

氏名（本籍）	やぶき としひろ 矢吹 俊裕（東京都）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲 第 144 号
学位記授与年月日	平成 26 年 3 月 16 日
学位の授与の要件	玉川大学学位規程第 5 条第 1 項該当
研究科・専攻の名称	玉川大学大学院農学研究科 資源生物学専攻博士課程後期
学位論文題目名	形態学のおよび分子系統学的手法に基づく 日本産 <i>Trichoderma</i> 属の分類と多様性評価
論文審査委員（主査）	教授 奥田 徹
（副査）	教授 星野 達雄 安藤 勝彦（独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 技監）

形態学および分子系統学的手法に基づく

日本産 *Trichoderma* 属の分類と多様性評価

玉川大学大学院農学研究科 矢吹俊裕

本研究では、近年の *Trichoderma* 属の研究を踏まえ、国内の生きた植物基質から内生菌として分離した菌株、きのこ栽培農家由来の基質から分離した菌株および、カルチャーコレクションに保存された日本産 *Trichoderma* 属菌株を対象とし、生育特性、形態形質、分子系統学的手法に基づいた精査を行い、国内に存在する *Trichoderma* 属の種を明らかとすることを目的とした。また、分子系統学的種概念に基づいた分類に矛盾しない、形態学的種概念に基づいた新たな分類指標を見出すことを目標とした。

形態学的分類と分子系統学的分類の両方に基づく近年の分類指標に基づいた、国内の *Trichoderma* 属の多様性の評価はまだ行われていない。国内で分離され、種まで同定されていない *Trichoderma* 属菌株もカルチャーコレクションに多数存在している。そこで、27 都道府県から採集された基質および公的菌株保存機関から、日本産 *Trichoderma* 属 303 菌株を供試菌株とした。供試菌株は種の仮同定を行い、重複していると思われる菌株を除き、より詳細な試験を行うための 121 菌株を選択した。選択した菌株は、各培地の生育特性試験、コロニー性状およびアナモルフ構造の顕微鏡観察による表現型解析、分子系統解析による系統樹の作製の結果から総合的な精査より種を決定した。その結果、15 種の新種、15 種の日本新産種、13 種の既知種、合計 43 種の日本産 *Trichoderma* 属の存在を確認し、各種の詳細を記載した。

日本新産種である *T. parareesei* と *T. sinense* は亜寒帯気候帯の北海道と長野県由来の生きた植物基質から内生菌として分離された。これまで *T. sinense* は熱帯東アジア由来の樹皮あるいは土壌、*T. parareesei* は熱帯～亜熱帯の土壌からのみ分離され、両種の分布と生息場所は限られていることが示唆されていた。本研究では、*T. sinense* と *T. parareesei* が、植物基質の内生菌として分離されたことで、季節風などの影響で一時的に検出されたので

はなく、日本国内において常在的に生息していることを示し、両種の分布域と生息場所は、記載されたものより、広く多様であることを示した。Longibrachiatum Clade に属する両種は 40°Cでも生育が可能であり、この生育能力の高さが、幅広い気候帯での生存を可能とし、そこに分布する植物を生息場所とすることが判明した。

Trichoderma 属の内生菌は、日本国内においては未報告である。*Trichoderma sinense* は、東アジア固有種である *Cerasus sargentii* (オオヤマザクラ) から、新種の *Trichoderma* sp. Har 2 は、日本固有種である *Acer miyabei* (クロビイタヤ) からそれぞれ内生菌として分離された。これらが地域固有の植物から分離されたという事実は、これら2種の分布もまた、地域固有である可能性を残した。また、国外でも分離報告はあるが、日本新産種である *T. parareesei*、*T. stramineum*、*T. voglmayrii* は日本固有あるいは地域固有の植物から分離された。異なる大陸およびそこに生息する固有の植物には固有の菌類が存在していることが知られている。これまで未開拓であった生きた植物基質を分離源とし、表面殺菌法などの選択的分離法を用いた本研究によって、多くの *Trichoderma* 属の未記載種および日本新産種が発見された。さらに日本固有の植物に分離源を限定することにより、今後より多くの *Trichoderma* 属の未記載種が効率的かつ効果的に分離されることが予想される。

日本新産種である *T. amazonicum* は複数のきのこ栽培農家由来の基質から分離され、それ以外の基質からは分離されなかった。系統樹上で、*T. amazonicum* は本研究で日本新産種として分離した *T. pleuroticola*、*T. pleuroti*、本研究で新種として分離された *Trichoderma* sp. Har 1 と近縁関係であり、一つの Clade に属する。*Trichoderma pleuroticola* と *T. pleuroti* はきのこ栽培農家の害菌として記載された種であり、本研究で分離した *T. pleuroticola* もきのこ栽培施設由来の基質以外からは分離されず、菌寄生として生息していることを示唆した。*Trichoderma* sp. Har 1 もきのこ栽培農家由来の基質以外からは分離されなかった。本研究において、*T. amazonicum* がきのこ栽培農家に由来する基質のみから分離されたこと、近縁種がいずれもきのこ栽培農家に由来する基質からのみ分離されたこと、過去の研究報告から、*T. amazonicum* は最初

に記載された *Hevea* 属（ゴムノキ）に特異的な内生菌というより、菌寄生としての生息が本来の性質である可能性を示した。

本研究では *Trichoderma* 属が同一培地上に 2 種類のアナモルフ構造を形成する 2 型性に注目した。培地面に広がる菌糸体あるいは気中菌糸から単生で生じるアナモルフ構造を一次形態、培地面に房状、樹木状、あるいはマット状に生じる密な分生子形成帯にあるアナモルフ構造を二次形態と定義・区別し、その有無を確認し、観察された場合は両方の形態の各部位の計測を行った。その結果、一次形態に *Verticillium* 型～*Gliocladium* 型をもち、二次形態に *Pachybasium* 型～*Gliocladium* 型をもつ Virens Clade の *T. crassum* は、Harzianum Clade および Virens Clade に含まれるすべての種の形態を内包する形態をもつことを示し、これを代表種とした Crassum Clade (Harzianum Clade, Virens Clade) を提案した。Crassum Clade (Harzianum Clade, Virens Clade) は、これまで見過ごされてきたアナモルフの一次形態と二次形態の有無を、形態学的分類の指標に取り入れることで明確となり、この Clade に含まれる種の形態的特徴を説明した。一次形態と二次形態を区別することに加え、主軸分生子柄の伸長を分生子柄の分岐様式の特徴としないことを提案し、これらを考慮したアナモルフの表現形質に基づいた日本産 *Trichoderma* 属 43 種の検索表を作製した。

平成 25 年度 博士学位論文審査票

玉川大学大学院農学研究科

論文題目	形態学および分子系統学的手法に基づく日本産 <i>Trichoderma</i> 属の分類と多様性評価		
氏 名	矢吹俊裕		
<p>審査要旨</p> <p><i>Trichoderma</i> 属の分類は非常に困難であったが、この 10 年の分子系統学的手法の発達はめざましく、国際トリコデルマ分類小委員会の努力もあり、分類大系がかなり整理された。しかしわが国の <i>Trichoderma</i> については土居のそれ以前の研究しか存在せず、新分類大系に基づく再調査が待たれていた。今回の論文は、そういう状況下で、現在通用する Samuels らの分類大系に基づき、日本産 <i>Trichoderma</i> の網羅的研究を行った成果である。この 13 年間に分離された 2 万株に及ぶ糸状菌株から <i>Trichoderma</i> と思われる菌株と公的保存機関に保存されている菌株、合計 303 株を選び、その中から重複株を取捨選択し、121 株に絞って、形態と分子系統の両面から分類同定した。その結果、これまでわが国では 13 種しか知られていなかった本属が 43 種に増加した。その中には、15 種の新種、15 種の日本新産種を含んでいた。</p> <p>分子系統学的手法の発達のおかげで、菌類の分類同定がずいぶん簡単になった。しかし、すべてが遺伝子の塩基配列で解決するわけではない。いずれの自然科学がそうであるように、分類学には歴史があり、ものの考え方がある。視覚という人間にとってもっとも精度の高い感覚が威力を発揮する形態は、菌類分類学にとって今後も重要である。その意味で、著者の描画や顕微鏡写真撮影の、高度な技術は賞賛に値する。このような技術があるからこそ、これまで明確な体系化がなされていなかった <i>Trichoderma</i> アナモルフの 2 型性の「一次形態」「二次形態」の認識と再定義が可能となった。その結果、分子系統樹のクレードごとの形態の差の説明ができた。同様に生理学的な性質として、40℃というクリティカルな生育温度と分子系統との関連の発見も意義がある。</p> <p>また個々の新種や新産種の発見においては、分離源や分離手法を工夫することにより、熱帯にしか知られていなかった種の生息域の拡大、内生菌など新たな生態などが判明した。</p> <p>以上すべてを勘案して、日本産 <i>Trichoderma</i> 属菌類 43 種の検索表が作成されたが、これは今後の同定の上で大変役に立つと考えられる。事実、著者は、博士課程在学中から、北は北海道、南は九州の、林業試験場、大学、国研の研究者から、きのこ栽培農家で害菌などとして分離された <i>Trichoderma</i> の同定依頼を多数受けてきた。これは著者の菌学者としての評判の証しであり、わが国の、この分野の研究者の欠如をも表している。</p> <p>本論文は、<i>Trichoderma</i> 属分類学の基礎のみならず、応用分野へのインパクトも高く、内容的にも分量も、農学博士論文として十分と認めることができる。</p>			
審査委員	主査	印	
	副査	印	副査
	副査	印	副査
		副査	印