

タバコマイルドグリーンモザイクウイルスにより発生する ピーマンモザイク病の発病抑制技術

宮崎暁喜*・勝山直樹

Disease suppression techniques for mosaic on *Capsicum* sp. caused by *Tobacco mild green mosaic virus*

Akiyoshi Miyazaki, Naoki Katsuyama

要約：県内の甘長ピーマン産地では、タバコマイルドグリーンモザイクウイルス (TMGMV) によるピーマンモザイク病が多発し、問題となっている。本病は土壤伝染することから、防除には土壤中のウイルス濃度と発病との関係性を明らかにするとともに、発病抑制技術について検討する必要がある。そこで、まず定量 RT-PCR 法を用いた土壤中 TMGMV 濃度の測定方法を確立し、本法を用いて発病圃場を調査した結果、TMGMV は土壤の表層 (深度 1～10 cm) に多く存在し、この層の土壤 1g 中に TMGMV が 0.1pg を超えると発病リスクが高まることが明らかとなった。さらにこの濃度以下にウイルス量を低減させる方法について検討した結果、圃場に牛糞堆肥を混和し、約 1 ヶ月間太陽熱土壤消毒を行った後、TMGMV の非宿主植物であるナバナを 3 ヶ月間栽培することで、ピーマンモザイク病の発生が抑制され、かつ土壤中 TMGMV 濃度も 0.1pg/g 程度まで低減できることが示された。また、単に太陽熱消毒をするだけでなく、ドリセラゼ (セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼが混合された家畜飼料発酵用酵素) を併用した太陽熱消毒を行うことで、土壤中 TMGMV 濃度を低減し、発病を抑制できることが明らかとなった。

キーワード：タバコマイルドグリーンモザイクウイルス、ピーマンモザイク病、非宿主植物、太陽熱土壤消毒、ドリセラゼ

緒言

甘長ピーマンはトウガラシ類の甘味種として知られ、本県では西南部に位置する海津地域で主に生産されている。しかし、2002 年頃からこの甘長ピーマン産地において葉身に淡いモザイク症状や退緑、かすり状の壊疽斑等を呈する症状が散見されるようになった (第1図)。病勢が進行すると葉に褐色の斑点を生じて落葉するだけでなく、果実の黄変や奇形等により商品価値を低下させることから、原因の究明と防除対策の確立が期待されている。そこで、2008 年 4 月に (独) 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の協力を得

て本症状の原因を検討した結果、タバコマイルドグリーンモザイクウイルス (以下「TMGMV」) の感染に起因するウイルス病であることが判明した^{1), 2)}。

TMGMV はトバモウイルス属の 1 種であり、土壤伝染や汁液感染、接触感染を主な感染経路とする。土壤伝染性ウイルスとして扱われる本属の中で極めて有名なウイルスとしてタバコモザイクウイルス (TMV) が挙げられ、トマト等では多数の抵抗性品種が育成され³⁾ 活用されている。しかし、マイナー作物である甘長ピーマンにおいては、トバモウイルス属に対する抵抗性品種は育成されていないため、土壤中のウイルスを除去、ある



第1図 タバコマイルドグリーンモザイクウイルスによるピーマンモザイク病の症状

A: 感染初期 (淡い退緑), B: 感染中期 (かすり状の壊疽斑), C: 感染後期: (落葉, 落果の激化)

*) 現; 岐阜県総合企画部研究開発課

いは不活化させる手法を用いなければ本病害を防除できない。従来、臭化メチル剤による土壌燻蒸処理が土壌伝染性ウイルス防除対策の唯一有効な手法であった⁴⁾が、1992年のモントリオール議定書締約国会合で臭化メチルがオゾン層破壊物質に指定されて以降、本剤の農業分野での使用が制限されるようになり、2012年に土壌消毒不可欠用途を含め、国内での農産物栽培への使用が全面的に禁止された⁵⁾。しかし、これに代わる土壌伝染性ウイルスの効果的な防除対策技術は確立されておらず、生産現場では対応に苦慮しているのが現状である。

土壌伝染性ウイルスは、根等の傷口から侵入して宿主に感染する。しかし、根の有傷部位付近に感染源となるウイルスが存在しなければ感染しないため、ウイルスの土壌中密度が低減されることで感染する確率が低くなると考えられる。そこで、本研究ではTMGMVの濃度を低減させ発病を抑制する土壌条件を明らかにし、臭化メチル剤土壌燻蒸方法に代わる発病抑制技術について検討した。

なお、本研究は農林水産省委託プロジェクト研究(2009～2012年)において実施した。

1 定量 RT-PCR 法による土壌中ウイルス濃度の測定方法

[目的]

土壌中のウイルス濃度を簡易にかつ多数のサンプルを一度に定量する手法として ELISA 法が挙げられる⁶⁾が、抗体作成に労力がかかる、抗体の力価により数値が変動する、濃度の絶対値を測定することができない、等のデメリットがある。そこで、標的とする遺伝子配列に特異的なプライマーを用いることで、ウイルス濃度の絶対値を測定可能な定量 RT-PCR 法を用い、土壌中 TMGMV 濃度の測定方法について検討した。

[材料と方法]

1)人工汚染培土からの検出と定量性の検討

(1)人工汚染培土の作成

TMGMV を感染させた甘長ピーマン葉からショ糖密度勾配遠心法によりウイルス液を精製してタンパク質を定量し、感染葉内のウイルス量を推定した⁷⁾。そして、この推定量から土壌中に混合する感染葉磨砕液量を決定し、土壌 1g 中に 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01pg の TMGMV が混合されるよう濃度の異なる人工汚染培土を作成した。なお、基本培土として、市販の園芸培土「くみあいスターベッド」を使用した。

(2)人工汚染培土からの TMGMV 抽出

人工汚染培土を室温で1週間風乾させた乾燥培土 15g

と2倍量(30ml)の1×PBS(pH7.2, 2%スキムミルク, 0.1%Tween20)を50mlコニカルチューブに入れて一晩振とう(160rpm・20°C)し、十分に混和した後、遠心処理(4,500×g・20分・4°C)を行って上清を回収することにより不溶性物質を除去した。さらに高速遠心処理(80,000×g・1時間・4°C)後、沈殿物を3mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)で懸濁し、懸濁液を遠心(10,000×g・20分・4°C)後、上清2mlを回収した(2度目の不溶性物質の除去)。その後再び高速遠心処理(11,000×g・20分・4°C)を行い、得られた沈殿物を150μlの滅菌水で再懸濁し、さらに遠心(10,000×g・20分・4°C)後、上清を回収して得られた溶液を土壌ウイルス精製液とした。

(3)cDNAの作成

Random Primer (6mer 50μM, TaKaRa 社) 1.0μl, dNTP (2.5mM each, TaKaRa 社) 4.0μl, 土壌ウイルス精製液 5.0μl を混合し、5分間65°Cで処理後、氷中に1分間静置した。次に、Rebonuclease Inhibitor (40U/μl, TaKaRa 社) 0.5μl, PrimeScript Reverse Transcriptase (200U/μl, TaKaRa 社) 0.5μl, 5×PrimeScript Buffer (TaKaRa 社) 4.0μl, UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen 社) 5.0μl を混和し、30°C・10分, 42°C・60分, 72°C・15分で逆転写反応を行った後、DNA精製キット(MonoFas® DNA精製キットI・GL Science 社)を用いてcDNAを精製し、滅菌水20μlに懸濁した。さらに、定量RT-PCR法による検量線作成に供試する鋳型を調整した。また、蛋白質定量で濃度を測定したTMGMV溶液を40μg/mlに濃度調整した後、同様に逆転写反応およびcDNAの精製を行い、段階希釈法で5~5×10⁷fg/5μlになるよう滅菌水にて調整した。

(4)定量 RT-PCR

基本原理はインターカレーション法を用いた。反応液は SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO 社) 10μl, TMGMV-real-F1 Primer (10μM) 0.8μl (最終濃度 0.5μM), TMGMV-real-R1 Primer (10μM) 0.8μl (最終濃度 0.5μM), (3)で調整した cDNA 溶液 5μl, 滅菌水 3.4μl を混合し、調整した。なお、検量線は 5~5×10⁷pg の範囲で作成した。その後、95°C で 1 分間処理して cDNA を解離後、95°C・15 秒, 60°C・15 秒, 72°C・30 秒を 40 サイクル行い、ターゲット領域を増幅・標識化し、95°C・2 分, 65°C・1 分, 95°C・30 秒で融解曲線分析を行った。得られた数値は土壌 1g に換算した。なお、定量 RT-PCR 法の装置は LineGene (Bioflux 社) を用いた。また、定量 RT-PCR 法にて用いたプライマー

第1表 TMGMV人工汚染培土を用いた定量RT-PCR法によるウイルス濃度の定量結果

土壌1g中に含まれるTMGMVの推定濃度 (pg/g)	TMGMV濃度実測値 (pg/g)	
1000	1023.45	(± 158.72)
100	96.37	(± 30.50)
10	6.87	(± 5.05)
1	0.86	(± 0.50)
0.1	0.07	(± 0.06)
0.01	0.03	(± 0.02)
0 (滅菌水)	0.00	(± 0.00)

※TMGMV濃度実測値は、4反復の平均値
※括弧内は標準偏差

配列は、TMGMV外皮タンパク領域の中でも非特異反応が確認されなかった配列とし、TMGMV-real-F1：5'-CCT GGAAAC CTG TGC CTA GC-3' (nt 5821-5840 accession AB078435)、TMGMV-real-R1：5'-ACA TGC CAG TTC CAC GAA CC-3' (nt 6084-6065 accession AB078435) とした。

2) 現地栽培土壌におけるウイルス濃度測定と実用性の検討

例年のピーマンモザイク病発生程度に基づき、未発生圃場を発生程度0 (調査圃場数：5件)、場内に数株程度発生する圃場を発生程度1 (調査圃場数：2件)、圃場の1割程度発生する圃場を発生程度2 (調査圃場数：1件)、圃場全体で発生が確認できる圃場を発生程度3 (調査圃場数：2件) とし、深度1～10cmおよび30～40cmからそれぞれ土壌を採取して、先に考案した測定法によりTMGMV濃度を測定した。

[結果および考察]

1) 人工汚染培土からの検出と定量性の検討

TMGMV人工汚染培土を用い、定量RT-PCR法による土壌中TMGMV濃度の測定法が有効であるか検討した。その結果、推定した濃度のTMGMVを検出できたことから、本法が土壌中のウイルス濃度測定に用いることが可能と考えられた (第1表)。

2) 現地栽培土壌におけるウイルス濃度測定と実用性の検討

現地生産圃場の培土を用い、TMGMV濃度を測定した結果、発生程度3の圃場では100pg/g以上の濃度であったのに対し、発生程度1～2では、1pg/g前後、発生程度0 (未発生圃場) では0.1pg/g前後であり、測定した

第2表 生産現場におけるピーマンモザイク病の発生程度と土壌中TMGMV濃度 (pg/g) の関係

発病程度	深度1～10cm	深度30～40cm
0	0.10 (± 0.13)	0.00 -
1～2	0.54 (± 0.60)	0.00 -
3	198.02 (±224.60)	50.48 (±57.96)

※例年のピーマンモザイク病の発生程度を4段階 (0～3) に分けた。数値は各平均値、エラーバーは標準偏差を示す。なお、試験は2009年8月29日に採取した土壌を用い実施した。

ウイルス濃度と発生程度に概ね比例関係が認められた (第2表)。また、測定する土壌の深度によりウイルス濃度が変化することが予想されたため、測定に適切な採取深度を調査したところ、深度1～10cmにおいては前述の濃度が検出されたのに対し、深度30～40cmでは濃度が低く、発生程度1～2においては検出されなかった (第2表)。

以上のことから、考案した土壌中TMGMV濃度の測定法は、ウイルス濃度の絶対値を測定する方法として妥当であると判断できた。また、採取する土壌は表層土壌 (深度1～10cm) が調査に適していることが示された。

2 土壌中TMGMV濃度とピーマンモザイク病の発病との関係

[目的]

土壌中TMGMV濃度とピーマンモザイク病の発病との相関性を明らかにし、本ウイルスによる被害リスクを予測する土壌中ウイルス濃度を明らかにする。

[材料と方法]

1) 現地圃場における土壌中TMGMV濃度とピーマンモザイク病の発生との関係

例年ピーマンモザイク病が発生する現地圃場および未発現地圃場計9圃場 (発生程度0：2圃場、発生程度1：3圃場、発生程度2：3圃場、発生程度3：1圃場) を対象に、各圃場5ヶ所から表層1～10cmの土壌を採取した。なお、採取時期は定植前 (2010年3月19日)、栽培期間 (2010年6月8日、7月19日、8月26日) の計4回とし、1で確立した定量RT-PCR法により土壌中TMGMV濃度を測定するとともに、各採取時における各圃場でのピーマンモザイク病発生株率を調査し

第3表 土壤中TMGMV濃度とピーマンモザイク病発生株率の時期別推移(2010年度調査結果)

対象圃場		調査項目	調査時期			
病害発生程度	調査圃場数		3/19 (定植前)	6/8	7/19	8/26 (抜根直前)
3	1	土壤中TMGMV濃度 (pg/g)	12.14	21.91	18.37	392.57
		発病株率 (%)	—	4.65	16.28	48.84
2	3	土壤中TMGMV濃度 (pg/g)	0.03	0.00	0.29	0.06
		発病株率 (%)	—	0.01	2.31	0.00
1	3	土壤中TMGMV濃度 (pg/g)	0.02	0.00	0.01	0.09
		発病株率 (%)	—	0.00	0.00	0.00
0	2	土壤中TMGMV濃度 (pg/g)	0.00	0.00	0.04	0.00
		発病株率 (%)	—	0.00	0.00	0.00

* 土壤中TMGMV濃度は、例年発生状況別圃場ごとに算出した土壌1g中のTMGMV含量平均値

* ピーマンモザイク病発生株率は例年発生状況別圃場ごとに算出した(発生えそ株数/全株)の平均値

た。

2)室内試験における土壤中TMGMV濃度とピーマンモザイク病発生との関係

1と同様にTMGMVの人工汚染培土を作成し、作成した人工汚染培土を充填したワグネルポット(1/5000a)に断根させた甘長ピーマンを定植した。定植後、25℃一定に管理されたガラス温室内で栽培し、栽培2ヶ月後のピーマンモザイク病の発生状況を観察すると共に、ウイルスの感染状況をRT-PCR法により調査した。なお、RT-PCRは、定法でtotal RNAを抽出後、cDNAを合成し、TMGMV-F/R特異的プライマーを用いて94℃・5分でcDNA(鋳型)を解離し、94℃・30秒、58℃・30秒、72℃・1分30秒を40サイクル実施し、ターゲット領域であるDNA断片を増幅(目的サイズ404bp)後、72℃・5分で伸長反応を行った。供試したプライマー配列はTMGMV-F:5'-GCA GCT GAT CAA TCT GTG TA -3'(nt 5731-5750 accession M34077)、TMGMV-R:5'-GAG TTG TGG TCC AGA CAA GT -3'(nt 6134-6115 accession M34077)とした。

[結果および考察]

1)現地圃場における土壤中TMGMV濃度とピーマンモザイク病の発生との関係

発生程度3における定植前の土壤中TMGMV濃度は約12pg/gであり、8月におけるピーマンモザイク病発生株率は約50%であった。また、発生程度2における定植前の土壤中TMGMV濃度は約0.03pg/g、発生程度1では約0.02pg/gであり、いずれも僅かに検出された。しかし、栽培期間中の発病は、発生程度2の7月を除き確認されなかった。なお、発生程度2における7月の土壤中TMGMV濃度は約0.3pg/gであり、発病株率は2%であ

った(第3表)。なお、発病程度2における8月の発病株率が0%である理由として、夏季高温による病徴のマスクングが影響したものと考えられる。

2)室内試験における土壤中TMGMV濃度とピーマンモザイク病の発生との関係

土壤中TMGMV濃度が10pg/g以上で発病と感染が認められた。これに対し、0.1pg/g以下では発病が認められず、かつ感染も認められなかった(第4表)。

以上から、TMGMVによるピーマンモザイク病の発生を防ぐためには、土壤中TMGMVの濃度を0.1pg/g以下に抑えることが必要であり、本濃度が発病に対する

第4表 土壤中のTMGMV濃度の違いが甘長ピーマンへの感染に与える影響

人工汚染培土作成時におけるTMGMVの推定濃度 (pg/g)	定植前のTMGMV濃度測定値 (pg/g)	発病 ^{a)}	TMGMV感染状況 ^{b)}
1000	983.333	+	+
100	79.000	+	+
10	3.923	+	+
1	0.533	±	-
0.1	0.058	-	-
0.01	0.022	-	-
0(滅菌水)	0.000	-	-

a) TMGMVによるピーマンモザイク病の特徴的な症状であるかすり状えそ斑が1枚以上確認できたものを+、うどんこ病等の併発により判然としないものを±、発病を確認できなかったものを-とした。

b) 定法に従い、RT-PCRにて陽性のものを+、陰性のものを-とした。

リスク基準濃度であることが明らかとなった。

3 非宿主植物を用いた土壤中ウイルス濃度の低減方法の検討

[目的]

土壤中 TMGMV 濃度を増加させないためには、宿主の残渣等を土壤内に残さないことが重要である。このため、輪作作物を非宿主植物とし、感染源を断つことで土壤中の TMGMV 濃度を低減できると考えられる。そこで、非宿主植物の定植による土壤中 TMGMV 濃度の低減効果について検討した。

[材料と方法]

1) TMGMV の宿主および非宿主植物の検討

海津地域における甘長ピーマン生産圃場では輪作作物としてシュンギク、ナバナを栽培している。そこで、シュンギク、ナバナを含む計8種類の植物種 [シュンギク (中葉春菊)、ナバナ (海津地域現地系統)、トマト (サンロード)、キュウリ (地這胡瓜・霜しらず)、キャベツ (金系 201 号)、ホウレンソウ (アトラス)、十六ササゲ、甘長ピーマン] について、カーボランダム法による汁液接種後の感染状況を RT-PCR 法を用いて調査し、TMGMV の宿主範囲を検討した。なお、RT-PCR は定法で実施し、TMGMV の検出は前述の TMGMV-F/R 特異的プライマーを、また植物体のアクチンを検出するインターナルコントロールとしては Act-F1/R1 プライマー (Act-F1 : 5'-GGG AYG AYA TGG ARA ARA THT GG -3'/Act-R1 : 5'-CKD ATR TCN ACR TCR CAY TTC AT-3') を用いた。また、アクチン検出における PCR 条件は、前述の PCR 条件のうちアニーリング温度 (58°C) を 50°C に変更し実施した。

2) 生産現場における TMGMV の土壤伝染環

TMGMV を汁液接種した甘長ピーマン、シュンギク、ナバナの茎葉部 (地上部) をそれぞれ液体窒素下で磨砕し、1×PBS (pH7.2) で5倍に希釈後、滅菌したパーミキュライトと磨砕物希釈液を体積比 4 : 1 で混合した。その後、TMGMV 感染甘長ピーマンを混合した培土にシュンギクおよびナバナを、感染シュンギクまたは感染ナバナを混合した培土に甘長ピーマンをそれぞれ定植した。なお、定植した植物体はいずれも、滅菌したハサミにより断根 (地際から 3~5cm 程度下方部位を断根) した。その後、定植1ヶ月後の各植物体感染状況を前述の RT-PCR 法により調査した。

3) 非宿主植物の定植による土壤中の TMGMV 濃度低減効果に係る室内試験

1と同様に作成した人工汚染培土を充填したワグネ

ルポット (1/5000a) に断根した甘長ピーマン、シュンギク、ナバナを定植し、25°C一定に管理されたガラス温室内で栽培して定植2ヶ月後の土壤中ウイルス量を定量 RT-PCR 法で調査した。なお、感染によりポット内に落葉した葉は週1回取り除く管理を実施した。

4) 非宿主植物の定植による土壤中の TMGMV 濃度低減効果に係る圃場試験

雨よけパイプハウス (0.5a) に TMGMV を感染させた甘長ピーマンを栽培 (2012年5月17日~8月30日) した。その後、地上部を地際から切除して感染株の主根や細根を残渣の主体とした圃場を耕耘・攪拌し、TMGMV 汚染圃場とした。この汚染圃場を1ヶ月間 (2012年9月6日~10月5日) 太陽熱で土壤消毒した。

この際、牛糞堆肥混和区と無混和区を設け、処理期間中の土壤水分含量は 30~40% とし、透明マルチビニール被覆にて処理した。その後、各区に対しシュンギクとナバナを定植し、1, 3ヶ月後の土壤中 TMGMV 濃度を定量 RT-PCR 法で測定することにより、TMGMV の低減推移を調査した。

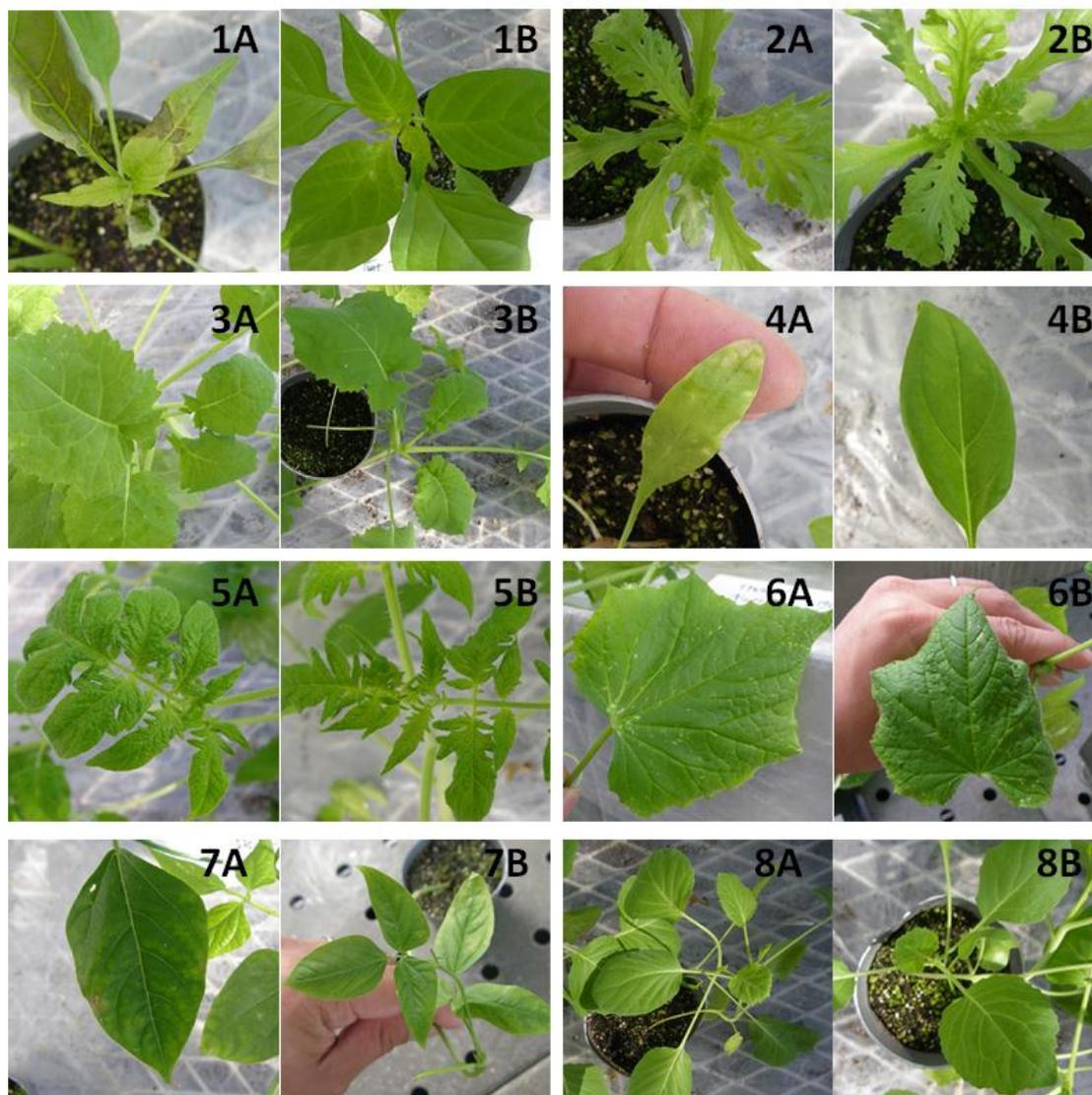
[結果および考察]

1) TMGMV の宿主および非宿主植物の検討

TMGMV 汁液接種12日目の甘長ピーマンおよびホウレンソウの汁液接種株は、TMGMV を含まない1×PBS 接種株 (健全株) よりも明らかに黄化し、壞疽斑も形成された (第2図-1A, 4A)。その他の植物種については1×PBS 接種株および汁液接種株の外観に差は認められなかった。次に接種12日目の汁液接種株および1×PBS 接種株の葉を用いて RT-PCR 法で TMGMV の検出を試みたところ、甘長ピーマン、ホウレンソウ、シュンギクの汁液接種株から目的とする DNA 増幅断片が得られた (第3図)。このことから、TMGMV は甘長ピーマン以外にホウレンソウおよびシュンギクに全身感染することが判明した。

2) 生産現場における TMGMV の土壤伝染環

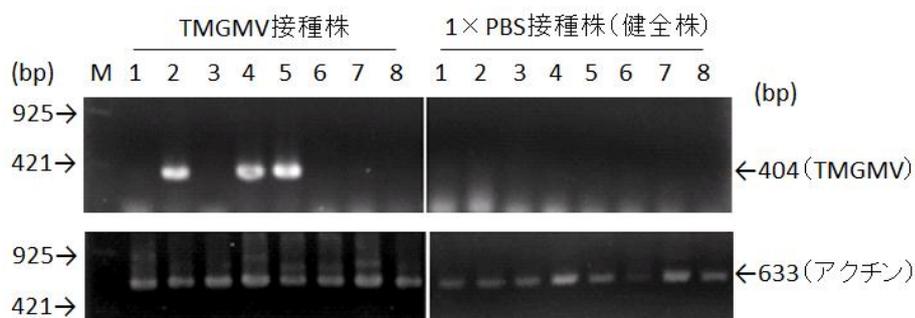
TMGMV は、1)よりシュンギクにも全身感染することが明らかとなったことから、シュンギクが土壤伝染の媒介植物となっている可能性がある。このため、土壤中の伝染環について調査した。その結果、TMGMV を接種したシュンギクを混合した培土に定植した甘長ピーマンには、TMGMV の感染時に見られる特徴的な壞疽斑が主茎先端部で確認された (第4図)。一方、その他の定植植物種には症状が認められなかった。また、RT-PCR の結果、TMGMV を接種したシュンギクを混合した培土に定植した甘長ピーマンおよび TMGMV を



第2図 TMGMV感染した甘長ピーマンの粗液汁を接種後12日目の各植物体の様子

*各数字番号は、1：甘長ピーマン、2：シュンギク、3：ナバナ、4：ホウレンソウ、5：トマト、6：キュウリ、7：十六ササゲ、8：キャベツを示す。

*数字番号以下のアルファベットは、A：汁液接種株、B：1×PBS接種株を示す。

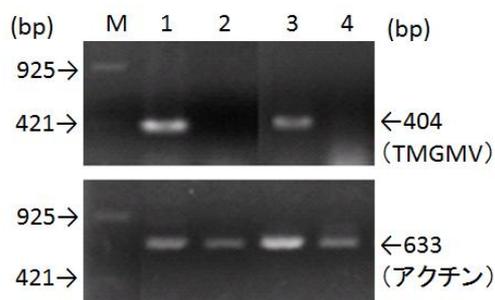


第3図 TMGMV接種株および1×PBS接種株(健全株)におけるTMGMVの感染確認

M：λEcoT-14DNA マーカー、1：トマト(品種 サンロード)、2：甘長ピーマン、3：キュウリ(品種 地這胡瓜・霜しらず)、4：ホウレンソウ(品種 アトラス)、5：シュンギク(品種 中葉春菊)、6：ナバナ(品種 現地系統)、7：キャベツ(品種 金系201号)、8：十六ササゲ



第4図 感染シュンギク混合培土に定植した甘長ピーマンの先端部の様子



第5図 各人工汚染培土で栽培し、定植31日目における各植物体のTMGMVの感染状況

M: λ EcoT-14DNAマーカー, 1: TMGMV感染甘長ピーマンを混合した培土に定植したシュンギク, 2: TMGMV感染甘長ピーマンを混合した培土に定植したナバナ, 3: TMGMV感染シュンギクを混合した培土に定植した甘長ピーマン, 4: TMGMVを接種したナバナを混合した培土に定植した甘長ピーマン

接種した甘長ピーマンを混合した培土に定植したシュンギクよりそれぞれTMGMVが検出された(第5図)ことから、TMGMVに感染したシュンギクが土壌内に残渣として残っていた場合、定植後の甘長ピーマンにTMGMVが感染することが判明した。また、その逆のパターンであるTMGMVが感染した甘長ピーマンが土壌内に残渣として残っていた場合、定植後のシュンギクにTMGMVが感染することも判明した。一方、ナバナと甘長ピーマンの組み合わせでは、輪作作物への感染がみられなかったことから、ナバナはTMGMVの感染環を断つ植物種である可能性が示された。

3) 非宿主植物の定植による土壌中のTMGMV濃度低減効果に係る室内試験

非宿主植物であるナバナをTMGMV人工汚染培土に定植し2ヶ月間栽培すると、定植前のTMGMV濃度(約1000pg/g)が、0.054pg/gまで大幅に低減した(第5表)。一方、甘長ピーマン定植では約1/7量まで、シュンギク定植では約1/2000量まで土壌中TMGMV濃度が減少し

第5表 定植植物種の違いがTMGMV人工汚染土壌中のウイルス量の変化に与える影響
(定植2ヶ月後の結果)

土壌1g中に含まれるTMGMVの推定濃度(pg/g)	定植前のTMGMV濃度実測値(pg/g)	定植後のTMGMV濃度(pg/g)		
		甘長ピーマン	シュンギク	ナバナ
1000	983.333	146.467	0.499	0.054
100	79.000	1.347	0.000	0.000
10	3.923	0.000	0.000	-
1	0.533	0.000	0.000	-
0.1	0.058	0.004	0.000	-
0.01	0.022	0.000	0.000	-
0(滅菌水)	0.000	0.000	0.000	-

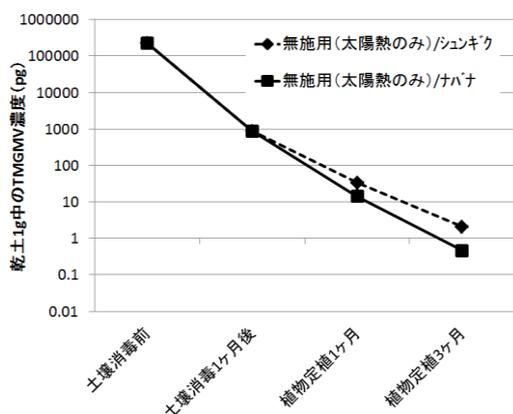
*数値は2鉢平均

たが、本病発生のリスク基準濃度(0.1pg/g)を下回らなかった(第5表)。このことより、ポット栽培の結果ではあるが、ナバナを2ヶ月間栽培すると土壌中のTMGMV濃度が効果的に低減され、ピーマンモザイク病が発生するリスク基準濃度(0.1pg/g)以下に抑制できることが明らかとなった。

4) 非宿主植物の定植による土壌中のTMGMV濃度低減効果に係る圃場試験

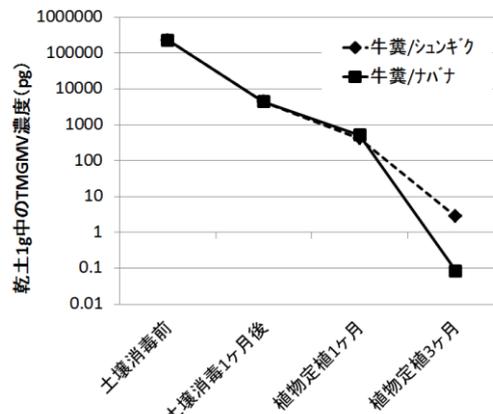
牛糞施用・無施用、定植植物の相違に関わらず、定植後の経過期間により土壌中TMGMV濃度は低下した。また、定植3ヶ月後の土壌中ウイルス濃度はシュンギクよりナバナの方が低く、ナバナ定植はシュンギク定植よりも低減効果が高いことが示された(第6、7図)。特に、牛糞施用区にナバナを定植した区では、定植3ヶ月後に約0.1pg/gまで低減された(第7図)。

以上のことから、生産現場での甘長ピーマンおよびシュンギクの輪作体系がTMGMVの土壌伝染環を引き起こす要因であることが明らかとなった。また、室内試験の結果から、TMGMV汚染培土であっても、非宿主であるナバナを2ヶ月間定植することで、TMGMVによるピーマンモザイク病の発生リスク基準濃度(0.1pg/g)以下に抑制できることが示され、甘長ピーマンおよびナバナの輪作体系により、土壌伝染環を断つことができるものと考えられた。また、感染残渣が漉き込まれた野外圃場においても、牛糞堆肥混和後1ヶ月程度太陽熱消毒を行い、その後ナバナを3ヶ月栽培することで、ピーマンモザイク病発生リスク基準濃度(0.1pg/g)程度までウイルス濃度を低減させることも明らかとなった。



第6図 太陽熱土壤消毒(併用資材無し)後の定植植物の違いが土壤中TMGMV濃度の推移に与える影響

*4ヶ所の平均値を示す



第7図 牛糞堆肥を併用した太陽熱土壤消毒後の定植植物の違いが土壤中TMGMV濃度の推移に与える影響

*4ヶ所の平均値を示す

4 酵素施用を併用した太陽熱土壤消毒による土壤中ウイルス濃度の低減方法の検討

[目的]

海津地域の甘長ピーマン生産現場では、甘長ピーマン作型からシュンギク・ナバナ作型へ切り替わる期間に太陽熱土壤消毒を行うことが多い。そこで、この太陽熱土壤消毒を行う約1ヶ月の期間を利用し、残渣の分解を促進し、かつ土壤中TMGMV濃度を低減できる土壤処理方法について検討した。特に、残渣を積極的に分解促進させるため、ドリセラージェ(セルラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼが混合された家畜飼料発酵用酵素)を併用した太陽熱土壤処理の効果について検討した。

[材料と方法]

1)残渣分解試験

1cm角に刻んだ甘長ピーマン葉5gを0.4mm目合いのナイロン袋に封入し、ドリセラージェ「あすか」-20 [アスカ製薬(セルラーゼ800U/g、プロテアーゼ10000U/g、ペクチナーゼ300U/g)]をそれぞれ0、0.1、1、5%加えた土壤水分含率100%の「くみあいスターベッド」内に埋没させた。この容器をラップフィルムで被覆して50℃で静置後0、4、8、16日後にナイロン袋を取り出し、各袋内の残渣を乾物重として測定して残渣の分解状況を確認した。

2)感染残渣から遊離されるウイルス量の確認

TMGMV人工汚染培土を作成後、1~0.0001%のドリセラージェ「あすか」-20を加え1週間静置(50℃)し、定法により土壤からウイルスを抽出して定量RT-PCR法を用いて土壤1g中のウイルス量を測定した。

3)室内試験における発病抑制効果

風乾した「くみあいスターベッド」1kgにTMGMV感染葉を生重量として10g加えた後、1ℓの滅菌水を混合した培土を人工汚染培土とした。この汚染培土にドリセラージェ「あすか」-20を0、0.1、0.5%の各濃度になるよう混入し、容器をラップで被覆して2週間静置(50℃)した。その後、過剰な水分を抜き取り、各培土に断根した甘長ピーマンを定植し、定植後の発病程度(0:発病無し、1:退緑、2:えそ斑、3:枯死)を調査した。

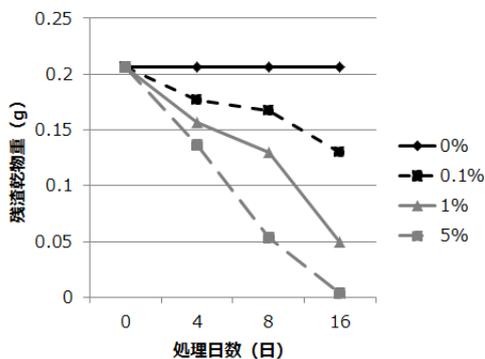
4)圃場試験における局所ドリセラージェ処理の効果

雨よけパイプハウス(0.5a)にTMGMVを感染させた甘長ピーマンを栽培(2012年5月17日~8月30日)し、感染残渣を圃場に漉き込んでTMGMV汚染圃場とした。さらに、牛糞堆肥を混和(作土10cm、4t/10a換算で混和)後、感染株が栽培されていた畝位置に粉状の状態では感染残渣が集中すると考えられる箇所、局所的にドリセラージェ「あすか」2[アスカ製薬(セルラーゼ80U/g、プロテアーゼ1000U/g、ペクチナーゼ30U/g)]を1ℓ/m施用し、耕耘せずに土壤水分が30~40%程度となるよう調整のうえ灌水して透明ビニールで被覆し、太陽熱土壤消毒処理を行った。処理1ヶ月後に土壤を回収し、本剤の自然浸透による表層土壤に対する高濃度処理の効果を検討するため、定法で土壤からウイルスを抽出して定量RT-PCR法により土壤1g中のウイルス量を定量することによって、土壤中TMGMV濃度の低減効果について検討した。

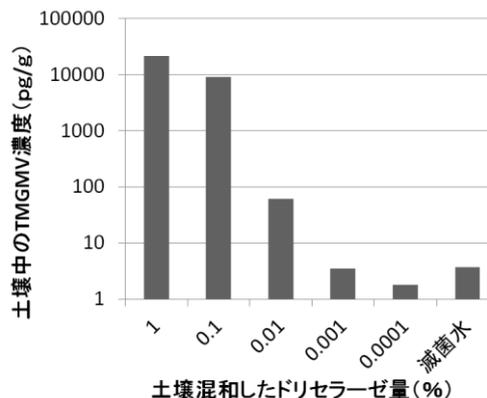
[結果および考察]

1)残渣分解試験

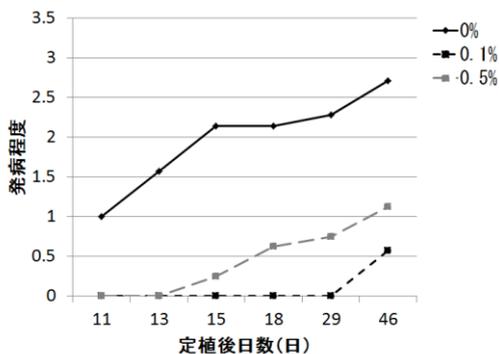
ドリセラージェ5%処理区では16日目で残渣はほぼす



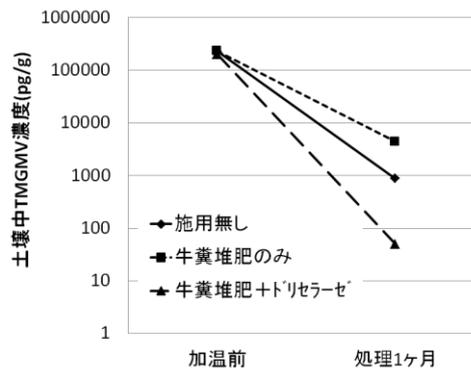
第8図 ドリセラーゼ処理濃度が土壤中残渣の分解に与える影響



第9図 ドリセラーゼ処理濃度が土壤中に遊離するウイルス量に与える影響 (処理2週間後の状況)



第10図 ドリセラーゼ混和による土壤処理がTMGMVの発病に与える影響



第11図 太陽熱土壤消毒時に併用する資材の違いが土壤中TMGMV濃度の推移に与える影響

*加温前：ビニール被覆直前の培土

*処理1ヶ月後：ビニール被覆を除去した直後の培土

べて分解した。また、1%以下の処理では処理16日目までに分解しきることはなかったが、処理濃度が高いほど分解が早まった (第8図)。

2) 感染残渣から遊離するウイルス量の確認

ドリセラーゼの混和濃度が高くなるほど、土壤中に遊離するウイルス量も増加した (第9図)。

3) 室内試験における発病抑制効果

ドリセラーゼ未混和区では、TMGMVによる発病を軽減することはできなかったが、混和区では発病が軽減された (第10図)。ただし、軽減程度は混和したドリセラーゼに比例することは無く、0.5%区よりも0.1%区の方が発病程度は低かった (第10図)。この原因として、ドリセラーゼ処理により感染残渣から遊離されるウイルス量と残渣の分解速度、その他土壤内における微生物相や有機酸等土壤内環境のバランスが関与している

ものと考えられた。

4) 圃場試験における局所ドリセラーゼ処理の効果

太陽熱土壤消毒処理中の土壤内温度は最高52.1℃、最低27℃、平均35.5℃であった。この条件下、処理1ヶ月後の土壤中TMGMV濃度は全区ともに減少し、牛糞とドリセラーゼを処理した区が最も低く、50pg/土1gであった (第11図)。本剤は高価な資材であり、圃場に全層混和することは極めて困難であるため、今回局所的な施用でもウイルス濃度低減に効果が認められたことは、実需者のコスト負担軽減につながられると考えられた。

以上から、TMGMV感染残渣を混入した土壤にドリセラーゼを処理することによって、ピーマンモザイク病の発生を抑制できることが示された。また、1ヶ月間太陽熱土壤消毒を行う際、牛糞堆肥を混和するだけでなく

ドリセラゼを併用することで、土壤中 TMGMV 濃度を低減できることも示された。一方、ドリセラゼを1ヶ月程度処理することで、残渣分解が促進されることが明らかとなったが、遊離するウイルス量も多くなることや、処理後の温度変化、その他酵素処理方法により発病抑制や土壤中ウイルス濃度の低減効果が異なり、安定的な効果を望むためには今後更に検討する必要があると考えられた。

総合考察

今回考案した定量 RT-PCR 法による土壤中 TMGMV 濃度の測定方法は、絶対量を測定するうえで極めて有用な手法と考えられる。また、土壤から抽出されたウイルス精製液を鋳型とし、他のトバモウイルス特異的プライマーを用いることで、土壤中に存在する TMGMV 以外の土壤伝染性ウイルス種を同時に定性、あるいは定量できると考えられる。近年、プライマーは低コストで作成できるため、PCR が実施できる環境であれば、抗原抗体反応を利用した ELISA 法等を用いることなく、比較的 low cost で病原の特定や、土壤中の病原ウイルス濃度を測定することが可能である。ただし、土壤内には多種多様な有機酸やタンパク質等が存在するため、土質によっては PCR に供試する土壤溶液内に PCR 反応を阻害する物質が混入する恐れがある。そのため、今回考案した土壤ウイルス精製液や cDNA の抽出については十分に精製を行うよう手順化した。しかしながらこの精製過程等を踏まえると、一度に処理できるサンプル量が限られることから、土壤サンプル数も多く、調査したいウイルス種の抗体が入手できる環境であれば、ELISA 法を用いた方が効率的に調査できる場合もある。そのため、調査の目的に応じ、ELISA 法と定量 RT-PCR 法を使い分けることが必要となる。

土壤伝染性ウイルスの防除は、かつては臭化メチル剤を用いた土壤燻蒸処理法により対処されてきたが、現在使用が禁止されている。また、その他の土壤消毒方法(土壤還元消毒やククロルピクリン等による薬剤処理)は、ウイルスに対する防除効果が低いため、事実上短期間に土壤伝染性ウイルスを除去する手段は無いのが現状である。今回考案した非宿主植物の輪作を利用した TMGMV 濃度の低減方法は、短期間に病原除去できる技術ではないが、ナバナを3ヶ月間栽培することでピーマンモザイク病発生リスク基準濃度である 0.1pg/土 1g 以下まで TMGMV 濃度を低減できる。また、特別な資材を導入する必要がないことから、低コストで圃場内の TMGMV 濃度を低減し、発病を抑制できる手法である

と考えられる。本研究では、非宿主植物のモデルとしてナバナを用いて検討したが、ナバナ以外の植物でも同様の効果を示す可能性があり、今後は海津地域における甘長ピーマンの経営安定につなげるためにも収益性の高い輪作可能作物の検討をする必要がある。

また、ドリセラゼおよび牛糞堆肥を併用した太陽熱土壤消毒法は、処理1ヶ月間で約1000分の1程度まで土壤中 TMGMV 濃度を低減可能であることが示された。この低減率は牛糞堆肥のみを混和した太陽熱土壤消毒や、資材を併用しない単純な太陽熱土壤消毒よりも高い。また、本剤を土壤に混和することで、未混和に比べピーマンモザイク病の発生を抑制できることも明らかになったことから、今後の太陽熱土壤消毒方法を改善するうえで参考となる知見であると考えられる。

また、ドリセラゼを感染残渣に処理すると、濃度依存的に残渣が分解して遊離するウイルス量が増加するが、この際、土壤水分率 30~40%条件と湛水条件下では遊離ウイルス量が異なり、土壤水分率 30~40%条件下の方が遊離ウイルス量は少ない傾向があった(データ未掲載)。このことより、今後、土壤水分率と土壤ウイルス濃度、並びに発病との相関について検討することで、より耕種的に土壤伝染性ウイルス病の発病を抑制できると考えられる。

本研究は、海津地域における甘長ピーマン生産地で発生しているピーマンモザイク病を防除する目的で実施してきたが、化学農薬に頼らない臭化メチル剤代替技術として、各地で問題となっている他の土壤ウイルス病害の測定方法や対策技術開発に応用が可能であると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、病原の特定や、防除方法の検討等にご尽力いただきました、(独)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の津田新哉氏、富高保弘氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 宮崎暁喜・村元靖典・勝山直樹・福田富幸・富高保弘・津田新哉. 2010. Tobacco mild green mosaic virus によるピーマンかすり状えそ病(新称)及び伝染環関西病虫研報. 52: 153-155.
- 2) 宮崎暁喜・勝山直樹・福田富幸・富高保弘・津田新哉. 2010. タバコマイルドグリーンモザイクウイルスによるピーマンかすり状えそ病(新称). 日植病報. 76: 64.

- 3) 畑中正一. 1997. ウイルス学. p.423-424. 朝倉書店. 東京
- 4) 肥料農薬部 技術対策課. 2012. 臭化メチル代替技術の開発・普及の状況. グリーンレポート. 514: 2-5.
- 5) 農林水産省消費・安全局植物防疫課. 2012. 不可欠用途臭化メチルの全廃に向けて. 植物防疫. 66: 1-5.
- 6) 津田新哉. 2006. 土壌伝染性ウイルス病対策技術開発への取り組み. 野菜茶業研究集報. 3: 29-34.
- 7) 脇本 哲. 1993. 植物病原性微生物研究法. p. 163-205. ソフトサイエンス社. 東京.

Abstract

Pepper mosaic caused by *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) has occurred since around 2002, so has become a problem in pepper cultivation in Gifu Prefecture. Because this virus is a soil-borne, we have studied about TMGMV- density in soil developing mosaic, and control technology of onset. We have first established a method for measuring the density of TMGMV in soil with quantitative RT-PCR. As a result of the investigation on onset field using this method, many TMGMV exist in the surface

layer of soil (depth 1~10cm), and we clearly demonstrated that the onset TMGMV was included 0.1pg or more in soil 1g of this soil-layer. Therefore, we considered how to reduce the amount of this virus in density. As the result, it was suggested that onset of pepper mosaic was suppressed by the cultivation of *Brassica rapa var. nipposoleifera* as the non-host plant on TMGMV of three months. And it has been shown TMGMV density in soil can also be reduced to about 0.1pg/g. In addition, doing solar disinfection combined with Driselase, the soil TMGMV density was reduced, and onset of pepper mosaic was suppressed.

Key words

Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), pepper mosaic, non-host plant, solar heat soil sterilization, Driselase