

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450044

研究課題名(和文) トウガラシ疫病抵抗性に関する量的形質遺伝子座の解析

研究課題名(英文) QTL analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper

研究代表者

南山 泰宏 (Minamiyama, Yasuhiro)

京都教育大学・教育学部・教授

研究者番号：00463266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では疫病抵抗性の評価方法として最も適した葉身接種条件を確立し、由来の異なる疫病菌株の病原性の違いや抵抗性品種における抵抗性の程度の違いを明らかにした。さらに、与保呂菌株とpph菌株を用いて上述の評価方法によりQTL解析を行ったところ、LG9に両菌株に共通、LG7に与保呂菌株に特異的、LG1にpph菌株に特異的な3つの新規のQTLを検出した。一方、両菌株に共通で寄与率の高いLG5に座乗するQTL近傍のDNAマーカーを探索し、LOD値の最も高い位置に、新たに開発した3つのマーカーを得た。これらのDNAマーカーは実際の育種において有効に利用できるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Relative virulence of 4 isolates of *Phytophthora capsici* from different origins was evaluated on 5 resistant and one susceptible cultivars by using leaf inoculation method under controlled environmental conditions. In order to perform a QTL analysis, resistance to *P. capsici* were evaluated in the DH population between susceptible ('Manganji') and resistance ('Criollo de Morelos 334') by leaf inoculation tests using two different isolates, pph and Yohoro. As a result, four QTLs were detected for resistance to each isolates. Of these four QTLs, three QTLs on LG5, LG8 and LG9 were common to two isolates, but the other QTL was unique to either isolates, which were on LG1 for isolate pph and on LG7 for isolate Yohoro. On the other hand, three PCR-based DNA markers were developed on the peak of common major QTL on LG5. They might surely be useful tool in the breeding program for phytophthora-resistant pepper cultivars.

研究分野：農学

キーワード：トウガラシ 疫病抵抗性 QTL解析 葉身接種法

## 1. 研究開始当初の背景

ピーマン・トウガラシ類の土壌病害のひとつである、*Phytophthora capsici* Leon によって引き起こされる根腐れや茎葉の枯損は、トウガラシ疫病として、国内だけでなく世界各地でトウガラシ属作物を含むナス科作物を中心とした多くの作物の重要病害となっている。トウガラシ疫病的防除には主に殺菌剤が用いられているが、土壌の宿主植物の残差などで数ヶ月間もの間生存するため、その防除や消毒が困難であるとともに、殺菌剤による防除は環境や健康への影響も懸念されている。

これまでに、トウガラシ遺伝資源から疫病抵抗性素材を探索する研究が数多く行われ、メキシコの在来品種である 'Criollo de Morelos 334' (以下、'CM334') は、様々な疫病菌株に対して極めて強度な抵抗性を示すことが知られている (Oelke et al., 2003)。しかし、この疫病抵抗性は複数の遺伝子が関与する量的形質であることから (Reifschneider et al., 1992)、慣行の育種手法ではその育成は極めて困難であり、国内で栽培されているピーマン・トウガラシ類において、強度な抵抗性を持つ品種がない現状にある。しかし、近年の分子マーカー技術の進展は、量的形質に関与する遺伝情報を提供し、これまで困難であった育種を効率的に行うことを可能にしている。疫病抵抗性についても、'CM334' の持つ疫病抵抗性に関する量的形質遺伝子座 (以下、QTL) の解析が行われているが、これらの研究では汎用性の低い RFLP、AFLP および RAPD マーカーが用いられているため (Thabuis et al., 2003)、実際の育種場面でのマーカー選抜に適用することができない状況にある。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでに検出が容易で汎用性、信頼性が高い SSR マーカーを大量に開発し、これに基づく高精度な連鎖地図を作成した (Minamiyama et al. 2006)。これをもとに、'CM334' における疫病抵抗性に関する QTL 解析を行い、2 つの抵抗性遺伝子座を明らかにし、その近傍に実用性の高い複数の SSR マーカーを得ることに成功した (Minamiyama et al. 2007)。しかし、強度の抵抗性品種の育成のためには、複数の菌株に対する抵抗性遺伝子座を明らかにし、これに連鎖した SSR マーカー情報を提供する必要がある。そこで、本研究では、これまでに京都府のトウガラシ疫病発生圃場から単離した疫病菌株の病原性の違いを明らかにするとともに、'CM334' を素材に遺伝解析のために作出した倍加半数体集団を用いて、複数の疫病菌株に対する抵抗性評価と QTL 解析を行い、複数の菌株に対する抵抗性遺伝子座を明らかにする。さらに得られた QTL について、同じナス科のトマトやナス等のゲノム情報を駆使し、実際の育種場面でマーカー選抜に利用できる PCR マー

カーを開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 疫病菌株の病原性の評価

疫病菌株の病原性の評価には、2007 年に京都府内のトウガラシ疫病発生圃場から分離した、'与保呂菌株' (KP07336) (京都府舞鶴市与保呂地区より採取分離)、'大原野菌株' (KP07340) (京都府京都市大原野地区より採取分離) および '明石菌株' (KP07346) (京都府与謝野町明石地区より採取分離) の 3 菌株 (京都府生物資源研究センターより分譲) と 'pph 菌株' (KP07335) (野菜茶業研究所より分譲) を供試した。また、植物材料として、疫病抵抗性である 'CM334'、'AC2258'、'CM2M-54'、'台パワー' および 'No.10' (以上、農研機構・野菜茶業研究所から分譲) と、罹病性品種である '万願寺' (京都府生物資源研究センターより分譲) の 6 品種を用いた。疫病菌の病原性の評価は、検定用プラスチックトレイに 5mL の滅菌水を添加したキッチンタオルの上にトウガラシの葉を重ねるように並べ、遊走子の濃度を調節した疫病菌懸濁液を葉上に 10  $\mu$ L 滴下した後トレイの蓋をして、インキュベーター内に静置し、接種後の病斑の最大径を計測して行った。

### (2) 複数の疫病菌株を用いた遺伝解析集団の抵抗性評価と QTL 解析

疫病抵抗性品種 'CM334' と罹病性系統 '万願寺' の交配 F<sub>1</sub> 個体から薬培養により作出した倍加半数体 88 系統を遺伝解析集団として用いた。遺伝解析集団の抵抗性の評価は、病原性が強かった与保呂系菌株と pph 菌株を用いて、遊走子密度  $1 \times 10^5$  個/mL、培養温度 15 の条件で葉身接種検定を 2 回反復で行った。この抵抗性評価データと既存の研究で得た連鎖地図情報により、QTL 解析ソフトウェア 'MapQTL4.0' を用いて Interval mapping 法により QTL 解析を行った。

### (3) 抵抗性 QTL に連鎖した選抜マーカーの開発

QTL 近傍に新たに DNA マーカーを開発するため、トマトの SNPs、トウガラシの EST 由来 SSR、RAPD 由来の CAPS の 3 種類を用いた。トマト SNPs については、トマトとトウガラシのマクロシンテニー (Wu et al., 2009) の情報から、トマト連鎖地図 Tomato-EXPEN 2000 で QTL 近傍に座乗すると考えられた SNPs マーカー増幅用プライマーを用いて、トウガラシ交配親品種の DNA を鋳型に PCR を行い、増幅した DNA 断片の塩基配列を決定し、交配親品種間で塩基多型を検出した。得られた SNPs マーカーについては、Tm-shift PCR 法により分離集団のジェノタイプングを行った。RAPD マーカーについては、約 500 種類のランダムプライマーを用いてバルク法により目的の領域に座乗する多型マーカーを検出した。得られた RAPD マーカーについて

は、塩基配列を決定後、CAPS マーカーへの交換を行った。EST 由来の SSR マーカーは、公開されているトウガラシ EST 配列情報より、SSR マーカー自動設計システム 'read2Marker' を用いて、SSR を含むクローンを検索、特異的プライマーを設計して、交配親品種間で多型であったマーカーを検索した。

3 種類の方法で開発した新たな DNA マーカーは、連鎖解析ソフト 'JoinMap3.0' を用いて既存の連鎖地図に追加した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 疫病菌株の特性評価

疫病抵抗性の程度が異なる '万願寺'、'CM334' および 'AC2258' の 3 品種と、疫病菌株の 'pph 菌' を用いて、遊走子密度 ( $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  個/mL) と培養温度 (15、20 および 25) を 9 区設定し、葉身接種条件を検討した。その結果、接種後 7 日目の病斑の最大径において、遊走子密度  $1 \times 10^5$  個/mL、培養温度 15 と 20 の 2 区でのみ、3 品種間に有意差が認められた (第 1 表)。しかし、 $1 \times 10^5$  個/mL・20 区では、抵抗性品種である 'AC2258' でも病斑の最大径が 64.3mm と罹病性品種 '万願寺' の 78.8mm とほぼ同等の病斑の拡大が認められた。品種によっては葉身長が短いものもあり、病斑が葉の大きさを超えると正確な評価が行えなくなるため、'万願寺' でも 40mm 程度の病斑の大きさであった遊走子密度  $1 \times 10^5$  個/mL、培養温度 15 の条件が葉身接種条件として適当であると考えた。

第 1 表 疫病接種条件と接種 7 日目の病斑の最大径 (mm) との関係

培養温度	品種	疫病菌遊走子密度 (個/mL)		
		$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
15°C	万願寺	3.0 a <sup>2</sup>	34.3 a	40.3 a
	AC2258	1.5 a	22.0 a	20.0 b
	CM334	0.5 a	3.0 b	0.0 c
	ANOVA <sup>3</sup>	ns	**	**
20°C	万願寺	29.0 a	73.3 a	78.8 a
	AC2258	0.0 b	51.3 ab	64.3 b
	CM334	0.0 b	16.5 b	5.0 c
	ANOVA	*	*	**
25°C	万願寺	34.6 a	94.8 a	-
	AC2258	10.3 a	49.5 ab	-
	CM334	0.0 a	44.8 b	-
	ANOVA	ns	*	-

<sup>2</sup> 異なるアルファベット間には Tukey-Kramer 検定により品種間に 5% 水準で有意差があることを示す。

<sup>3</sup> 品種間における分散分析の結果を示し、\*は 5%、\*\*は 1% で有意、ns は有意差なしを示す。

次に由来の異なる疫病菌 4 菌株と疫病抵抗性 5 品種を用いて、葉身接種条件を遊走子密度  $1 \times 10^5$  個/mL、培養温度 15 に設定し、接種後 7 日目の病斑の最大径を計測して、疫病菌株の病原性の評価と抵抗性品種の抵抗性の程度について検討した。その結果、疫病菌 4 菌株の病原性については、'与保呂菌株' と 'pph 菌株' が同程度で病原性が強く、続いて '大原野菌株' となり、'明石菌株' が最も病原性が弱かった (第 2 表)。特に '明石菌株' は罹病性品種 '万願寺' でも病斑が形

成されない接種葉が認められた。一方、抵抗性 5 品種の抵抗性の程度については、'CM334'、'CM2M-54' および '台パワー' が全ての菌株に対して強い抵抗性を示し、'AC2258' は中程度の抵抗性で、'No.10' は罹病性品種 '万願寺' と同程度で抵抗性はほぼ認められなかった。

第 2 表 由来の異なる疫病菌株を接種した際の抵抗性品種の病斑の最大径 (mm)<sup>2</sup>

品種	pph 菌株	与保呂菌株	大原野菌株	明石菌株
万願寺	35.8 a <sup>2</sup>	40.0 a	27.1 a	4.5 a
AC2258	29.6 b	33.0 ac	19.6 b	3.3 a
CM334	23.9 c	22.6 b	6.1 c	2.4 a
No.10	36.0 a	36.0 a	21.6 ab	3.0 a
CM2M-54	25.3 bc	25.3 bc	11.5 c	0.0 a
台パワー	28.1 bc	22.9 b	11.6 c	0.3 a
ANOVA <sup>3</sup>	**	**	**	ns

<sup>2</sup> 疫病菌接種条件は培養温度 15°C、遊走子密度は  $1 \times 10^5$  個/mL で行った。

<sup>3</sup> 異なるアルファベット間には Tukey-Kramer 検定により品種間に 5% 水準で有意差があることを示す。

<sup>4</sup> 品種間における分散分析の結果を示し、\*は 5%、\*\*は 1% で有意、ns は有意差なしを示す。

##### (2) 複数の疫病菌株を用いた遺伝解析集団の抵抗性評価と QTL 解析

'与保呂菌株' と 'pph 菌株' を用いて、'CM334' と 'MDH12-33' の交配 F<sub>2</sub> 由来倍加半数体系統の疫病抵抗性評価を行った。接種 7 日目の病斑の最大径を計測し、これを抵抗性の程度として Interval mapping 法により QTL 解析を行った。その結果、既報の 2 つの QTL (LG5 と LG8) は、どちらの菌株においてもほぼ同じ位置に QTL が認められた。一方、新たな QTL として、LG9 に両菌株に共通で LOD 値 2 程度の QTL を 1 か所、LG1 に 'pph 菌株' に特異的な LOD 値 1.5 程度の QTL を 1 か所、LG7 に '与保呂菌株' に特異的な LOD 値 1.5 程度の QTL を 1 か所検出した (第 3 表)。これらの新規の QTL は、LOD 値は低いが 2 回の反復試験で共通して検出されたことから、疫病抵抗性に関与している可能性が高いと推測された。

第 3 表 由来の異なる疫病菌株を用いて検出された抵抗性の QTL

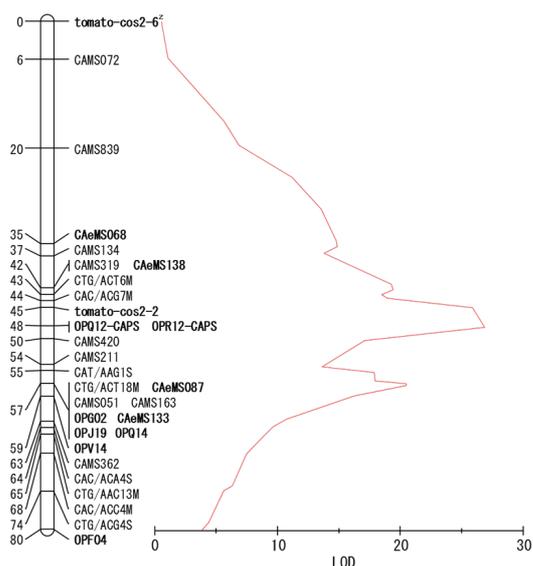
疫病菌株	連鎖群	DNA マーカー <sup>2</sup>	LOD 値		寄与率 (%)	
			反復 1	反復 2	反復 1	反復 2
pph 菌株	1	CAMS090	1.5	1.6	7.6	8
	5	CAMS420	9.2	9.3	39.6	38.9
	8	CTT/ACT3M	1.5	-	7.7	-
与保呂菌株	9	CTA/AAC8S	2.1	1.9	10.6	9.5
	5	CAMS420	17.9	9.5	61.7	40.1
	7	CTA/ACT3M	1.5	1.6	7.4	7.9
	8	CTT/ACT3M	1.7	1.3	8.5	6.5
	9	CTA/AAC8S	1.7	1.5	8.7	7.7

<sup>2</sup> LOD スコアの近傍に座乗した DNA マーカー

##### (3) 抵抗性 QTL に連鎖した選抜マーカーの開発

'与保呂菌株' と 'pph 菌株' に共通で寄与率の高い LG5 に座乗する QTL 近傍の DNA マーカーを、トウガラシ EST 由来の SSR マーカー、RAPD マーカーおよびトマトで開発された

SNPs マーカーから探索し、22cM の QTL 領域に新たな 7 つの PCR マーカーをマッピングした (第 1 図)、『与保呂菌株』を用いて行った抵抗性の評価結果を用いて、QTL 解析を行ったところ、LOD 値の最も高い位置には、RAPD 由来の 2 つの CAPS マーカー (OPQ12-CAPS と OPR12-CAPS) とトマト由来の SNPs マーカー (tomato-cos2-2) が座乗した。これらの DNA マーカー間の距離は約 3cM であり、実際の育種場面でマーカー選抜に有効に利用できるものと考えられた。



第1図 新たに開発したDNAマーカーを加えた第5連鎖群の連鎖地図と疫病抵抗性のQTL解析におけるLOD曲線  
<sup>†</sup>太字のDNAマーカーは新たに開発したマーカーを示す。

南山 泰宏 (MINAMIYAMA YASUHIRO)  
 京都教育大学・教育学部・教授  
 研究者番号：00463266

(2)研究分担者

(3)連携研究者

#### <引用文献>

- Minamiyama et al. (2006) Mol. Breed. 18: 157-169.  
 Minamiyama et al. (2007) Breed. Sci. 57: 129-134.  
 Oelke et al. (2003) J. Am. Soc. Hort. Sci. 128: 213-218.  
 Reifschneider et al. (1992) Euphytica 62: 45-49.  
 Thabuis et al. (2003) Theor. Appl. Genet. 106: 1473-1485.  
 Wu et al. (2009) Theor. Appl. Genet. 118: 1279-1293.

#### 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)

[学会発表](計1件)

南山泰宏, トウガラシ、マイナークロップのゲノム育種, 第35回和歌山バイオサイエンスフォーラム (和歌山バイオサイエンス連絡協議会), 2014年5月17日, 和歌山ビッグ愛 (和歌山市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者