

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450052

研究課題名(和文) 分離比分析法と連鎖解析に基づくリンゴ斑点落葉病抵抗性の早期判別システム確立

研究課題名(英文) Development of a Reliable Early Selection System for Resistance to Alternaria Blotch Based on Complex Segregation Analysis and Linkage Analysis in Apple

研究代表者

阿部 和幸 (ABE, Kazuyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門リンゴ研究領域・ユニット長

研究者番号：70370559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴ斑点落葉病はリンゴの最重要病害である。本研究の目的は、本病原菌に対する抵抗性程度の遺伝を包括的に解明することと、各種表現型個体の判別マーカーを開発することである。交雑実生を供試して接種試験を行い、分離比分析を行った結果、'ゴールドデリシャス'等に認められる中度罹病性は単一の遺伝因子(Altと区別してAlt-2と命名)に支配されることが示唆された。Alt-2についてQTL解析を行ったところ、'ゴールドデリシャス'の第11連鎖群の上方にマッピングされた。Alt近傍のDNAマーカーDR033892における遺伝子型によって斑点落葉病罹病性、中度罹病性、抵抗性を識別可能であった。

研究成果の概要(英文)：Alternaria blotch, caused by *Alternaria alternata* apple pathotype, is an economically important disease of apple. The aim of this study was to clarify a mode of inheritance on the resistance/susceptibility of apples to Alternaria blotch, and to develop DNA markers which allowed one a reliable assessment of apples for the degree of resistance to Alternaria blotch. Results of complex segregation analysis on the data sets of inoculation test on the resistance levels of apple seedlings suggested that moderately susceptibility (MS) to Alternaria blotch was controlled by a single dominant gene, Alt-2. Quantitative trait locus (QTL) analysis for the MS using phenotypic data obtained by the inoculation tests identified a significant QTL on the upper region of linkage group 11 on the genetic map of 'Golden Delicious'. The genotypes of DR033892, a DNA marker located to a neighbor of Alt, corresponded to the phenotype on the resistance levels of apple cultivars.

研究分野：園芸

キーワード：果樹 品種 斑点落葉病 罹病性

### 1. 研究開始当初の背景

(1) リンゴ斑点落葉病は梅雨時期以降の高温多湿条件で激発するリンゴの最重要病害である。日本のリンゴ栽培面積の約 65% が本病に罹病しやすい‘ふじ’、‘王林’、‘陸奥’、‘北斗’などで占められていることから、広い地域で多量の殺菌剤散布が必要であり、リンゴ生産者や環境に対する大きなリスクとなっている。こうした弊害を乗り越える有効な手段として、斑点落葉病に抵抗性を示すリンゴ新品種の育成・普及を図ることが強く求められている。

(2) リンゴ斑点落葉病は糸状菌 *Alternaria alternata* apple pathotype によって引き起こされる病害であり、本菌に対する抵抗性/罹病性は単一の遺伝子によって支配されると考えられてきた。しかし、この遺伝様式では説明できない現象が最近見つかっている。そこで、リンゴ斑点落葉病に対する抵抗性育種を効率化するためには、本病に対する抵抗性/罹病性の遺伝を再検討するとともに、抵抗性/罹病性に関する各種表現型を制御する個々の遺伝子(座)の特定と、抵抗性/罹病性についての高精度な判別方法の確立が喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

(1) リンゴ斑点落葉病菌に対するリンゴ品種の反応には明瞭な差異が認められるが、‘王林’、‘世界一’、‘ゴールドデリシャス’(‘G.D.’)等の品種では、‘スターキングデリシャス’(‘S.D.’)‘北斗’等の典型的な罹病性品種や‘紅玉’など抵抗性品種とは斑点落葉病菌に対する反応が異なる。そこで、‘王林’、‘世界一’、‘G.D.’など中度罹病性品種群の遺伝様式を明らかにして、本病原菌に対する抵抗性程度の遺伝を包括的に解明する。

(2) 斑点落葉病抵抗性を備えたリンゴ優良品種の育成を効率的に推進するためには、抵抗性/罹病性に関する各種表現型に連鎖するマーカーの開発による高精度な判別方法の確立が必要であることから、本研究では原因遺伝子(座)をリンゴ連鎖地図上に位置づけるとともに、原因遺伝子の近傍に座乗する SSR を供試して連鎖解析を行い、各種表現型個体の早期判別マーカーを開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 斑点落葉病抵抗性 3 品種(‘紅玉’、‘つがる’、‘さんさ’)、罹病性 3 品種(‘S.D.’、‘Redgold’、‘印度’)の相互交雑による 19 家系 723 個体(グループ 1)と‘G.D.’、‘世界一’、‘きおう’、‘王林’、‘ふじ’の相互交雑による 16 家系 704 個体(グループ 2)、合計 1,427 個体を用いて、斑点落葉病菌の接種試験を行った。各個体から採取した若い切離葉 5 枚に  $2 \times 10^5$  個/ml に調整した斑点落葉病菌 AKI-3 の孢子懸濁液を噴霧接種した。48 時

間後の壊死斑の形成程度(以下スコア)を 0 ~ 5 の 6 段階に区分し、2 回の接種試験の平均値が 0.5 以下の場合には抵抗性(R)、0.5 ~ 2.5 の場合は中度罹病性(M)、2.5 を超える場合は罹病性(S)と判定した。得られた表現型データを基にコンピュータソフトウェア PAP による分離比分析法(CSA 法)を適用して中度罹病性の遺伝モデルを推定した。遺伝様式については、単一の主働遺伝子(座)が関与する遺伝モデル(Mendelian model)、効果の小さい複数の遺伝子(座)が関与するモデル(Polygenic model)、主働遺伝子とポリジーンがともに関与するモデル(Mixed model)のいずれかに仮定した場合の最適なモデルを採用した。

(2) 斑点落葉病抵抗性程度を接種検定した上記のリンゴ交雑実生個体群における斑点落葉病抵抗性/罹病性に関する表現型データと連鎖地図上のマーカー遺伝子型データを用いて、JoinMap v4.0 により連鎖解析を行い、基盤連鎖地図上に原因遺伝子(座)をマッピングした。各交雑組合せにおいて、家系内の個体分布が非連続的で、遺伝モデルが Mendelian model と推定された場合は、GSA 法を適用し、家系内分布が連続的、または遺伝モデルが Polygenic model または Mixed model の場合は、作用力の大きい相加的 QTL をターゲットとして、QTL 解析によって連鎖地図上の位置をマーカーとの連鎖から統計的に推定した。その際の解析にはソフトウェア MapQTLv6.0 を用いた。さらに、斑点落葉病抵抗性程度の異なる各表現型の識別マーカーを開発するために、中度罹病性である‘王林’、‘G.D.’、‘世界一’、‘きおう’、‘陸奥’、罹病性の‘S.D.’、‘印度’、‘Redgold’、‘金星’、抵抗性である‘紅玉’、‘国光’、‘つがる’、‘千秋’、‘さんさ’の各品種を供試して、(中度)罹病性遺伝子の近傍に座乗する SSR 等の遺伝子型を PCR によって決定した。

### 4. 研究成果

(1) グループ 1 の 19 家系について組合せ別に抵抗性の分離状況を見ると、抵抗性(R)間の交雑の後代はほぼすべてが R であり、R と罹病性(S)または逆交雑の後代は R : S がほぼ 1 : 1 に分離、S 間の交雑による後代では R : S が 1 : 3 に分離した。‘S.D.’などの斑点落葉病罹病性は単一の罹病性遺伝子 *Alt* に支配され、遺伝子型はヘテロ型、抵抗性品種は劣性ホモ型であることが確認された。

一方、‘王林’、‘世界一’、‘G.D.’、‘ふじ’に‘紅玉’(劣性ホモ型)を交雑した各  $F_1$  集団では抵抗性から中度罹病性にかけて連続的に分布した。‘G.D.’、‘世界一’、‘きおう’、‘王林’、‘ふじ’の相互交雑由来の 16 家系からなる  $F_1$  集団(グループ 2)における斑点落葉病に対する中度罹病性の遺伝モデルを 1 つの主働遺伝子のみが関与し、その他の変動は環境誤差(Mendelian model)

微働遺伝子のみが関与 (Polygenic model) 主働遺伝子と微働遺伝子の両方が関与 (Mixed model) 環境誤差による変動で、遺伝因子は関与しない、のいずれかと仮定して分離比分析を行った結果、Mendelian model と想定したときの AIC が最も小さかったことから (表 1) 'G.D.'、'世界一'、'きおう'、'王林'、'ふじ' の後代実生集団に認められる中度罹病性は既知の罹病性遺伝子 *Alt* とは異なる単一の遺伝因子 (*Alt* と区別して *Alt-2* と命名) に支配されることが示唆された。

交雑実生集団を供試した分離比分析結果から、斑点落葉病に対する典型的な罹病性品種 ('S.D.' や '印度') とは異なる反応を示す '王林'、'G.D.'、'世界一' 等は、罹病性遺伝子 *Alt* とは異なる優性遺伝子 (*Alt-2*) を共通して保有すると考えられた。

表 1 CSA 法によって推定された遺伝モデルのパラメータ

Model	q <sub>A</sub>	Transmission probability			-2lnL	AIC
		AA	Aa	aa		
Environmental	1	0.73633	= AA	= AA	1840.091	1852.09
Mendel	0.601239	[1]	[0.5]	[0]	1831.249	1841.25
Mixed	0.594656	[1]	[0.5]	[0]	1830.754	1842.75
Polygenic	[1]	n/a	n/a	n/a	1868.822	1874.82
Sporadic	[1]	n/a	n/a	n/a	1894.545	1898.54

(2) 接種試験の結果、'S.D.' × '紅玉'、'紅玉' × 'S.D.' の集団とも抵抗性と罹病性の分離比が 1:1 に適合したので、これら二つの正逆交雑に由来する F<sub>1</sub> 個体、合計 114 個体から成る交雑実生集団を *Alt* のマッピングに供試した。*Alt* に連鎖するマーカーのスクリーニングはゲノム・スキャンニング・アプローチ (GSA) によって行った。GSA の結果、*Alt* は第 11 連鎖群の上方にマッピングされた (図 1)。



図 1 スターキングデリシャス第 11 連鎖群

(SD LG11) の連鎖地図

(3) 斑点落葉病に対する中度罹病性を支配する遺伝因子 *Alt-2* を連鎖地図上にマッピングするため、'ふじ' と 'G.D.' の交雑に由来する F<sub>1</sub> 集団 64 個体を用いて、double pseudo testcross 法により 'ふじ' と 'GD'

の連鎖地図をそれぞれ構築したところ、'ふじ' では、17 連鎖群からなり、366 遺伝子座を含む全長 927.195cM の連鎖地図が、'GD' では、18 連鎖群からなり、378 遺伝子座を含む全長 708.466cM の連鎖地図がそれぞれ構築された。次に、集団に含まれる各個体の 2 回の接種検定結果 (1stTest、2ndTest) と、その平均値 (Average) を QTL 解析に供試した。まず始めに、ノンパラメトリックな解析法である Kruskal-Wallis 法 (KW) によって解析を行った。次に、interval mapping 法 (IM) による解析を行った。IM による解析の際には繰り返し回数 5000 回の permutation test を行い、有意水準 95% の LOD 値を越えた連鎖地図中の領域に QTL が存在すると判断した。KW の結果、1stTest、2ndTest、Average を用いた解析において検定統計量 K\* が最大値を示した SSR マーカーは 'GD' 連鎖地図の第 11 連鎖群に座乗している SNP マーカー-271 (正式名: GDsnp01167; 3,479,002bp) であった。IM による計算を行ったところ、いずれの形質においても 'GD' 連鎖地図の第 11 連鎖群の SNP マーカー-271 上において LOD 値が最大値を示したことから、restricted multiple QTL models 法 (rMQM) に用いる Co-factor として、SNP マーカー-271 が適当であると判断された。そこで、SNP マーカー-271 を Co-factor として rMQM による計算を行ったところ、'GD' 連鎖地図の第 11 連鎖群の SNP マーカー-271 上で LOD 値が最大を示し、QTL の存在が認められた (図 2、1stTest: 赤の箱型、2ndTest: 青の箱型、Average: 緑の箱型)。この他の連鎖群には QTL は認められなかった。

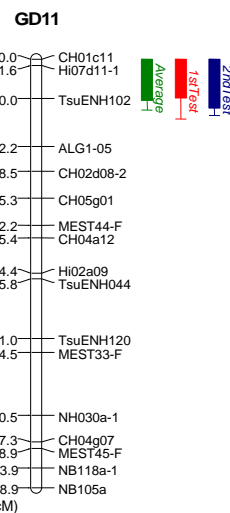


図 2 'GD' 第 11 連鎖群 (GD11) における QTL 解析

この領域は、罹病性品種 'S.D.' における *Alt* の座乗領域と相同であるとともに、'王林' × 'さんさ' の F<sub>1</sub> 集団で検出された中度罹病性を支配する QTL とも相同な領域であることから、先の分離比分析結果から示唆された遺伝因子 *Alt-2* の座乗領域であると考えられた。

(4) 斑点落葉病抵抗性、中度罹病性、罹病性の各品種を識別できるマーカーを開発するため、*Alt* 近傍の DNA マーカーを供試して、それらの遺伝子型と斑点落葉病抵抗性/罹病性に関する表現型との関連性を検討した。その結果、DNA マーカー DR033892 において、中度罹病性品種である‘王林’、‘G.D.’、‘世界一’、‘きおう’、‘陸奥’は共通して同一のマーカー遺伝子(110bp)を持つのに対して、罹病性品種‘S.D.’、‘印度’、‘Redgold’、‘金星’は共通してマーカー遺伝子 204bp を保有しており、抵抗性品種‘紅玉’、‘国光’、‘つがる’、‘千秋’、‘さんさ’はいずれのマーカー遺伝子も持たなかった(表2)。この結果から、DNA マーカー DR033892 はリンゴ斑点落葉病抵抗性、中度罹病性、罹病性の各表現型を識別可能であることが示唆された。

表2 各品種における斑点落葉病のマーカー遺伝子型と表現型

品種名	遺伝子型(表現型)
王林	110bp/207bp (中度罹病性)
ゴールドデリシャス	110bp/207bp (中度罹病性)
世界一	110bp/235bp (中度罹病性)
きおう	110bp/207bp (中度罹病性)
陸奥	110bp/207bp/207bp (中度罹病性)
スターキングデリシャス	204bp/235bp (罹病性)
印度	204bp/207bp (罹病性)
Redgold	204bp/207bp (罹病性)
金星	204bp/207bp (罹病性)
紅玉	207bp/207bp (抵抗性)
国光	207bp/207bp (抵抗性)
つがる	207bp/207bp (抵抗性)
千秋	207bp/207bp (抵抗性)
さんさ	207bp/207bp (抵抗性)

(5) これまでの解析結果から、斑点落葉病罹病性を支配する既知の *Alt* とは異なる遺伝因子 *Alt-2* によって中度罹病性が支配されていることが分かった。そこで、*Alt* と *Alt-2* の遺伝子型効果を明らかにするため、3家系138個体を供試して各個体の遺伝子型と表現型との関係を検討した。その結果、*Alt* または *Alt-2* を有する個体は *alt-1*・*alt-2* ホモ型個体より発病程度が高く、*Alt* ヘテロ型は *Alt-2* ヘテロ型より発病程度が高かった。また、*Alt* ヘテロ型と *Alt*・*Alt-2* ヘテロ型との間で表現型値の差は認められなかった(図3)。

以上の結果から、斑点落葉病罹病性程度に及ぼす遺伝子型効果に関しては、*Alt-2* の効果は *Alt* より低いことが示された。また、*Alt-2* と *Alt* との間で相加的な相互作用効果は認められず、*Alt* の存在下ではほぼ完全に *Alt-2* の表現型効果が抑制されることが示唆された。

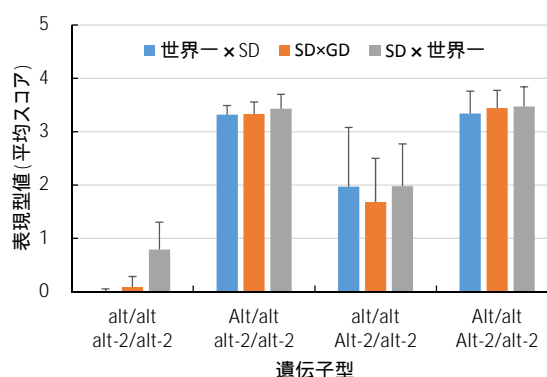


図3 斑点落葉病に対する抵抗性程度に及ぼす *Alt* と *Alt-2* の遺伝子型効果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Moriya Shigeki, Terakami Shingo, Iwanami Hiroshi, Haji Takashi, Okada Kazuma, Toshiya Yamamoto, Abe Kazuyuki, Genetic mapping and marker-assisted selection of the gene conferring susceptibility to *Alternaria blotch* caused by *Alternaria alternata* apple pathotype in apple, *Acta Horticulturae*, 査読有, vol.976, 2013, pp.555-560.

〔学会発表〕(計2件)

阿部和幸、森谷茂樹、岡田和馬、清水拓、リンゴ斑点落葉病の罹病性程度に及ぼす *Alt-1* と *Alt-2* の遺伝子型効果、園芸学会平成27年度秋季大会、2015年9月27日、徳島大学(徳島県徳島市)。

阿部和幸、森谷茂樹、岡田和馬、リンゴ斑点落葉病に対する「ふじ」の抵抗性程度と遺伝、園芸学会東北支部平成26年度大会、2014年8月28日、弘前市教育センター(青森県弘前市)。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 和幸 (ABE, Kazuyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門リンゴ研究領域・ユニット長

研究者番号：70370559

(2) 研究分担者

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・果樹茶業研究部門リンゴ研究領域・主任研究員

研究者番号：90391474

清水 拓 (SHIMIZU, Taku)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門リンゴ研究領域

域・研究員  
研究者番号：70759138

(3)連携研究者

岩波 宏 (IWANAMI, Hiroshi)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・果樹茶業研究部門リンゴ研究領  
域・ユニット長  
研究者番号：40355425