

第4章 ミトコンドリアDNAのRFLP分析による

*Alternaria*属病原菌の遺伝的類縁関係の解析

rDNAの比較解析から、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌にはそれぞれrDNA変異系統が分布していること、また、異なる毒素生産菌と非病原性*A. alternata*が同一の変異を共有していることが明らかとなった。さらに、4塩基認識制限酵素によるRFLPやITS領域の塩基配列に基づく系統解析から、7種の毒素生産菌と非病原性*A. alternata*が高い遺伝的類縁性を有することが示された。したがって、これら毒素生産病原菌が、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、少数の遺伝子(毒素生産性遺伝子)の獲得により*A. alternata*からランダムに出現したことが示唆された。しかしながら、rDNAは核ゲノムの一領域にすぎず、本領域の解析から推定した遺伝的類縁関係が偏った遺伝的傾向を反映していることも予想された。また、rDNAは保存性が高いため、同一種内における分化系統や、極めて近縁な種の識別には一般に適さないこと、さらに、rDNA変異が系統分化の以前に生じた場合にも、系統識別が不可能であることが報告されている(Nei, 1987)。そこで、毒素生産病原菌群の病原性分化の遺伝的背景についてさらに解析するために、より変異性の高いDNA領域としてミトコンドリアDNAを選び、そのRFLP分析により*Alternaria*属菌の遺伝的類縁関係を調査した。

真核生物の細胞内小器官ミトコンドリアは、独自のゲノム(ミトコンドリアDNA)を有することが知られている。ミトコンドリアDNAは環状であり、これまで糸状菌から単離されたミトコンドリアDNAのサイズは18 kb~100 kbと種によって大きく異なっている(Taylor, 1986)。一般に、高等動物におけるミトコンドリアDNAの変異は、点突然変異による塩基の置換あるいは塩基の挿入・欠失によるものが多く、生物間で鎖長に大きな差異は認められない(河野, 1990)。しかしながら、核の遺伝

子よりも10倍以上早い進化速度で塩基置換が起こるため、ミトコンドリアDNAは主に種内系統など類縁性の高い生物間における系統解析のマーカーとして利用されている (Vigilant *et al.*, 1991; Echelle and Dowling, 1992; Patton and Smith, 1992)。一方、糸状菌のミトコンドリアDNAでは、広範な塩基配列の挿入や欠失変異によって、同一種内の菌株間でもその長さに差異が検出される場合がある (Taylor, 1986)。このため、近縁種の類縁関係の解析や生態学的研究における種内系統の識別などにそのRFLP分析が利用されている (Kistler *et al.*, 1987; Förster *et al.*, 1989; Moody and Tyler, 1990a; Gordon and Okamoto, 1992; Hodson *et al.*, 1993; Kurdyla *et al.*, 1995)。

本章では、ナシ黒斑病菌15A菌株から単離したミトコンドリアDNAをプローブとして、供試菌におけるミトコンドリアDNA多型を検出した。検出した多型に基づき *Alternaria* 属病原菌の遺伝的類縁関係を解析し、宿主特異的毒素生産菌の病原性分化とその遺伝的背景についてさらに検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

A. alternata 基準株として非病原性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*) 3菌株、リンゴ斑点落葉病菌 (*A. mali*) 3菌株、タバコ赤星病菌 (*A. longipes*) 3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*) 3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 4-1)。また、*Alternaria* 属の他種菌として、*A. bataticola*、*A. dauci*、*A. dianthi*、*A. panax*、*A. porri*、*A. sesami* および *A. solani* の各1菌株を供試した (Table 4-1)。

2. 供試菌からの全DNAの抽出

Table 4-1. Strains of *Alternaria* species used in this study

Strain	Origin		Mt DNA RFLP			Mt DNA type ²⁾
	Location	Source ¹⁾	BgIII	HindIII	XbaI	
<i>A. alternata</i> ³⁾						
IFO4026	Unknown ⁴⁾	IFO	Bg1	Hi4	Xb3	M6
ATCC66981	United States	ATCC	Bg2	Hi1	Xb1	M1
ATCC66982	United States	ATCC	Bg2	Hi1	Xb1	M1
O-94	Tottori	TU	Bg3	Hi1	Xb1	M3
<i>A. kikuchiana</i> ⁵⁾						
No. 15A	Tottori	TU	Bg6	Hi7	Xb4	M9
IFO6444	Unknown	IFO	Bg2	Hi1	Xb1	M1
T88-4	Tottori	THES	Bg6	Hi9	Xb4	M11
<i>A. mali</i> ⁶⁾						
O-159	Unknown	TU	Bg6	Hi7	Xb5	M8
IFO8984	Unknown	IFO	Bg2	Hi1	Xb1	M1
FIVcont45	Aomori	FTRS	Bg1	Hi5	Xb3	M7
<i>A. longipes</i> ⁷⁾						
AT-204	Aichi	NU	Bg5	Hi6	Xb2	M5
IFO6149	Unknown	IFO	Bg3	Hi1	Xb1	M3
IFO6381	Unknown	IFO	Bg4	Hi2	Xb1	M4
<i>A. citri</i>						
ATCC38962 ⁸⁾	United States	ATCC	Bg2	Hi1	Xb1	M1
ATCC38963 ⁹⁾	United States	ATCC	Bg2	Hi3	Xb1	M2
<i>A. fragaria</i> ¹⁰⁾						
O-187	Iwate	TU	Bg6	Hi7	Xb5	M8
M-30	Tottori	TU	Bg1	Hi4	Xb3	M7
T-32	Tottori	TU	Bg6	Hi8	Xb6	M10
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ¹¹⁾						
AL-4	Mie	NU	Bg2	Hi1	Xb1	M1
No. 91080804	Mie	MARC	Bg3	Hi1	Xb1	M3
<i>A. bataticola</i> ¹²⁾						
IFO6187	Unknown	IFO	Bg7	Hi10	Xb7	M12
<i>A. dauci</i> ¹³⁾						
Ad1	Unknown	NU	Bg8	Hi11	Xb8	M13
<i>A. dianthi</i> ¹⁴⁾						
DA-1	Unknown	NU	Bg9	Hi12	Xb9	M14

Table 4-1. —Continued

Strain	Origin		Mt DNA RFLP			Mt DNA type ²⁾
	Location	Source ¹⁾	<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Xba</i> I	
<i>A. panax</i> ¹⁵⁾ Apx1	Shimane	NU	Bg10	Hi13	Xb10	M15
<i>A. porri</i> ¹⁶⁾ Ap1	Unknown	NU	Bg11	Hi14	Xb11	M16
<i>A. sesami</i> ¹⁷⁾ Se-1	Unknown	NU	Bg12	Hi15	Xb12	M17
<i>A. solani</i> ¹⁸⁾ IFO7517	Chiba	IFO	Bg13	Hi16	Xb13	M18

- 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) Mitochondrial DNA types were identified on the basis of the data set of RFLP patterns produced by *Bgl*III, *Hind*III and *Xba*I digestions.
- 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.

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。

3. 核DNAとミトコンドリアDNAの分画

供試菌の全DNAから、GarberとYoder (1983)の方法にしたがってミトコンドリアDNAを単離した。ナシ黒斑病菌15A菌株の菌体約20 g (新鮮重) から全DNAを抽出し、5 mlのTE緩衝溶液 (pH 8.0) に溶解した。この溶液に、塩化セシウム (最終濃度1.1 g/ml) およびビスベンズイミド (最終濃度120 μ g/ml) を溶解し、遠心分離 (177,000 X g、48時間) を行った。遠心分離後、UV照射下で核DNAとミトコンドリアDNA画分を回収し、それぞれについて同様な条件下で再度密度勾配遠心 (177,000 X g、48時間) を行った。回収したDNA画分に対して塩化セシウム-TE緩衝液 (pH 8.0) 飽和イソプロパノールによる抽出を3回繰り返し、ビスベンズイミドを除去した。回収液に1/10容量の3M 酢酸ナトリウムと2.5倍容量のエタノールを混合し、-80°C下で18時間静置した後、遠心分離 (15,000 X g、20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、TE緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、それぞれ核DNAとミトコンドリアDNAとして実験に供試した。

4. ハイブリダイゼーション

供試菌の全DNAを制限酵素HindIII、PstIまたはXbaI (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) 電気泳動により分画した (Sambrook *et al.*, 1989)。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) ナイロン膜に転写した。プロットした全DNAに対して、³²P標識ミトコンドリアDNAをプローブとしたハイブリダイゼーションを行い、ミトコンドリアDNAを検出した。プローブの作製とハイブリダイゼーションは、第2章「材料および方法」と同様に行った。

5. RFLPデータの統計学的処理

RFLP分析により検出された全てのミトコンドリアDNA断片について、同一サイズの断片を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、第2章「材料および方法」と同様に菌株間の類縁係数(F)を算出し(Nei and Li, 1979)、平均距離法(Sneath and Sokal, 1973)を用いて系統樹を作成した。

実験結果

1. *Alternaria*属菌におけるミトコンドリアDNAの変異

塩化セシウム-ビスベンズイミド密度勾配遠心によって分離したミトコンドリアDNAの純度を確認するために、ナシ黒斑病菌15A菌株の全DNAと密度勾配遠心によって分離した核DNAとのハイブリダイゼーションを行った。*Bgl*III、*Hind*IIIまたは*Xba*Iによりそれぞれ切断したDNAに対して、上記のミトコンドリアDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、全DNAからはDNA断片が検出されたが、核DNAからは全く検出されなかった(Fig. 4-1)。したがって、このミトコンドリアDNAプローブを用いて、全DNAからミトコンドリアDNAのみを特異的に検出できることが明らかとなった。なお、本菌株のミトコンドリアDNAサイズは約29 kbであった。

7種の宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の20菌株から、*Bgl*IIIと*Xba*Iにより6種の、*Hind*IIIにより9種のミトコンドリアDNA多型がそれぞれ検出された(Fig. 4-2, 4-3および4-4)。これら多型を、*Bgl*IIIの*Bg*1~*Bg*6、*Xba*Iの*Xb*1~*Xb*6、*Hind*IIIの*Hi*1~*Hi*9とそれぞれ命名した(Fig. 4-2, 4-3, 4-4およびTable 4-1)。これら多型は、多くの切断断片が共通しており、それらの高い遺伝的類縁性が示唆された。一方、供試した他種の菌株からは、3種の制限酵素それぞれについて7種の多型が検

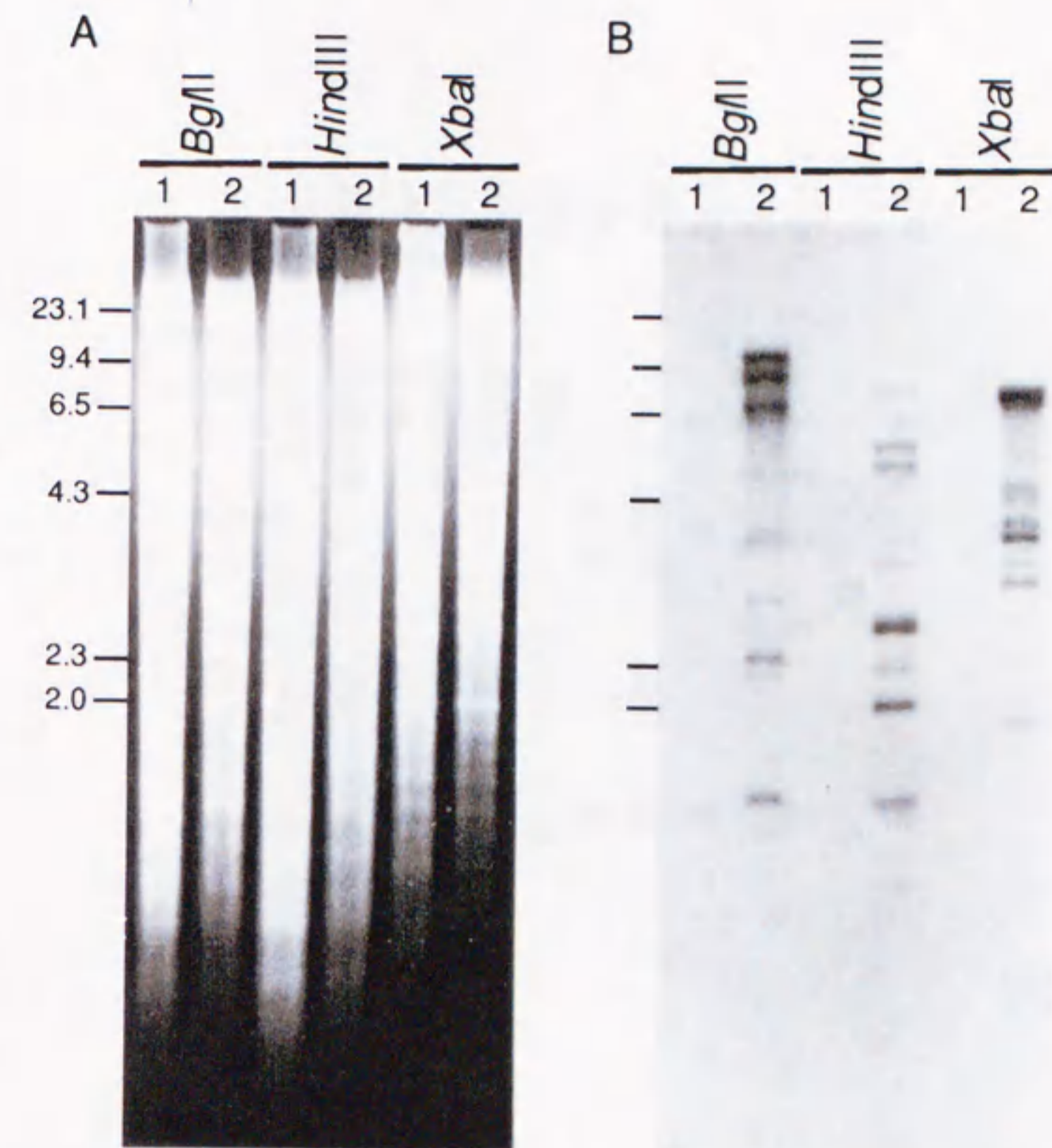


Fig. 4-1. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B) of nuclear DNA (lane 1) and whole cell DNA (lane 2) of strain 15A. Nuclear DNA and whole cell DNA were digested with *Bgl*II, *Hind*III or *Xba*I, and fractionated in a 0.8% agarose gel (A). The Southern blot was hybridized with ^{32}P -labeled mitochondrial DNA of strain 15A (B). The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λ DNA) are indicated on the left.

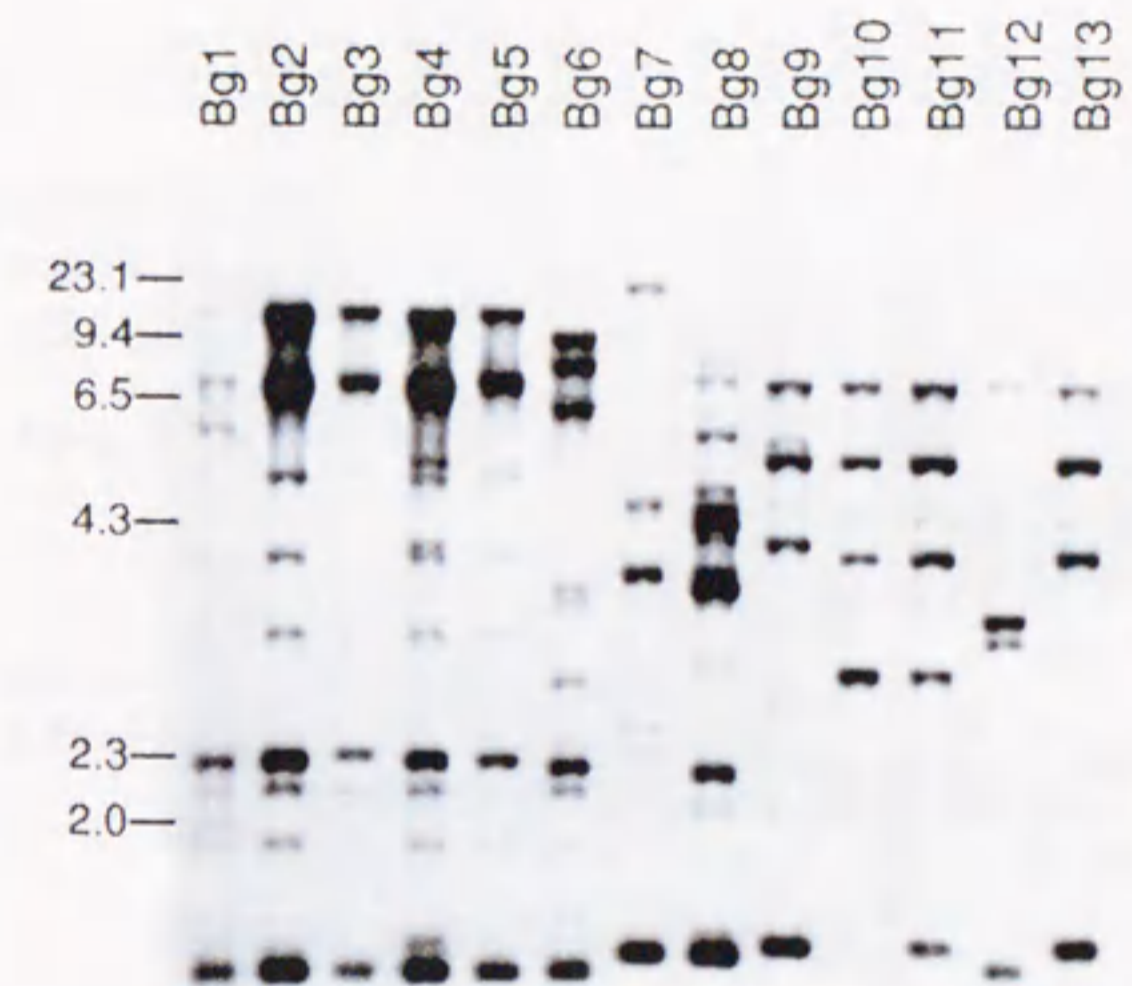


Fig. 4-2. RFLPs of representative strains of mitochondrial DNA types in *Alternaria* species. Total DNA was digested with *Bgl*III and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with 32 P-labeled mitochondrial DNA of strain 15A. The lane designations correspond to Mt DNA RFLP in Table 4-1. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λ DNA) are indicated on the left.

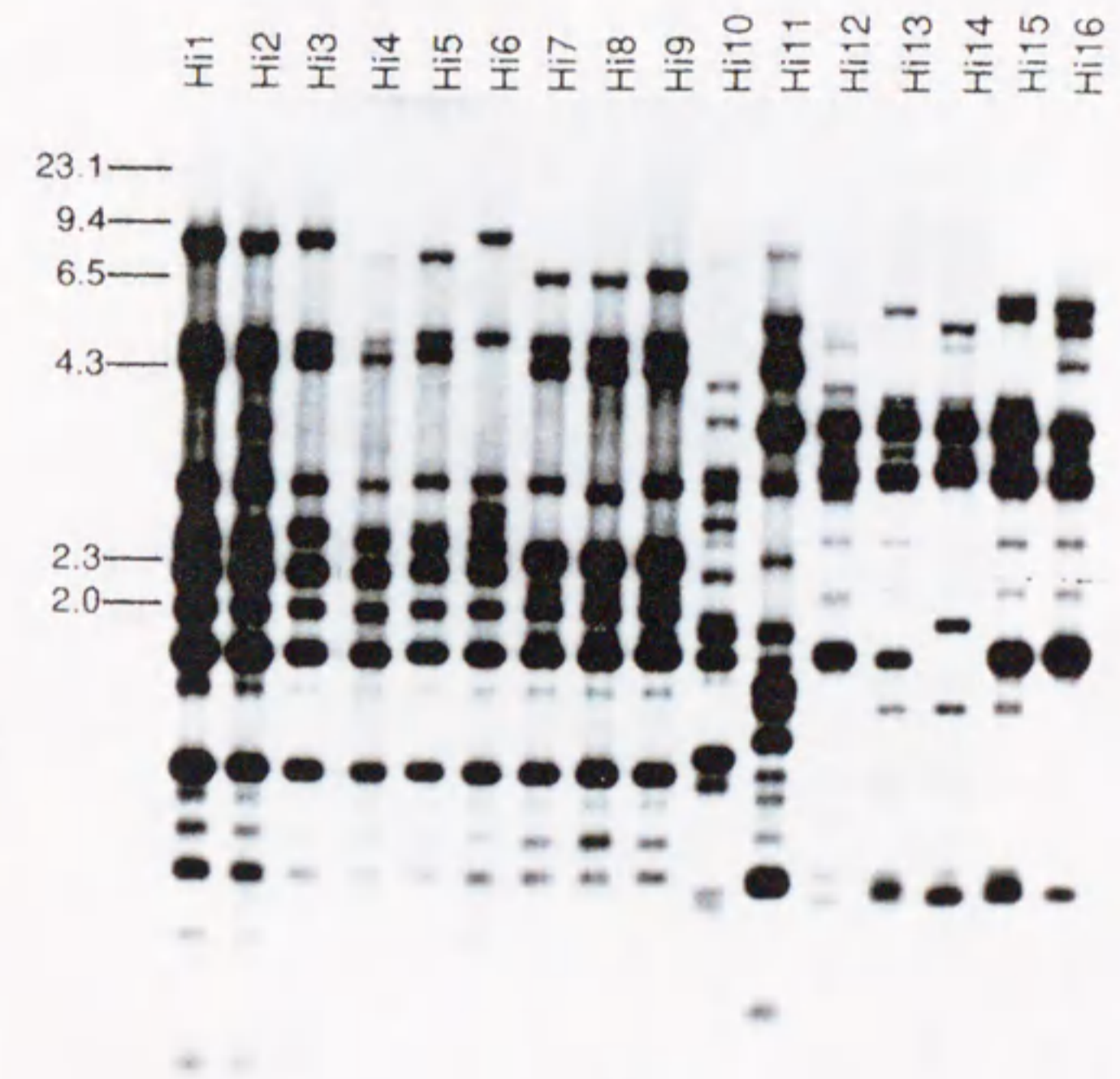


Fig. 4-3. RFLPs of representative strains of mitochondrial DNA types in *Alternaria* species. Total DNA was digested with *Hind*III and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled mitochondrial DNA of strain 15A. The lane designations correspond to Mt DNA RFLP in Table 4-1. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left.

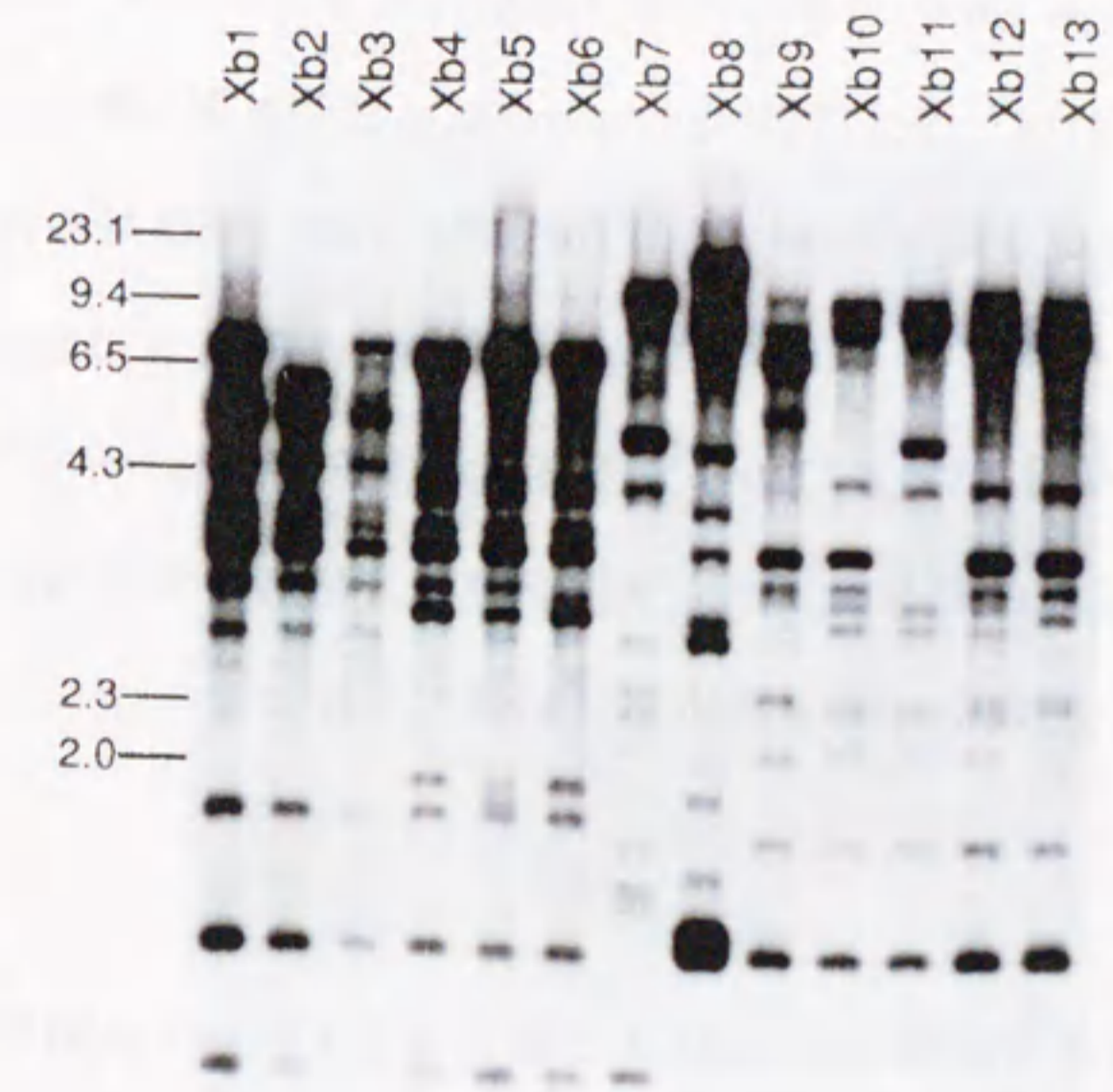


Fig. 4-4. RFLPs of representative strains of mitochondrial DNA types in *Alternaria* species. Total DNA was digested with *Xba*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled mitochondrial DNA of strain 15A. The lane designations correspond to Mt DNA RFLP in Table 4-1. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left.

出され、*Bgl*IIIのBg7~Bg13、*Hind*IIIのHi10~Hi16および*Xba*IのXb7~Xb13とそれぞれ命名した (Fig. 4-2, 4-3, 4-4およびTable 4-1)。これらの多型は、それぞれの種に特異的であった。

3種の制限酵素で検出された多型を組み合わせて解析したところ、供試菌株群は18種 (M1~M18)のミトコンドリアDNA型に類別された (Table 4-1およびTable 4-2)。宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*の菌株群はM1~M11の11種のミトコンドリアDNA型に類別されたが、M1、M3、M7およびM8型は異なる毒素生産菌さらには非病原性*A. alternata*にも共通して分布していた (Table 4-2)。一方、他種の菌株はM12~M18型と同定され、それぞれ種特異的なものであった (Table 4-2)。以上の結果から、宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*には共通したミトコンドリアDNA変異が分布し、ミトコンドリアDNAレベルでも互いに識別できないことが明らかとなった。

2. ミトコンドリアDNAのRFLP分析に基づく*Alternaria*属菌の系統解析

18種のミトコンドリアDNA型間の系統解析により、それらの遺伝的類縁関係を調査した。3種の制限酵素を用いたRFLP分析により、供試27菌株から合計161本のミトコンドリアDNA断片が検出された。これらDNA断片について、18種のミトコンドリアDNA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 (F) として算出し、平均距離法により系統樹を作成した (Fig. 4-5)。その結果、宿主特異的毒素生産菌と非病原性*A. alternata*から得られた11種のミトコンドリアDNA型は、他種とは明確に分岐した単一のクラスターを形成した。これらミトコンドリアDNA型間の遺伝的類似度は43%以上とやや低い数値であったが、他種と比較した場合には最高でも24% (*A. panax*のM15型との類似度) とさらに低い数値が得られた。また、供試菌の毒素生産性と遺伝的類縁関係には全く相関が見いだされなかった。たとえば、毒素生産菌と非病原性*A. alternata*のミトコンドリアDNA型は、M1、M2、M3、

Table 4-2. Distribution of mitochondrial DNA variation in *Alternaria* species measured by RFLP analysis with *Bgl*II, *Hind*III and *Xba*I

Species	Number of strains ¹⁾ with mitochondrial DNA type ²⁾																		
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	
<i>A. kikuchiana</i>	1								1										1
<i>A. mali</i>	1						1	1											
<i>A. longipes</i>			1	1	1														
<i>A. citri</i> ³⁾	1																		
<i>A. citri</i> ⁴⁾																			1
<i>A. fragaria</i>										1	1	1							
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1																		1
<i>A. alternata</i> ⁵⁾	2												1						
<i>A. bataticola</i>																			1
<i>A. dauci</i>																			1
<i>A. dianthi</i>																			1
<i>A. panax</i>																			1
<i>A. porri</i>																			1
<i>A. sesami</i>																			1
<i>A. solani</i>																			1

1) Strains used are shown in Table 4-1.

2) See Table 4-1.

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

4) The causal agent of brown spot of tangerines.

5) Nonpathogenic.

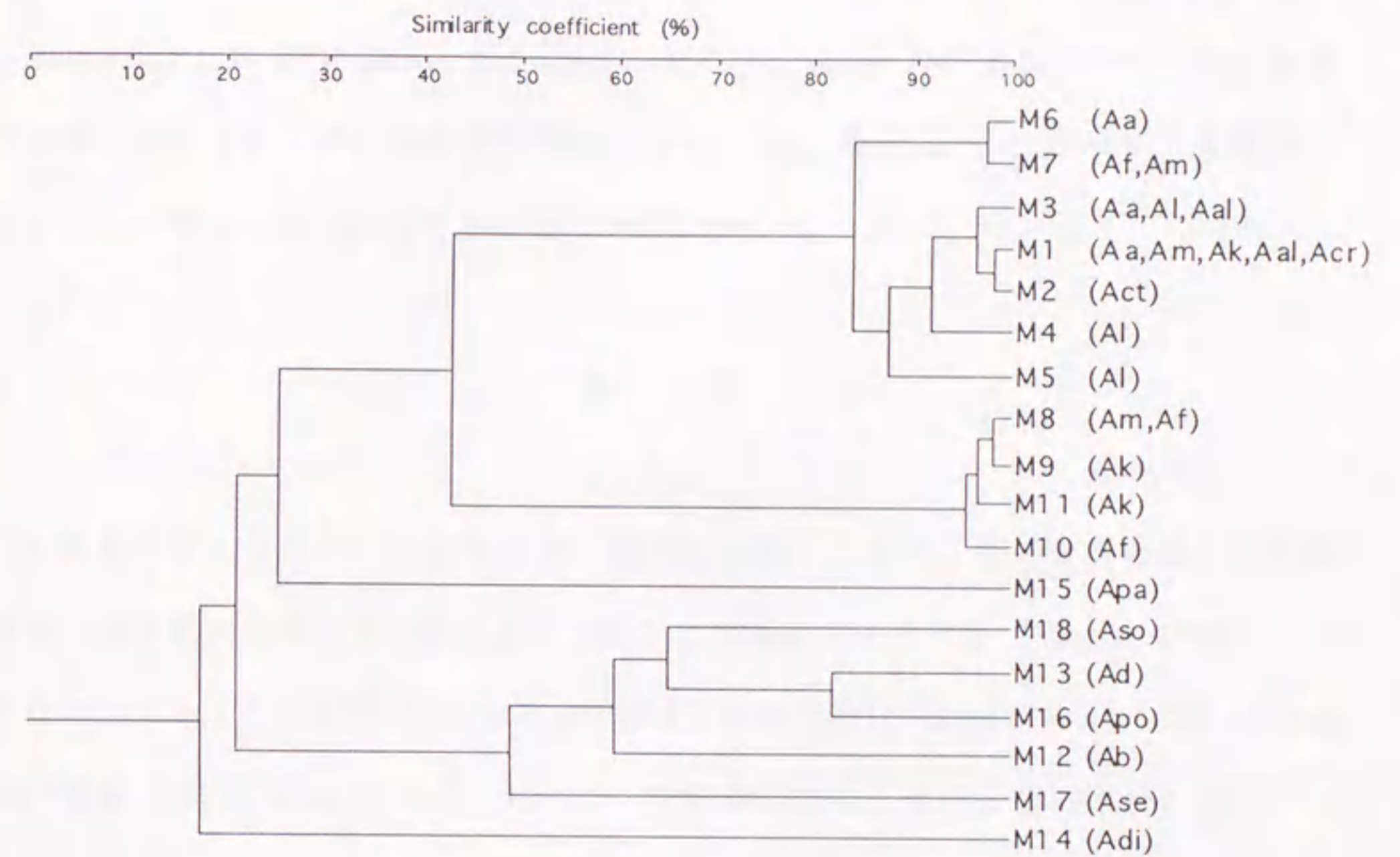


Fig. 4-5. Dendrogram showing the level of genetic relatedness of 18 mitochondrial DNA types (M1 to M18) detected in *Alternaria* species. The 18 types were identified on the basis of RFLP patterns produced by *Bgl*III, *Hind*III and *Xba*I digestions. A UPGMA dendrogram was constructed from the similarity coefficients calculated from the RFLP data. *Alternaria* species carrying respective mitochondrial DNA 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*; Adi, *A. dianthi*.

M4、M5、M6およびM7のグループと、M8、M9、M10およびM11のグループの2つのサブクラスターに分かれたが、ナシ黒斑病菌、リンゴ斑点落葉病菌およびイチゴ黒斑病菌菌株はどちらのグループにも分布していた (Fig. 4-5)。一方、他種菌では、*A. solani*、*A. dauci*、*A. porri*、*A. bataticola* および *A. sesami* のミトコンドリアDNA型間で47%~82%という高い類似度が算出された (Fig. 4-5)。したがって、本解析によって、これらの種を区別することはできなかった。

考 察

糸状菌のミトコンドリアDNAは高い変異性を有し、また、その変異の多くが比較的長い塩基配列の挿入や欠失に起因することが報告されている (Taylor, 1986)。このため、ミトコンドリアDNAのRFLP分析は近縁種の識別 (Förster *et al.*, 1989; Moody and Tyler, 1990a; Hodson *et al.*, 1993) や生態学的研究における種内系統の識別マーカー (Kistler *et al.*, 1987; Gordon and Okamoto, 1992; Kurdyla *et al.*, 1995) として利用されている。ミトコンドリアDNAのRFLP分析によって、7種の宿主特異的毒素生産菌からは多様な多型が検出され、これら病原菌においてもミトコンドリアDNAの広範な変異が存在することが明らかとなった。また、これら多型に基づき、各毒素生産菌、さらには非病原性*A. alternata*を識別することはできなかった。すなわち、3種の制限酵素を用いたRFLP分析によって、同一の多型が異なる毒素生産菌あるいは非病原性*A. alternata*から共通して検出された。さらに、RFLP分析に基づくクラスター分析では、毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*の菌株群が他種とは明確に異なる単一のグループを形成し、しかも、遺伝的類縁関係と毒素生産性の間には何ら相関は見いだされなかった。

奥田 (1996) は、トマトに感染する*Fusarium oxysporum*の分化型およびレース間の遺伝的類縁関係をRAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 法、核ゲノムのrDNA

とミトコンドリアDNAのRFLP分析を用いて解析した。rDNAのRFLP分析では、同一の多型が異なる分化型間に共通して分布しており、各分化型を識別することはできなかった。しかしながら、RAPD分析とミトコンドリアDNAのRFLP分析では、各分化型に特異的な遺伝的傾向が検出され、これらの識別が可能であった。この結果は、検出された*F. oxysporum*のrDNA多型が、寄生性分化が起こる以前に個体群中に存在していたこと、さらに、rDNA多型が成立した後、各分化型がそれぞれ固有の変異を蓄積することにより分化したことを示唆した (Nei, 1987)。一方、宿主特異的毒素生産菌群では、rDNA解析だけでなくミトコンドリアDNAのRFLP分析によっても、病原菌特異的な遺伝的傾向は検出されなかった。この結果は、各病原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、極めて多元的に出現した菌株群であることを強く示唆した。

ミトコンドリアDNAのRFLPに基づくクラスター分析では、毒素生産菌と非病原性*A. alternata*が単一のグループを形成したことから、これら多型が種内多型の範疇に入るものと考えた。このグループ内の遺伝的類似度は最低で43%と比較的低い値を示し、ミトコンドリアDNAの高い変異性が示された。このような変異を引き起こす機構として、交配過程での高頻度遺伝子組換え、モービルイントロンの介在、反復配列を介した分子内と分子間組換えなどが知られている (河野, 1990)。 *Alternaria*属菌の有性世代は未だ発見されておらず、本菌の遺伝的多様性と交配による遺伝的組換えとの関係については不明である。一方、宿主特異的毒素生産菌では菌糸融合現象が観察されており (Tsuge *et al.*, 1987; Stovall, 1992)、同一病斑に異なる菌株が重複感染した場合など、異核共存体が形成される可能性も示されている (Adachi and Tsuge, 1994)。したがって、本菌のミトコンドリアDNAの変異に、菌糸融合を介した遺伝的組換えが関与しているのかも知れない。本菌のミトコンドリアDNAの多様性を生み出す機構を解明するためには、正確な制限酵素地図の作製、遺伝子マッピングなど、ミトコンドリアDNAの詳細な構造解析が必要である。

ミトコンドリアDNAのRFLPに基づくクラスター分析から推定された*Alternaria*属菌の系統関係は、Neergaard (1945) のグループ分けを反映するものであった。すなわち、宿主特異的毒素生産病原菌と*A. alternata*を含むLongicatenataeと*A. bataticola*、*A. dauci*、*A. porri*、*A. sesami*および*A. solani*を含むNoncatenataeが、系統樹上でそれぞれ単一のクラスターを形成した。供試したNoncatenataeの種は、rDNAの解析と同様に本解析によっても比較的高い遺伝的類縁性を示した。これら種間の類似度はLongicatenataeのグループの最低値(43%)よりも高く、別種として区別できないことが支唆された。一方、Brevicatenataeに属する*A. panax*と*A. dianthi*は系統樹上で離れて分布し、単一のクラスターを形成しなかった。糸状菌におけるミトコンドリアDNA変異の多くは、DNA断片の挿入あるいは欠失に起因するため、RFLPデータから塩基置換率を算出することは困難である。このため、ミトコンドリア多型間で共通した制限酵素切断断片の保有率に基づき系統関係が推定される。しかしながら、種間比較では同じサイズのDNA断片が同じ塩基配列を有するという仮定が成立しない場合も予想される。したがって、さらに厳密に種間の系統関係を検討するためには、ミトコンドリアDNAの一部領域の塩基配列を比較することが必要であると考えた。

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*A. alternata*の個体群構造の比較

核ゲノムのrDNAとミトコンドリアDNAの解析から、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌が同一種*A. alternata*として位置付けられることを明らかにした。また、各毒素生産菌がそれぞれ固有の遺伝的背景を有する種内系統として分化したのではなく、少数の遺伝子（毒素生産性遺伝子）の獲得によって多元的に出現したことを示唆した。したがって、実際の圃場においても毒素生産菌と土着の腐生性*A. alternata*とが高い遺伝的類縁性を有すること、すなわち、腐生生活を送る*A. alternata*が毒素生産性を獲得することによって病原化していることが予想された。

近年、植物病原糸状菌の生態学的研究にRFLP分析やDNAフィンガープリント分析を用いた個体識別法が広く利用されるようになった（Adachi *et al.*, 1993; Leung *et al.*, 1993; McDonald and McDermott, 1993）。特に、染色体ゲノムに存在する反復DNA配列のDNAフィンガープリント分析は、個体識別に有効であるため、個体群構造の解析に用いられている（Burk *et al.*, 1991; Adachi *et al.*, 1993; Leung *et al.*, 1993）。

反復DNA配列には、特定のDNA配列が直列に反復して存在するもの（直列型反復配列）と複数の染色体上に散在するもの（分散型反復配列）とがあり、いくつかのファミリーを形成している。このような配列の変異は一般に表現形質に影響しないため、各ファミリーの反復単位は多くの変異を含んでいる。特に、分散型反復DNAをプローブに用いたDNAフィンガープリント分析では、反復単位内とその周辺領域における変異を簡便に検出し、染色体ゲノムの広範な領域を同時に解析することができる。

Adachiら（1993）は、ナシ黒斑病菌15A菌株の染色体ライブラリーから数種の分散型反復DNA配列を単離し、これらをプローブとしたDNAフィンガープリント分析が

黒斑病菌の個体群構造の解析に有効であることを示した。

本章では、分散型反復DNA配列のDNAフィンガープリント分析を用いて、全国各地から採集した毒素生産菌の遺伝的背景を比較するとともに、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さらに非病原性*A. alternata*の個体群構造を比較し、*A. alternata*における寄生性分化について集団遺伝学的観点から解析した。

材料および方法

1. 供試菌株

1) 全国各地から採集した宿主特異的毒素生産病原菌

*A. alternata*の基準株として非病原性*A. alternata* 2 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26菌株、リンゴ斑点落葉病菌23 菌株、タバコ赤星病菌17菌株、イチゴ黒斑病菌15菌株およびトマトアルタナリア茎枯病菌 4 菌株を供試した (Table 5-1)。

2) ナシ黒斑病とリンゴ斑点落葉病の自然病斑からの*A. alternata*の分離

1994年9月23日に、鳥取県園芸試験場（鳥取県大栄町）内の、近接する日本ナシ(*P. serotina* Rehder var. *culta* Rehder、品種二十世紀) 圃場とリンゴ (*M. pumila* Miller var. *domestica* Schneider、品種オウリンおよびフジ) 圃場からナシ黒斑病菌とリンゴ斑点落葉病罹病葉をそれぞれ採集した (Fig. 5-1)。なお、両圃場には樹齢約20年のナシ成木と樹齢約15年のリンゴ成木がそれぞれ栽培されており、また、二十世紀ナシ品種およびオウリンとフジ両リンゴ品種は、ナシ黒斑病菌とリンゴ斑点落葉病菌にそれぞれ感受性である (Maeno *et al.*, 1984; 甲元, 1990)。罹病葉は圃場内から任意に採集した。採集した罹病葉の病斑を約5 mm四方に切り取り、70%エタノールに15秒間、5%アンチホルミンに2分間浸漬して表面殺菌し、滅菌水で洗浄後、乾アンズ寒

Table 5-1. Strains of *Alternaria* species used in this study

Strain	Origin		Working No.
	Location	Source ¹⁾	
<i>A. alternata</i> ²⁾			
IFO4026	Unknown ³⁾	IFO	1
O-94	Tottori	TU	2
<i>A. mali</i> ⁴⁾			
M-71	Unknown	TU	3
O-159	Unknown	TU	4
AM-1	Aichi	NU	5
IFO8984	Unknown	IFO	6
Ki-44I	Aomori	FTRS	7
Ku-15Ro	Aomori	FTRS	8
Ku-16Ro	Aomori	FTRS	9
Ku-16I	Aomori	FTRS	10
Ku-22I	Aomori	FTRS	11
FIVcont45	Aomori	FTRS	12
AM-91-1	Nagano	NFTES	13
AM-91-2	Nagano	NFTES	14
AM-91-3	Nagano	NFTES	15
AM-91-4	Nagano	NFTES	16
AM-91-7	Nagano	NFTES	17
AM-91-8	Nagano	NFTES	18
Ha-1	Nagano	NFTES	19
Ha-4	Nagano	NFTES	20
Ha-8	Nagano	NFTES	21
Ha-12	Nagano	NFTES	22
No. 40	Nagano	NFTES	23
No. 42	Nagano	NFTES	24
No. 64	Nagano	NFTES	25
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ⁵⁾			
As-27	Unknown	NU	26
AL-4	Mie	NU	27
AL-12	Mie	NU	28
No. 91080804	Mie	MARC	29
<i>A. kikuchiana</i> ⁶⁾			
15A	Tottori	TU	30
T88-4	Tottori	THES	31
T88-8	Tottori	THES	32
T88-24	Tottori	THES	33
T88-48a	Tottori	THES	34

Table 5-1.—Continued

Strain	Origin		Working No.
	Location	Source ¹⁾	
T88-64a	Tottori	THES	35
T88-154	Tottori	THES	36
T88-165	Tottori	THES	37
T88-221	Tottori	THES	38
T88-229	Tottori	THES	39
T88-240-1	Tottori	THES	40
91H-18	Aichi	NU	41
91H-27	Aichi	NU	42
N5	Aichi	NU	43
N8	Aichi	NU	44
N18	Aichi	NU	45
G16	Gifu	NU	46
G19	Gifu	NU	47
G31	Gifu	NU	48
GA8	Gifu	NU	49
GA21	Gifu	NU	50
A85-2	Aichi	NU	51
A85-4	Aichi	NU	52
A85-6	Aichi	NU	53
A85-7a	Aichi	NU	54
A85-10	Aichi	NU	55
<i>A. longipes</i> ⁷⁾			
AT-204	Aichi	NU	56
IFO6149	Unknown	IFO	57
IFO6381	Unknown	IFO	58
86-1	Kanagawa	JTY	59
No. 122-2	Tochigi	JTY	60
No. 122-3	Tochigi	JTY	61
ATL-5	Kagawa	JTL	62
ATL-6	Tochigi	JTL	63
ATL-7	Tochigi	JTL	64
ATL-9	Tottori	JTL	65
ATL-10	Tottori	JTL	66
ATL-11	Tochigi	JTL	67
ATL-16	Iwate	JTL	68
ATL-17	Yamagata	JTL	69
ATL-18	Yamagata	JTL	70
ATL-23	Iwate	JTL	71
ATL-26	Fukushima	JTL	72

Table 5-1. —Continued

Strain	Origin		Working No.
	Location	Source ¹⁾	
<i>A. fragaria</i> ⁸⁾			
O-187	Iwate	TU	73
M-30	Tottori	TU	74
T-32	Tottori	TU	75
NAF-1	Aichi	NU	76
NAF-2	Aichi	NU	77
NAF-3	Aichi	NU	78
NAF-4	Aichi	NU	79
NAF-5	Aichi	NU	80
NAF-6	Aichi	NU	81
NAF-8	Aichi	NU	82
NAF-9	Aichi	NU	83
NAF-10	Aichi	NU	84
NAF-11	Aichi	NU	85
NAF-12	Aichi	NU	86
NAF-13	Aichi	NU	87

1) IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; TU, Laboratory of Plant Pathology, Tottori University, 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; MARC, Mie Agricultural Research Center, Mie, Japan; THES, Tottori Horticultural Experiment Station, Tottori, Japan; JTY, Yokohama Center, Japan Tobacco Inc., Kanagawa, Japan; JTL, Leaf Tobacco Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., Tochigi, Japan.

2) Nonpathogenic.

3) Unknown, but in Japan.

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

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

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

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

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

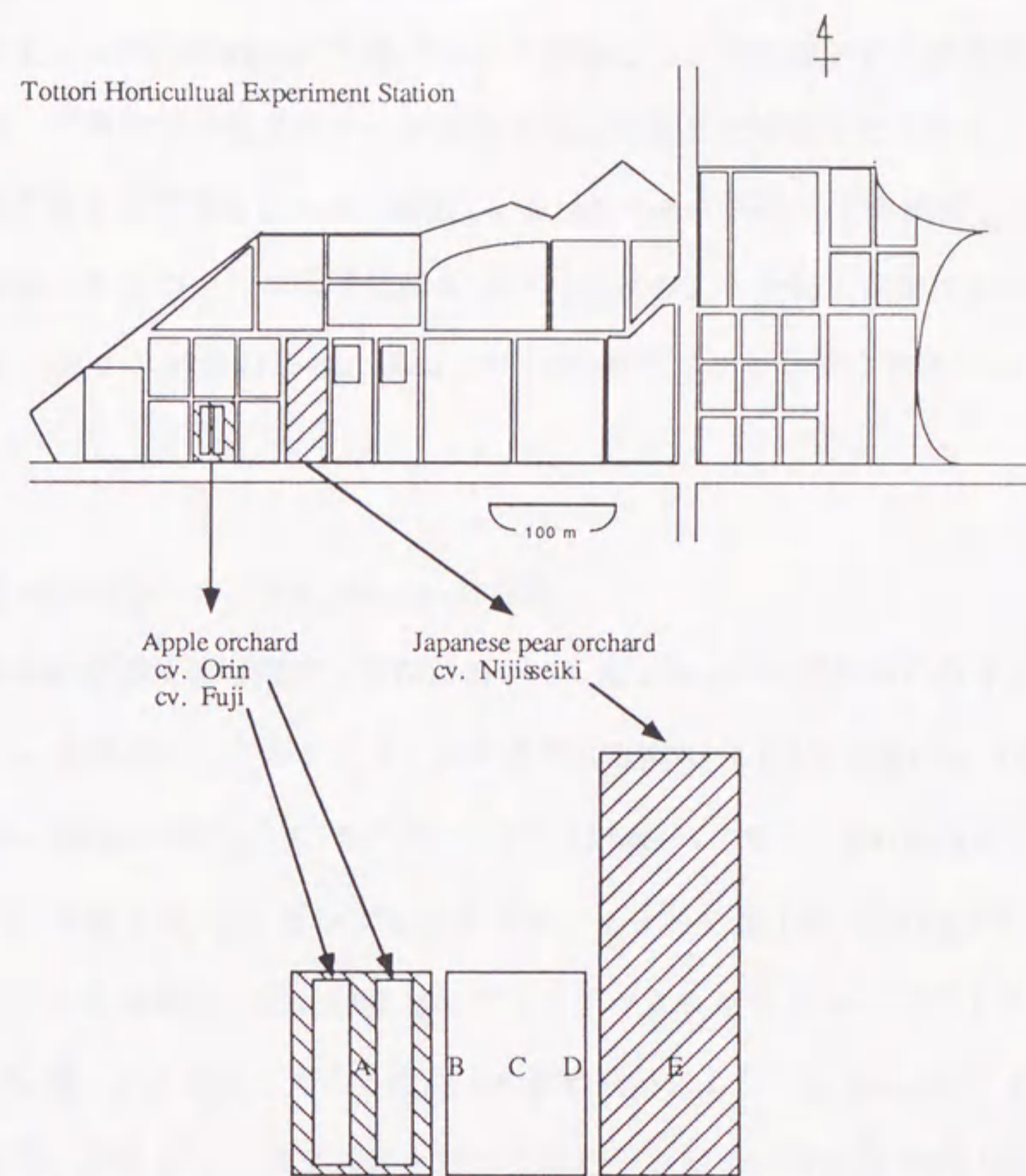


Fig. 5-1. Location of experimental fields in Tottori Horticultural Experiment Station. A, B, C, D and E, collection sites of air-borne spores of *A. alternata*.

天 (ASA) 培地 (宇田川ら, 1978) 上に置床した。25℃下で4日間BLBランプ照射下で培養し、菌糸伸長と分生孢子形成を誘導した。形成孢子から顕微鏡下でガラス針を用いて単孢子分離を行い、分離株をPSA培地上で培養した。なお、単孢子分離時に分生孢子の形態も合わせて観察し、*A. alternata*であることを確認した。1葉あたり1病斑のみについて単孢子分離を行い、35枚の二十世紀ナシ葉由来の35株、41枚のオウリンリンゴ葉由来の41株および34枚のフジリンゴ葉由来の34株をそれぞれ得た。

3) 空中飛散孢子からの*A. alternata*の採取

鳥取県園芸試験場内の5地点において、*A. alternata*の空中飛散孢子を採取した(Fig. 5-1)。各地点に、アルタナリア選択培地[1% KNO₃、0.5% KH₂PO₄、0.25% MgSO₄ · 7H₂O、20 ppm FeCl₃、2.5% グルコース、25 ppm ベノミル、200 ppm ストレプトマイシン、1.5% 粉末寒天]を含むプラスチックシャーレを地上約1mの高さにそれぞれ10枚置き、40分間暴露した。回収したプラスチックシャーレを、23℃下で5日間培養した。出現したコロニー上の分生孢子の形態観察により、*A. alternata*であることを確認した後、顕微鏡下でガラス針を用いて単孢子分離し、分離株をPSA培地上で培養した。なお、1シャーレあたり3コロニーからそれぞれ単孢子分離し、合計150株を得た。なお、*A. alternata*孢子の採取は、日本ナシとリンゴ罹病葉の採取と同日に行った。

2. 病原性の検定

病原性の検定植物として、ナシ黒斑病病斑由来の菌株には二十世紀ナシ、リンゴ斑点落葉病病斑由来の菌株にはレッドゴールドとインドリンゴをそれぞれ用いた。また、空中飛散孢子から分離した*A. alternata*については、日本ナシとリンゴの両者に対する病原性を検定した。供試菌の病原性検定は、分生孢子接種法により行った。

供試菌株をASA培地（宇田川ら，1978）を含むプラスチックシャーレに接種し、25℃下で4日間BLBライト照射下で培養し、分生孢子形成を誘導した。菌体表面に形成された分生孢子を綿棒を用いて滅菌蒸留水中に懸濁し、分生孢子懸濁液（約 1×10^6 孢子/ml）を調製した。供試植物の若葉裏面に孢子懸濁液を噴霧接種し、25℃温室中で18時間静置した後、出現病斑の有無を観察した。

3. 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。

4. DNAプローブ

rDNAのRFLP分析のプローブとして、ナシ黒斑病菌15A菌株から単離されたrDNAクローンAlt1を用いた（Tsuge *et al.*, 1989）。また、DNAフィンガープリント分析のプローブとして、ナシ黒斑病菌15A菌株から単離された分散型反復DNA配列クローンAAR9を用いた（Adachi *et al.*, 1993）。Alt1とAAR9はλファージクローンであり、それらのDNAはプレートライゼート法（Sambrook *et al.*, 1989）により抽出した。

5. ハイブリダイゼーション

プローブDNAの $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ による標識とハイブリダイゼーションは、第2章「材料および方法」と同様に行った。

実験結果

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

全国各地から収集した5種の毒素生産病原菌85菌株について、AAR9配列のDNA

フィンガープリント分析を行った。AAR9配列は、ナシ黒斑病菌15A菌株の8本の染色体上に分散して存在する中程度反復DNA配列であり、本プローブを用いたDNAフィンガープリント分析が黒斑病菌の個体群構造の解析に有効であることが既に報告されている (Adachi *et al.*, 1993; 足立, 1995)。供試菌株の全DNAを *Pst*Iにより切断後、AAR9をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、供試菌株群からは多様なDNAフィンガープリントパターンが検出され、同じ毒素生産菌でも地理的由来の異なる菌株間では著しい多型性が認められた (Fig. 5-2)。名古屋大学構内の盛岡16号イチゴ圃場 (約20m²) から1991年に分離したイチゴ黒斑病菌12株は同一のハイブリダイゼーションパターンを示したが、地理的由来の異なる菌株間ではDNAフィンガープリントパターンに明確な違いが検出された。したがって、毒素生産菌個体群の遺伝的構造は、地理的隔離の影響を受けることが示唆された。そこで次に、鳥取県園芸試験場内の近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 *A. alternata* の個体群構造を比較調査した。

2. ナシ葉病斑から分離した *A. alternata* の病原性

35枚のナシ黒斑病罹病葉のそれぞれ1病斑から *A. alternata* を分離した。これらの二十世紀ナシ葉に対する病原性を検定した結果、35株中28株が病原性を有していた (Table 5-2)。残りの7株は二十世紀ナシに対して病原性を示さず、これらを非病原性 *A. alternata* として以下の実験に用いた。

3. リンゴ葉病斑から分離した *A. alternata* の病原性

リンゴ斑点落葉病罹病オウリン葉 (41枚) とフジ葉 (34枚) から *A. alternata* を分離し、オウリン由来の41株、フジ由来の34株を得た。各菌株のリンゴ葉に対する病原性をレッドゴールド品種とインド品種を用いて検定した。その結果、オウリンとフジから分離した菌株のうち、それぞれ4株のみが病原性を示し、リンゴ病斑からの

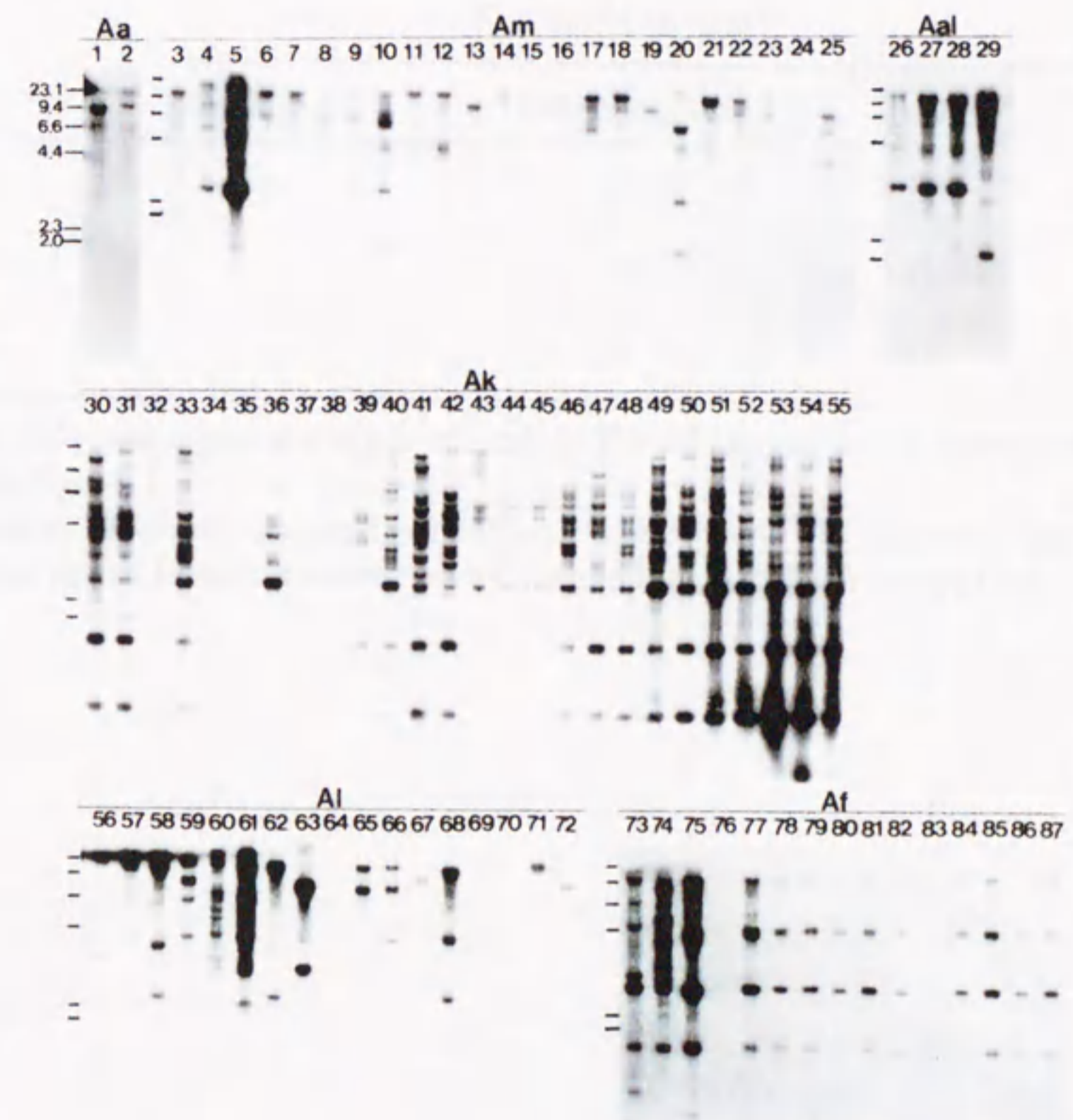


Fig. 5-2. AAR9-DNA fingerprints of strains from *Alternaria* fungi producing host-specific toxins and nonpathogenic *A. alternata*. The nuclear repetitive DNA clone AAR9 was isolated from a genomic library of *A. kikuchiana* strain 15A (Adachi *et al.*, 1993). Total DNA was cleaved with *Pst*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled AAR9 DNA. The numbers above each lane indicate the strain working numbers shown in Table 5-1. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left. Aa, nonpathogenic *A. alternata*; Am, *A. mali*; Aal, *A. alternata* f. sp. *lycopersici*; Ak, *A. kikuchiana*; Al, *A. longipes*; Af, *A. fragaria*.

Table 5-2. Pathogenic and nonpathogenic isolates of *A. alternata* obtained from diseased leaves of Japanese pear and apple plants

Origin ¹⁾	Number of isolates ²⁾		
	Pathogenic	Nonpathogenic	Total
Nijisseiki	28	7	35
Orin	4	37	41
Fuji	4	30	34

1) Location of Japanese pear and apple orchards in Tottori Horticultural Experiment Station is shown in Fig. 5-1.

2) Pathogenicity of isolates obtained from Nijisseiki pear plants was assayed using the pear leaves, and that of isolates obtained from Orin and Fuji plants was assayed using the apple leaves.

病原性菌株の分離率が非常に低かった (Table 5-2)。リンゴに病原性を示さなかった他の菌株を非病原性*A. alternata*として以下の実験に用いた。

4. 空中飛散孢子由来の*A. alternata*の病原性

アルタナリア選択培地を含むプラスチックシャーレを同圃場内の5カ所 (Fig. 5-1) で暴露後、23℃下で5日間培養した。各地点における捕捉糸状菌のコロニー数とそのうちの*A. alternata*のコロニー数をTable 5-3に示した。1プレートあたり*A. alternata*の3コロニーから1菌株ずつ単孢子分離を行い、各地点からそれぞれ30株を分離した。そのうち、20株ずつ計100株についてナシとリンゴに対する病原性を検定した。その結果、供試したすべての菌株がナシとリンゴのどちらにも病原性を示さず、これらを非病原性*A. alternata*として以下の解析に用いた。

5. rDNAのRFLP分析による個体群構造の解析

1) ナシ葉病斑から分離した*A. alternata*の個体群構造

ナシ病斑から分離したナシ黒斑病菌20株と非病原性*A. alternata* 7株についてrDNAのRFLP分析を行った。供試菌の全DNAを*Xba*Iで切断後、rDNAクローンAlt1をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、各菌株のrDNA型を同定した (Fig. 5-3)。その結果、27株中22株は、先に同定したA1、A4またはB2型いずれかのrDNA型に類別された。一方、残り5株はこれまでに見いだされていない新たなrDNA多型を示したが、そのバンドパターンが先に同定したAタイプのrDNA型と類似していたことからA8型と命名した。黒斑病菌20株中A1型が13株、B2型が5株を占め、これらrDNA系統が優占系統であった (Fig. 5-4A)。一方、非病原性*A. alternata* 7株のうち、3株がA4型、4株がA8型にそれぞれ類別された (Fig. 5-4B)。また、A4型とA8型系統は黒斑病菌からも1株ずつ検出され、少数ながら黒斑病菌にも分布していた (Fig. 5-4A)。

Table 5-3. Number of air-borne fungal colonies appeared on the Alternaria selective medium

Sites ¹⁾	Number of colonies/plate		
	<i>A. alternata</i>	Other fungi	Total
A	15	48	63
B	75	137	212
C	10	20	30
D	34	79	113
E	624	201	825

¹⁾ See Fig. 5-1.

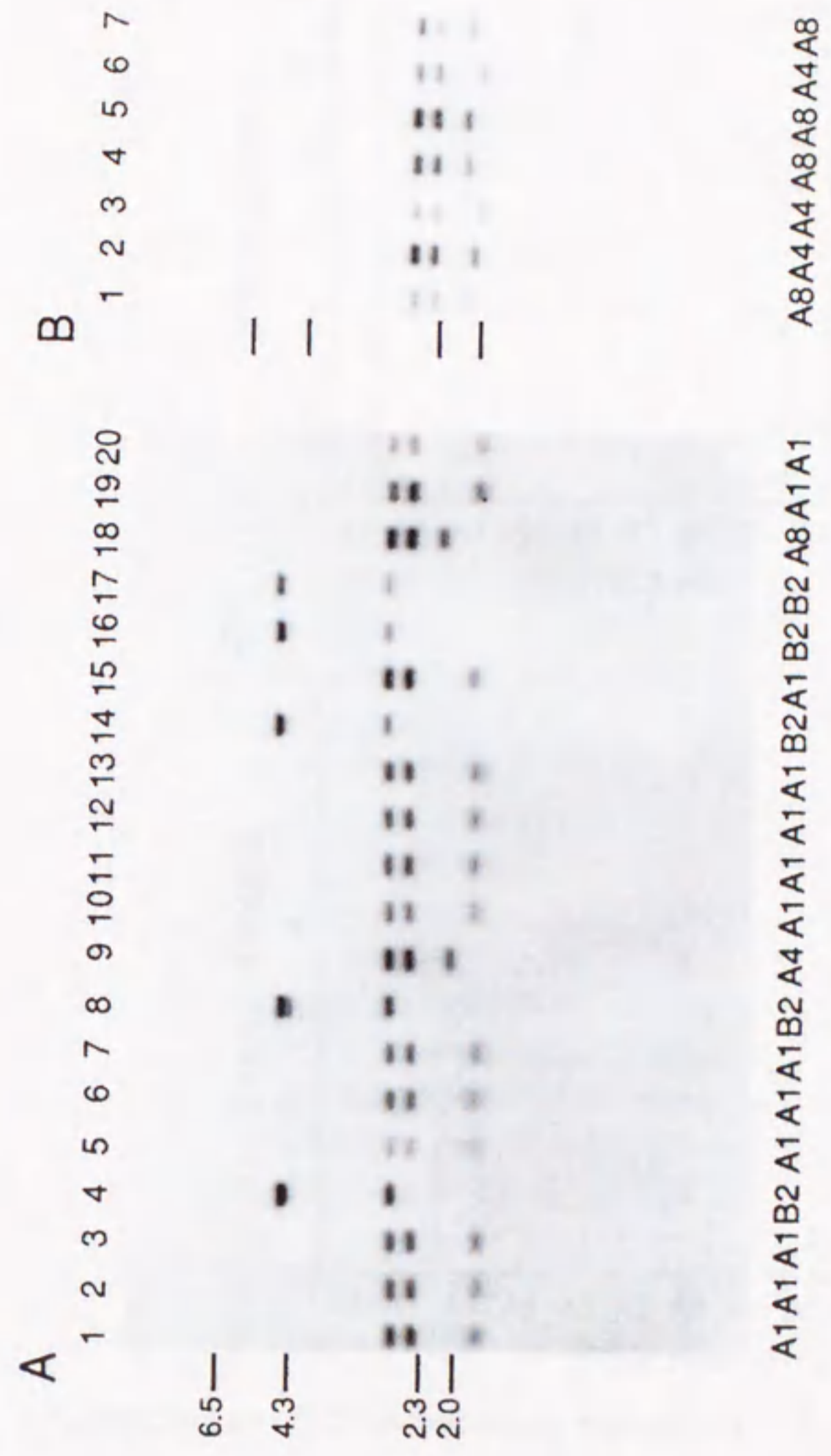


Fig. 5-3. RFLPs in rDNA repeat units among isolates of *A. alternata* obtained from black spot lesions on Japanese pear leaves (cultivar Nijisseiki) in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). Total DNA was cleaved with *Xba*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled *Alt*I DNA. rDNA types were identified on the basis of the RFLP profiles of representative strains of rDNA types shown in Fig. 2-3. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λ DNA) are indicated on the left. A, pathogenic isolates to Japanese pear; B, nonpathogenic isolates to Japanese pear.

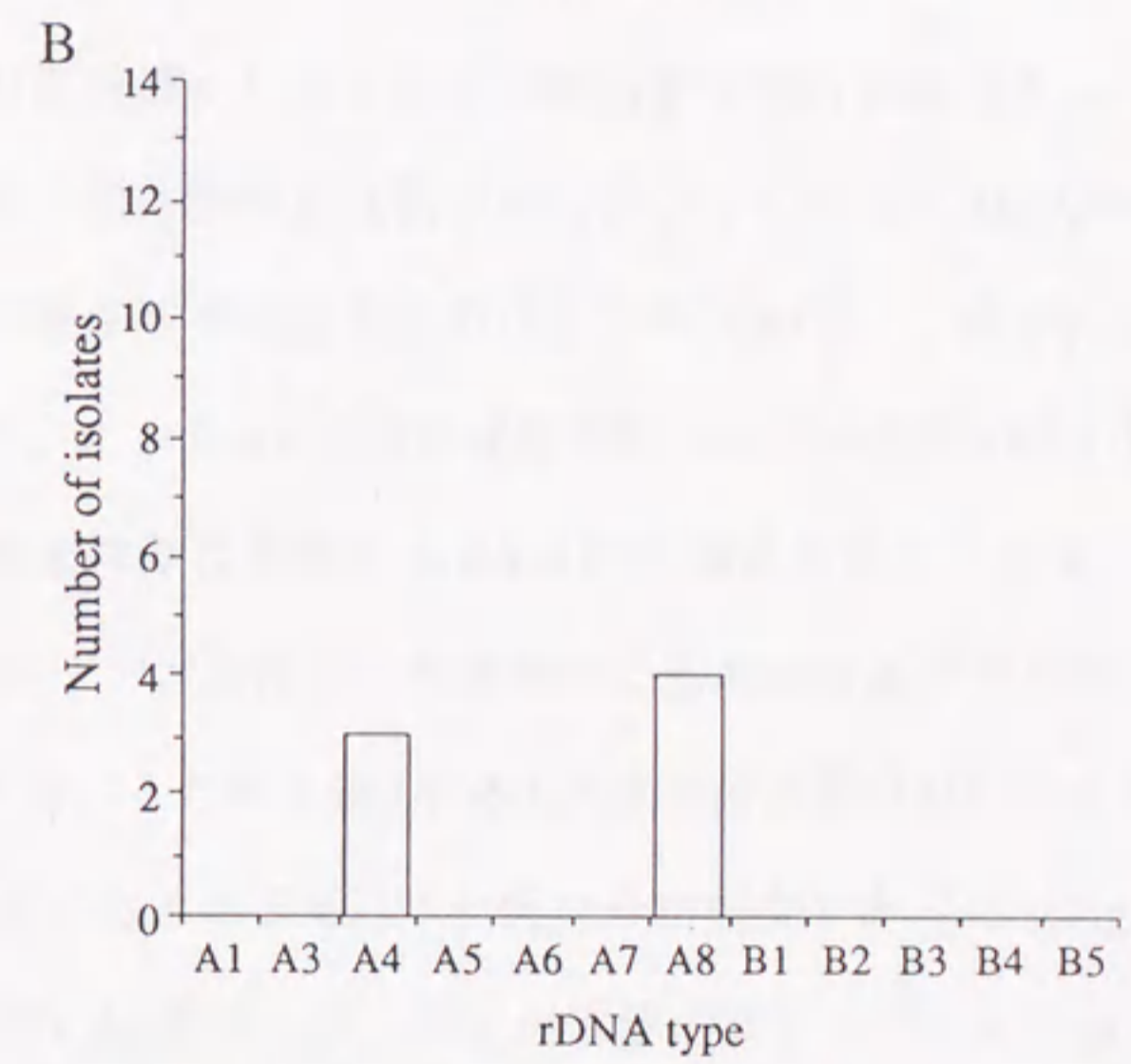
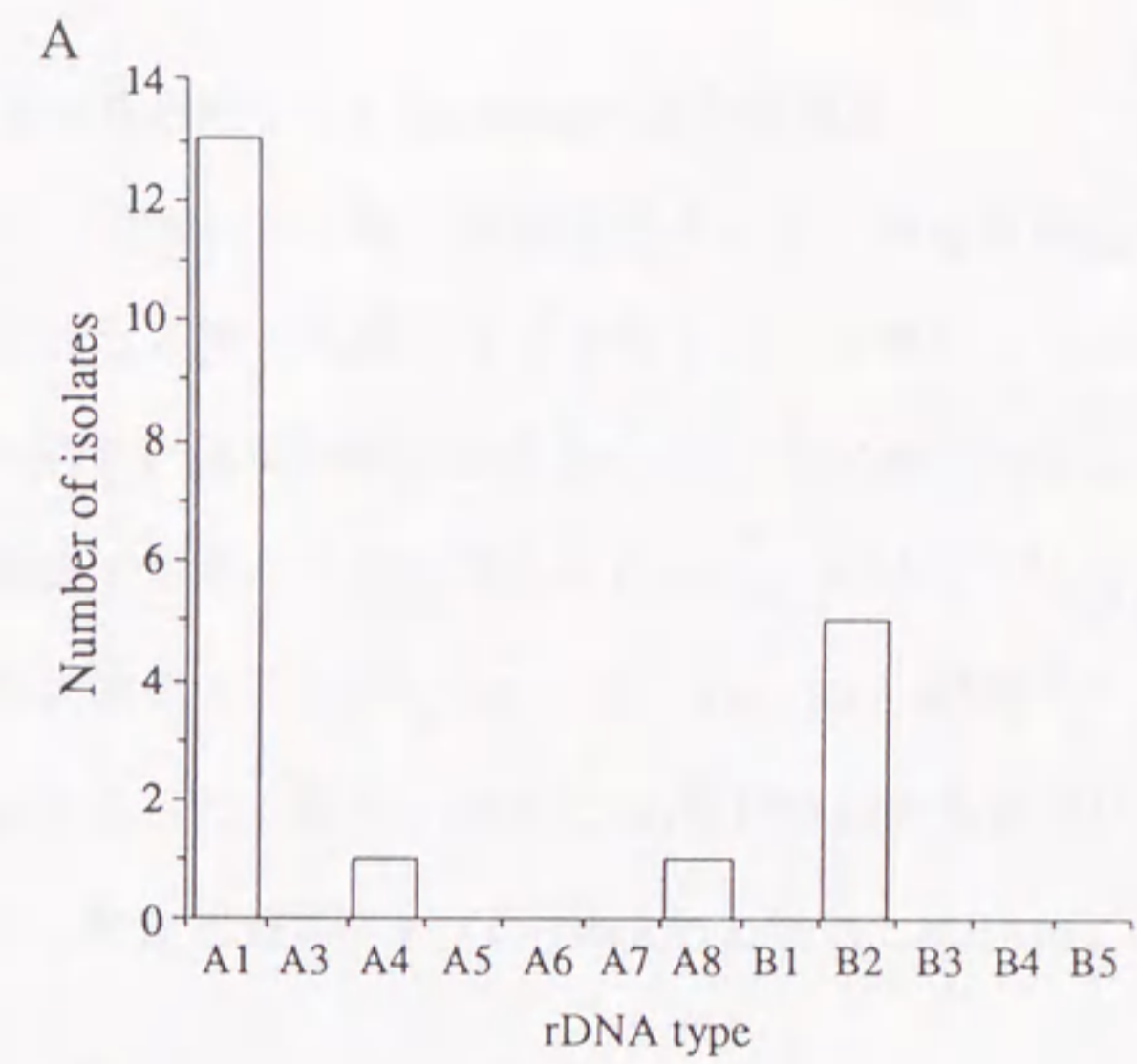


Fig. 5-4. Distribution of rDNA variants in populations of *A. alternata* obtained from black spot lesions on Japanese pear leaves (cultivar Nijisseiki) in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). A, pathogenic isolates to Japanese pear; B, nonpathogenic isolates to Japanese pear.

2) リンゴ葉病斑から分離した*A. alternata*の個体群構造

オウリン葉とフジ葉から分離した菌株群のうち、病原性検定によりリンゴ斑点落葉病菌と同定された8株と病原性を示さなかった40株について、rDNAのRFLP分析を行った。その結果、供試菌株群は8種のrDNA型に類別され、ナシ黒斑病菌よりも個体群構造が複雑であることが示唆された (Fig. 5-5および5-6)。これらrDNA型のうち7種は、先に同定されたA3、A4、A5、A6、B1、B3型とナシ黒斑病菌で新たに検出されたA8型であった。残り1種のrDNA型は既知のものとは異なる切断パターンを示したが、先に同定したAタイプのrDNA型と類似していたことからA7型と命名した。

リンゴ由来の菌株群からは、ナシ黒斑病菌で優占系統であったA1とB2型は全く検出されず、両者の個体群構造は明らかに異なっていた。rDNA型の分布様式を調査した結果、リンゴ斑点落葉病菌8株のうち3株がA4型、2株がA6型、3株がA8型にそれぞれ類別され、これらrDNA型が比較的均一に分布していた (Fig. 5-7AおよびC)。一方、非病原性菌株群は多様なrDNA系統で構成されていたが、A4、A5、A7およびA8型がどちらのリンゴ品種由来の菌株群にも同様な頻度で分布していた (Fig. 5-7BおよびD)。なお、これら4種のrDNA系統が個体群中の85%を占め、他のA3、A6、B1およびB3型はそれぞれ5%以下と低い分布頻度であった (Fig. 5-8)。また、分布頻度の高いA4型とA8型は、リンゴ斑点落葉病菌やナシから分離された非病原性菌株からも検出された。

3) 空中飛散孢子由来の*A. alternata*の個体群構造

鳥取県園芸試験場内の5地点からそれぞれ20菌株ずつ採集した空中飛散性*A. alternata*は、すべてナシにもリンゴにも病原性を示さなかった。これら菌株群におけるrDNA多型を検定したところ、供試した100株は11種のrDNA型に類別された (Fig.

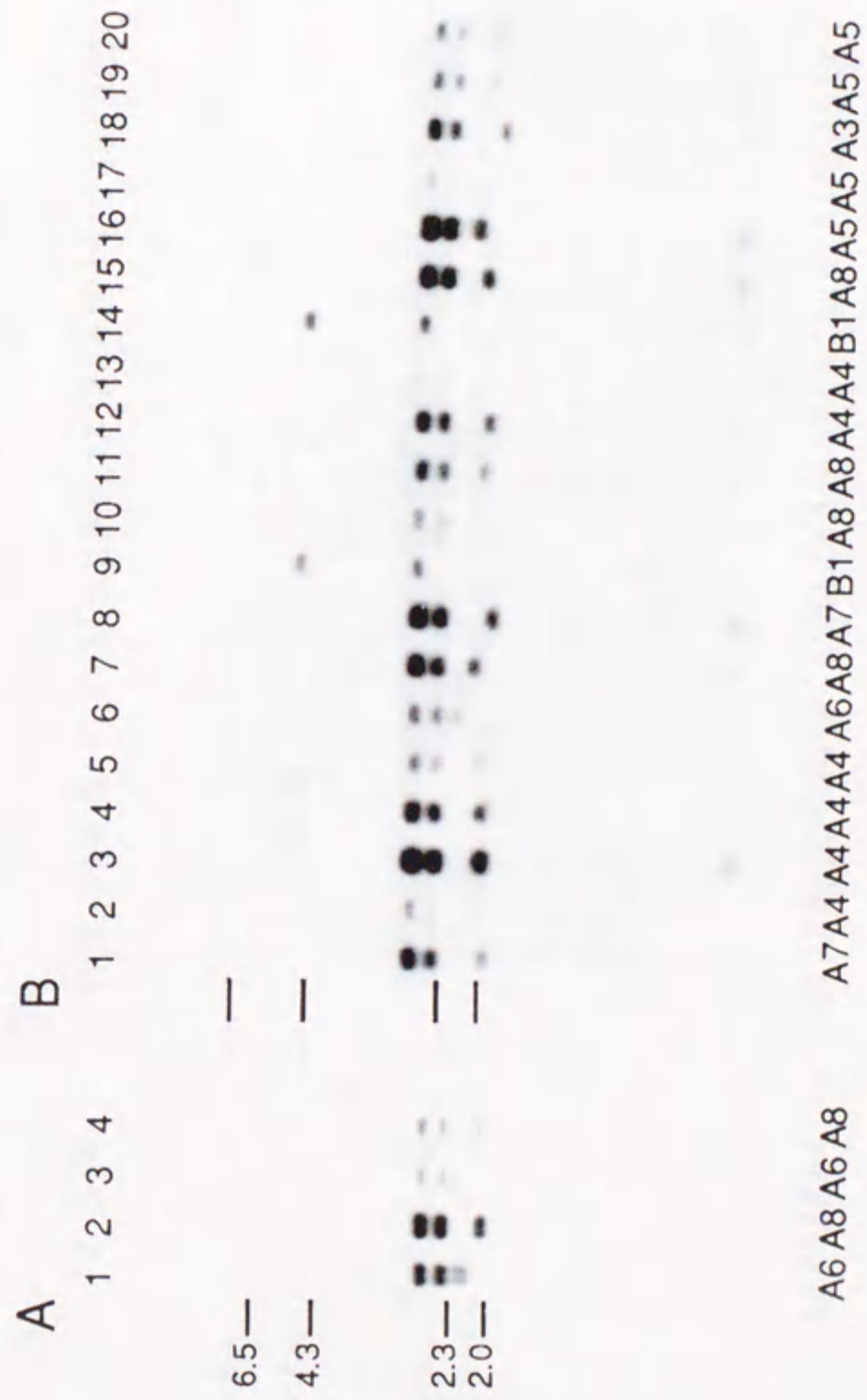


Fig. 5-5. RFLPs in rDNA repeat units among isolates of *A. alternata* obtained from Alternaria blotch lesions on apple leaves (cultivar Orin) in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). Total DNA was cleaved with *Xba*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled *Alt*1 DNA. rDNA types were identified on the basis of the RFLP profiles of representative strains of rDNA types shown in Fig. 2-3. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λ DNA) are indicated on the left. A, pathogenic isolates to apple; B, nonpathogenic isolates to apple.

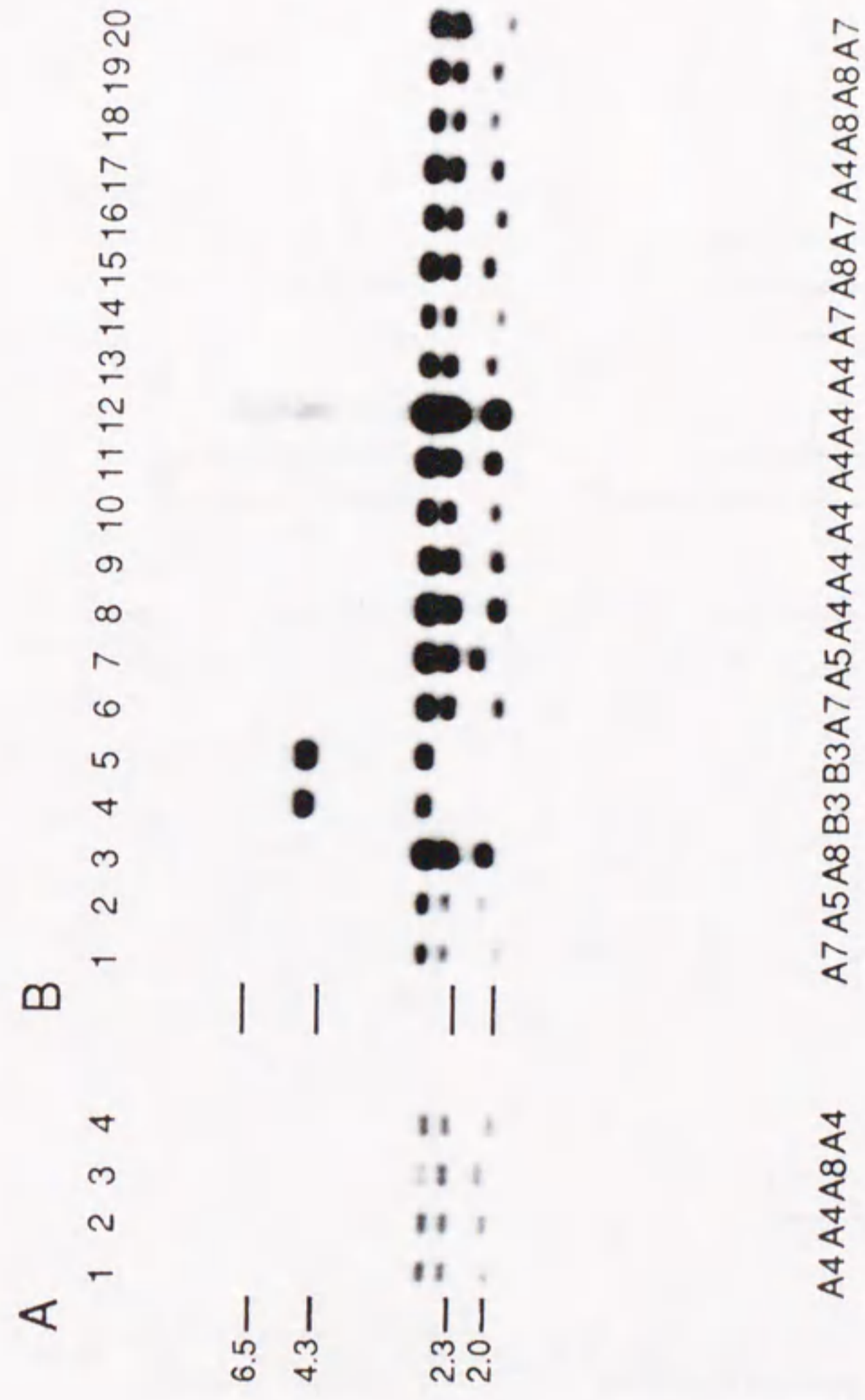


Fig. 5-6. RFLPs in rDNA repeat units among isolates of *A. alternata* obtained from Alternaria blotch lesions on apple leaves (cultivar Fuji) in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). Total DNA was cleaved with *Xba*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled Alt1 DNA. rDNA types were identified on the basis of the RFLP profiles of representative strains of rDNA types shown in Fig. 2-3. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left. A, pathogenic isolates to apple; B, nonpathogenic isolates to apple.

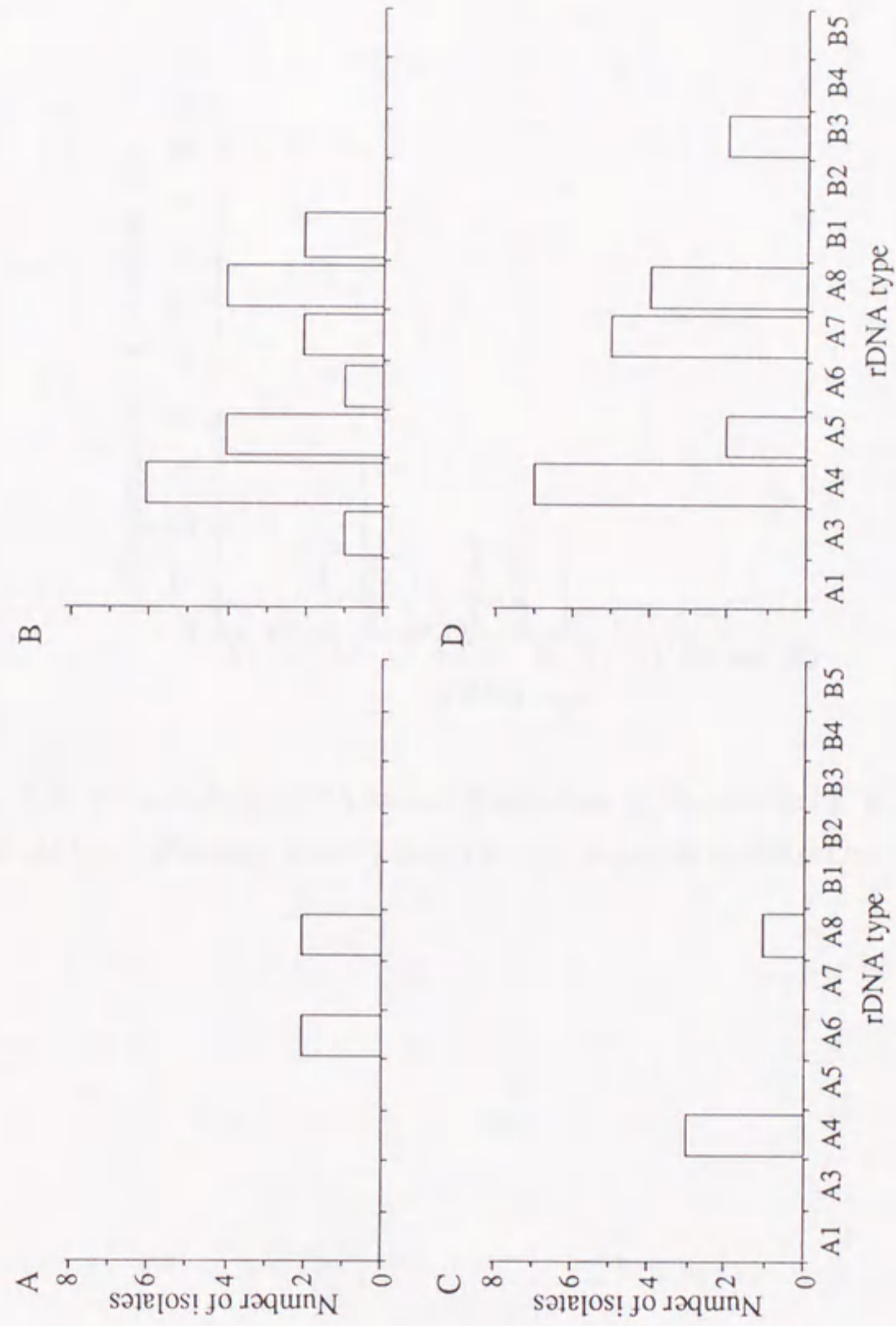


Fig. 5-7. Distribution of rDNA variants in populations of *A. alternata* obtained from *Alternaria* blotch lesions on apple leaves of cultivar Orin (A and B) and Fuji (C and D) in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). A and C, pathogenic isolates to apple; B and D, nonpathogenic isolates to apple.

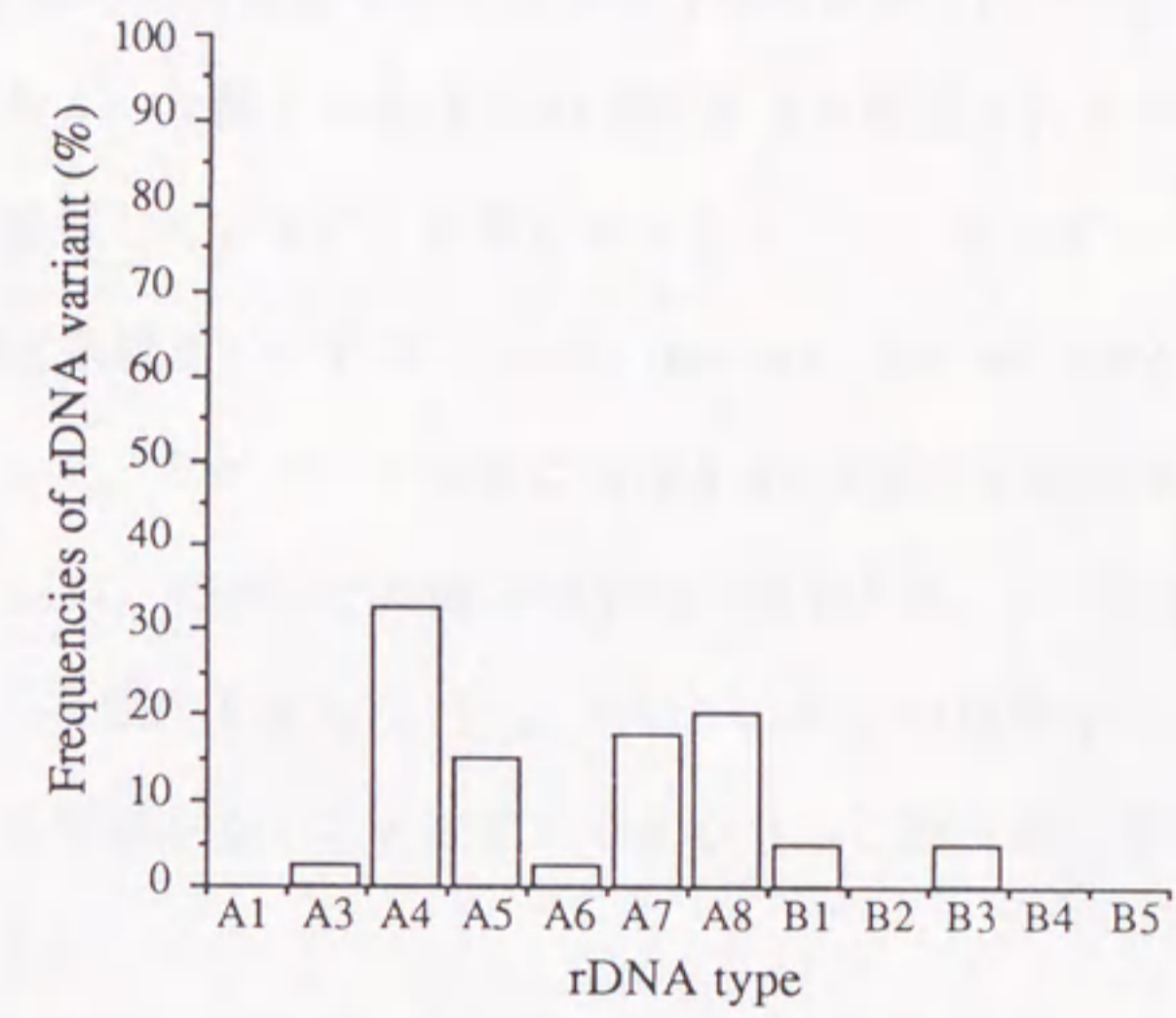


Fig. 5-8. Frequency of rDNA variant distribution in nonpathogenic population of *A. alternata* obtained from Alternaria blotch lesions on apple leaves of cultivars Orin and Fuji.

5-9)。このうち9種は、A3、A4、A5、A6、A7、A8、B1、B2およびB3型とそれぞれ判定された。残り2種のRFLPパターンは新規なものであったが、先に同定したBタイプのrDNA型と類似していたことから、B4およびB5型とそれぞれ命名した。これらrDNA系統の分布様式を採集地点間で比較調査した (Fig. 5-10)。その結果、どのグループも4~8種と多様なrDNA系統により構成されていること、さらに、その分布頻度が類似していることが明らかとなった。これらグループでは、A4、A5およびA8型が優占系統として分布し、A3、A6、A7、B1、B2、B3、B4およびB5型の検出頻度が低かった。5グループ全体におけるrDNA型の分布頻度を算出したところ、優占系統であるA4、A5およびA8型が全体の77%を占め、他の5種のrDNA型は最高でも8%と低い分布頻度を示した (Fig. 5-11)。以上の結果から、5グループの個体群構造に顕著な差異がないことが明らかとなり、これらを1集団と見なすことができるものと考えた。

空中飛散胞子由来の菌株群とリンゴから分離した菌株群のrDNA系統の分布様式が類似していることが明らかとなった (Fig. 5-7および5-10)。空中飛散胞子由来の菌株群は、リンゴ由来の菌株群で検出されたrDNA型を全て含んでおり、また、両者ともA4、A5およびA8型が優占系統であった。一方、ナシ黒斑病菌の個体群構造は他の菌株群とは明確に異なっていた (Fig. 5-4A)。ナシ黒斑病菌において優占系統であったA1型は、他の菌株群では全く検出されず、また、B2型もナシ黒斑病菌のみに優占的に分布していた。空中飛散胞子由来の菌株群とリンゴ由来の菌株群で優占系統であったA4、A5およびA8型のうち、ナシ黒斑病菌ではA4とA8型のみが低頻度で分布していた。しかしながら、ナシ黒斑病菌病斑から分離した非病原性菌株群からはA4とA8型のみが検出され、これら菌株が同圃場の非病原性*A. alternata*由来であることが示唆された (Fig. 5-4B)。

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

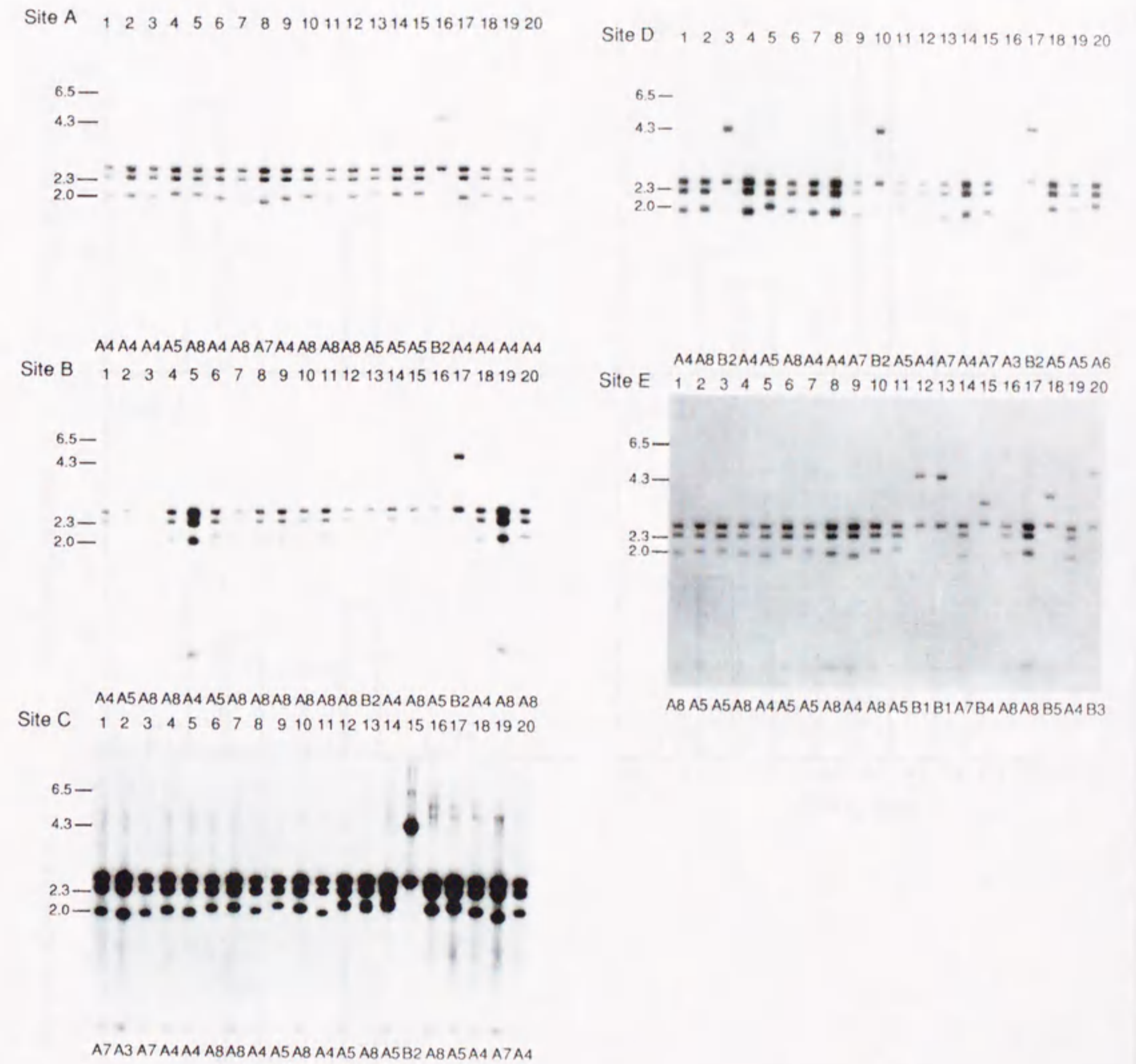


Fig. 5-9. RFLPs in rDNA repeat units among air-borne isolates of *A. alternata* collected at sites A, B, C, D and E in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). All isolates were pathogenic neither to apple nor to Japanese pear. Total DNA was cleaved with *Xba*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled Alt1 DNA. rDNA types were identified on the basis of the RFLP profiles of representative strains of rDNA types shown in Fig. 2-3. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left.

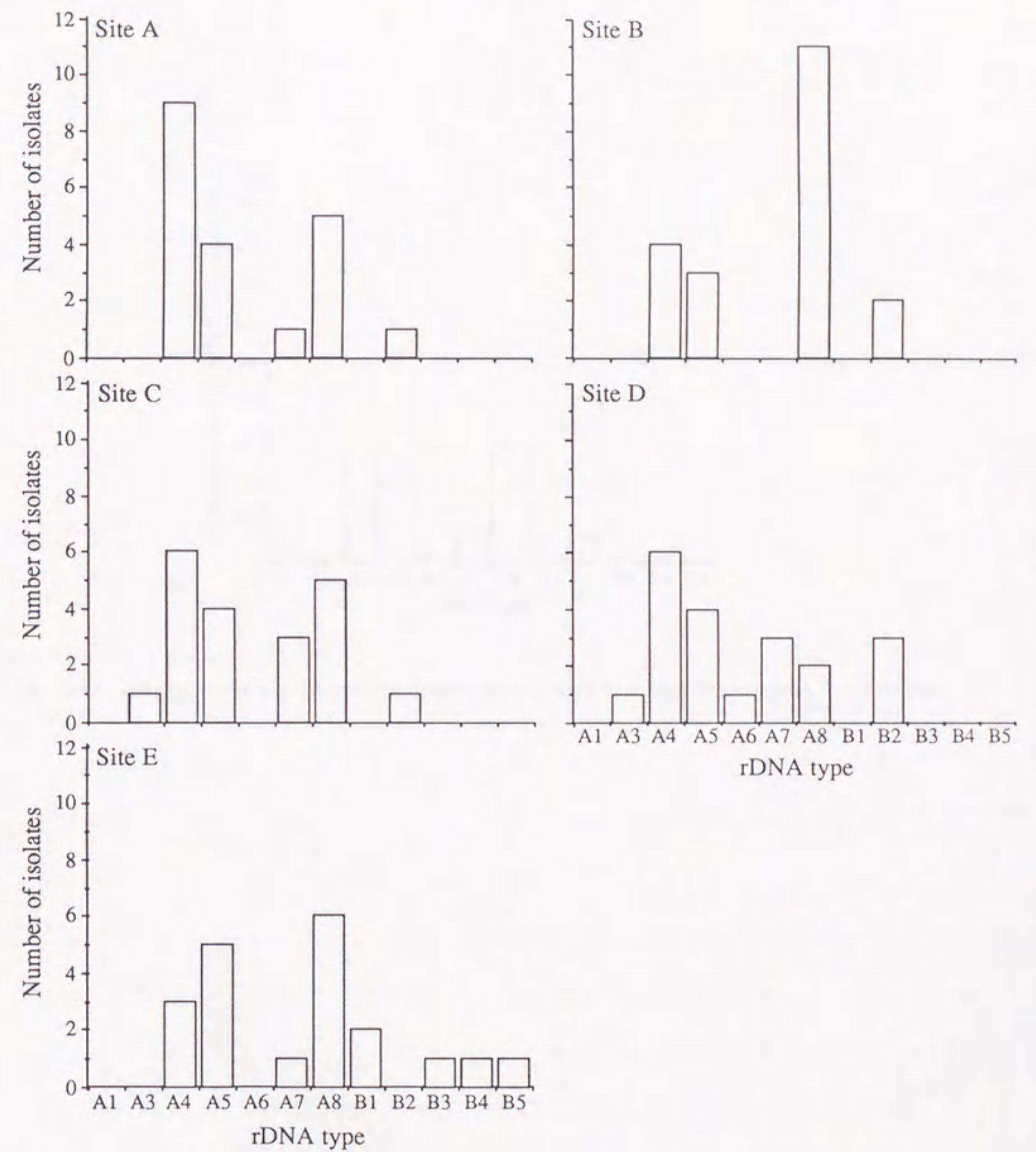


Fig. 5-10. Distribution of rDNA variants in populations of air-borne isolates of *A. alternata* collected at sites A, B, C, D and E. Origin of each population is shown in Fig. 5-1. All isolates were pathogenic neither to apple nor to Japanese pear.

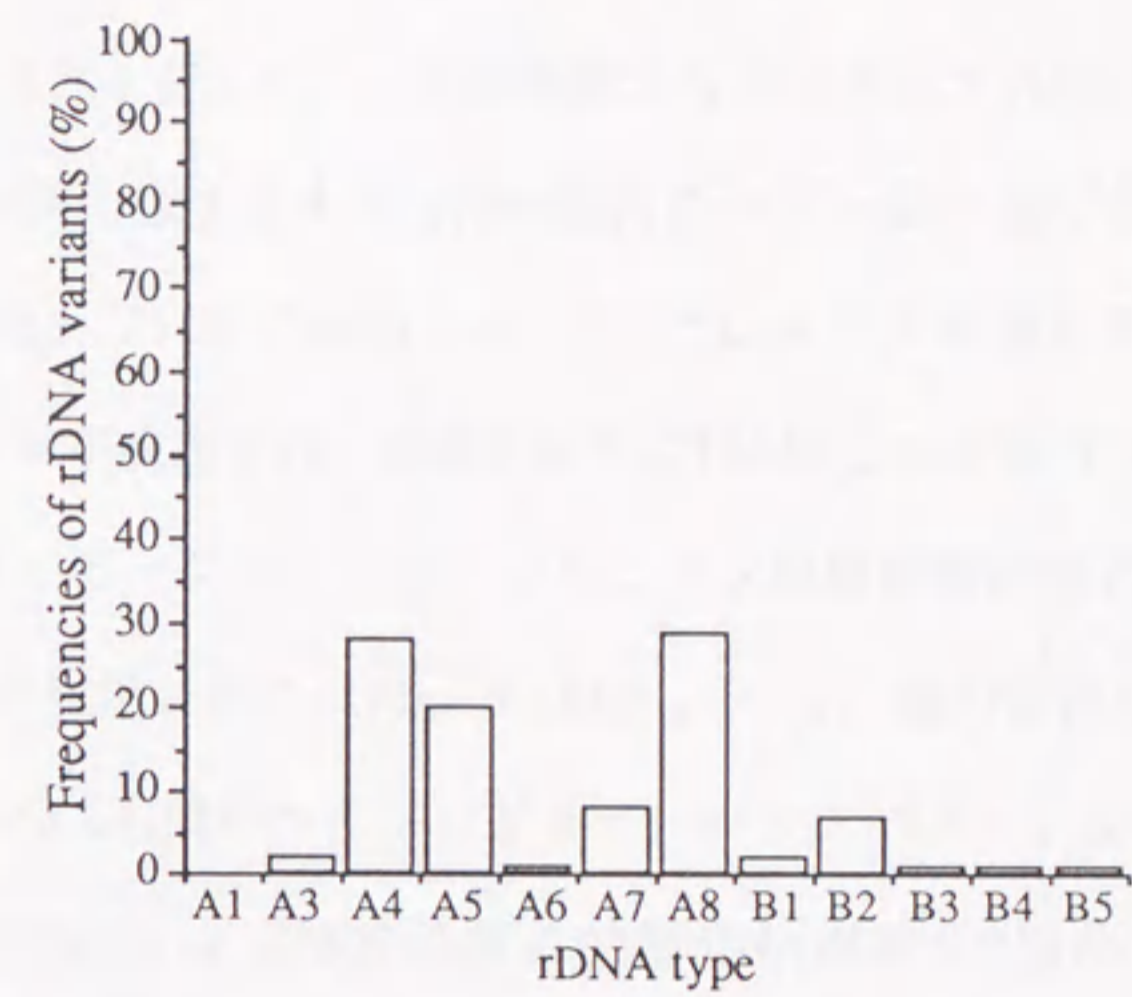


Fig. 5-11. Frequency of rDNA variant distribution in total samples of air-borne *A. alternata*.

供試菌株群の個体群構造をさらに詳細に解析するために、AAR9配列 (Adachi *et al.*, 1993) のDNAフィンガープリント分析を行った。供試菌株の全DNAを制限酵素 *Pst*Iにより切断後、AAR9 DNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った (Fig. 5-12、5-13、5-14および5-15)。供試菌株から検出されたDNAフィンガープリントパターンは、検出断片数すなわちAAR9配列のコピー数に基づき2グループに大別され、それぞれIおよびII型と命名した。I型ではサイズの異なる多数のハイブリダイゼーションバンドが検出され、II型では主に3 kb以上の少数のバンドが検出された。I型のハイブリダイゼーションパターンは、ナシ黒斑病菌の優占系統であるA1とB2型rDNA菌株でのみ検出された (Fig. 5-12A)。一方、他の菌株は、その由来や病原性とは関係なく、全てII型のハイブリダイゼーションパターンを示した (Fig. 5-12B、5-13、5-14および5-15)。非病原性菌のB2型rDNA菌株もII型のハイブリダイゼーションパターンを示し、これらがナシ黒斑病菌のB2型菌株とは遺伝的に異なることが明らかとなった。したがって、ナシ黒斑病菌で優占的に検出された2種のrDNA系統は、黒斑病菌に特異的な菌系であることが示唆された。

黒斑病菌でのみ検出されたI型内では、2種のrDNA系統 (A1型とB2型) 間でハイブリダイゼーションパターンに差異が認められた。しかしながら、同一系統内では同様なパターンが観察され、黒斑病菌の個体群構造が遺伝的に単純であることが示された。II型のハイブリダイゼーションパターンは極めて多様であり、同一のrDNA系統内でも異なるパターンが検出される場合が多く、ナシ黒斑病菌以外の各菌株群がそれぞれ遺伝的に多様な個体により構成されていることが明らかとなった。しかしながら、これら菌株群にそれぞれ特徴的な系統は見いだされなかった。また、ナシ黒斑病菌で分布頻度の低かったrDNA系統 (A4とB8型) の菌株や二十世紀ナシから分離された非病原性菌株もAAR9フィンガープリントではII型に類別され、空中飛散胞子由来の非病原性菌株群やリンゴ由来の菌株群と類似していた。

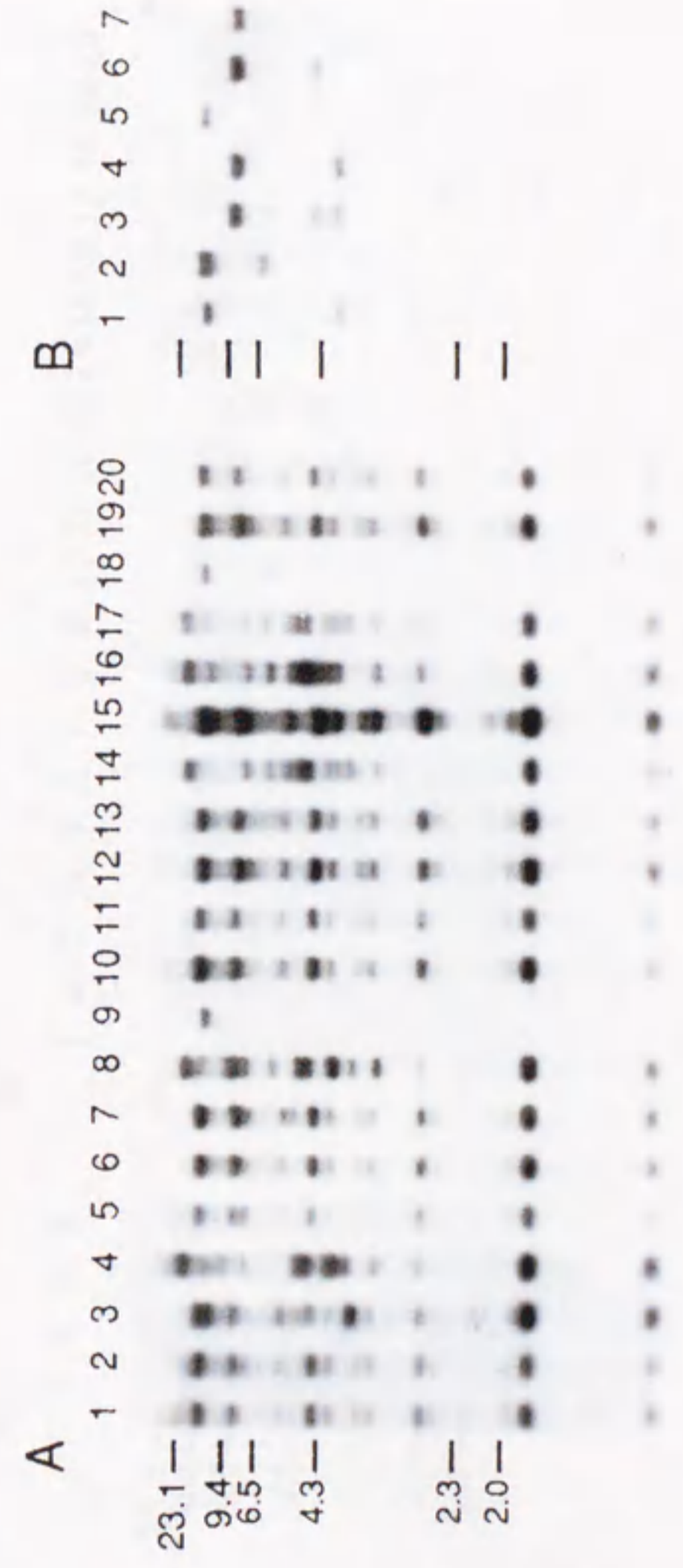


Fig. 5-12. AAR9-DNA fingerprints of isolates of *A. alternata* obtained from black spot lesions on Japanese pear leaves (cultivar Nijisseiki) in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). Total DNA was cleaved with *Pst*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled AAR9 DNA. Lane numbers correspond to Fig. 5-3. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left. A, pathogenic isolates to Japanese pear; B, nonpathogenic isolates to Japanese pear.

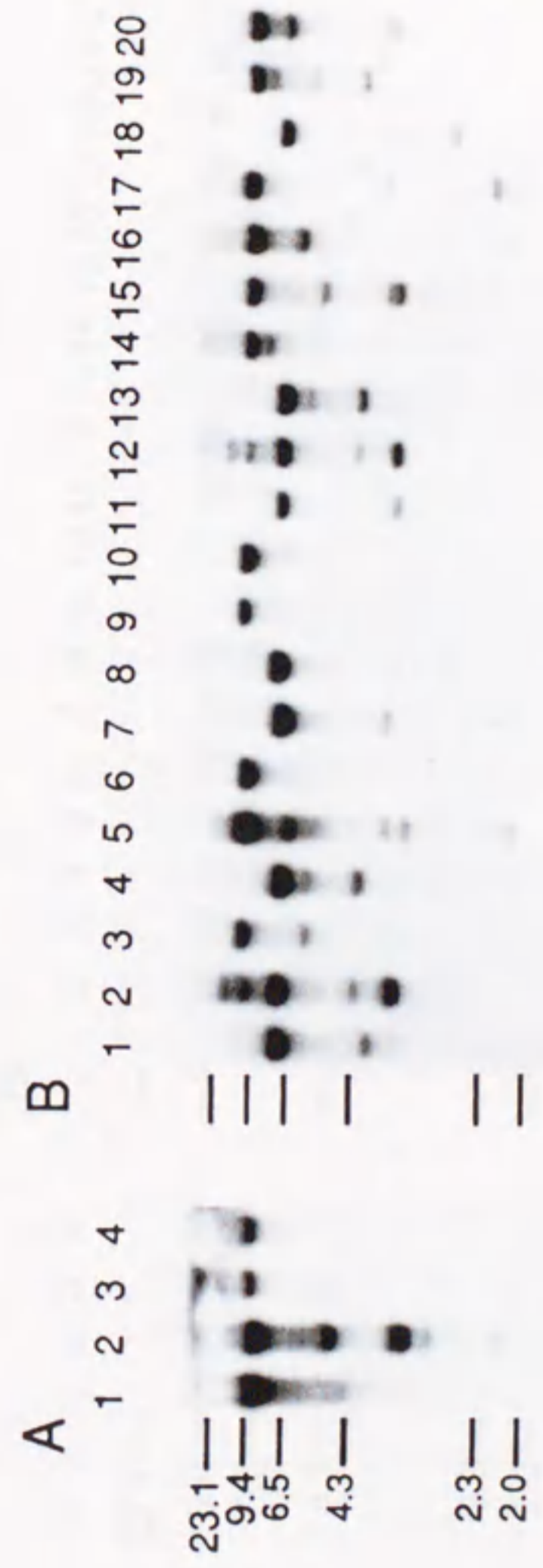


Fig. 5-13. AAR9-DNA fingerprints of isolates of *A. alternata* obtained from *Alternaria* blotch lesions on apple leaves (cultivar Orin) in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). Total DNA was cleaved with *Pst*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled AAR9 DNA. Lane numbers correspond to Fig. 5-5. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left. A, pathogenic isolates to apple; B, nonpathogenic isolates to apple.

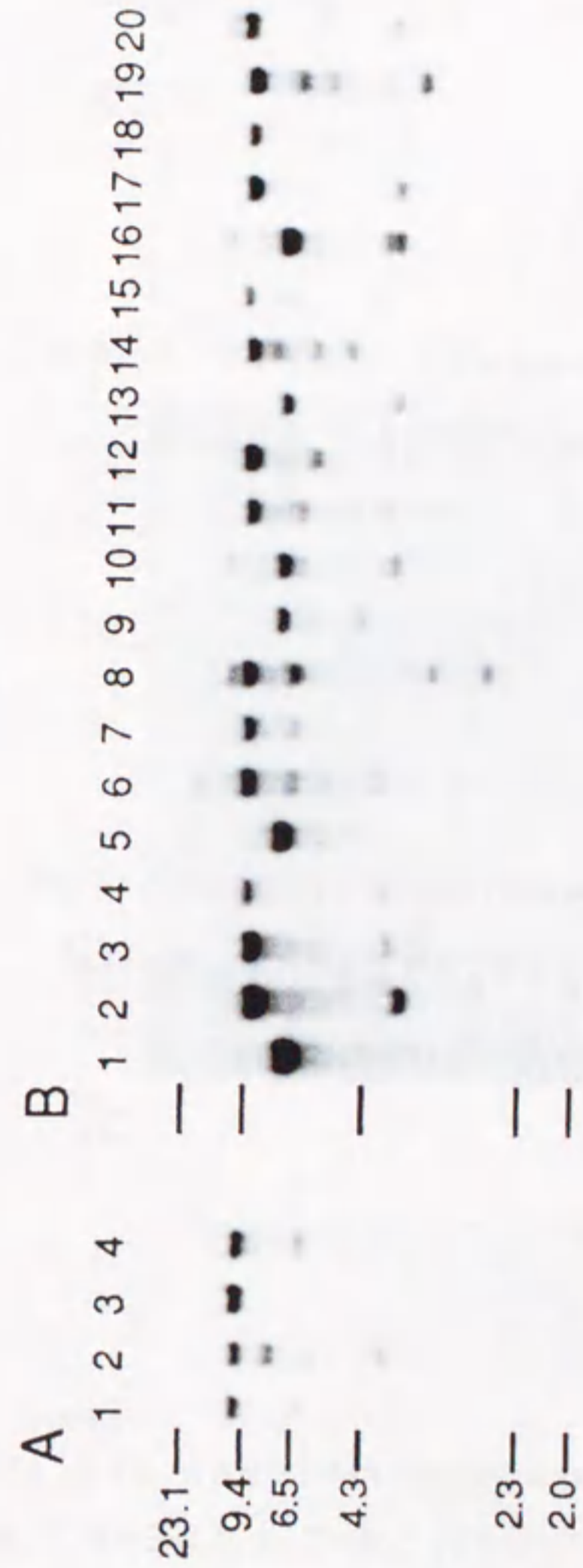


Fig. 5-14. AAR9-DNA fingerprints of isolates of *A. alternata* obtained from Alternaria blotch lesions on apple leaves (cultivar Fuji) in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). Total DNA was cleaved with *Pst*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled AAR9 DNA. Lane numbers correspond to Fig. 5-6. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left. A, pathogenic isolates to apple; B, nonpathogenic isolates to apple.

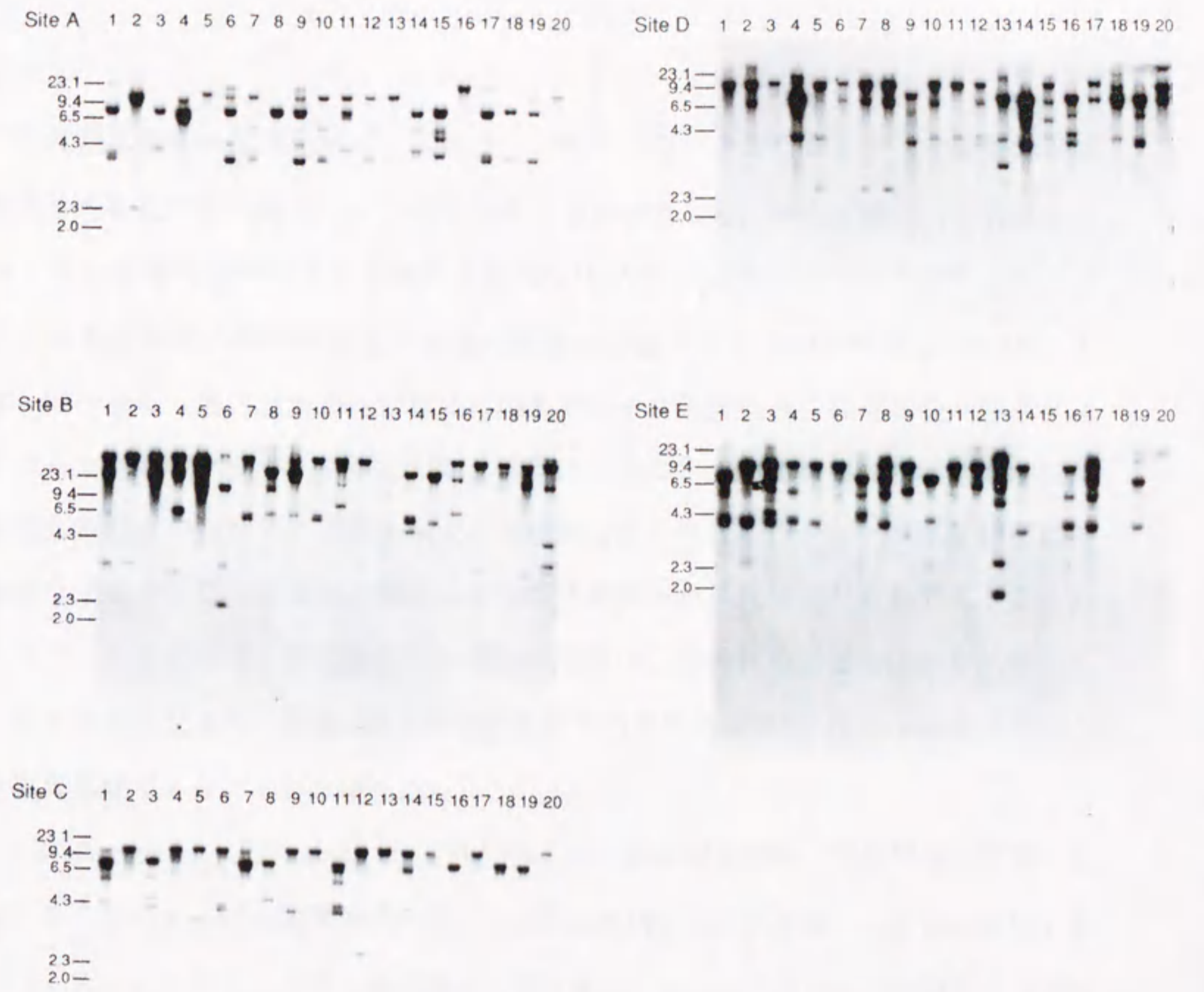


Fig. 5-15. AAR9-DNA fingerprints of air-borne isolates of *A. alternata* collected at sites A, B, C, D and E in Tottori Horticultural Experiment Station (Fig. 5-1). All isolates were pathogenic neither to apple nor to Japanese pear. Total DNA was cleaved with *Pst*I and fractionated in a 0.8% agarose gel. The Southern blot was hybridized with ³²P-labeled AAR9 DNA. Lane numbers correspond to Fig. 5-9. The sizes (in kilobases) of marker DNA fragments (*Hind*III-digested λDNA) are indicated on the left.

考 察

分散型反復DNA配列を用いたDNAフィンガープリント分析により、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を解析した。その結果、同一病原菌であっても地理的由来の異なる菌株は多様なDNAフィンガープリントパターンを示し、毒素生産菌の個体群構造に地理的隔離が影響することが示唆された。たとえば、同一圃場（名古屋大学実験圃場）由来のイチゴ黒斑病菌菌株群は全く同じフィンガープリントパターンを示したが、地理的由来の異なる菌株間では明確な多型が検出された。したがって、名古屋大学実験圃場由来の菌株群がイチゴ黒斑病菌に特徴的な系統ではなく、地理的隔離により個体群構造が単純化したものであると考えられた。したがって、供試菌株群の遺伝的背景は、各菌株の地理的由来を反映しているものと推定され、毒素生産菌群がそれぞれの地域の腐生性*A. alternata*から出現した変異系統であることが示唆された。

Nishimuraら（1979; 1980）により提唱された病原型仮説は、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌を同一種*A. alternata*の病原性変異系統として位置付けるものである。すなわち、これら病原菌は、腐生的な*A. alternata*がそれぞれ固有の宿主特異的毒素生産能を獲得することによって、特定の植物に病原性を示すようになった変異系統であると考えられる。したがって、実際の圃場に分布する毒素生産菌は、その圃場の土着の腐生性*A. alternata*から成立したものと考えられ、病原菌と土着の腐生性*A. alternata*の個体群構造がお互いに類似していることが予想された。そこで、rDNAのRFLP分析と反復DNA配列のDNAフィンガープリント分析を用いて、鳥取県園芸試験場内で隣接して栽培されている日本ナシとリンゴから分離したナシ黒斑病菌、リンゴ斑点落葉病菌、さらに同試験場内の空中飛散孢子由来の*A. alternata*について、それらの個体群構造を比較した。

ナシ黒斑病菌とリンゴ斑点落葉病菌は、化学構造が全く異なる宿主特異的毒素、

AK毒素とAM毒素をそれぞれ生産する (Okuno *et al.*, 1974; Ueno *et al.*, 1975; Nakashima *et al.*, 1985)。ナシ黒斑病菌が生産するAK毒素はエポキシトリエンカルボン酸とフェニールアラニン誘導体のエステル化合物であり、二十世紀ナシをはじめとする少数の日本ナシ品種に選択的な毒性を示す (Nakashima *et al.*, 1985)。また、リンゴ斑点落葉病菌が生産するAM毒素は環状ポリペプチド化合物であり、インドおよびアリシャス系統のリンゴ品種に毒性を示す (Ueno *et al.*, 1975; Okuno *et al.*, 1974)。日本ナシとリンゴの感受性品種が隣接して栽培されている本圃場では、そこで本来腐生的に生活する*A. alternata*集団からそれぞれの毒素生産菌株が出現し、ナシ黒斑病菌またはリンゴ斑点落葉病菌として成立したと推定された。したがって、両菌の個体群構造はその宿主の違いとは無関係に互いに類似していることが予想された。しかしながら、ナシ黒斑病菌菌株群はリンゴ斑点落葉病菌や空中飛散孢子由来の非病原性*A. alternata*の菌株群とは明らかに異なる個体群構造を有していた。rDNAのRFLP分析によって、ナシ黒斑病菌の多くの菌株がA1またはB2型に類別されたが、これら系統は他の個体群では少数系統であった。また、AAR9配列のDNAフィンガープリント分析でも、ナシ黒斑病菌のほとんどの菌株がI型と命名した特徴的なフィンガープリントパターンを示し、他の菌株群とは遺伝的に大きく異なることが明らかとなった。したがって、ナシ黒斑病菌の優占系統は土着の腐生性*A. alternata*から出現したものではなく、他の地域から移入した菌株であることも考えられた。

植物病原糸状菌では、風や水流による物理的移動、昆虫や小動物あるいは保菌苗や保菌種子などの移動にともなう持ち込みなどが、菌の短距離あるいは長距離移動を引き起こす (平井ら, 1986)。また、二十世紀ナシでは、苗木の移植や接木により繁殖・栽培が行われるため、苗木購入時に持ち込まれた黒斑病菌がその圃場の個体群構造に大きな影響を及ぼすことが報告されている (足立, 1995)。園芸試験場内のナシ黒斑病菌の優占系統も保菌苗の持ち込みにともない移入した菌株群かもしれない。

本圃場に分布するナシ黒斑病菌個体群は、リンゴ斑点落葉病菌や非病原性*A. alternata*の個体群に比べ単純な遺伝的構造を有することが明らかとなった。このような個体群構造の単純性は、自然あるいは人為的淘汰に対して何らかの適応を示した少数の毒素生産菌株がクローナルに増殖したことを示しているのかも知れない。一方、リンゴ斑点落葉病病斑から分離した*A. alternata*の個体群はその遺伝的構造が複雑であった。また、ナシ病斑由来の*A. alternata*菌株群からはナシ黒斑病菌が高率に分離されたが、リンゴ病斑由来のほとんどの菌株は感受性リンゴ品種に対して病原性を示さなかった。リンゴ斑点落葉病菌と同定された8菌株も、供試菌数が少なかつたにもかかわらず、その個体群構造はナシ黒斑病菌よりも複雑であった。この結果は、本圃場のリンゴ斑点落葉病菌の個体群が特定系統のクローナルな増殖により形成されたものではなく、多元的に出現した遺伝的に多様な菌株によって構成されていることを示唆した。

本圃場において、ナシ黒斑病菌とリンゴ斑点落葉病菌の個体群構造が明確に異なっていたことは、毒素生産病原菌の寄生適応性を研究する上で興味深い現象である。日本ナシとリンゴでは、樹形、薬剤防除、作付け面積などの栽培環境が大きく異なる。また、供試した二十世紀ナシは黒斑病菌に対して高度の感受性を示すのに対して、オウリンやフジは感受性リンゴ品種の中でも比較的斑点落葉病の発病率が低い品種とされている（山口・大竹, 1986）。このような病原菌に対する宿主の感受性の差異が、両菌の個体群構造に影響を及ぼしているのかも知れない。個体群構造に影響をおよぼす要因を解析するためには、栽培品種、栽培の歴史、作付面積などの栽培環境の異なる圃場間で同一病原菌の個体群構造を比較解析することが重要である。このような要因を明らかにすることによって、植物病原糸状菌の寄生適応性について、新たな知見が得られることが期待される。

空中飛散孢子由来の*A. alternata*100株は日本ナシにもリンゴにも病原性を示さず、これらを腐生性*A. alternata*として位置付けることができると考えた。rDNAのRFLP分析により、これら菌株群からは11種のrDNA系統が検出され、腐生性*A. alternata*が遺

伝的に多様な菌株群により構成されていることが明らかとなった。空中飛散菌は、ナシとリンゴ圃場内さらに圃場間の空き地を含む5カ所から採集したものであるが、rDNA系統の分布様式に採集地点間で有意な差異は認められなかった。したがって、罹病葉を採取したナシとリンゴ圃場に分布する腐生性*A. alternata*の個体群は類似した遺伝的構造を有することが示された。*A. alternata*の胞子は空中飛散性が高く、広範囲にわたり移動することが報告されている (Bashan, 1986; Bashan *et al.*, 1991)。また、本菌が高い腐生生活能力を有することから、自然界の種々の場所で生存が可能であると考えられている (Rotem, 1994)。このような性質が、遺伝的に多様な個体が比較的均一に分布していることの原因の一つと考えられた。

リンゴ2品種から分離した非病原性*A. alternata*の個体群構造に品種間で有意な差異は認められず、また、検出されたrDNA型はすべて空中飛散菌株群から検出されたものと同一であった。したがって、リンゴ由来の非病原性菌株群は、腐生性*A. alternata*の集団に由来することが強く示唆された。また、分離したリンゴ斑点落葉病菌は、菌株数が少なく分離品種との関係については検討できなかったが、これら菌株から検出された3種のrDNA型は空中飛散菌にも分布し、このうち2種は空中飛散菌における優占型 (A4型とA8型) であった。これら2系統はナシ黒斑病菌にも少数系統として存在し、さらに、黒斑病病斑から分離した非病原性菌株では全てがA4型またはA8型であった。また、DNAフィンガープリント分析でも、リンゴ斑点落葉病菌とナシ黒斑病菌の一部は、腐生性*A. alternata*と区別できなかった。以上の結果は、ナシ黒斑病菌の少数系統とリンゴ斑点落葉病菌の菌株群が、土着の腐生性*A. alternata*集団から出現した可能性を示した。

リンゴ病斑から分離した菌株の約90%は非病原性であり、また、それらは空中飛散胞子由来の*A. alternata*と類似した遺伝的背景を有することが示された。AdachiとTsuge (1994) は、ナシ黒斑病菌が形成した病斑に比較的高頻度で腐生性*A. alternata*が重複感染していることを報告した。また、宿主特異的毒素生産菌では、毒素生産

性の欠損にともなう病原性の失活現象が観察されている (Nishimura *et al.*, 1982)。
しかしながら、リンゴ病斑からの非病原性菌株の異常に高い分離率を、重複感染や
毒素生産性失活現象の結果であるとは考えにくい。日本ナシとリンゴのどちらから
分離した菌株も、罹病組織をアンチホルミンにより十分に表面殺菌した後、培地上
で出現してきたものである。そのため、宿主組織内に侵入していた菌である可能性
が高い。非特異的毒素生産性なども含め、これら非病原性菌株がいかにしてリンゴ
葉に侵入したかについて、今後さらに検討する必要がある。

第6章 総合考察

近年、進化理論の実験的検証が進むにつれて、これまで種の記載を中心に発展してきた分類学に系統進化学的基盤を導入する機運が高まっている（馬渡, 1994）。つまり、種の識別、さらには、高次分類群を含めた分類体系に生物の進化的背景を反映する必要性が認識されてきている（馬渡, 1994）。糸状菌の形態は単純であるため、分生孢子形態など少数の特徴のみを基準として分類され、さらに、植物病原菌では宿主範囲や病原性なども加味されるため分類基準の混乱を招いている事例も多い。また、農業現場への相次ぐ新品種の導入は、新病害の発生、病原菌の寄生性分化などを引き起こし、病原菌分類の基準をますます複雑化している。このため、糸状菌の分類体系の系統学的整理に向けて、新たな研究方法論の開発が望まれている。

近年の遺伝子操作技術の著しい進歩は、系統分類学や生態学などの分野にもDNAレベルの情報を導入する道を拓き、これらの分野に飛躍的な進歩をもたらした。植物病原菌を含めた糸状菌の分類学にもDNA解析技術が導入され、これまでほとんど未知であった糸状菌の系統進化や種分化について分子系統学的情報を取り入れた分類学の再構築が進められつつある（Bruns *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 1993; Maclean *et al.*, 1993; McDonald and McDermott, 1993）。本研究では、宿主特異的毒素を生産する *Alternaria* 属菌の分類学的位置付けについて、DNA解析技術を用いて分子系統学的に検証するとともに、寄生性分化の進化生態学的解析を試みた。

Alternaria 属菌には、宿主特異的毒素を生産する7種の植物病原菌が存在する。これら病原菌が、それぞれ全く異なる植物に病気を引き起こすことから、発生当初、別種として分類された（Tanaka, 1933; Ruehle, 1937; Sawamura, 1962; Pegg, 1966; Lucas, 1975; Cho and Moon, 1980）。一方、Nishimuraら（1979; 1980）は、腐生的な *A. alternata* とこれら病原菌が形態的にほとんど区別できないこと、各病原菌の病原性

が宿主特異的毒素生産性により決定されていることを明らかにした。そこで、これら病原菌を腐生性*A. alternata*がそれぞれ固有の宿主特異的毒素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ある種の変異系統であると考え、*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)。この仮説に基づくならば、それぞれの毒素生産菌と腐生性*A. alternata*はお互いに高い遺伝的類縁性を有することが予想された。しかしながら、これまでこの仮説を支持する遺伝学的な実験データは得られていなかった。

*Alternaria*属菌は不完全菌であり、交配能の有無に基づく種の同定や、毒素生産性の遺伝解析は不可能である。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、腐生性*A. alternata*およびこれらとは形態的に明らかに異なる*Alternaria*属の他種について、核染色体のrDNAのRFLP分析、rDNAのITS領域の塩基配列の比較、さらに、ミトコンドリアDNAのRFLP分析を行い、*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について検討した。

6塩基認識制限酵素*Xba*Iを用いたrDNAのRFLP分析により、7種の宿主特異的毒素生産菌から9種のrDNA多型が検出された(第2章)。これらrDNA多型は特定の毒素生産菌に固有なものではなく、同一のrDNA多型が異なる毒素生産菌さらには腐生性*A. alternata*からも共通して検出された。一方、形態的に異なる他種からは毒素生産菌と同様な多型は全く検出されず、それぞれ種特異的なrDNA型を示した。また、4塩基認識制限酵素*Hae*IIIと*Msp*Iを用いたRFLP分析に基づき、平均距離法によるクラスター分析を行ったところ、毒素生産病原菌と腐生性*A. alternata*で検出されたrDNA多型が他種とは明確に分岐した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示唆された(第2章)。さらに、rDNAのITS領域の塩基配列の比較解析では、全ての毒素生産菌が同一のITS1の塩基配列を有し、さらに腐生性*A. alternata*からも同一配列が検出された(第3章)。また、7種の毒素生産菌からは3種の異なるITS2配列が検出されたが、このうち2種は複数の毒

毒素生産菌と腐生性*A. alternata*にも共通して分布していた（第3章）。ITS1とITS2の塩基配列に基づき近隣結合法により系統解析を行ったところ、毒素生産菌と腐生性*A. alternata*から検出された塩基配列は密接に結合した単一のクラスターを形成し、これらITS領域の変異が種内多型であることが明確となった（第3章）。同様の結果は、ミトコンドリアDNAのRFLP分析によっても示された（第4章）。制限酵素*Bgl*II、*Hind*IIIまたは*Xba*Iを用いたRFLP分析によって、同一のミトコンドリアDNA多型が異なる毒素生産菌と腐生性*A. alternata*から共通して検出され、ミトコンドリアDNA多型の分布からもこれらを識別することはできなかった。また、ミトコンドリアDNAのRFLP分析に基づき、平均距離法によりクラスター分析を行ったところ、系統樹上で毒素生産菌と*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（第4章）。以上の結果から、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌が同一種*A. alternata*であることが分子系統学的に証明されたものと考えた。

宿主特異的毒素を生産する7種の植物病原菌の病原型仮説がこれまで広く受け入れられなかった理由の一つとして、*Alternaria*属菌全般にわたる分類学的混乱が挙げられる。*Alternaria*属菌の種分類は、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）。さらに、本属には多くの植物病原菌が含まれることから、宿主範囲などの病理学的性質も分類基準に加味されている（Simmons, 1992; Yu, 1992）。しかしながら、*Alternaria*属菌ではこれらの形態的、生理的な諸性質が培養条件や突然変異などによって変化しやすく、分類基準を複雑化している（Simmons, 1992; Yu, 1992; Rotem, 1994）。Nishimuraら（1978; 1979; 1980）は、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌について分生胞子の形態観察とそのサイズの計測を行った。その結果、これら病原菌が形態的に*A. alternata*と類似していることを見だし、病原型仮説を提案した（Nishimura *et al.*, 1979; Nishimura, 1980）。一方、Simmons（1992）は、*A. alternata*とその近縁の*Alternaria*属菌の種の同定基準に分

生孢子の立体的形成様相を採用している。このため、Nishimuraら (1978; 1979; 1980) の分類がこの基準を考慮していないことを指摘し、病原型仮説に疑問をなげかけている (Simmons, 1992)。Simmonsの分類基準に従えば、従来の*A. alternata*は複合種であり、さらに細分化した種分類が必要とされる。

一方、核染色体のrDNAとミトコンドリアDNAのRFLP分析およびrDNAのITS領域の塩基配列の比較の結果、7種の毒素生産菌と腐生性*A. alternata*の集団がこれらDNA領域における同一の変異を共有していることが明らかとなった。さらに、DNA分析に基づく系統解析の結果、毒素生産菌と腐生性*A. alternata*は孢子形態の異なる他種菌とは明確に分岐した単一の遺伝的クラスターを形成した。すなわち、宿主特異的毒素生産菌と*A. alternata*から検出されたrDNAおよびミトコンドリアDNAの遺伝的変異は、すべて種内多型の範疇に入るものと考えられた。TakeuchiとKuninaga (1994) は、宿主特異的毒素を生産するナシ黒斑病菌、リンゴ斑点落葉病菌およびタバコ赤星病菌と腐生性*A. alternata*について、DNA-DNA相同性解析を行った。その結果、これらがお互いに85~95%のDNA相同性を有することを見いだした。一方、同一種として広く受け入れられている*Fusarium oxysporum*の分化型 (*forma speciales*) について同様の手法を用いて比較した場合、65~95%のDNA相同性を示すことが明らかとなった (Kuninaga and Yokosawa, 1989)。近年、DNA-DNA相同性解析は、微生物の種分類の一つの有効な基準として採用されている。一般に、酵母では70%以上 (Kurtzman, 1987)、また、細菌では60%あるいは70%以上のDNA相同性が同一種として同定する場合の基準とされている (Wayne *et al.*, 1987)。したがって、毒素生産菌と*A. alternata*間で観察されたDNA相同性は、これらが同一種であることを支持している。Rotem (1994) は、形態的および生理的諸性質の多様性や可変性が*A. alternata*の特性であるとして、形態的変異に基づき種を細分化することの問題点を指摘している。すなわち、宿主特異的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*A. alternata*の種内多型として解

積すべきであると考えた。

本研究で推定された*Alternaria*属菌の種の系統関係は、先に述べたNeergaard (1945)によるグループ分けを支持するものであった。毒素生産菌と*A. alternata*が含まれるLongicatenataeグループだけでなく、長いピークを有する分生胞子を単生するNoncatenataeグループの種間にも高い遺伝的類縁性が観察された。Rotem (1994)は、Neergaard (1945)により分けられた*Alternaria*属菌の3グループ内の種間では、分生胞子サイズが重複し、互いに識別できない場合があることを報告している。供試したNoncatenataeのうち、*A. dauci*、*A. porri*および*A. solani*は形態が極めて類似していることから、これらを*A. porri* (Neergaard, 1945) または*A. dauci* (Joly, 1964) の分化型 (forma specialis) として位置付けることも提案されている。これらの結果を総合的に考察した場合、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、分子系統学的な解析法を利用することにより、より単純に整理されるものと考えた。

近年、種分化が生殖隔離とその後の遺伝的変異の蓄積により生じることがほぼ明らかにされた (馬渡, 1994)。そこで、特に高等生物の分類では種の定義として交配の成否、すなわち、生殖隔離を基準とした生物学的種概念が採用されている (馬渡, 1994)。一方、*Alternaria*属菌などの不完全菌類では交配能が欠除しているため、未だ、少数の形態的特徴や病原性などを種分類の基準としている。この場合、どの程度の形質の差異を種の基準として認めるかについては、一部の専門家にゆだねられた経験的根拠に頼らざるをえない場合もあり、再現性という科学的根拠についてはいまだ十分整理されているとはいえない。一方、遺伝的類縁関係をDNAレベルで検討することにより、完全世代が見いだされていない糸状菌についても、生物学的種概念に基づいたより有効な分類体系を構築できる可能性が予想される。本研究では、*Alternaria*属菌全般についての詳細な解析はできなかったが、さらに多くの種および菌株を供試することによって、*Alternaria*属菌さらにはその近縁属菌も含めた種

分類の再検討が望まれる。

宿主特異的毒素生産菌の分類学的位置付けを明確にする上で、本菌の病原性、さらには寄生性分化の分子進化的機構の解明は極めて興味ある課題である。これまで、植物病原糸状菌の種分化、さらには種内分化の機構として宿主との相互作用、すなわち共進化の重要性が示唆されてきた（清沢, 1992; 土佐, 1995）。植物病原菌はその生活環を宿主植物に大きく依存するため、宿主の系統分化にともない病原菌の寄生適応性の分化が起こること、つまり、病原菌の系統分化が宿主との共進化により生じることが推察されている（清沢, 1992; 土佐, 1995）。ムギ類うどんこ病菌（*Erysiphe graminis*）には、ムギ類の属に対応した寄生性分化を示す分化型が存在する。これら分化型間では交配が成立する場合があるが、子嚢殻の形成率、子嚢胞子の稔性などに分化型間で差異が認められる。この分化型間の生殖隔離の程度が、宿主ムギ属間の類縁関係とよく一致することから、分化型間の遺伝的類縁関係と宿主間の類縁関係とが対応すると考えられている（Hiura, 1978）。同様な宿主との共進化の例として、イネ科植物とそのいもち病菌（*Pyricularia*属菌）について報告されている。土佐ら（1995）は、イネ、アワ、キビ、シコクビエ、コムギまたはメヒシバにそれぞれ寄生性を示す各種イネ科植物いもち病菌におけるレトロトランスポゾンMAGGY配列の分布を調査した。その結果、アワまたはイネに寄生性を示す菌系のみがMAGGY配列を有することが明らかとなり、両菌の近縁性が示唆された。なお、これらの宿主植物の中でイネとアワは最も類縁関係が高いとされている。一方、宿主特異的毒素を生産する*Alternaria*属病原菌の宿主は、ナス科、バラ科、ミカン科などの系統学的に遠縁の植物にまたがっている。さらに、ほとんどの場合、特定の植物種に病原性を示すのではなく、宿主は特定品種に限られる。DNA解析の結果は、各毒素生産菌が固有の遺伝的背景を有する系統として分化したものでないこと、すなわち、宿主の差異と毒素生産菌の遺伝的背景の間に何ら相関のないことを示した。

*A. alternata*は本来腐生菌であり、生存にとって宿主植物の存在が必ずしも必要でな

いことが予想される。つまり、これら病原菌は、宿主植物の有無とは無関係に腐生生活環を全うしている*A. alternata*の毒素生産性変異系統であり、感受性植物の出現によって、はじめて病原菌として認知されるようになったと考えられる。このような性質は、宿主植物依存型の生活環を全うする絶対寄生性のうどんこ病菌や腐生性が低いと考えられているいもち病菌などとは大きく異なる。生活環の宿主植物に対する依存性の違いが病原菌の進化に大きく影響することを示唆している。

毒素生産病原菌の病原性分化に宿主植物の存在が関与しないことは、タンゼリン brown spot 病菌の宿主範囲からも推定される (Kohmoto *et al.*, 1993)。タンゼリン brown spot 病菌は、タンゼリンの他に、ナシ黒斑病菌感受性の二十世紀ナシなど少数の日本ナシ品種に対しても病原性を示すことが見いだされた。本病は米国、オーストラリアおよびイスラエルで報告されているが、日本では未発生である。一方、二十世紀をはじめとする黒斑病感受性の日本ナシ品種は、米国、オーストラリアおよびイスラエルでは栽培されていない。したがって、これまで本菌が感受性日本ナシに出会う機会はなかったものと考えられる。本菌の宿主特異的毒素、ACT毒素の化学構造が決定され、日本ナシに対する病原性の物質的根拠が示された (Kohmoto *et al.*, 1993)。本菌は構造類似のACT毒素IとACT毒素IIを生産するが、これらはナシ黒斑病菌の生産するAK毒素と同様にデカトリエン酸構造を有する (Fig. 1-1)。ACT毒素Iは、本来の宿主であるタンゼリンだけでなく二十世紀ナシに対しても毒性を示し、毒性IIは二十世紀ナシに対してより強い毒性を示す (Kohmoto *et al.*, 1993)。したがって、本菌は、宿主の存在とは無関係にこれらの毒素生産性を獲得し、未だ遭遇する機会のない植物に対して潜在的病原性を保持しているわけである。

宿主植物に対する病原菌の親和性成立機構には質的に異なる2つの段階があるとされている (Ellingboe, 1976; Day, 1976; Heath, 1980)。植物は本来、外来微生物に対して抵抗性を示すが、特定の微生物はこれを打ち破ることによりその植物の病原菌として成立する。この現象は基礎的親和性の確立と呼ばれている (Heath, 1980)。

さらに、自然あるいは人為交配による種分化や種内系統分化（品種の確立）にともない、植物と病原菌は真性抵抗性遺伝子と非病原性遺伝子との特異的な相互作用 (gene-for-gene relationship) に基づくより複雑な相互関係を確立する (Heath, 1980)。宿主特異的毒素の病原性における役割は、植物との基礎的親和性を確立することにあると考えられている (Otani and Kohmoto, 1992)。すなわち、これら病原菌は病原菌進化の最も単純な始原的な例であると推察される。清沢 (1992) は、宿主特異的毒素生産菌が病原菌として進化的に初期段階にあるとした上で、次のような進化モデルを提唱した。基礎的親和性の確立後、病原菌は宿主の死によりかえって繁殖の場をなくし、このため、病原性の弱体化と宿主への適応が起こり、その結果、宿主細胞を殺して養分を吸収する殺生菌から生きた細胞からのみ養分を摂取する絶対寄生菌へと進化が起きると推論した。このモデルに立脚すると、病原菌の進化が進むにつれて、植物に寄生するために必要な遺伝子（病原性遺伝子）が増加することが予想される。

本研究によって、異なる毒素生産菌と非病原性 *A. alternata* に類似の遺伝的背景を有する系統が分布し、各毒素生産菌が遺伝的に分化していないことが明らかとなった。すなわち、これら病原菌は宿主特異的毒素生産性の獲得により、顕著な遺伝的分化をともなうことなく成立した *A. alternata* の病原型であることが示された。

Nishimura ら (1978; 1979; 1980) は、宿主特異的毒素生産菌の病原性を非特異的な角皮感染能力と宿主範囲を決定する毒素生産能力に分け、前者が腐生菌を含めた全ての *A. alternata* に共通の性質であり、後者がそれぞれの病原菌に特徴的な性質であると規定した。本研究によって、毒素生産菌の個体群構造が遺伝的に極めて複雑なことが明らかとなった。たとえば、*Xba*I を用いた rDNA の RFLP 分析により、7 種の毒素生産病原菌と非病原性 *A. alternata* からは非転写領域 (IGR) の長さおよび *Xba*I 認識部位の有無に基づく 9 種の多型が検出された (第 2 章)。一般に、糸状菌では、rDNA の種内多型が観察されることは希である (Bruns *et al.*, 1991)。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から成る集団であることが推定された。さらに、ミトコンドリアDNAのRFLP分析によっても同様な遺伝的多様性が示された。これまでに、他の一部病原糸状菌においても種内での高い遺伝的多様性が観察されている (McDonald and Martine, 1990; Hodoson *et al.*, 1993)。Hodosonら (1993) は、アボガド、マンゴ、パパイヤまたはバナナに病害を引き起こす炭そ病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) のそれぞれの系統の個体群構造をrDNAとミトコンドリアDNAのRFLP分析により解析し、各病原系統が極めて多様な個体によって構成されていることを明らかにした。この多様性の原因として、それぞれの病原性系統が少数の菌株から成立し、その後、時間の経過と共に変異を蓄積していった、あるいは、多くの遺伝的に異なる菌株が各病原菌として成立したとする2つの可能性を考えた (Hodoson *et al.*, 1993)。一方、病原菌の処女地への新規移入を含め、新しく発生が確認された病原菌の個体群構造は一般に単純であり、遺伝的多様性が低いことが観察されている (Gordon and Okamoto, 1992; Goodwin *et al.*, 1994; Kurdyla *et al.*, 1995)。南米の中央メキシコを起源地とするジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) には、A1型とA2型と呼ばれる2つの交配型が知られている。このうちA1交配型の菌は、1840年代以降に全世界に広まったと考えられている (Goodwin *et al.*, 1994)。世界各地から収集したA1交配型菌のDNAフィンガープリント分析を行ったところ、移入後150年を経過する現在でも世界各地の菌株からほぼ同一のDNAフィンガープリントパターンが検出された (Goodwin *et al.*, 1994)。また、オーク立枯病菌 (*Ceratocystis fagacearum*) はアメリカ合衆国のみで発生が確認されているため、比較的新しく発生した病原菌であると推定されている (Kurdyla *et al.*, 1995)。そこで、アメリカ合衆国各地から採取した本菌の菌株群についてミトコンドリアDNAのRFLP分析と核DNAのRFLP分析を行ったところ、DNA多型がほとんど検出されず、個体群構造が極めて単純であることが明らかとなった (Kurdyla *et al.*, 1995)。このような個体群構造の単純性は、少数系統の地理的移動 (ジャガイモ疫病菌のA1交配型の場

合)、あるいは、腐生菌から病原菌が成立(オーク立枯病の場合)する際に少数の個体が関与したこと(創始者効果)に起因するものと考えられている(Goodwin *et al.*, 1994; Kurdyla *et al.*, 1995)。

宿主特異的毒素生産病原菌のほとんどは、品種改良により作出された新品種に発生した新規病害であり、発生が確認されてから100年にも満たないものが多い(甲元, 1990)。にもかかわらず、各毒素生産菌の個体群が高い遺伝的多様性を示すことは、本菌が少数の毒素生産遺伝子の獲得により極めて多元的に出現したことを示していると考えられる。今後さらに、病原性の進化機構について検討するためには、系統学的解析と同時に、毒素生産性遺伝子を含め病原性関連遺伝子の単離とその制御機構の解明が重要課題である。すでに、*A. alternata*の種々の遺伝子操作技術が確立されており、今後の進展が期待される(Tsuge *et al.*, 1990; Kimura and Tsuge, 1993; Shiotani and Tsuge, 1995)。

寄生性分化が見られる病原菌では、病原性形質が多数の遺伝子によって支配されている場合には、病原菌の遺伝的傾向は宿主の系統関係に大きく影響を受けるが、病原性に関与する遺伝子が少数の場合には、病原菌の遺伝的傾向は宿主の違いよりもむしろ地理的隔離に大きく支配されることが予想される(Koch *et al.*, 1991)。したがって、宿主特異的毒素生産病原菌が毒素生産性の獲得のみによって成立し、しかもその生存に宿主植物を必ずしも必要としないのならば、本菌の遺伝的傾向は土着の腐生性*A. alternata*の遺伝的傾向を反映したものになると推定される。Adachiら(1993)は、鳥取県、愛知県、岐阜県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DNAフィンガープリント分析を行い、各個体群間に地理的由来を反映した分化の認められることを明らかにした。同様に、Hwangら(1987)は、朝鮮半島の各地から採集したリンゴ斑点落葉病菌のアイソザイム分析を行い、本菌の個体群構造に地理的隔離の影響が認められることを報告している。したがって、同一地域に発生している毒素生産菌の個体群構造はその地域に生息する腐生性*A. alternata*の集

団と類似していることが予想された。そこで、鳥取県園芸試験場内の隣接したリンゴとナシ圃場から、それぞれリンゴ斑点落葉病菌とナシ黒斑病菌を、さらに圃場内の空中飛散胞子から非病原性*A. alternata*を採集し、各菌の個体群構造をrDNAのRFLP分析とDNAフィンガープリント分析によって解析した(第5章)。その結果、リンゴ斑点落葉病菌と腐生性*A. alternata*は複雑な個体群構造を有し、さらに、両者には共通した変異が分布していることが明らかとなった。一方、ナシ黒斑病菌は少数系統が優占する単純な個体群構造を示し、さらに、これら優占系統はナシ黒斑病菌に特異的な系統であることが明らかとなった。ナシ黒斑病菌では、苗木購入時に毒素生産菌が圃場に持ち込まれることが報告されている(足立, 1995)。したがって、ナシ黒斑病菌の優占系統が他の地域から移入した菌株群であることが示唆された。また、リンゴ斑点落葉病菌とナシ黒斑病菌の一部では土着の腐生性*A. alternata*と区別できないものもあり、実際の圃場においても、宿主特異的毒素生産菌が腐生性*A. alternata*から成立した可能性が示された。

植物病原菌の個体群構造に変化を与える要因として、感染苗木の人為的な持ち込みや風媒などによる移入(Aylor, 1990; Brown *et al.*, 1994)、栽培植物の抵抗性遺伝子の差異にともなうレースなどの病原性系統の変動(Wolfe *et al.*, 1992)、菌の病斑形成能に関連した孢子形成数の差異(林, 1985; Klittich and Bronson, 1986)、地理的隔離(Hwang *et al.*, 1987; Adachi *et al.*, 1993)、一年生植物の冬場の枯死による菌の大量絶滅とその後の機会的浮動(Burdon and Jarosz, 1992)、などが報告されている。毒素生産病原菌は、草本性作物から木本性作物まで多様な植物に対して寄生性が分化している。さらに、これらの宿主作物はそれぞれ栽培体系や生産適地も大きく異なる。これらの差異が本菌の個体群構造の形成に作用し、長い年月の間には、各毒素生産病原菌の遺伝的傾向を大きく変えてしまうかもしれない。

農業現場では、相次ぐ新品種の導入に伴う新病害の発生や病原菌の寄生性の分化により、防除体系は複雑化する一方である。病原菌の成立、さらには寄生性分化に

関する系統学的、進化生態学的研究は、植物病原糸状菌の分類体系の系統学的整理に役立つのみならず、新たなより有効な防除体系の確立に大きく寄与することが期待される。さらに、これまで未知であった糸状菌の植物病原性の分子機構の解明も含め、進化学的観点に立った研究はその重要性を一層増すものと考えられる。本研究で得られた成果がその一助となることを期待する。

引用文献

- 足立嘉彦 (1995). ナシ黒斑病菌の個体群構造の解析. 名古屋大学大学院農学研究科博士論文, 名古屋大学.
- Adachi, Y. and Tsuge, T. (1994). Coinfection by different isolates of *Alternaria alternata* in single black spot lesions of Japanese pear leaves. *Phytopathology* 84:447-451.
- Adachi, Y., Watanabe, H., Tanabe, K., Doke, N., Nishimura, S. and Tsuge, T. (1993). Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3197-3205.
- Anderson, J. B., Bailey, S. S. and Pukkila, P. J. (1989). Variation in ribosomal DNA among biological species of *Armillaria*, a genus of root-infecting fungi. *Evolution* 43:1652-1662.
- Anderson, J. B. and Stasovski, E. (1992). Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84:505-516.
- Aylor, D. E. (1990). The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:73-92.
- Bashan, N. (1986). Field dispersal of *Pseudomonas sryingae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Alternaria macrospora* by animals, people, birds, insects, mites, agricultural tools, aircraft, soil particles and water sources. *Can. J. Bot.* 64:276-281.
- Bashan, Y., Levanony, H. and Or, R. (1991). Wind dispersal of *Alternaria alternata*, a cause of leaf blight of cotton. *J. Phytopathol.* 133:225-238.
- Baura, G., Szaro, T. M. and Bruns, T. D. (1992). *Gastrospuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. *Mycologia* 84:592-597.
- Bottini, A. T., Bowen, J. R. and Gilchrist, D. G. (1981). Phytotoxins. II. Characterization of a phytotoxic fraction from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Tetrahedron Lett.* 22:2723-2726.
- Bottini, A. T. and Gilchrist, D. G. (1981). Phytotoxins. I. A 1-aminodimethylheptadecapentol from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Tetrahedron Lett.* 22:2719-2722.
- Brown, A. E., Muthumeenakshi, S., Swinburne, T. R. and Li, R. (1994). Detection of the source of infection of apple trees by *Cylindrocarpon heteronema* using DNA polymorphisms. *Plant Pathol.* 43:338-343.
- Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22:525-564.
- Burdon, J. J. and Jarosz, A. M. (1992). Temporal variation in the racial structure of flax rust

- (*Melampsora lini*) populations growing on natural stands of wild flax (*Linum marginale*): local versus metapopulation dynamics. *Plant Pathol.* 41:165-179.
- Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A. J. and Wolff, R., eds. (1991). *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. Birkehauser Verlag, Basel.
- Carbone, I. and Kohn, L. M. (1993). Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia* 85:415-427.
- Cho, J. T. and Moon, B. J. (1980). The occurrence of strawberry black leaf spot caused by *Alternaria alternata* in Korea. *Korean J. Plant. Prot.* 19:221-226.
- Curtis, M. D., Gore, J. and Oliver, R. P. (1994). The phylogeny of the tomato leaf mould fungus *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* by analysis of rDNA sequences. *Curr. Genet.* 25:318-322.
- Day, P. R. (1976). Gene functions in host-parasite systems. pp. 65-73. *In* R. K. S. Wood and A. Graniti (eds.), *Specificity in Plant Disease*. Plenum Press, New York.
- Echelle, A. A. and Dowling, T. E. (1992). Mitochondrial DNA variation and evolution of the death valley pupfishes (*Cyprinodon*, Cyprinodontidae). *Evolution* 46:193-206.
- Ellingboe, A. H. (1976). Genetics of host-parasite interactions. pp. 761-778. *In* R. Heitefuss and P. H. Williams (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 4*. Springer-Verlag, Berlin.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Felsenstein, J. (1991). PHYLIP-phylogenetic inference package. Computer programs distributed by Department of Genetics, University of Washington. Seattle, Washington.
- Förster, H., Kinscherf, T. G., Leong, S. A. and Maxwell, D. P. (1989). Restriction fragment length polymorphisms of the mitochondrial DNA of *Phytophthora megasperma* isolated from soybean, alfalfa, and fruit trees. *Can. J. Bot.* 67:529-537.
- Furlong, J. C., Forbes, J., Robertson, M. and Maden, B. E. H. (1983). The external transcribed spacer and preceding region of *Xenopus borealis* rDNA: comparison with the corresponding region of *Xenopus laevis* rDNA. *Nucleic Acids Res.* 11:8183-8196.
- Garber, R. C., Turgeon, B. G., Selker, E. U. and Yoder, O. C. (1988). Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr. Genet.* 14:309-314.
- Garber, R. C. and Yoder, O. C. (1983). Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal, and plasmid components. *Anal. Biochem.* 135:416-422.

Gardner, J. M., Kono, Y., Tatum, J. H., Suzuki, Y. and Takeuchi, S. (1985). Structure of the major component of ACRL-toxins, host-specific pathotoxic compounds produced by *Alternaria citri*. *Agric. Biol. Chem.* 49:1235-1238.

Goodwin, S. B., Cohen, B. A. and Fry, W. E. (1994). Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11591-11595.

Gordon, T. R. and Okamoto, D. (1992). Population structure and the relationship between pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 82:73-77.

Guadet, J., Julien, J., Lafay, J. F. and Brygoo, Y. (1989). Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* 6:227-242.

林 律器 (1985). *Alternaria alternata* 群病原菌の圃場における生態. 名古屋大学大学院農学研究科修士論文, 名古屋大学.

Heath, M. C. (1980). A generalized concept of host-parasite specificity. *Phytopathology* 71:1121-1123.

Heletijaris, T. and Burr, B., eds. (1989). *Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Hendy, M. D. and Penny, D. (1982). Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Math. Biosci.* 59:277-290.

Henrion, B., Chevalier, G. and Martin, F. (1994). Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98:37-43.

Henson, J. M. and French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.

Hibbett, D. S. and Vilgalys, R. (1991). Evolutionary relationships of *Lentinus* to the Polyporaceae: evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* 83:425-439.

平井篤造・浅田泰次・西村正暘・井上忠男 (1986). *植物病理学概論*. 養賢堂, 東京.

Hiura, U. (1978). Genetic basis of formae speciales in *Erysiphe graminis* D. C. pp. 101-128. *In* D. M. Spencer (ed.), *The Powdery Mildews*. Academic Press, London.

Hodson, A., Mills, P. R. and Brown, A. E. (1993). Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Mycol. Res.* 97:329-335.

Hopple, J. J. S. and Vilgalys, R. (1994). Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and

allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA. *Mycologia* 86:96-107.

堀 寛・大沢省三 (1984). リボソームから見た生物の系統進化. pp. 127-163. 分子進化学入門 (木村資生編), 培風館, 東京.

Hwang, B. K., Yun, J. H. and Kin, Z. S. (1987). Geographic variation of esterase isozymes in populations of *Alternaria mali* on apple leaves. *J. Phytopathol.* 119:225-231.

Joly, P. (1964). Le genre *Alternaria*. Encyclope'dia Mycologique. P. Lechevalier, Paris.

Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. pp. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.

Kasuga, T., Woods, C., Woodward, S. and Mitchelson, K. (1993). *Heterobasidion annosum* 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence: rapid identification of European intersterility groups by ribosomal DNA restriction polymorphism. *Curr. Genet.* 24:433-436.

Kimura, N. and Tsuge, T. (1993). Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *J. Bacteriol.* 175:4427-4435.

Kistler, H. C., Bosland, P. W., Benny, U., Leong, S. and Williams, P. H. (1987). Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from Crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology* 77:1289-1293.

清沢茂久 (1992). 植物と病原菌の共進化. pp. 75-87. 適応 (矢原徹一・松本忠夫編), 裳華房, 東京.

Klittich, C. J. R. and Bronson, C. R. (1986). Reduced fitness associated with *TOX1* of *Cochliobolus heterostrophus*. *Phytopathology* 76:1294-1298.

Koch, E., Song, K., Osborn, T. C. and Williams, P. H. (1991). Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:341-349.

甲元啓介 (1990). 病原菌の病原性決定因子. pp. 172-204. 植物感染生理学 (西村正陽・大内成志編), 文永堂出版, 東京.

Kohmoto, K., Itoh, Y., Shimomura, N., Kondoh, Y., Otani, H., Kodama, M., Nishimura, S. and Nakatsuka, S. (1993). Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 83:495-502.

Kohn, L. M., Petsche, D. M., Bailey, S. R., Novak, L. A. and Anderson, J. B. (1988). Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 78:1047-1051.

河野重行 (1990). ミトコンドリア染色体の多様性と遺伝子組換え. 植物細胞工学 2:141-151.

Kono, Y., Gardner, J. M., Suzuki, Y. and Takeuchi, S. (1986). Studies on host-selective toxins produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins. *Agric. Biol. Chem.* 50:1597-1606.

Kuninaga, S. and Yokosawa, R. (1989). Genetic relatedness within and between formae speciales of *Fusarium oxysporum* as measured by DNA-DNA reassociation kinetics. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55:216-223.

Kurdyla, T. M., Guthrie, P. A. I., McDonald, B. A. and Appel, D. N. (1995). RFLPs in mitochondrial and nuclear DNA indicate low levels of genetic diversity in the oak wilt pathogen *Ceratocystis fagacearum*. *Curr. Genet.* 27:373-378.

Kurtzman, C. P. (1987). Impact of nucleic acid comparisons on the classification of fungi. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* 97:185-201.

Kusaba, M. and Tsuge, T. (1994). Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3055-3062.

Kusaba, M. and Tsuge, T. (1995). Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr. Genet.* 23:491-498.

Kusaba, M. and Tsuge, T. Genetic relatedness among *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins based on mitochondrial DNA polymorphisms. 投稿準備中.

Kusaba, M., Watanabe, H. and Tsuge, T. Comparison of genetic structure between the two pathotypes of *Alternaria alternata* collected from neighboring fields. 投稿準備中.

Leung, H., Nelson, R. J. and Leach, J. E. (1993). Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. pp. 157-205. *In* J. H. Andrews and I. C. Tommeup (eds.), *Advances in Plant Pathology* Vol. 10. Academic Press, San Diego, California.

Lobuglio, K. F., Pitt, J. I. and Taylor, J. W. (1994). Independent origins of the synnematosus *Penicillium* species, *P. duclauxii*, *P. clavigerum*, and *P. vulpinum*, as assessed by two ribosomal DNA regions. *Mycol. Res.* 98:250-256.

Lucas, G. B. (1975). *Disease of Tobacco*. Biological Consulting Associates, Raleigh, North Carolina.

Maclean, D. J., Braithwaite, K. S., Manners, J. M. and Irwin, J. A. G. (1993). How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis? pp. 206-244. *In* J. H. Andrews and I. C. Tommeup (eds.), *Advances in Plant Pathology* Vol. 10. Academic Press, San Diego, California.

Maeno, S., Kohmoto, K., Otani, H. and Nishimura, S. (1984). Different sensitivities among apple and pear cultivars to AM-toxin produced by *Alternaria alternata* apple pathotype. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 19:8-19.

馬渡竣輔 (1994). 動物分類学の理論. 東京大学出版会, 東京.

McDonald, B. A. and Martinez, J. P. (1990). DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology* 80:1368-1373.

McDonald, B. A. and McDermott, J. M. (1993). Population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience* 43:311-319.

Meltzer, S. J. (1993) Direct sequencing of polymerase chain reaction products. pp. 137-141. *In* B. A. White (*ed.*), *PCR Protocols: Current Methods and Application*. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Michelmore, R. W. and Hulbert, S. H. (1987). Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:383-404.

Miller, S. A. and Martin, R. R. (1988). Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:409-432.

Moody, S. F. and Tyler, B. M. (1990a). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2441-2452.

Moody, S. F. and Tyler, B. M. (1990b). Use of nuclear DNA restriction fragment length polymorphisms to analyze the diversity of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2453-2461.

Morales, V. M., Pelcher, L. E. and Taylor, J. L. (1993). Comparison of the 5.8S rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. *Curr. Genet.* 23:490-495.

Moukhamedov, R., Hu, X., Nazer, R. N. and Robb, J. (1994). Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84:256-259.

Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.

村上哲明 (1992). 分子系統学と陸上植物の系統. 遺伝 46:10-17.

Nakashima, T., Ueno, T., Fukami, H., Taga, T., Masuda, H., Osaki, K., Otani, H., Kohmoto, K. and Nishimura, S. (1985). Isolation and structure of AK-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Agric. Biol. Chem.* 49:807-815.

Nakatsuka, S., Ueda, K., Goto, T., Yamamoto, M., Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1986). Structure of AF-toxin II, one of the host-specific toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype. *Tetrahedron Lett.* 27:2753-2756.

Nazar, R. N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D. and Robb, J. (1991). Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:1-11.

Neergaard, P. (1945). *Danish Species of Alternaria and Stemphylium*. Einar Munksgaard, Copenhagen.

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Nei, M. and Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.

Nishida, H. and Sugiyama, J. (1993). Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and other higher fungi. *Mol. Biol. Evol.* 10:431-436.

Nishimura, S. (1980). Host-specific toxins from *Alternaria alternata*: problem and prospects. *Proc. Jpn. Acad. (Ser. B)* 56:362-366.

Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1983a). Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21:87-116.

Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1983b). Role of toxins in pathogenesis. pp. 137-157. *In* J. M. Daly and B. J. Deverall (eds.), *Toxins and Plant Pathogenesis*. Academic Press, Sydney.

Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H. (1979). The role of host-specific toxins in saprophytic pathogens. pp. 133-146. *In* J. M. Daly and I. Uritani (eds.), *Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interaction*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.

Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H., Ramachandran, P. and Tamura, F. (1982). Pathological and epidemiological aspects of *Alternaria alternata* infection depending on a host-specific toxin. pp. 199-214. *In* Y. Asada, W. R. Bushnell, S. Ouchi and C. P. Vance (eds.), *Plant Infection: The Physiological and Biochemical Basis*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.

Nishimura, S., Sugihara, M., Kohmoto, K. and Otani, H. (1978). Two different phases in pathogenicity of the *Alternaria* pathogen causing black spot disease of Japanese pear. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 13:1-10.

奥田 充 (1996). *Fusarium oxysporum*の寄生性分化に関する研究. 名古屋大学大学院農学研究科修士論文, 名古屋大学.

Okuno, T., Ishita, Y., Sawai, K. and Matsumoto, T. (1974). Characterization of alternariolide, a host-specific toxin produced by *Alternaria mali* Roberts. *Chem. Lett.* 1974:635-638.

Otani, H. and Kohmoto, K. (1992). Host-specific toxins of *Alternaria* species. pp. 123-156. *In* J. Chelkowski and A. Visconti (eds.), *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier, Amsterdam.

- Otani, H., Kohmoto, K., Kodama, M. and Nishimura, S. (1989). Role of host-specific toxins in the pathogenesis of *Alternaria alternata*. pp. 139-149. In S. S. Patil, S. Ouchi and C. P. Vance (eds.), *Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants*. Springer-Verlag, New York.
- Otani, H., Nishimura, S., Kohmoto, K., Yano, K. and Seno, T. (1975). Nature of specific susceptibility to *Alternaria kikuchiana* in Nijisseiki cultivar among Japanese pear. V. Role of host-specific toxin in early step of infection. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 41:467-476.
- Panaccione, D. G., Scott-Craig, J. S., Pocard, J.-A. and Walton, J. D. (1992). A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6590-6594.
- Patton, J. L. and Smith, M. F. (1992). MtDNA phylogeny of andean mice: a test of diversification across ecological gradients. *Evolution* 46:174-183.
- Pegg, K. G. (1966). Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal organism of brown spot of emperor mandarin (*Citrus reticulata*). *Queensland J. Agric. Anim. Sci.* 23:15-28.
- Reed, K. C. and Mann, D. A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* 13:7207-7221.
- Rotem, J. (1994). *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Ruehle, G. D. (1937). A strain of *Alternaria citri* Ellis & Pierce causing a leaf spot of rough lemon in Florida. *Phytopathology* 27:863-865.
- Saenz, G. S., Taylor, J. W. and Gargas, A. (1994). 18S rRNA gene sequences and supraordinal classification of the Erysiphales. *Mycologia* 86:212-216.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Sawamura, K. (1962). Studies on spotted diseases of apple. I. The causal agent of Alternaria blotch. *Bull. Tohoku Natl. Agric. Exp. Stn.* 23:163-175.
- Scheffer, R. P. (1992). Ecological and evolutionary roles of toxins from *Alternaria* species pathogenic to plants. pp. 101-122. In J. Chelkowski and A. Visconti (eds.), *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier, Amsterdam.
- Scheffer, R. P. and Livingston, R. S. (1984). Host-selective toxins and their role in plant diseases. *Science* 223:415-419.

- Shiotani, H. and Tsuge, T. (1995). Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Mol. Gen. Genet.* 248:142-150.
- Simmons, E. G. (1992). *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. pp. 1-35. In J. Chelkowski and A. Visconti (eds.), *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier, Amsterdam.
- Simmons, E. G. (1993). *Alternaria* themes and variations (63-72). *Mycotaxon* 48:91-107.
- Simmons, E. G. and Roberts, R. G. (1993). *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* 48:109-140.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973). *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. Freeman W. H. & Co., San Francisco, California.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. (1981). Taxonomic congruence in the Leptopodomorpha reexamined. *Syst. Zool.* 30:309-325.
- Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R. and Brown, A. E. (1994). Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. *Mycol. Res.* 98:186-188.
- Stovall, M. E. (1992). Interstrain spheroplast fusion of *Alternaria alternata*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:480-484.
- Swofford, D. L. (1993). PAUP phylogenetic analysis using parsimony. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois.
- Takeuchi, T. and Kuninaga, S. (1994). Genetic relationships in *Pseudocercospora herpotrichoides* determined from DNA relatedness. *Mycol. Res.* 98:1059-1064.
- Tanaka, S. (1933). Studies on black spot disease of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ.* 28:1-31.
- Taylor, J. W. (1986). Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. *Exp. Mycol.* 10:259-269.
- 土佐幸雄 (1995). ムギ類うどんこ病菌の共進化. pp. 48-57. 植物感染機構の進化を考える (露無慎二編), 日本植物病理学会, 東京.
- 土佐幸雄・中屋敷均・真山滋志・加藤肇 (1995). レトロトランスポゾンMAGGYの各種イネ科植物寄生性いもち病菌における分布. 日植病報. 62:印刷中 (講要).
- Tsuge, T., Hayashi, N. and Nishimura, S. (1987). Selection of auxotrophic mutants and heterokaryosis in *Alternaria alternata*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 53:182-190.
- Tsuge, T., Kobayashi, H. and Nishimura, S. (1989). Organization of ribosomal RNA genes in *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype, a host-selective AK-toxin-producing fungus.

Curr. Genet. 16:267-272.

Tsuge, T., Nishimura, S. and Kobayashi, H. (1990). Efficient integrative transformation of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* mediated by the repetitive rDNA sequences. *Gene* 90:207-214.

Tsuge, T., Nishimura, S., Omura, S., Kohmoto, K. and Otani, H. (1985). Metabolic regulation of host-specific toxin production in *Alternaria alternata* pathogens. II. Suppression of toxin production from germinating spores by chemical treatment. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51:277-284.

宇田川俊一・椿 啓介・堀江義一・三浦宏一郎・箕浦久兵衛・山崎幹生・横山竜夫・渡辺昌平 (1978). 菌類図鑑. 講談社, 東京.

Ueno, T., Nakashima, T., Hayashi, Y. and Fukami, H. (1975). Structures of AM-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria mali*. *Agric. Biol. Chem.* 39:1115-1122.

Veldman, G. M., Klootwijk, J., van Heerikhuizen, H. and Planta, R. J. (1981). The nucleotide sequence of the intergenic region between the 5.8S and 26S rRNA genes of the yeast ribosomal RNA operon. Possible implications for the interaction between 5.8S and 26S rRNA and the processing of the primary transcript. *Nucleic Acids Res.* 9:4847-4862.

Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K. and Wilson, A. C. (1991). African population and the Evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253:1503-1507.

Vilgalys, R. and Gonzalez, D. (1990). Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rizoctonia solani*. *Phytopathology* 80:151-158.

Waterman, M. S. (1986). Multiple sequence alignment by consensus. *Nucleic Acids Res.* 14:9095-9102.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. and Trüper, H. G. (1987). Report of the *ad hoc* committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463-464.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, California.

Wolfe, M. S., Brandle, U., Koller, B., Limport, E., McDermatt, J. M., Muller, K. and Schaffer, D. (1992). Barley mildew in Europe: population biology and host resistance. *Euphytia* 63:125-139.

Xiao, J. Z., Tsuge, T., Doke, N., Nakatsuka, S., Tsuda, M. and Nishimura, S. (1991). Rice-specific toxins produced by *Bipolaris zeicola*, race 3; evidence for role as pathogenicity factors

for rice and maize plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38:67-82.

山口 昭・大竹昭郎編 (1986). 果樹の病害虫. 全国農村教育協会, 東京.

Yoder, O. C. (1980). Toxins in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18:103-129.

Yu, S. -H. (1992). Occurrence of *Alternaria* species in countries of the Far East and their taxonomy. pp. 37-62. *In* J. Chelkowski and A. Visconti (eds.), *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier, Amsterdam.

Zambino, P. J. and Szabo, L. J. (1993). Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. *Mycologia* 85:401-414.

摘 要

*Alternaria*属菌には、病原性の決定因子として宿主特異的毒素を生産する7種の重要植物病原菌が存在する。これら病原菌は、発生当初、*Alternaria*属菌の新種としてそれぞれ分類・同定されたが、形態的には腐生性*A. alternata*とほとんど区別することができない。そこで、これら病原菌を毒素生産性に基づく*A. alternata*の病原性変異系統、すなわち病原型 (pathotype) として位置付けることが提案された。本研究では、宿主特異的毒素を生産する7種の*Alternaria*属菌、非病原性*A. alternata*およびこれらとは形態的に異なる*Alternaria*属の他種菌について、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解析を行った。これら解析結果に基づき、*Alternaria*属菌の遺伝的類縁関係を調査し、7種の毒素生産病原菌の分類学的位置付けについて検討した。また、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、地理的由来が異なる同一病原菌菌株群、また同一圃場で分離した病原菌と腐生性*A. alternata*の個体群構造をrDNAのRFLP分析と反復DNA配列のDNAフィンガープリント分析を用いて比較解析した。

1. rDNAのRFLP分析による*Alternaria*属病原菌の遺伝的類縁関係の解析

非病原性*A. alternata* 8菌株、7種の宿主特異的毒素生産菌計74菌株およびこれらとは形態的に異なる6種23菌株について、rDNAのRFLP分析を行った。供試菌の全DNAを6塩基認識制限酵素*Xba*Iにより切断し、ナシ黒斑病菌15A菌株由来のrDNAクローンAlt1をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、宿主特異的毒素生産菌の菌株群からは9種のrDNA多型が検出された。これらの多型は、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、rDNA多型に基づきこ

れら病原菌を識別することはできなかった。一方、供試した他種菌からは、種特異的な多型がそれぞれ検出された。したがって、毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*が同一の遺伝的変異を共有していることが明らかとなり、これらが同一種であることが示唆された。さらに、より高感度に変異を検出することができる4塩基認識制限酵素*HaeIII*と*MspI*を用いてrDNAのRFLP分析を行ったところ、供試菌株から31種のrDNA多型が検出された。これら多型について、平均距離法を用いたクラスター分析により、系統関係を解析した。その結果、毒素生産菌と非病原性*A. alternata*から検出されたrDNA型は、系統樹上で他種とは明確に分岐した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強く示唆された。また、7種の毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*は単一クラスター上で極めて任意に分布し、それぞれに特徴的な遺伝的傾向は見いだされなかった。以上の結果から、各毒素生産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*から多元的に出現したこと、さらに、これら病原菌が少数の毒素生産性遺伝子の獲得によって成立したことが推定された。また、*Alternaria*属菌の種の系統関係がNeergaardによる種のグループ分けとよく一致することが明らかとなった。たとえば、*A. alternata*と毒素生産菌を含むLongicatenataeグループとその他の5種を含むNoncatenataeグループはそれぞれ独立した単一の遺伝的グループを形成した。さらに、LongicatenataeだけでなくNoncatenataeグループ内でも高い遺伝的類縁性が認められたことは、分子系統学的解析によって*Alternaria*属菌の種分類が、より単純に整理される可能性を示した。

2. 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

*Alternaria*属菌の遺伝的類縁関係をさらに詳細に解析するために、rDNAのITS領域の塩基配列の比較解析を行った。非病原性*A. alternata* 4菌株、7種の宿主特異的毒素生

産菌計13菌株、その他の7種計7菌株について、ITS1領域（18Sと5.8S rDNA間の非コード領域）とITS2領域（5.8Sと28S rDNA間の非コード領域）をPCR法によって増幅し、得られたPCR産物の塩基配列を決定した。その結果、供試した菌株からは、165～171塩基の7種のITS1配列と158～166塩基の10種のITS2配列が検出された。これら配列をアブラナ科植物根腐病菌（*Leptosphaeria maculans*）のITS配列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。その結果、毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*は同一のITS1配列を有していた。また、ITS2領域では、これら菌株群から3種の配列が検出されたが、それらの違いは1または2カ所の塩基の挿入あるいは欠失によるものであった。したがって、ITS1とITS2のどちらの塩基配列についても、これら病原菌と非病原性*A. alternata*が高い相同性を有することが明らかとなった。一方、供試した他種のITS配列は毒素生産菌群とは大きく異なっており、それらの相同性はITS1配列で74～85%、ITS2配列で76～83%であった。また、塩基配列の比較に基づき近隣結合法による系統解析を行った結果、どちらのITS領域の系統樹においても、毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*の配列が密接に結合した単一のクラスターを形成し、他種とは明確に分岐した。また、この単系統性は節約法による系統解析からも支持された。以上の結果は、毒素生産病原菌と*A. alternata*におけるITS領域の塩基配列の変異が種内多型の範疇に入ることを示しており、これら病原菌が同一種*A. alternata*であることをさらに強く示唆した。また、ITS領域の塩基配列に基づく解析からも、供試した*Alternaria*属菌の系統関係がNeergaardによる種のグループ分けを支持することが明らかとなった。

3. ミトコンドリアDNAのRFLP分析による*Alternaria*属病原菌の

遺伝的類縁関係の解析

rDNAは核ゲノムの一領域であり、また、保存性が高いことから近縁種や同一種内の分化系統の識別には一般に適さない。そこで、さらに変異性が高いとされるミト

コンドリアDNAのRFLP分析によって、*Alternaria*属菌の遺伝的類縁関係を調査した。供試菌として、非病原性*A. alternata* 4菌株、7種の宿主特異的毒素生産菌計16菌株およびその他の7種計7菌株を用いた。供試菌の全DNAを制限酵素*Bgl*III、*Hind*IIIまたは*Xba*Iによってそれぞれ切断し、ナシ黒斑病菌15A菌株から単離したミトコンドリアDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、どの制限酵素を用いた場合にも、毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*の菌株群から多様な多型が検出され、ミトコンドリアDNAの高い変異性が明らかとなった。3種の制限酵素で検出された多型を組み合わせて解析したところ、これら菌株は11種のミトコンドリアDNA型に類別され、それらのうち4種は異なる毒素生産病原菌、さらに非病原性*A. alternata*にも共通して分布していた。一方、他種の菌株は種特異的な7種のミトコンドリアDNA型にそれぞれ類別された。また、平均距離法により多型間の系統関係を解析したところ、毒素生産病原菌と非病原性*A. alternata*から検出された多型が他種とは明確に分岐した単一のクラスターを形成し、また、それらの遺伝的類縁関係と生産毒素との間には何ら相関は見いだされなかった。したがって、ミトコンドリアDNAの解析からも、7種の毒素生産病原菌が同一種*A. alternata*の病原型であることが強く示唆された。また、rDNA領域から推定された*Alternaria*属菌の系統関係は、ミトコンドリアDNAのRFLP分析に基づく系統解析の結果とよく一致することが明らかとなった。

4. 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*A. alternata*の個体群構造の比較

全国各地から採集した5種の宿主特異的毒素生産菌計85菌株について、反復DNA配列のDNAフィンガープリント分析を行い、それらの遺伝的背景を比較した。供試菌の全DNAを制限酵素*Pst*Iにより切断し、ナシ黒斑病菌15A菌株から単離した分散型反復DNA配列クローンAAR9をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。そ

の結果、供試菌株群から多様なDNAフィンガープリントパターンが検出され、同じ毒素生産菌でも地理的由来が異なる菌株間では著しい多型性が認められた。したがって、毒素生産病原菌の遺伝的背景には地理的隔離が大きく影響すること、すなわち、これら病原菌がそれぞれの地域で多元的に出現したことが示唆された。そこで、rDNAのRFLP分析とAAR9-DNAフィンガープリント分析を用いて、鳥取県園芸試験場内の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*A. alternata*の個体群構造を比較した。リンゴ病斑から分離した*A. alternata*菌株のほとんどはリンゴに対して病原性を示さず、リンゴ斑点落葉病菌の分離率は約10%であった。これらリンゴ由来の菌株群は多様なrDNA系統に類別され、個体群構造が複雑であることが明らかとなった。また、同様なrDNA系統が同圃場内の空中飛散孢子由来の非病原性*A. alternata*菌株群にも分布していた。したがって、リンゴ病斑由来の非病原性および病原性の菌株群が土着の腐生性*A. alternata*に由来する可能性が示された。一方、ナシ病斑由来の*A. alternata*菌株群からは高率にナシ黒斑病菌が分離された。また、rDNAのRFLP分析により、ナシ黒斑病菌の個体群には2種のrDNA系統が優占的に分布することが明らかとなった。さらに、AAR9-DNAフィンガープリント分析によって、これらの優占系統が他の個体群からは検出されない特徴的なDNAフィンガープリントパターンを示すことが明らかとなり、他の地域から移入した系統である可能性が示された。しかしながら、ナシ黒斑病菌の少数系統として類別された菌株は腐生性*A. alternata*と遺伝的に類似しており、土着の腐生菌由来であることが示唆された。

報文目録

1. Kusaba, M. and Tsuge, T. (1994). Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3055-3062.
2. Kusaba, M. and Tsuge, T. (1995). Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics* 23:491-498.

参考論文目録

1. 柘植尚志・草場基章・足立嘉彦 (1992). 植物病原糸状菌の R F L P. 植物防疫 46:315-319.
2. 柘植尚志・草場基章・足立嘉彦 (1993). *Alternaria*属菌の R F L P 解析. 分子植物病理学の最近の進歩 (八重樫博志編). 日本植物病理学会, pp. 123-132.
3. Tsuge, T., Kusaba, M., Katsuya, S., Shiotani, H., Kimura, N. and Adachi, Y. (1994). Molecular biology of AK-toxin production by the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. In Host-Specific Toxin: Biosynthesis, Receptor and Molecular Biology (Kohmoto, K. and Yoder, O. C. eds.). Tottori University Press, Tottori, pp. 239-250.
4. 柘植尚志・草場基章・勝屋 聡・塩谷 浩・木村教男 (1994). *Alternaria alternata*病原菌の病原性の分子解析. 植物疾病における「Gene-for-Gene」説の分子的基盤 (木村郁夫編). 日本植物病理学会, pp. 21-30.
5. Tosa, Y., Nakamura, T. and Kusaba, M. (1995). Distribution of genes for resistance to the wheatgrass mildew fungus in Japanese wheat cultivars and of their corresponding genes in the wheat mildew fungus. Japanese Journal of Genetics 70:119-126.
6. Tosa, Y., Kusaba, M., Fujiwara, N., Nakamura, T., Kiba, A., Noda, T., Furutsu, Y., Noguchi, H. and Kato, K. (1995). Geographical distribution of genes for resistance to formae speciales of *Erysiphe graminis* in common wheat. Theoretical and Applied Genetics 91:82-88.
7. Tsuge, T., Kusaba, M., Shiotani, H., Tanaka, A., Katsuya, S., Owaki, M. and Kaneko, I. (1995). Molecular aspects of pathogenic specialization in *Alternaria alternata* pathogens. In Molecular Aspects of Pathogenicity and Host Resistance: Requirement for Signal Transduction (Mills, D. and Kunoh, H. eds.). The American Phytopathological Society Press, St. Paul, (in press).