

特集：病原力低下因子利用による果樹類紋羽病の遺伝子治療

病原力低下因子の探索と評価

農業環境技術研究所 ^{なかもら}中村 ^{ひとし}仁*・^{いけだ}池田 ^{けんいち}健一

はじめに

病原力低下因子を用いた紋羽病の生物防除法を開発するためには、紋羽病菌に対して病原力の低下を引き起こすような因子、つまり二本鎖 RNA (double-stranded (ds) RNA；菌類ウイルスのゲノムと考えられる) を特定する必要がある。dsRNA は様々な糸状菌から検出されているが、そのほとんどは宿主菌に対して悪影響を及ぼさずに潜在している (BUCK, 1998)。紋羽病菌において dsRNA が検出されたとしても、それが生物防除への利用に有効な dsRNA であるとは限らない。したがって、できるだけ多くの紋羽病菌を収集し、その中から dsRNA を保有し、かつ弱病原力を示す菌株の選抜を行うこととした。さらに、dsRNA の直接的な病原力低下作用を明らかにするために、選抜菌株が保有する dsRNA の異なる菌株への導入あるいはフリー化実験を試み、それらの病原力への影響を評価した。また、病原力低下因子を実際の圃場に応用する際に影響を及ぼす可能性を考慮して、紫紋羽病菌および白紋羽病菌についての菌学的あるいは生態的知見を集積したので、それについても紹介する。

I 病原力低下因子の特定

1 菌株の探索

日本各地より紫紋羽病菌および白紋羽病菌の収集を行った。有用な dsRNA を含む病原力の弱い菌株は腐生生活を行っている可能性があることから、果樹園のみならず山林などの非農耕地からも菌株の採集を行った。両紋羽病菌は山林においても多数生息しており、特に紫紋羽病菌が宿主としていたほとんどの植物は外見上健全であった。また、果樹園では無病徴個体からの採集を中心に、他に紋羽病発病抑止圃場や紋羽病発生による栽培放棄園などからも採集を行った。さらに、土壌中に生息

する白紋羽病菌を採集する目的で、クワ枝束を果樹園および山林の土壌中に埋設して菌を捕捉する方法を用いて菌株を得た (池田ら, 2002c)。最終的に収集できた菌株は、各研究機関より分譲していただいた菌株を含め紫紋羽病菌約 1,450 菌株、白紋羽病菌 850 菌株であった。紋羽病菌収集に関する菌の分離および同定は既報 (NAKAMURA et al., 2000; 2001; 2002; 中村, 2002; 2003) によって行った。

2 dsRNA の探索

少量の培養菌体から迅速かつ安定的に dsRNA を検出する方法を確立した (ARAKAWA et al., 2002)。ポテト・デキストロース寒天培地に載せたセロファン上で培養した菌叢をセロファンごとにはがしたものを材料として、全核酸を抽出した。その後 DNA 分解酵素および S1 ヌクレアーゼ処理を行って精製した dsRNA を電気泳動により検出した。その結果、紫紋羽病菌では 64.9% (363 菌株/559 菌株)、白紋羽病菌では 19.3% (82 菌株/424 菌株) の菌株から dsRNA が検出された (池田ら, 2002b)。白紋羽病菌では、約 1.5 ~ 10 kbp 以上の様々なサイズの dsRNA が検出され、これらはその特徴によって、L (10 kbp 以上)、M (3.5 ~ 10 kbp)、S (1.5 ~ 3.5 kbp) とそれらの組み合わせ (MIX)、および 10 本以上の多分節 dsRNA (REO) の 5 タイプに類別して、比較した (図-1) (ARAKAWA et al., 2002)。紫紋羽病菌においても、L、M、S および MIX タイプの dsRNA が検出されたが、REO タイプのものは検出されなかった (松本ら, 2001; 池田, 未発表)。

3 dsRNA の病原力低下作用の評価

(1) 接種方法の確立

多くの紋羽病菌菌株から、dsRNA を保有し、かつ弱病原力を示す菌株を選抜する必要があることから、従来の接種方法よりも効率のよい紫・白紋羽病菌の接種方法を確立した。

1) 紫紋羽病菌

本菌の接種法として、簡便かつ省スペースで多数の検定が可能なニンジン・アクリル板根箱法を考案した (UETAKE et al., 2001a; 松本ら, 2002)。本法は、ビニール袋内を 2 枚の透明アクリル板で仕切り、その間に入れ

Screening for Hypovirulence Factor in Violet and White Root Rot Fungi. By Hitoshi NAKAMURA and Ken-ichi IKEDA

(キーワード：紫紋羽病, 白紋羽病, *Helicobasidium mompa*, *Rosellinia necatrix*, 二本鎖 RNA, 菌類ウイルス)

*現所属：農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所

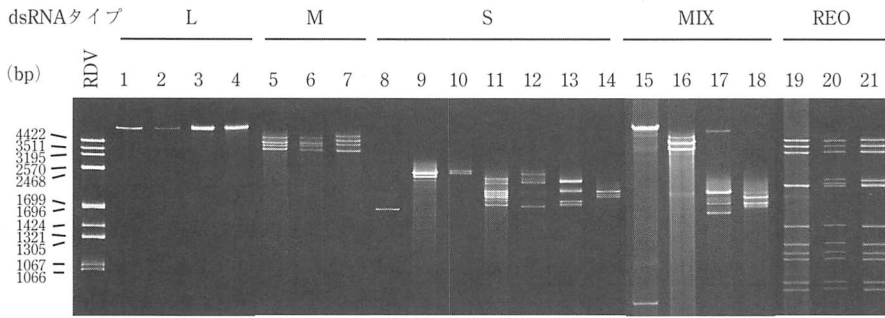


図-1 白紋羽病菌から検出された種々の dsRNA

RDV：イネ萎縮ウイルス（大村敏博氏より分譲）。

た培養土中で生育させたニンジンに菌株を接種し、その後の感染座の形成を経時的に観察するものである。接種後 14 週目まで観察し、感染座形成までの期間および感染座の形成率によって病原力を判定した。本法による各菌株の病原力は、圃場でのポット苗に対する接種を行った場合の病原力と一致した。本法を用いて紫紋羽病菌の病原力を判定したところ、供試菌株のべ 726 菌株中 118 菌株が弱病原力を示した。

2) 白紋羽病菌

黄花ルピナスを用いた白紋羽病菌の接種方法を確立した（渡辺，1962；UETAKE et al., 2001b）。黄花ルピナスは本菌に感受性が高く、また発芽も良好なので年間を通じて安定して試験を行うことができる。本法による病原力の評価は、接種後 14 週目まで観察し、発病度あるいは枯死率によって行った。本病原力評価法によって、供試菌株のべ 373 菌株のうち 80 菌株が弱病原力を示した。

(2) dsRNA の病原力低下作用の評価

dsRNA を保有し、かつ弱病原力である菌株が選抜されただけでは、その dsRNA が病原力低下因子であることの直接的な証明には繋がらない。そこで、異なる菌株への dsRNA の導入あるいは dsRNA のフリー化を行い、得られた菌株の病原力に影響が認められるか調査した。

1) 紫紋羽病菌

弱病原力株が保有している dsRNA の強病原力株への導入法に関しては本特集の「病原力低下因子の導入技術の開発および導入菌株の作出」を参照されたい。弱病原力株 2 菌株（V70, V17）が保有していた dsRNA を導入された 3 菌株（強病原力株）の病原力を判定したところ、導入された菌株の系統によってばらつきが認められたものの病原力の低下が確認されたことから、これらの dsRNA は病原力低下作用を有すると考えられた。本 dsRNA は各々ウイルスゲノムであることが明らかにされているが、詳しいことは本特集「病原力低下因子の分

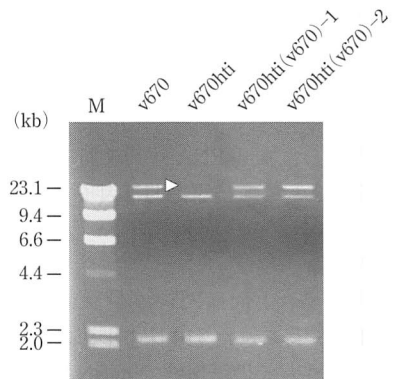


図-2 紫紋羽病菌 v670 株とその部分的 dsRNA フリー株（v670hti）・dsRNA 再導入株（v670hti(v670)）の保有する dsRNA。

v670hti(v670)-1, v670hti(v670)-2 はそれぞれ導入系統。

▷：脱落した dsRNA 断片。

子学的解析」を参照されたい。

次に、保有されている dsRNA が菌体から脱落すると想定して、弱病原力株を用いて単菌糸分離処理を行った。供試 14 菌株から単菌糸分離によって 829 菌株を獲得し、dsRNA 保有の有無を調べたところ、そのうち 1 菌株（V670）において一部の dsRNA が脱落した菌株が得られた。V670 株からは 3 本の dsRNA バンド（L, 2 本；S, 1 本）が検出されていたが、単菌糸分離により 3 本のうち最もサイズの大きい dsRNA バンド 1 本が消失した（図-2）（IKEDA et al., 2003b）。このとき、dsRNA 保有株（V670）は弱病原力を示す一方、単菌糸分離によって作出された dsRNA フリー株（V670hti）では病原力は中程度まで上昇した。さらにフリー株へ再度 dsRNA を導入した dsRNA 再導入株（V670hti(v670)）は再び弱病原力を示すようになった（図-3）（IKEDA et al., 2003b）。

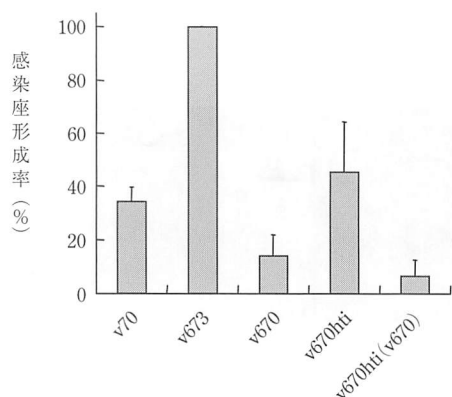


図-3 紫紋羽病菌 v670 株とその dsRNA フリー株 (v670hti)・再導入株 (v670hti(v670)) における病原力
v70 : 中度病原力株, v673 : 強度病原力株.

以上のことから、本 dsRNA は紫紋羽病菌に対して病原力の低下を引き起こす病原力低下因子であることが明らかとなった。

2) 白紋羽病菌

紫紋羽病菌の場合と同様に、17 供試菌株から単菌糸分離処理によって得られた 410 株の単菌糸分離菌株を検定したところ、うち 5 供試菌株で dsRNA の脱落が認められ、計 23 菌株の dsRNA フリー株が得られた。単菌糸分離によってフリー化した dsRNA は多分節 dsRNA (REO タイプ) であった (図-1)。そのうち菌株 W370 が保有する dsRNA は Reoviridae に属するウイルスのゲノムであることがわかっているが、詳しいことは本特集「病原力低下因子の分子学的解析」を参照されたい。上記の単菌糸分離処理によって dsRNA フリー株が得られたのは、REO タイプ dsRNA を保有する菌株のみであった。フリー株が得られた W370 株を含む 7 菌株について、フリー化前の dsRNA 保有株とフリー化後の単菌糸分離株の間で病原力の比較を行ったところ、2 菌株を除いてフリー化後の菌株は強病原力を示すようになった (荒川ら, 2001 ; 池田ら, 2003a)。

したがって、これらの dsRNA は白紋羽病菌に対する病原力低下因子であることが明らかとなった。

II 病原力低下因子を用いた生物防除に影響を及ぼす紋羽病菌の菌学的・生態的特徴

1 個体群構造

dsRNA は同一菌体内あるいは菌糸融合を通じて異なる菌体へ移行すると考えられる。よって、実際の圃場で発生している紋羽病菌に dsRNA を導入する場合、防除

効果をあげるためには圃場における紋羽病菌の個体群構造を把握しておく必要がある。そこで、本特集「巻頭言」の説明にある MCG (菌糸体と合性群) を調査単位として、個体群構造の解析を行った。

13 調査圃場 (紫紋羽病菌, 4 圃場 ; 白紋羽病菌, 9 圃場) における MCG の分布状況を調べた結果、両紋羽病菌ともに、1 圃場には 3 ~ 12 種の MCG が認められ、その中である特定の 1 ~ 3 種の MCG のみが優占的に広く分布していた。それら優占的 MCG は、経年後にはさらに大きく進展する傾向があり、病原力も強かった (中村ら, 2001 ; 2002a ; 2003)。また、1 樹の根系は単一の MCG に占有されており、各 MCG は罹病樹の根を通じて隣接樹へ進展することもわかった。さらに、ユリノキ植栽林で認められた紫紋羽病菌のある MCG において、新たに生じた dsRNA 断片が時間の経過に伴って菌体全体に伝搬されることも確認した (池田ら, 2003b)。

以上のことから、病原力低下因子を導入する際、実施圃場において優占する MCG を対象に施用することで治療効果が高くなると考えられた。

2 感染源と dsRNA

クリ胴枯病菌の病原力低下因子であるウイルスをはじめとして、多くの菌類ウイルスあるいは dsRNA は胞子・分生子形成によって宿主菌体から脱落する場合があることが知られている (Buck, 1998)。同様の現象が紋羽病菌でも起こると、病原力低下因子を用いた生物防除の効果減退につながる可能性がある。そこで、紋羽病菌における dsRNA の垂直伝搬について調査した。

紫紋羽病菌の単担子胞子分離株および白紋羽病菌の単子のう胞子分離株からの dsRNA の検出を行ったところ、各々栄養菌糸分離株 (親株に相当) では dsRNA が検出されたものの有性胞子分離株からは全く検出されなかったことから、紋羽病菌の dsRNA は有性胞子形成によって脱落することが明らかとなった (池田ら, 2002b)。紫紋羽病菌においては、病原性を有する担子胞子分離株についての報告がある (福島, 1998)。しかし、単担子胞子分離株の対峙培養を行ってみても交配能について確認できず、また単担子胞子分離株は病原性がないことが明らかになったことから (池田, 2002a ; IKEDA et al., 2003a)、野外において担子胞子が感染源として機能している可能性は少ないと考えられる。白紋羽病菌に関しては、罹病根からの子実体 (子座) の形成が可能であり、また子のう胞子分離菌株が病原性を有することを報告した (NAKAMURA et al., 2000 ; 中村ら, 2002a)。山林においては多数の子座が採集されているが、子座の形成には長期間を要し、また実際の圃場では罹病樹は即時除去さ

れることを考慮すると、白紋羽病菌の子のう胞子が栽培圃場で新たな感染源となる可能性は少ないものと考えられる。

以上のことから、有性胞子形成による dsRNA の脱落は実際的には問題とはならないと結論付けた。

3 種内変異

dsRNA は菌糸融合を介して異なる菌体内へ伝搬される。したがって、菌糸融合が行われないような種内変異が存在した場合、それは病原力低下因子を用いた紋羽病防除の妨げとなる。白紋羽病菌については、rDNA の ITS 領域を用いた PCR-RFLP 解析により国内の菌株には明らかな相違は認められていないことがわかっているが(兼松ら, 1998)、紫紋羽病菌については見知が得られていなかったことから、本菌における種内変異の有無について調べた。

紫紋羽病菌の寄生性について調べたところ、九州のサツマイモ分離株はリング台木にはほとんど感染しないことがわかった(UETAKE et al., 2003)。それら菌株を含め国内外の紫紋羽病菌について ITS 領域を用いた分子系統解析を行ったところ、供試菌は分子系統的に5菌群に分けられたが、国内の紫紋羽病菌 (*Helicobasidium mompa*) 内での変異はほとんど認められなかった(UETAKE et al., 2002)。また、菌糸融合観察を行ったところ、上記の結果で得られた5菌群間いずれの組み合わせでも菌糸融合反応(不完全融合)が認められたことから、国内外の紫紋羽病菌はすべて同一の菌糸融合群に属することがわかった。また、従来知られている紫紋羽病菌 (*H. mompa*) とは別種の紫紋羽病菌 (*H. brebissonii*) が見出されたが(中村ら, 2002b ; 中村, 2003)、本菌はヨーロッパなどで発生している紫紋羽病菌と同種であり、本菌も同一菌糸融合群に属した。

以上のことから、病原力低下因子の菌体間移行を妨げるような種内変異は存在しないこと、そして病原力低下因子を用いた生物防除は世界に分布するいずれの紫紋羽病菌に対しても応用可能であることが明らかにされた。

おわりに

本研究において、紫紋羽病菌および白紋羽病菌におけ

る病原力低下因子の存在が明らかとなった。また、本研究で得られた紋羽病菌に関する多くの菌学的・生態的知見を総合すると、複数の病原糸状菌より見出された既製の病原力低下因子と比較して、より持続的な防除効果が期待できると考えられる。今後は特定された当該因子の実用性の確認が求められる。また、病原力低下作用について未解析の dsRNA が多数残されていることから、これらの有効性の評価を行う必要がある。そのためには、任意の菌体への効率的な dsRNA 導入手法の開発が重要となろう。

謝辞：本研究は、生物系特定産業技術研究推進機構の援助により行われたものである。また、本研究で供試した試料および菌株の収集にご協力いただいた多くの関係者の方々に心より御礼申し上げる。

引用文献

- 1) 荒川征夫ら (2001) : 日植病報 67 : 192.
- 2) ARAKAWA, M. et al. (2002) : Mycoscience 43 : 21 ~ 26.
- 3) BUCK, K. W. (1998) : Molecular Variability of Fungal Pathogens, CAB International, Wallingford, pp 53 ~ 72.
- 4) 福島千萬男 (1998) : 青森りんご試報 30 : 1 ~ 112.
- 5) 池田健一ら (2002a) : 日本菌学会第 46 回大会講演要旨集, p.85.
- 6) ——— (2002b) : 日植病報 68 : 241.
- 7) ——— (2002c) : 土と微生物 56 : 148.
- 8) ——— (2003a) : 日植病報 69 : 45.
- 9) ——— (2003b) : 同上 69 : 277 ~ 278.
- 10) IKEDA, K. et al. (2003a) : Mycological Research 107 : 847 ~ 853.
- 11) ——— (2003b) : J. Gen. Plant Pathol. 69 : 385 ~ 390.
- 12) 兼松聡子ら (1998) : 日植病報 64 : 342.
- 13) 松本直幸ら (2001) : 同上 67 : 192.
- 14) ——— (2002) : 同上 68 : 201.
- 15) NAKAMURA, H. et al. (2000) : Mycoscience 41 : 503 ~ 507.
- 16) ——— (2001) : J. Gen. Plant Pathol. 67 : 37 ~ 40.
- 17) ——— (2002) : Mycoscience 43 : 251 ~ 254.
- 18) 中村 仁 (2002) : 日菌会報 43 : 27 ~ 35.
- 19) ——— (2003) : 植物防疫 57 : 123 ~ 126.
- 20) ———ら (2001) : 日植病報 67 : 198.
- 21) ——— (2002a) : 同上 68 : 68.
- 22) ——— (2002b) : 同上 68 : 192.
- 23) ——— (2003) : 同上 69 : 44 ~ 45.
- 24) UETAKE, Y. et al. (2001a) : J. Gen. Plant Pathol. 67 : 175 ~ 181.
- 25) ——— (2001b) : ibid. 67 : 285 ~ 288.
- 26) ——— (2002) : Mycological Research 106 : 156 ~ 163.
- 27) ——— (2003) : J. Gen. Plant Pathol. 69 : 42 ~ 44.
- 28) 渡辺文吉郎 (1962) : 農林省指定試験(病虫害)第3号 : 1 ~ 110.