

植物防疫基礎講座：

アブラナ科野菜根こぶ病の分類・同定と保存法

岐阜大学流域圏科学研究センター ^{あさ}浅 ^の野 ^{たか}貴 ^{ひろ}博*

はじめに

アブラナ科野菜根こぶ病（以下、根こぶ病）は *Plasmodiophora brassicae* によって引き起こされる土壌伝染病害である。根こぶ病菌に侵された作物は根部にこぶを形成するため、アブラナ科野菜の品質低下および収量にも影響を与えている。根こぶ病の初発生は、A.D.400 年ごろに根こぶ病菌による発病と思われる記録が残されているが、一般的には 1736 年の英国での発生とされる。1877 年にはロシアの菌学者 WORONIN によって世界最初の学術論文が発表された。その後、本菌は世界各国にまん延し、アブラナ科野菜の重要病害となっている。我が国においては、1892 年に北海道で最初の発生が確認され、現在では北海道から九州までの広い地域で発病が認められ問題となっている。本稿では、根こぶ病菌の見分け方と根こぶ病菌を用いて実験を行うに当たっての留意点について紹介する。

I 根こぶ病菌の分類学的位置と特徴

以前、根こぶ病菌は栄養体である変形体が変形菌のそれと似ていたため、変形菌門、ネコブカビ綱 (*Plasmodiophoromycetes*) ネコブカビ目 (*Plasmodiophorales*) に分類されていた。しかし、近年の分子系統解析に基づいた分類では、寄生性の原生生物として、リザリア (*Rhizaria*) 界、ケルコゾア (*Cercozoa*) 門、フィトミクサ綱 (*Phytophyceae*)、ネコブカビ目 (*Plasmodiophorida*) に分類されている (ADL et al., 2005)。

ネコブカビ目は 10 属 30 種ほどが知られており、主として休眠胞子の集まる状態、休眠胞子堆の形態によって属の区別がなされている。根こぶ病菌を含む *Plasmodiophora* 属菌の休眠胞子は、休眠胞子堆や休眠胞子集団を形成せず決まった形態を取らないのが特徴とされている (KARLING, 1968)。

Identification and Maintenance of Clubroot Disease Caused by *Plasmodiophora brassicae*. By Takahiro ASANO

(キーワード：アブラナ科野菜根こぶ病、同定、保存法、休眠胞子発芽、人工培養)

* 現所属：日本原子力研究開発機構

II 根こぶ病菌の生活環

根こぶ病菌の生活環は、不明な点も残されているが図-1 のように考えられている (TOMMERUP and INGRAM, 1971; MITHEN and MAGRATH, 1992; KAGEYAMA and ASANO, 2009)。根こぶ病の第一次伝染源は、根こぶ病罹病植物のこぶの腐敗に伴って土壌中に分散した休眠胞子である。この休眠胞子は耐久性があり 10 年近くも生存すると言われており、土壌環境が好適条件となったとき発芽して、第一次遊走子を放出する。第一次遊走子は根毛に感染し、根毛内で第一次変形体となり、速やかに遊走子のうに分化する。遊走子のうちには 4 ~ 16 個の第二次遊走子が形成される。この根毛への感染は、第一次感染あるいは根毛感染と呼ばれている。その後、遊走子のうから第二次遊走子が放出され、根毛内から皮層細胞に、あるいは根毛から再度土壌に放出したのち皮層細胞に感染するとされている。この皮層への感染は、第二次感染あるいは皮層感染と呼ばれているが、いまだにこの感染過程は解明されていない。皮層細胞に感染したのち、Myxamoeba と呼ばれるアメーバ状の形態となり、次いで多核の第二次変形体へと成熟し、根部組織の異常肥大を引き起こす。その後、第二次変形体は休眠胞子となり、こぶの腐敗に伴って土壌中に分散する。

III 根こぶ病菌の同定

ある作物に根こぶ症状が認められた場合、根こぶ病菌による被害とネコブセンチュウによる被害の両者が考えられる。根こぶ病菌による症状とネコブセンチュウによる症状の違いは、植物によっては即座に診断を下すことは難しく、総合的に判断しているが、次の点に注意して診断する。

(1) 被害植物の差異

根こぶ病による被害は、アブラナ科植物のみに症状が起きる。一方、ネコブセンチュウによる被害は、ほとんどの場合がウリ科 (スイカ、メロン、キュウリ等) およびナス科 (トマト、ナス)、たまにアブラナ科植物である。よって、被害植物によってある程度、類別することができる。ウリ科、ナス科のこぶ症状はほぼネコブセンチュウである。ただし、念のため後出(3)の検鏡による

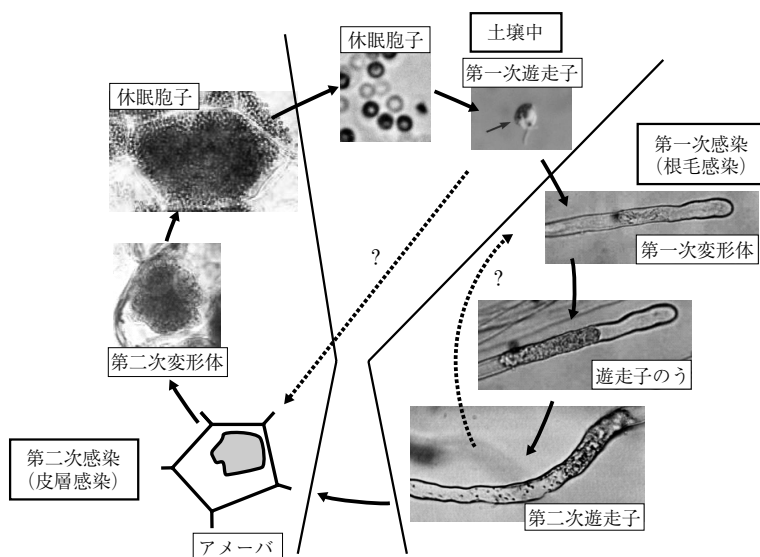


図-1 アブラナ科野菜根こぶ病菌の生活環

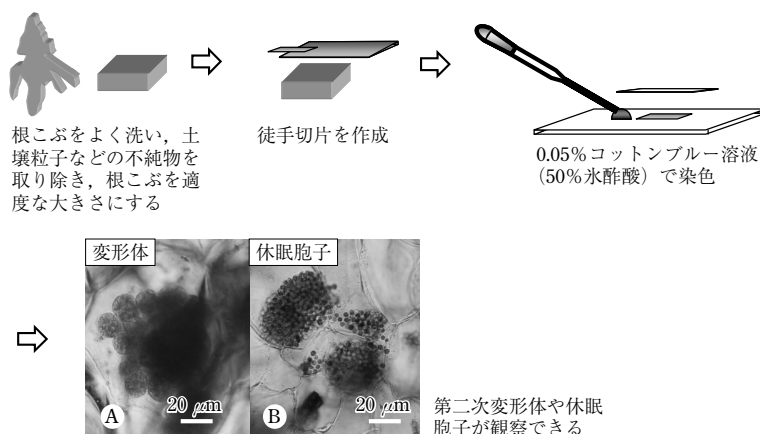


図-2 根こぶ病菌の観察方法

確認は実施する。

(2) 被害形態の差異

根こぶ病の場合、激発症状であれば罹病したアブラナ科植物の根には大人の親指に近い太さのこぶを生じている。このような大きなこぶがあれば根こぶ病と診断している。一方、ネコブセンチュウの場合、激しい症状でも親指大ほどで、太い根部の肥大はほとんど見られない。ただし、根こぶ病の発生初期である場合は、ネコブセンチュウによる被害と同様の症状であるため、即座に判断することは難しい。よく観察すると、根こぶ病の初期症状における根の表面はややなめらかで、ネコブセンチュウの場合はごつごつしていると言われる。しかし、微

妙な判定であるため、以下(3)の検鏡で確定診断を行う。

(3) 被害植物の根部切片の検鏡

アブラナ科植物の場合、根こぶ病の初期とネコブセンチュウの症状が類似しているため、判断に迷った場合には根の切片を検鏡する。ここで、センチュウがよく見られる場合にはネコブセンチュウと判定し、根こぶ病菌の変形体または休眠孢子が見られる場合には根こぶ病と診断する。

検鏡方法は以下の手順で行う。罹病個体をよく洗い、土壌粒子などの不純物を取り除き、徒手切片を作成し、スライドガラスにのせる。そこに、0.05% Cotton Blue 溶液 (50% 氷酢酸) を適量入れてカバーガラスをし、

顕微鏡で観察する。感染初期であると第二次変形体が、感染後期であれば休眠孢子が観察される (図-2)。

IV 根こぶ病菌の保存

根こぶ病菌は絶対寄生菌であるため、純粋培養をすることはできない。そのため、接種源となる休眠孢子は、罹病植物の根こぶから休眠孢子懸濁液を作成して実験に使用する。休眠孢子は懸濁液の状態では4℃で数か月間の保存が可能であるが、長期保存するときには、根こぶもしくは休眠孢子を一20℃から一80℃で冷凍保存する。この状態で、根こぶは1～数年間は保存することが可能である (図-3)。

V 実験の再現性

実験データを取得するときには、冷凍保存した根こぶではなく、休眠孢子懸濁液を作成し、改良スラリー法 (ASANO et al., 1999) や病土挿入接種法 (吉川, 1993) を用いて人工接種し、栽培環境を制御して発病させた根こぶを収穫後速やかに使用することが望ましい。これは、根こぶの保存条件と休眠孢子的成熟度によって休眠孢子発芽率が異なるためである。

根こぶの冷凍保存期間が休眠孢子的発芽率に与える影響について図-4に示す。採取直後および一20℃で1～3か月冷凍保存した根こぶから休眠孢子懸濁液を作成



図-3 根こぶ病菌の保存方法

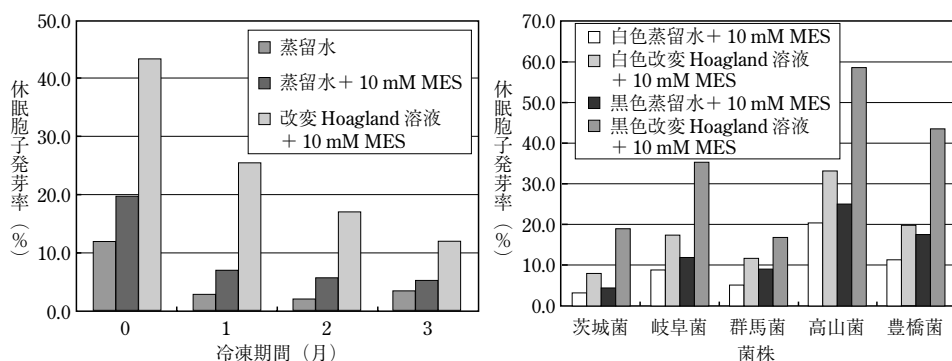


図-4 根こぶの冷凍保存期間および休眠孢子採取部位が休眠孢子発芽率に及ぼす影響

根こぶ：接種8週目、温室栽培。発芽実験：pH 5.8, 25℃, 暗所, 12日間培養。Hoagland 溶液：
 KNO_3 0.506 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.181 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.493 g, KH_2PO_4 0.272 g, 蒸留水 1 l.
 MES：pH 緩衝液 2- (N-morpholino)ethanesulfonic acid.

し、25℃、暗所で 12 日間培養した。その後、休眠胞子発芽をノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察した。培養溶液には、蒸留水もしくは 5 倍希釈した Hoagland 溶液を用いた。その結果、-20℃で 3 か月保存することで休眠胞子発芽率は最大で約 30% 減少した。

また、休眠胞子の成熟度も実験の再現性に影響を与える。休眠胞子の成熟度は、根こぶの生育状態・成熟程度によって異なり、休眠胞子の発芽能力に差異を生じる。根こぶの成熟度は、外見からおおよその判断がつく。若い根こぶは白色からクリーム色をしており、成熟するにつれて徐々に褐色から黒色となり、やがて腐敗する。そこで、根こぶを白色部と黒色部に分け、それぞれの休眠胞子発芽率を調査した。根こぶ病菌は 5 菌株、培養溶液には蒸留水と 5 倍希釈した Hoagland 溶液を用いた。その結果、いずれの菌株においても黒色部で発芽率が高くなった (図-4)。なお、腐敗したこぶでは細菌などの雑菌が混入しており、遠心分離してもそれらを取り除くことができないので実験に使用するにはふさわしくないとと言える。

VI 根こぶ病菌の人工培養

根こぶ病菌は絶対寄生菌であるため純粋培養することはできない。1966 年に STRANDBERG et al. が根こぶ病罹病根から根こぶ病菌を細胞内に有するカルス (保菌カルス) による培養法を報告した。保菌カルス内の根こぶ病菌の形態および性状は、細胞学的にも化学的にも自然の根こぶ組織中のものと極めて類似しており (WILLIAMS et al., 1969), カルスから分離した休眠胞子は病原力を有している (WILLIAMS et al., 1969; 池上, 1992)。TOMMERUP and INGRAM (1971) はカルス中で遊走子を含む根こぶ病菌のすべての生活環が観察されたとしている。筆者らは、保菌カルスを 2 週間ごとに継代培養することで、約 9 年間、第二次変形体の状態根こぶ病菌を維持した。

近年、*Agrobacterium rhizogenes* の感染によって誘導される毛状根を用いた共存培養法も試みられている (MUGNIER, 1987; He, 1991; GRAVELAND et al., 1992; ASANO et al., 1999)。毛状根を用いた共存培養系においても、根こぶ病菌の形態は自然の根こぶ組織中のものと極めて類似しており、根毛感染から休眠胞子形成までの生活環が観察され (ASANO et al., 1999), 根毛内での根こぶ病菌の生育段階についての詳細な報告がなされている (ASANO et

al., 2000)。さらに、毛状根での根こぶ病菌の継代培養も可能となっている (ASANO et al., 2006)。

また、毛状根に形成した根こぶの振とう培養による根こぶ病菌の維持方法も試みられ、感染細胞内での根こぶ病菌の生育段階について詳細な報告がなされている (ASANO and KAGEYAMA, 2006)。

お わ り に

根こぶ病の発病に及ぼす環境要因については、内記 (1987) の総説に詳しく記載されているので、参照されたい。しかし、根こぶ病の発病にふさわしい条件で実験を行っても再現性のある結果が得られない場合がある。これは本稿で述べたように使用する根こぶの状態、すなわち休眠胞子の発芽能力の差異に起因していると考えられる。特に、休眠胞子発芽実験や根毛感染実験を行うときには、使用する根こぶの状態に十分に注意を払うべきである。

謝辞 アブラナ科野菜根こぶ病菌の研究のご指導をいただきました岐阜大学流域圏科学研究センター 景山幸二教授に厚く感謝の意を表する。また、ご鞭撻と種々のご教示をいただきました岐阜大学 池上八郎名誉教授に深く感謝の意を表する。また、成瀬裕久氏、真野百合氏、小川泰一郎氏、児玉明子氏をはじめとする岐阜大学農学部植物病学研究室で根こぶ病菌の研究に携わった卒業生諸氏にあわせて深く感謝する。

引 用 文 献

- 1) ADL, S. M. et al. (2005): J. Eukaryot. Microbiol. **52**: 399 ~ 451.
- 2) ASANO, T. and K. KAGEYAMA (2006): Plant Pathology **55**: 145 ~ 151.
- 3) ——— et al. (1999): Phytopathology **89**: 314 ~ 319.
- 4) ——— et al. (2000): Mycoscience **41**: 49 ~ 54.
- 5) ——— et al. (2006): J. Gen. Plant Pathol. **72**: 85 ~ 91.
- 6) GRAVERAND, R. et al. (1992): Mycol. Res. **96**: 225 ~ 228.
- 7) He, Y.-K. (1991): Science in China (Series B) **34**: 1444 ~ 1451.
- 8) 池上八郎 (1992): 関西病虫研報 **34**: 17 ~ 28.
- 9) KAGEYAMA, K. and T. ASANO (2009): J. Plant Growth Regul. **28**: 203 ~ 211.
- 10) KARLING, J. S. (1968): The Plasmodiophorales 2nd. Hafner Publishing Co., New York, 144 pp.
- 11) MITHEN, R. and R. MAGRATH (1992): Mycol. Res. **96**: 877 ~ 885.
- 12) MUGNIER, J. (1987): Phytopathology **77**: 539 ~ 542.
- 13) 内記 隆 (1987): 土と微生物 **29**: 25 ~ 39.
- 14) STRANDBERG, J. O. et al. (1966): Phytopathology **56**: 903 (Abst.).
- 15) TOMMERUP, I. C. and D. S. INGRAM (1971): New Phytol. **70**: 327 ~ 332.
- 16) WILLIAMS, P. H. et al. (1969): Can. J. Bot. **47**: 1217 ~ 1221.
- 17) 吉川宏昭 (1993): 野菜・茶業試験場研究報告 **7**: 1 ~ 164.