

トウガラシ属
トバモウイルス抵抗性
病原型 1
特性調査マニュアル



(第2版)

令和5年3月30日 改正

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

種苗管理センター

国内において、トウガラシ属で発生しているトバモウイルスはタバコモザイクウイルス (*Tobacco mosaic virus*=TMV)、トマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus*=ToMV)、タバコ微斑モザイクウイルス (*Tobacco mild green mosaic virus*=TMGMV)、パプリカマイルドモットルウイルス (*Paprika mild mottle virus*=PaMMV) 及びトウガラシ微斑ウイルス (*Pepper mild mottle virus*=PMMoV) の5種類である。

トウガラシ属では、主なトバモウイルス抵抗性遺伝子として *L* 遺伝子 (L^1 、 L^2 、 L^3 及び L^4) の存在が報告されている。トバモウイルスは、それら個々の *L* 遺伝子を保有するトウガラシ属品種が、感受性反応を示すか抵抗性反応を示すかにより、病原型 0、1、1-2、1-2-3 及び 1-2-3-4 に分類される。TMV、ToMV 及び TMGMV は P0 型に、PaMMV は P1 型に分類され、PMMoV には、P1-2 型、P1-2-3 型及び P1-2-3-4 型の3種類が存在する。(竹内・澤田, 2010)。

トウガラシ属トバモウイルス抵抗性特性調査マニュアルで供試するトウガラシ属品種及びウイルスの関係を表1に示した。

表1. トウガラシ属の抵抗性遺伝子と品種及びトバモウイルスの病原型とウイルス株の関係

		ウイルス病原型	0	1	1-2	1-2-3
トウガラシ抵抗性遺伝子		使用ウイルス株 (MAFF 番号)	TMGMV-J (MAFF260250)	PaMMV-J (MAFF260251)	PMMoV-J (MAFF104032)	PMMoV-#7 (MAFF260252)
		基準品種				
L^+ *	昌介		S	S	S	S
L^1	California Wonder		R	S	S	S
L^2	Tabasco		R	R	S	S
L^3	台パワー		R	R	R	S
L^4	L4 台パワー		R	R	R	R

S : 感受性 R : 抵抗性

* 抵抗性遺伝子を持たないことを示す。

本マニュアルで供試する基準品種及びウイルス株の組み合わせの反応を実線で囲んだ。

1. 準備する器具及び試薬等

植物の育成：128 穴セルトレイ、ポリポット（10.5cm 径、12cm 径又は 15cm 径）、培養土、粒状肥料

接種源の調製：電子天秤、ピペット、チップ、乳鉢、乳棒、0.1 M リン酸緩衝液（pH7.2）、タバコ

（接種源の増殖用、本葉 6～12 枚期の *Nicotiana benthamiana* 又は *N. tabacum*）

（磨砕汁を凍結保存する場合、エッペンドルフチューブ、遠心分離機）

接種：カーボランダム粉末、使い捨て手袋、ガラスべら（乾熱又はオートクレーブ滅菌済み）、マイ

クロピペッター、チップ、タバコ（ウイルスの病原性確認用、本葉 6～12 枚期の *N. tabacum* :

‘Xanthi nc’）

廃棄及び洗浄：オートクレーブ装置、オートクレーブバッグ、洗剤

2. 供試ウイルス株

審査基準ではトバモウイルス病原型 1 のウイルスとして、TMV が記載されており、TMV の分離株は農研機構農業生物資源ジーンバンクに多数保存されているが、その全ての分離株の病原型は明らかではない。このため、審査基準と同一の病原型 1 である PaMMV の日本系統（PaMMV-J）（Hamada ら、2003）（MAFF260251）を供試する。ウイルス株は、農研機構農業生物資源ジーンバンクから入手することができる。農業生物資源データベース「微生物遺伝資源の検索」で、MAFF 番号により検索する。

なお、調査を行う前に供試ウイルス株の病原性を確認する。

3. 供試品種及び供試株数

（1）基準品種

感受性基準品種：‘California Wonder’（ L^1 型品種）（JP32538）

抵抗性基準品種：‘Tabasco’（ L^2 型品種）（JP124226）

‘California Wonder’（JP32538）及び‘Tabasco’（JP124226）は、農研機構農業生物資源ジーンバンク植物遺伝資源部門より入手できる。

農業生物資源データベース「植物遺伝資源の検索(来歴)」より、JP 番号により検索する。

（2）供試株数

接種区：20 株、無接種区：20 株

4. 調査方法

（1）接種源の増殖及び調製

PaMMV-J の増殖は、接種源を *Nicotiana benthamiana* 又は *N. tabacum* の下位葉にカーボランダムを用いて汁液接種し、1～2 週間後に接種葉及びモザイクを生じた葉を回収する。感染葉は-80℃で保存し、接種時にウイルス感染葉の重量に対して 10～15 倍量のリン酸緩衝液（pH7.2）を加え、乳鉢と乳棒を用いてよく磨砕し、接種源とする。または、前述の磨砕汁を遠心した上清を、1.5 ml エッペンドルフチューブに分注し、-20℃または-80℃で保存する。なお、解凍した接種源は再度冷凍せず、余剰は廃棄する。

(2) 供試品種等の準備

①タバコ ‘Xanthi nc’

接種と同時に行う接種源の病原性確認及び調査時に任意で行う上位葉の感染の確認で、それぞれ異なる株を使用する。

培養土をつめたポットなどに散播する。は種約2週間後に、培養土をつめた直径12cm又は15cmポットに1～3株ずつ定植する。栽培期間中、適宜粒状肥料を施肥する。

②トウガラシ

培養土をつめた128穴セルトレイに1粒ずつは種し、かん水して育苗する(図1左)。は種約2週間後に、培養土をつめた直径10.5cmポットに1株ずつ定植する(図1右)。根が定着した頃(およそ3日後)に、粒状肥料を施肥する。

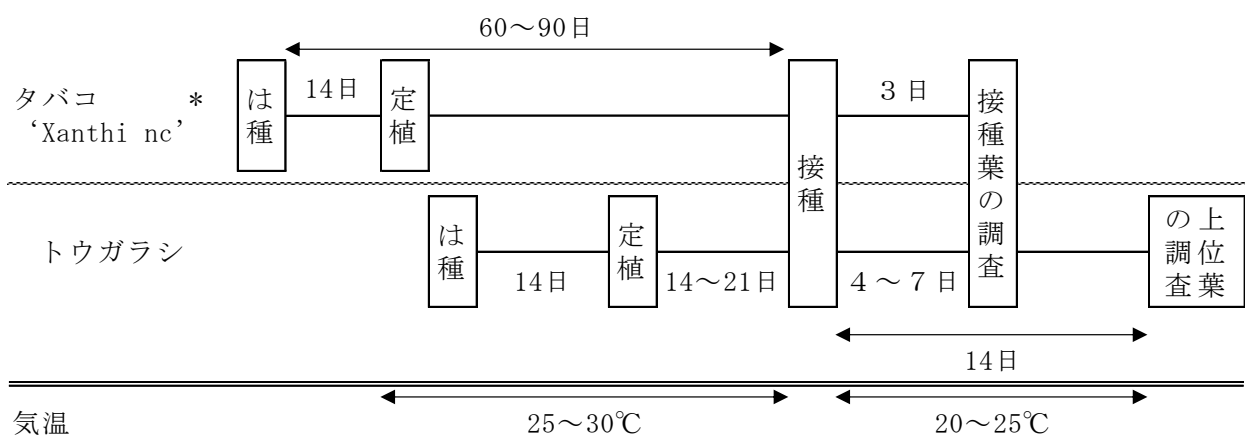
定植後1～2週間後(本葉3～6枚程度展開)の苗を供試する。



図1. 定植適期の目安(左)及び10.5cmポットに定植した苗

タバコ及びトウガラシのは種から接種及び調査までの目安となる日数及び気温を表2に示した。

表2. 検定に使用する植物の栽培暦



* 後述の4.(6)調査②上位葉の調査における感染の確認でタバコ‘Xanthi nc’を使用する場合には、複数株を育苗し、接種源の病原性確認で使用した株以外の株を使用する。

(3) 接種方法

本葉が3～6枚展開した時期に(図2)、第1本葉及び第2本葉(子葉の次に展開した葉)の2枚に接種する。接種を行う本葉にカーボランダムを極薄く振り掛け、葉1枚あたり総量10～20 μ Lの接種源を数か所にわけて滴下し、葉裏を手指で支えながらガラスべらで優しく擦って接種する。

無接種区の株は同様の方法でリン酸緩衝液(pH7.2)を接種する。

接種作業終了後に、接種葉上のカーボランダムを通常のかん水のように水道水で洗い流す。

タバコモザイクウイルス(病原型1) 基準品種
(供試ウイルス: PaMMV-J, MAFF260251)



図2. 各供試品種の接種適期の目安

左: 'California Wonder' (L^1 型品種)

右: 'Tabasco' (L^2 型品種)

(4) 接種源の病原性確認

トウガラシへの接種と同時に、接種源の病原性を確認するため、局部病斑宿主であるタバコ'Xanthi nc'にも(3)と同様の方法で接種する。接種から3日後までに、接種葉に数十個以上の局部えそ斑が形成されていれば接種源に病原性があり、接種及び接種後の管理が適切といえる(図3)。



図3. タバコ'Xanthi nc'に生じたトバモウイルスによる局部えそ斑の典型例(接種3日後)

(5) 接種後の管理

室温 20～25℃に調整した自然光下の温室等で管理する。28℃以上では抵抗性が十分に機能せず、ウイルスが接種葉に留まらず上位葉に移行する可能性があるため、28℃未満となるよう注意する。なお、抵抗性が十分に機能しなかった場合には上位葉にえそが生じる。

また、供試株間でのウイルスの意図しない伝染を避けるため、株同士が触れ合わないよう留意する。頭上灌水は行わず、株元への灌水又は底面給水とし、徒長により株が倒れないよう、水管理に留意する。

(6) 調査

①接種葉の調査

接種4～7日後に、接種区の各株の接種葉2枚の症状を、無接種区の接種葉及び基準品種の接種葉と比較し、明瞭なえそ、えそ斑点又はえそによる落葉の症状の有無により、抵抗性反応の有無を調査する。

感受性品種では抵抗性反応が生じず、接種葉には目立った症状は現れない(図4左)。抵抗性品種では、抵抗性反応として接種葉にえそ斑点や局部えそ斑、又はえそ斑に伴う落葉が生じる(図4右)。抵抗性反応が弱い場合、不明瞭なえそ斑や退緑、黄化といった症状が生じる。

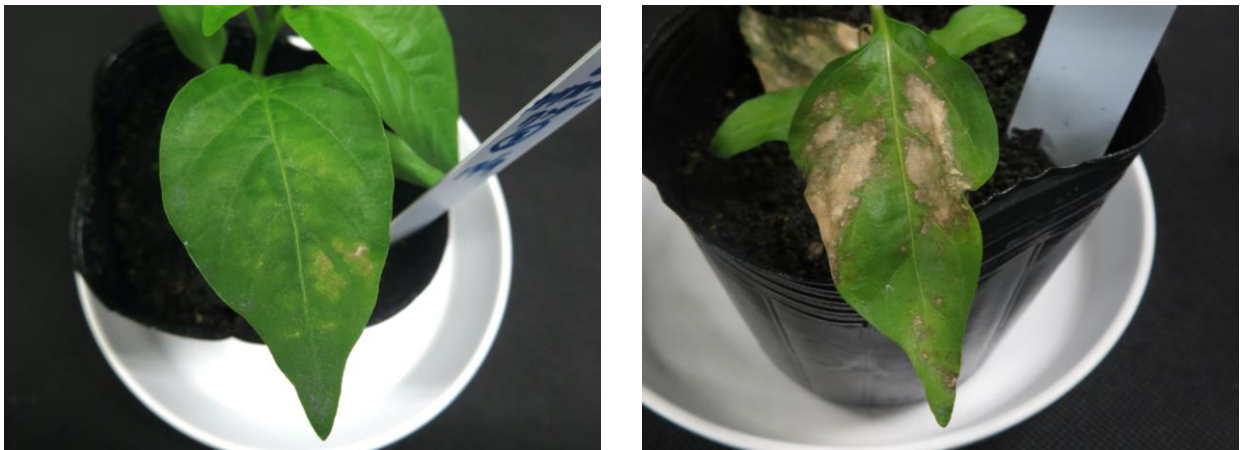


図4. 接種6日後の接種葉の症状 (PaMMV-J (MAFF260251))

左: 'California Wonder' (L^1 型品種: 抵抗性反応無し) 右: 'Tabasco' (L^2 型品種: 抵抗性反応)

また、評価の参考として、株毎に以下の評点を記録する。

評点	抵抗性反応の程度
3	えそ斑点、えそ、えそ後の落葉
2	境界のはっきりしないえそ斑
1	退緑、黄化
0	反応なし

②上位葉の調査

接種約 14 日後に接種区の各株の上位葉（主に頂部の新葉から 4 – 5 葉目まで）の症状を、無接種区の上位葉及び基準品種の上位葉と比較し、調査する。感受性品種では、上位葉にモザイク、縮葉又は株のわい化が生じる（図 5 左）。抵抗性品種の場合、上位葉に症状は現れない（図 5 右）。



図 5. 接種 15 日後の上位葉 PaMMV-J (MAFF260251) 接種株

左：‘California Wonder’ (L^1 型品種：感受性反応) 右：‘Tabasco’ (L^2 型品種：抵抗性反応)



図 6. 接種 15 日後の上位葉 無接種株

左：‘California Wonder’ (L^1 型品種)

右：‘Tabasco’ (L^2 型品種)

なお、上位葉の病徴が不明瞭で感染の有無が判然としない場合、追加で 1 週間程度管理し、接種 21 日後に調査を行う。または、上位葉を採取して (4) と同様にタバコ ‘Xanthi nc’ に接種を行い、その接種葉における局部えそ斑形成の有無により、トウガラシ株への感染の有無を確認する。ただし、トウガラシにはウイルス感染阻害物質が含まれていることから、トウガラシを接種源とした場合、タバコが接種源の場合に比べて局部えそ斑数が減少すること、また、トウガラシ株のウイルス濃度が低い場合は、局部えそ斑数が病原性確認時より減少することに留意する。

また、評価の参考として、株毎に以下の発病評点を記録する。

発病評点	発病程度
3	明瞭なモザイク、強い縮葉、株のわい化
2	不明瞭なモザイク、縮葉
1	僅かなモザイク、弱い縮葉
0	無病徴

5. 評価方法

(1) 調査結果の整理

評価に当たって、株別に記録した4. (6)①接種葉の調査結果が抵抗性反応無、かつ4. (6)②上位葉の調査結果が発病無の株は、接種ができていない可能性が非常に高いため、調査個体から除外した上で、①抵抗性反応株率、②抵抗性反応指数、③発病株率及び④発病指数を算出し、表3のように取りまとめる。

① 抵抗性反応株率

抵抗性反応の評点0及び評点1の株を抵抗性反応無、評点2及び評点3の株を抵抗性反応有として、供試品種毎に、以下の算出式で抵抗性反応株率を算出する。

$$\text{抵抗性反応株率} = \frac{\text{抵抗性反応株数}}{\text{調査株数}} \times 100$$

② 抵抗性反応指数

評価の参考値として、以下の算出式で抵抗性反応指数も算出する。

$$\text{抵抗性反応指数} = \frac{\Sigma (\text{抵抗性反応の評点} \times \text{抵抗性反応の評点別株数})}{\text{調査株数} \times 3} \times 100$$

③ 発病株率

発病評点0の株を発病無、発病評点1, 2及び評点3の株を発病有として、供試品種毎に、以下の算出式で発病株率を算出する。

$$\text{発病株率} = \frac{\text{発病株数}}{\text{調査株数}} \times 100$$

④ 発病指数

評価の参考値として、以下の算出式で抵抗性反応指数も算出する。

$$\text{発病指数} = \frac{\Sigma (\text{発病評点} \times \text{発病評点別株数})}{\text{調査株数} \times 3} \times 100$$

表 3. 調査結果

品種名	抵抗性反応株率 (%)	抵抗性反応指数	発病株率 (%)	発病指数
出願品種				
対照品種				
感受性基準品種				
抵抗性基準品種				

(2) 特性評価

(1) で算出した抵抗性反応株率と、発病株率の大小により特性を評価する。

特性値 1 : 抵抗性無 (感受性) : 抵抗性反応株率 < 発病株率

特性値 9 : 抵抗性有 : 抵抗性反応株率 > 発病株率

なお、抵抗性無と評価されたが発病株率 50%未満の場合や、抵抗性有と評価されたが発病株率 10%以上の場合は、均一性に問題がある可能性があるため、追加試験により均一性を確認する。また、調査結果の整理において調査個体から除外した株数が、供試株数の過半数となる場合も、適切な試験が行えなかったものとして再試験とする。

6. 注意事項

接種時のウイルス濃度が高い場合や、接種後に 28℃以上の高温条件となった場合、上位葉にまでえそが生じてモザイク・縮葉の症状が観察できなくなるため、適切なウイルス濃度での接種や、接種後の温度管理に留意する。また、ウイルスの拡散防止に留意して試験を実施し、試験終了後は供試株や土壌等をオートクレーブ処理によりウイルスを不活化して処分する。

7. その他



図 7. 試験の実施例 (全景, 2019 年 6 月 27 日撮影)

8. 参考文献

竹内繁治, 澤田博正 (2010)、Capsicum 属植物に発生するトバモウイルスと品種の抵抗性

Hamada et al. (2003) Characterization of Paprika mild mottle virus first isolated in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 69:199-204.