

令和元年6月17日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07785

研究課題名(和文) 命名規約、タイプ標本および分子系統に基づく日本産ヒノキ科樹木寄生菌類の再検討

研究課題名(英文) Reexamination of Cupressaceae parasitic fungi based on nomenclature, type specimens and molecular phylogeny

研究代表者

本橋 慶一 (MOTOHASHI, Keiichi)

東京農業大学・国際食料情報学部・教授

研究者番号：10527542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：採集されたヒノキ科樹木の病害標本およびタイプ標本の観察から、既知の2種の他、本属菌に転属すべき2種、日本新産種となる3種が認められた。さらに、ヒノキ科を含む針葉樹3科20属から分離されたPhyllosticta属菌の分子系統解析、形態的特徴、温度特性、病原性の確認を行い5系統になることを明らかにした。これまでPhyllosticta属菌は典型的な病斑を形成し宿主植物が限定される種と多犯性で病原性の無い内生菌の2つのグループが知られていた。しかしながら、ヒノキ科に寄生するPhyllosticta属菌は既知の種概念とは異なる典型的な病斑を形成する多犯性の種が存在することが初めて明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒノキ科樹木に寄生するPhyllosticta属菌について、命名規約、タイプ標本および分子系統解析を行った結果、既知の2種の他、日本新産種3種を含む5種が認められ、我が国の菌類相が明らかとなった。さらに、Phyllosticta属菌には、宿主が限定される種のみならず複数の宿主に寄生することのできる種が存在することが明らかとなり、病害防除を行う上で重要となる感染経路について、新たな知見となった。

研究成果の概要(英文)：As a result of observing the disease specimens by genus of Phyllosticta of collected cypress trees and some type specimens in Japan, two known species, two species to be transferred to this genus, and three species which are newly produced in Japan were recognized. Furthermore, molecular phylogenetic analysis, morphological characteristics, temperature characteristics and pathogenicity of Phyllosticta spp. isolated from 20 genera including Cupressaceae were identified as five monophyletic groups. Heretofore, two groups of Phyllosticta spp. have been known: pathogens that host plants are restricted and nonpathogenic endophytes which are polyphasic. For the first time in the genus of Phyllosticta from Cupressaceae, it is recognized that there is a pathogenic multispecific species different from the known species concept.

研究分野：分類学

キーワード：分類 ヒノキ科 Phyllosticta属菌 分子系統 タイプ標本 命名規約 植物寄生菌類 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒノキ科樹木は、裸子植物マツ綱マツ目に属する常緑および落葉性の植物群である。ヒノキ科は、裸子植物の中では最大の科で、我が国の林業上、重要なヒノキ属、アスナロ属およびスギ属を含んでいる。ヒノキ科を含む樹木に寄生する病原菌の記載は1878年に始まり、その数は現在までに3800種を越えている。これらの菌種の記載は、命名規約に従い行われており、樹木病理学上の病害防除のみならず、植物検疫制度や生物多様性条約で重要性を増している。近年、分子系統による分類体系の再編成や命名規約の変更に伴い、世界的に菌種の所属再検討が行われている。しかしながら、我が国で記載されたヒノキ科樹木に寄生する多くの日本産 *Phyllosticta* 属菌は、所属の再検討が必要であるものの未検討で、生産現場や公的機関、産業分野に影響を及ぼしている。また、これらの *Phyllosticta* 属菌は Holotype 標本由来の分離菌株がほとんど存在しないことから、分子系統解析による系統学的な位置の把握や病害リスクの検討ができない状況にあり、病害防除の観点から研究が急務であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒノキ科樹木に寄生する日本産 *Phyllosticta* 属菌に着目し、分類学上の再検討および菌類相の解明を目的として、タイプ標本の調査および命名規約に基づいた分類学上の処理、病害標本の再収集と分離菌株の確立を行うとともに、接種試験による病原性の確認を行った。

3. 研究の方法

(1) 文献およびタイプ標本の調査

ヒノキ科樹木に寄生する日本産 *Phyllosticta* 属菌の菌類相を明らかとするために、Holotype 標本の有無および所在、分離菌株の有無、学名の有効性等について文献調査を行った。さらに、必要に応じて分類学上有効となる Lectotype の選定または Neotype および Epitype を創設することを検討した。

(2) 病害標本の収集および分離菌株の確立

各種タイプ標本の採集情報を基に病害標本の再採集を行い、Epitype の選定と分離菌株の確立を行った。加えて、得られた病害標本から純粋な分離菌株を確立した。

(3) 形態的特徴による種同定

採集された病害標本および所在が明らかとなった日本産のタイプ標本は、ルーベおよび実体顕微鏡下で観察を行った。また、病徴部の一部を切り取り、徒手切片を作成した後、シェアー液 (Chupp1940) で封入し、プレパラート標本とした。作成されたプレパラート標本は光学顕微鏡下で、分生子殻、分生子柄および分生子の形態および大きさについて精査し、種の同定を試みた。

(4) 生育温度試験による生育適温の解明

菌叢の生育温度試験には、ヒノキ科およびマツ科樹木から分離された *Phyllosticta* 属菌 18 菌株を供試した。供試菌株は、OA 培地上で予め培養した後、菌叢の周縁部を直径 5.5cm の滅菌したコルクボーラーで打ち抜いた。得られた含菌寒天片を OA 培地 (10ml, Difco 社製) の中央に一個ずつ移植した。試験区は 5, 10, 15, 20, 22, 25, 28, 30, 32, 35 および 40°C の 11 区とし、暗黒下で 14 日間培養し、一日ごとに菌叢の長径および短径を測定した。また、Tuckey の多重比較検定を行い、生育適温を求めた。

(5) 分子系統解析

全 DNA の抽出は、OMA 培地で 14 日間、25°C、暗黒下で培養した菌叢から、Prepman® Ultra (Applied Biosystems 社製) を用いて、プロトコルに従って行った。各領域の PCR およびシーケンス反応は、rDNA ITS 領域には V9G/ITS4 または ITS1/ITS4、rDNA 28S 領域には LR5/LROR、TEF1 α 領域には EF2/EF512F の各プライマーセットを用いた。得られたシーケンスデータは、MAFFT version 6.861 を使用し、アライメントを行った。分子系統解析には *Phyllosticta* 属菌として 80 のシーケンスデータとアウトグループ *Melanops tulasnei* および *Pseudofusicoccum stromaticum* の計 82 OUT のデータマトリックスを作成し、最大節約法および最尤法を用いた。

(6) 接種試験による病原性の解明

ヒノキ属およびアスナロ属に寄生する *Phyllosticta* 属菌の病害リスクを検討するために接種試験を行った。供試菌株には異なる系統の *Phyllosticta* 属菌 3 種、*Phyllosticta spinarum*、*Phy. paracapitalensis* および *Phyllosticta* sp. を用いた。接種木には、樹高 30cm 程度の健全なヒノキアスナロの苗木を用いた。接種試験は無傷区および有傷区を設け、分生子懸濁液による噴霧接種試験を行った。分生子懸濁液の調整には、各分離菌株を OMA 培地上にて培養し、培地上に形成された分生子を採取して 10⁵ 個/ml 程度の濃度に分生子懸濁液を調整した。有傷区は剪定バサミで枝や葉先を複数箇所切断した。接種後は、いずれの試験区においても内部に滅菌水を噴霧したビニール袋で 3 日間包み、湿室に保った。また、対照区として、苗木 2 本に無傷区および有傷区を設け、それぞれに滅菌水を接種し比較を行った。

4. 研究成果

(1) タイプ標本の調査

文献調査から、国内のヒノキ科樹木に寄生する狭義 *Phyllosticta* 属菌は *Phyllosticta capitalensis*, *Phy. cryptomeriae*, *Phoma pilospora*, *Pho. thujopsidis* の4種が存在することが明らかとなった。その中でも *Phyllosticta cryptomeriae* は有効なタイプ標本が存在しないことから、*Neotyoe* の設立が必要であることが明らかとなった。また *Phoma pilospora* および *Pho. thujopsidis* の Holotype または Syntype 標本の再検討から、両菌共に *Phyllosticta* 属菌へ転属する必要がある他、*Pho. thujopsidis* においては原記載に記述のない付属糸が観察された。従って、Epitype の設立と分離菌株の確立を行うと共に、形態的特徴の精査、培養性質の解明および分子系統解析を行い、所属の決定をする必要があることが明らかとなった。

(2) 病害標本の収集および分離菌株の確立

2015年5月から2018年2月までに、東京都調布市および世田谷区、神奈川県川崎市および相模原市、愛知県名古屋市、青森県青森市および弘前市の1都3県において計24回の病害標本の採集を行い、ヒノキ科樹木を中心とした15科28属241標本を採集した。そのうち、針葉樹3科20属27種から、それぞれ *Phyllosticta* 属菌の一種と同定された53分離菌株を確立した。

(3) 形態的特徴の精査

採集された標本の観察から狭義 *Phyllosticta* 属菌3種を同定し、そのうち1種は日本新産種であることが明らかとなった。オウゴンシノブヒバの葉枯症状部からは *Phyllosticta* 属菌へ転属すべき *Phoma pilospora* Sawada が、ニオイヒバの葉枯症状部からは日本新産種となる *Phyllosticta thujae* Bissett & M.E. Palm が、ヒノキ科5属7種から内生菌として *Phyllosticta capitalensis* Henn. がそれぞれ分離・同定された。ヒノキアスナロおよびフィリヒメアスナロの葉枯症状部から分離された *Phyllosticta* 属菌は、既知の *Phyllosticta* 属菌と形態的特徴が一致せず同定できなかった。

(4) 生育温度試験による生育適温の解明

ヒノキ科およびマツ科から分離された *Phyllosticta* 属菌の生育可能温度は、5-40°C、5-35°Cあるいは10-35°Cであった。また、生育適温は20-30°Cの範囲内となった。また、同じ宿主属より得られた *Phyllosticta* 属菌であっても生育適温あるいは生長量が異なるものが存在することが明らかとなった。

(5) 分子系統解析

推定された系統樹から、ヒノキ科由来の *Phyllosticta* 属菌は複数の宿主属を含む5系統に分かれ、宿主属ごとに単系統となる従来の結果とは必ずしも一致しないことが明らかとなった(図1)。1つ目の系統は、ヒノキ科ヒノキ属、アスナロ属およびクロベ属由来の *Phyllosticta* 属菌と北米でヒノキ属への寄生の報告のある *Phyllosticta spinarum* (ex-type: CBS292.90)により構成された。2つ目の系統は、マツ科モミ属、ヒノキ科セコイア属、クロベ属、ネズミサシ属およびヒノキ属由来の *Phyllosticta* 属菌で構成された。3つ目の系統は、スギ属由来の *Phyllosticta* 属菌および *Phyllosticta cryptomeriae* で構成された。4つ目の系統は、ナンヨウスギ科ウオレミア属、マツ科ヒマヤスギ属、5つ目の系統は、ヒノキ科メタセコイア属、セコイア属、スイショウ属、ヌマスギ属およびアスナロ属由来の *Phyllosticta* 属菌と内生菌として知られる *Phyllosticta capitalensis* (ex-type: CBS128856) および *Phy. paracapitalensis* (ex-type: CBS141353) で構成された。これによりヒノキ科ヒノキ属に寄生する *Phyllosticta* 属菌は2系統、アスナロ属には3系統、クロベ属には2系統、セコイア属には2系統存在し、同じ宿主属に対して複数種の *Phyllosticta* 属菌が寄生することが明らかとなった。

(6) 接種試験による病原性の解明

接種36日後に *Phyllosticta spinarum* (NECC0050)を接種した有傷区では、葉先に褐色の葉枯が生じ、病徴は再現された。葉枯症状部からは、*Phyllosticta* 属菌の一種が分離された。本分離菌株は、分生子殻および分生子の形態的特徴が、NECC0050 および *Phyllosticta spinarum* (CBS292.90)と一致したほか、ITS領域の塩基配列が100%一致した。これらの結果から、*Phyllosticta spinarum* は、寄生の報告がある宿主ネズミサシ属およびヒノキ属に加え、新たにアスナロ属に感染し、病原性を示すことが明らかとなった。また、本菌によるアスナロ属およびヒノキ属の病害は未報告であることから、本病害をアスナロ・ヒノキ褐色葉枯病として提案する。また、*Phyllosticta paracapitalensis* (NECC0085) および *Phyllosticta* sp. (NECC0095) を接種した接種木は、無傷区および有傷区の両区とも病徴は再現されなかった。対照区も同様に、病徴を示さなかった。

本研究により、既報の *Phyllosticta capitalensis*, *Phy. cryptomeriae*, *Phoma pilospora* および *Pho. thujopsidis* に加え、日本新産種となる *Phy. spinarum*, *Phy. thujae* および *Phy. paracapitalensis* の 7 種を確認し、ヒノキ科に寄生する日本産 *Phyllosticta* 属菌の菌類相を明らかとした。また、ヒノキ科由来の *Phyllosticta* 属菌のタイプの有無を明らかにし、*Phoma pilospora* および *Pho. thujopsidis* のタイプ標本の再検討から、転属やシノニム化の提案を行った。さらに、*Phyllosticta thujae* および *Phoma pilospora* の Epitype を設立し、分離菌株を確立した。推定された系統樹からは、ヒノキ科由来の *Phyllosticta* 属菌は複数の宿主属を含む 5 系統に分かれ、同じ宿主属に対して複数種の *Phyllosticta* 属菌が寄生することが明らかとなった。さらに、形態の特徴および生育適温の違いが必ずしも系統関係と一致せず、系統 1 および系統 2 は、種複合体からなると推測された。

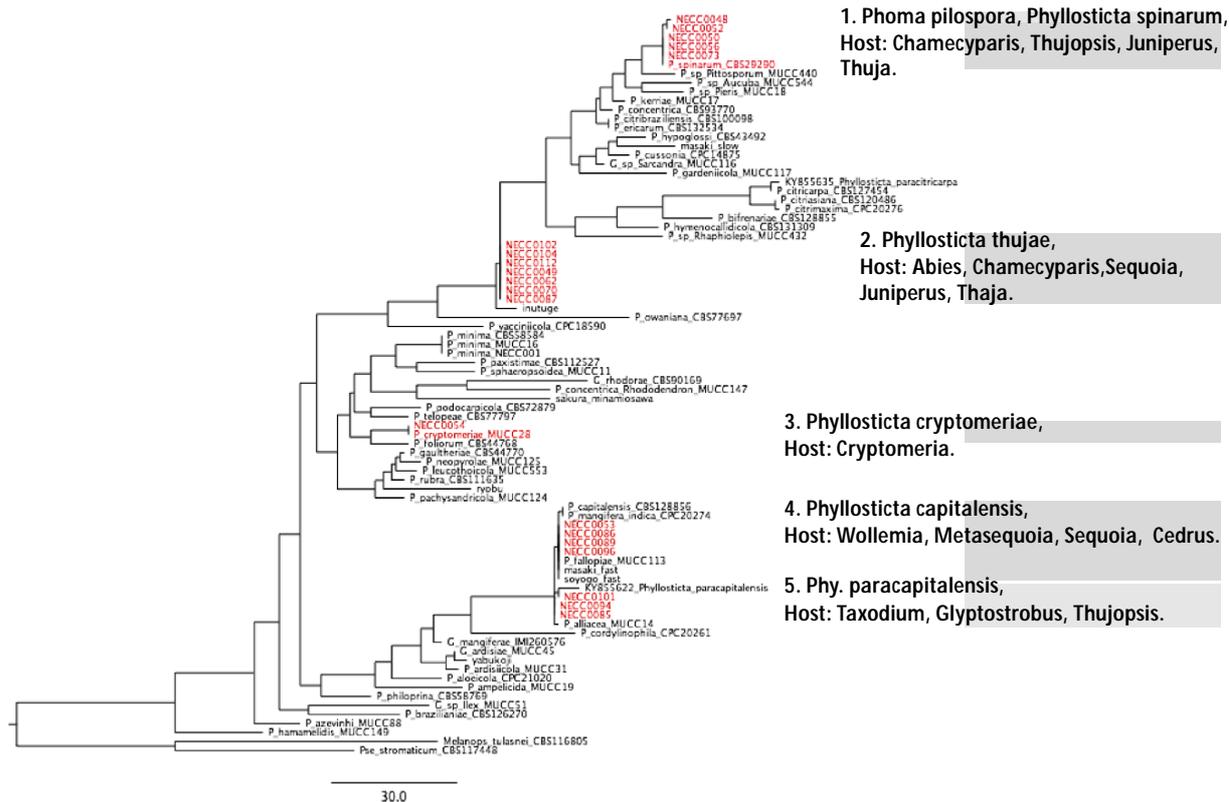


図 1. 最大節約法によって推定された *Phyllosticta* 属菌の系統樹。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

服部友香子・中島千晴・田中和明・神田 多・本橋慶一(2016)ヒノキ科樹木 3 属に寄生する *Phyllosticta* 属菌の分類学的再検討. 樹木医学研究 20: 99-100. 査読有り.

〔学会発表〕(計 5 件)

服部友香子・中島千晴・本橋慶一(2018)ヒノキ科に寄生する日本産 *Phyllosticta* 属菌の分類学的研究. 日本菌学会第 62 回大会

服部友香子・中島千晴・本橋慶一(2017)ヒノキ科樹木に寄生する日本産 *Phyllosticta* 属菌の分類学的再検討. 日本菌学会第 61 回大会・環境微生物系合同大会 2017

服部友香子・本橋慶一(2017) *Phyllosticta* 属菌によるアスナロ・ヒノキ褐色葉枯病(新称). 樹木医学会

樋口裕仁・二階堂由紀・服部友香子・本橋慶一(2017)モミジバスズカケノキのがんしゅ症状について. 樹木医学会第 22 回

服部友香子・中島千晴・本橋慶一(2016)ヒノキ科樹木に寄生する日本産 *Phyllosticta* 属菌の分子系統解析. 日本菌学会 60 回大会

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：服部 友香子

ローマ字氏名：HATTORI, Yukako

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。