

氏 名 (本国籍)	Gladys Wairimu Karugia (ケニア共和国)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農博甲第 514 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Population Structure of the <i>Fusarium graminearum</i> Species Complex from Two Japanese Locations and Eastern China (中国東部及び日本の 2 地域における <i>Fusarium graminearum</i> 種複合体の集団構成)
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 百 町 満 朗 副査 岐阜大学 准教授 須 賀 晴 久 副査 静岡大学 教授 露 無 慎 二 副査 信州大学 教授 福 田 正 樹 副査 岐阜大学 教授 小 山 博 之

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、中国東部及び日本の 2 地域における *Fusarium graminearum* 種複合体の集団構成を調べたものである。*Fusarium graminearum* 種複合体 (*Fg* complex) は、世界中のコムギやオオムギの赤かび病の主要な原因菌である。赤かび病は収量の減少だけでなく、トリコテセン系のデオキシニバレノール (DON) やエストロゲン活性を持つゼアラレノンといったかび毒汚染をもたらすことで問題となっている。本菌が産生するトリコテセン系のかび毒は、真核生物におけるタンパク合成阻害や免疫機能の変化を起こすことが知られており、食の安全と動物の健康に危険をもたらしている。栽培管理、抵抗性品種の開発、農薬使用とった赤かび病への対策にもかかわらず、病害の発生が続いており、この病原性糸状菌の基礎的研究が重要となっている。*Fg* complex は分子系統学的に明確に異なる、少なくとも 11 種で構成されている。それらのうちのある種については、特定の地域で主要な種となっている。アジアでは、*Fusarium asiaticum* が *Fg* complex の主要な種とされている。日本では地理的分布が異なるものの、*F. asiaticum* と *Fusarium graminearum sensu stricto* (s. str.) が *Fg* complex の主要な種として検出されている。

態学的、生物学的、分子系統学的種概念をもとに定義される。形態的特徴の違いは、ムギ類赤かび病を引き起こす *Fusarium* 菌の種同定に利用されうるものの、*Fg* complex を構成する種間には、培養形態の違いがなく、それを種同定には利用できない。また、分生胞子の形態は有用な情報であるものの、その観察には労力と時間を要する。病原菌の種の分布と集団構成に関する知見は、それらが宿主作物の育種に重要かどうかを知るうえで重要な

情報である。酸化やアセチル化はトリコテセンの毒性や生物活性を変えることから、異なるトリコテセンタイプは種や集団の生態に影響しているかもしれない。*Fg complex* 集団に関する過去の研究の多くは、集団が *Fg complex* のどの種、どのトリコテセンタイプで構成されているのかに焦点が当てており、ある特定の圃場の *Fg complex* の動態や、集団の分布地域やトリコテセンタイプの違いに基づく分集団化についてはほとんど分かっていない。

第一章では、九州において播種に用いられたコムギ種子に由来する *Fg complex* 集団と、栽培後に自然罹病穂から得た *Fg complex* 集団について、種とトリコテセンタイプの構成、更に、単純繰り返し配列 (VNTR) マーカーの多型を調査した。この研究では、コムギ穂と播種に用いられた種子の菌集団を比較することで、種子伝染がムギ類赤かび病の発生に寄与しているかどうかを調べることを想定した。コムギ穂における菌集団は、2003年(03W 集団)と2004年(04W 集団)の2年にわたって、熊本県における500m<sup>2</sup>の同一圃場で採集した。ここで、2003年に対しては福岡県(2002年秋に播種)、2004年に対しては長崎県(2003年秋に播種)で収穫された種子を播種に用いており、それぞれの種子から菌集団(福岡県種子:02WSC 集団、長崎県種子:03WSC 集団)を得た。ここでは4つの集団それぞれにつき46株、計184株を採集した。

集団の遺伝的多様性や集団間の遺伝的距離を評価するためにはVNTRマーカーによる多型データを、*Fg complex* 内の種を同定するためにはPCR-RFLP法を、各株のトリコテセンタイプ(3位がアセチル化されたデオキシニバレノールの3ADONタイプ、15位がアセチル化されたデオキシニバレノールの15ADONタイプ、ニバレノールのNIVタイプ)を同定するためには、トリコテセン生合成に関わる *Tri12* 遺伝子に基づいたマルチプレックスPCR法を使用した。1株については種が判定はできなかったが、PCR-RFLPにより全184株の97.3%は *F. asiaticum*、2.2%は *F. graminearum* s. str. と判定された。183株中、44%はNIVタイプ、*F. graminearum* s. str. の株を含め、残りの56%は3ADONタイプの菌であった。本研究で15ADONタイプの菌は検出されなかった。03W 集団と04W 集団のトリコテセンタイプ構成はほぼ同様であった。また、本研究で主要に検出された *F. asiaticum* 株について、4つの集団の遺伝的多様性を調べたところ、いずれも高い値を示した。いずれの集団間においても固定指数 ( $F_{ST}$ ) の値は低く(0.002 -0.016)、また、移動個体数 ( $N_m$ ) の値は高かった(29.852-301.847)ことから、これらの集団に明確な分集団化は認められなかった。また、マーカー間の連鎖不平衡もほとんど見られず、集団間に高頻度な遺伝的交流があることが示された。今回、集団間には遺伝的違いが検出できなかったことから、ムギ類赤かび病の発生に種子伝染の寄与を判断することはできなかったが、調査した熊本県のコムギ圃場は、少なくとも福岡県、長崎県、熊本県に広がる遺伝的に類似した菌集団によって、赤かび病が発生していることが明らかとなった。

第二章では、地理的、あるいはトリコテセンタイプの違いと *F. asiaticum* の遺伝的分集団化の関係を調べた。ここでは第一章の集団解析結果にもとづき、03W、04W、02WSC、03WSC の *F. asiaticum* (179株)を九州集団とし、東海地方の集団(91株)と中国東部の集団(208株)を加えた全478株を解析した。中国東部の株は、浙江省の4圃場(海宁の2圃場(I and II)及びそれぞれ寧波、徳清県の圃場)で採集されたものであり、東海地方の株は愛知県内各地の圃場で採集されたものである。これらは共同研究者より分譲された。

種同定用PCR-RFLPにより、解析した全株は *F. asiaticum* と判定された。中国の208株のうち、42.3%はNIVタイプ、57.7%は3ADONタイプの菌であった。この構成比は、九州集団(NIVタイプ44.7%、3ADONタイプ55.3%)に類似していたが、東海集団(NIVタイプ74.7%、3ADONタイプ25.3%)とは異なっていた。

ベイズモデルに基づくクラスター分析用ソフトウェアSTRUCTUREによって、VNTRデータを分析したところ、3つのクラスターが検出された。各株を0.8より大きい average

membership value (q)を持つクラスターに振り分けた結果、各クラスターには異なる株も含まれるものの、それぞれのクラスターがほぼ、日本産の 3ADON タイプ菌集団、中国産の 3ADON タイプ菌集団、アジア(日本産と中国産の両方)の NIV 菌集団に一致した。クラスター間の  $F_{ST}$  は高く(0.184 - 0.251)、 $N_m$  (1.495 - 2.221)は低かった。これらの結果は、3ADON タイプと NIV タイプ菌は例え同一地域に生息し、おそらくは交配が可能であっても、遺伝的には異なる集団であることを示唆している。更に、トリコテセンタイプの違いに加えて地理的違いの遺伝的分集団化への影響を調べるために、全 478 株を分離地域とトリコテセンタイプを考慮して、九州 NIV 集団(80 株)、九州 3ADON 集団(99 株)、東海 NIV 集団(68 株)、東海 3ADON 集団(23 株)、浙江省 NIV 集団(88 株)、浙江省 3ADON 集団(120 株)に再編成して解析した。その結果、 $F_{ST}$  値は九州 3ADON 集団と東海 3ADON 集団間(0.059)より九州 3ADON 集団と浙江省 3ADON 集団間(0.167)の方が高かった。同様の傾向は NIV 菌集団にも認められ、九州 NIV 集団と東海 NIV 集団間(0.035)より九州 NIV 集団と浙江省 NIV 集団間(0.079)の方が高かった。以上の結果は、*F. asiaticum* の遺伝的分集団化に地理的違いとトリコテセンタイプの違いの両方が関与していることを示している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教員や学生の出席者のもと、平成21年1月21日(水)午後3時より岐阜大学連合大学院棟2F会議室において実施された。本研究は、中国東部及び日本の2地域における *Fusarium graminearum* 種複合体の集団構成を調べたものである。

*Fusarium graminearum* 種複合体(*Fg* complex)は、世界中のコムギやオオムギの赤かび病の主要な原因菌である。赤かび病は収量の減少だけでなく、トリコテセン系のデオキシニバレノール(DON)やエストロゲン活性を持つゼアラレノンといったかび毒汚染をもたらすことで問題となっている。本菌が産生するトリコテセン系のかび毒は、真核生物におけるタンパク合成阻害や免疫機能の変化を起こすことが知られており、食の安全と動物の健康に危険をもたらしている。栽培管理、抵抗性品種の開発、農薬使用とった赤かび病への対策にもかかわらず、病害の発生が続いており、この病原性糸状菌の基礎的研究が重要となっている。*Fg* complex は分子系統学的に明確に異なる、少なくとも 11 種で構成されている。それらのうちのある種については、特定の地域で主要な種となっている。アジアでは、*Fusarium asiaticum* が *Fg* complex の主要な種とされている。日本では地理的分布が異なるものの、*F. asiaticum* と *Fusarium graminearum* sensu stricto(s. str.) が *Fg* complex の主要な種として検出されている。

態学的、生物学的、分子系統学的種概念をもとに定義される。形態的特徴の違いは、ムギ類赤かび病を引き起こす *Fusarium* 菌の種同定に利用されうるものの、*Fg* complex を構成する種間には、培養形態の違いがなく、それを種同定には利用できない。また、分生胞子の形態は有用な情報であるものの、その観察には労力と時間を要する。病原菌の種の分布と集団構成に関する知見は、それらが宿主作物の育種に重要かどうかを知るうえで重要な情報である。酸化やアセチル化はトリコテセンの毒性や生物活性を変えることから、異なるトリコテセンタイプは種や集団の生態に影響しているかもしれない。*Fg* complex 集団に関する過去の研究の多くは、集団が *Fg* complex のどの種、どのトリコテセンタイプで構成されているのかに焦点が当てており、ある特定の圃場の *Fg* complex の動態や、集団の分布地域やトリコテセンタイプの違いに基づく分集団化についてはほとんど分かっていない。

第一章では、九州において播種に用いられたコムギ種子に由来する *Fgcomplex* 集団と、栽培後に自然罹病穂から得た *Fgcomplex* 集団について、種とトリコテセンタイプの構成、更に、単純繰り返し配列(VNTR)マーカーの多型を調査した。この研究では、コムギ穂と播種に用いられた種子の菌集団を比較することで、種子伝染がムギ類赤かび病の発生に寄与しているかどうかを調べることを想定した。コムギ穂における菌集団は、2003年(03W 集団)と2004年(04W 集団)の2年にわたって、熊本県における500m<sup>2</sup>の同一圃場で採集した。ここで、2003年に対しては福岡県(2002年秋に播種)、2004年に対しては長崎県(2003年秋に播種)で収穫された種子を播種に用いており、それぞれの種子から菌集団(福岡県種子:02WSC 集団、長崎県種子:03WSC 集団)を得た。ここでは4つの集団それぞれにつき46株、計184株を採集した。

集団の遺伝的多様性や集団間の遺伝的距離を評価するためにはVNTRマーカーによる多型データを、*Fgcomplex*内の種を同定するためにはPCR-RFLP法を、各株のトリコテセンタイプ(3位がアセチル化されたデオキシニバレノールの3ADONタイプ、15位がアセチル化されたデオキシニバレノールの15ADONタイプ、ニバレノールのNIVタイプ)を同定するためには、トリコテセン生合成に関わる *Tril2* 遺伝子に基づいたマルチプレックスPCR法を使用した。1株については種が判定はできなかったが、PCR-RFLPにより全184株の97.3%は *F. asiaticum*、2.2%は *F. graminearum* s. str. と判定された。183株中、44%はNIVタイプ、*F. graminearum* s. str. の株を含め、残りの56%は3ADONタイプの菌であった。本研究で15ADONタイプの菌は検出されなかった。03W 集団と04W 集団のトリコテセンタイプ構成はほぼ同様であった。また、本研究で主に検出された *F. asiaticum* 株について、4つの集団の遺伝的多様性を調べたところ、いずれも高い値を示した。いずれの集団間においても固定指数( $F_{ST}$ )の値は低く(0.002 -0.016)、また、移動個体数( $N_m$ )の値は高かった(29.852-301.847)ことから、これらの集団に明確な分集団化は認められなかった。また、マーカー間の連鎖不平衡もほとんど見られず、集団間に高頻度な遺伝的交流があることが示された。今回、集団間には遺伝的違いが検出できなかったことから、ムギ類赤かび病の発生に種子伝染の寄与を判断することはできなかったが、調査した熊本県のコムギ圃場は、少なくとも福岡県、長崎県、熊本県に広がる遺伝的に類似した菌集団によって、赤かび病が発生していることが明らかとなった。

第二章では、地理的、あるいはトリコテセンタイプの違いと *F. asiaticum* の遺伝的分集団化の関係を調べた。ここでは第一章の集団解析結果にもとづき、03W、04W、02WSC、03WSC の *F. asiaticum* (179株)を九州集団とし、東海地方の集団(91株)と中国東部の集団(208株)を加えた全478株を解析した。中国東部の株は、浙江省の4圃場(海宁の2圃場(I and II)及びそれぞれ寧波、徳清県の圃場)で採集されたものであり、東海地方の株は愛知県内各地の圃場で採集されたものである。これらは共同研究者より分譲された。

種同定用PCR-RFLPにより、解析した全株は *F. asiaticum* と判定された。中国の208株のうち、42.3%はNIVタイプ、57.7%は3ADONタイプの菌であった。この構成比は、九州集団(NIVタイプ44.7%、3ADONタイプ55.3%)に類似していたが、東海集団(NIVタイプ74.7%、3ADONタイプ25.3%)とは異なっていた。

ベイズモデルに基づくクラスター分析用ソフトウェアSTRUCTUREによって、VNTRデータを分析したところ、3つのクラスターが検出された。各株を0.8より大きいaverage membership value (q)を持つクラスターに振り分けた結果、各クラスターには異なる株も含まれるものの、それぞれのクラスターがほぼ、日本産の3ADONタイプ菌集団、中国産の3ADONタイプ菌集団、アジア(日本産と中国産の両方)のNIV菌集団に一致した。ク

ラスター間の  $F_{ST}$  は高く (0.184 - 0.251)、 $N_m$  (1.495 - 2.221) は低かった。これらの結果は、3ADON タイプと NIV タイプ菌は例え同一地域に生息し、おそらくは交配が可能であっても、遺伝的には異なる集団であることを示唆している。更に、トリコテセンタイプの違いに加えて地理的違いの遺伝的分集団化への影響を調べるために、全 478 株を分離地域とトリコテセンタイプを考慮して、九州 NIV 集団 (80 株)、九州 3ADON 集団 (99 株)、東海 NIV 集団 (68 株)、東海 3ADON 集団 (23 株)、浙江省 NIV 集団 (88 株)、浙江省 3ADON 集団 (120 株) に再編成して解析した。その結果、 $F_{ST}$  値は九州 3ADON 集団と東海 3ADON 集団間 (0.059) より九州 3ADON 集団と浙江省 3ADON 集団間 (0.167) の方が高かった。同様の傾向は NIV 菌集団にも認められ、九州 NIV 集団と東海 NIV 集団間 (0.035) より九州 NIV 集団と浙江省 NIV 集団間 (0.079) の方が高かった。以上の結果は、*F. asiaticum* の遺伝的分集団化に地理的違いとトリコテセンタイプの違いの両方が関与していることを示している。

以上、本研究で得られた結果は、*Fusarium graminearum* 種複合体の集団構成に関する基礎的かつ重要な知見を提供しており、このことから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

#### 基礎となる学術論文

1. Karugia, G.W., Suga, H., Gale, L.R., Nakajima, T., Tomimura, K., and Hyakumachi, M. 2009. Population structure of the *Fusarium graminearum* species complex from a single Japanese wheat field sampled in two consecutive years. *Plant Dis.* 93: in press.
2. Karugia, G.W., Suga, H., Gale, L.R., Nakajima, T., Ueda, A., and Hyakumachi, M. 2009. Population structure of *Fusarium asiaticum* from two Japanese regions and eastern China. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: in press.