

国内産 *Corynespora cassiicola* 菌株の 寄生性と系統進化の解析

下元 祥史

高知県農業技術センター

[〒783-0023 高知県南国市廿枝 1100]

Analysis on parasitism and phylogeny of *Corynespora cassiicola* Japanese isolates

Yoshifumi SHIMOMOTO

Kochi Prefectural Agricultural Research Center

1. 目的

Corynespora cassiicola (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei は 100 種を超える *Corynespora* 属菌のタイプ種であり, Fungal Databases (<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/index.cfm>) によると, 300 種以上の植物に寄生し, 葉, 茎, 根等に障害を引き起こす.

近年, 日本では薬剤耐性株の出現等の理由により, キュウリ褐斑病, トマト褐色輪紋病など本病原菌による病害の発生が全国的に増加している (伊達ら, 2004a : 伊達ら, 2004b : 宮本ら, 2006 : 竹内ら, 2006). さらに, ピーマン黒枯病 (Shimomoto et al., 2008), サルビア斑点病 (Furukawa et al., 2008) など本病原菌による新たな病害の発生も報告され, 本病原菌による被害が様々な植物に拡大している.

国外では *C. cassiicola* の寄生性と分子系統に関する解析が行われ, 病害管理や抵抗性品種育成の基礎資料として活用されている (Cutrim and Silva, 2003; Dixon et al., 2009; Onesirosan et al., 1974; Pereira et al., 2003; Spencer and Walters, 1969). 一方, 国内の *C. cassiicola* については寄生性と分子系統に関する詳細な解析は, これまでのところ行われていない. そこで, 本研究では, 我が国での病害管理や抵抗性品種育成の基礎資料に供することを目的として, 様々な作物由来の *C. cassiicola* 菌株を供試して, 他作物に対する寄生性を解析するとともに, 分子系統解析を行った.

2. 材料および方法

1) 供試菌株

日本国内の 13 種作物から分離した 64 菌株を供試した. いずれの菌株も定法により単孢子分離後,

Potato dextrose agar (PDA) (DIFCO Laboratories, Sparks, MD) で保存した。なお、対照菌株としてアメリカ産およびオランダ産のキュウリ分離菌株ならびにインド産のトマト分離菌株を供試した (表 1)。

2) 接種試験

直径 9 cm のシャーレに分注した PDA に菌株を移植し、25°C、暗黒下で 10 日間培養して形成された分生子を滅菌水で 1.0×10^4 個/ml に調製後、直径 9.0 cm のポリエチレンポットに市販育苗培土 (土太郎：スミリン農産工業) を充填して栽培した本葉 6~9 葉期のピーマン (品種：京波)、本葉 3~5 葉期のナス (品種：千両 2 号)、本葉 4~7 葉期のトマト (品種：ハウス桃太郎)、本葉 3~5 葉期のキュウリ (品種：ZQ-7) および本葉 3~4 葉期のシソ (品種：青縮緬シソ) にハンドスプレーを用いて十分量を噴霧接種した。対照として同様の植物に滅菌水を散布する処理区を設けた。接種植物を 25°C、相対湿度 100% に設定した恒温室内で 2 日間管理後、 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ に設定したガラス室内で管理し、接種 7 日後に発病の有無を調査した。なお、発病は認められるが病斑の拡大が認められない場合については、発病部位を切り取り、メタノールで脱色後、コットンブルーで染色したのち、顕微鏡観察により植物組織内への菌糸の進入の有無を調査し、進入が認められない場合には過敏細胞死と判断した。各菌株を植物各 8 個体に接種した。

3) 分子系統解析

前項と同様に菌株を培養後、滅菌したスライドグラスを用いて菌叢をかき取ったのち、Luo et al. (2005) に従い全 DNA を抽出した。プライマーに tub-F1 (5'-CCTCCAAACCGGTCAATG-3') および tub-R2 (5'-CTGGGTCAACTCGGGGAC-3'), EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') および EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') (Carbone and Kohn, 1999), CAL-228F (5'-GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC-3') および CAL-737R (5'-CATCTTTCTGGCCATCATGG-3') (Carbone and Kohn, 1999) ならびに ACT-512F (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3') および ACT-783R (5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3') (Carbone and Kohn, 1999) を用いて、PCR により β -tubulin, Translation elongation factor 1- α (EF-1 α), calmodulin および actin 各遺伝子の部分塩基配列を増幅させた。

増幅産物を MonoFas DNA refining kit (GL Sciences, 東京) で精製後、PCR で使用したプライマーおよび BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いてシーケンシング反応を行ったのち、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を解析した。

Genetyx-Windows Ver. 6 (ゼネティックス, 東京) によりアライメント解析後、各遺伝子の塩基配列 (それぞれ 954 bp, 273 bp, 465-470 bp, 292-303 bp) を用いて ClustalW (DNA database of Japan : <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) により系統解析を行ったのち、TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) を用いて系統樹を作成した。さらに、4 遺伝子領域の配列を結合後、上記と同様に系統樹を作成した。なお、塩基置換推定法は Kimura (1980)

表1. *Corynespora cassiicola* 菌株の寄生性と分子系統

MAFF番号	菌株名	分離源植物	採集地	分離年	PG ^{a)}	MP ^{b)}
242443	ON3	シソ	高知県	2006	1	A
242445	S1	シソ	高知県	2004	1	A
242446	S2	シソ	高知県	2004	1	A
242448	SO2	シソ	高知県	2006	1	A
- ^{c)}	PC95010	シソ	大分県	1995	1	A
-	PC9810-2	シソ	愛知県	1998	1	A
305093	A-76	シソ	千葉県	1959	1	A
242433	CO1	キュウリ	高知県	2006	2	A
242434	CU1	キュウリ	高知県	2006	2	A
242435	CU2	キュウリ	高知県	2006	2	A
242438	K1	キュウリ	高知県	2006	2	A
242431	CC3-2	キュウリ	高知県	2005	2	A
-	1-1jppa	キュウリ	高知県	2004	2	A
-	KE1	キュウリ	愛媛県	2006	2	A
-	KE3	キュウリ	愛媛県	2006	2	A
-	02-C-ST-H1-2	キュウリ	岡山県	2002	2	A
-	C-KM2-11-2	キュウリ	岡山県	2000	2	A
306176	長野2	キュウリ	長野県	1988	2	A
-	1-5	キュウリ	徳島県	2006	2	A
-	4-3	キュウリ	徳島県	2006	2	A
-	MC1	キュウリ	宮崎県	2006	2	A
-	KS	キュウリ	島根県	- ^{d)}	2	A
-	KI1	キュウリ	岩手県	2007	2	A
-	KI5	キュウリ	岩手県	2007	2	A
-	CC041125	キュウリ	愛知県	2004	2	A
744073	CC-1	キュウリ	福岡県	2001	2	A
-	IbCor1481	キュウリ	茨城県	-	2	A
240444	MAFF240444	ニガウリ	岡山県	2007	2	A
-	MB	ニガウリ	宮崎県	2007	2	A
240443	- ^{d)}	パパイヤ	沖縄県	2007	7	A
305087	-	ダイズ	埼玉県	1945	7	A
305088	-	ダイズ	三重県	1950	7	A
240792	KHC5	アジサイ	神奈川県	2008	7	A
-	Nelumbo04	ハス	徳島県	2004	7	A
-	CBS162.60	キュウリ	オランダ	1957	8	A
-	ATCC64204	キュウリ	アメリカ	-	9	A

a) ピーマン, ナス, トマト, キュウリおよびシソに対する寄生性グループで, PG1はシソのみ, PG2はキュウリのみ, PG3はトマトのみ, PG4はナスのみ, PG5はピーマンのみ, PG6はピーマン, ナスおよびトマト, PG8はシソ以外の作物, PG9は全作物に対して寄生性を示し, PG7はいずれの作物に対しても寄生性を示さなかった.

b) β -tubulin, translation elongation factor 1- α , calmodulin, actin各遺伝子の部分塩基配列を結合して作成した系統樹のグループ.

c) MAFF番号なし.

d) 不明.

表1. (つづき)

MAFF番号	菌株名	分離源植物	採集地	分離年	PG	MP
242452	TTRC1-1	トマト	高知県	2005	3	B
-	02-T-NS1-3	トマト	岡山県	2002	3	B
-	02-T-TD18-3	トマト	岡山県	2002	3	B
-	KTO	トマト	鹿児島県	2007	3	B
-	GCC1	トマト	岐阜県	2001	3	B
-	GCC2	トマト	岐阜県	2001	3	B
-	MT1	トマト	宮崎県	2005	3	B
-	LC93009	トマト	大分県	1993	3	B
-	LC93020	トマト	大分県	1993	3	B
-	NBRC100170	トマト	栃木県	-	3	B
240205	Tokyo isolate	サルビア	東京都	2006	5	B
240206	Kanagawa isolate	サルビア	神奈川県	2006	5	B
-	ATCC26316	トマト	インド	-	6	B
-	ACC001	マンデビラ	愛知県	2007	7	B
242442	NRC2-1	ナス	高知県	2004	4	C
242440	N2	ナス	高知県	2006	4	C
242441	NK-C13	ナス	高知県	2006	4	C
241220	Shimane eggplant1	ナス	島根県	-	4	C
-	Kurashiki No.17	ナス	岡山県	1999	6	C
242444	PC1-2	ピーマン	高知県	2005	6	C
242451	T3	ピーマン	高知県	2006	6	C
242447	SN1	ピーマン	高知県	2006	6	C
242437	FN3	ピーマン	高知県	2006	6	C
242432	CN1	ピーマン	高知県	2006	6	C
242449	T1	ピーマン	高知県	2006	6	C
242450	T2	ピーマン	高知県	2006	6	C
-	TK	ピーマン	鹿児島県	2007	6	C
240207	Green pepper isolate	ピーマン	宮崎県	2005	6	C
242436	EN1	ナス	高知県	2005	6	C
242439	N1	ナス	高知県	2005	6	C
240496	-	プルメリア	沖縄県	2007	7	C

を用い、系統樹の外群には *C. smithii* NBRC 8162 株の当該遺伝子領域の塩基配列を用いた。

3. 結果

1) 接種試験

接種試験の結果、日本産菌株はシソ、キュウリ、トマト、ナス、ピーマンそれぞれに対してのみ寄生性を示した菌株、ナス、ピーマンおよびトマトに対して寄生性を示した菌株ならびにいずれの作物に対しても寄生性を示さなかった菌株の7つのグループ（それぞれPG1, PG2, PG3, PG4, PG5, PG6 および PG7）に分けられた。PG1, PG3, PG4 および PG5 にはそれぞれシソ、トマト、

ナスおよびサルビアから分離された菌株のみが属した。PG2 にはキュウリとニガウリ，PG6 にはピーマンとナス，PG7 にはパパイア，ダイズ，アジサイ，ハス，マンデビラおよびプルメリアから分離された菌株が属した。なお，インド産トマト分離菌株はピーマン，ナスおよびトマト (PG6) に，オランダ産キュウリ分離菌株はピーマン，ナス，トマトおよびキュウリ (PG8) に，アメリカ

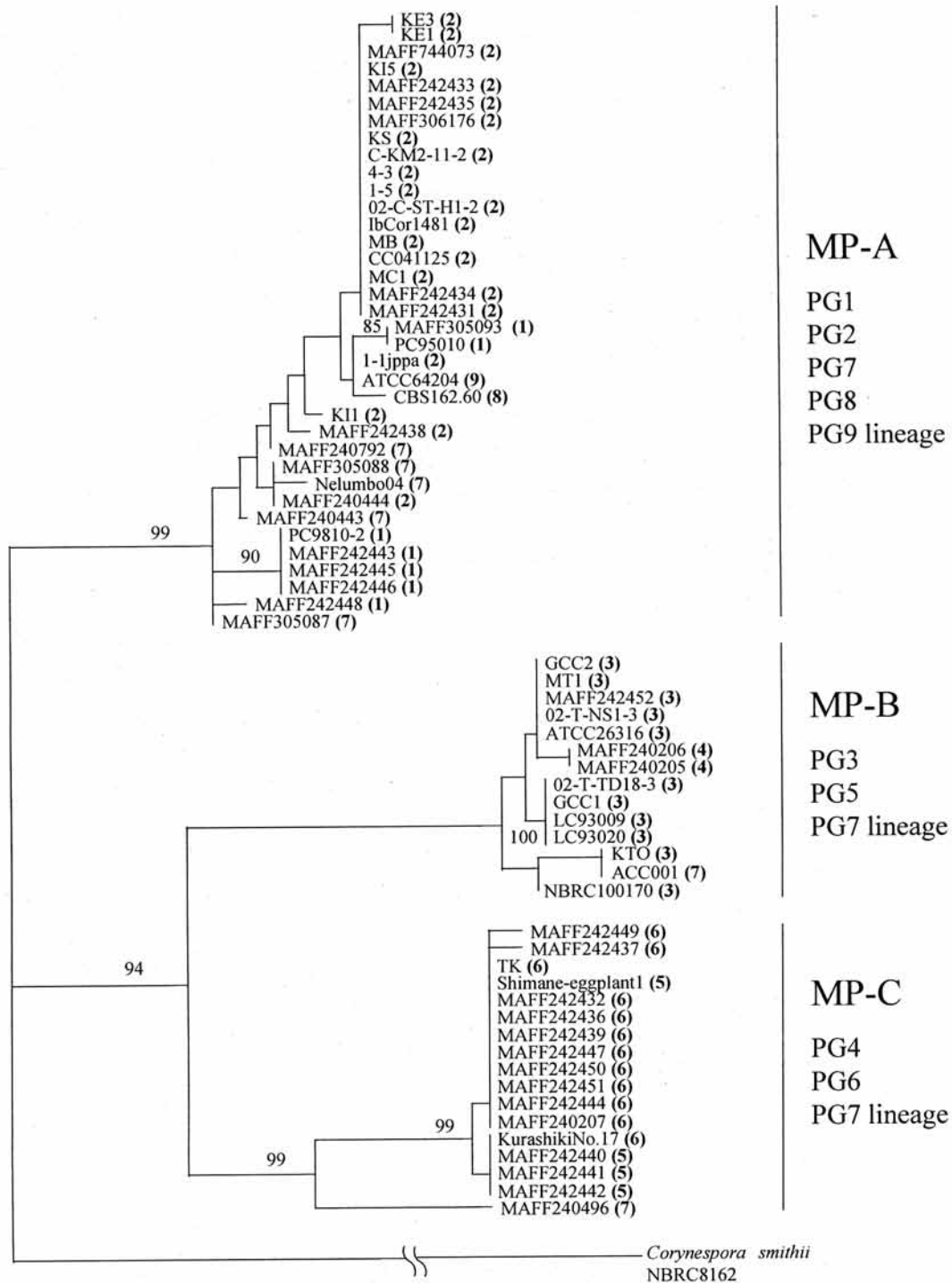


図 1. 日本産 *Corynespora cassiicola* 菌株の分子系統解析

β -tubulin, translation elongation factor 1- α , calmodulin および actin 各遺伝子の部分塩基配列を結合し，系統樹を作成した。枝上の数値はブーツストラップ値 (>80%) を示す。() は各菌株の属する寄生性グループ (PG)。

産キュウリ分離菌株は全作物 (PG9) に寄生性を示した (表 1).

2) 分子系統解析

β -tubulin, EF-1 α , calmodulin, actin 各遺伝子領域の部分塩基配列を用いて作成した系統樹はいずれも同様の傾向を示した (データ未掲載). そこで, 4 遺伝子領域の塩基配列を結合し, 系統樹を作成したところ, 供試菌株は 3 つのグループに分けられ (MP-A, MP-B および MP-C), それぞれの枝の信頼性は 94% および 99% と高かった. MP-A には PG1 と PG2 に属するすべての菌株および PG7 に属する菌株のうちパパイヤ, ダイズ, アジサイおよびハスから分離した菌株が属した. MP-B には PG3 と PG5 に属するすべての菌株と PG7 に属する菌株のうちマンデビラ分離菌株が属した. MP-C には PG4 と PG6 に属するすべての菌株と PG7 に属する菌株のうちプルメリア分離菌株が属した. なお, PG6 に属したインド産トマト分離菌株は MP-B に, PG8 に属したオランダ産キュウリ分離菌株, および PG9 に属したアメリカ産キュウリ分離菌株は, いずれも MP-A に属した (表 1, 図 1).

4. 所感

Dixson et al. (2009) はアメリカンサモア, ブラジル, マレーシアおよびアメリカでそれぞれ分離された *C. cassiicola* 菌株をバジル, インゲンマメ, ササゲ, キュウリ, パパイヤ, ダイズ, サツマイモおよびトマトに接種して寄生性を評価しており, トマト, キュウリおよびパパイヤから分離された菌株はトマトとキュウリに寄生性を示すと報告している. さらに, Onesirosan et al. (1974) はナイジェリアと北アメリカでそれぞれ分離された菌株をトマト, パパイヤ, キュウリ, ダイズ, ゴマ, ナス, ワタおよびササゲに接種して寄生性を評価しており, トマト分離菌株がトマトとナスに寄生性を示すと報告している. 一方, 本研究結果から明らかになった日本産菌株の寄生性を国外産菌株と比較すると, PG6 の菌株を除き, 宿主特異性が高かったことから, 伝染環は比較的単純である可能性が示唆され, この結果は, 病害管理上, 有用な知見であると考えられた. また, *C. cassiicola* は宿主特異的毒素 (HST) を生産するが (Barthe et al., 2007; de Lamotte et al., 2007; Onesirosan et al., 1975), これまで, 品種レベルで特異性を示す HST が介在する病害では, 果樹を除いて容易に抵抗性品種が育成されているが, 種や科レベルの特異性を示す HST が介在する病害では, 抵抗性品種を見出すのは非常に困難であることが予想される (尾谷, 2008). 本研究結果より, PG6 に属する菌株に関しては, その寄生性は少なくとも属レベルに及んでおり, 抵抗性品種の育成は容易ではないと考えられた.

分子系統解析の結果, MP-A には PG1 と PG2, MP-B には PG3 と PG5, および MP-C には PG4 と PG6 の菌株が属したことから, 国内産 *C. cassiicola* 菌株の寄生性と分子系統解析の結果には一定の相関が認められた. さらに, 接種試験ならびに rDNA-ITS 領域, 2 つの random hypervariable loci (*caa5* と *ga4*) および *act1* の塩基配列を解析している Dixson et al. (2009) の報告, およびゴム分離菌株を用いたゴムのクローンに対する接種試験と ISSR 解析を行っている Nghia et al. (2008) の報告においても, 寄生性と分子系統解析の結果には一定の相関が認められている. しかし, 本試

験結果では系統樹のそれぞれのクレードには複数の寄生性を示す菌株が属したことから、寄生性の進化速度は本研究において解析したハウスキーピング遺伝子の進化速度よりも早いかもしれない。さらに、本研究に供試した菌株は日本各地から様々な年代に分離されたものであるが、ナスを除き分離源の植物種内において寄生性および分子系統に差異は認められなかったことから、本病原菌は植物や種子の移動によりに分布を拡大させたものと推察された。

5. 謝辞

本研究では、多くの方々にご支援とご協力をいただいた。岩手県農業研究センター 猫塚修一博士、茨城県農業総合センター園芸研究所 宮本拓也氏、愛知県農業総合試験場 三宅律幸氏と間下なぎさ氏、岐阜県農業技術センター 渡辺秀樹博士、鳥取大学 尾谷浩博士、島根大学 上野誠博士、岡山県農林水産総合センター農業研究所 谷名光治氏と桐野菜美子氏、徳島県立農林水産総合技術センター農業研究所 広田恵介氏、愛媛県農林水産研究所 奈尾雅浩博士、宮崎県総合農業試験場 黒木尚氏と櫛間義幸氏、鹿児島県病害虫防除所 上門隆洋氏、および農業生物資源研究所 佐藤豊三博士より菌株を分譲いただいた。高知大学 曳地康史博士と木場章範博士、神戸大学 土佐幸雄博士、佐賀大学 草場基章博士、高知県農業技術センター 森田泰彰氏および高知県環境農業推進課 竹内繁治博士からはご助言を頂いた。ここに記して、深く感謝の意を表する。

6. 参考文献

- 1) Barthe, P., Pujade-Renaud, V., Breton, F., Gargani, D., Thai, R., Roumestand, C. and de Lamotte, F. (2007). Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *J. Mol. Biol.* 367: 89-101.
- 2) Carbone, I. and Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- 3) Cutrim, F.A. and Silva, G.S. (2003). Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* to different plant species. *Fitopatol. Brasil.* 28: 193-194.
- 4) 伊達寛敬・片岡英子・谷名光治・佐々木静江・井上幸次・那須英夫・粕山新二 (2004a) . チオファネートメチル及びジエトフェンカルブに対するトマト褐色輪紋病菌 (*Corynespora cassiicola*) の感受性. 日植病報 70 : 7-9.
- 5) 伊達寛敬・片岡英子・谷名光治・佐々木静江・井上幸次・那須英夫・粕山新二 (2004b) . 岡山県におけるチオファネートメチル, ジエトフェンカルブ及びアゾキシストロビンに対するキュウリ褐斑病菌の感受性. 日植病報 70 : 10-13.
- 6) de Lamotte, F., Duviau, M.P., Sanier, C., Thai, R., Poncet, J., Biessse, D., Breton, F. and Pujade-Renaud, V. (2007). Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. *J. Chromatogr. B* 849: 357-362.
- 7) Dixon, L.J., Schlub, R.L., Pernezny, K. and Datnoff, L.E. (2009). Host specialization and

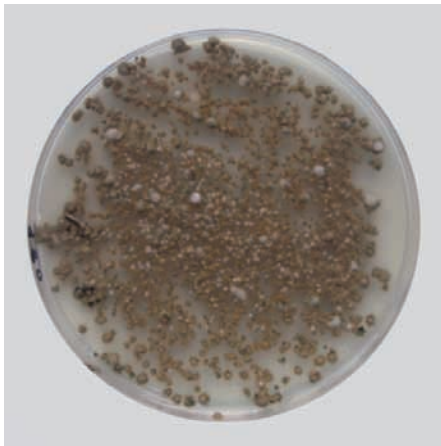
- phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 99: 1015-1027.
- 8) Furukawa, T., Ushiyama, K. and Kishi, K. (2008). *Corynespora* leaf spot of scarlet sage caused by *Corynespora cassiicola*. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 117-119.
 - 9) Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
 - 10) Luo, C.X., Yin, L.F., Koyanagi, S., Farman, M.L., Kusaba, M. and Yaegashi, H. (2005). Genetic mapping and chromosomal assignment of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *AvrPik*, *AvrPiz*, and *AvrPiz-t* controlling cultivar specificity on rice. *Phytopathology* 95: 640-647.
 - 11) 宮本拓也・富田恭範・鹿島哲郎・米山一海・野上真希・諏訪順子 (2006) . キュウリ褐斑病の品種間における発生差異とチオファネートメチル, プロシミドン, ジエトフェンカルブに対する感受性. *日植病報* 72 : 236-237.
 - 12) Nghia, N.A., Kadir, J., Sunderasan, E., Puad, A.M., Malik, A. and Napis, S. (2008). Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia* 166: 189–201.
 - 13) Onesirosan, P.T., Arny, D.C. and Durbin, R.D. (1974). Host specificity of Nigerian and North American isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 64: 1364-1367.
 - 14) 尾谷 浩 (2008). 宿主特異的毒素 : 構造, 生産および作用における多様性. 平成 20 年度日本植物病理学会関西西部会プログラム・講演要旨集. p. 5.
 - 15) Pereira, J.M., Barreto, R.W., Ellison, C.A. and Maffia, L.A. (2003). *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biol. Control* 26: 21-31.
 - 16) Shimomoto, Y., Adachi, R., Morita, Y., Yano, K., Kiba, A., Hikichi, Y. and Takeuchi, S. (2008). *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 335-337.
 - 17) Spencer, J.A. and Walters, H.J. (1969). Variations in certain isolates of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 59: 58-60.
 - 18) 竹内妙子・久保周子・石井英夫 (2006) . 千葉県におけるキュウリ褐斑病菌の数種薬剤に対する感受性. *関東東山病虫研報* 53 : 55-60.

Summary

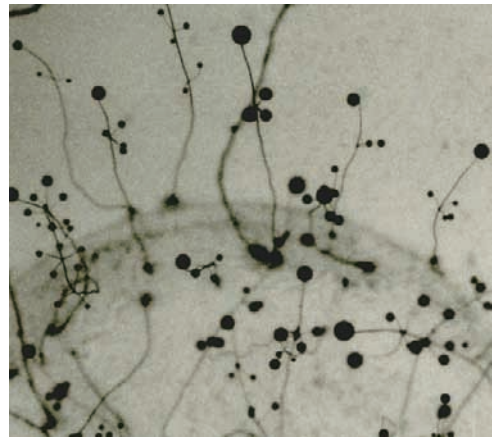
In order to develop a method for discrimination of *C. cassiicola* isolates from Japan based on their parasitism and phylogeny, we analyzed pathogenic variations of 64 isolates of the fungus

on perilla, cucumber, tomato, eggplant and sweet pepper as well as their multigene phylogeny. The isolates were divided into seven pathogenicity groups (PG1 to PG7). Pathogenicity of the isolates in each PG1 to PG5 was restricted to perilla, cucumber, tomato, eggplant and sweet pepper, respectively. The isolates in PG6 were pathogenic to sweet pepper, tomato and eggplant. Those in PG7 were non-pathogenic to all tested plants. Multigene phylogenetic analysis of the isolates based on β -tubulin, translation elongation factor 1- α , calmodulin and actin genes showed three divergent clusters, MP-A, MP-B and MP-C. MP-A, MP-B and MP-C clusters included all isolates in “PG1 and PG2”, “PG3 and PG5”, and “PG4 and PG6”, respectively. The isolates in PG7 were distributed among all clusters. These results show that analysis on pathogenicity and nucleotide sequences of house-keeping genes allow to discriminate *C. cassicola* isolates from Japan based on their parasitism and phylogeny.

微生物遺伝資源の調査プロフィール



トマト葉かび病菌 (*Passalora fulva*) のコロニー (飯田)



細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の子実体 (川上)



Corynespora cassiicola の分生子 (下元)



キクラゲ栽培菌床用木片から分離された *Trichoderma* sp. 5 (奥田・五十嵐)



褐色 *Trichoderma* cf. *pleuroticola* MAFF 242460 のコロニー (奥田・五十嵐)