

## rDNA の RFLP 分析によるタバコ赤星病菌の個体群構造

草場 基章・大石 恵・椿井 裕介・八重樫博志  
(佐賀大学農学部)

### Population structure of the tobacco pathotype of *Alternaria alternata* inferred from rDNA-RFLP analysis.

Motoaki KUSABA, Megumi OHISHI, Yusuke TSUBAI and Hiroshi YAEGASHI (Saga University, Saga 840-8502, Japan)

**Key words:** *Alternaria alternata*, rDNA, RFLP, Tobacco

### 緒 言

タバコ赤星病は収穫期の天葉に激発し、タバコ品質を著しく損なうことからタバコ (*Nicotiana tabacum* L.) の重要病害となっている。本病原因菌の分類学的位置付けについては論争があるものの、腐生性糸状菌の一種 *Alternaria alternata* (Fries) Keissler のタバコ病原型 (tobacco pathotype) とするのが一般的な見解となっている (Nishimura, 1980; Nishimura and Kohmoto, 1983a)。また、この病原型による分類は分子生物学的手法を用いた系統解析によっても支持されている (Kusaba and Tsuge, 1994; 1995; 1997)。

本病には絶対的な抵抗性品種が存在せず、その防除は農薬散布ならびに早期栽培による被害回避や圃場衛生といった耕種的手法を中心に行われている。本病をより効果的に防除するためには、原因菌の生態学的知見が重要であるが、発病圃場から分離される菌株の多様性つまり、個体群構造に関する研究はこれまでほとんどなされていない。そこで、本研究では、リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析により、本菌の個体群構造について解析を試みた。*A. alternata* の病原型とされる病原菌は本菌の他に 6 つ知られている (Nishimura and Kohmoto, 1983b; Otani and Kohmoto, 1992)。これら病原菌の 1 つであるナシ黒斑病菌では、rDNA の RFLP 分析が個体識別に極めて有効であることが既に報告されている (Adachi et al., 1993)。本研究では、鹿児島県加世田市内のタバコ圃場における本菌の個体群構造を解析するため、分離した菌株の遺伝的多様性について検討を行った。さらに、解析結果から、本菌の発生機構について考察した。

本研究に用いたタバコ赤星病菌の採集には、日本タバ

コ産業(株)鹿児島葉タバコ技術センター西村希志子氏の御協力をいただいた。また、RFLP 分析のプローブ・rDNA クローン Alt 1 は名古屋大学農学部柘植尚志博士から分譲頂いた。ここに記して深謝の意を表する。

### 材 料 お よ び 方 法

#### 1. 供試菌株

病斑の採集は鹿児島県加世田市のタバコ圃場で1999年7月2日に行った。採集圃場の面積は30aであり、品種は第一黄色種が栽培されていた。圃場内からランダムに植物体を63個体選び、1植物体当たり1病斑を採取した。さらに、同圃場から植物体を任意に1個体選び、この個体上の全病斑を採取した。これら病斑を約5mm角に切り出し、70%エタノールに瞬時浸漬の後、1%アンチホルミンに30秒～1分間浸漬を行った。表面殺菌した病斑は乾アンズ培地 (1l 処方: 乾アンズ30g, ショ糖40g, 寒天20g, 蒸留水1000ml, pH 6.5) 上に置床し、蛍光下で3～4日培養した。培養後、病斑から伸長したコロニー上あるいは病斑上に形成された分生胞子を素寒天培地上に展開し、顕微鏡下での形態観察により *Alternaria* 属菌であることを確認した。ガラス針を用いて单胞子分離して得た75菌株をショ糖添加ジャガイモ煎汁寒天培地 (PSA) [1l 処方: ジャガイモ200gの煎汁、ショ糖20g, 寒天15g, 蒸留水1000ml] で継代培養し、4℃下で保存した。これら分離菌株のタバコに対する病原性を Kodama ら (1990) の方法に準じて検定した。タバコ品種としてはタバコ赤星病菌感受性品種 Samsun を供試した。播種後、3ヶ月間温室で育成したタバコ植物体から葉を採取し、約3cm角の葉切片に切り出した。接種源としては胞子濃度 $10^5 \sim 10^6 / ml$  に調節した分生胞子懸濁液 5ml を用い、これを1菌株当たり3枚の葉切片に噴

霧接種した。接種した葉切片は温室、蛍光下、25°Cで培養し、48時間後に形成された病斑の有無および数について観察を行った。葉切片3枚の全てに10個以上の褐点を形成した接種菌株は病原性を有するものと判別し、これらをタバコ赤星病菌として解析に供試した。

## 2. 菌体DNAの抽出

供試菌株からのDNA抽出は、Adachiら(1993)の方法に従って行った。すなわち、ジャガイモ煎汁液体培地(1l処方：ジャガイモ200gの煮汁、ショ糖20g、蒸留水1000ml)で培養して得た菌体を液体窒素中で粉碎後、DNA抽出緩衝液[100mM LiCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl(pH7.5), 0.5% (W/V) SDS]中に懸濁し、30分間55°Cで加熱後、室温、14,000rpmで15分間遠心分離し、DNA画分として上清の回収を行った。さらに回収上清をフェノール抽出・RNaseA処理を行って、RFLP分析のためのDNA試料とした。

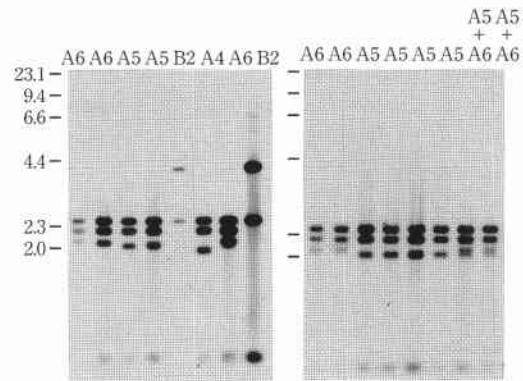
## 3. RFLP分析

rDNAクローンとして、ナシ黒斑病菌15A菌株の染色体ライブラリーから単離した $\lambda$ ファージクローンAlt 1(Tsuge et al., 1989)を用いた。プローブの調製はNEBlot-Labelling kit(New England Biolabs)を用いたランダムプライミング法(Feinberg and Vogelstein, 1983)により行った。すなわち、本クローンを鋳型DNAとしてビオチン標識プローブを作製した。各供試菌株のDNA試料は制限酵素XbaIにより切断し、0.8%アガロースグル(agarose S, Nippon Gene)を用いた電気泳動により切断DNA断片の分画を行った。分画したDNA断片は10×SSCを用いたキャピラリーブロッティングによりナイロン膜(MagnaGraph, MSI)へ転写を行った。プローブのハイブリダイゼーションはナイロン膜の添付説明書の指示に従って行い、ハイブリダイゼーションシグナルの検出はPhototope-Star Detection Kit(BioLabs)を用いて行った。

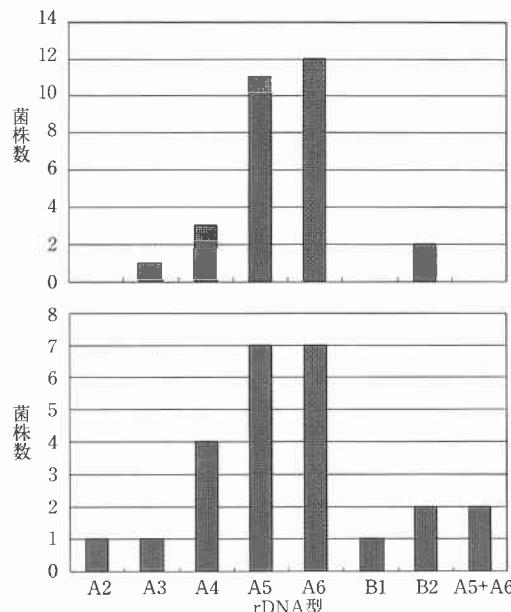
## 結果および考察

鹿児島県加世田市のタバコ圃場から採取されたAlternaria属菌についてタバコに対する病原性を検定したところ、75菌株中計54菌株に病原性が認められた。そこで、これら菌株をタバコ赤星病菌として供試し、rDNAのRFLP分析を行った。制限酵素XbaIおよびプローブAlt 1を用いて検出されたハイブリダイゼーションパターンの一例を第1図に示した。著者らは先に、腐生性A. alternataおよびA. alternataの7つの病原型の菌株について本報と同様のrDNAのRFLP分析を行い、これら菌株から9種のrDNA多型を見い出した

(Kusaba and Tsuge, 1994)。これら多型はハイブリダイゼーションパターンからA型とB型に大別され、それぞれ、A 1～A 6およびB 1～B 3のrDNA型と命名している(Adachi et al., 1993; Kusaba and Tsuge, 1994)。本試験の供試菌株中に検出されたハイブリダイゼーションパターンを検討したところ、52菌株については7種パターンに類別された(第1および第2図)。



第1図 供試菌株から検出されたハイブリダイゼーションパターンの例  
レーンデザインは各ハイブリダイゼーションパターンから同定されたrDNA型に対応する。



第2図 供試菌株集団におけるrDNA型の分布圃場全体  
上は圃場全体区、下は同一植物体区。上下ともに縦軸は各rDNA型を示した菌株数を示す。

これらパターンは先の報告で見い出されたrDNA型と同じであり、それぞれ、A2, A3, A4, A5, A6, B1およびB2rDNA型と同定した(第1および第2図)。残り2菌株はハイブリダイゼーションパターンから、A5およびA6rDNA型を同時に有するものと考えられた。供試菌株は全て単胞子分離を経たものであり、遺伝的に純系であると考えられる。従って、これら2菌株は異なる核を同一細胞中に併せ持つ異核共存体と考えた。

以上の結果から、本圃場のタバコ赤星病菌からは多数のrDNA型が検出されることが明らかとなり、菌株集団が遺伝的に極めて多様であることが強く示唆された。タバコ赤星病菌は、分生胞子の形態が*A. alternata*と類似していること(Nishimura, 1980)、さらに、本菌は宿主特異的AT毒素を生産することが見い出されている(Kodama et al., 1990)。これらのことより、本菌は腐生性*A. alternata*の病原性変異体、すなわち、タバコ病原型として位置付けられてきた(Nishimura, 1980; Nishimura and Kohmoto, 1983)。本菌のように*A. alternata*の病原型とされる病原菌では、個体群を構成する菌株は土着の腐生性*A. alternata*からの突然変異により多元的に成立することが予測される(Nishimura, 1980)。また、*A. alternata*の日本ナシ病原型であるナシ黒斑病菌においても、同一圃場の個体群に多数のrDNA多型が検出されることが報告されている(Adachi et al., 1993)。本菌およびナシ黒斑病菌で認められた個体群の多様性は、このような菌株の多元的由来を反映している可能性が考えられた。

本研究の供試菌株は圃場全体から任意に採集した29菌株(圃場全体区)と同一植物体上から採集した25菌株(同一植物体区)に分けられる(第2図)。このように供試菌株を2つの個体群に分けた場合、圃場全体区では5種のrDNA型が認められた(第2図)。また、同一植物体区では2つのrDNA型(A5とA6)を併せ持つ2菌株を除くと、7種のrDNA型が観察された(第2図)。これらrDNA型は、どちらの集団もA5およびA6型が優先的に分布し、他のrDNA型はマイナーな分布を示した。従って、個体群間ではrDNA型の分布様式に顕著な差異が認められないことが明らかとなった。このことから、同圃場内では本菌の個体群構造に局所的偏りが存在せず、圃場内での菌株の移動が活発であることが示唆された。また、個体群構造に偏りがないとすれば、1植物体からの菌株採集により、圃場全体を代表する個体群を把握できることが予想される。本研究の結果は、タバコ赤星病菌のサンプリング単位に関して有効な情報を提供するものと考えられた。

## 引用文献

- Adachi, Y., H. Watanabe, K. Tanabe, N. Doke, S. Nishimura, and T. Tsuge (1993) Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. Apple. Environ. Microbiol. 59 : 3197-3205.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132 : 6-13.
- Kodama, M., T. Suzuki, H. Otani, K. Kohmoto, and S. Nishimura (1990) Purification and bioassay of host-selective AT-toxin from *Alternaria alternata* causing brown spot of tobacco. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 56 : 628-636.
- Kusaba, M. and T. Tsuge (1994) Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. Apple. Environ. Microbiol. 60 : 3055-3062.
- Kusaba, M. and T. Tsuge (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. 28 : 491-498.
- Kusaba, M. and T. Tsuge (1997) Mitochondrial DNA variation in host-specific toxin-producing pathogens in the genus *Alternaria*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63 : 463-469.
- Nishimura, S. (1980) Host-specific toxins from *Alternaria alternata*: problem and prospects. Proc. Jpn. Acad. (Ser. B) 56 : 362-366.
- Nishimura, S. and K. Kohmoto (1983a) Roles of toxins in pathogenicity. In: Toxins and Plant pathogenesis (Daly, J. M. and B. J. Deverall eds.). Academic press (Sydney) : pp.137-157.
- Nishimura, S. and K. Kohmoto (1983b) Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. Annu. Rev. Phytopathol. 21 : 87-116.
- Otani, H. and K. Kohmoto (1992) Host-specific toxins of *Alternaria* species. In: *Alternaria*: biology, plant disease and metabolites (Chelkowski, J. and A. Visconti eds.). Elsevier (Amsterdam) : pp. 123-156.
- Tsuge, T., H. Kobayashi and S. Nishimura (1989) Organization of ribosomal RNA genes in *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype, a host-selective AK-toxin-producing fungus. Curr. Genet. 16 : 267-272.

(2001年11月16日受領；2002年8月8日受理)