

学 位 論 文

新規エンドルナウイルスがアスパラガス疫病菌の成長と分化、
及び殺菌剤感受性に及ぼす影響

**Effects of novel endornaviruses on vegetative growth, developmental stages and
fungicide sensitivities of the host oomycete, asparagus *Phytophthora* rot fungus
(*Phytophthora* sp.)**

2021. 9

東京農工大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻

内田 景子

目次

摘要.....	5
1. アスパラガス疫病菌分離株におけるウイルス二本鎖 RNA の探索.....	8
1.1. 緒言.....	8
1.2. 材料と方法.....	10
1.2.1. 供試菌株.....	10
1.2.2. 培養条件.....	10
1.2.3. アスパラガス疫病菌からの全核酸抽出.....	11
1.2.4. 二本鎖 RNA 精製.....	11
1.2.5. RT-PCR によるウイルス二本鎖 RNA の抽出と分析.....	12
1.2.6. クローニング.....	12
1.2.7. 分子系統解析.....	13
1.3. 結果.....	15
1.3.1. 国内疫病菌分離株からのエンデルナウイルスの検出.....	15
1.3.2. PEV2 および PEV3 の塩基配列分析.....	21
1.3.3. PEV2 および PEV3 dsRNA によってコードされる推定 RdRps の分子系統解析.....	22
1.4. 考察.....	28

2. PEV2 および PEV3 がアスペルギルス疫病菌に与える影響	29
2.1. 緒言.....	29
2.2. 材料と方法.....	33
2.2.1. 単遊走子を介した PEV2 および PEV3 の伝播.....	33
2.2.2. 宿主菌の栄養成長および発達段階におけるウイルス感染評価.....	33
2.2.2.1. 菌糸成長の測定.....	33
2.2.2.2. 遊走子嚢形成の誘導.....	33
2.2.3. 被嚢胞子形成および被嚢胞子発芽率の決定.....	34
2.2.4. 殺菌剤感受性試験.....	36
2.2.4.1. 菌糸成長阻害.....	37
2.2.4.2. 遊走子嚢形成阻害.....	38
2.3. 結果.....	40
2.3.1. 単遊走子を介した PEV2 および PEV3 の伝播.....	40
2.3.2. 宿主菌の栄養成長および発達段階における PEV2 および PEV3 の存在の影響.....	40
2.3.3. PEV2 および PEV3 感染が宿主菌の殺菌剤感受性に与える影響.....	41
2.3.3.1. 菌糸成長阻害.....	41
2.3.3.2. 遊走子嚢形成阻害.....	57
2.3.4. メタラキシルに曝露された宿主菌における PEV2 および PEV3 の dsRNA 含有量.....	57

2.3.5. 没食子酸 <i>n</i> -プロピルの存在下での菌糸成長に対する PEV2 および PEV3 の効果	58
2.4. 考察.....	63
3. 使用培地および試薬.	66
引用文献	69
謝辞	78

摘要

エンドルナウイルス科に属するウイルスは、9.8~17.6 kbp の線状二本鎖 RNA ゲノムを持ち、植物、菌、卵菌に感染する。植物宿主としては、イネ、インゲンマメ、ピーマン等を含む多くの農作物や河口沿岸部に自生する海草アマモに持続感染する。一方、疫病菌 (*Phytophthora* 属菌) においてもその存在が確認されているが、これまでに報告されてきた一部の例を除き、殆どのエンドルナウイルスは宿主に明らかな症状を起こすことが示されていない。疫病菌は卵菌類に分類され、2018 年時点で 161 種が報告されており、現在も増え続けている。菌と卵菌の相違点は、菌糸体の核相、細胞壁と細胞膜の組成、代謝経路、さまざまな阻害剤に対する感受性など、ライフサイクルにおける多くの重要な特性に基づいている。疫病菌は世界中の畑作物、野菜、果樹、樹木等、広い宿主範囲を持ち、ジャガイモ疫病、ダイズ茎疫病およびピーマン疫病等難防除病害も多く、その防除には多大な費用と、労力が必要とされている。現在、疫病の防除は、化学合成農薬を主体として、CAA 殺菌剤 (細胞壁生合成阻害)、PA 殺菌剤 (核酸合成代謝阻害)、QoI 剤 (呼吸阻害) 等の低濃度・高活性の薬剤を用いて行われることが多いが、一方で薬剤耐性菌出現のリスクも問題となっている。これまでのエンドルナウイルスに関する研究は、主に分離、配列決定およびゲノム構造解析に焦点が当てられてきており、エンドルナウイルスと宿主間の相互作用メカニズムについての知見はほとんど蓄積されていない。本研究では、アスパラガス疫病菌から発見された新規エンドルナウイルス (*Phytophthora endornavirus 2*, PEV2 および *Phytophthora endornavirus 3*, PEV3) のゲノム構造と系統発生の分析を行った。さらにウイルス感染株とウイルス感染株から誘導したウイルス含量低下株を用いて、ウイルス感染が宿主に及ぼす影響を菌のライフサイクルの各ステージにおける表現型と数種類の卵菌殺菌剤の感受性によって評価した。

PEV2 と PEV3 の 2 つの新規エンドルナウイルスは、日本で収集されたアスパラガスの病原菌である *Phytophthora* sp. の分離株 CH98ASP059 菌株および CH98ASP060 菌株から検出された。PEV2 と

PEV3 のゲノムはそれぞれ 14,345 bp および 13,810 bp で構成され、4,640 aa および 4,531 aa の単一の ORF を有していた。これらの推定アミノ酸配列中には、RNA helicase (HeL)、UDP-glycosyltransferase (UGT) および RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) の保存ドメインが含まれており、HeL と RdRp のドメインは他のアルファエンドルナウイルスのドメインと保存性を示した。全アミノ酸配列レベルでは PEV2 は Soybean leaf-associated endornavirus 1 と、PEV3 はベイマツ疫病菌に特異的に感染する *Phytophthora alphaendornavirus 1* (PEV1) と最も高い同一性を示した。RdRp 配列に基づく分子系統解析では PEV2 は Brown algae endornavirus 2 と、PEV3 は PEV1 と最も近縁であった。PEV2 および PEV3 は、分離株 CH98ASP059 および CH98ASP060 で明らかに高含量のウイルスとして検出されたが、PDA 培地での分離株 CH98ASP059 の継代培養中にウイルス低含量株 CH98ASP059-L が得られた。低含量株は、高含量株（オリジナルの分離株）よりも速い正常な菌糸成長を示したが、遊走子嚢および遊走子はほとんど観察されず、これらの器官形成は元の高含量株でのみ観察された。これらの結果は、PEV2 および PEV3 が遊走子嚢形成を促進し、宿主のライフサイクルを調節する可能性があることを示唆している。

殺菌剤感受性は、殺菌剤添加 PDA プレート上の菌糸成長に基づいて調べた。CAA 殺菌剤（セルロース合成酵素の阻害剤）；ベンチアバリカルブイソプロピルのウイルス高含量株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は、ウイルス低含量株と比較して、10 倍高い感受性を示した。同様に、高含量株は、低含量株と比較して、1 mM の没食子酸 *n*-プロピルの存在下で、QoI 殺菌剤（Qo サイトのチトクローム *bc1* の阻害剤）；ファモキサドンに対して 100 倍高い感受性を示した。対照的に、高含量株は、低含量株と比較して、フェニルアミド殺菌剤（RNA ポリメラーゼ I の阻害剤）；メタラキシルに対する感受性が 10 倍低かった。これらの結果は、PEV2 と PEV3 の持続的な感染が宿主卵菌の殺菌剤感受性を変動させることを示した。

本研究では、アスパラガス疫病菌 (*Phytophthora* sp.) に感染する新規エンドルナウイルスの分子特性を明らかにし、エンドルナウイルスの宿主菌の感染過程と殺菌剤感受性に及ぼす影響に関して新たな知見を提示した。PEV2 および PEV3 の疫病菌に対する作用性の解明は、宿主/ウイルス間相互作用

用の理解を深め、環境負荷低減および持続的生産可能な農業技術開発に向けての新たなアプローチの一つに資することができる」と期待される。

1. アスパラガス疫病菌分離株におけるウイルス二本鎖 RNA の探索

1.1. 緒言

マイコウイルスは、菌に広く分布しており、近年、メタトランスクリプトミクスによって益々多くのマイコウイルスが同定されている (Ghabrial and Suzuki, 2009; Pearson et al., 2009; Xie and Jiang, 2014; Ghabrial et al., 2015; Marzano et al., 2016). マイコウイルスは菌糸や胞子を介して垂直感染し、ほとんどの場合、菌糸吻合を介して水平感染する (Ikeda et al., 2003; Tuomivirta et al., 2009; Ong et al., 2016). ほとんどのマイコウイルスは、宿主である菌に目に見える異常な症状を引き起こさないが、一部のマイコウイルスは、病原性の低下や成長率の低下などの表現型の変化（弱毒化）を引き起こすことが報告されている (Nuss, 2005; Ghabrial et al., 2015). このような弱毒化の特徴は、生物的防除に利用される可能性が示唆される。

Endornaviridae ファミリーには、9.8~17.6 kbp の線状二本鎖 RNA ゲノムを持つウイルスが含まれる。それらのゲノムには、3,217~5,825 アミノ酸の範囲のポリタンパク質をコードする単一のオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれている (Valverde et al., 2019). 現在、このファミリーは、ゲノムサイズ、ホストタイプ、および一意のドメインに基づいて、*Alphaendornavirus* と *Betaendornavirus* の2つの属に分類されている (Adams et al., 2017). *Alphaendornavirus* は植物、菌、卵菌に感染し、*Betaendornavirus* は菌のうち子嚢菌に感染する (Fukuhara et al., 2006; Valverde et al., 2019). エンドルナウイルスは、ソラマメ (*Vicia faba*) (Grill and Garger, 1981; Pfeiffer, 1998)、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) (Wakarchuk and Hamilton, 1985, 1990; Mackenzie et al., 1988、Okada et al., 2013)、トウガラシ (*Capsicum annuum*) (Valverde and Gutierrez, 2007)、イネ (*Oryza sativa* L.) (Moriyama et al., 1995)、メロン (*Cucumis melo*) (Coutts, 2005) を含む農作物で広く検出されている。これら、エンドルナウイルスが検出される宿主植物は、ほとんどの場合、明らかな病気の症状は見られないが、唯一の例外として、ソラマメのエンドルナウイルスは、ソラマメの蒴形成に障害を齎し、結果として細胞質雄性不稔を引き起こすことが報告されている (Grill and Garger, 1981; Turpen et al., 1988; Lefebvre et al., 1990; Pfeiffer et al., 1993). また、菌および菌の宿主増殖に対するエンドルナウイルス感染の影響に関する

る報告もほとんどなく (Yang et al., 2018), *Phytophthora* 属で最初に検出されたエンドルナウイルスは、ベイマツから分離された *Phytophthora endornavirus 1* (PEV1) だったが (Hacker et al., 2005), このエンドルナウイルスについても、その宿主卵菌には目立った影響はなかった。ただし、一部の研究では、エンドルナウイルス感染による宿主菌の病原性の抑制が明らかになっており、*Helicobasidium mompa endornavirus 1-670* は、*Helicobasidium mompa* の病原性を低下させることが報告されている (Osaki et al., 2006).

これまで、*Phytophthora* 属菌におけるマイコウイルス感染については、ジャガイモ疫病の原因となる病原菌である *Phytophthora infestans* で、*Phytophthora infestans* RNA virus 1-4 (PiRV1-4) という名前の 4 つの未分類の二本鎖 RNA (dsRNA) ウイルスの検出 (Cai et al., 2009, 2012, 2013, 2019) と、米国のベイマツ (Douglas fir) からの *Phytophthora* 分離株で発見された Alphaendornavirus PEV1 (Hacker et al., 2005), および同様のウイルス株が、米国とヨーロッパの両方でシャクナゲおよびガマズミ属の種を含むさまざまな宿主植物からの *Phytophthora ramorum* 分離株で発見された事例 (Kozlakidis et al., 2010) 等であり、その報告数はまだ少数にとどまっている。

そこで本研究では、エンドルナウイルスが宿主卵菌に及ぼす影響を調査することを目的として、最初に本邦産疫病菌分離株をスクリーニングし、アスパラガス疫病菌で発見された 2 つの新規エンドルナウイルス (*Phytophthora endornavirus 2*, PEV2 および *Phytophthora endornavirus 3*, PEV3) のゲノム構成と系統発生を明らかにした。

1.2. 材料と方法

1.2.1. 供試菌株

Phytophthora 分離 68 菌株 および *Pythium* 分離 2 菌株をウイルスゲノム二本鎖 RNA (以下, dsRNA) の存在を指標とするスクリーニングに供試した. これらの分離株のうち 61 菌株は, 日本の複数の場所から採取した *Phytophthora* 属菌 7 種 (*P. nicotianae*, *P. cactorum*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. palmivora*, *P. citricola*, *P. cinnamomi*) である (Table 1-1). 残りの 7 つの *Phytophthora* sp. は, 富山県, 北海道, 秋田県, 福島県のアスパラガス (*Asparagus officinalis*) から収集された (Table 1-1). これらの中で, 分離株 CH98ASP060, CH98ASP059, および Ku-1 はアスパラガスの貯蔵根から収集され, 分離株 Ak-6-1 および Fk-3 は根茎から収集された.

1.2.2. 培養条件

菌株をストックする時は PDA 平板培地での前培養の後, 直径 4 mm のコルクボーラーで菌叢を培地ごと打ち抜いた. 改変された Weitzman-Silva-Hunter ager (WSH) スラント培地に打ち抜いた菌叢 1 粒を菌叢面が下になるように植菌し, 滅菌雨水を 2~3 ml 程度加え, 15°C で暗条件下のインキュベーターにてストックした. 必要に応じてストックスラントから一部断片を取り出し, PDA 平板培地にて前培養を行い各種実験に供試した. アスパラガス疫病菌の平板培養は PDA 培地で 25°C, 暗条件下で 14 日間培養した. 所定期間培養後, コルクボーラーで培地ごと菌叢を打ち抜き, 新しい平板培地に菌叢面が下になるように植菌して継代培養した. 液体培養には 1/3YG (または PD) 培地を用いた. 1/3 YG 液体培地に, 25 ml 培養 (50ml 三角フラスコ) で 3 ディスク, または 1L 培養 (2L 三角フラスコ) で 20 ディスクを植菌し, 毎分 60 回往復振とうするレシプロカルシェーカー上で, 12 時間明期, 12 時間暗期で 26°C, 2 週間インキュベートした. 液体培養したアスパラガス疫病菌は, 培養後にガーゼで濾過し新聞紙等で軽く脱水した後, 市販の乾燥器 (SIS Co., Ltd.) で 65°C で 10 分間乾燥させた後, -80°C フリーザーにてストックし, 必要に応じて取り出して実験に使用した.

PD 液体培地で培養した場合、菌糸体の収量は、25ml の培養物から約 0.2 g, 1 L の培養物から約 1 g であった。

菌糸、遊走子嚢や遊走子の顕微鏡観察には倒立型リサーチ顕微鏡 IX71 (OLYMPUS) と付属のアプリケーションソフトウェア DP2-BSW (OLYMPUS) の微分干渉モード (Differential interference contrast; DIC), もしくは生物顕微鏡 BX50 (OLYMPUS) を用いた。

1.2.3 アスパラガス疫病菌からの全核酸抽出

湿重量 0.1 g の菌体に液体窒素を用いて乳鉢・乳棒で凍結破碎した。菌体からの核酸抽出には SDS/フェノール法を用いた。菌体破碎物に PCI と等量の RNA 抽出 buffer を加え、ボルテックスミキサーで 5 分間攪拌した。その後、抽出液を 15,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を回収した。再度等量の PCI を加え、ボルテックスミキサーで 5 分間攪拌した。再び 15,000 rpm で 5 分間遠心分離して核酸抽出溶液として上清を回収し、dsRNA 精製や cDNA 合成, RT-PCR の鋳型として使用した。

1.2.4 二本鎖 RNA 精製

核酸抽出溶液からの二本鎖 RNA の精製は、繊維状セルロースパウダーである Advantec D (Advantec Toyo Kaisha, Ltd.) を用いてスピнкаラム法で行った (Okada et al., 2015)。Cellulose D 粉末は 16.6% エタノールを含む 1×STE buffer で平衡化した。核酸抽出には菌体 0.1 g 由来の磨砕物を用い、これに PCI 600 μ l と等量の抽出 buffer を加え、ボルテックスミキサーで 10 分間攪拌した。その後、抽出液を 15,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を回収した。抽出液上清に 0.4ml の PCI を加えボルテックスミキサーで 10 分間攪拌した。再び 15,000 rpm で 5 分間遠心分離して核酸抽出溶液として上清を回収した。この上清に終濃度 16.6% となるように 100% エタノールを加えた。サンプルをアプライする前に 2 ml チューブと底面を画鋏で軽く穴を開けた 0.6 ml チューブを作成し、予め 16.6% エタノールを含む 1×STE で平衡化した Cellulose D 懸濁液 500 μ l を 0.6 ml チューブに注ぎ入れ、13,000 rpm で 10 秒間遠心分離して下受 2 ml チューブの素通り画分を捨てた。カラムにサンプル (~

500 µl) をアプライして遠心分離 (10,000 rpm、室温、5 秒間) して素通り画分を捨てた。洗浄 buffer 500 µl で3 回以上洗浄後、10,000 rpm・5 秒間・室温で遠心分離した。下受チューブを新しい 2 ml チューブに交換し、溶出 buffer 350 µl をアプライして、10,000 rpm・室温・5 秒間で遠心分離後、溶出液に 3M CH₃COONa (pH5.2) を 1/10 量と 100 % エタノールを 2.5 倍量加えて核酸を沈殿させた。最後に、dsRNA をエタノール沈殿により濃縮し、-30°Cで保存した。遠心分離して得られた沈殿を 2×STE に溶解し 10×Loading Dye を加え、アガロースゲル電気泳動 (1×TAE buffer、0.8 % または 0.6 % アガロース) により展開した。ゲルはエチジウムブロマイドで染色し、UV 照射によって dsRNA を可視化した。各分離株の dsRNA の含量は、ゲルイメージングシステム (Ez-Capture MG, ATTO) を使用して推定した。これらの推定値は、Table 1-2 の+記号で示した。

1.2.5. RT-PCRによるウイルス二本鎖 RNA の抽出と分析

ウイルス特異的プライマーを用いた逆転写 (RT) -PCR も、PEV2 および PEV3 dsRNA の検出に使用した。Table 1-3 に示すプライマーを使用し、プロトコル (Life Technologies) に従って、PlatinumTaq を使用した SuperScriptIII ワンステップ RT-PCR システム (Invitrogen Co., Ltd) を使用して反応を設定した。サーマルサイクリング条件は、40 サイクルの増幅と 55°C のアニーリング温度で行った (Komatsu et al., 2016)。

1.2.6. クローニング

CH98ASP060 から抽出された 2 本鎖 RNA を cDNA 合成のテンプレートとして使用し、Aoki ら (2009) の記述方法に従って、一連の重複する cDNA クローンを取得した。これらの cDNA クローンは、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用して配列決定した。さらに、分離株 CH98ASP060 から精製された dsRNA は、Miseq システム (Illumina Co., Ltd. ; Miseq System Catalog No. MS-J-001) を使用した次世代シーケンサーによって配列決定された。2,270,543

の生のリードを取得し、2,255 のコンティグにアセンブルし、そのうち 28 のコンティグが 100 を超えるカバレッジを示した。各 dsRNA セグメントの 5'および 3'末端配列は、SMARTer® RACE cDNA 増幅キット (Clontech Laboratories, Inc.) (Frohman et al., 1988) を使用してメーカーのプロトコルに従い、Table 1-3 に示すプライマーを用いて決定した。

1.2.7. 分子系統解析

塩基配列を分析して GENETYX. Ver.9 ソフトウェア (GENETYX CORPORATION) を用いて ORF 検索を行い、アミノ酸配列に翻訳した。また、GENETYX を使用してタンパク質類似性検索を実行した。CLUSTAL_X バージョン 2.0 (Thompson et al., 1997; Larkin et al., 2007) および MEGA 6 ソフトウェア (Tamura et al., 2013) を使用して一連のペアワイズアラインメントを実行することにより、推定アミノ酸配列に基づくマルチプルアラインメントが得られた。最尤法の下での系統発生分析は、ProtTest 2.4 および PhyML 3.1 (Guindon et al., 2010) によって選択されたアミノ酸置換の最適モデルを使用して実行し、ブートストラップテストは 1,000 回の再サンプリングで実行した。

Table 1-1 2本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) 探索に用いた *Phytophthora* 属菌

Species, host	Isolate	Location	dsRNA	Species, host	Isolate	Location	dsRNA
<i>Phytophthora</i> sp.				<i>P. cactorum</i>			
Asparagus	CH98ASP060	Toyama	+	Loquat	CH98LOQ1 MAFF242859	Chiba	—
Asparagus	CH98ASP051	Toyama	+	<i>P. citrophthora</i>			
Asparagus	CH98ASP059	Toyama	+	Kiwifruit	CH90-15 MAFF245812	Chiba	—
Asparagus	CH98ASP066	Toyama	+	Kiwifruit	CH90-16	Chiba	—
Asparagus	Ku-1	Hokkaido	+	Kiwifruit	CH90-19 MAFF242874	Chiba	—
Asparagus	Ak-6-1	Akita	+	Citrus unshiu	CH98U7B	Chiba	—
Asparagus	Fk-3	Fukushima	+	Citrus unshiu	CH98U8B	Chiba	—
<i>P. nicotianae</i>				<i>P. cryptogea</i>			
Carrot	CH08DC9	Okinawa	—	Carnation	CH96CAR51	Chiba	—
Roselle	CH08HS1	Okinawa	—	Carnation	CH96CAR4	Chiba	—
Roselle	CH08HS3	Okinawa	—	Carnation	CH96CAR8	Chiba	—
Roselle	CH08HS7	Okinawa	—	Gerbera	CH95PHG4	Chiba	—
Roselle	CH08HS9	Okinawa	—	Gerbera	CH97PHG9	Chiba	—
Roselle	CH08HS10	Okinawa	—	Eustoma	CH95PHE26	Chiba	—
Kidney bean	CH1999PV14	Chiba	—	Eustoma	CH95PHE27	Ibaraki	—
Lavender	CH99LAV1-1	Chiba	—	Eustoma	CH95PHE10 MAFF245820	Chiba	—
Lavender	CH99LAV1-2	Chiba	—	Eustoma	CH95PHE16 MAFF242880	Ibaraki	—
Strelitzia	CH07STR23	Chiba	—	<i>P. palmivora</i>			
Strelitzia	CH07STR25	Chiba	—	Oncidium	CH88-1 MAFF242892	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR32	Chiba	—	Cymbidium	CH05PAL051	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR34	Chiba	—	Cymbidium	CH06PAL061	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR34-2	Chiba	—	Citrus	CH99KP1	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR34-3	Chiba	—	Strelitzia	CH07STR12	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR42	Chiba	—	Strelitzia	CH07STR14	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR43	Chiba	—	<i>P. citricola</i>			
Strelitzia	CH07STR42 (4-4)	Chiba	—	Citrus unshiu	CH98U121C	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR42 (4-5)	Chiba	—	Citrus unshiu	CH98U122C	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR72	Chiba	—	Citrus unshiu	CH98U132C	Chiba	—
Strelitzia	CH07STR81	Chiba	—	<i>P. cinnamomi</i>			
Strelitzia	CH07STR101	Chiba	—	Eustoma	CH95PHE1	Ibaraki	—
Citrus junos	CH98Y1A-W-2 MAFF245844	Chiba	—	Eustoma	CH95PHE1-1	Ibaraki	—
Citrus junos	CH98Y1A-W-3 MAFF245844	Chiba	—	Eustoma	CH95PHE4	Ibaraki	—
Citrus junos	CH98Y2A	Chiba	—	Eustoma	CH95PHE20	Ibaraki	—
Citrus junos	CH98Y2A-1	Chiba	—	<i>Pythium</i> spp.			
Bougainvillea	CH89-50	Chiba	—	Nemophila	CH98PYNE1	Chiba	—
Dianthus	CH87KY22	Chiba	—	Ranunculus	CH08RAPY9	Chiba	—
Dianthus	CH99KY11	Chiba	—				
Easter lily	CH91PKL3	Chiba	—				
Parsley	CH85PHP105	Chiba	—				
Parsley	CH85PHP61	Chiba	—				
Carnation	CH01DH1	Chiba	—				

+, infection; -, negative.

1.3. 結果

1.3.1. 国内疫病菌分離株からのエンドルナウイルスの検出

ウイルス dsRNA の存在について、*Phytophthora* 68 株と *Pythium* 2 株をエンドルナウイルスのスクリーニングに供試した。*Phytophthora* の 61 分離株は、日本の複数の場所から収集された果樹、観賞用植物、および野菜作物で見つかった 7 つの既知の種 (*P. nicotianae*, *P. cactorum*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. palmivora*, *P. citricola*, および *P. cinnamomi*) を用いた (Table 1-1). 残りの 7 つの *Phytophthora* sp. 分離株は、疫病菌により腐敗症状を示したアスパラガス (*Asparagus officinalis*) から収集されたものを用いた (Table 1-1, Table 1-2). アスパラガスから分離された *Phytophthora* sp. 7 菌株以外の分離株では dsRNA は検出されなかった。この 7 つの分離株からは、エチジウムブロマイド染色によって視覚的に検出された約 14 kbp の高分子量 dsRNA が含まれていた (Table 1-2, Figure 1-1A). これらの dsRNA 感染分離株のうち 4 つ、CH98ASP051, CH98ASP059, CH98ASP060, および CH98ASP066 (Figure 1-1A) は、日本海沿岸近くの富山県で収集された。他の 3 つの分離株, Ku-1, Ak-6-1, および Fk-3 (Figure 1-1A) は、それぞれ北海道, 秋田, および福島県で収集された。PDA 培地での CH98ASP060 の継代培養中に、表現型が変化した菌糸体のいくつかのセクターが出現した。セクターとして識別できた 2 つの表現型 (生育がやや旺盛な菌叢と、菌叢周辺の生育が抑制された領域) を別々に継代培養して、生育がやや旺盛になった菌叢を CH98ASP060-a として樹立した。元の分離株である CH98ASP060 は、菌糸の成長が著しく損なわれているのに対し、CH98ASP060-a は、部分的に回復した菌糸の成長を示した (Figure 1-1B). 14 kbp の dsRNA は CH98ASP060-a でも検出された (Figure 1-1A). 低濃度のアガロースゲル (0.6%) での長時間の電気泳動後、元の CH98ASP060 には約 13.8 kbp と 14.3 kbp の 2 つの近接した dsRNA があることがわかった (Figure 1-2). サブ分離株 CH98ASP060-a では、14.3 kbp の dsRNA バンドがはっきりと見えたが、13.8 kbp のバンドはかすかにしか見えなかった (Figure 1-2).

以下で詳しく説明するように、14.3 kbp dsRNA を PEV2, 13.8 kbp dsRNA を PEV3 と指定し、これらの各 dsRNA に特異的な PCR プライマーを作製した (Table 1-3). プライマーの両方のセットを使用して RT-PCR を実行し、アスパラガスからの分離株 *Phytophthora sp.* の 1 つ (北海道分離株 ; Ku-1) を除くすべてで PEV2 と PEV3 の両方の dsRNA を簡単に検出できるレベルを示した (Table 1-2, Figure 1-1C). これらには、サブ分離株 CH98ASP060-a が含まれていた (Figure 1-1C). 分離株 Ku-1 はかすかな増幅産物のみを示し (Figure 1-1C), Ku-1 分離株が PEV2 および PEV3 と類似しているが、同一ではないウイルス配列を持つ可能性を示唆している.

また、CH98ASP059 で菌糸体のセクター化を観察し、生育が早くなったセクターを分離してサブ分離株 CH98ASP059-L として樹立した. 元の分離株 (CH98ASP059) は 菌糸の成長障害を示したが、サブ分離株 (CH98ASP059-L) は活発な菌糸の成長を示した (Figure 1-1B). 約 14kbp の dsRNA バンドは、CH98ASP059-L から単離された RNA のゲル電気泳動では検出できるレベルではなかった (Figure 1-1A). ただし、PEV2 および PEV3 に特異的なプライマーを使用して RT-PCR を実行した場合、両方の dsRNA が CH98ASP059-L で検出された (Table 1-2, Figure 1-1C). 従って、PEV2, PEV3 高含量の 14 kbp dsRNA を含む株は、成長の減衰を示し (CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059; Figure 1-1B), PEV2, PEV3 低含量の株 (CH98ASP059-L) は活発な菌糸成長を示した. これらの結果は、菌糸成長が抑制される表現型が、アスパラガス分離株 *Phytophthora sp.* に持続感染する PEV2 および PEV3 ウイルスの宿主細胞内における高含量化によって引き起こされる可能性を示唆した.

Table 1-2 本研究で供試したアスパラガス疫病菌株の採取地, および各分離株における
エンデルナウイルスの存在

菌株名	採取地	エンデルナウイルス感染	
		dsRNA ^a	Contents ^b
CH98ASP060	Toyama	PEV2&PEV3	+++
CH98ASP060-a	Toyama	PEV2&PEV3#	++
CH98ASP051	Toyama	PEV2&PEV3	+++
CH98ASP059	Toyama	PEV2&PEV3	+++
CH98ASP059-L	Toyama	PEV2#&PEV3#	+
CH98ASP066	Toyama	PEV2&PEV3	+++
Ku-1	Hokkaido	14-kb dsRNAs	+++++
Ak-6-1	Akita	PEV2&PEV3	++
Fk-3	Fukushima	PEV2&PEV3	+++

^a # dsRNA 抽出後のエチジウムブロマイド染色(0.5mg/ml)では検出限界以下だが, RT-PCR では検出.
PEV2; 14.3 kbp, PEV3; 13.8 kbp.

^b 材料と方法に記載されているように, dsRNA の含量を推定した.

Table 1-3 本研究で使用した合成プライマー

primer name	sequence (5'-3')	position
PEV2-1F	AACCACACTTGCGAGCCTATGAAC	PEV2 (2369-2392)
PEV2-1R	GTCGCCCAGACTAGTTTCAATTGC	PEV2 (3305-3328)
PEV2-5' RACE	GGTCAAGACAGGCGGTAATCTCG	PEV2 (144-166)
PEV2-3' RACE	GTGATGTTACCAAGCATGGGACGTTCTG	PEV2(13904-3932)
PEV3-1F	GTTCCAATACCGTCCAACGTGTC	PEV3 (961-983)
PEV3-1R	ACTTCACCAGGGACCTTCATGG	PEV3 (1559-1580)
PEV3-5' RACE	CTTGACCTATTTGTAAGTCTTTAGGTGATGG	PEV3 (214-245)
PEV3-3' RACE	CACGGCACTTTCTGTAGTATGGTGGCTTAC	PEV3 (13396-13425)
oligo-dT	CGA TGG TAC CTG CAG GCG CGC CTT TTT TTT TTT TTT TTT	for 3' RACE
oligo-dT AP	CGA TGG TAC CTG CAG GCG CGC C	for 3' RACE

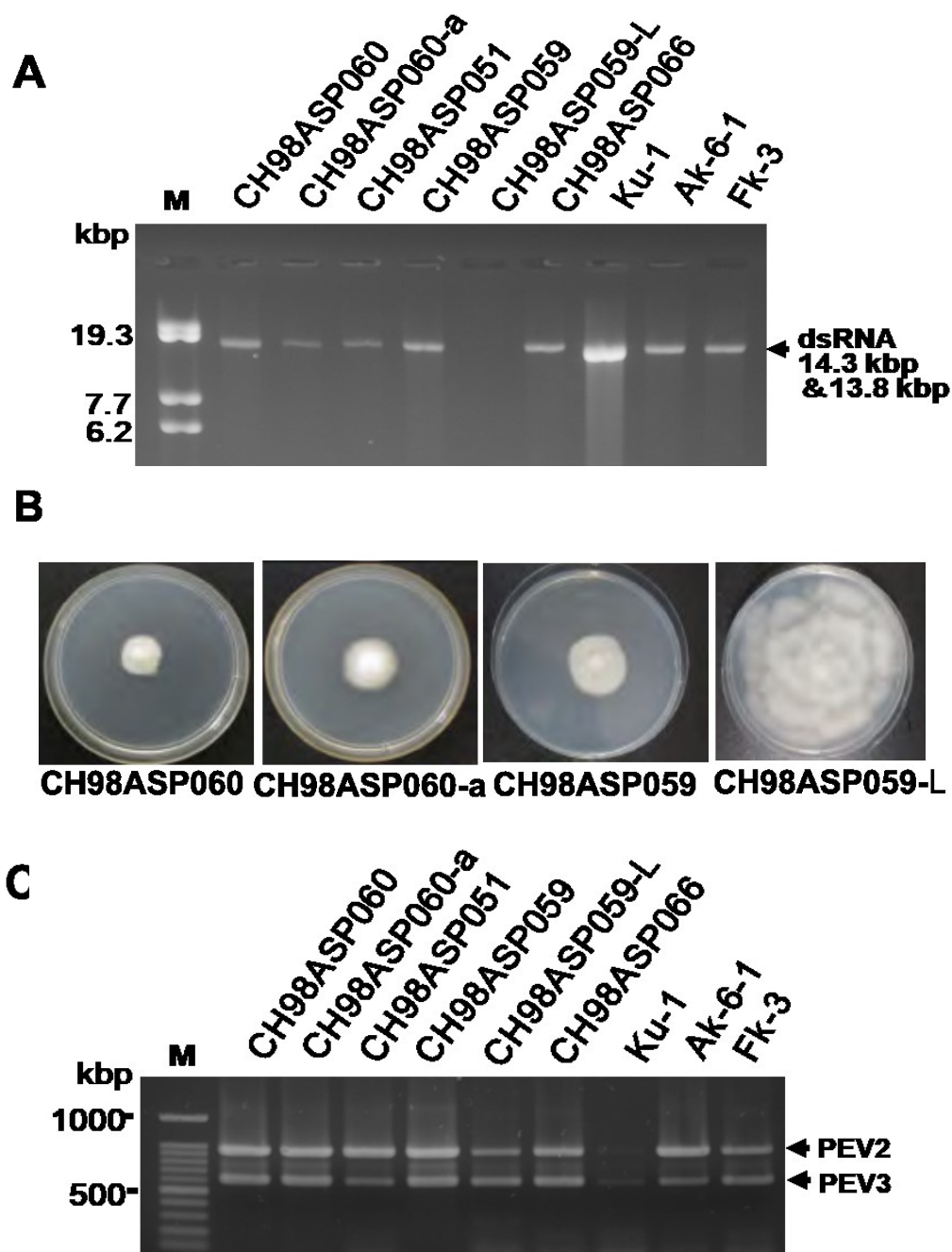


Figure 1-1 疫病菌分離株における PEV2 および PEV3 の dsRNA ゲノムの検出

(A) 各分離株から精製された dsRNA のアガロースゲル電気泳動. レーン指定: M, DNA マーカー (EcoT14I で消化された 250ng の λ DNA). 各分離株 (乾燥重量 0.1 g) に由来する dsRNA を, 0.8% アガロースゲルで 20 V で 18 時間電気泳動し, エチジウムブロマイド (0.5 μ g / ml) で染色した. 矢印は, 14.3 kbp および 13.8 kbp の dsRNA の位置を示している. (B) 4 つの分離株の菌糸形態. 元の分離株 CH98ASP060 とその誘導体 CH98ASP060-a, 元の分離株 CH98ASP059 とその誘導体 CH98ASP059-L を PDA プレート上で 25°C, 14 日間増殖させた. (C) PEV2 および PEV3 特異的プライマーを使用したワンステップ RT-PCR 増幅の結果 (Table1-3).

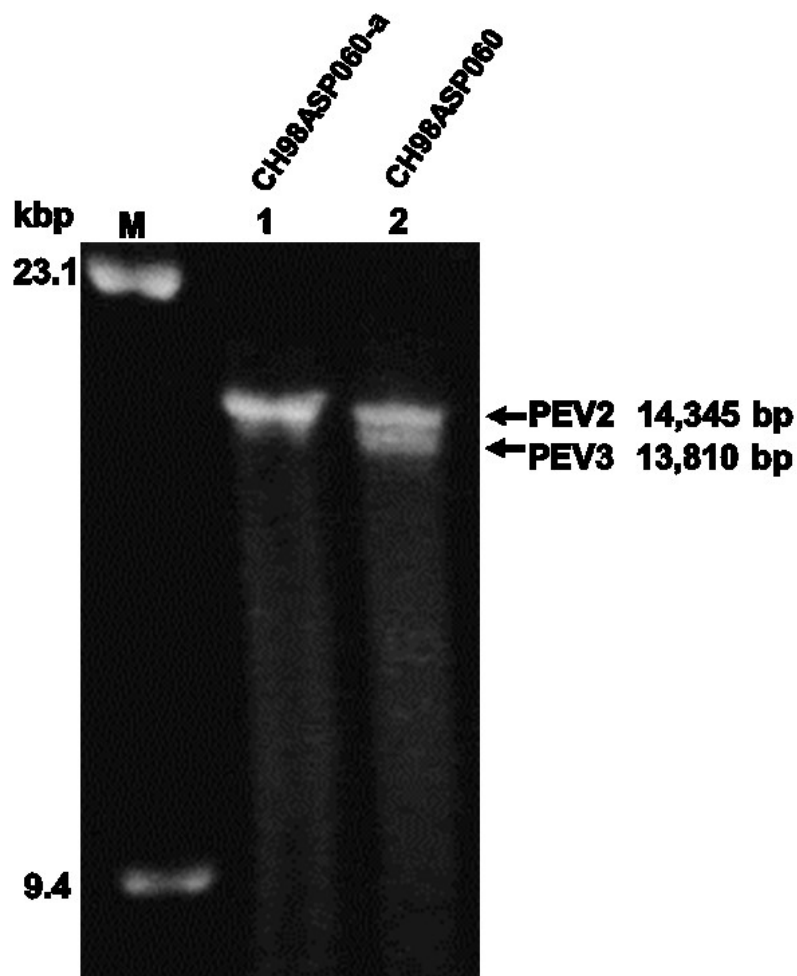


Figure 1-2 CH98ASP060 および CH98ASP060-a における PEV2 および PEV3 の dsRNA ゲノムの検出

0.6% アガロースゲル電気泳動, 20V, 50 時間, 0.5 mg / ml のエチジウムブロマイドで染色.

レーン M, DNA サイズマーカー (HindIII で消化された 250 ng の λ DNA) ; レーン 1, CH98ASP060-a / PEV2&PEV3#*: レーン 2, CH98ASP060 / PEV2&PEV3.

* # dsRNA 抽出後のエチジウムブロマイド染色(0.5mg/ml)では検出限界以下だが, RT-PCR では検出された.
PEV2; 14.3 kbp, PEV3; 13.8 kbp.

1.3.2. PEV2 および PEV3 の塩基配列分析

アスパラガスから分離された *Phytophthora* sp. 分離株に感染している PEV2 および PEV3 の詳細な解析のため、PEV2 および PEV3 ウイルスゲノムの全塩基配列の決定を行った。cDNA クローンを作製し、分離株 CH98ASP060 から 14.3 および 13.8 kbp のウイルス dsRNA の塩基配列を決定した。それらのゲノムサイズ、ゲノム構成、および他のエンドルナウイルスとの類似性に基づいて、14.3 kbp dsRNA を *Phytophthora endornavirus 2* (PEV2) として、13.8 kbp dsRNA を *Phytophthora endornavirus 3* (PEV3) として命名した。PEV2 と PEV3 の全長塩基配列は、アクセッション番号 LC586217 (PEV2; 14,345 nt) および LC586218 (PEV3; 13,810 nt) で Genbank (NCBI) データベースに寄託した。PEV2, PEV3, および PEV1 のゲノム構成 (Hacker et al., 2005) を Figure 1-3 に示す。PEV2 ゲノムは、379 bp の長さの 5' 非翻訳領域 (UTR: Untranslated region), 4,640 コドン (= 4,640 aa) の単一 ORF, およびその末端が 8 塩基のシトシン残基で終わる 46 bp の長さの 3' UTR で構成されている。PEV3 ゲノムには、181 bp の 5' UTR, 4,531 コドンの ORF, および 37 bp の 3' UTR があり、これも 8 塩基のシトシン残基で終わっている。これらの構造は、*Phytophthora* sp. で最初に検出された Alphaendornavirus PEV1 (Hacker et al., 2005) の構造と類似性が高かった。PEV1 および PEV3 はそれぞれ、5' UTR に終止コドンがない特徴を示した (Figures 1-3B, 1-3C)。

PEV2 および PEV3 の ORF によってコードされるポリタンパク質には、NCBI 保存ドメインデータベース (CDD; Marchler-Bauer et al., 2017) を検索して特定した保存タンパク質ドメインが含まれている。両方のウイルスのポリタンパク質のこれらの保存されたドメインには、RNA ヘリカーゼ (Superfamily 1; CDD accession pfam01443), UDP : フラボノイドグリコシルトランスフェラーゼ (YjiC, YdhE family; CDD accession COG1819), UDP-グリコシルトランスフェラーゼ (GT1_Gtf-like; CDD accession cd03784), および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 2 (RdRp 2; CDD accession pfam00978) が含まれる。PEV1, PEV2, および PEV3 のヘリカーゼ (Hel-1), UDP グリコシルトランスフェラーゼ (UGT), および RdRp の位置を Figures 1-3 に示す。保存された UDP : フラボノイドグリコシルトランスフェラーゼドメインは、PEV2 のアミノ酸位置 3100–3260 および PEV3 の位置 2991–3108 に位置していた。データベース内の保存されたドメインとの類似性を示す E 値は次のとおりである。Hel-1、PEV2 の場合は

1.97E-05, PEV3 の場合は 1.24E-08. UGT, PEV2 の場合は 3.91E-04, PEV3 の場合は 1.73E-04. RdRp, PEV2 の場合は 5.78 E-20, PEV3 の場合は 2.66E-14. また, UDP : フラボノイドグリコシルトランスフェラーゼの場合, PEV2 の場合は 1.14E-06, PEV3 の場合は 3.17E-06 であった.

PEV2 と PEV3 によってコードされるポリタンパク質の完全なアミノ酸配列間に低レベルの同一性 (11.2 %) と類似性 (51.8 %) が見つかった. PEV3 のポリタンパク質は, *Phytophthora* 分類群ダグラスファーに感染する PEV1 のポリタンパク質と 40 % のアミノ酸同一性を共有している (Genbank accession YP_241110.1; Hacker et al., 2005) . PEV2 および PEV3 の Hel-1, UGT, および RdRp 2 ドメイン間の同一性は, それぞれ 42, 21, および 53 % であった. PEV2 および PEV3 の RdRp および Hel-1 領域は, 植物, 菌, および卵菌由来の他のエンドルナウイルスの RdRp および Hel-1 ドメインと 25~75% の同一性を示した (Tables 1-4, 1-5) . 一方, PEV2 および PEV3 の UGT 領域と, 以前に報告された他のエンドルナウイルスの UGT 領域との間に類似性は見つからなかった. それらの UGT 領域は, 報告されている細菌および菌の UGT 領域と 20~40 % の類似性を示している (データは示していない).

1.3.3. PEV2 および PEV3 dsRNA がコードする推定 RdRp の分子系統解析

PEV2, PEV3, および 36 の関連するエンドルナウイルスの推定 RdRp 領域を使用し, Grapevine leafroll-associated virus 1 を外群として, 最尤法に基づく分子系統樹を構築した. 分析に使用しウイルスにコードされた配列の GenBank アクセション番号を Table 1-6 に示す. 分子系統樹は, エンドルナウイルスが *Alphaendornavirus* 属と *Betaendornavirus* 属の 2 つのクレードに分割できることを示した. PEV2 は Brown algae endornavirus 2 と, PEV3 は PEV1 と最も近縁であった. PEV2 および PEV3 (および PEV1) は, *Alphaendornavirus* 属に分類されたが, 核酸相同性が 70% 以下であり, ICTV 定義に従って異なるウイルス種に属することが示された. 従って, 系統発生分析により, PEV2 および PEV3 を *Endornaviridae* 科の新しい種として分類されることを示した (Figure 1-4).

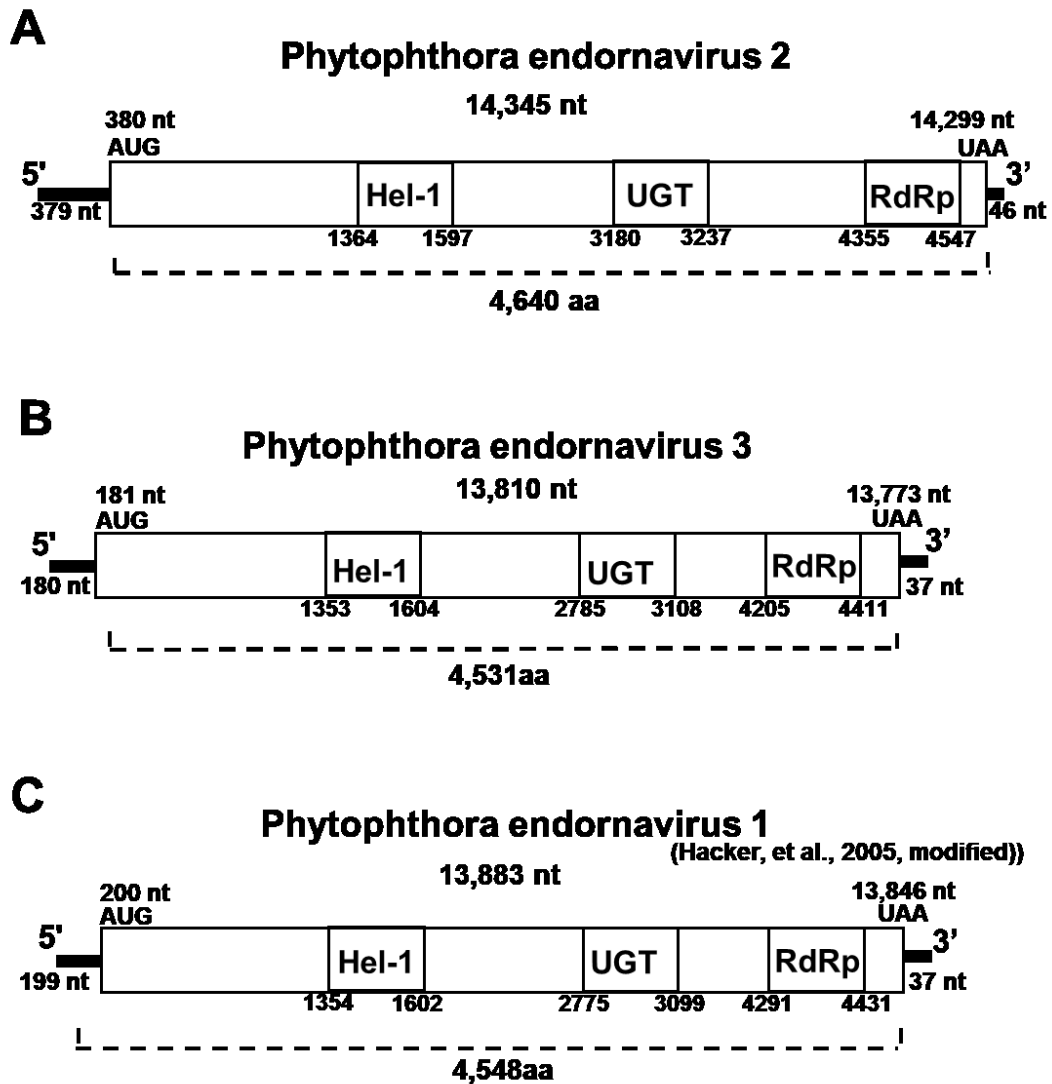


Figure 1-3 Phytophthora endornavirus (PEV) ゲノムの特性

各 dsRNA ゲノムサイズはウイルス名の下に表示. 点線下に予測されるアミノ酸数を表示. ボックスは ORF を表し, 線は UTR を表す. Hel-1, ウイルスヘリカーゼ 1; UGT, UDP-グリコシルトランスフェラーゼ; RdRp, ウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ. (A) PEV2 のゲノム構成. ウイルスゲノムの長さは 14,345 nt. (B) PEV3 のゲノム構成, ウイルスゲノムの長さは 13,810 nt. (C) PEV1 のゲノム構成, ウイルスゲノムの長さは 13,883 nt.

Table 1-4 PEV2 および PEV3 の RdRp 領域と他のエンドルナウイルスの RdRp 領域との間のアミノ酸の同一性

species name	RdRp		Sequence ID (NCBI)
	PEV2	PEV3	
<i>Lagenaria siceraria endornavirus</i> *	-	43%	YP_009010973.1
<i>Cucumis melo endornavirus</i>	43%	45%	YP_009222598.1
<i>Yerba mate endornavirus</i>	45%	46%	YP_009046830.1
<i>Vicia faba endornavirus</i>	49%	44%	YP_438201.1
<i>Phytophthora endornavirus 1</i>	53%	72%	YP_241110.1
<i>Hordeum vulgare endornavirus</i>	43%	44%	YP_009212849.1
<i>Winged bean endornavirus 1</i>	41%	44%	YP_009305414.1
<i>Phaseolus vulgaris endornavirus 2</i>	42%	44%	BAM68540.1
<i>Hot pepper endornavirus</i>	43%	43%	YP_009165596.1
<i>Rhizoctonia cerealis endornavirus 1</i>	48%	46%	YP_008719905.1
<i>Rhizoctonia solani endornavirus 1</i>	43%	-	YP_009552276.1
<i>Arthrocladiella mougeotii endornavirus</i>	-	44%	AZO92732.1
<i>Helianthus annuus endornavirus</i>	47%	43%	YP_009553502.1
<i>Brown algae endornavirus 1</i>	47%	49%	BBZ90073.1
<i>Brown algae endornavirus 2</i>	49%	-	BBZ90074.1
<i>Bremia lactucae associated endornavirus 1</i>	52%	75%	QIP68005.1
Soybean leaf-associated endornavirus 1	76%	53%	ALM62234.1

*The virus hosts are **oomycete** (red letter), **plant** (green letter), **basidiomycota** (brown letter) **Ascomycota** (purple letter) and **algae** (pink). The virus host is unknown (black letter).

Table 1-5 PEV2 および PEV3 の Hel-1 領域と他のエンドルナウイルスの Hel-1 領域との間のアミノ酸の同一性

species name	Hel-1		Sequence ID (NCBI)
	PEV2	PEV3	
<i>Lagenaria siceraria endornavirus</i> *	31%	30%	YP_009010973.1
<i>Cucumis melo endornavirus</i>	33%	-	YP_009222598.1
<i>Yerba mate endornavirus</i>	31%	-	YP_009046830.1
<i>Persea americana endornavirus 1</i>	33%	-	YP_005086952.1
<i>Oryza sativa endornavirus</i>	32%	30%	YP_438200.1
<i>Oryza rufipogon endornavirus</i>	-	31%	YP_438202.1
<i>Vicia faba endornavirus</i>	33%	33%	YP_438201.1
<i>Phytophthora endornavirus 1</i>	39%	58%	YP_241110.1
<i>Hordeum vulgare endornavirus</i>	27%	-	YP_009212849.1
<i>Winged bean endornavirus 1</i>	28%	28%	YP_009305414.1
<i>Phaseolus vulgaris endornavirus 2</i>	-	34%	BAM68540.1
<i>Hot pepper endornavirus</i>	-	34%	YP_009165596.1
<i>Rhizoctonia cerealis endornavirus 1</i>	30%	30%	YP_008719905.1
<i>Agaricus bisporus endornavirus 1</i>	-	32%	AQM32768.1
<i>Grapevine endophyte endornavirus</i>	25%	29%	YP_007003829.1
<i>Erysiphe cichoracearum endornavirus</i>	27%	28%	YP_009225663.1
<i>Rhizoctonia solani endornavirus 1</i>	25%	29%	YP_009552276.1
<i>Arthrocladiella mougeotii endornavirus</i>	-	30%	AZO92732.1
<i>Helianthus annuus endornavirus</i>	-	31%	YP_009553502.1
<i>Brown algae endornavirus 1</i>	29%	31%	BBZ90073.1
<i>Brown algae endornavirus 2</i>	32%	33%	BBZ90074.1
<i>Geranium carolinianum endornavirus 1</i>	-	27%	QBB21108.1
<i>Bremia lactucae associated endornavirus 1</i>	39%	63%	QIP68005.1

*The virus hosts are **oomycete** (red letter), **plant** (green letter), **basidiomycota** (brown letter) **Ascomycota** (purple letter) and **algae** (pink). The virus host is unknown (black letter).

Table 1-6 分子系統解析で使したウイルスにコードされるアミノ酸配列の GenBank アクセションNo. .

Virus name	Accession	Genus	Family
<i>Lagenaria siceraria endornavirus</i>	YP_009010973.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Cucumis melo endornavirus</i>	YP_009222598.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Phaseolus vulgaris endornavirus 1</i>	YP_009011062.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Basella alba endornavirus 1</i>	AB844264.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Yerba mate endornavirus</i>	YP_009046830.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Persea americana endornavirus 1</i>	YP_005086952.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Oryza sativa endornavirus</i>	YP_438200.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Oryza rufipogon endornavirus</i>	YP_438202.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Vicia faba endornavirus</i>	YP_438201.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Phytophthora endornavirus 1</i>	YP_241110.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Hordeum vulgare endornavirus</i>	YP_009212849.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Winged bean endornavirus 1</i>	YP_009305414.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Phaseolus vulgaris endornavirus 2</i>	BAM68540.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Bell pepper endornavirus</i>	YP_004765011.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Hot pepper endornavirus</i>	YP_009165596.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Helicobasidium mompa endornavirus 1</i>	YP_003280846.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Rhizoctonia cerealis endornavirus 1</i>	YP_008719905.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Agaricus bisporus endornavirus 1</i>	AQM32768.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Grapevine endophyte endornavirus</i>	YP_007003829.1	<i>Alphaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Erysiphe cichoracearum endornavirus</i>	YP_009225663.1	NA	NA
<i>Cluster bean endornavirus 1</i>	AYA60157.1	NA	NA
<i>Phaseolus vulgaris endornavirus 3</i>	AXB99512.1	NA	NA
<i>Rhizoctonia solani endornavirus 1</i>	YP_009552276.1	NA	NA
<i>Arthrocladiella mougeotii endornavirus</i>	AZO92732.1	NA	NA
<i>Helianthus annuus endornavirus</i>	YP_009553502.1	NA	NA
<i>Brown algae endornavirus 1</i>	BBZ90073.1	NA	NA
<i>Brown algae endornavirus 2</i>	BBZ90074.1	NA	NA
<i>Geranium carolinianum endornavirus 1</i>	QBB21108.1	NA	NA
<i>Phytophthora endornavirus 2</i>	LC586217	NA	NA
<i>Phytophthora endornavirus 3</i>	LC586218	NA	NA
<i>Bremia lactucae associated endornavirus 1</i>	QIP68005.1	NA	NA
<i>Alternaria brassicicola endornavirus 1</i>	YP_009115493.1	<i>Betaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Tuber aestivum endornavirus</i>	YP_004123950.1	<i>Betaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Gremmeniella abietina endornavirus 1</i>	YP_529670.1	<i>Betaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum endornavirus 1</i>	YP_009022070.1	<i>Betaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Botrytis cinerea endornavirus 1</i>	YP_009315910.1	<i>Betaendornavirus</i>	<i>Endornaviridae</i>
<i>Rosellinia necatrix endornavirus 1</i>	YP_009276355.1	NA	NA
<i>Sclerotinia minor endornavirus 1</i>	YP_009552723.1	NA	NA
<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>	YP_004940642	<i>Ampelovirus</i>	<i>Closteroviridae</i>

NA= Not available.

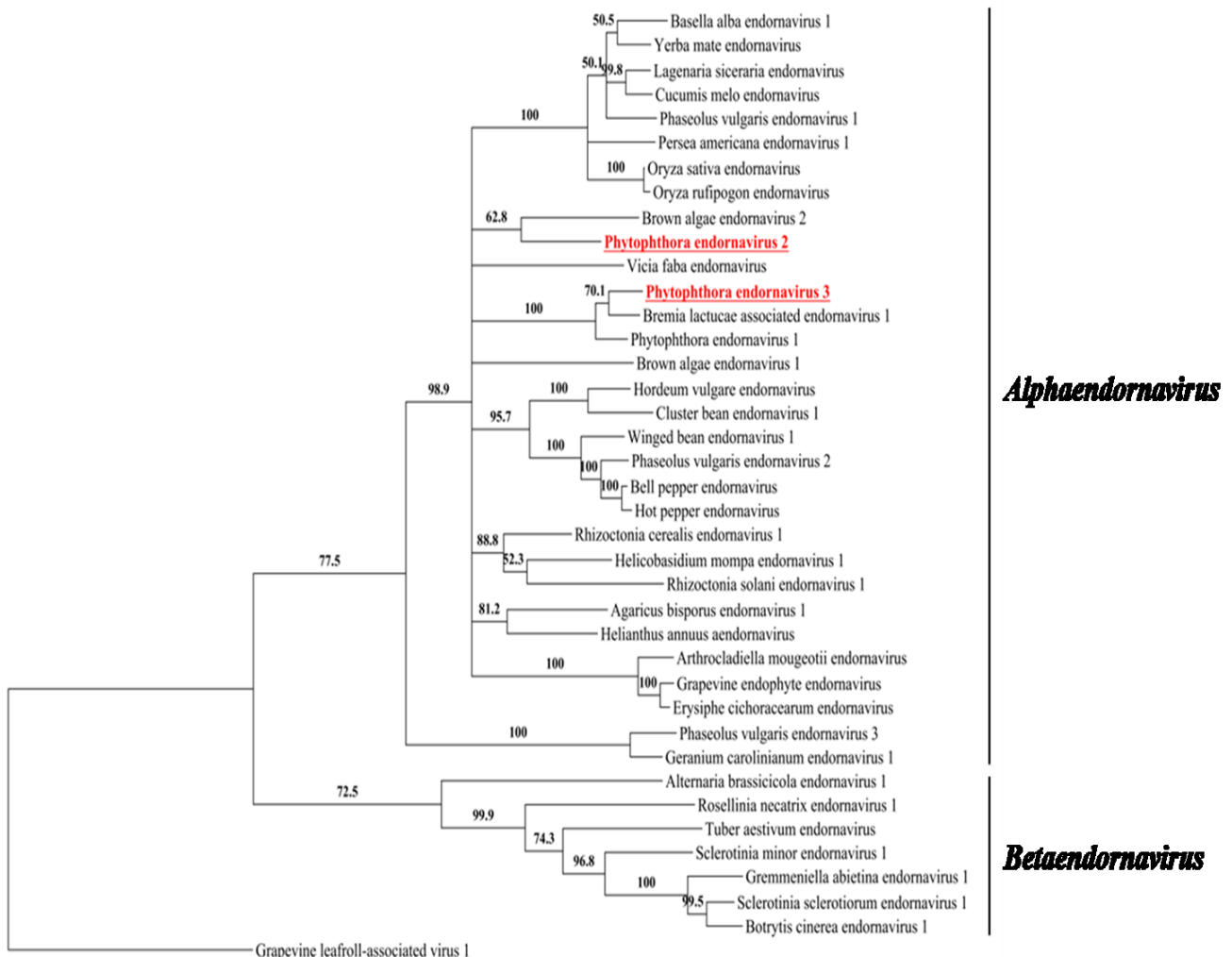


Figure 1-4 PEV2, PEV3, および関連するエンドルナウイルスの推定 RdRp 領域の推定アミノ酸配列に基づく分子系統樹

Le_Gascuel_2008 モデルに基づく最尤法を使用して推測された (Le and Gascuel, 2008). 離散ガンマ分布を使用して, サイト間の進化速度の違いをモデル化した 5 つのカテゴリー (+ G、パラメーター= 1.2113). レート変動モデルでは, 一部のサイトを進化的に不変にすることができた ([+ I], 4.0463 % サイト). 進化論的分析は MEGA6 で行った (Tamura et al, 2013). ノードのサポートは, 1000 回のブートストラップ反復後の信頼性のパーセンテージによって評価された. ブートストラップ値が 50 % 未満のブランチは, TreeGraph 2ver. で折りたたまれた. 2.14.0-771 ベータ版 (Stöver and Müller, 2010). 分析された遺伝子の GenBank アクセッション No は Table 1-6 に記載した. Grapevine leafroll-associated virus 1 は, *Closteroviridae* 科の ampelovirus であり, アウトグループとして使用された.

1.4. 考察

本研究では、日本で収集された *Phytophthora* sp. から菌糸体の dsRNA 分子を探すことにより、マイコウイルスによる感染をスクリーニングした。その結果、2つの新規エンドルナウイルス、*Phytophthora endornavirus* 2 (PEV2, 14,345 bp) と *Phytophthora endornavirus* 3 (PEV3, 13,810 bp) が見つかった。RdRp 配列に基づく、これらおよび他のエンドルナウイルスの系統発生分析は、PEV2 および PEV3 がベイマツで見つかった分離株 *Phytophthora* sp. の *Phytophthora endornavirus* 1 (PEV1) (Hacker et al., 2005) と密接に関連していることを示した (Table 1-4)。同じ属に属する宿主生物で3つの異なるエンドルナウイルスが発見された事例は、インゲンマメの *Phaseolus vulgaris* でも報告されている (Okada et al., 2013, 2018)。また、分離株 Ku-1 からの dsRNA は、実際には多く蓄積しているが (Figure 1-1A)、PEV2 および PEV3 特異的プライマーを使用した RT-PCR 分析では、わずかな増幅産物しか得られず (Figure 1-1C)、Ku-1 エンドルナウイルスが PEV2 および PEV3 の配列と類似しているが、同一ではない配列を持っている可能性があることを示唆している。これは、*Phytophthora* エンドルナウイルスが他の同様の姉妹ウイルスを持つことを示している。

系統発生分析により、PEV2 と PEV3 は進化的にソラマメエンドルナウイルス (VfEV) に近いことが明らかになった (Figure 1-4, Pfeiffer, 1998)。VfEV は、宿主植物に重大な損傷を与える唯一の植物エンドルナウイルスである (Grill and Garger, 1981)。VfEV が高含量で存在する場合、ソラマメ *Vicia faba* の蒴は異常な形を示し、雄性不稔となった (Turpen et al., 1988)。

2. PEV2 および PEV3 がアスパラガス疫病菌に与える影響

2.1. 緒言

Phytophthora 属は、世界中の野外作物、野菜作物、果樹、観賞植物、樹木植物など、さまざまな宿主に感染する可能性のある植物病原性卵菌の属である。多くの *Phytophthora* 属菌は多犯性であり、農林業における重要な病原体である。*Phytophthora* 属菌は、それらの rDNA ITS 領域の配列に基づいて、少なくとも 10 のクレードに分割されている (Cooke et al., 2000; Blair et al., 2008)。これらの卵菌は上門ストラメノパイルに属し、褐藻と珪藻に系統発生的に関連している (Cavalier-Smith and Chao, 2006; Webster and Weber, 2007)。

Phytophthora 属菌のライフサイクルの中で菌糸による栄養成長の他、菌糸から伸びた遊走子嚢柄上に形成される遊走子嚢が重要な役割を果たしている (Erwin and Ribeiro, 1996; Schumann and D'Arcy, 2000)。作物栽培において、遊走子嚢は水の存在下で遊走子の生成と放出を行うが、遊走子嚢が発芽する場合 (直接発芽) と、遊走子嚢から放出された遊走子が被嚢化した後に発芽する場合 (間接発芽) とがある。間接発芽の過程は、遊走子嚢から放出された遊走子が数時間泳いだ後、静止、球形になり細胞壁を形成するこの過程を被嚢化と呼ぶ。*Phytophthora* 属菌はこれらの感染過程を介して健康な組織に拡散し、新しい感染を引き起こす。最初の感染から数日以内に、病原体は目に見える病変を生成し、そこから多くの遊走子嚢が生成され、それぞれが別の病因サイクルを開始することができる (Figure 2-3)。

アスパラガスの *Phytophthora rot* は、カリフォルニアで最初に報告され (Ark and Barret, 1938)、その後、病原体は *Phytophthora sojae* として同定された (Falloon, 1982)。アスパラガスは、ペルーの *Phytophthora nicotianae* (Aragon-Caballero et al., 2008) およびミシガン州の *Phytophthora asparagi* (Saude et al., 2008; Crous et al., 2012) にも感染が確認されている。日本では、愛媛県、佐賀県および長崎県でアスパラガスに *Phytophthora nicotianae* の感染が確認され (横田ら, 2013; 渡邊ら, 2015; 長崎県病害虫防除所 2017)、富山県では *Phytophthora erythroseptica* (山崎・守川, 1998)、福島県、北海道および秋田県では、*P. asparagi* に近いものが同定されたが (児玉ら, 2014)、その後、*Phytophthora* sp.として

報告されている (古屋ら, 2015; 児玉ら, 2016; Kodama et al., 2015). また, 長野県においても *Phytophthora* sp. の発生が報告されている (長野県病害虫防除所 2017). アスパラガスは多年生作物であり, 栽培年数が 20 年を超えることも珍しくない. そのため, 一度植え付けると, 長期間にわたり圃場の土壌消毒が困難となる. そのために改植を行うが, 改植後の株の生育不良や成株になる前に枯死するなどの連作障害が問題となっており, 連作障害を引き起こす土壌病害の中でも近年, 疫病の発生により改植がうまくいかない産地が多くみられるようになってきている.

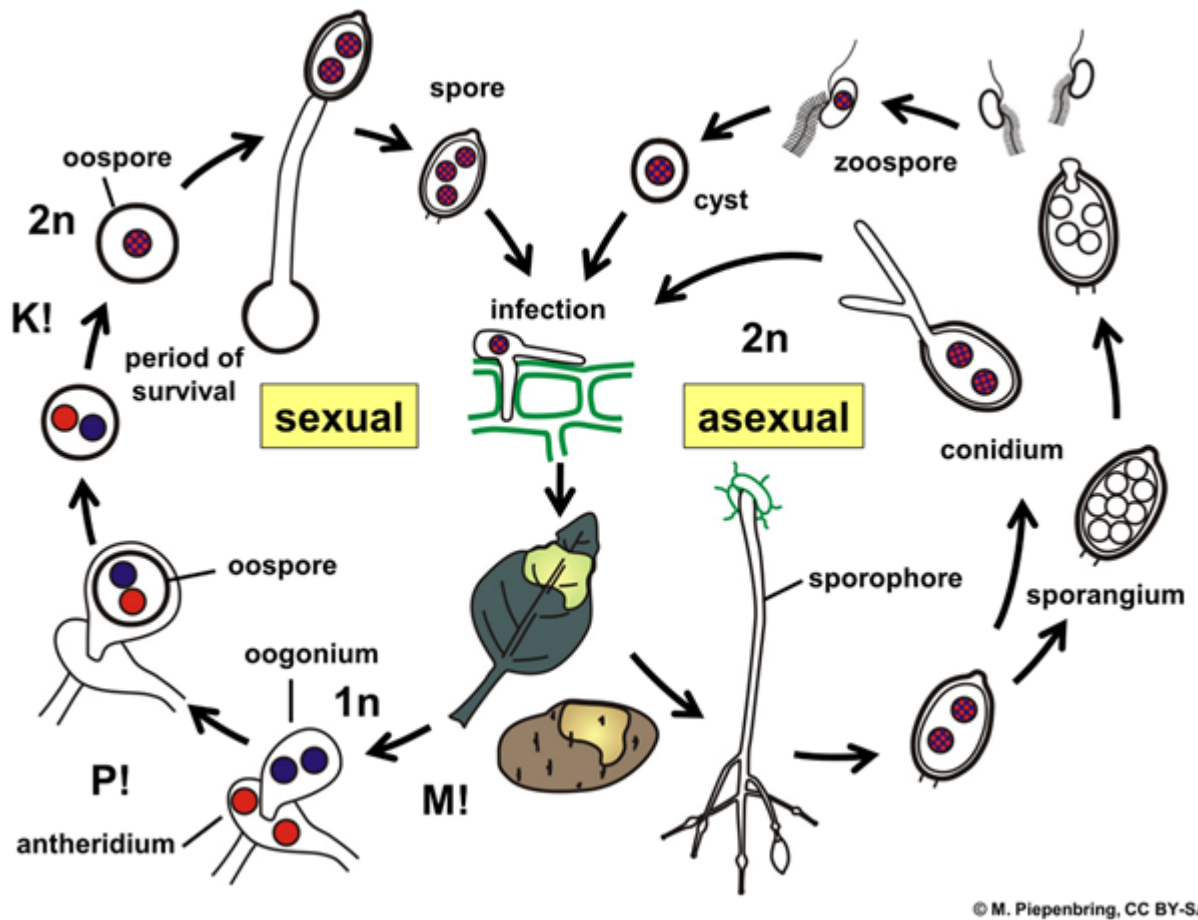
このような疫病の防除は, 主に, フェニルアミド, キノン外部阻害剤, カルボン酸アミド, およびマルチサイト阻害剤を含む 16 の異なる化学グループからの殺菌剤に依存しているが, 殺菌剤の頻繁な施用は, 化学的に制御するのが難しい殺菌剤耐性菌の発生を助長する可能性も否定できない. 耐性菌対策として異なる系統剤や, 耐性菌発達リスクのない多作用点阻害剤への依存が高まっているが, 前者においても使用頻度によっては耐性菌リスクを高めることに繋がり, 後者においては環境負荷が高いことから近年欧米では使用制限が強化される傾向が見られている (Fisher et al., 2018).

このような中, 令和 3 年 5 月, 農林水産省は「みどりの食料システム戦略」を策定した (<https://www.maff.go.jp/j/press/kanbo/kankyo/210512.html>). この戦略の中では 2050 年までに人や環境に対するリスクの高い農薬からより低い農薬への転換を段階的に進めつつ, 化学農薬のみに依存しない総合的な病害虫管理体系の確立・普及を図ることが目標とされている. 具体的には RNA 農薬 (RNA 干渉 (RNAi) 法による遺伝子機能抑制を利用した害虫防除法) の開発や薬剤抵抗性の獲得を抑制できる農薬の開発等の取り組みが示されており, 今後は今まで以上に化学合成農薬以外の環境負荷低減型防除資材の開発が重要になると考えられる.

これまでの環境負荷を低減する防除資材としては 1980 年代以降, 微生物農薬の開発が進み, 現在殺菌剤として 31 剤が登録され, 既存の化学農薬との併用が進められている. また新たな生物防除資材として, 植物病原糸状菌に感染するマイコウイルスには宿主菌の病原力を低下させるものが報告されており, これらはその病原糸状菌に対する生物防除資材として適用できる可能性が示唆されている (Huang and Ghabrial, 1996; Yu et al., 2013).

Phytophthora 属菌のマイコウイルス感染については、ジャガイモ疫病の原因病原体である *Phytophthora infestans* で、*Phytophthora infestans* RNA virus 1-4 (PiRV1-4) という名前の4つの未分類の二本鎖 RNA (dsRNA) ウイルスの検出 (Cai et al., 2009, 2012, 2013, 2019)と、米国のベイマツから分離された *Phytophthora* sp. で発見された Alphaendornavirus PEV1 (Hacker et al., 2005), および同様のウイルス株が、米国とヨーロッパの両方でシャクナゲおよびガマズミ属の種を含むさまざまな宿主植物から分離された *Phytophthora ramorum* で発見された事例 (Kozlakidis et al., 2010) があるが、その報告数はごく少数にとどまる。

これまでのエンドルナウイルス研究は、主にそれらの単離、配列決定、およびゲノム構造に焦点があてられてきており、エンドルナウイルスによる感染が宿主に及ぼす影響については、ほとんどわかっていない。本研究では、同一株でありながら、エンドルナウイルスの含量が高い菌株と低い菌株 (治癒株) の両方の系統を持つ *phytophthora* を利用して、PEV2 および PEV3 感染が宿主菌の生育に及ぼす影響と、数種の卵菌殺菌剤の薬剤感受性に与える影響に関して新たな知見を提示した。



© M. Piepenbring, CC BY-SA

Figure 2-3 疫病菌 (*Phytophthora* 属菌) の伝染環

(<https://www.pinterest.jp/>)

2.2. 材料と方法

2.2.1. 単遊走子を介した PEV2 および PEV3 の伝播

単遊走子におけるウイルス感染を評価するために、遊走子濃度を 1×10^4 遊走子/ml に調整し、各遊走子懸濁液 200 μ l を PDA 培地に広げ、25°C、暗所で 2 日間培養した。PDA 培地上に伸長した菌糸をコルクボーラーでコロニーごとに単離することで、単遊走子分離株を得た。単遊走子からの発芽菌糸体ディスク (4~5 粒) を 50 ml の PD ブロスを含むフラスコに移し、穏やかに振とうしながら暗所、25 °C で 14 日間インキュベートした。得られた菌糸体から dsRNA を抽出し、ゲル電気泳動で視覚化した。RT-PCR は、PEV2 および PEV3 を検出するための特異的プライマーを使用して実施した。

2.2.2. 宿主菌の栄養成長および発達段階におけるウイルス感染評価

2.2.2.1. 菌糸成長の測定

菌糸の成長を測定するために、菌糸体ディスク (直径 4 mm) を前培養コロニーの縁から切り取り、新鮮な PDA プレートに移し、25°C、暗所で 7 日間インキュベートした。各分離株について、コロニー直径の平均値は、3 つの独立したコロニーを測定によって決定した。

2.2.2.2. 遊走子嚢形成の誘導

疫病菌の遊走子嚢観察方法については、培地上に遊走子嚢を形成する菌株ではそのまま計測できるが、培地上で形成しにくい菌株については、アサ種子と雨水を使用した方法が報告されている (植松, 2015)。今回供試した菌株は、培地上での遊走子嚢形成ができない菌株だったため、植松の方法を一部改変して遊走子嚢の観察を行った。遊走子嚢形成を誘導するために、滅菌した 1 cm×1 cm の濾紙片 (Whatman 3MM) 3 枚を、25 μ g / ml の β -シトステロール (MP Biomedicals, LLC) を添加した PDA 培地

(BD Difco) に置いた. 2つの前培養菌糸体ディスクをこの濾紙片の相対する2片の中心に1粒ずつ濾紙に隣接するように置床した. これらを 25 °C, 暗所で 14 日間インキュベートした (Hendrix, 1970). 次に菌糸体で覆われた3枚の濾紙をフラスコ内の 50 ml の滅菌雨水に移し, 穏やかに振とうしながら全光条件下, 40 時間 18°C で培養した. 遊走子嚢の形成および遊走子の放出を光学顕微鏡 (オリンパス IX71) で確認し, 血球計算盤 (トーマ) を使用して遊走子密度を測定した. 各分離株について, 遊走子嚢形成の平均速度は, 9 枚の濾紙片の端に形成された遊走子嚢の数を数えることによって決定した ($n = 9$).

2.2.3. 被嚢胞子形成および被嚢胞子発芽率の決定

被嚢胞子 (非運動性の遊走子) を得る従来法として, 試験管内の遊走子懸濁液をボルテックスミキサーで 1~1.5 分間攪拌することが行われている. この方法では, 遊走子の破裂は発生せず, 運動性および非運動性遊走子の両方が, 発芽管のサイズおよび形状に差がなく, V-8 ジュース寒天上で完全に発芽する (Tokunaga et al., 1971; Kliejunas et al., 1974; Ko et al., 1974). 本研究においては, 前述 (2.2.2.2.) のように遊走子嚢形成が誘発され遊走子が放出された後, 遊走子懸濁液を振動装置 (Deep Wellmaximizen, Bio shaker M., BR-022up, TITEC) を用いて, 振動回転数 (1,000rpm, 1,200rpm, 1,500rpm, 1,800rpm, 2,000rpm) と回転時間 (0.5 分, 1 分, 2 分) を設定し, 振動処理を行った. その後, 顕微鏡下で遊走子懸濁液中の被嚢胞子および遊走子の存在を確認し, 遊走子懸濁液中の遊走子が全て被嚢胞子化する系を確立した (Figure 2-1). また, エンドルナウイルス感染アスパラガス疫病菌 (CH98ASP059), およびウイルス非感染の *Phytophthora* 属菌 2 菌株 (*P. capsici*, *P. palmivora*) を用いて, 被嚢胞子化の有無とエンドルナウイルス感染および非感染における, 被嚢胞子化後の菌叢形成数について検討した.

これらの結果を用いて, 被嚢胞子形成を誘発させた. まず, 遊走子嚢形成が確認されたフラスコを 18°C から 25°C に移動し, 遊走子の間接発芽 (遊走子嚢からの運動性遊走子の放出) を促進するために 30 分間から 1 時間程度インキュベートし, 間接発芽の効率が 50% 以上であることを確認した. 遊走子の被嚢胞子形成を誘発するために, 遊走子懸濁液 0.5 ml を 1.5 ml マイクロチューブに移し, 1,800

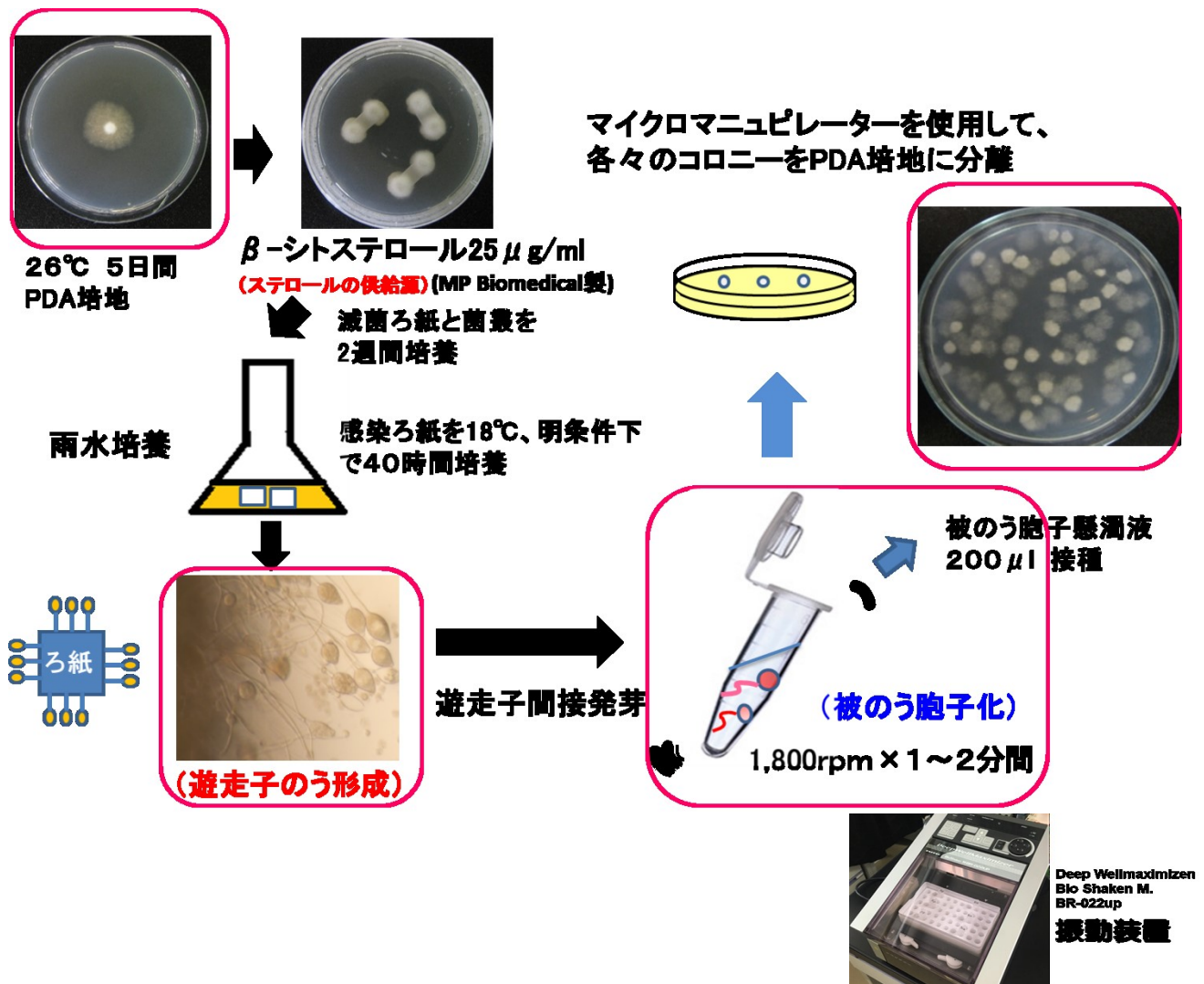


Figure 2-1 被囊胞子分離法

遊走子嚢形成後、遊走子の間接発芽を促進するために、フラスコを 18°C から 25°C に移動し、30 分から 1 時間インキュベートする。遊走子の間接発芽 (50 %) を確認後、懸濁液をマイクロチューブに移し、振動装置を用いて被囊胞子化させる。

rpm で 1~2 分間振動させた。血球計算盤を用いて被嚢胞子の濃度を測定し、約 1×10^4 被嚢胞子/ml に調整した。この被嚢胞子懸濁液 (200 μ l) を PDA プレートに広げ、25 $^{\circ}$ C で 2 日間インキュベートした。実体顕微鏡下で目に見える菌糸コロニーを数え、被嚢胞子からの菌糸の発芽率を計算した。

2.2.4. 殺菌剤感受性試験

殺菌剤感受性試験では、ベンチアバリカルブイソプロピル (規格含量 98.0%; 富士フィルム和光純薬株式会社), ファモキサドン (規格含量 98.8%; 富士フィルム和光純薬株式会社), メタラキシル (規格含量 98%; Toronto Research Chemicals, Inc.), およびクロロタロニル (規格含量 99.9%; 富士フィルム和光純薬株式会社) の 4 種類の殺菌剤を使用した。各化学物質をアセトン (10 mg ml^{-1}) に溶解し、使用するまで暗所、5 $^{\circ}$ C で保存した。PDA 培地に QoI 剤, 例えばファモキサドンを添加して培養すると、感受性菌でも菌糸生育が見られ、菌糸生育の有無で感受性を判断するのは難しい。これは、QoI 剤でミトコンドリア電子伝達系にある複合体 III タンパク質の Qo 部位に作用して呼吸を阻害すると、代替経路で alternative oxidase (AOX, 代替酸化酵素) が働き始めるからと考えられている。そこで AOX 阻害剤として用いられる没食子酸 *n*-プロピル (PG; MP Biomedicals, Inc.) をキノン外部阻害殺菌剤ファモキサドンとともに使用して、AOX 活性を阻害した (Hollomon et al., 2005; Ishii et al., 2009) 。PG は溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO、最終濃度 1%) に溶解してストック溶液 (1M) を調製した。

また、栽培圃場における防除を想定し、市販の登録農薬を使用した調査も行った。供試薬剤を Figure 2-10 に示す。

2.2.4.1. 菌糸成長阻害

菌糸体ディスク (直径 4 mm) を前培養コロニーの周辺部から切り取り, 菌叢面が培地に接するようにしてさまざまな濃度の各殺菌剤を含む PDA 培地に置床した. 殺菌剤の検定濃度は次のとおり設定した. ベンチアバリカルブイソプロピルの場合, 0, 0.003, 0.03, 0.3, 3, 30, および 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$. ファモキサドンの場合, 0, 0.0015, 0.015, 0.15, 1.5, 15, 150, および 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$. メタラキシルの場合, 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, および 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. クロロタロニルの場合, 0, 0.004, 0.04, 0.4, 4, 40, 400, および 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$. ファモキサドンについては無処理区の培地にも 1 mM PG を添加した.

市販の登録農薬の検定濃度は, メタラキシル M・TPN 水和剤の場合, 0, 0.0033+0.032, 0.033+0.32, 0.33+3.2, 3.3+32, および 33+320 $\mu\text{g ml}^{-1}$. TPN 水和剤の場合, 0, 0.04, 0.4, 4, 40, および 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$. ベンチアバリカルブイソプロピル・TPN 水和剤の場合, 0, 0.0033+0.0333, 0.033+0.333, 0.33+3.33, 3.3+33.3, および 33+330 $\mu\text{g ml}^{-1}$. マンゼブ・メタラキシル M 水和剤の場合, 0, 0.064+0.0038, 0.64+0.038, 6.4+0.38, 64+3.8, および 640+38 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

培地は 120°C で 20 分間滅菌した後, 培地が 50°C ~ 60°C に冷めてから各殺菌剤を所定濃度となるよう無菌的に添加した. 培養は 25°C で 14 日間インキュベートした後, 菌叢の直径を測定した. 菌糸成長の阻害率 (%) は以下のように計算された.

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{colony diameter on fungicide-amended PDA} - 4 \text{ mm}}{\text{colony diameter on unamended PDA} - 4 \text{ mm}} \right) \times 100$$

阻害率は, 各殺菌剤濃度の 3 つのコロニーの測定に基づいている. 各殺菌剤の最小発育阻止濃度 (MIC) は, 菌糸の成長を 100% 阻害する最小発育阻止濃度として求めるとともに, 薬剤無処理区と比較した阻害率を算出し, EC₅₀ 値 (50% 生育阻止濃度) を求めた.

2.2.4.2. 遊走子嚢形成阻害

遊走子嚢形成を指標として、実際に防除で使用されている市販の殺菌剤を供試し、エンドルナウイルス感染が疫病菌の殺菌剤感受性に及ぼす影響について調査した。菌株は、ウイルス高含量株として CH98ASP060-a を、低含量株として 14ASP2-7 (佐賀県農業試験研究センター分譲菌株: *P. nicotianae*) を供試した。14ASP2-7 から検出された dsRNA は、エチジウムブロマイド染色 (0.5mg/ml) では検出限界以下だが、特異的プライマーを用いた RT-PCR では PEV2 および PEV3 両方の dsRNA が検出されたため、ウイルス低含量株とした(データは示していない)。また、佐賀県のアスパラガス疫病防除対策としては、TPN 水和剤 (商品名 ダコニール 1000)、メタラキシル M・TPN 水和剤 (商品名 フォリオゴールド)、ベンチアバリカルブイソプロピル・TPN 水和剤 (商品名 プロポーズ顆粒水和剤、ワイドヒッター顆粒水和剤) (2015 年 7 月末日現在) の散布を指導しているが、14ASP2-7 の薬剤に対する感受性検定は実施されていなかった (渡邊ら、2015)。

殺菌剤の検定濃度は次のとおり設定した。ベンチアバリカルブイソプロピル・TPN の場合、0, 0.0033+0.033, 0.033+0.33, 0.33+3.3, 3.3+33, および 33+330 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 。TPN の場合、0, 0.04, 0.4, 4, 40, および 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 。PDA 培地上で 26°C で培養した 3 日目の菌叢の上にオートクレーブ (121°C, 40 分) したアサ種子を 10 粒程度置床し、4~7 日間、26°C で培養した。菌糸のアサ種子への感染を確認後、各殺菌剤を所定濃度となるよう添加した滅菌雨水を 50 ml 入れた 100 ml コルベンに感染アサ種子を 6 粒入れ、18°C 全明条件下で約 24 時間静置培養し、顕微鏡下で遊走子嚢形成数を計測した。

一般名	系統	有効成分	作用機構
メタラキシルM・ TPN	フェニルアמיד系 有機塩素系	メタラキシルM 3.3% TPN 32.0%	RNAPoII 合成阻害 多作用点・SH酵素阻害
TPN	有機塩素系	TPN 40.0%	多作用点・SH酵素阻害
ベンチアパリカルブ イソプロピル・ TPN	CAA(アミノ酸アミド カーバメート系) 有機塩素系	ベンチアパリカルブ イソプロピル 5.0% TPN 50.0%	セルロース合成阻害 多作用点・SH酵素阻害
マンゼブ・ メタラキシルM	ジチオカーバメート系 フェニルアמיד系	マンゼブ 64.0% メタラキシルM 3.8%	多作用点・SH酵素阻害 RNAPoII 合成阻害

Figure 2-10 アスパラガス疫病菌の殺菌剤感受性調査に供試した登録農薬とその作用機構

2.3. 結果

2.3.1 単遊走子を介した PEV2 および PEV3 の伝播

単遊走子を介した PEV2 および PEV3 の伝達効率を単遊走子分離法 (2.2.1) を用いて調査した。分離株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059 にそれぞれ由来する 102, 68, および 20 の単遊走子から菌糸体を培養した。次に、ゲル電気泳動と PEV2 および PEV3 に特異的なプライマーを使用した RT-PCR の両方を使用して、各菌糸体クローンに PEV2 および PEV3 dsRNA が存在するかどうかをテストした結果、すべての菌糸体クローンには、PEV2 と PEV3 の両方の dsRNA が含まれていた。このことは、2つの dsRNA がほぼ 100%の効率で単遊走子を介して安定して伝染し、遊走子嚢形成または遊走子発芽のいずれにおいてもウイルスフリークローンが形成されなかったことを示した。代表的なデータを Figure 2-4 に示す。

2.3.2. 宿主菌の栄養成長および発達段階における PEV2 および PEV3 の存在の影響

被嚢胞子分離法を用いて、遊走子の被嚢胞子化を行った結果、処理後の菌叢形成数は、いずれの分離株においても、振動による被嚢胞子化処理および非処理との間での有意差は見られず、エンドルナウイルス感染の影響も無いことを確認した (内田ら, 2018) (Figure 2-2)。

オリジナルの *Phytophthora* sp. の分離株 5 株は、サブ分離株 CH98ASP060-a および CH98ASP059-L とともに、菌糸の成長、遊走子嚢形成、および被嚢胞子の発芽率を比較するために PDA 培地で増殖させた (Table 2-1)。調べた分離株の中で、CH98ASP059-L は PEV2 および PEV3 の含量が非常に低く (Fig. 1-1A), CH98ASP060, CH98ASP060-a, CH98ASP059, Ku-1, Ak-6-1, および Fk-3 と比較して大きな菌糸コロニーを生成した (Table 2-1, Figure 1-1B)。菌糸の成長率は別として、これらの 7 分離株間の最も重大な違いは、遊走子嚢の数で観察された。高含量の PEV2 および PEV3 を示した株 CH98ASP059 は、豊富な遊走子嚢を生成したが、低含量の株 CH98ASP059-L は遊走子嚢を形成しなかった (Table 2-1, Figure 2-5)。被嚢胞子の発芽率は、遊走子嚢を生成した 6 つの分離株間 (ウイルス高含量の 6 株)

で有意差はなかった。これらの結果は、PEV2 および PEV3 の高い含量が、*Phytophthora sp.* の菌糸成長の低下および遊走子嚢形成の上昇に寄与する可能性を示唆している。

2.3.3. PEV2 および PEV3 感染が宿主菌の殺菌剤感受性に与える影響

2.3.3.1. 菌糸成長阻害

アスパラガス疫病菌の殺菌剤感受性に対する PEV2 および PEV3 感染の潜在的影響を次の 4 つの殺菌剤を使用し調査した。ベンチアバリカルブイソプロピル (セルロースシンターゼの阻害剤)、ファモキサドン (キノン結合部位に結合することによってチトクローム bc1 を阻害するキノン外部阻害剤)、メタラキシル (RNA ポリメラーゼ I の阻害剤)、およびクロロタロニル (マルチサイト接触活性の阻害剤)。PDA プレートで殺菌剤の段階希釈を使用し、殺菌剤を含まないプレートでの増殖と比較した場合の分離株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, CH98ASP059, および CH98ASP059-L の増殖阻害レベルを決定した (Tables 2-2~2-5)。データを使用して、各殺菌剤を含む各分離株の最小発育阻止濃度 (MIC) 値と、最小自乗法による回帰計算により EC₅₀ 値を決定した (Table 2-6)。Figures 2-6~2-9 は、エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059 の MIC で、各殺菌剤を含むプレート上で成長した各分離株の菌糸コロニーを示している。

エンドルナウイルス高含量株 (CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059) は、ベンチアバリカルブイソプロピルに対して非常に感受性が高く、0.03 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度でほぼ 100% の増殖阻害を示した (Figure 2-6, Table 2-2)。一方、エンドルナウイルス低含量株 (CH98ASP059-L) の MIC 値は 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ であり、10 倍以上の低い感受性を示した。EC₅₀ は、エンドルナウイルス高含量株で 0.0028~0.0052 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲、低含量株で 0.0129 $\mu\text{g ml}^{-1}$ だった (Table 2-2, Table 2-6)。同様の傾向がファモキサドンでも観察され、エンドルナウイルス高含量株の MIC 値は 1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ であったが、CH98ASP059-L の MIC は 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ を超えていた。EC₅₀ は、高含量株で 0.23~0.56 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲だった。(Figure 2-7, Table 2-4, Table 2-6)。従って、エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059 は、ベンチアバリカルブイソプロピルとファモキサドンの両方に対してより高い感

受性を示し、宿主卵菌における高レベルの PEV2 および PEV3 の存在がこれらの殺菌剤に対する感受性を高めた可能性を示唆している。クロロタロニルのデータは、それほど劇的ではなかったが、同様の傾向を示した。常用濃度 ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$) では、 エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059 は、それぞれ 90.7, 90.2, および 81.1% の増殖阻害率を示した。また、 EC_{50} は、 $3.48 \sim 7.79 \mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲だった。(Table 2-5, Figure 2-9, and Table 2-6). CH98ASP059-L の増殖阻害は、これらの割合の約半分で、47.1% だった (Table 2-5, Figure 2-9). 従って、大量の PEV2 および PEV3 が存在すると、これらの宿主卵菌のクロロタロニルに対する感受性も高まる可能性がある。

対照的に、エンドルナウイルス低含量株 CH98ASP059-L は、3つの高含量株よりもメタラキシルに対して感受性が高かった。常用濃度 ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) では、エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059 は、それぞれ 26.4, 20.7, および 68.0 % の増殖阻害率を示した (Figure 2-8, Table 2-4). 一方、CH98ASP059-L の MIC は僅か $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ だった。同様に EC_{50} は、エンドルナウイルス高含量株では $6.2 \sim 174.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ の範囲だったが、低含量株では $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ だった (Figure 2-8, Table 2-4, and Table 2-6). 従って、宿主卵菌中の PEV2 および PEV3 の量が多いと、RNA ポリメラーゼ I の阻害剤であるメタラキシルに対する感受性が低下することが示唆された。

市販の登録農薬では、PDA プレートで殺菌剤の段階希釈を使用し、殺菌剤を含まないプレートでの増殖と比較した場合のエンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060-a, および低含量株として 14ASP2-7 (佐賀県農業試験研究センター分譲菌株: *P. nicotianae*) の増殖阻害レベルとデータを使用して、各殺菌剤を含む各分離株の MIC 値を決定した (Figures 2-11~2-14).

エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060-a は、メタラキシル M・TPN 水和剤に対する MIC が、 $0.33+3.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ であり、低含量株 14ASP2-7 の MIC ($33+320 \mu\text{g ml}^{-1}$) の 100 倍感受性が高かった

(Figure 2-11). 同様の傾向が TPN 水和剤でも観察され、高含量株の MIC は、 $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ であったが、低含量株 14ASP2-7 の MIC は $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ であり 100 倍感受性が高かった (Figure 2-12). ベンチア

バリカルブイソプロピル・TPN水和剤の場合は、エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060-a の MIC は、 $0.033+0.333 \mu\text{g ml}^{-1}$ であり、低含量株 14ASP2-7 の MIC ($0.33+3.33 \mu\text{g ml}^{-1}$) に比べて 10 倍感受性が高かった (Figure 2-13). 同様の傾向がマンゼブ・メタラキシル M 水和剤でも観察され、エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060-a の MIC は、 $64+3.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ であり、低含量株 14ASP2-7 の MIC ($640+38 \mu\text{g ml}^{-1}$) の 10 倍感受性が高かった (Figure 2-14). これらの結果から、エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060-a の市販登録農薬における感受性は、低含量株 14ASP2-7 に比べて 10 から 100 倍高い傾向が見られた。栽培圃場で防除に使用される殺菌剤は、耐性菌対策も考慮して混合剤が多く、単剤を入手するのは困難である。そのため各成分に対するウイルス感染株の感受性を明確に把握することはできないが、少なくとも宿主卵菌中のエンドルナウイルスの高い含量によって各薬剤に対する感受性が高くなる傾向が示唆された。

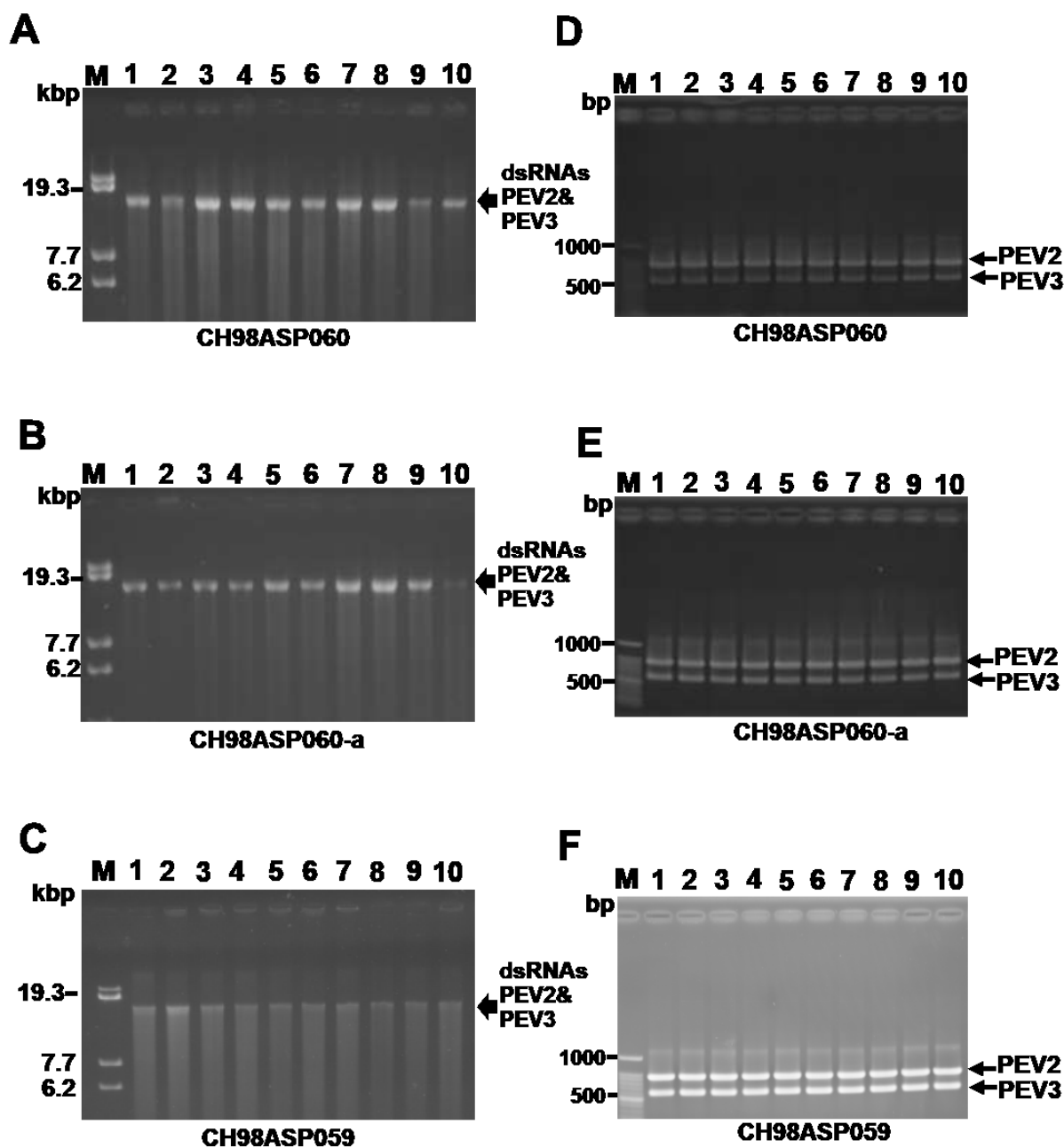
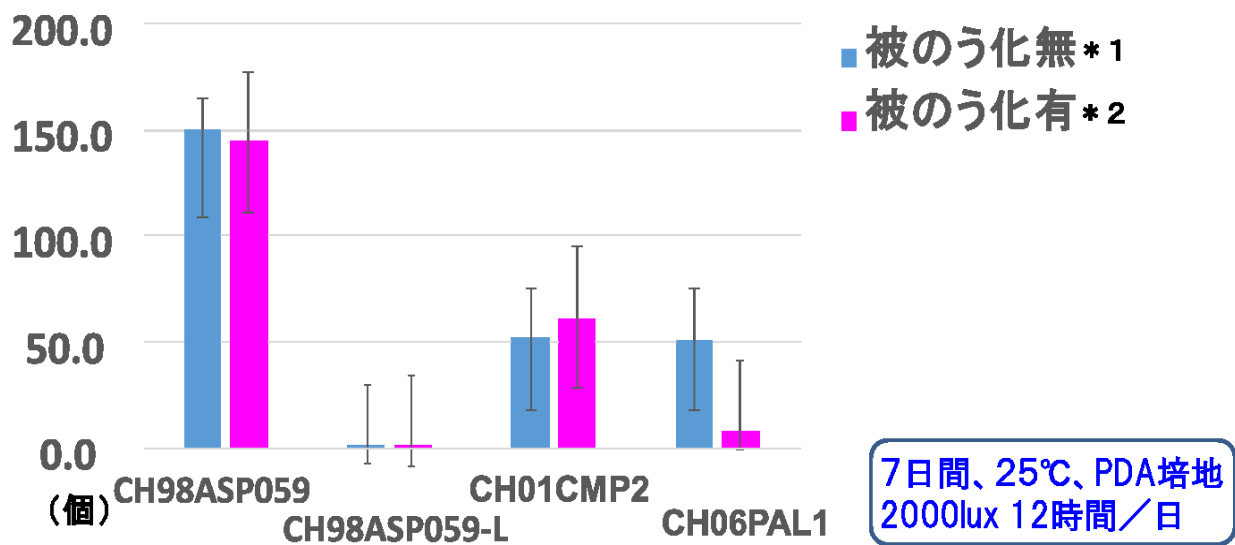


Figure 2-4 単遊走子分離株における PEV2, PEV3 dsRNA の検出

(A), (B), および (C) ; CH98ASP060 (A), CH98ASP060-a (B), および CH98ASP059 (C) における PEV2 および PEV3 の dsRNA ゲノムのアガロースゲル電気泳動. 各分離株の乾燥重量 0.1 g に由来する dsRNA を, 0.8% アガロースゲルで 20 V で 16 時間電気泳動し, エチジウムブロマイド (0.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) で染色した. 矢印は, PEV2 および PEV3 dsRNA の位置を示す. (D), (E), および (F) ; CH98ASP060 (D), CH98ASP060-a (E), および CH98ASP059 (F) における PEV2 および PEV3 dsRNA ゲノムの RT-PCR 検出. RT-PCR は, PEV2 および PEV3 dsRNA ゲノムを増幅するための特異的プライマーを使用して実行された. 増幅された DNA フラグメントを 1% アガロースゲル, 0.5 時間 100V で電気泳動にかけ. レーン M, 100 bp DNA ラダー. レーン 1 から 10, 個々の単遊走子は指定された番号 1 から 10 を分離.



	菌株
<i>Phytophthora</i> sp.	CH98ASP05
<i>Phytophthora</i> sp.	CH98ASP059-L
<i>P. capsici</i>	CH01CMP2
<i>P. palmivora</i> A1	CH06PAL

Figure 2-2 被のう化の有無が菌叢形成数に及ぼす影響

*1:遊走子懸濁液 (200μl) をプレートに塗布後、形成された菌叢数を計測

*2:被のう胞子懸濁液を同様に処理・調査

CH98ASP059-L 以外の処理区は 1×10^4 個 / ml 濃度とした

Table 2-1 アスパラガス疫病菌の栄養成長と分化に及ぼす PEV2 と PEV3 の影響

菌株名 (ウイルス)	菌糸生育速度 (mm) ^a	遊走子嚢形成数 ^b	被嚢胞子濃度	被嚢胞子化後の 菌叢形成率 (%) ^c
CH98ASP060 (PEV2&PEV3)	14.8	21.7±7.6	1×10 ⁴	75.0
CH98ASP060-a (PEV2&PEV3#) ^d	21.5	193.0±32.5 **	2×10 ⁴	76.0
CH98ASP059 (PEV2&PEV3)	21.9	193.0±37.6 **	1×10 ⁴	100.0
CH98ASP059-L (PEV2#&PEV3#) ^d	33.0	0.0	-	-
Ku-1 (14kb-dsRNAs)	20.3	214.0±103.0 **	2×10 ⁴	93.0
Ak-6-1 (PEV2&PEV3)	22.2	23.7±7.5	1×10 ⁴	80.0
Fk-3 (PEV2&PEV3)	19.0	134.0±28.1 *	2×10 ⁴	83.0

^a 菌叢直径は, PDA 培地で 7 日間培養した後に測定した (n = 3).

^b 18°C の雨水中で 40 時間培養した後, 濾紙 (1cm×1cm) の 4 つの端の周りに発生する遊走子嚢の数. データは, 9 枚の濾紙からの平均 ±SD (n = 9).

^c 1×10⁴ 個の被嚢胞子を含む懸濁液を PDA 培地に広げ, 25°C で 5 日間増殖させた.

^d # dsRNA 抽出後のエチジウムブロマイド染色 (0.5mg/ml) では検出限界以下だが, RT-PCR では検出された. PEV2; 14.3 kbp, PEV3; 13.8 kbp.

* および ** は, それぞれ <0.05 および 0.01 の p 値を示す (Tukey-Kramer 検定).

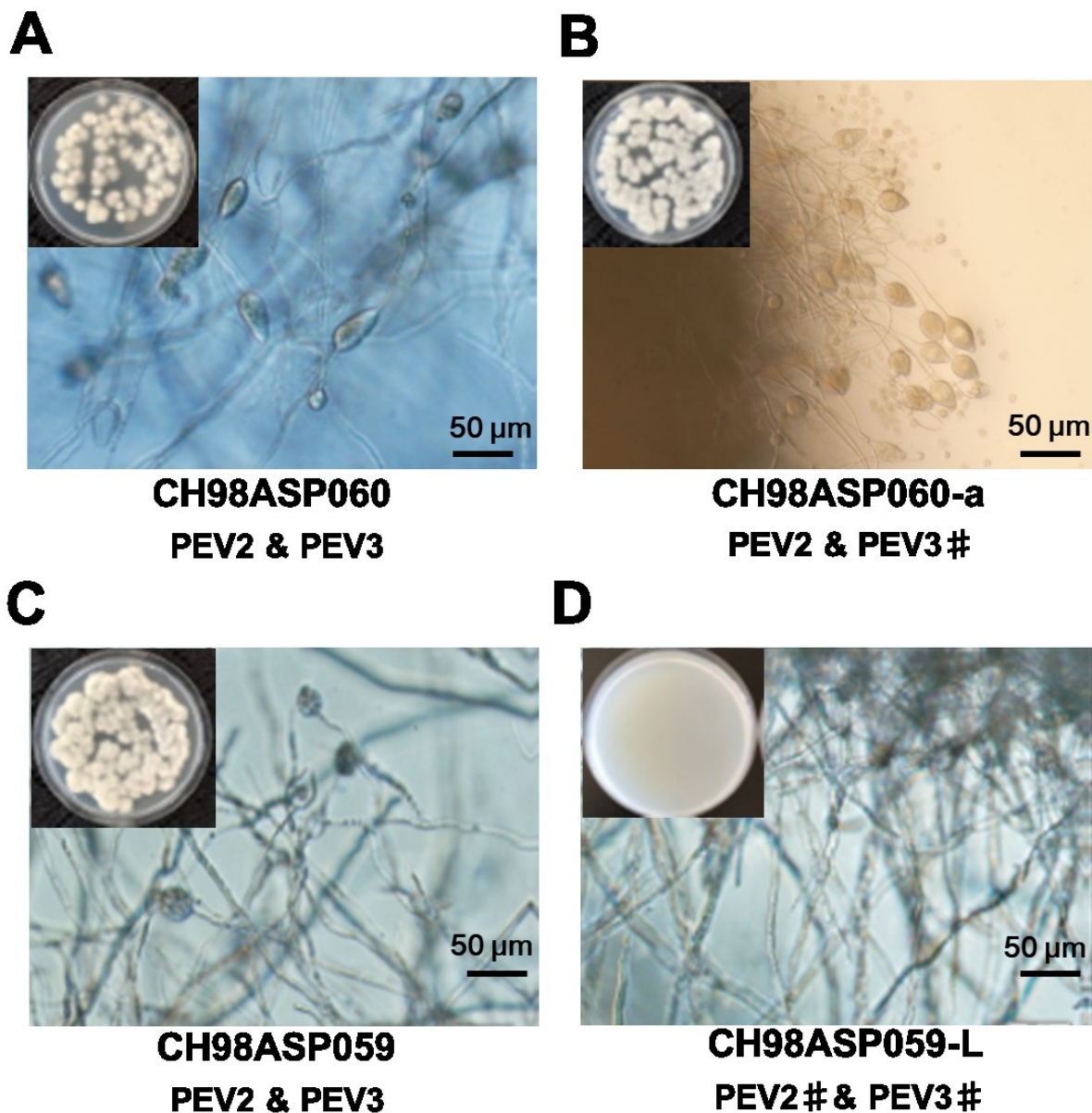


Figure 2-5 PEV2 および PEV3 の存在が、*Phytophthora* sp. の遊走子嚢産生に与える影響

PEV2, PEV3 高含量株 CH98ASP060 (A), CH98ASP060-a (B), および CH98ASP059 (C) と, 低含量株 CH98ASP059-L (D) による遊走子嚢形成を示す. 左上の画像は, 25°C, 7 日間のインキュベーション後の PDA 上での菌叢の様子. バーは 50 µm を示す. 分離株名の下の dsRNA ラベルの # は, dsRNA 抽出後のエチジウムブロマイド染色 (0.5 mg / ml) では見えないが, RT-PCR では検出される. PEV2; 14.3 kb, PEV3; 13.8kb. これは, 後続の Figure 2-6 ~2-9 でも同じ意味で使用される.

Table 2-2 アスパラガス疫病菌のベンチアバリカルブイソプロピルに対する感受性.

菌株名	endornaviruses	菌糸成長阻害 (%)					
		ベンチアバリカルブイソプロピル ($\mu\text{g ml}^{-1}$)					
		0.003	0.03	0.3	3	30 ^a	150 ^b
CH98ASP060	PEV2&PEV3	34.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
CH98ASP060-a	PEV2&PEV3# ^c	8.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
CH98ASP059	PEV2&PEV3	0.0	95.4	100.0	100.0	100.0	100.0
CH98ASP059-L	PEV2#&PEV3# ^c	3.8	81.8 [*]	100.0	100.0	100.0	100.0

^a 市販薬剤の常用濃度

^b 市販薬剤の常用濃度の 5 倍濃度

^c # dsRNA 抽出後のエチジウムブロマイド染色 (0.5mg/ml) では検出限界以下だが, RT-PCR では検出.

PEV2; 14.3 kbp, PEV3; 13.8 kbp.

* Tukey-Kramer 検定で有意に異なる ($p < 0.05$) グループを示す.

Table 2-3 アスパラガス疫病菌のファモキサドンに対する感受性

菌株名	endornaviruses	菌糸成長阻害 (%)						
		ファモキサドン ($\mu\text{g ml}^{-1}$) + 1mM PG						
		0.0015	0.015	0.15	1.5	15	150 ^a	300 ^b
CH98ASP060	PEV2&PEV3	23.5	18.5	18.5	100.0	100.0	100.0	100.0
CH98ASP060-a	PEV2&PEV3# ^c	0.0	15.8	12.6	100.0	100.0	100.0	100.0
CH98ASP059	PEV2&PEV3	0.0	0.0	2.1	100.0	100.0	100.0	100.0
CH98ASP059-L	PEV2#&PEV3# ^c	0.0	0.0	0.0	14.1 [*]	21.5	32.3 [*]	27.9 [*]

^a 市販薬剤の常用濃度.

^b 市販薬剤の常用濃度の 2 倍濃度.

^c # dsRNA 抽出後のエチジウムブロマイド染色 (0.5mg/ml) では検出限界以下だが, RT-PCR では検出.

PEV2; 14.3 kbp, PEV3; 13.8 kbp.

* Tukey-Kramer 検定で有意に異なる ($p < 0.05$) グループを示す.

Table 2-4 アスパラガス疫病菌のメタラキシルに対する感受性

菌株名	endornaviruses	菌糸成長阻害 (%)						
		メタラキシル ($\mu\text{g ml}^{-1}$)						
		0.001	0.01	0.1	1	10	100 ^a	500 ^b
CH98ASP060	PEV2&PEV3	0.0	9.4	6.6	17.9	23.6*	26.4	92.1
CH98ASP060-a	PEV2&PEV3#	0.0	8.0	8.0	11.5	19.5*	20.7	97.7*
CH98ASP059	PEV2&PEV3	0.0	21.0	24.0	43.0	28.9*	68.0*	93.2
CH98ASP059-L	PEV2#&PEV3#	0.0	11.1	62.1	92.2	100.0*	100.0*	100.0*

^a 市販薬剤の常用濃度.

^b 市販薬剤の常用濃度の 5 倍濃度.

* Tukey-Kramer 検定で有意に異なる ($p < 0.05$) グループを示す.

Table 2-5 アスパラガス疫病菌のクロロタロニルに対する感受性

菌株名	endornaviruses	菌糸成長阻害 (%)						
		クロロタロニル ($\mu\text{g ml}^{-1}$)						
		0.004	0.04	0.4	4	40	400 ^a	800 ^b
CH98ASP060	PEV2&PEV3	0.0	1.2	27.9	48.2	82.6	90.7	92.7
CH98ASP060-a	PEV2&PEV3#	0.0	0.0	25.2	74.4	68.3	90.2	93.5
CH98ASP059	PEV2&PEV3	0.0	0.0	20.5	50.8	73.8	81.1	82.8
CH98ASP059-L	PEV2#&PEV3#	2.2	1.4	0.8	10.6	28.6*	47.1*	64.4*

^a 市販薬剤の常用濃度.

^b 市販薬剤の常用濃度の 2 倍濃度.

* Tukey-Kramer 検定で有意に異なる ($p < 0.05$) グループを示す.

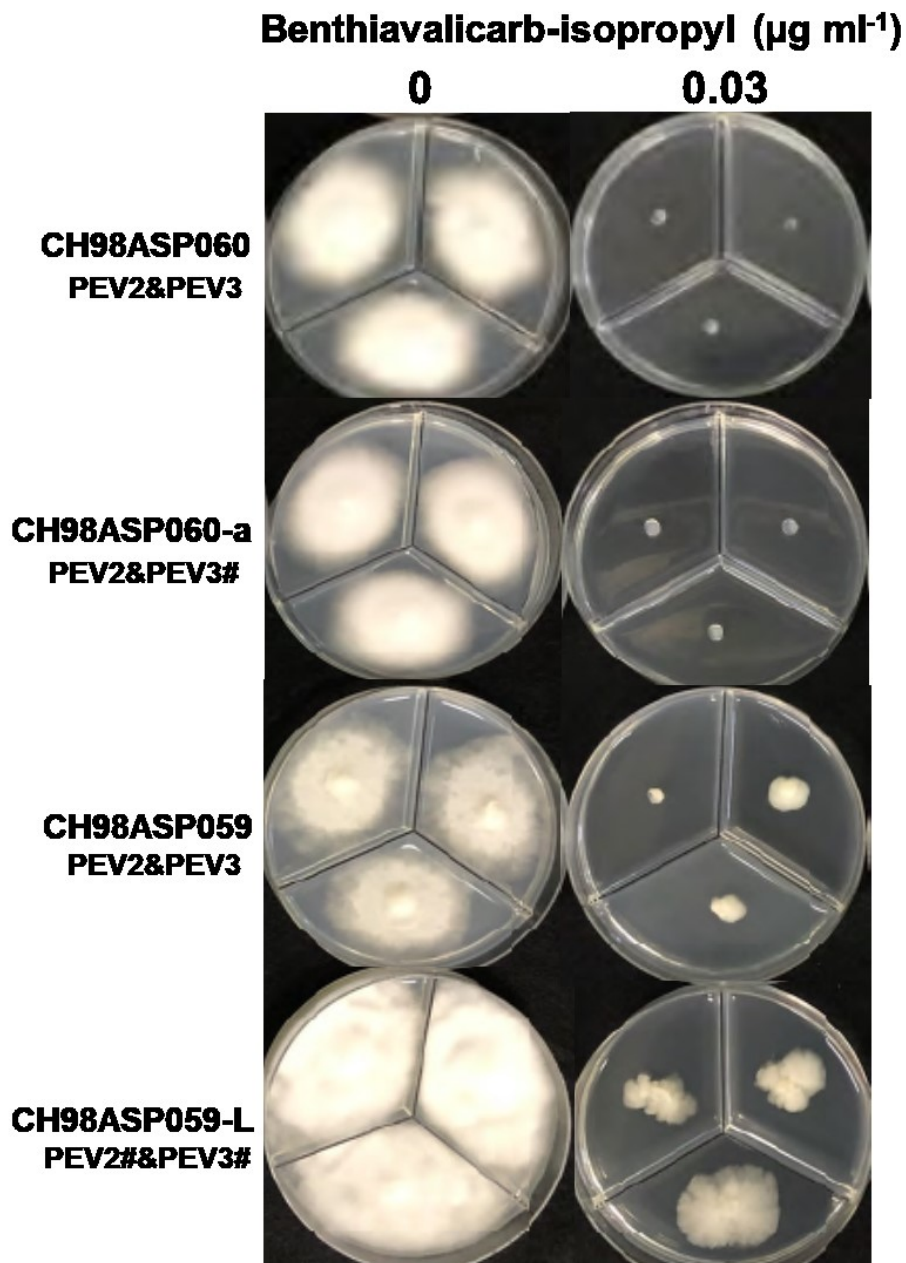


Figure 2-6 ベンチアバリカルブイソプロピル ($0.03 \mu\text{g ml}^{-1}$) を含む培地での菌糸の成長

CH98ASP060, CH98ASP060-a, CH98ASP059, および CH98ASP059-L は, 殺菌剤の存在下 (右) または非存在下 (左) で成長させた. PEV2 および PEV3 高含量株 (CH98ASP060, CH98ASP060-a, CH98ASP059) の最小発育阻止濃度 (MIC) を使用した.

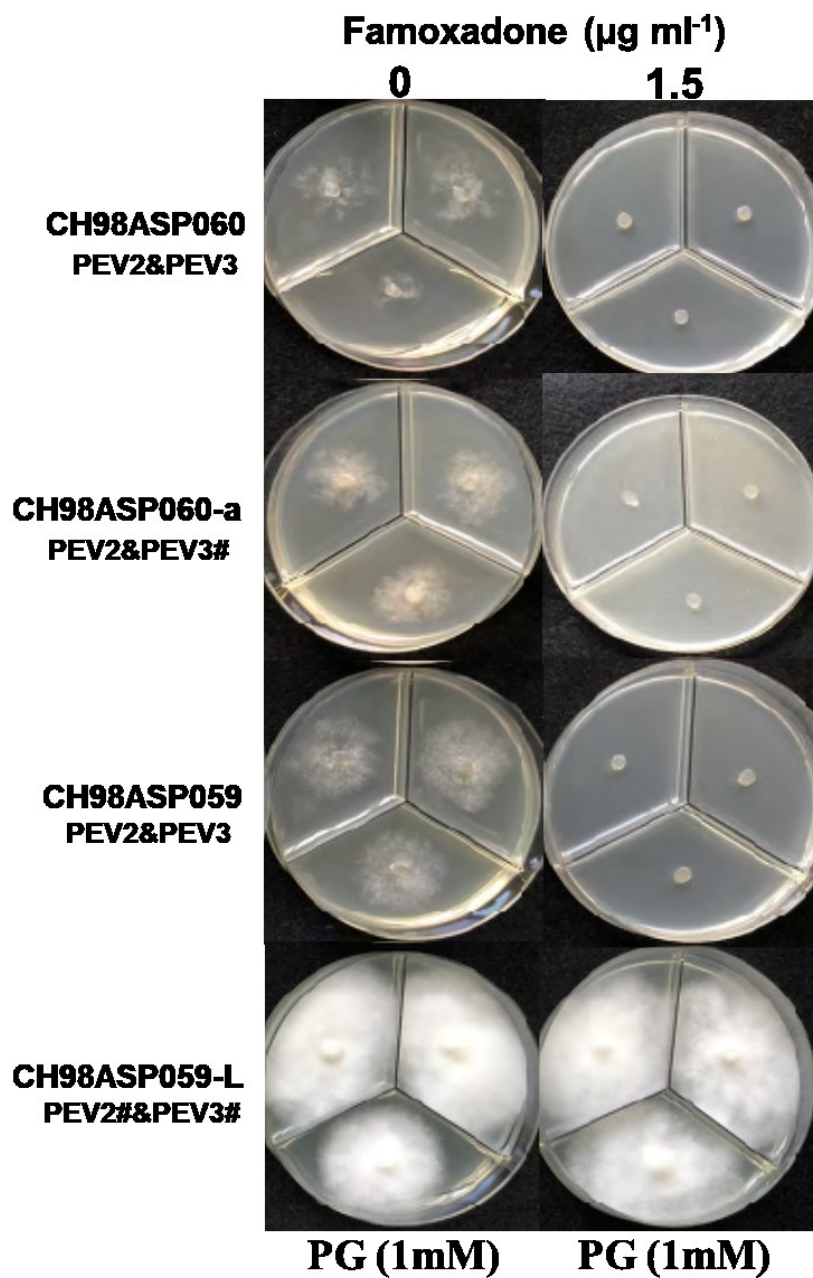


Figure 2-7 ファモキサドン ($1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) を含む培地での菌糸の成長

CH98ASP060, CH98ASP060-a, CH98ASP059, および CH98ASP059-L は、殺菌剤の存在下 (右) または非存在下 (左) で成長させた。PEV2 および PEV3 高含量株の MIC を使用した。PG (1mM) はすべての処理区に含まれていた。

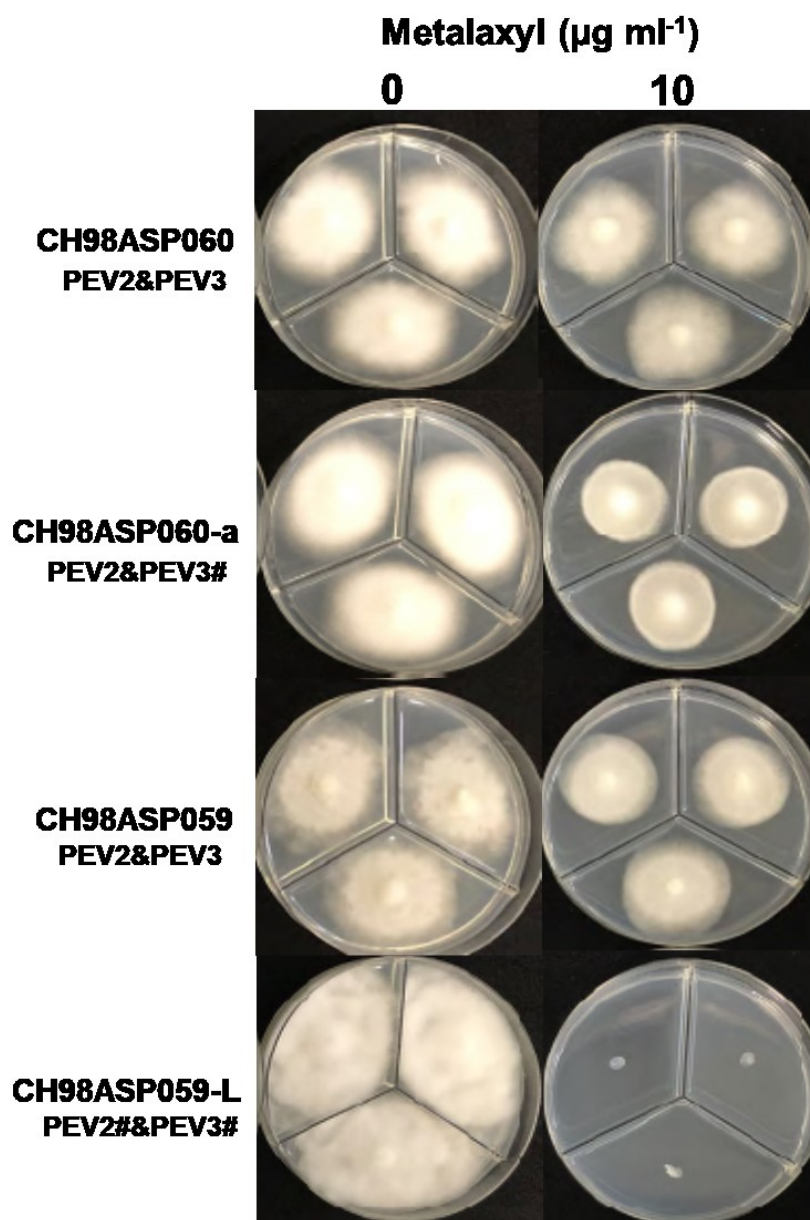


Figure 2-8 メタラキシル ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) を含む培地での菌糸の成長

CH98ASP060, CH98ASP060-a, CH98ASP059, および CH98ASP059-L は, 殺菌剤の存在下 (右) または非存在下 (左) で成長させた. PEV2 および PEV3 低含量株 (CH98ASP059-L) の MIC を使用した.



Figure 2-9 クロロタロニル ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$) を含む培地での菌糸の成長

CH98ASP060, CH98ASP060-a, CH98ASP059, および CH98ASP059-L は, 殺菌剤の存在下 (右) または非存在下 (左) で成長させた. 4 つの分離株すべての MIC 値は $>400 \mu\text{g ml}^{-1}$ であった.

Table 2-6 最小発育阻止濃度(MIC)および, 成長の 50%を阻害する濃度(EC50)に基づく, アスパラガス疫病菌の 4つの殺菌剤に対する感受性比較

菌株名	endornaviruses	ベンチアバリカルブ イソプロピル		ファモキサドン+ 1mM PG		メタラキシル		クロロタロニル	
		MIC (ppm)	EC50 (ppm)	MIC (ppm)	EC50 (ppm)	MIC (ppm)	EC50 (ppm)	MIC (ppm)	EC50 (ppm)
CH98ASP060	PEV2&PEV3	0.03	- ^a	1.5	0.23 ±0.19	>500	126.1 ±38.4	>800	3.63 ±0.88
CH98ASP060-a	PEV2&PEV3#	0.03	0.0028 ±0.0013 ^b	1.5	0.53 ±0.15	>500	174.1 ±55.1	>800	3.48 ±1.70
CH98ASP059	PEV2&PEV3	0.03	0.0052 ±0.0005	1.5	0.56 ±0.05	>500	6.2 ±4.4	>800	7.79 ±3.18
CH98ASP059-L	PEV2#&PEV3#	0.3	0.0129 ±0.0102	>300	- ^a	10	0.1 ±0.009	>800	- ^a

^a 検出無し.

^b データは平均値 ±SD (n = 6).

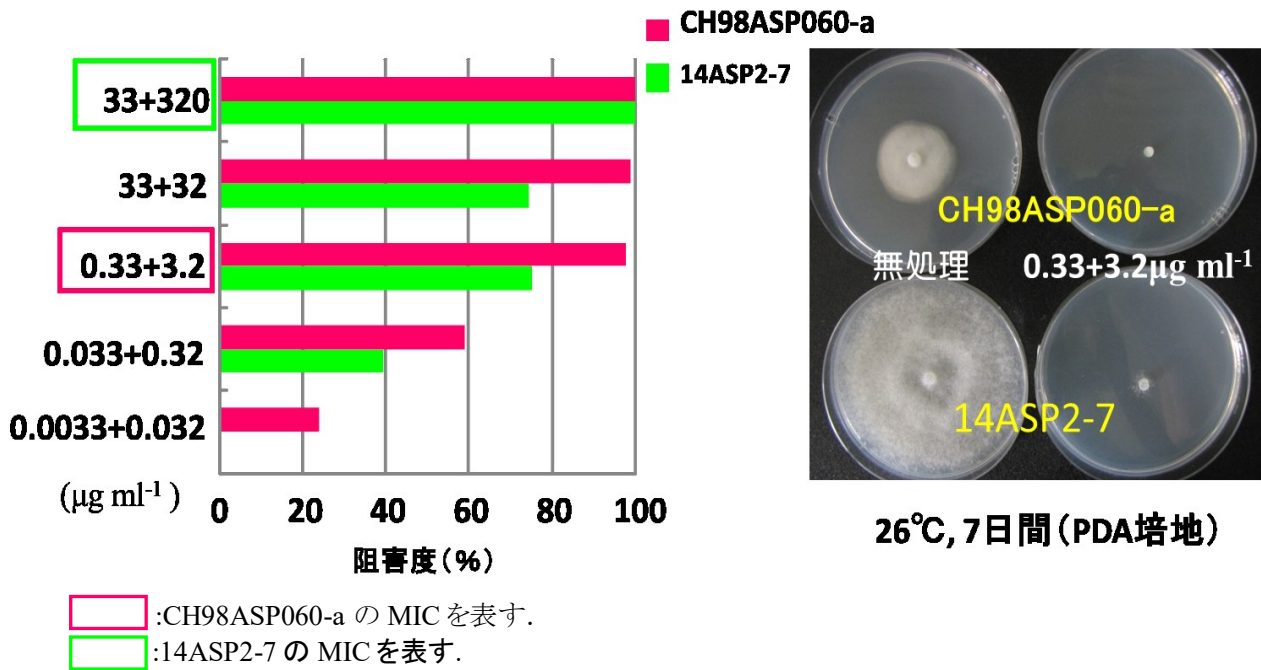


Figure 2-11 アスパラガス疫病菌の菌糸成長におけるメタラキシル M・TPN 水和剤に対する感受性.

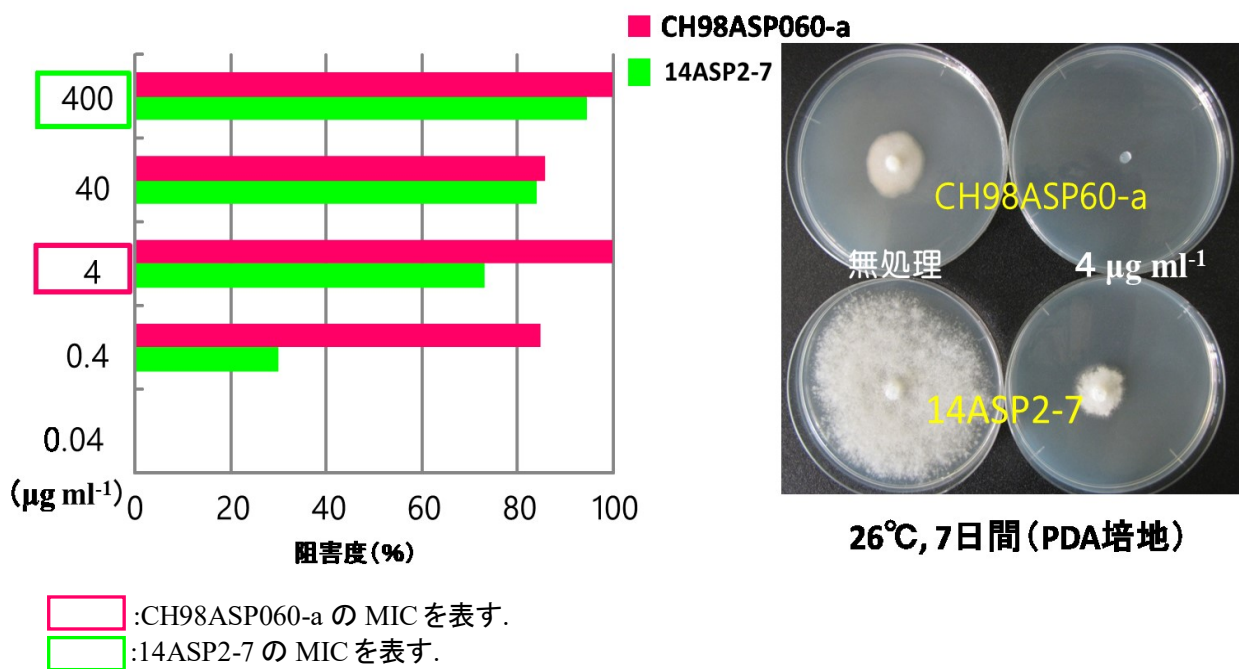


Figure 2-12 アスパラガス疫病菌の菌糸成長における TPN 水和剤に対する感受性.

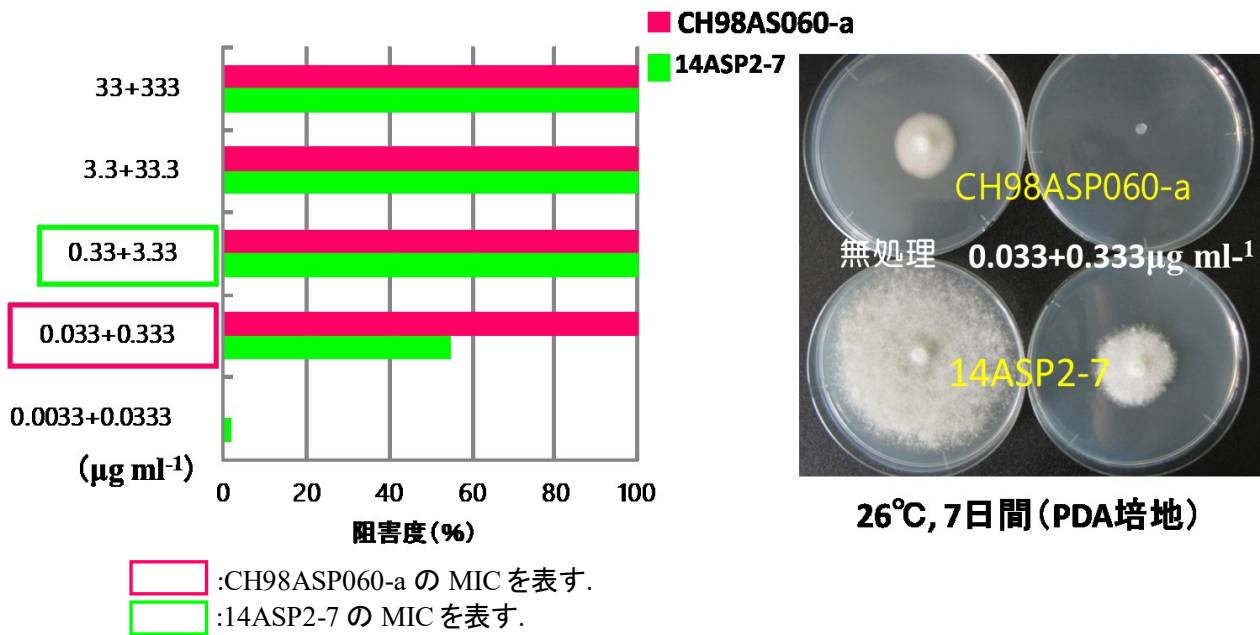


Figure 2-13 アスパラガス疫病菌の菌糸成長におけるベンチアバリカルブイソプロピル・TPN 水和剤に対する感受性.

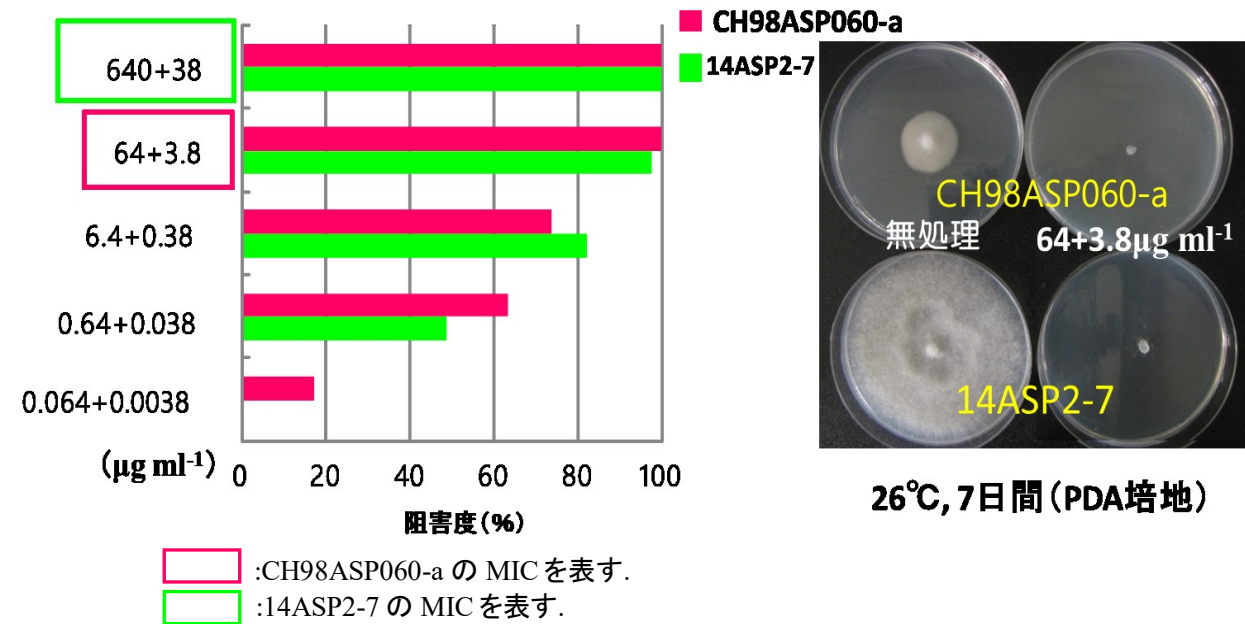


Figure 2-14 アスパラガス疫病菌の菌糸成長におけるマンゼブ・メタラキシル M 和剤に対する感受性.

2.3.3.2. 遊走子嚢形成阻害

遊走子嚢形成阻害では、次の市販の殺菌剤2剤を使用し調査を行った。ベンチアバリカルブイソプロピル・TPN水和剤(成分；ベンチアバリカルブイソプロピル 5.0%, TPN 50%)およびTPN水和剤(成分；TPN 40%)。所定濃度の殺菌剤を添加した滅菌雨水に感染アサ種子を入れ、殺菌剤を含まない雨水中での遊走子嚢形成数と比較した場合の分離株 CH98ASP060-a および 14ASP2-7 の遊走子嚢形成阻害レベルを決定した。その結果、ベンチアバリカルブイソプロピル・TPN水和剤の場合、エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060-a の遊走子嚢形成に対する MIC は、 $0.033+0.333 \mu\text{g ml}^{-1}$ であり、低含量株 (14ASP2-7 株) の MIC ($0.33+3.33 \mu\text{g ml}^{-1}$) の 10 倍感受性が高かった。また、TPN 水和剤の場合はエンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060-a の遊走子嚢形成に対する MIC は、 $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ であったが、低含量株 14ASP2-7 は、 $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ においても阻害度 75% 前後で、CH98ASP060-a は少なくとも 100 倍感受性が高かった (Figure 2-15, 2-16)。今回の結果は、菌糸成長阻害結果と同様な傾向が見られたが、菌株や供試薬剤の違いもあるため、今後、菌株や薬剤の条件を揃えて再試験を行う事が必要である。

2.3.4. メタラキシルに曝露された宿主菌における PEV2 および PEV3 の dsRNA 含有量

1つの殺菌剤または同様の化学的性質を持つ殺菌剤のグループを継続して使用すると、標的生物の感受性が低下する可能性がある。私たちの殺菌剤感受性試験では、エンドルナウイルス高含量の株は、低含量の株と比較した場合、メタラキシルに対する感受性の低下を示した。これらのことから、メタラキシルの存在下で PEV2 と PEV3 のレベルが変化するかどうかを調べるための実験を行った (Figure 2-17)。3つのエンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059 を、0 または $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度のメタラキシルを添加した PDA プレートで 5 回継代培養した。次に、液体培養で菌糸体を増殖させ、dsRNA を単離し、ゲル電気泳動と RT-PCR で調べた。また、半定量的画像システム ((Ez-Capture MG ATTO) を使用して、アガロースゲル中の dsRNA

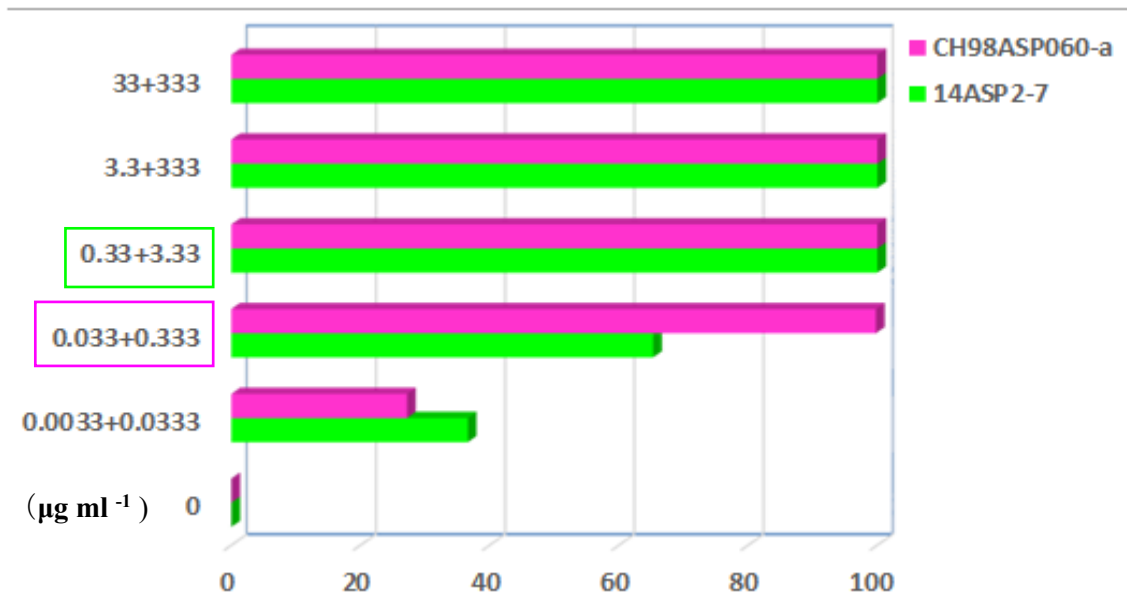
の量を推定した。結果は、メタラキシルの常用濃度下 ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) で、dsRNA のレベルがメタラキシルの存在下または非存在下で継代培養された菌糸体間で有意差がないことを示した (Figure 2-17A)。RT-PCR の結果は、PEV2 と PEV3 がメタラキシルの存在下と非存在下での培養中に保持されたことを示した (Figure 2-17B)。

2.3.5. 没食子酸 *n*-プロピルの存在下での菌糸成長に対する PEV2 および PEV3 の効果

一般に、没食子酸 *n*-プロピル (PG) は、シアン化物非感受性オルタナティブオキシダーゼ (AOX) の活性を阻害するために、ファモキサドンなどのキノン外部阻害剤を使用した殺菌剤感受性試験で使用されている (Hollomon et al., 2005; Ishii et al., 2009)。ファモキサドンを使用した感受性テストでは、 $0 \mu\text{g ml}^{-1}$ ファモキサドンのコントロール培地を含むすべての培地に 1 mM PG を含めた。エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059 は、非添加培地での菌糸生育と比較した場合、PG の存在下でいくらかの菌糸生育阻害を示すように見えることがわかった (Figure 2-7 と Figures, 2-6, 2-8, 2-9 を比較)。したがって、PG の非存在下でファモキサドンを使用して感受性テストを実行し、ファモキサドンのみの効果を決定した。興味深いことに、これらのテストでは、 $300 \mu\text{g ml}^{-1}$ ファモキサドンの最大濃度でも、エンドルナウイルス低含量株 CH98ASP059-L は菌糸生育阻害を示さなかった。エンドルナウイルス高含量株はある程度の菌糸生育阻害を示したが、PG が培地に含まれている場合と比較すると、フェモキサドンだけによる阻害程度は低かった (Table 2-3 と Table 2-7 を比較)。次に、菌糸の成長に対する PG のみの効果を決定した。 1 mM PG の存在下で、エンドルナウイルス高含量株 CH98ASP060, CH98ASP060-a, および CH98ASP059 は、非添加培地での増殖と比較して、それぞれ 59.5, 77.1, および 57.6% の菌糸生育阻害率を示した。

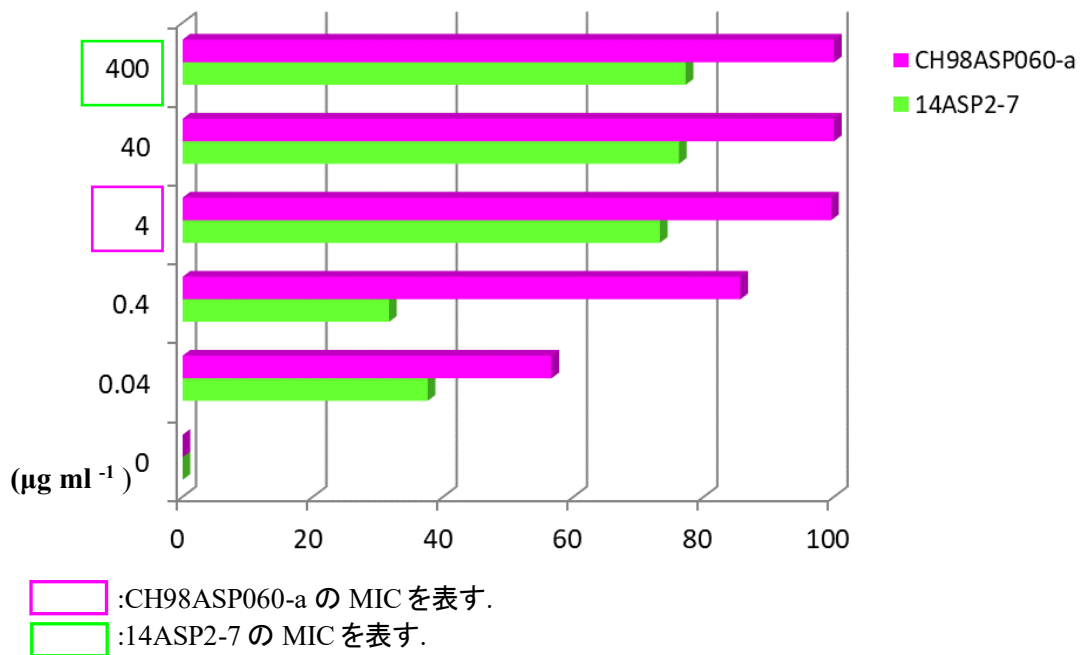
一方、エンドルナウイルス低含量株 CH98ASP059-L は、生育阻害はかなり低く、25% 以下であった (Table 2-8)。以上の結果から、PEV2 および PEV3 の感染が高含量である時、PG に対する感受性は極めて高く菌糸生育阻害を示すが、PEV2 と PEV3 が低含量の時、PG に対する感受性は極めて低く

なり, 目立った生育阻害は観察されなかった. PEV2 と PEV3 感染は, PG に対する感受性を高くし, その要因として宿主卵菌のミトコンドリアの AOX 機能に負の影響を与えることが示唆された.



0.033+0.333 :CH98ASP060-a の MIC を表す.
0.33+3.33 :14ASP2-7 の MIC を表す.

Figure 2-15 アスパラガス疫病菌の遊走子嚢形成におけるベンチアバリカルブインプロピル・TPN 水和剤に対する感受性.



4 :CH98ASP060-a の MIC を表す.
400 :14ASP2-7 の MIC を表す.

Figure 2-16 アスパラガス疫病菌の遊走子嚢形成における TPN 水和剤に対する感受性.

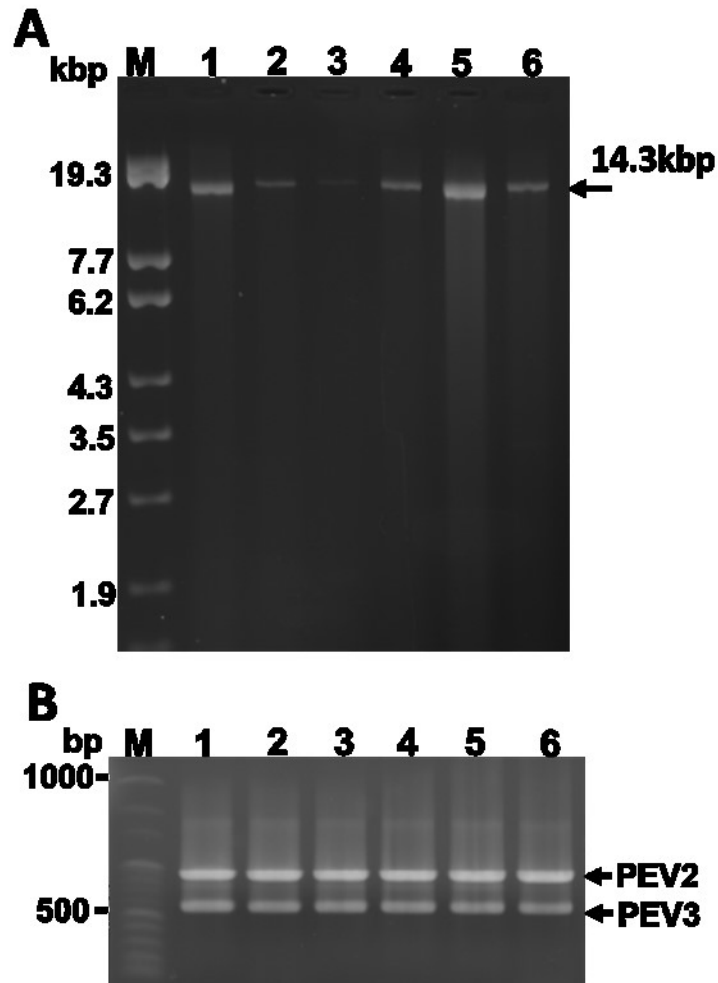


Figure 2-17 $100\mu\text{g ml}^{-1}$ のメタラキシルを含む PDA または PD ブロスで増殖した *Phytophthora* sp. 分離株における PEV2 および PEV3 の dsRNA ゲノムの検出.

(A) 3つの PEV2 および PEV3 高含量株から精製された dsRNA のアガロースゲル電気泳動. バンドの強度は, CS-Analyzerver.3.0 (ATTO) を使用したデンシトメトリーによって半定量化され. レーン 1, 51.2 ng; レーン 2, 15.7 ng; レーン 3, 5.3 ng; レーン 4, 30.0 ng; レーン 5, 48.6 ng; レーン 6, 35.8ng.

(B) PEV2 および PEV3 特異的プライマーを使用した RT-PCR 増幅. レーン指定: 1~3, メタラキシルを含まない PDA 培地で 5 回継代培養した後, 静的培養条件, PD ブロスで培養. 4-6, 100 mg ml^{-1} のメタラキシルを含む PDA 培地で 5 回継代培養した後, 静的培養条件, PD ブロスで培養した. M, DNA サイズマーカー (EcoT14I で消化された 300ng の λ DNA); レーン 1 および 4, CH98ASP060-a / PEV2&PEV3#; レーン 2 および 5, CH98ASP060 / PEV2&PEV3; レーン 3 および 6, CH98ASP059 / PEV2&PEV3.

Table 2-7 アスパラガス疫病菌の PDA 培地 (PG 添加無し) でのファモキサドンに対する感受性

菌株名	endornaviruses	菌糸成長阻害 (%)						
		ファモキサドン ($\mu\text{g ml}^{-1}$)						
		0.0015	0.015	0.15	1.5	15	150 ^a	300 ^b
CH98ASP060	PEV2&PEV3	0.0	7.0	0.0	22.0**	17.0	84.0	79.6
CH98ASP060-a	PEV2&PEV3#	0.0	23.8	73.5	79.6**	78.2	89.0	89.9
CH98ASP059	PEV2&PEV3	0.0	0.0	0.0	15.0**	15.0	72.6	66.6
CH98ASP059-L	PEV2#&PEV3#	0.0	0.0	0.0	0.0**	0.0	0.0	0.0

^a 市販薬剤の常用濃度.

^b 市販薬剤の常用濃度の 5 倍濃度(参考値).

** はそれぞれ p 値 <0.01 を示す (Tukey-Kramer 検定).

Table 2-8 アスパラガス疫病菌の PDA 培地でのファモキサドン(FA) および没食子酸 *n*-プロピル(PG) に対する感受性

菌株名	endornaviruses	菌糸成長阻害 (%)		
		FA 1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	FA 1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ + 1mM PG	1mM PG
CH98ASP060	PEV2&PEV3	22.0	100.0	59.5
CH98ASP060-a	PEV2&PEV3#	79.6	100.0	77.1
CH98ASP059	PEV2&PEV3	15.0	100.0	57.6
CH98ASP059-L	PEV2#&PEV3#	0.0	14.1	25.0

2.4. 考察

PEV2, PEV3 高含量株 CH98ASP059 とその低含量誘導体 CH98ASP059-L の菌糸成長速度を比較すると、PEV2, PEV3 高含量株は、低い成長速度と菌糸密度の低下を示すことが分かった (Figure 1-1B および Table 2-1). 同様に、卵菌であるべと病菌に感染する *Plasmopara halstedii* ウイルス (PhV) は、宿主の菌糸の成長阻害を引き起こすことが報告されている (Grasse et al., 2013). このようなウイルスによる栄養菌糸の成長の抑制は、野外での卵菌病原体の拡散を防ぐ可能性がある。

興味深いことに、PEV2, PEV3 高含量株 CH98ASP059 は、遊走子嚢を豊富に生成し、その低含量株 CH98ASP059-L は活発な菌糸の成長を示したが、非常に少ない遊走子嚢しか生成しなかった。

Phytophthora infestans RNA virus 2 (PiRV-2) では、遊走子嚢形成を刺激することが報告されている (Cai et al., 2019). このことから、PEV2 および PEV3 においても高い含量の PEV2 および PEV3 感染が宿主卵菌に遊走子嚢産生を促進するように刺激した可能性が示唆される (Figure 2-5 および Table 2-1). 遊走子嚢の形成には、 β -シトステロールなどの植物ステロールが必要である。卵菌細胞に取り込まれたステロールは、ゴルジ装置から卵割腔胞子を介して輸送され、遊走子細胞膜を構築するための材料として重要な役割を果たすと考えられている (Hendrix, 1970; 宮田ら, 1980). 宿主卵菌における高い含量レベルの PEV2 および PEV3 は、宿主卵菌によるステロール取り込みに寄与する可能性が考えられる。

Phytophthora 属菌は主に土壌を介して伝染するため、殺菌剤における管理は容易ではなく、さらに、感染から拡散までの期間が非常に短く、時間の経過とともに殺菌剤の使用頻度が高くなるため、殺菌剤の有効性が低下する傾向が危惧されている。このような状況から、主に4つの異なる作用機作を持つ疫病防除薬剤に対する PEV2, PEV3 高含量株およびその低含量株の感受性を調査した。PEV2 および PEV3 の高含量株は、カルボン酸アミド殺菌剤であるベンチアバリカルブイソプロピル (セルロースシンターゼの阻害剤) に対して高い感受性を示した。ベンチアバリカルブイソプロピルは、菌糸の成長、遊走子嚢の直接発芽、被嚢胞子発芽、および遊走子嚢の形成を強力に抑制す

ることが知られている (Gisi and Sierotzki, 2015). 宿主卵菌の細胞壁の生合成が PEV2 および PEV3 の感染によって弱められていると仮定すると、培地からの殺菌剤の取り込みが増加したために殺菌剤の感受性が増加した可能性がある。

対照的に、PEV2 および PEV3 の含量が高いと、メタラキシルに対する感受性が低下した (Figure 2-8, Table 2-4, および Table 2-6). メタラキシルは、全身的に機能するアシルアラニン殺菌剤である。RNA ポリメラーゼ I, ウリジンの RNA への取り込み, RNA, DNA, 脂質の合成を阻害する。これは、菌糸の成長、吸器の形成、遊走子嚢の形成など、宿主卵菌のすべての発達段階に影響を及ぼす (Gisi and Sierotzki, 2015). PEV2 および PEV3 高含量株におけるメタラキシルに対する感受性の低下の考えられる説明は、PEV2 および PEV3 の RdRp 活性が、メタラキシル処理中に宿主の RNA ポリメラーゼ I 活性を補完したことにあると考えられる。宿主卵菌におけるリボソーム RNA 合成の抑制は、これらのエンドルナウイルスが RNA 基質を使用することをより容易にする、あるいは、これらのエンドルナウイルスが自己分解して、宿主卵菌による RNA 合成のための基質を供給する可能性も考えられる。

異なる殺菌剤に対してこのようなマイコウイルス感染による対照的な効果が見つけられることはまれであり、メタラキシルとこの研究で使用された他の3つの殺菌剤との結果の違いを説明するメカニズムについては今後明らかにする必要がある。Penicillium digitatum polymycovirus 1 (PdPmV1) と Penicillium digitatum Narna-like virus 1 (PdNLV1) が *Penicillium digitatum* に同時感染すると、宿主はプロクロラズに対する感受性の増加を示したことが報告されている (Niu et al., 2018). しかし今日まで、宿主菌の殺菌剤感受性に対するマイコウイルスの影響を調査した研究はほとんど無い。このような研究の進展に伴い、将来、殺菌剤の感受性を調べる時には、病原菌にウイルスが存在する可能性を考慮する必要性が考えられる。

ベンチアバリカルブイソプロピルの場合と同様に、PEV2 と PEV3 の高含量は、ミトコンドリア呼吸阻害剤であるファモキサドンに対してより高い感受性をもたらした (Figure 2-7 と Table 2-3). この実験では、シアン化物非感受性オルタナティブオキシダーゼ (AOX) の阻害剤である PG を培地に添加した (Hollomon et al., 2005; Ishii et al., 2009). PEV2 および PEV3 の高含量感染により、PG の

みに対する感受性が増加することが分かった (Figure 2-7 の左側のパネルおよび Table 2-8). AOX は、ミトコンドリア内膜のマトリックス側に存在するユビキノールオキシダーゼで、それは一般に植物に存在し、真菌、原生動物、および他の下等真核生物にも広く見られる (Moore et al., 2013). 将来的には、エンドルナウイルスが宿主卵菌における AOX の PG 感受性に影響を与える潜在的なメカニズムを調査したいと考えている。

本研究では、アスパラガスから分離した PEV2, PEV3 高含量株と低含量株を比較して、*Phytophthora* sp. の成長、発達、および殺菌剤感受性に対する PEV2 および PEV3 感染の影響を評価した。理想的には、ウイルスが存在しない株はウイルス低含量株よりも優れたコントロールであるが、PEV2 と PEV3 の完全なフリー化は難しかった。本研究で行った単遊走子の分離に加えて、菌糸破壊法 (Kim et al., 2012) を使用して、低含量株 CH98ASP059-L に由来するエンドルナウイルスを含まないクローンの取得を試み、102 個の単遊走子分離株と 30 個のコロニー分離株を dsRNA 抽出で評価したが、ウイルスを含まないクローンは見つからなかった (データは示していない)。また、被嚢胞子分離後の約 30 のコロニー分離株を調査したが、エンドルナウイルスを含まない菌糸は得られなかった (データは示していない)。このような遊走子を介した PEV2 および PEV3 の高効率の垂直感染は、植物エンドルナウイルスの種子感染の高効率を彷彿とさせる。たとえば、栽培イネから検出された *Oryza sativa endornavirus* (OsEV) は主に細胞質に局在しているが、卵や花粉を介した種子の伝播率はほぼ 100% であり (Moriyama et al., 1996)、栄養成長中のエンドルナウイルスの非常に効率的な伝播は、エンドルナウイルスの細胞内局在に関連していることが示唆される。OsEV に感染した *Oryza sativa* (イネ) と *Oryza rufipogon* (雑草型野生イネ) の間の種間雑種、または *O. sativa* のジャポニカとインディカ品種の間の雑種では、一部の F2 個体は OsEV を含まず、これは非メンデル型遺伝であった (Moriyama et al., 1999a, b; Horiuchi et al., 2003)。植物エンドルナウイルスに関するこれらの発見を考えると、菌糸またはプロトプラストの融合によって種間雑種細胞を作製することで、ウイルスを含まない *Phytophthora* sp. を単離することは可能と考えられる。

3. 使用培地および試薬

PDA 培地 (Potato dextrose agr medium)

Potato	200 g/L
Glucose	2.0%
Agar	1.5%

ジャガイモの皮をむいて芽を取り、約 5mm 角のサイコロ状に切断した。D.W.とともに約 1 時間煮込んで成分を抽出した。煮汁をガーゼでこして、グルコースと寒天粉末を加え十分攪拌した後、オートクレーブ滅菌した。

PD 培地 (Potato dextrose broth)

Potato dextrose broth (BD Difco™)	24 g/L
-----------------------------------	--------

培地全量 1 L に対して、Potato dextrose broth 24g を加え、D.W. でメスアップし、オートクレーブ滅菌した。

改変 WSH 培地 (Weitzman-Silva-Hunter ager medium)

Otameal	1.0%
Mg ₂ SO ₄ · 7 H ₂ O	0.1%
KH ₂ PO ₄	0.1%
NaNO ₃	0.1%
Agar	2.0%

Oatmeal (日食オーツ) を培地全量の 8~9 割の D.W.とともに弱火で約 30 分間煮込む。煮汁をガーゼでこして、抽出液に上記の組成で試薬および Agar を加えた後、D.W.でメスアップする。その後 120°C, 10 分間オートクレーブし、試験管に 10ml ずつ分注した。シリコン栓をして 120°C, 20 分間滅菌し、斜めにして固めた。

YG 1/2 培地 (Yeast extract glucose broth 1/2)

Yeast extract	0.34%
Glucose	1.34 %

培地全量に対して, 0.34 % Yeast extract と 1.34 %グルコースを加え, D.W.でメスアップし, オートクレーブ滅菌した.

β -sitosterol PDA 培地 (β -sitosterol Potato dextrose agar medium)

Potato dextrose broth (BD Difco TM)	24 g/L
β -sitosterol	25 μ g/ml
Agar	1.5%

培地全量 1 L に対して, Potato dextrose broth 24g を加え, D.W. でメスアップした. 50ml ビーカーに β -sitosterol 50mg を入れ, アセトン 1ml を滴下し, ホットスターラーで溶解させる. 素早く PD 液を注ぎ込んで攪拌し, PD 培地に入れ, Agar を加えた後, オートクレーブ滅菌した.

PCI (Phenol/chloroform/Isoamyl alcohol)

50% 水飽和フェノール 48% クロロホルム 2% イソアミルアルコール

抽出 Buffer

200 mM NaCl
20 mM Tris-HCl (pH8.0)
2 mM EDTA
1% SDS
0.1% β -Mercaptoethanol

洗淨 Buffer (1 ×STE, 16.6% Ethanol)

100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl (pH8.0)
1 mM EDTA
16.6% Ethanol

溶出 buffer (1 ×STE)

100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl (pH8.0)
1 mM EDTA

1 ×TAE

40 mM Tris-acetate
1 mM EDTA
HCl を用いて pH8.0 に調整した.

1 ×TAE Agarose Gel

1 ×TAE を 1% Agar に調整し, 電子レンジで加熱して Agar を溶かした後, マグネティックスターラーを用いてよく攪拌した. 温度が約 70°C地まで冷めた後, ゲル作製プレートに流しいれて固まるまで放置した.

10 ×Loading dye

50% Glycerol
250 mM Tris-HCl (pH 8.0)
125 mM EDTA (pH 8.0)
0.1% Bromophenol blue
0.1% Xylene cyanol

引用文献

- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., et al. (2017).** Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 162, 2505–2538. doi: 10.1007/s00705-017-3358-5
- Aoki, N., Moriyama, H., Kodama, M., Arie, T., Teraoka, T., and Fukuhara, T. (2009).** A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. *Virus Res.* 140, 179-187. doi: 10.1016/j.virusres.2008.12.003
- Aragon-Caballero, L. M., Hurtado-Gonzales, O. P., Flores-Torres, J. G., Apaza-Tapia, W., and Lamour, K. H. (2008).** First Report of *Phytophthora nicotianae* Causing Asparagus Spear and Root Rot in Peru. *Plant Dis.* 92, 982.2–982.2. doi: org/10.1094/PDIS-92-6-0982B
- Ark, P. A., and Barret, J. T. (1938).** Phytophthora rot of asparagus in California. *Phytopathology.* 28, 754–756.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S-Y., Geiser, D. M., and Kang, S. (2008).** A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genet Biol.* 45, 266–77. doi: 10.1016/j.fgb.2007.10.010
- Cai, G., Krychiw, J. F., Myers, K., Fry, W. E., and Hillman, B. I. (2013).** A new virus from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans* with an 8 kb dsRNA genome: the sixth member of a proposed new virusgenus. *Virology.* 435, 341–349. doi: org/10.1016/j.virol.2012.10.012
- Cai, G., Myers, K., Fry, W. E., and Hillman, B. I. (2012).** A member of the virus family Narnaviridae from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Arch Virol.* 157, 165–169. doi: 10.1007/s00705-011-1126-5
- Cai, G., Myers, K., Fry, W. E., and Hillman, B. I. (2019).** Phytophthora infestans RNA virus 2, a novel RNA virus from *Phytophthora infestans*, does not belong to any known virus group. *Arch Virol.* 164, 567–572. doi: 10.1007/s00705-018-4050-0
- Cai, G., Myers, K., Hillman, B. I., and Fry, W. E. (2009).** A novel virus of the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, with two RNA segments and a supergroup 1 RNA-dependent RNA polymerase. *Virology.* 392, 52–61. doi: org/10.1016/j.virol.2009.06.040

- Cavalier-Smith, T., and Chao, E. E.-Y. (2006).** Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *J Mol Evol.* 62, 388–420. doi: 10.1007/s00239-004-0353-8
- Cooke, D. E., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., and Brasier, C. M. (2000).** A Molecular Phylogeny of Phytophthora and Related Oomycetes. *Fungal Genet Biol.* 30, 17–32. doi: 10.1006/fgbi.2000.1202
- Coutts, R. H. A. (2005).** First report of an endornavirus in the Cucurbitaceae. *Virus Genes.* 31, 361–362. doi: 10.1007/s11262-005-3255-y
- Crous, P W., Summerell, B A., Shivas, R G., Burgess, T I., Decock, C A., Dreyer, L L., et al. (2012).** Fungal Planet description sheets: 107-127. *Persoonia.* 28, 138-182. doi: 10.3767/003158512X652633
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. (1996).** Phytophthora Diseases Worldwide. *American Phytopathological Society.* pp. 562, £90. ISBN 0-89054-212-0.
- Falloon, P. G. (1982).** Baiting, pathogenicity and distribution of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in New Zealand asparagus soils. *N.Z. J. Agric. Res.* 25, 425–429. doi: 10.1080/00288233.1982.10417907
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., and Gurr, S. J. (2018).** Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science.* 360, 739–742. doi: 10.1126/science.aap7999i
- Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988).** Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85, 8998-9002. doi: 10.1073/pnas.85.23.8998
- Fukuhara, T., Koga, R., Aoki, N., Yuki, C., Yamamoto, N., Oyama, N., Udagawa, T., Horiuchi, H., Miyazaki, S., Higashi, Y., Takeshita, M., Ikeda, K., Arakawa, M., Matsumoto, N., and Moriyama, H. (2006).** The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties. *Arch Virol.* 151, 995–1002. doi: 10.1007/s00705-005-0688-5
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., and Suzuki, N. (2015).** 50-plus years of fungal viruses. *Virology.* 356, 479–480. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.034
- Ghabrial, S. A., and Suzuki, N. (2009).** Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 47, 353–384. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081932

- Gisi, U., and Sierotzki, H. (2015).** Oomycete Fungicides: Phenylamides, Quinone Outside Inhibitors, and Carboxylic Acid Amides. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens* pp 145–174.
- Grasse, W., Zipper, R., Totska, M., Spring, O. (2013).** Plasmopara halstedii virus causes hypovirulence in Plasmopara halstedii, the downy mildew pathogen of the sunflower. *Fungal Genet Biol.* 57, 42-47. doi: 10.1016/j.fgb.2013.05.009
- Grill, L. K., and Garger, S. J. (1981).** Identification and characterization of double-stranded RNA associated with cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78, 7043–7046. doi: 10.1073/pnas.78.11.7043
- Guindon, S., Dufayard, J-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010).** New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 3, 307-321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Hacker, C.V., Brasier, C. M., and Buck, K. W. (2005).** A double-stranded RNA from a Phytophthora species is related to the plant endornaviruses and contains a putative UDP glycosyltransferase gene. *J Gen Virol.* 86, 1561–1570. doi: 10.1099/vir.0.80808-0
- Hendrix, J. W. (1970).** Sterols in growth and reproduction of fungi. *Ann Rev Phytopathol.* 8, 111-130.
- Hollomon D. W., Wood P. M., Reeve C., and Miguez M. (2005).** Alternative oxidase and its impact on the activity of Qo and Qi site inhibitors, in *Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*, ed. by DehneHW, GisiU, Kuck KH, Russell PE and Lyr H. BCPC, Alton, Hants, UK, pp. 31–34.
- Horiuchi, H., Moriyama, H., Fukuhara, T. (2003).** Inheritance of *Oryza sativa* endornavirus in F1 and F2 hybrids between japonica and indica rice. *Genes Genet. Syst.* 78(3), 229-234. doi: 10.1266/ggs.78.229
- Huang, S., Ghabrial, S.A., 1996.** Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12541–12546.
- Ikeda, K. I., Nakamura, H., and Matsumoto, N. (2003).** Hypovirulent strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. *J. Gen. Plant Pathol.* 69, 385–390.

- Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W.-H., Kansako, M., Nishimura, K., Takahashi, K., and Oshima, M. (2009).** Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Manag Sci.* 65, 916-22. doi: 10.1002/ps.1773
- Kim, J.-X., Jung, J.-E., Park, J.-A., Park, S.-M., Cha, B.-J., and Dae-Hyuk Kim, D.-H. (2012).** Biological function of a novel chrysovirus, CnV1-BS122, in the Korean *Cryphonectria nitschkei* BS122 strain. *J. Biosci. Bioeng.* 115(1), 1-3. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.08.007
- Kliejunas, J. T., and Ko, W. H. (1974).** Effect of motility of *Phytophthora palmivora* zoospores on disease severity in Papaya seedlings and substrate colonization in soil. *Phytopathology.* 64, 426-428.
- Ko, W. H., and Mary J. Chan. (1974).** Infection and Colonization Potential of Sporangia, Zoospores, and Chlamydospores of *Phytophthora palmivora* in Soil. *Phytopathology.* 64, 1307-1309. doi: 10.1094/Phyto-64-1307
- Kodama, F., Sonoda, T., Kawamura, T., Okada, T., Fujii, N., Nara, C., Igarashi, Y., Toda, T., Fuji, S., and Furuya, H. (2015).** First Report of Blight Disease of Asparagus by *Phytophthora* sp. in Clade 6 in Japan. *Plant Disease.* 99, 1857. doi: org/10.1094/PDIS-02-15-0210-PDN
- Komatsu, K., Katayama, Y., Omatsu, T., Mizutani, T., Fukuhara, T., Kodama, M., Arie, T., Tohru Teraoka, T., and Moriyama, H. (2016).** Genome sequence of a novel mitovirus identified in the phytopathogenic fungus *Alternaria arborescens*. *Arch Virol.* 161, 2627-2631. doi: 10.1007/s00705-016-2953-1
- Kozlakidis, Z., Brown, N. A., Jamal, A., Phoon, X., and Coutts, R. H. A. (2010).** Incidence of endornaviruses in *Phytophthora* taxon douglasfir and *Phytophthora ramorum*. *Virus Genes.* 40, 130–134. doi: 10.1007/s11262-009-0421-7
- Larkin, M A., Blackshields, G., Brown, N P., et al. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23, 2947–2948. doi: org/10.1093/bioinformatics/btm404
- Lefebvre, A., Scalla, R., and Pfeiffer, P. (1990).** The double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* is packaged together with its replicase in cytoplasmic membranous vesicles. *Plant Mol Biol.* 14, 477-490. doi: 10.1007/BF00027494
- Le, S Q., and Gascuel, O. (2008).** An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol.* 25, 1307-1320. doi: 10.1093/molbev/msn067

- Marchler-Bauer, A., Yu Bo., Han, L., He, J., Lanczycki, C, J., Lu, S., Chitsaz, F., Myra K Derbyshire, M, K., Geer, R, C., Gonzales, N, R., Gwadz, M., et al. (2017).** CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 2017 45(D1), D200-D203. doi: 10.1093/nar/gkw1129
- Mackenzie, S. A., Pring, D. R., and Bassett, M. J. (1988).** Large doublestranded RNA molecules in *Phaseolus vulgaris* L. are not associated with cytoplasmic male sterility. *Theor Appl Genet.* 76, 59–63. doi: 10.1007/BF00288832
- Marzano, S. L., Nelson, B. D., Ajayi-Oyetunde, O., Bradley, C. A., Hughes, T. J., Hartman, G. L., Eastburn, D. M., and Domiera, L. L. (2016).** Identification of Diverse Mycoviruses through Metatranscriptomics Characterization of the Viromes of Five Major Fungal Plant Pathogens. *J Virol.* 90, 6846–6863. doi: 10.1128/JVI.00357-16
- Moore, A.L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K. and Ito, K. (2013).** Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 637-663.
- Moriyama, H., Kanaya, K., Wang, JZ., Nitta, T., and Fukuhara, T. (1996).** Stringently and developmentally regulated levels of a cytoplasmic double-stranded RNA and its high-efficiency transmission via egg and pollen in rice. *Plant Mol Biol.* 31, 713–719. doi: 10.1007/BF00019459
- Moriyama, H., Horiuchi, H., Nitta, T., and Fukuhara, T. (1999a).** Unusual inheritance of evolutionarily-related double-stranded RNAs in interspecific hybrid between rice plants *Oryza sativa* and *Oryza rufipogon*. *Plant Mol Biol.* 39, 1127–1136. doi: 10.1023/a: 1006118304093
- Moriyama, H., Horiuchi, H., Koga, R., and Fukuhara, T. (1999b).** Molecular Characterization of Two Endogenous Double-stranded RNAs in Rice and Their Inheritance by Interspecific Hybrids. *J. Biol. Chem.* 274 (11), 6882-6888. doi: 10.1074/jbc.274.11.6882
- Moriyama, H., Nitta, T., and Fukuhara, T. (1995).** Double-stranded RNA in rice: a novel RNA replicon in plants. *Mol Gen Genet* 248, 364-369. doi: 10.1007/BF02191603
- Niu, Y., Yuan, Y., Mao, J., Yang, Z., Cao, Q., Zhang, T., Wang, S., and Liu, D. (2018).** Characterization of two novel mycoviruses from *Penicillium digitatum* and the related fungicide resistance analysis. *Sci. Rep.* 8(1), 5513. doi: 10.1038/s41598-018-23807-3

- Nuss, D. L. (2005).** Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat Rev Microbiol.* 3, 632–642. doi: 10.1038/nrmicro1206
- Okada, R., Alcalá-Briseño, I. R., Escalante, C., Sabanadzovic, S., Rodrigo A. Valverde, R. A. (2018).** Genomic sequence of a novel endornavirus from *Phaseolus vulgaris* and occurrence in mixed infections with two other endornaviruses. *Virus Research* 257, 63- 67. doi: 10.1016/j.virusres.2018.09.005
- Okada, R., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T., and Natsuaki, T. (2015).** A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *J. Gen. Plant Pathol.* 81, 103–107. doi: 10.1007/s10327-014-0575-6
- Okada, R., Yong, C. K., Valverde, R. A., Sabanadzovic, S., Aoki, N., Hotate, S., Kiyota, E., Moriyama, H., and Fukuhara, T. (2013).** Molecular characterization of two evolutionarily distinct endornaviruses co-infecting common bean (*Phaseolus vulgaris*). *J Gen Virol* 94, 220–229. doi: 10.1099/vir.0.044487-0
- Ong, J. W. L., Li, H., Sivasithamparam, K., Dixon, K. W., Jones, M. G. K., and Wylie, S. J. (2016).** Novel Endorna-like viruses, including three with two open reading frames, challenge the membership criteria and taxonomy of the Endornaviridae. *Virology.* 499, 203–211. doi: 10.1016/j.virol.2016.08.019
- Osaki, H., Nakamura, H., Sasaki, A., Matsumoto, N., and Yoshida, K. (2006).** An endornavirus from a hypovirulent strain of the violet root rot fungus, *Helicobasidium mompa*. *Virus Res.* 118, 143–149. doi: 10.1016/j.virusres.2005.12.004
- Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B., and Arthur, K. (2009).** Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 10, 115–128. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x
- Pfeiffer, P. (1998).** Nucleotide sequence, genetic organization and expression strategy of the double-stranded RNA associated with the ‘447’ cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *J Gen Virol.* 79, 2349–2358 doi: org/10.1099/0022-1317-79-10-2349
- Pfeiffer, P., Jung, J. L., Heitzler, J., and Keith, G. (1993).** Unusual structure of the double-stranded RNA associated with the ‘447’ cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *J Gen Virol.* 74, 1167–1173. doi: 10.1099/0022-1317-74-6-1167

- Saude, C., Hurtado-Gonzales, O. P., Lamour, K. H., and Hausbeck, M. K. (2008).** Occurrence and characterization of a *Phytophthora* sp. pathogenic to asparagus (*Asparagus officinalis*) in Michigan. *Phytopathology*. 98, 1075–1083. doi: 10.1094/PHYTO-98-10-1075
- Schumann, G.L. and C. J. D’Arcy. (2000).** Late blight of potato and tomato. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2000-0724-01
- Stöver, B C., and Müller, K F. (2010).** TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*. 5, 11, 7. doi: 10.1186/1471-2105-11-7
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 30, 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Thompson, J. D., Gibson, T.J., F Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 25, 4876-4882. doi: 10.1093/nar/25.24.4876
- Tokunaga, T., and Bartnicki-Garcia, S. (1971).** Cyst wall formation and endogenous carbohydrate utilization during synchronous encystment of *Phytophthora palmivora* zoospores. *Arch Mikrobiol*. 79, 283-292. doi: 10.1007/BF00424905 Toyama Prefecture. *Ann Phytopathol. Soc. Jpn*. 64 (6), 629.
- Tuomivirta, T.T., Kaitera, J., and Hantula, J. (2009).** A novel putative virus of *Gremmeniella abietina* type B (Ascomycota: Helotiaceae) has a composite genome with endornavirus affinities. *J Gen Virol*. 90, 2299–2305. doi: 10.1099/vir.0.011973-0.
- Turpen, T., Garger, S. J., and Grill, L. K. (1988).** On the mechanism of cytoplasmic male sterility in the 447 line of *Vicia faba*. *Plant Mol Biol*. 10, 489–497. doi: 10.1007/BF00033604
- Valverde, R. A., Khalifa, M. E., Okada, R., Fukuhara, T., and Sabanadzovic, S. (2019).** ICTV Virus Taxonomy Profile: *Endornaviridae*. *J Gen Virol*. 100, 1204–1205 doi: 10.1099 /jgv.0.001277
- Valverde, R. A., and Gutierrez, D. L. (2007).** Transmission of a dsRNA in bell pepper and evidence that it consists of the genome of an endornavirus. *Virus Genes*. 35, 399–403. doi: 10.1007/s11262-007-0092-1
- Wakarchuk, D. A., and Hamilton, R. I. (1985).** Cellular double-stranded RNA in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol Biol*. 5, 55–63. doi: 10.1007/BF00017873

- Wakarchuk, D. A., and Hamilton, R. I. (1990).** Partial nucleotide sequence from enigmatic dsRNAs in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol Biol.* 14, 637–639. doi: 10.1007/BF00027512
- Webster, J. and Weber, R. W. S. (2007).** Introduction to Fungi. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 841 pp
- Xie, J., and Jiang, D. (2014).** New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annu Rev Phytopathol.* 52, 45–68. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-050222
- Yang, D., Wu, M., Zhang, J., Chen, W., Li, G., and Yang, L. (2018).** Sclerotinia minor Endornavirus 1, a Novel Pathogenicity Debilitation-Associated Mycovirus with a Wide Spectrum of Horizontal Transmissibility. *Viruses.* 27, 589. doi: 10.3390/v10110589
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X., Jiang, D., 2013.** Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1452–1457.
- 植松清次. (2015).** 疫病菌類同定のための簡易な分離・培養・形態形成法 Ver. 3. 植物防疫 特別増刊号 (№ 17) : 13-22.
- 内田景子, 高橋優実, 岡田 亮, 福原敏行, 有江 力, 寺岡 徹, 植松清次, 森山裕充. (2018).** 疫病菌エンドロナウイルスが遊走子嚢形成及び被嚢胞子化の発芽率に及ぼす影響. 日植病報 84 (3) : 236.
- 児玉不二雄, 植松清次, Mohammad Ziaur Rahman, 守川俊幸, 古屋廣光, 園田高広, 堀越紀夫, 平子喜一, 小木曾秀紀, 鐘ヶ江良彦, 景山幸二. (2016).** 日本産アスパラガス疫病菌と米国産アスパラガス疫病菌 *Phytophthora asparagi* との比較. 日植病報 82 (3) : 235-236.
- 児玉不二雄, 古屋廣光, 岡田 貴, 園田高広, 河村倫希, 藤井直哉, 戸田 武, 藤 晋一. (2014).** *Phytophthora asparagi*. によるアスパラガス疫病の発生. 日植病報 80 (4) : 240-241.
- 古屋廣光, 藤井直哉, 福島秀樹, 奈良知春, 戸田 武, 篠田光江, 佐山 玲, 藤 晋一, 齋藤隆明. (2015).** 秋田県でみられるアスパラガス生育不良の原因究明. 秋田県立大学ウェブジャーナルB (研究成果部門) 2 : 176-180.

宮田善雄, 大杉 武, 正子 朔. (1980). *Phytophthora capsici* 遊走子囊の遊走子分割過程における β -シトステロールの動向. The scientific reports of Kyoto Prefectural University. 32: 39-50.

山崎陽子, 守川俊幸. (1998). 富山県で発生したアスパラガス疫病 (新称). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64 (6) : 629.

横田仁子, 大森誉紀, 奈尾雅浩, 渡部貴志, 北本宏子. (2013). 愛媛県内のアスパラガス改植後の障害発生における疫病の関与. 土と微生物 (Soil Microorganisms) 67 (2) : 77-82.

渡邊幸子, 古田明子, 稲田 稔. (2015). 佐賀県におけるアスパラガス疫病の発生. 植物防疫 69: 663-669.

長崎県病害虫防除所. 2017. 平成29年度病害虫発生予察特殊報 第2号.

長野県病害虫防除所. 2017. 平成29年度病害虫発生予察特殊報 第2号.

謝辞

本論文は筆者が東京農工大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻博士課程に在籍中の研究成果を纏めたものです。同専攻教授 森山裕充 先生におかれましては指導教官として本研究の機会を与えていただき、その遂行にあたって丹念なご指導を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

また、同専攻准教授 小松 健 先生、同専攻教授 福原敏行 先生、同専攻教授 有江 力 先生、並びに、宇都宮大学農学部生物資源科学科教授 夏秋知英 先生、茨城大学農学部地域総合農学科教授 中島雅己 先生におかれましては副査としてご助言をいただくとともに本研究の細部にわたりご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

茨城県農業総合センター園芸研究所 岡田 亮 博士におかれましては原著論文投稿や研究遂行にあたってご助力とご支援を賜り大変お世話になりました。また、本学産学連携研究員 植松清次 先生におかれましては疫病菌の分譲や研究内容に関して日頃よりご討論いただき数々のお知恵を賜りました。また、本学名誉教授 寺岡 徹 先生におかれましては、全国農業協同組合連合会 営農技術センター在職中から研究内容に関して親身にご指導とご支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

国立感染センター 片山幸枝 先生、本学国際家畜感染症防疫研究教育センター 大松 勉 先生、同水谷哲也 先生におかれましては次世代シーケンサー解析等、丹念なご指導とご支援を賜りました。

佐賀県農業技術防除センター 稲田 稔 先生におかれましては本研究に用いたアスパラガス疫病菌の分譲を、日本大学生物資源科学部物医科学研究室教授 北 宜裕 先生におかれましては神奈川県内のアスパラガス農家での栽培圃場視察や技術指導にご助力とご支援をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、本学細胞分子生物学研究室の諸先輩方、同僚、後輩の皆様には日頃より有益なご討論とご助力、温かいご指導ご鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。特に、作田康平さん、井藤

碧吏さん，高橋優実さんには多大な御協力を戴きましたことに感謝申し上げます．本当に多くの方の並々ならぬお力添えによって学位論文研究を完遂することができました．ここに厚く御礼申し上げます．