

# 国内産 *Pestalotiopsis* 属菌の系統分類と拮抗性微生物としての可能性

渡辺 京子

玉川大学農学部 生物資源学科

[〒194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1]

## Phylogenetic analyses of the genus *Pestalotiopsis* in Japan and screening of its isolates for antagonistic activity

Kyoko WATANABE

College of Agriculture, Tamagawa University

### 1. 目的

*Pestalotiopsis* 属菌には、植物に対して病原性の強い菌株、弱い菌株、さらには他の植物病原菌に対する拮抗性微生物として有望な菌株がある。また、有効な代謝産物を生産するなどの報告もある (Strobel et al. 1996)。しかし、本属の種の分類法は客観性に欠き同定が難しいため、菌株ごとの生態的特徴などを考えることはできるものの、有用な菌種とそうでないものを分けるなど、本属について系統立てて考えることができない。

現在行われている分類は、分生子の大きさと頂部・尾部付属糸の数に加え、分生子を構成する 5 細胞のうちの中央 3 細胞の色調が基準となっている。また、*Pestalotia* 属菌に残されたままの種を加えると本属ではこれまで 200 種以上の学名が提案されたことも (Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>)、同定をさらに困難にしている。Jeewon ら (2003) は ITS1,2-5.8S rRNA 領域を指標に本属の種を 3 グループに分けたが、彼らは種の再定義を行っていない。そこで、本研究は本属菌を野外から探索収集すること、ITS1,2-5.8S rRNA 領域に加えて、子嚢菌類の分類に有効とされる *EF1a* 遺伝子領域を指標にした系統関係から、農業生物資源 (NIAS) ジーンバンク保存菌株の表示学名を再検討することを目的とした。

また、本属は拮抗菌として茶などで利用されつつあるだけでなく (秋田 2007)、*P. neglecta* が他の子嚢菌の分生子発芽を抑制することから (Watanabe et al. 2000)、本属の種が広く拮抗性微生物としての役割をもつ可能性がある。本研究では炭疽病菌などを対象に対峙培養を行い、分離菌株の拮抗性としての可能性についても検討した。

## 2. 探索概要と収集成果

2008年9月19日、20日、10月11日、26日の4回にわたり、淡褐色の斑点上に小黒点を有する罹病葉を収集した(図1)。その結果、町田市において採集したユリ、アセビ、シャクナゲから、定法に従い分離を行い、それぞれから *Pestalotiopsis* 属菌を得た。これらの単孢子分離菌株は、MAFF 241683 (*P. adusta*)、MAFF 241681 (*P. disseminata*)、MAFF 241682 (*P. neglecta*) として登録した。

表 1. 探索・収集日程

年月日	行程	行動内容
H20. 9.19	町田市→仙台市 (図1—①)	移動と探索
H20. 9.20	仙台市→水戸市 (図1—②)	移動と探索
H20. 10.11	町田市 (図1—③)	探索
H20. 10.26	町田市→三島市 (図1—④)	移動と探索

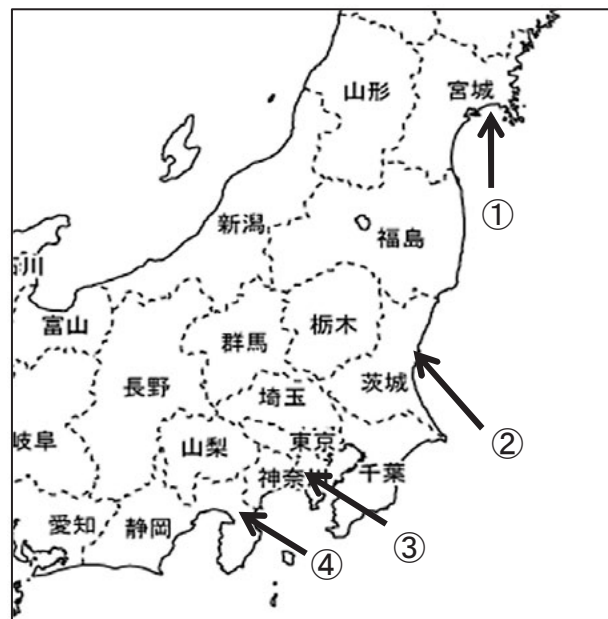


図 1. 探索場所 (①: 仙台市, ②: 水戸市, ③: 町田市, ④: 三島市)

## 3. 系統解析

### 1) 供試菌株

ITS1,2-5.8S rRNA 領域の系統解析には 40 菌株, *EF1a* 遺伝子領域を指標とした解析には 37 菌株を用いた。また、それぞれの外群として *Seiridium* sp. (MAFF 238468) を用いた(表 2)。

表 2. 分子系統解析ならびに拮抗菌スクリーニングに用いた NIAS ジーンバンク保存菌株

MAFF 番号	種 名	ITS1,2- 5.8S rDNA	<i>EF1a</i>	拮抗性 スクリーニング
237028	<i>P. crassiuscula</i> 1 <sup>1)</sup>	○ <sup>2)</sup>	○	— <sup>3)</sup>
237036	<i>P. ixorae</i>	○	○	—
237039	<i>P. aletridis</i> 1	○	○	○
237119	<i>P. lespedezae</i>	○	○	○
237190	<i>P. fici</i>	○	—	—
237210	<i>P. longiseta</i> 1	○	○	—
237611	<i>P. gracilis</i> 1	○	○	—
237672	<i>P. populi-nigrae</i>	○	○	○
237676	<i>P. glandicola</i> 1	○	○	—
237738	<i>P. disseminata</i> 1	—	○	—
237739	<i>P. disseminata</i> 2	○	○	—
237764	<i>P. olivacea</i>	○	○	—
237901	<i>P. crassiuscula</i> 2	○	○	—
237930	<i>P. paeoniae</i>	—	○	—
237931	<i>P. neglecta</i> 1	○	○	—
237935	<i>P. calabae</i>	○	○	○
237936	<i>P. cephalotaxi</i>	○	○	—
237965	<i>P. sydowiana</i>	○	○	—
238089	<i>P. foedans</i> 1	○	○	○
238273	<i>P. maculans</i> 1	○	—	—
238274	<i>P. maculans</i> 2	○	○	—
238344	<i>P. eriobotrifolia</i>	○	○	—
238347	<i>P. disseminata</i> 3	○	○	—
238353	<i>P. japonica</i>	—	○	—
238357	<i>P. foedans</i> 2	—	○	—
238360	<i>P. longiseta</i> 2	—	○	—
238363	<i>P. maculans</i> 3	○	○	—
238514 *	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	○	—	○
238515	<i>P. theae</i> 1	○	○	○
238685	<i>P. foedans</i> 3	○	—	—
238803	<i>P. palmarum</i>	○	—	○
239091	<i>P. aletridis</i> 2	—	○	○
239193	<i>P. oleandri</i>	○	○	—
239387	<i>P. glandicola</i> 2	○	○	○
239388	<i>P. neglecta</i> 1	—	—	○
239390	<i>P. eugeniae</i>	—	○	—
239394	<i>P. foedans</i>	—	—	○

表 2. (つづき)

MAFF 番号	種 名	ITS1,2- 5.8S rDNA	<i>EF1a</i>	拮抗性 スクリーニング
239520	<i>P. adusta</i>	○	○	—
239521	<i>P. conspicua</i>	—	—	○
239526	<i>P. neglecta</i> 2	○	○	—
240469	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	○	○	○
240470	<i>P. gracilis</i> 2	○	—	—
240479	<i>P. podocarpi</i>	○	○	○
240487	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 3	○	—	○
240500	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 4	○	—	—
240511	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 5	○	—	○
240993	<i>P. pallidothaeae</i>	○	—	—
241730	<i>P. palustris</i>	—	—	○
752002 <sup>*</sup>	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 6	○	○	○
752008	<i>P. longiseta</i> 3	○	○	—
752011	<i>P. theae</i> 2	○	○	○
752018	<i>P. longiseta</i>	—	—	○
238468 <sup>**</sup>	<i>Seiridium</i> sp.	○	○	—

\*: *P. theae* から *Pestalotiopsis* sp. に変更した. \*\*: 外群

<sup>1)</sup> 図 2 における菌株表記のための番号を付した, <sup>2)</sup> ○; 解析・評価済み, <sup>3)</sup> —; 未解析・未評価

## 2) ITS1,2-5.8S rRNA 領域と *EF1a* 遺伝子領域による系統樹作成

ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) 培地で培養した菌叢から DNA を抽出した. ITS1,2-5.8S rRNA 領域の増幅には, 菌類のユニバーサルプライマー ITS 5, 4 を使用し, *EF1a* 遺伝子領域の増幅には, EF1F と EF1R または EF1thR を使用した. PCR によって得られた産物は, ABI 310 シークエンサーによって塩基配列を決定し, ITS1,2-5.8S rRNA 領域の解析には 531bp を, *EF1a* には 521bp を用いた. Clustal W を用いてこれらのアライメントを行い, PAUP の近隣結合法 (HKY85 モデル) にて系統解析を行い, 系統樹を得た (図 2). これら系統樹は, ブートストラップ解析によりその確からしさを確認した. その結果, 両解析とも高いブートストラップ値で 3 つのクレードが支持され, それぞれを構成する菌株は類似していた. ITS1,2-5.8S rRNA 領域の系統樹から *P. theae* として登録されていた MAFF 238514 (図 2 の *Pestalotiopsis* sp.1) と玉川大学にて保存されていた TAP 99M110 (MAFF 240993, 図 2 の *P. pallidothaeae*) は, *P. theae* とは全く異なるクレードに属した. また, *P. theae* として保存されていた MAFF 752002 (図 2 の *Pestalotiopsis* sp.6) が ITS1,2-5.8S rRNA 領域と *EF1a* 遺伝子領域の両解析で, 他の *P. theae* とは異なるクレードに属した. 本研究によりこれらを再同定する必要があることを示した.

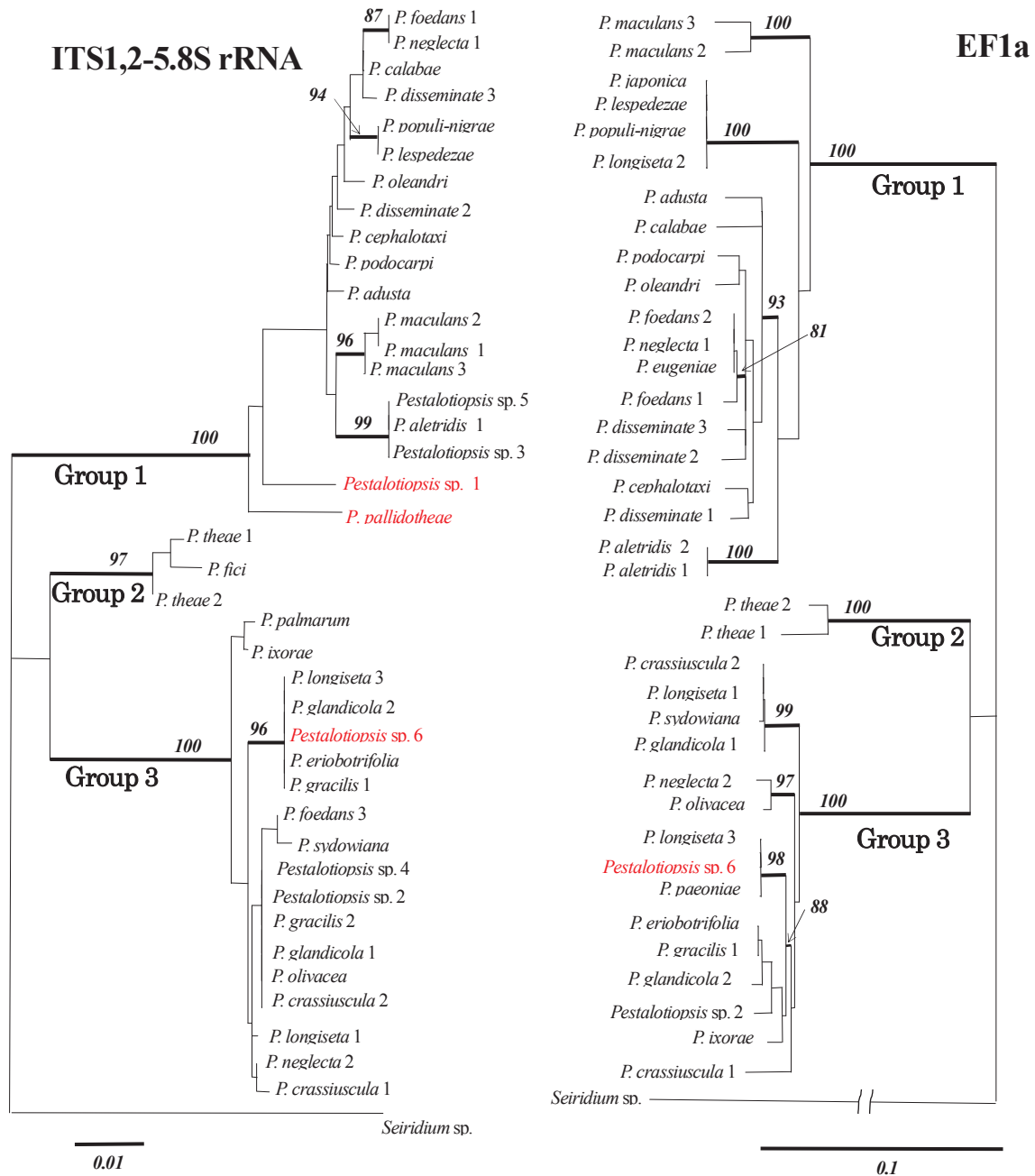


図2. ITS 1,2-5.8S rRNA 領域 (左) と EF1 $\alpha$  (右) を指標とした近隣結合系統樹

### 3) 形態の再検討と同定

本研究で得られた系統樹から、明らかに予想と異なるクレードに属した上述の菌株の形態を再検討した。菌株を PDA 培地上と寒天-葉片法 (岸 1994) に従い素寒天上のアジサイ葉に接種して約 1 ヶ月後に分生子を得た。この分生子の形態ならびに色調などを光学顕微鏡で観察し, Guba (1961) および Sutton (1980) の記載と比較し, 再同定を行った。その結果, これらの菌株は主に付属糸の長さには差があるだけでなく, 有色 3 細胞の色が薄く *P. theae* とは異なっていた (図 3)。また, 形態的特徴から MAFF 240993 は新種であったため *P. pallidotheae* Kyoko Watan. & Yas. Ono と命名

した (Watanabe et al. 2009). また, 付属糸が膨らんでいるものの, 有色3細胞の色が薄く, 形態的には *P. kunmingensis* (Wei and Xu 2004) の記載 と類似していることから, MAFF 238514 を日本新産種と判断したが, 更なる比較検討が必要なため暫定的に未同定種として *Pestalotiopsis* sp. と再表示した. 一方, MAFF 752002 は分生子の形態を確認できなかったため, ここでは *Pestalotiopsis* sp. と表示しなおした.

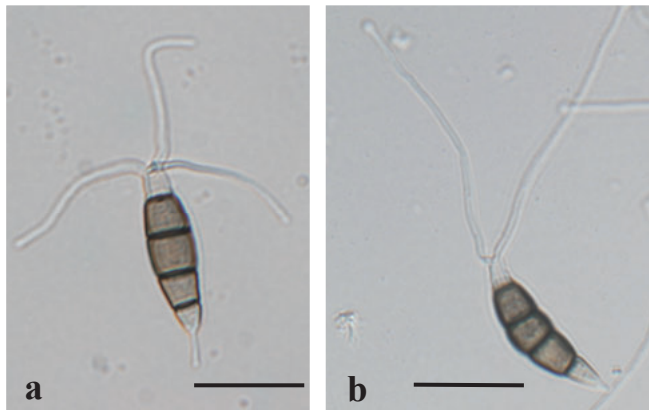


図3. 再同定された MAFF 238514 (a) および MAFF 752002 (b) の分生子  
Bar = 20  $\mu$ m

#### 4. 拮抗微生物としての可能性 (スクリーニング)

##### 1) 供試菌株

玉川大学の保存菌株であるトマト炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (TAP 06K001) と表1の *Pestalotiopsis* 属菌 21 菌株を組み合わせ対峙培養を行った.

##### 2) 対峙培養

直径 9cm の PDA 平板培地上 25°C で予め 1 週間程度供試菌株を培養し, その菌叢を直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜き新たな平板培地に置床した. 対照区ではシャーレあたり 1 菌株を 1 箇

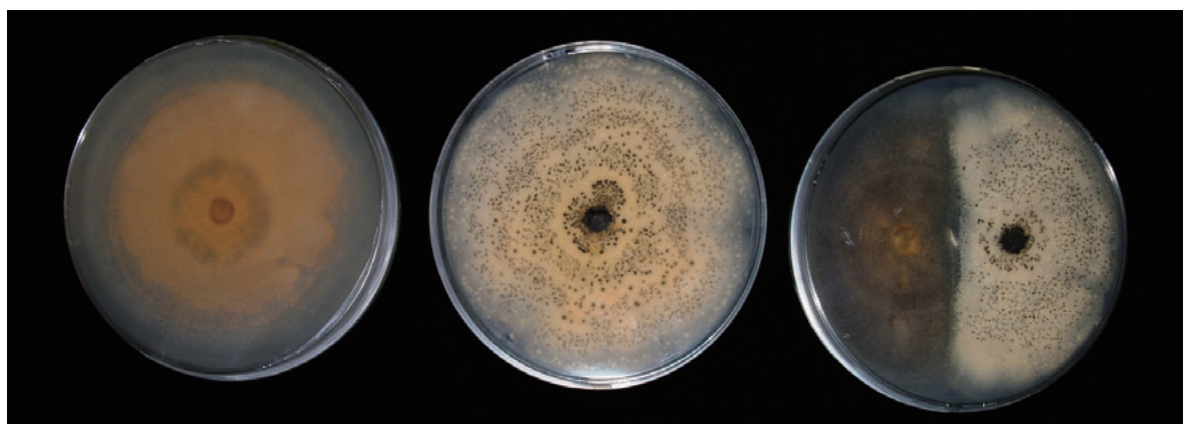


図4. 対峙培養の結果 (25°C 8日間培養)

左: *C. gloeosporioides* (TAP 06K001) コントロール, 中央: *P. palustris* (MAFF 241730) コントロール, 右: *C. gloeosporioides* と *P. palustris* との対峙培養

所に、対峙培養処理区としては1枚のシャーレに *C. gloeosporioides* と *Pestalotiopsis* 属菌の各菌株を約 2.5 cm 離して1箇所ずつ置床した。いずれも 25°C, 暗所で培養し, 8日後まで毎日観察を行った(図4)。

### 3) 結果

供試した菌株はいずれも炭疽病菌 *C. gloeosporioides* と培地上で交わることなく, 生育域の占有という意味では拮抗微生物としての効果が期待できた。菌叢が離れ, 拮抗帯が明瞭に現れた菌株, MAFF 237672, 237682, 238514, 237518, 752098 には忌避物質の関与が示唆された。これについては, 現在も実験を継続している。

## 5. 所感

本研究では ITS1,2-ITS5.8S rRNA 領域と *EF1 $\alpha$*  領域の系統解析から NIAS ジーンバンク保存菌株の表示学名の再検討を行ったところ, 供試菌株のうち, *P. theae* と同定されていた3菌株 MAFF 238514, 752002, 240993 が他の *P. theae* 菌株とは異なるクレードに属しかつ形態的にも異なることがわかった。MAFF 238514 と玉川大学保存菌株 TAP 99M110 (MAFF 240993) が誤同定されていた原因は, 両菌ともに日本で報告されておらず, 形態による同定の際に一番初めに指標とする分生子の中央有色3細胞の色を見誤ったことによる。この形質の判定は経験により左右されやすく, 本属菌の形態による種同定の際には問題となることが本研究により指摘できる。しかし, この問題は ITS1,2-5.8S rRNA 領域と *EF1 $\alpha$*  領域のいずれの遺伝子を指標とした分子系統解析では容易に解消できたため, 本研究から種同定・識別における分子系統解析の有効性が再確認された。一方, 同じクレード内にありながらも異なるサブクレード<sup>\*)</sup>に属する種については, 明らかな誤同定とする根拠をここで提示することはできなかった。この原因として, 種同定の基準となる標本がないことが挙げられ, 今後本属の種の整理には, 同定基準標本の探索・整備の必要性が示唆された。

トマト炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) を対象とした拮抗菌のスクリーニングでは, 明瞭な拮抗帯を形成した菌が21菌株中5菌株あり, これらの菌株は多犯性炭疽病菌 *C. gloeosporioides* に対して拮抗微生物である可能性が示された。現在, 生物防除剤の実用化に向けて研究を行っている。

## 6. 参考文献

- 1) 秋田滋 (2007) 茶樹から分離したチャ輪斑病菌近縁種のチャ輪斑病に対する抑制効果。日植病報 73 : 32.
- 2) Guba, E.F. (1961) Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- 3) Jeewon, R., Liew, E.C.Y., Simpson, J.A., Hodgkiss, I.J., Hyde, K.D. (2003) Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. Mol Phylogenet Evol 27: 372-383.
- 4) 岸國平 (1994) 寒天-葉片法による柄子殻及び分生子の形成。日植病報。 60 : 345.
- 5) Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S., Hess, W.M. (1996) Taxol from

- Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology 142: 435-440.
- 6) Sutton, B.C. (1980) *Pestalotiopsis*. In: The Coelomycetes. Fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, pp. 263-265.
- 7) Watanabe, K., Motohashi, K., Ono, Y. (2009) Description of *Pestalotiopsis pallidothae*; a new species from Japan. Mycoscience 50: (in press)
- 8) Watanabe, K., Parbery, D., Kobayashi, T., Doi, Y. (2000) Adaptations of potential ecological significance to *Pestalotiopsis neglecta*. Mycol. Res. 104: 686-690.
- 9) Wei, J.G., Xu, T. (2004) *Pestalotiopsis kunmingensis* sp. nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. Fungal Divers. 15: 247-254.

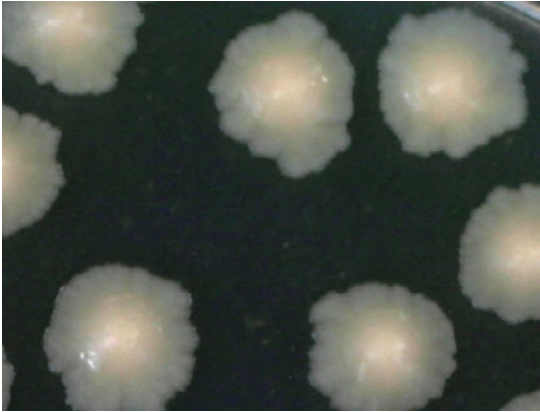
### Summary

Sequences of ITS1–5.8S rRNA (40 strains) and of *EF1 $\alpha$*  gene (37 strains) obtained from fungal strains in the NIAS Genebank collection were analyzed using the Neighbor-joining method for preparing phylogenetic trees. Tree topologies based on these two regions were very similar to each other, differing slightly only at the terminal branches. The strains were divided into three main clades, which were supported by high bootstrap values and associated with characteristic conidial morphology based on microscopic observation. One group had pale median cells, while the others were dark. Among the dark group, one had knobbed apical appendages, while the other did not have knobbed tips. Among all the strains, three of them MAFF 238514, 752002, and 240993 (preserved as TAP 99M110 at Tamagawa University), which had identified *Pestalotiopsis theae*, were clustered in different clade other than *P. theae*. Conidial morphology of MAFF 238514 and 240993, and typical *P. theae* differ in the color of the three median cells. MAFF 240993 was re-identified *P. pallidothae* as a new species and MAFF 238514 might be regarded as new to Japan

In the screening of candidate strains as bio-control agents against *Colletotrichum gloeosporioides*, all 21 stains tested showed competitive ability, and five strains (MAFF 237672, 237682, 238514, 237518 and 752098) made clearly-recognized inhibition zones.



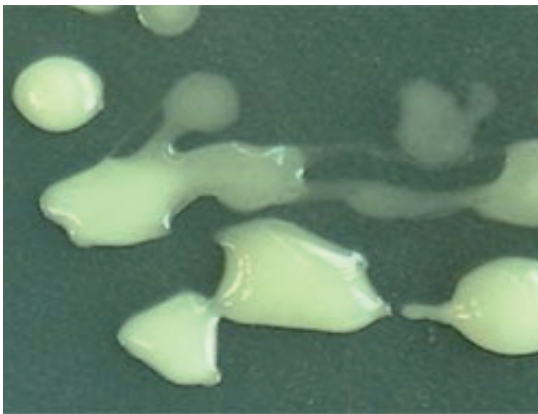
## 微生物遺伝資源の調査プロフィール



タイモ立枯細菌病菌 (*Erwinia chrysanthemi*) のコロニー (土屋)



落葉漂白菌類を採集した沖縄本島の亜熱帯常緑広葉樹林 (大園)



左: *Ralstonia solanacearum* OE1-1 株の PS 培地上でのコロニー  
右: 植物育成室における接種試験 (曳地)



*Pestalotiopsis adusta* が分離されたユリの斑点症状 (渡辺)