

イチゴにおける連鎖地図の作成および うどんこ病抵抗性 DNA マーカーの選抜

山元義久*・松本純一*・玉木克知*・杉本琢真*・塩飽邦子*・小林 保**

要 約

イチゴ品種「とよのか」×「宝交早生」の交雑個体を用いて連鎖地図を作成し、うどんこ病抵抗性 DNA マーカーの選抜を試みた。

- 1 F₁の47個体を用いて、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーの連鎖地図を作成した。「とよのか」特異的マーカーについては29連鎖群 (計109マーカー, 全長1451.7 cM), 「宝交早生」特異的マーカーについては21連鎖群 (計88マーカー, 全長1205.7cM) が得られた。
- 2 連鎖地図と各交雑個体のうどんこ病発病度調査の結果から QTL 解析を行い, 有望と考えられる連鎖群について128個体での解析を行ったところ, 得られた最高の LOD 値は1.22であった。
- 3 マーカーごとのF検定を行った結果, 5%水準で有意となるマーカーが4個認められた。

Construction of Linkage Maps and Selection of DNA Markers for Powdery Mildew Resistance in Strawberries

Yoshihisa YAMAMOTO, Jun-ichi MATSUMOTO, Katsutomo TAMAKI,
Takuma SUGIMOTO, Kuniko SHIWAKU and Tamotsu KOBAYASHI

Summary

We constructed linkage maps for strawberries in order to find molecular markers linked to powdery mildew resistant genes.

- (1) Linkage maps were constructed on the basis of a segregating F₁ population of 47 strawberry plants using RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) markers. The population was derived from a cross between cultivars 'Toyonoka' and 'Hokowase'. Twenty-nine linkage groups with 109 markers derived from 'Toyonoka', 1451.7cM long, and 21 linkage groups with 88 markers derived from 'Hokowase', 1205.7cM long, were identified in the population tested.
- (2) We made a first QTL analysis based on the linkage maps and powdery mildew infection frequency data of 47 plants, and we made a linkage analysis and a second QTL analysis based on hopeful markers and the data of 128 plants. The highest LOD score was 1.22.
- (3) We tested for the relation between the markers and fungal infection frequency with an F-test. Four markers were significantly related with infection frequency at the 5% level.

キーワード: イチゴ, RAPD, 連鎖地図, QTL, うどんこ病抵抗性

緒 言

近年の分子生物学的技術の進歩に伴い, 交雑育種における選抜の際に DNA マーカーの利用 (マーカーアシスト選抜) が実用化されつつある。単因子で支配される形質の DNA マーカー開発にはバルク法などの簡便化され

た手法を利用することができ, イチゴにおいても *Phytophthora fragariae* 抵抗性遺伝子 (*Rpf1*) に連鎖した DNA マーカー³⁾ が開発されている。しかし, 複数遺伝子支配による形質のマーカー開発には多数のマーカーによる連鎖地図の作成が不可欠となる。これまで主要な栽培植物で分子マーカーの連鎖地図が作成され, 遺伝解析に供されるようになってきている。しかし, イチゴは経済的に重要な作物であるにもかかわらず, これまでに2倍体種 (*Fragaria vesca*) で55個体の F₁ を用いた解析

2002年8月30日受理

* 農林水産技術総合センター部長 (生物工学担当)

** 農林水産技術総合センター農業技術センター

による5個の連鎖群²⁾が報告されているのみで、8倍体のイチゴ栽培種 (*F. x ananassa*) では取り組みがなされていなかった。

そこで、イチゴDNAマーカー開発の基礎となる連鎖地図を作成し、それを利用したうどんこ病抵抗性マーカーの選抜を試みた。連鎖地図の作成にあたっては、通常の学術的な遺伝解析を目的とした場合には100個体以上の多数の個体を供試して精度の高さを目指すが、時間・労力・予算が限られているため、今回は少数の個体でできるだけ多くのマーカーを用いて連鎖地図を作成し、そこからDNAマーカーを選抜することを目指した。47個体による連鎖地図を作成して1次QTL解析を行い、有望と考えられる連鎖群のマーカーについてのみ128個体による解析を行うこととした。

材料及び方法

1 供試植物

うどんこ病罹病性品種「とよのか」を子房親、本県育成のうどんこ病抵抗性品種「宝交早生」を花粉親として交配を行いF₁個体を得た。

2 イチゴゲノムDNAの抽出

イチゴ植物体からのDNA抽出は、Greenwoodら(1989)の方法を一部改変し、以下の手順で行った。抽出液1~3の組成は、0.15M Tris-HCl, 0.005M EDTA, 31.9mg/ml ソルビトール, 10μl/ml 2-メルカプトエタノールが共通しており、抽出液1にはさらに0.1g/ml PEG 6000を、抽出液2には10mg/ml ギャラクシルを、抽出液3には2mg/ml CTABと1.4M 塩化ナトリウムを添加した。

- (1) 凍結した未展開葉50mgを乳鉢と乳棒で磨砕した。抽出液1を1ml添加してさらに磨砕し、1.5mlマイクロチューブに移し、4℃, 6000rpmで5分間遠心分離。
- (2) 上清を捨て、沈殿に抽出液2を200μl加え攪拌した後、室温で30分間静置。
- (3) 抽出液3を200μl添加し攪拌した後、60℃で10分間静置。
- (4) クロロホルムを400μl加え攪拌した後、室温で15,000rpmの遠心分離を15分間行い、上清を新しいマイクロチューブに移した。以上のクロロホルム処理は2度行った。
- (5) 20μg/ml RNaseを4.5ml添加し、37℃で30分間静置。
- (6) イソプロパノールを300μl添加して転倒混和し、室温で10分間静置した後室温で5分間、12,000rpmの遠心分離。
- (7) 沈殿を70%エタノールで洗浄した後、軽く真空乾燥

を行い、TE緩衝液100μlに溶解。

3 RAPD反応

DNAマーカーにはすべてRAPDを使い、プライマーにはオペロン社の市販の10塩基プライマーを用いた。PCR反応のDNA合成酵素にはAmpliTaq Gold (アプライドバイオシステムズ社)を用いた。PCR条件は、95℃9分間の後、95℃30秒間→40℃30秒間→72℃1分間を40サイクル繰返し、最後に72℃10分間とした。

4 連鎖解析とQTL解析

DNAマーカー同士の連鎖解析には、パソコンのフリーソフトウェアMAPMAKER/EXPを用いた。イチゴは8倍体であるが、そのゲノム構成は、まだ議論が続いているもののAAA'A'BBB'B'の異質8倍体であるとする意見が主流であり¹⁾、その場合は2倍体と同様に扱って解析を行うことができる。連鎖解析はdouble pseudo-testcross法 (Grattapaglia and Sederoff (1994); Van Eck (1995))によって行うため、「とよのか」と「宝交早生」それぞれに独立の地図ができる。

また、QTL解析及びF検定のためには同じくqGENEを用いた。

5 うどんこ病抵抗性検定

交雑個体のうどんこ病抵抗性検定には、温室内に定植した各2クローンを供試した。調査個体はいずれも定植後6ヶ月以上経過した成植物であった。10⁵/ml程度に調整した孢子懸濁液を未展開葉に接種し、約10日後に発病が最大になった時点で調査を行った。

イチゴ交雑個体のうどんこ病抵抗性検定には、Okayama et. al. (1995)⁴⁾の薬剤効果評価法を準用した。すなわち、小葉ごとに発病指数を調査し、次式に基づいて発病度を算出した。

$$\text{発病度} = (\text{発病指数の平均値} / 4) \times 100$$

ただし、発病指数は以下の通りとした。

- 4 : 菌そう面積が葉面積の3/4以上
- 3 : 菌そう面積が葉面積の1/2以上
- 2 : 菌そう面積が葉面積の1/4以上
- 1 : 菌そう面積が葉面積の1/4以下
- 0 : 菌そうなし

結 果

まず、交配親である「とよのか」と「宝交早生」との間で多型となるRAPDマーカーを選抜し、それらについてF₁の47個体でバンドの有無を調査した。カイ二乗検定を行い、分離比1:1に適合するマーカーについて連鎖解析を行ったところ、「とよのか」特異的マーカーについては29連鎖群(計109マーカー、全長1451.7cM)、

「宝交早生」特異的マーカーについては21連鎖群（計88マーカー、全長1205.7cM）が得られたので、それぞれ、LGT 01～LGT 28（当初LGT 18と仮称していた連鎖群は、マーカーの並び順が確定できなかったため、LGT

18-1とLGT 18-2の2つの連鎖群とした）、LGH 01～LGH 21と仮称した（図1）。イチゴは基本数7の8倍体種であるので、理論上、ゲノム全体をカバーする連鎖地図ができれば、それぞれ28連鎖群となるはずだが、今回

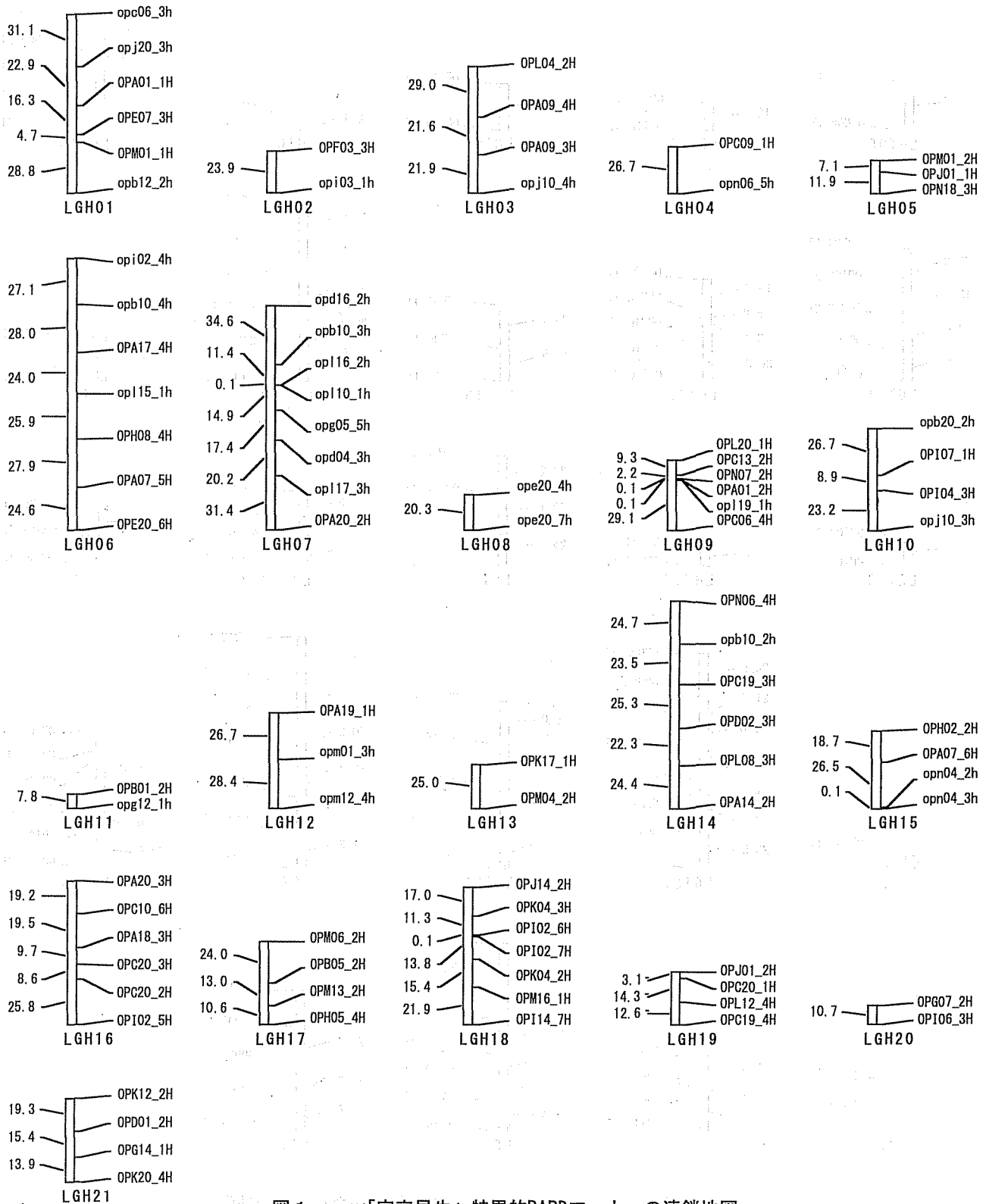


図1-a 「宝交早生」特異的RAPDマーカーの連鎖地図

注) 各連鎖群の右側にマーカー名、左側にマーカー間距離(cM)を示した

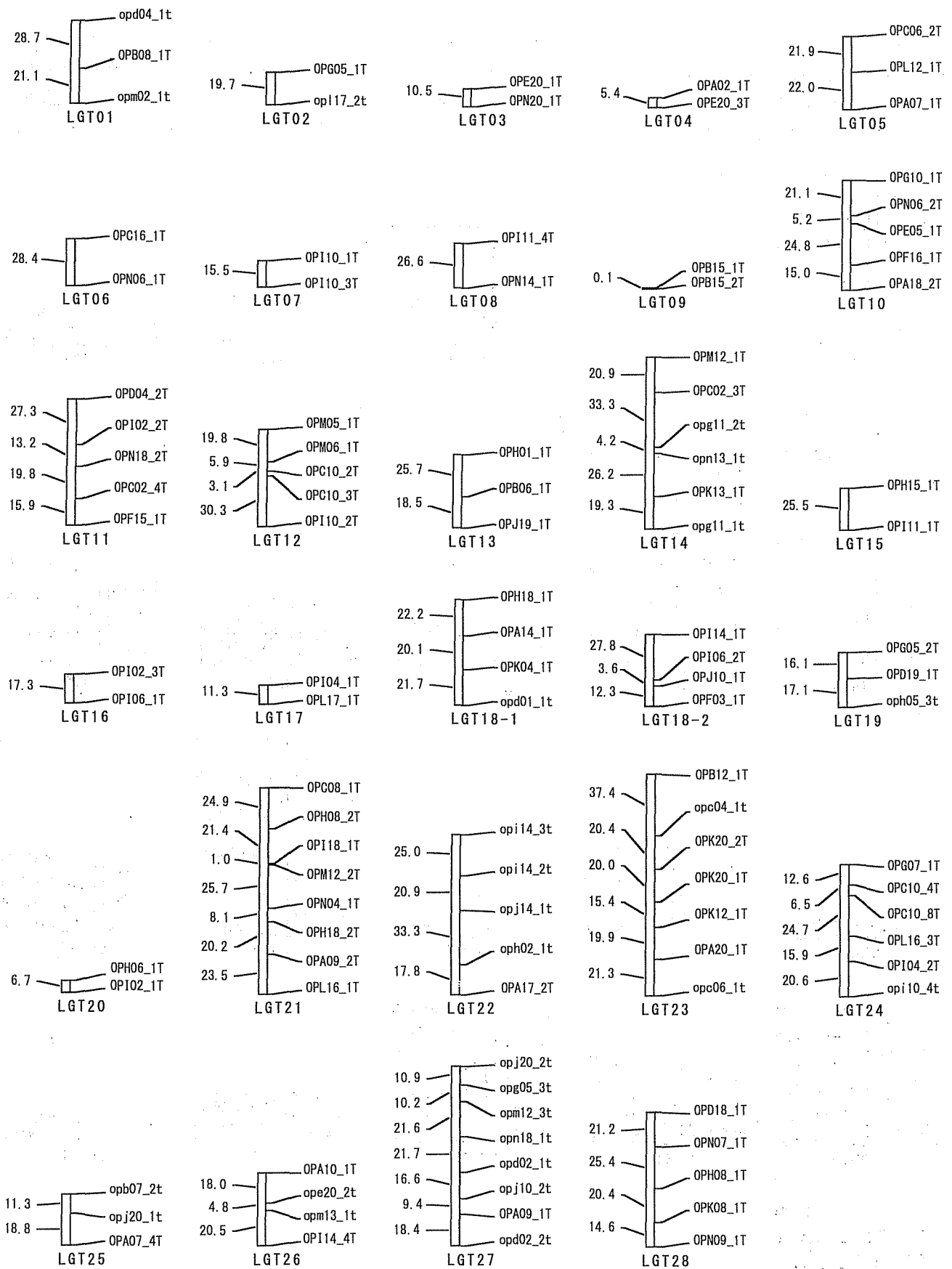


図1-b 「とよのか」特異的RAPDマーカーの連鎖地図

注) 各連鎖群の右側にマーカー名、左側にマーカー間距離(cM)を示した

はこの連鎖地図を以降の解析に供した。

「とよのか」, 「宝交早生」およびF₁ 個体群のうどんこ病抵抗性検定を行うにあたって, まず今回採用した接種検定法で評価した場合, 供試した2クローンが同様の発病を示すかを確認した(図2)。その結果, クローン1とクローン2の発病指数の間には相関係数 $r = 0.596$ が認められ, これは0.1%水準で有意な値であった。

「とよのか」×「宝交早生」のF₁ 123個体についてうどんこ病菌胞子接種検定を行った結果を図3に示した。抵抗性個体群と罹病性個体群に分離することなく連続的分布を示したことから, 「宝交早生」の持つうどんこ病抵抗性は量的形質であり, DNA マーカー選抜のために

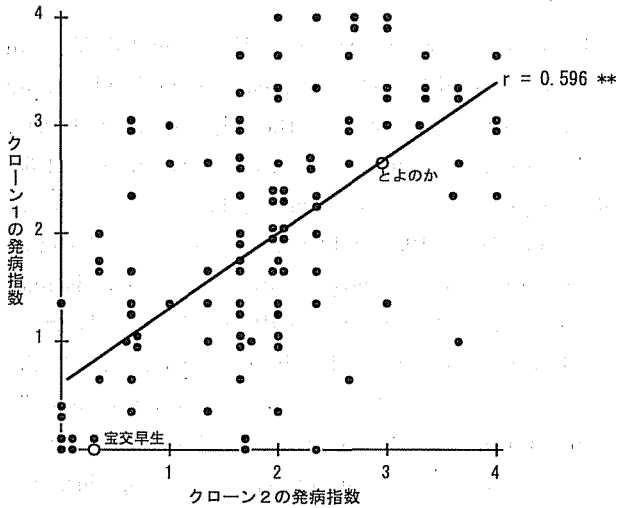


図2 イチゴ2クローンのうどんこ病発病指数間の相関
交配親「とよのか」と「宝交早生」を○で、交雑個体を●で示した。

はQTL解析を行う必要があると認められた。

連鎖地図作成に用いた47個体の発病度データによる一次QTL解析の結果, LGT 23, LGT 27, LGT 28, LGH 06, LGH 07, LGH 10, LGH 14の7つの連鎖群が有望と思われた。これらの連鎖群に属するマーカーについてF₁の合計128個体でマーカーの有無を調査したところ, LGH 06とLGH 10を構成するマーカーは実は連鎖していないことが判明した。他の5連鎖群について128個体の発病度データによるQTL解析を行ったが, 最高のLOD値はLGT 27の1.22, 次いでLGH 07の1.21であり(図4), 通常QTLが存在するとは認められない結果であった。

つぎに, 連鎖の認められなかった2連鎖群のものも含めて, 128個体データの得られているマーカーすべてについて, 連鎖を無視してマーカーごとにうどんこ病発病程度との関連性をF検定によって検証してみた。その結

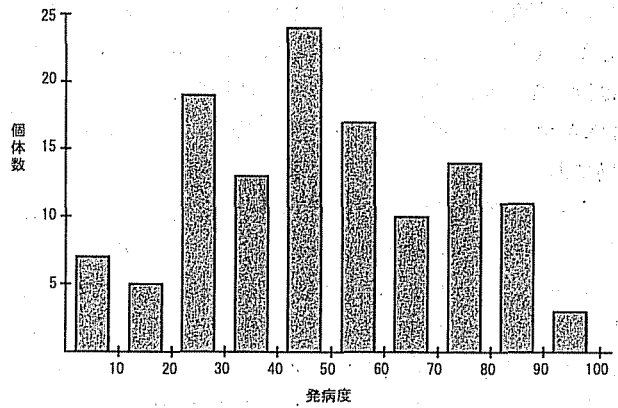


図3 F₁ 個体群へのうどんこ病菌接種による発病度の分布

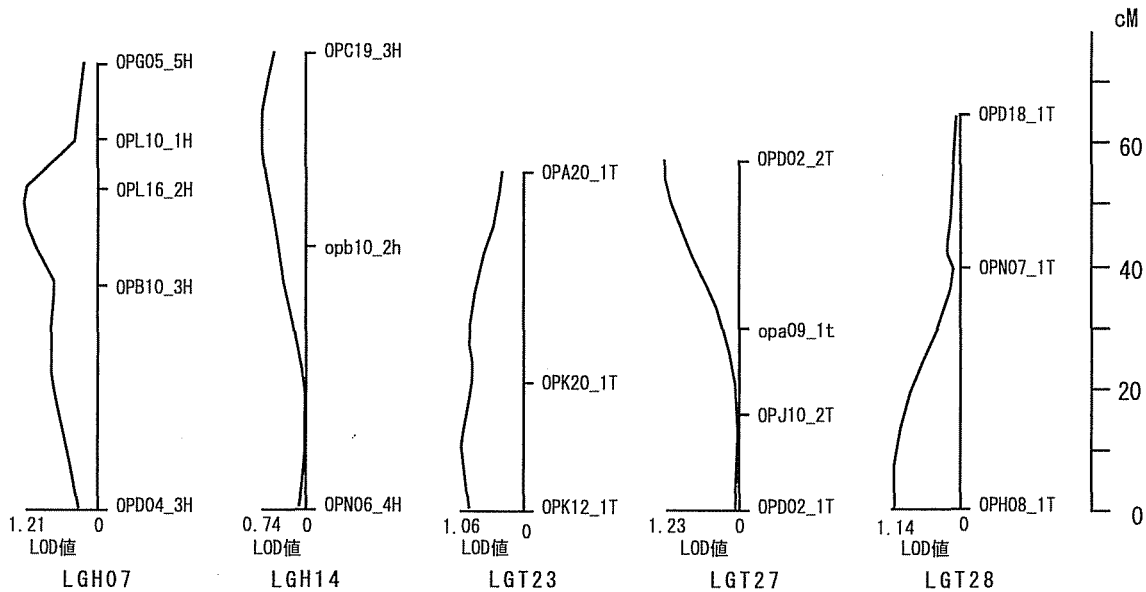


図4 イチゴうどんこ病抵抗性に関するQTL解析結果

表1 うどんこ病発病程度に関するF検定

Marker	Dist	N	Source	F	RSq	P	Add
OPL16__2 H	54.8	120	Hokowase	4.97	0.0404	0.0277	- 9.63
OPK12__1 T	0.0	123	Toyonoka	4.49	0.0358	0.0361	9.10
OPD02__2 T	59.4	110	Toyonoka	5.12	0.0453	0.0257	-10.72
OPH08__1 T	0.0	113	Toyonoka	5.48	0.0470	0.0210	-10.44

Dist : 連鎖群中でのマーカーの位置 (cM). Source : RAPD バンドを現す親品種.

F : F 値. RSq : 寄与率. P : 有意性. Add : 相加的効果

果, OPL16__2 H, OPK12__1 T, OPD02__2 T, OPH08__1 T の4つのマーカーが5%水準で有意であった(表1).

考 察

47個体で作成した連鎖群のうち7個について128個体での連鎖解析を行った結果, 2個の連鎖群が誤りと判明した。したがって, この連鎖地図だけで正確な遺伝解析は行えないが, 7個のうち5個の連鎖群が使えたことはDNAマーカー選抜のための出発点としてはある程度有効である。

今回のQTL解析では有望な領域を発見できなかった。しかしながら, F検定の結果5%水準で有意であったマーカー4個のうち3個は連鎖群の端に位置しており, 今回得られている連鎖群のさらに外側に目的の遺伝子が存在していることを示唆している。今後, 連鎖地図の拡充を行うことができれば, 有効なうどんこ病抵抗性遺伝子のDNAマーカーを得られる可能性がある。

引用文献

- (1) Bringhurst, R. S. (1990) : Cytogenetics and evolution in American *Fragaria* : HortScience 25, 879-881
- (2) Davis, T., K. M. Heymes, H. Yu and J. W. van Ooijen (1997) : Development of molecular map in *Fragaria vesca* L., the diploid strawberry : Molecular genetic studies in *Fragaria* species 21-33
- (3) Heymes, K. M., B. Henken, T. M. Davis, W. E. Van de Weg (1997) : Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (*Rpf1*) in the cultivated strawberry : Molecular genetic studies in *Fragaria* species 35-46
- (4) Okayama, K., T. Nakano, S. Matsutani and T. Sugimura (1995) : A simple and reliable method for evaluating the effectiveness of fungicides for control of powdery mildew (*Sphaerotheca macularis*) on strawberry : 日植防報 61(6), 536-540