

RAPD法を用いた白紋羽病菌系統判別の試み

生井 潔・須永哲央・木嶋利男

摘要：白紋羽病は果樹類を中心に多くの植物に病原性を示す難防除病害である。本病は病原学的、遺伝学的解析が遅れているため、防除を難しくしている。そこで本病菌を解析するためRAPD法の可能性について検討した。

1. 本菌におけるpolymerase chain reaction (PCR) に供試可能な簡易DNA抽出法を確立し、random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法のPCR条件を明らかにした。
2. 25菌株を供試し、18種類のプライマーを用いて138個のRAPDマーカーを得た。
3. ナシの同一発病樹から分離した4菌株は全てのマーカーで同じパターンを示したため、同一菌株と思われたが、リンゴの同一発病樹から分離した5菌株は4個のマーカーが異なる2グループに分類された。
4. 得られたRAPDマーカーを用いてクラスター解析を行い系統樹を作成したところ、ナシから分離した印-3が他の菌株と遺伝的距離が離れていた。また、各菌株間の遺伝的距離と分離宿主及び分離場所との関連性は認められなかった。そして、同一圃場内の別々の発病樹から分離した3菌株は、比較的遺伝的距離が離れていた。

キーワード：白紋羽病菌, PCR, RAPD, クラスター解析

Classification of *Rosellinia necatrix* by RAPD Analysis

Kiyoshi NAMAI, Tetsuo SUNAGA, Toshio KIJIMA

Summary: The white root rot is the important disease of various trees by *Rosellinia necatrix* and it is very hard to control. Since there have been few pathological and genetical studies, so RAPD analysis examined. At first, the DNA extraction method of *R. necatrix* and condition of PCR for RAPD analysis was established. Then 138 RAPD markers detected using 18 primers among 25 strains of *R. necatrix*. 4 isolates of the same pear tree indicated identical RAPD pattern, but 5 isolates of the same apple tree differed in 2 groups. The differences between the 2 groups were in the 4 RAPD makers. Also there was a genetical distance among Inn-3 and other strains in the dendrogram by cluster analysis. No relationship of the genetical distance of each strain and the isolated plants or the isolated places was found. Then 3 isolates of each different diseased tree in the same field were separated comparatively.

Key words: *Rosellinia necatrix*, PCR, RAPD, cluster analysis

I 緒 言

白紋羽病は *Rosellinia necatrix* (不完全世代名: *Dematophora necatrix*) によって引き起こされる土壌病害で、ブドウ、ナシ、リンゴを初めとした多くの果樹や樹木を中心として広い寄生性を示し43科83種の植物で報告がある³⁾。栃木県内では、ナシやブドウで本病の発生が認められ、特にブドウの早期加温ハウス栽培で問題となっている。最初に認められる地上部での顕著な病徴は新梢の生育が悪くなることであるが、この時点では既に根部の病徴は進んでおり、根に菌糸束が絡みつき(写真1)、その後多くの場合は枯死に至る。防除法については、フルアジナムSCの土壌灌注処理による高い防除効果が認められるが^{11,12)}、根を堀上げ、罹病組織を除去してから処理していることから、県内の栽培体系等を考慮すると現実的な防除法ではないと考えられる。そのため、枯死した樹を改植することで対応しているのが現状であるが、改植した樹も3年程度で発病する場合が多いことから、簡易で確実な防除対策の確立が望まれている。一方で、特に問題となっている栽培体系が樹に負担をかけやすいことや、同じ栽培体系でも圃場によって発病程度に差が認められること等から、耕種的な防除による可能性も示唆される。

このように本病は有効な防除対策が確立されていない難防除病害であるが、それに反して病原菌についての解析は進んでおらず、特に遺伝学的、病原学的に解明されていない点が多い。白紋羽病菌は菌糸塊を形成して侵入座となり、そこから発達する菌糸が組織の細胞縫合部を裂開するか直接コルク層を貫通して侵入することから¹⁴⁾、本菌の強力なセルラーゼ活性が²⁾組織への侵入に関係すると考えられる。また、サイトカラシンE(CE)を産生することが知られており、感染したリンゴ及びナシの根からCEが検出されているが、菌の産生するCEと病原性との関連性については解明されるに至っていない⁶⁾。また *R. necatrix* は子のう菌類に分類され、子のう殻や分生胞子を形成するが^{1,7,14)}、人工培地上では子のう殻が形成されず、フスマ培養等で人工接種を行い、敷きわら等のマルチを行うことで形成されるため¹⁾、現状での遺伝学的な解析は難しい。そこで、培地上での子のう殻形成条件を解明し、交配型や病原性等の遺伝的

な重要形質について明らかにしていくことが必要であり、より有効な防除法を確立するためには不可欠と思われる。

今後様々な解析を行うにあたり、DNAレベルでの解明が必要と考えられるため、まず、簡易で応用範囲の広いRAPD法を用いて収集した白紋羽病菌の解析を行い、得られたRAPDマーカーによって系統樹を作成することで若干の知見が得られたので報告する。

なお、今回我々が分離し実験に供試した菌株も、現在のところ子のう殻の形成をみていない。そのため、菅・奈須田の白紋羽病菌選択分離培地上でBavendamm氏反応によるBrown haloが認められ、洋ナシ型のこぶ状菌糸(写真2)を形成したものを白紋羽病菌とした⁴⁾。また、本稿の一部は平成10年度日本植物病理学会大会で報告した。

II 材料及び方法

1. 供試菌株

供試した白紋羽病菌株は25菌株で、その分離源と分離場所は第1表に示した。ただし、栃木6～10の5菌株及び栃木11～14の4菌株はそれぞれ同一発病樹から分離した菌株である。また、栃木1～3は同一圃場の別の発病樹から分離した。

2. 菌の培養及びDNAの抽出

供試した白紋羽病菌はポテトデキストロース寒天(PDA)斜面培地で保存した。DNA抽出に供試する菌糸体は、PDA斜面培地から移植し、直径90mmのシャーレに分注したポテトデキストロース液体(PDB)培地を用いて25℃で静置培養した。培地表面が菌糸体のマットで覆われた後収穫し、純水で洗浄して水分をペーパータオルでできる限り除いてから、Lee and Taylorの方法⁸⁾を

第1表 供試菌株

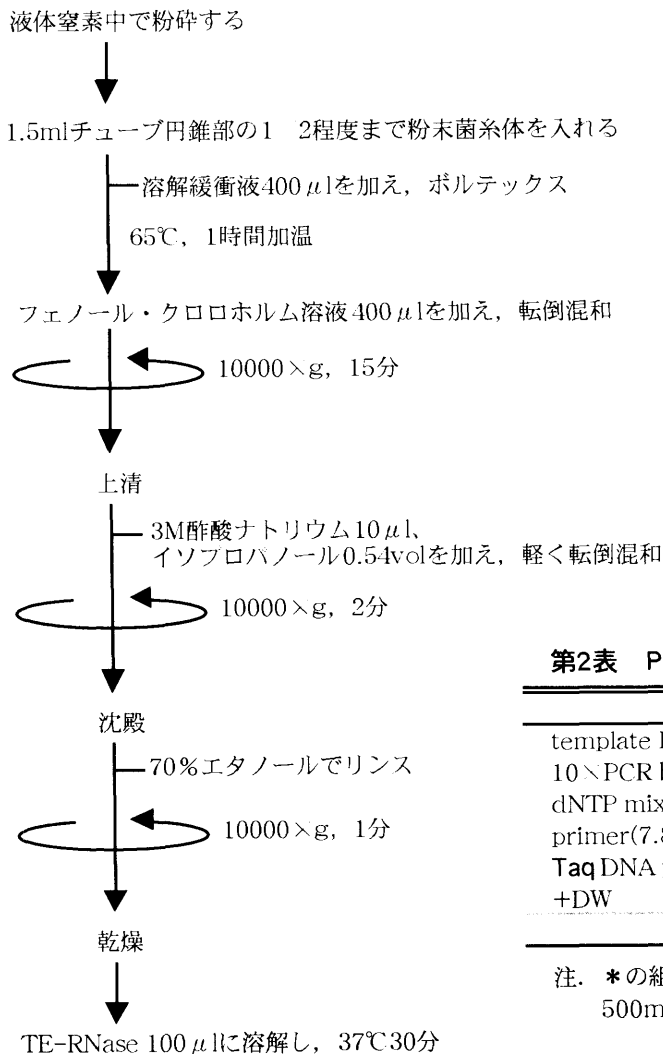
菌株名	分離植物	分離場所
印-3	ナシ	千葉農試より分譲
R-24	クリ	"
岡山3	アスバラガス	岡山農試より分譲
岡山1,2,4,6～10	ブドウ	"
栃木1～5	"	栃木県岩舟町
栃木6～10	リンゴ	栃木県矢板市
栃木11～14	ナシ	栃木県宇都宮市
計 25菌株		

注. 栃木1～3は同一圃場内の異なる発病樹から分離
 栃木6～10及び11～14はそれぞれ同一発病樹から分離

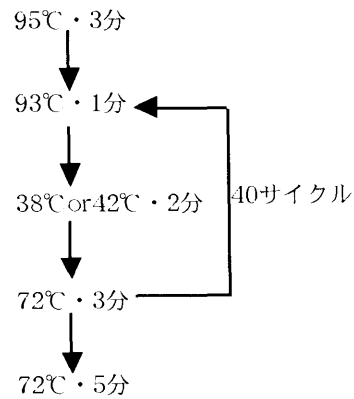
RAPD法を用いた白紋羽病菌系統判別の試み

用いてDNAを抽出した。つまり、液体窒素中で菌糸体を粉碎し、1.5ml遠心チューブ円錐部の1/2程度を満たし（50～100mg程度）、400 μ lの溶解緩衝液（50mM Tris-HCl pH7.2, 50mM EDTA, 3%SDS, 1% 2-メルカプトエタノール）を加え、ボルテックスミキサーで良く混合した後65℃で1時間加温する。次にフェノール・クロロホルム溶液（TE飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール＝25：24：1）を加え転倒混和し、

10000×g、室温で15分間遠心した後、上清を新しいチューブに移し、10 μ lの3M酢酸ナトリウム、0.54容量のイソプロパノールを加えて転倒混和し、DNAを析出させる。その後10000×g、室温で2分間遠心して上清を捨て、70%エタノールでリンスした後、DNAの沈殿を乾燥し、100 μ lのTE-RNase溶液（10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, RNase A 20 μ g/ml）に溶解させ、37℃で30分間加温してRNase処理したものをDNA試料とした（第1図）。



第1図 糸状菌DNAの抽出方法



第2図 PCR条件

第2表 PCR反応溶液組成

成分	容量	終濃度
template DNA	1.0 μ l	0.5～2ng程度
10×PCR buffer*	2.5 μ l	1×
dNTP mixer(各2.5mM)	2.0 μ l	0.2mM
primer(7.8 μ M)	1.6 μ l	0.5 μ M
Taq DNA polymerase(5U/ μ l)	0.2 μ l	1U
+DW		
計	25 μ l	

注. *の組成は100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂

第3表 供試プライマーとアニーリング温度

3. RAPD解析

1) DNA試料の濃度推定

DNA試料を $1\mu\text{l}$ とり、Sambrook et alの方法¹³⁾によりTris-borate-EDTA (TBE) を用いた0.7%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム (EtBr) 染色した後、紫外線照射下で写真撮影した。それにより、 $0.1\mu\text{g}$ /レーンの量を泳動したDNAサイズマーカー (λ /HindIII digest) と比較しDNA濃度を推定した。

2) 供試プライマー

プライマーはニッポンジーンの12merのオリゴヌクレオチドA02~A08, A22, A24, A29, A30, A41, A44の13種類及びOperon Technologiesの10merのオリゴヌクレオチドOPA-01, OPA-02, OPA-06, OPA-09, OPA-13, OPD-01~OPD03の8種類、計21種類を供試した。

3) PCR条件及びRAPD解析

PCR反応溶液の組成は矢野の方法¹⁶⁾に従ったが、糸状菌はゲノムサイズが小さいことから、鋳型DNAについてはWhiteらの方法¹⁵⁾を参考にし、抽出したDNA試料を10倍希釈した後 $1\mu\text{l}$ を鋳型DNAとして供試した(第2表)。Taq DNA Polymeraseは宝酒造、PCR装置はMJ RESEARCHのPTC-100-96VのHot Bonnet付きを使用し、第2図の条件及び第3表のアニーリング温度でPCRを行った。その後TBE-1.5%アガロースゲル電気泳動してEtBr染色して、紫外線照射下で写真撮影し、その写真からバンドのサイズを推定してRAPDマーカーとした。

4) 系統樹の作成

得られたRAPDマーカーにより解析ソフト「Systat」を用いてクラスター解析を行い、系統樹を作成した。

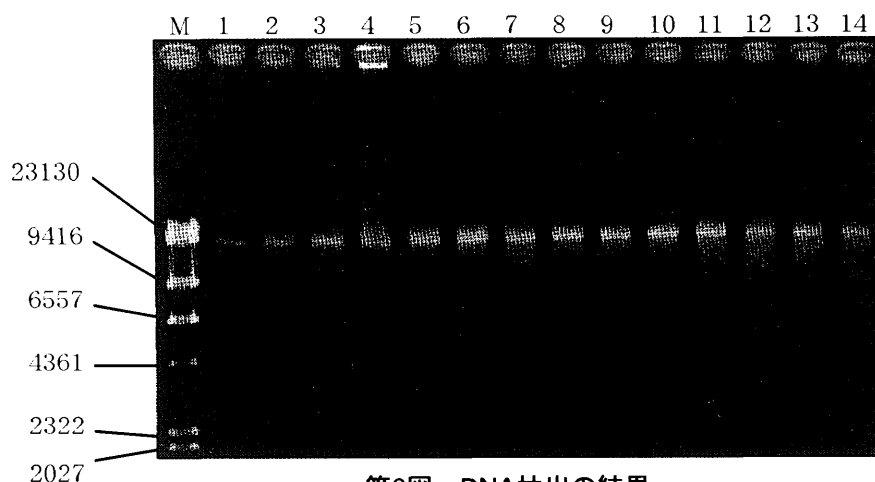
III 結果及び考察

1. DNA抽出条件の検討

白紋羽病菌のDNA抽出に、簡易な抽出法であるLee and Taylorの方法⁸⁾が適用可能かどうか検討した。できる限り水分を除去した生の菌糸体50~100mg程度を供試し、得られたDNAの沈殿は $100\mu\text{l}$ のTEに溶解させた。そのうちの $1\mu\text{l}$ を電気泳動に供試したところ、20Kb以上の大きさのDNAが $5\sim 20\text{ng}/\mu\text{l}$ 程度の濃度で得られていると推定された(第3図)。したがって、本法により $500\text{ng}\sim 2\mu\text{g}$ のDNAが抽出できることが明らかとなった。またこのDNA試料を10倍希釈して、 $25\mu\text{l}$ のPCRの系に $1\mu\text{l}$ 供試することを考えると、1000回のPCRに供試することになる。しかしLee and Taylorによると、得られたDNAを $100\sim 500\mu\text{l}$ のTEに溶解し $0.1\sim 10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように調製していることから⁸⁾、我々の少なくとも5倍以上の収量を得ていることになるため、更に収量を上げられる可能性がある。

2. PCR条件の検討

PCRに供試する鋳型DNAは夾雑物が多い場合には反応が阻害されるため、DNAが増幅されない。また、RAPD法は反応条件を変えることで結果が異なってしまうこと



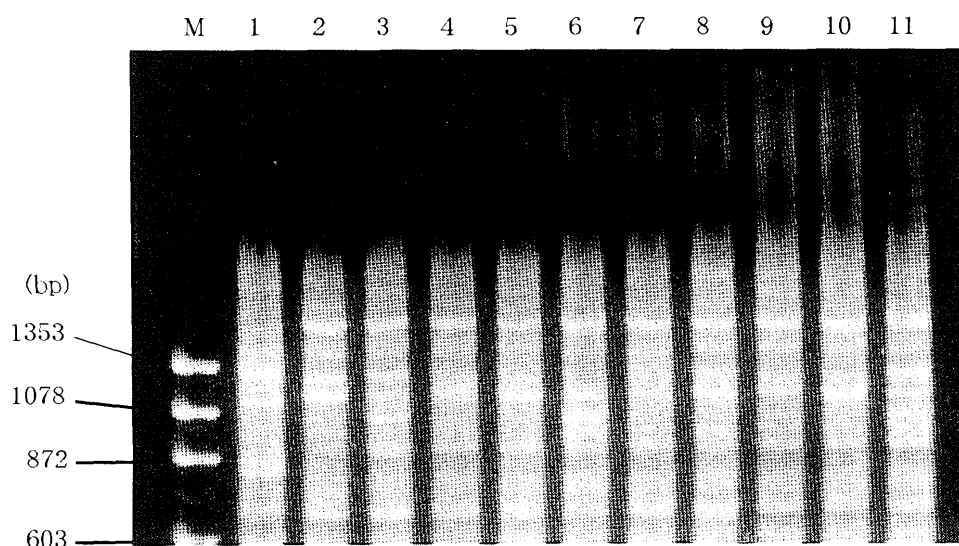
第3図 DNA抽出の結果

レーンM: マーカー (λ /HindIII digest) $0.1\mu\text{g}$
レーン1~14: 栃木1~14 各レーン $1\mu\text{l}$

から、得られたDNA試料をPCRに供試して条件検討を行い、RAPD解析を試みた。

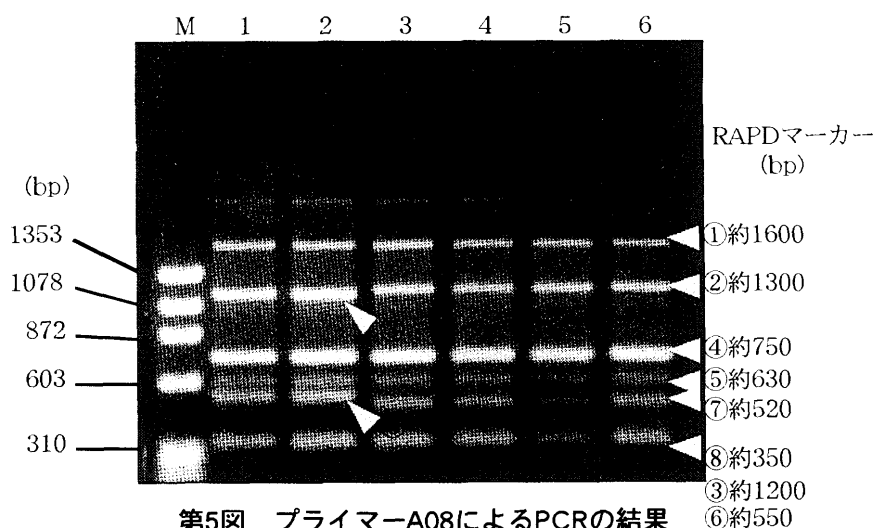
PCR反応溶液は鋳型DNA量を減少した以外は植物で行われている一般的な組成とし、アニーリングの温度についてはプライマーのmelting temperature (T_m) を考慮し¹⁰⁾、ニッポンジーンのパライマーは T_m の5℃下、Operon Technologiesのパライマーは T_m の1.5℃下に設定した。その結果、プライマーA02及びOPA-01を用いたPCRではバンドが全く現れず、プライマーA03はスメアーなパターンを示したため、RAPDマーカの検索は困難

であった(第4図)。しかし、その他のプライマーについてはバンドが検出されたため、本PCR条件及びDNA抽出法は白紋羽病菌においても適用できることが明らかとなった。また今までに本抽出法は、*Thraustotheca*, *Dictyuchus*, *Apodachlya*, *Aqualinderella*, *Pythium*に適用し、PCRに供試可能であったことから⁸⁾、多くの糸状菌DNAの抽出に適用できるものと思われる。一方、バンドが検出できなかったりスメアーであったプライマーについては、アニーリングの温度を変えることで対応できると予想されるため、今後検討する必要がある。



第4図 プライマーA03を用いたPCRの結果

レーンM: マーカー(ϕ X174/*Hae*III digest), レーン1: 印-3
レーン2: R-24, レーン3~6: 岡山1~4, レーン7~11: 岡山6~10



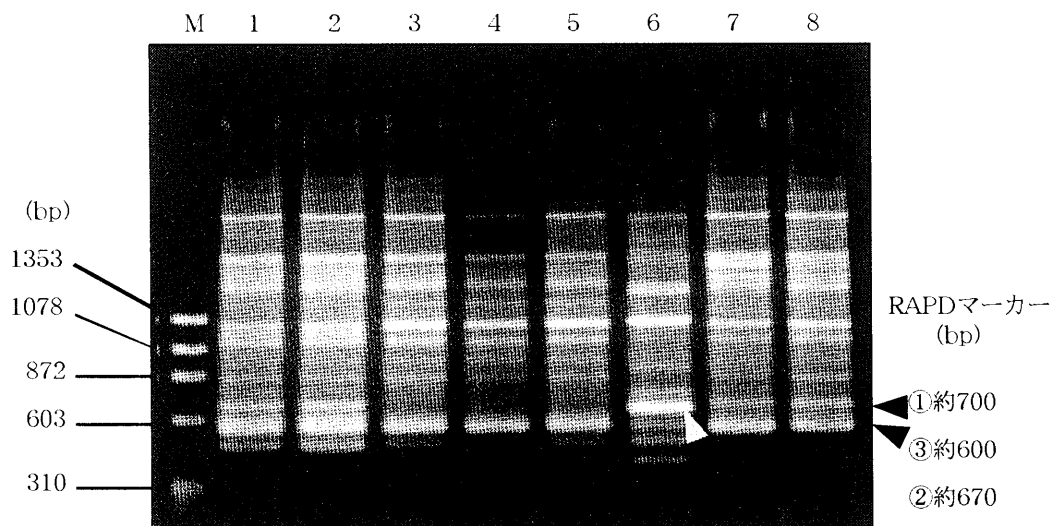
第5図 プライマーA08によるPCRの結果

レーンM: マーカー(ϕ X174/*Hae*III digest)
レーン1~6: 栃木9~14

3. RAPD解析

第5, 6図のようにバンドのサイズを推定し, 多型が認められた18種類のプライマーでRAPDマーカ―を決定していったところ, 138個のマーカ―が得られた(第4表). ナシの同一発病個体から分離した栃木11~14の4菌株は全てのRAPDマーカ―で同じ結果となり, 同一菌株であると考えられた. しかし, 同じくリンゴの同一発病個体

から分離した栃木6~10のうち, A41をプライマーに用いたPCRの結果では, 栃木6, 9, 10と栃木7, 8との間で異なったパターンが認められた(第7図). 栃木6, 9, 10は約700bpのRAPDマーカ―①を有するが, 栃木7, 8にはマーカ―①は存在せず, 若干サイズの小さい約670bpのマーカ―②を持つ. また, 栃木6, 9, 10は約580bpのマーカ―③を有するのに対し, 栃木7, 8は若干小さい約



第6図 プライマーOPD-02によるPCRの結果

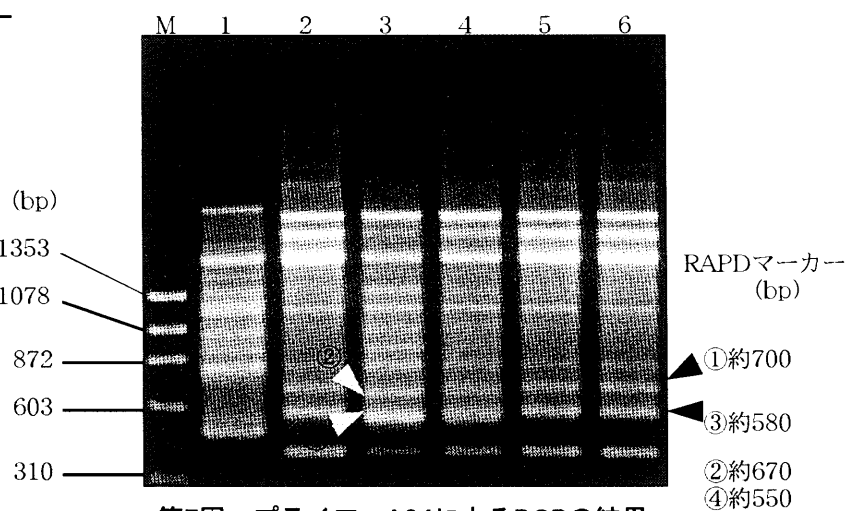
レーンM: マーカ―(ϕ X174/*Hae*III digest)

レーン1~3: 栃木9~11, レーン4: 栃木13, レーン5: 栃木14

レーン6: 印-3, レーン7: R-24, レーン8: 岡山3

第4表 得られたRAPDマーカ―

供試プライマー	マーカ―数
A04	7
A05	7
A06	4
A07	5
A08	13
A22	14
A24	1
A29	5
A30	9
A41	14
A44	9
OPA-02	2
OPA-06	12
OPA-09	12
OPA-13	10
OPD-01	8
OPD-02	4
OPD-03	2
計	138



第7図 プライマーA04によるPCRの結果

レーンM: マーカ―(ϕ X174/*Hae*III digest)

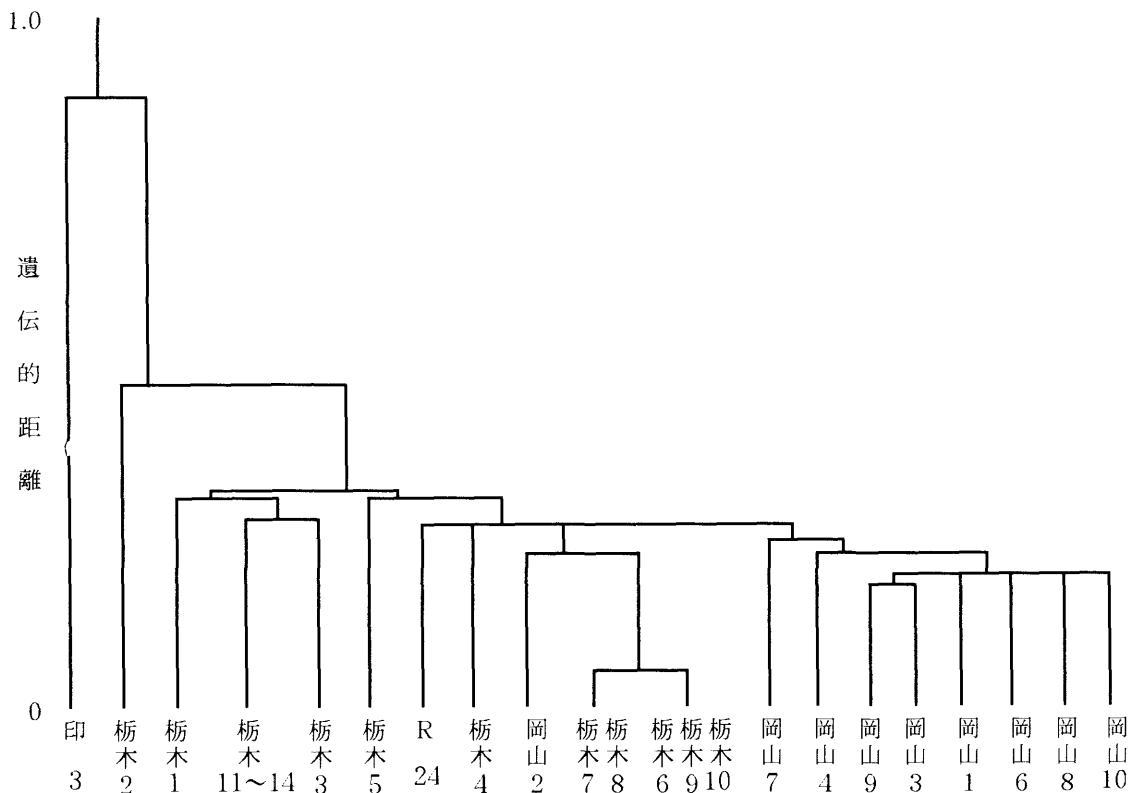
レーン1: 栃木2, レーン2~6: 栃木6~10

550bpのマーカー④と差異が認められるが、マーカー④はバンドが太いことから約550 bpと約580bpの2つのバンドが重なっている可能性も考えられる。これらの結果及び他のマーカーについては全く同じパターンを示すということから、これらの菌株はもとは同じ系統であったが、何らかの変異によって異なるパターンを示すようになったと考えられる。また、栃木6, 9, 10の3菌株と栃木7, 8の2菌株に分類されることから、培養中に変異が起こったとは考え難く、感染した植物体上で変異したと思われる。その他に何らかの形質等に関連する情報を得るため解析を行ったが、供試した菌株数が少ないことや分離源が限られていること及びブドウから分離した菌以外の菌株数が少ないこと等もあり、明らかな傾向は認められなかった。今後はこれらの菌株を接種試験に供試し、病原性等の形質を明らかにしたうえでのRAPD解析や、様々な植物からの分離菌株を得て解析を行うことが必要と思われる。また、子のう殻形成条件が明らかとなり、菌株間の交配が可能になれば、病原性等の何らかの形質に連

鎖したマーカーを得られる可能性もある。いずれにしても、多くの菌株の収集及び子のう殻形成条件の解明が重要な課題である。

4. 白紋羽病菌系統分類の試み

得られたRAPDマーカー138個を用いて解析ソフト「Systat」によりクラスター解析を行い、系統樹を作成したところ、第8図の結果となった。まず、印-3が1菌株だけ遺伝的に離れた位置にあることが目立つ。この結果はリボソームRNA遺伝子 (rDNA) internal transcribed spacers (ITS) 領域のPCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 結果と一致する。つまり、印-3, R-24, 岡山1~4及び岡山5~10の11菌株を供試してrDNA ITS領域のPCR-RFLPを行った結果、PCR産物は印-3のみ約620 bpと推定され、他菌株の約600bpと比較し若干大きく、Hae III, Hha I, Hin f I, Msp I の4種の制限酵素切断により印-3菌株のみ他菌株と異なるパターンを示した（未発表）。また、他菌株と比較して培地上での生育が遅いこと、兼松らによると国内各地から分離された白紋羽病



第8図 得られたRAPDマーカーによる遺伝的類縁関係

菌48菌株のrDNA ITS領域のPCR-RFLPパターンは、分離宿主に関わらず全て同じであったこと⁵⁾ から印-3は非常にユニークな菌株と思われる。

全体的には岡山の分離菌株は遺伝的に比較的まとまりを見せる、栃木の分離菌株はばらつきがあるが、分離場所による明確な分類には至らない。また分離宿主については、ブドウが栃木1~5及び岡山1, 2, 4, 6~10の13菌株であるが、間にリンゴの栃木7~10, ナシの栃木11~14, アスパラガスの岡山3が入っており、分離宿主による分類も難しい。このことは、宿主範囲の広さを支持する結果と考えられる。しかし、*Rhizoctonia solani* のように多犯性の病原菌であるが、菌糸融合群と宿主範囲が密接に関連している菌もあり、白紋羽病菌についても検討する必要がある。また、RAPDマーカーの不足や前述したように菌株の不足も考えられるため、更に解析を進めるためのデータを蓄積することが重要と思われる。

栃木1~3は同一圃場内の異なるブドウの発病樹から分離した菌株であるが、比較的遺伝的距離が離れた結果となった。松本は白紋羽病のhypovirusによる防除の可能性について指摘しており⁹⁾、そのためには圃場内のvegetative compatibility group (VCG) の多様性が低いことが重要となるため、遺伝的距離とVCGの関係について興味を持たれる。

本報告ではRAPD法を用いて系統間の多型を検出し、解析を加えてきたが、本法による白紋羽病菌の解析は十分な可能性を持つと考えられる。しかし、現状では菌株が少ないことや収集した菌の形質についての調査が済んでいないこと等から、より多くのデータを収集して多方面からの解析を進めることが必要と思われる。

謝辞

本研究を行うにあたり、岡山県農業試験場の那須英夫氏、金谷元氏、千葉県農業試験場の梅本清作氏には貴重な菌株を分譲していただいた。栃木県市貝農業改良普及センターの山崎周一郎氏には白紋羽病について有益な示唆をいただいた。当該企画経営部の天谷正行氏にはPCRについてご指導いただいた。栃木県栃木農業改良普及センターの鈴木裕章氏には菌株を収集するにあたりご協力いただいた。ここに記して心から感謝の意を表する。

引用文献

1. 荒木隆男 (1995) 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種—: 309-311. 日本植物防疫協会
2. 荒木隆男・鈴木直治 (1959) 白紋羽病菌及び紫紋羽病菌のセルロース分解酵素. 日植病報24: 19
3. 家城洋之 (1995) 植物病理学事典: 629. 養賢堂
4. 菅正道・奈須田和彦 (1975) 植物残渣ろ過法による白紋羽病菌の土壌検診法. 福井農試報12: 61-91
5. 兼松聡子・小林雅文・大津善弘 (1998) 白紋羽病菌のrDNA ITS領域の解析及び検出用プライマーの設計. 日植病報64: 342
6. Kanematu, S., Hayashi, T. and Kudo, A. (1997) Isolation of *Rosellinia necatrix* Mutants with Impaired Cytochalasin E Production and Its Pathogenicity. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63: 425-431
7. 北島博 (1989) 果樹病害各論: 544-551. 養賢堂
8. Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1991) 菌糸体および単一胞子からのDNA分離. PCR実験マニュアル: 245-249. HBJ出版局
9. 松本直幸 (1997) 病原菌のpopulation biologyを利用した生物防除の可能性. バイオコントロール研究会レポート. 5: 70-74. 日本植物病理学会
10. 中山広樹 (1996) 細胞工学 別冊 目で見える実験ノート シリーズ バイオ実験 イラストレイテット・本当に増えるPCR: 25-27. 秀潤社
11. 那須英男・金谷元・伊達寛敬 (1996) ブドウ白紋羽病に対するフルアジナムSC, プロクロラズ乳剤の土壌灌注処理の効果. 日植病報62: 318
12. 那須英男・金谷元・伊達寛敬 (1997) ブドウ白紋羽病に対するフルアジナムSCの土壌灌注処理の効果. 日植病報63: 222
13. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
14. 鈴木孝仁 (1984) 新版 土壌病害の手引: 141-144. 日本植物防疫協会
15. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1991) 系統発生研究のための真菌リボソームRNA遺伝子の

RAPD法を用いた白紋羽病菌系統判別の試み

増幅と直接シーケンス. PCR実験マニュアル:275-281.
HBJ出版局

別冊 植物生物工学シリーズ2, 植物のPCR実験プロト
コールー遺伝子の単離・発現からゲノム解析までー:
124-128. 秀潤社

16. 矢野博(1995)RAPD法による品種識別. 細胞工学

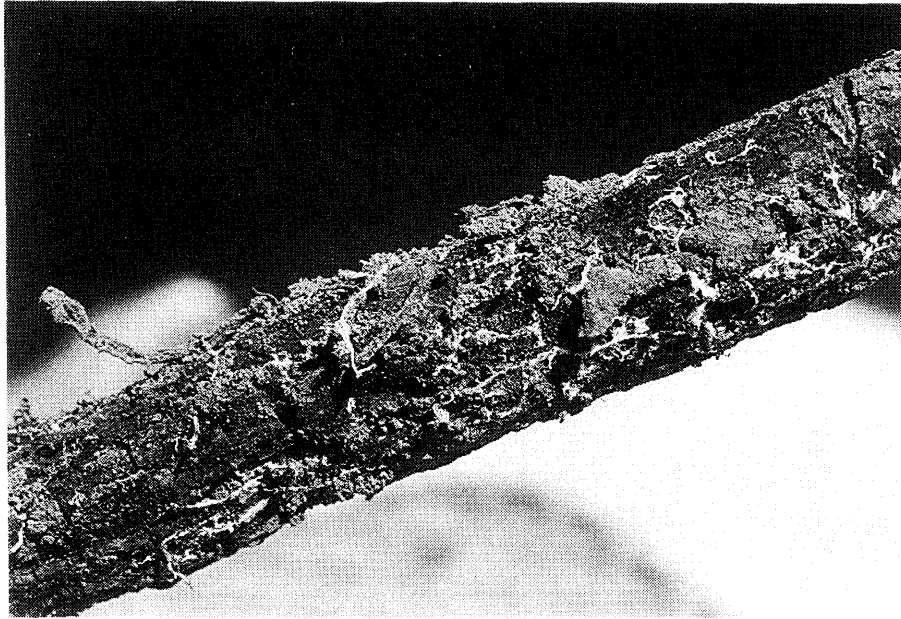


写真1 白紋羽病の菌糸束

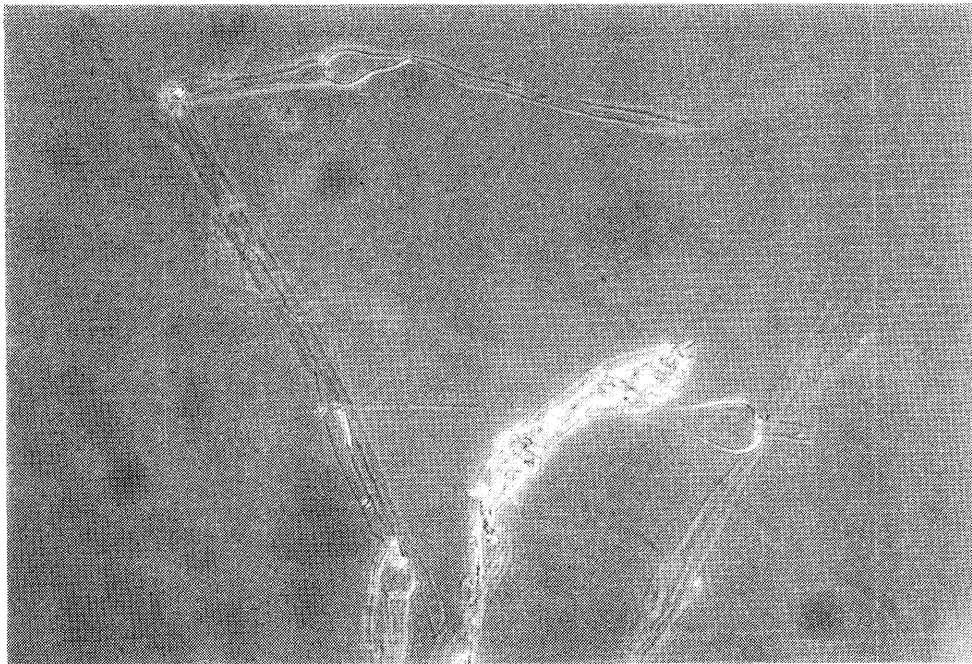


写真2 白紋羽病菌の洋なし型こぶ状菌糸(400倍)