

令和元年6月20日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07792

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いたクロマツにおけるマツノザイセンチュウ感受性遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of susceptibility gene for pine wood disease in *Pinus thunbergii* using next generation sequencing

研究代表者

平尾 知士 (Hirao, Tomonori)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・林木育種センター・主任研究員

研究者番号：90457763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いた遺伝子型決定法より得られた1,598個のDNA多型情報をもとに13連鎖群からなるクロマツの連鎖地図を構築した。構築した連鎖地図と接種検定より得られた表現型形質をもとに連鎖解析を行った結果、感受性形質に関連する遺伝子座を1ヶ所検出した。さらに検出した遺伝子座の塩基配列情報をもとにテダマツのゲノム情報に対して相同性検索を行うことで、当該ゲノム領域を検出することができた。また、検出したテダマツのゲノム領域に対して、現有のクロマツEST情報をマッピングすることで、候補遺伝子として10遺伝子に絞り込むことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マツノザイセンチュウによるマツ枯れは、依然として我が国最大級の森林病虫害である。このマツ枯れに対応するため、現在、抵抗性育種が進められている。栽培作物における病害虫抵抗性育種では、感受性遺伝子を排除することで永続的かつより幅広い抵抗性形質を獲得できる新たな育種戦略の一つとして提案されており、本研究で得られた成果はマツノザイセンチュウ抵抗性育種において、抵抗性遺伝子の蓄積と感受性遺伝子の排除を組み合わせる新たな育種戦略を提案することができる。

研究成果の概要(英文)：Based on the information of 1,598 DNA polymorphisms obtained by genotyping-by-sequencing using a next-generation sequencer, a linkage map of 13 linkage groups in *Pinus thunbergii* was constructed. As a result of linkage analysis with linkage map and the phenotypic traits obtained from the PWN inoculation, one locus associated with the susceptibility trait was detected. Furthermore, the genome region was able to be detected by carrying out a homology search with the genomic information of *Pinus taeda*. In addition, it was possible to narrow down to 10 genes as a candidate genes by mapping the EST information of *Pinus thunbergii* to the detected loblolly pine genome region.

研究分野：森林遺伝育種学

キーワード：クロマツ マツノザイセンチュウ 次世代シーケンサー 連鎖地図 感受性遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クロマツにおけるマツノザイセンチュウ抵抗性メカニズムの解明に向け、抵抗性形質に係わる遺伝的因子の特定を進めてきた。これまでに複数の人工交配家系と DNA マーカーを利用した遺伝統計解析から、抵抗性形質には複数の抵抗性遺伝子座が関与していること、さらに抵抗性個体は感受性の遺伝的因子（感受性遺伝子座）をも保因していることが分かってきた。しかし、そのクロマツの感受性遺伝子座については、これまでに連鎖地図上での大まかな位置のみの情報であり、その遺伝子自体の特定には至っていない。

2. 研究の目的

栽培作物では次世代シーケンサーを利用した大規模な遺伝子型決定法（Genotyping-by-sequencing; GBS）を利用した分子育種が加速しつつあり、ゲノム情報が少ない植物種においても、高密度な連鎖地図の構築や有用形質に関連する候補遺伝子の特定が進められている（Poland and Rife 2013）。本研究では、これまでに作成してきたクロマツの連鎖地図情報をもとに、次世代シーケンサーを利用した遺伝子型決定法を適用することで、より高密度な連鎖地図を作成し、マツノザイセンチュウ感受性遺伝子の特定を行う。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを利用した高密度連鎖地図の構築

抵抗性自殖家系 105 個体について DNA を抽出し、Elshire *et al.*(2011)および Chen *et al.* (2013) のプロトコルに基づいて、次世代シーケンス分析用のライブラリーを作成した。作成したライブラリーをもとに、次世代シーケンサー（HiSeq2500 及び 4000）を利用して塩基配列情報を取得し、配列情報のクオリティーチェックを行った後、TASSEL 3.0 を利用して各個体の遺伝子型を決定した。得られた遺伝子型をもとに Joinmap 4.1 を利用して連鎖地図を作成した。連鎖地図の作成にあたっては、すでに開発済みのマイクロサテライトマーカーをアンカーマーカーとして利用し、連鎖地図を作成した。

(2) 連鎖地図情報と形質情報を利用した遺伝解析

抵抗性自殖家系 105 個体に対してマツノザイセンチュウを個体あたり約 5,000 頭接種し、接種後 4 週目、8 週目、10 週目において目視で病徴を 5 段階評価した。10 週目については生存個体と枯死個体をバイナリデータとして評価した。得られた形質データと連鎖地図をもとに MapQTL 6.0 を用いて QTL 解析を行い、感受性に係わる遺伝子座を検出した。

(3) マツノザイセンチュウ感受性候補遺伝子の探索

遺伝解析から検出した感受性遺伝子座については、DNA 多型を含む周辺配列とゲノム情報が公開されているテーダマツのゲノム情報を利用して、相同性検索から該当遺伝子座が座乗するスキュフォールドを特定した。さらに現有のクロマツ EST 情報との相同性検索と遺伝子予測を行うことで感受性候補遺伝子の特定を試みた。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを利用した高密度連鎖地図の構築

次世代シーケンサーを利用したジェノタイピング（GBS）から得られた多型は計 594,655 個であった。これらの多型を示すマーカーのうち、欠測値がなく、メンデル遺伝を示す 1,598 マーカーとアンカーマーカーとして利用したマイクロサテライトマーカー 17 マーカーを用いて連鎖地図を構築した（図 1）。構築した連鎖地図は 13 連鎖群となり、その全長は 1,855 cM となった。マーカー間の平均距離は 1.2 cM となり、最もマーカー間の距離が大きい領域は 12.3 cM であった。これまでに構築されているクロマツの連鎖地図は 1469.8 cM であり（Kondo *et al.* 2000）、今回構築した連鎖地図はその連鎖地図と比較して約 400 cM 長い連鎖地図として構築された。一方で、クロマツの基本染色体数は 12 本であることから 12 連鎖群への収束が想定されたが、結果的には 13 連鎖群が構築された。現有のクロマツ標準連鎖地図上にあるアンカーマーカーと比較することで構築した 12 及び 13 連鎖群が 1 つの連鎖群を構成することが判明したが、致死遺伝子等の影響による遺伝的歪みが生じた可能性

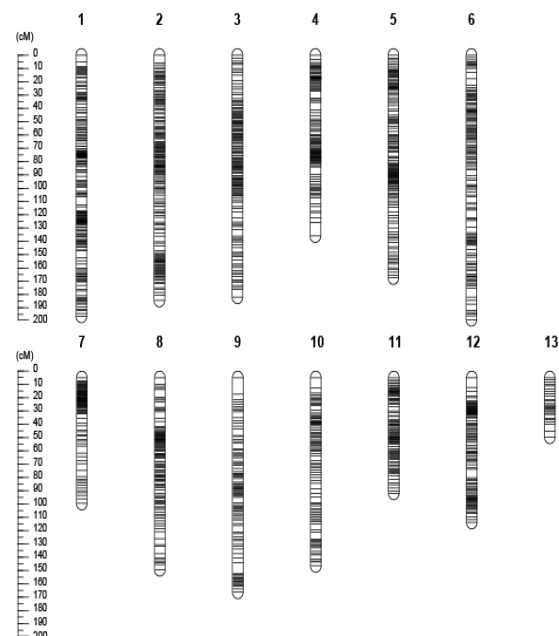


図 1 クロマツの高密度連鎖地図

が考えられる。

(2) 連鎖地図情報と形質情報を利用した遺伝解析

構築した連鎖地図と線虫接種検定より取得した形質情報をもとに感受性に寄与する遺伝子座の検出を試みた。QTL 解析の結果、5 番連鎖群に感受性形質に関連する遺伝子座が検出された (図 2)。QTL が検出された領域は 5 番連鎖群の 95.4 cM-95.7 cM の領域に検出され、LOD スコアは 8.13、形質への寄与率は 30%であることが分かった。QTL 領域の最も近傍に位置するマーカーは、次世代シーケンサーを利用したジェノタイピング (GBS) から得られたマーカーであった。

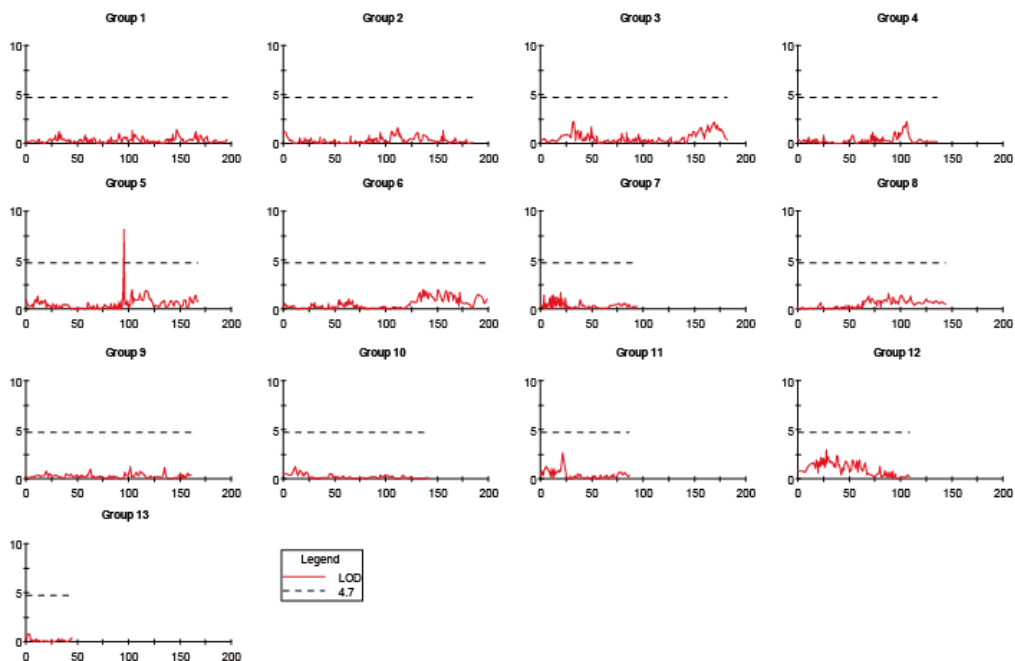


図 2 マツノザイセンチュウ感受性遺伝子座に関する連鎖解析の結果

(3) マツノザイセンチュウ感受性候補遺伝子の探索

上記の QTL 解析によって検出した遺伝子座 (マーカー) の塩基配列情報をもとにテーダマツのゲノム情報に対して相同性検索による当該ゲノム領域の探索を行った。相同性検索の結果、最も高い相同性を示すスキファールドが 1 つ検出された。検出したスキファールドに対して、既存のクロマツ EST 情報 (約 23,000 ESTs) をマッピングすることで、感受性候補遺伝子を 10 遺伝子に絞り込むことができた。

< 引用文献 >

Poland JA and Rife TW (2013) Genotyping-by-sequencing for Plant Breeding and Genetics. *The Plant Genome* 5:92-102

Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., et al. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6: e19379

Chen X., Li X., Zhang B., Xu J., Wu Z., Wang B., Li H. et al (2013) Detection and genotyping of restriction fragment associated polymorphisms in polyploid crops with a pseudo reference sequence: a case study in allotetraploid *Brassica napus*. *BMC Genom.* 14, 346.

Kondo T, Terada K, Hayashi E, Kuramoto N, Okamura M, Kawasaki H (2000) RAPD markers linked to a gene for resistance to pine needle gall midge in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *Theor Appl Genet.* 100:391-395.

5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

Tomonori Hira, Koji Matsunaga (2018) Identification of QTL for pine wood nematode resistance in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) using Genotyping-By-Sequencing (GBS). *Plant and Animal Genome Conference* 26: P0623

平尾知士 (2018) 林木におけるゲノム育種に向けた次世代シーケンサーの活用 第 7 回森林遺伝育種シンポジウム (高知大学)

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：松永孝治

ローマ字氏名：(MATSUNAGA, Koji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。