

令和元年6月13日現在

機関番号：82508

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04878

研究課題名(和文) 先端ゲノム解析による株枯病真性抵抗性イチジクの効率的育種法の開発

研究課題名(英文) Genomics-based breeding strategy to develop Ceratocystis canker resistance lines in fig (*Ficus carica*)

研究代表者

白澤 健太 (Shirasawa, Kenta)

公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・主任研究員

研究者番号：60527026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：イチジク株枯病に対して真性抵抗性を示すイチジクを効率的に育種できる方法を開発した。そのために、まずイチジクおよび抵抗性素材であるイヌビワのゲノム配列を高精度に解読し、種間雑種集団の遺伝学的解析を実施し高密度連鎖地図を開発し、イヌビワに由来する株枯病真性抵抗性遺伝子座およびイチジク属の性決定遺伝子座の連鎖地図上の位置を明らかにした。この情報に基づいて、株枯病真性抵抗性をもち、かつ、食用価値のある雌性イチジクを高効率に選抜できるDNAマーカーを開発した。さらに、株枯病真性抵抗性と雌雄性を制御する遺伝子候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年のイチジク栽培において多大な被害をもたらしている株枯病に対して真性抵抗性を示すイチジクを効率的に育種するための技術開発を行った。先端ゲノム解析技術を利用して、イチジク近縁種のイヌビワが持つ高度株枯病真性抵抗性遺伝子座を短期間、かつ、低コストにイチジクに導入できる技術を確立した。さらに、イチジク属が持つ雌雄性決定遺伝子座を明らかにし、食用価値のある雌性イチジクを幼苗段階で選抜できる方法を開発した。これらの成果により、株枯病真性抵抗性遺伝子を有する雌性イチジク品種が高効率に開発できるようになると期待される。

研究成果の概要(英文)：We established an efficient breeding system for *Ceratocystis canker* resistance lines in fig (*Ficus carica*). In this study, we determined high-quality genome sequences of fig and *F. erecta* which is a donor plant of the resistance, constructed a high-density genetic map based on single nucleotide polymorphism markers, and identified genetic loci for the resistance and sex determinant. As a result, we developed DNA markers linked to the loci to select resistance and female lines, which able to set bear fruits, in fig breeding programs. Through this study, we found out candidate genes for the resistance and sex determinant from the genome information.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イチジク 抵抗性 雌雄性

1. 研究開始当初の背景

イチジク株枯病 (*Ceratocystis ficicora*: 以下、株枯病)はイチジク (*Ficus carica*)の樹を短期間で高頻度に枯死させる防除困難な重要土壌病害である。一度感染すると、結果枝の伸長抑制や葉の萎凋が起き、最終的に落葉・枯死に至る。株枯病の対策としては、農薬使用による防除や新植、改植時に罹病苗を持ち込まないようにする、あるいは一旦発病した圃場においては、土壌消毒を行うことにより土壌中のイチジク株枯病菌密度を下げる等が挙げられる。一方で、土壌消毒によって菌密度を減少させたとしても、耐久性のある厚膜胞子が土壌中に残存するため、新植しても数年後には再発することが多く、圃場が再度全滅に至るケースもある。根本的な対策としては客土しかないが、多額のコストや多くの労力を要する。このように現状では本病に対する根本的な治療方法がないため、イチジク産地で最も恐れられている病害となっている。近年、株枯病への有効な対策法の一つとして、抵抗性台木の活用が期待されている。しかし、これらの台木はすべて圃場抵抗性であるため、株枯病に対して一定の防除効果を有するものの強度の汚染圃場や長期の栽培において最終的な感染が認められる。このことから、強い汚染圃場においても感染が認められない強度の抵抗性を持つ台木品種の早急な育成が強く望まれている。

研究分担者の薬師寺らは、株枯病真性抵抗性を持つイチジクに近縁な野生種のイヌビワ (*Ficus erecta*)の花粉をイチジクに人工交配することにより、株枯病真性抵抗性台木の素材を開発した。これは抵抗性台木としての活用が見込まれる。一方で近年、株枯病菌の新たな感染経路としてアイノキクイムシによる保毒・媒介が報告されている。この場合、土壌感染でなく穂木への直接的な感染が発生し抵抗性台木の利用効果が大きく低減するため、株枯病の被害拡大が強く懸念されている。このため抵抗性を有する穂木品種の開発が急務であり、抵抗性穂木品種の育成には、さらにイチジクとの交配を重ねることが必要である。

イチジクの戻し交配を短期間に効果的に進めるためには、株枯病抵抗性遺伝子の有無を幼苗段階で判別できる技術の開発が強く望まれる。ただし、イチジクとイヌビワの性形態として共に雌性株と両性株の2種類の存在が知られているが、花粉を採取できるのは両性株のみであるのに対して食用に適するのは雌性株のみであるため、イチジクの戻し交配においては雌雄性を判別する技術の開発も不可欠である。

2. 研究の目的

DNA マーカーを用いることにより、株枯病真性抵抗性遺伝子座のみがイヌビワに由来し、かつ、食用価値のある雌性株のイチジク優良系統を幼苗段階で多数の実生群から短期間に選抜できる。さらにゲノムワイドな DNA マーカー分析により、当該遺伝子座以外のゲノム領域がイチジクゲノムに置換された系統が選抜できるため、その生育特性および果実品質評価等の圃場試験の効率的な展開が可能となり、株枯病真性抵抗性を有する有望系統が短期間で育成可能になる。この株枯病真性抵抗性系統は、台木品種としてだけでなく穂木として、さらには通常の栽培品種として自根栽培することが可能であり、イチジク生産を大きく革新するものと期待される。

そこで本研究では、1) 種間雑種 BC₁ 集団の遺伝学的解析を実施し高密度連鎖地図を開発すること、2) イヌビワに由来する株枯病真性抵抗性遺伝子座およびイチジク属の性決定遺伝子座の連鎖地図上の位置を明らかにし、その選抜マーカーを開発すること、ならびに 3) 株枯病菌抵抗性および雌雄性形質を支配する遺伝子候補を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

イチジクとイヌビワの種間戻し交雑集団 (BC₁ 集団) およびイチジクの F₁ 集団を double-digest restriction-site associated sequencing (ddRAD-Seq) 法で分析し、得られた SNP の連鎖解析により高密度連鎖地図を開発する。研究期間中に先進ゲノム支援の援助によりイチジクおよびイヌビワのゲノム配列を高精度に決定することができたので、これらを連鎖解析に使用した。各集団の株枯病真性抵抗性および雌雄性の表現型を調査し、SNP 遺伝子型との連鎖解析を実施し、株枯病真性抵抗性および雌雄性に関する遺伝子座を連鎖地図上に位置付ける。原因遺伝子の絞り込みのために全ゲノムリシーケンス解析により候補領域のすべての配列変異を明らかにし、遺伝子の機能を変化させる SNP 等の配列変異を推定することで、株枯病真性抵抗性および雌雄性に関する遺伝子の候補を明らかにする。この結果に基づいて、株枯病真性抵抗性および雌雄性を選抜できる DNA マーカーを開発し、イチジクとイヌビワの種間戻し交雑集団 (BC₂ 集団) を用いて精度の検証を行う。

4. 研究成果

イヌビワの株枯病真性抵抗性座の高精度な解析を目的として、先進ゲノム支援の援助を受けてイヌビワのゲノム配列リードを取得した。リードをアセンブルした結果、イヌビワの推定ゲノム長のほぼ全長をカバーするアセンブル配列を得た。イチジクとイヌビワの種間戻し交雑集団 (BC₁ 集団) の ddRAD-Seq リードにより構築した高密度連鎖地図に基づいてイヌビワのショートモジュール配列を構築した。次いで、株枯病真性抵抗性の有無とのアソシエーション解析を行った。これにより、株枯病真性抵抗性に強いアソシエーションを示す SNP をイヌビワ

ゲノム配列上に見出した。この結果は、株枯真性抵抗性系統と感受性系統のそれぞれのバルクサンプルの全ゲノムリシーケンス解析を行うことで、同座に抵抗性遺伝子座が存在することを示すデータにより裏付けられた。得られた SNP に基づいて株枯真性抵抗性の選抜マーカーを開発した。このマーカーの分析結果が株枯真性抵抗性の有無と一致することを確認した。

イチジク属の性決定遺伝子座の解明のために、イチジクのゲノム概要配列を参照配列としてイチジク(蓬萊柿 × Caprifig6085)の F₁ 集団の ddRAD-Seq 分析を行い、SNP 情報を得た。SNP の連鎖解析によりイチジクの高密度連鎖地図を開発した。雌雄性の連鎖解析から、雌雄性関連遺伝子座の連鎖地図上での座乗位置を決定した。また、先進ゲノム支援の援助を受けてイチジクのゲノム配列データを更新し、雌雄性関連遺伝子座周辺の高精度なゲノム配列情報を得た。さらに、イチジクの遺伝資源の全ゲノムリシーケンス解析とアソシエーション解析を行い、雌雄性決定に関わると考えられる遺伝子の候補 (*RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1*, *RAN1*) を同定した。*RAN1* 遺伝子配列上の変異を利用して、イチジクの雌雄性を判別できる DNA マーカーを開発した。これに基づき、*RAN1* 遺伝子の変異を簡易に分析できる PCR マーカーを開発した。

これらの成果により、株枯病真性抵抗性遺伝子を有する雌性イチジク品種が高効率に開発できるようになると期待される。また本研究は、果樹園芸作物において先端ゲノム解析技術を利用することにより高効率な育種法を開発するためのモデルケースとなる。さらに言えば、病害抵抗性および性決定は個体の生存と存続に関わる形質であるため、それらの進化が植物の種分化の契機となった可能性は非常に高い。これらの形質に関わるゲノム構造変異を明らかにし、植物の種分化の原動力となったゲノムの進化機構を解き明かすための手がかりを得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Hiroshi Yakushiji, Takeshige Morita, Shota Jikumaru (2019) Ceratocystis canker resistance in BC₁ populations of interspecific hybridization of fig (*Ficus carica*) and *F. erecta*. *Scientia Horticulturae* 252: 71-76 査読あり <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.039>
2. Kazuki Mori, Kenta Shirasawa, Hitoshi Nogata, Chiharu Hirata, Kosuke Tashiro, Tsuyoshi Habu, Sangwan Kim, Shuichi Himeno, Satoru Kuhara and Hidetoshi Ikegami (2017) Identification of *RAN1* orthologue associated with sex determination through whole genome sequencing analysis in fig (*Ficus carica* L.). *Scientific Reports* 7: 41124 査読あり <https://doi.org/10.1038/srep41124>

〔学会発表〕(計6件)

1. 池上秀利・白澤健太・薬師寺博・姫野修一 (2019) イチジク *RAN1* 遺伝子上の SNP を検出する DNA マーカーの開発と迅速 PCR による雌雄判別. 園芸学会、明治大学
2. 森田剛成・軸丸祥大・薬師寺博 (2018) イチジクとイヌビワの種間交雑体「BC₁」が有するイチジク株枯病に対する抵抗性の評価. 日本植物病理学会、神戸
3. Kazuki Mori, Kenta Shirasawa, Hitoshi Nogata, Chiharu Hirata, Kosuke Tashiro, Tsuyoshi Habu, Sangwan Kim, Shuichi Himeno, Satoru Kuhara and Hidetoshi Ikegami (2018) Identification of *RAN1* Orthologue Associated with Sex Determination in Gynodioecious Fig (*Ficus carica* L.). *Plant & Animal Genome Conference XXVI*、アメリカ(招待講演、国際学会)
4. Kenta Shirasawa, Hidetoshi Ikegami, Kanji Isuzugawa, Mitsunobu Ikenaga, Hideki Hirakawa and Sachiko Isobe (2017) Genomic Information for High-Throughput Fruit Crop Breeding. *Plant and Animal Genome Conference ASIA 2017*、韓国(招待講演、国際学会)
5. 白澤健太、森一樹、野方仁、平田千春、田代康介、羽生剛、金相完、姫野修一、久原哲、池上秀利 (2017) イチジクの性表現型と関連する *RAN1* の同定と雌雄判別マーカーの開発. 園芸学会、日本大学
6. 薬師寺博、森田剛成、軸丸祥大 (2016) イチジクとイヌビワの種間雑種由来のイチジク株枯れ抵抗性 BC₁ の獲得. 園芸学会、名城大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

プレスリリース

世界で初めてイチジクのゲノム配列の解読に成功 品種開発の加速に期待

http://www.kazusa.or.jp/j/information/re_info/2017/0127.html

世界で初めてイチジクのゲノム配列の解読に成功
<http://www.pref.fukuoka.lg.jp/press-release/itizikugenomu.html>

研究成果データベース
Ficus Genome DataBase (論文発表と同時に公開する予定)
<http://ficus.kazusa.or.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

薬師寺 博 (Yakushiji, Hiroshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・研究領域長
研究者番号：00355364

池上 秀利 (Ikegami, Hidetoshi)

福岡県農林総合試験場・豊前分場・研究員
研究者番号：40502414

(2)研究協力者

広島県立総合技術研究所農業技術センター

森田剛成 (Morita, Takeshige)

軸丸祥大 (Jikumaru, Shota)