

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	酒井 啓充
論文題目	Morphological and Molecular Characterization of Japanese Populations of the Dagger Nematode, <i>Xiphinema americanum</i> -Group (オオハリセンチュウ <i>Xiphinema americanum</i> -group 日本産個体群の形態学および分子生物学的特徴)		
(論文内容の要旨)			
植物寄生性線虫は農業生産に損害をもたらす重要な要因の一つである。広範囲の宿主植物の根に外部寄生することが知られているオオハリセンチュウ (<i>Xiphinema</i>) 属は、植物ウイルス媒介種を含むため植物寄生性線虫の中で重要な属の一つと考えられている。欧州諸国の植物検疫においては、特に重要な規制対象線虫種として数種のオオハリセンチュウが指定されているが、これらはいずれも種群 <i>X. americanum</i>-group に属する種である。 <i>X. americanum</i>-group は重要なウイルス媒介種を含むため、植物検疫上重要な種群であるが、その種の同定分類は確立されていない。近年、欧州諸国の植物検疫において、日本から輸出された植木・盆栽類から <i>X. americanum</i>-group が検出され厳しい検疫措置を課せられることが、日本の生産者および輸出業者にとって大きな問題となっている。これらの線虫種の検疫上の問題点はウイルス媒介性に関係している種とそうでない種が混在していることであるため、日本産線虫個体群のウイルス媒介性に関する正確な情報と、正確な種同定が重要となるが、こうした情報を得るためには、我が国における <i>X. americanum</i>-group 線虫の分類学的状況を明らかにしておく必要がある。本研究は、日本国内の植木生産圃場から検出された <i>X. americanum</i>-group 個体群を精査することにより形態学および分子生物学的特徴を明らかにすることを目的として行われたものである。 本研究の目的を達成するには土壌サンプルから分離した少数の線虫を対象とした簡便で正確な分子同定技術が必要である。第1章では、線虫の遺伝領域の塩基配列を解析するために、線虫1頭から効果的かつ簡便に抽出したDNA断片を用いてPCR増幅する方法を考案した。確立された方法とは、線虫虫体の破碎と回収を滅菌ろ紙小片を用いて行い、0.1% SDSを含む単純な構成の抽出バッファーを用いて50℃、2時間の温度処理を加えることにより、(i) 線虫1頭からPCR増幅に十分な量のDNA抽出液を調製するもので、(ii) 特別な試薬キット等を必要とせず、次章以降の研究における (iii) 複数遺伝子座の塩基配列解析を線虫1頭ごとに容易に行うことを可能にする画期的なものである。 第2章では、千葉県匝瑳市内の植木生産圃場に植栽された主要植木樹種の一つであるイヌツゲ苗の根辺土壌1サンプルから検出された <i>X. americanum</i>-group 個体群について精査した。線虫9個体のミトコンドリアDNA COI領域の塩基配列解析から2種が混発していることを明らかにし、形態学的特徴からコーヒーオオハリセンチュウ <i>X. brevicolle</i> および未記載種 <i>Xiphinema</i> sp. と同定した。コーヒーオオハリセンチュウの発生については、日本初記録であった。コーヒーオオハリセンチュウの形態計測値はタイプ標本および模式産地標本の値と概して一致した。<i>Xiphinema</i> sp. の形態計			

測値は、尾長を除いて *X. paramonovi* の値と一致した。ミトコンドリアDNA COI領域および核リボソームRNA遺伝子2領域（18S rDNA領域および大サブユニットD2/D3領域）の塩基配列を比較した結果、検出した2種間の塩基配列の一致率はそれぞれ84.1%、99.9%、98.1-98.2%であった。COI領域については、既往の報告より約500塩基対長いDNA断片をPCR増幅できるプライマーを作製した。得られた塩基配列とデータベース上の*X. americanum*-groupの配列データを用いて最尤法により分子系統解析を行った結果、得られた線虫2種が他のコーヒーオオハリセンチュウおよびその近縁種と同じ群にまとまることが示された。

第3章では、同県東金市および八街市のイヌツゲ苗根辺土壌から検出されたコーヒーオオハリセンチュウ4個体群について、形態学的特徴および複数遺伝子座塩基配列の種内変異を明らかにした。ミトコンドリアDNA COI領域の塩基配列が約7%異なる2系統が存在することが明らかとなったが、形態計測値を含めて変異程度は種内レベルと判断された。八街市の1個体群はこれら2系統の混合サンプルであることが判明した。

得られた結果および既往の報告から、これまでに発生記録のあるボンサイオオハリセンチュウ*X. incognitum*を加えた日本産*X. americanum*-group 3種は歯針長の平均値によって識別できること、ならびに*X. americanum*-groupを3つの亜群に分けることが妥当であることを示し、これまで混乱が見られたこのグループの線虫についての分類・同定に確たる基準を提示した。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

植物寄生性線虫のオオハリセンチュウ (*Xiphinema*) 属のうち、*X. americanum*-groupは重要なウイルス媒介種を含み、植物検疫上重要な種群であるにもかかわらず、その種の同定分類は確立されていない。近年、日本から欧州に輸出される植木・盆栽類から同種群が検出され、厳しい植物検疫措置を執られることが問題となっているが、国内における本種群に関する知見は不足し、分類・同定基準にも不明瞭な点が存在している。

本論文は、日本国内の植木生産圃場から検出された*X. americanum*-groupに属するオオハリセンチュウ個体群の形態学および分子生物学的特徴を明らかにし、これまで確立していなかった本種群の分類・同定基準に一つの明確な指針を示したものであり、以下の点について評価できる。

1. 土壌サンプルから分離される少数線虫を対象にした分子同定のために線虫 1 頭からの効果的なDNA抽出法を考案し、1 個体ごとの簡便な塩基配列解析を可能にした。
2. 日本から輸出され、欧州諸国の植物検疫において *X. americanum*-groupが検出され厳しい検疫措置の対象になることが多い植木・盆栽類の一種、イヌツゲ苗の根辺土壌を精査した。検出された *X. americanum*-group について 2 種が混発していることを明らかにし、形態的、分子生物学的な検討を行い、それらをコーヒーオオハリセンチュウ*X. brevicolle* および未記載種 *Xiphinema* sp.と同定した。
3. 同県他地域のイヌツゲ苗根辺土壌から検出されたコーヒーオオハリセンチュウ 4 個体群について、形態および複数遺伝子座塩基配列の種内変異を明らかにした。
4. これまでに発生記録のあるボンサイオオハリセンチュウ*X. incognitum* を加えた日本産*X. americanum*-group 3 種は歯針長の平均値によって識別できることを明らかにすることにより、本グループ線虫の実用的な同定を可能にした。
5. 得られた結果および既往の報告を総合的に考察することにより、*X. americanum*-groupを 3 つの亜群に分けることが妥当であることを示した。

以上のように、本論文は、日本の農産物輸出における植物検疫上重要となるオオハリセンチュウ属の種群 *X. americanum*-group について、形態学および分子生物学的特徴の詳細な研究結果に基づき、日本産個体群の分類学的地位を明らかにした。また、得られた知見を基にして、日本記録種の同定識別に関する重要な知見を示すとともに、*X. americanum*-group 全体について新たな分類学的枠組みを示した。本論文で示された研究成果は、線虫学、応用動物学および植物保護学の発展に大きく寄与するものである。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 24 年 2 月 10 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注)Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降