HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の分類に関する研究
Author(s)	山本, 英樹
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 19(1), 57-98
Issue Date	1994-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12159
Type	bulletin (article)
File Information	19(1)_p57-98.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大農邦文紀要 19(1)：57～98, 1994

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の分類に関する研究*

山 本 英 樹**
（北海道大学農学部植物寄生病学講座）
（平成5年9月13日受理）

Studies on Taxonomy of the Causal Fungus of Brown Stem Rot of Adzuki Bean and Soybean, *Phialophora gregata* (Allington et Chamberlain) Gams

Hideki YAMAMOTO
(Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

目　次

緒　言 ……57
I．研究史 ……58
II．病原性 ……60
III．培養性質 ……65
IV．分子遺伝学的類縁性 ……68
A．菌体タンパク質および菌体内酵素の電気泳動パターン ……69
1．菌体タンパク質の電気泳動パターン ……69
2．菌体内酵素の電気泳動パターン ……70
B．DNAの塩基組成および塩基配列の相同性 ……76
1．DNAの塩基組成 ……77
2．DNA塩基配列の相同性 ……78
C．ミトコンドリアDNAの制限酵素断片長多型 82
D．二本鎖RNA ……86
V．総合考察 ……89
摘　要 ……90
謝　辞 ……91
引用文献 ……92
Summary ……97

緒　言

アズキ（*Vigna angularis* (Willd) Ohwi et Ohashi）は中国大陸南部が原産で，ヒメツルアズキ（*V. nakashimae* Ohwi et Ohashi）が原種と考えられている。栽培地は中国大陸，朝鮮半島，台湾および日本に限られている。北海道では少なくとも1695年以前に松前で栽培されていたとみられ，その後，石狩，空知，上川地方に中心が移ったが，1930年代以降，特に近年は十勝地方での作付が多い[125]。一方，ダイズ（*Glycine max* (L.) Merrill）は中国東北部とシベリア地域が原産地で[98]，ツルマメ（*G. soja* Sieb. et Zucc.）から分化したものとみられ，その中間型が半栽培型ダイズ（*G. gracilis* Skvorzow）であると考えられている。ダイズは世界的に栽培されており，北海道では1562年にすでに渡島地方で栽培されていた記録がある。最近は十勝地方での作付が全道の半分近くを占め，そのほか上川，石狩地方での栽培が多い[101]。

アズキ落葉病は1932年頃からその発生が認められており[111]，現在では北海道の主要なアズキ栽培地域に広く発生し，栽培上重大な障害になっている。一方，ダイズbrown stem rot (BSR) 病は1944年にアメリカで初めて発生が認められた病害で[3]，1980年には北海道において発生が確認され，ダイズ落葉病と命名された[7]。本病による被害はさほど大きいものではないが，その後，秋田県でも発生し[88]，発生地域の拡大が懸念されている。両病原菌は形態的同一種で，*Cephalosporium gregatum* Allington et Chamberlain[3,90]とされていたが，GAMS[34]は本菌を*Phialophora*属に移すことを提案

* 本報は北海道大学審査学位論文の一部である。
** 現在：秋田県遺伝資源開発利用センター，〒010-04 南秋田郡大潟村字東1-1

し，現在は*P. gregata*（Allington et Chamberlain）Gamsが広く用いられている。

両病害に関する研究はこれまで生態学的な側面を中心に進められてきており，両病原菌の分類，遺伝的類縁性に関する研究はほとんど行われていなかった。そこで，本研究ではアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の病原性，培養性質のほか，分子遺伝学的手法を用いて遺伝的類縁性を検討し，両菌の分類学的位置づけと遺伝的変異について考察した。

I. 研 究 史

アズキ落葉病とダイズ落葉病の研究は生態学的なものが多いが，ここでは病害の発生経過と病原菌，病原性，培養性質に関する研究について述べることにする。

a. 病害の発生経過と病原菌

アズキ落葉病は1932年に十勝，北見地方で多発し，初めて病名が記載された[111]（成田[89]は1904年にアズキに発生した一種の疫病を，その症状，発生状況からアズキ落葉病ではないかと推察している）。その後，石狩，空知，十勝地方で局所的に多発していたとされている[89]。当時，この病害はあまり重要ではなかったものと思われるが，1970年に十勝地方で大発生し，多大な被害をもたらした[90]。その後，北海道全域に蔓延し，アズキ栽培上重大な障害となっている。

罹病アズキは8月中旬頃から下位葉が萎凋し始め，次第に上位葉におよび，葉柄も下方に湾曲するようになる。その後，葉面の脈間が灰褐色あるいは灰白色に変じて乾燥し，逐次落葉する。このため，茎，花梗，莢などを残して坊主になり，やがて株全体が枯死する。また，病株は外観健全でも，内部の維管束部，ときには髄部も褐色，赤褐色あるいは紫褐色に変じ，根から上部および葉柄へと縦につながっていることが特徴である[90]。

この茎内部の褐変部分からきわめて緩慢に生育する菌が常に分離され，アズキに接種したところ落葉症状が再現されたことからこれがアズキ落葉病の病原菌であることが確認された。本菌は*Cephalosporium*の本来の属徴に合致しない点もあったが，その形態がアメリカで発生していたダイズBSR病の病原菌とほとんど一致すること，ならびに両者の病徴，発病経過などが酷似していることから，同一菌*C. gregatum*（後述）として取り扱われることになった[90]。その後，アメリカのダイズBSR病菌と日本のアズキ落葉病菌の形態が直接比較され，差が認められないことが報告された[58]。

一方，ダイズBSR病は1944年にアメリカのイリノイ州で初めて発見された病害で[3]，その後，アイオワ，インディアナ，ミネソタ，ミズーリ，ウイスコンシン等へ広がり，ダイズ栽培における重要な病害の一つとなった。罹病ダイズは8月末から9月初旬に葉が急にしおれだし，脈間が灰褐色，灰白色に変じて枯れ，落葉する。こうした外部病徴は維管束部および髄部の褐変が上昇するにつれて現れるようになる。

本病原菌は胞子を疑頭状に生成し，その分生子柄の分岐が多く，短小で棍棒状であること，胞子がほぼ整一で単胞に限られること等の特徴を有しており，既知の*Cephalosporium*菌とは異なるが，他のいかなる属よりも*Cephalosporium*属の性質に近いのでこれに含ませるべきものとし，新種の*C. gregatum* Allington et Chamberlainと命名された[3]。*Cephalosporium*属は腐植に富む草原土に普通にみられる菌で，ダイズBSR病の発生地域がこうした土壌であることから，ダイズの栽培が増加したことによって，土着の*Cephalosporium*属菌のうちこれを宿主とすることのできるダイズBSR病菌の菌密度が増大したためか，あるいは，導入品種やそこから選抜されて用いられてきた品種が1940～50年代に相互に遺伝的に近縁な品種に取って変わられており，その結果，感受性の品種が広く栽培されるようになったため病気が現れてきたのではないかと推察されている[1]。

本病害はアメリカのほか，カナダ[1]，エジプト[2]で発生が報告されている。日本においては近年までその発生が認められていなかったが，1980年に十勝地方で発見され，ダイズ落葉病と命名された[7]。その後，札幌[92]，長沼（近藤，私信），秋田県[88]でも発生が確認されている。

近年，GAMS[34]よって*Cephalosporium*属菌の多くは*Acremoniun*属に移されたが，本菌*C. gregatum*は棍棒状のフィアライドの一部が明らかにカラーを有することから*Phialophora*属に移され，*P. gregata*（Allington et Chamberlain）Gamsとされた。現在はこの学名が広く用いられている。

b. 病 原 性

ダイズ落葉病菌は供試した10属11種の植物のうちダイズとリョクトウ（*Vigna radiata*（L.）Wilczek）にのみ病原性を有することが明らかにされた[3]。一方，成田ら[90]はアズキのほか4属4種の植物に対するアズキ落葉病菌の病原性を調べ，本菌はアズキおよびリョクトウを宿主とするもののダイズには病原性を示さないことを認め，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は寄生性の分化した生態種ではないかと推察している[89]。

その後，KOBAYASHIら[55]がアメリカと日本で栽培試験を行い，アメリカのダイズ落葉病発病圃場ではダイズは激しく発病したがアズキは発病せず，一方，日本のアズキ落葉病発病圃場ではアズキは激しく発病したがダイズは何れの品種も感染が認められなかったことから，両菌はアズキ，ダイズに落葉症状を引き起こす能力が異なっていると結論づけた。また，アズキ落葉病が発生している圃場で新たにダイズ落葉病が発生し，アズキ落葉病菌の病原性の変異による可能性が考えられたが，アズキ分離菌株はアズキに，ダイズ分離菌株はダイズに病原性を示し，両方に病原性を示す菌株は見いだされなかった[92]。

さらに，それぞれの病原菌で病原性の菌株間差異が認められている。ダイズ落葉病菌は感受性品種に維管束の褐変と共に萎凋症状を引き起こすType Iと維管束の褐変のみで萎凋症状は引き起こさないType IIに分けられ，抵抗性品種に対しては両タイプとも萎凋症状は引き起こさないが，Type Iの方が維管束褐変の進展が大きく，またsoybean seed agar上での生育速度はType Iの方が速いことが報告された[40]。MENGISTU and GRAU[81]も同様の結果を得，さらに罹病組織から*Acremonium* sp.が低頻度ながら分離され，これがダイズの維管束や髄をわずかながら褐変させるが，葉の萎凋等は引き起こさないことを報告した。その後，彼らは硫酸銅を用いたダイズ落葉病菌の選択分離培地を報告したが，本培地上ではType IIの方が生育が速いとしている[82]。

一方，PHILLIPS[99]も菌株によって発病力や生育速度に違いが認められるとしたが，少なくとも3つ以上の病原型に分けられ，さらに菌株を増やせば発病力は連続しタイプ分けできなくなると推察した。また，発病力と生育速度に関係は認められないとした。このほか，罹病性の異なるダイズ品種を判別宿主として用いてダイズ落葉病菌の病原性が検定され，菌株によって侵略力の変異が大きく，生理的特異性の異なる多数の型が存在することが示されているが，レースを設定するには至っていない[104,123]。

アズキ落葉病菌でも菌株によりアズキの品種・系統間で発病程度に差が認められることが報告されている[6]。エリモショウズは罹病性品種の宝小豆分離菌株（A-13），強抵抗性の赤豆分離菌株（AK-11）の何れによっても激しく発病したが，赤豆を片親とするハツネショウズはA-13株に対しては抵抗性を示した。また，十系325号は何れの菌株によっても発病しなかった。

KOBAYASHIら[57]は，罹病組織から比較的高頻度で分離される，培地上での生育が従来からのアズキ落葉病菌（Type A）とは明らかに異なる糸状菌が萎凋毒素Gregatinを生産することから，これを落葉病菌の新しい系統（Type B）として報告した。本菌は注射接種により進展は小さいものの髄ならびに維管束部に褐変を引き起こし，また胞子の形成状態，胞子の大きさ，菌糸の幅などではType Aと差がないが，菌糸の生育速度は速く，ブドウ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地（PDA）上で胞子を多量に形成すること，ならびにGregatinの生産が少ない点などで大きく異なるとしている。一方，内田[118]はType AとType Bは胞子および分生子柄，コロニーの形態から容易に識別できるとした。

また，Type AをV-8ジュース寒天培地（V-8 A）上で数回移植を繰り返しているうちに，生育が良好で多量の胞子を形成する菌叢が扇状に現れた。この部分を分離培養した自発突然変異株は，病原性を含む諸性質がType Bと良く似ているが完全には一致していないことから，Type AがType Bに変異していく中間過程にあると考えられた[54]。また，Type Aを突然変異誘発処理することによっても，このような変異株（誘導突然変異株）が得られている[53]。

c. 培養性質

ALLINGTON and CHAMBERLAIN[3]によれば，ダイズ落葉病菌の生育適温は22～24℃，生育最低温度は8℃以下，また生育最高温度は30℃以上であるとしている。同様に，GRAY[40]は適温が21～25℃の間にあることを報告した。一方，MENGISTU and GRAU[81]によれば，生育最高温度は28～32℃の間にあるとしているものの，生育適

温は20℃であるとしており前二者より低い値を示している。アズキ落葉病菌についてはダイズ落葉病菌との比較で調べられ，両菌の生育適温は24～25℃，生育最低温度は4～5℃，生育最高温度は34℃付近にあり，ほぼ同じであるとされた[58]。

このほか，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は生育速度，各種培地上での胞子形成能やGregatin産生能などで差が認められないことが報告されている[58]。

II. 病　原　性

病原菌においては1つの種の中にも交雑あるいは変異などにより病原性を異にする系統が存在することがある。それが宿主の種レベルで特異性が異なるものを分化型として，また品種に対するものであればレースとして位置づけられる。例えば，*Fusarium oxysporum* では現在まで50以上の分化型が報告され，その中にはさらにいくつかのレースが存在する分化型もある[79]。また，同じ分化型あるいはレースであっても，同一宿主に対する発病力が菌株によって異なることが知られている。

本章では，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌のマメ科植物6種に対する病原性（宿主範囲）と，さらにアズキ落葉病菌については罹病性の異なるアズキ4品種に対する病原性（発病力）の菌株間差異について検討した。

材料および方法

a.　供試菌株

本研究で用いた菌株をまとめてTable 1に示した。アズキ落葉病菌（Type A）42菌株，ダイズ落葉病菌12菌株のほか，アズキ落葉病菌の弱病原性系統として報告されたType B[57] 1菌株，アズキ落葉病菌の突然変異株（本論文中ではType A′とする）[53,54] 4菌株，さらに生産する毒素の構造が酷似することから両菌との類縁性が考えられてきた（小林，私信）コムギ条斑病菌（*Cephalosporium gramineum* Nishikado et Ikata）1菌株を供試した。

b.　宿主範囲

検定植物にはアズキ，ダイズそれぞれ4品種のほか，リョクトウ2品種，エンドウ（*Pisum sativum* L.），インゲン（*Phaseolus vulgaris* L.）およびササゲ（*Vigna unguiculata* (L.) Walp.）の計6種13品種を用いた。

病原菌の接種は断根浸漬接種法によった。初生葉が展開した植物の主根および側根の先端部を切り取り，胞子懸濁液（10^7個/ml）に24時間浸漬した後，ポットに移植した。温室で2か月育てた後，発病状況を調べた。

c.　アズキ落葉病菌の病原性の菌株間差異

アズキ落葉病菌については病原性の菌株間差異を調べた。検定品種は宝小豆，丸葉（刈68号），ハツネショウズ（十育116号）ならびに赤豆を用いた。圃場抵抗性は宝小豆が弱で，その他の3品種は強とされている[21]。

断根浸漬法により6～8個体に接種した。発病度は，地際部を1つの節と見なし，下式で算出した。

$$\text{発病度}=\frac{\Sigma[(Ji+1)/(Ki+1)]}{n}\times 100$$

ただし，Ji，Kiはそれぞれ個体iにおける褐変が進んだ節位，総節数，nは調査個体数を示す。

また，供試菌株をダイズ茎煎汁寒天培地（SSA）上で24℃で培養し，菌糸の生長量を測定した。

結　　果

a.　宿主範囲

アズキ落葉菌4菌株は何れの菌株もアズキ4品種とリョクトウに対して病原性を示した（Table 2）。アズキでは接種後3週間ぐらいで維管束部の褐変および下位葉のしおれが認められた。その後，病徴進展の速いものでは接種後5週間ぐらいには多くの葉がしおれ，一部は落葉した（Fig. 1A）。2か月後には枯死に至る個体が多くみられた。また，アズキ落葉病菌を接種したリョクトウ2品種でも随部を中心に褐変が進展し，下位葉から葉がしおれだした。ダイズに対しては，2個体で維管束の褐変が認められたのを除き，病原性を示さなかった（Fig. 1B）。これら2個体の褐変も地際部ないし子葉節までで，外部病徴は認められなかった。また，アズキ落葉病菌はインゲン，ササゲ，エンドウには病原性を示さず，維管束褐変，葉のしおれ，落葉等の病徴は認められなかった。

一方，ダイズ落葉病菌は4菌株ともダイズ4品種とリョクトウに対し病原性を示した（Table 2）。ダイズの外部病徴は激しい場合もあったが（S62Ha-3株を接種したHarosoy；Fig. 1B），多くの組合せでは一部の葉にしおれが認められる程度の軽いもの

Table 1. Sources of the isolates used in this study.

Isolate	Host cultivar	Locality	Year of collection
Adzuki bean isolate of *Phialophora gregata* (Type A)			
A13	Takara-shozu	Memuro (Tokachi)[a]	1970
A54-13		Asyoro (do.)	1979
A54-24	Hayate-shozu	Makubetsu (do.)	do.
A54-25	Takara-shozu	do. (do.)	do.
A54Ka		Asahikawa (Kamikawa)	do.
A54W	Kotobuki-shozu	Wassamu (do.)	do.
A56-25	Takara-shozu	Makubetsu (Tokachi)	1981
A57T22		Shimizu (do.)	1982
A57T24	Erimo-shozu	Memuro (do.)	do.
A58H	Hayate-shozu	Sapporo (Ishikari)	1983
A59K		Kenbuchi (Kamikawa)	1984
A59M	Maruba No. 1	Sapporo (Ishikari)	do.
A59To	Hatsune-shozu	do. (do.)	do.
A60K68	Maruba (Kari No. 68)	do. (do.)	1985
A60N1		Asahikawa (Kamikawa)	do.
A60To	Hatsune-shozu	Sapporo (Ishikari)	do.
A60W1-1		Wassamu (Kamikawa)	do.
A61Ta	Takara-shozu	Sapporo (Ishikari)	1986
A62A-2	Akamame	do. (do.)	1987
A62A-10	do.	do. (do.)	do.
A62A-16	do.	do. (do.)	do.
A62B2-2	Erimo-shozu	Biei (Kamikawa)	do.
A62B3-1	do.	do. (do.)	do.
A62H1-6		Higashikawa (do.)	do.
A62H3-3		do. (do.)	do.
A62K68-3	Maruba (Kari No. 68)	Sapporo (Ishikari)	do.
A62S	Erimo-shozu	Shibetsu (Kamikawa)	do.
A62Ta-1	Takara-shozu	Sapporo (Ishikari)	do.
A62To-2	Hatsune-shozu	do. (do.)	do.
A63Ha-2	Hayate-shozu	do. (do.)	1988
A63Hi	Hikari-shozu	do. (do.)	do.
A63K1E-1	Erimo-shozu	Kenbuchi (Kamikawa)	do.
A63K1H-2	Hatsune-shozu	do. (do.)	do.
A63K63-1	Maruba (Kari No. 63)	Sapporo (Ishikari)	do.
A63Ko-5	Kotobuki-shozu	do. (do.)	do.
A63Sa-2	Sakae-shozu	do. (do.)	do.
A63Ta-1	Takara-shozu	do. (do.)	do.
A63To-1	Hatsune-shozu	do. (do.)	do.
A63W-3	Erimo-shozu	Wassamu (Kamikawa)	do.
AP1		Atsuma (Iburi)	do.
AP2		do. (do.)	do.
HH		Memuro (Tokachi)	1990
Soybean isolate of *P. gregata*			
S8001	Suzuhime	do. (do.)	1980
S57Ko	Kosodefuri	Sapporo (Ishikari)	1982
S57O	Oakland	do. (do.)	do.
S58W	Wasemidori	do. (do.)	1983
S8301	Suzuhime	Obihiro (Tokachi)	do.
S8302	do.	do. (do.)	do.
S60KS	Kitamishiro	Sapporo (Ishikari)	1985
S60S	Sapporomidori	do. (do.)	do.
S62Ha-3	Harosoy	do. (do.)	1987
R-3	Okushirone	Nishisenboku (Akita Prefecture)	do.
St-4	do.	do. (do.)	do.
AK-89-12	Suzuyutaka	do. (do.)	1989
Avirulent strain of adzuki bean isolate (Type B)			
B57T14		Honbetsu (Tokachi)	1982
Mutant from Type A isolates (Type A′)			
A′31-2		Kun-neppu (Abashiri)	1978
A′54Ka		Asahikawa (Kamikawa)	1979
A′56-31	Takara-shozu	Ikeda (Tokachi)	1981
A′59Ta	do.	Sapporo (Ishikari)	1984
Cephalosporium gramineum			
W56Kit		Kun-neppu (Abashiri)	1981

[a] District in Hokkaido unless otherwise indicated.

Table 2. Pathogenicity of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata.*

Plant species and cultivar	Adzuki bean isolate				Soybean isolate				Control
	A54-24	A61Ta	A62B2-2	A62K68-3	S8301	S60KS	S62Ha-3	St-4	
Adzuki bean									
Hikari-shozu	16/17[a] (+++)[b]	20/21 (+++)	15/17 (+++)	10/19 (++)	0/21 (−)	0/18 (−)	0/20 (−)	0/18 (−)	0/17 (−)
Kotobuki-shozu	13/16 (+++)	15/15 (+++)	16/16 (+++)	15/16 (++)	0/15 (−)	0/19 (−)	0/15 (−)	0/16 (−)	0/13 (−)
Sakae-shozu	11/16 (++)	16/17 (+++)	15/16 (+++)	16/17 (++)	0/16 (−)	0/19 (−)	0/17 (−)	0/16 (−)	0/17 (−)
Takara-shozu	17/18 (+++)	19/20 (+++)	17/17 (+++)	15/17 (++)	0/17 (−)	0/18 (−)	0/17 (−)	0/18 (−)	0/15 (−)
Soybean									
Harosoy	0/16 (−)	0/16 (−)	1/16 (−)	0/18 (−)	9/15 (−)	14/17 (+)	16/16 (+++)	10/16 (−)	0/15 (−)
Kitamishiro	0/14 (−)	0/17 (−)	0/14 (−)	0/14 (−)	10/16 (−)	12/17 (−)	15/17 (+)	11/18 (−)	0/14 (−)
Komamusume	0/14 (−)	1/16 (−)	0/15 (−)	0/15 (−)	6/17 (−)	12/17 (+)	16/19 (++)	10/22 (+)	0/11 (−)
Tsurukogane	0/14 (−)	0/14 (−)	0/13 (−)	0/11 (−)	12/17 (+)	12/15 (+)	16/18 (++)	9/19 (+)	0/12 (−)
Mung bean									
Green mappe	12/14 (+)	3/12 (−)	8/12 (+)	4/12 (−)	12/14 (+)	4/13 (−)	6/13 (+)	4/13 (−)	0/12 (−)
Ryokuto moyashi	7/7 (+)	ND[c]	5/7 (+)	2/7 (−)	6/6 (+)	ND	1/7 (−)	5/7 (−)	0/7 (−)
Kidney bean									
Kintoki saito	0/6 (−)	ND	0/6 (−)	0/6 (−)	0/6 (−)	ND	0/6 (−)	0/6 (−)	0/5 (−)
Cowpea									
	0/6 (−)	ND	0/5 (−)	0/6 (−)	0/6 (−)	ND	0/6 (−)	0/6 (−)	0/7 (−)
Pea									
Sanjunichi kinusaya endo	0/6 (−)	ND	0/5 (−)	0/6 (−)	0/6 (−)	ND	0/6 (−)	0/6 (−)	0/7 (−)

[a] Number of diseased plants/number of inoculated plants.
[b] External symptom, −: no external symptom, +: wilting of a part of leaves, ++: wilting of about half of leaves, +++: wilting of most of leaves and defoliation.
[c] Not done.

だった。茎内部の病徴はアズキ落葉病菌を接種したアズキの場合と異なり，主に随部を中心に褐変した。また，ダイズ落葉病菌はリョクトウに感染し，随部の褐変や下位葉にしおれを生じさせた。しかし，ダイズ落葉病菌はアズキには何れの組合せでも全く病原性を示さなかった（Fig. 1A)。同様に，ダイズ落葉病菌を接種したインゲン，ササゲ，エンドウでも落葉病の病徴は観察されず，健全な生育であった。

b. アズキ落葉病菌の病原性の菌株間差異

実験結果はTable 3に示したとおりである。アズキ落葉病菌（Type A）の突然変異株Type A′4菌株は何れの品種に対してもほとんど病原性を示さなかった。一方，Type Aは菌株によって病原性に違いが認められた。全個体が地際部まで褐変していた場合の発病度は約20であるため，発病度が20以上であったときその品種に対し病原性を有すると見なしたところ，検定品種に対する反応から3つのタイプに分かれた。1つは感受性品種の宝小豆のみに病原性を示すもので，供試したType A22菌株のうち17菌株がこのタイプであった。宝小豆の発病度は21（A13株)から100（A54W株など)まで菌株に

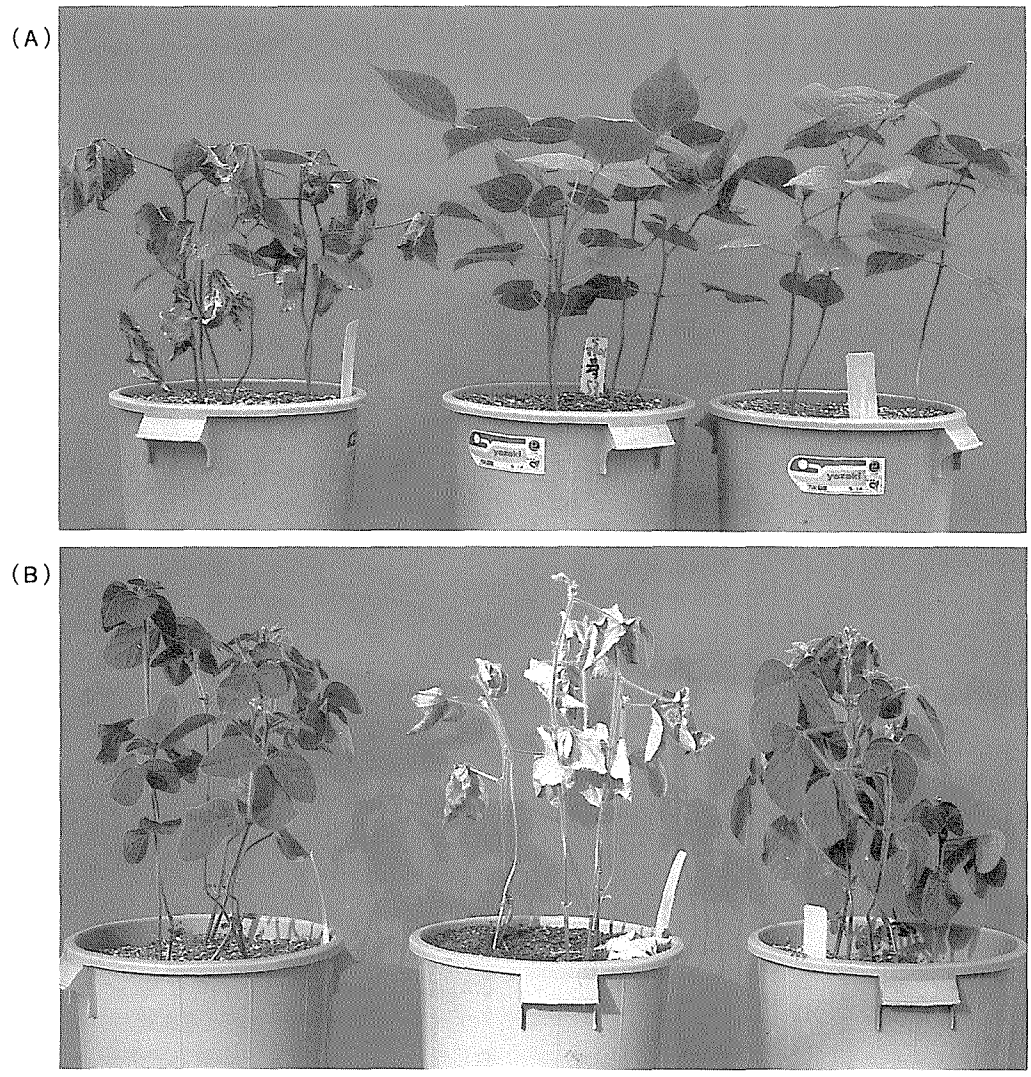


Fig. 1. Wilt symptoms on adzuki beans and on soybeans after inoculation with adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata*. (A) Left to right; adzuki beans (cultivar Kotobuki-shozu) showing wilting after inoculation with adzuki bean isolate (A61Ta), showing no symptoms after inoculation with soybean isolate (S62Ha-3) and healthy control plants. (B) Left to right; soybeans (cultivar Harosoy) showing no symptoms after inoculation with adzuki bean isolate (A54-24), showing wilting after inoculation with soybean isolate (S62Ha-3) and healthy control plants.

よって大きく異なった。2つめのタイプは宝小豆と抵抗性品種の丸葉に対し病原性を示したもので，4菌株（A62A-2, A63Ha-2, A63Hi, A63K63-1）が属した。もう1つは，宝小豆と抵抗性の丸葉，ハツネショウズの3品種に病原性のものでA62K68-3株のみがこのタイプであった。赤豆は供試したType Aの何れの菌株に対しても抵抗性であった。

以上のように，アズキ落葉病菌はType A′を含め病原性から4つのタイプに分かれたので，それぞれより代表菌株を選び菌糸生長速度を測定したところ，Type A′が明らかに速かったほかは，上述のType Aの病原性に基づく3タイプと生長速度に関係は見いだされなかった（Table 4）。

考　　察

アズキ落葉病は短期間に，かつ均一に発病させる

Table 3. Disease severity indices observed in host cultivars inoculated with adzuki bean isolates of *Phialophora gregata* (Type A) and their mutants (Type A′).

Isolate	Host cultivar			
	Takara-shozu	Maruba	Hatsune-shozu	Akamame
Type A′				
A′31-2	0[a]	0	0	0
A′54Ka	6	0	0	0
A′56-31	0	5	0	0
A′59Ta	0	0	6	0
Type A				
A13	21	0	0	0
A54-24	86	0	0	0
A54W	100	0	11	0
A60K68	75	6	8	0
A60To	100	0	4	0
A62A-10	100	3	6	0
A62A-16	80	0	0	0
A62B2-2	91	5	0	0
A62Ta-1	76	0	0	0
A62To-2	80	4	0	0
A63K1E-1	69	7	4	0
A63K1H-2	27	0	0	0
A63Ko-5	72	0	0	0
A63Sa-2	56	0	0	0
A63Ta-1	33	0	0	0
A63To-1	72	6	4	4
A63W-3	31	0	14	0
A62A-2	89	36	0	0
A63Ha-2	68	46	16	0
A63Hi	63	65	0	0
A63K63-1	35	63	0	0
A62K68-3	92	52	56	0

[a] Disease severity indices were calculated as described in the text.

ことが困難であるとされ，ダイズシストセンチュウ（*Heterodera glycines* Ichinohe）との混合接種法も試みられているが，発病までには1か月以上の期間が必要であった[91]。発病圃場においては播種後3週間以内に側根に感染が認められるのにもかかわらず，下位葉の萎凋がみられるのはそれから2か月以上後であることが観察されており[116]，本病の進展とアズキの齢との間に密接な関係があるのではないかと推察されている[91]。

本実験で用いた断根浸漬接種法は簡便で，維管束あるいは随部の褐変は安定して得られたが，外部病徴は冬期間に行った接種試験では現れたものの1か月以上を要した。これは，日照不足により植物の生育状態が余り良くなかったため，外部病徴の発現が促進されたものと考えられた。従って，1年を通じて接種試験を行う場合には，維管束・随部の褐変による評価法が安定していると思われる。千葉[22]はアズキ落葉病抵抗性の品種間差異は茎内部の褐変の進展速度の差によるものとしており，また，MENGISTU and GRAU[81]もダイズ落葉病で同様の結果を得，抵抗性の評価は茎内褐変の進展程度による方法が適当であると報告している。

Table 4. Mycelial growth (mm) of adzuki bean isolates of *Phialophora gregata* (Type A) and their mutants (Type A′) on soybean stem agar.

Isolate	Incubation period at 24℃		
	2 weeks	4 weeks	6 weeks
Type A′			
A′31-2	25.3	∞[a]	∞
A′59Ta	23.9	∞	∞
Type A			
A54-24	11.3	22.6	30.9
A60To	13.5	28.5	37.3
A62A-16	12.2	27.3	35.8
A62B2-2	13.2	29.2	35.3
A62A-2	13.1	27.9	32.3
A63Hi	13.0	28.8	37.3
A63K63-1	13.2	29.5	36.6
A62K68-3	13.9	29.4	36.0

[a] More than 43.

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の宿主範囲を比較したところ，これまでの報告[3,55,90,92]から推察されたとおり，アズキ落葉病菌はアズキおよびリョクトウに，ダイズ落葉病菌はダイズおよびリョクトウに対して病原性を示し，インゲン，ササゲ，エンドウには非病原性であった。すなわち，両菌はアズキとダイズに対する病原性が明らかに異なっており，形態的同一種であることから[58,90]，異なる分化型に相当するものと考えられる。

また，アズキ落葉病菌[6,53,54,57]，ダイズ落葉病菌[40,81,99,104,123]それぞれにおいて菌株レベルで病原性に違いがみられることが報告されている。一方，千葉[21,22]は，アズキ落葉病抵抗性は免疫的なものではなく，病原性の分化を促すことは少ないとしている。

Type A′は，本実験においても何れの品種に対

してもほとんど病原性を示さなかった。また，Type A の多くの菌株は抵抗性の3品種に非病原性で，宝小豆にのみ維管束の褐変を引き起こしたが，その進展の程度は菌株によって大きく異なった。これは，PHILLIPS[99] がダイズ落葉病菌において示唆しているような発病力の連続的な変異であると考えられた。その他の5菌株は抵抗性品種にも病原性を示し，4菌株は丸葉に，1菌株は丸葉とハツネショウズに維管束の褐変を引き起こした。後者は青田ら[6] の報告した AK-11 株に相当するものと思われる。しかし，こうした病原性の差異と培地上での生長速度の間に関係は認められず，病原性の強い Type I が弱い Type II よりも生長速度が速いとするダイズ落葉病菌での報告[40,81] とは異なった。

以上のことは，少なくともアズキ落葉病菌も菌株により病原性が異なることを示しているが，抵抗性品種から分離された菌株が必ずしもその品種に対して病原性を示すとは限らず（例えば，赤豆から分離された A62A-16 株など，ハツネショウズから分離された A62To-2 株などや，丸葉から分離された A60K68 株，Table 3 参照），病原性の安定性を含め，レースの設定についてはさらに検討を要するものと考える。

III. 培養性質

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は形態的同一種[58,90] で，宿主特異性から区別される[55,92]。しかし，本病害は接種試験が比較的難しく，時間がかかることから[91]，両菌の培養性質に何らかの差異が見いだされれば簡便で容易な識別方法として用いることができる。

本章では，培養性質のうち菌叢の性状，菌糸生育と温度・pH の関係ならびに硫酸銅耐性について，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の比較を行った。

材料および方法

a. 菌叢の性状

SSA, PDA, V-8A およびコーンミール寒天培地（CMA）上で2週間，23℃で培養した菌叢の性状を比較した。

b. 温度と菌糸の生育

SSA 培地上で3週間，所定の温度で培養し，菌糸の生長量を測定した。

c. 培地の pH と菌糸の生育

所定の pH に調整したダイズ茎煎汁液体培地と2倍濃度の緩衝液[124] の混合液（1：1）の2%寒天培地上で3週間，生育適温で培養し，生長量を測定した。

d. 硫酸銅耐性

上述のようにしてクエン酸塩緩衝液を用いて pH 4.0 に調整した培地に所定の濃度になるように硫酸銅を加えた培地上で30日間，生育適温で培養し，菌糸の生長量を測定した。

結果および考察

a. 菌叢の性状

PDA 上ではアズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌とも生育が遅く，おおよそ円形の厚いマット状の菌叢であった（Fig. 2A）。そして，放射状のひだを生じ，培養期間が長くなるのに従いより顕著になった。前者に比べ後者の方が生育が速い傾向にあった。菌叢の周辺部は多様で，ときどきなめらかな周辺を持つセクターが生じた。V-8A 上での菌叢は PDA 上でのそれに似ていたが，白い気中菌糸を生じることが多かった。また，ダイズ落葉病菌はアズキ落葉病菌より大きな菌叢を形成し，放射状のひだは顕著でなかった。また，アズキ落葉病菌は途中で生育を停止し，菌叢が小さいことが多かった。一方，CMA や SSA 上では両菌とも比較的生育が速く，薄く，透明で同心円状の菌叢を形成した（Fig. 2B）。

このように，菌叢の形態には両菌間で顕著な違いは認められなかったが，PDA，V-8A 上での菌糸マットの色は異なった。すなわち，これらの培地，特に V-8A 上で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いた。同様な結果は液体培地で培養した場合にも得られた。この菌糸マットの色の違いは培養初期に顕著で，培養期間が長くなるとアズキ落葉病菌では黒色化，ダイズ落葉病菌では暗灰緑色から黒色化することがしばしばあり，識別しにくくなった。また，アズキ落葉病菌は CMA においても希に淡赤色になることがあったが，このようなときには菌糸生育が抑制され，菌叢は小さかった。同様に，V-8 A 上でも菌叢が小さいときほど赤色の色づきが強い傾向にあった。

アズキ落葉病菌の菌叢の色調については，成田ら[90] も PDA 平面培養で基質がときには淡赤褐色に

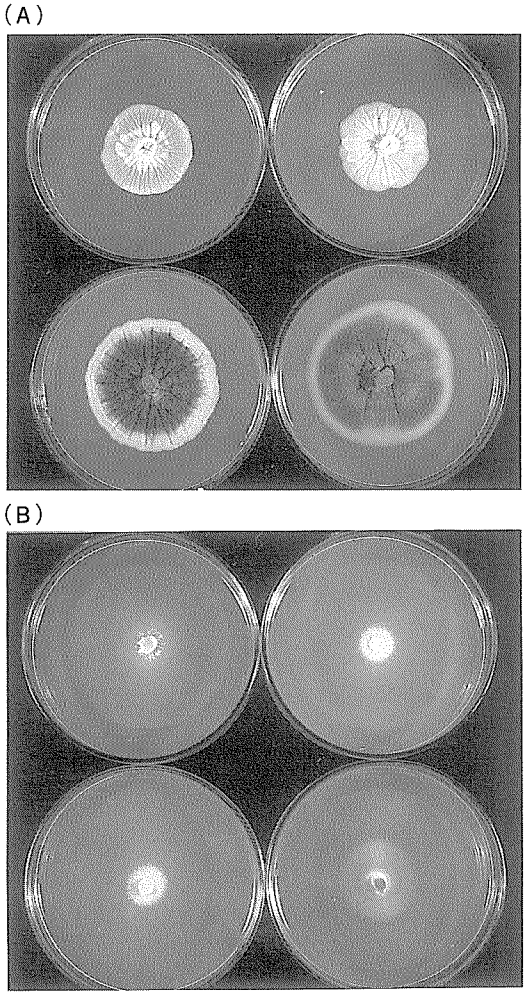


Fig. 2. Colonies of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* on (A) potato dextrose agar and (B) soybean stem agar. Upper, adzuki bean isolates (left, A54-13; right, A61Ta); Lower, soybean isolates (left, S62Ha-3; right, R-3).

変じること，オートミール寒天培地上でも基質が淡赤色に変じることが多いことを記している。*Fusarium* 属菌では，培地に添加する糖の量の増加，L-アスパラギンの添加と酸性化により，また暗所より明所における培養の方が色素生産が多くなることが知られており[59,79]，本菌においてもより色素生産の多くなる培養条件を見いだすことによって，菌叢の色調による両菌の識別がより明確になるものと思われる。

b.　温度と菌糸の生育

温度と菌糸の生育について，ダイズ落葉病菌で報告されている結果[3,40,81]を総合すると，生育適温は22～24℃の間に，また生育最高温度は30～32℃にあると考えられる。一方，アズキ落葉病菌の生育適温は24～25℃，最低温度は4～5℃，最高温度は34℃付近であることが報告されている[58]。

本実験の結果（Table 5），生育適温はアズキ落葉病菌がダイズ落葉病菌よりも2～3℃高く，それぞれ24～26℃，22～23℃であることが示された。それよりも高温域ではアズキ落葉病菌に比べダイズ落葉病菌の生育が顕著に抑えられた。各温度での3週間の菌糸の生長量（および生育適温での生長量に対する相対値）は，アズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌それぞれ28℃で30.0～44.0 mm（0.71～0.90），14.5～32.0 mm（0.31～0.65），30℃で17.0～27.0 mm（0.40～0.59），2.0～10.0 mm（0.04～0.23）であった。さらに，32℃ではダイズ落葉病菌は全く生育しなかったが，アズキ落葉病菌ではわずかながら生育が認められた。一方，生育適温よりも低温域での両菌の生育に差はほとんど認められず，生育最低温度は両菌とも5℃以下にあると考えられた。

以上の結果から，アズキ落葉病菌はダイズ落葉病菌に比べやや好高温菌であると考えられる。KOBAYASHI and UI[58]は生育と温度の関係について両菌間で大きな違いが認められないとしているが，彼らの示した結果にも本実験で得られた結果，すなわち25℃以上ではダイズ落葉病菌の生育がアズキ落葉病菌に比べ抑えられるという傾向が認められる。

c.　培地のpHと菌糸の生育

アズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌とも，リン酸クエン酸塩緩衝液で調整した培地上でpH 2.6でも生育する菌株が認められ，pHの上昇と共に生長量が増加し，pH 3.6ないし4.1で最大となり，その後，pHの上昇と共に生長量が低下した（Table 6）。バルビタール緩衝液（pH 6.5～8.7）およびグリシン水酸化ナトリウム緩衝液（pH 8.4～10.7）で調整した培地では，両菌ともpHの上昇と共に生長量が減少した。以上のことから，両菌の菌糸生育の最適pHは4付近にあるものと思われた。

これらの培地で用いた緩衝液はpHによって構成成分の割合が変化するので，こうした影響がほとんど無いと考えられるクエン酸塩緩衝液を用いて最適pH付近（pH 3.4～4.4）での生育を詳しく調べた。菌株による差異が認められたが，アズキ落葉病菌の

Table 5. Mycelial growth of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* at various temperatures on soybean stem agar.

Isolate	Temperature (℃)											
	5	10	15	20	22	23	24	25	26	28	30	32
Adzuki bean isolate												
A13	2.8[a]	8.5	16.0	19.3	19.3	19.5	**20.0**[b]	19.3	18.3	16.8	10.0	1.0
A54-13	2.5	4.5	6.3	11.0	19.5	20.0	22.4	22.5	**22.8**	19.8	13.5	1.0
A54W	2.5	6.5	13.0	16.3	17.5	18.5	**19.3**	**19.3**	18.3	15.0	9.0	1.0
A59To	2.4	7.9	15.5	21.8	22.5	23.5	24.5	**24.8**	24.5	22.0	12.0	1.3
A61Ta	2.3	2.8	6.8	12.0	16.4	20.5	22.5	**23.9**	21.3	17.5	11.5	1.3
A62A-16	2.0	7.5	13.5	17.8	18.0	20.8	**21.0**	20.0	17.0	15.8	8.5	1.0
A62B2-2	1.2	6.0	12.4	17.8	18.5	19.2	19.8	**20.0**	19.3	18.1	9.4	1.0
A62K68-3	2.5	7.5	13.5	17.0	18.0	20.5	**21.0**	20.0	16.8	15.0	11.8	1.0
Soybean isolate												
S8001	2.0	8.8	15.8	20.0	21.3	**21.8**	21.2	20.3	19.0	12.5	2.5	0
S8301	1.0	6.8	15.0	20.0	20.0	**20.9**	19.4	18.2	14.8	10.5	2.5	0
S8302	2.2	9.4	17.5	21.8	**23.3**	23.0	22.8	20.8	18.8	14.2	2.7	0
S60KS	2.8	7.0	10.5	17.8	21.0	**22.0**	21.5	20.9	18.8	14.0	3.8	0
S62Ha-3	3.3	8.3	15.2	20.7	22.4	**23.3**	23.0	22.8	19.8	7.3	1.0	0
R-3	1.5	9.1	16.5	20.8	22.0	**22.2**	21.2	20.5	18.8	11.0	5.0	0
St-4	2.8	9.2	16.7	22.8	24.3	**24.8**	24.5	23.3	20.8	16.0	2.5	0
AK89-12	1.0	6.0	11.0	16.5	17.0	**18.3**	16.3	15.0	10.8	8.5	1.8	0

[a] mm/three weeks.
[b] Numbers in bold show maximum growth.

Table 6. Mycelial growth of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* at various pHs on soybean stem agar.

Isolate	Buffer used and pH of medium[a]														
	Citrate-phosphate buffer									Citrate buffer					
	2.6	3.1	3.6	4.1	4.5	5.0	6.1	7.0	8.0	3.4	3.6	3.8	4.0	4.2	4.4
Adzuki bean isolate															
A13	0[b]	1.5	10.3	**10.5**[c]	7.3	5.5	4.5	3.5	3.0	7.5	10.3	**10.8**	10.3	8.8	8.0
A54W	<1.0	3.8	**13.8**	11.0	9.5	8.3	7.0	4.0	3.3	13.0	**14.8**	13.9	12.8	11.0	9.8
A59To	<1.0	5.5	19.5	**20.7**	14.8	8.3	1.5	1.3	1.0	15.0	19.0	20.5	**21.3**	20.0	17.3
A62A-16	0	2.5	9.5	**12.0**	10.8	9.3	8.5	6.0	5.5	8.0	9.8	11.0	**12.5**	12.3	12.0
A62B2-2	<1.0	4.8	**16.3**	15.3	11.0	9.0	6.0	4.0	2.0	13.3	16.8	**18.3**	**18.3**	15.3	11.8
A62K68-3	0	2.2	9.5	**12.0**	10.5	9.5	8.5	6.3	5.5	7.8	9.5	11.0	**12.5**	12.3	12.0
Soybean isolate															
S8301	<1.0	5.5	13.3	**15.0**	11.5	8.3	5.8	4.0	3.3	11.5	15.0	**17.0**	16.0	15.0	12.3
S8302	<1.0	6.8	12.0	**13.0**	8.3	6.5	5.8	5.3	5.0	11.2	13.7	**14.0**	**14.0**	11.8	11.3
S60KS	0	5.5	13.0	**15.3**	12.0	9.3	4.8	4.8	4.5	9.0	12.5	17.3	**17.5**	15.3	13.5
S62Ha-3	0	5.0	**14.3**	14.0	7.0	4.8	4.5	3.5	3.0	9.5	12.3	13.0	**14.8**	14.5	9.8
St-4	<1.0	5.5	**11.5**	10.8	5.3	3.3	3.0	3.0	3.0	10.0	11.0	**11.3**	10.8	9.4	6.8
AK89-12	<1.0	5.0	8.0	**8.3**	5.0	4.5	4.0	3.5	2.5	7.5	7.5	**9.0**	8.8	8.0	8.0

[a] Methods used to prepare the media are described in the text.
[b] mm/three weeks.
[c] Numbers in bold show maximum growth on each medium.

最適pHは3.6～4.0にあり，ダイズ落葉病菌のそれは3.8～4.0にあることが明らかとなった(Table 6)。このことから，両菌の生育最適pHには差がないと考えられた。

d. 硫酸銅耐性

硫酸銅は低濃度でアズキ落葉病菌の生育を阻害するとされていたが[56]，近年，ダイズ落葉病菌の選択分離に硫酸銅が効果的であることが報告され[82]，両菌間で硫酸銅耐性に差があることが推測された。

本実験の結果（Table 7），アズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌とも1,000 μg/mlまで対照区と変わらない生育を示した。むしろ硫酸銅が添加された培地上の方が生長速度が速い場合も認められた。5,000, 10,000 μg/mlでは両菌とも全く生育が認められなかったが，本濃度では培地のpHが2.9以下に低下し，これが生育に強く影響しているものと考えられた。何れにしろ，アズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌とも硫酸銅の最低生育阻害濃度は1,000 μg/ml以上にあり，両菌の硫酸銅耐性に差はないと考えられた。また，アズキ落葉病菌の選択分離にも硫酸銅の利用が有効であると考えられた。

以上のように，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は調査した培養性質のうち菌糸の生育と温度の関係や特定の培地上での菌叢の色合いが異なることが明らかとなり，簡便な識別方法として利用できるものと考えられた。こうしたことは，両菌が病原性を含む生理，代謝系レベルで差異が生じていることを示しており，同時に，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌を*P. gregata*の種内群とする考え方[58,89]を支持するものであると思われる。

IV. 分子遺伝学的類縁性

微生物，特に糸状菌の分類は形態観察に基づく伝統的分類学が中心で，これを化学あるいは生化学的手法により得られた情報で補強しているのが現状である。微生物の化学分類では細胞壁構成成分，細胞内脂肪酸，リン脂質，キノンなどの細胞構成成分や二次代謝産物などの特定の成分のほか，熱分解法による未同定成分の比較などが行われている（狭義の化学分類）。

さらに，近年における分子生物学の発達は分子遺伝学，分子進化学等の分野を生み出し，微生物の相互関係を遺伝情報高分子のレベルで研究することを可能にした。分子遺伝学を基礎とした分析法としてはタンパク質あるいは酵素の電気泳動パターン，DNAの塩基組成や塩基配列の相同性，制限酵素断片長多型（RFLP），さらに核酸の特定部位の塩基配列の直接比較などがあげられ，菌類の分類や同定，系統発生関係の推察などに利用されている。また，分子生物学の発展は生物集団の遺伝的変異をタ

Table 7. Mycelial growth of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* at various concentrations of $CuSO_4$ on soybean stem agar.

Isolate	Concentration of $CuSO_4$ (μg/ml)									
	0 (4.1)[a]	1 (4.1)	5 (4.1)	10 (4.1)	50 (4.1)	100 (4.1)	500 (3.9)	1,000 (3.9)	5,000 (2.9)	10,000 (2.6)
Adzuki bean isolate										
A54-13	27.3[b]	27.3	27.8	30.0	28.8	29.0	27.0	25.8	0	0
A54W	19.3	19.5	19.5	19.8	20.3	19.8	20.0	20.3	0	0
A59To	28.5	29.3	32.3	32.0	31.0	31.5	29.8	30.3	0	0
A61Ta	27.3	32.0	32.0	32.3	32.0	31.8	27.8	27.0	0	0
A62B2-2	21.3	22.0	22.0	22.3	24.0	23.3	23.3	23.5	0	0
Soybean isolate										
S8001	20.0	19.8	20.0	20.0	20.0	18.8	18.3	18.0	0	0
S8302	23.3	22.8	22.3	22.0	22.0	23.3	23.0	23.0	0	0
S60KS	26.8	26.3	25.5	25.3	27.0	26.8	27.0	26.3	0	0
S62Ha-3	18.0	18.5	20.3	20.0	20.3	19.5	19.5	20.0	0	0
R-3	21.3	20.8	20.3	20.5	20.5	20.8	21.0	21.0	0	0
St-4	15.8	16.3	15.8	15.8	16.3	16.3	16.5	16.3	0	0

[a] pH of the medium after adding $CuSO_4$, which was prepared as described in the text.
[b] mm/30 days.

ンパク質，核酸レベルで調べることを可能とした。そのため，集団遺伝学の研究対象が個体から分子へと移り，タンパク質多型や，最近ではRFLPを利用した報告が多くみられるようになってきた。

本章では，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調べた。タンパク質レベルでは菌体タンパク質の電気泳動パターンとアイソザイム分析を，また，核酸レベルではDNAの塩基組成と塩基配列の相同性，ミトコンドリア（mt）DNAのRFLPおよび二本鎖（ds）RNAについて検討した。

A. 菌体タンパク質および菌体内酵素の電気泳動パターン

タンパク質は遺伝情報をアミノ酸配列として写しとったものであり，タンパク質を比較することはDNAの構造上の相違を研究することになる。電気泳動法はタンパク質の構造の微細な差異を検出できるので，形態および生理的性質が類似していて判別が困難な菌種群の識別に有効であると考えられ，細菌，酵母をはじめ植物病原糸状菌の分類・同定の研究にも応用され，その有用性が認められている。

そこで，本節ではアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の菌体タンパク質および菌体内酵素の電気泳動パターンを比較し，本法による両菌の識別・同定の可能性を検討すると共に遺伝的類縁性について推察した。

1. 菌体タンパク質の電気泳動パターン

材料および方法

23℃で1週間，ジャガイモ煎汁液体培地で培養した菌体を凍結乾燥し，乳鉢•乳棒を用いて破砕した。菌体タンパク質の抽出はDALEら[25]の方法に準じ，電気泳動はLAEMMLI[73]の方法（SDS-PAGE）によった。泳動後，ゲルをCoomassie Brilliant Blueで染色した。

結　　果

細胞質可溶性分画のタンパク質を12.5%SDS-PAGEで分析したところ，各菌株とも約10～100 kDaにバンドが認められた（Fig. 3A）。供試したアズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌それぞれ6菌株は異なる地域，品種から分離されたものであるが，菌株間でバンドパターンにほとんど差異が認められず，両菌の主な細胞質可溶性タンパク質に差異はないものと考えられた。一方，アズキ落葉病菌の弱病原性系統として報告されたType Bはこれと異なるバンドパターンを示し，細胞質可溶性タンパク質の構成が*P. gregata*とは明らかに異なるものと考えられた。

全細胞タンパク質を10%ゲルで電気泳動したところ，各菌株とも約200 kDa以下に多数のバンドを生じたが，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は細胞質可溶性分画同様，菌株によるパターンの相違はほとんど認められなかった（Fig. 3B）。両菌は全細胞タンパク質においても顕著な差異はないものと考えられた。Type Bは全細胞タンパク質においても*P. gregata*とは明らかに異なる泳動像であった。

考　　察

これまで，多くの糸状菌で菌体タンパク質の電気泳動パターンが調査されてきた。多くの場合，同一種のものは類似した泳動像を示すことから，一般に種間の識別は可能であると考えられているが，本法は種内群レベルの識別には有効ではないとされている[18]。

従って，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の間で細胞質可溶性タンパク質および全細胞タンパク質の泳動像に差異が認められなかったことは，両菌が別種ではなく同一種であることを示していると考えられ，形態観察に基づき両菌を同一種とした報告[58,90]を支持するものである。そして両菌は，これまでの糸状菌における報告に照らして，*Rhizoctonia solani*の菌糸融合群[100]や*Puccinia*属菌の分化型[103]，*Armillaria mellea* complexの生物種[74]ほど遺伝的に分化しておらず，*Phytophthora fragariae*のphysiologic race[37]，*P. vignae*[117]や*Fusarium*属菌の分化型[38]のような関係にあると推察される。

また，Type Bは細胞質可溶性タンパク質，全細胞タンパク質何れもアズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌とは異なる泳動パターンを示し，*P. gregata*とは異なる種であると考えられた。

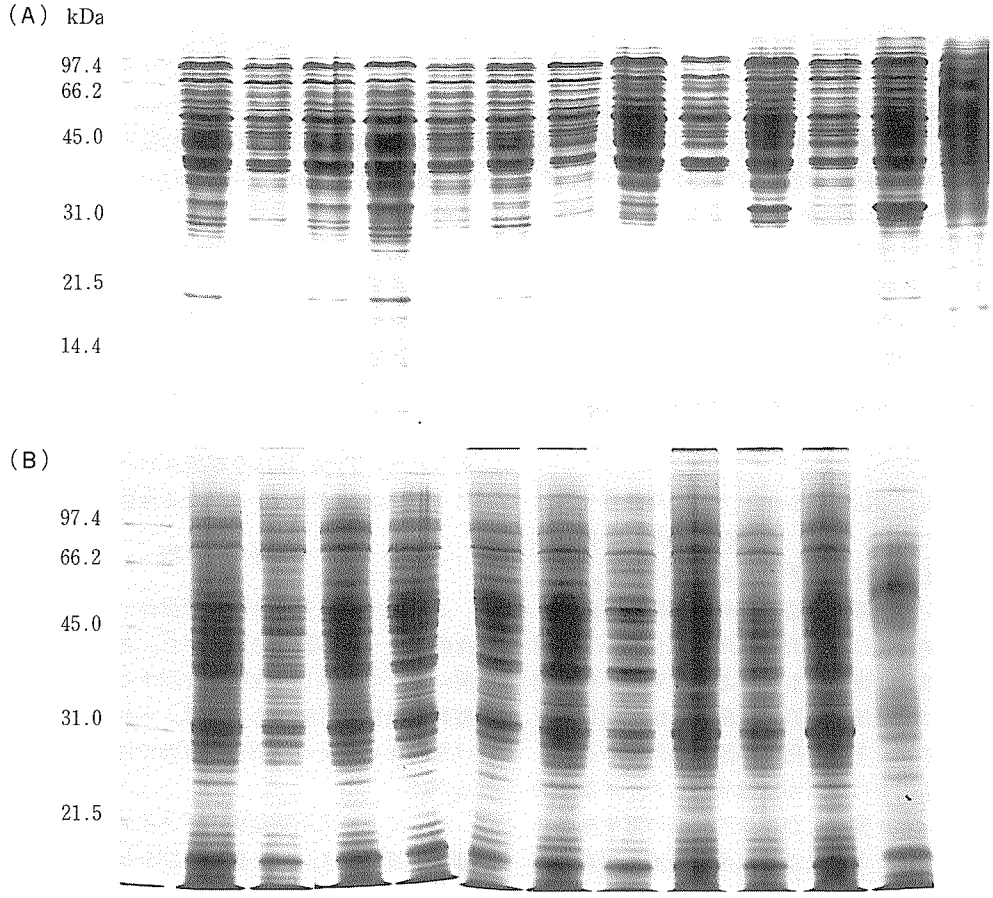


Fig. 3. Electrophoretic patterns of (A) soluble and (B) whole cell proteins of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* and avirulent strain of the former. (A) Left to right; molecular weight marker, A54-13, A54-24, A54W, A59To, A61Ta, A62B2-2, S8001, S8302, S60KS, S62Ha-3, R-3, St-4 and B57T14. (B) Left to right; molecular weight marker, A54-13, A54-24, A54W, A59To, A62B2-2, S8302, S60KS, S62Ha-3, R-3, St-4 and B57T14. The details of isolates are given in Table 1.

2. 菌体内酵素の電気泳動パターン

材料および方法

0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8) で抽出した細胞質可溶性タンパク質を電気泳動後[26]，基質溶液に浸し活性染色を行った (Table 8)。得られた電気泳動パターンを基に菌株間の相似度 (Jaccard coefficient) を算出し，その値を用いて平均距離法 (UPGMA) により系統樹 (類似度関係図) を作成した[105]。

結　　果

本実験では，菌体内酵素15種について検出を試みた。このうち11酵素 (アルコール脱水素酵素，α-グリセロリン酸脱水素酵素，ソルビトール脱水素酵素，シキミ酸脱水素酵素，リンゴ酸脱水素酵素，イソシトリ酸脱水素酵素，グルコース-6-リン酸脱水素酵素，グルタミン酸脱水素酵素，チロシナーゼ，フマラーゼ，テトラゾリウム酸化酸素) の電気泳動パターンは，供試したアズキ落葉病菌10菌株とダイズ落葉病菌10菌株の間で差がみられなかった (Fig. 4)。一方，Type B，コムギ条斑病菌はそれぞれこれと異なる泳動パターンを示した。

Table 8. Enzymes, their abbreviations, Enzyme Commission numbers and staining procedure references.

Enzyme	Abbrev.	E. C. no.	Reference
Alcohol dehydrogenase	ADH	1. 1. 1. 1	126
α-Glycerophosphate dehydrogenase	GPDH	1. 1. 1. 8	102
Sorbitol dehydrogenase	SORDH	1. 1. 1. 14	102
Shikimic acid dehydrogenase	SADH	1. 1. 1. 25	78
Lactate dehydrogenase	LDH	1. 1. 1. 27	126
Malate dehydrogenase	MDH	1. 1. 1. 37	126
Isocitrate dehydrogenase	IDH	1. 1. 1. 41	102
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PDH	1. 1. 1. 42	126
Glutamate dehydrogenase	GDH	1. 4. 1. 4	126
Tyrosinase	TYR	1. 10. 3. 1	75
Peroxidase	PER	1. 11. 1. 7	39
α-Esterase	EST	3. 3. 1. -	126
Acid phosphatase	ACP	3. 1. 3. 2	12
Fumarase	FUM	4. 2. 1. 2	126
Tetrazolium oxidase	TO		10

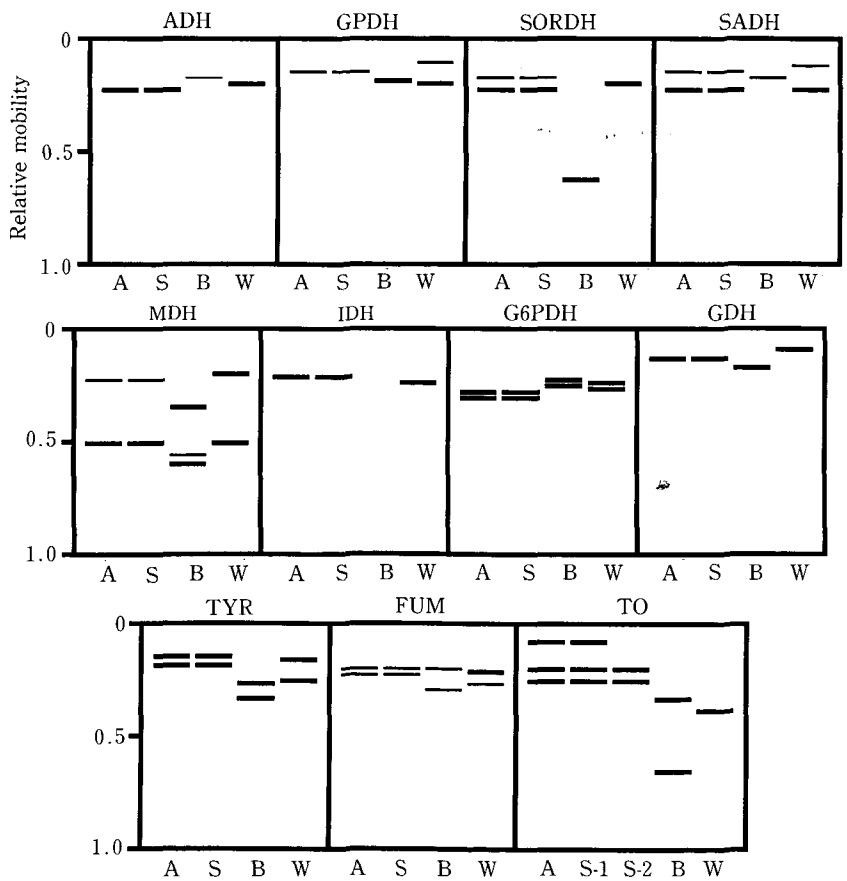


Fig. 4. Diagrammatic presentation of isozyme patterns for 11 enzymes of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata*. The key to enzyme abbreviations is shown in Table 8. Lanes A, adzuki bean isolate (A13, A54-13, A54-24, A54W, A59M, A59To, A61Ta, A62A-16, A62B2-2 and A62K68-3); S, soybean isolate (S8001, S57Ko, S57O, S8301, S8302, S60KS, S60S, S62Ha-3, R-3 and St-4); B, avirulent strain of adzuki bean isolate (B57T14); W, *Cephalosporium gramineum* (W56Kit). As regards TO, lane S-1 represents the 8 soybean isolates other than S8301 and S8302 (lane S-2).

その他の4酵素の泳動パターンはアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌で異なった（Figs. 5, 6）。また，Type B，コムギ条斑病菌もそれぞれ特異的な泳動像を示した。

乳酸脱水素酵素はアズキ落葉病菌では3本のバンドが検出されたが，ダイズ落葉病菌はこのうち相対移動度（Rm）0.38のバンドが検出されなかった。

パーオキシダーゼの移動度の遅いRm 0.18のバンドはアズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌に共通であった。一方，移動度の速いバンドは，ダイズ落葉病菌では全菌株Rm 0.62であったのに対し，アズキ落葉病菌では分離地域と関係した差異が認められた。すなわち，十勝地方で分離された3菌株（A13, A54-13, A54-24）からは検出されなかったが，上川地方で分離された2菌株（A54W, A62B2-2: Rm 0.64）および札幌で分離された5菌株（A59M, A59To, A61Ta, A62A-16, A62K68-3: Rm 0.66）はそれぞれ異なる移動度を示した。

α-エステラーゼは多くのアイソザイムが認められ，菌株レベルで泳動パターンが異なったが，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は明確に識別された。アズキ落葉病菌では14本のバンドが検出されたが，このうち全菌株に共通していたのは5本のみで，菌株間差異が顕著に認められた。これは，同一地域から分離された菌株は同一もしくは類似のパターンを示したのに対し，分離地域が異なる菌株間ではより多くの変異が認められたためであった。例えば，Rm 0.90のバンドは札幌で分離された5菌株からのみ検出され，逆にRm 0.81のそれはこれら5菌株からのみ検出されなかった。また，Rm 0.69のバンドは上川地方で分離された2菌株からのみ検出されなかった。アズキ落葉病菌に比べダイズ落葉病菌では菌株間差異がほとんど認められず，6本のバンドを有する6菌株（S57Ko, S57O, S8301, S8302, S60S, St-4）と，このうちRm 0.58のバンドを欠く4菌株（S8001, S60KS, S62Ha-3, R-3）の2グループに分かれた。

酸性ホスファターゼのRm 0.42のバンドはアズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌に共通して認められた。これに対し，移動度の小さいバンドはアズキ落

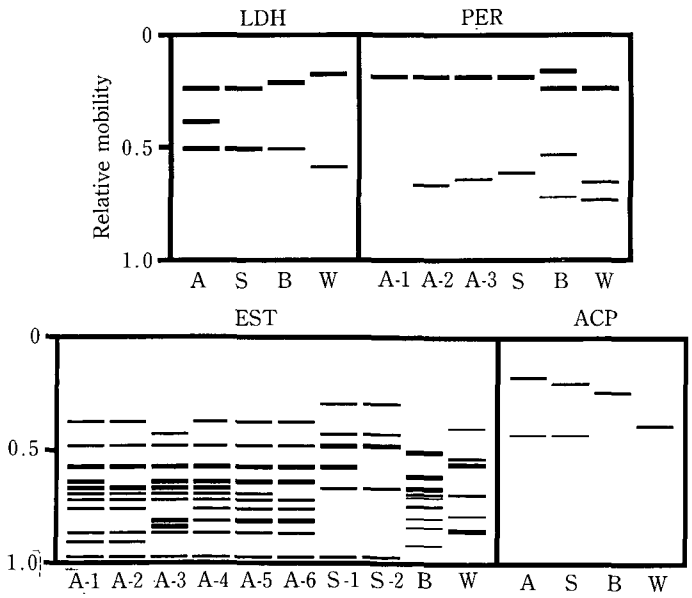


Fig. 5. Diagrammatic presentation of isozyme patterns for 4 enzymes of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata*. The key to enzyme abbreviations is shown in Table 8. Lanes A, adzuki bean isolate (A13, A54-13, A54-24, A54W, A59M, A59To, A61Ta, A62A-16, A62B2-2 and A62K68-3); S, soybean isolate (S8001, S57Ko, S57O, S8301, S8302, S60KS, S60S, S62Ha-3, R-3 and St-4); B, avirulent strain of adzuki bean isolate (B57T14); W, *Cephalosporium gramineum* (W56Kit). As regards PER, lane A-1 represents A13, A54-13 and A54-24, lane A-2 represents A59M, A59To, A61Ta, A62A-16 and A62K68-3, and lane A-3 represents A54W and A62B2-2. As regards EST, lane A-1 represents A59M, A59To, A61Ta and A62K68-3, lanes A-2 to A-5 represent A62A-16, A13, A54-13 and A54-24, respectively, lane A-6 represents A54W and A62B2-2, lane S-1 represents the 6 soybean isolates other than S8001, S60KS, S62Ha-3 and R-3 (lane S-2).

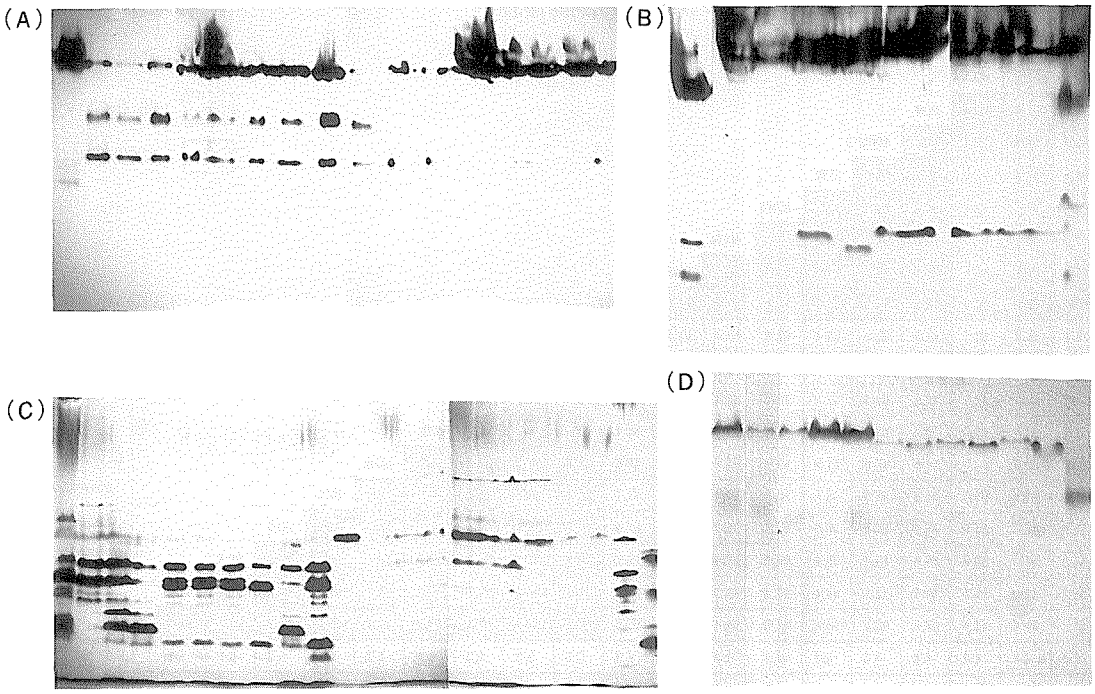


Fig. 6. Gels showing electrophoretic patterns of (A) lactate dehydrogenase, (B) peroxidase, (C) α-esterase and (D) acid phosphatase from adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata,* avirulent strain of the former and *Cephalosporium gramineum.* (A) Left to right; W56Kit, A13, A54-13, A54-24, A54W, A59M, A59To, A61Ta, A62A-16, A62B2-2, S8001, S57Ko, S57O, S8301, S8302, S60S, S62Ha-3, R-3, St-4 and B57T14. (B) Left to right; W56Kit, A13, A54-24, A62B2-2, A62K68-3, S8301, S8302, S57Ko, S60S, R-3 and B57T14. (C) Left to right; A13, A54-13, A54-24, A54W, A59M, A59To, A61Ta, A62A-16, A62B2-2, A62K68-3, S8001, S57Ko, S57O, S8301, S8302, S60KS, S60S, S62Ha-3, R-3, St-4, B57T14 and W56Kit. (D) Left to right; A54-13, A54W, A62A-16, A62B2-2, A62K68-3, S8302, S60KS, S60S, S62Ha-3, R-3, St-4 and W56Kit. The details of isolates are given in Table 1.

葉病菌ではRm 0.17であったが，ダイズ落葉病菌ではRm 0.20であった。

Fig. 7は，上述した15種類の菌体内酵素の電気泳動パターンから算出した供試菌株間の相似度をまとめて示したものである。さらに，この結果を基にUPGMAにより作出した系統樹をFig. 8に示した。アズキ落葉病菌の菌株どうしでは80.0～100%の相似度（UPGMAによる連結係数は0.84，以下同じ）であった。また，ダイズ落葉病菌の菌株どうしではこれよりも高く，93.5～100%(0.97)であった。一方，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の間では62.5～71.8%（0.63）であった。これに対し，アズキ落葉病菌とType B，コムギ条斑病菌の間では相似度は著しく低く，それぞれ3.1～4.7%，4.7～4.8%であった。ダイズ落葉病菌とType B，コムギ条斑病菌でもそれぞれ5.1～5.2%，5.2～5.3%であった。また，Type Bとコムギ条斑病菌の間の相似度も著しく低く3.4%であった。UPGMAで作成した系統樹で，*P. gregata*とコムギ条斑病菌が連結係数0.050で結合し，これにType Bが連結係数0.046で結び付いた。

さらに，アズキ落葉病菌10菌株は大きく4個のクラスターに分かれ，分離地域との間に関係が認められた(後述)。また，ダイズ落葉病菌は菌株間の相似度がかなり高かったが，その中にも3つのグループが認められた。しかし，これらと分離地域あるいは分離品種の間に関係は見られなかった。

考　察

タンパク質を電気泳動により解析する場合，全タンパク質を染色する方法とある酵素を特異的に発色させる方法に大別される。前者はタンパク質の全体

Adzuki bean isolate

: ≧80.0

: 60.0≦, <80.0

: <60.0

	A13	A54-13	A54-24	A54W	A62B2-2	A59M	A59To	A61Ta	A62K68-3	A62A-16	S8001	S60KS	S62Ha-3	R-3	S57Ko	S57O	S60S	St-4	S8301	S8302	W56Kit	B57T14
A13	83.5																					
A54-13	83.8	97.2																				
A54-24	82.1	91.9	94.4																			
A54W	82.1	91.9	94.4	100																		
A62B2-2	82.5	92.1	89.5	84.6	84.6																	
A59M	82.5	92.1	89.5	84.6	84.6	100																
A59To	82.5	92.1	89.5	84.6	84.6	100	100															
A61Ta	82.5	92.1	89.5	84.6	84.6	100	100	100														
A62K68-3	80.0	89.5	86.8	82.1	82.1	97.3	97.3	97.3	97.3													
A62A-16	69.2	65.0	62.5	62.5	62.5	63.4	63.4	63.4	63.4	65.0												
S8001	69.2	65.0	62.5	62.5	62.5	63.4	63.4	63.4	63.4	65.0	100											
S60KS	69.2	65.0	62.5	62.5	62.5	63.4	63.4	63.4	63.4	65.0	100	100										
S62Ha-3	69.2	65.0	62.5	62.5	62.5	63.4	63.4	63.4	63.4	65.0	100	100	100									
R-3	71.8	67.5	65.0	65.0	65.0	65.9	65.9	65.9	65.9	67.5	96.8	96.8	96.8	96.8								
S57Ko	71.8	67.5	65.0	65.0	65.0	65.9	65.9	65.9	65.9	67.5	96.8	96.8	96.8	96.8	100							
S57O	71.8	67.5	65.0	65.0	65.0	65.9	65.9	65.9	65.9	67.5	96.8	96.8	96.8	96.8	100	100						
S60S	71.8	67.5	65.0	65.0	65.0	65.9	65.9	65.9	65.9	67.5	96.8	96.8	96.8	96.8	100	100	100					
St-4	69.2	65.0	62.5	62.5	62.5	63.4	63.4	63.4	63.4	65.0	93.5	93.5	93.5	93.5	96.8	96.8	96.8	96.8				
S8301	69.2	65.0	62.5	62.5	62.5	63.4	63.4	63.4	63.4	65.0	93.5	93.5	93.5	93.5	96.8	96.8	96.8	96.8	100			
S8302	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.7	4.7	4.7	4.7	4.8	5.3	5.3	5.3	5.3	5.2	5.2	5.2	5.2	5.3	5.3		
W56Kit	4.7	4.7	3.1	3.1	3.1	4.6	4.6	4.6	4.6	4.7	5.2	5.2	5.2	5.2	5.1	5.1	5.1	5.1	5.2	5.2	3.4	

Soybean isolate

C. gramineum

Type B

Fig. 7. Similarity matrix based on isozyme patterns for 15 enzymes of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata,* avirulent strain of the former (Type B) and *Cephalosporium gramineum.*

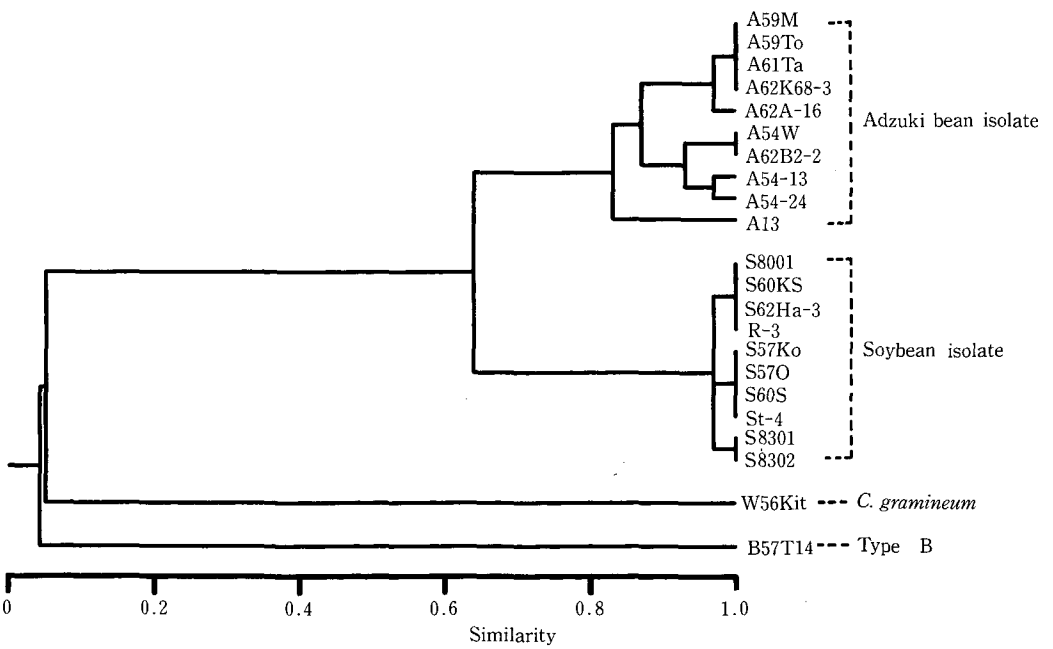


Fig. 8. Dendrogram constructed by unweighted pair group method using arithmetic averages based on similarities among adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata,* avirulent strain of the former (Type B) and *Cephalosporium gramineum.*

像を一度に見られるが微細な差異は検出しにくい。逆に，後者は微細な差異を検出しやすいが多くの酵素を調べないと全体としての類似性は推し量れない。しかし，Enzyme Commission に登録されている酵素の数は約 2100 であるのに対して，アイソザイム分析で活性染色法が報告されている酵素は数十種程度であり，一般には多くとも十数個の酵素が用いられているに過ぎない。すなわち，アイソザイム分析は遺伝情報のごく一部しか見ることができない。

種の分類に酵素の電気泳動パターンを利用する研究は多くの糸状菌で行われている。一般に同一種内の菌株は類似する泳動パターンを示すことが知られており，電気泳動による異種間の識別は十分可能であるとされているが，分化型・レース・生理品種などの種内群の類別は可能である場合とそうでない場合が報告されている[18]。

本実験では 15 種の菌体内酵素の電気泳動パターンを調べた。その結果，11 酵素が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。これはアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の遺伝的に共通な部分の反映であると考えられ，形態観察に基づき両菌を同一種であるとする考え[58,90]を支持するものである。その他の 4 酵素（乳酸脱水素酵素，パーオキシダーゼ，α-エステラーゼ，酸性ホスファターゼ）は両菌間で異なるパターンを示したが，これは遺伝的分化が進んでいることの現れである。このうち特に，α-エステラーゼや乳酸脱水素酵素の泳動パターンによって容易に両菌の識別・同定ができることが明らかとなった。

また，「エネルギー代謝に関係する解糖系の酵素（第 I 群）に比べそれ以外の酵素（第 II 群）の方が明らかに多型の程度が高い」[97]とされており，本実験でも同様な結果であったと考えられる。

菌体内酵素の電気泳動パターンを基に相似度を計算したとろ，アズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌の相似度はそれぞれ 80，94%以上であったが，両菌間では 63～72%で明らかに低い値となった。本実験で用いた Jaccard coefficient により電気泳動パターンを数理解析した菌類での例をみると[9,50,94,108,127]，一般には相似度 50～70%程度が種を分かつ境界ではないかと考えられる。

本実験結果とこれまでに報告されている植物病原糸状菌での報告を比べると，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は *Puccinia* 属菌[17,94]あるいは *F. oxysporum*[13]や *Phytophthora megasperma* の分化型[96]と同じ程度分化した種内群であることが推測された。

アズキ落葉病菌はダイズ落葉病菌に比べ菌株間のアイソザイムパターンの変異が大きく，相似度が低かったが，これは両病害の発生歴と発病の激しさに起因するものと考えられる。アズキ落葉病は少なくとも 1932 年に発生して以来[111]，現在までアズキ栽培地域に蔓延・激発している病害である。これに対しダイズ落葉病は 1980 年に十勝地方で発見された後[7]，札幌[92]，長沼（近藤，私信），秋田県[88]でも発生が確認されているが，今のところ発生地域は限られており被害も少ない。すなわち，アズキ落葉病菌はダイズ落葉病菌に比べ初発生からの経過時間が長く，また菌量も多く広い環境に適応していることを意味し，より多くの変異が蓄積されてきたためであると考えられる。

アズキ落葉病菌の変異はパーオキシダーゼおよびα-エステラーゼの泳動パターンの多様性によるものであり，菌株間の相似度と分離地域との間に関係が認められた。すなわち，アズキ落葉病菌は 4 つのグループに分かれることが示されたが，それらの相

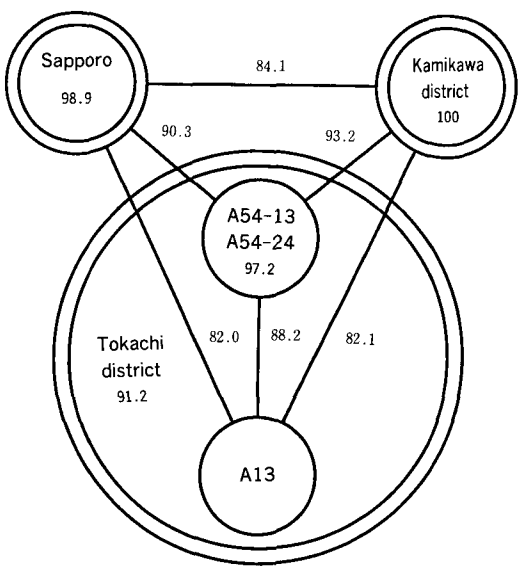


Fig. 9. Relationship of similarity based on isozyme patterns and geographical origin in adzuki bean isolate of *Phialophora gregata*. Similarities of intra- (in bold) and inter-populations are shown as the average of those between isolates.

互関係を示したのがFig. 9である。1970年に十勝地方で分離された菌株A13は他の3グループとの相似度が低いが(82～88%)，その中でも十勝地方で分離されたA54-13，A54-24の2菌株のグループとの相似度が比較的高い(88%)。このグループは札幌・上川地方のグループと相似度が高いが(90～93%)，やや後者との間の方が高い。これに比べ札幌と上川地方の間ではやや低い(84%)。また，菌株の分離された地点間の距離と相似度の間に負の相関が認められたが(Fig. 10)，相関係数(r＝－0.66)は低かった。

高等植物においては「集団の遺伝的変異性は，その種が発祥し，他の地域への分布の中心となった地域にもっとも高い」という一般論(遺伝子中心説)が提唱されている[112]。この説をアズキ落葉病菌にあてはめてみると，アイソザイムパターンの多様性が一番高い十勝地方が起源であることが推測される。

以上のことから，まず十勝地方で発生したアズキ落葉病菌は菌密度(菌量)を高めると共に変異を蓄積していき，その一部が何らかの理由で札幌に伝播して適応していき，次いで十勝地方の菌株の一部が上川地方へ伝播して適応したものが残ったと推察される。このことはアズキ落葉病の発生歴[89]ともほぼ一致する。しかし，それぞれの地域でアズキ落葉病が独立に発生，すなわち各地域の菌株の起源が異なる可能性も考えられる。

このような分離地域とアイソザイムパターンに関係が認められる例としては，韓国における*Alternaria mali*のエステラーゼパターンの変異があげられる[44]。この場合，異なる平野で分離された菌株はそれぞれ特異的なパターンを示し，この理由として高い山脈によって胞子の飛散が妨げられていること，すなわち，遺伝子構成が地理的隔離によって影響を受けているためであると考えられている。アズキ落葉病菌の場合も，それぞれの地域は別々の平野あるいは盆地にあり，土壌伝染性病害であることや種子伝染の可能性が低い[89]ことから考え，地理的隔離によりそれぞれの地域の菌株が交流することはほとんど無かったものと考えられる。そのほか，*Pyricularia oryzae*では菌体外エステラーゼの泳動パターンと地理的分布がかなりよく一致しており，I型(日本，韓国，台湾)，II型(インド，東南アジアの一部)，III型(東南アジア，中南米)の3つに大別されることが報告されている[80]。

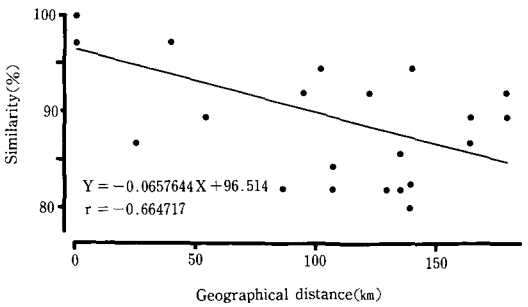


Fig. 10. Correlation of similarity based on isozyme patterns and geographical distance between locations in adzuki bean isolate of *Phialophora gregata*.

アズキ落葉病菌の弱病原性系統として報告されたType B，ならびに生産する毒素の構造が極めて類似することから*P. gregata*との類縁性が考えられてきたコムギ条斑病菌も供試し，アイソザイムパターンを比較した。しかし，何れの酵素においてもそれぞれ特異的な泳動パターンを示し，明らかに別種であると考えられた。

B. DNAの塩基組成および塩基配列の相同性

生物の類縁性を知るには遺伝情報の担い手であるDNAの構造を比較することが最も信頼性のある方法である。近年の分子生物学の発達に伴い，特に形態的特徴が単純な微生物においては核酸レベルで類縁性を論じることが分類学の主流となりつつある。

核酸レベルの実験手法のうちでこれまで広く用いられてきたのはDNAの塩基組成と塩基配列の相同性の解析である。この研究によって得られた結果は，多くの場合，それまでの分類学的知見あるいは細胞構成成分や二次代謝産物を対象とする(狭義の)化学分類学的研究の成果とよく一致し，矛盾しないことが示されている。また，DNAの塩基組成や塩基配列の相同性の値と分類群との間に対応関係があることが示唆されている。さらに，従来不明であった微生物間の遺伝的類縁性や有性世代と無性世代の異同が明らかにされ，本法の有用性が示されている。

本節では，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌，およびアズキ落葉病菌の弱病原性系統として報告されたType Bの遺伝的類縁性についてDNAレベルで解明するため，DNAの塩基組成・塩基配列の相

同性について測定した。

1. DNA の塩基組成

材料および方法

CTAB 法[87] により全細胞核酸を抽出後，CsCl-bisbenzimide 密度勾配超遠心法[35] で核 DNA を分画した。DNA の塩基組成は融解温度法により測定した[61]。

結　　果

Escherichia coil DNA の吸光度上昇は1段階増加で，融解温度（Tm）は85.9℃であった。一方，アズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌と Type B の DNA は75～83℃にかけての1段階めの小さな吸光度の上昇に続き，83～95℃にかけて2段階めの大きな上昇を示した（Fig. 11 に DNA の融解曲線の例を示した）。1段階めの吸光度の上昇（Table 9 に最終的な吸光度の上昇値に対する80℃における吸光度の上昇値の割合として示した）はダイズ落葉病菌（22～25%）に比べ，アズキ落葉病菌（30～37%）の方が顕著であった。

供試した *P. gregata* 12菌株の DNA の Tm は83.6～84.8℃で，これより計算された GC 含量は44.5～47.3 mole%で（Table 10），平均45.9 mole%であった。このうち，アズキ落葉病菌6菌株の Tm は83.6～84.2℃であり，GC 含量は44.5～46.0 mole%（平均45.2 mole%）であった。また，ダイズ落葉病菌6菌株の Tm は

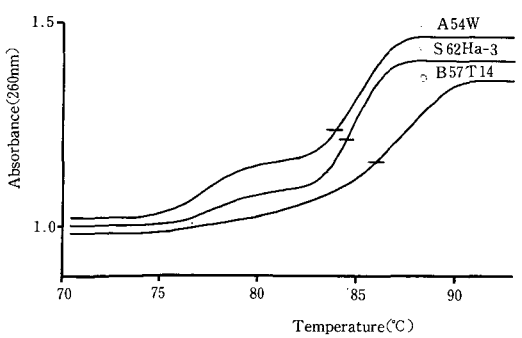


Fig. 11. DNA melting curves of adzuki bean (A59W) and soybean (S62Ha-3) isolates of *Phialophora gregata* and avirulent strain of the former (B57T14). Bar designates thermal melting point.

Table 9. Amounts of AT-rich fraction in nuclear DNAs from adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* and avirulent strain of the former (Type B).

Isolate	Amount of AT-rich fraction (%)[a]
Adzuki bean isolate	
A54-13	32.5
A54-24	30.3
A54W	32.5
A59To	36.5
A61Ta	35.5
A62B2-2	36.7
Soybean isolate	
S8001	21.8
S8302	22.5
S60KS	21.5
S62Ha-3	22.2
R-3	23.7
St-4	25.4
Type B	
B57T14	20.9

[a] The rate of an increase at 80℃ to the final increase in thermal melting point determination.

Table 10. Melting temperatures and base compositions of nuclear DNAs from adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* and avirulent strain of the former (Type B).

Isolate	Melting temperature (℃)	Base composition (GC mole%)
Adzuki bean isolate		
A54-13	84.2	46.0
A54-24	84.1	45.7
A54W	84.1	45.5
A59To	83.6	44.5
A61Ta	83.7	44.7
A62B2-2	83.7	44.7
Soybean isolate		
S8001	84.5	46.6
S8302	84.5	46.7
S60KS	84.8	47.3
S62Ha-3	84.5	46.6
R-3	84.3	46.2
St-4	84.5	46.6
Type B		
B57T14	86.3	50.9
Escherichia coli	85.9	50.0

84.3～84.8℃で，GC含量は46.2～47.3 mole%（平均46.7 mole%）であった。一方，Type B B57T14株のTmは86.3℃であり，GC含量は50.9 mole%であった。

考　　察

熱融解曲線の1段階めに上昇した分画のGC含量はおよそ30 mole%であった。糸状菌ではrDNAのGC含量が低いことが報告されており[35]，このAT-richな分画にrDNAが含まれていると考えられる。また，この1段階めの上昇はダイズ落葉病菌よりアズキ落葉病菌で顕著であったことから，両菌の核ゲノムの構造が大きく異なることが推測される。

GC含量はDNAの特性値のうち最も簡単なものであり，その相違だけでDNAの相違を立証できる。また，測定が容易でどのような生物種にも同じ手法が使えること，表現形質に比べ再現性が高いことなどの特質を持つため，今日では細菌や酵母の分類学上の記載には不可欠になっている。そして，分類学的に近縁であると考えられるもののGC含量は近似しているが，GC含量が大幅に異なっている生物間の類縁性は低いこと[76]，また，分類群階級が下がるにつれてGC含量の変動幅が小さくなることが知られている[106]。

STORCK and ALEXOPOULOS[107]は糸状菌322種のGC含量を測定し，菌類で同一種に属するもののGC含量の変動幅は10 mole%以内であり，多くの種では5 mole%以内であることを明らかにした。このことは*Fusarium*属菌などのように同一種内に種々の系統を含む場合にもあてはまるとしている。また，*Phialophora*属菌については，*P. lagerbergii, P. fastigiata, P. verrucosa, P. americana*のGC含量はそれぞれ40.5，49.5，51.0，51.0 mole%であることを報告している。

本実験において，*P. gregata*種全体としてのGC含量は44.5～47.3 mole%の範囲にあることが示され，その変動幅は2.8 mole%であり，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌が同一種であることを支持するものと考えられた。また，アズキ落葉病菌はダイズ落葉病菌に比べGC含量が低く，46.1 mole%を境界とすることにより両菌の識別が可能であると考えられた。同時に，このことは両菌が遺伝的に分化していることを示唆するものであった。

糸状菌においては，進化とDNAの塩基組成について，より進化した位置にあるものほどGC含量が高いとされており[107]，このような関係は酵母や放線菌でも報告されている。この考えによれば，アズキ落葉病菌よりもダイズ落葉病菌の方がより進化した位置にあると考えられる。

一方，Type BのGC含量は50.9 mole%で，*P. gregata*との差は4～6 mole%であり，*P. gregata*の変動幅が小さいことから，別種であるものと推察された。

2. DNA塩基配列の相同性

材料および方法

DNA塩基配列の相同性は再会合反応速度論に基づき測定した[61]。また，得られた結果を基に，BRITTEN and KOHNE[15]とWETMUR and DAVIDSON[121]の記載に従ってゲノムサイズと反復配列の量を算出した。

結　　果

DNAの再会合反応の様子をFig. 12に示した。*E. coli* DNAの再会合反応は一直線上にプロットされるのに対し，アズキ落葉病菌A59To株のそれは大きく折れ曲がり，$Cot_{1/2}$値は*E. coli*の10倍以上であることがわかる。この結果を基に計算した供試菌株のゲノムサイズおよび反復配列の割合はTable 11に示したとおりである。アズキ落葉病菌のゲノムサイズは$2.32\sim3.36\times10^{10}$ Daであり，13.1～16.3%の反復配列が認められた。また，ダイズ落葉病菌は9.9～12.9%の反復配列を有す$1.85\sim2.31\times10^{10}$ Daのゲノムを持ち，Type Bのゲノムサイズは2.69×10^{10} Daで12.8%の反復配列を含んでいた。

DNAの再会合反応速度から菌株間の塩基配列の相同性を計算したところ，アズキ落葉病菌は88.5%以上の相同性を示す集団であることが明らかとなった（Table 12）。札幌，上川地方で分離された4菌株（A54W，A59To，A61Ta，A62B2-2）は相互にほぼ100%の相同性であったが，十勝地方で分離された菌株（A54-13，A54-24）間の相同性は93%であり，前，後者の組合せでは89～95%であった。ダイズ落葉病菌は，S60KS株が他の5菌株とやや低い値（94～95%）を示したが，その他の

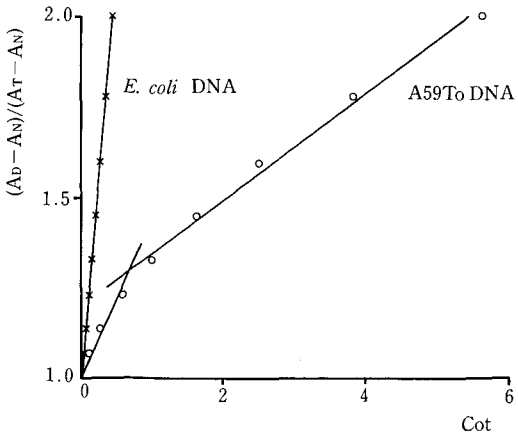


Fig. 12. Second-order rate plots of reassociation of DNAs from adzuki bean isolate of *Phialophora gregata* (A59To) and *Escherichia coli*. A_D, A_N and A_T are absorbance of denatured, native DNA and renatured DNA at any time T, respectively.

Table 11. Genome sizes and amounts of repeated sequence of nuclear DNAs from adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* and avirulent strain of the former (Type B).

Isolate	$Cot_{1/2}$ value	Genome size(Da)	Repeated sequence(%)
Adzuki bean isolate			
A54-13	4.46	2.71×10^{10}	14.0
A54-24	4.66	2.84×10^{10}	13.1
A54W	5.23	3.18×10^{10}	16.3
A59To	5.52	3.36×10^{10}	13.9
A61Ta	4.67	2.84×10^{10}	14.1
A62B2-2	3.81	2.32×10^{10}	13.9
Soybean isolate			
S8001	3.57	2.18×10^{10}	9.9
S8302	3.04	1.85×10^{10}	12.6
S60KS	3.45	2.10×10^{10}	10.9
S62Ha-3	3.27	2.00×10^{10}	11.9
St-4	3.78	2.31×10^{10}	12.9
R-3	3.71	2.26×10^{10}	11.5
Type B			
B57T14	4.41	2.69×10^{10}	12.8
Escherichia coli	0.46	2.8×10^{9}	

5菌株どうしは約100%の相同性であった。

一方，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌間では65.4～72.2%のDNA相同性を示した。アズキ落葉病菌とType B間のDNAの相同性は10～13%であり，著しく低い値であった。また，ダイズ落葉病菌とType B間では相同性は認められなかった。

Table 12. DNA base sequence homologies among isolates of adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* and avirulent strain of the former (Type B).

Pairing of isolates	DNA homology (%)
Adzuki bean isolates	
A54-13 + A54-24	92.9
A54-13 + A61Ta	90.7
A54-13 + A62B2-2	88.5
A54-24 + A59To	93.8
A54-24 + A62B2-2	95.3
A54W + A59To	100
A54W + A62B2-2	99.2
A59To + A61Ta	100
A61Ta + A62B2-2	98.6
Soybean isolates	
S8001 + S8302	98.8
S8001 + St-4	100
S8302 + S60KS	93.8
S60KS + S62Ha-3	95.4
S60KS + R-3	94.7
S62Ha-3 + St-4	100
R-3 + St-4	100
Adzuki bean and soybean isolates	
A54-13 + R-3	71.3
A54-24 + S60KS	65.4
A54W + S8001	71.3
A54W + St-4	66.7
A59To + S8302	69.8
A59To + R-3	69.9
A61Ta + S62Ha-3	72.2
A62B2-2 + S8001	70.4
A62B2-2 + St-4	68.9
Adzuki bean isolates and an Type B isolate	
A54W + B57T14	10.1
A59To + B57T14	12.9
Soybean isolates and an Type B isolate	
S8302 + B57T14	0
S60KS + B57T14	0

考　察

これまでの報告[23,30,109]をまとめると，菌類の核ゲノムは$0.6\sim3.0\times10^{10}$ Daにわたり，数～20%の反復配列を有しているようである。

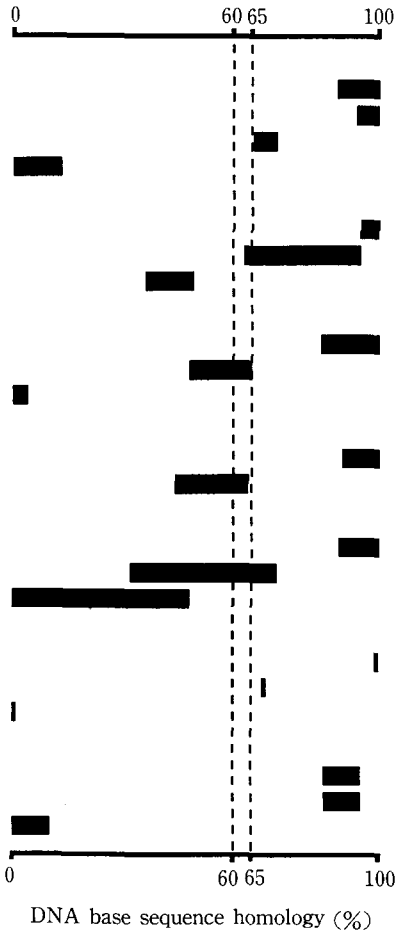
本実験の結果，*P. gregata*, Type Bのゲノムサ

イズおよび反復配列の割合は菌類一般が示す値の範囲内にあることが明らかとなったが，アズキ落葉病菌はダイズ落葉病菌よりもゲノムサイズが大きいことが示された。前節のアイソザイム分析において，α-エステラーゼ，乳酸脱水素酵素のアイソザイムの数はアズキ落葉病菌の方がダイズ落葉病菌よりも多いことが示されたが，これはゲノムサイズの差の現れであるかもしれない。このことについては，顕微分光法により核DNAを定量するなど，さらに検討していく必要がある。また，反復配列の割合もアズキ落葉病菌の方がダイズ落葉病菌よりも高く，核ゲノムの構造が大きく異なることが推測される。

GC含量は遺伝子の成分分析であり，類縁関係の無い生物が同一のGC含量を示すことが起こり得る。生物を決定しているのは遺伝情報，すなわち塩基配列であり，その相同性はDNAの再会合反応速度から知ることができる。特に，細菌や菌類はゲノムサイズがそれほど大きくないので比較的容易にこの方法を適用できる。Bergey's Manual of Systematic Bacteriologyでは，70%以上の相同性を示すものは同一種の同一種内群に属し，60～70%のものは同一種ではあるが異なる種内群であり，20～60%のものは別種であるが近縁な関係にあるとされている[49]。また，酵母においては70～100%のDNA相同性を示すものは同一種であり，30%以下のものは別種であると考えられている[77]。

近年，糸状菌でも塩基配列の相同性に関する報告が見られるようになってきたが，これらのうちいくつかをまとめてFig. 13に示した。

F. oxysporum で多くの分化型について相同性が調べられた結果，同一分化型では95%以上の相同性を示し，異なる分化型ではあるが近縁であると考



Phialophora gregata, Type B
- Adzuki bean isolate
- Soybean isolate
- Adzuki bean + Soybean isolates
- *P. gregata* + Type B

Genus *Fusarium*[70]
- The same forma specialis of *F. oxysporum*
- Different formae speciales of *F. oxysporum*
- *F. oxysporum* + *F. solani*

Genus *Verticillium*[69]
- *V. dahliae*
- *V. dahliae* + *V. albo-atrum*
- *V. dahliae* + *V. nigrescens*

Genus *Armirallia*[47]
- The same species of *Armirallia*
- *A. mellea* + *A. bulbosa*

Rhizoctonia solani[61-67]
- The same group in an anastomosis group
- Different groups in an anastomosis group
- Different anastomosis groups

Genus *Aspergillus*[72]
- *A. flavus* + *A. oryzae*
- *A. flavus* + *A. parasiticus*
- *A. flavus* + *A. leporis*

Genus *Alternaria*[68]
- The same species of *Alternaria*
- *A. alternata* + *A. mali*
- *A. alternata* + *A. solani*

Fig. 13. Examples of DNA base sequence homologies of some fungi.

えられるものでは85～94%，近縁関係にない分化型間では63～84%の相同性を示すことが明らかにされた[70]。一方，*Verticillium dahliae* と *V. albo-atrum* は形態が酷似しているため，同種とするか別種とするか長い間論争の対象となってきた。しかし，両菌は生態的・遺伝的に大きく異なるほか，*V. dahliae* が微小菌核を形成するという形態的な差も認められるため現在は別種とされている。両菌は48.0～65.2%の相同性を示すとされ，系統発生的に近い関係にあると考えられている[69]。このように，糸状菌においては分類学的に同一種とされているものは一般に60～65%以上の相同性を示すことから，DNA レベルでは相同性60～65%が種を分かつ境界線であると考えることができる。

相同性60～65%を種の境界線とするといくつかの例外がでてくる。*Alternaria alternata, A. kikuchiana, A. longipes* と *A. mali* は形態的にまったく区別できないが，宿主特異性（本菌の場合は生産する毒素の種類がこれを決めている）が異なることから別種とされてきた。NISHIMURA[95] は，これらの病原菌が本来腐生性であった *A. alternata* が変異により毒素生産能を獲得したことによって生じたもので，*A. alternata* の pathotype とすることを提案している。また，*Aspergillus flavus, A. oryzae, A. parasiticus, A. sojae* は種間の違いはわずかで中間型も多数存在するにもかかわらず，発酵・醸造での利用面から異なる種名がついている例である。KURTZMAN ら[72] は，これら4種は本来同一種であったものが異なる環境に適応していく過程で変異を蓄積していったものと推測し，*A. flavus* の subspecies, variety とすることを提案している。

一方，*R. solani* には病原性，培養性質，生態的性質が異なるいくつかの系統が存在し，菌糸融合群とほぼ一致している。この菌糸融合群間の DNA 相同性は著しく低く[66,67,120]，本菌の場合，各融合群（あるいはその中の系統）は DNA レベルではそれぞれ独立した種とみなされるものである。

本実験の結果，アズキ落葉病菌は89%以上の相同性を示す集団で，札幌，上川地方の相互に遺伝的に均質な集団と十勝地方の遺伝的変異の比較的大きな集団からなることが示唆された（Fig. 14）。また，ダイズ落葉病菌は相互に94%以上の相同性であった。これらは，*F. oxysporum* の同一分化型が示す値（95%以上）よりは低いものであったが，両菌がそれぞれ遺伝的にほぼ均質な集団であることを示していると考えられた。

一方，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌間の相同性は65～72%で，アズキ落葉病菌の遺伝的変異がやや大きかったが，それよりも明らかに低い値を示した。この値は，*F. oxysporum* では異なる科の植物を宿主とするような遺伝的に大きく異なる分化型間で認められる値である。また，形態的差異に基づき別種とされている *V. albo-atrum* と *V. dahliae* が示す相同性に近接するなど，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は同一種としての範疇にありながらも遺伝的にかなり分化した種内群であると考えられる。

また，*P. gregata* と Type B の間では13%以下の相同性が認められたに過ぎず，明らかに別種であり，系統発生的にも近縁関係にないと考えられた。

一般に，表現形質から算出した相似度と DNA 塩基配列の相同性には相関関係が認められるとされている。表現形質が高い相似度を示す場合には DNA

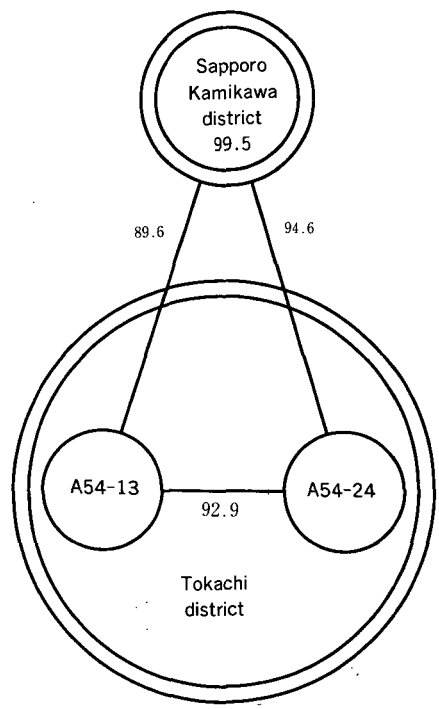


Fig. 14. Relationship of DNA base sequence homology and geographical origin in adzuki bean isolate of *Phialophora gregata*. Homologies of intra-(in bold) and inter-populations are shown as the average of those between isolates.

も高い相同性を示すが，表現形質の相似度が50%程度になると塩基配列の相同性はほとんど見られなくなることが報告されており[27]，このことは表現形質の相似度は必ずしも遺伝情報の相似度を反映していないことを意味していると考えられている[128]。アズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌とType Bでのアイソザイム分析に基づく相似度とDNA塩基配列の相同性の間にも高い相関関係（r=0.984）が認められた（Fig. 15）。

また，本研究の結果から塩基配列の相同性65%程度では細胞タンパク質の泳動パターンに差異が現れてこないことが推察された。他の糸状菌での例を見てみると，*F. oxysporum* の異なる分化型間では63～94%の相同性が認められ[70]，タンパク質パターンでは区別できないとされている[24,38,83]。タンパク質の泳動像から識別できるとする報告[42,84,122]が多い *V. albo-atrum* と *V. dahliae* 間の相同性は48～65%であるとされている[69]。*R. solani* の各菌糸融合群は明らかに異なるタンパク質パターンを示し[100]，融合群間の相同性は48%以下であることが報告されている[66,67]。このように，糸状菌では一般にDNA塩基配列の相同性が60%程度以下になるとタンパク質の電気泳動パターンに差異が認められるようになるものと考えられる。

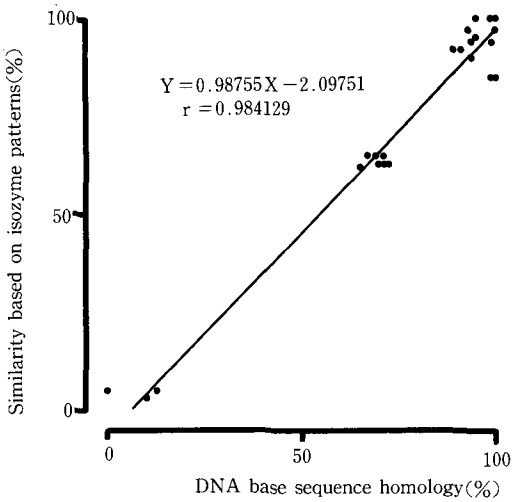


Fig. 15. Correlation of similarity based on isozyme patterns and DNA sequence homology in adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* and avirulent strain of the former.

C. ミトコンドリアDNAの制限酵素断片長多型

DNA塩基配列の相同性は同一種性や種内群の遺伝的類縁性を調べるのに適した方法であるが，菌株レベルの変異には対応できない。こうした場合には，塩基置換や欠失，挿入など塩基レベルの変異を比較的容易に検出できるRFLP分析が行われる。mtDNAはサイズが小さいためRFLP分析の適当な材料となる。また，mtDNAは核DNAの10倍の速さで進化していると考えられており[16]，集団や個体の変異は核DNAよりmtDNAを調べる方が明らかになることが推測される。

本節では，日本のアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌のmtDNAのRFLPを調べ，両菌の遺伝的類縁

Table 13. Restriction pattern types of mitochondrial (mt) DNAs from adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata*.

Isolate	Restriction endonuclease																	
	Bam HI	*Bgl* I	*Bgl* II	*Eco* RI	*Eco* RV	*Hae* III	*Hin* cII	*Hin* dIII	*Hin* fI	*Hpa* I	*Kpn* I	*Pst* I	*Pvu* II	*Sac* I	*Sal* I	*Sau* 3AI	*Sty* I	*Xba* I	*Xho* I
Adzuki bean isolate																			
A54-13	B1[a]	BI1	BII1	E1	EV1	H1	Hc1	Hd1	Hf1	Hp1	K1	P1	Pv1	S1	SI1	Su1	St1	X1	Xh1
A54-24	B1	BI1	BII1	E1	EV2	H1	Hc1	Hd1	Hf1	Hp1	K1	P1	Pv1	S1	SI1	Su1	St1	X1	Xh1
A54W	B1	BI1	BII1	E1	EV1	H1	Hc1	Hd1	Hf1	Hp1	K1	P1	Pv1	S1	SI1	Su1	St1	X1	Xh1
A59To	B1	BI1	BII1	E1	EV1	H1	Hc1	Hd1	Hf1	Hp1	K1	P1	Pv1	S1	SI1	Su1	St1	X1	Xh1
A61Ta	B1	BI1	BII1	E1	EV1	H1	Hc1	Hd1	Hf1	Hp1	K1	P1	Pv1	S1	SI1	Su1	St1	X1	Xh1
A62B2-2	B1	BI1	BII1	E1	EV1	H1	Hc1	Hd1	Hf1	Hp1	K1	P1	Pv1	S1	SI1	Su1	St1	X1	Xh1
Soybean isolate																			
S8001	B2	BI1	BII2	E2	EV3	H2	Hc2	Hd2	Hf2	Hp2	K2	P2	Pv2	S2	SI1	Su2	St2	X2	Xh2
S8302	B2	BI1	BII2	E2	EV3	H2	Hc2	Hd2	Hf2	Hp2	K2	P2	Pv2	S2	SI1	Su2	St2	X2	Xh2
S60KS	B2	BI1	BII2	E2	EV3	H2	Hc2	Hd2	Hf2	Hp2	K2	P2	Pv2	S2	SI1	Su2	St2	X2	Xh2
S62Ha-3	B2	BI1	BII2	E2	EV3	H2	Hc2	Hd2	Hf2	Hp2	K2	P2	Pv2	S2	SI1	Su2	St2	X2	Xh2
R-3	B2	BI1	BII3	E3	EV4	H3	Hc3	Hd3	Hf3	Hp3	K2	P2	Pv2	S2	SI1	Su3	St3	X2	Xh3
St-4	B2	BI1	BII3	E3	EV4	H3	Hc3	Hd3	Hf3	Hp3	K2	P2	Pv2	S2	SI1	Su3	St3	X2	Xh3

[a] Pattern type assigned by visual comparisons of mtDNA using each restriction endonuclesase. The pattern types with representative endonucleases are shown in Fig. 16.

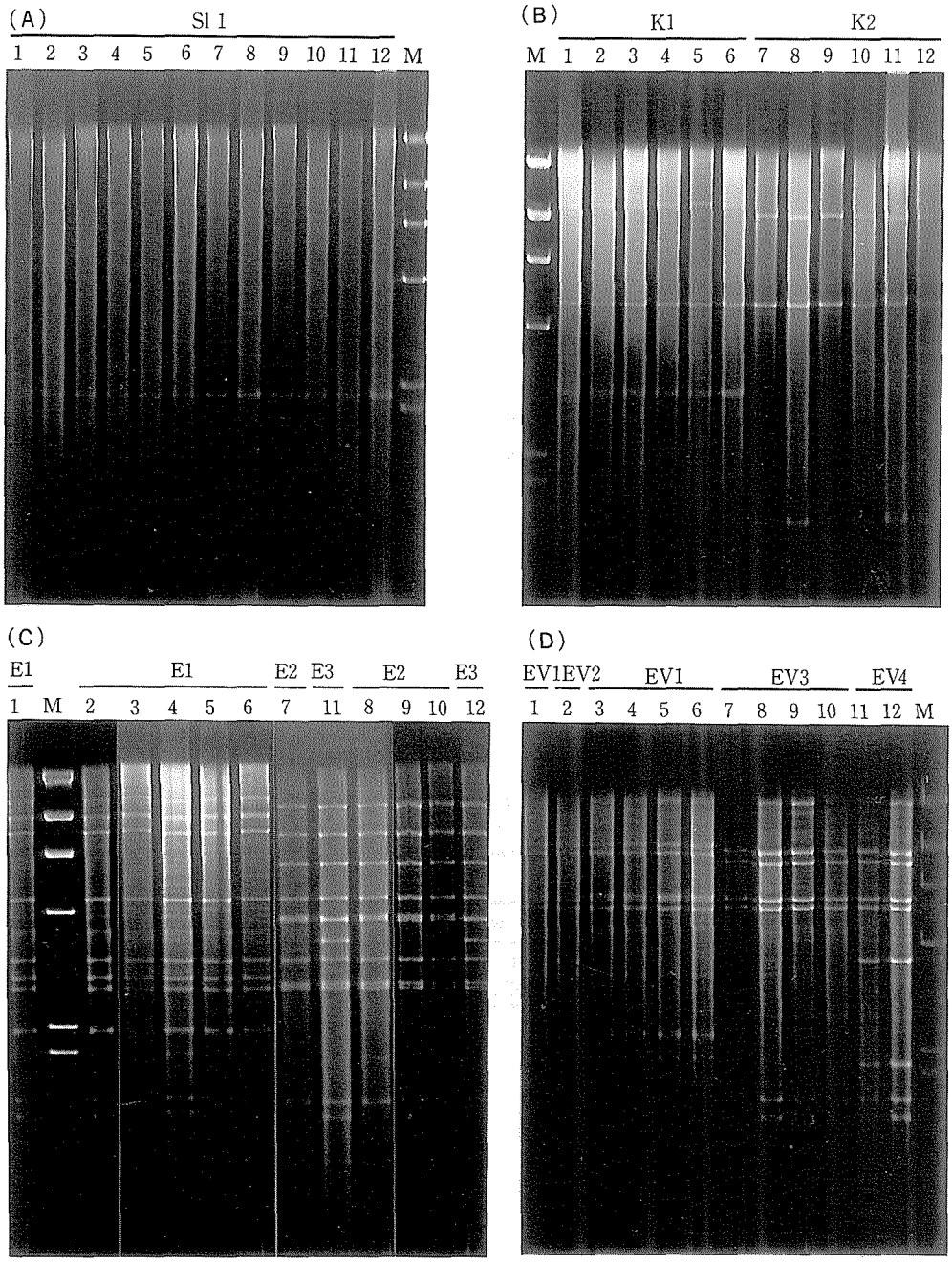


Fig. 16. Restriction fragment patterns of mitochondrial DNAs from adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora gregata* with representative endonucleases. Patterns digested with (A) *Sal* I, (B) *Kpn* I, (C) *Eco* RI and (D) *Eco* RV. Lanes 1, A54-13; 2, A54-24; 3, A54W; 4, A59To; 5, A61Ta; 6, A62B2-2; 7, S8001; 8, S8302; 9, S60KS; 10, S62Ha-3; 11, R-3; 12, St-4; and M, λDNA/*Hin* dIII as a size marker. The details of isolates are given in Table 1. Restriction pattern types assigned are shown above the lane number (See Table 13).

性と菌株レベルでの遺伝的変異の検出を試みた。

材料および方法

前節で記した方法[35,87]でmtDNAを分画した。得られたmtDNAを制限酵素処理し，アガロース電気泳動で分離した。電気泳動パターンを基に，根井[93]の記載に従って遺伝距離（塩基サイトあたりの塩基置換数：d値，塩基配列多様度評価：p値）を算出し，さらにd値を基にFarris法[113]により系統樹を作成した。

結　　果

計19種の制限酵素により処理して得られたアズキ落葉病菌，ダイズ落葉病菌それぞれ6菌株のmtDNAの電気泳動パターンを適当な英数字で表してTable 13に示し，代表的な泳動像をFig. 16に示した。

Bgl I処理では供試した12菌株何れのmtDNAでも消化断片が生じなかった。また，*Sal* I処理では全供試菌株に共通して2.2 kbのバンドが認められた（Fig. 16A）。ただし，アズキ落葉病菌と北海道産，秋田県産のダイズ落葉病菌はそれぞれmtDNAのサイズが異なるため（後述），高分子のバンドの分子量はこれら3者で異なっていると考えられる。これら2酵素処理による電気泳動パターンは，通常の泳動条件では菌株間差異が認められないので，同一の泳動型として表記した。

その他の17酵素では明らかな多型が認められた。*Bam* HI, *Kpn* I（Fig. 16B），*Pst* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Xba* Iの6酵素による消化では，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は特徴的な電気泳動パターンを示し，それぞれの菌で菌株レベルの多型は認められなかった。*Bgl* II, *Eco* RI（Fig. 16C），*Hae* III, *Hin* cII, *Hin* dIII, *Hin* fI, *Hpa* I, *Sau* 3 AI, *Sty* I, *Xho* Iの10酵素で消化した場合，アズキ落葉病菌では菌株間で差異は認められず同一の泳動像であったが，ダイズ落葉病菌はこれと異なる2つの電気泳動パターンを示し，北海道で分離された4菌株（S8001, S8302, S60KS, S62Ha-3）と秋田県で分離された2菌株（R-3, St-4）で異なった。*Eco* RV処理（Fig. 16D）でもダイズ落葉病菌は同様な2グループに大別されたが，アズキ落葉病菌にもA54-24株で多型が認められた（これは塩基置換等により他の5菌株で認められる6.0 kbの断片に*Eco* RVサイトが生じたためと考えられた）。そこで，A54-24株を除くアズキ落葉病菌をType Ia，A54-24株をType Ib，また北海道で分離されたダイズ落葉病菌4菌株をType II，秋田県産の2菌株をType

Table 14. Restriction fragment sizes (in kb) of four mitochondrial (mt) DNA types of *Phialophora gregata*.

Fragment	Endonuclease and mtDNA type																			
	Bgl II					*Eco* RI					*Eco* RV					*Xho* I				
	Type Ia	522[a]	Type II	Type III	G3[a]	Type Ia	522	Type II	Type III	G3	Type Ia	522	Type II	Type III	G3	Type Ia	522	Type II	Type III	G3
1	8.6	8.6	7.2	8.0	7.4	11.5	11.6	10.5	10.5	10.6	20.5	17.2	20.5	20.5	15.8	27.5	28.5	30.0	30.0	29.1
2	8.0	7.7	6.8	6.8	7.0	9.4	9.5	7.7	7.7	7.8	9.2	9.2	8.8	8.8	8.8	9.1	8.9	11.0	8.3	10.4
3	6.4	6.5	6.0	6.0	6.1	9.1	9.2	6.0	6.0	6.1	8.5	8.6	7.8	7.8	7.8	7.6	7.4	7.5	7.5	7.6
4	6.0	6.1	5.2	5.2	5.3	7.9	4.8	4.8	4.8	4.8	5.9	6.0	5.8	5.8	5.9	6.2	5.9	2.1	6.1	
5	5.8	6.0	4.8	4.8	4.9	4.8	3.6	4.0	3.9	4.0	5.8	5.6	5.4	5.4	5.5	2.1			2.1	
6	4.3	4.4	4.3	4.3	4.4	3.4	3.1	3.9	×2	3.9	5.5	2.5	1.8	3.7	1.8					
7	×2	3.3	3.3	3.3	3.3	3.0	2.8	3.3	3.6	3.3	2.4	2.2	1.6	2.1	1.6					
8	3.3	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.3	2.9	3.3	2.9	2.1			1.8						
9	2.8	2.7	2.7	2.7	2.7	2.3	1.6	2.8	2.9	2.8				1.6						
10	2.7	1.7	1.6	1.6	1.7	1.5	1.2	1.4	2.8	1.6										
11	1.6	1.6	1.5	1.5	1.6	1.3	1.0		1.4											
12	1.5		1.1	1.1		1.0			1.0											
13			0.9	0.9																
14			0.8	0.8																
Total	55.3	51.4	49.0	49.8	47.2	58.0	52.3	47.3	51.8	47.8	59.9	51.3	51.7	57.5	47.2	52.5	50.7	50.6	54.0	47.1

[a] 522 and G3 are Japanese adzuki bean isolate and American soybean one, respectively, which were reported by GRAY and HEPBURN[41].

III としてグルーピングした。

これらの mtDNA のサイズを制限酵素処理断片の合計から計算したところ，アズキ落葉病菌，Type II，Type III はそれぞれ 52.5～59.9（平均：56.4），47.3～51.7（平均：49.7），49.8～57.5（平均：53.3）kb であった（Table 14）。

また，mtDNA の RFLP を基に相互の遺伝距離を求めた。本実験で供試した 19 制限酵素のうち，その処理によって多数の断片が生じてバンドの識別や比較が不正確になりそうな *Hae* III，*Hin* fI，*Sau* 3 AI と消化断片の生じなかった *Bgl* I は用いず，他の 15 酵素の結果から計算した。Table 15 には各グループ間の共通なバンドの割合（F 値）と d 値，p 値を示した。アズキ落葉病菌の Type Ia と Type Ib の間では F=0.989，d=0.001，p=0.002 で，ダイズ落葉病菌の Type II と Type III の間では F=0.769，d=0.016，p=0.046 であった。一方，アズキ落葉病菌と Type II の間では F=0.461～0.463，d=0.046～0.047，p=0.132，また，アズキ落葉病菌と Type III の間では F=0.535～0.537，d=0.037～0.038，p=0.106～0.107 であった。

d 値を基に Farris 法によって作成したこれら 4 グループの系統樹を Fig. 17 に示した。

考　察

糸状菌の mtDNA のサイズは 19～176 kb にわたり[114]，菌によって異なるほか，同一種あるいは同一分化型であってもサイズが異なる場合があるようである[48,71,110]。また，菌類の mtDNA の GC 含量は低く，20～45 mole%を示すとされている[11]。mtDNA の RFLP 分析は近年になって多くの糸状菌で報告されるようになった。本手法は塩基レベルの微細な変異を検出できるため，種内群や菌株レベルの遺伝的変異を調査するために用いられている例が多く，検出された多型が分離地，宿主特異性やその他の菌株の性状と関係が認められる場合が多いが[32,36,43,46,52,71,110]，無関係であることもあるようである[19]。

最近，GRAY and HEPBURN[41] によって日本のアズキ落葉病菌とアメリカのダイズ落葉病菌の mtDNA が比較され，サイズはそれぞれ 51.1,

Table 15. Genetic distances among four mitochondrial DNA types of *Phialophora gregata*.

Group	Type Ia	Type Ib	Type II	Type III
Type Ia	—	133/269[a] (0.989)	59/255 (0.463)	72/268 (0.537)
Type Ib	0.001/0.002[b]	—	59/256 (0.461)	72/269 (0.535)
Type II	0.046/0.132	0.047/0.132	—	100/260 (0.769)
Type III	0.037/0.106	0.038/0.107	0.016/0.046	—

[a] Number of common fragments/total number of fragments (F value: proportion of common fragments).
[b] d value: nucleotide substitution per nucleotide/p value: nucleotide sequence divergence estimate.

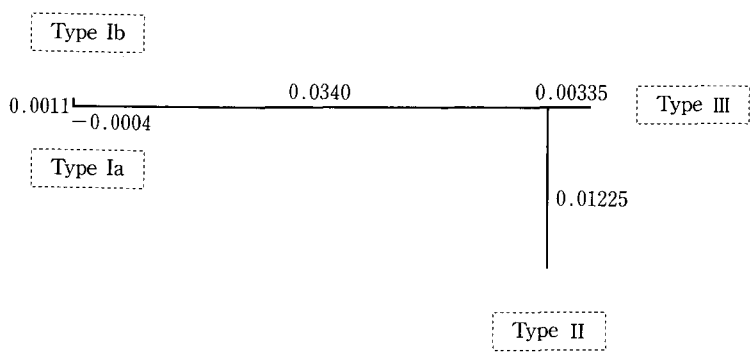


Fig. 17. Phylogenetic network for four mitochondrial DNA types of *Phialophora gregata* by the method of Farris using nucleotide substitution per nucleotide.

47.1 kbで明らかに異なる制限酵素分解パターンを示すが，そのうち同一分子量のバンドが33%認められることが報告された。また，ダイズ落葉病菌は広い地域から集められたが，多型は認められなかった。

本実験の結果，日本のダイズ落葉病菌には明らかに異なる2タイプのmtDNAが存在することが示され，北海道（Type II）と秋田県（Type III）という地理的分布と一致した。両者のうちType IIとアメリカのダイズ落葉病菌の制限酵素分解パターン[41]がほぼ一致したことから（Table 14），1980年以来北海道で発生しているダイズ落葉病はおそらくアメリカから持ち込まれたものであり，近年秋田県で発生しているものはこれと異なる起源であると考えられる。本病害はカナダ[1]，エジプト[2]でも発生しており，今後，両国の菌株についてmtDNAのRFLP分析を行う必要がある。一方，アズキ落葉病菌はこれらと明らかに異なるmtDNAで，1例（*Eco* RV処理でのA 54-24株）を除きRFLPは認められなかったことから，現在北海道全域で発生しているアズキ落葉病は単一起源であると推察された。

なお，これら3つのmtDNAのサイズについては，高分子量の断片における測定誤差が考えられ，適当な制限酵素を組み合わせて正確なサイズを求め直す必要がある。

mtDNAのRFLPに基づく遺伝的類縁性についての報告をみると[8,31,32,60,71,115]，分類階級に対応するp値は菌によって大きく異なるようであるが，一般に異なる種間ではp値は0.1以上を示すのではないかと考えられる。本菌の場合，p値はアズキ落葉病菌（Type IaとType Ib間）は0.002，ダイズ落葉病菌（Type IIとType III間）は0.046であり，両菌間では0.106～0.132と大きく，複合種と考えられている*P. megasperma*の分化型（生物種）間での値[32]に近かった。

また，動物でのmtDNAの研究から，一般にミトコンドリアゲノムは核ゲノムよりも速く進化（変異）するとされている[16]。しかし，*Phytophthora capsici*や*P. parasitica*ではmtDNAよりも核DNAのRFLPの方が菌株間の変異が大きいことが報告されている[33]。本研究でも，アズキ落葉病菌はアイソザイム分析やDNA塩基配列の相同性の結果から核DNAの遺伝的変異が比較的大きいことが推測されたのに対し，1例を除いてmtDNAのRFLPは認められなかった。逆に，ダイズ落葉病菌では核DNAの変異は比較的小さいものと思われたがmtDNAレベルでは大きく異なる2グループに大別された。今後，核DNAのRFLP分析を行って，*P. gregata*における核DNAの変異とmtDNAの変異の関係について検証していく必要がある。

D. 二本鎖RNA

dsRNAを細胞質遺伝分子マーカーとして促え，分類[51,94]や個体群生態学的研究[25]に利用した報告がみられる。

本節では，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌からdsRNAの検出，比較を行った。

材料および方法

dsRNAの抽出はMorris and Dodds[86]の方法に準じて行った。抽出した試料は5%PAGEにより分析した。

結　　果

アズキ落葉病菌27菌株，ダイズ落葉病菌5菌株から抽出した試料を電気泳動したところ，アズキ落葉病菌10菌株からバンドが検出された（Table 16, Fig. 18A）。これらのバンドはDNaseに耐性で，RNaseに高塩濃度下で耐性，低塩濃度下で分解されたことから，dsRNAであることが確認された（Fig. 18B）。dsRNAが検出されたのは札幌で分離された全ての菌株と上川地方南部で分離された6菌株のうち3菌株で，両者の泳動パターンは異なっていた。札幌で分離された菌株は何れも4本のバンドを持ち，rice dwarf virusをマーカーとしたときの分子量は約2.2，1.4，1.3，1.1×10^6 Daであった（Type I）。また，上川地方南部で分離された菌株は8本のバンドを有し，分子量は約1.75，1.70，1.05，1.00，0.95，0.80，0.75，0.70×10^6 Daであった（Type II）。

一方，上川地方北部，十勝地方ならびに厚真（胆振地方）で分離されたアズキ落葉病菌，およびダイズ落葉病菌からはdsRNAが検出されなかった。

考　　察

dsRNAは菌糸融合の際に伝播することが明らかにされ[20]，その伝播が体細胞和合性に大きく影響さ

Table 16. Detection of double-stranded (ds) RNAs from adzuki bean and soybean isolates of *Phialophora grogata*.

Isolate	Locality		DsRNA
Adzuki bean isolate			
A58H	Sapporo	(Ishikari district)	+(I)[a]
A59M	do.	(do.)	+(I)
A59To	do.	(do.)	+(I)
A60To	do.	(do.)	+(I)
A61Ta	do.	(do.)	+(I)
A62A-16	do.	(do.)	+(I)
A63Ta	do.	(do.)	+(I)
A54Ka	Asahikawa	(south Kamikawa district)	+(II)
A60N1	do.	(do.)	+(II)
A62B2-2	Biei	(do.)	+(II)
A62B3-1	do.	(do.)	−
A62H1-6	Higashikawa	(do.)	−
A62H3-3	do.	(do.)	−
A54W	Wassamu	(north Kamikawa district)	−
A60W1-1	do.	(do.)	−
A59K	Kenbuchi	(do.)	−
A62S	Shibetsu	(do.)	−
A13	Memuro	(Tokachi district)	−
A57T24	do.	(do.)	−
HH	do.	(do.)	−
A54-24	Makubetsu	(do.)	−
A54-25	do.	(do.)	−
A56-25	do.	(do.)	−
A54-13	Asyoro	(do.)	−
A57T22	Shimizu	(do.)	−
AP1	Atsuma	(Iburi district)	−
AP2	do.	(do.)	−
Soybean isolate			
S58W	Sapporo	(Ishikari district)	−
S8302	Obihiro	(Tokachi district)	−
R-3	Nishisenboku	(Akita Prefecture)	−
AK89-12	do.	(do.)	−

[a] + : detected (electrophoretic pattern types shown in Fig. 18), − : not detected.

れることが知られている[5]。アズキ落葉病とダイズ落葉病の両方が発生している札幌の圃場で分離された菌株のうちアズキ落葉病菌のみからdsRNAが検出されたことから，その圃場においては両菌間で細胞質の交流が行われていないことが示唆される。これは，両菌の宿主特異性が異なる，すなわち生態的に隔離されているため接触できないのか，あるいは体細胞不和合性であるためと考えられる。

また，アズキ落葉病菌ではdsRNAの有無や電気泳動パターンと分離地域の間に関係が認められたが，本菌で検出されたdsRNAが*Endothia parasitica*[4]で報告されているように無性生殖を通じて安定して伝達される性質のものならば，札幌や上川地方の菌株が十勝地方に伝播したとは考えにくく，十勝地方の菌株が札幌や厚真，上川地方に広がった後，何らかの理由で札幌，上川地方南部の菌株がdsRNAを持つようになったと考える方が適当であろう。さらに，上川地方北部とした採集地は名

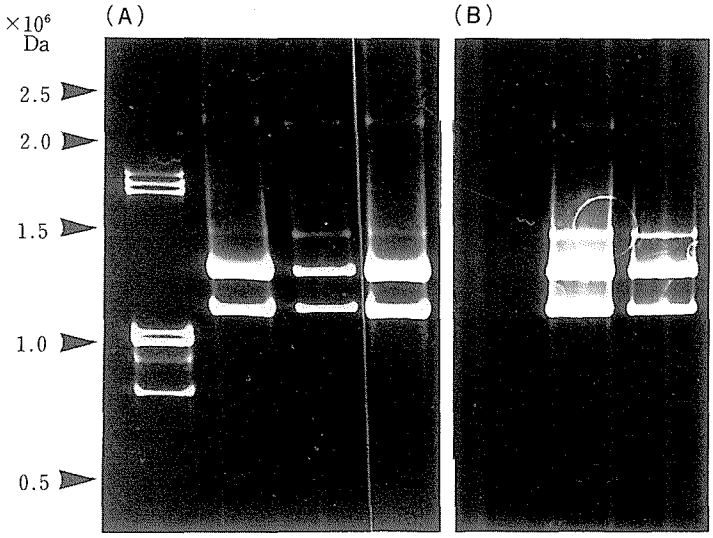


Fig. 18. Double-stranded RNAs detected from adzuki bean isolate of *Phialophora gregata*. (A) Electrophoretic patterns, left to right; A62B2-2 (Type II), A62A-16 (Type I), A59To (Type I) and A61Ta (Type I). (B) Reaction of a sample from A59To to nucleases, left to right; treated with RNase in 0.1×SSC, RNase in 2×SSC and DNase.

寄盆地の南側にあたり，上川地方南部とした採集地は旭川盆地にあり，小さな地理的隔離と見ることができ興味深い。あるいは，それぞれの地域で独立に病気が発生し，菌株の起源が異なることも考えられる。

このようなdsRNAのバンドパターンと分離地域の間に関係が認められる例として*E. parasitica*のhypovirulent株があげられる[29]。hypovirulent株で検出されるdsRNAの泳動パターンは3つにタイプ分けされ，類似するtype 1とtype 2はヨーロッパ分離株が示し，北アメリカ分離株はこれらと明らかに異なるtype 3を示す。

一方，dsRNAは植物病原糸状菌では病原性との関係から研究された例が多い。*R. solani*[20], *E.*

Table 17. Double-stranded (ds) RNAs, pathogenicity to four host cultivars and mycelial growth of adzuki bean isolate of *Phialophora gregata*.

Isolate	DsRNA[a]	Pathogenicity to adzuki bean[b]				Mycelial growth[c]
		Takara-shozu	Maruba	Hatsune-shozu	Akamame	
A13	−	21	0	0	0	20.0
A54-13	−					22.4
A54-24	−	86	0	0	0	16.9
A54W	−	100	0	11	0	19.3
A59To	+(I)					24.5
A60To	+(I)	100	0	4	0	20.6
A61Ta	+(I)					22.5
A62A-16	+(I)	80	0	0	0	21.0
A63Ta-1	+(I)	33	0	0	0	
A62B2-2	+(II)	91	5	0	0	19.8

[a] Data from Table 16.
[b] Data from Table 3.
[c] mm/three weeks on soybean stem agar at 24℃. Data from Tables 4 and 5, and from other.

parasitica[28] などではdsRNAが病原性を低下させるとされ，逆に，*Geotrichum candidum*[85] では増加させるとされているが，研究者によって矛盾する結果が得られている場合も多い。百町ら[45] もこうした考えから実験を行ったもので，アズキ落葉病菌（Type A）ではdsRNAが強く検出される菌株は毒素産生が多かったとしている。

しかし，本研究で得られた結果を総合すると（Table 17），dsRNAの有無と病原性あるいは菌糸の生長速度の間には関係が無いように思われるが，dsRNAの細胞内での存在様式（dsRNAは菌類ウイルスのゲノムである場合もあるが，ウイルス様粒子が発見されず，その由来が不明なものも多い[14]）も合わせ，今後さら検討していかねばならない問題である。また，dsRNAのバンド相互の相同性を調べる必要がある。

V. 総合考察

ダイズ落葉病菌を新種の *C. gregatum* として報告したALLIGTON and CHAMBERLAIN[3] とアズキ落葉病菌をこの同一種として報告した成田ら[90] は，本病原菌が *Cephalosporium* の属徴に完全には一致しないことを記述している。その後，GAMS[34] は *Cephalosporium* 属菌の多くが *Acremonium* 属に属するものであるとしたが，*C. gregatum* はフィアライドに明らかなカラーが認められることから *Phialophora* 属に移された。また，1986年に行われた国際菌類分類委員会のアンケート調査の結果，*Phialophora* 属および *Acremonium* 属は応用微生物（工業微生物および医真菌，バイオテクノロジー）の分野で重要でありながら分類学的研究が不十分で，緊急に検討を要するとされた[119]。これらのことは，本菌を含むかつての *Cephalosporium* 属や近縁の菌の分類が確立したものではなかったことを示している。

一方，宇田川[119] は「菌類分類学では精密なアプローチから得られる形態的特徴に加えて，より精度の高い分類システムを確立するために形態以外のかびの特質，特に化学分類学的情報を補助的に採用しようという動きが国際的にますます広がるであろう」と述べている。

これまでのところ，両病害が発生しているのは世界的にも北海道だけであるが，生態学的研究を中心に進められ，両病原菌の遺伝的類縁性についての研究はなされていなかった。

こうした状況のもと，本研究は形態的同一種であるアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の病原性や培養性質を比較し，さらに分子遺伝学的解析により両菌の遺伝的類縁性を検討したものである。

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌のマメ科6種に対する病原性を調査し，両菌はリョクトウを共通の宿主とするもののアズキ，ダイズに対する病原性は明らかに分化していることが確かめられた。従って，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は分類学的には“分化型”として扱われるものであると考えられた。また，調査した培養性質のうちPD，V-8培地上での菌体の色や，生育適温と生育最高温度が両菌で異なることが明らかになり，生理・代謝レベルで差異が生じているものと考えられた。さらに，分子遺伝学的手法による分析の結果，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌は同一種であるが遺伝的にかなり分化した種内群であることが明らかとなった。これらは両菌を異なる分化型とする考えを強く支持するものであった。

従って，アズキ落葉病菌には *Phialophora gregata*（Allington et Chamberlain）Gams f. sp. *adzukicola* Kobayashi, Yamamoto, Negishi et Ogoshi なる分化型名を，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 なる分化型名を提案する。

種の分化はおそらくはじめ1つの種から出発して，それが何らかの理由で生態的，あるいは地理的分布を異にする集団を形成し，それぞれの環境のもとで次第に淘汰され，その間に集団として生理的な変化を起こし，生殖的な隔離状態に到達し，その後，形態的差異が生じるようになると考えられる[128]。

分化型を含む種内群はこうした種分化の途中の段階にあるものと推測されるが，BOSLAND and WILLIAMS[13] は，アブラナ科植物に病原性を示す *F. oxysporum* では分化型とアイソザイムパターンと体細胞和合性（菌糸融合は不完全菌における遺伝情報の伝達・受容の主要な機構であると考えられ，体細胞不和合性であることは生殖的隔離が生じていることを意味すると考えられる）が一致することから，本菌における遺伝的分化について次のように考察している。「宿主特異性は病原菌の生存に優位性

をもたらす。そのため，進化的同胞種（同一場所に生息していて形態的に区別できないが生殖的に隔離されている集団と定義されるが，この場合は異なる分化型あるいは非病原菌をさしていると考える）との競争が減ると共に，それらとの遺伝的組換えの機会が減少する。その結果として新しいgenotypeが生じることが少なくなり，他の環境への適応能力が失われていく。*F. oxysporum*の場合，特定の宿主に適応したgenotype（分化型を意味すると考える）は同所的に生じ，体細胞不和合性となり，遺伝的に隔離されたのだろう。」

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌もこのような生態的隔離によって腐生性の祖先から生じたと考えられる。さらに，アズキ落葉病菌は日本において，またダイズ落葉病菌はアメリカにおいて発生したため，地理的な隔離によってそれぞれ独自に遺伝的変異を蓄積していったのではないかと推察する。また，この過程で体細胞不和合性になっていることが考えられた。さらに，*F. oxysporum* f. sp. *melonis*[46]とf. sp. *lycopersici*[71]ではmtDNAのRFLPに基づくグループと体細胞和合性群が一致するとされていることから，北海道産（Type II）と秋田県産（Type III）のダイズ落葉病菌間も不和合性であることが推察された。今後，適当なマーカーを選び，アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の体細胞和合性について検討していかなければならない。

アイソザイム分析，DNA塩基配列の相同性の結果から，アズキ落葉病菌はダイズ落葉病菌に比べ菌株間の遺伝的変異が大きいことが示された。これは，ダイズ落葉病に比べアズキ落葉病の発生歴が長く，全道で慢性的に大発生していること，すなわち異なる自然環境にも適応して菌量を増加するのに伴って，長期間にわたって変異を蓄積していったためであると推察された。

アズキ落葉病菌におけるアイソザイムパターンの変異は菌株の分離地域(札幌，上川地方，十勝地方)とほぼ一致した。また，アイソザイム分析，DNA塩基配列の相同性の結果から，十勝地方分離菌株の変異の幅が一番大きいことが示唆された。mtDNAは1例を除いてRFLPが認められず，アズキ落葉病菌が単一起源であることを示唆するものと考えられた。以上のことから，アズキ落葉病菌は十勝地方で発生し，菌密度を高め，変異を蓄積していった後，一部が何らかの理由で札幌，上川地方へ伝播し，そこに適応していったが，地理的に隔離されていたことによって独立した集団を形成したものと推察された。dsRNAの結果からも同様な推察がなされた。本研究はアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の識別と遺伝的類縁性を知ることが目的であったため供試菌株も比較的少なく，こうした個体群生態学的な推察はさらに多くの菌株を用いて確かめていく必要がある。

一方，本研究において，タンパク質パターン，アイソザイム分析，DNAの塩基組成と塩基配列の相同性の結果から，*P. gregata*とアズキ落葉病菌の弱病原性系統として報告されたType B[57]は別種であることが明らかになった。Type Bは，内田[118]の指摘やダイズ落葉病罹病組織から分離される*Acremonium* sp.の記載[81]と酷似することなどから，*Acremonium*属の一種ではないかと考えられる。

また，Type Bが*Acremonium*属菌であるとすると，Type AからType Bへ変異する過程にあると考えられていた突然変異株[53,54]の所属も残された問題となる。突然変異株の胞子形成能や生育速度あるいは培養濾液のガスクロマトグラム（これは代謝産物のプロフィールと考られる）はType Bに酷似しており[54]，突然変異株はType Bすなわち*Acremonium* sp.の変異株，あるいはその近縁の別種であることが考えられる。最近，GRAY and HEPBURN[41]は，mtDNAのRFLPと形態観察の結果から，本突然変異株は*Acremonium* sp.であろうと推察している。

今後，詳細な形態観察によりType Bと突然変異株の所属を明らかにすると共に，化学分類学の手法を用いて両菌の遺伝的類縁性を解明する必要がある。

摘　　要

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，これらの結果を総合して両菌の分類学的位置づけと遺伝的変異について考察した。

I. 病原性

1.　アズキ落葉病菌はアズキとリョクトウに，ダイズ落葉病菌はダイズとリョクトウに病原性を示し

た。また，インゲン，ササゲ，エンドウには両菌とも非病原性であった。

2. アズキ落葉病菌の多くの菌株は罹病性の宝小豆にのみ病徴を引き起こしたが，4菌株は抵抗性の丸葉にも病原性を示した。1菌株はさらにハツネショウズにも病原性を示した。しかし，強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。

II. 培養性質

アズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の間で培養性質に差異が見いだされた。PDAやV-8 A，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いた。また，アズキ落葉病菌の生育適温は24～26℃で，32℃でも生育できたの対し，ダイズ落葉病菌のそれは22～23℃で，32℃では生育できなかった。

III. 分子遺伝学的類縁性

1. 全細胞タンパク質，細胞質可溶性タンパク質，何れの分画の電気泳動パターンもアズキ落葉病菌とダイズ落葉病菌の間に顕著な差は認められなかった。

2. 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，乳酸脱水素酸素，パーオキシダーゼ，α-エステラーゼおよび酸性ホスファタ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，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これよりも低く63～72%の相似度であった。

3. 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。

4. DNA塩基配列の相同性は，アズキ落葉病菌どうしでは89%以上の値を示し，ダイズ落葉病菌どうしでは94%以上であった。これに対し，両菌間では65～72%の相同性であった。

5. ミトコンドリアDNAの制限酵素断片長多型を調査したところ，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，北海道（Type II）と秋田県（Type III）で分離されたダイズ落葉病菌の3グループに大別された。Type IIとType III間の遺伝距離（塩基配列多様度評価：p値）は0.046であった。アズキ落葉病菌とType II，Type III間のp値はそれぞれ0.132，0.106～0.107であった。

6. 札幌および上川地方南部で分離されたアズキ落葉病菌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。

IV. 分類学的位置づけと遺伝的変異

1. 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，両菌は同一種の範疇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を提案した。

2. 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が，これは発生歴が長く，広範囲で大発生している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関係が認められ，十勝地方での変異が大きかったこと，1例を除いてmtDNA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，上川地方に伝播，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RFLP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。

謝　辞

本研究は北海道大学大学院農学研究科農業生物学専攻博士後期課程在学中の1989年4月から1992年1月まで行ったもので，北海道大学農学部教授生越明博士には終始適切な御指導を頂き，本論文の御校閲を賜った。同助教授小林喜六博士には公私にわた

り暖かい御支援と激励を賜った。また，日々の実験を行うにあたって，秋野聖之助手には数多くの御指導と御助言を頂いた。DNA の塩基組成，塩基配列の相同性に関する実験では，東日本学園大学教養部教授横澤菱三博士ならびに同講師国永史朗博士に実験さらに研究全般にわたる有益かつ暖かい御指導を賜ると共に，終始激励と御援助を賜った。ミトコンドリア DNA の解析に関する実験では，秋田県立農業短期大学付属生物工学研究所教授井上正保博士，同助教授増田清博士ならびに同講師野村港二博士に研究遂行の便宜をはかって頂くと共に有益な御示唆を賜った。さらに罹病アズキの採集にあたっては，北海道立上川農業試験場主任研究員土屋貞夫博士ならびに病虫予察科田中文夫氏に御協力頂いた。また，北海道立十勝農業試験場病虫予察科堀田治邦氏には罹病アズキをお送り頂いた。北海道立中央農業試験場病理科近藤則夫氏にはアズキ落葉病菌ならびにダイズ種子を分譲頂いたほか，数多くの御助言を賜った。また，農林水産省東北農業試験場地域基盤研究部中島隆氏にはダイズ落葉病菌を分譲頂いた。本論文を作成するにあたっては，北海道大学農学部教授木村郁夫博士，同教授喜久田嘉郎博士に御校閲賜った。作物生理学講座博士後期課程冨田謙一氏には絶えざる激励と数多くの有意義な御助言を頂いた。また，事務官亀田真弓女史をはじめとする植物寄生病学講座各位，さらに植物学教室各位には公私にわたって御援助頂いた。以上の方々に対し，ここに謹んで感謝の意を表する次第である。

引用文献

1. ABEL, G. H.: Brown stem rot of soybean—*Cephalosporium gregatum*. *Rev. Plant Path.* **56**: 1065-1077. 1977
2. ABO-EL-DAHAB, M. K.: Occurrence of the brown stem rot disease of soybean in Egypt (U. A. R.). *Phytopath. Medit.* **7**: 28-33. 1968
3. ALLINGTON, W. B. and CHAMBERLAIN, D. W.: Brown stem rot of soybean. *Phytopathology* **38**: 793-802. 1948
4. ANAGNOSTAKIS, S. L.: Stability of double-stranded RNA components of *Endothia parasitica* through transfer and subculture. *Exp. Mycol.* **5**: 236-242. 1981
5. ANAGNOSTAKIS, S. L. and DAY, P. R.: Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* **69**: 1226-1229. 1979
6. 青田盾彦，原正紀，足立大山：アズキ落葉病菌の菌株と品種・系統間発病差異．日植病報 **52**: 141（講要）. 1986
7. 青田盾彦，小池正徳，坪木和男，酒井真次：*Cephalosporium gregatum* ALLINGTON et CHAMBERLAIN によるダイズ落葉病（新称）について．日植病報 **50**: 98（講要）. 1984
8. AVISE, J. C. and LANSMAN, R. A.: Polymorphisms of mitochondrial DNA in populations of higher animals. in NEI, M. and KOEHN, R. K. eds. Evolution of Genes and Proteins. pp 147-164. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 1983
9. BACKHOUSE, D., WILLETTS, H. J. and ADAM, P.: Electrophoretic studies of *Botrytis* species. *Trans. Br. mycol. Soc.* **82**: 625-630. 1984
10. BAPTIST, J. N., SHAW, C. R. and MANDEL, M.: Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy *J. Bacteriol.* **99**: 180-188. 1969
11. BELKHIRI, A. and DICK, M. W.: Comparative studies on the DNA of *Pythium* species and some possibly related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2673-2683. 1988
12. BERRY, J. A. and FRANKE, R. G.: Taxonomic significance of intraspecific isozyme patterns of the slime mold *Fuligo septica* produced by disc electrophoresis. *Amer. J. Bot.* **60**: 976-986. 1973
13. BOSLAND, P. W. and WILLIAMS, P. H.: An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.* **65**: 2067-2073. 1987
14. BOZARTH, R. F.: Properties of mycoviruses. in LEMKE, P. A. ed. Virus and Plasmids in Fungi. pp 43-91. Marcel Dekker Inc., New York. 1979
15. BRITTEN, R. J. and KOHNE, D. E.: Repeated sequences in DNA. *Science* **161**: 529-540. 1968
16. BROWN, W. M., GEORGE, M. and WILSON, A. C.: Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 1967-1971. 1979
17. BURDON, J. J. and MARSHALL, D. R.: Isozyme variation between species and formae speciales of genus *Puccinia*. *Can. J. Bot.* **59**:

2628-2634. 1981

18. BURDON, J. J. and MARSHALL, D. R.: The use of isozymes in plant disease research. in TANKSLEY, S. D. and ORTON, T. J. eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. pp 401-412. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. 1983
19. CARTER, D. A., ARCHER, S. A., BUCK, K. W., SHAW, D. S. and SHATTOCK, R. C.: Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycol. Res.* **94**: 1123-1128. 1990
20. CASTANHO, B., BUTLER, E. E. and SHEPHERD, R. J.: The association of double-stranded RNA with Rhizoctonia decline. *Phytopathology* **68**: 1515-1519. 1978
21. 千葉一美：アズキ落葉病抵抗性の育種学的研究 I. 抵抗性の品種間差異. 北海道立農試集報 **48**: 56-63. 1982
22. 千葉一美：アズキ落葉病抵抗性の育種学的研究 II. 品種間差の成立経過. 北海道立農試集報 **52**: 79-84. 1985
23. CHRISTIANSEN, C., LETH-BAK, A., STENDERUP, A. and CHRISTIANSEN, G.: Repetitive DNA in yeast. *Nature New Biology* **231**: 176-177. 1971
24. CLARE, B. G., FLENTJE, N. T. and ATKINSON, M. R.: Electrophoretic patterns of oxidoreductases and other proteins as criteria in fungal taxonomy. *Aust. J. Biol. Sci.* **21**: 275-295. 1968
25. DALE, J. L., MANNERS, J. M. and IRWIN, J. A. G.: *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Australia carry distinct double-stranded RNAs. *Trans. Br. mycol. Soc.* **91**: 671-676. 1988
26. DAVIS, B. J.: Disc electrophoresis— II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404-427. 1964
27. DELEY, J.: DNA base composition and hybridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopath.* **6**: 63-90. 1968
28. DODDS, J. A.: Association of type 1 viral-like dsRNA with club-shaped particles in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *Virology* **107**: 1-12. 1980
29. DODDS, J. A.: Revised estimates of the molecular weights of dsRNA segments in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 70: 1217-1220. 1980
30. DUTTA, S. K.: Repeated DNA sequences in fungi. *Nucleic Acids Res.* **1**: 1411-1419. 1974
31. FÖRSTER, H., KINSCHERF, T. G., LEONG, S. A. and MAXWELL, D. P.: Estimation of relatedness between *Phytophthora* species by analysis of mitochondrial DNA. *Mycologia* **80**: 466-478. 1988
32. FÖRSTER, H., KINSCHERF, T. G., LEONG, S. A. and MAXWELL, D. P.: Restriction fragment length polymorphisms of the mitochondrial DNA of *Phytophthora megasperma* isolated from soybean, alfalfa, and fruit trees. *Can. J. Bot.* **67**: 529-537. 1989
33. FÖRSTER, H., OUDEMANS, P. and COFFEY, M. D.: Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Exp. Mycol.* **14**: 18-31. 1990
34. GAMS, W.: Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). 262 pp. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1971
35. GARBER, R. C. and YODER, O. C.: Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal, and plasmid components. *Anal. Biochem.* **135**: 416-422. 1983
36. GARBER, R. C. and YODER, O. C.: Mitochondrial DNA of the filamentous ascomycete *Cochliobolus heterostrophus*: Characterization of the mitochondrial chromosome and population genetics of a restriction enzyme polymorphism. *Curr. Genet.* 8: 621-628. 1984
37. GILL, H. S. and POWELL, D.: Polyacrylamide gel (disc) electrophoresis of physiologic races A-1 to A-8 of *Phytophthora fragariae*. *Phytopathology* **58**: 722-723. 1968
38. GLYNN, A. N. and REID, J.: Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in the genus *Fusarium*. *Can. J. Bot.* **47**: 1823-1831. 1969
39. GRAHAM, R. C. and KARNOVSKY, M.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidases in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14**: 291-302. 1966
40. GRAY, L. E.: Variation in pathogenicity of *Ce-*

phalosporium gregatum isolates. *Phytopathology* **61**: 1410-1411. 1971

41. GRAY, L. E. and HEPBURN, A. G.: Mitochondrial DNA restriction patterns of *Phialophora gregata* isolates from soybean and adzuki bean. *Phytopathology* **82**: 211-215. 1992
42. HALL, R.: *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* distinguished by acrylamide gel electrophoresis of proteins. *Can. J. Bot.* **47**: 2110-2111. 1969
43. HULBERT, S. H. and MICHELMORE, R. W.: DNA restriction fragment length polymorphism and somatic variation in the lettuce downy mildew fungus, *Bremia lactucae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 17-24. 1988
44. HWANG, B. K., YUN, J. H. and KIM, Z. S.: Geographic variation of esterase isozymes in populations of *Alternaria mali* on apple leaves. *J. Phytopath.* **119**: 225-231. 1987
45. 百町満朗, 加藤直子, 小林喜六: アズキ落葉病菌(*Cephalosporium gregatum*)からのdsRNAの検出. 日植病報 **52**: 531(講要). 1986
46. JACOBSON, D. J. and GORDON, T. R.: Variability of mitochondrial DNA as an indicator of relationships between populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Mycol. Res.* **94**: 734-744. 1990
47. JAHNKE, K.-D., BAHNWEG, G. and WORRALL, J. J.: Species delimitation in the *Armillaria mellea* complex by analysis of nuclear and mitochondrial DNAs. *Trans. Br. mycol. Soc.* **88**: 572-575. 1987
48. JENG, R. S., DUCHESNE, L. C., SABOURIN, M. and HUBBES, M.: Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms of aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. *Mycol. Res.* **95**: 537-542. 1991
49. JOHNSON, J. L.: Nucleic acids in bacterial classification. in KRIEG, N. R. and HOLT, J. G. eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1. pp 9-11. Williams & Wilkins, Baltimore. 1984
50. 兼平勉, 篠原正行: オオムギ, コムギ, エンバクに寄生する *Ustilago* 属菌酵素の電気泳動パターンの比較. 日植病報 **52**: 660-668. 1986
51. KIM, W. K. and KLASSEN, G. R.: Double-stranded RNAs in mitochondrial extracts of stem rusts and leaf rusts of cereals. *Curr. Genet.* **15**: 161-166. 1989
52. KISTLER, H. C., BOSLAND, P. W., BENNY, U., LEONG, S. and WILLIAMS, P. H.: Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology* **77**: 1289-1293. 1987
53. KOBAYASHI, K.: Studies on induced mutants of *Cephalosporium gregatum*, the causal fungus of brown stem rot in adzuki beans. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **50**: 522-527. 1984
54. KOBAYASHI, K., KONDO, N. and UI, T.: Appearance of a mutant from *Cephalosporium gregatum* Type A isolate in culture. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **47**: 577-580. 1981
55. KOBAYASHI, K., KONDO, N., UI, T., TACHIBANA, H. and AOTA, T.: Difference in pathogenicity of *Phialophora gregata* isolates from adzuki bean in Japan and from soybean in the United States. *Plant Dis.* **67**: 387-388. 1983
56. KOBAYASHI, K., TANAKA, F., KONDO, N. and UI, T.: A selective medium for isolation of *Cephalosporium gregatum* from soil and populations in adzuki bean field soils estimated with the medium. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **47**: 29-34. 1981
57. KOBAYASHI, K., TANAKA, F., UI, T. and AKAI, J.: A new strain of *Cephalosporium gregatum*, causal fungus of brown stem rot of adzuki beans. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **45**: 409-411. 1979
58. KOBAYASHI, K. and UI, T.: Comparison of *Cephalosporium gregatum* isolates from adzuki bean in Japan and from soybean in U. S. A. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **46**: 241-246. 1980
59. 駒田旦: 土壌中の感染源の定量的分離法. 作物のフザリウム病(松尾卓見, 駒田旦, 松田明 編集). pp 201-220. 全国農村教育協会, 東京. 1980
60. KOZLOWSKI, M. and STEPIEN, P. P.: Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 471-476. 1982
61. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. I. Genetic relatedness within anastomosis group 1. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **48**: 659-667. 1982
62. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: DNA

base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. II. Genetic relatedness within anastomosis group 2. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **48**: 668-673. 1982

63. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. III. Genetic relatedness within AG-3, AG-5, AG-7 and AG-BI. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **49**: 647-652. 1983
64. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. IV. Genetic relatedness within AG-4. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **50**: 322-330. 1984
65. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. V. Genetic relatedness within AG-6. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **50**: 346-352. 1984
66. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. VI. Genetic relatedness among seven anastomosis groups. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **51**: 127-132. 1985
67. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn. VII. Genetic relatedness between AG-BI and other anastomosis groups. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **51**: 133-138. 1985
68. 国永史朗，横澤菱三：DNA 塩基配列の相同性比較による植物病原糸状菌の分類に関する研究 第1報 *Alternaria* 属菌の遺伝的類縁性. 日植病報 **53**: 368-369（講要）. 1987
69. 国永史朗，横澤菱三：DNA 塩基配列の相同性比較による植物病原糸状菌の分類に関する研究（第2報）*Verticillium* 属菌の遺伝的類縁性. 日植病報 **54**: 350（講要）. 1988
70. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: Genetic relatedness within and between formae speciales of *Fusarium oxysporum* as measured by DNA-DNA reassociation kinetics. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **55**: 216-223. 1989
71. KUNINAGA, S. and YOKOSAWA, R.: Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **33**: 449-459. 1992
72. KURTZMAN, C. P., SMILEY, M. J., ROBNETT, C. J. and WICKLOW, D. T.: DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* **78**: 955-959. 1986
73. LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685. 1970
74. LIN, D., DUMAS, M. T. and HUBBES, M.: Isozyme and general protein patterns of *Armillaria* spp. collected from the boreal mixedwood forest of Ontario. *Can. J. Bot.* **67**: 1143-1147. 1989
75. MADHOSINGH, C.: Tyrosinase isoenzymes in six agaric species of Basidiomycetes. *Can. J. Microbiol.* **16**: 895-899. 1970
76. MARMUR, J., FALKOW, S. and MANDEL, M.: New approaches to bacterial taxonomy. *Ann. Rev. Microbiol.* **17**: 329-372. 1963
77. MARTINI, A. and PHAFF, H. J.: The optical determination of DNA-DNA homologies in yeasts. *Ann. Microbiol.* **23**: 59-68. 1973
78. MARTY, T. L., O'MALLEY, D. M. and GURIES, R. P.: A Manual for Starch Gel Electrophoresis: New Microwave Edition, Staff Paper Series 20. 24 pp. College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin, Madison. 1984
79. 松尾卓見：フザリウム病菌の種類と同定. 作物のフザリウム病（松尾卓見，駒田旦，松田明 編集）. pp 17-59. 全国農村教育協会，東京. 1980
80. MATSUYAMA, N. and KOZAKA, T.: Comparative gel electrophoresis of soluble proteins and enzymes of rice blast fungus *Pyricularia oryzae* Cav. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **37**: 259-265. 1971
81. MENGISTU, A. and GRAU, C. R.: Variation in morphological, cultural, and pathological characteristics of *Phialophora gregata* and *Acremonium* sp. recovered from soybean in Wisconsin. *Plant Dis.* **70**: 1005-1009. 1986
82. MENGISTU, A., TACHIBANA, H. and GRAU, C. R.: Selective medium for isolation and enumeration of *Phialophora gregata* from soybean straw and soil. *Plant Dis.* **75**: 196-199. 1991
83. MEYER, J. A. and RENARD, J. L.: Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **59**: 1409-1411. 1969
84. MILTON, J. M., ROGERS, W. G. and ISAAC, I.: Application of acrylamide gel electrophoresis of soluble fungal proteins to taxonomy of *Verticillium* species. *Trans. Br. mycol. Soc.* **56**:

61-65. 1971

85. MOR, H., STEINLAUF, R. and BARASH, I.: Viruslike particles and double-stranded RNA in *Geotrichum candidum*, the causal agent of citrus sour rot. *Phytopathology* **74**: 921-924. 1984

86. MORRIS, T. J. and DODDS, J. A.: Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* **69**: 854-858. 1979

87. MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F.: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4321-4325. 1980

88. 中島隆, 酒井真次, 藤澤一郎: 秋田県におけるダイズ落葉病の発生. 日植病報 **57**: 86 (講要). 1991

89. 成田武四: 落葉病. 北海道農作物病害総覧 1980 北海道編. pp 243-247. 北海道植物防疫協会, 札幌. 1980

90. 成田武四, 赤井純, 坪木和男: アズキ落葉病とその病原菌. 植物防疫 **25**: 353-358. 1971

91. 根岸秀明, 小林喜六: アズキ落葉病の発病に及ぼすダイズシストセンチュウの影響. 日植病報 **50**: 500-506. 1984

92. 根岸秀明, 小林喜六: アズキ落葉病発病圃場に発生したダイズ落葉病について. 日植病報 **51**: 106 (講要). 1985

93. 根井正利: 分子進化遺伝学(五條堀孝, 斎藤成也 共訳, 根井正利 監訳, 改訂). 433 pp. 培風館, 東京. 1990

94. NEWTON, A. C., CATEN, C. E. and JOHNSON, R.: Variation for isozymes and double-stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts. *Plant Path.* **34**: 235-247. 1985

95. NISHIMURA, S.: Host-specific toxins from *Alternaria alternata*, problems and prospects. *Proc. Japan Acad.* **56(B)**: 362-366. 1980

96. NYGAARD, S. L., ELLIOTT, C. K., CANNON, S. J. and MAXWELL, D. P.: Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma*. *Phytopathology* **79**: 773-780. 1989

97. 大羽滋: UP BIOLOGY 集団の遺伝. pp 97-98. 東京大学出版会, 東京. 1977

98. 大泉久一: 朝日百科世界の植物 5 種子植物 V. p 1154. 朝日新聞社, 東京. 1979

99. PHILLIPS, D. V.: Variation in *Phialophora gregata*. *Plant Dis. Rep.* **57**: 1063-1065. 1973

100. REYNOLDS, M., WEINHOLD, A. R. and MORRIS, T. J.: Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. *Phytopathology* **73**: 903-906. 1983

101. 佐々木紘一: 北海道の豆作技術 —大豆編— (砂田喜与志 監修). pp 20-25. 農業技術普及協会, 江別. 1986

102. SHAW, C. R. and PRASAD, R.: Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochem. Genet.* **4**: 297-320. 1970

103. SHIPTON, W. A. and FLEISCHMANN, G.: Taxonomic significance of protein patterns of rust species and formae speciales obtained by disc electrophoresis. *Can. J. Bot.* **47**: 1351-1358. 1969

104. SILLS, G. R., GRITTON, E. T. and GRAU, C. R.: Differential reactions of soybean genotypes to isolates of *Phialophora gregata*. *Plant Dis.* **75**: 687-690. 1991

105. SNEATH, P. H. A. and SOKAL, R. R.: Numerical Taxonomy. 573 pp. W. H. Freeman & Company, San Francisco. 1973

106. STORCK, R.: Nucleotide composition of nucleic acids of fungi, II. Deoxyribonucleic acids. *J. Bacteriol.* **91**: 227-230. 1966

107. STORCK, R. and ALEXOPOULOS, C. J.: Deoxyribonucleic acid of fungi. *Bacteriol. Rev.* **34**: 126-154. 1970

108. STOUT, D. L. and SHAW, C. R.: Genetic distance among certain species of *Mucor*. *Mycologia* **66**: 969-977. 1974

109. SZECSI, A.: Kinetic complexity and repetitiveness of *Fusarium graminearum* nuclear DNA. *Exp. Mycol.* **5**: 323-329. 1981

110. 多賀正節, ELLINGBOE, A. H.: DNA レベルでのいもち病菌の類縁関係. 日植病報 **52**: 535 (講要). 1986

111. 田中一郎: 病害防除の著例. 病虫害雑誌 **20**: 299-301. 1933

112. 田中正武: 栽培植物の起源(NHK ブックス 245). pp 36-44. 日本放送出版協会, 東京. 1975

113. 舘野義男: 分子系統樹の作り方とその評価. 分子進化学入門 (木村資生 編). pp 164-184. 培風館, 東京. 1984

114. TAYLOR, J. W.: Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. *Exp. Mycol.* **10**: 259-269. 1986

115. TAYLOR, J. W., SMOLICH, B. D. and MAY, G.: Evolution and mitochondrial DNA in *Neurospora crassa*. *Evolution* **40**: 716-739. 1986

116. 土屋貞夫: Cephalosporium（アズキ落葉病菌とコムギ条斑病菌）総論. 北海道畑作物の土壌病害（宇井格生 監修). pp 185-195. 北海道畑作物の土壌病害刊行会, 札幌. 1983
117. TSUCHIYA, S., YANAGAWA, M. and OGOSHI, A.: Formae speciales differentiation of *Phytophthora vignae* isolates from cowpea and adzuki bean. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **52**: 577-584. 1986
118. 内田正俊: アズキ落葉病菌の生態に関する研究—落葉病菌の新系統といわれている一糸状菌分生胞子の in vitro の発芽について—. pp 5-6. 北海道大学大学院農学研究科修士論文. 1981
119. 宇田川俊一: 微生物分類学の新しい流れ. 8. かび. 化学と生物 **27**: 395-400. 1989
120. VILGALYS, R.: Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology* **78**: 698-702. 1988
121. WETMUR, J. G. and DAVIDSON, N.: Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* **31**: 349-370. 1968
122. WHITNEY, P. J., VAUGHN, J. G. and HEALE, J. B.: A disc electrophoretic study of the proteins of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy. *J. Exp. Bot.* **19**: 415-426. 1968
123. WILLMOT, D. B., NICKELL, C. D. and GRAY, L. E.: Physiologic specialization of *Phialophora gregata* on soybean. *Plant Dis.* **73**: 290-294. 1989
124. 山田和順: 組織化学（初学者のための基礎と実際). pp 492-501. 南江堂, 東京. 1987
125. 山川勉, 原正紀: 北海道の豆作技術—小豆・菜豆編—(後木利三 監修). p 18. 農業技術普及会, 江別. 1986
126. 山崎真司: 電気泳動パターン. 微生物の化学分類実験法（駒形和男 編). pp 184-209. 学会出版センター, 東京. 1982
127. YAMAZAKI, M., GOTO, S. and KOMAGATA, K.: Taxonomical studies of the genus *Tilletiopsis* on physiological properties and electrophoretic comparison of enzymes. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **26**: 13-22. 1985
128. 柳田友道: 微生物科学 1. 分類・代謝・細胞生理. pp 51-74. 学会出版センター, 東京. 1980

Summary

The fungi causing brown stem rot of adzuki bean and soybean are the same morphology and have been indentified as *Phialophora gregata*. In this study, pathogenicity, culture characteristics and genetic relatedness of the two pathogens were investigated. Taxonomic status and genetic diversity of them are discussed.

I. Pathogenicity

1. The adzuki bean isolates were pathogenic to adzuki beans and mung beans, while the soybean ones were pathogenic to soybeans and mung beans. However, the two pathogens were not pathogenic to kidney bean, cowpea and pea.
2. Most of the adzuki bean isolates examined were pathogenic only to the susceptible cultivar (cv.) Takara-shozu. However, four other isolates were found to be pathogenic not only to Takara-shozu but also to the resistant cv. Maruba, and another isolate was also pathogenic even to the resistant cv. Hatsune-shozu. The Highly resistant cv. Akamame was not infected by all the isolates tested.

II. Culture characteristics

Differences were observed in culture characteristics between the isolates of the two pathogens. The color of the colonies differed on potato dextrose and V-8 juice media, being reddish-brown to red in the adzuki bean isolates and pale yellow to brownish-yellow in the soybean ones. The optimum temperatures for mycelial growth were 24-26℃ and 22-23℃ in the adzki bean and soybean isolates, respectively. The soybean isolates did not grow at 32℃, whereas the adzuki bean ones showed some growth.

III. Genetic relatedness

1. No differences were observed in electrophoretic patterns of both whole cell and soluble proteins among the isolates of the two pathogens.
2. The isolates of the two pathogens exhibited the same patterns in 11 out of 15 enzymes investigated. However, they could be distinguished by the four other zymograms (lactate dehydrogenase, peroxidase, α-esterase and acid phosphatase). Although coefficients of similarity were more than 80% and 94% within the adzuki bean isolates and the soybean ones,

respectively, they were lower (63-73%) between them. The results also indicated that the adzuki bean isolates could be subdivided into four groups, which correlated with their localities.

3. Although intraspecific divergence of GC content was 2.8 mole%, the GC content of the adzuki bean isolates (44.5-46.0 mole%) was lower than that of the soybean ones (46.2-47.3 mole%).
4. DNA base sequence homology values were more than 89% and 94% in the adzuki bean and soybean isolates, respectively, while lower values (65-72%) were observed between the two isolates.
5. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in *P. gregata* mitochondrial (mt) DNA were found in 17 out of 19 endonucleases, in which three groups were recognized: the adzuki bean isolates, soybean ones from Hokkaido (Type II) and soybean ones from Akita Prefecture (Type III). Genetic distance (nucleotide sequence divergence estimate: p value) was 0.046 between Type II and Type III, and 0.132 and 0.106-0.107 between the adzuki bean isolates and Type II and Type III, respectively.
6. Double-stranded (ds) RNAs were observed in some isolates of the adzuki bean pathogen, and their electrophoretic patterns were different between isolates from Sapporo and those from the south Kamikawa district. On the other hand, all the soybean isolates tested did not have dsRNAs.

IV. Taxonomic status and genetic diversity

1. The two pathogens are different in host specificity and some culture characteristics; and there is substantial genetic diversity between them. Accordingly, they should be treated as different formae speciales of the same species, and *Phialophora gregata* (Allington et Chamberlain) Gams ff. sp. *adzukicola* and *sojae* Kobayashi, Yamamoto, Negishi et Ogoshi are proposed for the adzuki bean and soybean pathogens, respectively.
2. Analyses based on molecular genetics indicate that the adzuki bean pathoghen is more diverse than the soybean one. The reason may be that the adzuki bean pathogen, having a longer history in Japan and being larger in population, has varied naturally and been adapted to more diverse environmental conditions than the soybean pathogen. The genetic diversity in the adzuki bean pathogen could correlate with localities and was largest in the Tokachi district. No RFLPs were found in mtDNA of the adzuki bean pathogen with one exception. Therefore, it is suggested that this pathogen might have originated in the Tokachi district, and that it later spread to Sapporo and the Kamikawa district. On the other hand, although the genetic diversity of the soybean pathogen was low at the nuclear DNA level, restriction patterns of mtDNA were different between isolates from Hokkaido and those from Akita Prefecture. The former is supposed to have been introduced from the U. S. A.