

アブラナ科植物根こぶ病研究の最近の進歩

山口大学農学部生物生産科学講座 田 中 秀 平

はじめに

根こぶ病はアブラナ科植物を特異的に侵し、激しい被害をもたらす。本病防除のために、早くから効果的な対策の確立が望まれ、研究も進められてきたが、なお未解決の問題が少なくない。根こぶ病菌は人工培養ができない、土壌中で複雑な生活環をとるため、研究上の扱いが難しい。しかし、最近、根こぶ病の研究分野にも分子遺伝学的研究手法やその関連技術ならびに新たな視点が導入され、研究報告数は増加している。明確な結論が得られているわけではないが、研究は徐々に進みつつある。本稿では、最近数年間の報告を中心に、根こぶ病研究の進捗状況を紹介する。

I 発 生 状 況

根こぶ病は温・亜寒帯圏で発生する病害と考えられてきた。しかし、近年は熱帯や亜熱帯圏の諸国でも発生が見られるようになり、インド、台湾、インドネシアのほか、1987年にはタイでも発生が記録された(PETCHARAT et al., 1987)。タイの発生地は南部のソクラ県(北緯7度)の海岸に面し年間を通して気温の高い地域である。1993年8月に筆者も同県で、キャベツ、ブロッコリー、Chinese kaleにおける根こぶ病の発生を確認した。また、熱帯圏ではないが、中国(山東省)と韓国でも本病の発生が問題になっているようである。

一方、わが国でも、根こぶ病による被害は依然として拡大の傾向にある。1992年に、全国を対象に実施されたアンケート調査(本間, 1993)によると、発生面積が多い土壌病害として根こぶ病をあげた回答件数が1976年の調査時よりも大幅に増えている。また、近畿・中国地区を対象としたアンケート調査(岩間ら, 1993)でも、最近5年間に根こぶ病の初発生を認めたとする回答が31%に達し、以前から発生が多かった近畿地区のほか、中国地区でも発生が増加していることがうかがえる。さらに、根こぶ病の発生がほとんど問題になっていなかった九州地区でも、近年各地で本病による被害が見られるようになった。筆者は福岡、大分、長崎、熊本県での本病の激しい発生を観察している。特に長崎県島原市では、

根こぶ病が発生しにくいとされる冬期に播種して栽培した春獲りハクサイに、1987年ごろから本病の発生が見られるようになり問題となった(早田ら, 1990)。当地には極めて病原力の強い菌系の存在することが明らかにされている(田中ら, 1990)。

II 生 活 環

根こぶ病菌の生活環のうち、特に根毛感染と第二次遊走子の意義については早くから異論があり、今も結論に至っていない。GRAVELAND et al. (1992)は、*Agrobacterium rhizogenes* で形質転換させたナタネの培養毛状根に根こぶ病菌を接種したところ、こぶ形成が認められたにもかかわらず、根毛感染が認められなかったことから、第一次遊走子は皮層に直接感染できるとした。また、MITHEN and MAGRATH (1992)は、シロイヌナズナにおいて、根こぶ病菌の根毛次感染と皮層感染の両方を認めたが、第二次遊走子の成熟と同時期に mixamoebae と小型変形体の存在が皮層細胞内に観察されたことから、第一次遊走子は皮層に直接感染して mixamoebae をつくり、その二つが宿主細胞内で融合して遺伝的に異なる二つの核を持つ変形体になるとした。また、彼らは、第二次遊走子間で接合が行われるかどうかは疑わしいとし、根毛から放出された第二次遊走子は単に根毛への再感染を繰り返す独立した小さな生活環を形づくっているにすぎず、こぶ形成には関与しない可能性を示唆した。

このように、第一次遊走子は直接皮層に感染し得るとする報告が最近多い。しかし、第二次遊走子の皮層感染能の有無や遊走子(変形体)の接合(融合)が行われる時期と場所については、さらに詳しい検討が必要である。

III 病 原 性

1 レース混在の問題と単体眠胞子由来株

根こぶ病菌には、病原性を異にする多くの菌系が存在する。これら菌系の病原性の違いは、通常、レースとして分類整理され、レース判別には WILLIAMS 法と ECD 法が国際的に広く使用されている。しかし、圃場の根こぶ病菌菌系は、しばしば複数レースが混在する遺伝的に不均一な集団であることが JONES et al. (1982) を始め複数の研究者により示唆され、圃場の菌系は個体群(population)として扱われている。

根こぶ病菌は人工培養ができないので、単体眠胞子に

由来する遺伝的に均一な菌株を培地上で得ることはできない。したがって、単休眠一胞子を宿主植物に接種し、その罹病根から得られた休眠胞子が遺伝的に均一な菌株として研究に用いられるようになった。単休眠胞子接種法には、BUCZACKI (1977), JONES et al. (1982) などの方法があり、わが国では最近、KAGEYAMA et al. (1995) が簡便法を考案したほか、NARISAWA et al. (1996) は単細胞採取システムを用い高率に罹病植物を得ている。しかし、単核の単休眠胞子の接種によっては休眠胞子分化が認められないことから、これまでに各研究者が分離した単胞子由来株は2核休眠胞子に由来すると推測されている (NARISAWA et al., 1996)。なお、根こぶ病菌の1菌系 (個体群) において、核染色法 DAPI を用い各休眠胞子の核数を調べたところ、単核、2核、4核のものが観察され、それらの割合はそれぞれ 89.3, 10.3, 0.3% であったという (成澤ら, 1995)。

わが国でも、菌系 (個体群) から複数の単休眠胞子由来菌株が分離され、レース混在の有無が調べられたところ、供試2菌系ではレースの混在は観察されなかったが、他の1菌系において二つの単休眠胞子由来株間でレース判別宿主に対する病原性に違いが見られ、菌系内におけるレース混在の可能性が示唆された (KAGEYAMA et al., 1995)。このように根こぶ病菌の病原性をめぐる問題は複雑化している。

2 生化学的・分子遺伝学的手法による菌系およびレースの判別

アイソザイム分析や RAPD-PCR 法を用い菌系 (個体群) やレースを判別する試みがなされている。矢野ら (1994, 1995) によると、アイソザイム分析の結果、15 菌系 (個体群) のうち1菌系は他の14菌系と明らかに区別されたが、14菌系間の遺伝的多様度は極めて小さかった。また、任意 PCR プライマーを用いた RAPD-PCR 法においても同様の結果が得られた。一方、BUHARIWALLA et al. (1995) によると、クローニングした根こぶ病菌由来 DNA から作成した特異的 PCR プライマーを用いて菌系 (固体群) DNA の PCR を行くと、少数で、高度に増幅された多型 DNA 断片が得られた。これらの DNA 断片は菌系間で大きな多様度を示し、菌系相互の判別が容易であった。

また、レースの判別については、MÜLLER and HARLING (1996) の報告がある。彼らは、単休眠胞子由来根こぶ病菌3菌株の DNA に対し、10塩基対の任意 PCR プライマー40種を用いて RAPD を行い、得られたプロファイルを用いて ECD 法によるレース判別結果と比較したところ、使用プライマーの内の三つが菌株特異的プロファイルを示し、その内の一つがレース判別結果と一致するプロフ

ァイルを示したとしている。

なお、近年、欧州カブの遺伝子を導入してわが国で根こぶ病抵抗性 (CR) のハクサイが作出されたが、これらの品種の普及とともにその罹病が問題となり (吉川, 1989), 後にこれらの品種を侵す菌系 (個体群) と侵さない菌系 (個体群) が明確に存在することが明らかとなった (TANAKA et al. 1991; 釘貫ら, 1995)。これら両菌系 (個体群) を、分子遺伝学的手法により判別する試みが行われているが、今のところ成功していない (矢野ら, 1995)。

IV 病原性と抵抗性の生化学と分子遺伝学

1 高分子 DNA の抽出法

矢野ら (1994) は、高分子 DNA 抽出への利用を目的とし、根こぶ病菌休眠胞子のスフェロプラストの調製法を確立した。また、Ito et al. (1994) は、休眠胞子スフェロプラスト由来 DNA は高分子量を保持しており、制限酵素の基質および RAPD-PCR の鋳型として利用可能であったこと、このスフェロプラストを用いてパルス電気泳動を行うと少なくとも13本の染色体 DNA が検出されたことなどから、休眠胞子スフェロプラストは根こぶ病菌ゲノムと染色体の DNA 解析に有用であることを示した。

2 感染に伴う宿主タンパクの消長と酵素活性の変化

感受性および抵抗性宿主における根こぶ病菌感染前後の各種タンパクの消長や酵素活性の変化に注目した研究は多いが、まだ手探りの段階にある。以下に、二、三の研究を紹介する。

HANSEN et al. (1994) は、キャベツの健全根に存在するいくつかのタンパクが、根こぶ病菌の感染に伴って消失するかまたは著しく減少することを認め、感染によりこれらのタンパクをコードする宿主遺伝子の発現が抑制されるか、これらのタンパクが破壊されるためにこぶ形成が誘導されると考察している。また、Ludwig-MÜLLER et al. (1994) は、根こぶ病菌感染後のハクサイの感受性品種と耐性品種における、chitinase と peroxydase 活性の変化に注目したが、両酵素活性ともに耐性品種で有意に高くなるという結果は得られなかった。両酵素は一般に病原体に対する宿主植物の防御反応に関与しているとされるが、今のところ、根こぶ病の宿主病原体相互作用においてその証拠は得られていない。

一方、Ito et al. (1996) は、感受性および抵抗性品種に病原性を異にする根こぶ病菌2菌系をそれぞれ接種して根における各種タンパクの量的消長を調べたところ、感受性の組み合わせで特異的に増大した 25 kDa タンパク (pI 7.0) が PR タンパク group 5 と高い相同性を持つ

ことが明らかになった。しかしこのタンパクの機能や意義は明らかにされていない。

3 根こぶ病菌による宿主 DNA の取り込み

BRYNGELSSON et al. (1988) は、根こぶ病菌の休眠胞子と遊走子の DNA 中に宿主 DNA と高い相同性を持つ塩基配列が存在することを示した。これらの塩基配列は高分子の形のまま根こぶ病菌に取り込まれるが、宿主が変わると前の宿主の DNA 塩基配列は失われ、新しい宿主の DNA 塩基配列が検出される。彼らは、宿主 DNA 断片の取り込みの意義は明らかではないとしながらも、これは根こぶ病菌の進化に重要であり、宿主環境に対する根こぶ病菌の適応に関与していると考察している。また、BUHARIWALLA and MITHEN (1995) も、ナタネで継代した根こぶ病菌の休眠胞子 DNA において BRYNGELSSON et al. (1988) の見解を支持する結果を得ている。根こぶ病菌への宿主 DNA の取り込みが根こぶ病菌の病原性や宿主への適応に果たす具体的な役割について、今後の研究の進展が注目される。

4 根こぶ病抵抗性と抵抗性育種

RFLP マーカーを利用して各種アブラナ科作物における抵抗性遺伝子のマッピングや詳細な遺伝子地図の作成が進められている (LANDY et al., 1992; FIGDORE et al., 1993)。わが国でも欧州カブを抵抗性育種素材とする根こぶ病抵抗性育種において、抵抗性遺伝子に連鎖する RAPD マーカーが見いだされ、根こぶ病抵抗性個体の幼苗期での早期選抜が可能になった (釘貫ら, 1996)。

また、シロイヌナズナのエコタイプの多くは根こぶ病に感受性である (KOCH et al., 1991)。しかし、最近、特定の菌株 (pathotype) に特異的に抵抗性を示すエコタイプが見いだされた (FUCHS and SACRISTAN, 1996)。エコタイプの根こぶ病抵抗性は、単一優性遺伝子支配であるという。抵抗性エコタイプの利用により、根こぶ病抵抗性遺伝子の解明に研究の新たな展開が期待される。

V 休眠胞子の発芽機構

休眠胞子の発芽には、二価陽イオンが深くかかわっており、休眠胞子から Ca^{2+} を放出させると発芽が促進される (鈴木ら, 1988)。休眠胞子を純水に懸濁するだけでもかなり多量の Ca^{2+} が放出されるが、キレート剤 (EDTA, EGTA) を用いて休眠胞子から Ca^{2+} を一定量放出させると発芽が促進され、その量を超えてさらに放出させると発芽はむしろ抑制される (矢野ら, 1991)。また、宿主根の滲出物中に休眠胞子の発芽を促進する物質が存在し、その活性本体は熱に安定で比較的高極性 (親水性) の低分子物質であり、アブラナ科植物ばかりではなく、レタスのような非宿主植物の根の滲出物中にも見

いだされる (SUZUKI et al., 1992)。

VI 土 壌 診 断

根こぶ病防除対策の目安として、圃場土壌における根こぶ菌汚染度の簡便な診断法の確立が望まれている。TAKAHASHI and YAMAGUCHI (1987) は、土壌中の休眠胞子密度測定のために、汚染土壌から遠心分離操作を経て休眠胞子を定量する従来法に改良を加え、操作時間の短縮を図った。また、酵素抗体法を用い土壌中の休眠胞子密度を定量する方法も最近提案されている (折原・山本, 1996)。さらに土壌中の休眠胞子を顕微鏡観察により検出する方法として、蛍光抗体法 (有江ら, 1988) や蛍光色素カルコフルオールと臭化エチジウムの混合液による染色法 (TAKAHASHI and YAMAGUCHI, 1988, 1989) が考案された。前者は根こぶ病菌休眠胞子を特異的に検出できる点に、後者は休眠胞子の病原性活性も同時に評価できる点に特長がある。

根こぶ病の発生には、土壌中における根こぶ病菌の密度だけではなく、多様な誘因が関係し影響を及ぼすため、本病防除には総合防除の観点からの対策が必要となる。また、用いられるべき防除技術は圃場の諸条件等により必ずしも一様ではないことから、種々の防除技術をどう組み合わせ、個々の圃場の実態に応じた対策を講じるかが重要となる。そこで、「根こぶ病の発生予測」、「発生水準に応じた個別技術の合理的な総合化」、「総合防除技術の効果の事前評価」を目的とし、「圃場カルテシステム」が開発され (農林水産省農業研究センター, 1988)、その実用化試験が進められている。

VII 防 除

防除薬剤としては、従来、PCNB, TPN, トリクラミドの3剤が使用されてきたが、最近、フルアジナムとフルスルファミドが新規に開発、登録された。両薬剤ともに低薬量で高い効果を示す。フルアジナムは、休眠胞子に殺菌的に作用し、根毛感染と皮層感染を抑制する (鈴木ら, 1995)。フルスルファミドも類似の効果を有し (TANAKA et al., 1988)、定植以前にあらかじめ土壌に施用しても高い効果が得られる。なお、根こぶ病防除薬剤の効果は、一般的に土壌中の根こぶ病菌密度のほか、菌系の病原力によっても異なる (田中ら, 1995) ので、薬剤使用の際はこれらの点も考慮することが望ましい。また、くん蒸剤によるマルチ畦内処理も効果が高く、使用薬剤としては、D-D・イソチオシアネートとダゾメットが適している (奥村, 1991)。

根こぶ病抵抗性品種としては、ハクサイ、カブ、キャベツ、ブロッコリーなどで、計 120 品種以上が育成され

普及している(吉川, 1996)。地域によってはこれらの品種での罹病が問題になっているが, 前述のとおり, これらを侵す菌系と侵さない菌系が存在する (TANAKA et al., 1991; 釘貫ら, 1995)。なお, 根こぶ病菌の傷口感染や環境ストレスなども本品種罹病の原因ではないかとされるが, 明確な結論は得られていない (吉川, 1996)。

根こぶ病の生物防除についても研究が進められている。まだポット試験の段階ではあるが, ハクサイ根部エンドファイトの一種である *Hetericonium chaetospora* の有用性が示唆されている (成澤ら, 1996)。

VIII 伝染源としてのアブラナ科雑草

わが国で根こぶ病の発生が知られているアブラナ科雑草は3種であったが, 新たにタネツケバナとオオバタネツケバナで根こぶ病の発生が記録された (TANAKA et al., 1993)。タネツケバナの根こぶ病は北海道と沖縄を除くほとんどの府県でごく普通に観察される。アブラナ科野菜に寄生する根こぶ病菌はタネツケバナにまったく病原性を示さないが, タネツケバナに寄生する根こぶ病菌はワサビに強い病原性を示し, 他のアブラナ科野菜に対しても程度は弱い病原性を示す(田中ら, 1994)。現在, 両菌の生態的・遺伝的關係について検討が進められている。

おわりに

本稿では, 根こぶ病研究の最近の動向を概括した。生活環など従来からの研究課題のほか, 新たに分子遺伝学的手法による研究が増えつつある点が最近の特徴といえよう。これら分子遺伝学的研究の多くは, まだ断片的で手探りの段階にあるが, 示唆に富んだものが少なくない。根こぶ病の発生は依然として拡大傾向にあり, アブラナ科野菜の栽培農家に深刻な打撃を与えている。今後, 研究者相互の密な情報交換と協力体制により, 研究が飛躍的に進展し, 現場の要請に的確に応え得る防除技術が確立されることを期待したい。

なお, 本稿の執筆にあたり, 農林水産省野菜・茶業試験場育種部長吉川宏昭氏, タキイ種苗研究農場研究員塩見 寛氏, 茨城県生物工学研究所研究員成澤一彦氏から資料の提供をいただいた。ここに記して厚くお礼申し上げる。

引用文献

- 1) 有江 力ら (1988): 日植病報 54: 242~245.
- 2) BUCZACKI (1977): Trans. Br. Mycol. Soc. 69: 328~329.
- 3) BRYNGELSSON, T. et al. (1988): Physiol. Mol. Plant

- Pathol. 33: 167~171.
- 4) BUHARIWALLA, H. et al. (1995): ibid. 47: 83~94.
- 5) ——— and R. MITHEN (1995): ibid. 47: 95~101.
- 6) FIGDOR, S. S. et al. (1993): Euphytica 69: 33~44.
- 7) FUCHS, H. and M. O. SACRISTAN (1996): Mol. Plant-Microbe Interact. 9: 91~97.
- 8) GRAVELAND, R. et al. (1992): Mycol. Res. 96: 225~228.
- 9) HANSEN, C. E. et al. (1994): Acta. Agric. Scand. Sect. B. Soil and Plant Sci. 44: 123~128.
- 10) 早田栄一郎 (1990): 九病虫研会報 36: 34~35.
- 11) 本間善久 (1993): 植物防疫 47: 16~21.
- 12) ITO, S. et al. (1994): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 60: 491~495.
- 13) ——— et al. (1996): J. Phytopathol. 144: in press.
- 14) 岩波 壽ら (1993): 中国農研資料 21: 133~159.
- 15) JONES, D. R. et al. (1982): Plant Pathol. 31: 229~238.
- 16) ——— et al. (1982): ibid. 31: 239~246.
- 17) KAGEYAMA, K. et al. (1995): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61: 415~418.
- 18) KOCH E. et al. (1991): J. Phytopathol. 132: 99~104.
- 19) 釘貫靖久ら (1995): 園学雑誌 61 別: 218~219 (講要).
- 20) ——— (1996): 育種 45 別 2: 100 (講要).
- 21) LANDY, B. S. et al. (1992): Genome 35: 409~420.
- 22) LUDWIG-MÜLLER, J. et al. (1994): Physiol. Plant. 90: 661~670.
- 23) MITHEN, R. and R. MAGRATH (1992): Mycol. Res. 96: 877~885.
- 24) MÖLLER, M. and R. HARLING (1996): Letters in App. Microbiol. 22: 70~75.
- 25) 成澤ら (1995): 日本菌学会第39回大会講演要旨集, pp. 100 (講要).
- 26) NARISAWA, K. et al. (1996): Mycol. Res. 100: in press.
- 27) 農林水産省農業研究センター(1988): 総合農業研究叢書 第16号, 255 pp.
- 28) 奥村直志 (1991): 今月の農業 35(12): 30~37.
- 29) 折原祥子・山本孝稀 (1996): 平成8年度日本植物病理学会大会講演要旨集, p. 33 (講要).
- 30) PETCHARAT et al. (1987): J. Thai Phytopath. Soc. 9: 15~22.
- 31) 鈴木一美ら (1995): 日植病報 61: 395~398.
- 32) 鈴木 健ら (1988): 同上 54: 114~115 (講要).
- 33) SUZUKI, K. et al. (1992): Ann. Phytopath. Soc. Japan. 58: 699~705.
- 34) TAKAHASHI, K. and YAMAGUCHI, T. (1987): Ibid. 53: 507~515.
- 35) ———, ——— (1988): Ibid. 54: 466~475.
- 36) ———, ——— (1989): Ibid. 55: 621~628.
- 37) TANAKA, S. et al. (1988): Abstrs. Int. Congr. Plant Pathol. 5th, p. 326.
- 38) ——— et al. (1991): Bull. Fac. Agric. YAMAGUCHI Univ. 39: 113~122.
- 39) ——— et al. (1993): Trans. Mycol. Soc. Japan 34: 381~388.
- 40) 田中秀平ら (1990): 山口大農学報 38: 33~45.
- 41) ———ら (1994): 日植病報 60: 256~258.
- 42) ———ら (1995): 同上 61: 228 (講要).
- 43) 矢野彰吾ら (1991): 山口大農学報 39: 105~112.
- 44) ———ら (1994): 日植病報 60: 310~314.
- 45) ———ら (1994): 同上 60: 396 (講要).
- 46) ———ら (1995): 同上 61: 233 (講要).
- 47) 吉川宏昭ら(1989): 根こぶ病抵抗性ハクサイ品種の罹病化に関する緊急調査報告書, 野菜茶試, 46 pp.
- 48) ——— (1995): 日本植物防疫協会野菜病害防除研究会現地検討会資料, pp. 16~25.