

機関番号：32658  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20580160  
 研究課題名（和文） 樹木に胴・枝枯病害をおこす *Botryosphaeria* 属ホ口モルフの分子系統解析  
 研究課題名（英文） Studies of reidentification of several kinds of *Botryosphaeria* sp. causing the tree cankers and diebacks.  
 研究代表者  
 矢口 行雄（YAGUCHI Yukio）  
 東京農業大学・地域環境科学部・教授  
 研究者番号：50157971

## 研究成果の概要（和文）：

樹木の胴・枝枯性病害である針葉樹暗色枝枯病、ポプラ類ギグナルディア胴枯病、ハンノキ類ギグナルディア胴枯病、クルミ褐色枝枯病、カエデ類粗皮病、カラマツ先枯病の所属の再検討を行なった。遺伝子系統解析および形態観察の結果、全ての分離菌株および標本から、*Botryosphaeria* 属菌に所属することがわかった。しかし、針葉樹暗色枝枯病、ハンノキ類ギグナルディア胴枯病、クルミ褐色枝枯病、カエデ類粗皮病は遺伝子系統解析と形態観察の結果が異なった。

## 研究成果の概要（英文）：

I performed reidentification of the pathogenic fungi that is causing the tree cankers and diebacks on Guignardia dieback of Conifers, Guignardia canker of Poplar, Guignardia canker of Alder, Brown blight of Walnuts, Rough bark of Maples and Shoot blight of Japanese larch. As a result of sequence analysis and the observation on morphological characteristics, all isolates and all specimen which did test for this experiment were included in *Botryosphaeria* sp. However, Guignardia dieback of Conifers, Guignardia canker of Alder, Brown blight of Walnuts, and Rough bark of Maples were not identified, because result of the observation on morphological characteristics did not accord with sequence analysis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：樹木胴枯病、樹木枝枯病、*Botryosphaeria* 属、*Guignardia* 属、分子系統解析

## 1. 研究開始当初の背景

樹木の胴枯病および枝枯病をおこす病原菌である *Botryosphaeria* 属菌は、古典分類

では *Guignardia* 属に収められていた種類を近代自然分類への移行に伴い大きく分散させた。そのため現在 *Guignardia* 属と記載されている樹木病原菌の中には、今後、

*Botryosphaeria* 属に転属を必要とする病害が多くある。たとえば針葉樹暗色枝枯病は、1950年に澤田がスギから分離した菌株を *Guignardia cryptomeriae* Sawada と命名し、アナモルフ(不完全世代)は小林(1956)により *Macrophoma sugi* Hara と報告された。本病は1970年以降にボタン材の原因菌ともいわれ問題となった。その後、山田ら(1986)はヒノキの集団枯損の原因菌であった暗色枝枯病菌は、子嚢胞子が *Guignardia* 属菌に比べ大型で、さらにスギ暗色枝枯病菌に比べ病原力も異なると報告した。また宮下(2005)は分子系統解析を行い *Botryosphaeria* 属に所属すると報告したが、まだ正式な転属処理はされていない。

さらに *Botryosphaeria* 属菌のアナモルフも同様にその変遷は複雑である。まず Saccardo(1892)により記載された分生子が  $15\ \mu\text{m}$  以上の胴・枝枯病菌であった *Macrophoma* 属は、Petraik & Sydow(1927)により分生子の着色の有無により *Dothiorella* 属と *Sphaeropsis* 属に分類された。しかし現在では、この *Dothiorella* 属を新の *Dothiorella* 属、*Fusicoccum* 属、*Diplodia* 属の3属に分けた Crous & Palm(1999)の記載が有力である。そのため *Botryosphaeria* 属菌のアナモルフであった *Macrophoma* 属菌および旧の *Dothiorella* 属を、Crous & Palm(1999)の記載に基づき再同定する必要がある。

## 2. 研究の目的

樹木病害として、スギ、ヒノキ、カラマツの暗色枝枯病菌のアナモルフをはじめ16病害が記載され(日本植物病名目録、2000)、緊急にアナモルフとテレオモルフ全体の生活環であるホロモルフの形態観察と分子系統解析を用いた研究が必要である。これにより *Botryosphaeria* 属ホロモルフの所属が明らかとなり、今後、樹木病害の防除を目的とした基礎的な研究がさらに発展するものと期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子系統解析: 供試菌株は、(独)森林総合研究所 樹木病害標本庫(以下、森林総研標本庫)より分譲いただいたカラマツ先枯病9菌株、針葉樹暗色枝枯病17菌株、ポプラ類ギグナルディア胴枯病4菌株、ハンノキ類ギグナルディア胴枯病1菌株、クルミ褐色枝枯病4菌株およびカエデ類粗皮病1菌株とした。またカラマツ先枯病は、2008年、盛岡で新たに採取後、菌を分離し、2菌株を本実

験に供試した。

遺伝子系統解析を行うため、各分離菌株から抽出した全DNAのうち、ITS-1、5.8S、ITS-2の領域をPCR法により増幅させ、これをダイデオキシ法により蛍光標識し、シーケンサにて塩基配列を解読した。解読した塩基配列は、DDBJ(日本DNAデータバンク)が公開するDNA塩基配列データと比較し、相同性検索を行った。また、*Botryosphaeria* 属菌の分類に関する論文から得た既報の遺伝子データと共に、近隣結合法を用いて系統解析を行った。系統樹は、系統樹作成ソフト PAUP\*を用いて作成し、各分離菌株の所属を系統的に解析した。

(2) 形態観察: 森林総研標本庫より病害標本を借用し、またカラマツ先枯病は、2008年、盛岡で採取し本実験に供試した。各病害の標本数は、カラマツ先枯病:9、針葉樹暗色枝枯病:8、ポプラ類ギグナルディア胴枯病:15、ハンノキ類ギグナルディア胴枯病:3、クルミ褐色枝枯病:4、カエデ類粗皮病:3とした。各標本上に形成された完全時代の子嚢殻、子嚢、子嚢胞子および不完全時代の分生子殻、分生子の形態観察を行うため標本の一部を切り取り、徒手切片を作製した。切片はシェアー液(Chupp 1940)で封緘後、プレパラート標本を作製し、光学顕微鏡で検鏡した。針葉樹暗色枝枯病は、分離菌株2菌株上に形成した分生子殻も顕鏡した。子嚢胞子および分生子の大きさは、計測値の平均値を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) カラマツ先枯病

遺伝子系統解析: 本実験に供試した11菌株は、高いブートストラップ値に指示され *Botryosphaeria laricina* および *B. australis* の混在したクレードに含まれた(図1)。

形態観察: 本実験に供試した9標本は、全ての病斑部に子嚢殻および分生子殻が観察された。子嚢殻は子座を形成し樹皮下に埋没し、成熟すると孔口をもつ子嚢室が観察された。子嚢は無色、幅広い棍棒状、頂端は肥厚し8個の子嚢胞子を不整2列に含んでいた。子嚢胞子は無色、単胞、紡錘形から広楕円形で、大きさは  $29.1 \times 12.8\ \mu\text{m}$ (平均)であった。また、分生子殻は黒色、垂球形で頂部に孔口を有し、分生子は無色、単胞、長楕円から紡錘形、基部が裁断状で、大きさは  $27.1 \times 8.4\ \mu\text{m}$ (平均)であった(図2)。

以上の結果より、本研究で供試したカラマツ先枯病菌の標本および分離菌は、遺伝子系統解析および形態観察の結果から、*Guignardia* 属菌ではなく *Botryosphaeria* 属菌であると同定された。また遺伝子系統解析

の結果, *B. laricina* と *B. australis* が混在したクレードに含まれたが現在, *B. laricina* と *B. australis* との関係を論じた報告はなく, 本実験では形態的に明らかに *B. australis* とは異なった。さらに, 不完全時代は *Macrophoma* sp. (= *B. laricina*) と *F. aesculi* (= *B. dothidea*) に近い領域に入った。そこでカラマツ先枯病菌を尚 (1987) および小林 (1990) の報告に指示し, *B. laricina* (= *Macrophoma* sp.) と同定した。*B. laricina* の遺伝子データは, 日本と中国から報告されたデータのみであり, 世界的に他の種に比べて少ない種である。現在, *B. laricina* は *B. australis* と同じクレードに入ったが, 今後, これらの遺伝子データのさらなる構築が望まれる。

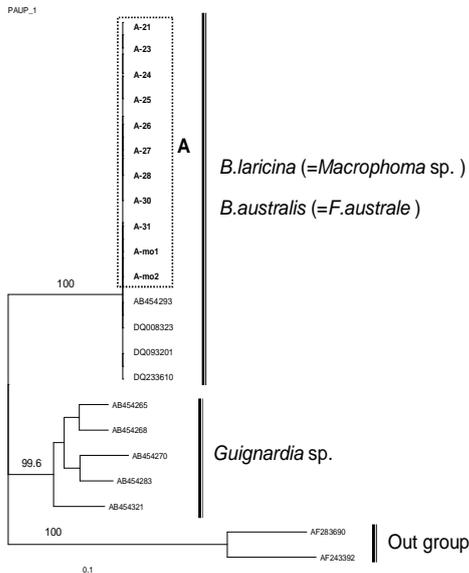


図1. カラマツ先枯病菌(A)の近隣結合法を用いた系統樹

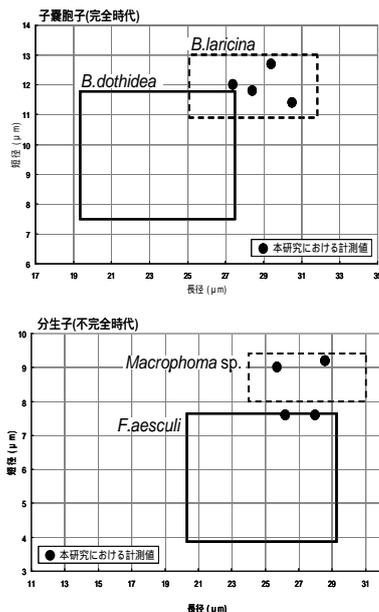


図2. カラマツ先枯病菌の子嚢胞子および分生子の大きさの比較

## (2) 針葉樹暗色枝枯病

遺伝子系統解析: 本実験に供試した 17 菌株は, 高いブートストラップ値に指示され *Botryosphaeria* 属菌のクレードに含まれた。また, 種レベルでは 5 菌株が *B. ribis*, 7 菌株が *B. parva*, 5 菌株が *B. dothidea* に分かれ, それぞれ高い相同性を示した(図3)。

形態観察: 子嚢殻は全 8 標本中, 6 標本から観察され, 病斑部に形成された子座が樹皮下に埋没し, 成熟すると孔口をもつ子嚢室が観察された。子嚢は無色, 幅広い棍棒状, 頂端は肥厚し, 8 個の子嚢胞子を不整 2 列に含んでいた。子嚢胞子は無色, 単胞, 紡錘形から広楕円形で, 大きさは  $21.1 \times 7.8 \mu\text{m}$  (平均) であった。分生子殻は 3 標本および 2 菌株から観察され, 黒色, 垂球形で頂部に孔口を有していた。また, 分生子は無色, 単胞, 長楕円から紡錘形, 基部が裁断状で, 大きさは  $20.4 \times 5.9 \mu\text{m}$  (平均) であった(図4)。

以上の結果より, 針葉樹暗色枝枯病菌の完全時代は, 形態観察から *Guignardia* 属菌ではなく *Botryosphaeria* 属菌の特徴を示した。さらに不完全時代は, *Fusicoccum* 属菌の特徴を示した。また, 遺伝子系統解析の結果から, *B. parva* (= *F. parvum*), *B. ribis* (= *F. ribis*) および *B. dothidea* (= *F. aesculi*) の 3 種に分かれた。

これらの結果から, *B. parva* と *B. dothidea* は, 不完全時代の分生子の形態が異なるため, 顕微鏡下で容易に識別できる。しかし, *B. ribis* は形態的に *B. parva* と *B. dothidea* に類似しているため同定が困難であり, 遺伝子系統解析が有効な手法となる。今後さらに針葉樹暗色枝枯病菌の種の特定が必要である。

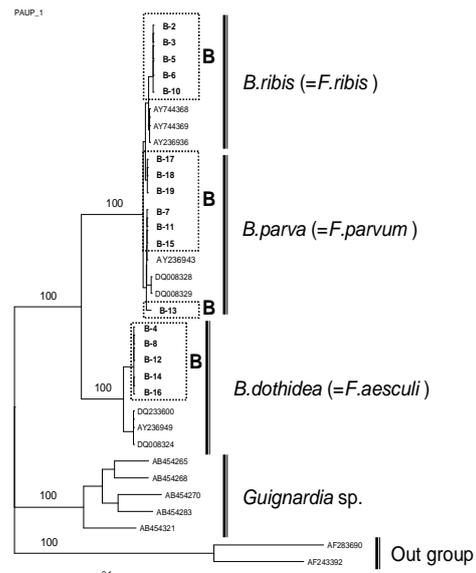


図3. 暗色枝枯病菌(B)の近隣結合法を用いた系統樹

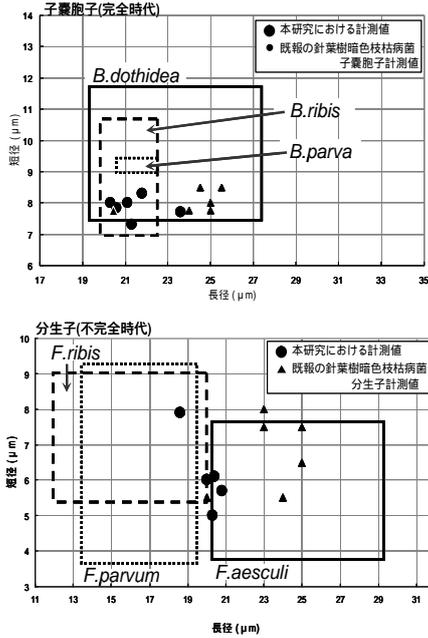


図4. 針葉樹暗色枝枯病菌の子嚢胞子および分生子の大きさの比較

(3) 広葉樹4種の胴・枝枯病

遺伝子系統解析：ポプラ類ギグナルディア胴枯病，ハンノキ類ギグナルディア胴枯病，クルミ褐色枝枯病，カエデ類粗皮病に供試した全ての菌株は，*Guignardia* 属菌ではなく *Botryosphaeria* 属菌と同じクレードに含まれ，*B. dothidea*(= *F. aesculi*)と同定された(図5)。

形態観察：ポプラ類ギグナルディア胴枯病は，子嚢胞子および分生子の計測値から *B. dothidea*(= *F. aesculi*)と同定した。しかし，他の3病害は子嚢胞子および分生子の計

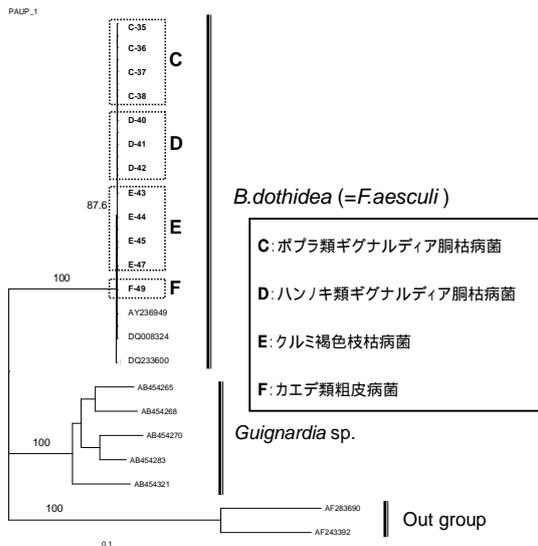


図5. 広葉樹胴・枝枯病菌4種の近隣結合法を用いた系統樹

測値が数種の領域に入り，特定できなかった。

以上の結果より，広葉樹4種の胴・枝枯病菌の完全時代は，*Guignardia* 属菌ではなく *Botryosphaeria* 属菌の特徴を示した(図6)。また不完全時代は *Fusicoccum* 属菌の特徴を示した。しかし，種の同定では，ポプラ類ギグナルディア胴枯病菌以外は，子嚢胞子および分生子の計測値が特定の種に合わず，さらに検討が必要である。

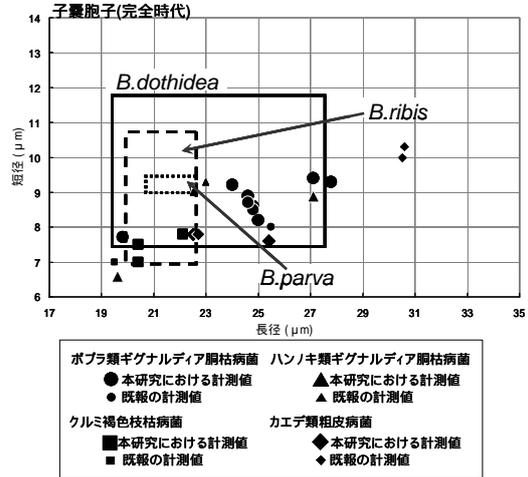


図6. 広葉樹胴・枝枯病菌4種の子嚢胞子および分生子の大きさの比較

(4)まとめ

カラマツ先枯病，針葉樹暗色枝枯病および広葉樹胴・枝枯病の病原菌の所属を検討した結果，*Guignardia* 属ではなく *Botryosphaeria* 属に所属することがわかった。胴・枝枯病菌の種の同定については，カラマツ先枯病，ポプラ類ギグナルディア胴枯病は特定できたが，他の病害については，遺伝子系統解析ばかりでなく，新鮮な病害標本を入手し，さらなる形態観察が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

無

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢口 行雄 (YAGUCHI Yukio)  
東京農業大学・地域環境科学部・教授  
研究者番号：50157971

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

無