

いちご中間母本農2号の炭疽病耐病性に連鎖するDNAマーカー開発

1. 試験のねらい

イチゴ炭疽病耐病性品種の開発には、耐病性の程度を接種試験により調査する必要があるが、株の増殖や、菌の接種、発病調査等に多大な労力と時間を要する。そこで、育種の効率化を図るため、イチゴ炭疽病耐病性と連鎖するDNAマーカーを用いた育種選抜法の開発を行う。

2. 試験方法

(1) 供試材料

とちおとめ、いちご中間母本農2号、(とちおとめ×いちご中間母本農2号)の F₁ 94系統を用いた。DNA抽出は改変CTAB法を用いた。

(2) 耐病性検定

供試材料の無菌培養苗を養液栽培により順化し、イチゴ炭疽病菌(*Glomerella cingulata*、菌株: OTT512)の分生子を 1.0×10^6 個/mlに調整し、1株あたり1mlずつ噴霧接種した。接種後はインキュベーター内(25°C、14時間日長)で管理し、接種21日後に発病状況を調査した。

$$\text{発病度} = \frac{\sum (\text{発病指数} \times \text{同株数})}{4 \times \text{調査株数}} \times 100$$

発病指数	1.5 : 葉柄褐変
0 : 無病徴	2 : 葉柄折損
0.5 : 斑点型病斑を形成	3 : 萎ちようまたはクラウン部褐変
1 : 葉に黒褐色の陥没病斑を形成	4 : 枯死

(3) マーカー検出

3種類の検出法(RAPD、AFLP、SSR)によりマーカーを収集した。プライマーはそれぞれRAPD法1377組、AFLP法256組、SSR法225組を供試した。とちおとめといちご中間母本農2号との間で多型が検出されるマーカーを収集し、それらのマーカーをF₁94系統で検出し、各マーカーの分離比を χ^2 検定により決定した。

(4) 連鎖地図作製

χ^2 検定の結果、F₁94系統で1:1に分離するマーカーを使用し連鎖解析を行った。マーカー間の距離の計算や地図の作製には解析ソフトMAPMAKER/EXP ver3.0を使用した。

(5) 耐病性連鎖マーカーの解析

マーカーと炭疽病耐病性との連鎖解析は、QTL解析ソフトQTL Cartographer ver2.5およびGMM法解析ソフトGenotype Matrix Mapping ver2.0を用いて行った。

3. 試験結果および考察

(1) F₁94系統で1:1に分離するDNAマーカーを収集した結果、とちおとめで398個(RAPD 44個、AFLP 258個、SSR 96個)、いちご中間母本農2号で524個(RAPD 60個、AFLP 340個、SSR 124個)のマーカーが得られた(表-1)。

(2) 得られたマーカーを用いて、とちおとめ、いちご中間母本農2号の連鎖地図を作製した。その結果、とちおとめで386個のマーカーが座する30の連鎖群、いちご中間母本農2号で515個のマーカーが座する29の連鎖群を作製した(表-2)。

(3) 連鎖地図を用いた連鎖解析の結果、とちおとめで1か所、いちご中間母本農2号で2か所に耐病性と関連する領域が見つかった。このことから、炭疽病耐病性は複数の量的遺伝子(QTL)が関与していることが明らかとなった。また、GMM法によって、8組のマーカー組合せが得られた(表-3、4)。

(4) QTL領域の近傍に座するマーカーを用いて、F₁94系統の発病度とマーカータイプの間を調査した結果、すべてのマーカータイプにおいて、マーカー有の系統とマーカー無の系統の平均発病度に有意な差が見られた(表-3、表-4)。GMM法No.4のマーカー組合せを利用して選抜した場合、集団を約1/8(15/94)に絞り込むことが可能であり、約70%(11/15)の確率で耐病性強(発病度60以下)の系統が選抜できる(図-1)。

4. 成果の要約

イチゴ炭疽病耐病性と連鎖するDNAマーカーを開発した。今回開発したDNAマーカーをいちご中間母本農2号を交配した集団で利用することで、育種集団を1/8に減らすことが可能であり、約70%の確率で耐病性系統を判別できる。

(担当者 生物工学部 遺伝子工学研究室 飯村 一成)

表—1 イチゴの各種DNAマーカー選抜結果

マーカー：プライマー数	特異的マーカー数		1:1分離マーカー数	
	とちおとめ	いちご中間母本農2号	とちおとめ	いちご中間母本農2号
RAPD : 1377	97	113	44	60
AFLP : 256	356	475	258	340
SSR : 225	126	151	96	124

表—2 イチゴ連鎖地図の概要

	座上マーカー数	連鎖群数	全長
とちおとめ	386	30	1003.4cM
いちご中間母本農2号	515	29	1441.6cM

表—3 QTL解析による炭疽病耐病性に関連するマーカーの選抜結果

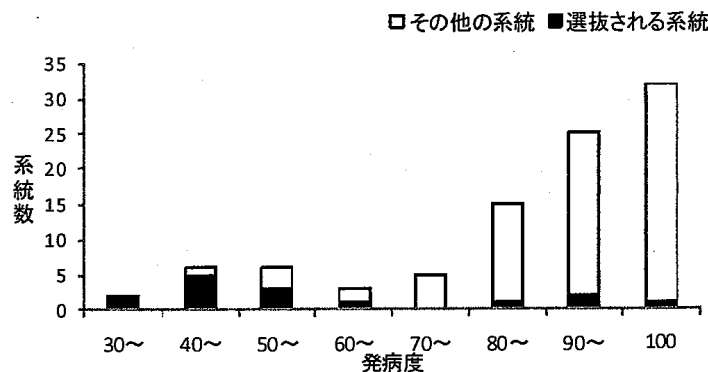
連鎖群	最大LOD値	最大寄与率	近傍マーカー	F ₁ 分離比		欠損値	F ₁ 平均発病度		有意差
				マーカー有:マーカー無	マーカー有:マーカー無				
T18	3.0	12.3%	TR15	47:47	-	89.1	81.1	*	
K13	3.4	12.7%	KA284	42:51	1	89.2	80.0	*	
K24	2.3	9.4%	KA28	48:46	-	89.7	80.7	*	

*:t検定により5%水準で有意差有

表—4 GMM法による炭疽病耐病性に関連するマーカーの選抜結果

No.	選抜されたマーカー組合せ	F ₁ 系統数		F ₁ 平均発病度		有意差
		マーカータイプ適合系統	マーカータイプ不適合系統	マーカータイプ適合系統	マーカータイプ不適合系統	
1	KA311 : ○ KA195 : ○	24	70	69.9	90.3	**
2	KA311 : ○ KA195 : ○ KR55 : ×	15	79	60.1	89.9	**
3	KA311 : ○ KA195 : ○ KA256 : ×	11	83	55.6	89.0	**
4	KA311 : ○ KA59 : ○ KA111 : ○	15	79	59.9	89.9	**
5	KA195 : ○ KA111 : ○ KA332 : ○	12	83	59.8	88.8	**
6	KA195 : ○ KR55 : × TS84 : ×	10	84	54.6	88.7	**
7	KA284 : × TS80 : ○ TA151 : ×	11	83	56.0	89.0	**
8	TS80 : ○ TA151 : × TA175 : ○	12	82	57.0	89.2	**

** : t検定により1%水準で有意差有



図—1 GMM法No. 4のマーカー組合せを用いた選抜系統の発病度分布