

ピーマンのウイルス病に関する研究

第1報 ピーマンを接種源とする汁液接種法の検討

井本 征 史

要 約

井本征史：(1974) ピーマンのウイルス病に関する研究 第1報 ピーマンを接種源とする汁液接種法の検討。広島農試報告 35：43～48

ピーマンの汁液には強いウイルス感染阻止作用があり、畑で採集した発病株の病葉を接種源とするとピーマン苗には容易に感染するが、タバコ、*N. glutinosa* センニチコウには50～60%程度の感染（CMVの場合）にとどまり、ソラマメ、*C. amaranticolor* には感染しない。感染したピーマン苗の頂葉を接種源とすると原株より高い感染率を示し、さらに発病したタバコ、*N. glutinosa*、およびセンニチコウの頂葉を接種源とすると全検定植物に接種が可能であり、その病徴も明瞭となる。EDTAを含むクエン酸緩衝液で分画遠心を2回行なうと感染阻止物質が除去され、直ちに全検定植物に汁液接種が可能である。フェノール処理で感染阻止物質がかなり除去できたが検定植物に葉害を生じ、 Na_2SO_4 など8種類の薬品を添加した各緩衝液によってウイルス感染の阻止力は低下しなかった。

I 緒 言

多くのピーマン産地で TMV、CMV 等によるウイルス病の発生が見られ、大きな減収の要因となっている。ウイルス病の防除を行なうにあたっては、病原ウイルスの種類を明らかにすることが必要であるが、ウイルスの同定の1手段である植物検定法は、ピーマン汁液に強いウイルス感染阻止作用がある^{1,2,3}ため、汁液接種の成功率が低い難点がある。著者は畑で採集した罹病ピーマンを接種源とした汁液接種を容易にするため、接種源への各種薬品の添加、超遠心分離法によるウイルス感染阻止物質の除去、阻害作用を受けにくい検定植物の探索等について実験を行ない、ほぼ実用に供し得る接種法を見いだしたので、その結果を報告する。

本試験は主として農林省植物ウイルス研究所で行なったものである。種々御教示、御指導を賜った小室康雄博士、栃原比呂志博士、および岩木満朗技官に対し謹んで感謝の意を表する。また校閲の労をとられた当場病害虫部中村啓二部長に対し厚くお礼申し上げる。

II 実験材料および方法

供試植物はガラス温室やフェイロン温室内で適宜殺虫剤を散布して育成したものである。検定植物には主として *Chenopodium amaranticolor* (アカザ)、*Nicotiana*

glutinosa (グルチノザ)、*Nicotiana tabacum* (Bright Yellow, Holme's Samsun) (タバコ)、*Datura stramonium* (チョウセンアサガオ)、*Vicia faba* (ソラマメ)、*Gomphrena globosa* (センニチコウ)、および *Capsicum frutescens* (California Wonder) (ピーマン) を供試した。接種源として用いたウイルスは、タバコ・モザイク・ウイルス (TMV) では普通系の純化したものを、キュウリ・モザイク・ウイルス (CMV) および CMV と TMV の混合接種の場合は温室内で保存育成した自然発病株を供試した。特記しないかぎり接種源の磨砕、ウイルスの希釈には0.02% KCN 添加0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) を使用し、ピーマン葉重量に同量の緩衝液で磨砕した汁液を原液とした。接種はカーボランダムを用いる常法によって行なった。

III 実験結果

1. ピーマン汁液の感染阻止作用

1) 汁液接種による各検定植物の感染状況

圃場で採集した発病株を接種源として、数種検定植物に接種し感染の有無を調べた。接種源は CMV と TMV の重複感染株を供試し、病葉の10倍量のリン酸緩衝液で磨砕し、数回にわたって数種検定植物に接種し、少なくとも15日間は病徴の出現を観察した。その結果第1表で明らかのように、ピーマン苗は両種ウイルスに対して100%の個体が感染したが、TMV においては Bright

*本研究の一部は、昭和45年度日本植物病理学会大会に於いて発表した。

第1表 汁液接種に対する各種検定植物の反応

接種源	検定植物の種類							原株中のウイルス	
	アソカザ	ソラマメ	タバコ	グリンゴ	ダマシ	センチュウ	ベニバナ		
原株	—	—	M	L	L	L	..	M	C M V
タバコ上葉	L	—	M	L	L	L	M	M	+
グリンゴ上葉	L	L	M	M	—	M	M	M	T M V
原株	—	—	M	—	—	—	—	M	C M V
ピーマン上葉	—	—	M	M	—	M	—	M	C M V
タバコ上葉	L	L	M	M	—	—	M	M	
原株	—	—	—	—	—	—	—	M	C M V
ピーマン上葉	—	M	M	M	R	M	..	M	+
グリンゴ上葉	L	L	M	M	M	..	BBWV
ソラマメ上葉	L	M	M	—	(R)	R	M	M	M
原株	—	—	M	—	—	—	—	M	C M V
ピーマン上葉	—	—	M	M	..	—	M	M	C M V
タバコ上葉	L	L	M	M	M	M	M	M	

注) タバコ: Bright Yellow, L: local lesion, M: mosaic, —: 接種陰性, R: ring spot, ..: 未試験, (): まれに病徴発現

第2表 ピーマン汁液の希釈による阻害の減少

汁液濃度	TMV濃度mg/ml	病斑数
10	0.03	79
40	0.03	115
100	0.03	160
200	0.03	228
2,000	0.03	289
10,000	0.03	全面
P.B.	0.03	全面

注) 接種量 4 ml, P.B.: リン酸緩衝液 供試植物: Holme's Samsun

第3表 ピーマン汁液とTMVの接触の違いによる阻害

処 理	病斑数
リン酸緩衝液にTMVを加え接種	114
健全汁液を塗った後、直ちにTMV接種	63
健全汁液を塗った後、水洗しTMV接種	45
健全汁液にTMVを加え接種	21

注) TMV濃度は0.006mg/mlのものを使用した。 供試植物: Holme's Samsun

Yellow, センニチコウで60~70%程度の個体が全身感染し, *N. glutinosa*, *D. stramonium* センニチコウの接種葉に僅かな局部病斑を作り, *C. amaranticolor* は全く感染しなかった。CMVではBright Yellow, *N. glutinosa*, センニチコウで50~60%の個体に全身感染が認められたが, *C. amaranticolor*, ソラマメ, ペチュニアなどでは感染が認められなかった。

2) 感染阻止物質の作用性

ウイルス感染阻止物質が, 希釈及びウイルスとの接触のしかたによって, ウイルス感染にどのような影響をおよぼすかを知るための試験を行なった。希釈試験は, 健全ピーマンの汁液を7段階に希釈し, 対照としてリン酸緩衝液区を設け, これに濃度が0.03mg/mlになるようにTMVを加えてHolme's Samsunに接種し, 4日後に接種葉に生じた病斑数(1処理3葉)を調査した。第2表のように, ピーマンの汁液は10倍液で感染をかなり阻止し, 10⁴倍に希釈すると阻止作用が認められなくなった。これは平井¹⁾がトウガラシで, 吉井⁴⁾がアカザで得ている結果とよく一致している。

ピーマン汁液とTMVの接触の違いによる感染力の阻害程度を第3表に示した。10倍に希釈したピーマン汁液にTMVを直接混合して接種した場合に阻止程度が最も高く, 次いでピーマン汁液を接種葉に塗った場合に阻止作用が高かった。この場合, 汁液塗布後水洗しても感染阻害作用は低下しなかった。

2. ピーマン汁液の感染阻止作用の除去

1) 薬品添加による阻止作用の除去

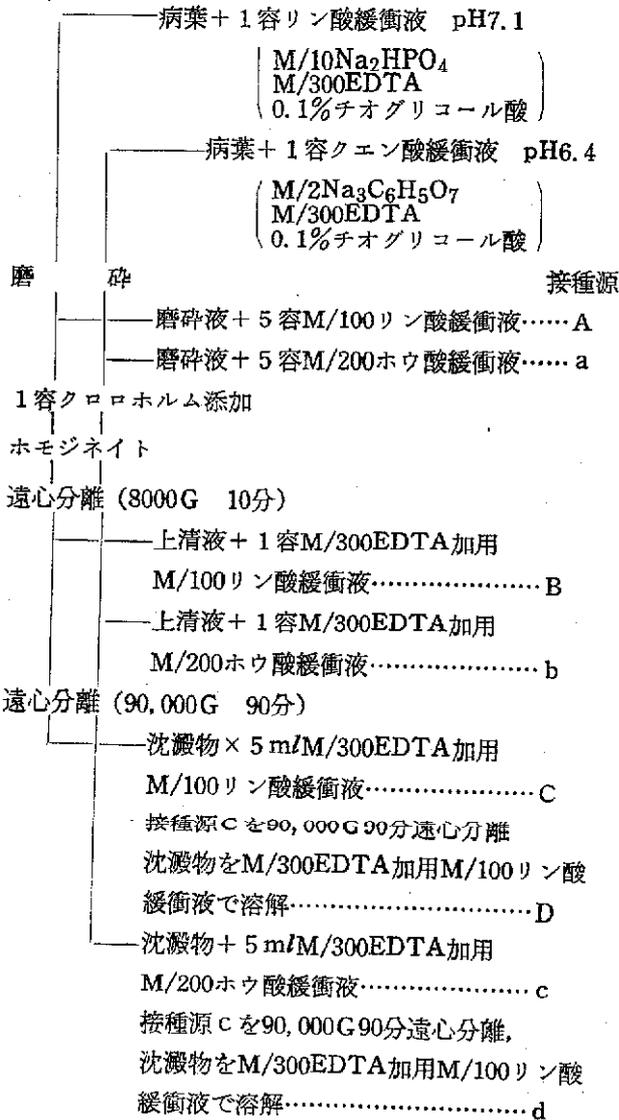
第4表に示すように, Na₂SO₄など8種類の薬品を添加したリン酸緩衝液10ml中で, ピーマン葉2.5gを磨砕し, 得られた磨砕液2mlにTMV(0.006mg/ml)液を2ml加えて*N. glutinosa*(3葉), Holme's Samsun(4葉)に接種し, 4日後に接種葉の局部病斑数を調べた。その結果, いずれの薬品も感染阻止作用を低下させる効果は認められなかった。

別に, フェノールによる感染阻止物質の除去を目的として, CMV(病葉)とTMV(健全葉1g当り0.006mg/ml)1mlを用いた実験を行なった。生葉に75%フェノール1.5容, M/400EDTA, 0.1%チオグリコール酸を添加した緩衝液(CMVでは0.5Mクエン酸, TMVでは0.05Mリン酸)1容, ベントナイト⁵⁾容を加えて磨砕し, 8000Gで10分間遠心分離した。CMVを含む層は中間層に, TMVは上層に分離する。それぞれを含む層をとり, CMV区はリン酸緩衝液で5倍と10倍に, TMV区は10倍に希釈して実験に供した。別にTMVを含む上層の10倍液に純化TMV(0.06mg/ml)0.1mlを加えた

区を設けた。CMV 区はソラマメ 4 葉に、TMV 区は *N. glutinosa* 3 葉に接種し、7 日後に局部病斑数を調べた。第 5 表のようにフェノール処理によって CMV 区ではソラマメに局部病斑を生じ、ウイルス感染阻止物質が減少し、TMV でも同様の傾向であった。フェノール処理によって阻止物質はある程度除去され汁液接種が可能であるが、*N. glutinosa* の接種葉に葉害を生じるので、メチルエーテルを加え窒素ガスを通して葉害を防止する必要があると思われる。

2) 超遠心分離による感染阻止物質の除去

次の処理によって各段階の接種源を得た。



これらの接種源を *C. amaranticolor* 3 葉, Holme's Samsun 3 葉, ソラマメ 5 葉に接種し、7 日後に局部病斑の調査を行なった。第 6 表に示すように、TMV, CMV ともに 8,000G と 90,000G 2 回の遠心分離を行ない、沈澱物を緩衝液に溶解して接種すると、阻止物質が除去されて検定植物は容易に発病することがわかった。

第 4 表 薬品による感染阻害の抑制

処 理	健葉 g/ml	<i>N. glutinosa</i>	H. samsun
M/50Na ₂ SO ₄	0.25	8	1
0.2%HSCH ₂ COOH	0.25	6	0
M/50C ₆ H ₈ O ₆	0.25	4	4
M/50KCN	0.25	5	1
M/50DIECA	0.25	3	1
0.6%ベントナイト	0.25	11	9
0.2%活性炭	0.25	6	2
0.2%HSCH ₂ CH ₂ OH	0.25	5	3
リン酸緩衝液	0.25	1	1
リン酸緩衝液	—	279	296

注) 接種時には各薬品、汁液とも 1/2 の濃度で行ない、TMV は最終濃度 0.003mg/ml とした。各容液の pH は 6.8~7.2 の間にあった。

第 5 表 フェノールによる感染阻止物質の除去

処 理	検定植物	病斑数
無処理(病葉 + 10 容 P·B)	ソラマメ	0
CMV 中間層液を 5 倍希釈	ソラマメ	8
” 10 倍希釈	ソラマメ	23
TMV 上層液を 10 倍に希釈	グルチノザ	12
” + TMV 0.1ml	グルチノザ	25

注) P·B: リン酸緩衝液, 病斑数はソラマメ 4 葉, *N. glutinosa* 3 葉の局部病斑数

第 6 表 分画遠心による感染阻止物質の除去

処 理	アカザ	ソラマメ	H. Samsun
A	0	0	111
B	—	0	95
C	—	0	500 以上
D	300 以上	60	500 以上
a	0	0	30
b	—	0	34
c	—	105	228
d	500 以上	500 以上	500 以上

注) 数字はアカザ 3 葉, H. Samsun 3 葉, ソラマメ 5 葉に接種した 7 日後の局部病斑数を示す。

また接種の際用いる緩衝液の種類と病斑数の関係は、TMV の場合は発病病斑数に差は認められないが、CMV の場合はクエン酸緩衝液の方が発病病斑数が多く、ウイルスに適した緩衝液であると思われる。

3) 頂葉接種法

阻止物質に影響されない検定植物を探索するため、実験結果 1 の 1) に示した方法で、各種ウイルスに感染し

たピーマン原株を接種源として、検定植物に接種したところ、ピーマン苗のみに100%近い発病が見られた。この発病したピーマン苗の頂葉を取り、常法により数種の検定植物に接種すると、原株からの接種結果に比べて高率の発病が認められる。例えばタバコ、センニチコウでは50%程度の発病率が70~80%に増加する。同様の現象はタバコやソラマメなどの発病株の頂葉接種によっても認められる。

ピーマン、タバコ、*N. glutinosa*、ソラマメ等に各種ウイルスを接種し、接種1~2週間後の発病初期に頂葉を取り、数種検定植物に接種した結果は第1表の通りで頂葉を接種源とした方が、原株を接種源とした場合より発病および病徴の判断が容易であることが明らかとなった。

IV 考 察

ピーマンに含まれるウイルス感染阻止物質除去のため試みた方法のうち、薬品添加はフェノールがやや有効と思われたが、フェノールの*N. glutinosa*に対する薬害防止のため、やや煩雑な処理が必要なことや、遠心分離を併用するため、有利な方法とは考えられない。超遠心分離法は2回の超遠心分離により確実に接種できるようになり、実験方法も複雑ではなく、後述の頂葉接種法より短時間で結果が現われ、すぐれた方法と考えられるが、超遠心分離機が高価であり、各所で常備されていないことが欠点である。

頂葉接種法は、畑で採集した発病株を接種源とした場合も、ピーマン苗には容易に発病し、かつその発病苗の頂葉による再接種で、多くの検定植物が発病し易くなることに注目して考え出した方法であるが、著者はこの方法によってウイルスの検定を行ない、ピーマンの数種ウイルスの同定に成功している。方法の概要は、畑で採集した発病株から病葉1~2gを取り、0.02% KCN 添加0.05M リン酸緩衝液10~20容を加えて磨砕し、常法により検定植物に接種する(阻害物質の希釈試験の結果およびウイルスの希釈の点から、この程度の希釈が適当と考えられる)。検定植物は、Bright Yellow, *N. glutinosa*, センニチコウおよびピーマンを用い、ピーマン苗にのみ発病した場合はその頂葉を再び Bright Yellow, *N. glutinosa*, センニチコウに接種し、発病したものの頂葉をさらに全検定植物に接種する。普通2~4回の接種結果によってウイルスの種類を同定することが出来る。

現在まで我国のピーマンから分離されたウイルスは CMV, TMV, BBWV (Broad bean wilt virus) 2

系統, CMMV (キク微斑・モザイク・ウイルス) PVY (ジャガイモ・Y・ウイルス) (著者未発表) である。これらのウイルスは、ピーマン汁液による阻害作用を顕著にうけるが、汁液接種が可能であり、Bright Yellow, *N. glutinosa*, センニチコウのいずれかが感染するのでピーマン苗の頂葉を接種源とする方法で同定が可能である。

V 摘 要

ピーマンの汁液には強いウイルス感染阻止作用があり、通常の汁液接種では感染しにくいいため、阻止物質除去の方法と汁液接種の方法について検討した。

1) ピーマンに含まれるウイルス感染阻止物質は希釈によって阻止力が低下し、葉面に塗布した阻止物質は水洗によって除去できなかった。

2) リン酸緩衝液に Na_2SO_4 などの8種類の薬品を添加した各緩衝液で、健全ピーマン葉を磨砕し TMV を加えて接種したが、阻止作用は低下しなかった。

3) フェノール処理により感染阻止物質はかなり除去できたが、*N. glutinosa* の接種葉に葉害を生じた。

4) M/300 EDTA を含むクエン酸緩衝液で分画遠心を2回行なうと、感染阻止物質が除去できて全検定植物に汁液接種が可能であった。

5) 畑で採集した発病株の病葉に10~20容の0.02% KCN 添加0.05M リン酸緩衝液を加え磨砕し接種すると、ピーマン苗には容易に感染するが、CMV の場合 Bright Yellow, *N. glutinosa*, センニチコウに50~60%感染し、ソラマメ、*C. amaranticolor* には感染しなかった。感染ピーマン苗の頂葉を接種源とすると、原株より高い感染率を示し、さらに Bright Yellow, *N. glutinosa* センニチコウの発病葉を接種源とすると、全検定植物に接種が可能である。

以上の結果から、畑で採集したピーマンを接種源とする場合、0.02% KCN 添加0.05M リン酸緩衝液を使用し、一度ピーマン苗及び Bright Yellow, *N. glutinosa*, センニチコウに接種し、ピーマン苗のみに発病した場合は、その頂葉を接種源としてセンニチコウ、Bright Yellow, *N. glutinosa* に再接種すると感染率が高くなる。さらにこれらの発病株の頂葉を接種源とすると全検定植物に対して汁液接種が出来る。また、検定を急ぐ場合には EDTA を含むクエン酸緩衝液で分画遠心を行なうと、感染阻止物質を除去できて、直ちに全検定植物に汁液接種が可能である。

引用文献

- 1) 平井篤造：1949. トウガラシ汁液による植物バイラスの不活性と再活性, 科学 19(5) : 233
- 2) MARCHOUX G. :1967. Effet inhibiteur des extraits de feuille de piment sur l'infection par gaelgues virus d'hôtes hypersensibles. Études de

Virologie, Ann. Épiphyties, 18 H.—S., : 35~45

- 3) ————— : 1968. Effet inhibiteur des extraits de feuilles de Piment. II. concentration et purification d'une fraction inhibitrice. Études de Virologie Ann. Épiphyties, 19H.—S., : 21~30

- 4) 古井甫・佐古宣道：1967. フカザ搾汁液のウイルス感染阻止作用について, 日植病報 33(4) : 244~252

Studies on the Virus Disease of Sweet Pepper (*Capsicum frutescens* L).

1. Examination of sap inoculation method with the infected pepper plant.

Masashi IMOTO

Summary

Because the pepper showed the inhibitory effects against the infection of the test plants, the identification of viruses of the naturally infected pepper could not easily carry out. So the experiments were carried out to find the suitable inoculation technique eliminating the inhibitory substance from the crude preparation.

- 1) The methods eliminating the inhibitory substance from the crude preparation.

(1) The eight kinds of chemicals were put in separately to the leaves sap of healthy pepper added TMV. The ability to depress the inhibitory effects of the each chemical could hardly recognize.

(2) The inhibitor was removed fairly well from the leaves of systemically infected pepper by means of phenol extracts, but phenol in inoculation sap produced chemical injury on the leaves of *N. glutinosa*.

(3) The 0.5M citric buffer, pH6.4, containing M/300 EDTA and the chloroform were added to the diseased leaves of pepper infected naturally respectively equal volume. After the mixture were homogenized completely, it was centrifugalized (8,000xg, 10min.). And the supernatant fluid was centrifugalized (90,000xg, 90min.). The resultant precipitation added with M/200 boric buffer containing M/300 EDTA was centrifugalized again (90,000xg, 90min.) and the precipitation was dissolved with M/100 phosphate buffer containing M/300 EDTA. The resultant purified preparation thus get, did not contain the inhibitor and the infection of the test plant were easily obtained with this preparation. Though this method was required super-centrifuge, it have the advantage of identifying the causal viruses when the identification was needed urgently.

- 2) The suitable inoculation technique using crude preparation.

The crude preparation was obtained to grind the diseased pepper leaves infected naturally with 10 to 20 fold (by weight) of 0.05M phosphate buffer solution, pH7.0, containing 0.02% KCN.

Though the crude preparation thus obtained infected papper easily, the other test plants, Bright Yellow, *N. glutinosa*, and globe amaranth were infected only 50 to 60% of the plants examined. Moreover, the crude preparation could not infecte broad bean and *C. amaranticolor*. But the preparation from the top leaves of systemically infected young pepper after artificial inoculation with the crude preparation showed higher infectivity than that from the naturally infected pepper in the field. And futher, all the test plants were easily infected with the preparation from the top leaves of the artificially inoculated Bright Yellow, *N. glutinosa* and globe amaranth. But this technique required long time to identify the causal viruses.

From the above results, the identification of viruses of naturally infected pepper was possibly carried ont by the methods mentioned above.