

## 受賞総説

# 卵菌類, 特に *Pythium* 属菌の分子系統解析に基づく 分類研究と安定的長期保存方法の開発 (平成 29 年度日本微生物資源学会奨励賞受賞)

埋橋志穂美

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源センター  
〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

## Taxonomic study and cryopreservation of the genus *Pythium*

Shihomi Uzuhashi

Genetic Resources Center, National Agriculture and Food Research Organization  
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

### はじめに

卵菌類に含まれる *Pythium* 属菌は, ストラメノパイル生物群に属し, 真菌類とは系統学的に大きく異なる生物である. 近年, 遺伝子解析の手法が分類や系統進化の研究に導入され, これまでの形態的特徴に基づく分類と, 遺伝子解析結果との相関についてさまざまな問題が指摘されてきた. そのなかで, 従来型の形態等の表現形質に加え, 分子系統学的手法から本属の分類学的検討が進められ, 本属は現在 5 属に分割されている (Bala *et al.*, 2010b; Uzuhashi *et al.*, 2010). この 5 属には, 系統学的に高い支持が得られる属もあるが, 現時点での分子系統学的情報では十分な系統関係が示されない属もあり, 解析種数や解析領域についてさらなる検討が必要と考えられる. また, 本菌群の培養株は凍結保存で死滅しやすく, 以前から長期間の安定的な保存が難しい材料として扱われてきた. 特に微生物保存施設においては, 貴重な遺伝資源を維持するため, 従来型の継代培養等による保存も行われている現状もあり, 本菌群の効率的かつ安定的長期保存法の確立が急務である. 著者は, 農業生物資源ジーンバンクに保存されている *Pythium* 属菌について, 分子系統解析に基づいた分類学的研究による学名検証を行い, 登録菌株の信頼性の向上に努めるとともに, これらの菌株を安定的に長期保存するための方法の開発を試み

た. 本稿では, これらの成果について紹介する.

### *Pythium* 属の分類

*Pythium* 属は 1858 年, Pringhseim により設立されて以降, 主にその形態的特徴に基づいた分類学的再編がしばしば試みられてきた. また, 近年遺伝子の塩基配列に基づく分類学的研究が発展したことに伴い, 本属が多系統群, あるいは側系統群であることが多くの研究者により指摘されてきた (Briard *et al.*, 1995; Villa *et al.*, 2006; Belbahri *et al.*, 2008). そのなかで, Uzuhashi *et al.* (2010) は, 系統関係と胞子のうの形状との間に相関関係を認め, 本属を 5 属 (*Pythium*, *Globisporangium*, *Ovatisporangium*, *Elongisporangium* および *Pilasporangium*) にする分類学的改変を提案した. このうち, *Ovatisporangium* 属は, 現在 *Phytophythium* 属 (Bala *et al.*, 2010b) のシノニムとされている. なお本稿では, 再編前の *Pythium* 属を広義の *Pythium* 属と記す.

### 表示学名の検証

農業生物資源ジーンバンクには, 2017 年 8 月時点で 861 株の広義の *Pythium* 属菌株が保存されている. これらのなかには, 遺伝子解析に基づく種同定が一般的となる以前に提供された菌株も多数含まれており, これらは主に形態的特徴に基づき同定され, その学名が表示学名として登録されデータベースでも公開され

E-mail: uzuhashi@affrc.go.jp

ている。遺伝子解析に基づく同定の裏づけが主流となってきた現在、特にこのような菌株について、塩基配列に基づく学名の検証が必要とされる。また、前述のとおり、広義の *Pythium* 属の分類体系は大きく変遷しており、それに伴う表示学名の更新も必要である。このような状況から、今回、ジーンバンクにおける広義の *Pythium* 属菌株について、カルチャーコレクションの菌株の信頼性の向上を図るため、塩基配列に基づく表示学名の検証と最新の分類体系に基づく表示学名の更新を行った。

塩基配列に基づく学名の検証では、卵菌類のバーコード遺伝子領域として支持されている (Bala *et al.*, 2010a; Robideau *et al.*, 2011) ミトコンドリア cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) 遺伝子領域を用いた。まず、全登録株について *cox1* の塩基配列を決定し、得られた塩基配列を GenBank に登録されている信頼性の高い配列 (e.g. Robideau *et al.*, 2011) と比較するとともに、これら既知配列とともに分子系統樹を構築した。これらの結果から、表示学名の妥当性を判断し、疑いのある菌株については、さらに広義の *Pythium* 属において種の同定に広く利用されてきた rRNA 遺伝子 Internal Transcribed Spacer region (ITS) 領域の塩基配列や必要に応じて形態観察を行い、再同定を試みた。こうして塩基配列に基づく表示学名の検証を行った後、全登録株について最新の分類体系に基づく学名の更新を行った。

### 検証結果とデータベースへの反映

塩基配列に基づく学名検証の結果、全 861 株のうち 159 株が再同定されたが (表 1)、129 株については、今回の学名検証では種を同定することはできなかった。このうち 55 株は、塩基配列が既知の配列とは明らかに異なることから新種の可能性が示唆された。また、広義の *Pythium* 属菌においては、形態的特徴が互いに類似し、さらに *cox1* および ITS 領域のいずれの塩基配列からも明確に種の区別ができないことから、species complex と考えられている種や、現時点での情報のみからでは種の異同が明白にできない種などが報告されている (Robideau *et al.*, 2011)。今回、これらの種に該当した菌株については、基本的に登録時の学名を尊重したが、塩基配列から登録時の学名が明らかに異なると判断された場合や、登録時に種同定がされていなかった菌株については、種の同定は行わず、*Pythium* sp. などとするにとどめた。その結果、種同定にいたらなかった 129 株のうち、12 株は species

complex として報告されている種、19 株はある程度種の候補は絞られるものの、現時点では区別ができない種群に属すると判断された。今後は、新種の可能性のある菌株については他領域を含めた分子系統解析や、詳細な形態観察等を行い、種の確立に努めるとともに、それ以外の菌株についても、形態観察など、より詳細な検討を行い、種同定を行うなどして表示学名の整備を進めていきたい。

農業生物資源ジーンバンクでは、保存されている菌株について MAFF 番号、学名、来歴、塩基配列や病原性などの特性、文献などの基本情報をデータベース化し、公開している (<https://www.gene.affrc.go.jp/databases.php>)。また、これらの情報を基に検索画面 ([https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro\\_search.php](https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search.php)) から菌株を検索することが可能である。今回、学名検証により多くの学名が変更・更新され、これらの学名は表示学名としてデータベースに反映した。一方、提供者により付与された学名は登録時学名として管理され、菌株の検索は、これらいずれの学名からも行うことが可能である。したがって、再同定や分類の変遷により学名が更新された場合でも、旧学名からも検索することができるため、ユーザーにとってもより利用しやすく整備されている。また、今回得られた塩基配列は、ダウンロード可能な情報としてデータベースに反映させており、ユーザーがいつでも自由に利用できるようにした。このようなデータベースの更新は、ジーンバンクに保存されている菌株の信頼性や利便性の向上において重要であり、今後も最新の分類学的情報に従い更新を続けていきたい。

### 卵菌類の長期保存における現状

現在、農業生物資源ジーンバンクに保存されている卵菌類は、基本的に一般的な真菌類と同様に液体窒素気層で凍結保存されている。しかし、多くの卵菌類は凍結保存での生残率が低いため、寒天斜面培地での保存を併用しており、多大な労力やスペースを要している。このような状況から、新たな安定的長期保存法の開発が長年望まれてきた。これまでに、凍結保存における培養条件、保護材の組成、凍結速度などを検討し、より効果的な方法の探索を行ってきたものの、生残率の有効な改善にはいたらなかった。そこで、本研究では、農業生物資源ジーンバンク植物部門において、植物細胞や組織の保存に用いられているガラス化法を参考に、新たな超低温保存法の卵菌類への適用を試みた。

表 1 塩基配列に基づく学名検証により学名変更された菌株

学名 (再同定後)	登録時学名	株数	MAFF
<i>Pythium acanthicum</i>	<i>Pythium acanthophoron</i>	3	425319, 425388, 425389
	<i>Pythium hydnosporum</i>	1	305861
<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Pythium deliense</i>	2	237504, 237505
	<i>Pythium irregulare</i>	1	242001
	<i>Pythium</i> sp.	1	712330
<i>Pythium attrantheridium</i>	<i>Pythium intermedium</i>	1	306022
	<i>Pythium irregulare</i>	1	237501
	<i>Pythium</i> sp.	1	241126
<i>Pythium catenulatum</i>	<i>Pythium elongatum</i>	2	305859, 306019
	<i>Pythium pyrlobum</i>	2	236743, 240156
	<i>Pythium</i> sp.	1	306020
<i>Pythium dissotocum</i>	<i>Pythium aploreticum</i>	1	425515
<i>Pythium inflatum</i>	<i>Pythium torulosum</i>	2	305874, 425480
<i>Pythium irregulare</i>	<i>Pythium debaryanum</i>	6	305462, 305463, 305464, 305465, 305466, 305467
	<i>Pythium</i> sp.	2	243522, 243523
<i>Pythium middletonii</i>	<i>Pythium carolinianum</i>	1	425400
<i>Pythium myriotylum</i>	<i>Pythium scleroteichum</i>	1	242229
	<i>Pythium ultimum</i>	1	725005
<i>Pythium nodosum</i>	<i>Pythium vexans</i>	1	305905
<i>Pythium oopapillum</i>	<i>Pythium afertile</i>	2	235101, 239438
	<i>Pythium irregulare</i>	1	242029
<i>Pythium oopapillum</i>	<i>Pythium</i> sp.	1	241122
<i>Pythium periilum</i>	<i>Pythium graminicola</i>	11	305577, 305578, 305860, 425413, 425415, 425416, 425417, 511550, 511551, 511558, 511562
<i>Pythium plurisporium</i>	<i>Pythium graminicola</i>	1	235183
<i>Pythium rostratifingens</i>	<i>Pythium rostratum</i>	5	242174, 305896, 425449, 425450, 425451
	<i>Pythium ultimum</i>	1	235799
	<i>Pythium</i> sp.	1	241146
<i>Pythium scleroteichum</i>	<i>Pythium myriotylum</i>	1	242286
<i>Pythium spinosum</i>	<i>Pythium irregulare</i>	3	425209, 425210, 425211
	<i>Pythium</i> sp.	1	242107
<i>Pythium splendens</i>	<i>Pythium</i> sp.	2	235442, 243524
<i>Pythium sylvaticum</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	1	425391
	<i>Pythium debaryanum</i>	1	242242
	<i>Pythium irregulare</i>	2	425326, 425328
	<i>Pythium</i> sp.	1	242108
<i>Pythium torulosum</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	1	425395
<i>Pythium ultimum</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	2	305199, 712361
	<i>Pythium</i> sp. (Group HS)	1	241062
	<i>Pythium</i> sp.	2	241946, 241947
<i>Pythium</i> sp.	<i>Pythium acanthicum</i>	1	240293
	<i>Pythium catenulatum</i>	1	245640
	<i>Pythium debaryanum</i>	1	242155
	<i>Pythium dissimile</i>	1	425321
	<i>Pythium echinulatum</i>	6	305580, 425516, 425517, 425518, 425411, 425510
	<i>Pythium elongatum</i>	1	425412
	<i>Pythium graminicola</i>	7	235836, 235837, 235840, 238432, 238433, 511557, 511560
	<i>Pythium hydnosporum</i>	1	305893
<i>Pythium inflatum</i>	2	425322, 425418	

表 1 続き

学名 (再同定後)	登録時学名	株数	MAFF
<i>Pythium</i> sp.	<i>Pythium intermedium</i>	2	245235, 425423
	<i>Pythium irregulare</i> Buisman	4	241103, 241104, 241926, 306021
	<i>Pythium macrosporum</i>	1	242168
	<i>Pythium marsipium</i>	1	236903
	<i>Pythium megalacanthum</i>	6	725020, 725021, 731158, 731159, 731160, 731161
	<i>Pythium paroecandrum</i>	1	425513
	<i>Pythium rostratum</i>	4	241111, 242124, 425447, 425448
	<i>Pythium salpingophorum</i>	1	238294
	<i>Pythium sylvaticum</i>	1	238012
	<i>Pythium ultimum</i>	3	305902, 425422, 242256
	<i>Pythium vexans</i>	1	305906
<i>Phytophythium helicoides</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	1	712368
	<i>Pythium carolinianum</i>	1	425401
	<i>Pythium debaryanum</i>	1	242239
	<i>Pythium oedochilum</i>	5	425442, 425443, 425441, 425445, 425446
	<i>Pythium splendens</i>	1	425470
	<i>Pythium</i> 'group F'	1	242275
	<i>Pythium</i> sp.	2	238156, 238157
<i>Phytophythium litorale</i>	<i>Pythium</i> sp. (Group P)	1	235103
<i>Phytophythium mercuriale</i>	<i>Pythium carolinianum</i>	1	425155
<i>Phytophythium vexans</i>	<i>Pythium</i> sp.	1	241144
<i>Phytophythium</i> sp.	<i>Pythium carolinianum</i>	1	425402
	<i>Pythium helicoides</i>	3	242900, 242901, 242902
	<i>Pythium intermedium</i>	1	305883
	<i>Pythium irregulare</i>	1	242271
<i>Globisporangium orydicola</i>	<i>Pythium rostratum</i>	1	235796
	<i>Pythium ultimum</i>	15	425485, 425486, 425487, 425488, 425491, 242016, 242017, 242022, 235800, 235801, 305875, 305877, 423489, 425494, 425497
	<i>Pythium</i> sp.	3	241143, 242195, 245646
Unidentified Zygomycetous fungus	<i>Pythium</i> sp.	1	236899

159

## 超低温保存の方法

新規超低温保存法の検討には、これまでの凍結保存で特に生残率の低い（ほぼ0%）卵菌類 55 株を用いた（表 2）。これらの菌株について、植物超低温保存法マニュアル（[https://www.gene.affrc.go.jp/pdf/manual/plant-cryo\\_toc.pdf](https://www.gene.affrc.go.jp/pdf/manual/plant-cryo_toc.pdf)）を参考に、一部改変するとともに各条件の検討を行い、生残率により評価した。まず、保存に用いる基質について、一般的な糸状菌の凍結保存では、培養後の菌体を寒天ごと打ち抜いたものを用いるのに対し、本研究では滅菌したアブラナ科種子に菌糸を感染・定着させたものを用いた。これらの種子に凍結耐性付与処理として、LS 液（1.0 M グリセロール、0.6 M ショ糖）による脱水耐性付与を行い、続いて PVS2 液（30% グリセロール、15% エチレングリコール、15% ジメチルスルフォキシド、0.4 M ショ

糖）による浸透脱水を行った。これらの種子を冷却用プレートに静置した後、液体窒素で急速冷却して保存した。高い生残率を得るための最適条件の検討は、これらの過程のうち、以下の点について行った。1) 保存用基質の培養に用いた培地の組成：Potato Dextrose Agar (PDA) または卵菌類の培養で用いられる鳥餌煮汁寒天培地 (T)、2) 保存用基質の培養日数、および、3) 凍結耐性付与処理における処理時間。これらの過程について複数の条件を設定し、生残率を調査した。生残率は、保存後の種子を 0.5 M スクロースで昇温し濾紙上で風乾した後、寒天培地に静置し、そこから菌糸が伸長した種子を生残していると判断し、その割合により生残率を算出した。また、コントロールとして、培養後凍結耐性付与処理や冷却処理を行わない無処理の種子、および凍結耐性付与処理後の液体窒素

表2 超低温保存に用いた菌株数

属	種	数
<i>Pythium</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	6
	<i>P. catenulatum</i>	1
	<i>P. conidiophorum</i>	1
	<i>P. dissotocum</i>	1
	<i>P. flevoense</i>	1
	<i>P. grandisporangium</i>	1
	<i>P. myriotylum</i>	7
	<i>P. oligandrum</i>	1
	<i>P. periplocum</i>	2
	<i>P. scleroteichum</i>	1
	<i>P. torulosum</i>	5
	<i>P. vanterpoolii</i>	3
	<i>Pythium</i> sp.	6
<i>Phytophythium</i>	<i>Ph. helicoides</i>	5
	<i>Ph. oedoehilum</i>	2
	<i>Phytophythium</i> sp.	2
<i>Globisporangium</i>	<i>G. ultimum</i>	1
	<i>G. uncinulatum</i>	1
	<i>Globisporangium</i> sp.	5
<i>Phytophthora</i>	<i>Phy. cinnamomi</i>	2
	<i>Phy. cryptogea</i>	1
合計		55

で冷却処理を行わなかった種子をそれぞれ培養し、培養後および凍結耐性付与処理後の生残の有無を明確にすることで、超低温処理による生残への影響を判断した。

## 結果

各条件の検討により、生残率が向上した菌株もあったが、条件を変えてもほとんど生残率が変化しない菌株もあった。生残率の向上した菌株では、検討した条件のうち1) 培養に用いた培地の組成については、ごく一部の菌株でわずかに影響が考えられたが、大部分の菌株で生残率への影響は見られなかった。2) 培養日数については、その影響がいくつかの菌株で確認された。たとえば、*Globisporangium* sp. (MAFF 236903) では、培養日数2週間以内で生残率が高い傾向が(表3)、一方 *Phytophythium oedoehilum* (MAFF 712270) では3週間以上の培養で比較的高い生残率が得られた(表4)。また、3) 凍結耐性付与処理の影響では、*G. ultimum* (MAFF 725014) において、PVS2 処理時間が60分と長い処理時間により高い生残率が達成された株もあったが(表5)、多くの株で処理時間の大きな影響は認められなかった。このように、特に培養日数が生残率に影響する菌株が多いことが明らかとなった。そこで、次に、培養日数以外の条件を一定にし、

表3 *Globisporangium* sp. (MAFF 236903) の生残率

前培養 <sup>a</sup>	培養日数	LS (min)	PVS2 (min)	生残率 (%)	備考
P	7	20	15	100	
P	14	10	10	86	
T	14	20	15	46	
T	14	10	10	46	
P	15	15	10	44	
T	7	20	15	43	
P	14	20	15	38	
T	15	15	10	31	
T	42	15	5	23	
P	28	20	60	19	
P	42	15	5	15	
P	31	15	15	13	
T	42	20	15	7	
T	28	20	60	6	
T	31	15	15	6	
P	42	20	15	0	元株死滅

<sup>a</sup> P: PDA, T: 鳥餌煮汁寒天培地

同一種の菌株間で生残率の違いを調査し、種内での最適条件の安定性について調査した。その結果、5株を供試した *P. torulosum* では、2週間程度の培養において4株で85%以上の高い生残率が、また残りの1株でも62%と比較的高い生残率が達成された。一方、*P. myriotylum* では、培養日数を変えても供試した6株すべてで生残率の向上は見られず、最大でも生残率は21%にとどまった。このように、同一種の菌株間で類似の傾向が見られた種もあったが、6株を供試した *Pythium aphanidermatum* のように、一定の傾向が見られず、生残率が0-90%と菌株間で大きく異なった種もあった。

最後に、供試した全55株について、最も高い生残率が得られた条件を表6にまとめた。その結果、15株で80%以上、12株で50-80%の生残率が達成され、約半数の菌株で50%以上の生残率が得られた。一方、13株では20-50%、残りの15株では20%未満の生残率にとどまった。

## 事業への導入と課題

今回用いた菌株は、いずれもこれまでの生残率が0%のものであった。このことから、約半数の菌株で50%以上の生残率が得られたことは、今回の方法が新規保存方法として有効であることを示している。しかしながら、菌株ごとに最適条件が異なることが多く、さらに同一種でも菌株により最適条件が異なることもあり、高い生残率を維持するためには、菌株ごとに条

表4 *Phytophythium oedochilum* (MAFF 712270) の生残率

前培養	培養日数	LS (min)	PVS2 (min)	生残率 (%)	備考
T	42	20	15	54	
T	26	10	10	31	
T	14	10	10	27	
P	31	20	30	25	
T	15	20	60	19	
T	31	20	30	19	
P	14	20	15	8	
P	26	10	10	6	
P	15	20	60	6	
P	7	20	15	0	
T	7	20	15	0	
T	14	20	15	0	
P	8	20	10	0	
P	8	20	30	0	
P	42	20	15	0	元株死滅
P	14	10	10	0	

表5 *Globisporangium ultimum* (MAFF 725014) の生残率

前培養	培養日数	LS (min)	PVS2 (min)	生残率 (%)
T	28	20	60	100
P	28	20	60	75
T	14	20	15	43
T	14	10	10	43
P	42	20	15	43
T	7	20	15	25
T	42	20	15	23
P	14	10	10	14
P	8	20	30	9
P	14	20	15	8
P	7	20	15	0
P	8	20	10	0

表6 各菌株の最高生残率とその条件

MAFF	学名	前培養	培養日数	LS (min)	PVS2 (min)	種子数	復活種子数	生残率 (%)
242217	<i>P. catenulatum</i>	P/T	10	15	20	21	21	100
241710	<i>P. flevoense</i>	T	56	15	20	20	20	100
242254	<i>P. periplocum</i>	P	18	15	20	18	18	100
425405	<i>P. torulosum</i>	T	13	15	20	21	21	100
425477	<i>P. torulosum</i>	P	17	15	20	20	20	100
725014	<i>G. ultimum</i>	T	28	20	60	16	16	100
242273	<i>Pythium</i> Group G	P	10	15	20	24	24	100
236903	<i>Globisporangium</i> sp.	P	7	20	15	7	7	100
242248	<i>P. dissotocum</i>	P	27	15	20	20	19	95
425407	<i>P. torulosum</i>	P	13	15	20	22	21	95
425472	<i>P. torulosum</i>	P	17	15	20	20	19	95
425398	<i>P. aphanidermatum</i>	T	12	15	20	20	18	90
238145	<i>Phy. cinnamomi</i>	T	15	20	30	16	14	88
242264	<i>P. aphanidermatum</i>	P	40	15	20	7	6	86
242265	<i>P. oligandrum</i>	T	10	15	20	20	16	80
242907	<i>Ph. oedochilum</i>	P	21	15	20	18	14	78
511479	<i>P. vanterpoolii</i>	T	47	15	20	22	17	77
241120	<i>Pythium</i> sp.	P	10	15	20	20	14	70
245807	<i>Phy. cinnamomi</i>	P/T	12	15	20	20	13	65
241131	<i>Globisporangium</i> sp.	P	56	15	20	25	16	64
235839	<i>P. vanterpoolii</i>	P	25	15	20	19	12	63
425479	<i>P. torulosum</i>	T	17	15	20	21	13	62
242228	<i>P. scleroteichum</i>	T	47	15	20	25	14	56
241980	<i>Pythium</i> sp.	P	40	15	20	16	9	56
242880	<i>Phy. cryptogea</i>	T	42	20	15	26	14	54
712270	<i>Ph. oedochilum</i>	T	42	20	15	13	7	54
235843	<i>P. aphanidermatum</i>	T	25	15	20	20	10	50
240867	<i>P. grandisporangium</i>	SC	19	20	15	12	5	42
306082	<i>P. aphanidermatum</i>	T	33	15	20	20	8	40
242159	<i>P. myriotylum</i>	P	42	20	15	20	8	40
425513	<i>Globisporangium</i> sp.	T	12	15	20	20	7	35

表6 続き

MAFF	学名	前培養	培養 日数	LS (min)	PVS2 (min)	種子数	復活 種子数	生残率 (%)
242271	<i>Phytophthium</i> sp.	T	19	20	15	12	4	33
242216	<i>Pythium</i> sp.	P	10	15	20	19	6	32
425402	<i>Phytophthium</i> sp.	P	17	15	20	20	6	30
235841	<i>P. vanterpoolii</i>	P/T	25	15	20	21	6	29
242899	<i>Ph. helicoides</i>	P	29	15	20	25	7	28
305857	<i>P. aphanidermatum</i>	T	17	15	20	22	6	27
242896	<i>Ph. helicoides</i>	T	15	10	5	16	4	25
425445	<i>Ph. helicoides</i>	T	47	15	20	20	5	25
242224	<i>P. myriotylum</i>	T	12	15	20	24	5	21
242227	<i>P. myriotylum</i>	T	56	15	20	18	3	17
242215	<i>Pythium</i> sp.	T	17	15	20	20	3	15
305906	<i>Globisporangium</i> sp.	T	17	15	20	21	3	14
305567	<i>P. aphanidermatum</i>	T	21	15	20	19	2	11
425320	<i>P. conidiophorum</i>	T	17	15	20	20	2	10
242263	<i>P. myriotylum</i>	P/T	27	15	20	20	2	10
241119	<i>Pythium</i> sp.	T	17	15	20	20	2	10
242232	<i>P. myriotylum</i>	T	18	15	20	18	1	6
241902	<i>Ph. helicoides</i>	T	13	15	20	21	1	5
242225	<i>P. myriotylum</i>	T	14	15	20	24	1	4
240295	<i>P. uncinatum</i>	T	56	15	20	23	1	4
425470	<i>Ph. helicoides</i>	P/T	12	15	20	20	0	0
239702	<i>P. myriotylum</i>	P/T	25	15	20	20	0	0
242246	<i>P. periplocum</i>	P/T	18	15	20	18	0	0
731159	<i>Globisporangium</i> sp.	P/T	36	15	20	22	0	0

件を検討する必要がある、このような状況では、事業への導入は現実的に難しい。今後、高い生残率が得られた菌株については、反復試験によりその安定性を評価し、生残率の低い菌株については、さらなる条件検討を行い、より高い生残率が得られるよう検討を重ねたい。一方で、超低温処理の過程における生残のメカニズムの解明、すなわち、どのような影響により生残が左右されているのか、ということの解明にも取り組み、より汎用性の高い超低温保存法の確立を目指したい。

#### おわりに

本研究では、農業生物資源遺伝子バンクに保存されている卵菌類、特に *Pythium* 属菌について、遺伝子解析に基づく学名の検証、ならびに新分類体系に基づく学名の更新を行い、これらの成果に基づきデータベースを更新・整備した。また、これらの菌株を安定的に長期間保存するための方法の開発に取り組んだ。これにより、信頼性の高い、また利便性の高いカルチャーコレクションの確立を目指してきた。今後も、このような更新を続けることで、分類学的研究にも信頼でき

るカルチャーコレクションの確立に努めていきたい。

#### 謝辞

本研究成果は、農業生物資源遺伝子バンクに保存されている貴重な遺伝資源の上に成り立ったものであり、これら貴重な菌株を提供して下さった多くの方々に深く感謝いたします。また、研究を行うにあたり、貴重な助言や支援をいただいた農研機構遺伝資源センターの青木孝之博士、田中大介博士、微生物分類評価チームの方々に深く感謝いたします。

#### 文献

- Bala, K., Robideau, G.P., Désaulniers, N., de Cock, A.W.A.M. & Lévesque, C.A. 2010a. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* **25**: 22-31.
- Bala, K., Robideau, G.P., Lévesque, C.A., de Cock, A.W.A.M., Abad, Z.G., Lodhi, A.M., Shahzad, S., Ghaffar, A. & Coffey, M.D. 2010b. *Phytophthium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque,

- gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. *Persoonia* **24**: 136–137.
- Belbahri, L., McLeod, A., Paul, B., Calmin, G., Moralejo, E., Spies, C.F., Botha, W.J., Clemente, A., Descals, E., Sanchez-Hernandez, E. & Lefort, F. 2008. Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (Pythiaceae). *FEMS Microbiol. Lett.* **284**: 17–27.
- Briard, M., Dutertre, M., Rouxel, F. & Brygoo, Y. 1995. Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. *Mycol. Res.* **99**: 1119–1127.
- Robideau, G.P., de Cock, A.W.A.M., Coffey, M.D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M.M., Hu, C.-H., Küpper, F.C., Rintoul, T.L., Sarhan, E., Verstappen, E.C., Zhang, Y., Bonants, P.J.M., Ristaino, J.B. & Lévesque, C.A. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome *c* oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol. Ecol. Resour.* **11**: 1002–1011.
- Uzuhashi, S., Kakishima, M. & Tojo, M. 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* **51**: 337–365.
- Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T. & Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ -tubulin gene sequences. *Mycologia* **98**: 410–422.