

ナシ萎縮病菌Fomitiporia sp.におけるヘテロタリズム

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan |
| ISSN | 00319473 |
| 著者名 | 金子,洋平 中村,仁 牛尾,進吾 |
| 発行元 | 日本植物病理學會 |
| 巻/号 | 78巻3号 |
| 掲載ページ | p. 159-168 |
| 発行年月 | 2012年8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



ナシ萎縮病菌 *Fomitiporia* sp. におけるヘテロタリズム

金子 洋平^{1*}・中村 仁²・牛尾 進吾¹

ABSTRACT

KANEKO, Y.^{1*}, NAKAMURA, H.² and USHIO, S.¹ (2012). Heterothallism in *Fomitiporia* sp. causing Japanese pear dwarf. Jpn. J. Phytopathol. 78: 159–168.

We determined the mating system of the pathogen of Japanese pear dwarf, *Fomitiporia* sp., in pairing tests of single basidiospore isolates from two vegetative strains isolated from decayed wood and from another vegetative strain from a fruiting body produced on a Japanese pear tree. Each basidiospore usually had a single nucleus. Number of nuclei per hyphal cell varied from two to six for vegetative strains and one to six for single basidiospore isolates. Thus, it was difficult to distinguish between primary and secondary hyphae based on nucleus number. In pairing tests using 15–20 single basidiospore isolates from each strain, compatible reactions were characterized by tuft formation at the junction between two mycelia. Tuft isolates, analyzed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers using a PCR primer (GTG)₅, were found to be composed of secondary hyphae. In incompatible pairing reactions, no tufts formed. Mating patterns based on tuft reactions were complex and ambiguous for determining polarity; however, the fungus was inferred to be bipolar or tetrapolar. Most inter-strain combinations were compatible. In conclusion, the pathogen of Japanese pear dwarf, *Fomitiporia* sp., was predominantly heterothallic.

(Received October 3, 2011; Accepted April 23, 2012)

Key words: Japanese pear, dwarf, *Fomitiporia*, mating

緒 言

ナシ萎縮病は主に 20 年生以上の成木に発生し、春先の展葉直後の葉の波打ちや小型化、葉縁の黒変、幼果の小型化・奇形を引き起こす。症状が激しくなると、主枝、樹全体の枯死に至る（佐久間ら、1993）。千葉県での生産現場では主要品種である「幸水」において、その被害が著しく、重要な問題となっている。本病は日本植物病名目録に記載されていたものの、長い間病原不明となっていた。しかし、塩田ら（2010）により、担子菌ヒダナシタケ目 [以降は、本分類群の一般総称に相当する硬質担子菌類と呼ぶ（有田、1983; 服部、2000）] に属し、材質腐朽性を示す *Fomitiporia* 属菌の接種によって病徴が再現されることが報告され、金子ら（2011）による子実体の形態的特徴の調査等から、ナシ萎縮病の病原菌は *Fomitiporia* sp.（チャアナタケモドキ）と同定された。本属菌においては形態的特徴が少ないことや変異が大きいことなどから種同定は難しいため、本種の海外種との異同は不明確

であるが、国内既知種のいずれとも異なっていることが分かっている。しかし、ナシ萎縮病菌 *Fomitiporia* sp. は、その生活環をはじめとした生理・生態的な特徴が明らかになっておらず、今後、防除対策を構築する上でこれらを明らかにする必要がある。特に、病原菌がナシ樹の材部に存在することから、本病の治療は困難であり、予防が中心になると考えられることから、伝染源と考えられる担子孢子による感染過程を明らかにすることが重要である。

一般に、いわゆる“きのこ”を形成する担子菌においては、担子孢子が発芽すると一次菌糸という単相 (n, 多くは 1 核) の菌糸になる。そして、交配因子の異なる一次菌糸同士が出会うと菌糸融合の後、核の移行が起こり (交配)、二次菌糸を生じる。子実体は二次菌糸より形成され、多くの担子菌において二次菌糸の核相は重相 (n + n, 多くは 2 核) でクランプ結合を有する。このような遺伝的に異なる一次菌糸の融合が二次菌糸形成に必要な性質をヘテロタリズムと呼ぶ。一方で、一次菌糸が菌糸融合とそれに続く核移行を経ることな

¹千葉県農林総合研究センター（〒266-0006 千葉県千葉市緑区大膳野町 808） Chiba Prefectural Agriculture and Forestry Research Center, 808 Daizenno, Midori, Chiba 266-0006, Japan

²独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所（〒305-8605 茨城県つくば市藤本 2-1） NARO Institute of Fruit Tree Science, 2-1 Fujimoto, Tsukuba 305-8685, Japan

*Corresponding author (E-mail: y.knk33@pref.chiba.lg.jp)

く、そのまま二次菌糸として機能するホモタリズムと呼ばれる性質の担子菌も存在する。以上のような交配様式は交配系と呼ばれ、生活環をはじめとした生態の解明において重要な形質であり、植物病原性の硬質担子菌類においては担子胞子に起因する感染過程を推定する上で不可欠な情報である。

すなわち、自然界において見出される硬質担子菌類の栄養菌糸は二次菌糸であることから (Adaskaveg and Ogawa, 1990), 植物病原性 (材質腐朽性) の硬質担子菌類においては交配後に形成される二次菌糸が宿主植物の材質部に伸展し、腐朽を起こすと考えられる。ナシ萎縮病菌においても担子胞子がナシ樹に到達した後、樹体内で菌糸が伸展するためには交配を必要とすると推測される。したがって、ナシ萎縮病菌の担子胞子由来の一次菌糸の植物体への定着と二次菌糸形成の阻止を有効な予防手段として提案する前提条件として、その交配系を明らかにする必要がある。

交配系を明らかにするためには、通常、単担子胞子分離菌株 (一次菌糸) 間による対峙培養を行い、その菌叢の接触部位等におけるクランプ結合の形成の有無を調査する (有田, 1983)。しかしながら、*Fomitiporia* 属菌や近縁の *Phellinus* 属菌 (両属菌とも広義の *Phellinus* 属菌として扱う場合もある) の二次菌糸にはクランプ結合が存在しない (Fischer and Binder, 2004; Wagner and Fischer, 2002)。このことから、これまで両属菌の交配系を明らかにするためには、単担子胞子分離菌株 (一次菌糸) 間による対峙培養で、両菌叢の接触部に新たに出現してくる菌糸を二次菌糸と見なし、その形成の有無から交配の成否を判別している (Fischer, 1994, 2002)。しかし、本手法を評価法としてより確実なものとするためには、交配反応が起こったとされる場合で核の移行が起きたことを確認する必要がある。

交配に伴う核の移行を検証する手法として、マイクロサテライト領域を利用した ISSR (inter-simple sequence repeat) マーカーによる多型解析があり、植物における雑種形成の検

定などに用いられている (Goldman, 2008; Ward *et al.*, 2009)。本手法は2つのマイクロサテライト領域に挟まれた領域を増幅するもので、予め配列の情報を必要としない。また、他の DNA マーカーと比べ、広汎性や再現性に優れ、ゲノムの複数箇所を同時に解析するため、多型を得られる可能性が高い。菌類においても、マッシュルーム (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) の一次・二次菌糸判定法としての利用が試みられている (Nazrul and Bian, 2010)。

本研究では、ナシ萎縮病菌 *Fomitiporia* sp. の担子胞子および菌糸 (一次菌糸, 二次菌糸) の核数を明らかにするとともに、複数菌株に由来する子実体から得た単担子胞子分離システムを用いて、対峙培養による交配試験および ISSR マーカーによる多型解析を行った結果、ナシ萎縮病菌の交配系に関する知見を得たので報告する。

材料および方法

(1) 供試菌株および供試子実体

1) 供試菌株 国内のナシ (*Pyrus pyrifolia* var. *culta*) 樹から採集された3菌株を親菌株として供試した (第1表)。PD001 と PES0201 は発病樹の材質腐朽組織から常法によって分離された栄養菌糸分離菌株で、子実体の形態的特徴等から、*Fomitiporia* sp. (チャアナタケモドキ) の二次菌糸と同定され

第1表 供試したナシ萎縮病菌 *Fomitiporia* sp. の菌株および子実体

| 菌株名 | 菌株 (親菌株) | | | 子実体 | |
|---------|----------|-----|------|--------------------|------|
| | 宿主 | 採集地 | 採集年 | 採集方法 | 採集年 |
| PD001 | ナシ | 徳島県 | 不明 | 人為形成 ^{a)} | 2009 |
| PES0201 | ナシ | 鳥取県 | 不明 | 人為形成 | 2009 |
| PP97 | ナシ | 茨城県 | 2008 | 野外採集 ^{b)} | 2009 |

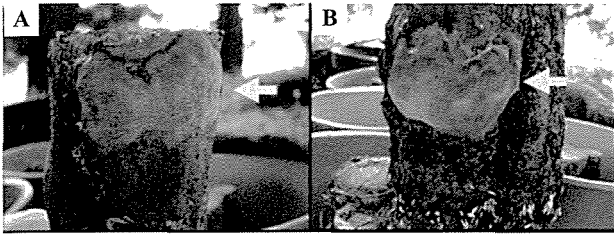
a) 菌株を太枝片に接種して約3年間培養した後、野外に放置して形成させた。

b) 菌株の分離源となった子実体。

第2表 供試菌株の表記法

| 表記 ^{a)} | 説明 | 実施した実験, 備考 |
|---|--|--------------------------------|
| PD001, PES0201, PP97 “親菌株名” 子実体 (例: PD001 子実体) | 親菌株名 当該親菌株から人為的に形成した子実体 あるいは分離源となった子実体 | 子実体形成, 第1表参照 単担子胞子分離 |
| “親菌株名” 単 x (例: PD001 単 1) | 当該親菌株から単担子胞子分離した菌株名 | 核数調査, 交配試験 |
| “親菌株名” 単担子胞子分離系統 (例: PD001 単担子胞子分離系統) | 当該親菌株から単担子胞子分離した単担子胞子分離菌株の一連の集団 | ISSR マーカーによる多型解析 核数調査, 交配試験 |
| “親菌株名” 単 x / “親菌株名” 単 y タフト (例: PD001 単 1 / PES0201 単 1 タフト) | “親菌株名” 単 x と “親菌株名” 単 y の交配によって得られたタフト分離菌株名 | 交配試験 ISSR マーカーによる多型解析 |

a) x, y は通し番号 (1 ~ 22 のうちの任意の数字)。



第1図 ナシ萎縮病菌の人為的に形成させた子実体
A, PD001由来の子実体; B, PES0201由来の子実体.

たものである(金子ら, 2011). PP97は萎縮症状を示していない未発病樹上で形成された子実体由来する. 各菌株は, 麦芽エキス寒天培地(MA; Difco™ malt agar 45 g, 蒸留水 1 L)を用いて 25°C 暗黒下で継代培養し, 長期間使用しない場合は 4°C で保存した. また, これらの供試菌株を元に, 後述するような単担子孢子分離系統やその交配後代等の菌株を作出し, これらを第2表のとおり表記した.

2) 子実体形成 供試菌株による子実体形成は以下の手順で行った. 直径約 10 cm, 長さ約 30 cm のクリ (*Castanea crenata*) の太枝片をオートクレーブして供試菌株を接種し, 25°C で約 3 年間培養し, 菌糸を蔓延させた. これを素焼きの植木鉢に鹿沼土あるいはモミガラを半分入れたものに挿し, 鉢全体を寒冷紗で覆い, 適宜灌水しつつ, 半日陰の野外で半年~2 年間放置し子実体を形成させた(第1表, 第1図). なお, PP97の子実体は, ナシ樹に自然発生した本株の分離源である子実体を供試した. これ以降, 親菌株名と併せて“子実体”と付されている場合は, 当該菌株から人為的に形成された子実体もしくは菌株の分離源となった子実体を指すものとする(第2表).

(2) 単担子孢子分離

子実体から単担子孢子分離を行い, 単担子孢子分離菌株(一次菌糸)を得た. 単担子孢子分離は, 各親菌株につき 1 子実体から行った. 分離方法は, 子実体の管孔部分(約 5 mm 四方)を切り出し, 白色ワセリンを用いてペトリ皿の蓋の内側に貼り付け, 麦芽エキス・酵母エキス寒天培地(Difco™ malt extract broth 15 g, 寒天 20 g, 蒸留水 1 L)平板培地上に担子孢子を落下させた. 培地上の担子孢子を 25°C で約 7 日間培養後, 発芽している単一の担子孢子を倒立顕微鏡下で柄付き針を用いて寒天ごと拾い, MA 平板培地に個別に移植して 25°C で培養した. そして, 菌叢に生長したものを各子実体あたり 15~20 菌株ずつ分離して保存した. これ以降, 親菌株名に併せて“担子孢子”と付されている場合は, 当該菌株の子実体より得られた担子孢子を指すものとする. また, “単担子孢子分離菌株”, “単”などと付されている場合は, 当該菌株より単担子孢子分離された菌株を指すものとし, “単

担子孢子分離系統”は単一子実体より得た一群の単担子孢子分離菌株集団を指すものとする(第2表).

(3) 核数調査

ナシ萎縮病菌の一次菌糸と二次菌糸が菌糸細胞における核数の違いによって区別できるか否かを明らかにするため, 核数の調査を行った. 核数の調査には, 担子孢子, および栄養菌糸分離菌株(二次菌糸)と単担子孢子分離菌株(一次菌糸)の菌糸を用いた. 担子孢子的核数の調査には PD001 を供試し, 菌糸の核数調査には PD001 と PES0201 およびそれらの単担子孢子分離菌株を用いた. 担子孢子については子実体の表面を 10 µl の滅菌水で洗って回収した懸濁液を試料とした. 菌糸については MA 平板培地上に形成した菌叢の先端部分を 10 µl の滅菌水に浸漬したものを試料とした. それぞれの試料にアクリジンオレンジ染色液(アクリジンオレンジ 40 mg, 100 mM リン酸緩衝液 1 L)を 5 µl 添加し, 核を染色した. これを蛍光顕微鏡(Axioplan2, Carl Zeiss)により観察し, 担子孢子および菌糸の細胞当たりの核数を調査した.

(4) 交配試験

交配試験は, 各親菌株の単一子実体由来の単担子孢子分離系統内および異なる親菌株の子実体由来する単担子孢子分離系統間で行った. 単一子実体由来の単担子孢子分離系統内の交配試験については単担子孢子分離系統 15~20 菌株を総当たりで対峙培養した. また, 異なる親菌株の子実体由来する単担子孢子分離系統間の交配試験については各単担子孢子分離系統のうち 5 菌株ずつを総当たりで対峙培養した. 交配試験の手順は, 予め MA 平板培地上で前培養した各菌株の菌叢の先端部を約 5 mm 角に切り出して接種源とし, 供試 2 菌株の接種源を約 2 cm 離して MA 平板培地上に移植し, 25°C 暗黒下で培養した. 培養開始後 2~4 週間に経時的に観察を行い, 両菌叢の接触部位において新たに生長してくる菌叢の有無を判別した. なお, ここでは, この新菌叢を *Rhizoctonia* 属菌に準じて“タフト(tuft)”と呼ぶこととし(Gatza-Chapa and Anderson, 1966; Julian *et al.*, 1996), 対峙培養時において両供試菌株の菌叢が接触した後, その接触部位およびその付近に新たに形成される白色~黄褐色の綿毛状の菌糸からなる菌叢で, 供試菌株の菌叢と色や菌糸伸長の状態によって区別できるものと定義した.

形成されたタフトから以下の方法で菌糸を分離した. すなわち, タフトを形成している菌糸のみをピンセットを用いて釣菌し, MA 平板培地に移植した. その後, そこから伸長した菌叢の先端部をかき取り, 新たに MA 平板培地に移植した. 純粋分離を目的として, これを 3 回繰り返す. タフト分離菌株とした. また, その菌叢が一様に発達することを確認することで, 分離の成否を判断した. これ以降, 2 つの単担

子孢子分離菌株名と併せて“タフト”と付されている場合は、両単担子孢子分離菌株間の対峙培養において形成されたタフトから分離された菌株を指すものとする(第2表)。

(5) ISSR マーカーによる多型解析

単担子孢子分離菌株およびその交配試験から得たタフト分離菌株を用いて ISSR マーカーによる多型解析を行った。菌糸体からの DNA 抽出は、MA 平板培地上に置いた滅菌セロファン (3.5 cm 四方) 上で培養した菌糸体をセロファンごと回収し、液体窒素により凍結粉碎した後、DNeasy PLANT Mini kit (QIAGEN) を用いて行った。抽出した DNA を鋳型に ISSR プライマーの一つである (GTG)₅ プライマー (Zhou *et al.*, 1999) を用いて PCR を行った。PCR 酵素には Gene Taq FT (ニッポンジーン) を用い、25 μ l の反応系で行った。95°C で 10 分間変性処理の後、95°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間および 72°C で 60 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分間反応させた。その後、PCR 反応産物を 3% アガロースゲルで電気泳動し、得られたバンドパターンを比較して菌株間の多型を検出した。

結 果

(1) 核数調査

PD001 担子孢子 74 個を供試して核数を調査したところ、1 つの担子孢子には 1~2 個の核が存在し、約 93% の孢子が 1 核であった。菌糸を調査したところ、PD001 および PES0201 の菌糸には、1 細胞あたり 2~6 個の核が存在し、これらの菌株の子実体から得た単担子孢子分離菌株の菌糸細胞には 1~6 個の核が存在した(第3表, 第2図)。すなわち、一次菌糸、二次菌糸ともに 2~4 核の細胞が多く、細胞あたりの核数で栄養菌糸分離菌株(二次菌糸)と単担子孢子分離菌株(一次菌糸)を明確に区別することはできなかった。

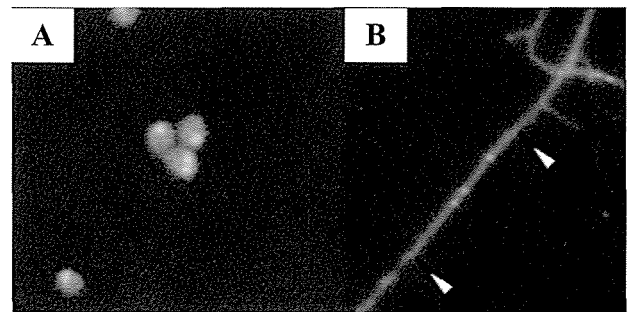
(2) 交配試験

1) 同一単担子孢子分離系統内での交配試験 まず、PD001 単担子孢子分離系統の 9 菌株、PES0201 単担子孢子分離系統の 13 菌株、PP97 単担子孢子分離系統の 13 菌株を用いて、同一菌株同士で対峙培養を行ったところ、いずれも帯線(両菌叢の接触部で気中菌糸が疎となるような境界線)は形成されず、菌叢が融合し、タフトは形成されなかった(第3図 E)。一方、同一単担子孢子分離系統の異なる単担子孢子分離菌株間で対峙培養を行ったところ、帯線が形成されて菌叢の融合は調査期間内には確認されず、その組合せによっては、両菌叢の接触部位において、タフトが形成された。タフト形成パターンは、その有無と形成場所にに基づき 4 種類に類別された(第3図 A~D)。A は菌叢の接触部位のみにタフトを形成し、B は菌叢の接触部位から片方の接種源に至るまでの領域

第3表 ナシ萎縮病菌菌糸における細胞あたりの核数とその内訳

| 菌株 ^{a)} | 調査細胞数 | 核数 | | | | | |
|------------------|-------|----|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| PD001 | 17 | 0 | 5 | 6 | 5 | 1 | 0 |
| PD001 単 1 | 11 | 1 | 5 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| PD001 単 2 | 19 | 0 | 2 | 9 | 6 | 2 | 0 |
| PES0201 | 15 | 0 | 4 | 5 | 3 | 2 | 1 |
| PES0201 単 1 | 12 | 1 | 5 | 4 | 2 | 0 | 0 |
| PES0201 単 2 | 15 | 0 | 7 | 4 | 3 | 0 | 1 |

a) PD001 単 1, 単 2 および PES0201 単 1, 単 2 はそれぞれ PD001, PES0201 の単担子孢子分離菌株。



第2図 ナシ萎縮病菌の担子孢子(A)および菌糸(B)内の核アクリジンオレンジで染色後、蛍光顕微鏡下で観察した。A, PD001 由来の子実体から採集した担子孢子; B, 麦芽エキス寒天培地で培養した PD001 の菌糸。矢尻は隔壁の位置を示す。

においてタフトを形成し、C は菌叢の接触部位から両方の接種源に至るまでの領域においてタフトを形成し、いずれも和合性反応(+)とした。一方、D では帯線が形成され、タフト形成はなく、不和合性反応(-)とした。PD001 単担子孢子分離系統内の異なる単担子孢子分離菌株同士の対峙培養において、PD001 単 1, PD001 単 10, PD001 単 12, PD001 単 17 を除く単担子孢子分離系統は 4 極性の交配パターンを示した(第4表)。一方、PES0201 単担子孢子分離系統は、一部例外的な反応を示す菌株がみられたものの 2 極性の交配パターンを示した(第5表)。PP97 単担子孢子分離系統は、多様な反応パターンが得られたため判然としなかったが、4 極性とは矛盾しない結果が得られ(第6表)、いずれの単担子孢子分離系統もヘテロタリックな交配パターンを示した。形成されたタフトのうち、40 タフトから菌株を分離した。タフト分離菌株は、菌叢内で帯線が形成されることはなく、菌叢は一様に発達した。

2) 異なる単担子孢子分離系統間での交配試験 各単担子孢子分離系統から無作為に 5 菌株を選出し、2 系統間において総当たりで対峙培養を行った。その結果、PD001 単担子孢子分離系統の 5 菌株と PES0201 単担子孢子分離系統の 5 菌

第4表 ナシ萎縮病菌 PD001 由来の単担子孢子分離菌系統を用いた系統内交配試験の結果^{a)}

| 菌株 ^{b)} | 10 | 17 | 11 | 1 | 12 | 7 | 15 | 19 | 6 | 18 | 20 | 5 | 9 | 16 | 3 | 4 | 8 | 2 | 13 | 14 |
|------------------|----|------|------|------|----|------|----|----|------|------|----|------|---|----|------|---|------|---|------|------|
| 10 | / | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 17 | | n.t. | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | | | n.t. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - |
| 1 | | | | n.t. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| 12 | | | | | / | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 7 | | | | | | n.t. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 15 | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 19 | | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 6 | | | | | | | | | n.t. | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 18 | | | | | | | | | | n.t. | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 20 | | | | | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 5 | | | | | | | | | | | | n.t. | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 9 | | | | | | | | | | | | | / | - | - | - | - | + | + | + |
| 16 | | | | | | | | | | | | | | / | - | - | - | + | + | + |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | n.t. | - | - | - | - | - |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | / | - | - | - | - |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | n.t. | - | - | - |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | / | - | - |
| 13 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | n.t. | - |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | n.t. |

a) +, 菌叢の接触部位でタフト形成あり (第3図A~C); -, 菌叢の接触部位でタフト形成なし (第3図D).

/, 菌叢が融合した (第3図E); n.t., 未調査.

b) “PD001 単” は共通のため, 記載を省略した.

第5表 ナシ萎縮病菌 PES0201 由来の単担子孢子分離菌系統を用いた系統内交配試験の結果^{a)}

| 菌株 ^{b)} | 11 | 1 | 5 | 9 | 10 | 2 | 17 | 4 | 12 | 3 | 7 | 13 | 20 | 22 | 14 | 19 | 8 |
|------------------|------|---|---|---|----|---|------|------|----|---|---|----|----|----|----|----|------|
| 11 | n.t. | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 1 | | / | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | | | / | - | - | - | - | △ | + | + | + | + | + | + | + | △ | + |
| 9 | | | | / | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | △ | + | △ |
| 10 | | | | | / | - | - | - | + | + | + | + | + | + | △ | + | + |
| 2 | | | | | | / | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + |
| 17 | | | | | | | n.t. | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| 4 | | | | | | | | n.t. | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | | | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | | | | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | | | | | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - |
| 13 | | | | | | | | | | | | / | - | △ | - | - | - |
| 20 | | | | | | | | | | | | | / | - | - | - | - |
| 22 | | | | | | | | | | | | | | / | - | - | - |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | | / | - | - |
| 19 | | | | | | | | | | | | | | | | / | - |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | n.t. |

a) +, 菌叢の接触部位でタフト形成あり (第3図A~C); -, 菌叢の接触部位でタフト形成なし (第3図D); △, 不明瞭のため判定できず.

/, 菌叢が融合した (第3図E); n.t., 未調査.

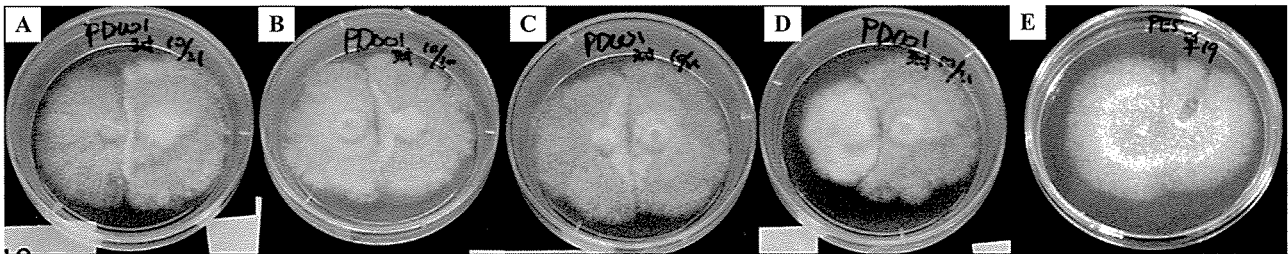
b) “PES0201 単” は共通のため, 記載を省略した.

第6表 ナシ萎縮病菌 PP97 由来の単担子胞子分離系統を用いた系統内交配試験の結果^{a)}

| 菌株 ^{b)} | 12 | 14 | 8 | 4 | 2 | 5 | 6 | 7 | 1 | 15 | 3 | 11 | 10 | 13 | 9 |
|------------------|----|----|---|---|---|------|---|---|---|----|---|----|----|------|---|
| 12 | / | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - |
| 14 | | / | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - |
| 8 | | | / | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| 4 | | | | / | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| 2 | | | | | / | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| 5 | | | | | | n.t. | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 6 | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 7 | | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - | + |
| 1 | | | | | | | | | / | - | - | - | - | - | - |
| 15 | | | | | | | | | | / | - | - | - | - | - |
| 3 | | | | | | | | | | | / | - | - | - | - |
| 11 | | | | | | | | | | | | / | - | - | - |
| 10 | | | | | | | | | | | | | / | - | - |
| 13 | | | | | | | | | | | | | | n.t. | - |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | / |

a) +, 菌叢の接触部位でタフト形成あり (第3図 A~C); -, 菌叢の接触部位でタフト形成なし (第3図 D); /, 菌叢が融合した (第3図 E); n.t., 未調査.

b) “PP97 単” は共通のため, 記載を省略した.



第3図 ナシ萎縮病菌単担子胞子分離菌株間の対峙培養時における菌叢接触部位での反応

A~Cは和合性反応(+), Dは不和合性反応(-)

A, 菌叢の接触部位のみにタフトを形成 (PD001 単 10 と単 16 の対峙培養); B, 菌叢の接触部位から片方の接種源に至るまでの領域においてタフトを形成 (PD001 単 1 と単 3 の対峙培養); C, 菌叢の接触部位から両方の接種源に至るまでの領域においてタフトを形成 (PD001 単 14 と単 16 の対峙培養); D, タフトを形成せず, 菌叢間に境界を形成 (PD001 単 11 と単 16 の対峙培養); E, 菌叢間で境界を形成せず, 菌叢が融合 (PES0201 単 19 同士の対峙培養).

株の全ての組合せおよび PD001 単担子胞子分離系統の 5 菌株と PP97 単担子胞子分離系統の 5 菌株の全ての組合せで, タフト形成が認められた (第7表). また, PES0201 単担子胞子分離系統の 5 菌株と PP97 単担子胞子分離系統の 5 菌株のほとんどの組合せでタフト形成が認められた (第7表). 各組合せとも形成されたタフトのうち 10 タフトから菌株を分離した. タフトから分離された菌株は, 菌叢内で帯線が形成されることなく, 菌叢は一樣に発達した.

(3) ISSR マーカーによる多型解析

1) 単担子胞子分離系統内交配に由来するタフト菌株における多型解析 PD001 単担子胞子分離菌株間の 11 組合せのうち 4 組合せ (PD001 単 1 × PD001 単 3, PD001 単 1 × PD001 単 14, PD001 単 10 × PD001 単 18, PD001 単 2 × PD001 単 18) でバンドパターンの違いがみられ, その対峙培養により

得られた全てのタフト菌株において, 交配元である単担子胞子分離菌株 2 菌株がそれぞれ有するバンドの両方が検出された (第4図). これらのタフト菌株は, 第3図の A~C のいずれかの反応を示した組合せに由来し, その反応の種類に関わりなく, 両方のバンドが検出された (データ省略). 残りの 7 タフト菌株については, 双方の単担子胞子分離菌株間にバンドパターンの違いがみられず, 交配元である単担子胞子分離菌株 2 菌株の核の共存が確認できなかった (データ省略). また, PP97 単担子胞子分離菌株間の 4 組合せのうち 1 組合せ (PP97 単 6 × PP97 単 13) でバンドパターンの違いがみられ, その対峙培養により得られたタフト菌株において, 交配元である単担子胞子分離菌株 2 菌株がそれぞれ有するバンドの両方が検出された. PES0201 単担子胞子分離菌株間については, 11 の組合せについて解析したが, 双方の単担

第7表 ナシ萎縮病菌 3 菌株由来の単担子孢子分離菌株を用いた系統間交配試験の結果^{a)}

| 菌株 | PES0201 単 | | | | | PP97 単 | | | | |
|-----------|-----------|---|---|---|---|--------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| PES0201 単 | 1 | | | | | + | + | + | + | + |
| | 2 | | | | | △ | + | △ | + | + |
| | 3 | | | | | + | + | + | + | △ |
| | 4 | | | | | + | + | △ | + | + |
| | 5 | | | | | + | + | + | + | + |
| PD001 単 | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

a) +, 菌叢の接触部位でタフト形成あり (第3図A~C); -, 菌叢の接触部位でタフト形成なし (第3図D); △, 不明瞭のため判定できず.

子孢子分離菌株にバンドパターンの違いがみられず, 交配元である単担子孢子分離菌株 2 菌株の核の共存が確認できなかった (データ省略).

2) 単担子孢子分離系統間交配に由来するタフト菌株における多型解析 PD001 単担子孢子分離菌株と PES0201 単担子孢子分離菌株間の組合せのうち, バンドパターンの違いがみられた 4 つの組合せ (PD001 単 2 × PES0201 単 1, PD001 単 2 × PES0201 単 5, PD001 単 4 × PES0201 単 3, PD001 単 5 × PES0201 単 2) の対峙培養により得られた全てのタフト

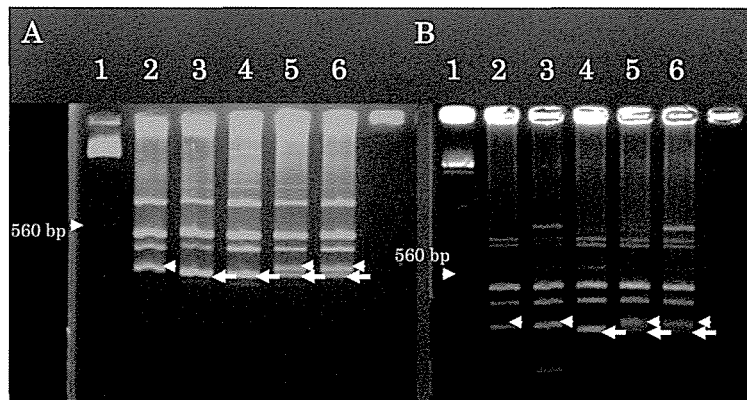
菌株からは, 交配元である単担子孢子分離菌株 2 菌株がそれぞれ有するバンドの両方が検出された (第5図A).

PES0201 単担子孢子分離菌株と PP97 単担子孢子分離菌株間では, 解析したすべての組合せ (PES0201 単 1 × PP97 単 2, PES0201 単 1 × PP97 単 3, PES0201 単 3 × PP97 単 4) で得られたタフト菌株で, 交配元である双方の単担子孢子分離菌株のバンドが検出された (第5図B). また, PP97 単担子孢子分離菌株と PD001 単担子孢子分離菌株間では, 解析した 3 つの組合せのうち 2 つ (PD001 単 2 × PP97 単 3, PD001 単 3 × PP97 単 4) で同様の結果が得られた (データ省略). いずれのタフト菌株においても, 多型検出に関して, タフト形成反応による違いはなかった (データ省略).

考 察

Fomitiporia 属菌はほとんどがホモトリックな交配系を有するとされ (Fischer, 1996), 例外的に *F. mediterranea* M. Fischer がヘテロトリックであることが報告されている (Fischer, 2002). また *Fomitiporia* 属は, 従来 *Phellinus* 属とされていた属 (広義の *Phellinus* 属) が細分化されて設けられた属であり, 狭義の *Phellinus* 属と同様に菌糸はクランプ結合を欠く (Fischer and Binder, 2004; Wagner and Fischer, 2002). そのため, 他の担子菌のように, クランプ結合を有する二次菌糸の出現に基づいて交配成立を確認する (有田, 1983) ことができない.

これまで幾つかの *Fomitiporia* 属菌や近縁の *Phellinus* 属菌については対峙培養を用いた交配試験が行われている



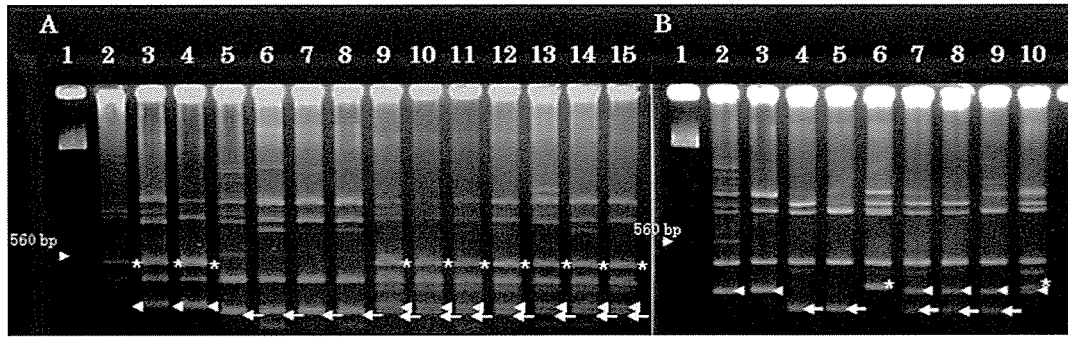
第4図 ナシ萎縮病菌の単担子孢子分離系統内の交配試験で用いた単担子孢子分離菌株およびタフト分離菌株における ISSR 解析による多型の検出

(GTG)₅ プライマーを用いて得られた PCR 産物を 3%アガロースゲルで電気泳動した. 図中の矢尻および矢印はそれぞれマーカーとしたバンドを示す.

PD001 株由来の単担子孢子分離系統内の交配試験で用いた単担子孢子分離菌株と得られたタフト菌株における多型.

A. 1, λHindIII マーカー; 2, PD001 単 1; 3, PD001 単 3; 4, PD001 単 14; 5, PD001 単 1/PD001 単 3 タフト; 6, PD001 単 1/PD001 単 14 タフト.

B. 1, λHindIII マーカー; 2, PD001 単 2; 3, PD001 単 10; 4, PD001 単 18; 5, PD001 単 2/PD001 単 18 タフト; 6, PD001 単 10/PD001 単 18 タフト.



第5図 ナシ萎縮病菌の単担子胞子分離系統間の交配試験で用いた単担子胞子分離菌株およびタフト分離菌株における ISSR 解析による多型の検出

(GTG)₅ プライマーを用いて得られた PCR 産物を 3% アガロースゲルで電気泳動した。図中の矢尻、矢印およびアスタリスクはそれぞれマーカーとしたバンドを示す。

A. PD001 と PES0201 由来の単担子胞子分離系統間の交配試験で用いた単担子胞子分離菌株と得られたタフト菌株における多型。

1, λ HindIII マーカー；2, PD001 単 2；3, PD001 単 4；4, PD001 単 5；5, PES0201 単 1；6, PES0201 単 2；7, PES0201 単 3；8, PES0201 単 5；9, PD001 単 2/PES0201 単 1 タフト 1；10, PD001 単 2/PES0201 単 1 タフト 2；11, PD001 単 2/PES0201 単 5 タフト 1；12, PD001 単 2/PES0201 単 5 タフト 2；13, PD001 単 4/PES0201 単 3 タフト；14, PD001 単 5/PES0201 単 2 タフト 1；15, PD001 単 5/PES0201 単 2 タフト 2。

B. PES0201 と PP97 由来の単担子胞子分離系統間の交配試験で用いた単担子胞子分離菌株と得られたタフト菌株における多型。

1, λ HindIII マーカー；2, PES0201 単 1；3, PES0201 単 3；4, PP97 単 2；5, PP97 単 3；6, PP97 単 4；7, PES0201 単 1/PP97 単 2 タフト 1；8, PES0201 単 1/PP97 単 2 タフト 2；9, PES0201 単 1/PP97 単 3 タフト；10, PES0201 単 3/PP97 単 4 タフト。

タフト株 1 およびタフト株 2 は第 3 図 C の反応におけるそれぞれの接種源側のタフトから分離された菌株で、タフト 1 は“f”の左、タフト 2 は“f”の右の単担子胞子分離菌株側のタフトから分離したことを示す。

(Fischer, 1994, 1996, 2002) . ホモタリックである *F. punctata* (P. Karst.) Murrill では、全ての組合せでわずかに拮抗反応がみられたものの、二次菌糸とみなすタフトの発達は認められなかったとしている。ヘテロタリックである *P. pini* (Brot. : Fr.) A. Ames や *F. mediterranea* の場合、タフトの形成の有無によって、交配の可否が判断されているが、核の移行は未確認であった。本研究により、ナシ萎縮病菌の単担子胞子分離菌株間の対峙培養においても、菌叢の接触部位にタフトが形成されることを確認した。そして、このタフトから得られた菌株について ISSR マーカーによる多型解析を行った結果、タフト分離菌株が由来する双方の単担子胞子分離菌株の核を有すると考えられた。すなわち、タフトが交配（核の移行）により形成された二次菌糸からなることが示された。今後、本マーカーを利用した試験事例を重ねることで、*Fomitiporia* 属菌および *Phellinus* 属菌における交配の成否判定の指標としてタフト形成を利用することの正確性・厳密性を示すことができると思われる。

また本研究では、ナシ萎縮病菌における核数の調査を行い、菌糸細胞における核数の違いによって一次菌糸と二次菌糸が区別できる可能性を検討した。しかし、担子胞子では主に 1 核であったものの、菌糸細胞では栄養菌糸分離菌株では 2～6 個の核が確認され、その子実体から得た単担子胞子分

離菌株でも 1～6 個の核が確認され、両者を明確に区別することはできなかった。これまでも *Phellinus* 属菌は菌糸の細胞あたりの核の数は一定でないとしてされており (Hennon and Hansen, 1987), ナシ萎縮病菌においても核観察による交配の可否の判定は困難であると判断された。

ヘテロタリックな担子菌の交配系において、性は二つ以上に分化していて形態的に区別ができないため、極性と表現される。不和合性因子の構成（交配型）が異なる一次菌糸同士で交配は起こり、1 対の不和合因子（1 遺伝子座の複対立遺伝子など）によって和合性が決まる 2 極性、2 対の不和合因子の組合せによって和合性が決まる 4 極性等が知られている。これまで報告されている *Fomitiporia* 属菌の中では、唯一、ヘテロタリックである *F. mediterranea* は 2 極性であった (Fischer, 2002) . 本研究で行われた交配試験では、PD001, PES0201 の各単担子胞子分離系統内において、一部例外的な反応を示す菌株がみられたものの、概ねそれぞれ 4 極性、2 極性の交配パターンを示した（第 4, 5 表）。一方、PP97 単担子胞子分離系統内において、明瞭な交配パターンは見られなかったが、4 極性とは矛盾しない結果が得られている（第 6 表）。各単担子胞子分離系統内において、交配パターンが異なるなど、ナシ萎縮病菌の交配系が判然としなかった理由は不明であるが、*Fomitiporia* sp. がヘテロタリックな交配系を

有することが明らかとなった。また、本研究において、93%の胞子が1核であったことから、2核の担子胞子に由来する単担子胞子菌株が供試された可能性は低いが、2核の担子胞子は発芽して二次的にホモタリクな菌糸を生じる可能性があり、これについては、今後、明らかにする必要がある。

Fischer (1994) の報告では、*P. pini* のタフトの形成は菌叢の接触部位で起こるとしたが、ナシ萎縮病菌 *Fomitiporia* sp. のタフト形成は、菌叢の接触部位に限らず、接触面から接種源に至るまでの領域において見られた。また、Rizzo *et al.* (1995) は *P. gilvus* (Schw.) Pat. の対峙培養による交配試験において、核の移行が両方向に起こるものと、接触部位に限られるものがあることを述べている。本研究では、第3図A、BおよびCのいずれの反応におけるタフトについても、ISSRマーカーを用いた解析により、これらは交配により生じた二次菌糸であることを明らかにした。第3図A、BおよびCの和合性反応が何に起因する違いなのかは不明であるが、核の移行パターンにはいくつかの種類が存在する可能性が示唆された。

ナシ萎縮病菌、*Fomitiporia* sp. (チャアナタケモドキ) はナシとスギの双方を宿主とする病原菌で (青島ら, 1964; 今関, 1960; 金子ら, 2011), その他の広・針葉樹上でも認められる (服部ら, 2010; 太田ら, 2010)。 *Phellinus* 属を含め、植物病原性の硬質担子菌類には、形態的に同種とされる菌の中に宿主植物を異にして交配を行わない菌群 (intersterile group) あるいは生物学的種 (biological species) が存在する例が知られており (Dai *et al.*, 2002; Fischer, 1994; 澤島・林, 2002), *Fomitiporia* sp. においてもそのような種内群が存在する可能性がある。これまでに *Phellinus* 属菌の子実体を人為的に発生させた報告例があり (Lim *et al.*, 2008), 本研究では *Fomitiporia* sp. の子実体を人為的に作出した。これらを応用した子実体形成法を開発することで、栄養菌糸由来の保存菌株から単担子胞子菌株を効率的に得ることができる。今後、様々な樹種から得られた *Fomitiporia* sp. 菌株間における交配の可否を調査することによって、種内群の存在を明らかにする必要がある。

本研究で、ナシ萎縮病菌がヘテロタリクな交配を行うことが明らかにされたことから、本菌が樹体内に伸展するためには交配を必要とすると考えられる。今後は、本菌の交配行動 (二次菌糸形成) を阻害することを目的に、担子胞子の飛散時期や一次菌糸の植物体への定着条件を明らかにして、ナシ萎縮病菌の生活環の解明と薬剤防除等を含めた効率的な予防法の開発を行うことが求められる。

摘 要

ナシ萎縮病を引き起こす担子菌類の *Fomitiporia* sp. の交配

系は不明であった。よって、その病原菌の交配系を明らかにするために、材質腐朽組織から分離した2菌株から作出した子実体および1菌株の分離源である自然発生した子実体の合計3子実体から単担子胞子分離系統を作出し、対峙培養による交配試験をおこなった。担子胞子、栄養菌糸および単担子胞子分離菌株の菌糸の核数を調査したところ、担子胞子は概ね1核で、栄養菌糸の菌糸細胞は2~6個、単担子胞子分離菌株の菌糸細胞は1~6個を有する多核であった。このことから、一次菌糸と二次菌糸を核の数から区別することは困難であった。交配試験は各系統につき15~25菌株の単担子胞子分離菌株を用いて総当たりで行った。和合性反応はいずれの単担子胞子分離系統内においても数多く確認され、菌叢の接触部付近にタフトが形成された。単担子胞子分離菌株およびタフト分離菌株についてマイクロサテライトを標的とする (GTG)₅ プライマーによるDNA多型を検出したところ、タフト分離菌株が二次菌糸であることが明らかとなった。一方、不和合性の反応としては菌叢接触部付近にタフト形成はみられなかった。単担子胞子分離系統内交配パターンは不明瞭であったが、本菌は2極性あるいは4極性と推定された。また、異なる子実体に由来する単担子胞子分離系統間においては、ほとんどの場合で和合性反応を示した。以上のことから、ナシ萎縮病菌である *Fomitiporia* sp. はヘテロタリクな交配系を有することが明らかとなった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、徳島県農林水産総合支援センター果樹研究所の辻雅人氏および鳥取県農林総合研究所園芸試験場の安田文俊氏には供試菌株を快く分譲いただいた。また、(独) 森林総合研究所の服部力氏に菌の同定・分類に関する貴重な情報をいただいた。ここに記して厚く御礼申し上げる。

引用文献

- Adaskaveg, J.E. and Ogawa, J.M. (1990). Wood decay pathology of fruit and nut trees in California. *Plant Dis.* 74: 341-352.
- 青島清雄・米林俵三・近藤秀明 (1964). サンプスギの非赤枯性溝腐病. *日林講* 75: 394-397.
- 有田郁夫 (1983). 菌類研究法 (青島清雄ほか編). pp. 155-172, 共立出版, 東京.
- Dai, Y.-C., Vainio, E.J., Hantula, J., Niemela, T. and Korhonen, K. (2002). Sexuality and intersterility within the *Heterobasidion insulare* complex. *Mycol. Res.* 106: 1435-1448.
- Fischer, M. (1994). Pairing tests in the *Phellinus pini* group. *Mycologia* 86: 524-539.
- Fischer, M. (1996). On the species complexes within *Phellinus: Fomitiporia* revisited. *Mycol. Res.* 100: 1459-1467.
- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species

- with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycol. Prog. 1: 315–324.
- Fischer, M. and Binder, M. (2004). Species recognition, geographic distribution and host-pathogen relationships: a case study in a group of lignicolous basidiomycetes, *Phellinus* s.l. Mycologia 96: 799–811.
- Gatza-Chapa, R. and Anderson, N.N. (1966). Behavior of single-basidiospore isolates and heterokaryons of *Rhizoctonia solani* from Flax. Phytopathology 56: 1260–1268.
- Goldman, J.J. (2008). The use of ISSR markers to identify Texas bluegrass interspecific hybrids. Plant Breed. 127: 644–646.
- 服部 力 (2000). 菌類の採集・検出と分離: 材質腐朽性硬質菌類. 日菌報 41: 197–203.
- 服部 力・太田祐子・中村 仁・寺嶋芳江 (2010). チャアナタケモドキの形態学的特徴. 日林学術講 121: 703. (講要)
- Hennon, P.E. and Hansen, E.M. (1987). Nuclear Behavior of *Phellinus arctostaphyli*, *P. igniarius*, and *P. tremulae*. Mycologia 79: 501–507.
- 今関六也 (1960). 山武杉の新しい病気, 非赤枯性の溝腐れ病とその生態的防除論. 森林防疫ニュース 9: 230–235.
- Julian, M.C., Debets, F. and Keijer, J. (1996). Independence of sexual and vegetative incompatibility mechanisms of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) anastomosis group 1. Phytopathology 86: 566–574.
- 金子洋平・中村 仁・塩田あづさ・鈴木 健・服部 力・太田祐子・安田文俊・幸由利香・北口美代子・牛尾進吾 (2011). ナシ萎縮病菌 *Fomitiporia* sp. の同定及び定義付け. 日植病報 77: 168. (講要)
- Lim, Y.W., Sturrock, R., Leal, I., Pellow, K., Yamaguchi, T. and Breuil, C. (2008). Distinguishing homokaryons and heterokaryons in *Phellinus sulphurasens* using pairing tests and ITS polymorphisms. Anton. Leeuw. 93: 99–110.
- Nazrul, M.I. and Bian, Y.-B. (2010). ISSR as new markers for identification of homokaryotic protoclones of *Agaricus bisporus*. Curr. Microbiol. 60: 92–98.
- 太田祐子・服部 力・中村 仁・寺嶋芳江 (2010). コウヤマキ, スギの幹腐れおよびナシ葉の萎縮症状を引き起こす病原菌の関係について. 日林学術講 121: 704.
- Rizzo, D.M., Rentmeester, R.M. and Burdsall, H.H. Jr. (1995). Sexuality and somatic incompatibility in *Phellinus gilvus*. Mycologia 87: 805–820.
- 佐久間勉・高村尚武・落合政文・小林 正・阿部恭久・田中寛康・高梨和雄 (1993). ニホンナシに発生するヒボキシロン幹腐病 (新称) と萎縮病. 果樹試報 24: 45–59.
- 澤島拓夫・林 康夫 (2002). 日本産 *Phellinus pini*-complex の交配試験および形態学的研究. 日菌報 43: 51–59.
- 塩田あづさ・金子洋平・鈴木 健・中村 仁・服部 力 (2010). ナシ萎縮病は *Fomitiporia* sp. によって引き起こされる. 日植病報 76: 156. (講要)
- Wagner, T. and Fischer, M. (2002). Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l. and phylogenetic relationships of allied genera. Mycologia 94: 998–1016.
- Ward, S., Fleischmann, C.E., Turner, M.F. and Sing, S.E. (2009). Hybridization between invasive populations of Dalmatian toadflax (*Linaria dalmanica*) and yellow toadflax (*Linaria vulgaris*). Inv. Plant Sci. Manage. 2: 369–378.
- Zhou, Z., Miwa, M. and Hogetsu, T. (1999). Analysis of genetic structure of a *Suillus frevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytol. 144: 55–63.