

第1章 緒 言

第1節 アズキ落葉病の北海道における発生状況

アズキ落葉病は *Cadophora gregata* Harrington & McNew (Harrington and McNew 2003) [syn. *Phialophora gregata* (Allington & D. W. Chamberlain) W. Gams] f. sp. *adzukicola* Kobayashi, Yamamoto, Negishi and Ogoshi (Kobayashi *et al.* 1991) によって引き起こされる土壤伝染性の病害で、北海道のアズキ栽培における重要病害の一つである (Kondo *et al.* 1998, 2004). アズキ落葉病に感染したアズキは、8月中旬頃から下位葉が萎凋しはじめ、次第に全身に症状が広がる。罹病個体の茎、葉柄、根などは外観健全であっても、切断すると内部の維管束部や髓部が褐色、赤褐色あるいは紫褐色に変じている (成田ら 1971). アズキの生育後期に落葉、立ち枯れ症状を起こすことから、さや数の減少や百粒重の低下などが生じ、収量と品質に大きな影響を及ぼす (藤田 2007).

本病害は 1970 年にアズキの主産地である十勝地方で大発生し問題となった (成田ら 1971). その後の発生面積率は、気象の影響で年次変動が大きい、概ね 20 ~ 40% で推移している (藤田ら 2007). アズキ落葉病菌はレース 1 からレース 3 までが確認されており、北海道のアズキ栽培圃場において 1997 年 ~ 1999 年までの 3 カ年で収集した菌株を分類したところ、レース 1 が 78.1%、レース 2 が 13.9%、レース 3 が 8.0% の割合となった (Kondo *et al.* 2005, 藤田 2007). 本病原菌はアズキ残渣からも分離され、残渣が伝染源として重要な役割をもっている (土屋・赤井 1976). また分生胞子は耐久生存能力を持つことが報告されている (近藤・小林 1983). このことより、現在においても北海道のアズキ栽培圃場においては病原菌型レース 1 が優占していると推察される。

第2節 アズキ落葉病抵抗性育種

アズキ落葉病菌は土壤伝染性であるため薬剤防除が難しく、長期輪作以外には抵抗性品種の作付けによる被害回避がもっとも効果的である。北海道立十勝農業試験場 (現在北海道立総合研究機構十勝農業試験場、以下「十勝農試」) では、1976 年からアズキ落葉病抵抗性遺伝資源の探索や遺伝解析を開始した。その後、高度な抵抗性を示す品種・系統として韓国在来種の「赤豆」、日本在

来種の「黒小豆 (岡山)」「円葉 (刈 63 号)」「小長品 - 10」などが見いだされた (千葉 1982). これらの遺伝資源を用いた抵抗性の遺伝様式についての試験も行われ、アズキ落葉病抵抗性は優性の 1 遺伝子座によって支配されていることが報告された (千葉 1987). 1981 年に奨励品種となった「エリモシヨウズ」は、耐病性はもたないが、多収で従来品種よりも耐冷性、品質が優れた (村田ら 1985) ことから普及開始後 3 年目で作付面積が全道一位となった。しかし、アズキ落葉病を含む土壤病害に対して感受性であったため、それが減収の一因となっていた。収量の年次間差を改善するため「赤豆」由来の抵抗性をもつ北海道で初めての落葉病抵抗性品種「ハツネシヨウズ」 (足立ら 1988), 「アケノワセ」 (島田ら 1992) が育成された。しかし、両品種は収量性、耐冷性および品質に劣ったため広く普及するには至らなかった。このため「エリモシヨウズ」を積極的に交配に利用し (村田ら 1998), アズキ落葉病菌汚染圃場を使用して選抜を行い、育成された抵抗性系統同士を交配することにより、「円葉 (刈 63 号)」を抵抗性母本とし「エリモシヨウズ」を系譜に持つ品質にすぐれた「きたのおとめ」 (藤田ら 1995a), 「黒小豆 (岡山)」を系譜にもつ「しゅまり」 (藤田ら 2002), 「円葉 (刈 63 号)」および「小長品 - 10」を系譜にもつ「きたろまん」 (青山ら 2009) などのアズキ落葉病抵抗性品種が開発され普及した (図 1-2-1).

一方抵抗性品種の普及にともない「きたのおとめ」「しゅまり」などを侵す新たなアズキ落葉病菌 (レース 2) の存在が明らかとなり (Kondo *et al.* 1998), 「Acc259」が高度な抵抗性を有していることが報告された (Kondo *et al.* 2005). 藤田ら (2007) の遺伝解析により「Acc259」のもつ抵抗性も、これまで抵抗性育種を行ってきたレース 1 抵抗性と同様に優性の 1 遺伝子座によって支配されていることが示された。「Acc259」はアズキ落葉病菌レース 1 にも抵抗性を示し、二つのレース抵抗性品種育成のための交配母本として期待された。しかし「Acc259」を侵すアズキ落葉病菌レース 3 の存在も明らかとなり、レース 3 にはこれまで抵抗性母本として用いられていた「黒小豆 (岡山)」「円葉 (刈 63 号)」「小長品 - 10」などが抵抗性を示すことが報告された (Kondo *et al.* 2009). このため近年十勝農試では 3 つのレースに抵抗性を示す品種の開発を目指し、アズキ落葉病菌レース 1 および

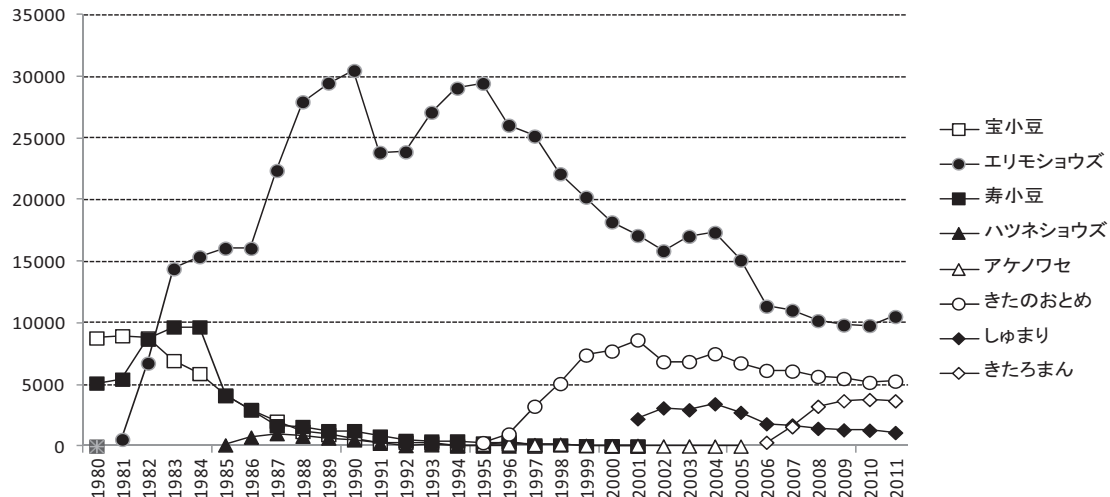


図1-2-1 主なアズキ品種と作付面積の推移 (北海道農政部資料より)

レース2が優占する二つの検定圃場と人工接種法を利用して小豆系統を選抜している。

第3節 DNA マーカーを利用した育種

植物育種の手法には交雑育種、倍数性育種、突然変異育種等があるが、選抜はどの手法においても重要である。通常、選抜は目的とする表現形質を確認することによって行われるが、そのためには多大な労働力、試験圃場あるいは温室などの場所、時間が必要である。また病害抵抗性など環境の影響を受ける形質の評価については複数年の検定が必要で、検定手法の簡便化、高精度化が求められていた。表現型を簡易に判別する手法の一つとして古くはアイソザイム等が利用されてきたが、1980年代から生物個体間のDNA塩基配列の違い(DNA多型)を検出する手法が確立されはじめた。多型を検出する方法として、精度は高いが技術的に煩雑で時間を要するRFLP法(Restriction Fragment Length Polymorphism, Botstein *et al.* 1980)、技術的には簡単だが再現性に問題があるRAPD法(Randomly Amplified Polymorphic DNA, Williams *et al.* 1990)、多型を検出しやすいがコストがかかるAFLP法(Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos *et al.* 1991)等がある。後に特異的な配列を利用した簡便な手法として、品種間で異なる遺伝子配列を利用したSCAR(Sequence Characterized Amplified Region, Williams *et al.* 1991)マーカー、制限酵素切断部位を利用し増幅断片に差を生じさせるCAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, Lyamichev *et al.* 1993)マーカー、繰り返し配列を使用し多型率の高いSSR(Simple Sequence Repeat, Hamada *et al.* 1982)マ-

ーカー等がDNAマーカーとして利用されるようになった。

育種目標となる形質の表現型と連鎖したDNAマーカーを利用することによって、簡便に抵抗性や品質などの遺伝的な違いを選抜することをMarker assisted selection(MAS)という。植物育種における選抜では、各種選抜条件を設定したり、検定材料を養成するために時間と労力がかかるが、MASでは茎、葉等の組織の一部を用いて環境条件に影響されることなく遺伝的な違いを調べることができるため、検定の労力を軽減したり、形質によっては短期間で形質改良も可能となる。各組織から抽出したDNAは、PCR(polymerase chain reaction)反応を行うことによって、約2時間で100億倍ほどに増幅され、アガロースゲルなどで簡易に識別できる。一方で植物体からゲノムDNAを抽出し、特定の領域を増幅させ確認する作業は、圃場に播種して調査する場合と比較すると一点あたりのコストが高い。このため出穂期、植物体の高さなど複数の因子が関与し、簡単に調査できる形質であれば、圃場における累年の評価を行う方が効率的であり、品種改良に係わるすべての形質でMASを利用することは現実的ではない。検定に時間、労力がかかる病虫害抵抗性の判定および収穫前に情報を得ることにより品種改良を効率化できる形質などについてはDNAマーカーの活用価値が高い(鈴木 2012)。

現在では、多くの機関で様々な植物に対してそれぞれ目的とする形質のMASを行っている。北海道立総合研究機構(道総研)では、品種改良の効率化を目指して2001年から難防除病害および小麦の品質関連形質を識別できるDNAマーカーの開発に着手した。2003年にアミロース合成遺伝子 $Wx-B1$ (うどんの粘弾性に関与)

の有無を判別する DNA マーカーを利用して小麦の系統内分離を調査したのが、道総研の品種改良において最初に DNA マーカーを利用した事例であった。その後、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性、インゲンマメ黄化病抵抗性、ダイズシストセンチュウ抵抗性など、重要病害に対する抵抗性を判別できる DNA マーカーの開発に成功し、選抜効率等の検証を行った後、本格的に品種改良への利用を開始し、現在では道総研で品種改良を行っている 6 作物で MAS を行っている（鈴木 2012）。

第 4 節 アズキ萎凋病の北海道における発生状況

アズキ萎凋病は *Fusarium oxysporum* Schlechtendehl f. sp. *adzukicola* Kitazawa et Yanagita（北沢・柳田 1989）によって引き起こされる土壌伝染性の病害である。本病に感染すると播種後ほぼ 1 ヶ月で初生葉に葉脈褐変が現れ、最終的には株全体の葉がしおれ、枯れあがる。本病原菌には 3 つのレースがあることが明らかにされており（Kondo *et al.* 1989）、レース 1 は「エリモシヨウズ」、「寿小豆」、「宝小豆」などを侵すが「光小豆」、「ハツネシヨウズ」は侵すことができず、レース 2 は「光小豆」を、レース 3 は「ハツネシヨウズ」をそれぞれ侵す。本病害は 1983 年に初発生が確認された後、1985 年には石狩、空知振興局管内で発生面積が 2000ha を超えた。1989 年には発生面積 6000ha、被害面積が 410a となった（近藤, 1995）。また、アズキ落葉病抵抗性系統・品種のほとんどがアズキ萎凋病抵抗性であることが報告されており（近藤 1995）、アズキ落葉病品種である「きたのおとめ」、「しゅまり」、「きたろまん」はともにアズキ萎凋病抵抗性も有しており、この結果アズキ萎凋病、アズキ落葉病ともに近年の発生率は減少している（藤田 2007）。

第 5 節 本研究の目的

アズキ落葉病は人工接種法では高精度に検定が可能で優良な品種が育成されてきているが、感染から発病までにおよそ 2～3 ヶ月と時間を要し、発病までの管理に労力が必要である。また本病害発生圃場を利用した選抜では、汚染土壌の拡散防止に注意が必要なことに加え、抵抗性系統の作付け増加にともなって優占レースに変化が生じ、目的とする病原レースに対する抵抗性を正確に判定できない場合があった。加えて病害汚染圃場の面積を最小限に抑えながら抵抗性検定を行うために、短期輪作で圃場を利用することによって、落葉病以外の病害、障害が発生することも懸念されており、簡便で高精度な抵抗性判定法が求められていた。DNA マーカーを開発するためには、精度の高い検定手法があること、目的とする形質が比較的少数の因子によって支配されていることが必要であるが、本病害はこれらの要件を満たしていた。

そのため本研究では、1) 北海道で多く分布しているアズキ落葉病菌レース 1 に対する抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーを開発し、2) 新たに発生が確認されたアズキ落葉病菌レース 2 に対する抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーを開発することを目的とし、育種で利用するための有効性を調査した。アズキ落葉病菌レース 1 抵抗性の遺伝資源はアズキ落葉病菌レース 3 にも抵抗性を示すことから、これらを同時に導入できれば、北海道で発生している 3 つのレースに対してすべて抵抗性を示す品種が育成できる。このため 3) アズキ落葉病菌レース 1 抵抗性遺伝子とレース 2 抵抗性遺伝子の関係を明らかとすることを目指した。また、アズキ落葉病菌抵抗性品種・系統の多くがアズキ萎凋病抵抗性を示すが、それぞれの抵抗性遺伝子の連鎖関係は調査されていなかったことから、4) アズキ落葉病菌レース 1 抵抗性遺伝子、レース 2 抵抗性遺伝子とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係についても検討した。

第2章 アズキ落葉病菌レース1抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーの開発

第1節 AFLP法による多型マーカーの探求

目 的

作物に特異的なDNAマーカーがなくても多型が確認できるAFLP法を利用して、アズキ落葉病菌レース1抵抗性系統群あるいは感受性系統群に特異的なマーカーを探求する。

材料および方法

(1) バルク構成系統の選抜

アズキ落葉病菌レース1抵抗性品種「しゅまり」と同感受性遺伝資源「斑小粒系-1」の単交配由来のF₃世代105系統を、抵抗性検定試験に供試した。

接種菌株はアズキ落葉病菌レース1分離株T96-1 (NIAS Genebank accession no. MAFF 241056) を用い、V8液体培地中で25°C、120回転/分の条件下で3週間培養した (Kondo *et al.* 2009)。接種当日、培養液を吸引濾過 (Whatman No. 1) して液体培地を取り除き、残った菌体を滅菌水で洗浄した。集めた菌体はポリトロン (Kinematica) で破碎し、 1×10^7 cfu/ml に調整したものを接種源とした。

アズキ種子は各系統15粒を、タキイ育苗培度を充填した素焼きの4号鉢 (直径12.4cm) に5粒ずつ (1系統あたり3鉢) 播種した。約10日から2週間後、初生葉が展開した植物体を土から抜き取り、水で丁寧に土を洗浄し、根を1.5cmほどまではさみで切り落とし、各系統それぞれ50mlの接種源が入った紙コップに入れ、一晚 (約16時間) 浸漬した。浸根接種後、素焼きの4号鉢に生育の良いものを各4個体ずつ移植し、移植後の苗の根もとに余った接種源を均等に散布した。接種約8週間後に、各個体とも地際から初生葉節までの茎を縦にカッターナイフで切り、茎断面の維管束褐変の有無で抵抗性と感受性を評価した。接種試験時にはコントロールとして、抵抗性親である「しゅまり」と感受性親である「斑小粒系-1」を各系統と同様に供試した。12個体中12個体が抵抗性と判定された系統を抵抗性ホモ接合型系統、12個体あるいは11個体が感受性と判定された系統を感受性ホモ接合型系統、1~10個体が感受性と判定された系統をヘテロ接合型系統と判定した。

(2) AFLP解析

AFLP解析はVos *et al.* (1995) らの方法を一部改変して行った。(1)で選抜した抵抗性ホモ接合型の12系統、感受性ホモ接合型の12系統からそれぞれ任意に1個体を選び、CTAB法 (Murray and Thompson 1980) によってゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAは、抵抗性、感受性別に等量混合しバルクDNAとした。バルクDNAをEcoR I, Mse Iで37°C、2時間切断 [全反応液量50μl, DNA750ng (3μl 250ng/1μl DNA), 8U EcoR I, 6U Mse I, 10μl 5× Buffer (50mM Tris-Ac, 50mM MgAc, 250mM KAc, 25mM DTT, 250ng BSA)] し、反応液10μlを電気泳動した。制限酵素切断後のゲノムDNAが全体にスミアな泳動像となり、短い断片は100bp程度まで切断されていることを確認した後、残り40μlの反応液に4μl D.W., 2μl 5× Buffer, 1μl ATP (10mM), 1μl T4DNA-Ligase (Roche 10U/1μl), 1μl EcoR I adapter (5pmol/μl), 1μl Mse I adapter (50pmol/μl) (図2-1-1) を加えて全量50μlとし、37°Cで3時間ライゲーションした。ライゲーション終了後、反応を停止するため、450μlの0.1TEを加えて4°Cで保存した。

次に、予備増幅プライマー (図2-1-2) を用いて、予備増幅を行った。増幅後、反応液5μlを電気泳動し、スミアな増幅産物が得られていることを確認し、残り45μlの液に405μlの0.1TEを加えて10倍希釈しAFLP反応のテンプレートとして利用した。予備増幅のPCR反応は表2-1-1の通り行った。AFLP増幅はEcoR I, Mse I側ともに3塩基認識の選択伸長配列を付加したプライマーを用いて各バルクの多型を調査した (図2-1-3)。EcoR I側プライマーは蛍光色素 (FAM, VIC (Applied Biosystems)) で標識し、合計で1024通りの組み合わせで多型を検出した。本試験に利用した選択的伸長配列を表2-1-2に示した。AFLP増幅のPCR反応は表2-1-3の通り行った。AFLP増幅産物は、GeneScan 310を用いて500LIZをサイズマーカーとして解析を行った。

EcoRI アダプターの構造 5-CTCGTA **GACTGCGTACC**
CATCTGACGCATGGTTAA-5

MseI アダプターの構造 5-GAC **GATGACTCCTGAG**
TACTCAGGACTCAT-5

図2-1-1 アダプターの構造

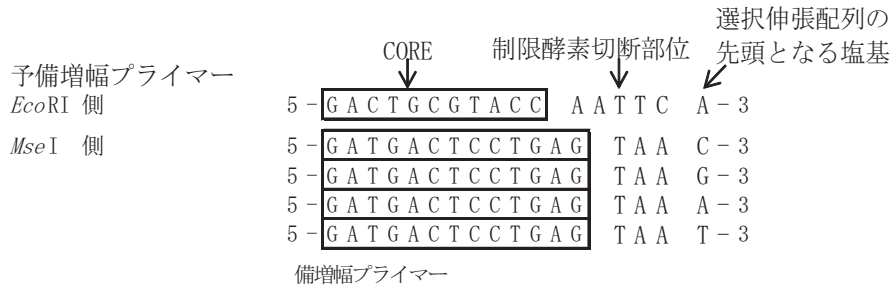


図2-1-2 予備増幅プライマー

表2-1-1 予備増幅のPCR 反応組成およびPCR 条件

反応液組成		PCR 条件	
D.W.	27.75 μ l	94°C	30 秒 } 20 サイクル 1 分 } 1 分 }
<i>EcoRI</i> pre amp primer (5pmol/ μ l)	2.5 μ l	56°C	
<i>MseI</i> pre amp primer (5pmol/ μ l)	2.5 μ l	72°C	
10 \times Buffer	5.0 μ l		
dNTPs (2.5mM each)	4.0 μ l		
MgCl ₂ (酵素に添付)	3.0 μ l		
Ampli Taq (Applied Biosystems)	0.25 μ l		
DNA	5.0 μ l		
total	50.0 μ l		

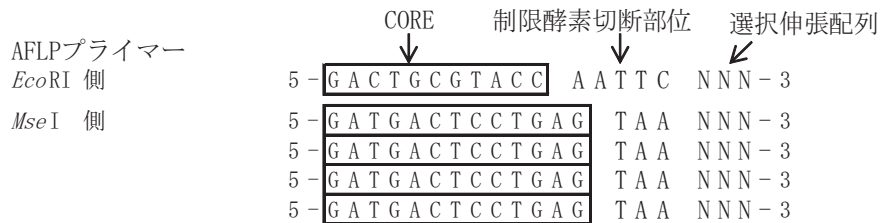


図2-1-3 AFLP プライマーの構造

表 2-1-2 選択的伸張配列

<i>EcoRI</i> primer		<i>MseI</i> primer			
FAM 標識	VIC 標識				
ACC	AGC	CAA	GAA	AAA	TAA
ACG	AGG	CAC	GAC	AAC	TAC
ACA	AGA	CAG	GAG	AAG	TAG
ACT	AGT	CAT	GAT	AAT	TAT
ACT	AAC	CCA	GCA	ACA	TCA
ATG	AAG	CCT	GCT	ACT	TCT
ATA	AAA	CGA	GGA	AGA	TGA
ATT	AAT	CGT	GGT	AGT	TGT
		CTA	GTA	ATA	TTA
		CTC	GTC	ATC	TTC
		CTG	GTG	ATG	TTG
		CTT	GTT	ATT	TTT
		CCC	GCC	ACC	TCC
		CCG	GCG	ACG	TCG
		CGC	GGC	AGC	TGC
		CGG	GGG	AGG	TGG

表 2-1-3 AFLP 増幅の PCR 反応液組成および PCR 条件

反応液組成		PCR 条件		
D.W.	7.1 μ l	94°C	30 秒	} 12 サイクル
<i>EcoRI</i> primer (10pmol/ μ l)	1.0 μ l	56°C	30 秒	
<i>MseI</i> primer (3pmol/ μ l)	2.0 μ l	72°C	1 分	
10 × Buffer	2.0 μ l	94°C	30 秒	} 23 サイクル
dNTPs (2.5mM each)	1.6 μ l	56°C	30 秒	
MgCl ₂ (酵素に添付)	1.2 μ l	72°C	1 分	
Ampli Taq (Applied Biosystems)	0.1 μ l	72°C	7 分	
DNA	5.0 μ l			
total	20.0 μ l			

(3) AFLP 断片のクローニングと塩基配列の決定

抵抗性バルクと感受性バルク間で多型を示した AFLP プライマーセットを用いて、両親間で同様の多型を示すことを確認した。次に両親の DNA を用いて増幅した AFLP 断片を 8% アクリルアミドゲルで電気泳動し、多型を示した増幅断片を切り出した。切り出した増幅断片は 1.5ml プラスチックチューブに 100 μ l の diffusion buffer (0.5M ammonium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM EDTA pH8.0, 0.1% SDS) を加えガラス棒を使って摩擦した。その後 50°C のウォーターバスで 30 分インキュベートし、14000rpm で 10 分間遠心した。上清 100 μ l を SUPERREC-01 (Takara) カラムで精製し、さらに精製液を MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) で濃縮精製した。切り出した AFLP 断片を DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara) (表 2-1-4) を用いて 16°C で一晩反応させ、pT7Blue T-Vector (Novagen) に組み込んだ。

ライゲーション溶液全量を JM109 (Takara) の入ったチューブに加え、氷中で 30 分静置し、42°C のウォーターバスで 45 秒間処理し、速やかに水入りの氷中で 2 分間静置した。その後、37°C に暖めておいた製品添付

の SOC 培地に、大腸菌溶液を全量加え 37°C で 5 分から 20 分静置後、37°C で 40 分間振とう培養した。10 μ l 100nM IPTG, 50 μ l 2%X-Gal を塗った LB 培地 (100mg アンピシリン含有) に、培養液を 100 μ l、および残り溶液を約 10 倍に濃縮し全量使用した 2 段階の濃度で平板に広げ一晩培養した。白色のコロニーを滅菌したつまようじの先でふれ、100ul の TE 溶液に懸濁し 99°C で 10 分間熱処理し、8000rpm で 15 分間遠心した。上清をテンプレートとして M13 プライマー (forward primer; 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', reverse primer; 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') で PCR を行い (表 2-1-5)、2% アガロースゲルで増幅断片を確認した。目的の大きさに近い増幅断片を示したコロニー懸濁液をテンプレートとし、AFLP マーカーを利用して DNA を増幅させ、GeneScan 310 で解析し、得られた増幅断片長が AFLP 解析時に多型を示した増幅断片長と完全に一致したものを選抜した。

選抜したコロニー懸濁液を利用して再度 M13 プライマーを用いた PCR を行い、増幅断片を QIAquick DNA Purification Kit (Qiagen) で精製した後、外注して塩基配列を解読した。

表 2-1-4 ライゲーション溶液の反応液組成

反応液組成		
Ligation Solution (Takara)	5.0	μl
pT7Blue T-Vector (Novagen)	1.0	μl
精製した DNA	1.0	μl
TE	3.0	μl
total	10.0	μl

表 2-1-5 インサートチェック用 PCR 反応液組成と PCR 条件

反応液組成			PCR 条件	
D.W.	13.7	μl	94°C	2 分
10 × Buffer	2.0	μl	94°C	30 秒
dNTPs (2.5mM each)	1.6	μl	56°C	30 秒
MgCl ₂ (酵素に添付)	1.2	μl	72°C	2 分
primer M13F (20pmol/ μl)	0.2	μl	94°C	5 分
primer M13R (20pmol/ μl)	0.2	μl		
ExTaq (Takara)	0.1	μl		
Template	1.0	μl		
total	20.0	μl		

結 果

(1) バルク構成系統の選抜

F₃ 世代 105 系統を用いてアズキ落葉病菌レース 1 を接種検定し、F₂ 世代の遺伝子型を推定した。観察値は抵抗性ホモ接合型：ヘテロ接合型：感受性ホモ接合型 = 26 : 54 : 25 となり、1 遺伝子支配による理論値に適合した (表 2-1-6)。抵抗性ホモ接合型、感受性ホモ接合型と推定した系統からそれぞれ 12 系統をバルク構成系統として選抜した。

表 2-1-6 斑小粒系-1/しゅまり F₂ 世代の推定表現型

観察値			理論値			χ^2	P
R	H	S	R	H	S		
26	54	25	26.3	52.5	26.3	0.11	0.95

注) R : 抵抗性ホモ接合型 H : ヘテロ接合型

S : 感受性ホモ接合型, 数字は系統数

(2) AFLP 解析

AFLP 解析の結果、抵抗性バルクに特異的な増幅断片が 4 個 (E-ACC/M-GGG-77, E-ACT/M-ACT-118, E-ATG/M-GAG-138, E-ACA/M-GAA-139) 感受性バルクに特異的な増幅断片が 2 個 (E-AAG/M-GAT-126, E-ATG/M-AAG-132) 検出され、両親間でも同様の多型が検出された。抵抗性バルクに特異的な E-ATG/M-GAG-138 および感受性バルクに特異的な E-ATG/M-AAG-132 の配列を比較したところ、前半に 1 塩基の置換、E-ATG/M-AAG-132 側の後半の配列に 6 塩基の欠失領域があった以外は同じ配列だった (図 2-1-4, 相同性 99.2%)。

```

E-ATG/M-GAG-138  1'  GACTGCGTAC CAATTCATGT TTTTCTTTGT CAATAGAATT AGAAGTCCGT TGATAATTTA
                    ***** ***** ***** ***** * ***** *****
E-ATG/M-AAG-132  1"  GACTGCGTAC CAATTCATGT TTTTCTTTGT CAATAGAATT ACAAGTCCGT TGATAATTTA

E-ATG/M-GAG-138  61' CTGGTCATGA TTTTTCCTTA TTTTGTGGTT TTGATGTAAG GGATATATCA ATGTGCTTTT
                    ***** ***** ***** ***** ***** *****
E-ATG/M-AAG-132  61" CTGGTCATGA TTTTTCCTTA TTTTGTGGTT TTGATGTAAG GGATATATCA ATGTGCTT--

E-ATG/M-GAG-138  121' GCTCTTACTC AGGACTCATC
                    ***** *****
E-ATG/M-AAG-132  119" ----TTACTC AGGACTCATC

```

図2-1-4 AFLP増幅断片 E-ATG/M-GAG-138 および E-ATG/M-AAG-132 の相同性比較

考 察

「しゅまり」のアズキ落葉病菌レース1に対する抵抗性は優性の1遺伝子によって支配されていると推定された(表2-1-6)。千葉らは「黒小豆(岡山)」などを用いた遺伝解析から、アズキ落葉病抵抗性は優性の1遺伝子座によって支配されていると報告した(1987)。「しゅまり」は「黒小豆(岡山)」を系譜に持つことから、「しゅまり」の抵抗性は「黒小豆(岡山)」由来の効果の大きい遺伝子座によって支配されていると考えられた。本試験の結果から「しゅまり」が有する優性に遺伝するアズキ落葉病抵抗性遺伝子を *Pgal* と命名した。

バルク法を利用した AFLP 解析では6個の特異的な増幅断片を得ることができた。バルク内では各個体は目的とする形質については同質であるが、他の遺伝子は選抜されていないため異質である可能性が高い(Michelmore *et al.* 1991)。このことから、精度の高い試験によって選抜された個体からなるバルク間では、目的とする形質と連鎖した領域以外では多型が得られないと考えられる。本試験は、接種検定時のコントロールとして供試した「しゅまり」には全個体維管束褐変がみられず、それに対して「斑小粒系-1」は12個体中12個体に維管束褐変がみられ、全個体が感受性と判定される条件であった(データ未掲載)ことから、接種精度は高いと考えられる。そのため、得られた増幅断片は抵抗性、感受性と連鎖している可能性が高いと考えられた。

配列の相同性が高かった E-ATG/M-GAG-138 と E-ATG/M-AAG-132 は、*EcoR* I 側の選択的伸張配列も同じであった(図2-1-4)ことから、これらは同一座にあると考えられた。そのため、以降のマーカー開発は E-ACC/M-GGG-77, E-ACT/M-ACT-118, E-ATG/M-GAG-138, E-ACA/M-GAA-139, E-AAG/M-GAT-126 の計5つの配列を用いて行うこととした。

第2節 アガロースベースの DNA マーカー開発

目 的

AFLP 法は、作物固有の特異的マーカーがない場合にも適用可能な長所を有する反面、煩雑な手法を用いるため、AFLP マーカーそのものを育種選抜における DNA マーカーとして利用することは難しい。また、育種選抜で DNA マーカーを利用する際には、抵抗性ホモ接合型、感受性ホモ接合型、ヘテロ接合型が判別できる共優性マーカーが望ましい。以上のことより、AFLP 断片およびその周辺領域の配列を利用して、アガロースで簡易に遺伝子型を判別できる DNA マーカーを開発する。

材料および方法

(1) インバース PCR を利用した AFLP 断片周辺配列の決定

第1節で塩基配列を決定した AFLP 増幅断片を利用して、フォワードプライマー、リバースプライマーを2つずつ設計した(図2-2-1)。

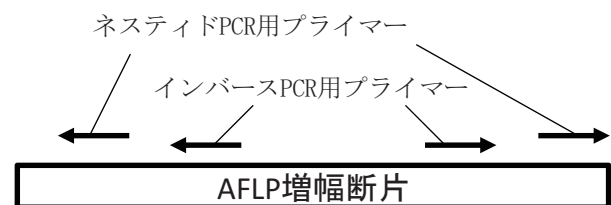


図2-2-1 AFLP断片を利用したプライマー設計のイメージ図

プライマーの設計は塩基数が20前後、GあるいはCの数が8個から10個になるように設計し(GC含有率40~50%)、設計したプライマーはインターネット上の

フリーソフト (<http://www.oligoevaluator.com/AddUserServlet>) で Tm 値および予想される二次構造を調べた。ヘアピン構造になりやすいと判定されたプライマーは利用せず、Tm 値は 60°C 前後を目安とした。以降のプライマーはすべて同様の方法で設計した。

ゲノムを切断する制限酵素は AFLP 断片が切断されないものを選択し、Alu I, Hae III, Hind III, Sau3 AI, Taq I, Xba I で切断した。制限酵素処理を行った反応液は QIAquick DNA Purification Kit で精製し、16°C で一晩ライゲーションした。反応液組成を表 2-2-1 に示した。ライゲーション溶液は MiniElute PCR Purification Kit で濃縮精製し、PCR テンプレートとした。

抵抗性バルクに特異的に増幅した AFLP 断片を利用して設計したプライマーには「しゅまり」の、感受性バルクに特異的に増幅した AFLP を利用して設計したプライマーには「斑小粒系-1」のゲノム DNA を自己環状化させたものをテンプレートとして用いた。

以降の PCR 反応はすべて表 2-2-2 の条件で実施した。はじめにインバース PCR 用プライマー (AFLP 断片の内側に設計したプライマー) で DNA を増幅させた。ゲノム DNA を直接増殖させた産物は、複数の増幅断片が見えるものが多かった。そのため増幅産物を 50 倍に希釈し、AFLP 断片の外側 (インバース PCR では内側プライマーとなる) に設計したプライマーを用いてネスティッド PCR を行い、1 本のクリアな増幅断片が得られたものを精製し、塩基配列を解読し、制限酵素サイトで 5' 側と 3' 側の位置を決定した。

次に周辺配列の 5' 側と 3' 側にプライマーを設計し、ゲノム DNA を増幅させ、増幅産物の配列を解読した。増幅産物の中に AFLP 増幅断片と 100% の相同性がある配列を確認後、もう一方の親のゲノム DNA を同様のプライマーで増幅させ、塩基配列を決定し、対立座の配列とした。一連の作業のイメージ図を図 2-2-2 に示した。

(2) SCAR (sequence characterized amplified region) マーカーの作成

AFLP 断片およびその周辺領域の塩基配列を利用してプライマーを設計した。増幅断片の長さは考慮せず、本試験のマーカーは優性遺伝する形質と連鎖していると予想されることから、表現型、遺伝子型を一致させるために抵抗性型を判別できる優性マーカーを作成した。

(3) 遺伝子型と表現型の比較および抵抗性遺伝子と強連鎖したマーカーの選抜

バルク構成個体の選抜に利用した F₃ 系統について、F₂ の推定表現型が抵抗性ホモ接合型およびヘテロ接合型の系統からは、病徴を示さず「抵抗性」と判定した 1 個体から、感受性ホモ接合型の系統からは明らかな病徴を示し「感受性」と判定した個体 1 個体から DNA を抽出し、作成した 5 つのマーカーを用いて遺伝子型を調査した。また、すでにアズキ落葉病抵抗性型が明らかとなっている遺伝資源 32 点を用いて遺伝子型を調査した。

結 果

(1) AFLP 断片周辺塩基配列の決定

第 1 節で選抜した「しゅまり」および「斑小粒系-1」の AFLP 断片およびその周辺の塩基配列を図 2-2-3 に示した。これらの配列は DDBJ に登録した (DDBJ accession no. AB749324 ~ AB749332, 「斑小粒系-1」の E-ATG/M-AAG-132 とその周辺領域のみ未登録)。これらの配列情報をもとに「しゅまり」型が特異的に増幅するように設計した DNA マーカーを表 2-2-3 に示した。

F₃ 世代 105 個体について、設計した DNA マーカーで遺伝子型を調査した結果、Pg118, Pg139 の遺伝子型はすべてアズキ落葉病抵抗性の表現型と一致し、Pg77, Pg126, Pg138 で 1 個体のみ組換えが認められた (表 2-2-4)。

表 2-2-1 ライゲーション溶液の反応液組成

反応液組成			
DNA	12.5	μl	=(125ng)
10 × Buffer	12.5	μl	
T ₄ Ligase(TAKARA)	1.0	μl	
D.W	3.0	μl	
total	125.0	μl	

表 2-2-2 ゲノム PCR 反応液組成と PCR 条件

反応液組成		PCR 条件		
D.W.	13.7 μl	94°C	2 分	
10 × Buffer	2.0 μl	94°C	30 秒	
dNTPs (2.5mM each)	1.6 μl	56°C	30 秒	
MgCl ₂ (酵素に添付)	1.2 μl	72°C	2 分	
primer (Forward) (20pmol/μl)	0.2 μl			
primer (Reverse) (20pmol/μl)	0.2 μl	94°C	5 分	
ExTaq (Takara)	0.1 μl			
Template	1.0 μl			
total	20.0 μl			

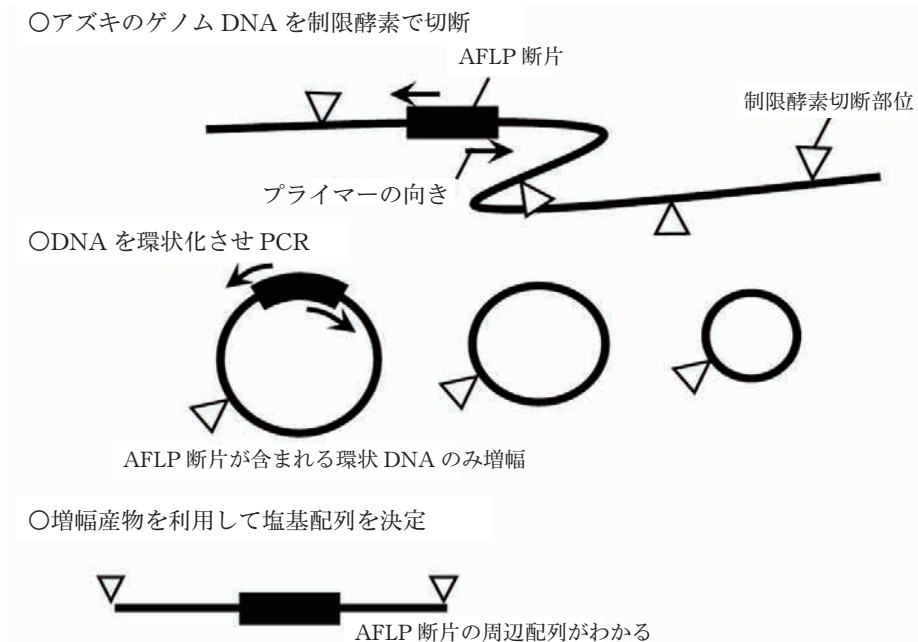


図 2-2-2 AFLP 周辺領域解析のイメージ図

CAGAAGAGGA AGATGTATCA CATTTAGCT CAAAGGTTG CATTCTAGTA AAAGGAGAAG ATTGATCCTT TAATTTATCA
 GAAAACATAG ATAAACCTA CGAAAAAAA ATGAATTATC ACATCAGACA ACATTGTAAT TCTATTCTTG TATACAATGA
 TATTATAAG TATAATAATT TGACAATACT TACTTCAATG ATTTTCATATG ACAAAGATAT AGATTTTGCC CTTTGCATGA
 TTCAAAATAG CTTAATCAGA GTATATAAGG AACCGCTATC TTTAGCCAAC CAACCTACAT CAATATATAT TTTCTCCACA
 AAGAGAAGAT TAATCTCAGT GGAAAAACA TATAAACAT AAGAATCAGT GTATTTAAAA TATTTAAGCC TTGGCGTTTG
 AAGCTCAAG ACACAGTCAG CTTCTAATTT CCCAGCCACT CTAACAACAG ATATATTTAA GTCTACAAGG TGGGGTGTAG
 AGATTTTGAA AATATTGAAG TCACCATAGT ATATACAAC ATGAAAATAT AAAGATTCCA AATTGACAAA ACCCTTAAAT
 GAATCAAAA GGTTTTCCA ACCACAATCA AAATTACAAC AGCAGAGGTA TAGGTGGTTA AGAGAAGGAA GATCGA

(1) 「斑小粒系-1」の E-ACC/M-GGG-77 (しゅまり) 対立座領域

CAGAAGAGGA AGATGTATCA CAGATTAAT CAAAAGTTG CATTCTGGTG AAAGGAGAAC ATCTATCCTC TAATTCATCA
 GAAAACATAG ATAAACCTA CAAAAGAAA ATGAATTATC AAATCAGACA TAATTGTAAT CCTATTCTTG TGCTACACTG
 ATATTGTAAA GAATAATAAT TTGCCAAAAG AAAAATACTT ACTCGAATGA TTTTAAATA CAGAGATATA GATTTGCCCC
 TTTTCATGAT TTCAAATAGC TCAACCAAAG TAGAAAAATA GGAAACAGTA CTTTGTAGCA ACCACCCTAC ATCGATATAC
 ATTTTCTCCA CAAAGAGAAG ATTAACCTCA GTAGAAAAAG AATATAAATG ATAAAAATCA GTATATTTAA AATACTGAAG
 CCTTGGTGTG TGAAGCTCAA AGACACAGTC ACCTTGAAAC TTCCAAAACA CTCTACTATC TGATATATTT AAGTCTACAA
 GGTGGGAGAC AGAGATTTG AAGGTATTGA **ATTCAACATA ATATGTACAA CTAACCAAAT ATAGAGATTC CAAATTGACA**
CAACCTTAA ATGGATCAAA AGGGCTTCC GATTACACA TAAATTCACA ACCATAGAGG TATAGGTGGT TAAGAGAAGG
 GAGATCGAAA TTTGTGATCT CACTGAATAT GTAAGAAAGT TTGAGAGTAG TGAG

(2) 「しゅまり」の E-ACC/M-GGG-77 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

TCCGTAACCC ACTTAAGATT CTCCAAAAT TGCTAGTGA ATTGACTGGA GTGCCCTGCA AAACGGGTCA TATGGGTTTG
 ATTTTCATCT TCAAATGTAT GCTATTTTGA CAAAGAATTT TGAAGTTTG ATAATTTTAC TATTCAACTA TCGTTATCTT
 GTACATCTTA TAATCGAAAA CATATTTTAC TATACCCATC CTTATAAATC AATCTATTAT CTTTCTAATA AAGATATGCC
 AGGATTTTTT TTTTAAAAAT CAATAAAATA TTGAGTTTAA TATGACATGA TTTTAAAGA ATTAGCTACT TCTTTTATCT
 TCTAAAAACA TTTCTGACAT CAGGTCAGT CTATAAAAT AATGAAATAA AAATTTTGA TGATAAAAT CCCAAGAAAA
 ATGGATGATA AAAATTGTTA AATGATGATG GTTAAACGGT AAAAAGTGTA GTTAAGTAAA TGTTTTATTC TTCCTGTAA
 TCTTTACTGG AAAGGAAATG C

(3) 「斑小粒系-1」の E-ACT/M-ACT-118 (しゅまり) 対立座領域

AGCTCGCCCA CCTCATTTTG AATGACATTC TTCATGGCTT GAAAATTTTT GTAAGTTTTT GGTATTTCGAC CATTGAAGAT
 TCTCATGTAA ACTTTTATTT CTTACAAAAT TTAGAGTCTA AATTTTCCGT AACCCACTTA AGATTCTCCC AAAATTGCTA
 CTGGAATTC **CTTCGAGTCA TAATCCCTG CAAAAACGGG TTATATGGGT TTGATTTTCA TCTTCAAATG TATGCTATTT**
TGACAAAGAA TTTTGAAGTT TAATAATTTT ACTATTCAAC TATCGTTATT TTGTACATTT TATAGTCCAA AACATATTTT
 AATATACCCA TTGTTATAAA TCAATTAAGT TTCTAACAAA GATATGCCAG GATTTTTTTA AAAATCAAT AAAATGAGTT
 TAATATGACA TGATTTTAA AGAATTAGCT ACTTCTTTTA TCTTCTAAAA ACATTTCTGA CATCAGGTCA CTGCTATAAA
 ATTAATGAAA TAAAACTTT TGATGATAAA ATGCATCGAA AACATGGATA ATAAAAATTG TAAAATGATG ATAATTTAAC
 TGTCAAAAGT GTAGCTAAGT AAATGTTTTA TTCTTCTGT AATCTTTACT GGAAAGGAAA TGCTATTCTT TTAATCTTTT
 CAGATACACT TAGTC

(4) 「しゅまり」の E-ACT/M-ACT-118 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

CACACTTATT TCITTTTTCTG AATATTATGT CGTTTATTTT GGTATAGGA GCAAAATGGA AAAACCAATA TAGTTAAAGA
 TGTCCTTTAT AAACGGAATT AGATGTTATT TGTCTATGTT TTATAAAGAA **TTCAAGTTTT TGTTTATGAT TGAATAGTA**
GTCCCGTGA TTATTCCTTA TTTTGTAGTC TTTATGTAAG GGATATATCT TATATATTCA GGTTCATCT TAAATGATAA
 ATCTTTTTTT TATTTTTCTT TTAGTTCTAT GTTCTTTTAT AAGAAAAATG TCTAAAACCTT GCAATTTTTT TTATTATTAT
 AAACCTTTAC GTTAAAAATA ATAATCCAAA TGAATTTATG AACTCCAATT TCAAAATAAC TCCATAAATT GAATAGTTAG
 TCACATTAAT ATATCAAAAT TTACTTAAAT AAATGGAGAA GATATGTCTT ATTCAATATA GTTTCGTTTT TTAAGCATAA
 TATTAACCTA TCCTTATCTA TTTTTTCTGA ACACATTTAG ATTGAAATAA CATTTAAAGT ATATCACCTA ATATTTAAAT
 TTTAAAATAT AATTGAGAAA AGTAATTTAA TGATGTTAAG ATGAAAAACAG AACAAAC

(5) 「斑小粒系-1」のE-AAG/M-GAT-126とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

CACACTTATT TCITTTTTCTG AATATTATGT CGTTTATTTT GGTATAGGA GCAAAATGGA AAAACCAATA TAGTTAAAGA
 TGTCCTTTAT AAACGGAATT AGATGTTATT TGTCTATGTT TTATAAAGAA **TTCAAGTTTT TGTTTATGAT TGAATAGTA**
 GTCCCGTGA TTATTCCTTA TTTTGTAGTC CCGGATATA TCTTATATAT TCAGGTCTA TCTTAAATGA TAAATCTTTT
 TTTTATTTTT CCTTAGTTC TATTTTCTTT TATAAGAAAA ATATCTAAAA CTGCAATTT TTTTATTAT TATAAATTTT
 TACGTTAAAA ATAATAATTC AAATGAATTT ATGAACTCCA ATTTCAAAAT AACTCCATAA ATTGAATAGT TAGTCACATT
 AATATATCAA AATTTACTTA AATAAATGGA GAAGATATGT CTATTCAAT ATAGTTTCGT TTTTAAAGCA TAATATTAAC
 TTATCTTTAT CTATTTTTTC TGAACACATT TAAATTGAAA TAACATTTAA AGTATATCAC CTAATATTTA AATTTTAAAA
 TATAATTGAG AAAAGTAATT AAATGATGTT AAGATGAAAA CAGAACAAAC

(6) 「しゅまり」のE-AAG/M-GAT-126 (斑小粒系-1) 対立座領域

AGCTATTATT TAAAAAGTT GAGATGAGTA ATGTCAAATA AAATGTTAAA ACGGATTTAG TGGTCATTGA ATGAAAAATGT
 TCTCTTTGGA CAACTGCAA GTCAAAAAAC TCATTGACTC GGTGGTCGTT GAGCGTGTAT AAACGTAAAG AACACAACGA
 ACGCATGGAT CGGTGGGAGA TGACAGTGC TTCTATTGAC AGCGTCTGAA AAACGACAAC CTAGAAAAGC AATGACGTCA
 ACAGTGTGGG GAGGCAATGA CATTGAAGGA GTGGAGGCAA CTACTCATTC GTGAAGTGAT ACATGATGCG TGAATGAAC
 TTAACAAGA GTGAAATTAG GGATTGAGAC AGTGATTTAA TAATTGTTAT AGACTGTTAT AGAATTATTT ATAGACTGAA
 GTTTGTTACA TTAATAAATA AGAAGTTACT TAAATAAAAA GAGATAATGT ATATCTTATT CATGAGAGTG TGGTTTCCTT
 TTCTTCAAAC ATAATATTA CTTGTCCTTA ACTATTTCTT ATGAACAAAT TTAATTTGA ATAGCATCTA AAATATATGA
 CATAAATTT TTTATTCATA TAAAAACAT TGTAAGGAA ATTTATAAAA AAAAATAATT AGAAGATAAA ATATAATAGA
 GTGAATTGAA ATAAAAAAA TAAGATGATA CAAAGAATAA TAACATTATT TTAACAGAAT GACCTGGGAG AGAATGAAAT
 ATAATACTTT AGAAATATGT ATTTGAGAAG GTTGAGAGTA CAAAAAGAAA AGAGTTCAAG ATAATAAACA GAAAAAATT
 CTACATCAA GATTCCTCAA ACACGATAAT TATTTGATGA AATTATTTTA TTCATGAGAT AATTTACCA ATGTTTCAA
 TATTAGTTA GAGTGTGGG ATAAGTTGA TAATGGACAT TTCAACGGTG AATATGCAA CTTTAAAGTT AATACAAGAT
 ACATCTTTTT CCTCTGCTAT GTTTAGGTT TTATCTATGT TTTCATATGT TTTGGAATAA GATGTTGAT TTTCTAGAT
 TTTATAAAGA **ATTCATGTTT TTCTTTGCA ATAGAATTAC AAGTCCGTTG ATAATTTACT GGTATGATT TTCTTATT**
TTGTGGTTTT GATGTAAGGG ATATATCAAT GTGCTTTTAA CATAAAAATT TACTCTTTTG AATATGTTCC CTGATAATAC
 GTAGCACCAA CACTCAAATT ATGTTTATC AAATTTATTG ACTTTGTTTT TCTGTTGAA ATATGATTTT ACAGTTTTTG
 ACTAAATAA AATTATATAT TCAAGTTCTA TCTTAAACGA ACCTTTTCTA TTTTACCTAT AGTTTTATTT TCTTTTATAA
 GAAAAATAAC TATAACTTGT CGTGAGGTTT TTTTTATTG CAACTTTTA CATTAATAA AATAATCCAT ATGAAATTTA
 TCAATCTCCA ATCTTAAAT AACTTCATA ATTAAGTTT GTCAGTCACA CATTAATATA TAAAAATTTG CGTAATAAAT
 GGAGATAGTG TCTTATCAA AACATAGTTT CATTTCTTTA AAGGTAATAT TAACTTATAT GCTTTACTAT TTCTTTTACA
 CACATTTATA TTTAATAAC ATCTAAAGTA TATCAACTCA TATTTAAAAT ATAACGTAAG TAATAGATAA TGTTCATATG
 TAAACGGAAC AACATAAGA TACAATTTG GTTATTTTTT ATAAATTTAA TCAAATATTA CATTAATCAA ACGAGATTAT
 CTAATCAGAC AAAACTTCGT GTCCATGATT AATATTAGAG GTTATAAATA TCAATTGAAT TGTACTAAAT AGTAAATAAA
 TGTATTAAT TAAAAATAG TTTGTGTTAA CTGAATTGAT CTAACATAA TTAATTTTTG TTTAATAAAA CTGAGCT

(7) 「斑小粒系-1」のE-ATG/M-AAG-132とその周辺領域 (8)の対立座領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

AGCTTG CATA AGGACTGTAC CTGTATAATA AGTTGATTAT ATATAGCATA CGAAATTTAC TTATTCTATC ACTAAACTTT
 AATTATATAC CTATAGATAT ATAATTTTGG ATAATTCAAT TGTAGCACAA GAATTGAATT ACAATGTTGT CTGATGTGAT
 AATTCATTTT TTTTCGTAGG TTTTATCTAT GTTTTCTGAT GAATTAAGG ATGAATCTTC TCCTTTCCT AGAATGCAAA
 CTTTTGAATT AACATGTGAT GCATCTTCCT CCTCTGCCAT GCCTCAGGAC GTAAAAAAT ATTTATTTGG TGCATCTTGT
 TGATTTGATT TACATGGATG TGAAGGTAAG TTATACTAAA GTGTTTGT TTTAAATATA AAAACAATTA TTTCTTTTTC
 TGAATATTAT GATGTTTATT TTGATTATAG GAGCAAAACG GAAAAACTAA TACCGTTGAA GATGAAATG GATGTTGTAT
 TTTTCTATGT TTTATAAGGA ATTCATGTTT TTGTTTCTGA ATAGGATAGT ATTCCCGGTG ATTATTCCTT GTTTCGTAGT
 CTTGATGTAA GGGATATATC ATATATACTC AAGTTCTATC TTAATGATA AATCTTTTTT ATTTTACCTA TAGTCTATG
 TTCTTTTATA GGTTAAATAC CTAAAACTTG TTGTGATTTT TTTTTATTAT AAACCTTTTAC GTTAAAAATA ATAATCCAAA
 TGAATTTTTG TACTCCAATC CTAATAAAC TCCATAAGTT AAATTGTTAG TCACATTAAT ATTTAAAAAT TACTTAAAT
 AAATGGAGAT GATGCTTAT TCCAGTTATA GTTTCGTTTT TAAGCATAAT ATTAACCTAT CCTTATCTAT TTCTTCTGAA
 CATATTTAAA TTTAAATAAC ATTTAAAAATA TATGATCTCA TATTTAAAAT ATAACAAAAC CAAAATATAC AAATTTTGTA
 AAGGAAATTT ATAAAAAAA TAATTAGAAG GTAAAAATA ATAGAGTGAA TTGAAATAAA AAAAAGATGA TACAAAGAAT
 AATAACATTA TTTTAACAGA ATGACCGGGG AGAGAATGAA ATATAATACT TTAGAAATAT GTATTTGAGA AGGTTGAGAG
 TACAGAAAGA AAAGAGTTCA AGATAATGAA CAGAAAAAAA TTCTACATCA AAGATTCTTC AACACGATA ATTATTTGAT
 GAAATTTT TATTCATGAG ATAATTTTAC CAATGTTTTT AATATTAGTT TAGAGTGCA GGATAAGGTT GATAATGGAC
 ATTTCAACGG TGAATATGCA AACTTTTAAAG TTAATACAAG ATATATCTTT TTCCTCTGCT ATGTTTTAGG TTTTATCTAT
 GTTTTCATAT GTTTTGAAT AAGATGTTGT ATTTTCTAG ATTTTATAAA **GAATTCATGT TTTTCTTGT CAATAGAATT**
AGAAGTCCGT TGATAATTTA CTGGTCATGA TTTTTCCTTA TTTTGTGGTT TTGATGTAAG GGATATATCA ATGTGCTTTT
GCTCTTAACA TAAAAATTTA CCTCTTTTGA ATATGTTCCC TGATAATACG TAGCACCAAC ACTCAAATTA TGTTTTATCA
 AATTTATTTA CTTGTTTTTT CTGTTAGAAA TATGATTTCA CAGTTTTTGA CTAATAAAAA ATTATATATT CAAGTTCTAT
 CTTAAACGAA CCTTTTCTAT TTTACCTATA GTTTTATTTT CTTTATAAG AAAATAACT ATAACCTGTT GTGAGGTTTT
 TTTATTGCAA ACTTTTACAT TAAAAATAAT AATCCATATG AAATTGATCA ATCTCCAATC TTAATAAATC TTCGTAAATT
 AAAGTTCGTC AGTCACACAT TAATATATAA AAATTTGCGT AATAAATGGA GATAGTGTCT TATTCAAAAC ATAGTTTCAT
 TTCTTTAAAG GTAATATTAA CTTATATGCT TTACTATTTT TTTTACACAC ATTTATATTT TAATAACATC TAAAGTATAT
 CAACTCATAT TAAAAATATA ACATAAGTAA TAGATAATGT TCATATGTAA ACGGAACAAA CATAAGATAC AAATTTGGTT
 ATTTTTTATA AATTAATCA AATATTACAT TAATCAAATG AGATTATCTA ATCAGACAAA ACTTGGTGTG CATGATTAAT
 ATTAGAGGTT ATAAATATCA ATTGAATTGT ACTAAATAGT AAATAAATGT ATTAATTTAA AAAATAGTTT GTCTGAATTG
 ATCTGAACTA AATTAATTTT TGTTTAAATA AACTGAATAT AACTATTATT CAAACTTAAA ATAATTCAT AAATTAACATA
 ACTACGTAGT TAATCATAGT TAGTTAAATA TGATTAAGTA ATTACATTTA GTTAATCGTG ATTAGTTGGT TAGCT

(8) 「しゅまり」の E-ATG/M- GAG -138 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

CAATTCACA TTGCATTGAG TTCTGAATTG TACTTTTCAA GTTACCTGAT CCAAAGAGTT GGACATTTAG ATCTCTACAA
 GGAGGAGTTC ACACCTTTTT TCACCAACAT TTCTCTCGTT ACTGATGGCT TATTTTGAGT GAATTTAAGA AGATTTGAAA
 ATAAATTTTT TTATTGTTA TTTGAGTGAA TTTGGAGATA AATGATAGTG AATTTGGAAA TAAATTTTTT TAATTTATCA
 CGTCAATACA ATTCTATACT AATTCTCATA AATTTTATTT TCAAATTCAT TCTCATTTAC TTTAAATTTA CTCAAAATAA
 CGATAAAAAA AATTTATCTT CGAATTCCTT CTAAGAACA ATACCTACGG ATTTCAAAT CAAAGCCTTG CTGGTCCCA
 ACTTCTGTTT AAATATTGAA TCAGTTTTTA TCTTTATCAG TTTCTTAATA TTGGTTTACT GATCATATAA GCTCAGTCTA
 ATTACATAAA AAAAATTGAC ATTATTCTCT GAAAAAAAT TTAACTTTAA GATAAGTTAA CGAATCTTTG TCTTTATATA
 GTATTCAACT TTTTATTTT ATCTTACTTT TTTATTTTAT CTTACGTGAG ATTTAAATTT ACCTTAAAA TTCTAACACT
 GTACAACAAGA AATTTATGAA GGAACCTTGA AGGTATGGAG CAAGCTGAAC TTGAAAAAAC TAGGAATATA TTTTCTGATG
 TTAATTTCTC TTATGATGAA ATACCAAAAA GCTTCGGTTT TAGATTATAT TTTGTTCAAC CAGAATTTCT AACATAGTTG
 ACATTCTGGA GTATTTACTT TACCTTAAGC ACCATCATT CAAAGATCCA AAGCTGTTGA AGTTGGATAC AAAGGAGAAA
 CAGATCGATG ATGATTCTGT ACGGAAATCT TGTTCTGTGT AAACAGACGA AAGCAAATC ATAGATGATT TGG

(9) 「斑小粒系-1」のE-ACA/M-GAA-139 (しゅまり) 対立座領域

TATAAATTAC AATTTACAT TGCATTGAGT TCTGAATTGT ACTTTTCAAG ATACCTGATC CAAGGAGTTG GACATTTAGA
 TCTCTACAAG GAG**GAATTCA CACCTTTTCT TACCAACATT TCTCTCTATA CTAAGGGTTT CAAAATCGAA GCCTAGCTTG**
GTCCCAACTT CTGTTCAAAT ATTGAATCAG TTTTATCTT TATGAGTTTC TTAATATTGG TTTACTGATC ATATAAGCTG
 ACTCCAATTA CATAAAAAAT TGA AAAATTGA CACTATTTTC TGTA AAAAAA ATTAATTTTA AGATAAGTTA ATAGATCTTC
 ACTTTATATA TAGTATTCAA CTTTTTCATT TTATCTTACG TGAGATTTAA ATTTACACTT GAAATTCCAA CACTGTCAAC
 AAGAAATTTA TGAAGGAACT TTGAAGGTGA TGGAGCAAGC TGAACCTGAA AAAACTAGGA ATATATTTTC TGATGTTAAA
 TTCTCTTATG ATCAAATACC AAAAAGCTTC GGTTTTAGAT TATATTTTGT TCACCCAGAA TTTCTAACAT ACTTGACATT
 CTGGAGTATT TACTTTACCT TAAACCCAT CATTCCAAGA ATCCAAAGCT ATTGAAGTTG GATACAAAGG AGAAACAGAT
 CGATGATGAT TCTGTACAGA AATCTTGTTT GTGTGAAACA GACGAAAGCA AAATCATAGA TGATTTGG

(10) 「しゅまり」のE-ACA/M-GAA-139 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

図2-2-3 「斑小粒系-1」および「しゅまり」の AFLP 増幅断片およびその周辺領域の塩基配列

表 2-2-3 AFLP 増幅断片周辺配列を用いて設計した DNA マーカー

マーカー名	プライマー		塩基配列 (5'-3')	アニーリング温度 (°C)
Pg77	Pg77F	Forward	CCAAAGTAGAAAATAAGGAAACAGTAC	60
	Pg77R	Reverse	ATGGTTGTGAATTTATGTGTGAATC	62
Pg118	Pg118F	Forward	GGAATTCACCTCGAGTCATAATTC	61
	Pg118R	Reverse	AACATTTACTTAGCTACACTTTTGACA	60
Pg126	Pg126F	Forward	GTCGTTTATTTTGGTTATAGGAGCA	62
	Pg126R	Reverse	CCTGAATATATAAGATATATCCCGGGAC	64
Pg138	Pg138F	Forward	GGATATATCAATGTGCTTTTGCTC	65
	Pg138R	Reverse	GTGTGACTGACGAACTTTAATTTAC	59
Pg139	Pg139F	Forward	CTTACCAACATTTCTCTCTATACTAAG	56
	Pg139R	Reverse	GGATTCTTGGAAATGATGGTGT	62

(注) すべて抵抗性型 (しゅまり型) が増幅される優性マーカー

表 2-2-4 斑小粒系-1/しゅまり F₃ 個体におけるアズキ落葉病菌レース 1 抵抗性と遺伝子型 (抜粋)

系統名	落葉病菌レース 1 抵抗性	DNA マーカーによる遺伝子型				
		Pg139	Pg118	Pg126	Pg77	Pg138
0125-1-1	S	-	-	-	-	-
0125-1-4	S	-	-	-	-	-
0125-1-6	S	-	-	-	-	-
0125-1-10	R	+	+	+	+	+
0125-1-12	S	-	-	-	-	-
0125-4-5	S	-	-	-	-	-
0125-4-8	R	+	+	+	+	+
0125-4-11	S	-	-	-	-	-
0125-4-12	R	+	+	+	+	+
0125-6-57	S	-	-	-	-	-
0125-6-59	S	-	-	-	-	-
0125-6-60	S	-	-	-	-	-
0125-6-61	S	-	-	+	+	+
0125-6-62	S	-	-	-	-	-

注 1) 調査した 105 系統から抜粋. ヘテロ型の系統は感受性を示した個体から DNA を抽出した.

注 2) R: 抵抗性 S: 感受性

注 3) +: 「しゅまり」(抵抗性) 型 -: 「斑小粒系-1」(感受性) 型

次にすでにアズキ落葉病の抵抗性評価が行われている品種および遺伝資源についてDNA マーカーで遺伝子型を調査した。アズキ落葉病菌レース2にも抵抗性を示す「Acc259」「赤豆」以外はすべてPg118, Pg77, Pg126, Pg138の遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性の表現型が一致

した(表2-2-5)。Pg139は品種によっては「しゅまり」と同じ遺伝子型でも感受性を示すものがみられた。また抵抗性遺伝資源である「小長品-10」およびその後代は、Pg139では「斑小粒系-1」型の遺伝子型を示した。

表2-2-5 品種および遺伝資源のアズキ落葉病菌レース1抵抗性と遺伝子型

品種	落葉病菌レース1 抵抗性	DNA マーカーによる遺伝子型					抵抗性供与親
		Pg139	Pg118	Pg126	Pg77	Pg138	
斑小粒系-1	S	-	-	-	-	-	
剣先	S	+	-	-	-	-	
茶殻早生	S	+	-	-	-	-	
早生円葉	S	-	-	-	-	-	
早生大粒	S	-	-	-	-	-	
高橋早生	S	-	-	-	-	-	
黒小豆(岡山)	R	+	+	+	+	+	
円葉(刈63号)	R	+	+	+	+	+	
小長品-10	R	-	+	+	+	+	
赤豆	R	-	-	-	-	-	
Acc259	R	-	-	-	-	-	
宝小豆	S	+	-	-	-	-	
光小豆	S	+	-	-	-	-	
寿小豆	S	-	-	-	-	-	
栄小豆	S	+	-	-	-	-	
ハヤテショウズ	S	+	-	-	-	-	
エリモショウズ	S	-	-	-	-	-	
ハツネショウズ	S	-	-	-	-	-	
サホロショウズ	S	+	-	-	-	-	
アケノワセ	S	-	-	-	-	-	
きたのおとめ	R	+	+	+	+	+	円葉(刈63号)
しゅまり	R	+	+	+	+	+	黒小豆(岡山)
早生大納言	S	-	-	-	-	-	
暁大納言	S	-	-	-	-	-	
アカネダイナゴン	S	-	-	-	-	-	
ベニダイナゴン	S	+	-	-	-	-	
カムイダイナゴン	S	-	-	-	-	-	
ほくと大納言	S	+	-	-	-	-	
とよみ大納言	R	-	+	+	+	+	小長品-10
ときあかり	R	+	+	+	+	+	黒小豆(岡山)
ホッカイシロショウズ	S	+	-	-	-	-	
きたほたる	R	+	+	+	+	+	円葉(刈63号)

注1) R:抵抗性 S:感受性

注2) +:「しゅまり」(抵抗性)型 -:「斑小粒系-1」(感受性)型

考 察

異なる F₃ 系統由来の 105 個体の遺伝子型と表現型は 1 個体を除いてすべて一致していた (表 2-2-4) ことから, すべてのマーカーが *Pga1* と 1cM 以内で連鎖していると考えられた. また, 5 つのマーカーの中では Pg118, Pg139 が *Pga1* により近い位置に座乗していると推察された.

表 2-2-5 の結果から, 開発した DNA マーカーによる遺伝子型は, 「黒小豆 (岡山)」に加えて, これまでアズキ落葉病抵抗性遺伝資源として多用されてきた「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」およびその後代にも適用可能であると考えられた. F₃ 系統の結果では Pg118, Pg139 が *Pga1* により近いと考えられたが, Pg139 は「小長品-10」や複数の感受性品種において遺伝子型と抵抗性型が一致しなかったことから, 抵抗性遺伝子に最も近く, 「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」についても適用可能な Pg118 が育種選抜において最も適した DNA マーカーであると考えられた.

千葉ら (1982) は「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」についても「黒小豆 (岡山)」と同様にアズキ落葉病抵抗性に優れた遺伝資源であることを報告しており, これらを系譜にもつ「きたのおとめ」「とよみ大納言」「きたほたる」についても Pg118 の遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性が一致したことから, 「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」は「しゅまり」や「黒小豆 (岡山)」と同様の抵抗性遺伝子 *Pga1* を有する可能性が高いと考えられた.

一方でアズキ落葉病レース 1 抵抗性である「赤豆」および「Acc259」は, 開発した DNA マーカーによる遺伝子型と表現型が一致しなかった. これら 2 品種は「きたのおとめ」「しゅまり」などが侵されるアズキ落葉病菌レース 2 に対して抵抗性を示す (藤田 2007) ことから, *Pga1* 以外の抵抗性遺伝子を持っている可能性が高いため, 遺伝子型と表現型が一致しなかったと考えられた.

第 3 節 Pg118 の共優性化と有効性の検証

目 的

品種改良を行う際は, アズキ落葉病感受性ホモ接合型およびヘテロ接合型の個体を廃棄するために用いることが想定されることから, 育種選抜に最も適した DNA マーカーと考えられる Pg118 を共優性マーカーに改良する. また, 改良した共優性マーカーについて, 育成系統および遺伝資源を利用してその有効性を検証する.

材料および方法

(1) DNA マーカーの共優性化

道総研では, アガロースベースの DNA マーカーはすべての作物において 2% アガロースゲルで同じ程度の泳動距離で確認できるよう, 短い増幅断片が 200 から 400bp, 長い増幅断片が 500 から 700bp 程度になるように設計している. 第 2 節と同様の方法で複数のプライマーを設計し, 様々な組み合わせで PCR を行い, 感受性型が短い断片, 抵抗性型が長い断片となり, ヘテロ型の個体で二本の増幅断片が同じ濃さとなるプライマーを選定した.

(2) 育成系統および遺伝資源を用いた有効性の検証

アズキ落葉病圃場検定に供試した 150 点の育成系統について, 遺伝子型と表現型を調査した. また十勝農試の遺伝資源における過去の成績より, アズキ落葉病抵抗性の可能性がある 209 点について, Pg118 の遺伝子型を調査した. 「しゅまり」型を示した遺伝資源を選抜し, アズキ落葉病菌レース 1 菌株に加え, レース 2 菌株 (T96-5, MAFF 241057), レース 3 菌株 (T650, MAFF 241055) を第 1 節と同様の手法で接種し, 抵抗性検定をおこなった.

結 果

「しゅまり」と「斑小粒系-1」の E-ACT/M-ACT-118 およびその周辺領域のホモロジー, 設計したプライマーの位置を図 2-3-1 に示した. Pg118-15 をフォワードプライマーとした場合, 様々なリバースプライマーを利用しても「斑小粒系-1」が増幅しなかったことから, 「しゅまり」型を特異的に増幅させるプライマーとした. Pg118-21 は「斑小粒系-1」型を特異的に増幅させるプライマー, Pg118-12 を共通プライマーとした (表 2-3-1).

Pg118 共優性マーカーの電気泳動写真を示した (図 2-3-2). 小豆サンプルから DNA を抽出するまでに数時間, DNA を増幅し電気泳動を行い図 2 のように遺伝子型を確認するまで約 4 時間で作業可能となった.

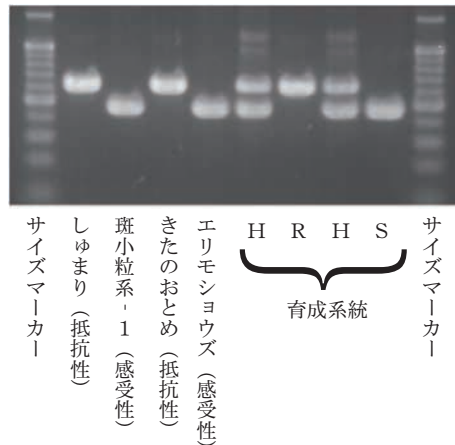
表 2-3-1 Pg118 の共優性マーカー配列および PCR 条件

(1) 共優性マーカー配列

プライマー	塩基配列 (5'-3')	アニーリング温度 (°C)
Pg118-15 Forward	AGCTCGCCACCTCATTT	64.0
Pg118-21 Forward	AAAATTGCTAGTGGAATTGACTG	60.0
Pg118-12 Reverse	GCATTTCTTTCCAGTAAAGATTACAG	64.0

(2) PCR 条件

反応液組成			PCR 条件		
D.W.	7.38	μl	94°C	2分	1 サイクル
10 × Buffer	1.00	μl	94°C	30秒	
dNTPs	0.80	μl	55°C	30秒	35 サイクル
プライマー Pg118-15	20pmol/μl	0.10 μl	72°C	2分	
プライマー Pg118-21	20pmol/μl	0.10 μl	72°C	5分	1 サイクル
プライマー Pg118-12	20pmol/μl	0.10 μl	2%アガロースで電気泳動		
ExTaq	0.03	μl			
DNA テンプレート	0.50	μl			
total	10.0	μl			

図 2-3-2 Pg118 (*Pga1* の有無を判定する DNA マーカー) を利用した検定結果

R: 「しゅまり」(抵抗性) 型 H: ヘテロ型

S: 「斑小粒系-1」(感受性) 型

圃場においてアズキ落葉病菌レース 1 抵抗性を調査した 150 の育成系統について、本試験で設計した DNA マーカーによる遺伝子型を調査した (表 2-3-3)。開発した 5 マーカーの中で、Pg118 の遺伝子型はほぼすべての抵抗性検定結果と一致した。遺伝子型が「斑小粒系-1」型だが、アズキ落葉病菌レース 1 に対して抵抗性を示した「十系 859 号」「十系 860 号」「十系 883 号」

「9707-79」「9930-4」「9931-55」の 6 系統、および遺伝子型が「しゅまり」型だが、アズキ落葉病菌レース 1 に対して感受性を示した「9715-34」「9718-2」の 2 系統、計 8 系統では抵抗性と遺伝子型が一致しなかった。

供試した遺伝資源 209 点の Pg118 による遺伝子型を表 2-3-4 に示した。遺伝子型が「しゅまり」型の品種・系統は 59 点あった。

表2-3-3 育成系統のアズキ落葉病抵抗性と遺伝子型

番号	系統名	アズキ落葉病 レース1抵抗性	Pg118の 遺伝子型	系譜にある抵抗性親
1	十育 123号	抵抗性	R	小長品 -10
2	十育 126号	感受性	S	なし
3	十育 147号	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、小長品 -10
4	十育 148号	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、小長品 -10
5	十育 149号	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
6	十育 150号	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
7	十育 151号	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
8	十育 152号	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、小長品 -10、丸葉 (刈 68)、赤豆
9	十育 153号	抵抗性	R	小長品 -10
10	十育 154号	抵抗性	R	小長品 -10
11	十系 793	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
12	十系 794	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
13	十系 811	抵抗性	R	小長品 -10、Acc86
14	十系 817	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、赤豆
15	十系 819	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、赤豆
16	十系 821	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、赤豆
17	十系 829	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、赤豆
18	十系 835	抵抗性	R	小長品 -10
19	十系 837	抵抗性	R	小長品 -10
20	十系 838	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、丸葉 (刈 68)
21	十系 839	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、丸葉 (刈 68)
22	十系 840	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、丸葉 (刈 68)
23	十系 841	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
24	十系 843	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
25	十系 844	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、小長品 -10、Acc86
26	十系 845	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
27	十系 847	抵抗性	R	小長品 -10
28	十系 848	抵抗性	R	小長品 -10
29	十系 849	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
30	十系 850	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
31	十系 851	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
32	十系 852	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
33	十系 853	感受性	S	なし
34	十系 854	感受性	S	なし
35	十系 855	感受性	S	なし
36	十系 856	感受性	S	なし
37	十系 857	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、Acc1238
38	十系 858	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)、Acc259
39	十系 859	抵抗性	S	黒小豆 (岡山)、Acc259
40	十系 860	抵抗性	S	黒小豆 (岡山)、Acc259
41	十系 861	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
42	十系 862	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
43	十系 863	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
44	十系 864	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
45	十系 865	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
46	十系 866	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
47	十系 867	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
48	十系 868	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
49	十系 869	感受性	S	なし
50	十系 870	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、Acc238

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型

表 2-3-3 つづき

番号	系統名	アズキ落葉病 レース 1 抵抗性	Pg118 の 遺伝子型	系譜にある抵抗性親
51	十系 872	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆
52	十系 873	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆
53	十系 874	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、赤豆
54	十系 875	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、赤豆
55	十系 876	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10
56	十系 877	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10
57	十系 878	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10
58	十系 879	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10
59	十系 880	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、赤豆
60	十系 881	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
61	十系 882	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)、Acc259
62	十系 883	抵抗性	S	黒小豆 (岡山)、Acc259
63	十系 884	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)、Acc2515
64	十系 888	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、Acc1238
65	9707- 2	感受性	S	黒小豆 (岡山)
66	9707- 12	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
67	9707- 19	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
68	9707- 20	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
69	9707- 35	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
70	9707- 39	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
71	9707- 50	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
72	9707- 51	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
73	9707- 79	抵抗性	S	黒小豆 (岡山)
74	9707- 96	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
75	9710- 3	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、小長品 -10
76	9710- 7	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、小長品 -10
77	9710- 17	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、小長品 -10
78	9714- 1	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
79	9714- 10	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
80	9714- 12	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
81	9714- 14	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
82	9714- 21	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
83	9714- 39	抵抗性	R	円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)
84	9715- 22	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
85	9715- 34	感受性	R	円葉 (刈 63)
86	9715- 64	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
87	9716- 16	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
88	9716- 36	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
89	9716- 42	感受性	S	黒小豆 (岡山)
90	9716- 48	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)
91	9718- 1	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
92	9718- 2	感受性	R	円葉 (刈 63)
93	9721- 7	感受性	S	なし
94	9721- 18	感受性	S	なし
95	9721- 21	感受性	S	なし
96	9721- 23	感受性	S	なし
97	9722- 18	感受性	S	円葉 (刈 63)
98	9722- 39	抵抗性	R	円葉 (刈 63)
99	9722- 47	感受性	S	円葉 (刈 63)
100	9723- 1	抵抗性	R	小長品 -10

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型

表2-3-3 つづき

番号	系統名	アズキ落葉病 レース1抵抗性	Pg118の 遺伝子型	系譜にある抵抗性親
101	9723- 6	抵抗性	R	小長品 -10
102	9723- 8	抵抗性	R	小長品 -10
103	9723- 11	抵抗性	R	小長品 -10
104	9723- 25	抵抗性	R	小長品 -10
105	9723- 26	抵抗性	R	小長品 -10
106	9723- 35	抵抗性	R	小長品 -10
107	9723- 40	抵抗性	R	小長品 -10
108	9723- 44	抵抗性	R	小長品 -10
109	9723- 56	抵抗性	R	小長品 -10
110	9723- 60	抵抗性	R	小長品 -10
111	9725- 14	感受性	S	なし
112	9725- 47	感受性	S	なし
113	9725- 51	感受性	S	なし
114	9725- 56	感受性	S	なし
115	9725- 68	感受性	S	なし
116	9727- 2	抵抗性	R	小長品 -10
117	9727- 5	抵抗性	R	小長品 -10
118	9727- 7	抵抗性	R	小長品 -10
119	9727- 9	抵抗性	R	小長品 -10
120	9728- 1	抵抗性	R	円葉 (刈63)
121	9728- 33	抵抗性	R	円葉 (刈63)
122	9728- 37	抵抗性	R	円葉 (刈63)
123	9801- 1	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10、赤豆
124	9801- 16	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10、赤豆
125	9801- 29	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10、赤豆
126	9801- 35	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10、赤豆
127	9801- 43	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10、赤豆
128	9801- 45	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10、赤豆
129	9802- 12	抵抗性	R	円葉 (刈63)、赤豆
130	9802- 16	抵抗性	R	円葉 (刈63)、赤豆
131	9802- 21	感受性	S	円葉 (刈63)、赤豆
132	9806- 15	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10
133	9806- 22	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10
134	9808- 7	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10
135	9809- 10	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10
136	9809- 17	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)、小長品 -10
137	9810- 3	抵抗性	R	円葉 (刈63)
138	9810- 21	抵抗性	R	円葉 (刈63)
139	9810- 27	抵抗性	R	円葉 (刈63)
140	9814- 4	抵抗性	R	円葉 (刈63)、丸葉 (刈68)
141	9815- 14	抵抗性	R	円葉 (刈63)、黒小豆 (岡山)
142	9815- 16	抵抗性	R	円葉 (刈63)、黒小豆 (岡山)
143	9817- 5	抵抗性	R	小長品 -10
144	9817- 10	感受性	S	小長品 -10
145	9817- 13	感受性	S	小長品 -10
146	9817- 26	抵抗性	R	小長品 -10
147	9930- 4	抵抗性	S	黒小豆 (岡山)、Acc259
148	9930- 14	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)、Acc259
149	9931- 15	抵抗性	R	黒小豆 (岡山)、Acc2515
150	9931- 55	抵抗性	S	黒小豆 (岡山)、Acc2515

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型

表 2-3-4 遺伝資源における Pg118 の遺伝子型

番号	品種・系統名	Pg118 による 遺伝子型	番号	品種・系統名	Pg118 による 遺伝子型
1	ACC 9 岩手 1-48-1	R	56	ACC 549 福島在 3	R
2	ACC 27 岩手 19-48-19	R	57	ACC 550 福島在 4	S
3	ACC 30 岩手 22-48-22	R	58	ACC 551 福島在 5	S
4	ACC 33 岩手 25-48-25	R	59	ACC 552 福島在 6	S
5	ACC 35 岩手 27-48-27	R	60	ACC 558 福島在 12	S
6	ACC 45 岩手 37-48-37	R	61	ACC 564 福島在 18	R
7	ACC 66 岩手 58-54-20	R	62	ACC 567 福島在 21	seg
8	ACC 67 岩手 59-54-21	seg	63	ACC 614 福島在 68	R
9	ACC 68 岩手 60-54-22	R	64	ACC 707 韓国 1	S
10	ACC 69 岩手 61-54-23	R	65	ACC 724 韓国 18	S
11	ACC 86 岩手 78-54-40	R	66	ACC 767 韓国 61	S
12	ACC 91 岩手 83-54-45	R	67	ACC 812 韓国 106	S
13	ACC 95 岩手 87-54-49	seg	68	ACC 829 韓国 123	S
14	ACC 136 岩手 128-54-90	R	69	ACC 839 韓国 133	S
15	ACC 151 岩手 143-54-105	R	70	ACC 951 韓国ヒメツルアズキ 222*	S
16	ACC 152 岩手 144-54-106	R	71	ACC 1028 奈良在 34	R
17	ACC 159 岩手 151-54-113	R	72	ACC 1056 岡山在 10	R
18	ACC 162 岩手 154-54-116	R	73	ACC 1635 福井在 24	S
19	ACC 163 岩手 155-54-117	R	74	ACC 1915 宮崎在 9	S
20	ACC 222 鳥取在 1	S	75	ACC 1937 宮崎ヤブツルアズキ 31*	R
21	ACC 223 鳥取在 2	seg	76	ACC 1974 鹿児島在 3	S
22	ACC 228 鳥取在 5	seg	77	ACC 2041 新潟ヤブツルアズキ 115*	R
23	ACC 239 鳥取在 16	seg	78	ACC 2042 新潟ヤブツルアズキ 116*	R
24	ACC 259 愛媛在 9	seg	79	ACC 2043 新潟ヤブツルアズキ 117*	S
25	ACC 260 新潟在 1	seg	80	ACC 2145 鳥取在 51	R
26	ACC 264 新潟在 5	seg	81	ACC 2147 新潟在 118	S
27	ACC 273 長崎在 1	seg	82	ACC 2161 新潟在 124	R
28	ACC 274 長崎在 2	seg	83	ACC 2162 新潟在 125	seg
29	ACC 275 長崎在 3	S	84	ACC 2186 奈良在 38	R
30	ACC 277 長崎在 5	seg	85	ACC 2243 ネパールヤブツルアズキ	R
31	ACC 278 長崎在 6	seg	86	ACC 2262 ブータン 17	-
32	ACC 279 長崎在 7	seg	87	ACC 2295 ブータンヤブツルアズキ	seg
33	ACC 280 長崎在 8- 大納言	S	88	ACC 2311 ブータンヤブツルアズキ	seg
34	ACC 284 栃木在 1	S	89	ACC 2463 宮城ヤブツルアズキ 1*	S
35	ACC 304 青森在 15	S	90	ACC 2464 茨城ヤブツルアズキ 1*	R
36	ACC 333 青森在 44	seg	91	ACC 2466 長崎ヒメツルアズキ 31*	-
37	ACC 349 青森在 60	R	92	ACC 2467 韓国ヒメツルアズキ 403*	S
38	ACC 385 秋田在 11	R	93	ACC 2468 沖縄ヒナアズキ 1*	-
39	ACC 388 秋田在 14	R	94	ACC 2470 沖縄ヒナアズキ 3*	-
40	ACC 422 秋田在 48	R	95	ACC 2477 沖縄ヒナアズキ 10*	-
41	ACC 424 秋田在 50	R	96	ACC 2479 沖縄ヒナアズキ 12*	-
42	ACC 428 秋田在 54	seg	97	ACC 2484 沖縄ヒナアズキ 17*	-
43	ACC 436 秋田在 62	R	98	ACC 2486 沖縄ヒナアズキ 19*	-
44	ACC 493 新潟在 24	S	99	ACC 2487 沖縄ヒナアズキ 20*	S
45	ACC 501 新潟在 32	S	100	ACC 2488 沖縄ヒナアズキ 21*	-
46	ACC 502 新潟在 33	R	101	ACC 2491 沖縄ヒナアズキ 24*	-
47	ACC 506 新潟在 37	seg	102	ACC 2497 沖縄ヒナアズキ 30*	-
48	ACC 507 新潟在 38	R	103	ACC 2499 タイ竹小豆 2*	S
49	ACC 509 新潟在 40	R	104	ACC 2502 タイ竹小豆 5*	-
50	ACC 510 新潟在 41	R	105	ACC 2503 タイ竹小豆 6*	S
51	ACC 511 新潟在 42	S	106	ACC 2514 滋賀ヤブツルアズキ 23*	R
52	ACC 533 新潟在 64	S	107	ACC 2515 石川ヤブツルアズキ 59*	S
53	ACC 534 新潟在 65	S	108	ACC 2516 石川ヤブツルアズキ 60*	S
54	ACC 535 新潟在 66	seg	109	ACC 2517 福井ヤブツルアズキ 27*	S
55	ACC 542 新潟在 73	S	110	ACC 2518 大阪ヤブツルアズキ 5*	R

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型 seg:分離 - :増幅なし

表2-3-4 つづき

番号	品種・系統名	Pg118による 遺伝子型	番号	品種・系統名	Pg118による 遺伝子型
111	ACC 2519 兵庫ヤブツルアズキ 105*	R	166	品保 472 清原春小豆	S
112	ACC 2520 兵庫ヤブツルアズキ 106*	S	167	品保 475 江原錦豆	S
113	ACC 2521 鳥取ヤブツルアズキ 56*	S	168	品保 483 慶州黒豆	S
114	ACC 2522 鳥取ヤブツルアズキ 57*	R	169	品保 487 公州白豆	S
115	ACC 2523 秋田ヤブツルアズキ 99*	S	170	品保 492 Bosodu	S
116	ACC 2524 岩手ヤブツルアズキ 235*	S	171	品保 499 Chungwon Hukdu	S
117	ACC 2526 福島ヤブツルアズキ 101*	R	172	品保 508 Garonipat(Y.G.)	S
118	ACC 2525 栃木ヤブツルアズキ 15*	R	173	品保 509 Garonipat (黒斑)	S
119	ACC 2527 長野ヤブツルアズキ 89*	S	174	品保 527 Kyungbuk Janpat	S
120	ACC 2528 群馬ヤブツルアズキ 31*	R	175	品保 534 Samjong Hukdu	S
121	ACC 2529 埼玉ヤブツルアズキ 12*	R	176	品保 535 Sisun Hukdu	S
122	ACC 2531 静岡ヤブツルアズキ 28*	R	177	品保 538 Yumseng Jekdu (赤斑)	S
123	ACC 2532 茨城ヤブツルアズキ 2*	S	178	品保 539 Yumseng Jekdu (黒斑)	S
124	ACC 2533 福島ヤブツルアズキ 102*	S	179	品保 551 ツルアズキ *	S
125	ACC 2534 高知ヤブツルアズキ 25*	S	180	品保 285 小納言 (刈 57号)	—
126	ACC 2535 新潟ヤブツルアズキ 130*	S	181	品保 288 円葉 (刈 63号)	R
127	ACC 2537 富山ヤブツルアズキ 30*	S	182	品保 289 丸葉 (刈 68号)	R
128	ACC 2538 高知ヤブツルアズキ 26*	R	183	品保 375 小長品 -10	R
129	ACC 103 岩手在 95-54-57	S	184	品保 400 黒小豆 (岡山)	R
130	ACC 158 岩手在 150-54-112	R	185	品保 491 Aansang Jekdu	S
131	ACC 195 岩手在 187- 県南在来	S	186	品保 525 Kyungbuk Jekdu D	S
132	ACC 212 奈良在 5	S	187	品保 55 小豆 (W33)	S
133	ACC 261 新潟在 2	S	188	品保 187 PHA-48	S
134	ACC 308 青森在 19	R	189	品保 188 PHA-49	S
135	ACC 356 青森在 67	S	190	品保 189 PHA-50	S
136	ACC 359 青森在 70	S	191	品保 190 PHA-51	S
137	ACC 400 秋田在 26	seg	192	品保 191 PHA-51(1)	S
138	ACC 459 秋田在 85	R	193	品保 192 PHA-52	S
139	ACC 593 福島在 47	seg	194	品保 193 PHA-53	S
140	ACC 595 福島在 49	seg	195	品保 194 PHA-55	S
141	ACC 597 福島在 51	S	196	品保 196 PHA-57	S
142	ACC 700 青森在 87	R	197	品保 532 Moonyui Jekdu	S
143	ACC 1014 奈良在 20	seg	198	品保 547 張家口緑豆 *	—
144	ACC 1635 福井在 24	S	199	品保 548 コウラ小豆 *	—
145	ACC 1915 宮崎在 9	S	200	品保 549 竹小豆 *	—
146	ACC 1974 鹿児島在 3	S	201	品保 185 WyR-8090	S
147	ACC 2790 中国 136	S	202	品保 317 花小豆 (刈 154号)	S
148	ACC 2804 秋田在 105	S	203	品保 469 丹陽紅豆 (=Danyang Jekdu)	S
149	ACC 2816 岩手在 252	seg	204	品保 479 清風黒豆	S
150	ACC 2818 中国 148	S	205	品保 494 Bongyang Jekdu	S
151	品保 271 十育 118号	R	206	品保 496 Changnam Hukdu	S
152	品保 277 ハツネシヨウズ	S	207	品保 500 Chungpung Hukdu	S
153	品保 398 大黒 (島根)	S	208	品保 512 Iseng Jekdu	S
154	品保 464 小豆 64-1 (韓国)	S	209	品保 517 Jangju Hukdu	S
155	品保 490 赤豆	S			
156	品保 501 Chungju Jekdu	S			
157	品保 502 Chungwon Bompat	S			
158	品保 503 Deksan Jekdu A	S			
159	品保 504 Deksan Jekdu B	S			
160	品保 505 Dangyang Hukdu	S			
161	品保 506 Dekreng Hukdu (赤斑)	S			
162	品保 507 Dekreng Hukdu (黒斑)	S			
163	品保 209 土系 9号	S			
164	品保 225 十系 323号	S			
165	品保 226 十系 325号	S			

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型 seg:分離 —:増幅なし

Pg118 の遺伝子型が「しゅまり」型で固定していた 59 の遺伝資源について、アズキ落葉病菌レース 1, 2, 3 を接種し抵抗性を調査した結果「Acc509」「Acc1937」

「Acc2243」はすべてのレースに対して感受性を示し、開発した DNA マーカーの遺伝子型と抵抗性の結果が一致しなかった (表 2-3-5)。

表 2-3-5 Pg118 の遺伝子型が「しゅまり」型の遺伝資源の落葉病接種検定結果

番号	アズキ落葉病接種検定結果			番号	アズキ落葉病接種検定結果		
	レース1	レース2	レース3		レース1	レース2	レース3
Acc 9	R	S	R	Acc 1028	R	S	R
Acc 27	R	S	R	Acc 1056	R	S	R
Acc 30	R	S	R	Acc 1937	S	S	S
Acc 33	R	S	R	Acc 2041	R	S	R
Acc 35	R	S	R	Acc 2142	R	S	R
Acc 45	R	S	R	Acc 2145	R	S	R
Acc 66	R	S	R	Acc 2161	R	S	R
Acc 68	R	S	R	Acc 2186	R	S	R
Acc 69	R	S	R	Acc 2243	S	S	S
Acc 86	R	S	R	Acc 2464	R	S	R
Acc 91	R	S	R	Acc 2514	R	S	R
Acc 136	R	S	R	Acc 2518	R	S	R
Acc 151	R	S	R	Acc 2519	R	S	R
Acc 152	R	S	R	Acc 2522	R	S	R
Acc 159	R	S	R	Acc 2525	R	S	R
Acc 162	R	S	R	Acc 2526	R	S	R
Acc 163	R	S	R	Acc 2528	R	S	R
Acc 349	R	S	R	Acc 2529	R	S	R
Acc 385	R	S	R	Acc 2531	R	S	R
Acc 388	R	S	R	Acc 2538	R	S	R
Acc 422	R	S	R	Acc 158	R	S	R
Acc 424	R	S	R	Acc 308	R	S	R
Acc 436	R	S	R	Acc 459	R	S	R
Acc 502	R	S	R	Acc 700	R	S	R
Acc 507	R	S	R	品保 271	R	S	R
Acc 509	S	S	S	品保 288	R	S	R
Acc 510	R	S	R	品保 289	R	S	R
Acc 549	R	S	R	品保 375	R	S	R
Acc 564	R	S	R	品保 400	R	S	R
Acc 614	R	S	R				

(注) R：抵抗性 S：感受性

考 察

育成系統における Pg118 の遺伝子型と表現型は、「黒小豆 (岡山)」以外の抵抗性遺伝資源を系譜にもつ系統についてもほぼ一致する結果となった (表 2-3-3)。遺伝子型が「斑小粒系-1」型でかつアズキ落葉病菌レース 1 に対して抵抗性を示した 6 系統のうち「十系 859 号」「十系 860 号」「十系 883 号」「9930-4」の 4 系統は「Acc259」を系譜にもち、「9931-55」は「Acc2515」を系譜にもつ。「Acc259」は、アズキ落葉病菌レース 1 に加えて、レース 2 に対しても抵抗性を示す遺伝資源で、藤田ら (2007) は「Acc259」の抵抗性も優性の 1 遺伝子座によって支配されていることを示唆していることから、「十系 859 号」「十系 860 号」「十系 883 号」「9930-4」は *Pgal* ではなく「Acc259」由来の抵抗性遺伝子を保持している可

能性が示唆された。また「Acc2515」も「Acc259」と同様にアズキ落葉病菌レース 1, 2 に対して抵抗性を示す (藤田 2007) ことから、「9931-55」についても *Pgal* 以外の抵抗性遺伝子を保持している可能性が高いと考えられた。「Acc259」「Acc2515」は、アズキ落葉病菌レース 2 抵抗性品種育成のため交配に利用されていることから、本系統については、抵抗性を判別できる DNA マーカーを開発する必要があると考えられた。一方で「9707-79」については主要なアズキ落葉病抵抗性遺伝資源は「黒小豆 (岡山)」以外にはなく、抵抗性検定のエスケープあるいは抵抗性遺伝子の極近傍で組み換えが生じている可能性が考えられた。

遺伝子型が「しゅまり」型でかつアズキ落葉病菌レース 1 に対して感受性を示した「9715-34」(9426F₄) (感受

性) × 十系 685 号 (抵抗性), 「9718-2」 (十系 706 号 (感受性) × 十系 696 号 (抵抗性)) については, 「円葉 (刈 63 号)」が系譜にあり, 兄弟系統は遺伝子型と表現型が一致している。これら 2 系統については, 抵抗性検定試験あるいは DNA マーカーによる調査のエラーの可能性が高いが, 本試験は過去の検定試験によってすでに落葉病抵抗性が明らかとなっている系統のみを使用したことから, 再試験はおこなっておらず, どちらが要因なのかは明らかではない。しかし, 後述するように落葉病レース 2 抵抗性親を系譜にもつ小豆以外では, Pg118 の遺伝子型と接種試験の結果はすべて一致していたことから, 圃場による抵抗性検定試験において落葉病以外の何らかの要因で黄化あるいは落葉症状がみられたことから感受性と判定された可能性が高いと推察される。

十勝農試には約 3000 点のアズキ遺伝資源が保存されているが, これまで予備調査でアズキ落葉病抵抗性の可能性がある遺伝資源 209 点を絞り込み, Pg118 の有無でスクリーニングしたところ約 1/4 の 59 点が「しゅまり」型を示し, 3 系統をのぞいてすべて「しゅまり」と同様にレース 1, レース 3 に対して抵抗性を示した (表 2-3-4, 5)。本試験によって, 十勝農試の遺伝資源の中には, これまで抵抗性遺伝資源として利用されてきた「黒小豆 (岡山)」「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」「Acc86」以外にも同じ抵抗性をもつ遺伝資源が多数あることが明らかとなった。これまで「黒小豆 (岡山)」「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」などを交配に利用し, 長い年数をかけて落葉病抵抗性を維持しながら品質, 農業特性に優れた品種, 系統を育成してきたことから (村田ら 1998), 本試験で明らかとなった *Pgal* を有する遺伝資源を今後積極的交配に直接利用することはないと考えられるが, Pg118 は DNA マーカーを作成した「しゅまり」以外の抵抗性遺伝資源を系譜にもつ系統の選抜も可能であることが明らかとなり, 本試験で開発したマーカーがアズキ育種で広く利用できることが示された。

一方で, Pg118 の領域が DNA マーカーを開発した抵抗性親である「しゅまり」の塩基配列と類似している可能性がある「Acc509」「Acc1937」「Acc2243」を系譜にもつ育成系統は, 開発したマーカーでは遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性が一致しない場合が想定される。このような遺伝資源が系譜にある系統は, 本試験で開発した DNA マーカーは利用できないことから注意が必要である。本試験は, 効率的に抵抗性遺伝資源を探索するため, 約 3000 点ある遺伝資源の一部のみのマーカー検定を行い, その抵抗性を調査した。すべての遺伝資源を調査し, Pg118 の遺伝子型を示す遺伝資源を探索し, 接種検定を

行うことによって, 北海道のアズキ育種において本マーカーが適用できない遺伝資源をすべて明らかとすることが可能となる。さらにアズキ遺伝資源の中には日本の各地域由来, 韓国, 中国等の海外由来の在来種などもあることから, *Pgal* の起源が推測できる可能性も考えられる。今後の研究に期待したい。

第 4 節 アズキ落葉病抵抗性育種における MAS (Marker assisted selection) の利用

目 的

小豆育種の中で MAS を利用する世代について検討する。

材料および方法

鈴木ら (2007) は小麦の顆粒性澱粉合成酵素遺伝子 (*Wx-B1*) の有無を調査する際に, 3 個体を混合して摩砕し下記 (2) の手法で抽出した DNA を利用すると, 育種現場で効率的に DNA マーカー検定ができることを示した。その事例を参考に, 発芽させたアズキの子葉 3 個体分を混合して抽出した DNA を用いて遺伝子型を判別した。

(1) 供試材料

小豆の系統育種では, 1 系統から 7 個体を選抜し, その中から 5 個体を選んで基本系統とする手法をとるため, F_6 以降系統については, 各系統それぞれ 7 個体由来の種子を用いて検定した。また F_4 世代で個体選抜を行い F_5 世代で系統播種されることから, F_5 世代は個体ごとに各 3 粒の種子を供試した。組合せについては表 2-4-1, 2-4-2 参照。

(2) DNA 抽出

簡易 CTAB 法で DNA を抽出した。手順を以下に示す。

- ① 2.2ml チューブに 5mm のステンレスビーズを一つ入れ, 2% CTAB を 800 μ l 加える。
- ② 子葉を 1cm 程度手でちぎり, 2.2ml チューブに入れ, シェイクマスターで 1~2 分程度処理する。
- ③ 62°C~65°C のインキュベーターに入れる (30 分~1 時間)。
- ④ クロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) 溶液を 600 μ l 加えて転倒混和後, 10000g で 15 分間遠心する。
- ⑤ あらかじめイソプロパノール 400 μ l を入れた 1.5ml チューブに, 上清 600 μ l を移し転倒混和後,

10000g で 15 分間遠心する。

⑥ 上清をデカンターで捨て、室温で乾燥し、TE 400 μ l に溶解。1 μ l を PCR に使用。

* 2%CTAB (2%CTAB, 0.1MTris-HCL pH8.0, 20mM EDTA pH8.0, 1.4M NaCl

結 果

F₆以降系統では、前の世代において圃場で判定した落葉病抵抗性と、次の世代の DNA マーカー検定による遺伝子型はほぼ一致した (表 2-4-1)。

F₅世代においては、各組合せのマーカー検定結果は、前年度の供試圃場の影響を大きく受けていた。すなわち落葉病菌レース 1 汚染圃場で集団選抜を行った交配番号 0115, 0119, 0213 は「しゅまり」(抵抗性)型を示す系統が多かった。一方落葉病菌レース 2 汚染圃場で選抜を行った交配番号 0102, 0208, 0209 は片親が *Pga1* を保持する親を交配に利用しているにもかかわらず、「斑小粒系-1」(感受性)型を示す系統が多かった。また F₄世代で落葉病抵抗性選抜を行っていない交配番号 0201, 0104, 0120, 0221 は落葉病菌レース 1 汚染圃場で選抜した集団と比較すると「しゅまり」(抵抗性)型の割合が少なかった。

表2-4-1 F₆世代以降系統のDNAマーカー検定結果

系統番号	世代	母	父	前の世代の圃 場検定結果	DNAマーカー検定結果 ^{①)}								
					1	2	3	4	5	6	7		
0007-1	F ₆	十系809号	十系793号	R	R	R	R	R	R	R	R		
0007-3				R	R	R	R	R	R	R	R		
0007-5				R	R	R	R	R	R	R	R		
0007-6				R	R	H	R	H	H	H	H		
0008-23				F ₆	十系807号	十系799号	R	R	R	R	R	R	R
0008-28	(R)	H	S				S	R	H	H	H		
0011-3	F ₆	十系793号	9728-3(F ₄)	R	R	R	R	R	R	R			
0011-6				R	R	R	R	R	R	R	R		
0011-8				R	R	R	R	R	R	R	R		
0011-16				R	R	R	R	R	R	R	R		
0011-26				R	R	R	R	R	R	R	R		
0011-42				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-22				F ₆	十系807号	十系794号	(R)	R	R	R	R	S	R
0015-23	(R)	R	R				R	R	R	R	R		
0015-1	F ₆	十系794号	9728-3(F ₄)	R	R	R	R	R	R	R			
0015-9				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-10				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-12				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-15				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-18				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-20				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-21				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-26				R	R	R	R	R	R	R	R		
0015-30				R	R	R	R	R	R	R	R		
0016-31				F ₆	十系793号	冀紅小豆3号-1	R	R	R	R	R	R	R
9923-18-1				F ₇	十系746号	ベニダイナゴン	R	R	R	R	R	R	R
9923-18-2							R	R	R	R	R	R	R
9923-18-3	R	R	R				R	R	R	R			
9923-18-4	R	R	R				R	R	R	R			
9923-18-5	R	R	R				R	R	R	R			
9924-14-1	F ₇	十系740号	十系666号	R	R	R	R	R	R	R			
9924-14-2				R	R	R	R	R	R	R			
9924-14-3				R	R	R	R	R	R	R			
9924-14-4				R	R	R	R	R	R	R			
9924-14-5				R	R	R	R	R	R	R			
十系864号-1	F ₉	9429F ₄	十育140号	R	R	R	R	R	R	R			
十系864号-2				R	R	R	R	R	R	R			
十系864号-3				R	R	R	R	R	R	R			
十系864号-4				R	R	R	R	R	R	R			
十系864号-5				R	R	R	R	R	R	R			
十系889号-1	F ₈	十系741号	斑小粒系-1	R	R	R	R	R	R	R			
十系889号-2				R	R	R	R	R	R	R			
十系889号-3				R	R	R	R	R	R	R			
十系889号-4				R	R	R	R	R	R	R			
十系889号-5				R	R	R	R	R	R	R			
十系901号-1	F ₈	エリモシヨウズ	十育141号	R	R	R	R	R	R	R			
十系901号-2				R	R	R	R	R	R	R			
十系901号-3				R	R	R	R	R	R	R			
十系901号-4				R	R	R	R	R	R	R			
十系901号-5				R	R	R	R	R	R	R			
十系904号-1	F ₈	ほくと大納言	9420-24	M	S	S	S	S	S	S			
十系904号-2				M	S	S	S	S	S	S			
十系904号-3				M	S	S	S	S	S	S			
十系904号-4				M	S	S	S	S	S	S			
十系904号-5				M	S	S	S	S	S	S			
十系905号-1	F ₈	ほくと大納言	9420-24	分	S	S	S	S	S	S			
十系905号-2				M	S	S	S	S	S	S			
十系905号-3				M	S	S	S	S	S	S			

表 2-4-1 つづき

系統番号	世代	母	父	前の世代の圃場検定結果	DNA マーカー検定結果 ^{注)}						
					1	2	3	4	5	6	7
十系 905 号 -4				分	S	S	S	S	S	S	S
十系 905 号 -5				分	S	S	S	S	S	S	S
十系 906 号 -1	F ₈	9426-71(F ₆)	十系 726 号	R	R	R	R	R	R	R	R
十系 906 号 -2				R	R	R	R	R	R	R	R
十系 906 号 -3				R	R	R	R	R	R	R	R
十系 906 号 -4				R	R	R	R	R	R	R	R
十系 906 号 -5				R	R	R	R	R	R	R	R
十系 910 号 -1	F ₈	9825F ₁	エリモシヨウズ	分	R	R	R	R	R	R	R
十系 910 号 -2				R	R	R	R	R	R	R	R
十系 910 号 -3				R	R	R	R	R	R	R	R
十系 910 号 -4				R	R	R	R	R	R	R	R
十系 910 号 -5				R	R	R	R	R	R	R	R

(注 1) 下線が抵抗性遺伝資源を系譜にもつ親

(注 2) 圃場検定 R: 抵抗性 (R): おそらく抵抗性 M: 中間的抵抗性 分: 分離

(注 3) DNA マーカー検定結果 個体ごとに 3 個体の種子を供試

R: しゅまり (抵抗性) 型 S: 斑小粒系-1 (感受性) 型 H: ヘテロ型

表 2-4-2 F₅ 世代の DNA マーカー検定結果

交配番号	組合せ		前世代供試圃場	供試個体数	DNA マーカー検査結果		
	母	父			R	S	H
0115	美甘大納言	十育 145 号	レース 1 汚染圃場	31	20	0	11
0119	9829-109(F ₄)	9622(F ₆)	レース 1 汚染圃場	32	22	0	10
0213	十系 798 号	9830F ₅ -41	レース 1 汚染圃場	63	51	4	8
0102	Acc812	十育 149 号	レース 2 汚染圃場	130	1	71	58
0208	十系 793 号	9931F ₇ -55	レース 2 汚染圃場	67	3	31	32
0209	十系 793 号	9930F ₇ -3	レース 2 汚染圃場	46	0	36	10
0201	0113F ₁	十育 150 号	大樹耐冷性検定圃場	106	71	31	4
0104	十育 149 号	9618-21 (F ₆)	中央現地選抜	59	45	5	9
0120	十育 143 号	アカネダイナゴン	中央現地選抜	53	26	18	9
0221	十育 150 号	0120F ₁	中央現地選抜	35	28	2	5

注) R: 「しゅまり」(抵抗性) 型 S: 「斑小粒系-1」(感受性) 型 H: ヘテロ型 斜体はレース 2 抵抗性系統

考 察

前の世代の落葉病圃場検定の結果で、抵抗性か否かを断定できなかった「0008-28」, 「0014-22」は次の世代の DNA マーカー検定結果では分離していた (表 2-4-1)。また「0007-6」は圃場では抵抗性と判定されたが、ヘテロ型の個体が混入していた (表 2-4-1)。DNA マーカーによる検定ではこのような分離個体が確実に判定できることが明らかとなり、系統播種をして圃場で判定するよりも確実にヘテロ個体、感受性個体を排除できると考えられた。

Pga1 は優性遺伝することから、落葉病レース 1 汚染圃場に供試された集団では、感受性の個体が排除されていたが、ヘテロ型の個体は排除できていなかった (表 2-4-2)。またアズキ落葉病汚染圃場に供試していない集団に関しては、感受性に固定した個体も選抜されていた (表 2-4-2)。小豆育種では、F₅ 世代から系統播種を行い、F₄ 世代で個体選抜された系統はアズキ落

葉病検定圃場に系統播種されてきた。今後播種前の種子から DNA を抽出して、ヘテロ型、あるいは感受性型で固定した個体を排除できれば、圃場の利用面積の削減に大きく貢献できると考えられた。

十勝農試では 3 レース抵抗性品種の育成を目指し、*Pga1* 保持系統にアズキ落葉病菌レース 2 抵抗性を導入するため、*Pga1* 保持品種・系統とレース抵抗性の「Acc259」の後代などのレース 2 抵抗性系統を交配していたが、レース 2 汚染圃場で選抜を行った系統群はしゅまり (*Pga1* 抵抗性) 型の個体が非常に少なかった (表 2-4-2)。*Pga1* と「Acc259」由来の抵抗性遺伝子が遺伝的に独立な場合は、1/2 の確率で *Pga1* 保持系統が出現することが予想されることから、*Pga1* と「Acc259」由来の抵抗性遺伝子は強連鎖あるいは対立遺伝子である可能性が示唆された。また本結果より、主導遺伝子によって 3 レース抵抗性品種を育成するのは困難であると推察された。

第3章 アズキ落葉病菌レース2 抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーの開発

第1節 AFLP 法による多型マーカーの探求

目 的

第1章で明らかとなった *Pga1* を持たない、アズキ落葉病抵抗性遺伝資源「Acc259」の抵抗性を判別する DNA マーカーを開発するため、アズキ落葉病菌レース2 抵抗性系統群あるいは感受性系統群に特異的なマーカーを探求する。

材料および方法

アズキ落葉病菌レース2 抵抗性遺伝資源「Acc259」と同感受性遺伝資源「斑小粒系-1」の単交配由来の F_3 世代 105 系統を、抵抗性検定試験に供試した。

接種菌株はアズキ落葉病菌レース2 分離株 T96-5(NIAS Genebank accession no. MAFF241057) を用い、第1章と同様の条件で接種および AFLP 解析を行った。

結 果

F_3 世代 105 系統を用いてアズキ落葉病菌レース2 を接種検定し、 F_2 世代の表現型を推定した。観察値は抵抗性ホモ型：ヘテロ型：感受性ホモ型 = 23 : 58 : 24 となり、1 遺伝子支配による理論値に適合した(表3-1-1)。抵抗性ホモ型、感受性ホモ型と推定した系統からそれぞれ 12 系統をバルク構成系統として選抜した。

AFLP 解析の結果、抵抗性あるいは感受性バルク

表3-3-1 斑小粒系-1/Acc259 F_2 系統の推定表現型

観察値			理論値			χ^2	<i>P</i>
R	H	S	R	H	S		
23	58	24	26.3	52.5	26.3	1.17	0.56

注) R : 抵抗性ホモ接合型 H : ヘテロ接合型

S : 感受性ホモ接合型, 数字は系統数

に特異的な6つの増幅断片 E-AGC/M-TAA-489, E-ACA/M-AAT-204, E-AGG/M-GTT-189, E-AGA/M-CTT-336, E-ATT/M-AGC-208, E-ATT/M-AGC-210 が検出された。これらの配列の中で、先に周辺領域の配列が解析できたのは感受性バルクに特異的に見られた E-ACA/M-AAT-204 おおび E-ATT/M-AGC-208, 抵抗性バルクに特異的に見ら

れた E-ATT/M-AGC-210 だった。両親の E-ACA/M-AAT-204 およびその周辺配列を図3-3-1に示した。また, E-ATT/M-AGC-208 および E-ATT/M-AGC-210 は AFLP 増幅断片内の2塩基以外の配列はすべて一致していた(図3-3-2)。

GGCCATTTCT ACCATCCCGT GATTATACTA GACATTCTGT CATACTAG CCAGCAACCA TTCGTGTAC TGAGGAAGAC
 AGTGTCTCT TTACATGCGC TCATTCAATT TTATCACAAG CTACAAATTC CTCGTGCAA ACAACACGTT TAGAATATTA
 TAACTTTCA **TGAACCTAAC TTTOGAATTC ACAGACTACT CACAGGTATT GATOCATTC CCCTTGACAG CAAGGGCAAG**
CCAAAGCTTC CCATCCTTTT GTTCCGTGT GAAATATCGA AGCAAAATGC CTCACTTTAT AGACGAAAGT AAAGTACCAA
TOGCCTAGGT ATGCGCTGGC ATGGTTGCT AAACATATCC TGATTTTAAA TAGTTCATCC ATTCCCCCTC CTAATTGTTT
 ACTGCTATTA CACAGAACAT GGAATTTGAC TACAAAGTAC TCCAAATCCA TCTGCCGTAT CATGGACACA CAGTGCAAAA
 GGACAGGTAC GGAGACACAT CTTCAACCGA ACTGGTTAAG GATACTTCA TCCTGAGAAG TTATTCATTA GGTGAAAAA
 AAACCTTAAT CTTAGAGGT TCCTTTTCCA ATTAATCAAT GCCTTGCCAG GGTAATAGGC TCAGGAACAC AACTTCTACA
 TGCCCCAATT CGTGTACTAA CTTTATGAAA ACTATAAGAT AAGAAAAAC AATTCAAACA TTCACTCACA TCATCCAGCA
 GCATATTGTT GCAGTAAGAA CCAAGGTTAG GTGAAATCTG CAACAGAGTA GTAAGATATT AATTCATACA GAGAATAATA
 ATTTGAGAGA GAAATATTA TCATGGACAG AGAAAGAGAG AGAACAAAAT TCAAGAATAA TAAATCTCTT TTTCTCAGA
 AGAACTTACA TCATCTAGA AACCTACTTT GGAACTAAT ATATAAATAC ATCACACAGT AAAATCCATC AAGGCATTGT
 CTGAAAATTC ATGACAGAA AAGCTTTTAA TCAACAGAG CAACAGCGAG ACGTTTTTCC ACAATAATA TAGTGAACAA
 GTTCACAATT TTACAGATCC ATTAGCTGCG CGAGATTATG AATTTCTTTT CGCAGTTTGC GTAAGATTAG CATCACAAT
 TATTTAATTA CTTCACTGAT ACTATGAGTC TCACAAAGAA ACGAAGAAGC ATTACAGATT AGAGGAAGGT CCTCTGTTGA
 AACAAATCT GGTACAAAG GACGCGACGA TTCCAATCAC TGCGAAAACT AGCGTGGTAA CCGAGAACCC CATATCGGAC
 CTAATCTGA TCACACAGAA AATGAGTTCC TGGAAGAACT AAACAGAAAT AGCATGAAGA AAATTCGGAA ACGAAACGAC
 ACAGCATTAC CCCTCAGTTC CGTAATTCGT AGTCGTATTA GTGATCTGAA GCTTCTGAGT TGTATATTC AATTTGATT
 TATTTGATCA CCTCTCATGG CATCGCATGG CC

(1) 「斑小粒系-1」の E-ACA/M-AAT-204 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

ACAGGGATTC TGTCAGAC TAGCAGCAA CCATTCCGTG TACTGGGAA GACAATGTCC TCTTACATG CGCTTATTCA
 ATTTTATCAC AAGCTACAAA TTCCTCGTGC AAAACAACAA GTTTAACTTT TCATGAACCT AACCTTCGAA TTCAAAGACT
 ACTCACAGGT ATGATCCAT TTCCCTTAA CAAACAGGC AAGCCAAAGC TTCCATCCT TTTGTCTCG TGTGAAATAT
 CGAAGCAAAA CGCTCACTT TATAGACGAA AGTAAAAAG ACCAATGGCC TAGGTATGCG CTGGCATGGT TGCCTAAACA
 TATCCTGATT TAAATAGTT CATCCATTC CTTCTACTTG TTTAATGCTA TTACACAGGA CATGGAACCT GACTACAAAG
 TACTCCAAAT CCATCTGCC TATCATGGAC ACACAGAGCA AAAGGACAGG TATGGAGACA CATCTTCAAC CGAACTGGTT
 AAGAATACAT TCATCCTGAG AAGTTATTCA TTAAGGGAA AAAAAACCTT AATCTTTAGA GGTTCCTTTT CTAATTAATC
 AATGCCTTG CAGGGTAATA GGCTCAGGAA CACAACCTT ACATGCCCCA ATTCGTGTAC TAACCTTATG AAACTATAA
 GAAAAACAA TTCAAACATT CACTCACATC ATCCAGCAGC ATATTGTTGC AGTAAGAACC AAGGTTAGGT GAAATCTGCA
 ACAGAGTAAT AAGATATTA TTCATACAGA GAATAATAAT TTGAGAGAGG AAATATTATC ATGGACAGAG AAAGAGAGAG
 AACAAAATTC AAGAATAATA AATCTCTTTT TCTTCAGAAG AACTTACATC ATCTTAGAAA CCTACTTTGG AACTAACTAA
 ATATAAATAC ATCAAAGT AAAATCCATC AAGGCATTGT CTAATAATTC ATGACAGAAT AAGCTTTTAA TTAACAGAG
 CAACAGCGAG ACGTTTTCCA CAATAATAAT AGTGAACAAG TTCACAATTT TACAGATCCA TTAGCTGCGC GAGATTATGA
 ATTTCTTTT GCAGTTTGTG TAAGATTAGC ATCAGCAATT ATTTAATTAC TTCACTGATA CTATGAGTCT CTCAAAGAAA
 CGAAGAAGCA TTACAGATTA GAGGAAGGTC CTCTGTTGAA ACAAATTCG GTACAAAGGG ACGCAACAAT TCCAATCACT
 GCGAAAACTA GCGTGGTAAC CGAGAACCC ATATCGGACC CTAATCTGA TCACACAGAA AATGAATTC AGGAAAACT
 AAACAGAAAT AGCATGAAGA AAATTCGGAA ACCAAACGAC ACAGCATTAC CCCTCAGTCC GACTCTGTTA TC

(2) 「Acc259」の E-ACA/M-AAT-204 対立座領域

図 3-3-1 「斑小粒系-1」および「Acc259」の E-ACA/M-AAT-204 およびその周辺領域の塩基配列

ACC259	1'	TTTTGAATTA TTAAGAGATT CTGATATCTT GGATTTATGT ATCAACCTAG TAAAAGAAAA *****
Buchi	1"	TTTTGAATTA TTAAGAGATT CTGATATCTT GGATTTATGT ATCAACCTAG TAAAAGAAAA
ACC259	61'	AATAAATAAG ATGAAGGTTT GATGGTGATG AATGAAGGAA GTGGAGAAGT AAGAATAGTA *****
Buchi	61"	AATAAATAAG ATGAAGGTTT GATGGTGATG AATGAAGGAA GTGGAGAAGT AAGAATAGTA
ACC259	121'	ACTTATGAAG AATATTTTCC TACAATATTT GGTTTCAGAGA TATGTGTTGA TTTGTGTAAT *****
Buchi	121"	ACTTATGAAG AATATTTTCC TACAATATTT GGTTTCAGAGA TATGTGTTGA TTTGTGTAAT
ACC259	181'	AGATAGGGAT GACAATTAGT CGTGTGCAAC ATGAATAATG TTTACCAATT ACTTGATCAG *****
Buchi	181"	AGATAGGGAT GACAATTAGT CGTGTGCAAC ATGAATAATG TTTACCAATT ACTTGATCAG
ACC259	241'	CAACAGAAAA AAAATTTGTT ATTTCTATTG AAATCTGTAA ACCATTCTCA CTTTCGATCA *****
Buchi	241"	CAACAGAAAA AAAATTTGTT ATTTCTATTG AAATCTGTAA ACCATTCTCA CTTTCGATCA
ACC259	301'	AATTTTATTT GAATATGTTA TTGAATTCAT TTGAGACGTG AGTAAAACCTC ATATTGGAGA *****
Buchi	301"	AATTTTATTT GAATATGTTA TTGAATTCAT TTGAGACGTG AGTAAAACCTC —ATTGGAGA
ACC259	361'	AGAATATGGT TTATTGTGTT CATTTTTTTG GAACTTTATT TCTATTTATT TTTGTTTCTA *****
Buchi	359"	AGAATATGGT TTATTGTGTT CATTTTTTTG GAACTTTATT TCTATTTATT TTTGTTTCTA
ACC259	421'	ACAGGTAATA GGCTCTTTTA CTTGGAAAAT CATCCAATTA CCTCATGGAG AGTTAGCTTC *****
Buchi	419"	ACAGGTAATA GGCTCTTTTA CTTGGAAAAT CATCCAATTA CCTCATGGAG AGTTAGCTTC
ACC259	481'	GTCAACAAAT GATATAAAGC ATTAGCTTTA AAAAAAGATT AGCTTATCTT AGTAAATACA *****
Buchi	479"	GTCAACAAAT GATATAAAGC ATTAGCTTTA AAAAAAGATT AGCTTATCTT AGTAAATACA
ACC259	541'	TCCAACCAAC TCCAATCCTT TTACCTATTA AC *****
Buchi	539"	TCCAACCAAC TCCAATCCTT TTACCTATTA AC

図3-3-2 「Acc259」のE-ATT/M-AGC-210および「斑小粒系-1」のE-ATT/M-AGC-208
およびその周辺領域の塩基配列
(注) □は AFLP 増幅断片の配列

考 察

「Acc259」のアズキ落葉病菌レース2に対する抵抗性は優性の1遺伝子によって支配されていると推定された(表3-1-1)。本結果は、藤田(2007)の結果と同様であり、「Acc259」が有する優性に遺伝するアズキ落葉病抵抗性遺伝子を *Pga2* と命名した。

選抜した AFLP 増幅断片およびその周辺領域の配列から、抵抗性バルクに特異的な E-AGG/M-GTT-210、感受性バルクに特異的な E-ATT/M-AGC-208 は同一

遺伝子座にあると判断した。MASの結果から、*Pga1* と *Pga2* は強連鎖あるいは対立遺伝子である可能性が高く(第1章 第4節)、*Pga1* 座乗領域については第1章で複数のDNAマーカーを利用した解析を行っていたこと、E-ACA/M-AAT-204は両親間の塩基配列の違いが多く、特異的なプライマーを設計しやすいことから、本試験では他の AFLP マーカー周辺領域の解析は行わず E-ACA/M-AAT-204 領域をもちいた共優性マーカー(Pg204)の開発を優先することとした。

第 2 節 Pg204 の共優性化と有効性の検証

目 的

アズキ落葉病菌レース 2 抵抗性遺伝子 *Pga2* と連鎖している可能性が高い E-ACA/M-AAT-204 領域を利用して共優性マーカーを開発する。また、開発した共優性マーカーについて、解析材料および遺伝資源を利用してその有効性を検証する。

材料および方法

(1) DNA マーカーの開発

共優性マーカーの開発については第 1 章と同様の方法で実施した。加えて、これまでの結果より *Pga1* と *Pga2* が対立遺伝子である可能性があることから第 1 章で選抜した「しゅまり」の E-ACT/M-ACT-118 領域の「Acc259」の対立座について塩基配列を決定し DNA マーカーを開発した (Pg118(R2))。

(2) DNA マーカーの有効性の検証

バルク構成個体の選抜に利用した F_3 系統について、 F_2 の推定遺伝子型が抵抗性ホモ接合型およびヘテロ接合型の系統からは、病徴を示さず「抵抗性」と判定した 1 個体から、感受性ホモ接合型の系統からは明らかな病徴を示し「感受性」と判定した個体 1 個体から DNA を抽出し、Pg204 および Pg118(R2) の塩基配列を決定した。また、第 1 章と同様にアズキ落葉病抵抗性の可能性がある遺伝資源 209 点について、Pg204 の遺伝子型を調査し、「Acc259」型を示した遺伝資源を選抜し、アズキ落葉病菌レース 1 菌株、レース 2 菌株、レース 3 菌株を第 1 章第 1 節と同様の手法で接種し、抵抗性検定をおこなった。

また育成系統 2 組合せ 183 系統について、第 1 章第 4 節と同様の手法で 3 個体を混合して 2 反復で抽出した DNA を用いて Pg204 と Pg118 の遺伝子型を調査した。

結 果

「Acc259」と「斑小粒系 - 1」の E-ACA/M-AAT-204 およびその周辺領域のホモロジー、設計したプライマーの位置を図 3-2-1 に示した。

また、「しゅまり」の E-ACT/M-ACT-118 領域の「Acc259」の対立座の塩基配列を決定し (図 3-2-3)、本領域で「Acc259」型が判別できる DNA マーカーを設計した (表 3-2-2)。*Pga1* と *Pga2* の位置関係を調査することが目的であったことから、共優性マーカーにはせず、設計が容易な優性マーカーとした。

抵抗性検定を行った F_3 世代 105 系統について、抵抗

性あるいは感受性ホモ接合型と判定した系統については任意に 1 個体、ヘテロ接合型と判定した系統については抵抗性を示した個体から任意に 1 個体の DNA を抽出して Pg204 の遺伝子型を調査したところ、抵抗性あるいは感受性ホモ接合型の系統については Pg204 の遺伝子型と表現型の結果は一致した。ヘテロ接合型と判定した系統については、抵抗性を示した個体から DNA を抽出しており、優性遺伝子によって支配される形質であることから、遺伝子型は抵抗性型あるいはヘテロ型になることが予想され、予想通りの結果となった。優性マーカーである Pg118 (R2) の遺伝子型もすべてアズキ落葉病抵抗性の表現型と一致した (表 3-2-3)。

遺伝資源を利用した遺伝子型と抵抗性調査の結果、供試した 22 系統の中で「Acc2499」はすべてのレースに対して感受性を示した。他の遺伝資源は「Acc259」と同様レース 1, 2 抵抗性を示した (表 3-2-4)。

また、育成系統における Pg204 (共優性) と Pg118 (R2) の遺伝子型はすべて一致した (表 3-2-5)。

ACC259	1'	ACAGGGATTC	TGTCAGACAC	TAGCCAGCAA	CCATTCCGTG	TACTGGGGAA	GACAATGTCC
Buchi	28"	CTAGACATTC	TGCATACAC	TAGCCAGCAA	CCATTCCGTG	TACTGAGGAA	GACAGTGTC
ACC259	61'	TCTTTACATG	CGCTTATTCA	ATTTTATCAC	AAGCTACAAA	TTCCTCGTGC	AAAAACAACA
Buchi	88"	TCTTTACATG	CGCTCATTCA	ATTTTATCAC	AAGCTACAAA	TTCCTCGTGC	AAAAACAAC
ACC259	121'	GTT-----	---TAACTTT	TCATGAACTT	AACTTTCGAA	TTCAAAGACT	ACTCACAGGT
Buchi	148"	GTTTAGAATA	TTATAACTTT	TCATGAACTT	AACTTTCGAA	TTCACAGACT	ACTCACAGGT
ACC259	171'	ATTGATCCAT	TTCCCCTTAA	CAAACAGGGC	AAGCCAAAGC	TCCCA1CCT	TTGTCTCCG
Buchi	208"	ATTGATCCAT	TTCCCCTTGA	CAGCAAGGGC	AAGCCAAAGC	TTCCCATCCT	TTGTCTCCG
ACC259	231'	TGTGAAATAT	CGAAGCAAAA	CGCCTCACTT	TATAGACGAA	AGTAAAAAGG	ACCAATGGCC
Buchi	268"	TGTGAAATAT	CGAAGCAAAA	TGCCTCACTT	TATAGACGAA	AGT--AAAGT	ACCAATCGCC
ACC259	291'	TAGGTATGCG	CTGGCATGGT	TGCCTAAACA	TATCCTGATT	TAAATAGTT	CATCCATT--
Buchi	326"	TAGGTATGCG	CTGGCATGGT	TGCCTAAACA	TATCCTGATT	TAAATAGTT	CATCCATTCC
ACC259	349'	CCCTTCTACT	TGTTAATGTC	TATTACACAG	GACATGGAAC	TTGACTACAA	AGTACTCCAA
Buchi	386"	CCCTTCTACT	TGTTACTGTC	TATTACACAG	AACATGGAAT	TTGACTACAA	AGTACTCCAA
ACC259	409'	ATCCATCTGC	CGTATCATGG	ACACACAGAG	CAAAAGGACA	GGTATGGAGA	CACATCTTCA
Buchi	446"	ATCCATCTGC	CGTATCATGG	ACACACAGTG	CAAAAGGACA	GGTACGGAGA	CACATCTTCA
ACC259	469'	ACCGAACTGG	TTAAGAATAC	ATTCATCCTG	AGAAGTTATT	CATTAAGGGG	AAAAAAAACC
Buchi	506"	ACCGAACTGG	TTAAGGATAC	ATTCATCCTG	AGAAGTTATT	CATTAGTGTA	AAAAAAAACC
ACC259	529'	TTAATCTTTA	GAGGTTCCCT	TTCAATTA	TCAATGCCTT	GCCAGGGTAA	TAGGCTCAGG
Buchi	566"	TTAATCTTTA	GAGGTTCCCT	TTCAATTA	TCAATGCCTT	GCCAGGGTAA	TAGGCTCAGG
ACC259	589'	AACACAACCT	CTACATGCC	CAATTCGTGT	ACTAACTTTA	TGAAAAC--	---ATAAGAA
Buchi	626"	AACACAACCT	CTACATGCC	CAATTCGTGT	ACTAACTTTA	TGAAAACAT	AAGATAAGAA
ACC259	644'	AAAACAATTC	AAACATTAC	TCACATCATC	CAGCAGCATA	TTGTTGCAGT	AAGAACCAAG
Buchi	686"	AAAACAATTC	AAACATTAC	TCACATCATC	CAGCAGCATA	TTGTTGCAGT	AAGAACCAAG
ACC259	704'	GTTAGGTGAA	ATCTGCAACA	GAGTAATAAG	ATATTAATTC	ATACAGAGAA	TAATAATTG
Buchi	746"	GTTAGGTGAA	ATCTGCAACA	GAGTAGTAAG	ATATTAATTC	ATACAGAGAA	TAATAATTG
ACC259	764'	AGAGAGGAAA	TATTATCATG	GACAGAGAAA	GAGAGAGAAC	AAAATTCAAG	AATAATAAAT
Buchi	806"	AGAGAGGAAA	TATTATCATG	GACAGAGAAA	GAGAGAGAAC	AAAATTCAAG	AATAATAAAT
ACC259	824'	CTCTTTTCT	TCAGAAGAAC	TTACATCATC	TTAGAAACCT	ACTTTGGAAC	TAATAAATA
Buchi	866"	CTCTTTTCT	TCAGAAGAAC	TTACATCATC	TTAGAAACCT	ACTTTGGAAC	TAATAAATA

図3-2-1 AFLP断片 E-ACA/M-AAT-204 およびその周辺領域の「Acc259」と「斑小粒系-1」(Buchi)の塩基配列。

*は「Acc259」「斑小粒系-1」が同じ塩基であるもの、-は欠失配列を示す。

灰色部分が AFLP断片、太線矢印で示した部分が共優性プライマーの位置

表 3-2-1 Pg204 の共優性マーカー配列および PCR 条件

(1) 共優性マーカー配列

プライマー		塩基配列 (5'-3')	アニーリング温度 (°C)
Pg204-22	Reverse	AACAATATGCTGCTGGATG	58.6
Pg204-23	Forward	CTGCTATTACACAGAACATGGAAT	60.8
Pg204-27	Forward	TCCATTTCCCCTTAACAAAC	60.1

(2) PCR 条件

反応液組成	
D.W.	7.38 μ l
10 \times Buffer	1.00 μ l
dNTPs	0.80 μ l
プライマー Pg204-22	20pmol/ μ l 0.10 μ l
プライマー Pg204-23	20pmol/ μ l 0.10 μ l
プライマー Pg204-27	20pmol/ μ l 0.10 μ l
Hotstar Taq(QIAGEN)	0.03 μ l
DNA テンプレート	0.50 μ l
total	10.0 μ l

PCR 条件		
94°C	15 分	1 サイクル
94°C	30 秒	} 35 サイクル
55°C	30 秒	
72°C	2 分	} 1 サイクル
72°C	5 分	

2% アガロースで電気泳動

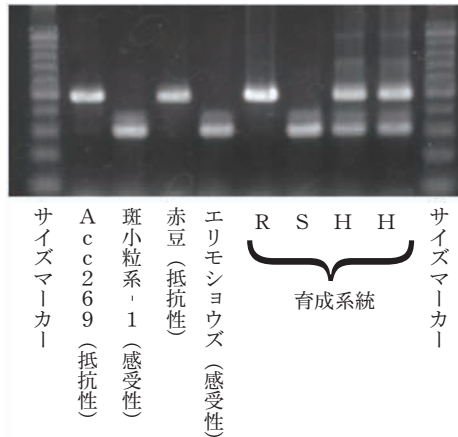


図 3-2-2 Pg204 を利用した検定結果

R : 「Acc259」(抵抗性) 型

H : ヘテロ型

S : 「斑小粒系-1」(感受性) 型

TCCGTAACCC ACTTAAGATT CTTCCAAAAT TGCTAGTGGA ATTGACTGGA GTCATTGCCT GCAAAAACGG GTCATATGGG
 TTTGATTTTC ATCTTCAAAT GTATGCTATT TTGACAAAAGA ATTTTGAAAG TTTAATAAATT TTAATAAATT TTAATAAATT
 TCTGTACAT TTTATAATCG AAAACATATT TTAATAAATT TTAATAAATT TTAATAAATT TTAATAAATT TTAATAAATT
 TGCCAGGATT TTTTTTAAA TCAATAAAA ATTTGAGTTTA ATACGACATG ATTTTTAAAAG AATTAGCTAC TTCTTTTATC
 TTCTAAATAC ATTTCTGACA TCAGGTCACT GCTATAAAAAT TAATGAAATA AAAACTTTTG ATGATAAAAAT TCCCAAGAAA
 AATGGATGAT AAAAATTGTT AAATGATGAT GGTTTAACGG TAAAAAGTGT AGTTAAGTAA ATGTTTTATT CTTCCTGTGA
 ATCTTTACTG GAAAGGAAAT GC

図3-2-3 「Acc259」のE-ACT/M-ACT-118（しゅまり）対立座領域

表3-2-2 Pg118 (R2) の優性マーカー配列およびPCR条件

(1) 共優性マーカー配列

プライマー	塩基配列 (5'-3')	アニーリング温度 (°C)
Pg118-24 Reverse	TGACCTGATGTCAGAAAATGTA	64.0
Pg118-33 Forward	ACTGGAGTCATTGCCTG	60.0

(2) PCR条件

反応液組成			PCR条件		
D.W.	7.48	μl	94°C	2分	1 サイクル
10 × Buffer	1.00	μl	94°C	30秒	
dNTPs	0.80	μl	55°C	30秒	} 35サイクル
プライマー Pg118-24	20pmol/μl	0.10 μl	72°C	2分	
プライマー Pg118-33	20pmol/μl	0.10 μl	72°C	5分	1 サイクル
Ex-Taq	0.03	μl	2%アガロースで電気泳動		
DNA テンプレート	0.50	μl			
total	10.0	μl			

表 3-2-3 斑小粒系-1 / Acc259 F₃ 系統の抵抗性と遺伝型の関係

系統番号	対抗性 個体数	感受性 個体数	判定	DNA マーカーによる遺伝子型	
				Pg204	Pg118(R2)
0441 2 31	4	0	抵抗性	R	+
0441 2 34	9	2	分離	H	+
0441 2 35	6	0	抵抗性	R	+
0441 2 36	4	4	分離	H	+
0441 2 37	6	6	分離	H	+
0441 2 38	5	4	分離	H	+
0441 2 39	7	5	分離	H	+
0441 2 40	11	1	分離	R	+
0441 2 41	3	5	分離	H	+
0441 2 42	11	0	抵抗性	R	+
0441 2 44	8	1	分離	H	+
0441 2 45	6	6	分離	H	+
0441 2 46	0	12	感受性	S	-
0441 2 47	0	12	感受性	S	-
0441 2 48	7	4	分離	R	+
0441 2 49	6	1	分離	R	+
0441 2 50	12	0	抵抗性	R	+
0441 2 51	12	0	抵抗性	R	+
0441 2 52	8	4	分離	H	+
0441 2 53	10	1	分離	H	+
0441 2 54	8	4	分離	H	+
0441 2 55	12	0	抵抗性	R	+
0441 3 1	11	1	分離	H	+
0441 3 2	10	1	分離	R	+
0441 3 3	0	8	感受性	S	-
0441 3 4	6	5	分離	R	+
0441 3 5	8	2	分離	R	+
0441 3 6	7	4	分離	H	+
0441 3 7	12	0	抵抗性	R	+
0441 3 8	0	12	感受性	S	-
0441 3 9	6	6	分離	H	+
0441 3 10	12	0	抵抗性	R	+
0441 3 11	11	0	抵抗性	R	+
0441 3 12	0	11	感受性	S	-
0441 3 13	11	0	抵抗性	R	+
0441 3 16	11	0	抵抗性	H	-
0441 3 17	10	0	抵抗性	R	+
0441 3 18	5	2	分離	H	+
0441 3 19	12	0	抵抗性	R	+
0441 3 20	0	12	感受性	S	-
0441 3 21	9	3	分離	H	+
0441 3 22	11	0	抵抗性	R	+
0441 3 23	10	2	分離	H	+
0441 3 24	9	3	分離	H	+
0441 3 25	11	0	抵抗性	R	+
0441 3 26	0	12	感受性	S	-
0441 3 27	0	12	感受性	S	-
0441 3 28	5	7	分離	H	+
0441 3 29	10	2	分離	H	+

(注1) R : 「Acc259」(抵抗性)型 S : 「斑小粒系-1」(感受性)型 H : ヘテロ型

(注2) + : 「Acc259」(抵抗性)型 (優性マーカー) - : 非「Acc259」型

(注3) F₃ 系統の中から抵抗性あるいは感受性ホモ型は任意に, 分離系統は抵抗性を示した個体から任意に DNA を抽出した。

表3-2-3 つづき

系統番号	対抗性 個体数	感受性 個体数	判定	DNA マーカーによる遺伝子型	
				Pg204	Pg118(R2)
0441 4 1	7	4	分離	H	+
0441 4 2	11	1	分離	H	+
0441 4 3	8	4	分離	R	+
0441 4 4	0	11	感受性	S	-
0441 4 5	0	12	感受性	S	-
0441 4 6	0	9	感受性	S	-
0441 4 7	9	3	分離	H	+
0441 4 8	6	4	分離	H	+
0441 4 9	0	11	感受性	S	-
0441 4 10	5	5	分離	H	+
0441 4 11	11	1	分離	R	+
0441 4 12	10	2	分離	H	+
0441 4 13	0	12	感受性	S	-
0441 4 14	0	12	感受性	S	-
0441 4 15	0	12	感受性	S	-
0441 4 16	9	2	分離	H	+
0441 4 17	0	12	感受性	S	-
0441 4 18	0	7	感受性	S	-
0441 4 19	12	0	抵抗性	R	+
0441 4 20	8	1	分離	R	+
0441 4 21	9	3	分離	H	+
0441 4 22	0	12	感受性	S	-
0441 4 24	11	0	抵抗性	R	+
0441 4 26	0	12	感受性	S	-
0441 4 28	11	1	分離	R	+
0441 4 29	9	1	分離	R	+
0441 7 1	8	3	分離	H	+
0441 7 2	7	1	分離	H	+
0441 7 3	12	0	抵抗性	R	+
0441 7 4	11	0	抵抗性	R	+
0441 7 5	0	12	感受性	S	-
0441 7 7	0	12	感受性	S	-
0441 7 8	8	3	分離	H	+
0441 7 9	10	2	分離	H	+
0441 7 10	6	0	抵抗性	R	+
0441 7 11	10	1	分離	H	+
0441 7 12	7	4	分離	H	+
0441 7 13	6	6	分離	H	+
0441 7 14	2	5	分離	H	+
0441 7 15	12	0	抵抗性	R	+
0441 7 16	8	3	分離	H	+
0441 7 17	8	3	分離	H	+
0441 7 18	1	11	感受性	S	-
0441 7 19	0	12	感受性	S	-
0441 7 20	8	4	分離	H	+
0441 7 21	10	2	分離	H	+
0441 7 22	11	1	分離	R	+
0441 7 23	9	3	分離	H	+
0441 7 24	10	2	分離	R	+
0441 7 25	7	5	分離	H	+
0441 7 26	4	7	分離	R	+
0441 7 27	8	4	分離	H	+
0441 7 28	7	2	分離	R	+
0441 7 29	11	0	抵抗性	R	+
0441 7 30	0	11	感受性	S	-
0441 7 31	12	0	抵抗性	R	+

*注釈は前のページと同様

表3-2-4 Pg204の遺伝子型が「Acc259」型の遺伝資源の落葉病接種検定結果

番号	アズキ落葉病接種検定結果			
	レース1	レース2	レース3	
Acc 67	岩手 在 59-54-21	R	R	S
Acc 259	愛媛 在 9	R	R	S
Acc 534	新潟 在 65	R	R	S
Acc 550	福島 在 4	R	R	S
Acc 558	福島 在 12	R	R	S
Acc 724	韓国 18	R	R	S
Acc 812	韓国 106	R	R	S
Acc 951	韓国ヒメツルアズキ 222	R	R	S
Acc 1238	新潟ヤブツルアズキ 82	R	R	S
Acc 2043	新潟ヤブツルアズキ 117	R	R	S
Acc 2463	宮城ヤブツルアズキ 1	R	R	S
Acc 2467	韓国ヒメツルアズキ 403	R	R	S
Acc 2499	タイ竹小豆 2	S	S	S
Acc 2515	石川ヤブツルアズキ 59	R	R	S
Acc 2517	福井ヤブツルアズキ 27	R	R	S
Acc 2520	兵庫ヤブツルアズキ 106	R	R	S
Acc 2521	鳥取ヤブツルアズキ 56	R	R	S
Acc 2523	秋田ヤブツルアズキ 99	R	R	S
Acc 2527	長野ヤブツルアズキ 89	R	R	S
Acc 2532	茨城ヤブツルアズキ 2	R	R	S
Acc 2537	富山ヤブツルアズキ 30	R	R	S
品保 490	赤豆	R	R	S

(注) R：抵抗性 S：感受性

考 察

F₃世代 105 個体における Pg204, Pg118(R2) の遺伝子型と表現型はすべて一致したことから、二つの DNA マーカーは *Pga2* と 1cM 以下で連鎖しており、99% 以上の精度 (100 個体で判定を誤る可能性は 1 個体以下) で抵抗性を判別できると考えられること、十勝農試における F₅ 集団の 1 組合せあたりの系統数は概ね 200 個体以下であることから、Pg204, Pg118(R2) とともに MAS を行うためには十分の精度であると推察された。F₃ 個体に加えて育成系統についても Pg204 と Pg118 (R2) の遺伝子型は一致しており (表 3-2-4), Pg118 領域は *Pga1* の極近傍に座乗していることが第 1 章で示されたことから、*Pga1* と *Pga2* は極近傍で連鎖しているか、対立遺伝子の可能性が高いと考えられた。

第 1 章で *Pga1* を有する可能性のある遺伝資源が 56 点あることが明らかとなったが、「Acc259」と同様にアズキ落葉病菌レース 1, 2 に対して抵抗性を示し、*Pga2* を有する可能性のある遺伝資源についても 21 点あることが明らかとなった (表 3-2-3)。「赤豆」を系譜に持ち、アズキ落葉病に対して中間的な抵抗性を示す「ハツネシヨウズ」「アケノワセ」については、209 の抵抗性遺

伝資源候補の中には入っていたが、Pg204 では「Acc259」型の増幅断片は検出されず、*Pga2* を持たない可能性が高いと考えられた。本試験によって、十勝農試の遺伝資源の中には、これまで抵抗性遺伝資源として利用されてきた「Acc259」以外にも同じ抵抗性をもつ遺伝資源が多数あることが明らかとなった。また過去に育種で利用されてきた「赤豆」も *Pga2* を有する可能性があることが明らかとなった。一方で「赤豆」の有する *Pga2* が「ハツネシヨウズ」「アケノワセ」に導入されなかった理由については不明である。「赤豆」の有する *Pga2* が何らかの形質と連鎖している、偶然導入されなかった等が考えられるが、「ハツネシヨウズ」「アケノワセ」は *Pga2* を保持していないにもかかわらず中間的な抵抗性を示すことから、「赤豆」には主動遺伝子以外にもアズキ落葉病抵抗性に関与する因子があると推察される。

また、本試験から Pg204 の遺伝子型によって「Acc259」以外の落葉病抵抗性品種、遺伝資源を系譜にもつ系統の選抜も可能であることが明らかとなり、本試験で開発したマーカーがアズキ育種で広く利用できることが示された。

表3-2-5 育成系統のPg204(共優性)とPg118(R2)の遺伝子型

系統名	世代	組合せ		Pg204		Pg118(R2)			
		母	父						
0611-1	F ₅	十系925号(Pga2)	Acc921	S	S	-	-		
0611-2	F ₅			R	R	+	+		
0611-3	F ₅			S	S	-	-		
0611-4	F ₅			R	R	+	+		
0611-5	F ₅			R	R	+	+		
0611-6	F ₅			S	S	-	-		
0611-7	F ₅			R	R	+	+		
0611-8	F ₅			S	H	-	+		
0611-9	F ₅			S	S	-	-		
0611-16	F ₅			S	S	-	-		
0611-17	F ₅			H	S	+	-		
0611-18	F ₅			H	R	+	+		
0611-19	F ₅			H	H	+	+		
0611-20	F ₅			H	H	+	+		
0611-21	F ₅			S	S	-	-		
0611-25	F ₅			S	S	-	-		
0611-26	F ₅			R	R	+	+		
0611-27	F ₅			S	S	-	-		
0611-28	F ₅			S	S	-	-		
0611-32	F ₅			S	S	-	-		
0611-33	F ₅			S	S	-	-		
0722-1	F ₅			エリモシヨウズ	十系974号(Pga2)	R	R	+	+
0722-2	F ₅					S	S	-	-
0722-3	F ₅					H	S	+	-
0722-6	F ₅					R	R	+	+
0722-7	F ₅					H	H	+	+
0722-8	F ₅					R	R	+	+
0722-9	F ₅					H	H	+	+
0722-10	F ₅					R	R	+	+
0722-11	F ₅					H	H	+	+
0722-12	F ₅					H	H	+	+
0722-13	F ₅					S	S	-	-
0722-17	F ₅					H	H	+	+
0722-18	F ₅	H	H			+	+		
0722-22	F ₅	S	S			-	-		
0722-23	F ₅	H	H			+	+		
0722-24	F ₅	R	R			+	+		
0722-80	F ₅	R	R			+	+		
0722-97	F ₅	R	R			+	+		
0722-128	F ₅	S	S			-	-		
0722-129	F ₅	R	R			+	+		
0722-149	F ₅	R	R			+	+		
0722-150	F ₅	R	R			+	+		

(注) R:「Acc259」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型 H:ヘテロ型

+ :「Acc259」型あるいはヘテロ型 - :非「Acc259」型, 1系統2反復で遺伝子型を調査した。

第3節 *Pga1* と *Pga2* の関係の検討

目 的

Pga1 および *Pga2* と連鎖した DNA マーカーを染色体上にマッピングし、その位置関係を調査する。*Pga1* を保持する小豆と *Pga2* を保持する小豆のとの交配後代を利用して二つの遺伝子に対立遺伝子である可能性を証明する。

材料および方法

(1) 連鎖地図の作成

「斑小粒系-1」×「しゅまり」の F_2 集団 140 個体から DNA を抽出し、Han ら (2005) らの報告した SSR マーカーおよび本試験で開発した Pg118, Pg204 を用いて遺伝子型を調査した。Schuelke (2000) の報告を参考に各 SSR マーカーのフォワードプライマーの先頭には M13 配列 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') を付加し、蛍光標識した M13 プライマー (6-FAM/VIC/NED/PET- 5'-ACGACGTTGTAAAACGAC-3', Applied Biosystems) を混合して PCR に供試した。PCR 反応は表 3-3-1 の条件で行った。

表 3-3-1 SSR マーカーによる PCR 反応条件

PCR 反応液		
D.W.	3.20	μl
AmpliQGold Master Mix	5.00	μl
フォワードプライマー(M13配列付加)	5pmol/ μl	0.40 μl
リバープライマー	5pmol/ μl	0.20 μl
蛍光プライマー	5pmol/ μl	0.20 μl
DNA テンプレート	1.00	μl
total	10.0	μl

PCR 条件

94°C	7 分	} 1 サイクル
94°C	20 秒	
56°C	20 秒	} 35 サイクル
72°C	30 秒	
72°C	5 分	1 サイクル

PCR 増幅産物は ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で多型を検出し GeneScan-600 LIZ をサイズスタンダードとして GeneMapper[®] software で解析を行った。連鎖地図の作成は MAPMAKER/Exp v3.0b (Lander *et al.* 1987) を用い、連鎖距離の計算は Kosambi のマップ関数を利用した (Kosambi 1943)。

(2) 育成系統を利用した *Pga1* と *Pga2* の関係解明

Pga1 と連鎖した DNA マーカーである Pg118 と、*Pga2* と連鎖した DNA マーカーである Pg204 を利用し

て、*Pga1* 保持系統と *Pga2* 保持系統の交配後代 230 系統の遺伝子型を調査した。また過去の接種検定によりアズキ落葉病菌 1~3 のすべてのレースに抵抗性を示した「十系 934 号」(F_7) (9609-1 (F_6) × 9930-5(F_2)) を用いて個体別に DNA マーカー検定と接種試験 (第 1 章と同様の手法) を行った。

* 9609-1 (F_6): 系譜に「黒小豆(岡山)」をもつ落葉病レース 1 抵抗性系統

* 9930-5(F_2): 「Acc259」をレース 2 抵抗性供与親とし、レース 1 抵抗性の「十育 140 号」を 3 回戻し交配した系統

結 果

Hanら(2005)が報告したSSRマーカーの中で、「しゅまり」と「斑小粒系-1」間で多型を示したのは89マーカーで、本試験で開発したPg118, Pg204の結果を加えて合計91マーカーで連鎖解析を行ったところ、Pg118とPg204は第3連鎖群の同じ位置にマップされた(図3-3-1)。

Pga1 保持系統と *Pga2* 保持系統の交配後代を検定した結果、*Pga1* と *Pga2* はいずれか一方のみを保持して固定しており、二つの遺伝子を同時に保持する系統、すなわち二つのDNAマーカー検定の結果がともに「R」を示した系統はなかった(表3-3-2)。

「十系934号」(F_7)の個体別DNAマーカー検定結果は *Pga1* 保持固定型と *Pga2* 保持固定型およびヘテロ保持型に分離した。接種試験の結果では、*Pga1* 保持固定型の個体はレース2に、*Pga2* 保持固定型の個体はレース3にそれぞれ感受性を示し、ヘテロ保持型の個体はすべてのレースに抵抗性を示した(表3-3-3)。

考 察

連鎖解析の結果アズキ落葉病抵抗性は第3連鎖群の末端側にマップされた(図3-3-1)。この領域にはHan(2005)らの論文では多型を示すマーカーが少なく、今回開発したDNAマーカーは第3連鎖群で多型を得る有効なマーカーとしても利用できる可能性が示唆された。加えてPg118とPg204は同じ位置にマップされたことから、二つの抵抗性遺伝子は少なくとも1cM以内で連鎖していると考えられた。*Pga1* 保持系統と *Pga2* 保持系統の交配後代からは、どちらか一方の抵抗性遺伝子をもつ系統しか得られなかったことから(表3-3-2)、二つの抵抗性遺伝子は非常に近い場所に座乗していると推察された。また、アズキ落葉病菌3レースに対して抵抗性の可能性があった「十系934号」は *Pga1* と *Pga2* をヘテロで保持していたことから3つのレースに抵抗性であったことが明らかとなり(表3-3-3)、DNAマーカー調査によってどちらかの遺伝子型に固定したと判定された系統は、2つのレースに対してのみ抵抗性を示したことから、*Pga1* と *Pga2* を同時に保持させることは困難であると推察され、二つの遺伝子は対立遺伝子であると考えられた。

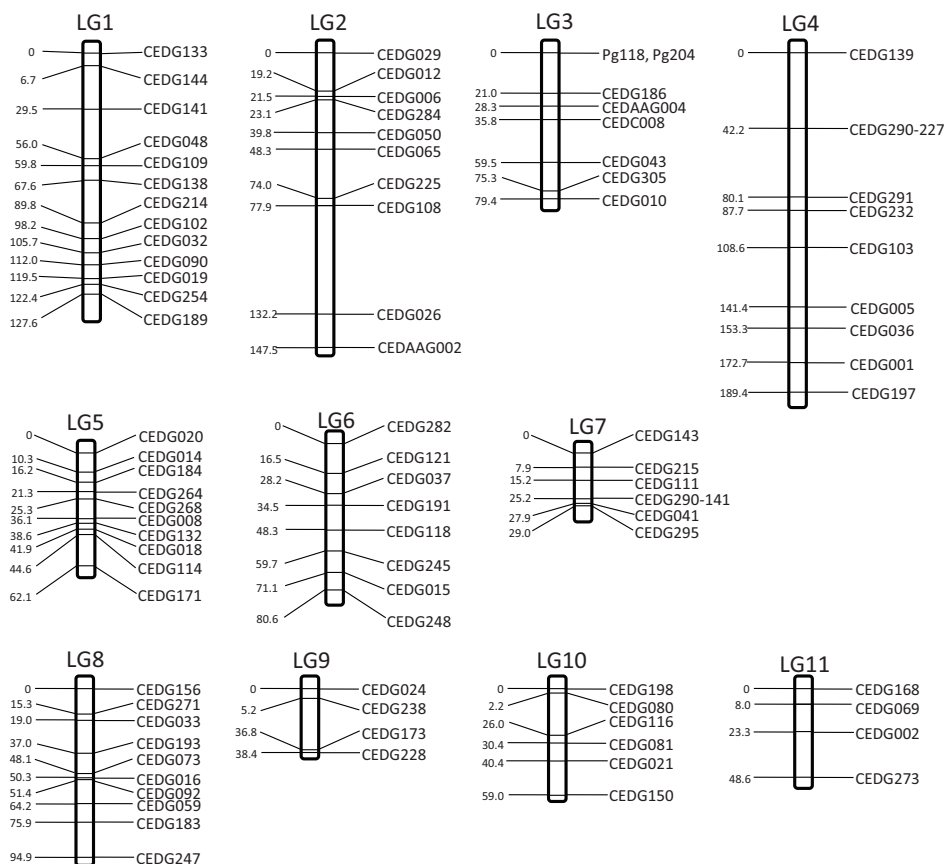


図3-3-1 しゅまり×斑小粒系-1の連鎖地図

表 3-3-2 育成系統を用いた DNA マーカー検定結果 (抜粋)

系統名	世代	組合せ		DNA マーカー検定結果	
		母	父	<i>Pga1</i>	<i>Pga2</i>
0708- 1	F ₅	9830-9-1 (<i>Pga1</i>)	十系 975 号 (<i>Pga2</i>)	H	H
0708-48	F ₅			H	H
0708-49	F ₅			H	H
0708-50	F ₅			S	R
0708-51	F ₅			H	H
0708-52	F ₅			S	R
0708-53	F ₅			S	R
0708-54	F ₅			S	R
0708-55	F ₅			H	H
0708-56	F ₅			S	R
0708-57	F ₅			R	S
0708-58	F ₅			R	S
0708-59	F ₅			H	H
0617- I -1	F ₅	0418(F ₃) (<i>Pga1</i>)	0211(F5)mass (<i>Pga2</i>)	S	R
0617- I -2	F ₅			H	H
0617- I -3	F ₅			H	H
0617- I -4	F ₅			S	R
0617- I -5	F ₅			R	S
0617- I -6	F ₅			H	H
0617- I -7	F ₅			S	R
0617- I -8	F ₅			R	S
0617- I -9	F ₅			H	H
0617- I -10	F ₅			R	S
0617- I -11	F ₅			R	S
0617- I -12	F ₅			H	H
0617- I -13	F ₅			H	H
0617- I -14	F ₅			H	H
0617- I -15	F ₅			H	H
0617- I -16	F ₅			R	S
0617- I -17	F ₅			H	H

注) R : *Pga1* では Pg118, *Pga2* では Pg204 の遺伝子型が抵抗性型

H : ヘテロ型

S : *Pga1* では Pg118, *Pga2* では Pg204 の遺伝子型が感受性型

表 3-3-3 「十系 934 号」の個体別の DNA マーカー検定結果およびアズキ落葉病接種検定結果

アズキ落葉病接種菌株	DNA マーカー検定結果	個体数	接種検定結果
レース 1	<i>Pga1</i>	4	R
	ヘテロ	2	R
	<i>Pga2</i>	5	R
レース 2	<i>Pga1</i>	2	S
	ヘテロ	1	R
	<i>Pga2</i>	9	R
レース 3	<i>Pga1</i>	1	R
	ヘテロ	5	R
	<i>Pga2</i>	5	S

注) *Pga1* : Pg118 で抵抗性型 *Pga2* : Pg204 で抵抗性型

第4章 アズキ落葉病抵抗性遺伝子と アズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係解明

第1節 *Pga1* とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係解明

目 的

これまで *Pga1* を保持したアズキ落葉病抵抗性品種は、アズキ萎凋病に対しても抵抗性を示すことが明らかとなっていることから、*Pga1* とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係を調査する。

材料および方法

「しゅまり」と「斑小粒系-1」の単交配由来の F_2 世代 192 個体について、Pg118 を用いて *Pga2* の有無を推定し、個体別にアズキ萎凋病抵抗性検定試験に供試した。加えて同様の F_2 集団 4278 個体について Pg139 と Pg77 の遺伝子型を調査し、両マーカー間で組み換えを生じていた個体を採種し、後代を用いてアズキ落葉病、アズキ萎凋病の接種検定を行った。 F_3 、 F_4 個体は、それぞれ DNA マーカー検定を行い、Pg118 の遺伝子型が固定しているものを抵抗性領域が固定した個体とみなして接種検定を行った。アズキ落葉病は第一章と同様の手法、アズキ萎凋病については *Fusarium oxysporum* f sp. *adzukicola* 96-3 (レース 3) を用いて接種検定を行った。菌は 1/4 PDA 寒天培地で 2 週間培養後、培地上に滅菌蒸留水を加えて筆で分生胞子をかき集め、 10^6 spores/ml に調整し接種源とした。接種方法はアズキ落葉病菌と同様で、発病調査は接種約 1 ヶ月半後に実施した。

結 果

萎凋病接種検定の分離比は抵抗性：感受性 = 3 : 1 の比に適合した (表 4-1-1)。萎凋病抵抗性を示した個体はすべて Pg118 の遺伝子型は「しゅまり」型、あ

るいはヘテロ型であった。一方で感受性個体は 1 個体がヘテロ型だったのみで残りの 44 個体は「斑小粒系-1」型だった。

Pg77 と Pg139 の二つのマーカー間では 10 個体が組み換えを生じていた。組み換え個体のグラフ遺伝子型、およびその後代を用いたアズキ落葉病菌レース 1 接種検定、アズキ萎凋病接種検定結果を表 4-1-2 に示した。Pg118 の遺伝子型とアズキ落葉病およびアズキ萎凋病の接種検定結果はすべて一致した。

考 察

F_2 集団のアズキ萎凋病接種検定結果により、アズキ萎凋病抵抗性は優性の 1 遺伝子に支配されていると推察された (表 5-5-1)。加えて萎凋病抵抗性と Pg118 の遺伝子型は 1 個体を除いてすべて一致していた。以上より *Pga1* と「しゅまり」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子は強連鎖していると推察された。

F_2 大規模集団を用いて抵抗性遺伝子近傍の組み換え個体を探索した結果、Pg118 による遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性はすべて一致しており、Pg118 は高精度な DNA マーカーとして利用できることが改めて示された。通常育種の選抜規模は系統初年目において最大 300 系統程度/組合せであることから、4000 個体以上を供試しても検定結果が一致している Pg118 を利用することによって、ほぼ 100% の確率でアズキ落葉病の抵抗性は判別可能であると考えられた。同様に Pg118 の遺伝子型とアズキ萎凋病抵抗性も一致していた。このことより *Pga1* と「しゅまり」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子は強連鎖ではなく同一遺伝子が作用している可能性もあると推測された。

表 4-1-1 *Pga1* 近傍組み換え個体の遺伝子型と落葉病、萎凋病接種検定結果

試験	系統名または組合せ	DNA マーカーによる検定結果 (<i>Pga1</i>)	萎凋病接種検定結果		χ^2 (3:1)	P
			抵抗性個体数	感受性個体数		
1	しゅまり	R	5	0	—	—
	斑小粒系 1	S	0	5	—	—
	斑小粒系 -1/ しゅまり	R	51	0	—	—
	F_2	H	96	1	—	—
		S	0	44	—	—
	合計		147	45	0.25	0.62

注) R: 「しゅまり」型 H: ヘテロ型 S: 「斑小粒系-1」型

表 4-1-2 *Pga1* 近傍組み換え個体の遺伝子型と落葉病, 萎凋病接種検定結果

F ₂ 個体番号	DNA マーカーによる遺伝子型					アズキ落葉病 後代検定 (F ₃ ,F ₄)	アズキ萎凋病 後代検定 (F ₄)
	Pg139	Pg118	Pg126	Pg77	Pg138		
241	+	-	-	-	-	S	S
435	+	-	-	-	-	S	S
445	-	-	+	+	+	S	S
1233	-	+	+	+	+	R	R
1393	-	-	+	+	+	S	S
1570	+	+	-	-	-	R	R
1900	-	-	+	+	+	S	S
2909	+	+	-	-	-	R	R
2983	-	-	-	+	+	S	S
3163	-	-	+	+	+	S	S

注) +:「しゅまり」型 -:「斑小粒系-1」型

第 2 節 *Pga2* とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係解明

目 的

Pga2 を保持する「Acc259」はアズキ萎凋病に対しても抵抗性を示すが, *Pga2* とアズキ萎凋病の抵抗性遺伝子の連鎖関係は明らかとなっていないため, *Pga2* とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係を調査する。

材料および方法

「十系 912 号」「十系 944 号」(*Pga1* 保持)と「十系 927 号」(*Pga2* 保持)の後代を用いて, DNA マーカーによる抵抗性遺伝子の有無の調査および各系統 12 個体についてアズキ萎凋病接種検定を行った。また「Acc259」と「斑小粒系-1」の単交配由来の F₂ 世代 306 個体について, Pg204 を用いて *Pga2* の有無を推定し, 個体別にアズキ萎凋病抵抗性検定試験に供試した。接種試験は第 1 節と同様の手法で行った。

結 果

「十系 912 号」(*Pga1* 保持)と「十系 927 号」(*Pga2* 保持)の後代 4 系統のうち, *Pga2* を保持していたのは「十系 1065 号」「十系 1066 号」「十系 1067 号」でそのうち「十系 1065 号」のみがアズキ萎凋病に対して抵抗性を示し, 他の 2 系統は感受性であった。*Pga1* を保持していた「十系 1068 号」はアズキ萎凋病に対して抵抗性を示した (表 4-2-1)。「十系 944 号」(*Pga1* 保持)と「十系 927 号」(*Pga2* 保持)の後代 4 系統のうち *Pga2* を保持していたのは「十系 1070 号」「十系 1071 号」「十系 1072 号」で, 「十系 1070 号」「十系 1071 号」はアズキ萎凋病抵抗性が系統内で分離していた。また「十系 1072 号」は感受性を示した。*Pga1* を保持していた「十系 1069 号」はアズキ萎凋病に対して抵抗性を示した。

つぎに「斑小粒系-1」と「Acc259」由来の F₂ 個体について, Pg204 の遺伝子型を調査しアズキ萎凋病接種検定を行った。2 回の試験ともに, 萎凋病抵抗性は優性 1 対の遺伝子支配の理論値と適合した。また, Pg204 の遺伝子型とアズキ萎凋病の接種検定結果は独立していた (独立性検定結果 試験 1: $\chi^2 = 1.83$, $P = 0.40$, 試験 2: $\chi^2 = 0.01$, $P = 0.997$) (表 4-2-2)。

表4-2-1 育成系統の落葉病抵抗性マーカー検定結果およびアズキ萎凋病接種検定結果

供試系統	組合せ		落葉病マーカー検定		アズキ萎凋病 接種検定結果
	母	父	<i>Pga1</i>	<i>Pga2</i>	
十系 1065 号	十系 912 号	十系 927 号	-	+	R
十系 1066 号			-	+	S
十系 1067 号			-	+	S
十系 1068 号			+	-	R
十系 1069 号	十系 944 号	十系 927 号	+	-	R
十系 1070 号			-	+	分離
十系 1071 号			-	+	分離
十系 1072 号			-	+	S

注1) R: 抵抗性 S: 感受性

注2) +: *Pga1*, *Pga2* それぞれの抵抗性遺伝子保持 - : 非保持表4-2-2 「斑小粒系-1」と「Acc259」由来のF₂個体の落葉病抵抗性マーカー検定結果およびアズキ萎凋病接種検定結果

系統名または組合せ	DNA マーカーによる 検定結果 (<i>Pga2</i>)	萎凋病接種検定結果		χ^2 (3:1)	<i>P</i>
		抵抗性個体数	感受性個体数		
Acc259	R	10	0	-	-
斑小粒系 1	S	0	15	-	-
斑小粒系 -1/Acc259	R	29	12	-	-
F ₂	H	59	29	-	-
	S	33	9	-	-
	合計	121	50	1.64	0.20
Acc259	R	10	0	-	-
斑小粒系 1	S	0	15	-	-
斑小粒系 -1/Acc259	R	26	10	-	-
F ₂	H	46	18	-	-
	S	25	10	-	-
	合計	97	38	0.71	0.40

注) R: 「Acc259」型 H: ヘテロ型 S: 「斑小粒系-1」型

考 察

本試験より「Acc259」は優性1対のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子を有しているが、*Pga2*とは独立して遺伝することが示唆された。これまでの試験結果から「しゅまり」と「Acc259」は異なるアズキ萎凋病抵抗性遺伝子を持っていると考えられることから、我々は「しゅまり」が有するアズキ萎凋病抵抗性遺伝子を*Rfoa1*、「Acc259」が有するアズキ萎凋病抵抗性遺伝子を*Rfoa2*と命名した。*Rfoa1*, *Rfoa2*ともにアズキ萎凋病レース3に対して抵抗性を示すことは明らかとなっているが (Kondo

et al. 2009), 近年*Rfoa1*を保持する「きたのおとめ」を侵す新たなアズキ萎凋病レースが報告されており (小倉ら 2012), 新レースに対して*Rfoa2*が抵抗性を示すのか、今後の研究の進捗に期待する。また、育種としてはこれまで*Pga1*を導入した系統のアズキ萎凋病抵抗性検定試験は後期世代まで省略してきたが、*Pga2*を導入した系統についてはアズキ萎凋病抵抗性検定試験を行う必要があることが明らかとなった。抵抗性検定の簡便化のために*Rfoa2*を判別するDNAマーカーの開発が急務であると考えられる。

第5章 総合論議

第1節 アズキ落葉病抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカー開発の意義

アズキ落葉病抵抗性育種は1970年代後半から開始され、発生圃場を利用した選抜を行ってきたが、短期輪作で圃場を利用したことから、優占レースに変化が生じ、目的とする病原レースが正確に判定できない事例があった。レース分化が問題視された1990年代後半には高精度な人工接種法が確立されたが（藤田ら 1996, Kondo *et al* 2002）、人工接種法は、感染から発病までにおよそ2～3ヶ月と時間を要し、発病までの管理に労力が必要であった。加えて温室の面積の制約から多点数をこなすことが困難であった。

本研究によって開発した DNA マーカーは、検定精度99%以上（1cM以下で連鎖）と推定され、検定に要する期間も1日200点程度となり飛躍的に短期間で抵抗性系統の選抜を行うことが可能となった（表5-1-1）。現在では、第2章第4節で検討したF₅世代の播種前選抜が実用化され、年間1500個体程度を DNA マーカー検定に供試しており、F₆世代で展開する系統数が約3分の2となり、これまで実施していたF₆世代以降の固定系統の確認作業も省略されるようになった。このことにより、アズキ落葉病発生圃場の利用は初期世代の集団選抜と地方番号系統の特性検定のみとなり、圃場の輪作年数を延ばすことが可能となった。短期輪作によるアズキ落葉病以外の障害の発生、新たなレースの発生などの問題の回避に DNA マーカー選抜は貢献できていると考えられる。

本試験によってPg118, Pg204は第3連鎖群の末端にマップされた。この領域はHanら（2005）の連鎖地図では座乗しているマーカーがほとんどない領域であり、本試験において開発した DNA マーカーは第3連鎖群末端に座乗している多型マーカーとしても利用できることから、今後の小豆研究の発展にも寄与できる。

第2節 高精度な DNA マーカーを開発するための条件

本研究で開発したマーカーはすでに実用化され、2005年に検定を開始して以来5000系統以上の検定を行っているが、2012年までに選抜された地方番号系統で、アズキ落葉病抵抗性と DNA マーカーによる遺伝子型が異なる系統は見られていない。このように精度の高い検定が可能な DNA マーカーを開発できた要因の一つとして、感受性親に病徴が明確な「斑小粒系-1」を選定したことがあげられる。「斑小粒系-1」は接種試験においてほぼエスケープがなく全個体に明確な病徴が現れる。そのため、分離世代においても個体ごとの正確な検定ができた。アズキ落葉病抵抗性検定試験の比較品種の一つとして供試していた「エリモショウズ」は、接種した各個体について4段階の発病指数で評価しその平均値をDSI（Disease severity index）で判定したときには感受性と評価されるが、12個体を個別に見ると1個体から2個体程度病徴が明確でない個体が見られた。「エリモショウズ」を感受性親とした解析集団を利用していた場合は分離系統の評価が難しくなり、検定個体数を増やす必要が生じたり、本試験ほどの高精度な DNA マーカーが開発できなかった可能性もある。DNA マーカーを開発するためには、精度の高い検定手法があること、目的とする形質が比較的少数の因子によって支配されていることが前提であるが、これらに加えて、過去のデータを精査し、解析に適した材料を選定することによって、より効率的に精度の高い DNA マーカーを開発することが可能となると考えられる。

表5-1-1 アズキ落葉病抵抗性検定法の比較

比較項目	検定方法		
	落葉病検定圃場利用	人工接種法	DNA マーカー
判定方法	8月下旬～9月上旬の病徴	病徴および茎切断面の褐変	PCRによる増幅断片
検定に要する期間	播種後3ヶ月程度	接種後2～3ヶ月	1日(200点)
問題点	1年に1回しか検定できない 優占レースが変化する場合がある	一度の検定における共試点数は、温室の スペースに影響され、100点前後	特になし

第3節 アズキ落葉病抵抗性とアズキ萎凋病抵抗性の関係

武田ら(2007)は「しゅまり」と「斑小粒系-1」の単交配由来のF₂集団319個体を供試してアズキ落葉病抵抗性遺伝子とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の連鎖解析を行い、二つの抵抗性遺伝子が強連鎖、あるいは同一遺伝子の多面発現である可能性を示唆した。本研究では同一組合せのF₂集団4278個体から*Pga1*近傍のDNAマーカーによる組み換え個体を選抜し、その後代で接種検定を行い、Pg118の遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性、アズキ萎凋病抵抗性*Rfoa1*の表現型が一致することを示した。一方で*Pga1*と対立関係にあると考えられる*Pga2*とそれを有する「Acc259」のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子*Rfoa2*が独立して遺伝することが本研究で明らかとなった。「しゅまり」の後代においては、抵抗性遺伝子の極近傍で組み変わった個体を利用しても二つの病害抵抗性は一致したが、*Pga1*と対立関係にあると推測される*Pga2*がアズキ萎凋病抵抗性遺伝子と連鎖していなかったことから、*Pga1*と*Rfoa1*は同一遺伝子の多面発現ではなく、強連鎖している可能性が高い。*Pga1*が連鎖していると推測される第3連鎖群は、Hanらの連鎖地図では座乗しているマーカーがほとんどない領域であることから、*Pga1*と*Rfoa1*は連鎖地図上では強連鎖しているが、物理地図上は離れた位置に座乗している可能性もあると推測される。現在農業生物資源研究所が中心となって、アズキと適応性に優れた*Vigna*属野生種15種の全ゲノムを解読し公開する「*Vigna*属ゲノムプロジェクト：高度環境適応性研究基盤の構築」が遂行中である。今後公開される情報を利用して二つの抵抗性遺伝子の関係を明らかにすることが期待される。

第4節 今後のアズキ落葉病抵抗性育種の方向性

千葉ら(1987)は「寿小豆」と「黒小豆(岡山)」の雑種については1対の遺伝子と仮定した場合の適合度がきわめて高かったが、「寿小豆」と「赤豆」を交配した組合せでは、2対の遺伝子により変動を仮定した場合の適合性も若干あったと報告している。また近藤らは、人工接種による全身病徴から判定した抵抗性検定では「赤豆」、「Acc2515」が3レースに抵抗性であると報告している(Kondo *et al.* 2005, 2009)。本試験のように、接種後2ヶ月前後の茎内褐変の有無で抵抗性を判定した場合には「Acc2515」および「赤豆」はレース3に対して感受性と判定されるが、全身病徴を緩和するような、もう一つの抵抗性因子を保有している可能性がある。これ

までのアズキ落葉病抵抗性育種は、3レース抵抗性品種の育成を目標に行われてきた。しかし、本研究によってアズキ落葉病菌レース1, 3抵抗性遺伝子*Pga1*とレース1, 2抵抗性遺伝子*Pga2*は、対立関係にあることが示され、二つの抵抗性遺伝子を同時に保有させることが困難であることが明らかとなった。今後の育種の方向性としては「赤豆」などの有する新たな抵抗性因子を導入することによって、3つのレースに対して実害がでない抵抗性品種を育成することが必要であると考えられる。「赤豆」を系譜にもつ「ハツネショウズ」「アケノワセ」は*Pga2*を保持していないがアズキ落葉病に対して中間的な抵抗性を示すことから、今後はこれらの抵抗性を効率的に導入する手法を検討することが望ましい。また、*Pga1*と*Pga2*のどちらの抵抗性遺伝子を利用するかについては、当面は同時にアズキ萎凋病抵抗性も導入できる*Pga1*を優先的に利用し、レース2抵抗性に対しては*Pga2*以外の抵抗性因子を導入する手法が効率的であると考えられる。*Pga1*と*Pga2*を同時に保持させることは困難であるが、*Pga2*と*Rfoa2*は独立して遺伝することから、*Pga1*と強連鎖していると推察される*Rfoa1*と「Acc259」由来の萎凋病抵抗性である*Rfoa2*は比較的容易に同時に保持させることができる。複数の抵抗性遺伝子を集積させることによって、新たなアズキ萎凋病菌レースに対する対策も可能となるであろう。

第5節 結 語

MASの利点については、簡便ですぐに結果が得られる、環境条件に左右されないことに加えて、抽出したDNAを利用して異なる形質を複数調査できるということがあげられる。アズキにおいては、本試験で開発したDNAマーカーによって先の二つの項目については大きな成果が得られているが、現在のところアズキ落葉病抵抗性検定以外のMASは行っていない。複数の形質でMASができる体制になることによって、費用対効果がさらに大きくなると考えられる。現在「Acc259」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーの開発、アズキ茎疫病菌抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーの開発、耐冷性と連鎖したDNAマーカーの探索等が行われており、これらのDNAマーカーが早期に実用化されることが期待される。

本試験で精度の高いDNAマーカーを開発できたのは、育成場の担当者が育種事業の傍らで解析用の材料を長い年月をかけて育成したこと、材料の観察をしっかりと行い、精度の高い検定を行ってきたことが背景にある。MASはあくまでも目印(マーカー)を利用して選抜を

行っているだけで、その表現型を見ているわけではない。材料の観察、精度の高い検定があって精度の高い DNA マーカーは開発できるが、どんなに高精度のマーカーであっても、それを利用して表現型が確実に判定できている訳ではないことを利用する側は常に注意する必要がある。MAS を行った際には、選抜した材料について観察によって検証を行うことが望ましい。アズキ落葉病に関しては育成後期に汚染圃場に播種することによって、抵抗性を確認しており、そのシステムが確立されているので理想的な利用の仕方と考えられる。近年のゲノム研究の進捗は非常に早く、アズキにおいても DNA マーカーに関する報告、抵抗性遺伝子に関する報告などが数多くだされるだろう。自分たちが観察によって検証できる形質なのか、どの段階で表現型を確認するのか等を熟慮しながら、それらの報告を利用していくことによって、さらなる育種の効率化、優れた品種が育成されることを期待する。

摘 要

アズキ落葉病は土壌伝染性の重要病害で、薬剤防除は難しいあるいは高価であるため、長期輪作以外では抵抗性品種の作付けによる被害回避がもっとも効果的である。本病害は感染から発病までにおよそ2～3ヶ月と時間を要し、発病までの管理に労力を必要とする。また発生圃場を利用した選抜では、抵抗性系統の作付け増加にともなって優占レースに変化が生じたり、新レースの発生を助長する可能性がある。以上のことより、小豆育種の中で育成系統に本病害抵抗性を導入するために、接種試験や病徴の確認を行わずに抵抗性の植物体が判別できる、DNAマーカーを利用した選抜が有効であると考えられた。本研究では、北海道で多く分布しているアズキ落葉病菌レース1に対する抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーを開発し、加えて新たに発生が確認されたアズキ落葉病菌レース2に対する抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーを開発し、品種改良における有効性を調査した。また、アズキ落葉病菌レース1抵抗性遺伝子、レース2抵抗性遺伝子とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係を調査した。その概略は以下の通りである。

1. アズキ落葉病抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーの開発に関わる研究成果

(1) レース1抵抗性遺伝子 (*Pga1*) と連鎖したDNAマーカーの開発

アズキ落葉病菌レース1抵抗性の「しゅまり」と同感受性の「斑小粒系-1」を交配したF₃世代105系統を供試して試験を行った。1024組のプライマーセットを利用したAFLP解析によって、抵抗性バルクと感受性バルク間で多型を示した6つのAFLPマーカーを探索し、得られた増幅断片およびその周辺配列の領域を利用して5つのアガローススペースのDNAマーカー (Pg77, Pg118, Pg138, Pg139, Pg126) を開発した。

「しゅまり」×「斑小粒系-1」のF₂大規模集団4278個体の中で10個体が開発した5つのマーカー間で組み換えを生じていた。従って5つのマーカーは全て抵抗性遺伝子に強連鎖していると考えられ、その中でPg118が最も抵抗性遺伝子に近いDNAマーカーであると考えられた。育成系統を用いた調査においても適用範囲が広いと推察されたPg118をホモ接合型、ヘテロ接合型の区別が可能な共優性マーカーに改良した。

育成品種・系統を調査した結果、Pg118による遺伝子型が「しゅまり」(抵抗性)型のもの、「赤豆」、「Acc259」および「Acc2515」およびその後代を除いてアズキ落葉病菌レース1に抵抗性を示した。このことにより、これまで育種で利用されてきた「小長品-10」「円葉(刈63号)」などは「しゅまり」や「黒小豆(岡山)」と同様の抵抗性遺伝子 *Pga1* を有する可能性が高いと考えられた。また十勝農業試験場で保有している遺伝資源の中で、アズキ落葉病抵抗性の可能性があった209点の中からPg118の遺伝子型でスクリーニングした59の遺伝資源に落葉病菌レース1, 2, 3を接種した結果、56点が *Pga1* を保持していると推察された。

一方でアズキ落葉病レース1かつレース2抵抗性である「赤豆」および「Acc259」などは、Pg118の遺伝子型では「斑小粒系-1」型となり、その抵抗性と遺伝子型が一致しなかったことから *Pga1* 以外の抵抗性遺伝子を持っている可能性が高いと考えられた。

(2) レース2抵抗性遺伝子 (*Pga2*) と連鎖したDNAマーカーの開発

アズキ落葉病菌レース2抵抗性の「Acc259」と同感受性の「斑小粒系-1」の交配後代を利用して試験を行った。バルク法を利用したAFLP解析によって、抵抗性バルクと感受性バルク間で多型を示した6つのAFLPマーカーを探索した。レース1抵抗性判別マーカーであるPg118を利用した系統検定の結果から、*Pga1* と *Pga2* は強連鎖あるいは対立遺伝子である可能性が高かったことから、連鎖解析は行わず「Acc259」のPg118対立座領域を利用して「Acc259」を判別できる優性マーカーPg118(R2)を設計した。また両親の配列情報からプライマーを設計しやすいと判断したPg204を共優性マーカーとした。二つのDNAマーカーは *Pga2* と1cM以下で連鎖しており、育種における抵抗性選抜においては十分の精度であると推察された。

F₃個体および育成系統を利用した調査の結果Pg204とPg118(R2)の遺伝子型とアズキ落葉病菌レース2抵抗性は一致していた。また十勝農業試験場で保有している遺伝資源の中で、アズキ落葉病抵抗性の可能性があった209点についてPg204の遺伝子型でスクリーニングした22点に落葉病菌レース1, 2, 3を接種した結果、21点が *Pga2* を保持していると推察された。

(3) *Pga1* と *Pga2* の関係

「しゅまり」×「斑小粒系-1」の F₂ 世代 140 個体を供試した連鎖解析の結果、*Pga1* と連鎖している DNA マーカー Pg118 と *Pga2* と連鎖している DNA マーカー Pg204 は第 3 連鎖群の末端の同じ位置にマップされた。また、*Pga1* 保持系統と *Pga2* 保持系統の交配後代からは、二つの抵抗性遺伝子を保持した系統は得られなかった。以上のことより *Pga1* と *Pga2* は対立遺伝子であり、二つの抵抗性遺伝子を同時に保持させることは困難であると推察された。

2. アズキ落葉病抵抗性遺伝子とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係

「しゅまり」×「斑小粒系-1」の F₂ 世代 192 個体で解析を行った結果、Pg118 の遺伝子型がヘテロ型あるいは「しゅまり」型の個体は 1 個体を除いて萎凋病抵抗性を示し、「斑小粒系-1」型はすべて感受性となった。このことより *Pga1* と「しゅまり」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子 *Rfoa1* は強連鎖していると考えられた。一方で「Acc259」×「斑小粒系-1」の F₂ 世代 306 個体で解析を行った結果、「Acc259」由来の萎凋病抵抗性は優性の 1 遺伝子に支配されているが、Pg204 の遺伝子型とは一致しておらず、「Acc259」由来の萎凋病抵抗性遺伝子 *Rfoa2* は *Pga2* とは独立して遺伝することが示唆された。

謝

本研究をとりまとめるにあたり、終始懇切なご指導とご校閲をいただいた北海道大学大学院農学院生物資源生産学部門教授の近藤則夫博士に深謝する。また、ご校閲の労をいただいた北海道大学大学院農学院生物資源生産学部門教授の増田清博士、講師の秋野聖之博士に深謝する。さらに、本研究のきっかけを与えていただき詳細なご指導とご校閲をいただいた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長の竹内徹氏に感謝申し上げます。

貴重な実験材料を養成、提供していただいた上川農業試験場島田尚典研究主幹、中央農業試験場藤田正平主査、十勝農業試験場佐藤仁主査、田澤暁子研究主任、北見農業試験場青山聡研究主査に感謝の意を表する。

また、中央農業試験場旧遺伝子工学科の紙谷元一氏（現上川農業試験場長）、佐々木純氏（現北見農業試験場主査）、堀田治邦氏（現道南農試主幹）および生物学

辞

グループ富田謙一氏（現北見農試研究主幹）、木口忠彦研究主査（現中央農試作物グループ）、鈴木千賀研究主任、山下陽子研究職員には様々な協力とご助言をいただいた。中でも生物学グループ主幹の入谷正樹氏には研究環境、論文執筆環境を整備していただいた。また小倉玲奈研究主任には病気の接種、萎凋病試験に多大なご協力をいただいた。現道南農業試験場長の柳沢朗博士には研究マネジメント、実験計画手法について適切なお助言を賜った。研究補助員諸氏には実験の遂行にあたり多大なご協力をいただいた。元北海道大学大学院吉井孝光氏、武田藍氏にはマーカー開発の一部を担当していただいた。以上の関係各位に篤くお礼申し上げます。

最後に、私の仕事を理解し、終始支えてくれた夫と、気持ちを切りかえて仕事をするを教えてくれた4人の子供たちに感謝の気持ちを捧げる。

引 用 文 献

- 1) 青山 聡・島田尚典・長谷川尚輝・村田吉平・藤田正平・松川 勲 (2009) アズキ新品種「きたろまん」の育成. 北海道立農試集報 94 : 1-16
- 2) Botstein, B., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331
- 3) 足立大山・成河智明・千葉一美・村田吉平・原 正紀・島田尚典 (1988) あずき新品種「ハツネショウズ」の育成について. 北海道立農試集報 57 : 13-24
- 4) 千葉一美 (1982) アズキ落葉病抵抗性の育種学的研究 I. 抵抗性の品種間差異. 北海道立農試集報 48 : 56-63
- 5) 千葉一美・成河智明・村田吉平・足立大山 (1987) アズキ落葉病抵抗性の育種学的研究 III. 抵抗性の遺伝様式とその導入効果. 北海道立農試集報 56 : 1-7
- 6) 藤田正平 (2007) アズキ落葉病およびアズキ茎疫病の抵抗性系統作出に関わる育種学的研究. 北海道立農業試験場報告 115
- 7) Fujita, S., N. Kondo, H. Shimada, K. Murata and S. Naito (2007) Re-evaluation and selection of adzuki beans (*Vigna angularis*) to breed cultivars resistant to a new race of *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola*, the causal agent of adzuki bean brown stem rot (BSR). *Breed. Res.* 9: 87-95.
- 8) 藤田正平・村田吉平・島田尚典・青山 聡・千葉一美・松川 勲・白井滋久・三浦豊雄・越智弘明・近藤則夫 (2002) アズキ新品種「しゅまり」の育成. 北海道立農試集報 82 : 31-40
- 9) 藤田正平・島田尚典・村田吉平・田引 正・三浦豊雄 (1995) あずき新品種「きたのおとめ」の育成について. 北海道立農試集報 68 : 17-31
- 10) Han, O. K., A. Kaga, T. Isemura, X. W. Wang, N. Tomooka, D. A. Vaughan. (2005) A genetic linkage map for azuki bean [*Vigna angularis* (willd.) ohwi & Ohashi] *Theor. Appl. Genet.* 111(7): 1278-1287
- 11) Harrington, T. C. and D. L. McNew (2003) Phylogenetic analysis places the *Phialophora*-like anamorph genus *Cadophora* in the Helotiales. *Mycotaxon* 87: 141-151.
- 12) 北海道農業試験会議 (成績会議) 平成 19 年資料 小麦品質関連遺伝子を判別する DNA マーカー (2007)
- 13) Kobayashi, K., H. Yamamoto, H. Negishi and A. Ogoshi (1991) *Formae specialis* differentiation of *Phialophora gregata* from adzuki bean and soybean in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 57: 225-231.
- 14) 北沢建治・柳田騏策 (1989) アズキ立枯病の病原菌 *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *adzukicola* n.f.sp. 日植病報 55 : 76-78
- 15) 近藤則夫 (1995) アズキ萎凋病に関する研究. 北海道大学農学部邦文紀要 19 : 411-472
- 16) 近藤則夫・小林喜六 (1983) アズキ落葉病菌の生態に関する研究. アズキ落葉病菌分生胞子の土壌中での生存と発芽. 北海道大学邦文紀要 14 : 48-49
- 17) Kondo, N., S. Fujita, K. Murata and A. Ogoshi (1998) Detection of two races of *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola*, the causal agent of adzuki bean brown stem rot. *Plant Dis.* 82: 928-930.
- 18) Kondo, N. and F. Kodama (1989) *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*, casual agent of adzuki bean wilt, and detection of three races of the fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn* 55:451-457
- 19) Kondo, N., K. Nakazawa, S. Fujita H. Shimada and S. Naito (2005) New virulent race of *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola* associated with continuous cultivation of adzuki bean cultivar Acc259. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 360-363.
- 20) Kondo, N., A. Notsu, S. Naito, S. Fujita and H. Shimada (2004) Distribution of *Phytophthora vignae* f. sp. *adzukicola* races in adzuki bean fields in Hokkaido, Japan. *Plant Dis.* 88: 875-877.
- 21) Kondo, N., H. Shimada and S. Fujita (2009) Screening of cultivated and wild adzuki bean for resistance to race 3 of *Cadophora gregata* f. sp. *adzukicola*, cause of brown stem rot. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 181-187.
- 22) Kondo, N. and N. Tomooka (2012) New sources of resistance to *Cadophora gregata* f. sp. *adzukicola* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola* in *Vigna* spp. *Plant Dis.* 96: 562-568.
- 23) Kosambi, D. D. (1943) The estimation of map

- distances from recombination values. *Ann. Hum. Genet.* 12: 172-175
- 24) Lyamichev, V., M. A. D. Brow and J.E. Dahlberg (1993) Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 260:778-783
- 25) Michelmore, R. W., I. Paran and V. Kesseli (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
- 26) 村田吉平・成河智明・千葉一美・佐藤久泰・足立大山・松川 勲 (1985) あずき新品種「エリモシヨウズ」の育成について. 北海道立農試集報 53 : 103-113
- 27) 村田吉平・松川 勲・藤田正平 (1998) 系譜作成ソフトによる十勝農試の小豆育種における交配組合せの解析. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会報 39 : 121-122 (講要)
- 28) Murray, M. G. and W. F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucl. Acids Res.* 8(19): 4321-4326.
- 29) 成田武四・赤井 純・坪木和男 (1971) アズキ落葉病とその病原菌. 植物防疫 25 : 353-358
- 30) 小倉玲奈・小松 勉・松浦 準 (2012) アズキ萎凋病菌の新レースの発生. 北日本病害虫研報 63: 242 (講演要旨)
- 31) 島田尚典・藤田正平・千葉一美・村田吉平・足立大山・原 正紀・白井滋久・成河智明・土屋武彦・三浦豊雄 (1992) あずき新品種「アケノワセ」の育成について. 北海道立農試集報 64 : 59-74
- 32) Schuelke, M. (2000) An economic method for fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18: 233-234
- 33) 鈴木孝子 (2012) DNA マーカーを利用した選抜 (MAS : Marker assisted selection) 育種の成果と展望. 北農 79 : 9-13
- 34) 武田藍 (2007) アズキ落葉病およびアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の連鎖解析と座乗連鎖解析と座乗連鎖群の決定. 北海道大学大学院農学研究科生物資源生産学専攻. 修士論文
- 35) 土屋貞夫・赤井 純 (1976) アズキ落葉病について. 第8回土壌伝染病談話会資料 : 14-18
- 36) Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- 37) Williams, J. H. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535
- 38) Williams, M. N. V., N. Pande, S. Nair, M. Mohan and J. Bennett (1991) Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theo. Appl. Genet.* 82:489-498

Studies on the development of DNA markers linked to genes for resistance to brown stem rot of adzuki bean and validation of their efficiency

Summary

Brown stem rot (BSR) of adzuki bean is a serious soil-borne disease in Hokkaido. Chemical controls of this disease are ineffective, expensive, or both, therefore cultivation of cultivars resistant to this disease is the most effective control method except crop rotation. BSR-resistant adzuki bean lines have been screened in pathogen-infected fields and it takes 2 or 3 months until detection of disease symptoms. This method is time consuming and labor intensive. And continuous cultivation of adzuki bean may promote evolution of new races of the pathogen and may change the dominant race in the field. Due to the above reasons, DNA markers can be used in marker-assisted selection (MAS) programs to aid with introduction of BSR resistance in adzuki bean for effective identification of resistant plants without inoculation and detection of symptoms. In the present study, objectives were as follows: 1) to develop the DNA markers that are located near the BSR resistance gene conferring resistance to *Cadophora gregata* race 1 that have had a wide distribution in Hokkaido; 2) to develop the DNA markers that are located near the BSR resistance gene conferring resistance to *C. gregata* race 2; 3) to research the relationship between BSR resistant gene and resistance gene conferring *Fusarium oxysporum* race 3, and we validated the efficiency of these DNA markers in the breeding programs.

(1) Development of the DNA markers linked to BSR race 1 resistance gene (*Pga1*)

We used 105 F₃ lines derived from a cross between *V. angularis* cv. 'Syumari' and cv. 'Buchishoryukei-1' to develop DNA markers. 'Syumari', which is derived from cv. 'Kuroshozu' (Okayama), is resistant to race 1 of *C. gregata* f. sp. *adzukicola*, whereas 'Buchishoryukei-1' is highly susceptible to BSR. Six amplified fragment-length polymorphism (AFLP) markers were polymorphic between resistant and susceptible bulked groups based on 1024 primer sets. Five DNA markers (Pg77, Pg118, Pg138, Pg139 and Pg126) were developed from the nucleotide sequences of polymorphic AFLP markers and their flanking regions.

We identified 10 F₂ plants that showed recombination for the developed DNA markers in the population of 4278 F₂ individuals. Therefore, the five markers were tightly linked to one another, and located near the BSR locus. Pg118 was the marker most closely linked to *Pga1* based on the segregation of BSR resistance in the F₃ progeny of the recombinant plants. Therefore we converted Pg118 into a codominant marker for its easier use in marker-assisted selection for adzuki bean BSR resistance.

We evaluated the resistance to BSR for adzuki bean bred lines and cultivars to confirm the general applicability of the developed markers to the BSR resistance as tagging markers. All lines and cultivars showed 'Syumari' genotype at Pg118 marker were resistant to BSR race 1 except for 'Akamame', 'Acc259' and 'Acc2515' and their progenies. 'Maruba' (Kari 63) and 'Shochohin-10' that had been used as BSR resistant lines may carry the same BSR resistance gene *Pga1* as 'Kuroshozu' (Okayama). In addition 59 germplasms were selected from 209 germplasms in Tokachi Agricultural Experiment Station by identifying the genotype with Pg118 marker and were inoculated with BSR race1, 2 and 3. 56 germplasms were supposed to have *Pga1*.

Whereas 'Akamame' and 'Acc259' that are resistant to BSR races 1 and 2 showed the same genotype as 'Buchishoryukei-1'. Their resistance to BSR was not consistent with the genotype of Pg118. Therefore they are likely to carry different BSR resistance genes.

(2) Development of the DNA markers linked to BSR race 2 resistance gene (*Pga2*)

We used 105 F₃ lines derived from a cross between cv. 'Acc259' and cv. 'Buchishoryukei-1' to develop DNA markers. 'Acc259' is resistant to race 2 of *C. gregata* f. sp. *adzukicola*. AFLP analysis revealed that six fragments were polymorphic between resistance and susceptible bulked groups. The result of some research using Pg118 marker suggested that *Pga1* and *Pga2* were tightly linked or allelic therefore we developed at first dominant marker Pg118 (R2) which identify 'Acc259' genotype using same locus of Pg118 in 'Acc259'. Next we developed Pg204 as co-dominant marker because two parents showed high polymorphism in the nucleotide sequences of polymorphic AFLP markers and their flanking regions. These two markers were linked to *Pga2* less than 1cM and were supposed high accuracy markers for adzuki breeding.

The genotypes of Pg204 and Pg118 (R2) were correspondent with resistance to BSR race 2 in F₃ generation individuals and bred lines. In addition 22 germplasms were selected from 209 germplasms by genotype with Pg204 marker and were inoculated BSR race1, 2 and 3. 21 germplasms were supposed to have *Pga2*.

(3) Relationship between *Pga1* and *Pga2*

Linkage analysis was performed with 140 F₂ individuals from the cross between 'Syumari' and 'Buchishoryukei-1'. Pg118 linked to *Pga1* and Pg204 linked to *Pga2* were mapped to the same locus on terminal of the linkage group 3. There were no lines having both *Pga1* and *Pga2* in the progenies from the cross between *Pga1* resistant line and *Pga2* resistant line. Therefore two genes were allelic and it might be impossible to introduce *Pga1* and *Pga2* together.

2. Relationship between BSR resistance gene and Adzuki *Fusarium* wilt (AFW) resistance gene

The plants having 'Syumari' genotype or heterozygous genotype showed resistance to AFW whereas the plants having 'Buchishoryukei-1' genotype showed susceptible to AFW with 192 F₂ individuals from the cross between 'Syumari' and 'Buchishoryukei-1'. Therefore we considered that *Pga1* was tightly linked to AFW resistance gene, *Rfoa1* derived from 'Syumari'. On the other hand the result of the genetic analysis with 306 F₂ individuals from the cross between 'Acc259' and 'Buchishoryukei-1' suggested AFW resistance was controlled by a single dominant gene but there was no relationship between the genotype of Pg204 and AFW resistance. Accordingly AFW resistance gene *Rfoa2* derived from 'Acc259' was independent to *Pga2*.