

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05746

研究課題名(和文) サカキ輪紋葉枯病菌の分類学的な検討と病理学的特性の解明

研究課題名(英文) Taxonomical and pathological characteristics of phytopathogenic fungus causing leaf blight of *Cleyera japonica*

研究代表者

木原 淳一 (KIHARA, JUNICHI)

島根大学・学術研究院環境システム科学系・教授

研究者番号：40294368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：常緑小高木であるサカキに病気を引き起こすサカキ輪紋葉枯病菌の基礎的研究を行った。分子系統解析の結果、サカキ輪紋葉枯病菌は、キンカクキン科に分類された。罹病サカキ葉に形成された黒色菌核から、子のう盤を形成することをはじめて確認した。LAMP法を用いたサカキ輪紋葉枯病菌の特異的遺伝子検出法を確立した。マイクロサテライトマーカーを用いた解析から、無性生殖が主な伝搬要因であることが示唆された。紫外線照射が繁殖体形成を促進することが明らかとなった。サカキ輪紋葉枯病菌は宿主範囲が広いものの、サカキのみが、サカキ輪紋葉枯病菌の主要な宿主植物である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

常緑小高木であるサカキに病気を引き起こすサカキ輪紋葉枯病菌については、病害防除の基礎となる病原菌の生活環や病理学的特性が不明であった。本研究では、分子系統解析、および、子のう盤の発見により、サカキ輪紋葉枯病菌がキンカクキン科に属することを明らかにし、マイクロサテライトマーカーを用いた解析から、無性生殖が主な伝搬要因であることを示唆した。また、サカキ輪紋葉枯病菌は宿主範囲が広いものの、サカキのみがサカキ輪紋葉枯病菌の主要な宿主植物であることを示唆した。以上の研究成果は、サカキ輪紋葉枯病を防除する上で学術的意義があり、今後の防除対策に活かされることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Basic research was performed regarding phytopathogenic fungus causing leaf blight of *Cleyera japonica*. This phytopathogenic fungus was suggested to belong to Sclerotiniaceae based on molecular phylogenetic analysis. Apothecia (sexual reproduction) of this fungus were firstly discovered in the nature. Specific detection methods of this fungus were established using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). It was suggested that asexual reproduction via propagules (asexual reproduction) in this fungus could be major propagation style in the nature. Propagules formation of this fungus was promoted by near-UV irradiation on the leaf lesion. It was suggested that *C. japonica* could be major host plant of this fungus, although this fungus has broad host range.

研究分野：植物病理学、森林保護学

キーワード：サカキ 輪紋葉枯病 繁殖体 分類 植物病原糸状菌 子のう盤 病害防除 病原性

1. 研究開始当初の背景

常緑小高木であるサカキ(榊)は、古来より、その枝葉を神棚や祭壇に供えるなど神事に用いられている植物であり、葉物としてのニーズが高いことから、神社の境内をはじめ、最近では、中山間地域でのサカキ栽培が行われている。サカキ栽培において、現在、最も問題となっている病害としてサカキ輪紋葉枯病がある。サカキ輪紋葉枯病は、サカキの葉に円形で黄褐色～褐色の病斑を形成する病害であり、著しい早期落葉を引き起こす。その病斑上には伝染源である大型の繁殖体が多数形成され、この繁殖体が風や自然落下により健全葉に付着して病気が伝搬するのが大きな特徴となっている。一旦、サカキ輪紋葉枯病が発生すると、被害が拡大し、経済的損失も大きいことから、サカキ輪紋葉枯病への防除対策が望まれている。これまでに、薬剤防除をはじめとした研究も行われてきているが、サカキ輪紋葉枯病を防除する上で、解決しなければならない以下の3つの課題があった。

(1) サカキ輪紋葉枯病菌の分類学的な位置付け

サカキ輪紋葉枯病菌は、種名がなく、分類学的に種(Species)として認知されていない。その大きな理由のひとつとして、菌類としての形態的な特徴が乏しいことがある。菌類の分類の多くは、無性または有性の胞子の形態的特徴に基づいて行われているが、サカキ輪紋葉枯病菌は、胞子を形成しないことから、既知の種との比較に基づいた分類ができなかった。また、遺伝子配列を用いた分子系統解析も十分には行われておらず、種名がないことがサカキ輪紋葉枯病研究の大きな妨げとなっていた。

(2) サカキ輪紋葉枯病菌の生活環

サカキ輪紋葉枯病の発生は春～秋に多く認められるが、冬ではまったく認められない。一方で、落葉した病斑葉には、黒い菌核が認められることから、落ち葉の中で、菌核の状態越冬することが考えられる。しかしながら、菌核から、どのように地上部のサカキ葉に伝染するのかが明らかになっていない。また、伝搬体である繁殖体は自然界で無性生殖により形成されるが、有性生殖を行なっているかについても明らかになっておらず、サカキ輪紋葉枯病菌の生活環を明らかにする必要があった。

(3) サカキ輪紋葉枯病菌の病理学的特性

感染に重要なサカキ輪紋葉枯病菌の繁殖体の形成は、太陽光に含まれる紫外線が関与している可能性が指摘されているが、繁殖体形成の詳しいメカニズムについては明らかになっていない。また、サカキ輪紋葉枯病は、他の植物病原糸状菌病と比較して病斑形成が著しく早くて激しいこと、また、サカキ輪紋葉枯病菌は、サカキ以外の様々な植物にも病気を引き起こすことが知られているが、病原性や宿主範囲をはじめとした輪紋葉枯病菌の病理学的特性に関する研究は、ほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、サカキ輪紋葉枯病の実用的かつ効率的な防除のための足がかりを築くため、以下の基礎的研究を行うことを目的とした。

(1) サカキ輪紋葉枯病菌の分類学的な位置付け

サカキ輪紋葉枯病菌の分子系統解析

サカキ及び異なる植物から分離した多数の輪紋葉枯病菌を用いて、複数の遺伝子のシーケンスを行なう。シーケンスデータから分子系統樹を作成し、既知種との分子系統の関係を明らかにする。

サカキ輪紋葉枯病菌の形態的特徴

アナモルフ(繁殖体)及びテレオモルフ(子のう胞子・子のう・子のう盤)における形態的特徴を、光学顕微鏡と実体顕微鏡を用いて明らかにする。

(2) サカキ輪紋葉枯病菌の生活環

子のう盤の探索・形成

サカキ輪紋葉枯病菌が属すると考えられるキンカクキン科では、罹病植物の菌核上にテレオモルフである子のう盤が形成されることが知られている。そこで、現地での調査による子のう盤の探索、及び、罹病葉からの人工的な子のう盤形成を試みる。

サカキ輪紋葉枯病菌の遺伝子を用いた特異的検出

サカキ輪紋葉枯病菌のDNAのみを特異的に検出するプライマーを作成し、サカキの葉、枝、落ち葉などの様々なサンプルでの特異的検出法を確立する。

マイクロサテライトマーカーによるジェネット分析

サカキ輪紋葉枯病菌の個体群内・個体群間におけるジェネット分析を行なうために、SSR(simple sequence repeat; 単純反復配列)を指標とした個体識別を可能にするマイクロサテライトマーカーを作成する。各菌株のマイクロサテライト多型により、個体群内・個体群間におけるジェネット分布をマップ化し、伝搬様式について考察する。

(3) サカキ輪紋葉枯病菌の病理学的特性

繁殖体形成の条件解析

サカキ輪紋葉枯病菌を卓上型人工気象器で培養し、各種培養条件における繁殖体形成の有無を調査する。

病原性

モッコク科、ツバキ科、ミズキ科植物などへの接種実験を行ない、サカキ輪紋葉枯病菌の宿主範囲から、その病理学的特性を明らかにする。

3 . 研究の方法

(1) サカキ輪紋葉枯病菌の分類学的な位置付け

サカキ輪紋葉枯病菌の分子系統解析

サカキ及び異なる植物から分離した多数の輪紋葉枯病菌を用いて、複数の遺伝子 (rDNA 遺伝子、G3PDH、EF1 、など) のシークエンスを行なう。シークエンスデータから系統樹作成プログラムを用いて分子系統樹を作成した。

サカキ輪紋葉枯病菌の形態的特徴

アナモルフ (繁殖体) 及びテレオモルフ (子のう胞子・子のう・子のう盤) における形態的特徴を光学顕微鏡、および、実体顕微鏡を用いて観察した。

(2) サカキ輪紋葉枯病菌の生活環

子のう盤の探索・形成

現地での調査によって、堆積している落葉落ち葉から、輪紋葉枯病菌の子のう盤の探索を行った。また、罹病葉からの人工的な子のう盤の形成を試みた。

サカキ輪紋葉枯病菌の遺伝子を用いた特異的検出

サカキ輪紋葉枯病菌の DNA のみを特異的に検出するプライマーを作成し、サカキの葉、枝、落ち葉などの様々なサンプルを用いた LAMP 法による特異的検出を行なった。

マイクロサテライトマーカーによるジェネット分析

サカキ輪紋葉枯病菌の個体群内・個体群間におけるジェネット分析を行なうために、SSR (simple sequence repeat ; 単純反復配列) を指標とした個体識別を可能にするマイクロサテライトマーカーを作成した。三成神社から分離した菌株を用いて、マイクロサテライト多型を調査した。

(3) サカキ輪紋葉枯病菌の病理学的特性

繁殖体形成の条件解析

サカキ輪紋葉枯病菌を卓上型人工気象器で培養し、各種培養条件における繁殖体形成の有無を調査した。

病原性

モッコク科、ツバキ科、ミズキ科植物などへの接種実験を行ない、病斑形成、および、繁殖体形成の有無を調査した。

4 . 研究成果

(1) サカキ輪紋葉枯病菌の分類学的な位置付け

サカキ輪紋葉枯病菌の分子系統解析

rDNA、G3PDH、TEF、Tubulin 遺伝子を用いた分子系統解析を行なった結果、サカキ輪紋葉枯病菌は、キンカクキン科に分類され、既知の近縁な糸状菌とは異なる系統群であったことから、新種である可能性が示唆された。

サカキ輪紋葉枯病菌の形態的特徴

罹病葉における繁殖体の経時的な形成過程の観察を行なった結果、実体顕微鏡を用いて繁殖体形成過程の連続写真を撮影できた。また、繁殖体の断面を光学顕微鏡で観察することができた。

(2) サカキ輪紋葉枯病菌の生活環

子のう盤の探索・形成

4~5 月頃に、落葉した罹病サカキ葉に黒色の菌核が形成されており、その菌核から子のう盤を形成していることをはじめ確認した。

サカキ輪紋葉枯病菌の遺伝子を用いた特異的検出

サカキ輪紋葉枯病菌を高感度で特異的に検出するため、LAMP 法を用いた遺伝子検出法を確立した。WarmStart Colorimetric LAMP が陽性・陰性を視覚的に判別しやすいことを明らかにした。人工接種により形成された罹病葉や、落葉・堆積した罹病葉の菌核から、サカキ輪紋葉枯病菌を検出できることを明らかにした。

マイクロサテライトマーカーによるジェネット分析

マイクロサテライト（SSR）マーカー作成の検討を行なった。サカキ輪紋葉枯病菌を用いて、（AC）10 または（GA）10 をターゲットとした候補遺伝子領域を 16 遺伝子スクリーニングし、そのうち 3 遺伝子については、SSR マーカーを増幅できるプライマーを作成することができた。作成した 3 つのマイクロサテライト（SSR）マーカーを用いて、三成神社境内から分離したサカキ輪紋葉枯病菌の塩基配列の差異を調査した。その結果、三成神社境内のサカキ輪紋葉枯病菌の遺伝的差異はあまり見られなかったことから、無性生殖が主な伝搬要因であることが示唆された。一方、他地域で分離されたサカキ輪紋葉枯病菌では、多数の遺伝的差異が認められた。

（3）サカキ輪紋葉枯病菌の病理学的特性

繁殖体形成の条件解析

病害伝搬に重要な繁殖体の形成に及ぼす光の影響を室内実験により調査した結果、紫外線照射によって繁殖体が形成されることが明らかとなった。また、サカキの切り葉に繁殖体を接種し、実験室内環境において、病斑や繁殖体を形成させる方法を確立した。

病原性

サカキ輪紋葉枯病菌の宿主範囲を明らかにするため、サカキ病斑上に形成された繁殖体を用いて 38 科 59 属 68 種の植物の切葉に有傷・無傷接種を行い、各植物に対する病原性及び繁殖体と菌核形成の有無を調査した。その結果、少なくとも 28 科 42 属 47 種の植物葉上で病斑形成が認められ、26 科 37 属 43 種の植物葉上で繁殖体形成が確認された。一方、罹病葉における菌核形成はサカキのみで観察された。以上の結果から、サカキ輪紋葉枯病菌は宿主範囲が広く、サカキ以外の植物葉上でも病斑及び繁殖体を形成するものの、生活環から考えると、罹病葉に菌核を形成するサカキのみが、サカキ輪紋葉枯病菌の主要な宿主植物である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松下莉奈・陶山大志・上野 誠・木原淳一
2. 発表標題 サカキ葉に葉枯症状を引き起こす植物病原糸状菌のLAMP法による検出
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎根敏弘・上野誠・木原淳一
2. 発表標題 サカキ葉に葉枯症状を引き起こす植物病原糸状菌の宿主範囲
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	陶山 大志 (Suyama Hiroshi) (20502892)	島根県中山間地域研究センター・森林保護育成科・専門研究員 (85203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------