Mini Review

アブラナ科野菜根こぶ病休眠胞子の発芽と感染性 —培養できないアブラナ科野菜の病原微生物，

Plasmodiophora brassicae の生態学的研究の将来展望—

Perspective on ecological studies of *Plasmodiophora brassicae*, an unculturable microorganism pathogenic on brassica crops

對馬 誠也*

TSUSHIMA SEIYA*

東北農業試験場総合研究部総合研究第3チーム

〒960-2156 福島市荒井字原宿南50

Project team 3, Department of Integrated Agricultural Research, Tohoku National Agricultural
Experiment Station, Arai, Fukushima 960-2156, Japan

(受付 1999年2月26日—受理 1999年4月28日)

Clubroot incited by *Plasmodiophora brassicae* Woron. causes serious yield losses in a wide range of brassica crops such as Chinese cabbage (*Brassica rapa* var. *pekinensis*). This pathogen is a root-invading organism belonging to the Plasmodiophorales, whose members are mostly obligate parasites. This pathogen does not grow in axenic culture, and can survive in soil as resting spores for a long period of time. These facts imply that the assessment of pathogenic activity of resting spores in soil is essential to study the ecology and control of the disease. The detection method using calcofluor white M2R and ethidium bromide has recently been developed. Other recent advances include *in vitro* growth of the pathogen and the inclusion of host-DNA in resting spores etc. A review of *in vitro* growth studies on *Plasmodiophora brassicae* was discussed here.

Key words: unculturable, clubroot, *Plasmodiophora brassicae*

1. はじめに

アブラナ科野菜根こぶ病は、キャベツ、ハクサイ、ブロッコリーなどのアブラナ科作物に大きな被害をもたらす病害である。本病の発生はアブラナ科作物を連作することによって著しく拡大するため、とくに連作せざるを得ない野菜産地で深刻な問題と

なっている。本病の病原菌は1877年に Woronin により最初に報告され、その後本病の発病機構や防除法などに関する多くの研究がなされた。その結果、一定の成果は得られているものの今なお決定的な防除法はなく、世界各国で大きな問題となっている。本病の研究に関しては、これまで多くの研究レビュー^{8,9,10,18,28)}がなされているが、そのいずれにおいても、本病原菌が培養できないことに起因する研究の遅れが指摘されている。ここでは、培養困難なために生じている根こぶ病研究上の問題点を指摘

* e-mail: seya@fk.affrc.go.jp

し、一例として人工培地を用いた検出が不可能な根こぶ病菌の休眠孢子数測定に関する研究の現状を紹介するとともに、最大の懸案事項である根こぶ病菌の培養可能性についてこれまでの研究をもとに論じてみたい。

2. 分類と生活環^{14,16)}

根こぶ病菌は菌界 (Mycota) の中の変形菌門 (Myxomycota), ネコブカビ綱 (Plasmodiophoromycetes), ネコブカビ目 (Plasmodiophorales), ネコブカビ科 (Plasmodiophoraceae) に入る。ネコブカビ綱にはジャガイモの粉状そうか病の病原菌である *Spongospora subterranea* などの植物病原菌やコムギ縮萎病ウイルスを伝播する *Polymyxa graminis* などが含まれるが、その中でもとくに根こぶ病菌による作物の被害が大きいと言われている。ネコブカビ綱が他の変形菌類と異なる点は、変形体が他種の生物の細胞内部に寄生する絶対寄生菌で、流動運動による食作用がみられず直接宿主植物の原形質から栄養を吸収することと、宿主細胞内に顕著な厚壁の休眠孢子（一次遊走子のう）を形成することである。なお、最近 Cavalier-Smith⁹⁾ は分子系統学的見地からネコブカビ門を変形菌門から独立させて原生動物 (Protozoa) に位置づけている。

本菌は休眠孢子的状態で土壤中に長期間生存している。この休眠孢子は宿主の根毛に感染して一次変形体を形成し、成熟すると二次遊走子のうとなる。二次遊走子のうからは二次遊走子が放出されるが、この二次遊走子は2個融合して主根や側根に侵入すると推定されている。これらは細胞内で発育して多核の二次変形体となるが、この時期に根こぶが形成される。二次変形体の中では核融合 (2n) が行われた後、減数分裂を経て一次遊走子のうが多数作られ、根が腐敗すると同時に一次遊走子のうが土壤中に放出される。一次遊走子のう、すなわち休眠孢子は球形～類球形で、直径は平均 3.2 μm である。

3. 培養できないことによる研究上の問題点

本菌が培養できないために生じる問題として、1) 無菌的に単休眠孢子由来のクローンを増殖させるのが難しい、2) 選択培地がないため土壌からの休眠孢子的検出・密度の推定が簡単にできない、などがあげられる。このため研究を推進する上で次のよう

な問題がある。

まず、無菌的なクローン増殖技術が簡単にできないことから、多くの試験では根こぶから回収して休眠孢子懸濁液を接種源として用いることが多いため、この菌液には常に複数のクローンが混在している可能性がある。このため、単一休眠孢子由来のクローンの病原力検定やその感染機構の解明が簡単にできないという問題がある。さらに根こぶ病菌にはアブラナ科作物に対する病原性の違いからレースが存在し、現在いくつかのレース判別法が開発されているが、実際には単一クローンを用いてのレース検定が困難であるため、厳密にはレース検定とはなっていないのが現状である。このことは同時に、特定のレースに対する宿主側の抵抗性遺伝子の解明等に関する研究が容易でなく、抵抗性育種の進展を妨げる要因となっている（釘貫，私信）。そのため、これらの問題を克服するために多くの研究がなされた結果、人工培養に代わる技術として単孢子接種技術およびカルス培養による無菌的な休眠孢子生産技術が開発されると同時に、こうした研究から人工培養の可能性に関して示唆に富む報告もなされてきた。

次に、土壌中の休眠孢子数の推定法としては、土壌から回収した休眠孢子的を顕微鏡観察により直接的推定する方法と所定濃度の休眠孢子懸濁液を接種して得た dose-response 曲線から汚染土壌の菌密度を間接的に推定する方法が知られている。しかし、従来の回収法は時間がかかり²⁴⁾、必ずしも実用的ではないという問題があったが、近年いろいろ工夫が加えられて新しい休眠孢子回収法や染色法が考案された。その結果、従来より短い時間で検出が可能になってきた。以下において、これらの新しい技術を用いた研究の現状と根こぶ病菌の人工培養の可能性について紹介する。

4. 土壌菌密度推定法

著者らは、現在根こぶ病の減農薬技術を確立するために、土壌中の休眠孢子密度の推定、dose-response 曲線を中心とした土壌評価などを行うことによって防除資材やおとり植物をより効果的に活用するための総合防除技術を開発中である^{17,29)}。しかしこのためには、対象圃場における土壌中の休眠孢子数を迅速に測定することが必要であり、さらに測定した休眠孢子中に高い感染力をもつ休眠孢子がどの程度あるかを知ることが重要である。現在用い

Fig. 1. Relationship between fluorescent staining reaction and pathogenicity of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* heated at 40C, 50C or 60C for the indicated incubation periods²⁶⁾.

られている休眠孢子の検出法は、土壌から休眠孢子を回収する方法と回収した休眠孢子を特異的に識別する方法から構成されており、このうち識別法には、蛍光色素による染色法²⁵⁻²⁷⁾、蛍光抗体法²¹⁾および酵素抗体法²¹⁾がある。蛍光色素を用いる方法は、操作が比較的簡単であることと、単に菌数だけでなく、休眠孢子の活性も評価できるメリットがあり、現在著者らはこの方法で土壌菌密度を調査している。Takahashi ら²⁵⁾は、根こぶ病菌の休眠孢子の外壁を厚く覆っているキチン層を特異的に染める蛍光色素カルコフルオールホワイトで休眠孢子を染色すると、休眠孢子が青白色に染まり、土壌中の粒子と識別できることを報告した (図 1)。その後、Takahashi ら^{26,27)}は、熱処理をした休眠孢子をカルコフルオールホワイトとエチジウムブロマイドで二重染色し、細胞壁のみが青く内部が無染色の休眠孢子 (青色孢子) と細胞壁が青くかつ内部が赤く染まる孢子 (赤色孢子) の存在を認め、このうち赤色孢子数は熱処理に伴い増加したことから、赤色孢子は活

Fig. 2. Fluorescence micrograph of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* differentially stained with a mixture solution of calcofluor white M2R and ethidium bromide (S. Tsushima). Bar = 10 μ m. A, red spore; B, blue spore.

性の低下した休眠孢子であるとした(図2)。また、本法は土壤中の休眠孢子的活性評価にも有効であることを明らかにし、現在土壤中の休眠孢子数と活性評価が比較的簡単にできるようになってきている。しかし、この方法も検出限界は約 $1 \times 10^4/\text{g}$ (乾土) とかなり低いことや、識別に熟練を要するため、今後、より簡単で高感度な検出法の開発が必要であろう。

5. 根こぶ病菌の各種培養法と人工培養の可能性

1) 人工培養の試み

Arnold ら²⁾は、新鮮な芽キャベツの根こぶから洗浄操作等を加えて休眠孢子を回収し、あらかじめ大腸菌を接種した Ringer 寒天平板上に滴下して 26°C で暗黒下に静置したところ、7日後に滴下した菌液の周辺にアメーバとシストを確認した。この菌株を更に7日間新しい培地で継代培養して懸濁液を作成し、10個体のハクサイとチリメンキャベツで接種試験を行った結果、ハクサイで全個体、チリメンキャベツでも10個体中5個体で根こぶの発生を確認するとともに、発病根の中に病原菌を認めた。彼らは、同様に2回継代培養したアメーバを用いて接種試験を実施したところ、アメーバ27個体中9個体でハクサイの発病を認めた。そこで、さらにアメーバの増殖が単なるコンタミによるものではないことを証明するために、休眠孢子由来の DNA から選抜した6個の DNA 断片をプローブとして、2回継代培養後の12個体のアメーバ DNA にドットプロットハイブリダイゼーションを実施したところ、3個体のアメーバでともに3つのプローブに対して強い陽性反応を示した。以上の結果は、短い期間とはいえ、本病原菌が培養できる可能性を示唆した点で刺激的である。しかし一方では、なぜ12個体中3個体でしか陽性反応が認められなかったのかについての説明は本論文では十分になされていない。また、病原性のあったアメーバを更に継代すると、継代菌はすべて病原性を消失すると同時にプローブに対する陽性反応も消失していることを認めており、これらの点については更なる検討が必要であろう。

2) 単孢子接種法

Buczacki⁴⁾ は、単独の休眠孢子を西洋ナタネ (*Brassica napus* var. *napus*) に接種して、根こぶ病を発現させることに成功した。その後、Kageyama

ら¹⁵⁾により簡易接種法が開発され、更に Narisawa ら¹⁹⁾によって感染率の高い単孢子接種法が報告されている。これらの結果は、まだ接種個体の生存率や感染率において十分実用的とは言えないが、一方でこうした研究の中から休眠孢子的感染や根こぶ形成に関して興味深い結果が提出された。彼ら¹⁹⁾は、まず DAPI 染色により休眠孢子に単核 (89.3%), 2核 (10.3%), 4核 (0.3%) のものがあることを確認した後、212個体のハクサイに単独の休眠孢子を接種したところ、接種したハクサイの内42個体が生存し、そのうち20個体 (48%) で根に変形体の形成を認めた。しかし、根に形成された小さな根こぶの中に休眠孢子は形成されなかった。この結果に関して、Narisawa らは根で確認した変形体が一次変形体 (単核) であって二次変形体 (2核を持つと思われる) ではないのではないかと考察しており、これまでの研究で根こぶ中に休眠孢子が形成されたのは二核体 (dikaryotic) の休眠孢子によるのではないかと推察した。Narisawa ら²⁰⁾は、さらに研究を進め、単核体 (monokaryotic) の休眠孢子では根こぶを形成するものの休眠孢子を形成しないが、二核体休眠孢子単独接種か一核体休眠孢子的2個同時接種により根こぶや休眠孢子的形成を認めた。このことは、次世代の休眠孢子的生産が一核体の休眠孢子単独では形成形成できないことを示しており、人工培養でクローンを形成する場合には、少なくとも一核体か二核体かあらかじめ把握しておく必要があることを示唆している。また、一核体のどの休眠孢子的の組み合わせが次世代の休眠孢子的形成を可能にするのかも含め、遺伝様式の解析等今後の研究が待たれる。

3) カルス培養法

Strandberg ら²³⁾は、 α -NAA とカイネチンを含む培地でキャベツの病根組織片からカルスが形成され、カルス内に変形体と、さらに孢子形成が見られることを報告した。その後、カルス培養による根こぶ形成に及ぼす種々の要因が多く研究者によって調べられた¹⁰⁾。これらの研究から、健全カルスは α -NAA とカイネチンが必要であるのに対して、保菌カルスでは α -NAA は必要であるがカイネチンは必要ないこと²²⁾や、罹病根からのカルスの生育が健全根由来のカルスより良好であること^{12,22)}などが明らかにされた。また、池上¹¹⁾によると、変形体の核数の増加に伴う細胞の核 DNA 量の増加が認められた。

一般に、感染細胞中にはデンプンが蓄積することでも知られており、このデンプンは休眠胞子形成時には著しく減少する。これらの結果から、デンプンが変形体の増殖と休眠胞子の生産などに利用されているのではないかとする考えもある（田中、私信）。

以上のように、カルス内で根こぶ病菌の発育に及ぼす植物ホルモンの影響や発育に伴う養分の変動などがかなり詳細に検討されている。したがって、今後はこれらの結果を基に、上記にあげた宿主の代謝産物、すなわち宿主の DNA 増加やデンプンなどの養分が、培養での根こぶ病菌の発育のために必須なのかどうかの更なる検討が必要であろう。

4) 根こぶ病菌による宿主 DNA の吸収

Bryngelsson ら³⁾は、西洋ナタネ (*Brassica napus*) などを用い、根こぶから回収した休眠胞子由来の DNA が宿主由来の DNA の反復配列に高い相同性を示すことから、休眠胞子が宿主の DNA を吸収していると報告した。さらに、この休眠胞子は他の宿主を通過すると、新しい宿主の DNA を吸収していることも明らかにし、休眠胞子による宿主 DNA の吸収の意味は不明としながらも、宿主 DNA の吸収が根こぶ病菌の進化および環境適応に関与している可能性を指摘した。その後、Buhariwalla ら⁵⁾も、これを支持する結果を得ている。彼らは、spheroplast と休眠胞子由来の DNA が宿主 (*Brassica rapa*) の DNA に高い相同性を示すことを明らかにし、さらに休眠胞子由来の 2 つの DNA 断片はすでに報告されている *Brassica nigra* の繰り返し配列に高い相同性を示すことを明らかにした。彼らは、休眠胞子による DNA 吸収が安定した現象かどうかは証明していないとしながらも、この現象が DNA の水平伝達のルートになっている可能性があることや、根こぶ病菌の進化に関与している可能性があることを考察している。

この問題も培養可能性を考える上で決して無視できない問題である。なぜなら、仮に根こぶ病菌による宿主 DNA の吸収が菌の生活環を全うするために必須のものであるとすると、人工培地上での培養は不可能に近いことを意味しているからである。したがって、培養可能性の観点から考えると、宿主 DNA の取り込みが根こぶ病菌の発育に必須かどうか研究されることを今後期待したい。

5) 他綱の変形菌の培養³⁰⁾

変形菌門の他綱に属する菌では、*Dictyostelium* などすでに培養法が確立されているものがあることから、本病原菌が培養できない理由としては、ネコブカビ綱に特有の性質が培養を困難にしているのではないかと考えられる。その中でも大きな要因の一つは本菌が生きた宿主内でのみ次世代を生産することと関係していることが考えられ、根こぶ病菌の宿主内での増殖機構の研究が本菌の培養法確立には必要不可欠であろう。また、従来から変形菌で使われている種々の培養法を根こぶ病菌で試してみることも重要かもしれない。培養可能な変形菌の中には、*Didymium squamulosum* や *Physarum polycephalum* などのように交配型の解析などが進んでいるものもあることから、培地上で根こぶ病菌由来のアメーバの増殖だけでも可能となれば、性や交配型に関する研究⁸⁾およびクローン化技術の開発に大きく貢献すると考えられ、人工培養に関する研究の進展を期待したい。

6. 今後の課題

上記の根こぶ病に関する研究の多くは、報告されて日が浅いものもあり、今後追試も含めた詳細な検討が必要と思われる。しかし一方では、本菌の培養法の確立に対する期待も高いことから、今後の研究の参考になればと思い、これまでの研究報告を基に、あえて本病原菌の培養技術開発のために留意すべきと思われる点を下記に示す。

- (1) 休眠胞子から二次変形体形成に至る機構の解明
- (2) 休眠胞子からの二次変形体形成、休眠胞子分化過程に及ぼす養分、とくに植物の代謝産物（植物ホルモン、デンプン、DNA 量等の増加など）の影響
- (3) 休眠胞子による宿主 DNA 取り込みの生理・生態学的意義の解明

文 献

- 1) 有江 力、難波成任、山下修一、土居養三. 1988. アブラナ科野菜根こぶ病菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woron.) 休眠胞子の蛍光抗体法による土壌および植物体からの検出について. 日植病報, 54: 242-245.
- 2) Arnold, D.L., D. Blakesley and J.M. Clarkson. 1996. Evidence for the growth of *Plasmodiophora*

- brassicae in vitro. Mycol. Res. **100**: 535-540.
- 3) Bryngelsson, T., M. Gustafsson, B. Green and C. Lind. 1988. Cloning of a Brassica repetitive DNA element from resting spores of *Plasmiodiophora brassicae*. Physiol. Mol. Plantpathol. **33**: 167-171.
 - 4) Buczacki, S.T. 1977. Root infection from single resting spores of *Plasmiodiophora Brassicae*. Trans. Br. Mycol. Soc. **69**: 328-329.
 - 5) Buhariwalla, H. and R. Mithen. 1995. Cloning of a Brassica repetitive DNA element from resting spores of *Plasmiodiophora brassicae*. Physiol. and Mol. Plantpathol. **47**: 95-101.
 - 6) Cavalier-Smith. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. Microbiological review **57**: 953-994.
 - 7) Gupta, V., V. Jagannathan and M. Lakshmikumar. 1990. A novel AT-rich tandem repeat of *Brassica nigra*. Plant science **68**: 223-229.
 - 8) 堀内誠三. 1981. 根こぶ病研究の現状と今後の課題. 植物防疫, **35**: 119-122.
 - 9) 池上八郎. 1978. 最近におけるアブラナ科野菜根こぶ病の研究動向. 植物防疫, **32**: 53-60.
 - 10) 池上八郎. 1979. アブラナ科野菜の根こぶ病. 化学と生物, **17**: 714-723.
 - 11) 池上八郎, 北井芳範. 1989. *Plasmiodiophora brassicae* に感染したカブ根部皮層とカルス細胞における核 DNA 量. 岐阜大農研報, **54**: 1-8.
 - 12) 池上八郎, 向島博行. 1990. 根こぶ病菌感染カルス組織の培地上における生育. 岐阜大農学部研究報告, **55**: 1-14.
 - 13) 池上八郎. 1992. アブラナ科野菜根こぶ病菌の生態と防除. 土と微生物, **39**: 1-10.
 - 14) 池上八郎, 勝本 謙, 原田幸雄, 百町満朗. 1996. 新編植物病原菌類解説. 養賢堂, 47-53.
 - 15) Kageyam, K., Y. Kamimura and M. Hyakumachi. 1995. A simple inoculation method with a single resting spore of *Plasmiodiophora brassicae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **61**: 415-418.
 - 16) 勝本 謙. 1997. 植物病原菌分類入門 (1). 農業時代, **175**: 6-8.
 - 17) Murakami, H., S. Tsushima, T. Akimoto, K. Murakami, I. Goto and Y. Shishido. 1998. The effects of planting daikon (*Raphanus sativus*) on subsequent populations of *Plasmiodiophora brassicae* (clubroot). Plant Pathology (submitted)
 - 18) 内記 隆. 1987. アブラナ科野菜根こぶ病菌の生活環からみた防除視点. 土と微生物, **29**: 23-37.
 - 19) Narisawa, K., K. Kageyama and T. Hashiba. 1996. Efficient root infection with single resting spores of *Plasmiodiophora brassicae*. Mycol. Res. **100**: 855-858.
 - 20) Narisawa, K. and T. Hashiba. 1998. Development of resting spores on plants inoculated with a dikaryotic resting spore of *Plasmiodiophora brassicae*. Mycol. Res. **102**: 949-952.
 - 21) 折原詳子, 山本孝稀. 1996. 酵素抗体法による土壌および植物組織からのアブラナ科野菜根こぶ病菌の検出. 日植病報, **62**: 276.
 - 22) Reddy, M.N. and P.H. Williams. 1970. Cutokinin activity in *Plasmiodiophora brassicae*-infected cabbage tissue cultures. Phytopathology **60**: 1463-1465.
 - 23) Strandberg, J.O., P.H. Williams and Y. Yukawa. 1966. Monoxenic culture of *Plasmiodiophora brassicae* with cabbage tissue. Phytopathology **56**: 903.
 - 24) 高橋賢司. 1990. アブラナ科野菜根こぶ病休眠胞子の活性評価. 植物防疫, **44**: 272-275.
 - 25) Takahashi, K. and T. Yamaguchi. 1987. An improved method for estimating the number of resting spores of *Plasmiodiophora brassicae* in soil. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **53**: 507-515.
 - 26) Takahashi, K. and T. Yamaguchi. 1988. A method for assessing the pathogenic activity of *Plasmiodiophora brassicae* by fluorescence microscopy. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **54**: 466-475.
 - 27) Takahashi, K. and T. Yamaguchi. 1991. Correlation between fluorescent staining reaction and germination in resting spores of *Plasmiodiophora brassicae*. Ann. Soc. Jpn. **57**: 160-164.
 - 28) 田中秀平. 1996. アブラナ科植物根こぶ病研究の最近の進歩. 植物防疫, **50**: 281-284.
 - 29) Tsushima, S., H. Murakami and Y. Shishido. 1997. Integrated control of clubroot disease of Chinese cabbage including daikon (*Raphanus sativus*) as a decoy plant. Abstract of ISHS symposium on brassica. p199.
 - 30) J. ウェブスター. 1985. ウェブスター菌類概論. 講談社サイエンティフィック. pp7-54.