

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0171

研究課題名（和文）東南アジアにおけるイネオレンジ葉ファイトプラズマ病の発生拡大メカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of spread of Rice Orange Leaf Phytoplasma in Southeast Asia

研究代表者

千葉 壮太郎（CHIBA, Sotaro）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：70754521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：気候変動による寒冷感受性昆虫の活動地域拡大に伴い、これらに媒介される熱帯・亜熱帯地域のファイトプラズマ関連病害が今後北上すると考えられ、東南アジア諸国で発生するイネオレンジ葉ファイトプラズマ（ROLP）の国内侵入が危惧される。そこで本研究では、東南アジア諸国での病害発生状況とROLP遺伝型を調査した結果、これがタイ周辺国を起源とし、特に東アジア近傍においては特定の遺伝型のROLPが既報の昆虫に加えてタイワツマグロヨコバイ等の新規媒介昆虫によって感染地域を拡大していることが明らかとなった。また、病原体の植物体内での挙動、罹病植物の生理学的変化の一端を明らかにし、病害制御に向けて重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ROLは、1960-80年頃にアジア各地で発生が確認されていたが、その後は中国南東部での発生報告のみに留まっていた。近年の東南アジアにおけるROL発生報告増加の背景にはイネの生育ステージ全体を通して安定的に高い密度で存在する新規媒介昆虫（*Nephotettix virescens*）が病原を維持すること、日本近傍には特定の遺伝型をもつROLPが感染域を拡大していることが明らかとなり、日本への侵入警戒対象とすべき昆虫（*Nephotettix*属）と病原菌遺伝型を特定した。また、ROLPの病原性の実態についてその一端を明らかにし、単子葉植物におけるファイトプラズマ病の知見集積に貢献した。

研究成果の概要（英文）：As cold-sensitive insects expand their habitat due to climate change, phytoplasma-related diseases in the tropics and subtropics transmitted by these insects are expected to move northward, and there is concern that rice orange leaf phytoplasma (ROLP), which occurs in Southeast Asian countries, may invade Japan. In this study, we investigated the ROL disease occurrence and ROLP genotypes in Southeast Asian countries, and we found that ROLP originated in Thailand and neighboring countries and that only a particular ROLP genotype is expanding to near East Asia, probably by the contributions of newly identified insect vectors such as a green leafhopper in addition to previously reported insects. In addition, the behavior of the pathogen in plants and some physiological changes in affected plants were clarified, and important findings were obtained for disease control.

研究分野：植物保護学 植物病理学 ウイルス学

キーワード：イネオレンジ葉ファイトプラズマ ROLP 発生分布 拡散メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化と気候変動による寒冷感受性昆虫の活動域が広がるにつれて、熱帯・亜熱帯地域で発生するファイトプラズマ関連病害が今後北上すると考えられる。日本に侵入する恐れがある病害については、正しい情報に基づいて対策を講じる必要がある。本国未発生 of イネオレンジ葉 (ROL) 病は、ROL ファイトプラズマ (Rice orange leaf phytoplasma, ROLP) に起因する病害で、中国やインドで猛威を振るい始めているほか、東南アジア諸国での発生拡大が懸念される。特に、1980 年以降には一部を除いて報告例が途絶えていた ROLP に関する詳細な知見は、十分に蓄積していない。したがって、将来日本に侵入する可能性が高いイネ病害 ROL に対して、防除法開発の基盤的知見を蓄積することが重要である。

## 2. 研究の目的

ファイトプラズマ (*Candidatus Phytoplasma*) は農業上重要な絶対寄生性の病原細菌グループであり、細胞壁を持たず分離培養ができないために、実験系の構築が難しい。日本国内で発生するイネ萎黄病 (Rice yellow dwarf phytoplasma による) とは病徴が異なり、ROLP は国内未発生である。しかし、病害の発生と拡大を食止めるには、病原体ファイトプラズマの基本性状と生態系における伝搬経路を明らかにする必要がある。そこで本研究では、東南アジアでの ROLP 発生状況を調査し、感染・伝播・病原機構を「現地で」生態学的、分子生物学的に解析し、今後危惧される ROLP 感染拡大の機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ROLP の発生状況を把握するために、東南アジア諸国 (タイ、カンボジア、ベトナム、フィリピン) における病害発生調査や媒介生物調査を実施した。病徴が分かりやすいイネの生育書記に合わせて実地調査を行ない、罹病イネ、およびイネ圃場生息昆虫を採取し、PCR 法および LAMP 法で ROLP を検出した。一部の PCR 産物 (16S rRNA gene) の配列解析を行ない、分子系統学的解析を行なった。さらに、他の病原体との重複感染の可能性を PCR 法、ELISA 法により検討した。

また、分離培養不能であるため、ファイトプラズマの完全長ゲノム情報が整備されていない。そこで、NGS を用いて ROLP のゲノム解析を行なった。さらに、植物体内における ROLP の感染挙動を明らかにするため、走査型電子顕微鏡、および組織染色と蛍光顕微鏡の併用により ROLP の集積挙動、感染植物の生理的变化について観察した。最後に、低分子代謝産物のメタボローム解析により、ROL の植物体の生理的变化を網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

(1) 発生調査: カンボジア、フィリピンを中心に、ベトナム、タイでの調査を実施し、各地で ROL が散発していることが明らかになった。特に、畦沿いにオレンジ葉あるいは黄化し、矮化する個体が目立ち、病害程度の酷い圃場では全体に黄化し矮化する状況が観察された。これらの圃場で採取したイネからは PCR、LAMP で容易にファイトプラズマが検出され、PCR 産物の配列解析から 16SrI 型の *Ca. Phytoplasma asteris* が病原であることを示唆した。ROLP 遺伝型の多型には調査地により偏りが見られた (下記)。尚、インドネシア、タイワンなどの各国においては、諸事情により開発した LAMP 法を用いて現地圃場においてオン

サイト調査が実施に至らず、今後のプロジェクトとして現地機関との連携において実施することを検討している。

(2) 媒介生物調査：ファイトプラズマは一般に吸汁昆虫に媒介される。これまでにイナズマヨコバイ(ZLH)、ツマグロヨコバイ(GLH-Nc)によって媒介されることが報告されている。そこで、カンボジアのイネ圃場において昆虫の群衆構造を調査したところ、GLH-Nc は温帯生息のため確認されず、イナズマヨコバイは圃場中の昆虫密度が顕著に低かった。この傾向はフィリピンのイネ圃場でも確認された。一方、ドビロウンカ(BPH)はイネ生育初期～収穫前に高い密度、タイワンツマグロヨコバイ(*Nephotettix virescens*)(GLH-Nv)が生育期全体を通して安定的に高密度で生息することが確認された。そこで、各昆虫種のROLP保毒率を調査した結果、ROLPがZLHから84%、GLH-Nvから26.3%検出された。その他、BPH等の他の昆虫からも低率でROLPが検出される。

(3) 伝搬試験：GLH-Nvを用いてROLPの伝搬試験(獲得5日、伝搬10日、病徴観察14日×20昆虫グループ×3セット)を行なった。その結果、処理したイネに対し10.6%の苗に病徴が生じた。さらに、処理した昆虫グループ(3匹/グループ)60のうち27でROLPの保毒が確認された(45%)。既報のZLH伝搬率は同条件で13%であり、近年の東南アジア諸国でのROLP発生確認にGLH-Nvが関与している可能性が非常に高い。加えて、最近の報告では、発病圃場で捕獲したZLH、GLH-Ncの伝搬率は約17-62%とより高い傾向が見られ、獲得条件により伝搬率が大きく振れると考えられる。また、BPHの伝搬性については現在までのところ確認できていない。

(4) ゲノム解析：ROLPの中国株ドラフトゲノムが報告されている。本研究では、完全長のゲノム配列取得を目指して、MinIONを利用したロングリード解析による解析を試みた。カンボジア株のショートリードを基盤情報としてロングリード解析を試行したが、長い配列情報の取得はできなかった。DNAサンプルに混入する爽雑物(スターチ等、下記参照)によるポア詰まりの解消がカギになると思われる。尚、解析したカンボジア株は中国株にごく近似であった。また、各地で採取したROLPの遺伝型を16S rDNAの部分配列解析結果から分子系統学的に解析したところ、タイ、カンボジアに多様性に富んだROLPが存在し、これらの内、特定の遺伝型を持った集団がベトナム、中国、フィリピンで特異的に検出された。したがって、タイを中心とする地域にROLPの起源があり、一部がベトナム、中国、フィリピン等の東北方向へ拡散したと見取れる。以上の情報は図1の通り。

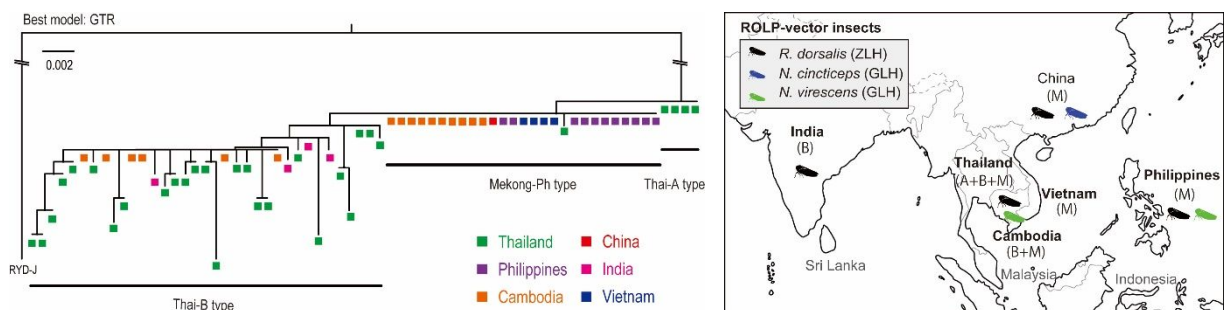


図1. ROLP 16S rDNA 部分配列に基づく分子系統樹(左)・ROLP分布と媒介昆虫(右)

(5) ツングロウイルスとの共感染：イネツングロウイルス(RTBVとRTSVの2種；共感染

で劇症化)はツングロ病という ROL に似た症状を誘導する。GLH-Nv を含むヨコバイ類で伝搬することが知られており、ROLP との共感染により病害強度が増す懸念もある。そこで、本研究で採取した一部のサンプルを用いて、PCR および ELISA により 2 種ウイルスの検出試験を行なった。その結果、ROLP 非感染であったでは RTBV が良好に検出されるケースがあったのに対し、ROLP 感染植物では RTBV の検出は殆ど見られないか、微弱に検出された。これまでに、ROL やツングロ病より激しい症状が目撃されていないことから、両者の共感染でシナジー効果による強毒化が起こる可能性は低いと考えられる。一方で、調査当初に比べ重複で検出される件数が増えているので、注意を要する。

(6) ROLP の局在性：ファイトプラズマは植物の師部組織に集積し、同組織から栄養分を吸汁する昆虫に媒介される。ROLP も透過型電子顕微鏡観察により師部細胞に感染する様子が報告されている。本研究では、周辺細胞における影響も観察する目的で、走査型電子顕微鏡での観察を行った。その結果、師部に顕著に凝集するファイトプラズマに加え、周辺細胞にはスターチ粒の集積と思われる観察像が得られた。さらに、DAPI、ルゴールによる染色と蛍光・光学顕微鏡観察により、同様の結果が得られている。

(7) ROLP 感染拡大の機構と対応：以上の結果を総合し、東南アジア諸国での ROL 拡散機構を紐解くと、少なくとも 3 種の吸汁昆虫が ROL 発病イネの師部組織から ROLP を獲得し、これらがイネの作付け期間を通して維持・伝搬し、散発的発病を徐々に拡大させていると考えられる。特に熱帯・亜熱帯地域では継続的にイネが作付けされており、日本との作付け体系とは異なる点で病害が収束する機会を逸している可能性がある。ROLP の中間宿主が明確にされていないため、より広い視野で生態学的調査を進める必要がある。また、昆虫の自然侵入阻止には限界があるため、仮に日本で本病害が認識された場合にはこれらの媒介昆虫を重点的に防除し、少なくとも国内で越冬させないことが ROLP 防除には重要である。

(8) ROLP の感染生理学 (情報未公開): ROL の病態について理解するため、まずパラフィン切片を作製し、各種組織染色・蛍光顕微鏡観察によって感染植物に集積する化合物(例えばカロース等)の状況を調査した。また、健全植物・感染植物間の低分子代謝産物のプロファイルを調査するため、メタノール抽出物を Orbitrap UHPLC で比較解析した。その結果、植物ホルモン等多数の蓄積変動した代謝産物を見出した。当初は師部組織の抽出液を使用する計画であったが、カンボジアにおいて十分量が確保できず断念した。本項目は、これらに加えてトランスクリプトーム解析を計画していたが、RNA の輸送に問題があり実施できていない。プロジェクト終了後となるが、現在再試行中であるので、以上の結果と合わせて取り纏め、投稿論文上で報告する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Gilda B. Jonson, Jerlie M. Matres, Socheath Ong, Toshiharu Tanaka, Il-Ryong Choi, Sotaro Chiba	4. 巻 9 (12)
2. 論文標題 Reemerging Rice Orange Leaf Phytoplasma with Varying Symptoms Expressions and Its Transmission by a New Leafhopper Vector - <i>Nephotettix virescens</i> Distant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 990 (1-13)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9120990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Socheath Ong, Gilda B. Jonson, Matteo Calassanzio, Soriya Rin, Cheythyrih Chou, Takao Oi, Ikuo Sato, Daigo Takemoto, Toshiharu Tanaka, Il-Ryong Choi, Chhay Nign, Sotaro Chiba	4. 巻 10
2. 論文標題 Geographic Distribution, Genetic Variability and Biological Properties of Rice Orange Leaf Phytoplasma in Southeast Asia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 169 (1-14)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10020169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 千葉 壮太郎	4. 巻 49
2. 論文標題 東南アジアで散発するイネファイトプラズマ病の伝染環	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本マイコプラズマ学会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 オンソチエ, ジョンソングルダ, マトレスジェリー, 田中利治, 崔一龍, 千葉壮太郎
2. 発表標題 イネオレンジ葉ファイトプラズマを伝搬する新規媒介昆虫 <i>Nephotettix virescens</i> Distant
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部会 (オンライン)
4. 発表年 2020年~2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 利治 (Tanaka Toshiharu)  (30227152)	名古屋大学・農学国際教育研究センター・客員教授  (13901)	
研究分担者	大井 崇生 (Oi Takao)  (60752219)	名古屋大学・生命農学研究科・助教  (13901)	
研究分担者	佐藤 育男 (Sato Ikuo)  (70743102)	名古屋大学・生命農学研究科・助教  (13901)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ニン チャイ (Ngin Chhay)		
研究協力者	チョイ イルリョン (Choi Il-Ryong)		
研究協力者	ジョンソン ジルダ (Jonson Gilda)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	オン ソチア  (Ong Socheath)		
研究協力者	リン ソリヤ  (Rin Soriya)		
研究協力者	カラッサンチオ マッテオ  (Calassanzio Matteo)		
研究協力者	ラッタナクリータクル チャイナロン  (Rattanakreetakul Chainarong)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カンボジア	General Directorate of Agriculture	Royal University of Agriculture		
フィリピン	International Rice Research Institute	University of Philippines Los Banios		
タイ	Kasetsart University			
イタリア	University of Bologna			