



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Plasmodiophora

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(アブラナ科植物の根こぶ病に関する研究(VIII))

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 池上, 八郎, 北井, 芳範 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5475

*Plasmodiophora 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

(アブラナ科植物の根こぶ病に関する研究 VIII)

池上八郎・北井芳範¹⁾

植物生産遺伝学講座

(1989年8月1日受理)

Nuclear DNA Content in Turnip Root Cortical and
Callus Cells Infected with *Plasmodiophora brassicae*

(Studies on the Clubroot of Cruciferous Plants VIII)

Hatiro IKEGAMI and Yoshinori KITAI

Department of Plant Genetics and Production

(Received August 1, 1989)

SUMMARY

In clubroot on turnip in cruciferous vegetables, cortical tissue and callus tissue cells infected with *Plasmodiophora brassicae* Woronin were employed for the present study. The relative nuclear DNA content in their cells was compared with healthy cells to obtain some data to clarify the mechanism of cell hypertrophy. Small pieces of young clubs on two susceptible cultivars to clubroot of turnip and infected callus tissues were fixed in acetoethanol fluid (glacial acetic acid 1 : absolute ethanol 3 in volume) and then stored in 70% ethanol in a refrigerator until used. After hydrolysis in 5N HCl at 25°C for 40 minutes, the samples were stained for 4—5 hours by Schiff's reagent at room temperature (about 25°C). The nuclei in tissue samples which were slightly crushed were used for measurements. Fresh leaves of *Camellia sasanqua* Thunb., in which Feulgen stain was consistently observed, were treated on the same slideglass as the standard. Microspectrophotometric measurements were made 30 nuclei per sample at the maximum absorption wavelength of 560 nm with a scanning microdensitometer, Nikon Vickers M 85. Two kinds of nuclei of 2C and 4C were found in healthy and infected cortical tissue cells, and variational width of nuclear DNA content of infected cells was large. Nuclei of 8C and higher DNA classes were also recognized. Both 2C and 4C nuclei were observed in healthy and infected calli and variational width of infected cells with more DNA content than 4C was large. In infected turnip cortical and callus cells, the relationship between the number of nuclei in a plasmodium in an infected cell and the nuclear DNA content in the cell showed a high correlation of $r = 0.83$ in 「Waseō—kabu」, $r = 0.64$ in 「Taibyōhikari—kabu」 and $r = 0.73$ in infected callus cell. From the above results, the abnormal metabolism in infected cells, the increased nuclei DNA synthesis accompanied with the growth of vegetative plasmodium in a cell and the disturbance of normal somatic cell division, were suggested.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (54) : 1—8, 1989.

1) 石川県小松農業改良普及所

要 約

本研究はアブラナ科野菜のカブ根こぶ病において、根こぶ病菌(*Plasmodiophora brassicae* Woronin)が最もさかんに増殖している皮層組織の感染細胞と根こぶ由来の感染カルス細胞を供試し、感染細胞内の核DNA量を健全細胞のそれと比較し、この細胞の肥大機構を明らかにする知見をうるために行った。罹病性の高いカブ2品種に生じた若い根こぶと感染カルス組織の小片を酢酸アルコール液(氷酢酸:100%エタノール, 容量比 1:3)で固定し、70%エタノールで冷蔵庫にて保存した。加水分解は5 N HClで25℃, 40分間とし、Schiff 試薬による染色は室温(約25℃)で4-5時間とし、やや押しつぶした組織試料の核を測定した。対照試料は染色性の安定したサザンカの新葉を常に上述の試料とともに同じスライドガラス上で同時処理した。測定は走査型顕微濃度計、ニコン・ビッカースM85を使用し、最大吸収波長の560nmで各試料当り30核を測定した。健全根と病根の皮層細胞には2 Cと4 Cの両核があり、感染細胞の核DNA量は変異巾が大きく、4 C核よりもさらに多い8 C核もあり、さらに核DNA量の多い核もあった。健全及び保菌の両カルスにおいて、2 Cと4 Cの両核があり、保菌カルスでの変異巾は大きく、4 C核よりDNA量の多い核も見出された。カブの根こぶと保菌カルスにおいて、感染細胞における変形体の核数の多少で示される菌の発育程度とその細胞の核DNAとの間では「早生大かぶ」は $r=0.83$, 「耐病ひかりかぶ」で $r=0.64$ という正の相関がみられ、感染カルス細胞における同様の実験で $r=0.73$ の相関があった。以上から感染をうけた細胞内は異常な代謝となり、病菌の栄養発育にともなって核DNA合成のより増大となり、感染皮層細胞の正常な体細胞分裂の攪乱が示唆された。

緒 言

根こぶ病菌(*Plasmodiophora brassicae* Woronin)がアブラナ科野菜の根部、とくに皮層部に寄生すると、その感染細胞の核と仁は健全細胞のそれらに比較して著しく肥大し、またこの細胞も肥大するとの多くの報告がある。Williamsら(1968)¹⁾はカンラン胚軸でDNA, RNA, 蛋白質, リビッド, アミノ酸, 糖 及びでん粉量の増加によって根こぶ発育の最初の徴候がみられ、これらの代謝物質の増加は根こぶ組織の増大と平行しておくと報じている。また本病菌は人工培養できないが、根こぶ由来の保菌カルスは培養できる。この保菌カルス細胞でも上述の根こぶと同様に細胞核と仁の肥大、またこの細胞の肥大も認められている²⁾。

本研究はカブに生じた根こぶ及び保菌カルスを用いて、根こぶ病菌による感染細胞内の核DNA量を健全細胞のそれと比較し、感染細胞における寄主-寄生者関係について、とくにその細胞の肥大機構への知見をうるために行った。

材料及び方法

1. 供試材料

1) 根こぶ病根と保菌カルス カブ (*Brassica campestris* L. subsp. *rapa* Hook. f. et Anders.) 2 品種, 「早生大かぶ」と「耐病ひかりかぶ」(長岡交配, タキイ種苗株式会社)を供試した。圃場では40~50 cmの畦に約10 cmの溝を作り、ここへ濃厚汚染土と非汚染土を1:1の容量比で混合した土壌を入れ、この上に播種し、また非汚染圃場にも播種した。その後30~40日に根こぶと健全根を採取した。鉢では非汚染土あるいは殺菌土の乾土1 g当り 10^6 休眠胞子になるように接種した土壌をペーパーポットに入れ、そこへ播種し育成した幼苗を非汚染土を入れた直径18あるいは21 cmの素焼鉢に定植した。また上述の素焼鉢に非汚染土を約 1/3 量入れ、その上に接種土壌を入れて播種した。いずれも播種後30~40日に根こぶは表面、断面ともに白色のもの、また健全根は主根上部の肥大根部を採取した。なお上述の濃厚汚染土とは前年秋にハクサイ発病地から採取した根こぶを黒ぼく土壌に埋めて冬期間放置し、春期にこれをよく攪拌混合し、篩にかけたものであり、また接種源は前年秋に採取した根こぶを-20℃で凍結保存したものからえた。

保菌カルスは「早生大かぶ」及びハクサイ (*Brassica campestris* L. subsp. *pekinensis* Rupr.) の品種, 「五十日白菜」(長岡交配, タキイ種苗株式会社)を殺菌土の乾土1 g当り 10^6 休眠胞子になるように接種し

た土壌と殺菌土をそれぞれ直径18cmの素焼鉢に入れて播種した。播種後30～40日に生じた表面、断面ともに白色の根こぶと健全の肥大根部を2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面消毒し、よく殺菌蒸留水で洗滌後、直径0.5cmのコルクボーラーで抜き取り、これの厚さ2～3mmの円盤状組織をMurashige and Skoog基本培地11にカイネチン1.0 mg, α -ナフタレン酢酸0.5 mgを添加した寒天培地に移植し、生じた保菌及び健全カルスを20日ごとに継代培養し、供試した。

2) サザンカ新葉 本研究に対照材料として用いたサザンカ (*Camellia sasanqua* Thunb.) は供試カブの細胞と容易に区別できること、またフォイルゲン染色性が安定していたので全実験に供試した。これは岐阜県各務原市那加門前町の岐阜大学農学部温室付近の生垣のサザンカの新梢上位3葉の新葉を5月上～中旬に採取した。

2. 固定法

上述の根こぶ、健全肥大根部、保菌カルス及び健全カルスは一辺が2～3mmの立方体に、サザンカ新葉は一辺が2～3mmの正方形に切り取り、酢酸アルコール液(氷酢酸1容：100%エタノール3容の混合液)で24時間以上固定した。ついで95%エタノールで数回洗滌し、85%エタノールを経て70%エタノールに移し冷所で保存した。この試料を50及び30%エタノールを通して水に移した後、カミソリ刃で厚さおよそ0.5mmの薄い切片を作製し、下記の加水分解への試料とした。

3. 加水分解、染色及び封入法

本研究に用いたカブの根こぶ及び健全根はともにフォイルゲン染色法による細胞核の染色性が低く、そのためDNA量の測定は困難であった。そこで「早生大かぶ」の健全肥大根部を供試し、細胞核の染色度を高めて測定値を上げるように、加水分解時間、染色時間及び測定法などについて検討した。

1) 加水分解時間 5 N HClを用い、25℃で加水分解時間を15から65分間まで6段階とし、染色時間を4時間として核DNA量を測定した結果、2 Cと4 Cの2種の核がみられた。加水分解の程度は15分間で不十分、65分間では過度であった。25分間ではまだ変異が大きくて問題があり、結局35～55分間が良好で、本研究では5 N HCl, 25℃, 40分間で行うことにした。

2) 染色時間 加水分解を5 N HCl, 25℃, 40分間と設定し、Schiff 試薬原液での染色時間は3～6時間を4段階として行った結果、3時間の染色度は低く、4～6時間ではいずれも有意差はなくよく染まっていたので、染色時間は室温(約25℃)で4～5時間で行うことにした。

3) 最大吸収波長、押しつぶす程度及び測定核数 加水分解は5 N HCl, 25℃, 45分間、染色は5時間として細胞核の最大吸収波長を調べた。任意に選んだ3つの核は560～564 nm付近で最大吸収を示した。また本実験の対照として用いたサザンカ新葉の上述の条件でフォイルゲン染色した細胞核の最大吸収波長は560 nmであり、以上両者を考え合わせて560 nmで測定することにした。サザンカ新葉の試料を押しつぶす程度は、全く押しつぶされなかった核では測定誤差が10%を越え、任意に抽出した核では10%前後、やや押しつぶした核で5%程度の低い値を示した。以上からDNA量の測定はやや押しつぶした核のみとした。測定核数について、10～40核までは変異係数は5%内外の値でほとんど変化しなかった。それで能率と正確さを加味して30核を測定することにした。なお本実験で示したDNA量は相対量であり、各実験における対照の測定値の全体平均を基準として補正した値で示した。

固定法で述べた厚さがおよそ0.5 mmの薄い切片を5 N HCl, 25℃, 40分間で加水分解し、直ちに約4℃の冷水に入れて分解を停止した。2～3分後、試料をSchiff 試薬原液に入れ、室温(約25℃)の暗黒下で4～5時間染色した。染色後、その直前に作製した洗滌液(10%メタ重亜硫酸カリウム1容：1 N HCl 1容：蒸留水20容)で15分ずつ5回よく洗滌した。この試料を1～2分間水洗し、つぎの順序で押しつぶした。

i) スライドガラス上に試料の一片を載せ、45%酢酸を1～2滴おき、卵白グリセリンを薄く塗布したカバーガラスを載せて押しつぶした。すなわち、全体が一様に薄く広がるようにマッチの軸で軽くたたいて適当に広げ、上部から垂直に押しつぶした。ii) 10%酢酸を満たしたペトリ皿のなかでカバーガラスを下にして傾かせて数分間放置し、カバーガラスとスライドガラスを分離した。組織細胞の多くが付着した方のガラス(普通スライドガラス)を取って、つぎの順序で処理し、封入した。i) 氷酢酸：100%エタノールの容量比1：1, 1：3, 1：9にそれぞれ3分間, ii) 100%エタノールに5分間ずつ2回, iii) キン

ロール：100%エタノールの容量比 1 : 1 に 5 分間, iv) キシロールに 5 分間とした。つぎにキシロールのなかの試料をスライドガラス上におき, ビオライトで封入し, 28℃で 1 - 2 日間乾燥し, さらに上から垂直に押して余分の封入剤を押し出した。なおサザンカの新葉は全実験の対照として, 各スライドガラスの一端に載せ, 常に同一の処理を行った。

4. 顕微濃度計による核DNA量の測定

上述のように作製したスライドガラス標本は 1 週間以内に測定に供した。測定に用いた走査型顕微濃度計はニコン・ビッカースM85で, 測定波長は560 nm, 対物レンズ×10と×20を使用し, 各核を 3 回測定し, その合計値で示した。

5. 供試組織

「早生大かぶ」の健全肥大根部の横断面について, 表皮周辺部, 皮層部及び中心柱部の 3 部位に分けて細胞核のDNA量を測定した。その結果, 皮層部には 2 C と 4 C 核が明瞭にみられたが, 表皮周辺部には 2 C 核が多く, 4 C 核は少なかった。また中心柱部はほとんど 2 C 核のみであった。皮層部は 4 C 核が最も多く, 細胞分裂がさかに行われ, 根における代謝活性の最も高い部位といえる。

「早生大かぶ」に生じた根こぶにおいて, 表皮細胞, 表皮直下細胞, 皮層細胞及び中心柱細胞に分けて感染細胞の頻度をパラフィン切片により調べた結果, 感染細胞率は皮層細胞で最も高く, ついで中心柱細胞, 表皮直下細胞の順に少なくなっており, 表皮細胞には全くみられなかった。根こぶ病菌による感染とその発育は皮層部の細胞で最も活発に行われることがわかった。

以上の結果から本実験には皮層部の組織を供試することにした。

結 果

1. カブの健全根及び病根の皮層組織の細胞核DNA量の比較

カブ品種, 「早生大かぶ」の健全根及び病根について, これらの皮層部の組織細胞の核DNA量に差異があるかどうかを調べた。健全皮層細胞の測定核数は126, また感染皮層細胞のそれは72である。核DNA量の相対値は25ごとに階級を設け, 各階級に入るDNA量を有する細胞核数をヒストグラフにてFig.1に示す。

健全細胞では相対値 25~200の範囲にすべての測定核が含まれ, 2 C と 4 C 核が明瞭にみられた。これに対して感染細胞では相対値 25~850の広い範囲にわたって測定核が分布しており, 2 C と 4 C 核, それに 8 C 核も認められ, また感染細胞の最大相対値 200以上の核は全測定核の26%もあった。

2. 感染細胞内の変形体の発育程度とその細胞の核DNA量との関係

カブ 2 品種, 「早生大かぶ」と「耐病ひかりかぶ」に生じた根こぶの皮層組織を供試し, 発育程度の異なる変形体を有する感染細胞の核DNA量を調べるために, 変形体内の核数を数え, この感染細胞の核DNA量を測定した結果をFig. 2 及び 3 に示す。なお 120 個以上の核を有する変形体ではその核数を数えることはかなり困難であったため, 測定核数は少なくなった。また測定核数はFig. 2 の実験 1 は 53, 実験 2 では 51 であり, Fig. 3 の実験 1 は 44, 実験 2 では 55である。

「早生大かぶ」に生じた根こぶを供試し, 実験を 2 回行った。Fig. 2 の実験 1 は感染細胞内の変形体当り核数とその細胞の核DNA量との間に $r = 0.83$ というかなり高い正の相関があり, また実験 2 では $r = 0.75$ という高い正の相関があり, これら 2 回の実験ともに同様の結果であった。

つぎに「耐病ひかりかぶ」に生じた根こぶについても実験を 2 回行い, Fig. 3 の実験 1 では感染細胞内の変形体当り核数とその細胞の核DNA量との間には $r = 0.64$ という正の相関があり, また実験 2 では $r = 0.60$ とやや低い正の相関があり, これら 2 回の実験ともに同様の結果となった。

3. 健全及び保菌カルの細胞核DNA量の比較

「早生大かぶ」の健全肥大根部由来の健全カルスと根こぶ由来の保菌カルの 7 継代目, 培養40日後のいずれも表層カルスを供試し, 両カルの細胞核DNA量をFig. 4 及び 5 に示す。

Fig. 4 の健全カルスでは 2 C と 4 C の両核が見出され, 2 C 核は著しく多く, 上述の健全根の結果と同様

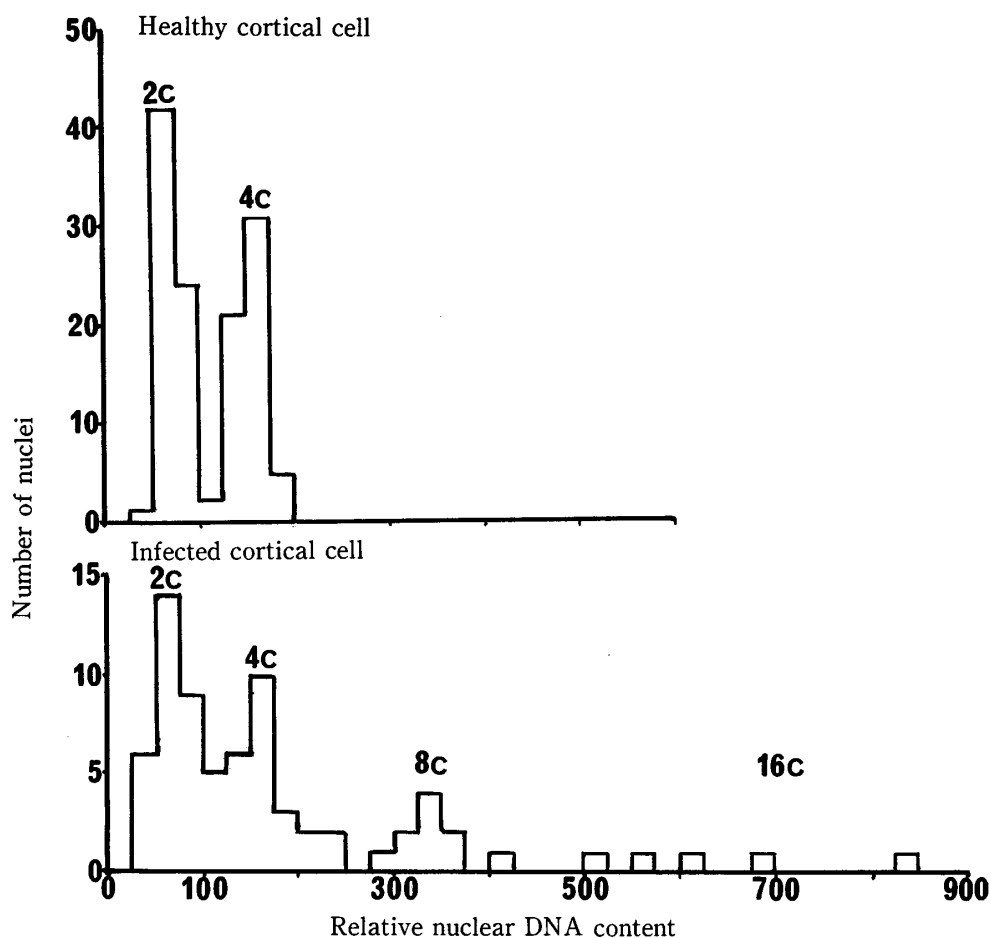


Fig. 1. The DNA content of nuclei in the healthy and infected cortical cells of turnip root (Waseō-kabu).

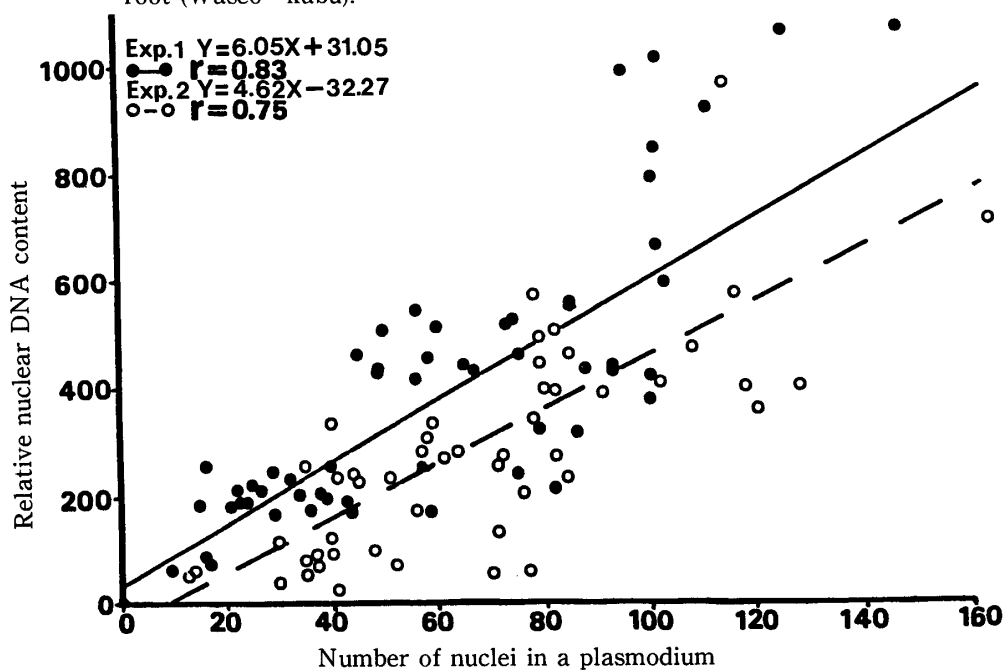


Fig. 2. The relationship between the number of nuclei in a plasmodium and the relative nuclear DNA content of the cell in the infected cortical cells of turnip root (Waseō-kabu).

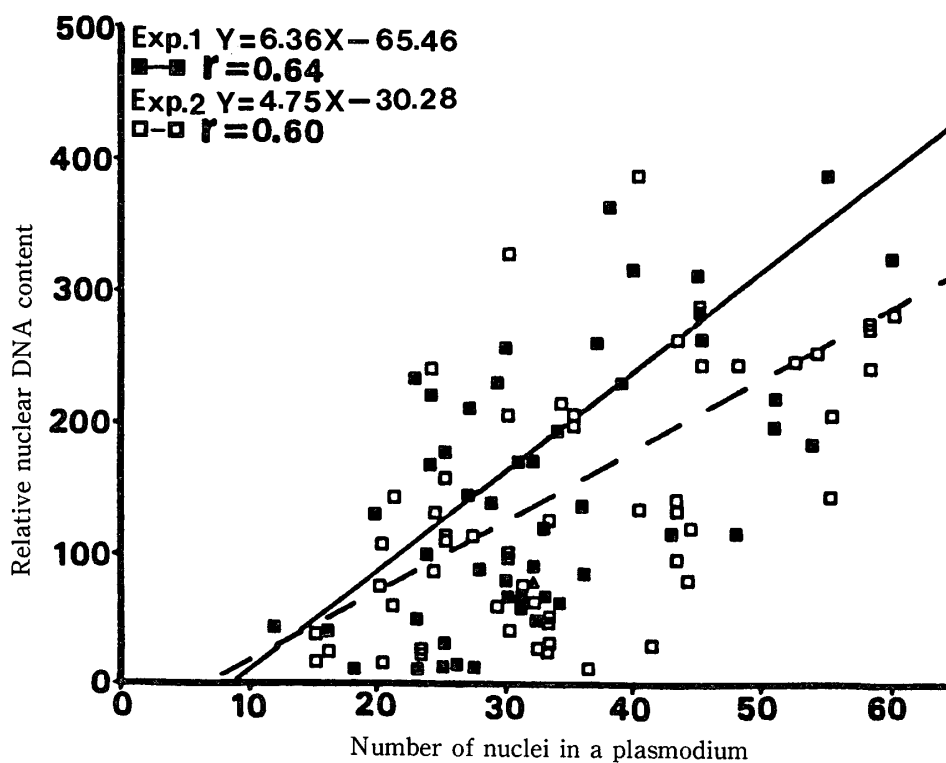


Fig. 3. The relationship between the number of nuclei in a plasmodium and the relative nuclear DNA content of the cell in the infected cortical cells of turnip root (Taibyōhikari-kabu).

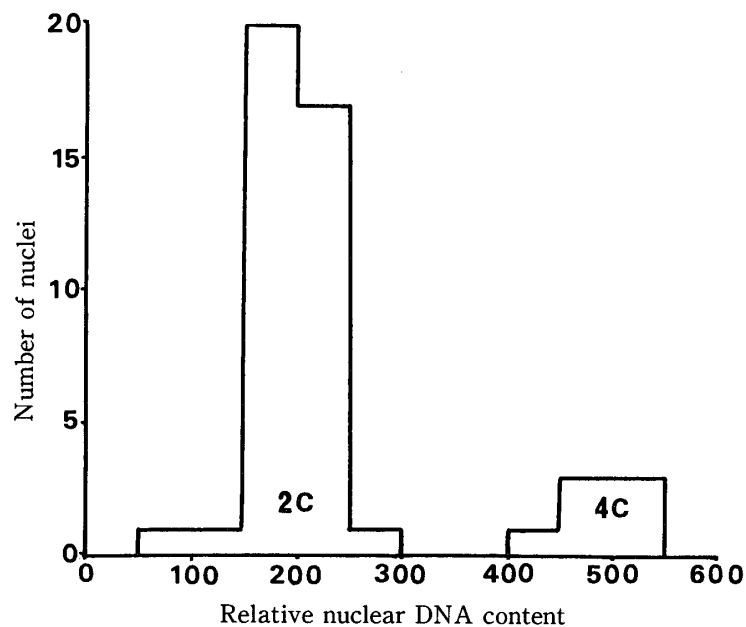


Fig. 4. The DNA content of nuclei in the healthy callus cells.

であった。Fig. 5 において、保菌カルスには 2C と 4C の両核があり、2C 核は明らかに多かった。核 DNA 量の変異巾は上述の根こぶと同様に大きかったが、8C 核は明瞭でなかった。なお、Fig. 4 及び 5 の核 DNA 量の相対値が既述の健全根及び病根に比較してかなり高いが、これは健全及び保菌の両カルスのフォイルゲン染色性が高かったためである。

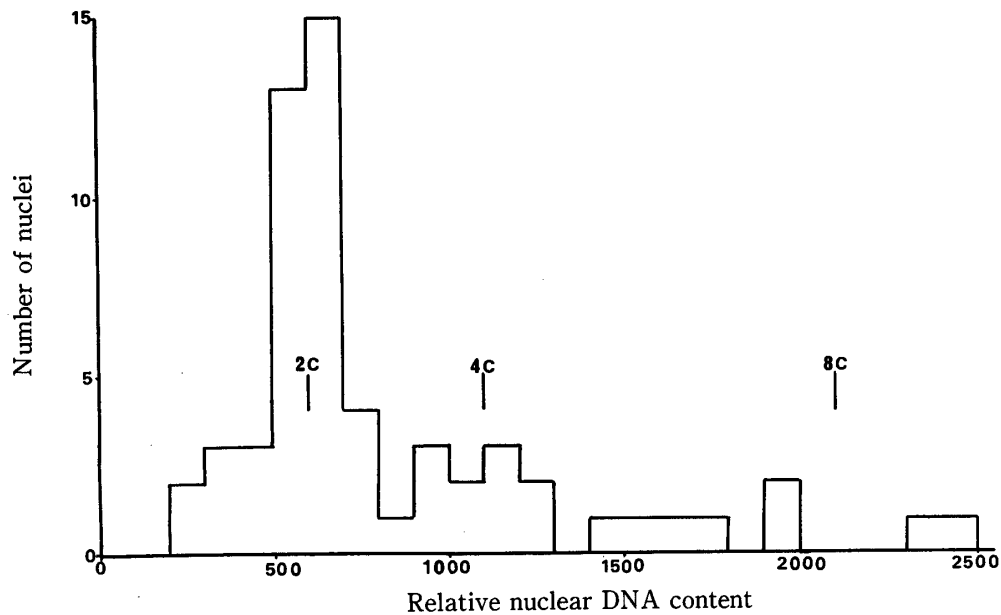


Fig. 5. The DNA content of nuclei in the infected callus cells.

4. 感染カルス細胞内の変形体の発育程度とその細胞の核DNAとの関係

「早生大かぶ」の根こぶ由来の保菌カルスの7継代目、培養40日後の内層カルスを供試し、感染カルス細胞内の変形体の発育程度、換言すると核数とその細胞核のDNA量との関係をFig. 6に示す。

測定核数は12で少なかったが、感染細胞の変形体内核数とその細胞の核DNA量との間には $r = 0.73$ の高い正の相関がみられた。

別に、ハクサイ品種、「五十日白菜」の根こぶ由来の初代保菌カルス、培養40日後の内層カルスを供試した上述と同様の実験で $r = 0.64$ (測定核数100)であった。保菌カルスも病根と同様に感染細胞の核DNA量の変化がみられた。

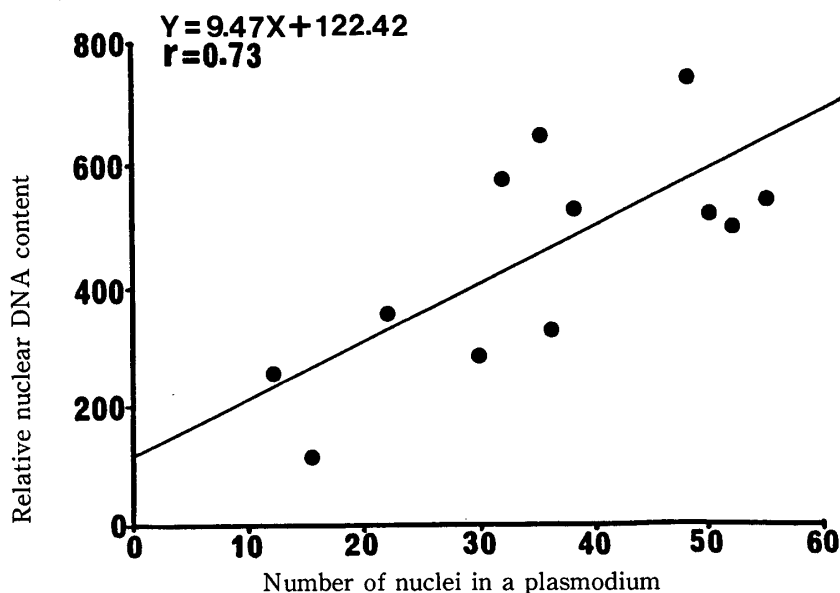


Fig. 6. The relationship between the number of nuclei in a plasmodium and the nuclear DNA content of the cell in the infected callus cells.

考 察

アブラナ科野菜であるカブの健全肥大根部及び根こぶの細胞核はフォイルゲン染色度が低く、DNA量の

測定はかなり困難であった。そのため加水分解、染色時間、押しつぶす程度などについて種々実験を行って検討を加えて本実験の推進をはかった。すなわち、5 N HClで25℃、40分間加水分解し、Schiff 試薬に室温（約25℃）で4—5時間、やや押しつぶした30核について測定した。これに対して健全及び保菌の両カルスの染色度は健全根及び病根に比べて高く、測定が容易であった。なお、対照材料のサザンカ新葉の細胞核はフォイルゲン染色度がよく、安定していたので、酢酸アルコールで固定し、70%エタノールで冷所保存し、全実験に使用した。

根こぶ病菌による感染皮層細胞では2 C核数に対する4 C核数の割合は健全皮層細胞のそれより高く、8 C核もみられ、さらにDNA量の多い核もあったが、16 Cとか32 C核は判然としなかった。寄生根皮層部の体細胞分裂は本病菌の寄生によって阻害され、分裂しないままの4 C核、また8 C核として残ったものと考えられる。カブの健全肥大根部の皮層組織には他の部位より明らかに4 C核が多く、また病根においても同一部位の組織に感染細胞が多く、このことは本病菌は代謝活性のさかんな細胞に感染し、寄主から菌の発育に必要な栄養物質を十分に吸収同化しつつ発育するものと考えられる。保菌カルス細胞には2 Cと4 C核が健全カルスと同程度見出され、根こぶと同様に4 C核以上のDNA量を有する核もあった。

根こぶの皮層組織及び保菌カルス組織において、感染細胞内の変形体の核数は多くなるほど、換言すると菌の発育程度が進むほど、その細胞の核DNA量が増加した。Williams(1966)³⁾は感染して肥大したカンラン胚軸において、感染細胞内の病原菌の核数とその細胞の核及び仁の体積との間に高い正の相関が認められ、感染細胞及び核の体積は10倍まで、仁の体積は30倍かそれ以上に増したとし、また肥大した細胞は非感染細胞に比べて16倍量のDNAを含んだと報じている。またBhattacharyaら(1971)⁴⁾は根こぶ病菌によるカンランの根毛感染において、貫入後6—8時間以内に核DNA、全蛋白質及び非ヒストン蛋白質の著しい増加を示し、核DNA量は変化しなかったことを示し、この根毛感染と上述のこぶ形成における感染細胞内の化学的変化の相違がわかる。同じ純寄生菌であるムギ黒さび病菌によるコムギの感染において、Allen(1923)⁵⁾は寄主細胞核及び仁の初期肥大を含めて核内は著しい変化をひきおこすと報じている。

根こぶ病菌で感染した細胞は異常な代謝の変化をもたらし、その結果、核と仁の肥大となり、その細胞の肥大となる。根こぶ病菌に感染した皮層細胞において本病菌変形体の栄養発育の増すとともに、その感染細胞の核DNA合成が増加した。また寄主皮層細胞における正常な体細胞分裂が感染によって攪乱され、これによって多量のDNAを有する核の出現になると推定される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、実験の技法等について御助言頂いた岐阜大学農学部遺伝育種学研究室の西川浩三教授並びに古田喜彦教授、また植物病理学研究室の故内記隆助教授に感謝の意を表する。また本研究の推進にあたって協力頂いた伊室善弘氏、鈴木敏之氏、牛田義久氏並びに山田寛之氏に謝意を表する。なお、本研究は昭和52—54年度文部省科学研究費補助金、一般研究A、課題番号244006の分担課題として行ったものである。

文 献

- 1) Williams, P. H., Keen, N. T., Strandberg, J. O. & McNabola, Sharon, S.: Metabolite synthesis and degradation during clubroot development in cabbage hypocotyls. *Phytopathology* **58** : 921—928, 1968.
- 2) Williams, P. H., Reddy, M. N. & Strandberg, L. O. : Growth of noninfected and *Plasmodiophora brassicae* infected cabbage callus in culture. *Can. J. Bot.* **47** : 1217—1221, 1969.
- 3) Williams, P. H. : A cytochemical study of hypertrophy in clubroot of cabbage. *Phytopathology* **56** : 521—524, 1966.
- 4) Bhattacharya, P. K. and Williams, P. H. : Microfluorometric quantitation of nuclear proteins and nucleic acids in cabbage root hair cells infected by *Plasmodiophora brassicae*. *Physiol. Pl. Path.* **1** : 167—175, 1971.
- 5) Allen, R. F. : Cytological studies of infection of Baart, Kanred and Mindum wheats by *Puccinia graminis* forms III and XIX. *J. Agr. Res.* **21** : 571—604, 1923.