

令和元年6月18日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18638

研究課題名(和文)新規素材を用いたRAD-seq解析によるイチゴ炭疽病抵抗性遺伝子マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of markers for resistance to anthracnose in new strawberry cultivar by RAD-Seq

研究代表者

遠藤 みのり(飛川みのり)(HIKAWA-ENDO, Minori)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・研究員

研究者番号：90614652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：イチゴ新品種「恋みのり」が2種のイチゴ炭疽病菌に異なる抵抗性、すなわち、*Colletotrichum siamense*に抵抗性、*C. fructicola*に罹病性を示すことを明らかにした。以上より、近年再分類が進むイチゴ炭疽病菌に対し、植物側にも複数の抵抗性が備わる可能性を見出した。また、「恋みのり」および既存2品種を用いてF1実生集団2集団を養成し、RAD-Seq解析により、2つの異なる炭疽病抵抗性マーカーの探索を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イチゴ炭疽病はいくつかの病原菌により引き起こされるイチゴ生産における最重要病害であり、激発時には生産者に甚大な経済的損失を与える。本研究では、従来知られるイチゴ炭疽病抵抗性は一部の病原菌には効果を有さないことを示し、複数の抵抗性を兼ね備えることの重要性を初めて示した。また、新品種「恋みのり」にこれまで知られなかった抵抗性を見出し、イチゴの病害抵抗性育種の進歩に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Strawberry anthracnose resistance of Japanese new strawberry cultivar 'Koiminori' as was investigated; It was found that 'Koiminori' was resistant to *Colletotrichum siamense* but susceptible to *C. fructicola*. Our studies are the first to demonstrate separate anthracnose resistances of strawberry plants.

RNA-Seq experiments using two groups of F1 seedlings were also conducted to identify two resistance genes.

研究分野：植物病理学、育種学

キーワード：イチゴ イチゴ炭疽病 新品種 病害抵抗性 RAD-seq解析 DNAマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Colletotrichum gloeosporioides 種複合体によるイチゴ炭疽病は、育苗圃場および生産圃場においてイチゴ苗の萎凋・枯死を引き起こし、農業上深刻な損害をもたらしている。

これまでに炭疽病抵抗性品種として、「Dover」およびその後代である「いちご中間母本農 2 号」、「宝交早生」等が育成された。しかしながら、申請者らが炭疽病抵抗性と連鎖する DNA マーカーを用いて予備試験を行ったところ、「Dover」「いちご中間母本農 2 号」「宝交早生」はいずれも同一の DNA マーカー IA2000826、IA202631 を保有することが示唆された。すなわち、以上既存 3 品種の炭疽病抵抗性は同一の遺伝子 (以下 R1) に由来するものであり、*C. gloeosporioides* 種複合体の変異や環境条件の変化により、一斉に打破される危険性を有している。

このような背景を受け、申請者らは約 5 年間にわたり年間 300 交配組合せ、1 万個体を超える実生を養成し、新たな炭疽病抵抗性遺伝子を有する有望系統の選抜を試みてきた。地道な圃場選抜および炭疽病接種試験を繰り返した結果、新品種「恋みのり」(旧系統名: 久留米 65 号) を得るに至った。「恋みのり」は炭疽病に「Dover」以上の極めて強い抵抗性を持つことが、複数の *C. siamense* 菌株を用いた接種試験により明らかになっている。また、IA2000826、IA202631 を保有しないことも確認されており、「Dover」「いちご中間母本農 2 号」「宝交早生」と異なる抵抗性遺伝子 (以下 R2) を持つと考えられる。

なお、申請者が過去に行った研究により、「恋みのり」が持つ R2 は *C. siamense* に対して非常に安定的に有効であるが、*C. fructicola* に対しては効果が低い可能性が示唆された。*C. gloeosporioides* 種複合体は、近年、分枝系統樹にもとづく再分類が進められているが、このような病原性の分化は過去に報告がない。よって、イチゴにおける炭疽病抵抗性育種のためのみならず、*C. gloeosporioides* 種複合体に関する植物病理学的意義からも、早急に DNA マーカーを作成して R1 と R2 を明確に区別するとともに、両者の集積効果など関係性を検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究を通じて「恋みのり」が持つ未知の炭疽病抵抗性の特性を明らかにし、今後の抵抗性品種育成に有用な DNA マーカーの開発を目指す。さらに、開発した DNA マーカーを用いて炭疽病抵抗性遺伝子の集積効果を確認し、より強い炭疽病抵抗性を持つ品種の開発が可能か検討する。

3. 研究の方法

(1) *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体の種が「恋みのり」における炭疽病発病に及ぼす影響

イチゴ炭疽病の主な病原菌である *C. siamense* および *C. fructicola* の孢子懸濁液を「恋みのり」および対照品種「Dover」(抵抗性)、「さちのか」(罹病性) に噴霧接種し、菌の種が発病に及ぼす影響を検討した。接種試験には *C. siamense* GC-7s、*C. fructicola* m-1-1 など複数の菌株および、50 穴セルトレーに挿し苗で採苗したイチゴ苗を供試した。高湿ハウス内で接種後、7、14、21、28 日後の葉柄発病度および枯死株率を評価した。

(2) 「恋みのり」と「Dover」の F₁ 実生集団を用いた炭疽病抵抗性 (R1) 連鎖マーカーの開発

「恋みのり」と「Dover」の F₁ 実生集団 182 個体を 50 穴セルトレーに養成し、供試した。

C. fructicola Nara gc-5 の孢子懸濁液を高湿ハウス内で噴霧接種し、接種後 21 日目の病斑数、葉柄発病度および枯死株率を算出した。

上記 F₁ 実生集団の一部個体から DNA を抽出し、既存の炭疽病抵抗性 DNA マーカー IA2000826、IA202631 のマーカー型を明らかにし、得られた表現型データとの関係性を検討した。

上記 F₁ 実生集団の 94 個体および母本 2 品種各 1 個体から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RAD-seq 解析を行った。新学術領域研究「先進ゲノム支援」の協力を得て上記

で得られた両データの連鎖解析を行い、抵抗性実生個体が持つ塩基配列を検索した。リファレンスゲノムとして、かずさ DNA 研究所が公開するイチゴゲノムデータベース (STRAWBERRY GARDEN, <http://strawberry-garden.kazusa.or.jp/>) 等を利用した。

(3) 「恋みのり」と「さちのか」の F₁ 実生集団を用いた炭疽病抵抗性 (R2) 連鎖マーカーの開発

「恋みのり」と「さちのか」の F₁ 実生集団 90 個体を 50 穴セルトレーに養成し、供試した。

C. siamense GC-7s の孢子懸濁液を高湿ハウス内で噴霧接種し、接種後 21 日目の病斑数、葉柄発病度および枯死株率を算出した。

上記 F₁ 実生集団の 94 個体および母本 2 品種各 1 個体から DNA を抽出し、次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いた RAD-seq 解析 (100bp、ペアエンド解析) を行った。新学術領域研究「先進ゲノム支援」の協力を得て上記で得られた両データの連鎖解析を行い、抵抗性実生個体が持つ塩基配列を検索した。リファレンスゲノム等は (2) に準じて用いた。

4. 研究成果

(1) *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体の種が「恋みのり」における炭疽病発病に及ぼす影響

接種試験の結果、「恋みのり」は *C. siamense* GC-7s に対し抵抗性を示したものの、*C. fructicola* m-1-1 等に対し「さちのか」並みの罹病性を示した。一方、「Dover」はすべての菌種に抵抗性を、「さちのか」はすべての菌種に罹病性を示した（図1：一部データ略）。すなわち、「恋みのり」の炭疽病抵抗性は *C. siamense* に有効であるが、*C. fructicola* の一部菌株に対し効果が低いこと、「Dover」の炭疽病抵抗性は両菌株に有効であることが示された。

本結果は「恋みのり」において既に観察されていた、試験条件による炭疽病抵抗性の発現の

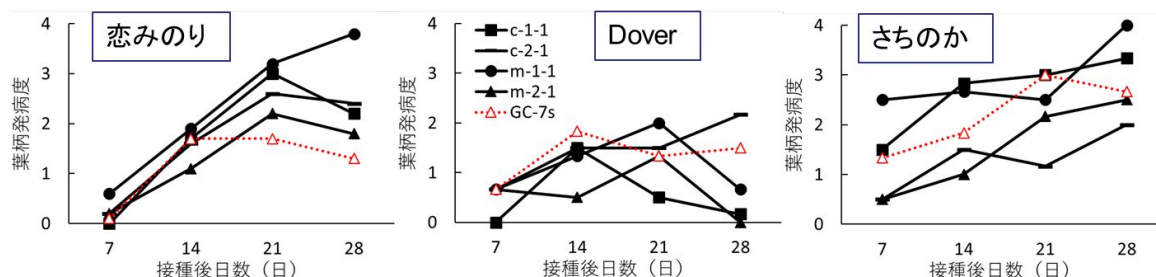


図1 *Colletotrichum gloeosporioides*種複合体の種が「恋みのり」における炭疽病発病に及ぼす影響の評価

差異の主要因であると考えられた。

(2) 「恋みのり」と「Dover」の F₁ 実生集団を用いた炭疽病抵抗性 (R₁) 連鎖マーカーの開発

(3) 「恋みのり」と「さちのか」の F₁ 実生集団を用いた炭疽病抵抗性 (R₂) 連鎖マーカーの開発

「恋みのり」と「Dover」の F₁ 実生集団における炭疽病抵抗性を図2に示す（一部データ略）。実生個体は抵抗性～罹病性に幅広く分離した。また、IA2000826、IA202631のマーカー型と観察された炭疽病抵抗性との表1に示す。IA2000826、IA202631のいずれも、本試験で観察した炭疽病抵抗性との間に相関は認められなかった。本研究以外の周辺研究で得られた知見も考慮すると、両マーカーが炭疽病抵抗性マーカーとして既知であるにもかかわらず、接種試験で得た表現型データとの間に相関が認められなかった原因として、「Dover」が有する炭疽病抵抗性の発現、もしくは *C. fructicola* が有する病原性の発現が、環境条件により大きく影響を受けるためと考えられる。

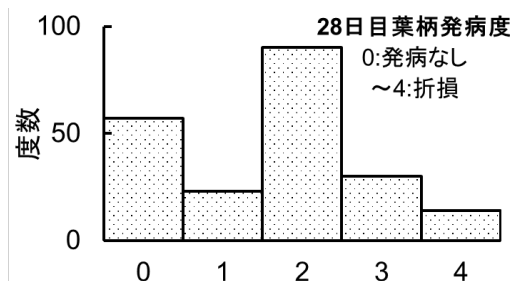


図2 「恋みのり」と「Dover」F₁ 実生集団における炭疽病抵抗性の分離

表1 「恋みのり」と「Dover」F₁ 実生におけるIA2000826、IA202631のマーカー型

マーカー型	n	抵抗性別個体数			病斑数 (参考)			葉柄発病度 (参考)			
		強	中	弱	14日目	21日目	28日目	14日目	21日目	28日目	
IA200826	-	42	15	14	13	13.9	10.9	6.5	1.5	1.3	1.3
	+	35	15	7	13	10.4	11.8	8.1	1.4	1.5	1.4
IA202631	-	38	14	13	11	12.7	10.8	5.9	1.4	1.3	1.4
	+	39	16	8	15	11.9	11.8	8.4	1.4	1.5	1.4

「恋みのり」と「さちのか」の F₁ 実生集団における炭疽病抵抗性を図3に示す（一部データ略）。前項の「恋みのり」と「Dover」の F₁ 実生集団に対し、葉柄発病度はやや高い傾向にあったものの、実生個体は抵抗性～罹病性に幅広く分離した。

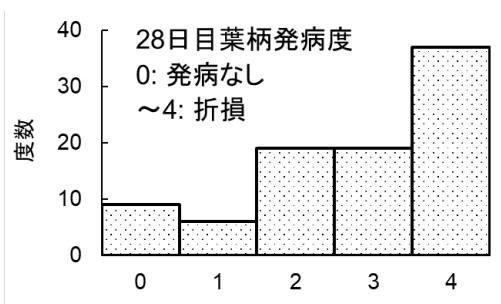


図3 「恋みのり」と「さちのか」F₁ 実生集団における炭疽病抵抗性の分離

両集団を用いた RAD-Seq 解析では、それぞれ総リード数約 39,500 万および約 36,900 万、総 contig 数約 6 万および約 1.3 万のデータが得られた。シーケンス結果解析ソフトウェア Stacks 等を用いた SNPs 探索を行い、個体あたり数万程度の SNPs を検出し、ジェノタイプ判定を行った。しかしながら、イチゴがヘテロ性の高い 8 倍体であること、STRAWBERRY GARDEN から取得したリファレンスゲ

ノムが Scaffold 状態であり、連鎖地図作成が行えず、連鎖解析が困難であった。そこで、かずさ DNA 研究所が 2019 年に新規に公開したリファレンスゲノムを借用し（借用当時未公開）、リファレンスゲノムを精査するとともに、解析を再開した。リファレンスゲノムの精査結果は省略するが、イチゴゲノムの特性上、従来の手法による連鎖解析は困難であることが示唆された。そこで、リファレンスゲノムに含まれる proteins を CDHIT でクラスタリングし、解析対象とするゲノムを限定したのち、新たな暫定リファレンスゲノムとする解析方法を採用した。

まず、「恋みのり」と「Dover」の F₁ 実生集団についてジェノタイプにもとづくハミング距離を元に樹形図を描き、実生個体間の類縁性を評価したところ、病斑数、葉柄発病度、枯死の有無のいずれも、個体間の類縁性との間に関係性は見出されなかった。本結果は、先に述べた、「Dover」が有する炭疽病抵抗性の発現、もしくは *C. fructicola* が有する病原性の発現が、環境条件により大きく影響を受けるとの仮説と矛盾しない。今後、*C. fructicola* のイチゴへの感染機構およびゲノムの解析を進め、*C. fructicola* によるイチゴ炭疽病の発病に及ぼす環境条件の影響について理解を進める必要がある。

「恋みのり」と「さちのか」の F₁ 実生集団についても、同様の解析を行っている。未公開のリファレンスゲノムを利用したことから、当初想定したスケジュールに比べ解析が遅れ、本研究機関内には完了できなかった。しかしながら、既に終了した集団と同様の解析手法を取っていることから、令和元年度中に解析を終え、*C. siamense* 抵抗性関連マーカーを得られると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

遠藤(飛川)みのり、イチゴ新品種「恋みのり」が有する炭疽病抵抗性 - *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体の菌種による差異の一例 -、植物防疫、査読有、第 72 巻第 4 号、2018、pp. 22-26

〔学会発表〕(計 2 件)

遠藤(飛川)みのり、森脇 丈治、イチゴ新品種「久留米 65 号」において認められた複数のイチゴ炭疽病菌株に対する抵抗性の差異、2017 年、九州病害虫研究会第 93 回研究発表会

金 相完、遠藤みのり、曽根一純、田代康介、久原 哲、RAD-Seq 解析によるイチゴの炭疽病抵抗遺伝子マーカー開発、2018 年、新学術先進ゲノム支援 2017 年度拡大班会議

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 金 相完

ローマ字氏名： （KIM, Sangwan）

研究協力者氏名： 田代 康介

ローマ字氏名： （TASHIRO, Kosuke）

研究協力者氏名： 久原 哲

ローマ字氏名： （KUHARA, Satoru）

研究協力者氏名： 森脇 丈治

ローマ字氏名： （MORIWAKI, Jouji）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。