

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：84701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14449

研究課題名(和文) ウメ葉縁えそ病を題材とした果樹ウイルス病害抵抗性に関する遺伝的因子の同定

研究課題名(英文) Identification of genetic factors associated with resistance to a fruit tree viral disease, mume leaf-edge necrosis

研究代表者

沼口 孝司 (Numaguchi, Koji)

和歌山県農林水産部(農業試験場、果樹試験場、畜産試験場、林業試験場及び水産試験場)・果樹試験場うめ研究所・副主査研究員

研究者番号：70761831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウメのウイルス病害である葉縁えそ病抵抗性に関する遺伝因子の同定に向け、接ぎ木接種による病徴・ウイルス保毒状況の調査、網羅的発現解析による感受性および非感受性品種間の発現変動遺伝子群の検出ならびにゲノムワイド関連解析(GWAS)による抵抗性に関する遺伝領域の探索を試みた。

その結果、果実収穫用に栽培されている「実ウメ」品種群と比較して、アンズやスモモとの交雑由来の品種群で症状やウイルス保毒濃度ともに少ない傾向が認められた。しかし、その原因因子の解明には至らなかった。今後これらの品種と実ウメとの交雑後代を獲得し、原因因子の遺伝様式解明に引き続き取り組む。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果樹栽培においては、一度感染すると治癒しないウイルス病害は致命的な問題である。抵抗性品種の育成は有力な対策となり得るが、果樹ではこれまでにウイルス抵抗性品種やその形質を支配する遺伝的因子の同定例が少なく、育種は進展していない。

本研究ではウメのウイルス病害である葉縁えそ病への抵抗性付与に、近縁種であるアンズやスモモの遺伝因子が利用できる可能性を示したものであり、詳細な原因因子の同定には至らなかったものの、今後の果樹育種の一つの方向性を示すことができた。また、研究の過程で得られた多数の品種におけるゲノムワイドな遺伝情報は、今後のウメ育種の加速化に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Viral disease can be a fatal problem in fruit tree cultivation. We tried to reveal genetic factors for resistance to a viral disease in Japanese apricot, mume leaf-edge necrosis. Surveys for symptoms and viral infection in scions grafted to infected rootstocks, transcriptome analysis and genome-wide association study (GWAS) suggested that interspecific hybrids derived from crosses with apricot or Japanese plum was less affected with viruses associated with mume leaf-edge necrosis, compared to varieties for harvesting fruits. However, we could not identify genetic factors for resistance, because all the interspecific hybrids were F1 hybrids which may be heterozygous at candidate loci. The results showed that it is useful to utilize interspecific hybrids to give resistance to viral diseases in Japanese apricot.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：ウメ ウイルス 葉縁えそ病 抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

永年性作物である果樹において、一度感染すると治癒しないウイルス病害は致命的な問題であり、抵抗性品種の育成が強く求められている。しかし、果樹では長い幼若期や大きな個体サイズなど特有の遺伝学的研究上の障壁に加え、ウイルス病害の高いリスクゆえに研究材料の入手や維持自体のハードルが高いため、これまでにウイルス抵抗性品種やその形質を支配する遺伝的因子の同定事例が少なく、抵抗性品種の育成は進んでいない。

そこで我々は、古くから産地と共存状態にあるウイルス病害に着目した。ウメ葉縁えそ病(通称「茶がす症」)(図1)がそのひとつである。本病は1980年代に和歌山県のウメ‘南高’で発見された接ぎ木伝染性の病害で、感染樹では早期落葉による樹勢低下や不完全花(発育不全や雌蕊の欠失を呈する花器)の発生による着果率の減少ならびに果実重量の減少などが生じ、収量が低下傾向となる(Nakaune et al. 2018, Numaguchi et al. 2018)。しかし果実への病斑形成がなく、実質的な品質劣化が認められないことから、感染樹は伐採されることなく栽培されており、産地では既に蔓延状態にある。我々は、感染樹からのウイルス探索ならびに現地調査から、‘南高’における本病の病徴発現にウメ樹皮えそシステムピッキング随伴ウイルス(PBNPaV)およびリトルチェリーウイルス2(LChV-2)の感染が強く関連していることを示した(Nakaune et al. 2018, Numaguchi et al. 2018)。本研究はこれらの知見と和歌山県果樹試験場うめ研究所が保有する、ウメを中心とした遺伝資源を活用することで、ウイルス抵抗性への遺伝学的アプローチを試みるものである。



図1. ウメ葉縁えそ病の葉および花における典型的な症状

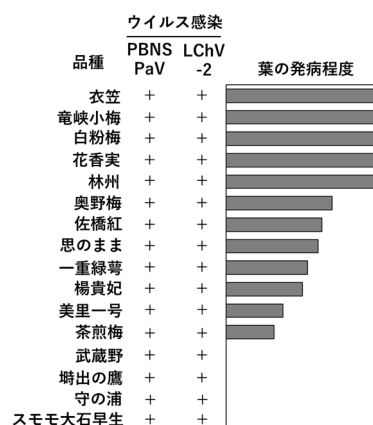


図2. 2種ウイルスの感染と葉の発病程度

2. 研究の目的

本研究ではウメ葉縁えそ病抵抗性に関する遺伝的因子の同定を通じて、果樹ウイルス抵抗性メカニズムの一端を解明することを目的とする。予備調査により、本病の抵抗性にはウイルスが感染できなくなる質的なタイプと、感染後の病徴発現を抑制する量的なタイプが存在することが示唆されている(図2)。そこで、ほ場実験により遺伝資源におけるウイルスへの感受性について特性化するとともに、パイオインフォマティクス解析を用いて、タイプ別の抵抗性に関する遺伝的因子の網羅的な同定を目指す。

3. 研究の方法

1) 接ぎ木接種による2種ウイルスへの感受性に関する品種間差の解明

(1) 葉および花の病徴程度の品種間差解明

上記 PBNPaV および LChV-2 への感受性に関する品種間差を明らかにするため、うめ研究所で維持する重複感染樹を中間台木として、2018年および2019年に81品種の穂木を高接ぎし、下記の通り葉および花の症状を調査した。

葉の症状調査

2019年8月および2020年8月、10月に、その時点で生存している品種について下記の基準で10枚/品種の葉の症状を調査し、平均スコアを求めた。

0: 症状なし、1: 黄化が認められる、2: 激しい黄化または葉縁のえそが認められる

花の症状調査

2021年1月以降、着花が認められる品種について、順次開花数および不完全花(雌蕊が欠失または正常化の1/2以下のサイズ)数を調査し、不完全花率(%)を算出した。

(2) ウイルス保毒濃度の品種間差解明

上記で高接ぎを行った品種の葉の葉柄基部から Total RNA を抽出し、既報の PBNPaV-F3-2/PBNPaV-B3-2 (Numaguchi et al. 2018) および LCV2UP2/LCV2L02 (Rott and Jelkmann 2001) を用いた RT-PCR (30 cycles) により、次の基準でバンドの有無および濃淡を評価した。

0: バンド検出なし、1: 検出されるが希薄、2: 明瞭に検出

2) トランスクリプトーム解析による、感受性および非感受性品種間の発現変動遺伝子群の検出

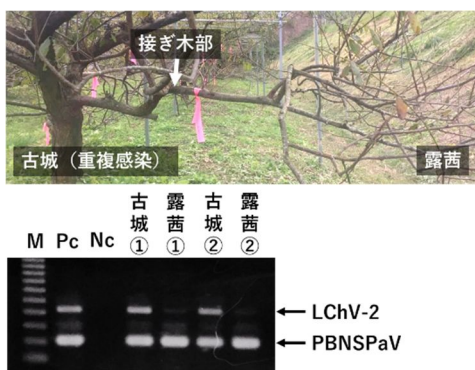


図3. 2種ウイルスが重複感染した‘古城’に高接ぎした‘露茜’のウイルス検定

予備実験により、2種ウイルスが重複感染した‘古城’に高接ぎした‘露茜’では、PBNSPaVは明瞭に検出されるものの、LChV-2が検出されにくい(図3)ことが明らかになっている。そこでこの生理学的な要因について考察するため、この‘露茜’、‘古城’およびウイルス保毒のない‘露茜’の幼葉からmRNA(メッセンジャーRNA)を抽出し、RNA-seq解析により、発現変動が認められる遺伝子群の検出を試みた。

3) ゲノムワイド関連解析(GWAS)によるウイルス感受性に関する遺伝領域の探索

供試品種の幼葉からゲノムDNAを抽出し、Target capture法(Numaguchi et al. 2020)により15,171か所の遺伝子コード領域周辺を対象としたIlluminaシーケンシングを行った。得られたリードからモモ参照ゲノムを用いて一塩基多型を検出した。本情報と上記1)で実施した形質データ等を用いてGWASを行い、ウイルス感受性に関する遺伝領域の探索を試みた。

4. 研究成果

1) 接ぎ木接種による2種ウイルスへの感受性に関する品種間差の解明

(1) 葉および花の病徴程度の品種間差

2種ウイルスの重複感染樹へ接ぎ木した品種について、適期に症状調査を行った(図4)。その結果、接ぎ木品種間の症状の程度に大きな品種間差が認められた。品種群毎にデータを整理すると、葉、花の症状ともに、実ウメおよび小ウメで程度が高い傾向が認められた(図4)。一方、台湾由来のウメ、アンズウメ、スモウメ、アンズおよびスモモでは、症状の程度が低い傾向であった。

(2) ウイルス保毒濃度の品種間差

2018年時点で接ぎ木に成功していた59品種について、30サイクルのRT-PCR検定を行った結果、PBNSPaVでバンドが希薄な品種が8品種、LChV-2ではバンドが希薄な品種が24品種、バンドが検出されない品種が8品種見いだされた。これらの品種には種間交雑に由来する品種が多く含まれた。

これらの結果から、アンズやスモモの遺伝因子が、抵抗性に関与する可能性が示された。

しかし、その他の品種において、葉および花における症状の程度とウイルス保毒濃度との間には明確な関係性は認められなかった。

2) トランスクリプトーム解析による発現変動遺伝子群の検出

重複感染樹へ高接ぎを行った‘露茜’において、LChV-2が検出されにくくなる(図3)要因を探索するため、健全な‘露茜’ならびに中間台木として用いた‘古城’重複感染樹の幼葉からmRNAを抽出し、モモの参照トランスクリプトーム配列に基づいたmRNA-seq解析を行った。結果についてFalse discovery rate(FDR)<0.05でフィルタリングしたところ、重複感染樹へ高接ぎを行った‘露茜’と健全な‘露茜’間に有意な発現変動が認められる遺伝子群は検出されなかった。このことから、探索対象の遺伝子は、ウイルスの感染により発現が誘起されるものではない可能性が示唆された。一方、重複感染樹へ高接ぎを行った‘露茜’と、その中間台木である‘古城’間では、1,282個の発現変動遺伝子群が認められ、そのうち‘露茜’で発現量が多い遺伝子が770個、発現量が少ない遺伝子が512個検出された。これらの遺伝子群についてagriGO v2を用いた遺伝子オントロジー(GO)解析に供したが、有意に蓄積したGOタームは検出されなかった。

3) ゲノムワイド関連解析(GWAS)によるウイルス感受性に関する遺伝領域の探索

GWASに先立ち、供試品種群を含む、うめ研究所植栽のウメを中心とした129品種の遺伝資源について、15,171か所の遺伝子コード領域周辺の配列を選択的に取得し、集団構造解析を行った。その結果、ウメには地理的・人為的な要因による集団の構造化の傾向や、種間遺伝子流動ならびにそれらに対する自然/人為選抜の痕跡が検出された。これらの結果は2020年にThe Plant Journal誌に報告した。本研究で検出した一塩基多型を用いたGWAS解析を実施したところ、明瞭ではないものの、葉、花の症状の品種間差に対応すると思われるピークが複数検出された。

本研究から、近縁種であるアンズやスモモの遺伝因子がウメのウイルス抵抗性に寄与する可能性が示されたが、その詳細の解明には至らなかった。今後は、スモモウメやアンズウメとウメとの交雑後代を可能な限り獲得し、原因因子の遺伝様式の解明を試みる予定である。

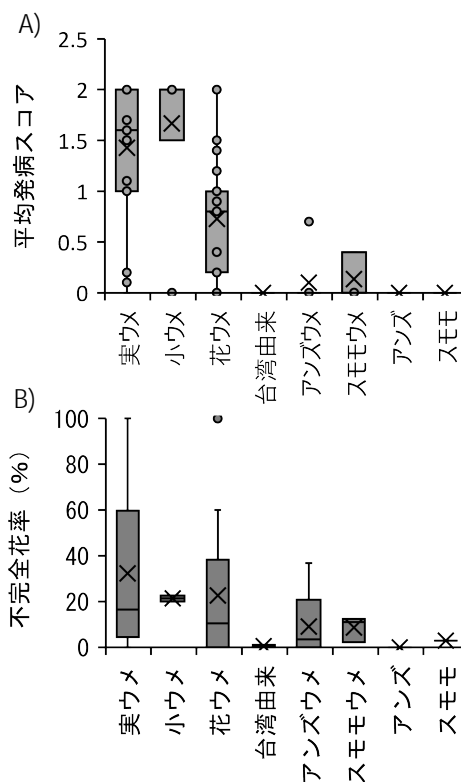


図4. 品種群間の葉縁えそ病症状の程度の違い

A) 葉の症状(2020年8月)

B) 花の症状(2021年1月~3月)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Numaguchi Koji, Yuto Kitamura, Ryo Ishikawa, Takashige Ishii	4. 巻 65
2. 論文標題 Estimation of demographic history of Japanese and Taiwanese populations in <i>Prunus mume</i> using SSR marker genotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Crop Research	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Numaguchi Koji, Ishio Shogo, Kitamura Yuto, Nakamura Kentaro, Ishikawa Ryo, Ishii Takashige	4. 巻 88
2. 論文標題 Microsatellite Marker Development and Population Structure Analysis in Japanese Apricot (<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 222 ~ 231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.UTD-013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Numaguchi Koji, Akagi Takashi, Kitamura Yuto, Ishikawa Ryo, Ishii Takashige	4. 巻 104
2. 論文標題 Interspecific introgression and natural selection in the evolution of Japanese apricot (<i>Prunus mume</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1551 ~ 1567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15020	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 沼口孝司	4. 巻 4
2. 論文標題 遺伝子流動や自然 / 人為選抜を伴ったウメの進化過程について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 56 ~ 57
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沼口孝司、赤木剛士、北村祐人、石川亮、石井尊生
2. 発表標題 ウメにおける分集団形成に関与した遺伝領域の探索
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沼口孝司、北村祐人、石川亮、石井尊生
2. 発表標題 ゲノムワイド関連解析によるウメ黒星病抵抗性に関する遺伝子座の推定
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沼口孝司、赤木剛士、北村祐人、大江孝明、柏本知晟、石川亮、石井尊生
2. 発表標題 ウメ品種群における果実矮小化形質に関連する遺伝領域の推定
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沼口孝司、赤木剛士、北村祐人、大江孝明、石川亮、石井尊生
2. 発表標題 Exome sequencingに基づく日本のウメの遺伝的多様性について
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼口孝司、赤木剛士、北村祐人、石川亮、石井尊生
2. 発表標題 Target capture法に基づく日本と中国のウメの集団構造および系統関係について
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沼口孝司、赤木剛士、北村祐人、石川亮、石井尊生
2. 発表標題 ウメの進化における種間遺伝子流動の重要性について
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2020年

〔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

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