

学 位 論 文 題 名

ナラタケ属における分子系統および遺伝的変異に関する研究

学位論文内容の要旨

担子菌のナラタケ属 (*Armillaria*) は樹木に対して根腐れ病を引き起こすことが知られている。また、白色腐朽、ラン科植物との共生、他の菌類への寄生などの生態的特徴を有しており、森林生態系において重要な位置を占めていると思われる。

ナラタケ属の *Armillaria mellea sensu lato* は形態的および生態的に非常に変化の富んだ種として認識されていた。そのため、この種は生物学的種概念により種の再検討が為され、現在、世界的に約30種、日本では9種の生物学的種に再編成されている。本研究では、まず、日本のナラタケ属の系統学的位置を決定するためにリボソームDNAの遺伝子間スペーサー (IGS) 領域に基づく分子系統学的解析を行なった。そして、IGS領域の制限酵素断片長多型 (RFLP) およびAFLP (amplified fragment length polymorphism) の解析により、種内および種間の遺伝的変異の解析を行なった。

1) リボソームDNAのIGS領域の塩基配列に基づく分子系統学的解析

日本のナラタケ属7種のIGS領域の塩基配列を決定し、その塩基配列とヨーロッパおよび北アメリカの種の既知の塩基配列とを、近隣結合法により分子系統学的解析を行なった。その結果、ナラタケ属の12種は3つのクラスター (*A. ostoyae* クラスター、*A. gallica* クラスターおよび *A. mellea* クラスター) に分かれることが示された。日本の *A. ostoyae* は *A. ostoyae* クラスターに、*A. jezoensis*、*A. singula*、*A. sinapina*、*A. cepistipes* および *A. gallica* は *A. gallica* クラスターに位置することが明らかになった。これにより、日本のみで報告のある *A. jezoensis* および *A. singula* の系統学的位置が初めて明らかとなった。また、日本の *A. mellea* subsp. *nipponica* はヨーロッパおよび北アメリカの *A. mellea sensu stricto* と共に *A. mellea* クラスターに位置していることが示唆された。

2) IGS領域の制限酵素断片長多型 (RFLP)

ナラタケ属の生物学的種の同定には、新鮮な単孢子分離菌株が必要である。しかし

ながら、ナラタケ属の多くの種では子実体の栽培が難しく、新鮮な単孢子分離菌株を得ることは困難である。そのため、ヨーロッパおよび北アメリカにおいて、IGS領域のRFLPの解析による生物学的種の簡易同定が検討されてきた。本研究では、北海道の6種に対してIGS領域のRFLPの解析を行なった。その結果、制限酵素Alu IおよびDde Iを用いたIGS領域のRFLPの解析により、*A. mellea* subsp. *nipponica*、*A. ostoyae*、*A. gallica*および*A. singula*の4種を同定できることが明らかになった。

### 3) AFLPによる種内の遺伝的変異の解析

#### 3-1. *Armillaria ostoyae*（ヘテロタリズムの生活環）における遺伝的変異の解析

単孢子分離菌株および同一林内の菌株に対して、AFLP（amplified fragment length polymorphism）の適用を検討した。その結果、単孢子分離菌株同士は全て区別でき、更に、特定林内において同一の菌株が分布している範囲を決定することが可能であった。

AFLPのナラタケ属への適用は本研究が初めてであり、RAPD（random amplified polymorphic DNA）に比べて、より多くのDNA断片を再現性良く検出可能であった。本研究でのAFLPの検出には、Texas Redで蛍光標識した選択的プライマーを用いており、従来の方法より容易にプライマーの条件設定が可能となった。

#### 3-2. *Armillaria mellea* subsp. *nipponica*（ホモタリズムの生活環）における遺伝的変異の解析

種内の遺伝的変異は、その種の生活環に大きく影響を受ける事が予想される。そのため、単孢子分離菌株と子実体分離菌株のAFLPを比較することにより、この種の生活環の中で不明な点について検討した。その結果、両者のAFLPパターンは、ほぼ同一であり、この種は擬似的な無性的生活環（二次的ホモタリズム）ではなく、完全に無性的な生活環（一次的ホモタリズム、アポミクシスなど）を持つことが示唆された。

日本各地から採取された11菌株に対して、AFLPパターンに基づく平均距離法による解析および主座標分析を行なった結果、日本において無性的に分布域を広げた遺伝的に異なる5つのグループが存在していることが明らかになった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 寺 澤 實

副 査 教 授 三 浦 清

副 査 助教授 小 島 康 夫

## 学 位 論 文 題 名

### ナラタケ属における分子系統および遺伝的変異に関する研究

本論文は6章からなり、図25、表10、文献93を含む頁数113の和文論文であり、別に参考論文2編が付されている。

ナラタケ属 (*Armillaria*) は世界中に広く分布しており、樹木に対して根腐れ病を引き起こす担子菌である。また、森林生態系において様々な働きを持つことが知られている。

ナラタケ属の *Armillaria mellea sensu lato* は1980年代以降、生物学的種概念により種の再検討が為されてきた。現在までに、世界的には30種、日本では9種の生物学的種が報告されている。本研究では、まず、日本のナラタケ属の系統学的位置を決定するためにリボソームDNAの遺伝子間スペーサー (IGS) 領域に基づく分子系統学的解析を行なった。そして、IGS領域の制限酵素断片長多型 (RFLP) および AFLP (amplified fragment length polymorphism) の解析により、種内および種間の遺伝的変異の解析を行なった。研究成果は、以下のように要約される。

#### 1) リボソームDNAのIGS領域の塩基配列に基づく分子系統学的解析

日本のナラタケ属7種のIGS領域の塩基配列を決定し、その塩基配列とヨーロッパおよび北アメリカの種の既知の塩基配列とを、近隣結合法で分子系統学的解析を行なった。その結果、ナラタケ属の12種は3つのクラスター (*A. ostoyae* クラスター、*A. gallica* クラスターおよび *A. mellea* クラスター) に分かれることが示され、日本のみで報告がある *A. jezoensis* および *A. singula* は *A. gallica* クラスターに位置することが明らかになった。また、*A. mellea* subsp. *nipponica* はヨーロッパおよび北アメリカの *A. mellea sensu stricto* と共に *A. mellea* クラスターに位置していることが示唆された。

#### 2) IGS領域の制限酵素断片長多型 (RFLP)

ナラタケ属の生物学的種の同定には、新鮮な単孢子分離菌株が必要である。しかしながら、ナラタケ属の多くの種では子実体の栽培が難しく、新鮮な単孢子分離菌株を得ることは困難である。ヨーロッパおよび北アメリカにおいては、IGS領域のRFLPを用いた生物学的種の簡易同定が検討されてきた。本研究では、北海道の6種に対してIGS領域のRFLPの解析を行なった。その結果、この方法により*A. mellea* subsp. *nipponica*、*A. ostoyae*、*A. gallica*および*A. singula*の4種を同定できることが明らかになった。

### 3) AFLPによる種内の遺伝的変異の解析

#### 3-1. *Armillaria ostoyae*（ヘテロタリズムの生活環）における遺伝的変異の解析

単孢子分離菌株および特定林内から分離された菌株へのAFLPの適用を検討した。その結果、単孢子分離菌株同士は全て区別できた。更に、特定林内において同一の菌株が分布している範囲が決定できた。

AFLPのナラタケ属への適用は本研究が初めてである。また本研究でのAFLPの検出には、Texas Redで蛍光標識した選択的プライマーを用いており、従来の方法より容易にプライマーの条件設定が可能となった。

#### 3-2. *Armillaria mellea* subsp. *nipponica*（ホモタリズムの生活環）における遺伝的変異の解析

単孢子分離菌株と子実体分離菌株のAFLPを比較することにより、この種の生活環の中で不明な点について検討した。その結果、両者のAFLPはほぼ同一であり、この種は擬似的な無性的生活環（二次的ホモタリズム）ではなく、完全に無性的な生活環（一次的ホモタリズム、アポミクシスなど）を持つことが示唆された。

更に、日本各地から採取された11菌株のAFLPを解析した結果、日本において無性的に分布域を広げた遺伝的に異なる5つのグループが存在していることが明らかになった。

日本のナラタケ属の分子系統学的解析は、ナラタケ属における系統分類の確立のための重要な知見である。また、IGS領域のRFLPの解析は、簡易で正確な種の同定を可能とし、ナラタケ属の引き起こす根腐れ病の診断に大きく貢献すると考えられる。更にAFLPの解析は、ナラタケ属の樹木への感染経路の解明および種内の詳細な遺伝的変異の解析に有効な手段である。これらの解析方法および得られた知見は、ナラタケ属の樹木病理学的研究また生態学的研究に対して、より深い理解もたらすものと期待される。

よって審査員一同は、寺島和寿が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。