

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440218

研究課題名(和文) 生物学的種を指標とした菌類の分類体系の構築

研究課題名(英文) Phylogenetic reconstruction of ascomycetes based on biological species concept

研究代表者

渡辺 京子 (WATANABE, Kyoko)

玉川大学・農学部・教授

研究者番号：70276682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：菌類の生物学的種概念による分類体系の確立を目的とし、広義Pestalotiopsis属に着目した。本菌群の有性生殖株は狭義Pestalotiopsis属の13株のみが報告されている。Pseudopestlotiopsis属の有性生殖株を世界で初めて発見し、これが狭義Pestalotiopsis属と酷似していることを見出した。有性株と無性株の合計11株のNGS解析からMAT1-2遺伝子を探索した。推定アミノ酸の配列長とHMG-boxの位置が菌株毎に異なり、系統解析の指標として不適であった。しかし配列の傾向、HMG-boxによる系統解析並びにNGSデータの比較から、3属は2属に整理されると推察された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to classify Pestalotiopsis into genera using its sexual morph and mating concept. Pestalotiopsis s. l. was separated into three genera in 2014 and assigned to the Pestalotiopsaceae family in 2015. For these 3 genera, 13 strains that produce sexual morph have been reported only in Pestalotiopsis s. st. In this study, we found two strains in Pestalotiopsis s. l. that produce sexual morph. Because the HMG-box of the MAT1-2 genes of this genera did not amplify using universal primers for ascomycetes, we analyzed NGS data of these sexual morph strains and three asexual strains. The MAT1-2 genes differed in the number of nucleotides and the position of the HMG-box in each strain. Therefore, full-length of MAT1-2 gene is not suitable for phylogenetic study among these genera. Based on HMG-box sequences and continued analysis of all the genomes, we infer that Pestalotiopsis s. l. may separate into two genera.

研究分野：植物病理学 菌学

キーワード：子囊菌 分類 形態種 交配型遺伝子

1. 研究開始当初の背景

新命名規約に従い、2012年12月31日に二重命名法 (ICBN 第 59 条) が廃止された。これにより「1属ではないかもしれない属」として注意深く扱われているアナモルフの属が、今後、あたかも「正式な属」として一斉に移動する。また、この廃止決定の大前提が「形態に関係なく遺伝子同定ができる」ことにある。命名規約改定後は菌類の形態種を「種」としたまま分子系統解析を行い、どの遺伝子で菌を同定するかに議論が進んでいる。つまり形態種を基準とした分類体系が、どの分子系統解析と一致するのかが議論されている。この方法で同定された菌の使用により、他の体系的な研究基盤を揺るがす重要問題となりかねない。

2. 研究の目的

本研究は、子囊菌門に属する *Pestalotiopsis* 属関連菌群、特に広義 *Pestalotiopsis* 属を用いて (1) MAT 遺伝子 (交配型遺伝子) を指標にした「生物学的種」により分類を見直し、(2) 形態種を基盤に据えた分類の問題を顕在化させ、分類体系を再構築することを目的とした。

3. 研究の方法

研究室保存菌株の有性生殖株 2 株に加えて、あらたに有性生殖株を採取して、MAT1-2 遺伝子を同定し、この情報に基づいた分類を試みる。また、本菌群の LSU や ITS 領域、BTU 領域を用いた系統解析と比較し、属を再構築する。

(1) 供試菌

国内分離株と本研究室保存菌株に加えてベトナム 103 株、ミャンマー 87 株、カナダ 4 菌株を分離菌として供試した。

(2) 形態観察

Furukawa, Kishi (2002) に従い、葉片方にて分生子を形成させ、形態を光学顕微鏡下で観察した。

(3) 従来の分類指標による系統解析

選抜株の LSU、ITS 領域と BTU 領域を既報のプライマー (O' Donnell 1993, White et al. 1990, Glass and Donaldson 1995) で増幅した。また、EF 領域は本研究にて設計したプライマーで増幅した。分子系統解析には MEGA5 を使用した。

(4) 次世代シーケンス解析

有性生殖株 2 株を含む広義 *Pestalotiopsis* 属菌 11 菌株の全ゲノム配列を得て、子囊菌の MAT 遺伝子と連鎖する SLA2、CIA30、APC5 遺伝子を指標に MAT 遺伝子を探索した。得られた結果はすべてが MAT1-2 遺伝子だったため、このアミノ酸配列を推定し、系統解析に用いた。

4. 研究成果

(1) *Synnemapestaloides rhododendri* の所属

Synnemapestaloides rhododendri の分生子の形態が *Pestalotiopsis* 関連菌群の基となった *Pestalotia* 属 (De Notaris 1839) の形態的特徴に酷似しているが、分生子形成器官が分生子束であることから *Pestalotiopsis* 関連菌群とは異なる不完全糸状菌類として報告されている (Handa et al. 2004)。

一方、本属は分子系統解析がないままに *Amphisphaeriaceae* に属することが 2011 年にリスト化された (Hyde et al. 2011)。本科には *Pestalotiopsis* 関連菌群が所属するが、分生子形成器官として分生子束を有するものはない。そこで本属の所属を明らかにするために、LSU、ITS+BTU+TEF の系統解析を行ったところ、本属は *Amphisphaeriaceae* に所属することが示唆された。

しかし、本科は 2015 年に Senanayake et al. が 8 科に分けたため、さらに現在の科を検討した。その結果、*Synnemapestaloides rhododendri* は、広義 *Pestalotiopsis* 属が所属する *Pestalotiopsidaceae* ではなく *Seimatospilium* 属とともに *Discosphaeriaceae* に所属することがわかった。(論文投稿中)

(2) 生物学的種概念による、広義 *Pestalotiopsis* 属の分類体系

2014 年に *Pestalotiopsis* 属の分類体系が変わり、本属は狭義 *Pestalotiopsis* 属、*Neopsetalotiopsis* 属、*Pseudopestalotiopsis* 属の 3 属に分けられた (Senanayake et al. 2015)。このときの指標は LSU と、ITS+TUB+TEF であった。しかし、実際は、LSU の系統樹では *Neopsetalotiopsis* 属と *Pseudopestalotiopsis* 属は側系統の関係にあり、独立したクレードではない。また、3 属の判別文は分生子の形態について書かれているが、3 属それぞれを構成する種の特徴は、いずれも 3 属の判別文にまたがっている。さらに、広義 *Pestalotiopsis* 属の有性世代は、*Pestalosphaeria* 属として 13 株が報告され、全てが狭義 *Pestalotiopsis* 属に所属するため、3 属間の形態的な違いは有性世代にある可能性が推察されていた (Maharachchikumbura et al. 2014)。すなわち、現段階では、3 属は分生子を指標とした形態種を維持して 1 属としてまとめるか、分子系統解析を指標として 3 属 (2 属?) を維持して遺伝子属として判別文を変える必要がある。

本研究では、有性生殖株を複数見出し、*Pseudopestalotiopsis* 属が *Pestalosphaeria* 属と同じであることを明らかにした。すなわち、狭義 *Pestalotiopsis* 属と *Pseudopestalotiopsis* 属は有性世代と無性世代の両形態が一致し、形態による違いがないことが示唆された (論文投稿中)。また、次世代シーケンスから得た 3 属 10 株と本属

に近縁な *Seiridium* 属の MAT1-2 遺伝子を探
索し、推定アミノ酸配列を比較し、HMG-box
を指標に分子系統解析を行った。その結果、
ITS+TUB+TEF の結果とほぼ一致した(図 1, 2:
ただし図 2 は ITS+TUB の分子系統樹結果)。

つまり、有性生殖株が見つからない
Neopestalotiopsis 属を除く 2 属は形態的な
違いはないが、HMG - box を指標にした生物学
的種概念に基づく分子系統解析においては、
2 属とすることが支持された。

Neopestalotiopsis 属については、全ゲノ
ムの比較解析において、LSU や ITS+TUB+
TEF 系統樹の結果と同様に *Pseudopesta-*
lotiopsis 属と近縁であり、両属を 1 属にま
とめられる可能性があると考えられる。しか
し、*Pseudopestalotiopsis* 属が本研究で新た
に見出した 2 種を加えても 5 種でのみ構成さ
れるため、さらに多くの菌株を集めて 3 属間
の関係を議論する必要がある。

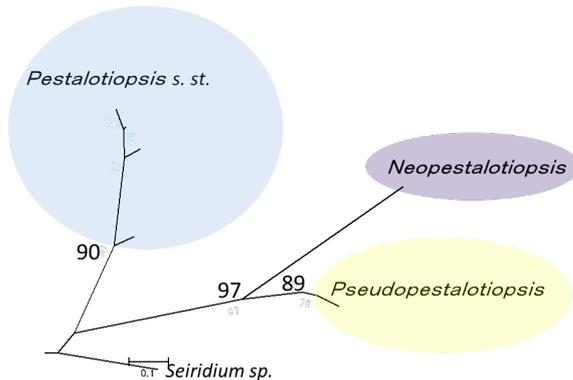


図 1. MAT1-2 遺伝子の HMG-box を指標とした
NJ 系統樹。枝上の数値はブートストラップ値
(1000 回繰り返し)

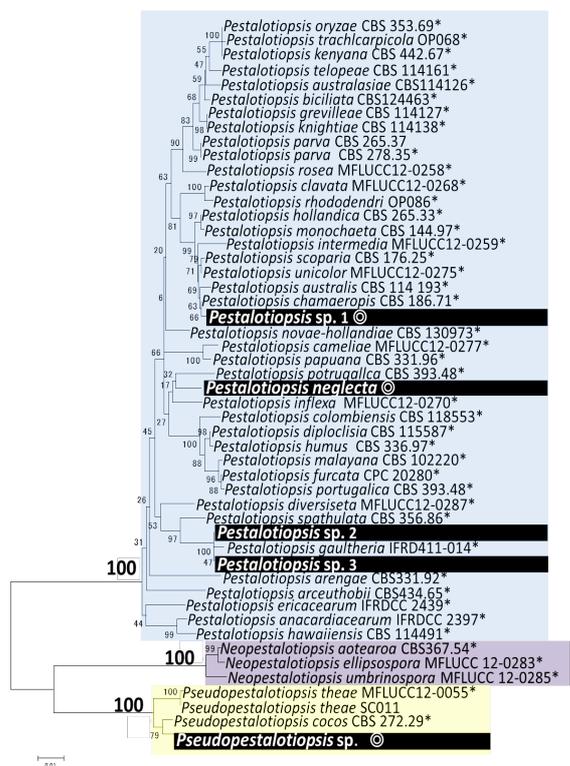


図 2. ITS + BTU 領域を指標とした NJ 系統樹。
枝上の数値はブートストラップ値(1000 回繰り返
し)。白抜きが本研究分離株、*はタイプ由来株、
は有性生殖株。

引用文献

- 1) De Notaris G, 1839. *Micromycetes italiei* Dec II. *Memorie della Reale Accademia delle scienze di Torino* 11 3: 80-81
- 2) Furukawa T, Kishi K, 2002. Production of perithecia of various ascosmycotina on water agar medium emended with leaf peace. *Journal of phytopathology* 50: 625-628
- 3) Glass NL, Donaldson GC, 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- 4) Handa T, Fujita T, Harada Y, 2004. *Synnemapestaloides rhododendri*, a new genus and new species of synnematos hyphomycete, causing synnemapestaloides twig blight disease of *Rhododendron brachycarpum* in Japan. *Mycoscience* 45: 137-142
- 5) Hyde KD, McKenzie EHC, KoKo TW, 2011. Towards incorporating anamorphic fungi in a natural classification - checklist and notes for 2010. *Mycosphere* 2: 1-88
- 6) Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J, Crous PW, 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology* 79: 121-186
- 7) O' Donnell K, 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds), *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB International, Wallingford, pp 225-233.
- 8) Senanayake IC, Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Bhat JD, Jones EBG, McKenzie EHC, Dai DQ, Daranagama DA, Dayarathne MC, Goonasekara ID, Konta S, Li WJ, Shang QJ, Stadler M, Wijayawardene NN, Xiao YP, Norphanphoun C, Li Q, Liu XZ, Bahkali AH, Kang JC, Wang Y, Wen TC, Wendt L, Xu JC, Camporesi E, 2015. Towards unraveling relationships in Xylariomycetidae (Sordariomycetes). *Fungal Diversity* 73: 73-144
- 9) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA

genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315-322

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)

[学会発表](計9件)

T. Hsiang, K. Watanabe, L. Lah and Y. Deng (2013) Genome sequencing of sordariomycetes plant pathogens to obtain primers for detecting mating type genes. ICPP, Beijing, China. (8月25日)

関口真央・金子繁・神田多・佐藤豊三・田中和明・渡辺京子 (2013) *Synnemapestaloides* 属菌の形態学および分子系統学的解析 日本菌学会第57回大会, 世田谷区, 東京. (

K. Watanabe, M Sekiguchi, S Kaneko, T Sato, Ki Tanaka, T Hsiang, M Kanda, S Nozawa. (2014) Phylogenetic position of the genus *Synnemapestaloides* producing synnemata in pestalotioid fungi. Proceeding of The 10th International Mycological Congress, Bangkok, Thailand. (8月3-8日)

野澤俊介・リー ティ ホアン イェン・安藤勝彦・ズオン バン ホップ・渡辺京子. (2015) *Pseudopestalotiopsis* 属菌の新種とエピタイプの提案. 日本菌学会第59回大会, 那覇市, 沖縄. 5月17日

S Nozawa, Nyunt Phey, K Ando and K. Watanabe. (2015) New species of genus *Pseudopestalotiopsis* in Myanmar. The second Myanmar-Japan symposium, Patheingyi, Myanmar. 2015年12月6日

K. Watanabe, S Nozawa (2015) Phylogenetic relationships within Amphisphaeriales base on ITS2 secondary structure. The second Myanmar-Japan symposium, Myanmar. 2015年12月5日

野澤俊介・勝又会理・渡辺京子 (2015) アセビおよびカノコユリにおける *Pestalotiopsis* 属菌による葉枯病の発生(新称). 平成27年植物病理学会大会 関東部会, 宇都宮市, 栃木. 9月10日

野澤俊介・渡辺京子. *Neopestalotiopsis* 属菌によるアセビ葉枯病の発生(病原追加). (2016) 平成28年度日本植物病理学会大会, 岡山市, 岡山. (9月10日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 京子 (WATANABE, Kyoko)

玉川大学・農学部・教授

研究者番号: 70276682