

北海道におけるインゲンの インゲン黄斑モザイクウィルスの発生*

萩田 孝志**

北海道のインゲンのインゲン黄斑モザイクウィルス (BYMV) の発生実態調査を1981年から4カ年行った結果、全道平均の発病率は、壊疽系統が1~2%、普通系統が僅少であった。ウィルス病の発生は有翅アブラムシの多発年に多く、特に胆振支庁管内の「改良早生大福」で著しかった。ほ場内での発生状況は、周辺雑草に近い畦ほど多く、中心部では少なかった。BYMVのエライザ検定は、接種検定に比べ100倍以上検出感度が高く、純化試料で5 ng/mlまで検出できた。ほ場周辺のクロウバ類からBYMVを検出した結果、壊疽系統の場合、シロクロウバからの検出率が36~43%、アカクロウバからは僅か1例(2%)のみ検出された。普通系統はアカクロウバから2~23%検出されたが、シロクロウバからは全く検出されなかった。従って壊疽系統が胆振管内で多発する原因は、一般ほでの発病率が他品種より高い「改良早生大福」の作付が多く、かつウィルス伝染源が多いためであり、一方普通系統が全道的に少ない原因は、主たる伝染源であるアカクロウバの量およびそのウィルス保毒率が低いためと推定した。

緒 言

北海道のインゲンに発生する主要なウィルスとしては、インゲンモザイクウィルス^{1,4,10)} (以下 BCMV と略す)、インゲン黄斑モザイクウィルス^{4,7,10)} (以下 BYMV と略す)、ダイズわい化ウィルス黄化系統^{8,9)} (以下 SDV-Y と略す)がある。このうち BCMV は種子伝染性ウィルスで、発病株の種子を通して次代に伝染するが、ウィルスフリー種子の利用によりその発生は著しく減少している⁶⁾。BYMV, SDV-Y はウィルス伝染源がクロウバ類とされ^{9,10)}、ウィルス保毒アブラムシによりインゲンは場に運び込まれる。ほ場周辺のクロウバ類のウィルス汚染拡大とともに年々発生が増加の傾向にある。

近年、胆振、網走各支庁管内の高級菜豆栽培地帯では、「大福」に壊疽を生じ枯死させるウィルス

病が増加しており、インゲン生産上著しい被害を与えている。本病は BYMV の壊疽系統によって起ることが既に明らかにされており^{10,12)}、九州の佐賀県²⁾、本州の千葉県⁵⁾においてもその発生が報告されている。

筆者は北海道におけるインゲンの BYMV の発生実態を把握するため、1981年から4カ年主要栽培地帯である胆振、網走、十勝各支庁管内の農家はほ場を調査し、さらにその発生要因について検討したのでその結果を報告する。

材料および方法

1. ウィルス病発生実態調査

道内のインゲン主要栽培地帯である胆振、網走、十勝各支庁管内を1981年から4カ年(1983年は胆振支庁管内のみ)調査した。調査は胆振支庁管内が7月下旬~8月上旬、網走、十勝支庁管内は8月上旬~下旬にそれぞれ実施した。調査方法は、インゲンは場周辺の雑草に最も近い畦からは場の中心部へ向かって順に3畦、各畦について任意に連続して100株調査した。ほ場の中心部のインゲンについては任意に200株を選び調査した。調査は場

1986年12月3日受理

*本報の一部は1984年度日本植物病理学会北海道部会で発表した。

**北海道立中央農業試験場, 069-13 夕張郡長沼町

数は1981年が胆振29, 網走11, 十勝11の合計51, '82年が胆振25, 網走17, 十勝25の合計67, '83年が胆振19, '84年が胆振17, 網走10, 十勝7の合計34であった。

2. 有翅アブラムシの飛来数調査

調査は中央農試のインゲン(品種改良早生大福)は場で6月20日～8月31日までの期間実施した。方法は1981年, '82年がは場周辺裸地の低位置(高さ30cm)に粘着剤を噴霧した黄色円筒(塩化ビニール製, 直径14cm, 長さ30cm)を設置し, 5日間隔で付着した有翅アブラムシ数を調べた。1983年, '84年は, 同は場周辺裸地に黄色水盤(鉄製, 縦22.5cm, 横16.5cm, 深さ3.3cm)を設置し, 1～2日間隔で飛来した有翅アブラムシ数を調べた。

3. ウィルスの純化と抗血清作成

接種後6～9日経過の早生ソラマメの頂葉(葉脈透化または葉脈壞疽症状)に0.5Mリン酸緩衝液(pH7.0, 0.5M尿素, 1%亜硫酸ナトリウム, 0.05Mエチレンジアミン四酢酸ナトリウム, 0.5%2-メルカプトエタノールを添加)を罹病葉生体重の2倍量加えて摩砕した。クロロホルムと四塩化炭素の等量混合液を罹病葉重と同量加えミキサーで3分間攪拌し, 2,400×g, 15分遠心分離した。上清にポリエチレングリコール6,000(4%)および塩化ナトリウム(0.3M)を加えて4℃で30分間攪拌し溶解した。6,200×g, 15分遠心分離した沈澱を摩砕用緩衝液の1/10量の0.5Mリン酸緩衝液(pH8.2, 1M尿素, 0.5%2-メルカプトエタノール, 2%トリトンX-100を添加)で懸濁し, 分画遠心分離(8,000×g, 10分, 123,000×g, 90分)を2度くり返した。高速遠心沈澱部を少量の懸濁用緩衝液で懸濁した後, 10～40%のショ糖密度勾配カラムに重層し, Beckman SW27ロータで69,000×g, 180分遠心分離した。ウィルスの沈降帯を集め, 123,000×g, 120分遠心分離して純化ウィルスを得た。日立ダブルビーム分光光度計(200—10型)で純化ウィルスの紫外外部吸収スペクトルを測定した結果, 波長260nmに最大値, 245nmに最小値を示す核蛋白特有の吸収曲線を示し, 260nm/280nmは1.35であった。その結果罹病葉100gから約4mgのウィルスが得られた。純化ウィルス1mgを家兎に筋肉注射2回, 静脈注射2回, それぞれ1週間間隔で行い免疫した。筋肉

注射はウィルス液, 1mlに等量のFreund's incomplete adjuvant(Difco社)を加え乳化させた後, 家兎に注射した。最終注射10日後に部分採血し力価を調べた結果, リングテストで力価1024倍の抗血清を得た。

4. エライザ検定とクローバ類からのウィルス検出

ウィルス抗血清からのγグロブリンの精製, アルカリンフォスファターゼ(Sigma社 Type VII-S)とγグロブリンの結合およびエライザ反応はClark and Adams³⁾の方法に準じた。ウィルス試料の摩砕用緩衝液は, 0.05% Tween-20と0.85%塩化ナトリウムを含む0.02Mリン酸緩衝液pH7.4(以下PBS-Tweenと略す)に2%ポリビニルピロリドンを加えて作成した。はじめにエライザ検定におけるγグロブリンおよび酵素結合抗体の濃度について検討した。その結果, γグロブリン濃度1μg/ml, 酵素結合抗体濃度500倍希釈が最適条件と考えられたので以後の実験は全てこの条件で実施した。

クローバ類からのウィルス検出は, インゲンは場周辺より採取し-80℃で凍結保存したクローバ葉に約10倍量の摩砕用緩衝液を加え, 乳鉢で摩砕した後その摩砕液をエライザ検定に供試した。ウィルス試料1検体のプレート(Dynatech社)のウェル数は1個で実験を行い, 反応の判定はA₄₁₀を測定し, 対照(健全葉)の2倍以上の吸光値を示した場合を陽性とした。

結 果

1. 北海道におけるインゲンの BYMV の発生状況

1981年から4カ年の道内インゲン主要栽培地帯におけるBYMVの発生状況をFig. 1に示した。1は場について500株調査した結果, BYMV壊疽系統と普通系統の2系統の発生が認められ, そのうち大部分は壊疽系統で, 普通系統の発生は僅少であった。全道平均の壊疽系統発病株率は, 1981年1.1%, '82年1.3%, '83年0.9%, '84年1.6%でおよそ1～2%の間で推移した。その間の有翅アブラムシの飛来数を中央農試インゲンは場で, 6月20日～8月31日までの期間調査した結果をFig. 1に示した。調査方法は異なるが, 1982年, '84年での発生が多かった。

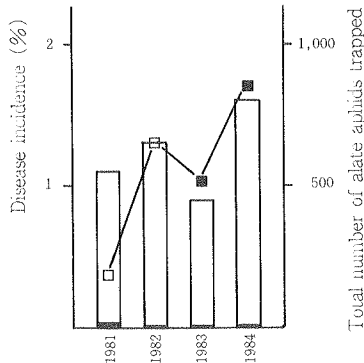


Fig. 1 Annual variation in aphid numbers and incidence of bean yellow mosaic viruses during 1981 and 1984.

Histograms show the percent of the virus diseased plants. □, Necrotic strain; ■, ordinary strain; lines show the number of alate aphids trapped; aphid data for the period Jun. 20-Aug. 31; □, sticky traps; ■, yellow water pan traps.

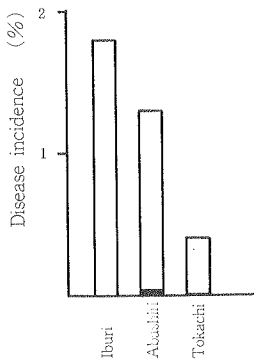


Fig. 2 The incidence of bean yellow mosaic virus in various districts of Hokkaido during 1981 and 1984. □, Necrotic strain; ■, ordinary strain.

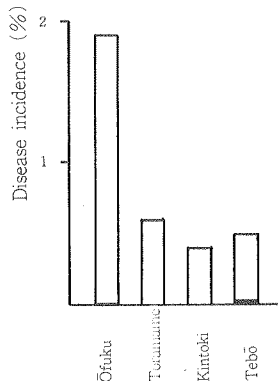


Fig. 3 The incidence of bean yellow mosaic virus in various cultivars of french bean. □, Necrotic strain; ■, ordinary strain.

次にインゲンの主要栽培地帯である胆振, 網走, 十勝各支庁管内別の BYMV 発生状況を Fig. 2 に示した。壊疽系統の平均発病株率は, 胆振1.8%, 網走1.3%, 十勝0.4%であった。また, 主要栽培品種別の調査結果は Fig. 3 に示した。壊疽系統の平均発病株率は「改良早生大福」1.9%, 「改良虎豆」0.6%, 「金時類」0.4%, 「手亡類」0.5%であった。

2. 本病のは場内における発生状況

は場の端からの距離とは場内におけるウィルス病発生の関係を Fig. 4 に示した。本病発生量の多少にかかわらず, いずれの年次においても雑草に近いほど発生が多く, は場の中心部では少ない傾向

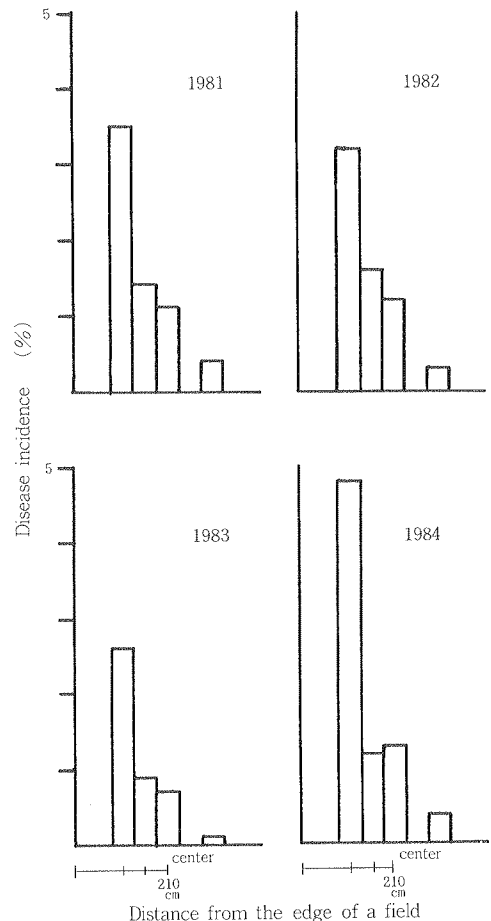


Fig. 4 Relationship between the distance from the edge of a field and the incidence of bean yellow mosaic virus (necrotic strain) during 1981 and 1984.

Table 1. Sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and inoculation test for detecting bean yellow mosaic virus (BYMV) in leaf extracts

Reciprocal dilution of a leaf extract	ELISA absorbance values of diseased and (healthy) broad bean extracts	Number of local lesions/leaf ^{a)}
10 ¹	— ^{b)} (0.10)	320
10 ²	— (0.09)	214
10 ³	— (0.09)	26
10 ⁴	0.52 (0.07)	1
10 ⁵	0.12 (0.06)	0
10 ⁶	0.08 (0.05)	0
10 ⁷	0.06 (0.06)	0

a) Three healthy leaves of *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. were inoculated with each dilution.

b) — indicated that absorbance value was in excess of 2.

向であった。

3. エライザによるウィルスの検出

エライザによるウィルスの検出感度を調べるため、ウィルス罹病葉(早生ソラマメ)の粗汁液と純化ウィルスを用いて、ウィルスの検出を行った。ウィルス接種後7～9日のソラマメ頂葉(葉脈透化または葉脈壊疽症状)をPBS-Tween(2%ポリビニルピロリドンを含む)で摩砕した後、3,000 rpm, 10分遠心分離した上清を罹病葉生体重の10⁻¹～10⁻⁷倍までの10倍希釈系列を作り、半量

をエライザ検定に供試し、残りの半量を *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. へ接種検定を行った。その結果を Table 1 に示した。エライザ検定では罹病葉粗汁液の10⁻⁵倍希釈まで検出できたのに対して、接種検定では、10⁻³倍希釈までであった。純化ウィルスを用いてウィルスの検出を行った結果、Fig. 5 に示したようにウィルス濃度で5 ng/ml まで検出できた。次にウィルス罹病葉粗汁液を用いて、BYMV の普通系統および他の PVY 群ウィルス(インゲンモザイクウィルス、ダイズモザイクウィルス)との反応を比較した結果を Fig. 6 に示した。壊疽系統抗体を用いたエライザは、普通系統および他の2種のウィルスともほとんど反応を示さなかった。

4. クローバ類からのウィルス検出

本病の主要な伝染源であるインゲンは場周辺のクローバ類からエライザを用いて、BYMV(壊疽系統、普通系統)の検出を行った結果を Fig. 7 に示した。壊疽系統の場合、シロクローバからの検出率が胆振42%, 網走43%, 十勝36%で、アカクローバからの検出率が胆振0, 網走2%, 十勝0であった。普通系統の場合、シロクローバからの検出率がいずれの地域も0で、アカクローバからの検出率が胆振6%, 網走2%, 十勝23%であった。

5. ほ場周辺のシロクローバ量と本病の発生

ほ場周辺のシロクローバが本病(壊疽系統)の最も重要な伝染源であることを明らかにするた

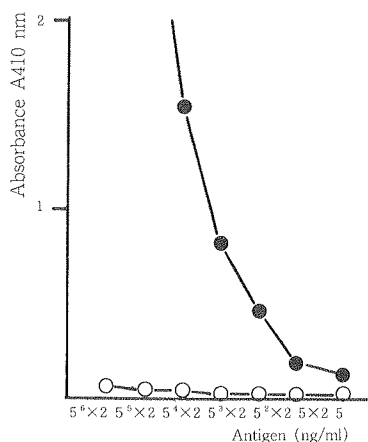


Fig. 5 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) absorbance values at 410 nm. ●, Purified preparations of bean yellow mosaic virus (necrotic strain); ○, PBS-Tween.

Table 2. Relationship between the incidence of the virus diseases in the french bean fields and the relative amount of the wild white clover plants in Iburi district of Hokkaido in 1984

Locality	Number of fields surveyed	Average percent of virus infected french bean plants (%)	Relative amount of wild white clover plants
Date	4	2.2	— ^{a)}
Sōbetu	5	2.7	—
Abuta	3	0.5	+
Toyoura	2	0.9	+

a) Relative amount of wild white clover plants estimated by the eye in terms of three grades.

Table 3. Relationship between the incidence of the virus diseases in the french bean fields and the relative amount of the wild white clover plants in various district of Hokkaido in 1984

District	Number of fields surveyed	Average percent of virus infected french bean plants (%)	Relative amount of wild white clover plants
Iburi	17	2.1	— ^{a)}
Abashiri	9	1.5	+
Tokachi	7	0.4	—

a) Relative amount of wild white clover plants estimated by the eye in terms of three grades.

め、肉眼観察による相対的なほ場周辺のシロクロバ量とは場内のインゲンの発病との関係を調べた。Table 2 は胆振支庁管内のインゲンは場周辺の相対的なシロクロバ量とインゲンのウィルス病発生との関係を示し、発病株率は市町別に調査ほ場数の平均値を示した。インゲンの発病株率は、壮瞥町2.7%、伊達市2.2%、豊浦町0.9%、虻田町0.5%であった。ほ場周辺のシロクロバ量は、相対的に壮瞥町>伊達市>豊浦町≒虻田町の関係であった。

6. 主要栽培地帯におけるほ場環境と本病の発生

胆振支庁管内17カ所、網走支庁管内9カ所、十勝支庁管内7カ所の各インゲンは場について、肉眼観察による相対的なほ場周辺のシロクロバ量とインゲンのウィルス病発生との関係を調べ、Table 3 に示した。インゲンの平均発病株率は胆振2.1%、網走1.5%、十勝0.4%であった。または場周辺のシロクロバ量は、相対的に胆振>十勝>網走の関係であった。

考 察

1981年から4カ年インゲンのBYMVの発生実

態調査を行った結果、2系統（壊疽系統、普通系統）の発生が認められ、その大部分は壊疽系統であった。ウィルス病の発生は年次による変動が若干あったが、全道平均では発病株率1~2%の間で推移した。本病のウィルス伝染源はほ場周辺のクロバ類とされ¹⁰⁾、有翅アブラムシによってインゲンは場に運び込まれる。従って本病の発生はほ場環境（ウィルス伝染源の量）とアブラムシの発生量に支配される。このことはFig. 1 に示すように、有翅アブラムシの飛来数が多い年ほど本病の発生が多いことでも明らかである。主要栽培地帯別に本病の発生をみると、Fig. 2 に示すように胆振支庁管内で最も多く、次いで網走支庁管内で、十勝支庁管内での発生は少なかった。品種別ではFig. 3 に示すように「改良早生大福」の発生が極めて多く、「改良虎豆」、「金時類」、「手亡類」で少なかった。従って品種による発生の差異が地域別の発生の差異となってあらわれ、「改良早生大福」の作付が多い胆振、網走支庁管内で本病の発生が多く、「金時類」、「手亡類」を主体とする十勝支庁管内で少ない結果となっている。

本病（壊疽系統）の伝染源について、インゲン

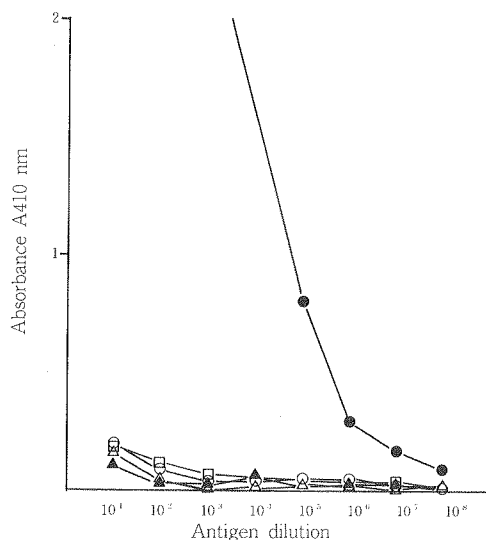


Fig. 6 Comparison of ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) absorbance values for dilutions of leaf extracts. ●, Bean yellow mosaic virus (necrotic strain); ○, bean yellow mosaic virus (ordinary strain); △, bean common mosaic virus; ▲, soybean mosaic virus; □, healthy broad bean.

は場内における本病の発生分布を調べた結果、Fig. 4 に示すようには場周辺の雑草に近いほど本病の発生が多い傾向にある。このことからウィルス伝染源がは場周辺の雑草中にあり、アブラムシ（主として有翅虫）によってウィルスがは場内に運び込まれることが推定された。そこで本病の主たる伝染源と思われるは場周辺のクロローバ類（アカクロローバ、シロクロローバ）について、ウィルスの検出と地域別保毒率を調べた。

まずウィルスの検定方法としてエライザの検出感度について検討した結果、Table 1, Fig. 5 に示すように、ウィルス罹病葉粗汁液を用いた場合、接種検定に比べ100倍以上低濃度まで検出可能であり、純化ウィルス濃度で5 ng/ml まで検出できた。クロローバには種々のウィルスが複合感染している疑いがあるが、BYMV（壊疽系統）と類縁関係があると思われる2、3のPVY群ウィルスとの反応を調べた結果（Fig. 6）、BYMV（普通系統）、BCMV及びダイズモザイクウィルス（SMV）はほとんど反応を示さず、エライザ検定によりクロ

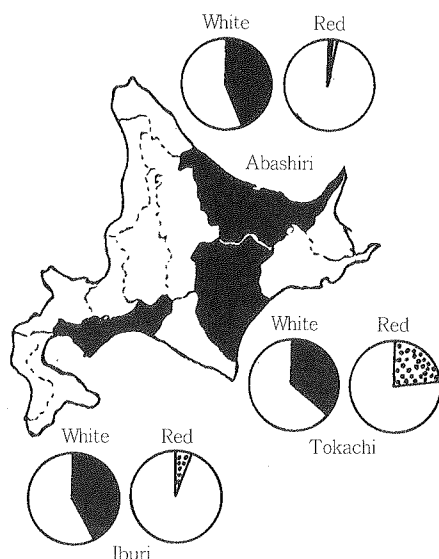


Fig. 7 Distribution of the percent of the virus infected clovers (white and red) in Hokkaido in 1984.
■, Necrotic strain; ▨, ordinary strain.

バ中から壊疽系統のみを検出できることが確認された。

道内のインゲン主要栽培地帯である胆振、網走、十勝各支庁管内のインゲンは場周辺のクロローバ類を採取し、凍結保存した後¹¹⁾、そのウィルス保毒率をエライザ検定により調べた。その結果 Fig. 7 に示したように壊疽系統は、シロクロローバから約35～40%が検出され十勝支庁管内は胆振、網走支庁管内に比べ若干低かった。またアカクロローバ

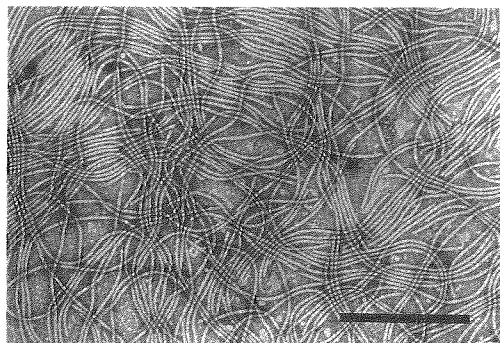


Fig. 8 Purified preparation of bean yellow mosaic virus (BYMV) negatively stained with potassium phosphotungstate. The bar represents 500nm.

らの検出は1例のみであった。この結果から壊疽系統の主たる伝染源はシロクローバであることが分った。一方、普通系統はアカクローバから検出されたが、シロクローバからは全く検出されなかった。アカクローバのウィルス保毒率は十勝支庁管内で約20%であったが、他の地域はいずれも低かった。これらの結果から、BYMVの壊疽系統はシロクローバ、普通系統はアカクローバが主たる伝染源と考えられ、土崎ら¹⁰⁾の報告に一致した。Fig. 1に示すように北海道のインゲンに普通系統の発生が少ない理由は、ほ場周辺のアカクローバの量が少なく、そのウィルス保毒率が低いとみられる。一方壊疽系統の発生が胆振支庁管内で多い理由として、作付品種が「改良早生大福」であり、かつTable 3に示すようにウィルス伝染源であるシロクローバの量が他の地域に比べ多いことなどが推定される。

本病の発生の多い胆振管内について、各市町別にインゲンの栽培環境とウィルス病発生との関係を調べた結果、ほ場周辺のシロクローバ量の多い地域ほど本病の発生が多い傾向にあることが明らかになった (Table 2)。

以上の結果から、北海道のインゲンに発生するBYMVは壊疽系統が大部分であり、普通系統は僅少である。壊疽系統の発生量はウィルス伝染源の量と媒介有翅アブラムシの発生量によって支配されると思われるが、本病発生の年次間差の結果をみると、主にアブラムシの発生量に起因するように思われる。地域的に胆振支庁管内で本病の発生が多いのは、「改良早生大福」の作付が多く、ウィルス伝染源の量が多いためであろう。従って本病を防除するためにはインゲンの栽培環境に留意し、伝染源であるクローバ類の除去が重要である。

謝 辞：本研究を行うにあたり、多大の便宜をいただいた北海道立中央農業試験場病理科長赤井純博士、並びに実験を遂行するにあたり有益な助言をいただいた同場技連室玉田哲男博士に厚く御礼申し上げる。また本稿の校閲を賜った北海道大学農学部教授四方英四郎博士に深く謝意を表する。

引用文献

- 1) 萩田孝志, 仙北俊弘, 小島誠, 四方英四郎, 村山大記, "北海道におけるマメ類ウィルス病に関する研究, 第2報 インゲンモザイクウィルスの種子伝染について", 北大農学部邦文紀要, **9**, 160—164 (1975).
- 2) 木曾皓, "インゲン黄斑モザイクウィルス(エソ系)の被害と防除", 今月の農薬, **18**, 42—46 (1974).
- 3) Clark, M. F.; Adams, A. N. "Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of plant Viruses". J. Gen. Virol. **34**, 475—483 (1977).
- 4) 村山大記, 四方英四郎, 小島誠, 仙北俊弘, 梶原一義, 上田一郎, "北海道におけるマメ類ウィルス病に関する研究, 第1報 インゲンより分離されたウィルスについて", 北大農学部邦文紀要, **9**, 155—159 (1975).
- 5) 夏秋啓子, 山下修一, 土居養二, 長井雄治, "bean yellow mosaic virus (BYMV) の1系統によるインゲンマメつる枯病について", 日植病報, **48**, 130 (1982).
- 6) 日本特産農作物種苗協会編, "豆類ウィルスフリー種苗研究会試験成績(昭和55年度)", 1—72 (1981).
- 7) 菅野徹, 上田一郎, 仙北俊弘, 四方英四郎, "インゲン(大福)の蔓枯れ症状について", 日植病報, **46**, 101 (1980).
- 8) 玉田哲男, 馬場徹代, 村山大記, "ダイズ矮化ウィルス黄化系統によるインゲン黄化病", 日植病報, **39**, 152 (1973).
- 9) 玉田哲男, "ダイズ矮化病に関する研究", 北海道立農試報告, **25**, 1—144 (1975).
- 10) 土崎常男, 後藤忠則, 藤沢一郎, 吉田幸二, "北海道のマメ科植物, 野菜に発生するウィルス病について", 北海道農試研報, **131**, 71—93 (1981).
- 11) 上田一郎, 四方英四郎, "インゲン黄斑モザイクウィルスの enzyme-linked immunosorbent assay による検出", 日植病報, **46**, 556—558 (1980).
- 12) 上田一郎, 菅野徹, 中曽根恒一, 仙北俊弘, 四方英四郎, "インゲン「大福」の蔓枯れ症状の病原ウィルスについて", 北大農学部邦文紀要, **13**, 69—80 (1981).

Bean Yellow Mosaic Virus of French Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Hokkaido

Takashi HAGITA*

Summary

Bean yellow mosaic virus (BYMV) was considered to be one of the most important french bean (*P. vulgaris* L.) viruses in Hokkaido.

It severely affected the french bean plants vr. "Kairyo-wase-ōfuku" and the incidence of virus disease was gradually increasing year after year.

The result of field survey of the french bean plants in Hokkaido during 1981 and 1984 showed that the average percent of the diseased plants was between 1% and 2%, and there were two strains of BYMV. And the necrotic strain was predominant over the ordinary one. A high incidence of the virus diseases was probably due to a high incidence of the alate aphids. In Hokkaido, it occurred most frequently in Iburi district where the french bean plants vr. "Kairyo-wase-ōfuku" were mainly cultivated. In the fields, it largely occurred in the french bean plants adjacent to the weeds.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect the virus using BYMV-antiserum (titer: 1/1024 in ring interface precipitin test). Sensitivity of ELISA for detection of the virus in leaf extracts was one hundred times higher than mechanical inoculation to *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. and as little as 5 ng/ml of the purified virus could be detected by ELISA.

The wild clovers (white and red) were examined by ELISA for the purpose of discovering the virus source plants.

The necrotic strains could be detected between 36% and 43% and none of the ordinary ones could be detected from the wild white clovers. On the other side the necrotic strains could be scarcely detected and the ordinary ones could be detected at a low rate from the wild red clovers.

It was concluded that the necrotic strains largely occurred in Iburi district because of a french bean cultivar and a large number of the virus source plants (mainly white clovers), and the ordinary ones scarcely occurred in Hokkaido because of a small number of the virus source plants (mainly red clovers).

*Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-13, Japan