

アールスメロンのかん病抵抗性遺伝子(Fom1)と連鎖するPCRマーカーの開発

誌名	愛知県農業総合試験場研究報告 = Research bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center
ISSN	03887995
著者名	遠山, 孝通 神戸, 三智雄
発行元	愛知県農業総合試験場
巻/号	34号
掲載ページ	p. 49-53
発行年月	2002年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



アールス系温室メロンのつる割病抵抗性遺伝子 (*Fom1*) と 連鎖するPCRマーカの開発

遠山孝通*・神戸三智雄**

摘要 : アールス系温室メロンのつる割病抵抗性遺伝子 (*Fom1*) と連鎖するPCRマーカ-D1を開発した。

D1マーカは、「NAT-2」の抵抗性遺伝子と連鎖し、PCRによって約350 bp のDNA断片を増幅する。罹病性系統「O-3」と「NAT-2」を交配して得た65個体の抵抗性分離F₂集団では、つる割病抵抗性の生物検定結果とD1マーカによる評価結果が97%一致した。

キーワード : 温室メロン、つる割病抵抗性、*Fom1*、PCRマーカ、品種育成

Development of PCR-based Marker Which Linked to the *Fom1* fusarium wilt resistance gene in Melon (*Cucumis melo* L.)

TOUYAMA Takamichi and KANBE Michio

Abstract : The PCR marker D1 which linked to the *Fom1* fusarium wilt resistance gene in melon was developed.

The D1 marker amplifies the DNA fragment of about 350bp which linked to the resistance gene from resistant line "NAT-2" by the PCR. The result of the D1 marker analysis corresponded to the result of test for fusarium wilt resistance which could 97% by the F₂ resistance segregating population of 65 which arranged a sensitive line "O-3" and "NAT-2" crossing.

Key Words : Melon(*Cucumis melo* L.), Fusarium wilt resistance , *Fom1*, PCR Marker, Breeding

緒言

当県の温室メロン栽培の歴史は長く、連作によりつる割病等の土壌病害が発生するため、蒸気や薬剤による土壌消毒、隔離ベットの導入、抵抗性台木の利用などの対策が行われてきた。近年では、つる割病に抵抗性を持ったF₁品種が数多く育成されており、アールス系温室メロンの育成において、つる割病抵抗性は必須の形質である。

抵抗性品種の育成過程では、つる割病の抵抗性検定は幼植物を移植した土壌につる割病菌を接種し、発病を調査する方法で行われてきた。この方法では検定に要する期間が40日程度であるが、DNAマーカーを利用した場合には検定期間は2日程度となる。また、DNAマーカーによる検定では、一度のDNA抽出と形質に応じたプライマーを用いることによって複数の形質を同じ実験操作で判定できる。

当県で育種に利用されているつる割病抵抗性遺伝子は *Fom1* であるが、*Fom1* と密接に連鎖するDNAマーカーの報告はない。したがって、*Fom1* を判定できるDNAマーカーを開発することとした。なお、つる割病の抵抗性遺伝子には、*Fom1* と *Fom2* の2種が知られている⁷⁾。*Fom2* については、X. Y. Zhengらによりマーカーによる検定結果が90%の確率でつる割病検定結果と一致するCAPSマーカーが開発され報告されている¹¹⁾。本報告は、つる割病抵抗性遺伝子 *Fom1* を判定できる実用的なDNAマーカー開発の最初の報告である。

材料及び方法

1 供試材料

アールス系温室メロンF₁品種「アイソフィ」を解析材料に用いた。「アイソフィ」の母親系統は「0-3」、父親系統は「NAT-2」であり、つる割病抵抗性は父親系統の「NAT-2」に由来する。「アイソフィ」を自殖して得られたF₂世代の65個体を、1997年3月13日に温室に定植し、当場の慣行方法に従って栽培し、自花受粉による自殖を行って得た果実から個体ごとに採種を行い、各々のF₂個体に由来するF₃系統を得た。

DNA抽出用の葉はF₂個体からサンプリングし、つる割病抵抗性検定には各々の個体の後代に当たるF₃系統を用いた。比較材料として、F₁品種「アイソフィ」と、その母親系統の「0-3」、父親系統の「NAT-2」を用いた。

2 つる割病抵抗性検定

「アイソフィ」の自殖F₂個体別F₃系統65系統を5群に分け、1998年秋、1999年春、1999年秋、2000年春、2000年秋に検定を行った。直径5 cmのポリポットに2個体ずつは種し、系統当たり約40個体を供試した。

Ka³培地 (K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 500 mg, KCl 500 mg, Fe-Na-EDTA 10 mg, Yeast extract 1 g, L-アスパラギン 2.0 g, Dグルコース 30 g, 水 1 L) によって室温で2~3週間振とう培養したつる割病菌を、1ポット当

表1 形質評価に用いたつる割病菌のレース検定

判別品種	病原性 (枯死/供試個体数)			判定
	調査日 (接種後日数)			
	13日	21日	29日	
アムス	1/5	5/5	5/5	+
大井	0/3	0/3	0/3	-
黄金9号	0/6	0/6	0/6	-

注 +:病原性あり、-:病原性なし。

たり7 mL接種した。接種約3週間後、個体ごとに外部病徴: 0 (無発病) ~ 3 (枯死) と、導管褐変評点0 (無) ~ 3 (50%以上) を観察した。系統の発病度 ((評点の合計×100) / (3×供試個体数)) を計算し、同時に供試した両親系統の発病度と比較して各系統の抵抗性を判定した。

なお、検定に使用したつる割病菌のレースを並木³⁾の方法により検定した結果、レース0と推定された (表1)。

3 DNAの準備

DNA抽出用のサンプルには「アイソフィ」の自殖F₂個体の側芽の葉身を用いた。DNAの抽出はCTAB法⁵⁾によって行った。抽出したDNAを0.8%のアガロースゲルで電気泳動して既知の濃度のDNAと比較して定量し、10ng μL⁻¹の濃度に希釈調整して、PCR反応に用いた。

4 PCR解析手法

PCRの反応液は合計25 μLとし、テンプレートDNAを10 ng、Taqポリメラーゼ (Ampli Taq Gold Perkin Elmer) を2 Unit 使用した。PCRにはサーマルサイクラーTP2000 (TaKaRa)を用い、95°Cで10分間処理した後、熱変性94°C30秒、アニーリング35°C2分、伸長反応72°C3分を1サイクルとして45サイクル行い、72°C10分の処理を行った。5 μLのPCR増幅産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイドで10分間染色後、紫外線照射下でDNA断片のバンドを観察した。

5 プライマーの選抜

まず最初に、解析集団の両親系統で多型を生ずるプライマーの選定を行った。プライマーとして、オペロン社、及びブリティッシュコロンビア大学製の10merのプライマー160種、プライマー2種類を組み合わせて作成した2,000種のプライマーを用いた。これらについて、「0-3」と「NAT-2」から抽出したDNAを鋳型に用いてPCRを行い、両系統間で多型が生ずるプライマーの選抜を行った。

次に、「0-3」と「NAT-2」両系統間で多型が生じたプライマー361種を用いて、「アイソフィ」の自殖F₂の個体別F₃系統の中から、つる割病に抵抗性又は抵抗性が分離している系統と、罹病性の系統をそれぞれ8系統選抜し、これらの系統の前世代のF₂個体から得たDNAを鋳型にPCRを行い、抵抗性遺伝子と連鎖するプライマーの選抜を行った。

表2 「アイソフィ」自殖F₂個体別F₃によるつる割病検定結果及びD1による判定結果

検定 時期	F ₂ 個体 及び 品 種 名	発病度		判 定		D1	検定 時期	F ₂ 個体 及び 品 種 名	発病度		判 定		D1
		外部病徴	導管褐変						外部病徴	導管褐変			
1998 秋	6	53.2	62.2	S	S		2000 春	39	21.6	18.7	R	R	
	18	6.7	7.5	R	R			40	79.5	75.2	S	S	
	22	55.6	37.7	R	S	*		41	16.7	17.7	R	R	
	24	42.7	23.1	R	R			42	3.3	4.1	R	R	
	28	83.3	73.5	S	S			43	0.0	0.0	R	R	
	33	39.5	2.6	R	R			45	12.5	11.6	R	R	
	36	31.7	0.8	R	R			47	25.5	26.5	R	R	
	56	79.0	80.7	S	S			48	61.8	54.1	S	S	
	58	27.0	19.8	R	R			49	14.5	16.2	R	R	
	62	19.4	0.0	R	R			50	88.0	92.3	S	S	
	0-3(P ₁)	60.9	51.7	(S)				51	83.7	83.7	S	S	
NAT-2(P ₂)	13.3	7.5	(R)			52	88.0	89.7	S	S			

1999 春	2	20.0	6.7	R	R		53	0.0	0.0	R	R		
	3	92.8	59.5	S	S		54	12.0	12.8	R	R		
	7	19.2	18.4	R	R		57	22.5	27.5	R	R		
	9	91.0	82.9	S	S		59	37.6	38.5	R	R		
	12	12.7	8.6	R	R		60	83.3	80.7	S	S		
	13	37.8	26.1	R	R		0-3(P ₁)	88.2	88.2	(S)			
	14	56.2	44.8	R	S	*	NAT-2(P ₂)	0.0	0.0	(R)			
	16	93.3	78.3	S	S		アイソフィ(F ₁)	0.0	0.0	(R)			
	17	7.6	1.7	R	R		-----						
	19	33.3	20.5	R	R		2000	61	7.5	7.5	R	R	
	0-3(P ₁)	80.7	61.4	(S)			秋	63	0.0	0.0	R	R	
NAT-2(P ₂)	0.0	0.0	(R)			64	79.2	81.2	S	S			

1999 秋	20	14.0	14.9	R	R		66	23.3	23.3	R	R		
	21	15.8	18.4	R	R		68	68.3	65.8	S	S		
	23	18.3	25.0	R	R		69	13.2	14.9	R	R		
	25	43.7	59.8	S	S		70	25.9	23.1	R	R		
	26	17.6	20.6	R	R		71	0.0	0.0	R	R		
	30	29.4	33.3	R	R		72	0.0	0.0	R	R		
	31	95.4	94.3	S	S		73	20.0	22.5	R	R		
	34	29.2	29.2	R	R		74	14.0	16.7	R	R		
	35	29.8	28.1	R	R		75	36.8	37.6	R	R		
	37	66.7	66.7	S	S		76	22.9	17.1	R	R		
	38	1.0	2.9	R	R		77	26.5	27.4	R	R		
	0-3(P ₁)	62.2	58.9	(S)			78	0.0	0.0	R	R		
	NAT-2(P ₂)	0.0	1.9	(R)			79	13.1	14.1	R	R		
	アイソフィ(F ₁)	14.0	0.0	(R)			80	12.3	13.2	R	R		

								0-3(P ₁)	47.5	51.2	(S)		
								NAT-2(P ₂)	0.0	0.0	(R)		
								アイソフィ(F ₁)	0.0	0.0	(R)		

注 (P₁): 母親系統 (罹病性)、(P₂): 父親系統 (抵抗性)、(F₁): 雑種第1代、R: 抵抗性、S: 罹病性
 外部病徴: 0 (無発病) ~ 3 (枯死)、導管褐変: 0 (無) ~ 3 (50%以上)
 発病度: ((評点の合計×100) / (3×供試個体数)) *: D1 とつる割検定結果が異なる系統

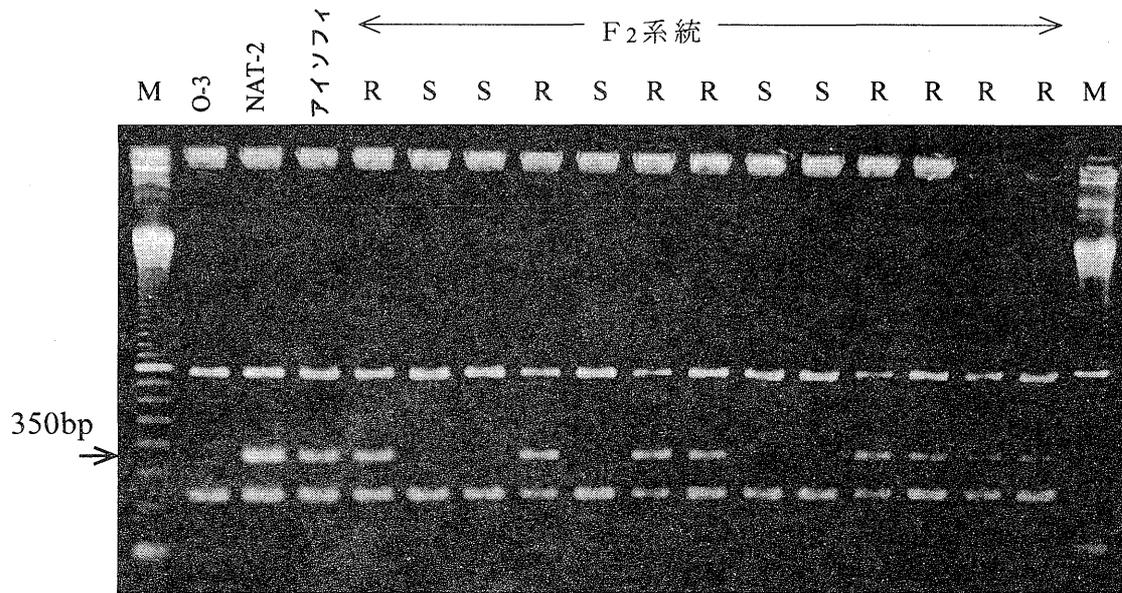


図1 D1マーカーのバンドパターン

注 「O-3」：「アイソフィ」の母親系統で罹病性
 「NAT-2」：「アイソフィ」の父親系統で抵抗性
 F₂系統：「アイソフィ」を自殖して得られたF₂個体
 R:抵抗性 S:罹病性 M:サイズマーカー

選抜で得られた1組のPCRプライマーを用いて、つる割病抵抗性検定によりあらかじめ抵抗性が判定された「アイソフィ」の、自殖F₂の個体別に仕立てたF₃系統65系統(プライマーの選抜に用いた16系統も含む)を材料にPCRを行い、つる割病抵抗性検定結果とPCRにより生ずる特異的DNA断片の一致程度を調査した。

試験結果

1 つる割病抵抗性検定評価

比較品種の発病程度の差は大きく、外部病徴と導管褐変を合わせた5回の検定の平均値は罹病性の「O-3」が65.1と高く、抵抗性の「NAT-2」では2.3と低かった。

「アイソフィ」のF₃系統の抵抗性検定結果は、系統間の発病程度の差が明確であったため、外部病徴と導管褐変の発病程度を比較品種の発病程度と比較することによって、F₂世代の抵抗性を明確に推定することが出来た(表2)。また、*Fom1*の発現は優性であり両系統のF₁「アイソフィ」の3回の検定の平均値は2.3で、抵抗性親の「NAT-2」の0.6と同程度に低かった。

2 プライマーの選抜

供試した2,160種類のプライマーのうち両親系統間で多型が生じたプライマーは361種類であった。このうち抵抗性系統と罹病性系統各8系統を用いた解析で抵抗性系統のみに特異的なバンドが生じる1組のプライマーTP16(CCAAGCTGCC)-TN14(TCGTGCGGGT)が得られ、このプライマーセットをD1プライマーと命名した。

D1を用いたPCR反応で抵抗性系統に生ずる特異的なDNA断片のサイズは約350bpであった。また、このほかに約750bpの断片と約220bpの断片が観察された(図1)。D1プライマーによる解析では約350bpの抵抗性系統に特異的なDNA断片の有無を調べることで抵抗性を判定できる。

集団を65系統に規模拡大してD1による解析結果とつる割病抵抗性検定結果を比較したところ、97%に当たる63系統の評価が一致した(表2)。

考察

アールス系温室メロンF₁品種「アイソフィ」は、父親系統の「NAT-2」から優性に発現するつる割病抵抗性遺伝子を受け継いでいる⁹⁾。「NAT-2」が持つ同病の抵抗性遺伝子は、父親系統の「東海PF70号」に由来し⁹⁾、「東海PF70号」の抵抗性遺伝子は、「ふかみどり」に由来する⁹⁾。並木ら³⁾の検定結果によると「ふかみどり」はレース0とレース2に抵抗性でレース1及びレース1、2yに罹病性である。このレース反応は、Risserら⁷⁾によるレース分類表では「Doublon」型となり、同分類表によると「Doublon」の持つ抵抗性遺伝子は*Fom1*とされている。以上のことは、「NAT-2」の持つつる割病抵抗性遺伝子が*Fom1*であることを示している。

1996年、S. Baudracco-Arnasら⁹⁾は全長1,390cMの14連鎖群からなるRFLP及びRAPDマーカーによるメロンの連鎖地図を作成した。*Fom1*は、この連鎖地図上にマッピ

ングされている。この研究は、メロンのDNAマーカーを利用した地図の先駆けである。*Fom1*と*Fom1*に最も近いマーカーA04との地図距離は17.8 cMで、遠く離れている。*Fom1*の論文での扱いは、選抜マーカーを見つけたものとしてではなく、構築した遺伝子地図に座乗した数少ない形質マーカーの一つとなっている。したがって、A04はDNAマーカーとして育種利用できない。本報告で開発したD1マーカーによる解析結果と、つる割病抵抗性検定結果は、抵抗性が分離した65系統において、97%の高率で一致した。したがって、D1マーカーはつる割病抵抗性遺伝子(*Fom1*)と密接に連鎖しており、抵抗性遺伝子の有無を選抜できるDNAマーカーとして使用できるものと考えられた。

並木らは⁹⁾、メロンのつる割病菌の4レース(レース0、1、2、及び1、2y)を用いて、市販メロン130品種を5群に大別した。「NAT-2」の抵抗性形質の導入親である「ふかみどり」が属するC群は、大半の85品種が属する群であった。C群の品種はレースに対する反応から抵抗性遺伝子として*Fom1*を持つものと推定され、市販メロンの多くは*Fom1*を持つものと考えられる。当報告は、栽培品種の選定及び抵抗性育種に資するために行われたもので供試系統に特別な偏りはない。今回報告したD1は、「ふかみどり」に由来するつる割病抵抗性遺伝子*Fom1*と密接に連鎖するものであるため、対象となる品種は多いものと考えられる。なお、前述の並木らの報告によると、*Fom2*に相当するB群に属する品種は「プリンス」1品種のみであった。

2000年、筆者ら¹⁰⁾はアールス系温室メロンの日持ち性形質(非黄化)と連鎖するDNAマーカーを開発した。開発時に用いた分離集団は、本試験と同じ「アイソフィ」のF₂集団である。開発したマーカーC1、C2は69個体中2個体を除いて形質評価とマーカーによる判定結果が一致した。岩山ら¹¹⁾はC1マーカーを用いて、合計171種の市販及び自社品種のメロンの検定を行い、日持ち性形質との関係を調べた結果95%が一致した。

この結果は、日持ち性マーカーC1、C2が目的としている日持ち性形質と密接に連鎖していることを示すとともに、「アイソフィ」の両親系統「0-3」及び「NAT-2」のマーカーに利用したゲノム上の部分が、その他の温室メロンと比較してDNAのレベルで大きく異なるものではないことを示唆している。D1の開発も「アイソフィ」を用いて行った。C1、C2マーカーと同様D1での多型の元となるDNA変異が、他種類のメロンで保存されていることを期待している。

本報告で開発したD1が実際の育種に利用されることによって、開発に用いた系統以外のメロンについての適応性が明らかとなる。

なお、本研究は、農林水産省助成による地域先端技術等地域実用化研究促進事業により行った。

謝辞：メロンのDNAの抽出に際して愛三種苗株式会社の岩山一敏氏に協力していただいた。ここに記して謝意を表す。

引用文献

1. 岩山一敏, 平野晃生. 日持ち性保有アールス系温室メロンのDNAマーカーによる育種の効率化技術の開発. 先端技術等地域実用化研究促進事業(バイオテクノロジー実用化型)成績概要集. 独立行政法人農業生物資源研究所. 3-4-1 (2002)
2. Murray M. G., Thompson W. F.. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8, 4321-4325(1980)
3. 並木史郎. メロンつる割病菌の病原性分化と遺伝的変異. *植物防疫.* 51 (2), 1-5 (1998)
4. 並木史郎, 西和文. メロンつる割病菌4レースに対する市販メロン品種の抵抗性の品種間差異, 研究成果情報総合農業試験研究推進会議. 農林水産省農業研究センター. 116-117 (1998)
5. 小川理恵, 菅原眞治, 糟谷真宏, 坂森正博, 青柳光昭, 櫻井擁三, 高瀬尚明. うどんこ病, つる割病複合抵抗性温室メロンの育成と, そのF₂組み合わせの特性. *愛知農総試研報.* 26, 147-156(1994)
6. 小川理恵, 菅原眞治, 伊藤裕朗, 河合 仁, 坂森正博, 青柳光昭, 櫻井擁三. 温室メロン新品種「アイソフィ」の育成. *愛知農総試研報.* 27, 175-180 (1995)
7. Risser G., Z. Banihashemi, D. W. Davis. A Proposed Nomenclature of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Races and Resistance Genes in *Cucumis melo*. *Phytopathology.* 66, 1105-1106(1976)
8. S. Baudracco-Arnas, M. Pitrat. A genetic map of melon(*Cucumis melo* L.)with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Theor Appl Genet.* 93, 57-67(1996)
9. 瀬古龍雄. わが国露地(ハウス)メロンの系譜 [13]. *農業および園芸.* 74 (8), 63-66 (1999)
10. 遠山孝通, 浅見逸夫, 大藪哲也, 矢部和則, 菅原眞治, 神戸三智雄. アールス系温室メロンの日持ち性形質(非黄化形質)と連鎖するPCRマーカーの開発. *愛知農総試研報.* 32, 47-52 (2000)
11. X. Y. Zheng, D. W. Wolff, S. Baudracco-Arnas, M. Pitrat. Development and utility of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) linked to the *Fom-2* fusarium wilt resistance gene in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet.* 99, 453-463(1999)