

九州の土壌から分離した *Metarhizium* 属糸状菌の系統解析

西 大海¹⁾・飯山和弘²⁾・青木智佐²⁾・清水 進²⁾

¹⁾九州大学農学部, ²⁾九州大学大学院農学研究院

(2008年12月8日受付; 2009年12月25日受理)

Phylogenetic analysis of *Metarhizium* isolated from soil in the Kyushu district, Japan

OUMI NISHI, KAZUHIRO IYAMA, CHISA YASUNAGA-AOKI and SUSUMU SHIMIZU

A phylogenetic analysis was carried out with the 79 *Metarhizium* spp. isolated mainly from soil in the Kyushu district with a view to classifying these isolates into 10 *Metarhizium* clades defined by DRIVER et al. (2000). A phylogeny was constructed by neighbor joining method using sequence data of *internal transcribed spacer* region and 5.8S ribosomal gene of Kyushu isolates and those of oversea isolates used in the study of DRIVER et al. (2000). Five and 74 isolates belonged to *M. flavoviride* and *M. anisopliae*, respectively. All *M. flavoviride* isolates were included in var. *pemphigum*. Among *M. anisopliae*, the monophyly of the group including var. *anisopliae* and var. *majus* was supported. Sixty-three and five isolates were morphologically classified into var. *anisopliae* and var. *majus*, respectively. But the difference of sequence data couldn't discriminate between these two variety.

Key Words : *Metarhizium*, Phylogenetic analysis, Ribosomal DNA

緒 言

Metarhizium 属糸状菌は昆虫に対して病原性があり、世界中のあらゆる環境の土壌中に存在する。多くの昆虫への感染が報告されており、宿主域や特異性において多様であると考えられてきた。*M. anisopliae* では、主要な農業害虫と林業害虫を含む7目200種以上の昆虫に対して、病原性を示すことが報告されている (VEEN, 1968)。また、最近では、生物農薬としての関心の高まりから、様々な分離株が報告されるようになり、低温や高温で生育可能な分離株も報告されている (RATH et al., 1995; RODDAM and RATH, 1997; DRIVER et al., 2000)。

様々な性状をもつ分離株が報告されると、主に形態学的特徴に基づく従来の分類基準では対応できなくなってきた。また、分子データを用いた分子系統樹が報告されるようになると、形態学的特徴は必ずしも分子系統分類における系統と対応しないことが明らかになった (DRIVER et al., 2000)。さらに、集団遺伝学的解析によって *M. anisopliae* 内には遺伝的に隔離された複数のグループが存在することも明らかとなり、本属の分類には形態学的特徴だけでなく、分子データや生殖的隔離に関する形質も用いる必要があることが指摘されている (BIDOCHKA et al., 2001, 2005)。

本属糸状菌の農薬としての使用が高まると、人為的な菌の移動により、本属糸状菌の遺伝子汚染や昆虫の生態系への影響が懸念される。この影響を評価したり進行を防止したりするためには、まず、本属糸状菌の系統と地理的分布を明らかにする必要がある。また、これらの調査は有用な形質をもった菌株の探索や、菌株の利用権を巡る国際的問題の解決においても重要であると考えられる

(BIDOCHKA et al., 2005)。

これまで *Metarhizium* 属糸状菌の系統地理学的調査は、オーストラリアとアメリカ大陸で主に報告されている。DRIVER et al. (2000) は、オーストラリアを中心として世界18カ国で採取された123菌株の *Metarhizium* 属糸状菌について、リボゾームDNA (rDNA) の塩基配列に基づいて系統解析を行い、*Metarhizium* 属を10のクレードに分類した。しかし、日本を含めアジアではほとんど報告がない。そこで、日本の本属糸状菌の系統と分布を明らかにするために、まず、九州の土壌からの分離菌株について、rDNAの塩基配列から系統の調査を行った。

材料と方法

供試菌株：九州と九州外の3県（東京都、青森県、宮城県）で土壌サンプルを採取した。土壌サンプルよりオートミール培地を選択培地として、分生子とコロニーの形態から *Metarhizium* 属と判断された79菌株を分離した (Table 1)。同一サンプルの土壌中に形態の異なる複数の菌株が存在した場合には、その形態ごとに分離した。分離株はポテトデキストロース寒天培地で継代培養し、実験に供した。菌株名のアルファベットはその菌株が分離された土壌の採取場所を表し (Aom=青森県, Fkk=福岡県, Kgs=鹿児島県, Kmm=熊本県, Myz=宮崎県, Myg=宮城県, Ngs=長崎県, Oit=大分県, Sag=佐賀県, Tky=東京都)、ハイフンの前の数字は土壌の識別番号、ハイフンの後の数字はその土壌から分離された菌株の識別番号である。

DNA抽出：分生子を25 mlのLB液体培地 (シヨ糖 2%, ペプトン 1%, 食塩 0.5%, 酵母抽出

^{1), 2)} 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
Tel: 092-642-3031, Fax: 092-642-4421
連絡先: sshimizu@grt.kyushu-u.ac.jp

物 0.3%) で 25 °C, 3~4 日間振盪培養後, 菌糸体を遠心分離 (4 °C, 2,000 g, 20 min) によって回収した。菌糸体を PBS で洗浄後, 1.5 ml チューブに移し, 抽出バッファー (4 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS) を 400 µl 加えて懸濁した。これに, 等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) を加え, 攪拌後遠心分離 (20 °C, 17,000 g, 15 min) を行った。上清を回収し, 0.6 倍量の冷イソプロパノールを加えて 10 分間静置した後, 遠心分離 (4 °C, 17,000 g, 15 min) を行った。遠心後, 上清のみを捨て, 70% 冷エタノールで洗浄し, エバポレータによってサンプルを乾燥させた。最後に TE 50 µl, RNase 500 µg を加え, 使用までは 4 °C で保存した。

塩基配列の決定:抽出された DNA を鋳型として *internal transcribed spacer* (以下 *ITS*) 1 及び *ITS2* を含む 5.8S rDNA を PCR 法によって増幅した。反応組成は Taq ポリメラーゼ (5 U/µl) 0.5 µl, 10×buffer 10 µl, MgCl₂ (25 mM) 6 µl, dNTP 混合液 10 µl, dH₂O 70.5 µl, プライマー (100 pmol/µl) 0.5 µl, 及びゲノム DNA 1.0 µl で行った。プライマーは, NS1<5'-CTCTCCAAACTCGGTCATT-3'>, AB28 <5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'>を使用した。PCR 条件は 94 °C 5 分・35 サイクル (94 °C 1 分, 55 °C 1 分, 72 °C 1 分)・72 °C 10 分で行った (CURRAN et al., 1994)。この増幅断片を鋳型とし, NS1 と AB28 をプライマーに用いて, ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kits よりダイレクトシーケンスを行った。塩基配列の決定には ABI PRISM 377DNA Sequencer (Applied Biosystems) 及び DNASIS ver.3.6 (HITACHI) を使用した。

系統樹の作成:得られた塩基配列は MEGA4 (TAMURA, 2007) によって解析を行った。アラインメントは CLUSTAL W を使用し, 初期設定で解析をした。まず, 日本分離株だけでマルチプルアラインメントを行い, 塩基置換率に基づいて 79 菌株を 15 の遺伝子型に分けた (Table 1)。遺伝子型の名称は, その遺伝子型に含まれる 1 菌株の名称とその遺伝子型に含まれる分離株数 (括弧内の数字) を表している。各遺伝子型から 1 菌株ずつ選んだ 15 菌株に DRIVER et al. (2000) によって分類された *Metarhizium* 属の菌株 36 菌株及びアウトグループ (*Beauveria bassiana* と *Gliocladium* sp.) 3 菌株を加えた合計 54 菌株のマルチプルアラインメントを行い, 近隣結合法 (SAITOU and NEI, 1987) により系統樹を作成した (Fig. 1)。菌株間の遺伝距離はギャップを含むサイトを完全削除し, Kimura 2-parameter 法 (KIMURA, 1980) で推定した。1000 回のランダムサンプリングによるブートストラップ検定 (FELSENSTEIN, 1985) を行い, 各枝の単系統性を評価した。Fig. 1 ではブートストラップ値が 50% 以上の分枝にはその値を記している。ブートストラップ値が 95% 以上の場合に, その分枝に含まれ

る菌株の単系統が支持されると判断した。

Table 1. Isolates used in this study.

Species	Genotype	Isolates included in the genotype	
<i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i>	Kmm2-1(4)	Fkk3-2,Fkk9-3, Kmm2-1,Sag13-1	
	Fkk9-2(1)	Fkk9-2	
<i>M. anisopliae</i>	Oit1-1(1)	Oit1-1	
	Kgs17-3(1)	Kgs17-3	
	Ngs1-1(2)	Kgs8-1,Ngs1-1	
	Myz2-2(2)	Myz2-2,Tky1-2	
	Kgs1-1(1)	Kgs1-1	
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>		Aom2-1,Fkk3-1, Fkk6-1,Fkk10-1, Kgs1-2,Kgs3-1, Kgs3-2,Kgs4-1, Kgs5-3,Kgs6-1, Kgs7-1,Kgs9-1, Kgs11-1,Kgs12-1, Sag4-1(31) Kgs17-1,Kmm6-1, Kmm7-1,Kmm12-2, Kmm12-3,Myz11-1, Myz14-1,Ngs3-1, Ngs3-2,Ngs8-1, Ngs9-1,Ngs11-1, Oit2-1,Oit4-1,Oit8-1, Sag3-2,Sag4-1	
		Fkk9-1,Kgs8-2, Kgs9-2,Kgs16-1, Kgs16-2,Kmm8-2, Myz9-1,Ngs5-1, Ngs6-1,Oit10-1, Oit14-1,Oit15-1	
	Kmm8-3(13)	Fkk6-2,Kgs10-2, Kgs11-2,Kgs17-2, Kmm8-3,Myz8-2, Ngs2-1,Oit5-1, Oit8-2,Sag1-2, Sag2-1,Sag7-1, Sag10-2	
	Sag1-1(2)	Sag1-1,Oit7-1	
	Fkk2-1(3)	Fkk2-1,Fkk5-1, Myz10-1	
	Myg2-1(1)	Myg2-1	
	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	Oit8-3(2)	Oit8-3,Sag14-1
		Kgs15-1(3)	Kgs15-1,Sag6-1, Sag8-1

結 果

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 の塩基配列による分離株の系統解析

九州各地から分離した *Metarhizium* 属糸状菌の rDNA の塩基配列に基づく系統樹を Fig. 1 に示した。本研究での分離株は 2 つの大きな単系統に分かれた。一方の単系統には DRIVER et al. (2000) の分類における *M. flavoviride* の 3 クレード, すなわち var. *pemphigum*, var. *flavoviride*, 及び var. *minus* が含まれた。この単系統内の本研究での分離株は 5 菌株存在し, 全て var. *pemphigum* FI-72 とともに単系統が支持された。

もう一方の大きな単系統には *M. anisopliae* の全てのクレード, すなわち var. *acridum*, var. *lepidiotum*, var. *anisopliae*, 及び var. *majus* が含まれた。この単系統内の分離株は 74 菌株存在した。var. *anisopliae* と var. *majus* の菌株を含む分枝は, ブートストラップ値 (98%) より単系統であることが推定された。var. *lepidiotum* FI-147, FI-1042 と近縁な 6 菌株が存在したが, それらを含む分枝のブートストラップ値は低かった。

分生子の大きさの比較

系統樹から *M. anisopliae* と推定された菌株の分生子の大きさを調べたところ, TULLOCH (1976) の基準から var. *majus* に分類された菌株は 5 菌株存在した。この 5 菌株には 2 つの遺伝子型が存在し, 同一の遺伝子型をもつ菌株は分生子の大きさがほぼ同じであった。また, 全て遺伝的に近縁であり, var. *anisopliae* と var. *majus* を含む単系統内に含まれた。

考 察

九州の土壌中の *Metarhizium* 属糸状菌には 2 つの大きな単系統の存在が推定された。この 2 系統について, 一方の系統には DRIVER et al. (2000) の報告における *M. flavoviride* のクレードの一部 (var. *pemphigum*, var. *minus*, var. *flavoviride*) が含まれ, もう一方には *M. anisopliae* のクレードの全て (var. *acridum*, var. *lepidiotum*, var. *anisopliae*, var. *majus*) が含まれた。このことから, 2 つの系統は *M. flavoviride* と *M. anisopliae* であると考えられる。この *M. flavoviride* の単系統には *M. flavoviride* Type E と *M. flavoviride* var. *novazealandicum* は含まれず, DRIVER et al. (2000) の分類における *M. flavoviride* は多系統となった。これらの 2 クレードには別の種小名が必要かもしれない。

M. flavoviride においては, これに含まれる 5 菌株全てが *M. flavoviride* var. *pemphigum* であると考えられた。*M. flavoviride* var. *pemphigum* は DRIVER et al. (2000) が報告した新しいクレードであるが, イギリスでネアブラムシ *Pemphigus trehermi* より分離さ

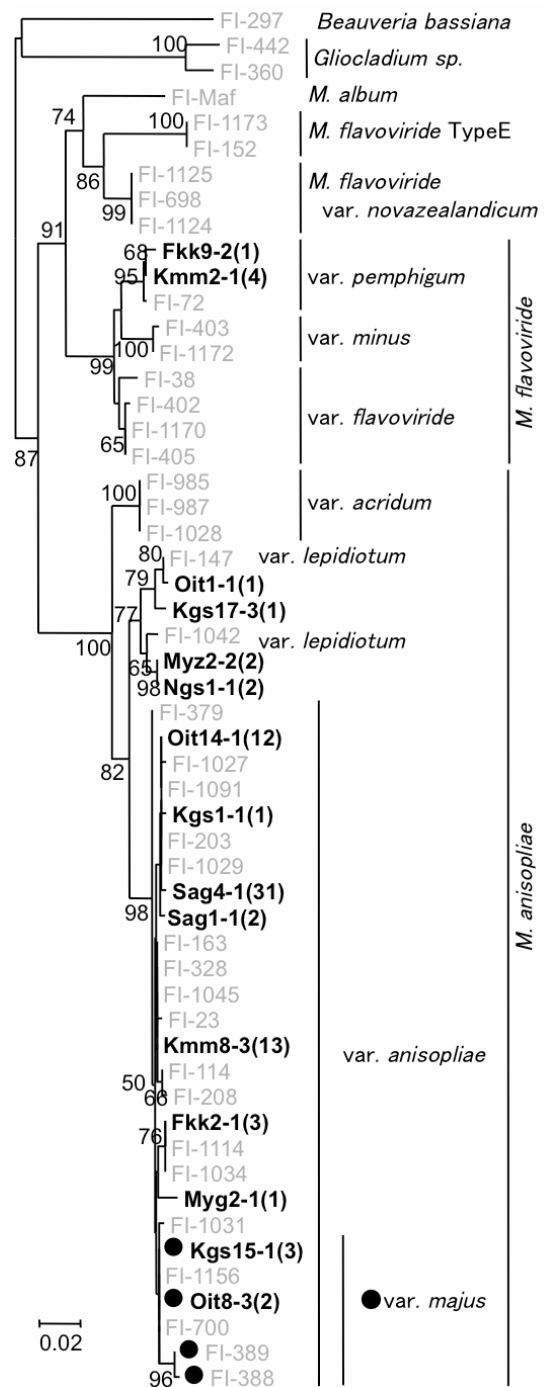


Fig. 1. A neighbour joining tree obtained by analyzing the internal transcribed spacer regions (ITS) 1 and 2, and the 5.8S ribosomal gene of 42 *Metarhizium* spp. and 3 outgroups. Reference strains are shown in gray. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 401 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4.

れた2菌株のみがこのクレードに分類されており、2菌株とも8°Cという低温環境で生育が可能であった。本研究で分離した5菌株は、コロニーの形態がイギリス分離株FI-72の形態に関する報告と一致していた。また、遺伝子型がKmm2-1(4)である4菌株については塩基配列が全く同じであり、FI-72との差異は2塩基のみであった。さらに、5菌株とも森林の土壌から分離された。これらのことから、クレード内の遺伝的多様性は低く、日本の5菌株はイギリスの菌株と同様の性状をもつことが予想される。

M. anisopliae においては、var. *anisopliae* と var. *majus* を含む分枝の単系統が支持され、これには68菌株が含まれた。これらの菌株をTULLOCH (1976)の基準に従って分生子の大きさで分類すると、63菌株がvar. *anisopliae* に、5菌株がvar. *majus* に分類された。

M. anisopliae var. *anisopliae* はほぼ世界全体に分布しており、多様な昆虫から分離されている。今回の調査の分離株の内、var. *anisopliae* であると考えられる菌株が約8割(63菌株/79菌株)を占めたが、これはこの変種内には様々な環境条件に適応した菌株が存在するためであると考えられる。

分生子の大きさからvar. *majus* と考えられた5菌株は、フィリピン・インドネシアのvar. *majus* FI-388, FI-389との単系統は支持されず、また、この5菌株だけの単系統も支持されなかった。したがって、今回比較に用いたITS1-5.8S rDNA-ITS2領域の塩基配列ではvar. *majus* と var. *anisopliae* とを区別できなかった。比較する分子データを増やすことで、var. *majus* の単系統を示すことが可能かもしれない。しかし、*Metarhizium* 属のアロザイム多型による系統解析ではvar. *majus* は系統樹上に散在し、多系統である可能性が報告されている(LEGER et al., 1992)。さらに、分生子が大きいというvar. *majus* に特徴的な形質が染色体の倍加によって生じている可能性も報告されている(LEGER et al., 1992; PIPE et al., 1995)。var. *majus* と var. *anisopliae* の系統的な関係を明らかにするためには、より多くのvar. *majus* の菌株を用いて、多型情報を豊富に含む分子データによる系統解析を行うこと及び染色体の倍加と分生子の大きさの関係を調べることが必要である。

var. *lepidiotum* FI-147, FI-1042と近縁な6菌株が存在したが、その単系統を支持するブートストラップ値は不十分であった。形態的特徴が報告されているFI-147と比較すると、遺伝的に近いOit1-1, Kgs17-3は類似しているため、これらはvar. *lepidiotum* である可能性が高い。他の4菌株はほぼ同一の形態的特徴をもつが、FI-147とは大きく異なっていた。var. *lepidiotum* はFI-147とFI-1042が遺伝的に離れていることから、var. *anisopliae* と同様に多様な性状をもつ菌株が含まれているのかも知れない。

摘 要

九州を中心に日本の土壌から分離された79菌株の*Metarhizium* 属糸状菌について、*internal transcribed spacer* と5.8S rDNA領域の塩基配列から系統解析を行った。DRIVER et al. (2000)分類で使用された菌株の塩基配列データと九州の分離株のデータから近隣結合法により系統樹を作成し、九州の分離株がDRIVER et al. (2000)によって報告された10のクレードのどれに分類されるかを調べた。その結果、5菌株が*M. flavoviride*, 74菌株が*M. anisopliae* であると推定された。*M. flavoviride* では、5菌株全てvar. *pemphigum* であると推定された。一方、*M. anisopliae* については、var. *anisopliae* と var. *majus* を含む分枝の単系統が支持された。形態的特徴によって分類すると、var. *anisopliae* が63菌株、var. *majus* が5菌株であったが、それらとrDNAに基づく分子系統樹によるクレードとの対応は認められなかった。

文 献

- BIDOCHKA, M. J. (2005) 昆虫と菌類の関係 その生態と進化 (Vega, F. E., Blackwell, M. 編), pp.39-66, 共立出版。
- BIDOCHKA, M. J., KAMP, A. M., LAVENDER, T., De KONING, J. and De CROOS, J. N. A. (2001) Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*; Uncovering cryptic species? *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1335-1342.
- DRIVER, F., MILNER, R. J. and TRUEMAN, J. W. H. (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.*, **104**, 134-150.
- FELSENSTEIN, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **3**, 783-791.
- KIMURA, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**, 111-120.
- PIPE, N. D., CHANDLER, D., BAINBRIDGE, B. W. and HEALE, J. B. (1995) Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.*, **99**, 485-491.
- RATH, A. C., CARR, C. J. and GRAHAM, B. R. (1995) Characterization of *Metarhizium anisopliae* strains carbohydrate utilization (AP150). *J. Invertebr. Pathol.*, **65**, 152-161.
- RODDAM, L. F. and RATH, A. C. (1997) Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 285-288.

- SAITOU, N. and NEI, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Evol. Biol.*, **4**, 406-425.
- ST. LEGER, R. J., MAY, B., ALLEE, L. L., FRANK, D. C., STAPLE, R. C. and ROBERT, D. W. (1992) Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, **60**, 89-101.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. and KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 1596-1599.
- TULLOCH, M. (1976) The genus *Metarhizium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **66**, 407-411.
- VEEN, K. H. (1968) Researchs sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae* le criquet pelerin. *Mededingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland*, **68**, 1-77.