

日本産モチビョウキン目菌類に関する研究

柴田, 紗帆 / SHIBATA, Saho

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

255

(発行年 / Year)

2023-03-24

(学位授与番号 / Degree Number)

32675甲第574号

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2023-03-24

(学位名 / Degree Name)

博士(生命科学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00026674>

法政大学審査学位論文

日本産モチビョウキン目菌類に関する研究

柴田紗帆

目次

総合序論	1
用語の定義	5
第1章 モチビョウキン目菌類種の基準標本指定	6
1.1 緒言	6
1.2 材料および方法	8
1.3 結果	13
1.3.1 ツツジ類てんぐ巣病菌 <i>Exobasidium pentasporium</i> Shirai	13
1.3.2 サザンカもち病菌 <i>Exobasidium gracile</i> (Shirai) Syd. & P. Syd.	15
1.3.3 ツバキもち病菌 <i>Exobasidium camelliae</i> Shirai	16
1.3.4 ツバキ粉もち病菌 <i>Exobasidium nudum</i> (Shirai) S. Ito & Otani	18
1.3.5 クロキもち病菌 <i>Exobasidium symploci-japonicae</i> var. <i>symploci-japonicae</i> Kusano & Tokubuchi	19
1.3.6 アオグスモドキもち病菌 <i>Exobasidium machili</i> Sawada	21
1.3.7 タブノキ類黒穂病菌 <i>Clinoconidium inouyei</i> (Henn. & Shirai) Kakish., S. Shibata & Hirooka	22
1.4 考察	24
1.4.1 ツツジ類てんぐ巣病菌 <i>Exobasidium pentasporium</i> Shirai	24
1.4.2 サザンカもち病菌 <i>Exobasidium gracile</i> (Shirai) Syd. & P. Syd.	25
1.4.3 ツバキもち病菌 <i>Exobasidium camelliae</i> Shirai	25
1.4.4 ツバキ粉もち病菌 <i>Exobasidium nudum</i> (Shirai) S. Ito & Otani	26
1.4.5 クロキもち病菌 <i>Exobasidium symploci-japonicae</i> var. <i>symploci-japonicae</i> Kusano & Tokubuchi	26

1.4.6	アオグスモドキもち病菌 <i>Exobasidium machili</i> Sawada	27
1.4.7	タブノキ類黒穂病菌 <i>Clinoconidium inouyei</i> (Henn. & Shirai) Kakish., S. Shibata & Hirooka	28
1.4.8	章の考察	29
第 2 章	モチビョウキン目菌類の有性世代の探索とその病害の診断	53
2.1	緒言	53
2.2	材料および方法	55
2.3	結果	62
2.3.1	ツツジ属 1 種 2 変種に発生した <i>Exobasidium</i> 属菌とその病害	62
2.3.2	バイカツツジに発生した <i>Exobasidium</i> 属菌とその病害	64
2.3.3	シロヤシオに発生した <i>Exobasidium</i> 属菌とその病害	65
2.3.4	コメツツジに発生した <i>Exobasidium</i> 属菌とその病害	66
2.3.5	美森の大ヤマツツジとその周辺のヤマツツジに発生した <i>Exobasidium</i> 属菌と その病害	68
2.3.6	カナリーヤシに発生した <i>Graphiola</i> 属菌とその病害	69
2.4	考察	72
2.4.1	ツツジ属 1 種 2 変種に発生した <i>Exobasidium</i> 属菌とその病害	72
2.4.2	バイカツツジに発生した <i>Exobasidium</i> 属菌とその病害	72
2.4.3	シロヤシオに発生した <i>Exobasidium</i> 属菌とその病害	73
2.4.4	コメツツジに発生した <i>Exobasidium</i> 属菌とその病害	74
2.4.5	美森の大ヤマツツジとその周辺のヤマツツジに発生した <i>Exobasidium</i> 属菌と その病害	74
2.4.6	カナリーヤシに発生した <i>Graphiola</i> 属菌とその病害	75
2.4.7	章の考察	75

第3章 モチビョウキン目菌類の無性世代の探索とその病害診断.....	100
3.1 緒言.....	100
3.2 材料および方法.....	102
3.3 結果.....	116
3.3.1 植物サンプルからの分離と簡易同定結果.....	116
3.3.2 <i>Exobasidium</i> 属菌.....	116
3.3.3 <i>Kordyana</i> 属菌.....	119
3.3.4 <i>Yunzhangomyces</i> 属菌.....	119
3.3.5 <i>Meira</i> 属菌.....	121
3.3.6 <i>Laurobasidium</i> 属菌.....	124
3.4 考察.....	127
3.4.1 <i>Exobasidium</i> 属菌.....	127
3.4.2 <i>Kordyana</i> 属菌.....	128
3.4.3 <i>Yunzhangomyces</i> 属菌.....	128
3.4.4 <i>Meira</i> 属菌.....	129
3.4.5 <i>Laurobasidium</i> 属菌.....	130
3.3.6 章の考察.....	131
第4章 モチビョウキン目の進化系統.....	173
4.1 緒言.....	173
4.2 材料および方法.....	175
4.3 結果.....	181
4.3.1 科間の体系構築.....	181
4.3.2 種間の体系構築.....	182

4.4 考察.....	187
4.4.1 科間の体系構築.....	187
4.4.2 種間の体系構築.....	188
4.4.3 章の考察.....	191
総合考察.....	217
要旨.....	230
謝辞.....	235
引用文献.....	236

総合序論

モチビョウキン目は担子菌門クロボキン亜門モチビョウキン綱に含まれ、Exobasidiaceae, Brachybasidiaceae, Cryptobasidiaceae, Graphiolaceae に加え、近年 Somrithipol ら (2018) によって提案された、Laurobasidiaceae の 5 科、21 属 205 種からなる (Index Fungorum ; <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>, accessed on September 21, 2022). 本目菌類の多くは、植物上に有性世代を形成し、その際に奇形、変色、葉枯れ症状を引き起こすことから植物病原菌として古くから認識されてきた。これら菌類は多様な宿主植物上に存在し、また様々な気候をもつ地域に分布するため、世界各国で発生が報告されている (Albu 2012, Boekhout et al. 2003, Cao et al. 2018, Brewer et al. 2014, Dong et al. 2019, 江塚 1990a, b, 1991a, b, Farr & Rossman 2021, Graafland 1960, 飛川ら 2014, Hirata 1981a, b, Iijima et al. 1985, Ito 1955, Ito & Otani 1958, Ito & Sawada 1912, Jiang & Kirschner 2016, Kakishima et al. 2017a, b, 2020, 草野 1907, Kobayashi 1971, Lee et al. 2015, Li et al. 2022, Limtong et al. 2017, McNabb 1962, Nagao 2001, 2003a, b, 2004a, b, 2006, Piątek et al. 2012, Nannfeldt 1981, Nasr et al. 2019, Otani 1976, Park et al. 2021a, b, Piepenbring et al. 2020, Reid 1969, 佐藤ら 2016, Sawada 1919, 1931, 1935, 1943, 1950, Singh et al. 2020, Shibata et al. 2021, 2022a, b, Shirai 1896, 澤田 1922a, b, Somrithipol et al. 2018, Tanaka et al. 2008, 安田ら 2005). 特に、我が国において本目菌類は、古くから多くの研究者により検討が行われた結果、33 種が新種として記載され、さらに 15 種の既知種を加えた 48 種の存在が知られている (植物病名データベース ; https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases_en.php, accessed on September 21, 2022).

モチビョウキン目菌類の多くは、短期的に甚大な被害をもたらすことは稀である。しかし、いくつかの病害については、経済的な被害になる場合もある。例えばチャの新葉に奇形と葉枯れ症状をもたらす *Exobasidium vexans* は、適切な対策をしなければ 33%もの減収をもたらすことが報告されている (Mabbett 2016)。さらに、近年では、ブルーベリーの新芽を壊死させ、果実に斑点症状を引き起こす *E. maculosum* による被害が拡大し、注目されるようになった (Brewer et al. 2014, Ingram et al. 2019)。本菌による被害においても 25%の減収をもたらしたとする報告が存在する (Cline 1998)。また、本目菌類の特徴的な特徴は、植物の文化的価値の低下をもたらす場合もある。観賞植物として世界各国で広く庭園等に利用される *Rhododendron* 属植物や *Camellia* 属植物には、開花期に奇形症状やてんぐ巣症状が発生し景観を損ねる (堀江ら 2001, Park et al. 2021)。 *Exobasidium* 属菌のほかに、ニッケイ属植物の新芽に特異的なゴールを形成する *Laurobasidium hachiyoense* は、発生した幹の感染部位が強風等により折れやすくなることが知られている (堀江ら 2001)。さらに、本症状が世界遺産に登録されている小笠原諸島の固有種コヤブニッケイに発生したため、今後その存続に影響を与える可能性も考えられている。以上から、本目菌類の発生は、植物保護の観点からも非常に重要と考える。

このような植物病害の防除には正確な同定・診断が必要不可欠である。しかし、その基盤となる本目の分類体系は、DNA の塩基配列による分子系統解析が進んだ現在でも確立したとは言えない状況にある。例えば、本目最大の系統群である *Exobasidium* 属菌は、宿主植物の器官に奇形を誘導し人目を惹く顕著なゴールを形成することから、1662 年にはすでに知られていたモチビョウキン目菌類を代表する菌群である (Hoffman 1662)。1867 年、本属は Woronin により正式に設立後、1896 年に日本でも研究が始まった (Shirai 1896)。これら分類学的研究は、

長きにわたり宿主や病徴を重視する学派と、菌類の形態的特徴を重視する学派の2つが存在したことで分類学的に混乱した背景をもつ (Nannfeldt 1981). そして現在では、分子生物学的解析に基づき、病徴と宿主の関係性を強調した分類が行われる傾向にある (Abraham 2022). これは他の系統群と比較し、宿主植物や病徴の多様性に富む *Exobasidium* 属菌において大きな変化をもたらす可能性を持つ. 形態学的な特徴にのみ着目した分類学的研究背景は「目」全体についても見られ、この結果、分子生物学的において多くの隠ぺい種の存在が明らかとなった. 例えば、*Exobasidium* 属菌の一部の種は *Laurobasidium* 属や *Climoconidium* 属へ転属された (Kakishima et al. 2017, Jiang & Kirschner 2016). しかし、我が国における *Exobasidium* 属菌およびその関連菌に関する研究は歴史的にも菌類の形態学的特徴を重視した研究にとどまっている (Sawada 1919, 1950, 江塚 1990b, Nagao et al. 2003a). このため、今後、「目」全体における再検討が必要である.

上述したようにモチビョウキン目菌類の分類学的研究は、主に有性世代の形態学的特徴により進められてきた. 一方、無性世代は多くの種でその形態的特徴が乏しく、分離菌株も少ないことから、その存在、そして、環境中における生態的な役割が不明な場合が多い. しかし、近年の分子系統解析により有性世代が不明な複数の酵母様菌類が本目に含まれることが報告されている (Boekhout et al. 2003, Cao et al. 2018, Li et al. 2022, Limtong et al. 2017, Nasr et al. 2019, Tanaka et al. 2019, Yasuda et al. 2006). さらに、これらの無性世代の系統群の一部は、植物病原菌としても知られている (Yasuda 2005, 2006, 2007). このような、モチビョウキン目菌類の両世代の関係性については、今後も新たな知見が発見される可能性が高く、このことで本目菌類の無性世代における生態的役割が少しずつ明らかになると考えられる.

これら植物病理学的, 生態学的, そして分類学的な課題を解決するため本研究では, 日本産モチビョウキン目菌類について, 全国各地で本目菌類の有性世代および無性世代の探索を行いながら, 特に被害の深刻な病害についてはその病害診断を行った (第 2, 3 章). また, それらモチビョウキン目菌類の基準標本の指定を行うとともに (第 1 章), DNA 塩基配列およびアミノ酸配列を用いた系統樹を作成することで, 進化学的なアプローチを試みた (第 4 章). さらに, それら結果をもとに, 分類体系の再構築, また両世代を網羅した生活環の解明を行うことで, 正確な同定・診断の情報基盤の構築を目的とした.

用語の定義

宿主植物: 有性世代の形成がみられる植物

宿主種: 有性世代の形成がみられる植物種

タイプシーケンス: タイプ由来の DNA 情報

タイプロカリティー: タイプ標本の採集された地点

ホロタイプ: 命名法上のタイプとして著者が指定もしくは、著者が使用した 1 つの標本または図解

レクトタイプ: ホロタイプなしに学名が発表された場合、ホロタイプが破損や喪失された場合、またはホロタイプが複数の分類群に属していることが明らかとなった場合に命名法上のタイプとして指定された 1 つの標本または図解

ネオタイプ: ホロタイプやそれに準ずる標本が存在しないもしくは所在不明の間、命名法上のタイプとして選出された 1 つの標本または図解

エピタイプ: ホロタイプ、レクトタイプ、ネオタイプまたはそれらに準ずる資料が曖昧で同定ができないときに、解釈のためのタイプとして選ばれた 1 つの標本または図解

第1章 モチビョウキン目菌類種の基準標本指定

1.1 緒言

国際藻類・菌類・植物命名規約（2018）によると、学名の命名とは“その群を引用する手段を与え、またその群の分類群の分類学上のランクを示すこと”と示されている（国際藻類・菌類・植物命名規約，前文1 2018）。間違いや曖昧さを含んだ学名を使用した場合は、科学的な混乱をもたらすため、安定した方法による規定が求められる。植物病理学において、病原菌の学名は植物病の診断に使用される。植物病の診断は病名と病原を明らかにすることを目的とし、①治療、②防除、③予防法の決定に関わる（難波 2013）。そのため、誤った学名の引用は、的確な診断を不可能とし、経済的な損失をもたらす可能性を含んでいる。

菌類の学名は国際藻類・菌類・植物命名規約に則り、1点の標本 (nomenclatural type) に対して与えられる（国際藻類・菌類・植物命名規約，7.1条 2018）。1753年5月1日以降、命名された菌類の学名にはタイプ指定されることが求められている（国際藻類・菌類・植物命名規約，7.9条 2018）。そして、1958年1月1日以降からは、その学名のタイプが指定された場合にのみ、正式発表となる。そのため、それ以前に記載された種についてはタイプを欠く可能性を有する（国際藻類・菌類・植物命名規約，40.1条 2018）。近年、これらタイプ指定は、そのタイプより得られた培養菌株や DNA 情報が時代や国を超えた研究を可能にするため、正確な同定、分類、診断を行う上で特に重要視されている。

モチビョウキン目菌類はこれまでに 205 種が記載されている (Index Fungorum, 2022. 9. 26 現在)。1957年12月31日以前に記載された種は109種に上り、明確なタイプ指定が行われていない種も確認される (Shirai 1896, 草野 1907, Ito & Sawada 1912, 1919, 1931, 1943, 澤田 1922a, b)。さらに、モチビョウキン

目菌類のタイプシーケンスは 33 種，タイプ由来ではない既知種のシーケンスは 78 種にとどまっている (Genbank Database, 2022. 4. 5).

日本国内で発見記載されたモチビョウキン目菌類は 32 種，台湾等で日本人研究者によって記載されたモチビョウキン目菌類は 42 種に上る．そのため，我が国は世界的に見て 1896 年以降，古くから継続的に記載が行われ，モチビョウキン目菌類が種多様性に富んでいることが明らかとなっている．

そこで本研究では，日本で記載されたモチビョウキン目菌類に対して，国内標本庫の探索，タイプロカリティーにおける新たな標本の採集を行い，必要に応じて基準標本の指定を行った．そして，新たな基準標本から培養菌株の確立やタイプシーケンスを決定することで，学名を命名規約に則った安定的な，モチビョウキン目菌類の分類・同定に関わる基盤の構築に貢献することを目的とした．

なお，本論文で取り扱う新規分類群および命名規約上のタイプ指定は正式発表を目的としたものではなく，本学位研究の遂行を目的として，リスト化したものである．

1.2 材料および方法

1.2.1 国内博物館における標本の探索と観察

筑波大学標本庫，東京大学標本庫，農研機構農業環境変動研究センター標本保管庫，および国立科学博物館において記載文中の内容と一致する標本の探索を行った。

1.2.2 タイプロカリティーにおける新規標本の探索

それぞれの種のタイプロカリティーの詳細を Table 1 に示した．記載文中に示された時期にその場所へ出向き，宿主上に発生した病害サンプルを採集した．採集したサンプルは紙袋に入れ，速やかに研究室に持ち帰り試験に供試した．

1.2.3 標本作製および菌株の取得

採集したサンプルを乾熱した新聞紙に挟み，重りを載せる（さくよう）もしくはドラフト内で 1 か月程度風乾した．供試菌株を確立するため，新鮮なサンプルを用いて孢子落下法により分離を行った．採集サンプルから 1cm 切片を作製後，WA 平板培地の蓋の裏面にナイスタック™（ニチバン，日本）で固定し，12 時間ごとに蓋を回転させた．設置 12～36 時間後，WA 培地上に落下して発芽した孢子を PDA 平板培地に移植した．菌株の長期間の保管には，PDA スラント，水・グリセリン凍結チューブを使用した．

1.2.4 標本および菌株の観察

標本を用いた形態観察には光学顕微鏡 BX53（OLYMPUS，日本）を使用し，顕微鏡カメラ DP27（OLYMPUS，日本）により撮影を行った．水をマウント液として使用し，染色の際にはラクトフェノールコットンブルー液を用いた．標徴の観察にはデジタル顕微鏡 VHX-5000（Keyence，日本）を使用した．形態観察は対物レンズ 40 倍もしくは 100 倍で観察し，写真撮影したものを計測に用いた．計測には

Image J (free download available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を使用した。計測値は、それぞれの部位で30ずつ計測を行い、平均値を出したのち、標準偏差値を差し引きした数値を示した。実測値が標準偏差を上回るもしくは下回る場合は、括弧内に最大値と最小値を併記した。アオグスモドキもち病菌 *Exobasidium machilii* については標本 (TNS-F-218395) の状態を考慮し、観察は最小限にとどめた。培養菌株の形態観察は、PDA 平板培地にループ白金耳で画線し、20°C、5日間培養後、培養性状の観察と光学顕微鏡を使用して行った。観察方法は標本の観察と同じ手法を用いた。また、5 mm コルクボーラーで打ち抜いた菌叢を PDA 平板培地中央に置床し、20°C、30日間培養した培養性状を観察した。

1.2.5 DNA シーケンスの決定

DNA 抽出は PDA 培地 20°C、培養 1 週間以内の菌叢を供試した。TE バッファー 50 μ l 中に、滅菌爪楊枝で菌体を加えた。ヒートブロック 95°C で 10 分加熱した。10000rpm で 3 分間遠心し、上澄みを新しいチューブに入れて -20°C で保存した。

PCR は rDNA-ITS および LSU 領域について決定した。ポリメラーゼは GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) を使用し、供試したプライマーは Table 2 に示した。PCR 反応は VeritiPro Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) にて、Table 3 に示したプロトコルで行った。

DNA 増幅産物の確認は 0.7% アガロースゲル電気泳動によって行った。PCR 産物 1 μ l をウェルにロードし、120V、15 分間泳動した後、染色バッファー (10 μ g/ml EtBr 10 μ g と 1 \times TAE Buffer 150ml を混合したものに 20 分間浸漬しトランスイルミネーターにてバンドの有無を確認した。

DNA の増幅が確認されたサンプルは ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher, USA) を使用し, VeritiPro Thermal Cycler にて 37°C, 4 分加熱した後, 80°C, 1 分で処理し, DNA 増幅産物中のプライマーと dNTP を不活性化させて, 精製を行った.

シーケンスリアクションは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) でサイクルシーケンスを行った. 使用したプライマーは Table 4 に示した. VeritiPro Thermal Cycler にて, Table 5 に示したプロトコルで処理した.

これら DNA 産物はカラム Sephadex™ G-50 Superfine (Sigma-Aldrich, USA) により精製を行った. カラム用 96 穴プレートにカラム担体の粉を入れ, そこに DDW 300µl を加えて 2 時間以上膨潤させた. 膨潤後のカラムは 910xg, 室温で 5 分間遠心し, 余分な水分を除去した. シーケンス反応産物 10µl に DDW 10µl を加え, 全量 20µl をカラムに染み込ませ, 910xg, 室温で 5 分間遠心し, 96 穴の PCR プレートに精製産物を回収した. その後, 風乾器を用いて 40 分間真空状態で風乾した. そして, 精製産物にホルムアミド (FA) を 15µl 加え, 45 秒間ボルテックスした後, 95°C, 4 分間加熱し, 氷水で急冷した. その後シーケンサー ABI prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) を使用し, 塩基配列を決定した.

決定した塩基配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST 検索にて, 決定配列の精度を確認した (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.2.6 分子系統解析

Wang et al. (2016)およびSomrithipol et al. (2018)の分子系統解析で使用した菌類の塩基配列に加え、NCBI に登録のある近縁種の塩基配列をもとに分子系統樹の作成を行った。

近縁属の塩基配列を加えた FASTA ファイルを作成し、その FASTA ファイルを MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>)を使用して、NEXUS ファイルに変換した。この NEXUS ファイルを Mesquite version 3.04 でアライメントし、Phylip ファイルに変換した。そして、Phylip ファイルを RAxML BlackBox (<https://raxml-ng.vital-it.ch/>) (Kozlov et al. 2019)にアップロードし、モデルを指定して rapid bootstrap algorithm による最尤法で系統解析を行った。

Table 2 Primer for PCR reaction		Reference
ITS	ITS1-F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns (1993)
	M-ITS1: GGTGAACCTGCAGATGGATC	Stoll et al. (2003)
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
LSU D1/D2	LR0R: ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys & Hester (1990)
	LR5: TCCTGAGGGAAACTTCG	Vilgalys & Hester (1990)
	NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG	O'Donnell (1993)
	NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O'Donnell (1993)

Table 3 Protocol of PCR reaction

95°C	4min	
95°C	1min	} ×35
45~50°C	1min	
72°C	1min	
72°C	8min	
4°C	∞	

Table 4 Primer for cycle sequencing

		Reference
ITS	ITS1-F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns (1993)
	M-ITS1: GGTGAACCTGCAGATGGATC	Stoll et al. (2003)
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
LSU D1/D2	NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	White et al. (1990)
	NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	White et al. (1990)

Table 5 Protocol of cycle sequencing

96°C	3min	
96°C	15sec	} ×25
50°C	5sec	
60°C	4min	
4°C	∞	

1.3 結果

1.3.1 ツツジ類てんぐ巢病菌 *Exobasidium pentasporium* Shirai

国内博物館における標本の探索と観察

記載者である白井博士が採集・同定した標本である TNS-F-4617 について光学顕微鏡観察を行ったところ (Fig. 1A-D), 標本中に *E. pentasporium* を特徴づける十分な菌体の観察ができなかった (Fig. 1E-G). 例えば, 担子器もしくは担子孢子様の構造は認識できたものの, 不明瞭であった (Fig. 1H, I). さらに, 本標本由来の生きた菌株はなく, DNA データを得ることはできなかった.

タイプロカリティーにおける新規標本の探索と菌株の確立

栃木県日光市においてヤマツツジのてんぐ巢上の葉に発生した菌類の標本 (HM21-486, 488) を採集した (Table 1, 12). さらに標本から, 菌株 (HM21-486C, 488C) を確立した.

新規標本の観察

若いてんぐ巢枝は, 健全な枝と見分けることが難しかったが, 健全な分枝部位より枝の密度が高い傾向が見られた (Fig. 2B). 発病から年月が経過したてんぐ巢枝はときに徒長症状を伴い, 健全部位とは明瞭な差が認められるほど枝の密度が高くなった (Fig. 2A). 5月中旬のてんぐ巢枝上には, 葉が旺盛に形成され,

その裏面には白色の菌叢が観察された (Fig. 2C-G). 菌叢は葉の裏面の一部分または全面に発生した (Fig. 2D-F). てんぐ巢枝上の葉は健全葉と比べて矮化し, ときに紅赤色を呈し, 舟形もしくは背軸方向に強く葉巻する症状を示した (Fig. 2C, D). 菌叢が見られたのはてんぐ巢上の葉のみであり, てんぐ巢枝以外の健全部位の葉, てんぐ巢枝上および健全枝には観察されなかった.

葉上の菌叢中に担子器，担子胞子および分生子を観察した (Fig. 2H-O)．担子器は密生し，無色，無隔壁，棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 2I-K)，大きさ (13.4-)22.8-35.7(-42.1) × (2.8-)3.4-6.6(-9.2)μm であった．担子器上には長さ (1.0-)1.5-3.7(-5.7)μm の小柄が 3-5 本生じ，その先に担子胞子が形成された (Fig. 2J, K)．担子胞子は，円筒形から紡錘形で無色，はじめ無隔壁で 1(-2)隔壁を有し，基部に向かって細く，大きさ (11.3-)12.2-15.3(-17.5) × (2.0-)2.8-3.7(-4.0)μm であった (Fig. 2L, M)．担子胞子は 12-36 時間程度で発芽し，胞子の両端もしくは隔壁部分から，分生子を出芽した (Fig. 2P)．分生子は円筒形で片側先端部が細く，大きさ (3.9-)5.4-8.6(-9.7) × (0.5-)0.7-1.2(-1.6)μm の大型のものと (Fig. 2N)，楕円形から円筒形で大きさ (4.3-)4.2-6.2 × 1.5-1.7(-1.8)μm (N=3) の小型の 2 タイプが観察された (Fig. 2O)．前者が多数を占め，後者は写真にある 3 つとごくわずかに観察された．

菌株の観察

分離株 HM21-486C は PDA 培地上で褐色を呈し，非常に生育の遅いコロニーを形成した (Fig. 2Q, R)．また，ときに培地上に色素を産生した (Fig. 2Q-S)．出芽型分生子とかすがい連結のない菌糸からなり，出芽型分生子は菌糸より出芽し，無色，楕円～長楕円形，無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した (Fig. 2T)．娘細胞を出芽した出芽型分生子は先端が細く，大きさ (6.8-)7.5-10.9(-15.4) × (0.9-)1.1-1.8(-2.1)μm であった．

DNA シーケンスの決定と分子系統解析

分離株 HM21-486C, 488C を用いて，rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 配列を決定した．分子系統解析の結果，*E. pentasporium* (HM21-486C, 488C) は高い支持を有する，他の種と独立したクレードを形成した (Fig. 3)．

1.3.2 サザンカもち病菌 *Exobasidium gracile* (Shirai) Syd. & P. Syd.

国内博物館における標本の探索と観察

原記載に準ずる標本，もしくは記載者の白井博士が採集したオーセンティックな標本の発見には至らなかった。

タイプロカリティーにおける新規標本の探索と菌株の確立

東京都においてサザンカの葉に発生した菌類の標本 (HM17-816, HM18-624) を採集した (Table 1, 12). さらに標本から，菌株 (HM18-624C) を確立した。

標本の観察

病徴は 5 月上旬から中旬にかけて新葉もしくは新梢の全身もしくは部分的に確認された (Fig. 4A-E). 花芽には病徴は見られなかった。病徴部位は肥厚し葉の向軸側は健全葉に比べ色が薄くなり，ときに紅赤色を呈した (Fig. 4C, D). 背軸側は表皮組織が剥離し，その下に白色の菌叢が形成された (Fig. 4E).

葉上の菌叢中には担子器，担子孢子および分生子が観察された (Fig. 4F). 植物組織内では，細胞間を菌糸が伸長し，先端が細かく分枝した吸器を陥入している様子が観察された (Fig. 4H). 担子器は密生し，無色，無隔壁，棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 4F, G), 大きさ (59.1-)75.3-107.6(-124.0) × (2.6-)3.4-5.0(-5.6) μm であった。担子器上には長さ (0.7-)1.6-3.1(-3.9) μm の小柄が (2-)3-4(-5) 本生じ，その先に担子孢子が形成された (Fig. 4G). 担子孢子は，円筒形から紡錘形で無色，はじめ無隔壁で 1-4(-6) 隔壁を有し，基部に向かって細くなり，極めてまれに縦隔壁を形成，大きさ (10.6-)13.0-16.3(-18.7) × (2.6-)3.4-5.0(-5.6) μm であった (Fig. 4I-K). 担子孢子は 12-36 時間後には孢子の両端から発芽し，のちに隔壁で区切られた細胞からも菌糸を発芽した (Fig. 4M-O). 菌糸からは出芽型分生子が形成された (Fig. 4O). 分生子の形成は

標本による差があり，HM18-624 ではほとんど確認できなかつた (N=3)．HM17-816 上で観察された分生子は，円筒形で片側先端部が細く，大きさ (4.1-)5.0-9.4(-15.2) × (0.4-)0.5-1.3(-1.9)μm であつた (Fig. 4L)．

菌株の観察

分離株 HM18-624C は PDA 培地上で色素を形成しない，乳白色菌叢を形成した．培養 5 日間の菌叢において菌糸の形成は認められず酵母様のコロニーとなり，培養 30 日間経過した菌叢では菌糸の形成が確認され，コロニー表面にしわを伴つた (Fig. 4P-R)．分生子 (酵母) は無色，長楕円形，無隔壁で，極から娘細胞を出芽した．娘細胞を出芽した分生子は，極に顕著な突起がみられ (Fig. 4S, T)，大きさ (3.0-)4.0-5.8(-7.4) × (0.5-)0.7-1.3(-1.7)μm であつた．

DNA シーケンスの決定と分子系統解析

分離株 HM18-624C と HM17-816 を用いて，rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した．分子系統解析の結果，*E. gracile* (HM18-624C と HM17-816) は高い支持を有する，他の種と独立したクレードを形成した (Fig. 3)．

1.3.3 ツバキもち病菌 *Exobasidium camelliae* Shirai

国内博物館における標本の探索

原記載に準ずる標本，もしくは記載者の白井博士が採集したオーセンティックな標本の発見には至らなかつた．

タイプロカリティーにおける新規標本の探索と菌株の確立

東京都利島および大島においてツバキの新芽，実に発生した菌類の標本 (HM16-732, HM17-819, 851) を採集した (Table 1, 12)．さらに標本から，菌株 (HM16-732C) を確立した．

標本の観察

病徴は5月上旬、新梢や花芽、果実に発生し、全体が白色粉状の菌叢で覆われた (Fig. 5A-D). その一方で、葉に病徴は見られなかった. 病徴部位は肥厚して、表皮組織が剥離し、その下に白色の菌叢が形成されていた (Fig. 5A-D).

葉上の菌叢には担子器、担子孢子および分生子を観察することができた (Fig. 5E, F). 植物組織内では、細胞間を菌糸が伸長し、先端が細かく分枝した吸器の陥入を観察した (Fig. 5G). 担子器は密生し、無色、無隔壁、棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 5H-J), 大きさ (60.9-)85.4-109.1(-138.7) × (3.5-)5.2-7.7(-10.0) μm であった. 担子器上には長さ (1.1-)3.8-6.8(-8.1) μm の小柄が 2(-3)本生じ、その先に担子孢子が形成された (Fig. 5H). 担子孢子は、円筒形から紡錘形で無色、はじめ無隔壁で 1-6(-7)隔壁を有し、ときに 1-2(-3)縦隔壁を形成、基部に向かって細く (Fig. 5K, L), 大きさ (13.0-)17.6-18.6(-22.0) × (2.7-)4.5-7.5(-8.3) μm であった. 分生子は円筒形で片側先端部が細く、大きさ (3.4-)4.6-7.8(-12.2) × (0.7-)0.9-1.5(-1.9) μm であった (Fig. 5M). 担子孢子的縦隔壁の形成を Shirai (1896) は観察しておらず、小柄の数に差が認められた.

菌株の観察

HM16-732C は PDA 培地上で色素を形成しない、乳白色菌叢を形成した (Fig. 5N-P). 培養5日間の菌叢において菌糸の形成は認められず酵母様のコロニーとなり、培養30日間経過した菌叢では菌糸の形成が確認され、コロニー表面にしわを伴った (Fig. 5N). 分生子は円筒形で片側先端部が細く、大きさ (3.1-)4.2-5.9(-6.1) × (0.8-)1.5-2.5(-2.6) μm であった (Fig. 5Q, R).

DNA シーケンスの決定と分子系統解析

乾燥標本 HM17-819 および分離株 HM16-732C を用いて, rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した. 分子系統解析の結果, *E. camelliae* (HM17-819 と HM16-732C) は高い支持を有する, 他の種と独立したクレードを形成した (Fig. 3).

1.3.4 ツバキ粉もち病菌 *Exobasidium nudum* (Shirai) S. Ito & Otani

国内博物館における標本の探索

原記載に準ずる標本, もしくは記載者の白井博士が採集したオーセンティックな標本の発見には至らなかった.

タイプロカリティーにおける新規標本の探索と菌株の確立

島根県においてツバキの葉に発生した菌類の標本 (HM16-745, 746, 994) を採集した (Table 1, 12). さらに標本から, 菌株 (HM16-745C, 746C) を確立した.

標本の観察

病徴は 6 月上旬, 葉, 葉柄と枝に発生し, 葉の病徴は葉の主脈または周縁部に, 同心円状に広がる病斑を形成した (Fig. 6A-D). 病徴部位は若干肥厚し, 胚軸方向にのみ白色粉状の菌叢で覆われ, 向軸方向は黄緑色を呈し, 後に赤褐色に変色した (Fig. 6A-D). 葉柄や枝の病徴部位は肥厚して, 白色菌叢に覆われた (Fig. 6E, F). 花や実に病徴は見られなかった. また, *E. camelliae* による病徴のように表皮層が剥離する症状は観察されなかった (Fig. 6B, D).

葉上の菌叢中に担子器, 担子胞子を観察した (Fig. 6G-I). 担子器は密生し (Fig. 6G, I), 無色, 無隔壁, 棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 6K, L), 大きさ $19.2-46.6(-85.1) \times (3.4-4.6-7.1(-8.6)\mu\text{m}$ であった. 担子器上には長さ $(0.7-1.0-2.8(-4.7)\mu\text{m}$ の小柄が (2-)3-5 本生じ, その先に担子胞子が形成

された (Fig. 6M). 担子胞子は, 円筒形から紡錘形で無色, はじめ無隔壁で 1(-2) 隔壁を有し, 基部に向かって細く, 大きさ 13.0-18.2(-25.6) × (3.3-)4.1-5.8(-6.9) μm であった (Fig. 6N, O). 分生子の形成は非常にまれで HM16-745 でのみ観察された (Fig. 6P). 円筒形で片側先端部が細く, 大きさ (3.1-)4.3-9.1(-12.5) × 0.7-1.9(-4.2) μm であった.

菌株の観察

HM16-746C は PDA 培地上で色素を形成しない, 薄橙色のコロニーを形成した. コロニーは深いしわが入り, 通常不整形で, ときにコロニーの一部が分離した (Fig. 6Q-S). 分離したコロニーが新たなコロニーを形成し, 培地上に複数の小さなコロニーが形成されることもあった. 分生子は円筒形で緩やかに湾曲し, 大きさ (3.1-)4.3-9.1(-12.5) × 0.7-1.9(-4.2) μm であった (Fig. 6T).

DNA シーケンスの決定と分子系統解析

分離株 HM16-745C, 746C を用いて, rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した. 分子系統解析の結果, *E. nudum* (HM16-745C, 746C) は高い支持を有する, 他の種と独立したクレードを形成した (Fig. 3)

1.3.5 クロキもち病菌 *Exobasidium symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae* Kusano & Tokubuchi

国内博物館における標本の探索

原記載に準ずる標本, もしくは記載者の草野博士が採集したオーセンティックな標本の発見には至らなかった. なお, 記載文中には簡易的な図版が載せられていた.

タイプロカリティーにおける新規標本の探索と菌株の確立

島根県においてクロキの葉に発生した菌類の標本 (HM16-747, 991) を採集した (Table 1, 12). さらに標本から, 菌株 (HM16-747C) を確立した.

標本の観察

病徴は 5 月下旬, クロキの樹上的一部分にまとまって形成された新葉全体にてんぐ巣様の病徴を示した (Fig. 7A, B). 感染葉は細長く伸びて肥大し棍棒状であった. 感染葉全体は白色粉状の菌叢で覆われた (Fig. 7C-D). 花や実には病徴は見られなかった. また, 表皮層が剥離する症状は観察されなかった.

葉上の菌叢に担子器, 担子孢子および分生子を観察した (Fig. 7E). 担子器は密生し, 無色, 無隔壁, 棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 7F), 波打つようにジグザグ型を呈し, 大きさ $27.8-54.1(-79.5) \times (2.8-3.4-6.6(-9.2)) \mu\text{m}$ であった. 担子器上には長さ $(1.5-3.0-6.0(-8.1)) \mu\text{m}$ の小柄が 2-3(-4) 本生じ, その先に担子孢子が形成された (Fig. 7G, H). 担子孢子は, 円筒形から紡錘形で無色, はじめ無隔壁で 3-4(-6) 隔壁を有し, とくに縦隔壁を形成し, 基部に向かって細く, 大きさ $(14.4-16.6-21.0(-23.1)) \times (3.7-4.8-6.1(-6.2)) \mu\text{m}$ であった (Fig. 7I, J). 分生子は円筒形で片側先端部が細く, 大きさ $(4.2-6.4-9.4(-9.9)) \times (0.6-2.3-3.8(-3.9)) \mu\text{m}$ であった. 植物組織内では, 細胞間を菌糸が伸長し, 先端が細かく分枝した吸器を陥入している様子が観察された (Fig. 7K).

菌株の観察

HM16-747C は PDA 培地上で色素を形成しない, 薄橙色のコロニーを形成した. コロニーは細かなしわがみられた (Fig. 7L-N). 分生子は円筒形で片側先端部が細く, 大きさは $(4.2-6.4-9.4(-9.9)) \times (0.6-2.3-3.8(-3.9)) \mu\text{m}$ であった (Fig. 7O).

DNA シーケンスの決定と分子系統解析

分離株 HM16-747C を用いて, rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した. 分子系統解析の結果, *E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae* (HM16-747C) は *E. symploci-japonicae* var. *carpogrum* と高い支持を有する, 他の種と独立したクレードを形成した (Fig. 3).

1.3.6 アオグスモドキもち病菌 *Exobasidium machilii* Sawada

国内博物館における標本の探索

国立科学博物館に所蔵されていた澤田博士によって採集された本菌の標本 (TNS-F-218395), 1点のみ見つかった (Fig. 8A).

タイプロカリティーにおける新規標本の探索と菌株の確立

タイプロカリティーは台湾であるため, 新規標本を採取することができなかった.

標本の観察

封筒内には菌えいのみが収蔵され, 植物体 (*Machilus japonica* Syn. *M. pseudolongifolia*) における詳細な症状の観察を行うことができなかった. 菌えいは長さ 0.5-2cm と小型で, 褐色, 先端部が細かく分岐していた. 菌えい表面にはわずかに白色菌叢が観察された (Fig. 8B-E).

白色菌叢には担子器, 担子胞子および分生子が観察された. 担子器は密生し, 無色, 無隔壁, 棍棒状円柱形で基部に向かって細くなった (Fig. 8F, G). 担子器上には3つの小柄が生じ, その先に担子胞子が形成された (Fig. 8F). 小柄上で見られる形成初期の担子胞子は球状であった. 担子胞子は, 円筒形から紡錘形で無色, 基部に向かって細く, はじめ無隔壁で, のちに隔壁が観察された (Fig. 8H,

I). 分生子は片側先端部が細い円筒形であった (Fig. 8J). これらの形態学的特徴は原記載と一致した.

菌株の観察

標本に紐づく菌株は確認できなかった.

DNA シーケンスの決定と分子系統解析

標本上の菌体量が限られ、菌株が手に入らなかったことから DNA 塩基配列の決定と分子系統解析は行うことができなかった.

1.3.7 タブノキ類黒穂病菌 *Clinoconidium inouyei* (Henn. & Shirai) Kakish., S. Shibata & Hirooka

国内博物館における標本の探索

論文中に使用標本の存在は明記されず、記載者らが採集した標本等の発見には至らなかった.

タイプロカリティーにおける新規標本の探索と菌株の確立

宮崎県田野町においてホソバタブに発生した標本を採集した (HM19-003).

標本の観察

ホソバタブの新芽が褐変肥大し、成熟した菌えいでは表皮が崩れ、子実層と胞子塊が露出していた (Fig. 9A, D). 未熟な菌えいでは、中を割ると白色の子実層が表皮と果実の間を充満していた (Fig. 9E). 子実層中には、無色、胃状や棍棒状の不整形で頂端部に小柄を欠き、大きさ $17.9\text{-}25.1 \times 2.8\text{-}4.9\mu\text{m}$ となる担子器と無色から黄褐色で表面にいぼ状の突起を多数有し、楕円から倒卵形で大きさ $15.7\text{-}20.8 \times 9.4\text{-}12.6\mu\text{m}$ の担子胞子が観察された (Fig. 9F-J). 担子胞子は WA 培地上で発芽して菌糸を伸長した (Fig. 9K).

菌株の観察

PDA 培地上では，単孢子分離を行うと数日後に生育がとまり，多孢子分離によりコロニーが得られた (HM19-003C)．白から乳白色の菌糸状のコロニーを形成し，分生子は確認できなかった (Fig. 9B, C)．固形培地 (CMA, MA, MEA, OA, SNA, WA, YMA, V8)，液体培地 (PDB, YMB, YB) における培養，イオン濃度 (pH5~12)，温度，光 (BLB 照射，暗黒) 条件を検討したが，分生子の形成には至らなかった．

なお，担子孢子は採集後 1 か月経過した標本中の担子孢子を使用した場合にも発芽がみられた．

DNA シーケンスの決定と分子系統解析

分離株 HM19-003C を用いて，rDNA-ITS と LSU 領域について DNA 塩基配列を決定した．分子系統解析の結果，分離菌は *Clinoconidium* 属内に独立したクレードを形成した (Fig. 10)．

1.4 考察

1.4.1 ツツジ類てんぐ巢病菌 *Exobasidium pentasporium* Shirai

本種の記載文からは研究に使用された標本が 1 つか、複数存在するかについては明記されていなかった。しかし、国立科学博物館に所蔵されていた TNS-F-4617 は 1896 年 6 月に白井博士により栃木県日光市中禅寺湖付近で採集・同定されたヤマツツジに発生した *E. pentasporium* の標本であり、採集地や採集年月などこれらのすべての情報は記載文の内容と一致した (Fig. 1A)。その後も、この他のタイプとなりえる標本は見つからなかったことから、本標本を Holotype として指定した。原記載文では、本種の宿主植物としてツツジもしくは *Rhododendron indicum* として記されていた (Shirai 1896)。しかし、この標本情報より、ヤマツツジ (*Rhododendron kaempferi*) の学名を *R. indicum* と誤って記載している可能性が示唆された (Fig. 1B)。以上より、タイプロカリティーで採集された標本 HM21-486 上に見られた形態学的特徴は Shirai (1896) と一致したため (Table 6)、HM21-486 を epitype に指定した (Table 12) (Shibata & Hirooka 2022b)。

江塚 (1990b)によると、*E. pentasporium*による病害は発症後、永続的に症状が進展し、てんぐ巢上の葉は経年的に小さくなり、最終的に枝全体が枯死する。本病害はツツジに重大な影響をもたらす場合がある (Shibata & Hirooka 2022b, 2 章)。しかし、発生初期の症状は、葉裏面に菌叢を展開している場合を除いて罹病部と健全部位の判別が困難であるため、見過ごされる可能性がある。これまでに、*E. pentasporium*の標本の採集履歴から、本州の山間地域を中心に分布することが明らかとなっている (Table 13)。被害の予防には、これら山間地域の環境変化や宿主植物の経年的な変化を把握することが必要である。

1.4.2 サザンカもち病菌 *Exobasidium gracile* (Shirai) Syd. & P. Syd.

*Exobasidium gracile*は、Shirai (1896)において宿主や担子胞子の形態に差がみられたものの *E. camelliae* var. *gracile*として記載された。その後、Sydow et al. (1912)によって、独立した種として記載がなされた。本研究においても、*E. camelliae*との間には担子胞子の形態において差が確認され、分子系統解析の結果もそれを強く支持した (Table 7, 8, Fig. 3)。担子胞子の縦隔壁の形成を白井博士は報告していなかったが、宿主植物の感染部位や病徴、菌の形態学的特徴は Shirai (1896)と一致した。これらの結果を踏まえ、タイプロカリティーで採集した HM18-624 を Neotype に指定した (Table 12)。また、本標本では分生子の形成が不十分であったことから、形態学的特徴および rDNA が一致し (Fig. 3)、同じくタイプロカリティーで採集した HM17-816 を Epitype に指定することで、今後の分類・同定に貢献した (Table 12)。

1.4.3 ツバキもち病菌 *Exobasidium camelliae* Shirai

担子胞子の縦隔壁の形成を白井博士は報告していなかったが、Ito (1955), McNabb (1962), Reid (1969)の *E. camelliae*に関する研究で観察された。また、江塚 (1991a) は先行研究の結果から本種の小柄数はサンプルによって差がある可能性を指摘した。しかし、タイプロカリティーで採集した HM16-732 は宿主植物や病害発生部位、またその病徴が Shirai (1896)の記載文と一致した (Table 8)。これらの結果を踏まえ、HM16-732 を Neotype に指定した (Table 12)。

*E. camelliae*はヤブツバキの花や実が発生することで、植物の世代の継続に影響を与えるだけでなく、椿油の生産に使用する果実の収量を低下させ、経済的な被害をもたらすことが知られている (Shirai 1896)。本種の基準標本の指定

は、迅速かつ正確な同定を可能にすることから、植物病理学の発展に寄与するものと考えられる。

1.4.4 ツバキ粉もち病菌 *Exobasidium nudum* (Shirai) S. Ito & Otani

本種が起こすツバキ粉もち病の症状は、ツバキもち病と明瞭な差がみられるものの本病原菌の担子胞子や担子器の大きさがツバキもち病菌 *E. camelliae* と類似するとして、変種 *E. camelliae* var. *nudum* として記載された (Shirai 1911)。その後、Ito & Otani (1958) は、本変種を独立した種、*E. nudum* として記載した。本研究においては、*E. nudum* と *E. camelliae* との間には担子器の大きさ、担子胞子の形態および隔壁数に明確な差が認められ、分子系統解析の結果もそれを強く支持した (Table 8, 9, Fig. 3)。また、タイプロカリティーで採集した HM16-746 の形態学的特徴は Shirai (1911) の記載文と一致したため、HM16-746 を Neotype に指定した (Table 12)。

1.4.5 クロキもち病菌 *Exobasidium symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae* Kusano & Tokubuchi

Exobasidium symploci-japonicae var. *symploci-japonicae* の原記載 (草野 1907) にある図は、本種の特徴的な担子器の形態を捉えている。そこで、草野 (1907) 中の図を Lectotype に指定することとした。本研究で採集した標本 (HM16-747, 991) の宿主植物や病徴は草野 (1907) や江塚 (1991b) と一致したが、形態学的な特徴について比較したところ、担子器、担子胞子および分生子の大きさが既報より小さかった (Table 10)。特に大きさに差異が生じていた担子器の長さにおいては、長さが 100 μ m を上回るものは見られなかった。Nagao et al. (2003b) の *E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae* の担子器、担子胞子の大きさは HM16-746 と概ね一致する。これら形態の違いは、

おそらく、乾燥状態の標本を観察したためと考えられる。分生子の大きさは Nagao et al. (2003b) と差が認められたが、標本中に分生子の数が少なく、未熟なものしか計測できなかった可能性が考えられる。本研究で採集した標本は タイプロカリティーで採集された標本であり、宿主や病徴、担子器の形態学的特徴が一致したことから HM16-747 を Epitype として指定した (Table 12)。

1.4.6 アオグスモドキもち病菌 *Exobasidium machilii* Sawada

TNS-F-218395 は 1919 年 5 月 9 日、澤田博士により“台湾霧社タロワン”で採集・同定されたホソバタブ (*Machilus japonica* Siebold & Zucc. ex Blume Syn. *M. pseudolongifolia* Hayata ; アオグスモドキ) に発生した *E. machilii* の標本であった。本種の記載文に標本数が明記されていなかったものの (Sawada 1919), TNS-F-218395 の形態は記載文の内容と一致した (Fig. 8A)。このことより、TNS-F-218395 を Holotype として指定した (Table 12)。

E. machilii は、クスノキ科植物の幹上に菌えいを形成することが知られている。これは *Exobasidium* 属菌の特徴と異なり、*Laurobasidium* 属菌の属概念に類似する。*Laurobasidium* 属菌は基準種の *L. lauri* のほかに、*L. hachiyoense* と *L. cinnamomi* が知られ、いずれも *Exobasidium* 属菌として記載された。本グループは *Exobasidium* 属菌と同様に背軸方向を向いた単室型担子器を菌えいの表面に形成するものの、その宿主植物はクスノキ科に限定され、植物の幹や枝に鹿の角もしくは外気根のような巨大なゴールを形成する植物寄生菌として定義されている。このことから *Exobasidium machilii* については *Laurobasidium* 属菌との新組み合わせが必要であると考えられる。*Exobasidium machilii* は Sawada (1919) 以降、これまでに台湾や他地域における発生報告はなく、本病原菌による被害程度は分かっていない。しかし、*Laurobasidium* 属菌による病害は、一度

発症すると永続的に進展し、ゴール形成部位が物理的に弱くなることで、強風等による倒木被害の発生が知られる（堀江ら 2001）。このことから、今後被害が顕在化する可能性が考えられる。本研究により、本種の基準標本を指定したことは、本種の正確な同定に貢献するとともに、今後の本種の存在の再発見を促すことにもつながると考える。

1.4.7 タブノキ類黒穂病菌 *Clinoconidium inouyei* (Henn. & Shirai) Kakish., S. Shibata & Hirooka

タイプロカリティーで採集した HM19-003 の形態学的特徴は Hennings (1900) と一致したため (Table 11), HM19-003 を Neotype に指定した (Table 12, Kakishima et al. 2020).

本種は、担子胞子がいぼ状で褐色を帯びていることから、サビ病菌 *Uredo* 属菌の一種として記載された (Hennings 1900)。その後、Hino & Nagaoka (1931) は本種を黒穂菌 *Anthrocoidea* 属菌として記載した。この時、担子胞子の発芽が確認されていたものの、担子胞子を黒穂胞子、菌糸を担子器、菌糸上に形成された分生子を担子胞子として解釈していたと考えられる。本研究では、担子胞子の発芽を観察しただけでなく、菌糸が数 100 μ m を超えても伸長し、のちに分岐をしたため担子器とは考えづらい。さらに、分子系統解析の結果も、モチビョウキン目の系統であることを強く支持した。以上より、*Clinoconidium* 属菌との新組み合わせを提案した (Kakishima et al. 2020)。

なお、褐色の担子胞子は採集 1 か月経過後も発芽能力を有した。このことから、本菌の胞子は厚壁胞子のような耐久性を有する可能性が考えられる。

1.4.8 章の考察

本研究において、モチビョウキン目菌類の *Exobasidium* 属 7 種 (*E. pentasporium*, *E. gracile*, *E. camelliae*, *E. nudum*, *E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. machilii*, *Cl. inouyei*) について最新の命名規約に従い、基準標本や菌株、DNA 塩基配列情報を確立した。これまでに国内外においてこれら菌類による甚大な宿主植物の被害はほとんど報告されていない。しかし、例えば *E. gracile*, *E. camelliae*, *E. nudum* は日本国内に普遍的に分布しており (Table 13) さらに、*E. pentasporium* (ロシア, 中国), *E. gracile* (アメリカ, 中国, 台湾, 韓国, ニューージーランド), *E. camelliae* (ネパール, アメリカ, ニューージーランド, イギリス, 韓国), *E. japonicum* (中国, 韓国, チリ, オーストラリア), *Cl. inouyei* (中国) など、世界中で比較的広域に発生している (Farr & Rossman 2021, Ling 1953)。このことから、本研究で扱った多くの種は、今後の宿主植物の老齢化、環境変化、さらに流通を通じた本病原菌の移動により、感染の拡大が危惧される重要な病原菌である。例えば、*E. japonicum* は一部地域で侵入外来生物として指定され防疫上看過できない病原体として認識されている (GBIF.org (2022), GBIF Home Page. Available from: <https://www.gbif.org>, 2022 年 4 月 26 日時点)。このことから、本研究は日本国内外における植物防疫上重要な菌類に対して、正確な診断、またその手法開発に貢献することが期待される。

E. formosum, *E. hemisphaericum*, *E. reticulatum*, *E. taihokuense*, *Kordyana aneilemae*, *K. comellinae* Sawada, *K. polliae* Sawada, *Graphiola cylindrica* については、記載文中に基準標本の存在が明示されていなかったこともあり、本研究における調査の結果、基準標本の発見に至らなかった (Table 1)。これら種

のうち、*E. taihokuense* は新種記載において基準標本の指定が義務付けられた 1958 年以降に記載された種であったため、違法名と考えられ、新たな基準標本の指定に向けたタイプロカリティーも含めた継続的な標本の探索が必要である。*E. reticulatum* および *E. monosporum* については、記載者の澤田 (Ito & Sawada 1912, 澤田 1922) によって採集された標本を発見した。しかし、種の記載に使用された標本情報とは一致しなかった。これら種についても、新たな基準標本の指定に向けたタイプロカリティーにおける探索と、継続的な標本の探索が必要である。

モチビョウキン目菌類を含めた菌類の種概念は、形態的特徴が微小であり、そのことで情報が乏しいため曖昧さを有することが多い。本目菌類の分類学的研究は 200 年以上にもわたり、ときにその微小な形態的特徴をもとに多くの種が記載されてきた。現在、少しずつ本目菌類においても分子系統解析により種の境界線を数値として可視化できるようになったものの、菌類のバーコード DNA である ITS 領域の登録数は形態分類によって記載された種の 15% に満たず、多くの種についてその基準を設置するに至っていない (Schoch et al. 2012)。また、緒言で述べたように、半数以上の種は分子系統解析を用いた解析が実施されていない。さらに世界中に広く分布し、他の菌群と比べても長い年月をかけて行われた本目菌類の形態分類は、それぞれの地域の研究者ごとに分類学的な基準が異なることも多い (Nannfeldt 1971)。今回の 7 種の基準標本を設定したことは、これまで標本の欠失により先行研究の結果を再検討することが困難であった状況を打開し、今後国内外の研究者らによる分類学的概念のすり合わせを行う意味でも重要と考える。

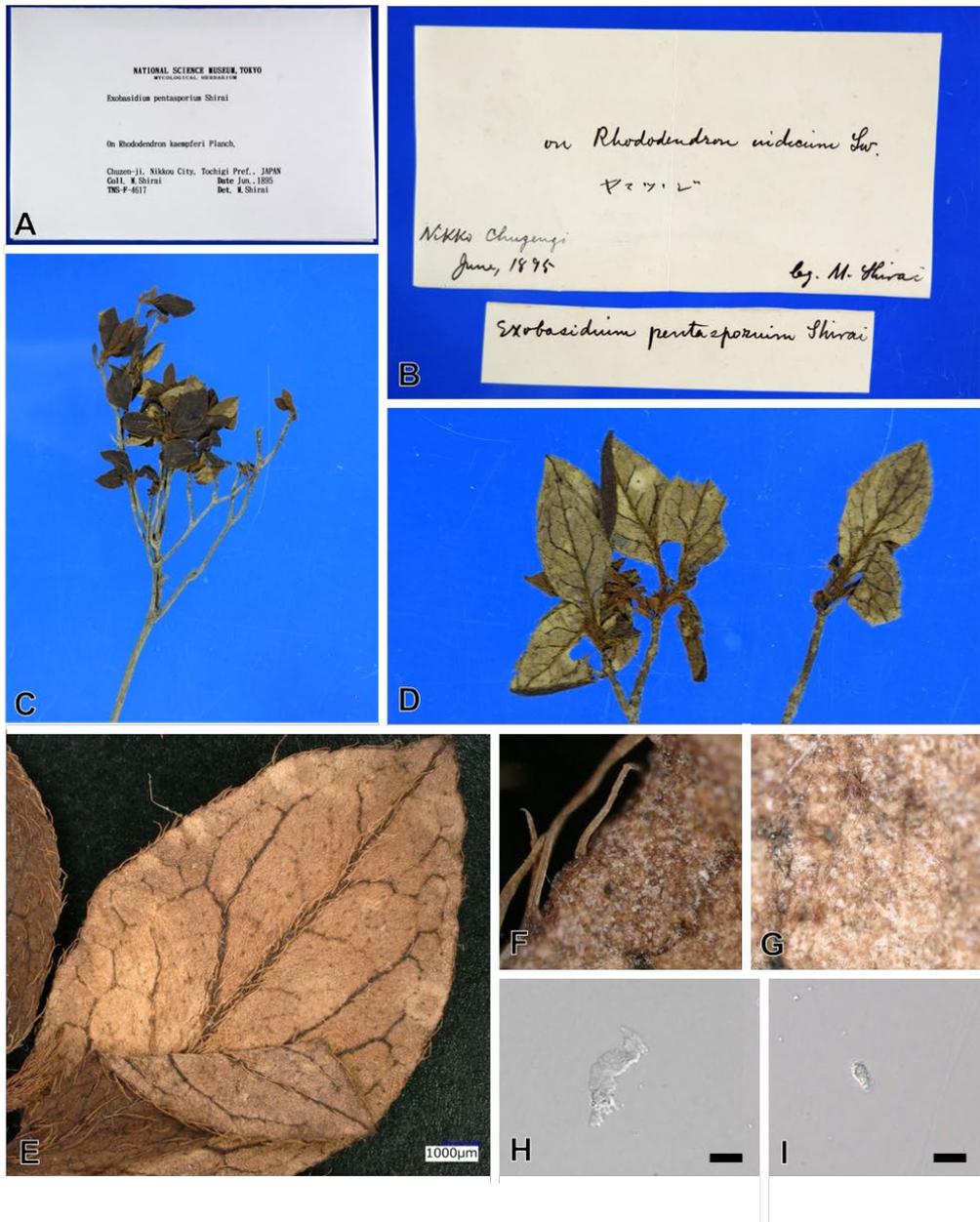


Fig. 1 Holotype specimen (TNS-F 4617) of *Exobasidium pentasporium* on *Rhododendron kaempferi* collected by Shirai. Specimen cover (A), annotation card written by Dr. Shirai (B), symptom of Witch's broom (C), white spot on abaxial side of the leaves (D, E), no hymenial layer (F, G), basidium-like structure (H), basidiospore-like structure (I). Bars: H, I 10µm

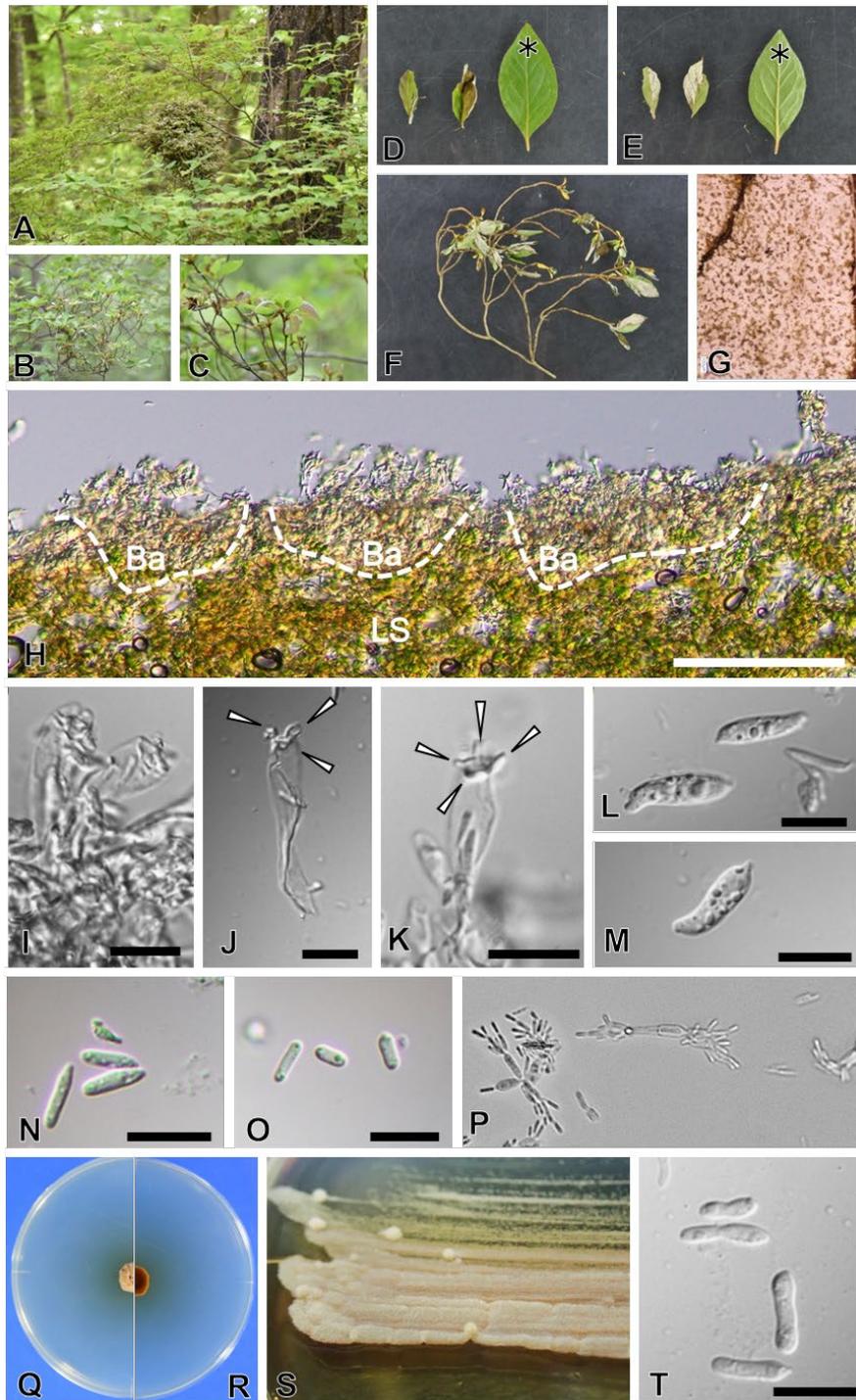


Fig. 2 Symptoms and morphological characters of *Exobasidium pentasporium* on *Rhododendron kaempferi*. Witch's broom (A, F: HM21-486, B, C: HM21-488). Hymenia on abaxial side on leaf blisters (D, E: HM21-488, G: HM21-486), basidia (Ba) emerged directly from the leaves surface (LS) (H, I), sterigma (arrows) on a basidium (J, K), basidiospores (L, M), large conidia (N), small conidia (O), germinating basidiospores (P), colony on PDA at 20 ° C for 30 d (Q, R), colony on PDA for 5 d (S), conidia on PDA (T). Asterisks indicate healthy leaves. Bars: H 100µm; I–O, T 10µm

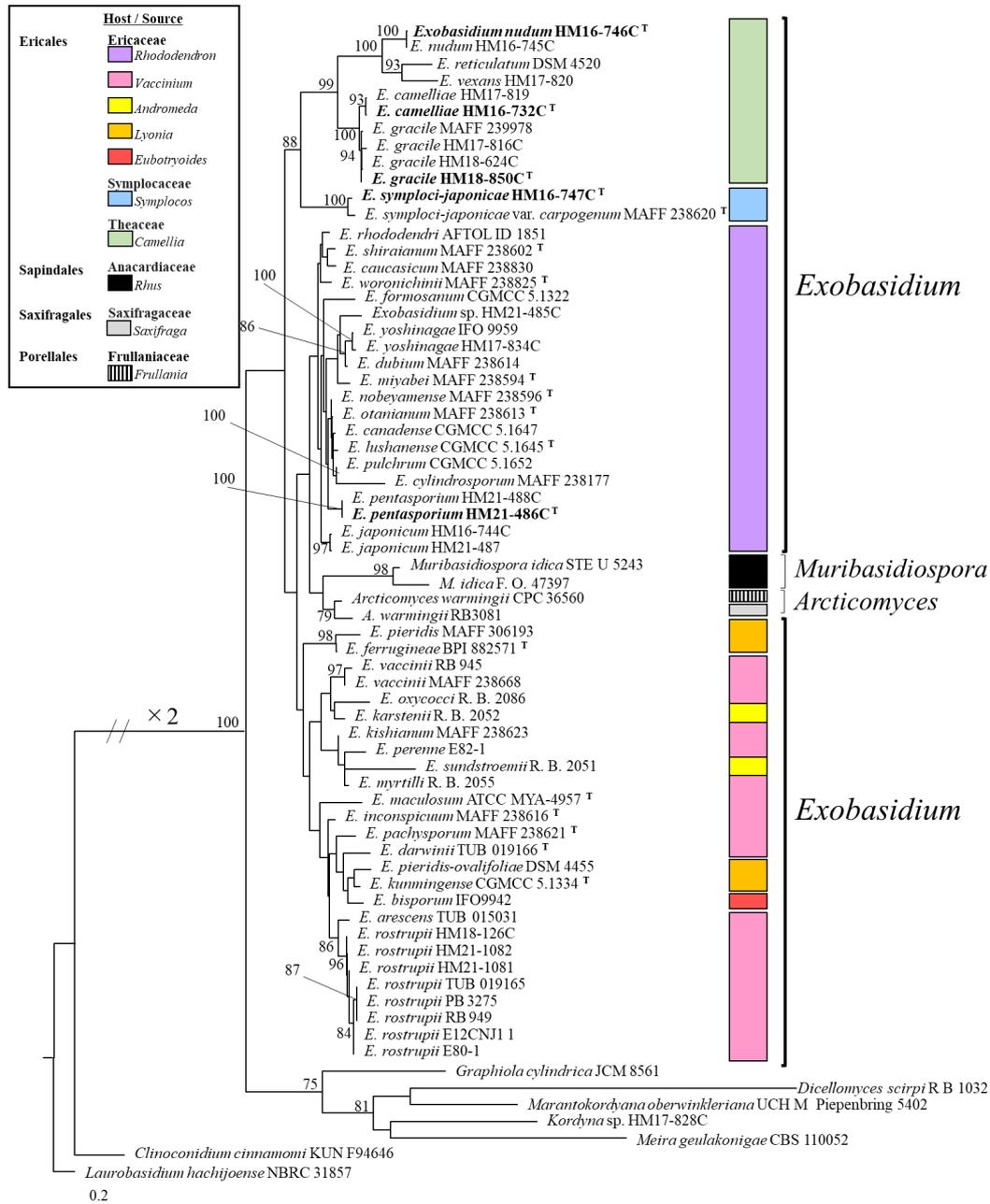


Fig. 3 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+I+G for ITS and TrN+I+G for LSU (Bootstrap value: > 70%). *Clinocidium cimamomi* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate, specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

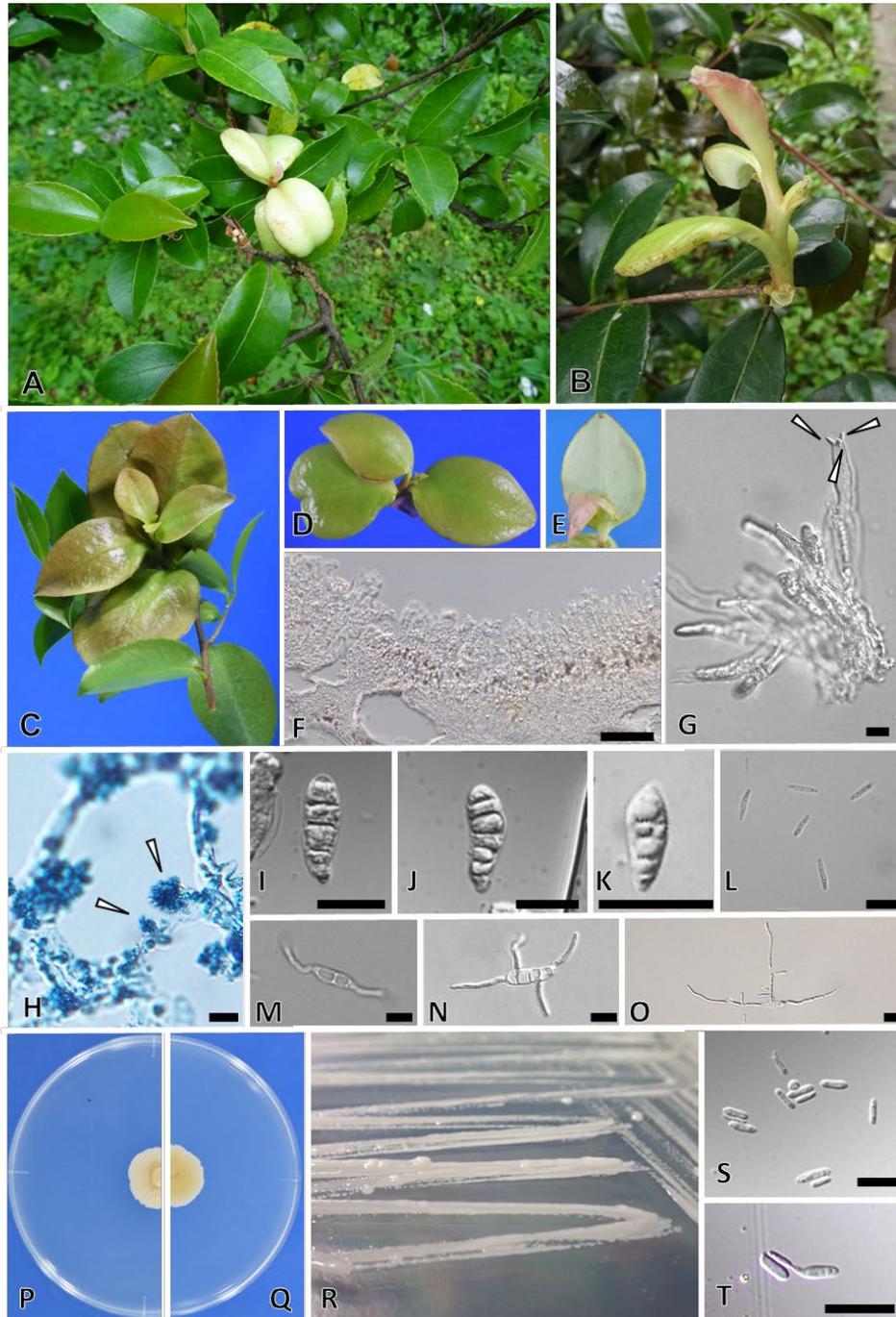


Fig. 4 Symptoms and morphological characters of *Exobasidium gracile* on *Camellia sasanqua* (C, H, L, M: HM17-816, D, E, G, I, J, N, P-T: HM18-624, 624C, F: HM17-850, K: HM17-817, O: HM18-625). Hypertrophic symptoms on leaves and shoots (A-D), hymenium on abaxial side on hypertrophy leaf (E), basidia emerged directly from the leaves surface (F), sterigma (arrows) on a basidium (G), haustoria (arrows) (H), basidiospores (I-K), conidia (L), germinating basidiospores (M-O), colony on PDA at 20 ° C for 30 d (P, Q) colony on PDA for 5 d (R), conidia on PDA (S, T). Bars: F 50µm; G-O, S, T 10µm

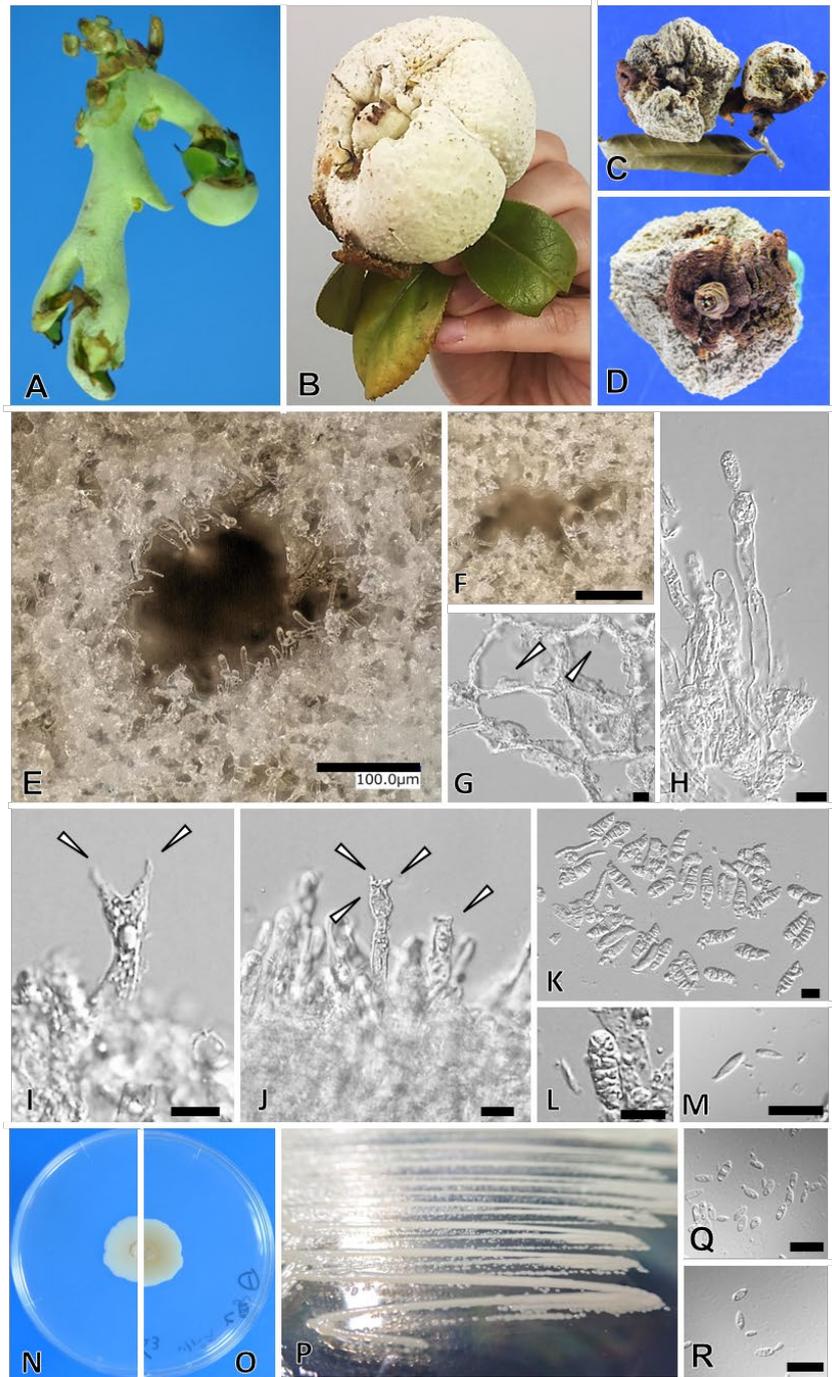


Fig. 5 The symptoms and morphological characters of *Exobasidium camelliae* on *Camellia japonicum* (A : HM16-732, B, K : HM17-852, C-J, L-R: HM17-819). Hypertrophic symptoms on shoot and bud (A-D), Hymenium on gall surface (E, F), haustoria (arrows) (G), basidiospore on basidium (H), sterigma (arrows) on a basidium (I, J), basidiospores (K, L), conidia (M), colony on PDA at 20 ° C for 30 d (N, O), colony on PDA for 5 d (P), conidia on PDA (Q, R). Bars: E, F 100µm; G–M, Q, R 10µm

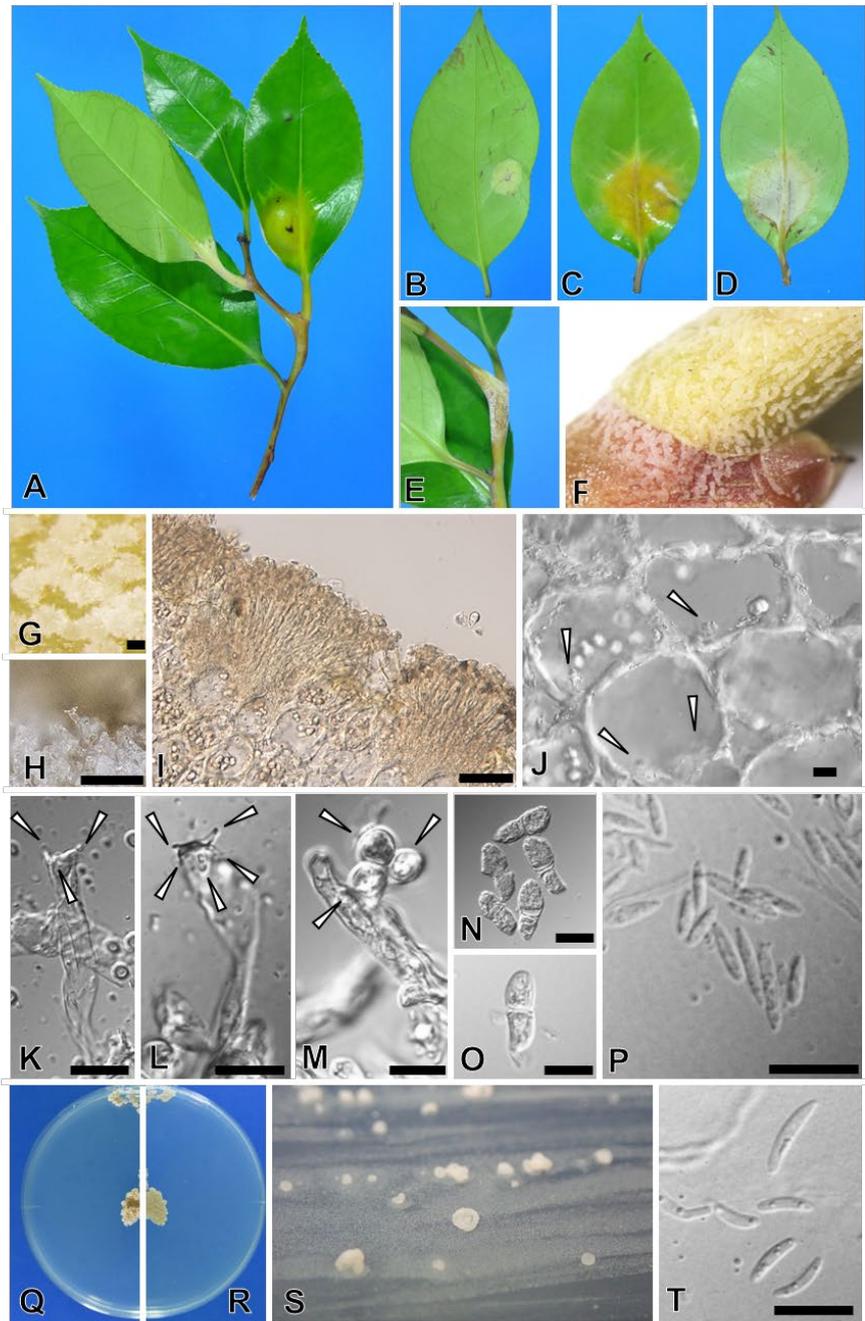


Fig. 6 The symptoms and morphological characters of *Exobasidium nudum* on *Camellia japonicum* (A, C-G, K-O, Q-T : HM16-746, B, P : HM16-745, H-J: HM16-994). Leaf blisters (A-D) symptoms (E, F), Hymenia on symptoms (G-I), haustoria (arrows) (J), sterigma (arrows) on a basidia (K, L), basidiospores on top basidium (M), basidiospores (N, O), conidia (P), colony on PDA at 20 ° C for 30 d (Q, R) colony on PDA for 5 d (S), conidia on PDA (T). Bars: G 100µm; H, I 50µm; J-P, 10µm

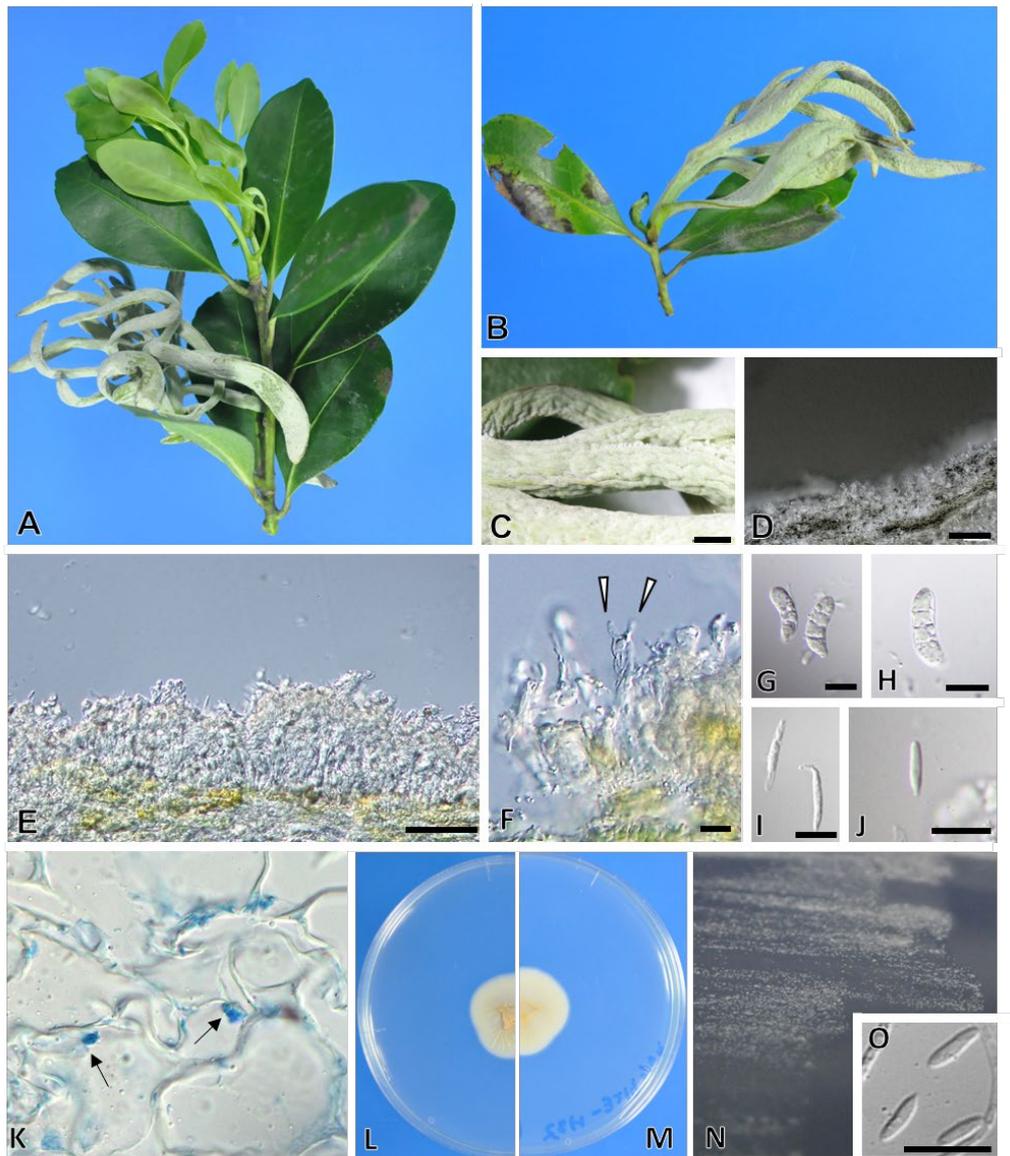


Fig. 7 Symptoms and morphological characters of *Exobasidium symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae* on *Symplocos nakaharae* (A-O : HM16-747). Hypertrophic symptoms on leaf (A, B), Hymenia on symptoms (C-E), sterigma (arrows) on a basidium (F), basidiospores (G, H), conidia (I, J), haustoria (arrow) (K), colony on PDA at 20 ° C for 30 d (L, M) colony on PDA for 5 d (N), conidia on PDA (O). Bars: C 2mm; D, E 100µm; F-J, O 10µm



Fig. 8 Holotype specimen (TNS-F-218395) of *Exobasidium machilii* on *Machilus japonica* Syn. *M. pseudolongifolia* collected by Sawada. Specimen cover (A), galls (B-D), gall covered with fugal layer (E), sterigma (arrows) on a basidium (F, G), basidiospore (H, I), conidium (J). Bars: F-J 10µm

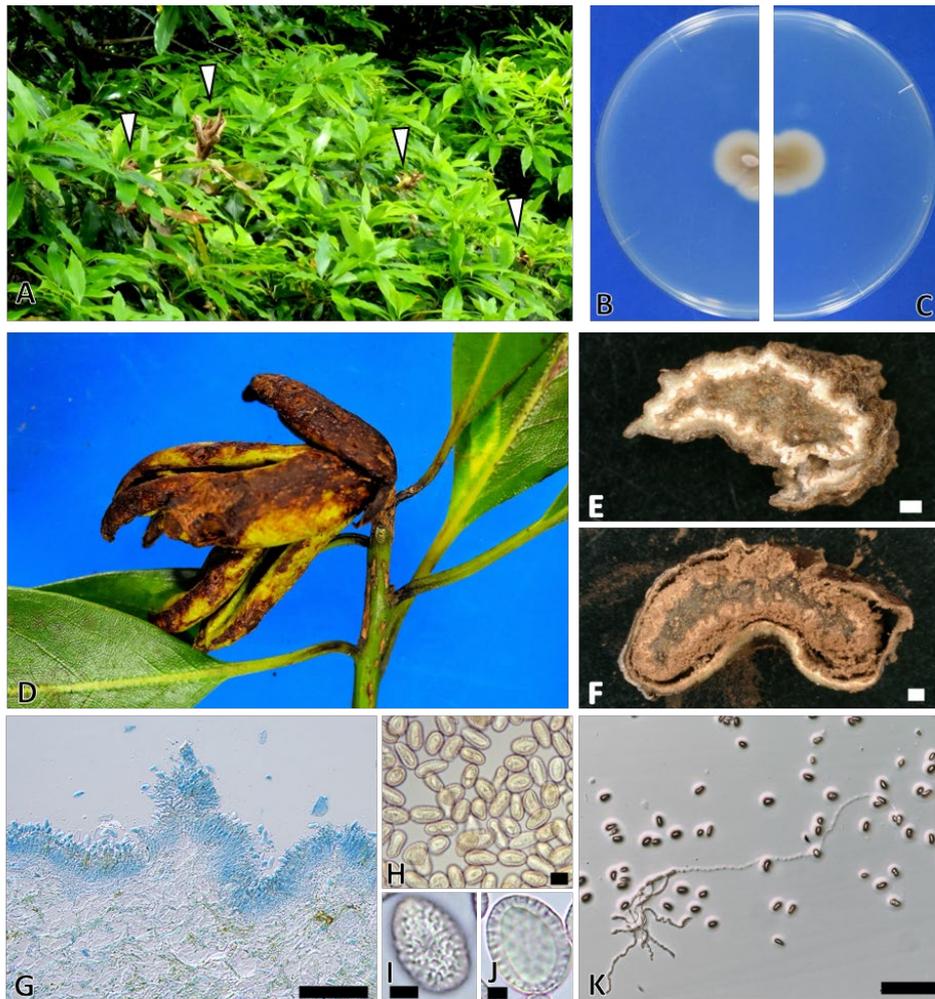


Fig. 9 Symptoms and morphological characters of *Clinoconidium inouyei* on *Machilus japonica* (A, F: HM19-003). Galls formed on shoot bud of the tree (A, D), colony on PDA at 20 ° C for 30 d (B, C), immature hymenium on gall (E), mature hymenium on gall (F), hymenium layer (G), basidiospores (H-J), germinating basidiospores (K) Bars: G, K 100µm; H-I 10µm Photo by Dr. Kakishima (A)

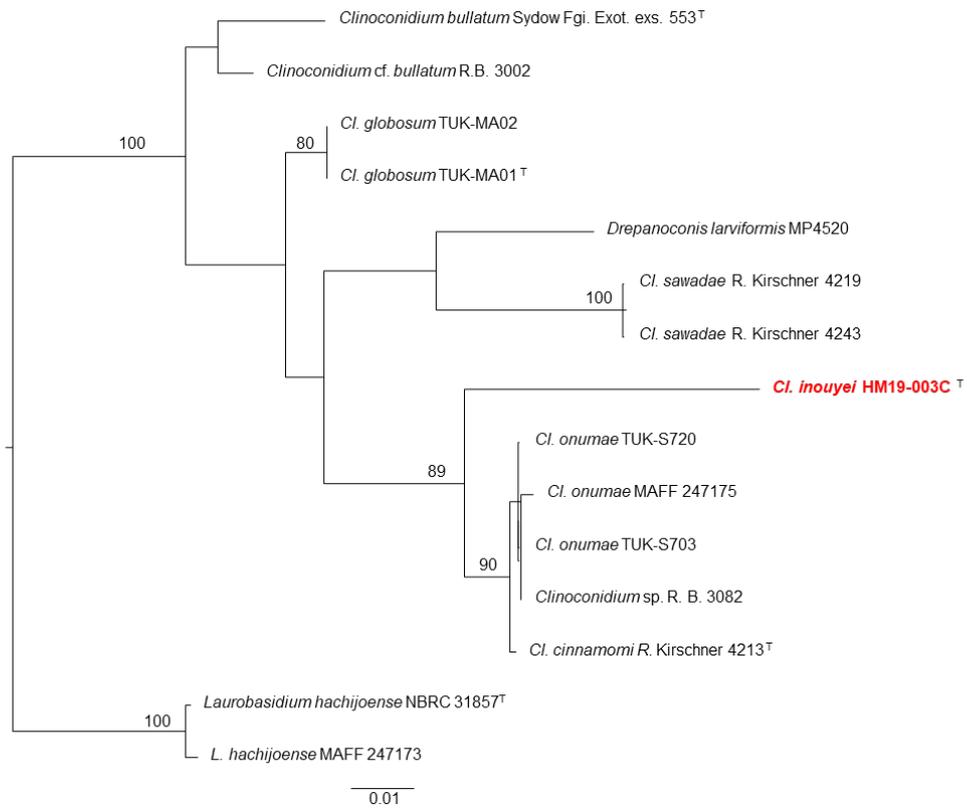


Fig. 10 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the TIM2+I for ITS and TIM2+I for LSU (Bootstrap value: > 70%). Two isoaltes of *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

Table 1 Information of type specimens for Japanese Exobasidioid fungi

Species name	Protologue	Specimen voucher	Typlocarity	Collect date
<i>Exobasidium asebiae</i>	Ezuka & Hara (1959)	TNS-F-196139	Ena,, Gihu	May, 1956
<i>E. bisporum</i>	Sawada (1950)	Sawada 5411	Mt. Himekami, Iwate	June, 1907
<i>E. cylindrosporum</i>	Ezuka (1990b)	NIAES 10472	Haibara, Shizuoka	May, 1971
<i>E. camelliae</i>	Shirai (1896)	HM16-732	Dogenzaka, Shibuya, Tokyo Izu islands, Tokyo	May
<i>E. formosum</i>	Sawada (1922a)	unknown	Taichu · Taipei, Taiwan	Janurari,1915 · May,1920
<i>E. giganteum</i>	Hirata (1981b)	MAPL-3	Miyakonojo, Miyazaki	November, 1975
<i>E. gracile</i>	Shirai (1896)	HM18-624	Tokyo	May
<i>E. hemisphaericum</i>	Shirai (1896)	unknown	Mt. Odaihara, Nara	Summer, 1895
<i>E. inconspicuum</i>	Nagao et al. (2006)	NIAES 10512	Haibara, Shizuoka	May, 1956
<i>E. japonicum</i>	Shirai (1896)	unknown	Tokyo	May
<i>E. japonicum var. hypophyllum</i>	Ezuka (1990b)	NIAES 10463	Age, Mie	May, 1971
<i>E. kawanense</i>	Ezuka (1990b)	NIAES 10477	Haibara, Shizuoka	May, 1956
<i>E. kishianum</i>	Nagao et al. (2006)	NIAES 10519	Tsu, Mie	June, 1974
<i>E. machilii</i>	Sawada (1919)	TNS-F-218395	Tarowan, Musha, Taiwan	May, 1919
<i>E. miyabei</i>	Nagao et al. (2003a)	TSH-B 0075	Hakodate, Hokkaido	June, 2001
<i>E. monosporum</i>	Sawada (1922a)	unknown	Hsinchu · Taipei, Taiwan	April,1922 · May,1910
<i>E. nobeyamense</i>	Nagao et al. (2001)	NIAES 10569	Minamisaku, Nagano	May, 1994
<i>E. nudum</i>	Shirai (1911)	HM16-746	Izu islands, Tokyo · Mie · Kochi	unknown
<i>E. otanianum</i>	Ezuka (1991a)	NIAES 10496	Fukuyama, Hiroshima	April, 1971

Species name	Protologue	Specimen voucher	Typlocarity	Collect date
<i>Exobasidium papuanum</i>	Kobayashi (1971)	TNS-F-225691	Mt. Wilhelm, Papua New Guinea	January, 1970
<i>E. pentasporium</i>	Shirai (1896)	TNS-F-4617	Lake Chuzenji, Nikko, Tochigi	June, 1985
<i>E. pieridis</i>	Hennings (1902)	Kusano 79	Mt, Tsukuba, Ibaraki	May, 1900
<i>E. pieridis-ovalifoliae</i>	Sawada (1931)	TNS-F-220657	Taipei, Taiwan	February, 1929 November, 1908
<i>E. reticulatum</i>	Ito & Sawada (1912)	unknown	Taipei, Taiwan · Shizuoka	January, 1910 · Aprile, May, 1911
<i>E. sakataniense</i>	Hirata (1981a)	MAPL-2	Nichinan, Miyazaki	July, 1951
<i>E. sakishimaense</i>	Otani (1976)	TNS-F-50208	Iriomote, Okinawa	June, 1973
<i>E. sasanqua</i>	Hara & Ezuka (1959)	TNS-F 19607	Shimada, Sizuoka	June, 1955
<i>E. shiraianum</i>	Hennings (1902)	S-F20843	Mt, Shirane	July, 1900
<i>E. symploci-japonicae</i> var. <i>symploci-japonicae</i>	Kusano (1907)	HMI6-747	Kochi · Shimane	Spring,
<i>E. symploci-japonicae</i> var. <i>carpogenum</i>	Nagao et al. (2003b)	TSH-B 0090	Onga, Fukuoka	June, 2001
<i>E. taihokuense</i>	Sawada (1959)	unknown	Taiwan	unknown
<i>E. woronichinii</i>	Nagao et al. (2004a)	TSH-B0081	Me-akan-dake spa, Hokkaido	June, 2002
<i>E. yoshinagae</i>	Hennings (1902)	Yoshinaga 11	Sagawa, Kochi	May, 1901
<i>Kordyana aneilemae</i>	Sawada (1931)	unknown	Taipei, Taiwan	October, 1928,
<i>K. comellinae</i> Sawada	Sawada (1922)	unknown	Tainan · Kaohsiung, Taiwan	August · September 1922
<i>K. polliae</i> Sawada	Sawada (1943)	unknown	Karen, Taiwan	August, 1928
<i>Laurobasidium hachijoense</i>	Iijima et al. (1985)	TNS-F-51502	Hachijo, Tokyo	Iijima et al. (1985)

Species name	Protologue	Specimen voucher	Typlocarity	Collect date
<i>Clinoconidium globosum</i>	Hirata (1979)	Hirata 4014	Hetsuka, Kagoshima	December, 1964
<i>C. inouyei</i>	Hennings (1900)	TNS-F-54697	Amami, Kagoshima	March, 1997
<i>C. onumae</i>	Ito (1935)	TNS-F-54697	Amami, Kagoshima	March, 1997
<i>C. sawadae</i>	Sawada (1919)	TNS-F-89145	Miyazaki, Miyazaki	May, 2019
<i>Graphiola cylindrica</i>	Kobayashi (1952)	unknown	Aoshima, Miyazaki	March · December, 1951
<i>G. trachycarpi</i>	Hennings (1904)	BPI 183565	Yoki, Kochi	November, 1903
<i>Meira nashicola</i>	Yasuda et al. (2006)	MAFF 230028	Tohaku, Tottori	September, 2001

*Red Character ; type specimen was designated

**Bold : Location of type specimen was confirmed

Table 6 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium pentasporium* and similar species

		<i>Exobasidium pentasporium</i> HM21-486 ^T	<i>E. pentasporium</i> HM21-586	<i>E.</i> <i>pentasporium</i> Shirai (1896)	<i>E. pentasporium</i> Sawada (1950)	<i>E. pentasporium</i> Ito (1955)	<i>E. pentasporium</i> Ezuka (1990b)
Basidia	size (μm)	(13.4–)22.8–35.7(–42.1) \times (2.8–)3.4–6.6(–9.2)	22.1–35.9 \times 3.4–6.6	nd	nd	nd	6.0–7.0 (wide)
Sterigma		3–5	4–5	4–6	nd	4–6	(3–)4–5(–6)
Basidiospores	size (μm)	(11.3–)12.2–15.3(–17.5) \times (2.0–)2.8–3.7(–4.0)	12.9–16.6 \times 2.7–4.1	14.4 \times 4.0	nd	14.5 \times 4.0	11–18 \times 3.0–4.0
	septa	1(–2)	1	nd	nd	nd	1
Conidia	size (μm)	(3.9–)5.4–8.6(–9.7) \times (0.5–)0.7– 1.2(–1.6)	6.1–8.7 \times 0.7–1.4	nd	nd	nd	4.0–10 \times 0.6–2.0
Host plants		<i>Rhododendron kaempferi</i>	<i>R. kaempferi</i>	<i>R. kaempferi</i>	<i>R. tschonoskii</i>	<i>R. kaempferi</i> <i>R. tschonoskii</i> <i>Tripetaleia</i> <i>paniculata</i>	<i>R. kaempferi</i> <i>R. macrosepalum</i>

^T : Type

nd : no data

Table 7 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium gracile* and similar species

		<i>Exobasidium gracile</i> HM18-624 ^T	<i>E. gracile</i> HM17-816	<i>E. gracile</i> Shirai (1896)	<i>E. gracile</i> Sawada (1935)	<i>E. gracile</i> McNabb (1962)	<i>E. gracile</i> Ezuka (1990a)
Basidia	size (μm)	(59.1–)75.3–107.6(–124.0) × (2.6–)3.4–5.0(–5.6)	48.9–177.4 × 11.4–16.2	nd	7.0–8.0 (wide)	50–80 × 5.0–7.0	100–150 × (5.0–)7.0–10
Sterigma		(2–)3–4(–5)	2(–4)	4	2–4	2(–4)	2–3(–4)
Basidiospores	size (μm)	(10.6–)13.0–16.3(–18.7) × (2.6–)3.4–5.0(–5.6)	11.7–14.2 × 4.1–5.7	14.5 × 2.5–5.0	12–24 × 5.0–8.0	12.5–16.0 × 3.5–5.5	12–20 × 3.5–6.0
	lateral septa	1–4(–6)	1–2(–4)	nd	1–5	(1–) 3(–5)	(1–) 3
	vertical septa	1	nd	nd	nd	nd	nd
Conidia	size (μm)	nd	(4.1–)5.0–9.4(–15.2) × (0.4–)0.5–1.3(–1.9)	nd	5.0–10 × 1.5–3.0	nd	6.0–13 × 1.0–2.5
Host plant		<i>Camellia sasanqua</i>	<i>C. sasanqua</i>	<i>C. sasanqua</i>	<i>C. oleifera</i>	<i>C. sasanqua</i>	<i>C. sasanqua</i>

^T : Type

nd : no data

Table 8 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium camelliae* and similar species

		<i>Exobasidium camelliae</i> HM16-732 ^T	<i>E. camelliae</i> Shirai (1896)	<i>E. camelliae</i> Ito (1955)	<i>E. camelliae</i> McNabb (1962)	<i>E. camelliae</i> Reid (1969)	<i>E. camelliae</i> Ezuka (1990a)
Basidia	size (μm)	(60.9–)85.4–109.1(–138.7) × (3.5–)5.2–7.7(–10.0)	nd	nd	70–100 × 6.0–9.0	169 × 5.8–6.0	130–160 × 6.0–12
Sterigma		2–(3)	4	(2–)4	2	2	2–3(–4)
Basidiospores	size (μm)	(13.0–)17.6–18.6(–22.0) × (2.7–)4.5–7.5(–8.3)	14.5–17 × 7.0	14.5–19 × 6.0–8.0	16–22 × 5.5–8.5	14–22 × 4.8–8.0	15–25 × 5.0–7.5
	lateral septa	1–6(–7)	nd	1–7	(1–)3–4(–5)	1–7	(1–)3(–7)
	vertical septa	1–2(–3)	nd	1–2	1?	1?	nd
Conidia	size (μm)	(3.4–)4.6–7.8(–12.2) × (0.7–)0.9–1.5(–1.9)	nd	5.0–10 × 1.5–3.0	9.0–11 × 1.5–2.5	4.2–9.0 × 0.5–1.2	5.0–15 × 1.5–2.5
Host plant		<i>Camellia japonica</i>	<i>C. japonica</i>	<i>C. japonica</i>	<i>C. japonica</i>	<i>C. japonica</i>	<i>C. japonica</i>

^T : Type

nd : no data

Table 9 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium nudum* and similar species

		<i>Exobasidium nudum</i>	<i>E. nudum</i>	<i>E. nudum</i>	<i>E. nudum</i>
		HM16-746 ^T ,745	Shirai (1911)	Ito & Otani (1958)	Ezuka (1990a)
Basidia	size (μm)	19.2–46.6(–85.1) × (3.4–)4.6–7.1(–8.6)	nd	100 × 7.5	100 × 5.0–8.0
Sterigma		(2–)3–5	nd	4	(2–)4
Basidiospores	size (μm)	13.0–18.2(–25.6) × (3.3–)4.1–5.8(–6.9)	nd	8.5–17 × 4.5–7.0	10–20 × 4.5–8.0
	lateral septa	1(–2)	nd	1–3	1–3
	vertical septa	0	nd	nd	nd
Conidia	size (μm)	(3.1–)4.3–9.1(–12.5) × 0.7–1.9(–4.2)*	nd	nd	nd
Host plant		<i>Camellia japonica</i>	<i>C. japonica</i>	<i>C. japonica</i>	<i>C. japonica</i>

*data from HM16-746 only

^T : Type

nd : no data

Table 10 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium symploci-japonicae* and similar species

		<i>Exobasidium symploci-japonicae</i> HM16-747 ^T	<i>E. symploci-japonicae</i> Kusano (1907)	<i>E. symploci-japonicae</i> Ezuka (1991b)	<i>E. symploci-japonicae</i> Nagao (2003b)*
Basidia	size (μm)	27.8–54.1(–79.5) \times (2.8–)3.4–6.6(–9.2)	120–140 (long)	100–150 \times 8.0–13.0	33–66 \times 5.0–8.0
Sterigma		2–3(–4)	(2–)4(–5)	(2–)3–4(–5)	2–4
Basidiospores	size (μm)	(14.4–)16.6–21.0(–23.1) \times (3.7–)4.8–6.1(–6.2)	17–22.5 \times 6.0–7.0	18–25 (–27) \times 5.0–6.5	15–22 \times 4.5–7.0
	lateral septa	3–4(–6)	nd	1–3	0–4(–6)
	vertical septa	1	nd	nd	nd
Conidia	size (μm)	(4.2–)6.4–9.4(–9.9) \times (0.6–)2.3–3.8(–3.9)	nd	10–27 \times 2.0–3.0	(14–)16–22(–32) \times 1.5–2.0
Host plant		<i>Symplocos kuroki</i>	<i>S. kuroki</i>	<i>S. kuroki</i>	<i>S. kuroki</i>

* NIAES 20520

^T : Type

nd : no data

Table 11 Comparison of distinctive morphological features of *Climoconidium inouyei* and similar species

		<i>Climoconidium inouyei</i> HM19-003 ^T	<i>Cl. inouyei</i> Hennings (1900)	<i>Cl. inouyei</i> Hino & Nagaoka (1931)	<i>Cl. inouyei</i> Ling (1953)
Basidia	size (μm)	17.9–25.1 \times 2.8–4.9.0	nd	nd	nd
Sterigma		absent	nd	nd	nd
Basidiospores	size (μm)	15.7–20.8 \times 9.4–12.6	14–21 \times 11–18	11–25 \times 7.0–15	10.5–21 \times 6.5–13
	septa	0	nd	nd	nd
Conidia	size (μm)	nd	nd	nd	nd
Host plant		<i>Machilus japonica</i>	<i>Symplocos</i> sp.*	<i>M. longifolia</i> <i>M. thunbergii</i>	<i>Machilus</i> sp.

*misidentification of *Machilus* species

^T : Type

nd : no data

Table 12 List of specimens examined in this study

Specimen Voucher	Strain	Species name	Collected site	Collected date
HM21-486	HM21-486C	<i>Exobasidium pentasporium</i>	Nikko, Tochigi	19, May, 2021
HM21-488	HM21-488C	<i>E. pentasporium</i>	Nikko, Tochigi	19, May, 2021
HM18-624	HM18-624C	<i>E. gracile</i>	Chofu, Tokyo	7, May, 2018
HM17-816	-	<i>E. gracile</i>	Tachikawa, Tokyo	14, May, 2017
HM16-732	HM16-732C	<i>E. camelliae</i>	Is. Toshim, Tokyo	9, May, 2016
HM17-819	-	<i>E. camelliae</i>	Is. Oshim, Tokyo	May, 2017
HM17-851	-	<i>E. camelliae</i>	Is. Oshim, Tokyo	May, 2017
HM16-745	HM16-745C	<i>E. nudum</i>	Matsue, Shimane	1, July, 2016
HM16-746	HM16-746C	<i>E. nudum</i>	Matsue, Shimane	1, July, 2016
HM16-994	-	<i>E. nudum</i>	Matsue, Shimane	1, July, 2016
HM16-747	HM16-747C	<i>E. symploci-japonicae</i> var. <i>symploci-japonicae</i>	Matsue, Shimane	July, 2016
HM16-991	-	<i>E. symploci-japonicae</i> var. <i>symploci-japonicae</i>	Matsue, Shimane	July, 2016

Table 13 List of six *Exobasidium* specimens collected in Japan

Species name	Collected site	Collected date	Host Plant	Specimen voucher or Reference
<i>Exobasidium pentasporium</i>	Nagano	10, October, 2006	unknown	*Kanagawa Prefectural Museum of Natural History
	Iwate	1930	<i>Rhododendron tschonoski</i>	Sawada (1950)
	unknown	unknown	<i>Elliottia paniculate</i> , (<i>R. weyrichii?</i>)	Ito (1955)
	Shizuoka	1956, 1971, 1980	<i>R. kaempferi</i>	Ezuka (1990b)
	Shizuoka	15, May, 1971	<i>R. macrosepalum</i>	Ezuka (1990b)
	Tochigi	July, 1895	<i>R. kaempferi</i>	Shirai (1896), TNS-F-4617
	Tochigi	19, May, 2021	<i>R. kaempferi</i>	HM21-486, 488
	Yamanashi	1, June, 2021	<i>R. kaempferi</i>	HM21-586, 595, 602
<i>E. gracile</i>	Kanagawa	6, May, 2008	<i>Camelliae sasanqua</i>	*Kanagawa Prefectural Museum of Natural History
	Kanagawa	2017	<i>C. sasanqua</i>	HM17-189, 813, 849, 850
	Tokyo	unknown	<i>C. sasanqua</i>	Shirai (1896)
	Tokyo	2016, 2017, 2021	<i>C. sasanqua</i>	HM16-739, 740, HM17-813, 815~817, HM18-619~625, HM21-253
	Shizuoka	1963, 1970	<i>C. sasanqua</i>	Ezuka (1990a)
	Shimane	13, May, 2016	<i>C. sasanqua</i>	HM16-737, 738
<i>E. gracile?</i> (Name on the specimen: <i>E. camelliae</i>) Kochi		1905	<i>C. sasanqua</i>	*National Museum of Nature and Science

Species name	Collected site	Collected date	Host Plant	Specimen voucher or Reference
<i>E. camelliae</i>	Shimane	2, July, 1924	unknown	*National Museum of Nature and Science
	Tokyo	unknown	<i>C. japonica</i>	Shirai (1896)
	Tokyo	1971	<i>C. japonica</i>	Ezuka (1990a)
	Tokyo	2016, 2017	<i>C. japonica</i>	HM16-732, 733, HM17-819, 851
	Hiroshima	28, May, 1971	<i>C. japonica</i>	Ezuka (1990a)
<i>E. nudum</i>	Shimane	1, June ,2016	<i>C. japonica</i>	HM16-745, 746, 993, 994
	Ibaraki	29, May, 2022	<i>C. japonica</i>	HM22-067
	Yamaguti	2007	<i>C. japonica</i>	*National Museum of Nature and Science
	unknown	unknown	<i>C. japonica</i>	Shirai (1911)
	Tokyo	5, June, 1955	<i>C. japonica</i>	Ezuka (1990a)
	Shizuoka	1955, 1956	<i>C. japonica</i>	Ezuka (1990a)
	<i>E. symploci-japonicae</i> var. <i>symploci-japonicae</i>	Yamaguchi	11, Aprille, 1936	<i>Symplocos kuroki</i>
Kochi		unknown	<i>S. kuroki</i>	Kusano (1907)
Shimane		unknown	<i>S. kuroki</i>	Kusano (1907)
Miyazaki		22, May, 1971	<i>S. kuroki</i>	Ezuka (1991b)
Fukuoka		unknown	<i>S. kuroki</i>	Nagao (2003b)
Shimane		unknown	<i>S. kuroki</i>	Nagao (2003b)
Shimane		May, 2016	<i>S. kuroki</i>	HM16-747, 991, 992

*All data were obtained from Science Museum Net (S-Net) (2022, April 24)

第2章 モチビョウキン目菌類の有性世代の探索とその病害の診断

2.1 緒言

モチビョウキン目菌類の分類は、感染部位が白色で肥大し、人の目を引く病徴を形成する有性世代を持つ種について先行して記載されてきた。しかし、このような特徴的な病徴を持つにもかかわらず、本目菌類は他の菌群と比べて新産種といった再報告・再発見が少ない。これは本目菌類の有性世代が、一年のうち数日から数週間というごくわずかな期間に、限られた地域や宿主植物上で局所的に発生することが影響していると考えられる。このことは、現行の分類体系から取り残された種の存在や、本目菌類を定義づけるような形態学的な知見の不足をもたらしているだけでなく、菌株やシーケンスデータの充実にも大きな遅れを招いている。

この状況は、モチビョウキン目菌類による病害診断を困難なものとしている。例えば、「美森の大ヤマツツジ」は山梨県北杜市に植栽されたヤマツツジ (*Rhododendron kaempferi*) であり、「史蹟名勝天然記念物保存法」に基づき 1935 年より天然記念物に指定された重要な樹木であるが、モチビョウキン目菌類によるツツジ類てんぐ巣病に類似した症状の発生が指摘されたものの、本症状に関係する病原菌やその発生実態については不明である。

400 年近く前の 1662 年、もち病の症状が世界で初めて発見された (Hoffmann 1662)。しかし、これだけ古くから発見されていた本病害であるにもかかわらず、Nannfeldt (1971) は特にモチビョウキン目菌類の中で最大の分類群であり、基準属でもある *Exobasidium* 属菌に関する植物病理学や生態学、分類学等の研究が他の菌群と比べて乏しいことを指摘している。これは、上述したように、自然界における有性世代の探索の遅れが原因と考えられる。本研究では日本国内の

モチビョウキン目菌類の発生が顕著な5～6月に病徴の観察および原因菌の解明に取り組み、*Exobasidium*属菌を中心とした有性世代とその病害の探索を行うことで、植物病理学的な知見の充実を目指した。

2.2 材料および方法

2.2.1 現地調査

調査の詳細は Table 14 に示した。現地にて宿主植物名や被害状況，病徴について記録し，宿主植物上に発生した病害サンプルをカメラで撮影したのちに，採集した。採集したサンプルは紙袋に入れ，速やかに研究室に持ち帰り試験に供した。

美森の大ヤマツツジとその周辺のヤマツツジに発生したてんぐ巣病（2.3.5 美森の大ヤマツツジとその周辺のヤマツツジに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害）は，発生実態の調査を 2020 年 3 月，6 月，11 月，2021 年 4 月，5 月，6 月，7 月の合計 7 回実施した。てんぐ巣症状が確認された枝および葉を観察，採集した。

2.2.2 標本の作製

採集したサンプルを乾熱した新聞紙に挟み，重りを載せる（さくよう）か，ドラフト内で 1 か月程度風乾した。

2.2.3 菌株の確立

孢子落下法により分離を行った。採集サンプルから 1cm 角切片を作製し，WA 平板培地の蓋の裏面にナイスタックTM（ニチバン，日本）で固定後，12 時間ごとに蓋を回転させた。設置 12～36 時間後 WA 培地上に落下し，発芽した胞子を PDA 平板培地に移植した。菌株の長期間の保管には，PDA スラント，水・グリセリン凍結チューブを使用した。

美森の大ヤマツツジとその周辺のヤマツツジに発生したてんぐ巣病菌については（2.3.5 美森の大ヤマツツジとその周辺のヤマツツジに発生した

Exobasidium 属菌とその病害), 標徴が見られる場合と見られない場合とで分離方法を変更した. 標徴の見られない時期は, 組織を 1.5ml チューブに滅菌水とともに加え, 10 分間ボルテックスミキサーで振とうしたのち, 乳鉢ですりつぶし, 希釈平板法により PDA 培地で分離を行った. 標徴が観察された時期のサンプルは, WA 培地を用いて, 孢子落下法による分離を行った.

2.2.4 標本の観察

標本を用いた形態観察には光学顕微鏡 BX53 (OLYMPUS, 日本) を使用し, 顕微鏡カメラ DP27 (OLYMPUS, 日本) により撮影を行った. 水をマウント液として使用し, 染色の際にはラクトフェノールコットンブルー液を使用した. また, 標徴の観察はデジタル顕微鏡 VHX-5000 (Keyence, 日本) で行った. また, ニワトコから作製されたピス (ケニス, 日本) に罹病部位を挟み, 徒手切片を作製して植物組織表面に発生した子実層と植物組織中の観察を行った.

2.2.5 培養菌株の観察

PDA 平板培地にループ白金耳で画線し, 20°C, 5 日間培養後, 培養性状の観察と光学顕微鏡を使用した形態観察を行った. また, 5 mm コルクボーラーで打ち抜いた菌叢を PDA 平板培地中央に置床し, 20°C, 30 日間培養した培養性状を観察した.

2.2.6 DNA シーケンスの決定

DNA 抽出は PDA 培地 20°C, 培養 1 週間以内の菌叢を供試した. TE バッファー 50 μ l 中に, 滅菌爪楊枝で菌体を加えた. ヒートブロック 95°C で 10 分加熱した. 10000rpm で 3 分間遠心し, 上澄みを新しいチューブに入れて -20°C で保存した.

PCR は rDNA-ITS および LSU 領域について行った. ポリメラーゼは GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) を使用し, 供試したプライマーは Table 15 に示し

た. PCR 反応は VeritiPro Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) にて, Table 16 に示したプロトコルで行った.

DNA 増幅産物の確認は 0.7% アガロースゲル電気泳動によって行った. PCR 産物 1 μ l をウェルにロードし, 120V, 15 分間泳動した後, 染色バッファー (10 μ g/ml EtBr) 10 μ l と 1 \times TAE Buffer 150ml を混合したものに 20 分間浸漬しトランスイルミネーターにてバンドの有無を確認した.

DNA の増幅が確認されたサンプルは ExoSAP-ITTM (Thermo Fisher, USA) を使用し, VeritiPro Thermal Cycler にて 37 $^{\circ}$ C, 4 分加熱した後, 80 $^{\circ}$ C, 1 分で処理し, DNA 増幅産物中のプライマーと dNTP を不活性化させて, 精製を行った.

シーケンスリアクションは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) でサイクルシーケンスを行った. 使用したプライマーは Table 17 に示した. VeritiPro Thermal Cycler にて, Table 18 に示したプロトコルで処理した.

これら DNA 産物はカラム SephadexTM G-50 Superfine (Sigma-Aldrich, USA) により精製を行った. カラム用 96 穴プレートにカラム担体の粉を入れ, そこに DDW 300 μ l を加えて 2 時間以上膨潤させた. 膨潤後のカラムは 910xg, 室温で 5 分間遠心し, 余分な水分を除去した. シーケンス反応産物 10 μ l に DDW 10 μ l を加え, 全量 20 μ l をカラムに染み込ませ, 910xg, 室温で 5 分間遠心し, 96 穴の PCR プレートに精製産物を回収した. その後, 風乾器を用いて 40 分間真空状態で風乾した. そして, 精製産物にホルムアミド (FA) を 15 μ l 加え, 45 秒間ボルテックスした後, 95 $^{\circ}$ C, 4 分間加熱し, 氷水で急冷した. 塩基配列の決定には, シーケンサー ABI prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) を使用した.

決定した塩基配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST 検索にて, 決定配列の精度を確認した (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.7 分子系統解析

Wang et al. (2016)およびLi et al. (2022)が分子系統解析で使用した菌類の塩基配列に加え, NCBI に登録のある近縁種の塩基配列をもとに分子系統樹の作成を行った.

近縁属の塩基配列を加えた FASTA ファイルを作成し, その FASTA ファイルを MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) を使用して, NEXUS ファイルに変換した. この NEXUS ファイルを Mesquite version 3.04 でアライメントし, Phylip ファイルに変換した. そして, Phylip ファイルを RAxML BlackBox (<https://raxml-ng.vital-it.ch/>) (Kozlov et al. 2019) にアップロードし, モデルを指定して rapid bootstrap algorithm による最尤法で系統解析を行った.

Table 15 Primer for PCR reaction

ITS	ITS1-F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns (1993)
	M-ITS1: GGTGAACCTGCAGATGGATC	Stoll et al. (2003)
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
LSU D1/D2	LR0R: ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys & Hester (1990)
	LR5: TCCTGAGGGAAACTTCG	Vilgalys & Hester (1990)
	NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	O'Donnell (1993)
	NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O'Donnell (1993)

Table 16 Protocol of PCR reaction

95°C	4min	
95°C	1min	} ×35
45~50°C	1min	
72°C	1min	
72°C	8min	
4°C	∞	

Table 17 Primer for cycle sequencing

ITS	ITS1-F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns (1993)
	M-ITS1: GGTGAACCTGCAGATGGATC	Stoll et al. (2003)
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
LSU D1/D2	NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAG	O'Donnell (1993)
	NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O'Donnell (1993)

Table 18 Protocol of cycle sequencing

96°C	3min	
96°C	15sec	} ×25
50°C	5sec	
60°C	4min	
4°C	∞	

2.2.8 農薬効果試験 (2.3.5 美森の大ヤマツツジとその周辺のヤマツツジに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害のみ)

もち病に対して農薬登録のあった4剤(銅水和剤, テブコナゾール水和剤, メプロニル水和剤, TPN 水和剤)について, それらを添加した培地上で効果を調査した.

農薬添加培地は PDA 培地を 121°C, 20 分オートクレーブしたのち 50°C まで加熱し, 各剤を有効成分濃度が 0, 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 mg/ml となるように添加した(各濃度区につき 3 反復).

接種菌液は PDB 培地で 5 日間培養した供試 3 菌株 (HM21-586C, 595C, 602C) をそれぞれ 100 μ l 農薬添加培地に接種し, コンラージ棒を用いて培地の全面に塗布した. コントロール区では無菌の PDB 培地を塗布した.

防除効果の調査は, PDA 培地の 2 分の 1 以上を覆うシャーレ数をカウントし, 実用濃度下で生育の抑制効果がみられた剤では菌体の顕微鏡観察を行った.

2.3 結果

2.3.1 ツツジ属 1 種 2 変種に発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

病徴および標徴

5 月中旬から 6 月上旬にかけて、新潟県佐渡島、栃木県日光市、宮城県大崎市においてヨウラクツツジ (*R. multiflorum*) およびその変種のウラジロヨウラク (*R. multiflorum* var. *longicalyx*, 以降、ヨウラクツツジ類) の新葉、新梢および花にもち病と考えられる症状が発生した。罹病部は、器官全体が肥大、または一部分が球状に肥大する症状を呈していた (Fig. 11A-G)。また、栃木県日光市ではアケボノツツジの変種アカヤシオ (*R. pentaphyllum* var. *nikoense*) において、葉全体もしくはその一部分が球状に肥大する症状が確認された (Fig. 12A-C)。これら罹病部位表面は、白色粉状の菌叢に覆われていた (Fig. 11H-J, 12D-F)。

病原菌の観察

ヨウラクツツジ類では罹病部上の菌叢に担子器、担子胞子および分生子、かすがい連結を有する菌糸を観察した (Fig. 11H-O, R)。担子器は密生し、無色、無隔壁、棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 11K, L)、大きさ $(18.7\text{-})27.3\text{-}51.1\text{-}(-64.9) \times (2.0\text{-})3.1\text{-}6.3\text{-}(-9.7)\mu\text{m}$ であった。担子器上には小柄が 3-4(-6) 本生じ、その先に担子胞子が形成された (Fig. 11L)。担子胞子は、円筒形から紡錘形で無色、はじめ無隔壁で 1-3(-6) 隔壁を有し、基部に向かって細く、大きさ $(13.2\text{-})15.2\text{-}20.2\text{-}(-23.7) \times (2.7\text{-})3.2\text{-}4.3\text{-}(-5.0)\mu\text{m}$ であった (Fig. 11M, N)。担子胞子は 12-36 時間程度で発芽し、胞子の両端もしくは隔壁部分から、分生子を出芽した (Fig. 11U)。分生子は円筒形で片側先端部が細く、大きさ $(4.4\text{-})5.3\text{-}9.0\text{-}(-13.8) \times (0.7\text{-})1.0\text{-}2.2\text{-}(-3.3)\mu\text{m}$ の大型と (Fig. 11Q)、楕円形

から円筒形で大きさ(5.3-)6.2-9.9(-13.8) × (1.0-)1.2-2.2(-3.3)μm の小型の2タイプが観察された(Fig. 11P). アカヤシオでは罹病葉上の菌叢中に担子器, 担子胞子および分生子を観察した(Fig. 12G-N). 担子器は密生し, 無色, 無隔壁, 棍棒状円柱形で基部に向かって細く(Fig. 12G, H), 大きさ(14.6-)17.6-31.0(-39.7) × (2.6-)3.0-4.7(-5.6)μm であった. 担子器上には小柄が3-4(-6)本生じ, その先に担子胞子が形成された. 担子胞子は, 円筒形から紡錘形で無色, はじめ無隔壁で1-2(-3)隔壁を有し, 基部に向かって細く, 大きさ(9.9-)12.4-17.1(-18.8) × (2.0-)3.4-4.9(-5.9)μm であった(Fig. 12I-K). 分生子は円筒形で片側先端部が細く, 大きさ(1.8-)6.7-11.4(-14.7) × (0.5-)0.8-2.0(-2.7)μm の大型のみが観察された(Fig. 12L-N).

ヨウラクツツジ類の罹病部から複数菌株(HM19-002C, HM21-483C, 491C, 492C)を確立した. 代表株 HM19-002C, HM21-491C は PDA 培地上で黄白色から褐色, 1か月で直径約1 cmと非常に生育の遅い菌叢を形成した(Fig. 11S, T). また, ときに培地上に色素を産生した. これら菌叢は出芽型分生子とかすがい連結のない菌糸からなり, 菌糸は無色, (0.5-)0.7-1.0(-1.1)μm であった. 出芽型分生子は菌糸より出芽し, 無色, 楕円~長楕円形, 無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した. 娘細胞を出芽した出芽型分生子は先端が細く, 大きさ(4.4-)5.5-8.1(-9.7) × (0.9-)1.2-1.8(-2.2)μm であった. アカヤシオの罹病部からは菌株を確立することはできなかった.

病原菌の DNA 解析

ヨウラクツツジ類分離菌株 HM19-002C, 483C, 491C, 492C とアカヤシオ標本 HM21-480 を用いて, rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した. これら配列を用いた分子系統解析の結果, *E. japonicum* と高い支持を有するクレードを形

成した (Fig. 13). このクレード内で、宿主植物ごとに高い単系統性を示す傾向はみられなかった。

2.3.2 バイカツツジに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

病徴および標徴

5月中旬から6月上旬にかけて、栃木県日光市のバイカツツジ (*R. semibarbatum*) の新葉に、黄色の斑点が生じ、その裏面に白色の菌叢を有する症状を確認した (Fig. 14A-D). ときにこれら斑点は融合し、拡大した (Fig. 14D). 枝や十分に展開した葉に本症状は確認されなかった。2021~2022年にかけて観察を行ったが、てんぐ巣症状の発生は見られなかった。

病原菌の観察

罹病葉上の菌叢には担子器、担子胞子および分生子を観察することができた (Fig. 14E-I). 担子器は密生し、無色、無隔壁、棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 14E), 大きさ (16.4-)22.9-45.0 (-55.9) × (4.0-) 4.4-7.5(-8.9) μm であった。担子器上には小柄が3-4本生じ、その先に担子胞子が形成された。担子胞子は、湾曲した円筒形から紡錘形で無色、はじめ無隔壁で1-2(-3)隔壁を有し、基部に向かって細く、大きさ (13.0-)15.5-21.4(-24.0) × (3.0-)3.5-4.4(-4.8) μm であった (Fig. 14 F, G). 分生子は円筒形もしくは皮針状で片側先端部が細く、大きさ (5.3-)7.3-13.2(-16.6) × (0.8-)1.1-2.0(-2.6) μm であった (Fig. 14 H, I).

罹病部から複数菌株 (HM21-485C, 489C) を分離した。代表株 HM21-489C は PDA 培地上で1か月間培養すると、黄色がかった白色で、深くしわが入り込んだ直径約1cm程度と非常に生育の遅い菌叢を形成した (Fig. 14J-L). PDA 培地上では

色素の産生は見られなかった。5日間培養した菌叢は白色で (Fig. 14M), 出芽型分生子とかすがい連結のない菌糸からなり, 出芽型分生子は菌糸より出芽し, 無色, 円筒形, 長楕円形, 無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した。娘細胞を出芽した出芽型分生子は先端が細く, 大きさ(9.6-)13.5-24.8(-32.6) × (1.1-)1.4-2.1(-2.6)μmであった (Fig. 14N).

病原菌のDNA解析

分離菌株 HM21-485C, 489C を用いて, rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した。この結果, ツツジ類平もち病を引き起こす *E. miyabei*, *E. yoshinagae*, *E. dubium* と近接し, 強く支持される独立した単系統群を形成した (Fig. 15).

2.3.3 シロヤシオに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

病徴および標徴

5月中旬から6月上旬にかけて, 栃木県日光市のシロヤシオ (*R. quinquefolium*) の新葉の一部もしくは新梢全体が初め黄色から赤色へと変色し (Fig. 16A-G), その後葉柄側もしくは葉脈および葉縁に沿って葉の半身に広がり, しだいに罹病部位が肥厚する症状が観察された (Fig. 16E, F)。これら罹病は, ときに病斑裏面が白色の菌叢で覆われた (Fig. 16E-H)。また, 罹病部位の葉の細胞が肥大している場合には, 柵状組織・海綿状組織の分化を欠いていた (Fig. 16I)。

病原菌の観察

葉上の菌叢に担子器, 担子胞子および分生子を観察した (Fig. 16I-P)。細胞間には菌糸が充満し, ときおり細胞内に吸器の挿入が見られた (Fig. 16I, J)。担子器は密生し, 無色, 無隔壁, 棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 16K), 大きさ(19.4-)24.5-35.1(-38.5) × (2.4-)2.8-4.1(-7.5)μmであった。担子器上には長さ(0.7-)1.6-3.1(-3.9)μmの小柄が(3-)4-5(-6)本生じ, その先に担子

胞子が形成された。担子胞子は、円筒形から紡錘形で無色、はじめ無隔壁で1(-2)隔壁を有し、基部に向かって細く(Fig. 16L-N), 大きさ(9.9-)12.1-17.1(-20.3) × (2.3-)2.8-4.1(-5.2)μmであった。担子胞子は12-36時間程度で発芽し、胞子の両端から発芽し、のちに隔壁で区切られた細胞から、菌糸を発芽した(Fig. 16Q)。菌糸からは出芽型分生子が形成された(Fig. 16Q)。分生子は、円筒形で片側先端部が細く、大きさ(4.8-)7.1-11.9(-15.5) × (0.5-)0.9-1.9(-2.7)μmであった(Fig. 16O, P)。

罹病部から複数菌株(HM21-500C, HM22-062C, 064C)を確立した。代表株HM21-500CをPDA培地上で1か月間培養すると、菌叢は出芽型分生子とかすがい連結のない菌糸からなり、黄色がかった白色で、細かなしわが入り込んだ菌叢の大きさが1か月で直径約1cmと生育の遅い菌叢を形成した(Fig. 16R, S)。PDA培地上では色素の産生は見られなかった。5日間培養した菌叢は白色、酵母様であった(Fig. 16T)。分生子(酵母)は無色、楕円～長楕円形、無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した。出芽した分生子は先端が細く、大きさ(4.5-)5.0-9.2(-13.1) × (0.8-)1.1-1.7(-2.1)μmであった(Fig. 16U, V)。

病原菌のDNA解析

分離菌株HM21-500CのrDNA-ITSとLSU領域のDNA塩基配列を決定した。これら配列を用いた分子系統解析の結果、分離菌は既知種と独立した高い支持を有する単系統群を形成した(Fig. 17)。

2.3.4 コメツツジに発生した*Exobasidium*属菌とその病害

病徴および標徴

5月中旬、栃木県日光市のコメツツジ(*R. tschonoskii*)新葉の一部もしくは新梢の全体が黄色～黄緑色を呈する症状が発生した(Fig. 18A-G)。罹病部位は

ときおり肥厚し、火ぶくれ状となった(Fig. 18D-G). 病斑裏面は白色の菌叢で覆われ、罹病部位の葉の細胞は肥大し、柵状組織・海綿状組織の分化を欠いた(Fig. 18H, I).

病原菌の観察

葉上の菌叢中には担子器、担子孢子および分生子を観察することができた(Fig. 18J-P). 細胞間には菌糸が充満し、ときおり細胞内に吸器の挿入が見られた(Fig. 18 I, M). 担子器は密生し、無色、無隔壁、棍棒状円柱形で基部に向かって細く(Fig. 18J-L), 大きさ(25.4-)25.9-40.1(-47.5) × (3.8-)4.1-5.4(-6.0)μmであった. 担子器上には小柄が3-4(-5)本生じ、その先に担子孢子が形成された. 担子孢子は、円筒形から紡錘形で無色、はじめ無隔壁で1-2(-3)隔壁を有し、基部に向かって細く(Fig. 18N, O), 大きさ(10.9-)12.7-16.7(-19.9) × (2.4-)3.0-4.6(-5.8)μmであった. 担子孢子は12-36時間程度で発芽した. 菌糸からは出芽型分生子が形成された. 分生子は、円筒形で片側先端部が細く、大きさ(3.1-)4.4-7.8(-9.7) × (0.4-)0.6-1.1(-1.3)μmであった(Fig. 18P).

罹病部から HM22-066C を確立した. PDA 培地上で1か月間培養すると、黄みがかかった白色で、細かなしわが入り込んだ菌叢の大きさが1か月で直径約1cmと生育の遅い酵母様の菌叢を形成した(Fig. 18Q, R). PDA培地上では色素の産生は見られなかった. 5日間培養した菌叢は白色、酵母様であった(Fig. 18S). 菌叢は出芽型分生子とかすがい連結のない菌糸からなり、菌糸は無色、幅(0.5-)0.8-1.3(-1.6)μmであった. 出芽型分生子は菌糸より出芽し、無色、楕円～長楕円形、無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した. 娘細胞を出芽した出芽型分生子は先端が細く、大きさ(3.7-)4.8-9.0(-12.1) × (0.6-)0.9-1.4(-1.6)μmであった(Fig. 18T).

病原菌の DNA 解析

乾燥標本 HM21-505 および分離菌株 HM22-066C の rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した。これら配列を用いた分子系統解析の結果、分離菌は *E. lushanense* として信頼のおける菌株のシーケンスと高い支持を有する単系統群を形成した (Fig. 17)。

2.3.5 美森の大ヤマツツジとその周辺ヤマツツジに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

病徴および標徴

大ヤマツツジやその周辺ヤマツツジの多くがてんぐ巣症状を発症していた (Fig. 19A, B)。てんぐ巣症状は、株元から枝先まで全体的に発生が認められ、1つの樹について複数発生する場合もあった (Fig. 19B-D)。発達したてんぐ巣の基部にはこぶが形成された (Fig. 19E)。これらヤマツツジでは、5月下旬、葉に黄緑化や軽度の葉巻症状が観察され、さらに、わずかではあるが葉の裏面に白色の菌叢と考えられる標徴も認められた (Fig. 20A-D)。そして、6月上旬にはこれら標徴が顕著に確認された。7月上旬、標徴は消失し、病斑部は褐変、多くが落葉した (Fig. 19I)。てんぐ巣病枝は通年で観察された (Fig. 19F-I)。標徴は6月上旬に採集したてんぐ巣上の葉でのみ観察された (Fig. 19H)。葉の一部もしくは全体が白色粉状の菌叢で覆われた (Fig. 20D-H)。その一方で、新梢や花芽、てんぐ巣症状部位以外の葉には病徴は見られなかった。

病原菌の観察

葉上の菌叢中に担子器、担子胞子および分生子を観察した (Fig. 20H-M)。担子器は密生し、無色、無隔壁、棍棒状円柱形で基部に向かって細く (Fig. 20J)、大きき $22.1-39.9 \times 3.4-6.6\mu\text{m}$ であった。担子器上には小柄が3-4(-6)本生じ、

その先に担子胞子を形成した (Fig. 20I, J). 担子胞子は、円筒形から紡錘形で無色、はじめ無隔壁で1(-2)隔壁を有し、基部に向かって細く、大きさ 12.9-17.4 × 2.7-4.4 μm であった (Fig. 20K, L). 分生子は円筒形で片側先端部が細く、大きさ 6.0-10.3 × 0.7-1.4 μm であった (Fig. 20M).

罹病部から得られた HM21-595C は PDA 培地上で褐色を呈し (Fig. 20N-P), 1 か月で直径約 1cm と非常に生育の遅い菌叢を形成した (Fig. 2N, 0). また、ときに培地上に色素を産生した (Fig. 20N, 0). 菌叢は出芽型分生子とかすがい連結のない菌糸からなり、出芽型分生子は菌糸より出芽し、無色、楕円～長楕円形、無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した (Fig. 20Q). 娘細胞を出芽した出芽型分生子は先端が細く、大きさ (5.9-)6.8-9.6(-12.0) × (0.8-)1.1-1.7(-1.9) μm であった.

病原菌の DNA 解析

分離菌株 HM21-586C, 595C, 602C の rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した. これら配列を用いた分子系統解析の結果, 分離菌は *E. pentasporium* のタイプシーケンスと高い支持を有する単系統群を形成した (Fig. 21).

農薬効果試験

テブコナゾール水和剤の有効成分 10^{-1} ~ 10^3 mg/ml 添加区と TPN 水和剤の有効成分 10^0 ~ 10^3 添加区で生育の抑制が確認された (Fig. 22, Table 25). テブコナゾール水和剤添加区では娘細胞と母細胞が分離しない細胞分裂の異常が観察され, TPN 水和剤添加区では細胞形成が停止した.

2.3.6 カナリーヤシに発生した *Graphiola* 属菌とその病害

病徴および標徴

9月中旬から11月中旬にかけて、高知県内においてカナリーヤシ (*Phoenix canariensis*) の葉の一部が黄色を呈し、のちに枯れる症状が発生した (Fig. 23A-D). 葉枯れ症状部位の表面には黒い壺状の担子器果が点在した (Fig. 23E-G).

病原菌の観察

担子器果は黒褐色の針状の菌体で構成されていた (Fig. 23H, I). 成熟した担子器果からは弾糸が伸長した (Fig. 23G). 弾糸は無色、繊維状であった (Fig. 23J). 担子器は無色、類球形で担子胞子が出芽した (Fig. 23K). 担子胞子のはじめ無色単胞で後に分裂して、成熟すると褐色を呈し (Fig. 23K-M), 表面に小さいぼを生じ (Fig. 23L), 類球形もしくは楕円形, 大きさ (3.2-)3.7-4.8(-6.0) × (2.0-)2.4-3.2(-3.3) であった. 褐色二次胞子は (7.0-)8.4-10.9(-12.1) × (2.2-)3.2-4.9(-5.4) μm であった (Fig. 23M). 標本中では, 分生子は観察されなかったが, WA 培地上に静置した担子胞子からは分生子が出芽した (Fig. 23N, O).

罹病部から得られた HM21-1332C は PDA 培地上で色素を有さない, 黄色がかった白色の酵母状菌叢を形成した (Fig. 23P-R). 分生子は, 無色, 円筒形もしくは涙型, 大きさ (2.9-)3.5-5.5(-6.6) × (0.5-)1.1-2.2(-2.9) μm であった (Fig. 23S).

病原菌の DNA 解析

分離菌株 HM21-1332C, 1333C を用いて, rDNA-ITS と LSU 領域の DNA 塩基配列を決定した. これら配列を用いた分子系統解析の結果, 分離菌はカナリーヤシに

発生し、過去の研究において *G. phoenicis* と同定されたシーケンスと強く支持される単系統群を形成した (Fig. 24).

2.4 考察

2.4.1 ツツジ属 1 種 2 変種に発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

宿主上で観察された病徴は、*E. japonicum*によるツツジ類もち病の病徴に類似した。一方、今回のヨウラクツツジ類およびアカヤシオの上で観察された担子器は、これまでに記録のある *E. japonicum*の特徴とはわずかに差異が見られたが、同一条件下において観察を行った既報の宿主植物（ヤマツツジ、サツキ）上に見られた *E. japonicum*についても同様の差異が認められたことから、種内間の違いと判断した (Table 19)。そこで、担子器を除いた形態学的特徴および病徴は既報の *E. japonicum*と概ね一致したことや分子系統解析の結果を考慮し、ヨウラクツツジ類とアカヤシオに発生した菌類を *E. japonicum*と同定し、発生した病害をツツジ類もち病と診断した。この診断をもとに、ヨウラクツツジ類とアカヤシオについて、本病の新宿主として新たに追加した（柴田ら 2022, 令和3年度 日本植物病理学会関東部会講演要旨）。

2.4.2 バイカツツジに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

バイカツツジに観察された病徴は *Exobasidium* 属菌によるツツジ類平もち病に類似した。一方、菌類の形態学的特徴については、Sawada (1950)により観察されたバイカツツジ平もち病の病原菌である“*E. butleri*”と概ね一致したが、いくつかの疑問が生じた (Table 21)。*E. butleri*は、バイカツツジ (Tsutsusi 節)とは遺伝的に異なる *R. arboreum* (Ponticum 節) (Xia et al. 2021) のてんぐ巣病葉上に発生する種として記載されており (Sydow & Sydow 1912)、今回のバイカツツジの *Exobasidium* 属菌の宿主と症状に矛盾が生じる。さらに、Sawada (1950) のバイカツツジの病害報告において、てんぐ巣症状を伴う記述はなかった。一方で、別のツツジ類平もち病菌である *E. kawanense* の担子胞子と分生子

の形態的特徴はバイカツツジ上に見られた本種と極めて酷似した (Table 21, 江塚 1990b). 現在までに *E. kawanense* と *E. butleri* の DNA データは存在しないが, 本研究でバイカツツジの病斑上に見つかった *Exobasidium* 属菌は, 分子系統解析の結果からツツジ類平もち病菌 *E. miyabei*, *E. yoshiagae*, *E. dubium* と近縁ではあるものの単系統群を形成した. さらに, 形態学的特徴でも本菌は, 上記 3 種とは一致しなかった (Table 21). 以上, 病徴と病原菌の形態学的特徴および分子系統解析の結果から, バイカツツジ上で観察された本病害をツツジ類平もち病と診断し, 病原菌を *E. kawanense* と同定した.

2.4.3 シロヤシオに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

観察された病徴は, *E. japonicum* var. *hypophyllum* や *E. otanianum* によるツツジ類裏白もち病に類似した. しかし, シロヤシオ上に観察された菌体は *E. japonicum* var. *hypophyllum* の担子器の形態と大きな差が見られた (Table 22). また, *E. otanianum* とは担子器および分生子の大きさに差が認められた. 分子系統解析の結果はシャクナゲ類粉もち病の原因菌として知られる *E. woronichinii* と近接するものの, 強く支持される単系統群を形成した. シャクナゲ類粉もち病菌 *E. woronichinii*, *E. shiraianum*, *E. caucasicum* とは担子器, 担子胞子および分生子の形態学的特徴とも一致しなかった. 今回, *E. japonicum* var. *hypophyllum* は, 江塚 (1990b) がヤマツツジの裏白もち病から採集, 報告して以降, 再発見はなく菌株や DNA シーケンスを欠くため, 今回の分離菌との正確な比較ができない. なお, それぞれの宿主植物の分類に注目すると, シロヤシオは *Sciadorhodion* 節であり, ヤマツツジの含まれる *Tsutsusi* 節と異なる (Xia et al. 2021). 以上, 宿主植物の所属の違い, 病徴の類似性, また病原菌の形態の差異から, 今回シロヤシオに発生した病害を *Exobasidium* sp. によ

るツツジ類裏白もち病と診断し、シロヤシオを本病の新宿主として登録したい。なお、今回確認された担子器の形態的差異については、*Exobasidium* sp. として病原追加するとともに、未記載種の可能性も含め、詳細な検討が必要である。

2.4.4 コメツツジに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

コメツツジに観察された病徴は *E. japonicum* var. *hypophyllum* によるツツジ類裏白もち病の病徴に概ね一致した。一方、今回の病原菌の形態や分子系統解析の結果、2009年にLi & Guoにより中国で新種記載された *E. lushanense* と一致した (Table 23)。以上の結果から、コメツツジに発生した菌を *E. lushanense* と同定し、本病害をツツジ類裏白もち病と診断した。今後、コメツツジは本病の新宿主として登録する必要がある。なお、*E. lushanense* は日本で以前から記録されている *E. japonicum* var. *hypophyllum* (宿主：ヤマツツジ) と形態学的に類似する点が多く (Table 23)、どちらの宿主も Tsutsusi 節の植物であることから (Xia et al. 2021)、*E. lushanense* と *E. japonicum* var. *hypophyllum* の学名の異同についてはさらに検討が必要である。

2.4.5 美森の大ヤマツツジとその周辺の大ヤマツツジに発生した *Exobasidium* 属菌とその病害

大ヤマツツジおよびその周辺のヤマツツジに観察されたてんぐ巣症状および葉の病徴は *E. pentasporium* によるツツジ類てんぐ巣病に類似した。また、観察された菌類の形態学的特徴もツツジ類てんぐ巣病菌である *E. pentasporium* と概ね一致した (Table 24)。この結果は分子系統解析の結果でも支持されたため、本菌を *E. pentasporium* と同定し、発生した病害をツツジ類てんぐ巣病と診断した (柴田・廣岡 2022 投稿中)。本病が発生するとてんぐ巣上の葉は矮化し、最終的にてんぐ巣枝が枯死すると報告されている (江塚 1990b)。本調査地

においても、てんぐ巢上の葉は健全葉に比べ矮化し、周辺のヤマツツジ上には枯死したてんぐ巢病部位が確認された。このことから、大ヤマツツジの衰退の原因には本病が大きく関与していると考えられる。

培養下における複数薬剤に対する効果試験の結果、テブコナゾール水和剤および TPN 水和剤の使用基準濃度で生育抑制が観察された。このことから、これら 2 剤が防除に使用できる可能性が示唆された。今回の現地調査により、本病原菌は 5 月下旬から 6 月上旬に胞子が飛散している可能性が高いことから、5 月中旬以前に罹病部の切除およびこれら 2 剤を用いた農薬散布が有効である可能性が高い。

2.4.6 カナリーヤシに発生した *Graphiola* 属菌とその病害

カナリーヤシに観察された症状は *Graphiola* 属菌によるフェニックス類黒つぼ病に類似した。また、標本上に観察された菌類の形態学的特徴 (Table 26) や菌叢性状は Tsubaki & Yokoyama (1971) の *G. phoenicis* のものと概ね一致した。以上の病徴、標本上に観察された菌類の形態学的特徴、並びに分子系統解析の結果を踏まえ、カナリーヤシに発生した菌類を *G. phoenicis* と同定し、本病害をフェニックス類黒つぼ病と診断した。本病の発生は極めてまれであり、高知県では 2 回目の報告である。

2.4.7 章の考察

本章ではモチビョウキン目菌類の有性世代による 6 病害を調査した結果、ツツジ類もち病、ツツジ類平もち病、ツツジ類裏白もち病、ツツジ類てんぐ巢病、フェニックス類黒つぼ病とそれぞれ診断した。また、ヨウラクツツジ、アカヤシオ、シロヤシオ、コメツツジはそれぞれの病害の新宿主と判断した。さらに、少

なくとも *Exobasidium* 属菌 1 種の病原追加の必要性を示唆した。これらの結果は、本目菌類の病害診断に必要な基礎情報を十分に蓄積することができたと考ええる。また、今回の病原菌 6 種については、未記載種の可能性のある 1 種および日本新産種 1 種が含まれていたことから、我が国に発生するモチビョウキン目菌類の多様性解明にも貢献すると考えられた。

さらに、本研究ではアカヤシオに観察された *E. japonicum* 以外、5 種の rDNA-ITS と LSU 領域のシーケンスデータを取得することに成功した。しかし、菌類のバーコード領域として知られる rDNA-ITS 領域は本目菌類の種内でも変異の蓄積が顕著であり、上位分類群間における解析の際にはホモロジーを欠くことが明らかとなりつつある。今後も本目菌類の DNA データの蓄積を行うと同時に、比較に使用する最適な DNA 領域の検討が必要である。



Fig. 11 The symptoms and morphological characters of *Exobasidium japonicum* on *Rhododendron multiflorum* (B-E : HM21-483) and *R. multiflorum* var. *longicalyx* (A, P, U : HM21-491, F-I, M, N, P, R : HM21-492, J-L, S, T : HM-19-002C). Hypertrophic symptoms on flowers, leaves, shoot (A-G), Hymenium on gall surface (H-K), basidiospore on basidium (L), basidiospores (M, N), conidia (O), rectangle cells (P), clamp connection (Q), colony on PDA at 20 °C for 30 d (R, S) germinating basidiospore (T). Bars: 10µm

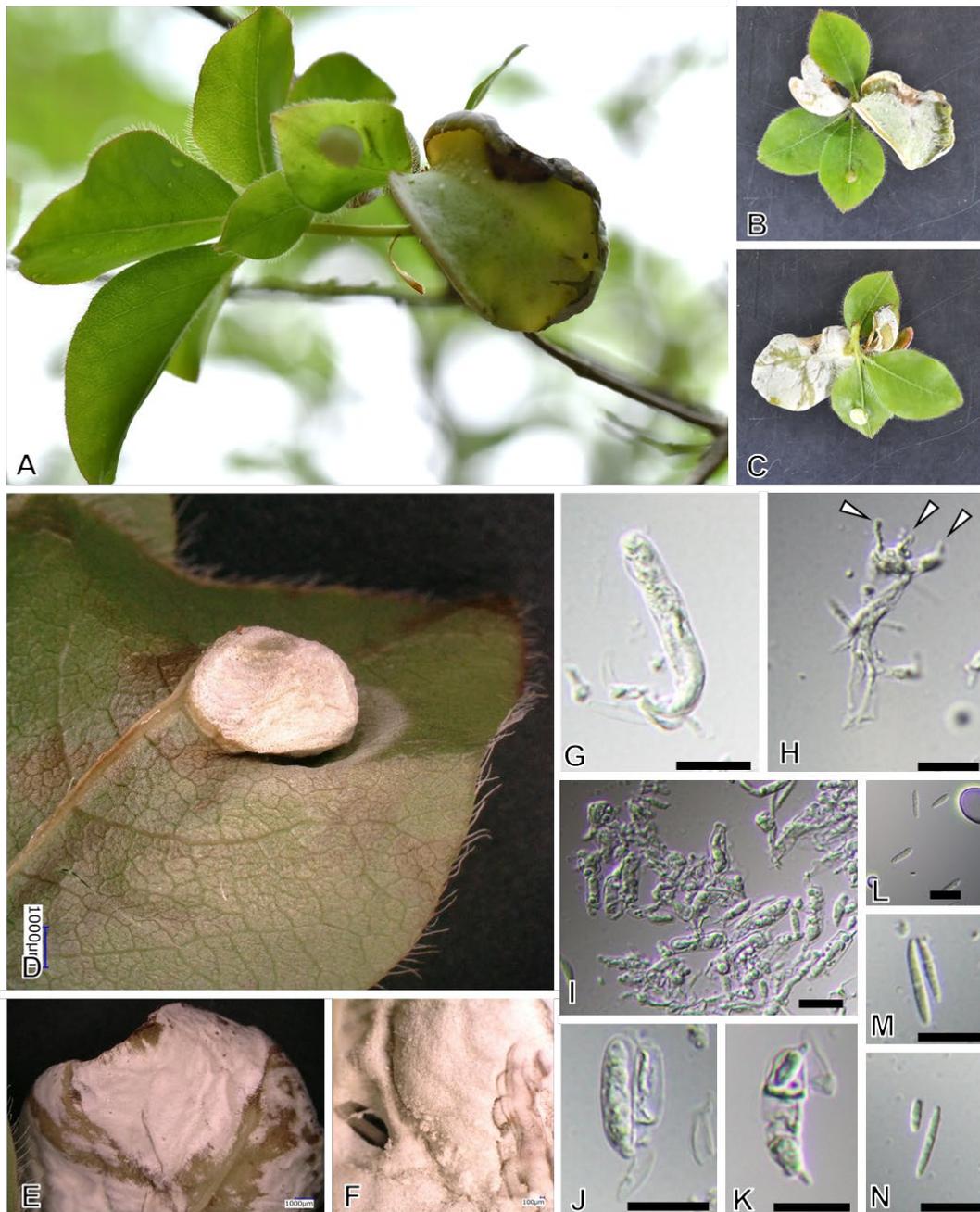


Fig. 12 The symptoms and morphological characters of *Exobasidium japonicum* on *R. pentaphyllum* var. *nikoense* (HM21-480). Hypertrophic symptoms on leaves (A-D), Hymenium on gall surface (E, F), immature basidium (G), sterigma (arrows) on a mature basidium (H), basidiospores (I-K), conidia (L-N). Bars: 10μm

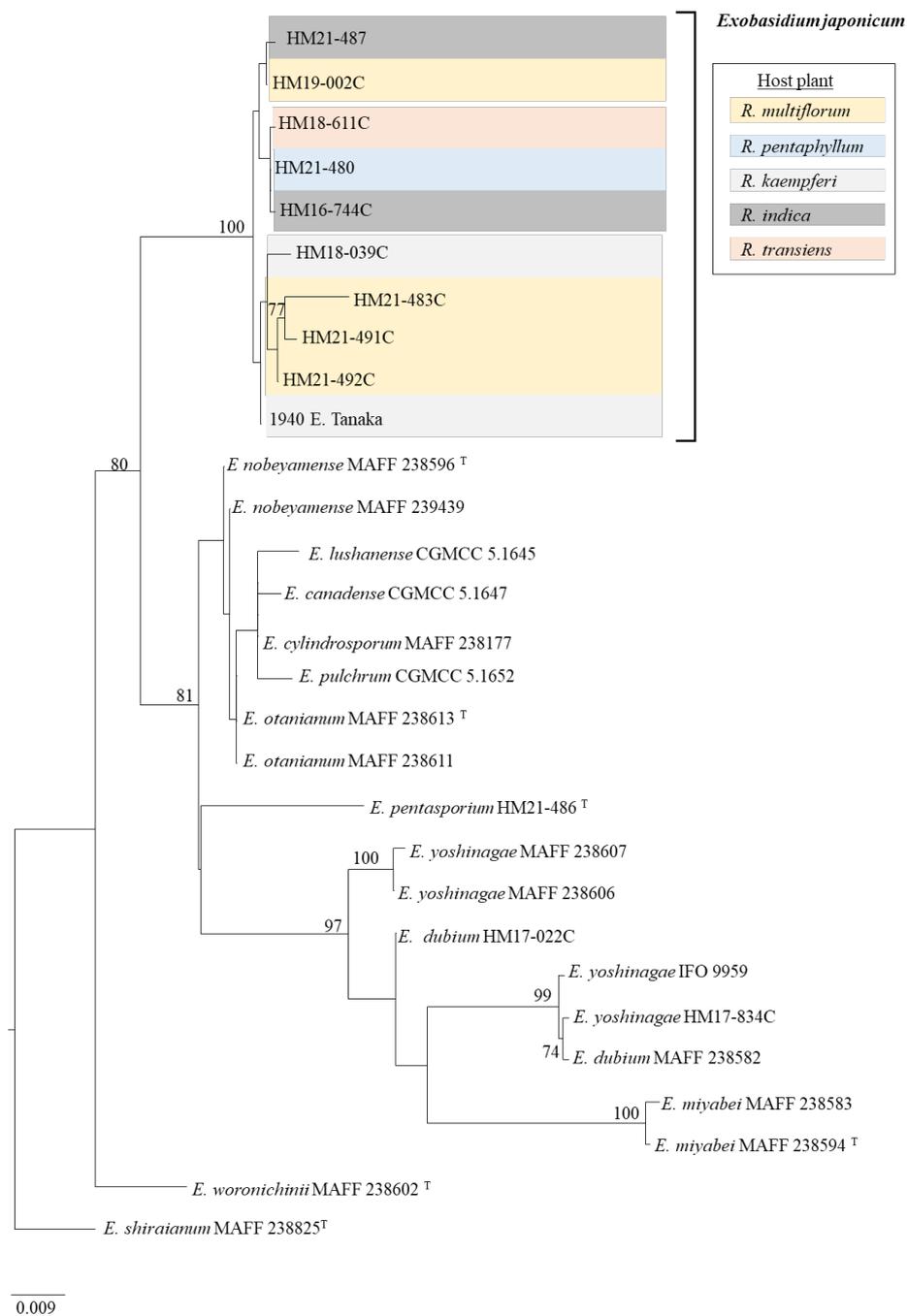


Fig. 13 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the TIM2+I+G for ITS and TPM1uf+I for LSU (Bootstrap value: > 70%). *E. shiraianum* and *E. woronichinii* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

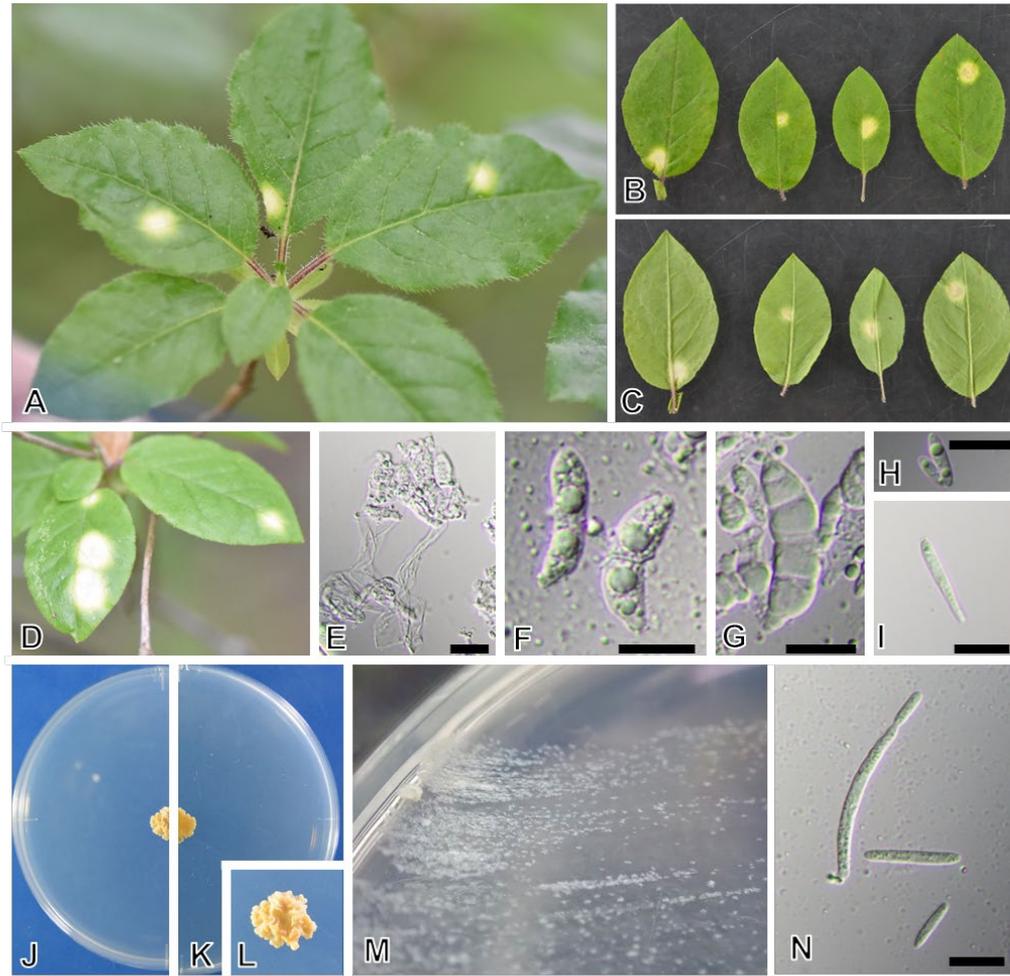


Fig. 14 The symptoms and morphological characters of *Exobasidium* sp. on *Rhododendron semibarbatum* (A, E, H, I : HM21-485, B-D, F, G, J-N : HM21-489). Symptoms on leaves (A-D), sterigma on top basidium (E), basidiospores (F, G), conidia (H, I), colony on PDA at 20 °C for 30 d (J-L), colony on PDA for 5d (M), conidia on PDA (N). Bars: 10 μ m

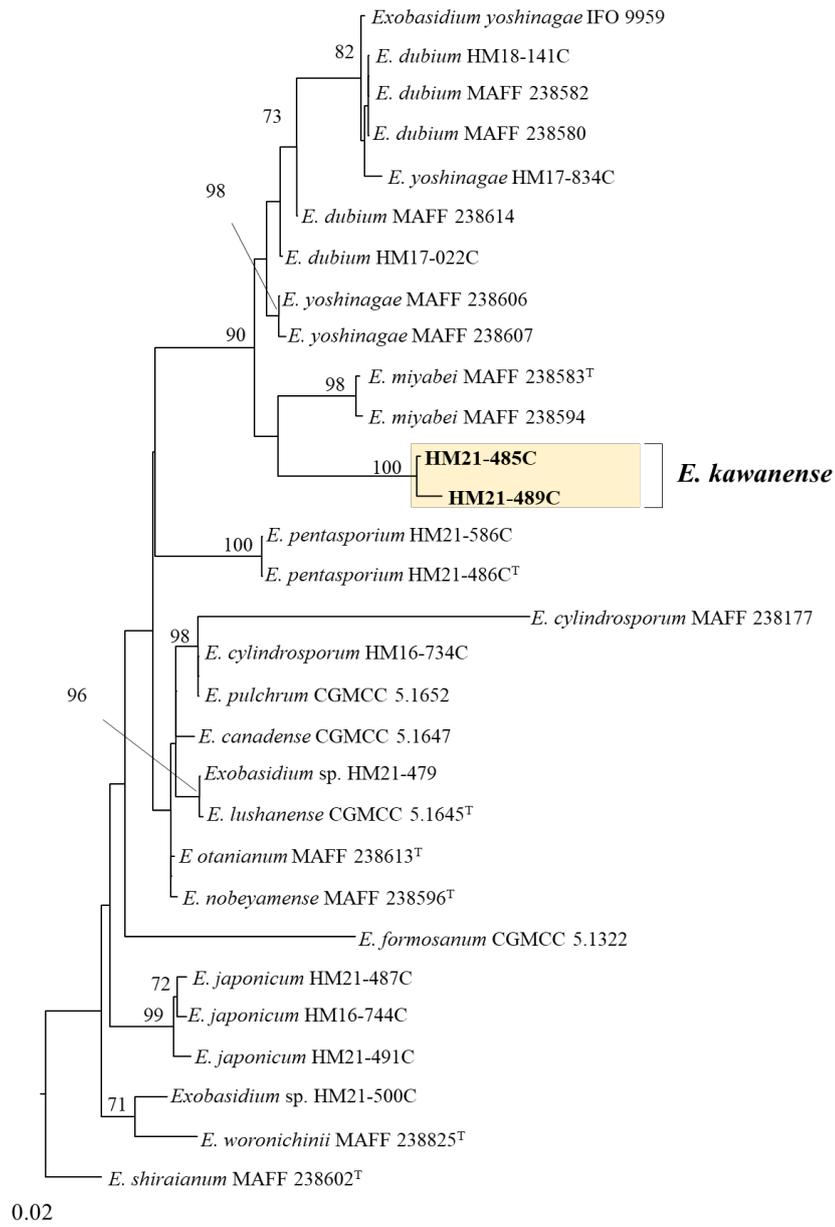


Fig. 15 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the TIM3+I+G for ITS and HKY+I+G for LSU (Bootstrap value: > 70%). *E. shiraianum* was used as outgroup. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

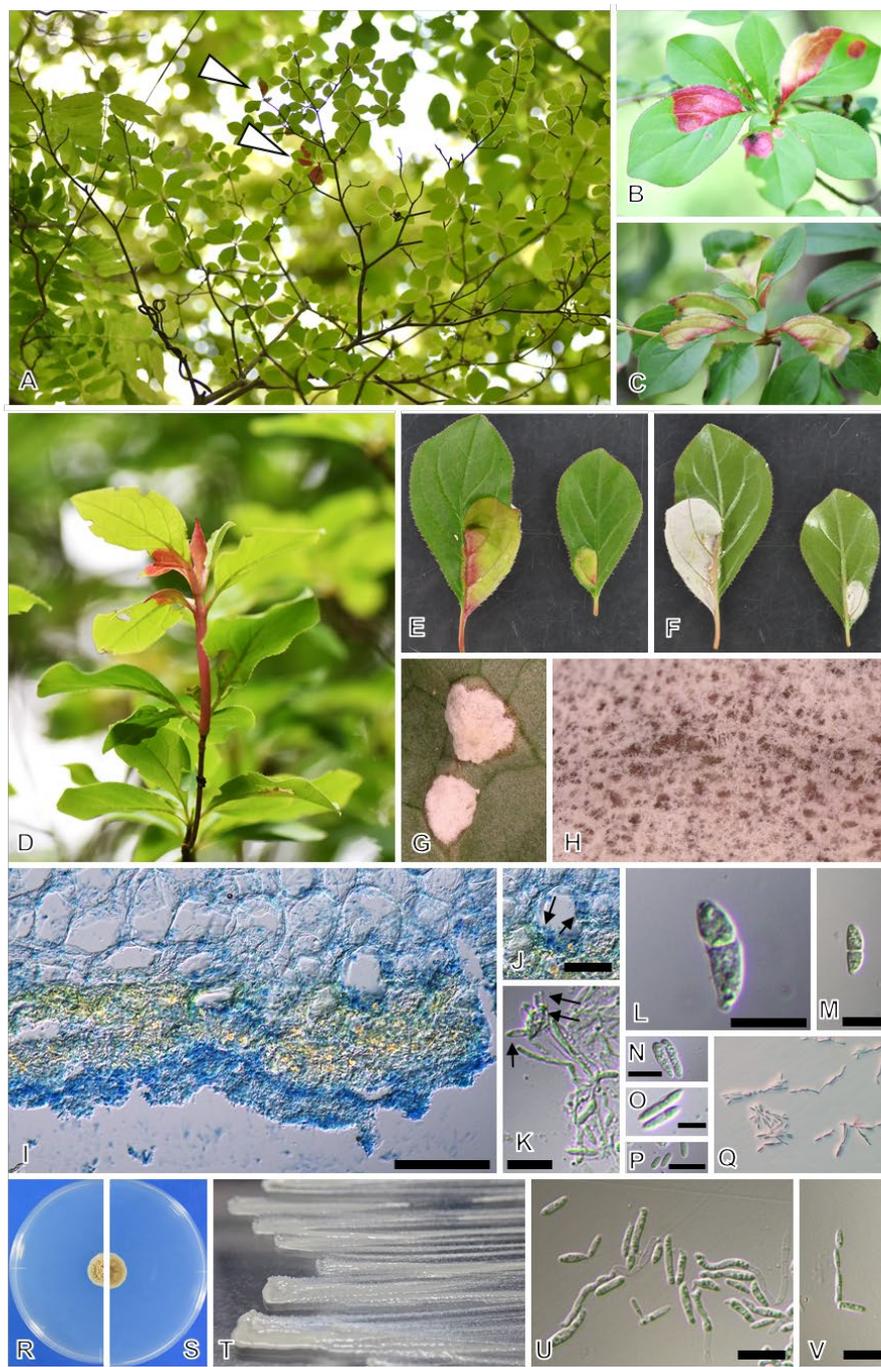


Fig. 16 The symptoms and morphological characters of *Exobasidium* sp. on *R. quinquefolium* (A-G, I-Q : HM21-481, H : HM22-062, R-V : HM21-500C). Symptomatic leaves (arrows) on higher layer of a tree (A), Bright red leaves (B, C), Stem symptom (D), Leaf blisters (E, F, G), Hymenium on leaf surface (H, I), Haustorium (arrows) (J), sterigma (arrows) on a basidium (K), basidiospores (L-N), conidia (O, P), Germinating basidiospores and conidium (Q), colony on PDA at 20 °C for 30 d (R, S) colony on PDA for 5 d (T), conidia on PDA (U, V). Bars: I 100µm; J 50µm; K-N, P, U, V 10µm; O 5µm

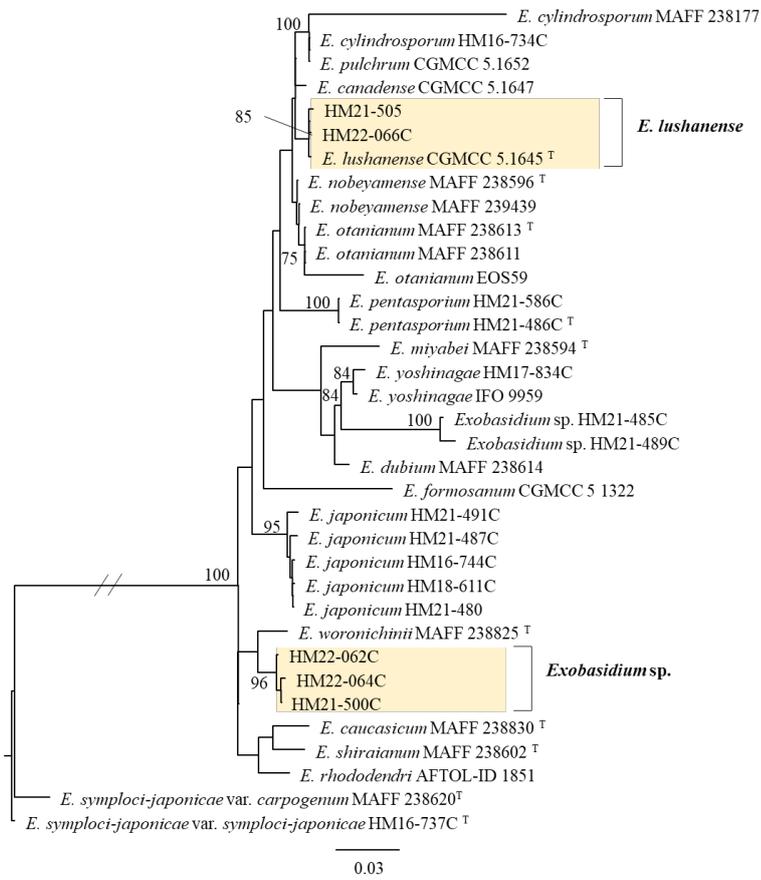


Fig. 17 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the TIM2+I+G for ITS and TPM3uf+G for LSU (Bootstrap value: > 70%). *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum* and *E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

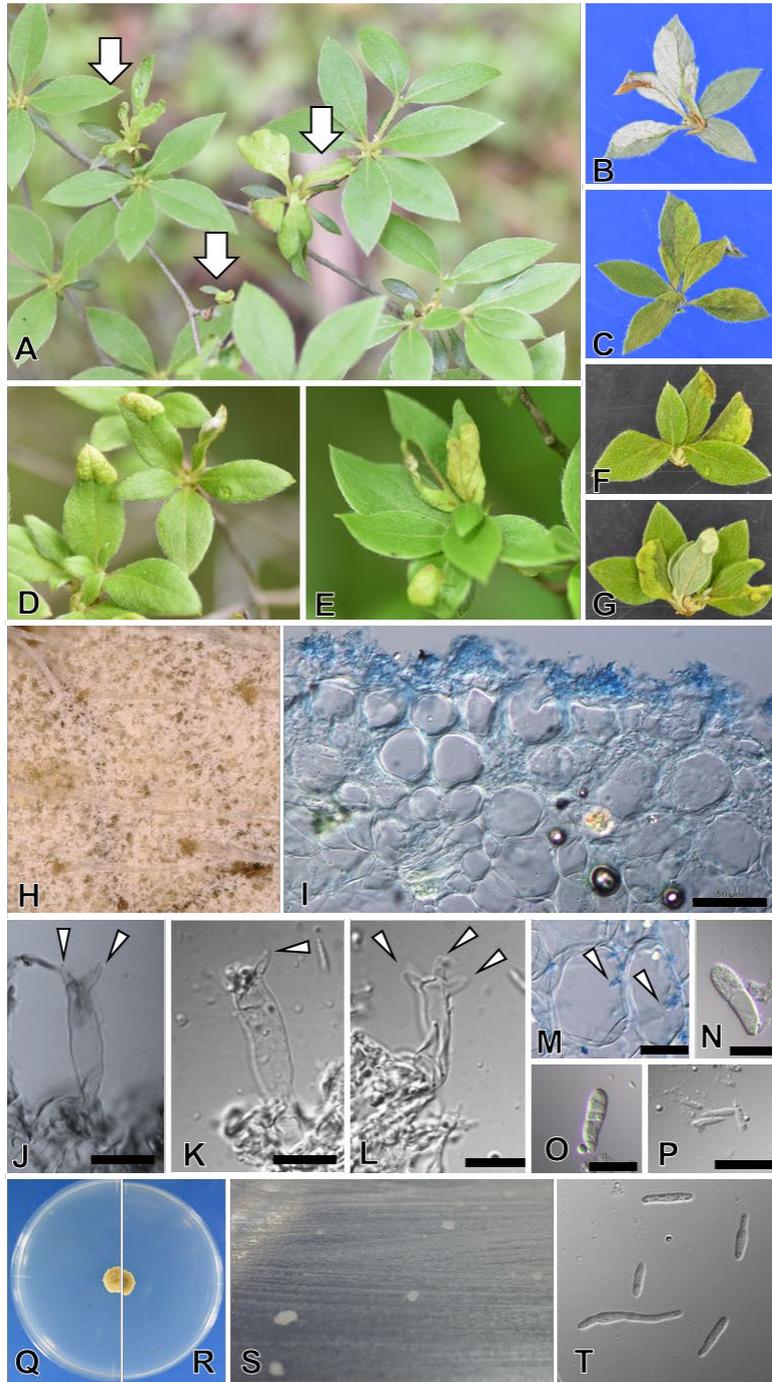


Fig. 18 The symptoms and morphological characters of *Exobasidium lushanense* on *R. tschonoskii* (B,C, I-P : HM22-066, F, G : HM21-479, H : HM22-063). Symptomatic leaves on tree. (A), leaf blister (B-G), hymenium on leaf surface (H, I), sterigma (arrows) on a basidium (J-L), haustoria (arrows) (M), basidiospore (N, O), conidia (P), colony on PDA at 20 °C for 30 d (Q, R) colony on PDA for 5 d (S), conidia on PDA (T). Bars: I, M 50µm; J-P 10µm



Fig. 19 The situation of damage in Ymanashi prefecture. Diseased trees (arrows) (A), Witches' broom symptoms on a tree (B-D), gall symptom (E), time variation of witches' broom in March (F), April (G), June(H), July(I)

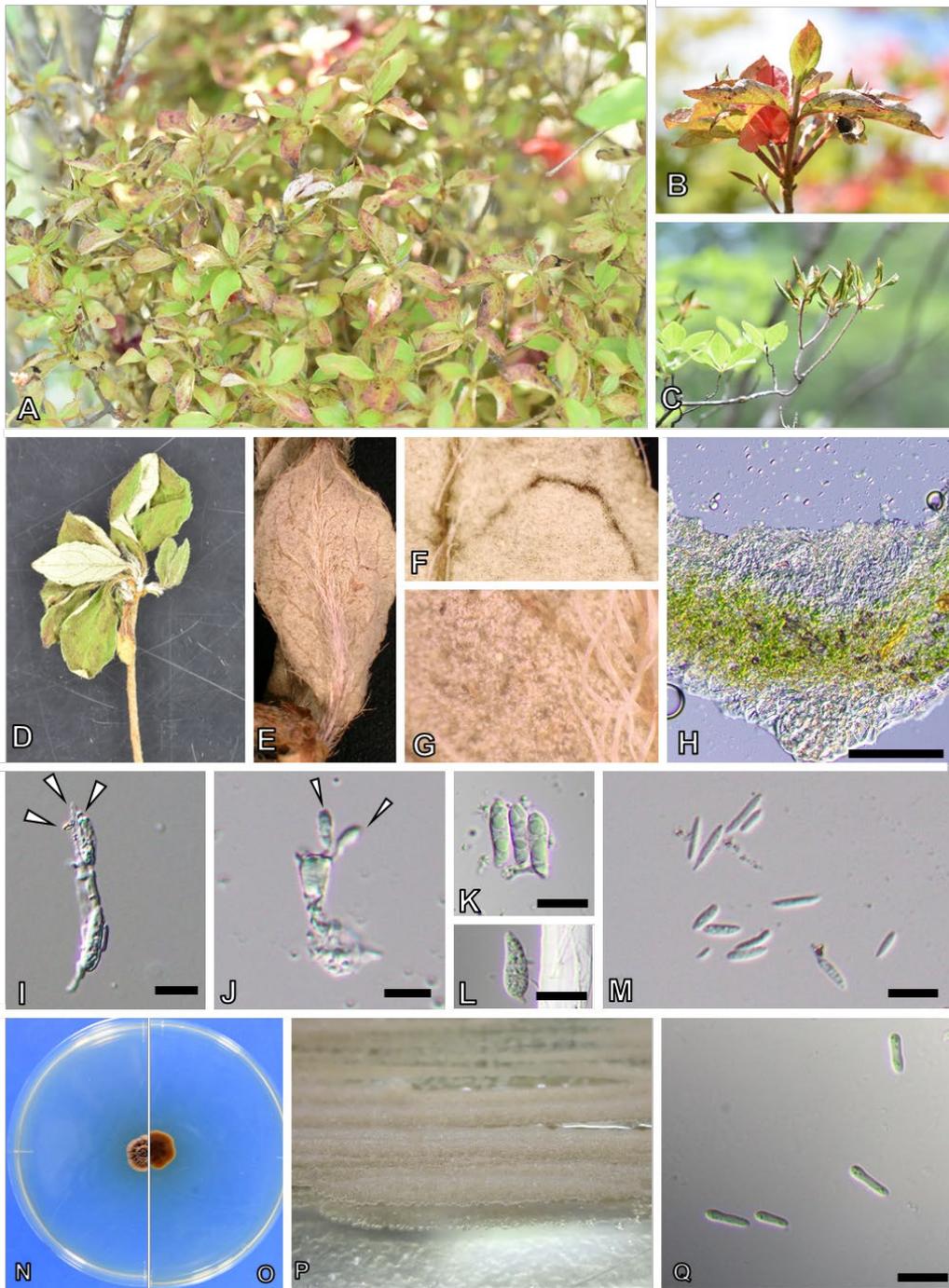


Fig. 20 The symptoms and morphological characters of *Exobasidium pentasporium* on *Rhododendron kaempferi*. Symptomatic leaves on witches' broom (A-C), hymenia on leaf surface (D-H), sterigma (arrows) on a basidium (I), immature basidiospores (arrows) on a basidium (J), basidiospores (K, L), conidia (M), colony on PDA at 20 °C for 30 d (N, O) colony on PDA for 5 d (P), conidia on PDA (Q). Bars: H 100µm; I-M, P10µm

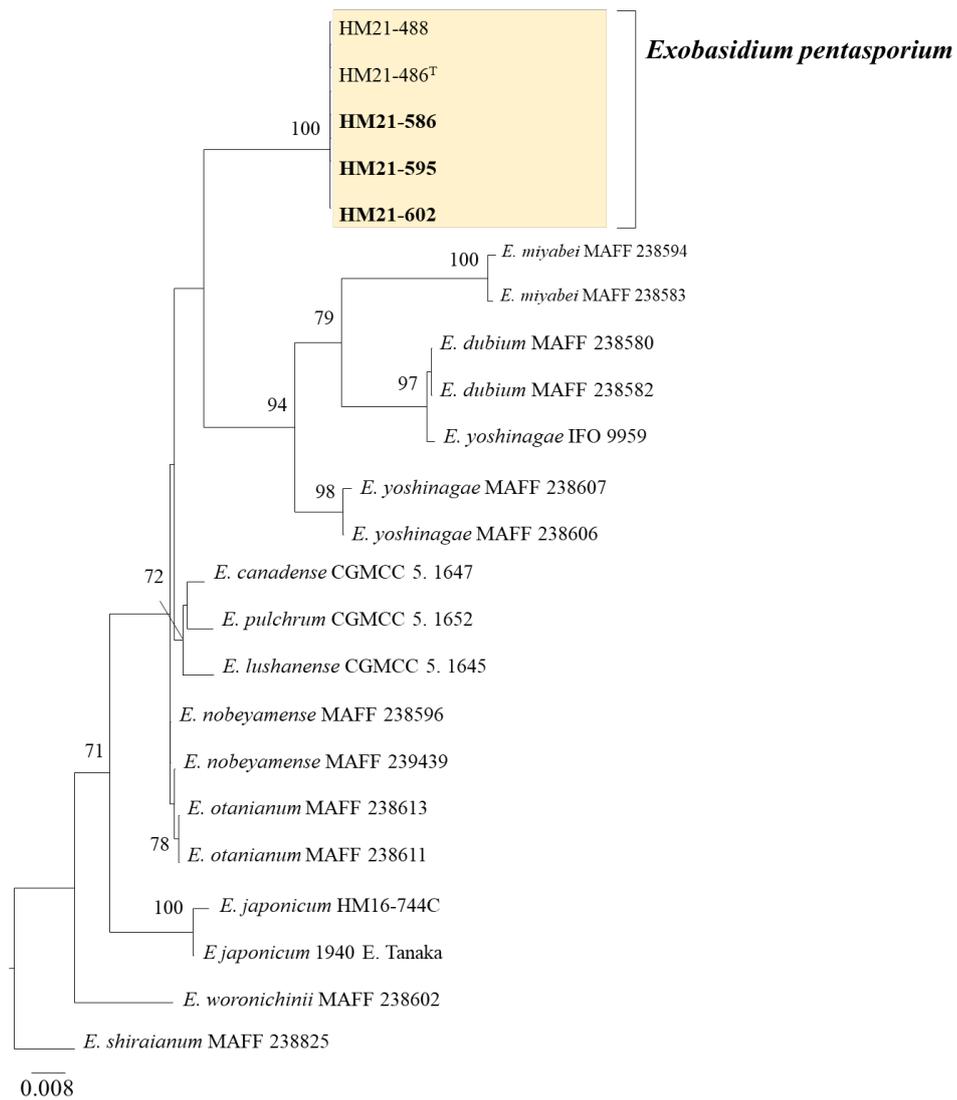


Fig. 21 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+I+G for ITS and TPM1uf+I for LSU (Bootstrap value: > 70%). *E. shiraianum* and *E. woronichinii* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T=type sequence

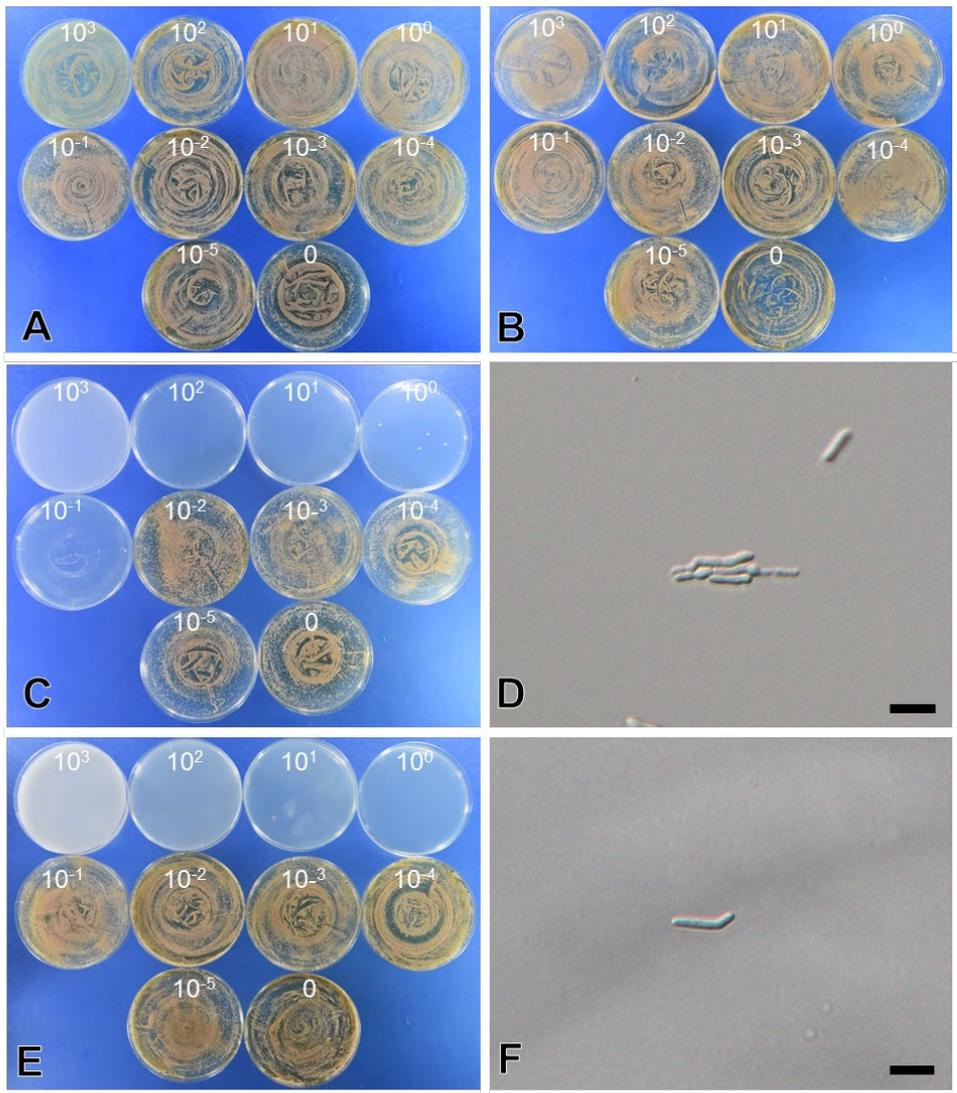


Fig. 22 in vitro tests of chemical components (A Bordeaux mixture, B Mepronil, C, D Tebuconazole, E, F TPN). Colony on PDA (A-C, E), abnormal cells (D, F). Unit: mg/ ml. Bars: 10 μ m

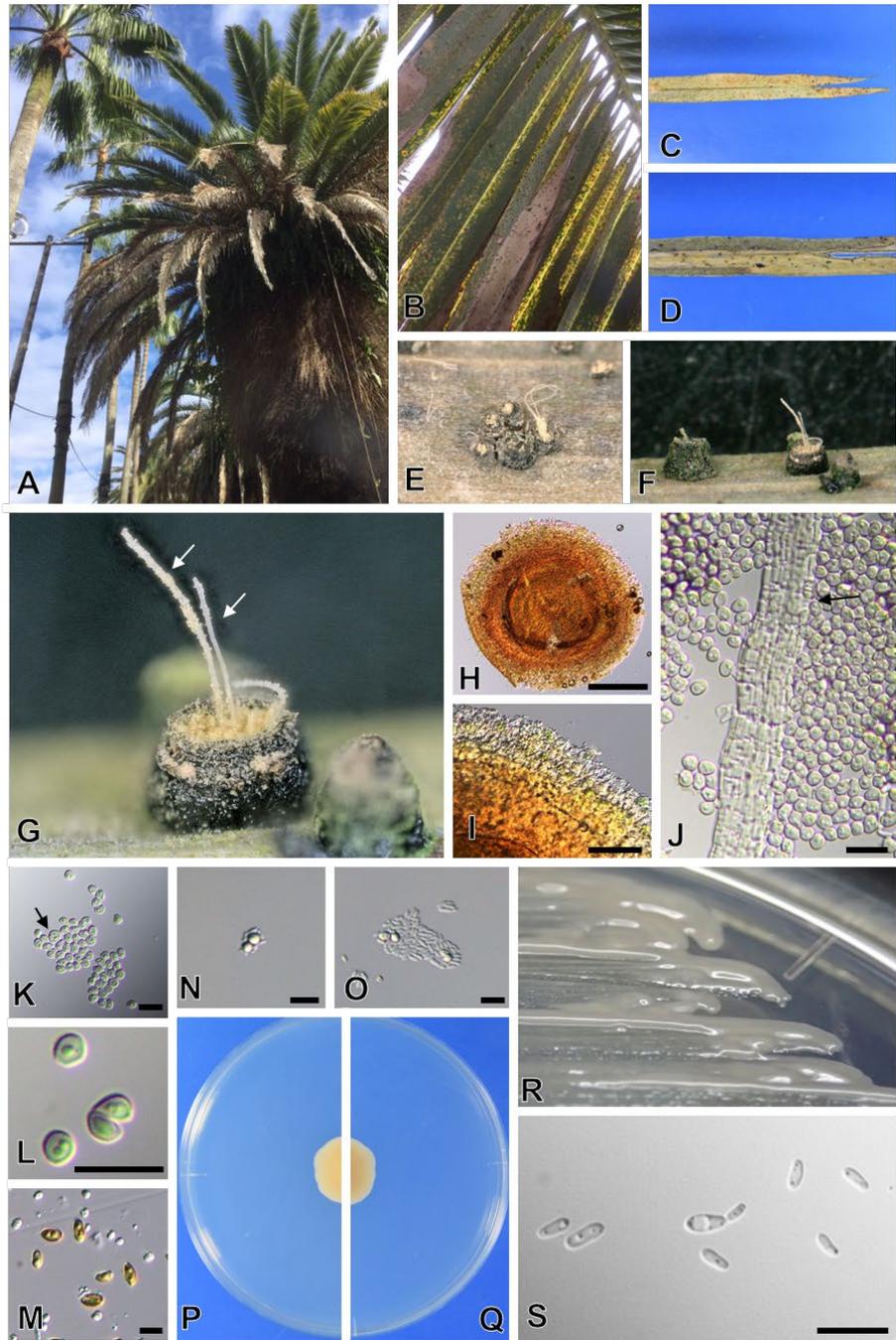


Fig. 23 The symptoms and morphological characters of *Graphiola phoenisis* on *Phoenix canariensis* (C, D : HM21-1333, E-I, K, M : HM21-1332, J, L : HM21-1425, N-S : HM21-1332C). Symptomatic leaves on tree (A), leaf blight (B-D), elater (arrows) from basidioma (E-G), upper surface of a basidiomum (H), surface of a basidiomum (H, I), elater (arrows) (J), basidiospores and basidium (arrow) (K), basidiospore (L, M), germinating basidiospores (N, O), colony on PDA at 20 °C for 30 d (P, Q), colony on PDA for 5 d (R), conidia on PDA (S). Bars: H 100µm; I 50µm; J-O, S 10µm

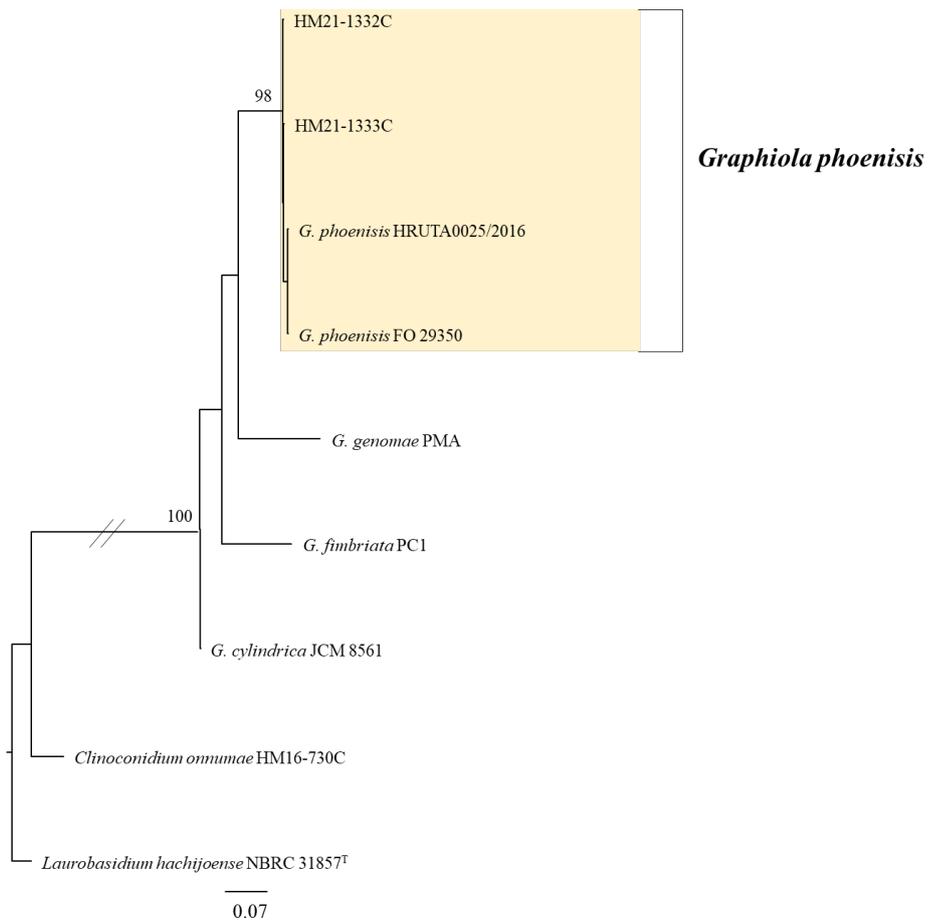


Fig. 24 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the TIM3+I+G for ITS and HKY+I+G for LSU (Bootstrap value: > 70%). *L. hachijoense* and *Clinoconidium onnumae* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

Table 14 Specimens of the genera *Exobasidium* and *Graphiola* used in this study

Species name	Sampling site	Host	Symptom	Collected date	Collector	Specimen voucher
<i>Exobasidium japonicum</i>	Sado, Niigata	<i>Rhododendron multiflorum</i>	hypertrophic	2018, June, 18	Yuho Ando	HM19-002
	Sado, Niigata	<i>R. multiflorum</i>	hypertrophic	2018, May, 20	Hiyori Itagaki	HM19-007
	Nikko, Tochigi	<i>R. multiflorum</i>	hypertrophic	2021, May, 19	Saho Shibata	HM21-483
	Naruko Onsenkyo, Oosaki, Miyagi	<i>R. multiflorum</i>	hypertrophic	2021, May, 19	Daiki Takahashi	HM21-491
	Naruko Onsenkyo, Oosaki, Miyagi	<i>R. multiflorum</i>	hypertrophic	2021, May, 19	Daiki Takahashi	HM21-492
	Naruko Onsenkyo, Oosaki, Miyagi	<i>R. multiflorum</i>	hypertrophic	2021, May, 19	Daiki Takahashi	HM21-493
	Naruko Onsenkyo, Oosaki, Miyagi	<i>R. multiflorum</i>	hypertrophic	2021, May, 19	Daiki Takahashi	HM21-494
	Naruko Onsenkyo, Oosaki, Miyagi	<i>R. multiflorum</i>	hypertrophic	2021, May, 19	Daiki Takahashi	HM21-495
	Nikko, Tochigi	<i>R. multiflorum</i>	hypertrophic	2021, June, 8	Saho Shibata	HM22-068
Nikko, Tochigi	<i>R. pentaphyllum</i> var. <i>nikoense</i>	hypertrophic	2021, May, 19	Saho Shibata	HM21-483	
<i>E. kawanense</i>	Nikko, Tochigi	<i>R. semibarbatum</i>	leaf spot	2021, May, 19	Saho Shibata	HM21-485
	Nikko, Tochigi	<i>R. semibarbatum</i>	leaf spot	2021, May, 19	Saho Shibata	HM21-489
	Nikko, Tochigi	<i>R. semibarbatum</i>	leaf spot	2021, June, 8	Saho Shibata	HM22-074
	Nikko, Tochigi	<i>R. semibarbatum</i>	leaf spot	2021, June, 8	Saho Shibata	HM22-076
<i>Exobasidium</i> sp. 1	Nikko, Tochigi	<i>R. quinquefolium</i>	leaf blister	2021, May, 19	Saho Shibata	HM21-500
	Nikko, Tochigi	<i>R. quinquefolium</i>	leaf blister	2021, June, 8	Saho Shibata	HM22-062
	Nikko, Tochigi	<i>R. quinquefolium</i>	leaf blister	2021, June, 8	Saho Shibata	HM22-064

Species name	Sampling site	Host	Symptom	Collected date	Collector	Specimen voucher
<i>Exobasidium</i> sp. 1	Nikko, Tochigi	<i>R. quinquefolium</i>	leaf blister	2021, June, 8	Saho Shibata	HM22-065
<i>E. lushanense</i>	Nikko, Tochigi	<i>R. tschonokii</i>	leaf blister	2021, May, 19	Saho Shibata	HM21-479
	Nikko, Tochigi	<i>R. tschonokii</i>	leaf blister	2021, June, 8	Saho Shibata	HM22-063
	Nikko, Tochigi	<i>R. tschonokii</i>	leaf blister	2021, June, 8	Saho Shibata	HM22-065
<i>E. pentasporium</i>	Hokuto, Yamanshi	<i>R. kaempferi</i>	witchs' broom	2021, Apr, 19	Saho Shibata, Yuuri Hirooka	HM21-255
	Hokuto, Yamanshi	<i>R. kaempferi</i>	witchs' broom	2021, May, 25	Hiroo Otsuka	HM21-442
	Hokuto, Yamanshi	<i>R. kaempferi</i>	witchs' broom	2021, May, 25	Hiroo Otsuka	HM21-443
	Hokuto, Yamanshi	<i>R. kaempferi</i>	witchs' broom	2021, May, 25	Hiroo Otsuka	HM21-444
	Hokuto, Yamanshi	<i>R. kaempferi</i>	witchs' broom	2021, May, 25	Hiroo Otsuka	HM21-445
	Hokuto, Yamanshi	<i>R. kaempferi</i>	witchs' broom	2021, June, 10	Saho Shibata, Yuuri Hirooka	HM21-586
	Hokuto, Yamanshi	<i>R. kaempferi</i>	witchs' broom	2021, June, 10	Saho Shibata, Yuuri Hirooka	HM21-595
	Hokuto, Yamanshi	<i>R. kaempferi</i>	witchs' broom	2021, June, 10	Saho Shibata, Yuuri Hirooka	HM21-602
<i>Graphiola phoenisis</i>	Aki, Kochi	<i>Phoenix canariensis</i>	leaf blight	2021, Act, 30	Shohei Fujimori	HM21-1332
	Aki, Kochi	<i>P. canariensis</i>	Aki, Kochi	2021, Act, 30	Shohei Fujimori	HM21-1333
	Aki, Kochi	<i>P. canariensis</i>	Aki, Kochi	2021, Sep, 21	Shohei Fujimori	HM21-1425
	Aki, Kochi	<i>P. canariensis</i>	Aki, Kochi	2021, Nov, 15	Shohei Fujimori	HM21-1426

Table 19 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium japonicum* on *Rhododendron multiflorum* and *R. pentaphyllum* var. *nikoense*

	<i>E. japonicum</i> *	<i>E. japonicum</i> HM21-480	<i>E. japonicum</i> HM18-611	<i>E. japonicum</i> **	<i>E. japonicum</i> 20150520, 201600608	<i>E. japonicum</i> Ezuka (1990b)
Basidia	size (μm) (18.7-)27.3-51.1(-64.9) × (2.0-)3.1-6.3(-9.7)	(14.6-)17.6-31(-39.7) × (2.6-)3.0-4.7(-5.6)	(19.2-)24.8-45.1(-60.6) × (2.6-)3.0-4.7(-7.6)	(25.9-)31.8-50.3(-63) × (3.0-)3.7-6.7(-8.7)	(32.6-)37-60(-75.8) × (3.4-)6.2-9.6(-13)	60-70×6-10
Sterigma	3-4(-6)	3-4(-6)	3-4(-5)	3-4(-5)	3-4(-5)	(2-)3-4(-5)
Basidiospores	size (μm) (13.2-)15.2-20.2(-23.7) × (2.7-)3.2-4.3(-5.0)	(9.9-)12.4-17.1(-18.8) × (2.0-)3.4-4.9(-5.9)	(10.8-)12.5-17.4(-21.2) × (2.2-)2.4-3.7(-5.4)	(11.3-)13.4-17.1(-20.2) × (2.3-)2.4-3.7(-5.0)	(12.2-)13-16(-17.8) × (1.8-)2.4-3.6(-4.3)	12-17×2.5-4.5
	lateral septa	1-3(-6)	1-2(-3)	1(-2)	1	1(-2)
Conidia	size (μm) (4.4-)5.3-9.0(-13.8) × (0.7-)1.0-2.2(-3.3)	(1.8-)6.7-11.4(-14.7) × (0.5-)0.8-2.0(-2.7)	(6.6-)8.3-13(-15) × (0.3-)0.6-1.1(-1.5)	(2.5-)5.1-11(-14.5) × (0.4-)0.6-1.0(-1.3)	(5.5-)7.3-12(-14.6) × (0.6-)0.8-1.4(-1.6)	6.0-12×1.0-1.5
Host plant	<i>R. multiflorum</i>	<i>R. pentaphyllum</i> var. <i>nikoense</i>	<i>R. transiens</i>	<i>R. indicum</i>	<i>R. kaempferi</i>	<i>R. kaempferi</i>

*HM19-002, HM21-491, 492, 493

** HM16-744, HM17-025, HM18-039, 083

Table 20 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium* sp. on *Rhododendron semibarbatum* and *E. butleri*

		<i>Exobasidium</i> sp. HM21-849,845, HM22-074, 076	<i>E. butleri</i> Sawada (1950)	<i>E. butleri</i> Sydow & Sydow (1912)
Basidia	size	(16.4–)22.9–45.0 (–55.9)	35–41 × 6.0–7.0	nd
	(μm)	× (4.0–) 4.4–7.5(–8.9)		
Sterigma		3–4	4	4–6 (mostly 4)
Basidiospores	size	(13.0–)15.5–21.4(–24.0)	14–16×4.0–5.0	12–15×4.0–5.0
	(μm)	× (3.0–)3.5–4.4(–4.8)		
	septa	1–2(–3)	1–3	1
Conidia	size	(5.3–)7.3–13.2(–16.6)	nd	nd
	(μm)	× (0.8–)1.1–2.0(–2.6)		
Host plant		<i>Rhododendron semibarbatum</i>	<i>R. semibarbatum</i>	<i>R. arboreum</i>

^T : Type

nd : no data

Table 21 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium* sp. on *Rhododendron semibarbatum* and similar species

		<i>Exobasidium</i> sp. HM21-849,845, HM22-074, 076	<i>E. miyabei</i> Nagao et al. (2003a)	<i>E. yoshinagae</i> Ezuka (1990b), Shibata et al. (2022a)	<i>E. dubium</i> Nagao et al. (2003a)	<i>E. kawanense</i> Ezuka (1990b)	<i>E. canadense</i> Savile (1959)	<i>E. decolorans</i> Harkness(1884)
Basidia	size (μm)	(16.4–)22.9–45.0 (–55.9) × (4.0–) 4.4–7.5(–8.9)	25–41 × 7.0–9.0	37–70 × 6.8–10	20–30 × 6.5–10	40–50 × 4.0–7.0	24–40 × 5.5–8.0	18–35 × 6.5–8.5
Sterigma		3–4	3–5	(3–)4–5(–6)	3–5	(4–)5(–6)	2–4(–5)	(2–)3–5(–6)
Basidiospores	size (μm)	(13.0–)15.5–21.4(–24.0) × (3.0–)3.5–4.4(–4.8)	14–23 × 4–5	13–23 × 2.6–6.0	15–25 × 3.8–5	14–25 × 3.0–4.4	14–20 × 3.0–4.7	14.5–22 × 4.2– 6.5
	septa	1–2(–3)	1–6	1–4 (–5)	1–4(6)	1–3(–7)	1–3	1–3
Conidia	size (μm)	(5.3–)7.3–13.2(–16.6) × (0.8–)1.1–2.0(–2.6)	3.0–12 × 1.0–1.5	2.7–12 × 0.7–3.0	5.0–9.0 × 0.7–1.5	5.0–13 × 1.0–2.6	nd	nd
Host plant		<i>Rhododendron semibarbatum</i>	<i>R. dauricum</i>	<i>Rhododendron</i> spp.	<i>R. yedoense</i> var. <i>yedoense</i> f. <i>yedoense</i>	<i>R. macrosepalum</i>	<i>R. canadense</i>	<i>R. occidentale</i>

^T : Type

nd : no data

Table 22 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium* sp. on *Rhododendron quinquefolium* and similar species

		<i>Exobasidium</i> sp. HM21-481	<i>E. japonicum</i> var. <i>hypophyllum</i> Ezuka (1990b)	<i>E. otanianum</i> Nagao et al. (2004b)	<i>E. woronichinii</i> Nagao et al. (2004a)	<i>E. caucasicum</i> Nagao et al. (2004a)	<i>E. shiraianum</i> Nagao et al. (2004a)
Basidia	size	(19.4–) 24.5 – 35.1(–38.5)	60–70 × 6.0–10	5.0–30 × 5.0–9.0	10–60 × 4.5–12	13–35 × 4.0–12	5–30 × 5.0–9.0
	(μm)	× (2.4–)2.8 – 4.1(–7.5)					
Sterigma		(3–)4–5(–6)	(2–)3–4(–5)	2–4	2–4	2–4	2–3
Basidiospores	size	(9.9–)12.1–17.1(–20.3)	12–17 × 3.5–5.0	10–21 × 3.0–6.5	11–19 (–22) × 3–4.5	13–35 × 5.0–12	11–21 × 5.0–8.0
	(μm)	× (2.3–)2.8–4.1(–5.2)					
	septa	1(–2)	1(–3)	1–4	1–5(–6)	1–2	1–3 (–4)
Conidia	size	(4.8–)7.1–11.9(–15.5)	6.0–12 × 1.0–1.5(–	5.0–20 × 1.0–2.0(–	2.0–30 × 1.0–2.5	3.0–7.0 × 1.0–2.0	2.0–10 × 1.0–2.0
	(μm)	× (0.5–)0.9–1.9(–2.7)	2.0)	2.5)			
Host plant		<i>Rhododendron quinquefolium</i>	<i>R. kaempferi</i>	<i>Rhododendron</i> spp.	<i>R. brachycarpi</i>	<i>R. aureum</i>	<i>R. degranianum</i>

^T : Type

nd : no data

Table 23 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium* sp. on *Rhododendron tschonoskii* and similar species

		<i>Exobasidium</i> sp. HM21-479, HM22- 063,066	<i>E. lushanense</i> Li & Guo (2009)	<i>E. japonicum</i> var. <i>hypophyllum</i> Ezuka (1990b)	<i>E. cylindrosporum</i> Ezuka (1991b)	<i>E. otanianum</i> Nagao et al. (2004b)
Basidia	size (μm)	(25.4–) 25.9–40.1 (–47.5) \times (3.8–) 4.1–5.4 (–6.0)	30–60 \times 5.5–7.0	60–70 \times 6.0–10	50–60 \times 5.0–7.0	5.0–30 \times 5.0–9.0
Sterigma		3–4 (–5)	(2–)3–6	(2–)3–4(–5)	(4–)5(–6)	2–4
Basidiospores	size (μm)	(10.9–)12.7–16.7(–19.9) \times (2.4–)3.0–4.6(–5.8)	(7.2–)9–13(–15) \times 3.0– 4.0	12–17 \times 3.5–5.0	12–22 \times 2.8–4.4	10–21 \times 3.0–6.5
	septa	1–2(–3)	1–3	1(–3)	1–3	1–4
Conidia	size (μm)	(3.1–)4.4–7.8(–9.7) \times (0.4–)0.6–1.1(–1.3)	nd	6.0–12 \times 1.0–1.5(–2.0)	5.0–17 \times 0.8–2.4	5.0–20 \times 1.0–2.0(–2.5)
Host plant		<i>Rhododendron</i> <i>tschonoskii</i>	<i>R. simsii</i>	<i>R. kaempferi</i>	<i>R. macrosepalm</i>	<i>Rhododendron</i> spp.

^T : Type

nd : no data

Table 24 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium pentasporium* on *Rhododendron kaempferi*

		<i>Exobasidium pentasporium</i>	<i>E. pentasporium</i>	<i>E. pentasporium</i>
		HM21-585	HM21-586, 587	HM21-486 ^T
Basidia	size	22.1–35.9 × 3.4–6.6	23.5–39.9 × 3.6–5.7	(13.4–)22.8–35.7(–42.1) × (2.8–)3.4–6.6(– 9.2)
	(µm)			
Sterigma		3–4(–5)	3–4(–5)	3–4(–5)
Basidiospores	size	12.9–16.6 × 2.7–4.1	14.1–17.4 × 3.0–4.4	(11.3–)12.2–15.3(–17.5) × (2.0–)2.8–3.7(– 4.0)
	(µm)			
	septa	1(–2)	1(–2)	1(–2)
Conidia	size	6.1–8.7 × 0.7–1.4	6.0–10.3 × 0.7–1.2	(3.9–)5.4–8.6(–9.7) × (0.5–)0.7–1.2(–1.6)
	(µm)			
Host plant		<i>R. kaempferi</i>	<i>R. kaempferi</i>	<i>R. kaempferi</i>

^T : Type

nd : no data

Table 25 in vitro tests of chemical components for *Exobasidium pentasporium*

	active constituent concentration (mg/ml)									
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³
Control	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Bordeaux mixture	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Mepronil	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Tebuconazole	9	9	9	9	9	0	0	0	0	0
TPN	9	9	9	9	9	9	0	0	0	0

() : unit

Table 26 Comparison of distinctive morphological features of *Graphiola phoenicis* on *Phoenix canariensis*

		<i>Graphiola phoenicis</i> HM21-1332	<i>G. phoenicis</i> Piepenbring et al. (2012)	<i>G. phoenicis</i> Tsubaki & Yokoyama (1971)
Basidia	size (µm)	nd	5 × 4	nd
Primary Basidiospores	size (µm)	(3.2–)3.7–4.8(–6.0) × (2.0–)2.4–3.2(–3.3) (primary + secondary)	nd	5–6 × 4–4.5 (primary + secondary)
Secondary basidiospores	size (µm)	(7.0–)8.4–10.9(–12.1) × (2.2–)3.2–4.9(–5.4)	(2–)3–4(–5) diam.	
Host plant		<i>P. canariensis</i>	<i>P. canariensis</i> <i>P. dactylifera</i> ,	<i>P. canariensis</i>

^T : Type

nd : no data

第3章 モチビョウキン目菌類の無性世代の探索とその病害診断

3.1 緒言

モチビョウキン目菌類は環境の変化に伴い、栄養増殖形態が酵母と菌糸型に変化する二形性真菌である。この生活環と形態の変化は、核相の変化が単相と複相で切り分けられることで生じる (Begerow et al. 2014)。単相 (n) の生活環ではさまざまな基質、環境から分離され、菌糸融合により重相 (n + n) となると宿主植物に顕著で特異的な病徴を引き起こす場合がある (Begerow et al. 2014)。

モチビョウキン目菌類の有性世代 (複相世代) は、植物体上で複相 (2n) となり、担子器内で減数分裂が起こることで、各担子胞子に核が移行し、単相 (n) として次の世代に移行することが知られている (Begerow et al. 2014)。一方、本目菌類の無性世代 (単相世代) は、植物体上に存在した場合でも顕著な病徴を示さず、基質上や人工条件下で観察される形態学的特徴も極めて単純である。そのため、無性世代の形態学的手法による種同定や系統推定は困難であった。その後、分子生物学的な解析が可能となった 2000 年代に、初めて果実とそれに寄生するダニの体表に発生した菌類がモチビョウキン目菌類の無性世代であることが明らかとなった (Boekhout et al. 2003)。この研究以降、自然環境下の様々な基質から有性世代の生活環が不明な無性世代の種の発見が相次ぎ、モチビョウキン目の種数は急激に増加している (Cao et al. 2018, Li et al. 2022, Limtong et al. 2017, Nasr et al. 2019, Rush & Aime 2013, Yasuda et al. 2006)。

これらモチビョウキン目菌類の中には、無性世代でも菌類の増殖に伴う標徴の出現や臭い、色素の産生により、農作物の商品価値を低下させるコスメティック病害の原因菌となる種が存在する (安田 2005, 柴田ら 2022 投稿中)。さらにこれらの菌類は有性世代が植物病原性を有する可能性、つまりは潜在的な植物

病原菌類である可能性があり，モチビョウキン目菌類の本邦における多様性の把握は植物防疫の観点から重要と考える．

これまで日本国内におけるモチビョウキン目の分類学的研究は，有性世代の発見とその分類に関する研究が中心であり，無性世代に目を向けた本目菌類の分類や多様性の解明は行われていなかった．このことは，モチビョウキン目菌類の生活環が多く種の未解明であることを意味し，植物病原菌の重要な伝染源，潜在的な植物病原菌を見過ごしている可能性がある．近年の DNA を用いた多様性解析の結果，有性世代の宿主植物を除き，モチビョウキン目菌類の検出頻度が最も高い生育環境は，植物表面（葉面，果面）である（Albu 2012, NCBI database）．葉面や果面といった植物体表面の菌類相に関する研究は 1950 年代と古くから行われ，多様な菌類の生存が知られている（Fonseca and Inácio 2006）．これまで，葉面菌の研究は分類学的，生態学的に独立して行われている傾向にある（Kirschner 2018, Fonseca and Inácio 2006, Vorholt 2012）．そのため，葉面菌の多様性を明らかにする生態学的研究では種まで同定されないまま，もしくは系統関係を反映しない暫定的な種で議論がなされてきた．このことから，正確な種同定に基づく多様性の解明は，モチビョウキン目菌類の葉面上における生態的役割に関する検討を行う余地が残されている．そこで第 3 章では，r-DNA LSU 領域の相同性に基づく簡易同定と形態観察とともに，複数 DNA 領域を用いた分子生物学的手法や生理学的性状試験による詳細な種同定，そして宿主植物への病原性試験により日本国内のモチビョウキン目菌類の多様性の解明と植物病理学的な知見の蓄積を目指した．

3.2 材料および方法

3.2.1 植物サンプルからの分離と簡易同定

植物サンプルは、調査地で葉もしくは果実を採集し、紙袋に入れて研究室へ持ち帰り、採集当日もしくは翌日中に以下の内容で供試した。サンプルは、実験室でランダムに5mm角に切り取り、切片3~4枚を滅菌水1mlを入れた1.5mlチューブに加え、ボルテックスミキサーで10分間振とうした。その後、菌液の調整のために原液を10~1000倍に希釈した。各濃度の菌液はPDA平板培地に100 μ lずつ、コンラージ棒で塗布し、室温で5日間培養後、菌叢ごとに新しいPDA平板培地に回収した。分離された菌叢の性状をもとに、モチビョウキン目菌類と考えられた全菌株についてrDNA-LSU D1/D2を決定し、BLAST検索の相同性(99%)に基づきふるい分け、OTUごとに代表菌株を決定した。「3.2.2 培養菌株の観察」以降の形態観察やDNA解析は代表菌株に対して行った。

3.2.2 培養菌株の観察

PDA平板培地にループ白金耳で画線し、20 $^{\circ}$ C、5日後の培養性状の観察と光学顕微鏡を使用した形態観察を行った。また、5mmコルクボーラーで打ち抜いた菌叢をPDA平板培地中央に置床し、20 $^{\circ}$ C、30日後の培養した培養性状を観察した。それ以外の異なる菌群の観察法については、以下に示す。

Yunzhangomyces 属菌

YM液体培地に酵母を懸濁し、20 $^{\circ}$ C、7日間培養後、培養性状の観察と光学顕微鏡を使用した形態観察を行った。

Meira 属菌

PDA培地、20 $^{\circ}$ C、5日間培養により酵母の観察を行い、14日間培養により菌糸と出芽型分生子の観察を行った。

Meira miltonrushii

SNA 培地 20°C, 10 日間培養により出芽型分生子の観察を行い, 21 日間培養により菌糸と出芽型分生子の観察を行った.

3.2.3 DNA シーケンスの決定

DNA 抽出は PDA 培地 20°C, 培養 1 週間以内の菌叢を供試した. TE バッファー 50 μ l 中に, 滅菌した爪楊枝で菌体を加えた. ヒートブロック 95°C で 10 分加熱した. 10000rpm で 3 分間遠心し, 上澄みを新しいチューブに入れて -20°C で保存した.

PCR は rDNA-ITS および LSU 領域について決定した. ポリメラーゼは GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) を使用し, 供試したプライマーは Table27 に示した. PCR 反応は VeritiPro Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) にて, Table28 に示したプロトコルで行った.

DNA 増幅産物の確認は 0.7%アガロースゲル電気泳動によって行った. PCR 産物 1 μ l をウェルにロードし, 120V, 15 分間泳動した後, 染色バッファー(10 μ g/ml EtBr10 μ l と 1 \times TAE Buffer 150ml を混合したもの)に 20 分間浸漬しトランスイルミネーターにてバンドの有無を確認した.

DNA の増幅が確認されたサンプルは ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher, USA) を使用し, VeritiPro Thermal Cycler にて 37°C, 4 分加熱した後, 80°C, 1 分で処理し, DNA 増幅産物中のプライマーと dNTP を不活性化させて, 精製を行った.

シーケンスリアクションは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) でサイクルシーケンスを行った. 使用したプライマ

一は Table 29 に示した. VeritiPro Thermal Cycler にて, Table30 に示したプロトコルで処理した.

これら DNA 産物はカラム Sephadex™ G-50 Superfine (Sigma-Aldrich, USA) により精製を行った. カラム用 96 穴プレートにカラム担体の粉を入れ, そこに DDW 300µl を加えて 2 時間以上膨潤させた. 膨潤後のカラムは 910xg, 室温で 5 分間遠心し, 余分な水分を除去した. シーケンス反応産物 10µl に DDW 10µl を加え, 全量 20µl をカラムに染み込ませ, 910xg, 室温で 5 分間遠心し, 96 穴の PCR プレートに精製産物を回収した. その後, 風乾器を用いて 40 分間真空状態で風乾した. そして, 精製産物にホルムアミド(FA)を 15µl 加え, 45 秒間ボルテックスした後, 95°C, 4 分間加熱し, 氷水で急冷した. その後シーケンサーABI prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) を使用し, 塩基配列を決定した.

決定した塩基配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST 検索にて, 決定配列の精度を確認した (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2.4 分子系統解析

Wang et al. (2016) および Li et al. (2022) が分子系統解析で使用した菌類の塩基配列に加え, NCBI に登録のある近縁種の塩基配列をもとに分子系統樹の作成を行った.

近縁属の塩基配列を加えた FASTA ファイルを作成し, その FASTA ファイルを MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) を使用して, NEXUS ファイルに変換した. この NEXUS ファイルを Mesquite version 3.04 でア

ライメントし, Phylip ファイルに変換した. そして, Phylip ファイルを RAxML BlackBox (<https://raxml-ng.vital-it.ch/>) (Kozlov et al. 2019) にアップロードし, モデルを指定して rapid bootstrap algorithm による最尤法で系統解析を行った.

Table 27 Primer for PCR reaction

ITS	M-ITS1: GGTGAACCTGCAGATGGATC	Stoll et al. (2003)
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
LSU D1/D2	LR0R: ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys & Hester (1990)
	LR5: TCCTGAGGGAAACTTCG	Vilgalys & Hester (1990)
	NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	O' Donnell (1993)
	NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O' Donnell (1993)
RPB1	RPB1-Ac: GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	Stiller & Hall (1997)
	RPB1-Cr:	Stiller & Hall (1997)
	CCNGCDATNTCRTRTRCCATRTA	
EF1- α	EF1-983F:	Carbone & Kohn (1999)
	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	
	EF1-2218R	Rehner (2001)
	ATGACACCRACRGCRCRGTGTG:	
RPB2	fRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu et al. (1999)
	fRPB2-7cR: CCCATRGCTTGYYTRCCCAT	Liu et al. (1999)

Table 28 Primer for cycle sequencing

95°C	4min	
95°C	1min	} × 35~40
47~62°C	1min	
72°C	1min	
72°C	8min	
4°C	∞	

Table 29 Primer for cycle sequencing

ITS	M-ITS1: GGTGAACCTGCAGATGGATC	Stoll et al. (2005)
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
LSU D1/D2	NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	O' Donnell (1993)
	NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O' Donnell (1993)
	RPB1-Ac: GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	Stiller & Hall (1997)
	RPB1-Cr: CCNGCDATNTRTTRTCCATRTA	Stiller & Hall (1997)
	EF1-983F: GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	Carbone & Kohn (1999)
	EF1-2218R ATGACACCRACRGCACRGTGTG:	Rehner (2001)
	EF1-1567R: ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	Rehner & Buckley (2005)
	EF1-1577F:	Rehner & Buckley
	CARGAYGTBTACAAGATYGGTGG	(2005)
	fRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu et al. (1999)
	fRPB2-7cR: CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT	Liu et al. (1999)
	bRPB2-6F: TGGGGYATGGTNTGYCCYGC	Matheny et al. (2006)
	gRPB2-6R: GCAGGRCARACCAWMCCCCA	Liu et al. (1999)

Table 30 Protocol of cycle sequencing

96°C	3min	
96°C	15sec	} ×25
50°C	5sec	
60°C	4min	
4°C	∞	

3.2.5 生理学的性状試験

The Yeast, a taxonomic study, 5th edn (Kurtzman et al. 2011) に準じて以下の試験を実施した。供試菌を PDA 培地で 20°C, 暗黒条件下で 1 週間培養した。この菌株をループ白金耳でかき取り, 滅菌水 5ml 中に攪拌させ, 濁度が視覚的に同程度となるように調整した液を接種液とした。ネガティブコントロールには, 滅菌水を使用した。各試験で温度指定がない場合は, すべて 20°C で試験を行った。結果の評価はそれぞれの試験ごとに培養 1~5 日以内に行った。評価は, ポジティブコントロール同様の旺盛な生育を示した場合を+, 全く生育が見られなかった場合を-, ネガティブコントロール区と比較して生育が見られるが, ポジティブコントロール区に劣る生育を見せた場合を W, 5 週目以降に生育が見られた場合を D とする 4 段階で行った。以下に, それぞれの試験の手法を示す。

C 源資化性状試験

以下の通りに準備した試験区に接種液をパスツールピペットで 2 滴ずつ加え, 5 週間観察を行った。

Table 31 のストック液をフィルターろ過した。0.8ml の滅菌水入り試験管に 0.2ml ずつ分注した。

Table 31 10×stock solution

YNB (yeast nitrogen base)	6.7g
Carbon source	5.0g
DDW	100ml

Table 32 の組成でフィルターろ過すると同時に試験管に 1ml ずつ分注した.

Table 32 1×stock solution

YNB	0.67g
Carbon source	0.5g
DDW	100ml

N 源資化性状試験

接種液をまず飢餓処理培地に加え, 1 週間培養する飢餓処理を行った. その後, N 源試験区に接種し 1 週間後に観察を行った. 以下の要領で作製した試験培地を使用した.

Table33 の組成でフィルターろ過すると同時に試験管に 1ml ずつ分注した.

Table 33 Liquid medium for starvation

YCB(yeast carbon base)	11.7g
DDW	100ml

N 源は 0.108g 相当になるように添加し滅菌水に溶解させたのち, ろ過滅菌した. 亜硝酸区は pH 7.0 前後に調整した.

Table 34 10×stock solution

Nitrogen source	**
DDW	100ml

YCB を滅菌水に加えオートクレーブし放熱したのち，10×ストック液を添加した．その後試験管に 1ml ずつ分注した．

Table 35 Nitrogen assimilation test media

YCB	1.17g
10×stock solution	10ml
DDW	90ml

Urease 活性試験

以下の要領で作製した試験区に接種液を 1 滴滴下しループ白金耳で画線した．1 週間後に色の変化を観察した．

Table 36 の組成でフィルターろ過すると同時に試験管に 1ml ずつ分注した．

Table 36 20% Urease solution

Urea	20g
DDW	100ml

Table 37 の組成で，超純水に Urea agar base を加え 115℃，20 分オートクレーブし，50℃まで放熱した時点で 20% Urease solution を添加して，試験管に 4ml ずつ分注し傾斜を付けた．

Table 37 Urea agar base

Urea agar base	2.4g
20% Urease solution	5ml
DDW	95ml

ゼラチン液化能力試験

以下の要領で作製した試験区に接種液を2滴滴下し、15℃で培養、2週間観察した。

Table 38 を混ぜ合わせたのちに試験管に4ml ずつ分注し121℃、20分オートクレーブした。

Table 38 Gelatin medium

YNB	0.67g
Glucose	0.5g
Gelatin	10g
DDW	100ml

高糖濃度・高塩濃度下増殖試験

以下の要領で作製した試験区に接種液を2滴ずつ滴下し、高糖度試験区は2週間後に観察を行い、高塩濃度区については5週間観察を続けた。

高糖度試験区はTable 39の組成で作製した1% Yeast extract 溶液にTable 40の組成で寒天、Glucoseの順で溶解し、110℃、10分オートクレーブした。その後、シャーレに分注し試験に使用した。

Table 39 1% Yeast extract solution

Yeast extract	1g
DDW	100ml

Table 40 50% Glucose medium

1% Yeast extract solution	100g
Glucose	100g
Agar	2.6g

高塩濃度区については Table 41 の組成で培地を作製し，ろ過滅菌したのち，試験管に 1ml ずつ分注した。

Table 41 10% NaCl + 5% Glucose medium

YNB	0.67g
Glucose	5g
NaCl	10g
DDW	100ml

1% 酢酸耐性試験

以下の要領で試験区を作成し接種液を 2 滴滴下して，2 週間後に観察を行った。

Table 42 の組成で氷酢酸以外のものを混合し，121℃，20 分でオートクレーブし，50℃まで放熱したのちに，氷酢酸を添加した。その後，シャーレに分注して試験区に使用した。

Table 42 1% Acetic-acid agar

Glucose	10g
Tryptone	1g
Yeast extract	1g
Agar	2g
DDw	100ml
Glacial acetic acid ^{b)}	1ml

酸産生試験

以下の要領で作製した試験区に接種液を2滴滴下して、2週間後に観察を行った。

Table 43の組成で121℃、20分でオートクレーブしたのち、試験管に4mlずつ分注した。

Table 43 Custer's chalk medium

Glucose	5g
Yeast extract	0.5g
Agar	2g
DDW	100ml

Cycloheximide 耐性試験

以下の要領で作製した試験区に、接種液を2滴滴下し5週間観察を続けた。

Table 44の組成でろ過滅菌したのちに1mlずつ試験管に分注した。

Table 44 0.1% Cycloheximide medium

YNB	0.67g
Glucose	0.5g
Cycloheximide	0.1g
DDW	100ml

Table 45 の組成でろ過滅菌したのち, 1ml ずつ分注した.

Table 45 0.01% Cycloheximide medium

YNB	0.6g
Glucose	0.45g
0.1% Cycloheximide medium	10ml
DDW	90ml

ビタミンフリー培地培養試験

以下の要領で作製した試験区に接種液を 2ml ずつ加えて, 5 週間観察を行った.

Table 46 の組成でフィルターろ過したのちに 1ml ずつ分注した.

Table 46 10×Vitamin-free medium

Yeast Vitamin Free Base	16.7g
DDW	100ml

3.2.6 接種試験 (3.3.6 *Laurobasidium* 属菌のみ)

ナシ罹病果実から分離された *L. hachiyoense* HM19-010C を用いて接種試験により病原性の確認を行った。接種試験は噴霧により行い、2021年10月13日に法政大学の研究施設内で実施した。70%エタノールを全体に吹き付けドラフトチャンバー内で乾燥させた品種‘にっこり’の成熟果（接種区および対照区2果、計4果）を用いた。PDA平板培地で20℃、5日間培養後、 1×10^8 個/mlとなるように孢子懸濁液を調整し接種源とした。対照区には滅菌水を噴霧した。噴霧した果実は滅菌水を加えたポリエチレン袋で被覆して保湿し、プラスチック製衣装ケースに入れて24℃、3~4週間静置した。この間、3日おきに滅菌水を噴霧し加湿した。接種菌の再分離には希釈平板法を使用し、接種区、対照区ともに行った。

3.3 結果

3.3.1 植物サンプルからの分離と簡易同定結果

2019年から2021年までの調査の結果、223サンプルから136菌株を確立した (Table 47). これらの菌株について rDNA-LSU 領域の BLAST 検索相同性に基づく簡易同定を行った結果、*Exobasidium* 属菌 4 OTUs / 10 菌株, *Kordyana* 属菌 1 OTU / 13 菌株, *Yunzhangomyces* 属菌 2 OTUs / 5 菌株, *Meira* 属菌 4 OTUs / 87 菌株, *Laurobasidium* 属菌 1 OTU / 21 菌株が含まれた (Table 47). LSU 領域を用いた最尤法による分子系統解析の結果、属以上の同定では BLAST 検索による簡易同定の結果と完全に一致したが、種では一致しない場合も認められた (Fig. 25).

3.3.2 *Exobasidium* 属菌

菌株の形態観察

以下、検出された OTU ごとに形態的特徴を記す. なお、それぞれの OTU は、種名, aff. (= affinity) または sp. 1, 2 等, 便宜的に振り分けた.

E. camelliae: ツブラジイ由来の代表株 HM20-021C は PDA 培地上で乳白色、酵母様の菌叢を形成した (Fig. 26A-C). 1 か月培養した菌叢に菌糸の形成は認められなかった (Fig. 26A, B). 分生子は無色、楕円～長楕円形、無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した (Fig. 26D, E). 娘細胞を出芽した分生子は先端が細く、大きさ (2.4-)3.1-5.3(-8.0) × (0.6-)1.0-2.0(-2.4) μm であった. 培地上で有性世代の形成は確認されなかった.

E. gracile: ツブラジイ由来の代表株 HM20-035C は PDA 培地上で乳白色、酵母様の菌叢を形成した (Fig. 28A-C). 1 か月の培養した菌叢に菌糸の形成は認め

られなかった (Fig. 28A, B). 分生子は無色, 幅の狭い楕円~長楕円形, 無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した (Fig. 28D). 娘細胞を出芽した分生子は先端が細くなり, 大きさ (3.4-)4.6-8.3(-11.7) × (0.6-)0.9-1.5(-1.8) μm であった. 培地上で有性世代の形成は確認されなかった.

E. japonicum: ノキシノブ由来の代表株 HM21-1476C は PDA 培地上で表面が薄粉状, 裏面が褐色, 菌糸を伴う菌叢を形成した (Fig. 30A-C). また, ときに培地上に色素を産生した (Fig. 30A, B). 菌叢は出芽型分生子とかすがい連結のない菌糸からなっていた. 出芽型分生子は菌糸より出芽し, 大きさ (6.2-)8.7-15.1(-20.8) × (0.9-)1.2-1.7(-2.0) μm, 無色, 楕円~長楕円形, 無隔壁で娘細胞を出芽した (Fig. 30D, E). 娘細胞を出芽した出芽型分生子は先端が細くなっていた. 娘細胞は大きさ (1.5-)2.5-5.5(-6.6) × (0.7-)0.9-1.4(-1.9) であった. 培地上で有性世代の形成は確認されなかった.

Exobasidium aff. *japonicum*: ヒサカキ由来の代表株 HM20-026C は PDA 培地上で褐色, 菌糸を伴う菌叢を形成した (Fig. 33A-C). また, ときに培地上に色素を産生した (Fig. 33A, B). 出芽型分生子とかすがい連結のない菌糸からなり, 出芽型分生子は菌糸より出芽し, 大きさ (9.0-)10.4-15.7(-20.0) × (0.6-)0.8-1.3(-1.5) μm, 無色, 楕円~長楕円形, 無隔壁で娘細胞を出芽した (Fig. 33D). 娘細胞を出芽した出芽型分生子は先端が細くなっていた. 娘細胞は大きさ (2.9-)4.1-5.8(-6.4) × (0.6-)0.8-1.3(-1.6) であった. 培地上で有性世代の形成は確認されなかった.

分子系統解析

rDNA-ITS, LSU 領域を用いた最尤法による分子系統解析の結果, *E. camelliae*, *E. gracile*, *E. japonicum* のそれぞれの代表菌株はツバキもち病由来の *E.*

camelliae, サザンカもち病由来の *E. gracile*, ツツジ類もち病由来の *E. japonicum* と強く支持される単系統群を形成した. その一方で, *Exobasidium* aff. *japonicum* の代表菌株 HM20-026C は *Exobasidium* aff. *japonicum* の菌株 HM20-231C と強く支持された単系統群を形成した (Fig. 48).

生理学的性状試験

以下に, 検出された OTU ごとに生理学的特徴を記す. なお, それぞれの OTU は, 種名, aff. または sp. 1, 2 等, 便宜的に振り分けた.

E. camelliae: HM20-021C とツバキもち病より分離した *E. camelliae* HM16-732C の生理学的特徴を比較した結果, Cadaverin の資化性で矛盾が確認されたが, その他の特徴はおおむね一致した (Table 56).

E. gracile: HM20-035C とサザンカもち病より分離した *E. gracile* HM18-624C の生理学的特徴を比較した結果, Maltose の資化性で矛盾が確認されたが, その他の特徴はおおむね一致した (Table 56).

E. japonicum: HM21-1476C とツツジ類もち病より分離した *E. japonicum* HM21-487C の生理学的特徴を比較した結果, Methyl- α -glucoside と Potassium nitrate の資化性で矛盾が確認されたが, C 源, N 源および生理試験の結果は *E. japonicum* HM21-487C とおおむね一致した (Table 57).

E. aff. japonicum: HM21-026C とツツジ類もち病より分離した *E. japonicum* HM21-487C の生理学的特徴を比較した結果, Etylamine hydrochloride の資化性と 10% の塩に対する耐性試験で矛盾が確認された (Table 57). また, *E. japonicum* HM21-1476C とは, Potassium nitrate の資化性に矛盾が観察された (Table 57).

3.3.3 *Kordyana* 属菌

菌株の観察

Kordyana sp. と同定したツブラジイ由来の代表株 HM20-034C を PDA 培地上で 5 日間培養したところ乳白色，酵母様の菌叢を形成し，1 か月後には乳白色で菌糸を伴い，しわの多い菌叢を形成した (Fig. 34A-C). 一方の HM20-033C は PDA 培地上で 5 日間培養および 1 か月培養した菌叢のどちらも乳白色，酵母様の菌叢を形成した (Fig. 35A-C). 両菌株とも色素の産生は確認できなかった (Fig. 35A-C). 分生子は大きさ (3.0-)3.6-5.3(-5.8) × (0.4-)0.7-1.3(-1.8) μm，無色，楕円～長楕円形，無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した (Fig. 34D, 35D). 出芽した細胞は先端が細くなっていた. 培地上で有性世代の形成は確認されなかった.

分子系統解析

rDNA-LSU, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1-α* 領域を用いた最尤法による分子系統解析の結果, *Kordyana* sp. の代表菌株 HM20-034C はツユクサ白斑病より分離した *Kordyana* sp. と強く支持される単系統群を形成した (Fig. 49).

生理学的性状試験

HM20-033C, 034C とツユクサ白斑病より分離した *Kordyana* sp. HM17-828C, 829C の生理学的特徴を比較した結果, meso-Erythritol の資化性, シクロヘキシミド耐性の結果に矛盾がみられたが, その他の特徴はおおむね一致した (Table 58). 分離源ごとの傾向は確認できなかった.

3.3.4 *Yunzhangomyces* 属菌

菌株の観察

以下に、検出された OTU ごとに形態的特徴を記す。なお、それぞれの OTU は、種名、aff. または sp. 1, 2 等、便宜的に振り分けた。

Yunzhangomyces sp. 1 : ノキシノブ由来の代表株 HM21-033C は PDA 培地上で 5 日間培養したところ乳白色 (Fig. 38C), 酵母様の菌叢を形成し, 1 か月後には, 乳白色から褐色を帯び, 菌糸を伴うしわの多い菌叢を形成した (Fig. 38A, B)。また, 培地上に若干色素を産生した (Fig. 38A, B)。分生子は大きさ (4.4-)7.5-14.9(-18.8) × (0.6-)1.0-2.0(-1.6) μm, 無色, 円筒形, 無隔壁で娘細胞を出芽した (Fig. 38D)。出芽した細胞は先端が細くなっていた。有性世代は PDA, YMB のいずれにおいても観察されなかった。

Yunzhangomyces sp. 2 : ノキシノブ由来の代表株 HM21-1481C は PDA 培地上で 5 日間 (Fig. 39C), また 1 か月間培養後も乳白色, 酵母様の菌叢を形成した (Fig. 39A-C)。色素の産生は確認できなかった (Fig. 39A, B)。これら菌叢では, ときに菌糸が観察された (Fig. 39D)。分生子は大きさ (3.4-)5.9-10.5(-12.4) × (0.5-)0.8-1.3(-1.8) μm, 無色, 楕円~長楕円形, 無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した (Fig. 39E)。出芽した分生子は先端が細くなっていた。有性世代は PDA, YMB のいずれでも観察されなかった。

分子系統解析

rDNA-LSU, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1-α* 領域を用いた最尤法による分子系統解析の結果, *Yunzhangomyces* sp. 1 の代表菌株 HM21-1188C は HM21-033C と単系統群を形成した (Fig. 49)。*Yunzhangomyces* sp. 2 は未記載種である可能性があるが, 複数の菌株が得られなかったため, 複数 DNA 領域による解析は行わなかった。しかし, rDNA-LSU 領域を用いた最尤法による分子系統解析の結果, 高く支持された単系統群を形成した (Fig. 25)。

生理学的性状試験

以下に、検出された種 (OTU) ごとに生理学的特徴を記す.

Yunzhangomyces sp. 1 : HM21-033C と近縁な分子系統関係が認められた *Y. qinlingensis* と比較すると D-Xylose, L-Arabinose, D-Ribose, L-Solbose, Sodium nitrite の資化性で矛盾が確認された (Table 59).

Yunzhangomyces sp. 2 : HM21-1481C と近縁な分子系統関係が認められた *Y. orchidis* と比較すると L-Arabinose, D-Ribose, Ethanol, meso-Erythritol, Potassium nitrate および Sodium nitrite の資化性で矛盾が確認された (Table 59).

3.3.5 *Meira* 属菌

菌株の観察

以下に、検出された種 OTU ごとに形態的特徴を記す. なお, それぞれの OTU は, 種名, aff. または sp. 1, 2 等, 便宜的に振り分けた.

M. nashicola : ノキシノブ由来の代表株 HM20-031C を PDA 培地上で 5 日間培養したところ, 乳白色で酵母様の菌叢を形成し (Fig. 40C), 1 か月後には褐色の菌糸を伴うベルベット状でしわの多い菌叢を形成した (Fig. 40A, B). また, YMA で 1 か月培養した菌叢は表面が白色ベルベット状, また, 培地上に色素を産生した (Fig. 40A, B). 培養性状は多くの場合褐色を呈したが, 白色となることもあり安定しなかった. 分生子は無色, 円筒形, 無隔壁で娘細胞を出芽した (Fig. 40D). 出芽した分生子は先端が細く, 大きさ (1.7-)3.4-7.8(-11.5) × (0.4-)0.8-1.5(-2.1) μm であった. 菌糸は無色, 幅 (0.6-)0.8-1.2(-1.5) μm, 菌糸上には無色, 楕円~長楕円形の出芽型分生子が観察され, 大きさ (9.8-)12.0-20.2(-25.8) × (0.5-)0.9-1.4(-1.8) μm, 先端細胞の大きさは (3.2-)3.6-8.5(-

12.5) × (0.6-)0.8-1.2(-1.5)μm であった。培地上で有性世代の形成は確認されなかった。

M. argovae: シケシダ由来の代表株 HM20-151C を PDA 培地上で 5 日間培養したところ、乳白色で菌糸を伴う菌叢を形成し (Fig. 41C), 1 か月後には褐色の菌糸を伴うベルベット状でしわの多い菌叢を形成した (Fig. 41A, B)。また、培地上に色素を産生した (Fig. 41A, B)。分生子は観察できなかった。菌糸上には出芽型分生子が観察された。出芽型分生子は菌糸より出芽し、大きさ (7.1-)8.0-12.3(-15.4) × (0.6-)0.7-1.2(-1.5)μm, 無色, 長楕円~円筒形, 無隔壁で細胞の極より娘細胞を出芽した (Fig. 41D)。娘細胞を出芽した出芽型分生子は先端が細くなっていた。先端細胞は大きさ (1.6-)2.5-5.8(-7.4) × (0.6-)0.8-1.1(-1.6)μm であった。培養日数が経過した菌叢には、大きさ (1.8-)2.6-5.0(-7.9) × (0.6-)0.8-1.1(-1.2)μm, 無色, 涙型, 楕円形~棍棒形の射出分生子が観察された (Fig. 41E)。培地上で有性世代の形成は確認されなかった。

M. geulaconigae: ノキシノブ由来の代表株 HM21-802C は PDA 培地上で 5 日間, また 1 か月培養した場合も乳白色, 裏面が褐色を帯びた酵母様の菌叢を形成した (Fig. 42A-C)。分生子は無色, 楕円~円筒形, 無隔壁で娘細胞を出芽した (Fig. 42D)。娘細胞を出芽した分生子は先端が細く, 大きさ (3.8-)5.1-7.1(-8.1) × (0.9-)1.1-1.8(-2.1)μm であった。菌糸および出芽型分生子の形成は確認できなかった。その一方で, 培養日数が経過した菌叢には大きさ (2.1-)2.4-3.6(-4.2) × (0.9-)1.2-2.2(-3.1)μm, 無色, 涙型, 楕円形~棍棒形の射出分生子が観察された (Fig. 42E)。培地上で有性世代の形成は確認されなかった。

M. miltonrushii: ノキシノブ由来の代表株 HM20-194C は PDA 培地上で 1 か月培養および 5 日間培養した場合とも乳白色の酵母様の菌叢を形成した (Fig.

43A-C). 培養性状は多くは褐色を呈したが、白色となることもあり安定しなかった。分生子は無色、楕円～長楕円形、無隔壁で娘細胞を出芽した(Fig. 43D)。出芽した分生子は先端が細く、大きさ(4.0-)5.7-9.9(-13.8) × (0.9-)1.2-2.0(-2.4)μmであった。PDA培地上では菌糸および出芽型分生子は観察できなかったが、SNA培地上では菌糸および出芽型分生子が観察された。出芽型分生子は菌糸より出芽し、10日間培養後に大きさ(7.4-)8.4-12.8(-16.9) × (0.7-)0.8-1.3(-1.6)μm、14日間培養後に大きさ(5.3-)5.4-12.3(-19.3) × (0.7-)0.8-1.4(-1.9)μmであった。培養日数が経過した菌叢では無色、涙型、楕円形～棍棒形の射出分生子が観察された(Fig. 43E)。本研究に用いた菌株は10日後で14日後の出芽型分生子の大きさを大幅に上回っていた(Table 54)。その一方で、21日後の出芽型分生子の大きさはおおむね一致していた(Table 54)。培地上で有性世代の形成は確認されなかった。

分子系統解析

rDNA-LSU, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1-α*領域を用いた最尤法による分子系統解析の結果,*M. nashicola*の代表菌株HM20-031Cは*M. nashicola*の基準菌株CBS 117161と強く支持される単系統群を形成した(Fig. 49)。同様に,*M. argovae*の代表菌株HM20-151Cは*M. argovae*の基準菌株CBS 110053と近接するものの、簡易同定において*M. argovae*と同定した菌株HM21-1138Cと単系統群を形成し、簡易同定結果と異なる結果を示した(Fig. 25, 49)。*M. geulaconigae*の代表菌株HM21-802Cは*M. geulaconigae*の基準菌株CBS 110052と強く支持される単系統群を形成した(Fig. 49)。*M. miltonrushii*の代表菌株HM20-194Cは*Me. miltonrushii*の基準菌株MCA 3882と強く支持される単系統群を形成した(Fig. 49)。

生理学的性状試験

以下に、検出された種 OTU ごとに生理学的特徴を記す。なお、それぞれの OTU は、種名, aff. または sp. 1, 2 等, 便宜的に振り分けた。

M. naschicola: HM20-031C と *M. nashicola* の基準株について結果を比較すると L-Arabinose, Melibiose, L-Arabinitol の資化性に矛盾がみられたものの, N 源の資化性や生理学的試験の結果はおおむね一致した (Table 60, Yasuda et al. 2005).

M. argovae: HM20-151C と *M. argovae* の基準株について結果を比較すると Glycerol, myo-Inositol, Glucono- δ -lactone, Sodium nitrite の資化性で矛盾が確認された (Table 60, Boekhout et al. 2003).

M. geulaconigae: HM20-802C と *M. geulaconigae* の基準株について結果を比較すると, L-Arabinose, Melibiose, Raffinose, Sodium nitrite の資化性, 0.1% シクロヘキシミド耐性において矛盾が確認された (Table 61, Boekhout et al. 2003). そのほかの結果はおおむね一致した。

M. miltonrushii: HM20-194C と *M. miltonrushii* の基準株について結果を比較すると L-Arabinose, Sodium nitrite と Lysine hydrochloride の資化性, 高糖濃度下における生育試験の結果で矛盾が確認されたものの, C 源, N 源の資化性や生理学的試験の結果はおおむね一致した (Table 61, Rush & Aime 2013).

3.3.6 *Laurobasidium* 属菌

菌株の観察

L. hachiyoense: ノキシノブ由来の代表株 HM21-047C は PDA 培地上で 5 日間, また 1 か月培養した場合も菌糸を伴うベルベット状で, 表面が白色, 裏面が褐

色を帯びた菌叢を形成した (Fig. 44A-C). 本菌の菌叢は PDA 培地が褐色に着色し、ときに菌叢裏面周縁部もしくは中央部に黄色、針状の溢出物を形成した。菌糸は無色、大きさ (0.9-)1.0-1.4(-1.6) μm , 菌糸上には無色、楕円～長楕円形、円筒形の出芽型分生子の形成が観察され (Fig. 44D), 大きさ (4.1-)7.8-18.5(-23.2) \times (1.0-)1.1-1.6(-1.8) μm , 先端細胞は大きさ (1.7-)2.7-6.7(-9.1) \times (0.5-)0.8-1.4(-1.7) μm であった。ゼンマイ由来の HM20-142C は HM21-047 と同様の培養性状、形態的特徴を有した (Fig. 45, Table 55). 培地上で有性世代の形成は確認されなかった。

分子系統解析

rDNA-LSU, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1*- α 領域を用いた最尤法による分子系統解析の結果, *L. hachijoense* の代表菌株 HM21-047C と HM20-142C は *L. hachijoense* の基準菌株 NBRC 31857 と強く支持される単系統群を形成した (Fig. 50). また, ITS 領域を用いた分子系統解析の結果, ヤブニッケイもしくはコヤブニッケイから分離された *L. hachijoense* は, タイのニッケイ属植物由来の *L. hachijoense* とは, 異なる独立した単系統群を形成する傾向が見られた (Fig. 51).

生理学的性状試験

L. hachioesne: 本研究で *L. hachioesne* と同定された HM21-047C と HM20-142C を *L. hachioesne* と *Acaromyces ingoldii* の生理試験の結果と比べたところ, D-Ribose および Hexadecan の資化性やゼラチンの分解性に分離株間で矛盾が見られたものの, その他の結果はおおむね一致した (Table 59).

接種試験

噴霧接種試験の結果, 1/2 (発症果実数/接種果実数) で赤から黒色のあざを生じ, カビ臭を伴う原病徴が再現された (Fig. 52 A-C, Fig. 53 A, B). 病斑部位

をデジタル顕微鏡で詳細に観察したところ、原病徴と同様、白色の菌糸が表皮細胞内を網目状に伸長していた (Fig. 53C)。また、無病徴区においても接種菌が再分離された。接種試験の対照区からはいずれの接種菌も分離されなかった。

3.4 考察

3.4.1 *Exobasidium* 属菌

E. camelliae と簡易同定されたツブラジイ由来代表菌株 HM20-021C は、ツバキもち病由来代表菌株である *E. camelliae* HM16-732C^T と形態的特徴 (Fig. 26D, E, Fig. 27D, E, Table 48), 生理学的特徴がおおむね一致した (Table 56). また, 分子系統解析の結果からも (Fig. 48), *E. camelliae* と強く支持される単系統群を形成したことから, ツバキもち病菌と同じ *E. camelliae* と同定した.

E. gracile と簡易同定されたツブラジイ由来代表株 HM20-035C は, サザンカもち病より分離した *E. gracile* HM18-624C^T と分生子の長さに差が見られた (Table 48). しかし, 酵母形態 (Fig. 28D, Fig. 29D), さらに分子系統解析と生理学的性状試験の結果から, サザンカもち病菌と同じ *E. gracile* と同定した (Fig. 48, Table 56).

E. japonicum と簡易同定されたノキシノブ由来代表株 HM21-1476C の分生子の形態的特徴は, 特にヤマツツジ由来の *E. japonicum* HM21-487C に類似したが (Fig. 30D, Fig. 31E, Table 49), 培養性状が HM17-487C, HM16-744C と異なった (Fig. 30A, Fig. 31A, Fig. 32A). また, 過去に記載のない卵形の細胞や分節型分生子 (arthoconidia) の形成, 隔壁の有無に差が確認された (Table 49). しかし, 出芽型分生子の形態的特徴 (Fig. 30D, Fig. 31E, Fig. 32D, Table 49), 分子系統解析 (Fig. 48), 生理学的性状試験の結果から (Table 57), ツツジ類もち病菌と同じ *E. japonicum* と同定した.

E. aff. japonicum と簡易同定されたヒサカキ由来代表株 HM20-026C は, ツツジ類もち病より分離した *E. japonicum* と培養性状および出芽型分生子や菌糸の

幅に差が確認され，過去に記載のない卵形の細胞や分節型分生子 (arthoconidia) の形成も確認された (Fig. 31-33, Table 49). また，分子系統解析 (Fig. 48), 生理学的性状試験の結果も考慮し (Table 57), *Exobasidium* sp. と同定した. 本種の *Exobasidium* 属内における系統位置は未解明のままであり，有性世代の確認されていない *Exobasidium* 属菌の存在は世界初発見であった.

3.4.2 *Kordyana* 属菌

Kordyana sp. と簡易同定されたツブラジイ由来代表株 HM20-034C はツユクサ白斑病より分離した *Kordyana* sp. HM17-829C, 828C と培養性状はおおむね一致したものの (Fig. 34A, Fig. 36A, Fig. 37A), 分生子の大きさがやや小さかった (Table 50). 一方，分子系統解析の結果から (Fig. 49), 葉面より分離され遺伝的に若干異なるクレードに位置した HM20-033C (Fig. 49) とは培養性状に違いが見られたものの (Fig. 34A, Fig. 35A), HM20-034C および HM20-033C は分生子の形態的特徴が一致した (Fig. 34D, Fig. 35D, Table 50). これらを踏まえ，ツユクサ白斑病菌と同じ *Kordyana* sp. と同定した. なお，ツユクサ白斑病菌 *Kordyana* sp. は形態学的特徴からシマツユクサ白斑病菌 *K. commelinae* Sawada と考えられる (澤田 1922). しかし，本種は *K. commelinae* Petch と同名異種と考えられ，今後宿主の再同定を含めた分類学的再検討が必要である.

3.4.3 *Yunzhangomyces* 属菌

Yunzhangomyces sp. 1 と簡易同定されたノキシノブ由来代表株 HM21-033C は分生子の形態的特徴が *Y. qinlingensis* と類似したが (Fig. 38D, Table 51, Li et al. 2022), 褐色を帯びる菌叢を形成する点が異なっていた (Fig. 38A, Li et al. 2022). その他，近縁な系統関係が認められた *Yunzhangomyces* 属菌数種との分子系統解析 (Fig. 49), 生理学的性状試験の結果から (Table 59), HM21-

033C を未記載種 *Yunzhangomyces* sp. と同定した。なお、分子生物学的解析の結果で *Yunzhangomyces* sp. 1 と同定された HM21-033C と HM21-1189C の間には若干の系統的な差が見られたため (Fig. 49), 今後菌株間における形態や生理学的性質の詳細な比較が必要である。

Yunzhangomyces sp. 2 と簡易同定されたノキシノブ由来代表株 HM21-1481C と近縁な系統関係が認められた *Yunzhangomyces* 属菌数種と形態的特徴 (Fig. 39, Table 51), 分子系統解析 (Fig. 25), 生理学的性状試験の結果から (Table 59), 本種を未記載種 *Yunzhangomyces* sp. と同定した。

3.4.4 *Meira* 属菌

M. naschicola と簡易同定されたノキシノブ由来代表株 HM21-031C は *M. nashicola* と形態的特徴 (Fig. 40, Table 52), 生理学的性状試験の結果においておおむね一致した (Table 60)。また、分子系統解析の結果も (Fig. 49), *M. nashicola* と強く支持される単系統群を形成したことから *M. nashicola* と同定した。

M. argovae と簡易同定されたシケシダ由来代表株 HM21-151C は *M. argovae* と生理学的性状試験の結果においておおむね一致したが (Table 60), 射出分生子の有無, 出芽型分生子の形態的特徴に違いが確認され (Table 53), さらに分子系統解析において *M. argovae* と異なる強く支持された単系統群を形成したため (Fig. 49), 未記載種 *Meira* sp. と同定した。

M. geulaconigae と簡易同定されたノキシノブ由来代表株 HM21-802C は *M. geulaconigae* と共通する形態的特徴の観察ができなかったものの (Table 53), 生理学的性状試験の結果においておおむね一致した (Table 60)。さらに、分子

系統解析の結果 (Fig. 49), *M. geulaconigae* と強く支持される単系統群を形成したことから *M. geulaconigae* 同定した.

M. miltonrushii と簡易同定されたノキシノブ由来代表株 HM20-194C は *M. miltonrushii* と形態的特徴 (Table 54), 生理学的性状試験の結果においておおむね一致した (Table 61). さらに, 分子系統解析の結果 (Fig. 49), *M. miltonrushii* と強く支持される単系統群を形成したことから *M. miltonrushii* と同定した.

3.4.5 *Laurobasidium* 属菌

L. hachijoesne と簡易同定されたノキシノブ由来代表株 HM21-047C とヤブニッケイ由来の *L. hachijoesne* との形態比較を行った結果, *L. hachijoesne* の基準菌株 NBRC 31857 と培養性状および分生子の大きさに若干差が確認されたがその他の特徴はほぼ一致した (Fig. 44, Fig. 47, Table 55). また, *A. ingoldii* の基準菌株 NBRC 112891 とともに培養性状に若干の差が認められたが (Fig. 44A, 46A), その他の特徴は一致した (Fig. 44D, Fig. 46D, Table 55). 生理学的性状試験の結果は NBRC31857, 112891 とおおむね一致した (Table 62). ITS 領域を用いた分子系統解析の結果 (Fig. 51), 日本産のヤブニッケイおよびコヤブニッケイ由来の菌株は単系統群を形成する傾向が見られたものの, タンパク質コード領域を用いた複数 DNA 領域による分子系統解析では, 強く支持される単系統群を形成した (Fig. 50). 以上の結果を総合的に判断し, HM21-047C および HM21-142C を *L. hachijoesne* と同定した. なお, 接種試験では, 本種のナシ果実への病原性を確認した.

ダニの体表より発見され記載された *Acaromyces ingoldii* は rDNA-ITS/LSU 領域を用いた分子系統解析の結果から *L. hachijoesne* であることが提案されている (Somrithipol et al. 2018). しかしながら, Somrithipol らの研究では, *L.*

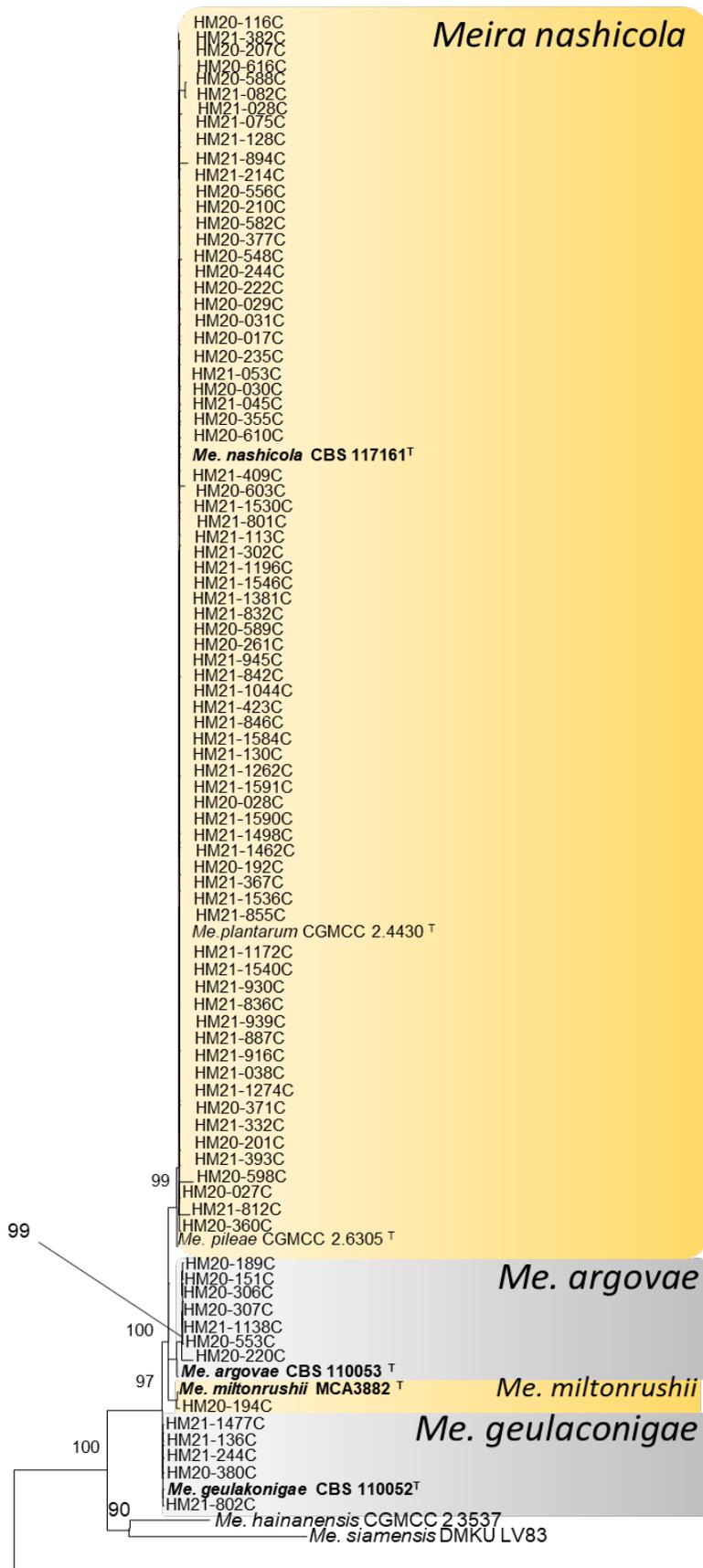
hachijoense の基準標本由来株との比較はされず、その後も両種は別種として扱われており分類学的にあいまいな状況であった (Denchev & Denchev 2021, Li et al. 2022, Olatinwo and Fraedrich 2019, Olatinwo et al. 2019, Qasim et al. 2020). 本研究では *L. hachijoense* の基準菌株 NBRC 31857, *A. ingoldii* の基準菌株 NBRC 112891 を用いた複数 DNA 領域による分子系統解析, 人工培養条件下における形態比較, 生理学的性状試験を行い *A. ingoldii* は *L. hachijoense* の同種異名であることを強く支持した.

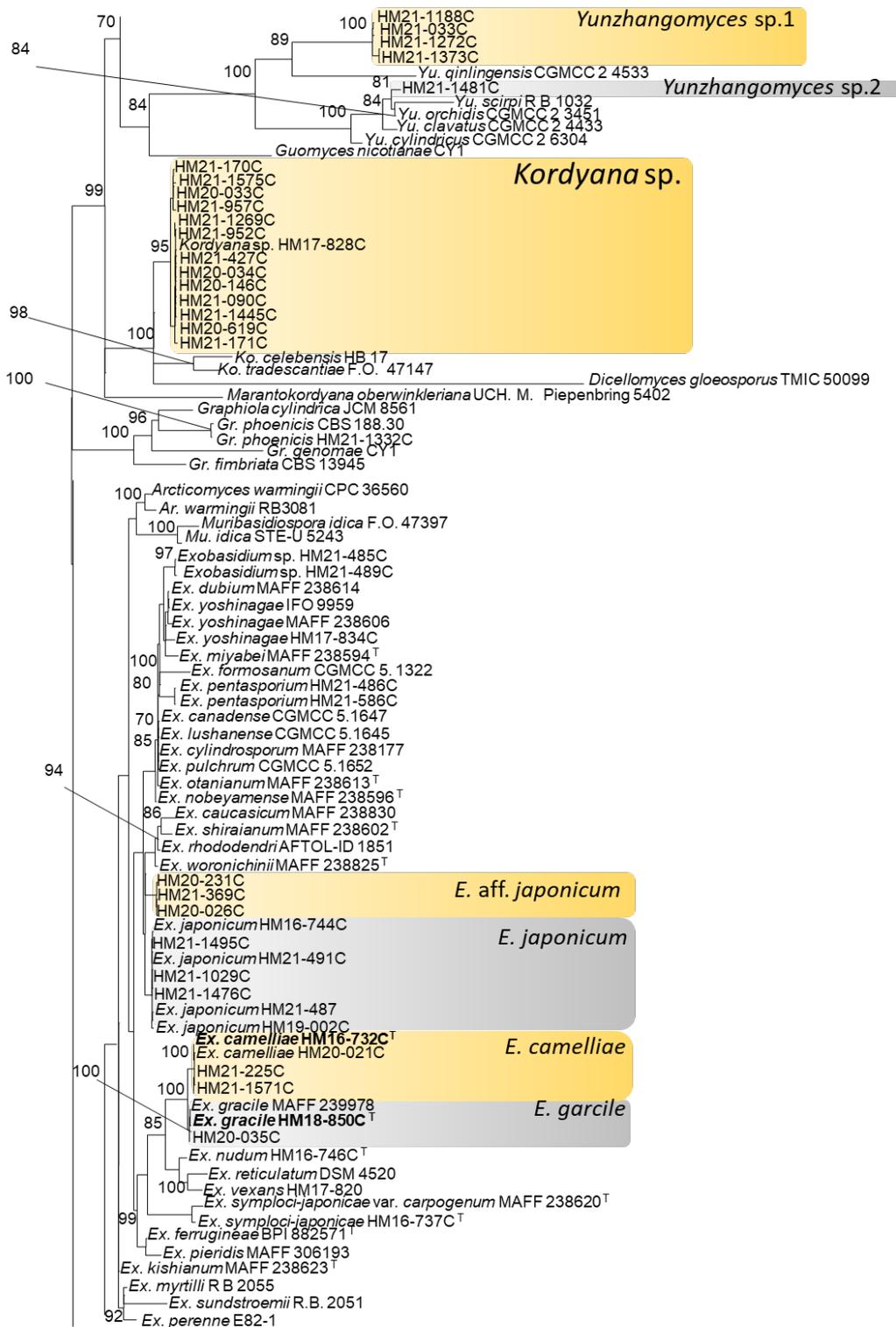
3.4.6 章の考察

本研究の結果から, 未記載種 4 種, 日本新産種 1 種を含む 5 属 12 種の菌類を発見した. このことで, 日本国内におけるモチビョウキン目菌類の無性世代が環境中, 特に植物体表に存在することを明らかにした. さらに, 自然環境下で有性世代の生活環のみが明らかとなっていた種の存在を見出し, 本目菌類の潜在的な伝染源の存在があることを示唆した. このことから, 今後, モチビョウキン目菌類の無性世代も, 宿主や基質特異性, 植物寄生性の発現条件などの解明が求められる. また, 同じ植物サンプル上に塩基配列や生理学的性質が異なる種内種が存在したことから, 葉面は遺伝的多様性のプールとして貢献している可能性が考えられた (Fig. 25, Fig. 49, Fig. 51, Table 47).

本研究における形態観察では, 先行研究を基に培地の種類や培養日数を決めたが, 実際の計測に使用する形態の定義が研究者ごとに曖昧なことから先行研究と一致する結果を得ることが極めて困難であった. また, 先行研究において観察されていない形態形質が多く存在し, 記載文に基づく同定は現状では困難であると考えられる.

また、生理学的性状試験において、形態学的形質同様、同種の菌株間における差異が確認される一方で、種間における明瞭な差が認められなかった。先行研究の結果は、種の代表菌株 1 株について示されることが多く (Boekhout et al. 2003, Li et al. 2022, Rush and Aime 2013, Yasuda et al. 2005), 本研究の結果から複数菌株を用いた種内における生理学的性状の揺らぎの考慮が必要であることを示唆した。今回供試した菌株は, Rahmnose, Lactose, Creatine, D-glucosamine, D-tryptophan の資化性試験, 1% 酢酸耐性試験, 高糖濃度下増殖試験において, すべての種でネガティブであった。一方, Fluctose, Treharose, Melezitose, Cellobiose, D-mannitole, D-glucitol, L-Arabinitol, Glucono- δ -lactone, Succic acid, Etylamine hydrochloride, ビタミンフリー培地培養試験, Urease 活性試験はすべての種でポジティブであった。以上のことから, これら項目は本目菌類に共通する代謝経路の存在を示唆し, 特徴的な形質である可能性が考えられた。その一方で, L-Arabinitol, Glucono- δ -lactone といった糖アルコールの資化性試験では菌株間で矛盾した結果となることがあった。生理学的性状試験の結果は, 遺伝子発現等の内生的な要因により結果が左右されると考えられる。そのため, 今後はこれら生理学的性状試験結果の蓄積とゲノム情報等を組み合わせた代謝経路の解明を行うことにより, 種もしくは系統群を特徴付ける新たな生理学的形質を見出すことが必要と考える。





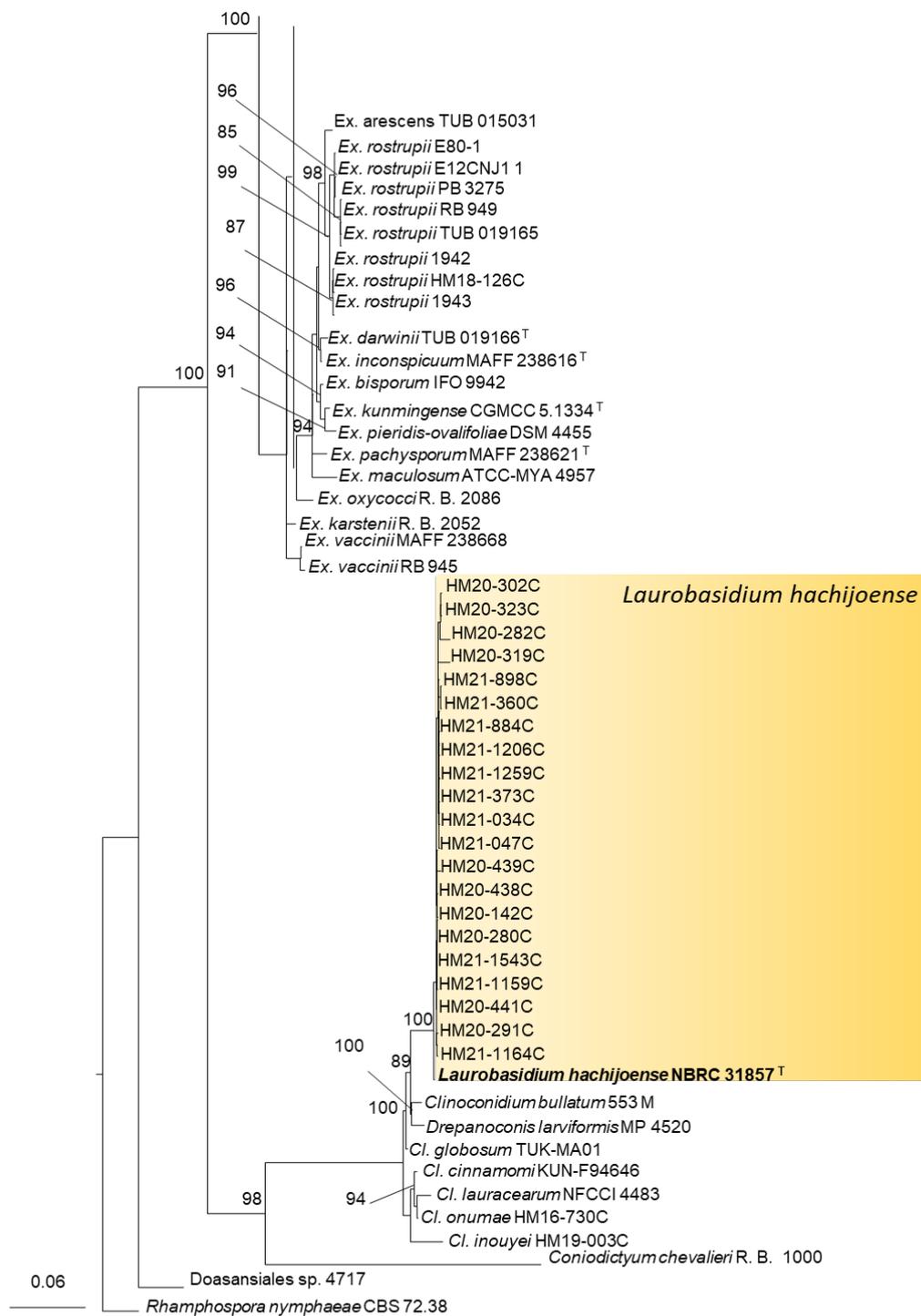


Fig. 25 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+I+G for LSU (Bootstrap value: > 70%). *Rhamphospora nymphaeae* and Doasansiales sp. were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

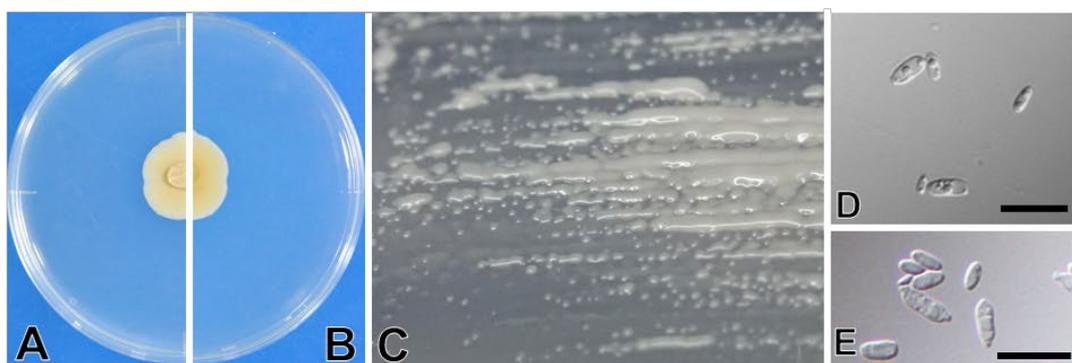


Fig. 26 *Exobasidium camelliae* (HM20-021C) isolated from *Castanopsis cuspidata*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D, E). Bars: 10µm

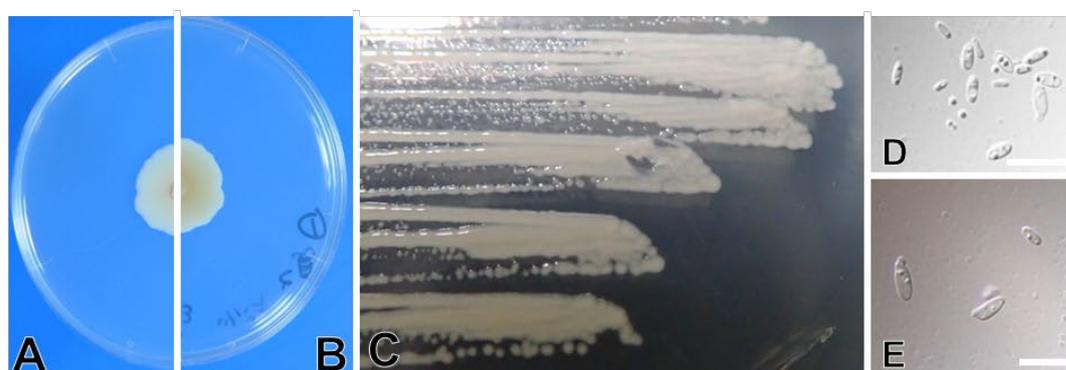


Fig. 27 *E. camelliae* (HM16-732C^T) isolated from *Camella japonica*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D, E). Bars: 10µm

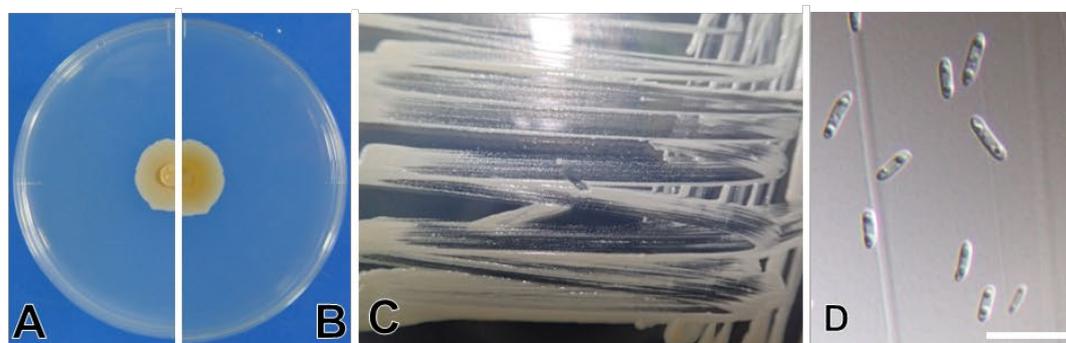


Fig. 28 *E. gracile* (HM20-035C) isolated from *Castanopsis cuspidata*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm



Fig. 29 *E. gracile* (HM18-624C^T) isolated from *Camellia sasaqua*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm

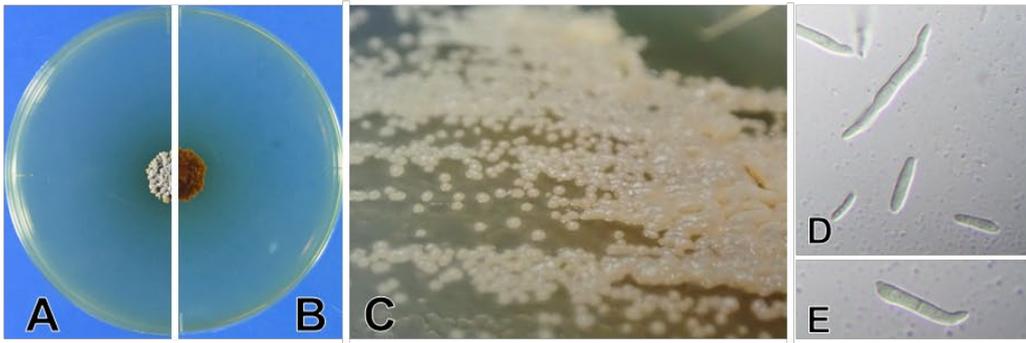


Fig. 30 *Exobasidium japonicum* (HM21-1476C) isolated from *Lepisorus thunbergianus*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D, E). Bar: 10µm

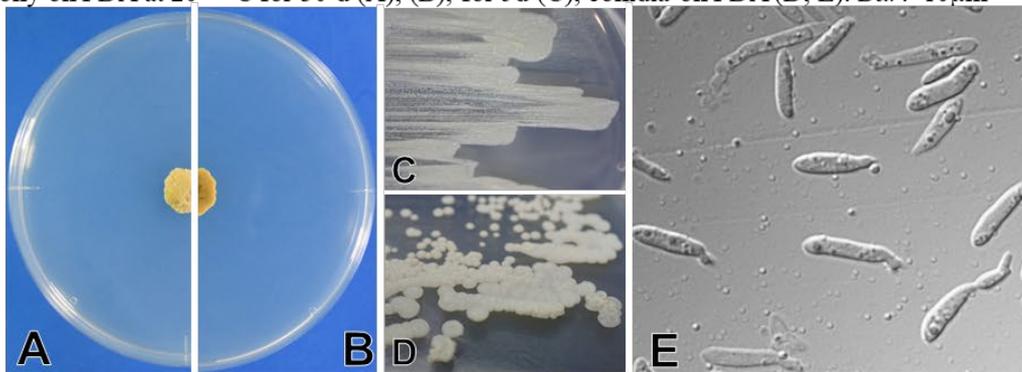


Fig. 31 *E. japonicum* (HM21-487C) isolated from *Rhododendron kaempferi*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C, D), conidia on PDA (E). Bar: 10µm



Fig. 32 *E. japonicum* (HM16-744C) isolated from *R. indicum*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm



Fig. 33 *Exobasidium* sp. (HM20-026C) isolated from *Eurya japonica*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm



Fig. 34 *Kordyana* sp. (HM20-034C) isolated from *Castanopsis cuspidata*.
Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm



Fig. 35 *Kordyana* sp. (HM20-033C) isolated from *Ca. cuspidata*.
Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm

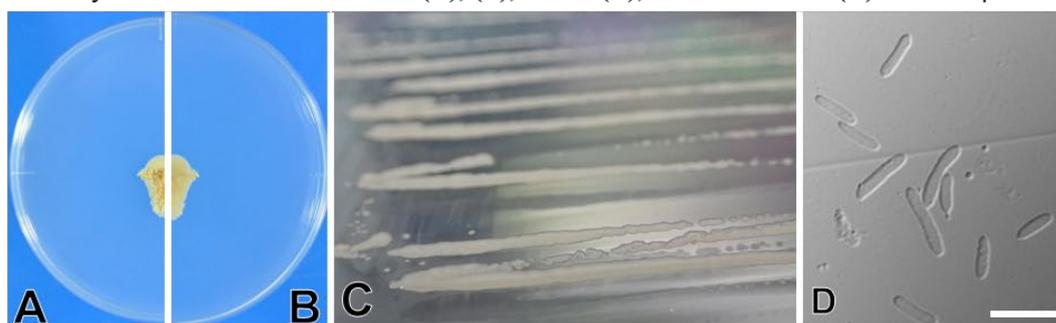


Fig. 36 *Kordyana* sp. (HM17-829C) isolated from *Commelina communis*.
Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm

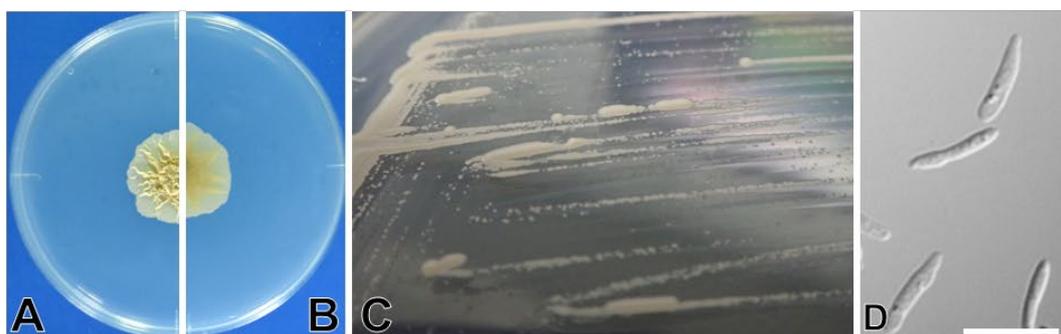


Fig. 37 *Kordyana* sp. (HM17-828C) isolated from *Co. communis*.
Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm

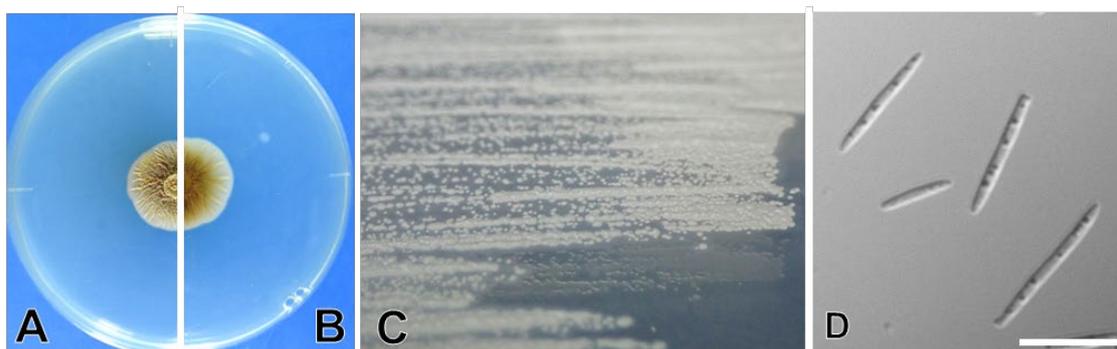


Fig. 38 *Yunzhangomyces* sp. 1 (HM21-033C) isolated from *Lepisorus thunbergianus*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm

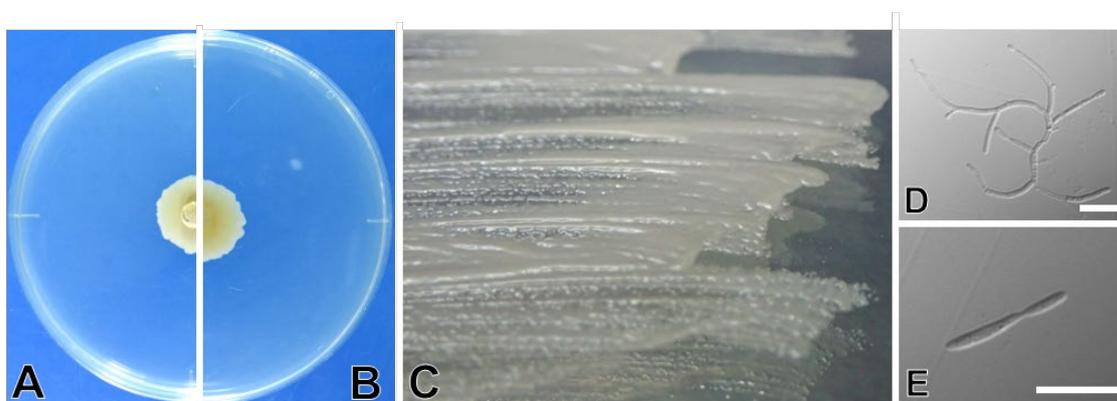


Fig. 39 *Yunzhangomyces* sp. 2 (HM21-1481C) isolated from *L. thunbergianus*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), hyphae on PDA (D), conidia on PDA (E). Bar: 10µm



Fig. 40 *Meira nashicola*. (HM20-031C) isolated from *Lepisorus thunbergianus*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm

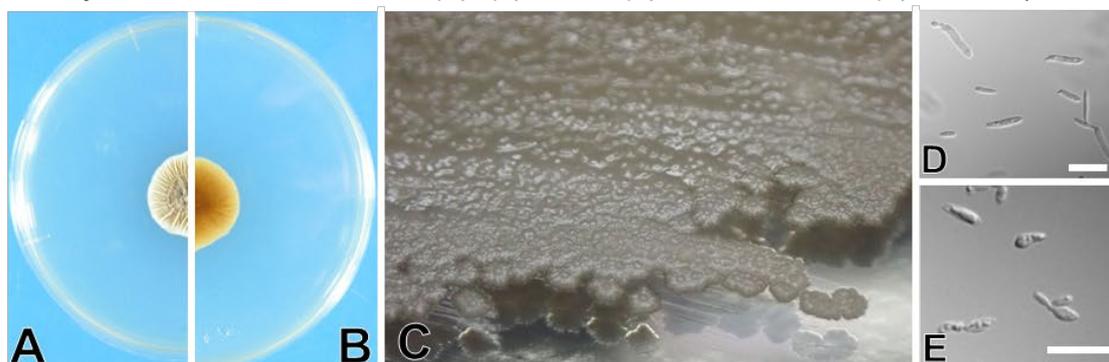


Fig. 41 *M. argovae*. (HM20-151C) isolated from *Deparia japonica*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 14d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm

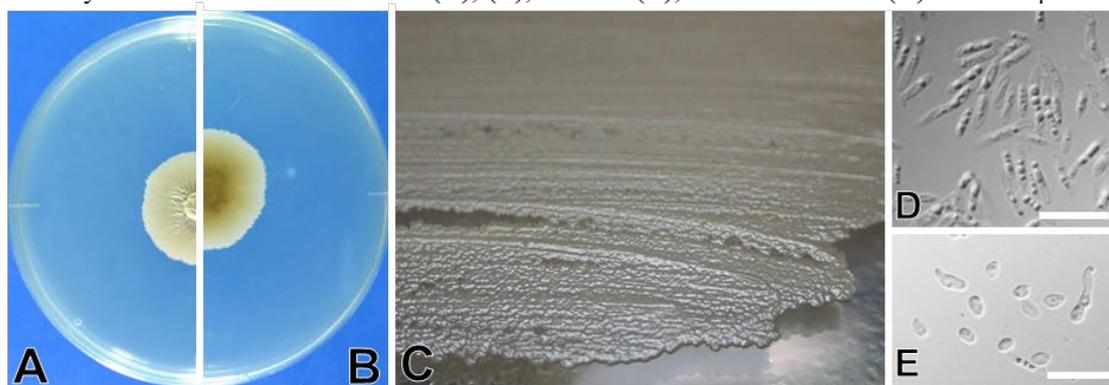


Fig. 42 *M. geulakonigae*. (HM21-802C) isolated from *L. thunbergianus*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 14d (C), conidia on PDA (D, E). Bar: 10µm

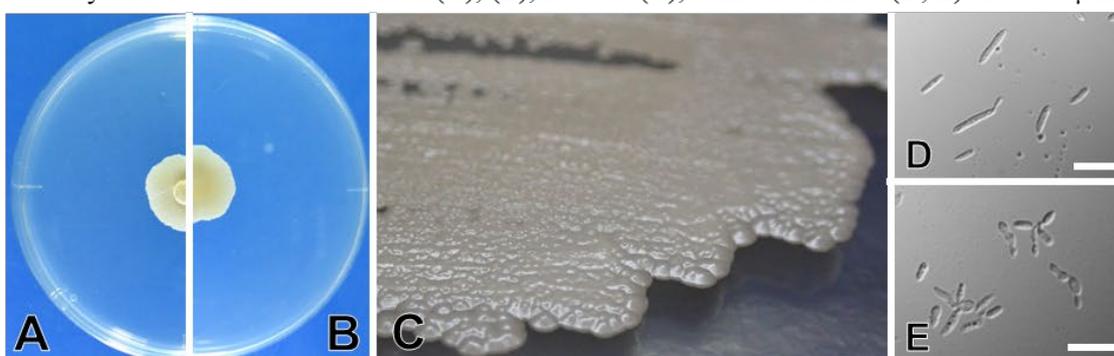


Fig. 43 *M. miltonrushii*. (HM20-194C) isolated from *L. thunbergianus*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 14d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10µm



Fig. 44 *Laurobasidium hachijoense* (HM21-047C) isolated from *Lepisorus thunbergianus*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10μm



Fig. 45 *L. hachijoense* (HM20-142C) isolated from *Osmunda japonica*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10μm



Fig. 46 *L. hachijoense* (NBRC 112891) isolated from *Phyllocoptura oleivira*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10μm



Fig. 47 *L. hachijoense* (NBRC 31857) isolated from *Cinnamomum tenuifolium*. Colony on PDA at 20 ° C for 30 d (A), (B), for 5d (C), conidia on PDA (D). Bar: 10μm

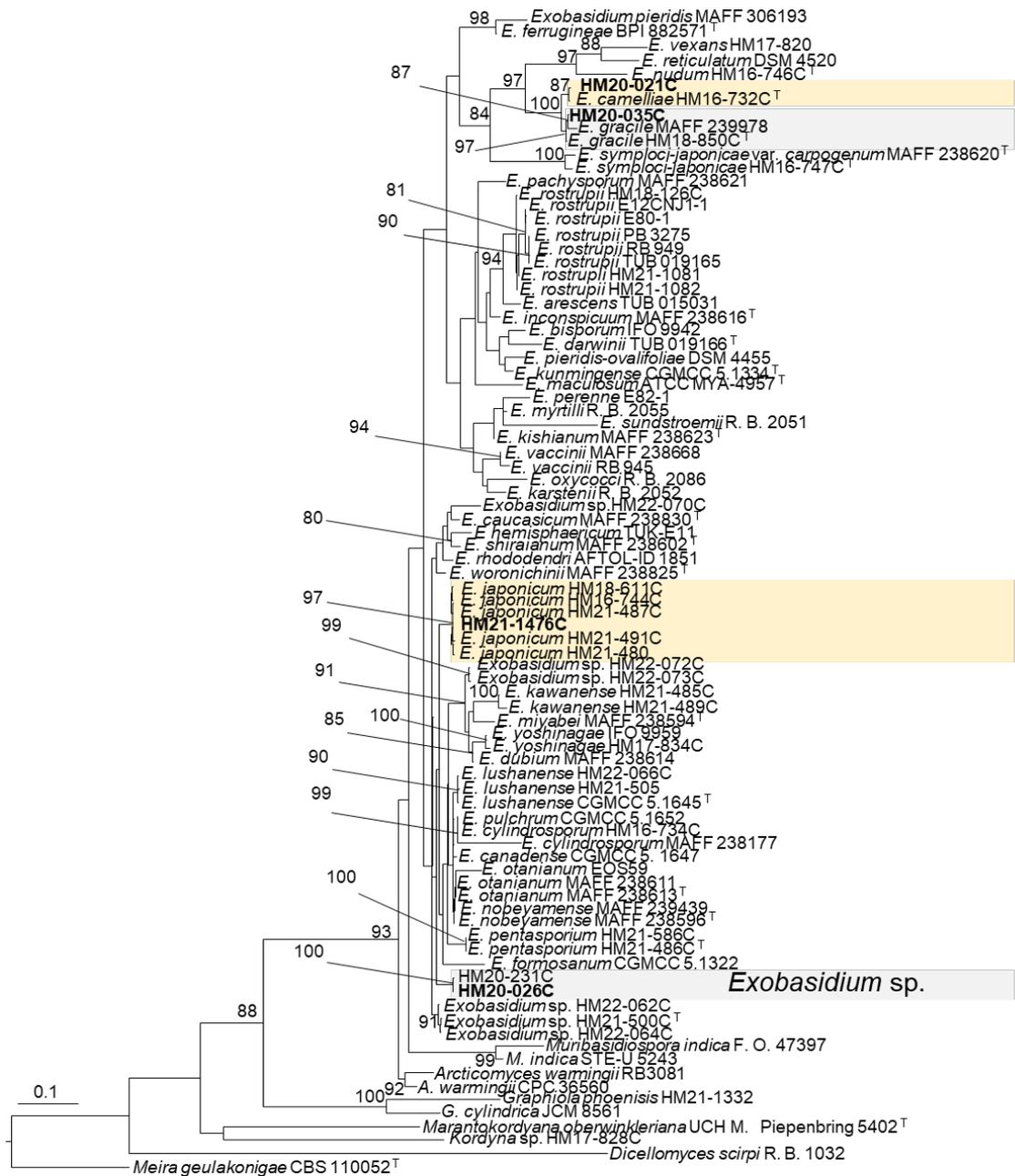


Fig. 48 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the TIM2+I+G for ITS and TIM1+I+G for LSU (Bootstrap value: > 70%). *Meira geulakonigae*, *Dicellomyces scirpi*, *Kordyana* sp. and *Marantokordyana oberwinkleriana* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

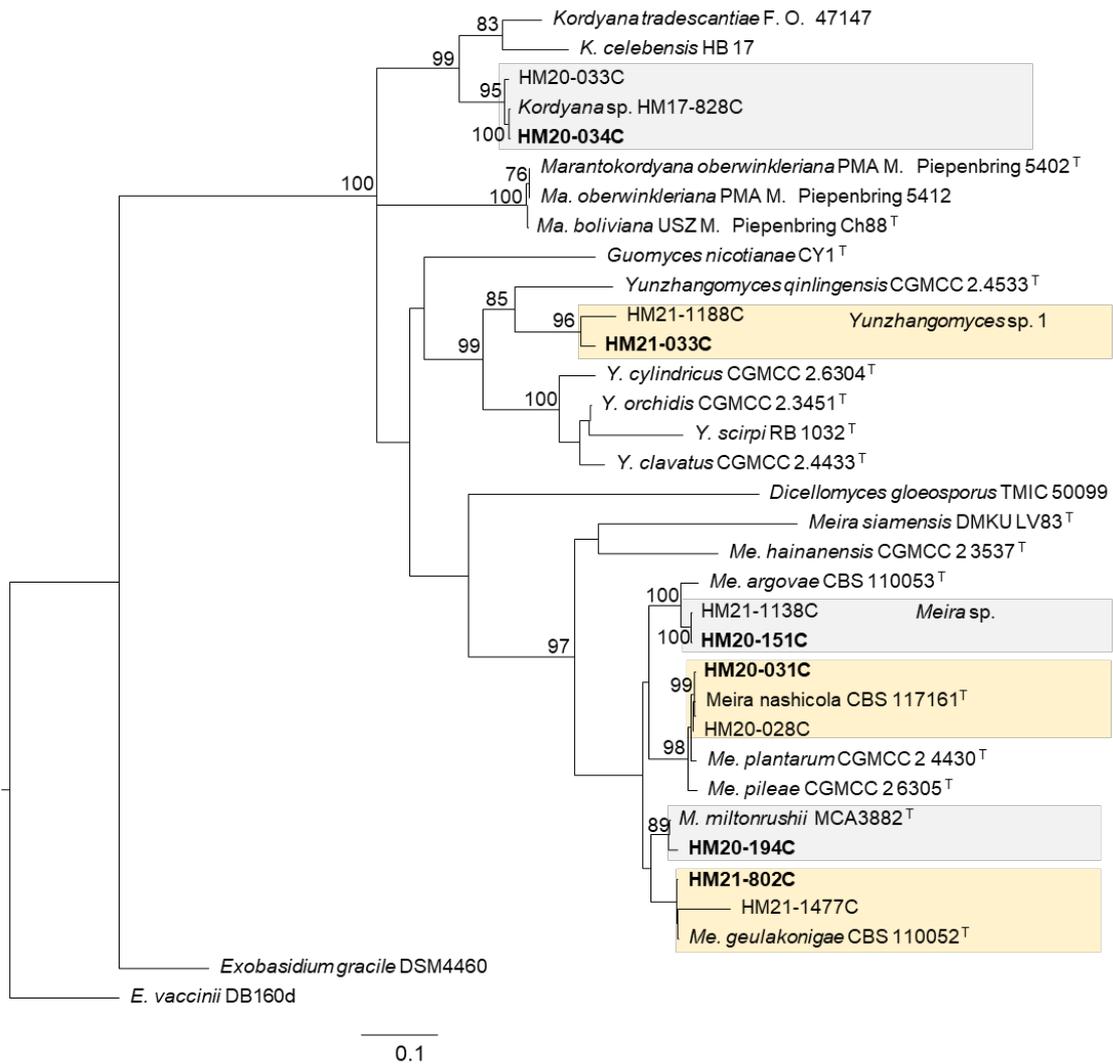


Fig. 49 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the TIM1+G for LSU, TIM2+I+G for *RPB1*, SYM+I+G for *RPB2* and SYM+I+G for *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *E. gracile* and *E. vaccinii* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

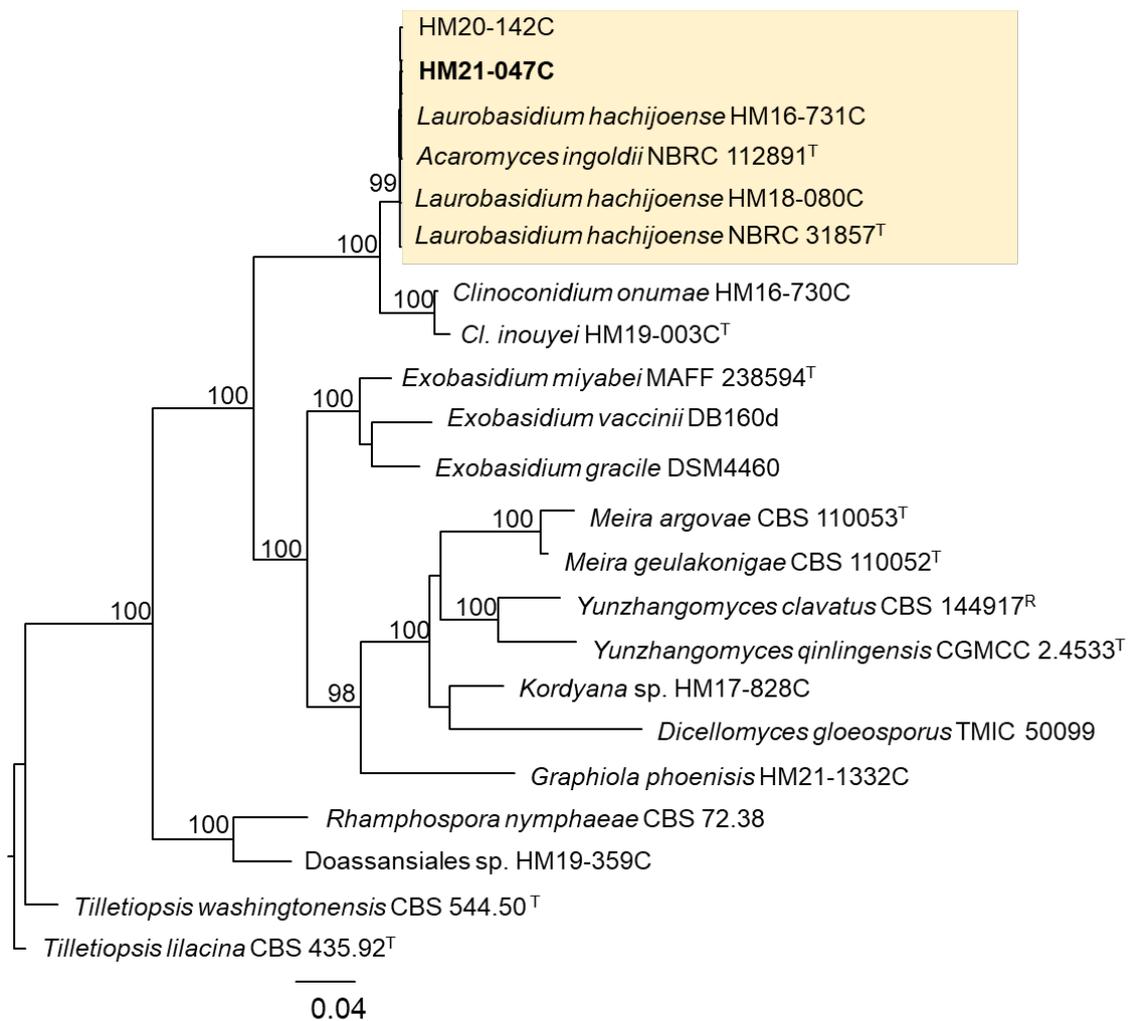


Fig. 50 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for LSU and WAG+B for *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Tilletiopsis washingtonensis* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

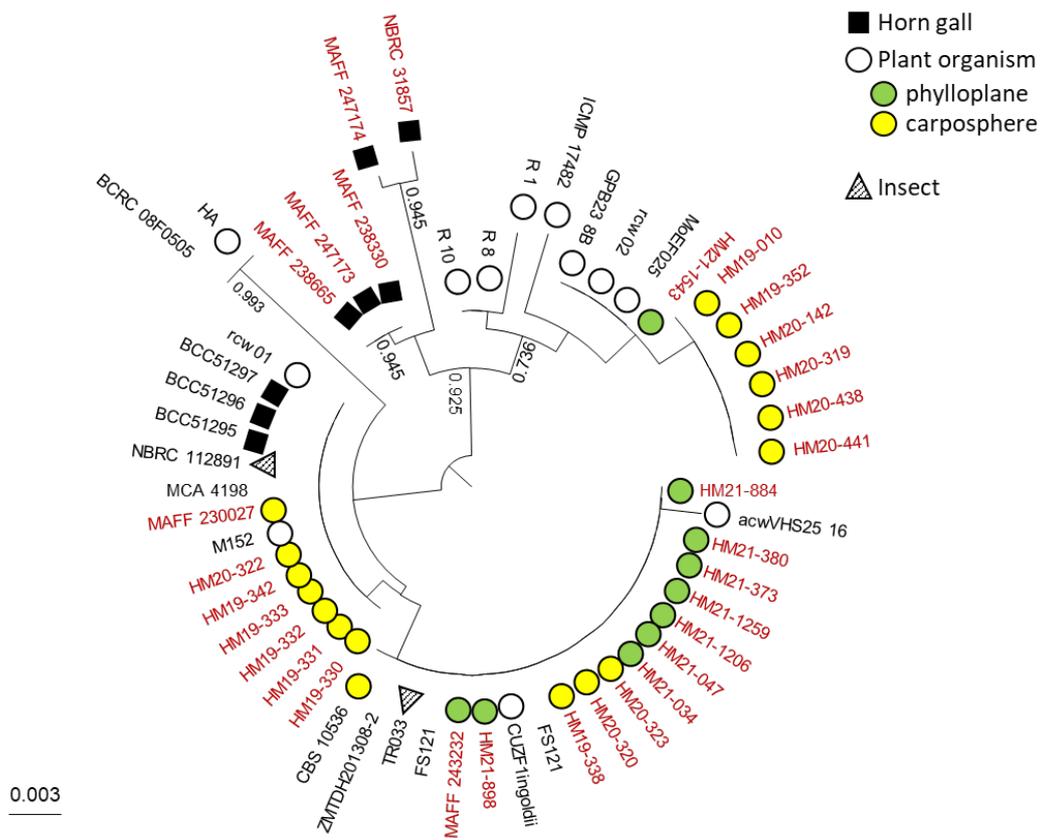


Fig. 51 Phylogenetic tree constructed using neighbor joining method (NJ) analysis based on the models selected with the p-distance for ITS (Bootstrap value: > 0.900 %). Numbers after taxa are isolate, specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site.



Fig. 52 Fruit stain of Japanese pear in Tochigi Prefecture. Original symptoms (A, B), white hyphae (arrows) on pear (C)

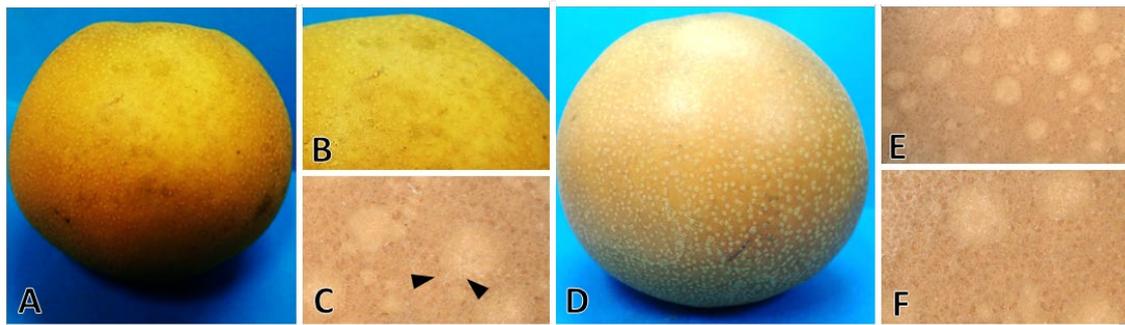


Fig. 53 Inoculating test for fruits of Japanese pear. Inoculated fruit (A, B), control fruit (D, E, F)

Table 47 Exobasidiales isolates used in the chapter three

No.	Genus	Species	Collection Date	Plant	Locality
HM20-035C	<i>Exobasidium</i>	<i>gracile</i>	2020, March 5	<i>Castanopsis cuspidata</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-021C	<i>Exobasidium</i>	<i>camelliae</i>	2020, March 5	<i>Castanopsis cuspidata</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-225C	<i>Exobasidium</i>	<i>camelliae</i>	2021, Feb, 23	<i>Aucuba japonica</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-1571C	<i>Exobasidium</i>	<i>camelliae</i>	2021, Dic, 13	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Tano, Miyazaki
HM21-1476C	<i>Exobasidium</i>	<i>japonicum</i>	2021, Nov	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Sado, Niigata
HM21-1029C	<i>Exobasidium</i>	<i>japonicum</i>	2021, Aug, 5	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Sado, Niigata
HM21-1495C	<i>Exobasidium</i>	<i>japonicum</i>	2021, Nov	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Sado, Niigata
HM20-026C	<i>Exobasidium</i>	sp. (aff. <i>japonicum</i>)	2020, March, 13	<i>Eurya japonica</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-231C	<i>Exobasidium</i>	sp. (aff. <i>japonicum</i>)	2020, Sep, 7	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-369C	<i>Exobasidium</i>	sp. (aff. <i>japonicum</i>)	2021, May, 15	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-034C	<i>Kordyana</i>	sp.	2020, March, 13	<i>Castanopsis cuspidata</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-033C	<i>Kordyana</i>	sp.	2020, March, 13	<i>Castanopsis cuspidata</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-146C	<i>Kordyana</i>	sp.	2020, Aug, 3	<i>Deparia japonica</i>	Tanashi, Tokyo
HM20-619C	<i>Kordyana</i>	sp.	2020, Nov, 2	<i>Cinnamomum verum</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-090C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, Feb, 22	<i>Camellia sasanqua</i>	Chofu, Tokyo
HM21-170C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, Feb, 24	<i>Botrychium ternatum</i>	Tanashi, Tokyo
HM21-171C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, Feb, 24	<i>Lygodium japonicum</i>	Tanashi, Tokyo
HM21-427C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, May, 15	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-952C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, July, 31	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo

HM21-957C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, Aug, 4	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Tano, Miyazaki
HM21-1269C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, Act, 12	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Imperial Palace
HM21-1445C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, Dic, 3	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-1575C	<i>Kordyana</i>	sp.	2021, Dic, 20	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Tano, Miyazaki
HM21-033C	<i>Yunzhangomyces</i>	sp. 1	2021, Feb, 22	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-1188C	<i>Yunzhangomyces</i>	sp. 1	2021, Act, 5	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-1272C	<i>Yunzhangomyces</i>	sp. 1	2021, Act, 12	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Imperial Palace
HM21-1373C	<i>Yunzhangomyces</i>	sp. 1	2021, Nov, 15	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Imperial Palace
HM21-1481C	<i>Yunzhangomyces</i>	sp. 2	2021, Dic, 6	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Sado, Niigata
HM20-031C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, March, 13	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-017C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, March, 5	<i>Castanopsis cuspidata</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-027C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, March, 5	<i>Eurya japonica</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-028C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, March, 5	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-029C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, March, 5	<i>Lemmaphyllum microphyllum</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-030C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, March, 5	<i>Aucuba japonica</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-116C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, June, 21	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Kasama. Ibaraki
HM20-192C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Aug, 31	<i>Matteuccia struthiopteris</i>	Chofu, Tokyo
HM20-201C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Aug, 31	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-207C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Aug, 31	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-210C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Aug, 31	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo

HM20-222C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Aug, 31	<i>Matteuccia struthiopteris</i>	Chofu, Tokyo
HM20-235C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Aug, 31	plant	Chofu, Tokyo
HM20-244C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Aug, 31	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-261C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Sep, 6	<i>Pollia japonica</i>	Kasama. Ibaraki
HM20-356C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 19	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-360C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 19	<i>Deparia japonica</i>	Chofu, Tokyo
HM20-371C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 19	<i>Arbutus unedo</i>	Chofu, Tokyo
HM20-377C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 19	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-548C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 19	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-556C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 19	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-582C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 24	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-588C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 24	<i>Dryopteris erythrosora</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-589C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 24	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-598C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 24	<i>Aucuba japonica</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-603C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 24	<i>Cinnamomum verum</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-610C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 24	<i>Ampelopsis glandulosa</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM20-616C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2020, Act, 24	<i>Aucuba japonica</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-028C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 16	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-038C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 16	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-045C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 16	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-053C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 16	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo

HM21-075C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 16	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-082C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 16	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-113C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 16	<i>Camellia sasanqua</i>	Chofu, Tokyo
HM21-128C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 16	<i>Camellia sasanqua</i>	Chofu, Tokyo
HM21-130C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 18	<i>Lygodium japonicum</i>	Tanashi, Tokyo
HM21-214C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Feb, 23	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-302C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Apr, 12	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-332C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Apr, 12	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-367C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Apr, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-382C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Apr, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-393C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Apr, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-409C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Apr, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-423C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Apr, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-801C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, June, 30	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Tanashi, Tokyo
HM21-812C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 4	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-832C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 4	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-836C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 8	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-842C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 8	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-846C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 8	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-855C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 8	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-887C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo

HM21-894C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-916C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-930C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-939C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-945C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, July, 26	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-1044C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Aug, 5	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Sado, Niigata
HM21-1172C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Sep, 28	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-1196C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Sep, 28	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-1262C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Act, 6	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Imperial Palace
HM21-1274C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Act, 6	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Imperial Palace
HM21-1381C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Nov, 10	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Imperial Palace
HM21-1462C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Nov, 27	<i>Castanopsis cuspidata</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-1498C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Nov	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Sado, Niigata
HM21-1530C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Dic, 7	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-1536C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Dic, 7	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-1540C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Dic, 7	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-1546C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Dic, 7	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-1584C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Dic, 13	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Tano, Miyazaki
HM21-1590C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	2021, Dic, 13	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Tano, Miyazaki
HM21-1591C	<i>Meira</i>	<i>nashicola</i>	-	<i>Balanophora tobiracola</i>	Kochi
HM20-151C	<i>Meira</i>	<i>argovae</i>	2020, Act, 3	<i>Deparia japonica</i>	Tanashi, Tokyo

HM20-189C	<i>Meira</i>	<i>argovae</i>	2020, Sep, 4	<i>Cerasus itosakura</i>	Chofu, Tokyo
HM20-220C	<i>Meira</i>	<i>argovae</i>	2020, Sep, 4	<i>Ziziphus jujuba</i>	Chofu, Tokyo
HM20-306C	<i>Meira</i>	<i>argovae</i>	2020, Sep, 17	<i>Comstockaspis pernicioso</i>	Utsunomiya, Tochigi
HM20-307C	<i>Meira</i>	<i>argovae</i>	2020, Sep, 17	<i>Comstockaspis pernicioso</i>	Utsunomiya, Tochigi
HM20-553C	<i>Meira</i>	<i>argovae</i>	2020, Act, 27	<i>Juglans ailantifolia</i>	Chofu, Tokyo
HM21-1138C	<i>Meira</i>	<i>argovae</i>	2021, Act	acari	Koganei, Tokyo
HM20-194C	<i>Meira</i>	<i>miltonrushii</i>	2020, Sep, 4	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-802C	<i>Meira</i>	<i>geulakonigae</i>	2020, July, 6	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Tanashi, Tokyo
HM20-136C	<i>Meira</i>	<i>geulakonigae</i>	2021, Feb, 22	<i>Athyrium distentifolium</i>	Tanashi, Tokyo
HM20-380C	<i>Meira</i>	<i>geulakonigae</i>	2020, Act, 24	<i>Celtis sinensis</i>	Chofu, Tokyo
HM21-1477C	<i>Meira</i>	<i>geulakonigae</i>	2021, Dic, 6	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Sado, Niigata
HM20-244C	<i>Meira</i>	<i>geulakonigae</i>	2021, March, 1	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Iryuda, Odawara, Kanagawa
HM21-047C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2021, Feb, 22	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM20-142C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2020, July, 31	<i>Osmunda japonica</i>	Tanashi, Tokyo
HM20-280C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	-	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Utsunomiya, Tochigi
HM20-282C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	-	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Nakagawa, Tochigi
HM20-291C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	-	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Otawara, Tochigi
HM20-302C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	-	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Utsunomiya, Tochigi
HM20-319C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2020, Act, 10	<i>Asimina triloba</i>	Ashikaga, Tochigi
HM20-323C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2020, Act, 10	<i>Asimina triloba</i>	Ashikaga, Tochigi
HM20-438C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2020, Act, 21	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Otawara, Tochigi

HM20-439C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2020, Act, 21	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Otawara, Tochigi
HM20-441C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2020, Act, 21	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Otawara, Tochigi
HM21-034C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2021, Feb, 22	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-373C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2021, May, 15	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-380C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2021, May, 15	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-884C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2021, July, 31	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-898C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2021, July, 31	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Chofu, Tokyo
HM21-1159C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	-	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Utsunomiya, Tochigi
HM21-1164C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	-	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Utsunomiya, Tochigi
HM21-1206C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2021, Act, 5	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo
HM21-1259C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2021, Act, 12	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Utsunomiya, Tochigi
HM21-1543C	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	2020, Dic, 14	<i>Lepisorus thunbergianus</i>	Meguro, Tokyo

Table 48 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium camelliae* and *E. gracile*

	<i>Exobasidium camelliae</i> HM20-021C	<i>E. camelliae</i> HM16-732C ^T	<i>E. gracile</i> HM20-035C	<i>E. gracile</i> HM18-624C ^T
yeast cells	(2.4-)3.1-5.3(-8.0) × (0.6-)1.0-2.0(-2.4)	(2.7-)3.8-5.8(-6.5) × (0.4-)1.2-2.5(-3.2)	(3.4-)4.6-8.3(-11.7) × (0.6-)0.9-1.5(-1.8)	(3.0-)4.0-5.8(-7.4) × (0.5-)0.7-1.3(-1.7)

Size: μm

Table 49 Comparison of distinctive morphological features of *Exobasidium japonicum* and *Exobasidium* sp.

	<i>Exobasidium japonicum</i> HM21-1476C	<i>E. japonicum</i> HM21-487C	<i>E. japonicum</i> HM16-744C	<i>Exobasidium</i> sp. HM20-026C
	(6.2-)8.7-15.1(-20.8) × (0.9-)1.2-1.7(-2.0)	(7.4-)8.4-13.1(-16.2) × (1.1-)1.4-2.2(-2.5)	(9.1-)9.9-14.5(-17.7) × (0.7-)0.8-1.5(-2.2)	(9.0-)10.4-15.7(-20.0) × (0.6-)0.8-1.3(-1.5)
blastconidia				
apex	(1.5-)2.5-5.5(-6.6) × (0.7-)0.9-1.4(-1.9)	(2.1-)2.9-7.3(-9.5) × (0.5-)0.8-1.4(-1.8)	(2.8-)3.7-6.8(-8.4) × (0.4-)0.6-1.2(-1.5)	(2.9-)4.1-5.8(-6.4) × (0.6-)0.8-1.3(-1.6)
septa	0-1	0	0	0
arthocoidia	×	×	○	×
ovoid cell	×	×	○	×
Hyphae	(0.7-)0.9-1.4(-1.7)	(0.8-)1.0-1.4(-1.7)	(0.6-)1.0-2.0(-2.4)	(0.3-)0.5-0.9(-1.0)

Size: μm

Table 50 Comparison of distinctive morphological features for isolates of *Kordyana* sp.

	<i>Kordyana</i> sp. HM20-034C	<i>Kordyana</i> sp. HM20-033C	<i>Kordyana</i> sp. HM17-828C	<i>Kordyana</i> sp. HM17-829C
yeast cells	(3.0–)3.6–5.3(–5.8) × (0.4–)0.7–1.3(–1.8)	(3.3–)4.2–6.3(–7.6) × (0.7–)1.0–1.5(–2.0)	(3.1–)4.2–7.6(–10.3) × (0.5–)0.7–1.3(–1.8)	(3.1–)4.2–7.6(–10.3) × (0.6–)0.9–1.3(–1.4)

Size: μm

Table 51 Morphological comparison : *Yunzhangomyces* spp.

	<i>Yunzhangomyces</i> sp. 1 HM21-033C	<i>Y. qinlingensis</i> CGMCC 2.4533 ^T Li et al. (2022)	<i>Yunzhangomyces</i> sp. 2 HM21-1481C	<i>Y. scirpi</i> R.B. 1032	<i>Y. orchidis</i> CGMCC 2.3451 ^T Li et al. (2022)
blastconidia	(4.4–)7.5–14.9(–18.8) × (0.6–)1.0–2.0(–1.6)	6.0–20.8 × 1.2–1.8	(3.4–)5.9–10.5(–12.4) × (0.5–)0.8–1.3(–1.8)	nd	2.8–16.7 × 0.8–1.7

Size: μm

Table 52 Comparison of distinctive morphological features for isolates of *Meira nashicola*

	<i>M. nashicola</i> HM20-031C	<i>M. nashicola</i> HM20-027C	<i>M. nashicola</i> PFS 002 ^T Yasuda et al. (2006)
Yeast	(1.7-)3.4-7.8(-11.5) × (0.4-)0.8-1.5(-2.1) [5days]	2.6-5.0(-7.7) × (0.4-)0.6-1.1(-1.5) [14days]	(4-)6-12(-17) × 2-3
Hyphae	(0.6-)0.8-1.2(-1.5) [14days]	nd	1.5-3.0
Conidia	(9.8-)12.0-20.2(-25.8) × (0.5-)0.9-1.4(-1.8) [14days]	nd	(4-)5-15 × 2-3
	(3.2-)3.6-8.5(-12.5) × (0.6-)0.8-1.2(-1.5) [14days]	nd	(4-)5-15 × 2-3

Size: μm

Table 53 Comparison of distinctive morphological features of *Meira argovae* and *M. geulakonigae*

	<i>M. argovae</i> HM20-151C	<i>M. argovae</i> CBS 110053 ^T Boekhout et al. (2003)	<i>M. geulakonigae</i> HM21-802C	<i>M. geulakonigae</i> CBS 110052 ^T Boekhout et al. (2003)
Yeast	nd	7–20 × 1.5–2.5	(3.8–)5.1–7.1(–8.1) × (0.9–)1.1–1.8(–2.1) [5days]	7–17 × 2.0–3.0
hyphae	(0.6–)0.9–1.3(–1.6) (7.1–)8.0–12.3(–15.4) × (0.6–)0.7–1.2(–1.5) [5days]	1.5–2.0 8.0–25 × 1.0–2.5	nd	2.0–3.0 5.0–17 × 2.0–4.5
blastconidia apex	(1.6–)2.5–5.8(–7.4) × (0.6–)0.8–1.1(–1.6) [5days]	3–10 × 1.0–2.0	nd	3–10 × 1.0–2.0
ballistic conidia	(1.8–)2.6–5.0(–7.9) × (0.6–)0.8–1.1(–1.2) [14days]	nd	(2.1–)2.4–3.6(–4.2) × (0.9–)1.2–2.2(–3.1) [14days]	nd

Size: μm

Table 54 Comparison of distinctive morphological features for isolates of *Meira miltonrushii*

	<i>M. miltonrushii</i> HM20-194C	<i>M. miltonrushii</i> CBS 110052 ^T Rush and Aime (2013)
yeast cells	(4.0–)5.7–9.9(–13.8) × (0.9–)1.2–2.0(–2.4) [5days]	nd
ballisticconidia	(3.6–)3.8–5.6(–6.8) × (1.1–)1.3–1.8(–2.0) [14days]	nd
hyphae	(0.5–)0.9–1.3(–1.6) [21days]	nd
blastconidia	(7.4–)8.4–12.8(–16.9) × (0.7–)0.8–1.3(–1.6) [10days]	2.5–6.8 × 1.2–2.7 [14days]
	(5.3–)5.4–12.3(–19.3) × (0.7–)0.8–1.4(–1.9) [21days]	8.8–18.1 × 1.3–2.6 [21days]

Size: μm

Table 55 Comparison of distinctive morphological features for isolates of *Laurobasidium hachijoense*

	<i>L. hachijoense</i> HM21-047C	<i>L. hachijoense</i> HM20-142C	<i>A. ingoldii</i> NBRC 112891 ^T	<i>L. hachijoense</i> NBRC 31857 ^T
blastcoidia	(4.1–)7.8–18.5(–23.2) × (1.0–)1.1–1.6(–1.8)	(3.3–)7.1–17.2(–25.7) × (0.8–)1.1–1.8(–2.4)	(6.2–)8.6–14.6(–17.9) × (0.9–)1.3–1.9(–2.3)	(7.2–)9.5–23.0(–29.1) × (0.8–)1.0–1.6(–1.9)
	(1.7–)2.7–6.7(–9.1) × (0.5–)0.8–1.4(–1.7)	(2.2–)2.6–6.3(–8.9) × (0.7–)0.9–1.5(–1.8)	(4.1–)4.7–6.6(–7.6) × (1.0–)1.2–1.6(–1.7)	(2.2–)2.7–5.7(–8.0) × (0.6–)0.8–1.4(–1.7)
	hyphae	(0.9–)1.0–1.4(–1.6)	(0.5–)0.8–1.3(–1.6)	(0.8–)1.0–1.5(–1.8)

Size: μm

Table 56 Comparison of physiological tests of *Exobasidium camelliae* and *E. gracile*

	<i>E. camelliae</i> HM16-732	<i>E. camelliae</i> HM20-021	<i>E. gracile</i> HM20-035	<i>E. gracile</i> HM18-624
Carbon Source				
D-Xylose	nd	nd	nd	nd
L-Arabinose	+	-/+	+	+
D-Arabinose	nd	nd	nd	nd
D-Ribose	+	+	+	+
Rahmnose	-	-	-	-
Fluctose	+	+	+	+
L-solbose	-	-	-	-
Galactose	W	W	W	W
Lactose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Raffinose	nd	nd	nd	nd
Suclose	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-
Maltose	-	-	+	-
Treharose	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+
Soluble starch	-	-	-	-
Methyl- α -glucoside	nd	nd	nd	nd
Cellobiose	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+
Arbtin	+	+	+	+
Methanol	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-
Glycerol	DW	-	-	W
meso-Erythritol	W	W	W	+
Ribitol	-	W	DW	-
Galactitol	-	DW	DW	-
D-mannitole	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+
myo-Inositol	W	DW	+	+
L-Arabinitol	+	+	+	+
Xylitol	-	-	-	-
Glucono- δ -lactone	W	+	W	W
2-Keto-gluconic acid	-	-	-	-
5-Keto-gluconic acid	-	-	-	-
DL-Lactic acid	W	W	-	-
Succic acid	W	W	W	W
Citric acid	W	W	W	-

	<i>E. camelliae</i> HM20-021C	<i>E. camelliae</i> HM16-732C	<i>E. gracile</i> HM20-035C	<i>E. gracile</i> HM18-624C
D-Glucuronic acid	nd	nd	nd	nd
D-Galacturonate	nd	nd	nd	nd
D-Gluconic acid	nd	nd	nd	nd
D-Glucurrono lactone	nd	nd	nd	nd
Quinic acid	+	+	+	+
Saccharic acid	nd	nd	nd	nd
D-Glucosamine	nd	nd	nd	nd
N acetyl-D-glucosamine	nd	nd	nd	nd
Hexadecan	nd	nd	nd	nd
Vanillic acid	-	-	-	-
Gallic acid	-	-	-	-
Lignin	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-
Chitin	W-	W-	W-	W-
Pectin	+	+	+	+
Nitrogen Source				
Ammonium sulfate	+	+	+	+
Potassium nitrate	+	+	+	W
Sodium nitrite	-	-	-	-
Etylamine hydrochloride	W	+	+	+
Lysine hydrochloride	-	-	-	-
Cadaberin	-	+	W	W
Creatine	-	-	-	-
Creatinine	-	-	-	-
D-glucosamine	-	-	-	-
Imidazole	-	-	-	-
D-tryptophan	-	-	-	-
Others				
Cycloheximide 0.01%	+	+	+	+
Cycloheximide 0.1%	-	-	+	+
10% NaCl	+	W	-	-
Vitamin free	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+
Acid production	-	-	-	-
1% Acetic acid	-	-	-	-
50% Glucose	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+

Table 57 Comparison of physiological tests of *Exobasidium japonicum* and *Exobasidium* sp.

	<i>E. japonicum</i> HM21-1476C	<i>E. japonicum</i> HM21-487C	<i>Exobasidium</i> sp. HM20-026C
Carbon Source			
D-Xylose	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-
D-Arabinose	W	W	-
D-Ribose	+	+	+
Rahmnose	-	-	-
Fluctose	+	+	+
L-solbose	-	-	-
Galactose	W	W	W
Lactose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Raffinose	+	D+	+
Suclose	+	+	+
Inulin	+	+	+
Maltose	+	-	W
Treharose	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Soluble starch	-	-	-
Methyl- α -glucoside	+	-	-
Cellobiose	W	W	W
Salicin	+	W	+
Arbtin	W	-	W
Methanol	-	-	-
Ethanol	W	-	-
Glycerol	+	D+	D+
meso-Erythritol	W	W	+
Ribitol	-	W	-
Galactitol	-	-	-
D-mannitole	+	+	+
D-glucitol	D+	D+	W
myo-Inositol	-	-	-
L-Arabinitol	W	W	W
Xylitol	+	W	DW
Glucono- δ -lactone	DW	DW	W
2-Keto-gluconic acid	-	-	DW
5-Keto-gluconic acid	-	-	-
DL-Lactic acid	-	-	W
Succic acid	W	+	DW
Citric acid	-	-	W

	<i>E. japonicum</i> HM21-1476C	<i>E. japonicum</i> HM21-487C	<i>Exobasidium</i> sp. HM20-026C
D-Glucuronic acid	-	-	-
D-Galacturonate	nd	nd	nd
D-Gluconic acid	-	-	-
D-Glucurono lactone	+	+	+
Quinic acid	-	-	-
Saccharic acid	-	-	-
D-Glucosamine	-	-	-
N acetyl-D-glucosamine	-	-	-
Vanillic acid	nd	nd	nd
Gallic acid	nd	nd	nd
Lignin	nd	nd	nd
Cellulose	nd	nd	nd
Chitin	nd	nd	nd
Pectin	nd	nd	nd
Nitrogen Source			
Ammonium sulfate	+	+	+
Potassium nitrate	-	+	+
Sodium nitrite	-	-	-
Etylamine hydrochloride	+	-	+
Lysine hydrochloride	-	-	-
Cadaberin	-	-	-
Creatine	-	-	-
Creatinine	-	-	-
D-glucosamine	-	-	-
Imidazole	+	-	-
D-tryptophan	-	-	-
Others			
Cycloheximide 0.01%	-	W	-
Cycloheximide 0.1%	-	-	-
10% NaCl	W	-	+
Vitamin free	+	+	+
Gelatin liquefaction	W	+	+
Acid production	-	-	-
1% Acetic acid	-	-	-
50% Glucose	-	-	-
Urease	+	+	+

Table 58 Comparison of physiological tests of *Kordyana* isolates

	<i>Kordyana</i> sp. HM21-033C	<i>Kordyana</i> sp. HM20-034C	<i>Kordyana</i> sp. HM17-828C	<i>Kordyana</i> sp. HM17-829C
Carbon Source				
D-Xylose	+	nd	+	+
L-Arabinose	-	nd	-	-
D-Arabinose	-	nd	W	W
D-Ribose	+	nd	+	+
Rahmnose	-	nd	-	-
Fluctose	+	nd	+	+
L-solbose	-	nd	-	-
Galactose	-	nd	-	-
Lactose	-	nd	-	-
Melibiose	-	nd	+	-
Raffinose	-	nd	W	W
Suclose	+	nd	+	+
Inulin	+	nd	+	+
Maltose	W	nd	-	-
Treharose	+	nd	+	+
Melezitose	+	nd	+	+
Soluble starch	-	nd	-	-
Methyl- α -glucoside	-	nd	-	-
Cellobiose	W	nd	W	W
Salicin	+	nd	W	W
Arbtin	W	nd	W	W
Methanol	-	nd	-	-
Ethanol	-	nd	-	-
Glycerol	-	nd	-	W
meso-Erythritol	-	nd	+	+
Ribitol	-	nd	W	-
Galactitol	-	nd	W	W
D-mannitole	+	nd	+	W
D-glucitol	+	nd	+	W
myo-Inositol	-	nd	-	-
L-Arabinitol	W	nd	W	W
Xylitol	-	nd	-	-
Glucono- δ -lactone	-	nd	W	W
2-Keto-gluconic acid	-	nd	-	-
5-Keto-gluconic acid	-	nd	-	-
DL-Lactic acid	-	nd	W	W
Succic acid	+	nd	W	W
Citric acid	-	nd	-	-

	<i>Kordyana</i> sp. HM20-033C	<i>Kordyana</i> sp. HM20-034C	<i>Kordyana</i> sp. HM17-828C	<i>Kordyana</i> sp. HM17-829C
D-Glucuronic acid	-	nd	-	-
D-Galacturonate	nd	nd	nd	nd
D-Gluconic acid	-	nd	-	-
D-Glucurono lactone	nd	nd	nd	nd
Quinic acid	W	nd	-	-
Saccharic acid	-	nd	-	-
D-Glucosamine	-	nd	-	-
N acetyl-D-glucosamine	-	nd	-	-
Hexadecan	W	nd	-	-
Vanillic acid	nd	nd	nd	nd
Gallic acid	nd	nd	nd	nd
Lignin	nd	nd	nd	nd
Cellulose	nd	nd	nd	nd
Chitin	nd	nd	nd	nd
Pectin	nd	nd	nd	nd
Nitrogen Source				
Ammonium sulfate	+	+	+	+
Potassium nitrate	+	+	+	+
Sodium nitrite	W	+	W	W
Etylamine hydrochloride	-	W	-	W
Lysine hydrochloride	+	+	+	+
Cadaberin	-	-	-	-
Creatine	nd	nd	nd	nd
Creatinine	-	-	-	-
D-glucosamine	-	-	-	-
Imidazole	-	-	-	-
D-tryptophan	-	-	-	-
Others	-	-	-	-
Cycloheximide 0.01%				
Cycloheximide 0.1%	W	+	-	+
10% NaCl	-	-	-	-
Vitamin free	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+
Acid production	-	-	-	-
1% Acetic acid	-	-	-	-
50% Glucose	-	-	-	-

Table 59 Comparison of physiological tests of *Yunzhangomyces* spp.

	<i>Yunzhangomyces</i> sp. 1 HM21-1188C	<i>Yunzhangomyces</i> sp. 2 HM21-1481C	<i>Y. qinlingensis</i> Li et al. (2022)	<i>Y. orchidis</i> Li et al. (2022)
Carbon Source				
D-Xylose	+	W	-	-
L-Arabinose	-	-	+	+
D-Arabinose	+	+	W	+
D-Ribose	+	+	-	-
Rahmnose	-	-	nd	nd
Fluctose	+	+	nd	nd
L-solbose	-	+	+	+
Galactose	W	W	+	+
Lactose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Raffinose	-	W	+	+
Suclose	+	+	+	+
Inulin	W	-	+	-
Maltose	+	+	+	+
Treharose	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+
Soluble starch	W	-	nd	nd
Methyl- α -glucoside	-	-	-	W
Cellobiose	W	W	+	-
Salicin	-	-	nd	nd
Arbtin	W	-	nd	nd
Methanol	W	-	-	-
Ethanol	W	-	+	+
Glycerol	W	W	+	-
meso-Erythritol	W	-	+	+
Ribitol	W	W	+	W
Galactitol	W	-	-	-
D-mannitole	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+
myo-Inositol	-	-	-	-
L-Arabinitol	W	+	nd	nd
Xylitol	W	-	nd	nd
Glucono- δ -lactone	W	+	nd	nd
2-Keto-gluconic acid	W	-	nd	nd
5-Keto-gluconic acid	W	-	nd	nd
DL-Lactic acid	-	+	nd	nd
Succic acid	+	W	W	+
Citric acid	W	+	W	+

	<i>Yunzhangomyces</i> sp. 1 HM21-1188C	<i>Yunzhangomyces</i> sp. 2 HM21-1481C	<i>Y. qinlingensis</i> Li et al. (2022)	<i>Y. orchidis</i> Li et al. (2022)
D-Glucuronic acid	W	-	nd	nd
D-Galacturonate	nd	nd	nd	nd
D-Gluconic acid		W	nd	nd
D-Glucurrono lactone	nd	nd	nd	nd
Quinic acid	-	+	nd	nd
Saccharic acid	nd	-	nd	nd
D-Glucosamine	-	-	nd	nd
N acetyl-D-glucosamine	-	-	nd	-
Hexadecan	W	-	-	-
Vanillic acid	nd	nd	nd	nd
Gallic acid	nd	nd	nd	nd
Lignin	nd	nd	nd	nd
Cellulose	nd	nd	nd	nd
Chitin	nd	nd	nd	nd
Pectin	nd	nd	nd	nd
Nitrogen Source				
Ammonium sulfate	+	+	+	+
Potassium nitrate	W	-	+	+
Sodium nitrite	-	-	+	+
Etylamine hydrochloride	+	+	+	W
Lysine hydrochloride	-	-	+	W
Cadaberin	W	-	+	W
Creatine	-	-	nd	nd
Creatinine	-	-	nd	nd
D-glucosamine	-	-	nd	nd
Imidazole	-	-	nd	nd
D-tryptophan	-	-	nd	nd
Others				
Cycloheximide 0.01%	-	W	nd	nd
Cycloheximide 0.1%	-	-	nd	nd
10% NaCl	+	+	nd	nd
Vitamin free	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	-	W	nd	nd
Acid production	-	-	nd	nd
1% Acetic acid	-	-	nd	nd
50% Glucose	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+

Table 60 Comparison of physiological tests of *Meira nashicola* and *M. argovae*

	<i>M. nashicola</i> HM20-031C	<i>M. nashicola</i> Yasuda et al. (2005)	<i>M. argovae</i> HM20-151C	<i>M. argovae</i> Boekhout et al. (2003)
Carbon Source				
D-Xylose	W	nd	W	+
L-Arabinose	-	+	-	D
D-Arabinose	W	+	W	W
D-Ribose	+	+	+	D
Rahmnose	-	nd	-	-
Fluctose	+	nd	+	nd
L-solbose	-	nd	-	-
Galactose	W	+	W	D
Lactose	-	-	-	D
Melibiose	-	+	-	W/-
Raffinose	W	nd	W	+
Suclose	+	nd	+	+
Inulin	W	-	W	W/-
Maltose	-	nd	+	+
Treharose	+	nd	+	+
Melezitose	+	+	+	+
Soluble starch	W	W	W	W/-
Methyl- α -glucoside	-	nd	-	-
Cellobiose	+	+	+	+
Salicin	W	-	W	+
Arbtin	W	W	DW	W/-
Methanol	W	nd	-	-
Ethanol	W	DW	DW	DW
Glycerol	-	-	+	-
meso-Erythritol	W	W	DW	DW
Ribitol	-	-	+	W/-
Galactitol	W	-	W	-
D-mannitole	+	nd	+	+
D-glucitol	+	nd	+	+
myo-Inositol	-	W	-	+
L-Arabinitol	+	-	+	W/-
Xylitol	-	-	+	W/-
Glucono- δ -lactone	-	-	+	-
2-Keto-gluconic acid	W	nd	W	-
5-Keto-gluconic acid	W	nd	DW	nd
DL-Lactic acid	-	-	D+	D
Succic acid	W	nd	+	+
Citric acid	+	W/-	+	W/-

	<i>M. nashicola</i> HM20-031C	<i>M. nashicola</i> Yasuda et al. (2005)	<i>M. argovae</i> HM20-151C	<i>M. argovae</i> Boekhout et al. (2003)
D-Glucuronic acid	-	nd	DW	W/-
D-Galacturonate	nd	D+	nd	-
D-Gluconic acid	-	W/-	W	D
D-Glucurrono lactone	nd	D+	nd	nd
Quinic acid	+	nd	+	D
Saccharic acid	W	nd	DW	+
D-Glucosamine	-	nd	-	-
N acetyl-D-glucosamine	-	nd	-	nd
Hexadecan	W	nd	W	nd
Vanillic acid	nd	nd	nd	nd
Gallic acid	nd	nd	nd	nd
Lignin	nd	nd	nd	nd
Cellulose	nd	nd	nd	nd
Chitin	nd	nd	nd	nd
Pectin	nd	nd	nd	nd
Nitrogen Source				
Ammonium sulfate	+	nd	+	
Potassium nitrate	+	+	+	+
Sodium nitrite	+	+	-	+
Etylamine hydrochloride	+	W	+	W
Lysine hydrochloride	-	-	W	-
Cadaberin	W	nd	W	+
Creatine	-	nd	-	nd
Creatinine	-	nd	W	-
D-glucosamine	-	nd	-	-
Imidazole	-	nd	W	-
D-tryptophan	-	nd	-	nd
Others				
Cycloheximide 0.01%	+	D+	+	D
Cycloheximide 0.1%	-	-	-	-
10% NaCl	+	nd	+	nd
Vitamin free	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	nd	+	nd
Acid production	W	nd	-	nd
1% Acetic acid	-	nd	-	nd
50% Glucose	-	nd	-	-
Urease	+	nd	+	W/+

Table 61 Comparison of physiological tests of *Meira geulaconigae* and *M. miltonrushii*

	<i>M. geulaconigae</i> HM20-802C	<i>M. geulaconigae</i> Boekhout et al. (2003)	<i>M. miltonrushii</i> HM20-194C	<i>M. miltonrushii</i> Rush and Aime (2013)
Carbon Source				
D-Xylose	+	+	+	+
L-Arabinose	-	+	-	+
D-Arabinose	+	+	D+	+
D-Ribose	+	+	+	+
Rahmnose	-	-	-	-
Fluctose	+	nd	+	nd
L-solbose	-	-	-	-
Galactose	W	D+	W	+
Lactose	-	D	-	W/-
Melibiose	-	+	W	+
Raffinose	-	+	D+	+
Suclose	+	+	+	+
Inulin	W	-	W	W/-
Maltose	+	+	+	+
Treharose	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+
Soluble starch	W	D	W	W/-
Methyl- α -glucoside	-	-	W	W
Cellobiose	W	W	+	+
Salicin	W	D	W	W
Arbtin	W	D	W	W
Methanol	W	-	W	W
Ethanol	W	D	W	W
Glycerol	W	D	W	-
meso-Erythritol	W	+	W	W/-
Ribitol	+	D+	+	+
Galactitol	W	D	W	W/+
D-mannitole	+	+	+	W/+
D-glucitol	+	+	+	
myo-Inositol	-	-	-	W/-
L-Arabinitol	W	+	W	nd
Xylitol	+	D	+	+
Glucono- δ -lactone	+	D	+	W/+
2-Keto-gluconic acid	W	-	W	+
5-Keto-gluconic acid	W	nd	W	-
DL-Lactic acid	+	D	+	nd
Succic acid	+	+	+	+/-
Citric acid	+	D	+	W/+

	<i>M. geulaconigae</i> HM20-802C	<i>M. geulaconigae</i> Boekhout et al. (2003)	<i>M. miltonrushii</i> HM20-194C	<i>M. miltonrushii</i> Rush and Aime (2013)
D-Glucuronic acid	W	D	W	nd
D-Galacturonate	nd	-	nd	nd
D-Gluconic acid	W	D	W	W
D-Glucurrono lactone	nd	nd	nd	nd
Quinic acid	W	D	W	+
Saccharic acid	nd	+	nd	W/+
D-Glucosamine	-	-	-	W/-
N acetyl-D-glucosamine	-	nd	-	nd
Hexadecan	W	nd	W	nd
Vanillic acid	nd	nd	nd	nd
Gallic acid	nd	nd	nd	nd
Lignin	nd	nd	nd	nd
Cellulose	nd	nd	nd	nd
Chitin	nd	nd	nd	nd
Pectin	nd	nd	nd	nd
Nitrogen Source				
Ammonium sulfate	+	nd	+	nd
Potassium nitrate	+	-	+	+
Sodium nitrite	-	-	-	+
Etylamine hydrochloride	+	D	+	+
Lysine hydrochloride	W	+	-	+
Cadaberin	W	+	+	+
Creatine	-	nd	-	nd
Creatinine	W	-	-	-
D-glucosamine	-	-	-	-
Imidazole	-	-	-	W
D-tryptophan	-	nd	-	nd
Others				
Cycloheximide 0.01%	+	+	W	-
Cycloheximide 0.1%	-	+	-	-
10% NaCl	+	nd	+	W
Vitamin free	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	nd	+	nd
Acid production	-	nd	W	-
1% Acetic acid	-	nd	-	nd
50% Glucose	-	-	-	+
Urease	+	+	+	+

Table 62 Comparison of physiological tests of *Laurobasidium hachijoense*

	<i>L. hachijoense</i> HM21-047C	<i>L. hachijoense</i> HM20-142C	<i>A. ingoldii</i> NBRC 112891	<i>L. hachijoense</i> NBRC 31857
Carbon Source				
D-Xylose	+	W	W	W
L-Arabinose	-	-	-	-
D-Arabinose	-	W	W	+
D-Ribose	+	-	-	-
Rahmnose	-	-	-	-
Fluctose	+	+	+	+
L-solbose	-	-	-	-
Galactose	W	W	W	W
Lactose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	W
Suclose	+	+	+	+
Inulin	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Treharose	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+
Soluble starch	-	-	-	-
Methyl- α -glucoside	W	-	-	-
Cellobiose	W	+	+	+
Salicin	+	+	W	+
Arbtin	W	W	+	W
Methanol	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-
Glycerol	W	-	DW	W
meso-Erythritol	+	+	D+	+
Ribitol	+	W	W	D+
Galactitol	W	-	-	-
D-mannitole	+	+	+	+
D-glucitol	+	D+	D+	+
myo-Inositol	+	+	+	+
L-Arabinitol	+	W	D+	W
Xylitol	W	-	W	+
Glucono- δ -lactone	+	+	DW	+
2-Keto-gluconic acid	W	-	-	-
5-Keto-gluconic acid	-	-	-	-
DL-Lactic acid	W	W	-	W
Succic acid	W	W	W	+
Citric acid	W	W	W	+

	<i>L. hachijoense</i> HM21-047C	<i>L. hachijoense</i> HM20-142C	<i>A. ingoldii</i> NBRC 112891	<i>L. hachijoense</i> NBRC 31857
D-Glucuronic acid	W	W	W	W
D-Galacturonate	nd	nd	nd	nd
D-Gluconic acid	W	-	W	W
D-Glucurono lactone	nd	nd	nd	nd
Quinic acid	W	+	+	W
Saccharic acid	W	-	-	-
D-Glucosamine	-	-	-	-
N acetyl-D-glucosamine	-	-	-	-
Hexadecan	-	-	D+	-
Vanillic acid	nd	nd	nd	nd
Gallic acid	nd	nd	nd	nd
Lignin	nd	nd	nd	nd
Cellulose	nd	nd	nd	nd
Chitin	nd	nd	nd	nd
Pectin	nd	nd	nd	nd
Nitrogen Source				
Ammonium sulfate	+	+	+	+
Potassium nitrate	+	+	+	+
Sodium nitrite	+	D+	D+	D+
Etylamine hydrochloride	+	+	+	+
Lysine hydrochloride	-	W	W-	+
Cadaberin	-	W	W	W
Creatine	-	-	-	-
Creatinine	-	-	-	-
D-glucosamine	-	-	-	-
Imidazole	-	-	-	-
D-tryptophan	-	-	-	-
Others				
Cycloheximide 0.01%	-	-	-	-
Cycloheximide 0.1%	-	-	-	-
10% NaCl	W	W	+	+
Vitamin free	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	-	+	-	+
Acid production	-	-	-	-
1% Acetic acid	-	-	-	-
50% Glucose	-	-	-	-
Urease	W	+	+	+

第4章 モチビョウキン目の進化系統

4.1 緒言

モチビョウキン目菌類は、分子系統解析により系統付けられる 5 つの科 (Exobasidiaceae, Brachybasidiaceae, Cryptobasidiaceae, Graphiolaceae, Laurobasidiaceae) から成る (Begerow et al. 2014, Somrithipol et al. 2018). これら菌群は、有性 (複相) 世代の形態学的特徴や宿主植物が極めて多様であるだけでなく、無性 (単相) 世代が二形性をもつこともあり、生態的に多様であると同時に、進化的にも複雑な背景を持つ可能性が示唆される. しかし、本目菌類分子生物学的手法による体系化とその進化の解明は、これまで種の記載のみを主とする研究が中心に進められたため、いまだ未解明の部分が多い. 現在までに単系統性の認められる 5 科の存在は明らかとなっているものの、分子生物学的手法を用いた「目」以下の分類体系構築は検討の余地がある (Begerow et al. 2002, Somrithipol et al. 2018). Begerow et al. (2002) は、rDNA-LSU D1/D2 領域を用いた近隣結合法 (TIMIG distances 法) による分子系統解析を行い、モチビョウキン目菌類の分子生物学的な特徴付けを行った. しかし、「目」の単系統性の支持率は低く、「目」内の多くの科についても Graphiolaceae を除いて系統的に強く支持されなかった (Begerow et al. 2002). その後、綱といった高次系統群を対象とした体系構築のために複数の DNA 領域を組み合わせた解析が行われたが、モチビョウキン目は科の一部を欠いていたため、これまで複数の DNA 領域を用いた「目」内の体系構築を目的とした研究は行われていない (Wang et al. 2016, Li et al. 2022).

本目最大のグループである *Exobasidium* 属菌については、ほかの科や属といった系統群と比較してもその宿主は数百種にわたり、病徴も多様なことから特

に複雑な進化の背景がうかがわれる (江塚 1990a, b, 1991a, b, Farr & Rossman 2021, Hirata 1979, 1981a, b, Ito 1955, Nagao 2001, 2003a, b, 2004a, b, 2006, Nannfeldt 1981, Otani 1976, Shibata et al. 2021, 2022a, b, Shirai 1896). 既報の論文と同様, 本論文でも rDNA-ITS・LSU 領域を用いた複数の DNA 領域による系統推定を行い, その結果は 3 章までに示したように多くの種間系統関係の解明が不十分であり, より多くの DNA 領域を用いた信頼性の高い系統解析による議論が必要と考える. *Exobasidium* 属菌についてもこれまでに進化的な議論は十分に行われていないが, Brewer et al. (2014) は ITS, LSU 領域を用いた分子系統解析の結果から, 宿主ではなく病徴 (病気の表現型) によって種のクレードが形成される傾向があることを見出した. このことから, 病徴に影響を与える遺伝的要因がそれぞれの種の近縁関係の要因である可能性を指摘している (Brewer et al. 2014).

進化系統の解明は, 本目菌類同定の強固な基盤構築に貢献するのみならず, 多様な植物病原性 (病徴形成) や菌の形態を獲得した背景が明らかになることが期待される. そこで本研究では前章までに採集した標本, 確立した菌株を用いて LSU, ITS, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* 領域の複数の DNA 領域を決定し, 最尤法による分子系統解析を行った. また, 単一 DNA 領域を用いた近隣接合 (NJ) 法と, 近年の主流な系統解析手法である最尤法による結果の違いを確認するとともに, 使用する分類群 (タクサ) 数やアミノ酸配列あるいは塩基配列による系統解析結果の違いによる解析も行った. これにより①NJ 法を主体とした先行研究結果と比較した分子系統解析による科間ならびに種間の系統推定を行うこと, ② *Exobasidium* 属菌の進化的側面について議論することを目的とした. なお, 属間の系統解析は十分な DNA 配列が得られなかったため行わなかった.

4.2 材料および方法

4.2.1 DNA シーケンスの決定

DNA 抽出は、PDA 培地 20°C、培養 1 週間以内の菌叢を供試した。TE バッファー 50 μ l 中に、滅菌した爪楊枝で菌体を加えた。ヒートブロック 95°C で 10 分加熱した。その後、10000rpm で 3 分間遠心し、上澄みを新しいチューブに入れて -20°C で保存した。

PCR は rDNA-ITS および LSU 領域について決定した。ポリメラーゼは GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) を使用し、供試したプライマーは Table 63 に示した。PCR 反応は VeritiPro Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) にて、Table 64 に示したプロトコルで行った。

DNA 増幅産物の確認は 0.7% アガロースゲル電気泳動により行った。PCR 産物 1 μ l をウェルにロードし、120V、15 分間泳動した後、染色バッファー (10 μ g/ml EtBr10 μ と 1 \times TAE Buffer 150ml を混合したものに 20 分間浸漬しトランスイルミネーターにてバンドの有無を確認した。

DNA の増幅が確認されたサンプルは ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher, USA) を使用し、VeritiPro Thermal Cycler にて 37°C、4 分加熱した後、80°C、1 分で処理し、DNA 増幅産物中のプライマーと dNTP を不活性化させて、精製を行った。

シーケンスリアクションは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) でサイクルシーケンスを行った。使用したプライマーは Table 65 に示した。VeritiPro Thermal Cycler にて Table 66 に示したプロトコルで処理した。

これら DNA 産物はカラム Sephadex™ G-50 Superfine (Sigma-Aldrich, USA) により精製を行った。カラム用 96 穴プレートにカラム担体の粉を入れ、そこに DDW 300 μ l を加えて 2 時間以上膨潤させた。膨潤後のカラムは 910xg, 室温で 5 分間遠心し、余分な水分を除去した。シーケンス反応産物 10 μ l に DDW 10 μ l を加え、全量 20 μ l をカラムに染み込ませ、910xg, 室温で 5 分間遠心し、96 穴の PCR プレートに精製産物を回収した。その後、風乾器を用いて 40 分間真空状態で風乾した。そして、精製産物にホルムアミド(FA)を 15 μ l 加え、45 秒間ボルテックスした後、95°C, 4 分間加熱し、氷水で急冷した。その後シーケンサーABI prism 3130 genetic analyzer(Applied Biosystems, USA)を使用し、塩基配列を決定した。

決定した塩基配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST 検索にて、決定配列の精度を確認した (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

4.2.2 分子系統解析

科間の体系構築

アライメントファイルの作成は、NCBI に登録のある塩基配列もしくは 3 章までに採集、また公的なカルチャーコレクションで購入した菌株をもとに決定した塩基配列/アミノ酸配列を加えた FASTA ファイルを作成した (Table 67)。 *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* 領域のようなタンパク質コード領域については、イントロン配列を削除しエクソン領域のみを解析に使用した。単一遺伝子による分子系統解析では Begerow et al. (2002), Wang et al. (2016) および Li et al. (2022) を参照し、各系統群の種多様性を考慮し 26 種 (アウトグループ 2 種含む) の LSU 領域のアライメントファイルを作成した (Table 67)。多遺伝子座による分子系

統解析では、ITS, LSU, *TEF1- α* 領域のすべてが決定されている 18 種（アウトグループ 4 種含む）の ITS, LSU, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* 領域の各 DNA 領域ごとにアライメントファイルを作成した。

アライメントファイルの処理は、作成したファイルを MEGA7 を用いて、アライメントしたのち両端の削除を行った。タンパク質コード領域についてはコドンスタートを意識して両端を処理した。その後、タンパク質コード領域はアミノ酸変換し FASTA 形式で出力した。

配列の結合は FaBox (<https://birc.au.dk/~palle/php/fabox/>) の Fasta alignment joiner を使用し、各領域の配列を結合したテキストファイルを FASTA 形式で保存した。FASTA ファイルを RAxML BlackBox (<https://raxml-ng.vital-it.ch/>) (Kozlov et al. 2019) にアップロードし、モデルを指定して最尤法による系統解析を行った。NJ 法には最尤法と同じ手法により作成し FASTA ファイルを使用し、MEGA7 により解析を行った。

種間の体系構築

アライメントファイルの作成は 3 章までに採集、または公的なカルチャーコレクションで購入した *Exobasidium* 属菌の菌株をもとに rDNA-ITS, LSU, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* 領域の決定を行って解析に用いた (Table 68)。また、GenBank データベースから上記遺伝子が決定されており、論文等で引用があり信頼性の高い *Exobasidium* 属菌のシーケンスデータを用いて FASTA ファイルを作成した (Table 68)。 *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* 領域については、エクソン領域のみを解析に使用した。

アライメントファイルの処理は作成したファイルを MEGA7 により、アライメントしたのち両端の削除を行った。タンパク質コード領域についてはコドンスタートを意識して両端を処理した。その後、*RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* 領域は塩基配列とアミノ酸変換したアライメントを FASTA 形式で出力した。

配列の結合は FaBox (<https://birc.au.dk/~palle/php/fabox/>) の Fasta alignment joiner を使用し、各領域の配列を結合したテキストファイルを FASTA 形式で保存した。FASTA ファイルを RAxML BlackBox (<https://raxml-ng.vital-it.ch/>) (Kozlov et al. 2019) にアップロードし、モデルを指定して最尤法による系統解析を行った。また、各領域について最尤法による分子系統解析を行い遺伝子間の樹形の矛盾について議論した。

Table 63 Primer for PCR reaction

ITS	M-ITS1: GGTGAACCTGCAGATGGATC	Stoll et al. (2003)
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
LSU D1/D2	LR0R: ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys & Hester (1990)
	LR5: TCCTGAGGGAAACTTCG	Vilgalys & Hester (1990)
	NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	O'Donnell (1993)
	NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O'Donnell (1993)
<i>RPB1</i>	RPB1-Ac: GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	Stiller & Hall (1997)
	RPB1-Cr:	Stiller & Hall (1997)
	CCNGCDATNTCRTRTRCCATRRA	
<i>EF1-α</i>	EF1-983F:	Carbone & Kohn (1999)
	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	
	EF1-2218R	Rehner (2001)
	ATGACACCRACRGCACRGTGTG:	
<i>RPB2</i>	fRPB2-5F: GAYGAYMGWATCAITTYGG	Liu et al. (1999)
	fRPB2-7cR:	Liu et al. (1999)
	CCCATRGCTTGYYTRCCCAT	

Table 64 Protocol of PCR reaction

95°C	4min	
95°C	1min	} ×40
50~58°C	1min	
72°C	1min	
72°C	8min	
4°C	∞	

Table 65 Primer for cycle sequencing

ITS	M-ITS1: GGTGAACCTGCAGATGGATC	Stoll et al. (2003)
-----	------------------------------	---------------------

	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
LSU D1/D2	NL1: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	O' Donnell (1993)
	NL4: GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O' Donnell (1993)
<i>RPB1</i>	RPB1-Ac: GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	Stiller & Hall (1997)
	RPB1-Cr: CCNGCDATNTCRTTRTCCATRTA	Stiller & Hall (1997)
<i>EF1-α</i>	EF1-983F: GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	Carbone & Kohn (1999)
	EF1-2218R ATGACACCRACRGCACRGTGTG:	Rehner (2001)
	EF1-1567R: ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	Rehner & Buckley (2005)
	EF1-1577F:	Rehner & Buckley (2005)
	CARGAYGTBTACAAGATYGGTGG	
<i>RPB2</i>	fRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu et al. (1999)
	fRPB2-7cR: CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT	Liu et al. (1999)
	bRPB2-6F: TGGGGYATGGTNTGYCCYGC	Matheny et al. (2006)
	gRPB2-6R: GCAGGRCARACCAWMCCCCA	Liu et al. (1999)

Table 66 Protocol of cycle sequencing

96°C	3min	
96°C	15sec	} × 25
50°C	5sec	
60°C	4min	
4°C	∞	

4.3 結果

4.3.1 科間 (Brachybasidiaceae, Cryptobasidiaceae, Exobasidiaceae, Graphiolaceae, Laurobasidiaceae) の体系構築

モチビョウキン目菌類の各科, 各属の基準種全てのシーケンスデータは得られなかったものの, 可能な限り取得した配列を用いた分子系統解析を行った.

rDNA-LSU 領域のみを用いた分子系統解析の結果, 系統解析方法 (NJ 法・ML 法) の違いによらず Brachybasidiaceae, Exobasidiaceae, Graphiolaceae, Laurobasidiaceae はそれぞれ高く支持される単系統群を形成した (BS 70%以上, Fig. 54, 55). しかし, Cryptobasidiaceae ではクスノキ科植物に有性世代を形成する *Clinoconidium* 属菌からなるグループ 1 とクロウメモドキ科 *Ziziphus* 属に有性世代を形成する *Coniodictyum* 属菌からなるグループ 2 に分岐した (Fig. 54, 55). Cryptobasidiaceae グループ 1 はクスノキ科植物に有性世代を形成する Laurobasidiaceae と姉妹群を形成し, グループ 2 の系統位置は支持されなかったものの, Cryptobasidiaceae グループ 1 と Laurobasidiaceae の側系統群に位置した.

下記に示す複数 DNA 領域 (rDNA-LSU, ITS, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α*) の塩基配列を用いた分子系統解析を行ったタクソンサンプルを用いて, 同じく rDNA-LSU 領域のみを用いた分子系統解析を行った結果, タクサ数の減少に伴い Brachybasidiaceae, Exobasidiaceae, Graphiolaceae では支持率が低下したものの, Laurobasidiaceae および Cryptobasidiaceae グループ 1 では支持率が上昇した (Fig. 56).

複数 DNA 領域 (rDNA-LSU, ITS, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α*) の塩基配列やアミノ酸配列を用いた分子系統解析を用いた最尤法による分子系統解析の結果, 5 領域の塩基配列 (尤度: -32144.502074) > 4 領域の塩基配列 (尤度: -25176.606278) > 5 領域の塩基+アミノ酸混合配列 (尤度: -18126.799148) > 4 領域の塩基+アミノ酸混合配列 (尤度: -11201.497493) の順で各科の系統群が高く支持された (Fig. 57-60). 特に, Brachybasidiaceae, Exobasidiaceae, Graphiolaceae では, rDNA-LSU 領域単一の塩基配列による分子系統解析結果と比較して, 支持率が大幅に上昇した (Fig. 56-60). 一方で, 2 領域 (LSU, ITS) の塩基配列と 3 領域 (*RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α*) のアミノ酸配列を用いた解析では Cryptobasidiaceae グループ 1 の単系統性が支持されなかった (Fig. 58, 60). これら系統樹上で, Exobasidiaceae は常に Brachybasidiaceae と Graphiolaceae は姉妹群を形成した (Fig. 57-60). 一方, Laurobasidiaceae と Cryptobasidiaceae グループ 1 は単系統群を形成し, 上記 3 科の姉妹群であった (Fig. 57, 60). これらの系統解析の結果は, 有性世代の形成の見られる植物種と系統学的な関係がみられた.

科間の各領域の塩基配列の変異の割合に注目すると, ITS, *RPB1*, *RPB2* で比較的高く, LSU, *TEF1- α* 領域では比較的低かった (Table 69). また, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* 領域をアミノ酸に変換した配列の変異の割合に注目すると塩基配列と比べ 3 領域すべてで低下し, *TEF1- α* 領域では半分程度にまで低下した (Table 69).

4.3.1 種間 (*Exobasidium* 属) の体系構築

rDNA-ITS 領域を用いた分子系統解析の結果, *Rhododendron* 属に有性世代を形成する種 (*Exobasidium* sp.) が基部に位置した (Fig. 61). *Camellia* 属 (*E. camelliae*, *E. gracile*, *E. nudum*) と, *Symplocos* 属 (*E. symploci-japonicae* var.

symploci-japonicae, *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum*) に有性世代を形成する菌群の単系統性が支持された (MLBS 100%, Fig. 61). また, *Vaccinium* 属 (*E. vaccinii*, *E. rostrupii*) に有性世代を形成する菌群は *Leucothe* 属に有性世代を形成する種 (*E. bisporum*) との単系統性が支持された (MLBS 83%, Fig. 61). 一方で, *Rhododendron* 属に有性世代を形成する菌群の単系統性は支持されなかった (Fig. 61).

rDNA-LSU 領域を用いた分子系統解析の結果, *Rhododendron* 属に有性世代を形成する種 (*E. shiraianum*) が基部に位置した (Fig. 62). ITS 領域の解析結果とおおむね一致し, *Camellia* 属 (*E. camelliae*, *E. gracile*, *E. nudum*) と *Symplocos* 属 (*E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum*) に有性世代を形成する菌群の単系統性が支持された (MLBS 90%以上, Fig. 62). *Vaccinium* 属 (*E. vaccinii*, *E. rostrupii*) および *Rhododendron* 属に有性世代を形成する菌群の単系統性は支持されなかった (Fig. 62).

RPB1 領域の塩基配列を用いた分子系統解析の結果, ITS, LSU 領域の解析結果と異なり, *Symplocos* 属に有性世代を形成する菌群 (*E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum*) が最基部に位置し, その単系統性が強く支持された (MLBS 100%, Fig. 63). また, *Camellia* 属に有性世代を形成する種 (*E. nudum*) は, *Vaccinium* 属に有性世代を形成する種 (*E. rostrupii*) と高く支持される単系統群を形成した (MLBS 100%, Fig. 63). *Camelliae* 属 (*E. camelliae*, *E. gracile*, *E. nudum*), *Vaccinium* 属 (*E. vaccinii*, *E. rostrupii*), *Rhododendron* 属に有性世代を形成する菌群の単系統性は支持されなかった (Fig. 63).

RPB1 領域のアミノ酸配列を用いた分子系統解析の結果、ITS、LSU 領域の結果と異なり、*Camellia* 属に有性世代を形成する菌群 (*E. camelliae*, *E. gracile*) が最基部に位置した (Fig. 64). その一方で、ITS、LSU 領域の解析結果と同様、*Symplocos* 属に有性世代を形成する菌群 (*E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum*) の単系統性が支持された (MLBS 100%, Fig. 64). また、*RPB1* 領域の塩基配列を用いた分子系統解析の結果と同様、*Camellia* 属に有性世代を形成する種 (*E. nudum*) は、*Vaccinium* 属に有性世代を形成する種 (*E. rostrupii*) と高く支持される単系統群を形成した (MLBS 100%, Fig. 64). *Vaccinium* 属 (*E. vaccinii*, *E. rostrupii*), *Rhododendron* 属に有性世代を形成する菌群の単系統性は支持されなかった (Fig. 64). また、塩基配列を用いた分子系統解析の結果と比較したところ、各系統群の支持率はおおむね低下した (Fig. 64).

RPB2 領域の塩基配列を用いた分子系統解析の結果、単領域解析の中で最も系統樹上に高く支持される系統群が多く確認されたものの、ITS、LSU 領域を用いた結果とは異なり、大きく二つの系統群を形成した (Fig. 65). 宿主系統は入れ子状となった (Fig. 65).

RPB2 領域のアミノ酸配列を用いた分子系統解析の結果、塩基配列を用いた分子系統解析の結果と比較して、各系統群の支持率はおおむね低下した (Fig. 66). *Rhododendron* 属に有性世代を形成する種 (*Exobasidium* sp.) が基部に位置した (Fig. 66). 塩基配列を用いた解析結果と同様、宿主系統ごとに強く支持される単系統群の形成は見られなかった (Fig. 66).

TEF1- α 領域の塩基配列を用いた分子系統解析の結果、*Symplocos* 属に有性世代を形成する菌群 (*E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E.*

symploci-japonicae var. *carpogenum*) と *Vaccinium* 属に有性世代を形成する種 (*E. rostrupii*) が最基部に位置した (Fig. 67). また, *RPB2* 領域の塩基配列を用いた解析の結果と同様, 宿主系統ごとに強く支持される単系統群の形成は見られなかった (Fig. 67). *Symplocos* 属に有性世代を形成する菌群 (*E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum*) の単系統性は支持されず, *Symplocos* 属に有性世代を形成する菌群 (*E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum*) と *Vaccinium* 属に有性世代形成する種である *E. rostrupii* の系統関係が強く支持された (MLBS 92%, Fig. 67).

TEF1- α 領域のアミノ酸配列を用いた分子系統解析の結果, 塩基配列を用いた分子系統解析の結果と比較して, 各系統群の支持率はおおむね低下した (Fig. 68). 塩基配列を用いた分子系統解析の結果と異なり, *Rhododendron* 属に有性世代を形成する種 (*E. cylindrosporum*, *E. nobeyamense*, *E. lushanense*) が最基部に位置した (Fig. 68). 宿主系統ごとに強く支持される単系統群の形成は見られなかった (Fig. 68).

rDNA-ITS 領域と LSU 領域の塩基配列を組み合わせた分子系統解析の結果は, 単領域による系統解析の結果よりも多くの系統群が強く支持された (Fig. 61, 62, 69). LSU 領域の塩基配列を用いた分子系統解析の結果と同様, *Rhododendron* 属に有性世代を形成する種 (*E. shiraianum*) が最基部に位置した (Fig. 61, 69). *Camellia* 属 (*E. camelliae*, *E. gracile*, *E. nudum*) と *Symplocos* 属 (*E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum*) に有性世代形成する菌群の単系統性が支持された (MLBS 100%, Fig. 69). また, *Vaccinium* 属に有性世代を形成する菌群 *E. vaccinii*, *E.*

rostrupii) は *Leucothe* 属に有性世代を形成する種 (*E. bisporum*) との系統学的な関係性が支持され, 単領域での解析の結果と一致した (Fig. 69). *Rhododendron* 属に有性世代を形成する菌群の単系統性は支持されなかった (Fig. 69)

複数 DNA 領域 (rDNA-LSU, ITS, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α*) の塩基配列を用いた分子系統解析の結果, 最も多くの枝が強く支持された (MLBS 70%以上, Fig. 70). 塩基アミノ酸混合配列を用いた分子系統解析の結果は, 塩基配列を用いた解析と比較すると支持率は低下したが, 単領域もしくは ITS・LSU 領域を用いた分子系統解析結果と比較して多くの系統群が強く支持された (Fig. 69, 71). 多遺伝子座の塩基配列と塩基アミノ酸混合配列を用いた解析結果の強く支持された系統群の系統関係性に齟齬は見られなかった.

複数 DNA 領域 (rDNA-LSU, ITS, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α*) の塩基配列を用いた分子系統解析の結果では, *Symplocos* 属 (*E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. symploci-japonicae* var. *carpogenum*) に有性世代を形成する菌群の単系統性が支持された (MLBS 99%, 以上 Fig. 70). *Vaccinium* (*E. vaccinii*, *E. rostrupii*) 属に有性世代を形成する菌群の単系統性は支持されなかった (Fig. 70). さらに, *Rhododendron* 属に有性世代を形成する菌群も, *Vaccinioideae* (*Vaccinium* 属および *Leucothe* 属) に有性世代を形成する菌群 (*E. vaccinii*, *E. bisporum*) が入れ子状となり単系統性は支持されなかった (Fig. 70).

種間における各領域の塩基配列の変異の割合に注目すると ITS, *RPB1*, *RPB2* で比較的高く, LSU, *TEF1- α* 領域で比較的低くなった (Table 70). また, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* をアミノ酸に変換した配列の変異の割合に注目すると 3 領域すべてで低下したが, *RPB2*, *TEF1- α* 領域では半分程度にまで低下した (Table 70). *TEF1- α* 領域の変異割合は科間の結果とほとんど差は認められなかった.

4.4 考察

4.4.1 科間 (Brachybasidiaceae, Exobasidiaceae, Graphiolaceae, Laurobasidiaceae) の体系構築

複数の塩基配列による分子系統解析の結果により、現存する全ての科の単系統性が強く支持される樹形が得られた。これにより、進化系統の推定が可能となることが期待されたが、ITS-LSU 領域による分子系統解析の結果から、Cryptobasidiaceae の多系統性が示唆された。

Cryptobasidiaceae の菌類は①担子器形態が胃型、②担子器上に小柄を欠失、③担子胞子は厚壁化し褐色、④担子器は植物上のゴール内部に形成し、のちに組織が崩壊することで露出するという共通派生形質を有する (Begerow et al. 2002)。本科は、現在までに *Botryoconis*, *Coniodictyum*, *Clinoconidium*, *Drepanoconis* の 4 属が知られ (Begerow et al. 2002)、そのうち *Coniodictyum* 属を除く 3 属はクスノキ科植物に寄生する。本科の基準属である *Botryoconis* (syn. *Cryptobasidium*) 属の基準種 *B. tumefusiense* は、DNA 配列が未決定であるが、本研究により複数の塩基配列を用いた分子系統解析から有性世代の形成が見られる植物の系統と相関関係が見られることから、Cryptobasidiaceae グループ 1 に含まれることが推測される。*Coniodictyum* 属菌は LSU 領域を用いた分子系統解析の結果、Cryptobasidiaceae グループ 1 と Laurobasidiaceae の外側に位置したものの、強く支持されなかった。なお、*Coniodictyum* 属菌の配列は、アミノ酸コード領域の塩基配列 (LSU 領域以外) が決定されておらず、複数の塩基配列やアミノ酸配列を用いた解析を行うことができなかったため、別科か否かを判断することはできなかった。しかし、本属菌は Cryptobasidiaceae の共通派生形質③、④を持たないことから、別の科である可能性が示唆される。今後、

Conyodictyum 属菌の系統位置については、タイプ種を含めた多遺伝子座による分子系統解析が必要である。

今回、LSU 単領域および LSU 領域を含む複数の塩基配列による分子系統解析を行った結果、分類群（タクサ）数によって樹形およびその支持率に変化が見られた (Fig. 55, 56). それぞれの解析に用いた分類群のセットで LSU 単領域を用いた分子系統解析を行った結果、Brachybasidiaceae と Exobasidiaceae では支持が低下し、Cryptobasidiaceae と Laurobasidiaceae では支持が上昇した。さらに、ITS, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* 領域の塩基およびアミノ酸配列を加えた分子系統解析の結果においても、科間の関係は十分に支持されなかった。このことから、Cryptobasidiaceae と Laurobasidiaceae では配列上にその系統群を特徴付けるような変異が多く蓄積されていないことが考えられ、前者 (Brachybasidiaceae と Exobasidiaceae) に比べ後者 (Cryptobasidiaceae と Laurobasidiaceae) は、近年各系統群への分化が起こった可能性が考えられる。

4.4.2 種間 (*Exobasidium* 属) の体系構築

ITS, LSU, *RPB1*, *RPB2*, *TEF1- α* の複数領域による分子系統解析の結果、ITS, LSU 領域による従前の結果と比較して、樹全体の支持率は飛躍的に向上し、種間の系統関係性の議論を可能とした。

Exobasidium 属菌では宿主植物との共進化が指摘されている (Begerow et al. 2014). そこで、種間の系統関係性について、宿主に着目し考察を行ったところ、本研究で扱った全ての系統解析結果を考慮すると、主に *Rhododendron* 属植物 (Ericaceae, Ericoideae) と *Camellia* 属植物に有性世代 (Theaceae) を形成する系統群と、*Symplocos* 属 (Symplocaceae) と *Vaccinium* 属 (Ericaceae, Vaccinioideae) 植物に有性世代を形成する大きく 2 つの系統に分かれることが

明らかとなった (Fig. 70, 74). このことから, *Exobasidium* 属菌は, 共通祖先では Ericaceae に寄生していたが祖先が Ericaceae 以外の宿主に対して寄生性を獲得した, または複数の祖先系統が Ericaceae への寄生性を獲得した可能性が考えられ, 単純な共進化の仮説を覆す可能性が考えられた. *Exobasidium* 属菌同様, 高い宿主特異性を有する植物病原菌である白さび病菌では, 宿主植物との共進化ではなく, 宿主に近縁な別の植物へと宿主を切り替えることにより進化してきたとする説が知られる (Choi & Thines 2015). 本研究において, *Rhododendron* 属の種もしくは亜属に注目すると, それらは入れ子状となっている (Fig. 72). このことから, *Exobasidium* 属菌はこれまで支持されてきた共進化とは異なる可能性が考えられた.

今回の系統解析の結果から, これまで言われてきた Ericaceae 植物に有性世代を形成する系統群の推定に誤りが存在する可能性が考えられた. *Camellia* 属, *Symplocos* 属植物上に有性世代の形成が見られる系統群は, 他の系統と比べて単系統性が強く支持されていた (Fig. 72). 一方, *Rhododendron* 属に有性世代の形成の見られる系統群は複数 DNA 領域の解析の結果, 強く支持されたが (MLBS 70%以上), Vaccinioideae 植物に有性世代の形成の見られる菌群 (*E. vaccinii*, *E. bisporum*) を含み, 宿主種との共進化仮説には疑問の残る結果を示した (Fig. 72). また, Vaccinioideae 植物に有性世代を形成する菌群は, 各 DNA の単領域による分子系統解析の結果において, 強く支持される系統枝が変化した. 例えば, *E. rostrupii* と *E. bisporum* は ITS, LSU, *RPB1*・*RPB2*, *TEF1- α* の結果で系統関係性が強く支持される種が異なり, *E. vaccinii* は ITS 領域を用いた解析を除き, 多くの解析結果において系統位置が定まらず, 特に *RPB1* 領域のアミノ酸配列による系統解析でロングブランチを形成した (Fig. 64). この理由は, 解析に用いたタクサ数の少なさに起因すると考えられる. *Exobasidium* 属菌の有性世代

はツツジ目植物上でよく観察される．特に，*Rhododendron* 属 (Ericoideae) では 35 種，*Vaccinium* 属 (Vaccinioideae) では 23 種が記録され，Theaceae や Symplocaceae 植物上での報告はごく僅かである (Table 71)．今後こうした議論を行う上では，Ericaceae に有性世代を形成する種をより多く解析に用いる必要がある．

Brewer et al. (2014)によると，*Exobasidium* 属菌の種の系統は宿主植物以上に病徴ごとに単系統群を形成すると指摘している．この仮説に対して，本研究においても一部の病徴形質においてそれを支持するような結果が得られた．例えば，*Rhododendron* 属植物および *Vaccinium* 属に平もち症状 (leaf spot / leaf blister) を引き起こす系統群は，強く支持された (MLBS 100%，Fig. 73)．その一方で，*Rhododendron* 属植物にてんぐ巢病症状 (witchs' broom) を引き起こす種は近接するものの単系統群は形成しなかった (Fig. 73)．また，*Rhododendron* 属植物に裏白もち病症状 (partial / systemic leaf blight) およびもち病症状 (partial / systemic hypertrophy) を引き起こす系統群は，互いに入れ子状となり，Brewer et al. (2014)の仮説と矛盾する結果が得られている (Fig. 73)．先に言及したように解析に用いたデータセットの問題点も挙げられるが，進化の過程で病徴形質が急速に獲得された場合は，解析に用いた領域の再検討も必要である．例えば，子のう菌門チャワソウ目チャワソウ目における地下生地の表現形質の獲得は劇的な進化速度で獲得されたことが示唆されている (Wynns 2015)．これは，*Exobasidium* 属菌でも同様の可能性が考えられる．例えば，一部の病徴形質では単系統性が強く支持され，進化的に重要な形質である可能性が示唆された．本研究の分子系統解析に使用した *Exobasidium* 属菌の種数は，未記載種を除く全 131 種中 19 種に留まる．また，有性世代の宿主植物で

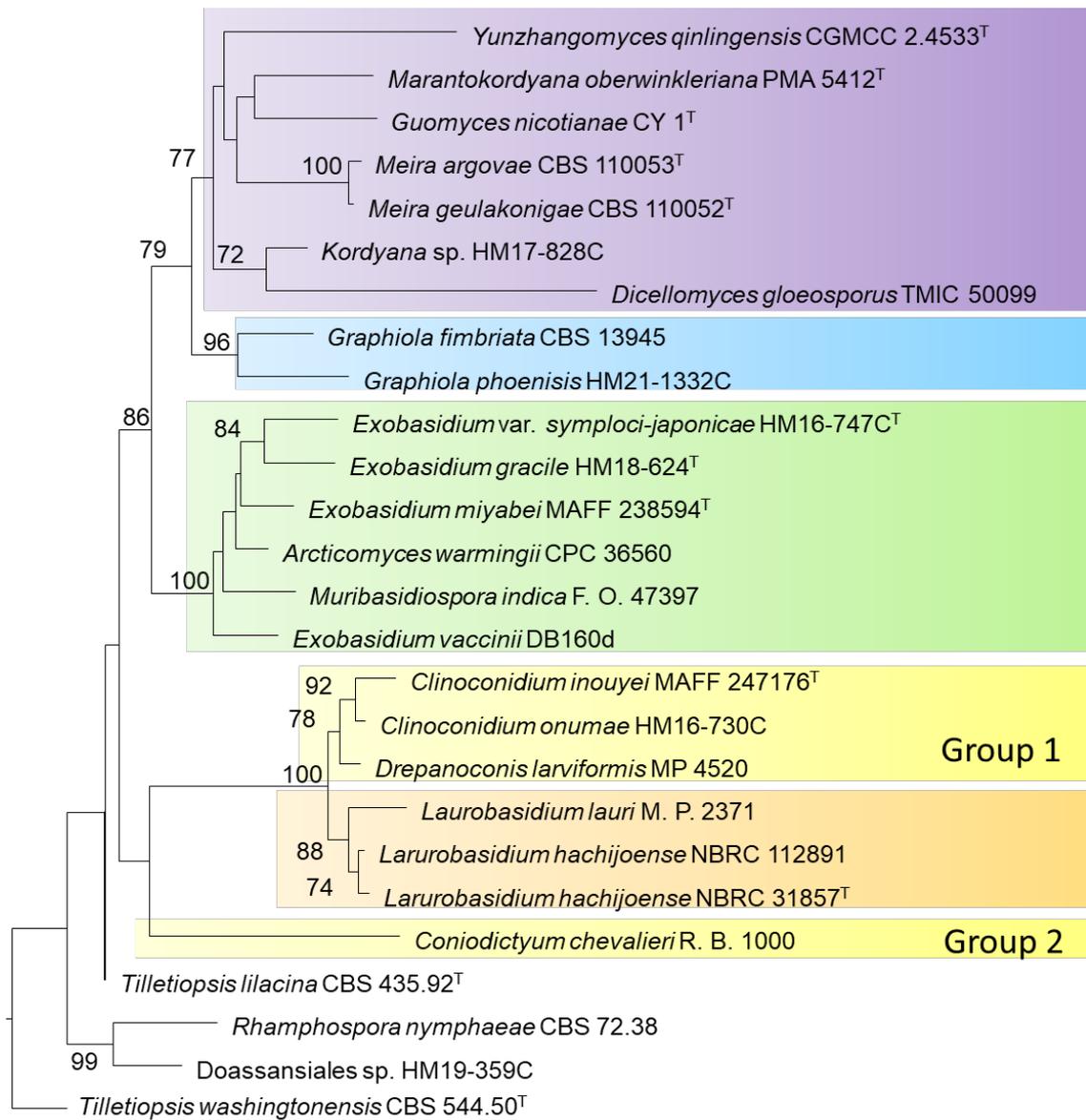
知られる種の代表種は十分とは言い難い。本属内の種多様化の促進を明らかにするためにも、今後の解析に含める種数の増強が必要である。

本研究の結果、病徴は進化的な議論を行う上で重要な共通派生形質となる可能性が示唆された。病徴と病原菌の関係はクロボキン目菌類の一部の種の病徴パターンの研究から宿主との相互作用や生活環の戦略に密接に関わることが推定されており、本菌群の進化パターンを検討する上でも無視できない特徴と考えられる (Zuo et al. 2019)。モチビョウキン目菌類の分子系統学的研究では、有性生殖器官である担子器を重視した系統進化の議論が中心であるが、病徴との進化の関係性は議論されていない。加えて、これまでにモチビョウキンの病徴については明確な定義づけは行われておらず、類似した病徴であっても研究者ごとに異なる名前が与えられてきた (岸 1998)。今後はこうした現状を整理するうえでも、病原菌ごとの詳細な病徴に関して解剖学的な手法・解析を組み合わせた定義付けが必要と考える。

4.4.3 章の考察

本論文研究では、これまで用いられてきた ITS や LSU 領域だけでなく、その他複数の DNA 領域による分子系統解析を試みた結果、特に科間および種間における分子系統樹の支持率の飛躍的な改善と、モチビョウキン目菌類の新たな進化系統の一端を明らかにすることができた。特に、本目菌類の進化と宿主植物および病徴に関する考察は、今後の本目菌類の病原性獲得に関する研究上有用な情報であると考えられる。しかし、今回作成した系統樹は、基準種が登録された *Guomyces* 属、*Meira* 属、*Manrantkordyana* 属、*Yunzhangomyces* 属を除く、他の属に対して基準標本に基づくシーケンスデータが欠けている。今後、本目菌類の更

なる進化体系構築のためには, epitype 指定といった分類学的研究も並行して行う必要があると考える.



0.02

Brachybasidiaceae
 Graphiolaceae
 Exobasidiaceae
 Laurobasidiaceae
 Cryptobasidiaceae

Fig. 54 Phylogenetic tree constructed using neighbor joining (NJ) analysis Jukes–Cantor correction (Bootstrap value: > 70%). *Tilletopsis washingtonensis* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

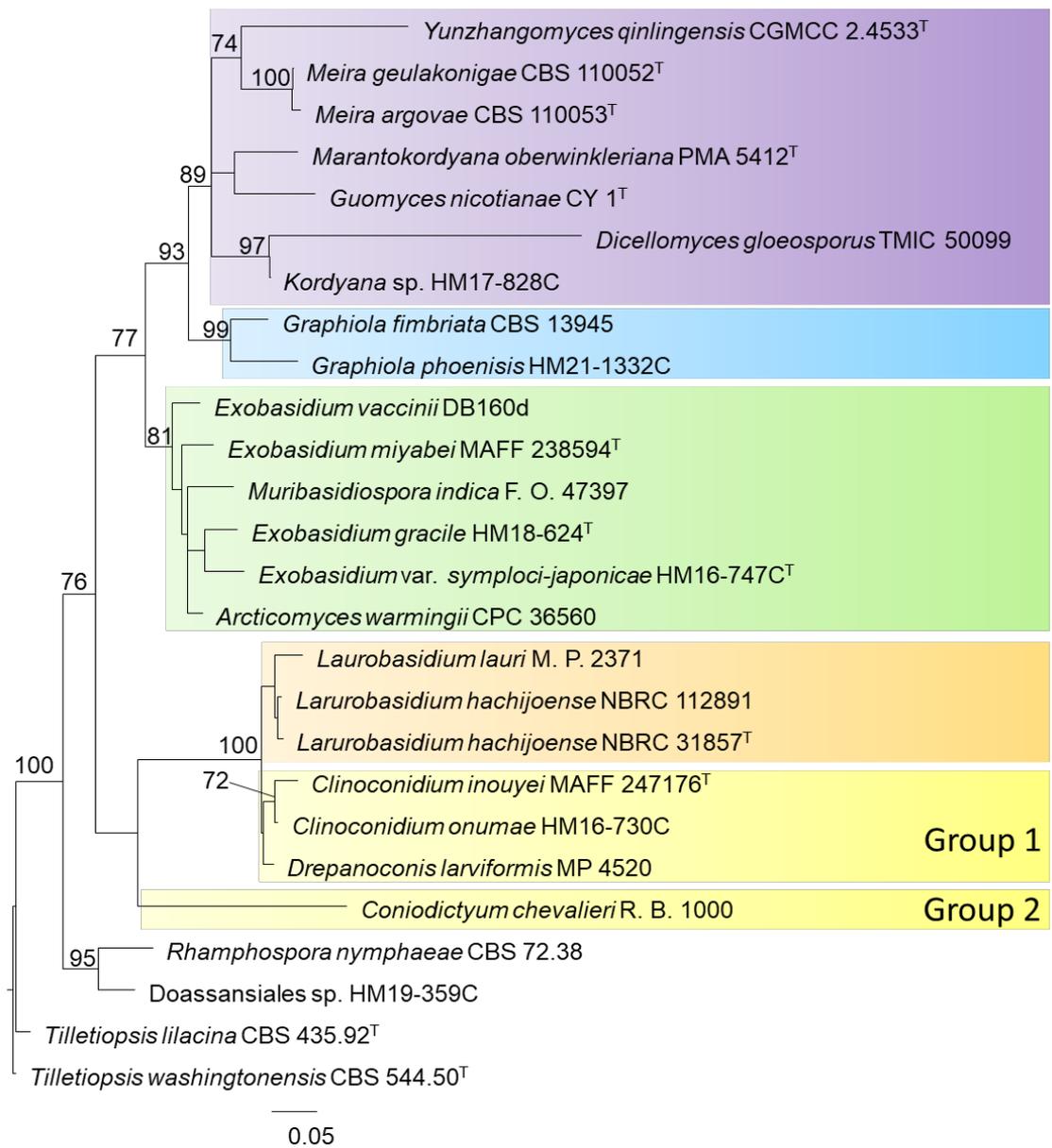


Fig. 55 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for LSU (Bootstrap value: > 70%). *Tilletiopsis washingtonensis* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

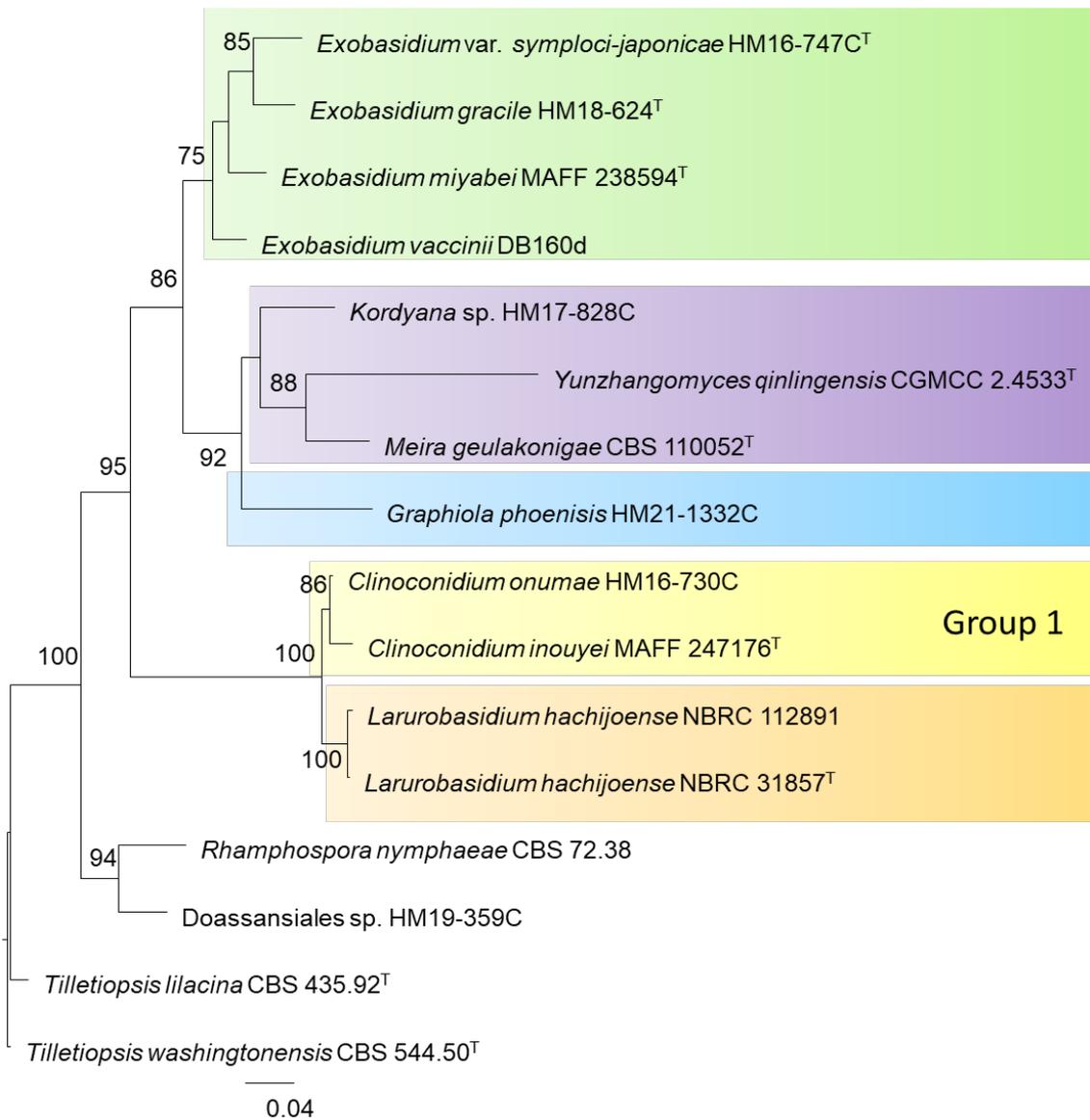


Fig. 56 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for LSU (Bootstrap value: > 70%). *Tilletiopsis washingtonensis* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

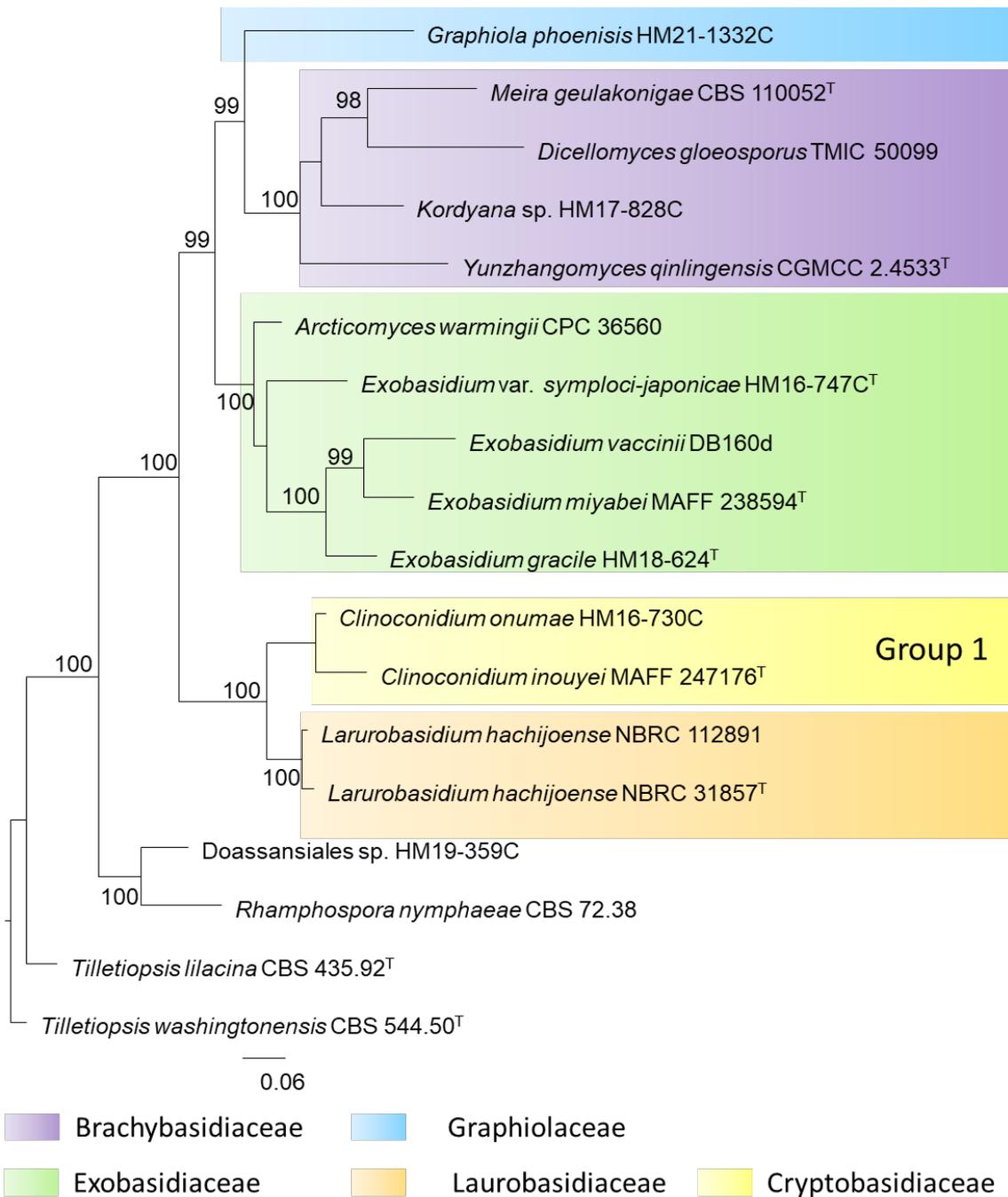


Fig. 57 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for LSU, *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Tilletiopsis washingtonensis* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

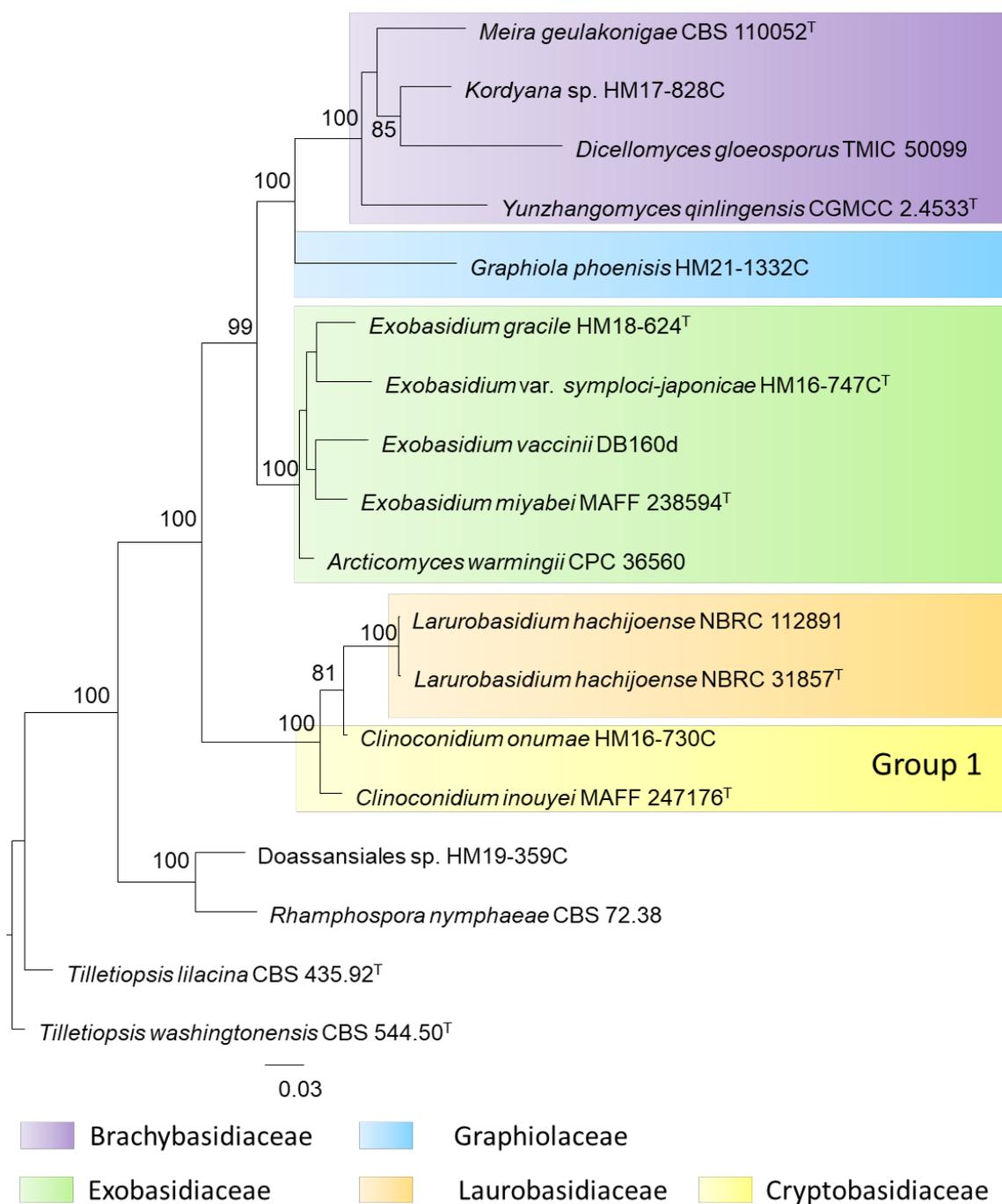


Fig. 58 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for LSU and WAG+B for *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Tilletiopsis washingtonensis* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

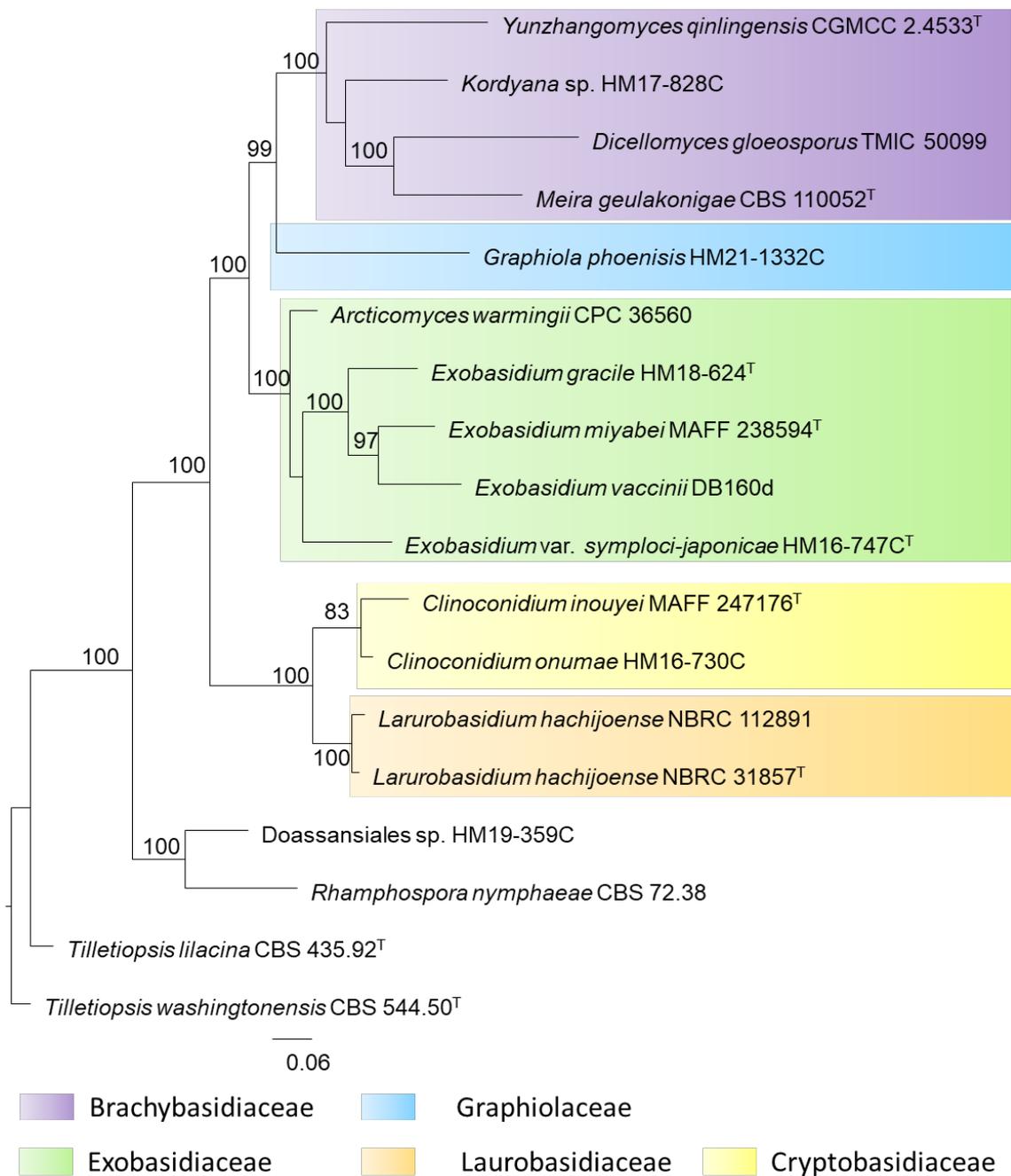


Fig. 59 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for ITS, LSU, *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Tilletiopsis washingtonensis* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

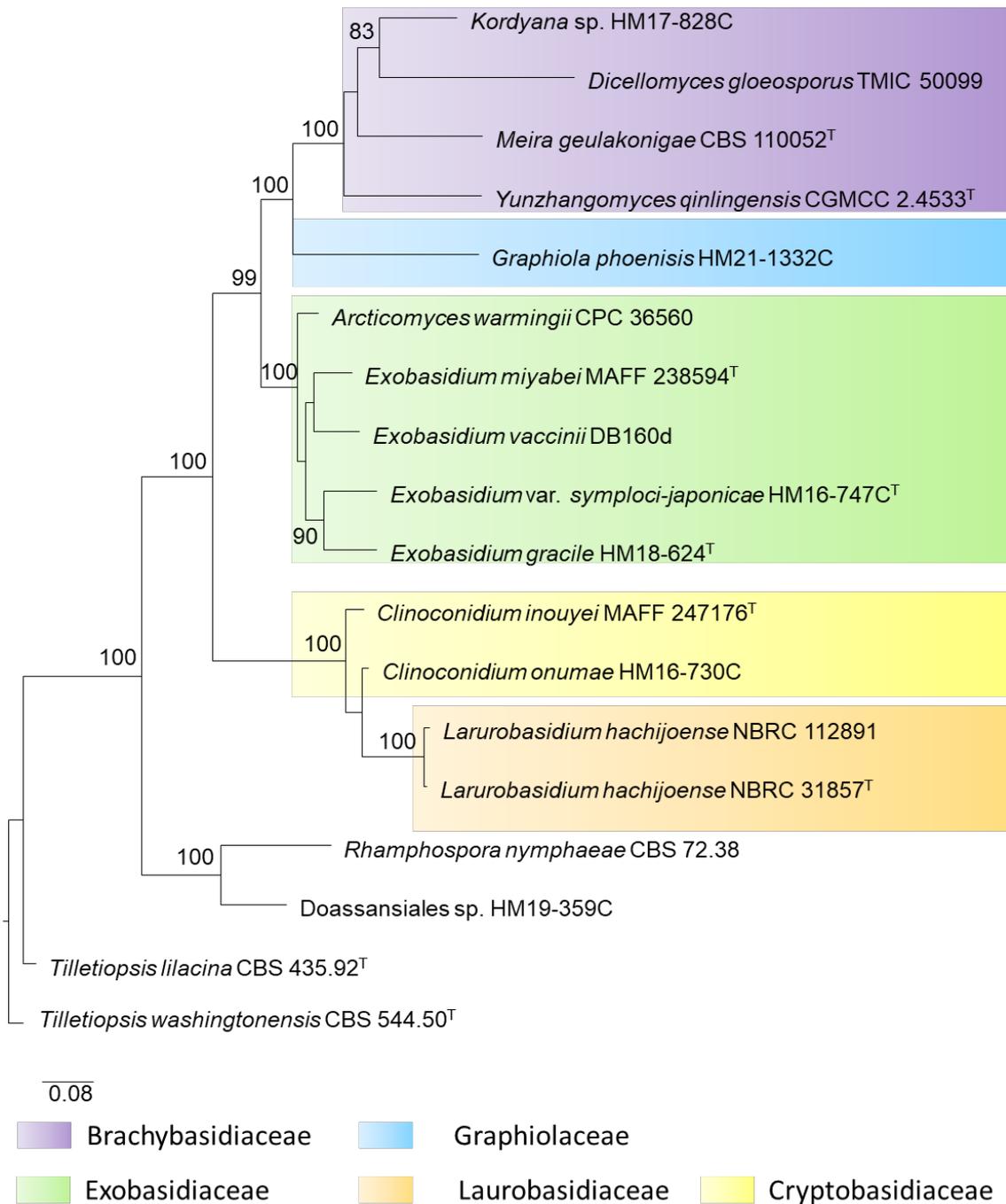


Fig. 60 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for ITS and LSU, and WAG+B for *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Tilletiopsis washingtonensis* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence

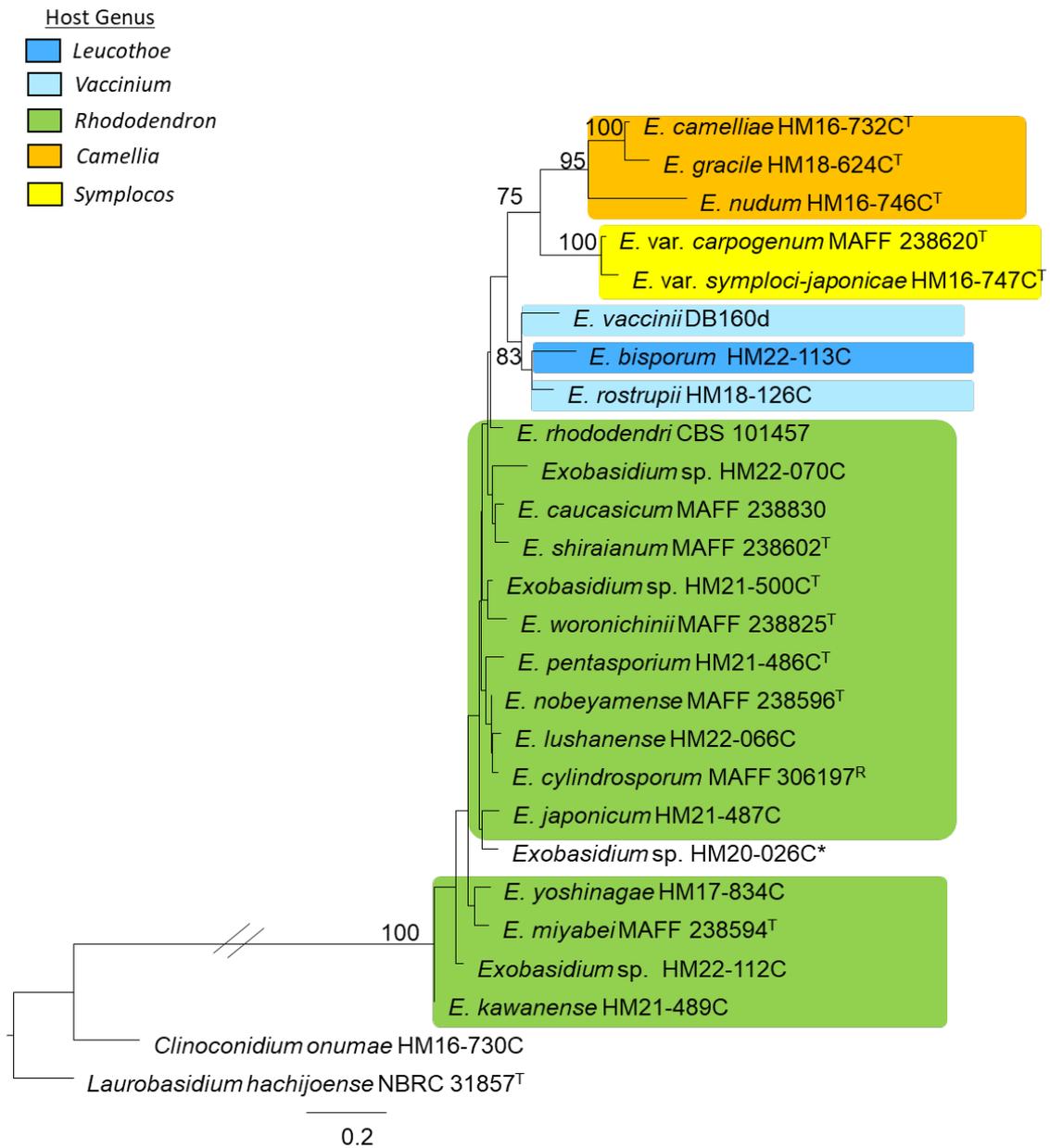


Fig. 61 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FO+G4m for ITS (Bootstrap value: > 70%). *Clinoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species

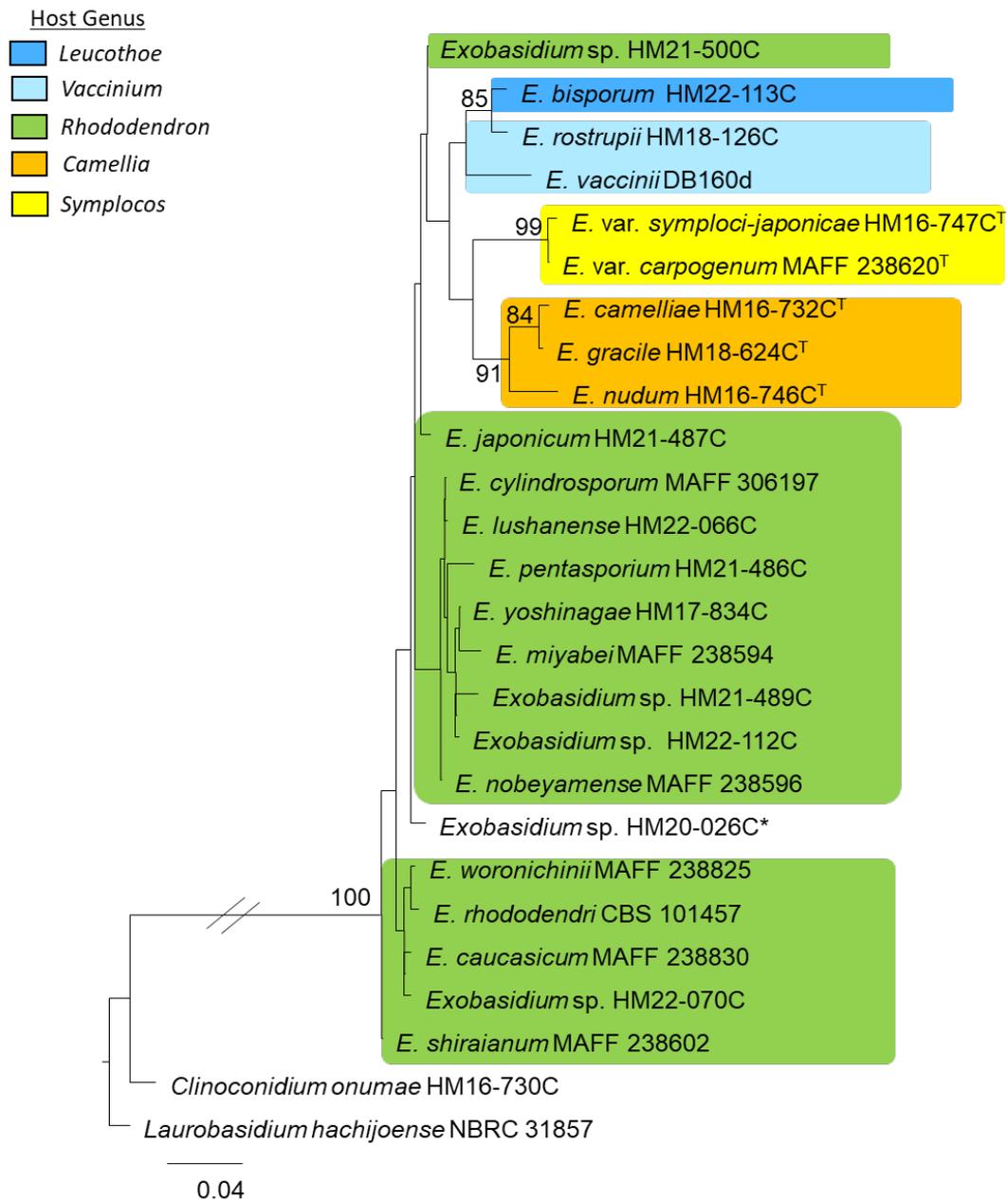


Fig. 62 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FO+G4m for LSU (Bootstrap value: > 70%). *Clinoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species

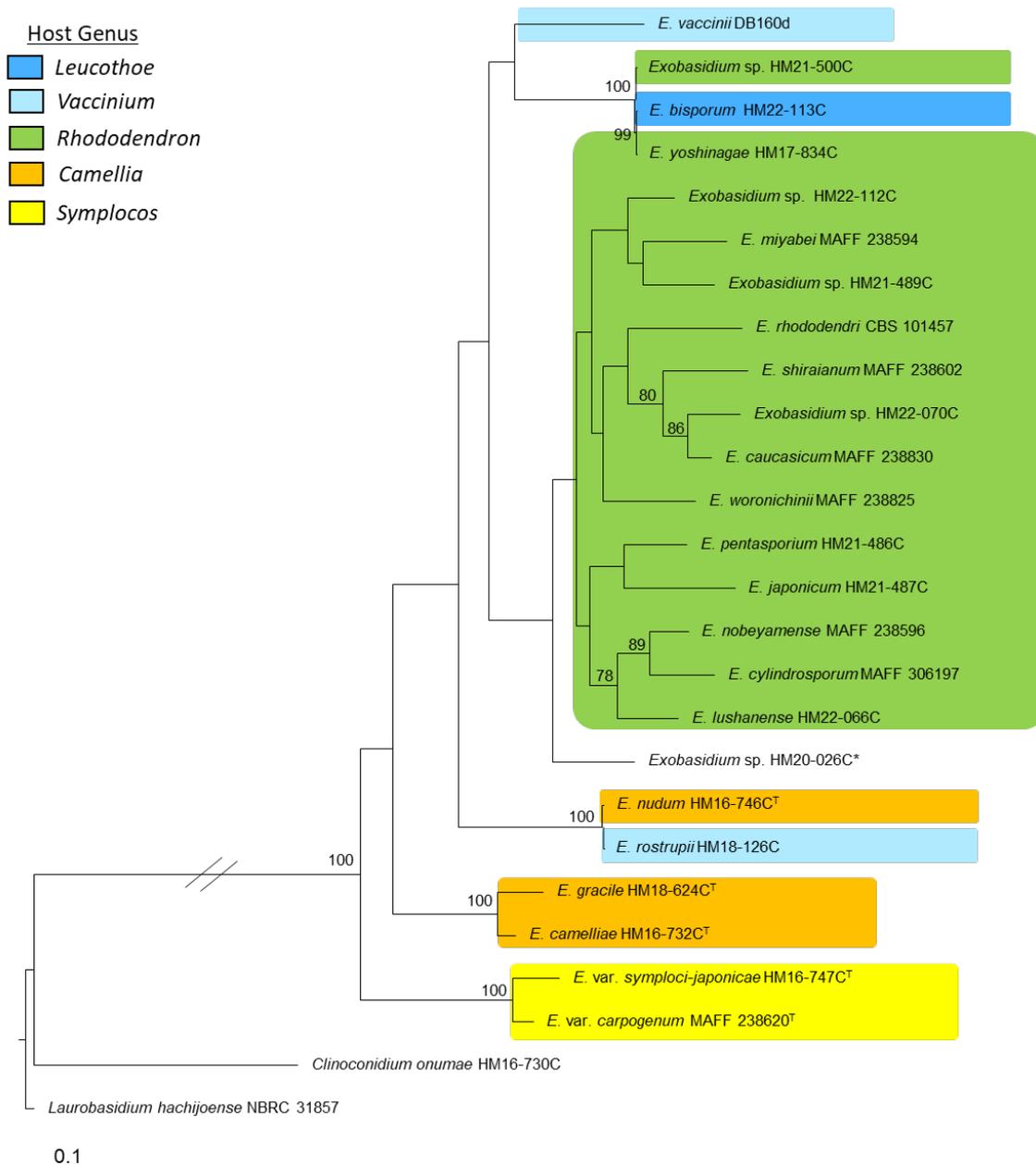


Fig. 63 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FO+G4m for *RPB1* (Bootstrap value: > 70%). *Clinoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T = type sequence. * = anamorphic species

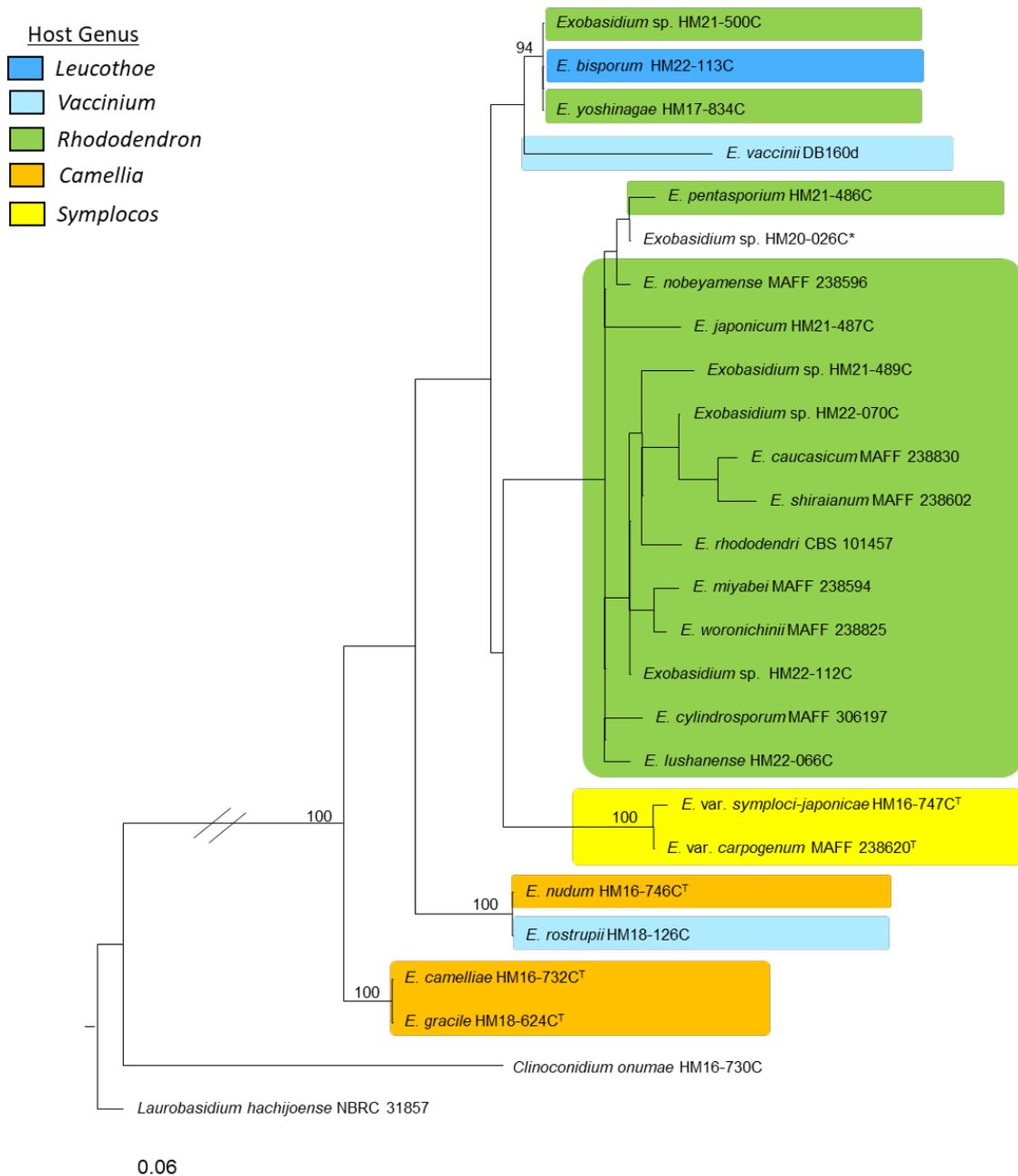
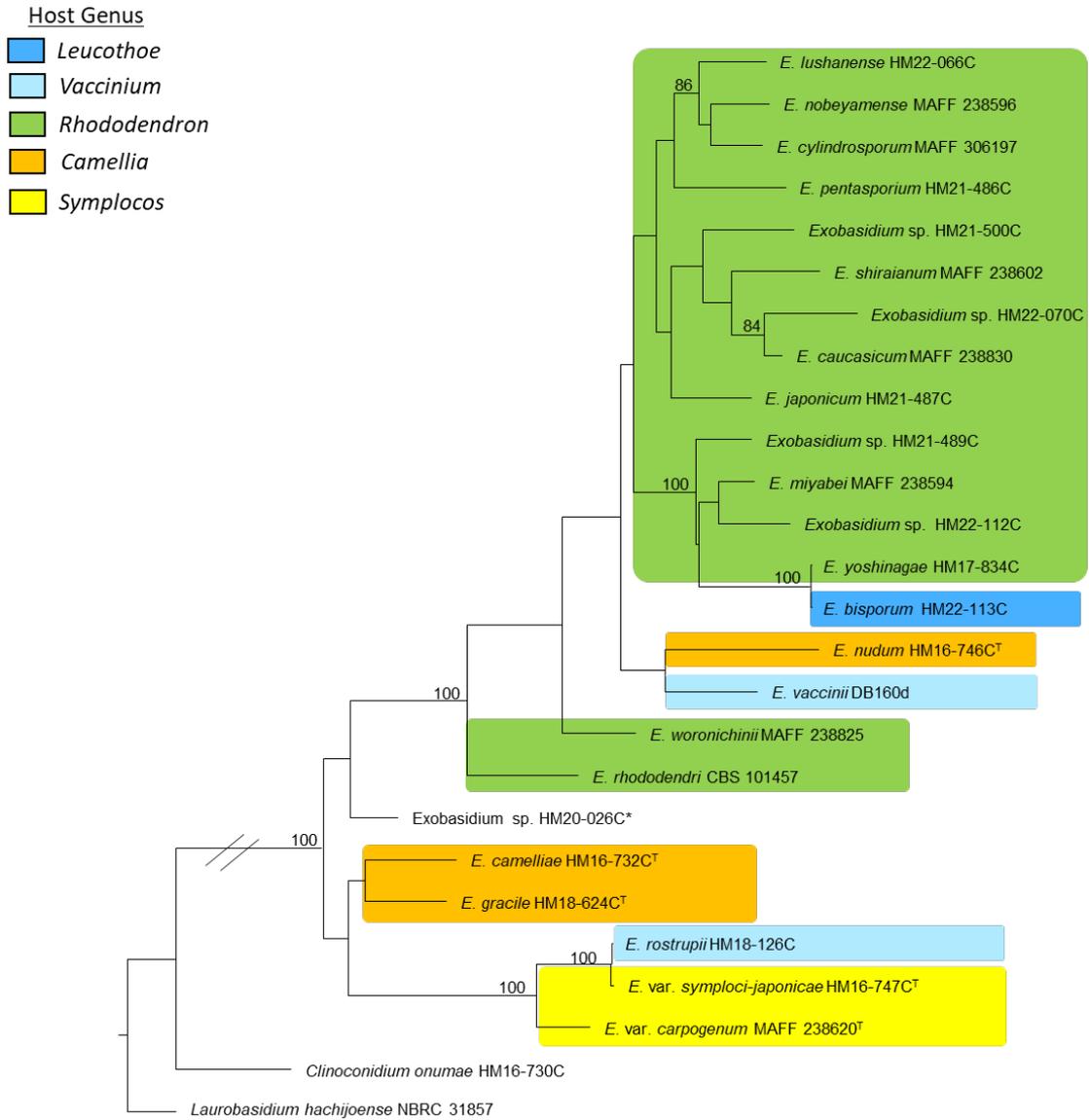


Fig. 64 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the WAG+G4m for *RPBI* (Bootstrap value: > 70%). *Clinoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species



0.06

Fig. 65 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FO+G4m for *RPB2* (Bootstrap value: > 70%). *Climoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T = type sequence. * = anamorphic species

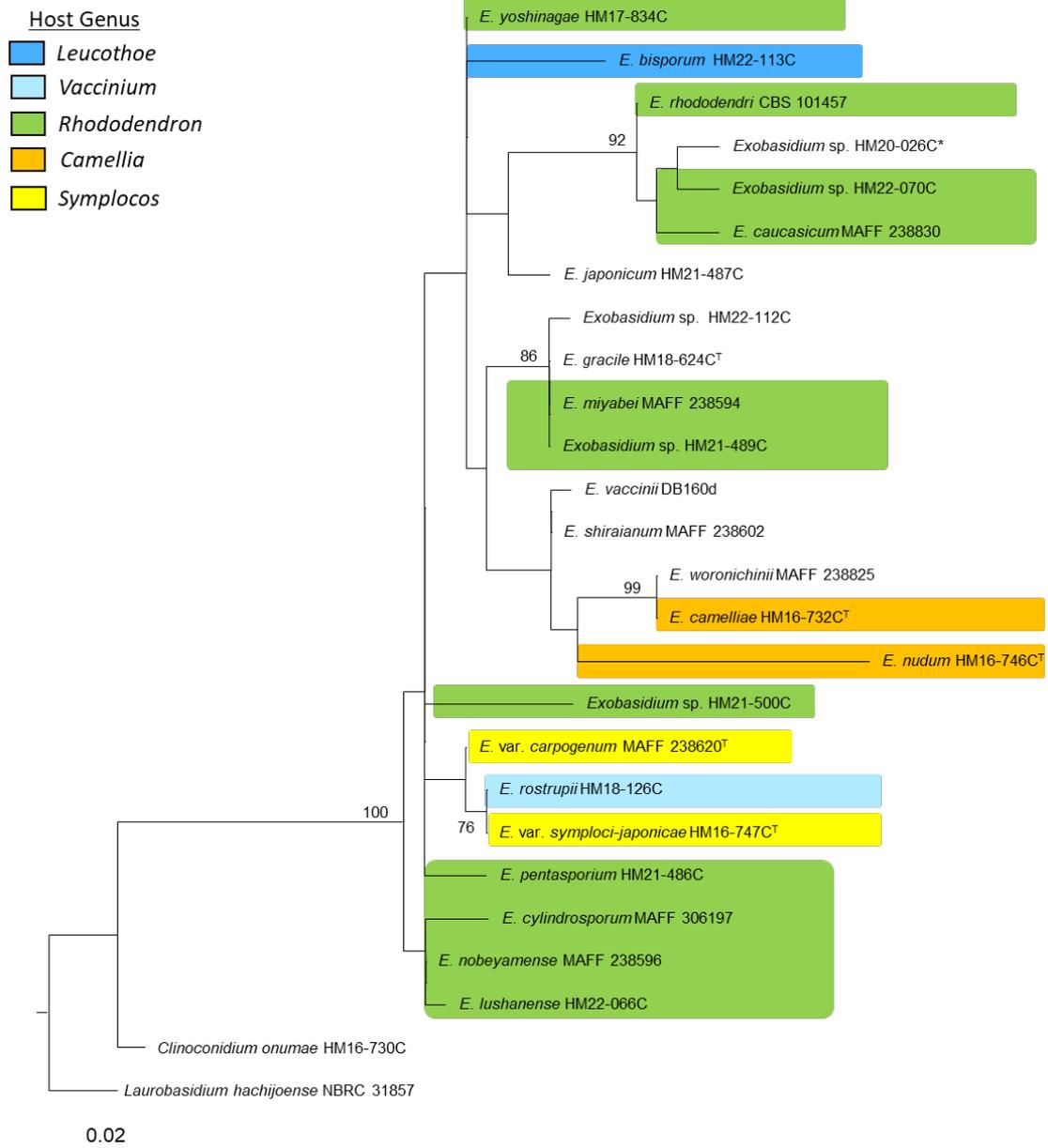


Fig. 68 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the WAG+G4m for *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Climoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species

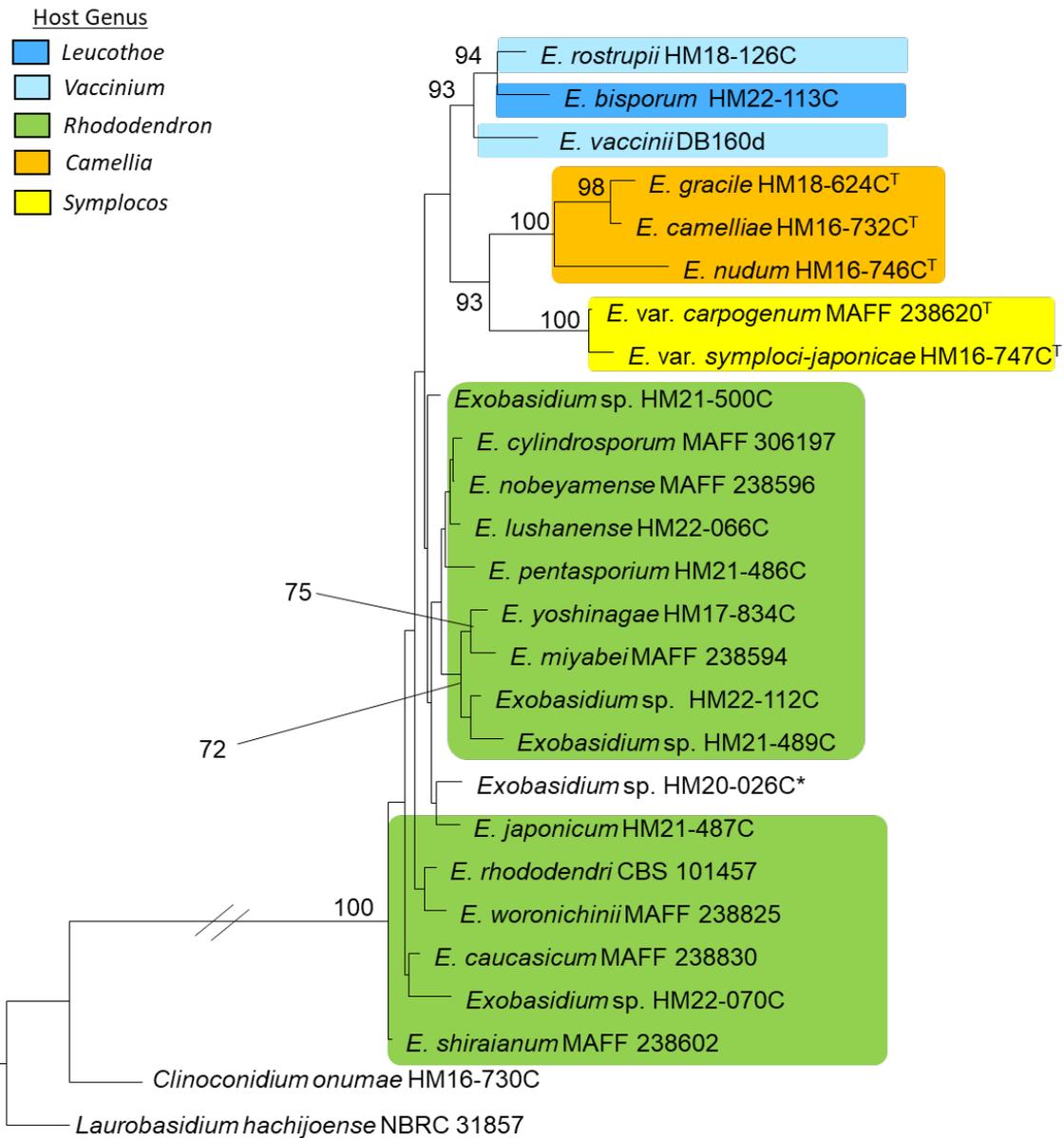


Fig. 69 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for LSU and ITS (Bootstrap value: > 70%). *Clinoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species

- Host Genus
- *Leucothoe*
 - *Vaccinium*
 - *Rhododendron*
 - *Camellia*
 - *Symplocos*

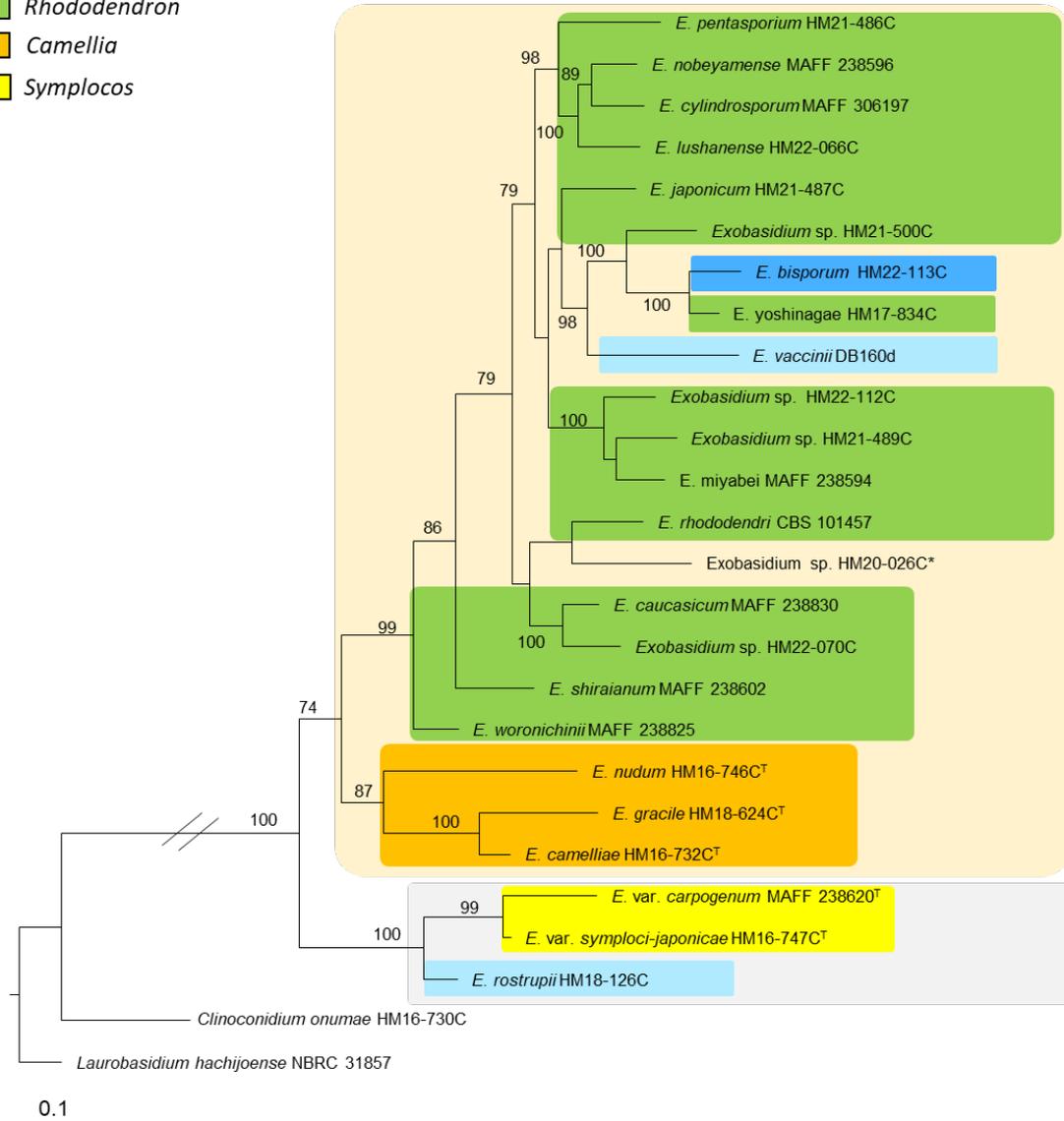


Fig. 70 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for ITS, LSU, *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Clinoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species

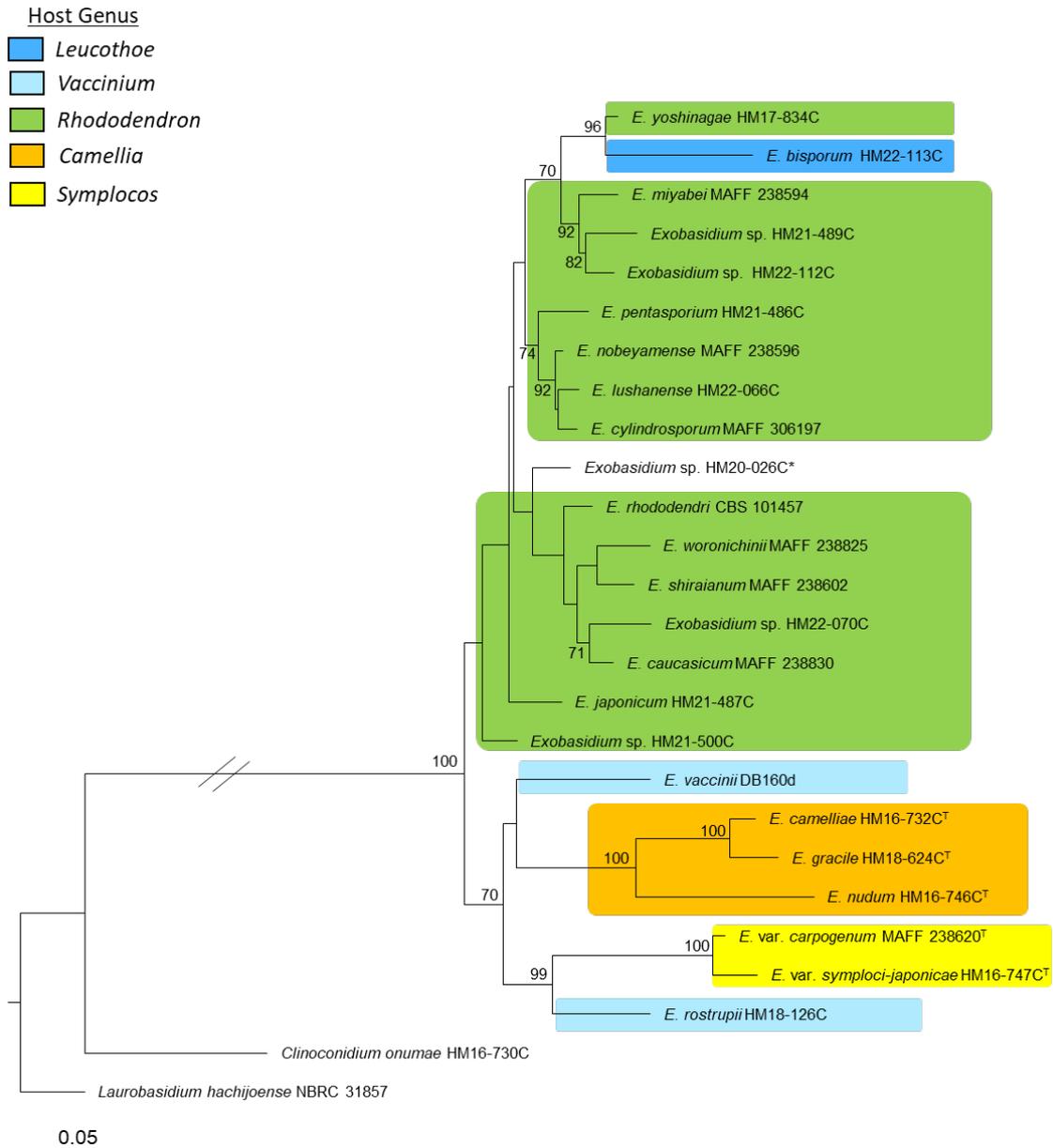


Fig. 71 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for ITS and LSU and WAG+B for *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Clinoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* and *T. lilacina* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species

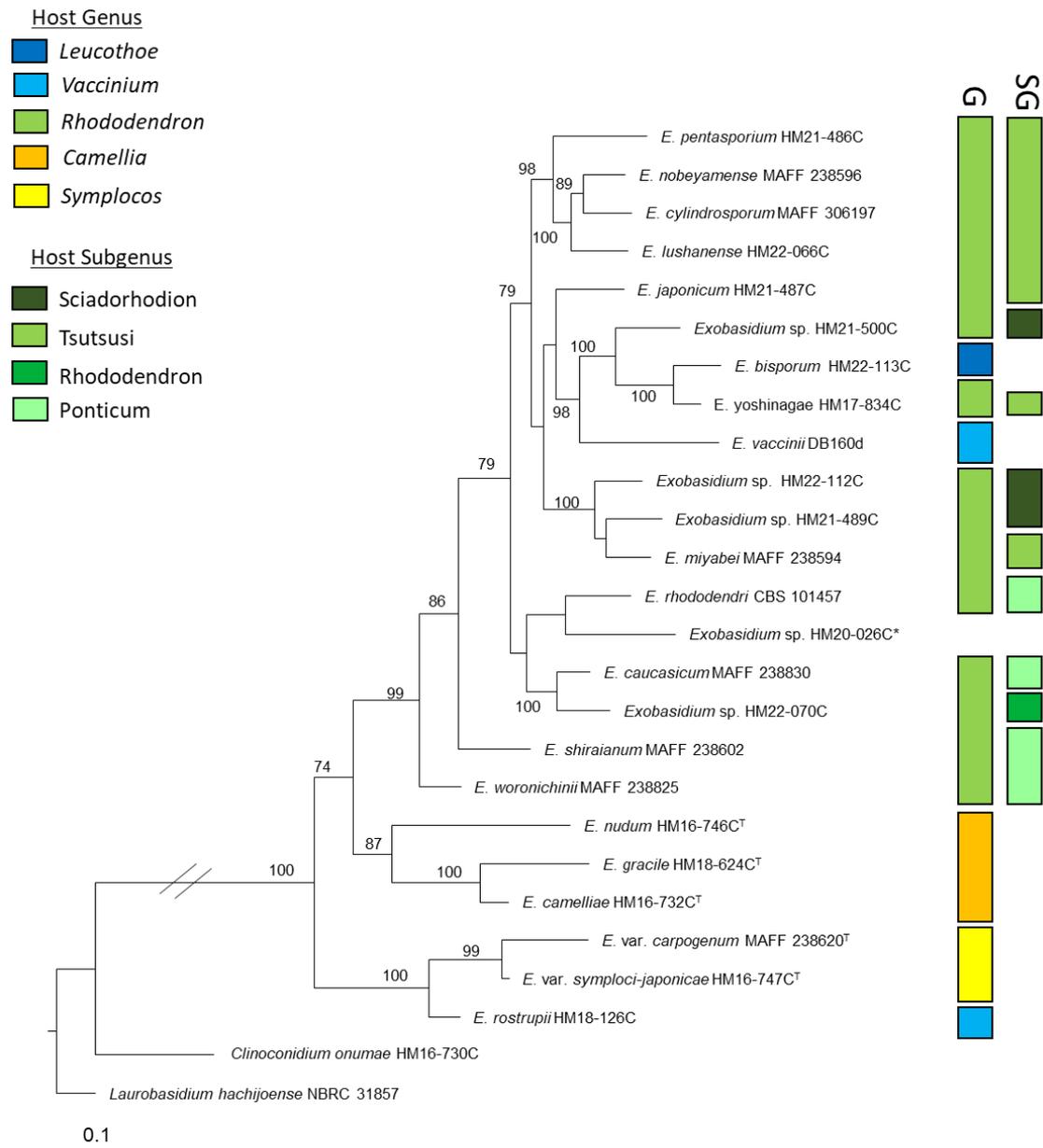


Fig. 72 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for ITS, LSU, *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Clinoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species

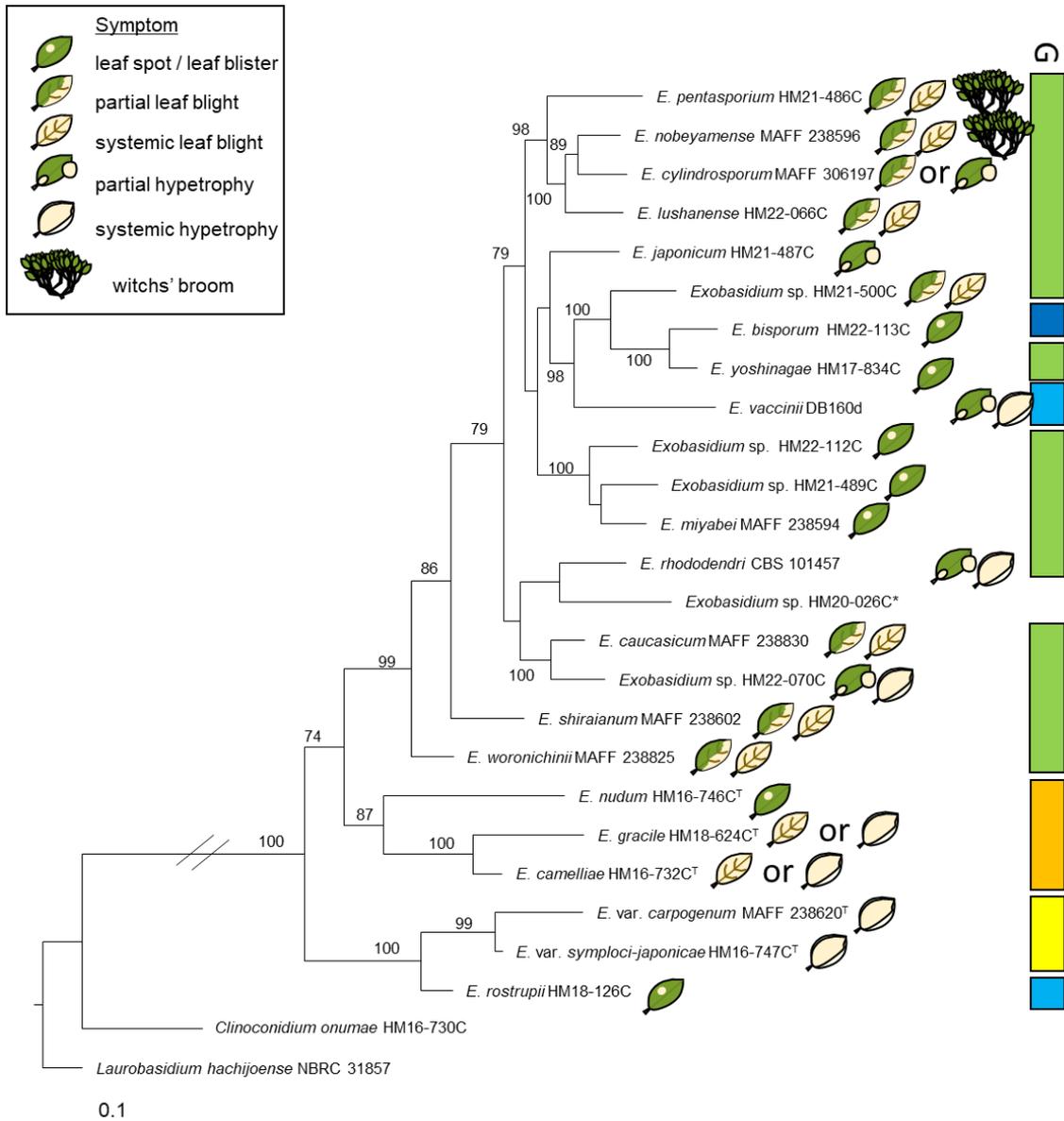


Fig. 73 Phylogenetic tree constructed using maximum likelihood (ML) analysis based on the models selected with the GTR+FC+G4m+B for ITS, LSU, *RPB1*, *RPB2* and *TEF1- α* (Bootstrap value: > 70%). *Climoconidium onumae* and *Laurobasidium hachijoense* were used as outgroups. Numbers after taxa are isolate or specimen or strain numbers. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. Sequences obtained for this study are in bold. T= type sequence. * = anamorphic species

Table 67 taxon samples

order	Family	Genus	species	Host Plant / Source	Voucher	type	LSU	RPB1	RPB2	TEF
Doassansiales	incertae sedis	<i>Doassansiales</i>	sp.	plant	HM19-359C		4717	-	4717	4717
Doassansiales	Rhizophosporaceae	<i>Rhizophospora</i>	<i>nymphaeae</i>	unkown	CBS 172.38	R	DQ831032	-	DQ831035	DQ831036
Entylomatales	Entylomataceae	<i>Tilletiopsis</i>	<i>lilacina</i>	plant	CBS 435.92=JCM5188	T	KP322984	JCM	KP323110	KP323112
Entylomatales	Entylomataceae	<i>Tilletiopsis</i>	<i>washingtonensis</i>	plant	CBS 544.50=JCM 8362	T	AJ235278	JCM	DQ835995	JCM
Exobasidiales	Brachybasidiaceae	<i>Dicellomyces</i>	<i>gloeosporus</i>	<i>Pleioblastus chino var. viridis</i>	TMIC 50099		AB427190	LC575093	LC575094	LC575092
Exobasidiales	Brachybasidiaceae	<i>Kordyana</i>	sp.	<i>Commelina communis</i>	HM17-828C		LC672673	1884	1884	1884
Exobasidiales	Brachybasidiaceae	<i>Meira</i>	<i>argovae</i>	plant	CBS 110053	T	AY158669	KP322922	KP323081	KP323139
Exobasidiales	Brachybasidiaceae	<i>Meira</i>	<i>geulakonigae</i>	plant	CBS 110052	T	NG_042394	KP322919	KP323083	KP323141
Exobasidiales	Brachybasidiaceae	<i>Yunzhangomyces</i>	<i>qinlingensis</i>	plant	CGMCC 2.4533	T	MN901729	MN901759	MN901785	MN901673
Exobasidiales	Cryptobasidiaceae	<i>Clinoconidium</i>	<i>inouyei</i>	<i>Machilus japonica</i>	MAFF 247176	T	4888	4888	4888	4888
Exobasidiales	Cryptobasidiaceae	<i>Clinoconidium</i>	<i>onumae</i>	<i>Cinnamomum tenuiflorum</i>	HM16-730C		600	600	600	600
Exobasidiales	Exobasidiaceae	<i>Arcticomyces</i>	<i>warmingii</i>	plant	CPC:36560=CBS 146033		MT223875	-	-	MT223708
Exobasidiales	Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>gracile</i>	<i>Camellia sasanqua</i>	HM18-624C	T	2242	2242	2242	2242
Exobasidiales	Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>miyabei</i>	<i>Rhododendron dauricum</i>	MAFF 238594	T	LC672660	2310	2310	2310
Exobasidiales	Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>vaccinii</i>	<i>Vaccinium vitis-idea</i>	DB160d		KP322983	KP322924	KP323076	KP323146
Exobasidiales	Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	var. <i>symploci-japonicae</i>	<i>Symplocos lucida</i>	HM16-747C	T	533	533	533	533
Exobasidiales	Graphiolaceae	<i>Graphiola</i>	<i>phoenisis</i>	<i>Phoenisis canariensis</i>	HM21-1332C		7083	7083	7083	7083
Exobasidiales	Laurobasidiaceae	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	<i>Cinnamomum tenuiflorum</i>	NBRC 31857	T	5277	5277	5277	5277
Exobasidiales	Laurobasidiaceae	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	insect	NBRC 112891=CBS 110050	T	5278	5278	5278	5278

Table 68 taxon samples

Family	Genus	species	Host Plant / Source	Voucher	type	LSU	ITS	RPB1	RPB2	TEF
Cryptobasidiaceae	<i>Clinoconidium</i>	<i>inouyei</i>	<i>Machilus japonica</i>	MAFF 247176	T	4888	4888	4888	4888	4888
Exobasidiaceae	<i>Clinoconidium</i>	<i>onumae</i>	<i>Cinnamomum tenuiflorum</i>	HM16-730C		600	LC522970	600	600	600
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>bisporum</i>	<i>Leucothoe grayana</i>	HM22-113C		7479	7479	7479	7479	7479
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>camelliae</i>	<i>Camellia japonica</i>	HM16-732C	T	727	727	727	727	727
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>caucasicum</i>	<i>Rhododendron aureum</i>	MAFF 238830		2313	2313	2313	2313	2313
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>cylindrosporium</i>	<i>R. macrosepalum</i>	MAFF 306197	R	5745	5745	5745	5745	5745
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>gracile</i>	<i>Camellia sasanqua</i>	HM18-624C	T	2242	2242	2242	2242	2242
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>japonicum</i>	<i>R. kaempferi</i>	HM21-487C		6319	6319	6319	6319	6319
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>lushanense</i>	<i>R. tschonoskii</i>	HM22-066C		7403	7403	7403	7403	7403
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>miyabei</i>	<i>R. dauricum</i>	MAFF 238594	T	LC672660	2310	2310	2310	2310
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>nobeyamense</i>	<i>R. wadanum</i>	MAFF 238596	R	2308	2308	2308	2308	2308
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>nudum</i>	<i>Camellia japonica</i>	HM16-746C	T	551	551	551	551	551
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>pentasporium</i>	<i>R. kaempferi</i>	HM21-486C	T	6317	6317	6317	6317	6317
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>rhododendri</i>	<i>R. sp.</i>	CBS 101457		DQ667151	DQ667153	DQ667155	DQ667154	DQ667156
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>rostrupii</i>	<i>Vaccinium japonicum</i>	HM18-126C		2529	2529	2529	2529	2529
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>shiraianum</i>	<i>R. degrobianum</i>	MAFF 238602	T	2311	2311	2311	2311	2311
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	sp.1	phylloplane	HM20-026C	T	4971	4971	4971	4971	4971
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	sp.2	<i>R. semibarbatum</i>	HM21-489C	T	6370	6370	6370	6370	6370
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	sp.3	<i>R. quinquefolium</i>	HM21-500C	T	6330	6330	6330	6330	6330
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	sp.4	<i>R. keiskei</i>	HM22-070C	T	7396	7396	7396	7396	7396
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	sp.5	<i>R. albrechtii</i>	HM22-112C	T	7478	7478	7478	7478	7478
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>vaccinii</i>	<i>Vaccinium vitis-idea</i>	DB160d		KP322983	KP322983	KP322924	KP323076	KP323146
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	var. <i>carpogenum</i>	<i>Symplocos lucida</i>	MAFF 238620	T	2312	2312	2312	2312	2312
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	var. <i>symploci-japonicae</i>	<i>Symplocos lucida</i>	HM16-747C	T	533	533	533	533	533
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>woronichinii</i>	<i>R. brachycarpum</i>	MAFF 238825	T	2307	2307	2307	2307	2307
Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	<i>yoshinagae</i>	<i>R. lagopus</i> var. <i>niphophilum</i>	HM17-834C		1975	1975	1975	1975	1975
Laurobasidiaceae	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	<i>Cinnamomum tenuiflorum</i>	NBRC 31857		5277	5277	5277	5277	5277
Laurobasidiaceae	<i>Laurobasidium</i>	<i>hachijoense</i>	insect	NBRC 112891=CBS 110050	T	5278	5278	5278	5278	5278

Table 69 variant rait (family)

	nucleotide			aminoacid		
	variant (bp)	hole length(bp)	%	variant (aa)	hole length(aa)	%
ITS	521	788	66.11675127	-	-	-
LSU	246	683	36.01756955	-	-	-
RPB1	374	576	64.93055556	116	192	60.41666667
RPB2	586	978	59.91820041	158	326	48.46625767
TEF	344	933	36.87031083	56	311	18.00643087

Table 70 variant rait (species)

	nucleotide			aminoacid		
	variant (bp)	hole length(bp)	%	variant (aa)	hole length(aa)	%
ITS	312	643	48.52255054	-	-	-
LSU	127	590	21.52542373	-	-	-
RPB1	303	597	50.75376884	76	199	38.19095477
RPB2	447	936	47.75641026	85	312	27.24358974
TEF	367	984	37.29674797	51	328	15.54878049

Table 71 list of *Exobasidium* host

Order	Family	Genus	fungal species
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Agauria</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Andromeda</i>	2
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Arbutus</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Arctostaphylos</i>	3
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Arctous</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Cassiope</i>	2
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Cavendishia</i>	2
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Chamaedaphne</i>	2
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Cyathodes</i>	2
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Disterigma</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Dracophyllum</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Empetrum</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Escallonia</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Gaultheria</i>	2
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Gaylussacia</i>	2
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Giseckia</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Lebetanthus</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Leucothoe</i> or <i>Eubotryoides</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Lyonia</i>	6
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Pentachondra</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Pernettya</i>	2
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Phylloduce</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Pieris</i>	5
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Rhododendron</i>	35
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Sphyrospermum</i>	1
Ericales	Exobasidiaceae	<i>Vaccinium</i>	23
Ericales	Theaceae	<i>Camellia</i>	9
Ericales	Theaceae	<i>Gordonia</i>	2
Ericales	Symplocaceae	<i>Symplocos</i>	5
Ericales	Pentaphragmataceae	<i>Eurya</i>	1
Polypodiales	Athyriaceae	<i>Athyrium</i>	1
Sapindales	Rutaceae	<i>Citrus</i>	1
Aquifoliales	Aquifoliaceae	<i>Ilex</i>	1
Caryophyllales	Caryophyllaceae	<i>Stellaria</i>	1
Unknown	Unknown	<i>Unknown</i>	4

総合考察

本研究はモチビョウキン目菌類による病害診断や防除の一助とするため、主に分類体系や進化体系の構築、また有性世代および無性世代の両世代を網羅した生活環の解明に取り組んだ。

分類学的研究に関する考察

体系構築

本目菌類は古くから分類学的研究が行われてきたが、複数の種の基準標本や基準菌株が保存されないまま、2000年まで主に形態学的特徴による分類学的研究が進められてきた (Begerow et al. 2002) . 2000年以降は本菌群の分類を熟知した研究者らによって同定された信頼性の高い標本をもとに、形態観察やシーケンスデータによる検討が行われている (Brewer et al. 2014, Kakishima et al. 2017a, b, c, 2020, Jiang & Kirschner 2016, Lee et al. 2015, Park et al. 2021a,b, Piątek et al. 2012, Piepenbring et al. 2020, Shibata et al. 2021, 2022a, b, Singh et al. 2020, Somrithipol et al. 2018) . そこで本研究では、最新の命名規約に沿った分類体系構築に向けて、可能な限り取得した基準標本もしくは基準菌株、さらにそれら標本の比較により得られた信頼性の高い標本の確立に努めた。その結果、これまで菌株が確立されておらず、DNA データも未決定な状態であった7種について新たな基準を設定した。これにより、先行研究の再検証と現行の分類体系における研究を可能とした。さらに、これまで決定されていなかった複数の DNA 領域

(*RPB1*, *RPB2*, *TEF*) を比較、検討したことで、モチビョウキン目菌類の分類体系の構築に大きく貢献すると考えた。なお、本研究では日本産モチビョウキ

ン目菌類の 38% (18/48 種) の種を扱った. 今後も我が国におけるモチビョウキン目菌類の分類体系構築に関する研究の継続が求められる.

分類・同定

モチビョウキン目菌類の分類は, 顕著な病徴を示す有性世代の形態形質に基づいて進められてきた. しかしながら, 分子系統解析の導入により本目菌類は担子器や担子孢子形成様式など, 系統的に異なるにも関わらず形態学的に相同で収斂した形質を持つことが明らかとなった (Begerow et al. 2002, Jiang & Kirschner 2016, Kakishima et al. 2017a). 本研究においてもその結果が支持されるとともに, さらに病徴について収斂した形態形質の存在を示唆した. 今後は形態分類に加え, 分子生物学的手法を組み合わせた研究が必要不可欠と考える. 分類学的に曖昧さを持ったデータを用いた研究は混乱を生じる. 今後も命名規約に則る基準標本を指定するとともに, それ由来の形態, DNA データの充実が本目菌類の分類および進化体系の構築に重要である.

モチビョウキン目最大の分類群である *Exobasidium* 属菌の分類・同定は, これまで歴史的に宿主や病徴を重視する学派と菌類の形態学的特徴を重視する学派に二分されていた (Nannfeldt 1981). しかし, 分子生物学的手法が取り入れられて以降, 宿主や病徴形質を分類の基準として重要視する傾向がみられる (Brewer et al. 2014). 複数 DNA 領域を用いた本研究の結果においても, 形態学的特徴には差が見られるものの病徴が共通形質と考えられる単系統群の存在を明らかにした. 以上から, 宿主植物と病徴形質を組み合わせることにより, さらに正確な種同定が可能であると考えられる. しかし, 宿主植物と病徴を用いた種同定には大きな課題も存在する. *Exobasidium* 属菌の分類は, すでに分類学的に体系化された宿主植物とは異なり, 本属菌類の病徴に関する表現

を明確に定義づけた報告はない。Nannfeldt (1981) の総説では、*Exobasidium* 属菌の分類学的な歴史的背景をまとめる中で、「病徴形質ごとに分類する」という発想を提起している。しかし、病徴形質ごとに明確な定義づけはなされず、より多くの種の観察による *Exobasidium* 属菌の熟練した分類学的経験が必要となる表現を用いていた (Fig. 74) 。例えば、葉に見られる病徴には1枚の葉に広汎に発生する場合と局所的に発生する場合が存在する。中でも局所的な病斑には、感染部位が明瞭でそこから同心円状に広がるような病徴 (localized symptom) と、感染部位が不明瞭な病斑は葉全身に至らず、葉の一部から半分にかけて葉脈に外接するような病徴 (circumscribed symptom) の2種類が該当する。Nannfeldt (1981) 以降、こうした病徴の概念を提案した論文はなく、受け入れられなかったものと考えられる。我が国の *Exobasidium* 属菌に関する研究も同様である。日本産 *Exobasidium* 属菌の病徴は、種ごとに詳細に記録されてきた (Hirata 1981a, b, 江塚 1990a, b, 1991a, b) 。しかし、Nannfeldt (1981) やこれに引用されている病徴形質との対応は見られなかった。日本植物病害大事典に掲載されたそれぞれの病名の解説欄から、病徴の形態学的な特徴を抜き出した結果を Table 72 に示した。現在、日本において *Exobasidium* 属菌が引き起こす病名として、もち病、ふくろもち病、玉もち病、裏白もち病、平もち病 (小斑平もち病) 、網もち病、粉もち病、てんぐ巢病の8病名が知られる。さらに、もち病の英名においても、ゴールの形態 (gall form) 、病徴の形成される範囲 (hymenium range) 、子実層の出現する軸方向 (hymenium forming axial) の項目はあるが、それらは観察者ごとに基準が異なるような不明瞭な点が挙げられる。例えば、シャクナゲ類とツバキ類の粉もち病は、それぞれ裏白もち病様と平もち病様で病徴の形成範囲が大きく異なり、多様な形質が包括されている (Table 73) 。このことから、病名と病徴

は、相関性が低いため、「病徴形質ごとに分類する」という発想はなかったものと推察される。今後は、それぞれの病名に江塚（1990a, b, 1991a, b）のような解剖学的な視点（植物組織内部における感染様式）も定義づける必要があると考える。

生態学的研究に関する考察

生活環

本研究の結果、モチビョウキン目菌類の無性世代は、有性世代が発生する宿主以外の植物上で生存していることが示唆され、さらにそれら植物の表面、特に葉面が潜在的な伝染源の1つとなり得る可能性を示した。今後はFig. 75に挙げるような有性世代と無性世代の生態的な関係性を明らかにする上で、「宿主種以外の植物にどのように伝播し、どのように宿主種に伝播されるのか」という、これまで注目されてこなかった生活環の解明が課題である。モチビョウキン目菌類は、有性世代形成時に植物体表面に子実層を露出するため風や虫（摂食や便乗）による、伝播が予想される（Fig. 76）。ここでは①風媒伝染と②昆虫類による虫媒伝染に関する仮説を提案する。

① 風媒伝染

Exobasidium 属菌ではチャの病原菌として知られる *E. reticulatum*, *E. vexans* の担子胞子が風媒伝染することが示されている（江塚・安藤 1994, 岡本・野中 1964）。岡本・野中（1964）によると、担子胞子の飛散は *E. reticulatum* の担子胞子において垂直方向に 4~6m, 水平方向に 35~50m 地点まで飛散すると推定している。そのため、この範囲内に宿主種以外の植物が生

育している可能性が高く，それらの植物の葉面が宿主植物以外の中間地点として機能している可能性がある．

② 虫媒伝染

Exobasidium 属菌や *Climoconidium* 属菌においては，以前から昆虫による分散の可能性が疑われていた (Abrahams 2022, 岸 1998, Fig. 77A-D) . 例えば，*Exobasidium* 属菌の子実層上には，ハエ目の幼虫がたびたび付着しているのを観察した (Fig. 77 E-I) . また，本研究で採集したサンプルに限らず，国立科学博物館や国立環境研究所に収蔵された標本上でも，これら幼虫はしばしば観察された (Fig. 77 J-L) . Abrahams (2022) はブルーベリー圃場内に生息するハエ目の昆虫体表から *Exobasidium* 属菌を分離・検出し，防虫ネットの設置により *Exobasidium* 属菌による病害の発生率が低下したことから本属菌の虫媒伝染の可能性を指摘した．*Climoconidium* 属菌では訪虫相がすでに調査され昆虫と菌類の関係性が注目されている (吉富 2017) . 中でも，ハエ目の数種は *Climoconidium* 属菌を餌としているとの記録もある (吉富 2017) . こうした背景を踏まえ，本属菌類と昆虫の生態的な関係性に関する著者の仮説を Fig. 76 に示した．*Climoconidium* 属菌における先行研究から，本属菌の菌えい，もしくは孢子を利用する昆虫類は，別の植物種を摂食する可能性が示唆されていた (吉富 2017) . このことから，昆虫類が孢子を新たな宿主に伝播するだけでなく，環境中の様々な植物上に伝播していると考えられる．

これまで，モチビョウキン目菌類とその宿主植物以外との関係性に目を向けた研究はほとんど見当たらない．本研究では，葉面の菌類を培養法により分離し，本目菌の生活環や多様性の解明を行った．これら結果をさらに充実するための1つの手法としては，培養によらない次世代シーケンサーを用いたメタゲ

ノム解析も有効と考えられる。本解析は、環境中に存在する DNA を網羅的に決定しフローラの構造解明が可能である。さらに、次世代シーケンサーによるゲノム解析は、個々の種に含まれる遺伝情報を解読することで、定説的な形質により特徴づけられてきた生物種を、定数的に特徴付けるのみならず、生態環境中における発現遺伝子を解析し生物間の関係性を解明することも可能になると考えられる。

植物病理学的研究に関する考察

本目菌類では 205 種中 193 種が植物病原菌として知られている。しかし、これまで植物病原性のメカニズムの解明には至っていない。この背景には、主に①接種試験による病徴再現が困難であること、②ゲノム情報の蓄積が遅れていることが挙げられる。

① 病徴再現試験

本目菌類では *Exobasidium* 属菌の数種に限り病徴再現試験が行われているが、発病に至る条件には不確定な要素もある。担子胞子を用いた病徴再現試験は *E. japonicum*, *E. maculosum*, *E. reticulatum*, *E. vexans* 等で報告されている (Abrahams 2022, 江塚・安藤 1994, Göttgens 1959, Graafland 1960, Ingram 2019, Sen et al. 2020)。しかし、本目菌類の担子胞子の形成期間は短いため、特に希少種については接種源の確保が困難である。さらに発病には感染後、数か月を要する場合もある (Lockhart 1958)。一方、江塚 (1955) は、ごく短期間培養した担子胞子由来菌株を利用し病徴を再現したと報告している。また、Göttgens (1959) や Graafland (1960) は培養後数年経過した菌株を用いて、葉身の展開が不十分な若い葉もしくは休眠芽に接種することで

病徴再現に成功している。本研究では、培養菌株を用いた接種試験による病徴再現には至っていない（未発表）。今後培養菌株を用いた病徴再現に関わる手法が確立されれば、自然発病における病徴を利用する必要がなく、本目菌類の病原性をより正確かつ簡易に調査することが可能となり、今後の本目菌類の植物病理学的な研究が飛躍的に発展する可能性がある。

② ゲノム情報の蓄積

本目菌類において全ゲノム情報の決定に至っている種は、205種のうち5種に留まり、*Exobasidium* 属、*Meira* 属、*Laurobasidium* 属の菌類に限られる（NCBI ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, JGI ; <https://genome.jgi.doe.gov/portal/>, accessed on November 4, 2022)。これは、前述のとおり菌株が確立されてこなかったことに起因すると考えられる。クロボキン目菌類においては、比較ゲノム解析の結果、病原性に関与するエフェクター遺伝子を宿主植物ごとに独自に獲得していることが明らかとなり、宿主特異性に関する議論を可能とした（Zuo 2019）。しかし、すでにゲノムが決定されたモチビョウキン目菌類については、同様な研究だけでなく、例えば近縁な系統関係にあり植物病原性解明のモデル生物であるクロボキン目菌類の *Ustilago maydis* との比較ゲノム解析や、病原性遺伝子は未解明である。今後、クロボキン目菌類と同様に、比較ゲノム解析や発生的な手法と組み合わせた遺伝子発現解析は、病害の発生メカニズム解明への貢献が期待される。病害の発生メカニズムの解明により、効果的な防除法や抵抗性品種の開発に有用な知見を与えられよう。

本研究では、上述したようなモチビョウキン目菌類の分類体系、生態、病原性について研究・議論する中で、特に研究に遅れが見られた分子生物学的研究を加えつつ、本目菌類の菌株を得ることを重視した。このことで、これまで議

論することが困難であった同一条件下における形態比較や資化性試験等が可能となり，ゲノム解析のみでは明らかにできない本目菌類の真の姿の一端も捉えることができたのではと考える．本研究で得られた標本や菌株は公的な研究機関に順次移管することで，本目菌類についての持続的な研究を可能なものとしている．今後，これら研究にゲノム解析も組み合わせることで，本目菌類の分類体系の再構築や生活環の解明がさらに進展し，植物病理学における正確な同定・診断のさらなる技術基盤の構築や防除法開発に貢献することが期待される．

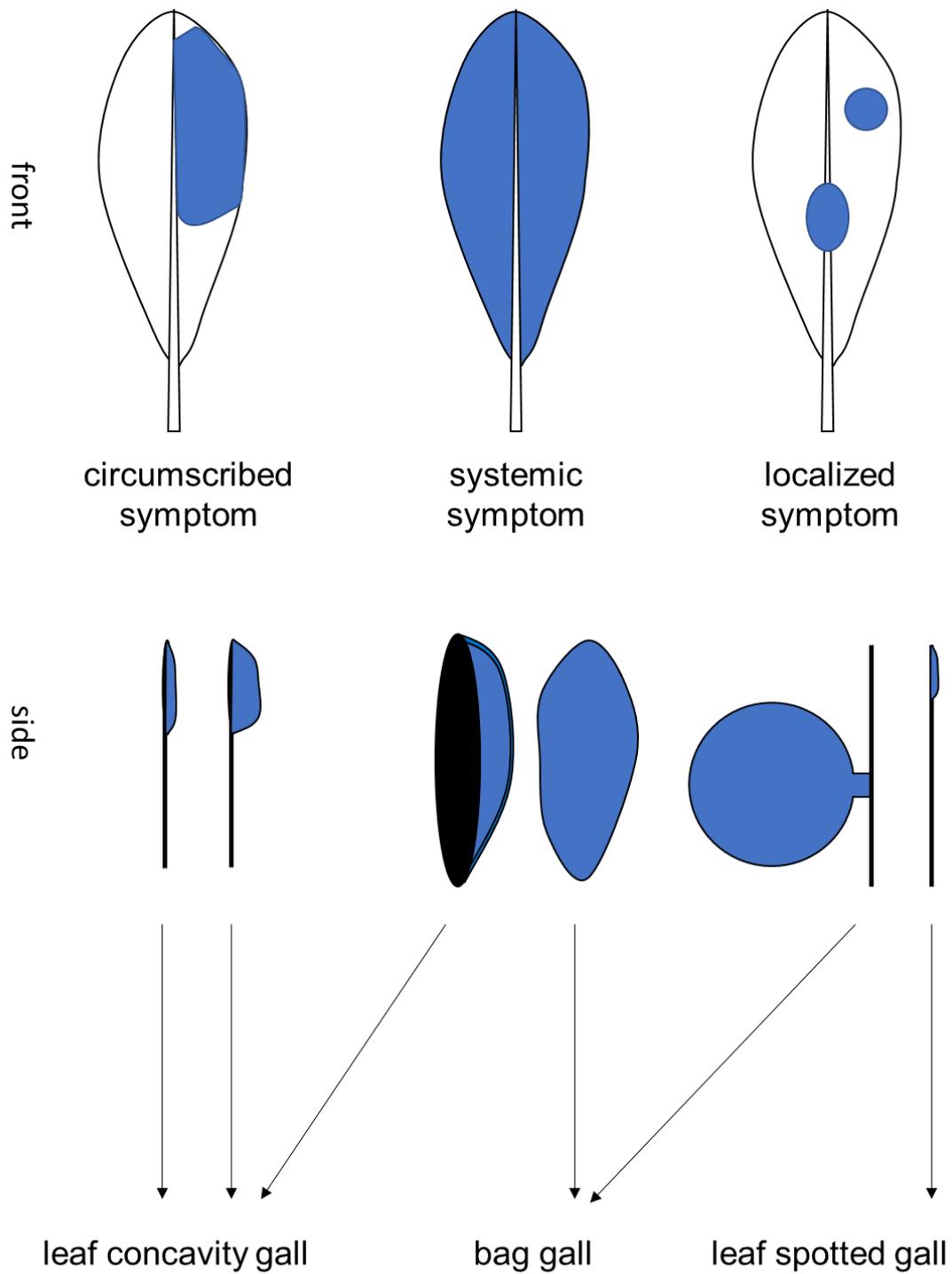
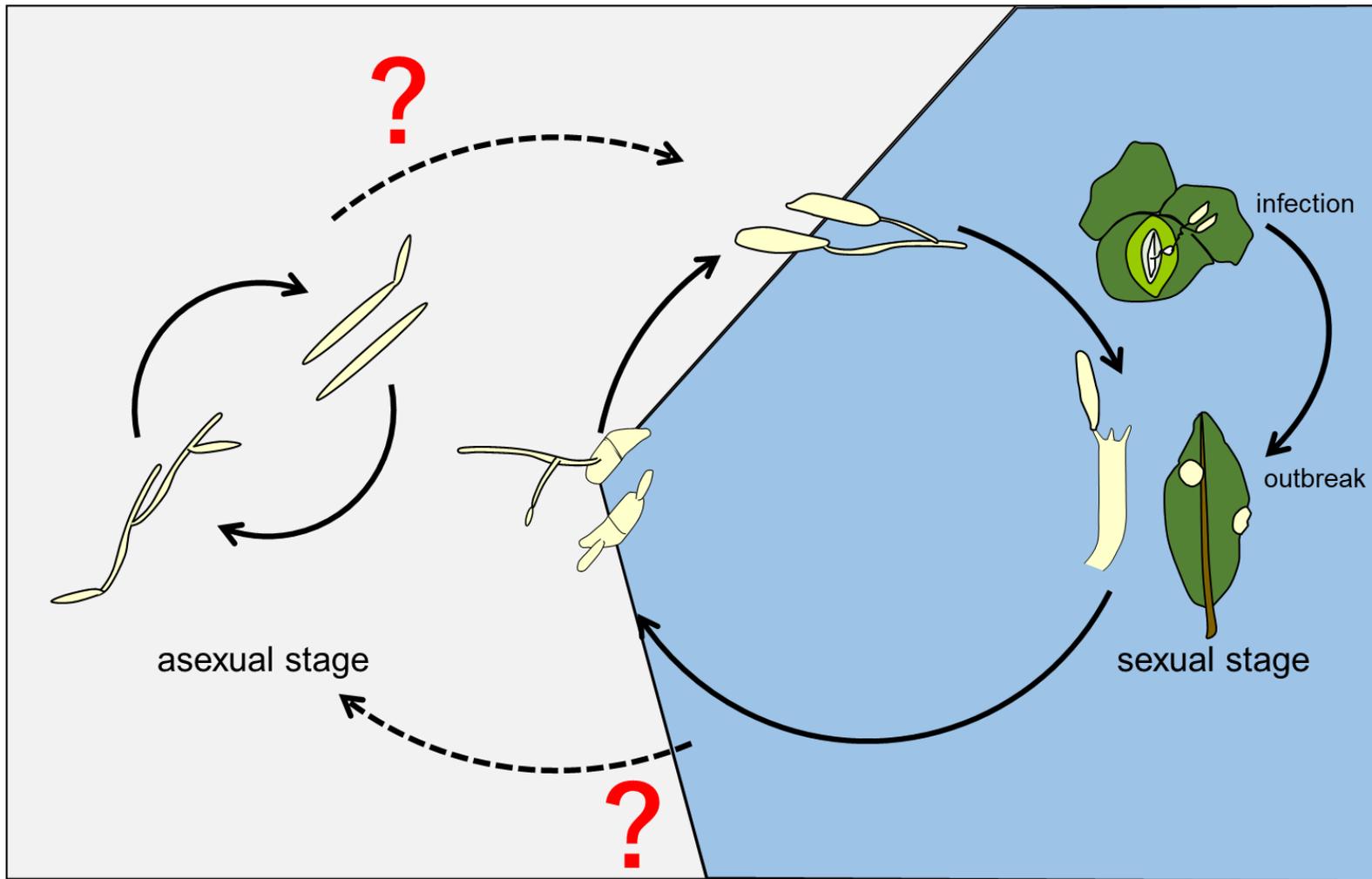


Fig. 74 Symptom characters based on Nannfeldt (1981)



Ito & Narisawa (1994), Ezuka & Ando (1994), Okamoto & Nonaka (1964), Begerow et al. (2014), Graffand (1960), Petch (1923), Sen et al. (2020)

Fig. 75 life cycle hypothesis of Exobasidiales in nature

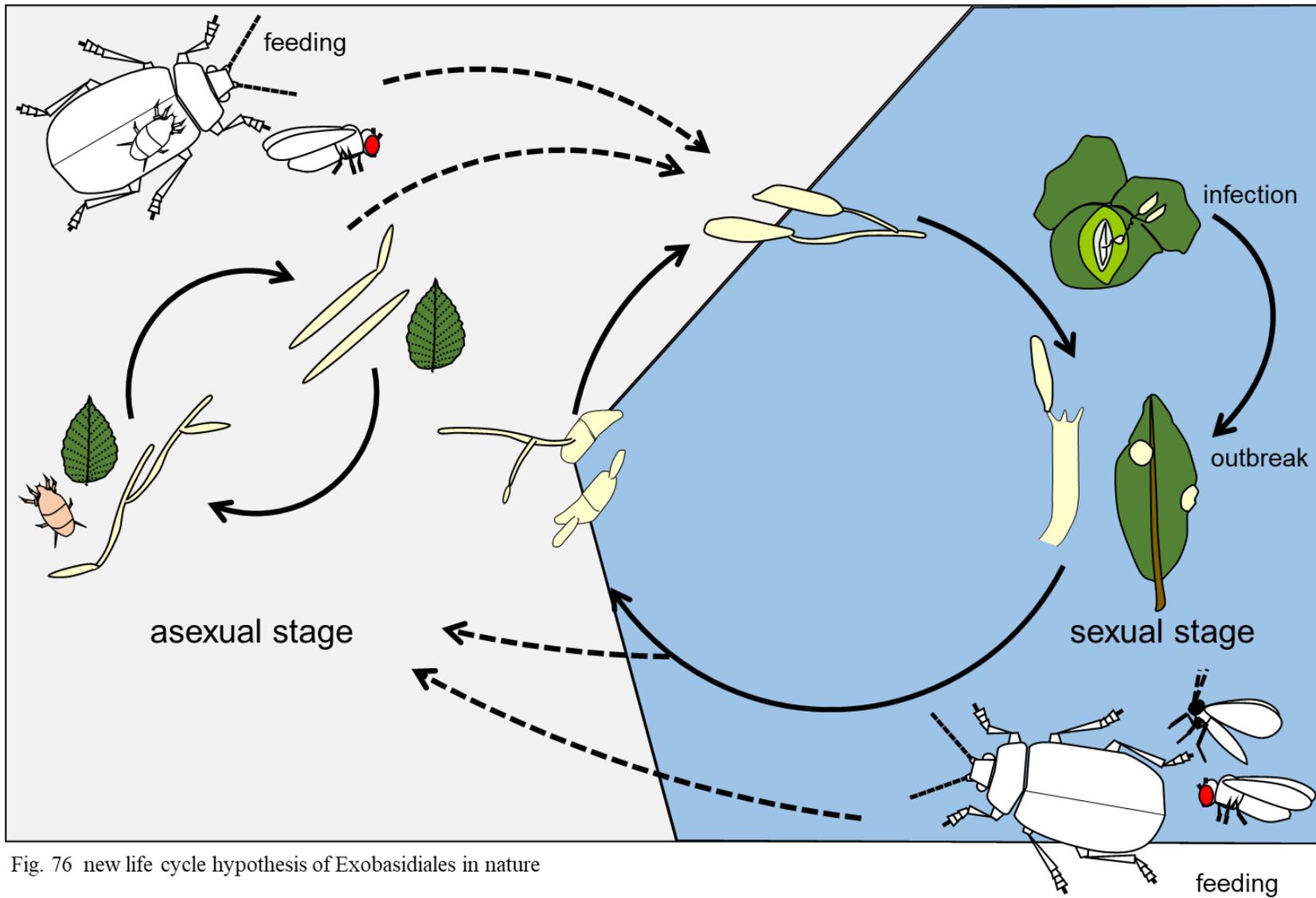


Fig. 76 new life cycle hypothesis of Exobasidiales in nature

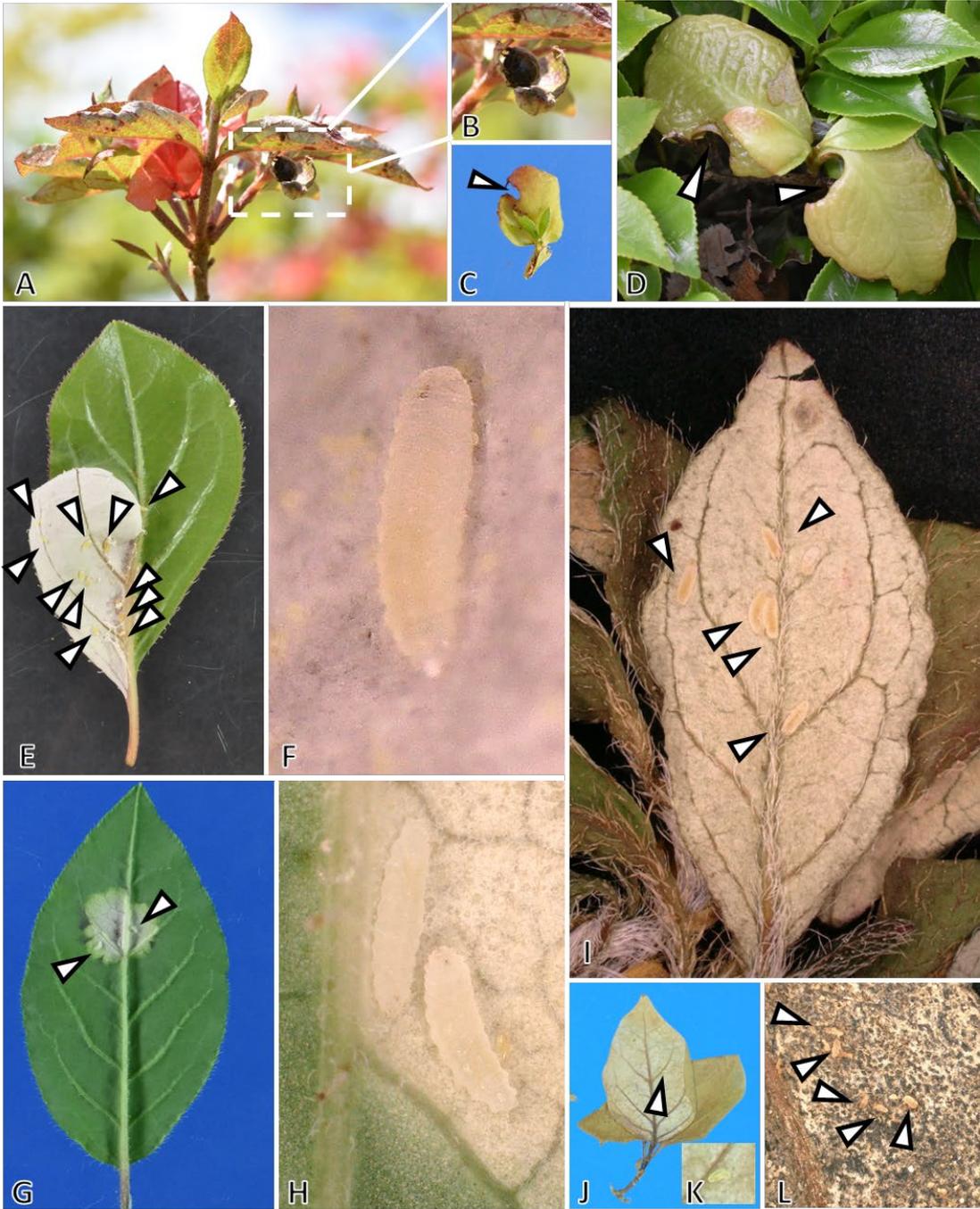


Fig. 77 Interaction of insects and *Exobasidium* species; a beetle feeding leaf covered hymenium (A, B), insect bite marks (arrows) on leaves (C, D), maggots (arrows) on *Exobasidium* hymenium (E, G, I-L), maggots (F, H)

Table 72 list of *Exobasidium* symptom variety1, 2

Japanese name	English name	gall form	hymenium range	hymenium forming axial	cell count and size	hymenium density	Exobasidium species
もち病	Leaf and stem gall, Leaf gall, Leaf blight, Leaf blister	bag-galls	locarized, systemic	epiphyllous or hypophyllous	increase cell layer and cell size	-	E. camelliae, E. japonicum, E. symploci-japonicae, E. pieridis
		leaf concavity galls	locarized, circumscribed	epiphyllous or hypophyllous	-	-	E. sakishimaense
				hypophyllous	increase cell layer and cell size	-	E. gracile
		ふくろもち病 玉もち病 裏白もち病	Giant gall Leaf gall	leaf spot galls	locarized	hypophyllous	no change in cell number, change in cell size
bag-galls	locarized			hypophyllous?	-	-	E. vaccinii
平もち病・小斑平もち病	Exobasidium leaf blight	leaf concavity galls	circumscribed, systemic	hypophyllous	-	-	E. vexans
		leaf spot galls	locarized	hypophyllous	-	-	E. sakataniense
網もち病 粉もち病	Net blister blight, Japanese exobasidium blight Leaf blister	leaf spot galls?	circumscribed	hypophyllous	-	-	E. giganteum
		leaf concavity galls	circumscribed, systemic	hypophyllous	-	-	E. hemisphaericum
てんぐ巢病	Witches' broom	leaf spot galls	locarized	hypophyllous	no change in cell number, change in cell size	-	E. asebuae, E. sasanqua, E. bisporum, E. yoshinagae, E. kawaense, E. pieridis-ovalifoliae
		Witches' broom, leaf concavity galls?	circumscribed, systemic	hypophyllous	increase cell layer, change in cell size	-	E. inconspicuum, E. dubium, E. miyabei
						low	E. japonicum var. hypophyllum, E. otanianum
						-	E. kishianum
						-	E. reticulatum
						-	E. caucasicum, E. shiraianum, E. woronichinii
						-	E. nudum
						-	E. pentasporium, E. nobeyamense

Table 73 list of *Exobasidium* symptom variety

Japanese name	English name	gall form	hymenium range	hymenium forming axial	cell count and size	hymenium density	Exobasidium species
もち病	Leaf and stem gall, Leaf gall, Leaf blight, Leaf blister	bag-galls	locarized, systemic	epiphyllous or hypophyllous	increase cell layer and cell size	-	E. camelliae, E. japonicum, E. symploci-japonicae, E. pieridis
		leaf concavity galls	locarized, circumscribed	epiphyllous or hypophyllous	-	-	E. sakishimaense
				hypophyllous	increase cell layer and cell size	-	E. gracile
		ふくろもち病 玉もち病 裏白もち病	Giant gall Leaf gall	leaf spot galls	locarized	hypophyllous	no change in cell number, change in cell size
bag-galls	locarized			hypophyllous?	-	-	E. vaccinii
平もち病・小斑平もち病	Exobasidium leaf blight	leaf concavity galls	circumscribed, systemic	hypophyllous	-	-	E. vexans
		leaf spot galls	locarized	hypophyllous	-	-	E. sakataniense
網もち病 粉もち病	Net blister blight, Japanese exobasidium blight Leaf blister	leaf spot galls?	circumscribed	hypophyllous	-	-	E. giganteum
		leaf concavity galls	circumscribed, systemic	hypophyllous	-	-	E. hemisphaericum
てんぐ巢病	Witches' broom	leaf spot galls	locarized	hypophyllous	no change in cell number, change in cell size	-	E. asebuae, E. sasanqua, E. bisporum, E. yoshinagae, E. kawaense, E. pieridis-ovalifoliae
		Witches' broom, leaf concavity galls?	circumscribed, systemic	hypophyllous	increase cell layer, change in cell size	-	E. inconspicuum, E. dubium, E. miyabei
						low	E. japonicum var. hypophyllum, E. otanianum
						-	E. kishianum
						-	E. reticulatum
						-	E. caucasicum, E. shiraianum, E. woronichinii
						-	E. nudum
						-	E. pentasporium, E. nobeyamense

要旨

モチビョウキン目菌類は担子菌門クロボキン亜門モチビョウキン綱に含まれ、5科、21属205種からなる。本目菌類の多くは、植物上に有性世代を形成し、その際に奇形、変色、葉枯れ症状を引き起こすことから植物病原菌として古くから認識されてきた。これら菌類は多様な宿主植物上に存在し、また様々な気候をもつ地域に分布するため、世界各国で発生が報告されている。特に、我が国では、古くから多数の研究者により検討が行われた結果、33種が新種として記載され、さらに15種の既知種の存在が知られている。モチビョウキン目菌類の多くは、植物に対して短期的に甚大な被害をもたらすことは稀である。しかし、いくつかの病害については、経済的な被害を起こす場合もある。加えて、本目菌類は、世界各国において庭園等の観賞用植物として利用される *Rhododendron* 属植物や *Camellia* 属植物の開花期に奇形症状やてんぐ巣症状を起こし、景観を損ねることで文化的価値の低下をもたらす場合もある。

このような植物病原菌の防除には正確な同定・診断が必要不可欠である。しかし、その基盤となる本「目」の分類体系は、DNAの塩基配列による分子系統解析が進んだ現在でも不安定である。例えば、本目最大の系統群である *Exobasidium* 属菌は、宿主植物の器官に奇形を誘導し人目を惹く顕著なゴールを形成することから、1662年にはすでにその病徴が知られていたモチビョウキン目菌類を代表する菌群であるが、長きにわたり宿主や病徴を重視する学派と、菌の形態的特徴による分類を重視する学派の2つが存在し、分類学的に混乱した経緯をもつ。一方、2000年代に入り自然界における存在が明らかとなったモチビョウキン目菌類の無性世代は、多くの種でその形態的特徴が乏しく、分離菌株も少ないことから、分類学的研究の遅れだけでなく、環境中における

生態的な役割についても不明な点が多い。しかし、近年の分子系統解析により有性世代が不明な複数の酵母様菌類が本目に含まれることが報告されている。さらに、これらの無性世代の系統群の一部は、植物病原菌としても知られている。このような、新たなモチビョウキン目菌類の両世代の特徴や関係性については、今後も確認される可能性が高く、このことで本目菌類の無性世代における様々な役割が少しずつ明らかになると考えられる。

以上の背景から、本研究ではこれら植物病理学的、生態学的、そして分類学的な課題を解決し、モチビョウキン目菌類による病害診断や防除の一助とするため、全国各地で本目菌類の有性世代および無性世代の探索を行いながら、特に被害の深刻な病害についてその病害診断を行った（第2, 3章）。また、それらモチビョウキン目菌類の基準標本の指定を行うとともに（第1章）、DNA塩基配列およびアミノ酸配列を用いた系統樹を作成することで、進化学的なアプローチも試みた（第4章）。そしてそれら結果をもとに、分類体系の再構築、また両世代を網羅した生活環の解明を行うことで、正確な同定・診断の基盤技術の構築を目的とした。

第1章では、日本で記載されたモチビョウキン目菌類に対して、国内標本庫の探索、タイプロカリティーにおける新たな標本の採集を行い、必要に応じて基準標本の指定を行った。そして、新たな基準標本から培養菌株の確立やタイプシーケンスを決定することで、学名を最新の命名規約に則った安定的なモチビョウキン目菌類の分類・同定に関わる基盤技術の構築に貢献することを目指した。その結果、本研究においてモチビョウキン目菌類の *Exobasidium* 属 7 種 (*E. pentasporium*, *E. gracile*, *E. camelliae*, *E. nudum*, *E. symploci-japonicae* var. *symploci-japonicae*, *E. machilii*, *Cli. inouyei*) について

最新の命名規約に従い、基準標本や菌株の確立、そしてその基準標本や菌株から得られた信頼性の高い DNA 塩基配列情報を取得した。これまで、国内外において、これら病原菌による宿主植物へ甚大な被害はほとんど報告されていないものの、その宿主植物は世界中に比較的広域に分布している。このことから、本研究で扱った病原菌が、今後の宿主植物の老齢化や環境変化、さらに貿易による流通を通じた移動により感染し、被害が拡大する可能性が危惧される。今回の結果は今後の国内外の研究者らによる同定や分類学的概念のすり合わせを行う意味でも重要な結果と考える。

第 2 章では、日本国内のモチビョウキン目菌類の発生が顕著な 5~6 月に集中的に *Exobasidium* 属菌を中心とした有性世代とその病害の探索を行い、病徴の観察および原因菌の解明により病害診断を行うことで、植物病理学的な知見の充実を目指した。ヨウラクツツジ類、アカヤシオ、バイカツツジ、シロヤシオ、コメツツジ、ヤマツツジ、カナリーヤシに発生した本目菌類の有性世代による病害を扱った結果、ヨウラクツツジ類とアカヤシオの被害をツツジ類もち病、バイカツツジの被害をツツジ類平もち病、シロヤシオとコメツツジの被害をツツジ類裏白もち病、ヤマツツジの被害をツツジ類てんぐ巢病、カナリーヤシの被害をヤシ類黒つぼ病とそれぞれ診断した。また、ヨウラクツツジ、アカヤシオ、シロヤシオ、コメツツジはそれぞれの病害の新宿主と判断した。さらに、少なくとも *Exobasidium* 属菌 1 種の病原追加を示唆した。これらにより、本目菌類の病害診断に必要な基礎情報を蓄積できたと考える。また、今回の病原菌 6 種については、未記載種の可能性のある 1 種および日本新産種 1 種が含まれていた。加えて、それら病原菌のうちアカヤシオに観察された *E. japonicum* 以外、5 種の rDNA-ITS と LSU 領域のシーケンスデータを取得するこ

とに成功した。以上から、我が国に発生するモチビョウキン目菌類の多様性解明にも貢献できたと考える。

第3章では、近年のDNAを用いた多様性解析の結果からモチビョウキン目菌類の無性世代の検出頻度が高い植物表面（葉面，果面）を中心に，分離菌を取得し，その形態観察，複数DNA領域を用いた分子生物学的解析および生理学的性状試験による詳細な種同定を行うことでその多様性の解明を目指した。さらに，ナシの汚れ果症状から分離されたモチビョウキン目菌類の病原性についても検討した。その結果，本目菌類の無性世代として未記載種4種，日本新産種1種を含む5属12種の菌類を発見した。このことで，日本国内における様々なモチビョウキン目菌類の無性世代が環境中，特に植物表面に存在することを明らかにした。また，自然環境下で有性世代の生活環のみが明らかとなっていた種の存在を植物表面から新たに見出したことで，その表面が本目菌類の伝染経路の1つになりうることを示唆した。さらに，同じ植物サンプル上に塩基配列や生理学的性質が異なる種内種が存在したことから，葉面は遺伝的多様性のプールとして貢献している可能性も考えられた。

第4章においては，モチビョウキン目の進化系統について検討を行うため，前章までに採集した標本，確立した菌株を用いて複数のDNA領域（LSU，ITS，*RPB1*，*RPB2*，*TEF1- α* ）を決定し，最尤法による分子系統解析を行った。また，単一DNA領域を用いた従来法として用いられていた近隣結合（NJ）法と，近年系統解析手法として主流となっている最尤法による結果の違いを確認するとともに，分類群（タクサ）数や解析方法による系統解析結果の違いを把握するため，rDNA-LSU領域を用いた解析を行った。その結果，これまで用いられてきたITSやLSU領域だけでなく，その他複数のDNA領域による分子系統解析を

試みたことで、科間および種間における分子系統樹の支持率の飛躍的な改善と、モチビョウキン目菌類の新たな進化系統の一端を明らかにすることができた。特に、本目菌類の進化と宿主植物および病徴に関する考察により、今後の病原性獲得に関する研究において有用な情報を得ることができた。これら進化系統の解明は、本目菌類の同定の強固な基盤の構築に貢献するのみならず、植物病原性獲得、多様な形態へと進化した背景を明らかにすることへの貢献が期待される。

本研究ではモチビョウキン目菌類の分類体系、生態、病原性について研究・議論する中で、DNA塩基配列による分子生物学的研究を加えつつ、本目菌類の菌株を得ることにも重視し研究を行った。このことで、これまで議論することが困難であった同一条件下における形態比較や資化性試験等が可能となり、ゲノム解析のみでは明らかにできない本目菌類の真の姿の一端も捉えることができたのではと考える。今後は、これら研究にゲノム解析も組み合わせることで、モチビョウキン目菌類の分類体系の再構築や生活環の解明がさらに進み、引いては植物病理学における正確な同定・診断の技術基盤の構築ならびに防除法開発に貢献することが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導・ご援助いただいた廣岡裕吏先生や大島研郎先生、佐野俊夫先生、中山喜一先生を始め、国立研究開発法人理化学研究所 バイオリソース研究センター 遠藤力也様、橋本 陽様、佐藤 匠様、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構国立研究開発法人 馬場隆士様、森林総合研究所 安藤裕萌様、東京都小笠原支庁 小野 剛様、飯塚亮様、都レンジャー 市岡洋三様、竹中 泉様、向 哲嗣様、宮川五葉様、小笠原野生生物研究会 小林佳子様、国立科学博物館 細矢 剛様、遠藤拓洋様、栃木県農業試験場 山城都様・山崎周一郎様、調査にご協力頂いた生産者の皆様、山梨県平松様、雲松園株式会社の皆様、元 島根県林業技術センター 周藤靖雄様、神奈川県立生命の星・地球博物館 折原貴道様、菌類ボランティアの皆様方、筑波大学 柿畠 眞先生、岡根泉先生、新潟食料農業大学 佐藤豊三先生、石川県立大学 田中栄爾先生、筑波大学 出川洋介先生、三重大学 中島千晴先生、岐阜大学 景山幸二先生、日恵野綾香先生、東京大学 竹本周平先生、山田利博先生、渡辺雅弘先生、龍谷大学 岸本圭子先生、宮崎大学 田中龍聖先生、高木正博先生、東京大学 板垣ひより様、法政大学応用植物科学科の皆様は厚く御礼申し上げます。

さらに、親身なご指導、また多くの相談に乗ってくださった植物菌類病診断研究室の先輩方、菌学若手の会の皆様方、互いに協力し合い、切磋琢磨しあった同期生の皆様、後輩方、大学・研究生活を支え温かく見守ってくれた家族に心から感謝いたします。

本研究の一部は日本科学協会 笹川科学研究助成による援助を受けたものです。

参考文献

- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. IEEE transactions on automatic control, 19, 716-723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Abrahams, A. D. (2022). Insight into ploidy variation, the complicated life cycle, and genomic architecture of *Exobasidium maculosum*, cause of *Exobasidium* leaf and fruit spot of blueberry. University of Georgia. USA.
- Albu, S. (2012). A survey of ballistosporic phylloplane yeasts in Baton Rouge, Louisiana. Louisiana State University. USA. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/3017.
- Begerow, D., Bauer, R. & Oberwinkler, F. (2002). The Exobasidiales: an evolutionary hypothesis. Mycological Research, 1, 187-199.
- Begerow, D, Schäfer, A. M., Kellner, R., Yorkov, A., Kemler, M., Oberwinkler, F. & Bauer, R. (2014). Ustilaginomycotina. In: The mycota, Vol. VII, Part A: systematics and evolution (McLaughlin, D. J. & Spatafora, J. W. eds), 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin: 295-329. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9_11.
- Boekhout, T., Theelen, B., Houbraken, J., Robert, V., Scorzetti, G., Gafni, A., Gerson, U. & Sztejnberg, A. (2003). Novel anamorphic mite-associated fungi belonging to the Ustilaginomycetes: *Meira geulakonigii* gen. nov., sp. nov., *Meira argovae* sp. nov. and *Acaromyces ingoldii* gen. nov., sp. nov.. International Journal of

Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(5), 1655-1664.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02434-0>.

Brewer, M. T., Turner, A. N., Brannen, P. M., Cline, W. O. & Richardson E. A. (2014). *Exobasidium maculosum*, a New Species Causing Leaf and Fruit Spots on Blueberry in the Southeastern USA and Its Relationship with Other *Exobasidium* spp. Parasitic to Blueberry and Cranberry. *Mycologia*, 106(3), 415-423.

<https://doi.org/10.3852/13-202>.

Cao, Y., Li, P. D., Zhao, J., Wang, H. K., Jeewon, R., Bhojroo, V., Aruna, B., Lin F. C. & Wang, Q. (2018). Morph-molecular characterization of *Meira nicotianae* sp. nov., a novel basidiomycetous, anamorphic yeast-like fungus associated with growth improvement in tobacco plant. *Phytotaxa*, 365(2), 169.

<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.365.2.4>.

Carbone, I. & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556. <https://doi.org/10.2307/3761358>.

Choi, Y. J., & Thines, M. (2015). Host Jumps and Radiation, Not Co-Divergence Drives Diversification of Obligate Pathogens. A Case Study in Downy Mildews and Asteraceae. *PLOS ONE* 10(7), e0133655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133655>.

Cline, W. O. (1998). An *Exobasidium* disease of fruit and leaves of highbush blueberry. *Plant Disease*, 82, 1064.

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012).
jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing.
Nature Methods, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- de Hoog G. S. & Ende A. H. G. Gerrits. (1998). Molecular diagnostics
of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. Mycoses, 41, 183-
189. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00321.x>
- Denchev, C. M. & Denchev T. T. (2021). Validation of the generic names
Meira and *Acaromyces* and nineteen species names of basidiomycetous
yeasts. MYCOBIOTA, 11, 1-10.
<https://doi.org/10.12664/mycobiota.2021.11.01>.
- Dong, Z., Liu, W., Zhou, D., Li, P., Wang, T., Sun, Y., Zhou, Y.,
Wang, J., Wang, B. & Chen, Y. (2019). Bioactive exopolysaccharides
reveal *Camellia oleifera* infected by the fungus *Exobasidium gracile*
could have a functional use. Molecules (Basel, Switzerland), 24(11).
[10.3390/molecules24112048](https://doi.org/10.3390/molecules24112048)
- 江塚昭典 (1955). 茶餅病及びツツジ餅病の人工培養. 東海近畿農業試験場研
究報告茶業部, 3, 28-53.
- 江塚昭典・原摂祐 (1959). 観賞植物のモチ病 3 種. 農業及び園芸, 34(9),
1352-1354.
- 江塚昭典(1990a). Notes on some species of *Exobasidium* in Japan (I) [in
Japanese]. 日本菌学会報, 31, 375-388.
- 江塚昭典(1990b). Notes on some species of *Exobasidium* in Japan (II)
[in Japanese]. 日本菌学会報, 31, 439-455.

- Ezuka, A. (1991a). Notes on some species of *Exobasidium* in Japan (III). [in Japanese]. 日本菌学会報, 32, 71-86.
- 江塚昭典(1991b). Notes on some species of *Exobasidium* in Japan (IV) [in Japanese]. 日本菌学会報, 32, 169-185.
- 江塚昭典, 安藤康雄 (1994). チャの病害. 日本植物防疫協会
- Farr, D. F. & Rossman, A. Y. (2021). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm>. Retrieved October 30, 2021.
- Fonseca, Á. & Inácio. J. (2006). Phylloplane yeasts. Biodiversity and ecophysiology of yeasts, In: Péter, G. & Rosa, C. (eds) The Yeast Handbook. (pp 263-301). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_13.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118.
- GBIF.org (2022), GBIF Home Page. Available from: <https://www.gbif.org>, 2022年4月26日時点
- Gillespie, E. & Kron, K. (2010). Molecular phylogenetic relationships and a revised classification of the subfamily Ericoideae (Ericaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56 (1), 343-354. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.02.028>
- Graafland, W. (1960). The parasitism of *Exobasidium japonicum* Shir. on azalea. *Acta Botanica Neerland*, 9, 347-379.

- Göttgens, E. (1959). Untersuchungen über die Physiologie der Entwicklung von *Exobasidium azaleae* Peck. und seine Infektion der Wirtspflanzen unter besonderer Berücksichtigung der gallenbildenden Wirkstoffe. *Phytopathologische Zeitschrift*, 38, 394-426.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Li, Z. & Guo, L. (2009). Three new species of *Exobasidium* (Exobasidiales) from China. *Mycotaxon*, 107, 215-220.
- Hennings, P. (1900) *Fungi japonici*. *Botanische Jahrbücher für Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 28, 259-280.
- Hennings, P. (1902). *Fungi japonici*. III. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 32, 34-46.
- Hennings, P. (1904). Einige neue Pilze aus Japan II. *Hedwigia*, 43, 150-153.
- 飛川みのり, 遠藤力也, 竹内祐子, 二井一禎 (2014). 抽水植物ミツガシワから分離された酵母様菌 *Meira nashicola*. *日本菌学会報*, 55, 5-11. <https://doi.org/10.18962/jjom.jjom.H25-05>.
- Hino, I. & Nagaoka, E. (1931). *Cintractia machili* n. sp., a new smut of *Machilus longifolia* Blume and *M. thunbergii* Sieb. et Zucc. var. *glaucescens* Blume. *Bulletin of Miyazaki College of Agriculture and Forestry*, 3, 49-60.
- Hirata, S. (1979). A new species of the genus *Sphacelotheca* causing smut galls on *Cinnamomum daphnoides* Sieb. et Zucc. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University* 26, 123-125.

- Hirata, S. (1981a). A new of *Exobasidium* causing giant galls on *Camellia japonica*. Transactions of the Mycological Society of Japan, 22, 393-395.
- Hirata, S. (1981b). A new species of *Exobasidium* parasitic on *Symplocos theophrastaefolia*. Transactions of the Mycological Society of Japan, 22, 61-63.
- Hoffmann, M. (1662). Florae altdorffinae deliciae sylvestres sive catalogus plantarum in agro altdorffino locisque vicinis sponte nascentium. Hagen, Altdorffi.
- 堀江博道, 高野喜八郎, 植松清次, 吉松英明, 池田二三高 (2001). 花と緑の病害図鑑. 全国農村教育協会.
- Iijima, T., Kakishima, M. & Otani, Y. (1985). A new species of *Exobasidium* on *Cinnamomum japonicum* Sieb. Transactions of the Mycological Society of Japan, 26, 161-67.
- Ingram, R. J., Ludwig, H. D. & Scherm, H. (2019). Epidemiology of *Exobasidium* leaf and fruit spot of rabbiteye blueberry: pathogen overwintering, primary infection, and disease progression on leaves and fruit. Plant Disease, 103(6), 1293-1301.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1534-RE>.
- Ito, S. (1935). Notae Mycologicae Asiae Orientaris II. Transactions of the Sapporo Natural History Society, 14(2), 87-96.
- Ito, S. (1955). Mycological Flora of Japan [in Japanese]. 2(4), pp. 52-53. Yokendo.

- Ito, S. & Otani, Y. (1958). Two new species of *Exobasidium*. 日本菌学会報, 8, 3-4.
- Ito, S. & Sawada, K. (1912). A new *Exobasidium*-disease of the tea-plant. Bot. Mag. Tokyo, 26, 237-241.
- Jiang, M. G. & Kirschner R. (2016). Unraveling two east Asian species of *Climoconidium* (Cryptobasidiaceae). Mycoscience, 57(6), 440-447.
<https://doi.org/10.1016/j.myc.2016.07.007>.
- Kakishima, M., Ji, J. X., Nagao, H., Wang, Q., & Denchev, C. M. (2017a). *Climoconidium globosum*, nom. nov. (Cryptobasidiaceae) producing galls on fruits of *Cinnamomum daphnoides* in Japan. Phytotaxa, 299(2): 267. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.299.2.11>.
- Kakishima, M., Nagao, H. & Denchev, C. M. (2017b). *Laurobasidium hachijoense*, comb. Nov. (Cryptobasidiaceae) causing aerial root-like galls on *Cinnamomum japonicum* in Japan. Phytotaxa, 303(1), 97.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.303.1.11>.
- Kakishima, M., Nagao, H., Ji, J. X., Sun, Y. & Denchev, C. M. (2017c). *Climoconidium onumae*, comb. nov. (Cryptobasidiaceae) producing galls on shoot buds of *Cinnamomum tenuifolium* in Japan. Phytotaxa, 313(2), 175. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.313.2.3>.
- Kakishima, M., Shibata, S. & Hirooka, Y. (2020). *Climoconidium inouyei* comb. nov. (Cryptobasidiaceae), producing galls on shoot buds of *Machilus japonica* in Japan. Phytotaxa, 450(2), 199-208.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.450.2.5>.

- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011) The yeasts, a taxonomic study, 5th edn. Elsevier Science Publication, Amsterdam
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772-780.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kirschner, R. (2018). Fungi on the leaf - a contribution towards a review of phyllosphere microbiology from the mycological perspective. *Biosystematics and Ecology Series*, 34, 433-448.
- 岸國平 (1998). 日本植物病害大事典. 東京全国農村教育協会.
- Kobayashi, Y. (1952). On the genus *Graphiola* found in Japan. *Ngaoa*, 1, 36.
- Kobayashi, Y. (1971). Mycological reports from New Guinea and the Solomon Islands (1-11). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B Botany*, 14(3), 367-551.
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RaxML-NG: a fast, scalable, and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35, 4453-4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- 草野俊助 (1907). クロキノ餅病二就テ. *植物学雑誌*. 244, 138-139.
- Lee, C. K., Lee, S. H., Shin, H. D. & Park, J.H. (2015) First report of *Exobasidium gracile* causing hypertrophied leaves of *Camellia sasanqua* in South Korea. *Forest Pathology*, 45(3), 258-261.
<https://doi.org/10.1111/efp.12184>.

- Li, Y. Y., Wang, M. M., Groenewald, M., Li, A. H., Guo, Y. T., Wu, F., Zhang, B. Q., ... & Begerw, D. (2022). Proposal of two new combinations, twenty new species, four new genera, one new family, and one new order for the anamorphic Basidiomycetous yeast species in Ustilaginomycotina. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.777338>.
- Limtong, S., Polburee, P., Chamnanpa, T., Khunnamwong, P. & Limtong, P. (2017). *Meira siamensis* sp. nov., a novel anamorphic Ustilaginomycetous yeast species isolated from the vetiver grass phylloplane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2418-2422. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001969>.
- Ling, L. (1953). The Ustilaginales of China. *Farlowia*, 4, 305-351.
- Liu, Y. J., Whelen, S. & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1799-1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>.
- Mabbett, T. (2016). Epidemiology and management of *Exobasidium vexans* (blister blight disease) on *Camellia sinensis* (tea). 58(2), 114-116
- Maddison, W. P. & Maddison, D. R. (2017). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis Version 3.31. [https:// www. Mesqu itepr oject. org](https://www.Mesquiteproject.org).
- Matheny, P., Gossman, J. A., Zalar, P., Kumar T. K. A. & Hibbett D. S. (2006). Resolving the Phylogenetic Position of the

Wallemiomycetes: An Enigmatic Major Lineage of Basidiomycota.

Canadian Journal of Botany, 84(12), 1794-1805.

<https://doi.org/10.1139/b06-128>.

McNabb (1962). The genus *Exobasidium* in New Zealand. Transactions of the Royal Society of New Zealand. 88(4), 259-268

Nagao, H., Ezuka, A., Ohkubo, H. & Kakishima, M. (2001). A new species of *Exobasidium* causing Witches' broom on *Rhododendron wadanum*.

Mycoscience, 42(6), 549-554. <https://doi.org/10.1007/BF02460953>.

Nagao, H., Kakishima, M., Akimoto, M., Kishi, K. & Ezuka, A. (2003a).

Exobasidium dubium and *E. miyabei* sp. nov. causing *Exobasidium* leaf blisters on *Rhododendron* spp. in Japan. Mycoscience, 44(1), 1-9.

<https://doi.org/10.1007/S10267-002-0068-X>.

Nagao, H., Kakishima, M., Akimoto, M., Ogawa, S. & Sato, T. (2003b).

Exobasidium symploci-japonicae var. *carpogenum* var. nov. causing *Exobasidium* fruit deformation on *Symplocos lucida* in Japan.

Mycoscience, 44(5), 369-375. <https://doi.org/10.1007/S10267-003-0126-Z>.

Nagao, H., Kakishima, M. & Sato, T. (2004a). Three species of

Exobasidium causing *Exobasidium* leaf blight on subgenus Hymenanthus, *Rhododendron* spp., in Japan. Mycoscience, 45(2), 85-95.

<https://doi.org/10.1007/S10267-003-0162-8>.

Nagao, H., Kakishima, M., Kurogi, S. & Sato, T. (2004b). Taxonomy of

Exobasidium otanianum causing *Exobasidium* leaf blight on

Rhododendron species in Japan. *Mycoscience*, 45(4), 245-250.

<https://doi.org/10.1007/S10267-004-0181-0>.

Nagao, H., Sato, T., Ezuka, A., Harada, Y. & Kakishima, M. (2006). Two new species of *Exobasidium* causing *Exobasidium* diseases on *Vaccinium* spp. in Japan. *Mycoscience*, 47(5), 277-283.

<https://doi.org/10.1007/S10267-006-0307-7>.

難波成任 (2008). 植物医科学 (上) . 養賢堂

Nannfeldt, J. A. (1981). *Exobasidium*: a taxonomic reassessment applied to the European species. *Symbolae botanicae Upsalienses* 23, 1-72.

Nasr, S., Lutz, M., Amoozegar, M. A., Eparvier, V., Fazeli, S. A. S. & Yurkov A. (2019). *Graphiola fimbriata*: The first species of Graphiolaceae (Exobasidiales, Basidiomycota) described only based on its yeast stage. *Mycological Progress*, 18(3), 359-368.

<https://doi.org/10.1007/s11557-018-1450-1>.

O' Donnell, K. L. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds D. R., Taylor J. W. (eds) *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* (pp. 225-233). CAB International.

岡本信義, 野中寿之 (1964). 茶網餅病菌 (*Exobasidium reticulatum* ITO et SAW) の担孢子飛散に関する研究. *Kyushu Plant Protection Research*, 10, 78-82. <https://doi.org/10.4241/kyubyochu.10.78>.

Olatinwo, R. & Fraedrich S. (2019). An *Acaromyces* Species Associated with Bark Beetles from Southern Pine Has Inhibitory Properties Against *Raffaelea lauricola*, the Causal Pathogen of Laurel Wilt

- Disease of Redbay. *Plant Health Progress*, 20(4), 220-228.
<https://doi.org/10.1094/PHP-06-19-0039-RS>.
- Olatinwo, R., So, C. L. & Eberhardt T. L. (2019). Effect of *Acaromyces ingoldii* Secondary Metabolites on the Growth of Brown-Rot (*Gloeophyllum trabeum*) and White-Rot (*Trametes versicolor*) Fungi. *Mycobiology*, 47(4), 506-511.
<https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1686944>.
- Otani, Y. (1976). A new species of *Exobasidium* collected in Iriomote-island, Okinawa. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 17, 355-357.
- Park, J. H., Jung, B. N., Choi B. K. & Shin, H. D. (2021a). First report of *Exobasidium camelliae* associated with fruit galls on *Camellia japonica* in Korea. *Forest Pathology*,
<https://doi.org/10.1111/efp.12670>.
- Park, J. H., Jung, B. N., Choi B. K. & Shin, H. D. (2021b). *Kordyana commelinae* associated with white smut-like disease on *Commelina communis* and *C. minor* in Korea. *Mycobiology*, 49(3), 275-79.
<https://doi.org/10.1080/12298093.2021.1923617>.
- Piatek, M., Lutz, M. & Welton, P. (2012). *Exobasidium darwinii*, a new Hawaiian species infecting endemic *Vaccinium reticulatum* in Haleakala National Park. *Mycological Progress*, 11(2), 361-371.
<https://doi.org/10.1007/s11557-011-0751-4>.
- Piepenbring, M., Nold, F., Trampe, T. & Kirschner, R. (2012). Revision of the Genus *Graphiola* (Exobasidiales, Basidiomycota). *Nova*

- Hedwigia, 94(1), 67-96. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2012/0094-0067>.
- Piepenbring, M., Hartmann, M., Hofmann, T. A., & Lutz, M. (2020). Two new species in a new genus and a critical revision of Brachybasidiaceae (Exobasidiales, Basidiomycota) in honor of Franz Oberwinkler. *Mycological Progress*, 19(4), 351-365. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01564-w>.
- Qasim, M., Ronliang, J., Islam, W., Ali, H., Khan, K. A., Dash, C. K., Jamal, Z. A. & Wang, L. (2020). Comparative Pathogenicity of Four Entomopathogenic Fungal Species against Nymphs and Adults of Citrus Red Mite on the Citrus Plantation. *International Journal of Tropical Insect Science*. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00263-z>.
- Rehner, S. A. (2001). Primers for elongation factor 1-alpha (EF1-alpha). Available from. <http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/EF1primer.pdf>
- Rehner, S. A. & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97, (1), 84-98. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>.
- Reid, D. A. (1969). New or interesting british plant diseases. *Transactions of the British Mycological Society*, 52(1), 19-38.
- Rush, T. A. & Aime M.C. (2013). The genus *Meira*: phylogenetic placement and description of a new species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(5), 1097-1106. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9889-1>.
- 佐藤豊三, 小野剛, 田中和明, 服部力 (2016). 小笠原諸島の樹木類等より分離された菌類. *Microbial Resources and Systematics*, 32(2), 163-178.

- Savile, D. B. O. (1959). Notes on *Exobasidium*. Canadian Journal of Botany, 37(4), 641-656. <https://doi.org/10.1139/b59-052>.
- Sawada, K. (1919). Rep. Dept Agric., Govern. Res. Inst. Formosa, Spec. Bull. Agric. Exp. Station Formosa, 19, 422-424
- 澤田兼吉(1922a). 台湾産菌類調査報告. 第2編, 108-109
- 澤田兼吉(1922b). 台湾總督府中央研究所農業部報告. 第35号 臺灣産菌類調査報告 第4編, 84-85
- Sawada, K. (1931). Dept. Agric. Gov. Res. Inst. Formosa, Rept. 51: 66
- Sawada, K. (1935). Dept. Agric. Gov. Res. Inst. Formosa, Rept. 25, 138-139.
- Sawada, K. (1943). Rep. Govt Res. Inst. Dep. Agric., Formosa, 85, 54
- Sawada, K. (1950). Fungi from the North-Eastern region of Honshu, Japan (2): Basidiomycetes [in Japanese]. Tohoku Biological Research, 1, 95-100.
- Sawada, K. (1959). Descriptive catalogue of Taiwan (Formosan) fungi. Part XI. Special Publication College of Agriculture National Taiwan University, 8, 1-268.
- Schoch, C. L., Wang, Z., Townsend, J. P. & Spatafora, J. W. (2009). Geoglossomycetes cl. nov., Geoglossales ord. nov. and taxa above class rank in the Ascomycota Tree of Life. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 22(1), 129-138.
- Sen, S., Rai, M., D., Swarnendu, D. C. & Acharya, K. (2020). Blister blight a threatened problem in tea industry: A review, 32, 3265-3272. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2020.09.008>.

- Singh, A., Nautiyal, M. C., Gautam, A. K., Singh, P. N., & Singh, S. K. (2020). Taxonomic and phylogenetic analysis of *Clinoconidium lauracearum* (Cryptobasidiaceae) producing galls on fruits of *Cinnamomum tamala* (Lauraceae) in India. *Phytotaxa*, 450(1), 73-84. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.450.1.5>.
- Shibata, S., Ono, T., Kobayashi, Y., Miyagawa, I., Mukai, A., Ichioka, Y., Takenaka, Y., Nakano, H. & Hirooka, Y. (2021). First report of horn gall disease of *Cinnamomum pseudopedunculatum* caused by *Laurobasidium hachijoense* in the Bonin Islands, Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 87, 322-325. <https://doi.org/10.1007/s10327-021-01005-w>.
- Shibata, S., Tanaka, E. & Hirooka, Y. (2022a). Leaf blister on two Ericaceae plants infected by *Exobasidium* Species in Japan. *Forest Pathology*, 52(4). <https://doi.org/10.1111/efp.12757>.
- Shibata, S. & Hirooka, Y. (2022b) Taxonomy and Phylogeny of *Exobasidium pentasporium* causing witches' broom of *Rhododendron* Species. *Mycoscience*, MYC582. <https://doi.org/10.47371/mycosci.2022.07.002>.
- 柴田紗帆, 山城都, 山崎周一郎, 中山喜一, 廣岡裕吏 (2023 投稿中). 栃木県のナシ栽培および貯蔵 時期に発生したナシ汚果病. *日植物病報*, 投稿中.
- 柴田紗帆, 廣岡裕吏 (2023 投稿中). 天然記念物美森の大ヤマツツジとその周辺のヤマツツジに発生したてんぐ巣病, *樹木医学会報*, 投稿中.

- Shirai, M. (1896). Descriptions of some new Japanese species of *Exobasidium*. The Botanocal Magazine Tokyo, 10, (113), 51-54.
https://doi.org/10.15281/jplantres1887.10.113_51
- 白井光太郎 (1911). 椿の怪奇. 農業国, 5(7), 20-25.
- Stiller, J. W. & Hall, B. D. (1997). The Origin of Red Algae: Implications for Plastid Evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(9), 4520-4525. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4520>.
- Stoll, M., Pienenbring, M., Begerow, D. & Oberwinkler, F. (2003). Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. Canadian Journal of Botany, 81, 976-984.
<https://doi.org/10.1139/b03-094>
- Somrithipol, S., Jones, E. B. G., Sommai, S., Suetrong, S., Mongkolsamrith, S., Nathalang, A. & Pinruan, A. (2018). Laurobasidiaceae fam. Nov. (Exobasidiales, Basidiomycota), a new family for fungi causing galls with aerial root-like outgrowths, with a new record from Thailand of *Laurobasidium hachijoense* on a new host, *Cinnamomum subavenium*. Phytotaxa, 347(2), 150-164.
- Sydow, H., Sydow, P. & Butler, E. J. (1912). Fungi indiae orientalis. Annales Mycologici, 10(3), 243-280.
- Tanaka, E., Shimizu, K., Imanishi, Y., Yasuda, F. & Tanaka, C. (2008). Isolation of basidiomycetous anamorphic yeast-like fungus *Meira*

- argovae* found on Japanese bamboo]. Mycoscience 49(5), 329-333.
<https://doi.org/10.1007/S10267-008-0429-1>.
- Tanaka, E., Koitabashi M., & Kitamoto, H. (2019). A teleomorph of the Ustilaginalean yeast *Moesziomyces antarcticus* on barnyardgrass in Japan provides bioresources that degrade biodegradable plastics. Antonie van Leeuwenhoek. 112(4), 599-614.
<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1190-x>.
- Tubaki, K. & Yokoyama, T. (1971). Cultural Aspects of *Graphiola phoenicis*. Mycopathologia et Mycologia Applicata, 43(1), 49-60.
<https://doi.org/10.1007/BF02051502>.
- Turland, N. J., Wiersema, J. H., Barrie, F. R., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Kusber, W. H., Li, D.Z., Marhold, K., May, T. W., McNeill, J., Monro, A. M., Prado, J., Price, M. J. & Smith, G. F. (2018). International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017. Koeltz Botanical Books.
- Vilgalys, R. & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. Journal of Bacteriology, 172, 4238-4246.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. Nature Reviews Microbiology, 10(12), 828-840.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>.

- Wang, Q. M., Begerow, D., Groenewald, M., Liu, X. Z., Theelen, B., Bai, F. Y. & Boekhout, T. (2016). Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. *Studies in Mycology*, 81, 55–83
- Watanabe, Y. & Takahashi, O. (2018). Science and nature Azalea and Rhododendron Handbook [in Japanese]. (pp. 1–108). Bun-ichi Sogo Shuppan.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp 315–322). Academic Press.
- Wynns, A. A. (2015). Convergent evolution of highly reduced fruiting bodies in Pezizomycotina suggests key adaptations to the bee habitat. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 145.
<https://doi.org/10.1186/s12862-015-0401-6>.
- Xia, X. M., Yang, M. Q., Li, C. L., Huang, S. X., Jin, W. T., Shen, T., Wang, T. F., ... Wang, X. Q. (2022). Spatiotemporal Evolution of the Global Species Diversity of Rhododendron. *Molecular Biology and Evolution*, 39(1), msab314. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab314>.
- Yasuda, F., Yamagishi, D., Akamatsu, H., Izawa, H., Kodama, M. & Otani, H. (2005). Fruit stain of Japanese pear caused by basidiomycetous, yeast-like fungi, *Acaromyces ingoldii* and *Meira* sp.

Japanese Journal of Phytopathology, 71(3), 156-165.

<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.71.156>.

Yasuda, F., Izawa, H., Yamagishi, D., Akamatsu, H., Kodama, M. & Otani, H. (2006). *Meira nashicola* sp. nov., a novel basidiomycetous, anamorphic yeastlike fungus isolated from Japanese pear fruit with reddish stain. *Mycoscience*, 47(1), 36-40.

<https://doi.org/10.1007/S10267-005-0266-4>.

Yasuda, F., Yamagishi, D., Izawa, H., Kodama, M. & Otani, H. (2007). Fruit stain of Japanese pear caused by basidiomycetous, yeastlike fungi *Meira geulakonigii* and *Pseudozyma aphidis*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 73(3), 166-71.

<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.73.166>

吉富博之(2017). ヤブニッケイ黒穂病菌癭に集まる昆虫. さやばねニューシリース, 25, 25-30.

Yurkov, A., Alves, A., Bai, F.Y., Boundy M. K., Buzzini, P., Čadež, N., Cardinali, G., Casaregola, S., Chaturvedi, V., Collin, V., Fell, J. W., Girard, V., Groenewald, M., Hagen, F., Hittinger, C. T., Kachalkin, A. V., Kostrzewa, M., Kouvelis, V., Libkind, D., ... Boekhout, T. (2021). Nomenclatural issues concerning cultured yeasts and other fungi: Why it is important to avoid unneeded name changes.

IMA Fungus, 12, 18. <https://doi.org/10.1186/s43008-021-00067-x>

Zuo, W., Ökmen, B., Depotter, J. R. L., Ebert, M. K., Redkar, A., Villamil, J. M. & Doehlemann G. (2019). Molecular Interactions Between Smut Fungi and Their Host Plants. *Annual Review of*

Phytopathology, 57(1), 411-430. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100139>.