

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H04618

研究課題名(和文) ベトナムで発生するイネ白化病の発生状況調査と病原体の解析

研究課題名(英文) Epidemiological and biological analysis on rice bleaching disease occurred in Vietnam

研究代表者

岡崎 伸 (Okazaki, Shin)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40379285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ベトナムではイネが白化する新規病害(白化病)が発生している。白化病に罹ったイネは、生育途中で植物体が白化して枯死するため、病害発生により収量が激減する。研究開始当初、この病害についての研究はなく、病害発生状況や病原菌、病害に関連する条件等は不明であった。本研究では、ベトナムとの共同研究により、白化病の発生状況や病害に関連する条件(低気温、長雨、休耕期間が短いなど)を明らかにし、さらに原因菌として *Methylobacterium indicum* を初めて同定した。また、白化病菌のゲノム解析を行い、病原遺伝子の推定、LAMP法によるイネ植物体や土壌から病原菌を高感度に検出する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベトナムで発生しているイネ白化病では生育途中で植物体が白化して枯死するため、病害発生により収量が激減する。ベトナムの稲作農家はその被害に苦しみ、病害発生については一部メディアで報道されていたものの、研究開始当初はほとんど研究が行われていなかった。本研究により、イネ白化病の発生状況や病害に関連する条件が明らかとなり、さらに病原菌検出法が開発されたことで、病害対策への一歩を踏み出したといえる。また、病原菌として同定された *Methylobacterium* 属細菌は一般的に植物共生細菌として知られており、これまで病原菌としての報告はなく、植物病理学など関連分野へ新たな知見を提供するものとなった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, a new disease (bleaching disease) that causes the leaves of rice plants to turn white has been occurring in Vietnam. The rice plants affected by the disease turn white and die during growth, resulting in a drastic decrease in yield in the diseased fields. At the beginning of this research, little research had been conducted on this disease, and the disease incidence, pathogens, and conditions related to the disease were unknown. In this study, through joint research with Vietnam, we clarified the occurrence of bleaching disease and conditions related to the disease (low temperature, long rainfall, short fallow period, etc.), and identified *Methylobacterium indicum* as the causal agent for the first time. In addition, through genome analysis of *Methylobacterium indicum*, we found that the pathogenic gene is located on a plasmid, and developed a highly sensitive method for detecting the pathogen in rice plants and soil by the LAMP method.

研究分野：微生物生態学、植物生理学、植物微生物相互作用

キーワード：イネ 病害 ベトナム *Methylobacterium* LAMP法

1. 研究開始当初の背景

ベトナムでは、イネの葉が白化する病気（白化病）がたびたび発生することが知られている（図1）。白化病に罹ったイネは、生育途中で植物体の大部分が白化して枯死するため、病害発生圃場では収量が激減する。ベトナムの稲作農家はその被害に苦しみ、病害発生についてはベトナム国内で報道され始めてきてはいたものの、研究開始当初は専門家による調査・研究はほとんど行われていなかった。

イネ白化病は、いもち病や白葉枯病など、既知のイネ病害や、一部の除草剤にみられる白化作用とは症状が異なり、原因は同定されていなかった。さらに、いもち病や白葉枯病などに対する主要な農薬は全く効果がないとのことから、早急に専門家による調査・研究を行い、対策を講じる必要があった。

申請者らは、ベトナム・カントー大学との共同研究により、イネの共生微生物の単離を行ってきた。その中で、ベトナム Vinh Long 省の健全なイネから単離した *Methylobacterium* 属細菌 VL1 株が、実験室内でイネに接種すると白化症状を起こすことを発見した（図2）。VL1 株を接種されたイネは、2週間程度で内側の若い葉から白化症状が顕れ、数日後には枯死する。その白化症状はベトナムで発見されているものと極めて類似していることから、VL1 株がイネ白化病の原因菌である可能性が示唆された。しかしながら、研究開始当初ベトナムの白化病イネからの同菌の単離は行われておらず、VL1 株が白化病の原因菌かどうかの確定には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ベトナムにおいて白化病の発生状況調査を行い、稲品種や栽培法など病害発生に関する諸条件を明らかにすること、また、イネ白化病の病原菌を分離・同定・解析することで、白化病の基本情報を取得して防除方法開発へつなげることを目的とした。本研究の成果は、新規イネ病害「白化病」の発生メカニズムとその病原機構解明、および病害防除対策を講じる上で重要な基礎的知見となる。

3. 研究の方法

(1) ベトナムにおける白化病発生状況調査

ベトナム側共同研究者である Cuu Long デルタ稲研究所、およびカントー大学の研究者と病害発生地域であるメコンデルタ周辺の稲作に関する情報を収集、分析した。白化病発生圃場と非発生圃場について、それぞれ、発生前後の気象条件（温度、湿度、日照など）、栽培されているイネ品種、播種方法、施肥管理などを調査した。また、土壌については窒素、リン酸、カリ、および pH や電気伝導度など、土壌の基本的な理化学性を調査した。

(2) 白化病菌の分離・同定

ベトナム各地において病害発生圃場でイネを採取した。採取したイネは部位別（根、茎、葉）に分け、乳鉢で摩砕して滅菌水に懸濁して、糸状菌用、細菌用培地に塗布した。病原体がウイルスである場合も考慮し、採取した植物体の一部は冷凍保存しておいた。微生物の単離は、*Methylobacterium* 属細菌を選択する MMS 培地（0.5%メタノール、10 μ g/ml シクロヘキシミドを添加）を使っても同様に行った。これにより、白化病イネから *Methylobacterium* 属細菌を選択的に単離した。

白化病症状を示すイネから分離してきた微生物については、滅菌土壌および表面殺菌したイネ種子を用いて、個別に接種試験を行い、白化病症状を指標に病原性の有無を判定した。また、接種した病原体の再分離が可能か確認した。白化病菌を確定できた場合は、16S/18S rRNA 遺伝子や *recA* 遺伝子その他遺伝子の塩基配列を決定し、種同定を行った。また、生化学テスト、薬剤耐性テストなどを行い、白化病防除のための基礎データとした。

(3) 白化病菌のゲノム解析および病原遺伝子同定

イネ白化病の原因菌である *Methylobacterium* 属細菌 VL1 株についてゲノム解析を行なった。VL1 株のゲノム DNA は SDS/ProteaseK/CTAB 法により抽出した。抽出したゲノム DNA は、PacBio RSII シーケンサーおよび Illumina HiSeq 2500 シーケンサーを使用して塩基配列を解読した。PacBio のシーケンス結果は、デフォルト設定の HGAP3 アセンブラを使用してアセンブリした。Illumina のシーケンス結果は、Pilon v1.22 を使用してドラフトシーケンスの改善を行なった。プラスミドの検出と配列検証のために Platanus v1.2.4 を使用した。完全なゲノム配列は、DDBJ Fast



図1. ベトナムの水田に発生したイネの白化病。ベトナム Vinh Long 省のテレビ局THVLで2014年12月30日に放送された。
参照URL: <https://www.youtube.com/watch?v=Pqax7Abb6G8>



図2. *Methylobacterium*属細菌VL1株を接種したイネ。接種後14日後、白化病の病状がみられる。接種後20日後には完全に枯死した。

Annotation and Submission Tool (DFAST)を使用して注釈付けを行なった。

(4) 白化病防除へ向けた病原菌検出法の開発

病原株 (VL1 株) と非病原性近縁株のゲノム比較により、病原株に特異的染色体領域を同定した。この病原菌特異的領域を利用して、LAMP 法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification) により土壌中やイネ植物体中から特異的に病原体を検出する方法を検討した。

4. 研究成果

(1) ベトナムにおける白化病発生状況調査

ベトナムの共同研究者からの白化病発生の報告に基づき、2017年12月、2018年12月、2019年5月に日本側研究も同行してベトナム各地での病害発生調査を行なった。白化病の発生が多発している Vinh Long 省の約 100 圃場を調査し、病害発生 5 件を確認した。いずれも直播栽培で播種後 1、2 週間の圃場であった。農家への聞き取り調査の結果、病害発生時には低気温で雨の日が続いていたこと、前作からの休耕期間が短く、収穫後の稲株は生のまま(焼却せず)土壌に鋤き込んだこと、などが共通項目としてあげられた。また、イネ種子は自家採種ではなく購入しているとのことであったが、品種や購入先などについては農家ごとに意見が異なり、病害発生との明確な傾向は認められなかった。この点については、ベトナム側の研究者が中心となって調査を継続している。

(2) 白化病菌の分離・同定

病害発生圃場で採取したイネから微生物を単離した。今年度は病原菌の可能性が高い *Methylobacterium* 属細菌を中心に単離を行なった。約 50 株の *Methylobacterium* 属細菌の単離に成功した。一部をイネに接種して病原性を確認したところ、白化病を誘導するものを 7 株確認した (図 3)。16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、全 7 株が私たちが先に分離していた白化病菌 VL1 株と同様に *Methylobacterium indicum* に最も近縁であることが判明した。この結果は *M. indicum* がベトナムでイネ白化病を起こす原因菌株であることを強く裏付けるものであった。

また、白化病菌の接種濃度と白化病罹病率の関係について解析した。VL1 株の濃度を変えてイネ品種日本晴に接種し、栽培 2 週間後に白化病罹病率を調査した結果、接種濃度に応じて罹病率が上昇すること、1 種子あたり 1000 細胞以下の接種量では白化が観られないことが判明した。この結果から、イネの栽培初期からある程度以上の白化病菌が種子周辺に存在していることが白化病発生に必要であることが示唆された。

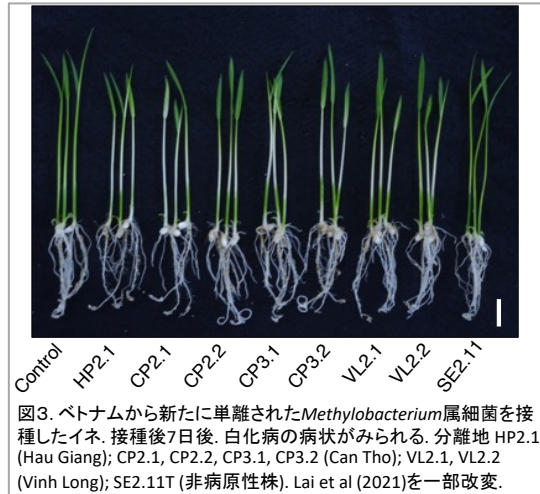


図3. ベトナムから新たに単離された *Methylobacterium* 属細菌を接種したイネ。接種後7日後、白化病の病状がみられる。分離地 HP2.1 (Hau Giang); CP2.1, CP2.2, CP3.1, CP3.2 (Can Tho); VL2.1, VL2.2 (Vinh Long); SE2.11T (非病原性株)。Lai et al (2021)を一部改変。

(3) 白化病菌のゲノム解析および病原遺伝子同定

白化病菌の病原因子の特定、および圃場における病原体の検出のため、白化病菌 VL1 株のゲノム解析を行なった。VL1 株のゲノムは、単一の染色体と 6 つのプラスミドから構成され、ゲノムサイズが 7.05Mbp、GC 含量が 70.5%であった (図 4)。VL1 株のゲノムには 6,599 の推定コード配列が含まれており、36 の rRNA と 114 の tRNA を保持していた。

白化病菌 VL1 株と非病原性の近縁株 (*M. indicum* SE2.11、*M. indicum* SE3.6) とのゲノム比較を行ない、VL1 株に特有なゲノム領域を同定した。VL1 株に特有なゲノム領域はプラスミドに多く存在し、バクテリオファージのゲノムやタンパク質分泌系関連遺伝子と相同性を示す配列が含まれており、VL1 株の病原性との関連性が推察された。

白化病菌 VL1 株は主染色体 1 つと 6 個のプラスミドを保持している。白化病の原因遺伝子の存在部位を大まかに判別するため、プラスミドを欠失させた変異株を作成してイネに接種し、白化病を誘導するか調査した。その結果、プラスミド 1 (pVL1-1、153,568bp) を欠失した変異株において、白化病誘導能の消失が確認された。他のプラスミド欠失株では野生株と同様な白化病が観察された。この結果か

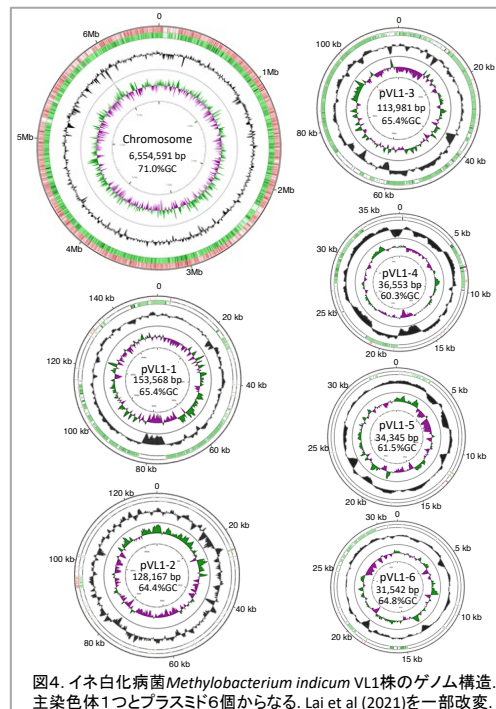


図4. イネ白化病菌 *Methylobacterium indicum* VL1 株のゲノム構造。主染色体 1 つとプラスミド 6 個からなる。Lai et al (2021)を一部改変。

ら、白化病の原因遺伝子がプラスミド1に存在していることが示唆された。

なお、上記の VL1 株の全ゲノム配列解読、比較ゲノム解析は新学術領域研究『学術研究支援基盤形成』・先進ゲノム支援(先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム)の支援を受けて行なった。

(4) 白化病防除へ向けた病原菌検出法の開発

白化病菌特異的なゲノム領域を用いて LAMP 法による白化病菌検出法を開発を行った。複数の白化病菌特異的 DNA 領域と種々のプライマーを用いた検討を行なった結果、これまでに PCR 法よりもおよそ 80 倍程度検出感度の高い方法を開発することができ、VL1 株を接種したイネの葉、茎、根、および接種土壌から白化病菌を検出可能であった。今後、ベトナムの圃場のサンプルを用いて病原菌検出の実用性を検討する必要がある。

以上、ベトナムメコンデルタ水田からの白化病菌の単離、ゲノム解析、LAMP 法による病原菌高感度検出法の開発、について原著論文にまとめ、専門分野の学術雑誌に投稿した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Lai Khoa, Thai Nguyen Ngoc, Miwa Hiroki, Yasuda Michiko, Huu Nguyen Hiep, Okazaki Shin	4. 巻 35
2. 論文標題 Diversity of <i>Methylobacterium</i> spp. in the Rice of the Vietnamese Mekong Delta	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.ME19111	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 Lai Khoa, Nguyen Ngoc Thai, Yasuda Michiko, Dastogeer Khondoker M.G., Toyoda Atsushi, Higashi Koichi, Kurokawa Ken, Nguyen Nga Thi Thu, Komatsu Ken, Okazaki Shin	4. 巻 36
2. 論文標題 Leaf Bleaching in Rice: A New Disease in Vietnam Caused by <i>Methylobacterium indicum</i> , Its Genomic Characterization and the Development of a Suitable Detection Technique	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.ME21035	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

〔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 Lai Trinh Anh Khoa, Nguyen Thai Ngoc, Yasuda Michiko, Shin Okazaki.
2. 発表標題 Isolation and characterization of <i>Methylobacterium indicum</i> causing leaf bleaching disease in rice plants.
3. 学会等名 植物微生物研究会第30回研究交流会, 2021.
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学植物微生物研究室
植物微生物研究室（岡崎研究室）
https://www.plant-microbiology.jp

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	桂 圭佑 (Katsura Keisuke) (20432338)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (12605)	
研究分担者	佐々木 和浩 (Sasaki Kazuhiro) (70513688)	国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・ 利用領域・任期付研究員 (82104)	削除：2018年12月13日
研究分担者	田中 治夫 (Tanaka Haruo) (20236615)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (12605)	

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		
ベトナム	ホーチミン市自然科学大学	カントー大学	Vinh Long省農政局