

令和元年5月13日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07613

研究課題名(和文) カシ類うどんこ病菌 *Erysiphe gracilis* 種複合体の種分化メカニズム研究課題名(英文) Studies on the mechanism of speciation of *Erysiphe gracilis* species complex, a powdery mildew of evergreen oaks

研究代表者

高松 進 (Takamatsu, Susumu)

三重大学・生物資源学研究科・招聘教授

研究者番号：20260599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：当初考えていた研究計画以上に新規な知見が得られた。本研究の主要な成果は以下の通り。1) 常緑カシ類のうどんこ病菌である *Erysiphe gracilis* が種複合体であることを明らかにし、3新種を含む6種に分割することを提案した。2) 本来は落葉ナラ類のうどんこ病菌である *Erysiphe quercicola* が常緑カシ類に発生することを始めて報告した。3) 三重県津市のアラカシ生垣において3種うどんこ病菌の発生状況を定期的に調査し、*Cystotheca wrightii*, *E. gracilis* 種複合体および *E. quercicola* の生活史を宿主であるカシ類への適応進化の観点から明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

経済のグローバル化に伴い、農畜産物に付随する病原菌類が頻りに海外から侵入する傾向にある。植物病害の防除だけでなく、このような植物検疫からの観点からも植物病原菌の正確な分類、多様性調査、鑑定は重要である。今回は街路樹、庭木、生垣として用いられる常緑カシ類をターゲットとして、それに寄生するうどんこ病菌の分類、地理的分布、生活史の研究を行った。その結果、当初予想していた結果とは全く異なる多くの結果を得ることができた。このことは常緑カシ類に限らず、従来のおうどんこ病菌に関する知見がいかに曖昧であったかを明白にすることになり、カシ類以外のうどんこ病菌についても同様な調査が必須であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We were able to obtain very valuable results more than expected at the starting of this study. They are summarized as follows. 1) Molecular and morphological studies revealed that *Erysiphe gracilis*, a powdery mildew of evergreen oaks, is a species complex consisting of six species including three new species. 2) *Erysiphe quercicola* that is a powdery mildew of deciduous oak trees was first reported on evergreen oaks first time. 3) We investigated the life cycle of the three powdery mildew species on evergreen oaks at a hedge of Tsu-shi, Mie Prefecture, and discussed the life cycles of *Cystotheca wrightii*, *E. gracilis* species complex, and *E. quercicola* from the aspect of adaptive evolution of powdery mildews to their hosts.

研究分野：植物病理学, 菌学

キーワード：うどんこ病菌 常緑カシ genotype 種分化 地理的分布 宿主

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

1. 研究開始当初の背景

うどんこ病菌は世界で16属873種が知られている。そのすべては植物の絶対寄生菌であって、植物寄生菌でないうどんこ病菌は知られていない。うどんこ病菌の宿主として世界で約1万種の被子植物が記載されているが、その中に経済的に重要な多くの作物、果樹、野菜、花卉、鑑賞樹木類が含まれるため、最も重要な植物病原菌の一つとして認識されている。研究代表者らのグループは20年以上前からうどんこ病菌の分子系統学の手法を用いて、世界のうどんこ病菌の生物地理、形態進化および宿主との相互作用の進化的解析を行ってきた。これらの成果は、日本菌学会が発行する国際誌 *Mycoscience* を始め、多くの菌学関連の雑誌に原著論文として公表されてきた。研究代表者らが決定したうどんこ病菌のDNA塩基配列データはすべて公的なデータベースに登録され、うどんこ病菌鑑定のためのDNAバーコードとして活用されている。さらに、研究代表者らの系統解析結果に基づいて、1999年からうどんこ病菌全体の分類体系の見直しが行われ、2012年に刊行された Braun and Cook による「Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews)」には研究代表者らの研究結果が大きく紹介されている。ここ10年間でうどんこ病菌の属レベル以上の分類体系は系統関係に基づいた体系に整理されたが、種レベルではまだまだ未解析の分類群が多く残されている。

ブナ科コナラ属の常緑カシ類には *Cystotheca wrightii* と *Erysiphe gracilis* の2種類のうどんこ病菌が発生する。研究代表者の予備的観察では、この両種ともうどんこ病菌としては例外的に分散性が低く、限られた樹木個体に毎年発生する。そのため、地域ごとに遺伝的に異なる集団に分化しているのではないかと考え、幾つかの地域からアラカシ上の標本を採集し、rDNA領域の解析を行った。ところが、1種と考えていた *E. gracilis* に明らかに異なる二つの genotype に別れることがわかってきた。この二つの genotype 間の違いは、rDNA ITS 領域の配列で96.5%で、これは種レベル以上の違いである。系統解析の結果からこれらの genotype は一つの祖先から分化したことが明らかであった。同じ宿主に寄生し、祖先を共有するにもかかわらず *E. gracilis* はなぜ二つの genotype へと遺伝的に分化したのだろうか。

同所的に分布する種が二つの種に分化する現象を同所的種分化という。今回の *E. gracilis* はその1例であるが、なぜ同じ植物種に寄生するにもかかわらず遺伝的分化が起こったのか。この要因を、地理的隔離、時間的隔離、生態的隔離などの観点から明らかにしようとする。さらに、ほとんど知られていない本菌の発生生態を検討するとともに、*E. gracilis* 種複合体の分類学的な再検討を行う。

2. 研究の目的

本研究では次の3点に焦点を絞り、研究を行う。

(1)【発生生態の解明】

Erysiphe gracilis の発生生態の大部分は不明である。大部分のうどんこ病菌は、三重県では春から秋にかけて分生子を形成して、拡大蔓延したのち、10月中旬くらいから有性世代である閉子のう殻を形成し始める。研究代表者の予備的観察では、*E. gracilis* は1年のうち5月中旬から6月中旬までの約1ヶ月間のみ分生子を形成し、その後は分生子を形成しない。閉子のう殻の形成始めは12月頃で、遅く、子のう胞子の成熟は1月から2月の真冬に起こる。本研究では、病徴の初発時期、分生子形成期間、閉子のう殻形成始期、および子のう胞子の放散時期をメインとして、発生生態の解明を行う。特に、二つの異なる genotype に分けて、生態的な違いがあるかどうか注目する。

(2)【形態学的、分類学的検討】

有性世代(子のう胞子世代)および無性世代(分生子世代)について genotype ごとに形態的特徴を詳細に観察し、形態的な違いの有無を検討する。形態的な違いを検出できたら、分子データと合わせて *E. gracilis* 種複合体の分類の再提案を行う。なお、アラカシだけでなく、シラカシ、ウラジロガシ、アカガシ、ツクバネガシに寄生する *E. gracilis* についても同様に分子系統および形態解析を行い、常緑ガシに寄生する *E. gracilis* 全体の種分類を整理する。

(3)【種分化機構の解明】

1) 空間的隔離の有無の検討 日本各地から常緑カシに寄生する *E. gracilis* 標本を採集し、genotype を決定する。これにより、両 genotype の地理的分布およびカシ種ごとの genotype の分布を明らかにし、隔離の有無および種分化機構を明らかにしようとする。

2) 時間的隔離の有無の検討 三重大学キャンパス内および名古屋市東山植物園には両 genotype が混在することが、これまでの予備調査で明らかになっている。そこで、この2カ所を定点調査地点とし、同じ常緑カシ個体から定期的に標本を採集し、両 genotype の時間的隔離の有無を検討する。さらに、同じカシ個体および単一葉上において二つの genotype が混在するかどうか検討する。

3. 研究の方法

1) 生物地理学的解析

1.1. 標本の収集

1.1.1. 自分たちで採集する 日本を南から、九州、四国、中国、近畿、中部、関東の6地域に分け、各地域から *Erysiphe gracilis* 標本を採集する。目標数は平成29年度を合わせた2年間で500標本とする。

1.1.2. 収蔵標本の借り受け 丹田コレクションおよび野村コレクションの中から *E. gracilis* 標本を借り受ける。

1.2. 標本の解析

1.2.1. シークエンス解析 上記で収集した標本の中から代表的なものを選択し、DNA シークエンス解析を行う。シークエンス領域は 28S rDNA, ITS および IGS の 3 領域。この解析により、*E. gracilis* が 2 つの genotype に別れることを確認するとともに、それ以外の genotype が存在するかどうかを検討する。

1.2.2. RFLP 解析 シークエンス結果に基づいて PCR-RFLP 解析によって genotype を判別する。

1.3. 結果の解析

上記の解析結果に基づいて、以下の点を明らかにする。両 genotype 間で地理的分布に違いがあるかどうか。宿主（アラカシ、シラカシ、ウラジロガシなど）間で genotype が異なるかどうか。これらの結果から、*E. gracilis* 種複合体の種分化メカニズムを生物地理学的観点から考察する。

2) 発生生態の解析および時間的隔離の検討

2.1. 調査場所 三重県津市三重大学キャンパス内、名古屋市東山植物園

上記 2 地点で調査樹を数本定め、定期的に調査を行う。

2.2. 調査方法

2.2.1. 調査期日 2 週間ごと（ただし初発期は毎週）

2.2.2. 調査項目

2.2.2.1. 生活史の調査 3 月以降定期的に調査樹を観察し、病徴初発期、分生子形成時期、分生子形成終期、コロニーサイズの変化、閉子のう殻形成始め、子のう孢子成熟期等の項目を調査する（2 年間継続）

2.2.2.2. 調査樹における genotype の調査 発生したコロニーから定期的に DNA を抽出し、genotype の同定および時間的な genotype の頻度の変遷を調べる。

2.2.2.3. 同一葉における genotype の混在の有無および病徴の違いの有無 一つの葉に生じたコロニーからそれぞれ DNA を抽出し、genotype を決定する。同一葉に二つの genotype が混在しているかどうかを調べる。さらに genotype 間で、コロニーの形状に違いがあるかどうかを調べる。

3) 形態および分類学的検討

3.1. 調査場所 三重大学生物資源学部研究室内

3.2. 調査方法および項目

3.2.1. 調査方法 genotype が明らかになっている標本を選び、顕微鏡を用いて genotype 間の形態的違いの有無を調査する。

3.2.2. 調査項目

3.2.2.1. 有性世代 閉子のう殻の大きさ、隔壁細胞の形態、付属糸の数と形態、子のうの数と形態、子のう孢子の数と形態

3.2.2.2. 無性世代 分生子形成様式、分生子柄のサイズ、脚胞細胞のサイズと形態、菌糸付着器の形態、分生子のサイズと形態、発芽管の形態

3.3. 結果の整理 形態の違いが見られた場合は、それぞれの genotype ごとに種分類の整理を行い、必要に応じて新種として記載する。

4. 研究成果

1) 西日本各地から常緑ナラ類上の *Erysiphe gracilis* var. *gracilis* を 402 標本採集した。これらは系統樹上で強く支持される 4 つの明瞭な genotype に分割された。これらは別の分類学的検討により、*E. hiratae* (genotype I), *E. uncinuloides* (genotype II), *E. gracilis* s. str. (genotype III), and *E. pseudogracilis* (genotype IV) として整理された。これら 4 つの genotype は明瞭な地理的遺伝構造を示さなかった。シラカシには genotype II のみが、ウラジロガシには genotype IV のみが感染したが、アラカシには 4 つの genotype 全てが感染した。これらの結果は genotype の分化に宿種植物が強く関与したことを示している。2015 年 5 月から 2016 年 1 月にかけて三重大学の 4 箇所から *E. gracilis* 種複合体のコロニーを持つアラカシ 312 サンプルを採集した。これらのサンプルには採集時期による genotype 頻度に傾向は認められなかった。人為的攪乱を受けたカシ類の葉では 1 枚の葉上にしばしば複数の genotype が混在する傾向にあった。カシ類のうどんこ病菌である *E. gracilis* s. lat. と *Cystotheca wrightii* は 1 年のうち春先の 1 ヶ月間のみ分生子を形成し、それ以外の期間は分生子形成は認められなかった。これは春から秋まで約半年間分生子を形成し続けるたのうどんこ病菌とは全く異なる生活史であり、これは宿主であるカシ類への適応進化の結果であると考えられた。

2) *Erysiphe gracilis* は日本、中国など東アジアに分布する常緑カシ類のうどんこ病菌である。前報において *Erysiphe gracilis* var. *gracilis* が 4 つの genotype に別れることを報告したが、今回、アカガシ、ツクバネガシに寄生する *E. gracilis* var. *longissima* を調査したところさらに二つの genotype に分割されることがわかった。これらの結果および形態的観察の結果をあわせ、*E. gracilis* を 6 つの種に分割することを提案した。これには、3 新種 (*E. uncinuloides*, *E.*

pseudogracilis, *E. longiappendiculata*) 1 新名 (*E. longifilamentosa*)と 2 既知種(*E. gracilis* s. str., *E. hiratae*)が含まれた。

3) *Erysiphe gracilis* または *Cystotheca wrightii* として標本庫に寄託された標本を調査したところこの 2 種とは異なる DNA シークエンスを持つ標本が複数見つかった。BLAST 検索および形態的調査により、この菌は *E. quercicola* と同定された。これは常緑カシ類における *E. quercicola* の初めての記録である。これまでの研究により *E. quercicola* が多犯性であることが明らかになっている。落葉ナラ類に感染するうどんこ病菌の中でなぜ *E. quercicola* のみが常緑カシ類に宿主を拡大できたのかについて今後の研究が必要である。

4) 常緑カシ類には *Cystotheca wrightii* (Cw) と *Erysiphe gracilis* (Eg) の 2 種うどんこ病菌が発生する。両種共分生子形成期間は春先の約 1 ヶ月間のみで、残りの 11 ヶ月はほぼ休眠状態で過ごす。これはうどんこ病菌の常緑カシ類への感染時期が若葉期に限られるため、宿主に適応して進化した生活サイクルと考えられる。研究代表者らは 2017 年の本大会で常緑カシ類に *E. quercicola* (Eq) の新発生を報告した。本菌は庭や生垣等の人間活動が加わるカシ類で発生し、自然放置樹では発生しない。3 種うどんこ病菌が同所的に発生する津市内のアラカシ生垣で定点調査を行ったところ、春季には Cw と Eg が優占して発生したが、剪定によって生じた夏季の新葉では Eq のみが優占的に感染し、本来のカシ類うどんこ病菌 Cw と Eg は不活性で感染しなかった。剪定等の人間活動によって生じた新たな未利用資源(夏季の新葉)を、カシ類の生活サイクルに高度に適応した Cw と Eg は利用できなかったのに対し、Eq は優占的に利用することができ新たな病原菌になりえたと推察された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Siahaan SAS, Sakamoto H, Shinoda T, Takamatsu S, 2018. Morphophylogenetic study revealed that *Erysiphe gracilis* (powdery mildew of evergreen oaks, Erysiphales) is a species complex consisting of six different species. *Mycoscience* 59(2): 124–136; DOI:10.1016/j.myc.2017.08.011. 査読有
- 2) Siahaan SAS, Sakamoto H, Shinoda T, Takamatsu S, 2018. Geographic and temporal distributions of four genotypes found in *Erysiphe gracilis* var. *gracilis*, a powdery mildew of evergreen oaks (Erysiphales). *Mycoscience* 59(2): 110–118; DOI:10.1016/j.myc.2017.08.002. 査読有
- 3) Takamatsu S, Katsuyama S, Shinoda T, 2018. First record of *Erysiphe quercicola* (Ascomycota: Erysiphales) on species of *Quercus* subgenus *Cyclobalanopsis* (evergreen oaks, Fagaceae). *Mycoscience* 59(2): 105–109; DOI:10.1016/j.myc.2017.07.006. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 高松 進・Jamjan Meeboon・坂本人美・篠田俊哉 (2019) 人間活動が新たな病害を誘発する：常緑カシ類に新発生したうどんこ病菌を例にして。平成 31 年度日本植物病理学会大会
- 2) 高松 進・篠田俊哉・勝山さや (2017) コナラ属アカガシ亜属に新しく発生した *Erysiphe quercicola* (ウドンコカビ科)。平成 29 年度の本植物病理学会大会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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：

ローマ字氏名：

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。