

Dual culture of Plasmodiophora brassicae with host plant

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 浅野, 貴博 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2521

氏 名（国籍）	浅 野 貴 博 （愛 知 県）
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	農博甲第180号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Dual culture of <i>Plasmodiophora brassicae</i> with host plant
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 百 町 満 朗 副査 静 岡 大 学 教 授 露 無 慎 二 副査 信 州 大 学 教 授 大 政 正 武 副査 岐 阜 大 学 教 授 福 井 博 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

アブラナ科野菜根こぶ病菌は絶対寄生菌であり、まだ純粋培養は成功していない。本研究では *Agrobacterium rhizogenes* の感染により誘導される毛状根に雑菌混入のない根こぶ病菌の休眠胞子を感染させる培養系の確立を試みた。また、本菌が内在した宿主細胞を *in vitro* で大量増殖させる目的で、本菌を感染させた宿主のカルスやプロトプラストを用いた振とう培養系の確立を試みた。これらから得られた結果は以下の通りである。

薬剤処理により接種源となる休眠胞子から雑菌を取り除くことを試みた。その結果、休眠胞子を 2% クロラミン-T 溶液に 20 分、抗生物質溶液（コリスチン 1000ppm、バンコマイシン 1000ppm、セフトキシム 6000ppm）に 1 日懸濁することで休眠胞子発芽を阻害することなく雑菌を抑制することができた。次に、*A. rhizogenes* により 4 種のアブラナ科野菜（キャベツ、ハクサイ、カブ、西洋ナタネ）から毛状根を誘導し、毛状根に薬剤処理し表面殺菌した休眠胞子懸濁液を接種・感染させることを試みた。その結果、毛状根の系統により根こぶ病菌に対する感受性の差が認められ、ハクサイとカブから誘導した毛状根は根毛感染率が高く、根こぶ形成が認められた。一方、キャベツ、西洋ナタネから誘導した毛状根では、根毛感染率は低く、根こぶ形成は認められなかった。また、光学および走査型電子顕微鏡を用いて根毛感染および皮層感染を観察したところ、毛状根内の遊走子のう、第二次変形体、休眠胞子の形態は罹病植物で見られるものと同様であった。毛状根を用いて根こぶ病菌を継代的に培養することが可能であるか否かを知るため、毛状根由来の休眠胞子を再度毛状根に接種し根こぶ形成の有無を調べた。その結果、毛状根に再び根こぶが形成された。すなわち、毛状根培養による根こぶ病菌の培養系を確立するこ

とができた。根こぶ病菌と毛状根との共存培養法を用いて、本菌の感染初期段階を調査した。その結果、根毛感染は休眠孢子の接種時期が異なっても、接種前 1 日に伸長した根の根毛で多く見られた。根毛感染数は、接種後 4~6 日に著しく増加し、その後 12 日目まで緩やかに増加した。また、根毛感染数の増加は、休眠孢子の発芽率の増加と同調的であった。毛状根と根こぶ病菌との共存培養系は、同一根毛内における根こぶ病菌の生育を経時的に観察することが可能で、本菌の宿主内の動態を追うのに適しており、本菌の増殖や生活環の解明に有効な技術であると言えた。

アブラナ科野菜根こぶ病菌の宿主との共存培養法として本菌に感染した宿主細胞からカルス（保菌カルス）を誘導し継代培養することが行われている。しかし、この培養法は増殖効率が低く、また病原菌を同調的に培養できないことが問題となっている。そこで、保菌カルスを振とう培養および保菌カルス由来のプロトプラストを液体培養することで本菌を大量にまた同調的に増殖できるか否かを検討した。本菌に感染した宿主細胞のカルスの振とう培養を試みるため、培養に用いる MS 培地の植物ホルモン条件について検討したところ、2,4-D 0.1mg/l+カイネチン 0.02mg/l のときに宿主細胞の増殖は良く、また細胞内に根こぶ病菌の変形体が観察された。細胞増殖に用いる培養容器内のキャップにポアサイズ 0.5 μm のフロロカーボン製通気膜を用いたところ、容器内は適当な酸素濃度となり、根こぶ病菌を含む細胞が良く増殖した。また、細胞増殖には培地内に一定の細胞密度が必要とされているが、100ml 容三角フラスコ当たりの培地量を 15ml にした結果、細胞の増殖は良く、変形体も多く存在した。保菌カルスから作成したプロトプラストを用いた培養では MS 培地に NAA 5.0mg/l とカイネチン 1.0mg/l を加えた 1/2 希釈 MS 培地が根こぶ病菌を内在するプロトプラストの増殖に適していた。このように本菌を感染させた宿主カルスの振とう培養やプロトプラストの液体培養により、根こぶ病菌を *in vitro* の状態である程度まで増殖させることは可能となった。しかし、根こぶ病菌に感染した宿主細胞の継代培養で大量増殖させるまでには至らなかった。

本研究は、毛状根による根こぶ病菌の共存培養系を確立するとともに、根こぶ病菌を内在する宿主細胞を懸濁培養することで大量培養の可能性を示した。これらの方法は、アブラナ科野菜根こぶ病菌の遺伝子構造や生理などの基礎的研究に有効なばかりでなく、抵抗性品種育成試験の基礎的手法ともなり得るものであり、応用面での意義も非常に大きいものと評価される。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、絶対寄生菌であり純粋培養できないアブラナ科野菜根こぶ病菌の宿主細胞内での共存培養について検討したものである。また、本菌が内在した宿主細胞を *in vitro* で大量増殖させる目的で、本菌を感染させた宿主のカルスやプロトプラストを用いた振とう培養系の確立を試みたものである。この研究を進めるには、根こぶから雑菌混入のない根こぶ病菌の休眠孢子を分離するとともに、それを無菌状態で育成したアブラナ科野菜の毛状根あるいは宿主植物に接種して宿主細胞内で増殖させることが必要である。そこで、申請者はまず

雑菌混入のない休眠胞子の分離法に着手した。雑菌混入のない休眠胞子の分離技術の確立には、殺菌液や抗生物質を処理して単に雑菌混入のない休眠胞子を分離すればよいのではなく、薬剤を処理しても休眠胞子の活性が低下しないようにするという、非常に難しい問題を含んでいた。申請者はこの難問題を2%クロラミン-T溶液と抗生物質溶液（コリスチン1000ppm、バンコマイシン1000ppm、セフトキシム6000ppm）の組み合わせを用いて解決することに成功した。また、この技術を用いて毛状根に根こぶ病菌を感染させ、こぶ形成させることにも成功した。次に、毛状根を用いて根こぶ病菌を継代的に培養することが可能であるか否かを知るため、毛状根由来の休眠胞子を再度毛状根に接種し根こぶ形成の有無を調べたところ、毛状根に再び根こぶが形成された。すなわち、毛状根培養による根こぶ病菌の培養系を確立することができた。また、根こぶ病菌の生活環には不明な点が多くあるため、根こぶ病菌と毛状根との共存培養法を用いて、本菌の感染初期段階を調査した。その結果、根毛感染は休眠胞子の接種時期が異なっても、接種前1日に伸長した根の根毛で多く見られた。根毛感染数は、接種後4~6日に著しく増加し、その後12日目まで緩やかに増加した。根毛感染数の増加は、休眠胞子の発芽率の増加と同調的であった。さらに、この方法を使うと同一根毛内における根こぶ病菌の生育を経時的に観察することも可能であった。毛状根と根こぶ病菌との共存培養系は、本菌の宿主内の動態を追うのに適しており、本菌の増殖や生活環の解明に有効な技術であると言えた。

次に、根こぶ病菌に感染した宿主細胞の振とう培養およびプロトプラスト培養による本菌の大量増殖法について検討した。まず、根こぶ病菌感染カルスを用いて本菌に感染した宿主細胞の振とう培養を試みるため、培養に用いたMS培地の植物ホルモン条件を調べた。その結果、2,4-D 0.1mg/l+カイネチン 0.02mg/lのときに宿主細胞の増殖は良く、また細胞内に根こぶ病菌の変形体が観察された。細胞増殖に用いる培養容器内のキャップにポアサイズ 0.5 μ m のフロロカーボン製通気膜を用いたところ、容器内は適当な酸素濃度となり、根こぶ病菌が良く増殖した。また細胞増殖には培地内に一定の細胞密度が必要であり、100ml 容三角フラスコ当たりの培地量を15mlにした結果、細胞の増殖は良く、変形体も多く存在した。根こぶ病菌感染カルスから作成したプロトプラストを用いた培養ではMS培地にNAA 5.0mg/lとカイネチン 1.0mg/lを加えた1/2希釈MS培地が根こぶ病菌の増殖に適していた。このように本菌に感染した宿主細胞の振とう培養やプロトプラストの液体培養により、根こぶ病菌を *in vitro* の状態である程度まで増殖させることは可能となった。しかし、根こぶ病菌に感染した宿主細胞を継代培養し大量増殖するまでには至らなかった。

以上、本論文の内容は、根こぶ病菌の毛状根による共存培養系を確立するとともに、本菌の大量培養に向けて本菌が内在する宿主細胞の懸濁培養法を成功させたことに大きな意義を持っている。この研究は、アブラナ科野菜根こぶ病菌の遺伝子構造や生理などの基礎的研究に有効なばかりでなく、抵抗性品種育成の基礎資料ともなり、応用面での意義も非常に大きいものと評価される。

これら一連の研究に対して、審査委員は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

基礎となる学術論文

- Surface disinfection of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* used to infect hairy roots of *Brassica* spp. *Phytopathology* 89(4):314–319. 1999
- Germination of surface-disinfected resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and their root hair infection in turnip hairy roots. *Mycoscience* (in press)