

# 食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	サツマイモネコブセンチュウ系統の分類と寄主適合性との関連解析
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	浅水 恵理香（農学部・准教授）研究代表者 岩堀 英晶（農学部・教授）
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1)植物寄生性線虫 (2)ゲノム多型解析 (3) (4) (5) (6)

## 1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

国内で単離されたサツマイモネコブセンチュウのコレクションについて、ゲノムワイドに多型を検出し、系統分類する。更に、代表的なサツマイモ品種に対する感染試験を行い、感染表現型を調べる。将来的に、線虫のゲノム多型から寄主適合性を判別する解析に進展させる。研究計画は、以下の2項目である。

### 1. サツマイモネコブセンチュウの系統分類（浅水）

国内で単離された40系統程度を対象として、全ゲノムを解読する。各系統からゲノムDNAを抽出し、マルチプレックス化したショットガンライブラリーを作製し、NGSによるペアエンドシーケンスを行う。各系統から得られた配列データをサツマイモネコブセンチュウ参照ゲノム配列に対してマッピングし、多型検出を行い、系統分類する。

### 2. サツマイモ品種に対する感染性評価（岩堀）

サツマイモネコブセンチュウには、これまでにSP1からSP9までの9つのレースが知られており、本学が所有する国内で単離された40系統程度について、サツマイモ5品種に対する寄生性を異にするレースを判別する。

## 2. 研究成果の概要 (4 ページ程度)

### 1. サツマイモネコブセンチュウの系統分類

平成 28 (2016) 年度には、サツマイモネコブセンチュウ 39 系統からゲノム DNA を抽出し、マルチプレックス化したショットガンライブラリーを作製し、Illumina HiSeq 4000 によるペアエンドシーケンスを行った。各系統から 300 Mb~2.4 Gb、全体で 56.6 Gb の配列データを蓄積した。各系統から得られた配列データをサツマイモネコブセンチュウ標準系統 'Morelos' のゲノム配列 (Abad P. et al. 2008) に対してマッピングし、一塩基多型 (SNP) を検出した結果、1,067,280 箇所検出された。

平成 29 (2017) 年度には、前年度にデータが得られなかった系統と新たに追加した系統について、ゲノム配列を解読した。系統数は前年度と合わせて 50 となり、合わせて 135 Gb のデータを蓄積した。一塩基多型 (SNP) を検出した結果、429,361 箇所検出された。各系統の系統関係を明らかにするため、多型情報に基づいて、近接結合法 (neighbor-joining method) による分子系統解析を行った (図 1)。

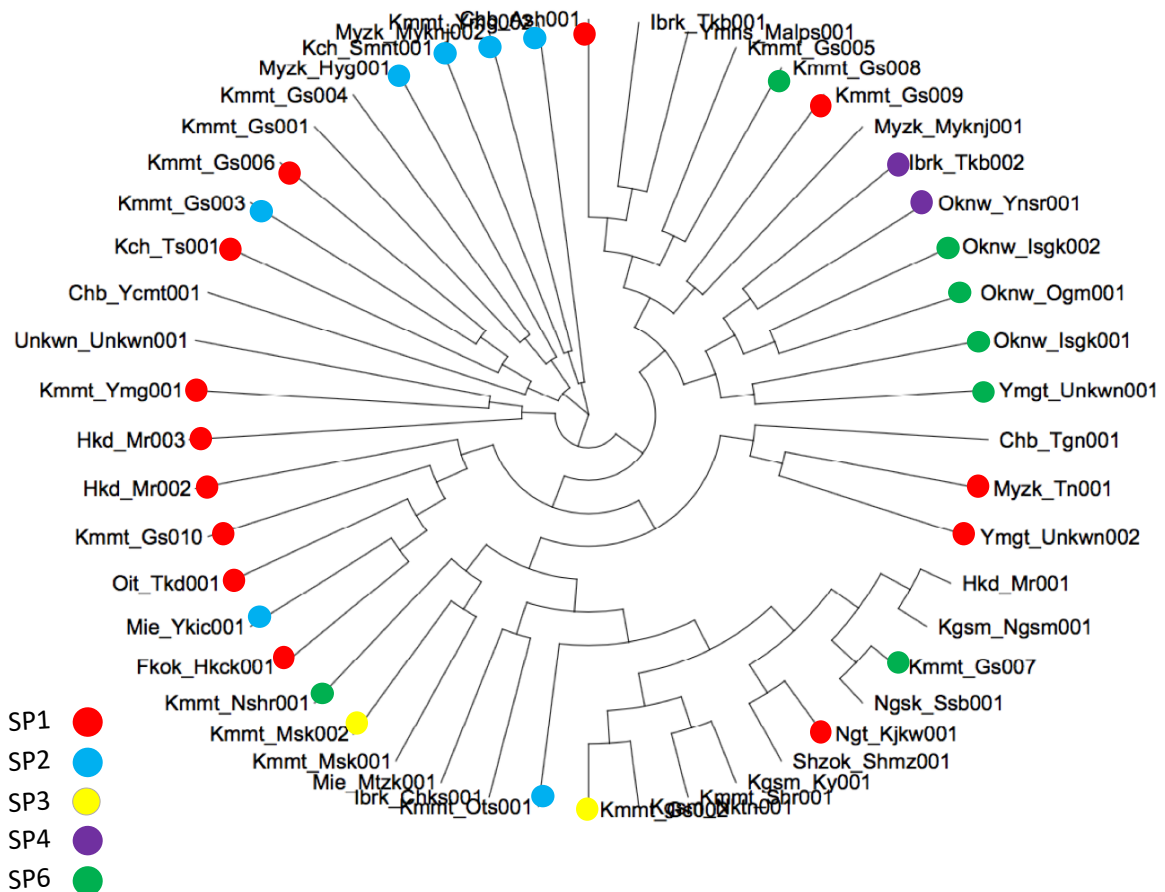


図 1 サツマイモネコブセンチュウ 50 系統の分子系統樹

## 2. サツマイモ品種に対する感染性評価

1 の遺伝子解析に供試されたサツマイモネコブセンチュウ 39 系統のうち、これまでに 35 系統のレース検定を行った。サツマイモ 5 品種を栽培し、1 系統線虫につき各品種 3 反復で簡易接種検定を行った結果、SP1 が 15 系統、SP2 が 10 系統、SP3 が 3 系統、SP4 が 4 系統、SP6 が 6 系統、判定不能が 4 系統であった。今後未検定の 7 系統線虫および判定不能系統の再試験を行う予定である。

表 遺伝子解析に供試されたサツマイモネコブセンチュウ 39 系統の SP レース判定結果

判定されたレース	サツマイモネコブセンチュウ系統	系統数
SP1	西合志、R18 号、R 新潟、土佐①CM、R 山田、Tmi2P、R 大分、R25 桃×26、R 福岡、R 飯田、R 鉢呂、15D ムラ、R 都農、山鹿 4V、山鹿 4	15
SP2	都城、Mg2、R 日向、吾平、R 三 5 四、山鹿 2V、15DN2-2、15 号 on CM、四市 CM、大津 3-3N2	10
SP3	益城、15D139-1、15D タネ 7-1	3
SP4	SP4 鹿中⑤、SP4 沖与②、SP2 宮新③、1.7kb	4
SP6	TmiR-1、1.5kb、15D139-2、15B139-1、15E139-1、沖石 2	6
判定不能	R 山梨	1
		39

### 3. GWAS 解析

まず、より計算時間の短い一般化線形モデル (GLM) による全ゲノムアソシエーション解析 (GWAS) を行った。遺伝子型データとして 50 系統の多型データ、形質データとしてサツマイモ 5 品種に対する感染性の有無を用いた。その結果は、有意な  $p$  値を示す SNP が多数 (1000 前後) 得られたものの、GWAS の精度の低さが  $p$  値の Q-Q プロットで示唆されるものだった。

次に、集団構造の影響を考慮した。ADMIXTURE (D.H. Alexander et al. 2009) により推定された  $K$  値 (祖先集団数) をプロットした結果を図 2 に示す。この結果から、最適  $K$  値が 1 であることが示された。

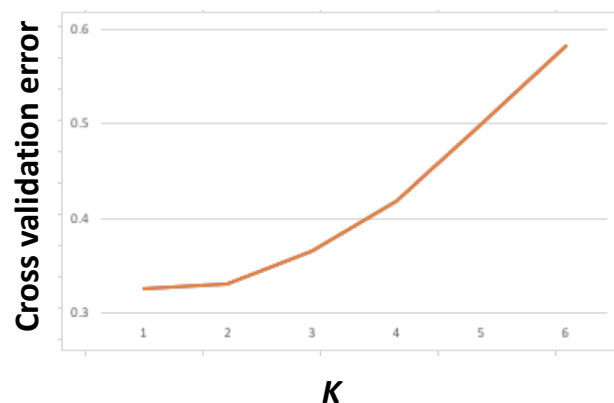


図 2 ADMIXTURE により推定された  $K$  値

得られた最適  $K$  値を用いて、混合線形モデル (MLM) による GWAS を試みた。GWAS の精度は前述の GLM に比べて大きく改善したものの、有意な  $p$  値を示す SNP が得られないという結果であった。

現在原因を検討中であるが、系統の感染形質データが揃っていないことが原因の一つではないかと考えており、引き続き形質データの取得を進める予定である。

### 4. InDel 解析

感染表現型と関連するゲノム領域を特定するため、図 1 で示した系統分類の結果から、近縁にあって感染形質が異なるペア (SP1 と SP2) 系統を選び、ゲノムの挿入欠失 (InDel) 部位を同定した (図 3)。

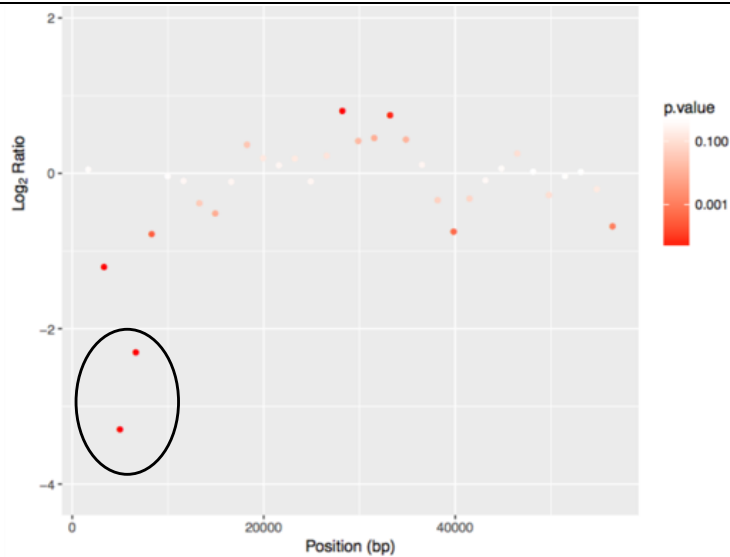


図3 あるコンティグで検出されたSP2系統ゲノムの欠失部位 (黒丸部分)

検出された InDel の中には、SP レースで保存されているものもあり (図4)、今後機能との関連を解析していく計画である。

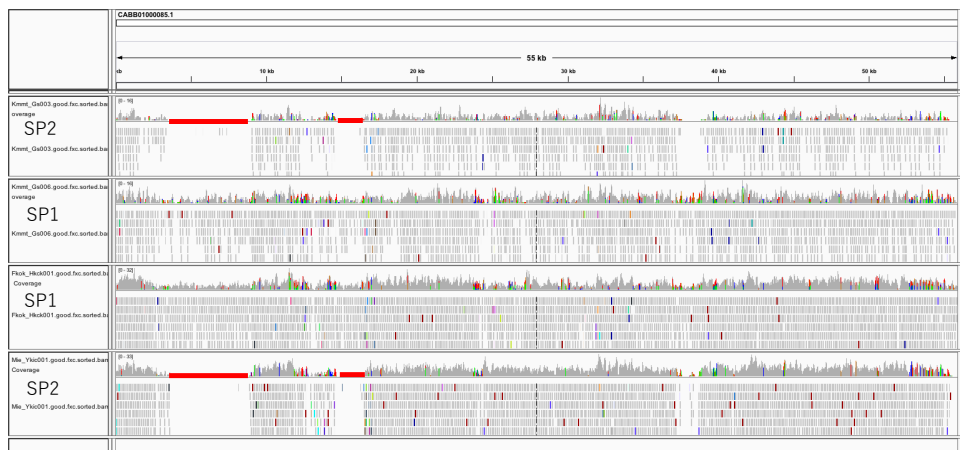


図4 SP レースで保存されている InDel (赤線部分)

<まとめ>

- サツマイモネコブセンチュウ 50 系統のゲノムを解読した。これは世界に例のない数である。
- 分子系統解析の結果、SP レースによって分かれる傾向があることが示された (図1)。遺伝子型と表現型が関連することが示唆された。
- InDel 解析の結果、感染形質と関連する可能性のあるゲノム領域が検出された。

以上の結果から、圃場における線虫レース判別に使用可能な DNA マーカーの開発といった応用面および、線虫遺伝子の感染形質に関する機能解析といった基礎研究面への展開を進めていきたいと考えている。

### 3. 収支報告

( 非公開 )

### 4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

#### <学会発表>

E. Asamizu<sup>1</sup>, K. Shirasawa<sup>2</sup>, H. Hirakawa<sup>2</sup>, H. Iwahori<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Ryukoku University, <sup>2</sup>Kazusa DNA Research Institute) Genotype and phenotype analysis of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) isolates, 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, H30 年 3 月 28 日～30 日

○浅水恵理香<sup>1</sup>, 白澤健太<sup>2</sup>, 平川英樹<sup>2</sup>, 岩堀英晶<sup>1</sup>(<sup>1</sup>龍谷大・農, <sup>2</sup>かずさDNA研) サツマイモネコブセンチュウ系統のゲノム多型解析, 植物微生物研究会第 27 回研究交流会, 京都大, H29年9月20日～22日

Asamizu E. Genotyping of *Meloidogyne incognita* isolates in Japan. *International workshop on Plant Parasitic Nematode in Kumamoto*, July 30th – August 1st (2017) 招待講演

○浅水恵理香・岩堀英晶(龍谷大農) ミヤコグサ野生系統に対するサツマイモネコブセンチュウ系統の感染表現型の普遍性調査, 2016 年度日本線虫学会大会(第 24 回大会), 東京農工大, H28 年 9 月 14 日～16 日

#### <学外資金獲得状況>

浅水恵理香, H30~32年度, 科学研究費補助金(基盤研究(C)), 分担, 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, 510,000円(H30)

浅水恵理香, H29~31 年度, 科学研究費補助金(基盤研究(C)), 代表, サツマイモネコブセンチュウ系統のエフェクター多型比較, 3,600,000 円

岩堀英晶, H26~30 年度, 農林水産省委託プロジェクト: PGRasia, 共同研究者, ナス遺伝資源の線虫抵抗性素材検定, 1,071,000 円(H28)

岩堀英晶, H27~31 年度, 農林水産省委託プロジェクト: 有害動植物の検出・同定技術の開発, 共同研究者, 遺伝子情報に基づく国内未発生有害線虫類の検出・同定技術とそのためのデータベースの開発, 6,119,000 円(H28)