

令和 5 年 4 月 22 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14459

研究課題名（和文）メロンつる割病レース1.2抵抗性遺伝子F1,2yのRAD-seq解析と育種利用

研究課題名（英文）Analysis of the gene, F1,2y, resistant to Fusarium wilt race 1.2 in melon using RAD-Seq method, and its use in breeding

研究代表者

松本 雄一（Matsumoto, Yuichi）

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号：80538265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抵抗性を持つ野生種*Cucumis anguria*のF2分離集団の解析で得られた各SNPとSSRマーカーを用いた遺伝子型解析から1225個のSNP遺伝子型データを得た。また、F3系統のつる割病レース1,2y抵抗性表現型から推定したF1,2y遺伝子型と併せて連鎖解析を行った結果、F1,2yはSNP43249と密接に連鎖することが示唆された。メロンと様々な*Cucumis*属野生種との交雑親和性の結果から、*C. anguria*に加え*C. zambianus*も交配親として有望であることを示した。*C. anguria*は果実加温を行うことで雑種胚の発達を促進できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりメロンの重要病害であるつる割病レース1,2y抵抗性品種の育成に向け、抵抗性マーカーの作製に関する知見および種間雑種作出に向けた知見を得ることができ、品種育成という種苗業界において、また生産の安定化など農業・食品産業に向けても意義のある成果を得た。品種の作出などの実用化に向け、本研究により新たに得られた課題も含め今後のさらなる解明が進むことを期待したい。

研究成果の概要（英文）：Genotyping of SNPs obtained by RAD-seq in 99 F2 segregating strains of *C. anguria* was performed to investigate marker genotypes. We also estimated the F1,2y genotypes of the F2 segregants based on the F3 generation's resistance phenotype. Linkage analysis was performed based on these results, and 1225 SNP genotype data were obtained. Linkage analysis suggested that F1,2y is closely linked to SNP43249. Crosses compatibility results indicated that *C. zambianus* is a promising crossing parent in addition to *C. anguria*. *C. anguria* showed that the development of hybrid embryos could be promoted by warming fruit.

研究分野：園芸学

キーワード：メロン つる割病 種間交雑

1. 研究開始当初の背景

メロン (*Cucumis melo*) の重要病害であるメロンつる割病は、レース 0, 1, 2 および 1, 2 の 4 レースに分類され、レース 1, 2 はさらにその病徴から黄化型 (1, 2y) と萎凋型 (1, 2w) に細分化されている。レース 0, 1, 2 に関しては、真性抵抗性遺伝子を有するメロン系統が報告されているが、レース 1, 2y および 1, 2w に関しては、真性抵抗性遺伝子を有するメロン系統は報告されていない。一方、*Cucumis* 属の野生種である *C. anguria* はレース 1, 2y 真性抵抗性遺伝子 *Fl, 2y* を有することが報告されており、メロンの遺伝資源として期待されている。本遺伝子は *C. anguria* の第 11 染色体上に座乗するが、利用できる DNA マーカーが少ないことから詳細な位置は不明である。*C. anguria* とメロンにおいては、現在、種間雑種の作出に向けた研究が行われており、*Fl, 2y* 遺伝子の座乗位置に関する情報は今後の選抜において有益となる。

しかしながら、*C. anguria* は非モデル植物であるためゲノム情報が少なく、従来の方法では詳細な連鎖地図の構築が困難である。一方、いくつかのマイナー作物においては Single Nucleotide Polymorphism (SNP) を利用した数百から数千のマーカーの座乗する高密度連鎖地図が報告されている。特に、Restriction-site Associated DNA sequencing (RAD-seq) を用いた方法では制限酵素で切断した DNA 断片を次世代シーケンサーを用いてシーケンスすることで、SNP の探索・マーカー作成・ジェノタイピングを効率的に行うことができ、またゲノム情報のない非モデル生物にも適用可能である。このため *C. anguria* においても RAD-seq を適用することで数千の SNP マーカーが座乗した高密度連鎖地図が得られる可能性が考えられる。さらに近年、*C. anguria* と同属であるメロン及びキュウリについては全ゲノム配列が決定されており、解析の際のリファレンスとしての利用も期待できる。

この遺伝子を用いた抵抗性育種のためには、*C. anguria* などの *Cucumis* 属の野生種とメロンとの種間交雑を作出することが前提となる。しかしながら、本組み合わせにおいては花粉が発芽しない、発芽しても柱頭または花柱で花粉管の伸長が停止する、受精に至っても初期の胚で発達が停止・崩壊するなどの生殖隔離が起こり雑種は得られていない。特に胚培養に繋がる知見は乏しく、また、*C. anguria* 以外の有望な交雑組み合わせについての検討も近年は行われていない。

2. 研究の目的

本研究ではメロンの遺伝資源として期待される *C. anguria* の有するメロンつる割病レース 1, 2y 抵抗性遺伝子 *Fl, 2y* の連鎖解析を行う。さらに、*C. anguria* などの *Cucumis* 属野生種をメロンの育種に用いるために必要となる花粉管伸長の阻害や胚崩壊などの交雑不親和性の回避・克服に向けた知見を得る。これらの成果を基に、今後のメロンつる割病レース 1, 2y 抵抗性を有する種間雑種由来品種の作出の可能性を高めていく。

3. 研究の方法

(1) RAD-seq 解析による *Fl, 2y* の連鎖解析

C. anguria の 2 系統 PI 320052, PI 364475 および F₂ 分離集団 99 個体を用いた。DNA 抽出を行い、RAD-seq を適用するためのライブラリ調製を行った。(株) マクロジェン・ジャパンへ委託し HiSeq2500 (Illumina) を用いて 50bp シングルエンドリードのシーケンスを行った。シーケンスにより得た FASTQ 形式ファイルは Stacks により F₂ 集団 99 個体の SNP のジェノタイピングを行い、99 個体のうち 70 個体以上で検出できた SNP を取り出した。連鎖解析にはメロンおよびキュウリの SSR プライマー 92 個も追加した。

Fl, 2y 遺伝子型の解析には F₃ 系統を用い、メロンつる割病レース 1, 2y 菌株として Fom 142-s1 (MAFF 242352) を 1×10⁵ spores/ml 以上の濃度に調整した孢子懸濁液を浸根接種し、3 週間後に病徴を観察した。この結果を基に各系統の遺伝子型を決定した。

得られた SNP マーカーのうち、F₂ 分離集団における遺伝子型の期待分離比(1 : 2 : 1)に適合するもの、SSR マーカー遺伝子型、および *Fl, 2y* 遺伝子型に基づき連鎖解析を行った。連鎖解析は JoinMap 4.1 ソフトウェアを用いて Kosambi の地図関数を適用した。連鎖群を決めるための LOD 値は 5.0 とした。

(2) *Cucumis* 属野生種のメロンつる割病抵抗性育種への利用法確立

①果実加温法による *C. anguria* とメロンとの種間交雑における雑種胚の発達促進

メロン系統 MR-1, *Cucumis* 属野生種 *C. anguria* PI 320052 および PI 147065 を用いた。交雑組み合わせはそれぞれの自殖および種間交雑を行い、交雑組み合わせの一部において受粉後すぐに表面温度は 45°C に設定した加温装置を設置した。受粉後 7~22 日目に果実を収穫し果実重、胚珠サイズを測定した。また果実から胚珠を取り出し、マイクロトームで 10 μm 厚の切片を作成したのち光学顕微鏡下で観察した。さらに、受粉後 10~30 日目の胚珠について培養を行った。培地は、MS 培地にカイネチンおよびインドール酢酸を添加したものをを用いた。

②メロンと *Cucumis* 属野生種の交雑親和性の比較

メロン系統 MR-1, *C. heptadactylus*, *C. metuliferus*, *C. meeusei*, *C. zambianus* を用いた。それぞれの自殖および MR-1 と野生種間の正逆交雑を行った。授粉後 2 週間の肥大状況をもとに結実率を判断した。

4. 研究成果

(1) RAD-seq 解析による *Fl, 2y* の連鎖解析

PI 320052 と PI 364475 のサンプルをシーケンスにかけたところ、個体ごとの遺伝子座の平均リード数は 9.22 から 25.22 の範囲であった。得られた総 SNP 数は 35,624 個であり、これらの結果をもとに F₂ 分離集団の SNP 検出を行ったところ、1,225 個の SNP マーカーが得られた。SSR マーカーでは PI 320052 と PI 364475 間で多型を示したものが 20 個みられた。これらのマーカーのうち 8 個で F₂ 分離集団のマーカー遺伝子型の判別を行った。また、F₃ 各個体での抵抗性と罹病性の分離比をもとに F₂ 分離集団の *Fl, 2y* 遺伝子型を抵抗性ホモ (*Fl, 2y / Fl, 2y*)、罹病性ホモ (*fl, 2y / fl, 2y*)、ヘテロ (*Fl, 2y / fl, 2y*) に分類した。

得られた F₂ 分離集団の SNP マーカー遺伝子型、SSR マーカー遺伝子型および *Fl, 2y* 遺伝子型をもとに連鎖解析を行った結果、139 個の SNP マーカー、6 個の SSR マーカーおよび *Fl, 2y* が座乗する、マーカー間の平均距離 18.3 cM、全長 2654.2 cM の連鎖地図が得られた。さらに、メロンの第 11 連鎖群上の SSR マーカー GCM206、第 3 連鎖群上の SSR マーカー CMBR001, CMBR056, CMBR100、第 11 連鎖群上の SSR マーカー CMTCN62, CMBR071 をもとに第 1, 3, 11 連鎖群について連鎖群名を付与した。また *Fl, 2y* 遺伝子は第 11 連鎖群上の SSR マーカー CMTCN62 および CMBR071 と同一連鎖群上に座乗し、SNP マーカー 43249 と 10.4 cM、SNP マーカー 58325 と 13.6 cM の距離で連鎖していた。

(2) *Cucumis* 属野生種のメロンつる割病抵抗性育種への利用法確立

①果実加温法による *C. anguria* とメロンとの種間交雑における雑種胚の発達促進

PI 320052 の果実重は、受粉後 10 日目において加温なしでは 14.5 g であったが、加温ありでは 23.3 g となり、自殖の 27.3 g に近い値だった。胚珠面積は、受粉後 10 日目において、加温なしでは 4.58 mm² であったが、加温ありでは 9.91 mm² となり、自殖の 5.22 mm² よりも大きく、さ

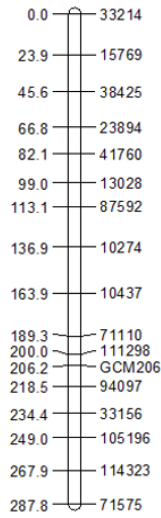
らに受粉後 40 日目以降の自殖の 8.83 mm を上回った。PI 147065 自殖胚では、受粉後 7 日目に前胚が、10 日目に後期球状胚及び心臓型胚が観察された。PI 147065×MR-1 加温なしは受粉後 13 日目に前胚に満たない大きさの胚及び一部で前胚が、16 日目に初めて前期球状胚が観察された。PI 147065×MR-1 加温ありは受粉後 10 日目に初めて前胚が観察された。しかしながら、いずれもその後のシュートの発生やカルスの形成は見られなかった。

②メロンと *Cucumis* 属野生種の交雑親和性の比較

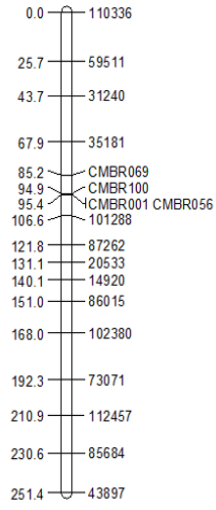
自殖の花粉管伸長距離は、*C. zambianus* が 4 種の中で最も旺盛な伸長であった。栽培種に対して野生種を花粉親として受粉した場合は、*C. metuliferus*, *C. zambianus*, *C. meeusei*, *C. heptadactylus* いずれも、花粉管伸長が大きく阻害された。野生種に対して栽培種を花粉親として受粉した場合は、*C. zambianus*×MR-1 では、他の 3 つの交雑と比べ有意に伸長距離が長くなった。*C. zambianus* の自殖においては、結実率は 83%、98% が完熟種子であった。*C. metuliferus*×MR-1 および *C. meeusei*×MR-1 では結実率 0%、*C. zambianus*×MR-1 で 38% となった。*C. zambianus*×MR-1 では完熟種子は得られなかった。

以上より、全 11 連鎖群にわたる、139 個の SNP マーカー、6 個の SSR マーカーおよび *Fl, 2y* が座乗する、全長 2,654.2 cM の連鎖地図が得られた。また、*Fl, 2y* 遺伝子は第 11 連鎖群上の SSR マーカー CMTCN62 および CMBR071 と同一連鎖群上に座乗し、SNP マーカー 43249 と 10.4 cM、SNP マーカー 58325 と 13.6 cM の距離で連鎖した。これまでの報告では、全 16 連鎖群、全長 605.2cM、*Fl, 2y* が第 11 連鎖群上の SSR マーカー ECM164 と約 10.0cM で連鎖した地図が報告されており、今回も同一連鎖群上に位置付けられたことから、*Fl, 2y* は *C. anguria* の第 11 連鎖群上に座乗している可能性が高いと考えられる。さらなる精度の向上に向けては *C. anguria* でのリファレンスを作成することが必要と思われる。また、より多くの系統数での抵抗性遺伝子型の推定を行うことが必要であろう。*C. anguria* の果実内での胚発達の促進や、新たに有望な *Cucumis* 属野生種も見出すことができ、これらの研究を基に、*C. anguria* や本研究で新たに有望とした *C. zambianus* を用いたメロン種間交雑育種においてマーカーを利用した抵抗性育種が可能となることを期待したい。

LG 1



LG 3



LG 11

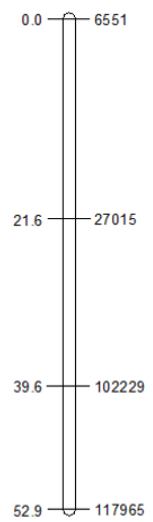
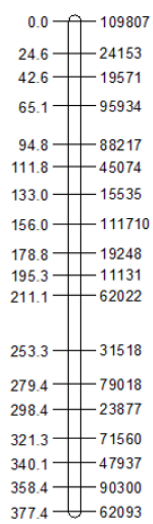
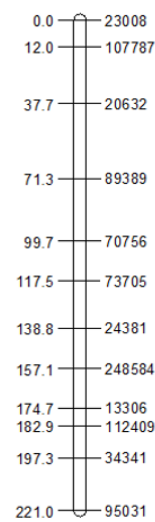
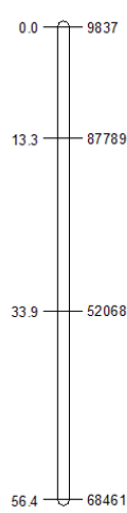
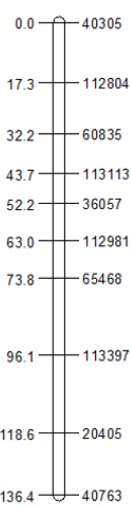
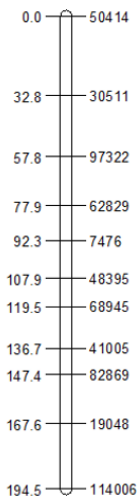
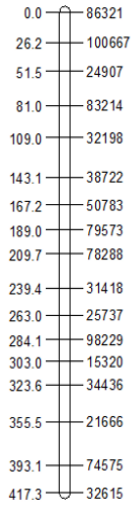
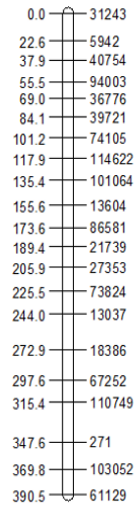
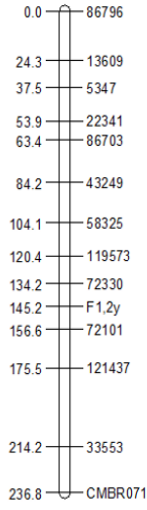


図 得られた連鎖地図

Fl, 2y は SSR マーカー CMBR071 と同一連鎖群上に座乗. SNP マーカー 72330 と 11.0cM で連鎖

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuichi Matsumoto, Mako Tsunamoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Growth promotion of interspecific hybrid embryos between Cucumis anguria L. and melon (C. melo L.) by fruit heating	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Horticultural Plant Journal	6. 最初と最後の頁 213-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hpj.2021.11.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 松本雄一, 水崎菜月	4. 巻 27
2. 論文標題 Cucumis zambianusとメロン (C. melo) との種間交配における親和性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 農業生産技術管理学会誌	6. 最初と最後の頁 205-210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 松本雄一, 丸田沙織	4. 巻 27
2. 論文標題 Cucumis metulifer台木を利用したメロン接木栽培における施肥窒素量の影響および播種時期の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 農業生産技術管理学会誌	6. 最初と最後の頁 123-131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本雄一
2. 発表標題 メロン栽培および育種におけるCucumis属野生種の利用
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会第22回ウリ科作物研究小集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水崎菜月, 松尾岳法, 松本雄一
2. 発表標題 メロンと複数のCucumis属野生種の正逆交雑親和性の比較
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本雄一, 久保山勉
2. 発表標題 生殖隔離の克服によるCucumis属野生種とメロンとの種間雑種作出の試み
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関