

特集：疫病

分子系統から見た *Phytophthora* 属菌の新分類体系

岐阜大学流域圏科学研究センター かげ 山 幸 二

はじめに

疫病菌 (*Phytophthora* 属菌) だけでなく菌類の分類体系は大きく変わろうとしている。これまでの分類は形態的特徴によっていたが、DNA 塩基配列に基づく分子系統解析、さらには特定の塩基配列のみによる同定にしようとの試みがなされている。ただ、疫病菌の場合は分子系統解析だけでは同定に間違いが起こる可能性がある。塩基配列が似ていても形態的には異なり、違う種であることがある。ここでは、疫病菌の種同定について分子系統と形態分類を含めて説明する。

I 種数の急増

近年、本属菌では種数が激増している (KROON et al., 2012)。1999 年に 55 種であったが、2012 年には 117 種と倍増し、現在も増え続けている。我が国においても本特集で取り上げられているキク疫病菌 *Phytophthora chrysanthemi* は新種として筆者らが最近記載した種である (NAHER et al., 2011)。新種ラッシュになったきっかけは三つの要因が考えられる。一つは、ナラ (オーク) を枯らす病原菌 *P. ramorum* の発見にある。*P. ramorum* は、米国で 2001 年に初めて発見され大きな木を倒すほどの重要病原菌であり (WERRES et al., 2001)、拡大を防ぐために植物検疫が活発になされている (サドンオークデス病の病原菌は植物防疫所により侵入を警戒している主な病害虫に指定されている)。これに伴いこれまで調べられていなかった森林での病原菌探索が始まり、一本一本の木だけでなく、森を枯らす菌として多数の新種が発見された。もう一つは、森林も含めて非農耕地での病原菌探索の機運が高まったことによる。これまで利害関係のある菌のみが取り上げられてきたが、農業上利害関係のない菌も研究対象になっている。この意味では、*Phytophthora* 属菌を疫病菌と言っではいけない時代になってしまうかもしれない。三つ目の要因は分子系統解析の導入である。詳細は後述するが、これまで形態的に違うように見えても種内変異に収まるのではと思い、既存の

種に当てはめて同定された菌株が実は新種であることが明らかにされた種がいくつかある。分子系統解析で菌株を改めて形態観察すると新種に間違いがないことがわかった例が報告されている。

II 分子系統

分子系統解析に関して、疫病菌では rDNA ITS 領域の塩基配列に基づいて作られた COOKE et al. (2000) による報告が最初で、50 種、234 菌株を使って、疫病菌は分子系統的に九つの系統 (クレード) に分けられた。これ以降、より正確な分子系統関係がわかるとして KROON et al. (2004) が 6 領域、BLAIR et al. (2008) が 8 領域の塩基配列による分子系統樹を發した。いずれの分子系統樹も COOKE et al. (2000) の rDNA ITS 領域によるものとよく似ており、クレードは一つ増えて 10 になったものの各クレードに所属する種構成はほぼ同じである (表-1)。現在、BLAIR et al. (2008) のクレード分けが基準となっており、新種を記載するときには、どのクレードに属し既知種と異なっているかを示すことが必須条件となっている。

III 分子系統と形態

分子系統解析で分けられた 10 クレードに所属する種の形態をクレード間で比較すると遊走子のうの乳頭状突起 (papilla) の形態の違い (口絵①)、すなわち papillate, semi-papillate, non-papillate を形成する種の区別がクレードの区別とよく一致している。クレード 1~5 は papillate または semi-papillate, クレード 6~9 は non-papillate, クレード 10 だけは明確に分かれず 4 種中 3 種が papillate, 1 種が non-papillate である。そのほかの形態的特徴はクレードとの関係はない。すなわち、形態分類で重要となる有性世代は分子系統との関連がなく、例えば雌雄異株性と同株性の種が同じクレードに混在している。この無性器官と分子系統の関係は *Pythium* 属菌でも同じことが見られている (MATSUMOTO et al., 1999; LÉVESQUE and de COCK, 2004)。

IV DNA Barcoding

動物、植物では種を識別できる特定の遺伝子の塩基配

New Systematics of *Phytophthora* Species Based on Molecular Phylogeny. By Koji KAGEYAMA

(キーワード: 疫病菌, *Phytophthora* 属菌, 分子系統分類)

表-1 2012年までに報告されている疫病菌

クレード 1		クレード 4		<i>P. cinnamomi</i>	
<i>P. nicotianae</i>	P	<i>P. alticola</i>	P	<i>P. melonis</i>	NP
<i>P. cactorum</i>	P	<i>P. arenaria</i>	P	<i>P. niederhauseri</i>	NP
<i>P. hedraiondra</i>	P	<i>P. litchii</i>	P	<i>P. pistaciae</i>	NP
<i>P. idaei</i>	P	<i>P. megakarya</i>	P	<i>P. sojae</i> *	NP
<i>P. pseudotsugae</i>	P	<i>P. palmivora</i>	P	<i>P. vignae</i>	NP
<i>P. clandestina</i>	P	<i>P. quercetorum</i>	P	クレード 8	
<i>P. iranica</i>	P	<i>P. quercina</i>	P	<i>P. cryptogea</i>	NP
<i>P. tentaculata</i>	P	クレード 5		<i>P. drechsleri</i>	NP
<i>P. andina</i>	SP	<i>P. heveae</i>	P	<i>P. erythroseptica</i>	NP
<i>P. infestans</i>	SP	<i>P. katsurae</i>	P	<i>P. sp. kelmania</i>	NP
<i>P. ipomoeae nom. inval.</i>	SP	クレード 6		<i>P. medicaginis</i> *	NP
<i>P. mirabilis</i>	SP	<i>P. gemini</i>	NP	<i>P. richardiae</i>	NP
<i>P. phaseoli</i>	SP	<i>P. humicola</i>	NP	<i>P. sansomeana</i> *	NP
クレード 2		<i>P. inundata</i>	NP	<i>P. trifolii</i> *	NP
<i>P. bisheria</i>	SP	<i>P. sp. personii</i>	NP	<i>P. brassicae</i>	SP
<i>P. capensis</i>	SP	<i>P. rosacearum</i> *	NP	<i>P. porri</i>	SP
<i>P. citricola</i>	SP	<i>P. taxon walnut</i>	NP	<i>P. primulae</i>	SP
<i>P. elongata</i>	SP	<i>P. taxon cranberry</i>	NP	<i>P. foliorum</i>	SP
<i>P. taxon emzansi</i>	SP	<i>P. fluviialis</i>	NP	<i>P. hibemalis</i>	SP
<i>P. frigida</i>	P	<i>P. taxon forestsoil</i>	NP	<i>P. lateralis</i>	SP/NP
<i>P. mingei</i>	SP	<i>P. gibbosa</i>	SP/NP	<i>P. ramorum</i>	SP
<i>P. multivesiculata</i>	NP/SP	<i>P. gonapodyides</i>	NP	<i>P. austrocedrae</i>	SP
<i>P. multivora</i>	SP	<i>P. gragata</i>	NP	<i>P. obscura</i>	SP
<i>P. pini</i>	SP	<i>P. litoralis</i>	NP	<i>P. syringae</i>	SP
<i>P. plurivora</i>	SP	<i>P. megasperma</i> *	NP	クレード 9	
<i>P. siskiyouensis</i>	SP	<i>P. taxon oaksoil</i>	NP	<i>P. captiosa</i>	NP
<i>P. botryosa</i>	P	<i>P. taxon paludosa</i>	SP/NP	<i>P. chrysanthemi</i>	NP
<i>P. citrophthora</i>	P	<i>P. taxon pgchlamydo</i>	NP	<i>P. constricta</i>	NP
<i>P. colocasiae</i>	SP	<i>P. pinifolia</i>	NP	<i>P. fallax</i>	NP
<i>P. himalsilva</i>	P	<i>P. taxon raspberry</i>	NP	<i>P. hydropathica</i>	NP
<i>P. inflata</i>	SP	<i>P. taxon riversoil</i>	NP	<i>P. irrigata</i>	NP
<i>P. meadii</i>	P	<i>P. taxon salixsoil</i>	NP	<i>P. insolita</i>	NP
<i>P. capsici</i>	P	<i>P. thermophila</i>	NP	<i>P. macrochlamydospora</i>	NP
<i>P. glovera</i>	SP	<i>P. asparagi nom. inval.</i>	NP	<i>P. parsiana</i>	NP
<i>P. tropicalis</i>	P	クレード 7		<i>P. polonica</i>	SP
クレード 3		<i>P. alni</i>	NP	<i>P. quininea</i>	NP
<i>P. ilicis</i>	SP	<i>P. cambivora</i>	NP	クレード 10	
<i>P. nemorosa</i>	SP	<i>P. europaea</i>	NP	<i>P. boehmeriae</i>	P
<i>P. pseudosyringae</i>	SP	<i>P. fragariae</i>	NP	<i>P. gallica</i>	NP
<i>P. psychrophila</i>	SP	<i>P. rubi</i>	NP	<i>P. kernoviae</i>	P
		<i>P. uliginosa</i>	NP	<i>P. morindae</i>	P
		<i>P. cajani</i>	NP		

太字は ERWIN and RIBEIRO (1996) の本「*Phytophthora* Disease Worldwide」以降に記載された種。

P, papillate 遊走子のう; SP, semi-papillate 遊走子のう; NP, non-papillate 遊走子のう。

nom. inval. 正式に種として登録されていない。

P. taxon, これから新種として記載される予定。

P. sp. 取り敢えず塩基配列が登録されている。

nom. nud. 既に種名が使われているが、新種記載がない。

*最初は *P. megasperma* として同定されていた。

列に基づいて、種同定を行う試みが世界的に進められている (<http://www.barcodeoflife.org/>)。この取組では、塩基配列が A, T, C, G の四つの塩基から構成されているので、これを販売したものを識別のために生活用品

や食料品等につけられているバーコードに見立てて DNA バーコーディング (Barcoding) と名付けている。菌類も例外ではなく、疫病菌を含めた卵菌類では ROBIDEAU et al. (2011) がミトコンドリアにコードされて

いる cytochrome c oxidase subunit I (COI) と核にコードされている rDNA ITS 領域が、DNA Barcoding に適しているとの論文を発表した。COI のほうが rDNA ITS 領域より種内変異が少なく、種の識別能力もよいが、これまでの塩基配列データの蓄積は圧倒的に rDNA ITS 領域のほうが多いので、併用するとしている。

V 種複合体 (species complex) および種間雑種

分子系統解析によりこれまでの種が実は一つの種ではなく複数種が含まれている種複合体であることが明らかになってきているものがある。*Phytophthora megasperma* は non-papillate で増殖性の遊走子のう、大きな造卵器を形成する種として多くの作物の病原菌として報告されてきた。しかし、HANSEN and MAXWELL (1991) は、分子系統解析の前にアイソザイム分析などからマメ科作物から分離された菌株を *P. sojae*, *P. medicaginis*, *P. trifolii* として *P. megasperma* から独立させた(口絵①)。その後、分子系統解析から *P. rosacearum* と *P. sansomeana* が新種として分けられた (HANSEN et al., 2009)。さらに、筆者らはバラ疫病菌 *P. megasperma* は分子系統、形態、病原性から新種であることを明らかにした (RAHMAN et al., 2013)。*P. megasperma* 以外にも *P. cryptogea*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. capsici* も種複合体である可能性があると研究が進められている (MARTIN et al., 2012)。

近年、種間交雑の報告が見られるようになってきている。例えば *P. nicotianae* と *P. cactorum* が種間交雑したと思われる圃場菌株が得られている。このほかにも *P. cactorum* と *P. hedraïandra* の雑種など近縁な種間の雑種が分子系統解析により明らかにされている。これからの研究の動向について注目する必要がある。

VI 日本産疫病菌の再評価

筆者らは MAFF および NBRC に保存されている菌株を含め日本で報告されたほとんどの種 21 種からなる 151 菌株および未同定の 10 菌株、合計 161 菌株について rDNA ITS 領域の塩基配列に基づく分子系統解析により同定の再評価を行った (RAHMAN et al. 2012)。その結果、161 菌株中 124 菌株は同定されていた種と同じ種であることが確認できた。残り 37 菌株中 13 菌株は同定されていた種とは異なる種の塩基配列と相同性が高く、分子系統的にも異なることが明らかになった。*Phytophthora hedraïandra*, *P. multivora*, *P. gregata*, *P. niederhauseri*, *P. sansomeana*, *Phytophthora* sp. *kelmania* が相同性が高い種であったが、*Phytophthora* sp. *kelmania* はこれから新記載される予定の種、そのほかの種もそれぞれの菌株

が同定された以降に、新種として記載された種であるとともに日本新産種であることが明らかになった。未同定の 6 菌株は、*P. nicotianae* と *P. palmivora* であり、ともに雌雄異株性のため同定が困難であったと思われる。そのほかの 18 菌株については、これまでに記載されている種に該当するものではなく、新種と思われた。このうち、バラ疫病菌 *P. megasperma* として同定されていた 14 菌株については、先に述べたように新種であることを明らかにした (RAHMAN et al., 2013)。残り 4 菌株については未同定の菌株であり、分子系統的には 4 菌株とも異なる新種と思われ、今後さらなる研究が必要である。

以上のように、再評価の結果、多くの同定については問題ないが、分子系統解析の面から最近新種として記載されたことによる種名の変更が必要な菌株、新種として記載が必要な菌株があることが明らかになった。また、未同定の菌株については雌雄異株性のため同定が困難であった菌株、新種であるため同定が困難であった菌株が含まれていることが明らかとなった。

VII 最近の同定手順

疫病菌では汎用されている形態に基づく検索表はないことに加え、先に述べたように新種が年に数種、十数種と増えている状況では、これまでの形態的特徴から同定に入るのは困難である。そこで、最初に塩基配列を調べることから始めるのが良い。注目する領域は、先の DNA Barcoding で推奨されている rDNA ITS 領域と COI である。rDNA ITS 領域はユニバーサルプライマーを用いて PCR できるが、COI はユニバーサルプライマーがなく、卵菌用のプライマーが作成されている。プライマーおよび PCR 条件は DNA Barcoding の論文 (ROBIDEAU et al., 2011) に示されている。また、rDNA ITS 領域ではダイレクトシーケンス法では塩基配列が読めないことがある。これは、疫病菌は 2 倍体であるため塩基配列に菌株内多型があることが原因で、このような場合はクローニングを行う。得られた塩基配列を使って相同性の高い種を調べるため、DNA データベースで検索を行う。国立遺伝学研究所の DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) の相同性検索 (BLAST) が、一般的に使われている。塩基配列データは世界中で共有されているので、日本のデータベースを使っても問題なく検索ができる。疫病菌では疫病菌専用のデータベース *Phytophthora* Database (<http://www.phytophthoradb.org/>) と *Phytophthora*-ID (<http://phytophthora-id.org/>) の二つが構築されている。データベース利用に際しては二つの注意点がある。一つは、検索結果は相同性の高い菌株順

にリストとして示されるが、相同性の内容を確認する必要がある。100%の相同性がある塩基配列であっても、自分の検索に用いた塩基配列全体の相同性が、100%相同となっていない場合がある。特に、新種である場合には一部の塩基配列が自動的に抽出され、その部分の相同性が100%の菌株がリストの一番上に表示される場合がある。もう一つの注意点は、検索塩基配列全体が100%相同性の菌株であっても、その菌株の同定が間違っている場合があることである。塩基配列をデータベースに登録するとき、データベース運用側は菌株の同定が正しいかどうかを確認しない。したがって、検索結果リストの2番目以降も確認する。時々見られる例として、リスト1番目と2番目以降の種が異なっており、2番目以降の種が圧倒的に多いことがある。この場合は、2番目以降の種が同定の候補と考える。しかし、2番目以降いろいろな種が入り乱れている場合があり、このときは先に述べた DNA Barcoding の論文 (ROBIDEAU et al., 2011) を利用する。この論文で使われた菌株については検索結果の菌株名の前に「voucher」という単語が付いている。論文の「Supporting Information」の Fig. S1 に分子系統樹があるのでその菌株の信頼性が確認できる。論文はオープンアクセスになっており (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x/pdf>), 疫病菌同定には必須の論文である。また、卵菌類を対象にした論文であるので *Pythium* 属菌や *Aphanomyces* 属菌の同定にも利用できる。このようにして塩基配列に基づいた同定の候補を見つける。次に、候補種を基本にして形態観察を行う (口絵①)。1996年以前の種であれば ERWIN and RIBEIRO (1996) が出版した「*Phytophthora Disease Worldwide*」という本を参考にするとそれぞれの種の形態的特徴、病原性等詳細に記載されている。

1996年以降に新種として記載された種の場合は原著論文を見る必要がある。2012年までの種については KROON et al. (2012) の論文に各種の原著論文が示されている。形態は、無性世代については遊走子のう、厚壁胞子、Hyphal swelling, 有性世代については雌雄異株性・同株性、造卵器、造精器、卵胞子を観察する。また、菌糸生育の温度反応も重要な性質の一つである。

おわりに

菌類全体が分子系統解析の導入により分類体系が変わろうとしている。疫病菌では新種が日々増え続け、塩基配列のデータは同定には重要な要素である。ただし、疫病菌では分子系統的に近縁であっても、形態や病原性が異なる種があるため、分子系統や DNA Barcoding だけでは同定に誤りが生じる可能性があることを忘れてはならない。

引用文献

- 1) BLAIR, J. E. et al. (2008): *Fungal Genet. Biol.* **45**: 266 ~ 277.
- 2) COOKE, D. E. L. et al. (2000): *ibid.* **30**: 17 ~ 32.
- 3) ERWIN, D. C. and O. K. RIBEIRO (1996): *Phytophthora Disease Worldwide*, Amer. Phytopath. Soc., St. Paul, MN, USA, p. 562.
- 4) HANSEN, E. M. and D. P. MAXWELL (1991): *Mycologia* **83**: 376 ~ 381.
- 5) ——— et al. (2009): *ibid.* **101**: 129 ~ 135.
- 6) KROON, L. P. N. M. et al. (2004): *Fungal Genet. Biol.* **41**: 766 ~ 782.
- 7) ——— et al. (2012): *Phytopathology* **102**: 348 ~ 364.
- 8) LÉVESQUE, C. A. and A. W. A. M. de Cock (2004): *Mycol. Res.* **108**: 1363 ~ 1383.
- 9) MARTIN, F. N. et al. (2012): *Plant Disease* **96**: 1080 ~ 1103.
- 10) MATSUMOTO, C. et al. (1999): *Mycoscience* **40**: 321 ~ 331.
- 11) NAHER, M. et al. (2011): *Mycol. Prog.* **10**: 21 ~ 31.
- 12) RAHMAN, Z. M. et al. (2012): *日植病報* **78**: 189.
- 13) ——— et al. (2013): *日菌学会第57回大会講要集*: p. 59.
- 14) ROBIDEAU, G. P. et al. (2011): *Mol. Ecol. Res.* **11**: 1002 ~ 1011.
- 15) WERRES, S. et al. (2001): *Mycol. Res.* **105**: 1155 ~ 1165.