

トウガラシマイルドモットルウイルス (Pepper mild mottle virus) の感染を抑制する土壌微生物の分離・同定及び土壌伝染抑制効果

誌名	土と微生物
ISSN	09122184
著者名	池頭 靖夫 野口,勝憲 浜田,博幸 津田,新哉
発行元	土壌微生物研究会
巻/号	64巻1号
掲載ページ	p. 11-17
発行年月	2010年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



原著論文

トウガラシマイルドモットルウイルス (*Pepper mild mottle virus*) の
感染を抑制する土壌微生物の分離・同定及び土壌伝染抑制効果池頭靖夫^{1*}・野口勝憲²・浜田博幸³・津田新哉³¹片倉チッカリン(株)筑波総合研究所(現大越工場), 〒963-4111 福島県田村市大越町上大越字鷹待田 96²片倉チッカリン(株)グリーンシステム本部, 〒102-0073 東京都千代田区九段北一丁目 13-5³農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター, 〒305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1Isolation of the microbes inactivating *Pepper mild mottle virus* (PMMoV),
as naturally occurring beneficial bacteria in soil, and suppressive effect of
soil-borne PMMoV diseasesYasuo Ikegashira¹, Katsunori Noguchi², Hiroyuki Hamada³ and Shinya Tsuda³¹ Katakura Chikkarin Co. Ltd. Oogoe Factory, Kamioogoe, Tamura, Fukushima 963-4111, Japan² Katakura Chikkarin Co. Ltd., Kudankita, Chiyoda, Tokyo 102-0073, Japan³ National Agriculture and Bio-oriented Research Organization,
National Agricultural Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

To create a new biological control technique for soil-borne diseases on pepper caused by the *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), we examined 253 microorganisms isolated from soils of plant-cultivated fields and inactivating pathogenic fungi. The screening was carried out by evaluating the suppression degree of PMMoV infection to pepper root. Three isolates, M-21, C-176, and BS-17, were selected from two hundred and fifty-three rhizosphere microorganisms. The isolates M-21 and C-176, selected as the most effective bacteria throughout the second screening by pot-inoculation tests, were identified as *Bacillus megaterium* and *Ralstonia pickettii*, respectively, on the basis of several biological properties and the identity of their 16S rDNA sequence. In the isolation field of a green house, the sole application of M-21 suppressed soil-borne PMMoV diseases. Furthermore, the combination of M-21 soil incorporation and root dipping into the C-176 suspension suppressed soil-borne PMMoV diseases more effectively.

Key words : *Bacillus megaterium*, *Ralstonia pickettii*, *Pepper mild mottle virus*, methyl bromide, biological control

1. はじめに

タバコモザイクウイルス (*Tobacco mosaic virus*:TMV) と同じトバモウイルス属であるトウガラシマイルドモットルウイルス (*Pepper mild mottle virus*:以下 PMMoV と表記) によるモザイク病は, 日本各地で発生し, ピーマンやトウガラシの生育不良, 収量低下だけでなく, 果実において奇形果, 黄化などの症状を引き起こして, 果実の品質を低下させている^{4,5,10,18,20}). PMMoV は非常に安定なウイルスで, あらゆる場面で感染性を長期間維持している。さらに, 接触伝染力が強く管理作業により株から株へと容易に伝染するため, 連作地域では本病が慢性的に発生している。PMMoV の一次伝染は主として, 種子伝染と土壌伝染による。種子伝染は, 70℃, 3日間の乾熱種子消毒により抑

制できる¹⁰)。土壌伝染¹⁶) は, これまで本病を防除するために, 臭化メチル剤による土壌くん蒸が最も効果的であったが^{10,21})、本剤は1992年のモントリオール議定書締約国会合においてオゾン層破壊物質に指定され, 2005年には不可欠用途を除き国内での使用が全面的に禁止された。一方, 本病害対策として抵抗性品種の開発が精力的に進められているが, 新品種が普及しても数年後には抵抗性機能を打破する新型のウイルス系統が出現する¹⁹)。従って, 抵抗性品種による本病の防除には限界があり, 栽培現場での被害は今なお後を絶たない。

本病を防除するためには, 土壌中に残る病原ウイルスを化学的, 物理的, あるいは生物的手法により速やかに不活化することが重要である。ウイルス病を対象とした生物的手法としては, レタスピックベイン病の病原ウイルスを媒介する *Olpidium brassicae* の遊走子の感染を阻害する内生細菌^{1,2}) やメロンえそ斑点病ウイルスの病原ウイルスを媒介する *O. bornovanus* の感染を阻害する *Bacillus* 属が報告さ

2009年9月21日受付・2009年10月13日受理

* Corresponding author.

E-mail: YASUO_IKEGASHIRA@chikkarin.co.jp

れている⁷⁾。また、PMMoV 感染根を含む土壤にセルロースを添加した際、土壤微生物の働きが関与して PMMoV の不活化が促進されたとの報告¹³⁾はあるが、実際に土壤微生物を使って、直接病原ウイルスをターゲットにした報告はない。

そこで筆者らは、本病を防ぐ生物防除技術を開発するため、直接病原ウイルスである PMMoV を不活化する土壤微生物を探索し、選抜された微生物の中から本病の土壤伝染も抑制するウイルス不活化微生物を発見するに至ったのでここに報告する。

2. 材料及び方法

1) 供試菌

各地の作物栽培地根圏土壤より分離し、土壤伝染性病原糸状菌の *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Corticium rolfii* および *Rosellinia necatrix* にそれぞれ拮抗性を示した細菌、糸状菌および放線菌の 253 株⁹⁾を供試した。各菌株は、それらの凍結保存株を 1/10 YPMG 寒天培地 (酵母エキス 0.3 g, ペプトン 0.5 g, 肉エキス 0.3 g, グルコース 1 g, 寒天 18 g / 蒸留水 1000 ml, pH 7.0) に撒き、30℃の恒温器内で 3 日間静置培養し、増殖した菌体を使用した。

2) ウイルス不活化微生物の選抜

a) PMMoV 汚染根の調製

9 cm ポリポットに園芸培土 (商品名:クレハ園芸培土) をポットの 8 分目程度に充填し、ピーマン (品種:ニュー土佐ひかり) を播種して、ガラス温室内で栽培した。播種 30 日後の子葉にカーボランダム法¹⁴⁾により PMMoV を接種した。接種後 2 ヶ月間栽培した PMMoV に感染、発病したピーマン根の側根を 1 cm 程度に切り刻み、ビニール袋に入れて 4℃で保管した。

b) 1 次選抜

PMMoV 汚染ピーマン根 (0.1 g) と滅菌水 (0.2 ml) を入れた滅菌エッペンドルフチューブ (2.0 ml 容) に、1 白金耳分の供試菌株を添加して、無処理区は菌無添加で、それぞれ 10℃と 30℃の暗条件下で 1 ヶ月間静置培養した。培養後、pH 7.0 のリン酸緩衝液を 0.5 ml 添加して、SK ミル (SK-100; (株) トッケン製) に滅菌クラッシャーを入れ、15 往復上下に振って磨砕した。磨砕液の 20 μ l を予めカーボランダム粉末を降りかけたタバコ葉 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) の第 5 葉、第 6 葉、第 7 葉の 1/4 葉にそれぞれ添加し、ガラス棒で擦って接種した。また、同じ葉に菌を添加していない無処理の磨砕液を同様に接種した。この操作を 1 菌株あたり、10℃、30℃の培養区で各 2 反復、反復につきタバコ 1 苗の第 5、第 6、第 7 葉の 3 枚に接種し、タバコ苗 2 株分の計 6 枚に処理した。その後、5 日間ガラス温室で栽培した接種葉の局部病斑数を計数した。計数した局部病斑数は、次式により病斑出現率を算出し、平均値を求めた。病斑出現率 = (試験区の病斑数 / 無処理区の病斑数) \times 100

c) 2 次選抜

1 次選抜で得られたウイルス不活化微生物 3 菌株につい

て、1 次選抜と同様に PMMoV 汚染ピーマン根 (0.1 g) と滅菌水 (0.2 ml) を入れた滅菌エッペンドルフチューブ (2.0 ml 容) に、1 白金耳分の供試菌株を添加し、さらに DAS-ELISA 法で PMMoV 陰性を確認した PMMoV 無発病の茨城県神栖市のピーマン栽培健全未滅菌土壤を 0.2 g 添加して、30℃の暗条件下で 1 ヶ月間静置培養した。以下、同様の操作方法で接種葉の局部病斑数を計数した。

3) ウイルス不活化微生物の同定

a) 細菌学的性質の調査

細菌学的性質の調査は、顕微鏡観察、V-P 反応 (Voges-Proskauer test), Egg-Yolk 反応, NaCl 添加培地での生育, 糖類からの酸の生成反応, デンプンの加水分解およびカゼインの分解等を行った^{3,8,17)}。また、PMMoV は 1 本鎖の RNA を持ち、その表面はタンパク質で覆われていることから、ウイルス不活化効果にはプロテアーゼが関与しているのではないかと想定し、ウイルス不活化微生物のプロテアーゼ活性の評価を行った。プロテアーゼ活性は、基質としてゼラチンを用いて検出した⁶⁾。使用した培地は、Nutrient agar 培地 (Difco 社製) に 0.4% ゼラチンを加えたものを用いた。その培地上に、各微生物を白菌線を用いてそれぞれ 1 ヶ所に塗布し、30℃の恒温器で 5 日間静置培養した。活性の検出は、硫酸アンモニウム飽和水溶液を培地に重層した後、コロニーの周りのクリアゾーンの有無を確認した。

b) 16S rDNA 遺伝子の部分塩基配列の解析

ウイルス不活化微生物からのゲノム DNA の抽出は、IntraGene Matrix (Bio-Rad 社製) のプロトコールに従って行った。16S rDNA 遺伝子は、MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて PCR 増幅した。得られた断片は、MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用い、ダイレクトシーケンスにより 16S rDNA のうち 5' 末端側 500 bp について塩基配列を決定した。得られた塩基配列を基に BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)²²⁾により国際塩基配列データベース (GenBank /EMBL /DDBJ) でホモロジー検索を行った。

4) PMMoV 汚染土壤におけるウイルス不活化微生物の PMMoV 土壤伝染抑制試験

a) ポット試験

PMMoV 汚染根を風乾し、2 mm 程度に粉砕した。粉砕した PMMoV 汚染根は、その最終濃度が 0.5% (w/w) になるように園芸培土 (商品名:元気くん) と川砂、パーミキュライトを重量 % で 6:2:1 によく混合し、PMMoV 汚染土壤を作製した。作製した PMMoV 汚染土壤を 9 cm ポリポットに 180 g ずつ充填後、蒸留水 111ml と 2 次選抜した菌株を酵母エキス 3 g, ペプトン 5 g, 肉エキス 3 g, グルコース 10 g / 蒸留水 1000 ml, pH 7.0 (以下 YPMG と表記) 液体培地で 30℃、4 日間振とう培養した各菌液 9 ml を添加し、全体量を 300 g とした。菌無添加区は、液体培地のみを添加し、3 菌株区は、各菌液を 9 ml ずつ添加して残りは水で調整した。各試験区ごとに 5 ポットずつバットに入れ

て、水分が飛ばないようにビニール袋で密閉して30℃の恒温器中で2週間静置した。静置後のポットへ播種1ヵ月後のピーマン苗（品種：ニュー土佐ひかり）を定植した。定植後はガラス温室で3週間栽培後に、ピーマン上位葉をDAS-ELISAにより、PMMoV感染を調査した。本試験は4回に分けて繰り返し行った。

b) 選抜菌株 M-21 の資材化

ポット試験において選抜されたM-21については、Biologプレートを用いてM-21の基質資化性を調査し、最適な液体培地組成を検討した。また、大量増殖固体培地の検討として、バイオサーモアナライザー（H201：日本医化器械製作所）を利用してM-21の最適な有機質基質と鉱物質資材を検討し、微生物資材を開発した。有機質基質の選抜では、ガラス円筒瓶で各種有機質基質1gとゼオライト9gを混合し、蒸留水2.5mlを添加後、アルミ箔で蓋をして121℃、60分間オートクレイブで滅菌した。大豆粉末、豚乾血、スキムミルク、ゼラチン、CMC（カルボキシメチルセルロース）については、各種0.25gとゼオライト9.75gを混合した。滅菌後、各ガラス円筒瓶にM-21培養液を50μlずつ添加し、バイオサーモアナライザーを用いて、30℃の条件で0時間から96時間まで間、10分間隔で微小熱量（単位V）を計測した。鉱物質資材の選抜では、各種鉱物質資材9gと大豆粕1gを混合し、有機質基質の場合と同様にバイオサーモアナライザーを用いた。各種資材につき2反復設け、その平均値を算出した。一方、1次選抜、2次選抜で高い不活化活性の認められたC-176については、芽胞を形成しないため固体培養しても菌数大幅に減少してしまい、長期保管による菌数の維持が困難であることから、固体培地として資材化せずに液体培養した菌液を使用した。

c) 隔離床試験（1）

ガラス温室内（片倉チッカリン（株）筑波総合研究所内25℃設定）にある関東ローム土壌の入った隔離床を波板で仕切り（1.4m×0.42m）、PMMoV感染風乾植物体を2mm程度に粉碎したものを各試験区土壌に220g/m²相当量になるように鋤き込んで汚染土壌を作製した。M-21処理区では、M-21資材を100g/m²混合し、上からかん水した。処理2週間後、播種48日後のピーマン苗（品種：ニュー土佐ひかり）を汚染土壌に定植した。C176処理区では、ピーマン苗の根を露出させ、C176培養液（肉エキス3g、ペプトン10g、塩化ナトリウム5g／蒸留水1000ml、pH7.0液体培地、30℃、7日間振とう培養）に数秒間根を浸漬させて汚染土壌に定植した。無処理区では、ピーマン苗の根を露出させてそのまま定植した。1区あたり14株ずつ定植し、無処理区については3反復した。PMMoV感染の判定は、定植2週間後のピーマン上位葉のティッシュプリンティング免疫検定¹¹⁾により行った。

d) 隔離床試験（2）

前と同様のガラス温室内で、隔離床にPMMoV感染風乾植物体を各試験区土壌に220g/m²相当量になるように鋤き込んで汚染土壌を作製した。M-21資材処理区では、M-

21資材を100g/m²混合し、上からかん水した。処理20日後、播種75日後のピーマン苗（品種：ニュー土佐ひかり）を汚染土壌に定植した。M-21菌液浸漬処理区では、ピーマン苗の根を露出させ、M-21培養液（YPMG液体培地+1%（w/v）アラビノース、30℃、5日間振とう培養、10⁸cfu/ml）に浸漬処理し、PMMoV汚染圃場またはM-21資材を処理したPMMoV汚染圃場に定植した。無処理区では、ピーマン苗の根を露出させてそのまま定植した。1区あたり11株ずつ定植し、無処理区については3反復した。PMMoV感染の判定は、定植2週間後のピーマン上位葉のティッシュプリンティング免疫検定により行った。

3. 結果

1) 不活化微生物の選抜

タバコにおける病斑出現率をウイルス不活化活性の指標として、根圏微生物253菌株から不活化微生物候補を選抜した（図1）。まず、菌無添加の病斑出現率を100%とした時、10℃、30℃培養区のどちらかで100%以下となった根圏微生物20株を不活化微生物候補として選抜した（データ略）。次に、その20株に対して再度同様の試験を行い、10℃、30℃培養の両区で50%以下になった3菌株（M-21、BS-17およびC-176）を不活化微生物として選抜した（表1）。選抜した菌株では、C-176、BS-17、M-21の順に病斑出現率が少なく、そのウイルス不活化活性が高かった。

2次選抜では、1次選抜で得られた3菌株について、1次選抜の方法に土壌を加えたin vitro試験により不活化活性の試験をした。土壌添加前の結果と比較するとC-176は同程度のウイルス不活化活性が認められたが、M-21はわずかに不活化活性が低下した（表2）。一方、BS-17は土壌を加えることで不活化活性が大きく低下した（表2）。

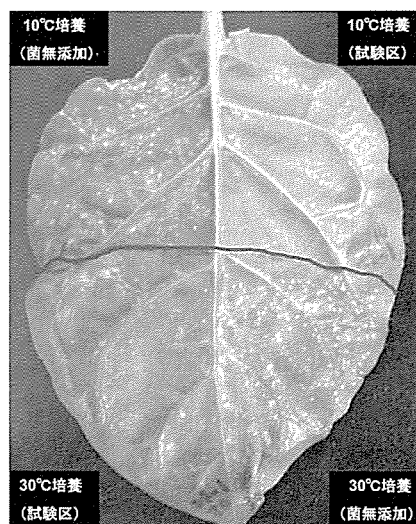


図1 タバコ（*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc）を用いたウイルス不活化微生物選抜（写真C176）各培養温度区（10、30℃）における菌無添加区と試験区に出現した局部病斑数をそれぞれ計数し、比較した。

表1 In vitro 試験における候補微生物のウイルス不活化活性

供試菌株	病斑出現率 (%)	
	30℃培養	10℃培養
菌無添加	100	100
C-176	19 ± 2.2	15 ± 6.1
BS-5	46 ± 8.4	70 ± 5.1
BS-11	75 ± 9.3	86 ± 13.3
BS-13	69 ± 4.4	65 ± 5.7
BS-17	44 ± 6.9	46 ± 1.9
M-1	136 ± 20.0	89 ± 34.0
M-4	74 ± 5.9	73 ± 16.8
M-9	71 ± 15.1	78 ± 17.4
M-21	50 ± 5.0	49 ± 5.2
FS-6	87 ± 21.6	75 ± 17.3
FS-11	132 ± 37.1	67 ± 16.7
FS-26	85 ± 11.0	92 ± 27.1
FS-35	67 ± 4.2	103 ± 27.0
FS-42	55 ± 18.5	108 ± 26.0
FS-44	75 ± 16.8	89 ± 21.7
FS-86	107 ± 25.2	75 ± 9.0
K-1	63 ± 11.0	81 ± 13.9
K-4	77 ± 12.6	84 ± 9.5
K-6	77 ± 14.4	129 ± 27.0
K-15	62 ± 6.0	134 ± 29.1

表中の数字は、1菌株あたり、10℃、30℃の培養区で各2反復、反復につきタバコ1苗の第5、第6、第7葉の3枚に接種し、タバコ苗2株分の計6枚に出現した病斑出現率 (%) の平均値を示し、±はその6反復の標準誤差を示す。

表2 土壌を加えた in vitro 試験でのウイルス不活化微生物によるウイルス不活化活性

試験区	1回目	2回目	3回目	平均
菌無添加	100	100	100	100
C-176	26	12	15	18 ± 4.3
M-21	93	50	30	58 ± 18.6
BS-17	93	89	81	88 ± 3.5

表中の数字は、1菌株あたり、30℃の培養区で各2反復、反復につきタバコ1苗の第5、第6、第7葉の3枚に接種し、タバコ苗2株分の計6枚出現した病斑出現率 (%) の各回の平均値を示し、平均は、1回~3回試験の平均値で、±はその3回試験の標準誤差を示す。

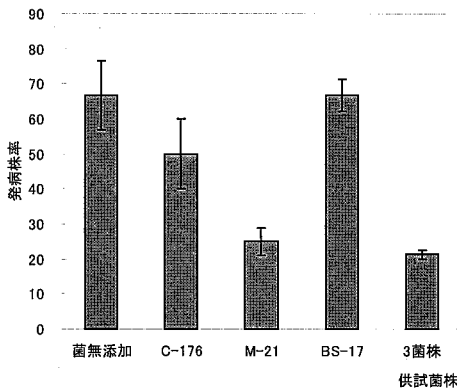


図2 ポット試験におけるウイルス不活化微生物の PMMoV 土壌伝染抑制効果
各試験区は、1区 (5株) で4反復の試験を行い、DAS-ELISA 陽性のウイルス感染株数から発病株率の平均値を算出した。バーは発病株率の標準誤差を示す。

2) 小規模 PMMoV 汚染土壌における土壌伝染抑制効果

In vitro 試験で選抜した3菌株による PMMoV の土壌伝染抑制効果を調べるために、ポット試験を行った (図2)。In vitro 試験と異なり、M-21 処理区で最も高い土壌伝染抑制効果が認められた。また、3菌株を組み合わせた処理区も M-21 処理区と同程度の土壌伝染抑制効果が認められた。一方、C-176 処理区と BS-17 処理区では土壌伝染抑制効果はほとんど認められなかった。BS-17 については、in vitro 試験とポット試験の結果から、これ以降の試験から除外した。

3) 不活化微生物の同定

細菌学的性質の結果、M-21 は桿状の細菌で芽胞を形成し、主として好気的条件下で増殖するという特徴を示したことから、*Bacillus* 属と分類された。M-21 は、V-P 反応、糖の分解特性では *B. megaterium* に類似し、16S rDNA 解析の結果 99.6% の相同性 (株名: IAM13418, Accession No.D16273) を示したことから *B. megaterium* と同定した (表3)。一方、C-176 は、桿状のグラム陰性細菌で、運動性があり好気・嫌気条件下で生育でき、グルコースから酸の生成を行い、L-ロイシンを分解しないことから *Ralstonia pickettii* に類似し、16S rDNA 解析の結果 99.6% の相同性 (株名: ATCC27511, Accession AY741342) を示したことから、*Ralstonia pickettii* と同定した (表4)。

4) ウイルス不活化微生物のプロテアーゼ活性

PMMoV は1本鎖の RNA を持ち、その表面はタンパク質で覆われていることから、ウイルス不活化効果にはプロテアーゼが関与しているのではないかと想定された。そこで、ゼラチンを用いた検出培地を用いて M-21 と C-176

表3 M-21 の細菌学的性質

菌学的性質	M-21	<i>B. megaterium</i>
細胞形態	桿菌	桿菌
細胞の長さ×幅 (μm)	3~8×0.9~2.3	2~5×1.2~1.5
グラム染色	+	+
孢子の有無	+	+
孢子の形	楕円	楕円
孢子の位置	中央	中央
運動性の有無	-	-
嫌気条件下での生育	-	-
V-P 反応	-	-
pH 5.7 培地での生育	+	d
NB での生育	+	+
NaCl (2~7%) 培地での生育	+	d
糖の分解 (酸の生成)		
D-グルコース	-	+
L-アラビノース	-	d
D-キシロース	-	d
D-マンニトール	-	d
糖の分解 (ガスの生成)		
デンプンの加水分解	+	+
ゼラチンの加水分解	+	+
カゼインの加水分解	+	+
レシチナーゼ活性	-	-

+陽性、-陰性、d株により違いがある

のプロテアーゼ活性を調べた。M-21, C-176ともにプロテアーゼ活性が検出され、特にM-21に高い活性が認められた(図3)。ポット試験で、ウイルス不活化活性が低かったBS-17には、プロテアーゼ活性はほとんど認められなかった

5) 隔離床を用いた大規模 PMMoV 汚染土壌における土壌伝染抑制効果

a) 選抜菌株 M-21 の資材化

隔離床を用いた大規模な試験をするためには、ウイルス不活化微生物を安定的かつ効率よく土壌に添加する必要がある。そこで、小規模ポット試験において最も土壌伝染抑制効果の高かったM-21の資材化を行った。最初にM-21の栄養要求性から液体培地組成の検討を行った。M

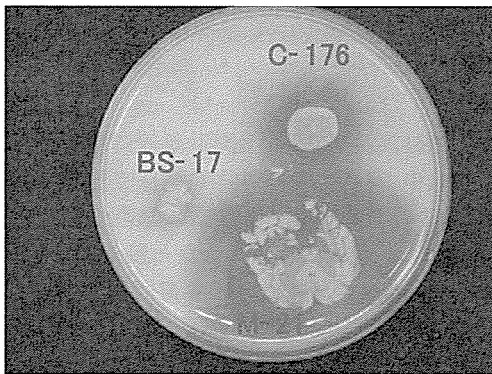


図3 ウイルス不活化微生物のプロテアーゼ活性能検出培地上に各菌を置床し、クリアゾーンの範囲によりプロテアーゼ活性を検出した。

表4 C-176の細菌学的性質

菌学的性質	C-176	<i>R. pickettii</i>
細胞形態	桿菌	桿菌
細胞の長さ×幅 (μm)	1~3×0.5	1.5~3.0×0.5~0.6
グラム染色	-	-
胞子の有無	-	-
運動性の有無	+	+
好氣的条件での生育	+	+
嫌氣条件での生育	+	+
生育温度 (40℃)	+	+
生育温度 (4℃)	-	-
炭素源の資化性		
D-グルコース	+	+
D-マンニトール	-	-
D-ガラクトース	+	+
L-アラビノース	+	+
D-ソルビトール	-	-
m-イノシトール	-	-
D-トレハロース	-	-
窒素源の資化性		
L-セリン	+	+
L-アスパラギン酸	+	+
L-ヒスチジン	+	d
L-アラニン	+	+
L-プロリン	+	+
L-ロイシン	-	-

+陽性、-陰性、d株により違いがある

-21の液体培地組成は、YPMG+1%アラビノースの場合に、28℃、5日間の振とう培養で10⁸ cfu/mlの菌数になった。次に、液体の状態では微生物が不安定であることから、大量増殖固体培地の検討を行った。バイオサーモアナライザーを利用して、M-21の増殖に最適な有機質基質(菜種油粕、大豆油粕、スキムミルク)と鉱物質資材(ゼオライト)を配合した固体培地組成を決定した(図4)。最終的に、M-21の培養液を固体培地に添加し、さらに30℃で30日間培養する事で10⁹ cfu/gのM-21資材を開発した。隔離床試験では、30℃で30日間培養した資材をその都度使用した。

b) 隔離床試験(1)

隔離床を用いた大規模 PMMoV 汚染土壌における土壌伝染抑制効果を試験した。M-21については開発したM-21資材を用い、C-176については胞子を持たない微生物であり、固体培養しても菌数が大幅に減少してしまい、長期保管による菌数の維持が困難であることから、そのまま培養液として供試した。無処理区では58%の発病率に対して、土壌へのM-21資材処理区では43%であり、PMMoV土壌伝染の抑制が認められた。一方、ピーマン根へのC-176菌液浸漬処理区では、無処理区とほぼ同等の発病株率であり、土壌伝染抑制効果は認められなかった。両者を組み合わせ

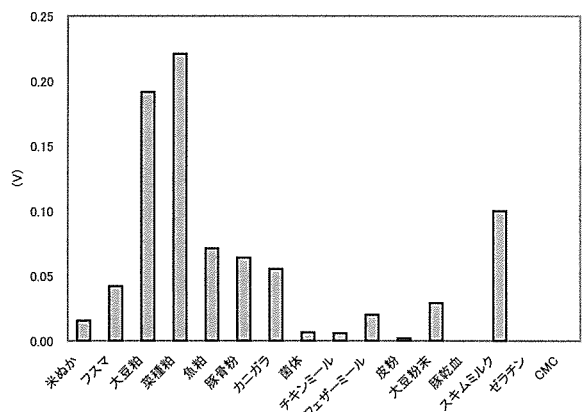
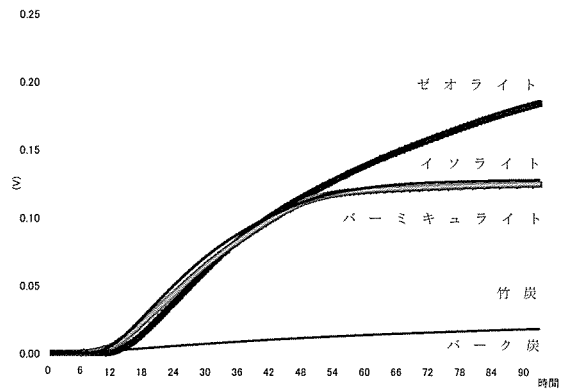


図4 M-21の増殖による発熱量(上);各種鉱物質資材,(下);各種有機質基質各区分は、2反復で行い、バイオサーモアナライザーを用いて、30℃における0時間~96時間後の微小熱量(V)を計測し、その平均値を求めた。各種有機質基質は、96時間後の積算微小熱量の値を棒グラフに示した。

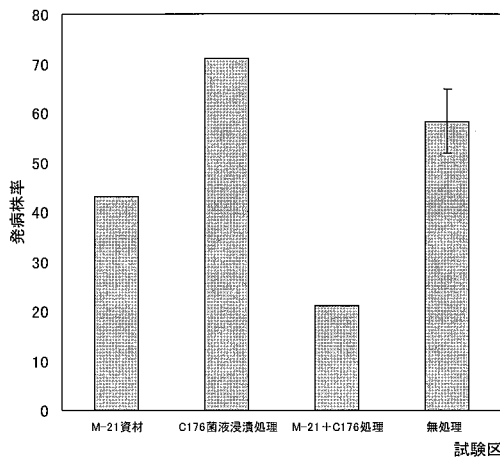


図5 大規模隔離床試験におけるM-21とC-176によるPMMoV土壌伝染抑制効果
各試験区は1区(14株)で1反復の試験を行い、ティッシュプリンティング免疫検定陽性のウイルス感染株数から発病株率を算出した。無処理区は1区(14株)で3反復の試験を行い、ウイルス感染株数から発病株率を算出した。バーは発病株率の標準誤差を示す。

た処理区では、21%の発病率であり、M-21資材単独処理区よりも高い土壌伝染抑制効果が認められた(図5)。

c) 隔離床試験(2)

次に、前の隔離床試験でM-21資材とC-176菌液浸漬処理を組み合わせた処理区で、土壌伝染抑制効果が高かったことから、M-21のみによる処理方法の組み合わせを行った。その結果、無処理区の発病株率27%に対して、M-21資材とM-21菌液浸漬処理の組み合わせでは発病株率が0%になり、完全にPMMoV土壌伝染を抑制していた。さらには、M-21菌液浸漬処理の単独区でも発病株率が0%になった(図6)。

4. 考 察

これまで、病原ウイルスを媒介する *Q. brassicae* や *Q. bornovanus* をターゲットにし、微生物の拮抗性を利用して間接的にウイルス病の感染を抑制する報告はいくつかある^{1,2,7)}。また、PMMoV感染根を含む土壌にセルロースを添加した際、土壌微生物の働きが関与してPMMoVの不活化が促進されたとの報告¹³⁾はあるが、実際に土壌微生物を使って、直接病原ウイルスをターゲットにしてウイルスを不活化し、ウイルスの土壌伝染を抑制する報告はない。本研究では、直接病原ウイルスを不活化する土壌微生物を探索し、各地の作物栽培根圏土壌より分離した253菌株からPMMoV不活化効果を有する3菌株を得た。

小規模ポット試験では、M-21処理区において最も高い土壌伝染抑制効果が認められた。一方、*in vitro*の試験では高いウイルス不活化効果を示したC-176処理区において土壌伝染抑制効果が*in vitro*試験のように高い活性では認められなかった。*Ralstonia*属菌は孢子をもたない菌であるために環境による影響を受けやすく、死滅してしまい活性が不安定になった事が原因であると考えられた。M-21は *Bacillus* 属菌であり、耐久体の芽胞を形成することから、

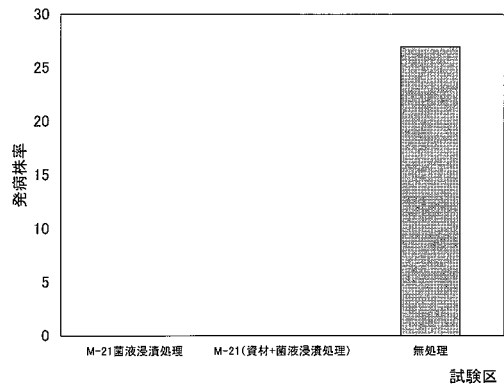


図6 大規模隔離床試験におけるM-21菌液浸漬単独処理と処理方法組み合わせによるPMMoV土壌伝染抑制効果
各試験区は1区(11株)で1反復の試験を行い、ティッシュプリンティング免疫検定陽性のウイルス感染株数から発病株率を算出した。無処理区は1区(11株)で3反復の試験を行い、ウイルス感染株数から発病株率を算出した。

乾燥、熱、紫外線並びに各種化学物質等に対して強い耐性を示し、土壌中でも生存が安定的に確保できる特性を有している¹²⁾。そのため、ポット試験においてM-21による高い土壌伝染抑制効果が認められたと考えられた。また、3菌株を組み合わせた区においてもM-21処理区と同等の土壌伝染抑制効果が認められたのは、M-21の効果によるものであると考えられた。以上のようにM-21の土壌を用いたウイルス不活化効果の高さは、プロテアーゼ活性の高さとも相関があり、M-21が土壌中で定着あるいは増殖し、その際生産されるプロテアーゼによって効果が高かったのではないかと考えられた。BS-17については、土壌を用いた*in vitro*試験やポット試験でウイルス不活化効果が低下した。プロテアーゼ活性の評価では、ほとんど活性が認められなかったため、土壌を用いた場合はウイルス不活化活性が低下したのではないかと考えられた。これらのことから、土壌が存在する条件下におけるウイルス不活化活性には、プロテアーゼ活性が関与している可能性が示唆された。

1回目の隔離床試験では、M-21資材の土壌全面処理単独区のウイルス不活化効果が認められた。C-176培養液のピーマン根浸漬処理単独区では、ウイルス不活化効果は認められなかったが、M-21資材と組み合わせることによりその効果は高まった。処理方法の組み合わせによる相乗効果ではないかと考えられたが、詳細は不明である。また、2回目の隔離床試験において、1回目の結果で処理方法の組み合わせにより効果が高まったことから、ポット試験で抑制効果の高かったM-21のみによる処理方法の組み合わせを行った。その結果、M-21の処理方法の組み合わせで最も高い土壌伝染抑制効果が認められ、さらにはM-21の培養液浸漬処理単独区でも同様に高い効果が認められた。M-21資材を土壌に全面処理した場合、土壌定着菌数は 10^6 cfu/gになるのに対して、培養液浸漬処理では根におけるM-21の定着菌数は 10^8 cfu/g新鮮根となり、浸漬処理の方が菌密度が高くなる。すなわち、M-21による

PMMoVの土壤伝染抑制には、根における定着菌数が関与する可能性が示唆された。また、PMMoVの土壤伝染は移植時に生じる根の傷口からの感染が主要因と考えられている¹⁵⁾ことから、すでに培養液で生成されたM-21のプロテアーゼのような物質的なものが、移植時に即効的に働いているとも考えられる。M-21のプロテアーゼのような物質的なものが有効であると考えた場合は、培養液で処理した方が効果的なものかもしれない。しかし、培養液で資材化となると、保管によりプロテアーゼのような物質の安定性や菌数の安定性が問題となってくる。

いずれにしても、プロテアーゼ活性とPMMoV不活化活性の相関、あるいはその他のウイルス不活化物質の特定を行い、不活化の作用機作を解析する必要がある。その上で、土壤処理あるいは浸漬処理などの処理条件の検討を行う必要がある。それらによって、PMMoV土壤伝染性病害に対する臭化メチル代替技術になるものと思われる。

5. 摘 要

本研究では、ピーマンのウイルス病害である *Pepper mild mottle virus* の土壤伝染を生物防除する為、作物栽培土壌より分離した根圏微生物 253 菌株の中からウイルス不活化能を持つ 3 菌株を選抜した。In vitro 試験やポット試験で高い土壤伝染抑制効果を示した M-21 と C-176 は、それぞれ *B. megaterium* と *R. pickettii* と同定された。資材化した M-21 は、隔離床試験において単独処理でも土壤伝染抑制効果が見られ、C-176 培養液の浸漬処理との組み合わせにより、その効果が高まる事が認められた。

引用文献

- 1) 相野公孝・前川和正・岩本 豊・神頭武嗣 (2002) *Olpidium brassicae* 感染阻害細菌の選抜とレタスビッグベイン病に対する発病抑制効果, 日植病報, 68, 240
- 2) 相野公孝・植松清次・三輪千華・竹内繁治・安達理恵・鍛冶原寛・松尾和敏・大木健広・津田新哉 (2006) メロンえそ斑点ウイルス媒介 *Olpidium bornovanus* の感染阻害効果を有する内生細菌の存在, 関西病虫研報, 48, 55-56
- 3) Barrow GI and Feltham RKA (1993) Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き 第3版 (坂崎利一監訳), p. 95-99, 近代出版, 東京
- 4) 後藤英世・花田 薫・板井 隆・佐藤俊次・藤澤一郎 (1993) 大分県のピーマンから検出されたウイルス, 九病虫研報, 39, 48-51
- 5) 後藤忠則・土崎常男・飯塚典男 (1981) 北海道のトウガラシから分離されたタバコモザイクウイルス, 日植病報, 47, 409-410
- 6) Hankin L and Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67, 597-607
- 7) 池頭靖夫・大木健広・松尾和敏・相野公孝・鍛冶原 寛・植松清次・田中千華・竹内繁治・紀岡雄三・野口勝憲・津田謙次・津田新哉 (2008) メロンえそ斑点ウイルスの媒介菌 *Olpidium bornovanus* に感染阻害効果を示す新規 *Bacillus* 属菌の選抜, 日植病報, 74, 148-152
- 8) 金子精一 (1983) 微生物同定法, p. 144-148, 衛生技術会, 東京
- 9) 紀岡雄三・赤澤貴徳・増村弘明・野口勝憲 (1999) *Bacillus* 属拮抗細菌の病害抑制効果, 土と微生物, 53, 103-109
- 10) 長井雄治 (1981) タバコ・モザイク・ウイルスに起因するトマトおよびピーマンのモザイク病の防除に関する研究, 千葉農試特報, 9, 1-109
- 11) Nakazawa NY, Kitanosono S, Hasegawa H, Okunoya K, Yaegaki F, Suzuki K, Hikichi Y and Okuno T (1999) Detection of *Ralstonia solanacearum* using tissue printing immunoassay. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 65, 549-552
- 12) 日本植物防疫協会 (2006) 生物農薬 + フェロモンガイドブック 2006, p. 217, 日本植物防疫協会, 東京
- 13) 岡 紀邦・大木健広・本田要八郎・松本英樹・西尾 隆 (2004) 土壌へのセルロース添加によるトウガラシマイルドモットルウイルスの不活化促進, 土肥誌, 75, 673-677
- 14) 大木 理 (1997) 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン, p. 26-36, 日本植物防疫協会, 東京
- 15) 大木健広・津田新哉・本田要八郎 (2003) トウガラシマイルドモットルウイルスの土壤伝染要因の解析, 日植病報, 69, 334
- 16) Pares RD and Gunn LV (1989) The role of non - vectored soil transmission as a primary source of infection by pepper mild mottle and cucumber mosaic viruses in glasshouse - grown capsicum in Australia. *J. Phytopathol.*, 126, 353-360
- 17) Sneath PHA (1986) Endospore-forming gram-positive rods and cocci: Genus *Bacillus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe and JG Holt, p. 1104-1139, Williams and Wilkins, Baltimore
- 18) 竹内繁治 (2000) *Capsicum* 属植物におけるトバモウイルス病の発生生態とその防除に関する研究, 高知農技セ特報, 3, 1-53
- 19) Tsuda S, Kirita M and Watanabe Y (1998) Character - Iization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the L³ gene - mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Mol. Plant - Microbe Int.*, 11, 327-331
- 20) 津田新哉・山中雅典・Atiri GI・千葉恒夫・藤澤一郎 (1995) 茨城県神栖町ピーマン栽培地帯のウイルス病発生調査, 関東病虫研報, 42, 79-81
- 21) 米山伸吾 (1988) タバコモザイクウイルス P 系統によるピーマンウイルス病の防除 (3) メチルプロマイドによる夏期の土壤消毒による防除効果, 関東病虫研報, 35, 56-57
- 22) Zhang J and Madden TL (1997) Power BLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.*, 7, 649-656