ソメイヨシノの枝内におけるサクラてんぐ巣病菌の越冬部位の解明

東京大学大学院農学生命科学研究科　松下（まつした）　範久（のりひさ）・小松（こまつ）　雅史（まさぶみ）・宝月（ほうげつ）　岱造（たいぞう）

はじめに

サクラてんぐ巣病は，子のう菌類の *Taphrina wiesneri* によって引き起こされるサクラ類の病気である。本病は世界の温帯地域で広く発生しており，我が国では沖縄県を除く九州から北海道まで被害が確認されている（松下ら，2006）。サクラてんぐ巣病の被害樹種は，ソメイヨシノ，ヤマザクラ，オオヤマザクラ等であり，特に全国的に広く植栽されているソメイヨシノが本病により大きな被害を受けている。本病の発生は 100 年以上前から知られており，明治初年には，幕府の医官であった大淵祐玄が，東京向島墨田堤上のサクラに大発生したてんぐ巣を病害と考え，病枝を除去することにより治療したとされている（白井，1914）。また，1895（明治 28）年には，本病の病徴や病原菌の形態に関する最初の報告がなされた（白井，1895）。

サクラ類の枝に *T. wiesneri* が感染すると枝の一部がふくらみ，その部分から枝梢が不規則にほうき状に叢生する。このような様相を日本では「天狗の巣」に，西洋では「魔女のほうき（witches' broom）」に見立てて，本病の病名がつけられている。てんぐ巣内の枝では，開花期に小型で厚い葉が展開する。また，罹病枝には花芽が全く形成されないか，形成されても少数である。そのためソメイヨシノでは，開花期に花だけをつけた健全枝と緑色の葉を展開した罹病枝との違いが明瞭にわかる（口絵①）。罹病葉は展開後まもなく縁から縮れて褐変しはじめ，その後，乾燥して脱落する。罹病枝には健全な葉も展開し，罹病葉が落下した後も枝が伸長する。そして，翌年の開花期には，同じてんぐ巣内に同様の病徴が発生する。てんぐ巣は，このような過程を繰り返しながら，数年間から時には 10 年以上にわたって枝の数や長さを増加させながら成長した後に枯死する。罹病木の樹冠内ではてんぐ巣の数が増加していくことが多く，多数のてんぐ巣が形成された樹木は次第に衰弱し，枯死に至ることもある。

一つのてんぐ巣内で毎年同じ病徴が発現することから，*T. wiesneri* はてんぐ巣内の枝の中で越冬しているのであろうと想像されてきた。これまでに，Rathay（1881）は，冬期のてんぐ巣内の枝の中に菌糸を観察している。菌種は未同定であるものの，この報告に基づいて，Mix（1935）は，*T. wiesneri* は枝の中で菌糸の状態で越冬すると推測した。しかし，その後多くの樹病研究者が，罹病葉が落下した後のてんぐ巣内や周辺の枝から *T. wiesneri* を分離しようと試みてきたが，これまで成功していない。このように，*T. wiesneri* の越冬部位については，直接的な証拠がなく，つい最近まで不明であった。

昨年，筆者らは，種特異的プライマーを用いた PCR 法により罹病枝中の *T. wiesneri* を検出し，さらに *T. wiesneri* が検出された部位の組織解剖観察により，ソメイヨシノの枝内における *T. wiesneri* の越冬部位を明らかにした（Komatsu et al., 2010）。本稿ではその概要について紹介する。

I　種特異的プライマーを用いた PCR 法による *T. wiesneri* の検出

従来，対象とする病原菌が植物組織内に存在するのかを確認するために，組織分離による菌の検出が行われてきた。しかし，*T. wiesneri* が，子のう胞子形成時期以外の罹病木から分離された例は報告されていない。

近年，植物病害の診断法の一つとして，宿主組織内の病原菌の有無を PCR 法により確認する方法が用いられている。この方法は，植物組織から抽出した DNA を鋳型として病原菌の種特異的プライマー対を用いた PCR 反応を行い，DNA 断片の増幅の有無により組織内の病原菌の存在を確認するというものである。この方法により *T. wiesneri* の越冬部位を特定するためには，まず始めに *T. wiesneri* の DNA のみを特異的に増幅するプライマー対が必要である。

病原菌を検出するための種特異的プライマーは，リボソーム DNA（rDNA）領域に設計されることが多い。rDNA 領域は，リボソーム RNA（rRNA）をコードしている遺伝子領域と，internal transcribed spacer（ITS）領域と intergenic spacer（IGS）領域と呼ばれる非コード領域が 1 単位となり，染色体上に数百回の繰り返しで

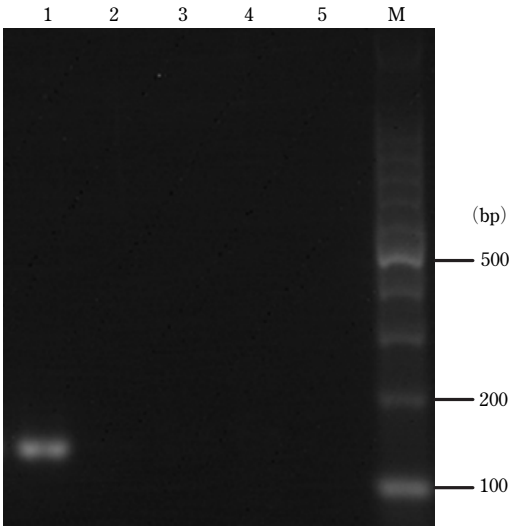
Overwintering Site of *Taphrina wiesneri* within Cherry Shoots. By Norihisa Matsushita, Masabumi Komatsu and Taizo Hogetsu
（キーワード：FITC 標識レクチン，PCR 法，rDNA－ITS 領域，種特異的プライマー，潜在感染）

存在する領域である。このうちITS領域は，菌類の種間の系統解析や種の識別に広く用いられている。*Taphrina*属菌については，既に31種のrDNA−ITS領域の塩基配列が決定され，種間の系統関係が報告されている（Rodrigues and Fonseca, 2003）。さらにモモ縮葉病菌（*T. deformans*）では，ITS領域の一部を増幅するための種特異的プライマー対が設計されており，罹病木から菌を直接検出することにも成功している（Tavares et al., 2004）。そこで筆者らも，*T. wiesneri*のrDNA−ITS領域を特異的に増幅させるプライマー対を設計した。

まず，日本産の*Taphrina*属菌のうち，*T. wiesineri*の6菌株とバラ科樹木に寄生する*T. deformans*，*T. mume*，*T. pruni*の各1菌株のITS領域の塩基配列を決定した。次に，これらの塩基配列と日本DNAデータバンクから取得した*T. wiesneri*を含む海外の*Taphrina*属菌31種60菌株のITS領域の塩基配列の合計69塩基配列をアライメントした。その結果から*T. wiesneri*だけに共通している塩基配列の部分を探し，プライマーTwITSRを設計した。このプライマーと対になるプライマーTwITSFは，*T. wiesneri*だけに共通する適当な配列が存在しなかったため，*Taphrina*属菌に共通する配列から設計した。設計したプライマー対を用いてPCR反応を行った結果，*T. wiesneri*では塩基配列から予想された123 bpのDNA断片が増幅され，他のバラ科樹木に寄生する*Taphrina*属菌3種と健全なソメイヨシノの葉ではDNAが増幅されなかった（図−1）。このようにして，PCR法により，ソメイヨシノ組織中の*T. wiesneri*を特異的に検出できるプライマー対を設計することができた。

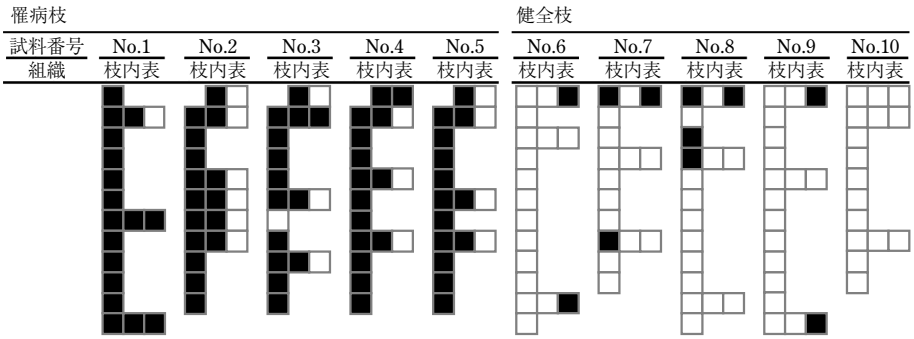
次に，このプライマー対を用いて，罹病枝内における*T. wiesneri*の越冬部位を調査した。2009年3月2日に，東京大学附属演習林田無試験地の樹木園内に植栽されたソメイヨシノ4本のてんぐ巣5個と，樹木園から約100 m離れた苗畑に植栽されたソメイヨシノ健全木5本から，それぞれ開芽前の当年枝を1本ずつ採集した。各枝から冬芽を採取し，表面の芽鱗と内部組織に分けた。また，冬芽を採取した枝は5 mm間隔で切断した。それぞれからDNAを抽出し，設計したプライマー対を用いてPCRを行った後，アガロースゲル電気泳動でDNA断片の増幅の有無を確認した。

調査の結果，罹病枝では，すべての冬芽の内部組織と1箇所を除くすべての枝片で，約120 bpのDNA断片が増幅された（図−2）。このことは，*T. wiesneri*が開芽前からてんぐ巣内の当年枝の内部全体に分布していることを示している。また，対照とした健全木の枝でも，56個のうちの5個の枝片でDNA断片が増幅された。本研究では，健全木の枝から*T. wiesneri*が検出された原因について特定することはできなかったが，おそらく*T. wiesneri*が枝内に潜在感染していたのではないかと推測している。実際，枝を採取した翌年の春には，健全に見えた苗畑内の数個体において，*T. wiesneri*の子のうを形成した罹病葉を確認している。一方，芽鱗からは罹病木からも健全木からもDNA断片が増幅されたが，検出頻度はどちらも低く，両者間で有意な差は認められなかった。モモ縮葉病では，*T. deformans*の出芽型胞子が芽鱗の表面に付着して越冬し，翌春，そこから発芽した菌糸が葉に感染することが知られている。今回，芽鱗で検出された*T. wiesneri*も，付着していた発芽胞子に由来する可能性がある。しかし，検出頻度が低く，また健全木でも検出されたことから，サクラてんぐ巣病の病徴の発現には，芽表面に付着した出芽型胞子は直接関与していないと考えられる。



図−1　*Taphrina wiesneri*の種特異的プライマー対により増幅されたDNA断片の電気泳動像
1：*T. wiesneri*（サクラてんぐ巣病菌），2：*T. deformans*（モモ縮葉病菌），3：*T. mume*（ウメ縮葉病菌），4：*T. pruni*（ユスラウメ縮葉病菌）の各培養菌体，5：ソメイヨシノの健全葉，M：サイズマーカー．

さらに，枝内における*T. wiesneri*の越冬部位をより詳細に調べた。まず，5個のてんぐ巣から5 mm長の枝を1個ずつ採取し，外樹皮，内樹皮，木部に分け，それぞれからDNAを抽出した。上記と同じ方法によりPCRを行ってDNA断片の増幅の有無を調べた。その結果，すべての内樹皮と1個の木部からDNA断片が増幅されたが，外樹皮では全くDNA断片は増幅されなかった。このことから，枝内では，*T. wiesneri*は内樹皮で主に越



枝：枝の断片，内：芽の内部組織，表：芽表面の芽鱗，
■：*T. wiesneri* の検出部位，□：*T. wiesneri* の非検出部位．

図-2　ソメイヨシノの枝における *T. wiesneri* の検出部位
四角は，5 mm の枝の断片（枝），芽の内部組織（内），芽表面の芽鱗（表）のそれぞれにおける検出結果．図の上が枝の上側．芽における検出結果は，各芽が付いていた枝断片の右側に示した．

冬していることがわかった。

II　枝内における *T. wiesneri* の菌糸の観察

種特異的プライマーを用いた解析により，*T. wiesneri* が枝や芽の内部で越冬していることが示された。しかしDNA 解析では，実際に本菌が枝や芽のどの部分にどのようにして分布しているのかはわからない。また，*T. wiesneri* は，菌糸型と酵母型の二形性を示すことが知られているが，組織内ではどちらの形態で存在しているのかについても不明である。そこで，組織解剖観察により，枝内の *T. wiesneri* の観察を行った。

従来，植物組織内の菌糸を観察するための染色法としては，サフラニン・ファストグリーン二重染色などの方法が用いられてきた。しかし，一般的に使用されている染色法では植物組織も染色されることが多いため，菌糸と宿主組織を識別することが困難であった。そこで，筆者らは，植物組織内の菌糸を染色する際に，FITC 標識レクチンを用いることにした。レクチンは特定の糖鎖に結合する性質を持った酵素・抗体以外のタンパク質であり，細胞を凝集させたり，多糖類や糖タンパク質を沈降させたりする性質がある。レクチンは構造的に多様であり，様々な生物によって作られる。子のう菌類や担子菌類の細胞壁には，N-アセチルグルコサミンの重合体であるキチンや，グルコースの重合体であるグルカン，マンノースの重合体であるマンナンが含まれている。そのため，N-アセチルグルコサミンに結合する小麦胚芽レクチン（wheat germ agglutinin, WGA）や，グルコースやマンノースに結合するコンカナバリン A（concanavalin A, ConA）を FITC などの蛍光を発する物質で標識した物質により，菌糸が染色できる。これまでに FITC 標識 WGA（F-WGA）を用いることにより，葉内や材内の植物病原菌を明瞭に観察することができた（高橋ら，2008；Takahashi et al., 2010）。そこで，蛍光標識レクチンによる染色法を用いて，宿主組織内の *T. wiesneri* の観察を試みた。

まず，F-WGA と F-ConA により，宿主組織内の *T. wiesneri* を染色して観察できるのかを確認するために，子のうが形成されたソメイヨシノ罹病葉の切片を両物質で染色し，蛍光顕微鏡で観察した。その結果，F-WGA では子のうの下部細胞である脚胞のみが染色されたのに対して，F-ConA では子のう全体と葉肉細胞の細胞間隙に広がる菌糸が染色された。このことから，*T. wiesneri* の菌糸の染色には F-ConA が適していることがわかった。また，この結果は，*T. wiesneri* の細胞壁が，主にキチンではなくグルカンまたはマンナンから構成されている可能性を示唆する。

次に，DNA 解析用の試料と同時に採集した枝と冬芽の切片を作成し，F-ConA で染色した後，組織内の菌糸を観察した。枝の切片では，F-ConA で染色される顆粒が組織内に大量に分布していたため，菌糸を観察することができなかった。一方，てんぐ巣から採取した芽の横断切片では，同様の顆粒が芽鱗と葉脈の部分に見られたものの，葉肉の部分にはほとんど見られなかった。そして，F-ConA で染色された菌糸が，芽の内部にある葉の葉肉細胞の細胞間隙に広がっている様子が明瞭に観察された（口絵②）。一方，健全木の芽内では，菌糸

は観察されなかった。DNA解析の結果，*T. wiesneri* が罹病枝の芽の内部で常に検出されたことから，観察された菌糸は *T. wiesneri* のものであると考えられた。以上のことから，*T. wiesneri* は，芽内部において，葉の葉肉細胞の細胞間隙に菌糸の状態で越冬していることが確認された。これらの菌糸が，開花期の罹病葉での子のう形成に関与していると推測される。

お わ り に

本研究により，*T. wiesneri* が少なくとも枝の内樹皮や芽の内部で越冬していることを明確に示すことができた。また，*T. wiesneri* が，てんぐ巣内の枝内部のほぼすべての部位から検出されたことから，本菌は，樹体内に侵入した後，枝内で無性的に増殖しながら数年間にわたって生き続けているのではないかと推測している。このことについて明らかにするために，年間を通じた *T. wiesneri* の存在部位の特定や，てんぐ巣内に分布する *T. wiesneri* の遺伝子型の解析を行っている。

サクラてんぐ巣病の伝染環には，病原菌の越冬部位以外にも不明な点が多く，そのため罹病枝を切除する以外に有効な防除法が確立されていない。たとえば，*T. wiesneri* は，開花期に罹病葉の裏面に裸生子のうを形成し，約3～4日間にわたって子のう胞子を飛散させるが，飛散した子のう胞子がいつどのように宿主へ侵入するか，*T. wiesneri* の接種方法が確立されていないため，全く不明である。また，それらがどのくらいの範囲まで飛散するかについても，全くわかっていない。今後，このような不明点を一つ一つ解明して，本菌の伝染環の全貌を明らかにし，サクラてんぐ巣病の新たな防除法への道を拓きたいと考えている。

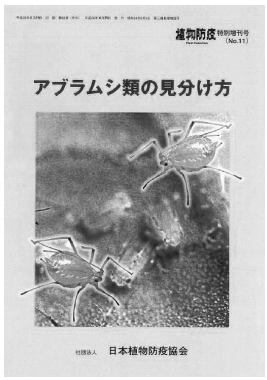
引 用 文 献

1）Komatsu, M. et al.（2010）: J. Gen. Plant Pathol. **76**: 363～369.
2）松下範久ら（2006）: 樹木医学研究 **10**: 11～18.
3）Mix, A.J.（1935）: Phytopathology **25**: 41～66.
4）Räthay, E.（1881）: Sitzungsber d k Akd d Wiss Math-naturw kl 83（Abt I）: 267～288
5）Rodrigues, M.G. and A. Fonseca（2003）: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 607～626.
6）白井光太郎（1895）: 植物学雑誌 **9**: 161～164.
7）――――（1914）: 病蟲害雑誌 **1**: 17～20.
8）高橋由紀子ら（2008）: 日植病報 **74**: 140～147.
9）Takahashi, Y. et al.（2010）: Phytopathology **100**: 747～755.
10）Tavares, S. et al.（2004）: Eur. J. Plant Pathol. **110**: 973～982.

植物防疫特別増刊号 No.11　**アブラムシ類の見分け方**

社団法人 日本植物防疫協会 編　B5判 103ページ 口絵カラー
価格 2,520円（本体2,400円＋税） 送料100円

◆ 農作物を加害するアブラムシ類の見分け方を詳しく解説。薬剤感受性の検定法も掲載。



§1. 農作物のアブラムシの見分け方＜総説＞（宗林 正人）
§2. 水稲・畑作物のアブラムシ類（鳥倉 英徳）
§3. 野菜のアブラムシ類（高橋 滋）
§4. 果樹のアブラムシ類（宗林 正人）
§5. 花きのアブラムシ類（木村 裕）
§6. 緑化樹木のアブラムシ類（宗林 正人）
§7. 主要アブラムシの有翅虫による見分け方（杉本俊一郎）

付 録
1．果樹のアブラムシの見分け方（宮崎 昌久）
2．「果樹のアブラムシの見分け方」への補足（宮崎 昌久）
3．薬剤感受性検定法（西東 力）

お問い合わせとご注文は
社団法人 日本植物防疫協会 支援事業部　〒114-0015 東京都北区中里2-28-10
郵便振替口座 00110-7-177867　TEL 03-5980-2183　FAX 03-5980-6753
ホームページ http://www.jppa.or.jp/　メール：order@jppa.or.jp