

学 位 論 文 要 旨

氏 名	山頭 亜紀子
題 目	野生 <i>Setaria</i> 属植物であるエノコログサおよびアキノエノコログサから分離された日本産いもち病菌の分類学的位置付けおよび生態学的諸性質に関する研究 (Taxonomic and ecological studies on <i>Pyricularia</i> isolates from wild foxtails, green foxtail and giant foxtail, in Japan)
<p>野生 <i>Setaria</i> 属植物のいもち病菌である、エノコログサとアキノエノコログサいもち病菌(以下、エノコロ菌およびアキノ菌)の日本産菌株について、分類学的位置付け、集団構造および種子感染による越冬の可否を検討した。また、得られた結果を既報のイネいもち病菌のものと比較し、生態特性の差異を検討した。</p> <p>日本各地で採集されたエノコロおよびアキノ菌計 28 菌株について分類学的位置付けを DNA 解析および病原性検定に基づき検討した。β-tubulin 遺伝子の PCR-RFLP 分析により、全供試菌株から <i>Magnaporthe oryzae</i> の同定基準とされる切断断片パターンが検出された。また、種々のイネ科植物に対する病原性検定では、両菌はアワいもち病菌と同じくアワにのみ病原性を示した。さらに、各種シングルコピー-DNA 配列をプローブとした RFLP データから構築されたデンドログラム上で、エノコロおよびアキノ菌とアワいもち病菌は単一のサブクラスターを <i>M. oryzae</i> 特異的クラスター中に形成した。これらより、両菌はイネいもち病菌と同一種 <i>M. oryzae</i> の <i>Setaria</i> pathotype に属すると考えられた。</p> <p>日本の広域から採集されたエノコロおよびアキノ菌各 15 菌株を散在性反復配列 MGR586 および MAGGY をプローブとした DNA フィンガープリント分析に供試した。DNA フィンガープリントパターンの類縁度が 70% 以下の菌株組み合わせを異なるリネージとしたところ、少なくともエノコロ菌では 13、アキノ菌では 8 つのリネージが見出された。先に報告された世界各地のイネいもち病菌集団におけるリネージ数は 2 から 10 であり、両菌集団のリネージ構成はイネいもち病菌と比較して複雑であることが示唆された。また、1 m² または 50 m² 区画から採集された 16 の菌株集団を MGR586-DNA フィンガープリント分析に供試し、両菌の局所集団のリネージ構造を検討した。上記と同様の基準でリネージを識別したところ、ほぼ全集団に 2 つ以上のリネージが認められた。よって、両菌集団のリネージ構成は局所においても複雑であると考えられた。</p> <p>2006 年 9 月に、佐賀大学実験圃場で育成したエノコログサおよびアキノエノコログサから種子を採集し、同年 10 月に佐賀県内 3 地点の露地に播種した。また、2007 年 7 月に播種した種子に由来する植物体からいもち罹病葉を各地点で採集した。そして、2006 年の採集種子に含まれていた保菌種子および 2007 年の罹病葉からいもち病菌株を分離し、MGR586-DNA フィンガープリント分析に供試した。その結果、保菌種子および罹病葉からの分離菌株のほとんどが同一あるいは DNA フィンガープリントパターンが極めて類似したハプロタイプに属していた。従って、イネいもち病菌では不可能とされてきた野外における越冬が、エノコロおよびアキノ菌では可能であることが示唆された。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Akiko Yamagashira
題 目	<p style="text-align: center;">Taxonomic and ecological studies on <i>Pyricularia</i> isolates from wild foxtails, green foxtail and giant foxtail, in Japan (野生 <i>Setaria</i> 属植物であるエノコログサおよびアキノエノコログサから分離された日本産いもち病菌の分類学的位置付けおよび生態学的諸性質に関する研究)</p>

Pyricularia isolates from wild foxtails in Japan, green foxtail (*Setaria viridis*) and giant foxtail (*S. faberii*), were examined on their taxonomic status, population structures and winter survival.

A total of 28 *Pyricularia* isolates from the wild foxtails was collected from various locations in Japan and taxonomically characterized by DNA analyses and pathogenicity assays. A diagnostic polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) phenotype of *M. oryzae* was detected in the beta-tubulin genomic region in all the wild foxtail isolates used. Host ranges of the wild foxtail isolates inferred from the pathogenicity assays were similar to those of isolates from foxtail millet (*S. italica*). The 28 wild foxtail isolates formed a subcluster with foxtail millet isolates within *M. oryzae* specific cluster in the dendrogram constructed from RFLP analysis using single-copy sequences as probes. These results indicated that *Pyricularia* isolates from the wild foxtails could be classified into the *Setaria* pathotype of *M. oryzae*.

As representatives of macrogeographic population, 15 isolates from green foxtail and 15 isolates from giant foxtail were collected from various locations in Japan and subjected to DNA fingerprint analyses with the transposable elements MGR586 and MAGGY as probes. If lineages are arbitrarily established based on greater than 70% DNA fingerprint similarities in isolates, at least 13 and 8 lineages were detected in the green foxtail and the giant foxtail pathogen population, respectively. The numbers of the putative lineages in the wild foxtail pathogen populations were higher than those reported in the rice blast pathogen populations from several countries or regions, in which isolates were sorted into 2 to 10 lineages. MGR586-DNA fingerprint variations of the wild foxtail pathogens were also examined in 16 microgeographic populations collected from a 1 m² or 50 m² area. If lineages were arbitrarily established based on the above criterion, almost of the 16 populations contained more than two lineages. These results suggested that *M. oryzae* isolates from the green foxtail and giant foxtail in Japan possessed a complex lineage structure, even at the microgeographic scales.

Seeds including those infected with *M. oryzae* were collected from both of the wild foxtails growing at the experimental field in Saga University in Saga prefecture on August to September, 2006. These seeds were sown on soil surface at three fields in Saga prefecture on October, 2006. On July, 2007, leaves with blast lesion were collected from plants generated from the seeds at these fields. *M. oryzae* isolates were collected from the infected seeds and the infected leaves and subjected to MGR586-DNA fingerprint analyses. For each of the wild foxtails, the majority of the isolates from the infected seeds and the infected leaves could be sorted into an identical haplotype or lineage based on the DNA fingerprint analyses. These results suggest that the wild foxtail pathogens can survive during the winter season in natural condition where rice blast pathogen is supposed to be extinguished.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	山頭亜紀子
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 大島 一里
	副査 佐賀 大学 准教授 草場 基章
	副査 宮崎 大学 教授 上運天 博
	副査 鹿児島大学 教授 岩井 久
	副査 琉球 大学 教授 諸見里 善一
審査協力者	
題 目	野生 <i>Setaria</i> 属植物であるエノコログサおよびアキノエノコログサから分離された日本産いもち病菌の分類学的位置付けおよび生態学的諸性質に関する研究 (Taxonomic and ecological studies on <i>Pyricularia</i> isolates from wild foxtails, green foxtail and giant foxtail, in Japan)
<p>イネ科植物いもち病菌 (<i>Magnaporthe/Pyricularia</i> spp.) は 50 種以上のイネ科植物を宿主とする。このうち、イネの重要病原菌であるイネいもち病菌については、その防除の必要性から分類・生態学的解明が極めて進んでいる。一方、イネ以外の宿主、特に野生植物の菌については、このような研究はほとんどなされていない。そこで本研究では野生 <i>Setaria</i> 属植物のエノコログサとアキノエノコログのいもち病菌(以下、エノコロ菌およびアキノ菌)の日本産菌株について分類学的位置付けの検討、さらに、生態特性の解明を試みた。</p> <p>近年、イネいもち病菌を始めとする栽培植物のいもち病菌は従来 <i>M. grisea</i> から新種 <i>M. oryzae</i> に再分類された。また、本種には <i>Oryza</i> や <i>Setaria</i> pathotype といった宿主の属に対して寄生性が分化した病原型が存在する。日本各地で採集されたエノコロおよびアキノ菌計 28 菌株について、制限酵素断片長多型 (RFLP) に基づく β-tublin 遺伝子の遺伝子型を調査した。その結果、全供試菌株から <i>M. oryzae</i> の同定基準とされる切断断片パターンが検出された。また、種々のイネ科植物に対する病原性検定では、両菌は <i>Setaria</i> 属のアワのみに病原性を示した。さらに、各種シングルコピー DNA</p>	

配列をプローブとした RFLP データから構築されたデンドログラム上で、エノコロおよびアキノ菌は *Setaria pathotype* の菌と単一のサブクラスターを *M. oryzae* 特異的クラスター中に形成した。これらより、両菌はイネいもち病菌と同一種 *M. oryzae* の *Setaria pathotype* に属すると考えられた。

宿主の品種更新や農薬散布等の人為選択が作用しない野生植物のいもち病菌では祖先集団の遺伝的多様性が維持され、イネいもち病菌等の栽培植物の菌と比較し、集団のリネージ構成が複雑になることが予想された。そこで、日本の広域から採集されたエノコロおよびアキノ菌各 15 菌株を供試し、散在性反復配列 MGR586 および MAGGY をプローブとした DNA フィンガープリント分析を行った。DNA フィンガープリントパターンの類縁度が 70% 以下の菌株組み合わせを異なるリネージとしたところ、少なくともエノコロ菌では 13、アキノ菌では 8 つのリネージが見出された。先に報告された世界各地のイネいもち病菌集団におけるリネージ数は 2 から 10 であり、両菌集団のリネージ構成はイネいもち病菌と比較して複雑であることが示された。また、1 m² または 50 m² 区画から採集された 16 の両菌株集団を MGR586-DNA フィンガープリント分析に供試し上記と同様の基準でリネージを識別した。その結果、ほぼ全集団に 2 つ以上のリネージが認められ、両菌集団のリネージ構成は局所においても複雑であると考えられた。

2006 年 9 月に、佐賀大学実験圃場で育成したエノコログサおよびアキノエノコログサから種子を採集し、同年 10 月に佐賀県内 3 地点の露地に播種した。また、2007 年 7 月に播種した種子に由来する植物体からいもち罹病葉を各地点で採集した。そして、2006 年の採集種子に含まれていた保菌種子および 2007 年の罹病葉からいもち病菌株を分離し、MGR586-DNA フィンガープリント分析に供試した。その結果、保菌種子および罹病葉からの分離菌株のほとんどが同一あるいは DNA フィンガープリントパターンが極めて類似したハプロタイプに属していた。従って、イネいもち病菌では不可能とされてきた野外における越冬が、エノコロおよびアキノ菌では可能であることが示唆された。

以上のように本論文はエノコロおよびアキノ菌を中心とした研究により、重要病原菌を含むイネ科植物いもち病菌の分類・進化学的理解に大きく貢献した。また、これまで詳細な検討もないまま不可能とされてきたイネいもち病菌の野外での越冬に関して再考を促す契機を与えるなど、応用面における貢献も高く評価される。これらのことより、本論文は博士（農学）の学位論文として十分な価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者氏名	山頭亜紀子
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 大島 一里
	副査 佐賀 大学 准教授 草場 基章
	副査 宮崎 大学 教授 上運天 博
	副査 鹿児島大学 教授 岩井 久
	副査 琉球 大学 教授 諸見里 善一
審査協力者	
実施年月日	平成 20 年 12 月 26 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年12月26日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有するものと認めた。</p>	

学位申請者
氏名

山頭亜紀子

[質問1] エノコログサおよびアキノエノコログサイもち病菌を研究対象とした理由は何か。

[回答1] いもち病は50種以上のイネ科植物に発生が認められるが、イネを除くほとんどの宿主では栽培種・野生種ともに希にしか発生が認められないため、原因菌の採集を容易に行うことができない。一方、エノコログサおよびアキノエノコログサは例外的に本病が頻繁に発生するため、日本の広域から採集された多数の菌株を研究に供試できる。このことより、これら植物のいもち病菌を研究対象に選んだ。

[質問2] 本研究ではこれら野生植物のいもち病菌の生態特性をイネいもち病菌のものと比較し、宿主が野生植物と栽培植物であることによるいもち病菌の進化的傾向の違いを論じているが、このようなことを論じるにはイネの野生種のいもち病菌を研究対象とすべきではなかったのか。

[回答2] いもち病が発生する野生種のイネは極めて限られており、菌株の採集が困難となる。さらに、日本では野生イネが分布していない。また、本研究の結果、ならびに、これまでの知見から種々のいもち病菌の中でもエノコログサおよびアキノエノコログサイもち病菌は系統学的に最もイネいもち病菌に近縁なことが明らかとなっており、これら菌をイネいもち病菌との比較対象として選んだことは妥当であったと考える。

[質問3] raceとpathotypeの違いは何か。

[回答3] raceは宿主の品種に対して寄生性が分化した植物病原菌の種内系統のことであり、各レースの示す寄生特異性は変異し易いことが知られている。一方、いもち病菌ではイネ、アワ、シコクビエといった宿主の属レベルに対して寄生性が分化した種内系統を示す用語としてpathotypeが用いられており、各pathotypeの寄生特異性は安定とされている。つまり、例えば、イネに特異性を示すpathotypeがアワのpathotypeに変異するようなことは通常起こらない。

[質問4] 子のう菌の交配では子のう殻が形成されれば子のう胞子も形成されることが考えられるが、エノコログサおよびアキノエノコログサイもち病菌とイネいもち病菌との交配では子のう殻のみ形成する交配組み合わせが認められる。これは本交配系のみ認められる特殊な現象ではないのか。

[回答4] いもち病菌の交配実験では子のう殻のみ形成され子のう胞子の形成が認められない交配組み合わせも頻繁に認められるため、特殊な現象ではないと考える。

[質問5] エノコログサおよびアキノエノコログサイもち病菌はどのような形態で越冬するのか。耐久胞子等の越冬器官を形成するのか。

[回答5] 種子の組織中に感染した菌糸の状態でも越冬するものと考えている。

[質問6] 種子の組織に感染することにより越冬能が向上する理由は何か？

[回答6] 種子組織中に入り込むことにより、他の微生物との競合を回避していると考えられる。

[質問7] 佐賀県内の3地点で越冬の調査を行っているが、これら地点を選んだ理由は何か。

[回答7] 佐賀県内の平野部から2地点および山間部から1地点を選び、地点間で気象条件等の環境ができる限り異なるようにして実験を行った。

[質問8] 2007年度に分離された菌株のうち2006年度の分離菌株と異なるDNAフィンガープリントパターンを有する菌株については、2006年度の菌株が越冬したものに由来すると結論できないのではないのか。

[回答8] このような2007年の分離菌株についても2006年の菌株と同一リネージに所属しており、これら兩年の菌株間におけるDNAフィンガープリントパターンの違いは数本のハイブリダイゼーションバンドのみとなっている。従って、2007年の菌株は2006年の菌株が突然変異により異なるDNAフィンガープリントパターンを有するものになったと考えている。

[質問9] [回答8] のようにDNAフィンガープリントパターンに変異が生じ易いことはエノコログサおよびアキノエノコログサイもち病菌集団のリネージの多様性が祖先集団の遺伝的多様性を反映するとした本論の結論と矛盾しないのか。

[回答9] 同一菌株の継代培養中に生じるDNAフィンガープリントパターンの変異は、少数のハイブリダイゼーションバンドの消失あるいは新規出現であり、所属リネージを変更するようなものは観察されない。また、30年以上隔てて採集された菌株でも同一リネージに所属するものが見い出されている。これらのことより、エノコログサおよびアキノエノコログサイもち病菌のリネージは変異に対して安定であり、菌株間の遺伝的分化を反映するものと考えている。

[質問10] リネージ間の遺伝的分化を検証する実験は行ったのか。

[回答10] リネージ間の遺伝的分化についてはさらに検討を必要とするが、予備実験として非病原力遺伝子の一種*AvrCO39*をプローブとしたRFLP分析を行っており、リネージ間で本遺伝領域の変異を示す多様な多型が観察されている。なお、*AvrCO39*はイネに対する非病原性に関与する遺伝子であり、エノコログサおよびアキノエノコログサのいもち病菌では中立に変異すると予想される。

[質問11] DNAフィンガープリント分析をMAGGYおよびMGR586の2つのプローブで行った理由は何か。

[回答11] MAGGYはレトロトランスポゾン因子であり「Copy and Past」でゲノム内を転移する。一方、MGR586はDNA型のトランスポゾン因子であり、「Cut and Past」で転移する。このように性質が異なる転移因子を供試することにより解析の精度および信頼性が向上すると考えた。