

異なる植物種から分離された *Phyllosticta* 属菌の宿主特異性に関する研究

山野邊 裕樹（筑波大学生物学類） 指導教員：岡根 泉（筑波大学生命環境系）

【背景と目的】

植物と菌類は様々な相互関係を持っている。植物と正の相互作用を持つ菌類の中には、内生菌が含まれる。内生菌とは、生活環のある時期において、明らかな病徴を引き起こすことなく宿主植物の生きた組織内に生息する菌類のことである。*Phyllosticta capitalensis* Henn.は、ラン科植物の褐斑病菌として記載され、その後多くの植物種の葉において内生菌として分離されることが明らかになった種である。病原菌として報告されている *Phyllosticta* 属菌の宿主範囲は、多犯性の種であってもおよそ1つの植物科内に収まるとされている。しかし、*P. capitalensis* は宿主範囲が広い内生菌として知られ、その宿主植物種は70以上の科にわたることが報告されている。これまで *P. capitalensis* は様々な宿主植物種からの分離報告があるが、それぞれの植物種から分離された本菌の菌株が宿主特異性を有するかについては不明である。

そこで本研究では、*P. capitalensis* の宿主特異性を明らかにすることを目的とした。まず、系統的に遠縁である異なる植物種の葉から分離された *P. capitalensis* の菌株、および本種との同一性が示唆されているネギ黒紋病菌 *P. alliacea* を対象に、分離源と異なる植物種へ接種した。そして、各供試菌株の内生菌としての定着と病原性発現における宿主特異性について調査した。さらに、異なる植物種から分離された *Phyllosticta* 属菌の菌株間の形態的および遺伝的差異について比較検討した。

【材料と方法】

供試菌株および供試植物

ヒラドツツジ葉から内生菌として分離された *P. capitalensis* RP1、同様にシランから分離された *P. capitalensis* BS1、ネギの病徴から分離された *P. alliacea* MUCC14 の3菌株を供試菌株として、それぞれの分離源の植物種であるヒラドツツジ(品種:オオムラサキ)、シラン、ネギ(品種:ホワイスター)を供試植物として用いた。

交接種試験による定着能力・病原性の比較

供試菌株 RP1、BS1、MUCC14 のポテトデキストロース寒天(PDA)培地での培養コロニーから、滅菌蒸留水に分生子を懸濁してそれぞれ分生子懸濁液 (5.0×10^5 cells/ml) を作製した。作製した分生子懸濁液を各供試植物の葉にマイクロピペットを用いて滴下接種した。その後、病徴発生を継続観察すると同時に、接種2週間後と4週間後に接種点を含む葉を切り取り、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による表面殺菌処理を行った。表面殺菌後の葉を、接種点を含む5 mm×5 mmの葉片に切り出してPDA培地に置き、形成されたコロニーを分離した。そして、分離株の形態学的特徴を観察し、接種菌株との同一性を確認した。

形態・塩基配列の比較

RP1、BS1、MUCC14 の培養コロニーからプレパラートを作製して光学顕微鏡による観察を行い、分生子、子嚢、子嚢胞子の長さおよび短径、付属糸の長さを測定した(n=25)。測定結果はTukey検定により、統計処理した。

RP1、BS1、MUCC14 の植物葉への侵入形態を比較するため、各菌株接種24時間後の葉をアルコールラクトフェノールトリパンブルー染色し、葉上での分生子形態を光学顕微鏡により観察した。

各供試菌株のコロニー端から菌体を掻き取り、DNAを抽出し、rDNA ITS(ITS1-5.8S rDNA-ITS2)、28S rDNA、*tefl-α* の3領域のPCR増幅およびシーケンス解析により各領域の塩基配列を決定し、菌株間の相同性を算出した。

【結果と考察】

接種試験では、ヒラドツツジとシランにそれぞれ内生する *P. capitalensis* の菌株 RP1、BS1、ネギ黒紋病菌 *P. alliacea* の菌株 MUCC14 において、ヒラドツツジおよびシランから接種後2週間と4週間で各接種菌株が内生菌として再分離された(表1)。また、全ての菌株において、接種後のネギで病徴の発生が確認されなかった。形態観察の結果、RP1、BS1、MUCC14 の分生子、付属糸、子嚢、子嚢胞子の測定値において、各菌株間で測定値に有意な差は確認されなかった。さらに、各菌株接種後の葉上における分生子の形態観察により、*P. capitalensis* が内生菌として定着する際に付着器形成することを明らかにした(図1)。RP1、BS1、MUCC14 において、ITS 領域の塩基配列はそれぞれ99.6%以上、28S rDNA 領域はそれぞれ99.7%以上、*tefl-α* 領域では100%の相同性を示した。

形態・分子データから、これら3菌株間に形態的、遺伝的分化が生じていないことが示唆された。さらに、*P. alliacea* は *P. capitalensis* と同一種であることが強く示唆された。また、接種試験の結果から、これらの菌株がヒラドツツジおよびシラン上で内生菌として定着することが確認された。本研究成果は、異植物種に内生する *P. capitalensis* が宿主特異性を持たず、系統的に広範な植物種に対して内生菌として定着できる可能性を示した。

表1 ヒラドツツジ、シランの各菌株接種後2、4週間での再分離結果。(+:再分離された処理区、括弧:再分離された葉片数/供試葉片数)

	ヒラドツツジ		シラン	
	2 wk	4 wk	2 wk	4 wk
RP1	+(2/6)	+(4/6)	+(4/6)	+(3/6)
BS1	+(4/6)	+(5/6)	+(3/6)	+(3/6)
MUCC14	+(1/6)	+(2/6)	+(2/6)	+(2/6)

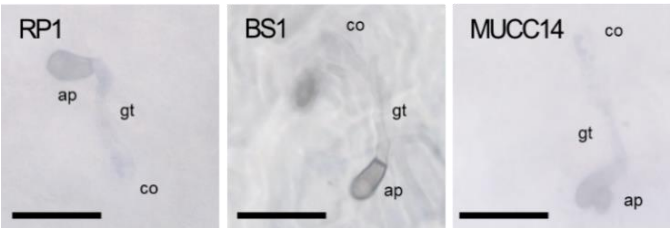


図1 アルコールラクトフェノールトリパンブルー染色後に観察した各菌株接種24時間後のヒラドツツジ葉上の分生子。(スケールバー20 μm、co:分生子、gt:発芽管、ap:付着器)