

# わが国における白絹病菌の遺伝的変異

誌名	農業環境技術研究所報告
ISSN	09119450
著者名	岡部,郁子
発行元	農業環境技術研究所
巻/号	21号
掲載ページ	p. 1-39
発行年月	2002年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## わが国における白絹病菌の遺伝的変異

岡部 郁子<sup>1)</sup>

(2001年10月10日受理)

日本国内の白絹病菌は、リボソームRNA遺伝子ITS領域のPCR-RFLPパターン、菌核の形態および生育適温範囲において異なる2つのグループに大別される。それぞれのグループは外国における *Sclerotium rolfsii* および *S. delphinii* に相当した。一方のグループは西日本から関東南部にかけて、もう一方のグループは北陸・東北・北関東に分布していた。

西日本の1つの分離菌株から2種類のホモカリオン菌株が分離されたが、その1つはITS領域塩基配列において北陸・東北・北関東の菌株と極めて近く、両グループの間に遺伝的交流があることが示された。すなわち、両グループは形態学的には若干異なるが、生物学的には同一種である可能性を示した。

一方で、本菌はその生活環において無性生殖が中心であり、有性生殖の機会は少ないことが、白絹病発生圃場の個体群において大多数の菌株が同一クローンに属することから示された。

以上から、白絹病菌はグループ間で遺伝的交流を行う能力は保っているが、実際にはその機会が少なく、地域による変異が大きいと考えられた。

## 目 次

緒言 .....	2	ITS-RFLP グループ間の系統関係 .....	19
既往の研究 .....	3	1 緒言 .....	19
1 系統分類 .....	3	2 ホモカリオンの作出 .....	19
2 発生生態 .....	6	3 ITS 領域塩基配列による系統解析 .....	23
圃場における遺伝的個体群構造 .....	7	4 考察 .....	25
1 緒言 .....	7	交配と菌糸融合 .....	26
2 MCG の分布 .....	7	1 緒言 .....	26
3 MCG 間の遺伝的差異 .....	9	2 ホモカリオン菌株と他菌株との交配 .....	27
4 考察 .....	10	3 日本産菌株間の菌糸融合反応 .....	27
ITS 領域の PCR-RFLP 解析による地域間の		4 外国産 <i>S.rolfsii</i> および <i>S.delphinii</i> と日本産	
遺伝的変異 .....	11	菌株の菌糸融合反応 .....	28
1 緒言 .....	11	5 考察 .....	29
2 ITS-RFLP グループによる類別 .....	11	総合考察 .....	30
3 生育適温および菌核形成 .....	15	謝辞 .....	31
4 考察 .....	18	引用文献 .....	31
		Summary .....	38

## 緒 言

白絹病菌[ *Sclerotium rolfsii* Sacc. 完全時代名は *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough ] は土壌伝染性の植物病原菌の1つで、世界的には温帯から熱帯地域にかけて分布する。白絹病菌はダイズ、ラッカセイなどのマメ科作物をはじめ、およそ100科500種にわたるが( Aycoc, 1966; Punja, 1988; Gazaway ら, 1989 ), 菌の系統による病原性の違いは知られていない。

白絹病の発生は夏季に多く、気温が28 前後の時期に最も発生が多い( 澤田, 1911 )。熱帯地域では年間を通じて発生し、ダイズ幼苗の立枯れ( *Sclerotium damping-off* ) を引き起こし、大きな問題となっている( Yorinori, 1994 )。温帯地域では夏から初秋に多く発生し、茎の地際部を侵して萎凋・枯死などの症状( *Sclerotium blight*, *southern blight*, *stem rot* ) を引き起こし、収量の低下を招く( Backman ら, 1997 )。この時、罹病植物体の表面あるいはその周辺の地表面に形成されるアワ粒大の褐色の菌核( 図1 ) で越冬し、それが翌年の伝染源となる( 渡辺, 1984 )。

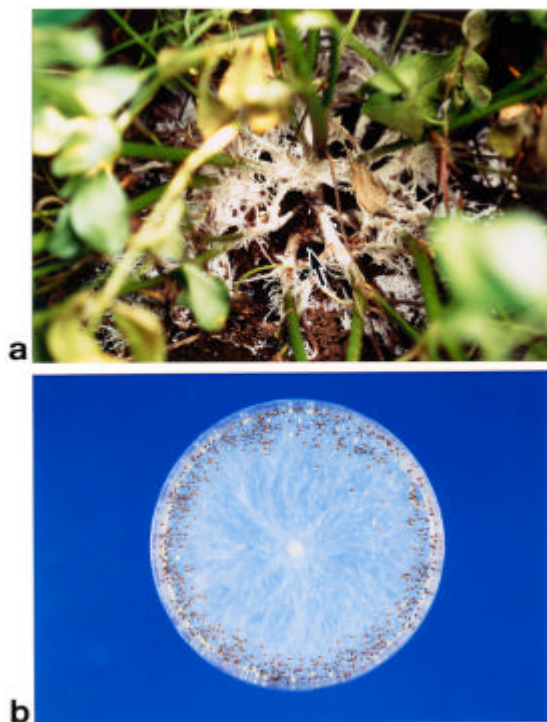


図1 a): 白絹病に侵されたラッカセイ  
地際部に白色の菌糸がまとわりつき、褐色・アワ粒大の菌核( 矢印 ) が見られる。

b): *S. rolfsii* の菌叢の形態  
PDA 平板培地( 直径9cm ) 上で1ヶ月間培養。  
白色の菌叢上に多数の菌核が形成されている。

西南暖地では白絹病は頻繁に発生する病害であり、近畿・中国地方のダイズ立枯性病害の30%以上を占め( 仲川, 1990 ), 紫斑病[ 病原菌: *Cercosporakikuchii* (Matsumoto et Tomoyasu) Gardner ] や黒根腐病[ 病原菌: *Colonectria crotalariae* (Loos) Bell et Sobers ] と並んで重要な病害となっている。ダイズの主要品種であるタマホマレやエンレイでは栽培面積の約11 ~ 17%で白絹病が発生している( 仲川ら, 1995 )。近年は白絹病の宿主植物の種類および国内での発生地域の拡大も問題となっている。1990年代からキク科、ユリ科およびキンポウゲ科などの花卉類での被害が目立ちはじめた( 井, 2000 )。発生地域も、秋田県、山形県( 生井ら, 1990 ), 新潟県( 斉藤ら, 1962 ), 富山県( 井, 2000 ), 栃木県( 羽山ら, 1984 ), 長野県( 富田ら, 1999 ) など、比較的冷涼な地域に広がっている。また、これらの寒冷地での発生例の中には白絹病の発生時期がやや早く、春から初夏にかけて発生している。

*S. rolfsii* が一般に高温を好むのに反して、これらの冷涼な地域で白絹病が発生する理由には、*S. rolfsii* の中に低温条件に適応した系統が存在する、*S. rolfsii* よりも生育適温が低く、アメリカ合衆国北部およびカナダに分布する同属の植物病原菌 *S. delphinii* Welch が日本の寒冷地でも発生している、などが考えられる。しかし、日本産白絹病菌の地域間差異についての報告は井( 2000 ) によるもの以外は見当たらない。

寒冷地の環境条件に適応した変異が *S. rolfsii* に生じた可能性があると考えられる理由は、*S. rolfsii* の生活史にある。種内分化は、一般に、個体群間の遺伝的交流が制限された場合に生じるとされる( Avise, 1994 ) が、*S. rolfsii* では有性生殖はほとんど行われず、地域間での遺伝的交流の機会もほとんど無いと予想される。また、多くの場合、*S. rolfsii* は不完全時代である菌核と菌糸体のステージを繰り返す( 池上, 1996 ) が、菌核の移動・分散能力は高くない。そのため、同じ系統の菌が長年にわたって同じ場所に発生し、新たな突然変異が生じても新しい性質を持った系統は他の地域に広まりにくいと考えられる。このように完全時代をほとんど形成しないこと、および同じ場所に定住する生活様式は、1つの地域内では単純な個体群構造を生じるが、地域間ではそれぞれの地域に特有の変異を生じさせると考えられる。

一方、日本でも、*S. delphinii* に相当すると考えられる菌による病害が、少数例ではあるが、報告されている。斉藤ら( 1962 ) は北陸地方のラジノクローパーから分離された菌が *S. delphinii* であるとし、また、羽山ら( 1984 )

も栃木県内で分離された白絹病菌株の一部に形態的に *S.delphinii* に近いものがあることを報告した。しかし、日本において *S.delphinii* についての既往の観察・研究例は少なく、また、*S.rolfsii* と *S.delphinii* は発生生態や病徴による区別が難しいことから、*S.delphinii* の日本での存在はあまり認識されていない。完全時代の形態観察例は *S.rolfsii* ではごく少数であり、*S.delphinii* では観察例がないため、両菌の同定基準は菌叢の生育適温範囲と菌核の形態に限られ、両者の区別は判然としない。

日本の地域間における白絹病の発生生態の違いが病原菌の種内変異によるものか、それとも、近縁な病原菌同士の住み分けによるのかは不明であったが、白絹病菌の地域間差異は宿主植物の栽培慣行や地域の気象などの環境条件を反映するものと考えられた。そこで、本菌はそれぞれの地域の農業環境に応じて微生物の多様性が生じたメカニズムを解明するための良いモデルと考え、本研究に取り組んだ。近年、分子生物学的手法が発達し、属や種、亜種といったさまざまなレベルでの遺伝的多様性の研究が急速に進んでいる (Brunsら, 1991)。特に PCR (polymerase chain reaction) 技術の普及により、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD (random amplified polymorphic DNA)、直接塩基配列決定法、PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism)、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 等の手法が広く行われるようになった (島本ら, 1997)。

本研究では、分子生物学的手法も取り入れて、白絹病菌の地域間の違いが種内・種間のいずれのレベルのものであるか、また、その差がどのようにして生まれたのかを解析することを目的とした。そこで、*S.rolfsii* 個体群内の遺伝的交流の頻度を知るため、1つの地域の個体群構造を、MCG (mycelial compatibility group, 菌糸体適合性グループ) と DNA フィンガープリント解析の一種である RAPD 法によって調べた ( 章)。また、日本の寒冷地の菌株と西南暖地の菌株の遺伝的な違いを調べるため、リボソーム RNA 遺伝子の ITS (internal transcribed spacer) 領域の PCR-RFLP パターンを比較し ( 章)、ITS 領域の塩基配列から寒冷地の菌株と西南暖地の菌株の系統学的関係を推察した ( 章)。さらに、対峙培養によって交配の有無と菌糸融合反応を調べた ( 章)。

なお、本報告は岐阜大学大学院連合農学研究科に提出した学位論文を一部修正加筆したものである。

## 既往の研究

### 1 系統分類

*S.rolfsii* の不完全時代は、直径 0.5 ~ 0.8mm の菌核を形成し、ナス科、ウリ科などを侵す多犯性の菌として、Saccardo (1911) によって初めて記載された。しかし、完全時代が容易に形成されなかったことから、分類学的位置づけが難しく (Punja, 1988)、また、他の種と混同されることもあった (Weresubら, 1980)。

澤田 (1911, 1912) は台湾で発生した瓜類白絹病菌が植物体上に形成した完全時代を記載し、*Hypochnus centrifugus* (Lev.) Tul (別名 *Hypochnus cucumeris* Fr., *Hypochnus solani* Prill et Delacr.) とした。また、*H.centrifugus* が *S.rolfsii* の完全時代であるとした (澤田, 1919 (表 1))。中田 (1926) はフィリピンおよび日本の福岡県下で採集された *S.rolfsii* をテンサイおよびコンニャクに接種して完全時代を形成させ、澤田の *H.centrifugus* 菌株と比較し、同一種であることを認めた。しかし、*H.solani* の原記載にある担子柄および担子胞子とは大きさが異なり、菌叢および菌核の形態も異なることから、*H.solani* および *H.cucumeris* は *S.rolfsii* とは別種 (*Rhizoctonia solani* Kuhn) であるとした。さらに培養基上に形成された *S.rolfsii* の完全時代も観察した (中田, 1927)。

Goto (1930) はタマネギ煎汁寒天培地上で *S.rolfsii* の完全時代を観察し、担子胞子が無色で表面が平滑であることから *Hypochnus* 属よりも *Corticium* 属に分類すべきとした。そして、*S.rolfsii* の完全時代は、*Corticium* 属の既知の種の中では *C.centrifugum* (Lev.) Bres. に最も近いと考えた。しかし、同時に、*C.centrifugum* の原記載には菌核を形成しないことが記されていたため、*S.rolfsii* の完全時代を *C.centrifugum* とすることに疑問を示した。Curzi (1932) も *S.rolfsii* の完全時代を *Corticium* 属であるとしたが、*C. centrifugum* [現在は *Butlerella eustacei* Weres. & Illman と呼ばれる (Weresubら, 1980)] とは異なるとし、*Corticiumrolfsii* Curzi の名を提唱した。

*S.rolfsii* の完全時代の属名についてはさらに、*Pellicularia* (West, 1947) あるいは *Botryobasidium* (Venkatarayan, 1950) が提案されたが、Talbot (1973) は *S.rolfsii* の完全時代を *Athelia* 属に入れるべきだとした。Tuら (1978) は *Atheliarolfsii* (Curzi) Tuand Kimbrough の名を与え、現在、広く受け入れられている (Ginns, 1998)。*Athelia* 属には *S.rolfsii* (= *A.rolfsii*) の他に *A. arachnoidea* (Berk.) Julich などの植物病原菌が含まれる (Julich, 1972)。

表1 これまでに報告された *S.rolfsii* の完全時代の形態

菌株	担子器 ( $\mu\text{m}$ )	小柄 ( $\mu\text{m}$ )	担孢子 ( $\mu\text{m}$ )	形成条件	採集地	宿主植物	文献
	9-22 $\times$ 5-6 15-25 $\times$ 5-7		7.5-8 $\times$ 4.5-5 7.5 $\times$ 5 6-8 $\times$ 3.5-5 7.5-9 $\times$ 5-6 7.5-10 $\times$ 4-6 5-7.5 $\times$ 3.5-5 7.5 $\times$ 5 7.5 $\times$ 5 7.5 $\times$ 5 8 $\times$ 5	宿主植物上 宿主植物上 宿主植物上 宿主植物上 藁筵の上 宿主植物上 宿主植物上 宿主植物上 宿主植物上 宿主植物上	台湾 台湾 台湾 台湾 台湾 台湾 台湾 台湾 台湾 台湾	ババパイア エンバク サトウキビ ジャガイモ インゲン ミツバ <i>Abtilonstriatm</i> カボチャ ラッカセイ	澤田 (1911)
5号	16 $\times$ 6.6	3-5	7.0 $\times$ 4.6	テンサイおよび	福岡	ソラマメ	中田 (1926)
24号	16 $\times$ 6.6	3-5	7.5 $\times$ 4.5	コンニャクに接種	福岡	コンニャク	
44号	16 $\times$ 6.6	3-5	6.9 $\times$ 4.4		フィリピン	インゲン	
M1	? $\times$ 6.4		6.0 $\times$ 4.4	麹汁寒天培地上		インゲン	中田 (1927)
R16	19.0-41.6 $\times$ 4.4-7.3	2.2-8.0	5.5-10.2 $\times$ 2.9-6.6	タマネギ煎汁天	台湾	サトウキビ	Goto (1930)
R14	19.0-56.9 $\times$ 4.4-7.3	2.2-9.5	5.8-12.4 $\times$ 3.7-8.0	タマネギ煎汁天	台湾	セスバニア	
R11	15.3-30.7 $\times$ 4.4-7.3	2.2-7.3	5.1-11.0 $\times$ 3.7-6.6	タマネギ煎汁天	台湾	ツナソ	
	10-15 $\times$ 4-6	4-5	5-7.5 $\times$ 2.5-3.75 4.5-6.75 $\times$ 3.5-4.5	培地上 培地上	イタリア イタリア	アスター ジャガイモ	Curzi (1932)
	7-9 $\times$ 4-5	2.5-4	6-7 $\times$ 3.5-5	宿主植物上	フロリダ, USA	イチジク	West (1947)
	11.5-26 $\times$ 4-6.5		5.5-7 $\times$ 3-5	PDA+2%活性炭			Punjaら (1982)
	13.1-22 $\times$ 4.55-5.51	4-4.65	4-8.8 $\times$ 2.8-5.6	植物の葉に接種			Tuら (1992)

一方, *S.delphinii* は, アメリカ合衆国北東部より分離されたものが Welch (1924) によって新種として記載された。Stevens (1931) および Punjaら (1996) の研究によって, *S.delphinii* は大型で不定形の菌核を形成すること (表2), 生育適温範囲が 20 ~ 30 と比較的低いことなど, *S.rolfsii* との差異が明らかにされた。しかし, 罹病植物の病徴から両者を区別することは難しく (西原, 1961), *S.rolfsii* の継代培養や担子孢子由来株の中に大型の菌核を形成するものが出現すること (中田, 1927; West, 1947) も報告された。また, *S.rolfsii* の生育適温範囲は研究者によって, やや意見が異なる (権藤, 1961)。Boeremaら (1988) も *S.rolfsii* と *S.delphinii* が球根植物に対して同じ病徴を引き起こすことから, *S.delphinii* を *S.rolfsii* の変種として扱い, *S.rolfsii* var. *delphinii* とすることを提案した。

近年, DNA 解析の手法が系統分類学に取り入れられ, 形態的特徴とともに遺伝子解析が系統分類の基準と

して受け入れられている。分子進化の中立説, 系統樹作成法などの理論 (木村ら, 1989; Liら, 1991) の進展とともに, 実験手法においても, PCR法 (Saikiら, 1988) の普及によって, RAPD (Williamsら, 1990), PCR-RFLP (Tsumuraら, 1995), 直接塩基配列決定法 (Yangら, 1989) などの手法が生まれ, 糸状菌の系統分類にも応用されている (Takamatsu, 1998)。

しかし, これまでに, 白絹病菌の系統解析に分子生物学的手法が用いられた研究例はあまり多くない。Harltonら (1995) は *S.rolfsii* と *S.delphinii* の ITS 領域の PCR-RFLP パターンが異なること, また, *S.rolfsii* 内にも RFLP パターンの異なるグループが存在することを報告した。しかし, *A.bombacina* Pers., *A.arachnoidea*, *A.epiphylla* Pers.:Fr. などの他の *Athelia* 属菌の系統学的位置がリボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の解読によって明らかにされている (Illingworthら, 1991; Adamsら, 1996) のに対して, *S.rolfsii* および *S.delphinii* のリボソーム RNA

表2 これまでに報告された *S.rolfsii* および *S.delphinii* の菌核の形態

<i>S.delphinii</i>							
菌株	菌核の形状	菌核の色	菌核の直径 (mm)	形成条件	採集地	宿主植物	文献
			0.5-0.8				Saccardo ら (1911)
	球形～卵形 ～楕円形	淡栗褐色 ～暗褐色	0.5-1.5	温室	台湾		澤田 (1911)
5号	球形～不規則	淡茶	1.2-2.1	麹汁寒天培地	福岡	ソラマメ	中田
24号	球形～不規則	淡茶	0.8-2.1	麹汁寒天培地	福岡	コンニャク	(1926)
44号	球形	淡茶	0.8-1.7	麹汁寒天培地	フィリピン	インゲン	
M1	不規則	黒褐色	2.0 × 1.76	麹汁寒天培地		インゲン	中田
M2	球形	濃褐色	1.65	麹汁寒天培地		ラッカセイ	(1927)
			0.57-1.19 0.95-2.99	素寒天 ニンジン上			Stevens (1931)
			0.64-1.19 1.2-2.5	ジャガイモ煎汁寒天 ジャガイモ煎汁寒天 + 10%グルコース	イタリア イタリア	アスター アスター	Curzi (1932)
			0.94-1.24 0.97-1.68	ジャガイモ煎汁寒天 ジャガイモ煎汁寒天 + 10%グルコース	イタリア イタリア	ジャガイモ ジャガイモ	
Sr001			1.23 × 1.15		台湾	イネ	Tu ら
Sr002			1.02 × 0.89		台湾	ステビア	(1992)
Sr004			0.93 × 0.86		台湾	ヒシの仲間	
Sr005			1.19 × 1.06		台湾	ラッカセイ	
Sr006			1.13 × 1.10		台湾	ラッカセイ	
Sr007			1.00 × 0.92		台湾	ナデシコ類	
Sr008			1.10 × 1.04		台湾	ナデシコ類	
Sr009			1.23 × 1.12		台湾	ユリ類	
Sr010			1.11 × 1.01		インド	ノギクの仲間	
Sr013			1.20 × 1.10		USA	ソルガムの仲間	
Sr014			1.68 × 1.44		台湾	トマト	
Sr016			1.10 × 1.08		台湾	トマト	
Sr017			0.97 × 0.86		台湾	ヒシの仲間	
Sr018			1.15 × 1.05		台湾	ヒシの仲間	
Sr020			1.20 × 1.15		台湾	ナデシコ類	
			0.5 1.0 0.7 0.7 0.6 1.0 0.7 0.6 0.5 0.5	PDA,15 PDA,20 PDA,25 PDA,30 PDA,35 V-8, 15 V-8, 20 V-8, 25 V-8, 30 V-8, 35			Punja ら (1996)

*S. delphini*

菌株	菌核の形状	菌核の色	菌核の直径 (mm)	形成条件	採集地	宿主植物	文献
	不定形	暗褐色	1.0-15.0		ニューヨーク など	デルフィニウム	Welch (1924)
		赤褐色		宿主植物上	ワシントン	ツルボ類	Huber ら (1948)
S637			0.80-1.39	素寒天	イリノイ	デルフィニウム	Stevens (1931)
S637			1.69-6.57	蒸したコメ			
			0.70-1.79	素寒天	イリノイ	デルフィニウム	
			1.09-6.57	蒸したコメ			
			0.60-2.09	素寒天			
			1.69-4.98	蒸したコメ			
			0.80-1.29	素寒天			
			1.69-5.17	蒸したコメ			
			3.0	PDA, 15			Punja ら (1996)
			3.5	PDA, 20			
			2.4	PDA, 25			
			2.7	PDA, 30			
			3.1	PDA, 35			
			2.4	V-8,15			
			2.1	V-8,20			
			2.4	V-8,25			
			2.1	V-8,30			
			1.7	V-8,35			

遺伝子の塩基配列の解読は進んでいない。

このほか、Punjaら(2001)はRAPD解析を行い、世界各地から分離された菌株の系統関係を明らかにしようとした。Nalimら(1995)はPCR-RFLPと18塩基のランダムプライマーを用いたPCR法によって、アメリカ合衆国テキサス州内に異なる系統が混在することを示し、Cilliersら(2000)もAFLP法によって南アフリカ共和国の白絹病菌個体群内の遺伝的多様性を示した。また、*S. rolfsii*の同定に関してはミトコンドリアDNA由来の検出用プローブが開発されている(Chenら,1997)。

## 2 発生生態

*S. rolfsii*の完全時代は実験室内で観察され(Goto, 1930; Punjaら,1982; Punjaら,1983A; Tuら,1992),形成された担子胞子が宿主植物に侵入して感染を引き起こす能力がある(Punjaら,1983C)ことも知られている。しかし、野外で*S. rolfsii*の完全時代を観察した例はあるものの(澤田,1912; West,1947),担子胞子が伝染環の中で果たす役割は不明である(Punja,1988)。圃場

における*S. rolfsii*の生活史は主に不完全時代である菌核と菌糸体の繰り返しと考えられている(池上,1996)。

*S. rolfsii*の菌核は、メラニン色素を含み、細胞壁の厚い細胞から成るラインド(rind)、大型の細胞から成る皮層(cortex)および髄(medulla)で構成され、耐久生存に適した構造を持つ(Chet,1975)。菌核は水によって移動する場合もあるが(本村ら,1992;本村ら,1998),通常は、菌核の移動分散能力は極めて低いと考えられる。

圃場における*S. rolfsii*の分布の拡大は、主に菌糸伸長による。菌糸の1日当たりの生育速度は、殺菌土壌中では4cmを超える場合もあり、粘土質土壌より砂質土壌で生育が良好である。25~30℃で生育が最も早く、10~15℃以下、40℃以上ではほとんど生育しない(権藤,1961)。非殺菌土壌においても生育適温範囲は同じであるが、土壌湿度の増加によって菌糸生育が低下する。非殺菌土壌での*S. rolfsii*の生育低下の理由は土壌中の拮抗性を有す細菌の活動によるためと考えられる(権藤,1964)。

土壌水分は菌核の生存にも影響を与える。乾燥土壌に

埋没した菌核は数ヶ月間生存するのに対して、湿潤土壌に埋没した菌核の多くは速やかに死滅する（渡辺ら，1968；Smith，1972A；Beuteら，1981；Smithら，1989）。土壌中の菌核の多くは、細菌などによる静菌作用（Smith，1972B；Lockwood，1986）あるいは*Trichoderma*属菌などの寄生（Rizki，1989）によって発芽能力を失い、死滅する。翌年まで生き残った菌核は宿主植物由来物質などの刺激によって発芽し（Lindermanら，1969；Beuteら，1979；Punjaら，1984），第一次伝染源となる。

圃場における菌核の密度は白絹病の発病率と密接に関連し（Leachら，1938），テンサイ圃場における菌核の密度と発病率の相関係数は $r=0.83 \sim 0.85$ である（Backmanら，1981）。圃場内の菌核の分布は不均一で（Rodriguez-Kabanaら，1974；Punjaら，1985），発病は30cm内の小さな範囲から始まる（Rodriguez-Kabanaら，1975）。発病範囲は菌系の伸長によって、罹病植物から隣接する健全植物へと広がるが、その速度は1日当たり平均1cmである（Punja，1986）。そのため、罹病植物の分布も菌核の分布と同様に不均一である（Shewら，1984）。

圃場における菌核の生存が白絹病の発生に大きく関与するため（Punja，1985），本病の防除には菌核の死滅を促進する方法，例えば、圃場の湛水処理（仲川，1990；仲川ら，1992；仲川ら，1994；仲川，1999）あるいは*Trichoderma*属菌などの生物防除因子（Henisら，1984；Desaiら，1999）などが用いられている。

他方，*S.delphinii*の生態に関する研究例は少ないが，菌核の生存と発芽に関しては*S.rolfsii*と同様と考えられる（Javedら，1973）。

## 圃場における遺伝的個体群構造

### 1 緒言

*S.rolfsii*は罹病植物あるいはその残渣から伸長した菌系が宿主植物と接触することで生息域を拡大する。罹病植物の周囲に形成された菌核は土壌中で越冬して翌年の第一次伝染源となる。菌核は移動分散能力が極めて低いいため、白絹病の発生は局地的であり、圃場内での罹病植物の分布は集中している（Shewら，1984）。

Nalimら（1995）はテキサス州のラッカセイ圃場で採集した*S.rolfsii*の個体群構造を調査し、同じMCG（mycelial compatibility group，菌系体和合性グループ）が複数の圃場に存在すること、また、それぞれの圃場の*S.rolfsii*個体群は少数のMCGから成ることを示した。MCGとは

菌叢を対峙させた場合に境界線が現れない菌株の集合である（Punjaら，1983B）。担子菌類の菌系体和合性は一般に、複数の遺伝子座によって決定され、菌系体和合性に関与する全ての遺伝子座の対立遺伝子が一致する菌株は同じMCGに含まれる（Worrall，1997）。このことから、遺伝的に同一な菌株（クローン）あるいは遺伝的に非常に近い菌株は同じMCGに含まれるが、遺伝的に異なる菌株が同じMCGに含まれることは稀であると考えられる。しかし、*S.rolfsii*の菌系体和合性遺伝子座の数および遺伝様式はまだ不明である（Punjaら，1983B）。

本章では、日本の圃場における個体群構造を明らかにするため、茨城県つくば市および牛久市のラッカセイ圃場7カ所から白絹病菌185菌株を分離し、MCGを調べた。また、MCGが実際に遺伝的に均一な菌株の集まりであるか否かを検証するため、各MCGの代表菌株についてDNAフィンガープリント（Rosewichら，1994；McDonald，1997）の1つであるRAPD解析を行った（Okabeら，2000）。

## 2 MCGの分布

### (1) 実験材料および方法

#### 1) 調査圃場

茨城県つくば市梶内にあるラッカセイ圃場4つを1994年8月に調査した（図2a，3）。圃場1～4はいずれも半径120mの円内にあり、畦で仕切られていた。これらの圃場ではラッカセイと陸稲、サトイモなどの輪作栽培が行われていた。圃場のラッカセイの10～40%が白絹病に罹病していた。

1997年9月に梶内の別の1圃場（圃場5）および梶内より南へ2.5km離れた牛久市獺穴の2圃場（圃場6および7）を調査した（図2b）。圃場5は圃場1～4とは高速道路を挟んで反対側にあり、400m北東に離れている。獺穴の圃場での作付け体系は梶内とほぼ同じであった。これらの圃場では10～20%のラッカセイが白絹病に罹病していた。

#### 2) 白絹病菌の分離

各罹病植物から菌核5個を採集し、白絹病菌の分離を行った。菌核は次亜塩素酸ナトリウム溶液（塩素0.125%）で5分間、表面殺菌を行い、滅菌水で洗浄した後、ジャガイモ煎汁寒天培地（PDA）で培養して、伸長した菌系を分離した。同一罹病植物個体から分離された菌株はいずれもコロニー形態などが等しく、同一菌系体から由来したと考えられたので、各罹病植物個体につき1菌株をとり、以下の実験に用いた。



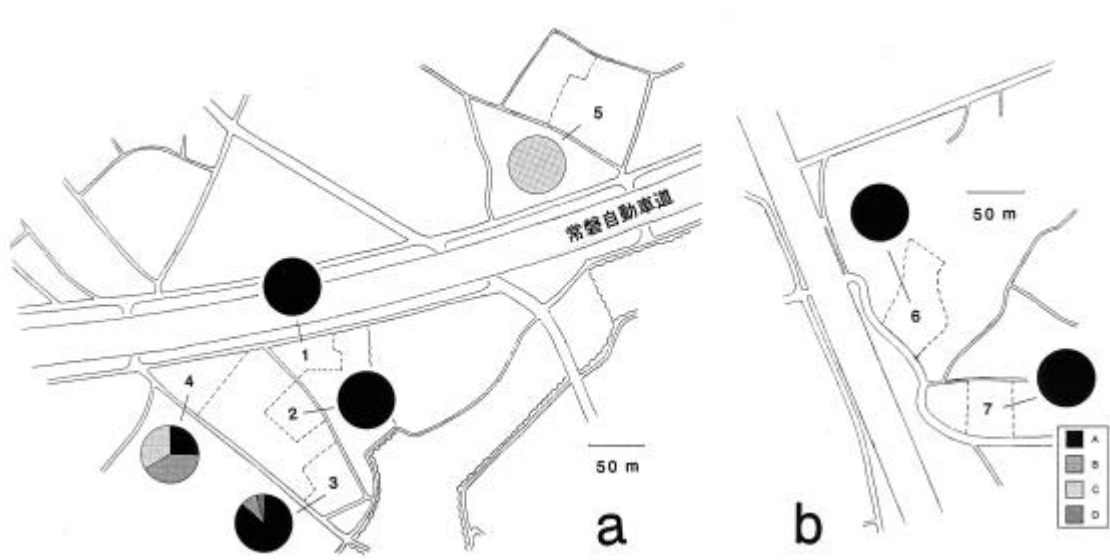


図2 圃場におけるMCG A, B, C およびDの分離頻度(円グラフ)



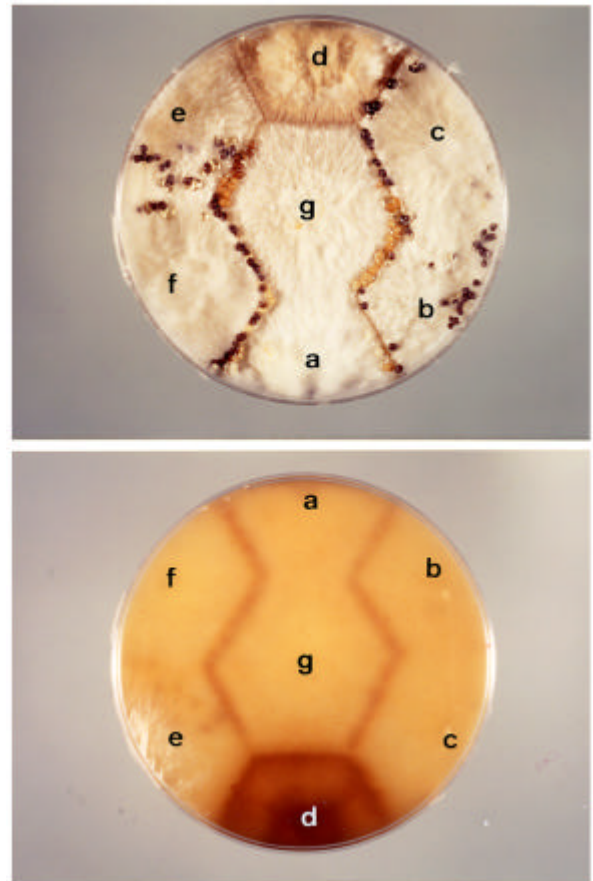
手前の罹病株(矢印)は萎凋・黄変している。

図3 白絹病に侵されたラッカセイ圃場  
(茨城県つくば市梶内)

### 3) MCGの判定

オートミール寒天培地(Difco社)を用い、室温で対峙培養を行い、MCGを判定した。対峙させた菌株のコロニーの間に境界線が現れない場合は、それらの菌株が同一MCGに属すると判定した。MCGの異なる菌株同士の場合は2週間後に境界線(barragezone)と境界部の着色が見られた(図4)。

同一圃場内の菌株を総当たりで対峙させ、同一MCGに属する菌株の中から代表菌株を選んで、異なる圃場の代表菌株と対峙培養を行い、全体のMCGを決定した。



ペトリ皿を上から見たもの(上段)と裏から見たもの(下段)。aとg, bとc, およびfとeの3つの組み合わせは同一MCG(境界線を生じない)、他の組み合わせは異なるMCG。

図4 オートミール寒天培地上での7菌株の対峙培養

(2) 実験結果

圃場1から11菌株(菌株番号1-1から1-11)圃場2から21菌株(菌株2-1から2-21),圃場3から22菌株(菌株3-1から3-22),圃場4から78菌株(菌株4-1から4-78),圃場5から11菌株(菌株5-1から5-11),圃場6から10菌株(菌株6-1から6-10),圃場7から32菌株(菌株7-1から7-32),合計185菌株を得た。これらの菌株は白色のクラムを有する菌糸と直径約1mmの褐色・球形の菌核を形成し,*S.rolfsii*であることが確認された。対峙培養によって,得られたこれらの菌株は4つのMCGに分けられた(表3)。MCG Aは全体の61.1%,MCG Bは18.4%,MCG Cは20.0%,MCG Dは0.5%を占めた。MCG Aは圃場1および2を独占し,圃場3でも優占(86.4%)していた。圃場4ではMCG Aが25.6%,MCG Bが41.0%,MCG Cが33.3%を占めた。圃場は全ての分離菌株はMCG Cであった。他の圃場から2.5km離れた圃場6および7もMCG Aが独占した。圃場での発病は散発的であったが,圃場4では罹病植物が集中して大きなパッチを形成した。このパッチから分離された15菌株(菌株4-64から4-78)は全てMCG Bであった。

表3 1994年および1997年のラッカセイ調査圃場から分離された *Sclerotium rolfsii* 菌株のMCGによる類別

	各MCGの分離株数			
	MCG A	B	C	D
1994年8月				
圃場1(つくば市梶内)	11	0	0	0
2(つくば市梶内)	21	0	0	0
3(つくば市梶内)	19	2	0	1
4(つくば市梶内)	20	32	26	0
1997年9月				
圃場5(つくば市梶内)	0	0	11	0
6(牛久市獺穴)	10	0	0	0
7(牛久市獺穴)	32	0	0	0

3 MCG間の遺伝的差異

(1) 実験材料および方法

4つのMCGから選んだ24菌株(表4)を用い,Punjaら(2001)の方法に準じてRAPD解析を行った。菌叢をジャガイモ煎汁(PDB)で1~2週間,室温で液体培養し,濾紙を敷いたブフナー漏斗で培養液と菌叢を分離し,さらに蒸留水で洗浄した後,-20℃で保存した。凍結した菌叢約50mgを液体窒素中で磨砕し,DNA分離

キット(Easy-DNA,Invitrogen社)を用いてDNAを分離した。

40種類のプライマー(Operon Technologies社のOPA-01から20,およびOPB-01から20)を試し,MCGを区別する5つのプライマー,OPA-09,15,16,19およびOPB-13を選んだ。PCR反応液量は50μlで,10×GeneTaq Universal Buffer(ニッポンジーン社)5μl,2.5mM dNTP mixture(ニッポンジーン社)2μl,プライマー20pmol,Taq DNAポリメラーゼ(ニッポンジーン社)1ユニットおよび鋳型DNA 50ngを含む。PCR反応は94℃,2分間の変性を行った後,変性(94℃,1分間)アニーリング(36℃,1分間)伸長反応(72℃,2分間)を44回繰り返す,最後に72℃,5分間の伸長反応を行った。PCR生成物はアガロースゲル電気泳動(2%アガロース(NuSieve3:1,FMCBioproducts社またはアガロースS,ニッポンジーン社),TAEバッファー,50mA,60分間)にかけ,0.5μg/ml臭化エチジウム溶液で染色して,UV照射下でバンドを観察した(Sambrooketal.,1989)。

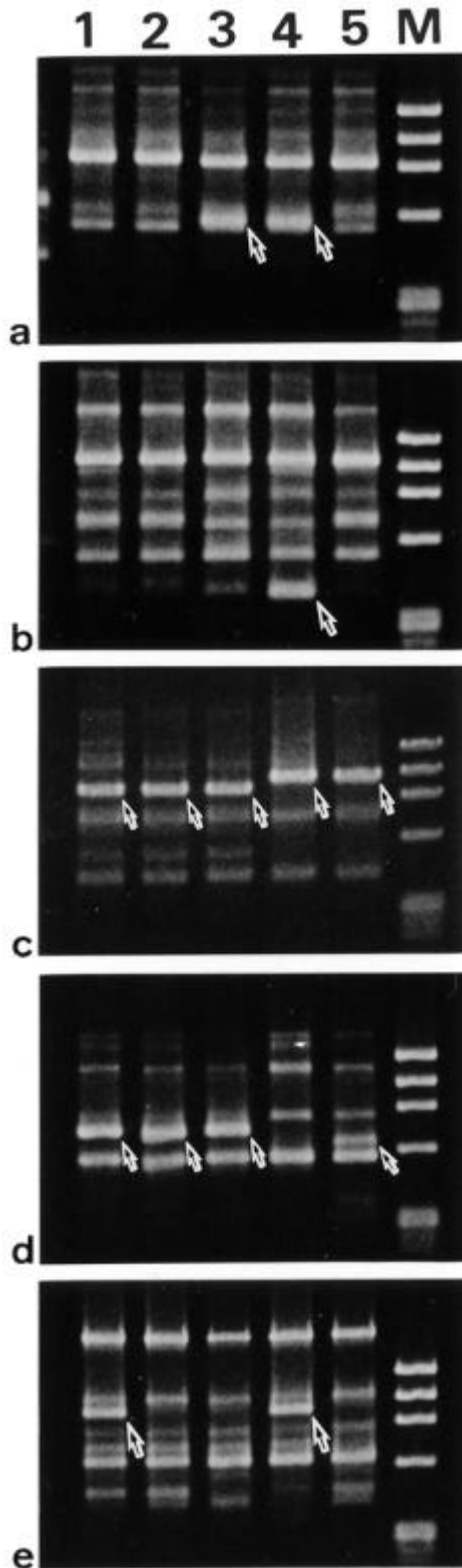
(2) 実験結果

プライマーOPA-09,15,16,OPB-13ではそれぞれ2種類のパターンが,OPA-19では3種類のパターンが見られた(図5)。5種類のプライマーの結果を組み合わせると,4つのMCGから選んだ24菌株は5つのタイプに分かれた(表4)。

圃場5を除く6つの圃場から分離されたMCG Aの12菌株はRAPDタイプ1に属したが,同じMCG Aの菌株1-7(圃場1より分離)はタイプ2であった。タイプ2はOPB-13でのパターンがタイプ1と異なり,約900bpのバンドを欠いた。MCG Bの5菌株(圃場3および4より分離)はタイプ3,MCG Cの5菌株(圃場4および5より分離)はタイプ4,MCG Dの1菌株はタイプ5であった。

表4 各MCGの代表菌株のRAPDパターンによる類別

RAPDタイプ	菌株	MCG
タイプ1	1-2,2-1,2-6,3-3,3-7,3-12,4-12,4-47,6-2,6-8,7-2,7-25	A
2	1-7	A
3	3-4,3-6,4-1,4-10,4-72	B
4	4-23,4-28,4-60,5-3,5-9	C
5	3-19	D



上よりプライマー OPA-09 ( a ), OPA-15 ( b ), OPA-16 ( c ), OPA-19 ( d ) および OPB-13 ( e ) によるパターン。  
 レーン 1 = 菌株 3-7 ( タイプ 1 ), レーン 2 = 菌株 1-7 ( タイプ 2 ),  
 レーン 3 = 菌株 3-4 ( タイプ 3 ), レーン 4 = 菌株 4-28 ( タイプ 4 ),  
 レーン 5 = 菌株 3-19 ( タイプ 5 ), レーン M = 分子量マーカー ( 174/Hae )  
 矢印は RAPD タイプによって異なるバンド。

図 5 RAPD パターンによる遺伝型の区別

#### 4 考察

ラッカセイ圃場の *S.rolfsii* 個体群は 1 ~ 3 つの MCG で構成されることが明らかになった。圃場 4 のパッチから分離された 15 菌株が全て同一 MCG であったことから、このパッチは単一系統の菌が無性的に増殖して形成されたと考えられる。

もっとも優占的な MCG である MCG A は約 2.5 km 離れた 2 つの調査地点から分離され、MCG B および C もそれぞれ 2 つの圃場で分離された。同一 MCG に属する菌株は異なる圃場から分離されたものでも同じ RAPD パターンを示した。このことは、同じ地域で分離された同一 MCG に属する菌株は遺伝的にも均一である、とする既往の報告と一致する ( Smithら, 1992 ; Smithら, 1994 ; Worrall, 1997 )。

一般に、土壌伝染性植物病原菌の個体群は、少数の遺伝的に非常に近縁な集団 ( MCG, クローン, genet など ) で構成される場合が多い ( Smithら, 1992 ; Matsumotoら, 1993 ; Smithら, 1994 ; Katsumataら, 1996 ; Earnshawら, 1997 ) ( 表 5 )。土壌病原菌の個体群が少数の近縁集団から成る理由は、これらの菌が菌糸体や菌核による無性生殖で広がるためと推測される。他方、有性胞子によって広がる空気伝染性植物病原菌では 1 つの圃場に多数の遺伝型が混在することが知られている ( Anagnostakisら, 1987 ; Kohnら, 1991 ; Chenら, 1996 ) ( 表 5 )。

MCG A と MCG C は 1994 年の調査と 1997 年の調査の両方で見られたが、同一 MCG が数年にわたって分離された例は、今回の他にも *S.rolfsii* ( Nalimら, 1995 ) や *T.ishikariensis* ( Matsumotoら, 1996 ) など知られている。これもまた、土壌病原菌が長年にわたって無性生殖を繰り返すことを示している。

今回の結果ではほとんどの場合、同じ MCG の菌株は同じ RAPD パターンを示したが、菌株 1-7 は他の MCG A の菌株と RAPD パターンがやや異なった。菌株 1-7 は他の MCG A の菌株と比較して、OPB-13 でバンド ( RAPD マーカー ) が 1 つ欠失していた。同一 MCG の菌株の間にも遺伝的変異があることは知られているが ( Kohliら, 1992 ; Jacobsonら, 1993 ), 同一 MCG 内での変異の幅は異なる MCG の菌株間での遺伝的差異に比べて小さいことも報告されている ( Matsumotoら, 1996 ; Cilliersら, 2000 ; Punjaら, 2001 )。菌株 1-7 も OPB-13 以外の 4 種のプライマーでは他の MCG A の菌株と同じパターンを示しており、遺伝的変異は小さい。同一 MCG に属する菌株間で変異が見られるのは、無性生殖を繰り返している間に体細胞突然変異が生じたためと考えられる。

表5 既報の各植物病原菌の個体群構造

病原菌	調査地	分離菌株数	遺伝型の数	文献
土壌伝染性病原菌				
<i>Armillaria bulbosa</i>	森林 (30ha)	26 菌株	2 クローン	Smith ら (1992)
<i>Armillaria ostoyae</i>	植林地 (130 × 60m)	87 菌株	22genets	Smith ら (1994)
<i>Helicobasidiummompae</i>	リンゴ園場 (40 × 72m)	68 菌株	9genets	Katsumata ら (1996)
<i>Sclerotium cepivorum</i>	Holland-Bladford 湿地	14 菌株	2MCG	Earnshaw ら (1997)
<i>Typhula ishikariensis</i>	牧草地 A (10 × 10 株)	36 菌株	18VCG	Matsumoto ら (1993)
-----				
空気伝染性病原菌				
<i>Cryphonectria parasitica</i>	クリ園 (60 × 60m)	272 菌株	48vc タイプ	Anagnostakis ら (1987)
<i>Mycosphaerellagramminicola</i>	コムギ園場 (1.5 × 6.1m × 45 区)	544 菌株	497genotypes	Chen ら (1996)
<i>Sclerotiniasclerotiorum</i>	ナタネ園場 (100 + 8 エーカー)	63 菌株	32MCG	Kohn ら (1991)

本実験の結果から、*S.rolfsii*の個体群の遺伝的構造は単純であり、本菌の生活環においては無性生殖が大きな役割を果たすことが示唆された。また、それぞれのMCGが1つの地域に長年にわたって定着することが明らかになった。これらのことは*S.rolfsii*において地理的分化が進み易いことを示している。

### ITS領域のPCR-RFLP解析による地域間の遺伝的変異

#### 1 緒言

白絹病は西南暖地のマメ科作物に夏季に発生する病害として知られているが、近年、春～初夏にユリ科などの花卉類の球根に発生して問題となった。発生地域も北陸・東北・北関東の寒冷地にまで広まっている(井, 2000)。寒冷地に発生する白絹病菌と西南暖地の白絹病菌は宿主植物の種類や発生時期などの発生生態がやや異なり、遺伝的に異なるグループに分かれる可能性がある。

近年、分子生物学的手法を取り入れることによって糸状菌の系統分類が急速に進み、リボソームRNA遺伝子のITS領域を利用した種あるいは種内グループの識別が行われている(Whiteら, 1990; Gardesら, 1993)。白絹病菌においてもHarltonら(1995)がITS領域のPCR-RFLP解析を行った。その結果、*S.rolfsii*にRFLPパターンの異なるサブグループが存在すること、また、*S.rolfsii*とその近縁種である*S. delphinii*もRFLPパターンの一部が異なることが明らかになった。

本章では日本各地のさまざまな宿主植物から分離された菌株のITS-RFLPパターンを比較し、菌核の形態や生

育適温などの諸性質とITS-RFLPによる類別との関係について調べた(Okabeら, 1998; Okabeら, 2000)。

#### 2 ITS-RFLPグループによる類別

##### (1) 実験材料および方法

##### 1) 供試菌株

供試菌株を表6に示す。このうち、S-51～55は前章で述べた茨城県の菌株、S-1～10は植松清次氏より(植松ら, 1992; 植松ら, 1993)、S-11～18は農林水産ゾーンバンクより、S-19および20は中島隆博士より、S-21～30は手塚信夫博士より(手塚ら, 1992; 石井ら, 1994; 手塚ら, 1994)、S-31～39は竹内純氏より(堀江ら, 1993; 竹内ら, 1993; 竹内ら, 1994; 竹内ら, 1995)、S-40および41は石川成寿氏より(石川ら, 1992)、S-42～50は本村知樹博士より(野中ら, 1990)、S-56～61は築尾嘉章博士より(井ら, 2000)、S-62～64は佐藤豊三博士より(佐藤ら, 1995)、S-65～67は庄司俊彦氏より(庄司, 1993; 庄司, 1996)分譲されたものである。S-44, 45および46は分離された時期が3月から6月と早い、これは罹病植物からではなく、土壌中あるいは水面に浮遊していた菌核を採集したためである。これらの菌株は全て白絹病菌(*S.rolfsii*)と同定されたものであり、それぞれ異なるMCGに属した。ただし、S-56と57は同一MCGであり、S-58～61も同じMCGであった。

##### 2) PCR-RFLP解析

リボソームRNA遺伝子のITS領域のPCR-RFLP解析はHarltonら(1995)の方法に準じた。菌叢をジャガイモ煎汁(PDB)で1～2週間、室温で液体培養し、濾紙を敷いたブフナー漏斗で培養液と菌叢を分離し、さら

表 6 供試菌株の由来

菌株番号	分離源	採集地	分離年
S-1 (CH92S-1)	アルストロメリア <i>Alstromeria</i> sp.	千葉県	1992 年 8 月
2 (CH92S-2)	アルストロメリア <i>Alstromeria pulchella</i>	千葉県	1992 年 7 月
3 (CH92S-3)	ツノナス <i>Solanum mammosum</i>	千葉県	1992 年 9 月
4 (CH92S-4)	ツノナス <i>Solanum mammosum</i>	千葉県	1992 年 9 月
5 (CH92S-5)	コチョウラン <i>Phalaenopsis</i> sp.	千葉県	1992 年 9 月
6 (CH87-52)	ソリダスター × <i>Solidaster luteus</i>	千葉県	1987 年 8 月
7 (CH87-53)	ソリダスター × <i>Solidaster luteus</i>	千葉県	1987 年 8 月
8 (CH91-41)	デルフィニウム <i>Delphinium ajacis</i>	千葉県	1991 年 7 月
9 (CH91-42)	デルフィニウム <i>Delphinium ajacis</i>	千葉県	1991 年 7 月
10 (CH91-52)	オリヅルラン <i>Chlorophytum</i> sp.	千葉県	1991 年 8 月
11 (MAFF410049)	スギ <i>Cryptomea japonica</i>	福井県	1952 年
12 (MAFF410050)	オウレン <i>Coptis japonica</i>	福井県	1972 年
13 (MAFF102020)	ダイズ <i>Glycinemax</i>	群馬県	1984 年
14 (MAFF102021)	ダイズ <i>Glycinemax</i>	徳島県	1986 年
15 (MAFF102022)	ダイズ <i>Glycinemax</i>	岐阜県	1987 年
16 (MAFF102023)	ラッカセイ <i>Arachis hypogaea</i>	茨城県	1987 年
17 (MAFF305344)	土壌	石川県	1977 年
18 (MAFF305545)	クローバー <i>Trifolium repens</i>	千葉県	1958 年
19 (CR-1)	ダイズ <i>Glycinemax</i>	秋田県	
20 (CR-2)	ダイズ <i>Glycinemax</i>	秋田県	
21	ホトトギス <i>Tricyrtis</i> sp.	三重県	1991 年 8 月
22	シャボンソウ <i>Saponariaofficinalis</i>		
23	フジバカマ <i>Eupatrium fortunei</i>	三重県	1991 年 8 月
24	ジャガイモ <i>Solanum tuberosum</i>	三重県	1993 年 7 月
25	スターチス <i>Limonium sinuatum</i>		
26	シロクジャク <i>Asterpilosus</i>	三重県	1991 年 10 月
27	グラジオラス <i>Gladiolus</i> sp.	三重県	1991 年 8 月
28	カクトラノオ <i>Physostegia virginiana</i>	三重県	1991 年 8 月
29	タチアオイ <i>Althaea rosea</i>		

30	フダンソウ <i>Betavulgaris var. cicla</i>	広島県	1973年9月
31 (Co-3501-1)	チヂミバペペロミア <i>Peperomia caperata</i>	東京都	1992年10月
32 (CoOp-1)	ジャノヒゲ <i>Ophiopogon japonicus</i> Tokyo	東京都	1992年6月
33 (Co-400-1)	アジュガ <i>Ajuga</i> sp.	東京都	1983年6月
34 (Co-Pa-1)	フッキソウ <i>Pachysandra terminalis</i>	東京都	1993年8月
35 (Co-3-2)	カラジウム <i>Caladium</i> sp.	八丈島	1983年12月
36 (Co-Ar-1)	ウド <i>Araliacordata</i>	東京都	1992年9月
37 (Co-At-1)	オオバナオケラ <i>Atractylodes japonica</i>	東京都	1993年6月
38 (Co-Ly-1)	トマト <i>Lycopersicon esculentum</i>	東京都	1994年7月
39 (Co-Ne-1)	ネリネ <i>Nerine</i> sp.	三宅島	1994年7月
40 (NI91-02)	イチゴ <i>Fragaria ananassa</i>	栃木県	1991年6月
41	ウド <i>Araliacordata</i>	栃木県	
42 (CR-8801)	トウビシ <i>Trapabispinosa</i>	佐賀県	1988年9月
43 (CR-8923)	チュウビシ <i>Trapa</i> spp.	佐賀県	1989年10月
44 (CR-9001)	トウビシ <i>Trapabispinosa</i>	佐賀県	1990年6月
45 (CR-9006)	トウビシ <i>Trapabispinosa</i>	佐賀県	1990年3月
46 (CR-9007)	トウビシ <i>Trapabispinosa</i>	佐賀県	1990年3月
47 (CR-9011)	トウビシ <i>Trapabispinosa</i>	佐賀県	1990年10月
48 (CR-9014)	トウビシ <i>Trapabispinosa</i>	佐賀県	1990年10月
49 (CR-9016)	トウビシ <i>Trapabispinosa</i>	佐賀県	1990年10月
50 (CR-9101)	トウビシ <i>Trapabispinosa</i>	佐賀県	1991年9月
51 (1-7)	ラッカセイ <i>Arachis hypogaea</i>	茨城県	1994年8月
52 (3-4)	ラッカセイ <i>Arachis hypogaea</i>	茨城県	1994年8月
53 (4-28)	ラッカセイ <i>Arachis hypogaea</i>	茨城県	1994年8月
54 (3-7)	ラッカセイ <i>Arachis hypogaea</i>	茨城県	1994年8月
55 (3-19)	ラッカセイ <i>Arachis hypogaea</i>	茨城県	1994年8月
56	チューリップ <i>Tulipa gesneriana</i>	富山県	1995年6月
57	チューリップ <i>Tulipa gesneriana</i>	富山県	1995年6月
58	ユリ <i>Lilium</i> sp.	富山県	1995年9月
59	ユリ <i>Lilium</i> sp.	富山県	1995年9月
60	ユリ <i>Lilium</i> sp.	富山県	1995年9月

61	ユリ <i>Lilium sp.</i>	富山県	1995 年 9 月
62 (W2)	スイカ <i>Citrullus vulgaris</i>	香川県	1994 年
63 (B12)	ダイズ <i>Glycinemax</i>	香川県	1994 年
64 (Y1)	ヤーコン <i>Polymniasonchifolia</i>	香川県	1994 年 7 月
65 (F-1)	フジバカマ <i>Eupatorium fortunei</i>	埼玉県	1994 年 10 月
66	ゴボウ <i>Arctium lappa</i>	埼玉県	1995 年 10 月
67 (I-1)	イワヒバ <i>Selaginellatamariscina Saitama</i>	埼玉県	1992 年 8 月

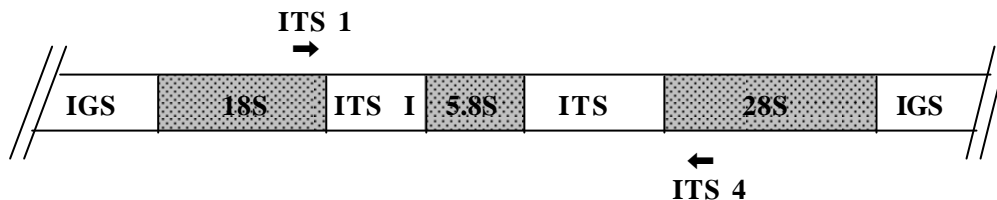


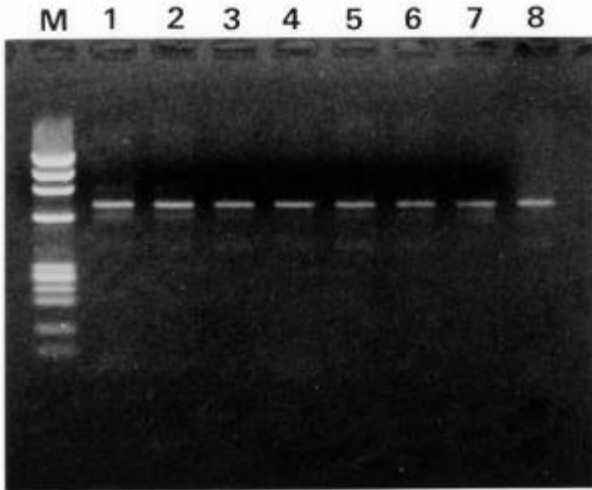
図 6 リボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域を増幅するプライマー ITS 1 および ITS 4 の結合する位置

に蒸留水で洗浄した後、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。凍結した菌叢約 50mg を液体窒素中で磨砕し、DNA 分離キット (Easy-DNA, Invitrogen 社) を用いて DNA を分離した。プライマー ITS 1 および ITS 4 を用いて ITS 領域 (ITS, 5.8S リボソーム DNA および ITS 領域を含む) を増幅した (White ら, 1990) (図 6)。PCR 反応液量は 50  $\mu\text{l}$  で、 $10 \times$  GeneTaq Universal Buffer (ニッポンジーン社) 5  $\mu\text{l}$ , 2.5mM dNTP mixture (ニッポンジーン社) 2  $\mu\text{l}$ , プライマー ITS 1 40pmol, プライマー ITS 4 40pmol, GeneTaq (ニッポンジーン社) 1 ユニットおよび鋳型 DNA 50ng を含んだ。PCR 反応は 94  $^{\circ}\text{C}$ , 5 分間の変性を行った後、変性 (94  $^{\circ}\text{C}$ , 1 分間) アニール (55  $^{\circ}\text{C}$ , 1.5 分間) 伸長反応 (72  $^{\circ}\text{C}$ , 2 分間) を 30 回繰り返し、最後に 72  $^{\circ}\text{C}$ , 10 分間の伸長反応を行った。PCR 生成物は *Alu*, *Hpa*, *Rsa*, *Nde* (*Mbo*, *Sau* 3AI) の各酵素で 37  $^{\circ}\text{C}$ , 3 時間処理した。制限酵素処理したものはアガロースゲル電気泳動 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  臭化エチジウム添加 2% アガロース (NuSieve 3:1, FMC Bioproducts 社 または アガロース S, ニッポンジーン社), TAE バッファー, 50mA, 60分間) にかけた (Sambrook ら, 1989)。

## (2) 実験結果

全ての菌株で同じサイズ (約 700bp) の PCR 生成物が得られた (図 7)。*Alu*, *Hpa*, *Rsa* あるいは *Nde* の処理によって、それぞれ、2, 3, 4 および 4 種類のパターンが認められた (図 8)。これらのパターンは Harlton ら (1995) の記述した A1 から A2, H1 から H3, R1 から R3, M1 から M4 のパターンに相当したが、*Rsa* 処理で見られたパターンの 1 つはこれまでに報告がなかったので、R0 パターンとした (表 7)。

4 種類の制限酵素で処理した ITS-RFLP パターンの組み合わせによって、67 菌株は 5 つのグループに分けられた。グループ 1 (A2, H3, R1, M2) は 38 菌株、グループ 2 (A2, H3, R1, M3) は 11 菌株、グループ 3 (A1, H2, R2, M4) は 1 菌株、グループ 4 (A2, H1, R3, M2) は 10 菌株、そしてグループ 5 (A2, H1, R0, M1) は 7 菌株であった (表 8)。グループ 1, 3 および 4 はそれぞれ、Harlton ら (1995) の報告したグループ, および XIV に相当したが、このうちのグループ XIV は *S. delphinii* に属するグループであった。グループ 2 および 5 は Harlton ら (1995) の報告には見られなかったグループである。



レーン M = 分子量マーカー ( 174/Hae )  
 レーン 1 = S-22, レーン 2 = S-42, レーン 3 = S-43  
 レーン 4 = S-17, レーン 5 = S-41, レーン 6 = S-56  
 レーン 7 = S-8, レーン 8 = S-12。いずれも約 700bp

図 7 PCR によって増幅された各菌株の ITS 領域

表 7 ITS 領域の PCR-RFLP によって生じた断片長

制限酵素	パターン	断片長 (bp)
<i>Alu</i>	A1	470,120, 90
	A2	470,360, 120,90
<i>Hpa</i>	H1	700
	H2	550,140
	H3	700,550, 140
<i>Rsa</i>	R0	700
	R1	700,570, 110
	R2	570,110
	R3	700,550, 140
<i>Nde</i>	M1	430,160
	M2	430,230, 160
	M3	430,160, 130
	M4	430,230

### 3 生育適温および菌核形成

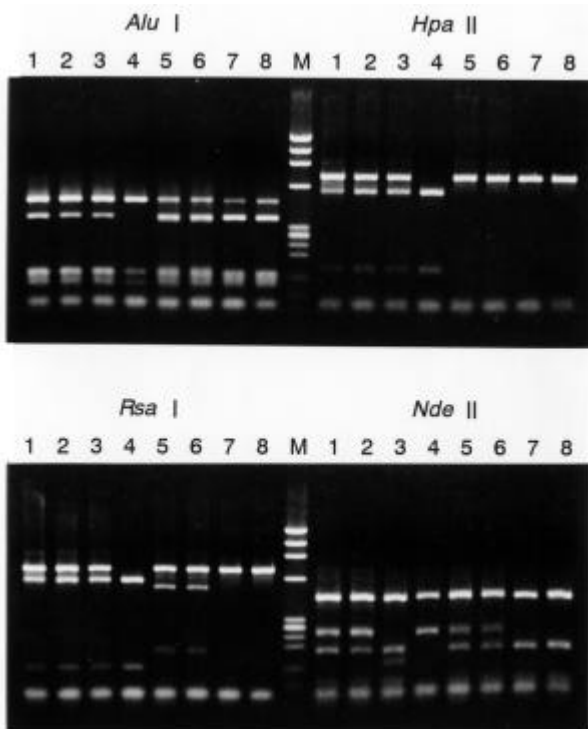
#### (1) 実験材料および方法

各 ITS-RFLP グループから代表菌株を数株選び (表 9), 供試した。菌叢の生長速度の測定および菌核形成の観察は 10 ~ 36 の各温度暗黒下でジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 平板培地上で培養して行った。各菌株は 28 暗黒下で PDA 平板培地上で 2 ~ 3 日間前培養し, 菌叢の周縁部から直径 5mm の寒天片をとって新しい培地上に移植した。生育速度は 10 ~ 36 の各温度に保った恒温器の中で 2 日間培養後に菌叢が生長した長さ (寒天片の端から菌叢の端までの距離, 各菌叢 3 箇所) を測定した。また, 40 日後に形成された菌核の数, 生重および直径を測定した。菌核の直径の測定は, スケールと共に撮影した菌核の画像を NIHImage1.61 (ResearchServices Branch, the National Institute of Mental Health, the National Institutes of Health) の粒径分析プログラム (Analyze Particles) で解析し, 菌核に外接する楕円形の長軸と短軸の平均を求めることにより行った。

#### (2) 実験結果

供試した菌株の多くは 10 での生育は認められなかったが, 一部の菌株ではわずかながら生育が認められ, このような菌株はいずれのグループにも存在した。15 では全ての菌株が生育し, 低温域でのグループ間の差は認められなかった (表 9)。

グループ 1 および 2 の菌株とグループ 4 の菌株の多くは生育最適温が 30 を示した (表 10) のに対し, グループ 5 の菌株とグループ 4 の菌株の一部の生育最適温は



レーン 1 = S-22 (グループ 1), レーン 2 = S-42 (グループ 1)  
 レーン 3 = S-43 (グループ 2), レーン 4 = S-17 (グループ 3)  
 レーン 5 = S-41 (グループ 4), レーン 6 = S-56 (グループ 4)  
 レーン 7 = S-8 (グループ 5), レーン 8 = S-12 (グループ 5)  
 レーン M = 分子量マーカー ( 174/Hae )

図 8 4 種類の制限酵素 (*Alu*, *Hpa*, *Rsa* および *Nde*) による各菌株の ITS-RFLP パターン



表 8 *Sclerotium rolfsii* 菌株の ITS-RFLP パターンによる類別

グループ	ITS-RFLP パターン	菌株番号
1	A2,H3,R1,M2	S-2,3,4,6,7, 10, 13, 14,15,21,22,24,26,27,28,29,30,31,33,34, 35, 39,42,46,47,48,49, 50,51,52,53,54,55,62,63,64,66,67
2	A2,H3,R1,M3	S-1,5,9,18,23,25,38,43,44,45,65
3	A1,H2,R2,M4	S-17
4	A2,H1,R3,M2	S-32,36, 37,41,56,57,58,59,60,61
5	A2,H1,R0,M1	S-8,11,12,16,19,20,40

表 9 生育温度 (10 ~ 36 ) と菌叢の生長

供試菌株 (RFLPグループ)	菌叢の生長 (mm)						
	10	15	20	25	28	33	36 ( )
S-35 (グループ1)	1.0	5.3	0.1	0.4	6.0	13.3	0.0
S-46 (グループ1)	0.0	4.9	7.8	18.8	22.9	20.1	2.2
S-63 (グループ1)	1.0	6.7	9.3	21.0	27.2	25.1	6.2
S-1 (グループ2)	0.0	2.8	4.4	10.4	11.3	9.7	2.0
S-18 (グループ2)	0.0	5.1	7.2	15.7	18.3	13.7	2.9
S-45 (グループ2)	0.8	8.0	11.3	21.4	24.7	23.6	5.0
S-32 (グループ4)	0.0	2.8	3.4	11.9	11.6	10.0	0.0
S-56 (グループ4)	0.0	4.7	5.1	13.7	17.3	15.8	3.0
S-61 (グループ4)	2.2	9.1	11.6	20.4	23.3	14.8	1.7
S-11 (グループ5)	0.0	0.4	1.3	8.9	14.2	11.3	0.0
S-19 (グループ5)	0.0	2.7	6.7	11.8	13.1	10.8	0.1
S-40 (グループ5)	0.1	4.1	5.0	10.1	15.1	13.0	1.0

表 11 生育温度 (10 ~ 36 ) と菌核の大きさ

供試菌株 (RFLPグループ)	菌核の直径 (mm)						
	10	15	20	25	28	33	36 ( )
S-35 (グループ1)	1.57	2.02	1.92	2.56	2.69	1.84	1.45
S-46 (グループ1)	-	1.93	2.37	2.21	2.49	1.87	1.59
S-63 (グループ1)	-	2.17	1.92	1.63	1.53	1.19	0.95
S-1 (グループ2)	-	3.00	2.15	2.02	1.57	1.73	-
S-18 (グループ2)	-	8.63	2.69	2.37	2.54	-	-
S-45 (グループ2)	-	1.93	2.37	2.21	2.49	1.87	1.59
S-32 (グループ4)	3.40	4.21	3.00	4.13	2.81	2.47	-
S-56 (グループ4)	3.47	2.29	3.42	2.89	2.70	3.47	-
S-61 (グループ4)	3.75	2.18	3.05	3.17	3.25	3.11	-
S-11 (グループ5)	-	-	-	-	-	-	-
S-19 (グループ5)	-	-	-	-	-	-	-
S-40 (グループ5)	-	-	-	-	4.06	-	-

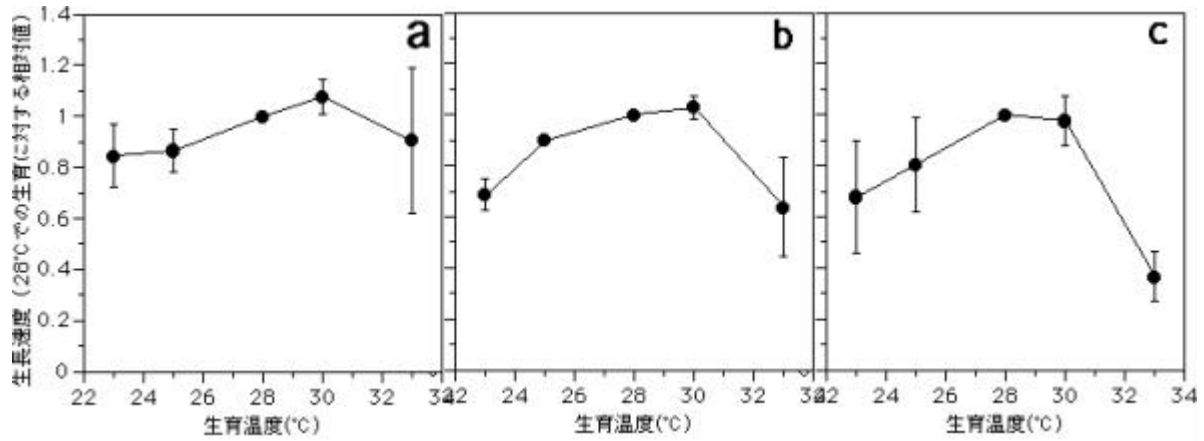
- ; 菌核を形成しなかった。

表 10 生育温度 (23 ~ 33 ) と菌叢の生長

供試菌株 (RFLPグループ)	菌叢の生長 (mm)				
	23	25	28	30	33 ( )
S-22 (グループ1)	13.8	18.3	18.9	21.9	18.4
S-24 (グループ1)	11.3	8.6	12.0	12.1	6.9
S-26 (グループ1)	14.0	15.4	16.1	17.0	15.1
S-30 (グループ1)	15.9	18.4	21.0	21.7	15.0
S-35 (グループ1)	11.8	7.9	10.6	10.9	16.7
S-46 (グループ1)	13.9	17.2	19.3	19.9	16.3
S-54 (グループ1)	17.2	20.9	23.2	24.8	20.8
S-63 (グループ1)	15.3	16.7	19.4	23.8	14.0
S-1 (グループ2)	16.1	19.1	19.6	21.9	16.2
S-32 (グループ4)	9.6	13.1	14.2	13.9	9.9
S-41 (グループ4)	15.2	19.0	21.0	22.7	16.2
S-56 (グループ4)	13.3	19.9	22.9	24.9	18.9
S-58 (グループ4)	13.7	18.4	20.3	20.4	12.4
S-60 (グループ4)	15.8	18.3	20.4	20.1	5.6

表 12 生育温度 (23 ~ 33 ) と菌核の大きさ

供試菌株 (RFLPグループ)	菌核の直径 (mm)				
	23	25	28	30	33 ( )
S-22 (グループ1)	1.90	1.83	1.81	1.44	2.04
S-24 (グループ1)	2.00	2.31	2.42	1.65	1.50
S-26 (グループ1)	1.29	1.63	1.40	2.21	2.41
S-30 (グループ1)	1.62	1.84	1.90	1.87	1.24
S-35 (グループ1)	1.63	2.11	1.82	1.60	1.00
S-46 (グループ1)	1.59	1.92	1.85	1.66	1.19
S-54 (グループ1)	1.97	1.83	1.78	1.67	2.14
S-63 (グループ1)	1.32	1.72	1.51	1.42	1.04
S-1 (グループ2)	2.03	2.34	2.06	1.72	1.24
S-32 (グループ4)	4.85	3.19	3.23	2.25	1.23
S-41 (グループ4)	3.03	2.70	2.75	2.05	1.76
S-56 (グループ4)	1.66	2.16	2.10	1.72	1.84
S-58 (グループ4)	4.43	2.75	3.69	2.74	1.54
S-60 (グループ4)	3.56	2.90	3.34	2.21	2.94



28 での生長を 1 とした場合の各温度での生長の比率を標準偏差とともに示した。

図9 グループ 1 (a) , 4 (b) および 5 (c) の菌叢の生長

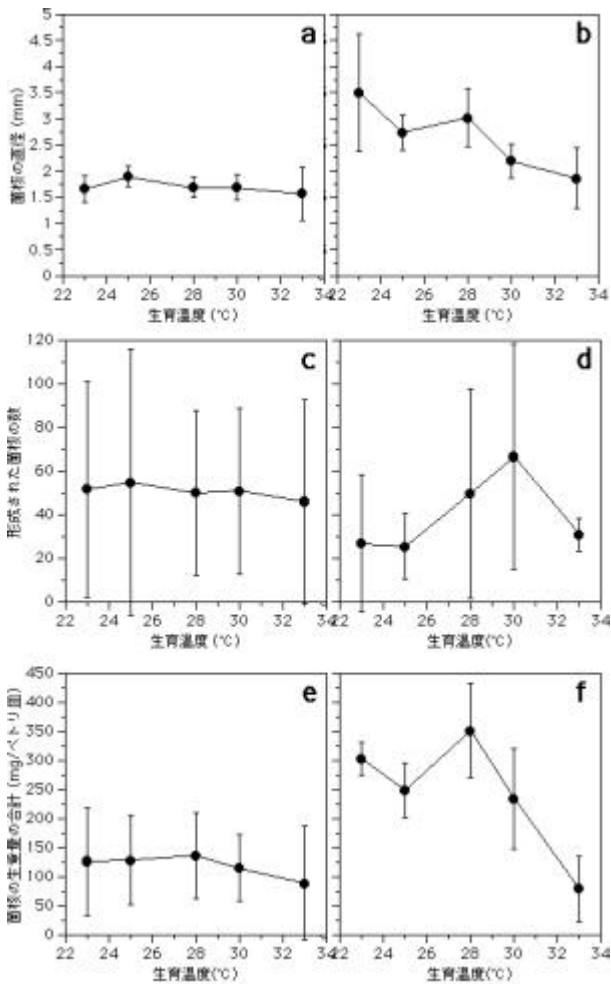
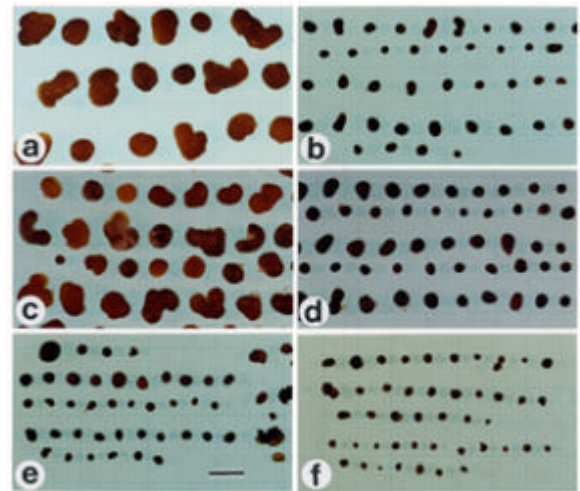


図10 グループ 1 (a, c, e) およびグループ 4 (b, d, f) が各温度で形成した菌核の直径, 数, および生量の平均および標準偏差



a) S-58, 23 , b) S-46, 23  
c) S-58, 28 , d) S-46, 28  
e) S-58, 33 , f) S-46, 33  
スケールは5mm

図11 菌株 S-58 (グループ 4) および S-46 (グループ 1) が各培養温度で形成した菌核。

28 であった (図9)。一方, グループ 3 の菌株では生育が極めて遅かったために実験から除外した。

グループ 1 および 2 の菌株は 23 から 28 で良好な菌核形成を示した。また, これらの菌株は小型の菌核を形成した。グループ 4 および 5 の菌株は大型で不定形の菌核を形成したが, 培養温度の上昇とともに菌核は小型化し (表11, 12 および図10), グループ 1 および 2 の菌核と形態的な差がほとんど認められない場合もあった (図11)。グループ 4 の菌株の多くは, 28 で菌核の生量が最大となったが, 菌核の形成数は 30 で最も多かった (図10)。グループ 3 の菌株は菌核を形成しなかった。

4 考察

ITS領域のPCR-RFLP解析により日本で分離された白絹病菌の菌株は5つのグループに分けられた。ITS-RFLPグループによって生育適温範囲および菌核の形態がわずかに異なったが、菌核の形態は生育温度によっても影響を受けた。

グループ1は菌核の形態が典型的な*S.rolfsii*の記述と一致し、ITS-RFLPパターンについてもアメリカ合衆国およびインドネシアの*S.rolfsii*のグループと同じであった(Harltontら,1995)。しかし、アメリカ合衆国およびバングラデシュの*S.rolfsii*では35で良好な菌叢の生長と菌核形成が見られたのに対して(Chowdhuryら,1993; Punjaら,1996)、グループ1は33以上で菌叢の生長および菌核形成が不良となった。グループ2は外国での報告はないが、形態的特徴はグループ1と同じであった。日本の菌株の73%はグループ1および2であり、

章の4つのMCGも全てグループ1に属した。一方、アメリカ合衆国の菌株で主要なグループとなっているグループ , および は日本では見られなかった。グループ3の菌株は菌叢の生長が極めて遅く、菌核を形成しなかったため、形態的特徴は不明であるが、ITS-RFLPパターンはネパールに分布するグループXIと同じであっ

た(Harltontら,1995)。

グループ4はITS-RFLPパターンおよび大型の菌核を形成する点で、これまでに報告されている*S.rolfsii*よりもアメリカ合衆国北部およびカナダに発生する*S.delphinii*に近いと考えられた。ユリ科植物に病原性のある点や北陸地方のような寒冷地に発生する点も*S.delphinii*の既報の性質と一致した。しかし、グループ4の菌叢の生長と菌核形成の最適温度はアメリカ合衆国の典型的な*S.delphinii*よりも高かった(Punjaら,1996)。そのため、グループ4と1の生育適温の違いは外国の*S.delphinii*と*S.rolfsii*の差ほど大きくはなかった。グループ5はRsaパターンがこれまでに報告されていないものであったが、その他のRFLPパターンおよび生育最適温度はグループ4に似ていた。グループ5は菌核を形成しない場合も多かったが、まれに形成される菌核は大型で、やはりグループ4に近かった。

ITS-RFLPグループによる生育適温の違いはそれぞれのグループの地理的分布および発生時期と一致していた。グループ4の菌株の多くは初夏に寒冷地でチューリップやユリから分離されたのに対し、グループ1および2は主に盛夏から初秋にかけて西南暖地から分離された(図12)。また、バングラデシュ、アメリカ合衆国南部、



括弧内の数値はそれぞれグループ1, 2, 3, 4および5の菌株数

図 12 日本各地から分離された菌株の ITS-RFLP グループによる分類

メキシコ、ブラジルおよびチリで分離された菌株（Chowdhuryら, 1993; Punjaら, 1996）と比較して日本の菌株は生育最適温度が低く、このことも生育適温と地理的分布との関連を示していた。グループ1および4はそれぞれ*S.rolfsii* および *S.delphinii* に相当したが、日本のグループ1と4の差異はアメリカ合衆国の*S.rolfsii* と*S.delphinii* の差より小さく、グループ1と4の間に明確な境界は認められなかった。

ITS-RFLPパターンにおいて、グループ1、2および3は外国の*S.rolfsii* に近く、グループ4および5は*S.delphinii* に近い。両者はITS-RFLPの*Hpa* および*Rsa* パターンにおいて区別された。しかし、*Nde* パターンではグループ1と4が同じで、グループ2および3はグループ1と異なることから、一概にグループ1、2および3と4および5が遺伝的に隔たっているとは言えない。しかも、いくつかのRFLPパターンは他のパターンの組み合わせで生じたとみることができる。すなわち、 $H3 = H1 + H2$ ,  $R1 = R0 + R2$ , また、 $M2 = M1 + M4$  と考えられる（表7）。このようにH3, R1, M2パターンを示す菌株は互いに異なる二種類のITS領域を持つヘテロカリオンである可能性があり、異なるITS-RFLPグループ間での遺伝的交流が生じている可能性が示唆される。

H3, R1あるいはM2パターンを示すグループ（グループ1、2および4）がヘテロカリオンであり、また、これらのグループが他のグループ間での核の交換によって生じたと想定した場合、ヘテロカリオンと考えられるグループの菌株からそれぞれ片方のタイプの核を持つホモカリオンを作出して核のITS領域をそれぞれ決定することで、各タイプの核の由来を推定することが可能と思われる。これにより、ITS-RFLPグループ間の系統関係、特にグループ1および2（外国の*S.rolfsii* に近いグループ）とグループ4および5（*S.delphinii* に近いグループ）の関係も明らかにできると考えられた。

## ITS-RFLP グループ間の系統関係

### 1 緒言

リボソームRNA遺伝子のITS領域のPCR-RFLPによって日本の白絹病菌株は5つのグループに分けられた。グループ1がHarltonら(1995)の*S.rolfsii* のグループと同じITS-RFLPパターンを示したのに対して、グループ4および5は寒冷地に分布すること、大型の菌核を形成すること、および*Hpa* および*Rsa* パターンが

*S.delphinii* に近いことから典型的な*S.rolfsii* の性質とは異なっていた。しかし、*Nde* パターンではグループ1と4が同じであること、また、グループ1が異なるITS領域を持つ2つの核を有し、グループ間の核の交流によって生じたヘテロカリオン菌株である可能性も示された。

*S.rolfsii* にヘテロカリオン菌株が存在することは既にいくつかの研究グループが示唆している。Harltonら(1995)はPCR-RFLPで生じたITS領域の制限酵素断片の長さを合計すると、もとのITS領域より長くなることから、それぞれのITS-RFLPパターンが2つのITS-RFLPサブタイプから構成される制限酵素地図を示した。また、彼らは、担子孢子から生じた菌株は親株と異なるRFLPパターンを示し、同一親株から生じた担子孢子由来株のRFLPパターンは2種類に分かれることも報告した(Harltonら, 1995)。Adamsら(1996)は*S.rolfsii* のITS領域の塩基配列解析に直接塩基配列決定法を用いたが、配列は決定できなかった。Nalimら(1995)も塩基配列の解析を試み、1つの菌株の中に異なるタイプのITS領域が混在すること、またITS領域の長さは686bp(塩基対)であることを示した。

本章では、ヘテロカリオン菌株と考えられるITS-RFLPグループ1に属する菌株の1つからホモカリオン菌株を分離し、元の菌株に含まれていたと考えられる2つのタイプのITS領域の塩基配列をそれぞれ決定し、他のITS-RFLPグループの塩基配列と比較した(Okabeら, 2001)。なお、*S.rolfsii* の担子孢子由来株は得られなかったため、ホモカリオン化にはプロトプラスト分離(Wesselsら, 1976)および単菌糸分離を用いた。また、*S.rolfsii* のホモカリオン菌株は二核あるいは多核であり(Punjaら, 1983A)、顕微鏡観察でホモカリオン菌株とヘテロカリオン菌株を区別することは困難であるため、ホモカリオン菌株であることの確認はRFLP解析とRAPD解析により行った。

### 2 ホモカリオンの作出

#### (1) 実験材料および方法

##### 1) 供試菌株

菌株S-1, S-26, S-32およびS-63を用いた。S-26およびS-63はITS-RFLPグループ1, S-1はITS-RFLPグループ2, S-32はグループ4に属し、章の実験結果からヘテロカリオン菌株であると推定された。また、これらの菌株は菌糸にクランプが見られた。

## 2) プロトプラスト分離

ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) 上で 1 ヶ月間培養して形成された菌核をジャガイモ煎汁 (PSB) 100ml に接種し, 25 °C で 2 ~ 3 週間振とう培養した (100 往復/分)。菌体を含む培養液をホモジナイザーにかけて磨砕し, 新しい PSB を等量加え, 25 °C でさらに 20 ~ 30 時間振とう培養を行った。これを遠心分離にかけて菌体を集め, MS 溶液 (50mM maleic acid/0.5M sorbitol, pH5.8) (Arima ら, 1995) で 2 回洗浄した。菌体 150mg (湿重) に対して酵素液 (表 13) 1ml を加え, 28 °C で 30 分間処理した後, 氷冷した。プロトプラストを含む酵素液から菌糸片を除くためにコーヒー用ペーパーフィルターで濾過し, 遠心分離 (3000rpm) でプロトプラストを集め, MS 溶液で 3 回洗浄した。プロトプラストの密度を血球計算盤で計数して  $1.0 \sim 3.0 \times 10^5$  個/ml に調製し, 10  $\mu$ l をとって 5ml の再生用培地 (Difco 社 PDA 粉末 39g, ショ糖 180g を蒸留水 1L に加え, オートクレーブにかけた後, 42 °C に保温) に混ぜ, 直径 6cm のペトリ皿に流した。室温 (23 ~ 28 °C) で 50 時間培養し, 単一のプロトプラストから再生した菌糸体を顕微鏡下で確認し, 新しい PDA に移植した。また, プロトプラスト液の一部をとり, 染色液 (50  $\mu$ g/ml ヘキスト 33342 添加 MS 溶液) に 1 分間入れた後, MS 溶液で洗浄して, 蛍光顕微鏡観察 (UV 励起) を行い, 核数を調べた。元株およびプロトプラスト再生株の細胞内の核は菌糸を 50  $\mu$ g/ml ヘキスト 33342 (Nelson, 1994) で染色して観察した。

## 3) 単菌糸分離

S-63 の継代培養中にコロニー生長が元株より遅く, 菌糸にクランプの認められないもの (菌株 63H) が現れた。

担子菌類では菌叢の一部でホモカリオン化あるいは単核化が生じる現象が知られている (Masuda ら, 1995) ため, 63H は S-63 のホモカリオン菌株である可能性が考えられた。

菌叢の形態の変化が雑菌の汚染によるものでないことを確かめるため, 素寒天培地上に生育させたコロニー先端から単菌糸を含む寒天片をメスで切り取り, 新しい培地上に移植した。移植した寒天片に単菌糸のみが含まれていることを顕微鏡下で確認した。

## 4) 核相の比較

プロトプラスト再生株の中でコロニー形態が元株と異なり, 菌糸にクランプのないものを選抜した。選抜した菌株について PCR-RFLP および RAPD 解析を行い, 元株の泳動パターンと比較した。元株と異なる泳動パターンを示した菌株はホモカリオンと見なした。DNA 抽出と RAPD 解析の方法は 4 章の方法に, ITS 領域の PCR-RFLP 解析は 5 章の方法によった。単菌糸分離株でも同様に PCR-RFLP および RAPD を行った。RAPD 解析では泳動パターンが既知の菌株 3-4 (S-52) を対照に用いた。

## (2) 実験結果

## 1) プロトプラスト分離

S-63 を各種の酵素液で処理して得られたプロトプラスト数の違いを表 13 に示す。最も多くのプロトプラストが分離されたのは Nakagawa ら (1989) の酵素液であり, 次いで 1% セルラーゼ + 0.1% キチナーゼであった。しかし, Nakagawa らの酵素液は多くの種類の酵素を必要するために調製に手間がかかり, また, 1% セルラーゼ + 0.1% キチナーゼは処理後 1 時間でプロトプラスト数が激減し

表 13 各酵素液処理によるプロトプラスト形成量

酵素液組成	菌体 0.1g (湿重) から分離されたプロトプラスト数 (個)	
	実験 1	実験 2
1%セルラーゼ YC	$3.25 \times 10^5$	$1.25 \times 10^5$
セルラーゼ YC + 1%ドリセラーゼ	$6.00 \times 10^5$	$4.25 \times 10^5$
1%セルラーゼ YC + 0.1%ザイモリアーゼ 20T	$2.75 \times 10^5$	$6.25 \times 10^5$
1%セルラーゼ YC + 0.1%キチナーゼ	$1.33 \times 10^6$	$3.13 \times 10^6$
1%セルラーゼ YC + 0.1%ペクトリアーゼ	$3.75 \times 10^5$	$6.25 \times 10^5$
1%セルラーゼ YC + 0.1%ノボザイム	$5.50 \times 10^5$	$1.10 \times 10^6$
仲川・山口の酵素液 <sup>a)</sup>	$1.50 \times 10^6$	$1.35 \times 10^6$

a) Nakagawa ら (1989) による。1%セルラーゼ YC, 1%ドリセラーゼ, 0.1%ザイモリアーゼ, 0.1%キチナーゼ, 0.1%ペクトリアーゼ。

た。これらに次いでプロトプラストが安定的に多量に得られた組み合わせは1%セルラーゼ+0.1%ノボザイムであったので、この組み合わせを以下の実験に用いた。

1個のプロトプラストには1~4個の核が含まれていた(図13)。菌糸細胞は通常4~6個の核を持つが、プロトプラスト化する際に1つの細胞がいくつか分割されるため、核数が減少したと考えられる。

S-63のプロトプラスト再生株212菌株の中から、菌叢の生育が元株より遅く、菌糸にクランプの見られないものが8菌株(菌株63-21, 63-40, 63-76, 63-126, 63-136, 63-147, 63-195, 63-205)得られた(図14および15)。S-1, S-26およびS-32のプロトプラスト再生株(それぞれ, 10, 20, 35菌株)は全て元株と同じ形態を示した。

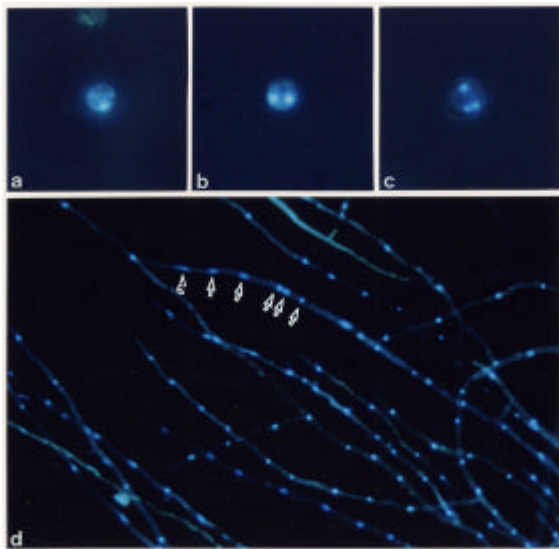


図13 上段：核を蛍光染色したプロトプラスト  
1核(a), 2核(b)および3核(c)  
下段：核を蛍光染色した菌糸(d)  
菌糸先端細胞に6個の核が見られる(矢印)

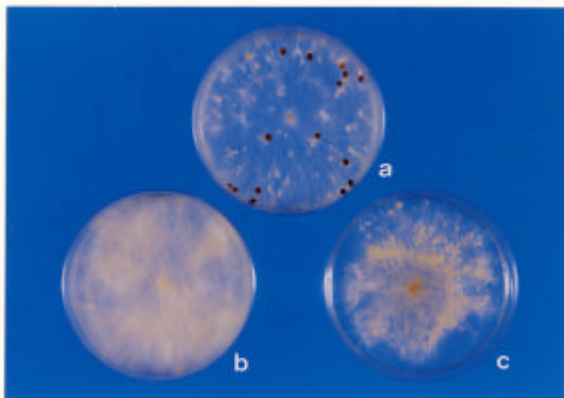


図14 菌株S-63(a), 63-76(b)および63H1(c)の菌叢。PDA平板培地(直径52mm)上で1ヶ月間培養。

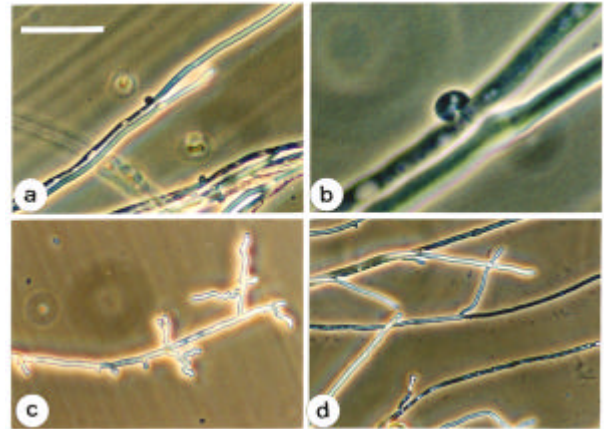


図15 菌株S-63 [ aおよびb(クランプのある部分の拡大図) ]63-76(c)および63H1(d)の菌糸。  
スケールは100 μ m。

菌糸細胞内の核数は元株, プロトプラスト再生株のいずれも4~6個であった。

## 2) 単菌糸分離

63Hの菌糸先端から生長した菌叢(菌株63H1, 63H2および63H3)は全て63Hと同様に, 元株S-63より生育が遅く, 気中菌糸が少なく, 菌糸にクランプは見られなかった(図14および15)。以上のことから63Hの形態的性質は安定しており, 菌株63Hとそれに由来する63H1, 63H2および63H3は同一であると考えられたので, 以下の実験には63H1を用いた。なお, 63H1の菌糸細胞内の核数も多核(4~6個/細胞)であった。

## 3) PCR-RFLP 解析

元株と同じ形態を持つプロトプラスト再生株, クランプを欠くプロトプラスト再生株および単菌糸分離株について, プライマーITS1およびITS4を用いてITS領域を増幅したところ, 全ての菌株で約700bpの単一の増幅産物が見られた。増幅産物の制限酵素処理を行ったところ, 元株と同じ形態を持つプロトプラスト再生株は元株と同じITS-RFLPパターンを示した。クランプを欠くプロトプラスト再生株も, 63-76を除く全てが元株と同じパターンを示した。

元株S-63, プロトプラスト再生株63-76および単菌糸分離株63H1のITS-RFLPパターンはそれぞれ異なった。S-63はITS-RFLPグループ1に属し, *Alu*, *Hpa*, *Rsa* あるいは*Sau3AI*(*Nde*)処理によって, それぞれ, A2, H3, R1およびM2パターンを示したが, 63-76はA2, H1, R0およびM1パターンであり, これは

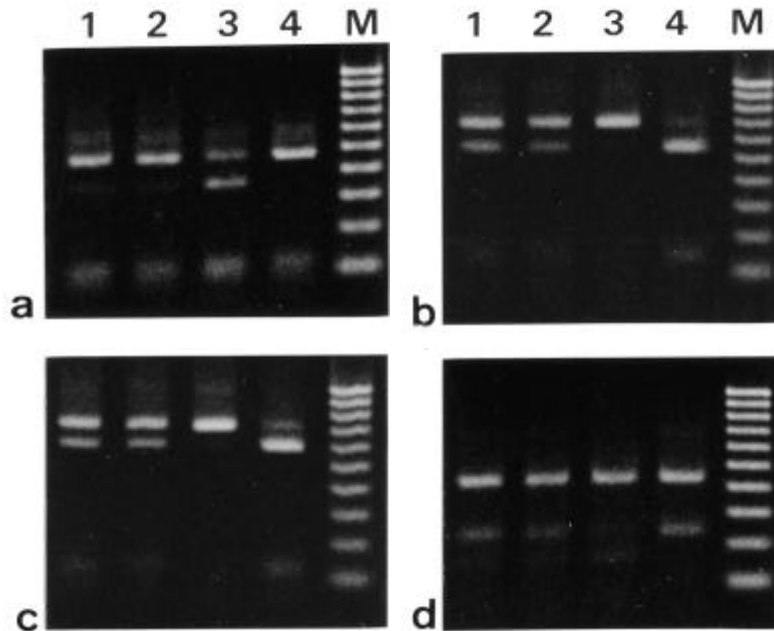


ITS-RFLPグループ 5 に相当した。また, 63H1 は A1, H2, R2 および M4 パターンであり, ITS-RFLPグループ 3 と同じであった (図 16)。これらのことから, 63-76 と 63H1 はそれぞれ異なる核を有するホモカリオン菌株であると考えられた。

#### 4) RAPD 解析

元株の S-63 に比べ, プロトプラスト由来株 63-76 はプ

ライマー OPA-15 を使用した場合約 500bp のバンドを欠き, また, 単菌系分離株 63H1 はプライマー OPA-16 を使用した場合の約 900bp のバンドと OPA-19 の約 800bp のバンドを欠いていた。これらの RAPD マーカーはヘテロカリオン S-63 に含まれる 2 種類の核の片方だけに存在したため, ホモカリオン化によって失われたと考えられる。他のプロトプラスト分離株は元株と全てのプライマーで同じバンドパターンを示した (図 17)。

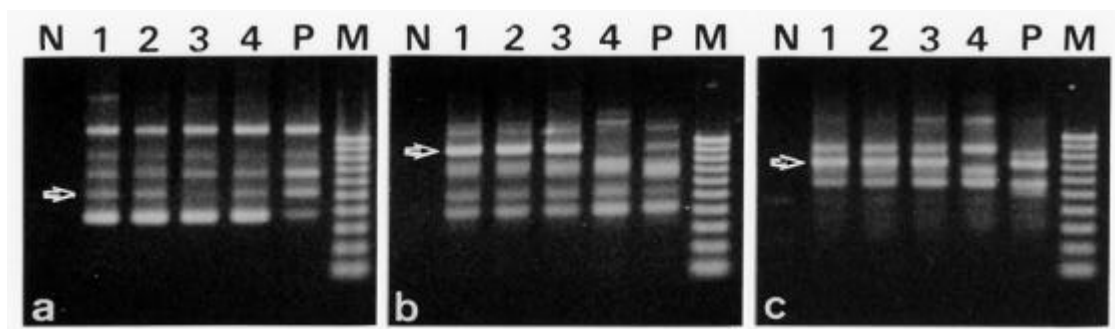


4 種類の制限酵素 *AluI* (a), *HpaI* (b), *RsaI* (c) および *Sau3A* (d) によるパターン。

レーン 1 = S-63, レーン 2 = 63-1, レーン 3 = 63-76, レーン 4 = 63H1

レーン M = 分子量マーカー (100bp ラダー)

図 16 菌株 S-63, 63-76 および 63H1 の ITS 領域の PCR-RFLP



プライマー OPA-15 (a), OPA-16 (b) および OPA-19 (c) によるパターン

レーン N = 対照区 (鋳型 DNA なし), レーン 1 = S-63, レーン 2 = 63-1

レーン 3 = 63-76, レーン 4 = 63H1, レーン P = 対照区 (S-52)

レーン M = 分子量マーカー (100bp ラダー)

図 17 菌株 S-63, 63-76 および 63H1 の RAPD 解析

### 3 ITS 領域塩基配列による系統解析

#### (1) 実験材料および方法

##### 1) 供試菌株

ホモカリオン菌株 63-76, 63H1 およびその元株 (ヘテロカリオン) S-63 を用いた。ホモカリオン化しなかったプロトプラスト分離株 32-32 も供試した。また, ITS-RFLP グループ間の比較のため, S-35 (グループ 1), S-52 (グループ 1), S-1 (グループ 2), S-43 (グループ 2), S-17 (グループ 3), S-32 (グループ 4), S-58 (グループ 4), S-8 (グループ 5), S-11 (グループ 5) も供試した。

##### 2) 直接塩基配列決定法

ダイデオキシ法によって, ITS 領域の PCR 産物の両方向の鎖の塩基配列を決定した。プライマー ITS1 および ITS4 を用い, PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) でシーケンス反応を行った。Applied Biosystems sequencer 373A あるいは 377 型機を使用して配列を解読した。

##### 3) 塩基配列解析

塩基配列の多重整列は GENETYX-WIN 3.2 (Software Development 社) あるいは Clustal X (Gibson ら, 1994) プログラムを用いて行った。近隣結合法による系統樹を PHYLIP 3.573c の NEIGHBOR プログラム (Felsenstein, 1995) を用いて作成し, TreeView PPC 1.5.3 プログラム (Page, 1998) で描画した。系統樹の外群としては, 同じ *Athelia* 属の *Athelia arachnoidea* (Berk.) Julich (不完全時代名: *Rhizoctonia carotae* Rader) の ITS 領域 (Adams ら, 1996) と, さらに Smith-Waterman ホモロジー

検索で菌株 63-76 に最も近かった *Laccariabicolor* [ (Maire) Orton ] (Martin ら, 1997) の ITS 領域の塩基配列データを用いた。

##### (2) 実験結果

S-1, S-32, S-35, S-43, S-52, S-58, S-63 の 7 菌株は塩基配列を決定できなかったが, 63-76, 63H1, S-8, S-11 および S-17 の 5 菌株について, ITS, 5.8s rDNA 遺伝子および ITS を含む ITS 領域の全塩基配列を決定した。菌株 32-32 は読みとり困難な部分もあったが, ほとんどの塩基を決定できた (図 18)。ITS-RFLP グループ 1, 2 および 4 の菌株で塩基配列を決定できなかったのは, ピークが 2 重に現れたためである。S-63 の塩基配列を決定できなかった部分は 63-76 と 63H1 の塩基配列の異なる部分に相当していた (図 19)。

プライマー ITS1 (19 ヌクレオチド) および ITS2 (20 ヌクレオチド) を除いた ITS 領域の全長は 642bp から 645bp で, GC 含量は 36.7% から 37.4% であった。AluI, HpaI, RsaI および Sau3AI (NdeI) の制限酵素認識部位の間隔は, 各菌株の RFLP パターンに現れる制限酵素断片から予想されるものと一致し, Harlton ら (1995) の制限酵素地図ともほぼ一致した (図 18)。

ITS 領域の塩基配列によって 6 菌株は 2 つのクラスターに分けられた (図 20)。一方は S-8, S-11, 63-76 および 32-32 から成り, もう一方は S-17 および 63H1 から成った。2 つのクラスターの遺伝的距離は外群である *A. arachnoidea* (*R. carotae*) あるいは *L. bicolor* との距離に比べて非常に近かった。

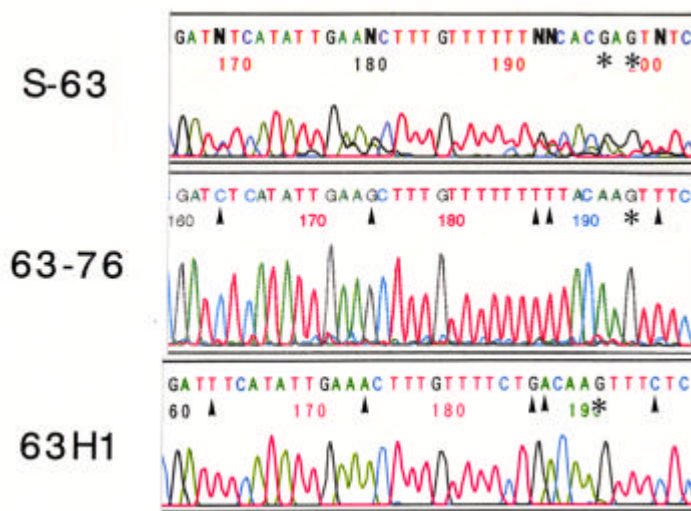
MboI		MboI		AluI	
63-76	1:AAGGATCATTATTGAATTCATATATGCAAGGAGTTGTGCTGGTAATAAATATTGCATGT 60	63-76121:	TGACTATGATTACTCTATATAACTCTTATTGTATGTTACATAGAAGCATCTCATATTGAA180	63-76181:	GCITTTG-TTTTTTTTACAAGTTTCTCTTAATTGAAAAATACACAACCTTTCAACAACGGGA239
63h1	1:.....G.....G.....60	63h1 121:	A.....C.....T.....180	63h1 181:	A.....C.G.....TA.A.....A.....236
S-8	1:.....A.....A.....60	S-8 121:	G.....T.....C.....180	S-8 181:	G.....-T.....T.T.....G.....CA.A.....A.....238
S-11	1:.....A.....A.....60	S-11 121:	G.....T.....C.....180	S-11 181:	G.....-T.....T.T.....G.....CA.A.....A.....238
S-17	1:.....G.....G.....60	S-17 121:	A.....C.....T.....180	S-17 181:	A.....-C.G.....-.....TA.A.....A.....236
32-32	1:.....A.....A.....60	32-32121:	G.....T.....C.....180	32-32181:	G.....TTT.....T.T.....G.....CN.N.....N.....240
AluI				MboI	
63-76	61:GCACACTCTGAAGCTATATAATATATACACCTGTGAACCAACTGTAGTCTGGAGAAATCC120				
63h1	61:.....G.....A.....120				
S-8	61:.....A.....T.....120				
S-11	61:.....A.....T.....120				
S-17	61:.....G.....A.....120				
32-32	61:.....A.....T.....120				



63-76 240: <u>TCTCTTGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA</u> 299	63-76420: GGATGTGAGAGTTGCTAGTTA-AG-A-ATATCTGACTGGCTCTCTTAAACTATTAGTA 476
63h1 237: <u>.....</u> 296	63h1 417: <u>.....G...G..T.T..</u> 475
S-8 239: <u>.....</u> 298	S-8 419: <u>.....A.....-..-..A.....</u> 475
S-11 239: <u>.....</u> 298	S-11 419: <u>.....A.....-..-..A.....</u> 475
S-17 237: <u>.....</u> 296	S-17 417: <u>.....G...G..T.T..</u> 475
32-32 241: <u>.....</u> 300	32-32421: <u>.....A.....-..-..A.....</u> 477
HpaI	
63-76 300: GAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAGGGGC359	63-76477: GGACATATAGAAATGCCTGCGGTTGGTGTGATAATATGTCTACGCTATACC--AAAGGG 534
63h1 297: <u>.....A.....</u> 356	63h1 476: <u>.....G.....A.....</u> <u>..GG..G..</u> 535
S-8 299: <u>.....A.....</u> 358	S-8 476: <u>.....A.....G.....</u> <u>---A...</u> 533
S-11 299: <u>.....A.....</u> 358	S-11 476: <u>.....A.....G.....</u> <u>---A...</u> 533
S-17 297: <u>.....A.....</u> 356	S-17 476: <u>.....G.....A.....</u> <u>..GG..G..</u> 535
32-32 301: <u>.....N.....</u> 360	32-32478: <u>.....A.....G.....</u> <u>---A...</u> 535
AluI RsaI	
63-76 360: ATGCCTGTTTGAGAGTCATTAATCTCAACCTTACAATAATTTTGTATTTGTCAAGGCTT419	63-76535: GATTCTAGCTTGTATGCACTACTTATAAAATCATGCCATATATCTAGCATATAAGTCA 594
63h1 357: <u>.....</u> 416	63h1 536: <u>.....T.....</u> 595
S-8 359: <u>.....</u> 418	S-8 534: <u>.....C.....</u> 593
S-11 359: <u>.....</u> 418	S-11 534: <u>.....C.....</u> 593
S-17 357: <u>.....</u> 416	S-17 536: <u>.....T.....</u> 595
32-32 361: <u>.....</u> 420	32-32536: <u>.....C.....</u> 595
63-76595: TATATTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAA 644	
63h1 596: <u>.....A.....</u> 645	
S-8 594: <u>.....-.....</u> 642	
S-11 594: <u>.....A.....</u> 643	
S-17 596: <u>.....A.....</u> 645	
32-32596: <u>.....A.....</u> 645	

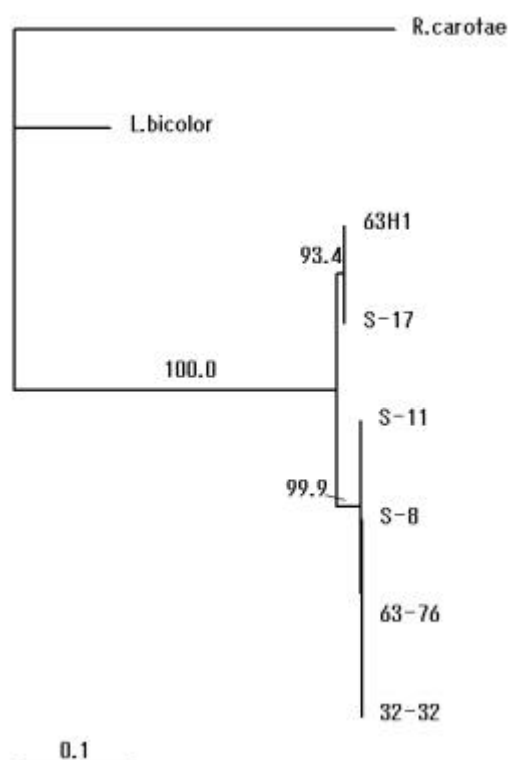
制限酵素 *Alu* , *Hpa* , *Rsa* および *Mbo* ( *Nde* , *Sau3A* ) の認識配列に下線を付した。  
 ドット ( . ) は保存された塩基, ダッシュ ( - ) は欠失, N は決定されなかった塩基を表す。  
 63-76 の DDBJ ( DNADatabank of Japan ) 登録番号は AB042626

図 18 各菌株の ITS 領域の塩基配列



S-63 の 169, 180, 192, 193 および 203 の位置に現れた二重のピーク ( 矢印 ) は 63-76 と 63H1 の塩基が異なる部分に相当する。また, 欠失・挿入によって 63-76 と 63H1 の間にずれが生じた直後の位置に, S-63 では G ( グアニン, \* 印 ) が 2 回繰り返された。

図 19 菌株 S-63 の塩基配列解析中に現れた二重のピーク



Kimuraの2パラメーターモデルを用いた近隣結合法によって作成。  
 外群として *Laccariabicolor* の菌株 S238N (Martinら, 1997) および *Fiblarhizoctonia carotae* (*Rhizoctonia carotae*, 完全時代名は *Athelia arachnoidea*) の菌株 ATCC10866 (Adamsら, 1996) を用いた。  
 分岐に付した数値はブーストラップ検定による (50%)。スケールは遺伝的距離 (0.1 塩基置換 / サイト) を表す。

図20 ITS領域の塩基配列に基づく系統樹

#### 4 考察

*S. rolfisii* のITS領域はその塩基配列を決定できないこと (Nalimら, 1995; Adamsら, 1996) およびPCR-RFLPパターン ( 章) から異なるタイプのものが混在すると推察された。本実験の塩基配列解析の際にも、ヘテロカリオンと思われるITS-RFLPグループ1, 2および4の菌株では2重のピークが現れたことから、これらの菌株の中には異なる塩基配列を持つITS領域が混在すると考えられた。ヘテロカリオン菌株であるS-63から分離された2つのホモカリオン菌株, 63-76と63H1ではITS領域の塩基配列を決定することができた。このことからそれぞれのタイプのITS領域は異なる核に存在していたことが示された。

63-76のITS領域の配列は菌株S-8およびS-11(ともにITS-RFLPグループ5)の配列と99%以上の相同性を示し 63H1はS-17(グループ3)の配列と同一であっ

た。これはH3パターンがH1パターンとH2パターンを合わせたもの、また  $R1 = R0 + R2$ ,  $M2 = M1 + M4$  であると推測したこと ( 章) と一致した。一方, 63-76と63H1の相同性は96.3%であり、元株S-63に含まれる2種類のITS領域が異なることを示した。これらのことからグループ1がグループ5とグループ3の菌系融合によって生じたヘテロカリオンである可能性も考えられる。

ヘテロカリオンの菌株の中に異なる2つのタイプのリボソームRNA遺伝子が存在し、それぞれのタイプが異なる核に位置する現象は、*Laccariabicolor* においても報告されている (Selosseら, 1996; Martinら, 1999)。 *L. bicolor* の菌株S238Nは長さの異なる2つのタイプのIGS (intergenicspacer) 領域を持ち、S238Nから得られたモノカリオン菌株の多くはいずれか片方のタイプを持っていた。また、一部のモノカリオン菌株は両方のタイプのIGS領域を持ち、ゲノム中に多数存在するリボソームRNA遺伝子コピーの一部で組み換えが生じたことが示唆された。

*S. delphinii* においてもITS領域の反復コピー中に塩基配列がわずかに異なるものが混在することが知られている。Harltonら (1995) の制限酵素地図にITS領域の205番目の塩基 (プライマー部分を除いて186番目の塩基) 付近にある *Alu* 認識部位は全てのa-1タイプ (A2パターンを示す菌株に含まれる2つのタイプのITS領域の中の1つ) の反復コピーに存在するわけではないことが述べられている。今回の結果からも *S. rolfisii* のホモカリオン菌株63-76のITS領域の反復コピー中に異なる配列を持つものが混在すると考えられた。63-76の *Alu* パターンはA2で、これは180番目の塩基から始まる4塩基が *Alu* に認識されるものと認識されないものが混在することを示す。ITS領域のコピー中に異なる配列を持つものが混在していたにもかかわらず、63-76の塩基配列が決定できたのは、おそらく、片方の塩基配列のコピー数がもう一方に比べて多く、多い方の塩基配列が解読されたためと思われる。同様に、ヘテロカリオンのプロトプラスト再生株32-32においても何らかの理由でPCR産物中に片方のタイプの塩基配列のITS領域がより多く含まれ、その配列が解読されたと考えられる。

多くの生物種においてリボソームRNA遺伝子のITS領域は同種の個体間で、また同一個体内のコピー間で極めて類似している (Avice, 1994)。この現象は協調進化と呼ばれ、有性生殖に伴う減数分裂の際の不等交叉と遺伝子変換によって生じるとされる (Liら, 1991)。しかし、接合菌および子のう菌の一部 (Hijriら, 1999; Sanders,

1999; Pringleら, 2000; O'Donnell, 1992; O'Donnellら, 1997) において同種の菌株間あるいは同一菌株内でのITS領域の多型が報告されている。このことはこれらの菌の祖先においてITS領域の塩基配列の異なる近縁種間の交雑が起こったことを示唆する (O'Donnellら, 1997)。そして、同一菌株内に異なるITS領域が共存する状態が現在に至るまで保存されてきたのは、これらの菌が有性生殖をほとんど行わないために協調進化の機構が作用しなかったからであると考えられている (Sanders, 1999)。

今回の実験結果から *S. rolfsii* のITS領域も協調進化の例外の1つであることが明らかになった。*S. rolfsii* およびその近縁種である *S. delphinii* の系統進化には従来の集団遺伝学や系統分類学の理論を単純に適用することはできないことを考慮し、これらの菌の系統分類学的位置を再検討する必要がある。

## 交配と菌糸融合

### 1 緒言

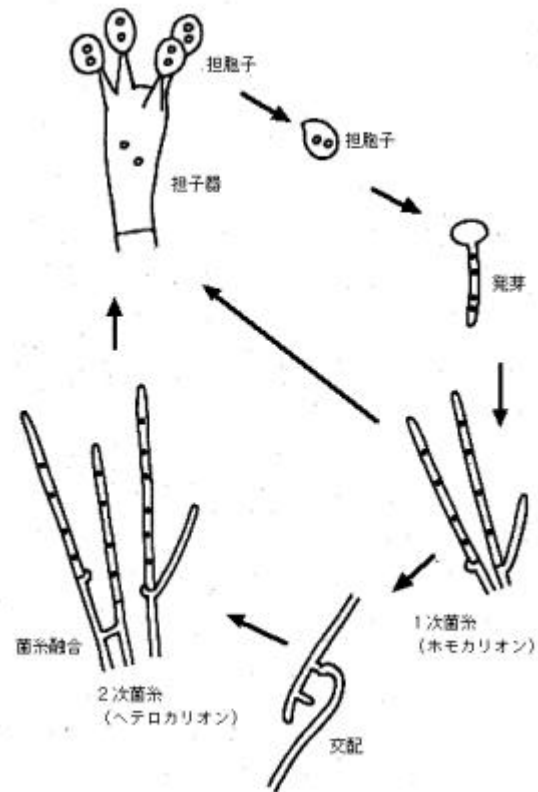
ITS-RFLPグループ1の菌株がグループ3と同じITS領域を持つ核とグループ5に近いITS領域を持つ核を併せ持つことから、異なるグループ間で交配 (図21) が行われる可能性が示唆された。担子菌類の交配は2つの一核体 (またはホモカリオン) の間で、あるいは一核体と二核体 (またはホモカリオンとヘテロカリオン) の間 (Buller, 1931; 亀本ら, 2000) で行われる。交配には1~3の遺伝因子が関与し、異なる対立遺伝子を持った核が交換される (Webster, 1980; Casseltonら, 1994)。 *S. rolfsii* では交配に関する遺伝因子の数は決定されていない。後藤 (1952) は2つの遺伝因子 (4極性) による説明を試みたが、 *S. rolfsii* の交配和合性を完全には説明できなかった。Punjaら (1983A) も担子孢子由来菌株間の交配を試みたが、120組の交配の中からわずか6つのヘテロカリオン菌株しか得られなかった。

交配と類似した現象として、二核体間、またはヘテロカリオン菌株間の菌糸融合がある (図21)。菌糸融合は通常、同一菌叢内の菌糸間で (あるいは、同一菌株を対峙培養した場合、2つの菌叢の菌糸の間で) 観察され (横山ら, 1983; Yokoyamaら, 1985)、物質輸送のための菌糸のネットワークを構築する役割を持つと考えられている (Gregory, 1984)。異なる菌株間でも菌糸融合は起こるが、多くの場合、融合した菌糸細胞が壊死するため (Yokoyamaら, 1986)、菌株間での細胞質や核の交換は

行われない (Rayner, 1991)。しかし、まれに、ヘテロカリオン菌株の菌糸の一部がホモカリオン化し、異菌株との菌糸融合後も細胞が生存して、核の交換が行われることもある (Hansenら, 1993)。

菌糸融合後の細胞死を決定する機構はまだほとんど解明されていない (Julianら, 1996) が、いずれにせよ、異種間では菌糸融合は見られない (Gregory, 1984)。このことは、一部の糸状菌の分類基準として重視されてきた。*Rhizoctonia solani* Kuhn (完全時代名: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) は宿主範囲、病徴およびDNA配列の相同性などから (Carlingら, 1990; Liuら, 1993; Vilgalysら, 1994; Kunitagira, 1997; Hyakumachiら, 1998; Salazarら, 2000)、異なるいくつかの生物学的種の集合体、すなわち複合種 (species complex) と考えられている (国永, 1997) が、その複合種内の分類に菌糸融合の有無が利用されている (生越, 1976; Ogoshi, 1987; Carling, 1996)。

*S. rolfsii* では、異なるMCGの菌株の対峙で細胞死が



担子器および担孢子は2核、1次菌糸 (ホモカリオン) および2次菌糸 (ヘテロカリオン) は多核。  
1次菌糸はまれにクランプを有し、また、完全時代を形成する (Punjaら, 1983A)。

図21 *S. rolfsii* の生活環

観察され、また、同一MCGに属する菌株間では細胞死を伴わずに菌叢が混じり合うことが知られている（Punjaら、1983B）。しかし、*S.rolfsii*と*S.delphinii*の間の菌系融合の有無については不明である。

本章では、章の2つのホモカリオンの菌株間で交配が行われるか、また、ホモカリオン菌株と他の菌株（多くはヘテロカリオン）との間で交配が見られるかを調べた。さらに、異なるITS-RFLPグループ間での菌系融合の有無（Okabeら、1998）、および日本の菌株と外国産*S.rolfsii*あるいは*S.delphinii*との菌系融合についても調べた。

## 2 ホモカリオン菌株と他菌株との交配

### (1) 実験材料および方法

ホモカリオン菌株 63-76 とホモカリオン菌株 63H1、および 63-76 と 章の 67 菌株（S-1 から S-67）を対峙させた。また、菌株 63H1 と S-63 も対峙させた。PDA 平板上で前培養した菌叢の周縁部から直径 0.5cm のコルクボーラーで含菌寒天を打ち抜き、新しい PDA 平板上に約 2.5cm 離して対峙させ、28℃ 暗黒下で 2 週間培養した。

交配の有無は、PDA 上に対峙させた 2 つの菌株の間に房状の菌糸（tuft）が出現するか否か（Julianら、1996）によって、また、2 つの菌叢の接触部の付近から寒天片をとって新しい PDA 上で培養し、両者とは異なる形態の菌叢が生じるか否かによって判定した。

### (2) 実験結果

全ての組み合わせで房状の菌糸は生じなかった。63-76 × 63H1 を含むほとんどの組み合わせで MCG が異なることを示す境界線が現れたが（図 22）、63-76 と S-17、S-32、S-43、S-52 および S-63（元株）との菌叢の

間の境界は不明瞭であった。

対峙させた 2 つの菌叢の接触部付近からとった寒天片から生じた菌叢は対峙させた菌株のいずれか一方と同じ形態を示した。

## 3 日本産菌株間の菌系融合反応

### (1) 実験材料および方法

#### 1) 供試菌株

各 ITS-RFLP グループの代表菌株を総当たりで対峙培養を行った。グループ 1 の S-30、S-35、S-54、グループ 2 の S-1、S-18、S-43、グループ 3 の S-17、グループ 4 の S-32、S-37、S-41、S-58 およびグループ 5 の S-11、S-19、S-40 の計 14 菌株を供試した。

#### 2) 顕微鏡観察

透析用セルロースチューブ（Dialysis Membrane 36/32、Viskase 社）を水洗し、水を取り替えながら煮沸を繰り返して、一辺 3.5cm の正方形に切り分け、蒸留水とともにオートクレーブで滅菌した。滅菌セルロースチューブ片を 1.5% 寒天培地の上に置き、PDA 培地上に生育させたコロニーの周縁部からとった含菌寒天をセルロース上に約 2cm 離して置いた。対峙培養を始めてから 2 週間まで、毎日、明視野および位相差顕微鏡観察を行った。

### (2) 実験結果

対峙させた菌株の菌叢は培養 1 ~ 2 日後に接触し、菌系融合が見られた。培養 3 ~ 4 日後に対峙させた菌叢は重なりあった（図 23）。接触した菌糸細胞（図 24）は融合 1 ~ 2 日後に壊死し、ついで周辺の細胞も壊死した。培養 5 日後から 14 日後に、菌叢の重なり合った部分の菌糸細胞の大部分が壊死し、境界線が形成された（図 23）。



図 22 ホモカリオン菌株 63-76 (左) と 63H1 (右) の対峙培養

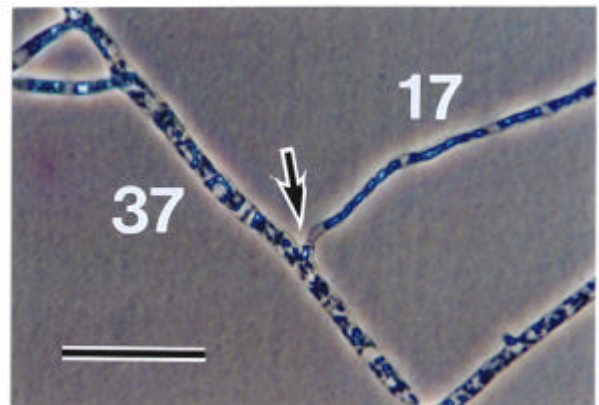


図 24 菌株 S-17 (グループ 3) と菌株 S-37 (グループ 4) の菌系融合 (位相差顕微鏡観察) スケールは 30 μm



図 23 菌株 S-54 (グループ 1, 左) と S-35 (グループ 1, 右) の対峙培養

- a) 培養 2 日後。菌叢が互いに接触する。
  - b) 培養 4 日後。菌糸が互いに入り交じる。
  - c) 培養 6 日後菌叢の接触した部分の細胞が壊死し、境界線が形成される。
- スケールは 400 μ m。

表 14 日本産白絹病菌の各 ITS-RFLP グループの菌株間の菌糸融合反応

	グループ 1			2			3			4				5		
	S-30	35	54	1	18	43	17	32	37	41	58	11	19	40		
S-30	++															
35	+	++														
54	+	+	++													
1	+	+	+	++												
18	+	+	+	+	++											
43	+	+	+	+	+	++										
17	+	+	+	+	+	+	++									
32	+	+	+	+	+	+	+	++								
37	+	+	+	+	+	+	+	+	++							
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++						
58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++					
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++				
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++			
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++		

- ; 融合が確認されない。  
 + ; 融合後、細胞が壊死する。  
 ++ ; 融合後も細胞は生存。

この反応は同一菌株同士の対峙を除く全ての組み合わせで見られた (表 14)。

**4 外国産 *S. rolfsii* および *S. delphinii* と日本産菌株の菌糸融合反応**

(1) 実験材料および方法

日本の ITS-RFLP グループ 1, 2, 4 および 5 の代表 1 菌株 (表 15), 外国産 *S. rolfsii* の 4 菌株 1003, WM909, 156 および WM913 を用いた。これらの外国産菌株は Punja 博士より分譲されたもので、それぞれ ITS-RFLP グループ , , および に属した (Harlton ら, 1995)。さら

に *S. delphinii* の 2 菌株 (Punja 博士より分譲された菌株 W10 および 196) を加え、総当たりで対峙培養した。菌糸融合の観察法は前述の通りである。

(2) 実験結果

菌株 196 (*S. delphinii*) と菌株 S-58 (グループ 4) を除く、異菌株間の組み合わせの全てで不完全融合が観察された (図 25)。また、S-58 と S-11 を除く全ての self-pairing (同一菌株同士の対峙) で完全融合が観察された (表 15)。196 × S-58, S-58 × S-58 および S-11 × S-11 の組み合わせでは、双方の菌糸が複雑に混じり合い、菌糸がどち



表15 外国産 *S. rolfsii*, *S. delphinii* および日本産白絹病菌株の菌系融合反応

	WM				<i>S. delphinii</i>		1	2	4	5
	1003	909	156	913	W10	196	S-63	S-43	S-58	S-11
1003	++									
WM909	+	++								
156	+	+	++							
WM913	+	+	+	++						
W10	+	+	+	+	++					
196	+	+	+	+	+	++				
S-63	+	+	+	+	+	+	++			
S-43	+	+	+	+	+	+	+	++		
S-58	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
S-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

- ; 融合が確認されない。  
 + ; 融合後、細胞が壊死する。  
 ++ ; 融合後も細胞は生存。

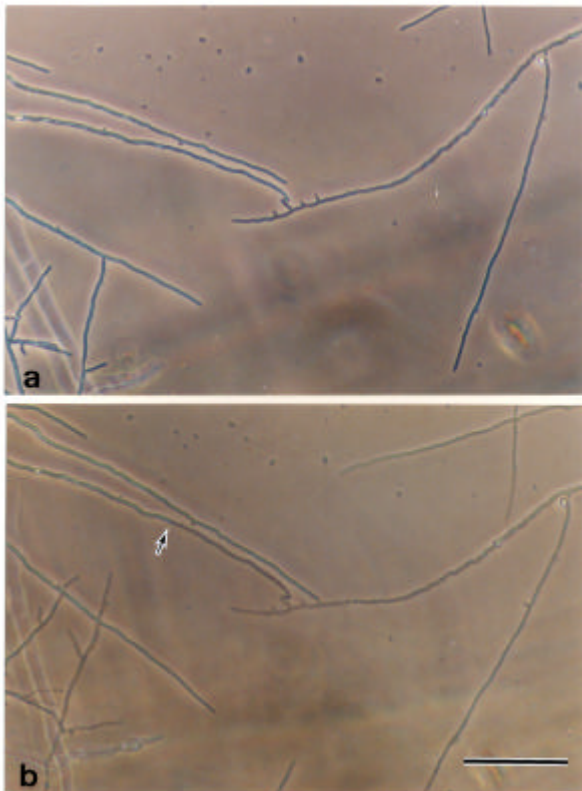


図25 a) : 菌株 S-58 (グループ4, 右)と WM909 (外国産 *S. rolfsii*, 左) の菌系融合。  
 b) : 1 日後, 融合部の WM909 の細胞 (矢印より先端まで) が壊死。  
 スケールは 100 μm

らのものか判別不可能であった。

### 5 考察

今回の実験ではホモカリオン菌株 63-76 と 63H1 の交配によって S-63 に相当するヘテロカリオン菌株を再形成することはできなかった。また、ホモカリオン菌株とヘテロカリオン菌株の交配も行われなかった。Punjaら (1983 A) は *S. rolfsii* のホモカリオン菌株間の交配を行ったが、ヘテロカリオン菌株が形成されたのは 120 組中 6 組と極めて低率であったことから *S. rolfsii* のヘテロカリオン形成は他の担子菌類の交配システムとは異なると述べている。したがって、今回の実験でヘテロカリオン菌株が生じなかったことも交配遺伝子以外に菌株間の核の交換を妨げる要因が存在したためである可能性がある。

また、Punjaら (1983B) は、同じ親株に由来する担子胞子由来株間の組み合わせの 80 ~ 92%, 親株が異なる担子胞子由来株間の組み合わせの 86% が菌叢間に境界線を生じ、担子胞子由来株と親株を対峙させた場合には全ての組み合わせで境界線が生じたと報告した。今回の実験でもホモカリオン菌株 63-76 とほとんどの菌株の間に境界線が現れ、63H1 と S-63 の間にも明瞭な境界線が見られたが、63-76 と S-63 の間の境界線は不明瞭であった。*S. rolfsii* の体細胞和合性グループ (MCG) を決定する遺伝的な仕組みはまだ解明されておらず (Punjaら, 1983B), 今回の実験結果も解釈が困難である。

菌系融合では全ての ITS-RFLP グループ間で融合が観

察され、5つのグループが1つの菌系融合群に含まれることがわかった。さらに、外国産*S.rolfsii*と日本の白絹病菌、外国産*S.delphinii*と日本の白絹病菌、外国産*S.rolfsii*と外国産*S. delphinii*の間でも菌系融合が見られ、これらが全て*R. solani*の菌系融合群に相当する1つのグループに属すると考えられ、生物学的に同一種である可能性が示された。

異菌株間の融合の場合、*R. solani*では接触した菌系細胞が融合後1時間以内に壊死する(Yokoyamaら,1986)のに対して、*S.rolfsii*あるいは*S. delphinii*では菌系が接触してから壊死までに約24時間かかった。同様にPunjaら(1983B)も*S.rolfsii*では対峙培養開始後96時間で細胞死が見られると報告した。白絹病菌では菌系融合後しばらくは菌系細胞が生存しているが、しかし、壊死するまでの期間に、対峙させた菌株間で細胞質の接触あるいは核の交換があるか否かは不明である。

## 総合考察

日本の白絹病菌には大きく分けて2つのタイプが存在する。西南暖地に分布し、従来から白絹病菌の性質として知られている特徴(夏から初秋、マメ科作物などに発生)を持つものと、北陸・東北・北関東の寒冷地に分布し、春から初夏にかけてチューリップなどの花卉類に発生するものである。前者はリボソームRNA遺伝子のITS領域のPCR-RFLP解析によってグループ1あるいは2に分類され、後者はグループ4および5に属した。この他、石川県にはITS-RFLPグループ3が存在した。

菌核の形態とITS-RFLPパターンにおいてグループ1および2はアメリカ合衆国南部およびインドネシアの*S. rolfsii*に類似し、グループ4および5はアメリカ合衆国北部およびカナダの*S. delphinii*と類似した。しかし、菌核の形態は生育条件によって変化するため、グループ間の区別の指標として明確でない場合があった。また、グループ1のRFLPパターンはグループ3とグループ5のパターンを合わせたものと見なすことができ、グループ1の菌株はグループ3と同じ塩基配列のITS領域とグループ5と同じタイプのITS領域を併せ持つと考えられた。グループ間の交配は確認できなかったが、5つのグループは互いに菌系融合し、外国産*S.rolfsii*および*S. delphinii*とも菌系融合した。

以上の実験結果から、日本の寒冷地に分布するグループ4および5の白絹病菌はアメリカ合衆国北部およびカ

ナダに発生する*S. delphinii*に相当することが明らかになった。しかし、グループ4、5とグループ1、2あるいは外国産*S.rolfsii*との間に明瞭な境界線を引くことはできない。欧米においては多くの研究者が*S.rolfsii*と*S. delphinii*との形態的な違いを重視して別種としているが、Boeremaら(1988)は*S. delphinii*を*S.rolfsii*の変種とみなし、*S.rolfsii*を*S.rolfsii* var. *rolfsii*とし、*S. delphinii*を*S.rolfsii* var. *delphinii*とすることを提案した。本研究の結果からも*S. rolfsii*と*S. delphinii*は生物学的に同一種であると考えられた。

これまでに、*S.rolfsii*と*S. delphinii*は系統的に非常に近いと考えられてきた。Harltonら(1995)は、*S.rolfsii*、*S. delphinii*および*Sclerotium coffeicola* Stahel、*Athelia*属菌数種のITS領域を比較し、*S.rolfsii*と*S. delphinii*のITS領域の長さが同じであるのに対して、他の菌は異なることを示した。また、*Alu*、*Hpa*、*Mbo*の3つの制限酵素では*S.rolfsii*の一部のグループと*S. delphinii*に共通のパターンが認められた。形態についても両菌の区別が必ずしも明瞭でない事例があり、フィリピン産の*S. rolfsii*菌株から大型の菌核を形成する突然変異体が得られた例(中田,1927)、培地のグルコース濃度を増すことによって*S.rolfsii*の菌核が大型化した例(Curzi,1932)、あるいは*S.rolfsii*の担子孢子由来株の中に*S. delphinii*に近い形態のものが得られた例(West, 1947)等の報告がある。

Curzi(1931)はイタリアの*S.rolfsii*菌株に比べて中田(1926)およびGoto(1930)の菌株が*S. delphinii*に近いことを示唆したが、本研究においてもITS-RFLPグループ1と4の生育適温および菌核の形態の差異はPunjaら(1996)の報告に比べて小さかった。日本のグループ1はアメリカ合衆国南部の*S.rolfsii*に比べて、高温域での生育が劣る。また、日本のグループ4はアメリカ合衆国北部の*S. delphinii*の記載に比べて、菌核が小さい場合があり、形態学的には*S.rolfsii*に近い。以上のことから、*S. rolfsii*と*S. delphinii*の形態的差異には明瞭な境界がなく、日本の菌株は両者のほぼ中間に位置すると考えられる。

*S.rolfsii*および*S. delphinii*の両者を合わせると白絹病菌の分布域は全世界の温帯から熱帯にかけての広範な地域になる。このようにさまざまな生育環境に適応できるのは、白絹病菌に多様な変異が発達し、それぞれの地域に*S.rolfsii*および*S. delphinii*という形態的・生理的に異なるグループが存在するためと考えられる。

## 謝 辞

本研究を行うに当たり、当初から御指導くださった農業環境技術研究所微生物生態ユニット長 松本直幸博士、常に有益な御助言をくださった石川県農業総合研究センター病害虫防除室 森川千春氏、名城大学農学部 荒川征夫博士に深く感謝の意を表します。また、実験に際して御教示をいただいた農業技術研究機構北海道農業研究センター畑作研究部 横山和成博士、中央農業総合研究センター病害防除部 仲川晃生氏、広島県立大学生物資源学部教授 森永 力博士、広島県立大学生物資源学部 会見忠則博士、スミリン農産工業株式会社 伊藤花子氏、研究を行うに当たって御助力くださった谷口和子氏、久保和子氏に感謝いたします。本研究に供試した菌株を分譲してくださった農業技術研究機構九州沖縄農業研究センター 中島 隆博士、栃木県農業試験場応用生物研究室 長石川成寿氏、埼玉県農林総合研究センター園芸支所生産環境担当 庄司俊彦氏、東京都農業試験場八丈島園芸技術センター 竹内 純氏、千葉県農業総合研究センター暖地園芸研究所 植松清次氏、農業技術研究機構花き研究所 築尾嘉章博士、同所 手塚信夫博士、農業生物資源研究所ジーンバンク 佐藤豊三博士、農業生物資源研究所生理機能研究グループ 本村知樹博士、農林水産ジーンバンク、サイモン・フレーザー大学環境生物学研究所 長 Zamir K. Punja 博士に厚くお礼を申し上げます。本報告の作成に当たって、懇切な御指導をいただいた岐阜大学農学部教授 百町満朗博士、同大学流域環境研究センター教授 小泉博博士、信州大学農学部教授 大政正武博士、静岡大学農学部教授 露無慎二博士に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Adams, G. C. and B. R. Kropp (1996) : *Athelia arachnoidea*, the sexual state of *Rhizoctonia carotae*, a pathogen of carrot in cold storage. *Mycologia*, **88**, 459-472
- 2) Anagnostakis, S.L. and J. Kranz (1987) : Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. *Phytopathology*, **77**, 751-754
- 3) Arima, T. and T. Morinaga (1995) : Inheritance of chromosomal length polymorphisms in *Coprinus cinereus*. *Mycoscience*, **36**, 9-15
- 4) Avise, J. C. (1994) : Molecular markers, natural history and evolution, p.1-511, Chapman & Hall, New York
- 5) Aycock, R. (1966) : Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. *N.C. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* **174**, 1-202
- 6) Backman, P. A. and T. B. Brenneman (1997) : Stem rot. In: Kokalis-Burelle, N., D.M. Porter, R. Rodriguez-Kabana, D. H. Smith and P. Subrahmanyam [eds.] Compendium of peanut diseases. 2nd ed., p.36-37, APS Press, St. Paul
- 7) Backman, P.A. and R. Rodriguez-Kabana (1981) : Using the soil-tray technique to predict the incidence of *Sclerotium* rot in sugarbeets. *Plant Disease*, **65**, 419-421
- 8) Beute, M. K. and R. Rodriguez-Kabana (1979) : Effect of wetting and the presence of peanut tissues on germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* produced in soil. *Phytopathology*, **69**, 869-872
- 9) Beute, M. K. and R. Rodriguez-Kabana (1981) : Effect of soil moisture, temperature, and field environment on survival of *Sclerotium rolfsii* in Alabama and North Carolina. *Phytopathology*, **71**, 1293-1296
- 10) Boerema, G. H. and M. E. C. Hamers (1988) : Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 3a: Fungion bulbs: Liliaceae. *Neth. J. Plant Pathol.*, **94** Supplement 1, 1-32
- 11) Bruns, T.D., T.J. White and J.W. Taylor (1991) : Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **22**, 525-564
- 12) Buller, A. H. R. (1931) : Researches on fungi. volume **4**, p.187-293, Longmans, Green and Co, London
- 13) Carling, D. E. (1996) : Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S. and Neate, S. [eds.] *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control, p.37-47, Kluwer Academic Publishers, Netherland
- 14) Carling, D.E. and S. Kuninaga (1990) : DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn:



- Inter- and intragroup relatedness of anastomosis group-9. *Phytopathology*, **80**, 1362-1364
- 15) Casselton, L. A. and U. Kues (1994) : Mating-type genes in Homobasidiomycetes. In: Esser, K. and Lemke, P. A. [eds.] *The mycotavolume 1*, p. 307-321, Springer-Verlag, Berlin
- 16) Chen, L. C., T. Z. Chen, R. C. Yu, Y. W. Chung and E. Yeh (1997) : Development and analysis of DNA probe of *Sclerotium rolfsii*. *Plant Pathol. Bull.*, **6**, 181-190
- 17) Chen, R. -S. and B. A. McDonald (1996) : Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics*, **142**, 1119-1127
- 18) Chet, I. (1975) : Ultrastructural basis of sclerotial survival in soil. *Microb. Ecol.*, **2**, 194-200
- 19) Chowdhury, N., T. K. Dey and A. L. Khan (1993) : Effect of culture media, light, temperature and pH on the mycelial growth and sclerotia formation of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Bangladesh J. Bot.*, **22**, 149-153
- 20) Cilliers, A. J., L. Herselman and Z. A. Pretorius (2000) : Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. *Phytopathology*, **90**, 1026-1031
- 21) Curzi, M. (1931) : Alcuni casi di 'cancrena pedale' da 'Sclerotium' osservati in Italia. *Rendic. R. Accad. Lincei, xiv, Ser.*, **5-6**, 233-236 (*Rev. Appl. Mycol.*, **11**, 405-406)
- 22) Curzi, M. (1932) : Studi su *Sclerotium rolfsii*. *Bollettino della R. Stazione di patologia vegetale Nuova, Serie* **6**, 306-373
- 23) Desai, S. and E. Schlosser (1999) : Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma*. *Indian Phytopath.*, **52**, 47-50
- 24) Earnshaw, D. and G. J. Boland (1997) : Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathol.*, **46**, 229-238
- 25) Felsenstein, J. (1995) : PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.573c. University of Washington, Seattle.
- 26) Gardes, M. and T. D. Bruns (1993) : ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, **2**, 113-118
- 27) Gazaway, W. S. and A. K. Hagan (1989) : *Sclerotium blight*. In: Sinclair, J. B. and P. A. Backman [eds.] *Compendium of soybean diseases*. 3rd ed., p. 48-49, APS Press, St. Paul
- 28) Gibson, T. J., D. G. Higgins and J. D. Thompson (1994) : CLUSTALX. EMBL, Heidelberg
- 29) Ginns, J. (1998) : Genera of the North American Corticiales sensu lato. *Mycologia*, **90**, 1-35
- 30) 権藤道夫 (1961) : 土壤病原菌の生態学的研究 第4報 白絹病菌に対する土壌諸要素の影響. 鹿児島大学農学部学術報告, **10**, 23-27
- 31) 権藤道夫 (1964) : 土壤病原菌の生態学的研究 第8報 自然土壌における白絹病菌に対する土壌諸要素の影響. 鹿児島大学農学部学術報告, **14**, 61-67
- 32) Goto, T. (1930) : On the perfect stage of *Sclerotium rolfsii* Sacc. produced on culture media. 熱帯農学会報, **2**, 165-175
- 33) 後藤和夫 (1952) : 完全時代に於ける *Sclerotium rolfsii* 菌特にその遺伝, 一次世代の形態, 環境と完全時代形成の関係及び菌に対する完全時代の意義について. 東海近畿農業試験場特別報告 栽培部, **1**, 1-82
- 34) Gregory, P. H. (1984) : The fungal mycelium: an historical perspective. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **82**, 1-11
- 35) Hansen, E. M., J. Stenlid and M. Johansson (1993) : Somatic incompatibility and nuclear reassortment in *Heterobasidion annosum*. *Mycol. Res.*, **97**, 1223-1228
- 36) 羽山 潔, 寺中理明, 奥田誠一, 夏秋知英 (1984) : 各種植物から分離した白絹病菌の形態および病原性の比較と分類学的考察. 日植病報, **50**, 403
- 37) Harlton, C. E., C. A. Levesque and Z. K. Punja (1995) : Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology*, **85**, 1269-1281
- 38) Henis, Y., J. A. Lewis and G. C. Papavizas (1984) : Interactions between *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* spp.: relationship between antagonism and disease control. *Soil Biol. Biochem.*, **16**, 391-395
- 39) Hijri, M., M. Hosny, D. van Tuinen and H. Dulieu (1999) : Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellosporacastanea* (Gromales, Zygomycota)

- is structured within multinucleated spores. *Fungal Genetics and Biology*, **26**, 141-151
- 40) 堀江博道, 竹内 純 (1993) : ウド疫病, 菌核病及び白絹病の発病温度. 関東東山病害虫研究会年報, **40**, 113-115
- 41) Huber, A. and C. J. Gould (1948) : *Sclerotium delphinii* Welch on scilla. *Phytopathology*, **38**, 82-85
- 42) Hyakumachi, M., T. Mushika, Y. Ogiso, T. Toda, K. Kageyama and T. Tsuge (1998) : Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. *Plant Pathology*, **47**, 1-9
- 43) 池上八郎 (1996) : 白絹病菌. 池上八郎, 勝本 謙, 原田幸雄, 百町満朗編, 新編植物病原菌類解説, p.142-145, 養賢堂, 東京
- 44) Illingworth, C. A., J. H. Andrews, C. Bibeau and M. L. Sogin (1991) : Phylogenetic placement of *Athelia bombacina*, *Aureobasidium pullulans*, and *Colletotrichum gloeosporioides* inferred from sequence comparison of small subunit ribosomal RNAs. *Exp. Mycol.*, **15**, 65-75
- 45) 石井正義, 手塚信夫 (1994) : フジバカマ, カクトラノオ, ホトトギス (新称) 及びジャガイモの白絹病. 関西病害虫研究会報, **36**, 79-80
- 46) 石川成寿, 羽山 潔, 中山喜一, 手塚紳浩 (1992) : イチゴ白絹病 (新称) の発生. 関東東山病害虫研究会年報, **39**, 125-127
- 47) 井 智史 (2000) : 花き類の白絹病について. 今月の農業, **44**, 20-25
- 48) Jacobson, K. M., O. K. Miller and B. Turner (1993) : Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9159-9163
- 49) Javed, Z. U. R. and J. R. Coley-Smith (1973) : Studies on germination of sclerotia of *Sclerotium delphinii*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **60**, 441-451
- 50) Julian, M. C., F. Debets and J. Keijer (1996) : Independence of sexual and vegetative incompatibility mechanisms of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) anastomosis group 1. *Phytopathology*, **86**, 566-574
- 51) Julich, W. (1972) : Monographie der Atheliae (Corticaceae, Basidiomycetes). *Willdenowia Beih.*, **7**, 1-283
- 52) 亀本弥生, 板東明人, 三原弘靖, 北本 豊 (2000) : 栄養要求性変異株を用いた担子菌のブラー現象 (ダイ・モン交配) の再検討. 日本菌学会第44回大会講演要旨集, p.48
- 53) Katsumata, H., T. Ogata and N. Matsumoto (1996) : Population structure of *Helicobasidium mompa* in an apple orchard in Fukushima. 日植病報, **62**, 490-491
- 54) 木村資生・大沢省三 (1989) : 生物の歴史, p.25-87, 岩波書店, 東京
- 55) Kohli, Y., R. A. A. Morrall, J. B. Anderson and L. M. Kohn (1992) : Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. *Phytopathology*, **82**, 875-880
- 56) Kohn, L. M., E. Stasovski, I. Carbone, J. Royer and J. B. Anderson (1991) : Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, **81**, 480-485
- 57) 国永史朗 (1997) : *Rhizoctonia solani* における進化と適応. 土と微生物, **50**, 5-12
- 58) Kuninaga, S., T. Natsuaki, T. Takeuchi and R. Yokosawa (1997) : Sequence variation of the DNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.*, **32**, 237-243
- 59) Leach, L. D. and A. E. Davey (1938) : Determining the sclerotial population of *Sclerotium rolfsii* by soil analysis and predicting losses of sugarbeets on the basis of these analyses. *J. Agric. Res.*, **56**, 619-631
- 60) Li, W. -H. and D. Graur, (1991) : Fundamentals of molecular evolution, p.42-169, Sinauer Associates, Massachusetts
- 61) Linderman, R. G. and R. G. Gilbert (1969) : Stimulation of *Sclerotium rolfsii* in soil by volatile components of alfalfa hay. *Phytopathology*, **59**, 1366-1372
- 62) Liu, Z. L., L. L. Domier and J. B. Sinclair (1993) : ISG-specific ribosomal DNA polymorphism of the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, **85**, 795-800

- 63) Lockwood, J.L. (1986) : Soilborne plant pathogens : concepts and comments. *Phytopathology*, **76**, 20-27
- 64) Martin, F., C. Di Battista, D. Vairalles and F. Le Tacon (1997) : Internal transcribed spacer sequences from European species of *Laccaria* species: phylogenetic and taxonomic implications. GenBank accession number AF006595
- 65) Martin, F., M.A. Selosse and F.L. Tacon (1999) : The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* : structural analysis and allelic polymorphism. *Microbiology*, **145**, 1605-1611
- 66) Masuda, P., K. Yamanaka, Y. Sato and Y. Kitamoto (1995) : Nuclear selection in monokaryotization of dikaryotic mycelia of *Pholiotanameko* as described by leading and following nuclei. *Mycoscience*, **36**, 413-420
- 67) N. Matsumoto and A. Tajimi (1993) : Effect of cropping history on the population structure of *Typhula incarnata* and *Typhula ishikariensis*. *Can. J. Bot.*, **71**, 1434-1440
- 68) N. Matsumoto, K. Uchiyama and S. Tsushima (1996) : Genetof *Typhula ishikariensis* biotype A belonging to a vegetative compatibility group. *Can. J. Bot.*, **74**, 1695-1700
- 69) McDonald, B.A. (1997) : The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, **87**, 448-453.
- 70) 本村知樹・田中欽二・佐古宣道・野中福次 (1992) : ヒシ白絹病菌菌核の水面浮上性に及ぼす培養条件の影響. 日植病報, **58**, 292-297
- 71) 本村知樹・田中欽二 (1998) : ヒシおよび各種植物から分離された白絹病菌菌核の水面浮上性に及ぼす光の影響と菌核内部構造の比較. 日菌報, **39**, 3-11
- 72) 仲川晃生 (1990) : ダイズ栽培における白絹病の発生とその防除法. 農業および園芸, **65**, 841-848
- 73) 仲川晃生 (1999) : ダイズ白絹病の湛水による防除. 今月の農業, **43**, 96-98
- 74) 仲川晃生, 高橋 茂, 鈴木正昭, 我孫子和雄 (1992) : 有機物施用湛水処理によるダイズ白絹病および黒根腐病の防除. 日植病報, **58**, 578-579
- 75) 仲川晃生, 高橋 茂, 鈴木正昭, 佐藤 守 (1994) : 有機物施用湛水処理によるダイズ白絹病及び黒根腐病の防除 (第 2 報) 日植病報, **60**, 789
- 76) 仲川晃生, 島田信二 (1995) : 近畿中国地域におけるダイズ立枯性病害の発生実態. 中国農業試験場研究報告, **15**, 19-27
- 77) Nakagawa, A. and T. Yamaguchi (1989) : Formation and regeneration of protoplasts from mycelia of *Sclerotium rolfsii*. 日植病報, **55**, 680-683
- 78) 中田覺五郎 (1926) : 菌核菌一名白絹病菌 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) に就て 第三報 菌核菌の孢子型及之れと *Hypochnus centrifugus* (Lev) Tul., *H. solani* Prill. et Delacr., *H. cucumeris* Fr. との系統的関係並に *Sclerotium coffeicolum* Stah. との種類的関係に就て. 九州帝国大学農学部学芸雑誌, **2**, 7-19
- 79) 中田覺五郎 (1927) : 菌核菌一名白絹病菌 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) に就て 第六報 菌核菌の突然變異の二例. 九州帝国大学農学部学芸雑誌, **2**, 292-306
- 80) Nalim, F.A., J.L. Starr, K.E. Woodard, S. Segner and N.P. Keller (1995) : Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **85**, 1507-1512
- 81) 生井恒雄, 富樫二郎, 高樹英明 (1990) : ギョウジャニンニクの白絹病について. 山形農林学会報, **47**, 27-29
- 82) Nelson, B. D. (1994) : Vital staining of fungal nuclei with the bis-benzimidazole fluorochrome Hoechst 33342. *Phytopathology*, **84**, 1125
- 83) 西原夏樹 (1961) : 白絹病. 千葉県農業試験場資料, **1**, 6-8
- 84) 野中福次, 本村知樹, 田中欽二 (1990) : ヒシ白絹病に関する研究 第 1 報 ヒシから分離された白絹病菌について. 九州病害虫研究会報, **36**, 56-58
- 85) O'Donnell, K. (1992) : Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.*, **22**, 213-220
- 86) O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997) : Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium arenonorthologus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **7**, 103-116
- 87) 生越 明 (1976) : *Rhizoctonia solani* Kuhn の菌糸融合による類別と各群の完全時代に関する研究. 農業技術研究所報告 C, **30**, 1-63

- 88) Ogoshi, A. (1987) : Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctoniasolani* Kuhn. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**, 125-143
- 89) Okabe, I., M. Arakawa and N. Matsumoto (2001) : ITS polymorphism within a single strain of *Sclerotium rolfsii*. *Mycoscience*, **42**, 107-113
- 90) Okabe, I. and N. Matsumoto (2000) : Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. *Mycoscience*, **41**, 145-148
- 91) Okabe, I., C. Morikawa and N. Matsumoto (2000) : Variation in southern blight fungus in Japan detected by ITS-RFLP analysis. *JARQ*, **34**, 93-97
- 92) Okabe, I., C. Morikawa, N. Matsumoto and K. Yokoyama (1998) : Variation in *Sclerotium rolfsii* isolates in Japan. *Mycoscience*, **39**, 399-407
- 93) Page, R. D. M. (1998) : Tree View PPC Version 1.5.3. Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow
- 94) Pringle, A., J. M. Moncalvo and R. Vilgalys (2000) : High levels of variation in ribosomal DNA sequences within and among spores of a natural population of the earbuscular mycorrhizal fungus *Acaulosporacrossica*. *Mycologia*, **92**, 259-268
- 95) Punja, Z. K. (1985) : The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **23**, 97-127
- 96) Punja, Z. K. (1986) : Progression of root rot on processing carrots due to *Sclerotium rolfsii* and the relationship of disease incidence to inoculum density. *Can. J. Plant Pathol.*, **8**, 297-304
- 97) Punja, Z. K. (1988) : *Sclerotium (Athelia) rolfsii*, a pathogen of many plant species. In : Sidhu, G. S. [ed.] *Advances in plant pathology* **6**, p.523-534, Academic Press, San Diego
- 98) Punja, Z. K. and A. Damiani (1996) : Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. *Mycologia*, **88**, 694-706
- 99) Punja, Z. K. and R. G. Grogan (1983A) : Basidiocarp induction, nuclear condition, variability, and heterokaryon incompatibility in *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Phytopathology*, **73**, 1273-1278
- 100) Punja, Z. K. and R. G. Grogan (1983 B) : Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Phytopathology*, **73**, 1279-1284
- 101) Punja, Z. K. and R. G. Grogan (1983 C) : Germination and infection by basidiospores of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Plant Disease*, **67**, 875-878
- 102) Punja, Z. K., R. G. Grogan and G. C. Adams, Jr. (1982) : Influence of nutrition, environment, and the isolate, on basidiocarp formation, development, and structure in *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Mycologia*, **74**, 917-926
- 103) Punja, Z. K., S. F. Jenkins and R. G. Grogan (1984) : Effect of volatile compounds, nutrients, and source of sclerotia on eruptive sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **74**, 1290-1295
- 104) Punja, Z. K., V. L. Smith, C. L. Campbell and S. F. Jenkins (1985) : Sampling and extraction procedures to estimate numbers, spatial patterns, and temporal distribution of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Plant Disease*, **69**, 469-474
- 105) Punja, Z. K. and L. J. Sun (2001) : Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S. delphinii*. *Mycol. Res.*, **105**, 537-546
- 106) Rayner, A. D. M. (1991) : The phytopathological significance of mycelial individualism. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **29**, 305-323
- 107) Rizki, Y. M. (1989) : Ultrastructure of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and *Sclerotium delphinii* Welch, after burial in soil. *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, **32**, 185-189
- 108) Rodriguez-Kabana, R., P. A. Backman and E. A. Wiggins (1974) : Determination of sclerotial population of *Sclerotium rolfsii* in soil by a rapid flotation-sieving technique. *Phytopathology*, **64**, 610-615
- 109) Rodriguez-Kabana, R., P. A. Backman and J. C. Williams (1975) : Determination of yield losses to *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. *Plant Dis. Repr.*, **59**, 855-858
- 110) Rosewich, U. L. and B. A. McDonald (1994) : DNA fingerprinting in fungi. *Methods in Mol. Cell. Biol.*, **5**, 41-48

- 111) Saccardo, P.A. (1911): *Notaemycologicae. Annals Mycologici*, **9**, 249-257
- 112) Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491
- 113) 齊藤 正, 吉村彰治 (1962): 北陸地方におけるクローバー類の病害について. 北陸病害虫研究会報, **10**, 51-54
- 114) Salazar, O., M. C. Julian, M. Hyakumachi and V. Rubio (2000): Phylogenetic grouping of cultural types of *Rhizoctonia solani* AG2-2 based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*, **92**, 505-509
- 115) Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989): *Molecular cloning*, p. 6.3-6.34, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- 116) Sanders, I.R. (1999): No sex please, we're fungi. *Nature*, **399**, 737-739
- 117) 佐藤豊三, 中西建夫, 小金澤碩城 (1995): *Sclerotium rolfsii* Saccardo によるヤーコン白絹病 (新称). 四国植物防疫研究, **30**, 79-84
- 118) 澤田兼吉 (1911): 瓜類白絹病. 台湾総督府農事試験場特別報告, **2**, 1-72
- 119) 澤田兼吉 (1912): 臺灣に於ける作物の白絹病. 植物学雑誌, **305**, 125-138
- 120) 澤田兼吉 (1919): 白絹菌属. 台湾総督府農事試験場特別報告, **19**, 438-495
- 121) Selosse, M. A., G. Costa, C. D. Battista, F. L. Tacon and F. Martin (1996): Meiotic segregation and recombination of the intergenic spacer of the ribosomal DNA in the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor*. *Curr. Genet.*, **30**, 332-337
- 122) Shew, B. B., M. K. Beute and C. L. Campbell (1984): Spatial pattern of southern stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* in six North Carolina peanut fields. *Phytopathology*, **74**, 730-735
- 123) 島本 功, 佐々木卓治 (1997): 新版 植物の PCR 実験プロトコール 核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解析法, p. 26-31, 秀潤社, 東京
- 124) 庄司俊彦 (1993): イワヒバ白絹病 (新称) の発生. 関東東山病害虫研究会年報, **40**, 179-180
- 125) 庄司俊彦 (1996): フジバカマ白絹病 (新称) の発生. 関東東山病害虫研究会年報, **43**, 123-124
- 126) Smith A.M. (1972A): Drying and wettings sclerotia promotes biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Soil Biol. Biochem.*, **4**, 119-123
- 127) Smith A.M. (1972B): Nutrient leakage promotes biological control of dried sclerotia of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Soil Biol. Biochem.*, **4**, 125-129
- 128) Smith, M. L., J. N. Bruhn and J. B. Anderson (1992): The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, **356**, 428-431
- 129) Smith, M. L., J. N. Bruhn and J. B. Anderson (1994): Relatedness and spatial distribution of *Armillaria* genets infecting red pine seedlings. *Phytopathology*, **84**, 822-829
- 130) Smith, V.L., S.F. Jenkins, Z.K. Punja and D.M. Benson (1989): Survival of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*: influence of sclerotial treatment and depth of burial. *Soil Biol. Biochem.*, **21**, 627-632
- 131) Stevens, F. L. (1931): A comparative study of *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotium delphinii*. *Mycologia*, **23**, 204-222
- 132) Takamatsu, S. (1998): PCR applications in fungal phylogeny. In: Bridge, P. D., Arora, D. K., Reddy, C. A. and Elander, R. P. [eds.] *Application of PCR in mycology*, p. 125-152, CAB International, Oxon
- 133) 竹内 純, 堀江博道 (1993): チヂミペペロミア, ジャノヒゲ及びアジュガの白絹病 (新称) 関東東山病害虫研究会年報, **40**, 163-165
- 134) 竹内 純, 堀江博道 (1994): フッキソウ及びサルココッカの白絹病 (新称) 関東東山病害虫研究会年報, **41**, 145-147
- 135) 竹内 純, 堀江博道, 福田達男, 平野寿一 (1995): サンダーソニア及びオオバナオケラの白絹病 (新称). 関東東山病害虫研究会年報, **42**, 143-145
- 136) Talbot, P. H. B. (1973): Aphylophorales: general characteristics; the telephoroid and cupuloid families. In: Ainsworth, G. C., F. K. Sparrow and A. S. Sussman [eds.] *The fungi* B, Academic Press, London
- 137) 手塚信夫, 石井正義 (1994): グラジオラス, ルドベキア, ルピナス, ナデシコ及びオダマキの白絹病 (新称). 関西病害虫研究会報, **36**, 81-82
- 138) 手塚信夫, 石井正義, 堀内誠三 (1992): フダンソウ, イチゴ, ゴボウ, ラッキョウ, シオン及びシ

- ロクジャクの白絹病(新称) 関西病害虫研究会報, **34**, 75-76
- 139) 富田恭範, 小木曾秀紀 (1999) : トルコギキョウ白絹病の発生. 関東東山病害虫研究会報, **46**, 49-51
- 140) Tsumura, Y., K. Yoshimura, N. Tomaru and K. Ohba (1995) : Molecular phylogeny of conifers using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.*, **91**, 1222-1236
- 141) Tu, C. C., T. F. Hsieh and W. H. Tsai (1992) : Induction of basidia and morphological comparison among isolates of *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Mycologia*, **84**, 695-704
- 142) Tu, C. C. and J. W. Kimbrough (1978) : Systematics and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complex. *Bot. Gaz.*, **139**, 454-466
- 143) 植松清次, 児玉浩一, 中村靖弘 (1993) : アルストロメリア, ネリネ, ファレノブシス, ツノナス及びツルバキアに発生した白絹病(新称). 関東東山病害虫研究会年報, **40**, 171-174
- 144) 植松清次, 高橋 徹, 赤山喜一郎 (1992) : デルフィニウム, ソリダスター及びオリヅルランに発生した白絹病(新称). 関東東山病害虫研究会年報, **39**, 163-165
- 145) Venkatarayan, S. V. (1950) : Notes on some species of *Corticium* and *Pellicularia*. *Indian Phytopathol.*, **3**, 31-86 (Rev. Appl. Mycol., **32**, 341).
- 146) Vilgalys, R. and M. A. Cubeta (1994) : Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **32**, 135-155
- 147) 渡辺文吉郎 (1984) : 白絹病. 「新版 土壤病害の手引」編集委員会編, 新版 土壤病害の手引, p. 41, 日本植物防疫協会, 東京
- 148) 渡辺文吉郎, 朝日秀雄, 松田 明 (1968) : 白絹病の生態的防除について. 茨城県農業試験場研究報告, **9**, 30-39
- 149) Webster, J. (1980) : Introduction of fungi 2nd ed. 椿 啓介, 三浦宏一郎, 山本昌木 訳, ウェブスター菌類概論, p. 391-402, 講談社サイエンティフィク, 東京
- 150) Welch, D. S. (1924) : A sclerotial disease of cultivated *Delphinium*. *Phytopathology*, **14**, 31
- 151) Weresub, L. K. and W. I. Illman (1980) : *Corticium centrifugum* reisolated from fish-eye rot of stored apples. *Can. J. Bot.*, **58**, 137-146
- 152) Wessels, J. G. H., H. L. Hoeksema and D. Stermerding (1976) : Reversion of protoplasts from dikaryotic mycelium of *Schizophyllum commune*. *Protoplasma*, **89**, 317-321
- 153) West, E. (1947) : *Sclerotium rolfsii* Sacc. and its perfect stage on climbing fig. *Phytopathology*, **37**, 67-69
- 154) White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990) : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White [eds.] PCR protocols: a guide to methods and applications, p. 315-322, Academic Press, San Diego
- 155) Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535
- 156) Worrall, J. J. (1997) : Somatic incompatibility in basidiomycetes. *Mycologia*, **89**, 24-36
- 157) Yang, J. L., V. M. Maher and J. J. McCormick (1989) : Amplification and direct nucleotide sequencing of cDNA from the lysate of low number of diploid human cells. *Gene*, **83**, 347-354
- 158) Yokoyama, K. and A. Ogoshi (1986) : Studies on hyphal anastomosis of *Rhizoctonia solani*. Observation of imperfect fusion by light and electron microscopy. 日菌報, **27**, 399-413
- 159) 横山和成, 生越 明, 宇井格生 (1983) : *Rhizoctonia solani* の菌糸融合に関する研究. 完全融合の光顕的観察. 日菌報, **24**, 329-340
- 160) Yokoyama, K., A. Ogoshi and T. Ui (1985) : Studies on hyphal anastomosis of *Rhizoctonia solani*. The ultrastructural changes of hyphal cells during perfect fusion. 日菌報, **26**, 199-207
- 161) Yorinori, J. T. (1994) : Fungal diseases. In: Brazilian Agricultural Research Enterprise [ed.] Tropical soybean; improvement and production, p. 52-55, FAO, Rome

## Genetic variation in *Sclerotium rolfsii*

Ikuko Okabe

### Summary

The isolates of *Sclerotium rolfsii* Sacc [teleomorph: *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough] from Japan were divided into two groups by their ecological characters. One group caused southern blight disease of leguminous crops and other plants in southwestern regions of Japan in summer or early autumn, while the other occurred in the central to northern regions and infected ornamental plants in spring or early summer. To reveal the genetic variation in *S. rolfsii*, molecular genetic and morphological characters of Japanese isolates were studied.

The *S. rolfsii* population in each field consisted of one to three MCGs (mycelial compatibility groups), and the same MCG was found in two sites 2.5 km distant. With one exception, most isolates of the same MCG showed the same RAPD patterns, suggesting that they were clones. The major MCGs persisted for more than three years. It was implied that genetic exchanges and sexual reproduction seldom occur in *S. rolfsii* population.

PCR-RFLP analysis of ITS regions of ribosomal RNA gene cluster showed genetic variation in *S. rolfsii* isolates from different regions in Japan. The isolates were classified into five groups by the combination of the *Alu*, *Hpa*, *Rsa* and *Nde* patterns. Groups 1 and 2 were distributed in the southwestern region of Japan, and groups 4 and 5 found in the central to northeastern regions, e. g. Hokuriku, Tohoku and Kita-Kanto. The only isolate of group 3 was from Ishikawa, central region of Japan. The RFLP patterns of group 1 were identical to those of group from U. S. A. and south Asia, and the group 3 corresponded to group in Nepal. The group 4 showed the same patterns as those of *S. delphinii* Welch from U. S. A. Groups 2 and 5 were newly found, and group 2 was similar to group 1, whereas group 5 was close to group 4.

In morphology, groups 1 and 2 were similar to *S. rolfsii* isolates from U. S. A. and south Asia, producing small, spherical sclerotia. Groups 4 and 5 formed large sclerotia with irregular shape, and resembled to *S. delphinii*. However, the sclerotial size of group 4 decreased with increasing growth temperature, and the difference between groups 1 and 4 became less distinct. The growth temperature response did not vary among the RFLP groups of Japan as much as that between *S. rolfsii* and *S. delphinii* in foreign countries.

Two homokaryons were obtained from a protoplast and a hyphal tip of the isolate of group 1. They showed the same PCR-RFLP patterns of those of groups 3 or 5. The homokaryons were multinucleate (4-6 nuclei/cell), lacked clamp connections and differed with each other and from their parent in RAPD patterns. The sequences of ITS regions of the homokaryons were also similar to groups 3 or 5 suggesting that group 1 contained two types of ITS regions. It was also implied that there were genetic exchanges between ITS-RFLP groups, and that ITS heterogeneity in the group 1 originated from heterokaryosis between groups 3 and 5.

Heterokaryons were not obtained by pairing the two homokaryons. Buller phenomenon was not observed, either. However, anastomosis (imperfect fusion) occurred between the isolates of different

ITS-RFLP groups, suggesting the five ITS-RFLP groups belong to the same anastomosis group. Anastomosis was also observed between Japanese isolates and *S. delphinii* or *S. rolfsii* from U. S. A.

It is concluded that five ITS-RFLP groups from Japan belonged to the same biological species. The Japanese ITS-RFLP groups 1, 2 and 3 are close to *S. rolfsii* group, and Japanese groups 4 and 5 are similar to *S. delphinii* group.