博士（農学）　山　本　英　樹

学位論文題名

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の分類に関する研究

学位論文内容の要旨

本論文は，形態的同一種（*Phialophora gregata*）であるアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の病原性，培養性質を比較し，また，分子遺伝学的手法を用いて遺伝的類縁性を検討し，得られた結果を総合して，両菌の分類学的位置づけを考察したものである。

まず，来歴の異なるアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌を収集し，マメ科6種13品種に対する病原性を断根浸漬接種法により調査した。その結果，アズキ落葉病菌はアズキとリョクトウに，またダイズ落葉病菌はダイズとリョクトウに病原性を示し，維管束あるいは髄部の褐変，葉のしおれなどの病徴を引き起こした。一方，インゲン，ササゲ，エンドウに対しては両菌とも病原性を示さなかった。アズキ落葉病菌については罹病性の異なる4品種に対する病原性を検討した。多くの菌株は罹病性の宝小豆にのみ病原性を示したが，4菌株は宝小豆のほか，抵抗性とされている丸葉にも病原性を有し，1菌株はさらに抵抗性のハツネショウズにも病原性を示した。しかし，抵抗性の赤豆に病原性を示す菌株は見いだされなかった。これら病原性に基づく3つのグループと培地上での菌糸生長速度の間に関係は認められなかった。

次に，いくつかの培養性質についてアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の比較を行ったところ，菌糸の生育と培地のpHの関係や硫酸銅耐性には両菌間に差異が見いだされなかった。一方，PDAやV－8Aあるいはその液体培地で培養した場合，アズキ落葉病菌は赤褐色、鮭肉色ないし赤色に色づくのに対し，ダイズ落葉病菌は淡黄色から黄褐色に色づき，これらの培地上では菌叢の色調が異なることが明らかとなった。また，アズキ落葉病菌の生育適温は24～26℃で，32℃でも生育できたのに対し，ダイズ落葉病菌のそれは22～23℃で，これより高温域での生育はアズキ落葉病菌に比べ顕著に抑制され，32℃では生育できなかった。こうした培養性質の差異を基に両菌を簡便に識別できる可能性が示された。

また，分子遺伝学的手法を用いて，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の遺伝的類縁性を検討した。アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の全細胞タンパク質と細胞質可溶性タンパク質の電気泳動パターンを比較したが，何れの分画においても両菌間に顕著な差は認められなかった。一方，ア

ズキ落葉病菌の弱病原性系統として報告された *Cephalosporium gregatum* Type B は何れの分画でもアズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌とは明らかに異なる泳動像を示した。

次に，菌体内酵素の電気泳動パターンを比較した。調査した菌体内酵素15種のうち11酵素はアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌に共通のザイモグラムを示したが，その他の4酵素，乳酸脱水素酵素，パーオキシターゼ，酸性ホスファターゼおよびエステラーゼはそれぞれの菌に特異的な泳動パターンを示した。この結果を基に計算した菌株間の相似度はアズキ落葉病菌どうしでは80～100%で，この中に大きく4つのグループが形成され，これと分離地域との間に関係が認められた。また，ダイズ落葉病菌どうしの相似度はアズキ落葉病菌のそれよりも高かった（94～100%）。アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の間ではやや低く63～72%の相似度であった。一方，*C. gregatum* Type B，対照として用いたコムギ条斑病菌と両菌の間には5%以下の相似度しか認められなかった。

さらに，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の遺伝的類縁性を核 DNA レベルで検討した。アズキ落葉病菌の DNA の塩基組成（44.5～46.0 mole %）はダイズ落葉病菌のそれ（46.2～47.3 mole %）より低い値を示した。しかし，*P. gregata* 種としての変動幅は2.8 mole %と小さかった。一方，*C. gregatum* Type B は明らかに異なる値（50.9 mole %）であった。DNA 塩基配列の相同性は，アズキ落葉病菌どうしでは89～100%の値を示し，ダイズ落葉病菌どうしでは94～100%であった。これに対し，両菌間では65～72%のやや低い相同性であった。*C. gregatum* Type B は両菌と13%以下の相同性しか示さなかった。

また，ミトコンドリア DNA の制限酵素断片長多型（RFLP）を調べたところ，用いた19酵素のうち17酵素で多型が認められ，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌が識別された。アズキ落葉病菌はA54－24株が1酵素で多型を示したのみで，他の18酵素では菌株間差異は認められなかった。A54－24株と他のアズキ落葉病菌との塩基サイトあたりの塩基置換数（d）および塩基配列多様度評価（p）はそれぞれ0.001，0.002であった。一方，ダイズ落葉病菌は15酵素で多型がみられ，北海道で分離された菌株と秋田県で分離された菌株が異なる泳動像を示した。両グループ間のd値はそれぞれ0.016，0.046であった。また，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌間ではd＝0.037～0.047，p＝0.106～0.132であった。

二本鎖 RNA を細胞質遺伝分子マーカーとして捉え，その検出を行ったところ，アズキ落葉病菌27菌株中，札幌および上川地方南部で分離された10菌株から dsRNA が検出され，両者間で電気泳動パターンが異なった。しかし，dsRNA の有無と菌糸の生育速度や病原性の間には関係が認められなかった。一方ダイズ落葉病菌から dsRNA は検出されなかった。

以上のように，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌はアズキ，ダイズに対する病原性が異なり，培養性質にも差異が認められ，また，分子遺伝学的解析から，両菌は同一種の範ちゅうにありながらも遺伝的にかなり分化していることが示された。従って，両菌を異なる分化型とすることが適当であると考え，アズキ落葉病菌には *Phialophora gregata*（Allington et Chamberlain）Gams f.sp. *adzukicola* Kobayashi, Yamamoto, Negishi et Ogoshi を，またダイズ落葉病菌には *Phialophora gregata*（Allington et Chamberlain）Gams f. sp. *sojae* Kobayashi, Yamamoto, Negishi et Ogoshi なる学名を提案した。

また，分子遺伝学的解析からアズキ落葉病菌はダイズ落葉病菌に比べ遺伝的変異が大きいことが示された。これは，アズキ落葉病菌の方が発生歴が長く，広範囲で大発生しており，より多くの変異を蓄積したためであると考えられた。さらに，遺伝的変異は分離地域との関係が認められ，十勝地方での変異の幅がおおきかったこと，1例を除いてミトコンドリア DNA に RFLP が認められなかったことから，アズキ落葉病菌は十勝地方で発生し，札幌，上川地方に伝搬，適応し，それぞれの地域に独立した集団が形成されたものと推測された。一方，ダイズ落葉病菌は核ゲノムの変異は小さいものと考えられたが，ミトコンドリア DNA の RELP から北海道産と秋田県産の2グループに大別され，前者はアメリカ起源であることが推察された。

一方，アズキ落葉病菌の弱病原性系統とされていた *C. gregatum* Type B は，分子遺伝学的解析の結果，*P. gregata* とは別種であり，系統発生的にも近縁関係にないものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	生 越 明
副 査	教 授	木 村 郁 夫
副 査	教 授	喜久田 嘉 郎

本論文は和文で記され，図47，表30を含む総頁数248からなり，7章をもって構成されている。

本研究は，形態的同一種（*Phialophora gregata*）であるアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の病原性，培養性質を比較し，また，分子遺伝学的手法を用いて遺伝的類縁性を検討し，得られた結果を総合して，両菌の分類学的位置づけを考察したものである。

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌のマメ科6種13品種に対する病原性を断根浸漬接種法により

調査したところ，アズキ落葉病菌はアズキとリョクトウにまたダイズ落葉病菌はダイズとリョクトウに病原性を示すことが明らかとなった。さらに，アズキ落葉病菌については，多くの菌株は罹病性の宝小豆にのみ病原性を示したが，宝小豆のほか，抵抗性とされている丸葉やハツネショウズにも病原性を示す菌株が存在することが明らかとなった。

また，いくつかの培養性質について比較を行ったところ，PDA やV－8Aあるいはその液体培地で培養した場合，アズキ落葉病菌は赤褐色，鮭肉色ないし赤色に色づくのに対し，ダイズ落葉病菌は淡黄色から黄褐色に色づき，菌叢の色調が異なることが明らかとなった。また，アズキ落葉病菌の生育適温は24～26℃で，32℃では生育できなかった。

つぎに，分子遺伝学的手法を用いて，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の遺伝的類縁性を検討した。

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の全細胞タンパク質と細胞質可溶性タンパク質の電気泳動パターンを比較したが，何れの分画においても両菌間に顕著な差は認められなかった。次に，菌体内酵素の電気泳動パターンを比較した。調査した酵素15種のうち11酵素はアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌に共通のザイモグラムを示したが，その他の4酵素，乳酸脱水素酵素，パーオキシターゼ，酸性ホスファターゼおよびエステラーゼはそれぞれの菌に特異的な泳動パターンを示した。この結果を基に計算した菌株間の相似度は，アズキ落葉病菌どうしでは80～100%で，この中に大きく4つのグループが形成され，これと分離地域との間に関係が認められた。また，ダイズ落葉病菌どうしの相似度はアズキ落葉病菌のそれよりも高かった（94～100%）が，両菌間ではやや低く63～72%の相似度であった。

アズキ落葉病菌の DNA の塩基組成（44.5～46.0 mole %）はダイズ落葉病菌のそれ（46.2～47.3 mole %）より低い値を示したが，種としての変動幅は2.8 mole %と小さかった。また，DNA 塩基配列の相同性は，アズキ落葉病菌どうしでは89～100%の値を示し，ダイズ落葉病菌どうしでは94～100%であった。これに対し，両菌間では65～72%のやや低い相同性であった。

ミトコンドリア NDA の制限酵素断片長多型（RFLP）を比較したところ，用いた19酵素のうち17酵素で多型が認められ，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌が識別された。アズキ落葉病菌はA54－24株が1酵素で多型を示したのみで，他のアズキ落葉病菌との塩基サイトあたりの塩基置換数（d）および塩基配列多様度評価（p）はそれぞれ0.002であった。一方，ダイズ落葉病菌は15酵素で多型がみられ，北海道産の菌株と秋田県産の菌株で異なる泳動像を示した。両グループ間のdおよびp値はそれぞれ0.016，0.046であった。また，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌間ではd＝0.037～0.047，p＝0.106～0.132であった。

二本鎖 RNA を細胞質遺伝子マーカーとして捉え，その検出を行ったところ，アズキ落葉病菌27菌株中，札幌および上川地方南部で分離された10菌株から dsRNA が検出され，両者間で電気泳動パターンが異なった。また，ダイズ落葉病菌から dsRNA は検出されなかった。

以上のように，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌はアズキ，ダイズに対する病原性が異なり，培養性質にも差異が認められることが明らかとなった。また，分子遺伝学的解析から，両菌は同一の範ちゅうにありながらも遺伝的にかなり分化していることが示された。従って，両菌を異なる分化型とすることが適当であると考え，アズキ落葉病菌には *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola* を，またダイズ落葉病菌には *Phialophora gregata* f. sp. *sojae* なる学名を提案した。

以上の研究成果は最新の研究手法を用いて，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の分類的関係を明らかにしたものであり，学術上応用上貢献するところ大きく，高く評価される。よって審査員一同は，最終試験の結果と合わせて，本論文の提出者山本英樹は博士（農学）の学位を受けるの十分な資格があるものと認定した。