

灰色かび病菌の人工交配法と薬剤感受性の遺伝解析への応用

JA 全農 営農・技術センター

やま だ まさ かず
山 田 正 和

はじめに

灰色かび病は *Botrytis cinerea* Pers. (完全世代 *Botryotinia fuckeliana* (DE BARY) WHETZEL) によって引き起こされ、多くの作物に発生して世界的に重要な病害となっている。本病原菌ははまた、薬剤に対して次々に耐性を獲得してきたことから、薬剤耐性のリスクの大きなものとしてよく知られている。しかし、菌の形態的、生理的な性質を解析するうえで様々な情報を得ることのできる人工交配については、近年、ようやくその方法が確立されたばかりで (FARETRA et al., 1988 a), 灰色かび病菌の薬剤感受性をはじめとした諸性質の遺伝に関する研究は、まだ緒についたところである。ここでは、灰色かび病菌の人工交配法とそれを用いた薬剤感受性の遺伝解析について紹介し、参考に供したい。

I 灰色かび病菌の交配型

灰色かび病菌はヘテロタリックであり、交配には MAT-1, MAT-2 の二つの交配型の菌株を準備することが必要である。遺伝子座 *MAT1* における複対立遺伝子 *MAT1-1*, *MAT1-2* がそれぞれ交配型 MAT-1, MAT-2 に対応する (FARETRA et al., 1988 b)。灰色かび病菌を含む菌核菌科の交配では小型分生胞子 (図-1) が雄性機能を、菌核が雌性機能を果たしていると考えられている (LORBEER, 1980)。基本的には MAT-1, MAT-2 いずれの交配型も♀親または♂親となることが可能であるが、菌株によっては培地上で小型分生胞子、菌核を容易には形成しにくい菌株もあり、そういう場合にはそれぞれの役割を果たすことはできない。また、これまで国内のキュウリ、イチゴ、トマト、ナス、ブドウ、シクラメンから分離した菌株間で交配を行ったが、宿主や分離地域間で生殖の隔離は見られず、交配型さえ合致すればおおむね良好な交配率を得ている。しかし、圃場から分離した菌株同士の交配よりも、少なくとも片親に子のう胞子分離株を用いた場合に交配率は高くなる傾向が見られた (表-1)。また、子のう胞子分離株であっても、菌株によ

っては培地上での継代培養を繰り返すと交配率が低くなる傾向が見られた。

II 人工交配法

FARETRA and ANTONACCI (1987) は、本菌を麦芽エキス寒天培地上で培養して菌核、小型分生胞子を得ているが、筆者の経験では、麦芽エキス寒天培地上よりもむしろ PDA 培地上でこれらを良好に形成する傾向が見られたので、筆者らは PDA 培地を使用している。

♀親とする菌株を培地上で 20°C で 3 日間培養し、その後 15°C で 4 週間培養する。そうすると培地上に菌核が形成されるのでこれを取り出し、菌核に付着した培地や菌核以外の菌体を取り除き、滅菌水中で 0°C で 4 週間保持する。また、♂親とする菌株を PDA 培地上で 20°C, 3 日間、さらに 15°C で 4 週間培養した菌叢面から小型分生胞子、大型分生胞子、菌糸を滅菌水中で搔き取って、4 重ガーゼで済過した懸濁液を得る。先にも述べたように小型分生胞子は交配において重要な役割を果たしているので、必ず懸濁液におけるその有無を確認する。これを♀

表-1 供試菌株の違いと人工交配率

供試菌株	交配率(%)*
両親とも圃場分離株	66.7
両親または片親が子のう胞子分離株	78.5

*: 標準菌株との交配により交配型が MAT-1 または MAT-2 であることを確認した菌株についての交配のみを計数した。



図-1 灰色かび病菌の大型分生胞子、小型分生胞子および菌糸

Method for mating of *Botryotinia fuckeliana* (teleomorph of *Botrytis cinerea*) and its application to genetic analysis of fungicide sensitivity. By Masakazu YAMADA

親の菌株の菌核を沈めた試験管内に注ぎ、蛍光灯と白熱電球照明下、10°Cで培養する。そうすると1~3か月後に菌核上に子のう盤が形成され(図-2)，子のう盤上には子のう胞子を直線状に8個含む多数の子のうが形成される(図-3, 4)。形成した子のう盤を静かに取り出し、子のうをつぶした後、ガラス針や希釈分離法を用いて子のう胞子を釣菌する。灰色かび病菌の場合は、8個の子のう胞子が子のう内で直線状に配列しているため、ランダム分析のほかに四分子分析を行うことも可能である。

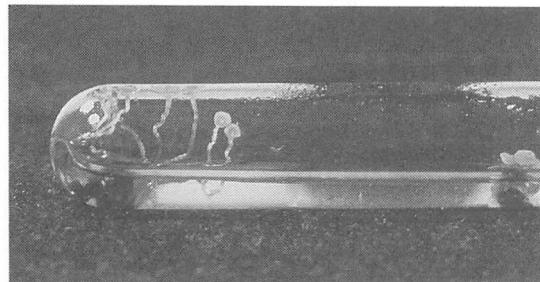


図-2 試験管内で形成した子のう盤

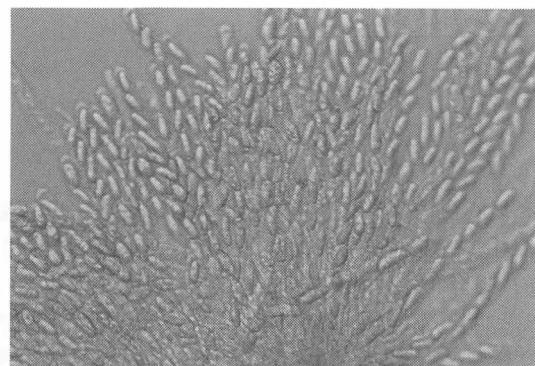


図-3 子のうと子のう胞子

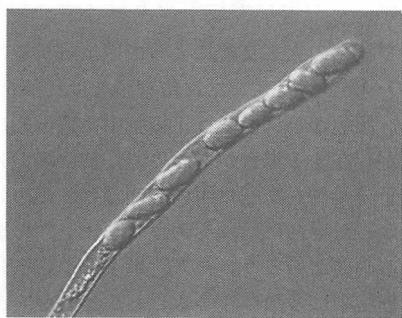


図-4 子のう内に直線状に形成された子のう胞子

III ベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルブ感受性の遺伝

灰色かび病菌のベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルブ感受性に関する4種類の表現型(ベンズイミダゾール感受性—ジエトフェンカルブ高度耐性、ベンズイミダゾール高度耐性—ジエトフェンカルブ感受性、ベンズイミダゾール中等度耐性—ジエトフェンカルブ高度耐性、ベンズイミダゾール高度耐性—ジエトフェンカルブ高度耐性)は POLLASTRO and FARETRA (1992) によって遺伝子座 *Mbc1* 上の複対立遺伝子の一つに支配されていることが示されている。しかし、上記の4種のほかにもベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルブに対して感受性を異なる菌(ベンズイミダゾール高度耐性—ジエトフェンカルブ弱耐性)が存在することが報告されている(田中ら, 1994)。そこで筆者らは、この菌のベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルブに対する感受性の遺伝様式を検討した(山田ら, 1995)。ベンズイミダゾール感受性—ジエトフェンカルブ高度耐性、ベンズイミダゾール高度耐性—ジエトフェンカルブ感受性、ベンズイミダゾール高度耐性—ジエトフェンカルブ弱耐性を示す菌株を交配し、得られた後代のベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルブに対する感受性を調べた。ペノミル1および100 μg/ml、ジエトフェンカルブ0.3および10 μg/mlをそれぞれ含む培地上での菌叢生育を調査し、ペノミル1 μg/mlで生育できないものを感受性、1 μg/mlでは生育するが100 μg/mlでは生育できないものを中等度耐性、100 μg/mlでも生育できるものを高度耐性とした。また、ジエトフェンカルブでは0.3 μg/mlで生育できないものを感受性、0.3 μg/mlでは生育するが10 μg/mlでは生育できないものを弱耐性、10 μg/mlでも生育できるものを高度耐性とした。その結果、感受性程度が同じ菌株同士の交配では子のう胞子分離株はすべて親株と同じ感受性程度に、また感受性の異なる菌株間の交配から得られた子のう胞子分離株は両親と同じ感受性程度にそれぞれ1:1に分離した(表-2)。また、組換え型株が得られなかつたことから、灰色かび病菌におけるベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルブに対する感受性の表現型、すなわちベンズイミダゾール感受性—ジエトフェンカルブ高度耐性、ベンズイミダゾール高度耐性—ジエトフェンカルブ感受性、ベンズイミダゾール高度耐性—ジエトフェンカルブ弱耐性は染色体上の1遺伝子座における複対立遺伝子の一つによって支配されていることが唆された。POLLASTRO and FARETRA (1992) の報告と併せ

表-2 灰色かび病菌におけるベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルプ感受性の遺伝 (ランダム子のう胞子分析)

交配組合せ (供試菌株)	供試子の う胞子数	子のう胞子数			$\times 2(1:1)^{**}$
		S, HR*	HR, WR	HR, S	
S, HR × S, HR (SAS 56) (MA 101)	100	100	0	0	—
HR, WR × HR, WR (93 K 1020) (MA 405)	100	0	100	0	—
HR, S × HR, S (MAB 81) (SAS 405)	100	0	0	100	—
S, HR × HR, S (SAS 56) (SAS 405)	100	43	0	57	1.96
HR, S × HR, WR (MAB 81) (93 K 1020)	99	0	60	39	4.45
HR, WR × S, HR (93 K 1027) (SAS 56)	100	53	47	0	0.36

* : ベンズイミダゾール系薬剤あるいはジエトフェンカルプに対する感受性程度を示す。

S : 感受性, WR : 弱耐性, HR : 高度耐性

** : 期待値 ($p=0.05$) は 3.84

表-3 遺伝子座 *Mbc1* と *Daf1* の連鎖解析

交配組合せ	薬剤感受性に関する遺伝子型	子のう胞子分離菌株 の数
<i>Mbc1-HR, Daf1-LR</i> × <i>Mbc1-S, Daf1-S</i>	両親型 <i>Mbc1-HR, Daf1-LR</i> <i>Mbc1-S, Daf1-S</i>	38 33
	組み換え型 <i>Mbc1-HR, Daf1-S</i> <i>Mbc1-S, Daf1-LR</i>	9 20
組み換え率 (%) = 29/100 × 100 = 29		S = 感受性, LR = 低度耐性, HR = 高度耐性

て考えてみると、ベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルプに対する感受性に関してこれまでに報告されている 5 種類の表現型は、染色体上の遺伝子座 *Mbc1* 上の複対立遺伝子の一つによって支配されていることが示唆された。

このように、灰色かび病菌におけるベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルプに対する感受性は 1 遺伝子によって支配されており、圃場における菌群の感受性が薬剤の散布により急速に耐性側へシフトする事実をよく説明している。これはコムギうどんこ病菌の DMI 剤感受性が複数の遺伝子によって支配されるとされ (HOLLOWON et al., 1984), 感受性に関する一つのピークが徐々に低感受性側にシフトするのと好対照をなしている。なお、FARETRA and POLLASTRO (1991) は灰色かび病菌のジカルボキシミド系薬剤感受性の遺伝様式についても調べ、ベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルプ感受性と同様に 1 遺伝子支配であることを報告しており、遺伝子座 *Daf1* が同定されている (FARETRA and POLLASTRO, 1991)。

IV 連鎖解析

ベンズイミダゾール系薬剤とジカルボキシミド系薬剤に対する感受性をおのおの支配する遺伝子座 *Mbc1* と *Daf1* の連鎖解析を行ったところ、得られた組換え率は 29% と低く、*Mbc1* と *Daf1* には緩い連鎖があることが示唆された (表-3)。FARETRA and POLLASTRO (1991) も同様の結果を報告している。

V 灰色かび病菌の遺伝解析を行う上での留意点

灰色かび病菌の人工交配によって遺伝解析を行う際には、本菌のヘテロカリオシスに留意しなければならない。すなわち、灰色かび病菌では 1 細胞中に遺伝的に異質の複数の核が存在する場合があるので、特に組織分離株や単分生胞子分離株を交配に用いて理論どおりの分離比が得られなかった場合には、ヘテロカリオシスの影響も考慮にいれる必要があろう。一方、単子のう胞子分離株でも核が 1 細胞中に多数存在することが多いが、これらはもともと一つの核が子のう胞子の成熟過程で分裂したも

ので、ホモカリオンと考えられるので (FARETRA and ANTONACCI, 1987) ヘテロカリオシスを考慮する必要はない。

おわりに

今後登場してくる灰色かび病の防除薬剤に対する菌の感受性の遺伝様式を人工交配によって明らかにし、実際圃場における菌群の薬剤感受性の推移を予測することによって、耐性菌が広がる前に、より速く有効な耐性菌対策を打ち出すことができると考えられる。また、薬剤感受性に限らず灰色かび病菌の形態的、生理的性質を解析するツールとしても人工交配法は非常に有効である。さらに、交配によって得られた単子のう胞子分離株は遺伝的に同質な核ばかりを持つホモカリオンであるため、標

準菌株として信頼性の高い菌株となると思われる。

参考文献

- 1) FARETRA, F. and E. ANTONACCI (1987) : Phytopathol. Mediterr. 26 : 29~35.
- 2) _____ et al. (1988) : Ann. Microbiol. 38 : 29~40.
- 3) _____ et al. (1988) : Journal of Microbiology. 134 : 2543~2550.
- 4) _____ and Pollastro S. (1991) : Mycol. Res. 95 : 943~951.
- 5) _____ . _____ (1993) : Plant Pathology 42 : 48~57.
- 6) HOLLOWAY, D. W. et al. (1984) : Proc. Br. Conf.-Pests and Dis. 2 : 477~482.
- 7) LORBEER, J. W. (1980) : The Biology of *Botrytis*, Academic Press, London : pp. 19~39.
- 8) POLLASTRO, S. and F. FARETRA (1992) : Phytopathol. Mediterr. 31 : 148~151
- 9) 田中 薫ら (1994) : 日植病報 60 : 349 (講要).
- 10) 山田 正和ら (1995) : 同上 61 : 215 (講要).

中央だより

/病/害/虫/発/生/予/察/ニ/ュ/-/ス/

(8.4.18~5.8)

◆果樹カメムシ類

4月に入り平均気温は全国的にかなり低い傾向が続いていましたが、ゴールデンウィーク前後から平年値を上回る暖かい日が続いています。今後の気温は平年並で推移するようですが、田植期までの気象推移には十分注意する必要があります。

前回以降発表された注意報、特殊報は以下のとおりですが、引き続き西日本では果樹カメムシに関する注意報が発表されています。また、南九州では茶のクワシロカイガラムシについて注意報が発表されています。

カメムシ類については、今後、果樹園への飛来に十分注意をはらい、各県の発生予察情報に留意し適時適切な防除を行って下さい。

【注意報の一覧】計6件

発表月日	県名	作物名	病害虫名	発生量
4/19	岩手	水稻	苗立枯病	多
24	宮崎	茶	クワシロカイガラムシ	やや多
26	神奈川	ウメ、ナシ、ブドウ等	カメムシ類(チャバネアオカメムシ)	多
		越冬量は平年に比べ著しく多い。ウメでは5月中下旬の比較的早い時期に被害発生。		
5/01	鹿児島	茶	クワシロカイガラムシ	多
		越冬成虫が多い。防除はふ化盛期に実施し、効果のある適期を逃さないよう注意。		
02	兵庫	ナシ	黒斑病	多
		調査で花弁に病斑が多数確認された。薬剤散布は手散布で丁寧に行う。(特に果実)		
02	鳥取	ナシ、モモ	カメムシ類(クサギカメムシ)	多
		山間地等のナシ園ではすでに寄生加害が認められている。被害園では早急に防除。		

【特殊報の一覧】計1件

発表月日	県名	作物名	病害虫名	発生量
5/01	鹿児島	インゲン	炭腐病	初確認

収穫期頃に葉が急にしおれて黄化して落ちる。病勢が進むと木炭粉状の菌核が露出。