-12-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11805
Type	bulletin (article)
File Information	7(4)_p435-448.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

アカクローバーから分離したインゲン黄斑モザイクウイルス (Bean yellow mosaic virus) の一系統について

久米宏毅・田中貞之・村山大記
(北海道大学農学部植物学教室)

A strain of bean yellow mosaic virus isolated from mosaic-diseased red clover plant

Hiroki KUME, Sadayuki TANAKA and Daiki MURAYAMA
(Department of Botany, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received February 23, 1970

1. 緒　　言

クローバー類は広い面積に栽培されるために，ひとたびウイルス病が発生すると刈取作業や家畜に踏み荒されることなどによって自然状態でつぎつぎと汁液感染し，アブラムシなどの媒介昆虫によって容易に蔓延する。防除の上では抵抗性品種の育成が急がれているが，ウイルス病が容易に伝染する性質上，抵抗性品種研究の育種圃場そのものがウイルス病に侵され，実験がきわめて困難になることが多い。

筆者らは，札幌市羊ケ丘の圃場に大量に発生したアカクローバーのモザイク病徴を示した罹病株から病原ウイルスを単離し，その同定を試みた。

本研究を行なうにあたって，電子顕微鏡的研究の指導を得た四方英四郎助教授，終始有益な助言を賜わった小島誠助手，大学院学生松本勤氏をはじめ教室の諸氏に深甚の謝意を表する。

また，インゲン黄斑モザイクウイルス(BYMV)の4系統の分譲を賜わり，種々御忠言を与えられた岡山大学農業生物研究所の井上忠男助教授，アカクローバーモザイク病発生地での材料採集に便宜を与えられた農林省北海道農業試験場草地部の諸氏の御厚意に対し厚く御礼申し上げる。

2. 研　究　史

わが国では飯塚・飯田(1962)がモザイク症状を示していたアカクローバーから，アブラムシにより伝染し，汁液接種ではマメ科植物中アルファルファ，ダイズ，ササゲ，シロクローバーにうつらず，アカザに局部病斑をつくり，寄主植物体内にX体，核内封入体をつくるウイルスを分離した。その物理的性質は耐熱性60～65°C 10分，耐希釈性5,000～10,000倍，耐保存性は室温で3～5日であった。井上(1968)はこのウイルスをインゲン黄斑モザイクウイルス(BYMV)とし，この他にわが国のクローバー類を侵すウイルスとしてホワイトクローバーモザイクウイルス(WCMV)，アルファルファモザイクウイルス(AMV)，エンドウ萎縮モザイクウイルス(PDMV)，キュウリモザイクウイルスマメ科系統(CMV-Le)などをあげた。(彼ら(1969)はまたBynvについて報告した。

レッドクローバーのモザイク病はELLIOT(1921)によりはじめて報告された。彼は1919年Arkansas大学の構内で本病を発見し，そのウイルスは汁液接種が可能で，ソラマメ，スイートクローバー，*Medicago arabica*などに病原性を有するが，アルファルファ，シロクローバーには病原性がないことを明かにした。また彼はこのウイルスはアカクローバーでは越年せず，スイートクローバーで越年しているようであると報告した。DOOLITTLE and JONES(1925)はWisconsinのアカクローバーはエンドウモザイク病の越年寄主なることおよびこのウイルスはアブラムシによって伝染することを報じた。ZAUMEYER and WADE(1935)はマメ科植物のウイルスのインゲンに対する病原性の相違について調べ，アカクローバーのモザイク病のウイルスはDOOLITTLE and JONES(1925)のウイルスと同一のものであろうと報告した。また，アカクローバーのモザイク症状はすべて同一ではなく，2種以上のウイルスがアカクローバーを侵し得る

ことを示唆した。PIERCE (1937) は Idaho のマメ科植物から各種のウイルスを分離し，アカクローバーからは28株中19株から Pea virus 3，5株からBean virus 2，3株から Alfalfa virus 2，1株から White clover virus 1 を分離した。

OSBORN (1937) はアカクローバーから未記載のウイルスを分離し，寄主範囲，物理的性質，伝搬方法などを調べ，Red clover vein-mosaic virus と命名した。

AINSWORTH (1940) はイギリスの多くの地域からエンドウ，スイートピー，ソラマメ，アカクローバーからエンドウモザイクウイルス様のウイルスを分離し，その一部は Pea virus 2A であると報じた。

HANSON and HAGEDORN (1952) によるとWisconsin ではアカクローバーからはもっとも多く Red clover vein-mosaic virus が，ついで Pea common mosaic virus と Bean yellow mosaic virus が同程度に，さらに Alsike clover mosaic virus と Wisconsin pea streak virus が同程度，またその頻度は少ないが Alfalfa mosaic virus が分離できたという。他にも未同定のもの数種があることを述べた。DIACHUN and HENSON (1956) はKentucky のモザイク病徴のアカクローバーからしばしば Yellow bean mosaic virus が分離できたことを報じた。

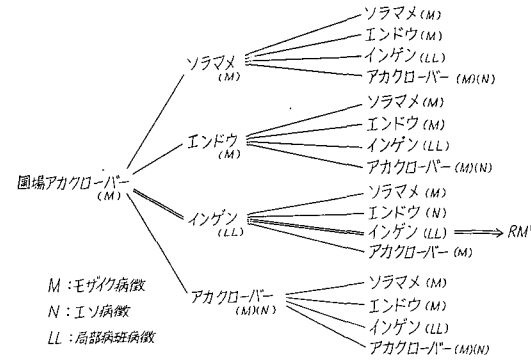
SINHA (1960) はイギリスのアカクローバーから未記載のウイルスを分離し，その寄主範囲，物理的性質，伝搬方法を記載し，Red clover mottle virus と命名した。

VERMA and GIBBS (1967) は England と Wales の永年アカクローバー畑からアカクローバーをおかすウイルスのうち汁液接種可能のものを分離同定し，Red clover vein-mosaic virus, Pea mosaic virus, Bean yellow mosaic virus の各ウイルスがもっとも多く分離され，Pea streak virus, Arabis mosaic virus, Alfalfa mosaic virus, Red clover mottle virus の各ウイルスがたまに分離されることを報告した。

3. 実験材料および実験方法

1. 供試ウイルス

1966年，札幌市羊ケ丘の圃場に生育していたアカクローバー (*Trifolium pratense L.*) のうち，典型的なモザイク病徴を示した罹病株葉を接種源とし，インゲン (*Phaseolus vulgaris L.*, 改良大手亡)，ソラマメ (*Vicia faba L.*, 早生ソラマメ)，エンドウ (*Pisum sativum L.*, 米国大莢)，アカクローバーにそれぞれ汁液接種した。2週間後，インゲンには接種葉に局部病斑，ソラマメ，エンドウにはモザイク症状，アカクローバーにはモザイク症状と壊死症状の2つの病徴があらわれた。アカクローバーに2つの病徴が見られるところから，圃場のモザイク症状を呈していたアカクローバーは複合感染していることが考えられたので，局部病斑寄主であるインゲンを用いてウイルスの単離を試みた。その結果アカクローバーにモザイク病徴のみを生ずるものが得られたので，本実験においてはこのウイルス分離株を用いることとし，エンドウ，ソラマメで増殖，維持し，これを供試した。本ウイルスの単離過程は図-1のとおりである。



図—1　本ウイルス単離過程

2. 供試植物

供試植物はすべてビニールハウスおよび温室内で播種育成した。アブラムシ防除にはバルサンくん蒸を定期的に施し，ダニの防除にはフェニールメルカプトン 1,000倍液を散布した。

3. 接種法

接種源は前記の方法で単離したウイルスをエンドウに接種し，およそ2週間後に顕著な病徴を示したものを刈取り，−25°C で凍結保存した。接種に際しては凍結茎葉を殺菌した乳鉢と乳棒を用いて 1/10 モル燐酸緩衝液 (pH 7.0) を10倍量加えながら磨砕し，その粗汁液をカーボランダム (400メッシュ) を散布した供試植物の下葉に塗沫接種した。接種後はかならず葉に水をかけた。

4. 寄主範囲と病徴

本ウイルスの同定を行なうために前記の方法で接種して寄主範囲を調べた。接種植物の病徴を観察するとともに，2〜3週間後に接種植物よりエンドウに戻し接種をして感染の有無をたしかめた。

また系統について考察するために，井上氏より分譲を受けたインゲン黄斑モザイクウイルス・エンドウモザイク系統 (Bean yellow mosaic virus-pea mosaic strain, BYMV-P)，同じくエソ系統 (necrotic strain, -N) と本

ウイルスをインゲン数品種にそれぞれ接種して同条件下で病徴の比較を行なった。

5. ウイルス増殖曲線

前記の接種法により，生育のよくそろったエンドウの苗に接種し，恒温恒湿ガラス室 (25°C, 70%) においた。接種後3, 6, 9, 11, 14, 16日目にそれぞれ刈取り，根，茎，葉，それらの混合を接種源用として凍結保存した。全接種源を得た後，前記の方法でインゲン（トップクロップ）の初生葉の半葉ごとに接種した。接種した植物はビニールハウス内におき，10日後にあらわれた局部病斑数により活性を検定した。

6. ウイルスの物理的性質

a. 耐熱性　供試ウイルス源にはウイルス活性がもっとも高い，接種後14日目のエンドウの茎葉を用いた。磨砕後ガーゼで搾汁した粗汁液に，常法により加温処理を行なった。各試験区につきインゲン（トップクロップ）の初生葉を用いて活性を調べた。また同様の操作を行ない，全身感染するエンドウ，ソラマメを検定植物として用いた。

b. 耐希釈性　上記の供試汁液を燐酸緩衝液で希釈し，各々の希釈した試料を上記のようにインゲンに接種し活性をみた。また同時に全身感染するエンドウ，ソラマメにも接種して比較した。

c. 耐保存性　上記の汁液をビーカーに取り，5°Cの定温室に保存し，2日ごとにその一部をインゲンに接種した。一方室温に保存した場合，エンドウ，ソラマメを用い活性の有無を検定した。

d. 有機溶媒の影響　上記の供試汁液5 mℓ に chloroform を15 mℓ 加え，homogenizer で3分間攪拌し，10分間低速遠心 (3,000 rpm) してその上清をエンドウ，ソラマメに接種した。また粗汁液5 mℓ に chloroform-*n*-butanol 等量混合液を15 mℓ 加え，以下同様の操作を行なった。

7. ウイルスの伝染方法

a. 土壌伝染　罹病ソラマメを木箱で生育させ，生育後罹病ソラマメを抜き取った土壌を用いて，ソラマメ，エンドウ，アカクローバーの健全種子をそれぞれ播種し，発芽後の株の発病の有無を調べた。

b. 種子伝染　苗および花をつけはじめた時期のエンドウに本ウイルスを接種し，罹病したエンドウから種子を採取し，無病土壌に播種して発芽後の株の発病の有無を調べた。

c. 虫媒伝染　モモアカアブラムシ (*Myzus persicae* Sulz.) を用い，罹病ソラマメ上で10～15分獲得吸汁させた後，健全エンドウに接種した。1日間の接種吸汁後殺虫し，その後の発病の有無を観察した。

8. 封入体の観察

本ウイルスに罹病し，顕著なモザイク症状を示しているソラマメの葉の表皮を用い，ギムザ染色およびトリパンブルーによる染色 (McWhorter, 1941) を行なった。スライドグラス上に染色液を一滴滴下し，その中に表皮片を浸した（その際少し暖めるとよく染る)。数分後50% アルコールで適度に脱色し，核と封入体を染め分けた。各部位の葉について封入体の存否を調べ，茎の表皮，根の細胞についてもその存否を調べた。

9. ウイルス粒子の観察

試料作製には dip method (Brandes, 1957) を用いた。カーボン蒸着したホルンバール支持膜上に2% PTA (pH 5.5, 0.05% の仔牛血清を含む) を一滴滴下し，そこに顕著な病徴を示している罹病葉片の切口を浸した。数分後ろ紙で余分な溶液を静かに吸取り，ただちに電子顕微鏡 (JEM-5Y) で観察した。

10. 交叉免疫 (Cross protection)

ソラマメの苗に本ウイルスを接種し，1カ月後モザイク症状を顕著に示した病株の小葉100枚に challenge virus として井上氏から分譲を受けた BYMV-N を接種した。BYMV-N はソラマメの接種葉に明瞭な壊死病斑を形成する。対照区として健全葉50枚に BYMV-N を接種した。また少数の健全葉には燐酸緩衝液のみを接種した。

さらにエンドウ10株についても同様の処理をおこなった。BYMV-N はエンドウに対して病原性が強く，罹病エンドウはモザイク症状を呈した後しだいに壊死する。

本ウイルス罹病のソラマメ，エンドウに，challenge virus の典型的な病徴があらわれるかどうかを観察した。

4. 実験結果

1. 寄主範囲と病徴

本ウイルスは表-1に示すごとく，インゲン，エンドウ，ソラマメ，アカクローバーなどのマメ科植物のほか，*Chenopodium amaranticolor*, グラジオラスなど，計3科11種の植物に病原性を有していたが，マメ科植物でもダイズ，ササゲ，アズキ，シロクローバーなど，その他タバコ，フリージアなどには病原性がなかった。

おもな罹病植物の病徴は以下のようであった。

a. インゲン　改良大手亡，金時の接種葉には接種後9～10日目に直径2～3 mm の退緑病斑があらわれた。上葉には接種葉の病斑形成後2～3日に接種葉と同様の

表—1　本ウイルスの寄主範囲と病徴

接種植物（品種）	感染株数/接種株数	病徴 接種葉	病徴 上葉
インゲン（改良大手亡）(*Phaseolus vulgaris* L.)	19/20	Y. CS	N
（トップクロップ）	16/20	Y. CS	Lat
エンドウ（米国大莢）(*Pisum sativum* L.)	19/20	Lat	M
(Wisconsin Perfection)	0/5		
ソラマメ（早生ソラマメ）(*Vicia faba* L.)	17/20	Lat	M
コモンベッチ (*Vicia sativa* L.)	15/20		N
スイートピー (*Lathyrus odoratus* L.)	4/7	Lat	M
黄花ルーピン（ゴマ種）(*Lupinus luteus* L.)	20/20		M. St
ラッセルルーピン (*Lupinus luteus* L.)	3/5		M. St
アカクローバー (*Trifolium pratense* L.)	18/20	Lat	M
クリムソンクローバー (*T. incarnatum* L.)	8/8	Lat	VN. St
Chenopodium amaranticolor COSTE & REYN	5/5	LL	N
グラジオラス (*Gladiolus gandavensis* HOUTT.)	5/5	Lat	不明瞭
ササゲ（黒種三尺）(*Vigna sinensis* (L.) ENDL.)	0/20	—	—
アズキ（早生大納言）(*Phaseolus angularis* W. F. WIGHT)	0/20	—	—
ダイズ（白鶴の子）(*Glycine max* MERR.)	0/20	—	—
アルサイククローバー (*Trifolium hybridum* L.)	0/20	—	—
シロクローバー (*T. repens* L.)	0/20	—	—
アルファルファ（デュピー）(*Medicago sativa* L.)	0/20	—	—
レンゲ (*Astragalus sinicus* L.)	0/12	—	—
タバコ (White Burley) (*Nicotiana tabacum* L.)	0/20	—	—
N. glutinosa L.	0/20	—	—
N. sylvestris SPEG. et COMES.	0/20	—	—
トマト（新札幌）(*Lycopersicon esculentum* MILL.)	0/20	—	—
Physalis floridana RYDB.	0/20	—	—
Datura stramonium L.	0/7	—	—
キュウリ（青長地這）(*Cucumis sativus* L.)	0/12	—	—
カボチャ（東京）(*Cucurbita moschata* DUCH.)	0/6	—	—
サトウダイコン（導入2号）(*Beta vulgaris* L.)	0/20	—	—
ツルナ (*Tetragonia expansa* MURR.)	0/20	—	—
ニンジン（K号大型5寸）(*Daucus carota* L. var. *sativa* DC.)	0/20	—	—
キンギョソウ (*Antirrhinum majus* L.)	0/10	—	—
ダイコン（美濃早生）(*Raphanus sativus* L.)	0/20	—	—
エゾギク（有明ポンポン）(*Callistephus chinensis* NEES.)	0/12	—	—
フリージア（スーパージャイアント）(*Freesia reflacta* KLATT)	0/20	—	—
トウモロコシ（ゴールデンクロスバンタム）(*Zea mays* L.)	0/20	—	—
センニチソウ (*Gomphrena globosa* L.)	0/6	—	—

M：モザイク　St：萎縮　N：エソ
LL：局部病斑　CS：退緑斑　VN：葉脈エソ
Lat：無病徴感染　Y：黄化　—：感染せず

退緑病斑があらわれ，漸次葉脈にそって拡大した。さらに上葉にはモザイク葉があらわれた。場合によっては上葉が壊死し，展開しきらないで脱落することもあった。

トップクロップの接種葉には通常接種後8～10日目に改良大手亡より小さくかつ鮮明な退緑病斑があらわれた。上葉にはまったく病斑があらわれなかった。しかし接種葉全体が黄化する病徴のはげしいものや，感染しないもの，接種後1カ月後ころに上葉に退緑斑やモザイクのあらわれた株などがあった。同様の病徴を示したものに大手亡，マスターピース，白金時，黄莢黒三度，長ウズラ，平莢尺五寸があった。

b.　エンドウ（米国大莢）　接種葉は病徴をあらわさない。接種後7～10日目以後に展開する葉はすべてモザイク病徴を呈するが，感染初期はおもに葉脈にそった小黄斑を生じ，のちに黄緑色の部分の方が多いはげしいモザイクとなり，葉はやや縮む。病植物はやや萎縮し，ときに実莢にもモザイク斑紋を生じた。

しかし本ウイルスは Wisconsin Perfection Pea には感染性がなかった。

c.　ソラマメ（早生ソラマメ）　接種葉は病徴をあらわさない。接種後7～10日目以後に展開する葉はすべてモザイク葉であった。感染初期のものは葉脈にそって黄緑

表—2　インゲン各品種上の病徴

インゲン品種	井上氏の実験結果 BYMV-P*	実験結果		
		BYMV-P	本ウイルス	BYMV-N
改良大手亡		CS/—	CS/CS, M	CS, Y/N
金時	CS/M	Y/CS, M	Lat/M	CS, Y/M
トップクロップ	Lat	(Y)/—	Lat/M	Y/N
大手亡	CS/M	Y/M	Y/CS, M	Y/N
衣笠	—	(Y)/—	(Y)/M	Y/N
マスターピース	(CS) or —	—	—	Y/M
茶白	(CS) or —	(Y)/—	Y/—	Y/M

* 井上 (1968) および井上 (1969, 私信) による
( ) は病徴か否か決定し難かったもの
/ の左は接種葉の，右は上葉の病徴を示す。記号は表-1 のものと同じ

の帯状病徴を生じ，時がたつにつれて葉面全体が濃緑と緑白色の大理石様モザイクを示し，捲葉および縮葉をともなった。

d. 黄花ルーピン（ゴマ種） 新葉に小退緑斑があらわれ，のちにモザイク状になった。病葉は少し上に捲き，病植物はいちじるしく萎縮した。

e. アカクローバー 接種後10日目ころから鮮明なモザイク病徴を呈した葉をつぎつぎに展開した。

f. クリムソンクローバー はじめは新葉に軽いモザイク病徴をあらわし，漸次葉脈壊疽を生じて病植物はいちじるしく萎縮した。

g. *C. amaranticolor* 接種葉に赤色の局部病斑があらわれ，上葉は壊疽症状を示した。接種葉はのちに脱落した。

h. コモンベッチ 病植物は全身に壊疽を生じ，萎縮がはなはだしく，枯死した株もあった。実莢にモザイク病徴のあらわれた株もあった。

i. グラジオラス 病徴は不明瞭であったが，戻し接種の結果本ウイルスの寄主植物であることが明らかとなった。

本ウィルスの系統間のインゲン上の病徴の品種間差異については表-2にまとめた。

2. ウイルス増殖曲線

病植物の刈取保存および供試のためのもっともよい時期を知るために，ウイルス接種後の寄主植物（エンドウ，米国大莢）体内におけるウイルス増殖の様態を調べた。

接種後一定の期日に各区とも収穫し同時にインゲン初生葉で活性を検定したところ，初生葉2葉あたりの局部病斑数は，根茎葉混合区で第1回目の実験では3, 6, 9, 11, 14, 16日目が各々0, 0, 14, 19, 25, 17であり，第2回目では同じく0, 12, 10, 27, 54, 47であった。各部位における搾汁による病斑数は，茎では14日目の25あるいは140，葉では11日目の17あるいは14日目の55，根では11日目の20であった。これによりウイルス活性の最高時は11日目から14日目にかけてであり，根にもかなりのウイルス活性があることが明らかとなった。

3. ウイルスの物理的性質

エンドウの粗汁液中のウイルスの物理的諸性質を調べた結果はつぎのごとくであった。

a. 耐熱性 局部病斑を形成するインゲンあるいは全身感染してモザイク病徴を示すエンドウおよびソラマメを用いてウイルス活性の検定を行なった。その結果は表-3に示したごとくである。本ウイルスの耐熱性は60～70°C (10分) の間にあると考えられる。

表—3　耐熱性試験

処理温度 (°C)	局部病斑数	発病株数/接種株数		感染率 (%)
		ソラマメ	エンドウ	
50	17	2/4	1/4	37.5
60	6	0/4	0/4	0
70	0	2/2	0/4	33.3
80	0	0/4	0/4	0
90	0	0/4	0/2	0

b. 耐希釈性 インゲン，エンドウ，ソラマメを用いてウイルス活性の検定をおこなった。その結果は表-4に示したごとくである。本ウイルスの耐希釈性は 10^3～10^4 倍であると考えられる。

c. 耐保存性 インゲンを用いて検定した結果は表-

表—4　耐希釈性試験

希釈倍数	局部病斑数	発病株数/接種株数		感染率 (%)
		ソラマメ	エンドウ	
10	40	2/2	1/4	50.0
10^2	3	2/2	2/4	66.7
10^3	1	1/2	0/4	16.7
10^4	0	0/2	0/4	0
10^5	0	0/2	0/4	0

表—5　耐保存性試験

保存日数 (5°C)	0日	2	4	6
局部病斑数	40	42	16	12

5に示したごとく，5°Cにおいては6日目でもなお活性が認められた。

一方，室温に保存したものは3日間保存するとエンドウ，ソラマメには感染しなかった。以上のことから本ウイルスの室温での耐保存性は2～3日と考えられる。

d. 有機溶媒の影響　植物ウイルスの純化にもっとも多く使われているクロロホルム，あるいはクロロホルム・ブタノール等量混合液によって本ウイルスは影響を受けず，表-6に示すごとく，いずれも失活することなく汁液を清澄化できた。

表—6　有機溶媒の影響

有機溶媒	供試植物 発病株数/供試株数		感染率 (%)
	エンドウ	ソラマメ	
クロロホルム・ブタノール	6/6	4/4	100
クロロホルム	6/6	4/4	100

4. ウイルスの伝染方法

汁液伝染以外の本ウイルスの伝染方法を調べた結果は表-7のごとくであった。

表—7　ウイルスの伝染方法

伝染方法	供試植物	供試株数	発病株数	備考
土壌	エンドウ	256	0	罹病ソラマメ生育土に播種
	ソラマメ	212	0	
	アカクローバー	278	0	
種子	エンドウ	306	0	
昆虫	エンドウ	10	8	モモアカアブラムシ

土壌伝染（罹病ソラマメ生育土にエンドウ，ソラマメ，アカクローバーを植える）および種子伝染（罹病エンドウの種子を播種）は認められなかった。

しかしモモアカアブラムシにより伝搬されることを認めた。

5. 封入体の観察

本ウイルスに感染したソラマメの葉の表皮をはいでギムザ染色すると核は青藍色，結晶性封入体は淡紅色を呈した。トリパンブルー染色では核は淡青色，結晶性封入体は青黒色に染った。感染初期の葉には見つけ難いが，時間がたつにしたがって表皮細胞の細胞質中にとくにいちじるしく，また気孔の孔辺細胞や葉肉細胞および核内にも封入体が観察された。

その典型的なものは1辺1～4 μ の立方体であり，不定形のものも多かった。

茎の表皮および根の細胞についても観察したが，封入体は観察できなかった。

6. ウイルス粒子の観察

接種後3週間目のソラマメおよびエンドウの茎から dip method で得た試料を電子顕微鏡で観察したところいずれも紐状粒子が認められ，その長さは約 750 mμ であった。

7. 交叉免疫 (Cross protection)

本ウイルス罹病ソラマメおよびエンドウは challenge virus としての BYMV-N の感染を干渉することが確かめられた。

対照区のソラマメの葉には接種後10日目ごろから BYMV-N による典型的な壊死病斑が形成されたが，すでに本ウイルスに罹病した葉にはまったく壊死病斑があらわれなかった。

対照区のエンドウは接種後3週間目ころからしだいに枯死したが，すでに本ウイルスに罹病した株はその後も枯死することなく本ウイルスによる病徴を示した。

5. 考　　察

自然感染のアカクローバーから現在までに分離されたウイルスと本ウイルスとについて，汁液接種による寄主範囲を中心に，他の諸性質も含めて，それぞれ比較して一覧表にまとめたものが表-8である。これによると本ウイルスはわが国で飯塚・飯田 (1962, '69) が分離したウイルスに諸性質がよく似ていることが認められるが細かい点で異なる。また *C. amaranticolor* に病原性がある点では VERMA ら (1967) の分離したウイルスの中にも

表—8　アカクローバーから分離されたウイルスの寄主範囲と諸性質一覧表

分離者（文献）	寄主，諸性質 ／ 分離ウイルス名	エンドウ	ソラマメ	インゲン	ササゲ	ダイズ	アルファルファ	シロクローバー	スイートクローバー	クリムソンクローバー	アカザ *C. amaranticolor*	グラジオラス	タバコ	*N. cleveland*ii	アブラムシによる伝搬	種子伝染	物理的性質 耐熱性 ℃ (10分)	物理的性質 耐希釈性 (×1,000)	物理的性質 耐保存性 (日)	封入体存否	粒子形態
ELLIOT (1921)			○				×	×	○												
DOOLITTLE (1925)		○							○						○						
PIERCE (1937)	Pea virus 3	○	○	×		×	×	×	×				×			○	62～64		2～3		
	Bean virus 2	○	○	○		○	×	×	○				×		○	×	58～60	1	1～2		
	Alfalfa virus 2	○	○	○	×	○	○	○	○	○			○				62～64		7～9		
	White clover virus 2	○	○	○		×	○	○	○				×				58		6～7		
OSBORN (1937)	Red clover vein-mosaic virus	○	○	×			×	○		○			×		○		58～60		2		
SINHA (1960)	Red clover mottle virus	○	○	○	○	○		○	○	○	×		×		×		60～63	1	8		
VERMA & GIBBS (1967)	Arabis mosaic virus	○	○	○							○		○	○							球形
	Bean yellow mosaic virus	○	○	○							○			×							750
	Pea mosaic virus	○	○	×							○			×							750
	Red clover mottle virus	○	○	○							×			×							球形
	Red clover vein mosaic virus		○	×							○			×							650
飯塚・飯田 (1962)	Bean yellow mosaic virus	○	○	○	×	×	×	×			○				○		60～65	5～10	3～5	○	
飯塚・飯田 (1969)	Bean yellow mosaic virus	○	○	○	×	○	×	×	○	○	○		×		○	×	60～65	10～50	2～3	○	750
筆者ら		○	○	○	×	×	×	×		○	○	○	×		○	×	60～70	1～10	2～3	○	750
STUBBS (1937)	Pisum virus 2	○	○	×	○	○	×	×	○	○			×		○	×	60～64	1.5	1	○	

○…感染する　　×…感染しない

近似のものが認められるが，タバコやインゲンへの感染性の比較からそれらの中では Bean yellow mosaic virus (BYMV) がもっとも近いものと考えられる。またインゲン，エンドウ，ソラマメに感染性があり，アルファルファ，シロクローバーに感染性がない点からは ELLIOT (1921) の分離したウイルスおよび PIERCE (1937) の分離した Bean virus 2 が近いものと考えられる。ELLIOT の分離したウイルスは DIACHUN ら (1956) はその寄主範囲および病徴写真から BYMV であろうと述べており，SMITH (1957) も BYMV として分類した。わが国で飯

表—9　Bean yellow mosaic virus 諸系統の

BYMV 系統 ＼ 寄主，諸性質		インゲン	エンドウ	*Perfection type pea*	ソラマメ	スイートピー	コモンベッチ	ルーピン	アカクローバー	クリムソンクローバー	アカザ *C. amaranticolor*	グラジオラス
SMITH (1957)	Type BYMV	M.St	M		M. St		○	○		○		○
	Pod distorting strain	M			—		—					
	Black root strain	VN										○
	Necrotic lesion strain	NLL										
	Severe yellow mosaic strain	C.W.TN										
	Sweetpea streak virus	RS			NLL.M	VC.M.N						
日野 (1960)		—	M		—							
日野 (1960)		M	M		VC.VB					VC	—	
日野 (1961)					LL.M		VN					
飯塚・飯田 (1962)		M	M		M				M		LL	
小室・栃原 (1964)	BYMV フリージア分離系	○	○		○	○					○	
井上 (1968)	BYMV-B	+	M	—	M				—		LL	
	-P	+	M	—	M				—		LL	
	-O P174	M	M	—	M				—		SLL	
	BH-8	M	M	—	M				M		SLL	
	-N P180	N.M	M.N	—	M.N				N		LL	
	P120	N	N	—	N				N		SLL	
	-V 166	LL	M	—	M				—	LL	LL	
STUBBS (1937)	Pisum virus 2A, 2B, 2C	—	M	—	M	M		—	—	M		
BYMV-インゲン退緑斑系統		CS	M	—	M	M	N	M.St	M	St.M.VN	SLL	

M…モザイク　St…萎縮　N…エソ　LL…局部病斑　NLL…エソ病斑　SLL…全身局部病斑　CS…退緑斑
—…感染性なし　○…感染するが病徴の記載のないもの　種…種子伝染しない　土…土壌伝染しない

塚らが分離したウイルスは井上 (1968) により BYMV (インゲン黄斑モザイクウイルス) とされ，レッドクローバー系と命名されている (植物ウイルス保存株目録)。

以上の寄主範囲一覧表より推定すると，本ウイルスは BYMV にあたると考えられる。BYMV の寄主範囲やその他の諸性質は PIERCE (1934) により調べられているが，それによると近縁のウイルス (おもに Common bean mosaic virus) と区別するに足る寄主範囲の差異は，スイートクローバー (白)，シロクローバー，ダイズ，ルーピン，クリムソンクローバーに感染性がある点である。

寄主範囲とその病徴，その他の諸性質一覧表

ササゲ	アズキ	ダイズ	アルサイクローバー	シロクローバー	アルファルファ	レンゲ	タバコ	*N. glutinosa*	*N. sylvestris*	物理的性質	伝染方式	その他
		○	○							58～60°C 1,000～ 1～2日	種 アブラムシ	封入体，750 mμ 紐状粒子
		—								type と同様	type と同様	上葉壊死，さやの奇形，スイートクローバに病原性なし
												根腐れ，さやの黒化 (Oregon (U.S.A.) でのみ記録されている)，上葉壊死は生じない
NLL							○			type と同様		type virus との間に交叉免疫成立
							LL		LL	50～55°C 2,000～3,000 2～3日		type virus, ecrotic lesion strain との間に交叉免疫が成立しない
										55°		インゲンに退緑部を壊死組織がとりまいた局部病斑．ソラマメに赤褐色局部病斑．スイートピーの花にも病徴
—	—	—	M			N.St				50～55°C 1,000～10,000 1.5～2.5日	アブラムシ	
			M			VC		—		60～65°C 5,000～7,500 1～2日	アブラムシ	
											種主	
—		—		—		—				60～65°C 5,000～10,000 3～5日	アブラムシ	封入体，レッドクローバー系
	○									55～60°C 1,000～10,000 3～6日	アブラムシ	785 mμ 紐状
—	—	—				M	—	—				
—	—	—				M	+	—				
—	—	M				M	+	—				
M	—	M				M	+	—				
M.N	M	M				N	N	—				
M	M.N	M.N				N	N	—				
—	M	M				M	N	—				
M		M	—	—	—		—	—				
—	—	—	—	—	—		—	—	—	60～70°C 1,000～10,000 2～3日	種主 アブラムシ	封入体，750 mμ 紐状

C…退　緑　RS…リングスポット　VN…葉脈エソ　VC…葉脈透化　TN…先端エソ　＋…無病徴感染

インゲンの病徴の相違，ダイズに病原性がない点を除いて本ウイルスの寄主範囲，病徴はBYMVによるそれらによく合致している。インゲンの病徴の相違とは本ウイルスは上葉に明瞭な黄斑をつくらず，接種葉に退緑病斑をつくる点であるが，品種の問題もあり，系統の相違とも考えられる。またダイズに対する病原性についてもPIERCE (1935) によればダイズの感染率は低率で9%である点からみて，品種の問題も考慮に入れると大きな相違とみなせないのではないかと思われる。SMITH (1957) によればBYMVはグラジオラス，フリージアに病原性を有することが特徴であるが，本ウイルスはグラジオラスにのみ病原性を有していた。

物理的性質はPIERCE (1934, 1935) によると，耐熱性56～60°C 10分，耐希釈性1,000倍以上，耐保存性24～36時間，化学物質に対する抵抗性は50%アルコール，1,000倍希釈液で37%ホルムアルデヒド30分処理で不活化するとのことである。物理的性質はいずれも類似しており，同定に決定的な役割ははたせないが，本ウイルスの性質はBYMVのそれと大きくははなれていない。

PIERCE (1934) はアブラムシによる伝搬試験で *Illinoia pisi* と *Macrosiphum solanifolii* がBYMVを伝搬することをたしかめた。SWENSON (1954) はそれを追試し，さらにニセダイコンアブラムシ (*Brevicoryne brassicae*) およびモモアカアブラムシを用い前者はウイルスを伝搬しないが，モモアカアブラムシは80%の伝搬率を示したことを明かにした。

種子伝染についてはPIERCE (1934) がインゲンの数品種およびダイズを使って6,000粒以上について調べ，まったく陰性の結果を得ている。

伝染方法については種子伝染の寄主植物の違いはあるが，いずれも本ウイルスの性質と同一である。なお種子伝染しないという性質は近縁のCommon bean mosaic virusとの区別点として重要である。

MCWHORTER (1941) はPisum virus 2とPhaseolus vius 2に感染したソラマメの葉の表皮細胞中に封入体が見られることを報告した。それは立方体様結晶の封入体であり，大きさは0.3～4 μ であったという。掲載の写真を参照すると本ウイルスがソラマメの表皮細胞中につくる封入体と形状がはなはだ似ている。

DIACHUN and HENSON (1956) はBYMVがアカクローバーにおこす病徴についてのべ，同じcloneには同一の病徴がいつもあらわれることを確かめ，その種々のcloneのあらわす病徴写真を掲載している。その中には本ウイルスがアカクローバーにおこすのと同様のものが見られる。つづいて彼らは局部病斑を形成するクローバーのcloneを得，その性質を利用してBYMVの系統間に交叉免疫が成立することを確かめた。なおその実験に使用したウイルスはいずれもソラマメの細胞核中に封入体をつくった (DIACHUN and HENSON, 1958 a, b)。

CORBETT (1957) はBYMVの感染により局部病斑をつくるクロタラリアを使い交叉免疫実験をおこない，その系統間では交叉免疫が成立するが，Tobacco ring-spot virusとの間にはそれが成立しないことを確かめた。MULLER and KOENIG (1956) もソラマメ表皮細胞中の封入体の存否を目やすとし交叉免疫実験をおこないその成立をたしかめた。筆者らの実験においても本ウイルスと井上 (1968) のBYMV-Nの間に交叉免疫が成立したことは，本ウイルスがBYMVの一系統であることを強く示唆している。

一方DOOLITTLE and JONES (1925) のPisum virus 2 (Pea virus 3, PIERCE: Pea mosaic virus, OSBORN) も寄主範囲や諸性質が本ウイルスと甚だ類似している。このウイルスはインゲンに病原性を有さない点でBYMVと区別されてきたが，両ウイルスの類縁関係がいろいろの点から推定されていた上，SCHROEDER et al. (1966) はPV 2は品種によってはインゲンに病原性があることを見いだし，PV 2はBYMVの系統であると考えている。

井上 (1968) はこれらの点を考慮してインゲンに対する病原性の有無よりはむしろBYMV抵抗性といわれるPerfection typeのエンドウへの病原性の有無で特徴づけて，比較的類似の病原性を有するウイルス分離株をあつめ4系統群をたてた。

本ウイルスもWisconsin perfection peaに病原性を持たない。本ウイルスの寄生性をインゲン数品種について井上のBYMV-P, -Nと比較した結果は表-2の通りである。三つの分離株のインゲンに対する病原性についてみると本ウイルスはややP系統に近く，インゲンに対する病原性はあまり強くない。井上 (1969) はP系統はPisum virus 2A (marble strain, STUBBS, 1937) に近いものとしている。本ウイルスのエンドウ，ソラマメ，アカクローバーの病斑はPisum virus (DOOLITTLE and JONES, 1925) によく類似している。

本ウイルスとBYMV-Pとはアカクローバーに病原性がある点，タバコに病原性がない点で異なるほか，エンドウの病斑ではPisum virus 2あるいはPisum virus 2B (speckle strain, STUBBS, 1937, アカクローバーに病原性なし) に類似している。

6. 結　　論

以上の諸点から本ウイルスは BYMV の一系統であり，本邦の系統では BYMV-P に近く，外国のものでは Pisum virus 2 あるいは Pisum virus 2B に近いものと考える。本ウイルスはインゲンの接種葉に退緑病斑を形成する点に特徴があるので，BYMV のインゲン退緑斑系 (BYMV-CS) と名づけた。

摘　　要

1) 1966年，札幌市羊ケ丘の圃場のアカクローバーからウイルスを分離し，その同定を試みた。

2) そのウイルス分離株はインゲンの初生葉に局部退緑病斑を形成し，上葉の病徴は品種によって異なり，トップクロップは無病徴，改良大手亡の上葉には壊死をおこさしめる。

エンドウ，ソラマメ，スィートピー，アカクローバー，クリムソンクローバー，ルーピンにはモザイク病徴があらわれ，そのうちルーピンやクリムソンクローバーはいちじるしく萎縮した。コモンベッチは壊死し，*C. amaranticolor* は局部病斑をあらわした。グラジオラスには明瞭な病徴があらわれなかったが，感染性が認められた。

3) ササゲ，スズキ，ダイズ，アルファルファ，シロクローバー，レンゲ，タバコ，トマト，キュウリ，フリージアなどは本ウイルスに感染しなかった。

4) 本ウイルスを接種したエンドウは接種後2週間目ころにウイルス活性がもっとも高くなり，その後漸減した。

5) 本ウイルスの耐熱性は60～70°C, 10分，耐希釈性1,000～10,000倍，耐保存性は室温で2～3日，5°C では6日以上であった。

6) 清澄化につかわれる有機溶媒（クロロホルム，クロロホルム・ブタノール）の影響は受けなかった。

7) 土壌伝染，種子伝染はしかなかった，モモアカアブラムシにより非永続的に伝搬された。

8) 本ウイルスに感染したソラマメの葉の表皮細胞内に結晶性の封入体を観察した。

9) ウイルス粒子は長さ約750 mμ，紐状であった。

10) BYMV の N 系統との間に交叉免疫が成立した。

11) 以上の諸性質は Bean yellow mosaic virus（インゲン黄斑モザイクウイルス，BYMV）のそれとよく一致している。よって本ウイルスは BYMV であると同定した。しかし病徴や寄主範囲をさらに細く検討すると既知の系統と完全に一致しないので，特徴のあるインゲンの病徴より，本ウイルス分離株を BYMV のインゲン退緑斑系統 (chlorotic spot strain) と命名した。

文　　献

1) AINTHWORTH, G. C. (1940). The identification of certain viruses found infecting leguminous plants in Great Britain. Ann. Appl. Biol., 27; 218-226.

2) CORBETT, M, K. (1957). Locol lesions and cross protection studies with bean yellow mosaic virus. Phytopath. 47; 573-574.

3) DIACHUN, S. and HENSON, L. (1956). Symptom reaction of individual red clover plant to yellow bean mosaic virus. Ibid. 46; 150-152.

4) ——— (1958, a). Red clover clones as local-lesion hosts for bean yellow mosaic virus. Ibid. 48; 369-371.

5) ——— (1958, b). Protection tests with clones of red clover as an aid in identifying isolates of bean yellow mosaic virus. Ibid. 48; 697-698.

6) DOOLITTLE, S. P. and JONES, F. R. (1925). The mosaic disease in the garden pea and other legumes. Ibid. 15; 763-772.

7) ELLIOT, J. A. (1921). A mosaic of sweet and red clovers. Ibid. 11; 146-148.

8) HANSON, E. W. and HAGEDORN, D. J. (1952). Red clover, a reservoir of legume virus in Wisconsin. Ibid. 42; 467.

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

10) ——— (1960, b). コモンベッチから分離した virus について. 日植病報 25; 66.

11) ——— (1961). コモンベッチの葉脈壊疽ウイルスについて. 日植病報 26; 222.

12) 飯塚典男・飯田　格 (1962). レッドクローバーから

13) ———・——— (1969). 牧草病害に関する研究 III. 東北農試研報 37; 43～122.
分離したウイルスについて. 日植病報 27; 83.

14) 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.

15) ——— (1969). 私信.

16) 小室康雄・栃原比呂志 (1964). インゲル黄斑モザイクウイルスのフリージア分離系について. 日植病報 29; 80.

17) MCWHORTER, F. P. (1941). Isometic crystals produced by Pisum Virus 2 and Phaseolus Vi-

rus 2. Phytopath. 31; 760.

18) MULLER, W. C. and KOENIG, R. (1965). Nuclear inclusions produced by bean yellow mosaic virus as indicators of cross protection. Ibid. 55; 242–243.

19) OSBORN, H. T. (1937). Vein-mosaic virus of red clover. Ibid. 27; 1051–1058.

20) PIERCE, W. H. (1934). Viroses of the bean. Ibid. 24; 87–115.

21) ——— (1935). The identification of certain viruses affecting leguminous plants. Journ. Agr. Res. 51; 1017–1039.

22) ——— (1937). Legume viruses in Idaho. Phytopath. 27; 836–843.

23) SCHROEDER, W. T. and PROVVIDENTI, R. (1966). Further evidence that common pea mosaic virus (PV 2) is a strain of bean yellow mosaic virus (BV 2). Pl. Dis. Reptr. 50; 337–340.

24) SINHA, R. C. (1960). Red clover mottle virus. Ann. appl. Biol. 48; 742–748.

25) SMITH, K. M. (1957). A text book of plant virus diseases. 2nd ed. pp. 64–69. Churchill, London.

26) STUBBS, M. W. (1937). Certain Viroses of the Garden Pea. Phytopath., 27; 242–266.

27) SWENSON, K. G. (1954). Aphid transmission of a bean yellow mosaic virus. J. Econ. Entom. 47; 1121–1123.

28) VERMA, P. and GIBBS, A. J. (1967). Preliminary studies on sap-transmissible viruses of red clover (*Trifolium pratense* L.) in England and Wales. Ann. appl. Biol. 59; 23–30.

29) ZAUMEYER, W. J. and WADE, B. L. (1935). The relationship of certain legume mosaic to bean. Journ. Agr. Res. 51; 715–749.

Summary

This is the report of the identification of an isolate which was isolated from diseased red clover (*Trifolium pratense* L.) in Sapporo. The virus produced chlorotic local lesions on inoculated primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and then varieties of Kairyo-Ōtebo and Kintoki were systemically infected, but Top Crop and some other varieties were not. The systemic hosts of the virus were those plants; pea (*Pisum sativum* L.), broad bean (*Vicia faba* L.), sweetpea (*Lathyrus odoratus* L.), common vetch (*Vicia sativa* L.), lupin (*Lupinus luteus* L.), red clover (*Trifolium pratense* L.), crimson clover (*T. incarnatum* L.), Chenopodium amaranticolor, gladiolus (*Gladiolus gandavensis* HOUTT.). Infected lupin and crimson clover were severely stunted. On common vetch, necrosis was produced at first and finally the plant died. On Chenopodium amaranticolor, local lesions were produced. No symptom appeared on gladiolus, but it was found to be susceptible with the virus.

The virus did not infectious to those plants; cowpea (*Vigna sinensis* ENDL.), azuki bean (*Phaseolus angularis* W. F. WIGHT), soybean (*Glycine max* MERR.), alsike clover (*Trifolium hybridum* L.), white clover (*T. repens* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Astragalus sinicus* L., tobacco (White Burley) (*Nicotiana tobacum* L.), *N. glutinosa*, *N. sylvestris*, tomato (*Lycopersicon esculentum* MILL), *Physalis floridana* Rydb., *Datura stramonium* L., freesia (*Freesia reflacta* KLATT) etc.

The virus activity was highest on 14 days after inoculation.

Thermal inactivation point of the virus ranged from 60°C to 70°C, dilution end point was between 1,000 and 10,000 and, longevity in vitro was 2 days in room temperature and more than 6 days in 5°C.

The virus was transmitted non-persistently by green peach aphid (*Myzus persicae*), but not transmitted by soil and seed.

Epidermal strips from infected broad bean leaves revealed many crystal and granule inclusions in cytoplasm of many cells. Some long flexuous rods which were about 750 mμ in length were seen in dip preparations from infected pea and broad bean leaves. Cross protection phenomenon between this virus and BYMV-N strain was observed.

The virus was identified on the basis of these properties as a strain of bean yellow mosaic virus and named chlorotic spot strain.

図 版 説 明

第1図　インゲン黄斑モザイクウイルス-インゲン退緑斑系 (BYMV-CS) 罹病アカクローバーの病徴

第2図　BYMV-CS を接種したインゲン (トップクロップ) 初生葉にあらわれた退緑斑

第3図　BYMV-CS 罹病エンドウ (米国大莢) の病徴

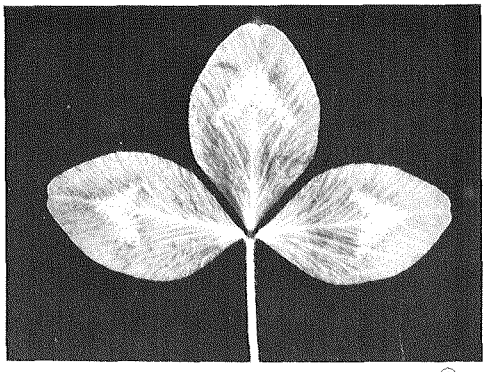
第4図　BYMV-CS 罹病ソラマメ (早生ソラマメ) の病徴

第5図　EYMV-CS を接種した *C. amaranticolor* の接種葉にあらわれた赤色局部病斑

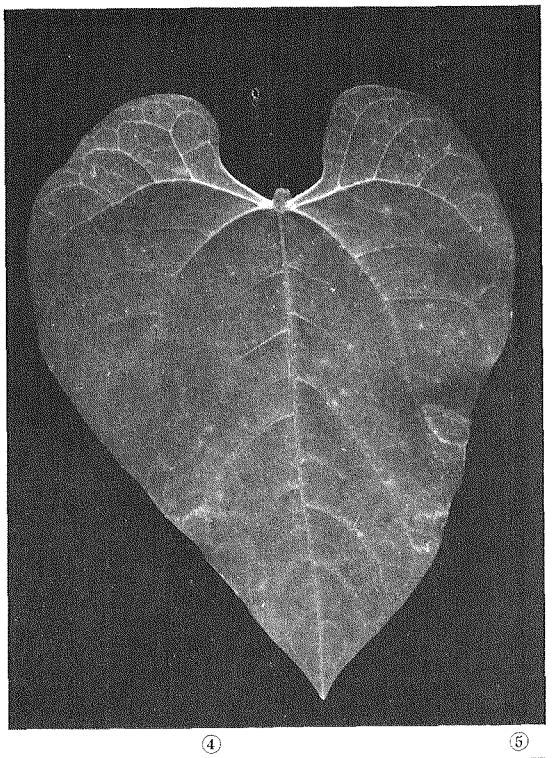
第6図　BYMV-CS 罹病ソラマメの葉の表皮細胞中の封入体。立方体のもの，顆粒状のものなどが多数認められる　×500

第7図　BYMV-CS 罹病エンドウの葉から dip 法で得た試料のネガティブステイニング像　×40,000

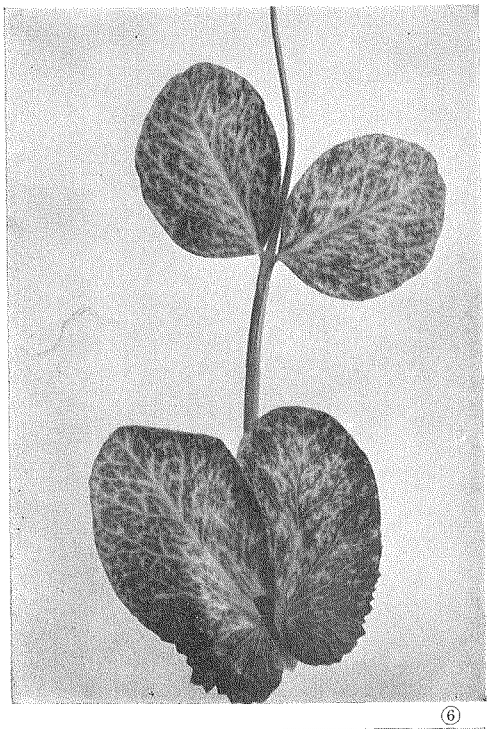
①



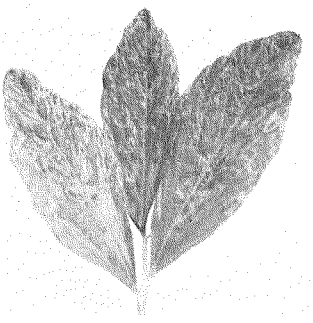
②



③

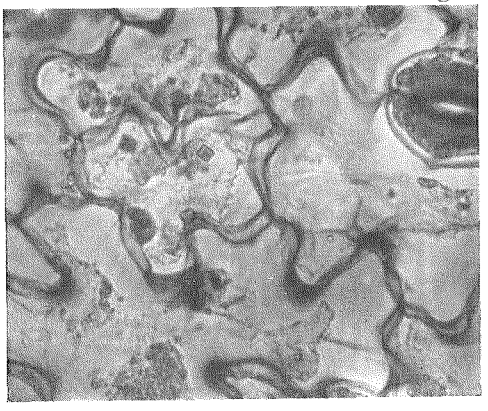
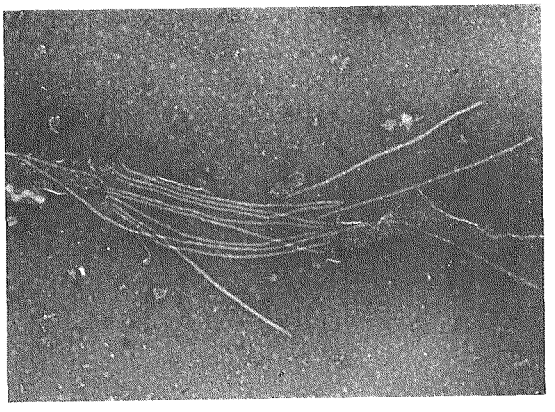


④



⑤

⑥



⑦