

(技術名) DNA マーカーによるニガウリうどんこ病抵抗性個体の判別							
(要約) ニガウリうどんこ病抵抗性と連鎖する DNA マーカー (PMR71、PMR80) の遺伝子型を調べることで、抵抗性個体を判別することができる。							
農業研究センター研究企画班・野菜花き班				連絡先		098-840-8513	
部会名	野菜・花き	専門	バイテク	対象	ニガウリ	分類	研究
普及対象地域							

[背景・ねらい]

ニガウリうどんこ病（以下、うどんこ病）はニガウリの重要病害の一つで、多発すると葉が枯死し、収量および品質に大きな影響を与える。県内で利用されている経済品種には同病に対して抵抗性を示すものは無く、生産現場からは抵抗性品種の育成が望まれている。農業研究センターでは、これまでに多くのニガウリ遺伝資源を収集しており、明らかなうどんこ病抵抗性を示す系統も得られている。そこで本研究では、うどんこ病抵抗性を導入した優良品種の効率的な育成を図るため、抵抗性系統 14-01 の遺伝情報を解析し、DNA マーカーを用いたうどんこ病抵抗性個体の判別技術を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. うどんこ病感受性系統 OHB61-5（母本）と抵抗性系統 14-01（父本）の F₂ 分離集団（162 個体）から抵抗性個体（61 個体、人工接種 3 週間後の病斑面積が 5 %未満）の DNA を供試し、次世代シーケンサーでゲノム解析（RAD-Seq 解析）すると、抵抗性集団に特異的な DNA 配列が得られる（データ省略）。
2. 抵抗性集団に特異的な DNA 配列とニガウリゲノム配列（Urasaki et al., 2017）を用いて塩基配列比較を行うと DNA マーカー（PMR71、PMR80）が開発できる。さらに PCR 増幅およびアガロースゲル電気泳動を行うと OHB61-5、14-01、F₁ 個体のそれぞれに特異的なバンドパターン（遺伝子型）が得られる（図 1）。
3. F₂ 分離集団（162 個体）を用いて PMR71、PMR80 の遺伝子型およびうどんこ病抵抗性の調査を行うと、両 DNA マーカーの遺伝子型とうどんこ病抵抗性間には有意な関連があり（ $\chi^2(2)=8.096, 7.146, p<0.05$ ）、また遺伝子型が抵抗性ホモを示す個体（B1 および B2）は、80%以上が病斑面積割合 10%未満の抵抗性個体である（表 1）。以上から、PMR71 および PMR80 はうどんこ病抵抗性と連鎖している。
4. PMR71 および PMR80 を用いて 14-01 を遺伝的背景にもつ F₂ 分離集団（95-32-112-68×OAC09-04C、323 個体）の抵抗性評価を行うと、遺伝子型 B1 と B2 を同時に保持する個体（B1B2、23 個体）は、うどんこ病抵抗性評価が極強（ 1.1 ± 0.3 ）の抵抗性を示す（表 2）。

[成果の活用面・留意点]

1. PMR71 と PMR80 を用いてうどんこ病抵抗性個体のみを選抜することで、ニガウリの効率的な育種に活用できる。また、両マーカーを組み合わせることでうどんこ病抵抗性をより強く示す個体の選抜に活用できる。
2. 病原菌のレース分化などによる抵抗性系統の罹病化に対応するためには、新たな抵抗性素材の探索とともに DNA マーカーを活用して複数の抵抗性遺伝子を集積しながら選抜する必要がある。
3. 本結果は抵抗性系統 14-01 由来のうどんこ病抵抗性をもつニガウリ系統にのみ適用される点に留意する。

[具体的データ]

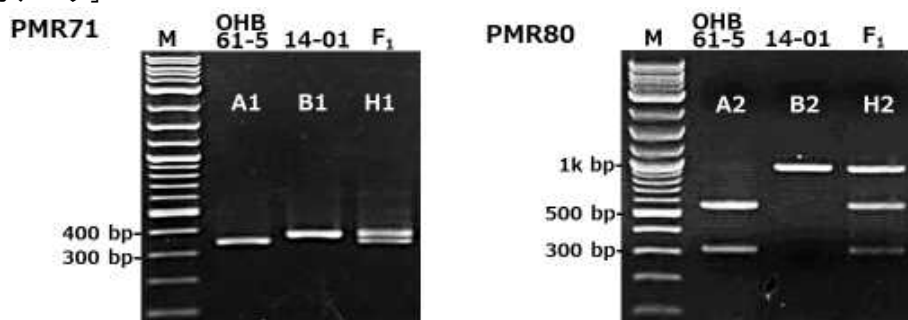


図1 DNA マーカーPMR71 と PMR80 のアガロースゲル電気泳動の結果

A1(349bp)、A2(577bp と 321bp)は OHB61-5、B1(379bp)、B2(898bp)は 14-01、そして H1 と H2 は F₁ 個体に特異的なバンドパターン（遺伝子型）を示す。M は 1 kb Plus DNA Ladder を示す。PMR71 はプライマー W71F5 (CGGAATAACTATGGCGAGTC)、W71R5 (GGTCAGTATCTTCTTCCCTC)を用いて PCR 法により増幅した。PMR80 は W80F1 (TATTGCCAAGCAGCAGCAAG)、W80R2 (CACCAGATGCTAATCAGGGA)を用いて増幅後、制限酵素 TspRI を用いて処理した。PCR 条件は、両マーカーともに 94℃（5 分）、94℃（10 秒）55℃（10 秒）68℃（60 秒）35 サイクル、68℃（5 分）で実施した。

表1 F₂ 分離集団(OHB61-5×14-01)の遺伝子型別のうどんこ病病斑面積割合の個体分布

DNA マーカー	遺伝子型 ¹⁾	病斑面積割合（%） ²⁾					合計	抵抗性個体の割合 ³⁾ （%）
		～5	～10	～15	～20	～65		
PMR71	A1	10	8	9	3	6	36	50
	H1	32	28	13	8	11	92	65
	B1	19	9	1	2	3	34	82
PMR80	A2	12	13	7	4	6	42	60
	H2	32	18	14	7	12	83	60
	B2	17	14	2	2	2	37	84

1) 遺伝子型は幼苗期の葉から DNA を抽出し、PCR 増幅およびアガロースゲル電気泳動により決定した。

2) 本葉 1 葉期に人工接種を実施し 3 週間後に本葉 1 ～ 4 葉を採取し葉面積画像解析システム WinDIAS3 を用いて植物体あたりの病斑面積割合を調査した（2017 年）。

3) うどんこ病の病斑面積割合が 10%未満の個体を抵抗性個体とした。

表2 F₂ 分離集団(95-32-112-68×OAC09-04C¹⁾、323 個体)での PMR71 と PMR80 の遺伝子型の組合せによる抵抗性評価

1)95-32-112-68 は抵抗性系統（遺伝子型：B1B2）、OAC09-04C は感受性系統（遺伝子型：A1A2）である。

2) 幼苗期に人工接種し、3 週間後に 5 段階評価（1 極強：無発病、2 強：病斑面積率 5%以下、3 中：病斑面積率 6～25%、4 弱：病斑面積率 26～50%、5 極弱：病斑面積率 51%以上）で抵抗性を達観評価した（2020 年）。異符号間は Tukey-Kramer 法の多重比較検定による有意差を示す（p<0.01）。

組合せ	個体数	抵抗性評価 ²⁾
A1A2	28	3.9±1.3 ^a
A1H2	43	2.6±0.9 ^b
A1B2	13	2.4±0.8 ^b
H1A2	28	2.8±1.1 ^b
H1B2	37	2.2±0.7 ^b
H1H2	94	2.2±0.7 ^b
B1A2	18	2.1±0.7 ^b
B1H2	39	2.1±0.6 ^b
B1B2	23	1.1±0.3 ^c

[その他]

課題 I D : 2012 農 012、2018 農 001、2022 農 001

研究課題名：DNA マーカー育種システムの開発、野菜類の DNA マーカー等開発、DNA マーカーを用いた野菜類のスマート育種

予算区分：沖縄振興特別推進交付金（次世代沖縄ブランド作物特産化推進事業、先端技術を結集した園芸品目競争力強化事業、労働力不足と環境負荷軽減に対する沖縄型園芸農業技術開発事業）

研究期間（事業全体の期間）：2012～2017 年度、2018～2021 年度、2022 年度（2022～2026 年度）

研究担当者：友寄敬太、浦崎直也、太郎良和彦、伊礼彩夏、谷合直樹、儀間康造

発表論文等：なし