ビワがんしゅ病抵抗性遺伝子 (*Pse a*) と連鎖する DNA マーカーの開発

福田伸二^{1*}・稗圃直史^{1**}・山本俊哉²・寺井理治¹・根角博久¹

¹ 長崎県果樹試験場 856-0021 大村市鬼橋町

² 農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所 305-8605 つくば市藤本

Development of DNA Markers Linked to the Resistance Gene (*Pse a*) to Loquat Canker

Shinji Fukuda^{1*}, Naofumi Hiehata^{1**}, Toshiya Yamamoto², Osamu Terai¹ and Hirohisa Nesumi¹

¹ Nagasaki Fruit Tree Experiment Station, Onibashi, Omura 856-0021

² National Institute of Fruit Tree Science, Fujimoto, Tsukuba 305-8605

Summary

A RAPD marker, linked to the resistance gene *Pse a* to loquat canker disease (caused by *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*), was screened from 2390 primers or primer combinations by using bulked DNA samples derived from progenies of 'Yougyoku' × 74-1737. A primer combination, OPAY02 and OPAY16, generated an 857 bp DNA fragment which was present in the resistant bulk, but not in the susceptible bulk. The recombination value between the RAPD marker OPAY02/OPAY16-857 and the *Pse a* gene is 1.1% (LOD score 23.7). The marker OPAY02/OPAY16-857 was successfully converted into a STS (sequence tagged site) marker (STS-*Pse a*1a). The linkage between the STS marker (STS-*Pse a*1a) and the *Pse a* gene was also confirmed in the progenies of 'Fukuharawase' × 'Shiromogi' with the recombination value of 9.3% (LOD score 13.2). An evaluation of loquat germplasms, including loquat canker resistant varieties and susceptible varieties, showed a close relation between the presence of the STS-*Pse a*1a marker and loquat canker resistance. Therefore, STS-*Pse a*1a marker will be a useful tool to conduct a marker assisted selection for loquat canker resistance in loquat breeding.

Key Words: *Eriobotrya japonica*, loquat canker, *Pse a*, RAPD, STS.

緒 言

ビワがんしゅ病 (*Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*) は、ビワの枝、幹に感染し、樹勢を弱らせる病害で、栽培上大きな障害となっている。森田 (1978) は、全国のビワ産地から本病原細菌を分離して、培地上での褐色色素産生の有無とビワ樹体各部位に対する病原性を比較することにより、A (色素を産生せず、葉に病原性を示さない)、B (色素を産生せず、葉に病原性を示す) および C (色素を産生し、葉に病原性を示さない) の 3 系統に類別した。さらに、経済栽培される主要な品種を供試して接種検定を行い、それぞれの菌系統に抵抗性の品種はあるが、3 系統菌すべてに抵抗性を示す品種は存在しなかったと報告している (森田, 1988)。したがって、抵抗性品種の育成のためには、異なる抵抗性遺伝子をもつ品種間の雑種を育成し、すべての菌系統に抵抗性の個体を選抜し

ていく必要がある。ビワがんしゅ病の抵抗性個体の選抜は、簡易接種検定 (稗圃ら, 2002a) による幼苗選抜が可能である。しかし、接種検定では、植物体が接種可能なステージまで生長するのに 1 年以上を要する。また、接種時期が年 2 回と限定されるため、3 系統菌すべての抵抗性判定を完了するのに数年を要する。もし、DNA マーカーによる抵抗性個体の早期選抜ができれば、その期間を短縮し、育種規模の拡大が可能である。

近年、果樹においても実用形質と連鎖する DNA マーカーの開発が積極的に進められており、リンゴでの果皮色 (Cheng ら, 1996)、黒星病抵抗性遺伝子 (Yang・Krüger 1994; Yang ら, 1997)、ニホンナシの黒斑病感受性遺伝子 (Banno ら, 1999)、モモではネコブセンチュウ抵抗性遺伝子 (Lu ら, 1999) などマーカーの開発に成功している。いずれの形質も一遺伝子座によって支配されていることが表現型の分離で証明されてきたものである。がんしゅ病 A 系統菌に対するビワの抵抗性の遺伝様式についても、11 品種を交配親とする 31 組み合わせ、1307 個体の交配実生を用いて一つの主働遺伝子 (*Pse a*) によって

2004 年 8 月 2 日 受付。2004 年 12 月 10 日 受理。

* Corresponding author (E-mail: fukushin@pref.nagasaki.lg.jp).

** 現在: 農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所。

支配され、抵抗性が優性であることを明らかにしている(稗圃ら, 2002b). 著者らはその知見をもとにバルク法(Michelmoreら, 1991)によりがんしゅ病抵抗性と連鎖する RAPD マーカーの検出を試み、さらにマグネシウム濃度や反応液の状態で反応結果に影響を受けやすい RAPD マーカーから信頼性の高い STS (sequence tagged site) マーカー (Yang ら, 1997) に置換することで、有効な DNA マーカーを得たので報告する。

材料および方法

1. 材料および DNA 抽出

ビワがんしゅ病 A 系統菌に対する抵抗性が分離する‘陽玉’(*pse a/pse a*) × 74-1737(‘楠’(*Pse a/pse a*) × ‘茂木’(*pse a/pse a*))(稗圃ら, 2002b)の組合わせから得られた個体から抵抗性個体とり病性個体各 10 個体のゲノム DNA を等量混合してバルクを作製した。RAPD マーカーのスクリーニングには、この交配組合わせの F₁ 集団の抵抗性 55 個体とり病性 34 個体を用いた。一方、STS マーカー検定用集団として‘福原早生’(*Pse a/pse a*) × ‘白茂木’(*pse a/pse a*)の 75 個体を作出し、開発した STS マーカーと抵抗性との連鎖関係を検討した。また、長崎県果樹試験場で遺伝資源として保存するビワ 40 品種・系統の抵抗性とその STS マーカーとの関係を確認した。DNA は 3 cm 未満の幼葉から CTAB 法 (Doyle・Doyle, 1987) により抽出した。各個体の Total DNA をミニフクロメーター (Hoefer Scientific) を用いて 10 mg・L⁻¹ に調整した。

2. 接種検定による抵抗性の判定

接種した菌系統は、長崎県果樹試験場内のビワ (*Eriobotrya japonica* Lindl.) のり病葉から分離した A 系統菌株 (01A-12)(稗圃ら, 2002b) とした。PSA 培地 (森田, 1988) を用いて培養し、その菌叢を滅菌水に 10⁸ cfu/mL になるように懸濁し、展着剤として 0.02% のポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレートを追加し、接種源とした。接種方法は稗圃ら (2002a) の方法に従い、幼葉裏面の中肋部に昆虫針で 1 葉につき 6~9 ヶ所、各個体 2 葉ずつ付傷接種した。接種 1~2 ヶ月後にがんしゅ状病斑を形成した個体を病性、形成しなかった個体を抵抗性と判定した。

3. RAPD 分析

PCR は 20 μL 反応液で行った。これは 10 ng 鋳型バルク DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 unit Taq polymerase (宝酒造), 200 μM dNTPs および 20 μM プライマーを添加したものであった。ランダムプライマーとして、オペロン社製の 1060 種類 (OPA1-OPBA20) と 2 種類のオペロンプライマーを組合わせたプライマーセット 1330 種類を用いた。

PCR 反応は、① 93°C で 1 分間の熱変性、② 93°C で 20 秒の熱変性、③ 37°C で 20 秒のアニーリング、④ 72°C で 1 分

間の伸長反応とし、②~④の過程を 45 サイクル行った。最後に 72°C で 10 分間の再伸長反応を行った。得られた PCR 産物は 1.5% アガロースゲルを用いて TAE 緩衝液中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。それをポラロイドフィルムで撮影後、バンドの観察を行った。

4. STS マーカーの開発

RAPD 分析で得られたマーカーとなるバンドを、1.5% アガロースゲルで分離した。目的のバンドをゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction キット (QIAGEN) により分離精製した後、pCR2.1-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングした。その塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing キット (PE Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った後、PRISM 377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems) を用いて解析した。

STS プライマーセットは、得られた塩基配列をもとに Oligo ver. 6 (Molecular Biology Insights, Inc.) を用いて設計した。STS プライマーによる PCR 反応は 20 μL 反応液で行った。これは 10 ng 鋳型 DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 unit Taq polymerase (宝酒造), 200 μM dNTPs および 20 μM プライマーを添加したものであった。PCR 反応は① 93°C で 1 分間の熱変性、② 93°C で 20 秒の熱変性、③ 55°C で 1 分間のアニーリング、④ 72°C で 2 分間の伸長反応とし、②~④を 35 サイクル行った。また、最後に 72°C で 10 分間の再伸長反応を行った。

5. 連鎖解析

組換え価は、Join Map ver. 2.0 (Stam・Ooijen, CPRO-DLO, The Netherlands) を用いて算出した。

結果および考察

1. RAPD マーカーのスクリーニング

抵抗性とり病性のバルク間で多型を示すプライマーおよびプライマーセットは 38 種類で、38 本の多型バンドが検出された。そのプライマーおよびプライマーセットを供試し、個体別に検定した結果、*Pse a* 遺伝子と連鎖すると思われる DNA マーカーは、OPAY02 と OPAY16 のプ

Table 1. Resistance and susceptibility to loquat canker and the presence and absence of RAPD marker OPAY02/OPAY16-857 in the F₁ progenies of ‘Yougyoku’ × 74-1737.

Phenotype	No. of plants	OPAY02/OPAY16-857		Recombination ratio
		+	-	
Resistance	55	54	1	0.011 (23.7) ^z
Susceptibility	34	0	34	

^z LOD scores are shown in parentheses.

Table 2. Primers used for amplification of marker.

Primer	Sequence (5'–3')
OPAY02	TGCGAAGGCT
OPAY16	GGTGTGGTTC
STS1AY02	TGCGAAGGCTTTGGCAAAAC
STS1AY16	GGTGTGGTTCGTAGTAATCC

ライマーを組合わせて増幅させた 857 bp のバンド (OPAY02/OPAY16–857) のみだった。このプライマーセットを用いた場合、‘陽玉’×74–1737のF₁集団の抵抗性 55 個体中 54 個体で OPAY02/OPAY16–857 が検出され、り病性の 34 個体では、すべてで OPAY02/OPAY16–857 が検出されなかった (第 1 表)。
‘陽玉’×74–1737のF₁集団では、OPAY02/OPAY16–857とPse a遺伝子との組換え価は、1.1% (LOD 値 23.7) であった。

2. OPAY02/OPAY16–857 の STS 化

OPAY02/OPAY16–857 マーカーの塩基配列から設計した、プライマー STS1AY02 と STS1AY16 (第 2 表) を用いて、‘陽玉’×74–1737のF₁集団の各個体の検定を

行った結果、OPAY02/OPAY16–857 マーカーの検定結果と STS–Pse a マーカーの検定結果は、すべて同一であった (第 1 図)。RAPD マーカーを STS 化することで、共優性マーカーに置換される例 (Lu ら, 1999; Yamamoto・Hayashi, 2002) が報告されている。STS–Pse a マーカーの場合は抵抗性に単一バンドが検出される優性マーカーであったが、不安定な RAPD マーカーから信頼性の高い STS マーカーに置換することが可能であった。

3. STS–Pse a によるビワがんしゅ病抵抗性の評価

開発した STS–Pse a マーカーの‘陽玉’×74–1737 以外の交配組合わせまたは既存の品種における利用を検討した。‘福原早生’ (Pse a/pse a)×‘白茂木’ (pse a/pse a) のF₁集団の 75 個体では、抵抗性とり病性が期待比と矛盾せず、約 1:1 に分離した (第 3 表)。がんしゅ病抵抗性の連鎖マーカーは、抵抗性 39 個体中 33 個体で STS–Pse a が検出されたが、6 個体ではバンドの増幅が確認されなかった。また、り病性 36 個体中 35 個体で STS–Pse a が検出されなかったが、1 個体で STS–Pse a が検出された。

Resistance to <i>P. syringae</i>	R S R R S R S S R R R R S R S R R S S S
AY02/AY16–857	+ – + – + – – + – – + + + + – + – + + – + – – –
STS–Pse a	+ – + – + – – + – – + + + + – + – + + – + – – –

Fig. 1. Gel plates showing band patterns of parents and F₁ individuals obtained with AY02/AY16–857 (A) and STS–Pse a (B). BR : Resistant bulk, BS : Susceptible bulk, P₁: 74–1737, P₂: ‘Yougyoku’, M: size marker (øX174/HaeIII). Resistance or susceptibility to loquat canker is denoted by R or S, respectively.

Table 3. Linkage between resistance to the loquat canker disease and the occurrence of the STS marker STS Pseal1a in the F₁ progenies of 'Fukuharawase' × 'Shiromogi'.

Phenotype	No. of plants	STS Pseal1a		Recombination ratio
		+	-	
Resistant	39	33	6	0.048 (13.2) ²
Susceptible	36	1	35	

² LOD scores are shown in parentheses.**Table 4.** Relationship between STS marker and canker responses in loquat cultivars and strains.

Phenotype	STS Pseal1a	
	+	-
Resistant	Tanaka, Nagaowase, Fusahikari, Obusa, Fukujuuin, Fukuharawase, Tsukumo, Kusunoki, Nagasaki No. 6, 74-1737, Baiyu, Zikim, Yehuda, Akko-1, Gold nugget	Champagne, Kangtong
Susceptible	Hondawase, Dazhong, Deyexiangdun	Mogi, Nagasakiwase, Shiromogi, Suzukaze, Yougyoku, Taisho, Toi, Amakusagokuwase, Suzhouhai, Biqibai, Changhong 3 hao, Dahongpao, Hongganben, Houshanwanshou, Huabao 2 hao, Wanhong, Xiyexiangdun, Zaohuang, Advance, Zrifin 8

OPAY02/OPAY16-857 マーカーにおいて検定を行った場合もすべて同じであった。この結果、'福原早生' × '白茂木' の F₁ 集団におけるがんしゅ病 (A 系統菌) 抵抗性遺伝子と STS-Pseal1a との組換え価は 9.3% (LOD 値 13.2) であった。他の果樹の抵抗性選抜マーカーでは、ニホンナシ黒斑病感受性遺伝子連鎖マーカー (Banno ら, 1999) やリンゴの黒星病抵抗性選抜マーカー (Yang ら, 1997) が開発されており、組換え価はそれぞれ 3.3% と 3.6% との報告がある。OPAY02/OPAY16-857 マーカーや STS-Pseal1a マーカーを用いた 2 集団での組換え価は、それぞれ 1.1% と 9.3% であった。組換え価のばらつきはあるが、マーカーの開発に用いた集団と異なる組合せにおいてもがんしゅ病抵抗性個体の選抜に利用できることが明らかとなった。

遺伝資源で保有している抵抗性品種では、17 品種中 15 品種で STS-Pseal1a が検出され、'シャンパン' と '広東' の 2 品種では検出されなかった (第 4 表)。り病性の 23 品種中 20 品種で、STS-Pseal1a は検出されなかったが、'本田早生'、'大鐘' および 'Deyexiangdun' の 3 品種では検出された。このように供試した 88% の品種で STS-Pseal1a マーカーの増幅とビワがんしゅ病 (A 系統菌) 抵抗性検定結果が一致した。しかしながら、接種検定と異なる判定結果を示した 5 品種では、このマーカーが使用できないために育種計画を立てるときに注意する必要がある。また、第 4 表に記載していない品種を交配親に用いた場合も、その F₁ 集団でマーカーが使用できるか交配親を用いて検討する必要がある。以上のように、マーカーの開発に用いた集団と異なる '福原早生' × '白茂木' の F₁ 集団

においても抵抗性遺伝子と連鎖したことやほとんどの品種でマーカーの判定結果と接種検定結果が一致したことなどから、STS-Pseal1a はビワがんしゅ病抵抗性育種に実用的なマーカーである事が示唆された。

摘 要

ビワがんしゅ病抵抗性遺伝子と連鎖する DNA マーカーを開発するために、'陽玉' × 74-1737 の F₁ 集団から抵抗性とり病性の DNA バルクを設計し、2390 種類のプライマー (セット) を用いて検討した。その内、OPAY02 と OPAY16 を組合わせたプライマーセットは、抵抗性遺伝子と連鎖する 857 bp の DNA 断片を増幅した。この RAPD マーカーと集団との組換え価は、1.1% (LOD 値 23.7) であった。さらに、この RAPD マーカーを STS 化し (STS-Pseal1a マーカー)、同様の集団で検定を行った結果、DNA マーカーとしての特異性は失われなかった。また、'福原早生' × '白茂木' の F₁ 集団との組換え価は、9.3% (LOD 値 13.2) であった。ビワの 40 品種・系統を供試して STS-Pseal1a マーカーによるビワがんしゅ病抵抗性の検定を行ったところ、88% の品種・系統で接種試験と一致したことから、本マーカーはビワがんしゅ病抵抗性育種に有用であると示唆された。

引用文献

- Banno, K., H. Ishikawa, Y. Hamazu and H. Tabira. 1999. Identification of a RAPD marker linked to the susceptible gene of black spot disease in Japanese pear. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 476-481.

- Cheng, F. S., N. F. Weeden and S. K. Brown. 1996. Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple. *Theor. Appl. Genet.* 93: 222-227.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul.* 19: 11-15.
- 稗圃直史・佐藤義彦・福田伸二・寺井理治. 2002a. ビワがんしゅ病抵抗性育種における幼苗検定. 長崎県果樹試験場研究報告 9: 27-37.
- 稗圃直史・佐藤義彦・福田伸二・寺井理治. 2002b. ビワがんしゅ病 (A 系統菌) に対する抵抗性の遺伝. 園学雑. 71: 255-261.
- Lu, Z. X., K. Sossey-Alaoui., G. L. Reighard, Wm. V. Baird and A. G. Abbott. 1999. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach root-stock breeding. *Theor. Appl. Genet.* 99: 115-122.
- Michelmore, R. W., I. Paran and R. V. Kesseli 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis; A RAPD method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
- 森田 昭. 1978. ビワがんしゅ病に関する研究. 第2報. ビワがんしゅ病菌の色素産生性と病原性による系統類別. 日植病報. 44: 6-13.
- 森田 昭. 1988. ビワがんしゅ病病原細菌の類別とビワ品種の抵抗性に関する研究. 長崎県果樹試験場特別研究報告. 1-58.
- Yamamoto, T. and T. Hayashi. 2002. New root-knot nematode resistance genes and their STS markers in peach. *Scientia Hort.* 96: 81-90.
- Yang, H. Y., S. S. Korban, J. Krüger and H. Schmidt. 1997. A randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker tightly linked to the scab-resistance gene V_f in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 47-52.
- Yang, H. Y. and J. Krüger. 1994. Identification of a RAPD marker linked to the V_f gene for scab resistance in apples. *Euphytica* 77: 83-87.