

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2962762号

(45)発行日 平成11年(1999)10月12日

(24)登録日 平成11年(1999) 8 月 6 日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

A 0 1 H 5/00

A 0 1 H 5/00

A

A 0 1 N 63/00

A 0 1 N 63/00

F

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

7/04

7/04

請求項の数 9 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平2-73538

(22)出願日

平成 2 年 (1990) 3 月 26 日

(65)公開番号

特開平3-277273

(43)公開日

平成 3 年 (1991) 12 月 9 日

審査請求日

平成 8 年 (1996) 12 月 20 日

(73)特許権者

999999999

日本甜菜製糖株式会社

東京都中央区京橋 2 丁目 3 番 13 号

(73)特許権者

999999999

北海道

北海道札幌市中央区北 3 条西 6 丁目

(72)発明者

玉田 哲男

北海道夕張郡栗山町中央 4 丁目 88 番地

(72)発明者

阿部 秀夫

北海道岩見沢市上幌向町 217 番地

(72)発明者

神沢 克一

北海道帯広市稲田町南 9 線西 19 番地

(72)発明者

内野 浩克

北海道帯広市稲田町南 9 線西 17 番地

(74)代理人

弁理士 戸田 親男

審査官

深草 亜子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 そう根病の防除剤とその製法および防除方法並びにこれに用いる B N Y V V 弱毒ウイルスとその作出

1

2

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】テンサイに感染してそう根病を発病するテンサイえそ性葉脈黄化ウイルス (Beet necrotic yellow vein virus, B N Y V V) の 4 個の RNA 成分、RNA1, RNA2, RNA3 および RNA4 のうち RNA3 を欠失した B N Y V V 弱毒ウイルスを有効成分として含有すること、を特徴とするそう根病の防除剤。

【請求項 2】その根病の病徴を発現するテンサイ根部の汁液をツルナ葉に接種して形成する病斑より、電気泳動法でテンサイえそ性葉脈黄化ウイルス (Beet necrotic yellow vein virus, B N Y V V) の 4 個の RNA 成分のうち RNA 1, RNA2 および RNA4 のみを有する病斑を選別し、この病斑の汁液を採取することにより作出した該 B N Y V V 弱毒ウイルスを有効成分として含有すること、を特徴とする請求項 1 に記載のそう根病の防除剤。

【請求項 3】該 B N Y V V 弱毒ウイルスをポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) に保毒させてなる請求項 1 又は 2 に記載の B N Y V V 弱毒ウイルスを有効成分として含むこと、を特徴とするそう根病の防除剤。

【請求項 4】電気泳動法によって該 B N Y V V 弱毒ウイルスの RNA 成分を有するツルナ葉病斑の汁液をテンサイ幼苗根部に接種し、これにポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) を接種してポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) に、該 B N Y V V 弱毒ウイルスを保毒させ、これの休眠胞子を回収すること、を特徴とする請求項 3 に記載のそう根病の防除剤の製法。

【請求項 5】無病のテンサイ苗に、該 B N Y V V 弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) を感染させ、養液栽培することにより B N Y V V 弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) を増

殖させ、休眠胞子を得ること、を特徴とする請求項 3 に記載のそう根病の防除剤の製法。

【請求項 6】養液栽培に用いる培養液が、窒素濃度を通常のおよそ 1/2 としたホークランド・アーノン (Hoagland & Arnon) 氏培養液に炭酸カルシウムを添加した培養液であることを特徴とする請求項 5 に記載のそう根病の防除剤の製法。

【請求項 7】請求項 4 ~ 請求項 6 のいずれか 1 項に記載した方法により該 BNYVV 弱毒ウイルスをポリミキサ・ベタエ (*Polymyxa betae*) の休眠胞子を得、得られた休眠胞子を育苗移植用紙筒に充填した無病の培土に加えてテンサイを育苗することにより、育苗時に該 BNYVV 弱毒ウイルスを確実に BNYVV の感染以前にテンサイ幼苗に感染させ、これを移植することを特徴とするそう根病の防除方法。

【請求項 8】該休眠胞子として、休眠胞子を含むテンサイ細根及び/又はテンサイ細根加工物を用いること、を特徴とする請求項 7 に記載の防除方法。

【請求項 9】請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の防除剤でテンサイ苗を処理することにより、該 BNYVV 弱毒ウイルスを感染せしめたテンサイ苗。

【発明の詳細な説明】

〔産業上の利用分野〕

この発明は、そう根病の防除に係り、防除剤とその製法および防除方法ならびにこれを用いる BNYVV 弱毒ウイルスとその作出および該ウイルス保毒菌に関する。

〔従来の技術〕

植物が植物病原性ウイルスに感染すると、ウイルス病に特徴的な、例えばモザイク (mosaic)、輪点 (ring spot)、えそ (necrosis)、黄化 (yellows)、萎縮 (stunt) 等の病徴を発現し、生育不良、収量減、あるいは奇形をもたらすことが知られる。

テンサイにも多くのウイルス病が知られ、主なものを挙げると萎黄病 (Beet yellows)、西部萎黄病 (Beet western yellows)、カールトップ (Beet curly top, 日本未発生)、そう根病 (Rhizomania) 等であり、なかでも、そう根病は、ほかのウイルス病と異なり土壤伝染性の難防除病害であり、比較的近年になって発生したものである。

そう根病は、1955 年頃にイタリアにおいて原因不明の根部の奇病として認められ、当時はイタリア地方の風土病とされていた。その後、1968 年頃から日本で発生し、最近ではヨーロッパ、アメリカ、中国等の主要なテンサイ栽培地帯でも発生が認められている。

日本においては、テンサイの連作畑にイタリアと同様の根部の奇病として発生し、1972 年に、この発明者の一人である神沢等が、この奇病に土壤菌ポリミキサ・ベタエ (*Polymyxa betae*) と未知のウイルスが関与し、イタリアで発生しているリゾマニアと類似していることを突き止め、これを「そう根病」と命名した〔神沢、宇井：

日植病報., 38, 434 - 435 (1972) 〕。

また、上記そう根病の病原ウイルスについては 1973 年に、この発明者の一人である玉田等が未知の新ウイルスであることを明らかにし、これを「テンサイえそ性葉脈黄化ウイルス (Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV)」と名命した〔玉田、馬場: Ann. Phytopath. Soc. Japan., 39, 325 - 532 (1973) 〕。その後の研究により、BNYVV は核酸の長さの異なる 4 種類の RNA からなる多粒子型の桿状ウイルスで、これらの RNA は長さの大きい順に RNA 1、RNA 2、RNA 3、RNA 4 と名付けられ、塩基数がそれぞれ 7.1kb、4.8kb、1.85kb、1.5kb であることが明らかになっている。〔Richard et al: journal of general viology., 66, 345 - 350 (1985) 〕。

自然界により分離される BNYVV はすべて RNA 1、2、3、4 からなる BNYVV であり、その他の RNA 組成からなる BNYVV は分離されていない〔Koenig et al: journal of general viology., 67, 2043 - 2046 (1986) 〕；玉田等：てん菜研究会報., 29 号, (1987) 〕。

これらのことから、そう根病は、土壤菌ポリミキサ・ベタエ (*Polymyxa betae*) により媒介されるウイルス病であることが明らかになり、テンサイの細根にポリミキサ・ベタエが寄生することにより、この菌が保毒している上記 BNYVV がテンサイに感染し、細根中で増殖後、植物体内に移行し、細根の異常増加と維管束の褐変、地上部の黄化、要素欠乏症および葉脈黄化等特徴的な病徴を発現し、一旦罹病すると回復することなく根部の重量および含糖分が著しく減少し、製糖原料として使用を不可能とする等の大きな被害をもたらすものである。

イタリアにおいては、そう根病の発生のため製糖工場が休業したこともあり、日本においても、一部の地域で作付けを中止しているが、全地域的な調査によれば、そう根病汚染が、全作付け面積のおよそ 20% に及んでおり、このまま汚染が進行すれば、製糖作業が充足するに十分なテンサイ原料の確保が困難になり、テンサイを原料とする製糖業はきわめて困難な状態に陥ることになる。

そう根病は、かように大きな被害をもたらすウイルス病ではあるが、難病のため現状では効果的な防除手段がなく、BNYVV 汚染圃場の薬剤くん蒸処理、例えば D - D 剤 (dichloropropene - dichloropropane) によるとか、連作の回避、あるいは耐病性品種の栽培等が考慮されているに過ぎない。

一方、一般の植物ウイルスの防除方法として、弱毒ウイルスの干渉作用を利用する方法があり、例えばハウストマトにおけるモザイク病防除に、トマト系タバコモザイクウイルス (TMV - L) から高温処理と局所病斑選抜の反復によって分離した弱毒株 (L_{11} A, L_{11} A₂₃₇) を利用するもの〔北農誌彙報., 99, 67 - 76 (1971) 〕、カラタチハッサク萎黄病に対して無病徴樹により分離したカンキツトリステザウイルス (CTV) の弱毒株 (HM - 55)

を利用するもの〔日植病報., 33, 162 - 167 (1967)〕、マスクメロンにおけるキュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) に対して亜硫酸ナトリウム処理と紫外線照射処理を行ない局所病斑選抜により分離した弱毒株 (SH₃₃b) を利用するもの〔植物防疫., 38, 353 - 357 (1984)〕、露地トマトのモザイク病の病原ウイルスであるキュウリモザイクウイルス (CMV) にサテライトRNAを組み込むことにより作出した、例えば〔CMV - P (No.2) + CMV - PF (1)〕を利用するもの〔特開昭61 - 177985号公報、日植病報., 51, 238 - 242 (1985)〕などが知られている。

〔発明が解決しようとする課題〕

そう根病、あるいは一般の植物ウイルス病の防除手段としてそれぞれ上記手段が知られているが、そう根病がきわめて難病に属するがために、薬剤くん蒸による方法では十分な防除効果が得られず、耐病性品種の栽培といっても未だ確立されたものがなく開発段階にある。また連作回避についても、そう根病が1度発生した圃場は、他作物を6、7年栽培しても回復することがなく、テンサイの栽培を中止せざるを得ない状況にあるのが実情である。

また、弱毒ウイルスを利用する方法では、弱毒ウイルスの干渉作用はウイルスが異なると全くその作用が現われず、上記のCMV弱毒ウイルスおよび弱毒株L₁₁Aが知られていても、これをそう根病の防除に適用することはできない。さらに、BNYVVにはCTVの様に自然界で無病徴を示す弱毒株が存在せず、また、TMVのように高温、薬剤、紫外線処理により弱毒株の作出も利用できない。また、BNYVVは、CMVの様なサテライトRNAを持つウイルスではないのでCMV弱毒株ウイルスのようにサテライトRNAを利用する方法も適用できない。

これらの従来から知られるウイルスはCTVを除き全て汁液接種により感染するので、発病が生じる前に、前もって弱毒株を汁液接種により感染させることができるが、そう根病ウイルスは、かように容易な汁液接種による感染が非常に困難であるため、そう根病の発病前に弱毒株を汁液接種により感染させる方法を利用できず、従来から知られる汁液接種報も採用できない。

このように、そう根病を防除するための好適な手段が存在しないのが、現在の実情である。

〔発明の目的〕

本発明は、このような技術の現状に鑑みてなされたものであって、特に環境汚染を防止し農薬公害を防ぎ安全な防除剤であってしかも効果の高い防除剤を開発する目的でなされたものである。

そこで各方面から検討した結果、弱毒ウイルスによる防除は環境汚染をまねかず、効果が大きい有用な方法であることから、ウイルスを利用する方法に着目するに至り、そう根病の防除に効果的な弱毒ウイルスの作出および防除方法の開発を行うこととした。

したがって本発明の目的は、テンサイのそう根病の防除に用いることのできるBNYVV弱毒ウイルスの提供にあり、その上位の目的は、このBNYVV弱毒ウイルスの作出にあり、さらにその上位の目的はこのような弱毒ウイルスを効果的に利用する防除剤にあり、そしてさらにまたその上位の目的は、この防除剤によりそう根病を防除する方法にある。

すなわち本発明の目的は、そう根病を防除するための総合システムを開発することにある。

10 〔課題を解決するための手段〕

この発明者等は、上記の事情から、毒性の回復がなく、大量生産の容易で、接種の容易なBNYVV弱毒ウイルス、その作出および利用について鋭意研究した結果、そう根病に感染したテンサイ根部の汁液をツルナ葉に接種して形成する不明瞭な退緑病斑から得た汁液が、テンサイに対し殆どそう根病の病徴を発現しないことを発見し、この病斑から得た汁液をさらに電気泳動法によりウイルスRNA解析したところ、RNA成分の異なる2種類のウイルスを確認し、さらに多くの研究の結果、RNA成分がRNA1、RNA2およびRNA4であるウイルスがそう根病の防除に最適なBNYVV弱毒ウイルスであることをはじめて知り、この新知見に基づき本発明を完成させるに至ったものである。

すなわち、この発明のそう根病の防除システムの中心部を形成するのがBNYVV弱毒ウイルスであるが、このウイルスは、テンサイに感染してそう根病を発現するテンサイえそ性葉脈黄化ウイルス (Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV) の4個のRNA成分RNA1、RNA2、RNA3およびRNA4のうちのRNA3を欠失し、BNYVVに対して干渉作用を有することを特徴とするものである。

そして、これの作出は、そう根病の病徴を発現するテンサイ根部の汁液をツルナ葉に接種して形成する病斑により、電気泳動法でRNA1、RNA2およびRNA4のみを有する病斑を選別し、この病斑の液汁からRNA1、RNA2およびRNA4のみをRNA成分とするBNYVV弱毒ウイルスを得ることを特徴とするものである。

また本発明は、このBNYVV弱毒ウイルスによる防除剤にも関するものであるが、それは、上記RNA1、RNA2およびRNA4のみをRNA成分とし、BNYVVに対して干渉作用を有するBNYVV弱毒ウイルスをポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) に保毒させることによりBNYVV弱毒ウイルスを有効成分として含有させたことを特徴とするものである。

この防除剤の製法は、上記電気泳動法で、RNA1、RNA2およびRNA4のみを有する病斑の汁液をテンサイ幼苗根部に接種し、これをウイルスフリーのポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) を接種してポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) に上記BNYVVに対して干渉作用を有するBNYVV弱毒ウイルスを保毒させ、これの休眠胞子を回収することを特徴とするものであり、さらに好ましい製法

が、無病のテンサイ苗に上記のBNYVVに対して干渉作用を有するBNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ (*Polymyxa betae*) を鑑賞させ、養液栽培することによりBNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ (*Polymyxa betae*) を増殖させ、休眠胞子を大量に得ることを特徴とするものである。

そしてまた本発明に係る上記防除剤による防除方法は、育苗移植用紙筒に充填した無病の培土に上記BNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ (*Polymyxa betae*) の休眠胞子を加えてテンサイを育苗することにより、育苗時に上記BNYVVの弱毒ウイルスを、確実に、BNYVVの感染以前にテンサイ幼苗に感染させ、これを移植することを特徴とするものである。

また本発明は該弱毒ウイルスを保毒ないし担持した微生物、ポリミキサ・ベタエ (*Polymyxabetae*) 自体にも関する。

かように、本発明は、BNYVVに対して干渉作用を有するBNYVV弱毒ウイルスをそう根病の防除に利用することにより、効果的にそう根病の防除を可能としたものである。

以下、この発明を作用を含めて詳細に説明する。

そう根病に感染したテンサイ根の液汁をテンサイ (*Be ta vulgaris*)、ツルナ (*Tetragonia expansa*)、キノア (*Chenopodium quinoa*) 等の葉部に接種すると1主、または病徴の強さの異なる複数の病斑を形成する。特にツルナにおいて、異なる病斑の単一病斑分離を繰り返すと、次に示すように4種類の病斑が形態および病徴の変化が安定して得られるようになる。

- a) 黄色えそ病斑
- b) 黄色病斑
- c) 淡黄化病斑
- d) 不明瞭な退緑病斑

これらa)～d)の角病斑について、以下の手法によりウイルスを純化した後、アガロースゲル電気泳動法によりRNAを分離すると第1図に示す分離パターンを得る。

1) ウイルスの純化

上記a)～d)の病斑(5g)を切り取り、それぞれについて、5倍量の1mM EDTAを含む0.5Mホウ酸緩衝液(pH 9.0)を添加して磨砕し、搾汁液を10,000rpm、10分で遠心後、上清に1/9容量の20%トリトンX-100を加えて攪拌混合し、これを、遠心管の底に20%蔗糖溶液を重ねて35,000rpm、60分で遠心後、生成したペレットを0.5mlの蒸留水に溶解し、-20℃で凍結する。

2) ウイルスRNAの抽出

上記で得た凍結物のそれぞれについて、融解後3000rp

m、10分で遠心し、上清についてSDS・フェノール法により、それぞれのウイルスRNAを抽出する。

3) RNAの電気泳動

上記それぞれの抽出RNAを、ホルマリンで変性(65℃、10分)させ、これをアガロースゲル(1.5～1.7%)で作成したパイレックスチューブ(内径7mm、長さ110mm)を用い、ゲル1本当たり負荷電流(定電流)6mA、泳動時間2時間の条件で電気泳動にかけ、染色に0.005%スチンズオール(50%ホルムアミド)を用い、4～5時間で発色させる。

第1図において各バンドに付したRNA1、RNA2、RNA3、RNA4は、それぞれ前記玉田が同定したRNAの各成分に相当する。

これらの結果により、黄色えそ病斑および黄色病斑はいずれもRNA成分がRNA1、2、3、4であるウイルスによって生じ、淡黄化病斑はRNA1、2、3をRNA成分とするウイルスによって、そして不明瞭な退緑病斑にはRNA1、2、4をRNA成分とするウイルスと、RNA1、2をRNA成分とするウイルスによって生じるものがある。

これら4種の病斑について、前記同様単一病斑分離を繰り返し、前記電気泳動法によるRNAの分離を行ってもRNA組成の変化は認めず、安定している、これら各病斑から分離されるウイルスに、以下の説明を容易するために次のような系統番号を付し分類する。

- 系統1 RNA1、2、3、4からなるウイルス
- 系統2 RNA1、2、3からなるウイルス
- 系統3 RNA1、2、4からなるウイルス
- 系統4 RNA1、2からなるウイルス

電気泳動法により、これらのRNA成分を持つ病斑をそれぞれ100～300個切り取り、重量の10倍量の0.1Mリン酸緩衝液(pH7)を加え磨砕して調製した汁液を20日間無病条件で育苗したテンサイ幼苗の根にカーボランダムと共に塗り付けて汁液接種を行ない、各個体ごとに殺菌した石英砂を詰めた栽培用試験管(下部を細管状に絞り液抜き可能にしたもの)で4ヶ月間栽培した結果、各系統のウイルスの感染状況とそう根病の発病の状況は表1に示すとおりで、エライザ法(ELISA法、酵素結合抗体法)により感染を確認できた個体数は各系統とも極めて少なく、汁液接種によってはBNYVV系統のウイルスはテンサイに容易に感染しない。また、感染を認めた各系統の個体でそう根病の発病の病徴を認めたものは系統1および2であり、系統3および4には認められない。

これらのことから、系統3および4のウイルスはツルナ葉に対して弱毒であるばかりでなくテンサイに対しても弱毒である。

表 1

系統別	接種個体数	感染個体数	発病の有無
1	75	4	有
2	75	5	有
3	75	7	無
4	70	1	無

したがって、上記系統 3、4 のウイルスはBNYVの弱毒ウイルス株としてテンサイに感染させてそう根病の発病を抑制できうることを知るが、上記のように一般の弱毒ウイルスの感染手段として用いられる汁液接種では感染率が低いことから実用性に欠け、これら弱毒ウイルスの感染率を高めることが解決されなければならない。

そこで、前記したところのBNYVの媒介菌として知られるポリミキサ・ベタエの利用について検討した。

ポリミキサ・ベタエはテンサイ栽培畑の土壌でテンサイまたはフダンソウを栽培することによりその根部または土壌から容易に得ることができるが、このようにして得たポリミキサ・ベタエは、通常BNYVを保有していることが多く、また無毒のものを自然界から選択することは困難であるので、以下の人為的な方法で作出した。

ポリミキサ・ベタエに感染しているテンサイ細根1gに脱塩水100mlを加えて乳鉢で磨砕しガラスフィルター(3G)で夾雑物を除去し、適量の脱塩水を加え1000回転の低速で残っていた夾雑物を遠心分離した後3000回転で遠心分離して休眠孢子塊を集めた。この休眠孢子塊を予め殺菌した砂で栽培しているアカザ科のコアカザ(Chenopodium ficifolium)の根に1個体当たり1000~3000個で接種し40日間25℃の恒温室で栽培して休眠孢子塊の増殖をはかった後、休眠孢子塊を含む細根を上記同様に磨砕し、これをコアカザの根部に接種する要領の再接種を*

* 数回繰り返した後、これの脱塩水添加磨砕物を健全に栽培したテンサイ幼苗の根部に接種し20日間栽培した後、細根部にBNYVが存在しないことをエライザ法で確認し、ウイルスフリーのポリミキサ・ベタエを調製して供した。このウイルスフリーのポリミキサー・ベタエを保存し、コアカザで継代接種を行なうことにより維持、増殖する。

20 系統 3、4 の弱毒ウイルス株のそれぞれを前記の汁液接種の要領で無病のテンサイ幼苗の根部に接種して約1ヶ月養液栽培し、それぞれの根部に、上記で調製したウイルスフリーのポリミキサ・ベタエを接種し更に約2ヶ月間養液栽培して増殖を図り、顕微鏡で上記弱毒ウイルス株を保有したポリミキサ・ベタエの休眠孢子塊を多数含むことが確認された根部から上記の要領でこれを回収し、各休眠孢子塊を無病に育苗したテンサイの幼苗30個体当たり1個体1000~10,000個の範囲で接種し前記同様に殺菌した石英砂を詰めた前記試験管で40日間栽培して感染能力について調査したところ、表2の結果を得た。

表2に示すとおり、系統3の弱毒ウイルス株は100%の感染を示したのに対し、系統4の弱毒ウイルス株の感染率は低くウイルス濃度も系統3のおよそ1/20と低いもので、系統4の弱毒ウイルス株はポリミキサ・ベタエによって伝搬され難いことが知れた。

表 2

系統	接種数	感染数	感染率(%)
3	30	30	100
4	30	12	40

このことから、テンサイに対して病徴を示さないBNYVの弱毒株(系統3、4)のうち系統3、すなわちRNA組成がRNA1、2、4からなるBNYVの弱毒株がこの発明において利用できる最適の弱毒株であることが判明した。

上記ポリミキサ・ベタエの休眠孢子は上記BNYVの弱毒株を保有すれば、これをテンサイに感染させることが

できるが、休眠孢子中のBNYV弱毒ウイルスを顕微鏡による直接的な観察、あるいは、エライザ法の血清学的方法を用いても確認することができない。

このため、ウイルスフリーのポリミキサ・ベタエがBNYV弱毒ウイルスを獲得したか否かは、ポリミキサ・ベタエをテンサイに接種し、ポリミキサ・ベタエの増殖を

確認する共にBNYW弱毒ウイルスが増殖するか否かを確認することにより行なう。

また、BNYW弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエが、休眠胞子を含むテンサイ細根の搾汁液あるいは粉碎物をテンサイの根部に継代接種することで安定して維持、増殖できることが要求されるが、上記休眠胞子を含むテンサイ細根の搾汁液をツルナ葉に接種し形成する病斑の汁液について前記した要領で電気泳動法によりウイルスRNAを分離する手法で検定した結果、5世代の継代の接種を行なったところでは安定して保持されており、増殖していることが確認された。

また、上記休眠胞子を含むテンサイ細根を風乾して室内に2年間保存し、ポリミキサ・ベタエおよびBNYW弱毒ウイルスの感染力の低下を検討したが共に低下が認められなかった。それ以上の長期保存については、なお継続中である。

上記で最適と認めた系統3の弱毒ウイルス株は、ポリミキサ・ベタエによりテンサイに有効に伝搬させるものであるが、一般に、ある病原ウイルスの弱毒株は同種の病原ウイルスに対して干渉作用を持つことは知られているものの、これを利用した防除法はごく一部のウイルス病について知られているにすぎない。

しかし、多くのウイルスについて実験的にウイルス間で干渉作用は認められるものの、防除に利用できる例は少なく、これを用いた防除法を確立するためには、それぞれのウイルス病について実証しなければならない。

また、弱毒株にも干渉能に差があり実用的な観点に立*

表 3

	接 種 株 系統 3	*1 系統 1	発 病 *2	糖 量 (g)
試験区 1	+	+	±	36.7
試験区 2	—	+	+++	3.8
対照区 1	+	—	—	38.7
対照区 2	—	—	—	38.9

*1 + 接種、— 無接種

*2 + 有り、— なし、± 僅少

表3から、系統1の強毒ウイルス株のみを接種した試験区2には極めて強い発病が認められ、糖量も著しく減少したのに対し、強毒ウイルス株に先行して弱毒ウイルス株を接種した試験区1は、対照区1と2に全く発病を認めないのに対し、僅少の発病を認めたが、糖量においてはこの二者に比べてわずかの減少を見せるに過ぎず、試験区2が著しい発病および糖量減少をもたらした現象

* せば、優れた干渉能を持つものを供することが必要となる。

以上の観点から、以下において上記で最適とされたBNYW弱毒ウイルスの干渉作用について検討した。

前記系統3の弱毒ウイルス株を保毒したポリミキサ・ベタエの休眠胞子塊を多数含むテンサイ細根を調製し、同様に前記系統1の弱毒ウイルス株を保毒したポリミキサ・ベタエの休眠胞子塊を多数含むテンサイ細根を調製して、それぞれの休眠胞子塊を採取し、殺菌した砂で20日間健全に栽培したテンサイ幼苗1群を30個体として4群用意し第1、2群を試験区1、2とし、第3、4群を対照区1、2として試験区1と対照区1の個体根部にそれぞれ1個体当たり1000~10,000個の系統3の弱毒ウイルス株を保毒したポリミキサ・ベタエの休眠胞子塊を接種し、試験区2と対照区2には無接種で、各群の個体を別々に用意した石英砂を充填した前記試験管に移植して36日間養液栽培した。

試験区1と対照区1の各個体についてはエライザ法でウイルスの感染を確認し、また試験区2と対照区2については同様にウイルスが感染していないことを確認した後、試験区1と試験区2の個体根部にそれぞれ1個体当たり1000個の上記系統1の強毒ウイルス株を保毒したポリミキサ・ベタエの休眠胞子を接種し対照区1と2には無接種で各群の個体を別に用意した殺菌土を詰めた素焼き鉢に移植して4ヶ月間栽培した結果、系統3の弱毒ウイルスの干渉作用について表3の成績を得た。

に鑑みれば、系統3の弱毒ウイルス株の先行接種により強毒ウイルス株によるそう根病の発病が十分に抑制されたと認めることができ、系統3の弱毒ウイルス株は明らかに強毒ウイルスに対して干渉作用を有する株である。

以上の各試験により、系統3の弱毒ウイルス株、すなわちRNA成分がRNA1、および4からなるBNYWの弱毒株はそう根病の防除に作用できる有用な特性を有する弱毒ウ

イルスで、この発明によるBNYVV弱毒ウイルスである。

そして、このBNYVV弱毒ウイルスは、そう根病罹病のテンサイ個体、あるいは、栽培土壌から単独で分離されることのないウイルス株であり、人為的に作出されるところに特徴を有するものである。

この発明の上記BNYVV弱毒ウイルスは以上の説明で明らかなように、そう根病の病徴を発現するテンサイ根部の汁液をツルナ葉に接種して形成する病斑により、電気泳動法によりBNYVVの4個のRNA成分のうちRNA1、RNA2およびRNA4のみを有する病斑を選別し、この病斑の汁液を採取することにより容易に作出でき、このBNYVV弱毒ウイルスをテンサイ根部を用いウイルスフリーのポリミキサ・ベタエに保毒せしめてポリミキサ・ベタエの休眠胞子を形成させることにより、強毒BNYVVに対して干渉作用のある弱毒BNYVVによるそう根病の防除剤を製造でき、これによって製造されたBNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエの休眠胞子は、BNYVV弱毒ウイルスを有効成分としてそう根病を効果的に防除する有用な防除剤である。

上記防除剤によるそう根病の防除は、有効成分であるBNYVV弱毒ウイルスを確実に、BNYVVがテンサイに感染する以前に感染させることが必須要件であり、これを怠るときは、防除は保証されない。

このような必須要件を満足する除去は、テンサイの育苗に育苗移植用紙筒を採用することにより確実に、そして効果的になされ、これの実際的な方法は、適当に選択した育苗移植用の紙筒に充填して無病の培土に上記防除剤を加え、この中でテンサイを育苗することにより、育苗時にテンサイに上記のBNYVV弱毒ウイルスを確実に感染せしめて後、これを圃場に定植するものである。

このような方法により、定植後において強毒BNYVVの感染があっても、定植したテンサイにはこれ以前にBNYVV弱毒ウイルスが確実に感染しているので、強毒のBNYVVに対し干渉して発病に至ることがなく、その後の成育を順調としてそう根病の被害を被ることがない。

この場合、BNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエをテンサイに接種する時期は、テンサイの播種後20～40日目の最も感受性の高い時期が最も好ましい。

一方、上記のように育苗移植用紙筒を用いないでテンサイを畑に直に播種して栽培する直播栽培の場合には、上記防除剤を畑土に直接混合しなければならず、防除剤を莫大に要するばかりでなく、そのうえ、BNYVV弱毒ウイルス畑土中に存在する強毒BNYVVよりも作にテンサイに確実に感染するという保証がなく、上記この発明によるそう根病の防除方法の必須条件であるところのBNYVV弱毒ウイルスを確実に、BNYVVがテンサイに感染する以前に感染させるという基本的な技術を全うできない。

この発明においては、そう根病の防除に、BNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ及び/又はその休眠胞子を用いるが、これに限らずこの休眠胞子を含む

テンサイ根部の細根、あるいはこの細根の粉碎物等の加工物を用いることもできる。

このように、ポリミキサ・ベタエに保毒したBNYVV弱毒ウイルスあるいは、これを含む細根またはその加工物は、その根病の防除剤の有効成分として用いて有効に機能し、この場合、育苗移植用紙筒によるテンサイの育苗、移植を組み合わせることによってのみ、この防除法が完成する。

以下実施例によりこの発明の態様をより具体的に説明するが、これによりこの発明が制限されるものではない。

〔実施例〕

実施例1:BNYVV弱毒ウイルスの作出

北海道内の20地域のテンサイ畑から採取した土壌にテンサイを播種し、2ヶ月栽培した後、その細根を0.5gとり、これに0.1Mリン酸緩衝液(pH7)50mlを加えてよく磨砕した後、ツルナ葉の表面に、この磨砕物をガーゼにつけて微細カーボランダム(400～600メッシュ)と共に塗り付け、温室(20～30℃)で1ヶ月生育した。接種後2週間経過したときに肉眼で十分識別できる形態の異なる病斑を形成した。

それぞれ形態の異なった病斑から径が5mm前後の切片50個を切り取り、これら各単病斑に生重量の100倍量の上記緩衝液を加えて磨砕し、上記要領でツルナ葉に接種し、以下各単病斑についてこの操作を5回反復し、病斑形態の安定した黄色えそ病斑3株、黄色病斑8株、淡黄化病斑15株、不明瞭な退緑病斑25株の4種類の単病斑を得た。

上記不明瞭な退緑病斑25株を切り取り、生重量の10～20倍量の上記緩衝液を加えて磨砕し上記要領でツルナ葉に接種して葉全体に発病させ形成した病斑からそれぞれ1部5gを切り取りこれを接種源とし、残部を凍結保存(-80℃)して、上記要領によるツルナ葉に接種する継代接種とこの病斑の搾汁についての前記電気泳動法によるRNA解析を繰り返し、RNA組成の安定したRNA1、RNA2からなるウイルス22株、RNA1、RNA2、RNA4からなるウイルス3株を得た。

このRNA1、RNA2、RNA4をRNA成分とするウイルス起源の凍結保存病斑から汁液を採取し、これについて上記同様の電気泳動法によるRNA解析を行なったところRNA1、RNA2、RNA4のみを分離したことからこのツルナ葉汁液中には、この発明のBNYVV弱毒ウイルスが明らかに存在している。

実施例2:防除剤の生産

予め殺菌した石英砂で20日間育苗した健全なテンサイ幼苗30個体の根部に、実施例1で得たRNA1、RNA2、RNA4をRNA成分とするウイルス起源の凍結保存病斑生重1g量に0.1Mリン酸緩衝液(pH7)10mlを加えて磨砕した磨砕物を実施例1の要領により接種し、殺菌砂を充填した径24cm、高さ120mmの栽培用試験管にそれぞれ移し、窒素

濃度を通常の1/2としたホークランド・アーノン (Hoagland & Arnon) 氏培養液を用いて25 の恒温室で40日間栽培し、細根の一部を取り前記したエライザ法でウイルスの感染を確認し、十分な感染を認めた個体5個を取り出し水洗後、別に調製したウイルスフリーのポリミキサ・ベタエを1個体当たり1000～10,000個接種して感染させ、上記試験管に移し、さらに40日間栽培した。これらの細根を採取し休眠胞子の形成を調べたところ1個体約0.5g(生重)から30万個の休眠胞子塊を得た。

なお、このようにして得たウイルス保毒ポリミキサ・ベタエについて、当該微生物の寄託は、ウイルスを含むため受託拒否の微生物を該当するとの理由で、その寄託は微生物工業技術研究所から認められなかった。

実施例3:防除剤の大量生産

礫による養液栽培でテンサイ(品種モノエース)を播種し、播種後20日目に実施例2で得た休眠胞子を1個体当たり1000～10,000個接種し、実施例2で用いたホークランド・アーノン氏の培養液1ℓ当たり炭酸カルシウム*

表 4

試験別	ウイルス*1 感染率(%)	発病率 (%)	葉 重 g / 個	根 重 g / 個	根中糖分 (%)
試験区	100	0	1500	800	13.2
対照区	100	60	410	293	8.7

*1 エライザ法による判定

【効 果】

この発明によれば、そう根病を発現するBNYVVからツルナ葉への汁液接種と電気泳動法によるウイルスRNA解析を組み合わせることにより容易にBNYVVに対して干渉作用を有するBNYVV弱毒ウイルスを得ることができ、さらに得られたBNYVV弱毒ウイルスをウイルスフリーのポリミキサ・ベタエに保毒せしめることにより大量の増殖と長期保存を可能とし、そのうえ、テンサイへの感染を完全とすることができる。

さらに、防除にあたっては育苗移植用紙筒を用い健全な培土に上記BNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエを混合する手法により使用量を合理的にして、確実に、テンサイがBNYVVに感染する以前の発芽苗へBNY

* 3gを添加した溶液を培養液として循環し、40日間栽培した後、各個体から細根3～5g(生重)を採取し、実施例2と同様にして1個体の細根当たりおよそ1千万個の休眠胞子塊を得た。

実施例4:防除試験

径19mm、長さ13cmの六角柱状の育苗移植用紙筒1040本を1群520本として2群に分け、一方の群520本にそう根病に汚染していない土を培土として詰め(対照区)、他方の群520個には、実施例3で得た休眠胞子を感染させて別に栽培したテンサイ3個体の根部から採取した細根15gを風乾した後、粗砕きした粗砕物を上記そう根病に汚染していない土1kgに対し0.086gの割合で混合した培土を詰め(試験区)、試験区、対照区それぞれの紙筒にテンサイ(品種モノエース)を1個宛播種し常法により40日間育苗して得た紙筒苗(紙筒を着けたままの苗)をそう根病に汚染した土壌に移植し、6ヶ月間栽培した後生育状態を調査した。その結果を表4に示す。

4

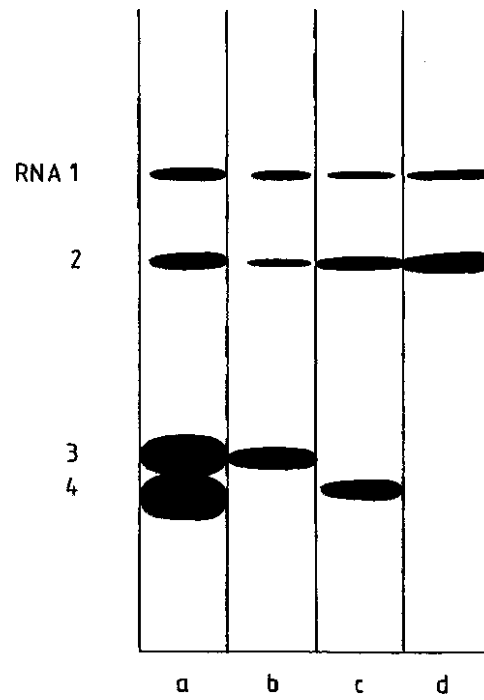
30 VV弱毒ウイルスを感染させ、かつ感染効率を高めることができ、このようなBNYVV弱毒ウイルスの感染が十分な紙筒苗を移植すると、BNYVV弱毒ウイルスの干渉作用により、移植後のBNYVVの感染により発病するであろうそう根病が抑制されるので、従来は作付け中止を余儀なくされた圃場におけるテンサイの栽培を可能とし、常時製糖原料に適合するテンサイをもたらすので、極めて有益である。

【図面の簡単な説明】

第1図はBNYVVをツルナ葉に接種して形成した各病斑の有するウイルスの電気泳動パターンを示す。

a系統1のウイルス、b系統2のウイルス
c系統3ウイルス、d系統4のウイルス

【第 1 図】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

//(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:12)

(56)参考文献 J . G e n . V i r o l . 70 (1989)
p . 3391 - 3398

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶ , D B 名)

C12N 15/09

A01N 63/00

C12N 7/04

C12N 1/21

A01H 5/00

B I O S I S (D I A L O G)

W P I L (D I A L O G)