

学位論文題名

Rhizoctonia solani AG-2-2 IV 個体群の遺伝的多様化に
果たす完全世代 *Thanatephorus cucumeris* の役割

学位論文内容の要旨

Rhizoctonia solani は多犯性の病原糸状菌であり、北海道では、特にジャガイモ、テンサイなどの根菜類を中心に被害が問題となっている。本病原菌は通常、土壤中で菌糸や菌核の状態で腐生生活を営み、作物が栽培されると、主として、植物体の地下部あるいは地際部を侵し、根腐れ、立枯れ、茎腐れ、紋枯れ等のさまざまな症状を引き起こす。このような場合、感染源は土壤中に生存していた菌糸であることが多い。一方、本病原菌は、圃場においてしばしばその完全世代 *Thanatephorus cucumeris* の担子胞子が第一次感染源となって葉腐病を起こすことが知られている。従来の化学合成農薬による作物病害の防除は、環境負荷や食の安全性の面から批判が高まっており、生態的・生物的手法を中心とする防除法の確立が期待されている。本研究は、それらの新しい防除法の確立のための基礎的知見を得ることを目的とし、北海道畑作の基幹作物であるテンサイで特に問題となる、根腐病と葉腐病の病原菌 *R. solani* AG-2-2 IV 個体群の遺伝的多様性に果たす完全世代 *T. cucumeris* 担子胞子株の役割を、体細胞和合性反応と分子生物学的手法を用いて解明しようとした。

(1) 圃場分離株（親株）とその完全世代後代の担子胞子株について、菌株相互の菌糸融合 C3 反応（完全融合反応）をマーカーとして、親子間の体細胞和合性因子の解析を行った。まず、テンサイ圃場から *R. solani* AG-2-2 IV を分離し、それら圃場分離株から土壌法を用いて完全世代を人為的に形成させ、後代担子胞子株について体細胞和合性を調べた。*R. solani* AG-2-2 IV の圃場分離株には体細胞和合性の異なる菌株群が多数存在した。後代担子胞子株の体細胞和合性試験の結果からは、根腐病に罹病した根部および葉柄基部から分離した親菌株（G1 世代）は、2 世代目（G2）において体細胞和合性群（SCG）の異なる担子胞子を生じることが明らかとなった。これとは対照的に、葉腐病罹病葉からの分離菌株は、G2 世代で単一の SCG からなる担子胞子を生じた。

G2 世代で体細胞不和合性の後代担子胞子を生じた親菌株は完全世代を 1, 2 回繰り返すことにより、単一の SCG 構成からなる担子胞子株を生じることが明らかとなった。その後 10 世代重ねても異質な SCG を生じることがなかった。担子胞子を形成させることで、体細胞和合性に関しては同質化していくこと、また一度同質化すると安定して遺伝していくことが明らかになった。

(2) 完全世代の後代担子胞子株における培養諸性質の変異を調べた。後代で単一の SCG を生じた同質性の親株では、担子胞子株はいずれも PSA 培地上の菌糸生育にほとんど差がなかった。後代で複数の

SCG を生じた異質性の親株では、担子孢子株は親株と比べて菌糸生育の劣るものや、培養菌叢に変異の見られるものが多い傾向にあった。担子孢子の発芽率を 0.05% イーストエキストラクトを加えた素寒天平板上で調べたところ、培養 48 時間後の発芽率は 98% 以上であった。圃場分離株だけではなく、2 世代目 (G2) 菌株も同様に子実体形成能力を持ち、その担子孢子も高い発芽率を示した。担子孢子の核数は DAPI 染色により観察した結果、子実体からの離脱直後はほとんど単核であった。無核孢子、あるいは複数の核を含む孢子は極めてまれであった。このことから担子孢子株はホモカリオンであると考えられた。

(3) *R. solani* AG-2-2 IV 内の分離菌株の SCG 解析をする前に、菌糸融合群とサブグループを同定する必要があるが、それには多大な時間と経験が必要とされる。多数の *R. solani* 菌糸融合群 (AG-1~AG-13) あるいはそのサブグループの中から、テンサイの根腐病・葉腐病菌 (*R. solani* AG-2-2 IV) を簡易・迅速に識別する方法として、ISSR-PCR (inter simple sequence repeat polymerase chain reaction) 法を検討した。供試した 14 種類のプライマーのうち、*R. solani* AG-2-2 IV の菌株間で多型の少なかった (ACG)₅ を選抜した。このプライマーを用いると、*R. solani* AG-2-2 IV を特異的に検出できるとともに、他の多くの AG をも同時に識別できることがわかった。

(4) 上記 (3) において AG-2-2 IV の菌株間での多型が最もよく見られた (GTG)₅ を用いた ISSR-PCR により AG-2-2 IV 後代担子孢子株の遺伝的解析を行った。その結果、同一のバンドパターンを示した後代担子孢子株同士は SCG の種類も 1 つであった。一方、後代で異なるバンドパターンを生じた担子孢子株同士は SCG も異なった。以上のように、本研究で用いた (GTG)₅ は 1 種類のプライマーで菌糸融合 C3 反応を指標とした SCG の識別とほぼ一致したことから、完全世代の親子間の遺伝解析に利用できることが、明らかとなった。また、SCG の簡易・迅速な識別のためのプライマーとして有効であることが示された。

(5) SCG が異なる担子孢子株同士を 1% 活性炭含有の PDA 培地上で対峙培養して、接触境界部にできた気中菌糸の多い部分 (Taft) より単菌糸分離した。プライマー (GTG)₅ を用いて ISSR-PCR 解析を行ったところ、その単菌糸分離株は対峙培養したそれぞれの菌株に特有なバンドを共有したことから、ヘテロカリオン株であることが確認された。この合成ヘテロカリオン株から子実体を形成させたところ、その後代での SCG は多様となった。

以上のことから、*R. solani* AG-2-2 IV は子実体を形成することで、親株とは体細胞和合性において異なる菌株を多数生じ、遺伝的多様性を増すことが明らかになった。担子孢子株は単独培養でくり返し担子孢子を形成する能力を持つこと、また担子孢子株同士、あるいは担子孢子株と圃場分離株間でヘテロカリオンを形成し、子実体を形成する能力を持つことから、*R. solani* AG-2-2 IV 個体群の遺伝的多様性発現に完全世代が大きく関与していることが明らかとなった。さらに、本研究では、個体群解析に必要な、*R. solani* の菌糸融合群とそのサブグループを簡易・迅速に識別する分子マーカー、およびサブグループ内の SCG 識別のための分子マーカーを明らかにした。これら本研究の成果は、圃場における個体群動態に基づいた病害管理技術の開発のための、基礎的知見としての利用が期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 内藤 繁 男
副査 教授 幸田 泰 則
副査 助教授 近藤 則 夫

学位論文題名

Rhizoctonia solani AG-2-2 IV 個体群の遺伝的多様化に 果たす完全世代 *Thanatephorus cucumeris* の役割

本論文は、図20、表17からなる和文であり別に参考論文2編が付されている。

植物病原菌の *Rhizoctonia solani* は宿主範囲が広いが、北海道では特にテンサイでの被害が大きい。本菌は通常、土壤中で菌糸によって地下部あるいは地際部を侵す。また野外でしばしば完全世代 *Thanatephorus cucumeris* を形成し、担子孢子が第一次感染源となって葉腐病を起こす。このような *R. solani* の汚染圃場内には多様な個体群が存在するが、それがどのようにして生じるのかは不明である。本研究は、テンサイ根腐病や葉腐病の病原菌 (*R. solani* AG-2-2 IV) の個体群動態解明の基礎に資するため、本菌の担子孢子が個体群の遺伝的多様化にどのように関わっているかを、体細胞和合性反応と分子生物学的手法を用いて解明した。

1. 体細胞和合性による圃場分離株の後代単孢子解析

圃場分離株(親株)と完全世代後代の担子孢子株の体細胞和合性を、菌株相互の菌糸融合(完全融合)反応を指標とし調べた結果、(1)葉腐病葉から分離した菌株(G1世代)はほとんどが2世代目(G2)で単一の体細胞和合性群(SCG)からなる担子孢子を生じる、(2)根腐病株の根部や葉柄基部から分離した菌株の多くはG2世代で異なるSCGの担子孢子を生じる、(3)G2世代でSCGが異なった個々の単孢子株は完全世代を1、2回繰り返すことによりその後代のSCGは容易に同質化(ホモ化)する、(4)ホモ化した菌株は完全世代を10世代重ねてもSCGが異なることはない、ことが明らかとなった。つまり、土壤中に生息していたと思われる菌糸由来の菌株は体細胞和合性に関して遺伝的に異質(ヘテロ)であるが、完全世代を経ることで個体群の多様化が起こることが示された。

2. 担子孢子とその培養株の諸性質

親株とその後代株より形成された担子孢子のほとんどが単核であった。発芽率も平均92%と高かった。親株が後代で単一のSCGを生じるものは発芽後の菌糸生育速度や培

養菌叢形質にほとんど差がなかった。他方、複数の体細胞和合性因子を持つと見られる親株からの担子胞子株は菌糸生育が劣るものや培養菌叢が異なるものが見られた。子実体形成能力は圃場分離株、その2世代目(G2)以降も同様に認められた。

3. テンサイ根腐病菌および葉腐病菌の簡易・迅速な識別法

圃場内には複数の *R.solani* 菌糸融合群やサブグループに加え、サブグループ内にも多くの個体群が存在する。その中から根腐病・葉腐病の病原菌やその個体群を特定するには簡易・迅速な手法が必要となる。14種類のプライマーを供試し ISSR (Inter-Single-Sequence Repeated) 法を検討したところ、(ACG)₅では病原菌の AG-2-2 IV を特異的に検出できるとともに、他の AG をも同時に識別できた。次いで AG-2-2 IV の菌株間で最も多型が検出されたプライマー (GTG)₅を用いた ISSR によって後代担子胞子株を解析したところ、同一バンドパターンを示した後代担子胞子株はいずれも SCG が同じであった。異なるバンドパターンを示した担子胞子株同士は SCG も異なった。すなわちプライマー (GTG)₅を用いた ISSR は菌糸の完全融合反応を指標とした体細胞和合性反応による識別とほぼ一致した結果が得られ、また完全世代の親子間の遺伝解析にも利用可能なことが明らかとなった。

4. ヘテロカリオン株の作出とその後代検定

SCG の異なる担子胞子株同士を対峙培養し、菌叢の重なりあった部分に生じた綿毛状菌糸の密な箇所 (tuft) より単菌糸分離し、ISSR 解析を行った。分離菌は対峙菌株に特有な双方のバンドを共有し、ヘテロカリオン株であることが確認された。この合成ヘテロカリオン株から子実体を形成させ、後代胞子を調べたところ、複数の SCG を生じることが明らかとなった。

以上のことから、*R. solani* AG-2-2 IV は担子胞子形成により体細胞和合性の異なる菌株を生じ、遺伝的多様性を増すことが明らかになった。また担子胞子株同士あるいは担子胞子株と圃場分離株間で容易にヘテロカリオンを形成し、子実体形成能力をも持ち合わせたことから、交配の面からも *R. solani* AG-2-2 IV の完全世代は個体群の遺伝的多様化に大きく関与していると考えられた。さらに、本研究では個体群解析に必要な、*R. solani* の菌糸融合群とそのサブグループを簡易・迅速に識別する特異的分子マーカー、およびサブグループ内の SCG 識別のための特異的分子マーカーを明らかにした。これら研究成果は個体群動態に基づいた病害管理技術の開発のための基礎的知見としての利用が期待される。

よって、審査員一同は、清 多佳子が博士 (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。