

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 29 日現在

機関番号：88002

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450014

研究課題名(和文) パパイヤ野生種が持つウイルス抵抗性のマーカーをゲノムワイドな多型探索法で開発する

研究課題名(英文) Development of DNA marker associated with virus resistance for papaya breeding.

## 研究代表者

浦崎 直也 (Urasaki, Naoya)

沖縄県農業研究センター・本所研究企画班・班長

研究者番号：20504591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス抵抗性パパイヤ育成のために、ウイルス抵抗性を持つ野生種(マウンテンパパイヤ)とパパイヤの属間雑種個体と、戻し交雑個体(属間雑種×パパイヤ)を作出した。ウイルスの人工接種により、属間雑種個体と戻し交雑個体がパパイヤ奇形葉モザイクウイルスに対して抵抗性を持つことを明らかにした。次に、属間雑種個体のゲノム解析と既報の情報から、抵抗性遺伝子候補としてserine threonine protein kinase (STK) 遺伝子を選抜した。最後に、パパイヤと野生種のSTK遺伝子の塩基配列の違いを利用してDNAマーカーを開発した。本マーカーは、ウイルス抵抗性パパイヤの育種に活用できる。

研究成果の概要(英文)：To breed virus resistant papaya, intergeneric hybrids between papaya and mountain papaya, and backcross plants between intergeneric hybrids and papaya were developed. Both intergeneric hybrids and backcross plants showed resistance to papaya leaf distortion mosaic virus. According to the RAD-seq analysis of intergeneric hybrids and the previous reports, we identified a STK gene as candidate of virus resistance gene and converted it into a CAPS marker which can be usable for papaya breeding.

研究分野：植物ゲノム学

キーワード：ウイルス 抵抗性 遺伝子 属間交雑

1. 研究開始当初の背景

沖縄県は熱帯果樹であるパパイヤ (*Carica papaya*) を戦略品目に指定し、生産振興を図っている。しかしながら、重要病害であるパパイヤ奇形葉モザイクウイルス (PLDMV) が振興の妨げとなっており、ウイルス抵抗性パパイヤの育成が望まれている。

2. 研究の目的

パパイヤ野生種であるマウンテンパパイヤ (*Vasconcellea cundinamarcensis*) が持つウイルス抵抗性遺伝子をパパイヤの育種に利用するために、雑種個体、戻し交雑個体の育成、ウイルス抵抗性マーカーの開発と選抜システムの構築を行う。

3. 研究の方法

(1)パパイヤとマウンテンパパイヤを材料に、属間交雑個体及び戻し交雑個体を作成した。作出には、交雑不和合性を打破するために、胚救出培養法を用いた。交雑性の確認は、染色体観察と PCR により確認した。作出個体のウイルス抵抗性は、PLDMV の人工接種と RT-PCR によるウイルスの検出により評価した。

(2)PLDMV を接種したパパイヤ、マウンテンパパイヤと属間雑種個体の葉から cDNA を合成した。cDNA を制限酵素 (*Nla*III) 切断後、TruSeq DNA LT Sample Prep Kit (イルミナ社) を用いてライブラリーを調製した。シーケンシングは、HiSeq 2500 (イルミナ社) を用いた。得られた RAD タグの中から、ウイルス抵抗性特異的に存在するタグを抽出し、DNA マーカーへと変換した。DNA マーカーへの変換は、抵抗性特異的タグの周辺領域を制限酵素 *Xsp*I で切断することにより行った (CAPS マーカー)。

4. 研究成果

(1)ウイルス抵抗性パパイヤ育成のために作出した属間雑種個体 (パパイヤ×マウンテンパパイヤ、図 1、Tarora et al., 2016) と戻し交雑個体 (属間雑種×パパイヤ) を作出した。これらのゲノム構造解明と PLDMV に対する抵抗性を評価した。ゲノム構造解明では、戻し交雑個体は戻し交雑親であるパパイヤゲノムを有しているが、異質 3 倍体、異質 4 倍体、異質 5 倍体となっていることを染色体観察により明らかにした (図 2)。戻し交雑個体のウイルス抵抗性評価では、82 個体の戻し交雑個体を PLDMV 接種試験に供した。その結果、抵抗性と考えられる無病徴の個体 (54 個体、図 3) と接種上位葉に壞疽斑点が形成された個体 (28 個体) が存在した。観察を継続したところ、壞疽斑を形成した個体中で、2 個体は枯死したものの、26 個体では上位葉で新たな壞疽斑形成は確認されず、抵抗性であることを確認した。また、壞疽斑点内にウイルスが封じ込められていることを RT-PCR で確認した (図 4)。戻し交雑集団では、パ

パイヤと同様に PLDMV 感受性個体の存在が期待されたが、確認されなかった。戻し交雑個体は母本として用いた属間雑種の配偶子 (ウイルス抵抗性遺伝子) を非還元配偶子として保持しているため、感受性個体が存在しないと考えられた。

(2) Razean Haireen と Drew (2014) は、マウンテンパパイヤのウイルス抵抗性遺伝子の候補として serine threonine protein kinase (STK) 遺伝子を報告している。我々の RAD-seq 解析の結果からも、同遺伝子の関与が示唆されている。そこで、パパイヤとマウンテンパパイヤの STK 遺伝子の塩基配列の違いを利用した CAPS マーカーを開発した (図 5)。本 CAPS マーカーは、被検植物体がマウンテンパパイヤ由来の STK 遺伝子を有するかどうかを判定することができるため、ウイルス抵抗性パパイヤの育種に活用できる。

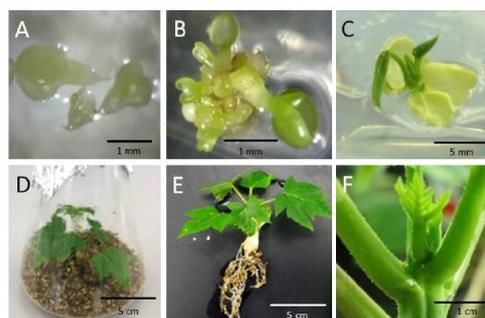


図 1 胚救出培養による属間交雑個体の作出

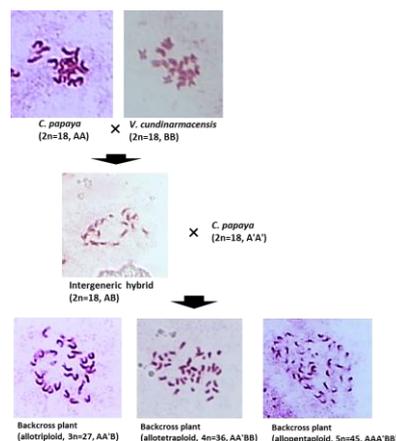


図 2 ゲノム構造解析の結果



図 3 PLDMV 人工接種の結果 (接種 2 か月後)

左: パパイヤ、右: 戻し交雑個体

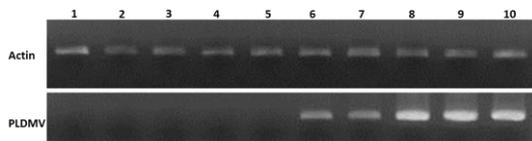


図4 壊疽斑点を形成した戻し交雑個体のRT-PCRの結果

1から4は壊疽斑点以外を由来とするcDNAの結果で、6から10は壊疽斑点を由来とするcDNAの結果である。6から10のみPLDMVが検出されたことから、壊疽斑点内にウイルスが封じ込められていると考えられた。

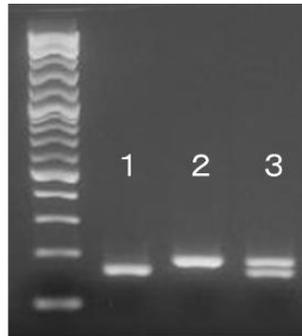


図5 開発したSTK遺伝子のCAPSマーカー  
1：パパイヤ、2：マウンテンパパイヤ、3：属間交雑個体

<引用文献>

① Tarora et al. (2016). Development of plants resistant to Papaya leaf distortion mosaic virus by intergeneric hybridization between *Carica papaya* and *Vasconcellea cundinamarcensis*. *Breeding science*, 66(5), 734-741.

② Razean Haireen, M. R. and Drew, R. A. (2014). Isolation and characterisation of PRSV-P resistance genes in *Carica* and *Vasconcellea*. *International journal of genomics*, Vol. 2014, Article ID 145403.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Tarora, K., Shudo, A., Kawano, S., Yasuda, K., Ueno, H., Matsumura, H. and Urasaki, N. (2016). Development of plants resistant to Papaya leaf distortion mosaic virus by intergeneric hybridization between *Carica papaya* and *Vasconcellea cundinamarcensis*. 査読有、*Breeding science*, 66(5), 734-741. DOI : 10.1270/jsbbs.16107

[学会発表] (計4件)

① 太郎良 和彦、屋比久 裕也、宮里 千春、高嶺 朝典、安田 慶次、河野 伸二、上野 広樹、松村 英生、浦崎 直也、パパイヤと

マウンテンパパイヤの属間交雑へのパパイヤの戻し交雑、日本育種学会第127回講演会  
② 太郎良 和彦、屋比久 裕也、兼島 莉沙、河野 伸二、安田 慶次、上野 広樹、松村 英生、浦崎 直也、マウンテンパパイヤが持つパパイヤ奇形葉モザイクウイルス抵抗性遺伝子の探索、日本育種学会第128回講演会  
③ 太郎良 和彦、安田 慶次、河野 伸二、上野 広樹、松村 英生、浦崎 直也、属間雑種(パパイヤ×マウンテンパパイヤ)の戻し交雑個体における性型とゲノムサイズの変化、日本育種学会第129回講演会  
④ 太郎良 和彦、河野 伸二、安田 慶次、玉城 盛俊、松村 英生、浦崎 直也、属間雑種(パパイヤ×マウンテンパパイヤ)の戻し交雑個体におけるパパイヤ奇形葉モザイクウイルス抵抗性評価、日本育種学会第131回講演会

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：  
[その他]  
ホームページ等

<http://www.pref.okinawa.jp/arc/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浦崎 直也 (URASAKI, Naoya)  
沖縄県農業研究センター・研究企画班・班長  
研究者番号：20504591  
研究者番号：

(2)研究分担者

太郎良 和彦 (TARORA, Kazuhiko)  
沖縄県農業研究センター・研究企画班・上席主任研究員  
研究者番号：10504772

(3)連携研究者

松村 英生 (MATSUMURA, Hideo)  
信州大学・基盤研究支援センター・生命科学分野・遺伝子実験支援部門・准教授  
研究者番号：40390885