

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03006

研究課題名(和文) ベトナム産熱帯有用植物に寄生するさび病菌の多様性解明

研究課題名(英文) Study of biodiversity of rust fungi on tropical useful plants in Vietnam

研究代表者

岡根 泉 (Okane, Izumi)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60260171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：コーヒーノキ葉さび病の起源と移動経路について集団遺伝学的調査を行った。ベトナムでの本病の病原菌は *Hemileia vastatrix* であることを確認するとともに、41カ所のコーヒーノキ農園で採集した罹病葉サンプルから本菌の核リボソームDNA内部転写スペーサー領域について解析を行った結果、北西部を起源地とする南部への拡大ルートと、中央高地を起源地とする南部への拡大ルートが推定された。また、ベトナム国内で採集したサビキン標本約190点を調査した結果、30属、約70種を超えるサビキンの生息が示唆され、新種候補として *Maravalia*-like サビキンおよびベトナム新産種として17属23種を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベトナム産さび病菌の種多様性と発生生態の解明を目的とし、有用植物を中心にさび病の発生調査および病原サビキンの標本と生物学的情報の収集と解析を行った本研究の成果は、農林業生産上の重要なリスクである植物病原菌の正確な同定と発生生態の把握につながり、持続的農林業生産や森林環境の保全と再生を行うためにも重要である。また、日本を含む東アジアへの新規病原菌としてのさび病菌の移入とその制御に備えるためにも重要である。そして、流通システムの発展の中で起こっている世界規模での植物の移動に伴うサビキンの非生息地域への拡散と異種交配による強病原性個体群の創出メカニズムの理解と解明につながるものである。

研究成果の概要(英文)：A population genetic study of the origin and migration of coffee leaf rust in Vietnam was conducted. The causal agent of the disease was identified as *Hemileia vastatrix*, and the internal transcribed spacer region of the fungal nuclear ribosomal DNA was analyzed from diseased leaf samples collected from 41 coffee tree plantations. The results indicated two routes of spread, one southward with origins in the northwest, and the other southward with origins in the central highlands. The study of about 190 specimens of rust fungi collected in Vietnam suggested a distribution of more than 30 genera and about 70 species, and recognized *Maravalia*-like fungus as new species candidates and 23 species in 17 genera as new species from Vietnam.

研究分野：植物寄生菌学

キーワード：ベトナム さび病 サビキン コーヒーノキ葉さび病 東南アジア 生物多様性 インベントリ

1. 研究開始当初の背景

ベトナム北部は温帯夏雨気候、中部と南部地方は熱帯でありながら、中部は季節風(モンスーン)の影響で気候が大きく変わる熱帯モンスーン気候、南部は雨季と乾季が明瞭に区別されるサバナ気候に属するとされている。また、ベトナムには南北にデルタ地帯などの低地がある一方で、北部にはヒマラヤ山脈に連続する山岳地帯があり、南西部にはインドシナ半島を縦断するチュオンソン山脈が存在する。南シナ海に沿って南北に延びる国土に複雑な気候条件と標高差の大きな地形がモザイク状に分布することが、植物種の多様性と植生の複雑性を高めている。そのため、植物に寄生する生体栄養性のさび病菌(サビキン)の種多様性を高めていると推測される。しかし、ベトナムではこれまで体系的なサビキンの分類学的・生態学的調査研究が行われていなかったため、東南アジア大陸部におけるサビキンインベントリーの空白地点であった。これまでベトナムで、Trinh et al. (2001) によって 40 種が、その後 Kaneko et al. (2007) によって新たに 13 種のサビキンが報告されているのみである。

新第三紀遺存植物相の種多様性が極めて高い東南アジア大陸部と東アジアにおけるサビキンの生物地理と種分化を統一的に理解する上で、インドシナ半島東部に位置し、日本を含む東アジアを結ぶ位置にあるベトナムでのサビキンの種多様性と発生生態の実態解明が重要であると考えた。一方、農林業生産上の重要なリスクである植物病原菌の正確な同定と発生生態の把握は、持続的農林業生産や森林環境の保全と再生を行うために重要である。この観点から、ベトナムを含む東南アジア大陸部から日本を含む東アジアへの新規病原菌としてのサビキンの移入とその制御に備えることは喫緊の課題である。すなわち、流通システムの発展の中で起こっている世界規模での植物の移動に伴うサビキンの非生息地域への拡散と、異種交配による新規(強病原性)個体群の創出メカニズムについても着目していく必要があると考えた。

2. 研究の目的

インベントリーデータがほとんど皆無であるベトナムにおいて、世界第 2 位の生産量を誇るコーヒーノキを含む有用植物上および野生植物でのさび病の発生生態調査と病原サビキンの収集を行い、サビキン種の多様性、さび病の発生生態を明らかにし、ベトナム産サビキンインベントリーを構築することが本研究の目的である。

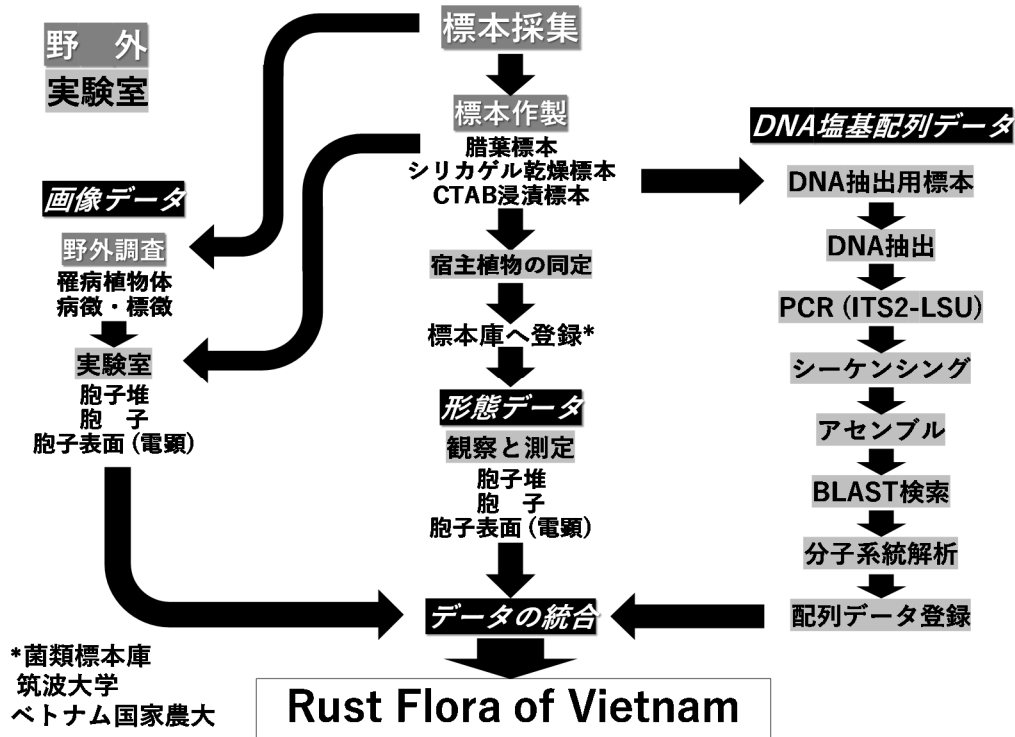
3. 研究の方法

2022 年 9 月、2023 年 3 月および 2023 年 12 月から 2024 年 1 月にかけて、ハノイ中央直轄市、ニンビン省(北部)、ダクラク省(中央高原)、タイニン省、ビンズオン省、ホーチミン中央直轄市近郊(南東部)で現地調査を行った。なお採集調査は、ベトナム国家農業大学(VNUA)、西部高地農業および森林科学研究所(WASI)ならびにホーチミン・バイオテクノロジーセンター(HCMBIOTECH)の共同研究者の協力の下で実施した。採集したサビキン標本は、現地にて適切に処理を行い乾燥標本とする一方で、DNA 抽出材料としてシリカゲルを用いた乾燥試料の作製も行った。宿主植物の同定は、ベトナム国家農業大学の協力の下で可能な限り現地にて行った。これらの採集試料については、農林水産大臣の許可を事前に得た上で輸入し、形態学的および分子系統学的手法により同定作業を進めた。

分子系統学的解析では、まず、標本上に認められたサビキンの孢子堆から火炎滅菌したメスでかきとった孢子を DNA extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.3) , 1.5 mM MgCl₂ , 50 mM KCl , 0.01 % SDS , 0.01 % Proteinase K] が 20 μ l 入った 0.6 ml チューブに入れ、ZYMOREACTER AB-1820 (ATTO, 東京, 日本) を用いてインキュベートを 37 $^{\circ}$ C で 60 分、熱変性を 90 $^{\circ}$ C で 10 分を行い、その後 30 μ l の SDW を添加し希釈した。この抽出 DNA をテンプレートとし、プライマーに Rust2inv (Aime, 2006) と LR6 (White et al., 1990) を用いた PCR を行い核 rDNA ITS2 - LSU 遺伝子を増幅し、シーケンス解読を行い、塩基配列情報を取得した。

ベトナムにおいて経済的に重要なコーヒーノキならびに近縁植物を宿主とするサビキンである *Hemileia* 属サビキンについては、2019 年にベトナム南東部、中央高地および北西部の 3 地域の計 85 のコーヒーノキ農園で実施したコーヒーノキ葉さび病 (coffee leaf rust: CLR) の発生生態調査で採集された標本を供試した。まず、核 rDNA ITS 領域遺伝子塩基配列に基づく種同定を行った。そして、国際塩基配列データベースより取得したベトナム以外の地域集団の ITS シーケンスデータを含めた 83 データに基づき本病原サビキンのハプロタイプを検出し、集団遺伝学的解析を行った。本解析では、各集団のハプロタイプ数、ハプロタイプ多様性 (Hd)、塩基多様性 (Pi) を算出した。また、各個体群内および異なる個体群間の分子分散分析 (AMOVA) を算出した。その上で、ハプロタイプ間の遺伝的関係を評価することで、ベトナムにおけるコーヒーノキ葉さび病菌の発生生態と拡散経路を推定した。

本研究では、次頁に示す作業フローに沿って行った。



4. 研究成果

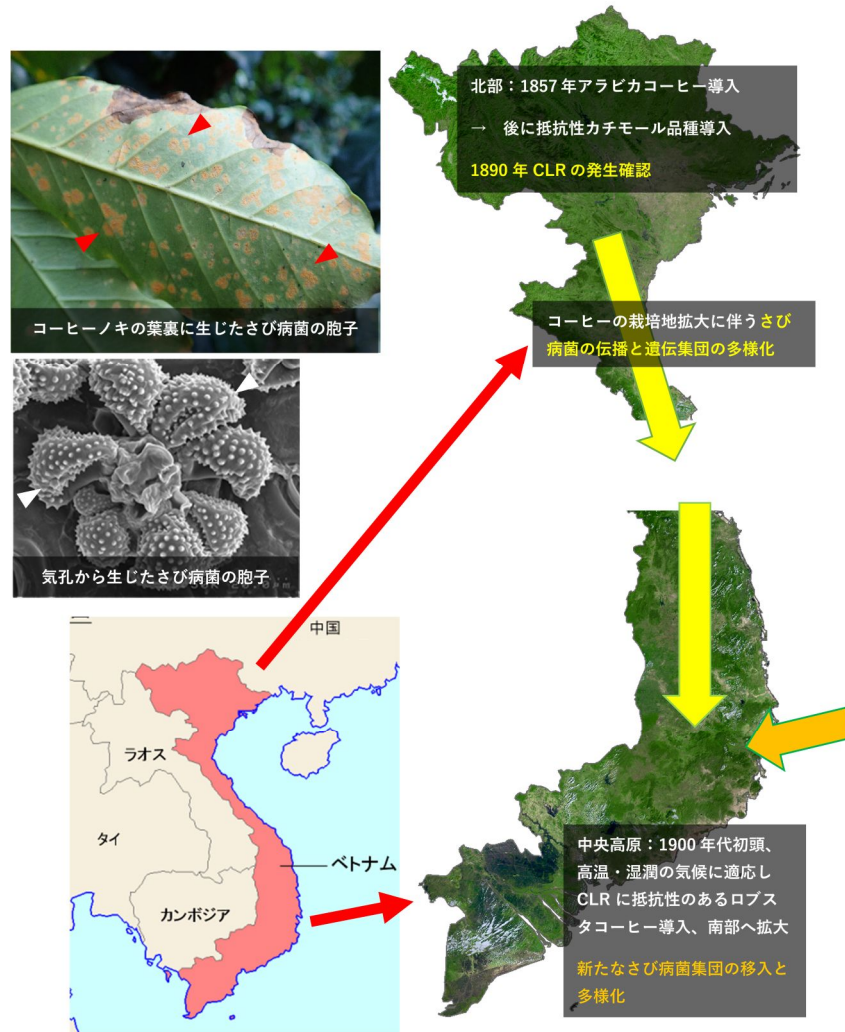
ベトナムのコーヒーノキ葉さび病菌について

コーヒーノキ栽培の主要地域となっているベトナム南東部、中央高地および北西部の3地域の計85農園で本病の発生調査を行うと同時に、罹病葉を採集し病徴の程度から重症度を評価した。その結果、ベトナム南部から北部、低地から高地に至る41農園で本病の発生を確認し、現在ベトナムで栽培されているほぼ全てのコーヒーノキの種および品種が本病原サビキンに感受性であることが明らかとなった。特に、カチモール品種が高い感受性を示し激しい症状を呈する一方で、ロブスタ種については重症度評価にばらつきがあり感受性は中程度であった。

採集された本病罹病葉上に形成されたサビキンの夏胞子の形態は *Hemileia vastatrix* に類似し (Ritschel, 2005)、核 rDNA-ITS 領域遺伝子塩基配列の類似度比較によりベトナムで発生している本病の原因サビキンは *H. vastatrix* であることを確認した。

Hemileia vastatrix の83標本(ベトナム産41標本、タイ産2標本、および中南米諸国産を主体とする40標本; 後者のデータは国際塩基配列データベースより取得)に由来する rDNA-ITS 塩基配列情報に基づく集団遺伝学的解析の結果、ベトナム産 *H. vastatrix* 集団と中南米諸国(特にメキシコ、ブラジル)の集団は遺伝的に近い関係にあることが明らかになった。ベトナムの *H. vastatrix* 集団には36のハプロタイプが見出され、ベトナムでの各地域集団には異なるハプロタイプ組成で明確に識別できる個体群構造が確立されていないことが示唆された。このことは、ベトナムの異なる地域で採集された *H. vastatrix* 集団間で遺伝的距離が近く、本菌の移動が地域間で頻繁に生じているとの推定と整合していた。そして、ほとんどの祖先的ハプロタイプがベトナム北西部に存在し、その割合も他の地域より高いことが明らかになった。さらに、分子系統学的解析から北西部の *H. vastatrix* 集団がベトナムの他の地域集団と遺伝的に密接な関係にあることが示唆された。このことから、ベトナムでの本病の発生は、同国でのコーヒーノキの最初の栽培地域とされる北西部を起源として南部へ広がったと推定された。また同時に、ハプロタイプネットワーク解析と NeighborNet 解析から、現在ベトナムでのコーヒーノキの主要栽培地の1つである中央高原を起源としたサビキン集団が、ベトナム南部でさらに拡大していることが示唆された(次頁の図を参照)。

なお本研究では、ベトナムで採集された *H. vastatrix* 標本から抽出した DNA 試料を用いてミトコンドリアのシトクロム *b* (CYTB) 遺伝子を解析した。本遺伝子の特定領域内でのアミノ酸変異は QoI 剤耐性に関わることがサビキンを含む病原糸状菌で報告されているが、*H. vastatrix* においては CYTB 遺伝子内のエクソン 2 および 3 領域には塩基置換が認められない一方で、全ての標本においてエクソン 4 に 2 つの同義置換を認め、ベトナム産の *H. vastatrix* 集団は QoI 剤に対して感受性が高いことが示唆された。



地図： https://www.travel-entech.jp/world/map/vietnam/Map_of_Vietnam_and_neighboring_countries.htm

コーヒーノキ葉さび病の病徴と病原サビキン *Hemileia vastatrix* の顕微鏡写真、およびベトナムにおけるコーヒー栽培の歴史と本病の発生・拡大の経緯

(<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/biology-environment/20220405130000.html>)

ベトナムのサビキン多様性について

文献調査に基づく東南アジア各国におけるサビキン種の多様性は、フィリピンで53属320種、タイで37属137種、マレーシアで24属95種、インドネシアで32属147種が報告されている一方で、ベトナムでは24属52種となっている。ベトナムのサビキン相がヒマラヤ地域、東南アジア大陸部および東アジア各地域のサビキン相とどのように共通あるいは相違するのか、また、ベトナムの気候と地理的特性に特徴付けられるサビキン相や固有種の存在を明らかにすることは学術上解明すべき重要な課題といえる。

2022年9月、2023年3月および2023年12月から2024年1月にかけてハノイ中央直轄市、ニンビン省、ダクラク省、タイニン省、ピンズオン省、ホーチミン中央直轄市近郊での現地調査により約190点のサビキン標本を採集した。これまで実施した形態学および分子系統学的検討に基づく同定の結果、以下の新知見が得られている。

新種候補として *Maravalia* 様サビキン [ITS2 - LSU rDNA 配列による BLAST 検索で *Puccorchidium polyalthiae* JF263493 と相同性 95%] が見出された。LSU 領域約 850bp に基づく分子系統解析の結果、本 *Maravalia* 様サビキンは、BLAST 検索で相同性が比較的高かった *Puccorchidium* 属と姉妹群となったが、*Puccorchidium polyalthiae* の冬孢子とは形態的には全く異なるものである。本系統解析では、比較対象として別の *Maravalia* 属種の登録塩基配列も供試したが、いずれも系統的には離れて位置するなど、本 *Maravalia* 様サビキンの分類学的措置については *Maravalia* 属の系統分類学的検討を含め、今後慎重に検討する必要がある。

また、これまでに収集されている標本で26属46種が同定されているが、ベトナム新産種となるサビキン17属23種が見出されている(次頁の表を参照)。

同定されたベトナム産サビキン (緑字:ベトナム新産)

種	既報	新規	種	既報	新規
<i>Cerotelium fici</i>	0	1	<i>Phakopsora jatrophiicola</i>	0	1
<i>Coleosporium perillae</i>	1		<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	1	
<i>Coleosporium plumeriae</i>	0	1	<i>Phakopsora tecta</i>	0	1
<i>Coleosporium zanthoxyli</i>	0	1	<i>Prospodium appendiculatum</i>	0	1
<i>Cronartium orientale</i>	1		<i>Puccinia citrina</i>	0	1
<i>Crossopsora ziziphi</i>	0	1	<i>Puccinia congesta</i>	1	
<i>Diabole cubensis</i>	0	1	<i>Puccinia kuehnii</i>	1	
<i>Endophyllum kaernbachii</i>	1		<i>Puccinia minussensis</i>	1	
<i>Endophyllum paederiae</i>	1		<i>Puccinia mogiphanis</i>	0	1
<i>Endophyllum superficiale</i>	1		<i>Puccinia paederiae</i>	1	
<i>Gerwasia rubi</i>	1		<i>Puccinia thaliae</i>	1	
<i>Goplana dioscoreae</i>	0	1	<i>Puccinia thwaitesii</i>	1	
<i>Hamaspora acutissima</i>	1		<i>Sorataea periodica</i>	0	1
<i>Hapalophragmium setulosum</i>	1		<i>Sphaerophragmium clemensiae</i>	0	1
<i>Hemileia vastatrix</i>	1		<i>Tranzschelia discolor</i>	1	
<i>Hemileia wrightiae</i>	0	1	<i>Uredo alocasiae</i>	0	1
<i>Hemileia detergibile</i>	0	1	<i>Uredo musae</i>	0	1
<i>Kwelllingia divina</i>	1		<i>Uromyces vignae</i>	1	
<i>Leucotelium pruni-persicae</i>	0	1	<i>Uromyces bidenticola</i>	1	
<i>Maravalia-like fungus</i>	0	1	<i>Uromyces mucunae</i>	0	1
<i>Masseella capparidis</i>	0	1	<i>Uropyxis arisanensis</i>	0	1
<i>Neoolivea tectonae</i>	1		属種数	14属23種	17属23種
<i>Neophysopella tropicalis</i>	1		計26属46種		
<i>Phakopsora dioscoreae</i>	0	1			
<i>Phakopsora glochidii</i>	1				

すなわち、*Cerotelium fici*、*Coleosporium plumeriae*、*Col. zanthoxyli*、*Crossopsora ziziphi*、*Diabole cubensis*、*Goplana dioscoreae*、*Hemileia detergibile*、*Hem.wrightiae*、*Leucotelium pruni-persicae*、*Maravalia crotalariae*、*Masseella capparidis*、*Phakopsora dioscoreae*、*Pha. jatrophiicola*、*Pha. tecta*、*Prospodium appendiculatum*、*Puccinia citrina*、*Puc. mogiphanis*、*Sorataea periodica*、*Sphaerophragmium clemensiae*、*Uredo alocasiae*、*Ure. musae*、*Uromyces mucunae*、*Uropyxis arisanensis* がベトナム新産であるとともに、この中には東南アジアあるいはアジア初記録のサビキンも含まれる。また、ベトナムでの初発見から130年ぶりとなる*Hapalophragmium setulosum*も本調査で見出されている。未同定のイネ科植物を宿主とするサビキンの同定作業が必要であるが、上記以外にも未記載あるいはベトナム新産種となるサビキンが見出されることが示唆されており、それらを含めるとこれまで採集されたサビキンは30属70種を超える。

国際的な新型コロナウイルス感染症の蔓延による行動制限のために当初予定していた現地調査が計画どおりに実施できなかったものの、予想以上の成果を得られたものとする。今後、継続調査を行うことで、さらにベトナムのサビキン多様性が明らかになるものと期待する。

成果報告 学会発表

ベトナムのサビキン相調査 岡根 泉・小野義隆・糟谷大河・H.D. Nguyen・C.T.M. Le・T.V. Nguyen・山岡裕一 日本菌学会第68回大会 八戸 2024年5月18・19日
Exploration of rust fungi in Vietnam by I. Okane, Y. Ono, T. Kasuya, H.D. Nguyen, C.T.M. Le and Y. Yamaoka, Asian Mycological Congress 2023, Busan, Korea, Oct. 10 - 13, 2023
The incidence and population genetics of coffee leaf rust in Vietnam by C.T.M. Le, I. Okane, Y. Ono, Y. Tsuda and Y. Yamaoka, Asian Mycological Congress 2021, Pathum Thani, Thailand, Aug. 3 - 5, 2022
The incidence and severity of coffee leaf rust in Vietnam by C.T.M. Le, I. Okane, Y. Yamaoka and Y. Ono, 日本菌学会第65回大会 オンライン 2021年8月23 - 29日

論文発表

Le, T. M. C., Ishii, H., Okane, I., Yamaoka, Y. Sequence analysis of cytochrome b gene in Vietnamese isolates of *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust, in relation to potential QoI fungicide resistance. *Tropical Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s40858-023-00556-x>, 2023
Le, T. M. C., Okane, I., Ono, Y., Tsuda, Y., Yamaoka, Y. Incidence of coffee leaf rust in Vietnam, possible original sources and subsequent pathways of migration. *Frontiers in Plant Science*, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.872877>, 2022
Ono, Y., Okane, I., Chatasiri, S., Pota, S., Unartngam, J., Ayawong, C., Nguyen, H. D., Le, C. T. M. Taxonomy of Southeast Asian-Australasian grapevine leaf rust fungus and its close relatives. *Mycological Progress* 19: 905 - 919. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01607-2>, 2020

以上

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Cham Thi Mai Le, Hideo Ishii, Izumi Okane, Yuichi Yamaoka	4. 巻 49
2. 論文標題 Sequence analysis of cytochrome b gene in Vietnamese isolates of <i>Hemileia vastatrix</i> , the causal agent of coffee leaf rust, in relation to potential QoI fungicide resistance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tropical Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 126; 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40858-023-00556-x	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 Cham Thi Mai Le, Izumi Okane, Yoshitaka Ono, Yoshiaki Tsuda, Yuichi Yamaoka	4. 巻 13
2. 論文標題 Incidence of Coffee Leaf Rust in Vietnam, Possible Original Sources and Subsequent Pathways of Migration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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） 10.3389/fpls.2022.872877	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 Yoshitaka Ono, Izumi Okane, Sinchai Chatasiri, Siriporn Pota, Jintana Unartngam, Chanjira Ayawong, Huy Duc Nguyen, Cham Thi Mai Le	4. 巻 19
2. 論文標題 Taxonomy of Southeast Asian-Australasian grapevine leaf rust fungus and its close relatives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mycological Progress	6. 最初と最後の頁 905; 919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11557-020-01607-2	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡根 泉・小野義隆・糟谷大河・Huy D. Nguyen・Cham T.M. Le・Tru V. Nguyen・山岡裕一
2. 発表標題 ベトナムのサビキン相調査
3. 学会等名 日本菌学会第68回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Izumi Okane, Yochitaka Ono, Taiga Kasuya, Huy Duc Nguyen, Cham Thi Mai Le , Yuichi Yamaoka
2. 発表標題 Exploration of rust fungi in Vietnam
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Cham Thi Mai Le, Izumi Okane, Yoshitaka Ono, Yoshiaki Tsuda, Yuichi Yamaoka
2. 発表標題 The incidence and population genetics of coffee leaf rus in Vietnam
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Cham Thi Mai Le, Izumi Okane, Yamaoka Yuichi , Yoshitaka Ono
2. 発表標題 The incidence and severity of coffee leaf rust in Vietnam
3. 学会等名 日本菌学会第65回オンライン大会
4. 発表年 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	山岡 裕一 (Yamaoka Yuichi) (00220236)	筑波大学・生命環境系・名誉教授 (12102)	

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
研究分担者	小野 義隆 (Ono Yoshitaka) (90134163)	茨城大学・教育学部・名誉教授 (12101)	
研究分担者	糟谷 大河 (Kasuya Taiga) (90712513)	慶應義塾大学・経済学部（日吉）・准教授 (32612)	

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	ベトナム国家農業大学	ホーチミン・バイオテクノロジーセンター	西部高地農業および森林科学研究所