

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3206767号
(P3206767)

(45)発行日 平成13年9月10日(2001.9.10)

(24)登録日 平成13年7月6日(2001.7.6)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 N 7/04

C 1 2 N 7/04

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

C 1 2 R 1:12)

C 1 2 R 1:12)

請求項の数7(全10頁)

(21)出願番号

特願平4-69369

(22)出願日

平成4年2月20日(1992.2.20)

(65)公開番号

特開平6-14770

(43)公開日

平成6年1月25日(1994.1.25)

審査請求日

平成7年11月10日(1995.11.10)

審判番号

平11-10790

審判請求日

平成11年7月7日(1999.7.7)

(73)特許権者 591245772

北海道

北海道札幌市中央区北3条西6丁目

(73)特許権者 000231981

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

(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

(74)代理人

100075775

弁理士 戸田 親男

合議体

審判長 徳廣 正道

審判官 田村 明照

審判官 田中 久直

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 欠失RNA遺伝子を用いたBNYVV弱毒ウイルスの作出とその利用

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 テンサイえそ性葉脈黄化ウイルス(Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV)のRNA成分の内、RNA-3が、その塩基配列の一部を欠失してなる欠失遺伝子、即ち、RNA-3の全塩基数1775上にあるそう根病の病徴発現に關与する蛋白質をコードする447番目から1106番目の660塩基のおよそ半数である欠失遺伝子RNA-3cであることを特徴とするBNYVV弱毒ウイルス。

【請求項2】 BNYVVを含む汁液のツルナによる単一病斑分離により得る淡黄色病斑の汁液をさらに淡黄色が退緑色に変化するまで単一病斑分離を反復してBNYVVのRNA成分RNA-3の塩基配列の一部を欠失した欠失遺伝子RNA-3cをRNA成分として含む、RNA成分がRNA-1、RNA-2およびRNA-3c

2

のウイルスを含む病斑の汁液を得、これにRNA成分がRNA-1、RNA-2およびRNA-4のウイルスを含むツルナ病斑の汁液を等量混合し、この混合汁液をツルナに接種し、増殖することによりRNA成分がRNA-1、RNA-2、RNA-3cおよびRNA-4のウイルスを得ること、を特徴とする請求項1に記載のBNYVV弱毒ウイルスの作出方法。

【請求項3】 育苗移植用紙筒に充填した無病の培土に請求項1に記載のBNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ(Polymyxa betae)の休眠胞子を含むテンサイ細根またはテンサイ細根加工物を加えることによりそう根病の防除を行う事、を特徴とする請求項1に記載のBNYVV弱毒ウイルスの使用法。

【請求項4】 請求項1に記載のBNYVV弱毒ウイルスを保毒させてなるポリミキサ・ベタエ(Polymyxa bet

ae)。

【請求項 5】 請求項 1 に記載の B N Y V V 弱毒ウイルスを保毒させてなるポリミキサ・ベタエ (Polymyxa betae) に保毒させてなる請求項 1 に記載の 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 6】 請求項 5 に記載の防除剤で処理した土壌で育苗すること、を特徴とするそう根病の発病が抑制された苗を製造する方法。

【請求項 7】 請求項 5 に記載の防除剤で処理することにより、該 B N Y V V 弱毒ウイルスを感染せしめた苗。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、砂糖の製造原料として知られる甜菜（以下「テンサイ」という。）の難病の一であ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) によって発病するそう根病の防除に有効な、B N Y V V に対する干渉力を改善した B N Y V V 弱毒ウイルスとその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】甜菜糖 (beet sugar) の原料として知られているテンサイの栽培において、根部に原因不明の奇病が日本においても発生し、この発明者の一人である神沢等が、この奇病に未知のウイルスが関与することを突き止め、これを「そう根病」と命名とした（神沢、宇井：日植病報．，38，434-435（1972））。

【0003】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, B N Y V V)」と命名した（玉田、馬場：Ann. Phytopath. Soc. Japan.，39，325-532（1973））。その後の研究により、B N Y V V 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 7.1 kb、4.8 kb、1.85 kb、1.5 kb であることが明らかになっている。（Richard et al: Journal of General Virology.，66，345-350（1985））。

【0004】テンサイがこの植物ウイルス病に罹ると、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、製糖原料としての使用を不可能とする等の大きな被害をもたらす、土壌菌に感染して伝搬する性質の

ものであるため一旦土壌がそう根病に汚染すると病原ウイルスが長期にわたって残存しテンサイの栽培を不可能にする。

【0005】この発明者らは先に上記 B N Y V V に干渉能を有する弱毒ウイルスとして、B N Y V V の有する 4 種の RNA 成分、RNA - 1、- 2、- 3、および - 4 のうち RNA - 3 を脱落した RNA - 1、- 2、- 4 を RNA 成分とする弱毒ウイルスの作出に成功し、この弱毒ウイルスによるワクチン的なそう根病の防除技術を確立し、これらの技術を提案した（特開平 3 - 277273 号、以下「先行出願」という。）。

【0006】弱毒ウイルスによるウイルス病の防除はテンサイ以外の一般の植物のウイルス病についても従来から種々提案されていて、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 (T M V - 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 (L₁₁ A、L₁₁ A₂₃₇) を利用するもの（北農誌彙報．，99，67-76（1971））、カラタチ台ハッサク萎黄病に対して無病徴樹より分離したカンキツトリステザウイルス (C T V) の弱毒株 (H M - 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 (C G M M V) に対して亜硝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 (S H₃₃ b) 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 (C M V) にサテライト RNA を組み込むことにより作出した、例えば (C M V - P (No. 2) + C M V - P F (1)) を利用するもの（特開昭 61 - 177985 号公報、日植病報．，51，238-242（1985））などがある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】そう根病の防除に使用する弱毒ウイルスの特性としてそう根病を発病する強毒 B N Y V V に対し干渉能が可能な限り高く、強毒 B N Y V V の感染、増殖を強く抑制することが要求される。

【0008】この発明者らが先行出願にて提案した B N Y V V の弱毒ウイルスは、強毒 B N Y V V に対して干渉作用を有し、テンサイのそう根病の防除に有効な弱毒ウイルスであるが、その後の研究においてテンサイ根部への感染力が強毒 B N Y V V に比べて若干劣る場合のあることが新たに判明し、感染力の高い強毒ウイルスの毒性を抑制するためには、常時感染力の十分な B N Y V V の弱毒ウイルスを接種する必要がある、実用面でなお解決されなければならない課題を残す。

【0009】また、一般の植物ウイルス病の防除方法として知られる一般の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 C M V 弱毒ウイルスおよび弱毒

株 L₁₁ A 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。

【0010】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、紫外線処理による弱毒株の作出も利用できず、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を利用する方法も適用できない。

【0011】これら従来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、BNYVV は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も利用できない。

【0012】

【課題を解決するための手段】この発明者らは上記事情に鑑み、強毒 BNYVV であるか、BNYVV 弱毒ウイルスであるかは他の RNA 成分を同じとし RNA - 3 を有するか否かに依存する事実に注目し、RNA - 3 が毒性発現機能の他に感染能にも関与するとの想定のもとに、RNA - 3 を脱落させることなく、強毒 BNYVV に対する干渉能がより高く、かつ感染力が安定して高い、BNYVV の弱毒ウイルスを作出するべく鋭意研究を進めた結果この発明に到達したもので、この発明に係る改善された BNYVV の弱毒ウイルスは、(1) テンサイえそ性葉脈黄化ウイルス (Beet necrotic yellow vein virus、BNYVV) の RNA 成分、RNA - 3 の塩基配列の一部を欠失した欠失遺伝子 RNA - 3c を RNA 成分として含む、RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2、RNA - 3c および RNA - 4 であることを特徴とするものであり、また (2) RNA - 3 の塩基配列の一部の欠失が、全塩基数 1775 上にあるそう根病の病徴発現に関与する蛋白質をコードする 447 番目から 1106 番目の 660 塩基の領域に含まれる欠失遺伝子 RNA - 3c であることを特徴とし、さらに (3) RNA - 3 の塩基配列の一部の欠失が全塩基数 1775 上にあるそう根病の病徴発現に関与する蛋白質をコードする 447 番目から 1106 番目の 660 塩基のおよそ半数である欠失遺伝子 RNA - 3c であることを特徴とするものであり、そのうえ、(4) この発明の BNYVV 弱毒ウイルスの作出は、BNYVV を含む汁液のツルナによる単一病斑分離により

得る淡黄色病斑の汁液をさらに淡黄色が退緑色に変化するまで単一病斑分離を反復して BNYVV の RNA 成分 RNA - 3 の塩基配列の一部を欠失した欠失遺伝子 RNA - 3c を RNA 成分として含む、RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 3c のウイルスを含む病斑の汁液を得、これに RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 4 のウイルスを含むツルナ病斑の汁液を等量混合し、この混合汁液をツルナに接種し、増殖することにより RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2、RNA - 3c および RNA - 4 のウイルスを得ることを特徴とするものであり、そして (5) この発明の BNYVV 弱毒ウイルスのそう根病の防除への利用は、育苗移植用紙筒に充填した無病の培土に BNYVV 弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ (Polymyx a beta e) の休眠孢子またはこの休眠孢子を含むテンサイ細根あるいはテンサイ細根加工物を加えることを特徴とするものである。

【0013】また本発明は、上記した BNYVV 弱毒ウイルスを保毒させてなるポリミキサ・ベタエ (Polymyx a beta e) 自体、及び、それに保毒させてなる BNYVV 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、BNYVV ウイルスに起因する植物ウイルス病、特にそう根病防除剤にも関するものである。

【0014】かように、この発明は、病原 BNYVV に対する干渉力とテンサイへの感染能の改善された BNYVV 弱毒ウイルスをそう根病の防除に用いて、より効果的なそう根病の防除を可能としたものである。

【0015】以下、この発明について更に詳細に説明する。

【0016】そう根病に感染したテンサイ根の汁液 (病原 BNYVV を含む) をツルナ葉部に接種すると、ウイルス RNA 成分の異なる複数の病斑が形成する。この複数の病斑を摘出しそれぞれの病斑から得た汁液を再度ツルナ葉部に接種する手法 (単一病斑分離という) を反復していくと、ウイルス RNA 成分の異なる 4 種の病斑を安定的に得るに至る。下記する表 1 に、この病斑の種類と、これに対応する RNA 成分 (電気泳動法 (図 1) による) および便宜的に付けたウイルス系統を示す。

【0017】

【表 1】

病斑の種類

RNA成分とウイルス系統

a) 黄色病斑	RNA - 1, - 2, - 3, - 4系統 1
b) 淡黄色病斑	RNA - 1, - 2, - 3,系統 2
c) 退緑病斑	RNA - 1, - 2, - 4,系統 3
d) 不明瞭な退緑病斑	RNA - 1, - 2,系統 4

【0018】この発明者らが先行出願で提案したBNYVV弱毒ウイルスは、ツルナによる単一病斑分離により得た、RNA成分がRNA - 1、- 2、- 4のウイルス（系統3）で、ツルナという植物体の機能、換言すれば自然界の機能を利用して、BNYVVが有する本来のRNA成分からRNA - 3を脱落させて異なるRNA成分のウイルス株を人為的に作出したことを特徴とするものである。

【0019】この発明の改善されたBNYVV弱毒ウイルスも自然界の機能を利用する点においては先行出願と軌を一とするが、この発明は、特にこれに遺伝子解析の手段を加味することにより作出したことに於いて大きな意義がある。

【0020】この発明者らは、前記従来技術の課題の項において挙げた、先行出願のBNYVV弱毒ウイルスのテンサイ根部への感染力が強毒BNYVVに比べて若干劣る要因がRNA - 3の脱落に関係があるとの想定のもとに、RNA - 3を脱落させることなくRNA - 3を存在させた状態で弱毒化できないものかについて検討した。

【0021】このために、上記ツルナによる単一病斑分離の反復により安定的に形成した4種の病斑、すなわちa) 黄色病斑、b) 淡黄色病斑、c) 退緑病斑およびd) 不明瞭な退緑病斑から、RNA成分にRNA - 3を含むウイルスとして、RNA - 1、- 2、- 3の系統2のウイルスを含むb) 淡黄色病斑を選定し、この病斑が更に単一病斑分離を数ないし十数回反復すると意外にも一時は安定していた黄色病斑の一部の病斑が退色することを見つけ、最終的にもはや変わることはない、退緑色の病斑を形成することをはじめて知ったのである。

【0022】このような単一病斑の更なる反復は先行出願の時点では全く考慮が及ばなかったことで、かかる病斑の二次的な変色現象もまた全く予測できなかったものであり、更にまた、このような変色現象をメルクマールとしてウイルスのスクリーニングが可能となることも従来全く知られていなかったことであり、本発明をもって最初とするものである。

【0023】この病斑色の二次的な変色は含まれるRNAのいずれかに何等かの変化を生じ、特に最終色相が退緑色となったことから、この色相はRNA成分がRNA

- 1、- 2、- 4のRNA - 3を含まない系統3のウイルスに対応するc) 退緑病斑に類似し、RNA - 3に変化が生じたことを示唆するもので、かかる病斑変化の究明のためオリジナルのRNA - 3と変色した病斑中のRNA - 3の遺伝子工学的解析を試みた。

【0024】オリジナルのRNA - 3として、RNA成分がRNA - 1、- 2、- 3である強毒BNYVVに感染したテンサイから採取した汁液を先行出願に記載の手法でウイルスの純化、ウイルスRNAの抽出、RNAの電気泳動処理して得た泳動支持体上に分離したRNA - 3のバンド（図1）から抽出したRNA - 3を用い、サンガーらの手法（Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1977）により全塩基の解析を行なったところ、図2の模式図的な遺伝子地図に示すように、オリジナルRNA - 3は1775塩基から成り、447番目～1106番目の660塩基が分子量2万5千ダルトンの蛋白質をコードし、この蛋白質の発現がそう根病の病徴発現に係っていることを突き止めることができた。

【0025】この解析の結果を踏まえ、上記退緑色病斑を示す変異株について上記同様にウイルスの純化、ウイルスRNAの抽出をし、ここで得たウイルスRNAをアガロースゲルを支持体とする電気泳動にかけたところ、図1のEに示すようなRNAの分離パターンを示し、RNA - 1、- 2のバンドの位置はオリジナルのRNA - 1、- 2のバンド位置に一致し、これら2種のRNAには変化のないことを示すが、RNA - 3のバンドの位置はオリジナルのRNA - 3のバンドの位置する若干下方でRNA - 4のバンドに近接して現われ、分子量の減少が認められた。

【0026】そこで、この分子量の減少位置に現われたバンドから抽出したRNAについて、前記オリジナルのRNA - 3の全塩基配列の全長cDNAを制限酵素処理して得た断片をプローブとしたノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーション（Northern blotting hybridization）の手法（Thomas, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205, 1980）に

より欠失部位を調べたところ、図 2 に示すようにオリジナルの RNA - 3 の塩基配列全長の内部領域が欠失していることが判明し、さらに塩基配列の解析により、欠失領域を特定したところオリジナルの RNA - 3 の全塩基配列全長の 7 2 8 番目から 1 0 9 0 番目の領域に当たる 3 6 3 塩基を欠失していることが知られた。

【0 0 2 7】この 7 2 8 番目から 1 0 9 0 番目の領域は、オリジナルの RNA - 3 の病徴発現に係る蛋白質をコードする塩基領域 4 4 7 番目 ~ 1 1 0 6 番目に含まれ、欠失した 3 6 3 塩基は蛋白質をコードする 6 6 0 塩基のおよそ半数に相当する。

【0 0 2 8】かかる蛋白質をコードする塩基領域の一部の欠失が、病斑の退色方向への変色現象となって現われたと判断するに至り、かかる現象はこの発明を通して初めて知り得たことで、この二次的な病斑の変色をメルクマールとすることにより、上記欠失 RNA 遺伝子を RNA 成分として含むウイルス変異株の選別採取を容易にすることができたものである。

【0 0 2 9】上記解析の結果から、ツルナ葉上での単一病斑分離により安定的に形成する RNA - 1、- 2、- 3 を RNA 成分とする淡黄色病斑を更にツルナ葉で反復接種を繰り返して得られた退緑色に変化した病斑には、RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 3 の塩基の一部が欠失した欠失 RNA 遺伝子（これを「RNA - 3 c」という。）を RNA 成分とするウイルスが存在することが明らかになった。

【0 0 3 0】かようにして、この退緑色に変化した病斑から上記欠失 RNA 遺伝子 RNA 3 c を含む、RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 3 c（図 1 の E）のウイルスを含む汁液を得、これに RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 4（図 1 の C、先行出願）からなるウイルスを含む上記退緑病斑の汁液を等量混合し、この混合汁液をツルナに接種し、増殖をはかり、ツルナ葉上に形成した病斑を採取し、この汁液に含まれるウイルス RNA について上記同様に電気泳動法による分離を行なった結果は図 1 の F に示すとおりで RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 3 c（図 1 の E）のウイルスと、RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 4（図 1 の C）のウイルスに示す分離パターンを合成したパターンとなって現わ

れ、このように RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 3 c のウイルスを含む汁液を得、これに RNA 成分が RNA - 1、RNA - 2 および RNA - 4 からなるウイルスを含む上記退緑病斑の汁液を等量混合し、この混合汁液をツルナに接種し、増殖をはかる手法で RNA 成分を RNA - 1、RNA - 2、RNA - 3 c および RNA - 4（図 1 の F）とする新規のウイルスを得ることが可能となったので、更に、このウイルスにそう根病の防除に適合する効果的な、強毒 BNYVV に対する干渉能と感染能が期待できるかにつき検討した。

【0 0 3 1】殺菌石英砂を詰めた栽培用試験管で 2 ヶ月間育苗した 1 群 1 0 個体 3 群のベータ・マクロカルパ（Beta macrocarpa、テンサイ野生種の 1 種で BNYVV に全身感染する）の葉に、電気泳動法により RNA 成分がそれぞれ RNA - 1、- 2、- 4（先行出願の弱毒ウイルス）、RNA - 1、- 2、- 3 c、- 4（この発明による上記弱毒ウイルス）および RNA - 1、- 2、- 3、- 4（強毒ウイルス）と特定されたツルナ葉上に形成した各病斑のそれぞれ約 1 g を重量の 1 0 倍量の 0 . 1 M リン酸緩衝液（pH 7）を加えて磨砕調製した汁液を接種し、同時に各群のベータ・マクロカルパの根部にウイルス・フリーのポリミキサ・ベタエ（先行出願の保存菌）を接種して 2 ヶ月間養液栽培して増殖を図り、上記 3 群のベータ・マクロカルパ根部がそれぞれ接種したウイルス（エライザ法による）およびポリミキサ・ベタエの休眠孢子塊（顕微鏡）を多数含むことを確認した。これら各根部 1 g 宛を採取しその 5 0 倍量の蒸留水を加えて磨砕調製した汁液を、別に用意した殺菌石英砂を詰めた 1 群 2 0 本の上記と同じ栽培用試験管の 3 群のそれぞれに独立して 1 m l 宛加え、これにテンサイ（品種スターヒル；そう根病罹病性品種）を播種し、2 5 の恒温室（グロースキャビネット）で 4 0 日間育苗した。

【0 0 3 2】この 4 0 日育成苗の細根の各ウイルス濃度を測定した結果は下記の表 2 に示す如くで、平均濃度で、この発明の弱毒ウイルスが先行出願の弱毒ウイルスの 4 倍で、強毒ウイルスの 9 0 % に達する値を示し、顕著な感染能の改善が認められた。

【0 0 3 3】

【表 2】

ウイルスの種類 (RNA成分)	細根のウイルス濃度 (平均) (μ / g)
先行出願の弱毒ウイルス (RNA-1、-2、-4)	85
この発明の弱毒ウイルス (RNA-1、-2、-3c、-4)	245
強毒BNYVV (RNA-1、-2、-3、-4)	280

【0034】上記のように、この発明の弱毒ウイルスの感染能が顕著に改善されたことが明らかになったことにより、次に強毒BNYVVに対する干渉能について検討した。

【0035】殺菌石英砂を詰めた1群20本の上記と同じ栽培用試験管の3群を用意し、その1群に先行出願の弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエの休眠孢子塊の多数を含むテンサイ根部の磨砕汁液を添加し、他の1群にはこの発明の弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエの休眠孢子塊の多数を含むテンサイ根部の磨砕汁液を添加し、残りの1群には何も添加しないで、これらの3群の栽培用試験管にテンサイ（品種スターヒル；そう根病罹病品種）を播種し、25℃の恒温室（グロースキャビネット）内で40日間育苗した3群の育成苗のそれぞれ各10本をそう根病に汚染した圃場に定植して*

* 3ヶ月間栽培した後収穫し、各群のテンサイ主根部から採取した汁液について前記のcDNAの断片をプローブとするRNAの判別検定によりRNAの主根への移行の有無を調査した結果、および収穫したテンサイの性状は下記の表3に示すとおりで、先行出願の弱毒ウイルス接種群からは全個数にRNA-3が検出されたのに対し、この発明の弱毒ウイルス接種群からはRNA-3は検出されず、無接種群からも全個数にRNA-3が検出された。したがって、先行出願の弱毒ウイルスはRNA-3を脱落するので強毒BNYVVに対して干渉能が十分であればRNA-3が検出されることはないが、この結果から、干渉能が不十分であることが認められた。

【0036】

【表3】

ウイルスの接種別	検出RNA		テンサイの性状 (平均)		
	RNA-3	RNA-3c	根重(g)	糖分(%)	糖量(g)
先行出願の弱毒ウイルス*1	4/4	0/4	80.7	11.9	9.6
この発明の弱毒ウイルス	0/10	8/10	195.9	12.3	24.1
無接種*2	4/4	0/4	69.3	9.9	6.9

検出RNA；分母は群の個体数、分子は検出個体数を示す。

*1、*2；そう根病による腐敗、枯死のため調査可能な個体のみ用いた。

【0037】RNA-3cについては、先行出願の弱毒ウイルス接種群および無接種群からは検出されず、この発明の弱毒ウイルス接種群からは80%の個体から検出されたことから、この発明の弱毒ウイルスの生体内増殖が旺盛で、高濃度に存在することが認められ、この結果、この発明の弱毒ウイルスの干渉能の改善は顕著で、強毒BNYVVの毒性の発現をほぼ完全に抑制し、これによりテンサイの性状においても上記表3に見られるように、この発明の弱毒ウイルス接種群が他に比して高品質となることが認められる。

【0038】以上の感染能、干渉能の検討結果より、次のことが確認された。つまり、RNA成分をRNA-1、-2、-3cおよび-4（図1のF）とするこの発明の弱毒ウイルスは、テンサイのそう根病の防除に適合する、より性能の改善されたBNYVVの弱毒ウイルス株である。

【0039】また、BNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエが、休眠孢子を含むテンサイ細根の粉碎物あるいは感染した細根より採取した遊走子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、継代接種を継続している現在においても安定して保持されており、増殖されている。

【0040】また、上記この発明のBNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエ休眠胞子を含むテンサイ細根を風乾して室内に長期保存した場合について、ポリミキサ・ベタエおよびBNYVV弱毒ウイルスの感

10 染力の低下を検討したが共に低下が認められなかった。
【0041】以上のことから、この発明のBNYVV弱毒ウイルスはそう根病の防除に利用できる有用な特性を有する弱毒ウイルスで、この弱毒ウイルスは、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。

【0042】この発明の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より、電気泳動法によりRNA成分がRNA-1、-2および-3であることが特定された淡黄色病斑を選別し、この病斑について更にツルナ葉による単一病斑分離を淡黄色病斑が退緑色病斑に変色するまで反復し、ここに形成した退緑色病斑について電気泳動法でRNA成分がRNA-1、-2、および-3であると特定できた病斑の汁液を採取することにより、RNA成分がRNA-1、-2、および-3のウイルスの変異株を得、さらにこのウイルスに上記の要領でRNA-4を加えたRNA-1、-2、-3および-4をRNA成分とするBNYVV弱毒ウイルスを作出し、これをベータ・マクロカルパを用いて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、これを礫栽培の健全なテンサイに接種して増殖させ、大量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BNYVV弱毒ウイルス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たそう根病を効果的に防除する有用な防除剤である。

【0043】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。

【0044】このような必須要件を満足する防除は、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た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。

【0045】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、その後の生育は順調で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10～30日目の最も感受性の高い時期が最も好ましい。

【0046】一方、上記のように育苗移植用紙筒を用い15 ないでテンサイを畑に直接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弱毒ウイルスが畑土中に存在する強毒BNYVVよりも先にテンサイに確実に感染するという保証がなく、弱毒ウイルスによるそう根病の防除の必須要件である、弱毒ウイルスをBNYVVがテンサイに感染する以前に確実に感染させるという基本的な技術を全うすることができない。

【0047】この発明のBNYVV弱毒ウイルスのそう根病の防除への利用にあっては、BNYVV弱毒ウイルスを保毒したポリミキサ・ベタエの休眠胞子を用いるが、これに限らず、実用的には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。

【0048】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、そう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、BNYVV弱毒ウイルスによるそう根病の防除が完成する。

【0049】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。

【0050】[実施例1：BNYVV弱毒ウイルスの作出]北海道斜里町のテンサイ畑から採取した土壌にテンサイ(品種モノエース；そう根病罹病品種)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複数の病斑を形成した。

【0051】上記で形成した複数の病斑からそれぞれ径が5mm前後の切片15個を切り取り、これら各病斑に

重量の 1 0 0 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する単一病斑分離を反復し、病斑形態の安定した黄色病斑 1 0 株、淡黄色病斑 1 0 株、退緑病斑 1 0 株、不明瞭な退緑病斑 1 0 株の 4 種類の病斑を得た。

【 0 0 5 2 】上記淡黄色病斑 1 0 株から病斑を切り取り、重量の 1 0 ~ 2 0 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形成した病斑 1 0 g を切り取り、その 1 部を RNA 解析に供し、残部を凍結保存 (- 8 0) した。

【 0 0 5 3 】上記 1 部の病斑を前記同様に処理して、電気泳動法による RNA 分離を行なった結果、RNA 成分が RNA - 1、- 2 および - 3 であった。

【 0 0 5 4 】上記淡黄色病斑 1 0 株から単一病斑を各々 1 0 個宛選び、さらに 5 回ツルナ葉による単一病斑分離を反復したところ 1 病斑が淡黄色から退緑色に変化していることを認めた。

【 0 0 5 5 】この退緑色に変化した病斑について、上記同様に処理して電気泳動法による RNA 解析を行なったところ、正常 (オリジナル) の淡黄色病斑を示す RNA - 3 はサイズが 1 . 8 k b であるのに対して、退緑色病斑の RNA - 3 は 1 . 5 k b であり、さらに c DNA プローブによるノーザン・ハイブリダイゼーションの結果からも RNA - 3 由来であることを確認し、RNA - 3 の塩基の 1 部が欠失した欠失 RNA 遺伝子 RNA - 3 c であると認めた。

【 0 0 5 6 】上記退緑色に変化した病斑から得た RNA 成分が RNA - 1、- 2 および - 3 c で (図 1 の E) である変異分離株と退緑病斑から得た RNA 成分が RNA - 1、- 2、および - 4 (図 1 の C) である分離株の等量をツルナに混合接種して増殖させ、形成した病斑を多数切り取り、うち 1 0 個を除き残りを凍結保存し、1 0 個の病斑から得た汁液について上記要領の電気泳動法により RNA 成分を調査した結果、図 1 の F のパターンと同じパターンを示し、この汁液中に RNA 成分が RNA - 1、- 2、- 3 c および - 4 のこの発明の弱毒ウイルスが存在することを確認した。

【 0 0 5 7 】[実施例 2 : 防除剤の生産] 予め殺菌石英砂を詰めた径 2 4 mm、高さ 1 2 0 mm の栽培用試験管で 2 ヶ月間育苗した健全ベータ・マクロカルパの幼苗 2 0 個体の葉に実施例 1 の要領で得た RNA 成分が RNA - 1、- 2、- 3 c および - 4 である B N Y V V 弱毒ウイルスを含む凍結保存病斑生重 1 g に 0 . 1 M リン酸緩衝液 (pH 7) 1 0 m l を加えて磨砕物をガーゼにつけて微細カーボランダム (4 0 0 ~ 6 0 0 メッシュ) と共

に塗り付けて接種した。同時に、別に調製したウイルス・フリーのポリミキサ・ベタエを 1 個体当たり約 5 0 0 0 個接種して感染させた。

【 0 0 5 8 】窒素濃度を通常の 1 / 5 としたホークランド・アーノン (Hoagland & Arnon) 氏培養液を用いて 2 5 の恒温室で 2 ヶ月間栽培し、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 1 0 個体を取り出し水洗後、磨砕調製し、別に用意した殺菌石英砂を充填した上記同様の培養用試験管に分注し、これにテンサイ (品種モノエース ; そう根病罹病性品種) を播種し、4 0 日間栽培した。4 0 日間栽培後のテンサイの細根を採取し休眠孢子の形成を調べたところ、1 個体約 0 . 5 g (生重) から 3 0 万個の休眠孢子塊を得た。

【 0 0 5 9 】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に該当し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託することができないものである。

【 0 0 6 0 】[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 ; そう根病罹病性品種) に実施例 2 で得た休眠孢子を 1 個体当たり 5 0 0 0 個接種し、実施例 2 で用いたホークランド・アーノンの培養液 1 l 当たり炭酸カルシウム 3 g を添加した溶液を培養液として循環し、4 0 日間栽培した後、各個体から細根 3 ~ 5 g (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 千万個の休眠孢子塊を得た。

【 0 0 6 1 】[実施例 4 : 防除試験] 径 1 9 mm、長さ 1 3 cm の六角柱状の育苗移植用紙筒 1 0 4 0 本を 1 群 5 2 0 本として 2 群に分け、一方の群 5 2 0 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 5 2 0 個には、実施例 3 で得た休眠孢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 1 5 g 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壌 2 0 k g に対し 1 . 7 g 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 ; そう根病罹病性品種) を 1 個宛播種し常法により 4 0 日間育苗して得た紙筒苗 (紙筒を着けたままの苗) をそう根病汚染土壌に定植し、6 ヶ月間栽培した後、無作為に各 2 1 個体のテンサイを採取し、下記表 4 の成績を得た。

【 0 0 6 2 】

【 表 4 】

試験区別	発病率 (%)	葉 重 (g/本)	根 重 (g/本)	根中糖分 (%)	糖 量 (g/本)
試験区	0	1 4 0 0	9 4 2	1 5 . 2 4	1 4 3 . 6
対照区	4 0	1 3 0 5	4 6 3	1 3 . 6 7	6 3 . 6

但し、発病率は地上部の黄化病斑の割合

【0063】

【発明の効果】この発明によれば、そう根病の病原ウイルスであるBNYVVから、このBNYVVをツルナ葉で単一病斑分離を反復し、形成した病斑の汁液中に電気泳動法とウイルスRNA解析手法を組み合わせることにより、RNA成分がRNA-1、-2、-3cおよび-4であるウイルスの存在を確定する人為的手法により、病原BNYVVに対する感染能と干渉能の改善された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・ベタエに保毒させて大量の増殖と長期保存を可能とし、テンサイそう根病の防除剤として利用でき、さらに、防除にあたっては育苗移植用紙筒を用いて健全な培土に上記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BNYVV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ことにより、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】

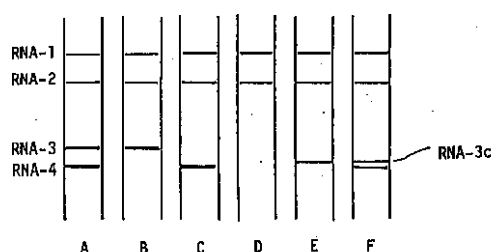
【図1】電気泳動法による各種ウイルスRNAの分離パターンを示す。

【図2】RNA3と、RNA3cの遺伝子地図を示す。

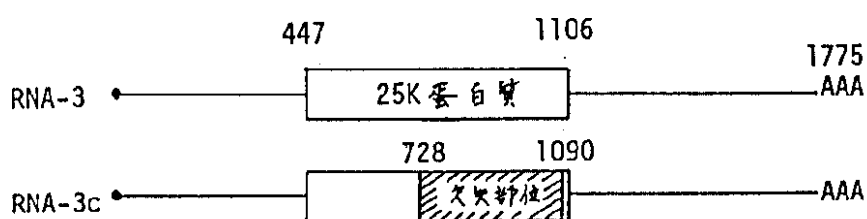
【符号の説明】

- 20 A RNA成分がRNA-1、-2、-3、-4であるウイルスRNA
 B RNA成分がRNA-1、-2、-3であるウイルスRNA
 C RNA成分がRNA-1、-2、-4であるウイルスRNA
 D RNA成分がRNA-1、-2であるウイルスRNA
 E RNA成分がRNA-1、-2、-3cであるウイルスRNA
 F この発明のBNYVV弱毒ウイルスのRNA

【図1】



【図 2】



 フロントページの続き

(72)発明者 齊 藤 美 奈 子
 北海道札幌市厚別区大谷地東 4 丁目 2 番
 - 801号
 (72)発明者 木 口 忠 彦
 北海道夕張郡長沼東 6 線北16番地
 (72)発明者 楠 目 俊 三
 北海道夕張郡長沼東 6 線北16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 8 線西16番地
 (56)参考文献 特開 平 3 - 277273 (J P , A)
 特開 昭60 - 221081 (J P , A)
 J . Gen . Virol . , Vol .
 66 (1985) p . 345 - 350