

植物防疫専攻者への育英費の支給

令和3年度

岡本 雄太（宮崎大学大学院農学研究科修士課程・指導教員：安達 鉄矢）

『土着天敵タバコカスミカメの生活史の解明』

佐藤菜々実（茨城大学大学院農学研究科修士課程・指導教員：中島 雅己）

『*Botrytis cinerea* の宿主侵入におけるカタラーゼの機能に関する研究』

左ショウテイ（東京農業大学大学院農学研究科博士課程・指導教員：岩波 徹）

『ナツカン萎縮ウイルスとネーブル斑葉モザイクウイルスの全ゲノム解析』

竹内 翼（東京農工大学大学院農学府修士課程・指導教員：小松 健）

『抵抗性誘導剤 Acibenzolar-*S*-methyl (ASM) による植物ウイルス感染抑制機構の解析』

土着天敵タバコカスミカメの生活史の研究

宮崎大学大学院農学研究科農学専攻修士課程 岡本 雄太

タバコカスミカメ *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) は、動物質餌とともに植物質餌も利用する天敵である。タバコカスミカメはその捕食能力の高さから、施設果菜類における微小害虫の防除に広く利用されている。タバコカスミカメは 2021 年 5 月に農薬登録されたことから、本種の利用は今後一層普及していくことが予想される。このように、タバコカスミカメの応用面については盛んに研究されているが、我が国における本種の越冬の有無や寄主植物など、生活史に影響をおよぼす基礎的な生態は未解明な部分が多い。昨年度の研究において、西日本地域で採集されたタバコカスミカメ個体群を用い、MIG-seq による集団遺伝構造解析および、腸内容物分析を行った。今年度は引き続き、STRUCTURE 解析および *COI* 領域のハプロタイプ解析による集団遺伝構造解析を行った。

MIG-seq で得られた SNP のデータをもとに STRUCTURE 解析をした結果、 $K=1$ が最適であり、我が国のタバコカスミカメに遺伝的な構造は認められなかった。すなわち、九州地域の個体群ごとに、世代交代による変異の蓄積は認められなかった。*COI* 領域のハプロタイプ解析には、国内各地で採集されたタバコカスミカメ個体群を用いた。その結果、我が国由来の個体から 10 種類のハプロタイプが発見された。また、我が国で採集された個体のほとんどは、中国で採集された個体のハプロタイプと同一であった。以上より、タバコカスミカメは中国から我が国へ飛来する侵入種である可能性が示唆された。

Botrytis cinerea の宿主侵入におけるカタラーゼの機能に関する研究

茨城大学大学院 佐藤 菜々実

Botrytis cinerea は多くの植物に灰色かび病を引き起こす多犯性の病原菌である。当研究室では野生株の人工交配によって得られた病原性が著しく低下した弱病原性株を用いて本菌における病原性発現機構の解析を進めている。これまでに、本菌株における病原性の低下がカタラーゼ (CAT) 活性の低下に起因することが推察されている。そこで、弱病原性株における CAT 遺伝子 (*bccat1*, *bccat2*, *bccat3*, *bccat4*, *bccat5*, *bccat6*, *bccat7* および *bccat8*) の発現量を病原性株のそれらと比較するため、qRT-PCR による発現解析を行った。その結果、培地上で培養した菌体では、弱病原性株における全 CAT 遺伝子の発現量は病原性株と比較して低いことが示された。一方、トマト葉に接種した菌体では、全ての CAT 遺伝子の発現量が弱病原性株で高いことが確認された。弱病原性株の CAT 遺伝子についてシーケンス解析を行った結果、塩基配列において *Bccat2*, *Bccat3*, *Bccat4*, *Bccat7*, *Bccat8* で配列の違いが見られ、*Bccat2*, *Bccat4*, *Bccat7*, *Bccat8* ではアミノ酸置換を伴うことが確認された。今後は、これらの CAT 遺伝子の病原性発現への関与を明らかにする予定である。

ナツカン萎縮ウイルスとネーブル斑葉モザイクウイルスの全ゲノム解析

東京農業大学大学院農学研究科

農学専攻博士前期課程 1 年

左 ショウテイ

温州萎縮ウイルス(satsuma dwarf virus, SDV)は、ウンシュウミカンの葉を萎縮させ、樹勢を低下させて深刻な被害をもたらしている。SDVの近縁ウイルスとして、カンキツモザイクウイルス(citrus mosaic virus, CiMV)、ナツカン萎縮ウイルス(Natsudaidai dwarf virus, NDV)、ネーブル斑葉モザイクウイルス(navel orange infectious mottling virus, NIMV)などが知られている。NDV, NIMVに関しては、RNA2のみ全塩基配列が解読されただけで、RNA1の全塩基配列の解読は未達成であり、関係性に不明な点が残っていた。このため、NDVとNIMVのRNA1の全塩基配列の解読を試みた。ウイルス精製RNAを次世代シーケンサーを用いて解析し、de novo アセンブリを行い、NDV, NIMVのRNA1全長に相当する6.8 kbsの塩基配列を得た。NDVのRNA1は、中国で分離されたCiMVのSE-1株とGTC-1株とにそれぞれ相同性が認められ、NDVはSDVやNIMVよりは、CiMVに近縁であることが明白となった。

NIMVのRNA1は、中国で分離されたNIMVのEH1株に相同性が認められた。それ以外の既知配列との相同性は低かった。NIMVは国内のSDV, CiMV, NDVのいずれともやや異なるウイルスであり、中国のNIMVのEH1株が唯一近縁であることが判明した。これまでNIMVは和歌山県の一部にのみ発生するとされ、遺伝子レベルでもSDVグループの中で孤立したウイルスであることが分かっていたが、本研究で初めて近縁なウイルス株(EH1株)が見つかった。すなわち、NIMVはこれまで考えられていたような和歌山県の一部のみに分布するレアなウイルスではなく、多くの変異を伴う多様なウイルス株群から形成される集合体である可能性が示唆され、今後各地での多様なNIMVの発生に注意すべきであると思われた。

抵抗性誘導剤 Acibenzolar-S-methyl による植物ウイルス感染抑制機構の解析

東京農工大学大学院農学専攻 修士課程1年 竹内 翼

Acibenzolar-S-methyl (ASM) は植物へ処理することでサリチル酸 (SA) のシグナル応答経路を活性化させ、菌・細菌・ウイルスといった幅広い範囲の病原の感染の抑制する薬剤である。SA シグナル応答経路については抗菌性物質の生産、物理的障壁の強化や気孔の閉鎖に代表される菌や細菌への防御応答における知見はあるが、ウイルスに対してどのような防御応答により感染を抑制しているかは明らかになっていない。本研究では GFP 発現オオバコモザイクウイルス (PIAMV-GFP) を各種遺伝子変異体の利用が可能なモデル植物であるシロイヌナズナへ接種し、ASM 処理植物とコントロールの非処理植物でウイルス感染による緑色蛍光の数を比較することで ASM によるウイルスの初期感染への抑制効果を評価する系が構築されている。その実験系とシロイヌナズナの遺伝子欠失変異体を用いた試験により SA シグナル応答経路のハブ因子である NPR1 が必要である一方、ウイルスへの基礎的な防御応答である RNA サイレンシングに必要不可欠な因子である Dicer-like protein2/3/4 が必要でないことが示されている (Matsuo et al., 2019)。本研究ではこの NPR1 下流に存在し、RNA サイレンシングに依らないウイルス感染抑制機構に必要な因子の解析を目的として、シロイヌナズナの SA シグナル応答経路関連遺伝子の機能欠損変異体と ASM を用いたウイルス感染評価を行った。

PIAMV-GFP の接種試験を行った結果、転写因子 TGA2/5/6 の機能欠失した *tga2-1/5-1/6-1* 植物では ASM によるウイルス感染抑制が見られないことがわかった。この結果から、SA シグナル応答経路に存在するウイルスの感染抑制を引き起こす機構は TGA2/5/6 による制御を受けていることが考えられた。現在、ASM が誘導する TGA2/5/6 下流の遺伝子発現に注目することでウイルス感染抑制に関与する因子を絞り込めるのではないかと考え、野生型植物と *tga2-1/5-1/6-1* 植物の ASM 処理と非処理の遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に解析し、野生型植物の ASM 処理で発現が上昇しており、かつ、野生型植物の非処理・*tga2-1/5-1/6-1* 植物の ASM 処理・非処理で発現が上昇しない遺伝子群を特定しようとしている。

今後は遺伝子群の中から候補遺伝子をピックアップしその欠失変異体に ASM を処理しウイルス感染抑制が起きるかどうかを見ることで、その遺伝子が ASM によるウイルス感染抑制に関与するかを評価し、候補遺伝子群の中から SA シグナル応答経路におけるウイルス感染抑制に必要な因子を特定する。