

平成27年度終了 豆類振興事業助成金（試験研究）の成果概要

- 1 課題名 大納言小豆におけるインゲンマメモザイクウイルス病抵抗性 DNA マーカー開発とその利用
- 2 研究実施者
研究代表者 京都府農林水産技術センター 生物資源研究センター 応用研究部
主任研究員 小西あや子（H26～27）
静川幸明（H25）
分担 国立大学法人千葉大学 園芸学研究科 准教授 佐々英徳
- 3 実施期間 平成25年度～27年度（3年間）

4 試験研究の成果概要

（1）試験研究の目的

インゲンマメモザイクウイルス（以下 BCMV）は東北以南で栽培される小豆で発生が認められ、罹病性品種では BCMV 感染により株の生育抑制や着莢数、収量の低下を引き起こすことが確認されている。本研究では、BCMV 抵抗性系統選抜効率化による育種年限の短縮を図るため、BCMV 抵抗性遺伝子に連鎖した DNA マーカーを開発し、マーカーの有効性を実証する。また、現地圃場で発生している BCMV には病徴の異なるウイルス株が観察されることから、BCMV を分類することで BCMV 抵抗性育種の効率化を図る。

（2）実験計画、手法

①大納言小豆近交系統の BCMV 抵抗性検定及び DNA マーカーの開発（京都農技セ、千葉大）

BCMV 抵抗性品種（新京都大納言）と罹病性の遺伝資源系統（No.225）を交配して作出した自殖 F₆集団の 136 個体（系統）に BCMV を汁液接種後 DAS-ELISA 分析を行い、抵抗性または罹病性の調査を行った。同時に自殖 F₆集団から DNA を抽出し、マーカーの多型解析に供試した。

②現地ほ場で発生している BCMV 採取株についての発生分布調査（京都農技セ）

京都府内で栽培されている大納言小豆のうち BCMV の病徴が観察された株（図 1）から葉を採取した。過去に採取した BCMV 株（標準株：典型的な病徴を示す）とあわせて BCMV 罹病性の「京都大納言」と抵抗性の「新京都大納言」に病徴観察と DAS-ELISA 分析による感染の有無を確認した。



図1 京都府内で栽培されていた大納言小豆に見られる BCMV の病徴

病原性や感染性の強弱に関連があると報告されている HC-Pro 領域配列について解析を行うため、各分離株から RNA を抽出した。HC-Pro 領域を増幅するプライマーを用いて RT-PCR を行った後、シーケンサーで HC-Pro 塩基配列を確定すると共に分子系統樹を作成し、分離株の比較を行った。

③開発 DNA マーカーの育種への適用（京都農技セ）

現在育成中の大納言小豆のうち、「新京都大納言」を交配親に使用した大納言小豆選抜集団 3 系統を供試し、ほ場における BCMV 抵抗性調査と①で開発した DNA マーカー (ARNBS782k)解析を行った。

(3) 成果の概要

①大納言小豆近交系統の BCMV 抵抗性検定及び DNA マーカーの開発

<H26 年度成果> 農業生物資源研究所開発の SSR マーカー66 種について、両親系統の多型を調査したところ、両親間で多型が得られたのは 24 種であった。F₆ 近交系集団のうち 32 系統を用い、両親間で多型が得られた 24 の SSR マーカーについて多型を調査したところ、CEDG144 では 87.5%の系統で表現型と遺伝子型が一致しており、BCMV 抵抗性と連鎖していると推定された。そこで、F₆ 近交系集団 134 系統について CEDG144 の多型の調査を行ったところ、106 系統で表現型と遺伝子型が一致し、一致率は 79.1%であった。CEDG144 はアズキの第 1 連鎖群(LG1)に位置し、CEDG144 と BCMV 抵抗性遺伝子との距離は約 23cM であると考えられた。

CEDG144 より近傍のマーカーを開発するため、アズキの LG1 に座乗する SSR マーカーのプライマー配列、及び CEDG144 とその周辺の 2 マーカー(CEDG133、CEDG141)の増幅産物の配列を決定し、アズキと同じインゲンマメ連に属するインゲンマメゲノムに対して相同性検索を行った。その結果、アズキ LG1 の CEDG144 周辺と、インゲンマメ第 2 染色体(Chr2)の 42.7Mb~49.0Mb にシンテニーが認められた。この結果を基に、インゲンマメのゲノム情報を用いたマーカー開発を行い、BCMV 抵抗性遺伝子との距離が約 10cM である dCAPS マーカー(dARF2)を得た。インゲンマメ Chr2 の長さは約 49.05Mb であり、dARF2 はインゲンマメゲノム上では Chr2 の 49.0Mb とほぼ末端に存在している。しかし連鎖地図上では、BCMV 抵抗性遺伝子は dARF2 よりも更にテロメア側に約 10cM 離れた位置に座乗している。これは、インゲンマメゲノム情報が不完全であるためか、アズキ LG1 に対応する染色体ではインゲンマメ Chr2 の末端に相当する部分よりも更に先に配列が存在するためであると考えられた。

<H27 年度成果> 新たに公開されたアズキゲノム情報 (Naito et al. 2015) を用いて dARF2 の配列のアズキゲノム上の位置を調査したところ、第一連鎖群 (LG1) のテロメアから 65kbp に座乗していた。その近傍に SSR マーカー(AG652)を設計し F₆ 近交系集団で多型の調査を行ったところ、表現型と遺伝子型の一致率は 86.3%であった。

一方、インゲンマメの BCMV 抵抗性遺伝子である *I* 遺伝子をアズキ Chr1 のゲノム情報で相同性検索したところ、782kbp 近傍に相同性が認められた。*I* 遺伝子とシンテニーを持つ領域に作成した SSR マーカー(ARNBS782k)で両親間での多型が得られたため、F₆ 近交系集団で多型調査を行った結果、表現型と遺伝子型の一致率は 91.7%であった。

連鎖地図作成ソフトウェア Antmap を用いて、BCMV の表現型と dARF2、CEDG149、AG652、ARNBS782k の4つの SSR マーカーの連鎖地図を作成し、アズキゲノムと比較した。連鎖地図作成に用いた 4 種の SSR マーカーのうち BCMV 抵抗性遺伝子の最も近傍に位置するのは ARNBS782k であり、約 5cM 離れていた。アズキゲノム Chr1と連鎖地図 LG1 の全長はそれぞれ約 64Mbp と約 120cM であり地図距離と物理距離の比は 0.53Mb/cM となる。これを用いて計算すると BCMV 抵抗性遺伝子と ARNBS782k は約 2.7Mbp 離れていると考えられた(図 2)。このことと、ARNBS782k はインゲンマメゲノムの *I* 遺伝子の相同的な配列であることから、アズキの BCMV 抵抗性遺伝子はインゲンマメの *I* 遺伝子の NBS クラスタとは異なるものだと考えられた。

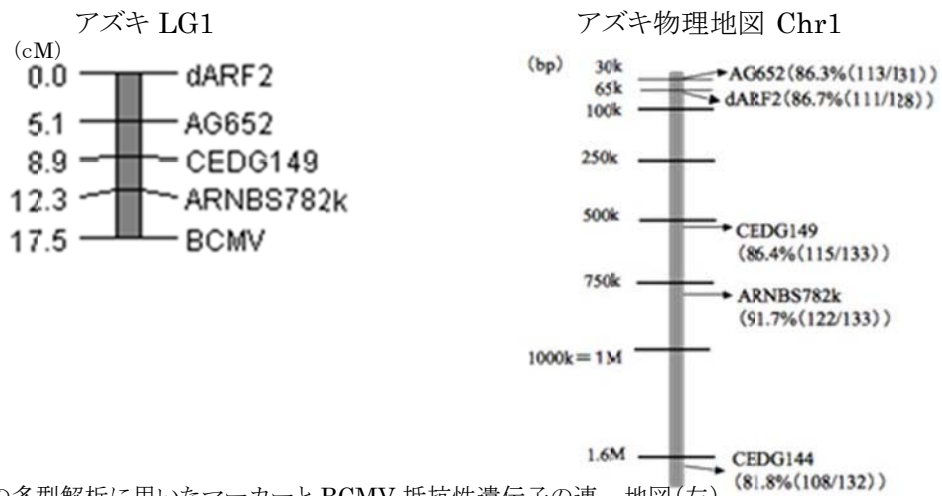


図2 アズキの多型解析に用いたマーカーと BCMV 抵抗性遺伝子の連 地図(左)
アズキゲノム情報を基に作成した物理地図(右)

*マーカー名 (BCMV 表現型と遺伝子型の一致率 (BCMV 表現型と遺伝子型が一致した系 統数 / 解析した系統数))

②現地ほ場で発生している BCMV 採取株についての発生分布調査京都府内の大納言小豆圃場から採取した BCMV 25 分離株について接種検定を行った結果、抵抗性品種として育成した「新京都大納言」にも明らかに感染する分離株が確認された。このため、「新京都大納言」に感染しないタイプ (A タイプと表記) と「新京都大納言」にも感染するタイプ (B タイプと表記) に分類した。A タイプ BCMV は、病徴として葉脈緑帯のみが観察されたが、B タイプ BCMV では、「新京都大納言」にも葉脈緑帯と葉の周縁部が巻くなどの奇形が観察された (図 3)。

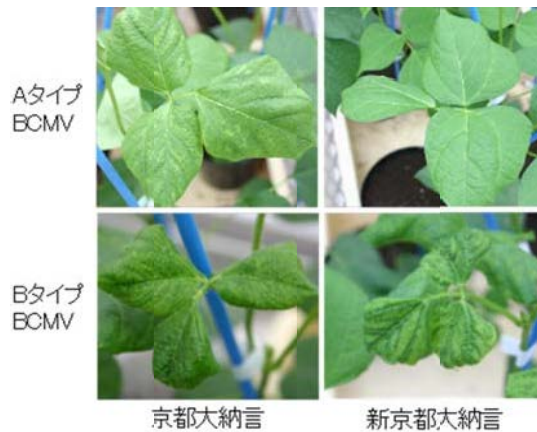


図3 京都府内大納言小豆産地で採取した BCMV を接種し、上位葉で観察された病徴

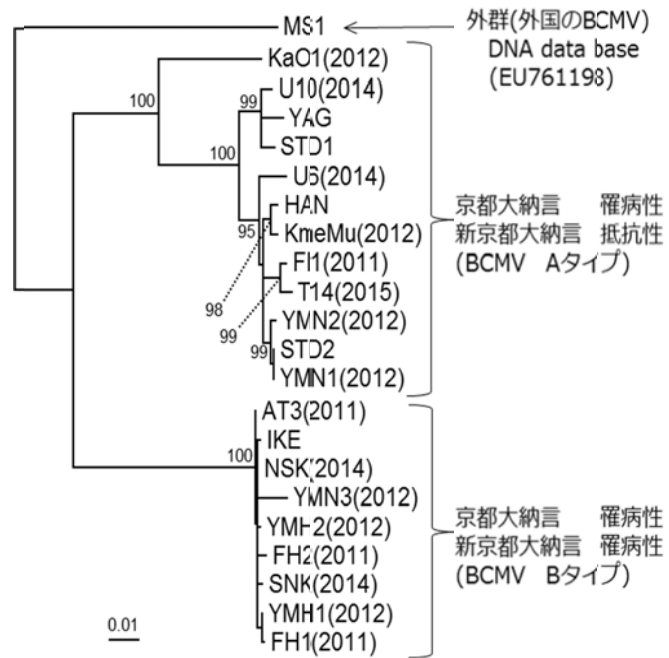
府内圃場で採取した BCMV の HC-Pro 領域塩基配列を解析した結果から、分子系統樹を作成した。いずれの BCMV 株についても、病原性評価に基づく分類と塩基配列に基づく分類の結果が一致し、A タイプまたは B タイプに分類されることを確認した (図 4)。これらの結果から、既存 2 品種を検定材料に使用することで BCMV の病原性の評価を行うことが可能と考えられた。

図 4 京都府内大納言小豆産地で採取した

BCMV の HC-Pro 領域全長塩基配列

を元に作成した分子系統樹

注) カッコ内の数字は、採取した年を示す MS1 以外でカッコがついていないものは、京都府生物資源研究センターにおける BCMV 保存株を示す。



③開発 DNA マーカーの育種への適用

ほ場での抵抗性調査では、育成系統の間に BCMV を接種した罹病性品種を配置した栽培を行い、アブラムシによる自然感染後に ELISA 分析により感染の有無を確認している。平成 27 年はアブラムシの発生が少なかったため BCMV の自然感染率が低く、罹病性品種でも感染率が 32~80%であった。育成系統の感染率も非常に低く、DNA マーカーによる遺伝子型の調査では罹病性型であるが感染していない個体が見られた（データ略）。このような条件下において、表現型で非感染個体を選抜しても確実に抵抗性個体を選抜することが困難である中、DNA マーカーを用いた選抜は有効であると考えられた。

(4) 今後の課題

ARNBS782k と BCMV 抵抗性遺伝子の距離は約 5cM であるため、より近傍に位置し、緊密に連鎖する DNA マーカーを開発することが望ましい。

B タイプ BCMV の抵抗性品種育成に向け、抵抗性遺伝子を持つ育種素材の探索が急務である。

(5) 成果の波及効果

BCMV 抵抗性 DNA マーカーを開発することで、BCMV 抵抗性に関して選抜初期段階で、遺伝子レベルによる選抜が確実にできることから、当該ウイルス病抵抗性大納言品種の育成効率化が期待される。

京都府内各地で栽培されている小豆には、病原性の異なる BCMV が発生していることが明らかとなった。BCMV の病原性と感染性の評価を行うことで、BCMV タイプ別分布が明らかとなるので、導入予定地のウイルス株による検定・選抜が可能となる。

(6) 論文、特許等

なし