

植物寄生性 *Verticillium* 属菌の分子分類

帯広畜産大学畜産学部畜産環境科学科作物科学講座

こ
小
なが
長い
池
お
尾まさ
正
ひで
英のり
徳
ゆき
幸

千葉大学園芸学部生物生産基礎科学講座

は じ め に

作物の *Verticillium* 病は、近年特に被害が急増している病害である。わが国では、*V. albo-atrum*, *V. dahliae* および *V. nigrescens* の3種が植物寄生菌として報告されている。このうち、特に *V. dahliae* と *V. albo-atrum* の被害が多い。また *Verticillium* 属菌は宿主範囲が広いこともあり (*V. dahliae* では160属350種以上)、病原性の分化の確認が困難であることが知られていた (Heale, 1988; 長尾, 1995)。しかし、*V. dahliae* における、飯島 (1983) のトマト系、非トマト系の判別、萩原 (1990)、Horiuchi ら (1990) の菌群の判別など、この分野での日本人研究者の功績があげられる。欧米諸国では *V. dahliae* の栄養体親和性 (Vegetative Compatibility) に基づく分類法が進んでおり、宿主範囲や病原性との関連性が報告されている (Rowe, 1995)。またゲノム解析など分子生物学的な研究の報告もあるが、病原性との明確な関連性を論じた論文は *V. albo-atrum* の RFLP や RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) を除きほとんどない (Carter and Barbara, 1991; Barasubiyee et al., 1995)。

筆者らは、ここ数年、*V. dahliae* および *V. albo-atrum* の病原性と菌株の DNA レベルの変異との間に、また病原性と栄養体親和性との間に関連性が見いだされるかどうか、研究を続けている。ここでは、これらの研究で得られた (特に前者の) 知見、および他の植物寄生性 *Verticillium* 属菌を含めた諸外国の研究について報告する。

I *Verticillium* 属菌の菌群と系統

萩原 (1990) は、*V. dahliae* を特定の作物または作物群に対する病原力の強弱に基づき主に四つの菌群に分類した (A 群: ナス系, B 群: トマト系, C 群: ピーマン系, D 群: アブラナ科系)。また Sato (1994) は *V. albo-atrum* をジャガイモ系とアルファルファ系に分類した。菌群や系統を明らかにすることは、圃場診断や抵抗性育種の際の菌の選択、同じ宿主に複数の *Verti-*

llium 属菌が感染した場合の菌の同定の場面において、必要不可欠である。しかし、これらの菌群や系を決定するためには、複数の判別植物に接種試験を実施しなければならず、手間がかかる。そこで、より簡便で迅速な検定法の開発が望まれている。

II RAPD による *Verticillium* 属菌の解析

1 国内産 *Verticillium* 属菌の解析

先に述べた菌群ならびに系統を分類するため、RAPD 法を用いて国内産 *Verticillium* 属菌 (*V. albo-atrum*, *V. dahliae*) を解析した (Koike et al., 1995; Koike et al., 1996)。多型が出たバンドの有無に基づきクラスター分析を行ったところ、まず *V. dahliae* と *V. albo-atrum* の二つのクラスターに分けられた (図-1)。*V. dahliae* はナス系、ピーマン系、エダメ系およびウリ科分離株 (菌群未定) を含むグループ (タイプ I)、トマト系のみを含むグループ (タイプ II) およびアブラナ科系を含むグループ (タイプ III) の三つのサブクラスターに分かれた。*V. albo-atrum* は大きく二つのサブクラスターに分かれ、一つはアルファルファ系だけを含むグループ (タイプ IV)、もう一つはアルファルファ系1菌株以外はジャガイモ系を含むグループ (タイプ V) であった。

これらの結果から、半数体の *V. dahliae* は、ナス系およびピーマン系を含むグループとトマト系に遺伝的に分化しており、菌群による類別が用いられる以前に提唱されていた飯島のトマト系、非トマト系の類別 (1983) は DNA レベルでも検定可能であった。また、遺伝子診断として RAPD 法を利用した場合二つのプライマー (A-04: 5'-ATCAGCGCACCA-3', A-06: 5'-GCCAGCTGTACG-3') で簡便に検定できるので、菌群や系統の決定がある程度簡略化できるのではないかと考えている。

2 欧米産の菌株を含めた解析

五つの RAPD タイプに分けられた国内産 *V. dahliae* と *V. albo-atrum* に対して、欧米産の菌株がどのような関係にあるのかは、病原性の分化や生物地理学的見地からも非常に興味のあるところである。そこでカナダ・ゲルフ大学ロブ教授研究室保存の *V. dahliae*, *V. albo-atrum* (産地: カナダ, オランダ, イギリス, 宿主: ト

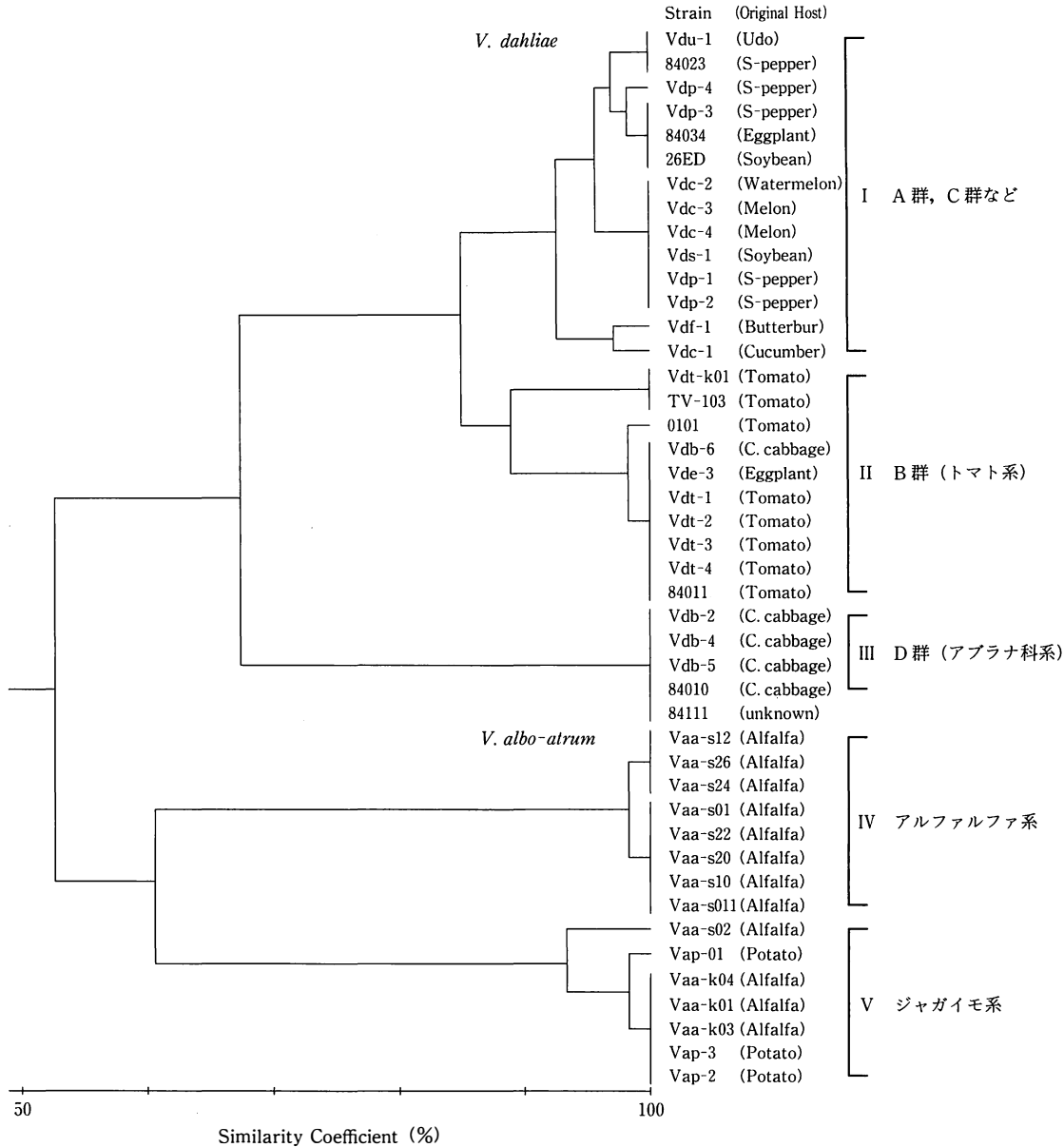


図-1 RAPD法による日本産 *Verticillium* 属菌のクラスター分析 (KOIKE et al., 1996 を改変)

マト、ナス、ジャガイモなど)を用いて、RAPD解析をした (KOIKE et al., 1997b)。その結果、欧米産の *V. dahliae* のジャガイモおよびトマト分離株は日本の B 群と近いところでサブクラスターを形成した。またトマトの半身萎ちょう病抵抗性品種を侵すレース 2 についても検討した。その結果カナダ産および日本産レース 2 は、それぞれカナダ産および日本産起源のレース 1 (トマト病原性型) と類似度が高かった。さらに欧米産 *V. albo-atrum* のアルファルファおよびジャガイモ分離株は、それぞれ日本産の *V. albo-atrum* のアルファルファ系、

ジャガイモ系と同じサブクラスターに属していた。これらのことから、以下のことが推測できる。(1)日本産 *V. dahliae* のトマト系は欧米産のトマトおよびジャガイモ病原性株と起源を同じとする。(2)同様に日本産 *V. albo-atrum* のアルファルファ系、ジャガイモ系も欧米産のアルファルファ、ジャガイモ分離株とそれぞれ起源を同じとする。(3)トマト病原性株の *V. dahliae* レース 2 はそれぞれの地域のレース 1 から分化したものである。

筆者らは日本産 *V. dahliae* のジャガイモ分離株に関

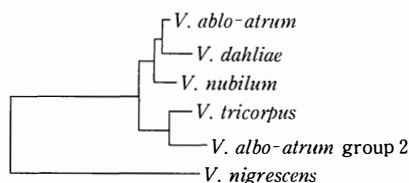


図-2 植物寄生性 *Verticillium* 属菌の分子系統樹 (ITS 配列による)

しては、まだ解析を行っていない。角野 (1995) は、北海道のジャガイモ栽培土壌から分離された菌株でジャガイモに病原性のあるもののほとんどがナス系 (A 群) であったことを報告した。今後、これらの分離株も含めて解析する必要があるだろう。

III 植物寄生性 *Verticillium* の分子進化

諸外国では、先にあげた 3 種以外に *V. tricorpus* や *V. nubilum* などが植物の病原菌として知られている。これらの菌を含めた核ゲノム (CARDER and BARBARA, 1991) やミトコンドリア DNA の RFLP (TYPAS et al., 1992) の報告はある。しかし、これら *Verticillium* 属菌の分類学的な位置や類縁関係は詳しく調査されていない。そこで筆者らは最近、分子分類や分子進化の研究で多用されているリボソーム RNA 遺伝子の ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域に着目し、その塩基配列の解析を行って系統樹を作成した (図-2, 未発表)。その結果、*V. albo-atrum*, *V. dahliae* と *V. nubilum* が一グループとしてまとめ、*V. tricorpus* と *V. albo-atrum* group 2 (Vaa 2) が近縁のグループとして存在し、*V. nigrescens* がやや他の種と離れていた。Vaa 2 は形態学的に *V. albo-atrum* と同定された菌である。しかし、その配列は *V. tricorpus* に類似している (ROBB et al., 1993)。本系統は、カナダだけではなくヨーロッパにも分布していることが知られているが、日本での発生は認められていない。

次に、日本の菌株 (*V. dahliae*, *V. albo-atrum* およびアブラナ科系の *V. dahliae*) についても同様な解析を行った。その結果、アブラナ科系の *V. dahliae* が *V. albo-atrum* と類似した配列を持っていることがわかった。またイギリスのバーバラ (王立園芸研究所) の研究グループも既に同じ結果を報告している (MORTON et al., 1995)。

筆者らは、さらにヒストン 4 および β -チューブリン遺伝子のイントロン領域を PCR-RFLP により解析し、合計 143 の制限サイトにより系統樹を作成した (図-3)。

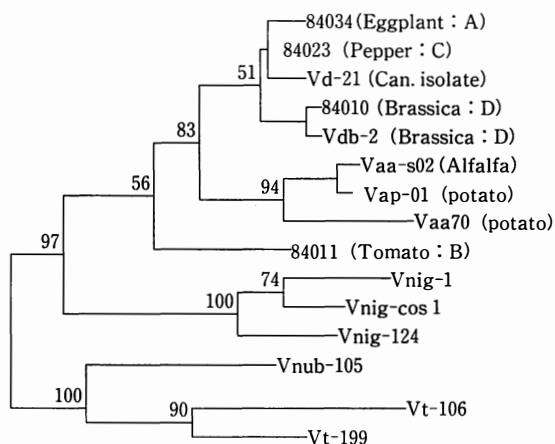


図-3 ヒストン 4 および β -チューブリン遺伝子のイントロン領域の制限サイトによる植物寄生性 *Verticillium* 属菌の系統樹 (最節約法, 数字はブートストラップ法の確率)

代表的なハプロタイプのみ示した。 *V. dahliae*: 84034, 84023, Vd-21, 84010 (アブラナ科系), Vdb-2 (アブラナ科系), 84011, *V. albo-atrum*: Vaa-s02, Vap-01, Vaa 70, *V. nigrescens*: Vnig-1, Vnig-cos 1, Vnig-124, *V. nubilum*: Vnub-105, *V. tricorpus*: Vt-106, Vt-199

アブラナ科系の *V. dahliae* は半数体の *V. dahliae* のグループに属し、ITS で認められた *V. albo-atrum* との類似性はなかった。また RFLP のパターンから類推すると、アブラナ科系の *V. dahliae* のヒストン 4 遺伝子のイントロンは *V. albo-atrum* と半数体の *V. dahliae* の両方の性質を持っていた (KOIKE et al., 1997 b)。このことは、アブラナ科系 *V. dahliae* (D 群, diploid) の進化を考えるうえで非常に興味深い。本系統は ITS の塩基配列や微小菌核の形態から、*V. albo-atrum* が倍数化したのではないかと考えられていたが、単純な倍数化や単純な (*V. albo-atrum* と半数体の *V. dahliae* の) 融合化ではなさそうである。この系統は既に *V. dahliae* var. *longisporum* とされている。また、イスラエルで 1994 年に開催された第 6 回 *Verticillium* シンポジウムではこの系統を *V. brassicicola* と呼ぶことが提案されたが、まだコンセンサスは得られていない。今後の解析が楽しみである。

IV *Verticillium* 属菌のリボタイピング

リボタイピング (Ribotyping) とは、リボソーム RNA 遺伝子領域を RFLP や PCR などの技術を用いて生物種の分類や種内の変異を検出する手法である (TICHY and SIMON, 1994)。ロブの研究グループは先に述

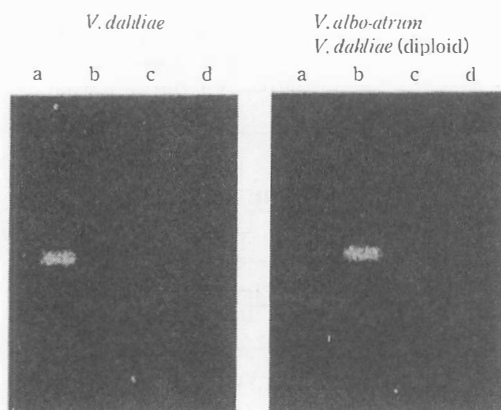


図-4 種特異的プライマーによる日本産 *V. dahliae* と *V. albo-atrum* の検出

a: *V. dahliae*, b: *V. albo-atrum*, c: *V. albo-atrum* group 2, d: *V. tricornis* 特異的プライマー

べたりボゾーム RNA 遺伝子 (ITS) の塩基配列の違いを利用し, *V. albo-atrum* (NAZAR et al., 1991), *V. dahliae* (NAZAR et al., 1991), Vaa 2 (ROBB et al., 1993) および *V. tricornis* (MOUKHAMEDOV, et al., 1994) を特異的に検出するプライマーを開発した。これらのプライマーの特異性は高く, 感染植物体の DNA を PCR の鋳型にしても, 検出が可能である。また, 他の土壌菌 (*Fusarium* 菌, *Rhizoctonia* 菌など) の DNA も増幅しない。

日本産の菌株にこれらのプライマーが適用できるかどうかを調査したところ, アブラナ科系以外の *V. dahliae* は *V. dahliae* 用プライマーで, *V. albo-atrum* は *V. albo-atrum* 用プライマーで検出が可能であった。また日本産 *V. albo-atrum* の中に, Vaa 2 プライマーで検出されるものはなかった。しかし, アブラナ科系の *V. dahliae* は *V. albo-atrum* 用プライマーで検出された (図-4)。これは ITS の塩基配列の相同性が高い (99.6%) ことから, 予測された。カナダでは 2 倍体 *V. dahliae* の被害はほとんどないので, これらのプライマーを検出用に使用するには支障はないであろうが, 日本や欧州など 2 倍体 *V. dahliae* が発生しているところでは問題が生じる。

これを解決するため, 次にリボゾーム遺伝子の IGS (Intergenic Spacer Region) の解析を試みた。核内大サブユニットの下流と小サブユニットの上流の *Verticillium* 保存領域の配列をプライマーとして用いて, PCR を行った。その結果, *V. dahliae*, *V. albo-atrum* および *V. dahliae* のアブラナ科系 (D 群) の増幅バン

ドに多型が確認でき, これらの 2 種 1 変種の類別は可能であった (KOIKE et al., 未発表)。しかし, この方法では菌群や系統は区別できなかった。現在は土壌からの直接的な検出をめざし, ITS 領域の SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) の検討を始めている。

V 欧州菌株の RFLP 型特異的プライマーによる日本産 *Verticillium* 菌の検出

先に挙げたバーバラのグループ (OKOLI et al., 1993; OKOLI et al., 1994) は RFLP を用いて *V. dahliae* と *V. albo-atrum* を解析し, これらのグルーピングを行った。*V. dahliae* は二つのサブグループ (「A」と「B」: 萩原の菌群と区別するため「」をつける) に, *V. albo-atrum* はルーサン (アルファルフ) 分離株「L」とそれ以外の宿主分離株「NL」に類別できること, また 2 倍体の *V. dahliae* 「D」は半数体の *V. dahliae* とも異なることを示した。彼らはこの RFLP のプローブに用いた DNA の塩基配列を解析し, サブグループ株検出用のプライマーを開発した (CARDER et al., 1994)。それらは 4 組あり, (a) すべての *V. dahliae* を検出する [19/22: 5'-CGGTGACATAATACTGAGAG-3'/5'-GACGATGCGGATTGAACGAA-3'], (b) *V. albo-atrum* の「NL」のサブグループを検出する [2/3: 5'-ATGGACCGAACAAGCTAGGTA-3'/5'-TCTCAGATATATGCTGCTGC-3'], (c) *V. dahliae* の「A」のサブグループを検出する [42/70: 5'-GTTTCTTAGCTTGCAACAT-3'/5'-ACGAGAGTGGAATAAAAGCGA-3'], および (d) diploid の *V. dahliae* 「D」以外の *V. dahliae* と *V. albo-atrum* を検出する [53/54: 5'-CATGGATAACCGTGGTAATT-3'/5'-CCATTCAATCGGTAGTAGCG-3'] プライマーである。

これらのプライマーを用いて, 日本産菌株を解析したところ, プライマー [19/22] はアブラナ科系 (D 群) を含めたすべての *V. dahliae* の, プライマー [2/3] は *V. albo-atrum* のジャガイモ系の, プライマー [42/70] は *V. dahliae* のトマト系 (B 群) のおよびプライマー [53/54] は *V. dahliae* のアブラナ科系 (D 群) 以外の *V. dahliae* と *V. albo-atrum* の DNA 断片を増幅した (KOIKE et al., 1997)。

以上のことから, バーバラのグループが開発した 4 組のプライマーを用いれば, 先に述べた RAPD と同じグルーピングが可能であることがわかった。すなわち, *V. dahliae* においては RAPD のタイプ I (ナス系, ピーマン系などを含む) とサブグループ「B」, タイプ II

(トマト系) とサブグループ「A」, タイプIII (アブラナ科系) とサブグループ「D」および *V. albo-atrum* のタイプIV (アルファルファ系), タイプV (ジャガイモ系) それぞれとサブグループ「L」, 「NL」が対応している。

お わ り に

以上, 主に日本産の植物寄生性 *Verticillium* 属菌の分子分類学的な解析について述べてきた。これらのデータを併せて考察してみると, 欧州産の菌に関してはサンプル数は少ないが, *V. dahliae* (haploid) には大きく二つの分子タイプが存在し, それらが(おそらくヨーロッパから)世界中に伝播され, それぞれの地域でその栽培環境に適応して, 病原性を分化させているのではないかと推測される。また, *V. albo-atrum* に関しても, *V. dahliae* ほど宿主範囲は広くないが, 同様な分布状況が認められる。こちらはアルファルファやジャガイモのそれぞれに病原性を持つ二つの分子型が存在し, それらがやや冷涼な地域に分布していると思われる。

これらのテクニックを活用することによって, *Verticillium* 属菌の分子疫学や集団遺伝学的研究が進展することが期待される。現在, *V. dahliae* の菌群はナス科, アブラナ科に対する病原性に基づいて判別されている。しかし, 年々新しい宿主植物の報告がなされていることを考慮すると, 新しい分類法が必要となるかもしれない。また, 本稿は栄養体親和性との関連性については述べていないが, 現在, 国内産の *V. dahliae* の栄養体親和性の解析が進んでおり (NAGAO et al., 1994; WAKATABE et al., 1997; NAGAO et al., 1997 a, b), 病原性および DNA レベルとの関連性も明らかになりつつある。今回は紙面が足りないので詳しい記述はまたの機会にゆずる。

本研究を行うに当たり, ご協力賜ったサカタのタネ君 津育種場大嶋聡子氏, 金子種苗星野健一氏, カナダ・ゲルフ大学 Jane ROBB 教授ならびに菌株および DNA を分譲して下さったカナダ農務省ロンドン・ステーション Katherine DOBINSON, 同じくプリンスエドワード島・ステーション Bud PLATT 両氏, 農研センター萩原 廣氏

(現 野菜茶試), 大阪府農林技術センター草刈真一氏, 雪印種苗佐藤倫造氏に深甚な謝意を表する。

引 用 文 献

- 1) BARASUBIYE, T. (1995): Mycol. Res. 99: 1507~1512.
- 2) CARDER, J. H. et al. (1994): Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification, CAB international, England, pp. 91~97.
- 3) ——— and D. J. BARBARA (1991) Mycol. Res. 95: 935~942.
- 4) 萩原 廣 (1990): 植物防疫 44: 299~303.
- 5) HEALE, J. P. (1988): Adv. Plant Pathol. 6: 291~312.
- 6) HORIUCHI, S. et al. (1990): Biological control of soil-borne pathogen, CAB international, England, pp. 285~298.
- 7) 飯島 勉 (1983) 東京農試研報 16: 63~128.
- 8) KOIKE, M. et al. (1995): Lett. Appl. Microbiol. 21: 75~78.
- 9) ——— et al. (1996): Plant Dis. 80: 1224~1227.
- 10) ——— et al. (1997 a): Microb. Environ. 12: 15~18.
- 11) ——— et al. (1997 b): Proc. 7th Verticillium Symp., (in press)
- 12) MORTON, A. et al. (1995): Plant Pathol. 44: 183~190.
- 13) MOUKHAMEDOV, R. S. et al. (1993): Phytopathology 84: 256~259.
- 14) NAGAO, H. et al. (1994): J. Gen. Appl. Microbiol. 40: 277~285.
- 15) 長尾英幸 (1995): 防菌防黴誌 23(8): 503~511.
- 16) NAGAO, H. et al. (1997): Mycoscience 38 (submitted).
- 17) ——— et al. (1997): ibid. (submitted).
- 18) NAZAR, R. N. et al. (1991): Physiol. Mol. Plant Pathol. 39: 1~11.
- 19) OKOLI, C. A. N. et al. (1993): Mycol. Res. 97: 233~239.
- 20) ——— et al. (1994): Plant Pathol. 43: 33~40.
- 21) ROBB, J. et al. (1993): Physiol. Mol. Plant Pathol. 43: 423~436.
- 22) ——— et al. (1994): Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification, CAB international, England, pp. 83~90.
- 23) ROWE, R. C. (1995): Phytoparasitica 23: 31~38.
- 24) SATO, R. (1994): JARQ 28: 44~51.
- 25) 角野晶大 (1995): 植物防疫 49: 500~505.
- 26) TICHY H. and R. SIMON (1994): Molecular ecology of rhizosphere microorganisms, VCH, Weinheim, pp. 103~112.
- 27) TYPAS, M. A. et al. (1992): FEMS Microbiol. Lett. 95: 157~162.
- 28) WAKATABE, D. et al. (1997): Mycoscience 38: 17~23.