

平成25年度豆類振興事業助成金（試験研究）の成果概要

1 課題名 DNA マーカー選抜による小豆の土壌病害複合抵抗性系統の選抜強化

2 研究実施者

研究代表者 地方独立行政法人北海道立総合研究機構 農業研究本部
十勝農業試験場 研究部豆類グループ

研究主任 田澤 暁子

分担 同上 上川農業試験場 研究部地域技術グループ

同上 中央農業試験場 作物開発部生物学グループ

国立大学法人 北海道大学大学院農学研究院 作物生産生物学分野



3 実施期間 平成23年度～平成25年度（3年間）

4 試験研究の成果概要

（1）試験研究の目的

小豆の育種においては、育種目標の高度化と多様化により、重要病害であるアズキ落葉病（以下、落葉病）、アズキ萎凋病（以下、萎凋病）、アズキ茎疫病（以下、茎疫病）の抵抗性育種においてもさらなる効率化が求められている。落葉病は DNA マーカーによる効率的で精度の高い選抜が実現され、萎凋病についても同時選抜が可能だったが、新たな抵抗性母本の利用により、新しい萎凋病抵抗性の選抜マーカーが必要となった。また、レース分化が著しい茎疫病については圃場抵抗性を持つ品種の育成を目指しているが、DNA マーカーの開発には、機作や遺伝様式の解明が必要である。

本研究では、小豆育種の更なる効率化のため、落葉病抵抗性DNAマーカーによる有望系統の選抜、萎凋病抵抗性の新たなマーカー開発を行い、茎疫病圃場抵抗性に関する遺伝様式と機作を明らかにする。

（2）実施計画、手法

1) DNA マーカーによる落葉病抵抗性系統の選抜（十勝農試、中央農試）

〔ねらい〕 落葉病抵抗性のレース 1,3 または 1,2 に抵抗性を持つ有望系統を選抜する。

〔試験項目等〕 年間数百点の中期世代系統について、落葉病抵抗性遺伝子 *Pga1*（レース 1,3 抵抗性）と *Pga2*（レース 1,2 抵抗性）のマーカー選抜を行う。

2) 新たな萎凋病抵抗性 DNA マーカーの開発（中央農試、十勝農試）

〔ねらい〕 落葉病抵抗性 *Pga1* とは独立した新たな萎凋病抵抗性に関する DNA マーカーを開発する。

〔試験項目等〕 十勝農試育成の「斑小粒系-1」（感受性）×「Acc259」（抵抗性）の F3 世代系統を材料に、中央農試において萎凋病抵抗性の DNA マーカーを開発する。また、既存の育成系統等を用いてマーカーの有効性を確認する。

3) 茎疫病圃場抵抗性の遺伝解析と機作解明（上川農試、北海道大学、十勝農試）

〔ねらい〕 マーカー開発に必要な遺伝解析と解析材料養成、圃場抵抗性有効利用のための機作

解明を行う。

〔試験項目等〕

①「きたのおとめ」（圃場抵抗性“弱”）×「十系 1077 号」（同“強”、「Acc1398」由来）の交配後代を用いて、茎疫病圃場抵抗性検定を行い、遺伝様式を解明する。

②北大において、「Acc1398」由来の茎疫病圃場抵抗性を持つ系統を用いて、茎疫病菌接種による kievitone（小豆のファイトアレキシン）の蓄積量、また、kievitone の生合成に関わる酵素遺伝子の転写量を上川農試の検定圃場における茎疫病発病度と比較し、圃場抵抗性の機作に関わる物質や遺伝子を明らかにする。

（3）成果の概要

1) DNA マーカーによる落葉病抵抗性系統の選抜

3 年間で *Pga1* についてのべ 18 組み合わせ 1,360 系統、*Pga2* についてのべ 34 組み合わせ 2,358 系統を DNA マーカー検定に供試し、遺伝子型による選抜を行った。また、新たに地方番号を付与した系統「十育 160 号」「十育 161 号」「十育 162 号」「十育 163 号」について、夏期圃場から葉のサンプリングを行い、*Pga1* を保持していることを確認した（データ省略）。

2) 新たな萎凋病抵抗性 DNA マーカーの開発

F2 および F3 を解析材料にし、遺伝解析を行い、「Acc259」由来の新たな萎凋病抵抗性が優性の単一遺伝子支配であることを推定した。また、アズキの SSR プライマー 186 点を用いて解析した F3 系統の多型を調査したところ、萎凋病抵抗性遺伝子は連鎖群 1 に座乗していることが明らかとなった。

抵抗性ホモ型の F3 系統 8 個体と感受性ホモ型の F3 系統 8 個体のゲノム DNA をそれぞれ等量混合してバルクを作成し、AFLP 解析を行った結果、供試した 1,024 点の AFLP マーカーから萎凋病抵抗性バルク、あるいは感受性バルクに特異的な AFLP マーカー 5 点を選抜した。萎凋病抵抗性バルクに特異的な AFLP 断片およびその周辺配列を利用して萎凋病抵抗性と連鎖した共優性マーカーを開発した。育成系統、遺伝資源を用いて開発したマーカー遺伝子型と幼苗接種による表現型を比較したところ、「Acc259」を母本とする系統では一致したが、「Acc812」を母本とする系統では一致しない場合があり、さらなる高精度化が必要であった（表 1）。

3) 茎疫病圃場抵抗性の遺伝解析と機作解明

①上川農試内の検定圃場において F1、F2、F3、F4 世代の抵抗性評価を行った。F1 世代個体の発病指数は概ね抵抗性親と感受性親の中間に分布したことから、優性または劣性の単一遺伝子支配ではなく、複数の遺伝子が関与していると考えられた（図 1）。

F3 世代と F4 世代について、系統の発病程度により“強”“やや強”“中間”“やや弱”“弱”に区分した結果、抵抗性が 2 つの同義遺伝子支配と仮定した場合の分離比に類似した（図 2）。観測値は期待値と比較して発病程度が高い系統の頻度が高かったが、これは検定圃場において茎疫病ではなく湿害による生理的な枯死が発生しており、茎疫病による枯死と区別できなかったことによると考えられた。

②「Acc1398」（茎疫病圃場抵抗性“強”）、「エリモショウズ」および「しゅまり」（いずれも同“弱”）の胚軸における茎疫病菌レース 4 接種後 12 時間の kievitone 蓄積量は、「Acc1398」において他の 2 品種と比較して有意に高かった。しかし、「エリモショウズ×Acc1398」交配後代系統においては、kievitone 蓄積量が多く発病度が低い系統はあるものの、全体としては発

病度と蓄積量との相関は認められなかった (図3)。

前課題において、kievitone は小豆に茎疫病菌を接種した際に産生され、茎疫病菌の被のう胞子発芽の抑制作用を持つ小豆のファイトアレキシンであり、その蓄積量が茎疫病抵抗性の指標となることが示されている。ただ、kievitone の蓄積量測定に用いる HPLC に必要な煩雑な前処理は、多数のサンプルを用いて経時的な量的変動を比較計測する際には障害となる。本研究では、kievitone の直接計測に代わり、その生合成に関わる酵素遺伝子群 (*PAL*, *C4H*, *IFS*) について、リアルタイム PCR により発現量の比較を行うこととした。

接種後6時間において遺伝子転写量を接種前と比較したところ、*PAL*, *C4H*, *IFS* のいずれも品種間に顕著な差はなく、また、転写量比と圃場抵抗性との関連は認められなかった (データ省略)。接種後24時間では、感受性品種の転写量は接種前と同等か接種前に比べ低下したが、「Acc1398」の *PAL* および *IFS* 転写量比は感受性品種と比較して有意に高かった。「エリモシヨウズ×Acc1398」交配後代系統については、圃場抵抗性との相関は認められなかった (図4、5)。*C4H* 転写量比は品種、系統間で明確な差は認められなかった。

以上のことから、「Acc1398」において *PAL* および *IFS* の発現を伴う kievitone 生合成能力が茎疫病圃場抵抗性の機作に関わる可能性は高いものの、そのみで圃場での発病差のすべてを説明出来ないことが示された。

表1 開発した萎凋病抵抗性 DNA マーカーの有効性(中央農試)

品種系統名	落葉病抵抗性		指数 ^{注1)}		開発したDNAマーカーの遺伝子型 ^{注2)}
	母本	gene			
十系1065号			0.70	R	Acc259型
十系1066号			3.00	S	斑小粒系1型
十系1067号			3.00	S	斑小粒系1型
十系1071号			0.13	R	Acc259型
十系1072号	Acc259	<i>Pga2</i>	2.60	S	斑小粒系1型
十系1004号			1.10	S	斑小粒系1型
十系1054号			2.60	S	斑小粒系1型
十系1046号			1.60	S	斑小粒系1型
十系927号			1.80	S	斑小粒系1型
十系1126号			0.87	R	斑小粒系1型
十系1127号	Acc812	<i>Pga2</i>	0.53	R	斑小粒系1型
十系972号			1.60	S	斑小粒系1型
十系974号			0.20	R	斑小粒系1型
Acc259	-		0.00	R	Acc259型
Acc812	-	<i>Pga2</i>	0.00	R	Acc259型
赤豆	-		0.00	R	Acc259型
とよみ大納言	-		0.00	R	Acc259型
きたあすか	-	<i>Pga1</i>	0.00	R	Acc259型
しゅまり	-		0.00	R	斑小粒系1型
エリモシヨウズ			2.80	S	斑小粒系1型
斑小粒系1			3.00	S	斑小粒系1型

注1) 各系統15個体 (5個体×3ポット) 供試、指数0 (健全) ~3 (枯死)、R (抵抗性) : 指数平均<1、S (感受性) : 指数平均≥1

注2) マーカーの遺伝子型はAcc259型が抵抗性、斑小粒系1型が感受性

網掛けはマーカーの遺伝子型と萎凋病抵抗性が一致しなかったもの

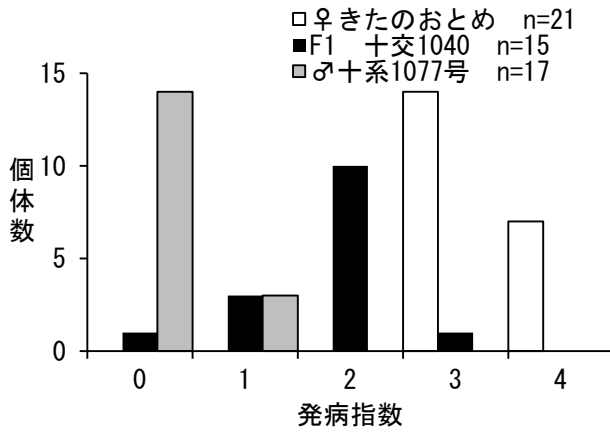


図1 F1世代個体の発病指数の分布 (H24年)

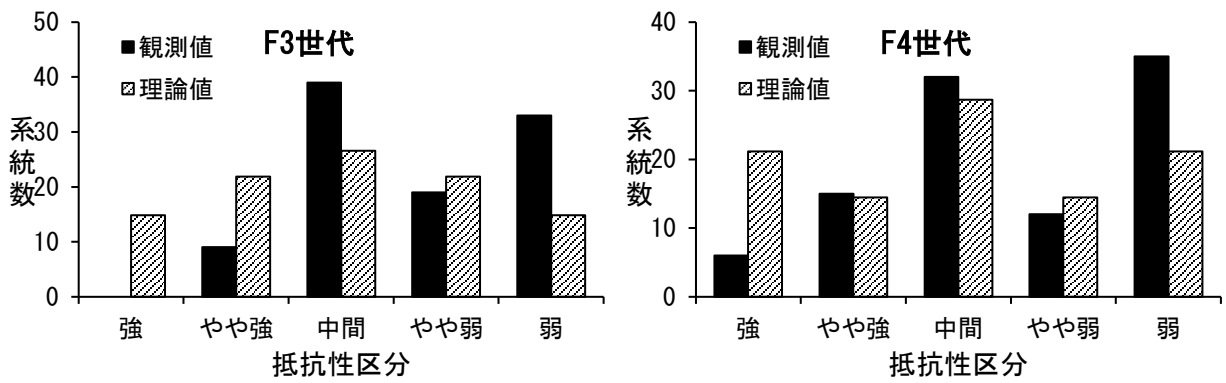


図2 F3世代 (H24年) および F4世代 (H25年) 系統の観測値と理論値の分布

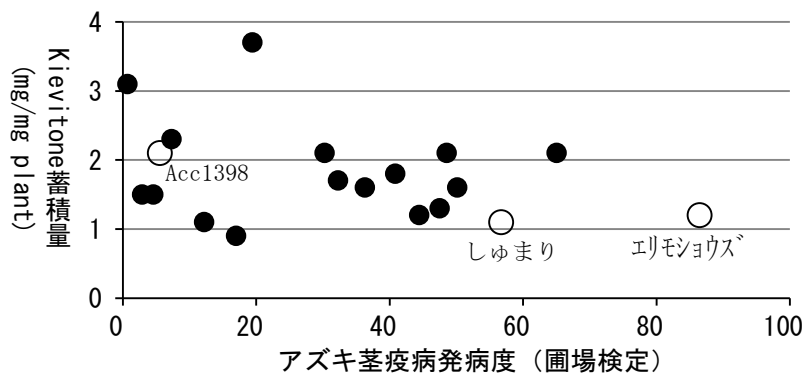


図3 圃場抵抗性と Kievitone 蓄積量 (接種 12 時間後)

(● : エリモショウス×Acc1398 の交配後代系統、○ : 比較品種 以下の図同じ)

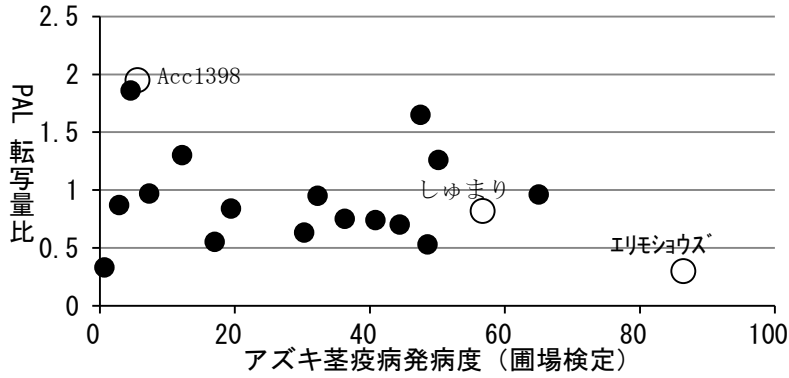


図4 圃場抵抗性と PAL 転写量比 (接種 24 時間後転写量/接種前転写量)

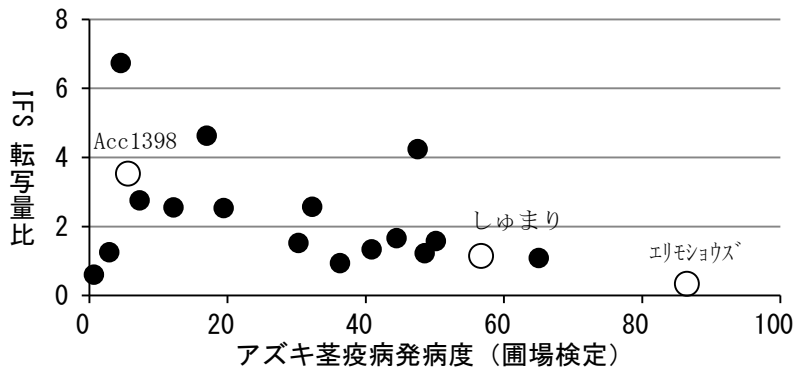


図5 圃場抵抗性と IFS 転写量比 (接種 24 時間後転写量/接種前転写量)

(4) 今後の課題

新規課題「アズキ茎疫病圃場抵抗性のマーカー開発と MAS による小豆重要土壌病害抵抗性選抜の効率化」の中で、本研究で開発した萎凋病抵抗性の DNA マーカーの高精度化と、本研究で育成した材料と得られた情報を基にした茎疫病圃場抵抗性 DNA マーカーの開発に取り組み、複数の重要病害抵抗性の同時選抜体制確立を目指す。

(5) 成果の波及効果

本試験における成果は、小豆の重要土壌病害に複合抵抗性を持つ新品種の育成に活用する。同成果を活用して育成される抵抗性の新品種は、北海道内で広く栽培され、北海道産小豆の安定生産・供給に貢献する。

(6) 論文、特許等

なし