

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780168

研究課題名(和文) 絶滅危惧種ハナノキに激発する斑点性病害の防除を目指す

研究課題名(英文) Study in the emerging disease of *Acer pycnanthum* in endangered species

研究代表者

本橋 慶一 (Motohashi, Keiichi)

東京農業大学・地域環境科学部・准教授

研究者番号：10527542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅危惧 類種に指定され、日本固有種でもあるハナノキにおける斑点性病害の被害状況を把握するために、自生地長野県を中心に5県9カ所にて調査を行った。その結果、すべての調査地で幼苗から成木のいずれのステージでも被害が観察された。罹病葉から分離された糸状菌は、*Phyllosticta minima*と同定され、国内初記録の菌種となった。本菌による病原性の確認を行ったところ、分生子懸濁液による接種試験で病徴が再現され、病原性が確認された。本菌によるハナノキの病害を褐色円斑病(英名：Leaf spot)とすることが提案された。本菌に特異的なプライマーが作製され、迅速で的確な診断が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Because leaf spot suspected of the participation of genus of *Phyllosticta* was observed in *Acer pycnanthum* that was a Japanese endemic species, investigations were performed with five prefectures of nine places including Nagano of natural habitat. As a result of investigation, serious damage was observed in all investigations place. The fungus observed on the emerging disease of *A. pycnanthum* was identified as *Phyllosticta minima*. It was newly recorded in Japan. Leaf spot symptoms appeared within about 1 month after inoculation by sprayed conidial suspensions of *P. minima*. A same fungus was re-isolated from lesions of the diseased tree. This is the first record of this fungal species causing a plant disease in Japan. Furthermore, the specific primer set that detected only fungus of *P. minima* was made, and there were some problems, but a quick and precise diagnosis was enabled.

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：ハナノキ *Phyllosticta minima* 同定 病害 診断

1. 研究開始当初の背景

カエデ科ハナノキはレッドリスト絶滅危惧類種に指定される日本固有種である。この貴重な遺伝資源であるハナノキの葉に植物病原菌 *Phyllosticta* 属の関与が疑われる斑点性病害が長野県、岐阜県、愛知県で激発している。ハナノキの生息環境の悪化による減少と共に本病害による被害が減少の原因の一つである可能性がある。しかしながら、本病害による病害報告や病害に関する研究は全く行われておらず、ハナノキ保全のために早急に本病害について研究する必要がある。海外においては、ハナノキは日本固有種であるため病害発生報告はない。カエデ科でハナノキの近縁種に *Phyllosticta* 属菌による斑点性病害が北米で報告されているが、国内で発生している病害との関係は不明である。

2. 研究の目的

本研究ではハナノキに激発している斑点性病害の被害状況を明らかにし、病害の関与が疑われる *Phyllosticta* 属菌の病原性の確認と種の同定を行う。加えて、病原菌の早期検出を確立し、迅速で的確な診断・防除の確立を行う。

3. 研究の方法

(1) ハナノキ斑点性病害の被害状況を把握するために2011年6月から2014年2月の間に現地調査を行った。調査地はハナノキの自生地である長野県飯田市および大町市の2市5カ所、植栽されている岐阜県岐阜市、愛知県千種区、三重県津市および神奈川県足柄下郡の2市1区1郡4カ所とした。現地調査にてハナノキの葉に斑点症状を示す罹病葉を採集し、植物罹病標本として保管した。

(2) 採集したハナノキの病斑部を実体顕微鏡下でメスを用いて2mm角に切り取り、ピスにはさみ、菌体の徒手切片を作成した。これらはスライドガラス上に滴下した滅菌水中に浮かべた。これを光学顕微鏡下で分生子が分生子殻内に存在しているのを確認し、後、改変スギ培地上に乗せ、22℃、暗黒条件の恒温器内で2、3週間培養した。培養した菌叢は光学顕微鏡下で観察し、単菌糸分離を行い、OMA培地(オートミール30g、滅菌水10、寒天20g)に移植、22℃、暗黒条件の恒温器内で培養し、分離菌株を確立した。得られた分離菌株は各種試験に用いられた。

(3) 菌種の同定を行うために、標本の病斑部を、肉眼および実体顕微鏡を用いて病徴の観察を行った。また、それぞれの標本の病斑部を、メスを用いて2mm画に切り、その一片をピスにはさみ、両刃剃刀を用いて徒手切片を作成した。徒手切片は、封入液としてスライドガラス上に滴下したシェアー液に浮かべ、カバーガラスを被せ永久プレパラートを作成した。これを、光学顕微鏡を用いて検鏡

し、分生子殻の色、形、大きさ、分生子形成細胞の大きさ、分生子の色、隔壁数、形、大きさ、分生子の付属糸の有無等の形態的特徴について観察を行った。

(4) 罹病葉の病斑部より分離された菌株を用いて病原性の確認を行った。接種試験には含菌寒天片と分生子懸濁液を用いる2法を試みた。含菌寒天による接種試験では、3週間OMA培地で培養した分離株を用いて健全なハナノキの葉に有傷および無傷接種を行った。葉への無傷接種は、培養した菌叢を1cm角に切り取り、葉に固定し接種した。葉への付傷による有傷接種は、火炎滅菌した柄つき針で針孔し、培養した菌叢をそれぞれ固定、接種した。それぞれ、接種した部分に滅菌水で湿した脱脂綿を付け、1日間ビニールテープで固定した。また、コントロールとして滅菌済みのOMA培地を1cm角に切り取り、同様に有傷および無傷接種を行った。分生子懸濁液による接種試験では、分離菌株をOMA培地、暗黒下で4週間培養した後、培養菌叢上に形成された分生子塊を回収し、 10^5 /mlに調整した分生子懸濁液とし、新葉へ無傷の噴霧接種を行った。対照区には滅菌水を無傷で噴霧した。接種後、両区は内面に滅菌水を噴霧したビニール袋で覆い過湿条件下で3日間管理し、その後、ビニール袋を取り去り、灌水管理を行った。

(5) ハナノキの斑点性症状を引き起こす植物病原菌の防除を行う上で、早期の診断が必要となる。そこで、本症状を引き起こす病原体を迅速で的確に検出するため、種特異的プライマーによる検出法の検討を行った。種特異的プライマーの作製前に予め、本病原体が分子系統学的に単系統群であるのかを調査した。全DNAの抽出には、オートミール寒天平板培地に1-2週間、25℃暗黒下で培養し、PrepMan® Ultraを用いて、全DNAの抽出を行った。28S rDNA、internal transcribed spacer (ITS)-28S rDNA、 α -tubulin、および actin の各遺伝子領域におけるPCRおよびシーケンス反応には、28S rDNA: NL1 / NL4、ITS-28S rDNA: ITS5 / NL4、actin: ACT-512F / ACT-783R、 α -tubulin: Bt2a / Bt2b の各プライマーを用いた。各遺伝子領域の増幅には、Takara Ex Taq™を用い、PCRおよびシーケンス反応は、サーマルサイクラーを使用した。得られたPCR産物は、GenElute™ PCR Clean-Up Kitをプロトコルに従い使用して精製を行った。PCR精製産物の蛍光標識は、ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kitを使用した。識されたPCR精製産物は、エタノール沈殿を行い、DNAシーケンスを行った。DNAシーケンスにはABI PRISM® 310 Genetic Analyzerを用いた。本研究によって得られた分離菌株および比較のために用いられた *Phyllosticta* 属菌の各種塩基配列は、GenBank に登録した。本研究で得られたシー

クエンスデータのアライメントには、Mafft version 6.861 を使用し、オプション E-INS-i を用いて、アライメントを行った。得られたシークエンスデータの 5' および 3' 末端を整形し、BioEdit version 7.09 を用いて手作業で最終的なアライメントを行った。系統解析には、節約法、最尤法およびベイズ法を用いて行った。あらかじめ、PAUP* version 4.0b10 (Swofford 2002) および Kakusan 4 (Tanabe 2007) を用いて rDNA ITS1、ITS2、5.8S、28S および actin、 α -tubulin の各領域に最も適した進化モデルを決定した。最適な進化モデルを選択するための情報量規準は、最大節約法および最尤法では、補正修正赤池情報量規準(AICc)を、ベイズ法ではベイズ情報量規準(BIC)を用い、領域・コドン位置ごとにそれぞれの情報量規準を算出してモデルが選択された。その結果、最尤法解析における 28S rDNA 領域での系統解析では、TIMef+Gamma モデルが選択され、ITS-28S rDNA、actin および α -tubulin の部分領域による結合配列を用いた分子系統解析では、ITS1 領域で TN93ef+Gamma モデル、ITS2 領域で K80+Gamma、5.8S 領域で JC69 + Gamma、28S 領域で TN93 + Gamma、actin 領域で HKY85 + Gamma、 α -tubulin 領域で TIM + Gamma モデルがそれぞれ選択された。一方、ベイズ法における 28S rDNA 領域での系統解析では、SYM+Gamma モデルが選択され、ITS-28S rDNA、actin および α -tubulin の部分領域による結合配列を用いた分子系統解析では、ITS1 領域で K80 + Gamma モデル、ITS2、5.8S および 28S 領域で K80+Gamma、actin 領域で HKY85 + Gamma、 α -tubulin 領域で SYM+Gamma モデルがそれぞれ選択された。なお、節約法解析を行うために用いた PAUP* version 4.0b10 では、複数領域の進化モデルを取り扱うことができないため、非区分として1つの進化モデルを算出し、同一ステップからなる複数の系統樹からその進化モデルに対して最も尤度の高い系統樹を選択するために用いられた。節約法解析を行うために PAUP* version 4.0b10 を用いた。最節約系統樹の探索には、発見的探索法を、初期系統樹の作成には、random addition オプションを用いて 1000 回反復を行った。アライメントデータのギャップは missing data として取り扱った。すべてのキャラクターは、unordered および equal weight とした。枝の位置交換は、tree-bisection-reconnection (TBR) に設定した。また、総体一致指数 (CI)、保持指数 (RI)、修正一致指数 (RC) についても求めた。最尤法には、Treefinder を用いて likelihood ratchet 法による系統推定を行った。ベイズ法には、MrBayes version 3.1.2 を用いて、28S rDNA 領域および ITS-28S rDNA、actin、 α -tubulin 領域の解析にはジェネレーションの発生回数をそれぞれ 10,000,000 ステップ行い解析した。系統樹は 500 ジェネレーションごとに保存し、収束する前までの

系統樹は破棄して、残りの系統樹にて合意樹を作成した。節約法および最尤法で得られた系統樹の各枝の支持率には、ブートストラップ (BS) 検定を 1000 回反復した。また、崩壊指数 (DI) は、Auto Decay version 5.04 および PAUP* を用いて行った。さらに、MrBayes により得られたベイズ事後確率値 (Bayesian PP) も示した。

得られたそれぞれのシークエンスデータから本病原菌に特異的な配列を rDNA ITS 領域から検索を行い、種特異的プライマーの設計を行い、PCR 反応にて特異的に検出できるのか検討を行った。

4. 研究成果

(1) これまでの現地調査から、自生地である長野県飯田市および大町市の5カ所、植栽地の岐阜県岐阜市、愛知県千種区、三重県津市および神奈川県足柄下郡の4カ所のいずれの地域においても斑点症状を呈する病害が、5月下旬から7月下旬にかけて、幼苗から成木のいずれのステージにおいても観察された。病斑は、はじめ小黒点で、後に褐色で円形、径約5mmに拡大し、健全部との境界は暗褐色から黒色で明瞭となった。幼苗においては枯死に至る場合も観察された(図1,2)。

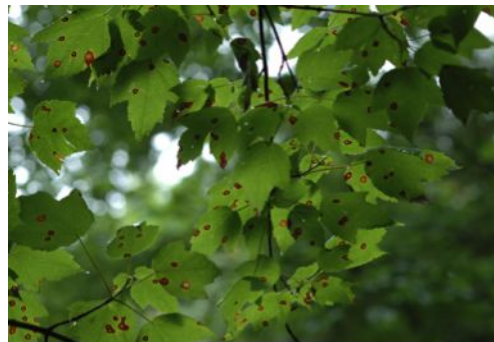


図1 長野県飯田市での被害状況



図2 幼苗期の斑点症状

(2) 採集された罹病葉から単菌糸分離により分離菌株を確立した(図3)。これまでに得られた分離菌株は、三重大学植物感染学研究室菌株番号(MUCC)を付与して保管、または東京農業大学電子顕微鏡室に保管すると共に、国内の菌株保存機関(独)農業生物資源研究所微生物ゲノムバンク(MAFF)、(独)製品評価技術基盤機構生物遺伝資源センター(NBRC)に寄託した。

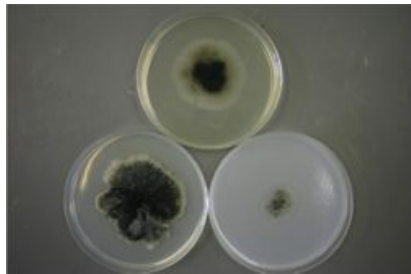


図3 罹病葉から分離された糸状菌

(3) ハナノキの罹病葉上に観察された菌類の同定を行う目的で、分生子殻の色、形、大きさ、分生子形成細胞の大きさ、分生子の色、隔壁数、形、大きさ、分生子の付属系の有無等の形態的特徴について観察を行った。

分生子殻は葉組織内に半埋生、単生、表面性、楕円形から球形で直径 93-119×104-115 μm、分生子隔壁は 1-3 層の変形した細胞からなり、褐色から暗褐色、孔口周辺部の細胞は黒色、外側から内側に向かって色が薄くなり、最内層は無色。分生子形成細胞はフラスコ型、円柱形または円錐形、大きさは 5.5-9.5 × 1.5-2.1 μm、最初の分生子を全出芽型で形成し、2 番目以降は内生出芽的に形成、わずかに貫性型で伸長、分生子は無色、単胞、楕円形、倒卵形または洋なし型で、基部は裁切状ないし丸みを帯び、大きさ 6-10×5-8 μm、分生子の周囲は無色の薄い粘質の膜に覆われ、油滴を含み、頂部に一本の付属系を有し、長さ 7-12 μm (図 4-7)。

以上の形態的特徴と宿主からこれらの標本上の菌類は、北米に隔離分布する近縁植物である *Acer rubrum* (アメリカハナノキ) の病原菌として知られる *Phyllosticta minima* (Berk. & M.A. Curtis) Underw. & Earle と同一であると同定した。本菌はこれまでに日本国内での記録はなく、日本初記録となった。



図4 斑点症状部の拡大図

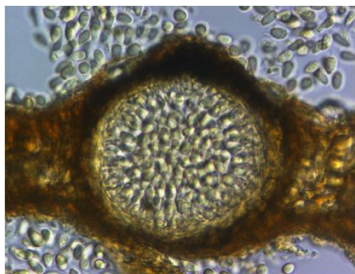


図5 分生子殻と分生子

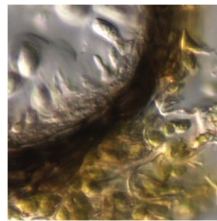


図6 分生子形成細胞

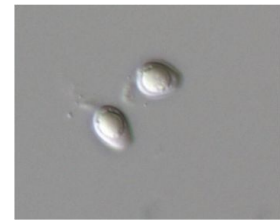


図7 分生子

(4) 病原性を確認するために得られた分離菌株を用いて、含菌寒天片および分生子懸濁液による接種試験を行った。その結果、含菌寒天片による接種試験では有傷区および無傷区ともに、病徴の再現はできなかった。一方、分生子懸濁液による噴霧接種試験では、接種 2-3 週間後に初期病徴として小黑点が認められ 4-5 週間後に源病徴を再現した (図 8,9)。再現された病徴からは分生子殻が形成され、再分離を行ったところ、接種した菌と同じ菌が分離され、病原性が確認された。本菌、*P. minima* (Berk. & M.A. Curtis) Underw. & Earle によるハナノキの病害は未報告であるため、本病害を和名として「褐色円斑病」、英名「Leaf spot」とすることを提案した。北米ではハナノキに近縁な種である、アメリカハナノキとギンヨウカエデ、また、アメリカ



図7 初期病徴

カヤマモミジ、セイヨウカジカエデに本菌による被害報告があるが、ハナノキでの報告はこれまでにない。



図8 再現された病徴

(5) はじめに、本病原菌の系統学的な位置を把握するために、rDNA ITS 領域、28S 領域、actin 領域および α -tubulin 領域を用いた分子系統解析を行った。異なる *Phyllosticta* 属菌を含む 46 taxa を用いて系統解析を行った結果、本病原菌 *P. minima* は最大節約法、最尤法およびベイズ法のいずれの系統樹上でも、単系統群となることが明らかとなった (図 9)。 *Phyllosticta minima* の単系統が明らかとなったことから、次に、本菌の rDNA ITS 領域のうち、他の種とは異なる特異的な配列を検索し、2 本の組合せからなる特異的プライマー設計し、PCR 反応による特異的なバンドとして検出可能かを調査した。4 菌株の *P. minima* を含む *Phyllosticta* 属菌 25 種 88 菌株を用いて PCR 反応を行った結果、本菌にの

み特異的な反応が観察され、種特異的プライマーの作製に成功した(図10)。本実験では分離菌株から抽出したDNAを用いたPCR反応であったが、より実用的な運用を行うためには、罹病葉または見かけ健全であるが既に感染している葉を含む試料から、本プライマーを用いた検出技術の構築が必要である。

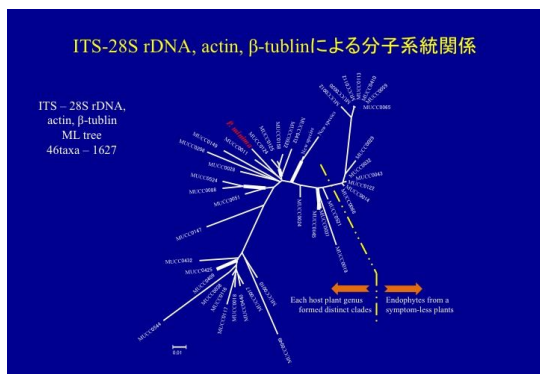


図9 分子系統解析による系統樹

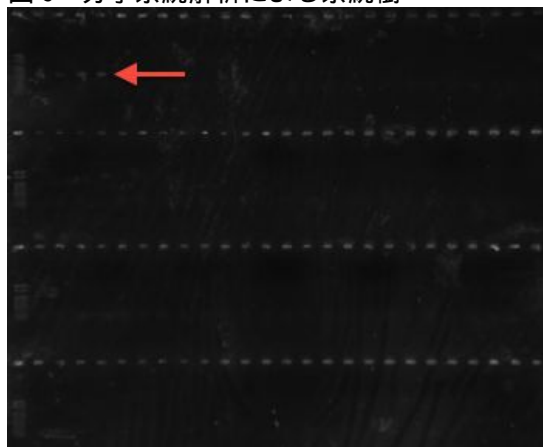


図10 種特異的プライマーによるバンド反応

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)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Saowanee Wikee, Lorenzo Lombard, Chiharu Nakashima, Keiichi Motohashi, Ekachai Chukeatirote, R. Cheewangkoon, Eric H.C. McKenzie, Kevin D. Hyde, Pedro W. Crous., (2013) A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales)., *Studies in Mycology*, 76:1-29. 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

*Phyllosticta minima*によるハナノキ褐色円斑病(新称), 本橋慶一, 早田祐介, 中島千晴, 河辺祐嗣, 第124回日本森林学会大会, 2013.3.25-2013.3.28. (岩手)

The emerging disease of Japanese endemic tree species, *Acer pycnanthum*., Keiichi Motohashi, Yuusuke Hayata, Natsumi Miyazawa, Chiharu Nakashima., FFTC-TUA Joint Symposium 2012, 2012.10.19- 2012.10.22. (Tokyo)

6. 研究組織

(1)研究代表者

本橋 慶一 (MOTOHASHI Keiichi)

東京農業大学・地域環境科学部・准教授

研究者番号: 10527542