

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05594

研究課題名(和文) 種間の無性的交雑を利用したVerticillium属菌の病原性分化機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of hostrange determination systems of Verticillium species using interspecific asexual recombination

研究代表者

宇佐見 俊行 (Usami, Toshiyuki)

千葉大学・大学院園芸学研究院・准教授

研究者番号：50334173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナスに病原性を示すVerticillium dahliaeと、ナスに病原性を示さないV. longisporumのプロトプラスト融合により、両種のゲノムを合わせ持つ3倍体の融合株が多数得られた。これらはナスへの病原性を失っていた。これらをベノミル添加培地で培養し、ナスへの病原性を回復した菌株を選抜したところ、その染色体数は大きく減少していた。両種の融合株から染色体数を減少させることでナスへの病原性が回復するため、V. longisporumのゲノムにはナスに対する非病原力因子が存在すると考えられた。本研究では、本属菌の種レベルでの宿主選択に非病原力因子が関与することを初めて示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Verticillium属菌は様々な作物に萎凋性病害を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は耐久生存体により土壤中に十年以上生残し、広範な双子葉植物に感染するため、その防除は極めて困難で、世界各地の作物生産に甚大な被害を与えている。本属菌の宿主範囲は菌種あるいは菌株ごとに異なるが、その宿主選択メカニズムは解明されておらず、これが防除を一層困難にしている。本研究では、本属菌の種レベルでの宿主選択に非病原力因子が関与することを世界で初めて示した。これは、本属菌の病原性決定機構を解明して防除法を確立するために、極めて重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted genetic recombination between V. dahliae and other Verticillium species to investigate genetic factors involved in virulence on eggplant. Protoplast fusion between a strain of V. dahliae which is highly virulent on eggplant and less virulent other species (V. longisporum, V. alfalfae) was performed. Most recombinants appeared to have entire genome of both parental strains of each species. Interestingly, all fusants between V. dahliae and V. longisporum lost pathogenicity on eggplant. In contrast, fusants between V. dahliae and V. alfalfae were pathogenic on eggplant. These results indicate that there is some kind of genetic factor which suppress pathogenicity on eggplant completely in the genome of V. longisporum, but not in the genome of V. alfalfae.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原糸状菌 病原性 土壤伝染病 宿主範囲 Verticillium属菌 植物病害 半身萎凋病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Verticillium 属の糸状菌は、多様な双子葉植物の根に感染して道管内に蔓延し、萎凋性病害を引き起こし、日本および世界各地の農業生産に大きな被害をもたらしている。本属の中でも *V. dahliae* は特に宿主範囲が広く、病原力も強い。しかし、*V. dahliae* の宿主範囲は種内の菌株ごとに明確に異なっている。一方、*V. longisporum* はアブラナ科植物に顕著な病原性を示すが、宿主範囲は *V. dahliae* より狭い。*Verticillium* 属菌の病原性メカニズムは依然多くが不明だが、これが本属菌の防除を困難にする一因になっている。現在までに、本属菌による病害を防除する決定的な手段はなく、従来とは異なる視点からの防除法の開発が求められている。そのために、本属菌の病原性(病原力)および宿主範囲決定機構の解明は急務である。

Verticillium 属菌は完全世代が確認されない糸状菌(不完全菌類)であるが、我々はこれまでに、無性的な交雑プロセスである『擬有性生殖』を用いた本属菌の遺伝的交雑法を確立した。そして、病原性の異なる *V. dahliae* の菌株を交雑した組換え株を解析し、トマトやピーマンに対する病原性に一致する遺伝子座を明らかにした。このような方法は、本属菌の病原性決定機構を解明するために有効と考えられる。しかし、植物病原性 *V. dahliae* の全系統がナスやオクラに病原性を示すため、これらに対する病原性決定因子を特定するためには、これらに対して病原性がない、あるいは病原力が弱い異種の菌株と、*V. dahliae* の菌株を交雑する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、*Verticillium* 属菌の宿主選択機構を解明して病害防除に活かすことを目的として、本属菌のナスやオクラへの病原性(病原力)を決定するゲノム配列の特定を目指した。本研究の成果をきっかけとして本属菌の病原性決定機構や病原性分化機構を解明できれば、本属菌による病害の防除や診断を行う技術開発につながるだけでなく、本属菌と同様に多犯性かつ病原性分化が認められる病原体の研究を行う上でも有益な情報となる。さらに、有性交雑が困難な他の糸状菌の遺伝学的研究を推進するための貴重な知見も得られる。また、各植物に対する病原性を決定するゲノム配列が明らかになれば、*Verticillium* 属の種分化と病原性分化の関係を解明することも可能である。

3. 研究の方法

(1) *Verticillium* 属菌の形質転換および遺伝的交雑

本研究には、ナスおよびオクラに強い病原性を示す *V. dahliae* の菌株と、ナスに病原性を示さない *V. longisporum* の菌株、そして、ナスおよびオクラへの病原力が弱い *V. alfalfae* の菌株を供試した。これらに菌株に対して、遺伝的交雑の際のマーカーとなるハイグロマイシン B 耐性遺伝子およびジェネティシン耐性遺伝子を、プロトプラスト-PEG 法により導入した。ハイグロマイシン B 耐性菌株とジェネティシン耐性菌株を組み合わせて、それぞれの種内および種間の遺伝的交雑を行った。交雑に供試する 2 菌株のプロトプラストを作成して PEG 法により融合させ、ハイグロマイシン B とジェネティシンの両方に耐性を示す菌株を選抜して単孢子分離を行い、組換え株とした。

(2) 組換え株の病原性試験

交雑により得られた各組換え株を PSB 培地で一週間振盪培養し、分生子を回収した。これをナスおよびオクラの苗に浸根接種した。接種後の苗を培養土に定植して一ヶ月間栽培した後、外部病徴(葉の萎凋や黄化、落葉)および内部病徴(道管褐変)の程度を評価することで、組換え株の病原性や病原力を調査した。

(3) 組換え株の遺伝的解析

交雑に供試した各菌株の全ゲノムデータを利用し、それぞれの種あるいは菌株に特異的な塩基配列を見出し、その箇所を増幅する PCR プライマーをデザインして DNA マーカーとした。これらのプライマーによる増幅産物を電気泳動することで、交雑により得られた各組換え株がいずれの親株に由来するゲノム領域を持つかを判定した。

(4) ベノミルによる染色体脱落の誘導

染色体の分離を阻害する作用のあるベノミル(ベンレート水和剤)を 1~50 µg/mL の濃度で添加した PSB 培地を用いて、重複した異種ゲノムを持つ組換え株を振盪培養した。培養から得られた単孢子分離株を、上記(2)および(3)と同様の病原性試験と遺伝的解析に供試した。

4. 研究成果

V. dahliae、*V. longisporum*、*V. alfalfae* の菌株を用いて種内あるいは種間交雑を試みた結果、いずれの組み合わせでも多数の組換え株を得ることができた。各組換え株の生育は野生株と同様に安定していた。それぞれの組換え株のゲノム構成を調査した結果、*V. dahliae* および *V.*

alfalfae の種内交雑により得られた組換え株については、ほとんどの場合でいずれか一方の親株に由来する DNA マーカー配列を保有していた (図 1, 表 1)。すなわち、これらの組換え株はそれぞれの親株の遺伝的雑種である半数体になって安定していると考えられた。一方で、*V. dahliae* (ナスに顕著な病原性あり) × *V. longisporum* (ナスに病原性なし) あるいは *V. dahliae* (ナスに顕著な病原性あり) × *V. alfalfae* (ナスへの病原力弱い) の種間交雑によって得られた組換え株については、ほとんどの場合で両方の親株に由来する DNA マーカー配列を全て保有していた (図 2, 表 2)。すなわち、種間で核融合が生じた後、ゲノムの半数化がほとんど生じていないと考えられた。このように、プロトプラスト融合により擬有性生殖を誘導した際には、2つの親株の間で核融合が生じた後の半数化プロセスの進みややすさが、種内交雑の場合と種間交雑の場合で大きく異なった。これには、交雑に用いる親株同志の遺伝的類縁性、特に染色体の相同関係や、染色体内の領域構成の相違などが影響していると考えられた。

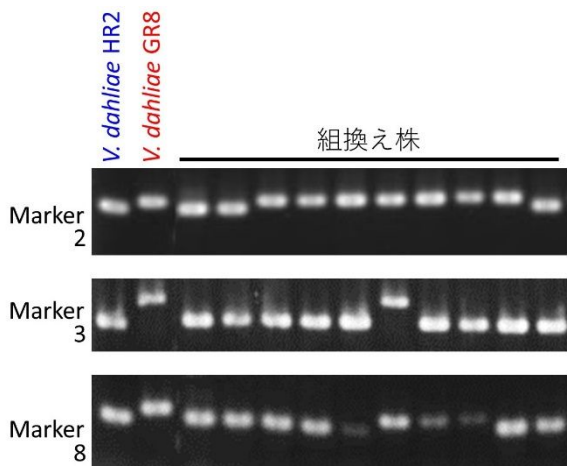


図 1 *Verticillium dahliae* の種内交雑により得られた組換え株の遺伝的解析結果
交雑に用いた親株 HR2 と GR8、それらの種内交雑により得られた組換え株について、3 種類の DNA マーカーにより PCR 解析を行った際の電気泳動像を示す。

表 1 *Verticillium dahliae* の種内交雑により得られた組換え株のゲノム構成

	DNA マーカー							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>V. dahliae</i> HR2	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>V. dahliae</i> GR8	G	G	G	G	G	G	G	G
組換え株	#1	H	H	H	G	H	H	H
	#2	H	H	H	G	H	H	H
	#3	H	G	H	G	H	G	H
	#4	H	G	H	G	H	H	H
	#5	H	G	H	G	H	H	H
	#6	H	G	G	G	G	H	H
	#7	G	G	H	G	H	H	G
	#8	H	G	H	G	G	H	G
	#9	H	G	H	G	H	H	H
	#10	H	H	H	G	H	H	H

H は親株 HR2 と、G は親株 GR8 と同じ配列を持つことを示す。

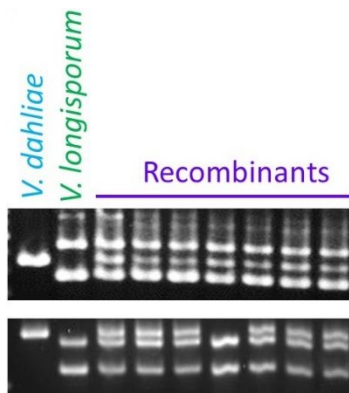


図 2 *V. dahliae* と *V. longisporum* の種間交雑により得られた組換え株の遺伝的解析結果
交雑に用いた各親株と、それらの種間交雑により得られた組換え株について、2 種類の DNA マーカーにより PCR 解析を行った際の電気泳動像を示す。

表2 *V. dahliae* と *V. longisporum* の種間交雑により得られた組換え株のゲノム構成

		DNA markers on each chromosome						
		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
<i>V. dahliae</i>		D	D	D	D	D	D	D
<i>V. longisporum</i>		L1·L2	L1·L2	L1·L2	L1·L2	L1·L2	L1·L2	L1·L2
Recombinants	DL1	All	All	All	All	All	All	All
	DL2	All	All	All	All	All	All	All
	DL3	All	All	All	All	All	All	All
	DL4	L1·L2	L1·L2	All	All	D·L2	All	All
	DL5	All	All	All	All	All	All	All
	DL6	All	All	All	All	All	All	All
	DL7	All	All	All	All	All	All	All

D は *V. dahliae* の親株と、L1 および L2 は *V. longisporum* の親株と同じ配列を持つことを示す。*V. longisporum* は野生株が複単相体 (amphihaploid) であるため、ひとつの DNA マーカーにつき二種類の配列を持つ。All は D · L1 · L2 の全ての配列を持つことを示す。

上述したように、ナスに病原性を示す *V. dahliae* と、ナスに病原性を示さない *V. longisporum* を交雑したところ、得られた組換え株のほとんどは、親株である両種のゲノムを合わせ持っていた。*V. longisporum* の野生株はそもそも複単相体 (amphihaploid) であるため、両種が融合したゲノムを持つ組換え株は、三倍体に近いゲノムを持つと推定される。接種試験によりこれらの菌株の病原性を調査したところ、興味深いことに、全ての組換え株はナスに対する病原性を失っていた (図 3)。全ての組換え株がオクラに対する病原性を維持していたことから、ナスに対して病原性を示さないのは、三倍体ゲノムを持つために生理的な異常を来したことに起因するわけではないと考えられた。一方で、*V. dahliae* と *V. alfalfae* の種間交雑により得られた組換え株においては、このようなナスに対する病原性の喪失は生じなかった。

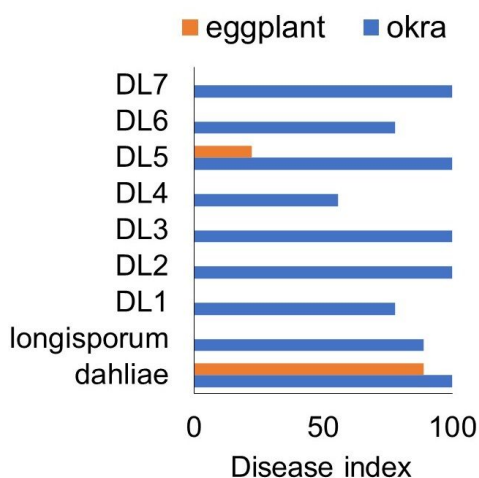


図3 *V. dahliae* と *V. longisporum* の種間交雑により得られた組換え株の病原性
交雑に用いた各親株と、それらの種間交雑により得られた組換え株 (DL1 ~ 7) をナスおよびオクラに接種して病原性 (外部病徴) を調査した。

次に、ナスに対する病原性を失った組換え株を、染色体の分離を阻害する作用のあるベノミルを添加した培地で一定期間培養した。すると、染色体の脱落 (染色体数の減少) が認められた。組換え株をベノミル添加培地で培養して得られた菌群からナスに対する病原性を回復した菌株を選抜したところ、そのような菌株の染色体数は減少していた。このように、*V. dahliae* と *V. longisporum* のゲノムを合わせ持つ融合株から染色体数を減少させていくことでナスに対する病原性が回復したため、*V. longisporum* のゲノム中にはナスに対する非病原力因子が存在すると考えられた。このように本研究では、本属菌の種レベルでの宿主選択に非病原力因子が関与する可能性を初めて示した。一方で、ナスに対する病原力が強い *V. dahliae* と病原力が弱い *V. alfalfae* の種間融合株は、ナスに対する病原性を喪失しなかった。従って、これらの種はゲノム中に非病原力因子を持たず、病原力の強弱は他の機構で決定されていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tan Qian, Li Ran, Liu Lei, Wang Dan, Dai Xiao-Feng, Song Li-Min, Zhang Dan-Dan, Kong Zhi-Qiang, Klosterman Steve J., Usami Toshiyuki, Subbarao Krishna V., Liang Wen-Xing, Chen Jie-Yin	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional Characterization of <i>Verticillium dahliae</i> Race 3-Specific Gene <i>VdR3e</i> in Virulence and Elicitation of Plant Immune Responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.01083-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 谷中仁有, 佐々木葉南, 宇佐見俊行
2. 発表標題 Verticillium属における同種・異種間融合株の倍数性
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 張寧寧, 白井慶, 孫曉雨, 宇佐見俊行
2. 発表標題 <i>Verticillium dahliae</i> のピーマンに対する病原性の有無に非病原力因子が関与する可能性
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Niyu Yanaka, Senri Yoshida, Toshiyuki Usami
2. 発表標題 Virulence of interspecific fusants of <i>Verticillium</i> species in eggplant
3. 学会等名 XX International Plant Protection Congress (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Megumi Araya, Toshiyuki Usami
2. 発表標題 Investigation of the <i>Verticillium</i> wilt pathosystems in horticultural plants to develop novel control methods for it
3. 学会等名 31st International Horticultural Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木葉南・宇佐見俊行
2. 発表標題 オクラへの病原力が異なる <i>Verticillium alfalfae</i> の2菌株間における遺伝的交雑
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田先利・佐々木葉南・和田拓也・宇佐見俊行
2. 発表標題 <i>Verticillium longisporum</i> と他の <i>Verticillium</i> 属菌との種間交雑 および染色体脱落の誘導
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田拓也・佐々木葉南・吉田先利・宇佐見俊行
2. 発表標題 病原性遺伝子探索を目的とした <i>Verticillium alfalfae</i> と <i>V. dahliae</i> の種間交雑の試み
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒矢恵・宇佐見俊行
2. 発表標題 半身萎凋病菌のトマトに対する病原性を決定するゲノム領域
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張寧寧・孫曉雨・宇佐見俊行
2. 発表標題 半身萎凋病菌のピーマンに対する病原性を決定するゲノム領域
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関