

特集：パーティシリウム病の現状と課題〔4〕

パーティシリウム属菌のゲノム解析

帯広畜産大学畜産学部畜産環境科学科 小池 正徳

はじめに

分子生物学的手法の導入により *Verticillium* 病(菌)の研究においても診断・系統解析・種内の DNA 多型・病原性発現などに新知見が得られつつある。昨年アテネで開催された第7回国際 *Verticillium* シンポジウム の話題やこの分野の現在までの知見を含め病原菌側のゲノム解析(特に *V. dahliae* と *V. albo-atrum* の種内の DNA 多型)を中心に解説したい。また昨年の本誌6月号に「植物寄生性 *Verticillium* 属菌の分子分類」(小池・長尾, 1997)が掲載されている。DNA 診断技術や系統解析についてはそちらを参照されたい。

I *Verticillium dahliae* var. *longisporum* から *V. longisporum* へ

STARK (1961) がワサビダイコンから分離した分生子の長径が長い (8.2 μm) *V. dahliae* の株を *V. dahliae* var. *longisporum* と同定して以来、この変種は単純に *V. dahliae* の2倍体と考えられていた。その後形態、生理学的な性質、核のDNA含量などの研究がなされ、1994年イスラエルで開催された第6回国際シンポジウムにおいて、ロンドン・キングスカレッジの HEALE が *V. dahliae* var. *longisporum* は遺伝子の構造や微小菌核の形態が *V. dahliae* とは異なることを指摘し、単純な *V. dahliae* の2倍体ではなく別種(筆者の記憶によるとアブラナ科に病原性を示すのでその時点では *V. brassicola*)ではないかと提案した(小池・長尾, 1994)。しかし、その場ではシンポジウム参加者のコンセンサスは得られなかった。その後、イギリス王立園芸研究所の BARBARA のグループがリボゾーム RNA 遺伝子の領域を解析し、*V. dahliae* var. *longisporum* の ITS 領域は *V. dahliae* より *V. albo-atrum* に類似していること、IGS 領域の反復配列の分布様式は *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. dahliae* var. *longisporum* がそれぞれ異なることから、HEALE の提案を支持した(MORTON et al., 1995 a, b)。

そして、昨年アテネで開催された第7回国際 *Verticillium* シンポジウムにおいて、HEALE と KARAPAPA は *V. dahliae* var. *longisporum* の(1)Feulgen や DAPI 染色による未発芽分生子の核のDNA含量、(2)分生子の長径、微小菌核の形成や分生子柄の形態、(3)ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)活性、(4)RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)解析、(5)ナタネに対する病原性などを *V. albo-atrum* や *V. dahliae* と比較した。それぞれの項目の形質を0, 1でスコアリングし(例えば胞子の長径は7 μm 以上か未満か、PPO活性はあるかないかなど)、クラスター分析と主成分分析を行い解析した。その結果、*V. dahliae* var. *longisporum* は *V. albo-atrum*, *V. dahliae* とは別のグループを形成した(KARAPAPA et al., 1997)。これらのことから *V. dahliae* var. *longisporum* を *V. longisporum* comb. nov. と種に昇格させることを提案し、ほぼ参加者全員がこれに同意、以降 *V. longisporum* を使用することとなった(小池, 1998)。

しかし、BARBARA は、ゲノム構造は *V. longisporum* だが胞子の長径が短い株が存在することを指摘し、ゲノムの構成から *V. albo-atrum* と *V. dahliae* の雑種(しかし単純な雑種ではない)ということで、種名として *V. dahliae* var. *longisporum* を提案していることをつけ加えておきたい(BARBARA, 私信)。

II *V. dahliae* の DNA 多型

V. dahliae の種内のDNAレベルの変異を最初に報告したのは BARBARA のグループである(CARDER et al., 1991)。彼らはRFLP解析により、ヨーロッパ産の *V. dahliae* に大きく二つの分子型(A, B)があること、その後、さらにAをA/1, A/2にBをB/1, B/2に分割し、ミントに宿主特異性があるM型が存在することを明らかにした(OKOLI et al., 1993, 1994)。しかし、これらの分子型と病原性との関連はM型をのぞき、必ずしも明らかではなかった。

その後、RAPD法を用いた *V. dahliae* の解析が1996年後半に相次いで報告された(KOIKE et al., 1996; MESSNER et al., 1996; RAMSAY et al., 1996)。まずオーストラリア・シドニー大学LYONのグループのRAPD解

Genomic Analyses of *Verticillium* spp. By Masanori KOIKE

(キーワード:パーティシリウム属菌,ゲノム解析)

析について述べる (RAMSAY et al., 1996)。彼らはオーストラリア国内のワタの主要産地より菌株を収集し、品種に対する病原性や、地域集団間で多型が検出されるか否か調べた。その結果、オーストラリア産の菌株は二つのグループに分かれたが、そのグルーピングと地理的な変異やワタに対する病原性との間に関連性は認められなかった。その後、株を増やしてさらに解析し二つのグループの内一つに二つのサブグループが存在することを示したが、前報と同様、これらのサブグループと地理的変異やワタ品種に対する病原性との関連性はなかった (YOUYONG et al., 未発表)。次に、オーストリア農業大学・応用微生物学研究所の PRILLINGER のグループはドイツを中心に数種の宿主植物から分離した菌株 (これには *V. longisporum* も含まれている) を用いて、RAPD 解析し、バンドの有無によるクラスター分析を行った (MESSNER et al., 1996)。その結果、*V. longisporum* と *V. dahliae* が二つのグループに大きく分かれ、*V. dahliae* 内に幾つかのサブグループが形成された。そのサブグループはアマ、ジャガイモなどの分離株のサブグループとナスなどの分離株のサブグループに分かれていたが、彼らは、RAPD の多型と地理的変異や宿主との関係はなかったとしている。

また、昨年度アテネで開催された国際 *Verticillium* シンポジウムにおいて、スペインの PEREZ-ARTES ら (1997) はスペインとイスラエルのワタの分離株を、ギリシャ・ペナキ農業ステーションの PAPLOMATAS ら (1997) はギリシャの菌株の RAPD 解析を報告した。PEREZ-ARTES らによればスペインのワタの落葉型 (defoliating, D) と非落葉型 (non-defoliating, ND) がそれぞれ区別できるサブグループを形成した。イスラエルの ND 型はこれらのサブグループに属さず別のサブグループを形成し地理的な変異が RAPD の多型に認められたと報告し、オーストラリアの LYON のグループとは異なる結果であった。また PAPLOMATAS らによるとギリシャの分離株は大きく二つのサブグループに分かれたが、これら RAPD のグルーピングと地理的な変異や病原性に何も関連性は認められなかった。以上示したように、外国産株を用いたほとんどの RAPD 解析が混沌とした解釈になるのは、病原性などの調査をせず、オリジナルの宿主のみと RAPD の多型で説明しようとしているからではないかと筆者は考えている。しかし、いずれの解析 (クラスター分析など) を見ても、共通するのは大きく二つのサブグループが存在し、それに合わない株がいくつか検出されることである。これらの二つのサブグループは BARBARA がグルーピングした RFLP-A 型と RFLP-B

型 (CARDER et al., 1991) に対応しているのかもしれない。

日本産株の RAPD 解析は、菌群 (萩原, 1990; HORIUCHI et al., 1990) が明らかになっている株を含んで行われた (KOIKE et al., 1995, 1996; 小池・長尾, 1997)。その結果、A 群 (ナス系) と C 群 (ピーマン系) は DNA レベルでは分けられなかったが、トマトに病原性のある B 群 (トマト系) とは区別できた。なおかつこれら半数体の *V. dahliae* (A から C 群) は、D 群 (アブラナ科系, *V. longisporum*) とは異なった RAPD のパターンを示した。次に、BARBARA のグループが開発した RFLP 型を特異的に検出する PCR のプライマーを用いて、これらの株を解析したところ、A 群、C 群は RFLP-B 型に、B 群は RFLP-A 型に対応することが明らかになった (CARDER et al., 1994; KOIKE et al., 1997)。

さらに、栄養体親和性 (Vegetative Compatibility Groups; VCGs) との関係を見ると、A 群、C 群は、VCGJ1 と VCGJ3 それぞれに含まれ、B 群 (トマト半身萎ちょう病抵抗性品種に病原性を示すレース 2 も含む) は VCGJ2 に属することが明らかになった (WAKATABE et al., 1997; NAGAO et al., 1997)。またアメリカ産の VCGs 標準株 (JOAQUIM and ROWE, 1990) との関連も最近解析され (EBIHARA et al., 1998; 表-1, 図-1)、VCGJ1 と VCGJ3 は VCG 2 B と、VCGJ2 は VCG 2 A と親和性を示し、新たに検出された VCGJ4 (福島産の B 群など) は VCG 4 A/B と親和性を示すことがわかった。また DOBINSON ら (1998) は、カナダ・オンタリオ州産のトマトに病原性を示す菌株が VCG 2 A, VCG 4 A/B に属するという EBIHARA らの日本産株のデータと同様な結果を報告した。このようにトマトに対する病原性と VCGs のグルーピングに関連性が認められた。現在、筆者らは主要な菌群以外の日本産株 (エダマメ系や E 群, トマト・ピーマン系) の VCGs によるグルーピ

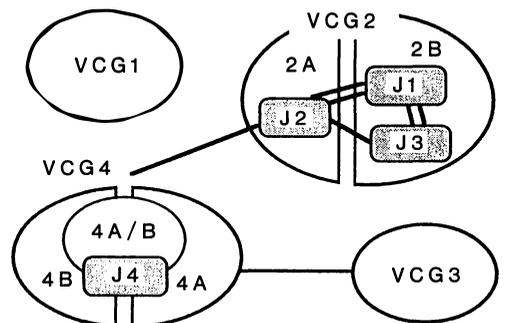


図-1 日本産とアメリカ産 *Verticillium dahliae* の栄養体親和性グループ (VCGs) の関係 (EBIHARA et al. 原図)

表-1 日本産 *Verticillium* 属菌の菌群 (系統) とヨーロッパの RFLP 型, アメリカ VCGs 標準株との関係

菌群・系統	Japanese ^{a)} RAPD type	European ^{b)} RFLP type	β -tubulin ^{c)} haplotype	VCGs ^{d)} (日本)	VCGs ^{e)} (USA)
<i>V. dahliae</i>					
A, C	I	B	a, b	J 1, J 3	2 B
B	II	A	c	J 2, J 4	2 A, 4 A/B
<i>V. longisporum</i>					
D	III	D	a'	nd	nd
<i>V. albo-atrum</i>					
アルファルファ	IV	L	e	J 01	01
ジャガイモ	V	NL	f	J 02	02

^{a)}: KOIKE et al. (1996), ^{b)}: KOIKE et al. (1997), ^{c)}: KOIKE et al. (未発表), ^{d)}: NAGAO et al. (1997), 杉本ら(1998), WAKATABE et al. (1997), ^{e)}: JOAQUIM and ROWE (1990), CORELL et al. (1988)

ング (NAGAO et al., 1998 a, b) やこれらの株とアメリカ産の VCGs を含めた DNA 多型の解析を行っている。これらの解析を行うことにより, 病原性や栄養体親和性レベルの種内のミクロな進化メカニズムをさらに明らかにしたいと考えている。

III *V. albo-atrum* の DNA 多型

V. albo-atrum も最初 BARBARA のグループにより, RFLP 解析がなされ, 彼らはヨーロッパ産の株を L 型 (Lucerne, アルファルファ分離株) と NL 型 (非アルファルファ分離株) とに分けた (CARDER et al., 1991; OKOLI et al., 1993)。その後 BARASUBIYE et al. (1995) によりカナダ産株の RAPD 分析の報告がされた。彼女らはカナダ各地およびアメリカ起源のアルファルファとジャガイモ分離株を用い RAPD 分析した。その結果, アルファルファとジャガイモ分離株は異なる RAPD のパターンを示した。そして, 筆者らは日本産の株について (KOIKE et al., 1996), HEALE のグループもヨーロッパ産の株についてほぼ同様な結果を報告している (1997)。さらに BARBARA の RFLP 型特異的プライマーを用いて解析したところ, 日本産株のアルファルファ系は RFLP-L 型に, ジャガイモ系は RFLP-NL 型に対応しており (KOIKE et al., 1997, 表-1), リボゾーム RNA 遺伝子の IGS (Intergenic spacer) 領域の RFLP でも明確なバンドパターンの違いが認められた (図-2)。

V. albo-atrum の栄養体親和性についてはアメリカ産 (CORRELL et al., 1988) ヨーロッパ産 (RATAJ-GURANOWSKA et al., 1995), 日本産 (杉本ら, 1998) について報告があり, *V. dahliae* のように複雑ではなく, アルファルファ分離株 (系) とジャガイモ分離株 (系) でそれぞれ 1 グループの明確な VCGs が存在しており, 現在までのところそれぞれの VCGs にサブグループがあるという報告

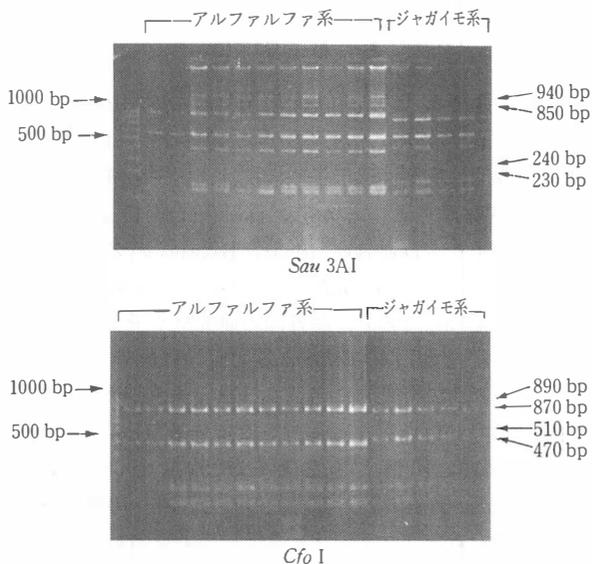


図-2 *Verticillium albo-atrum* のリボゾーム RNA 遺伝子の IGS 領域 (2.1 kbp) を *Sau*3AI と *Cfo*I で処理したときの RFLP パターン (杉本 原図)

はない。

また, カナダ・ゲルフ大学の ROBB のグループは形態学的には *V. albo-atrum* であるが, リボゾーム RNA 遺伝子の ITS 領域の DNA 塩基配列の違いに基づき, 彼女らが開発した *V. albo-atrum* を特異的に検出するプライマーによる PCR 反応では検出できない株を見いだした。これらの株の ITS 領域の DNA 塩基配列を解析したところ, *V. albo-atrum* とは異なり *V. tricolorpus* に類似しており, この系統を *V. albo-atrum* sub-group 2 [*V. a. a.* 2] と命名した。彼女らは *V. tricolorpus* のリボゾーム領域の遺伝子が (*V. albo-atrum* と *V. tricolorpus* 間の) 擬似有性生殖の結果, 遺伝的組換えを

生じ *V. albo-atrum* に取り込まれたのが *V. a. a. 2* ではないかと考えた (ROBB et al., 1993)。しかし、これらの系統は、ITS 領域だけでなく、RAPD 解析や他の DNA 領域でも *V. tricorpus* に類似していることが明らかになった (KOIKE et al., 1998; KOIKE et al., 未発表)。*V. a. a. 2* も *V. tricorpus* も日本では発生の報告がなく、実物を使っての実験はできないので推測の域を出ないが、筆者は *V. tricorpus* が厚膜胞子形成能と微小菌核形成能を2段階で失った系統が *V. a. a. 2* ではないかと考えている。それぞれの形質が一つの遺伝子で支配されていると考えるのは難しいかもしれないが、もしかしたら厚膜胞子形成能や微小菌核形成能のうち一つを失った中間型が *V. tricorpus* と *V. a. a. 2* の発生しているカナダ、ヨーロッパの大地で眠っているかもしれない。

おわりに

以上、主要な *Verticillium* 属菌 (*V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. longisporum*) のゲノム解析について述べてきた。今回は病原性遺伝子や抵抗性遺伝子の解析については記さなかった。しかし、DOBINSON が *V. dahliae* の形質転換系を (DOBINSON, 1995), BARBARA のグループがシロイヌナズナと *V. dahliae* の感染系を開発して以来 (TABRETT et al., 1995), 諸外国の研究室や千葉大学の雨宮のグループが、*V. dahliae* の病原性に関連する遺伝子、レース2に特異的に発現する遺伝子やトランスポゾン様因子の解析を着々と進行させている (DOBINSON, 私信; BARBARA, 私信; 宇佐美ら, 1997, 1998)。また *Verticillium* 属菌の数ある宿主のうち、唯一の真正抵抗性遺伝子であるトマトの *Ve* 遺伝子 (半身萎ちょう病抵抗性遺伝子) がクローニングされるのも時間の問題であろう (KAWCHAK et al., 1998)。

本稿を記すにあたって、未発表の原稿、印刷中の論文および電子メールによる新規の情報を提供していただいた BARBARA 博士 (イギリス王立園芸研究所), DOBINSON 博士 (カナダ農務省ロンドンステーション), LYON 博士 (オーストラリア・シドニー大学) に感謝する。また日本産 *V. dahliae* の VCGs と米国標準 VCGs との関係図の利用を快く承諾していただいた海老原克介氏 (千葉県暖地園芸試験場), および原稿に関して有益なコメントをいただいた長尾英幸博士 (千葉大学園芸学部) に感謝する。

引用文献

- 1) BARASUBIYE, T. et al. (1995): Mycol. Res. 99: 1507~1512.
- 2) CARDER, J. H. and D. J. Barbara (1991): Mycol. Res. 95: 935~942.
- 3) ——— et al. (1994): Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification, CAB, England, pp. 91~97.
- 4) CORRELL, et al. (1988): Phytopathology 78: 1017~1021.
- 5) DOBINSON, K. F. (1995): Can. J. Bot. 73: 710~715.
- 6) ——— et al. (1998): Mycol. Res. 102 (in press).
- 7) EBIHARA, et al. (1998): Proc. 7th International Verticillium Symposium (in press).
- 8) 萩原 廣 (1990): 植物防疫 44: 299~303.
- 9) HORIUCHI, S. et al. (1990): Biological control of soil-borne pathogen (ed. by Homby, D.) C. A. B. International, U. K. pp. 285~298.
- 10) JOAQUIM, T. R. and R. C. ROWE (1990): Phytopathology 80: 1160~1166.
- 11) KARAPAPA, et al., (1997): Mycol. Res. 101: 1281~1294.
- 12) KAWCHAK, L. M. et al. (1998): Genome 41: 91~95.
- 13) 小池正徳・長尾英幸 (1994): 植物防疫 48: 505~508.
- 14) KOIKE, M. et al. (1995): Lett. Appl. Microbiol. 21: 75~78.
- 15) ——— et al. (1996): Plant Dis. 80: 1224~1227.
- 16) ——— et al. (1997): Microb. Environ. 12: 15~18.
- 17) 小池正徳・長尾英幸 (1997): 植物防疫 51: 271~275.
- 18) ——— (1998): 植物防疫 52 (印刷中).
- 19) KOIKE, M. et al. (1998): Proc. 7th International Verticillium Symposium (in press).
- 20) ——— et al.: 未発表.
- 21) MESSNER, R. et al. (1996): J. Phytopathol. 144: 347~354.
- 22) MORTON, A. et al. (1995 a): Plant Pathol. 44: 183~190.
- 23) ——— et al. (1995 b): Mycol. Res. 99: 257~266.
- 24) NAGAO, H. et al. (1997): Mycoscience 38: 379~385.
- 25) ——— et al. (1998 a): ibid. 39 (in press).
- 26) ——— et al. (1998 b): ibid. (submitted).
- 27) OKOLI, C. A. N. et al. (1993): Mycol. Res. 97: 233~239.
- 28) ——— et al. (1994): Plant Pathol. 43: 33~40.
- 29) PAPLOMATAS, E. J. et al. (1997): 7th International Verticillium Symposium (Abstracts) p. 17.
- 30) PEREZ-ARTES, E. et al. (1997): ibid. p. 14.
- 31) RAMSAY, J. R. et al. (1996): Aust. J. Agric. Res. 47: 681~693.
- 32) RATAJ-GURANOWSKA, M. et al. (1995): Phytoparasitica 23: 46~47.
- 33) ROBB, J. et al. (1993): Physiol. Mol. Plant Pathol. 43: 423~436.
- 34) STARK, C. (1961): Gartenbauwissenschaft 26: 493~528.
- 35) 杉本みどりら (1998): 平成10年度日本植物病理学会講演要旨予稿集, p. 16.
- 36) TABRETT, A. M. et al. (1995): Phytoparasitica 23: 49.
- 37) 宇佐美俊行ら (1997): 日植病報 63: 247 (講演要旨).
- 38) ——— (1998): 平成10年度日本植物病理学会講演要旨予稿集, p. 81.
- 39) WAKATABE, D. et al. (1997): Mycoscience 38: 17~23.
- 40) YOUYONG, Z. et al.: 未発表