

# 日本産Phyllosticta属菌の分類学的再検討と系統関係

誌名	日本菌学会会報 = Transactions of the Mycological Society of Japan
ISSN	00290289
著者名	本橋,慶一
発行元	日本菌学会
巻/号	52巻1号
掲載ページ	p. 1-10
発行年月	2011年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 日本産 *Phyllosticta* 属菌の分類学的再検討と系統関係

本橋慶一

東京農業大学地域環境科学部電子顕微鏡室, 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

### Morphological reexamination and molecular phylogeny of *Phyllosticta* originating to Japan

Keiichi MOTOHASHI

Electron Microscope Center, Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

(Accepted for publication August 24 2010)

Many species of *Phyllosticta* are known as the causal fungi of leaf spot diseases of various plants in the world. First, 224 species of genus *Phyllosticta* s.l. from Japan were reexamined on the basis of herbarium specimens and literatures. As a result, these were reclassified into 20 hitherto known species of *Phyllosticta* s.str., and 7 species were newly recorded to Japanese mycoflora. Moreover, 16 species should be described as new species of *Phyllosticta*, and also, 3 species were transferred to *Phyllosticta* s.str. from other related genera. Next, the phylogenetic relationships among the Japanese species of *Phyllosticta* s.str. and its teleomorph, *Guignardia* were analyzed using rDNA sequences. rDNA sequences extracted from fungal cultures obtained from various host plants were divided into two subgroups. The first group included the isolates having the wide host range and the isolates recognized as endophytes obtained from a symptom-less plant. The second group were composed from the isolates originated from various host plants; and besides, these formed the distinct clades reflected by those host genera. The isolates belonging to the first group generally grew faster on oatmeal agar. To classify the species of *Phyllosticta* s.str. it is necessary to consider an integrated approach such as the molecular phylogeny, host, colony growth, symptom, and morphological characteristics that has not been paid attention before.

(Japanese Journal of Mycology 52: 1 - 10, 2011)

Key Words—Coelomycetes, molecular phylogeny, *Phyllosticta*, taxonomy

#### はじめに

*Phyllosticta* 属菌(完全世代: *Guignardia* Viala & Ravaz) は, 1818年に Persoon によって創設された(van der Aa 1973). 本属菌の多くの種は植物病原菌として知られ(van der Aa and Vanev 2002), 世界でも多くの被害が報告されている。“*Phyllosticta*”とはギリシャ語の葉を意味する“*phyllon*”と斑点を意味する“*stiktos*”からなり, その名の通り本属菌による植物病害の病徴は宿主の葉, 枝, 茎や果実に, 斑点症状や褐斑症状を呈する(図1A-F). 一方, 本属菌はツツジ科を含む多くの植物に, 無病徴で, 植物体内に内生的に存在する内生菌(endo-

phytic fungi) としても多く報告されており, その生態や宿主域については, いくつかの研究が知られている(Petrini 1986; Petrini et al. 1991; Okane et al. 2001, 2003; Baayen et al. 2002; Pandey et al. 2003). 本属菌は Saccardo (1884) の分類体系において, 寄生する宿主毎に種名が与えられたため, 膨大な種が記載されてきた. その後, van der Aa (1973) は属の概念を整理し, その新分類基準によって再検討されたリストが公表された(van der Aa and Vanev 2002). この再検討の中で旧分類基準に基づく広義 *Phyllosticta* 属菌の種は, 新分類基準に基づいた狭義 *Phyllosticta* 属菌の種と, 類似した形態的特徴を持つ *Phoma* 属, *Asteromella* 属などへ類別され, 狭

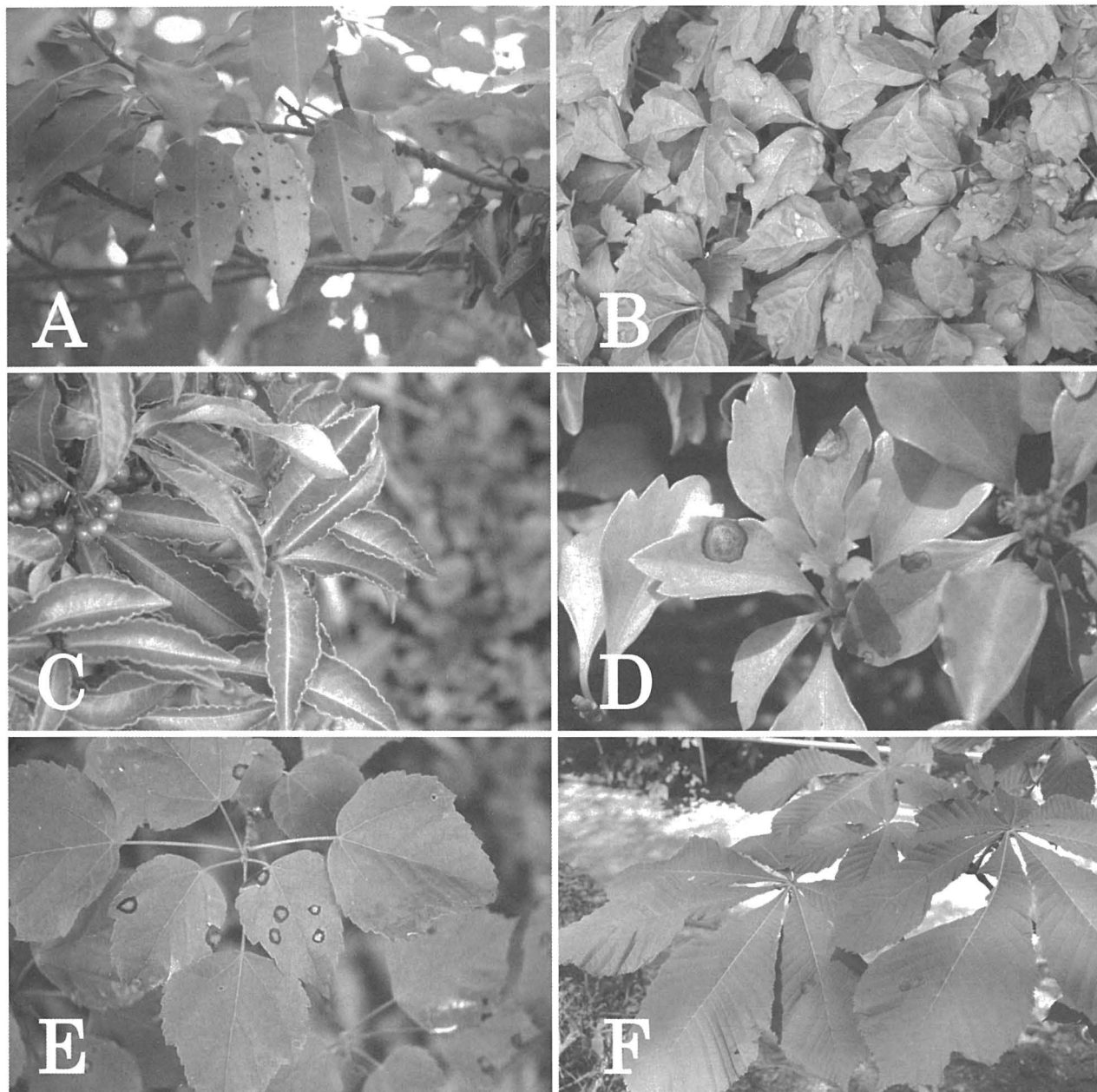


図1. 狭義 *Phyllosticta* 属菌による斑点性病害の病徴. A ソヨゴ褐斑病 *P. azevinhi*. B ツタ褐色円星病 *P. ampelicida*. C マンリョウ *P. ardisiicola*. D フッキソウ褐斑病 *Phyllosticta* sp. E カエデ *P. minima*. F トチノキ *P. sphaeropoidea*

義 *Phyllosticta* 属菌以外はそれぞれの属へ転属再記載された。日本産種についても検討が行われているが、多くの場合、基準標本ではなく、記載文により所属が検討された。また、未検討の種も多く、日本産 *Phyllosticta* 属菌の正確な菌類相は未解明であった。これは1935年以前に新種として記載された日本産 *Phyllosticta* 属菌は、日本語で記載されている場合が多く、且つその基準標本の所在についても不明、もしくはその存在が世界に認知されていなかったためと考えられる。そこで著者は日本

産 *Phyllosticta* 属菌を新分類基準に基づき再検討し、その目録を作成することで日本産 *Phyllosticta* 属菌の菌類相を明らかにすることを試みた。さらに本属菌の新たな分類法について検討する事を目的として分子系統解析を行った。

#### *Phyllosticta* 属菌の分類史

*Phyllosticta* 属菌の属の概念について Saccardo (1878,

1884) は、“病斑は葉、まれに枝上で輪紋となり、分生子殻は表皮下に埋生し、レンズ型、薄い膜質で口孔を有する。分生子は小さく、無色から緑色を帯び、単胞、卵形から楕円形である”とした。しかし、その後の多くの研究者により“葉に分生子殻を形成し、分生子は無色、単胞のものすべては *Phyllosticta* 属菌とされ、それに対して、同様の形態をもち茎に寄生するものは *Phoma* 属菌”と属の概念が変更された (van der Aa and Vanev 2002)。その後、van der Aa (1973) および van der Aa and Vanev (2002) は属の概念について再検討を行い、“葉もしくは小枝に分生子座状の分生子果を形成し、分生子形成細胞は全出芽型で、分生子は無色、単胞 (例外として2細胞)、球形、類球形もしくは長楕円形で、大きさは  $10-20 \times 5-10 \mu\text{m}$ 、通常、緑色を帯びた油滴を含み、周辺は粘質の層に覆われ、頭頂部に付属糸をもち、基部は裁切状となる”とし、このような形態的な特徴を持つ菌類を狭義 *Phyllosticta* 属菌とした。加えて、彼らはその完全世代についても言及し、狭義 *Phyllosticta* 属菌のテレオモルフを *Guignardia* 属菌であると定義した。これらの定義は菌学者や植物病理学者の間で世界的に受け入れられた。その後、van der Aa ら (1990) は、数千種の *Phyllosticta* 属菌のうち50%が *Phoma* 属、20%が *Asteromella* 属、5%が *Phomopsis* 属、18%は他の分生子果不完全菌類もしくは他のグループ菌類であり、わずか7%が狭義 *Phyllosticta* 属菌であるとした。続く研究で、van der Aa and Vanev (2002) は、2936種について基準標本や記載文献を検討し、そのうち143種を狭義 *Phyllosticta* 属菌であると認めた。

種の定義に関しては、*Guignardia* 属菌とそのアナモルフである *Phyllosticta* 属菌が、接種試験の結果から1つの宿主属もしくは科のみに病原性を示し、宿主特異的な菌類であるとされた (Stewart 1916; Luttrell 1946, 1948; Reusser 1964)。従って *Phyllosticta* 属菌の種名は、宿主属または宿主種上での形態の違いや培養特性、もしくは生態の違いによって与えられてきた (van der Aa 1973)。例えば、宿主イチヤクソウ属には *Phyllosticta pyrolae* Ellis & Everh. が、シラタマノキ属には *P. gaultheriae* Ellis & Everh. が寄生することが知られ、それぞれ形態的特徴が似るものの宿主属の違いにより異なる種名が与えられている。同属宿主上に2種以上の *Phyllosticta* 属菌が寄生する例も報告されている。宿主シオデ属には *P. crypta* Bissett, *P. cumminsii* Bissett および *P. subeffusa* (Ellis & Everh.) Tehon & G.L. Stout. の3種が寄生することが知られているが、分生子の形態的特徴および大きさ、粘質層の厚みに違いがあるとしてそれぞれ別種と報告された (Bissett 1979)。一方で、これらの種の定義に

当てはまらない種も存在する。スギ、セイヨウキツタ、*Heptapleurum venulosum*、モチノキ属、モクレン属、ツツジ属およびイチイ属に寄生する *Phyllosticta* 属菌は宿主上での形態的特徴の違いが見られないことから、広い宿主域を持つ種、*P. concentrica* Sacc. として認識されている (van der Aa and Vanev 2002)。さらには、広範囲の植物に病徴を示さず内生的に存在する *Phyllosticta* 属菌も報告されており、Okane ら (2001, 2003) は、38科54属67種の植物から内生的に存在する *Phyllosticta* 属菌を分離し、これらの分離菌株は、形態的特徴およびリボソーム DNA 内の ITS 領域を用いた分子系統解析から、すべて *P. capitalensis* Henn. であると同定している。また、Baayen ら (2002) は、カンキツ類から分離された病原性を示さない *G. mangiferae* A.J. Roy と、同じくカンキツ類から分離される *G. citricarpa* Kiely (アナモルフ: *P. citricarpa* (McAlpine) Aa) の違いについて、分生子は同等の大きさだが、その周囲に形成される粘質層の厚みと rDNA リボソームの塩基配列に違いがあることを明らかにした。以上のように *Phyllosticta* 属菌の種分類については分子系統学的な結果を基に議論が行われ始めているが、多くの種については未検討であり、すべての種に適用することはできないのが現状である。

#### 日本産 *Phyllosticta* 属菌の分類史

日本においては、*Phyllosticta* 属菌による植物病害の記録は1900年初頭から始まった。日本国内では、分生子殻内の分生子が無色、単胞のもので、 $15 \mu\text{m}$  以上のものを *Macrophoma* 属菌、 $15 \mu\text{m}$  以下の分生子で葉に寄生するものを *Phyllosticta* 属菌、葉以外の植物体上に寄生するものを *Phoma* 属菌として分類してきた (川村 1913; 三浦 1928; 瀧元 1930)。川村 (1913) は、それぞれの属の分生子の大きさの範囲が  $15 \mu\text{m}$  を含む場合があることから、この分類方法に疑問を呈した。しかし、この分類基準に従い多くの日本人研究者が多数の *Phyllosticta* 属菌の新種を植物病害に関与する糸状菌として記載した。2007年までには、少なくとも93種が新種として記載され (三宅 1909; 三宅・原 1910; 堀 1913; 川村 1913; 鶴田 1915; 原 1916, 1918, 1920, 1925, 1927, 1930a, 1930b, 1931, 1938, 1959; 澤田 1916, 1918, 1943, 1950a, 1950b, 1958, 1959; 三浦 1928, 1957, 1962; 福井 1936, 1942; Togashi, 1936a, 1936b; Naito 1940, 1952; 香月 1950; Katsuki 1950; Kobayashi 1974, 1977; 小林・千葉 1961; Kobayashi and Onuki 1990; Kobayashi and Okamoto 2003)、224種の分布が確認された。しかしながら、これらの種の多くは van der Aa (1973) が提案した新しい属

概念ではなく、広義の属概念に基づいた発生報告、もしくは新種記載であるため、現在日本産 *Phyllosticta* 属菌として報告されている種は広義および狭義の *Phyllosticta* 属菌が混在していると考えられる。また、世界的なリストを公表した van der Aa and Vanev (2002) は、日本産 *Phyllosticta* 属菌についてその多くを標本ではなく記載文をもとに検討を行っており、さらには未検討としている種が数多くある。このほかにも著者の文献調査により、命名規約上有効な発表ではあるが海外ではその存在が認識されていない種が多く存在していることが判明した。従って日本では正確な *Phyllosticta* 属菌の菌類相の把握ができていないのが現状である。

### 日本産 *Phyllosticta* 属菌の菌類相

日本産 *Phyllosticta* 属の菌類相を把握するために、野外にて斑点性の病徴を呈している植物葉を採集し、1道1都16県にて狭義 *Phyllosticta* 属菌標本131点を得た。加えて、(独)森林総合研究所樹木病害研究室標本庫、国立科学博物館菌類標本庫、山口大学植物病理学標本庫および岩手大学ミュージアム植物標本庫に *Phyllosticta* 属菌として収蔵されている病害標本計531点を取り寄せ検討を行った。加えて、澤田兼吉氏により台湾にて採集・記載された基準標本を多く含む51点の標本も比較のために検討を行った。これらの標本713点の内訳は、正基準標本が18種18点、副基準標本2種2点、等価基準標本7種38点、従基準標本4種5点、命名者により同定された標本17種52点、およびその他の標本665点となった。文献調査では日本産 *Phyllosticta* 属菌として224種が確認されたが、標本を基にした再検討の結果、日本産狭義 *Phyllosticta* 属菌は、既知種として、*P. ampelicida* (Engelm.) Aa(ツタ), *P. anacardiacearum* Aa(マンゴー), *P. azevini* Torrend(ソヨゴ), *P. boninense* Tak. Kobay. & T. Okamoto(ヘクソカズラ), *P. capitalensis* Henn.(ランの一種・宿主多数), *P. concentrica* Sacc.(セイヨウキヅタ・ツツジ科等), *P. conjac* Hara(コンニャク), *P. cordylino-phila* P.A. Young(センネンボク), *P. cruenta* (Fr.) J. Kickx f.(アマドコロ), *P. cryptomeriae* Kawam. (= *P. concentrica*, スギ), *P. dioscoreae* Cooke(ヤマノイモ), *P. drummondii* Vanev & Aa(コバノナンヨウスギ), *P. gardenicola* Sawada(クチナシ), *P. glochidii* Sawada(カンコノキ), *P. hiratsukae* Tak, Kobay. & Onuki(オヒルギ・ヤエヤマヒルギ), *P. kobayashii* Vanev & Aa(アブラチャン), *P. kobus* Henn. (= *P. concentrica*, コブシ), *P. multi-maculans* Tak. Kobay.(アオモジ), *P. solitaria* Ellis & Everh.(ナシ・リンゴ), *P. toxica* Ellis & G. Mart(ハゼノ

キ)の20種が認められ、日本新産種として *P. citricarpa* (McAlpine) Aa(カンキツ), *P. ghaesembillae* Koord.(クロトン), *P. hamamelidis* Peck(マンサク類), *P. minima* (Berk. & M.A. Curtis) Underw. & Earle(ハナノキ・ウリカエデ), *P. musarum* (Cooke) Aa(バショウ), *P. sphaerospoidea* Ellis & Everh.(トチノキ), *P. theacearum* Aa(チャノキ・ツバキ)の7種が見出された(Motohashi et al. 2010)。 *Phyllosticta* 属菌へ転属すべき種として、*Phoma thujspsidis* Sawada(ヒノキアスナロ), *Strasseria garciniae* I. Hino & Katum.(フクギ), *S. japonica* Hara(マサキ)の3種が確認され、そのうち *S. garciniae* を *P. garciniae* (I. Hino & Katum.) Motohashi, Tak. Kobay. & Yas. Onoとして転属再記載した(Motohashi et al. 2010)。また、観察した標本から16種の未知種を見出し、*Phyllosticta alliacea* Motohashi, Jun. Nishikawa & C. Nakash.(ネギ), *P. ardisiicola* Motohashi, I. Araki & C. Nakash.(マンリョウ), *P. aspidistricola* Motohashi, I. Araki & C. Nakash.(ハラン), *P. disanthi* Motohashi & C. Nakash.(マルバノキ), *P. fallopiae* Motohashi, I. Araki & C. Nakash.(イタドリ), *P. hoveniicola* Motohashi & C. Nakash.(ケンボナシ), *P. kerriae* Motohashi, I. Araki & C. Nakash.(ヤマブキ), *P. ligustricola* Motohashi & C. Nakash.(イボタノキ)の8種を既に公表した(Motohashi et al. 2008a, 2008b, 2010)。以上の結果から日本産の狭義 *Phyllosticta* 属菌は計46種となることが明らかとなり、他は狭義 *Phyllosticta* 属菌から除外されるべきものであった。

### 日本産 *Phyllosticta* 属菌の分子系統関係

van der Aa (1973) が定義した新たな *Phyllosticta* 属菌の定義については安定していると考えられるが、本属菌の種の定義については未だ議論する余地があり、今後分子データを活用することで正確な種および種以下のレベルの分類が整理されると考えられている(van der Aa and Vanev 2002)。近年、*Phyllosticta* 属菌およびそれに関連する属のrDNAに基づく分子系統解析を行った研究が報告されている(Baayen et al. 2002; Meyer et al. 2006; Peres et al. 2007)。Crousら(2006)は、狭義 *Phyllosticta* 属菌を含む Botryosphaeriaceae の分子系統解析による大まかな系統関係を提示した。Okaneら(2001, 2003)は外見上健全な植物から内生的に存在する *Phyllosticta* 属菌を分離し、その形態的特徴とrDNA ITS領域のデータからそれらは全て *P. capitalensis* と同定した。さらに、Pandyら(2003)はインドの熱帯果樹から内生菌として分離された *Phyllosticta* 属菌は全て

*P. capitalensis* であると報告した。しかし、宿主葉に斑点症状を示す *Phyllosticta* 属菌の分子系統解析については未だ研究されていない。狭義 *Phyllosticta* 属菌の種の定義を考えると、さらに多くの種を用いた研究が必要である。そこで、病斑を形成もしくは内生する日本産広義・狭義 *Phyllosticta* 属菌、およびこれと関連する分生子果不完全菌類の 18S rDNA 領域を用いてこれらの系統関係解明を試みた。さらに、狭義 *Phyllosticta* 属菌の 28S rDNA および ITS 領域を用い、種間・種内の分子系統関係を明らかにする事を目的として研究を行った (Motohashi et al. 2009)。

広義 *Phyllosticta* 属菌とそれに関連する菌類の系統関係

18S rDNA 領域の分子系統解析には、狭義 *Phyllosticta* 属菌 (テレオモルフ: *Guignardia* 属を含む)、広義 *Phyllosticta* 属菌に関連する *Phoma* 属, *Fusicoccum* 属 (テレオモルフ: *Botryosphaeria* 属を含む) および *Phomopsis* 属 (テレオモルフ; *Diaporthe* 属) を含む 91 のシークエンスデータを用いた。アウトグループには *Peziza echinophora* Donadini および *Phillipsia domingensis* Berk. のシークエンスデータを用いた。系統関係の推定には近隣結合法, 最大節約法および Bayesian 法を用いた。得られた 18S 領域の系統樹では 4 つの大きなグループに分

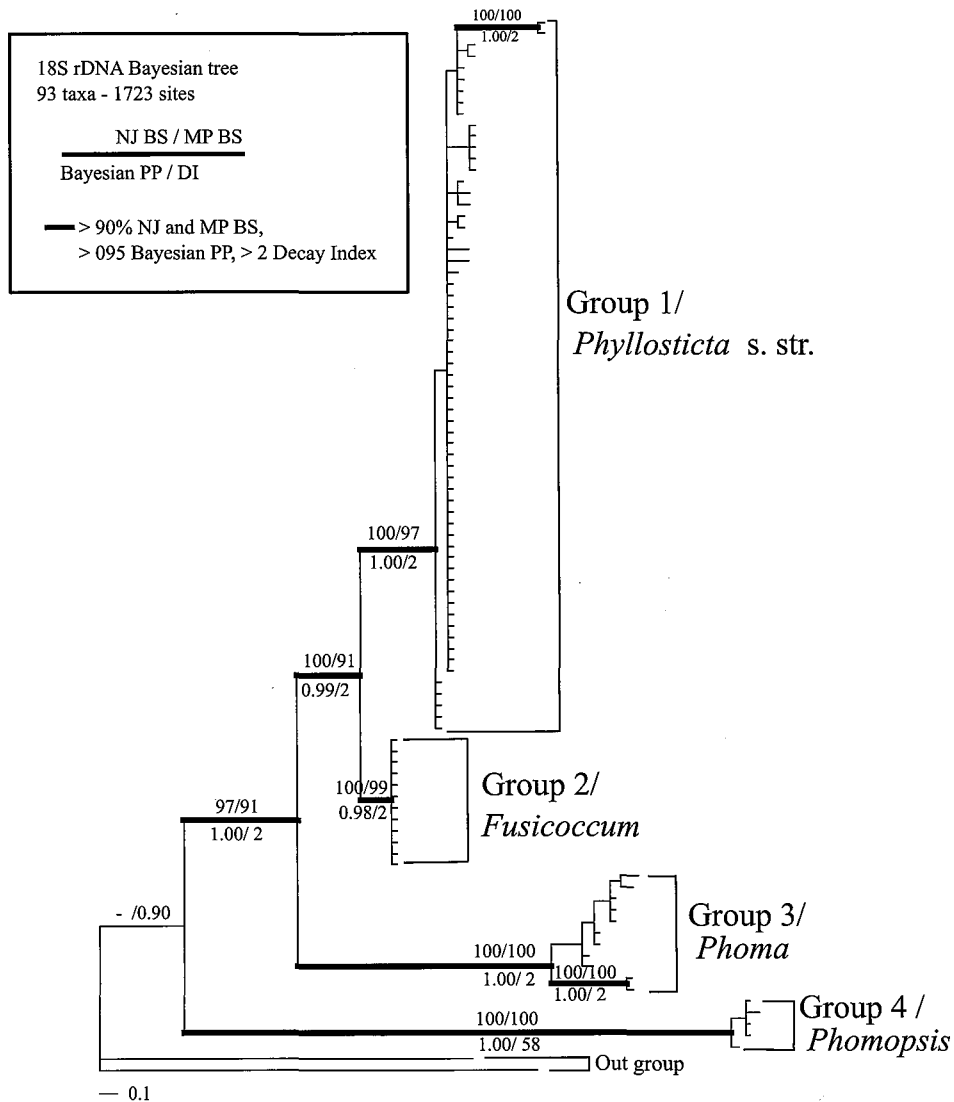


図 2. *Fusicoccum* 属, *Phoma* 属, *Phomopsis* 属および *Phyllosticta* 属の 18S rDNA 領域に基づいて推定された Bayesian 系統樹。枝の信頼値は各枝の上と下に示した。NJ BS: 近隣結合法ブートストラップ値, MP BS: 最大節約法ブートストラップ値, Bayesian PP: 事後確率値, DI: 崩壊指数。枝の信頼値が NJ もしくは MP BS にて >90, Bayesian PP にて >0.95 および DI にて >2 を満たす場合, 太線で示した。(Motohashi et al. 2009 を改変)

かれ、各枝の信頼度は強く支持された (図 2)。Group 1 は 59 の狭義 *Phyllosticta* 属とそのテレオモルフである *Guignardia* 属、および DNA データベースより得た *Guignardia* 属で構成された。また、Group 2 は *Fusicoccum* 属およびそのテレオモルフである *Botryosphaeria* 属から成り、Group 3 は *Phoma* 属および広義 *Phyllosticta* 属菌 (= *Phoma* spp.)、Group 4 は *Phomopsis* 属菌および

広義 *Phyllosticta* 属菌 (= *Phomopsis* spp.) で構成された。このように 18S rDNA 領域における系統解析では、アナモルフ世代の属がそれぞれ単系統群を形成することが明らかとなった。これらの結果から、狭義 *Phyllosticta* 属菌は単一の祖先から進化したタクサであることが示された。

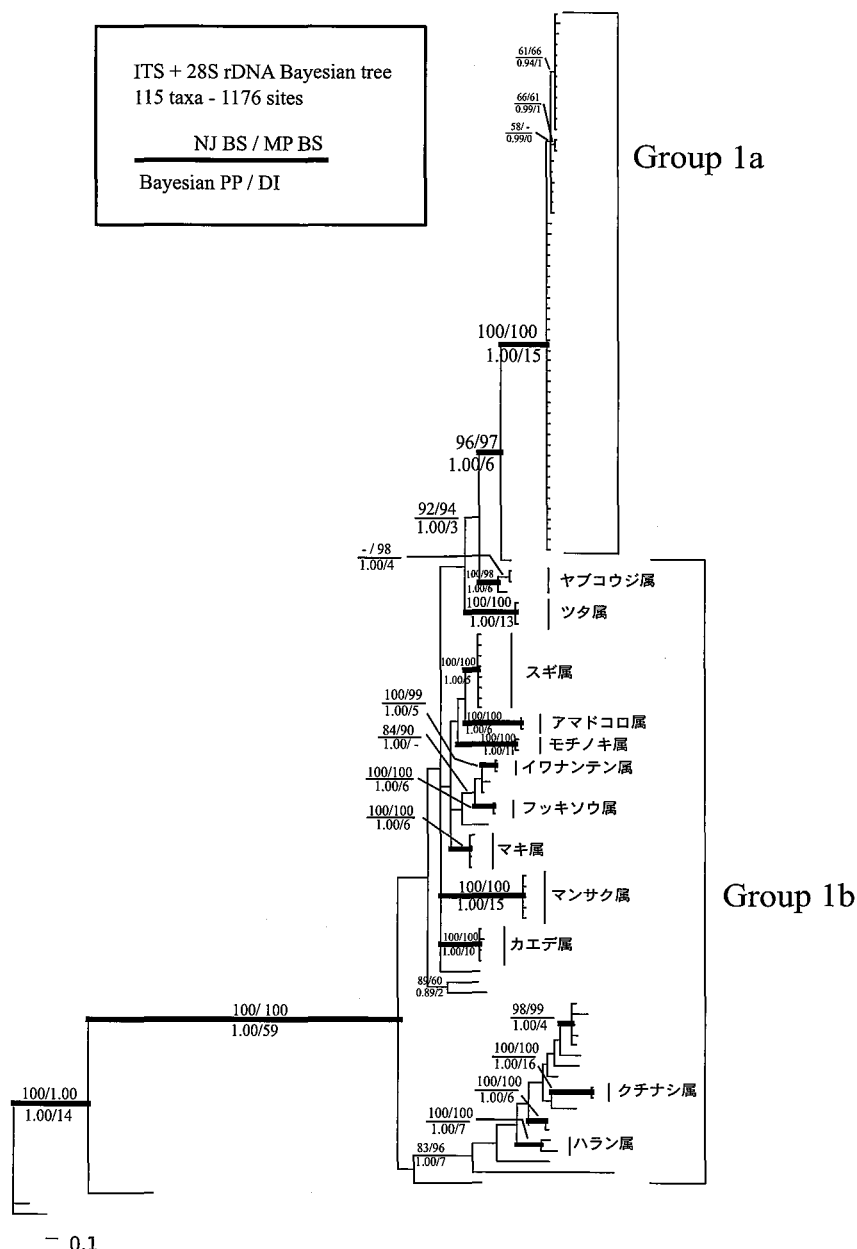


図 3. 狭義 *Phyllosticta* 属菌における ITS と 28S rDNA 領域の結合配列に基づいて推定された Bayesian 系統樹。枝の信頼値は各枝の上と下に示した。NJ BS: 近隣結合法ブートストラップ値, MP BS: 最大節約法ブートストラップ値, Bayesian PP: 事後確率値, DI: 崩壊指数。枝の信頼値が NJ もしくは MP BS にて >90, Bayesian PP にて >0.95 および DI にて >2 を満たす場合、太線で示した。(Motohashi et al. 2009 を改変)

日本産狭義 *Phyllosticta* 属菌における種間および種内の系統関係

ITS および 28S 領域の分子系統解析には 112 の狭義 *Phyllosticta* 属菌のシークエンスデータを用いた。アウトグループには 18S 領域における系統解析の結果から、*F. aesculi*, *B. laricina* および *G. cryptomeriae* (= *Botryosphaeria* sp.) を用いた。これら二つの領域のデータを結合し、近隣結合法、最大節約法および Bayesian 法による系統解析を行った結果、112 の狭義 *Phyllosticta* 属菌とそのテレオモルフ *Guignardia* 属菌は、2 つのグループに分かれた (図 3)。Group 1a は 33 科 45 属 47 種の宿主から分離された 52 の狭義 *Phyllosticta* 属菌と *Guignardia* 属から構成され強く支持された。Okane ら (2003) は、*G. endophyllicola* (= *G. mangiferae*) を厳密な宿主特異性を確立する前の原始的な種であろうと推測しているが、今回の結果では、多くの宿主から分離される *G. endophyllicola* がある程度宿主特異性の高い種から分化したと推測された (Motohashi et al. 2009)。一方 Group 1b は 23 科 29 属 35 種の宿主からなり、ほぼ宿主の属ごとにそれぞ

れ単系統を形成した。例えばツタ属の *P. ampelicida* やスギ属の *P. cryptomeriae*, アマドコロ属の *P. cruenta*, マキ属上の *Phyllosticta* sp. および *Guignardia* sp., マンサク属の *P. hamamelidis*, カエデ属の *P. minima* などは、それぞれ強く支持される単系統を形成し、それぞれ単独種であることが示唆された。この結果は van der Aa (1973) および van der Aa and Vanev (2002) による狭義 *Phyllosticta* 属菌の種の定義に一致する。すなわち、本属菌の寄生性は限定的であり、種はその宿主の病斑上に形成される菌体の形態的特徴や培養特性による違いによって類別されるとするものである。

カエデ属、トチノキ属、ハラノ属、アオキ属、スギ属、クチナシ属、イボタノキ属、モクレン属およびトベラ属を分離源とする *Phyllosticta* 属菌は、それぞれ同じ属の宿主から分離されたものであっても、グループ 1a および 1b の 2 つのグループに所属した。すなわち、同じ宿主植物から分離された *Phyllosticta* 属菌であっても、それぞれは別種である可能性がある。病斑上に形成された菌体を観察した結果、ハラノ属寄生種は分生子の大きさ

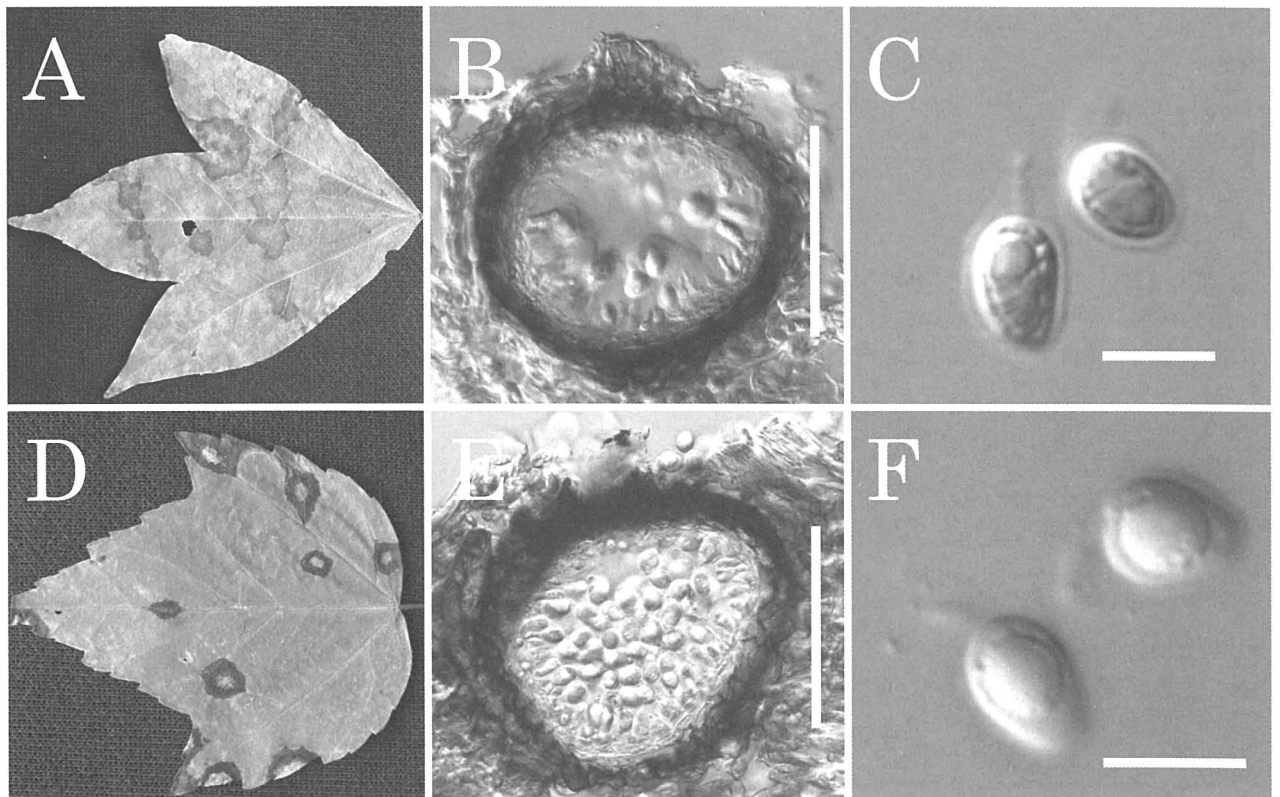


図 4. Group 1a または 1b に位置しカエデ属に寄生性 *Phyllosticta* 属菌の比較。A-C. Group 1a に所属菌のカエデ属に対する病徴および形態的特徴: A. 淡褐色から褐色で不整形から不明瞭な病斑を形成, B. 分生子殻の断面図および分生子, C. 分生子は頭頂部に付属糸をもち粘質層に覆われる。D-F. グループ 1b に所属菌のカエデ属に対する病徴および形態的特徴: D. 淡褐色から褐色で円形から楕円形の病斑を形成し、病斑部と健全部の境界は黒褐色となり明瞭, E. 分生子殻の断面図および分生子, F. 分生子は頭頂部に付属糸をもち粘質層に覆われる。Bars: B, E 100  $\mu$ m; C, F 10  $\mu$ m. (Motohashi et al. 2009 を改変)



に違いが見られた。一方カエデ属寄生種の分生子の形状、大きさおよび粘質層の厚みには違いがみられなかったが(図4 C, F), 各分離株は異なる生育速度を示し, Group 1a に所属菌では生育速度が早い傾向にあった。カエデ属植物上の病斑を観察した結果, Group 1b 所属菌による病斑は黒褐色で, かつ明瞭であったのに対して, Group 1a 所属菌による病斑では明瞭な斑点が観察されなかった(図4 A, D)。この病斑の違いは, 植物に侵入した *Phyllosticta* 属菌種の違いによるもので, その病原性の有無, 強弱に関連して違いが現れると想像される。同様に分生子等の形態では区別できないものの, 分子系統樹および病斑の違いによって区別が可能となる例は, トチノキ属寄生種間でもみられた。以上のほか培養上での黄色色素産生に注目し, 形態的類似菌を別種として分類する例も報告されているが(Baayen et al. 2002), 本研究では Group 1a および 1b の両方に色素を産生する分離菌株が所属したことから, 類似菌を識別する分類形質としての有用性には疑問が残る。今後はさらにサンプル数を増やし, 分類形質としての病斑の特徴や菌叢の生育速度等を評価する必要がある。

本研究の結果から, rDNA を用いた分子系統解析は *Phyllosticta* 属菌の種を再検討するために非常に有効であると考えた。しかしながら, *G. mangiferae* と同じ Group 1a に属するものの, van der Aa (1973) の基準に従えば宿主属の違いにより別種と考えられる分離菌株について, rDNA だけから独立種として扱うのは困難である。Group 1a 内の OTU を同種とせず, これまで通り宿主の属をもとに別種とする場合には, より進化速度の速い遺伝子領域の分子系統解析による細分化を試みるか, 形態的特徴や培養菌叢の違い, 病徴の違いなどをより詳細に解析し種分類を再検討するほか無い。従って, 今後 *Phyllosticta* 属菌の種のあり方について, これまで未検討の形態的特徴や培養特性, 分子系統解析も加味した種の定義の再構築が必要であろう。

#### おわりに

本研究は日本産 *Phyllosticta* 属菌の分類について多くの知見をもたらした。これまでわが国では広義・狭義によって記載された *Phyllosticta* 属菌が混在して正確な菌類相を把握することが困難であったが, 多くの標本と綿密な文献調査をもとに本属菌類相の把握に大きく貢献したと考える。さらに本研究では, これまで研究例の少なかった病原性 *Phyllosticta* 属菌の種間・種内の分子系統解析を行うとともに, 形態的特徴, 病徴および培養性状について総合的な考察を行うことにより, 新たな類別の

可能性を検討した。これらの研究は, 分子生物学的な植物病害診断手法の開発や, 本菌群の迅速で正確な種の同定手法の開発においても有用な情報となるであろう。本研究では, 特にアナモルフ時代である *Phyllosticta* 属菌について研究を行っており, テレオモルフ時代である *Guignardia* 属菌の種との関係を, やはり統合的な形質に基づいて検討し, 新たな分類体系を構築する必要があると考えている。また, 本研究で用いた多数の宿主から分離される内生菌は, 培地上でもテレオモルフの形成が容易に観察される場合が多かった。一方で, 宿主属ごとにクレードを形成する宿主特異的な種については, 培地上でテレオモルフがほとんど観察されない。ミカン属に寄生する 2 種についても同様の報告がされている(Baayen et al. 2002)。このように宿主特異的な種と多数の植物を宿主とする内生的な種がどのような進化のイベントを経由して分化してきたのか, 植物側の反応やテレオモルフ形成能の違いなど生態的な面からも検討して行きたい課題である。今後は本属菌の分類体系再構築を行う上で日本産のみならず, 世界各地で発生している *Phyllosticta* 属菌および *Guignardia* 属菌を用いて, 形態的特徴はもちろん病徴, 培養性質, 複数領域に基づく分子系統解析を加味し, 総合的に本属菌の分類を追求していきたい。

#### 謝 辞

本研究は三重大学大学院在学中に実施したものである。三重大学大学院にて一貫してご指導いただいた高松進教授, 中島千晴准教授に厚く御礼申し上げます。さらに小林享夫博士には多岐にわたりご指導, ご鞭撻をいただきました。また, 株式会社サカタのタネの西川盾士氏, アメリカ農務省の廣岡裕吏博士をはじめとする先輩, 後輩諸氏には多くの助言と励ましをいただきました。研究を遂行するにあたり標本採集の機会や貸出, 菌株提供や研究技術など多くのご助力をいただいた, 富山県立大学 佐藤幸生教授, 国立科学博物館 細矢 剛博士, (独) 森林総合研究所 河辺祐嗣氏, (独) 製品評価技術基盤機構 稲葉重樹博士, 岡根 泉博士, 第一三共株式会社 小野泰典博士, (独) 農業生物資源研究所 佐藤豊三博士, 東京都農林総合研究センター竹内 純博士, 東京農業大学 矢口行雄教授には心から感謝申し上げます。

#### 摘 要

*Phyllosticta* 属菌は植物に主に斑点や褐斑症状を呈する植物病原菌で, 世界でも多くの被害が報告されている。

本研究では、日本産 *Phyllosticta* 属菌 224 種を再検討したところ、既知種 20 種、日本新産種 7 種、他属からの転属種 3 種および未知種 16 種の計 46 種となり、他は狭義 *Phyllosticta* 属菌から除外されるべき種であることを明らかにした。*Phyllosticta* 属菌の系統解析を行ったところ 2 つのサブグループになった。一方は、主に無病徴植物から内生菌として様々な宿主域から分離されたグループであった。他方は明瞭な病斑を示し宿主属毎に単系統となるグループであった。また、内生菌グループは生育速度が早い傾向にあった。*Phyllosticta* 属菌における種の分類には分子系統関係、宿主、菌叢の生育、病徴およびこれまで未検討の分類形質について総合的に考察する必要がある。

### 引用文献

- Baayen RP, Bonants PJM, Verkley G, Carroll GC, van der Aa HA, de Weerd M, van Brouwershaven IR, Schutte GC, Maccheroni W, de Blanco CG, Azevedo JL (2002) Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology* 92: 464–477
- Bissett J (1979) Coelomycetes on Liliales, the genus *Phyllosticta*. *Can J Bot* 57: 2082–2095
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol* 55: 235–253
- 福井武治 (1936) 鑑賞植物病害調査報告 (2). 三重高農同窓会学術彙報 5: 53–60
- 福井武治 (1942) 有用植物病害調査報告. 三重博物 5: 14–19
- 原攝 祐 (1916) 桑の病害菌に就て. 大日本蚕糸会報 304: 387–391
- 原攝 祐 (1918) 稲の病害. 著者発行, 岐阜
- 原攝 祐 (1920) 静岡県病菌管見 (3). 静岡県農会報 277 特別付録: 9–12
- 原攝 祐 (1925) 静岡県に於ける蒟蒻. 静岡県農会, 静岡
- 原攝 祐 (1927) 実験樹木病害編. 養賢堂, 東京
- 原攝 祐 (1930a) 茶樹の病害. 日本菌類学会, 静岡, pp 72–80
- 原攝 祐 (1930b) 赤石山採集の寄生菌. 静岡県農会報 34 (10): 55–65
- 原攝 祐 (1931) 日本菌類志料菌類 (三). 1: 103–113
- 原攝 祐 (1938) 本邦柑橘類落葉病の害菌学的研究. 農及園 13: 2641–2650
- 原攝 祐 (1959) 稲の病害. 養賢堂, 東京
- 堀正太郎 (1913) 柑橘落葉性病害の予防法. 園芸の友 9: 626–631
- 香月繁孝 (1950) 屋久島産植物寄生菌調査報告. 九州農業研究 6: 51–52
- Katsuki S. (1950) Notes on some new or noteworthy fungi in Kyushu I. *Kyushu Agri Res* 7: 75–76
- 川村清一 (1913) 杉苗赤枯病の研究. 林試研報 10: 91–107
- Kobayashi T (1974) Notes on new or little-known fungi inhabiting woody plant in Japan VI. *Trans Mycol Soc Jpn* 15: 370–383
- Kobayashi T (1977) Fungi parasitic to woody plant in Yaku Island, south Kyusyu, Japan. *Bull Gov For Exp Stn Tokyo* 292: 1–25
- 小林享夫・千葉 修 (1961) ポプラ植物に寄生する本邦産菌類 (1). 林試研報 130: 1–43
- Kobayashi T, Okamoto T (2003) Notes on plant inhabiting fungi collected at Hahajima Islands. *J Agric Sci Tokyo Univ Agric* 48: 89–104
- Kobayashi T, Onuki M (1990) Notes on some new or noteworthy fungi parasitic to woody plant from the Yaeyama Islands, Kyushu, Japan. *Rept Tottori Mycol Inst* 28: 159–169
- Luttrell ES (1946) Black rot of muscadine grapes. *Phytopathology* 36: 905–924
- Luttrell ES (1948) Physiologic specialization in *Guignardia bidwellii*, cause of black rot of *Vitis* and *Parthenocissus* species. *Phytopathology* 38: 716–723
- Meyer L, Sanders GM, Jacobs R, Korsten L (2006) A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Dis* 90: 97–101
- 三浦密成 (1928) 満蒙植物誌Ⅲ, 隠花植物, 菌類. 南滿洲鐵道株式會社興業部農務課, 大連
- 三浦密成 (1957) 秋田農試保管病菌標本調査報告. 秋田農試報 8: 1–64
- 三浦密成 (1962) 秋田農試保管病菌標本調査報告, 補遺. 秋田農試報 13: 1–17
- 三宅市郎 (1909) 我邦に於ける稲の菌類の研究. 植物学雑誌 23: 127–145
- 三宅市郎・原攝祐 (1910) 我国に於ける竹類の菌類の研究. 植物学雑誌 24: 351–360

- Motohashi K, Nishikawa J, Akiba M, Nakashima C (2008a) Studies on the Japanese species belonging to the genus *Phyllosticta* (1). *Mycoscience* 49: 11 – 18
- Motohashi K, Araki I, Nakashima C (2008b) Four new species of *Phyllosticta*, one new species of *Pseudocercospora* and other collected in Japan. *Mycoscience* 49: 138 – 146
- Motohashi K, Inaba S, Anzai K, Takamatsu A, Nakashima C (2009) Phylogenetic analyses of Japanese species of *Phyllosticta* sensu stricto. *Mycoscience* 50: 291 – 302
- Motohashi K, Kobayashi T, Furukawa T, Ono Y (2010) Notes on some plant-inhabiting fungi collected from the Nansei Islands (2). *Mycoscience* 51: 93 – 97
- Naito N (1940) Notes on some new or noteworthy fungi of Japan. *Mem Coll Agric Kyoto Imp Univ* 47: 45 – 52
- Naito T (1952) The mycoflora of southern Kiusiu IV. *Sci Rept Kagoshima Univ* 1: 71 – 81
- Okane I, Nakagiri A, Ito T (2001) Identity of *Guignardia* sp. inhabiting ericaceous plants. *Can J Bot* 79: 101 – 109
- Okane I, Lumyong S, Nakagiri A, Ito T (2003) Extensive host range of an endophytic fungus *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). *Mycoscience* 44: 353 – 363
- Pandey AK, Reddy MS, Suryanarayanan TS (2003) ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. *Mycol Res* 107: 439 – 444
- Peres NA, Harakava R, Carroll GC, Adaskaveg JE, Timmer LW (2007) Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Dis* 91: 525 – 531
- Petrini O (1986) Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema NJ, Heuvel JVD (eds) *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press, New York, pp 175 – 187
- Petrini LE, Petrini O, Leuchtman A, Carroll GC (1991) Conifer inhabiting species of *Phyllosticta*. *Sydowia* 43: 148 – 169
- Reusser FA (1964) Über einige Arten der Gattung *Guignardia* Viala et Ravaz. *Phytopathol Z* 51: 205 – 240
- Saccardo PA (1878) *Fungi Veneti novi vel critici*, series 7. *Michelia* 1: 133 – 221
- Saccardo PA (1884) *Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum*, vol 3. Patavii, Italy (Lithoprinted by Edwards brothers INC, Michigan 1994)
- 澤田兼吉 (1916) 臺灣菌類資料 10. 臺灣博物 26: 74 – 180
- 澤田兼吉 (1918) 臺灣菌類資料 16. 臺灣博物 35: 47 – 54
- 澤田兼吉 (1943) 台湾菌類調査報告 Ⅷ. 臺灣農試報 85: 1 – 130
- 澤田兼吉 (1950a) 東北地方に於ける針葉樹の菌類 (I), スギの菌類. 林試報 45: 27 – 53
- 澤田兼吉 (1950b) 東北地方に於ける針葉樹の菌類 (II), スギ以外の針葉樹の菌類. 林試報 46: 111 – 150
- 澤田兼吉 (1958) 東北地方菌類調査報告 (IV), 不完全菌類. 林試報 105: 35 – 140
- Sawada K (1959) Descriptive catalogue of Formosan fungi XI. *Coll Agric Nat Taiwan Univ* 8: 1 – 268
- Stewart VB (1916) The leaf blotch disease of horse-chestnut. *Phytopathology* 6: 5 – 19
- 瀧元清秀 (1930) 微生物及植物病理学実験法. 養賢堂, 東京
- Togashi, K (1936a) A contribution to the parasitic-fungus flora of Mt. Iwate, Iwate Prefecture. *Bull Imp Agri For Morioka* 22: 1 – 61
- Togashi, K (1936b) New species of parasitic fungi I. *Trans Sapporo Nat Hist Soc* 14: 280 – 285
- 鶴田章逸 (1915) 栲の斑紋病. 病虫雑 2: 1041 – 1042
- van der Aa HA (1973) Studies in *Phyllosticta* I. *Stud Mycol* 5: 1 – 110
- van der Aa HA, Vanev SG (2002) A revision of the species described in *Phyllosticta*. *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht*
- van der Aa HA, Noordeloos ME, de Gruyter J (1990) Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Stud Mycol* 32: 3 – 19