

## イチゴ炭疽病耐病性遺伝子の機能解析に用いる 2 倍体野生種系統の選定

高野純一・生井 潔

**摘要:** 2 倍体野生種形質転換系に用いる系統の選定を目的とし、2 倍体野生種について炭疽病耐病性、倍数性および遺伝的類縁関係に関する調査を行った。まず、炭疽病の発病調査に 2 倍体野生種 16 系統を供試し、炭疽病耐病性が低い *Fragaria vesca* の Alexandria, Alba, C3 および、*F. nipponica* のシロバナノヘビイチゴ C の 4 系統を選定した。また、2 倍体野生種とされる 23 系統を供試し、フローサイトメーターによって倍数性を調査したところ、1 系統が 8 倍体で他は 2 倍体と推定された。さらに同じ 23 系統と栽培種 2 品種を供試し、SSR プライマーおよび AFLP プライマーを 10 ペアずつ用いて多型検出を試みたところ、それぞれ 85 種類および 97 種類のマーカーが検出された。それらのマーカーを供試してクラスター分析を行った結果、シロバナノヘビイチゴおよびエゾクサイチゴは、他の 2 倍体野生種系統より栽培種から遺伝的に離れて位置づけられた。そのため、機能解析に供試する候補系統として、遺伝的により近縁である *F. vesca* の Alexandria, Alba および C3 の 3 系統を選定した。

**キーワード:** イチゴ 2 倍体野生種, 遺伝子機能解析, 炭疽病耐病性, 倍数性, 遺伝的類縁関係

## Selection of Diploid Wild Strawberry Lines for Functional Analyses of Resistance Genes to Anthracnose

Junichi TAKANO and Kiyoshi NAMAI

**Summary:** Diploid wild strawberry lines were selected to establish transformation systems for analysis of resistance genes to anthracnose in cultivated strawberries. We investigated the resistance to anthracnose, ploidies, and genetic relationships of the diploid wild strawberry lines. First, 16 diploid lines were tested for anthracnose sensitivity and four lines (Alexandria, Alba, C3 of *Fragaria vesca*, and Shirobananohebiichigo C of *F. nipponica*) were selected because their high sensitivity. Next, the ploidy of 23 putative diploid lines was examined by flow cytometer. The results indicated that 22 lines were diploid and one was octoploid. The same 23 lines and two more cultivars were tested with 10 pairs of SSR and AFLP primers and 85 and 97 markers were developed, respectively. Results of the cluster analysis carried out with these markers revealed that *F. nipponica* and *F. yezoensis* were genetically positioned further away from the cultivated strawberry than other diploid wild strawberry lines. Therefore, Alexandria, Alba, and C3 of *F. vesca* which are closely related to the cultivated strawberry were selected as candidates using gene function analysis in further study.

**Key words:** diploid wild strawberry, gene functional analysis, sensitivity to anthracnose, ploidies, genetic relationship

## I 緒言

栃木県におけるイチゴ育種では、収量や果実形質とともに主要病害である炭疽病や萎黄病に対する耐病性を重要形質とし、耐病性が付与された品種の育成に取り組んでいる。その成果として、平成23年に品種登録申請した栃木 i27 号（商標名：スカイベリー）は、炭疽病および萎黄病に対する耐病性がとちおとめ（石原ら、1996）と比較して向上している。しかし、その耐病性は、炭疽病耐病性品種のいちご中間母本農2号（沖村ら、2004）や萎黄病耐病性品種のアスカウェイブ（峯岸ら、1994）と比較すると十分とは言えない。そのため、更なる高度耐病性を有する優良品種の育成が望まれている。しかし、それには長い時間と多くの労力を必要するため、大幅な育種の効率化を目指し、耐病性を識別するDNAマーカーの開発に取り組んでいる。

萎黄病耐病性は主働遺伝子の関与が認められるため（森ら、2005）、DNAマーカーによる育種の効率化が可能と考えられる。一方、*Glomerella cingulate* によって引き起こされる炭疽病の耐病性は、複数の遺伝子に支配されると推測されており（森、2001）、Quantitative trait locus（QTL）解析では寄与率の低いQTLが複数検出されている（飯村ら、2013）。これらの結果は、炭疽病耐病性育種を効率化するにはDNAマーカーのみでは不十分で、耐病性メカニズムの解明が必要であることを示唆している。そこで栃木農試では、cDNAマイクロアレイを用いて炭疽病耐病性に関連する遺伝子の検索を行っており、選抜された遺伝子の中から耐病性に関連すると推定される遺伝子を見出している（Namaiら、2013）。しかし、それら遺伝子と耐病性との関連を明らかにするためには、遺伝子の機能解析が必要となる。

イチゴ栽培種（*Fragaria × ananassa*）はバラ科（*Rosaceae*）の多年草で、*F. chiloensis* と *F. virginiana* の8倍体（ $2n=8x=56$ ）同士の交雑種と推定されている（織田、2004）。また、*F. × ananassa* のゲノム構成は、部分4倍体説や完全複2倍体説が提唱され、決着は付いていないものの、少なくとも2組の独立した2倍体ゲノムを含有している（國久、2008）。さらに、栽培品種のほとんどが遺伝的に未固定であり、複雑なゲノム構造を有すると予想される。そのため、遺伝子の機能解析を行うためには、変異体の作製・利用は困難と考えられ、過剰発現系（浅尾ら、1994；平島ら、1998）やRNA interference（RNAi：RNA干渉）（Hoffmannら、2006）の利用が考えられる。果実に対するアグロインフィルトレーションによってRNAiを引き起こすHoffmannらの方法は、果実形

質に関する遺伝子の機能解析には効率的で優れた方法と考えられる。しかし、イチゴ炭疽病は葉や葉柄、クラウン部での発病が主となるため、Hoffmannらの方法は適さない。従って、過剰発現系を選択することとなり、そのためには形質転換系の確立が必須となる。

導入した遺伝子を過剰発現によって効率的に機能解析するためには、ゲノム構造が単純な2倍体野生種が望ましい。一方で、病原菌は宿主範囲が限定されており、非病原菌に対しては様々な非宿主抵抗性を示す（一瀬、2006）。そのため、機能解析に用いる2倍体野生種系統が、炭疽病菌に対して感受性であることの確認は必須となる。更に、解析する遺伝子が多くの生物で保存された普遍性のある遺伝子であれば、シロイヌナズナを用いた機能解析が可能であり（de la Fuenteら、2006）、非常に効率的な解析が可能と考えられる。しかし、種や品種特異的な遺伝子の機能を解析する場合、種の異なる植物に形質転換しても機能せず、適正に評価できないリスクを抱えることとなる。そのため、選定する系統は可能な限り栽培種と近縁であることが望ましい。

そこで本研究では、炭疽病耐病性に関連する候補遺伝子を機能解析するための形質転換に用いる解析材料として、炭疽病耐病性の低い2倍体野生種系統を選定することを目的とし、各供試系統の炭疽病耐病性を明らかにした。また、8倍体栽培種と可能な限り遺伝的に近い系統を選定するため、DNAマーカーを用いたクラスター分析により、供試系統の遺伝的類縁関係を明らかにした。さらに得られた結果から、形質転換系を確立するための候補系統を選定したので報告する。

## II 試験方法

### 1. 供試イチゴ品種・系統と試験構成

本研究に用いたイチゴの種名等と供試した試験の対応を第1表に示した。

供試イチゴ系統として、*F. vesca* の16系統、*F. nipponica* の3系統、*F. iinumae*、*F. yezoensis*、*F. nilgerrensis* の各1系統と種名の分からない1系統の計23系統の野生種を用いた。また、8倍体栽培種 *F. × ananassa* のとちおとめを対照とし、他4品種を参考として用いた。

### 2. 炭疽病発病調査

イチゴ炭疽病菌は、2002年に栃木県大田原市でイチゴ品種とちおとめ発病株から分離された *Glomerella cingulate* OTT512 菌株を供試した。

供試系統への炭疽病菌の接種は、2007年および2008

第1表 供試系統の来歴と試験実施項目

種名 <sup>1)</sup> および品種・系統名	導入先	供試苗の種類 <sup>2)</sup>	供試試験 <sup>3)</sup>		
			接種	倍数性	PCR
<i>Fragaria vesca</i>					
Vesca	九州沖縄農研	実生		○	○
UC-5	いちご研究所	ランナー	○	○	○
Mignonette	香川大学	実生	○	○	○
Reugen	香川大学	実生	○	○	○
Alexandria	香川大学	実生	○	○	○
Alba	香川大学	実生	○	○	○
Nippon1	香川大学	実生	○	○	○
C2R	香川大学	実生	○	○	○
C3	香川大学	実生	○	○	○
Super Baron Solemacher	香川大学	実生		○	○
Baron Solemacher	NCGR <sup>4)</sup>	実生	○	○	○
サカタWS	購入(サカタのタネ)	実生	○	○	○
ワイルドストロベリーA	購入(名田植物園)	実生		○	○
ワイルドストロベリーB	購入(カンセキ)	実生		○	○
ミグノネッテ	購入(福花園)	実生	○	○	○
フレスカ	購入(福花園)	実生		○	○
<i>F. nipponica</i>					
シロバナノヘビイチゴA	九州沖縄農研	ランナー	○	○	○
シロバナノヘビイチゴB	東大植物園日光分園	ランナー	○	○	○
シロバナノヘビイチゴC	いちご研究所	ランナー	○	○	○
<i>F. iinumae</i>					
ノウゴウイチゴ	東大植物園日光分園	ランナー		○	○
<i>F. yezoensis</i>					
エゾクサイチゴ	九州沖縄農研	ランナー	○	○	○
<i>F. nilgerrensis</i>					
雲南	いちご研究所	ランナー	○	○	○
不明					
ワイルドイェローワンダー	購入(名田植物園)	実生		○	○
<i>F. × ananassa</i> (8倍体栽培種)					
とちおとめ(対照)		ランナー	○	○	○
女峰(参考)		ランナー	○		
いちご中間母本農2号(参考)		ランナー	○		○
宝交早生(参考)		ランナー	○		
Dover(参考)		ランナー	○		

1) 分譲時または購入時の付帯情報による。

2) 各試験へ供試した苗の種類を示す。

3) 「接種」は炭疽病発病調査, 「倍数性」は倍数性推定調査, 「PCR」は遺伝的類縁関係調査の各試験の略で, ○は各試験に供試した品種・系統を示す。

4) The National Clonal Germplasm Repositoryの略称。

年の2か年実施した。

供試炭疽病菌は, PDA平板培地で25°C, 15日間培養後, 殺菌蒸留水を加えて形成された分生子を回収し, 1.0×10<sup>5</sup>個/mlに調整して接種源とした。各供試系統の苗は, 第1表のとおり実生苗またはランナー苗を用いて10.5cm黒ポリポットで育苗した。ランナー苗は採苗後2~3か月間, 実生苗は播種後4~5か月間育苗し, 接種7日前に展開した本葉3枚を残して下葉を除去した。

炭疽病菌接種は, ガラス温室内で, ペーパークロマトグラフ用噴霧器を用いて1株当たり接種源5mlを噴霧した。接種後, ハウスを15時間密閉して湿度を保ち, 感染を促した。水管理は頭上灌水とし, 試験中に生じた萎凋枯死株は, 鉢間に均一に配置して第2次伝染源とした。

2007年は9月20日に, 2008年は10月10日にそれぞれ実施した。

発病調査は発病指数0:発病なし, 1:斑点型病斑を形成, 2:分生子層または葉柄に黒褐色の陥没病斑を形成, 3:萎凋, 4:枯死の基準で行い, 次の計算式に従って発病度を算出した。なお, 各品種・系統は10株ずつ供試し, 接種5, 12, 19, 26, 33, 40日後に調査した。

$$\text{発病度} = \left[ \sum (\text{発病指数} \times \text{発病指数別株数}) / (4 \times \text{調査株数}) \right] \times 100$$

### 3. 倍数性推定調査

供試系統の倍数性は, フローサイトメーター(partec社製PA)を用いて推定した。供試部位は花弁とし, 開花

第2表 供試SSRプライマー

制限酵素	SSRモチーフ	供試プライマー数
<i>Alu I</i>		20
<i>Hae III</i>	CA	20
<i>Rsa I</i>		20
<hr/>		
<i>Alu I</i>		20
<i>Hae III</i>	GA	20
<i>Rsa I</i>		20
<hr/>		
	計	120

注1. 制限酵素は、濃縮ライブラリー作製時のゲノムDNAを切断した酵素を示す。

2. SSRモチーフは、濃縮ライブラリー作製時のプローブの繰返し配列を示す。

第3表 供試AFLP Selectiveプライマー

プライマー付加配列	
Forward	Reverse
AAG	CGC
	CCG
	CTC
<hr/>	
AAT	CGC
	CCG
<hr/>	
ATA	CCC
	CGG
<hr/>	
ATC	CAG
	CAC
	CCG

注. Forwardプライマーは*Eco R I*アダプター配列の、Reverseプライマーは*Mse I*アダプター配列の3'末端に、各プライマー付加配列が付加されている。



第1図 炭疽病菌接種による葉柄折損

していない系統は葉身を用いた。測定方法は、既報に従った(高野・生井, 2008)。ただし、花卉の測定に使用したDAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)染色液の組成は、100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 85 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5 µg/ml DAPIに変更した。各野生種系統の倍数性は、対照をとちおとめとし、次の式により算出した相対蛍光強度を用いて推定した。ただし、フレスカは系統 Vesca を対照とした。

$$\text{相対蛍光強度} = \text{供試系統蛍光強度} / \text{対照品種蛍光強度}$$

#### 4. 遺伝的類縁関係調査

##### 1) DNA の抽出

供試系統のDNAは、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)で付属のマニュアルに従うか、Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)法(Murray and Thompson, 1980; 島本・佐々木, 1997)により、葉身から抽出した。

##### 2) PCR および増幅産物の検出

Simple Sequence Repeat (SSR) プライマーおよび Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) プライマーを用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) の条件および増幅産物の検出は、飯村ら(2013)の方法に従った。SSRプライマーは、第2表のとおり飯村ら(2013)がイチゴ品種とちおとめから作出した120ペアを供試した。AFLP Selective プライマーは、アダプター配列(Forward; *Eco R I* アダプター: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', Reverse; *Mse I* アダプター: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3')に第3表のプライマー付加配列を3'末端に付加した10ペアを供試した。

##### 3) SSR プライマーの選抜

供試イチゴ2倍体野生種系統のうち、種の異なるUC-5、シロバナノヘビイチゴCおよび雲南の3系統を供試し、

SSRプライマー120ペアで増幅されるSSRマーカを検出した。得られた結果から、全系統の解析に供試するプライマー10ペアを選抜した。

##### 4) クラスタ分析

得られたSSRマーカーおよびAFLPマーカーは、インターネット上の統計解析プログラムBlack-Box(<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.html>)を用い、データの正規化を行わずに群平均法でクラスタ分析し、系統樹を作成した。

## III 結果

### 1. 炭疽病発病調査

炭疽病の発病調査期間中(40日間)のガラス温室内平均気温は、2007年が24.4℃、2008年が26.8℃であった。

2007、2008年の両年とも炭疽病菌接種5日後には、葉柄の陥没病斑によって葉柄折損が認められた(第1図)。発病度の推移を第4表に示した。両年とも供試した系統は、Alexandria, Alba, Nippon1, C3, シロバナノヘビイチゴC, 雲南の6系統と対照および参考の8倍体栽培種5品種であるが、とちおとめを除くと2007年に比べて2008年の発病度が高く推移する傾向を示した。

2007年の接種40日後の発病度を比較すると、対照であるとちおとめ(発病度78)以上の高い発病度を示した系統は、Alexandria(発病度78), C3(発病度88), Alba(発病度100), シロバナノヘビイチゴB(発病度85), シロバナノヘビイチゴC(発病度88)であった。一方、雲南(発病度25.0)およびエゾクサイチゴ(発病度25.0)の発病度は、耐病性品種のいちご中間母本農2号(発病度20), Dover(発病度25)および宝交早生(発病度25)と同程度であった。

第4表 炭疽病菌を接種した各供試系統における発病度の推移

品種・系統名	接種5日後		接種12日後		接種19日後		接種26日後		接種33日後		接種40日後	
	2007年	2008年	2007年	2008年	2007年	2008年	2007年	2008年	2007年	2008年	2007年	2008年
UC-5	0	—	0	—	8	—	25	—	25	—	30	—
Mignonette	20	—	23	—	30	—	30	—	45	—	45	—
Reugen	5	—	18	—	25	—	33	—	33	—	43	—
Alexandria	25	40	25	68	30	98	50	98	60	100	78	100
Alba	45	48	58	70	100	98	100	98	100	100	100	100
Nippon1	15	25	25	60	33	100	43	100	43	100	45	100
C2R	—	40	—	65	—	90	—	95	—	98	—	100
C3	30	33	35	45	58	85	60	95	73	100	88	100
Baron Solemacher	—	30	—	60	—	95	—	98	—	100	—	100
サカタWS	18	—	28	—	35	—	45	—	48	—	63	—
ミグノネッテ	18	—	20	—	28	—	33	—	40	—	43	—
シロバナノヘビイチゴA	8	—	18	—	33	—	35	—	38	—	53	—
シロバナノヘビイチゴB	13	—	25	—	40	—	48	—	58	—	85	—
シロバナノヘビイチゴC	0	25	23	45	28	88	35	100	65	100	88	100
エゾクサイチゴ	13	—	15	—	25	—	25	—	25	—	25	—
雲南	0	18	8	23	10	28	13	35	20	35	25	35
とちおとめ(罹病性)	23	23	25	25	40	25	60	33	73	45	78	50
女峰(罹病性)	15	25	20	35	20	53	25	63	40	70	43	80
農2号(耐病性)	13	20	13	25	15	33	15	30	18	30	20	30
宝交早生(耐病性)	13	23	13	28	18	30	23	30	25	35	25	38
Dover(耐病性)	8	23	8	30	13	30	23	30	23	30	25	30

注1. —は未実施を示す。

2. 農2号はいちご中間母本農2号を示す。

2008年における対照品種とちおとめの発病度は、接種後日数とともに徐々に高まったのに対し、雲南を除いた供試系統では接種19日後までに急激に高まった。接種40日後の発病度を比較すると、対照品種であるとちおとめ(発病度50)以上の高い発病度を示した系統は、Alexandria, Alba, Nippon1, C2R, C3, Baron Solemacher およびシロバナノヘビイチゴCで、発病度はすべて100であった。雲南(発病度35)は2007年と同様に、いちご中間母本農2号, Dover(発病度30)および宝交早生(発病度38)と同程度の発病度であった。

以上の結果から、罹病性の対照品種に比べ2年連続して発病度が同等以上であったAlexandria, Alba, C3およびシロバナノヘビイチゴCの4系統を形質転換系に供試する候補系統とした。

## 2. 倍数性推定調査

倍数性の調査結果を第5表に示した。2倍体であることが確認されているUC-5の相対蛍光強度は、対照品種である8倍体のとちおとめに対して0.29であった。F. vescaとされる16系統の相対蛍光強度は、フレスカを除き0.28~0.32となり、2倍体と推定された。また、日本に自生するF. nipponica, F. iinumae, F. yezoensisは、相対蛍光強度が0.32または0.33とF. vescaの高い値を示す系統と同等であり、2倍体と推定された。F. nilgerrensisである雲南の相対蛍光強度は0.36であり、他の2倍体系統より若干高い値を示した。フレスカはF. vescaとして種子を購入したが、とちおとめを対照として蛍光強度を

第5表 イチゴ供試系統の倍数性

種名および品種・系統名	供試部位	相対蛍光強度	推定倍数性
対照:とちおとめ			
<i>Fragaria vesca</i>			
Vesca	花	0.29	2x
UC-5	葉	0.29	2x
Mignonette	花	0.28	2x
Reugen	花	0.31	2x
Alexandria	花	0.30	2x
Alba	花	0.28	2x
Nippon1	花	0.28	2x
C2R	花	0.31	2x
C3	花	0.32	2x
Super Baron Solemacher	花	0.32	2x
Baron Solemacher	花	0.30	2x
サカタWS	花	0.28	2x
ワイルドストロベリーA	花	0.29	2x
ワイルドストロベリーB	花	0.28	2x
ミグノネッテ	花	0.32	2x
<i>F. nipponica</i>			
シロバナノヘビイチゴA	葉	0.33	2x
シロバナノヘビイチゴB	葉	0.32	2x
シロバナノヘビイチゴC	葉	0.33	2x
<i>F. iinumae</i>			
ノウゴウイチゴ	葉	0.33	2x
<i>F. yezoensis</i>			
エゾクサイチゴ	葉	0.33	2x
<i>F. nilgerrensis</i>			
雲南	葉	0.36	2x
不明			
ワイルドイェローワンダー	花	0.31	2x
対照:系統Vesca			
F. × ananassa	花	3.39	8x
とちおとめ			
不明			
フレスカ	花	3.57	8x

第6表 供試した3系統で増幅が確認されたSSRプライマーのPCR結果

プライマー名	検出された断片数			3系統間の多型数	プライマー名	検出された断片数			3系統間の多型数
	UC-5	シロバナノヘビイチゴ C	雲南			UC-5	シロバナノヘビイチゴ C	雲南	
Alu ICA030103	1	1	2	4	Alu IGA030203	2	1	1	3
Alu ICA030113	2	1	1	4	Alu IGA030216	2	1	1	4
Alu ICA030136	1	2	1	4	Alu IGA030231	1	1	1	2
Alu ICA030147	1	1	1	3	Alu IGA030240	1	2	1	4
Alu ICA030163	1	2	1	4	Hae IIIIGA030110	1	1	2	4
Alu ICA030165	2	1	2	5	Hae IIIIGA030124	2	1	2	5
Alu ICA030211	1	1	1	3	Hae IIIIGA030125	1	1	2	3
Alu ICA030213	1	1	1	3	Hae IIIIGA030126	1	1	1	1
Alu ICA030225	1	1	1	2	Hae IIIIGA030127	2	1	1	4
Alu ICA030259	1	1	1	2	Hae IIIIGA030142	1	1	1	2
Alu ICA030261	1	1	2	3	Hae IIIIGA030152	1	1	1	3
Alu ICA030273	1	1	1	2	Hae IIIIGA030179	2	1	1	4
Hae IIIICA030210	2	1	1	4	Hae IIIIGA030184	2	2	1	3
Hae IIIICA030234	1	2	2	4	Hae IIIIGA030195	1	1	1	2
Hae IIIICA030362	1	1	1	3	Rsa IGA030125	1	2	1	4
Hae IIIICA030378	1	1	1	3	Rsa IGA030137	2	1	1	3
Hae IIIICA030381	1	1	1	2	Rsa IGA030140	1	2	1	4
Hae IIIICA031215	1	1	1	2	Rsa IGA030142	1	2	2	4
Rsa ICA030105	1	1	1	3	Rsa IGA030158	1	1	1	3
Rsa ICA030154	1	1	1	3	Rsa IGA030173	2	2	2	2
Rsa ICA030169	1	1	1	3	Rsa IGA030205	2	1	2	5
Alu IGA030116	1	1	2	4	Rsa IGA030211	2	2	1	5
Alu IGA030127	1	1	1	3	Rsa IGA030253	1	1	1	3
Alu IGA030134	1	2	1	3	Rsa IGA030266	1	1	1	3
Alu IGA030149	1	2	1	4	Rsa IGA030271	1	1	1	3
Alu IGA030177	1	2	1	4	計				167

注. 3系統間での多型数は、異なる系統で同一の分子量と推定された増幅断片を同一断片として計測した。

測定するとピークが1つしか認められず、とちおとめとフレスカのピークが重なっていることが考えられた。そこで、系統 Vesca を対照として再度測定すると、相対蛍光強度は 3.57 となった。系統 Vesca を対照としたとちおとめの相対蛍光強度は 3.39 であることから、フレスカは 8 倍体であると推定された。

### 3. 遺伝的類縁関係調査

#### 1) SSR プライマーの選抜

SSR プライマー120 ペアを用いて、種の異なる 2 倍体野生種 3 系統 (UC-5, シロバナノヘビイチゴ C, 雲南) に対して PCR を行った結果を第 6 表に示した。3 系統全てで増幅が認められたものは 51 ペア (42.5%) であった。また、2 系統で増幅が認められたプライマーは 20 ペア (16.7%)、1 系統で認められたプライマーは 11 ペア (9.2%)、全く増幅が認められなかったものが 38 ペア (31.7%) であった。3 系統全てで増幅が認められた 51 プライマーペアのうち、3 系統から検出された断片が 1 個のプライマーは 1 ペア、2 個の断片が検出されたのは 9 ペア、3 個が 20 ペア、4 個が 17 ペアおよび 5 個が 4 ペア

であった。

以上の結果から、3 系統全てで増幅が認められた SSR プライマー51 ペアのうち、10 ペアを全供試系統の解析に用いた。

#### 2) SSR マーカーおよび AFLP マーカーの検出

SSR プライマー10 ペアを用い、全供試系統およびとちおとめ、いちご中間母本農 2 号のゲノム DNA を供試し、PCR 増幅を行った。結果を第 7 表に示した。2 倍体野生種の 22 系統間で検出された断片は、各プライマーで 2~8 個、供試した全 10 プライマーの合計では 50 個であった。また、とちおとめおよびいちご中間母本農 2 号と 8 倍体と推定されるフレスカを加えた 25 品種・系統間では、各プライマーで検出された断片は 5~13 個、全供試プライマーの合計では 85 個であった。しかし、AluICA030165 を除くプライマーによって *F. vesca* 各系統を PCR 増幅すると、ほとんどの系統が 1 断片しか増幅されなかった。一方で、AluICA030165 は全ての *F. vesca* 系統で 2 個の断片が検出された。また、*F. vesca* の 15 系統間で比較すると、各プライマーで 1~3 個の断片が検出されるのみで、全供試プライマーで増幅される断片でも合計 17 個であ

第7表 イチゴ供試系統におけるSSRマーカーおよびAFLPマーカー検出結果

種名および系統名	各SSRプライマーで検出された断片数										各AFLPプライマーで検出された断片数											
	Alu ICA030113	Alu ICA030136	Alu ICA030147	Alu ICA030163	Alu ICA030165	Alu ICA030211	Alu ICA030213	Alu ICA030225	Alu ICA030259	Alu ICA030261	計	AAG-CGC	AAG-CCG	AAG-CTC	AAT-CGC	AAT-CCG	ATA-CCC	ATA-CGG	ATC-CAG	ATC-CAC	ATC-CCG	計
<i>Fragaria vesca</i>																						
Vesca	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	2	6	3	0	6	1	26
UC-5	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	12	2	3	2	1	2	7	2	0	6	2	27
Mignonette	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	2	6	3	0	5	1	25
Reugen	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	1	6	2	0	6	1	24
Alexandria	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	12	2	3	1	2	2	6	3	0	6	1	26
Alba	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	1	6	2	0	6	1	24
Nippon1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	1	6	2	0	6	1	24
C2R	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	1	6	2	0	6	1	24
C3	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	2	1	2	6	4	0	5	1	26
Super Balon Solemacher	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	2	2	3	6	3	0	6	1	28
Baron Soelmacher	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	1	3	1	2	1	6	2	0	6	1	23
サカタWS	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	2	6	3	0	5	1	25
ワイルドストロベリーA	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	2	6	3	0	6	1	26
ワイルドストロベリーB	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	3	1	2	1	6	4	0	6	1	26
ミグノネッテ	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	1	3	2	2	2	6	3	0	6	1	26
全 <i>F. vesca</i> 系統	2	2	1	3	2	1	2	1	1	2	17	2	3	2	2	3	8	4	0	6	2	32
<i>F. nipponica</i>																						
シロバナノヘビイチゴA	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	13	2	0	0	1	1	5	4	3	7	6	29
シロバナノヘビイチゴB	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	14	2	0	0	2	2	7	4	2	11	5	35
シロバナノヘビイチゴC	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	12	2	0	0	1	2	7	3	2	11	6	34
全 <i>F. nipponica</i> 系統	1	4	1	3	1	1	3	2	1	3	20	2	0	0	3	2	8	6	3	12	7	43
<i>F. iinumae</i>																						
ノウゴウイチゴ	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	11	0	1	2	0	0	6	0	1	7	3	20
<i>F. yezoensis</i>																						
エゾクサイチゴ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	11	2	0	1	0	1	7	6	3	7	5	32
<i>F. nilgerrensis</i>																						
雲南	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	13	1	0	0	0	1	3	2	1	8	2	18
不明																						
ワイルドイエローワンダー	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11	2	0	0	2	2	5	2	0	6	1	20
全2倍体供試系統	5	8	4	6	5	4	5	4	2	7	50	4	4	3	3	4	23	12	4	23	11	91
フレスカ	2	3	2	2	2	2	3	2	2	3	23	0	1	0	1	3	4	2	1	6	9	27
全供試系統	7	9	5	7	5	6	8	4	3	9	63	4	4	3	3	4	23	13	4	23	16	97
とちおとめ	5	4	2	4	2	2	3	3	2	3	30	1	1	1	0	2	2	3	0	3	4	17
いちご中間母本農2号	6	3	2	2	3	3	2	2	2	4	29	0	1	1	0	2	2	3	1	3	7	20
全供試系統および対照品種	12	11	5	9	6	9	10	5	5	13	85	4	4	3	3	4	23	13	4	23	16	97

り、遺伝的な類縁関係を検討するためには多型が少なかった。

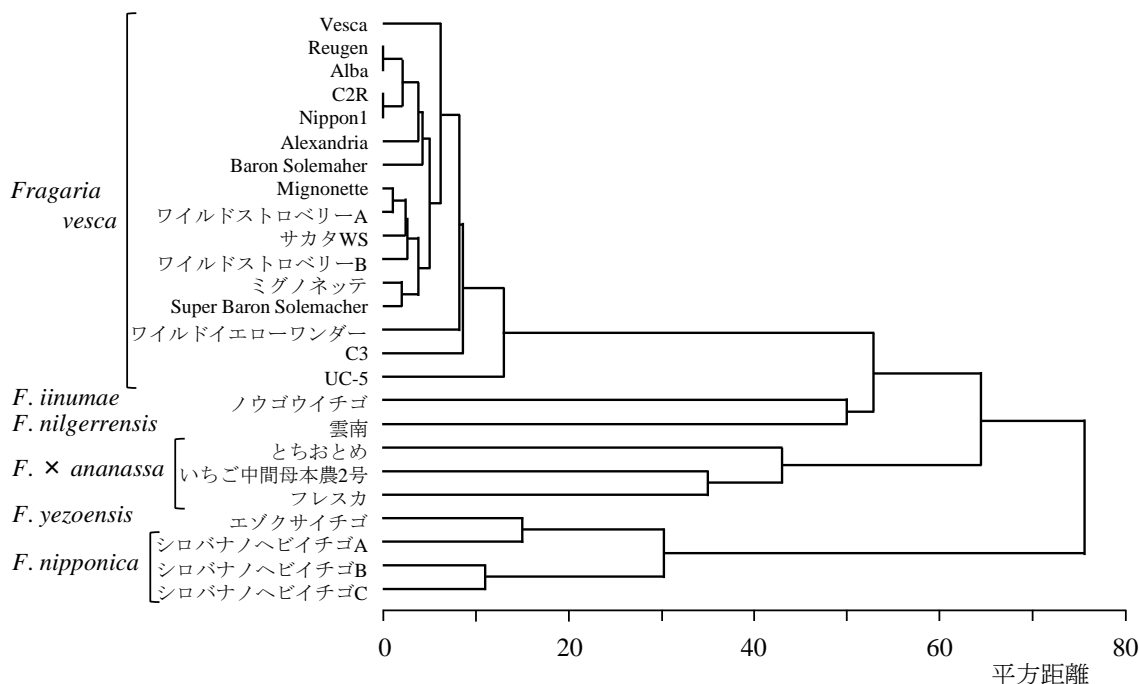
そこで、より種内での多型が検出できると期待される AFLP プライマーを供試した。その結果、*F. vesca* の 15 系統間では各プライマーで 0~8 個の断片が検出され、供試した全 10 プライマーの合計では 32 個が検出された。また、2 倍体野生種の 22 系統間では各プライマーで 3~23 個の断片が検出され、全供試プライマーの合計では 91 個が検出された。さらに、とちおとめおよびいちご中間母本農 2 号とフレスカを加えた 25 品種・系統間では、全供試プライマーの合計で 97 個の断片が検出された。

以上の結果から、SSR プライマーおよび AFLP プライマーで検出された 85 個および 97 個の計 182 個の断片をマーカーとし、クラスター分析に供試することとした。

### 3) クラスター分析

供試系統、とちおとめおよびいちご中間母本農 2 号の計 25 品種・系統から得られた 182 個の DNA マーカーを用い、データの正規化を行わず群平均法によりクラスター分析を行った。

その結果を第 2 図に示した。*F. vesca* は他のクラスターと比較して、よりまとまった 1 つのクラスターを形成した。Reugen と Alba, C2R と Nippon1 の間では多型が認められなかった。また、種名が分からないワイルドイエローワンダーは、*F. vesca* のクラスター内に位置付けられた。シロバナノヘビイチゴ A~C とエゾクサイチゴは同じクラスターに分類され、シロバナノヘビイチゴ A とエゾクサイチゴ、シロバナノヘビイチゴ B と C がそれぞれサブクラスターを形成した。これらの 4 系統は、他の 2 倍体系統より 8 倍体栽培種から離れて位置付けられた。



第2図 SSRマーカーおよびAFLPマーカーの多型情報に基づくイチゴ供試系統間のクラスター分析結果

また、フレスカは8倍体栽培種と同じクラスターを形成した。

これらの結果から、シロバナノヘビイチゴCは*F. vesca*の各系統に比べ8倍体栽培種から遺伝的に離れていると推定されるため、形質転換系確立に供試する候補系統から除外することとした。従って、Alexandria, Alba, C3の3系統を候補系統として選定した。

#### IV 考察

筆者らは、炭疽病耐病性に関連する遺伝子の機能解析を行うことを目指している。そのため、本研究では形質転換系確立に供試する2倍体イチゴ野生種を選定することを目的とした。イチゴ栽培種は8倍体でゲノム構造が複雑であり、解析には不向きであることは既に論じた。一方、2倍体野生種は8倍体と比較して単純なゲノム構造であるだけでなく、そのうちの1種である*F. vesca*はドラフトゲノムシーケンスが完了しており(Shulaevら, 2011)、解析材料としての利便性が高い。更に、効率的な形質転換系の報告もあることから(Oosumiら, 2006)、機能解析を行うための材料として優れていると考えられる。炭疽病耐病性に関連する遺伝子の解析を目的としていることから、炭疽病発病調査を行って、その結果を最重要視した。

発病調査の結果から選定した系統は、Alexandria, Alba, C3, シロイヌナズナCの4系統とした。しかし、2年間

の発病度の推移を見るとAlbaが最も炭疽病耐病性が低く、その点ではAlbaが最も優れた候補系統と考えられた。炭疽病耐病性は、複数の遺伝子に支配されると推定されるため(森, 2001)、形質転換系確立に用いる系統の耐病性は、可能な限り低い方が望ましい。一方、形質転換効率は品種間差が大きいことから(Oosumiら, 2006)、最終的には炭疽病の耐病性だけでなく、形質転換効率も考慮した系統の選定を行うことが必要となる。

2年間の炭疽病の発病調査を比較すると、とちおとめを除いて2008年がより激しく発病している。その理由の1つとして、試験期間中のハウス内平均気温が2007年は24.4℃、2008年は26.8℃と2008年の方が2.4℃高かったことがあげられる。25℃では枯死しないが、28℃では25%の株が枯死したという栽培種の報告(岡山, 1989)から、2倍体野生種でも同様の理由で2008年の発病度が上昇した可能性が示唆される。

本研究で供試したSSRプライマーは、*F. vesca*の15系統間では得られる多型が少なく、1つのマーカー当たり1~3個で合計20個の断片が検出されたのみである。多型が少なかった理由として、とちおとめといちご中間母本農2号間での多型で選抜したマーカーであることがあげられる。2倍体野生種で作製されたSSRマーカー(Sargentら, 2006)であれば、もっと多型が得られることが予想される。また、*F. nipponica*は3系統のみの供試であったが、合計20個の断片が検出されていることから、今回供試した*F. vesca*の遺伝的多様性の低さが示唆される。同様の傾向はAFLPプラ



イマーでも認められ、*F. vesca*から増幅された断片の合計が32個であったのに対して、*F. nipponica*では43個であった。さらに、2倍体全22系統でのSSRプライマーによって増幅された断片は50個であったが、8倍体の3品種・系統を加えるだけで35個の断片が増加している。この結果は、*F. × ananassa*の複雑なゲノム構造を裏付ける間接的な証拠と言える。

また、*F. vesca*の各系統をSSRプライマーでPCR増幅すると、*AluICA030165*を除くプライマーによって増幅される断片が、ほとんど多型を示さないことが明らかとなった。一方、*AluICA030165*は全ての*F. vesca*系統で2種類の断片が検出されたが、本マーカーのみが全ての系統でヘテロ接合型であるとは考え難い。そのため、*AluICA030165*プライマーで増幅される領域は重複しており、その重複した領域のそれぞれがホモ接合型になっている可能性が示唆される。これらの結果から、今回供試した*F. vesca*の各系統はホモ化が進んでいると推察され、解析材料としての利点と考えられる。

DNAマーカーを用いたクラスター分析の結果は、シロバナノヘビイチゴとエゾクサイチゴが、他の2倍体野生種と比較して、8倍体栽培種と遺伝的距離が離れていることを示している。Potterら(2000)は、*F. vesca*および*F. nubicola*が8倍体を含む倍数性*Fragaria*種と近縁であり、*F. iinumae*も8倍体形成に関与している可能性を示唆しており、本研究の結果と矛盾しない。そのため、炭疽病発病調査結果から選定した4系統のうちシロバナノヘビイチゴCを除外し、Alexandria, Alba, C3の3系統を候補系統として選定した。

供試した系統の種名は、譲渡先や購入先から付帯された情報にもとづいて表記したが、倍数性の確認やDNAマーカーによるクラスター分析によって、変更する必要性が示唆された。フレスカは*F. vesca*として購入したが、倍数性調査では8倍体であると推定された。また、DNAマーカーによるクラスター分析では、*F. × ananassa*のクラスターに位置付けられた。これらの結果から、フレスカは種子繁殖性の*F. × ananassa*である可能性が示唆された。

本研究では、炭疽病耐病性に関連するイチゴ栽培種遺伝子の機能解析を行うため、その解析材料として2倍体野生種から3系統を選定した。今後、それらの系統を用いて形質転換系の確立に取り組む予定であるが、多数の遺伝子の機能を解析するためには、効率的な実験系が必須となる。そのため、最終的にどの系統を選定するか、選定した系統の最適な再分化条件や形質転換条件を確立することが、今後の課題である。

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、貴重な遺伝資源を分譲いただいた香川大学農学部柳智博教授、九州沖縄農業研究センター沖村誠氏に厚く御礼申し上げる。イチゴ炭疽病に関して御助言・御指導いただいた法政大学生命科学部(元栃木県農業試験場研究統括監)石川成寿教授に心より感謝申し上げます。また、栃木県農業試験場研究開発部生物学研究室の皆様には、貴重なご助言、ご協力をいただいた。ここに記して心から感謝の意を表する。

## 引用文献

- 浅尾浩史・新井滋・佐藤隆徳・平井正志・日比忠明(1994) *Agrobacterium tumefaciens*によるイチゴ形質転換体の作出. 植物組織培養 11: 19-25.
- de la Fuente, J.I., Amaya, I., Castillejo, C., Sánchez-Sevilla, J.F., Quesada, M.A., Botella, M.A. and Valpuesta, V. (2006) The strawberry gene FaGAST affects plant growth through inhibition of cell elongation. *J Exp Bot*: 2401-2411.
- 平島敬太・古賀正明・中原隆夫(1998) ヤマイモキチナーゼ遺伝子導入によるイチゴ形質転換 第1報・とよのかの形質転換カルス及びシュートの効率的獲得法. 福岡農総試研報 17: 73-77.
- Hoffmann, T., Kalinowski, G. and Schwab, W. (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J* 48: 818-826.
- 一瀬勇規(2006) 植物の非宿主抵抗性. 化学と生物 44: 556-562.
- 飯村一成・田崎公久・中澤佳子・天谷正行(2013) QTL解析によるイチゴ炭疽病耐病性遺伝子領域の検索. 育種学研究 15: 90-97.
- 石原良行・高野邦治・植木正明・栃木博美(1996) イチゴ新品種「とちおとめ」の育成. 栃木農試研報 44: 109-123.
- 國久美由紀(2008) 栽培イチゴにおけるゲノム特異的DNAマーカーの開発と品種識別技術への応用. 筑波大学大学院生命環境科学研究科学学位論文.
- 峯岸正好・内藤潔・前川寛之(1994) イチゴ新品種「アスカウェイブ」の育成ならびに栽培特性. 奈良農試研報 25: 9-20.
- 森利樹(2001) イチゴにおける炭そ病抵抗性の遺伝と選抜反応. 三重農技研報 28: 15-21.
- Mori, T., Kitamura, H. and Kuroda, K. (2005) Varietal

- differences in fusarium wilt-resistance in strawberry cultivars and the segregation of this trait in F1 hybrids. J. Japan. Soc. Hort. Sci 74: 57-59.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8: 4321-4325.
- Namai, K., Matsushima, Y., Morishima, M., Amagai, M., and Natsuaki, T. (2013) Resistance to anthracnose is decreased by tissue culture but increased with longer acclimation in the resistant strawberry cultivar. J Gen Plant Pathol 79: 402-411.
- 織田弥三郎 (2004) 栽培イチゴの起源と来歴. 農業技術体系 野菜編3イチゴ: 基3-10の9.
- 岡山健夫 (1989) 奈良県におけるイチゴ炭そ病の発生実態と薬剤防除について. 奈良農試研報 20: 79-86.
- 沖村誠・野口裕司・望月龍也・曾根一純・北谷恵美 (2004) 炭疽病抵抗性の‘いちご中間母本農2号’の育成とその特性. 園学研 3:257-260.
- Oosumi, T., Gruszewski, H.A., Blischak, L.A., Baxter, A.J., Wadl, P.A., Shuman, J.L., Veilleux, R.E. and Shulaev, V. (2006) High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. Planta: 1219-1230.
- Potter, D., Luby, J.J. and Harrison, R.E. (2000) Phylogenetic relationships among species of *Fragaria* (Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. Syst Bot 25: 337-348
- Sargent, D.J., Clarke, J., Simpson, D.W., Tobutt, K.R., Arús, P., Monfort, A., Vilanova, S., Denoyes-Rothan, B., Rousseau, M., Folta, K.M., Bassil, N.V. and Battey, N.H. (2006) An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. Theor Appl Genet 112: 1349-1359.
- 島本功・佐々木卓治 (1997) 新版植物のPCR実験プロトコール. 秀潤社: pp. 34-37.
- Shulaev, V., Sargent, D.J., Crowhurst, R.N., Mockler, T.C., Folkerts, O., Delcher, A.L., Jaiswal, P., Mockaitis, K., Liston, A., Mane, S.P., Burns, P., Davis, T.M., Slovin, J.P., Bassil, N., Hellens, R.P., Evans, C., Harkins, T., Kodira, C., Desany, B., Crasta, O.R., Jensen, R.V., Allan, A.C., Michael, T.P., Setubal, J.C., Celton, J.M., Rees, D.J., Williams, K.P., Holt, S.H., Ruiz Rojas, J.J., Chatterjee, M., Liu, B., Silva, H., Meisel, L., Adato, A., Filichkin, S.A., Troggo, M., Viola, R., Ashman, T.L., Wang, H., Dharmawardhana, P., Elser, J., Raja, R., Priest, H.D., Bryant, D.W. Jr, Fox, S.E., Givan, S.A., Wilhelm, L.J., Naithani, S., Christoffels, A., Salama, D.Y., Carter, J., Lopez Girona, E., Zdepski, A., Wang, W., Kerstetter, R.A., Schwab, W., Korban, S.S., Davik, J., Monfort, A., Denoyes-Rothan, B., Arus, P., Mittler, R., Flinn, B., Aharoni, A., Bennetzen, J.L., Salzberg, S.L., Dickerman, A.W., Velasco, R., Borodovsky, M., Veilleux, R.E. and Folta, K.M. (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nat Genet 43: 109-116.
- 高野純一・生井 潔 (2008) イチゴ品種「とちおとめ」のカルス誘導および再分化条件. 栃木農試研報 63:9-16.