

アブラナ科野菜根こぶ病菌の検出方法

農林水産省中国農業試験場 おり はら しょう こ
折 原 詳 子

はじめに

アブラナ科野菜根こぶ病は、糸状菌 *Plasmodiophra brassicae* によって引き起こされる土壤伝染性病害であり、アブラナ科野菜類の最も重要な病害の一つである。伝染源は、耐久体として罹病組織から放出され、土壤中で長期間生存する休眠孢子である。このため、本病の防除対策を講じるうえから、土壤中の休眠孢子的密度や動態を把握することがきわめて重要な課題である。土壤中の休眠孢子数を調べる方法としては、大別して汚染圃場の土壤に感受性植物を栽培し、感染の程度から間接的に判断する方法および休眠孢子そのものの数を直接計数する方法の二つが用いられている。本稿ではこれら既報の検出手法を簡単に紹介するとともに、現在筆者らが行っている酵素抗体法による検出手法について述べ、参考供したい。

なお、本稿執筆に際して、有益な助言をいただいた当地域域基盤研究部上席研究官山本孝猷博士に厚くお礼申し上げる。

I 宿主植物の感染、発病から判定する間接法

COLHOUN (1957) は、検定圃場の土壤をポットにつめ、指標植物を栽培する方法を開発し、人工汚染土壤との対比により汚染の程度を推定した。この方法は、簡易であるが、圃場からの土壤のサンプリング、指標植物の選定、試験環境の条件設定に十分注意する必要がある。これに対し、SAMUEL and GARRETT (1945) は、第一次感染を受けている宿主根毛数を計数することにより間接的に汚染程度を知る方法を報告している。この方法は、こぶ形成に基づく発病調査に比べ主観が入りにくく、1週間程度の短期間で調査でき、実験場所も取らないという利点がある。しかし、土壤中の菌密度と根毛感染率との相関については報告によってその評価が異なり (NAIKI et al., 1984)、十分とはいえない。

その他、休眠孢子を直接計測するかわりに、休眠孢子的細胞壁成分であるキチンのキチナーゼ反応物質、*N*-アセチルグルコサミンの濃度を測定することにより土壤中の休眠孢子を定量する方法 (BOTZ et al., 1988) も提

案されている。

II 土壤中の休眠孢子数を直接数える方法

初期の方法は、汚染土壤を水に懸濁しそのまま検鏡するというものであったが (COLHOUN, 1957), BUCZACKI and OCKENDON (1978) は、微細土壤粒子と混在する休眠孢子を 40% ショ糖溶液に懸濁させ、3°C に 2 日間保つと土壤粒子は沈殿するが、休眠孢子は浮遊したままであることに着目し、人工汚染土壤 (10^6 spores/g 以上) から高率に休眠孢子を回収することに成功している。さらに、内記・北沢 (1984) は、BUCZACKI and OCKENDON (1978) の休眠孢子抽出方法の中で、回収のロスを生じている部分を洗い出し、粗砂等を取り除く過程を篩別法に変えることにより回収率を高めた。休眠孢子数を直接数える方法は、TAKAHASHI and YAMAGUCHI (1987) が、蛍光色素 (calcofluor white M 2 R) で染色した休眠孢子を、蛍光顕微鏡観察により定量する方法を確立したことによりいっそう簡便になった。TAKAHASHI and YAMAGUCHI (1987) の方法については、その後各地の土壤特性等に合わせていくつかの改良法が報告されている。まず、笹谷ら (1991) は、土壤粒子の除去過程でショ糖溶液上への重層法を取り入れ検出精度を高め、続いて赤池・我孫子 (1993) は、土壤粒子から休眠孢子をより効果的に遊離させるため超音波洗浄処理を行っている。これらの直接法は、休眠孢子を確認しながら計数でき、さらに染め分けにより病原性評価ができる (TAKAHASHI and YAMAGUCHI, 1988) という点で、信頼が置けるが、休眠孢子と類似物との判別に多少の熟練が必要である。また、 10^4 以下の低濃度の場合には、統計的に信頼性のある調査結果を得るために血球計算板上で多くの視野を観察しなければならない、試験者への肉体的負担が大きい。

III 酵素抗体法による罹病植物からの根こぶ病菌の検出

有江ら (1988) は、休眠孢子を抗原として抗血清を作成し、蛍光抗体法による植物中および土壤中の休眠孢子的検出を行っている。同様に、LANGE et al. (1989)、高橋 (1996)、WAKEHAM and WHITE (1996) らも酵素抗体法を利用した検出法を試みている。

筆者ら (1996) は、アブラナ科野菜根こぶ病菌休眠胞

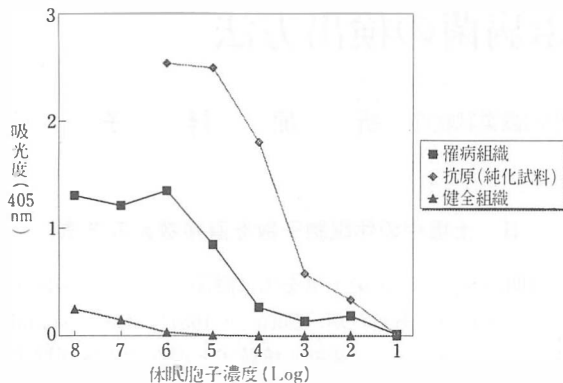


図-1 ELISA 法による罹病組織からの根こぶ病菌の検出
(未発表)

子の抗血清を作成し、酵素抗体反応を利用した ELISA 法、DIBA 法 (Dot immunobinding assay) および TBIA 法 (Tissue-blot immunoassay) の 3 法を用い、病原菌の検出を行っているのでその概略と操作手順を述べる。

1 ELISA 法

今回筆者らが用いた ELISA 法は、マイクロタイタープレートにコーティングバッファーに懸濁した試料を直接吸着させ、4°Cで一晩静置したのち、ウサギ IgG 溶液、アルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギ・ヤギ IgG 溶液を順に添加しそれぞれ 37°Cで4時間もしくは、4°Cで一晩反応させる方法である。早生大カブを用い、罹病組織および健全組織を磨砕し、粗大な植物組織をガーゼで濾過し軽く洗浄したものを使用して検定を行った結果、罹病組織で根こぶ病菌の存在が明瞭に確認できた。休眠胞子濃度が 10^4 個/ml まで、抗原に用いた休眠胞子の純化試料では 10^2 個/ml まで検出することができた (図-1)。

2 DIBA 法

操作の手順は、日比ら (1984) の方法に従い行った。適当な大きさに切ったニトロセルロースメンブレンに、試料を $2\mu\text{l}$ ずつプロットし、アルカリフォスファターゼを標識酵素として反応を行った。プロットの際、イムノドット (ATTO) を用いると、最高で $400\mu\text{l}$ までプロットすることができる。早生大カブの罹病組織および健全組織を ELISA 法のとくと同様に処理したものを供試したところ、ELISA 法と同じく休眠胞子濃度が 10^4 個/ml まで、抗原に用いた休眠胞子の純化試料では 10^2 個/ml まで検出することができた (図-2)。

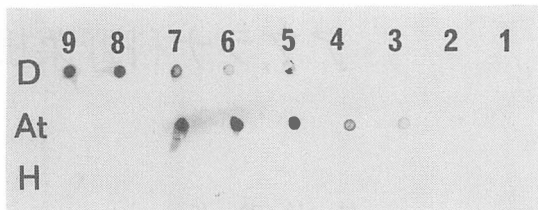


図-2 DIBA 法による罹病組織からの根こぶ病菌の検出
(未発表) (数字は根こぶ病菌濃度 (Log) を示す)。
D: 罹病組織 At: 抗原に用いた純化試料 H: 健全組織

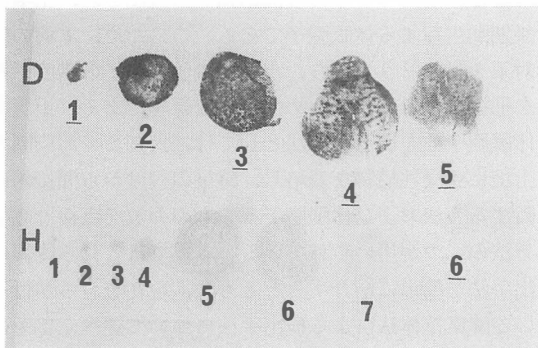


図-3 TBIA 法による罹病組織からの根こぶ病菌の検出
(未発表) (数字は根先端部から上方への切断面を示す)。
D: 罹病組織 (1~6 6は葉身との境界部)
H: 健全組織 (1~7)

3 TBIA 法

この方法は、供試植物の切断面をニトロセルロースシートに押しつけスタンプされた跡から病原菌を検出するというものであり、貯蔵球根組織などからのウイルスの検出において実用化されている方法である。酵素抗体反応の手順は、DIBA 法の場合と同様である。

早生大カブの罹病組織を垂直方向に 1 cm 間隔に切断し、スタンプしたところ罹病組織内の根こぶ病菌を特異的に検出することができた (図-3)。罹病組織内では、維管束部が崩壊している様子が観察できた。また、奇形となった根部のみでなく胚軸が肥大した可食部にも、ほぼ均等に病原菌が存在していることが観察できた。罹病組織内の根こぶ病菌の存在部位、分布状況等の検診には適した方法である。

IV モデル汚染土壌からの根こぶ病菌の検出

モデル汚染土壌は、市販の園芸培土 (宇部粒状培土) を用い、高圧滅菌したものを 160°C で 10 時間乾燥させ、すり鉢で磨砕後、1 mm の篩ふるいを通した。これに罹病組織から調整した休眠胞子懸濁液を土壌 1 g 当たりの休眠胞

土壌 2 g を蒸留水に懸濁
↓
スターラーで 60 分間かくはん
↓
60, 200, 635 メッシュの篩でこす
↓
3,000 rpm で 10 分間遠心 上清を捨てる
図-4 検出に用いる際の土壌処理

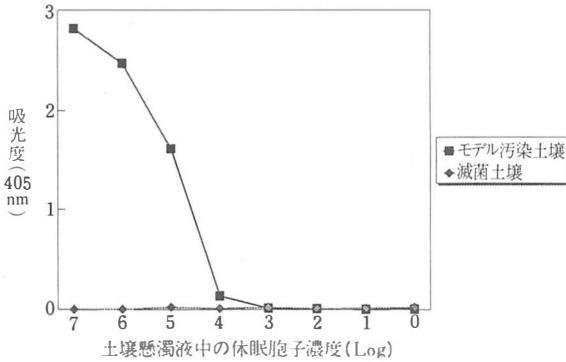


図-5 ELISA 法によるモデル汚染土壌からの根こぶ病菌の検出 (未発表)

子密度が 10^8 個になるように接種して作成した。検出に用いる際の土壌処理は、モデル汚染土壌 2 g を蒸留水 40 ml に懸濁し、スターラーで 60 分間かくはん後、60, 200, 635 メッシュの篩でこし、これを 3,000 rpm で 10 分間遠心分離した沈殿を希釈して被検液とした (図-4)。

1 ELISA 法

図-4 で得た沈殿をコーティングバッファーに懸濁し、土屋ら (1991) の方法に従って 100°C で 15 分間加熱したものをご供試したところ、モデル汚染土壌からは、土壌 1 g 当たりの休眠孢子数が 10^4 個まで検出することができた (図-5)。土壌からの検出の際に起こる非特異的反応は 2% 牛血清アルブミン・2% PVP 液でブロッキングすることにより抑えることができた。また、加熱操作も非特異的反応を抑え、反応を増幅させることに有効であった。

2 DIBA 法

図-4 の方法で調整した土壌を蒸留水に再懸濁し、前述の DIBA 法で検出したところ、ELISA 法と同様に土壌 1 g 当たりの休眠孢子数 10^4 個まで検出することができた (図-6)。

V 今後の課題点

酵素抗体法は、感度が高く多数の検体を迅速かつ簡便

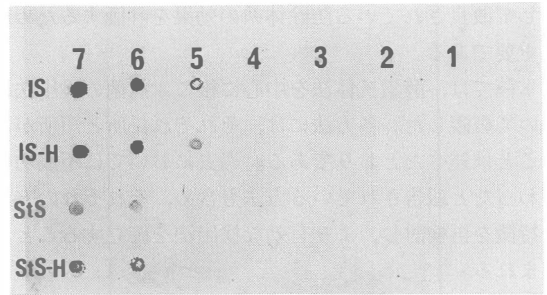


図-6 DIBA 法によるモデル汚染土壌からの根こぶ病菌の検出 (未発表) (数字は根こぶ病菌濃度 (Log) を示す)。

IS: モデル汚染土壌, IS-H: モデル汚染土壌 (加熱処理)

StS: 滅菌土壌, StS-H: 滅菌土壌 (加熱処理)
(StS, StS-H のスポットは土壌による汚れ)

に診断できる点ではきわめて優れた方法である。筆者らの根こぶ病菌の検出においても、罹病植物やモデル汚染土壌から孢子数 $10^4/\text{ml}$, g 程度まで可能である。この検出感度は、根こぶ病の被害が土壌中の休眠孢子数 10^3 から $10^4/\text{g}$ 以上で問題になることを考えると、十分圃場診断に耐えうるものと考えられる。今後、一般の汚染圃場の土壌からの根こぶ病菌休眠孢子の検出に適用し、実用的な診断法とするためには、さらにいくつかの改良が必要であると考えられる。特に、腐食等に起因すると思われる非特異的な反応をどのように除去し、精度を高めるかということが問題の鍵になっている。さらに、酵素抗体法などを用いた直接検出法に画像解析等の技術を組み合わせるにより、低濃度汚染土壌からも特異的な検出が可能になるであろう。このためには、休眠孢子の形態にかかわる詳細な情報が必要となる。最近、NARISAWA et al. (1996) により根こぶの 1 菌系 (個体群) において核数の異なる (核数に比例して孢子の大きさも異なる) 孢子が存在することが報告され、栽培条件等により孢子の形態に奇形が生じる可能性が示唆されており、休眠孢子の形態について整理し直す必要があると思われる。また、酵素抗体法による方法は、孢子の活性については判断することができないため、活性が低くなった孢子の土壌中での保存期間等についても調査しなければならない。

おわりに

根こぶ病の発生は依然として拡大傾向にあり、アブラナ科野菜栽培農家にとって深刻な問題となっている。土壌中の菌の量や動態をつかむことは、少しずつ工夫を凝

らして改良されている防除体系の効果を評価するためにも重要である。

本稿では、酵素抗体法を中心に根こぶ病菌の検出法について概観した。各方法には、それぞれ長所と短所があることは述べたとおりである。過去においては不成功に終わったと報告されている方法も含め、それぞれの方法の特徴を再検討し、より有効な検出法を確立することが望まれる。

引 用 文 献

- 1) 赤池良久・我孫子和雄 (1993) : 日植病報 59 : 743 (講要).
- 2) 有江 力ら (1988) : 日植病報 54 : 242~245.
- 3) BOTZ, T. et al. (1988) : J. Phytopathology 122 : 135~142.
- 4) BUCZACKI, S. T. and J. G. OCKENDON (1978) : Ann. appl. Biol. 88 : 363~367.
- 5) COLHOUN, J. (1957) : Ann. appl. Biol. 45 : 559~565.
- 6) 日比忠明 (1984) : 植物防疫 38 : 380~384.

- 7) LANGE, L. et al. (1989) : Phytopathology 79 : 1066~1071.
- 8) 内記 隆・北沢宗一 (1984) : 関西病虫研報 26 : 9~14.
- 9) NAIKI T. et al. (1984) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 50 : 211~215.
- 10) NARISAWA, K. et al. (1966) : Mycol. Res. 100 : 855~858.
- 11) 折原詳子・山本孝稀 (1996) : 日植病報 62 : 276 (講要).
- 12) SAMUEL, G. and S. D. GARRETT (1945) : Ann. appl. Biol. 32 : 96~101.
- 13) 笹谷孝英ら (1991) : 関西植物防疫研究 26 : 39~47.
- 14) TAKAHASHI, K. and T. YAMAGUCHI (1987) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 53 : 507~515.
- 15) ——— (1988) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 54 : 466~475.
- 16) 高橋賢司 (1996) : 平成7・8年度北海道農業試験場成績・計画概要集一病虫害一.
- 17) TSUCHIYA, K. et al. (1991) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 57 : 196~202.
- 18) WAKEHAM, A. J. and J. G. WHITE (1996) : Physiological and Molecular Plant Pathology 48 : 289~303.

(12 ページより続く)

(同部微生物探索評価研究チーム主研), 落合弘和一同上 (同上), 肥後健一—遺伝資源第二部上席研究官 (分子育種部遺伝子構造研究室長), 土屋健一—同部微生物評価保存研究チーム長 (同部微生物保存研究チーム長), 横山 正一同部微生物評価保存研究チーム主研 (遺伝資源第一部微生物探索評価研究チーム主研), 野津祐三—分子遺伝部上席研究官 (分子育種部酵素化学研究室長), 大橋祐子一同上 (同上部抵抗性遺伝子研究室長), 西口正通—同部遺伝子応答研究室長 (同上部核外遺伝子研究室長), 門脇光一—同部遺伝子応答研主研 (同上部核外遺伝子研主研), 角谷徹仁—同部遺伝子修飾研主研 (同上部遺伝子構造研主研), 田中喜文—生理機能部耐病性研究室長 (機能開発部化学耐性研究室長), 川崎信二—同部耐病性研主研 (同上部特殊生理反応研主研), 宇垣正志—生物工学部遺伝子設計研究室長 (分子育種部適応性遺伝子研究室長), 富山雅光—同部染色体操作研主研 (機能開発部微生物機能利用研主研), 市川裕章—同部遺伝子設計研主研 (分子育種部適応性遺伝子研主研), 西澤洋子一同上 (機能開発部微生物機能利用研主研), 門間 充—同部蛋白質工学研主研 (分子育種部酵素化学研主研), 北本宏子—遺伝資源第一部微生物探索研究チーム (同部微生物探索評価研究チーム), 西村麻里江一同上 (同上), 堀田光生—遺伝資源第二部微生物評価保存研究チーム (同部微生物保存研究チーム), 岩本政雄—同部 DNA 管理情報科 (同上), 望月淳子—分子遺伝部遺伝子応答研 (同核外遺伝子研), 光原一郎—同部遺伝子修飾研 (分子育種部抵抗性遺伝子研), 仁木智哉—同部 (同上), 福田篤徳—生理機能部耐病性研 (機能開発部化学耐性研), 梶原英一—生物工学部遺伝子設計研 (分子育種部適応性遺伝子研)

〔農業環境技術研究所〕

鳥山重光—環境生物部微生物管理科上席研究官 (同科土壤微生物分類研究室長), 桑原信彦—資材動態部農薬動態科上席研究官 (同科殺虫剤動態研究室長), 遠藤正造—

同上科殺虫剤動態研究室長 (同科薬剤耐性研究室長), 鈴木健一同上研主研 (同上研主研), 高橋真美—環境生物部微生物管理科寄生菌動態研 (同科土壤微生物分類科), 岡部郁子一同上科土壤微生物生態研 (同上)

〔畜産試験場〕

天野和宏—育種部みつばち研究室長 (同部育種第3研究室長), 木村 澄一同上研主研 (同上研主研)

〔草地試験場〕

奥村隆史—環境部上席研究官 (放牧利用部家畜害虫研究室長), 神田健一—環境部害虫制御研究室長 (同部作物害虫研究室長), 白石昭彦一同上研主研 (放牧利用部家畜害虫研主研), 吉松慎一一同上 (同部作物害虫研主研), 有村一弘一同上研 (同上研)

〔果樹試験場〕

足立 礎—企画連絡室企画科主研 (保護部虫害研主研), 大津善弘—保護部病害研究室長 (同部病害第2研究室長), 家城洋文—同部病原機能研究室長 (同部病害第1研究室長), 佐藤 威—同部天敵機能研究室長 (同部天敵微生物研究室長), 加納 健—同部病原機能研主研 (同部病害第1研主研), 山中正博—同部虫害研主研 (興津支場虫害研主研), 尾崎克巳—カンキツ部病害研 (口之津) 室長 (口之津支場病害研究室長), 芦原 亘一同上部虫害研 (口之津) 室長 (同上支場虫害研究室長), 岩波 徹—同部形質発現研主研 (興津支場病害研主研), 高梨祐明—同部虫害研主研 (口之津支場虫害研主研), 吉田幸二—リンゴ支場 (盛岡) 病害研究室長 (盛岡支場病害研究室長), 坂神泰輔—同上支場虫害研究室長 (同上支場虫害研究室長), 伊藤 伝—同支場病害研主研 (同上支場病害研主研), 馬淵正人—同支場虫害研主研 (同上支場虫害研主研), 柳沼勝彦—同上 (同上), 今田 準—カキ・ブドウ支場 (安芸津) 病害研究室長 (安芸津支場病害研究室長), 駒崎進吉—同上支場虫害研究室長 (同上支場虫害研究室長), 島根孝典—同支場病害研主研 (同上支場病害研主研), 刑部正博—同支場虫害研主研 (同上支場虫害研主研), 大崎秀樹—保護部病害研 (保護部病害第2研), 兼松聡子—

(29 ページに続く)