

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780056

研究課題名（和文） モデルトマト・マイクロトムを使ったネコブセンチュウ感染機構の研究

研究課題名（英文） Study of the root-knot nematode infection mechanism using a model tomato, Micro-Tom

研究代表者

浅水 恵理香（ASAMIZU ERIKA）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00370924

研究成果の概要（和文）：

植物寄生性ネコブセンチュウ感染に対する宿主植物の応答機構を解明するため、本研究ではトマト矮性モデル系統マイクロトムのエチレン非感受性変異系統と共生関連遺伝子発現抑制系統を用いてネコブセンチュウ感染試験を行い、感染に与える影響を調べた。その結果、植物のエチレン感受性がより低いほど、ネコブセンチュウの卵塊形成に対する抑制効果が高いことが分かった。また、共生関連遺伝子発現抑制系統では、ネコブセンチュウ感染が減少することが示された。

研究成果の概要（英文）：

To analyze the host plant response mechanism related to the parasitic root-knot nematode infection, we performed the infection assay using ethylene-insensitive mutant lines and knockdown lines of symbiosis genes, of a dwarf model tomato cv. Micro-Tom. The result indicated that the egg mass formation was suppressed in the ethylene-insensitive lines with the suppression level positively linked to the degree of insensitivity. It was also shown that the root-knot nematode infection was suppressed in the knockdown lines of symbiosis genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養学・土壌学

キーワード：土壌生物、ネコブセンチュウ、菌根菌共生、園芸作物

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる植物の根に寄生するネコブセンチュウは、世界的に農作物に甚大な被害を与えているにも関わらず、感染成立に至るプロセスの中で、とくに宿主植物との相互作用については不明な点が多い。トマト栽培種では、野生種から導入

された極めて限られた抵抗性遺伝子 (*Mi*) が知られているが、国内で既に打破センチュウ系統が出現するなど、問題となっている。本研究では、将来的に新たな抵抗性因子を獲得することを目指して、トマトをモデルとして感染に至る相互作用機構を理解するための解析

を行った。

## 2. 研究の目的

- (1) 植物のエチレン感受性の違いがネコブセンチュウ感染率に与える影響について調べる。
- (2) 植物の共生シグナル伝達経路とネコブセンチュウ感染の関連について調べる。

## 3. 研究の方法

- (1) エチレンとの関連について

### ①材料

トマト矮性モデル系統マイクロトムの大規模 EMS 変異誘発系統の中から単離した、エチレン受容体 *ETR1* の変異系統および、キタネコブセンチュウ (*Meloidogyne hapla* strain VW9)。

### ②方法

エチレン非感受性レベルに差がある二種類の *ETR1* 変異アレルを解析対象とした。ポット栽培した *ETR1* 変異系統と野生型マイクロトムに対して、キタネコブセンチュウを感染させ、60 日後に根を染色して卵塊形成数をカウントした。

- (2) 共生シグナル伝達経路との関連について

### ①材料

マイクロトム共生関連遺伝子 *RNAi* 発現抑制系統および、キタネコブセンチュウ。

### ②方法

共生関連遺伝子 *SYMRK*, *CASTOR*, *POLLUX*, *CCaMK* を解析対象とし、ステイブルあるいは毛状根 *RNAi* 系統を作出した。培地上に無菌的に生育させた根に対して、滅菌処理したキタネコブセンチュウを感染させ、4 週間後に根を染色して瘤 (ゴール) 形成数をカウントした。

## 4. 研究成果

- (1) マイクロトムエチレン受容体変異系統の単離と、ネコブセンチュウ感染試験

① マイクロトム EMS 変異誘発系統集団から、エチレン受容体 (*ETR1*) の膜貫通ドメインの異なる部位に点変異をもつ系統 (*Sletr1-1* と *Sletr1-2*) が単離された。これらの変異系統は、異なるレベルのエチレン感受性を示し、*Sletr1-1* はより強い非感受性を呈した。

② 野生型マイクロトム、*Sletr1-1* および *Sletr1-2* をポットで 3 週間育成後、植物体あたり約 200 頭のキタネコブセンチュウ J2 幼虫を感染させた。60 日後に感染状態の評価を行った。評価は、植物

体の根における瘤 (ゴール) の数、卵塊数および染色によるネコブセンチュウの発段階の確認により行った。その結果、ゴール数は野生型で 6.5 個 (n=4, SE=1.3)、エチレン受容体変異体では、*Sletr1-1* で 3.3 個 (n=4, SE=0.63)、*Sletr1-2* で 3.5 個 (n=6, SE=0.62) であった (図 1)。卵塊数は、野生型で 9 個 (SE=1.1)、エチレン受容体変異体では、*Sletr1-1* で 0.75 個 (SE=0.5)、*Sletr1-2* で 4.2 個 (SE=0.8) であった (図 2)。実体顕微鏡を用いて感染根におけるネコブセンチュウの形態を観察した結果、野生型では脱皮した雌成虫が確認できたが、変異体では雌成虫は確認できないか、極めて少数であった。

③以上の結果から、エチレン感受性の減少は、ネコブセンチュウ卵塊形成に対して強い抑制効果をもつことが示された。更に、ネコブセンチュウの卵塊形成が野生型よりも *Sletr1-2* が少なく、*Sletr1-2* よりも *Sletr1-1* が更に少ないことが示されたが、これはエチレン感受性のレベルと一致している。すなわち、エチレン感受性がより低いほど、ネコブセンチュウの卵塊形成に対する抑制効果が高いことが分かった。

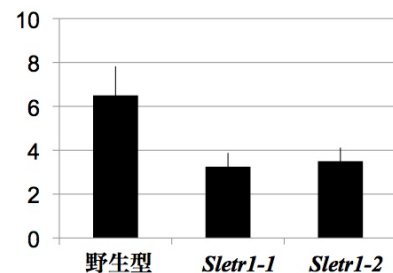


図 1. 植物体あたりのゴール形成数

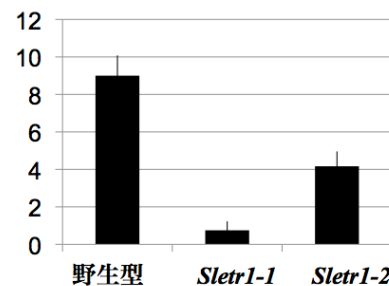


図 2. 植物体あたりの卵塊形成数

- (2) 共生関連遺伝子発現抑制トマト系統を用いたネコブセンチュウ感染試験

① トマト共生関連遺伝子 *S1SYMRK*,

*SICASTOR*, *SIPOLLUX*, *SICCaMK* をトマトゲノムデータベース Sol Genomics Network (SGN) を用いて同定した。それぞれの遺伝子はシングルコピーでトマトゲノム中に存在したことから、*RNAi* 法による発現抑制が有効であると考え、植物形質転換用ベクターを構築した。*SISYMRK* についてはステイブル形質転換を行い、複数のマイクロトム発現抑制システムを作出した。これ以外の3種類の遺伝子については、毛状根形質転換系を用いて *RNAi* 根を作出した。

② 発現抑制の割合が高かった *SISYMRK-RNAi* システムを用いて、感染4週間後のゴール形成数を野生型と比較した。感染実験は独立して3回以上行った。根あたりのゴール形成数は野生型で  $3.4 \pm 0.7$  個であったのに対して、*RNAi* システムでは  $1.3 \pm 0.5$  個と有意に減少していた。ゴール内でのネコブセンチュウの発達段階を観察したところ、野生型ゴール内では雌成虫が確認できたが、*RNAi* システムゴール内では雌成虫は存在せず、発達が途中で止まっている様子が見られた。更に、共生シグナル伝達経路の他の遺伝子の関連について、毛状根形質転換法を用いて調べた。マイクロトム *CASTOR*-, *POLLUX-RNAi* 毛状根では、ベクターコントロールと比較して感染4週間後のゴール形成数がそれぞれ72%、43%減少していた。

③以上の結果から、共生関連遺伝子発現抑制システムでは、ネコブセンチュウ感染が減少することが示された。また、雌成虫が *RNAi* システムでは見られなかったことから、ネコブセンチュウの正常な発達が抑制される可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Brès C, Rothan C, Mizoguchi T, Ezura H. Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1994-2005. (2011)  
<http://hdl.handle.net/2241/114770>

[学会発表] (計7件)

① Narumi Souda, Shuhei Hayashi, Yoshihiro Okabe, Hiroshi Ezura,

Masayoshi Kawaguchi, Derek Goto, Erika Asamizu

Potential involvement of common signaling pathway in the root-knot nematode infection process.

第53回日本植物生理学会年会

平成24年3月16日、京都産業大学

② Shuhei Hayashi, Yosuke Maruyama, Tatsuhiro Ezawa, Mitsuru Osaki, Masayoshi Kawaguchi, Junji Yamaguchi, Erika Asamizu, Derek B. Goto

Host infection by the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* depends on parasitic utilisation of a common plant signaling pathway.

8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Joint Conference

平成23年11月29日、神戸コンベンションセンター

③ Yoshihiro Okabe, Narumi Souda, Hiroshi Ezura, Erika Asamizu

Ethylene signaling pathway in interaction between sedentary nematode and tomato.

8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Joint Conference

平成23年11月29日、神戸コンベンションセンター

④ 林周平、江沢辰広、大崎満、浅水恵理香、川口正代司、後藤デレック

Mutant analysis suggests root-knot nematode requires part of the symbiotic pathway for parasitic infection.

第21回植物微生物研究会交流会

平成23年9月21日、岡山大学

⑤ 岡部佳弘、江面浩、GOTO Derek、浅水恵理香

矮性モデルトマト・マイクロトムのEMS変異誘発システムを用いたネコブセンチュウ感染性の解析

第21回植物微生物研究会交流会

平成23年9月21日、岡山大学

⑥ 浅水恵理香、岡部佳弘、江面浩、Arshana Noorul Amin, Derek Goto

Potential role of regulatory genes in the root-knot nematode infection process.

第52回日本植物生理学会年会

平成23年3月20日、東北大学

⑦浅水恵理香、岡部佳弘、江面浩、奥村新、江沢辰広、Derek Goto

Potential role of regulatory genes in the root-knot nematode infection process.

日本ナス科・ウリ科ゲノム合同国際シンポジウム

平成 23 年 3 月 5 日，岡山大学

〔産業財産権〕

○ 出願状況（計 1 件）

名称：植物のネコブセンチュウ抵抗性の増加方法

発明者：浅水恵理香，岡部佳弘

権利者：国立大学法人筑波大学

種類：特許

番号：特願 2011-191888

出願年月日：平成 23 年 9 月 2 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅水 恵理香 (ASAMIZU ERIKA)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00370924