

Colletotrichum acutatum 系統群 A2 および A4 の再分類と同系統群の国内産菌株の再同定

独立行政法人 農業生物資源研究所 佐藤 豊 三治
 富山県農林水産総合技術センター 園芸研究所 森 脇 丈 治

はじめに

今年の本誌 2 月号に寄稿した「広義 *Colletotrichum acutatum* の種分割と炭疽病の病原再同定」の中で DAMM et al. (2012) が、同種をさらに 29 種（未同定 1 種を除く）に細分したことを紹介した。彼らは 6 遺伝子・領域の塩基配列に基づき *C. acutatum* 種複合体の系統群 A2 を 12 種に再分割し、また、同系統群 A4 は単系統であり、*Colletotrichum godetiae* Neergaard に該当することを明らかにした。そこで、国内産の系統群 A2 および A4 の菌株等を用いて同じ 6 遺伝子・領域に基づき系統解析を行った。その結果、それらは少なくとも 5 種に再同定され、DAMM et al. (2012) の 29 種に当てはまらない菌株も見いだされた (SATO and MORIWAKI, 2013)。再同定された菌株のうち、広義の *Colletotrichum carthami* に位置づけられていた近縁の 2 種 1 系統群について分生子の形態を再調査し、検索表に追加・修正した。本稿を 2 月号の補足・更新版として、広義 *Colletotrichum acutatum* による炭疽病の診断・同定の参考にしていただければ幸甚である。

I DAMM et al. (2012) による再分類

SHIVAS and TAN (2009) が定義した *Colletotrichum simmondsii* R. G. Shivas & Y. P. Tan., すなわち *C. acutatum* 種複合体の系統群 A2 は rDNA-ITS 領域に基づき系統解析では単系統であるが、 β -tubulin-2 による国内産菌株の系統解析では多系統性が指摘されていた (UEMATSU et al., 2012; SATO et al., 2013)。そのうちキク科植物に炭疽病を起こす 1 系統は、*C. carthami* (Fukui) S. Uematsu, Kageyama, Moriwaki & Toy. Sato として分割されたことはすでに紹介した。DAMM et al. (2012) は rDNA-ITS 領域と β -tubulin-2, Actin, CHS-1 (キチン合成酵素-1), GAPDH (グルタルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素) および Histone3 遺伝子に基づき系統群 A2 を 12 種に再分

割した。また、同系統群 A3 および A4 は単系統であり、前者は *Colletotrichum floriniae* (Marcelino & Gouli) R. G. Shivas & Y. P. Tan に、後者は *Colletotrichum godetiae* Neergaard に該当すること等を明らかにした (佐藤・森脇, 2013 の表-4 参照)。

II 6 遺伝子・領域を用いた系統解析に基づく国内産菌株の再同定

農業生物資源ジーンバンクに保存されている国内産の系統群 A2 の 80 菌株、A4 の 7 菌株およびその他の *Colletotrichum* 属 5 菌株を用いて上記 6 遺伝子・領域に基づき系統解析を行った。なお、A2 の 80 菌株は β -tubulin-2 遺伝子の塩基配列により大半が *C. simmondsii* に、また一部が広義の *C. carthami* および暫定的系統群 A2-P に同定されていたものである (SATO et al., 2013; 佐藤・森脇, 2013; 表-1)。解析の結果、系統群 A2 の菌株は 5 系統に分かれ、A4 の菌株は単系統となった。すなわち、A2 の菌株のうち系統群 A2-P として識別されていた 5 県のピーマン炭疽病菌はいずれも *C. scovillei* Damm, P. F. Cannon & Crous のクレードに所属し、つい最近まで *C. simmondsii* とされていた菌株はほぼすべて *C. nymphaeae* (Passerini) Aa と同じクレードに入ることが明らかとなった。

また、*C. carthami* の菌株は、2 系統に類別され、その多くは *C. chrysanthemi* のクレードに入ったのに対し、狭義の *C. carthami* は一部のキンセンカ由来菌株に限られた。さらに、一部のイチゴ由来菌株が狭義 *C. carthami* の近縁系統として単独のクレードを形成したが、既知種の対照菌株とは同系統にならず、暫定的に系統群 A2-S として区別した。以上より、SATO et al. (2013) の供試菌株では系統群 A2 として 2 種 1 系統が再同定されたが、SATO and MORIWAKI (2013) では追加された菌株を含めてさらに 4 種 1 系統に再同定された (図-1)。一方、系統群 A4 の全菌株は *C. godetiae* の対照菌株と単一クレードを形成し、同種に再同定された。

SATO et al. (2013) および佐藤・森脇 (2013) の β -tubulin-2 遺伝子のみによる系統解析で同定できなかったナツツバキ炭疽病菌は、今回も既知種とは同一クレード

Re-classification of the *Colletotrichum acutatum* Group A2 and A4 and Re-identification of Strains Belonging to the Groups in Japan.
 By Toyozo SATO and Jouji MORIWAKI

(キーワード: *C. acutatum* A2-S, *C. carthami*, *C. chrysanthemi*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae*, *C. scovillei*, 分子系統解析)

表-1 農業生物資源遺伝バンク所蔵 *Colletotrichum acutatum* 系統群 A2 および A4 の菌株の再同定結果 a)

分離源(宿主植物) b)	種・系統群 c)	最新再同定結果 d)	MAFF 番号 c)	文献 e)
アネモネ	<i>C. simmondsii</i> f)	<i>C. nymphaeae</i> j)	306487, 306488, 306507 ~ 306509	SATO et al., 1996 佐藤, 1997
	<i>C. acutatum</i> A4 g)	<i>C. godetiae</i> k)	306506	SATO et al., 1996
イチゴ	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	239773, 306647, 306682, 731068 o), 731069 o)	佐藤・森脇, 2003
	<i>C. fioriniae</i> h)	(←存続)	241293, 242430, 306282, 306283	石川ら, 1992 MORIWAKI et al., 2002
	<i>C. carthami</i>	<i>C. acutatum</i> A2-S l)	238555, 744062 o), 744063 o)	SATO and MORIWAKI, 2013
ウルシ	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	410042	伊藤・小林, 1959
キンセンカ	<i>C. carthami</i> i)	<i>C. carthami</i> s. str.	239356, 239357	UEMATSU et al., 2012
	<i>C. carthami</i>	<i>C. chrysanthemi</i> m)	239358 ~ 239361, 242919	UEMATSU et al., 2012
シナノグルミ	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	410040	伊藤・小林, 1956
シュンギク	<i>C. carthami</i>	<i>C. chrysanthemi</i>	239362 ~ 239369	UEMATSU et al., 2012
ストック	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	712311	菅原ら, 2009
	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	242590	FUJINAGA et al., 2011
セルリー	<i>C. fioriniae</i>	(←存続)	242591	竹内, 2007 FUJINAGA et al., 2011
	<i>C. acutatum</i> A2-P	<i>C. scovillei</i> n)	242420 ~ 242428, 242592, 242692, 242693	植松ら, 2010 神頭ら, 2010 塚本ら, 2010
ナツツバキ	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp. (J)	237922, 306725, 306726, 410809	金子ら, 1998 佐藤・森脇, 2003
ビワ	<i>C. fioriniae</i>	(←存続)	241801, 305596, 306405, 306408 ~ 306410	佐藤, 1997 SATO et al., 1997 MORIWAKI et al., 2002
	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	306406, 306407	SATO et al., 1997
ベニバナ	<i>C. carthami</i>	<i>C. chrysanthemi</i>	239370 ~ 239374, 243248	UEMATSU et al., 2012
モモ	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	306430, 306522 ~ 306524	菅野・森脇, 1999 MORIWAKI et al., 2002
	<i>C. acutatum</i> A4	<i>C. godetiae</i>	241295	萩田, 2006
ヨーロッパスモモ	<i>C. fioriniae</i>	(←存続)	306489, 306504, 306651	SATO et al., 1996 MORIWAKI et al., 2002
	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	241294, 306503, 306505	SATO et al., 1996 萩田, 2006
	<i>C. acutatum</i> A4	<i>C. godetiae</i>	241297	
リング	<i>C. fioriniae</i>	(←存続)	305145, 306543, 306544, 306549, 306630	堀江ら, 1990 佐藤ら, 1998 MORIWAKI et al., 2002
	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	306546 ~ 306548	佐藤ら, 1998
リンドウ	<i>C. fioriniae</i>	(←存続)	241878, 241879	中山ら, 2004
	<i>C. simmondsii</i>	<i>C. nymphaeae</i>	712289	
ワレモコウ	<i>C. acutatum</i> A4	<i>C. godetiae</i>	240289	杉山ら, 2008

a) 新病害等の提案で用いられた菌株のみ (SATO and MORIWAKI (2013) を改変)。

b) 国内で“*Colletotrichum acutatum*”による病害が報告されている植物。c) SATO et al. (2013) および佐藤・森脇 (2013) の再同定学名 (*C. fioriniae* 単独の宿主は文献後者を参照)。

d) SATO and MORIWAKI (2013) の6遺伝子・領域による再同定結果, 太字は更新学名。

e) 太字は“*C. acutatum*”による病害の初報告 (詳細は日本植物病名目録第2版参照)。f) *Colletotrichum simmondsii* R. G. Shivas & Y. P. Tan.g) *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds group A4 = ‘larger spored form’ (SIMMONDS, 1965).h) *Colletotrichum fioriniae* (Marcelino & Gouli) R. G. Shivas & Y. P. Tan.i) *Colletotrichum carthami* (Fukui) S. Uematsu, Kageyama, Moriwaki & Toy. Sato.j) *Colletotrichum nymphaeae* (Passerini) Aa.k) *Colletotrichum godetiae* Neergaard.l) *Colletotrichum acutatum* 系統群 A2-S (SATO and MORIWAKI, 2013).m) *Colletotrichum chrysanthemi* (Hori) Sawada.n) *Colletotrichum scovillei* Damm, P. F. Cannon & Crous.

o) 接種により病原性を確認 (未発表)。

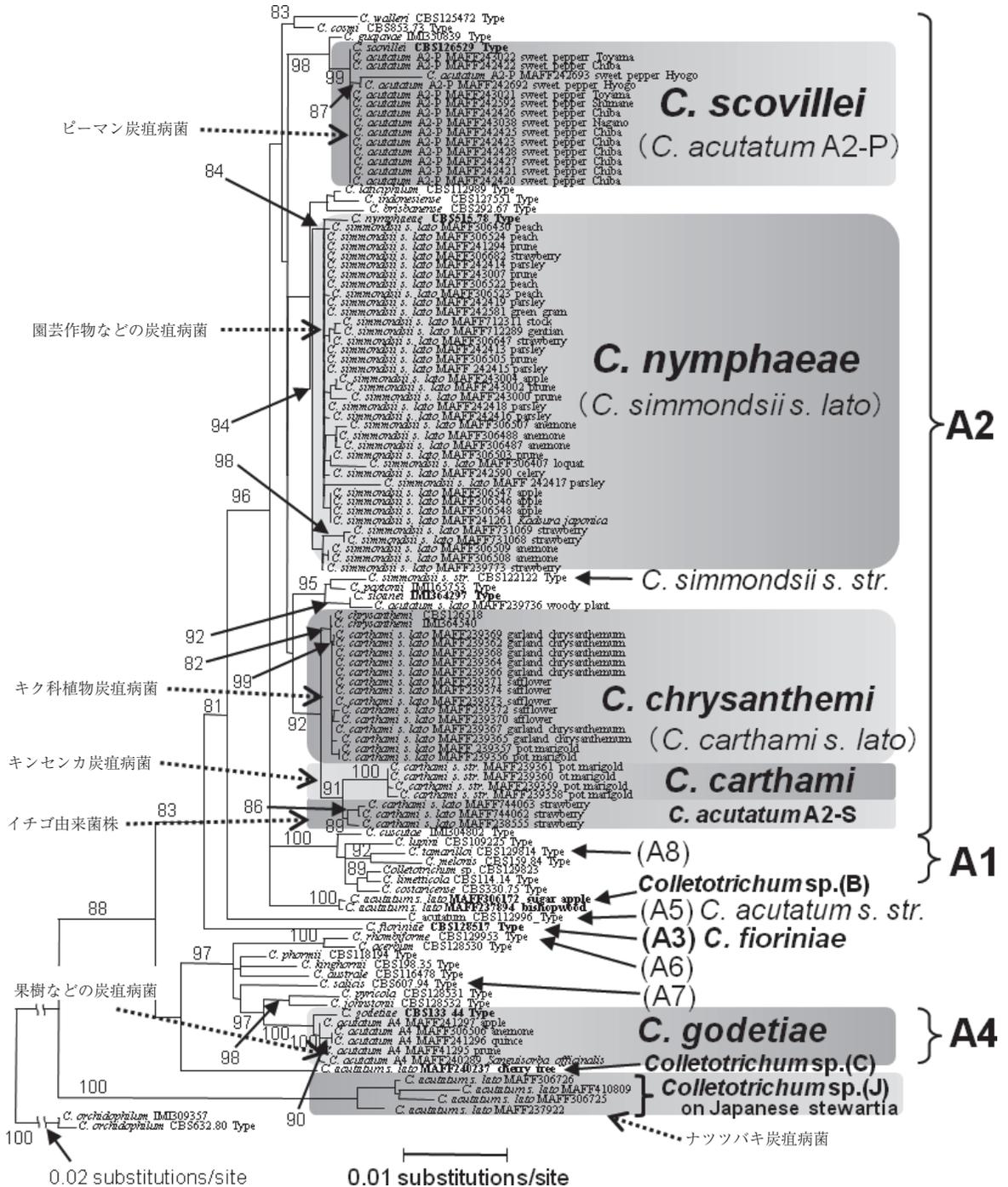


図-1 rDNA-ITS, β -tubulin-2, Actin, CHS-1 (キチン合成酵素), GAPDH (グルタルアルデヒド3リン酸脱水素酵素) および Histone3 の塩基配列を用いた *Colletotrichum acutatum* 系統群 A2 および A4 菌株の最尤法による系統樹。バーは 100 塩基当たり 2 塩基の違い、MAFF を冠した 6 桁の数字は農業生物資源ジーンバンクの菌株、それ以外は DDBJ/EMBL/GenBank データベースより塩基配列をダウンロードした比較対照菌株、1,000 回ブーツストラップ値が 80% 以上の場合枝上にパーセンテージを表示、A1 ~ A8 は *C. acutatum* の系統群 (SATO and MORIWAKI (2013) を改変)。

ドにならず、新種の可能性が高まった。その他アカギとバンレイシ由来菌株 (*Colletotrichum* sp. (B)) やサクラ由来菌株 (*Colletotrichum* sp. (C)) が分割された構成種とは別系統となり、種を特定できなかった。

SATO and MORIWAKI (2013) の系統解析では、*C. simmondsii* のタイプ由来菌株と同じクレードを形成する供試菌株、すなわち狭義 *C. simmondsii* に該当する菌株はなかった。今のところ、狭義の *C. acutatum* も上記ジェンバンクの保存菌株ではまだ見つかっていない (佐藤・森脇, 2013)。今後、これらの学名は「広義」か「狭義」あるいは誰の定義かを明記せずに使うことは、混乱を招くため控えたい。

III 再同定された構成種の形態的差異

1 広義 *C. carthami* に属する 2 種 1 系統群

Colletotrichum fioriniae, 広義 *C. simmondsii* の一部 (= *C. nymphaeae*), 広義 *C. carthami*, *C. acutatum* 系統群 A4 (= *C. godetiae*) および *C. acutatum* 系統群 A2-P (= *C. scovillei*) が分生子のサイズなどで区別できることはすでに解説した (SATO et al., 2013)。今回、広義 *C. carthami* の菌株が 2 種 1 系統群に細分されたが、それらの分生子の形態を調べた結果、やはり大きさや形で識別できることが明らかになった。すなわち、最も小型の分生子を持つのが *C. carthami* であるのに対し、*C. chrysanthemi* の分生子がこれらの中で最大であり、*C. acutatum* A2-S は太くて短いものや中央がややくびれるものを持つ、という違いがある (表-2)。上記 4 種とともにこれら 2 種 1 系統群の代表菌株が PDA 上で形成した分生子を同じ倍率で図-2 に掲げた。以上のように分子系統解

析の結果、国内での 6 種 1 系統群の分布が明らかになったが、これら *C. acutatum* 種複合体構成種の分生子は形態的には識別できる。

2 *C. acutatum* 種複合体構成種・系統群の更新検索表

上記の結果を基に SATO et al. (2013) および佐藤・森脇 (2013) の検索表を以下の通り更新した (SATO and MORIWAKI, 2013)。

1. PDA または WSH でコロニー裏面が赤みを帯びる
…*C. fioriniae*
1. PDA または WSH でコロニー裏面が赤みを帯びない
…2
2. 一部の分生子は長さ 18 μm 以上 …*C. godetiae*
2. 分生子は長さ 18 μm 以下 …3
3. PDA 上の分生子の平均長は 11 μm 以下 …4
3. PDA 上の分生子の平均長は 11 μm 以上 …5
4. PDA 上の分生子の L/B 比はほとんどが 3 以下
…6
4. PDA 上の分生子の L/B 比はほとんどが 3 以上
…*C. nymphaeae*
5. 分生子の平均幅は 3.5 μm 以下 …*C. scovillei*
5. 分生子の平均幅は 3.5 μm 以上 …*C. fioriniae*
6. 一部の分生子は中央がややくびれるか卵形
…*C. acutatum* A2-S
6. 分生子は紡錘形, 類円筒形, 棍棒形 …7
7. PDA 上の分生子の平均長は 8 μm 以下
…*C. carthami* s. str.
7. PDA 上の分生子の平均長は 9 μm 以上
…*C. chrysanthemi*

表-2 *Colletotrichum carthami*, *C. chrysanthemi* およびイチゴ由来 *C. acutatum* A2-S の分生子サイズ^{a)}

種・系統群	PDA 上の分生子 (μm)			SNA 上の分生子 ^{b)} (μm)		
	サイズの範囲 (長さ×幅)	平均	L/B 比	サイズの範囲 (長さ×幅)	平均	L/B 比
<i>C. carthami</i>	4.5-9.8 (-10.9) × 2.4-4.6	7 × 3.2	2.18	5.8-11.4 × 2.6-4.8	8.4 × 3.5	2.47
<i>C. chrysanthemi</i> (IMI 364540 ^{c)} (CBS 126518 ^{d)})	7.3-15.8 (-17.3) × 2.6-5.3 (-6) 記述なし 記述なし	10.8 × 4	2.73	7.5-15.6 (-20) × 2.6-6.2 (-6.6) (4.5-) 6.5-13 (-26) × (3-) 3.5-5 (-11) (6-) 7-9.5 (-12) × (3-) 4-5.5 (-6)	11.9 × 4.1 9.8 × 4.3 8.3 × 4.8	2.93 2.3 1.7
<i>C. acutatum</i> A2-S	5.3-14.3 (-16.8) × 2.6-5.5	8.6 × 4.1	2.17	5.8-13.0 (-15.8) × 2.8-5.6 (-6.5)	8.7 × 4.2	2.14

a) 近紫外線下 25°C 7 日間培養で形成。

b) 培地平板上に滅菌ろ紙片を添加。

c) 中国産 *Chrysanthemum coronarium* 由来 (DAMM et al., 2012)。

d) オランダ産 *Carthamus* sp. 由来 (DAMM et al., 2012)。



図-2 PDA上に形成された国内産の *Colletotrichum acutatum* 種複合体構成種の分生子 (20~25℃, 7~14日間培養, バー: 20 μm, 位相差顕微鏡像)

IV 広義 *C. acutatum* による炭疽病の病原学名の再更新

広義 *C. acutatum* による炭疽病の提案に用いられた菌株の再同定結果に基づき, SATO and MORIWAKI (2013) は表-3 のように病原学名の更新を提案した。なお, *C. fioriniae* だけが病原と判明した病害は, 佐藤・森脇 (2013) を参照されたい。今回, 系統群 A2 の菌株が新規構成種に振り分けられたことに伴い, 各種の宿主範囲がより狭まった。細分された構成種間に形態差はあるものの, これまでの広義 *C. acutatum* のように同定が容易とは言えない。しかし, それらを特定することは, より絞り込まれた病原菌の情報を得ることにつながり, 効率的な防除を行ううえで重要と考えられる。

おわりに

昨年, オランダの菌株保存機関 CBS を中心とする研究グループが複数の遺伝子に基づく分子系統解析により, 大きな種複合体である *C. acutatum* や *C. gloeosporioides* 等を多数の構成種に分割した。上記の通り, 幸い国内に分布する広義 *C. acutatum* の構成種間には形態的差異が見いだされたため, 今のところは形態で種の見当を付けることができる。しかし, 調べた菌株は 200 株に満たず, 今後他の構成種が国内で見つかることは十分ありうる。実際, 最近国内発生が確認されたピーマン炭疽病菌 *C. scovillei* は, 東南アジアのトウガラシ炭疽病菌として昨年記載された新種であり, 海外からの侵入が疑われている (KANTO et al., 2013)。また, ナツツバキ炭疽病菌などのように, *C. acutatum* 種複合体に属する「名無し」の種も実在するところから, DAMM et al. (2012) の再分類で同複合体の構成種が出尽くしたわけではないことは明らかである。今後 *C. acutatum* 種複合体による新病害が見つかったときは, 形態による病原同定に加えて同複合体のバーコード遺伝子とされる β -tubulin-2 の塩基配列に基づく確認が必要である。

表-3 各種植物の炭疽病の病原学名変更^{a)}

宿主植物	更新学名 ^{b)}		
ピーマン	<i>C. scovillei</i>		
パセリ	<i>C. nymphaeae</i>		
ストック	<i>C. nymphaeae</i>		
モモ	<i>C. nymphaeae</i>		
ワレモコウ	<i>C. godetiae</i>		
ブルー	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. godetiae</i>	<i>C. fioriniae</i>
リンゴ	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. godetiae</i>	<i>C. fioriniae</i>
イチゴ	<i>C. nymphaeae</i>	(<i>C. acutatum</i> A2-S)	<i>C. fioriniae</i>
アネモネ	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. godetiae</i>	
ピワ	<i>C. nymphaeae</i>		<i>C. fioriniae</i>
セルリー	<i>C. nymphaeae</i>		<i>C. fioriniae</i>
キンセンカ	<i>C. chrysanthemi</i>	<i>C. carthami</i>	
ペニバナ	<i>C. chrysanthemi</i>	<i>C. carthami</i>	
シュンギク	<i>C. chrysanthemi</i>		

^{a)} 病原が *C. fioriniae* のみの宿主は, 佐藤・森脇 (2013) を参照。

^{b)} 学名の詳細は, 表-1 を参照。

2月号で紹介した成果を含めて今回の再同定には, 多くの研究者が農業生物資源ゾーンバンクに寄託された菌株を供試させていただいた。また, 大量の菌株を扱う際, 同ゾーンバンクの中島比呂美さんと藪中恭子さんに多々お手伝いいただいた。これらの皆様とご支援をいただいた関係者の方々に厚く御礼申し上げる。

引用文献

- DAMM, U. et al. (2012): Stud. Mycol. **73**: 37 ~ 113.
- 堀江博道ら (1990): 菌草研報 **28**: 267 ~ 274.
- KANTO, T. et al. (2013): Jour. Gen. Plant Pathol. **79** (In press).
- MORIWAKI, J. et al. (2002): J. Gen. Plant Pathol. **68**: 307 ~ 320.
- 佐藤豊三 (1997): 四国植防 **32**: 1 ~ 19.
- ・森脇丈治 (2003): 微生物遺伝資源利用マニュアル, (生物研資料) **13**: 1 ~ 12.
- (2013): 植物防疫 **67**: 113 ~ 120.
- SATO, T. et al. (2013): JARQ **47**: 295 ~ 305.
- and MORIWAKI, J. (2013): Microbiol. Cult. Coll. **25**: 13 ~ 23.
- SHIVAS, R. G. and Y. P. Tan (2009): Fungal Divers. **39**: 111 ~ 122.
- SIMMONDS, J. H. (1965): Queensl. J. Agric. Anim. Sci. **22**: 437 ~ 459.
- UEMATSU, S. et al. (2012): J. Gen. Plant Pathol. **78**: 316 ~ 330.