

Fusarium 菌

岐阜大学生命科学総合研究支援センター 須賀晴久

はじめに

Fusarium 属菌は植物病原菌として、またカビ毒（マイコトキシン）産生菌やヒトに日和見感染症を起こす菌としてよく知られた糸状菌である。分類学的には鎌形から円筒形で多隔壁の分生胞子をフィアロ型で産生する特徴をもつ不完全糸状菌の一属を示している。

Fusarium 属菌においては他の糸状菌同様、主に形態的特徴に基づいた種（形態学的種）による分類が永らく用いられてきたが、本属菌は形態的特徴に乏しいうえ、培養条件でその特徴が変動したり、また菌株間に変異性があるなど様々な問題があった。さらに、形態学的特徴をもとにした分類では種を明確に定義することが困難であり、*Fusarium* 属菌の分類は歴史的に混乱を極めている（青木, 1998）。主要な分類体系としては WOLLENWEBER, SNYDER and HANSEN, BOOTH などによるものが知られている（松尾, 1980）。一方、交配能に基づく種（生物学的種）は種の定義が明確であり、一部の *Fusarium* 属菌の分類に導入された（青木, 1998）。しかし、*Fusarium* 属菌には有性世代が不明なものも多く、また有性世代が知られているものでも交配能を喪失した株については種を同定できないという問題がある。また、交配能のデータだけでは種間の関係を明らかにできず、種の上位の階層的分類は不可能である。そこで近年 *Fusarium* 属菌では他の糸状菌同様、分子データから推定される系統樹に基づいた種（分子系統学的種）による分類が導入されはじめている（青木, 2001）。形態的特徴は培養条件によって変動することがあり、また、微妙な形態的差違の識別には経験を要することになる。しかし、分子データの場合はデータ取得のための技術を習得すれば、経験に頼ることはない。また、交配能は必ずしもすべての菌株で調べられるわけではないのに対し、分子データは調べたいすべての菌株で得ることができる。さらに、分子系統解析は種を超えたレベルにも適用できるため、種から上位

の階層的分類にも利用できる。したがって、分子系統学的種は特にその適用において形態学的種や生物学的種に優るものと考えられる。ただし、分子系統学的種の場合、種の定義についての問題が残されている。一般にはユニークな特徴を有する単系統の集団が種とされるが、厳密に系統樹のどこから先端の単系統を種とすべきなのかは明確ではない。この問題に対し、近年 TAYLOR et al. (2000) は Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) という分子系統における種のとらえ方を提唱した。別種の菌株間では理論上、交配が起きないためにゲノムの乗り換えはなく、遺伝子それぞれで作成される系統樹は一致する。これに対し、種内の菌株間では交配などにより各種遺伝子の系統樹は一致しなくなる。GCPSR ではこの考えに基づき、複数の遺伝子系統樹の比較で一致しなくなる点を種の境界と定めている。

I 塩基配列をもとにした分子系統解析で利用されるゲノム領域

分子系統解析では RFLP, RAPD, AFLP, DNA シーケンスなどで各菌株のゲノム情報が調べられ、その類似性をもとに進化的関係が推定される。分子系統解析で塩基配列をもとにする場合は、共通の祖先遺伝子から派生した機能的・進化的に等価な（つまりオーソログスな）遺伝子を標的にする。糸状菌では検出が容易なことや多様性が高いことから核 ribosomal DNA—internal transcribed spacer (rDNA—ITS) 領域がよく用いられている。しかし、*Gibberella fujikuroi* 種複合体（おおまかに WOLLENWEBER の分類体系における *Liseola* 節に対応）や *Fusarium oxysporum* 種複合体（おおまかに *Elegans* 節に対応）においては rDNA の ITS2 領域に基づく系統樹がミトコンドリアの small subunit rDNA や核 large subunit (28S) rDNA, β -tubuline の系統樹と一致しなかったことから、この領域を分子系統解析に使用すべきではない（O' DONNELL and CIGELNIK, 1997）。これは、それらの菌のゲノムに二つのタイプの ITS2（タイプ1—ITS2, タイプ2—ITS2）が、片方がメジャー、もう片方がマイ

表-1 塩基配列に基づく分子系統解析で用いられたプライマー

対象領域	プライマー名 ^{a)}	塩基配列	向き ^{b)}	解析された菌 ^{c)}	文献	
核 small subunit (18S) rDNA	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	F11	CTTCCCTATCAACTTTCGATG	F	<i>Fusarium</i> spp.	O' DONNELL, 1996	
	F21	CATCGAAAGTTGATAGGG AG	R	<i>Fusarium</i> spp.	O' DONNELL, 1996	
	NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	NS3	GCAAGTCTGGTCCAGCAGCC	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	F31	CGTAATGATTAATAGGGACAG	F	<i>Fusarium</i> spp.	O' DONNELL, 1996	
	F41	CTGTCCCTATTAATCAATTACG	R	<i>Fusarium</i> spp.	O' DONNELL, 1996	
	NS4	CTTCCGTC AATTCCCTTAAAG	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGGAAG	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	NS6	GCATCACAGACTGTTATTCGCTC	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	NS7	GAGGCAATAACAGTCTGTGTATGC	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	NS8	TCCGAGGTTCCACTACCGA	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	核 large subunit (28S) rDNA	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	F	<i>G. pulicaris</i>	O' DONNELL, 1992
		NL2	CTCTCTTTTCAATAAGCGGAGGAAAAG	R	<i>G. pulicaris</i>	O' DONNELL, 1992
		NL3	AGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAG	F	<i>G. pulicaris</i>	O' DONNELL, 1992
		NL4	GGTCCGTTTCAAGACGG	R	<i>G. pulicaris</i>	O' DONNELL, 1992
	核 rDNA - internal transcribed spacer	ITS5	GGAAGTAAAGTCTGTAACAAGG	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990
		ITS1	TCCGTAGGTGAACCTCGGG	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990
ITS2		GCTGCGTTCTTCATCGATCG	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
ITS3		GCATCGATGAAGAACGCAGC	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGCG	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
核 rDNA - intergenic spacer	CNL12 ^{d)}	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	F	<i>F. oxysporum</i>	APPEL and GORDON, 1996	
	GCNS7r	GTTGTAAAGAGCGCGGTGTCT	F	<i>G. fujikuroi</i> complex	SCHWEIGKOFLEDER et al., 2004	
	GCNS7f	GACACCGCGCCTCTTAACAAC	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	SCHWEIGKOFLEDER et al., 2004	
	U : 49-67	AATACAAGCACGCCGACAC	R	<i>F. oxysporum</i>	APPEL and GORDON, 1996	
	SCNS7	TACCCTATACCACCTAGTAGC	R	<i>F. virguliforme</i> , <i>F. tucumaniae</i> , <i>F. phaseoli</i>	AOKI et al., 2003	
	G5 - 2G ^{e)}	TGTGACKACCTACCCTACACC	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	SCHWEIGKOFLEDER et al., 2004	
	G5 - 4C ^{e)}	TGTGAYGACCTACCCTATACC	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	SCHWEIGKOFLEDER et al., 2004	
	G5 - A5 ^{e)}	TGTGACTRCCTACCCTATACC	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	SCHWEIGKOFLEDER et al., 2004	
	SCNS3	GGTCTGAAAGATCAGGTACG	R	<i>F. virguliforme</i> , <i>F. tucumaniae</i> , <i>F. phaseoli</i>	AOKI et al., 2003	
	GCNS3	CTGCAAAGCTGTACAGAGGG	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	SCHWEIGKOFLEDER et al., 2004	
GCNS5d	CACCTACCCTACACCACC	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	SCHWEIGKOFLEDER et al., 2004		
CNS1 ^{d)}	GAGACAAGCATATGACTACTG	R	<i>F. oxysporum</i>	APPEL and GORDON, 1996		
ミトコンドリア small subunit rDNA	MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	MS11	GCAGTACTTGAGGAGGAGAG	F	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
	MS21	CTCTCCTCCTCAAGTACTGC	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
ミトコンドリア large subunit rDNA	MS2	GCGGATTATCGAATTAATAAC	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	ML1	GTACTTTTGCATAATGGGTGACG	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	ML2	TATGTTTCGTAGAAAACAGC	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	ML3	GCTGTTTTCTACGAAAATATTAAG	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	ML4	GAGGATAATTTGCCGAGTTCC	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	ML5	CTCGGCAAAATATCCTCATAAG	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	ML6	CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	ML7	GACCCTATGCAGCTTCTACTG	F	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	ML8	TTATCCCTAGCGTAACTTTATC	R	wide variety of fungi	WHITE et al., 1990	
	β-tubuline	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	F	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997
		T10	ACGATAGGTTCACTCCAGAC	F	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997
		T41	GCGATGAGCACTTACGCACTG	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997
T11		AATTGGTGTGCTTTCTGGCA	F	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
T21		GGTTTGCCAGAAAGCAGCACC	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
T12		AACAAGTGGCCAAAGGGTCAAC	F	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
T2		TAGTGACCTTTGCCAGTTG	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
T224		GAGGGAACGACGGAGAAGGTGG	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
T121		CCACCTGTCTCCGTTTCCCGG	F	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
T222		GACCGGGAAACGGAGACAGG	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
T22		TCTGGATGTTGTTGGGAATCC	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	O' DONNELL and CIGELNIK, 1997	
Translation elongation factor 1 α		EF - 1 ⁰	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	F	<i>F. oxysporum</i>	O' DONNELL et al., 1998 b
		EF - 11 ⁰	GTGGGGCATTACCCCGCC	F	<i>F. oxysporum</i>	O' DONNELL et al., 1998 b
	EF - 21 ⁰	GAGTGGCGGGTAAATGCC	R	<i>F. oxysporum</i>	O' DONNELL et al., 1998 b	
	EF - 22 ⁰	AGGAACCCTTACCAGCTC	R	<i>F. oxysporum</i>	O' DONNELL et al., 1998 b	
	EF - 2 ⁰	GGARGTACCAGTSATCATGTT	R	<i>F. oxysporum</i>	O' DONNELL et al., 1998 b	
Putative reductase	RED1 ^{d)}	TCTCAGAAAGCGCATATATG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000	
	RED11 ^{d)}	CCRAAATTTAGTCTCCTTAC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000	
	RED21 ^{d)}	TGGCTCKGCCAATTCATGGC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000	
	RED2 ^{d)}	CGTAAGTCCGCTATCCGGC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000	

3-O-acetyltransferase	AT1 ^{e)}	AAAATGGCTTCAAGATACAGC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	AT6 ^{e)}	ATCCATAGCACCGTGTCTGCC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	AT3 ^{e)}	TTGATGCTCGACCGGCAATGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	AT4 ^{e)}	GTTGTGGTAGGTCATGTTTG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	AT2 ^{e)}	CRTAYTCCGCRARTTGGTCCA	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
Phosphate permease	PHO1 ^{e)}	ATCTCTCGCGCTGTATCATG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	PHO2 ^{e)}	GACGTCAAAGGTGAACGAGG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	PHO4 ^{e)}	GTGCTGGAAGAAGTCTCTCC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	PHO3 ^{e)}	TTCCAGCACTACAGCAAATGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	PHO6 ^{e)}	GATGTGGTTGTAAGCAAAGCCC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA1 ^{e)}	ATGAAGGTTGTTCTTGTGAGCCGGCGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
Ammonia ligase	URA3 ^{e)}	TTTGTCTCGATGACGGCGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA4 ^{e)}	CGTTCGTAGTTTCCAAGATC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA7 ^{e)}	ACAGACGCCATTCAGATTGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA6 ^{e)}	AATCCAACTCTGAATGCGCTC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA8 ^{e)}	CTCTCCATTGATAATAGGGAC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA10 ^{e)}	GCAATCTTTGTGATGGTAGCTTGATC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA11 ^{e)}	GAGTATGCCCGCAACGTCATG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA13 ^{e)}	TTCAAGCCAGGCACCGAGTGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA14 ^{e)}	ACTCGACACCTTGGTCAATCC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
	URA16 ^{e)}	AAITATCTCATCGAGACATCC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2000
Histone H3	H3-1a ^{h)}	ACTAAGCAGACCCGCCGAGG	F	<i>G. fujikuroi</i> complex	STEENKAMP et al., 1999
	H3F1 ⁱ⁾	TGGCAAGGCCCTCGCAAAGC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	H5F ⁱ⁾	GTGTCAAGAAGCCYACCCGC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	H5R ⁱ⁾	GAGATCRGACTTGAAGTCC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	H3R1 ⁱ⁾	TTGGACTGGATRGTAAACACGC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	H3-1b ^{h)}	GCGGGCAGCTGGATGTCTCT	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	STEENKAMP et al., 1999
	M13-2 ⁱ⁾	CGCTAGTTATCGCGTCTCCCTC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M13-4 ⁱ⁾	AGGCTGTTGGACACGGCGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
Mating type locus (MAT)	M13-1 ⁱ⁾	ATGCCTCTGAAGCCGAGGTCCC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M12-1 ⁱ⁾	ATGGATACCTCTTCAGTTTC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M12-6 ⁱ⁾	AAGCGTGTGGAAGCCTTCGCC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M12-3 ⁱ⁾	TCGGCCATCTGCTTGGATTGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M12-5 ⁱ⁾	ACAGTGTACTCAAGAAGACG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M12-4 ⁱ⁾	CACCGTTAGCTCTGCTTGAGG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M12-7 ⁱ⁾	CTCGACGTGTGCTTTCAGAGC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M12-2 ⁱ⁾	GATCATCCGGCTCCTCAGGGTC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M12-9 ⁱ⁾	CAAATAGCATTAGTAATACGTGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M11-8 ⁱ⁾	CTTGGCAACAACAGCCGAG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M11-1 ⁱ⁾	ATGAGTGACTACAAGGATCAAG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M11-6 ⁱ⁾	GAAGTCTCTCATCATCGAGG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M11-3 ⁱ⁾	CCTACTACTGAAGCTGTTCC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M11-5 ⁱ⁾	CTCTCGAGAATCTTGAGCAC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M11-7 ⁱ⁾	ATGGAGATCACCAGCGCTTGG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M11-2 ⁱ⁾	GTGGATCGCGACAGCCAAGTC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M11-9 ⁱ⁾	AAGTGAAGAATCAGAGCAACG	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M21-9 ⁱ⁾	CCAAAGTGGTTGCAAGCAGC	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M21-7 ⁱ⁾	GAGTAAGTTGTCTCAAGCTGG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M21-2 ⁱ⁾	TCAGACGTTGTTTYTGCTGAGC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M21-4 ⁱ⁾	GATGTAAGCGTTGGGAGGTCC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M21-5 ⁱ⁾	TTGGACGATGCTGGAACATGG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M21-4C ⁱ⁾	AACGCCATCTCTACATTCGC	F	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M21-3C ⁱ⁾	ACGCGAAAAGAAGTCCGCGGG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	M21-1 ⁱ⁾	ATGAGCACCCCTTATGTTGATG	R	<i>F. graminearum</i> complex	O' DONNELL et al., 2004
	α -Box in MAT1	Falpha1 ^{j)}	CGGTCAYGAGTATCTTCCCTG	F	<i>G. fujikuroi</i> complex
Falpha2 ^{j)}		GATGTAGATGGAGGGTTCAA	R	<i>G. fujikuroi</i> complex	STEENKAMP et al., 2000
HMG box in MAT2	FHMG11	TACCGYAAGGAGCGCTACC	F	Pyrenomyces, Discomycetes, Laculoascomycetes	ARIE et al., 2000
	FHMG12	TTYWYCTSATCSGSMKHWSCCTG	R	Pyrenomyces, Discomycetes, Laculoascomycetes	ARIE et al., 2000

a) 各領域におけるプライマーの位置にあわせて上から順に表示した。 b) FはForward, RはReverseを示す。 c) 引用文献において解析された菌。 d) APPEL and GORDON (1995) に由来するプライマー。 e) 同領域, 同じ向きで一部の塩基を異にするプライマー。 f) FUSARIUM-ID v.1.0 (GEISER et al., 2004) においても使用されているプライマー。 g) ウェブサイト (<http://www.cdl.umn.edu/scab/primers.html>) にて公開されているプライマー。 h) GLASS and DONALDSON (1995) に由来するプライマー。 i) 捕捉資料 (<http://nrri.ncaur.usda.gov/research/MGB-O'Donnell.html>) にて公開されているプライマー。 j) ARIE et al. (1999) に由来するプライマー。

ナーに存在しており、進化の途上でメジャーとマイナーのタイプの入れ替りが生じてきたためとされている。糸状菌の rDNA-ITS の解析には一般に WHITE et al. (1990) のユニバーサルプライマーが利用されており (表-1)、このユニバーサルプライマーで増幅した PCR 産物をダイレクトシーケンスすると、メジャーな ITS2 のみの塩基配列が得られることになる。その結果、本来ならタイプ 1 のみあるいはタイプ 2 のみ (つまりオーソログスなゲノム領域) を用いて系統樹を作成すべきところを、ある菌ではタイプ 1、ある菌ではタイプ 2 の配列 (つまりオーソログスではないゲノム領域) を用いて系統樹を作成することになってしまう。同様に、*Nectria haematococca* 種複合体 (おおまかに *Martiella* 節に対応) では β -tubuline のパラログ (ゲノム中に複数のホモログス領域) が報告されていることから (O' DONNELL, 1996 ; O' DONNELL and CIGELNIK, 1997)、この種複合体の分子系統学的解析では β -tubuline を使用すべきではない。*Gibberella fujikuroi* 種複合体の場合、ITS2 だけでなく、他の領域の系統樹を作成して比較したことにより、ITS2 に基づく分子系統解析の結果がゲノム全体の進化を反映していないことが判明した (O' DONNELL and CIGELNIK, 1997)。また、遺伝子によっては特殊な選択圧などによりゲノムの全体の進化と異なる特殊な進化を経ている可能性もある。*Fusarium graminearum* 種複合体 (以下で述べるところの Group 2 に相当) のトリコテセン系マイコトキシン産生に關与する主要遺伝子クラスターは、ゲノム全体の進化とは大きく異なる進化をしてきたことが示されている (WARD et al., 2002)。菌の分子系統解析ではゲノム全体の進化を反映させるために、特殊な選択圧のかかっていないハウスキーピング遺伝子を複数用いることが適当と考える。これまで *Fusarium* 属菌の分子系統解析では、核 large subunit (28S) rDNA、核 small subunit (18S) rDNA、核 rDNA-ITS、核 rDNA-intergenic spacer (IGS)、 β -tubuline、translation elongation factor 1 α (TEF1 α)、ミトコンドリアの small subunit rDNA、histone H3 などの塩基配列が用いられてきた。これまで分子系統解析のための PCR およびシーケンスに利用されてきた主なプライマーを表-1 にまとめた。

II 形態学的種、生物学的種と分子系統学的種の関係

これまで *Fusarium* 属菌の分類における分子系統解析

は形態学的種、生物学的種を検証する目的で用いられてきた。*Gibberella fujikuroi* 種複合体と *N. haematococca* 種複合体において明らかにされていた交配群 (生物学的種) は、分子系統的にもそれぞれ明確に異なるクラスターを形成した (O' DONNELL et al., 1998 a ; O' DONNELL, 2000 ; SUGA et al., 2000)。また、それらの独自性は pulsed field gel electrophoresis による核型解析からも裏付けられている (XU et al., 1995 ; SUGA et al., 2002)。現在、*N. haematococca* 種複合体の交配群はそれぞれが種とはされていないが、*G. fujikuroi* 種複合体においては交配群ごとにそれぞれが種とされている (SAMUELS et al., 2001)。また、厚膜胞子を産生しないグループとして *Liseola* 節が設けられているが、分子系統解析の結果は厚膜胞子産生は原始的形質の一つであり、*G. fujikuroi* 種複合体の進化の過程で複数回にわたって独立に失われた形質であることを示した (O' DONNELL et al., 1998 a)。これは、*Liseola* 節が進化系統に基づく分類単位ではなく、人為的な分類単位であることを意味する (O' DONNELL et al., 1998 a)。形態的特徴に基づく分類ではどの特徴を基準とすべきか、その重要性の解釈をめぐって様々な分類体系が主観的に提案されることになる。分子系統解析は形態的特徴と進化系統との関係を明確にすることで、その重要性の解釈に客観性を与えることができる。

Fusarium redolens Wollenweb. は形態的類似性から SNYDER and HANSEN の分類体系において *F. oxysporum* とされた。しかし、分子系統学的解析により *F. oxysporum* 種複合体の姉妹群でもない (つまり *F. oxysporum* 種複合体に最も近縁な群ではない) ことが示されたことで、現在は別種とするのが妥当と考えられている (BAAYEN et al., 2001 ; O' DONNELL et al., 1998 a)。さらに、ギボウシに病原性を有する菌群は *F. oxysporum* の形態的特徴をもつものの、分子系統学的解析で *F. oxysporum* より *F. redolens* に近縁であることが示されたことにより新種の *Fusarium hostae* とされた (BAAYEN et al., 2001 ; GEISERET al., 2001)。*Fusarium graminearum* Schwabe にはホモタリックに子囊殻の形成が認められないものと認められるものがあることが知られ、それぞれ Group 1、Group 2 と呼ばれていた。AOKI and O' DONNELL (1999) は詳細な形態学的観察に加え、 β -tubuline の塩基配列を用いた分子系統解析によりそれらが明確に異なる群であることを明らかにし、それぞれを *Fusarium pseudograminearum* (Group 1 に相当)、*Fusarium graminearum* (Group 2 に相当) とした。さらに、*F. graminearum* は世界各地で

分離された菌株の分子系統解析により、少なくとも九つの種で構成される種複合体であることが明らかにされた (O' DONNELL et al., 2000 ; O' DONNELL et al., 2004)。*Fusarium graminearum* はホモトリック菌としてよく知られた菌であるが、近年の研究によればホモトリックであると同時にヘテロトリックでもある (つまり他菌株間の交配も可能である) (BOWDEN and LESLIE 1999)。*Fusarium graminearum* 種複合体内の *F. graminearum* (狭義の *F. graminearum* : 第7系統に相当) と *F. asiaticum* (第6系統に相当) の間では実験環境下で交配が可能であることが確認されている (JURGENSON et al., 2002)。また、O' DONNELL et al. (2000) は *F. meridionale* (第2系統に相当) と *F. asiaticum* のハイブリッドと考えられる株も検出している。したがって、*F. graminearum* 種複合体においては、種間の交配能が維持されているが、地理的隔離など何らかの要因により種間のランダム交配が比較的制限されており、したがって、それぞれの種がゲノムレベルで明確に異なる状態にあるものと考えられる。

III 宿主特異的病原性に基づく分類と分子系統解析

Fusarium 属菌には *F. solani* 種複合体や *F. oxysporum* 種複合体のように種内に特定の植物種のみ寄生性を有する菌群が存在することがあり、種はその特異性に基づいて分化型 (forma specialis) に細分化される。このような細分化そのものが、「分化型は単一祖先を起源とする集団である (言い換えると分子系統樹において単系統)」との考えを抱かせる (SUGA and HYAKUMACHI, 2004)。実際、*F. solani* 種複合体の一部の分化型 (ないしレース) はそれぞれが交配群を形成しており、分子系統学的にも単系統となっている (ただし、MP VI は f. sp. *psii* (エンドウを宿主とする) に相当するとされるが、ヒヨコマメなどエンドウ以外の植物種に病原性を有するものも含んでおり、厳密には分化型と交配群を同一視することはできないので注意を要する) (O' DONNELL, 2000 ; SUGA et al., 2000)。一方、*Fusarium oxysporum* Schlechtend. : Fr. の分子系統樹解析では、「分化型は単一祖先を起源とする集団である」との考えについて検証の必要があることを示す結果が得られている。*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* や f. sp. *melonis* などは、分化型内の菌株よりむしろ別の分化型の菌株に近縁性を示す菌株が存在している (O' DONNELL et al., 1998 b)。*Fusarium solani* 種複合体

には有性世代が認められているもの (*N. haematococca* 種複合体) と認められていないものがある。有性世代が認められていないものの中には、インゲン根腐病菌の f. sp. *phaseoli* とダイズ急性枯死症の原因菌の f. sp. *glycines* が知られる。ダイズ急性枯死症に関係する *F. solani* 菌としては当初、大型分生胞子産生タイプの Form A と小型分生胞子産生タイプの Form B が報告されたが (ABNEY et al., 1993)、現在では病原性が確認された Form A のみが f. sp. *glycines* とされている (ROY, 1997)。*Fusarium solani* f. sp. *glycines* の rDNA-ITS の塩基配列は ITS2 領域の1塩基挿入を除いて、f. sp. *phaseoli* と一致したため (O' DONNELL and GRAY, 1995)、f. sp. *glycines* と f. sp. *phaseoli* は同一視されることがあった。しかし、f. sp. *glycines* と f. sp. *phaseoli* の病原性が明確に異なることが示されている (ROY, 1997)。近年青木らは、これらについて形態を詳しく観察するとともに rDNA-ITS 以外の領域を加えた分子系統解析を行った。その結果、f. sp. *glycines* 内に3種、f. sp. *phaseoli* 内に2種を認め、f. sp. *phaseoli* と f. sp. *glycines* は互いに単系統の関係にはないことから宿主特異性に基づく分化型の分類体系を改めることを提唱している (AOKI et al., 2003 ; AOKI et al., 2005)。*Fusarium* 属菌において、分化型が単系統ではないということは必ずしもすべての分化型で示されているわけではないが、分化型が単一祖先を起源とする集団であるかどうかは分子系統解析で検証する必要があるものとする。ここで検証するに当たっては、解析にどのような菌を用いるかが重要となる。分化型内の菌株よりむしろ別の分化型の菌株に遺伝的近縁性をもつ菌株が存在したとしても、もともとそのような菌が解析に入っていなかった場合は、分化型は分子系統樹において単系統となり、したがって「分化型は単一祖先を起源とする集団である」との誤った結論を導く危険性がある。分化型の単系統性を検証する際は可能な限り多くの分化型、多くの菌株数を用いることが重要と考える。

IV 分子生物学的手法による種の同定

分子系統解析はこれまでの形態的種、生物学的種、分化型による分類の進化系統上の妥当性を検証する目的に用いられてきた。一方、*F. graminearum* の研究では少なくとも9種からなる種複合体であることが分子系統解析により先に示され、それらの間に形態的の違いがあるかどうか調べられた (O' DONNELL et al., 2004 ; 青木, 2005)。その結果、9種すべてが形態的に識別できるわ

けではなかった。O'DONNELL et al. (2004) は、それぞれの種の特徴として分子系統解析で用いた各種遺伝子の塩基配列中に見られた特異的塩基を記載している。近年ではDNAのデータベースが微生物の種の同定に役立てられている。各種解析で得られた塩基配列の情報は一般に調べた菌の種名情報などとともにDDBJ/EMBL/GenBank国際塩基配列データベースに登録される。新たに分離した菌の種を同定する場合、まず、各種遺伝子の塩基配列が調べられ、BLAST検索を使ってデータベース中から類似の配列が探し出される。このように国際塩基配列データベースを種の同定に役立てることが微生物で一般化しつつあるが、データベース中には同定の間違いによって誤った種名が登録されている問題が指摘されている。また、命名規約上のタイプ(基準標本、あるいはその由来菌株)のデータが必ずしも登録されているわけではない。そこで、GEISER et al. (2004) はTEF1 α の部分配列をもとに*Fusarium*属菌の種を同定するためのDNAデータベース(FUSARIUM-ID v.1.0: <http://fusarium.cbio.psu.edu/>)を構築した。ただし、このデータベースは運用が始まったばかりであり、*Fusarium*属菌全体について種の同定に利用できるまでには今後改良が必要と考える。菌の種同定に利用するにはそれぞれの種の典型的菌株に基づく代表的配列だけでなく、それぞれの種内における変異の程度を明らかにしておくことが必要であり、塩基配列の情報を豊富に蓄積していくことが求められる。また、Geiser et al. (2004) はTEF1 α 以外の遺伝子に解析対象を広げていく必要性も指摘している。

おわりに

これまで歴史的に混乱を極めてきた*Fusarium*属菌の分類は、分子系統解析により進化を反映させた新たな分類へと変遷しつつあり、今しばらくは種名とそれが示す菌群の実体の把握に苦勞させられそうである。ただ、分子系統的解析は分類、同定において用いるべき重要な形態的特徴を明らかにしていくことが期待される。また、DNAデータベースの充実や分子データに基づく診断技術の向上は、分離菌の種同定を迅速で確実なものにしていくことが期待される。それらが整っていない現在、*Fusarium*属菌における分子系統的解析は種数を増加させ、かえって種同定を困難にしていると見なされることも多い。しかし、形態学的種、生物学的種、分子系統学的種の考えかたを協調的に導入することにより

*Fusarium*属菌における分類の混乱は少しづつ収束に向けられるものと考えられる。

本稿の執筆に当たっては農業生物資源研究所の青木孝之氏、岐阜大学の百町満朗氏、景山幸二氏にご協力いただいた。記してお礼申し上げる。

引用文献

- 1) ABNEY, T. S. et al. (1993): *Mycologia* 85: 801 ~ 806.
- 2) 青木孝之 (1998): 土と微生物 52: 73 ~ 83.
- 3) ——— (2001): 日植病報 67: 235 ~ 247.
- 4) ——— (2005): *Mycotoxins* 55: 55 ~ 63.
- 5) AOKI, T. and K. O'DONNELL (1999): *ibid.* 91: 597 ~ 609.
- 6) ——— et al. (2003): *ibid.* 95: 660 ~ 684.
- 7) ——— et al. (2005): *Mycoscience in press.*
- 8) APPEL, D. J. and T. R. GORDON (1995): *Exp. Mycol.* 19: 120 ~ 128.
- 9) ——— . ——— (1996): *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 125 ~ 138.
- 10) ARIE, T. et al. (1999): *Mycoscience* 40: 311 ~ 314.
- 11) ——— et al. (2000): *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1330 ~ 1339.
- 12) BAAYEN, R. P. et al. (2001): *Phytopathology* 91: 1037 ~ 1044.
- 13) BOWDEN, R. L. and J. F. LESLIE (1999): *ibid.* 89: 182 ~ 188.
- 14) GEISER, D. M. et al. (2001): *Mycologia* 93: 670 ~ 678.
- 15) ——— et al. (2004): *Europ. J. Plant Path.* 110: 473 ~ 479.
- 16) GLASS, N. L. and G. C. DONALDSON (1995): *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1323 ~ 1330.
- 17) JURGENSON, J. E. et al. (2002): *Genetics* 160: 1451 ~ 1460.
- 18) 松尾卓見 (1980): フザリウム菌種の種類と同定(松尾卓見, 駒田 旦, 松田 明編), 作物のフザリウム病, 全国農村教育協会, 東京, p. 7 ~ 59.
- 19) O'DONNELL, K. (1992): *Curr. Genet.* 22: 213 ~ 220.
- 20) ——— (1996): *Sydowia* 48: 57 ~ 70.
- 21) ——— (2000): *Mycologia* 92: 919 ~ 938.
- 22) ——— and E. CIGELNIK (1997): *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103 ~ 116.
- 23) ——— and L. E. GRAY (1995): *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 709 ~ 716.
- 24) ——— et al. (1998 a): *Mycologia* 90: 465 ~ 493.
- 25) ——— et al. (1998 b): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2044 ~ 2049.
- 26) ——— et al. (2000): *ibid.* 97: 7905 ~ 7910.
- 27) ——— et al. (2004): *Fungal Genet. Biol.* 41: 600 ~ 623.
- 28) ROY, K. W. (1997): *Plant Dis.* 81: 259 ~ 266.
- 29) SAMUELS, G. J. et al. (2001): Perithecial species of *Fusarium* (SUMMERELL, B. A. et al. ed), *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium, APS Press, St. Paul, p. 1 ~ 14.
- 30) SCHWEIGKOFER, W. et al. (2004): *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3512 ~ 3520.
- 31) STEENKAMP, E. T. et al. (1999): *ibid.* 65: 3401 ~ 3406.
- 32) ——— et al. (2000): *ibid.* 66: 4378 ~ 4382.
- 33) SUGA, H. et al. (2000): *Mycol. Res.* 104: 1175 ~ 1183.
- 34) ——— and M. HYAKUMACHI (2004): Genomics of phytopathogenic *Fusarium* (ARORA, D. K. and G. G. KHACHATOURIANS, ed.), *Applied Mycology and Biotechnology* 4 (Fungal Genomics), Elsevier Science, Amsterdam, p. 161 ~ 189.
- 35) ——— et al. (2002): *Curr. Genet.* 41: 254 ~ 260.
- 36) TAYLOR, J. W. et al. (2000): *Fungal Genet. Biol.* 31: 21 ~ 32.
- 37) WARD, T. J. et al. (2002): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9278 ~ 9283.
- 38) WHITE, T. J. et al. (1990): Amplification and direct sequences of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics (INNIS, M. A. et al. Ed.), *PCR protocols (a guide to method and applications)*, Academic Press, San Diego, p. 315 ~ 322.
- 39) XU, J.-R. et al. (1995): *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 74 ~ 84.