

# マイクロアレイ法を用いたイチゴ萎黄病耐病性遺伝子の探索

## 1. 試験のねらい

イチゴ萎黄病耐病性品種の開発に有用な遺伝子情報を得る目的で、イチゴ遺伝子の集積を図るとともに、マイクロアレイ法を用いて萎黄病菌接種時に特異的に発現が変化する遺伝子を検索する。

## 2. 試験方法

### (1) イチゴ遺伝子の集積とマイクロアレイの作製

アスカウェイブで萎黄病菌接種時にのみ発現する遺伝子をサブトラクション法により cDNA ライブラリー化した。とちおとめ各組織（葉、花、果実、根など）由来の cDNA クローンとともにアレイスポッターを用いてスライドガラス上にスポットし、cDNA マイクロアレイを作製した。

### (2) イチゴ萎黄病耐病性遺伝子の探索

アスカウェイブ（萎黄病耐病性）およびとちおとめ（萎黄病罹病性）の培養苗を供試材料とし、順化後、 $10^5$  bud cells/ml 萎黄病菌液に浸根接種した。4、8、24 時間後に根から RNA を抽出し、無接種を対照としてマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。選抜した遺伝子についてリアルタイム PCR 法により詳細な発現解析を行った。

## 3. 試験結果および考察

(1) 萎黄病菌応答性サブトラクションライブラリーから cDNA クローン 2,688 個を得た。とちおとめ各組織からのクローン 9,495 個、いちご中間母本農 2 号葉由来からのクローン 972 個と合わせて計 13,155 個をスライドガラス上にスポットしたイチゴ cDNA マイクロアレイを作製した（表-1）。

(2) いちご苗に萎黄病菌を接種し、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行った。各接種時間におけるアスカウェイブととちおとめの発現変動クローンを調査し（図-1）、全変動クローン中どちらかの品種のみで増加または減少がみられた 42 個を選抜した。

(3) 選抜した cDNA クローンの遺伝子をリアルタイム PCR 法により発現解析した。その結果、萎黄病菌接種時にアスカウェイブでとちおとめより早く、大きく増加する遺伝子が 3 つ、減少する遺伝子が 1 つ得られた（図-2、一部抜粋）。

(4) これら遺伝子の部分塩基配列を NCBI のタンパク質データベースで相同性検索したところ、真菌の細胞膜形成に関与する酵素、病害抵抗性への関与が示唆されている WRKY 転写因子、機能不明の転写因子、脂質代謝に関与する酵素、が高い相同性を示した（データ省略）。

## 4. 成果の要約

アスカウェイブから萎黄病菌接種時に発現が変動する遺伝子のライブラリーを作成した。マイクロアレイ法により選抜したクローンについて、リアルタイム PCR 法で遺伝子の発現解析を行い、萎黄病耐病性遺伝子候補が 4 つ得られた。

（担当者 生物工学研究室 和氣貴光、松島雄大\*、天谷正行\*\*）

\*下都賀農業振興事務所、\*\*経営技術課

表-1 マイクロアレイに用いたクローンの由来とクローン数

品種	アスカウェイブ			とちおとめ				いちご中間	全クローン数	
	cDNAの由来	萎黄病菌 接種 根由来	葉由来	花由来	成熟 果実 由来	未成熟 果実 由来	炭疽病菌 接種 葉由来	母本農2号 葉由来		
クローン数	2,688		765	726	2,319	3,391	1,401	893	972	13,155

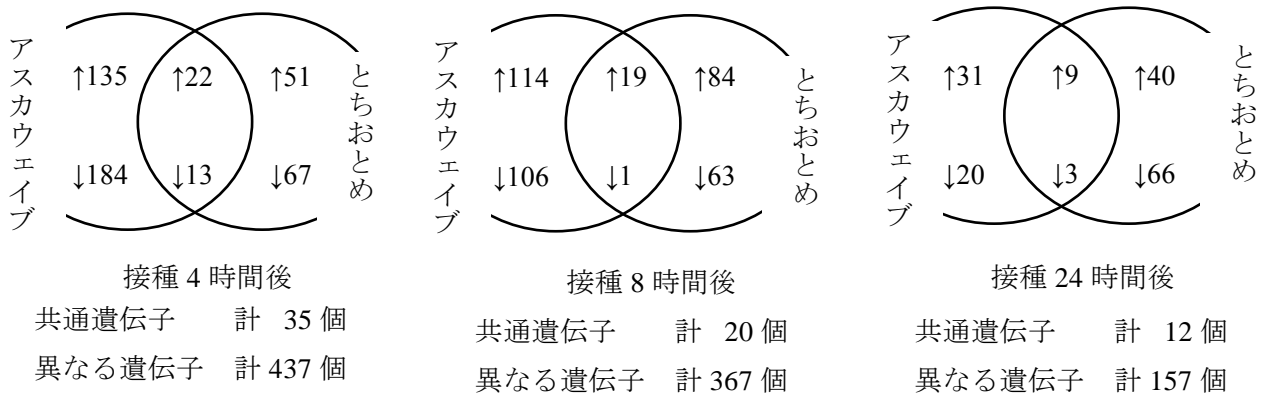


図-1 イチゴ萎黄病菌接種後における発現遺伝子の品種間関係

上矢印(↑)は無接種と比較して発現量が2倍以上に増加、下矢印(↓)は1/2以下に減少したことを示す。共通遺伝子は2品種に共通して変動した遺伝子、異なる遺伝子は片方の品種だけで変動した遺伝子を示す。

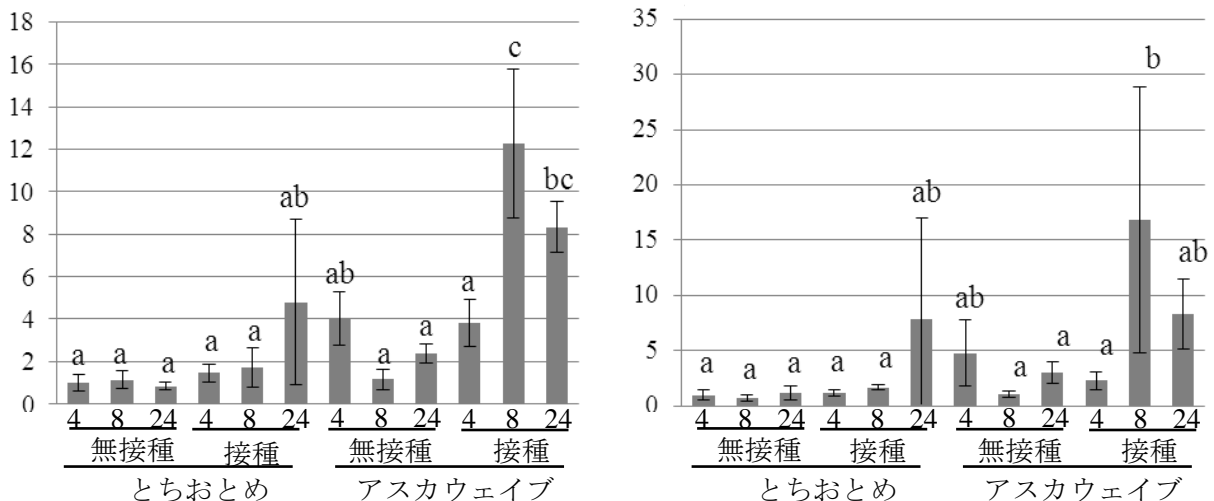


図-2 リアルタイム PCR による再検定で、品種間で発現量に差が認められた遺伝子 (一部抜粋)

縦軸はとちおとめ無接種区4時間の発現量を1とした時の各区の相対発現量を、横軸は接種後時間を示す。同一文字は5%水準で有意差がないことを示す。