

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05663

研究課題名(和文) サツマイモネコブセンチュウのレース判別用DNAマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of DNA markers to identify races of southern root-knot nematode.

研究代表者

田淵 宏朗 (Tabuchi, Hiroaki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・上級研究員

研究者番号：10355571

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)：サツマイモネコブセンチュウ(以下線虫と略)のレース決定は、サツマイモへの接種法により行われているため時間と労力がかかる。そこで本研究では短時間で簡易にレース判別が可能なDNAマーカーの開発を目指した。そのために、新規に線虫系統を確立して接種法によりレースを決定した。また、既存の系統も用いて40系統のDNA多型解析を行ったが、レース特異的な多型部の同定はできなかった。しかし、系統数が1増える毎にレース特異的なDNA多型部位の候補数を約1/2に減らせるため、各レースにつき約20系統の解析を行えば多型部位を数カ所程度まで絞り込める可能性があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線虫レースの分化に関与するゲノム領域の同定は、植物が線虫を異物と認識し、線虫がそれを回避するために分子進化する機構の解明に繋がる。また、簡易なレース判別システムの開発により、抵抗性品種の導入による低コストな線虫被害抑制対策が行える。本研究では各レースにつき約20系統の解析によりレース特異的なDNA多型部位を数カ所程度まで絞り込める可能性を示すことで、上記目標に向けた新知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Races of the southern root-knot nematode (SRKN) is identified based on their different responses to six differential sweetpotato cultivars. Because this inoculation method is time-consuming and laborious, we intended to develop DNA markers to identify SRKN races easily. At first, we established new single egg-mass isolates of SRKN followed by the race identification with inoculation method. Then we conducted DNA polymorphism analysis of 40 new and already-existing isolates of SRKN, and did not identify the race-specific genome region. However, we suppose that analysis of about 20 isolates of each SRKN race might restrict the race-specific DNA region to several sites out of about fifty thousand polymorphic sites.

研究分野：植物遺伝学。分子生物学。

キーワード：サツマイモネコブセンチュウ レース DNAマーカー サツマイモ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

線虫は千種類以上の農作物を侵す土壌害虫で世界的に問題となっており、サツマイモでは 10 レースが確認されている。植物が線虫を「異物」と認識する標的の違いがレースの違いであり、レース分化は植物への対抗手段として線虫がゲノム DNA の変異を通して認識される標的を変化させた結果だと考えられるが、レースの差異がどのような分子機構に因るのかについての詳細は不明である。我々は、線虫のゲノム多型とレース分化の関係を調べるために、異なるレースに属する分離系統(isolate, 以下系統と略)間のゲノムの多型解析を予備的に行っており、系統特異的な多型部位が平均で 50,000 程度あることが分かった。この中からレース分化を規定する領域を同定するには大規模な線虫系統のゲノム多型解析とレース判別を行って、同一のレース内では多型が無いが異なるレース間では多型を示すゲノム部位を絞り込む必要がある。このうち、ゲノム多型解析は次世代シーケンサー(NGS)により近年可能となった。しかし、レース判別には半年~1年以上の時間をかけ、圃場から採取した線虫 1 頭由来の系統を確立し、それを、6 品種のサツマイモ判別品種に接種して抵抗性程度を確認する必要があるため、大規模な調査には膨大な時間と労力がかかる。現状では簡易なレース判別方法が無いことが研究推進のネックになっている。

### 2. 研究の目的

最終的な研究目的はレース分化を規定しているゲノム領域を同定し関与する分子機構を明らかにすることであるが、一時に達成できる課題ではない。そのため、本研究課題ではまず、数十程度の線虫系統のゲノム塩基配列情報を解析し、レースの差異を決定する遺伝子そのものではなくても、レース特異的な多型を示すようなゲノム部位を探索することにより、簡易にレース判別用が可能な DNA マーカーの作成を目標とする。なお、報告されている 10 レースの内、日本の主要レースは SP1、SP2、SP4、SP6-1 の 4 種類であり、さらに SP3、SP6-2 を我々は保持しているため、まずはこれら 6 レースについて判別可能な DNA マーカーの作成を目指す。

本研究の成果により大規模な線虫系統の解析が加速され、植物と線虫の相互作用に関する分子機構の解明に繋がる。また、広範囲な地域の線虫レース分布調査が可能となり、線虫ゲノムの多型データによるレース間およびレース内系統間の遺伝距離の解析情報と共に、線虫のレース分化・進化や地域的な拡大経路の解明に貢献できる。

また、九州と沖縄については線虫のレース分布に地域ごとの特徴があると予想されているが、それ以外の地域や圃場一筆ごとのレース分布については不明である。生産現場において圃場ごとに簡易にレース判別が可能となれば、それらのレースに対する抵抗性を持つサツマイモ品種を導入することにより、低コストな線虫被害抑制が可能となる。

### 3. 研究の方法

レース特異的なゲノム部位を探索するためには多数の線虫系統が必要である。そのため、まずは新規分離系統の確立を目指した。具体的には、九州と関東のサツマイモやナス科圃場からサンプリングした土壌で感受性のトマト等を栽培し、着生した線虫の卵のうを収集した。次に、最初の 1 回のみ 1 株の感受性のトマト等に卵のう 1 個を接種した。線虫は単為生殖で 1 頭の雌個体が 1 個の卵のうを作るため、これを線虫 1 頭由来の系統とした。2 回目以降は 1 株の感受性のトマト等に同一の系統由来の複数の卵のうまたは第二期幼虫を接種し、増殖を続けていくことで、新たな系統を確立した。新規系統は、十分に増殖した段階で順次レース判別用サツマイモに接種してレースを決定した。次に、レースが決定された新規および既存の線虫系統について、次世代シーケンサーにより DNA の塩基配列情報を取得し、リファレンス配列との比較などから多型解析を行った。

### 4. 研究成果

九州と関東の 27 圃場から 76 系統を確立し、そのうち 48 系統のレースを決定した。複数系統のレースを決定した 15 圃場のうち 1 圃場のみ複数レースが検出され、一般畑作圃場では単一レースと複数レースの場合があると思われた。レースの地域分布を見ると、関東(茨城・神奈川)では SP1、SP3、SP6-1 がそれぞれ 7、2、1 圃場、中北部九州(福岡・熊本・大分)では SP1 が 5 圃場、南部九州(宮崎・鹿児島)では SP1 と SP2 がそれぞれ 1、5 圃場で検出された。SP1 は佐賀・長崎・熊本の主要レースだが(Sano ら 2005)、福岡・大分や関東でも最も検出頻度が高かった。一方で南部九州では SP2 の検出頻度が高く既報と一致した。また、沖縄の主要レースの一つである SP6-1 は茨城からのみ検出された。千葉でも検出例があるため(藏之内ら 2018)、関東にも SP6-1 が分布していると思われる。さらに、SP3 はこれまで熊本以外での検出例が少ないが茨城の 2 圃場から検出された。

レースを決定した新規および既存の線虫についてのべ 40 系統の多型解析を行ったがレース特異的な多型部位を絞り込めなかった。その理由として、レースあたりの系統数が少なかったこと、レースにより採取頻度に差があったこと(SP4 の新規系統は無し)等があげられる。しかしながら、

解析する系統数が 1 増える毎にレース内多型部位数は約 1/2 に減らせるため、各レースにつき約 20 系統の解析を行えば、平均約五万あるレース内多型部位を数カ所程度まで絞り込める可能性があることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	浅水 恵理香  (Asamizu Erika)  (00370924)	龍谷大学・農学部・教授   (34316)	
研究分担者	上杉 謙太  (Kenta Uesugi)  (00414798)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・主任研究員   (82111)	
研究分担者	鈴木 崇之  (Suzuki Takayuki)  (20414823)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・チーム長   (82111)	2018年度に削除。

	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
連携研究者	藏之内 利和  (Kuranouchi Toshikazu)  (50414644)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター 畑作物研究領域・上級研究員   (82111)	
連携研究者	村田 岳  (Murata Gaku)  (90760364)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター 生産環境研究領域・研究員   (82111)	

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
---------	---------