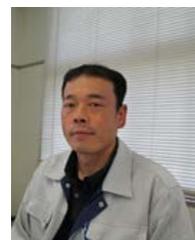


平成28年度終了 豆類振興事業助成金（試験研究）の成果概要

1 課題名 アズキ茎疫病圃場抵抗性のマーカー開発と DNA マーカー選抜による小豆重要土壌病害抵抗性選抜の効率化

2 研究実施者

研究代表者（地独）北海道立総合研究機構 農業研究本部 中央農業試験場 作物開発部 生物学グループ 主査 小倉玲奈



分担 同上 上川農業試験場 研究部 地域技術グループ
十勝農業試験場 研究部 豆類グループ

3 実施期間 平成26年度～平成28年度（3年間）

4 試験研究の成果概要

（1）試験研究の目的

道総研では、落葉病抵抗性高精度選抜マーカーを開発し、効率的な品種開発に欠かせない技術として活用している。また、萎凋病抵抗性の DNA マーカーは現在開発中で、育種で活用するため幅広い遺伝資源に対して利用可能なマーカーとして改良をすすめている。しかし、アズキ茎疫病圃場抵抗性の選抜・評価は、DNA マーカーが開発されていないことから圃場試験が不可欠となっており、試験精度の維持や圃場管理に労力を要し、供試点数も制約されることから、より効率的な選抜を行うためには DNA マーカーの開発が必要不可欠である。

本研究では、茎疫病圃場抵抗性を選抜できる DNA マーカーを開発する。また、落葉病抵抗性および萎凋病抵抗性 DNA マーカーを利用することにより、小豆の重要土壌病害複合抵抗性選抜を効率化する。

（2）実施計画、手法

1) 茎疫病圃場抵抗性を選抜できる DNA マーカーの開発

検定圃場での茎疫病圃場抵抗性評価に基づき、SSR マーカーにより各系統の遺伝子型を調査し、茎疫病圃場抵抗性に関与する領域を特定する。また、抵抗性領域内の塩基配列を解読し、茎疫病圃場抵抗性に関する DNA マーカーを開発する。

2) 新たな萎凋病抵抗性 DNA マーカーの有効性検証

次世代シーケンサーを用いて萎凋病抵抗性である「Acc259」と同感受性である「斑小粒系1」の抵抗性遺伝子領域の塩基配列を解読し、その情報を基に DNA マーカーを設計し、有効性を検証する。

3) DNA マーカーを利用した複合抵抗性系統の選抜

十勝農試育成の中期世代系統について、落葉病抵抗性（落葉病菌レース1およびレース2抵抗性）および萎凋病抵抗性について DNA マーカー検定による選抜を行う。

（3）成果の概要

1) 茎疫病圃場抵抗性を選抜できる DNA マーカーの開発

第8染色体（近傍マーカー：CEDG151）および第9染色体上（近傍マーカー：CEDG166）に圃場抵抗性“強”である「Acc1398」由来の抵抗性に関与する QTL が検出された。アズキの

ゲノム情報 (Vigna Genome Server : <http://viggs.dna.affrc.go.jp/>) を利用して検出された QTL 領域について SSR マーカーのデータベース上での座乗位置を推定し、抵抗性領域に位置する遺伝子情報からプライマーを設計し、共優性の DNA マーカー (Vi08G3193 および Az93610) を作成した。茎疫病圃場抵抗性に関して無選抜の 2 組合せを用い、検定圃場において圃場抵抗性を評価したところ、2 つのマーカー遺伝子型が Acc1398 型である系統は非 Acc1398 型である系統と比較して明らかに発病度が低かった (表 1)。また、Vi08G3193 のマーカー遺伝子型がそれぞれ Acc1398 型、非 Acc1398 型で固定した系統を選抜し、検定圃場において圃場抵抗性を評価したところ、マーカー遺伝子型が Acc1398 型である系統は達観による発病指数が明らかに低く、選抜マーカーとして活用できる可能性が示され (図 1)、今後、この DNA マーカーの有効性についてさらなる検証を行う予定である。

表 1. 抵抗性領域を保持した系統の発病度 (平成28年)

組合せ・品種・系統	マーカーの遺伝子型 ^{注1)}		系統数	発病度	標準偏差	p値 (t検定) ^{注2)}
	第8染色体 Vi08G3193	第9染色体 Az93610				
	十交1107 (十系1027号×十系1077号) F ₃ 世代 50系統	A				
	A	B	9	7.5	3.5	0.0003
	B	A	7	12.3	4.2	0.0299
	B	B	5	19.3	4.5	—
十交1108 (十系1031号×十系1077号) F ₃ 世代 38系統	A	A	7	7.9	2.2	0.0000
	A	B	8	13.0	5.2	0.0000
	B	A	3	23.7	6.5	0.0337
	B	B	4	36.1	2.8	—
基準品種 (弱) エリモショウズ	B	A	—	43.9	5.0	—
基準品種 (弱) しゅまり	B	B	—	42.4	7.1	—
基準品種 (中) 能登小豆	B	A	—	13.0	10.9	—
基準品種 (強) 十系1077号	A	A	—	4.0	2.6	—

注1) A : Acc1398型 (抵抗性型)、B : 非Acc1398型 (感受性型)、注2) 2つのマーカー遺伝子型がB型とのt検定による

注3) アンダーラインの系統がAcc1398由来の圃場抵抗性を保持している

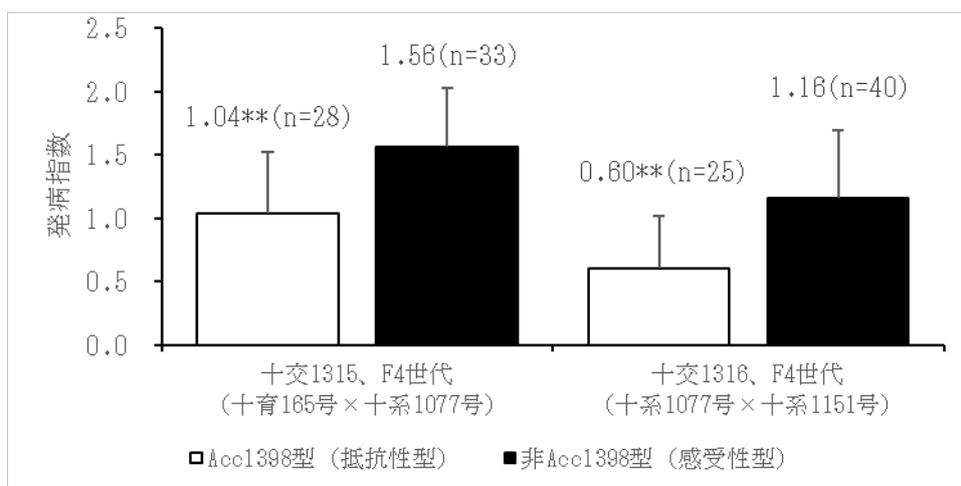


図 1. Vi08G3193 で選抜した系統の発病指数 (平成 28 年)

注 1) 十系 1077 号が Acc1398 由来の圃場抵抗性を保持している

2) 新たな萎凋病抵抗性 DNA マーカーの有効性検証

検出された QTL 近傍の塩基配列を解読し、アズキのゲノム情報と比較しながらプライマーを設計した。94°C15 分間の熱変成後、94°C・30 秒間・58°C30 秒間・72°C1 分間を 35 サイクル繰り返し、72°C5 分間の伸長反応条件で PCR を行うことにより、QTL 近傍の既存の SSR マーカーより精度の高い共優性の DNA マーカーである Vi01G3149 を開発した (図 2)。

開発した DNA マーカーを利用することにより、1 日あたり 200 系統程度の検定が可能で、接種検定結果とマーカー遺伝子型は約 90%の精度で一致した (図 3)。また、開発した DNA マーカーは「Acc259」と同じ QTL を保持する複数の遺伝資源およびそれらの後代にも適応可能であった (表 2)。

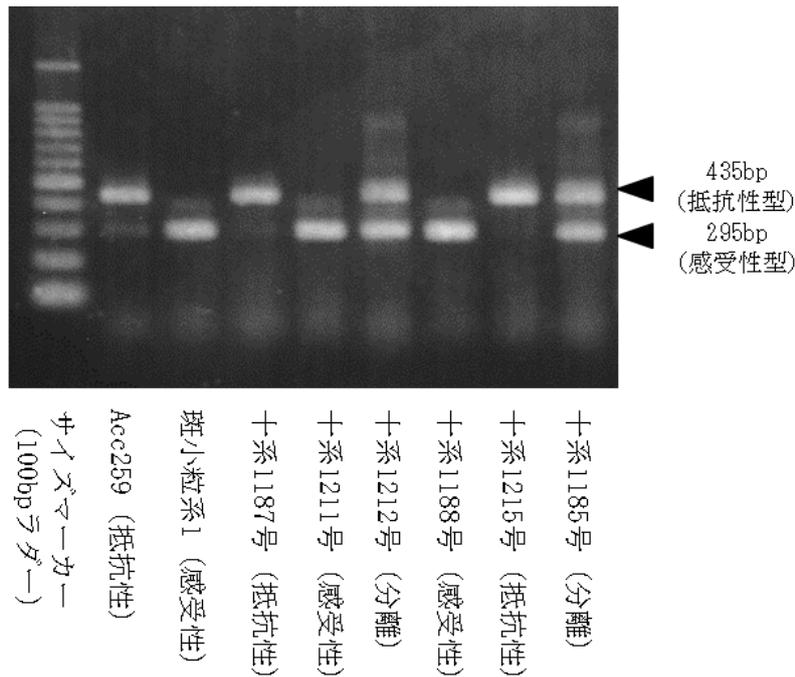


図 2. 開発した DNA マーカーによる判定事例

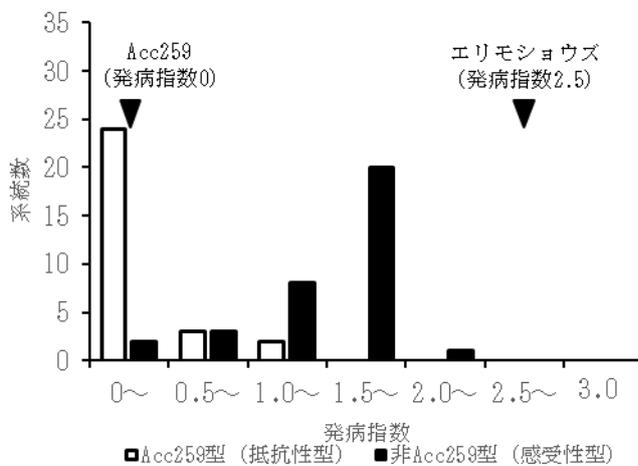


図 3. マーカー遺伝子型の違いによる発病指数の違い

注 1) 発病指数 0 : 無発病、維管束褐変なし
 1 : 外部病徴は認められないが維管束褐変あり
 2 : 葉脈のえそ、縮葉、葉の黄化などの外部病徴が認められ、維管束褐変あり
 3 : 枯死
 注 2) 十交 1225 (「きたあすか」 / 「十系 1071 号」)、
 F₄ 世代 63 系統
 「十系 1071 号」は「Acc259」由来の抵抗性を保持している。

表2. DNAマーカーを利用した判定結果と萎凋病菌接種検定結果

品種・系統 ・遺伝資源名	DNAマーカーによる アズキ萎凋病菌接種検定結果 ^{注2)}		落葉病抵抗性 遺伝子
	判定結果 ^{注1)}	発病指数	
Acc67	+	0.00	R
Acc259	+	0.00	R
Acc550	+	0.00	R
Acc558	+	0.00	R
Acc724	+	0.00	R
Acc812	+	0.00	R
赤豆	+	0.00	R
十育170号	+	0.13	R
十育159号	-	2.00	S
斑小粒系1	-	3.00	S
エリモシヨウズ	-	2.20	S

注1) +: 抵抗性遺伝子保持固定型、-: 抵抗性遺伝子非保持固定型、注2) R: 抵抗性、S: 感受性

注3) 指数0 (健全) ~3 (枯死)、1.0>指数平均: R (抵抗性)、1.0≤指数平均: S (感受性)

注4) 太字アンダーラインはアズキ落葉病菌レース1, 2抵抗性育種で利用してきた遺伝資源

3) DNA マーカーを利用した複合抵抗性系統の選抜

収穫後、子実の外観品質により選抜した。H26~H28年の3年間で19組合せ1,966系統についてDNAマーカー検定を行い、落葉病抵抗性および萎凋病抵抗性を共に保持した1,261系統を効率的に選抜した(表3)。

表3. DNAマーカー検定結果

年次	形質名	系統数	
		供試	抵抗性
H26	落葉病抵抗性、 萎凋病抵抗性	619	444
H27		320	201
H28		1027	616
合計		1966	1261

(4) 今後の課題

- ・ 茎疫病圃場抵抗性 DNA マーカーの高精度化と有効性の検証を行う必要がある。
- ・ DNA マーカーを利用した効率的なアズキ萎凋病抵抗性系統の選抜に活用する。

(5) 成果の波及効果

茎疫病圃場抵抗性 DNA マーカーおよび新たな萎凋病抵抗性 DNA マーカーを活用することにより、より効率的な抵抗性系統の選抜が可能となる。また、本課題で選抜された有望系統を品種化することにより、小豆の安定生産に寄与できる。

(6) 論文、特許等

なし