

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780038

研究課題名(和文)カーネーション萎凋細菌病主働抵抗性遺伝子の特定

研究課題名(英文)Identification of the responsible gene for carnation bacterial wilt resistance

研究代表者

八木 雅史(YAGI, Masafumi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員

研究者番号：40391403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：野生種 *Dianthus capitatus* ssp. *andrzejowskianus* 由来のカーネーション萎凋細菌病に強い抵抗性を有する品種「花恋ルーージュ」の抵抗性の原因遺伝子を明らかにするために、約12倍のゲノム情報を含むBAC(大腸菌人工染色体)ライブラリーを作成した。このライブラリーを用いて、抵抗性の遺伝子近傍に存在するSTS-WG44マーカーの周辺配列91,790塩基を明らかにし、抵抗性の候補遺伝子6個を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：'Karen Rouge' is the carnation cultivar with the bacterial wilt resistance derived from *Dianthus capitatus* ssp. *andrzejowskianus*. In order to identify the responsible gene for the resistance, we constructed a BAC (bacterial artificial chromosome) library using 'Karen Rouge' genomic DNA, whose coverage was estimated to be about 12 genome equivalents. By using this library, we determined the 91,790 nucleotide sequence surrounding the marker STS-WG44 that is tightly linked to the resistance, and identified six candidate genes for the resistance.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：カーネーション 萎凋細菌病 QTL DNAマーカー BACライブラリー 病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

Burkholderia caryophylli によって引き起こされるカーネーション萎凋細菌病は、夏の高温期に発病が多発する立枯れ性の土壤伝染病害であり、日本の暖地におけるカーネーション栽培上最も重要な病害の一つである。近年の温暖化による気温の上昇により、その発生の増加が懸念されている。本病害は一旦発病すると有効な薬剤がないことから、長年、抵抗性品種の開発が強く望まれてきた。農研機構花き研究所では 1988 年から抵抗性検定法の開発に着手し、抵抗性を有する遺伝資源のスクリーニングを行った。その結果、既存の栽培品種の中には強度の抵抗性を有する品種は存在せず、カーネーションに含まれるダイアンサス属野生種の中に有望な抵抗性素材 *Dianthus capitatus* を見出した。この抵抗性をカーネーション栽培品種へ導入するために、カーネーションとの交雑と抵抗性による検定を 15 年以上かけて繰り返した。その結果、強い萎凋細菌病抵抗性を有し、生理生態的特性が既存品種と同等の系統を選抜し、「花恋ルージュ」として 2010 年に品種登録出願を行った(八木ら, 2010)。

これまでに、連鎖地図を用いた QTL (量的形質遺伝子座) 解析から、萎凋細菌病の抵抗性には作用の大きな QTL (LOD 値 23.5、寄与率 60.5%) と少なくとも二つの作用の小さな QTL が関与していることを明らかにした (Yagi et al., 2006)。さらに、作用の大きな QTL の近傍 (0.7cM) に DNA マーカー STS-WG44 を見出し (Onozaki et al., 2004)、実際の選抜にマーカーを利用して育種の効率化を図った。

このようにカーネーション萎凋細菌病に関して、抵抗性素材や抵抗性個体を選抜できる DNA マーカーは存在するが、抵抗性遺伝子の本体が何であり、どのような抵抗性機構が関与しているか等の基礎的知見は全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では「花恋ルージュ」のゲノム DNA を用いて bacterial artificial chromosome (BAC) ライブラリーを作成し、STS-WG44 マーカー近傍の塩基配列を決定することで抵抗性遺伝子を見出し、耐病性機構解明の前進を図る。

3. 研究の方法

(1) BAC ライブラリーの作成

「花恋ルージュ」からゲノム DNA を抽出し、制限酵素を用いて切断する。これを BAC ベクターに挿入し、ライブラリーを作成する。複数の BAC クローンのパルスフィールド電気泳動を行い、作成した BAC ライブラリーの性能を評価する。

(2) BAC クローンのスクリーニング

抵抗性遺伝子の近傍に存在する STS-WG44

マーカーを用いて PCR を行い、増幅するクローンのスクリーニングを行う。

(3) BAC クローンの配列解読

選抜した BAC クローンについて、高速シーケンサー等を用いて網羅的に塩基配列情報を取得する。得られた配列をアッセンブルし、コンティグ配列を作成する。

(4) 遺伝子の領域の特定

得られたコンティグ配列から病害抵抗性遺伝子に特徴的な配列 (LRR、NBS 等) を探し出し、抵抗性の候補遺伝子を抽出する。

4. 研究成果

(1) BAC ライブラリーの作成

「花恋ルージュ」からゲノム DNA を抽出し、制限酵素 Hind を用いて消化した。さらにゲノム DNA 断片を pIndigoBAC-5 ベクターへ挿入し、BAC ライブラリーを作成した。作成したライブラリーの中から 46,080 (384 穴プレート × 120 枚) クローンをピックアップし、プレートに整列化した。そのうち 24 クローンを選択し、パルスフィールド電気泳動法を用いてインサート長を推定した結果、平均 156.7kb であると計算され、作成した BAC ライブラリーはカーネーションのゲノムサイズ 611Mb (RBG Kew DNA C-values より) の約 12 倍 (7.2Gb) を網羅する高品質なライブラリーであることが明らかになった (図 1)。

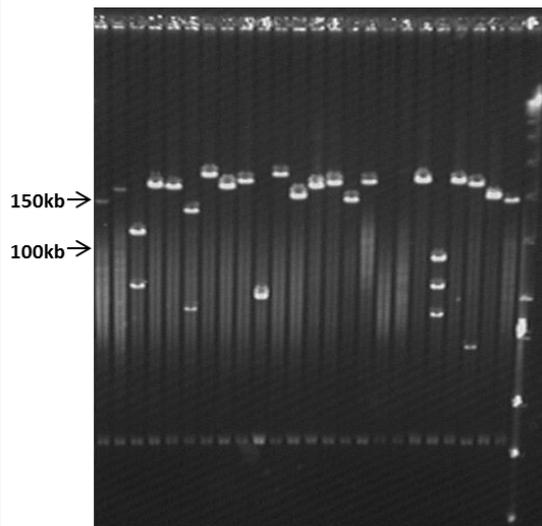


図 1 作成した BAC ライブラリーの電気泳動による分子量の推定

(2) BAC クローンの選抜

主働抵抗性遺伝子近傍マーカーである STS-WG44 を用いて 1 プレート分 (384 個) の BAC 情報を集めた 120 プールについて 1 次スクリーニングを行った結果、25 プールで増幅が認められた。これは作成したライブラリー規模から予想される数より 4 倍程度多かった

ことから、STS-WG44 が複数のゲノム領域を増幅している可能性が示唆された。その後、3 プールについてクローンを特定するための 2 次スクリーニングを行い、3 クローン (K11、N18、H01) を選抜した。さらに、STS-WG44 マーカーを用いた PCR により選抜クローンが増幅できたことから、確かに STS-WG44 マーカー近傍配列を含むことを確認した。

(3) BAC クローンの配列解読

選抜した STS-WG44 マーカーを含む 3 つの BAC クローンについて、第 2 世代型シーケンサー GS FLX+ (Roche 社) を用いて塩基配列を解読し、Newbler を用いてアセンブルを行った。その結果、3 つのクローンからそれぞれ 16 個 (K11)、19 個 (N18)、13 個 (H01) のコンティグ配列が得られた。通常は少数のコンティグ配列に収束することが期待されることから、これらのクローンには多数の繰り返し配列が存在していることが示唆された。また、各クローンで最大のコンティグ長は 34,205 塩基 (K11)、91,790 塩基 (N18)、46,888 塩基 (H01) であった。これらのコンティグ配列をもとに各クローンの配列比較を行った結果、3 つのクローンはいずれもほぼ同じ配列であることが明らかになった。以上の結果から、STS-WG44 マーカーが複数の領域を増幅している可能性は少ないと考えられた。

(4) 遺伝子領域の特定

最も長いコンティグ配列が得られた N18 クローンについて遺伝子構造予測プログラム GENSCAN を用いて遺伝子領域の推定を行い、HMMER プログラムを用いてタンパク質の機能推定を行った。その結果、91,790 塩基の配列の中には 13 個の遺伝子領域が推定され、その中に病害抵抗性への関与が知られている NBS-LRR (NBS; nucleotide-binding site=核酸結合部位、LRR; leucine-rich repeat) 型遺伝子に似た構造をもつ遺伝子が少なくとも 6 個存在すると推定された(図 2)。次に、抵抗性遺伝子の絞り込みを行うため、カーネ

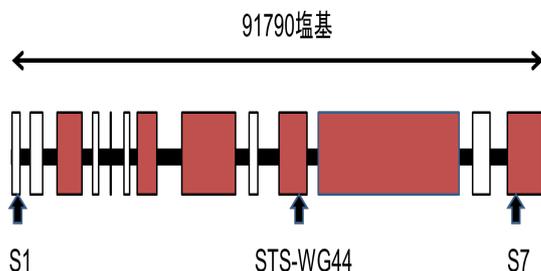


図 2 STS-WG44 マーカー近傍領域の遺伝子構造
NBS-LRR 型遺伝子と類似構造を持つ遺伝子を色で示す。

ーションの全ゲノム情報 (Yagi et al., 2013) を用いて、コンティグ配列と対応するスキャフォールド配列を特定した。次に、両配列で異なる領域にプライマーを設計し、スクリーニングした結果、STS-WG44 マーカーから約 40kb 離れた両端の位置に存在する新規の STS マーカー (S1 および S7) を作成した(図 2)。

その後、2013 年度に萎凋細菌病に抵抗性を有する系統と罹病性の系統を交配して得られた実際の育種集団の中から、STS-WG44 マーカーを含むことを確認済みの 360 個体について新規の STS マーカーの有無を確認した。その結果、すべての個体がこれらマーカーを有していた。このことから、本年度の育種集団の中からは、この領域で組み換えを生じている個体を見出すことはできなかった。

今後は、育種集団の規模を拡大し、新規のマーカー間で組み換えを生じている個体を見出し、それら個体の発病率を調査することで、候補遺伝子の絞り込みが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Masafumi Yagi, Toshiya Yamamoto, Sachiko Isobe, Satoshi Tabata, Hideki Hirakawa, Hiroyasu Yamaguchi, Takashi Onozaki. Identification of tightly SSR markers for flower type in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Euphytica*, DOI: 10.1007/s10681-014-1090-8, 2014, 査読有

Masafumi Yagi, Shunichi Kosugi, Hideki Hirakawa, Akemi Ohmiya, Koji Tanase et al. (他 22 名). Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *DNA Research*, doi: 10.1093/dnares/dst053, 2013, 査読有

Masafumi Yagi, Toshiya Yamamoto, Sachiko Isobe, Hideki Hirakawa, Satoshi Tabata, Koji Tanase, Hiroyasu Yamaguchi, Takashi Onozaki. Construction of a reference genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) *BMC Genomics*, 14, 734, doi:10.1186/1471-2164-14-734, 2013, 査読有

[学会発表](計 2 件)

八木雅史、山本俊哉、磯部祥子、平川英樹、田畑哲之、棚瀬幸司、山口博康、小野崎隆、カーネーションの標準連鎖地図の作成、育種学会、2013 年 10 月 12 日~13 日、鹿児島大学

八木雅史、山本俊哉、磯部祥子、平川英樹、田畑哲之、棚瀬幸司、山口博康、小野崎隆、カーネーションの花型遺伝子座に連鎖した DNA マーカーの開発、園芸学会、2013 年 9 月 21 日～22 日、岩手大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

八木 雅史 (YAGI, Masafumi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
花き研究所花き研究領域・主任研究員

研究者番号：40391403