

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 ONG Socheath

論 文 題 目

Occurrence, distribution, genetic variability and biological properties of bacterial rice pathogens in Cambodia

(カンボジアにおけるイネ病原細菌の発生・分布・遺伝的多様性および生物学的特性)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学准教授 千葉壮太郎

委 員 名古屋大学教授 山内章

委 員 名古屋大学教授 江原宏

委 員 名古屋大学准教授 竹本大吾

委 員 名古屋大学助教 佐藤育男

委 員 名古屋大学特任助教 RIN Soriya

## 論文審査の結果の要旨

イネの生産は常に病害や虫害のリスクに晒されており、これらの防除は品質、収量を担保するためにも非常に重要である。主たるイネ生産国である東南アジア諸国では、国際稲研究所 (IRRI) 主導のもと、生産性の高い品種の開発・利用が進められると同時に、病虫害防除に関する技術も提供されている。しかし、これらの普及は、当該国のキャパシティによるところが大きく、カンボジアにおいては、虫害への対応は大きく取り上げられている反面、病害に対する政府主導の対策や基礎的な研究および知見の蓄積が大きく遅れている。本学位論文では、このような状況下でカンボジアにおいて適切な病原体制御に基づくイネの増産に寄与することを目的とし、2種類のイネ細菌病に着目した基盤的研究を実施した。尚、本研究は、IRRI、カンボジア農林水産省との共同研究として実施した。本学位論文研究で実施した国内の病害発生調査、分離病原菌の遺伝型解析、病原性の評価、感染機構および伝搬機構の解析は、今後の病害防除指針の確立に資する重要な知見を提供しており、学術的価値も十分なものと判断される。以下に、各研究成果の概要と評価を記す。

第一に、イネの収量に大きく影響する重要病害の1つ、イネ白葉枯病 (Bacterial Leaf Blight) について、カンボジア国内の発生状況調査、病原菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) の遺伝的多型解析、Xoo 代表株の病原性およびレース解析を行ない、基盤的知見が得られた。本病は、イネ作付け地域で世界的に広く起こる病害で、化学農薬による制御には限界があり、抵抗性品種の利用が最も効果のある防除法として推奨される。しかし、病原細菌 Xoo のレースとイネの抵抗性遺伝子群の最適なマッチングが重要であり、カンボジアに分布する Xoo のレース構造を明らかにすることが不可欠である。本研究では、カンボジアの代表的イネ生産地域 (5つの州)、とりわけ灌漑整備された地域と天水田の双方を網羅し、病害発生状況を調査した結果、全ての作付け地域でイネ白葉枯病の発生が確認された。各州の罹病イネサンプルから総計 145 の Xoo 分離株を取得し、うち 80 株について SNP 解析を行なった結果、約半数が既報の遺伝型 (Population ID3, 4, 8, 10, 13) と合致し、ID8 型が大半を占めた。また、半数が鑑別不能の遺伝型 (Population ID "other") を持っており、これらはカンボジア固有の Xoo 系統で構成されると考えられた。

さらに、これらの代表株を 16 株選定し、IRRI に提供を受けた 24 の Xoo レース判定イネ品種 (near isogenic lines; 単一または複数の *Xa* および *xa* 抵抗性遺伝子を保有する品種) への Xoo 接種試験を行なった。その結果、単一の抵抗性遺伝子保持イネは殆どの Xoo 株で感受性を示し、複数種の抵抗性遺伝子保持イネにおいては、Xoo 分離株毎に異なる抵抗性強度 (感受性~弱抵抗性~強抵抗性) を発揮した。したがって、カンボジア産 Xoo は、複雑な病原型をもつ集団で構成されることが明らか

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1-2

かになった。さらに、これらの分離株を統計学的に 7 つの病原型 (pathotype) に分け、分析した結果、すべての試験に用いた Xoo 株に中程度から強度抵抗性を発揮する品種、IRBB57 および IRBB62 が同定された。すなわち、これらが保持する抵抗性遺伝子 *Xa4* と *Xa21* および *xa5* 或いは *Xa7* のいずれかの 3 つの抵抗性遺伝子を持つ場合に、カンボジア産 Xoo に対するより広い抵抗性スペクトラムが発揮されることが明らかにされた。一方、カンボジア在来品種 Sen Pidor について同様に検討した結果、ある程度広い抵抗性スペクトラムを示したことから、本品種が保存する抵抗性遺伝子を明らかにし、上記の抵抗性遺伝子をうまく導入することで、カンボジア人が好む Sen Pidor の風味等を損なうことなく抵抗性を向上させられる可能性がある。今後、Xoo の遺伝型解析をさらに進め、レース判定の基盤情報を確立しつつ、Xoo 抵抗性イネ品種の加発を進めることが求められる。

第二に、近年、アジア諸国で突発的発生が広がるイネオレンジ葉病 (rice orange leaf) について、カンボジア国内および周辺国の発生状況調査、病原菌 *Candidatus Phytoplasma asteris* (rice orange leaf phytoplasma; ROLP) の遺伝学的多様性と起源の考察、発生拡大機構の解明 (媒介昆虫の同定)、感染組織の顕微鏡観察等の実施により、病原菌の基本的性状の一端を明らかにした。イネオレンジ葉病は、細胞壁を持たない絶対寄生菌であるファイトプラズマ (ROLP) の感染により発症する。本病害は 1960 年代に初めて確認されて以降、1980 年代までアジア諸国での発生報告があり、それ以降は中国での報告事例があるのみで、その発生は下火になったと思われていた。しかし、2013 年以降、中国を含め、インド、タイでの発生が報告され、IRRI 研究者の予備試験ではフィリピン、カンボジア、ベトナムでも発生があることが認められていた。そこで本研究では、カンボジアとフィリピンを中心に病害発生調査を実施し、罹病イネサンプルから回収した DNA を基に Nested PCR で増幅した ROLP の 16S rDNA 配列を解析し、遺伝学的多様性を調査した。その結果、調査したカンボジア (6 州)、フィリピン (2 州)、ベトナム (1 州) の全ての地域内の複数のイネ圃場で罹病植物が発見され、本病害が広く発生していることが明らかにされた。また、16S rDNA 配列の分子系統解析から、多様性が高いタイ周辺 (カンボジアを含む) が病原ファイトプラズマの起源である可能性が示唆され、また、中国、フィリピン、ベトナムおよび一部のカンボジア分離株は遺伝学的に単一の集団で、この祖先株が各地に拡散し維持されていると考えられた。

ファイトプラズマは、植物の師部組織に局在すると考えられており、感染によりホルモン分泌、代謝、物質交換や水分・栄養供給に異常が起こり、様々な病徴を示すと考えられる。本研究では、イネ感染葉の切片を用いて、師部組織におけるファイトプラズマの集積を DAPI 染色と蛍光顕微鏡観察により確認した。さらに、走査

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1 - 2

電子顕微鏡下では、師管部に高密度に集積するファイトプラズマを観察したことに加え、周辺組織細胞に異常なスターチ様の構造物が蓄積し、エネルギー利用の不安定化が起こっていることが推察された。

さらに、本ファイトプラズマの植物組織局在性と関連して、病原体の伝搬は吸汁昆虫が担うことが分かっている。既に、イナヅマヨコバイ (*Racilia dorsalis*) およびツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps*) が伝搬することが報告されていたが、カンボジアのイネ圃場調査では、イナヅマヨコバイは存在数が少なく、主に温帯に分布する *N. cincticeps* は確認されなかった。それに代わり、熱帯に生息する *N. virescens* が多く確認され、これらが低率で ROLP を獲得していることが判明した。そこで、*N. virescens* を用いて管理環境下で ROLP の獲得・伝搬試験を実施したところ、本昆虫の病原伝搬能が証明され、適切な媒介昆虫防除で本病の発生が制御できる可能性が示された。

ファイトプラズマは培養ができないことから、実験的制限が多くあり、感染や発病メカニズムが明らかにされた例はごく限られた pathosystem のみであるが、確立した実験系を駆使した発病機構の解明が望まれる。

以上、本学位論文は、カンボジアにおけるイネ細菌病について初めて基盤的知見を提供するものであり、当該国の防除体系確立と植物保護学の発展に寄与するものである。また、第一部の研究成果は、追加試験結果を加えて投稿する準備を進めており、第二部の研究成果は二報の学術論文として公表され、関係分野から一定の評価を受けている。さらに、世界的な温暖化の影響により病原体の分布域も変動する時代となり、熱帯・亜熱帯特有の病原が日本に侵入するリスクも高まる中、本研究で得た知見は我が国の植物防疫においても高い価値があると考えられる。よって、本審査委員会は本論文の内容が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。