

## 植物防疫基礎講座：植物病原菌の分子系統樹—そのシステムと見方—(3)

## 炭疽病菌

中央農業総合研究センター <sup>もり</sup>森 <sup>わき</sup>脇 <sup>じょう</sup>丈 <sup>じ</sup>治

## はじめに

炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) は1,000種を超える様々な植物の葉、葉柄、幼茎枝および花などに壊死斑、炭疽潰瘍、枝枯れを起こし、果実・種子を侵して腐敗させる重要病原菌である。SUTTON (1980; 1992) により、主に分生子と付着器の形状と大きさに重点を置き、菌叢の色調、菌核および厚壁胞子の有無、菌糸生育速度などの培養性状、さらに宿主特異性も考慮に入れて分類され、38種1変種8分化型が暫定的に認められている。しかしながら、*Colletotrichum* 属菌の重要な分類形質である分生子や付着器の形態は単純なため、種間での差異が必ずしも顕著ではなく、加えて種内でも分生子や付着器の形状や大きさが変異に富む。加えていまだに多くの種について、特に *C. gloeosporioides* や *C. graminicola* など宿主範囲の広い種や集合種については、SUTTON の基準に基づいた整理が十分に行われていないため、今後の再検討により独立種として分離される種が増える可能性がある。また、形態的に類似する複数の *Colletotrichum* 属菌が同一宿主植物に病原性を示す場合、原因菌の同定が困難な場合も多い。

近年、リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) による分子系統解析により多くの菌群において種など分類群間の類縁関係が明らかになり、分類の再整理が試みられている。*Colletotrichum* 属菌については SHERRIFF et al. (1994) が、rDNA スペーサー 2 (ITS2) 領域、28S rDNA D2 領域の塩基配列を用いた分子系統解析に基づき、同属菌を二つのグループに分け、両者は分生子発芽時に隔壁をつくるか否かで判別できることを明らかにした。また、SREENIVASAPRASAD et al. (1996) は18種の *Colletotrichum* 属菌において、約200塩基の ITS1 領域の50.3%のサイトで、ITS2 領域の12.4%のサイトで変異があると報告した。また、分子系統解析の結果、供試した18種が分生子の形態にほぼ関連した六つの系統群に類別されることを明らかにした。SHERRIFF et al. (1995) は、トウモロコシ由来の *C. graminicola* と、ソルガム、セイバンモロコシまたはツノアイアシ (以上、いずれもイネ科) 由来の *C. sublineolum* とが形態だけでなく、ITS2 塩基配列

についても異なることを確認した。BAILEY et al. (1996) はアオイ科植物由来 *Colletotrichum* 属菌の ITS2 および 28S rDNA D2 領域の塩基配列に基づいた分子系統解析を行い、ワタ属植物由来の *C. gloeosporioides* と、アメリカキンゴジカ、ハナアオイまたはハイアオイ (いずれもアオイ科) 由来の *C. orbiculare* の2種に分けられることを明らかにした。LATUNDE-DADA et al. (1996) は、ITS2 および 28S rDNA D2 領域の塩基配列と形態から、ササゲ由来の *Colletotrichum* 属菌は *C. lindemuthianum* ではなく、*C. destructivum* とすべきであるとした。このように多くの *Colletotrichum* 属菌の rDNA ITS 領域の解析が進み、分類に反映されつつある。しかし、日本産の *Colletotrichum* 属菌については、rDNA ITS 領域の塩基配列に基づく研究はいまだ行われていなかった。

そこで、筆者らは日本産 *Colletotrichum* 属菌について分子系統学的な解析を基に供試種の分類学的な再検討を行い、特に再分類を要する種についてはその形態的特徴を明らかにすることを目的に研究を進めている (MORIWAKI et al., 2002; 2003)。具体的にはまず、*Colletotrichum* 属菌 25種 236菌株を rDNA ITS1 領域の塩基配列に基づき、類別 (グルーピング) を試みた。次にその結果を踏まえ、各グループの代表菌株を用いて本属内の分子系統解析を試み、形態および病原性による既往の系統分類について評価を加え、*Colletotrichum* 属菌の系統関係を再検討した。また、上記のグルーピングにより明らかとなった本属の分類に関する問題点を指摘するとともに、その解決を進めている。ここでは、日本産 *Colletotrichum* 属菌の rDNA グルーピングにより想定された新たな種の枠組みとともに、しばしば問題となる *C. gloeosporioides* 群と *C. acutatum* との識別法について述べたい。

## I リボソーム RNA 遺伝子に基づくグループ化

日本産 *Colletotrichum* 属菌 236株の rDNA ITS1 領域は157~190塩基であった。この領域の塩基配列相同性が互いに96%以上を示す菌株を同一グループであると判断し (CANNON et al., 2000)、グループ分けを行った。その結果、供試した236菌株は形態による種を反映した20グループに類別され、これをリボソームグループ (RG) とした (表-1)。各RGは、既に日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録されている *Colletotrichum* 属菌種の塩基配列との一致により、種名が推察された。いくつもの株において DDBJ に登録された種名と一致し

rDNA Grouping and Phylogenetic Analysis of Japanese *Colletotrichum* Species. By Jouji MORIWAKI

(キーワード: *Colletotrichum* 属菌, rDNA, 分子系統解析, ITS-RFLP)

表-1 SUTTON に基づく種とリボソームグループから想定される新たな種の枠組み。数字はリボソームグループを表す

SUTTON に基づく種	リボソームグループ (RG) に基づく種	分生子の形態
<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	1
<i>C. coccodes</i>	<i>C. coccodes</i>	2
<i>C. destructivum</i>	<i>C. destructivum</i> group ( <i>C. higginsianum</i> , <i>C. linicola</i> , <i>C. fuscum</i> )	両端が尖る
<i>C. higginsianum</i>		
<i>C. linicola</i>		
<i>C. fuscum</i>		
<i>C. gloeosporioides</i> 群 ( <i>C. coffeanum</i> , <i>C. fragariae</i> , <i>C. musae</i> を含む)	<i>C. gloeosporioides</i> group1 ( <i>C. coffeanum</i> , <i>C. fragariae</i> , <i>C. musae</i> )	4
	<i>C. boninense</i>	5
	<i>C. gloeosporioides</i> group2	6
		両端が鈍頭
<i>C. orbiculare</i>	<i>C. orbiculare</i> group ( <i>C. trifolii</i> , <i>C. lindemuthianum</i> )	7
<i>C. trifolii</i>		
<i>C. lindemuthianum</i>		
<i>C. crassipes</i>	<i>C. crassipes</i>	8
<i>C. dematium</i>	<i>C. dematium</i> ?	9
<i>C. capsici</i>		
<i>C. circinans</i>	<i>C. dematium</i> ?	10
<i>C. dematium</i>	<i>C. dematium</i> ?	11
<i>C. truncatum</i>		
<i>C. dematium</i>	<i>C. dematium</i> ?	12
<i>C. truncatum</i>		
<i>C. trichellum</i>	<i>C. trichellum</i>	13
		両端が尖る
	<i>C. graminicola</i> group1	14
<i>C. graminicola</i>	<i>C. graminicola</i> group2	15
	<i>C. graminicola</i> group3	16
<i>C. sublineolium</i>	<i>C. sublineolium</i>	17
<i>C. falcatum</i>	<i>C. falcatum</i>	18
<i>C. caudatum</i>	<i>C. caudatum</i>	19
<i>C. theae-sinensis</i>	<i>C. theae-sinensis</i>	20
		小型で両端が尖る

ない場合があり、誤同定ないしは同属菌の種の枠組みが不明確なためであると考えられた。形態観察および分子生物学的解析を行い、それら両特性による種の再定義が必要である。各 RG はそれぞれ以下のものであった。

#### RG1 *C. acutatum*

多犯性菌。*C. gloeosporioides* とは明確に識別された。赤色色素を産生する株と産生しない株があり, BAXTER et al. (1983) は赤色色素産生系統を *C. acutatum* f. sp.

*chromogenum* としたが, 両者の ITS1 塩基配列は一致し, 同種内に病原分化型以外の下位分類群を設けることは適当ではないと考えられた。

#### RG2 *C. coccodes*

ナス科植物炭疽病菌。インゲンマメから分離された菌株を含む。培地上で菌核を多量に形成する

#### RG3 *C. destructivum*, *C. higginsianum*, *C. linicola*, *C. fuscum*

アルファルファやシロクロバナなどのマメ科植物炭疽病菌 (*C. destructivum*) は, アブラナ科植物炭疽病菌 (*C. higginsianum*), アマ炭疽病菌 (*C. linicola*), ネメシア炭疽病菌 (*C. fuscum*) と同じ RG3 となった。分生子は4種ともに, 真直~やや曲がり, 両端が細く, ほぼ形態的に一致しており, 同一種の可能性が考えられた。しかしながら, SREENIVASAPRASAD et al. (1996) は ITS1 塩基配列相同性により *C. fuscum* 分離株が *C. gloeosporioides* と一致したと報告している。*C. fuscum* については, タイプ由来株もしくはそれに準じた株による再検討が必要である。

RG1~3 に属する *Colletotrichum* 属菌は, ほぼ真直で両端が尖る紡錘形分生子を形成する。

#### RG4 *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. fragariae*, *C. coffeanum*

円筒形~長楕円形の分生子を形成し, 典型的な *C. gloeosporioides* と考えられた。また, バナナ炭疽病菌 (*C. musae*) やイチゴ炭疽病菌 (*C. fragariae*), コーヒーノキ炭疽病菌 (*C. coffeanum*) も同一の RG であった。

#### RG5 *C. boninense*

幅広で円筒形, 基部に突起がある分生子を形成することが特徴的であり, 新種として命名記載した (MORIWAKI et al., 2003)。*C. boninense* は, 部分的に広義の *C. gloeosporioides* (von ARX, 1957; SUTTON, 1992) の範疇に含まれるが, 菌叢の色調や分生子の形態が *C. gloeosporioides* としては特異的であった。*C. gloeosporioides* の菌叢が灰白色から暗灰色であるのに対して, *C. boninense* はクリーム色から橙色である。*C. boninense* の分生子の大きさは  $13 \sim 15.5 \times 5 \sim 6 \mu\text{m}$  であり, *C. gloeosporioides* の記載値 ( $12 \sim 17 \times 3.5 \sim 6 \mu\text{m}$ ; SUTTON, 1992) と重複していたが, 基部に突起をもち, 幅広 (1/b 比 2~3) であることが異なっている。菌糸は  $10 \sim 36^\circ\text{C}$  で生育し, 適温は  $25^\circ\text{C}$  で, *C. gloeosporioides* よりもやや低い。生育適温での菌糸生育速度は  $5.2 \sim 6.1 \text{ mm/day}$  であり, *C. gloeosporioides* よりも遅い。ベンゾイミダゾール系薬剤耐性は *C. gloeosporioides* と比べてやや感受性が低いが, *C. acutatum* よりは感受性が高い。ジエトフェンカルブには感受性を示さない (佐藤, 1997)。

#### RG6 *C. gloeosporioides* group2

PDA 平板上で長楕円形の分生子と子嚢胞子を形成し, 形態的には *C. gloeosporioides* の範囲に入るが, 遺伝的に異なる。より詳細な形態観察, 分子系統解析および病原

性の調査が必要である。

#### RG7 *C. orbiculare*, *C. trifolii*, *C. lindemuthianum*

ウリ科植物炭疽病菌 (*C. orbiculare*), マメ科植物炭疽病菌 (*C. trifolii*), インゲンマメ炭疽病菌 (*C. lindemuthianum*) は, *C. gloeosporioides* に比べて菌糸生育速度が遅いことと (SUTTON, 1992), 発芽時に分生子が2細胞にならない (SHERRIFF et al., 1994) ことから識別が可能である。

#### RG8 *C. crassipes*

アオキ炭疽病菌。大型 (30 ~ 40  $\mu\text{m}$ ) で円筒形の分生子を形成する。

これら RG4 ~ 8 の *Colletotrichum* 属菌は, 真直で両端が円い分生子を形成する。

#### RG9 ~ 12 *C. dematium*, *C. circinans*, *C. truncatum*, *C. capsici*

鎌形の分生子を形成する広義の *C. dematium* (*C. truncatum*, *C. circinans*, *C. capsici* を含む; von ARX, 1957) は, RG9 ~ 12 の四つの RG に類別された。*C. dematium* および *C. capsici* は, どちらも鎌形分生子を形成し, 多犯性菌であるため宿主が重複しており, しばしば混同されてきた (SUTTON, 1992)。MORDUE (1971) は, *C. capsici* の形態的特徴として分生子層の基部に子座を有し付着器を鎖状に形成することを挙げ, また, トウガラシ属植物に強い病原性を示すとしている。それらの形質を有し, *C. capsici* と同定された8株の ITS1 領域塩基配列は SREENIVASAPARSAD et al. (1996) が *C. dematium* と同定したグループのものと一致した。これら2種の形態的な特性は重複しており, 両菌の形態的差異を明らかにするため, より多くの菌株を用いて再検討する必要がある。同様にネギ科植物炭疽病菌 (*C. circinans*), マメ科植物炭疽病菌 (*C. truncatum*) も形態による *C. dematium* との明瞭な識別は困難であった。

#### RG13 *C. trichellum*

キヅタ炭疽病菌。鈍鋸歯状の付着器を形成する。

以上の RG9 ~ 13 は, 新月形~鎌形の分生子を形成する *Colletotrichum* 属菌のうちイネ科植物由来株を除くグループである。

#### RG14 *C. graminicola* group1

トウモロコシ炭疽病菌。大型 (30 ~ 40  $\mu\text{m}$ ) で鎌形の分生子を形成する。

#### RG15 *C. graminicola* group2

エンバク, オーチャードグラスなど寒地型牧草 (C3植物) から分離された炭疽病菌。

#### RG16 *C. graminicola* group3

ヒエまたはメヒシバから分離された炭疽病菌。

#### RG17 *C. sublineolum*

ソルガム炭疽病菌。

#### RG18 *C. falcatum*

サトウキビ炭疽病菌。

#### RG19 *C. caudatum*

付属糸をもつ分生子を形成するイネ科植物炭疽病菌。

イネ科植物由来の *Colletotrichum* 属菌は RG14 ~ 19 の六つの RG に類別された。*C. graminicola* は RG14 ~ 16 に類別された。RG14 はトウモロコシ由来株, イネ科 C3 植物由来株はすべて RG15 としてまとめ, RG16 はメヒシバもしくはヒエ由来菌株のグループである。SUTTON (1980) は, *C. graminicola* の記載はトウモロコシおよびヒエ分離株でなされているが, 現存するタイプ標本はトウモロコシ由来であり, *C. graminicola* はトウモロコシ由来株のみに適用すべきであるとしている。筆者の結果では, 原記載の基となったトウモロコシ由来株は, ヒエ由来株とは別種である可能性がある。また, イネ科 C3 植物由来株も独立種として扱うほうが適切と考えられた。RG17 ~ 19 に属した株はそれぞれ *C. sublineolum*, *C. falcatum* および *C. caudatum* と一致し, 形態も各 RG と一致した (SUTTON, 1980; 1992)。分子系統解析の結果, イネ科 C4 植物由来である RG14, 16 ~ 19 と C3 植物由来 RG15 は単系統群を形成した (図-1)。これはイネ科植物炭疽病菌が同一起源である可能性を示しているのと考えられた。

#### RG20 *C. theae-sinensis*

チャ炭疽病菌。小型 (4 ~ 6  $\mu\text{m}$ ) の分生子を形成する。ITS1 領域の塩基配列相同性は他の *Colletotrichum* 属菌とは約 70 ~ 76% で極端に低く, 対照として用いた *Pyricularia grisea* とは 84 ~ 89% であった。転属も含めた再検討が必要であろう。

## II 分子系統解析

日本産 *Colletotrichum* 属菌の分子系統解析の結果, 分生子形態の異なる三つの分子系統群 (Phylogenetic Group: PG) に類別することができた。*Colletotrichum* 属菌の ITS2, D2 塩基配列に基づいた分子系統解析の結果得られた近隣結合法による系統樹 (NJ 樹, 図-1) および最大節約法による系統樹 (MP 樹) の樹形は, 互いにはほぼ一致した。NJ 樹および MP 樹のどちらにおいても, 三つの PG に類別された。PG1 (RG1 ~ 3, 9 ~ 19) は両端が尖る分生子を, PG2 (RG4 ~ 8) は両端が鈍頭の分生子を, PG3 (RG20) は小型の分生子を形成する種で構成されていた。また, *C. theae-sinensis* を除く *Colletotrichum* 属菌は単系統群となり, 100% ブーツストラップ値で支持された (図-1)。しかしながら, 残りの *Colletotrichum* 属菌群の枝のブーツストラップ値はあまり高くなく, それ以上の解釈は難しかった。

*Colletotrichum* 属菌では ITS 領域を含む rDNA 塩基配列だけが解析されている。 $\beta$ -tubulin や translation elongation factor (TEF) など別の遺伝子領域も解析することにより, より客観的な系統関係を明らかにすることができるであろう。

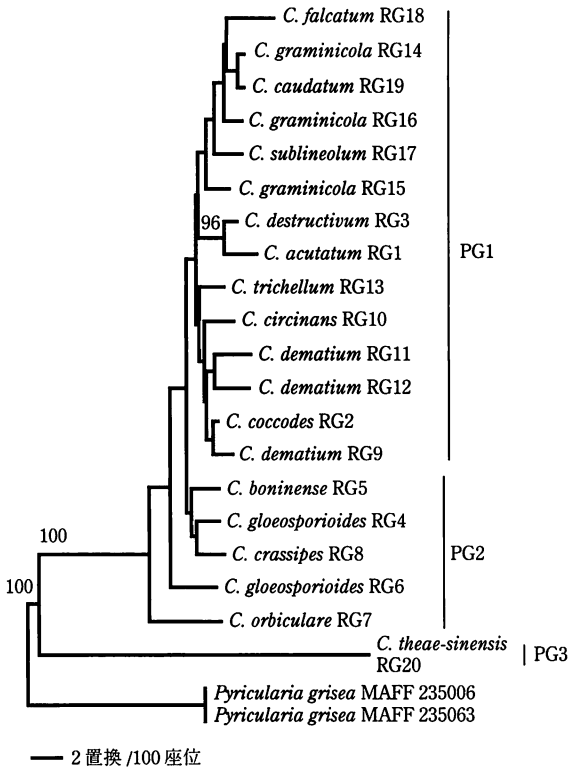


図-1 *Colletotrichum* 属菌の ITS2 および 28S rDNA D2 領域に基づく近隣結合法による分子系統樹  
枝上の数字はブーツストラップ値 (%) の 90% 以上の値を表す。

### III *C. gloeosporioides* 群と *C. acutatum* との ITS-RFLP 法による識別

多犯性種である *C. gloeosporioides* と *C. acutatum* は、それぞれイチゴ、カキ、ビワ、リンゴ、モモ、セイヨウナシ、ブドウ、マンゴー、パンレイシ等に炭疽病を引き起こし、しばしば誤同定される。両種は分生子・付着器形態や菌叢色調が異なるとされているが、*C. acutatum* の中には菌叢が赤色を帯びず、また典型的な紡錘型の分生子をつくらぬ株が存在し、形態だけでは両種の識別は困難な場合がある。ベンゾイミダゾール系薬剤に対する両種の感受性の違いについても、*C. gloeosporioides* のベンゾイミダゾール系薬剤中等度耐性菌が報告されており(矢野ら, 2004)、完全ではない。MILLS et al. (1992) により両種の rDNA ITS 領域の違いに基づいた種特異的プライマーが開発されている。ただ *C. gloeosporioides* は複合種であり、本来別種とされるべき種が含まれているために、これら種特異的プライマーを用いて PCR を行っても検出できない菌株がある。そこで ITS 領域の制限酵素断片長多型 (RFLP) により両種が識別できるか検討し、その有効性を明らかにした(表-2; 森脇ら, 1998; BUDDIE et al., 1999)。87 菌株の *C. gloeosporioides*

表-2 *C. gloeosporioides* 群と *C. acutatum* との制限酵素断片長

種名	制限酵素断片長 (bp)	
	<i>AluI</i>	<i>HhaI</i>
<i>C. gloeosporioides</i>	370, 190, 30	270, 185, 135
<i>C. gloeosporioides</i> group2	500, 100	280, 190, 130
<i>C. boninense</i>	280, 215, 60, 55, 20	285, 195, 150
<i>C. acutatum</i>	590	260, 185, 120, 25

(*C. gloeosporioides* group2 と *C. boninense* を含む) と 48 菌株の *C. acutatum* を供試し、WHITE et al. (1980) の二つのプライマー ITS1 (GCCGTAGGTGAACCTGCGG) および ITS4 (GCCTCCGCTTATTGATATGC) を使った PCR により、5.8S rDNA を含む ITS 領域を増幅した。サイクルパラメータは熱変性 95°C 30 秒間、アニーリング 55°C 30 秒間、DNA 伸長 72°C 1 分間を 1 サイクルとして、30 サイクル行った。この反応によりすべての供試菌株から約 600 塩基の PCR 産物が得られた。この PCR 産物の二つの制限酵素 *AluI* と *HhaI* による RFLP パターンにより識別が可能であった(表-2)。この方法は比較的簡便で安定性があり、*C. gloeosporioides* 群と *C. acutatum* の識別に有効である。

### おわりに

rDNA に基づいたグルーピングと分子系統解析により *Colletotrichum* 属菌の分類の新しい枠組みを示した。今後、各 RG の形態、培養特性、病原性、分子特性に関してさらに詳細に明らかにすることにより、*Colletotrichum* 属菌の分類は、系統を反映した、より明確な体系となると思われる。

### 引用文献

- 1) von ARX, J. A. (1957): *Phytopath. Z.* 29: 413 ~ 468.
- 2) BAILEY, J. A. et al. (1996): *Phytopathology* 86: 1076 ~ 1083.
- 3) BAXTER, A. P. et al. (1983): *S. Afr. J. Bot.* 2: 259 ~ 289.
- 4) BUDDIE, A. G. et al. (1999): *Mycol. Res.* 103: 385 ~ 394.
- 5) CANNON, P. F. et al. (2000): *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*, APS Press, St. Paul, p. 1 ~ 20.
- 6) LATUNDE-DADA A. O. et al. (1996): *Mycol. Res.* 100: 1133 ~ 1141.
- 7) MORDUE, J. E. M. (1971): *C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*: 317.
- 8) 森脇丈治ら (1998): *日植病報* 64: 603.
- 9) MORIWAKI, J. et al. (2002): *JGPP* 68: 307 ~ 320.
- 10) ——— (2003): *Mycoscience* 44: 47 ~ 53.
- 11) 佐藤豊三 (1997): *四国植防* 32: 1 ~ 19.
- 12) SHERRIFF, C. et al. (1994): *Exp. Mycol.* 18: 121 ~ 138.
- 13) ——— (1995): *Mycol. Res.* 99: 475 ~ 478.
- 14) SREENIVASAPRASAD, S. et al. (1996): *Genome* 39: 499 ~ 512.
- 15) SUTTON, B. C. (1980): *The Coelomycetes fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, p. 523 ~ 537.
- 16) ——— (1992): *Colletotrichum: biology, pathology and control*, CAB International, Wallingford, p. 1 ~ 26.
- 17) 矢野和孝ら (2004): *日植病報* 70: 314 ~ 319.
- 18) WHITE, T. J. et al. (1990): *PCR protocols, a guide to methods and applications*, Academic Press, New York, p. 315 ~ 322.