平成２８年度　成績概要書

課題コード（研究区分）：６１０１－６９２３３、６１０１－６９２３６１（公募型研究）

１．研究課題名と成果の要点

１）研究成果名：アズキ萎凋病の抵抗性選抜に有効な DNA マーカー
（研究課題名：DNA マーカー選抜による小豆の土壌病害複合抵抗性系統の選抜強化(H23-25)）
（研究課題名：アズキ茎疫病圃場抵抗性のマーカー開発と DNA マーカー選抜による小豆重要土壌病害抵抗性選抜の効率化（H26-28））

２）キーワード：DNA マーカー、小豆、アズキ萎凋病、抵抗性育種

３）成果の要約：開発した DNA マーカーは「Acc259」由来のアズキ萎凋病抵抗性を精度良く判定でき、選抜マーカーとして有効である。また、「Acc259」と同じ QTL（量的形質遺伝子座）を保持する複数の遺伝資源やその後代の萎凋病抵抗性の判定にも適用できる。

２．研究機関名

１）担当機関・部・グループ・担当者名：中央農試・作物開発部・生物工学 G・主査　小倉玲奈
十勝農試・研究部・豆類 G

２）共同研究機関（協力機関）：なし

３．研究期間：平成 23～28 年度　（2011～2016 年度）

４．研究概要

１）研究の背景

アズキ萎凋病は、萎凋病菌の接種により抵抗性の検定を実施してきたが、萎凋病抵抗性遺伝子（*Rfoa1*）と強連鎖もしくは多面発現する落葉病レース 1 抵抗性遺伝子（*Pga1*）に連鎖している DNA マーカーが開発され、効率的に落葉病と萎凋病の抵抗性を選抜してきた。しかし近年、落葉病レース 1 抵抗性品種の普及にともない、新たに落葉病菌レース 2 の発生が認められ、「Acc259」を由来とする落葉病レース 1，2 抵抗性遺伝子（*Pga2*）に連鎖している DNA マーカーについても開発を行った。「Acc259」自体は萎凋病に抵抗性を示すが、その後代から育成された「十育 159 号」（*Pga2* 保持）は萎凋病に感受性であることが明らかとなり、DNA マーカーを利用した選抜においては萎凋病抵抗性が同時に選抜できない状況にある。

２）研究の目的

「Acc259」に由来する新たな萎凋病抵抗性遺伝子（*Rfoa2*）に連鎖した DNA マーカーを開発し、その有効性を検証する。

５．研究内容

１）「Acc259」由来の萎凋病抵抗性の遺伝解析

・ねらい：解析材料のアズキ萎凋病に対する抵抗性を評価し、QTL 解析を実施する。

・試験項目等：「斑小粒系 1」（アズキ萎凋病感受性）/「Acc259」（同抵抗性）の F_2 集団、F_3 世代 54 系統、萎凋病菌（レース 3）の接種検定。遺伝様式の検討。SSR マーカーによる多型の検出および発病データを用いた QTL 解析。

２）DNA マーカーの高精度化と有効性検証

・ねらい：DNA マーカーの高精度化とその有効性を検証する。

・試験項目等：アズキのゲノム情報を活用した DNA マーカーの高精度化。育成系統および遺伝資源を用いた DNA マーカーの有効性検証。

６．成果概要

１）F_2 集団の解析から「Acc259」由来の萎凋病抵抗性と落葉病菌レース 1、2 抵抗性はそれぞれ独立に遺伝することを明らかにした（データ省略）。

２）F_3 系統の発病指数による QTL 解析の結果、第 1 染色体上に QTL が 2 つ検出された。検出された 2 つの QTL 近傍のマーカー遺伝子型と接種検定による発病指数を比較したところ、ひとつの QTL 近傍のマーカー遺伝子型と接種検定結果がよく一致した（図 1）。

３）検出された QTL 近傍の塩基配列を解読し、アズキのゲノム情報と比較しながらプライマーを設計した（表 1）。94℃15 分間の熱変成後、94℃・30 秒間・58℃30 秒間・72℃1 分間を 35 サイクル繰り返し、72℃5 分間の伸長反応条件で PCR を行うことにより、QTL 近傍の既存の SSR マーカーより精度の高い共優性の DNA マーカーである Vi01G3149 を開発した（図 2）。

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

【用語説明】

QTL：量的形質遺伝子座（Quantitative trait locus、QTL と略す）のことであり、農業上有用な形質の多くは、複数の遺伝子の効果の組み合わせによって決定されている。このような形質を総称して量的形質という。

PCR（Polymerase Chain Reaction）：少量の DNA を鋳型に特異的なプライマーと酵素（DNA ポリメラーゼ）を用いて DNA の特定の領域を数百万倍以上に増幅する方法。

＜具体的データ＞

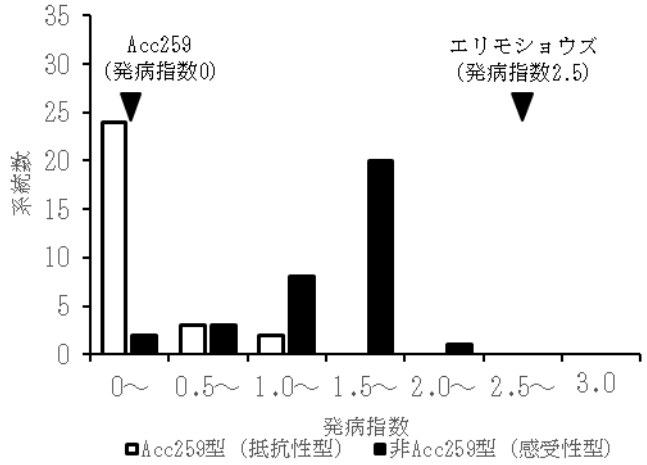

図 1. マーカー遺伝子型の違いによる発病指数の違い

注 1) 発病指数 0：無発病、維管束褐変なし
1：外部病徴は認められないが維管束褐変あり
2：葉脈のえそ、縮葉、葉の黄化などの外部病徴が認められ、維管束褐変あり
3：枯死

注 2) 十交 1225（「きたあすか」/「十系 1071 号」）、F_4世代 63 系統
「十系 1071 号」は「Acc259」由来の抵抗性を保持している。

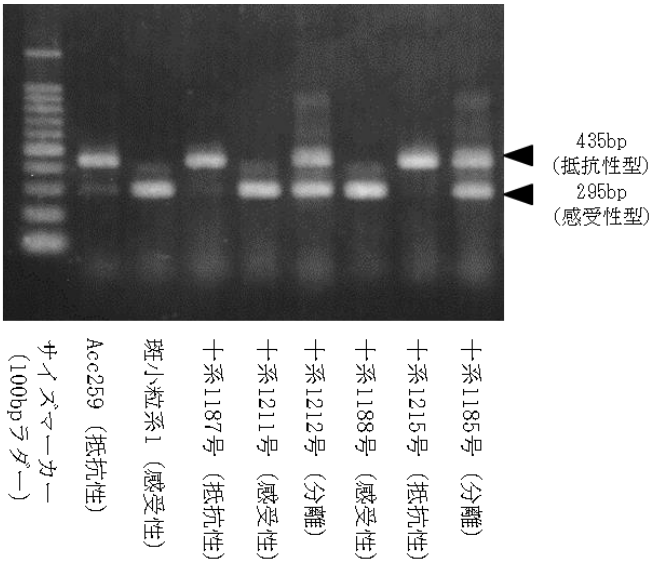

図 2. 開発した DNA マーカーによる判定事例

表 1. 開発した DNA マーカー：Vi01G3149 の塩基配列

プライマー		塩基配列（5’－3’）	Tm値(℃)
Vi01G3149-13	Forward	TGAGTTAAAGGTGTTCAGTTTTG	59.8
Vi01G3149-5	Forward	GAAGTTGCCATCAAAATGTTTAAG	62.4
Vi01G3149-6	Reverse	GTTCAAGACGTTGGATTTATGG	62.1

注1) 反応温度条件は、94℃15 分間の熱変成後、94℃・30 秒間・58℃30 秒間・72℃1 分間を 35 サイクル繰り返し、72℃5 分間の伸長反応を行う。
注 2) DNA ポリメラーゼは、HotStarTaq Master Mix (QIAGEN 社製) を使用する。

表 2. DNA マーカーを利用した判定結果と萎凋病菌接種検定結果

品種・系統・遺伝資源名	DNAマーカーによる判定結果[注1)]	アズキ萎凋病菌接種検定結果[注2)] 発病指数	判定	落葉病抵抗性遺伝子
Acc67	＋	0.00	R	*Pga2*
Acc259	＋	0.00	R	*Pga2*
Acc550	＋	0.00	R	*Pga2*
Acc558	＋	0.00	R	*Pga2*
Acc724	＋	0.00	R	*Pga2*
Acc812	＋	0.00	R	*Pga2*
赤豆	＋	0.00	R	*Pga2*
十育170号	＋	0.13	R	*Pga2*
十育159号	－	2.00	S	*Pga2*
斑小粒系1	－	3.00	S	非保持
エリモショウズ	－	2.20	S	非保持

注1) ＋：抵抗性遺伝子保持固定型、－：抵抗性遺伝子非保持固定型、注2) R：抵抗性、S：感受性
注3) 指数0（健全）～3（枯死）、1.0＞指数平均：R（抵抗性）、1.0≦指数平均：S（感受性）
注4) 太字アンダーラインはアズキ落葉病菌レース1，2抵抗性育種で利用してきた遺伝資源

７．成果の活用策

１）成果の活用面と留意点

(1) DNA マーカーを利用した効率的なアズキ萎凋病抵抗性系統の選抜に活用できる。
(2) マーカー選抜系統の抵抗性を確定させる場合は必ずアズキ萎凋病抵抗性の生物検定を行う。

２）残された問題とその対応　なし

８．研究成果の発表等

１）小倉ら（2012）「Acc259」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子に連鎖した DNA マーカーの開発．日本植物病理学会報 78（3）.144（講要）