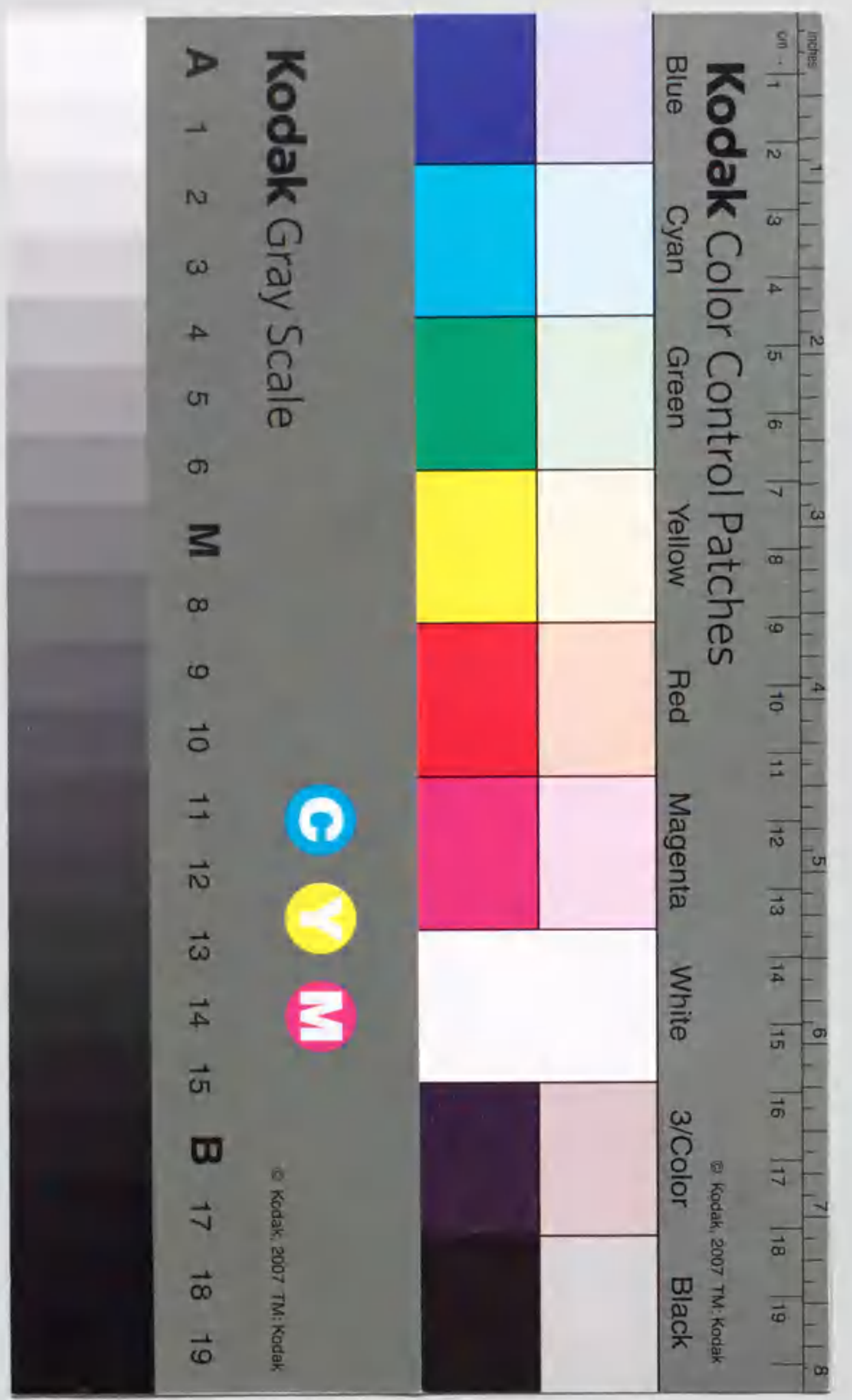


宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 属植物病原菌の
遺伝的類縁関係の解析

草場基章



報告番号 甲第 3361 号

①

宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 属植物病原菌群の
遺伝的類縁関係の解析

草場基章

1996

目 次

	頁
第1章 緒論	1
第2章 リボソームRNA遺伝子のRFLP分析による <i>Alternaria</i> 属病原菌の 遺伝的類縁関係の解析	17
材料および方法	19
1. 供試菌株	19
2. 供試菌からの全DNAの抽出	19
3. RFLPプローブ	25
4. ハイブリダイゼーション	26
5. RFLPデータの統計学的処理	27
実験結果	27
1. <i>Alternaria</i> 属菌における rDNA の RFLP	27
1) 6塩基認識制限酵素を用いた rDNA の RFLP 分析	27
2) 4塩基認識制限酵素を用いた rDNA の RFLP 分析	31
2. rDNA の RFLP 分析に基づく <i>Alternaria</i> 属菌の系統学的解析	34
考察	37

第3章 rDNA ITS領域の塩基配列の比較による *Alternaria* 属病原菌の 40
遺传的類縁関係の解析

材料および方法 41

1. 供試菌株 41

2. 供試菌からの全DNAの抽出 41

3. PCR法によるITS領域の増幅 44

4. PCR産物の塩基配列の解析 44

5. 塩基配列データの解析 46

実験結果 47

1. *Alternaria* 属菌におけるITS領域の塩基配列の変異 47

1) ITS1領域の塩基配列の変異 47

2) ITS2領域の塩基配列の変異 50

2. ITS領域の塩基配列に基づく *Alternaria* 属菌の系統解析 53

考察 55

第4章 ミトコンドリアDNAのRFLP分析による *Alternaria* 属病原菌の 61
遺传的類縁関係の解析

材料および方法 62

1. 供試菌株 62

2. 供試菌からの全DNAの抽出 62

3. 核DNAとミトコンドリアDNAの分画	65
4. ハイブリダイゼーション	65
5. RFLPデータの統計学的処理	66
実験結果	66
1. <i>Alternaria</i> 属菌におけるミトコンドリアDNAの変異	66
2. ミトコンドリアDNAのRFLP分析に基づく <i>Alternaria</i> 属菌の系統解析	71
考察	74
第5章 隣接圃場から分離したナシ黒斑病菌、リンゴ斑点落葉病菌 および非病原性 <i>A. alternata</i> の個体群構造の比較	77
材料および方法	78
1. 供試菌株	78
1) 全国各地から採集した宿主特異的毒素生産菌	78
2) ナシ黒斑病とリンゴ斑点落葉病自然病斑からの <i>A. alternata</i> の分離	78
3) 空中飛散胞子からの <i>A. alternata</i> の採取	83
2. 病原性の検定	83
3. 供試菌からの全DNAの抽出	84
4. DNAプローブ	84
5. ハイブリダイゼーション	84
実験結果	84

1. 全国各地から採集した宿主特異的毒素生産菌の個体群構造	84
2. ナシ葉病斑から分離した <i>A. alternata</i> の病原性	84
3. リンゴ葉病斑から分離した <i>A. alternata</i> の病原性	84
4. 空中飛散胞子由来の <i>A. alternata</i> の病原性	88
5. rDNAのRFLP分析による個体群構造の解析	88
1) ナシ葉病斑から分離した <i>A. alternata</i> の個体群構造	88
2) リンゴ葉病斑から分離した <i>A. alternata</i> の個体群構造	92
3) 空中飛散胞子由来の <i>A. alternata</i> の個体群構造	92
6. AAR-DNAフィンガープリント分析による個体群構造の解析	97
考察	106
第6章 総合考察	111
引用文献	123
摘要	134

第1章 緒 論

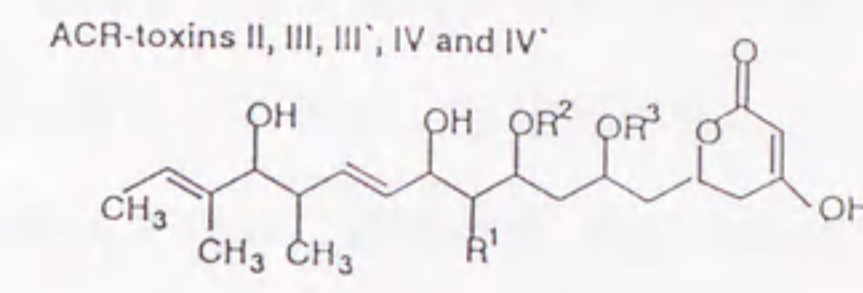
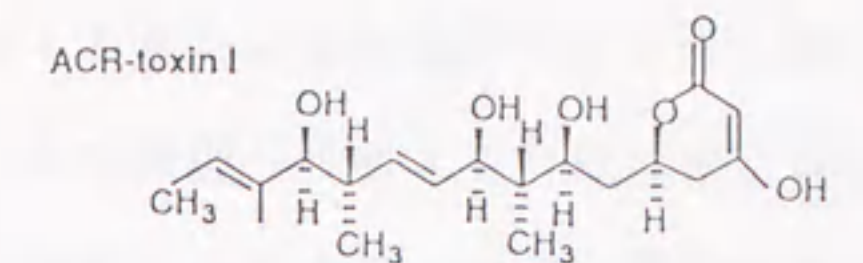
Alternaria alternata (Fries) Keissler は自然界に広く分布する糸状菌であり、一般に、枯死した植物体上などで腐生生活環を全うしている。また時として、生理的傷害や加齢などにより衰弱した植物組織に侵入し、不定性病害を引き起こす (Nishimura *et al.*, 1979; Nishimura, 1980; Scheffer, 1992)。このような現象はいわゆる日和見感染と呼ばれ、宿主に対する明確な特異性や安定した病原性は認められない。一方、腐生性*A. alternata*と形態的にはほとんど区別できないが、特定の植物に激発型病害を引き起こす7種の重要植物病原菌が存在する (Table 1-1) (Nishimura and Kohmoto, 1983a; 1983b)。これら病原菌は、それぞれナシ、リンゴ、イチゴ、トマト、カンキツまたはタバコの少数品種あるいは品種群に対してのみ特異的に病原性を示す。これら病害のほとんどが、品種改良により新たに作出された作物品種に突発的に発生した新規病害であったため、病原菌が*A. alternata*と形態的に類似しているにもかかわらず、*Alternaria*属菌の新種としてそれぞれ分類された (Tanaka, 1933; Ruehle, 1937; Sawamura, 1962; Pegg, 1966; Lucas, 1975; Cho and Moon, 1980)。その後、これら病原菌の病原性が、それぞれの宿主植物のみに毒性を示す宿主特異的毒素の生産性に依存していることが明らかにされた (Nishimura, 1980; Nishimura and Kohmoto, 1983a; 1983b)。*Alternaria*属菌が生産する宿主特異的毒素はどれも低分子量化合物であり、タバコ赤星病菌 (*A. longipes*) のAT毒素以外についてはすでにその化学構造が決定されている (Fig. 1-1) (Okuno *et al.*, 1974; Ueno *et al.*, 1975; Bottini *et al.*, 1981; Bottini and Gilchrist, 1981; Gardner *et al.*, 1985; Nakashima *et al.*, 1985; Kono *et al.*, 1986; Nakatsuka *et al.*, 1986; Kohmoto *et al.*, 1993)。どの毒素も 10^{-9} ~ 10^{-8} Mという極めて低濃度で宿主植物組織に特異的にえ死を引き起こす。

Nishimuraらのグループ (Nishimura *et al.*, 1979; Nishimura, 1980; Nishimura and Kohmoto, 1983a; 1983b; Otani *et al.*, 1989; Otani and Kohmoto, 1992) は、病原性発現

Table 1-1. *Alternaria* fungi known to produced host-specific toxins

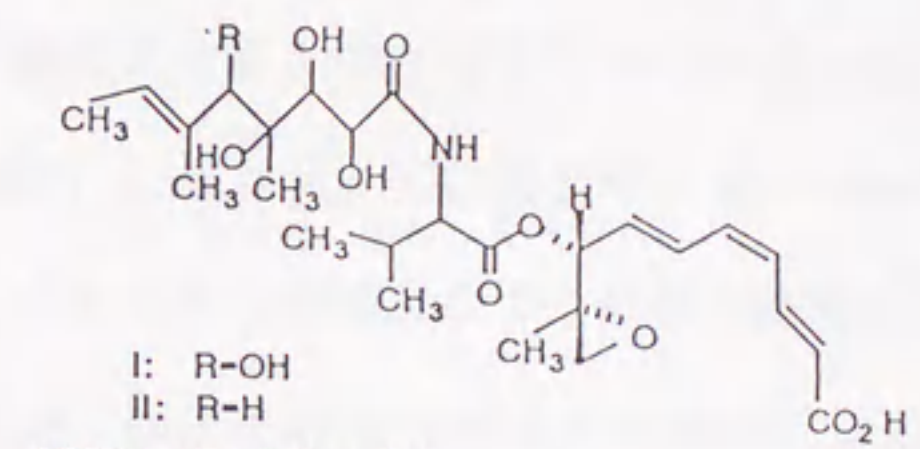
Pathogen			
Pathotype ¹⁾	Original name	Toxin	Disease
Japanese pear	<i>A. kikuchiana</i>	AK-toxin	Black spot of Japanese pear
Apple	<i>A. mali</i>	AM-toxin	Alternaria blotch of apple
Tobacco	<i>A. longipes</i>	AT-toxin	Brown spot of tobacco
Rough lemon	<i>A. citri</i>	ACRL-toxin	Brown spot of rough lemon
Tangerine	<i>A. citri</i>	ACTG-toxin ACT-toxin	Brown spot of tangerine
Strawberry	<i>A. fragaria</i>	AF-toxin	Alternaria black spot of strawberry
Tomato	<i>A. alternata</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	AAL-toxin	Stem canker of tomato

¹⁾ Pathotype designation of *A. alternata* described by Nishimura (1980)



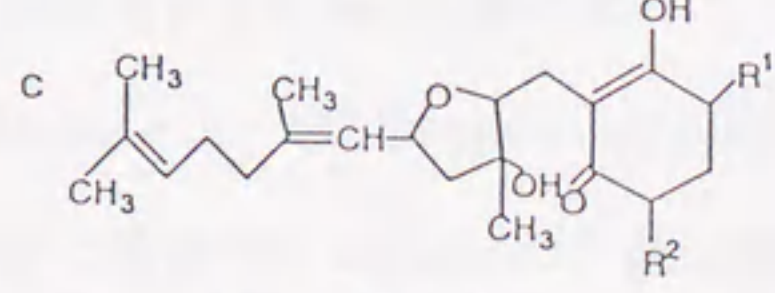
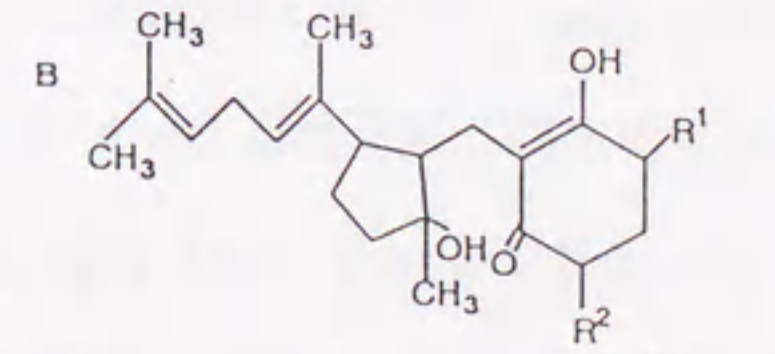
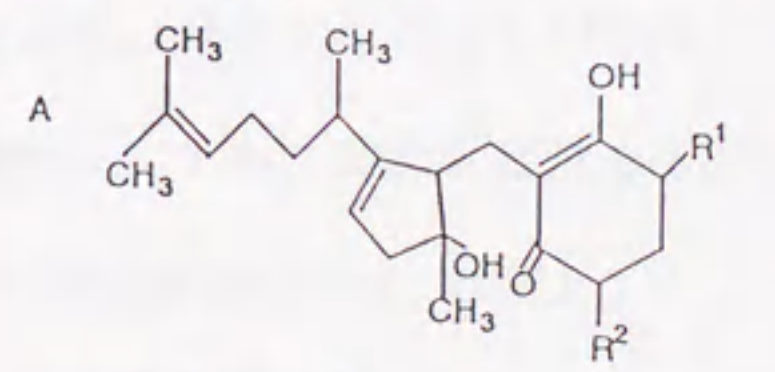
	R ¹	R ²	R ³
I:	CH ₃	-	-
II:	CH ₃	H	-
III:	H	H	-
III':	CH ₃	H	H
IV:	CH ₃	H	H
IV':	H	H	H

ACT-toxins I and II



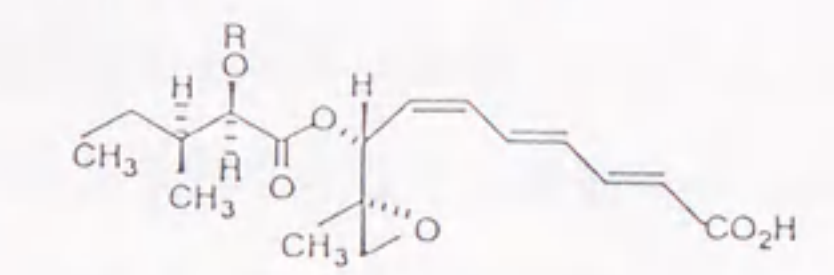
I:	R-OH
II:	R-H

ACTG-toxins A, B and C



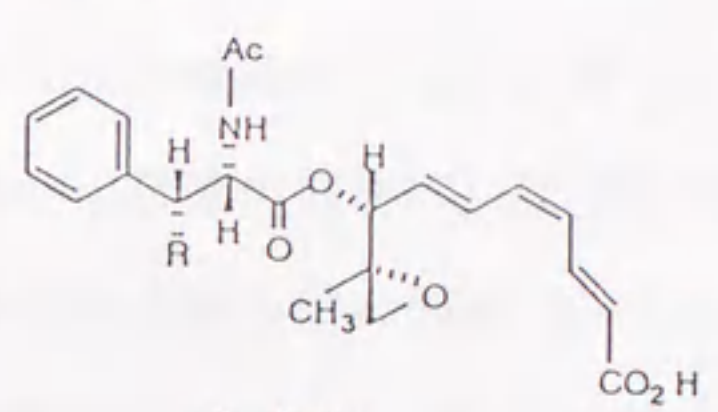
R¹-OH, R²-H or R¹-H, R²-OH

AF-toxins



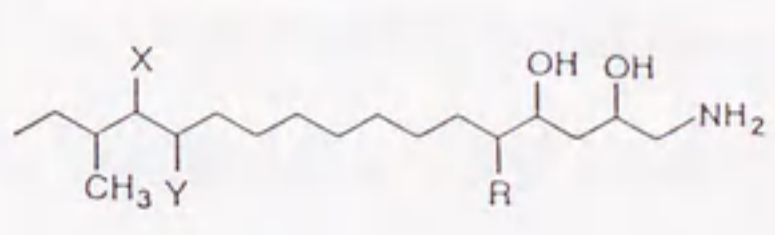
I:	COCH(OH)C(CH ₃) ₂ OH
II:	H
III:	COCH(OH)CH(CH ₃) ₂

AK-toxins



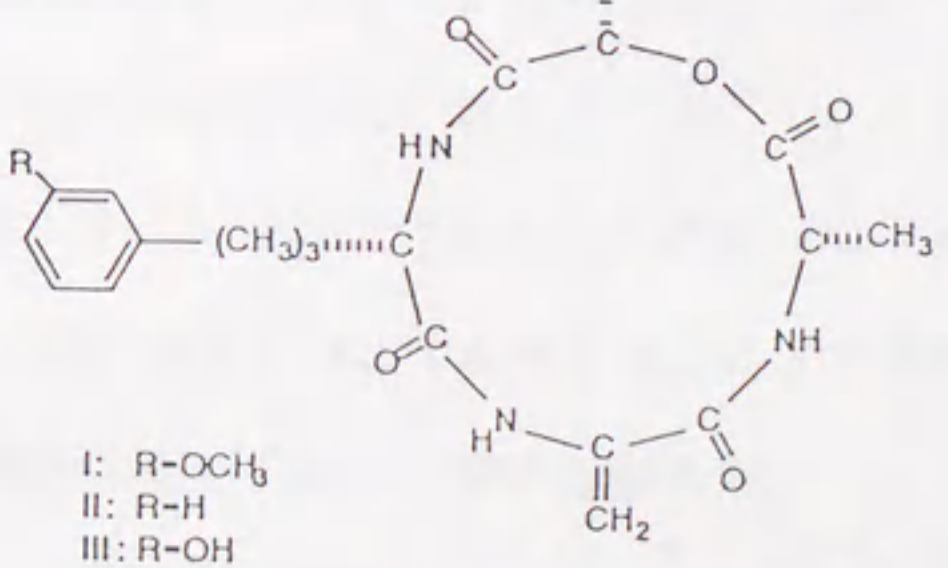
I:	R-CH ₃
II:	R-H

AL-toxins



Ta	I	R	X	Y
	II	OH	OH	OH
Tb	I	H	OH	OH
	II	H	OH	OH

AM-toxins



I:	R-OCH ₃
II:	R-H
III:	R-OH

Fig. 1-1. Chemical structures of host-specific toxins produced by *Alternaria* species (Table 1-1).

におけるこれら毒素の役割について詳細に解析し、毒素が感染後期の病徴発現に関与する単なる毒性因子ではなく、宿主植物の抵抗性反応を抑制することにより、菌の宿主組織への侵入を可能にする感染誘導因子であることを見いだした。宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 属菌の胞子をタマネギ鱗茎表皮の生細胞やセロファン膜上に置くと、発芽、付着器形成、侵入菌糸形成という一連の形態形成を行い、容易に侵入あるいは貫通する (Nishimura, *et al.* 1978; 1979; Nishimura, 1980)。このような角皮感染能力は、菌の宿主選択性とは関係なく、腐生性 *A. alternata* にも共通した性質である。一方、植物側は微生物侵入に対する抵抗性機構を本来具備しているため、菌の角皮感染能力だけでは感染は成立しない。毒素生産菌は、胞子発芽時に生産・放出する毒素の作用によって宿主の抵抗性反応を特異的に抑制し、その結果、感染を成立させるものと考えられている (Nishimura and Kohmoto, 1983a; 1983b; Otani *et al.*, 1989)。したがって、腐生性 *A. alternata* の胞子を毒素と同時に感受性植物に接種すると、あたかも病原菌のように植物組織に侵入し、病斑を形成する (Otani *et al.*, 1975)。一方、毒素生産阻害剤などの処理によって、病原菌の宿主への侵入行動には影響を与えず、毒素生産のみを抑制すると、腐生菌と同様に感染できなくなる (Tsuge *et al.*, 1985)。また、毒素生産性を失活した菌株は、もはや腐生性 *A. alternata* と区別できない (Nishimura *et al.*, 1982)。

以上の観察に基づき、Nishimuraら (1979; 1980) は、宿主特異的毒素を生産する7種の *Alternaria* 属菌を、腐生性 *A. alternata* が固有の毒素生産性を獲得することによって、特定の植物に感染できるようになった変異系統であると考えた。そこで、これら病原菌群を *A. alternata* の病原型 (pathotype) として位置付けることを提案した (Nishimura *et al.*, 1979; Nishimura, 1980)。この仮説が正しいとするならば、これら病原菌群と腐生性 *A. alternata* は、高い遺伝的類縁関係を有することが予想される。

宿主特異的毒素を生産する病原糸状菌は、*Corynespore* 属、*Cochliobolus* 属、*Periconia* 属および *Phyllosticta* 属からも報告されている (Scheffer and Livingston, 1984;

甲元, 1990)。宿主特異的毒素を生産する *Cochliobolus* 属菌として、トウモロコシ北方斑点病菌 (*C. carbonum* race 1、HC毒素生産菌; race 3、BZR毒素生産菌)、エンバク Victoria blight 病菌 (*C. victoriae*、HV毒素生産菌)、サトウキビ眼点病菌 (*C. sacchari*、HS毒素生産菌) およびトウモロコシごま葉枯病菌 (*C. heterostrophus* race T、HMT毒素生産菌) の4種が報告されている (Scheffer and Livingston, 1984; Xiao *et al.*, 1991)。 *Cochliobolus* 属菌では、交配実験に基づく毒素生産性の遺伝解析が行われ、毒素生産性すなわち病原性がそれぞれ優性の一遺伝子座により決定されていることが示されている (Yoder, 1980; Scheffer and Livingston, 1984)。また、トウモロコシ北方斑点病菌ではHC毒素生合成遺伝子が単離され、本菌の病原性が毒素生合成遺伝子により決定されていることが分子生物学的にも確認されている (Panaccione *et al.*, 1992)。一方、 *Alternaria* 属菌は不完全菌であり、交配実験による毒素生産性の遺伝解析は不可能である。また、毒素生産菌間の交雑親和性に基づき同一種かどうかを判定することもできない。先に、DNA-DNA相同性解析を用いて宿主特異的毒素生産菌群の遺伝的類縁性が調査された (Takeuchi and Kuninaga, 1994)。その結果は、Nishimuraら (1979; 1980) の病原型仮説を支持するものであったが、供試したサンプル数とその由来などに問題があり、病原型仮説の遺伝学的な証拠としては不十分であった。現在までのところ、この病原型仮説は広く受け入れられるには至っていない。

Alternaria 属菌の種分類は、主に分生胞子の形態とその形成様相に基づき行われている (Simmons 1992; Yu 1992)。特に、胞子形成様相、胞子サイズおよびピークの有無と長さが基本的な基準となっているが、これらの形態的特徴は培養条件などによって変化しやすく、安定した結果を得ることが難しい (Simmons 1992; Yu 1992; Rotem, 1994)。また、本属には多くの植物病原菌が含まれるため、分類基準として宿主植物など病理学的性質も加味されることから、その分類をより一層複雑化している (Simmons, 1992; Yu, 1992; Rotem, 1994)。Neergaard (1945) は、分生胞子の

形態とその形成様相から *Alternaria* 属の種を、ピークが無いかあるいは短いピークを持つ分生胞子を長く連鎖して形成する Longicatenatae、ピークを持つ分生胞子を3~5個連鎖して形成する Brevicatenatae、長いピークを持つ分生胞子を単生する Noncatenatae の3グループに大別した (Fig. 1-2、1-3および1-4)。特に、宿主特異的毒素生産菌を含む Longicatenatae グループの種は形態的特徴が乏しく、また、培養条件等によって胞子形態が変化しやすいため、種分類が極めて混乱している。

Nishimura ら (1978; 1979; 1980) は、宿主特異的毒素を生産する7種の *Alternaria* 属菌の分生胞子サイズが *A. alternata* の分類範疇にはいることを確認し、病原型仮説の分類学的正当性を主張した。一方、Simmons (1992) は、低倍率の顕微鏡を用いて観察される分生胞子の立体的形成様相を Longicatenatae グループの種分類の基準として採用している。たとえば、*A. alternata* の特徴は、分生胞子を連鎖し、しかも分岐をともないながら形成することであり、分岐をともなわないものは他種として分類している。Simmons (1992) は、Nishimura ら (1978; 1979; 1980) の毒素生産病原菌の分類がこの基準を考慮していないことを指摘し、病原型仮説について強く反論している。Simmons と Roberts (1993) は、分生胞子形態とサイズが *A. alternata* と類似した *Alternaria* 属菌134菌株の分生胞子の形成様相を観察し、その結果に基づきこれら菌株群を6グループに類別した。さらに、それぞれのグループを別種として分類すべきことを提案した (Simmons, 1993; Simmons and Roberts, 1993)。また、これらグループの1つがナシ黒斑病菌 (*A. kikuchiana*) のみを含んでいたことから、本菌を独立種 *A. gaisen* としてあらためて分類している (Simmons, 1993; Simmons and Roberts, 1993)。*A. gaisen* として分類されたナシ黒斑病菌菌株は、分生胞子を短く連鎖して形成し、分岐は見られないとしている (Simmons, 1993; Simmons and Roberts, 1993) (Fig. 1-5)。しかしながら、自然病斑から分離したナシ黒斑病菌には、分生胞子を長く連鎖して形成する菌株、連鎖が短い菌株など様々な変異が観察される (Fig. 1-6および1-7)。

他の宿主特異的毒素生産菌についても、*A. alternata* との形態的な差異が報告されて

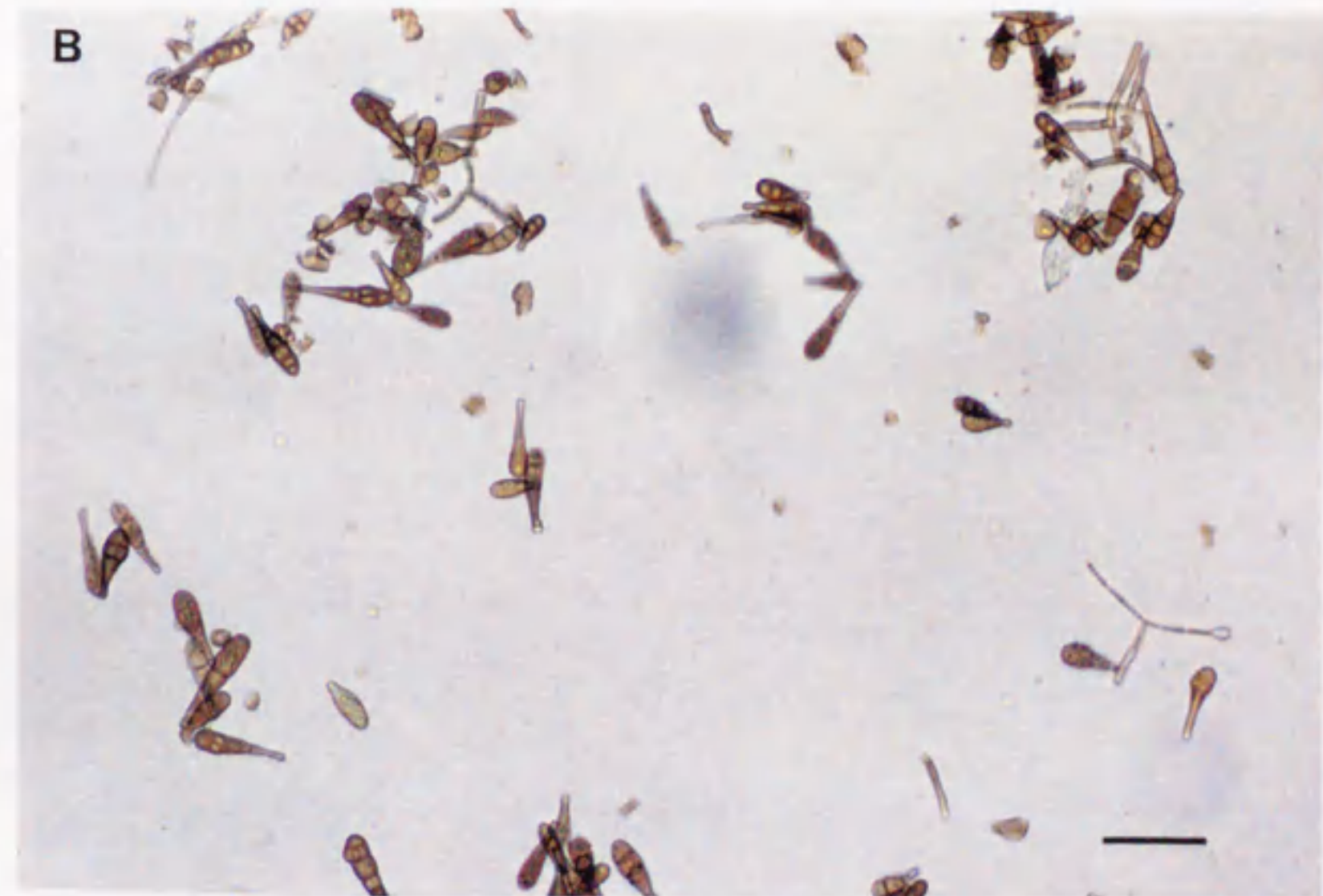
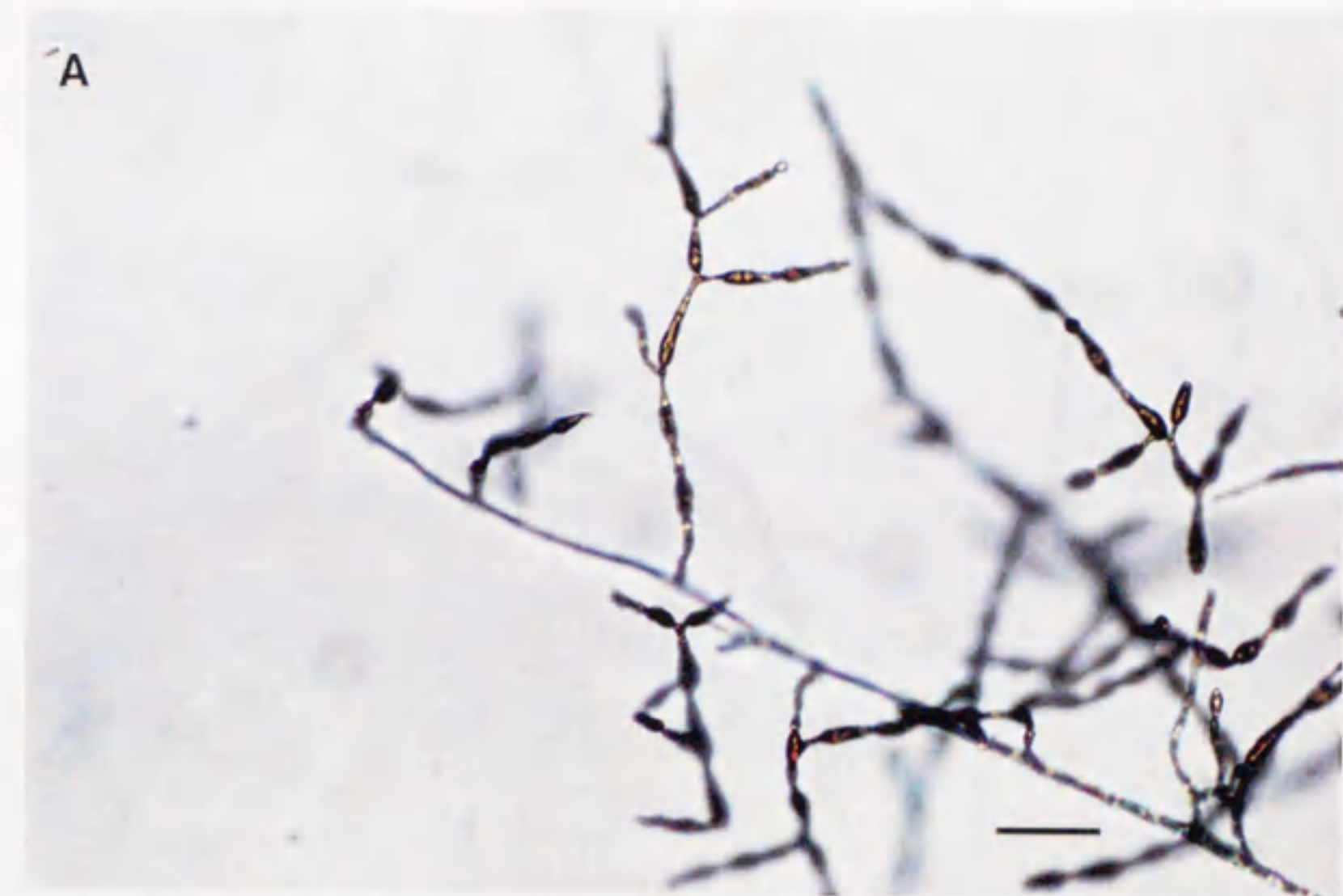


Fig. 1-2. Morphology and catenulation of conidia of *A. alternata* strain ATCC32417 belonging to the Longicatenatae species (Neergaard, 1945). The strain was grown on apricot sucrose agar (ASA) at 25°C for 5 days under BLB light. A, catenulation of conidia (dry mount); B, conidia and hyphae (mount in water). The bar indicates 50 μ m.



Fig. 1-3. Morphology and catenulation of conidia of *A. panax* strain Apx1 belonging to the *Brevicatenatae* species (Neergaard, 1945). The strain was grown on ASA at 25°C for 5 days under BLB light. A, catenulation of conidia (dry mount); B, conidia and hyphae (mount in water). The bar indicates 50 μ m.



Faint, illegible text on the left page, possibly bleed-through from the reverse side.

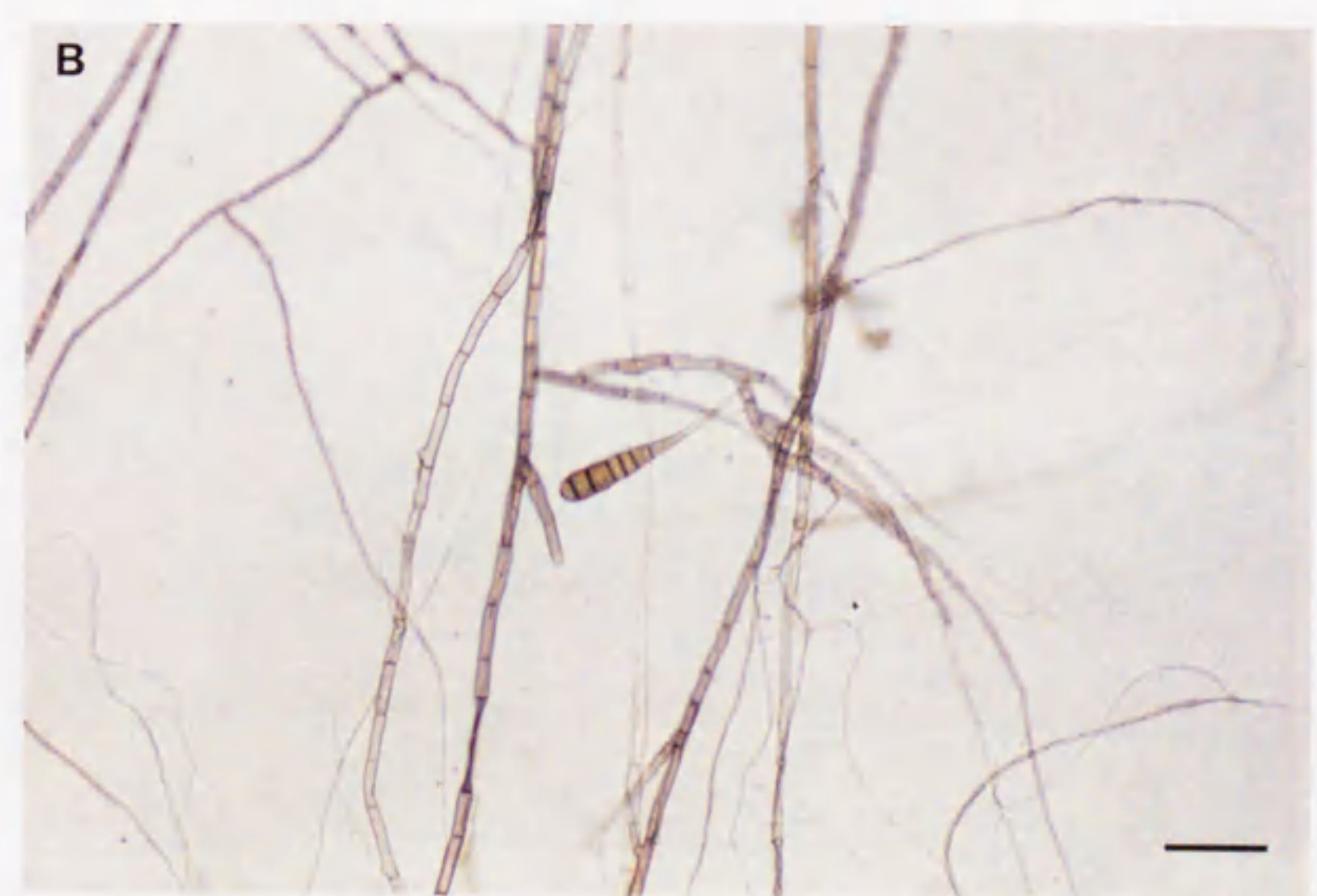
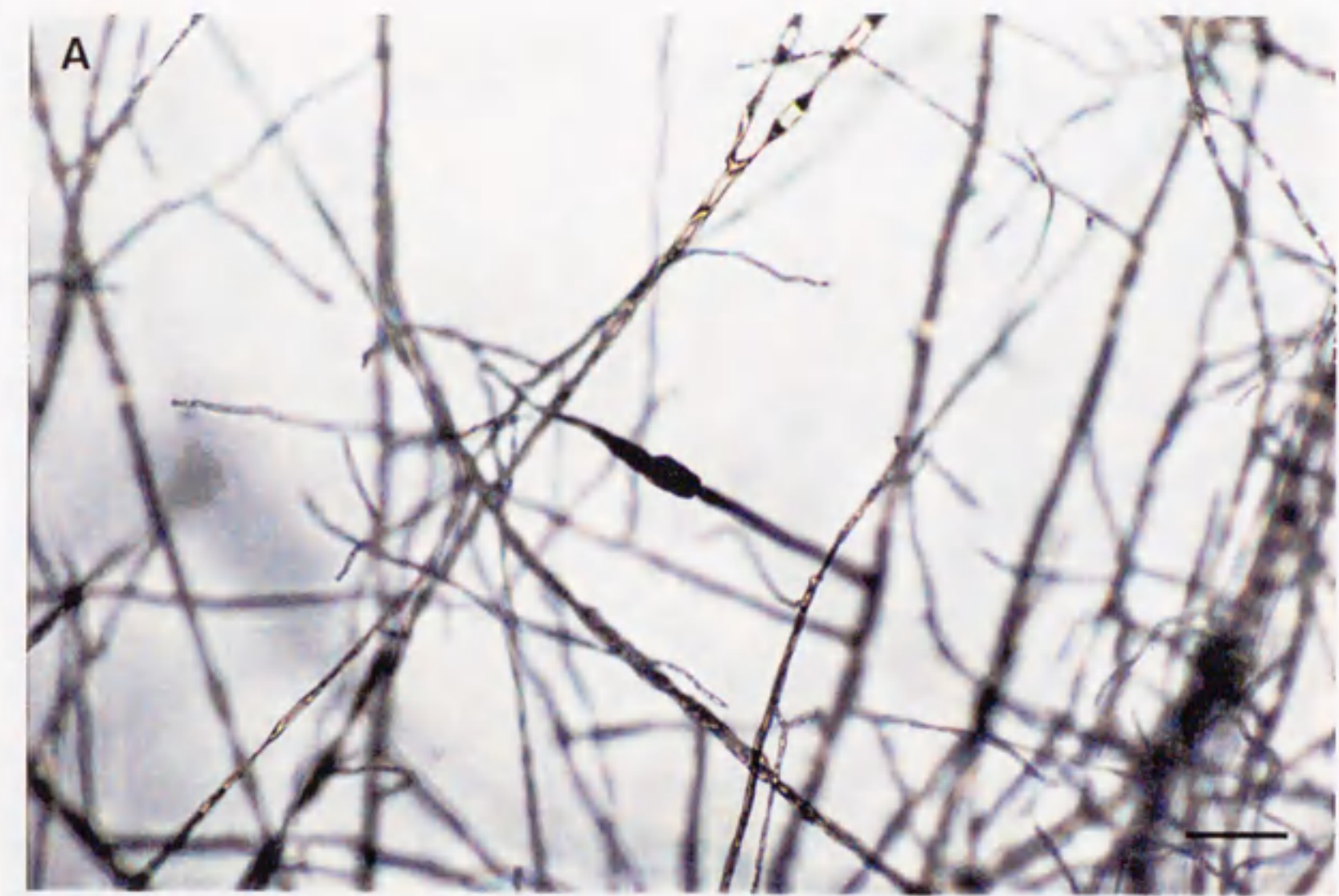


Fig. 1-4. Morphology and catenulation of conidia of *A. porri* strain Ap0 belonging to the Noncatenatae species (Neergaard, 1945). The strain was grown on ASA at 25°C for 5 days under BLB light. A, catenulation of conidia (dry mount); B, conidia and hyphae (mount in water). The bar indicates 50 μ m.

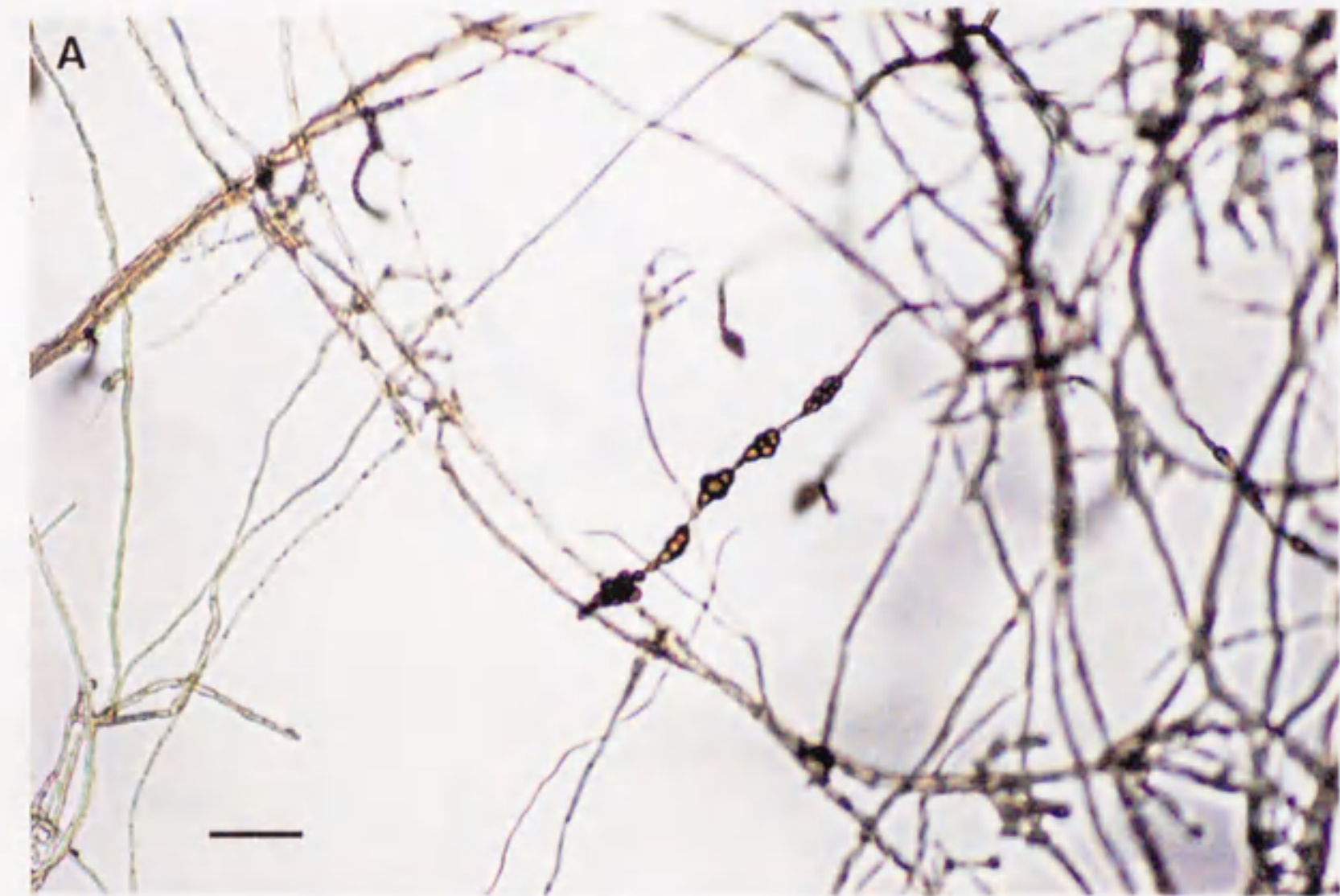


Fig. 1-5. Morphology and catenulation of conidia of *A. kikuchiana* strain 15A belonging to the Longicatenatae species (Neergaard, 1945). The strain was grown on ASA at 25°C for 5 days under BLB light. A, catenulation of conidia (dry mount); B, conidia and hyphae (mount in water). The bar indicates 50 μ m.



Faint, illegible text at the bottom of the left page, possibly bleed-through from the reverse side.



Fig. 1-6. Morphology and catenulation of conidia of *A. kikuchiana* strain T88-54 belonging to the Longicatenatae species (Neergaard, 1945). The strain was grown on ASA at 25°C for 5 days under BLB light. A, catenulation of conidia (dry mount); B, conidia and hyphae (mount in water). The bar indicates 50 μ m.

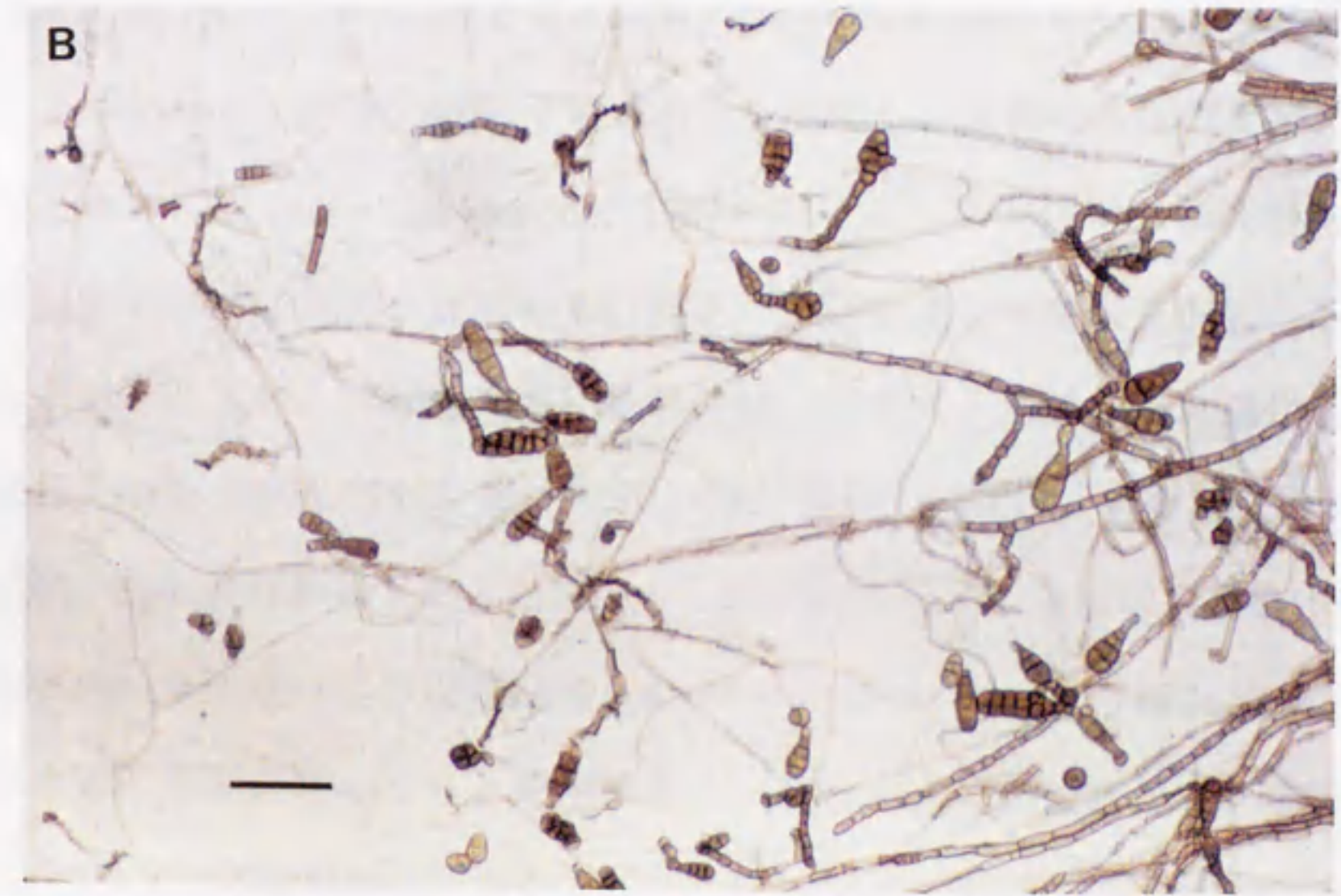
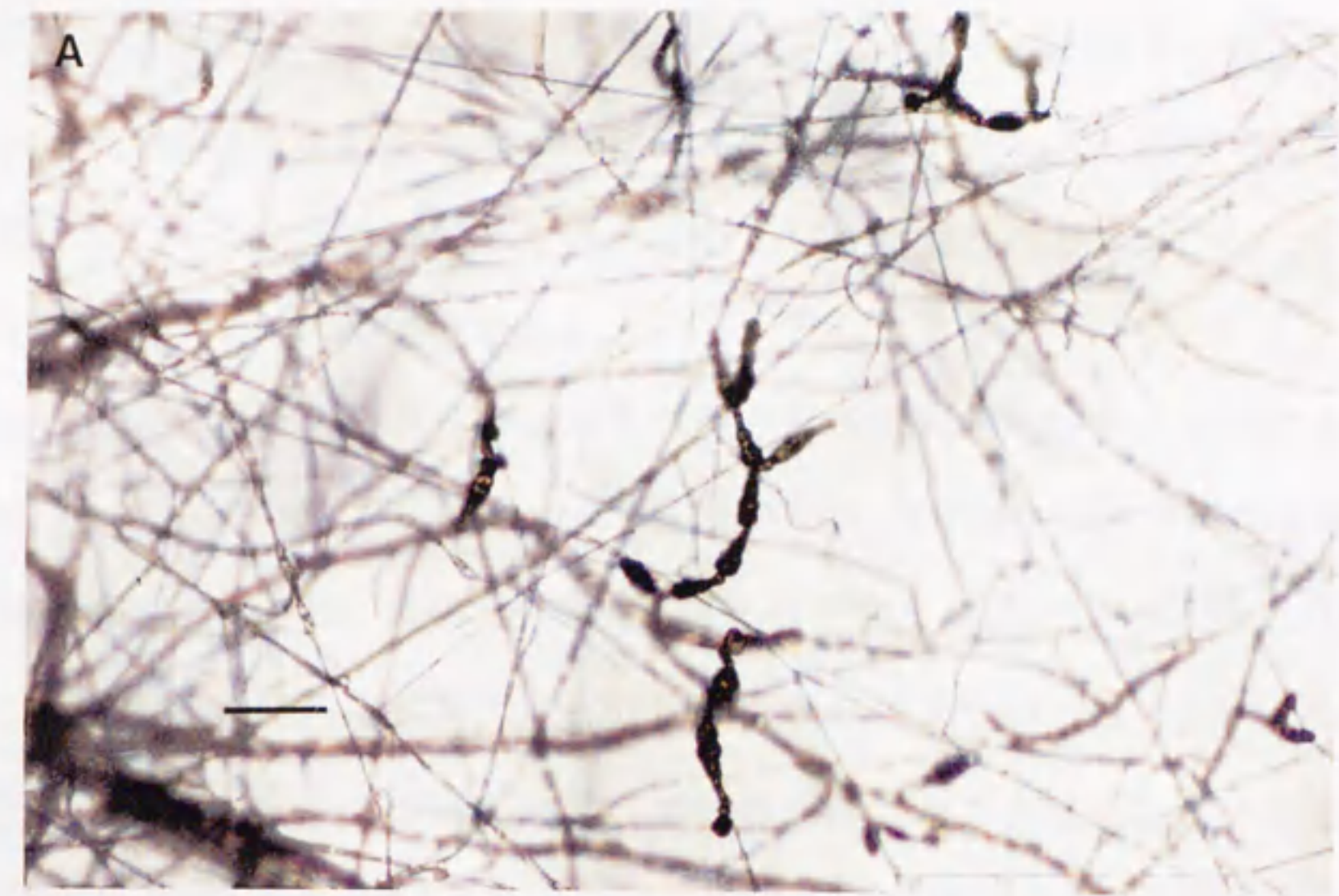


Fig. 1-7. Morphology and catenulation of conidia of *A. kikuchiana* strain G90-1 belonging to the Longicatenatae species (Neergaard, 1945). The strain was grown on ASA at 25°C for 5 days under BLB light. A, catenulation of conidia (dry mount); B, conidia and hyphae (mount in water). The bar indicates 50 μ m.

いる。Yu (1992) は、タバコ赤星病菌の分生胞子サイズが *A. alternata* に比べて大きいことを観察し、*A. longipes* とすることの正当性を主張している (Yu, 1992)。しかしながら、分生胞子サイズも安定した基準ではなく、同一個体内でもかなりのばらつきがあることが報告されている (Rotem, 1994)。したがって、形態的な比較のみによる分類では、どの程度の変異を種内多型として位置付けるかについて、明確な基準が示されていないのが現状である。

近年、遺伝子操作技術の進歩とそれに伴う分子生物学的情報の蓄積により、形態観察を中心に進められてきた従来の系統分類学に、DNAレベルの情報を導入する機運が高まってきている。当初、生物界に広く存在する 5S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子などの塩基配列の比較解析が有効に利用されてきたが (堀・大沢, 1984)、その後、さらに簡便にしかも比較的高感度で変異を検出する方法として、制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism、以下 RFLP と略す) 分析法が登場した (Heletijaris and Burr, 1989)。さらに、PCR (polymerase chain reaction) 法の開発によって、ゲノム DNA から特定の遺伝子領域のみを増幅し、直接塩基配列を解析することが可能となった (Mullis and Faloona, 1987)。これらの手法は、研究目的に応じて種々の分野で有効に利用されている。例えば、特定遺伝子の塩基配列、あるいはそこから推定されるアミノ酸配列の比較解析は、分類学と同時に系統進化学にも大きく貢献している (村上, 1992; 堀・大沢, 1984; 馬渡, 1994)。また、特定の遺伝子の塩基配列の比較では困難であった種内もしくは個体群内の遺伝的変異を、RFLP 分析や染色体 DNA に散在する反復 DNA の DNA フィンガープリント分析などによって簡便に検出することが可能となり、生態学あるいは集団遺伝学に新たな方法論を提供した (Burke *et al.*, 1991)。

近年、植物病原糸状菌においても、これら手法が分類学、生態学、植物疫学などの分野に応用されつつある (Bruns *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 1993; Maclean *et al.*, 1993; McDonald and McDermott, 1993)。植物病原菌に限らず、糸状菌ではその形態が単純

であり、比較できる形質も限られている。このため、*Alternaria*属菌と同様に他の多くの糸状菌で、種分類 (Kohn *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1989; Förster *et al.*, 1989; Guadet *et al.*, 1989; Moody and Tyler, 1990a; 1990b; Koch *et al.*, 1991; Lobuglio *et al.*, 1994)、さらには、属や科などの高次分類 (Hibbett and Vilgalys, 1991; Nishida and Sugiyama, 1993; Curtis *et al.*, 1994; Saenz *et al.*, 1994) にも大きな混乱が生じている。DNAレベルでの解析を分類学に応用した場合、表現形質に現れないような変異も含め遺伝的背景に関する多くの情報をより正確に得ることができる。さらに、得られた遺伝的情報から菌の類縁関係を統計学的に解析することにより、種などの分類に特定の基準を提供することが期待される。現在、これらの手法を用いて、植物病原糸状菌についても進化学的な背景を加味した系統分類学が展開されようとしている (Bruns *et al.*, 1991; Maclean *et al.*, 1993)。さらに、DNA解析を利用することによって、病原菌の同定や検出などが簡易に行えることから、植物疫学分野への応用が期待されている (Miller and Martin, 1988; Henson and French, 1993)。

DNA解析技術は、植物病原糸状菌の生態学的研究における個体識別のマーカースとして利用されている (Leung *et al.*, 1993; McDonald and McDermott, 1993)。生態学では、一つの生物を遺伝的に多様な個体の集団、すなわち個体群としてとらえ、その動態を解析することが基本である。しかしながら、植物病原糸状菌では、一つの病原菌個体群にも多様な変異菌系が存在することに経験的に気づきながらも、その生態学的意義を解析する試みは必ずしも成功しなかった。これは、個体群構造を解析するための有効なマーカースが存在しなかったためである。一部の糸状菌では、この目的のためにアイソザイム、交配型、菌糸融合型、二次代謝産物などの利用が試みられてきたが、個体識別を可能にするほどの多型を検出することはできなかった (Michelmore and Hulbert, 1987)。しかしながら、遺伝的変異を高感度で検出できるRFLP分析やDNAフィンガープリント分析の利用によって、糸状菌においても個体識別が可能となった。このような個体識別法は、これまで全く未知であった病原菌の

個体群動態の解析に新たな展開をもたらしている (Leung *et al.*, 1993; McDonald and McDermott, 1993)。

以上のような背景のもと、本研究では宿主特異的毒素を生産する7種の *Alternaria* 属植物病原菌、腐生性 *A. alternata*、さらにこれらとは形態的に異なる *Alternaria* 属菌の他種について、核染色体のリボソームRNA遺伝子 (rDNA) とミトコンドリアDNAのRFLP分析、さらにrDNAの非コード領域であるITS (internal transcribed spacer) 領域の塩基配列の比較を行った。これらの調査結果から、供試した *Alternaria* 属菌の遺伝的類縁関係を解析し、宿主特異的毒素生産菌の分類学的位置付けの分子系統学的解明を試みた。また、実際の農業生態系における毒素生産菌の成立過程について調査するために、地理的由来の異なる同一病原菌菌株群、また地理的由来の同じ病原菌と土着の腐生性 *A. alternata* の個体群構造をrDNAのRFLP分析とDNAフィンガープリント分析を用いて比較解析した。

宿主特異的毒素生産菌の遺伝的類縁関係の解析は、農業上重要なこれら病原菌のみならず、これまで形態を中心に行われてきた *Alternaria* 属菌全般についてその分類学に新たな方法論を提供するものと考えられる。宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 属菌は、その病原性の物質的背景が明確に示されている数少ない植物病原糸状菌のグループである。したがって、これら病原菌の寄生性分化に関する系統学的研究や進化生態学的研究は、植物病原糸状菌の病原性進化について新たな知見を提供するものと考えられる。

本研究の大部分は、日本植物病理学会において口頭発表するとともに原著論文として既に発表あるいは発表準備中である (Kusaba and Tsuge, 1994; 1995; 投稿準備中; Kusaba *et al.*, 投稿準備中)。

本研究を通じて終始御指導頂いた名古屋大学農学部植物病理学教室の柘植尚志助教授に深く感謝の意を表す。有益な御助言と御指導を頂いた同教室の道家紀志教

授、川北一人博士ならびに吉岡博文博士に深く感謝の意を表す。また、貴重な菌株を御分譲頂き、さらに有益な御助言を頂いた鳥取県果樹園芸試験場の渡辺博幸氏に感謝の意を表す。さらに、貴重な菌株を御分譲頂いた長野県果樹園芸試験場飯島章彦氏、農林水産省果樹試験場石井英夫氏、日本たばこ産業（株）遺伝育種研究所石井祐二氏、同業タバコ研究所多川閃氏、青森県リンゴ試験場長内昌彦氏、三重県農業技術センター富川章氏、愛知県農業総合試験場広田耕作氏、鳥取大学農学部甲元啓介教授ならびに尾谷浩教授に感謝の意を表す。また、多変量解析プログラムを御分譲頂いた京都大学霊長類研究所川本芳博士、PAUP version 3.0プログラムを御分譲頂いたD. Swofford博士（Illinois Natural History Survey）、PHYLIP version 3.4プログラムを御分譲頂いたJ. Felsenstein博士（Department of Genetics, University of Washington）に感謝の意を表す。本研究を行うにあたり御支援を頂いた足立嘉彦氏（現農林水産省果樹試験場）をはじめとする植物病理学教室の皆様方に深謝の意を表す。さらに、病原型仮説の提唱者であり、本研究を行うきっかけを与えて下さった故西村正暘先生に深く感謝の意を表するとともに、御冥福を心より御祈り申し上げます。

最後に、五年間の研究活動を終始支援してくれた友人、勝屋聡氏、小西弘晃氏ならびに古瀬勝美氏、そして、敬愛なる父章久、母セツ子、姉理恵子に心から感謝の意を表す。

第2章 リボソームRNA遺伝子のRFLP分析による

*Alternaria*属病原菌の遺伝的類縁関係の解析

真核生物の核ゲノムに存在するリボソームRNA遺伝子 (rDNA) は、典型的な直列型反復DNA配列である。これまでに解析された糸状菌では、いずれも半数体ゲノムあたり100~300コピーのrDNA反復単位がタンデムに繰り返して存在することが報告されている (Garber *et al.*, 1988)。 *Alternaria*属菌では、ナシ黒斑病菌15A菌株から18S、5.8Sおよび28S rRNAのコード領域を含む約8.15 kbの反復単位が単離され、この単位がゲノムあたり約200コピー存在することが示された (Fig. 2-1) (Tsuge *et al.*, 1989)。

rDNAは、18S rRNAのコード領域の5'末端上流から28S rRNAコード領域までが一つの単位として転写された後、スプライシングにより3種のrRNAが形成される。したがって、rDNA反復単位はそれぞれの機能から、各rRNAコード領域、転写後スプライシングにより除かれるITS (internal transcribed spacer) 領域およびプロモーター配列を含む非転写領域IGR (intergenic region) に分けられる。rRNAコード領域は非常に保存性が高く、遠縁の生物間でさえ塩基配列に高い相同性が認められるため、真核生物全般にわたる進化学的研究のマーカー配列として利用されている (堀・大沢, 1984)。一方、ITSおよびIGR領域は比較的変異性が高いため、糸状菌では、それらの塩基配列比較やRFLP分析が、種間などの近縁な分類群の系統解析、同定などに有効であることが既に報告されている (Moody and Tyler, 1990b; Vilgalys and Gonzalez, 1990; Nazer *et al.*, 1991; Anderson and Stasovsky, 1992; Morales *et al.*, 1993; Moukhamedov *et al.*, 1994)。なお、これら領域も同一種内では保存性が高く、RFLP分析などで種内多型が検出される例はまれである (Bruns *et al.*, 1991)。しかしながら、Adachiら (1993) は、日本各地から採集したナシ黒斑病菌約500菌株について

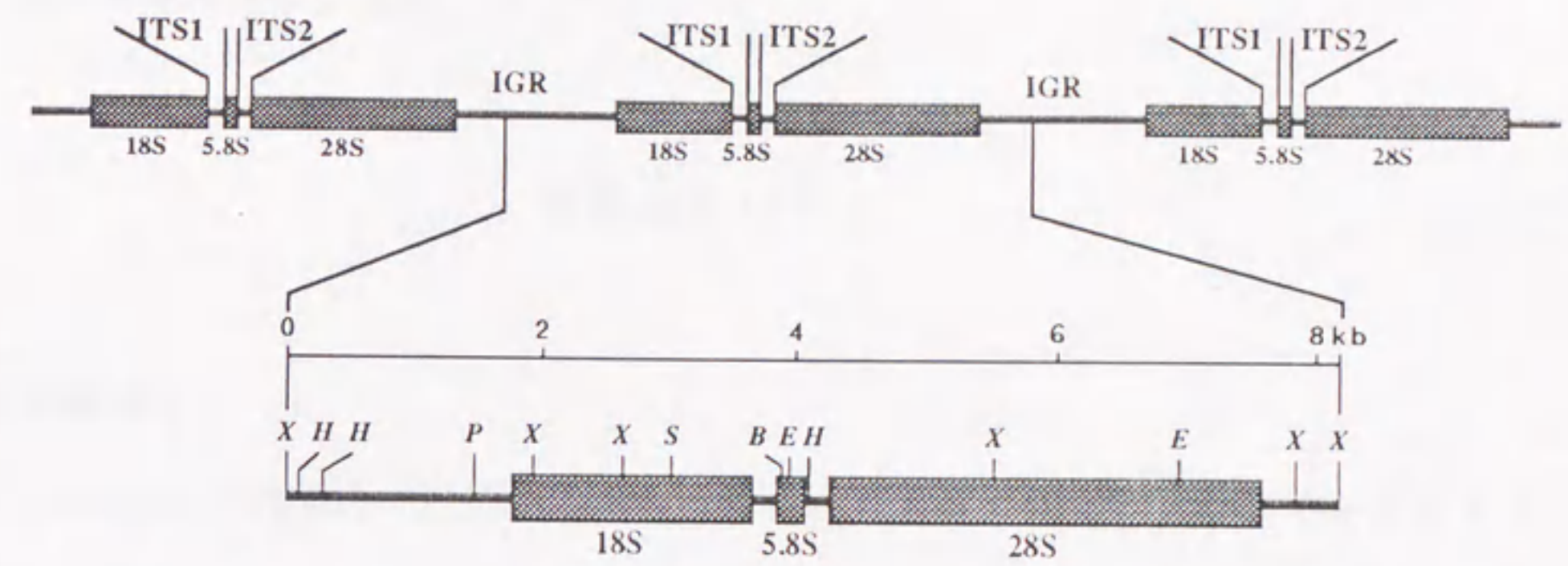


Fig. 2-1. Gene arrangement and restriction site maps of nuclear rDNA deduced in a rDNA clone Alt1 of *A. kikuchiana* strain 15A. Alt1 was cloned from a genomic library of strain 15A (Tsuge *et al.*, 1989). Abbreviations: 18S, 5.8S and 28S, coding regions for 18S, 5.8S and 28S rRNA, respectively; IGR, intergenic region; ITS, internal transcribed spacer; B, *Ban*III; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sac*I; X, *Xba*I.

rDNAのRFLP分析を行い、IGR領域の制限酵素認識部位の有無や長さの違いに起因する8種の多型を見いだすとともに、そのRFLP分析を本菌の個体群構造の解析に利用できることを示した。

本章では、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌、非病原性*A. alternata*および形態的に*A. alternata*と明確に異なる他種についてrDNAのRFLP分析を行い、これらの遺伝的類縁関係を調査した。

材料および方法

1. 供試菌株

*A. alternata*の基準株として非病原性*A. alternata* 8菌株、宿主特異的毒素を生産する*Alternaria*属菌として、ナシ黒斑病菌 (*A. kikuchiana*) 18菌株、リンゴ斑点落葉病菌 (*A. mali*) 18菌株、タバコ赤星病菌 (*A. longipes*) 18菌株、ラフレモンbrown spot病菌 (*A. citri*) 1菌株、タンゼリンbrown spot病菌 (*A. citri*) 1菌株、イチゴ黒斑病菌 (*A. fragaria*) 15菌株およびトマトアルタナリア茎枯病菌 (*A. alternata* f. sp. *lycopersici*) 3菌株を供試した。また、*Alternaria*属の他種として、サツマイモ黒星病菌 (*A. bataticola*) 4菌株、ニンジン黒葉枯病菌 (*A. dauci*) 3菌株、チョウセンニンジン斑点病菌 (*A. panax*) 5菌株、タマネギ黒斑病菌 (*A. porri*) 3菌株、ゴマ黒斑病菌 (*A. sesami*) 1菌株およびジャガイモ夏疫病菌 (*A. solani*) 7菌株を用いた。Table 2-1に各菌株の菌株名、由来などをまとめて示した。また、Yu (1992) の記載に基づき、Fig. 2-2に各種*Alternaria*属菌の分生胞子の形態を示した。供試菌株をショ糖添加ジャガイモ煎汁寒天 (PSA) 培地上に植え継ぎ、4℃下に保存した。

2. 供試菌からの全DNAの抽出

Table 2-1. Strains of *Alternaria* species used in this study

Strain	Origin		rDNA RFLP type	
	Location	Source ¹⁾	I ²⁾	II ³⁾
<i>A. alternata</i> ⁴⁾				
IFO31188	Kagawa	IFO	A4	R2
IFO31189	Unknown ⁵⁾	IFO	A2	R2
IFO31805	Unknown	IFO	A5	R14
IFO4026	Unknown	IFO	A6	R1
ATCC66981	United States	ATCC	A5	R23
ATCC66982	United States	ATCC	A5	R23
ATCC66983	United States	ATCC	A3	R12
O-94	Tottori	TU	B2	R2
<i>A. kikuchiana</i> ⁶⁾				
15A	Tottori	TU	A2	R3
IFO6444	Unknown	IFO	A4	R2
T88-4	Tottori	THES	B2	R4
T88-8	Tottori	THES	B1	R5
T88-54	Tottori	THES	A5	NT
T88-64a	Tottori	THES	B2	R2
T88-154	Tottori	THES	A2	R3
T88-165	Tottori	THES	A4	R6
T88-186	Tottori	THES	A5	NT
91H-18	Aichi	NU	A2	R7
91H-27	Aichi	NU	A4	R8
N18	Aichi	NU	A2	R9
G16	Gifu	NU	B3	R8
G31	Gifu	NU	B3	R8
G90-A2	Gifu	NU	A1	NT
A85-2	Aichi	NU	B1	R10
85-10	Aichi	NU	B1	R10
Nu89-22	Aichi	NU	A3	NT
<i>A. mali</i> ⁷⁾				
M-71	Unknown	TU	A6	R15
O-159	Unknown	TU	A1	R16
AM-1	Aichi	NU	B2	R12
IFO8984	Unknown	IFO	A5	R17
Ki-44I	Aomori	FTRS	A5	R18
Ku-15Ro	Aomori	FTRS	A5	NT
Ku-16Ro	Aomori	FTRS	A5	R17
Ku-16I	Aomori	FTRS	A5	NT
Ku-22I	Aomori	FTRS	A4	NT
FIVcont45	Aomori	FTRS	A5	R17

Table 2-1. —Continued

Strain	Origin		rDNA RFLP type	
	Location	Source ¹⁾	I ²⁾	II ³⁾
AM-91-1	Nagano	NFTES	A4	NT
AM-91-3	Nagano	NFTES	A4	NT
AM-91-4	Nagano	NFTES	A4	R19
AM-91-8	Nagano	NFTES	A5	NT
Ha-1	Nagano	NFTES	A6	R20
No. 40	Nagano	NFTES	A2	R12
No. 42	Nagano	NFTES	B2	NT
No. 64	Nagano	NFTES	A4	R21
<i>A. longipes</i> ⁸⁾				
AT-204	Aichi	NU	A5	R8
IFO6149	Unknown	IFO	B2	R11
IFO6381	Unknown	IFO	B3	R2
86-1	Kanagawa	JTY	A4	NT
No. 122-2	Tochigi	JTY	A5	NT
No. 122-3	Tochigi	JTY	A5	R8
ATL-5	Kagawa	JTL	A4	R2
ATL-6	Tochigi	JTL	A3	R12
ATL-7	Tochigi	JTL	A3	NT
ATL-9	Tottori	JTL	A3	R12
ATL-10	Tottori	JTL	A4	R6
ATL-11	Tochigi	JTL	A4	NT
ATL-16	Iwate	JTL	A5	R13
ATL-17	Yamagata	JTL	A5	NT
ATL-18	Yamagata	JTL	A4	NT
ATL-23	Iwate	JTL	A5	NT
ATL-26	Fukushima	JTL	A3	NT
ATL-28	Fukushima	JTL	A4	R6
<i>A. citri</i>				
ATCC38962 ⁹⁾	United States	ATCC	A4	R2
ATCC38963 ¹⁰⁾	United States	ATCC	A4	R2
<i>A. fragaria</i> ¹¹⁾				
O-187	Iwate	TU	A1	R16
M-30	Tottori	TU	A4	R22
T-32	Tottori	TU	A2	R3
NAF-1	Aichi	NU	A2	R3
NAF-2	Aichi	NU	A2	NT
NAF-3	Aichi	NU	A2	NT
NAF-4	Aichi	NU	A2	NT

Table 2-1. —Continued

Strain	Origin		rDNA RFLP type	
	Location	Source ¹⁾	I ²⁾	II ³⁾
NAF-5	Aichi	NU	A2	NT
NAF-6	Aichi	NU	A2	R3
NAF-8	Aichi	NU	A2	NT
NAF-9	Aichi	NU	A2	NT
NAF-10	Aichi	NU	A2	NT
NAF-11	Aichi	NU	A2	NT
NAF-12	Aichi	NU	A2	NT
NAF-13	Aichi	NU	A2	NT
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ¹²⁾				
AL-4	Mie	NU	A5	R1
AL-12	Mie	NU	A5	R1
No. 91080804	Mie	MARC	A4	R2
<i>A. bataticola</i> ¹³⁾				
Ab1	Unknown	NU	C7	R24
IFO6187	Unknown	IFO	C7	R29
03-05009	Unknown	NIAR	C7	NT
03-05010	Chiba	NIAR	C7	NT
<i>A. dauci</i> ¹⁴⁾				
Ad1	Unknown	NU	C4	R25
Ad2	Unknown	NU	C3	NT
03-05012	Saitama	NIAR	C4	NT
<i>A. panax</i> ¹⁵⁾				
Apx1	Shimane	NU	C6	R26
Apx2	Shimane	NU	C6	NT
Apx11	Shimane	NU	C6	NT
Apx12	Shimane	NU	C6	R27
Apx22	Shimane	NU	C6	NT
<i>A. porri</i> ¹⁶⁾				
Ap0	Unknown	NU	C5	R28
Ap28	Unknown	NU	C5	NT
Ap29	Unknown	NU	C5	NT
<i>A. sesami</i> ¹⁷⁾				
Se-1	Unknown	NU	C8	R30
<i>A. solani</i> ¹⁸⁾				

Table 2-1. —Continued

Strain	Origin		rDNA RFLP type	
	Location	Source ¹⁾	I ²⁾	II ³⁾
A16	Shimane	SU	C1	R31
A17	Shimane	SU	C2	NT
A18	Shimane	SU	C1	NT
A425	Unknown	NU	C1	NT
A426	Unknown	NU	C2	NT
AsII	Mie	NU	C1	NT
IFO7516	Kanagawa	IFO	C2	NT

1) IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, USA; TU, Laboratory of Plant Pathology, Tottori University, Tottori, Japan; THES, Tottori Horticultural Experiment Station, Tottori, Japan; NU, Plant Pathology Laboratory, Nagoya University, Aichi, Japan; FTRS, Fruit Tree Research Station, Ibaraki, Japan; NFTES, Nagano Fruit Tree Experiment Station, Nagano, Japan; JTY, Yokohama Center, Japan Tobacco Inc., Kanagawa, Japan; JTL, Leaf Tobacco Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., Tochigi, Japan; MARC, Mie Agricultural Research Center, Mie, Japan; NIAR, National Institute of Agricultural Resources, Ibaraki, Japan; SU, Laboratory of Plant Pathology, Shimane University, Shimane, Japan.

2) RFLP type based on *Xba*I restriction patterns.

3) RFLP type based on *Hae*III and *Msp*I restriction patterns. NT, not tested.

4) Nonpathogenic.

5) Unknown, but in Japan.

6) The Japanese pear pathotype, AK-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *Pyrus serotina* var. *culta*.

7) The apple pathotype, AM-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *Malus pumila* var. *domestica*.

8) The tobacco pathotype, AT-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *Nicotiana* species.

9) The rough lemon pathotype, ACRL-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *Citrus jambhiri*.

10) The tangerine pathotype, ACT- or ACTG-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *C. reticulata*.

11) The strawberry pathotype, AF-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *Fragaria ananassa*.

12) The tomato pathotype, AAL-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *Lycopersicon esculentum*.

13) Host plant, *Ipomoea batatas*.

14) Host plant, *Daucus carota*.

15) Host plant, *Panax ginseng*.

16) Host plant, *Allium cepa*.

17) Host plant, *Sesamum indicum*.

18) Host plant, members of the family Solanaceae

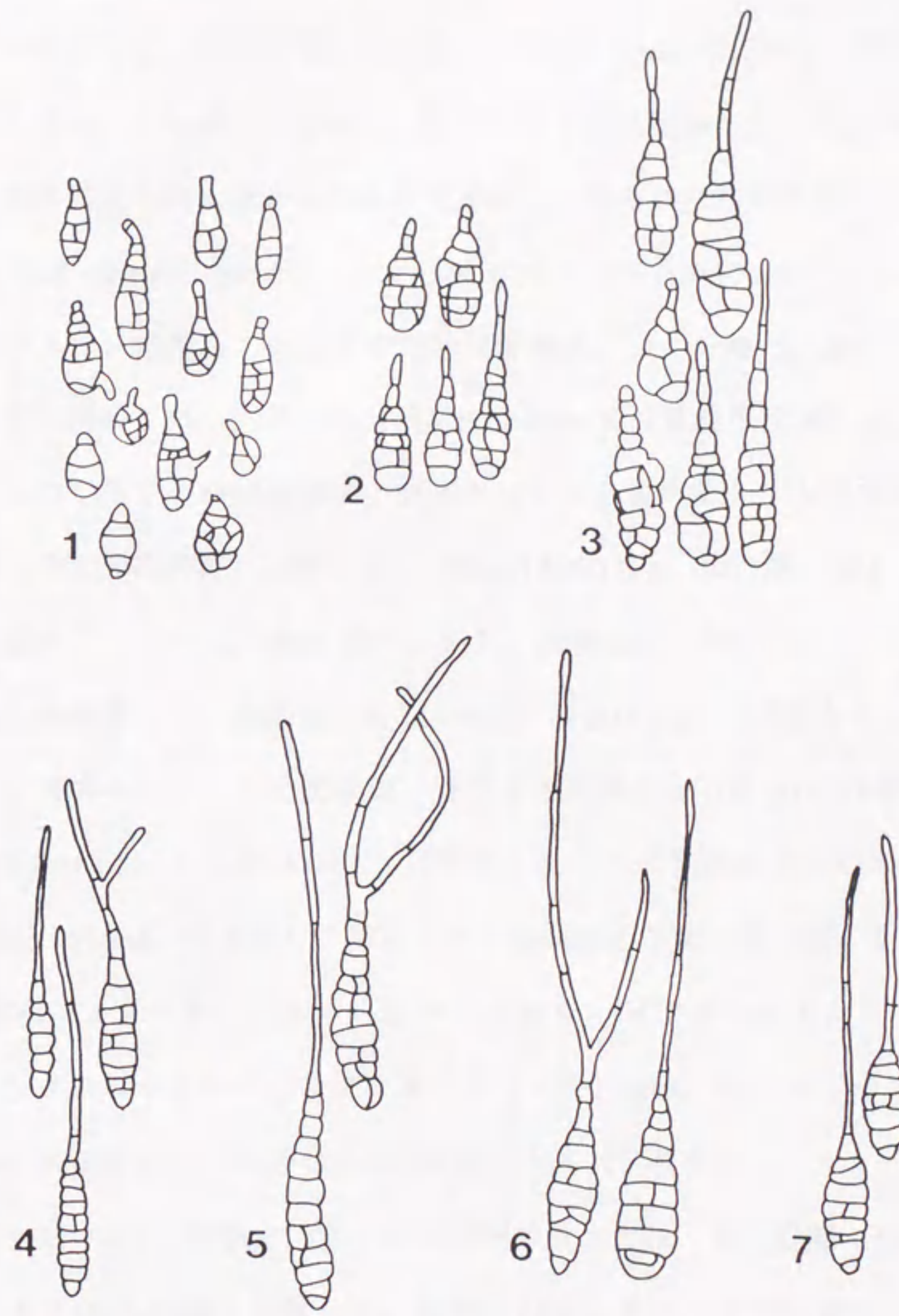


Fig. 2-2. Conidial morphology of *Alternaria* species (Yu, 1992). 1, *A. alternata*; 2, *A. dianthi*; 3, *A. panax*; 4, *A. porri*; 5, *A. solani*; 6, *A. dauci*; 7, *A. sesami*.

供試菌株からの全DNAの抽出は、Adachiら（1993）の方法にしたがって行った。供試菌株を 50 mlのグルコース添加ジャガイモ煎汁（PDB）培地を含む 100 ml 三角フラスコに接種し、25℃下で3日間振とう（120 rpm）培養した。得られた培養菌体を吸引ろ過によりろ紙上に回収し、蒸留水で十分に洗浄した。回収菌体約 1 g（新鮮重）を液体窒素を加えながら乳鉢中で摩砕し、得られた粉末菌体を 4 mlのDNA抽出液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM EDTA、1% (w/v) N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム] に懸濁し、65℃下で10分間静置後、遠心分離（2,000 X g、10分間）により上清を回収した。回収した上清にProteinase K（最終濃度300 μ g/ml、Merck）を溶解し、37℃下で1時間処理後、酢酸カリウムを最終濃度 2 Mになるように添加した。氷上で30分間静置した後、遠心分離（12,000 X g、10分間）によって上清を回収し、酢酸アンモニウム（最終濃度 2 M）、同容量のイソプロパノールを添加し、氷上に30分間静置した。核酸画分を遠心分離（8,000 X g、10分間）により沈殿として回収し、70%エタノールで洗浄後、真空下で乾燥し、700 μ lのTE緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA] に溶解した。この核酸溶液にRNase A（最終濃度 20 μ g/ml、Sigma）を添加し、37℃下で1時間反応させた後、同容量のTris-HCl (pH 8.0) 飽和フェノール、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール（25:24:1、v/v/v）、クロロホルム/イソアミルアルコール（24:1、v/v）により順次抽出した。得られた水層画分に11/16容量のPEG溶液 [20%ポリエチレングリコール6000（和光純薬）、2.5 M NaCl] を加え、氷上に10分間静置した後、遠心分離（15,000 X g、10分間）によりDNA沈殿を回収した。沈殿を70%エタノールで洗浄し、真空下で乾燥後、最終DNA濃度 1 μ g/ μ lとなるようにTE緩衝液（pH 7.5）に溶解した。

3. RFLPプローブ

rDNAのRFLP解析のプローブとして、ナシ黒斑病菌15A菌株の染色体ライブラリー

から単離されたrDNAのλファージクローンAlt1を用いた (Tsuge *et al.*, 1989)。なお、Alt1には、λファージベクターλFix (STRATAGENE) に本菌のrDNA反復単位が2コピー組み込まれている (Fig. 2-1)。Alt1 DNAは、プレートライゼート法 (Sambrook *et al.*, 1989) により抽出した。

4. ハイブリダイゼーション

供試菌の全DNAを種々の6塩基認識制限酵素 (東洋紡) によりそれぞれ切断し、0.8%アガロースゲル (LO3、宝酒造) 中で電気泳動した (Sambrook *et al.*, 1989)。また、供試菌の全DNAを4塩基認識制限酵素 *Hae*III (東洋紡) または *Msp*I (東洋紡) によりそれぞれ切断し、3.5%アガロースゲル (NuSieve 3:1、FMC) と1.2%アガロースゲル (LO3、宝酒造) 中で電気泳動した (Sambrook *et al.*, 1989)。なお、3.5%アガロースゲル電気泳動は100 bp~2000 bpのDNA断片、1.2%アガロースゲル電気泳動は400 bp~3000 bpのDNA断片の分画にそれぞれ用いた。分画後、DNA断片をアルカリプロット法 (Reed and Mann, 1985) によりHybond-N+ (Amersham) ナイロン膜上に転写した。

ハイブリダイゼーションは、³²P標識したAlt1 DNAをプローブとして行った。熱変性したAlt1 DNAをランダムプライミング法 (Feinberg and Vogelstein, 1983) によって [α -³²P] dCTP (111 TBq/mmol、ICN Biomedicals) 存在下で標識し、約 1×10^8 dpm/ μ g DNAの比活性を有するプローブを作製した。DNAを転写したナイロン膜をプレハイブリダイゼーション溶液 [50%ホルミルアミド、5 X SSPE (1 X SSPE: 0.18 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄ [pH 7.7]、1 mM EDTA)、5 X デンハルト溶液 (Sambrook *et al.*, 1989)、0.5% SDS、100 μ g/ml熱変性サケ精子DNA] に42°C下で1時間以上浸漬した後、³²P標識Alt1 DNAを添加し、42°C下で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この膜を0.1% SDS含有2 X SSPE中で65°C下10分間 (2回)、0.1% SDS含

有 1 X SSPE 中で 65°C 下 15 分間 (1 回)、0.1% SDS 含有 0.1 X SSPE 中で 65°C 下 10 分間 (1 回) 順次洗浄した。オートラジオグラフィーは、X 線フィルム X-OMAT (KODAK) と増感紙 Lightning PLUS (DUPONT) を用いて、-80°C 下で行った。

5. RFLP データの統計学的処理

4 塩基認識制限酵素を用いた RFLP 分析により検出された全ての DNA 断片について、同一サイズの DNA 断片は同一のものとみなし、共通断片数をそれぞれの菌株間で計測した。得られた数値から以下の式を用いて菌株間の類縁係数 (F) を算出した (Nei and Li, 1979)。

$$F = \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y}$$

N_x 、 N_y は菌株 x と y においてそれぞれ検出された全 DNA 断片数、 N_{xy} は菌株間で共通な断片数を示す (Nei and Li, 1979)。この係数 (F) から平均距離法 (Sneath and Sokal, 1973) を用いて菌株間の類縁関係を算出し、系統樹を作成した。系統樹の作成には、京都大学霊長類研究所の川本芳博士よりご分譲頂いた多変量解析プログラムを用いた。

実験結果

1. *Alternaria* 属菌における rDNA の RFLP

1) 6 塩基認識制限酵素を用いた rDNA の RFLP 分析

Adachi ら (1993) は、ナシ黒斑病菌菌株群の rDNA の RFLP 分析を行い、6 塩基認識制限酵素 *Xba*I 切断パターンの相違から 8 種の多型を見いだした。そこで、本研究では、宿主特異的毒素を生産する 7 種の *Alternaria* 属菌計 74 菌株、非病原性 *A. alternata* 8

菌株、その他の*Alternaria*属菌6種計23菌株についてrDNAのRFLP分析を行った。

*Xba*Iで切断した供試菌の全DNAについてrDNAのRFLP分析を行ったところ、異なるハイブリダイゼーションパターンを示す17種の多型が検出された (Fig. 2-3)。これらrDNA多型の供試菌における分布をTable 2-1およびTable 2-2に示した。供試した宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の菌株群からは、9種のrDNA多型 (A1~A6およびB1~B3型) が検出された (Fig. 2-3)。これらのうち8種は、先にナシ黒斑病菌で報告されたrDNA型 (A1~A5およびB1~B3型) と同一のものであった (Adachi *et al.*, 1993)。なお、リンゴ斑点落葉病菌2菌株と非病原性*A. alternata* 1菌株からはこれらとは異なるrDNA型が検出されたが、ハイブリダイゼーションパターンが他のA型と類似していたことから、これをA6型と命名した (Fig. 2-3およびTable 2-2)。Adachiら (1993) は、ナシ黒斑病で検出された8種のrDNA多型が、IGRにおける*Xba*I認識部位の有無とその長さの違いによるものと同定した。新たに検出されたA6型についても、そのハイブリダイゼーションパターンから同様な変異に起因するものと考えた。これら9種のrDNA型は、ナシ黒斑病菌でのみ検出されたB1型を除き、特定の宿主特異的毒素生産菌または非病原性*A. alternata*に特異的なものでなかった。すなわち、同一のrDNA型が、異なる毒素生産菌さらには非病原性*A. alternata*に共通して分布していた (Table 2-2)。一方、供試した他の6種の*Alternaria*属菌23菌株からは、宿主特異的毒素生産菌や非病原性*A. alternata*とは全く異なる8種の多型が検出され、これらをrDNA型C1~C8と命名した (Fig. 2-3)。これら多型は、それぞれの種に特異的な分布を示した (Table 2-2)。

以上の結果から、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌と非病原性*A. alternata*の菌株群には、共通したrDNA変異が分布していることが明らかとなり、これら集団の遺伝的背景が類似していることが示唆された。また、解析には他の6塩基認識制限酵素*Eco*RI、*Pst*I、*Sac*Iおよび*Xho*Iを用いたが、供試菌株のrDNAにおけるこ

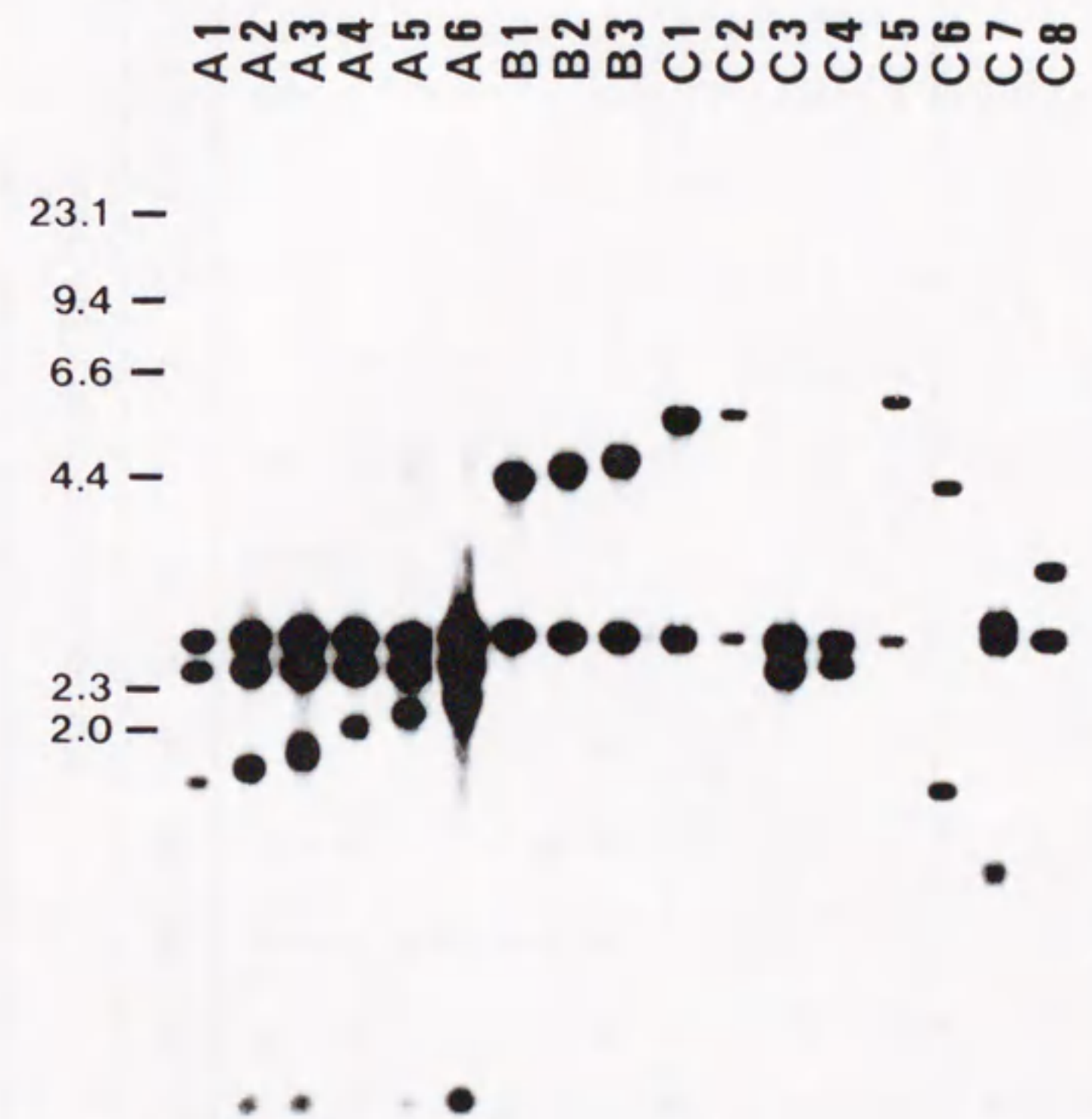


Fig. 2-3. RFLPs of representative strains of rDNA types in *Alternaria* species. Total DNA was cleaved with *Xba*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with 32 P-labeled Alt1 DNA. The lane designations correspond to the rDNA types in Tables 2-1 and 2-2. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λ DNA) are indicated on the left.

Table 2-2. Distribution of rDNA variation in *Alternaria* species measured by RFLP analysis using *Xba*I

Species	Number of strains ¹⁾ with rDNA type ²⁾																	
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	
<i>A. kikuchiana</i>	1	4	1	3	2	2	3	2	2	2								
<i>A. mali</i>	1	1		5	7	2		2										
<i>A. longipes</i>			4	6	6			1	1									
<i>A. citri</i> ³⁾				1														
<i>A. citri</i> ⁴⁾				1														
<i>A. fragaria</i>	1	13		1														
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>				1	2													
<i>A. alternata</i> 5)	1	1	1	1	3	1		1										
<i>A. bataticola</i>																		
<i>A. dauci</i>												1	2					
<i>A. panax</i>																		
<i>A. porri</i>																		
<i>A. sesami</i>														3				
<i>A. solani</i>							4	3										1

1) Strains used are shown in Table 2-1.

2) See Fig. 2-3.

3) The causal agent of brown spot of rough lemons.

4) The causal agent of brown spot of tangerines.

5) Nonpathogenic.

れら制限酵素の認識部位が0～2カ所と少ないため、*Xba*Iほど明確な多型は検出されなかった。しかしながら、*Xba*Iの場合と同様に、IGRのサイズの違いに起因するハイブリダイゼーションパターンが得られた。

2) 4塩基認識制限酵素を用いたrDNAのRFLP分析

rDNAは保存性の高いDNA領域であり、また、6塩基認識制限酵素によるRFLP分析では検出断片が少ないため、菌株群の詳細なグループ分けやRFLPデータに基づくrDNA型間の遺伝的類縁関係の推定は不可能である。そこで、より多数の認識部位を有する、すなわち、その切断によってより多数の断片を生じる4塩基認識制限酵素*Hae*IIIと*Msp*Iを用いてrDNAのRFLP分析を行い、さらに詳細なrDNA多型の検出を試みた。

宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌計45菌株、非病原性*A. alternata* 8菌株、他の*Alternaria*属菌6種計8菌株を用いた。供試菌株のハイブリダイゼーションパターンの一部をFig. 2-4に示した。*Hae*IIIで切断した場合には、各菌株から8～9本のDNA断片が検出されたが、0.7 kb以下の6本のDNA断片は全ての供試菌株に共通して見いだされた (Fig. 2-4A)。一方、0.7 kb以上の断片には多型が認められ、合計27本の多型を示す断片が検出された (Fig. 2-4A)。 *Msp*Iを用いた場合には、各菌株で10本～12本のDNA断片が検出され、菌株間で多型を示す合計33本のDNA断片が検出された (Fig. 2-4B)。毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の菌株間では0.7 kb以上の少数の切断断片に多型が認められたが、ほとんどのDNA断片は共通していた (Fig. 2-4B)。一方、それ以外の種との比較では、より多くの切断断片に多型が観察された (Fig. 2-4B)。 *Hae*IIIと*Msp*IのRFLPパターンを組み合わせると解析したところ、供試菌株からは31種の多型が検出され、これらをR1～R31型と命名した (Table 2-1および2-3)。宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*菌株は23種のrDNA型 (R1～R23) に類別されたが、そのうち7種 (R1、R2、R3、R6、R8、R12およびR16)

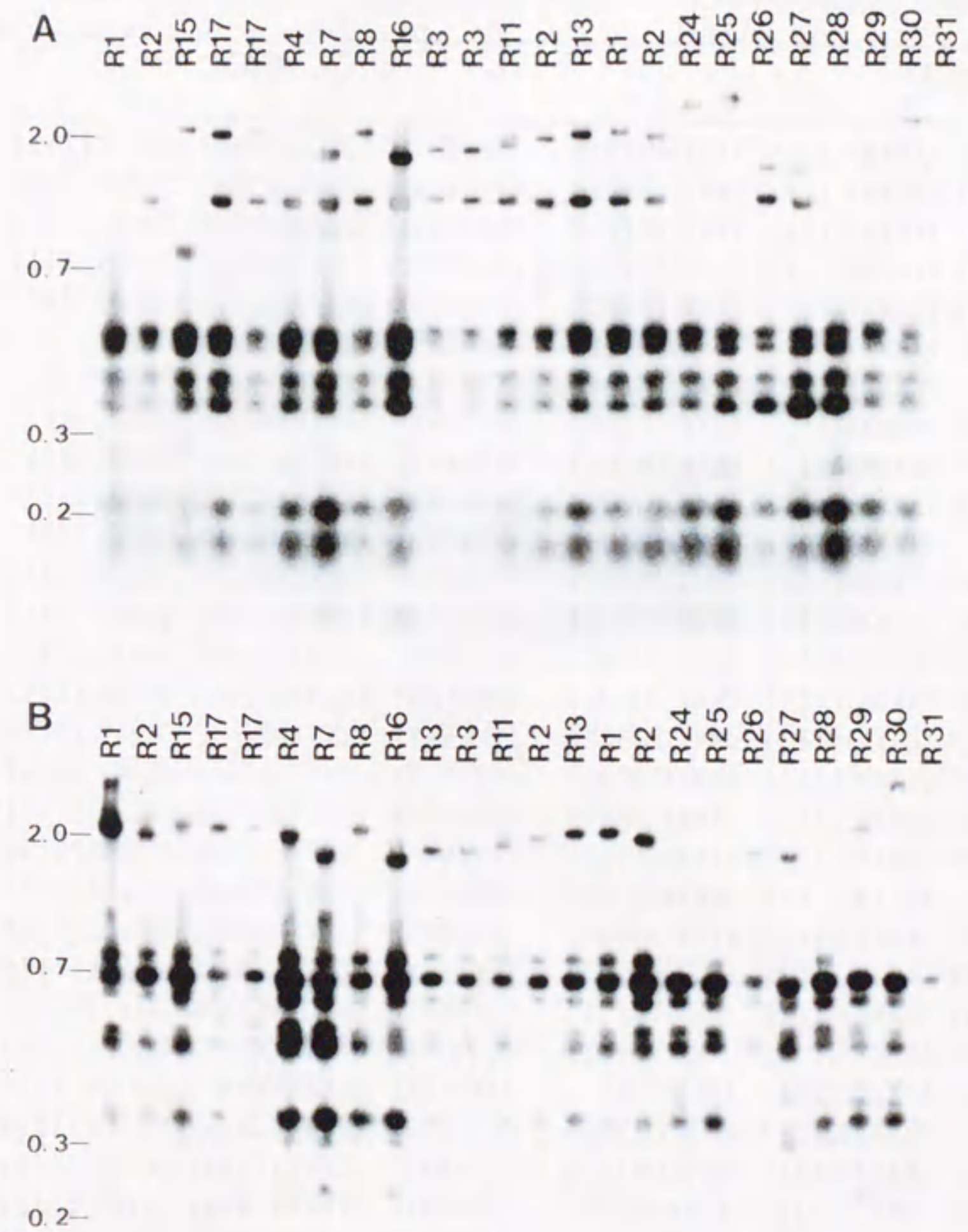


Fig. 2-4. RFLPs of representative strains of rDNA types in *Alternaria* species. Total DNA was cleaved with *Hae*III (A) or *Msp*I (B) and fractionated in a 3.5% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled Alt1 DNA. The lane designations correspond to the rDNA types in Tables 2-1, 2-3 and 2-4. As an example, the hybridization patterns of 19 of 31 types are shown. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments are indicated on the left.

Table 2-3. Data set showing presence and absence of restriction fragments at 60 positions hybridizing to a nuclear rDNA clone of *A. kikuchiana*

RFLP type	Presence or absence ¹⁾ of restriction fragments as determined by restriction enzyme							
	<i>Hae</i> III				<i>Msp</i> I			
R1	1111110100	0000000000	1000000	1101010000	1111100000	0000000000	100	
R2	1111110100	0000100000	0000000	1101010000	1111100000	0000010000	000	
R3	1111110100	0100000000	0000000	1101010000	1111100000	0100000000	000	
R4	1111110100	0000001000	0100000	1101010000	1111100000	0000000100	000	
R5	1111110100	0010010000	0000000	1101010000	1111100000	0010001000	000	
R6	1111110100	0001000000	0000000	1101010000	1111100000	0001000000	000	
R7	1111110101	1000000000	0000000	1101010000	1111100000	1000000000	000	
R8	1111110100	0000000001	0000000	1101010000	1111100000	0000000001	000	
R9	1111110100	1000000000	0000000	1101010000	1111100000	1000000000	000	
R10	1111110100	0100000000	0000000	1101010000	1111100000	0100010000	000	
R11	1111110100	0100100000	0000000	1101010000	1111100000	0100010000	000	
R12	1111110100	0010000000	0000000	1101010000	1111100000	0010000000	000	
R13	1111110100	0000000100	0000000	1101010000	1111100000	0000000001	000	
R14	1111110100	0000000001	0010000	1101010000	1111100000	0000000001	010	
R15	1111110000	0000000000	0010000	1101010000	1111100000	0000000000	001	
R16	1111110100	1000000000	0000000	1101010000	1111100010	0000000000	000	
R17	1111110100	0000000001	0000000	1101010000	1111100000	0000000010	000	
R18	1111111000	0000001000	0000000	1101010000	1111100000	0000000100	000	
R19	1111110100	0000100000	0000000	1101010000	1111100000	0001000000	000	
R20	1111110100	0000000000	0010000	1101010000	1111100000	0000000000	001	
R21	1111110100	0000000001	0000000	1101010000	1111100000	0000100000	000	
R22	1111110100	1000000000	0000000	1101010000	1111100000	0000010000	000	
R23	1111110100	0000001000	0000000	1101010000	1111100000	0000000100	000	
R24	1111110000	0000000001	0000100	1101011001	1111000000	0000000000	001	
R25	1111110000	0000000000	0000001	1101011000	1111111000	0000000000	000	
R26	1111110110	0000000000	0000000	1011100010	1111000001	0000000000	000	
R27	1111110110	0000000000	0000000	1101100010	1111000000	1000000000	000	
R28	1111110000	0000000000	0000001	1101010101	1111001000	0000000000	000	
R29	1111110000	0000000000	0001010	1101010101	1111000000	0000000000	001	
R30	1111110000	0000000000	0001000	1101010101	1111010000	0000000000	000	
R31	1111110000	0000000000	0000001	1101010100	1111100100	0000000000	000	

¹⁾ 1, presence; 0, absence.

は、異なる毒素生産菌あるいは非病原性*A. alternata*に共通して分布していた (Table 2-4)。一方、形態的に異なる他種菌は別の8種のrDNA型 (R24~R31)に類別され、これらは種特異的な分布を示した (Table 2-4)。

2. rDNAのRFLP分析に基づく*Alternaria*属菌の系統学的解析

*HaeIII*と*MspI*を用いて検出された31種のrDNA型の全ての組み合わせについて、共通DNA断片の割合を類縁係数として算出し、系統樹を作成した (Fig. 2-5)。なお、本解析は、2種のrDNA型間で検出されたサイズの同じDNA断片の割合が、これらrDNA型間の遺伝的類縁性を反映するという仮定に基づいている。

宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の菌株群で検出されたR1~R23型は互いに高い遺伝的類縁性 (87%以上)を示し、系統樹上で他種のR24~R31型とは明確に分岐した単一のクラスターを形成した (Fig. 2-5)。一方、各毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の菌株はその単一クラスター中に任意に分布しており、生産毒素とrDNA型との間に全く相関が認められなかった。なお、先の*XbaI*によるRFLP分析でナシ黒斑病菌からのみ検出されたB1型菌株が、本解析ではR5とR10型に類別された。これらrDNA型は、系統樹上で非病原性*A. alternata*、タバコ赤星病菌およびリンゴ斑点落葉病菌から検出されたR12型およびタバコ赤星病菌で検出されたR11型とそれぞれクラスターを形成し、ナシ黒斑病菌に特異的な多型ではないことが示唆された (Fig. 2-5)。以上の結果は、宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*から検出されたrDNA多型が種内変異として位置付けられること、すなわち、毒素生産菌と非病原性*A. alternata*が同一種であることを強く示唆した。また、供試したその他の種では、*A. bataticola*と*A. sesami*のrDNA型間で84%、また、*A. dauci*、*A. porri*および*A. solani*のrDNA型間で86%以上という高い類似度が算出され、両グループがそれぞれ単一のクラスターを形成した (Fig. 2-5)。

Table 2-4. Distribution of rDNA variation in *Alternaria* species measured by RFLP analysis using *Hae*III and *Msp*I

Species	Number of strains ¹⁾ with rDNA type ²⁾																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31						
<i>A. kikuchiana</i>	2	2	1	1	1	1	1	3	1	2																											
<i>A. mali</i>																																					
<i>A. longipes</i>	2																																				
<i>A. citri</i> ³⁾	1																																				
<i>A. citri</i> ⁴⁾	1																																				
<i>A. fragaria</i>																																					
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>																																					
<i>A. alternata</i> ⁵⁾	2	1																																			
<i>A. bataticola</i>	1	3																																			
<i>A. dauci</i>																																					
<i>A. panax</i>																																					
<i>A. porri</i>																																					
<i>A. sesami</i>																																					
<i>A. solani</i>																																					

1) Strains used are shown in Table 2-1.
 2) See Table 2-1, 2-3 and Fig. 2-4.
 3) The causal agent of brown spot of rough lemons.
 4) The causal agent of brown spot of tangerines.
 5) Nonpathogenic.

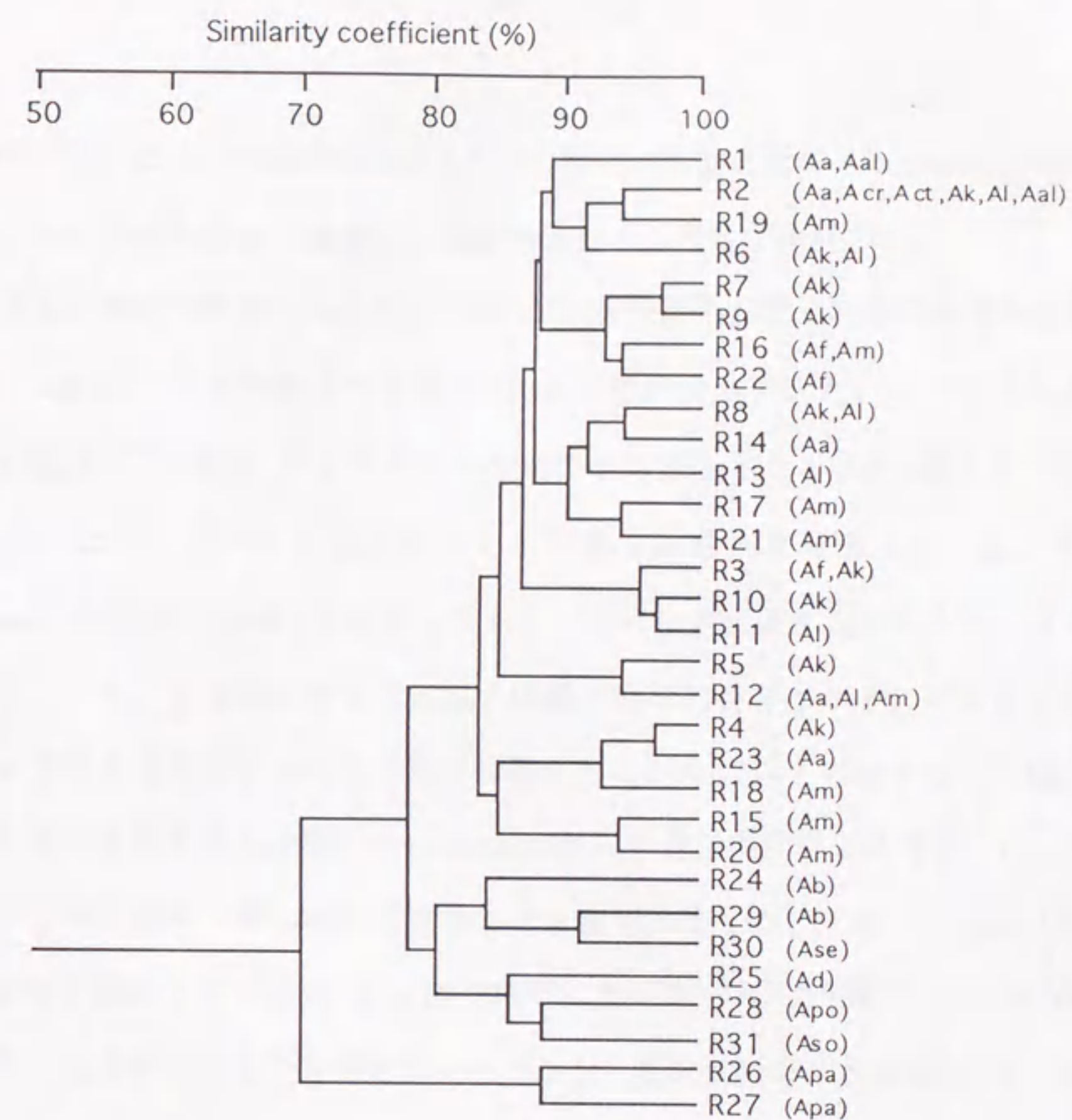


Fig. 2-5. Dendrogram showing the level of genetic relatedness of 31 rDNA types (R1 to R31) detected in *Alternaria* species. The 31 types were identified on the basis of the data set of RFLP profiles shown in Table 2-3. A UPGMA dendrogram was constructed from the similarity coefficients calculated from the RFLP data. *Alternaria* species carrying respective rDNA types are shown in parentheses. Abbreviations: Aa, *A. alternata*; Ak, *A. kikuchiana*; Am, *A. mali*; Al, *A. longipes*; Af, *A. fragaria*; Aal, *A. alternata* f. sp. *lycopersici*; Acr, *A. citri* causing brown spot of rough lemons; Act, *A. citri* causing brown spot of tangerines; Ab, *A. bataticola*; Ase, *A. sesami*; Ad, *A. dauci*; Apo, *A. porri*; Aso, *A. solani*; Apa, *A. panax*.

考 察

本章では、rDNAのRFLP分析により宿主特異的毒素を生産する*Alternaria*属植物病原菌群の遺伝的類縁関係を調査し、病原型仮説の正当性を検証した。

6塩基認識制限酵素*Xba*Iを用いたRFLP分析の結果、宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の菌株群から9種のrDNA多型が検出された。このうち8種は、先に、Adachiら(1993)によりナシ黒斑病菌から検出されたrDNA型と同一のものであった。また、これら多型のほとんどは異なる毒素生産菌さらには非病原性*A. alternata*の菌株群に共通して分布しており、これら病原菌を識別することは不可能であった。一方、形態的に異なる他種では種に特異的な多型がそれぞれ検出され、それらは毒素生産菌群における多型とは異なっていた。以上の結果は、7種の宿主特異的毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*が同じ遺伝的変異を共有することを示しており、これらが同一種の範疇に入ることを強く示唆した。また、4塩基認識制限酵素*Hae*IIIと*Msp*Iを用いたRFLP分析の結果に基づき、平均距離法(Sneath and Sokal, 1973)によるクラスター分析を行ったところ、毒素生産菌群と非病原性*A. alternata*は他種とは明確に異なる単一のクラスターを形成し、これらを同一種*A. alternata*として分類することの妥当性が支持された。

Adachiら(1993)によってナシ黒斑病菌から検出された8種のrDNA多型は、rDNAのプロモーターを含む非転写領域(IGR)の長さ制限酵素認識部位の有無に基づくものであることが明らかにされている。本解析では、宿主特異的毒素生産菌群からこれらとは異なる新たな多型(A6型)を検出した。しかしながら、そのハイブリダイゼーションパターンがAdachiら(1993)によって検出されたA型と類似しており、この多型もIGRの長さの変異によるものであることが示唆された。一般に、糸状菌では同一種内でrDNA多型が観察されることは希であり、そのためrDNAのRFLP分析が種間の類縁性比較などに利用されている(Bruns *et al.*, 1991)。これは、タンパク質

合成に不可欠なリボソームを構成するrRNAの塩基配列の高い保存性とゲノム当たり100~300コピー存在するというrDNAの性質に起因する。したがって、*A. alternata*は他の糸状菌に比べ、遺伝的に多様な個体によって構成された集団であると推定された。Adachiら(1993)は、日本各地から採集したナシ黒斑病菌について反復DNA配列を用いたフィンガープリント分析を行い、各個体群が多様かつ高度な遺伝的変異を含む集団であることを示した。また、Hwangら(1987)は、アイソザイム分析により朝鮮半島の各地から採集したリンゴ斑点落葉病菌の個体群構造を解析し、それらが遺伝的に極めて多様であることを報告した。

*Alternaria*属菌では形態的あるいは生理的諸性質の変異性が高く、特に、*A. alternata*において顕著であることが報告されている(Rotem, 1994)。宿主特異的毒素生産菌のうちタバコ赤星病菌とナシ黒斑病菌については、*A. alternata*との形態的な差異が指摘され、これらを独立種とすることが提唱されている(Simmons, 1992; Yu, 1992; Simmons, 1993; Simmons and Roberts, 1993)。毒素生産菌に見られる形態的な差異とrDNA多型との関係については、今後さらに検討する必要があるが、もし、毒素生産菌の形態に有意な差異があったとしても、それらは種の範疇を越えるものでなく、遺伝的に多様な種、*A. alternata*の種内多型として解釈すべきであると考えた。

同一種内に寄生性分化の見られる病原菌では、病原性形質が多数の遺伝子に支配されている場合には、病原菌の系統関係は宿主の違いに大きく影響を受けるが、少数遺伝子に支配される場合には、宿主の違いよりも地理的隔離や交配型などの影響を受けやすいことが推定されている(Koch *et al.*, 1991)。本解析では、それぞれの宿主特異的毒素生産菌から何ら特徴的な遺伝的傾向が見いだされず、宿主植物と遺伝的類縁関係との間に相関は認められなかった。たとえば、*Xba*Iを用いたRFLP分析で検出されたA4型は、全ての毒素生産菌、さらには、非病原性*A. alternata*からも共通して検出された。したがって、これらA4型の菌株間では宿主植物は異なるものの、同一病原菌で別のrDNA型と同定された菌株よりも、むしろ遺伝的に近いものと考え

られた。また、クラスター分析によっても、これら毒素生産菌と非病原性*A. alternata*が単一のクラスターを形成し、しかもそれぞれの菌株は宿主植物とは無関係に系統樹上で極めて任意に分布した。以上の結果から、宿主特異的毒素生産菌がそれぞれ固有の遺伝的背景を有する系統として分化したのではなく、*A. alternata*からランダムに出現したこと、さらに、宿主特異的毒素生産菌の病原菌としての成立、すなわち寄生性分化が、少数の遺伝子（毒素生産遺伝子）の獲得に起因することが推定された。なお、本菌群の遺伝的分化におよぼす地理的隔離の影響については第5章で述べる。

Neergaard (1945) は、分生胞子の形態とその形成様相から*Alternaria*属菌の種を大きく3グループに類別した。すなわち、ピークの無い、あるいは、短いピークを持つ分生胞子を長く連鎖して形成するLongicatenatae、ピークを持つ分生胞子を3~5個連鎖して形成するBrevicatenatae、さらに、長いピークを持つ分生胞子を単生するNoncatenataeの3グループである。供試した*Alternaria*属菌では、*A. alternata*と宿主特異的毒素生産菌がLongicatenataeに、*A. panax*がBrevicatenataeに、他の5種がNoncatenataeにそれぞれ含まれる。

4塩基認識制限酵素のRFLPに基づくクラスター分析によって、供試した*Alternaria*属菌の系統関係が、Neergaard (1945) のグループ分けとよく一致することが明らかとなった。すなわち、宿主特異的毒素生産菌と*A. alternata*を含むLongicatenataeグループ、*A. bataticola*、*A. dauci*、*A. porri*、*A. sesami*および*A. solani*のNoncatenataeグループ、Brevicatenataeに属する*A. panax*が系統樹上でもそれぞれ明確に分岐した。また、Noncatenataeに含まれる*A. bataticola*と*A. sesami*の間、さらには、*A. dauci*、*A. porri*および*A. solani*の間には高い遺伝的類縁性が推定された。これらグループ内では、種間で分生胞子サイズの幅が重複し、種が形態的にも識別できない場合がある (Rotem, 1994)。以上の結果から、宿主植物の違いなども加味して複雑化した*Alternaria*属菌の種分類は、分子系統学的解析によってより単純に整理される可能性が示された。

第3章 rDNA ITS領域の塩基配列の比較による

*Alternaria*属病原菌の遺伝的類縁関係の解析

rDNAのRFLP分析により、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌が同一の遺伝的変異を共有すること、さらに、RFLP分析に基づくクラスター分析により、これら病原菌が互いに高い遺伝的類縁性を有することが明らかとなった。この結果は、これら病原菌を同一種*A. alternata*の病原性変異系統（病原型、pathotype）として位置付けられることの妥当性を示唆するものであった。対象生物の遺伝的類縁関係をRFLP分析に基づき推定する場合には、制限酵素認識部位がランダムに分布しており、さらに、検出された同一サイズのDNA断片が同じ塩基配列を有するという2つの仮定が前提となる。このため、種内変異系統など本来遺伝的類縁性が高い生物間の比較には有効とされている。また、rDNAは保存性が高い領域であるため、RFLP分析によって比較的正確な種間比較が行えることが報告されている（Moody and Tyler, 1990b; Vilgalys and Gonzales, 1990; Hibbett and Vilgays, 1991; Hopple and Vilgays, 1994）。しかしながら、検出された多型が遺伝的変異の全体像をどこまで反映しているかを正確に判断することは困難である。したがって、RFLPパターンの統計学的解析から推定された遺伝的類縁関係は一定の遺伝的傾向は反映するものの、塩基やアミノ酸配列の比較に基づく解析ほどの信頼性は期待できない。そこで本章では、rDNAのITS領域の塩基配列の比較に基づき*Alternaria*属菌の類縁関係を調査した。

ITS領域は、rDNAの転写単位内の3種のrRNA（18S、5.8Sおよび28S rRNA）コード領域間に存在する非遺伝子領域であり、18Sと5.8S rRNAコード領域間のITS1および5.8Sと28S rRNAコード領域間のITS2とそれぞれ呼ばれている。ITS領域は転写後スプライシングにより除去されるため、スプライシングに適した一定の構造をとる

以外には機能的制約が少なく、比較的変異に富むことが知られている。このため、糸状菌の種間、さらには種内系統の遺伝的類縁関係の解析に最も適した領域の一つとされている。本領域の塩基配列の比較解析によって、これまで分類学的混乱の見られたいくつかの糸状菌について、種の系統解析や同定が進められ、その有効性が立証されている (Nazar *et al.*, 1991; Carbone and Kohn, 1993; Kasuga *et al.*, 1993; Morales *et al.*, 1993; Zambino and Szabo, 1993; Henrion *et al.*, 1994; Moukhamedov *et al.*, 1994; Sreenivasaprasad *et al.*, 1994)。

本章では、*Alternaria*属菌のITS領域の塩基配列をPCR法を用いた直接塩基配列決定法 (Meltzer, 1993) により解析し、それらの比較から宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌の遺伝的類縁関係を調査した。

材料および方法

1. 供試菌株

*A. alternata*の基準株として非病原性の4菌株、宿主特異的毒素を生産する*Alternaria*属菌として、ナシ黒斑病菌 (*A. kikuchiana*) 4菌株、リンゴ斑点落葉病菌 (*A. mali*) 2菌株、タバコ赤星病菌 (*A. longipes*) 2菌株、ラフレモンbrown spot病菌 (*A. citri*) 1菌株、タンゼリンbrown spot病菌 (*A. citri*) 1菌株、イチゴ黒斑病菌 (*A. fragaria*) 1菌株およびトマトアルタナリア茎枯病菌 (*A. alternata* f. sp. *lycopersici*) 2菌株を供試した (Table 3-1)。また、*Alternaria*属の他種菌として、*A. bataticola* 2菌株、*A. dauci* 2菌株、*A. dianthi* 1菌株、*A. panax* 1菌株、*A. porri* 2菌株、*A. sesami* 1菌株および*A. solani* 1菌株を供試した (Table 3-1)。

2. 供試菌からの全DNAの抽出

供試菌からの全DNAの抽出は、第2章「材料および方法」と同様に行った。

Table 3-1. Strains of *Alternaria* species used in this study

Strain	Origin		ITS type ²⁾	
	Location	Source ¹⁾	ITS1	ITS2
<i>A. alternata</i> ³⁾				
IFO4026	Unknown ⁴⁾	IFO	Aal1-1	Aal2-2
ATCC66981	United States	ATCC	Aal1-2	Aal2-1
ATCC66982	United States	ATCC	Aal1-2	Aal2-1
O-94	Tottori	TU	Aal1-2	Aal2-1
<i>A. kikuchiana</i> ⁵⁾				
No. 15A	Tottori	TU	Aal1-2	Aal2-2
T88-4	Tottori	THES	Aal1-2	Aal2-2
T88-54	Tottori	THES	Aal1-2	Aal2-1
91H-81	Aichi	NU	Aal1-2	Aal2-2
<i>A. mali</i> ⁶⁾				
IFO8984	Unknown	IFO	Aal1-2	Aal2-3
FIVcont45	Aomori	FTRS	Aal1-2	Aal2-2
<i>A. longipes</i> ⁷⁾				
AT-204	Aichi	NU	Aal1-2	Aal2-2
IFO6149	Unknown	IFO	Aal1-2	Aal2-1
<i>A. citri</i>				
ATCC38962 ⁸⁾	United States	ATCC	Aal1-2	Aal2-1
ATCC38963 ⁹⁾	United States	ATCC	Aal1-2	Aal2-1
<i>A. fragaria</i> ¹⁰⁾				
O-187	Iwate	TU	Aal1-2	Aal2-2
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ¹¹⁾				
As-27	Unknown	NU	Aal1-2	Aal2-2
No. 91080804	Mie	MARC	Aal1-2	Aal2-1
<i>A. bataticola</i> ¹²⁾				
IFO6187	Unknown	IFO	Aba1-1	Aba2-1
Ab-1	Unknown	NU	ND	ND
<i>A. dauci</i> ¹³⁾				
Ad1	Unknown	NU	ND	Ada2-1
Ad2	Unknown	NU	ND	ND
<i>A. dianthi</i> ¹⁴⁾				
DA-1	Unkown	NU	Adi1-1	Adi2-1
<i>A. panax</i> ¹⁵⁾				

Table 3-1. —Continued

Strain	Origin		ITS type ²⁾	
	Location	Source ¹⁾	ITS1	ITS2
Apx1	Shimane	NU	Apa1-1	Apa2-1
<i>A. porri</i> ¹⁶⁾				
Ap0	Unknown	NU	ND	ND
Ap1	Unknown	NU	Aba1-1	Apo2-1
<i>A. sesami</i> ¹⁷⁾				
Se-1	Unknown	NU	Ase1-1	Ase2-1
<i>A. solani</i> ¹⁸⁾				
IFO7517	Chiba	IFO	Aso1-1	Aso2-1

1) IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, USA; TU, Laboratory of Plant Pathology, Tottori University, Tottori, Japan; THES, Tottori Horticultural Experiment Station, Tottori, Japan; FTRS, Fruit Tree Research Station, Ibaraki, Japan; NU, Plant Pathology Laboratory, Nagoya University, Aichi, Japan; MARC, Mie Agricultural Research Center, Mie, Japan.

2) ITS1 and ITS2 types based on the sequence variation shown in Fig. 3-3 and 3-5, respectively. ND, not determined.

3) Nonpathogenic.

4) Unknown, but in Japan.

5) The Japanese pear pathotype, AK-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *P. serotina* var. *culta*.

6) The apple pathotype, AM-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *M. pumila* var. *domestica*.

7) The tobacco pathotype, AT-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *Nicotiana* species.

8) The rough lemon pathotype, ACRL-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *C. jambhiri*.

9) The tangerine pathotype, ACT- or ACTG-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *C. reticulata*.

10) The strawberry pathotype, AF-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *F. ananassa*.

11) The tomato pathotype, AAL-toxin producer (Nishimura, 1980). Host plant, *L. esculentum*.

12) Host plant, *I. batatas*.

13) Host plant, *D. carota*.

14) Host plant, *Dianthus* species.

15) Host plant, *P. ginseng*.

16) Host plant, *A. cepa*.

17) Host plant, *S. indicum*.

18) Host plant, members of the family Solanaceae.

3. PCR法によるITS領域の増幅

供試菌の全DNAから、rDNAのITS領域をFig. 3-1に示すDNAプライマーを用いてPCR法により増幅した。プライマーITS5とITS2 (White *et al.*, 1990) はITS1領域の、プライマーP1とP3はITS2領域の増幅にそれぞれ用いた。プライマーP1は*A. alternata*の5.8S rRNA遺伝子の3'末端の配列 (Tsuge *et al.*, 1989) と同様であり、プライマーP3は種々の糸状菌で保存されている28S rRNA遺伝子内の配列 (Guadet *et al.*, 1989) に基づき設計した。

PCR反応は以下の条件で行った。

反応液 (100 μ l) 組成:

50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) 、1.5 mM MgCl₂, 0.1% (w/v)

Triton X、各200 μ MのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、各1 μ Mの2種のプライマー、0.1 μ g糸状菌全DNA、2.5U *Taq* DNA polymerase (Promega)

装置:

DNA Thermal Cycler PJ2000 (Perkin Elmer)

反応温度条件:

熱変性反応 (94°C-30秒間)、アニーリング反応 (57°C-30秒間)、

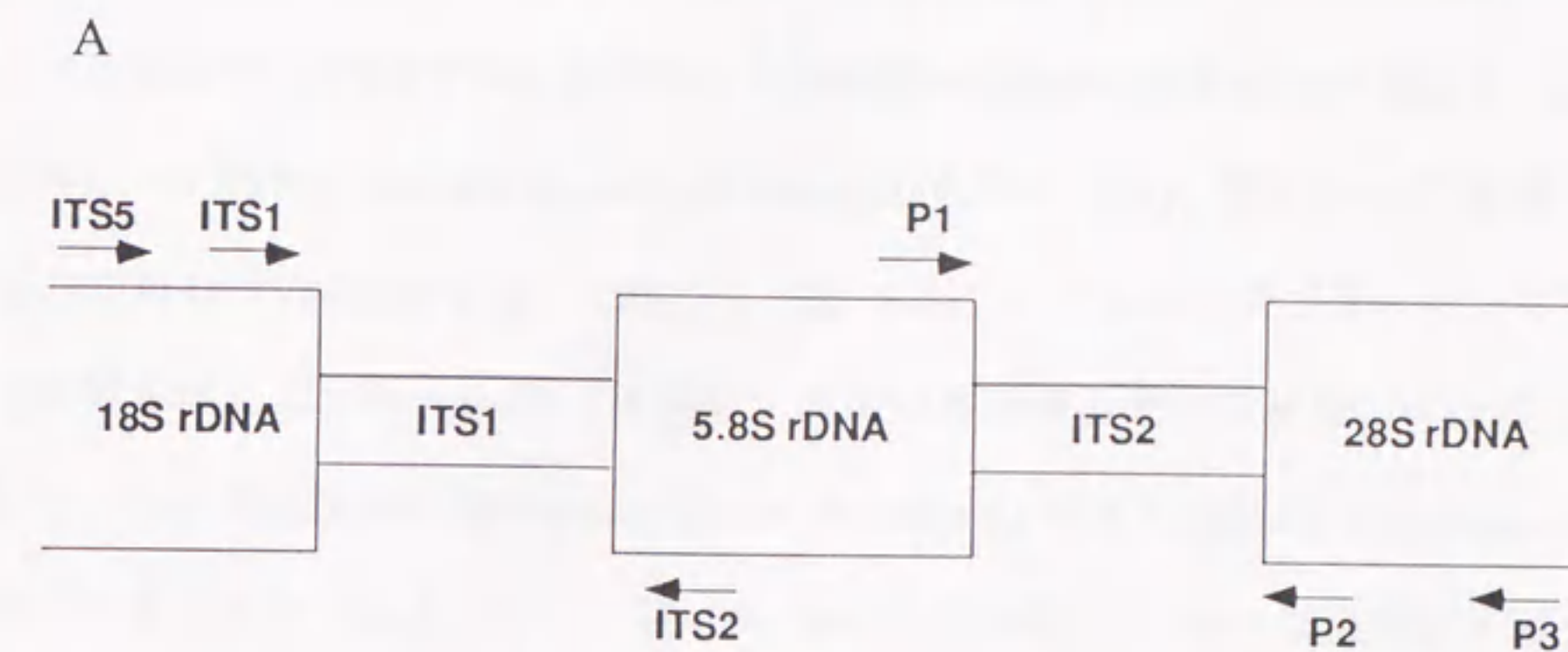
伸長反応 (72°C-30秒間)、30サイクル

なお、鋳型DNAの熱変性のために、増幅反応を行う前に反応液を94°C下で2分間放置し、また、増幅反応後、ITS領域を完全に伸長するために、反応液を72°C下で7分間放置した。

PCR反応産物を10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、ITS領域の伸長・増幅を確認した後、塩基配列の決定に用いた。

4. PCR産物の塩基配列の解析

PCR産物の塩基配列を直接塩基配列決定法 (Meltzer, 1993) により解析した。ITS1



B

ITS1 : 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG^{3'}
 ITS2 : GCTGCGTTCATCGATGC
 ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
 P1 : TGCCTGTTGAGCGTCATTT
 P2 : CCTACCTGATTTGAGGTCAA
 P3 : GCCGCTTCACTCGCCGTTAC

Fig. 3-1. (A) The regions of nuclear rDNA unit amplified and sequenced. Ribosomal RNA coding regions (18S, 5.8S and 28S) and spacer regions (ITS1 and ITS2) were indicated in the open boxes. The arrows denote the positions of primers for PCR amplification and sequencing. (B) Primer sequences for PCR amplification and sequencing of the ITS regions. Origin of the primer sequences: ITS1, ITS2 and ITS5, White *et al.* (1990); P1, the 3' end of the 5.8S rDNA of *A. alternata* (Tsuge *et al.*, 1989); P2, the 5' end of the 26S rDNA of *Saccharomyces carlsbergensis* (Veldman *et al.*, 1981); P3, a part of the conserved sequences in the 28S rDNA of several fungi (Guadet *et al.*, 1989).

領域についてはプライマーITS1とITS2 (White *et al.*, 1990) を、ITS2領域についてはプライマーP1とP2をそれぞれ用い、PCR産物の両鎖の塩基配列を決定した。なお、プライマーP2は、*Saccharomyces carlsbergensis* の26S rRNA 遺伝子の5'末端の20塩基配列である (Veldman *et al.*, 1981)。Fig. 3-1にシーケンスプライマーの位置と塩基配列を示した。Suprec-02 (宝酒造) を用いて精製したPCR産物 (40 ng) を鋳型として、*Taq* DyeDeoxi Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、デオキシターミネーション法 (Sanger *et al.*, 1977) により塩基配列を決定した。PCR反応には、DNA Thermal Cycler PJ2000 (Perkin Elmer)を用い、熱変性反応(94°C-30秒間)、アニーリング反応 (50°C-15秒間)、伸長反応 (60°C-4分間) を25サイクル行った。反応産物をQuick Spin Columns Sephadex G50 Fine (Boehringer Mannheim) を用いて回収し、回収液に1/10容量の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.5) と3倍容量の95%エタノールを混合し、-80°C下で一晩静置した。遠心分離 (15,000 X g、10分間) により反応産物を沈殿として回収し、減圧乾燥後、3 μ lの50mM EDTA - ホルムアミド混合液 (1:5, v/v) に溶解した。反応産物の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動と塩基配列の決定には、DNAシーケンサー・DNAシーケンス自動解析装置ABI 373-A (Applied Biosystem) を用いた。

5. 塩基配列データの解析

A. *alternata*のITS領域の塩基配列に対して相同性を有する配列をEMBLとGenBankのデータベースから検索したところ、アブラナ科植物根腐病菌 (*Leptosphaeria maculans*) WA74-4菌株のITS領域 (Morales *et al.*, 1993) が最も高い相同性を有することが明らかとなった。そこで、各供試菌のITS1とITS2領域の塩基配列を、WA74-4菌株のITS領域の塩基配列に対して最大の相同性を有するように整列した。塩基配列の整列には、Waterman (1986) のアルゴリズムに基づくMULTIPLE ALIGNMENTプロ

グラムを用いた。整列させたITS1およびITS2領域の塩基配列から、Jukes and Cantor (1969) のone-parameter modelを用いて、それぞれ進化距離 (D) を算出し、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。系統樹の信頼度を1,000回反復のブーツストラップ法 (Felsenstein, 1985) により求めた。また、整列させたITS1とITS2領域の塩基配列から、塩基置換が等価かつ方向性がなく起こると仮定し、Blanch-and-Boundアルゴリズム (Hendy and Penny, 1982) を用いた節約法により系統樹を作成した。さらに、得られた等価の最大節約系統樹から厳密合意法 (Sokal and Rohlf, 1981) により合意樹を作成し、すべての系統樹に共通して検出された単系統群の検索を行った。なお、進化距離 (D) の算出、近隣結合法による系統樹の作成、ブーツストラップ法による信頼度の算出にはPHYLIP v 3.4 (Felsenstein, 1991) の計算プログラムを用いた。また、節約法による系統樹と厳密合意樹の作成には、Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) v 3.1.1 (Swofford, 1993) の計算プログラムを用いた。

実験結果

1. *Alternaria*属菌におけるITS領域の塩基配列の変異

1) ITS1領域の塩基配列の変異

供試菌の全DNAを鋳型として、プライマーITS5とITS2を用いたPCR法によりITS1領域を増幅した。PCR産物を10%ポリアクリルアミドゲルにより分析したところ、供試菌株間でその長さに違いが認められた。分析結果の一部をFig. 3-2に示した。PCR産物の両鎖の塩基配列をプライマーITS1とITS2を用いて決定し、両鎖の配列が完全に相補的であることを確認した。供試した23菌株から、165~171塩基の7種のITS1配列が検出された (Fig. 3-3)。 *A. alternata* と宿主特異的毒素生産菌から検出された

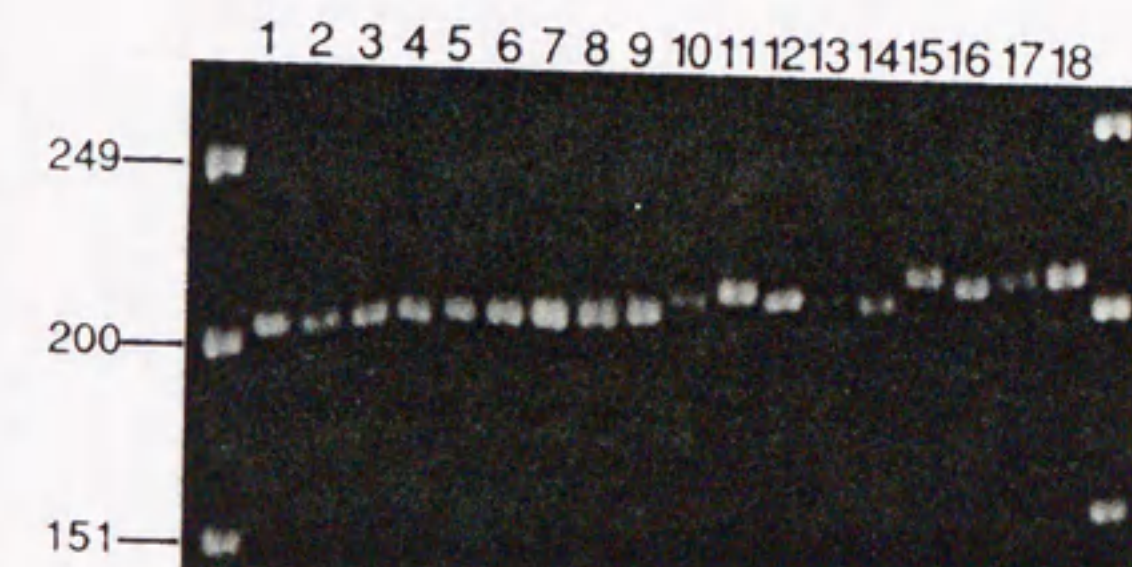


Fig. 3-2. PCR amplification of the ITS1 region of nuclear rDNA in *Alternaria* species. The PCR products were electrophoresed in 10% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. The sizes of marker DNA fragments (*Hinf*I-digested Φ X174 DNA) are given in bases. *Alternaria* strains: lane1, IFO4026; 2, O-94; 3, IFO8984; 4, FIVcont45; 5, T88-54; 6, 15A; 7, O-187; 8, AT-204; 9, As-27; 10, Ab-1; 11, Ad-1; 12, Ad-2; 13, DA-1; 14, Apx1; 15, Ap0; 16, Ap1; 17, Sc-1; 18, IFO7517 (Table 3-1).

2種の配列をAal1-1とAal1-2、*A. dianthi*の配列をAdi1-1、*A. panax*の配列をApa1-1、*A. bataticola*と*A. porri*で検出された共通の配列をAba1-1、*A. sesami*の配列をAse1-1、*A. solani*の配列をAso1-1とそれぞれ命名した (Fig. 3-3)。これらの塩基配列を*L. maculans* WA74-4菌株のITS1配列 (Morales *et al.*, 1993) に対して最大の相同性を有するように整列し、塩基配列を比較した (Fig. 3-3)。なお、*A. dauci* Ad1菌株では、数個の塩基が読み取れなかったため、解析から除外した。7種の宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の16菌株は、同一の塩基配列Aal1-2を有していた (Table 3-1およびFig. 3-3)。一方、非病原性*A. alternata* IFO4026菌株からは、Aal1-2と3塩基異なったAal1-1が検出されたが、両者は98%と高い相同性を示した (Table 3-1およびFig. 3-3)。他種の*Alternaria*属菌6菌株からは、5種の異なる塩基配列が検出されたが、*A. bataticola*と*A. porri*菌株は同一の配列Aba1-1を有していた (Table 3-1およびFig. 3-3)。これら5種の配列とAal1-1およびAal1-2配列との相同性は74~85%であった。

2) ITS2領域の塩基配列の変異

供試菌の全DNAを鋳型として、プライマーP1とP3を用いたPCR法によりITS2領域を増幅した。PCR産物を10%ポリアクリルアミドゲルにより分析したところ、供試菌株間でその長さに違いが認められた。分析結果の一部をFig. 3-4に示した。PCR産物の塩基配列をプライマーP1とP2を用いて決定し、両鎖の配列が完全に相補的であることを確認した。供試した24菌株から、158~166塩基の10種のITS2配列が検出された (Fig. 3-5)。 *A. alternata*と宿主特異的毒素生産菌から検出された3種の配列をAal2-1~Aal2-3、*A. dianthi*の配列をAdi2-1、*A. panax*の配列をApa2-1、*A. dauci*の配列をAda2-1、*A. bataticola*の配列をAba2-1、*A. porri*の配列をApo2-1、*A. sesami*の配列をAse2-1、*A. solani*の配列をAso2-1とそれぞれ命名した (Fig. 3-5)。これらの塩基配列を*L. maculans* WA74-4菌株のITS2配列 (Morales *et al.*, 1993) に対して最大の相同

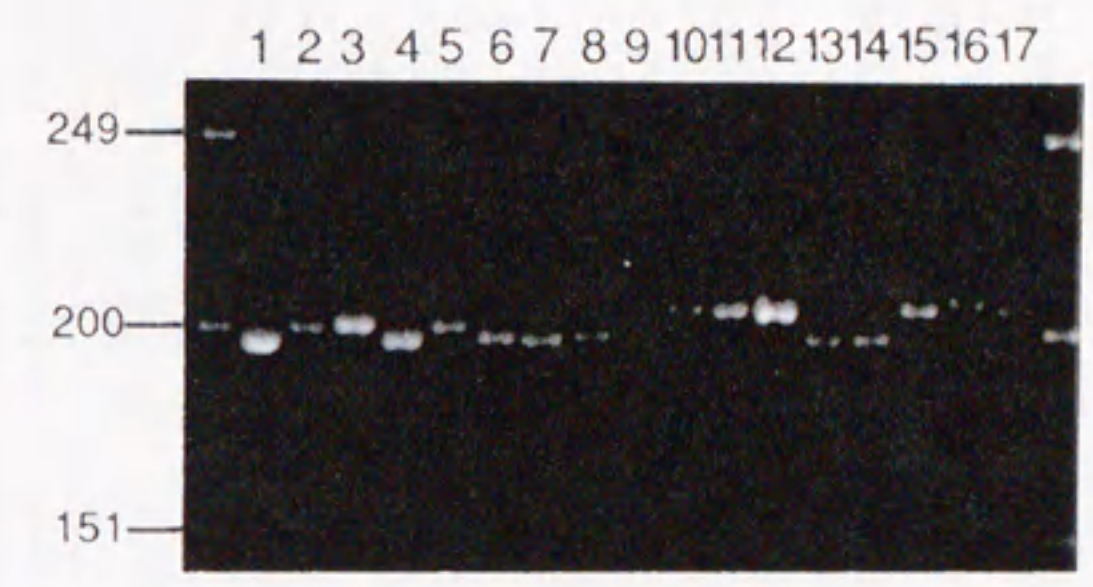


Fig. 3-4. PCR amplification of the ITS2 region of nuclear rDNA in *Alternaria* species. The PCR products were electrophoresed in 10% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. The sizes of marker DNA fragments (*Hinf*I-digested Φ X174 DNA) are given in bases. *Alternaria* strains: lane1, IFO4026; 2, O-94; 3, IFO8984; 4, FIVcont45; 5, T88-54; 6, 15A; 7, O-187; 8, AT-204; 9, As-27; 10, Ab-1; 11, Ad-1; 12, Ad-2; 13, DA-1; 14, Apx1; 15, Apl; 16, Se-1; 17, IFO7517 (Table 3-1).

性を有するように整列し、塩基配列を比較した (Fig. 3-5)。7種の宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*菌株からは3種の配列が検出されたが、それらの違いは1~2カ所の塩基の挿入あるいは欠失によるものであり、互いに高い相同性を示した (Table 3-1およびFig. 3-5)。また、Aal2-3はリンゴ斑点落葉病菌IFO8984菌株のみから検出されたが、他の2つの配列は異なる毒素生産菌や非病原性*A. alternata*菌株に共通して分布していた (Table 3-1)。一方、供試した他種の*Alternaria*属菌7菌株からは、それぞれ異なる7種のITS2配列が検出された (Table 3-1およびFig. 3-5)。*A. bataticola*と*A. porri*は同一のITS1配列を有していたが、ITS2配列は両者で2塩基異なっていた (Table 3-1およびFig. 3-5)。また、これら7種の塩基配列とAal2-1、Aal2-2およびAal2-3との配列の相同性は76~83%であった。

2. ITS領域の塩基配列に基づく*Alternaria*属菌の系統解析

供試菌から得られたITS1とITS2の各配列を*L. maculans* WA74-4菌株のITS領域の塩基配列 (Morales *et al.*, 1993) に対してそれぞれ最大の相同性を示すように整列し、配列間の進化距離 (D) (Jukes and Cantor, 1969) を算出した。得られた進化距離 (D) から近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成し、*Alternaria*属菌の系統関係を推定した。供試した*Alternaria*属菌は、ITS1とITS2配列のどちらの系統樹上でも、類似した分岐パターンを示した (Fig. 3-6)。宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の配列はお互いに密接に結合した単一のクラスターを形成したが、他種とは明確に分岐した (Fig. 3-6)。毒素生産菌と非病原性*A. alternata*のクラスターの単系統性をブーツストラップ法 (Felsenstein, 1985) により検定したところ、ITS1とITS2の系統樹上でそれぞれ82.6%、95.6%と高い信頼度が得られた (Fig. 3-6)。一方、*A. dianthi*、*A. panax*、*A. dauci*、*A. bataticola*、*A. porri*、*A. seasmii*および*A. solani*は系統樹上で毒素生産菌とは明確に分岐した別のクラスターを形成した (Fig. 3-6)。こ

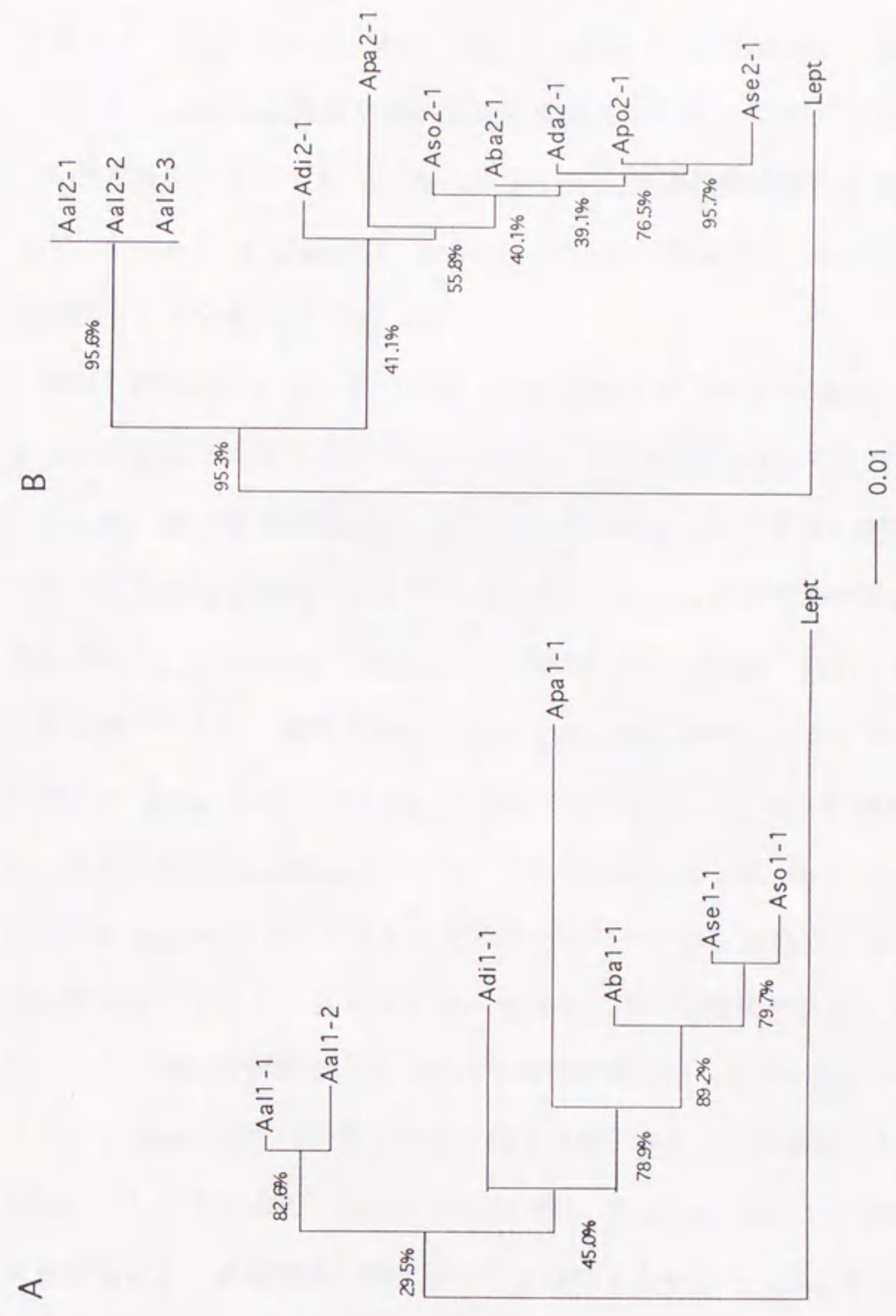


Fig. 3-6. Neighbor-joining trees on distances derived from sequences of the ITS1 (A) and ITS2 (B) regions of *Alternaria* species. Distances were determined by the Jukes-Cantor one parameter method (Jukes and Cantor, 1969), using aligned sequences shown in Fig. 3-3 and 3-5. The bar indicates a distance of 0.01 (one base change per 100 nucleotide positions). The percentages are the frequencies with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replications. Both trees are unrooted.

これらの分岐パターンはITS1とITS2で異なっていたが、どちらの系統樹においても、*A. bataticola*、*A. porri*、*A. sesami*および*A. solani*は密接に結合した単一のクラスターに分布した (Fig. 3-6)。また、ITS2のみ解析した*A. dauci*もこのクラスターに分布し、これら *Alternaria* 属菌が高い遺伝的類縁性を有することが示唆された。一方、どちらの系統樹においても、*A. dianthi*と*A. panax*は他の供試菌と単系統性を示さなかったが、*A. dauci*、*A. bataticola*、*A. porri*、*A. sesami*および*A. solani*を含むクラスターの姉妹群として分布した (Fig. 3-6)。

ITS1とITS2配列に基づき、Blanch-and-Boundアルゴリズム (Hendy and Penny, 1982) を用いた節約法により系統樹を作成した。ITS1配列については53の置換数を必要とする3種の最大節約系統樹が、また、ITS2配列については30の置換数を必要とする13種の最大節約系統樹がそれぞれ得られた。これらの最大節約系統樹のうち代表的なものをFig. 3-7AとFig. 3-8Aにそれぞれ示した。さらに、ITS1とITS2配列の最大節約系統樹について、厳密合意法 (Sokal and Rohlf, 1981) によりそれぞれの合意樹を作成した (Fig. 3-7BおよびFig. 3-8B)。その結果、どちらの厳密合意樹においても、毒素生産菌と*A. alternata*のグループと*A. bataticola*、*A. porri*、*A. sesami*、*A. solani*および*A. dauci*のグループはそれぞれ単一のクラスターを形成した。したがって、最大節約系統樹上でも、これらのグループがそれぞれ単系統であることが明らかとなった。一方、ITS2の解析から得られた厳密合意樹では、*A. dianthi*と*A. panax*が単系統となり、*A. bataticola*をはじめとする5種を含むグループの姉妹群として分布した (Fig. 3-8B)。しかしながら、ITS1の合意樹では、これら2種はどの供試菌からも独立した分布を示し、系統関係を特定することはできなかった (Fig. 3-7B)。

考 察

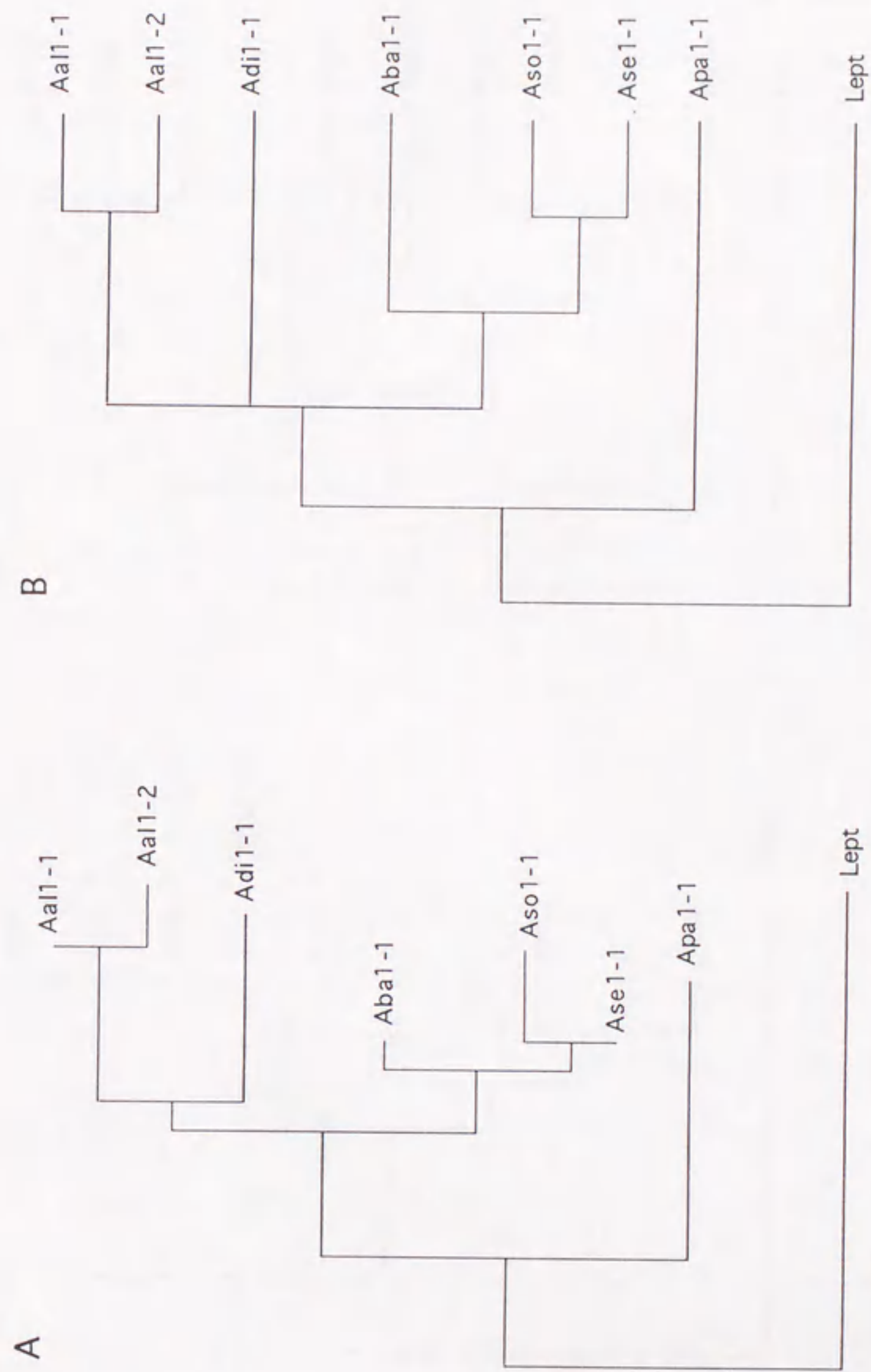


Fig. 3-7. The most parsimonious (A) and the strict consensus (B) trees of the ITS1 sequences of *Alternaria* species. The three equally parsimonious trees were generated from Branch-and-Bound algorithm (Hendy and Penny, 1982), and one of them is shown as an example. The bar indicates one of the total nucleotide changes (53 changes). The strict consensus tree was inferred from the three equally parsimonious trees.

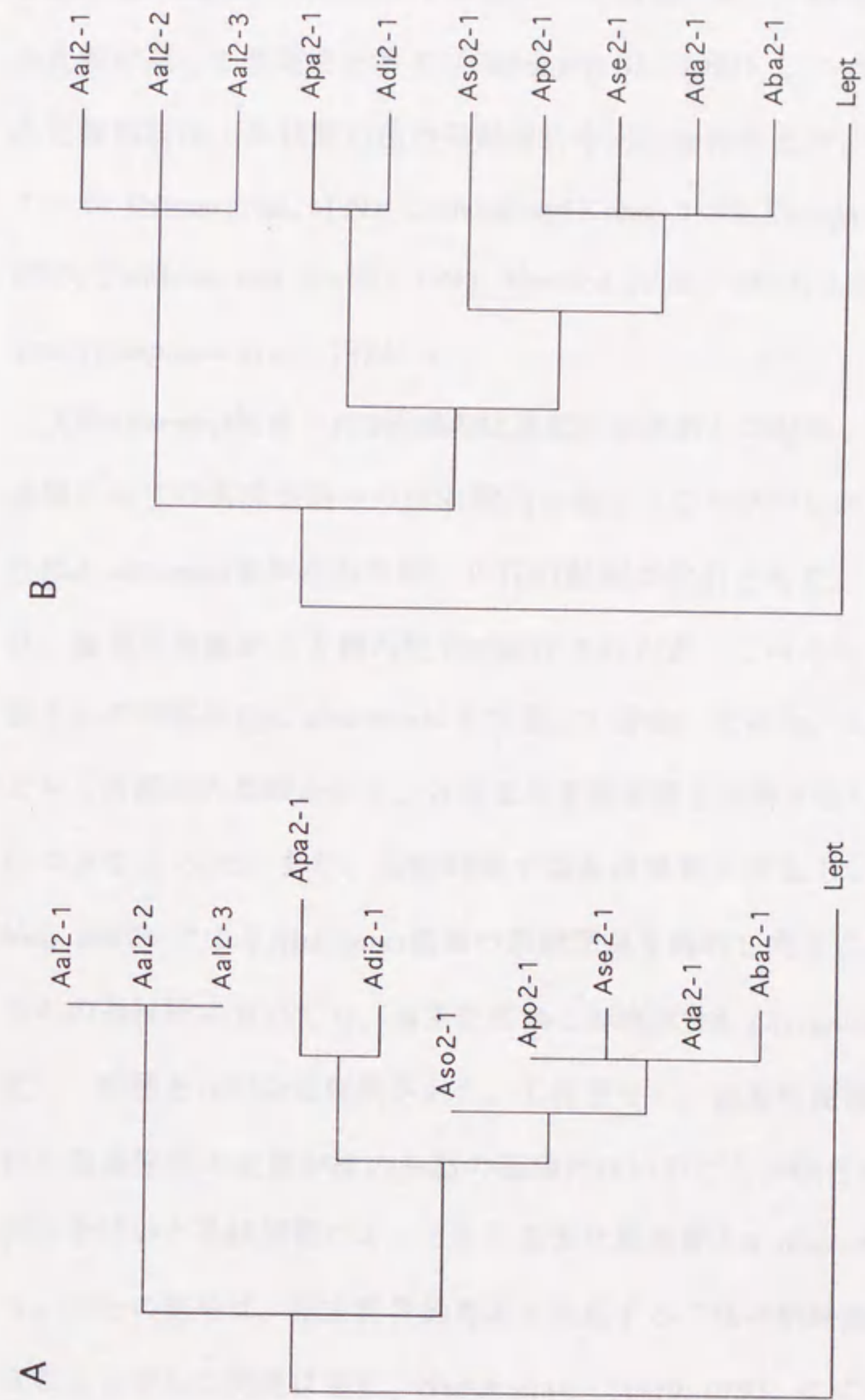


Fig. 3-8. The most parsimonious (A) and the strict consensus (B) trees of the ITS2 sequences of *Alternaria* species. The 13 equally parsimonious trees were generated from Branch-and-Bound algorithm (Hendy and Penny, 1982), and one of them is shown as an example. The bar indicates one of the total nucleotide changes (30 changes). The strict consensus tree was inferred from the 13 equally parsimonious trees.

本章では、rDNAのITS領域の塩基配列の比較解析を行い、宿主特異的毒素を生産する*Alternaria*属菌の遺伝的類縁関係について検討した。ITS領域は、18S、5.8S および28S rRNA遺伝子間に存在する非コード領域であり、機能的制約が少ないため、種間比較に適した変異性を示す (Furlong *et al.*, 1983)。このため、本領域の塩基配列の比較解析は、糸状菌の種の系統解析や同定を行う上で、有効な方法の一つとされている (Nazar *et al.*, 1991; Carbone and Kohn, 1993; Kasuga *et al.*, 1993; Morales *et al.*, 1993; Zambino and Szabo, 1993; Henrion *et al.*, 1994; Moukhamedov *et al.*, 1994; Sreenivasaprasad *et al.*, 1994)。

供試*Alternaria*属菌のITS領域の塩基配列を解析した結果、7種の宿主特異的毒素生産菌の全ての菌株が同一のITS1配列を有することが明らかとなった。また、非病原性の*A. alternata*菌株からも同一のITS1配列が検出された。一方、ITS2領域については、毒素生産菌から3種の配列が検出されたが、このうち2種は、異なる毒素生産菌さらに非病原性*A. alternata*にも共通して分布していた。したがって、ITS1とITS2のどちらの配列の比較からも、各毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*を識別することはできなかった。また、各配列間で塩基置換数を算出し、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) により*Alternaria*属菌の系統関係を解析したところ、ITS1とITS2配列のどちらの系統樹においても、毒素生産菌と非病原性*A. alternata*は単一のクラスターを形成し、他種とは明確に区別された。したがって、毒素生産菌と*A. alternata*から検出された塩基配列の変異が種内多型の範疇にはいることが明らかとなった。さらに、節約法を用いた系統解析によっても、毒素生産菌群と*A. alternata*の単系統性が支持された。以上の結果は、宿主特異的毒素を生産する7種の病原菌が同一種*A. alternata*であることをさらに明確に示し、Nishimuraら (1979; 1980) により提唱された病原型仮説の正当性を支持するものであった。

ITS領域の塩基配列の解析からも、各毒素生産菌や非病原性*A. alternata*にそれぞれ特異的な遺伝的傾向は見いだされなかった。ナシ黒斑病菌とタバコ赤星病菌では、

*A. alternata*との形態的な差異が報告されている (Simmons, 1992; Yu, 1992; Simmons, 1993; Simmons and Roberts, 1993)。しかしながら、供試した両病原菌の菌株群、他の毒素生産菌さらに非病原性*A. alternata*の菌株群から同一の配列が検出され、両病原菌に特徴的な遺伝的傾向は全く検出されなかった。したがって、それぞれの毒素生産病原菌が固有の遺伝的背景を有する系統として分化したのではなく、*A. alternata*からランダムに出現したことがさらに強く示唆された。

形態が明確に異なる糸状菌が、同一のITS領域の塩基配列を有する例が報告されている (Baura *et al.*, 1992; Anderson and Stasovsky, 1992)。Bauraら (1992) は、形態的に明らかに異なる2種の担子菌*Suillus grevillei*と*Gastrospuillus laricinus*のITS領域の塩基配列を解析したところ、両菌が同一の塩基配列を有し、互いに識別できないことを見いだした。Bauraら (1992) は、*G. laricinus*が急速な種分化により*S. grevillei*から成立したこと、すなわち、少数遺伝子の突然変異とその多発現により形態分化と生殖隔離が生じた結果であると推定している。このような機構により宿主特異的毒素生産菌の種分化が起こったと仮定すると、ITS領域の解析では種の識別は不可能である。一方、AndersonとStasovski (1992) は、少数遺伝子の変異に起因して種が分化したとされる糸状菌においても、rDNAのIGR領域の塩基配列の比較では種の識別が可能であることを報告している。第2章のrDNAのRFLP分析では、毒素生産菌群にIGR領域の変異に基づく共通した多型が分布すること、さらにその分布様式からは毒素生産菌群と*A. alternata*を識別できないことを明らかにした。以上の結果を総合的に評価した場合、7種の毒素生産菌は同一種*A. alternata*と位置付けるべきであり、Simmons (1992) あるいはYu (1992) によって観察された形態的な差異は種内変異の範疇にはいるものと考えた。

ITS領域の塩基配列から近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) によって推定した*Alternaria*属菌の系統関係は、Neergaard (1945) による*Alternaria*属菌のグループ分けを支持するものであった。Neergaardによるグループ分けでは、*A. alternata*と宿主特異的

毒素生産菌がLongicatenataeに、*A. dianthi*と*A. panax*がBrevicatenataeに、他の5種はNoncatenataeにそれぞれ含まれる。ITS1とITS2配列に基づき作成したどちらの系統樹においても、Longicatenataeは他の2グループに含まれる種とは明確に分岐した単一のクラスターに分布した。また、どちらの系統樹においても、Noncatenataeに属する種は密接に結合した単系統を形成し、それらの高い遺伝的類縁関係が明らかとなった。Neergaard (1945) は、Noncatenataeに属する種を同一種としてまとめることを提案した。本研究の結果は、この提案を支持するものと考えた。また、Brevicatenataeの2種は単一のクラスターを形成しなかったが、どちらの系統樹においてもNoncatenataeグループの姉妹群として分布した。なお、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) に基づく供試菌の系統関係は、Blanch-and-Boundアルゴリズム (Hendy and Penny, 1982) を用いた節約法による結果とほぼ一致した。*Alternaria*属菌の種の系統関係を正確に特定するためには、本研究で供試した種および菌株数では不十分と思われる。今後、より多くの種と菌株を用いて、ITS領域、IGR領域さらにはrRNAコード領域の塩基配列を比較解析することによって、*Alternaria*属菌の系統進化についてより正確な知見が得られるものと考えた。