

学位論文題名

ジャガイモ疫病菌の集団構造と
その多様化要因に関する研究

学位論文内容の要旨

ジャガイモ疫病はジャガイモの最重要病害のひとつであり、その的確な防除はジャガイモ生産に欠かせない。本病はジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) により引き起こされる。本菌はヘテロタリックなため、A1, A2 両交配型が存在しないと有性生殖が出来ない。1980 年代にジャガイモ疫病菌の大規模な伝播がおこり、それまでは一部の地域を除き存在が確認されていなかった A2 交配型菌株が世界中で発見された。同時期に薬剤耐性株や強病原性菌株が見つかり、有性生殖がそれらの出現に関与したのではないかと考えられた。多くの地域でジャガイモ疫病菌集団が遺伝学的に解析され、データが蓄積されているが、アジアにおける集団は知見に乏しい。また、大きな多様化要因と考えられている有性生殖も、日本を含むアジアにおいては確認されていない。本研究はジャガイモ疫病菌の個体群構造および変遷を遺伝学的に把握すること、さらにその多様化要因の解明を目的とした。ジャガイモ疫病菌個体群解析は、日本およびアジア諸国の個体群について行った。日本の集団については薬剤感受性検定により、表現型の多様性を調査し、その多様化要因を有性生殖との関連で検討した。

個体群構造の解析

個体群が未解析である、アジア諸国のジャガイモ疫病菌集団の遺伝学的解析を行った。

1992-1997 年に韓国、インド、インドネシア、台湾、タイ、中国、ネパールから分離した計 90 菌株、および 1958, 1993-2002 年に分離した日本産 54 菌株を供し、RG57 プローブを用いた restriction fragments length polymorphism (RFLP) および mitochondrial DNA (mtDNA) ハプロタイプを解析した。加えて、アロザイム多型 [*glucose-6-phosphate isomerase (Gpi)*, *peptidase (Pep)*] のデータを基に、遺伝子型を決定した。

日本を除くアジア 7 カ国では、19 種の遺伝子型が同定され、うち 13 種は未報告の遺伝子型であった。ネパールにおいて、既報の優占遺伝子型と類似の遺伝子型、NP-1 が発見された。中国北部集団のひとつである JP-2 遺伝子型と、ポーランドで同定された PO-28 遺伝子型が同様の RFLP, mtDNA ハプロタイプ、アロザイム多型、交配型を示すことが判明した。複数の地域および国で同一の遺伝子型が見つかり、ジャガイモ疫病菌の国間伝播が確認された。RFLP, mtDNA ハプロタイプ、アロザイム多型により、NP-1, NP-2 遺伝子型が、世界中に分布している US-1 遺伝子型とアジアにのみ確認

されている TH-1 遺伝子型の有性後代である可能性が示唆された。

日本における遺伝子型は、US-1, JP-1, JP-2, JP-3 のみが報告されていた。本研究で 10 種の遺伝子型が同定され、そのうち 6 遺伝子型は新規の遺伝子型であった。これら 6 種の遺伝子型は RG57 を用いた RFLP でのみ識別可能であった。また新たに同定された遺伝子型は全て、既報の遺伝子型と近縁であった。これらを JP-1 群, JP-2 群, JP-3 群と命名した。今回、同一圃場で異なる交配型菌株が分離されており、有性生殖の可能性が示唆された。以上のことより、日本のジャガイモ疫病菌集団の多様性は、以前の報告よりも増加していることがわかった。

薬剤感受性検定

ジャガイモ疫病菌におけるメタラキシル耐性菌の報告より、薬剤感受性の多様性検定を行った。

北海道菌株 32 菌株 (1992-2002, 1958 年分離) を用いて薬剤感受性試験を行った。供試薬剤はメタラキシル、フルアジナム、クロロタロニル (=TPN)、シアゾファミド、シモキサニル + ファモキサドン の計 5 種を用いた。検定方法は希釈平板法とし、各薬剤の生育阻害効果を EC₅₀ 値で判断した。その結果、メタラキシルとフルアジナムにおいて薬剤の感受性に菌株間差が確認された。メタラキシルとフルアジナムにおいて 1 ppm における菌糸生育阻害率を遺伝子型間で比較したところ、各薬剤の感受性が遺伝子型間で異なることが確認された。またメタラキシル登録前である、1958 年に分離された菌株が耐性を示したことから、メタラキシル耐性は前適応であることが示唆された。

日本菌株における有性生殖および有性後代の解析

JP-1, JP-2, JP-3 遺伝子型菌株における有性生殖能を確認するため、*in vitro* で交配試験を行った。

JP-2, JP-3 菌株 (A1 交配型; 11 菌株), JP-1 菌株 (A2 交配型; 10 菌株) を用いて V-8 平板培地上で交配を行い、その卵胞子の発芽を試みた。その結果、110 組み合わせのうち、35 の組み合わせで卵胞子の発芽が確認された。これは日本産菌株同士の組み合わせによる卵胞子が発芽した、初の報告である。

上記の親株の組み合わせから 3 組を選抜し、31 菌株の単卵胞子株を分離した。この後代菌株の交配型およびメタラキシル耐性について解析した結果、親株と異なった後代菌株は 17% であった。これらのことにより日本菌株は、薬剤耐性能を交配により獲得できる可能性があることがわかった。さらに遺伝的な交雑を確認するため、親株 HK2 と KK0101 およびその後代 11 菌株を RAPD 解析に供した。その結果、91% という高率で親株と異なる多型が検出され、遺伝的交雑が示唆された。この結果より、日本において、ジャガイモ疫病菌株の間で遺伝的交雑がおきていることが考えられた。

培地上および宿主内における有性器官形成頻度

日本菌株における有性器官形成頻度 (それぞれの有性器官が共培養したどちらの菌株由来であるか) を野生株 3 菌株と β -glucuronidase (GUS) 形質転換体を用いて、3 種の交配時の培地条件 (平板培地、液体培地、植物体内) で比較した。他国の A1 菌株とは異なり、日本産 A1 交配型菌株は、40% 程度の自家交配卵胞子を形成し、かつ蔵精器を形成する傾向が高いという有性器官形成頻度を

示した。さらに植物体内での有性器官形成頻度は培地上での頻度を反映していなかった。このため、*P. infestans* が有性器官形成時に、宿主から何らかの影響を受けている可能性がある。

本研究により、日本およびアジア諸国の *P. infestans* 集団は、世界中に分布していた 'old' 遺伝子型を除けば、その多くがアジア独自の遺伝子型により構成されていることがわかった。これらの遺伝子型のいくつかは国を越えて伝播していた。また、タイ、ネパール、インド集団、および日本集団では、有性生殖によると考えられる、新たな遺伝子型の発生が確認された。日本菌株を用いて *in vitro* で交配させ、その有性後代を分離し、これらの有性後代を解析したところ、遺伝的に交雑していることが示唆され、日本において有性後代菌株が出現する可能性が考えられた。これらのことより、ジャガイモ疫病菌集団のアジア、特に日本における多様化は伝播および有性生殖によりおきていると思われる。本研究の結果は、ジャガイモ疫病の発生予察など、本病害の適切な防除に寄与できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 繁 男
副 査 教 授 幸 田 泰 則
副 査 助 教 授 近 藤 則 夫

学 位 論 文 題 名

ジャガイモ疫病菌の集団構造と その多様化要因に関する研究

本論文は図 9, 表 14, 95 頁からなる和文であり, 別に参考論文 4 編が付されている。

1980 年代にジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) の大規模な伝播がおり, 一部地域に限られていた A2 交配型菌株が世界中で発見され, 薬剤耐性株や強病原性菌株が蔓延し問題となった。本病原菌はヘテロタリックなため, 交配型 A1 と A2 による有性生殖が疑われた。欧米においては, ジャガイモ疫病菌集団が遺伝学的に同定されデータが蓄積されているが, アジア集団については知見に乏しく, 多様化要因と考えられている有性生殖についても不明である。本研究は, 日本およびアジア諸地域におけるジャガイモ疫病菌の個体群構造とその変遷を遺伝学的に把握するとともに, その個体群の多様化要因を解明することを目的とし, 個体群の遺伝子型と薬剤感受性, および有性生殖の可能性を明らかにした。

1. 個体群構造の解析

アジア産 144 菌株 (1958, 1992-2002) を供し, RG57 プローブを用いた RFLP および mtDNA ハプロタイプを解析した。さらに, 2 種のアロザイム多型のデータを加えて, 遺伝子型を決定した。

日本を除くアジア諸地域において, 19 種の遺伝子型が同定され, そのうち 13 種は未報告の遺伝子型であった。複数の国で同一の遺伝子型が見つかり, ジャガイモ疫病菌の多国間伝播が確認された。加えて, 有性生殖が起きている可能性が示唆された。

日本においては 11 種の遺伝子型が同定され, そのうち 6 種の遺伝子型は新規の遺伝子型であった。これら新規遺伝子型は全て, 既報の遺伝子型と近縁であった。これらを JP-1 群, JP-2 群, JP-3 群と命名した。以上より, 日本のジャガイモ疫病菌集団の多様性が増加していると考えられた。

2. 薬剤感受性検定

北海道菌株 32 菌株 (1958, 1992-2002) を用いて薬剤感受性試験を行った。検定方法は希釈平板法とし、その菌糸生育阻止効果を EC_{50} 値で評価した。5 種の薬剤に対する感受性を検定した結果、メタラキシルとフルアジナムにおいて感受性に菌株間差が確認された。さらにこの 2 薬剤 (1 ppm) での菌糸生育阻止率を比較したところ、各薬剤の感受性が遺伝子型間で異なった。メタラキシル登録前に分離された保存菌株が耐性を示したことから、メタラキシル耐性は前適応であることが示唆された。

3. 日本菌株における有性生殖および有性後代の解析

日本産 A1 交配型菌株 11 菌株, A2 交配型菌株 10 菌株を用いて交配を行い、その卵胞子の発芽を試みた。その結果、5 種の組み合わせで発芽が確認された。これは日本産菌株同士の交配で卵胞子の発芽に成功した、初の報告である。

親株 3 組から 31 菌株の単卵胞子株を分離した。この後代菌株の交配型およびメタラキシル耐性を解析した結果、親株と異なる後代菌株が約 2 割出現した。そのうちの 1 組について親株とその後代単卵胞子株を 3 種のプライマーを用いて RAPD 解析により精査したところ、遺伝的交雑の結果と思われる多型が検出された。したがって日本のジャガイモ圃場で疫病異菌株の間で遺伝的交雑がおきている可能性がある。

4. 培地上および宿主内における有性器官の形成頻度

野生株 3 菌株と β -glucuronidase (GUS) 形質転換体を用いて、*P. infestans* の有性器官形成頻度 (sexual preference: 共培養時における各有性器官の由来割合) を平板培地、液体培地、宿主体内で比較した。日本菌株は、約 4 割の自家交配卵胞子を形成し、かつ蔵精器を形成する傾向が高いことが明らかとなった。また植物体内での有性器官形成頻度は培地上での頻度を反映していなかったことから、*P. infestans* が、有性器官形成時に宿主から何らかの影響を受けていることがわかった。

本研究により、日本およびアジア諸地域の *P. infestans* 集団は、その多くがアジア独自の遺伝子型により構成されていることがわかった。これらの遺伝子型のいくつかは多国間伝播をし、有性生殖によって新たな遺伝子型を生じているとの可能性を明らかにするとともに、*in vitro* での日本菌株による有性世代交雑株の状況証拠を得た。すなわち、ジャガイモ疫病菌集団のアジア、特に日本における多様化は、他の地域からのジャガイモ疫病菌の伝播と、有性生殖による新たな遺伝子型の出現とによっておきている可能性が高い。本研究の成果は、ジャガイモ疫病の省力防除、種イモの管理、防疫システムの構築に基礎となる知見を提供している。

よって審査委員一同は、後藤清孝が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。