

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06124

研究課題名(和文) 植物絶対寄生菌ウドンコカビの大規模系統解析に基づく木本・草本宿主への適応機構解明

研究課題名(英文) Molecular phylogenetic analysis of obligate plant parasites, Erysiphaceae, to elucidate their adaptation mechanisms to tree and herbaceous hosts

研究代表者

白水 貴 (Shirouzu, Takashi)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：10571789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本産ウドンコカビの多様性解明を目的とした野外調査を行った結果、クマノザクラから *Podosphaera prunigena* の発生を初めて確認した。ウドンコカビ目274種のLSU, 5.8S, SSU, MCM7領域の配列を用いた系統解析を行った結果、より信頼性の高い系統仮説を得ることができた。ウドンコカビにおける宿主タイプと付属系形態の進化的関係を明らかにすることを目的とし、*Cyctothecaceae* をモデルとした系統比較法による解析を行った。その結果、宿主タイプと付属系形態の同時的なシフトが複数の祖先ノードで生じていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウドンコカビ目は17属約900種からなる植物絶対寄生菌で、有用樹木や農作物を含む被子植物1万種以上に“うどんこ病”を引き起こす重要病原菌である。うどんこ病の正確かつ迅速な病害診断と防除を達成するうえで、系統関係を反映した分類体系の整備および宿主植物への適応機構の解明が必要である。しかし、ウドンコカビ目の高次の系統関係が不明なため分類体系の一部が未整理であり、多様な木本・草本宿主への適応機構についても未検証である。本研究では、日本産ウドンコカビの多様性調査による分類学的知見の蓄積、大規模系統解析による信頼性の高い系統仮説の提示、系統比較法による宿主タイプと付属系形態の進化的関係の推定を行った。

研究成果の概要(英文)：As a result of a field survey aimed at elucidating the species diversity of Japanese Erysiphaceae, the occurrence of *Podosphaera prunigena* from *Cerasus kumanoensis* was confirmed for the first time. A phylogenetic analysis using sequences of the LSU, 5.8S, SSU, and MCM7 regions of 274 Erysiphaceae species was conducted to generate a more reliable phylogenetic hypothesis. To clarify the evolutionary relationship between host type and appendage morphology in Erysiphaceae, we performed a phylogenetic comparative methods using *Cyctothecaceae* as a model fungal group. The results suggest that simultaneous shifts in host type and appendage morphology occurred in multiple ancestral nodes.

研究分野：菌類生態学

キーワード：ウドンコカビ 系統種間比較法 系統推定 越冬戦略 形態 宿主 分類 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウドンコカビ目 (Erysiphales) は植物の絶対寄生菌 (生きた植物にのみ感染する菌) で、有用樹木や農作物を含む被子植物 1 万種以上にうどんこ病を引き起こす重要病原菌である。ウドンコカビの正確かつ迅速な病害診断と防除法策定のためには、系統関係を反映した分類体系の整備と多様な宿主植物への適応機構の解明が不可欠である。しかし、ウドンコカビ目は高次、特に属間の系統関係が不明瞭なため、正確な同定や病害診断に欠かせない分類体系の整備ができていない。また、木本・草本からなる多様な宿主への適応機構についても検証されていない。この背景を踏まえ、本研究では 2 つの課題を設定した。

課題 : ウドンコカビ目の系統解析に用いられてきた種数や遺伝子領域が限られているため、高次の系統関係が不明瞭

ウドンコカビ目の系統関係と分類体系には不明瞭な部分が多く、菌の形態や DNA 情報に基づく正確な病害診断は依然難易度が高い。これまでウドンコカビ目全体の系統解析に用いられた配列データはウドンコカビ 31 種の核リボソーム遺伝子 (nrDNA) にとどまっている (Mori et al. 2000)。予備的解析として、データベース (NCBI) に登録されている 16 属 118 種の nrDNA 配列を用いた解析を行った結果、高次の系統関係が不明瞭であり、単系統群と考えられていた Phyllactiniae が二つに分かれるなど、従来の系統学的理解や分類体系とは異なる知見や課題が見出された。ウドンコカビ目では、他の真菌類で主流となりつつあるタンパク質コード領域を加えた複数遺伝子領域に基づく系統解析は検討されておらず、新たなサンプルや配列データを加えることでより信頼性の高い系統仮説が得られると考えた。

課題 : ウドンコカビの形態形質と宿主植物に進化的相関があることが示唆されているが、データに基づく客観的な検証はなされていない

先行研究により、ウドンコカビの形態形質と宿主植物に進化的相関があることが示唆されている (Takamatsu 2013 など)。例えば、裂子嚢殻 (有性生殖器官) に複雑な付属糸を持つ菌は木本植物を宿主とし、単純な付属糸を持つ菌は草本植物を宿主とする傾向が知られている。しかし、これらの形態形質と宿主植物の進化的関係について客観的な検証はなされていない。課題で得られた信頼性の高い系統仮説に基づき、菌と宿主の進化的相関解析を行うことで、植物絶対寄生菌の多様な木本・草本宿主への適応機構を検証できると考えた。

2. 研究の目的

以上の 2 つの課題を踏まえ、本研究では以下の 2 つを目的とした。

目的 : ウドンコカビ目の大規模系統解析に基づく分類体系の整理

新たなサンプルとタンパク質コード領域を加えた過去最大規模の系統解析に基づき、正確な種同定と病害診断の基盤となる分類体系の整備を目指す。この目的の達成により、形態情報に基づく病原菌の種同定や病害診断、DNA バーコーディングなどの分子同定、未知病害発生時における病原性予測の精度が大きく向上する。

目的 : ウドンコカビの形態形質と宿主植物の進化的相関解析による木本・草本宿主への適応機構の解明

これまであまり研究されてこなかった植物絶対寄生菌の形態形質と木本・草本宿主の進化的関係について、菌の詳細な形態観察および信頼性の高い系統仮説に基づく進化的相関解析により検証する。この目的の達成により、植物絶対寄生菌が木本・草本という生活環の異なる宿主にどのように適応してきたのか、菌の形態形質の進化から新たな説明を試みる。

3. 研究の方法

ウドンコカビ目を対象に、信頼性の高い系統解析に基づく分類体系の整理、絶対寄生菌の形態形質と宿主植物の進化的相関解析による木本・草本宿主への適応機構の解明を目指す。研究スケジュールは、(1) 標本と DNA サンプルの収集、(2) nrDNA とタンパク質コード領域の配列決定、(3) 複数遺伝子領域に基づく分子系統解析、(4) 形態形質と宿主植物の進化的相関解析、の順で進める。

(1) 標本と DNA サンプルの収集

ウドンコカビ目には多くの未記載種が存在すると考えられており、既知種でもその大半で DNA サンプルや塩基配列データが得られていない。系統解析に用いるサンプル数と配列データを充実させる目的で、ウドンコカビ目の全属（17 属）100 種以上を目標に、国内外での野外調査や標本調査によりサンプルを収集する。同時に形態観察による種同定や未記載種の記載も適宜行っていく。

(2) nrDNA とタンパク質コード領域の塩基配列決定

従来の nrDNA の LSU, SSU, ITS 領域に加え、TEF-1 α , β -tubulin, RPB2 などタンパク質コード領域を対象に、塩基配列の決定と系統解析に有用な遺伝子領域の検討を行う。既存のプライマーによる PCR で増幅がみられない場合は新たなプライマーを設計して増幅を試みる。

(3) 複数遺伝子領域に基づく分子系統解析

先行研究での系統解析は主に最節約法で行われてきたが、解析方法による誤りやバイアスを避けるため、最尤法やベイズ法など他の方法による検討も行う。得られたデータを用いた予備的な解析結果を踏まえ、情報が不足している系統群を特定し、それに対して重点的なサンプリングを行って不足分のデータを補い、系統解析の信頼性向上を図る。得られた系統関係に基づき、正確な種同定や病害診断の基盤となる分類体系を整理する。

(4) 形態形質と宿主植物の進化的相関解析

複数遺伝子領域を用いた系統仮説に基づき、ウドンコカビの形態形質と宿主植物の進化的相関について BayesTraits (Pagel and Meade 2006) を用いて解析する。子嚢果や栄養吸収器官などの微小形態は凍結ミクロトームを用いて詳細に観察する。菌と宿主の進化的関係から、植物絶対寄生菌の木本・草本宿主への適応機構について考察する。

4. 研究成果

(1) 日本産ウドンコカビの多様性探索

ウドンコカビの多様性解明を目的とした野外調査の結果、近年新種記載された日本産サクラであるクマノザクラから Cystothecaceae の 1 種 *Podosphaera prunigena* の発生を確認した。本菌はクマノザクラ初の病害発生記録であった。*Podosphaera prunigena* のタイプ標本も合わせて詳細な形態観察を行った結果、本種の原記載文の一部においてタイプ標本の形態測定値との不一致がみられた。よって、タイプ標本の形態学的再検討を行い、新たに得られた観察結果に基づき原記載文を修正した。これらの成果については原著論文 (白水ら 2020) にて公表済みである。

(2) ウドンコカビ目の分子系統解析

ウドンコカビ目内の信頼性の高い系統仮説を得ることを目的とし、rDNA と *MCM7* 領域の塩基配列に基づく系統推定を行った。標本から抽出した DNA を用いた PCR の結果、新たに 67 サンプルの SSU rDNA と 50 サンプルの *MCM7* 領域の配列を得ることができた。これらの配列を既報の塩基配列データと組み合わせ、ウドンコカビ科 274 種の LSU, 5.8S, SSU, *MCM7* 領域の配列を用いた系統解析を行った。その結果、先行研究で報告されている系統樹とほぼ同じ樹形が得られたが、その一方、Golovinomycetaceae と Phyllactiniaceae の分岐順序が異なる、Phyllactiniaceae が単系統群にならない、などの新たな系統関係も示された。Phyllactiniaceae と Erysiphaceae は Golovinomycetaceae との分岐後に多様化していることが推定され、非連鎖分生子 + 内部寄生または非連鎖分生子 + 外部寄生の系統が、連鎖分生子 + 外部寄生の系統から派生する仮説が示された。Phyllactiniaceae は *Phyllactinia* + *Leveillula* のクレードと、*Pleochaeta* および *Queirozia* からなるクレードに分かれた。この結果は、Phyllactiniaceae の分類や、ウドンコカビ目における内部寄生の進化について新たな解釈が必要であることを示している。本研究では、過去最大規模のデータセットに基づく系統推定によりウドンコカビ目内の系統仮説を更新することができたが、依然、高次の系統関係は不明瞭であった。ウドンコカビ目のより頑健な系統仮説を得るためには、タンパク質コード領域を含むさらなる配列データを加えた系統推定が必要である。なお、これらの成果は原著論文 (Shirouzu et al. 2020) にて公表済みである。

(3) ウドンコカビの形質進化過程

ウドンコカビにおける宿主タイプと付属系形態の進化的関係を明らかにすることを目的とし、Cystothecaceae をモデルとした系統比較法 (PCM) による解析を行った。宿主タイプの祖先状態推定により、Cystothecaceae では落葉樹型が最も祖先的であり、草本型は 4 回、常緑樹型は 2 回、それぞれ二次的に進化したと推定された。付属系形態の祖先状態推定では、分岐型と渦巻型が最も祖先的であり、菌糸型と未発達型がそれぞれ 3 回と 1 回、二次的に進化したと推定された。また、宿主タイプと付属系形態の祖先状態推定から、これらの形質状態の同時的なシフトが複数の祖先ノードで生じていることが示唆された。この結果は、宿主タイプと付属系形態の間に何らかの機能的な関係があることを示唆している。この研究成果については原著論文 (Shirouzu et al. 2022) にて公表済みである。また、形質進化過程についてさらに検証するため、Erysiphaceae を対

象とした PCM による解析を進めている．これまで 186 OTU の配列および形質データを収集し，これらを用いた系統推定および PCM による解析を行っている．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Shirouzu T., Suzuki T.K., Matsuoka S., Takamatsu S. | 4. 巻 114 |
| 2. 論文標題 Evolutionary patterns of host type and chasmothecial appendage morphology in obligate plant parasites belonging to Cystothecaceae (powdery mildew, Erysiphaceae). | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Mycologia | 6. 最初と最後の頁 35-45 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00275514.2021.1983352 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 白水貴, 藤田彩花, 中村昌幸, 高松進 | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 クマノザクラ葉上に発生したPodosphaera prunigenaおよびその記載文の修正 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 日本菌学会会報 | 6. 最初と最後の頁 33-39 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18962/jjom.jjom.R01-12 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Shirouzu T., Takamatsu S., Hashimoto A., Meeboon J., Ohkuma M. | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 Phylogenetic overview of Erysiphaceae based on nrDNA and MCM7 sequences | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Mycoscience | 6. 最初と最後の頁 249-258 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.myc.2020.03.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔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 白水貴, 鈴木誉保, 松岡俊将, 高松進 |
| 2. 発表標題 植物絶対寄生菌Cystothecaceaeにおける宿主タイプと裂子囊殻付属糸形態の進化 |
| 3. 学会等名 第65回日本菌学会年次大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 白水貴・高松進・橋本陽・Jamjan Meeboon・大熊盛也 |
| 2. 発表標題 ウドンコカビ科のnrDNAおよびMCM7配列に基づく分子系統解析 |
| 3. 学会等名 日本菌学会第64回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究者の個人サイト <https://sites.google.com/site/ornithomyces/gyoseki/evolutionary-patterns-of-host-type-and-chasmothecial-appendage-morphology?authuser=0>

| 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 |
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |