

Rhizoctonia 菌

北海道医療大学歯学部 ^{くに} 國 ^{なが} 永 ^し 史 ^{ろう} 朗

はじめに

菌類の分類の始まりは、担子菌類の担子器果、つまり「きのこ」をつくる仲間が最初であるといわれている。同じ担子菌の仲間である *Rhizoctonia* 属菌は、食用となる担子器果をもたないため、分類の黎明期では対象とならなかった菌と考えられる。

現在、*Rhizoctonia* 属とされるものは完全世代の形態から大きく5属からなる。*Thanatephorus* (*Rhizoctonia*)、*Ceratobasidium* (*Ceratorhiza*)、*Waitea* (*Chrysorhiza*)、*Tulasnella* (*Epulorhiza*)、*Sebacina* (*Opadorhiza*)である(カッコ内は不完全世代の属名)。本属は、カスガイ連結(clamp connection)、分生孢子、根状菌糸束、外皮と内層に分化した菌核のいずれももたず、次のような菌糸の形態を有する菌とされている。すなわち、菌糸先端細胞の隔壁のすぐ下で菌糸の分枝が起き、分枝点には狭帯があり、顕著なドリポア構造の隔壁をもつ菌である。

本属の代表菌である *Thanatephorus* 属菌では、古くから遺伝的に異なる多くの系統の存在が知られていた。このような事情のもとで、この菌では菌糸融合という現象を導入して、菌糸融合群(菌群:AG)という個体群を設けて、系統の多様性を評価してきた。やがて分子生物学の発展により、*Thanatephorus* や *Ceratobasidium* の各菌群は、それぞれ遺伝的に隔離した生物学的種であることが明らかにされ(VILGALYS and CUBETA, 1994; KUNINAGA, 1996)、菌群を中心する分類体系の妥当性が証明された。また、様々なDNA解析法の応用により、同一菌群内にはさらに遺伝的に異なる個体群(亜群)が存在することが示された。現在、最も研究の進んでいる *Thanatephorus* 属菌では、菌群に続いて亜群を明記する方法で分類が行われている(KUNINAGA, 2002)。

ここでは *T. cucumeris* を中心として、菌群や亜群の分類・同定において採用されている分子生物学的手法を紹介し、その特徴などを述べる。また、リボソームDNA(rDNA)の塩基配列を基に構築された「遺伝子系

統樹」を示し、そこからどのようなことが読み取れるかを説明する。最後に担子菌類の中での本属の系統的位置についても説明したい。

I *Thanatephorus* 属菌の分類・同定に用いられるDNA解析法とその有用性

AG-1やAG-4の菌群やその亜群は、慣れてくるとPDA上の特徴的な培養形態だけで比較的容易に同定できる。これはあくまでも例外的であり、ほとんどの場合は菌糸融合の観察により菌群を同定することになる。しかし、一般に亜群の同定では融合の観察だけでは困難を伴うことが多い。また、AG-2では複数の菌群/亜群にわたって融合を行うものがあり、この仲間はとりわけ分類は難しい。したがって、特に亜群の同定を確実に行うためにはDNAレベルでの解析が必要となる。

これまでに本属で用いられているDNA解析法としては、DNA-DNA分子交雑法、DNAフィンガープリント法、パルスフィールドゲル電気泳動法、DNA RFLP、scnDNA RFLP(single-copy nuclear RFLP)、RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)、rDNA RFLP、AFLP(amplified fragment length polymorphism)、rDNA-ITS RFLP、rDNA-ITS塩基配列比較法、PCR特異的プライマー法などがある。それぞれに特徴をもつが、DNA RFLP、scnDNA RFLP、RAPD、AFLPなどの手法は、一般に分類群の同定よりも、むしろ個体識別に有効な手法である。自然圃場の分離菌株間の遺伝的多様性の評価、あるいは特定の病原菌株の動態解析などの研究に応用され、成果があげられている(CERESINI et al., 2002; CERESINI et al., 2003; ROSEWICH et al., 1999)。

現在、菌群や亜群の同定において最も有効な手法は、rDNA-ITS RFLP法(PRIYATMOJO et al., 2001)、rDNA-ITS塩基配列比較法(KUNINAGA et al., 1997)、PCR特異的プライマー法(CARLING et al., 2002)である。いずれの手法も菌群や亜群は、それぞれ固有のITS塩基配列を有するという根拠に基づいているものである。

1 rDNA-ITS RFLP 法

PCR特異的プライマー法とともに、簡便性の点で優れた手法である。ITS1とITS4のユニバーサルプライマーを用いて5.8S rDNAを含むITS領域を増幅し、その

Ribosomal DNA Systematics of the Genus *Rhizoctonia*. By Shiro KUNINAGA

(キーワード: *Rhizoctonia* 属菌, 菌糸融合群, 亜群同定法, 分子系統樹)

表-1 *Thanatephorus cucumeris* の AG-1, AG-2, AG-3, AG-4 の亜群菌株の制限酵素断片長 (bp)^{a)}

AG-1 亜群	<i>Eco</i> RI	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Taq</i> I
IA	390, 320	520, 130, 60	360, 350	310, 280, 60
IB	370, 340	520, 130, 60	380, 330	350, 300, 60
IC	380, 310	410, 120, 100, 60	345 ^{b)}	360, 270, 60
ID	380, 350	540, 130, 60	390, 340	360, 310, 60
AG-2 菌群/亜群	<i>Eco</i> RI	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Taq</i> I
1	330, 290, 80	520, 120, 60	700	350, 290, 60
2, III B	390, 350	600, 140	740	370, 310, 60
2, IV	390, 350	600, 140	580, 160	370, 310, 60
2, LP	390, 350	600, 140	580, 160	310, 270, 100, 60
3	370, 330	580, 120	700	350, 290, 60
4	370, 330	520, 120, 60	700	380, 290, 60
BI	390, 340	610, 120	730	
AG-3 亜群	<i>Hae</i> III	<i>Hin</i> c II	<i>Mfe</i> I	<i>Rsa</i> I
PT	600, 120	460, 260	720	720
TB	540, 120, 60	720	460, 260	510, 210
AG-4 亜群	<i>Alu</i> I	<i>Ase</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Hin</i> c II
HG-I	420, 200, 60, 30	630, 80	380, 330	440, 270
HG-II	420, 200, 60, 30	710	370, 340	710
HG-III	420, 220, 60, 30	550, 180	400, 330	730

^{a)} ITS1 と ITS4 プライマーで増幅した DNA を制限酵素処理した断片長。 ^{b)} バンドが重なっている。

PCR産物を制限酵素処理し、得られた切断片長多型を比較し同定を行うものである。菌群はすでに同定されているが、さらに亜群を決定したいときに有効な手法である。現在、AG-1は四つの亜群 (IA, IB, IC, ID), AG-2は七つの菌群/亜群 (2-1, 2-2 III B, 2-2 IV, 2-2 LP, 2-3, 2-4, 2-BI), AG-3は二つの亜群 (PT, TB), AG-4は三つの亜群 (HG-I, HG-II, HG-III) からなっている。これらの菌群の亜群は、表-1に示す制限酵素を用いて特有の切断片長を確認することで同定することができる。

Ceratobasidium 属菌では、本手法や 28S rDNA RFLP法が用いられ、それぞれ AG-D の亜群類別 (TODA et al., 1999) や菌群同定 (MARTIN, 2000) が試みられている。また、*Waitea* 属菌では変種の分類・同定 (六鹿ら, 1995) に本手法が用いられているが、一般に *Thanatephorus* 以外での応用例は非常に少ない。

2 rDNA-ITS塩基配列比較法

DNAの塩基配列を解読しなければならず、簡便性という点では rDNA-ITS RFLP法などと比べ明らかに劣る。しかし得られる情報量は格段に多いという点で優

れた手法である。すべての菌群の標準菌株を保存してなくても、この手法により菌群や亜群を同定することが可能である。また得られたデータは系統関係の解析にも応用できる。この点については後述する。

現在、本菌種のほとんどの菌群、亜群の rDNA-ITS領域の情報は、データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) として登録されている。およそ 360件を超えるものがあり、これらの登録データとの間で類似度 (maximum matching) を調べることで、分類群を容易に同定することができる。

ITS領域の類似度の比較は、基本的には ITS1の部分 (およそ 220 bp) のみで十分である。一般に、ITS1で 90%以上の類似度が得られた場合は、同一菌群であると判断できる。また亜群の明記されたデータベースとの間で 95%以上を示した場合は、その亜群と同一であると判断できる。一方、ITS1の類似度が 90%以下 (多くの場合 85%以下となる) を示した場合、それとは明らかに異なる菌群であると判断される。したがって、同定したい菌が登録されているすべての菌群や亜群のデータと低い値を示した場合は、新たな菌群である可能性が高い

ことになる。

本手法は、*Ceratobasidium* 属菌の菌群同定にも基本的には応用可能と考える。現在 180 件を超える rDNA-ITS データベースが登録されているが、ほとんどのものは菌群が未記載である。記載されたものの中に一部誤りがあるので、ここで記す。Accession No の AF354091 と AJ242892 は、AG-B(o) (標準菌株 SIR-2) の情報とされている。しかし、実際は AG-A の情報であることを確認している。したがって、AG-A と AG-B(o) は単系統群であるとする見解 (GONZALEZ et al., 2001) があるが、これは誤りとなる。また、AF354082 は AG-R (標準菌株 Bn37) の情報ではなく、AG-F のある菌のデータである。AG-R の正しい情報は AF427407 である。

Ceratobasidium ではこのような状況であり、また正確な菌群の ITS 領域のデータ数が十分ではなく、現時点での応用には注意が必要である。

3 PCR 特異的プライマー法

簡便性という点では最も優れた手法である。ここで用いられているプライマー配列は、ほとんどが rDNA-ITS 領域でデザインされたものである。現在、AG-1 から

AG-4 の菌群および亜群をすべて同定できるプライマーが設計されている。したがって、これらの菌群や亜群については標準菌株を用い菌糸融合を観察しなくても同定可能である。

プライマー配列や本法の詳細については、既に本誌で紹介した (国永, 2003) ので、そちらを参照していただきたい。ここでは割愛させていただく。

II rDNA による *Rhizoctonia* 属の分子系統学

1 *T. cucumeris* の菌糸融合群間の系統関係

菌類では、rRNA コード領域 (18S, 28S rDNA) は分類群が大きく異なってもよく保存されており、属間レベルの系統関係の解析によく使われる。一方、塩基置換速度の速い rDNA-ITS 領域は、近縁な分類群間の解析に一般に有効である。しかし変異が飽和状態に達していることが考えられ、系統関係の推定ではよい情報が得られない場合も知られている。本菌種の場合、この二つの rDNA 領域データで作成した系統樹を比較すると、基本的に非常に似た樹形 (topology) をとることがわかっている。

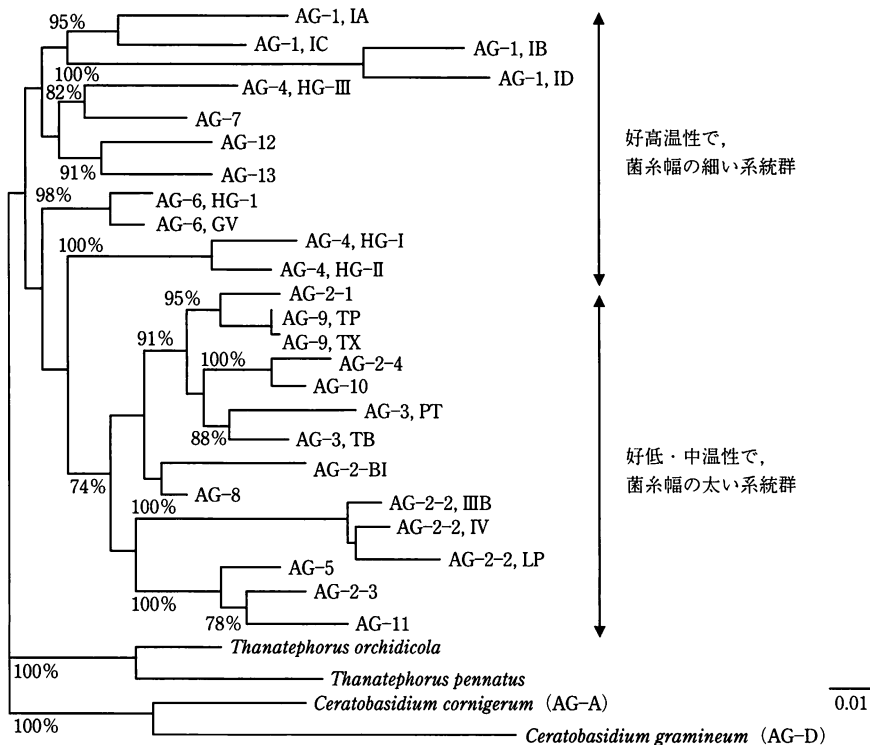


図-1 *Thanatephorus cucumeris* の菌糸融合群間の分子系統樹

rDNA-ITS 領域について近隣結合法を用いて構築した。枝の横にある数値はブートストラップ確率で、100%に近いほどその枝の信頼性が高いことを示す。バーは 100 塩基中 1 塩基の違いを表す。

今日、「種系統樹」と「遺伝子系統樹」とは区別される。一般に分子系統樹とされるものはほとんど遺伝子系統樹である。ここでは ITS 領域を基に近隣結合法で作成した遺伝子系統樹を示し(図-1)、種系統樹を遠くからながめたものであるという認識のもとで、系統関係を解説する。

系統樹から、AG-1 IA, IC; AG-1 IB, ID; AG-6 HG-I, GV; AG-4 HG-I, HG-II; AG-2-1, AG-9 TP, TX; AG-2-4, AG-10; AG-2-2 IIIB, IV, LP は、それぞれ単一の祖先種から由来したある一つの系統発生の全体部分を占める個体群(クレイドともいう)、つまり単系統群(monophyletic group)であることが示唆される。

さらに系統樹は、この菌は大きく二つのグループからなることを示す。第1系統群は AG-1, AG-4, AG-6, AG-7, AG-12, AG-13 の仲間である。第2系統群は、その他の菌群の AG-2, AG-3, AG-5, AG-8, AG-9, AG-10, AG-11 からなるもので、多くのものは多系統群(polyphyletic group)に属する。

この二つの系統発生群について、主軸菌糸幅(25℃, 2週間 PDA 培地で培養時の着色主軸菌糸の幅)と菌糸生育(PDA 培地上での菌糸伸長速度)の形質で比較すると、興味深い関係が見えてくる。第1系統群のものは、いずれも菌糸幅が一般に細く、好高温性(適温 30℃)を示す。いずれも 33~35℃でも生育が可能である。第2系統群のものは比較的菌糸幅が太く、好高温性を示さない傾向を示す。20~25℃に生育適温をもち、30℃以上ではほとんど生育できない。この仲間ではさらに、同一菌群内の亜群間で生育適温の違いが認められる。AG-2-2 IIIB は比較的高温性であるのに対し、IV と LP は低温性である。AG-3 の PT は低温性、TB は高温性を示す。

本菌種では、古くから菌群と病原性の間に一定の関係のあることがわかっている。また、生育温度と病原性発現の土壌温度との間にも深い関係のあることや、季節の違いにより活動する菌群が異なることなどが数多く報告されている。このことは、病原性や生育温度反応は明らかに菌群や亜群の固有の性質であることを示唆する。自然条件下での菌の生活の場は、菌群や亜群ごとにその条

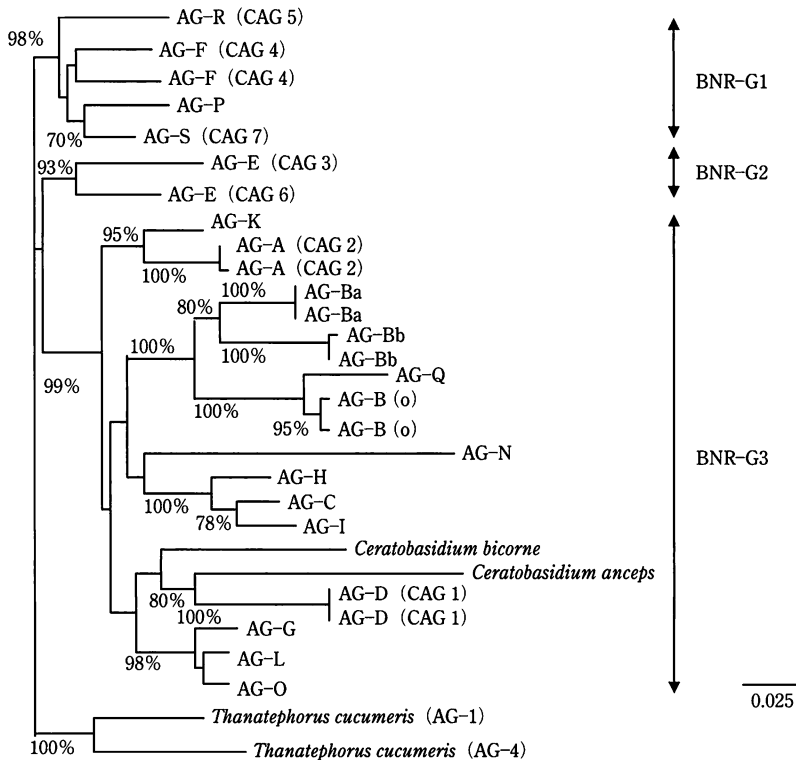


図-2 *Ceratobasidium* 属菌の菌糸融合群間の分子系統樹

rDNA-ITS 領域について近隣結合法を用いて構築した。枝の横にある数値はブートストラップ確率で、100%に近いほどその枝の信頼性が高いことを示す。バーは 100 塩基中 2.5 塩基の違いを表す。

件が異なり、そのことが系統の分化を引き起こす選択的機構の一つの要因となっている可能性が系統樹より読み取れる(国永, 1997)。

2 *Ceratobasidium* 属菌の菌糸融合群間の系統関係

本属には寄生菌、腐生菌およびラン科植物の共生菌などの様々な系統が含まれ、現在、AG-A から S までの 17 菌群 (AG-J と M は除外) が知られている。完全世代の形態から 13 の種が記載されているが、菌群との関係は一部を除き明確ではない。ここでは、rDNA-ITS 領域を基に近隣結合法で描いた遺伝子系統樹を示す(図-2)。

系統樹から、AG-A ; AG-Ba ; AG-Bb ; AG-B(o) ; AG-D ; AG-E ; AG-G, AG-L, AG-O は、単系統群であることがわかる。

また系統発生的に見ると、大きく三つのグループに分けられる。AG-F, AG-P, AG-R, AG-S のグループ 1 (BNR-G1), AG-E のグループ 2 (BNR-G2), その他の菌群からなるグループ 3 (BNR-G3) である。BNR-G3 のいくつかの菌群では 5.8S rDNA に多型が見

られる。この領域での置換は *Thanatephorus* 属菌では全く認められないものであり特異的である。

3 担子菌類の中での *Rhizoctonia* 属の系統的位置

18S rDNA で作成した分子系統樹を示し(図-3)、担子菌類での *Rhizoctonia* 4 属の系統的位置を解説する。

担子菌類は大きく三つの主要な系統群に分けられる。一つは *Ustilago* 属菌を代表とするクロボキン類の仲間。第 2 系統群はサビ菌類や冬孢子形成酵母菌からなる仲間である。第 3 系統群はいわゆる菌茸類の仲間、シロキクラゲ属 (*Tremella*) などの異担子菌類や *Athelia* 属などの単室担子菌類を含む大きな群である。

本属は系統的にかなり異なる菌で構成されていることがわかる。*Thanatephorus* 属菌と *Ceratobasidium* 属菌は姉妹群 (sister group) の関係を示し、*Waitea* 属菌はこれらとは系統的に異なる。これらの 3 属はいずれも第 3 系統群に位置しているのに対し、*Tulasnella* 属菌は大きく系統的に離れ、第 1 系統群と第 2 系統群の間に位置している。

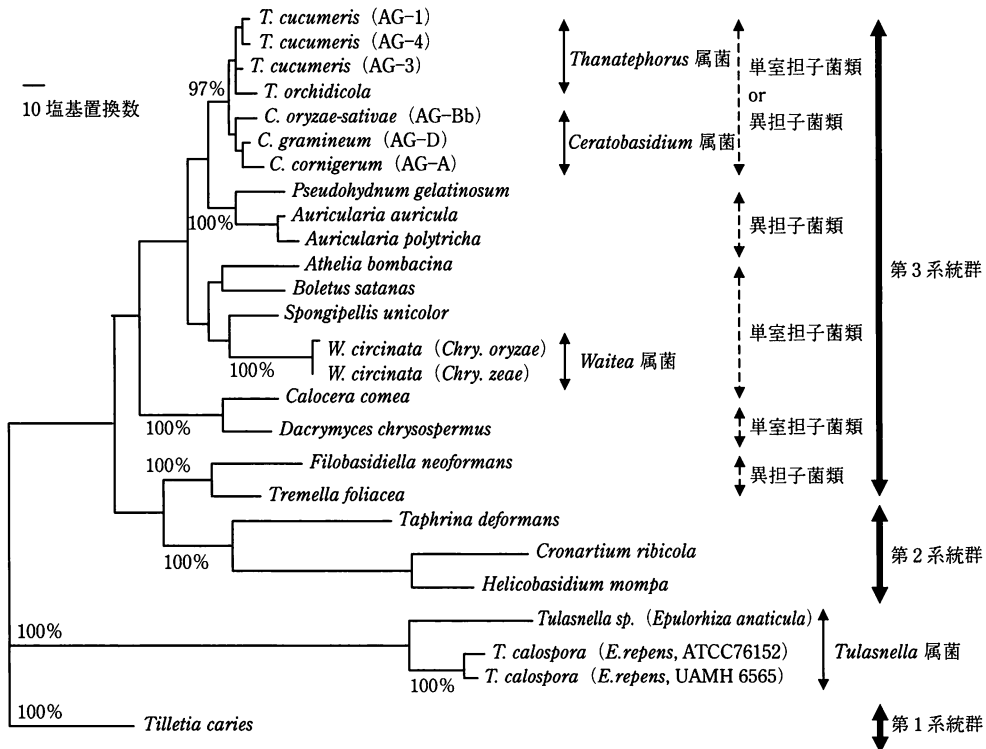


図-3 *Rhizoctonia* 属を含めた担子菌類間の分子系統樹

18S rRNA 遺伝子について最大節約法を用いて構築した。一致指数 (CI = 0.657), 保持指数 (RI = 0.735), 修正一致指数 (RC = 0.483) は系統樹の評価を示す指数で、数値 (最大値 1) が高いほど信頼できる系統樹であることを示す。枝の横にある数値はブートストラップ確率で、100%に近いほどその枝の信頼性が高いことを示す。バーは 10 塩基置換数 (ステップ数) の違いを表す。

Rhizoctonia 属菌は、菌核形成の有無、担子器の形状、ドリポア隔壁・かっこ体 (parenthesome) の形状などから、*Thanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Waitea* からなる仲間と *Tulasnella* などの仲間に大きく分けられることがわかっている。これは分子からの証拠ともよく一致する。

系統樹上では、*Thanatephorus* と *Ceratobasidium* は第3系統群の異担子菌類と単室担子菌類の中間に位置している。*Thanatephorus* やベニキクラゲ類 (Dacrymycetes) を異担子菌類とする見解があるが、その考えは分子系統樹からも支持される。

おわりに

Thanatephorus 属菌を中心に DNA 解析法による菌群/亜群の同定の仕方を紹介し、また分子系統樹から見えてくる個体群の関係について解説した。一方 *Ceratobasidium* 属菌の分類では、分子生物学的手法の応用は非常に遅れている現状を紹介した。この属にも多くの菌群が存在する。一方で同一菌群の菌株であるが、菌株の組み合わせでは菌糸融合を観察できない場合のある

ことが知られている。*Rhizoctonia* 属では *Thanatephorus* 属菌での分類研究が契機となり、他の属へと研究が進展している。今後は *Ceratobasidium* 属において菌群同定に適用できる DNA 解析法の開発が望まれる。

引用文献

- 1) CARLING, D. E. et al. (2002): *Phytopathology* 92: 43 ~ 50.
- 2) CERESINI, P. C. et al. (2002): *Mycologia* 94: 437 ~ 449.
- 3) ——— et al. (2003): *Phytopathology* 93: 610 ~ 615.
- 4) GONZALEZ, D. et al. (2001): *Mycologia* 93: 1138 ~ 1150.
- 5) KUNINAGA, S. (1996): *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control (eds. SNEH, B., S. JABAJI-HARE, S. NEATE and G. DUJST), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 73 ~ 80.
- 6) 国永史朗 (1997): 土と微生物 50: 5 ~ 12.
- 7) ——— (2002): 日植病報 68: 3 ~ 20.
- 8) ——— (2003): 植物防疫 57: 19 ~ 22
- 9) KUNINAGA, S. et al. (1997): *Curr. Genet.* 32: 237 ~ 247.
- 10) MARTIN, F. N. (2000): *Phytopathology* 90: 345 ~ 353.
- 11) 六鹿智行ら (1995): 日植病報 61: 634.
- 12) PRIYATMOJO, A. V. et al. (2001): *Phytopathology* 91: 1054 ~ 1061.
- 13) ROSEWICH, U. L. et al. (1999): *Fungal Genet. and Biol.* 28: 148 ~ 159.
- 14) TODA, T. et al. (1999): *Eur. J. Plant Path.* 105: 835 ~ 846.
- 15) VILGALYS, R. and M. A. CUBETA (1994): *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 135 ~ 155.

登録が失効した農薬 (9 ページより続き)

「殺菌剤」

●硫酸銅

- 14647: マルア硫酸銅塊 (東邦亜鉛) 2005/07/01
 ●ジラム・チウラム・フェナリモル水和剤
 17607: シオノギ・スペックス水和剤 (バイエルクロップサイエンス) 2005/07/04
 ●チオファネートメチル・ホセチル水和剤
 19288: ローヌ・プーラングラコーン水和剤 (バイエルクロップサイエンス) 2005/07/08
 ●イプロジオン・マンゼブ水和剤
 15778: クミアイロブジマン水和剤 (クミアイ化学工業) 2005/07/11
 15779: 有機ロブジマン水和剤 (ダウ・ケミカル日本) 2005/07/11

「殺虫殺菌剤」

- ベンスルトップ・バリダマイシン粉剤
 17601: ルーバンバリダ粉剤 DL (住化武田農薬) 2005/07/02
 ●BPMC・MPP・フサライド・EDDP 粉剤
 15816: 三共ヒノラブバイバッサ粉剤 35DL (三共アグロ) 2005/07/24
 ●BPMC・MEP・EDDP 粉剤
 19299: ヒノスミバッサ粉剤 DL (協友アグリ) 2005/07/30
 ●エトフェンプロックス・MEP・EDDP 粉剤
 19298: ヒノスミトレボン粉剤 DL (協友アグリ) 2005/07/30

「除草剤」

- メチルダイムロン水和剤
 13978: スタッカー水和剤 (エス・ディー・エス バイオテック) 2005/07/14
 ●アミプロホスメチル水和剤
 13977: トクノール M 水和剤 (バイエルクロップサイエンス) 2005/07/14
 ●2,4-PA 液剤
 7685: 2,4-D「日産」アミン塩 (日産化学工業) 2005/07/19
 ●カルブチレート水和剤
 19295: バックアップ 80 水和剤 (エス・ディー・エス バイオテック) 2005/07/22
 ●カルブチレート・2,4-PA 水和剤
 19297: バックアップ D 水和剤 (エス・ディー・エス バイオテック) 2005/07/22
 ●ジチオピル・ハロスルフロンメチル水和剤
 20205: プロハービー①水和剤 (日産化学工業) 2005/07/23
 20206: ローム・アンド・ハースプロハービー①水和剤 (ダウ・ケミカル日本) 2005/07/23
 ●トリネキサバクエチル水和剤
 19302: プリモ WSB 水和剤 (シンジェンタ ジャパン) 2005/07/30

「その他」

- 生石灰
 10115: カイ印ボルドー液用生石灰 (有限会社カイ石灰工場) 2005/07/28