

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15226

研究課題名(和文) リンゴ高接病抵抗性の早期選抜法の開発および原因遺伝子のポジショナルクローニング

研究課題名(英文) Marker-assisted selection and positional cloning of the genes conferring top working disease in apple

研究代表者

森谷 茂樹(MORIYA, Shigeki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員

研究者番号：90391474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴに対して高接病を引き起こすACLSVに対する感受性原因遺伝子を「ミツバカイドウ」の第10染色体、および「マルバカイドウ」の第4染色体に位置づけた。また、高密度にマーカーを開発して詳細なマッピング解析を行い、これらの座乗候補領域をそれぞれの染色体中の約500Kbに絞り込んだ。さらに、育種場面において、これらの早期選抜に利用するに適したDNAマーカーを開発した。これらの知見を利用して、原因遺伝子のポジショナルクローニングに用いるための植物材料を育成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高接病が発生すると樹勢が衰弱し生産性が著しく低下する。しかしながら、本病には有効な治療法がないことから対処としては樹を伐採するしかない。このため、本病に抵抗性を示す素材が求められている。本研究によって、ACLSVに対する感受性原因遺伝子の座乗位置が初めて明らかにされ、さらに本形質に対するマーカー選抜法が初めて開発された。今後、原因遺伝子のポジショナルクローニングによって、高接病の発病機構が解明され、総合的防除法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Top working disease in apple is caused by ACLSV. Linkage analysis using two F1 progenies derived from the crosses of *Malus sieboldii* and of *M. prunifolia* resulted in the identification of positions of the genes conferring susceptibility to ACLSV in chromosome 10 of *Malus sieboldii* and chromosome 4 of *Malus prunifolia*. Marker enrichment analysis narrowed down their location within approximately 500 Kb in the respective chromosomes. Two SSR markers tightly link to the causal genes and clearly discriminate susceptible alleles. Those were selected as markers for use in breeding. To obtain plant material that is used for positional cloning of these genes, two crosses identical to those used in the initial mapping were performed.

研究分野：園芸学

キーワード：リンゴ 病害抵抗性 ウイルス病 ポジショナルクローニング

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

### 1. 研究開始当初の背景

リンゴの高接病は、主に台木として用いられるリンゴ属植物において症状が認められ、発病すると樹全体が衰弱して、病勢が進むと枯死に到る。本病はウイルス病であり、一度発病すると防除は困難である。病原となるウイルスは、潜在感染している穂木を台木に接ぎ木したり、既存の樹に高接ぎすることで伝搬される。商業用の苗木の生産現場においては、穂木を採取する母樹の管理が厳格に行われている一方、生産者が苗木を自家増殖したり、高接ぎを行うような場合においては、このような管理がなされていないことが多いので、ウイルス感染樹が認められることがある。このように、高接病は不用意な接ぎ木から感染が広がり、感染すると手の施しようがないので、果実生産に大きな影響を及ぼす。

リンゴ高接病については、現在までに3種類のウイルス (ACLSV、ASPV、ASGV) が病原として知られており (坂上、工藤 2009)、各ウイルスに対して各種のリンゴ属植物が呈する病徴が調べられている (羽生田ら 1983)。台木として用いられる「マルバカイドウ (*Malus prunifolia*)」や「ミツバカイドウ (*Malus sieboldii*)」は、ACLSV に対して病徴を示す感受性である。一方、栽培リンゴ (*Malus x domestica*) や「M系」台木 (*Malus pumila*) は病徴を示さない抵抗性である。ACLSV に対する感受性は、感受性が抵抗性に対して優性を示す1遺伝子によって後代に遺伝することが報告されている (羽生田ら 1984)。さらに、「マルバカイドウ」と「ミツバカイドウ」では異なる病徴が認められるので、これら2種の発病機構が異なっていると考えられている。現在、普及が進められているわい性台木においては、農研機構果樹茶業研究部門が育成した我が国の気候に適したわい性台木「JM台木」のうち、「JM1」がACLSVに感受性を示す (副島ら 2010)。この感受性は、交雑親であった「マルバカイドウ」から遺伝したと推測されている。

また、現在、「JM台木」に根頭がんしゅ病抵抗性を付与した台木新品種を育成するために、「JM台木」と根頭がんしゅ病に抵抗性の「ミツバカイドウ」を交雑した実生個体群を養成している。上述した高接病感受性の遺伝性に関する知見をもとに考えると、この実生個体群において、高接病に対する感受性の個体が出現していると予想される。このため、育種上、個体選抜を行う際に、本病に対して抵抗性を示す個体を選抜することが求められる。

現在、高接病の感受性を検定するためには、ウイルスの保毒穂木を接種し、病徴の有無を観察するしか方法が無く、表現型の判定には早いもので接種から1ヶ月程度、遅いものでは2年を要する。このため、接種検定に代替する簡便な判別法の開発が求められている。その方法としては、本病に対する感受性の遺伝様式が1遺伝子で説明できることを勘案すると、DNAマーカーを利用した判定を行うことが有効と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、高接病のうち、ACLSVが引き起こす症状に着目し、「マルバカイドウ」と「ミツバカイドウ」に由来する原因遺伝子をマーカー選抜する方法を確立するとともに、病徴の発現機構を解明することを見据え、原因遺伝子のポジショナルクローニングの基礎となる知見と材料を得ることである。具体的には以下の3点を明らかにする。

- (1) 「マルバカイドウ」および「ミツバカイドウ」それぞれに由来するACLSVに対する感受性の原因遺伝子座について、リンゴ連鎖地図上の座乗位置の解明。
- (2) 連鎖地図の高密度化、およびそれらを利用した原因遺伝子のマーカー選抜法の開発。
- (3) ポジショナルクローニングの材料とする個体群の養成、およびそれらの中から原因遺伝子の近傍の染色体領域に組換えが認められる個体の選抜。

### 3. 研究の方法

- (1) ACLSVに対する感受性の原因遺伝子の連鎖地図上へのマッピング

「ミツバカイドウ」を片親とするF1集団の121個体 (ミツバ集団) および「マルバカイドウ」を片親とするF1集団の100個体 (マルバ集団) について、複製樹を養成し、腹接ぎによってACLSVを接種した。発芽直後に現れる葉における病徴、および接ぎ木部に現れる病徴を剥皮して観察し、各個体について抵抗性または感受性を判定した。判定された表現型を元に、連鎖解析により原因遺伝子をリンゴ連鎖地図上へマッピングした。

- (2) 連鎖地図の高密度化、および原因遺伝子のマーカー選抜法の開発

連鎖地図と栽培リンゴゲノムの位置情報との対応付けを行った。次に、当該領域の塩基配列から、SSRマーカーとして利用できる単純反復配列を抽出した。抽出された配列はSSRマーカー化して連鎖地図上にマッピングした。マッピングの結果、原因遺伝子に強く連鎖し、識別しやすい対立遺伝子を示すSSRマーカーを育種場面で利用可能な選抜マーカーとして提示した。

- (3) ポジショナルクローニングに用いる新たな交雑実生個体の獲得

「ミツバカイドウ」由来の原因遺伝子については、追加で利用可能となった新たなF1集団 (ミツバ集団2) 1025個体から候補領域の染色体に組換えが起きた個体を選抜して、原因遺伝子のマッピングを行った。さらに、ポジショナルクローニングに用いる1000個体規模の新たな交雑実生個体を得るため、ミツバ集団およびマルバ集団について再交雑を行った。得られた種子を播種し、実生個体を得た。実生個体から原因遺伝子候補領域を挟むように位置する2種類のDNAマーカーを検出し、候補領域中で染色体の組換えが起きている個体を選抜した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ACLSV に対する感受性原因遺伝子の連鎖地図上へのマッピング

ミツバ集団を用いて原因遺伝子座の遺伝解析を行ったところ、*Cv1* は、第 10 連鎖群上の 2.45cM、栽培リンゴゲノム(GDDH13 v1.1)における第 10 染色体の 1.37 ~ 6.07Mbp(4704Kbp)に座乗していると推定された(第 1 図、*Cv1* 灰色領域)。一方、マルバ集団では、第 4 連鎖群上の 32.16cM と、ミツバ集団とは異なる染色体に座乗していると推定された(第 1 図、*Cv2*)。栽培リンゴゲノムとの対応付けから、*Cv2* の座乗位置は第 4 染色体の 31.06 ~ 31.62Mbp(556Kbp)に相当していた(第 1 図 黒色領域)。

ACLSV に感染すると、ミツバカイドウでは生育が緩やかに阻害される一方、マルバカイドウでは病徴の発現が早く、皮内にネクロシスが発生して葉に赤色斑点や退緑が生じる等、病徴に違いが認められる。本研究により、両種で異なる位置に感受性原因遺伝子が検出されたことから、異なる遺伝子の働きにより、このような病徴の違いが生じている可能性が示唆された。

##### (2) 連鎖地図の高密度化、および原因遺伝子のマーカー選抜法の開発

当該領域の配列から SSR マーカーを設計し、マッピングを試みたところ、*Cv1* の連鎖地図には 17 種類、*Cv2* の連鎖地図には 14 種類の SSR マーカーが新たに位置づけられた。このうち、*Cv1* については Mdo.chr10.80 が、増幅長 219 ~ 235bp を示し、供試集団では原因遺伝子とマーカーとの間に組換えが認められなかった(表 1)。一方、*Cv2* については、Mdo.chr4.14 が増幅長 211 ~ 219bp を示し、原因遺伝子とマーカーとの間に組換えが認められなかった(表 1)。

リンゴ台木育種において、DNA マーカー選抜が行われている 3 種類の重要形質(わい化性、挿し木発根性、根頭がんしゅ病抵抗性)は、DNA シーケンサーを利用したフラグメント解析によって SSR マーカーを検出することで選抜が行われている。本研究において、ACLSV 感受性の選抜マーカーとして提示された 2 種類の SSR マーカーの増幅長を既存の形質に連鎖する選抜マーカーと比較したところ、いずれも選抜マーカーの増幅長とも重複しないことから、これらのマーカーと同時に検出することが可能であると判断された(表 1)。

表 1. DNA マーカーを利用したリンゴ台木育種上の重要形質の選抜

DNA マーカー	連鎖する遺伝子	連鎖群	選抜(淘汰)対象となる対立遺伝子	増幅範囲
Mdo.chr10.80	<i>Cv1</i>	10	235bp (淘汰対象)	219-235bp
Mdo.chr4.14	<i>Cv2</i>	4	219bp (淘汰対象)	211-219bp
CH03a09	<i>Dw1</i>	5	156bp (選抜対象)	142-156bp
NZmsEB119405	<i>Cg</i>	2	191bp (選抜対象)	191-206bp
SAMsCN490324	挿し木発根性QTL	17	260bp (選抜対象)	238-260bp

*Dw1*: わい化性遺伝子、*Cg*: 根頭がんしゅ病抵抗性遺伝子

##### (3) ポジショナルクローニングに用いる新たな交雑実生個体の獲得

ミツバ集団 2 から DNA マーカー SSR0105 と SSR1764 を用いて、両マーカー間でミツバカイドウ由来の染色体に組換えを起こしている個体を識別したところ、組換え型の 45 個体が選抜された。これらの材料について表現型を検定し、(2)で得られた DNA マーカーを検出した結果、*Cv1*

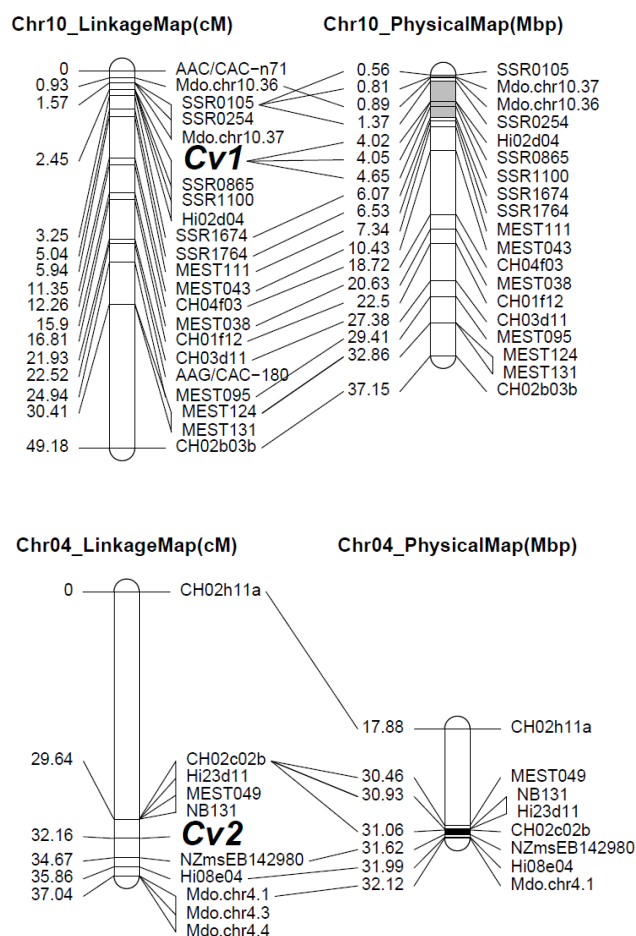


図 1 ACLSV 感受性の原因遺伝子 *Cv1* (ミツバ型症状), および *Cv2* (マルバ型症状) の遺伝連鎖地図(左)と物理地図(右)

の座乗候補領域は Mdo.chr10.51 と Mdo.chr10.70 の間 (2.06 ~ 2.61Mbp) の 550Kbp に絞り込まれた (図2)。

ミツバ集団、およびマルバ集団の再交雑によって、それぞれ 1819 粒、743 粒の種子を得た。これらを播種したところ、それぞれ 1520 個体、540 個体が育成された。ミツバ集団では、SSR マーカー Mdo.chr10.51 と Mdo.chr10.70 をおよびマルバ集団について、候補領域を挟み込む DNA マーカーを検出し、原因遺伝子の近傍で染色体の組換えが起きている個体を選抜したところ 8 個体が組換え型個体として選抜された。同様に、マルバ集団では SSR マーカー Mdo.chr4.5 と Mdo.chr4.21 を用いて組換え型個体の選抜を行い、13 個体が選抜された。これらの組換え型個体は、今後、Cv1 および Cv2 のポジショナルクローニングを行う際に利用される。

DNAマーカー	第10染色体 物理位置(bp)	個体番号	
		739	771
SSR0254	1,366,779	S	R
Mdo.chr10.50	1,697,942	S	R
Mdo.chr10.51	2,061,435	S	R
Mdo.chr10.77	2,207,345	R	R
Mdo.chr10.53	2,317,749	R	R
Mdo.chr10.68	2,330,293	R	R
Mdo.chr10.69	2,509,301	R	R
ACLSV感受性 (Cv1)	-	R	R
Mdo.chr10.80	2,530,164	R	R
Mdo.chr10.81	2,568,448	R	R
Mdo.chr10.70	2,608,215	R	S
Mdo.chr10.72	2,609,474	R	S
Mdo.chr10.73	2,634,223	R	S
Mdo.chr10.56	2,680,582	R	-
Mdo.chr10.74	2,697,965	R	S
Mdo.chr10.75	3,007,255	R	S
Mdo.chr10.58	3,029,159	R	S
Mdo.chr10.48	3,193,128	R	S
Mdo.chr10.61	3,691,116	R	S
SSR0865	4,047,697	R	S

Cv1  
候補領域

図2 Cv1の候補領域の絞り込み

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

北本尚子・森谷茂樹・岡田和馬・清水拓・伊藤伝・阿部和幸、リンゴ高接病感受性原因遺伝子のラフマッピングとファインマッピングにむけた集団の作成、園芸学会平成30年度春季大会、2018

Shigeki Moriya, Naoko Kitamoto, Kazuma Okada, Taku Shimizu, Tsutae Ito and Kazuyuki Abe, Toward the molecular cloning of two genes conferring susceptibility to apple chlorotic leaf spot virus derived from wild *Malus* accessions, 9th International Rosaceae Genomics Conference, 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

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。