

令和 5 年 3 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15213

研究課題名(和文) オミクス解析によるジャガイモそうか病抵抗性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of potato common scab resistance by omics analysis.

研究代表者

浅野 賢治 (ASANO, Kenji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・主任研究員

研究者番号：80547034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：バレイシヨの重要病害であるそうか病抵抗性が“極強”のユキラシャと“弱”のながさき黄金の雑種集団から選抜した抵抗性強系統群と弱系統群各20系統について、ゲノムワイドな遺伝子型を取得した。取得した遺伝子型と抵抗性との相関を確認した結果、4本の染色体上に座乗する26個のSNPがそうか病抵抗性と相関があることを明らかにした。また、塊茎表皮の共生微生物相解析からは、抵抗性強系統群の方が微生物の多様性が高いことが明らかとなった。葉におけるメタボローム解析からは、2種類の代謝物含量が抵抗性強系統群と弱系統群との間で有意に異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でそうか病抵抗性と相関があることを見出したSNPは過去に報告のないものであり、新たな抵抗性遺伝子座である可能性があり学術的に新規性が高い。また、雑種集団から選抜した遺伝的背景の近い系統群において、共生微生物相の多様性とそうか病抵抗性の相関を示した報告はこれまでに無い。同様に地上部の代謝物とそうか病抵抗性の関係を明らかにした報告はなく、これらの結果はそうか病抵抗性機構の解明に新たな知見をもたらす。また、特定したSNPや代謝物はバレイシヨ育種において、抵抗性個体の効率的選抜に利用できる可能性があり、抵抗性品種の開発を加速化させられる可能性があり社会的にも有用である。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide SNPs was obtained from 20 resistant and 20 susceptible lines to potato common scab, which were selected from the progenies of Yukirasha (Resistant) and Nagasakikogane (Susceptible). Among those genome-wide SNPs, 26 SNPs loci on four chromosomes were correlated with resistance. Analysis of tuber epidermis bacteria diversity showed that the microbial diversity was higher in the resistant strains. Metabolomic analysis of leaves revealed that the content of two metabolites was significantly different between the resistant and susceptible lines.

研究分野：植物育種学

キーワード：ばれいしょ そうか病 病害虫抵抗性 オミクス解析 育種 選抜マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

ジャガイモそうか病は、*Streptomyces scabies* や *S. turgidiscabies* など数種の *Streptomyces* 属の菌によって引き起こされるバレイショ栽培上の重要な土壌病害である。本病が発病すると塊茎表面にかさぶた上の病斑が形成され、収穫物の価値が損なわれる。これまでに本病害克服のために栽培法の改良などの多数の研究が実施されてきたが、いずれも効果は限定的であり生産現場では未だにそうか病の発生が大きな問題となっている。この中でそうか病抵抗性品種は比較的安定的な効果を持っていることからそうか病総合防除の基盤として位置づけられ、抵抗性品種の育成が精力的に進められている。しかしながらそうか病抵抗性には品種間差があることは明らかとなっているが、その機構や遺伝様式に関する研究は国内外を含め報告例が少なく、抵抗性機構は解明されていない。現在抵抗性品種の選抜は、主にそうか病菌高密度汚染圃場での発病程度に基づき実施されているものの、本病害の発病は土壌水分等の栽培環境に大きく影響され年次変動が大きいことや、圃場全体の菌密度を一定に保ち均一な試験を実施することが困難であることから効率的で確実な選抜が行えておらず、安定的かつ簡便な抵抗性個体の選抜法の開発が望まれている。

近年になって、バレイショの全ゲノム情報が解読、公開されそれらを元にゲノム全体の遺伝子型を容易にかつ高密度に決定することが可能になっている (Xu *et al.*, 2011, Hamilton *et al.*, 2011)。また次世代シーケンス技術の発展に伴い、Restriction site Associated DNA (RAD) sequencing や QTL-seq といったハイスループットな解析法が開発されるなど、ゲノミクスにおける技術革新が著しい。植物共生微生物相の解析においては、培養に依存しない網羅的な環境 DNA 抽出法の開発 (Ikeda *et al.*, 2009) や低コスト・迅速な遺伝子分析法の開発によって、植物共生微生物の多様性を偏りなく網羅的に解析することが容易となった(池田、浅野ら 2014 環境微生物系学会合同大会)。メタボロミクス解析はこれまで基礎研究を中心に利用されてきたが、圃場で栽培した作物等の代謝成分の解析に活用し、代謝物の面から作物の特性を明らかにするフィールドメタボロミクス解析も行われ始めている。

このように各種オミクス解析技術が急速な進展を見せる中で研究代表者らのフィールドメタボロミクス研究から、ジャガイモ疫病抵抗性品種の葉に特異的な代謝物が存在することや、そうか病汚染圃場で栽培したバレイショの葉に特徴的な代謝物が存在することが明らかとなった。また、共生微生物の研究からはそうか病を抑制する栽培環境下では、そうか病菌と拮抗的に作用する微生物が増加すること (Tomihama *et al.*, 2016) や植物の根に共生する微生物が産出する物質によって地上部の病害虫抵抗性が強くなることが明らかになっている (D' Alessandro *et al.*, 2013)。これらのことから植物の病害虫抵抗性には植物自身の抵抗性遺伝子のみだけでなく、代謝物を通じた植物 - 共生微生物 - 病害虫間の相互作用が大きな役割を占めていることが明らかになりつつある。

研究代表者はこのような状況からそうか病抵抗性品種では、抵抗性品種に特異的な代謝物の作用によって塊茎周辺でそうか病菌に拮抗的に作用する共生微生物が増加することで抵抗性が発揮されているのではないかとこの着想に至った。そこで、ゲノミクス技術を活用してそうか病抵抗性に関する遺伝子座を特定すると共に、メタゲノミクス解析及びメタボロミクス解析を行うことで、バレイショ - 共生微生物 - そうか病菌間の相互作用を明らかにし、これまで未解明であったそうか病抵抗性機構の全体像を解明することができると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、バレイショ - 共生微生物 - そうか病菌間の相互作用を網羅的に把握し、そうか病抵抗性機構を解明することを目的とする。そうか病抵抗性が“極強”と“弱”の品種の後代について、複数年のそうか病抵抗性評価を元にそうか病抵抗性の遺伝様式を明らかにする。また、集団内で表現型が顕著に異なる系統群に特徴的なゲノム領域、共生微生物、代謝物等を同定し、抵抗性選抜のための DNA マーカー、微生物マーカー、バイオマーカーの候補を見出す。最終的にはそれらのマーカー候補について、様々な材料での有効性を確認しそうか病抵抗性のマーカーを開発することも目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試材料

そうか病抵抗性が“極強”のユキラシャを種子親、“弱”のながさき黄金を花粉親とした雑種集団 179 系統を用いた。また、本集団から平成 29-30 年の 2 か年のそうか病抵抗性に基づき選抜したそうか病抵抗性が“強”の 20 系統と“弱”の 20 系統をそれぞれ強系統群、弱系統群として解析に供試した。

### (2) 解析系統のそうか病抵抗性評価

上記雑種集団について、研究代表者が開発した圃場での精密評価系を用いてそうか病抵抗性の評価を平成 29 ~ 令和元年の 3 か年実施した。そうか病菌 *S. turgidiscabies* の 94-3 株の培養

物に畑土、ピートモス、川砂を加え菌密度が  $1.0 \times 10^7$  cfu/g の汚染土壌を作成した。直径 10cm のジフィーポットに供試系統の塊茎を入れ、その上に作成した汚染土壌を加え畑に植え付けた。評価は 3 株 2 反復で行った。慣行法に従い栽培管理を実施し、地上部が枯凋後に収穫、発病調査を行った。収穫した塊茎について、以下の基準に基づいて 7 段階に分類し、各塊茎の発病面積及び発病塊茎数から罹病度を算出した。0：発病なし、0.5：塊茎表面の 1%未満または病斑数 1 個が観察される、1：塊茎表面の 1~3%未満または病斑数 2~3 個が観察される、2：塊茎表面の 3~13%または病斑数 4~10 個が観察される、3：塊茎表面の 13~25%または病斑数 11~20 個が観察される、4：塊茎表面の 26~50%または病斑数 21~30 個以上、5：塊茎表面の 50%以上または病斑数 31 個以上。発病率 = (発病塊茎数) / (全塊茎数) × 100、罹病度 = (発病指数 × 塊茎数) / (6 × 調査塊茎数) × 100。

### (3) 遺伝子型の取得

抵抗性強系統群 20 系統、弱系統群 20 系統、ユキラシャ、ながさき黄金から SoICAP SNP アレイにより 21,226 個の SNP について、遺伝子型を取得した。両親感で多型がないマーカーやデータ品質の低い SNP 等をのぞいた 7,163 個の SNP を解析に用いた。

### (4) 共生微生物相の多様性解析

抵抗性強系統群 20 系統、弱系統群 20 系統、ユキラシャ、ながさき黄金をそうか病汚染圃場で栽培し、そうか病が感染する時期とされる塊茎肥大初期に塊茎をサンプリングした。塊茎表皮部分から、細菌の 16S rRNA 領域の配列を増幅し次世代シーケンサーによる多様性解析を行った。

### (5) 葉における <sup>1</sup>H-NMR によるメタボローム解析

抵抗性強系統群 20 系統、弱系統群 20 系統、ユキラシャ、ながさき黄金をそうか病汚染圃場で栽培し、そうか病が感染する時期とされる塊茎肥大初期に複数枚の葉をサンプリングした。凍結乾燥後に葉の水抽出物の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを計測し代謝物量を測定した。

### (6) 遺伝子発現解析

ユキラシャとながさき黄金を汚染土で栽培し、塊茎肥大前のストロンおよび肥大初期の塊茎から RNA を抽出した。抽出した RNA について RNA-seq 解析を行い、両品種で遺伝子発現を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) そうか病抵抗性の遺伝解析

平成 29 年~令和元年の 3 か年そうか病抵抗性を評価した結果、分離集団では罹病度は最小 6.9、最大 59.4、発病率は最小 25.6、最大 92.3%の間で連続的に分布した。ユキラシャでは罹病度 9.0、発病率 26.9%、ながさき黄金では罹病度 37.6、発病率 72.3%であり、雑種後代では超越分離が見られた(図 1)。この結果からユキラシャのそうか病抵抗性は複数の遺伝子座によって制御される量的形質であることが示唆された。

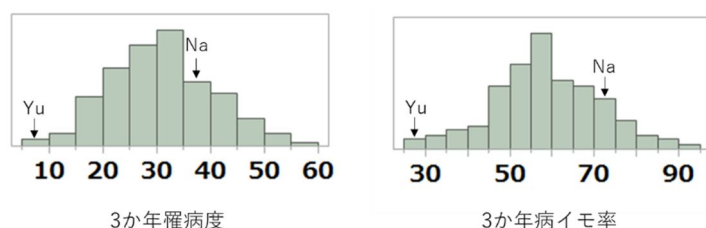


図 1 平成 29~令和元年のそうか病抵抗性の分離様式

Yu: ユキラシャ、Na、ながさき黄金

### (2) SoICAP SNP アレイによる連鎖解析

ユキラシャとながさき黄金の雑種後代から、平成 29-30 年の 2 カ年の評価結果に基づき選抜した抵抗性強系統群と弱系統群を各 20 系統について、SoICAP SNP アレイにより 21,226 個の SNP の遺伝子型を取得した。両親間で多型の無い SNP やデータ品質の低い SNP 等を削除した結果、7,163 個の SNP の遺伝子型が取得できた。7,163 個の SNP について、抵抗性強系統群と弱系統群の間で分離比が有意に異なる SNP を探索した(二乗検定)。その結果 12 本の染色体のうち 7 本の染色体に座乗する 39 個の SNP が抵抗性強系統群と弱系統群の間で分離比に有意な差があることが明らかとなった。有意差があった各 SNP について、解析に用いた 40 系統の中で遺伝子型ごとの罹病度および発病率を比較した結果、6 本の染色体上の 30 個の SNP で罹病度と発病率の両者もしくは発病率のみに遺伝子型ごとに有意な差が見られ、4 本の染色体上の 26 個の SNP については複数の近傍 SNP で有意な差が見られた。このうち、第 1、7、8 染色体上の SNP はユキラシャ型、第 12 染色体上の SNP はながさき黄金型の遺伝子型で抵抗性が強くなった(図 2、3)。

また、第 1、7 染色体上の SNP では相加効果が示唆された。検出された各 SNP について、ユキラシャとながさき黄金の雑種集団 182 系統における遺伝子型を決定し発病程度との相関を解析した。遺伝子型解析は iSeq100 を用いて行い、得られたリード数から遺伝子型を推定した。その結果発病度および罹病度の両者と有意な差が見られた SNP が第 1、8 染色体上に、罹病率のみで有意な差が見られた SNP が第 7、8、12 染色体上に見られた (図 4)。さらには、遺伝的背景が異なる様々な品種においても、これらの SNP の遺伝子型と発病程度の相関を解析したが、いずれの SNP でも発病程度と相関は見られなかった。以上のことから本研究で見出された SNP はユキラシャに由来する抵抗性に相関があるものの、由来が異なる別の抵抗性とは相関が見られないことが示唆された。

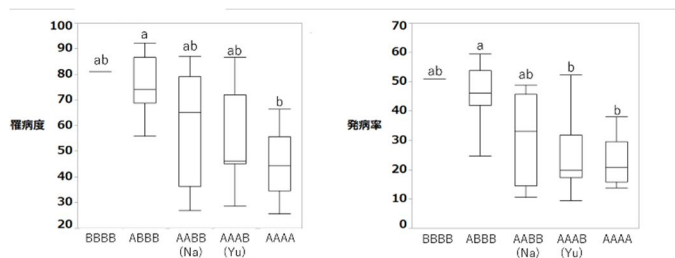


図 2 第 1 染色体上のマーカー遺伝子型とそうか病発病程度

抵抗性強系統群 20 系統、弱系統群 20 系統における結果。異文字間に有意差有り (Tukey 法  $p=0.05$ )

括弧内の Yu と Na はユキラシャとながさき黄金の遺伝子型であることを示す。

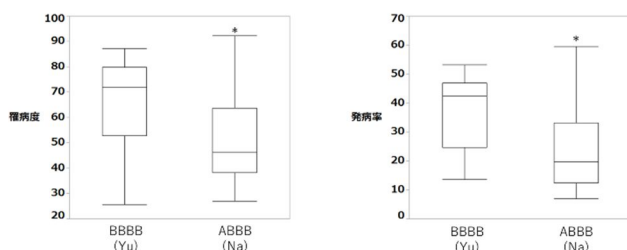


図 3 第 12 染色体上のマーカー遺伝子型とそうか病発病程度

抵抗性強系統群 20 系統、弱系統群 20 系統における結果。

\*は有意差があることを示す (t 検定、 $p=0.05$ )

括弧内の Yu と Na はユキラシャとながさき黄金の遺伝子型であることを示す。

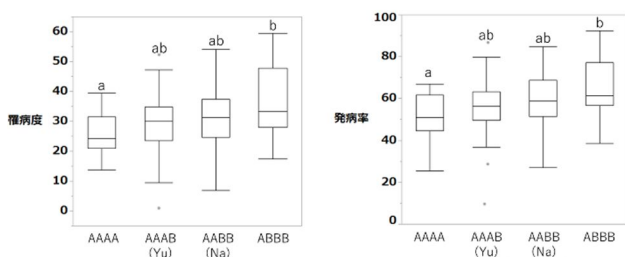


図 4 第 1 染色体上のマーカー遺伝子型とそうか病発病程度

ユキラシャ × ながさき黄金 182 系統における結果。異文字間に有意差有り (Tukey 法  $p=0.05$ )

括弧内の Yu と Na はユキラシャとながさき黄金の遺伝子型であることを示す。

### (3) 塊茎表皮における共生微生物の多様性解析

そうか病汚染圃場で栽培した抵抗性強系統群 20 系統、弱系統群 20 系統、ユキラシャ、ながさき黄金の肥大初期の塊茎表皮部分から抽出した DNA について、細菌の 16S rRNA 領域の配列を増幅し次世代シーケンサーによる多様性解析を行った。その結果、抵抗性強系統群およびユキラシ

ヤでは、抵抗性弱系統群およびながさき黄金に比べて、Shannon's index および observed-species が高かった（表1）。以上の結果からそうか病菌の感染時期である肥大初期塊茎表皮での微生物相が多様である方がそうか病抵抗性が強い可能性が示唆された。本細菌群について主座標分析を行った結果、ユキラシャとながさき黄金は明確に異なる群集構造を持っていたが、雑種集団は抵抗性に関わらず両親の中間に分布し、抵抗性の違いによる明確な分布は見られなかった。また、抵抗性強系統群およびユキラシャでは Cytophagales 目の細菌が有意に多いなど、抵抗性強系統群と弱系統群の間で複数の細菌群量に差が見られた。

表1 そうか病抵抗性の違いが塊茎表皮の細菌群多様性に及ぼす影響

	ace	chao1	shannon	equitability	simpson	simpson e	singles	observed_ species
抵抗性強集団	1121	1157	6.04	0.657	0.954	0.040	293	593
抵抗性弱集団	1103	1132	5.87 *	0.646	0.952	0.042	282	546 *
ユキラシャ	1157	1216	6.67	0.710	0.975	0.060	312	675
ながさき黄金	1048	1054	5.73 *	0.628 *	0.934 *	0.028 *	276	559 *

#### (4) 葉における 1H-NMR によるメタボローム解析

そうか病汚染圃場で栽培した抵抗性強系統群 20 系統、弱系統群 20 系統、ユキラシャ、ながさき黄金について、そうか病感染時期とされる塊茎肥大初期に複数枚の葉をサンプリングした。凍結乾燥後に葉の水抽出物の 1H-NMR スペクトルを計測し代謝物量を測定した。検出された 19 種類の代謝物について抵抗性強系統群と弱系統群の間で比較した結果、2 種類の代謝物含量が両者の間で有意に異なっていることが明らかになった（図5）。以上の結果から地上部の代謝物の違いを元に地下部の病害虫抵抗性を選抜できる可能性が明らかとなった。

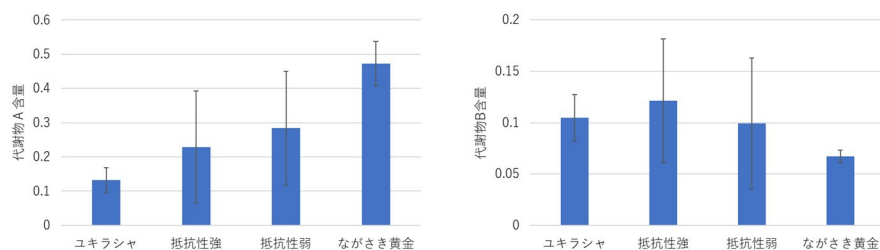


図5 そうか病抵抗性程度によって含量が異なる二種の代謝物

#### (5) ユキラシャとながさき黄金のストロンおよび肥大初期塊茎における遺伝子発現比較

ユキラシャとながさき黄金について、塊茎肥大前のストロンおよび肥大初期の塊茎から RNA を抽出し、RNA seq 解析により遺伝子発現を比較した。肥大開始前ではユキラシャで 2 倍以上発現が上昇していた物が 1,412 遺伝子、2 倍以上減少していた物が 2,505 遺伝子検出された。肥大初期ではユキラシャで 2 倍以上発現が上昇していた物が 1,928 遺伝子、2 倍以上減少していた物 3,497 遺伝子が検出された。今後は発現が変動している遺伝子について、GO 解析等を通じてそうか病抵抗性に関与する遺伝子の特定を進める計画である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 池田 成志、浅野 賢治	4. 巻 50
2. 論文標題 有機物を活用したジャガイモそうか病防除研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 土づくりとエコ農業	6. 最初と最後の頁 5-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 池田 成志、浅野 賢治、森 清文	4. 巻 776
2. 論文標題 有機物を活用したジャガイモそうか病防除研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ニューカントリー	6. 最初と最後の頁 14-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 池田 成志、浅野 賢治、森 清文	4. 巻 23
2. 論文標題 ジャガイモそうか病防除のための有機物活用研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 農業ビジネスベジ	6. 最初と最後の頁 86-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 浅野賢治	4. 巻 133
2. 論文標題 ジャガイモそうか病防除に向けた取り組み	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 いも類振興情報	6. 最初と最後の頁 33-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koizumi Emiko, Igarashi Toshiya, Tsuyama Mutsuo, Ogawa Keiichi, Asano Kenji, Kobayashi Akira, Sanetomo Rena, Hosaka Kazuyoshi	4. 巻 98
2. 論文標題 Association of Genome-Wide SNP Markers with Resistance to Common Scab of Potato	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Potato Research	6. 最初と最後の頁 149 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12230-021-09827-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 関山 恭代、池田 成志、浅野 賢治、岡崎 和之	4. 巻 91
2. 論文標題 NMRによる農業メタボロミクスの活用と展望 - 農業現場と分析現場のスムーズな連携に向けて -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 272 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20710/dojo.91.4_272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 浅野賢治
2. 発表標題 気候変動がバレイシヨ病害に 及ぼす影響と育種の対応
3. 学会等名 日本植物病理学会北海道部会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野賢治
2. 発表標題 北海道におけるジャガイモそうか病低減に向けた取り組み
3. 学会等名 持続的農業研究セミナー2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野賢治
2. 発表標題 北海道でのそうか病抑制栽培技術 体系確立に向けた取り組み
3. 学会等名 2017年度次世代バレイショセミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅野賢治
2. 発表標題 北海道におけるジャガイモそうか病防除のための新規資材の探索
3. 学会等名 2017年自然共生型農業研究シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 池田成志、浅野賢治、森清文	4. 発行年 2020年
2. 出版社 農山漁村文化協会	5. 総ページ数 256
3. 書名 農業技術大系 土壌施肥編 第5-1巻 (追録の一部を執筆)	

1. 著者名 浅野賢治	4. 発行年 2020年
2. 出版社 農山漁村文化協会	5. 総ページ数 113
3. 書名 農業技術大系 作物編 第5巻 (追録の一部を執筆)	

〔産業財産権〕

〔その他〕



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------