

ダイズシスト線虫応答性遺伝子を利用した シスト線虫抵抗性ダイズ育種の試み

岡崎 伸*

東京農工大学大学院農学研究院国際環境農学専攻

Basic Study of Soybean Cyst Nematode Control by Enhanced Expression of Soybean Genes

Shin OKAZAKI*

Department of International Environmental and Agricultural Science, Graduate School of
Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu 183-8509

ABSTRACT

The soybean cyst nematode (SCN) is a devastating pathogen that causes approximately 10% production loss and reduces seed yield more than any other soybean pathogen. Reports have shown that it causes as much as 1.5 billion dollars in agronomic losses every year world-wide. In Japan, SCN causes serious damage, especially in Hokkaido and Tohoku. Major approaches to suppress SCN involve crop rotation and green manure cultivation; however, the effectiveness of both approaches is quite limited. In this study, we explored a novel approach to controlling SCN infection using a molecular genetic approach. Soybean genes responsible for SCN resistance were selected by comparative expression analysis of soybean roots grown in SCN-containing and non-containing soils. Disease-resistance protein KR3, SAR regulator protein NIMIN-1 and Polygalacturonase-inhibiting protein were highly expressed in SCN-containing soil and their respective genes were selected as candidates for SCN resistance. Transgenic soybean roots expressing the candidate SCN resistance genes were constructed using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. Inoculation tests revealed that the transgenic soybean roots expressing Disease resistance-protein KR3 have lower levels of SCN infection relative to wild-type soybean roots. Furthermore, plant fresh weights of the KR3-expressing soybeans were increased in comparison to the wild-type soybeans when grown in SNC-containing soil. These results indicate the potential ability of Disease-resistance protein KR3 for breeding SCN-resistant soybeans. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 173-176, 2013.

*〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

ダイズシスト線虫 (soybean cyst nematode) は、大豆生産の上で最も甚大な被害をもたらす有害線虫である。ダイズシスト線虫に感染したダイズは、茎葉が黄化して生育不良となり、収量が劇減する。ダイズ生産量の約7-10%がダイズシスト線虫により失われているとされており、その被害額は世界中で11-15億ドルにもなるとの報告がある¹⁾。日本においてもダイズシスト線虫は全国に分布し、特に北海道や東北等寒冷地に広く発生し、ダイズ、アズキなどに重大な被害をもたらしている。

ダイズシスト線虫への主な対策として、輪作や緑肥の利用が行われている。輪作ではマメ類以外の作物の栽培により、徐々に線虫の密度を低下させることが可能であるが、ダイズシスト線虫はシストと呼ばれる細胞を形成して10年間近くも生存し、マメ類の栽培で一気に密度が回復してしまう。また、緑肥の利用では、ネグサレ線虫など別の有害線虫密度を高めてしまうことが知られており、ダイズシスト線虫に対する有効な対策は未だ見つかっていない。

本研究では、以上のような古典的な対策とは異なる手段として、分子遺伝学的知見を利用したダイズシスト線虫防除方法を検討した。具体的には、ダイズシスト線虫の感染時に働くダイズの遺伝子を選抜し、人工的にダイズ根に過剰発現させ、シスト線虫の感染頻度と生育を調査した。今後、本研究で感染防止効果がみられた遺伝子について、大豆栽培品種の中での発現量を調査し、ダイズシスト線虫抵抗性との相関を調査することで、シスト線虫に強いダイズの育種に貢献できると考えている。

方 法

Real-time RT-PCRによるダイズ根遺伝子の発現解析

ダイズは (*Glycine max*) Enrei野生型系統を用いた。栽培2週間経過後のダイズ根を回収し、土壌を除いた後、液体窒素で速やかに凍結した。凍結根をホモジナイザーで粉碎後、約100 mgの粉碎試料からQiagen社 (Qiagen, Hilden, Germany) のRNeasy plant mini-kitを使用してRNAを抽出した。抽出したRNAは、Super script III Reverse Transcriptase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) を使ってcDNAを合成し、KAPA SYBR Fast qPCR mixによってReal-time PCRを行った。

ダイズ形質転換根の誘導

ダイズ遺伝子を常法²⁾によりプラスミドpCAMBIA1300にクローニングし、これを用いて *Agrobacterium rhizogenes* を形質転換した³⁾。ポットで1週間ほど生育させたダイズの下胚軸に注射針を貫通させて、傷口に形質転換 *Agrobacterium* の懸濁液を接種し、滅菌パーミキュライトを追加し、ダイズ水耕液を与えた後、乾燥を防ぐため鉢表面をラップでしっかり覆い、10日から2週間栽培をつづけた。プラスミドpCAMBIA1300に由来するGFP蛍光を指標に形質転換根を確認し、非形質転換根を除去したのち、シスト線虫汚染/非汚染土壌に移して栽培した。

ダイズシスト線虫感染観察

Bybdらの方法⁴⁾に従い、ダイズ根中のダイズシスト線虫を染色した。ダイズシスト線虫汚染土壌と非汚染土壌で60日間栽培したダイズの根を採取し、流水で洗浄したのち、1%次亜塩素酸に4分間浸して脱色した。次亜塩素酸を流水で除去した後、0.35%酸性フクシン溶液に浸漬し、30秒間沸騰させた。室温まで冷却した後に流水で酸性フクシン溶液を除去し、酸性グリセリン中で脱色した。この染色により、線虫は赤色に染色される。顕微鏡下で観察を行い、ダイズシスト線虫個体数を計数した。

結果と考察

(1) ダイズシスト線虫感染抑制に関わる遺伝子候補の選抜

Mazareiraらは、ダイズシスト線虫抵抗性品種と感受性品種の遺伝子発現をマイクロアレイ解析により比較し、38遺伝子の発現に差があることを報告している⁵⁾。これらの遺伝子の中にはダイズシスト線虫への抵抗性に関わる遺伝子が含まれると予想された。本研究では、38遺伝子のうちプライマーが設計可能であった25遺伝子についてダイズ根における遺伝子発現を解析した。

ダイズシスト線虫が発生している圃場 (東京都府中市の農家Aさん) から分譲いただいた土壌 (ダイズシスト線虫汚染土壌) と、ダイズシスト線虫が発生していない近隣の土壌 (非汚染土壌) を用いてダイズを栽培した。栽培2週間経過後、ダイズ根の遺伝子発現をReal-time RT-PCR法により解析した結果、Disease resistance protein KR3, SAR regulator protein NIMIN-1およびPolygalacturonase inhibiting proteinの

3遺伝子がダイズシスト線虫汚染土壌で強く発現することを確認した (Fig. 1). 他22遺伝子については統計的に有意な差は認められなかった. Mazareiらの論文ではダイズ品種TN02-226 (FowlerとAnandの交配種) を使用しており, 本研究で使用した品種Enreiとの遺伝的背景の差異により結果が異なっただと考えられる.

(2) 感染抑制候補遺伝子を強く発現するダイズ形質転換根の作製

ダイズシスト線虫汚染土壌で強く発現した3遺伝子 (Disease resistance protein KR3, SAR regulator protein NIMIN-1およびPolygalacturonase inhibiting protein) を人工的に強く発現する形質転換根を作製した. プラスミドpCAMBIA1300由来のGFP蛍光を指標に形質転換根を確認したところ, 形質転換根の割合は5-10%以下であり, ミヤコグサ等他のマメ科植物で報告されている効率に比較すると非常に低い形質転換効率であった. 形質転換に起因する根の生長阻害や形態異常などは認められなかった.

(3) 遺伝子発現ダイズのシスト線虫感染率

(2) で作製した遺伝子発現ダイズを線虫汚染土壌で60日間栽培し, ダイズシスト線虫感染頻度と生育状況を調査した. 野生型ダイズ (非遺伝子組換え体) では, 植物体当たり約73箇所 (73 ± 11) の線虫感染が観察された (Table 1). 一方, Disease resistance protein KR3を発現させたダイズでは, シスト線虫の感染頻度が約50% (31 ± 21) に低下した (個体差が大きく, 統計的な有意差は認められなかった). SAR regulator protein NIMIN-1およびPolygalacturonase inhibiting

proteinを発現させたダイズにおいては, 野生型ダイズとの間に顕著な差は認められなかった.

生育状況を調査したところ, Disease resistance protein KR3を発現させたダイズでは, 統計的な有意差は認められなかったものの, 植物体湿重量の増加が認められた. 線虫感染頻度の低下により, 生育状況が改善した可能性が考えられる. 一方, SAR regulator protein NIMIN-1およびPolygalacturonase inhibiting proteinを発現させたダイズにおいては, 野生型ダイズとの間に顕著な差は認められなかった. 以上の結果から, Disease resistance protein KR3遺伝子には, 線虫感染頻度を下げることによってダイズの生育を改善する効果がある可能性が示唆された.

本研究では, 線虫感染頻度とダイズの生育量において個体差が大きくみられたが, これは個体ごとに形質転換根の出現効率がばらついたことに起因するものと推定される. 今後は形質転換個体を作製した上で Disease resistance protein KR3遺伝子の効果を再評価する必要がある. 将来的にはダイズ栽培品種の中での KR3遺伝子の発現量とダイズシスト線虫抵抗性との関連性を調査し, KR3遺伝子を指標にした育種を行うことで, シスト線虫抵抗性品種の開発に貢献できると考えている.

Table 1. Number of soybean cyst nematodes in roots of wild-type and transgenic soybean grown in soybean cyst nematode containing soil

Expressed gene	No. of Soybean cyst nematodes/plant	n
—	73 ± 11	(n=3)
Disease resistance protein KR3	31 ± 21	(n=3)
SAR regulator protein NIMIN-1	85 ± 42	(n=3)
Poly galacturonase inhibiting protein	98 ± 39	(n=3)

Table 2. Fresh weights of wild-type and transgenic soybean grown in soybean cyst nematode containing soil

Expressed gene	Plant fresh weights (average $\pm$ standard deviation)	n
—	3.56 ± 0.85	(n=3)
Disease resistance protein KR3	5.42 ± 1.41	(n=3)
SAR regulator protein NIMIN-1	3.15 ± 1.60	(n=3)
Poly galacturonase inhibiting protein	3.98 ± 1.51	(n=3)

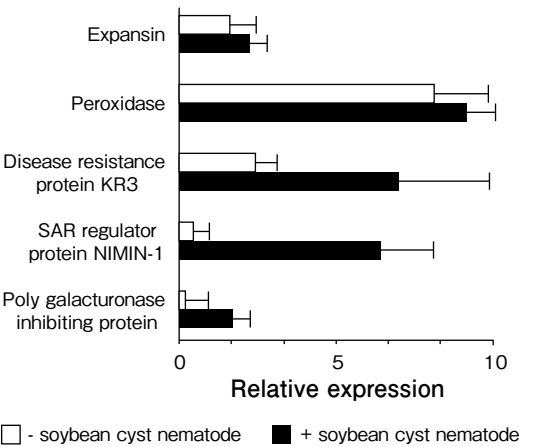


Fig. 1. Relative expression of selected genes in soybean roots grown in soybean cyst nematodes containing (■) and non-containing (□) soils.

要 約

本研究では、分子遺伝学的知見を利用したダイズシスト線虫防除方法を検討した。ダイズシスト線虫汚染土壌で特異的な発現がみられたダイズ遺伝子Disease resistance protein KR3を人工的にダイズ根に過剰発現させたところ、ダイズシスト線虫の感染頻度が低下し、生育状況が改善した。今後はKR3遺伝子を指標にした育種を行うことで、シスト線虫抵抗性ダイズ品種の開発に貢献できると考えている。

文 献

- 1) Wrather, J. Anderson TR, Arsyad DM, Tan Y, Ploper LD, Porta-Puglia A, Ram HH and Yorinori JT (2001): Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. *Canadian J Plant Pathol*, **23**, 115-121.
- 2) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): *Molecular cloning*. Vol. **2**, Cold spring harbor laboratory press, New York.
- 3) Kereszt A, Dongxue L, Indrasumunar A, Nguyen CD, Nontachaiyapoom S, Kinkema M and Gresshoff PM (2007): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols*, **2**, 948-952.
- 4) Bybd D, Kirkpatrick T and Barker K (1983): An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *J Nematol*, **15**, 142.
- 5) Mazarei M, Liu W, Al-Ahmad H, Arelli PR, Pantalone VR and Stewart CN Jr (2011): Gene expression profiling of resistant and susceptible soybean lines infected with soybean cyst nematode. *Theor Appl Genet*, **123**, 1193-1206.