バーティシリウム属菌の系統解析とその利用

北海道立花・野菜技術センター　小松　勉（こまつ つとむ）

はじめに

近年，作物の *Verticillium* 属菌による病害が増加しており，特に冷涼な気候を活用した大規模園芸作物栽培地域や畑作地域での発生は，土壌消毒などの対策が可能な施設栽培での発生とは異なり，対策が困難であるため大きな問題となっている。

日本国内で報告されている植物病原 *Verticillium* 属菌は，*V. albo-atrum, V. dahliae, V. longisporum, V. nigrescens* の4種であるが中でも *V. dahliae* の被害が多く，かつ広範囲に及んでいる。*V. albo-atrum* は病原性は強いものの，より冷涼な気候地域に限定され（Issac, 1949.: Rowe et al., 1987），国内では関東および北海道で発生が確認されているものの，北海道内では最も冷涼な道東地域でのみ発生している（角野，1995）。また，*V. nigrescens* については，病原性が弱いため植物病原菌としての検討があまりなされていない。

植物病原菌においては，同一種内における系統として病原性の分化に基づいた分化型（*forma specialis*）による分類がよくなされているが，*Veticillium* 属菌は宿主範囲が広く，特定の宿主との病原性に基づく分化型の決定は難しいと考えられていた（Heale, 1998; 長尾，1995）。しかし，*V. dahliae* において，トマト系・非トマト系の判別（飯島，1983）や，菌群の分類（萩原，1990）が報告されたこと，栄養体親和性群（Vegitative Compatibility Groups: VCGs）による分類と病原性との関連が報告され（Rowe, 1995），*V. dahliae* における種内の系統分類の研究がすすめられた。また，分子生物学的系統解析の手法が導入されるようになり，病原性や菌群と分子生物学的系統との関連が報告されるようになった。

なお，*Verticillium* 属菌の分子分類については小池・長尾が本誌第51巻（1997）に，ゲノム解析については小池が52巻（1998）に報告しており，ここではこれらの報告の概略を踏まえつつ，その後の研究およびゲノム解析手法の利用について報告する。より詳細な研究の経過はこの二つの報告を参照されたい。

I　*Verticillium* 属菌の菌群・系統

萩原（1990）は，判別作物に対する病原性から *V. dahliae* を7系統に分類し，中でも病原性の分化が明瞭な系統をA～Eの菌群に分類している（表-1）。A群：ナス系は，ナスに対し強い病原性を示し，トマト・ピーマンに対し病原性が認められない。B群：トマト系は，ナス・トマトに病原性が強く，ピーマンに病原性が認められない。C群：ピーマン系は，ピーマン・ナスに病原性が強く，トマトに病原性が認められない。D群：アブラナ科系は，ハクサイ・ダイコンに病原性が強く，ナ

表-1　日本産 *Verticillium dahliae* の系統と判別植物に対する病原性（萩原，1990より抜粋）

系統名	菌群	病原性[a]				
		ナス	トマト	ピーマン	ハクサイ・ダイコン	エダマメ
ナス系	A	＋＋～＋＋＋	－	－	－～＋＋	－～＋＋
トマト系	B	＋＋～＋＋＋	＋＋＋	－	－～＋＋	－～＋＋
ピーマン系	C	＋＋～＋＋＋	－	＋＋～＋＋＋	－～＋＋	－～＋＋
アブラナ科系[b]	D	－～＋	－	－	＋＋～＋＋＋	－
病原性不明株	E	－～＋	－～＋	－～＋	－～＋	＊
トマト・ピーマン系	－	＋＋～＋＋＋	＋＋＋	＋＋～＋＋＋	－～＋＋	＊
エダマメ系	－	－～＋＋	－	－	－～＋＋	＋＋＋

[a] 胚軸部維管束の褐変程度および枯死株数に基づく発病程度，－：無，＋：弱，＋＋：中，＋＋＋：強，＊：不明，[b] *V. longisporum.*

Phylogenetic analyses of Verticilium spp. and utilization of DNA fingerprinting techniques.　By Tsutomu Komatsu

（キーワード：バーティシリウム属菌，病原性分化，遺伝子解析，病原生態）

ス・トマト・ピーマンに対する病原性はないかまたは弱い。E群：病原性弱または不明株は，病原性が明瞭でない菌群とされている。このうち，アブラナ科系は *V. dahliae* の複相型（Diploid）とされていたが，近年，形態および分子生物学的解析により別種の *V. longisporum* とされた（Karapapa et al., 1997）。

また，Sato（1994）は，*V. albo-atrum* を病原性の分化に基づきジャガイモ系とアルファルファ系に分類している。

II *Verticillium* の系統解析

V. dahliae, V. albo-atrum において，最初に DNA 多型についてなされた報告は Carder and Barbara (1991) による RFLP 解析である。この解析によりヨーロッパ産 *V. dahliae* に RFLP-A 型と RFLP-B 型の二つの分子型があること，*V. albo-atrum* には L 型（Lucerne，アルファルファ型）と NL 型（Non-Lucerne，非アルファルファ型）とに分けられること，*V. longisporum*（当時 *V. dahliae diploid*）は RFLP-D 型として *V. dahliae* haploid とは区別されることが報告された。また Carder らは RAPD 解析によるバンドパターンの違いから *V. dahliae*（*V. longisporum* を含む），*V. albo-atrum* NL group を特異的に検出するプライマーを設計してる（Carder et al., 1994）。その後，RAPD を用いた解析が多数なされているものの，病原性による分類と分子生物学的系統を比較して解析されたものは少ない（小池，1998）。日本産 *V. dahliae, V. longisporum* および *V. albo-atrum* については Koike らにより RAPD 解析が行われ，*V. dahliae* は RAPD type I および II の 2 グループに分けられこと，*V. longisporum* は RAPD type III として *V. dahliae* と区別されること，*V. albo-atrum* も RAPD type IV および V の 2 グループに分けられことが報告されている（Koike et al., 1996）。この報告の中で Koike らは，*V. dahliae* の二つのサブグループが萩原（1990）の菌群に基づき，RAPD type I はナス系・ピーマン系に，RAPD type II がトマト系に相当すること，また *V. albo-atrum* では RAPD type IV が Sato（1994）の分類によるアルファルファ系に，RAPD type V はジャガイモ系に相当することを報告している。さらに，Koike らはこの RAPD type とヨーロッパの RFLP type との相関を調査し，RAPD type I は RFLP type B に，RAPD type II は RFLP type A に，RAPD type IV は L 型，RAPD type V は NL 型に相当することを報告している（Koike et al., 1997）。これらの関係については表-2 にまとめて示した。また，*Verticillium* 属菌では VCGs による分類がよく検討されており，その分類と病原性による系統および DNA 多型との関係も併せて表-2 に示した。なお，VCGs による分類の詳細についてはここでは割愛するので，小池（1998）を参照されたい。

III *V. dahliae* の新系統

角野（1995）は，北海道において 1990 年代前半にはジャガイモ半身萎凋病が全道的に発生していることを報告している。発生圃場の菌種別内訳は，*V. dahliae* が 80%，*V. albo-atrum* が 6%，*V. nigrescens* が 10%，*V. dahliae* と *V. nigrescens* が混発していた圃場が 4% と，*V. dahliae* の割合が圧倒的であった。また，このジャガイモ半身萎凋病株から分離された *V. dahliae* は，1 圃場から分離された株を除き，すべてナス，ダイコン，ハクサイ，メロンに病原性を示したものの，トマト，ピーマンには病原性を示さなかった。これらのことから角野は北海道におけるジャガイモ半身萎凋病は *V. dahliae* が主要因であり，その系統・菌群はナス系であることを報告している（角野，1995）。

Komatsu ら（2001）は，この北海道においてジャガイモから分離された *V. dahliae*（以下，ジャガイモグループ）について，RAPD 解析と REP（repetitive

表－2　日本産 *Verticillium* 属菌の系統と分子分類および VCGs との関係（小池，1998 より抜粋）

	系　統	RAPD type[a]	RFLP type[b]	VCGs[c]（日本）	VCGs[d]（USA）
V. dahliae	ナス系・ピーマン系	I	B	J 1, J 3	2 B
	トマト系	II	A	J 2, J 4	2 A, 4 A/B
V. longisporum		III	D	—	—
V. albo-atrum	アルファルファ系	IV	L	J 01	01
	ジャガイモ系	V	NL	J 02	02

[a] Koike et al. (1996), [b] Koike et al. (1997), [c] Nagao et al. (1997), 杉本ら (1998), Wakatabe et al. (1997), [d] Joaquim and Rowe (1990), Correll et al. (1988).

extragenic palindromic) PCR法による遺伝子解析を行ったところ，これまで報告されていたRAPD typeとは異なるサブグループを形成することを報告した。ジャガイモグループは，病原性から想定されるRAPD typeはIであるが（表-2），そのクラスターはRAPD type Iと全く異なっていたため，*V. dahliae* のDNA多型としてDNA group Iを従来のナス系とピーマン系，DNA group IIをトマト系，DNA group IIIをジャガイモグループとする三つのサブグループに分けている（図-1）。

北海道において，ジャガイモは畑作の基幹作物であり，その栽培面積は大きい。また，ジャガイモ半身萎凋病は，発生しても大幅な収量の減少をもたらす場合が少ないこと，生食用主要品種である「男爵薯」や「メークイン」は早生品種であるため，ジャガイモ半身萎凋病による黄化・萎凋症状が本来の黄化期・枯凋期が早まった程度の認識しかされないこと，などから発生そのものが見過ごされやすい。加えて，ジャガイモは栄養体繁殖を行うため，発病を見過ごされたイモが栽培される危険性も高い。恐らく，北海道内における *V. dahliae* ジャガイモグループは，これらの要因により，ある1系統がジャガイモを介してまん延したものと考えられる。近年，北海道において畑作地域に収益性の高い園芸作物の導入が盛んに行われており，同時に *Verticillium* による病害の発生が問題となっている。過去にジャガイモが作付けされていたか，あるいは周辺がジャガイモ過作地域であるような圃場では，園芸作物（ダイコン，メロンなど）で発生した *Verticillium* 病害を検定した場合，分離されるのは *V. dahliae* であり，そのDNA多型はほぼDNA type III（ジャガイモグループ）である。一方，北海道において稲作栽培地域に導入された施設園芸等で発生する *Verticillium* 病害を検定すると，それらはDNA type I（ナス系・ピーマン系）やII（トマト系）である場合が多い。

RAPDおよびREP-PCRによる遺伝子解析により，*V. dahliae* が三つのサブグループに分けられることが明らかになったが，ここで二つの問題が残されている。

一つはナス系とピーマン系との判別方法である。これまで紹介してきた解析法ではこの2系統の区別はできていない。著者らはREP-PCRおよびERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)-PCRによる解析で当初ナス系とピーマン系が判別できると考えていた（図-1）が，調査菌株を増やしていった過程で，これらの手法を用いてもピーマン系と区別できないナス系株が見つかったことから最終的には両者の区別はできな

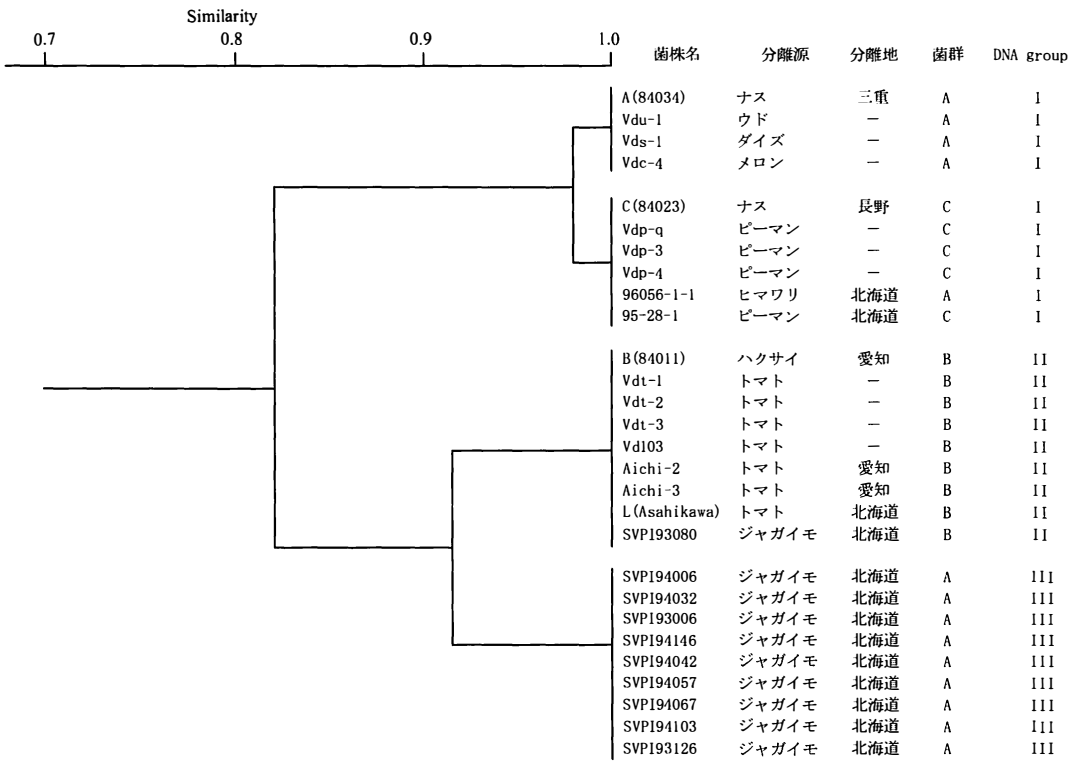

図-1　RAPDおよびREP-PCR法による *Verticillium dahliae* クラスター分析（小松ら，1999を改変）

かった。

もう一つの問題は，ジャガイモグループの病原性の分化についてである。植物病原菌の系統としてもっとも重要な形質は病原性であると考えられる。ジャガイモ系は病原性による分類ではナス系になるが，DNA多型によるクラスターを考慮すると，ナス系とジャガイモグループに病原性の分化はないのか？　という疑問が残る。角野（1998）はナス系，ピーマン系，トマト系株のジャガイモに対する病原性を検討しているが，どの系統もジャガイモに対して強い病原性を示し，ジャガイモグループと病原性における違いは認められなかったことを報告している。しかし，他のナス科植物も含めたさらなる検討がなされることによりジャガイモグループとナス系の病原性の分化が明らかになるのではないかと考えている。

Ⅳ　遺伝子解析の利用

本来，多種類の植物苗を準備し，菌株を培養し，接種検定を行って系統を解析するところを分子生物学的手法で行うことにより，検定の迅速化や労力・使用空間の軽減による検体数の増加などの利点が考えられる。病原性に関連する系統が迅速・省力的に検定できるようになった場合，発病圃場における次期作付けの指針を判断する材料としても役立つ。例えば，発生した病害の主因が*V. dahliae*ナス系によるという判定が出た場合，次回はトマト，ピーマンを栽培すれば被害が回避されると考えられる。しかし，実際の栽培においては，病害回避の目的みで作目を変更することは難しいと思われる。また，冒頭で述べたように，北海道のような畑輪作に野菜栽培が導入されているような地域では，栽培されている作目（主要畑作物：ジャガイモ，コムギ，テンサイ，豆類）は，イネ科のコムギを除いてすべて*Verticillium*に対して感受性であり（角野，1998），系統の判定が作付け指針の判断材料とはならない。したがって，*Verticillium*における系統の判定は，実際の農業場面において有益な情報とはなりにくいのが現状であると考えられる。

しかし，植物病理における知見，特に病原菌生態に関する研究において，遺伝子解析による系統の判定が有効であると考えられる。ある特定の系統が占有する圃場に判別可能な別系統を導入し，その後の導入系統の広がり等を追跡調査することで，病原菌の動態を解明することが可能となる。従来はこのような研究を行うにあたって薬剤抵抗性の付与など人工的なマーカーが必要であったが，遺伝子解析を用いた判定により，変異に関わる危険のある操作を行わなくとも判別が可能となる。北海道においては，病原性において同じナス系と判断されるグループに遺伝的サブグループの異なるDNA group Ⅰ（ナス系）とⅢ（ジャガイモグループ）が混在していることから，病原性の面でも菌株間の生態的適応性を同じ条件で検定することが可能である。具体的には，土壌中にジャガイモグループが占有している圃場にナス系を人工的に接種した作物を移植，栽培し*Verticillium*病を発病させる。その後，鋤込まれた残渣からどの程度接種したナス系が広がっていくのかを経時的に検定することによって，罹病残渣が*V. dahliae*土壌菌密度の上昇にどのように関与するのかを解析することが可能になると考えている。また，作物の種類を変えることにより，どの作物が土壌中の菌密度の上昇にどの程度関与しているのかも解明できるだろう。これにより，作目の作付け順序など被害軽減を目指した輪作体系の組立て方針も模索できるのでないかと考えられる。

また，遺伝子解析やVCGsによるグルーピングにより，それぞれの系統の伝搬経路や起源等についても考察が進められている。渋谷ら（2000）は，*V. dahliae*rDNA IGS領域のPCR-RFLPによる多型とVCGsにより，VCG J 4に分類される北海道産株の由来は，本州産VCG 2Aから派生したものと，まったく別の経路で移入したものとが混在しているという報告をしている。Dobinsonら（1998）は，カナダ・オンタリオ州産の*V. dahliae*について，非トマト系，トマト系レース1，トマト系レース2についてRFLPsおよびRAPDによる解析とVCGsによるグルーピングの結果，同一レース内においても多様性が認められ，トマト系レース2の起源が単一のものではないことを示唆している。トマトは，唯一*Verticillium*に対する真性抵抗性遺伝子*Ve*遺伝子を持つ作物であるが，この*Ve*遺伝子を持つトマトを犯すレース2の発生が日本でも問題となっている。筆者は，北海道で*Ve*遺伝子保有トマト品種から分離された*V. dahliae*について，レース検定を行うとともにRAPDなどの解析を試みているが，やはり同一レース内での多様性が見つかっており（未発表），北海道で発生しているトマト系レース2についても複数の起源があるものと考えている。

おわりに

以上，*V. dahliae*を中心に*Verticillium*属菌の系統解析とその利用について述べてきた。分子生物学的系統解析の技術は，やはり環境・生態学的研究においてもっとも活用される手法であると思われる。近年，病原微生物の起源・伝搬についてはもちろん，実際の圃場におけ

る動態についても多くの知見が得られるようになってきており，今後さらなる成果が期待される。

Verticillium に関しては，病原性に関する研究がさらになされていく必要があるだろう。ナス・トマト・ピーマン以外の病原性分化判定作物を検討するとともに，多犯性や系統の分化に関わる機構も含め，*Verticillium* 属菌の病原性をつかさどる遺伝子群が解明されることが重要な鍵になると考えられる。

引　用　文　献

1) Carder, J. H. and D. J. Barbara, (1991) : Mycol. Res. **99** : 1507～1512.
2) Carder, J. H. et al. (1994) : Modern assays for plant pathogenic fungi : identification, detection and quantifyication, CAB, England, pp. 91～97.
3) Correll, J. C. et al. (1998) : Phytopathology **78** : 1017～1021.
4) Dobinson, K. F. et al. (1998) : Mycol. Res. **102** : 1089～1095.
5) 萩原　廣 (1990) : 植物防疫　**44** : 299～303.
6) Heare, J. P. (1998) : Adv. Plant Pathol. **6** : 291～312.
7) 飯島　勉 (1983) : 東京農試研報　**16** : 63～128.
8) Issac, I. (1949) : Trans. Br. mycol. Soc. **32** : 137～157.
9) Joaquim, T. R. and Rowe, R. C. (1990) : Phytopathology **80** : 1160～1166.
10) Karapapa, V. K. et al. (1997) : Mycol. Res. **101** : 1281～1294.
11) Koike, M. et al. (1996) : Plant Dis. **80** : 1224～1227.
12) ――― et al. (1997) : Microb. Environ. **12** : 15～18.
13) 小池正徳・長尾英幸 (1997) : 植物防疫　**51** : 271～275.
14) ――― (1998) : 同上　**52** : 351～354.
15) 小松　勉ら (1999) : 日植病報　**65** : 399 (講要).
16) Komatsu, T. et al. (2001) : J. Gen. Plant Pathol. **67** : 23～27.
17) 長尾英幸 (1995) : 防菌防黴誌　**23**(8) : 503～511.
18) Nagao, H. et al. (1997) : Mycoscience　**38** : 379～385.
19) Rowe, R. C. (1995) : Phytoparasitica　**23** : 31～38.
20) ――― et al. (1987) : Plant Dis. **71** : 482～489.
21) Sato, R. (1994) : JARQ　**28** : 44～51.
22) 渋谷亜理佐ら (2000) : 日植病報　**66** : 309 (講要).
23) 杉本みどりら (1998) : 日植病報　**64** : 335 (講要).
24) 角野晶大 (1995) : 植物防疫　**49** : 500～505.
25) ――― (1998) : ジャガイモ半身萎凋病の発生状況と土壌中の微小菌核密度に基づく当面の作付け指針，北海道農業試験会議，北海道，70 pp.
26) Wakatabe, D. et al. (1997) : Mycoscience　**38** : 17～23.

新刊

農薬概説　第四版 2001 年版

植物防疫全国協議会　編　B 5 判　本文 254 頁

定価 1,890 円税込み（本体 1,800 円）　送料 340 円

農薬に関する法律，農薬の一般的知識，農薬の安全性評価の仕組み，病害虫雑草防除の概論・農薬散布法・防除機，農薬の安全な使用法，販売業者・防除業者の責務など，農薬に関する正しい知識を解説したテキストです。研修会や農薬業界での新人教育に最適です。

お申し込みは直接当協会へ，前金（現金書留・郵便振替）で申し込むか，お近くの書店でお取り寄せ下さい。
社団法人　日本植物防疫協会　出版情報グループ　〒 170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11
郵便振替口座 00110-7-177867　TEL (03) 3944-1561(代)　FAX (03) 3944-2103　メール：order@jppa.or.jp

発行図書

日本植物病名目録(初版)

日本植物病理学会　編　B 5 判　本文 734 頁＋索引他 124 頁

定価 11,550 円税込み（本体 11,000 円）　送料サービス

1960 年から発行された日本有用植物病名目録：第 1 巻(食用作物・特用作物・牧草・芝草)，第 2 巻(野菜および草花)，第 3 巻(果樹)，第 4 巻(針葉樹，竹笹)，第 5 巻の広葉樹(林木・観賞樹木)までの全 5 巻に新規に「きのこ」を追加して一冊に纏めた見やすい大植物病名目録です。掲載内容は，食用作物，特用作物，牧草及び芝草，野草，野菜，きのこ，草花，果樹，針葉樹，竹笹，広葉樹，索引(宿主和名，宿主学名，病原学名，病原和名，ウイルス・ウイロイドの種名・略号・和名・科名および属名一覧表。

お申し込みは直接当協会へ，前金（現金書留・郵便為替）で申し込むか，お近くの書店でお取り寄せ下さい。
社団法人　日本植物防疫協会　出版情報グループ　〒 170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11
郵郵便振替口座 00110-7-177867　TEL (03) 3944-1561(代) FAX (03) 3944-2103　メール：order@jppa.or.jp