

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450063

研究課題名(和文) トマトで観察されたシストセンチュウ-ワイドスペクトル抵抗性の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular analysis and characterization of the broad-spectrum cyst nematode resistant tomato

研究代表者

植原 健人 (UEHARA, Taketo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター虫・鳥獣害研究領域・上級研究員

研究者番号：30355458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：1) 国内のジャガイモシストセンチュウ抵抗性トマトはHeroA遺伝子を保持することが明らかとなった。2) ジャガイモシストセンチュウ抵抗性トマトはタバコシストセンチュウ抵抗性である。3) F1抵抗性品種の分離試験を行った。接種試験で抵抗性と感受性の分離比は3:1と考えられる。すなわち単一優勢遺伝子により支配される。4) マイクロアレイ解析を行った。抵抗性品種にタバコシストを接種して3日目と7日目のアレイ解析で、PR1が誘導されており、典型的なサリチル酸系の誘導抵抗性と考えられた。5) 抵抗性品種による線虫密度低減試験を行った。抵抗性品種で土壌中のタバコシストの密度が減少した。

研究成果の概要(英文)： We confirmed that Potato Cyst Nematode (PCN)-resistant tomato cultivars in Japan contained the HeroA gene, whereas susceptible cultivars did not. PCN-resistant tomato cultivars are identical to Tobacco Cyst Nematode (TCN)-resistant tomato cultivars. When segregated progenies from the selfing of resistant cultivar (Doctor-K) were inoculated with PCN, the progenies segregated into 20 resistant and five susceptible plants, fitting the 3 : 1 ratio expected for single-gene inheritance ($\chi^2=0.61$, $P=0.56$). Microarray analyses were performed to investigate the transcriptome profiles in the incompatible and compatible interactions at 3 and 7 days postinoculation (dpi). The PR1(P4,P6) transcript increased to exceptionally high level at 3 dpi in the cyst nematode-infected resistant plants compared to the uninoculated controls. We elucidated the effective of cyst nematode-resistant tomato cultivars in reducing the population of TCN in greenhouse trials.

研究分野：植物寄生性線虫

キーワード：トマト Globodera HeroA タバコシストセンチュウ 抵抗性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

線虫に対する植物の抵抗性のメカニズムの解明は、他の病原に対して、未知な部分が圧倒的に多い。それは土壤中の根の中で起こる反応で観察し難く、さらに、線虫の複雑な寄生方法にあると考えられる。線虫の寄生は、根への侵入後、維管束に頭部を向けて定着し、養分を摂取するための給餌細胞である多核体細胞を形成することに始まる。線虫はその給餌細胞からのみ養分を摂取し生育する。一方、抵抗性植物では、多核体細胞が形成されず、寄生が成立しない。

我々は、トマトのジャガイモシストセンチュウ（以下：PCN）抵抗性品種では過敏感様反応が誘導されていること、根でサリチル酸（SA）誘導が起こることを明らかにしている。本研究では、これらの線虫と植物の相互作用を解析する中で、PCN 抵抗性のトマト品種が、タバコシストセンチュウ（以下：TCN）に対しても抵抗性を示すことが観察されたため、この研究を進展させ、抵抗性遺伝子マーカーを用いた国内のトマトに関してのシストセンチュウ抵抗性遺伝子の特定、接種試験、抵抗性の遺伝的分離試験、網羅的遺伝子発現解析を行い、線虫寄生に対する植物の抵抗性メカニズムを明らかにしていく。さらに、抵抗性植物に侵入した線虫は根の中で定着後に、餓死するので、土壤中の線虫をクリーニングする効果が期待でき、その防除効果も併せて検証する。

2. 研究の目的

トマトの品種の中に *Globodera* 属シストセンチュウの複数種に強力な抵抗性を示す品種を発見した。すなわち、PCN に抵抗性を示すトマトのある品種が、TCN に対しても抵抗性を示す。一般にシストセンチュウに対する抵抗性は、レースやパソタイプと呼ばれる、ある病原型に対してのみ抵抗性を発揮することがほとんどであり、種を超えて広く抵抗性を示すことは極めて希である。その抵抗性の症状を詳細に解析し、その特徴を明らかにし、併せて、その抵抗性品種栽培におけるシストセンチュウの土壤密度低減効果（防除効果）を検証する。

Globodera 属線虫は、世界の農業に大きな被害を及ぼし、作物育種目標としても、その抵抗性品種育成は世界的にとっても重要な目標であり、ナス科作物に被害を及ぼす *Globodera* 属線虫複数種に同時に抵抗性であるトマトは応用面でも大変活用できる可能性が高い。現に複数種の *Globodera* 属線虫の国内発生が確認されており、PCN はジャガイモ、トマトで大きな被害があり、TCN は、タバコ、トマト、ナスで被害がある。本研究では、経済的被害が大きく重要性が高い割には、これまで、あまり解析されてこなかった、実用的な線虫抵抗性の特徴を明らかにすることを目的とし、併せて防除効果等の応用面での調査も行う。

3. 研究の方法

・試験材料

線虫：TCN (*Globodera tabacum*)
植物：トマト品種：桃太郎、ドクターK、ブチ、シュガーランプ、キャロル7、強力米寿等、ドクターK の自殖種子系統、ナス台木品種等

・試験方法

(1) 接種試験：TCN を赤ナスで増殖して、シスト篩い分け流し法でシストを分離し、シストをポリトロンで破碎して、卵を取り出し、約 1000 頭を 9 センチ黒ポットで栽培した植物の株元へガラスピペットを用いて接種を行った。約 3 ヶ月栽培後、土壌より再びシストを分離して、乾燥土壌 1g 当たりの卵を計数した。

(2) 植物の「芽だし」から Plant DNA Isolation Reagent (Takara-Bio) で DNA を精製し、*HeroA* 遺伝子の塩基配列から遺伝子マーカーを作成して、その遺伝子マーカー（遺伝子内マーカーであり抵抗性と 100%一致する。）により抵抗性・感受性を判定した。

(3) 遺伝子マーカーで抵抗性・感受性と判定された品種に TCN を接種し、3 ヶ月栽培後に栽培土壌を乾燥して、シスト篩い分け流し法で線虫を分離して、TCN の増殖を調査し、PCN 抵抗性遺伝子と TCN 抵抗性遺伝子が関係（連鎖）しているか推測した。

(4) ドクターK の自殖後代種子採種：ドクターK は、*HeroA* 遺伝子をヘテロに持つと推測され、自殖すると後代は抵抗性が分離すると考えられる。そこで、PCN の抵抗性と TCN の抵抗性が密接に連鎖している可能性を検証するために、まずは、自殖させた種子を採種した。この種子をポットに播種して 1 ヶ月後、TCN の 2 期幼虫を 1 ポット当たり、3000 頭接種し、3 ヶ月温室で栽培後、シスト篩い分け流し法でシスト分離を行った。

(5) マイクロアレイ解析：ドクターK（抵抗性）と強力米寿（感受性）に TCN を接種し、接種 3 日後、7 日後で根から RNA を精製して、マイクロアレイに反応させて、2.5 倍以上誘導・抑制している遺伝子を選択してクラスタ解析を行った。

(6) TCN を良く増殖させる赤ナスを用いて線虫を増殖させた土壌を作成した。その土をワグネルポットに詰め、抵抗性品種と感受性品種を移植して 3 ヶ月栽培後の土壌中のシストセンチュウ密度を調査した。

4. 研究成果

(1) PCN 抵抗性トマトは *HeroA* 遺伝子を保持
PCN 接種試験による表現型と遺伝子マーカーによる判定が完全に一致しているため、国内のトマトが保持する PCN 抵抗性遺伝子は、*HeroA* 遺伝子によると考えられる(表 1)。

表 1 : トマト品種の *HeroA* 遺伝子マーカーによる判定

品種	果実 台木	PCN 表現型	遺伝子マーカー
桃太郎 ⁸	大玉	感受性	感受性
ハウス桃太郎	大玉	感受性	感受性
桃太郎	大玉	感受性	感受性
桃太郎ファイト	大玉	感受性	感受性
強力米寿	大玉	感受性	感受性
影武者	台木	感受性	感受性
プチ	ミニ	感受性	感受性
キャロル ⁷	ミニ	感受性	感受性
シュガーランプ	ミニ	抵抗性	抵抗性
チェルシーミニ	ミニ	抵抗性	抵抗性
キャロルクイーン	ミニ	抵抗性	抵抗性
ピコ	ミニ	抵抗性	抵抗性
ベベ	ミニ	抵抗性	抵抗性
キャロル ¹⁰	ミニ	抵抗性	抵抗性
ココ	ミニ	抵抗性	抵抗性
オレンジキャロル	ミニ	抵抗性	抵抗性
イエローキャロル	ミニ	抵抗性	抵抗性
ミニキャロル	ミニ	抵抗性	抵抗性
ドクターK	台木	抵抗性	抵抗性

(2) PCN 抵抗性トマトへの TCN 接種試験

(1) の結果から、ドクターK、シュガーランプは *HeroA* 遺伝子を持ち PCN 抵抗性である。桃太郎、プチ、キャロル7は *HeroA* 遺伝子を持っていないので PCN 感受性と評価される。これらの品種に TCN を接種すると、TCN に対しても *HeroA* 遺伝子を持つドクターK、シュガーランプは、やはり抵抗性であり、*HeroA* 遺伝子を持っていない桃太郎、プチ、キャロル7は感受性と評価された。すなわち、PCN を接種した時と同じ反応になることを確認した。特にドクターK、シュガーランプでは、TCN のシストが一つも分離されず TCN がまったく増殖しない。*HeroA* 遺伝子をもつトマトは TCN に対して非常に強い抵抗性であると考えられる。同時に接種した桃太郎、キャロル7、プチからは TCN の複数のシストが分離され感受性であると判断される (図 1)。すなわち、PCN の抵抗性品種と TCN の抵抗性品種は一致する。TCN 抵抗性と PCN 抵抗性は密接に連鎖しているか、*HeroA* そのものが TCN 抵抗性遺伝子でもある可能性がある。

TCN の抵抗性トマトに関する既存知見として、ミニトマトが TCN 抵抗性であるとの報告がある。しかし、遺伝子マーカーで *HeroA* をもたないと判定されたプチやキャロル7等のミニトマト品種で TCN が増殖するため、ミニトマトのすべてが抵抗性であるわけではないことも明らかとなった。

HeroA 遺伝子を持つトマトは PCN (*G. rostochiensis* 及び *G. pallida*) と TCN の、ナス科に寄生できる *Globodera* 属シストセンチュウに共通に抵抗性を示すのではないかと推測される。

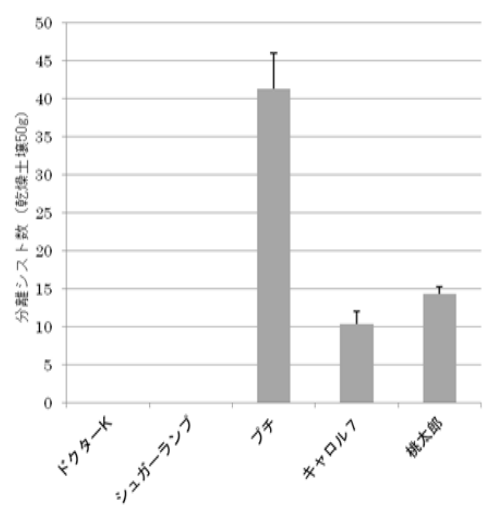


図 1 : PCN 抵抗性品種 (ドクターK、シュガーランプ) と PCN 感受性品種 (プチ、キャロル7、桃太郎) へ TCN 接種試験の結果

(3) ドクターK の分離試験

ドクターK の自殖後代の種子播種し 25 個体の植物に TCN を接種して、3 ヶ月後にシスト分離を行った結果、抵抗性個体 20 個体、感受性個体 5 個体と抵抗性が分離した。分離比は 3:1 と考えられる ($\chi^2=0.61, P=0.56$)。TCN 抵抗性遺伝子は単一優勢遺伝子である可能性が高い。抵抗性個体からはシストがまったく分離されず、強い抵抗性であると判断される。この結果からも *HeroA* が抵抗性遺伝子ではないかと推測される。

(4) マイクロアレイ解析

抵抗性品種ドクターKに TCN を接種して 3 日目と 7 日目のアレイ解析で、誘導している遺伝子としては、*PR1* の *P4* や *P6* が誘導しており、典型的なサリチル酸系の誘導抵抗性と考えられた (図 2)。また、*HeroA* 遺伝子を持つトマトに PCN を接種した場合も同様に *PR1* の *P4* や *P6* が誘導された。

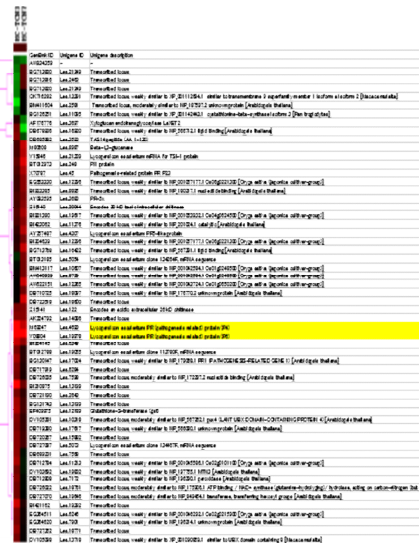


図 2 : マイクロアレイのクラスター解析 (黄色が *PR1* の *P4* や *P6*)

(5) 抵抗性植物による線虫密度低減試験

抵抗性品種栽培で土壌中の TCN 密度が減少するか、TCN を高密度に増殖させた土壌を準備して、赤ナス（感受性）、ドクターK（抵抗性）の苗を移植して3ヶ月栽培後、再び土壌中の TCN 密度を計数した。赤ナスが初期密度の3.7倍以上TCNを増殖させたのに対して、ドクターKは密度を70%ほど減少させた（図3）。しかし、PCN に対しては *HeroA* を持つ抵抗性トマトはポット試験で PCN を90%以上減少させる効果が確認されていたので、TCN は孵化促進物質に対する感受性が低いのではないかと推測される。

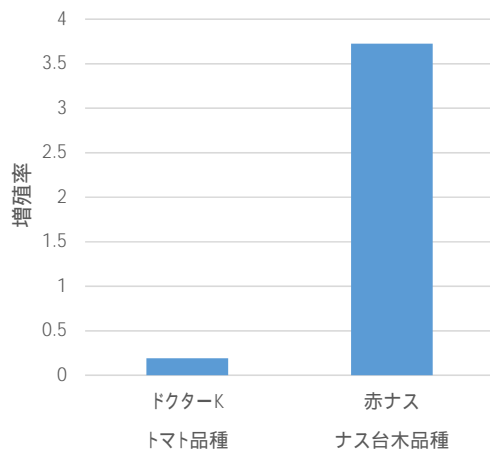


図3：TCN 高密度土壌における抵抗性植物、感受性植物の栽培後の TCN 増殖率

(6) ナス台木について

侵入害虫である TCN は、国内では最初にナスに被害が確認され、ナス栽培品種に被害を及ぼす。今後の被害のまん延防止のために、ナス台木での増殖程度を調査することは国内のナス栽培地にとって有益であると考えられる。そこで既存のナス台木品種「トレロ」、「トナシム」（この2品種は *Solanum torvum* である。）、「台太郎」、「赤ナス」、コントロールとして「千両二号」を使用し接種試験を行った。その結果、*S. torvum* である「トレロ」、「トナシム」は非常に強い抵抗性を示すことが明らかとなった。「台太郎」、「赤ナス」、「千両二号」が多数のシストを形成・増殖させるのに対して、*S. torvum* である「トレロ」、「トナシム」は全くシストが分離されてこなかった。この抵抗性台木を用いれば、タバコシストセンチュウ対策として有効であると考えられる。

総合考察

既存品種への TCN の接種試験、抵抗性の分離試験、マイクロアレイの遺伝子発現解析から、TCN 抵抗性は *HeroA* である可能性があると推測された。*HeroA* はナス科に寄生する *Globodera* 属3種への抵抗性遺伝子である可

能性がある。防除には、*HeroA* を持つトマト品種・台木品種、ナスの場合は *S. torvum* 台木が有効である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Uehara Taketo, Narabu Takashi, Itou Kenji, Masuta Chikara (2016) Detection of the potato cyst nematode resistance gene *Hero A* in Japanese tomato cultivars using PCR-RFLP method. Nematological Research.45(2):115-120
査読有

〔学会発表〕(計1件)

植原健人、中保一浩、水久保隆之、増田税 線虫抵抗性ナス属台木品種による線虫密度低減効果と抵抗性機構 平成26年度日本植物病理学会大会 2014年6月4日札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

〔図書〕(計1件)

植原健人(2014)植物の線虫抵抗性遺伝子と抵抗性メカニズム、「線虫学実験」p254-256 京都大学学術出版会

6. 研究組織

(1)研究代表者

植原 健人 (UEHARA, Taketo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター 虫・鳥獣害研究領域 上級研究員

研究者番号：30355458

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

増田 税 (MASUTA, Chikara)

北海道大学大学院農学研究院 教授

研究者番号：60281854