ミトコンドリアDNAで識別される高度耐凍性の雪腐黒色小粒菌核病菌

生物環境安全部微生物・小動物研究グループ微生物生態ユニット　松本 直幸

積雪下のみで蔓延する雪腐黒色小粒菌核病菌は低温に耐性であるが，そのなかでも特定のグループは－40℃の低温に耐えることができる．このような高度耐凍性は遺伝的に異なる二つのグループに見られるが，これら高度耐凍性菌のミトコンドリアDNAには共通部分が見られた．

雪腐黒色小粒菌核病菌

積雪下で秋まき小麦や牧草を加害する病原菌を総称して雪腐病菌という．雪腐病菌としては数種の病原菌が記載されているが，もっとも重要な種は雪腐黒色小粒菌核病菌（*Typhula ishikariensis*）である．本種は，非常に変異に富み，多様な積雪条件下に適応している．そのため，種以下の分類群については世界的に様々な名称が使われている（表1）．日本産生物型Aと生物型Bのテスターモノカリオンの交配反応パターンにより，世界各地の分類群は以下の4つに分けることができた．

①生物型Aと生物型Bの両方に和合性のもの：ノルウェー産group Ⅰと北米産未同定菌

②生物型Aとのみ和合性のもの：生物型A，ノルウェー産group Ⅰ，北米産未同定菌およびロシア産 var. *ishikariensis*

③生物型Bとのみ和合性のもの：生物型B，ノルウェー産group Ⅱ，北米産 var. *idahoensis* および var. *canadensis*

④両方の生物型に対し不和合性のもの：ノルウェー産group Ⅲ

これらの菌群は交配パターン，培養形態やrDNA-ITS RFLPにより二つに大別された．すなわち，菌群①②および④を含む生物種Ⅰの菌核は茶色で，その直径はほぼ等しく，気中菌糸は少なめである（図1a）．また，北米のvar. *idahoensis* は，培養形態やrDNA-ITS RFLPについては，生物種Ⅰの特徴を備えていたが，日本の生物型Aとは交配しないので③とした．しかし，生物種Ⅰに属す他の菌群（var. *ishikariensis* やgroup Ⅰ）とは交配可能である．生物種Ⅱは交配パターン③を示し，その菌核は黒く，大きさに菌株変異が著しく，気中菌糸は多い（図1b）．以上のように，雪腐黒色小粒菌核病菌は基本的にはこの二つの生物種よりなると考えられる．

耐凍性

ノルウェー産group Ⅲや北米産 *T. ishikariensis* var. *canadensis* は非常に耐凍性に優れている．Hoshinoら（1998）はgroup Ⅲの菌糸を－40℃に処理し，その耐凍性を近縁のgroup Ⅰと比較した．group Ⅰ菌株の培養菌を，凍結処理の後生育適温である10℃においても菌糸成長は著しく低下したが，group Ⅲ菌株を生育適温の2℃に戻すと正常に生育を再開した．

group Ⅲ菌株は10℃以上の「高温」では生育が異常になり，菌糸伸長が異常になり，複数の菌核が癒着し不定型となる（図2，Matsumoto *et al.*, 1996）．「高温」での菌糸生育異常は細胞質可溶性蛋白の変性を伴い（Hoshino *et al.*, 1997），カロチンなどのフリーラジカルスカベンジャー（活性酸素捕捉剤）の添加により改善

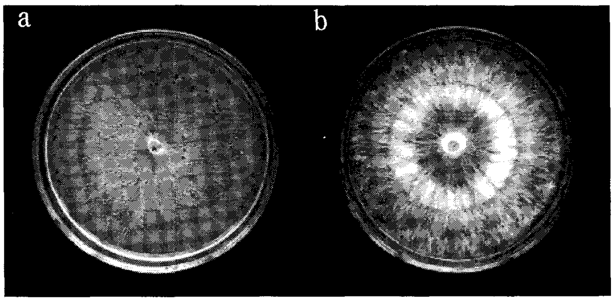

図1　雪腐黒色小粒菌核病菌生物種Ⅰ(a)と生物種Ⅱ(b)の培養形態

表1　雪腐黒色小粒菌核病複合体を形成する分類群の特徴

	生物種Ⅰ					生物種Ⅱ		
分類群	生物型A	group Ⅰ	var. *ishikariensis*	var. *idahoensis*	group Ⅲ	var. *canadensis*	生物型B	group Ⅱ
産地	日本	ノルウェー	北米・ロシア	北米	ノルウェー	北米	日本	ノルウェー
培養形態	A				A'	B	B'	B　B"
交配	②	①②		③	④	③		
ITS-RFLP	a				a'	b		
mtDNA	α				γ		β	

それぞれの特徴について，分類群間で境界線のある場合は違いが明瞭で，境界線のない分類群間では違いがないことを示す．
A'：高温で生育異常を示す．B'：菌核が大きい．B"：菌核の表面が菌糸で覆われている．a'：group Ⅰとの雑種あり．
交配パターンについては本文参照．

される（Hoshino *et al.*, 2000）．このことから，group Ⅲは高温による呼吸増大が生育異常を引き起こし，高度耐凍性菌群のミトコンドリアには他の菌群と異なる可能性が高いと考えられた．

group Ⅲの分布するノルウェー沿岸部では，真冬にしばしば融雪がおこり，その後の急速な気温の低下で，牧草は凍結し枯死する．また，カナダやロシアの大陸内陸部でも植物は凍害をうける．このようなところにはvar. *canadensis*（サスカツーン）やvar. *ishikariensis*（シベリア）が分布している．これらも同様な性質をもつものと考えられる．

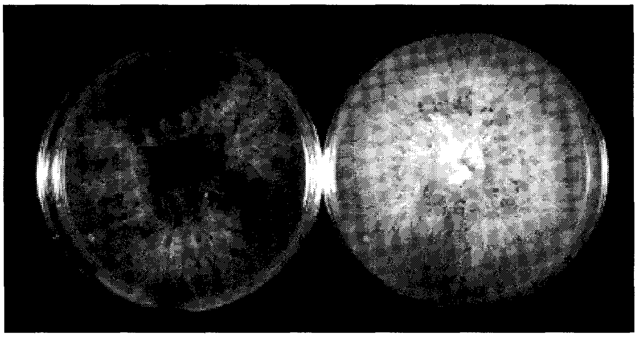

図2　高度耐凍性菌群（group Ⅲ）の培養形態
0℃（右）で培養すると正常に生育するが，10℃（左側）では生育が異常になる．

mtDNA解析

日本，ノルウェー，および北米産の雪腐黒色小粒菌核病菌29菌株よりDNAを抽出し，プライマーML5とML6を用いてミトコンドリア（mt）DNA配列の一部をPCRにより増幅した．その結果，生物型Aが含まれる生物種Ⅰからは約600～650bpのバンドが検出され，生物型Bを中心とする生物種Ⅱのバンドの大きさは約470bpであった．耐凍性の高いgroup Ⅲとvar. *canadensis*は生物種を異にするが，バンドサイズは両方とも約530bpであった．塩基配列を比較したところ，塩基対数の違いは欠失・挿入による違いであり，それ以外の部分の配列はほぼ一致していた．

結　論

雪腐黒色小粒菌核病菌に属す八つの分類群は種々の特徴により二つの生物種に大別される．両生物種にそれぞれ高度耐凍性を有する分類群が存在するが，これらの高度耐凍性菌群は二つの生物種と異なる独自のmtDNAをもっていた．高度耐凍性菌群が高温で生育異常を示し，その影響はフリーラジカルスカベンジャーにより軽減されることは，呼吸に関わる器官であるミトコンドリアが関与していることを示唆する．しかし，ミトコンドリアと耐凍性がどのように関わっているかは不明であるが，プライマーML5とプライマーML6の組合せで増幅されるmtDNAにより，高度耐凍性分類群を特異的に識別することは可能である．mtDNAの特徴は，高度耐凍性がどのように発達したかを今後研究するための指標となるだろう．

引用文献

Hoshino, T., Tronsmo, A. M., Matsumoto, N., Ohgiya, S, and Ishizaki, K. 1997. Effects of temperature on growth and intracellular proteins of Norwegian Typhula ishikariensis isolates. Acta. Agric. Scand., Sect. B, Soil and Plant Sci. 47 : 185-189.

Hoshino, T., Tronsmo, A. M., Matsumoto, N., Araki, T., Gerges, F., Goda, T., Ohgiya, S, and Ishizaki, K. 1998. Freezing resistance among isolates o a psychrophilic fungus, Typhula ishikariensis, from Norway. Proc. NIPR Symp. Polar Biol. 11 : 112-118.

Hoshino, T., Tronsmo, A. M., and Matsumoto, N. 2000. Distribution and ecological characteristics of snow mold fungi in Northern Atlantic area., 4th International Symposium on Arctic and Alpine Mycology. 7.

Matsumoto, N., Tronsmo, A. N., and Shimanuki, T. 1996 . Genetic and biological characteristics of Typhula ishikariensis isolates from Norway. Europ. J. Plant Pathol. 102 : 431-439.

2002年1月