

# 果樹に寄生する *Phomopsis* 属菌の新たな分類

農林水産省果樹試験場 <sup>かね</sup>兼 <sup>まつ</sup>松 <sup>さと</sup>聡 <sup>こ</sup>子

## はじめに

微生物を含む多くの生物において系統を反映した分類体系を構築するために、DNAを指標とする様々な解析手法が試みられてきている。RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA) あるいは塩基配列そのものの比較などの手法がこの目的のために用いられることが多い。こうした事情は、糸状菌を含む植物病原微生物においても例外ではない。従来行われてきた、形態観察や接種試験あるいは交配試験などに比較して、DNAを用いて植物病原菌の分類・同定を行う背景には、時間や労力をあまり必要としないことに加えて、遺伝的系統関係を類推しやすい、といった利点があるためである。とはいえ、生物としての形態や生態を無視した分類体系には意味がないことは言うまでもない。

果樹に寄生する *Phomopsis* 属菌については、従来の手法によるその分類が混乱している現状があったため、接種試験・形態観察といった手法による結果とDNAを用いる系統解析の結果を比較したうえで、新たな分類体系を検討する必要があった。そして、形態などの「物差し」だけでは類別が困難な *Phomopsis* 属菌の分類を、DNAという「物差し」をさらに追加して体系づけることを試みたので、その結果を以下に紹介したい。

## I 果樹に寄生する *Phomopsis* 属菌とは

*Phomopsis* 属とは、糸状菌・子のう菌類・*Diaporthe* 属菌の不完全世代である。だ円形の $\alpha$ 胞子と鞭状の $\beta$ 胞子を有するのが特徴である(図-1)。*Phomopsis* 属菌は分離された宿主ごとに命名されてきたために非常に多くの種を含んでおり、そのうち、植物に病原性のある *Phomopsis* 属菌だけでも少なくとも60種の記載がある。本属菌の属徴は特異的であっても、種間では形態的特徴に乏しく、 $\alpha$ 胞子の大きさで分類すると、長さ4~12 $\mu\text{m}$ という狭い範囲の中にそのうちの97%の種が含まれてしまう(Uecker, 1988)。また、同種と考えられるも

のまでも分離された宿主ごとに命名が行われている。そのため、現在別種とされているものの中には、完全世代との菌学的関係(BRAYFORD, 1990)、宿主範囲などの病原性、さらにDNA解析結果(REHNER and UECKER, 1994)を考慮することでいくつかの種が統合された集合種になるものもあると考えられる。

*Phomopsis* 属菌による果樹病害は国内で20種類の報告がある(表-1)。その多くは枝幹の胴枯症状や果実の腐敗などを引き起こす。本属菌はまた、樹体内に生息するため根絶が難しく、多くの果樹園において慢性的な被害をもたらしている。これら病害の病原菌の中には、カンキツ黒点病菌とナシ胴枯病菌のように形態的には区別が付きにくいものや、モモホモプシス腐敗病菌のように種名が未定のままのものも含まれている。また、ナシ胴枯病菌(*P. fukushii*)とリンゴ胴枯病菌(*P. mali*)のように形態的特徴からは同種と推定されながらも異なる種名で扱われているものも存在する。このように分類上の混乱があるため、*Phomopsis* 属菌が関連する新たな果樹病害が発見されても、病原菌の同定が困難な状況が続いている。

## II 果樹に寄生する *Phomopsis* 属菌の 分生子形態、培養性状および病原性

モモホモプシス腐敗病菌、ナシ胴枯病菌、リンゴ胴枯病菌は形態的に区別がつかない小型の $\alpha$ 胞子を形成する。ところが、これら3樹種から分離された菌株は分離宿主にかかわらず、コロニーの色が白色のものと灰色の

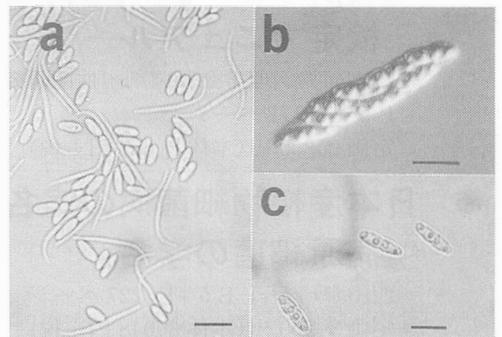


図-1 a:  $\alpha$ 胞子と $\beta$ 胞子(不完全世代), b: 子のうおよび子のう胞子(完全世代), c: 子のう胞子。バーは10 $\mu\text{m}$ を表す。

Phylogenetic systematics of *Phomopsis* isolates from fruit trees. By Satoko KANEMATSU

(キーワード: 果樹, *Phomopsis*, *Diaporthe*, rDNA ITS領域, 分類)

表-1 *Phomopsis* 属菌による果樹病害一覧(国内)

| 病名           | 不完全世代 ( <i>Phomopsis</i> )                | 完全世代 ( <i>Diaporthe</i> )                            |
|--------------|---|--|
| モモホモプシス腐敗病   | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |
| ナシ胴枯病        | <i>P. fukushii</i> ENDO et TANAKA         | <i>D. medusaea</i> NITSCHKE, <i>D. eres</i> NITSCHKE |
| リンゴ胴枯病       | <i>P. mali</i> ROBERTS                    |  |
|              | <i>P. tanakae</i> KOBAYASHI et SAKUMA     | <i>D. tanakae</i> KOBAYASHI et SAKUMA                |
| セイヨウナシ胴枯病    | <i>P. tanakae</i> KOBAYASHI et SAKUMA     | <i>D. tanakae</i> KOBAYASHI et SAKUMA                |
| カンキツ黒点病      | <i>P. citri</i> FAWCETT                   | <i>D. citri</i> (FAWCETT) WOLF                       |
| カンキツ小黒点病     |   | <i>D. medusaea</i> NITSCHKE                          |
| ブドウ芽枯病       |   | <i>D. medusaea</i> NITSCHKE                          |
| ブドウつる割病      | <i>P. viticola</i> (SACCARDO) SACCARDO    |  |
| セイヨウナシ尻腐病    | <i>P. fukushii</i> ENDO et TANAKA         |  |
| ナシ汚果病        | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |
| ブドウ枝膨病       | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |
| ブドウホモプシス腐敗病  | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |
| カキ胴枯病        | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |
| カキホモプシス立枯病   | <i>P. rojana</i> LINNAEUS                 |  |
| クルミホモプシス枝枯病  | <i>P. albobestita</i> FAIRMAN             |  |
| キウイフルーツ果実軟腐病 | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |
| キウイフルーツ角斑病   | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |
| イチジク胴枯病      | <i>P. cinerescens</i> (SACCARDO) TRAVERSO |  |
| パパイヤ軸腐病      | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |
| カンキツ樹脂病      | <i>Phomopsis</i> sp.                      |  |

もの (W 型株と G 型株と命名) の 2 種類に大きく類別された。PDA 培地上 25°C で培養すると、W 型株は  $\alpha$  胞子、 $\beta$  胞子とも形成するのに対し、G 型株は  $\alpha$  胞子のみしか形成しない。圃場の立木の枝に対する接種試験では、分離宿主に関係なく、G 型株は W 型株よりもモモ、ニホンナシ、リンゴに強い病原性を示した (表-2) (KANEMATSU et al., 1999 a)。これら 2 系統の *Phomopsis* 属菌を他の *Phomopsis* 属菌と比較すると、西洋ナシ胴枯病菌、ブドウつる割病菌、ブドウ枝膨病菌などは  $\alpha$  胞子の大きさが W 型株や G 型株のそれらより有意に大きかった。また、カンキツ黒点病菌の分生子はナシ胴枯病菌など小型の胞子形成株との見分けが難しいとされていたが、詳細に計測するとカンキツ黒点病菌が有意に大きく (大和, 1976; KANEMATSU et al., 1999 a)、カンキツに黒点症状を引き起こすのは、カンキツ黒点病菌のみであった (KANEMATSU et al., 1999 a)。

新潟県において 1991 年ごろから大発生したモモ枝折病菌は、モモ栽培に甚大な被害をもたらした (横山ら, 1996)。本病は過去に神奈川県 (原田, 1952) と静岡県 (芹澤, 1984) において多発した記録が残されているが、その病原菌はホモプシス属菌の  $\alpha$  胞子に形態が類似した分生子をもつ *Fusicoccum* 属菌による病害とされていた (富経ら, 1952)。ヨーロッパにおいては、本病と類似した症状をモモやアーモンドに引き起こす病害として *F. amygdali* が知られていたが、近年本菌から  $\beta$  胞子が

表-2 W 型株, G 型株, モモ枝折病菌の比較

| 分離株の種類 | コロニー形態      | モモ, ニホンナシ, リンゴ枝への病原性 | 35°C での生育 | モモ枝折症状 |
|--------|-------------|----------------------|-----------|--------|
| W 型株   | 主に白色        | 弱                    | ×         | ×      |
| G 型株   | 主に灰色        | 強                    | ○         | ×      |
| モモ枝折病菌 | 白色, バラの花びら状 | 強                    | ○         | ○      |

見いだされたことから、*Phomopsis amygdali* と改名された (Tuset and Portilla, 1989)。本邦産モモ枝折病菌は、病徴が *P. amygdali* に類似していること、また、滅菌枝上、30°C で培養すると  $\beta$  胞子が形成されるため (KANEMATSU et al., 1999 b)、*P. amygdali* と同種ではないかと考えている。*P. amygdali* の  $\alpha$  胞子の形態は、W 型株および G 型株に類似しているが、そのコロニー形態は白色で特徴的なバラの花びら状の隆起があった。PDA 培地上で培養しても、 $\beta$  胞子の形成は認められず、培地上での  $\beta$  胞子形成は難しいようであった。接種試験では、本病菌分離株のみがモモ枝折症状を再現し、W 型株および G 型株は病徴を示さなかった (表-2) (KANEMATSU et al., 1999 b)。

### III 果樹に寄生する *Phomopsis* 属菌の DNA を用いた系統分類

他の生物と同様に糸状菌を含む真菌類においても、リ

ボソーム RNA 遺伝子の塩基配列に基づいた系統解析は広く行われている。そのうち、18S rRNA 遺伝子は進化速度が比較的遅いので門、綱レベルの関係に、また、ミトコンドリアの rRNA 遺伝子は目レベルあるいは科レベルの関連に用いられている。一方、非コード領域である ITS (internal transcribed spacer) 領域は進化速度が比較的早いので、同属内の種を関連づけるのに有効と考えられている (WHITE et al., 1990)。そこで、多型が現れやすいと考えられた 5.8S rRNA 遺伝子を含む ITS 領域の解析を行った。

WHITE らの設計したプライマー (WHITE et al., 1990) を用いて PCR により当該領域を増幅し制限酵素で切断後、電気泳動像を比較した (RFLP 解析)。その結果、3種類の制限酵素で切断することにより、今回供試した病原菌を類別することが可能であった (兼松ら, 1995)。また各 RFLP 像に属する菌株から代表菌株をいくつか選んで塩基配列を解析し、最節約法、最尤法および近隣結合法により系統樹を推定した。その結果、同一の RFLP グループに属する菌は単系統群を形成した。モモ、ニホンナシ、リンゴから分離された W 型株と G 型株間では、分離した宿主にかかわらずそれぞれ異なる

RFLP 像を示し、それらは二つの異なる単系統群に属した。また、G 型株とモモ枝折病菌は単系統群に属し、遺伝的に近いことが推察された (図-2) (兼松ら, 1996)。その後、モモやニホンナシの滅菌した切り枝上で菌株を対峙培養することにより交配試験を行ったところ、W 型株内、および G 型株内 (モモ枝折病菌を含む) では交配が認められたが、W 型株と G 型株とでは交配は観察されず、二つの交配グループが認められた (図-2) (兼松ら, 1998)。これらのことから、W 型株と G 型株は別種、もしくは亜種に分類されると考えられる。モモ枝折病菌のみがモモに枝折症状を引き起こし、G 型株では見られないことから (表-2) (KANEMATSU et al., 1999 b), G 型株とモモ枝折病菌は系統的には近いものの、病原性が分化した種ではないかと考えられる。

カンキツ黒点病菌の伝染源であるカンキツの枯れ枝からホモブシス属菌を分離すると、カンキツ果実に黒点症状を引き起こす菌と無病徴の菌が分離されてくる。これら 2 者の孢子は類似しており見分けるのは難しく、発生予察や防除試験を行ううえでの障害となっている。しかし、RFLP パターンからはこれらを区別することができた。カンキツ黒点病を引き起こさない菌のパターン

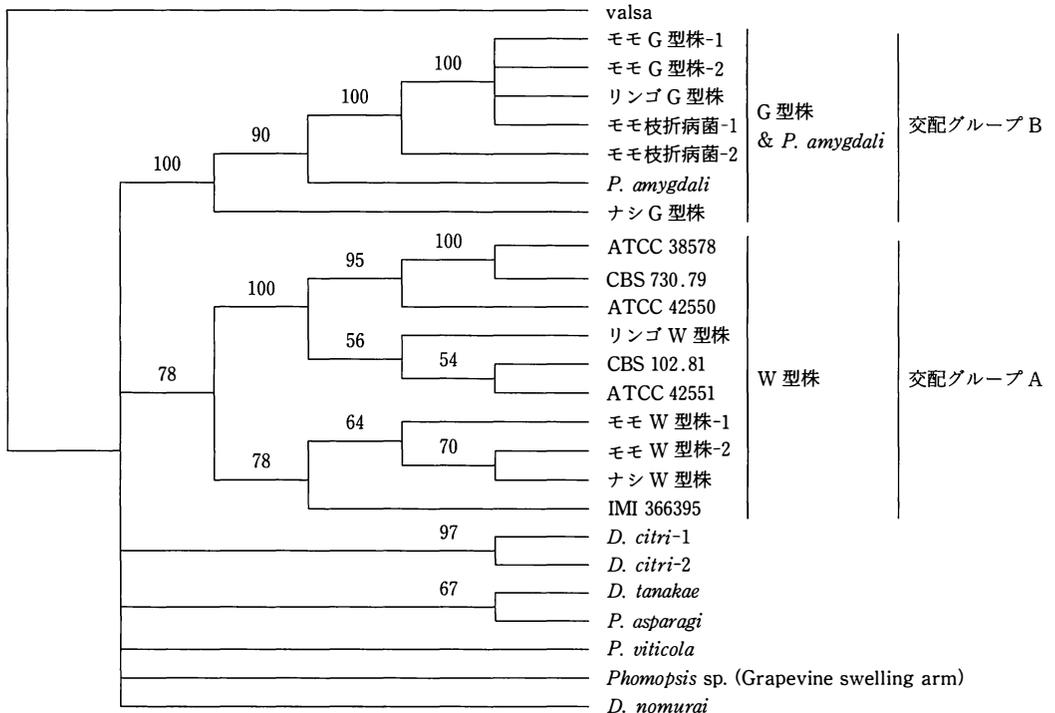


図-2 rDNA ITS 領域の塩基配列による果樹類に寄生する *Phomopsis* 属菌の系統樹 (近隣結合法による。数字はブートストラップ法の確率) と交配グループ

は、ナシ、モモ、リンゴの W 型菌のそれと同じであった (兼松ら, 未発表)。また, W 型菌はキウイフルーツ, ブドウ, イチジク, 西洋ナシおよびニレからも検出されている (兼松ら, 未発表)。こうしたことから, W タイプの菌は腐生的あるいは半寄生的に果樹を含む樹木に寄生しており, 果樹においては果実の抵抗性の弱い時期に感染して収穫後に腐敗を引き起こし, ナシやリンゴ樹においては幼木時あるいは樹勢の低下時に胴枯症状を引き起こすと考えられる。

胞子の大きさが中間型のもの (西洋ナシ胴枯病菌, ブドウつる割病菌) や大型の胞子を有するもの (ブドウ枝膨病菌), さらに, クワ胴枯病菌およびアスパラガス茎枯病菌は, それぞれ特有の RFLP パターンを示し, 系統樹上でもそれぞれ異なる系統群となった (図-2)。

### おわりに

WEHMEYER (1933) は, 宿主ごとに分類されていた *Diaporthe* 属菌 650 種を, 形態的特徴を比較することにより 70 種に統合・整理した。しかしながら, その不完全世代である *Phomopsis* 属菌の整理統合は進んでおらず, 現在でも宿主依存型の分類体系が用いられている (UECKER, 1988)。REHNER と UECKER (1994) は多くの宿主から分離したホモポリス属菌の ITS 領域を解析したところ, 必ずしも分離した宿主と分離菌株の系統関係が一致しないことから, 宿主依存型の分類体系に疑問を投げかけた。BRAYFORD (1990) は異なる宿主から分離した菌が, 互いに交配可能であったことから, 宿主依存型分類の矛盾について述べている。このように, *Phomopsis* 属菌においては, 宿主依存型分類に対して疑問が生じているにもかかわらず, 系統を反映した分類が構築されるには至っていない。

今回の試験結果から, 果樹に寄生する *Phomopsis* 属菌では, rRNA 遺伝子の ITS 領域の解析や交配試験の結果を加味することにより, 従来の手法, すなわち胞子の形態や, 宿主に依存した分類体系では判然としなかった系統関係が明らかとなった。同様の手法で果樹以外の宿主由来の菌株についてもさらに研究が進展すれば, *Phomopsis* 属菌のさらに明瞭な系統分類が確立することになるであろう。その結果, 記載されている多くの種が整理・統合されることで, より洗練された合理的分類体系が構築されると思われる。

今回行った, 果樹類由来の菌株についての ITS 領域の RFLP の結果を DNA 診断法として用いることにより, 形態が類似していても病原性の異なる *Phomopsis*

属菌の分類・診断を行うことも可能となった。本法は既知の病原菌の診断においても有効であるばかりではなく, 今後, 種名がついていない本属菌が発見され, その胞子の形状が多くの既知種と同じだった場合に, どの種に近いのか, あるいは同じなのかの見当をつけることを可能とし, 同定作業が効率化されることになる。

生態研究においても本 DNA 診断法は有効であると考えられる。例えば, ナシの胴枯病斑には W 型株が感染しているものと G 型株が感染しているものが存在するが, その被害樹では, どちらの菌によって引き起こされたのか, などを調査することが可能である。

本研究を行うに当たり, 継代培養で変化しやすい本属菌を安定的に保存することに一番注意を払ったといっても過言ではない。不安定な胞子形成能を維持させるため, 岸 (1995) の寒天葉片法, および 10% グリセロールを用いて  $-80^{\circ}\text{C}$  で分生子を凍結保存しておくことが大変有効であったことをここに報告しておきたい。

最後に, ご協力いただいた私の共同研究者, すなわち系統樹作成にご尽力下さった農業環境技術研究所主研の三中信宏氏, *Phomopsis* 属菌の分類についてご助言下さった東京農業大学の小林享夫教授, そして研究が円滑に進むよう種々のご助言を賜った, 果樹試験場保設部長の工藤 晟氏ならびに病害研究室長の大津善弘氏に深く感謝するとともに, 貴重な菌株を提供して下さいました関係諸氏に, 心よりお礼申し上げます。

### 引用文献

- 1) BRAYFORD, D. (1990): Mycol. Res. 94: 691~697.
- 2) 原田俊男 (1952): 植物防疫 6: 415~417.
- 3) 兼松聡子ら (1995): 日植病報 61: 238~239 (講要).
- 4) ——— (1996): 同上 62: 296 (講要).
- 5) KANEMATSU, S. et al. (1998): 7th ICPP abstract 3.7.21.
- 6) ——— et al. (1999 a): 投稿中.
- 7) ——— et al. (1999 b): 投稿中.
- 8) 岸 國平 (1995): 植物防疫 49: 129~130
- 9) REHNER, S. A. and F. A. UECKER (1994): Can. J. Bot. 72: 1666~1674.
- 10) 芥澤拙夫 (1984): 静岡柑試研報 20: 31~43.
- 11) 富樫浩吾ら (1952): 日植病報 16: 147.
- 12) TUSET, J. J. and M. T. PORTILLA (1989): Can. J. Bot.: 1275~1280.
- 13) UECKER, F. A. (1988): Mycologia Memoirs No. 13, Cramer Publishers, Berlin, pp. 1~231.
- 14) WEHMEYER, L. E. (1933): Univ. Michig. Stud. Sci. Ser. No. 9, University of Michigan Press, Ann Arbor, pp. 1~349.
- 15) WHITE et al. (1990): PCR Protocols, Academic Press, San Diego, pp. 315.
- 16) YAMATO, H. (1976): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 42: 56~59
- 17) 横山康裕ら (1996): 日植病報 62: 318 (講要).