

|             |   |        |         |
|-------------|---|--------|---------|
| 氏 名（本籍）     | うず はし し ほ み<br>埋 橋 志穂美（長 野 県）   |        |         |
| 学 位 の 種 類   | 博 士（農 学）  |        |         |
| 学 位 記 番 号   | 博 甲 第 5002 号  |        |         |
| 学位授与年月日     | 平成 21 年 3 月 25 日  |        |         |
| 学位授与の要件     | 学位規則第 4 条第 1 項該当  |        |         |
| 審 査 研 究 科   | 生命環境科学研究科   |        |         |
| 学 位 論 文 題 目 | <b>Phylogeny and Taxonomy of the Genus <i>Pythium</i></b><br>( <i>Pythium</i> 属菌の系統と分類に関する研究) |        |         |
| 主 査         | 筑波大学教授  | 農学博士   | 柿 寫 眞   |
| 副 査         | 筑波大学教授（連携大学院）   | 農学博士   | 石 井 英 夫 |
| 副 査         | 筑波大学准教授   | 農学博士   | 山 岡 裕 一 |
| 副 査         | 筑波大学教授  | 理学博士   | 徳 増 征 二 |
| 副 査         | 大阪府立大学准教授   | 博士（農学） | 東 條 元 昭 |

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

*Pythium* 属菌は、世界各地の様々な土壌や水域環境に広く分布し、現在世界で 130 種以上、日本では約 50 種が報告されている。これまで本属菌は、農作物などに病原性を有する種を中心に研究が行われており、その病原性や生態などの多くの知見が得られている。しかし本属菌には蚊の幼虫や哺乳類へ寄生する種も知られ、また、非耕地土壌には未知種を含む多数の本属菌の存在も示唆されており、生態的に多様な生物群であると考えられる。本属は遊走子が球のう内で分化する特徴により近縁属とは形態的に区別される。しかし本属内には胞子のうの形状において糸状と球状の明らかに異なる 2 つのタイプや、造卵器壁の突起の有無などが知られ、その形態的特徴は変異に富んでおり、異なる複数の分類群を含んでいることが示唆されている。また、過去の分子系統解析でも本属は近縁属とは明らかに異なる系統群であることが示されているものの、本属は複数の単系統群からなる多系統群であることも示されている。このように本属は生態的、形態的また系統学的に多様な生物群の集団であることが示唆されており、分類学的再検討が必要であると考えられる。そこで本研究では各地土壌から本属菌の分離培養を行い、これらを用いて分子系統学的解析を行うとともに、本属の系統と形態的特徴との関係を明らかにして、本属の分類学的再検討を行うことを目的とした。

最初に、18 都道府県から採集した非耕地土壌を含む土壌 79 サンプルから本属菌の分離を行った。その結果 554 菌株が分離され、このうち 240 菌株は非耕地土壌由来であった。形態的特徴に基づき 356 菌株を 18 種に同定したが、他の 198 菌株は形態的特徴が既知種のものと一致せず種の同定には至らなかった。これらの結果から、非耕地土壌には本属菌の未知種が多数存在することが確認された。

次に、分離菌株より種同定のできた菌株と、未同定でも形態的特徴や遺伝的構造に違いが認められた菌株を選択し分子系統解析を行った。*Pythium* 属菌や近縁属の遺伝子解析では現在 ITS 領域が多用されているが、この領域には本属種間で最大で約 330bp 以上の長さの違いがあり、系統解析における有効性が疑問視される。したがって本研究では ITS 領域より種内変異の小さい rDNA LSU D1/D2 領域および *coxII* 遺伝子領域の塩基配列を明らかにし、さらに、GenBank データベースより入手した近縁属を含む多数の種の塩基配列を解析に

加え、最尤法、近隣結合法、ベイズ法により系統解析を行った。異なる DNA 領域および解析法により得られた系統樹を比較し、本属内および近縁属との系統関係を明らかにした。その結果、本属はいずれの近縁属とも異なる系統群を形成しこれらの属とは系統学的に明らかに異なることが確認された。さらに本属は多系統群であり、属内には全ての系統樹で支持される 5 単系統群が検出された。このうち 1 系統群の単系統性は一部の系統樹では支持されなかったが、系統学的に互いに近縁な生物群から構成されていた。

系統と形態的特徴の関係を検討した結果、各系統群は胞子のうの形状により特徴付けられたが、造卵器壁の構造など他の形態形質との間に相関関係は認められなかった。したがって胞子のうの形態が重要な分類形質であると判断し、その形態と系統との関係に基づき属内の分類学的再検討を行った。その結果、5 系統群のうち 3 系統群は、形態的にも、球状、糸状、棍棒状胞子のうによりそれぞれ特徴付けられ、独立した分類群であると考えられた。一方他の 2 系統群は、いずれも球状胞子のうの形態により特徴付けられたが、互いに系統学的に明らかに異なっていたため独立した分類群であると考えられた。また、5 系統群のこのような系統学的、形態学的相異は、近縁属のそれと比較して、属レベルの分類学的相異であると考えられた。以上の結果から、系統学的、形態学的特徴に基づき支持されたこれら 5 系統群をそれぞれ独立した属とすることが妥当であると結論し、*Pythium* 属に加えて新たに 4 属を設立して、分類学的再編を行った。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

*Pythium* 属菌は、湿潤な環境の土壤中に広く分布し、植物に病原性を有するものが多く知られていたため、農作物などの病原菌として、古くから分類、生態などの研究が行われてきた。しかし、最近、昆虫類、魚類、哺乳類などにも病原性を示す種が報告されたり、他の生物に対する病原性が明確でない多くの種が、様々な環境下に存在することなどが報告されていた。また、本属は、形態的に変異に富み、近縁属との相異も明確でなかったため、分類学的混乱も認められていた。このように、本属には、形態的および生態的に多様な種が含まれていることから、分類学的には異質グループの集団であることが指摘され、その系統・分類学的再検討が望まれていた。そのため、本研究では、本属菌を、日本各地の土壤から分離・培養するとともに、保存機関から収集し、多数の菌株を用いて分子系統学的解析を行い、系統関係を明らかにしている。系統解析では、属内の系統を明確にするために、近縁なグループのデータを多量に加えて、様々な手法を用いて解析し、極めて信頼性の高い系統樹を確立している。そして、この系統と形態的特徴との関係を詳細に検討し、本属を *Pythium* 属を含む 5 属に整理し、分類学的再編を行っている。

以上のように、本研究は、これまで、不明瞭であった *Pythium* 属菌の系統関係を明らかにし、系統と関連する分類形質を見出し、新しい分類システムを提案したものであり、*Pythium* 属菌のみならず、菌類の系統分類学に大きな進展をもたらす成果として大変高く評価される。また、病気の診断や病原菌の同定などでも本属菌の取り扱いが明確となり、応用面での貢献も大きいと判断される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。