

トマト葉かび病菌の寄生性分化機構

(独)農研機構 野菜茶業研究所 ^{いいだ}飯田 ^{ゆういちろう}祐一郎・^{くぼた}窪田 ^{まさはる}昌春
大分県農林水産研究指導センター ^{あめ}雨 ^{かわ}川 ^{きみ}公 ^{ひろ}洋

は じ め に

トマト葉かび病菌 *Passalora fulva* (Cooke) Braun [Syn: *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri, *Cladosporium fulvum* (Cooke)] は葉に斑点性の病徴を示す糸状菌で、施設栽培などの高湿度となる環境で発生が多く見られる(口絵①)。初期には、下位葉に白～黄色で円形または不定形の病斑が認められ、その葉裏に生じた灰～茶または黄褐色の菌叢に、二次伝染源となる分生胞子が形成される(口絵②)。病勢が激しいと枯れ上がり、生育不良や着果不良を引き起こす。分生胞子は植物残渣上だけでなく、施設内のビニール、支柱、鉄骨等の表面に付着し、感染源となる。本菌はトマトにしか病原性を示さず、トマト以外のナス科植物にも感染しない(THOMMA et al., 2005)。抵抗性品種に依存した防除体系や、特異性の高い微生物農薬の普及によって、これまでは抑制されていた本病害が近年、顕在化している。本菌には、宿主植物がもつ真性抵抗性遺伝子に対応した寄生性系統(レース)が数多く存在し、空気伝染性であることから新レースが発生すると、抵抗性品種にも被害が急速に拡大する。栽培現場ではこれまで市販の抵抗性品種が効力を発揮してきたが、多様な新レースの出現により抵抗性品種が無効化しつつある。また本菌は、寄生性分化が進んだ糸状菌として世界的にも最も研究されている病原糸状菌の一つである(THOMMA et al., 2005)。

我が国でも葉かび病研究の歴史は古く、村田(1915)によって海外での発生事例が初めて紹介されて以来、研究報告としては堀(1932)の発生分布、病徴および防除法を検討した記述が最初であり、次いで坂野(1934)の潜伏期間やトマトの成育ステージごとの感受性差異に関する報告がある。寄生性分化に関する研究は、岸(1962)によって全国的な調査が行われて以降、逐次行われてきたが、特に1990年代後半からレースの多様化が進んでいる(窪田, 2009)。本稿では、トマト葉かび病菌の寄生性が分化するメカニズムと国内分離菌株の遺伝的背景を概説し、これらの情報を用いて市販品種に対する親和

性を推定する試みについて紹介する。

I 抵抗性品種と国内発生レース

トマト葉かび病抵抗性品種の育種は、1930年代にカナダで始まり、その後、米国や欧州を中心に進み、トマトの野生種などから24個の真性抵抗性遺伝子(*Cf* 遺伝子)が染色体上にマッピングされた(KANWAR et al., 1980 a; 1980 b)。一方、トマトが持つ抵抗性遺伝子に対応して、葉かび病菌は遺伝子対遺伝子説に基づくレースに分化してきた。レースの決定は、抵抗性反応が明瞭な6遺伝子に対する病原性検定によって判別することが多い(表-1)。国内では1960年代に*Cf-2*が国内品種に初めて導入され、1996年に*Cf-4*が、2003年には*Cf-9*が導入された品種が市販された。葉かび病菌のレース表記は、抵抗性遺伝子*Cf-2*を持つ品種に感染できるレースをレース2、*Cf-2*と*Cf-4*を持つ品種に感染できるレースをレース2.4と表す(表-1)。*Cf-4E*は*Cf-4*とは異なる抵抗性遺伝子であるが、近傍に連鎖していることが後に明らかとなったため、レース表記には含まれていない。

2008年に全国で発生しているトマト葉かび病菌184菌株を分離・収集し、接種検定によってレース分布を解析した。その結果、*Cf-4*抵抗性品種に感染できるレース2.4, 2.4.11, 4, 4.11は調査したほぼすべての道府県において分離され、収集した菌株の約6割を占めた(図-1)。一方、*Cf-9*に親和性のレース4.9, 4.9.11, 2.9, 9は関東と九州、東北等の一部で発生していることが明らかになった。*Cf-9*の親和性レースは2007年に関東で発見されて以来、分離地域が国内で飛び地して広がりつつあり、今後さらにまん延する可能性が高い(図-2)。また*Cf-2*抵抗性に親和性のレース2, 2.4, 2.4.11は、過去の調査では最も多く日本各地から分離されていたが、今回の調査では分離頻度は全体の1割程度であった。近年、国内では*Cf-4*と*Cf-9*導入品種の利用に移行しており、*Cf-2*抵抗性品種の栽培面積の減少とともに、その親和性レースの優占率も徐々に減少しつつあることが示唆された。これまでに国内では10種類のレースの発生が確認されており、そのうち4.9, 4.9.11, 2.9および9は海外での報告がない日本特有のレースである

Mechanisms of Race Differentiation of Tomato Leaf Mold. By
Yuichiro IDA, Masaharu KUBOTA and Kimihiro AMEKAWA
(キーワード: トマト葉かび病, レース, AVR 遺伝子)

表-1 トマト葉かび病抵抗性遺伝子と国内発生レース

検定品種	抵抗性 遺伝子	抵抗性 ^{a)}									
		0	2	2.4	2.4.11	4	4.11	4.9	4.9.11	2.9	9
Potentate	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vetomold	<i>Cf-2</i>	—	+	+	+	—	—	—	—	+	—
Purdue 135	<i>Cf-4, Cf-4E</i>	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
MoneyMaker-Cf-5	<i>Cf-5</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ontario 7818	<i>Cf-6</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MoneyMaker-Cf-9	<i>Cf-9</i>	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Ontario 7716	<i>Cf-4, Cf-4E, Cf-11</i>	—	—	—	+	—	+	—	+	—	—

a) + : 感受性 (親和性), — : 抵抗性 (非親和性).

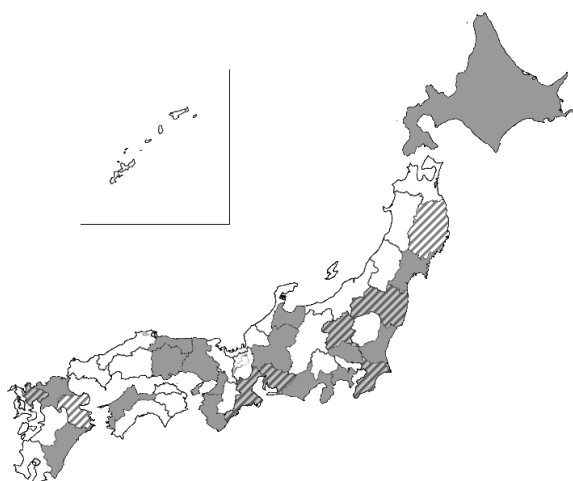


図-1 トマト葉かび病菌の国内レース分布
これまでに同定された *Cf-4* (灰色) および *Cf-9*
(斜線) に親和性を示すレースの分離地域を示す。

(表-1) (ENYA et al., 2009 ; IIDA et al., 2010 ; IIDA et al., 投稿中)。以上の結果, 現在市販されている主な国内品種は, 地域によっては無力化していることが明らかとなった。

トマト葉かび病に限らず, 多くの病害抵抗性品種には単一で優性の真性抵抗性遺伝子が導入され, これら特定の品種を用いての単純化した栽培体系が, 病原菌の変異によって生まれる新たなレースの発生と優占化を招き, 抵抗性品種に被害をもたらすことが多い。本菌の場合, *Cf-4* および *Cf-9* を持つ抵抗性品種が市販されてから数年で, 抵抗性が打破されている (山田・我孫子 2002, ENYA et al. 2009)。表-1 に示したように, *Cf-5* および *Cf-6* に感染するレースは今のところ見いだされておらず, 国内の栽培品種への導入が期待されるが, *Cf-6* は栽培形質や食味形質に及ぼす隣接遺伝子群の影響が小さくなく, また *Cf-5* に関しては欧州で既に親和性レースの発生が報告されており, 国内で *Cf-5* 品種が普及したと

しても, その有効期間は短いことが予想される (LINDHOUT et al., 1989)。

II 寄生性の分化機構と遺伝的背景

トマト葉かび病菌の寄生性 (レース) を決定するのは *AVR* 遺伝子である。病原菌から分泌される *AVR* 遺伝子産物を, 宿主植物は対応する *Cf* 遺伝子産物によって認識することで病原菌の侵入を感知し, 一連の抵抗性反応を誘導する。一方, トマト葉かび病菌は *AVR* 遺伝子を変異または欠失することでレースを分化させ, 宿主の *Cf* 遺伝子産物による認識機構を回避することで感染を成立させる。本菌からは現在までに四つの *AVR* 遺伝子 (*AVR2*, *AVR4*, *AVR4E*, *AVR9*) が単離されており, 宿主のトマトでは四つの *Cf* 遺伝子 (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4E*, *Cf-9*) がそれぞれに対応して抵抗性を誘導する。抵抗性遺伝子を持ついずれの品種にも感染できないレース 0 は, すべての *AVR* 遺伝子が正常に機能しており, トマト葉かび病菌の本来の系統と言えるが, レース 0 の *AVR2* が変異して機能を失うと, *Cf-2* を持つ抵抗性品種にとっては葉かび病を認識するターゲット分子が失われるため抵抗性を発揮できず, 宿主体内への侵入を許すことになり, 結果として本菌株がレース 2 となる (表-1)。さらにレース 2 において *AVR9* の機能が失われると, *Cf-2* と *Cf-9* の双方に対して親和性をもつレース 2.9 となる。*AVR* 遺伝子の変異はゲノム中において中立的に起こるが, *Cf* 抵抗性品種の画一的な栽培による選択圧が局地的な新レースの増殖を招き, 定着するものと考えられる。

国内で分離された菌株の中には, 海外での報告がない日本特有のレースが見いだされた。これらの菌株は, 日本においてレース分化した可能性が考えられる。そこでトマト葉かび病菌の遺伝的背景を明らかにする目的で, 国内で分離された菌株について四つの *AVR* 遺伝子の塩

基配列を決定し、既に解析済みの海外分離菌株の配列情報と比較した (Iida et al., 投稿中)。その結果、日本分離菌株のそれぞれの *AVR* 遺伝子には塩基配列の欠失や塩基置換、あるいは遺伝子全体の欠失など多数の変異が蓄積していることが明らかになり、これまでに海外分離菌株には認められなかった新たな変異部位も見いだされた。以上の結果から、多様なレースは海外から持ち込まれたものではなく、国内で独自の寄生性分化を遂げ、日本特有のレースが生じたものと考えられた。また同じレースでも菌株によって変異様式が異なることが明らかになり、新レースは各地域においてそれぞれに発生したと推察された。このように日本分離菌株において新たな変異部位が多数見いだされたにもかかわらず、その変異パターンは海外分離菌株と同様に① *AVR2* のフレームシフト変異、② *AVR2* へのレトロトランスポゾンの挿入、③ *AVR4* と *AVR4E* の点突然変異、④ *AVR4E* と *AVR9* の遺伝子の欠失、の四つであることが明らかになった。なぜたった4パターンに集約されるのか定かではないが、現在のところ *AVR* 遺伝子の本来の機能による可能性とゲノム上の位置に関係するものと推測している。本病害では種子汚染を想定して輸入種子の消毒が奨励されていたが、少なくともこれまで解析したすべてのレースは海外からもちこまれたとは考えにくく、消毒の効果は薄いことが明らかになった。

III 塩基配列情報による親和性の推定

トマト葉かび病菌が発生すると、まずはレースを判別することが以後の対応を決める最初のステップとなる。レース判別法としては接種検定による生物検定が最も精度がよいが、判別用品種が手に入りやすく、播種から検定結果が出るまで約2か月と時間も要する。上述したように、レースを決定する四つの *AVR* 遺伝子の塩基配列の比較によって、日本で分離された菌株における変異パターンが明らかになった。これらの変異を検出することができれば、国内で市販されている葉かび病抵抗性品種への親和性の推定が可能であり、迅速なレース判別法の開発につながる。その場合、上述の②レトロトランスポゾンの挿入と④遺伝子の欠失はPCR増幅で判別できるものの、多数の①フレームシフト変異や③点突然変異を検出するには塩基配列を決定する必要がある。そこで大分県で2010年に分離したトマト葉かび病菌株を用いて、接種検定によるレース判別を行うとともに、塩基配列情報による *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4E*, *Cf-9* に対する親和性の推定を試みた (雨川ら, 未発表)。以下に実験の流れを簡単に示す。

(1) PDA培地で培養した菌株からゲノムDNAを抽出し、表-2に示したプライマーセットを用いてPCR増幅を行う (伸長時間2分, 35サイクル)。

(2) *AVR4E* および *AVR9* が増幅されない場合は、遺伝子全体の欠失が起こっていると予想される (図-2)。

(3) *AVR2* が増幅されない場合はトランスポゾンの挿入が疑われるため、5.5 kbの断片が検出されるかどうかをPCRの条件を変更して再度確認する (伸長時間5分, 35サイクル) (図-2)。

(4) 予想サイズで増幅されたPCR断片は同じプライマーを用いて塩基配列を決定し、標準菌株の塩基配列と比較して、変異部位を確認する。

(5) 過去の変異事例 (STERGIOPOULOS et al. 2007; Iida et al. 投稿中) から、*Cf* 遺伝子に対する親和性を推定する。

その結果、レース未知の菌株において *AVR9* がPCR増幅されなかったことから、遺伝子の欠失が予想された

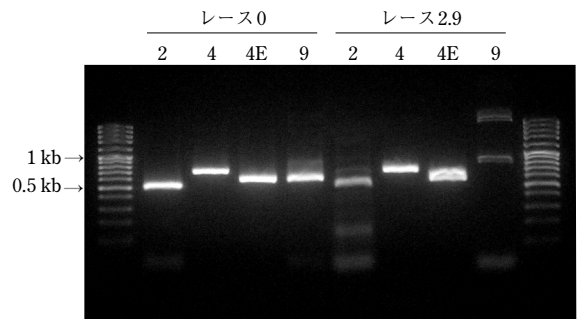


図-2 大分県分離菌株からの *AVR* 遺伝子断片のPCR増幅
標準菌株であるレース0はすべての *AVR* 遺伝子が増幅されるが、大分県から分離された菌株では予想される位置に *AVR9* の断片がなく、遺伝子の欠失が推測された。増幅断片の塩基配列を決定したところ、*AVR2* はフレームシフト変異が、*AVR4* には点突然変異がそれぞれ検出された。この結果、レース2.9と推定され、判別品種に対する接種検定の結果と一致した。2: *AVR2*, 4: *AVR4*, 4E: *AVR4E*, 9: *AVR9*。

表-2 PCR増幅と塩基配列決定に用いた *AVR* 遺伝子のプライマー

配列 (5'-3')	
<i>AVR2</i> -F	GCGGACAAATCATCAGCATA
<i>AVR2</i> -R	AGGCAGATCTGGGTACAAGC
<i>AVR4</i> -F	ACGCAGGTCCAAAATAGCTC
<i>AVR4</i> -R	TCGCAGTTATTTACCTTGCT
<i>AVR4E</i> -F	CCGCAGCGAAGTAAATTTTG
<i>AVR4E</i> -R	GTCACTCCAGTCCGGAACC
<i>AVR9</i> -F	AGTAGATCCGGCCGAGAGAG
<i>AVR9</i> -R	AAAGCCTTCAATATGAACGAAT

(図-2)。増幅された *AVR2*, *AVR4* と *AVR4E* の塩基配列を決定したところ, *AVR4* はタンパク質機能が失われる変異が認められなかったが, *AVR2* では塩基欠失によるフレームシフト変異, *AVR4E* ではアミノ酸変異を伴う点突然変異が存在することが明らかとなった。そのため大分県から分離された菌株は, Purdue 135 (表-1) のように *Cf-4* と *Cf-4E* の二つの抵抗性遺伝子を持つ品種では, 正常な *AVR4* 遺伝子産物により *Cf-4* の抵抗性が誘導され, *Cf-2* と *Cf-9* 品種には親和性を示すことが推定された。これまでに同定された国内レースの中では 2.9 が該当するが, 判別品種を用いた接種検定においてもレース 2.9 と判定され, *AVR* 遺伝子の塩基配列の決定による親和性の推定が有効な手法の一つであることが示された。今回の実験では培養菌体からゲノム DNA の抽出を行ったが, 罹病葉からのゲノム DNA の抽出, あるいは罹病葉から直接 PCR によって *AVR* 遺伝子を増幅することも可能であり, 今後さらに本法に改良を加える必要がある。

お わ り に

これまでに全国の葉かび病菌のレース分布を調査し, さらに分離した菌株の遺伝的背景の解析を行ってきた。おそらく, 抵抗性品種の導入とともに, 本菌はその寄生性を多様化させ, 国内における新レースの急速なまん延へと至ったと考えられる。本稿で紹介した各 *Cf* 抵抗性への親和性推定の試みは, まだまだ多くの欠点がある。すべての *Cf* 抵抗性に対応するすべての *AVR* 遺伝子が単離されていないため, 現状ではあくまでも *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4E*, *Cf-9* に対する親和性の推定法である。塩基配列に変異があるものの過去に同様の変異事例がない場合は, 遺伝子コードからタンパク質機能が失われる変異であるかどうかを推定し, 場合によっては確認のための接種検定を行う必要がある。現在オランダの研究グ

ループを中心として, 残りの *AVR* 遺伝子の探索が行われており, すべてのセットが揃った場合にはより簡便な検定法への改良が期待できる。同グループは *Cf* 以外の抵抗性遺伝子についても同定・解析を進めており, 日本分離菌株ではこれらの抵抗性遺伝子に対して非親和性を示す解析結果も得られている (Iida et al., 投稿中)。しかしながら, 新たな抵抗性品種が市販された場合にも, それらに対応するトマト葉かび病菌の *AVR* 遺伝子は容易に変異するため, 抵抗性品種のみに依存しない IPM 技術の導入が求められる。

トマト葉かび病菌は空中浮遊性の常在菌であり, 同属菌にはアレルゲンとしての報告もある。そのため本病害の発生した施設内での作業は, 健康上の問題も生じる。施設内の湿度を管理することで本病の発生はかなり低減できるが, 高湿度を伴う秋～春の施設栽培や昼夜の温度差のある中山間地域においては, 湿度調整には限界がある。病害防除のみならず, 作業現場における孢子密度を下げる意味でも, またレースの多様化を防ぐためにも, 今後も, 抵抗性品種だけでなく, 現状では最も防除効率の高い化学農薬を使用することは避けられないと考えられる。

引用文献

- 1) ENYA J. et al. (2009): J. Gen. Plant Pathol. 75: 76 ~ 79.
- 2) 堀 正太郎 (1932): 實際園藝 13: 15 ~ 22.
- 3) IIDA Y. et al. (2010): J. Gen. Plant Pathol. 76: 84 ~ 86.
- 4) KANWAR J. S. et al. (1980 a): Rep. Tomato Gen. Coop. 30: 20 ~ 21.
- 5) ——— et al. (1980 b): ibid. 30: 22 ~ 23.
- 6) 岸 國平 (1962): 日植病報 27: 189 ~ 196.
- 7) 窪田昌春 (2009): 植物防疫 63: 357 ~ 360.
- 8) LINDHOUT P. et al. (1989): 實際園藝 95: 143 ~ 148.
- 9) 村田壽太郎 (1915): 病蟲害雑誌 2: 618.
- 10) 坂野秀次郎 (1934): 同上 21: 338 ~ 346.
- 11) STERGIPOULOS I. et al. (2007): MPMI 20: 1271 ~ 1283.
- 12) THOMMA B. P. et al. (2005): Mol Plant Pathol. 6: 379 ~ 393.
- 13) 山田憲吾・我孫子和雄 (2002): 日植病報 68: 36 ~ 38.

発生予察情報・特殊報 (23.10.1 ~ 10.31)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち, 特殊報のみ紹介。発生作物: 発生病害虫 (発表都道府県) 発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたは JPP-NET (<http://www.jpnp.ne.jp/>) でご確認下さい。

- ナシ: フタモンマダラメイガ (静岡県: 初) 10/5
- トマト: 黄化病 (熊本県: 初) 10/6
- 日本ナシ: 萎縮病 (千葉県) 10/14
- サツマイモ, ゴボウ: アワダチソウグンバイ (千葉県: 初) 10/14
- クロスグリ: スグリコスカシバ (長野県: 初) 10/14

- キャベツ, ブロッコリー: トビイロシワアリ (滋賀県: 初) 10/14
- 水稲, ダイズ, 野菜, 果樹: ミナミアオカメムシ (滋賀県: 初) 10/26
- ナシ: チャノキイロアザミウマ (埼玉県: 初) 10/26
- スイカ: 炭腐病 (秋田県: 初) 10/27