

不完全さび菌 *Uredo iyoensis* の系統位置の推定と夏胞子の二形性についての検討

山下 祐紀子 (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

さび菌は菌界の担子菌門のうちサビキン亜門に分類され、維管束植物上で生体栄養性の寄生生活を行う菌類である。種数は7000種以上が知られており、最大5つの孢子世代を生活環の中で形成する。だが、中には生活環の一部しか確認されていない種や、無性世代で生活環を全うする種も存在し、それらは不完全さび菌とよばれている。最近の分子系統解析の手法の発展により、不完全さび菌についても分子情報を利用した生活環の解明および分子系統学的位置の推定の必要性が求められている。

不完全さび菌の一種である *Uredo iyoensis* は、スミレ属の植物に寄生しているが、その生活環は夏孢子世代しか発見されておらず、その系統的位置は明らかになっていない。また孢子が二形性であることが知られているが、発芽試験や接種実験は現在成功例がなく、その同根性は明らかになっていない。

本研究では、*U. iyoensis* の系統位置の推定を行い、夏胞子の二形性について分類学的検討を行うことを目的とし、形態観察によって識別した標本サンプルから得られた DNA 塩基配列に基づく系統解析を行うとともに、夏胞子の発芽試験、接種実験を試みた。

材料と方法

分子系統解析供試標本 (*U. iyoensis* と同定されたもの) : 筑波大学寄生菌学研究室標本庫 (TSH) 所蔵標本 10 点; 茨城大学教育学部菌学標本庫 (IBA) 所蔵標本 24 点; YT0925 (筑波大学川上演習林で採集); YT1030 (筑波山で採集)

接種試験供試菌: YT0925 が由来するタチツボスミレ上に形成された夏孢子

接種試験供試植物: タチツボスミレ (筑波山で採集)

発芽試験: 2 枚のシャーレに濾紙を敷き蒸留水で湿らせ、直径および高さが 15mm のガラスリングを各 2 個ずつ置いた。カバーガラスに蒸留水を滴下し、そこにタチツボスミレから掻き取った夏胞子を散布し、その面を下に向けて各ガラスリング上に置いた。それらを 15°C と 23°C の室内に別々に置き、2 日ごとに光学顕微鏡で胞子の発芽の有無を 2 週間観察した。それを 2 反復行った。

接種実験: 5mm 角に切った濾紙を蒸留水で濡らし、上記と同様の夏胞子を散布し、無病徴のタチツボスミレ 2 株の葉の両面に貼り付けた。蒸留水を十分に噴霧したポリバケツの中に接種したタチツボスミレを入れ、23°C の室内に 2 日間置き、その後生育チャンパーに移し観察を行った。被接種植物個体数は 2 株である。夏孢子無散布の濾紙を接種したものをコントロールとした。

形態観察: 夏胞子の形態観察・形態測定のために各標本の一孢子堆から掻き取った胞子のプレパラートを作製し、また、夏胞子堆の側糸の有無を観察するため孢子堆切片のプレパラートを作製し、光学顕微鏡で観察した。

分子系統解析: 供試標本上の一孢子堆由来の夏胞子 (形態タイプを識別済み; 図 1 参照) から DNA を抽出し、28S D1/D2 rDNA 領域の塩基配列を決定し、近隣接合法 (NJ 法) による解析を行った。解析には Aime(2006)、Maier et al(2003)、Maier et al(2007) の既知種の登録配列データを加えて行った。

結果と考察

発芽試験および接種試験: 微突起 (mucronate, M タイプ; 図 1) と判別された新鮮な夏胞子を用いた発芽試験の結果、2 週間の継続観察においても発芽は認められなかった。また、接種実験 (1 反復のみ) では 2 週間以上経過しても夏胞子堆の出現は認められなかった。本菌の夏胞子の発芽試験はこれまでも試みられているが発芽は観察されていない。これらの形態の異なる夏胞子の機能解明のためにも、今後は発芽誘導の条件検討が必要である。

形態観察: 供試標本 36 点中、32 点で楕円形 (elliptic, E タイプ)、4 標本において M タイプの夏胞子が観察された (図 1)。胞子の大きさは Ono (1980) による記載の範囲内であり、また、いずれの標本においても孢子堆中に側糸は観察されず、*U. iyoensis* の形態的特徴と有意な差異は認められなかった。

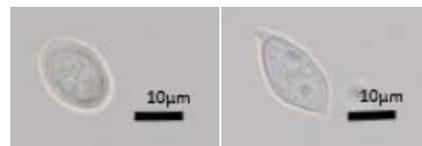


図 1 *U. iyoensis* の形の異なる 2 タイプの夏胞子: elliptic(左 IBA8445)と mucronate(右 YT0925)

分子系統解析: *U. iyoensis* と同定された標本由来の配列データは大きく 2 つの系統群に分かれた。多くのデータを含む系統群 (図 2A) は、*Puccinia* や *Uromyces* 属菌等と姉妹群を形成し、系統的に *Pucciniaceae* に所属するさび菌であると推定された。この系統群は E タイプおよび M タイプの胞子由来する配列データが入れ子状となった。他方の系統群 (図 2B) は *U. alpestris* の登録配列データ (AF426212) を包含し、*Pragmidium*, *Kuehneola* 属菌と姉妹群を形成した。この系統群においても E タイプおよび M タイプの胞子由来する配列データが入れ子状となった。

以上の結果から、*U. iyoensis* は *Pucciniaceae* に所属するさび菌であり、本種における夏胞子の二形性は同種内における変異であると示唆された。また、形態的特徴が類似し宿主も共通する *U. alpestris* が *U. iyoensis* と系統的に大きく異なる種であることが示唆され、両種の形態および分子系統学的な精査が必要である。

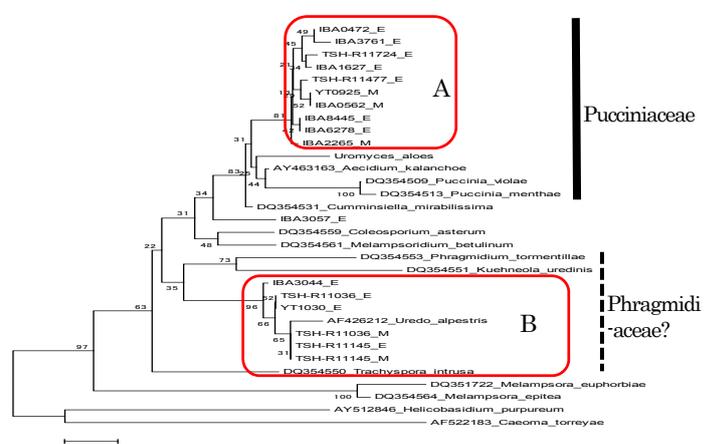


図 2 NJ 法による系統樹。E は elliptic タイプ、M は mucronate タイプの胞子由来であることを示す。数値はブートストラップ値を示す。なお、本系統樹では選ばれた 17 標本のデータおよび DNA バンクからの取得データを示した