

平成27年度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

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年のうち3年目）

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 抵抗性系統選抜の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」に汁液接種を行った後、病徴観察と DAS-ELISA 分析による感染の有無を確認した。

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）今年度の実施状況

①昨年度設計した dARF2 の配列の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

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1)。

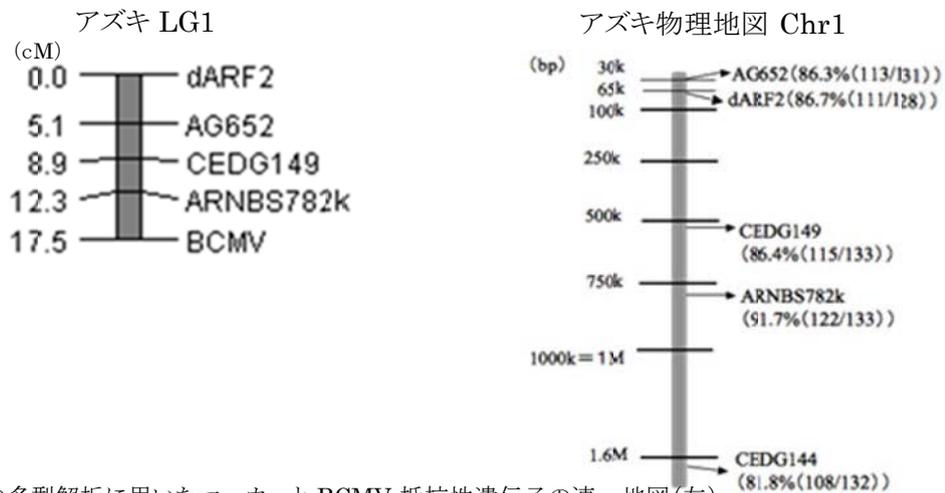


図1 アズキの多型解析に用いたマーカーと BCMV 抵抗性遺伝子の連鎖地図(左)

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))

②京都府内の大納言小豆ほ場から BCMV 感染の疑われる 177 株の葉を採取し、ELISA 分析で感染を確認したところ 9 株が陽性を示した。陽性であった 9 株を「京都大納言」と「新京大納言」に汁液接種し、病徴観察と ELISA 分析で感染の有無を確認した。その結果、いずれの BCMV 株も「新京大納言」に感染しないタイプ (A タイプ) と推察された。

本年度および昨年採取した BCMV 株について、HC-Pro 領域の塩基配列を確定した。その結果、本年度採取の 9 株は塩基配列が同一であり、以後、同一株と見なして解析を進めることとした。昨年までに分子系統樹を作成済みの BCMV 株(14 株)に、本年塩基配列を確定した 5 株を加え、新たに分子系統樹を作成した。これらの結果、昨年までの結果と同様、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「新京大納言」に感染するタイプ (B タイプ) に分類されることを確認した (データ略)。

③本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。本年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 (データ略)。

(4) 今後の課題および対応

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。