

## 第1章 緒 言

### 第1節 アズキ落葉病の北海道における発生状況

アズキ落葉病は *Cadophora gregata* Harrington & McNew (Harrington and McNew 2003) [syn. *Phialophora gregata* (Allington & D. W. Chamberlain) W. Gams] f. sp. *adzukicola* Kobayashi, Yamamoto, Negishi and Ogoshi (Kobayashi *et al.* 1991) によって引き起こされる土壌伝染性の病害で、北海道のアズキ栽培における重要病害の一つである (Kondo *et al.* 1998, 2004). アズキ落葉病に感染したアズキは、8月中旬頃から下位葉が萎凋しはじめ、次第に全身に症状が広がる。罹病個体の茎、葉柄、根などは外観健全であっても、切断すると内部の維管束部や髓部が褐色、赤褐色あるいは紫褐色に変じている (成田ら 1971). アズキの生育後期に落葉、立ち枯れ症状を起こすことから、さや数の減少や百粒重の低下などが生じ、収量と品質に大きな影響を及ぼす (藤田 2007).

本病害は 1970 年にアズキの主産地である十勝地方で大発生し問題となった (成田ら 1971). その後の発生面積率は、気象の影響で年次変動が大きい、概ね 20 ~ 40% で推移している (藤田ら 2007). アズキ落葉病菌はレース 1 からレース 3 までは確認されており、北海道のアズキ栽培圃場において 1997 年 ~ 1999 年までの 3 カ年で収集した菌株を分類したところ、レース 1 が 78.1%, レース 2 が 13.9%, レース 3 が 8.0% の割合となった (Kondo *et al.* 2005, 藤田 2007). 本病原菌はアズキ残渣からも分離され、残渣が伝染源として重要な役割をもっている (土屋・赤井 1976). また分生胞子は耐久生存能力を持つことが報告されている (近藤・小林 1983). このことより、現在においても北海道のアズキ栽培圃場においては病原菌型レース 1 が優占していると推察される。

### 第2節 アズキ落葉病抵抗性育種

アズキ落葉病菌は土壌伝染性であるため薬剤防除が難しく、長期輪作以外には抵抗性品種の作付けによる被害回避がもっとも効果的である。北海道立十勝農業試験場 (現在北海道立総合研究機構十勝農業試験場、以下「十勝農試」) では、1976 年からアズキ落葉病抵抗性遺伝資源の探索や遺伝解析を開始した。その後、高度な抵抗性を示す品種・系統として韓国在来種の「赤豆」、日本在

来種の「黒小豆 (岡山)」「円葉 (刈 63 号)」「小長品 - 10」などが見いだされた (千葉 1982). これらの遺伝資源を用いた抵抗性の遺伝様式についての試験も行われ、アズキ落葉病抵抗性は優性の 1 遺伝子座によって支配されていることが報告された (千葉 1987). 1981 年に奨励品種となった「エリモショウズ」は、耐病性はもたないが、多収で従来の品種よりも耐冷性、品質が優れた (村田ら 1985) ことから普及開始後 3 年目で作付面積が全道一位となった。しかし、アズキ落葉病を含む土壌病害に対して感受性であったため、それが減収の一因となっていた。収量の年次間差を改善するため「赤豆」由来の抵抗性をもつ北海道で初めての落葉病抵抗性品種「ハツネショウズ」 (足立ら 1988), 「アケノワセ」 (島田ら 1992) が育成された。しかし、両品種は収量性、耐冷性および品質に劣ったため広く普及するには至らなかった。このため「エリモショウズ」を積極的に交配に利用し (村田ら 1998), アズキ落葉病菌汚染圃場を使用して選抜を行い、育成された抵抗性系統同士を交配することにより、「円葉 (刈 63 号)」を抵抗性母本とし「エリモショウズ」を系譜に持つ品質にすぐれた「きたのおとめ」 (藤田ら 1995a), 「黒小豆 (岡山)」を系譜にもつ「しゅまり」 (藤田ら 2002), 「円葉 (刈 63 号)」および「小長品 - 10」を系譜にもつ「きたろまん」 (青山ら 2009) などのアズキ落葉病抵抗性品種が開発され普及した (図 1-2-1)。

一方抵抗性品種の普及にともない「きたのおとめ」「しゅまり」などを侵す新たなアズキ落葉病菌 (レース 2) の存在が明らかとなり (Kondo *et al.* 1998), 「Acc259」が高度な抵抗性を有していることが報告された (Kondo *et al.* 2005). 藤田ら (2007) の遺伝解析により「Acc259」のもつ抵抗性も、これまで抵抗性育種を行ってきたレース 1 抵抗性と同様に優性の 1 遺伝子座によって支配されていることが示された。「Acc259」はアズキ落葉病菌レース 1 にも抵抗性を示し、二つのレース抵抗性品種育成のための交配母本として期待された。しかし「Acc259」を侵すアズキ落葉病菌レース 3 の存在も明らかとなり、レース 3 にはこれまで抵抗性母本として用いられていた「黒小豆 (岡山)」「円葉 (刈 63 号)」「小長品 - 10」などが抵抗性を示すことが報告された (Kondo *et al.* 2009). このため近年十勝農試では 3 つのレースに抵抗性を示す品種の開発を目指し、アズキ落葉病菌レース 1 および

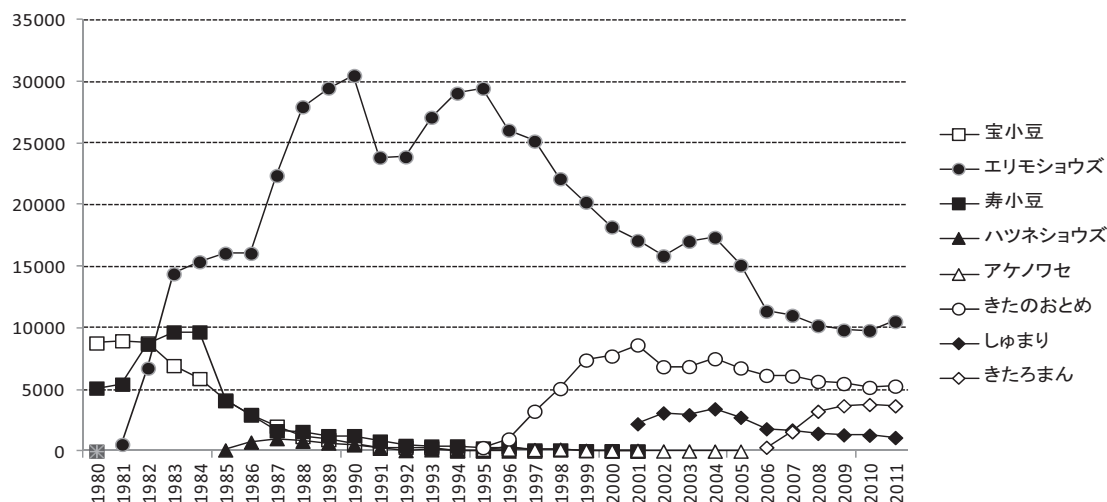


図1-2-1 主なアズキ品種と作付面積の推移（北海道農政部資料より）

レース2が優占する二つの検定圃場と人工接種法を利用して小豆系統を選抜している。

### 第3節 DNA マーカーを利用した育種

植物育種の手法には交雑育種、倍数性育種、突然変異育種等があるが、選抜はどの手法においても重要である。通常、選抜は目的とする表現形質を確認することによって行われるが、そのためには多大な労働力、試験圃場あるいは温室などの場所、時間が必要である。また病害抵抗性など環境の影響を受ける形質の評価については複数年の検定が必要で、検定手法の簡便化、高精度化が求められていた。表現型を簡易に判別する手法の一つとして古くはアイソザイム等が利用されてきたが、1980年代から生物個体間のDNA塩基配列の違い（DNA多型）を検出する手法が確立されはじめた。多型を検出する方法として、精度は高いが技術的に煩雑で時間を要するRFLP法（Restriction Fragment Length Polymorphism, Botstein *et al.* 1980）、技術的には簡単だが再現性に問題があるRAPD法（Randomly Amplified Polymorphic DNA, Williams *et al.* 1990）、多型を検出しやすいがコストがかかるAFLP法（Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos *et al.* 1991）等がある。後に特異的な配列を利用した簡便な手法として、品種間で異なる遺伝子配列を利用したSCAR（Sequence Characterized Amplified Region, Williams *et al.* 1991）マーカー、制限酵素切断部位を利用し増幅断片に差を生じさせるCAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, Lyamichev *et al.* 1993）マーカー、繰り返し配列を使用し多型率の高いSSR（Simple Sequence Repeat, Hamada *et al.* 1982）マ-

ーカー等がDNAマーカーとして利用されるようになった。

育種目標となる形質の表現型と連鎖したDNAマーカーを利用することによって、簡便に抵抗性や品質などの遺伝的な違いを選抜することをMarker assisted selection（MAS）という。植物育種における選抜では、各種選抜条件を設定したり、検定材料を養成するために時間と労力がかかるが、MASでは茎、葉等の組織の一部を用いて環境条件に影響されことなく遺伝的な違いを調べることができるため、検定の労力を軽減したり、形質によっては短期間での形質改良も可能となる。各組織から抽出したDNAは、PCR（polymerase chain reaction）反応を行うことによって、約2時間で100億倍ほどに増幅され、アガロースゲルなどで簡易に識別できる。一方で植物体からゲノムDNAを抽出し、特定の領域を増幅させ確認する作業は、圃場に播種して調査する場合と比較すると一点あたりのコストが高い。このため出穂期、植物体の高さなど複数の因子が関与し、簡単に調査できる形質であれば、圃場における累年の評価を行う方が効率的であり、品種改良に係わるすべての形質でMASを利用することは現実的ではない。検定に時間、労力がかかる病虫害抵抗性の判定および収穫前に情報を得ることにより品種改良を効率化できる形質などについてはDNAマーカーの活用価値が高い（鈴木 2012）。

現在では、多くの機関で様々な植物に対してそれぞれ目的とする形質のMASを行っている。北海道立総合研究機構（道総研）では、品種改良の効率化を目指して2001年から難防除病害および小麦の品質関連形質を識別できるDNAマーカーの開発に着手した。2003年にアミロース合成遺伝子Wx-B1（うどんの粘弾性に関与）

の有無を判別する DNA マーカーを利用して小麦の系統内分離を調査したのが、道総研の品種改良において最初に DNA マーカーを利用した事例であった。その後、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性、インゲンマメ黄化病抵抗性、ダイズシストセンチュウ抵抗性など、重要病害に対する抵抗性を判別できる DNA マーカーの開発に成功し、選抜効率等の検証を行った後、本格的に品種改良への利用を開始し、現在では道総研で品種改良を行っている 6 作物で MAS を行っている（鈴木 2012）。

#### 第 4 節 アズキ萎凋病の北海道における発生状況

アズキ萎凋病は *Fusarium oxysporum* Schlechtendehlf. sp. *adzukicola* Kitazawa et Yanagita（北 沢・柳 田 1989）によって引き起こされる土壌伝染性の病害である。本病に感染すると播種後ほぼ 1 ヶ月で初生葉に葉脈褐変が現れ、最終的には株全体の葉がしおれ、枯れあがる。本病原菌には 3 つのレースがあることが明らかにされており（Kondo *et al.* 1989）、レース 1 は「エリモシヨウズ」、「寿小豆」、「宝小豆」などを侵すが「光小豆」、「ハツネシヨウズ」は侵すことができず、レース 2 は「光小豆」を、レース 3 は「ハツネシヨウズ」をそれぞれ侵す。本病害は 1983 年に初発生が確認された後、1985 年には石狩、空知振興局管内で発生面積が 2000ha を超えた。1989 年には発生面積 6000ha、被害面積が 410a となった（近藤, 1995）。また、アズキ落葉病抵抗性系統・品種のほとんどがアズキ萎凋病抵抗性であることが報告されており（近藤 1995）、アズキ落葉病品種である「きたのおとめ」、「しゅまり」、「きたろまん」はともにアズキ萎凋病抵抗性も有しており、この結果アズキ萎凋病、アズキ落葉病ともに近年の発生率は減少している（藤田 2007）。

#### 第 5 節 本研究の目的

アズキ落葉病は人工接種法では高精度に検定が可能で優良な品種が育成されてきているが、感染から発病までにおよそ 2 ～ 3 ヶ月と時間を要し、発病までの管理に労力が必要である。また本病害発生圃場を利用した選抜では、汚染土壌の拡散防止に注意が必要なことに加え、抵抗性系統の作付け増加にともなって優占レースに変化が生じ、目的とする病原レースに対する抵抗性を正確に判定できない場合があった。加えて病害汚染圃場の面積を最小限に抑えながら抵抗性検定を行うために、短期輪作で圃場を利用することによって、落葉病以外の病害、障害が発生することも懸念されており、簡便で高精度な抵抗性判定法が求められていた。DNA マーカーを開発するためには、精度の高い検定手法があること、目的とする形質が比較的少数の因子によって支配されていることが必要であるが、本病害はこれらの要件を満たしていた。

そのため本研究では、1) 北海道で多く分布しているアズキ落葉病菌レース 1 に対する抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーを開発し、2) 新たに発生が確認されたアズキ落葉病菌レース 2 に対する抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカーを開発することを目的とし、育種で利用するための有効性を調査した。アズキ落葉病菌レース 1 抵抗性の遺伝資源はアズキ落葉病菌レース 3 にも抵抗性を示すことから、これらを同時に導入できれば、北海道で発生している 3 つのレースに対してすべて抵抗性を示す品種が育成できる。このため 3) アズキ落葉病菌レース 1 抵抗性遺伝子とレース 2 抵抗性遺伝子の関係を明らかにすることを目指した。また、アズキ落葉病菌抵抗性品種・系統の多くがアズキ萎凋病抵抗性を示すが、それぞれの抵抗性遺伝子の連鎖関係は調査されていなかったことから、4) アズキ落葉病菌レース 1 抵抗性遺伝子、レース 2 抵抗性遺伝子とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係についても検討した。

## 第2章 アズキ落葉病菌レース1抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーの開発

### 第1節 AFLP法による多型マーカーの探求

#### 目 的

作物に特異的なDNAマーカーがなくとも多型が確認できるAFLP法を利用して、アズキ落葉病菌レース1抵抗性系統群あるいは感受性系統群に特異的なマーカーを探求する。

#### 材料および方法

##### (1) バルク構成系統の選抜

アズキ落葉病菌レース1抵抗性品種「しゅまり」と同感受性遺伝資源「斑小粒系-1」の単交配由来のF<sub>3</sub>世代105系統を、抵抗性検定試験に供試した。

接種菌株はアズキ落葉病菌レース1分離株T96-1 (NIAS Genebank accession no. MAFF 241056) を用い、V8液体培地中で25°C、120回転/分の条件下で3週間培養した (Kondo *et al.* 2009)。接種当日、培養液を吸引濾過 (Whatman No. 1) して液体培地を取り除き、残った菌体を滅菌水で洗浄した。集めた菌体はポリトロン (Kinematica) で破碎し、 $1 \times 10^7$  cfu / ml に調整したものを接種源とした。

アズキ種子は各系統15粒を、タキイ育苗培度を充填した素焼きの4号鉢 (直径12.4cm) に5粒ずつ (1系統あたり3鉢) 播種した。約10日から2週間後、初生葉が展開した植物体を土から抜き取り、水で丁寧に土を洗浄し、根を1.5cmほどまではさみで切り落とし、各系統それぞれ50mlの接種源が入った紙コップに入れ、一晚 (約16時間) 浸漬した。浸根接種後、素焼きの4号鉢に生育の良いものを各4個体ずつ移植し、移植後の苗の根もとに余った接種源を均等に散布した。接種約8週間後に、各個体とも地際から初生葉節までの茎を縦にカッターナイフで切り、茎断面の維管束褐変の有無で抵抗性と感受性を評価した。接種試験時にはコントロールとして、抵抗性親である「しゅまり」と感受性親である「斑小粒系-1」を各系統と同様に供試した。12個体中12個体が抵抗性と判定された系統を抵抗性ホモ接合型系統、12個体あるいは11個体が感受性と判定された系統を感受性ホモ接合型系統、1～10個体が感受性と判定された系統をヘテロ接合型系統と判定した。

##### (2) AFLP解析

AFLP解析はVos *et al.* (1995) らの方法を一部改変して行った。(1)で選抜した抵抗性ホモ接合型の12系統、感受性ホモ接合型の12系統からそれぞれ任意に1個体を選び、CTAB法 (Murray and Thompson 1980) によってゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAは、抵抗性、感受性別に等量混合しバルクDNAとした。バルクDNAをEcoR I, Mse Iで37°C、2時間切断 [全反応液量50  $\mu$ l, DNA750ng (3  $\mu$ l 250ng/1  $\mu$ l DNA), 8U EcoR I, 6U Mse I, 10  $\mu$ l 5  $\times$  Buffer (50mM Tris-Ac, 50mM MgAc, 250mM KAc, 25mM DTT, 250ng BSA)] し、反応液10  $\mu$ lを電気泳動した。制限酵素切断後のゲノムDNAが全体にスミアな泳動像となり、短い断片は100bp程度まで切断されていることを確認した後、残り40  $\mu$ lの反応液に4  $\mu$ l D.W., 2  $\mu$ l 5  $\times$  Buffer, 1  $\mu$ l ATP (10mM), 1  $\mu$ l T4DNA-Ligase (Roche 10U/1  $\mu$ l), 1  $\mu$ l EcoR I adapter (5pmol/  $\mu$ l), 1  $\mu$ l Mse I adapter (50pmol/  $\mu$ l) (図2-1-1) を加えて全量50  $\mu$ lとし、37°Cで3時間ライゲーションした。ライゲーション終了後、反応を停止するため、450  $\mu$ lの0.1TEを加えて4°Cで保存した。

次に、予備増幅プライマー (図2-1-2) を用いて、予備増幅を行った。増幅後、反応液5  $\mu$ lを電気泳動し、スミアな増幅産物が得られていることを確認し、残り45  $\mu$ lの液に405  $\mu$ lの0.1TEを加えて10倍希釈しAFLP反応のテンプレートとして利用した。予備増幅のPCR反応は表2-1-1の通り行った。AFLP増幅はEcoR I, Mse I側ともに3塩基認識の選択伸長配列を付加したプライマーを用いて各バルクの多型を調査した (図2-1-3)。EcoR I側プライマーは蛍光色素 (FAM, VIC (Applied Biosystems)) で標識し、合計で1024通りの組み合わせで多型を検出した。本試験に利用した選択的伸長配列を表2-1-2に示した。AFLP増幅のPCR反応は表2-1-3の通り行った。AFLP増幅産物は、GeneScan 310を用いて500LIZをサイズマーカーとして解析を行った。



図 2-1-1 アダプターの構造

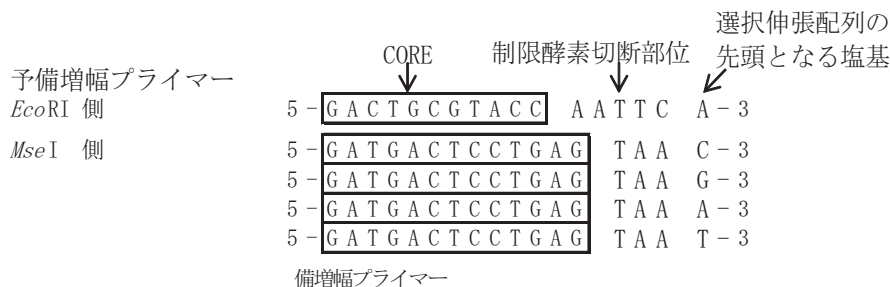


図 2-1-2 予備増幅プライマー

表 2-1-1 予備増幅の PCR 反応組成および PCR 条件

| 反応液組成                                         |       |         | PCR 条件 |      |           |
|-----------------------------------------------|-------|---------|--------|------|-----------|
| D.W.                                          | 27.75 | $\mu$ l | 94°C   | 30 秒 | } 20 サイクル |
| <i>Eco</i> RI pre amp primer (5pmol/ $\mu$ l) | 2.5   | $\mu$ l | 56°C   | 1 分  |           |
| <i>Mse</i> I pre amp primer (5pmol/ $\mu$ l)  | 2.5   | $\mu$ l | 72°C   | 1 分  |           |
| 10 × Buffer                                   | 5.0   | $\mu$ l |        |      |           |
| dNTPs (2.5mM each)                            | 4.0   | $\mu$ l |        |      |           |
| MgCl <sub>2</sub> (酵素に添付)                     | 3.0   | $\mu$ l |        |      |           |
| Ampli Taq (Applied Biosystems)                | 0.25  | $\mu$ l |        |      |           |
| DNA                                           | 5.0   | $\mu$ l |        |      |           |
| total                                         | 50.0  | $\mu$ l |        |      |           |

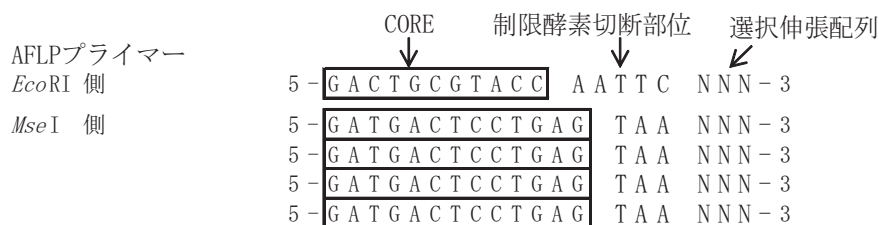


図 2-1-3 AFLP プライマーの構造

表2-1-2 選択的伸張配列

| <i>EcoRI</i> primer |        | <i>MseI</i> primer |     |     |     |
|---------------------|--------|--------------------|-----|-----|-----|
| FAM 標識              | VIC 標識 |                    |     |     |     |
| ACC                 | AGC    | CAA                | GAA | AAA | TAA |
| ACG                 | AGG    | CAC                | GAC | AAC | TAC |
| ACA                 | AGA    | CAG                | GAG | AAG | TAG |
| ACT                 | AGT    | CAT                | GAT | AAT | TAT |
| ACT                 | AAC    | CCA                | GCA | ACA | TCA |
| ATG                 | AAG    | CCT                | GCT | ACT | TCT |
| ATA                 | AAA    | CGA                | GGA | AGA | TGA |
| ATT                 | AAT    | CGT                | GGT | AGT | TGT |
|                     |        | CTA                | GTA | ATA | TTA |
|                     |        | CTC                | GTC | ATC | TTC |
|                     |        | CTG                | GTG | ATG | TTG |
|                     |        | CTT                | GTT | ATT | TTT |
|                     |        | CCC                | GCC | ACC | TCC |
|                     |        | CCG                | GCG | ACG | TCG |
|                     |        | CGC                | GGC | AGC | TGC |
|                     |        | CGG                | GGG | AGG | TGG |

表2-1-3 AFLP 増幅の PCR 反応液組成および PCR 条件

| 反応液組成                                 |      |         | PCR 条件 |      |         |
|---------------------------------------|------|---------|--------|------|---------|
| D.W.                                  | 7.1  | $\mu$ l | 94°C   | 30 秒 | 12 サイクル |
| <i>EcoRI</i> primer (10pmol/ $\mu$ l) | 1.0  | $\mu$ l | 56°C   | 30 秒 |         |
| <i>MseI</i> primer (3pmol/ $\mu$ l)   | 2.0  | $\mu$ l | 72°C   | 1 分  |         |
| 10 × Buffer                           | 2.0  | $\mu$ l | 94°C   | 30 秒 | 23 サイクル |
| dNTPs (2.5mM each)                    | 1.6  | $\mu$ l | 56°C   | 30 秒 |         |
| MgCl <sub>2</sub> (酵素に添付)             | 1.2  | $\mu$ l | 72°C   | 1 分  |         |
| Ampli Taq (Applied Biosystems)        | 0.1  | $\mu$ l | 72°C   | 7 分  |         |
| DNA                                   | 5.0  | $\mu$ l |        |      |         |
| total                                 | 20.0 | $\mu$ l |        |      |         |

## (3) AFLP 断片のクローニングと塩基配列の決定

抵抗性バルクと感受性バルク間で多型を示した AFLP プライマーセットを用いて、両親間で同様の多型を示すことを確認した。次に両親の DNA を用いて増幅した AFLP 断片を 8% アクリルアミドゲルで電気泳動し、多型を示した増幅断片を切り出した。切り出した増幅断片は 1.5ml プラスチックチューブに 100  $\mu$ l の diffusion buffer (0.5M ammonium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM EDTA pH8.0, 0.1% SDS) を加えガラス棒を使って摩砕した。その後 50°C のウォーターバスで 30 分インキュベートし、14000rpm で 10 分間遠心した。上清 100  $\mu$ l を SUPERREC-01 (Takara) カラムで精製し、さらに精製液を MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) で濃縮精製した。切り出した AFLP 断片を DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara) (表 2-1-4) を用いて 16°C で一晩反応させ、pT7Blue T-Vector (Novagen) に組み込んだ。

ライゲーション溶液全量を JM109 (Takara) の入ったチューブに加え、氷中で 30 分静置し、42°C のウォーターバスで 45 秒間処理し、速やかに水入りの氷中で 2 分間静置した。その後、37°C に暖めておいた製品添付

の SOC 培地に、大腸菌溶液を全量加え 37°C で 5 分から 20 分静置後、37°C で 40 分間振とう培養した。10  $\mu$ l 100nM IPTG, 50  $\mu$ l 2%X-Gal を塗った LB 培地 (100mg アンプシリン含有) に、培養液を 100  $\mu$ l、および残り溶液を約 10 倍に濃縮し全量使用した 2 段階の濃度で平板に広げ一晩培養した。白色のコロニーを滅菌したつまようじの先でふれ、100ul の TE 溶液に懸濁し 99°C で 10 分間熱処理し、8000rpm で 15 分間遠心した。上清をテンプレートとして M13 プライマー (forward primer; 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', reverse primer; 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') で PCR を行い (表 2-1-5)、2% アガロースゲルで増幅断片を確認した。目的の大きさに近い増幅断片を示したコロニー懸濁液をテンプレートとし、AFLP マーカーを利用して DNA を増幅させ、GeneScan 310 で解析し、得られた増幅断片長が AFLP 解析時に多型を示した増幅断片長と完全に一致したものを選抜した。

選抜したコロニー懸濁液を利用して再度 M13 プライマーを用いた PCR を行い、増幅断片を QIAquick DNA Purification Kit (Qiagen) で精製した後、外注して塩基配列を解読した。

表 2-1-4 ライゲーション溶液の反応液組成

| 反応液組成                      |      |               |
|----------------------------|------|---------------|
| Ligation Solution (Takara) | 5.0  | $\mu\text{l}$ |
| pT7Blue T-Vector (Novagen) | 1.0  | $\mu\text{l}$ |
| 精製した DNA                   | 1.0  | $\mu\text{l}$ |
| TE                         | 3.0  | $\mu\text{l}$ |
| total                      | 10.0 | $\mu\text{l}$ |

表 2-1-5 インサートチェック用 PCR 反応液組成と PCR 条件

| 反応液組成                                |      |               | PCR 条件 |      |
|--------------------------------------|------|---------------|--------|------|
| D.W.                                 | 13.7 | $\mu\text{l}$ | 94°C   | 2 分  |
| 10 × Buffer                          | 2.0  | $\mu\text{l}$ | 94°C   | 30 秒 |
| dNTPs (2.5mM each)                   | 1.6  | $\mu\text{l}$ | 56°C   | 30 秒 |
| MgCl <sub>2</sub> (酵素に添付)            | 1.2  | $\mu\text{l}$ | 72°C   | 2 分  |
| primer M13F (20pmol/ $\mu\text{l}$ ) | 0.2  | $\mu\text{l}$ | 94°C   | 5 分  |
| primer M13R (20pmol/ $\mu\text{l}$ ) | 0.2  | $\mu\text{l}$ |        |      |
| ExTaq (Takara)                       | 0.1  | $\mu\text{l}$ |        |      |
| Template                             | 1.0  | $\mu\text{l}$ |        |      |
| total                                | 20.0 | $\mu\text{l}$ |        |      |

## 結 果

### (1) バルク構成系統の選抜

F<sub>3</sub> 世代 105 系統を用いてアズキ落葉病菌レース 1 を接種検定し、F<sub>2</sub> 世代の遺伝子型を推定した。観察値は抵抗性ホモ接合型：ヘテロ接合型：感受性ホモ接合型＝26：54：25 となり、1 遺伝子支配による理論値に適合した（表 2-1-6）。抵抗性ホモ接合型、感受性ホモ接合型と推定した系統からそれぞれ 12 系統をバルク構成系統として選抜した。

表 2-1-6 斑小粒系-1/しゅまり F<sub>2</sub> 世代の推定表現型

| 観察値 |    |    | 理論値  |      |      | $\chi^2$ | P    |
|-----|----|----|------|------|------|----------|------|
| R   | H  | S  | R    | H    | S    |          |      |
| 26  | 54 | 25 | 26.3 | 52.5 | 26.3 | 0.11     | 0.95 |

注) R：抵抗性ホモ接合型 H：ヘテロ接合型

S：感受性ホモ接合型、数字は系統数

### (2) AFLP 解析

AFLP 解析の結果、抵抗性バルクに特異的な増幅断片が 4 個 (E-ACC/M-GGG-77, E-ACT/M-ACT-118, E-ATG/M-GAG-138, E-ACA/M-GAA-139) 感受性バルクに特異的な増幅断片が 2 個 (E-AAG/M-GAT-126, E-ATG/M-AAG-132) 検出され、両親間でも同様の多型が検出された。抵抗性バルクに特異的な E-ATG/M-GAG-138 および感受性バルクに特異的な E-ATG/M-AAG-132 の配列を比較したところ、前半に 1 塩基の置換、E-ATG/M-AAG-132 側の後半の配列に 6 塩基の欠失領域があった以外は同じ配列だった（図 2-1-4、相同性 99.2%）。

```

E-ATG/M-GAG-138  1' GACTGCGTAC CAATTCATGT TTTCTTTGT CAATAGAATT AGAAGTCCGT TGATAATTTA
                  *****
E-ATG/M-AAG-132  1" GACTGCGTAC CAATTCATGT TTTCTTTGT CAATAGAATT ACAAGTCCGT TGATAATTTA

E-ATG/M-GAG-138  61' CTGGTCATGA TTTTTCCTTA TTTTGTGGTT TTGATGTAAG GGATATATCA ATGTGCTTTT
                  *****
E-ATG/M-AAG-132  61" CTGGTCATGA TTTTTCCTTA TTTTGTGGTT TTGATGTAAG GGATATATCA ATGTGCTT--

E-ATG/M-GAG-138  121' GCTCTTACTC AGGACTCATC
                  *****
E-ATG/M-AAG-132  119" ----TTACTC AGGACTCATC

```

図2-1-4 AFLP増幅断片 E-ATG/M-GAG-138 および E-ATG/M-AAG-132 の同源性比較

## 考 察

「しゅまり」のアズキ落葉病菌レース1に対する抵抗性は優性の1遺伝子によって支配されていると推定された(表2-1-6)。千葉らは「黒小豆(岡山)」などを用いた遺伝解析から、アズキ落葉病抵抗性は優性の1遺伝子座によって支配されていると報告した(1987)。「しゅまり」は「黒小豆(岡山)」を系譜に持つことから、「しゅまり」の抵抗性は「黒小豆(岡山)」由来の効果の大きい遺伝子座によって支配されていると考えられた。本試験の結果から「しゅまり」が有する優性に遺伝するアズキ落葉病抵抗性遺伝子を *Pga1* と命名した。

バルク法を利用した AFLP 解析では6個の特異的な増幅断片を得ることができた。バルク内では各個体は目的とする形質については同質であるが、他の遺伝子は選抜されていないため異質である可能性が高い(Michelmore *et al.* 1991)。このことから、精度の高い試験によって選抜された個体からなるバルク間では、目的とする形質と連鎖した領域以外では多型が得られないと考えられる。本試験は、接種検定時のコントロールとして供試した「しゅまり」には全個体維管束褐変がみられず、それに対して「斑小粒系-1」は12個体中12個体に維管束褐変がみられ、全個体が感受性と判定される条件であった(データ未掲載)ことから、接種精度は高いと考えられる。そのため、得られた増幅断片は抵抗性、感受性と連鎖している可能性が高いと考えられた。

配列の相同性が高かった E-ATG/M-GAG-138 と E-ATG/M-AAG-132 は、*EcoR* I 側の選択的伸張配列も同じであった(図2-1-4)ことから、これらは同一座にあると考えられた。そのため、以降のマーカー開発は E-ACC/M-GGG-77, E-ACT/M-ACT-118, E-ATG/M-GAG-138, E-ACA/M-GAA-139, E-AAG/M-GAT-126 の計5つの配列を用いて行うこととした。

## 第2節 アガロースベースの DNA マーカー開発

### 目 的

AFLP 法は、作物固有の特異的マーカーがない場合にも適用可能な長所を有する反面、煩雑な手法を用いるため、AFLP マーカーそのものを育種選抜における DNA マーカーとして利用することは難しい。また、育種選抜で DNA マーカーを利用する際には、抵抗性ホモ接合型、感受性ホモ接合型、ヘテロ接合型が判別できる共優性マーカーが望ましい。以上のことより、AFLP 断片およびその周辺領域の配列を利用して、アガロースで簡易に遺伝子型を判別できる DNA マーカーを開発する。

### 材料および方法

#### (1) インバースPCRを利用した AFLP 断片周辺配列の決定

第1節で塩基配列を決定した AFLP 増幅断片を利用して、フォワードプライマー、リバースプライマーを2つずつ設計した(図2-2-1)。

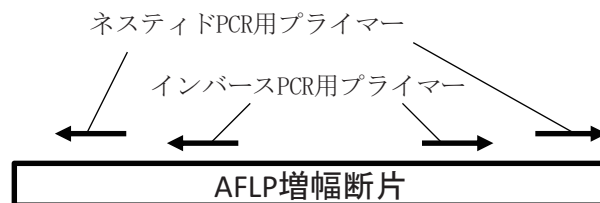


図2-2-1 AFLP断片を利用したプライマー設計のイメージ図

プライマーの設計は塩基数が20前後、GあるいはCの数が8個から10個になるように設計し(GC含有率40～50%)、設計したプライマーはインターネット上の

フリーソフト (<http://www.oligoevaluator.com/AddUserServlet>) で  $T_m$  値および予想される二次構造を調べた。ヘアピン構造になりやすいと判定されたプライマーは利用せず、 $T_m$  値は  $60^{\circ}\text{C}$  前後を目安とした。以降のプライマーはすべて同様の方法で設計した。

ゲノムを切断する制限酵素は AFLP 断片が切断されないものを選択し、Alu I, Hae III, Hind III, Sau3 AI, Taq I, Xba I で切断した。制限酵素処理を行った反応液は QIAquick DNA Purification Kit で精製し、 $16^{\circ}\text{C}$  で一晩ライゲーションした。反応液組成を表 2-2-1 に示した。ライゲーション溶液は MiniElute PCR Purification Kit で濃縮精製し、PCR テンプレートとした。

抵抗性バルクに特異的に増幅した AFLP 断片を利用して設計したプライマーには「しゅまり」の、感受性バルクに特異的に増幅した AFLP を利用して設計したプライマーには「斑小粒系-1」のゲノム DNA を自己環状化させたものをテンプレートとして用いた。

以降の PCR 反応はすべて表 2-2-2 の条件で実施した。はじめにインバース PCR 用プライマー (AFLP 断片の内側に設計したプライマー) で DNA を増幅させた。ゲノム DNA を直接増殖させた産物は、複数の増幅断片が見えるものが多かった。そのため増幅産物を 50 倍に希釈し、AFLP 断片の外側 (インバース PCR では内側プライマーとなる) に設計したプライマーを用いてネスティッド PCR を行い、1 本のクリアな増幅断片が得られたものを精製し、塩基配列を解読し、制限酵素サイトで 5' 側と 3' 側の位置を決定した。

次に周辺配列の 5' 側と 3' 側にプライマーを設計し、ゲノム DNA を増幅させ、増幅産物の配列を解読した。増幅産物の中に AFLP 増幅断片と 100% の相同性がある配列を確認後、もう一方の親のゲノム DNA を同様のプライマーで増幅させ、塩基配列を決定し、対立座の配列とした。一連の作業のイメージ図を図 2-2-2 に示した。

## (2) SCAR (sequence characterized amplified region) マーカーの作成

AFLP 断片およびその周辺領域の塩基配列を利用してプライマーを設計した。増幅断片の長さは考慮せず、本試験のマーカーは優性遺伝する形質と連鎖していると予想されることから、表現型、遺伝子型を一致させるために抵抗性型を判別できる優性マーカーを作成した。

## (3) 遺伝子型と表現型の比較および抵抗性遺伝子と強連鎖したマーカーの選抜

バルク構成個体の選抜に利用した  $F_3$  系統について、 $F_2$  の推定表現型が抵抗性ホモ接合型およびヘテロ接合型の系統からは、病徴を示さず「抵抗性」と判定した 1 個体から、感受性ホモ接合型の系統からは明らかな病徴を示し「感受性」と判定した個体 1 個体から DNA を抽出し、作成した 5 つのマーカーを用いて遺伝子型を調査した。また、すでにアズキ落葉病抵抗性型が明らかとなっている遺伝資源 32 点を用いて遺伝子型を調査した。

## 結 果

### (1) AFLP 断片周辺塩基配列の決定

第 1 節で選抜した「しゅまり」および「斑小粒系-1」の AFLP 断片およびその周辺の塩基配列を図 2-2-3 に示した。これらの配列は DDBJ に登録した (DDBJ accession no. AB749324 ~ AB749332, 「斑小粒系-1」の E-ATG/M-AAG-132 とその周辺領域のみ未登録)。これらの配列情報をもとに「しゅまり」型が特異的に増幅するように設計した DNA マーカーを表 2-2-3 に示した。

$F_3$  世代 105 個体について、設計した DNA マーカーで遺伝子型を調査した結果、Pg118, Pg139 の遺伝子型はすべてアズキ落葉病抵抗性の表現型と一致し、Pg77, Pg126, Pg138 で 1 個体のみ組換えが認められた (表 2-2-4)。

表2-2-1 ライゲーション溶液の反応液組成

| 反応液組成                         |       |               |          |
|-------------------------------|-------|---------------|----------|
| DNA                           | 12.5  | $\mu\text{l}$ | =(125ng) |
| 10 × Buffer                   | 12.5  | $\mu\text{l}$ |          |
| T <sub>4</sub> Ligase(TAKARA) | 1.0   | $\mu\text{l}$ |          |
| D.W                           | 3.0   | $\mu\text{l}$ |          |
| total                         | 125.0 | $\mu\text{l}$ |          |

表2-2-2 ゲノム PCR 反応液組成と PCR 条件

| 反応液組成                                     |      |               | PCR 条件 |      |
|-------------------------------------------|------|---------------|--------|------|
| D.W.                                      | 13.7 | $\mu\text{l}$ | 94°C   | 2 分  |
| 10 × Buffer                               | 2.0  | $\mu\text{l}$ | 94°C   | 30 秒 |
| dNTPs (2.5mM each)                        | 1.6  | $\mu\text{l}$ | 56°C   | 30 秒 |
| MgCl <sub>2</sub> (酵素に添付)                 | 1.2  | $\mu\text{l}$ | 72°C   | 2 分  |
| primer (Forward) (20pmol/ $\mu\text{l}$ ) | 0.2  | $\mu\text{l}$ | 94°C   | 5 分  |
| primer (Reverse) (20pmol/ $\mu\text{l}$ ) | 0.2  | $\mu\text{l}$ |        |      |
| ExTaq (Takara)                            | 0.1  | $\mu\text{l}$ |        |      |
| Template                                  | 1.0  | $\mu\text{l}$ |        |      |
| total                                     | 20.0 | $\mu\text{l}$ |        |      |

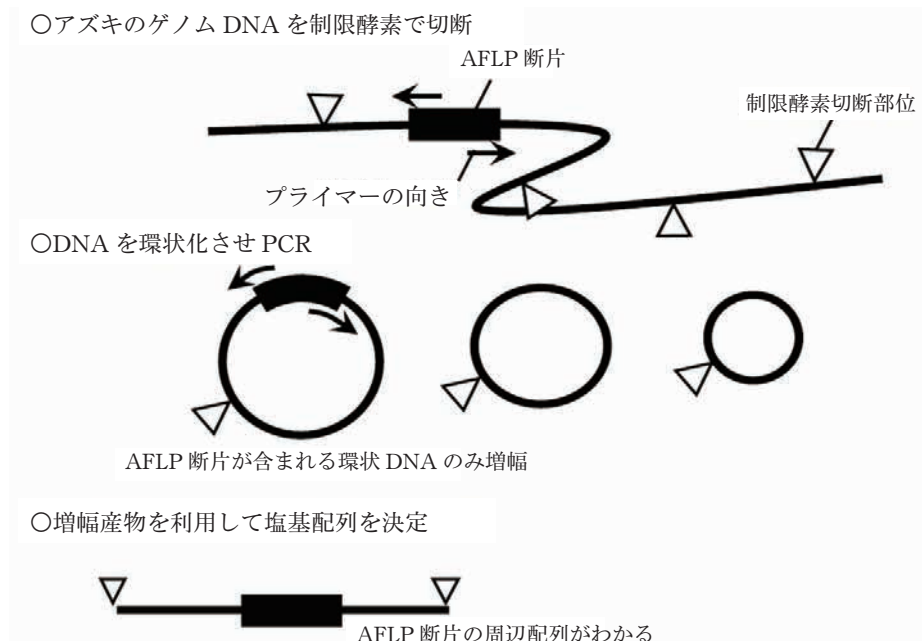


図2-2-2 AFLP 周辺領域解析のイメージ図

CAGAAGAGGA AGATGTATCA CATTTAGCT CAAAGGTTTG CATTCTAGTA AAAGGAGAAG ATTGATCCTT TAATTTATCA  
 GAAAACATAG ATAAACCTA CGAAAAAAA ATGAATTATC ACATCAGACA ACATTGTAAT TCTATTCTTG TATACAATGA  
 TATTATAAG TATAATAATT TGACAATACT TACTTCAATG ATTTTCATATG ACAAAGATAT AGATTTTGCC CTTTGCATGA  
 TTCAAAATAG CTTAATCAGA GTATATAAGG AACCGCTATC TTTAGCCAAC CAACCTACAT CAATATATAT TTTCTCCACA  
 AAGAGAAGAT TAATCTCAGT GGAAAAACAA TATAAACAT AAGAATCAGT GTATTTAAAA TATTTAAGCC TTGGCGTTTG  
 AAGCTCAAG ACACAGTCAG CTTCTAATTT CCCAGCCACT CTAAAAACAAG ATATATTTAA GTCTACAAGG TGGGGGTAG  
 AGATTTTGAA AATATTGAAG TCACCATAGT ATATACAAC ATGAAAAATAT AAAGATTCCA AATTGACAAA ACCCTTAAAT  
 GAATCAAAAA GGTTTTCCCA ACCACAATCA AAATTACAAC AGCAGAGGTA TAGGTGGTTA AGAGAAGGAA GATCGA

(1) 「斑小粒系－1」の E-ACC/M-GGG-77 (しゅまり) 対立座領域

CAGAAGAGGA AGATGTATCA CAGATTAAAT CAAAGGTTTG CATTCTGGTG AAAGGAGAAC ATCTATCCTC TAATTCATCA  
 GAAAACATAG ATAAACCTA CAAAAGAAA ATGAATTATC AAATCAGACA TAATTGTAAT CCTATTCTTG TGCTACACTG  
 ATATTGTAAA GAATAATAAT TTGCCAAAAG AAAAATACCTT ACTCGAATGA TTTTAAATA CAGAGATATA GATTTGCCCC  
 TTTTCATGAT TTCAAAATAGC TCAACCAAAG TAGAAAAATA GGAAACAGTA CTTTGTAGCA ACCACCCTAC ATCGATATAC  
 ATTTTCTCCA CAAAGAGAAG ATTAACCTCA GTAGAAAAAG AATATAAATG ATAAAAATCA GTATATTTAA AATACTGAAG  
 CCTTGGTGTT TGAAGCTCAA AGACACAGTC ACCTTGAAC TCCTCAACA CTCTACTATC TGATATATTT AAGTCTACAA  
 GGTGGGAGAC AGAGATTTTG AAGGTATTGA **ATTCAACATA ATATGTACAA CTAACCAAAT ATAGAGATTC CAAATTGACA**  
**CAACCTTAA** ATGGATCAAA AGGGCTTTCC GATTACACA TAAATTCACA ACCATAGAGG TATAGGTGGT TAAGAGAAGG  
 GAGATCGAAA TTTGTGATCT CACTGAATAT GTAAGAAAGT TTGAGAGTAG TGAG

(2) 「しゅまり」の E-ACC/M-GGG-77 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

TCCGTAACCC ACTTAAGATT CTCCAAAAAT TGCTAGTGGA ATTGACTGGA GTGCCTGCAA AAACGGGTCA TATGGGTTTG  
 ATTTTCATCT TCAAATGTAT GCTATTTTGA CAAAGAATTT TGAAAGTTTG ATAATTTTAC TATTCAACTA TCGTTATCTT  
 GTACATCTTA TAATCGAAAA CATATTTTAC TATACCATC CTTATAAATC AATCTATTAT CTTTCTAATA AAGATATGCC  
 AGGATTTTTT TTTTAAAT CAATAAATA TTGAGTTTAA TATGACATGA TTTTAAAGA ATTAGCTACT TCTTTATCT  
 TCTAAAAACA TTTCTGACAT CAGGTCAGT CTATAAAAT AATGAAATAA AAACCTTTGA TGATAAAAT CCCAAGAAAA  
 ATGGATGATA AAAATTGTTA AATGATGATG GTTAAACGGT AAAAAGTGTA GTTAAGTAAA TGTTTTATTC TTCCCTGTAA  
 TCTTTACTGG AAAGGAAATG C

(3) 「斑小粒系－1」の E-ACT/M-ACT-118 (しゅまり) 対立座領域

AGCTCGCCCA CCTCATTTTG AATGACATTC TTCATGGCTT GAAAATTTTT GTAAGTTTTT GGTATTGAC CATTGAAGAT  
 TCTCATGTAA ACTTTTATTT CTTACAAAAT TTAGAGTCTA AATTTTCCGT AACCCACTTA AGATTCTCCC AAAATTGCTA  
 CTGGAATTCA **CTTCGAGTCA TAATCCCTG CAAAAACGGG TTATATGGGT TTGATTTTCA TCTTCAAATG TATGCTATTT**  
**TGACAAAGAA TTTTGAAGTT TAATAATTTT** ACTATTCAAC TATCGTTATT TTGTACATTT TATAGTCCAA AACATATTTT  
 AATATACCCA TTGTTATAAA TCAATTAAAT TTCTAACAAA GATATGCCAG GATTTTTTTA AAAATCAAT AAAATGAGTT  
 TAATATGACA TGATTTTAA AGAATTAGCT ACTTCTTTTA TCTTCTAAAA ACATTTCTGA CATCAGGTCA CTGCTATAAA  
 ATTAATGAAA TAAAACTTT TGATGATAAA ATGCATCGAA AACATGGATA ATAAAAATTG TAAATGATG ATAATTTAAC  
 TGTCAAAAGT GTAGCTAAGT AAATGTTTTA TTCTTCCTGT AATCTTTACT GGAAAGGAAA TGCTATTCTT TTAATCTTTT  
 CAGATACACT TAGTC

(4) 「しゅまり」の E-ACT/M-ACT-118 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

CACACTTATT TCTTTTTCTG AATATTATGT CGTTTATTTT GGTATAGGA GCAAAATGGA AAAACCAATA TAGTTAAAGA  
 TGTCTTTTAT AAACGGAATT AGATGTTATT TGTCTATGTT TTATAAAGAA TTCAAGTTT TGTTTATGAT TGAATAGTA  
**GTCCCGTGA TTATTCCTTA TTTTGTAGTC TTTATGTAAG GGATATATCT TATATATTCA GGTTCATCT TAAATGATAA**  
 ATCTTTTTTT TATTTTTCTT TTAGTTCTAT GTTCTTTTAT AAGAAAAATG TCTAAAACCTT GCAATTTTTT TTATTATTAT  
 AAACTTTAC GTTAAAAATA ATAATCCAAA TGAATTTATG AACTCCAATT TCAAAATAAC TCCATAAATT GAATAGTTAG  
 TCACATTAAT ATATCAAAAT TTACTTAAAT AAATGGAGAA GATATGTCTT ATTCAATATA GTTTCGTTTT TTAAGCATAA  
 TATTAACCTA TCCTTATCTA TTTTTTCTGA ACACATTTAG ATTGAAATAA CATTTAAAGT ATATCACCTA ATATTTAAAT  
 TTTAAATAT AATTGAGAAA AGTAATTAAA TGATGTTAAG ATGAAAACAG AACAAAC

(5) 「斑小粒系－1」のE-AAG/M-GAT-126とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

CACACTTATT TCTTTTTCTG AATATTATGT CGTTTATTTT GGTATAGGA GCAAAATGGA AAAACCAATA TAGTTAAAGA  
 TGTCTTTTAT AAACGGAATT AGATGTTATT TGTCTATGTT TTATAAAGAA TTCAAGTTT TGTTTATGAT TGAATAGTA  
 GTCCCGTGA TTATTCCTTA TTTTGTAGTC CCGGATATA TCTTATATAT TCAGGTCTA TCTTAAATGA TAAATCTTTT  
 TTTTATTTT CCTTAGTTC TATTTCTTT TATAAGAAAA ATATCTAAAA CTGCAATTT TTTTATTAT TATAAATTT  
 TACGTAAAA ATAATAATTC AAATGAATTT ATGAATCCA ATTTCAAAAT AACTCCATAA ATTGAATAGT TAGTCACATT  
 AATATATCAA AATTTACTTA AATAAATGGA GAAGATATGT CTATTCAAT ATAGTTTCGT TTTTAAAGCA TAATATTAAC  
 TTATCTTAT CTATTTTTTC TGAACACATT TAAATTGAAA TAACATTTAA AGTATATCAC CTAATATTTA AATTTTAAAA  
 TATAATTGAG AAAAGTAATT AAATGATGTT AAGATGAAAA CAGAACAAAC

(6) 「しゅまり」のE-AAG/M-GAT-126 (斑小粒系－1) 対立座領域

AGCTATTATT TAAAAAAGTT GAGATGAGTA ATGTCAAATA AAATGTTAAA ACGGATTTAG TGGTCATTGA ATGAAAATGT  
 TCTCTTTGGA CAACTGCAAA GTCAAAAAAC TCATTGACTC GGTGGTCGTT GAGCGTGTAT AAACGTAAAG AACACAACGA  
 ACGCATGGAT CGGTGGGAGA TGACAGTGTC TTCTATTGAC AGCGTCTGAA AAACGACAAC CTAGAAAAGC AATGACGTCA  
 ACAGTGTGGG GAGGCAATGA CATTGAAGGA GTGGAGGCAA CTACTCATTC GTGAAGTGAT ACATGATGCG TGGAAATGAAC  
 TTAAACAAGA GTGAAATTAG GGATTGAGAC AGTGATTTAA TAATTGTTAT AGACTGTTAT AGAATTATTT ATAGACTGAA  
 GTTTGTACA TTAATAAATA AGAAGTTACT TAAATAAAAA GAGATAATGT ATATCTTATT CATGAGAGTG TGGTTTCCTT  
 TTCTTCAAAC ATAATATTAA CTGTCTTAA ACTATTTCTT ATGAACAAAT TTAAATTTGA ATAGCATCTA AAATATATGA  
 CATAAATTTT TTTATTCATA TAAAAACAT TGTAAGGAA ATTTATAAAA AAAAATAATT AGAAGATAAA ATATAATAGA  
 GTGAATTGAA ATAAAAAAA TAAGATGATA CAAAGAATAA TAACATTATT TTAACAGAAT GACCTGGGAG AGAATGAAAT  
 ATAATACTTT AGAAATATGT ATTTGAGAAG GTTGAGAGTA CAAAAAGAAA AGAGTTCAAG ATAATAACA GAAAAAAT  
 CTACATCAA GATTCCTCAA ACACGATAAT TATTTGATGA AATTATTTTA TTCATGAGAT AATTCACCA ATGTTTCAA  
 TATTAGTTTA GAGTGTGGG ATAAGTTGA TAATGGACAT TTCAACGGTG AATATGCAAA CTTTAAAGTT AATACAAGAT  
 ACATCTTTTT CCTCTGCTAT GTTTAGGTT TTATCTATGT TTTCATATGT TTTGAATAA GATGTTGTAT TTTCTAGAT  
 TTTATAAAGA **ATTCATGTTT TTCTTTGTCA ATAGAATTAC AAGTCCGTG ATAATTTACT GGTTCATGATT TTCTTATT**  
**TTGTGGTTTT GATGTAAGGG ATATATCAAT GTGCTTTTAA** CATAAAAATT TACTCTTTTG AATATGTTCC CTGATAATAC  
 GTAGACCAA CACTCAAATT ATGTTTATC AAATTTATTG ACTTTGTTTT TCTGTTGAA ATATGATTTC ACAGTTTTTG  
 ACTAAATAAA AATTATATAT TCAAGTTCTA TCTTAAACGA ACCTTTTCTA TTTTACCTAT AGTTTTATTT TCTTTTATAA  
 GAAAAATAAC TATAACTTGT CGTGAGGTTT TTTTTATTG CAACTTTTA CATTAAAAAT AATAATCCAT ATGAAATTTA  
 TCAATCTCCA ATCTTAAAT AACTTCATA ATTAAGTTC GTCAGTCACA CATTAATATA TAAAAATTTG CGTAATAAAT  
 GGAGATAGTG TCTTATTCAA AACATAGTTT CATTTCTTTA AAGGTAATAT TAACTTATAT GCTTTACTAT TTCTTTTACA  
 CACATTTATA TTTTAATAAC ATCTAAAGTA TATCAACTCA TATTTAAAAAT ATAACGTAAG TAATAGATAA TGTTCATATG  
 TAAACGGAAC AACATAAGA TACAAATTTG GTTATTTTTT ATAAATTTAA TCAATATTA CATTATCAA ACGAGATTAT  
 CTAATCAGAC AAAACTTCGT GTCCATGATT AATATTAGAG GTTATAAATA TCAATTGAAT TGTACTAAAT AGTAAATAAA  
 TGTATTAAAT TAAAAATAG TTTGTGTTAA CTGAATTGAT CTAACTAAA TTAATTTTTG TTTTAATAAA CTGAGCT

(7) 「斑小粒系－1」のE-ATG/M-AAG-132とその周辺領域 (8)の対立座領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

AGCTTG CATA AGGACTGTAC CTGTATAATA AGTTGATTAT ATATAGCATA CGAAATTAC TTATTCTATC ACTAACTTT  
 AATTATATAC CTATAGATAT ATAATTTTGG ATAATTCAAT TGTAGCACAA GAATTGAATT ACAATGTTGT CTGATGTGAT  
 AATTCATTTT TTTTCGTAGG TTTTATCTAT GTTTTCTGAT GAATTAAAGG ATGAATCTTC TCCTTTCAC TGAATGCAAA  
 CTTTGAATT AACATGTGAT GCATCTTCCT CCTCTGCCAT GCCTCAGGAC GTAAAAAAT ATTTATTTGG TGCATCTTGT  
 TGATTTGATT TACATGGATG TGAAGGTAAG TTATACTAAA GTGTTTGT TTAAATATA AAAACAATTA TTTCTTTTTC  
 TGAATATTAT GATGTTTATT TTGATTATAG GAGCAAAACG GAAAACTAA TACCGTTGAA GATGAAATTG GATGTTGTAT  
 TTTTCTATGT TTTATAAGGA ATTCATGTTT TTGTTTCTGA ATAGGATAGT ATTCCCGGTG ATTATTCCTT GTTTCGTAGT  
 CTTGATGTAA GGGATATATC ATATATACTC AAGTTCTATC TTAAATGATA AATCTTTTTT ATTTTACCTA TAGTCTATG  
 TTCTTTTATA GGTAAATAC CTAAACTTG TTGTGATTTT TTTTATTAT AAACCTTTTAC GTTAAAAATA ATAATCCAAA  
 TGAATTTTGG TACTCCAATC CTAATAAAC TCCATAAGTT AAATTGTTAG TCACATTAAT ATTTAAAAAT TACTTAAAT  
 AAATGGAGAT GATGCTTAT TCCAGTTATA GTTTCGTTTT TAAGCATAAT ATTAACCTAT CCTTATCTAT TTCTCTGAA  
 CATATTTAAA TTTAAATAAC ATTTAAAAATA TATGATCTCA TATTTAAAAT ATAACAAAAC CAAAATATAC AAATTTTGTA  
 AAGGAAATTT ATAAAAAAA TAATTAGAAG GTAAAAATA ATAGAGTGAA TTGAAATAAA AAAAGATGA TACAAAGAAT  
 AATAACATTA TTTTAACAGA ATGACCGGG AGAGAAATGAA ATATAATACT TTAGAAATAT GTATTTGAGA AGGTTGAGAG  
 TACAGAAAGA AAAGAGTTCA AGATAATGAA CAGAAAAAAA TTCTACATCA AAGATTCTTC AAACAGATA ATTATTTGAT  
 GAAATTATTT TATTCATGAG ATAATTTTAC CAATGTTTTT AATATTAGTT TAGAGTGCA GGATAAGGTT GATAATGGAC  
 ATTTCAACGG TGAATATGCA AACTTTTAAAG TTAATACAAG ATATATCTTT TTCTCTGCT ATGTTTTAGG TTTTATCTAT  
 GTTTTCATAT GTTTTGAAT AAGATGTTGT ATTTTCTAG ATTTTATAAA **GAATTCATGT TTTTCTTGT CAATAGAATT**  
**AGAAGTCCGT TGATAATTTA CTGGTCATGA TTTTTCCTTA TTTTGTGGTT TTGATGTAAG GGATATATCA ATGTGCTTTT**  
**GCCTTTAA**CA TAAAAATTA CCTCTTTTGA ATATGTCCC TGATAATACG TAGCACCAAC ACTCAAATTA TGTTTTATCA  
 AATTTATTTA CTTGTGTTTT CTGTTAGAAA TATGATTTCA CAGTTTTTGA CTAAATAAAA ATTATATATT CAAGTTCTAT  
 CTAAACGAA CCTTTTCTAT TTTACCTATA GTTTTATTTT CTTTATAAG AAAATAACT ATAACCTGTT GTGAGGTTTT  
 TTTATTGCAA ACTTTTACAT TAAAAATAAT AATCCATATG AAATTGATCA ATCTCCAATC TTAATAAAC TTCGTAAATT  
 AAAGTTCGTC AGTCACACAT TAATATATAA AAATTTGCGT AATAAATGGA GATAGTGTCT TATTCAAAAC ATAGTTTCAT  
 TTCTTTAAAG GATATATTAA CTTATATGCT TTACTATTTT TTTTACACAC ATTTATATTT TAATAACATC TAAAGTATAT  
 CAACTCATAT TAAAAATATA ACATAAGTAA TAGATAATGT TCATATGTAA ACGGAACAAA CATAAGATAC AAATTTGGTT  
 ATTTTTTATA AATTAAATCA AATATTACAT TAATCAAATG AGATTATCTA ATCAGACAAA ACTTGGTGTC CATGATTAAT  
 ATTAGAGGTT ATAAATATCA ATTGAATTGT ACTAAATAGT AAATAAATGT ATTAATTTAA AAAATAGTTT GTCTGAATTG  
 ATCTGAACATA AATTAATTTT TGTTTAAATA AACTGAATAT AACTATTATT CAACTTAAA ATAATTCAT AAATTAACATA  
 ACTACGTAGT TAATCATAGT TAGTTAAATA TGATTAAGTA ATTACATTTA GTTAATCGTG ATTAGTTGGT TAGCT

(8) 「しゅまり」の E-ATG/M- GAG -138 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

CAATTCACA TTGCATTGAG TTCTGAATTG TACTTTTCAA GTTACCTGAT CCAAAGAGTT GGACATTTAG ATCTCTACAA  
 GGAGGAGTTC ACACCTTTTT TCACCAACAT TTCTCTCGTT ACTGATGGCT TATTTTGAGT GAATTTAAGA AGATTGAAA  
 ATAAATTTTT TTATTGTTTA TTGAGTGAA TTTGGAGATA AATGATAGTG AATTTGGAAA TAAATTTTTT TAATTTATCA  
 CGTCAATACA ATTCTATACT AATTCTCATA AATTTTATTT TCAAATTCAT TCTCATTTAC TTTAAATTTA CTCAAATAAA  
 CGATAAAAAA AATTATCTT CGAATTCCT CTAAGAACA ATACCTACGG ATTTCAAAT CAAAGCCTTG CTGGTCCCA  
 ACTTCTGTTT AAATATTGAA TCAGTTTTTA TCTTTATCAG TTTCTTAATA TTGGTTTACT GATCATATAA GCTCAGTCTA  
 ATTACATAAA AAAAATTGAC ATTATTCTCT GAAAAAAT TTAACTTTAA GATAAGTTAA CGAATCTTTG TCTTTATATA  
 GTATTCAACT TTTTATTTT ATCTTACTTT TTTATTTTAT CTTACGTGAG ATTTAAATTT ACCTTAAAA TTCTAACACT  
 GTACAACAAGA AATTATGAA GGAACCTTGA AGGTATGGAG CAAGCTGAAC TTGAAAAAC TAGGAATATA TTTCTGATG  
 TTAATTTCTT TTATGATGAA ATACCAAAAA GCTTCGGTTT TAGATTATAT TTTGTTTACC CAGAATTTCT AACATAGTTG  
 ACATTCTGGA GTATTTACTT TACCTTAAGC ACCATCATT CAGAATCCA AAGCTGTTGA AGTTGGATAC AAAGGAGAAA  
 CAGATCGATG ATGATTCTGT ACGGAAATCT TGTTCGTGTG AAACAGACGA AAGCAAAATC ATAGATGATT TGG

(9) 「斑小粒系－1」のE-ACA/M-GAA-139（しゅまり）対立座領域

TATAAATTAC AATTTACAT TGCATTGAGT TCTGAATTGT ACTTTTCAAG ATACCTGATC CAAGGAGTTG GACATTTAGA  
 TCTCTACAAG GAGGAATTCA CACCTTTTCT TACCAACATT TCTCTCTATA CTAAGGGTTT CAAAATCGAA GCCTAGCTTG  
 GTCCCAACTT CTGTTCAAAT ATTGAATCAG TTTTATCTT TATGAGTTTC TTAATATTGG TTTACTGATC ATATAAGCTG  
 ACTCCAATTA CATAAAAAAT TGAATTTGA CACTATTTTC TGTAACAAAA ATTAATTTTA AGATAAGTTA ATAGATCTTC  
 ACTTTATATA TAGTATTCAA CTTTTCATT TTATCTTACG TGAGATTTAA ATTTACACTT GAAATTCCAA CACTGTCAAC  
 AAGAAATTTA TGAAGGAACT TTGAAGGTGA TGGAGCAAGC TGAACCTGAA AAAACTAGGA ATATATTTTC TGATGTTAAA  
 TTCTCTTATG ATCAAATACC AAAAAGCTTC GGTTTTAGAT TATATTTTGT TCACCCAGAA TTTCTAACAT ACTTGACATT  
 CTGGAGTATT TACTTTACCT TAAACACCAT CATTCOAAGA ATCCAAAGCT ATTGAAGTTG GATACAAAGG AGAAACAGAT  
 CGATGATGAT TCTGTACAGA AATCTTGTTT GTGTGAAACA GACGAAAGCA AAATCATAGA TGATTTGG

(10) 「しゅまり」のE-ACA/M-GAA-139とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

図2-2-3 「斑小粒系－1」および「しゅまり」の AFLP 増幅断片およびその周辺領域の塩基配列

表 2-2-3 AFLP 増幅断片周辺配列を用いて設計した DNA マーカー

| マーカー名 | プライマー  |         | 塩基配列 (5'-3')                 | アニーリング温度 (°C) |
|-------|--------|---------|------------------------------|---------------|
| Pg77  | Pg77F  | Forward | CCAAAGTAGAAAATAAGGAAACAGTAC  | 60            |
|       | Pg77R  | Reverse | ATGGTTGTGAATTTATGTGTGAATC    | 62            |
| Pg118 | Pg118F | Forward | GGAATTCACCTCGAGTCATAATTC     | 61            |
|       | Pg118R | Reverse | AACATTTACTTAGCTACACTTTTGACA  | 60            |
| Pg126 | Pg126F | Forward | GTCGTTTATTTTGGTTATAGGAGCA    | 62            |
|       | Pg126R | Reverse | CCTGAATATATAAGATATATCCCGGGAC | 64            |
| Pg138 | Pg138F | Forward | GGGATATATCAATGTGCTTTTGCTC    | 65            |
|       | Pg138R | Reverse | GTGTGACTGACGAACCTTAATTTAC    | 59            |
| Pg139 | Pg139F | Forward | CTTACCAACATTTCTCTCTATACTAAG  | 56            |
|       | Pg139R | Reverse | GGATTCTTGGGAATGATGGTGT       | 62            |

(注) すべて抵抗性型 (しゅまり型) が増幅される優性マーカー

表 2-2-4 斑小粒系-1/しゅまり F<sub>3</sub> 個体におけるアズキ落葉病菌レース 1 抵抗性と遺伝子型 (抜粋)

| 系統名       | 落葉病菌レース 1<br>抵抗性 | DNA マーカーによる遺伝子型 |       |       |      |       |
|-----------|------------------|-----------------|-------|-------|------|-------|
|           |                  | Pg139           | Pg118 | Pg126 | Pg77 | Pg138 |
| 0125-1-1  | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-1-4  | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-1-6  | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-1-10 | R                | +               | +     | +     | +    | +     |
| 0125-1-12 | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-4-5  | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-4-8  | R                | +               | +     | +     | +    | +     |
| 0125-4-11 | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-4-12 | R                | +               | +     | +     | +    | +     |
| 0125-6-57 | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-6-59 | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-6-60 | S                | —               | —     | —     | —    | —     |
| 0125-6-61 | S                | —               | —     | +     | +    | +     |
| 0125-6-62 | S                | —               | —     | —     | —    | —     |

注 1) 調査した 105 系統から抜粋。ヘテロ型の系統は感受性を示した個体から DNA を抽出した。

注 2) R: 抵抗性 S: 感受性

注 3) +: 「しゅまり」(抵抗性) 型 —: 「斑小粒系-1」(感受性) 型

次にすでにアズキ落葉病の抵抗性評価が行われている品種および遺伝資源についてDNA マーカーで遺伝子型を調査した。アズキ落葉病菌レース2にも抵抗性を示す「Acc259」「赤豆」以外はすべてPg118, Pg77, Pg126, Pg138の遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性の表現型が一致

した(表2-2-5)。Pg139は品種によっては「しゅまり」と同じ遺伝子型でも感受性を示すものがみられた。また抵抗性遺伝資源である「小長品-10」およびその後代は、Pg139では「斑小粒系-1」型の遺伝子型を示した。

表2-2-5 品種および遺伝資源のアズキ落葉病菌レース1抵抗性と遺伝子型

| 品種         | 落葉病菌レース1<br>抵抗性 | DNA マーカーによる遺伝子型 |       |       |      |       | 抵抗性供与親   |
|------------|-----------------|-----------------|-------|-------|------|-------|----------|
|            |                 | Pg139           | Pg118 | Pg126 | Pg77 | Pg138 |          |
| 斑小粒系-1     | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| 剣先         | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| 茶殻早生       | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| 早生円葉       | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| 早生大粒       | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| 高橋早生       | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| 黒小豆(岡山)    | R               | +               | +     | +     | +    | +     |          |
| 円葉(刈63号)   | R               | +               | +     | +     | +    | +     |          |
| 小長品-10     | R               | —               | +     | +     | +    | +     |          |
| 赤豆         | R               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| Acc259     | R               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| 宝小豆        | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| 光小豆        | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| 寿小豆        | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| 栄小豆        | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| ハヤテショウズ    | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| エリモショウズ    | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| ハツネショウズ    | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| サホロショウズ    | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| アケノワセ      | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| きたのおとめ     | R               | +               | +     | +     | +    | +     | 円葉(刈63号) |
| しゅまり       | R               | +               | +     | +     | +    | +     | 黒小豆(岡山)  |
| 早生大納言      | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| 暁大納言       | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| アカネダイナゴン   | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| ベニダイナゴン    | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| カムイダイナゴン   | S               | —               | —     | —     | —    | —     |          |
| ほくと大納言     | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| とよみ大納言     | R               | —               | +     | +     | +    | +     | 小長品-10   |
| ときあかり      | R               | +               | +     | +     | +    | +     | 黒小豆(岡山)  |
| ホッカイシロショウズ | S               | +               | —     | —     | —    | —     |          |
| きたほたる      | R               | +               | +     | +     | +    | +     | 円葉(刈63号) |

注1) R:抵抗性 S:感受性

注2) +:「しゅまり」(抵抗性)型 —:「斑小粒系-1」(感受性)型

## 考 察

異なる  $F_3$  系統由来の 105 個体の遺伝子型と表現型は 1 個体を除いてすべて一致していた (表 2-2-4) ことから, すべてのマーカーが *Pga1* と 1cM 以内で連鎖していると考えられた. また, 5 つのマーカーの中では Pg118, Pg139 が *Pga1* により近い位置に座乗していると推察された.

表 2-2-5 の結果から, 開発した DNA マーカーによる遺伝子型は, 「黒小豆 (岡山)」に加えて, これまでアズキ落葉病抵抗性遺伝資源として多用されてきた「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」およびその後代にも適用可能であると考えられた.  $F_3$  系統の結果では Pg118, Pg139 が *Pga1* により近いと考えられたが, Pg139 は「小長品-10」や複数の感受性品種において遺伝子型と抵抗性型が一致しなかったことから, 抵抗性遺伝子に最も近く, 「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」についても適用可能な Pg118 が育種選抜において最も適した DNA マーカーであると考えられた.

千葉ら (1982) は「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」についても「黒小豆 (岡山)」と同様にアズキ落葉病抵抗性に優れた遺伝資源であることを報告しており, これらを系譜にもつ「きたのおとめ」「とよみ大納言」「きたほたる」についても Pg118 の遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性が一致したことから, 「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」は「しゅまり」や「黒小豆 (岡山)」と同様の抵抗性遺伝子 *Pga1* を有する可能性が高いと考えられた.

一方でアズキ落葉病レース 1 抵抗性である「赤豆」および「Acc259」は, 開発した DNA マーカーによる遺伝子型と表現型が一致しなかった. これら 2 品種は「きたのおとめ」「しゅまり」などが侵されるアズキ落葉病菌レース 2 に対して抵抗性を示す (藤田 2007) ことから, *Pga1* 以外の抵抗性遺伝子を持っている可能性が高いため, 遺伝子型と表現型が一致しなかったと考えられた.

### 第 3 節 Pg118 の共優性化と有効性の検証

#### 目 的

品種改良を行う際は, アズキ落葉病感受性ホモ接合型およびヘテロ接合型の個体を廃棄するために用いることが想定されることから, 育種選抜に最も適した DNA マーカーと考えられる Pg118 を共優性マーカーに改良する. また, 改良した共優性マーカーについて, 育成系統および遺伝資源を利用してその有効性を検証する.

## 材料および方法

### (1) DNA マーカーの共優性化

道総研では, アガロースベースの DNA マーカーはすべての作物において 2% アガロースゲルで同じ程度の泳動距離で確認できるよう, 短い増幅断片が 200 から 400bp, 長い増幅断片が 500 から 700bp 程度になるように設計している. 第 2 節と同様の方法で複数のプライマーを設計し, 様々な組み合わせで PCR を行い, 感受性型が短い断片, 抵抗性型が長い断片となり, ヘテロ型の個体で二本の増幅断片が同じ濃さとなるプライマーを選定した.

### (2) 育成系統および遺伝資源を用いた有効性の検証

アズキ落葉病圃場検定に供試した 150 点の育成系統について, 遺伝子型と表現型を調査した. また十勝農試の遺伝資源における過去の成績より, アズキ落葉病抵抗性の可能性がある 209 点について, Pg118 の遺伝子型を調査した. 「しゅまり」型を示した遺伝資源を選抜し, アズキ落葉病菌レース 1 菌株に加え, レース 2 菌株 (T96-5, MAFF 241057), レース 3 菌株 (T650, MAFF 241055) を第 1 節と同様の手法で接種し, 抵抗性検定をおこなった.

## 結 果

「しゅまり」と「斑小粒系-1」の E-ACT/M-ACT-118 およびその周辺領域のホモロジー, 設計したプライマーの位置を図 2-3-1 に示した. Pg118-15 をフォワードプライマーとした場合, 様々なリバースプライマーを利用しても「斑小粒系-1」が増幅しなかったことから, 「しゅまり」型を特異的に増幅させるプライマーとした. Pg118-21 は「斑小粒系-1」型を特異的に増幅させるプライマー, Pg118-12 を共通プライマーとした (表 2-3-1).

Pg118 共優性マーカーの電気泳動写真を示した (図 2-3-2). 小豆サンプルから DNA を抽出するまでに数時間, DNA を増幅し電気泳動を行い図 2 のように遺伝子型を確認するまで約 4 時間で作業可能となった.

|     |     |                                                                     |     |
|-----|-----|---------------------------------------------------------------------|-----|
|     |     | <b>Pg118-15</b>                                                     |     |
| Syu | 1   | AGCTCGCCACCTCATTTTGAATGACATTCTTCATGGCTTGAAATTTTGTAAAGTTTTT          | 60  |
| Bu  | 0   |                                                                     | 0   |
| Syu | 61  | GGTATTCGACCATTGAAGATTCTCATGTAAACTTTTATTTCTTACAAAATTTAGAGTCTA        | 120 |
| Bu  | 0   |                                                                     | 0   |
| Syu | 121 | AATTTTCCGTAACCCACTTAAGATTCTCCCAAATTGCTACTG                          | 180 |
| Bu  | 1   | TCCGTAACCCACTTAAGATTCTCCCAAATTGCTAGTGGGAATTGAC - - -                | 51  |
|     |     | <b>EcoRI site</b> <b>Pg118F</b>                                     |     |
| Syu | 181 | TAATTCCTGCAAAAACGGGTATATGGGTTTGATTTTCATCTTCAAATGTATGCTATTT          | 240 |
| Bu  | 52  | - - - TGCCTGCAAAAACGGGTATATGGGTTTGATTTTCATCTTCAAATGTATGCTATTT       | 107 |
|     |     | <b>MseI site</b>                                                    |     |
| Syu | 241 | TGACAAAGAATTTTG - AAGTTTAA                                          | 299 |
| Bu  | 108 | TGACAAAGAATTTTGAAAGTTTGATAATTTTACTATTCAACTATCGTTATCTTGACATC         | 167 |
| Syu | 300 | TTATAGTCCAAAACATATTTTAAATATACCCATTGTTATAAATCA - - - ATTAAGTTTCTA    | 355 |
| Bu  | 168 | TTATAATCGAAAACATATTTTACTATACCCATCCTTATAAATCAATCTATTATCTTTCTA        | 227 |
| Syu | 356 | ACAAAGATATGCCAGGA - - TTTTTTTAAAAAATCAATAAAA - - - TGAGTTTAATATGACA | 410 |
| Bu  | 228 | ATAAAGATATGCCAGGATTTTTTTTTTTTAAAAATCAATAAAAATATTGAGTTTAATATGACA     | 287 |
| Syu | 411 | TGATTTTTTAAAGAATTAGCTACTTCTTTTATCTTCTAAAAACATTTCTGACATCAGGTCA       | 470 |
| Bu  | 288 | TGATTTTTTAAAGAATTAGCTACTTCTTTTATCTTCTAAAAACATTTCTGACATCAGGTCA       | 347 |
| Syu | 471 | CTGCTATAAAATTAATGAAATAAAAACTTTTGATGATAAAATGCATCGAAAACATGGATA        | 530 |
| Bu  | 348 | CTGCTATAAAATTAATGAAATAAAAACTTTTGATGATAAAATCCCAAGAAAAATGGATG         | 407 |
|     |     | <b>Pg118R</b>                                                       |     |
| Syu | 531 | ATAAAAATTGTAAAATGATGATAATTTAAC                                      | 590 |
| Bu  | 408 | ATAAAAATTGTAAATGATGATGGTTTAAACGGTAAAAAGTGTAGTTAAGTAAATGTTTTA        | 467 |
|     |     | <b>Pg118-12</b>                                                     |     |
| Syu | 591 | TTCTT - CCTGTAATCTTTACTGGAAAGGAAATGCTATTCTTTTAAATCTTTTCAGATACAC     |     |
| Bu  | 468 | TTCTTCCCTGTAATCTTTACTGGAAAGGAAATGC                                  |     |

図2-3-1 AFLP断片E-ACT/M-ACT-118およびその周辺領域の「しゅまり」(Syu)と「斑小粒系-1」(Bu)の塩基配列  
 \*は「しゅまり」「斑小粒系-1」が同じ塩基であるもの、-は欠失配列を示す。  
 灰色部分がAFLP断片、太線矢印で示した部分が今回作成した共優性プライマーの位置。  
 Pg118F, Rは表2-2-3で利用した優性マーカーのプライマー位置。

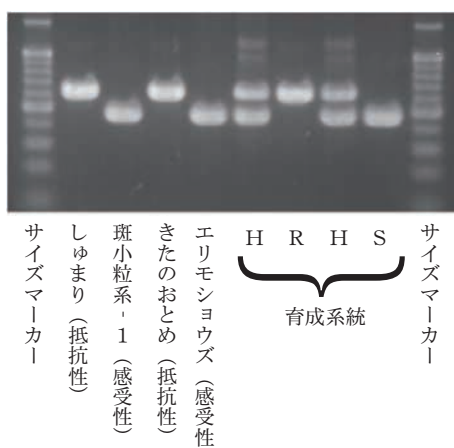
表 2-3-1 Pg118 の共優性マーカー配列および PCR 条件

## (1) 共優性マーカー配列

| プライマー            | 塩基配列 (5'-3')               | アニーリング温度 (°C) |
|------------------|----------------------------|---------------|
| Pg118-15 Forward | AGCTCGCCACCTCATTT          | 64.0          |
| Pg118-21 Forward | AAAATTGCTAGTGGAATTGACTG    | 60.0          |
| Pg118-12 Reverse | GCATTTCTTTCCAGTAAAGATTACAG | 64.0          |

## (2) PCR 条件

| 反応液組成          |           |         | PCR 条件         |      |         |
|----------------|-----------|---------|----------------|------|---------|
| D.W.           | 7.38      | μl      | 94°C           | 2 分  | 1 サイクル  |
| 10 × Buffer    | 1.00      | μl      | 94°C           | 30 秒 | 35 サイクル |
| dNTPs          | 0.80      | μl      | 55°C           | 30 秒 |         |
| プライマー Pg118-15 | 20pmol/μl | 0.10 μl | 72°C           | 2 分  |         |
| プライマー Pg118-21 | 20pmol/μl | 0.10 μl | 72°C           | 5 分  | 1 サイクル  |
| プライマー Pg118-12 | 20pmol/μl | 0.10 μl | 2 % アガロースで電気泳動 |      |         |
| ExTaq          |           | 0.03 μl |                |      |         |
| DNA テンプレート     |           | 0.50 μl |                |      |         |
| total          |           | 10.0 μl |                |      |         |

図 2-3-2 Pg118 (*Pga1* の有無を判定する DNA マーカー) を利用した検定結果

R: 「しゅまり」(抵抗性) 型 H: ヘテロ型

S: 「斑小粒系-1」(感受性) 型

圃場においてアズキ落葉病菌レース 1 抵抗性を調査した 150 の育成系統について、本試験で設計した DNA マーカーによる遺伝子型を調査した (表 2-3-3)。開発した 5 マーカーの中で、Pg118 の遺伝子型はほぼすべての抵抗性検定結果と一致した。遺伝子型が「斑小粒系-1」型だが、アズキ落葉病菌レース 1 に対して抵抗性を示した「十系 859 号」「十系 860 号」「十系 883 号」

「9707-79」「9930-4」「9931-55」の 6 系統、および遺伝子型が「しゅまり」型だが、アズキ落葉病菌レース 1 に対して感受性を示した「9715-34」「9718-2」の 2 系統、計 8 系統では抵抗性と遺伝子型が一致しなかった。

供試した遺伝資源 209 点の Pg118 による遺伝子型を表 2-3-4 に示した。遺伝子型が「しゅまり」型の品種・系統は 59 点あった。

表2-3-3 育成系統のアズキ落葉病抵抗性と遺伝子型

| 番号 | 系統名     | アズキ落葉病<br>レース1抵抗性 | Pg118の<br>遺伝子型 | 系譜にある抵抗性親                      |
|----|---------|-------------------|----------------|--------------------------------|
| 1  | 十育 123号 | 抵抗性               | R              | 小長品 -10                        |
| 2  | 十育 126号 | 感受性               | S              | なし                             |
| 3  | 十育 147号 | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、小長品 -10              |
| 4  | 十育 148号 | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、小長品 -10              |
| 5  | 十育 149号 | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 6  | 十育 150号 | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 7  | 十育 151号 | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 8  | 十育 152号 | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、小長品 -10、丸葉 (刈 68)、赤豆 |
| 9  | 十育 153号 | 抵抗性               | R              | 小長品 -10                        |
| 10 | 十育 154号 | 抵抗性               | R              | 小長品 -10                        |
| 11 | 十系 793  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 12 | 十系 794  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 13 | 十系 811  | 抵抗性               | R              | 小長品 -10、Acc86                  |
| 14 | 十系 817  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、赤豆                   |
| 15 | 十系 819  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、赤豆                   |
| 16 | 十系 821  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、赤豆          |
| 17 | 十系 829  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、赤豆                   |
| 18 | 十系 835  | 抵抗性               | R              | 小長品 -10                        |
| 19 | 十系 837  | 抵抗性               | R              | 小長品 -10                        |
| 20 | 十系 838  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、丸葉 (刈 68)   |
| 21 | 十系 839  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、丸葉 (刈 68)   |
| 22 | 十系 840  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、丸葉 (刈 68)   |
| 23 | 十系 841  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 24 | 十系 843  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 25 | 十系 844  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、小長品 -10、Acc86        |
| 26 | 十系 845  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 27 | 十系 847  | 抵抗性               | R              | 小長品 -10                        |
| 28 | 十系 848  | 抵抗性               | R              | 小長品 -10                        |
| 29 | 十系 849  | 抵抗性               | R              | 黒小豆 (岡山)                       |
| 30 | 十系 850  | 抵抗性               | R              | 黒小豆 (岡山)                       |
| 31 | 十系 851  | 抵抗性               | R              | 黒小豆 (岡山)                       |
| 32 | 十系 852  | 抵抗性               | R              | 黒小豆 (岡山)                       |
| 33 | 十系 853  | 感受性               | S              | なし                             |
| 34 | 十系 854  | 感受性               | S              | なし                             |
| 35 | 十系 855  | 感受性               | S              | なし                             |
| 36 | 十系 856  | 感受性               | S              | なし                             |
| 37 | 十系 857  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、Acc1238    |
| 38 | 十系 858  | 抵抗性               | R              | 黒小豆 (岡山)、Acc259                |
| 39 | 十系 859  | 抵抗性               | S              | 黒小豆 (岡山)、Acc259                |
| 40 | 十系 860  | 抵抗性               | S              | 黒小豆 (岡山)、Acc259                |
| 41 | 十系 861  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 42 | 十系 862  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 43 | 十系 863  | 抵抗性               | R              | 黒小豆 (岡山)                       |
| 44 | 十系 864  | 抵抗性               | R              | 黒小豆 (岡山)                       |
| 45 | 十系 865  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 46 | 十系 866  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 47 | 十系 867  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)                      |
| 48 | 十系 868  | 抵抗性               | R              | 黒小豆 (岡山)                       |
| 49 | 十系 869  | 感受性               | S              | なし                             |
| 50 | 十系 870  | 抵抗性               | R              | 円葉 (刈 63)、Acc238               |

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型

表 2-3-3 つづき

| 番号  | 系統名      | アズキ落葉病<br>レース 1 抵抗性 | Pg118 の<br>遺伝子型 | 系譜にある抵抗性親                      |
|-----|----------|---------------------|-----------------|--------------------------------|
| 51  | 十系 872   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆 |
| 52  | 十系 873   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆 |
| 53  | 十系 874   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、赤豆                   |
| 54  | 十系 875   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、赤豆                   |
| 55  | 十系 876   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 56  | 十系 877   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 57  | 十系 878   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 58  | 十系 879   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 59  | 十系 880   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)、赤豆          |
| 60  | 十系 881   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 61  | 十系 882   | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)、Acc259                |
| 62  | 十系 883   | 抵抗性                 | S               | 黒小豆 (岡山)、Acc259                |
| 63  | 十系 884   | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)、Acc2515               |
| 64  | 十系 888   | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、Acc1238              |
| 65  | 9707- 2  | 感受性                 | S               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 66  | 9707- 12 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 67  | 9707- 19 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 68  | 9707- 20 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 69  | 9707- 35 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 70  | 9707- 39 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 71  | 9707- 50 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 72  | 9707- 51 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 73  | 9707- 79 | 抵抗性                 | S               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 74  | 9707- 96 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 75  | 9710- 3  | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、小長品 -10              |
| 76  | 9710- 7  | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、小長品 -10              |
| 77  | 9710- 17 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、小長品 -10              |
| 78  | 9714- 1  | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 79  | 9714- 10 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 80  | 9714- 12 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 81  | 9714- 14 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 82  | 9714- 21 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 83  | 9714- 39 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 84  | 9715- 22 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 85  | 9715- 34 | 感受性                 | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 86  | 9715- 64 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 87  | 9716- 16 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 88  | 9716- 36 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 89  | 9716- 42 | 感受性                 | S               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 90  | 9716- 48 | 抵抗性                 | R               | 黒小豆 (岡山)                       |
| 91  | 9718- 1  | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 92  | 9718- 2  | 感受性                 | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 93  | 9721- 7  | 感受性                 | S               | なし                             |
| 94  | 9721- 18 | 感受性                 | S               | なし                             |
| 95  | 9721- 21 | 感受性                 | S               | なし                             |
| 96  | 9721- 23 | 感受性                 | S               | なし                             |
| 97  | 9722- 18 | 感受性                 | S               | 円葉 (刈 63)                      |
| 98  | 9722- 39 | 抵抗性                 | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 99  | 9722- 47 | 感受性                 | S               | 円葉 (刈 63)                      |
| 100 | 9723- 1  | 抵抗性                 | R               | 小長品 -10                        |

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型

表2-3-3 つづき

| 番号  | 系統名      | アズキ落葉病<br>レース1 抵抗性 | Pg118 の<br>遺伝子型 | 系譜にある抵抗性親                      |
|-----|----------|--------------------|-----------------|--------------------------------|
| 101 | 9723- 6  | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 102 | 9723- 8  | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 103 | 9723- 11 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 104 | 9723- 25 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 105 | 9723- 26 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 106 | 9723- 35 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 107 | 9723- 40 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 108 | 9723- 44 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 109 | 9723- 56 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 110 | 9723- 60 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 111 | 9725- 14 | 感受性                | S               | なし                             |
| 112 | 9725- 47 | 感受性                | S               | なし                             |
| 113 | 9725- 51 | 感受性                | S               | なし                             |
| 114 | 9725- 56 | 感受性                | S               | なし                             |
| 115 | 9725- 68 | 感受性                | S               | なし                             |
| 116 | 9727- 2  | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 117 | 9727- 5  | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 118 | 9727- 7  | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 119 | 9727- 9  | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 120 | 9728- 1  | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 121 | 9728- 33 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 122 | 9728- 37 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 123 | 9801- 1  | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆 |
| 124 | 9801- 16 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆 |
| 125 | 9801- 29 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆 |
| 126 | 9801- 35 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆 |
| 127 | 9801- 43 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆 |
| 128 | 9801- 45 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10、赤豆 |
| 129 | 9802- 12 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、赤豆                   |
| 130 | 9802- 16 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、赤豆                   |
| 131 | 9802- 21 | 感受性                | S               | 円葉 (刈 63)、赤豆                   |
| 132 | 9806- 15 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 133 | 9806- 22 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 134 | 9808- 7  | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 135 | 9809- 10 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 136 | 9809- 17 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)、小長品 -10    |
| 137 | 9810- 3  | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 138 | 9810- 21 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 139 | 9810- 27 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)                      |
| 140 | 9814- 4  | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、丸葉 (刈 68)            |
| 141 | 9815- 14 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 142 | 9815- 16 | 抵抗性                | R               | 円葉 (刈 63)、黒小豆 (岡山)             |
| 143 | 9817- 5  | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 144 | 9817- 10 | 感受性                | S               | 小長品 -10                        |
| 145 | 9817- 13 | 感受性                | S               | 小長品 -10                        |
| 146 | 9817- 26 | 抵抗性                | R               | 小長品 -10                        |
| 147 | 9930- 4  | 抵抗性                | S               | 黒小豆 (岡山)、Acc259                |
| 148 | 9930- 14 | 抵抗性                | R               | 黒小豆 (岡山)、Acc259                |
| 149 | 9931- 15 | 抵抗性                | R               | 黒小豆 (岡山)、Acc2515               |
| 150 | 9931- 55 | 抵抗性                | S               | 黒小豆 (岡山)、Acc2515               |

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型

表 2-3-4 遺伝資源における Pg118 の遺伝子型

| 番号 | 品種・系統名                | Pg118 による<br>遺伝子型 | 番号  | 品種・系統名                  | Pg118 による<br>遺伝子型 |
|----|-----------------------|-------------------|-----|-------------------------|-------------------|
| 1  | ACC 9 岩手 1-48-1       | R                 | 56  | ACC 549 福島 3            | R                 |
| 2  | ACC 27 岩手 19-48-19    | R                 | 57  | ACC 550 福島 4            | S                 |
| 3  | ACC 30 岩手 22-48-22    | R                 | 58  | ACC 551 福島 5            | S                 |
| 4  | ACC 33 岩手 25-48-25    | R                 | 59  | ACC 552 福島 6            | S                 |
| 5  | ACC 35 岩手 27-48-27    | R                 | 60  | ACC 558 福島 12           | S                 |
| 6  | ACC 45 岩手 37-48-37    | R                 | 61  | ACC 564 福島 18           | R                 |
| 7  | ACC 66 岩手 58-54-20    | R                 | 62  | ACC 567 福島 21           | seg               |
| 8  | ACC 67 岩手 59-54-21    | seg               | 63  | ACC 614 福島 68           | R                 |
| 9  | ACC 68 岩手 60-54-22    | R                 | 64  | ACC 707 韓国 1            | S                 |
| 10 | ACC 69 岩手 61-54-23    | R                 | 65  | ACC 724 韓国 18           | S                 |
| 11 | ACC 86 岩手 78-54-40    | R                 | 66  | ACC 767 韓国 61           | S                 |
| 12 | ACC 91 岩手 83-54-45    | R                 | 67  | ACC 812 韓国 106          | S                 |
| 13 | ACC 95 岩手 87-54-49    | seg               | 68  | ACC 829 韓国 123          | S                 |
| 14 | ACC 136 岩手 128-54-90  | R                 | 69  | ACC 839 韓国 133          | S                 |
| 15 | ACC 151 岩手 143-54-105 | R                 | 70  | ACC 951 韓国ヒメツルアズキ 222*  | S                 |
| 16 | ACC 152 岩手 144-54-106 | R                 | 71  | ACC 1028 奈良 34          | R                 |
| 17 | ACC 159 岩手 151-54-113 | R                 | 72  | ACC 1056 岡山 10          | R                 |
| 18 | ACC 162 岩手 154-54-116 | R                 | 73  | ACC 1635 福井 24          | S                 |
| 19 | ACC 163 岩手 155-54-117 | R                 | 74  | ACC 1915 宮崎 9           | S                 |
| 20 | ACC 222 鳥取 1          | S                 | 75  | ACC 1937 宮崎ヤブツルアズキ 31*  | R                 |
| 21 | ACC 223 鳥取 2          | seg               | 76  | ACC 1974 鹿児島 3          | S                 |
| 22 | ACC 228 鳥取 5          | seg               | 77  | ACC 2041 新潟ヤブツルアズキ 115* | R                 |
| 23 | ACC 239 鳥取 16         | seg               | 78  | ACC 2042 新潟ヤブツルアズキ 116* | R                 |
| 24 | ACC 259 愛媛 9          | seg               | 79  | ACC 2043 新潟ヤブツルアズキ 117* | S                 |
| 25 | ACC 260 新潟 1          | seg               | 80  | ACC 2145 鳥取 51          | R                 |
| 26 | ACC 264 新潟 5          | seg               | 81  | ACC 2147 新潟 118         | S                 |
| 27 | ACC 273 長崎 1          | seg               | 82  | ACC 2161 新潟 124         | R                 |
| 28 | ACC 274 長崎 2          | seg               | 83  | ACC 2162 新潟 125         | seg               |
| 29 | ACC 275 長崎 3          | S                 | 84  | ACC 2186 奈良 38          | R                 |
| 30 | ACC 277 長崎 5          | seg               | 85  | ACC 2243 ネパールヤブツルアズキ    | R                 |
| 31 | ACC 278 長崎 6          | seg               | 86  | ACC 2262 ブータン 17        | —                 |
| 32 | ACC 279 長崎 7          | seg               | 87  | ACC 2295 ブータンヤブツルアズキ    | seg               |
| 33 | ACC 280 長崎 8- 大納言     | S                 | 88  | ACC 2311 ブータンヤブツルアズキ    | seg               |
| 34 | ACC 284 栃木 1          | S                 | 89  | ACC 2463 宮城ヤブツルアズキ 1*   | S                 |
| 35 | ACC 304 青森 15         | S                 | 90  | ACC 2464 茨城ヤブツルアズキ 1*   | R                 |
| 36 | ACC 333 青森 44         | seg               | 91  | ACC 2466 長崎ヒメツルアズキ 31*  | —                 |
| 37 | ACC 349 青森 60         | R                 | 92  | ACC 2467 韓国ヒメツルアズキ 403* | S                 |
| 38 | ACC 385 秋田 11         | R                 | 93  | ACC 2468 沖縄ヒナアズキ 1*     | —                 |
| 39 | ACC 388 秋田 14         | R                 | 94  | ACC 2470 沖縄ヒナアズキ 3*     | —                 |
| 40 | ACC 422 秋田 48         | R                 | 95  | ACC 2477 沖縄ヒナアズキ 10*    | —                 |
| 41 | ACC 424 秋田 50         | R                 | 96  | ACC 2479 沖縄ヒナアズキ 12*    | —                 |
| 42 | ACC 428 秋田 54         | seg               | 97  | ACC 2484 沖縄ヒナアズキ 17*    | —                 |
| 43 | ACC 436 秋田 62         | R                 | 98  | ACC 2486 沖縄ヒナアズキ 19*    | —                 |
| 44 | ACC 493 新潟 24         | S                 | 99  | ACC 2487 沖縄ヒナアズキ 20*    | S                 |
| 45 | ACC 501 新潟 32         | S                 | 100 | ACC 2488 沖縄ヒナアズキ 21*    | —                 |
| 46 | ACC 502 新潟 33         | R                 | 101 | ACC 2491 沖縄ヒナアズキ 24*    | —                 |
| 47 | ACC 506 新潟 37         | seg               | 102 | ACC 2497 沖縄ヒナアズキ 30*    | —                 |
| 48 | ACC 507 新潟 38         | R                 | 103 | ACC 2499 タイ竹小豆 2*       | S                 |
| 49 | ACC 509 新潟 40         | R                 | 104 | ACC 2502 タイ竹小豆 5*       | —                 |
| 50 | ACC 510 新潟 41         | R                 | 105 | ACC 2503 タイ竹小豆 6*       | S                 |
| 51 | ACC 511 新潟 42         | S                 | 106 | ACC 2514 滋賀ヤブツルアズキ 23*  | R                 |
| 52 | ACC 533 新潟 64         | S                 | 107 | ACC 2515 石川ヤブツルアズキ 59*  | S                 |
| 53 | ACC 534 新潟 65         | S                 | 108 | ACC 2516 石川ヤブツルアズキ 60*  | S                 |
| 54 | ACC 535 新潟 66         | seg               | 109 | ACC 2517 福井ヤブツルアズキ 27*  | S                 |
| 55 | ACC 542 新潟 73         | S                 | 110 | ACC 2518 大阪ヤブツルアズキ 5*   | R                 |

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型 seg:分離 —:増幅なし

表2-3-4 つづき

| 番号  |     |      |                    | Pg118 による<br>遺伝子型 | 番号  |    |     |                       | Pg118 による<br>遺伝子型 |
|-----|-----|------|--------------------|-------------------|-----|----|-----|-----------------------|-------------------|
| 111 | ACC | 2519 | 兵庫ヤブツルアズキ 105*     | R                 | 166 | 品保 | 472 | 清原春小豆                 | S                 |
| 112 | ACC | 2520 | 兵庫ヤブツルアズキ 106*     | S                 | 167 | 品保 | 475 | 江原錦豆                  | S                 |
| 113 | ACC | 2521 | 鳥取ヤブツルアズキ 56*      | S                 | 168 | 品保 | 483 | 慶州黒豆                  | S                 |
| 114 | ACC | 2522 | 鳥取ヤブツルアズキ 57*      | R                 | 169 | 品保 | 487 | 公州白豆                  | S                 |
| 115 | ACC | 2523 | 秋田ヤブツルアズキ 99*      | S                 | 170 | 品保 | 492 | Bosodu                | S                 |
| 116 | ACC | 2524 | 岩手ヤブツルアズキ 235*     | S                 | 171 | 品保 | 499 | Chungwon Hukdu        | S                 |
| 117 | ACC | 2526 | 福島ヤブツルアズキ 101*     | R                 | 172 | 品保 | 508 | Garonipat(Y.G.)       | S                 |
| 118 | ACC | 2525 | 栃木ヤブツルアズキ 15*      | R                 | 173 | 品保 | 509 | Garonipat (黒斑)        | S                 |
| 119 | ACC | 2527 | 長野ヤブツルアズキ 89*      | S                 | 174 | 品保 | 527 | Kyungbuk Janpat       | S                 |
| 120 | ACC | 2528 | 群馬ヤブツルアズキ 31*      | R                 | 175 | 品保 | 534 | Samjong Hukdu         | S                 |
| 121 | ACC | 2529 | 埼玉ヤブツルアズキ 12*      | R                 | 176 | 品保 | 535 | Sisun Hukdu           | S                 |
| 122 | ACC | 2531 | 静岡ヤブツルアズキ 28*      | R                 | 177 | 品保 | 538 | Yumseng Jekdu (赤斑)    | S                 |
| 123 | ACC | 2532 | 茨城ヤブツルアズキ 2*       | S                 | 178 | 品保 | 539 | Yumseng Jekdu (黒斑)    | S                 |
| 124 | ACC | 2533 | 福島ヤブツルアズキ 102*     | S                 | 179 | 品保 | 551 | ツルアズキ *               | S                 |
| 125 | ACC | 2534 | 高知ヤブツルアズキ 25*      | S                 | 180 | 品保 | 285 | 小納言 (刈 57 号)          | —                 |
| 126 | ACC | 2535 | 新潟ヤブツルアズキ 130*     | S                 | 181 | 品保 | 288 | 円葉 (刈 63 号)           | R                 |
| 127 | ACC | 2537 | 富山ヤブツルアズキ 30*      | S                 | 182 | 品保 | 289 | 丸葉 (刈 68 号)           | R                 |
| 128 | ACC | 2538 | 高知ヤブツルアズキ 26*      | R                 | 183 | 品保 | 375 | 小長品 -10               | R                 |
| 129 | ACC | 103  | 岩手在 95-54-57       | S                 | 184 | 品保 | 400 | 黒小豆 (岡山)              | R                 |
| 130 | ACC | 158  | 岩手在 150-54-112     | R                 | 185 | 品保 | 491 | Aansang Jekdu         | S                 |
| 131 | ACC | 195  | 岩手在 187- 県南在来      | S                 | 186 | 品保 | 525 | Kyungbuk Jekdu D      | S                 |
| 132 | ACC | 212  | 奈良在 5              | S                 | 187 | 品保 | 55  | 小豆 (W33)              | S                 |
| 133 | ACC | 261  | 新潟在 2              | S                 | 188 | 品保 | 187 | PHA-48                | S                 |
| 134 | ACC | 308  | 青森在 19             | R                 | 189 | 品保 | 188 | PHA-49                | S                 |
| 135 | ACC | 356  | 青森在 67             | S                 | 190 | 品保 | 189 | PHA-50                | S                 |
| 136 | ACC | 359  | 青森在 70             | S                 | 191 | 品保 | 190 | PHA-51                | S                 |
| 137 | ACC | 400  | 秋田在 26             | seg               | 192 | 品保 | 191 | PHA-51(1)             | S                 |
| 138 | ACC | 459  | 秋田在 85             | R                 | 193 | 品保 | 192 | PHA-52                | S                 |
| 139 | ACC | 593  | 福島在 47             | seg               | 194 | 品保 | 193 | PHA-53                | S                 |
| 140 | ACC | 595  | 福島在 49             | seg               | 195 | 品保 | 194 | PHA-55                | S                 |
| 141 | ACC | 597  | 福島在 51             | S                 | 196 | 品保 | 196 | PHA-57                | S                 |
| 142 | ACC | 700  | 青森在 87             | R                 | 197 | 品保 | 532 | Moonyui Jekdu         | S                 |
| 143 | ACC | 1014 | 奈良在 20             | seg               | 198 | 品保 | 547 | 張家口緑豆 *               | —                 |
| 144 | ACC | 1635 | 福井在 24             | S                 | 199 | 品保 | 548 | コウラ小豆 *               | —                 |
| 145 | ACC | 1915 | 宮崎在 9              | S                 | 200 | 品保 | 549 | 竹小豆 *                 | —                 |
| 146 | ACC | 1974 | 鹿児島在 3             | S                 | 201 | 品保 | 185 | WyR-8090              | S                 |
| 147 | ACC | 2790 | 中国 136             | S                 | 202 | 品保 | 317 | 花小豆 (刈 154 号)         | S                 |
| 148 | ACC | 2804 | 秋田在 105            | S                 | 203 | 品保 | 469 | 丹陽紅豆 (=Danyang Jekdu) | S                 |
| 149 | ACC | 2816 | 岩手在 252            | seg               | 204 | 品保 | 479 | 清風黒豆                  | S                 |
| 150 | ACC | 2818 | 中国 148             | S                 | 205 | 品保 | 494 | Bongyang Jekdu        | S                 |
| 151 | 品保  | 271  | 十育 118 号           | R                 | 206 | 品保 | 496 | Changnam Hukdu        | S                 |
| 152 | 品保  | 277  | ハツネショウズ            | S                 | 207 | 品保 | 500 | Chungpung Hukdu       | S                 |
| 153 | 品保  | 398  | 大黒 (島根)            | S                 | 208 | 品保 | 512 | Iseng Jekdu           | S                 |
| 154 | 品保  | 464  | 小豆 64-1 (韓国)       | S                 | 209 | 品保 | 517 | Jangju Hukdu          | S                 |
| 155 | 品保  | 490  | 赤豆                 | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 156 | 品保  | 501  | Chungju Jekdu      | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 157 | 品保  | 502  | Chungwon Bompat    | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 158 | 品保  | 503  | Deksan Jekdu A     | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 159 | 品保  | 504  | Deksan Jekdu B     | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 160 | 品保  | 505  | Dangyang Hukdu     | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 161 | 品保  | 506  | Dekreng Hukdu (赤斑) | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 162 | 品保  | 507  | Dekreng Hukdu (黒斑) | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 163 | 品保  | 209  | 土系 9 号             | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 164 | 品保  | 225  | 十系 323 号           | S                 |     |    |     |                       |                   |
| 165 | 品保  | 226  | 十系 325 号           | S                 |     |    |     |                       |                   |

注) R:「しゅまり」(抵抗性)型 S:「斑小粒系-1」(感受性)型 seg:分離 —:増幅なし

Pg118 の遺伝子型が「しゅまり」型で固定していた 59 の遺伝資源について、アズキ落葉病菌レース 1, 2, 3 を接種し抵抗性を調査した結果「Acc509」「Acc1937」

「Acc2243」はすべてのレースに対して感受性を示し、開発した DNA マーカーの遺伝子型と抵抗性の結果が一致しなかった（表 2-3-5）。

表 2-3-5 Pg118 の遺伝子型が「しゅまり」型の遺伝資源の落葉病接種検定結果

| 番号                     | アズキ落葉病接種検定結果 |       |       |
|------------------------|--------------|-------|-------|
|                        | レース 1        | レース 2 | レース 3 |
| Acc 9 岩手在 1-48-1       | R            | S     | R     |
| Acc 27 岩手在 19-48-19    | R            | S     | R     |
| Acc 30 岩手在 22-48-22    | R            | S     | R     |
| Acc 33 岩手在 25-48-25    | R            | S     | R     |
| Acc 35 岩手在 27-48-27    | R            | S     | R     |
| Acc 45 岩手在 37-48-37    | R            | S     | R     |
| Acc 66 岩手在 58-54-20    | R            | S     | R     |
| Acc 68 岩手在 60-54-22    | R            | S     | R     |
| Acc 69 岩手在 61-54-23    | R            | S     | R     |
| Acc 86 岩手在 78-54-40    | R            | S     | R     |
| Acc 91 岩手在 83-54-45    | R            | S     | R     |
| Acc 136 岩手在 128-54-90  | R            | S     | R     |
| Acc 151 岩手在 143-54-105 | R            | S     | R     |
| Acc 152 岩手在 144-54-106 | R            | S     | R     |
| Acc 159 岩手在 151-54-113 | R            | S     | R     |
| Acc 162 岩手在 154-54-116 | R            | S     | R     |
| Acc 163 岩手在 155-54-117 | R            | S     | R     |
| Acc 349 青森在 60         | R            | S     | R     |
| Acc 385 秋田在 11         | R            | S     | R     |
| Acc 388 秋田在 14         | R            | S     | R     |
| Acc 422 秋田在 48         | R            | S     | R     |
| Acc 424 秋田在 50         | R            | S     | R     |
| Acc 436 秋田在 62         | R            | S     | R     |
| Acc 502 新潟在 33         | R            | S     | R     |
| Acc 507 新潟在 38         | R            | S     | R     |
| Acc 509 新潟在 40         | S            | S     | S     |
| Acc 510 新潟在 41         | R            | S     | R     |
| Acc 549 福島在 3          | R            | S     | R     |
| Acc 564 福島在 18         | R            | S     | R     |
| Acc 614 福島在 68         | R            | S     | R     |

| 番号                     | アズキ落葉病接種検定結果 |       |       |
|------------------------|--------------|-------|-------|
|                        | レース 1        | レース 2 | レース 3 |
| Acc 1028 奈良在 34        | R            | S     | R     |
| Acc 1056 岡山在 10        | R            | S     | R     |
| Acc 1937 宮崎ヤブツルアズキ 31  | S            | S     | S     |
| Acc 2041 新潟ヤブツルアズキ 115 | R            | S     | R     |
| Acc 2142 新潟ヤブツルアズキ 116 | R            | S     | R     |
| Acc 2145 鳥取在 51        | R            | S     | R     |
| Acc 2161 新潟在 124       | R            | S     | R     |
| Acc 2186 奈良在 38        | R            | S     | R     |
| Acc 2243 ネパールヤブツルアズキ 1 | S            | S     | S     |
| Acc 2464 茨城ヤブツルアズキ 1   | R            | S     | R     |
| Acc 2514 滋賀ヤブツルアズキ 23  | R            | S     | R     |
| Acc 2518 大阪ヤブツルアズキ 5   | R            | S     | R     |
| Acc 2519 兵庫ヤブツルアズキ 105 | R            | S     | R     |
| Acc 2522 鳥取ヤブツルアズキ 57  | R            | S     | R     |
| Acc 2525 福島ヤブツルアズキ 101 | R            | S     | R     |
| Acc 2526 栃木ヤブツルアズキ 15  | R            | S     | R     |
| Acc 2528 群馬ヤブツルアズキ 31  | R            | S     | R     |
| Acc 2529 埼玉ヤブツルアズキ 12  | R            | S     | R     |
| Acc 2531 静岡ヤブツルアズキ 28  | R            | S     | R     |
| Acc 2538 高知ヤブツルアズキ 26  | R            | S     | R     |
| Acc 158 岩手在 150-54-112 | R            | S     | R     |
| Acc 308 青森在 19         | R            | S     | R     |
| Acc 459 秋田在 85         | R            | S     | R     |
| Acc 700 青森在 87         | R            | S     | R     |
| 品保 271 十育 118 号        | R            | S     | R     |
| 品保 288 円葉 (刈 63 号)     | R            | S     | R     |
| 品保 289 丸葉 (刈 68 号)     | R            | S     | R     |
| 品保 375 小長品 -10         | R            | S     | R     |
| 品保 400 黒小豆 (岡山)        | R            | S     | R     |

(注) R：抵抗性 S：感受性

## 考 察

育成系統における Pg118 の遺伝子型と表現型は、「黒小豆 (岡山)」以外の抵抗性遺伝資源を系譜にもつ系統についてもほぼ一致する結果となった (表 2-3-3)。遺伝子型が「斑小粒系-1」型でかつアズキ落葉病菌レース 1 に対して抵抗性を示した 6 系統のうち「十系 859 号」「十系 860 号」「十系 883 号」「9930-4」の 4 系統は「Acc259」を系譜にもち、「9931-55」は「Acc2515」を系譜にもつ。「Acc259」は、アズキ落葉病菌レース 1 に加えて、レース 2 に対しても抵抗性を示す遺伝資源で、藤田ら (2007) は「Acc259」の抵抗性も優性の 1 遺伝子座によって支配されていることを示唆していることから、「十系 859 号」「十系 860 号」「十系 883 号」「9930-4」は *Pgal* ではなく「Acc259」由来の抵抗性遺伝子を保持している可

能性が示唆された。また「Acc2515」も「Acc259」と同様にアズキ落葉病菌レース 1, 2 に対して抵抗性を示す (藤田 2007) ことから、「9931-55」についても *Pgal* 以外の抵抗性遺伝子を保持している可能性が高いと考えられた。「Acc259」「Acc2515」は、アズキ落葉病菌レース 2 抵抗性品種育成のため交配に利用されていることから、本系統については、抵抗性を判別できる DNA マーカーを開発する必要があると考えられた。一方で「9707-79」については主要なアズキ落葉病抵抗性遺伝資源は「黒小豆 (岡山)」以外にはなく、抵抗性検定のエスケープあるいは抵抗性遺伝子の極近傍で組み換えが生じている可能性が考えられた。

遺伝子型が「しゅまり」型でかつアズキ落葉病菌レース 1 に対して感受性を示した「9715-34」(9426F) (感受

性) × 十系 685 号 (抵抗性)), 「9718-2」 (十系 706 号 (感受性) × 十系 696 号 (抵抗性)) については, 「円葉 (刈 63 号)」が系譜にあり, 兄弟系統は遺伝子型と表現型が一致している。これら 2 系統については, 抵抗性検定試験あるいは DNA マーカーによる調査のエラーの可能性が高いが, 本試験は過去の検定試験によってすでに落葉病抵抗性が明らかとなっている系統のみを使用したことから, 再試験はおこなっておらず, どちらが要因なのかは明らかではない。しかし, 後述するように落葉病レース 2 抵抗性親を系譜にもつ小豆以外では, Pg118 の遺伝子型と接種試験の結果はすべて一致していたことから, 圃場による抵抗性検定試験において落葉病以外の何らかの要因で黄化あるいは落葉症状がみられたことから感受性と判定された可能性が高いと推察される。

十勝農試には約 3000 点のアズキ遺伝資源が保存されているが, これまで予備調査でアズキ落葉病抵抗性の可能性がある遺伝資源 209 点を絞り込み, Pg118 の有無でスクリーニングしたところ約 1/4 の 59 点が「しゅまり」型を示し, 3 系統をのぞいてすべて「しゅまり」と同様にレース 1, レース 3 に対して抵抗性を示した (表 2-3-4, 5)。本試験によって, 十勝農試の遺伝資源の中には, これまで抵抗性遺伝資源として利用されてきた「黒小豆 (岡山)」「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」「Acc86」以外にも同じ抵抗性をもつ遺伝資源が多数あることが明らかとなった。これまで「黒小豆 (岡山)」「小長品-10」「円葉 (刈 63 号)」などを交配に利用し, 長い年数をかけて落葉病抵抗性を維持しながら品質, 農業特性に優れた品種, 系統を育成してきたことから (村田ら 1998), 本試験で明らかとなった *Pga1* を有する遺伝資源を今後積極的交配に直接利用することはないと考えられるが, Pg118 は DNA マーカーを作成した「しゅまり」以外の抵抗性遺伝資源を系譜にもつ系統の選抜も可能であることが明らかとなり, 本試験で開発したマーカーがアズキ育種で広く利用できることが示された。

一方で, Pg118 の領域が DNA マーカーを開発した抵抗性親である「しゅまり」の塩基配列と類似している可能性がある「Acc509」「Acc1937」「Acc2243」を系譜にもつ育成系統は, 開発したマーカーでは遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性が一致しない場合が想定される。このような遺伝資源が系譜にある系統は, 本試験で開発した DNA マーカーは利用できないことから注意が必要である。本試験は, 効率的に抵抗性遺伝資源を探索するため, 約 3000 点ある遺伝資源の一部のみのマーカー検定を行い, その抵抗性を調査した。すべての遺伝資源を調査し, Pg118 の遺伝子型を示す遺伝資源を探索し, 接種検定を

行うことによって, 北海道のアズキ育種において本マーカーが適用できない遺伝資源をすべて明らかとすることが可能となる。さらにアズキ遺伝資源の中には日本の各地域由来, 韓国, 中国等の海外由来の在来種などもあることから, *Pga1* の起源が推測できる可能性も考えられる。今後の研究に期待したい。

#### 第 4 節 アズキ落葉病抵抗性育種における MAS (Marker assisted selection) の利用

##### 目 的

小豆育種の中で MAS を利用する世代について検討する。

##### 材料および方法

鈴木ら (2007) は小麦の顆粒性澱粉合成酵素遺伝子 (*Wx-B1*) の有無を調査する際に, 3 個体を混合して摩砕し下記 (2) の手法で抽出した DNA を利用すると, 育種現場で効率的に DNA マーカー検定ができることを示した。その事例を参考に, 発芽させたアズキの子葉 3 個体分を混合して抽出した DNA を用いて遺伝子型を判別した。

##### (1) 供試材料

小豆の系統育種では, 1 系統から 7 個体を選抜し, その中から 5 個体を選んで基本系統とする手法をとるため,  $F_6$  以降系統については, 各系統それぞれ 7 個体由来の種子を用いて検定した。また  $F_4$  世代で個体選抜を行い  $F_5$  世代で系統播種されることから,  $F_5$  世代は個体ごとに各 3 粒の種子を供試した。組合せについては表 2-4-1, 2-4-2 参照。

##### (2) DNA 抽出

簡易 CTAB 法で DNA を抽出した。手順を以下に示す。

- ① 2.2ml チューブに 5mm のステンレスビーズを一つ入れ, 2% CTAB を 800  $\mu$ l 加える。
- ② 子葉を 1cm 程度手でちぎり, 2.2ml チューブに入れ, シェイクマスターで 1~2 分程度処理する。
- ③ 62°C~65°C のインキュベーターに入れる (30 分~1 時間)。
- ④ クロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) 溶液を 600  $\mu$ l 加えて転倒混和後, 10000g で 15 分間遠心する。
- ⑤ あらかじめイソプロパノール 400  $\mu$ l を入れた 1.5ml チューブに, 上清 600  $\mu$ l を移し転倒混和後,

10000g で 15 分間遠心する。

- ⑥ 上清をデカンターで捨て、室温で乾燥し、TE  
400  $\mu$ l に溶解。1  $\mu$ l を PCR に使用。

\* 2%CTAB (2%CTAB, 0.1MTris-HCL pH8.0,  
20mM EDTA pH8.0, 1.4M NaCl

## 結 果

F<sub>6</sub>以降系統では、前の世代において圃場で判定した落葉病抵抗性と、次の世代の DNA マーカー検定による遺伝子型はほぼ一致した (表 2-4-1)。

F<sub>5</sub>世代においては、各組合せのマーカー検定結果は、前年度の供試圃場の影響を大きく受けていた。すなわち落葉病菌レース 1 汚染圃場で集団選抜を行った交配番号 0115, 0119, 0213 は「しゅまり」(抵抗性)型を示す系統が多かった。一方落葉病菌レース 2 汚染圃場で選抜を行った交配番号 0102, 0208, 0209 は片親が *Pga1* を保持する親を交配に利用しているにもかかわらず、「斑小粒系-1」(感受性)型を示す系統が多かった。また F<sub>4</sub>世代で落葉病抵抗性選抜を行っていない交配番号 0201, 0104, 0120, 0221 は落葉病菌レース 1 汚染圃場で選抜した集団と比較すると「しゅまり」(抵抗性)型の割合が少なかった。

表2-4-1 F<sub>6</sub>世代以降系統のDNAマーカー検定結果

| 系統番号      | 世代             | 母                  | 父                       | 前の世代の圃<br>場検定結果 | DNAマーカー検定結果 <sup>2)</sup> |   |   |   |   |   |   |
|-----------|----------------|--------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------|---|---|---|---|---|---|
|           |                |                    |                         |                 | 1                         | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 0007-1    | F <sub>6</sub> | 十系809号             | <u>十系793号</u>           | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0007-3    |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0007-5    |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0007-6    |                |                    |                         | R               | R                         | R | H | R | H | H | H |
| 0008-23   | F <sub>6</sub> | 十系807号             | <u>十系799号</u>           | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0008-28   |                |                    |                         | (R)             | H                         | S | S | R | H | H | H |
| 0011-3    | F <sub>6</sub> | <u>十系793号</u>      | 9728-3(F <sub>4</sub> ) | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0011-6    |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0011-8    |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0011-16   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0011-26   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0011-42   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-22   | F <sub>6</sub> | 十系807号             | <u>十系794号</u>           | (R)             | R                         | R | R | R | S | R | R |
| 0015-23   |                |                    |                         | (R)             | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-1    | F <sub>6</sub> | <u>十系794号</u>      | 9728-3(F <sub>4</sub> ) | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-9    |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-10   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-12   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-15   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-18   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-20   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-21   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-26   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0015-30   |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 0016-31   | F <sub>6</sub> | 十系793号             | 冀紅小豆3号-1                | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9923-18-1 | F <sub>7</sub> | <u>十系746号</u>      | ベニダイナゴン                 | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9923-18-2 |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9923-18-3 |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9923-18-4 |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9923-18-5 |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9924-14-1 | F <sub>7</sub> | 十系740号             | <u>十系666号</u>           | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9924-14-2 |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9924-14-3 |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9924-14-4 |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 9924-14-5 |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系864号-1  | F <sub>9</sub> | 9429F <sub>4</sub> | <u>十育140号</u>           | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系864号-2  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系864号-3  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系864号-4  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系864号-5  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系889号-1  | F <sub>8</sub> | <u>十系741号</u>      | 斑小粒系-1                  | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系889号-2  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系889号-3  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系889号-4  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系889号-5  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系901号-1  | F <sub>8</sub> | エリモショウズ            | <u>十育141号</u>           | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系901号-2  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系901号-3  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系901号-4  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系901号-5  |                |                    |                         | R               | R                         | R | R | R | R | R | R |
| 十系904号-1  | F <sub>8</sub> | ほくと大納言             | 9420-24                 | M               | S                         | S | S | S | S | S | S |
| 十系904号-2  |                |                    |                         | M               | S                         | S | S | S | S | S | S |
| 十系904号-3  |                |                    |                         | M               | S                         | S | S | S | S | S | S |
| 十系904号-4  |                |                    |                         | M               | S                         | S | S | S | S | S | S |
| 十系904号-5  |                |                    |                         | M               | S                         | S | S | S | S | S | S |
| 十系905号-1  | F <sub>8</sub> | ほくと大納言             | 9420-24                 | 分               | S                         | S | S | S | S | S | S |
| 十系905号-2  |                |                    |                         | M               | S                         | S | S | S | S | S | S |
| 十系905号-3  |                |                    |                         | M               | S                         | S | S | S | S | S | S |

表 2-4-1 つづき

| 系統番号       | 世代             | 母                        | 父        | 前の世代の圃場検定結果 | DNA マーカー検定結果 <sup>(注)</sup> |   |   |   |   |   |   |
|------------|----------------|--------------------------|----------|-------------|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|
|            |                |                          |          |             | 1                           | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 十系 905 号-4 |                |                          |          | 分           | S                           | S | S | S | S | S | S |
| 十系 905 号-5 |                |                          |          | 分           | S                           | S | S | S | S | S | S |
| 十系 906 号-1 | F <sub>8</sub> | 9426-71(F <sub>6</sub> ) | 十系 726 号 | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 906 号-2 |                |                          |          | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 906 号-3 |                |                          |          | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 906 号-4 |                |                          |          | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 906 号-5 |                |                          |          | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 910 号-1 | F <sub>8</sub> | 9825F <sub>1</sub>       | エリモショウズ  | 分           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 910 号-2 |                |                          |          | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 910 号-3 |                |                          |          | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 910 号-4 |                |                          |          | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |
| 十系 910 号-5 |                |                          |          | R           | R                           | R | R | R | R | R | R |

(注 1) 下線が抵抗性遺伝資源を系譜にもつ親

(注 2) 圃場検定 R: 抵抗性 (R): おそらく抵抗性 M: 中間的抵抗性 分: 分離

(注 3) DNA マーカー検定結果 個体ごとに 3 個体の種子を供試

R: しゅまり (抵抗性) 型 S: 斑小粒系-1 (感受性) 型 H: ヘテロ型

表 2-4-2 F<sub>5</sub> 世代の DNA マーカー検定結果

| 交配番号 | 組合せ                       |                           | 前世代<br>供試圃場 | 供試<br>個体数 | DNA マーカー検査結果 |    |    |
|------|---------------------------|---------------------------|-------------|-----------|--------------|----|----|
|      | 母                         | 父                         |             |           | R            | S  | H  |
| 0115 | 美甘大納言                     | 十育 145 号                  | レース 1 汚染圃場  | 31        | 20           | 0  | 11 |
| 0119 | 9829-109(F <sub>4</sub> ) | 9622(F <sub>6</sub> )     | レース 1 汚染圃場  | 32        | 22           | 0  | 10 |
| 0213 | 十系 798 号                  | 9830F <sub>5</sub> -41    | レース 1 汚染圃場  | 63        | 51           | 4  | 8  |
| 0102 | Acc812                    | 十育 149 号                  | レース 2 汚染圃場  | 130       | 1            | 71 | 58 |
| 0208 | 十系 793 号                  | 9931F <sub>4</sub> -55    | レース 2 汚染圃場  | 67        | 3            | 31 | 32 |
| 0209 | 十系 793 号                  | 9930F <sub>4</sub> -3     | レース 2 汚染圃場  | 46        | 0            | 36 | 10 |
| 0201 | 0113F <sub>1</sub>        | 十育 150 号                  | 大樹耐冷性検定圃場   | 106       | 71           | 31 | 4  |
| 0104 | 十育 149 号                  | 9618-21 (F <sub>6</sub> ) | 中央現地選抜      | 59        | 45           | 5  | 9  |
| 0120 | 十育 143 号                  | アカネダイナゴン                  | 中央現地選抜      | 53        | 26           | 18 | 9  |
| 0221 | 十育 150 号                  | 0120F <sub>1</sub>        | 中央現地選抜      | 35        | 28           | 2  | 5  |

注) R: 「しゅまり」(抵抗性) 型 S: 「斑小粒系-1」(感受性) 型 H: ヘテロ型 斜体はレース 2 抵抗性系統

## 考 察

前の世代の落葉病圃場検定の結果で、抵抗性か否かを断定できなかった「0008-28」, 「0014-22」は次の世代の DNA マーカー検定結果では分離していた (表 2-4-1)。また「0007-6」は圃場では抵抗性と判定されたが、ヘテロ型の個体が混入していた (表 2-4-1)。DNA マーカーによる検定ではこのような分離個体が確実に判定できることが明らかとなり、系統播種をして圃場で判定するよりも確実にヘテロ個体、感受性個体を排除できると考えられた。

*Pga1* は優性遺伝することから、落葉病レース 1 汚染圃場に供試された集団では、感受性の個体が排除されていたが、ヘテロ型の個体は排除できていなかった (表 2-4-2)。またアズキ落葉病汚染圃場に供試していない集団に関しては、感受性に固定した個体も選抜されていた (表 2-4-2)。小豆育種では、F<sub>5</sub> 世代から系統播種を行い、F<sub>4</sub> 世代で個体選抜された系統はアズキ落

葉病検定圃場に系統播種されてきた。今後播種前の種子から DNA を抽出して、ヘテロ型、あるいは感受性型で固定した個体を排除できれば、圃場の利用面積の削減に大きく貢献できると考えられた。

十勝農試では 3 レース抵抗性品種の育成を目指し、*Pga1* 保持系統にアズキ落葉病菌レース 2 抵抗性を導入するため、*Pga1* 保持品種・系統とレース抵抗性の「Acc259」の後代などのレース 2 抵抗性系統を交配していたが、レース 2 汚染圃場で選抜を行った系統群はしゅまり (*Pga1* 抵抗性) 型の個体が非常に少なかった (表 2-4-2)。*Pga1* と「Acc259」由来の抵抗性遺伝子が遺伝的に独立な場合は、1/2 の確率で *Pga1* 保持系統が出現することが予想されることから、*Pga1* と「Acc259」由来の抵抗性遺伝子は強連鎖あるいは対立遺伝子である可能性が示唆された。また本結果より、主導遺伝子によって 3 レース抵抗性品種を育成するのは困難であると推察された。

### 第3章 アズキ落葉病菌レース2抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーの開発

#### 第1節 AFLP法による多型マーカーの探求

##### 目 的

第1章で明らかとなった *Pga1* を持たない、アズキ落葉病抵抗性遺伝資源「Acc259」の抵抗性を判別するDNAマーカーを開発するため、アズキ落葉病菌レース2抵抗性系統群あるいは感受性系統群に特異的なマーカーを探求する。

##### 材料および方法

アズキ落葉病菌レース2抵抗性遺伝資源「Acc259」と同感受性遺伝資源「斑小粒系-1」の単交配由来の  $F_3$  世代105系統を、抵抗性検定試験に供試した。

接種菌株はアズキ落葉病菌レース2分離株 T96-5(NIAS Genebank accession no. MAFF241057) を用い、第1章と同様の条件で接種および AFLP 解析を行った。

##### 結 果

$F_3$  世代105系統を用いてアズキ落葉病菌レース2を接種検定し、 $F_2$  世代の表現型を推定した。観察値は抵抗性ホモ型：ヘテロ型：感受性ホモ型＝23：58：24となり、1遺伝子支配による理論値に適合した（表3-1-1）。抵抗性ホモ型、感受性ホモ型と推定した系統からそれぞれ12系統をバルク構成系統として選抜した。

AFLP解析の結果、抵抗性あるいは感受性バルク

表3-3-1 斑小粒系-1/Acc259  $F_2$ 系統の推定表現型

| 観察値 |    |    | 理論値  |      |      | $\chi^2$ | <i>P</i> |
|-----|----|----|------|------|------|----------|----------|
| R   | H  | S  | R    | H    | S    |          |          |
| 23  | 58 | 24 | 26.3 | 52.5 | 26.3 | 1.17     | 0.56     |

注) R：抵抗性ホモ接合型 H：ヘテロ接合型

S：感受性ホモ接合型，数字は系統数

に特異的な6つの増幅断片 E-AGC/M-TAA-489, E-ACA/M-AAT-204, E-AGG/M-GTT-189, E-AGA/M-CTT-336, E-ATT/M-AGC-208, E-ATT/M-AGC-210 が検出された。これらの配列の中で、先に周辺領域の配列が解析できたのは感受性バルクに特異的に見られた E-ACA/M-AAT-204 おおび E-ATT/M-AGC-208, 抵抗性バルクに特異的に見ら

れた E-ATT/M-AGC-210 だった。両親の E-ACA/M-AAT-204 おおびその周辺配列を図3-3-1に示した。また、E-ATT/M-AGC-208 おおび E-ATT/M-AGC-210 は AFLP 増幅断片内の2塩基以外の配列はすべて一致していた（図3-3-2）。

GGCCATTTCT ACCATCCCGT GATTATACTA GACATTCTGT CATACACTAG CCAGCAACCA TTCCGTGTAC TGAGGAAGAC  
 AGTGTCTCTT TTACATGCGC TCATTCAATT TTATCACAAG CTACAAATTC CTCGTGCAAA ACAACACGTT TAGAATATTA  
 TAACTTTCA **TGAACCTAAC TTTGAATTC ACAGACTACT CACAGGTATT GATOCATTTC CCCTTGACAG CAAGGGCAAG**  
**CCAAAGCTTC CCATCCTTTT GTTTCCGTGT GAAATATCGA AGCAAAATGC CTCACTTTAT AGACGAAAGT AAAGTACCAA**  
**TOGCCTAGGT ATGCGCTGGC ATGGTTGCCT AAACATATCC TGATTTTAAA** TAGTTCATCC ATTCCCCCTC CTACTTGTTT  
 ACTGCTATTA CACAGAACAT GGAATTTGAC TACAAAGTAC TCCAAATCCA TCTGCCGTAT CATGGACACA CAGTGCAAAA  
 GGACAGGTAC GGAGACACAT CTTCAACCGA ACTGGTTAAG GATACATTCA TCCTGAGAAG TTATTCATTA GGTGAAAAA  
 AAACCTTAAT CTTTAGAGGT TCCTTTTCCA ATTAATCAAT GCCTTGCCAG GGAATAGGC TCAGGAACAC AACTTCTACA  
 TGCCCCAATT CGTGACTAA CTTTATGAAA ACTATAAGAT AAGAAAAAC AATTCAAACA TTTACTCACA TCATCCAGCA  
 GCATATTGTT GCAGTAAGAA CCAAGGTTAG GTGAAATCTG CAACAGAGTA GTAAGATATT AATTCATACA GAGAATAATA  
 ATTTGAGAGA GGAAATATTA TCATGGACAG AGAAAGAGAG AGAACAAAAT TCAAGAATAA TAAATCTCTT TTTCTTCAGA  
 AGAACTTACA TCATCTTAGA AACCTACTTT GGAACCTAAT ATATAAATAC ATCACACAGT AAAATCCATC AAGGCATTGT  
 CTGAAAATTC ATGACAGAAT AAGCTTTTAA TCAAACAGAG CAACAGCGAG ACGTTTTTCC ACAATAATAA TAGTGAACAA  
 GTTCACAATT TTACAGATCC ATTAGCTGCG CGAGATTATG AATTCTTTT CGCAGTTTGC GTAAGATTAG CATCACCAAT  
 TATTTAATTA CTTCACTGAT ACTATGAGTC TCACAAAGAA ACGAAGAAGC ATTACAGATT AGAGGAAGGT CCTCTGTTGA  
 AACAAATCTT GGTACAAAGG GACGCGACGA TTCCAATCAC TGCGAAAACT AGCGTGGTAA CCGAGAACCC CATATCGGAC  
 CTAATCCTGA TCACACAGAA AATGAGTTCC TGGAAGAACT AAACAGAAAT AGCATGAAGA AAATTCGGAA ACGAAACGAC  
 ACAGCATTAC CCCTCAGTTC CGTAATTCGT AGTCGTATTA GTGATCTGAA GCTTCTGAGT TGTATATTC AATTGATTT  
 TATTTGATCA CCTCTCATGG CATCGCATGG CC

(1) 「斑小粒系-1」の E-ACA/M-AAT-204 とその周辺領域

(注) 網かけ太字は AFLP 増幅断片の配列

ACAGGGATTC TGTCAGACAC TAGCCAGCAA CCATTCCGTG TACTGGGGAA GACAATGTCC TCTTTACATG CGCTTATTCA  
 ATTTTATCAC AAGCTACAAA TTCTCGTGC AAAACAACAA GTTTAACTTT TCATGAACCT AACTTTGAA TTCAAAGACT  
 ACTCACAGGT ATTGATCCAT TTCCCTTAA CAAACAGGGC AAGCCAAAGC TTCCATCCT TTTGTCTCG TGTGAAATAT  
 CGAAGCAAAA CGCTCACTT TATAGACGAA AGTAAAAAGG ACCAATGGCC TAGGTATGCG CTGGCATGGT TGCCTAAACA  
 TATCCTGATT TTAAATAGTT CATCCATTCC CTTCTACTTG TTTAATGCTA TTACACAGGA CATGGAACCT GACTACAAAG  
 TACTCCAAAT CCATCTGCCG TATCATGGAC ACACAGAGCA AAAGGACAGG TATGGAGACA CATCTTCAAC CGAACTGGTT  
 AAGAATACAT TCATCCTGAG AAGTTATTCA TTAAGGGGAA AAAAAACCTT AATCTTTAGA GGTTCCCTTT CTAATTAATC  
 AATGCCTTGC CAGGGTAATA GGCTCAGGAA CACAACCTCT ACATGCCCCA ATTCGTGTAC TAACCTTATG AAACTATAA  
 GAAAAACAA TTCAAACATT CACTCACATC ATCCAGCAGC ATATTGTTGC AGTAAGAACC AAGGTTAGGT GAAATCTGCA  
 ACAGAGTAAT AAGATATTAA TTCATACAGA GAATAATAAT TTGAGAGAGG AAATATTATC ATGGACAGAG AAAGAGAGAG  
 AACAAAATTC AAGAATAATA AATCTCTTTT TCTTCAGAAG AACTTACATC ATCTTAGAAA CCTACTTTGG AACTAACTAA  
 ATATAAATAC ATCACAAGT AAAATCCATC AAGGCATTGT CTAATAATTC ATGACAGAAT AAGCTTTTAA TTAACAGAG  
 CAACAGCGAG ACGTTTTCCA CAATAATAAT AGTGAACAAG TTCACAATTT TACAGATCCA TTAGCTGCGC GAGATTATGA  
 ATTTCTTTT GCAGTTTGTG TAAGATTAGC ATCAGCAATT ATTTAATTAC TTTACTGATA CTATGAGTCT CTCAAAGAAA  
 CGAAGAAGCA TTACAGATTA GAGGAAGGTC CTCTGTTGAA ACAAATTTCTG GTACAAAGGG ACGCAACAAT TCCAATCACT  
 GCGAAAACTA GCGTGGTAAC CGAGAACCC ATATCGGACC CTAATCCTGA TCACACAGAA AATGAATTCC AGGAAAACT  
 AAACAGAAAT AGCATGAAGA AAATTCGGAA ACCAAACGAC ACAGCATTAC CCCTCAGTCC GTACTCGTTA TC

(2) 「Acc259」の E-ACA/M-AAT-204 対立座領域

図 3-3-1 「斑小粒系-1」および「Acc259」の E-ACA/M-AAT-204 およびその周辺領域の塩基配列

|        |      |                                                                    |
|--------|------|--------------------------------------------------------------------|
| ACC259 | 1'   | TTTGAATTA TTAAGAGATT CTGATATCTT GGATTTATGT ATCAACCTAG TAAAAGAAAA   |
| Buchi  | 1"   | TTTGAATTA TTAAGAGATT CTGATATCTT GGATTTATGT ATCAACCTAG TAAAAGAAAA   |
| ACC259 | 61'  | AATAAATAAG ATGAAGGTTT GATGGTGATG AATGAAGGAA GTGGAGAAGT AAGAATAGTA  |
| Buchi  | 61"  | AATAAATAAG ATGAAGGTTT GATGGTGATG AATGAAGGAA GTGGAGAAGT AAGAATAGTA  |
| ACC259 | 121' | ACTTATGAAG AATATTTTCC TACAATATTT GGTTCAGAGA TATGTGTTGA TTTGTGTAAT  |
| Buchi  | 121" | ACTTATGAAG AATATTTTCC TACAATATTT GGTTCAGAGA TATGTGTTGA TTTGTGTAAT  |
| ACC259 | 181' | AGATAGGGAT GACAATTAGT CGTGTCGAAC ATGAATAATG TTTACCAATT ACTTGATCAG  |
| Buchi  | 181" | AGATAGGGAT GACAATTAGT CGTGTCGAAC ATGAATAATG TTTACCAATT ACTTGATCAG  |
| ACC259 | 241' | CAACAGAAAA AAAATTTGTT ATTTCTATTG AAATCTGTAA ACCATTCTCA CTTTCGATCA  |
| Buchi  | 241" | CAACAGAAAA AAAATTTGTT ATTTCTATTG AAATCTGTAA ACCATTCTCA CTTTCGATCA  |
| ACC259 | 301' | AATTTTATTT GAATATGTTA TTGAATTCAT TTGAGACGTG AGTAAACTC ATATTGGAGA   |
| Buchi  | 301" | AATTTTATTT GAATATGTTA TTGAATTCAT TTGAGACGTG AGTAAACTC —ATTGGAGA    |
| ACC259 | 361' | AGAATATGGT TTATTGTGTT CATTTTTTTG GAACTTTATT TCTATTTATT TTTGTTTCTA  |
| Buchi  | 359" | AGAATATGGT TTATTGTGTT CATTTTTTTG GAACTTTATT TCTATTTATT TTTGTTTCTA  |
| ACC259 | 421' | ACAGGTAATA GGCTCTTTTA CTTGGAAAAAT CATCCAATTA CCTCATGGAG AGTTAGCTTC |
| Buchi  | 419" | ACAGGTAATA GGCTCTTTTA CTTGGAAAAAT CATCCAATTA CCTCATGGAG AGTTAGCTTC |
| ACC259 | 481' | GTCAACAAAT GATATAAAGC ATTAGCTTTA AAAAAAGATT AGCTTATCTT AGTAAATACA  |
| Buchi  | 479" | GTCAACAAAT GATATAAAGC ATTAGCTTTA AAAAAAGATT AGCTTATCTT AGTAAATACA  |
| ACC259 | 541' | TCCAACCAAC TCCAATCCTT TTACCTATTA AC                                |
| Buchi  | 539" | TCCAACCAAC TCCAATCCTT TTACCTATTA AC                                |

図3-3-2 「Acc259」のE-ATT/M-AGC-210および「斑小粒系-1」のE-ATT/M-AGC-208  
およびその周辺領域の塩基配列  
(注) □は AFLP 増幅断片の配列

## 考 察

「Acc259」のアズキ落葉病菌レース2に対する抵抗性は優性の1遺伝子によって支配されていると推定された(表3-1-1)。本結果は、藤田(2007)の結果と同様であり、「Acc259」が有する優性に遺伝するアズキ落葉病抵抗性遺伝子を *Pga2* と命名した。

選抜した AFLP 増幅断片およびその周辺領域の配列から、抵抗性バルクに特異的な E-AGG/M-GTT-210、感受性バルクに特異的な E-ATT/M-AGC-208 は同一

遺伝子座にあると判断した。MASの結果から、*Pga1* と *Pga2* は強連鎖あるいは対立遺伝子である可能性が高く(第1章 第4節)、*Pga1* 座乗領域については第1章で複数のDNAマーカーを利用した解析を行っていたこと、E-ACA/M-AAT-204は両親間の塩基配列の違いが多く、特異的なプライマーを設計しやすいことから、本試験では他の AFLP マーカー周辺領域の解析は行わず E-ACA/M-AAT-204 領域をもちいた共優性マーカー(Pg204)の開発を優先することとした。

## 第2節 Pg204 の共優性化と有効性の検証

### 目 的

アズキ落葉病菌レース 2 抵抗性遺伝子 *Pga2* と連鎖している可能性が高い E-ACA/M-AAT-204 領域を利用して共優性マーカーを開発する。また、開発した共優性マーカーについて、解析材料および遺伝資源を利用してその有効性を検証する。

### 材料および方法

#### (1) DNA マーカーの開発

共優性マーカーの開発については第 1 章と同様の方法で実施した。加えて、これまでの結果より *Pga1* と *Pga2* が対立遺伝子である可能性があることから第 1 章で選抜した「しゅまり」の E-ACT/M-ACT-118 領域の「Acc259」の対立座について塩基配列を決定し DNA マーカーを開発した (Pg118(R2))。

#### (2) DNA マーカーの有効性の検証

バルク構成個体の選抜に利用した  $F_3$  系統について、 $F_2$  の推定遺伝子型が抵抗性ホモ接合型およびヘテロ接合型の系統からは、病徴を示さず「抵抗性」と判定した 1 個体から、感受性ホモ接合型の系統からは明らかな病徴を示し「感受性」と判定した個体 1 個体から DNA を抽出し、Pg204 および Pg118(R2) の塩基配列を決定した。また、第 1 章と同様にアズキ落葉病抵抗性の可能性がある遺伝資源 209 点について、Pg204 の遺伝子型を調査し、「Acc259」型を示した遺伝資源を選抜し、アズキ落葉病菌レース 1 菌株、レース 2 菌株、レース 3 菌株を第 1 章第 1 節と同様の手法で接種し、抵抗性検定をおこなった。

また育成系統 2 組合せ 183 系統について、第 1 章第 4 節と同様の手法で 3 個体を混合して 2 反復で抽出した DNA を用いて Pg204 と Pg118 の遺伝子型を調査した。

### 結 果

「Acc259」と「斑小粒系 - 1」の E-ACA/M-AAT-204 およびその周辺領域のホモロジー、設計したプライマーの位置を図 3-2-1 に示した。

また、「しゅまり」の E-ACT/M-ACT-118 領域の「Acc259」の対立座の塩基配列を決定し (図 3-2-3)、本領域で「Acc259」型が判別できる DNA マーカーを設計した (表 3-2-2)。*Pga1* と *Pga2* の位置関係を調査することが目的であったことから、共優性マーカーにはせず、設計が容易な優性マーカーとした。

抵抗性検定を行った  $F_3$  世代 105 系統について、抵抗

性あるいは感受性ホモ接合型と判定した系統については任意に 1 個体、ヘテロ接合型と判定した系統については抵抗性を示した個体から任意に 1 個体の DNA を抽出して Pg204 の遺伝子型を調査したところ、抵抗性あるいは感受性ホモ接合型の系統については Pg204 の遺伝子型と表現型の結果は一致した。ヘテロ接合型と判定した系統については、抵抗性を示した個体から DNA を抽出しており、優性遺伝子によって支配される形質であることから、遺伝子型は抵抗性型あるいはヘテロ型になることが予想され、予想通りの結果となった。優性マーカーである Pg118 (R2) の遺伝子型もすべてアズキ落葉病抵抗性の表現型と一致した (表 3-2-3)。

遺伝資源を利用した遺伝子型と抵抗性調査の結果、供試した 22 系統の中で「Acc2499」はすべてのレースに対して感受性を示した。他の遺伝資源は「Acc259」と同様レース 1, 2 抵抗性を示した (表 3-2-4)。

また、育成系統における Pg204 (共優性) と Pg118 (R2) の遺伝子型はすべて一致した (表 3-2-5)。

|        |      |            |            |            |             |            |            |
|--------|------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| ACC259 | 1'   | ACAGGGATTC | TGTCAGACAC | TAGCCAGCAA | CCATTCCGTG  | TACTGGGGAA | GACAATGTCC |
| Buchi  | 28"  | CTAGACATTC | TGTCATACAC | TAGCCAGCAA | CCATTCCGTG  | TACTGAGGAA | GACAGTGTCC |
| ACC259 | 61'  | TCTTTACATG | CGCTTATCA  | ATTTTATCAC | AAGCTACAAA  | TTCCTCGTGC | AAAACAACAA |
| Buchi  | 88"  | TCTTTACATG | CGCTCATCA  | ATTTTATCAC | AAGCTACAAA  | TTCCTCGTGC | AAAACAACAC |
| ACC259 | 121' | GTT-----   | ---TAACTTT | TCATGAACTT | AACTTTTCGAA | TTCAAAGACT | ACTCACAGGT |
| Buchi  | 148" | GTTTAGAATA | TTATAACTTT | TCATGAACTT | AACTTTGAA   | TTCACAGACT | ACTCACAGGT |
| ACC259 | 171' | ATTGATCCAT | TTCCCCTTAA | CAAACAGGGC | AAGCCAAAGC  | TCCCAATCCT | TTGTCTCCG  |
| Buchi  | 208" | ATTGATCCAT | TTCCCCTTGA | CAGCAAGGGC | AAGCCAAAGC  | TTCCATCCT  | TTGTCTCCG  |
| ACC259 | 231' | TGTGAAATAT | CGAAGCAAAA | CGCCTCACTT | TATAGACGAA  | AGTAAAAAGG | ACCAATGGCC |
| Buchi  | 268" | TGTGAAATAT | CGAAGCAAAA | TGCCTCACTT | TATAGACGAA  | AGT--AAAGT | ACCAATCGCC |
| ACC259 | 291' | TAGGTATGCG | CTGGCATGGT | TGCCTAAACA | TATCCTGATT  | TAAATAGTT  | CATCCATT-- |
| Buchi  | 326" | TAGGTATGCG | CTGGCATGGT | TGCCTAAACA | TATCCTGATT  | TAAATAGTT  | CATCCATTCC |
| ACC259 | 349' | CCCTTCTACT | TGTTTAATGC | TATTACACAG | GACATGGAAC  | TTGACTACAA | AGTACTCCAA |
| Buchi  | 386" | CCCTTCTACT | TGTTTAATGC | TATTACACAG | AACATGGAAT  | TTGACTACAA | AGTACTCCAA |
| ACC259 | 409' | ATCCATCTGC | CGTATCATGG | ACACACAGAG | CAAAAGGACA  | GGTATGGAGA | CACATCTTCA |
| Buchi  | 446" | ATCCATCTGC | CGTATCATGG | ACACACAGTG | CAAAAGGACA  | GGTACGGAGA | CACATCTTCA |
| ACC259 | 469' | ACCGAACTGG | TTAAGAATAC | ATTCATCCTG | AGAAGTTATT  | CATTAGGGG  | AAAAAAAACC |
| Buchi  | 506" | ACCGAACTGG | TTAAGGATAC | ATTCATCCTG | AGAAGTTATT  | CATTAGGTGA | AAAAAAAACC |
| ACC259 | 529' | TTAATCTTTA | GAGGTTCTTT | TTCTAATTAA | TCAATGCCTT  | GCCAGGGTAA | TAGGCTCAGG |
| Buchi  | 566" | TTAATCTTTA | GAGGTTCTTT | TTCCAATTAA | TCAATGCCTT  | GCCAGGGTAA | TAGGCTCAGG |
| ACC259 | 589' | AACACAACCT | CTACATGCC  | CAATTCGTGT | ACTAACTTTA  | TGAAAACT-- | ---ATAAGAA |
| Buchi  | 626" | AACACAACCT | CTACATGCC  | CAATTCGTGT | ACTAACTTTA  | TGAAAACTAT | AAGATAAGAA |
| ACC259 | 644' | AAAACAATTC | AAACATTAC  | TCACATCATC | CAGCAGCATA  | TTGTTGCAGT | AAGAACCAAG |
| Buchi  | 686" | AAAACAATTC | AAACATTAC  | TCACATCATC | CAGCAGCATA  | TTGTTGCAGT | AAGAACCAAG |
| ACC259 | 704' | GTTAGGTGAA | ATCTGCAACA | GAGTAATAAG | ATATTAATTC  | ATACAGAGAA | TAATAATTTG |
| Buchi  | 746" | GTTAGGTGAA | ATCTGCAACA | GAGTAGTAAG | ATATTAATTC  | ATACAGAGAA | TAATAATTTG |
| ACC259 | 764' | AGAGAGGAAA | TATTATCATG | GACAGAGAAA | GAGAGAGAAC  | AAAATTCAAG | AATAATAAAT |
| Buchi  | 806" | AGAGAGGAAA | TATTATCATG | GACAGAGAAA | GAGAGAGAAC  | AAAATTCAAG | AATAATAAAT |
| ACC259 | 824' | CTCTTTTCT  | TCAGAAGAAC | TTACATCATC | TTAGAAACCT  | ACTTTGGAAC | TAATAAATA  |
| Buchi  | 866" | CTCTTTTCT  | TCAGAAGAAC | TTACATCATC | TTAGAAACCT  | ACTTTGGAAC | TAATAAATA  |

図3-2-1 AFLP断片 E-ACA/M-AAT-204 およびその周辺領域の「Acc259」と「斑小粒系-1」(Buchi)の塩基配列.

\*は「Acc259」「斑小粒系-1」が同じ塩基であるもの、-は欠失配列を示す.

灰色部分が AFLP断片, 太線矢印で示した部分が共優性プライマーの位置

表 3-2-1 Pg204 の共優性マーカー配列および PCR 条件

## (1) 共優性マーカー配列

| プライマー    |         | 塩基配列 (5'-3')             | アニーリング温度 (°C) |
|----------|---------|--------------------------|---------------|
| Pg204-22 | Reverse | AACAATATGCTGCTGGATG      | 58.6          |
| Pg204-23 | Forward | CTGCTATTACACAGAACATGGAAT | 60.8          |
| Pg204-27 | Forward | TCCATTTCCCCTTAACAAAC     | 60.1          |

## (2) PCR 条件

| 反応液組成               |                       |                    |
|---------------------|-----------------------|--------------------|
| D.W.                | 7.38                  | $\mu\text{l}$      |
| 10 × Buffer         | 1.00                  | $\mu\text{l}$      |
| dNTPs               | 0.80                  | $\mu\text{l}$      |
| プライマー Pg204-22      | 20pmol/ $\mu\text{l}$ | 0.10 $\mu\text{l}$ |
| プライマー Pg204-23      | 20pmol/ $\mu\text{l}$ | 0.10 $\mu\text{l}$ |
| プライマー Pg204-27      | 20pmol/ $\mu\text{l}$ | 0.10 $\mu\text{l}$ |
| Hotstar Taq(QIAGEN) |                       | 0.03 $\mu\text{l}$ |
| DNA テンプレート          |                       | 0.50 $\mu\text{l}$ |
| total               | 10.0                  | $\mu\text{l}$      |

## PCR 条件

|      |      |         |
|------|------|---------|
| 94°C | 15 分 | 1 サイクル  |
| 94°C | 30 秒 | 35 サイクル |
| 55°C | 30 秒 |         |
| 72°C | 2 分  |         |
| 72°C | 5 分  | 1 サイクル  |

2 % アガロースで電気泳動

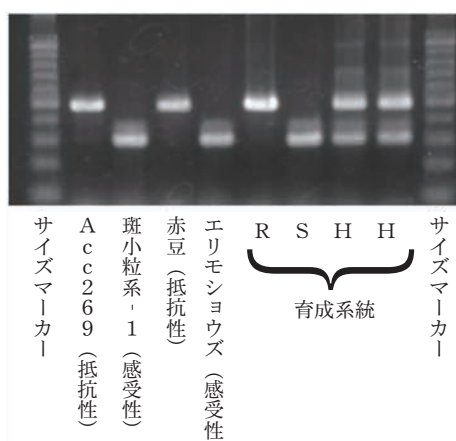


図 3-2-2 Pg204 を利用した検定結果

R : 「Acc259」 (抵抗性) 型

H : ヘテロ型

S : 「斑小粒系-1」 (感受性) 型

TCCGTAACCC ACTTAAGATT CTTCCAAAAT TGCTAGTGGA ATTGACTGGA GTCATTGCCT GCAAAAACGG GTCATATGGG  
 TTTGATTTTC ATCTTCAAAT GTATGCTATT TTGACAAAGA ATTTTGAAAG TTTAATAATT TTAATTAATT ACTATCGTTA  
 TCTTGATCAT TTTATAATCG AAAACATATT TTAATATAACC CATCCTTATA AATCAATCTA TTATCTTTCT AATAAAGATA  
 TGCCAGGATT TTTTITTTAAA TCAATAAAAT ATTGAGTTTA ATACGACATG ATTTTITTTAAAG AATTAGCTAC TTCTTTTATC  
 TTCTAAATAC ATTTCTGACA TCAGGTCACCT GCTATAAAAT TAATGAAATA AAAACTTTTG ATGATAAAAT TCCCAAGAAA  
 AATGGATGAT AAAAATTGTT AAATGATGAT GGTTTAACGG TAAAAAGTGT AGTTAAGTAA ATGTTTTATT CTTCCCTGTA  
 ATCTTTACTG GAAAGGAAAT GC

図3-2-3 「Acc259」のE-ACT/M-ACT-118（しゅまり）対立座領域

表3-2-2 Pg118（R2）の優性マーカー配列およびPCR条件

(1) 共優性マーカー配列

| プライマー            | 塩基配列 (5'-3')          | アニーリング温度 (°C) |
|------------------|-----------------------|---------------|
| Pg118-24 Reverse | TGACCTGATGTCAGAAATGTA | 64.0          |
| Pg118-33 Forward | ACTGGAGTCATTGCCTG     | 60.0          |

(2) PCR 条件

| 反応液組成                          |      |         | PCR 条件 |      |               |
|--------------------------------|------|---------|--------|------|---------------|
| D.W.                           | 7.48 | $\mu$ l | 94°C   | 2 分  | 1 サイクル        |
| 10 × Buffer                    | 1.00 | $\mu$ l | 94°C   | 30 秒 | 35 サイクル       |
| dNTPs                          | 0.80 | $\mu$ l | 55°C   | 30 秒 |               |
| プライマー Pg118-24 20pmol/ $\mu$ l | 0.10 | $\mu$ l | 72°C   | 2 分  | 2 %アガロースで電気泳動 |
| プライマー Pg118-33 20pmol/ $\mu$ l | 0.10 | $\mu$ l | 72°C   | 5 分  |               |
| Ex-Taq                         | 0.03 | $\mu$ l |        |      |               |
| DNA テンプレート                     | 0.50 | $\mu$ l |        |      |               |
| total                          | 10.0 | $\mu$ l |        |      |               |

表 3-2-3 斑小粒系-1 / Acc259 F<sub>3</sub> 系統の抵抗性と遺伝型の関係

| 系統番号 |   |    | 対抗性<br>個体数 | 感受性<br>個体数 | 判定  | DNA マーカーによる遺伝子型 |           |
|------|---|----|------------|------------|-----|-----------------|-----------|
|      |   |    |            |            |     | Pg204           | Pg118(R2) |
| 0441 | 2 | 31 | 4          | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 2 | 34 | 9          | 2          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 35 | 6          | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 2 | 36 | 4          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 37 | 6          | 6          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 38 | 5          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 39 | 7          | 5          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 40 | 11         | 1          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 2 | 41 | 3          | 5          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 42 | 11         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 2 | 44 | 8          | 1          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 45 | 6          | 6          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 46 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 2 | 47 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 2 | 48 | 7          | 4          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 2 | 49 | 6          | 1          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 2 | 50 | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 2 | 51 | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 2 | 52 | 8          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 53 | 10         | 1          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 54 | 8          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 2 | 55 | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 1  | 11         | 1          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 3 | 2  | 10         | 1          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 3 | 3  | 0          | 8          | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 3 | 4  | 6          | 5          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 3 | 5  | 8          | 2          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 3 | 6  | 7          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 3 | 7  | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 8  | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 3 | 9  | 6          | 6          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 3 | 10 | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 11 | 11         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 12 | 0          | 11         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 3 | 13 | 11         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 16 | 11         | 0          | 抵抗性 | H               | -         |
| 0441 | 3 | 17 | 10         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 18 | 5          | 2          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 3 | 19 | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 20 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 3 | 21 | 9          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 3 | 22 | 11         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 23 | 10         | 2          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 3 | 24 | 9          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 3 | 25 | 11         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 3 | 26 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 3 | 27 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 3 | 28 | 5          | 7          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 3 | 29 | 10         | 2          | 分離  | H               | +         |

(注1) R : 「Acc259」(抵抗性)型 S : 「斑小粒系-1」(感受性)型 H : ヘテロ型

(注2) + : 「Acc259」(抵抗性)型(優性マーカー) - : 非「Acc259」型

(注3) F<sub>3</sub> 系統の中から抵抗性あるいは感受性ホモ型は任意に, 分離系統は抵抗性を示した個体から任意に DNA を抽出した。

表3-2-3 つづき

| 系統番号 |   |    | 対抗性<br>個体数 | 感受性<br>個体数 | 判定  | DNA マーカーによる遺伝子型 |           |
|------|---|----|------------|------------|-----|-----------------|-----------|
|      |   |    |            |            |     | Pg204           | Pg118(R2) |
| 0441 | 4 | 1  | 7          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 4 | 2  | 11         | 1          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 4 | 3  | 8          | 4          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 4 | 4  | 0          | 11         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 5  | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 6  | 0          | 9          | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 7  | 9          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 4 | 8  | 6          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 4 | 9  | 0          | 11         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 10 | 5          | 5          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 4 | 11 | 11         | 1          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 4 | 12 | 10         | 2          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 4 | 13 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 14 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 15 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 16 | 9          | 2          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 4 | 17 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 18 | 0          | 7          | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 19 | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 4 | 20 | 8          | 1          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 4 | 21 | 9          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 4 | 22 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 24 | 11         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 4 | 26 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 4 | 28 | 11         | 1          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 4 | 29 | 9          | 1          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 7 | 1  | 8          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 2  | 7          | 1          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 3  | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 7 | 4  | 11         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 7 | 5  | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 7 | 7  | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 7 | 8  | 8          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 9  | 10         | 2          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 10 | 6          | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 7 | 11 | 10         | 1          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 12 | 7          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 13 | 6          | 6          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 14 | 2          | 5          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 15 | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 7 | 16 | 8          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 17 | 8          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 18 | 1          | 11         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 7 | 19 | 0          | 12         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 7 | 20 | 8          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 21 | 10         | 2          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 22 | 11         | 1          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 7 | 23 | 9          | 3          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 24 | 10         | 2          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 7 | 25 | 7          | 5          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 26 | 4          | 7          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 7 | 27 | 8          | 4          | 分離  | H               | +         |
| 0441 | 7 | 28 | 7          | 2          | 分離  | R               | +         |
| 0441 | 7 | 29 | 11         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |
| 0441 | 7 | 30 | 0          | 11         | 感受性 | S               | -         |
| 0441 | 7 | 31 | 12         | 0          | 抵抗性 | R               | +         |

\*注釈は前のページと同様

表 3-2-4 Pg204 の遺伝子型が「Acc259」型の遺伝資源の落葉病接種検定結果

| 番号  |      |               | アズキ落葉病接種検定結果 |       |       |
|-----|------|---------------|--------------|-------|-------|
|     |      |               | レース 1        | レース 2 | レース 3 |
| Acc | 67   | 岩手 59-54-21   | R            | R     | S     |
| Acc | 259  | 愛媛 在 9        | R            | R     | S     |
| Acc | 534  | 新潟 在 65       | R            | R     | S     |
| Acc | 550  | 福島 在 4        | R            | R     | S     |
| Acc | 558  | 福島 在 12       | R            | R     | S     |
| Acc | 724  | 韓国 18         | R            | R     | S     |
| Acc | 812  | 韓国 106        | R            | R     | S     |
| Acc | 951  | 韓国ヒメツルアズキ 222 | R            | R     | S     |
| Acc | 1238 | 新潟ヤブツルアズキ 82  | R            | R     | S     |
| Acc | 2043 | 新潟ヤブツルアズキ 117 | R            | R     | S     |
| Acc | 2463 | 宮城ヤブツルアズキ 1   | R            | R     | S     |
| Acc | 2467 | 韓国ヒメツルアズキ 403 | R            | R     | S     |
| Acc | 2499 | タイ竹小豆 2       | S            | S     | S     |
| Acc | 2515 | 石川ヤブツルアズキ 59  | R            | R     | S     |
| Acc | 2517 | 福井ヤブツルアズキ 27  | R            | R     | S     |
| Acc | 2520 | 兵庫ヤブツルアズキ 106 | R            | R     | S     |
| Acc | 2521 | 鳥取ヤブツルアズキ 56  | R            | R     | S     |
| Acc | 2523 | 秋田ヤブツルアズキ 99  | R            | R     | S     |
| Acc | 2527 | 長野ヤブツルアズキ 89  | R            | R     | S     |
| Acc | 2532 | 茨城ヤブツルアズキ 2   | R            | R     | S     |
| Acc | 2537 | 富山ヤブツルアズキ 30  | R            | R     | S     |
| 品保  | 490  | 赤豆            | R            | R     | S     |

(注) R: 抵抗性 S: 感受性

### 考 察

F<sub>3</sub> 世代 105 個体における Pg204, Pg118(R2) の遺伝子型と表現型はすべて一致したことから、二つの DNA マーカーは *Pga2* と 1cM 以下で連鎖しており、99% 以上の精度 (100 個体で判定を誤る可能性は 1 個体以下) で抵抗性を判別できると考えられること、十勝農試における F<sub>5</sub> 集団の 1 組合せあたりの系統数は概ね 200 個体以下であることから、Pg204, Pg118(R2) とともに MAS を行うためには十分の精度であると推察された。F<sub>3</sub> 個体に加えて育成系統についても Pg204 と Pg118 (R2) の遺伝子型は一致しており (表 3-2-4), Pg118 領域は *Pga1* の極近傍に座乗していることが第 1 章で示されたことから、*Pga1* と *Pga2* は極近傍で連鎖しているか、対立遺伝子の可能性が高いと考えられた。

第 1 章で *Pga1* を有する可能性のある遺伝資源が 56 点あることが明らかとなったが、「Acc259」と同様にアズキ落葉病菌レース 1, 2 に対して抵抗性を示し、*Pga2* を有する可能性のある遺伝資源についても 21 点あることが明らかとなった (表 3-2-3)。「赤豆」を系譜に持ち、アズキ落葉病に対して中間的な抵抗性を示す「ハツネショウズ」「アケノワセ」については、209 の抵抗性遺

伝資源候補の中には入っていたが、Pg204 では「Acc259」型の増幅断片は検出されず、*Pga2* を持たない可能性が高いと考えられた。本試験によって、十勝農試の遺伝資源の中には、これまで抵抗性遺伝資源として利用されてきた「Acc259」以外にも同じ抵抗性をもつ遺伝資源が多数あることが明らかとなった。また過去に育種で利用されてきた「赤豆」も *Pga2* を有する可能性があることが明らかとなった。一方で「赤豆」の有する *Pga2* が「ハツネショウズ」「アケノワセ」に導入されなかった理由については不明である。「赤豆」の有する *Pga2* が何らかの形質と連鎖している、偶然導入されなかった等が考えられるが、「ハツネショウズ」「アケノワセ」は *Pga2* を保持していないにもかかわらず中間的な抵抗性を示すことから、「赤豆」には主動遺伝子以外にもアズキ落葉病抵抗性に関与する因子があると推察される。

また、本試験から Pg204 の遺伝子型によって「Acc259」以外の落葉病抵抗性品種、遺伝資源を系譜にもつ系統の選抜も可能であることが明らかとなり、本試験で開発したマーカーがアズキ育種で広く利用できることが示された。

表3-2-5 育成系統のPg204（共優性）とPg118（R2）の遺伝子型

| 系統名      | 世代             | 組合せ                            |        | Pg204 |   | Pg118(R2) |   |
|----------|----------------|--------------------------------|--------|-------|---|-----------|---|
|          |                | 母                              | 父      |       |   |           |   |
| 0611-1   | F <sub>5</sub> | 十系925号 ( <i>Pga2</i> )         | Acc921 | S     | S | —         | — |
| 0611-2   | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0611-3   | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-4   | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0611-5   | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0611-6   | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-7   | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0611-8   | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | H | —         | + |
| 0611-9   | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-16  | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-17  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | S | +         | — |
| 0611-18  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | R | +         | + |
| 0611-19  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0611-20  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0611-21  | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-25  | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-26  | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0611-27  | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-28  | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-32  | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0611-33  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0722-1   | F <sub>5</sub> | エリモシヨウズ 十系974号 ( <i>Pga2</i> ) |        | R     | R | +         | + |
| 0722-2   | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0722-3   | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | S | +         | — |
| 0722-6   | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0722-7   | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0722-8   | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0722-9   | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0722-10  | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0722-11  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0722-12  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0722-13  | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0722-17  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0722-18  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0722-22  | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0722-23  | F <sub>5</sub> |                                |        | H     | H | +         | + |
| 0722-24  | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0722-80  | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0722-97  | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0722-128 | F <sub>5</sub> |                                |        | S     | S | —         | — |
| 0722-129 | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0722-149 | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |
| 0722-150 | F <sub>5</sub> |                                |        | R     | R | +         | + |

(注) R : 「Acc259」(抵抗性)型 S : 「斑小粒系-1」(感受性)型 H : ヘテロ型

+: 「Acc259」型あるいはヘテロ型 — : 非「Acc259」型, 1系統2反復で遺伝子型を調査した.

### 第3節 *Pga1* と *Pga2* の関係の検討

#### 目 的

*Pga1* および *Pga2* と連鎖した DNA マーカーを染色体上にマッピングし、その位置関係を調査する。*Pga1* を保持する小豆と *Pga2* を保持する小豆のとの交配後代を利用して二つの遺伝子に対立遺伝子である可能性を証明する。

#### 材料および方法

##### (1) 連鎖地図の作成

「斑小粒系-1」×「しゅまり」の  $F_2$  集団 140 個体から DNA を抽出し、Han ら (2005) らの報告した SSR マーカーおよび本試験で開発した Pg118, Pg204 を用いて遺伝子型を調査した。Schuelke (2000) の報告を参考に各 SSR マーカーのフォワードプライマーの先頭には M13 配列 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') を付加し、蛍光標識した M13 プライマー (6-FAM/VIC/NED/PET- 5'-ACGACGTTGTAAAACGAC-3', Applied Biosystems) を混合して PCR に供試した。PCR 反応は表 3-3-1 の条件で行った。

表 3-3-1 SSR マーカーによる PCR 反応条件

| PCR 反応液                            |      |         |
|------------------------------------|------|---------|
| D.W.                               | 3.20 | $\mu$ l |
| AmpliTaqGold Master Mix            | 5.00 | $\mu$ l |
| フォワードプライマー(M13配列付加) 5pmol/ $\mu$ l | 0.40 | $\mu$ l |
| リバープライマー 5pmol/ $\mu$ l            | 0.20 | $\mu$ l |
| 蛍光プライマー 5pmol/ $\mu$ l             | 0.20 | $\mu$ l |
| DNA テンプレート                         | 1.00 | $\mu$ l |
| total                              | 10.0 | $\mu$ l |

##### PCR 条件

|      |      |           |
|------|------|-----------|
| 94°C | 7 分  | 1 サイクル    |
| 94°C | 20 秒 | } 35 サイクル |
| 56°C | 20 秒 |           |
| 72°C | 30 秒 |           |
| 72°C | 5 分  | 1 サイクル    |

PCR 増幅産物は ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で多型を検出し GeneScan-600 LIZ をサイズスタンダードとして GeneMapper® software で解析を行った。連鎖地図の作成は MAPMAKER/Exp v3.0b (Lander *et al.* 1987) を用い、連鎖距離の計算は Kosambi のマップ関数を利用した (Kosambi 1943)。

##### (2) 育成系統を利用した *Pga1* と *Pga2* の関係解明

*Pga1* と連鎖した DNA マーカーである Pg118 と、*Pga2* と連鎖した DNA マーカーである Pg204 を利用し

て、*Pga1* 保持系統と *Pga2* 保持系統の交配後代 230 系統の遺伝子型を調査した。また過去の接種検定によりアズキ落葉病菌 1～3 のすべてのレースに抵抗性を示した「十系 934 号」( $F_7$ ) (9609-1 ( $F_6$ ) × 9930-5( $F_2$ )) を用いて個体別に DNA マーカー検定と接種試験 (第 1 章と同様の手法) を行った。

\* 9609-1 ( $F_6$ ): 系譜に「黒小豆 (岡山)」をもつ落葉病レース 1 抵抗性系統

\* 9930-5( $F_2$ ): 「Acc259」をレース 2 抵抗性供与親とし、レース 1 抵抗性の「十育 140 号」を 3 回戻し交配した系統

## 結 果

Han ら (2005) が報告した SSR マーカーの中で、「しゅまり」と「斑小粒系-1」間で多型を示したのは 89 マーカーで、本試験で開発した Pg118, Pg204 の結果を加えて合計 91 マーカーで連鎖解析を行ったところ、Pg118 と Pg204 は第 3 連鎖群の同じ位置にマップされた (図 3-3-1)。

*Pga1* 保持系統と *Pga2* 保持系統の交配後代を検定した結果、*Pga1* と *Pga2* はいずれか一方のみを保持して固定しており、二つの遺伝子を同時に保持する系統、すなわち二つの DNA マーカー検定の結果がともに「R」を示した系統はなかった (表 3-3-2)。

「十系 934 号」( $F_7$ ) の個体別 DNA マーカー検定結果は *Pga1* 保持固定型と *Pga2* 保持固定型およびヘテロ保持型に分離した。接種試験の結果では、*Pga1* 保持固定型の個体はレース 2 に、*Pga2* 保持固定型の個体はレース 3 にそれぞれ感受性を示し、ヘテロ保持型の個体はすべてのレースに抵抗性を示した (表 3-3-3)。

## 考 察

連鎖解析の結果アズキ落葉病抵抗性は第 3 連鎖群の末端側にマップされた (図 3-3-1)。この領域には Han (2005) らの論文では多型を示すマーカーが少なく、今回開発した DNA マーカーは第 3 連鎖群で多型を得る有効なマーカーとしても利用できる可能性が示唆された。加えて Pg118 と Pg204 は同じ位置にマップされたことから、二つの抵抗性遺伝子は少なくとも 1cM 以内で連鎖していると考えられた。*Pga1* 保持系統と *Pga2* 保持系統の交配後代からは、どちらか一方の抵抗性遺伝子をもつ系統しか得られなかったことから (表 3-3-2)、二つの抵抗性遺伝子は非常に近い場所に座乗していると推察された。また、アズキ落葉病菌 3 レースに対して抵抗性の可能性があった「十系 934 号」は *Pga1* と *Pga2* をヘテロで保持していたことから 3 つのレースに抵抗性であったことが明らかとなり (表 3-3-3)、DNA マーカー調査によってどちらかの遺伝子型に固定したと判定された系統は、2 つのレースに対してのみ抵抗性を示したことから、*Pga1* と *Pga2* を同時に保持させることは困難であると推察され、二つの遺伝子は対立遺伝子であると考えられた。

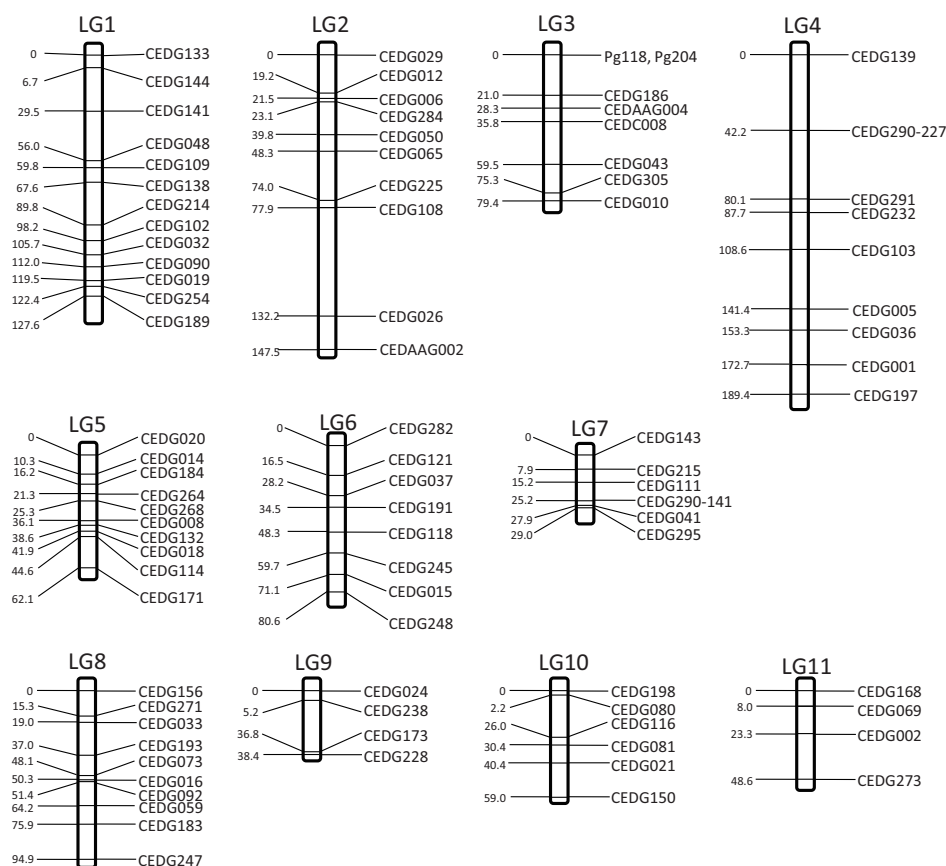


図 3-3-1 しゅまり×斑小粒系-1 の連鎖地図

表 3-3-2 育成系統を用いた DNA マーカー検定結果 (抜粋)

| 系統名         | 世代             | 組合せ                                   |                              | DNA マーカー検定結果 |             |
|-------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------|--------------|-------------|
|             |                | 母                                     | 父                            | <i>Pga1</i>  | <i>Pga2</i> |
| 0708- 1     | F <sub>5</sub> | 9830-9-1 ( <i>Pga1</i> )              | 十系 975 号 ( <i>Pga2</i> )     | H            | H           |
| 0708-48     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0708-49     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0708-50     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | S            | R           |
| 0708-51     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0708-52     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | S            | R           |
| 0708-53     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | S            | R           |
| 0708-54     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | S            | R           |
| 0708-55     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0708-56     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | S            | R           |
| 0708-57     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | R            | S           |
| 0708-58     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | R            | S           |
| 0708-59     | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -1  | F <sub>5</sub> | 0418(F <sub>3</sub> ) ( <i>Pga1</i> ) | 0211(F5)mass ( <i>Pga2</i> ) | S            | R           |
| 0617- I -2  | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -3  | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -4  | F <sub>5</sub> |                                       |                              | S            | R           |
| 0617- I -5  | F <sub>5</sub> |                                       |                              | R            | S           |
| 0617- I -6  | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -7  | F <sub>5</sub> |                                       |                              | S            | R           |
| 0617- I -8  | F <sub>5</sub> |                                       |                              | R            | S           |
| 0617- I -9  | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -10 | F <sub>5</sub> |                                       |                              | R            | S           |
| 0617- I -11 | F <sub>5</sub> |                                       |                              | R            | S           |
| 0617- I -12 | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -13 | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -14 | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -15 | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |
| 0617- I -16 | F <sub>5</sub> |                                       |                              | R            | S           |
| 0617- I -17 | F <sub>5</sub> |                                       |                              | H            | H           |

注) R : *Pga1* では Pg118, *Pga2* では Pg204 の遺伝子型が抵抗性型

H : ヘテロ型

S : *Pga1* では Pg118, *Pga2* では Pg204 の遺伝子型が感受性型

表 3-3-3 「十系 934 号」の個体別の DNA マーカー検定結果およびアズキ落葉病接種検定結果

| アズキ落葉病接種菌株 | DNA マーカー検定結果 | 個体数 | 接種検定結果 |
|------------|--------------|-----|--------|
| レース 1      | <i>Pga1</i>  | 4   | R      |
|            | ヘテロ          | 2   | R      |
|            | <i>Pga2</i>  | 5   | R      |
| レース 2      | <i>Pga1</i>  | 2   | S      |
|            | ヘテロ          | 1   | R      |
|            | <i>Pga2</i>  | 9   | R      |
| レース 3      | <i>Pga1</i>  | 1   | R      |
|            | ヘテロ          | 5   | R      |
|            | <i>Pga2</i>  | 5   | S      |

注) *Pga1* : Pg118 で抵抗性型 *Pga2* : Pg204 で抵抗性型

## 第4章 アズキ落葉病抵抗性遺伝子と アズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係解明

### 第1節 *Pga1* とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係解明

#### 目 的

これまで *Pga1* を保持したアズキ落葉病抵抗性品種は、アズキ萎凋病に対しても抵抗性を示すことが明らかとなっていることから、*Pga1* とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係を調査する。

#### 材料および方法

「しゅまり」と「斑小粒系-1」の単交配由来の  $F_2$  世代 192 個体について、Pg118 を用いて *Pga2* の有無を推定し、個体別にアズキ萎凋病抵抗性検定試験に供試した。加えて同様の  $F_2$  集団 4278 個体について Pg139 と Pg77 の遺伝子型を調査し、両マーカー間で組み換えを生じていた個体を採種し、後代を用いてアズキ落葉病、アズキ萎凋病の接種検定を行った。 $F_3$ 、 $F_4$  個体は、それぞれ DNA マーカー検定を行い、Pg118 の遺伝子型が固定しているものを抵抗性領域が固定した個体とみなして接種検定を行った。アズキ落葉病は第一章と同様の手法、アズキ萎凋病については *Fusarium oxysporum* f sp. *adzukicola* 96-3 (レース 3) を用いて接種検定を行った。菌は 1/4 PDA 寒天培地で 2 週間培養後、培地上に滅菌蒸留水を加えて筆で分生胞子をかき集め、 $10^6$  spores/ml に調整し接種源とした。接種方法はアズキ落葉病菌と同様で、発病調査は接種約 1 ヶ月半後に実施した。

#### 結 果

萎凋病接種検定の分離比は抵抗性：感受性 = 3 : 1 の比に適合した (表 4-1-1)。萎凋病抵抗性を示した個体はすべて Pg118 の遺伝子型は「しゅまり」型、あ

るいはヘテロ型であった。一方で感受性個体は 1 個体がヘテロ型だったのみで残りの 44 個体は「斑小粒系-1」型だった。

Pg77 と Pg139 の二つのマーカー間では 10 個体が組み換えを生じていた。組み換え個体のグラフ遺伝子型、およびその後代を用いたアズキ落葉病菌レース 1 接種検定、アズキ萎凋病接種検定結果を表 4-1-2 に示した。Pg118 の遺伝子型とアズキ落葉病およびアズキ萎凋病の接種検定結果はすべて一致した。

#### 考 察

$F_2$  集団のアズキ萎凋病接種検定結果により、アズキ萎凋病抵抗性は優性の 1 遺伝子に支配されていると推察された (表 5-5-1)。加えて萎凋病抵抗性と Pg118 の遺伝子型は 1 個体を除いてすべて一致していた。以上より *Pga1* と「しゅまり」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子は強連鎖していると推察された。

$F_2$  大規模集団を用いて抵抗性遺伝子近傍の組み換え個体を探索した結果、Pg118 による遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性はすべて一致しており、Pg118 は高精度な DNA マーカーとして利用できることが改めて示された。通常育種の選抜規模は系統初年目において最大 300 系統程度／組合せであることから、4000 個体以上を供試しても検定結果が一致している Pg118 を利用することによって、ほぼ 100% の確率でアズキ落葉病の抵抗性は判別可能であると考えられた。同様に Pg118 の遺伝子型とアズキ萎凋病抵抗性も一致していた。このことより *Pga1* と「しゅまり」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子は強連鎖ではなく同一遺伝子が作用している可能性もあると推測された。

表 4-1-1 *Pga1* 近傍組み換え個体の遺伝子型と落葉病、萎凋病接種検定結果

| 試験 | 系統名または組合せ     | DNA マーカーによる検定結果 ( <i>Pga1</i> ) | 萎凋病接種検定結果 |        | $\chi^2$<br>(3:1) | P    |
|----|---------------|---------------------------------|-----------|--------|-------------------|------|
|    |               |                                 | 抵抗性個体数    | 感受性個体数 |                   |      |
| 1  | しゅまり          | R                               | 5         | 0      | —                 | —    |
|    | 斑小粒系 1        | S                               | 0         | 5      | —                 | —    |
|    | 斑小粒系 -1/ しゅまり | R                               | 51        | 0      | —                 | —    |
|    | $F_2$         | H                               | 96        | 1      | —                 | —    |
|    |               | S                               | 0         | 44     | —                 | —    |
| 合計 |               |                                 | 147       | 45     | 0.25              | 0.62 |

注) R:「しゅまり」型 H:ヘテロ型 S:「斑小粒系-1」型

表 4-1-2 *Pga1* 近傍組み換え個体の遺伝子型と落葉病，萎凋病接種検定結果

| F <sub>2</sub> 個体番号 | DNA マーカーによる遺伝子型 |       |       |      |       | アズキ落葉病<br>後代検定 (F <sub>3</sub> , F <sub>4</sub> ) | アズキ萎凋病<br>後代検定 (F <sub>4</sub> ) |
|---------------------|-----------------|-------|-------|------|-------|---------------------------------------------------|----------------------------------|
|                     | Pg139           | Pg118 | Pg126 | Pg77 | Pg138 |                                                   |                                  |
| 241                 | +               | -     | -     | -    | -     | S                                                 | S                                |
| 435                 | +               | -     | -     | -    | -     | S                                                 | S                                |
| 445                 | -               | -     | +     | +    | +     | S                                                 | S                                |
| 1233                | -               | +     | +     | +    | +     | R                                                 | R                                |
| 1393                | -               | -     | +     | +    | +     | S                                                 | S                                |
| 1570                | +               | +     | -     | -    | -     | R                                                 | R                                |
| 1900                | -               | -     | +     | +    | +     | S                                                 | S                                |
| 2909                | +               | +     | -     | -    | -     | R                                                 | R                                |
| 2983                | -               | -     | -     | +    | +     | S                                                 | S                                |
| 3163                | -               | -     | +     | +    | +     | S                                                 | S                                |

注) +:「しゅまり」型 -:「斑小粒系-1」型

## 第 2 節 *Pga2* とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係解明

### 目 的

*Pga2* を保持する「Acc259」はアズキ萎凋病に対しても抵抗性を示すが、*Pga2* とアズキ萎凋病の抵抗性遺伝子の連鎖関係は明らかとなっていないため、*Pga2* とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係を調査する。

### 材料および方法

「十系 912 号」「十系 944 号」(*Pga1* 保持)と「十系 927 号」(*Pga2* 保持)の後代を用いて、DNA マーカーによる抵抗性遺伝子の有無の調査および各系統 12 個体についてアズキ萎凋病接種検定を行った。また「Acc259」と「斑小粒系-1」の単交配由来の F<sub>2</sub> 世代 306 個体について、Pg204 を用いて *Pga2* の有無を推定し、個体別にアズキ萎凋病抵抗性検定試験に供試した。接種試験は第 1 節と同様の手法で行った。

### 結 果

「十系 912 号」(*Pga1* 保持)と「十系 927 号」(*Pga2* 保持)の後代 4 系統のうち、*Pga2* を保持していたのは「十系 1065 号」「十系 1066 号」「十系 1067 号」でそのうち「十系 1065 号」のみがアズキ萎凋病に対して抵抗性を示し、他の 2 系統は感受性であった。*Pga1* を保持していた「十系 1068 号」はアズキ萎凋病に対して抵抗性を示した(表 4-2-1)。「十系 944 号」(*Pga1* 保持)と「十系 927 号」(*Pga2* 保持)の後代 4 系統のうち *Pga2* を保持していたのは「十系 1070 号」「十系 1071 号」「十系 1072 号」で、「十系 1070 号」「十系 1071 号」はアズキ萎凋病抵抗性が系統内で分離していた。また「十系 1072 号」は感受性を示した。*Pga1* を保持していた「十系 1069 号」はアズキ萎凋病に対して抵抗性を示した。

つぎに「斑小粒系-1」と「Acc259」由来の F<sub>2</sub> 個体について、Pg204 の遺伝子型を調査しアズキ萎凋病接種検定を行った。2 回の試験ともに、萎凋病抵抗性は優性 1 対の遺伝子支配の理論値と適合した。また、Pg204 の遺伝子型とアズキ萎凋病の接種検定結果は独立していた(独立性検定結果 試験 1:  $\chi^2 = 1.83$ ,  $P = 0.40$ , 試験 2:  $\chi^2 = 0.01$ ,  $P = 0.997$ ) (表 4-2-2)。

表4-2-1 育成系統の落葉病抵抗性マーカー検定結果およびアズキ萎凋病接種検定結果

| 供試系統      | 組合せ      |          | 落葉病マーカー検定   |             | アズキ萎凋病<br>接種検定結果 |
|-----------|----------|----------|-------------|-------------|------------------|
|           | 母        | 父        | <i>Pga1</i> | <i>Pga2</i> |                  |
| 十系 1065 号 | 十系 912 号 | 十系 927 号 | —           | +           | R                |
| 十系 1066 号 |          |          | —           | +           | S                |
| 十系 1067 号 |          |          | —           | +           | S                |
| 十系 1068 号 |          |          | +           | —           | R                |
| 十系 1069 号 | 十系 944 号 | 十系 927 号 | +           | —           | R                |
| 十系 1070 号 |          |          | —           | +           | 分離               |
| 十系 1071 号 |          |          | —           | +           | 分離               |
| 十系 1072 号 |          |          | —           | +           | S                |

注1) R: 抵抗性 S: 感受性

注2) +: *Pga1*, *Pga2* それぞれの抵抗性遺伝子保持 —: 非保持表4-2-2 「斑小粒系-1」と「Acc259」由来のF<sub>2</sub>個体の落葉病抵抗性マーカー検定結果およびアズキ萎凋病接種検定結果

| 系統名または組合せ      | DNA マーカーによる<br>検定結果 ( <i>Pga2</i> ) | 萎凋病接種検定結果 |        | $\chi^2$<br>(3:1) | <i>P</i> |
|----------------|-------------------------------------|-----------|--------|-------------------|----------|
|                |                                     | 抵抗性個体数    | 感受性個体数 |                   |          |
| Acc259         | R                                   | 10        | 0      | —                 | —        |
| 斑小粒系 1         | S                                   | 0         | 15     | —                 | —        |
| 斑小粒系 -1/Acc259 | R                                   | 29        | 12     | —                 | —        |
| F <sub>2</sub> | H                                   | 59        | 29     | —                 | —        |
|                | S                                   | 33        | 9      | —                 | —        |
|                | 合計                                  | 121       | 50     | 1.64              | 0.20     |
| Acc259         | R                                   | 10        | 0      | —                 | —        |
| 斑小粒系 1         | S                                   | 0         | 15     | —                 | —        |
| 斑小粒系 -1/Acc259 | R                                   | 26        | 10     | —                 | —        |
| F <sub>2</sub> | H                                   | 46        | 18     | —                 | —        |
|                | S                                   | 25        | 10     | —                 | —        |
|                | 合計                                  | 97        | 38     | 0.71              | 0.40     |

注) R: 「Acc259」型 H: ヘテロ型 S: 「斑小粒系-1」型

## 考 察

本試験より「Acc259」は優性1対のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子を有しているが、*Pga2*とは独立して遺伝することが示唆された。これまでの試験結果から「しゅまり」と「Acc259」は異なるアズキ萎凋病抵抗性遺伝子を持っていると考えられることから、我々は「しゅまり」が有するアズキ萎凋病抵抗性遺伝子を *Rfoa1*、「Acc259」が有するアズキ萎凋病抵抗性遺伝子を *Rfoa2* と命名した。*Rfoa1*, *Rfoa2* ともにアズキ萎凋病レース3に対して抵抗性を示すことは明らかとなっているが (Kondo

et al. 2009), 近年 *Rfoa1* を保持する「きたのおとめ」を侵す新たなアズキ萎凋病レースが報告されており (小倉ら 2012), 新レースに対して *Rfoa2* が抵抗性を示すのか、今後の研究の進捗に期待する。また、育種としてはこれまで *Pga1* を導入した系統のアズキ萎凋病抵抗性検定試験は後期世代まで省略してきたが、*Pga2* を導入した系統についてはアズキ萎凋病抵抗性検定試験を行う必要があることが明らかとなった。抵抗性検定の簡便化のために *Rfoa2* を判別するDNAマーカーの開発が急務であると考えられる。

## 第5章 総合論議

### 第1節 アズキ落葉病抵抗性遺伝子と連鎖した DNA マーカー開発の意義

アズキ落葉病抵抗性育種は 1970 年代後半から開始され、発生圃場を利用した選抜を行ってきたが、短期輪作で圃場を利用したことから、優占レースに変化が生じ、目的とする病原レースが正確に判定できない事例があった。レース分化が問題視された 1990 年代後半には高精度な人工接種法が確立されたが（藤田ら 1996, Kondo *et al* 2002）、人工接種法は、感染から発病までにおよそ 2～3 ヶ月と時間を要し、発病までの管理に労力が必要であった。加えて温室の面積の制約から多点数をこなすことが困難であった。

本研究によって開発した DNA マーカーは、検定精度 99% 以上（1cM 以下で連鎖）と推定され、検定に要する期間も 1 日 200 点程度となり飛躍的に短期間で抵抗性系統の選抜を行うことが可能となった（表 5-1-1）。現在では、第 2 章第 4 節で検討した  $F_5$  世代の播種前選抜が実用化され、年間 1500 個体程度を DNA マーカー検定に供試しており、 $F_6$  世代で展開する系統数が約 3 分の 2 となり、これまで実施していた  $F_6$  世代以降の固定系統の確認作業も省略されるようになった。このことにより、アズキ落葉病発生圃場の利用は初期世代の集団選抜と地方番号系統の特性検定のみとなり、圃場の輪作年数を延ばすことが可能となった。短期輪作によるアズキ落葉病以外の障害の発生、新たなレースの発生などの問題の回避に DNA マーカー選抜は貢献できていると考えられる。

本試験によって Pg118, Pg204 は第 3 連鎖群の末端にマップされた。この領域は Han ら（2005）の連鎖地図では座乗しているマーカーがほとんどない領域であり、本試験において開発した DNA マーカーは第 3 連鎖群末端に座乗している多型マーカーとしても利用できることから、今後の小豆研究の発展にも寄与できる。

### 第2節 高精度な DNA マーカーを開発するための条件

本研究で開発したマーカーはすでに実用化され、2005 年に検定を開始して以来 5000 系統以上の検定を行っているが、2012 年までに選抜された地方番号系統で、アズキ落葉病抵抗性と DNA マーカーによる遺伝子型が異なる系統は見られていない。このように精度の高い検定が可能な DNA マーカーを開発できた要因の一つとして、感受性親に病徴が明確な「斑小粒系-1」を選定したことがあげられる。「斑小粒系-1」は接種試験においてほぼエスケープがなく全個体に明確な病徴が現れる。そのため、分離世代においても個体ごとの正確な検定ができた。アズキ落葉病抵抗性検定試験の比較品種の一つとして供試していた「エリモショウズ」は、接種した各個体について 4 段階の発病指数で評価しその平均値を DSI（Disease severity index）で判定したときには感受性と評価されるが、12 個体を個別に見ると 1 個体から 2 個体程度病徴が明確でない個体が見られた。「エリモショウズ」を感受性親とした解析集団を利用していた場合は分離系統の評価が難しくなり、検定個体数を増やす必要が生じたり、本試験ほどの高精度な DNA マーカーが開発できなかった可能性もある。DNA マーカーを開発するためには、精度の高い検定手法があること、目的とする形質が比較的少数の因子によって支配されていることが前提であるが、これらに加えて、過去のデータを精査し、解析に適した材料を選定することによって、より効率的に精度の高い DNA マーカーを開発することが可能となると考えられる。

表 5-1-1 アズキ落葉病抵抗性検定法の比較

| 比較項目     | 検定方法                                |                                         |             |
|----------|-------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|
|          | 落葉病検定圃場利用                           | 人工接種法                                   | DNA マーカー    |
| 判定方法     | 8 月下旬～9 月上旬の病徴                      | 病徴および茎切断面の褐変                            | PCR による増幅断片 |
| 検定に要する期間 | 播種後 3 ヶ月程度                          | 接種後 2～3 ヶ月                              | 1 日 (200 点) |
| 問題点      | 1 年に 1 回しか検定できない<br>優占レースが変化する場合がある | 一度の検定における共試点数は、温室の<br>スペースに影響され、100 点前後 | 特になし        |

### 第3節 アズキ落葉病抵抗性とアズキ萎凋病抵抗性の関係

武田ら(2007)は「しゅまり」と「斑小粒系-1」の単交配由来のF<sub>2</sub>集団319個体を供試してアズキ落葉病抵抗性遺伝子とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の連鎖解析を行い、二つの抵抗性遺伝子が強連鎖、あるいは同一遺伝子の多面発現である可能性を示唆した。本研究では同一組合せのF<sub>2</sub>集団4278個体から*Pga1*近傍のDNAマーカーによる組み換え個体を選抜し、その後代で接種検定を行い、Pg118の遺伝子型とアズキ落葉病抵抗性、アズキ萎凋病抵抗性*Rfoa1*の表現型が一致することを示した。一方で*Pga1*と対立関係にあると考えられる*Pga2*とそれを有する「Acc259」のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子*Rfoa2*が独立して遺伝することが本研究で明らかとなった。「しゅまり」の後代においては、抵抗性遺伝子の極近傍で組み変わった個体を利用しても二つの病害抵抗性は一致したが、*Pga1*と対立関係にあると推測される*Pga2*がアズキ萎凋病抵抗性遺伝子と連鎖していなかったことから、*Pga1*と*Rfoa1*は同一遺伝子の多面発現ではなく、強連鎖している可能性が高い。*Pga1*が連鎖していると推測される第3連鎖群は、Hanらの連鎖地図では座乗しているマーカーがほとんどない領域であることから、*Pga1*と*Rfoa1*は連鎖地図上では強連鎖しているが、物理地図上は離れた位置に座乗している可能性もあると推測される。現在農業生物資源研究所が中心となって、アズキと適応性に優れた*Vigna*属野生種15種の全ゲノムを解読し公開する「*Vigna*属ゲノムプロジェクト：高度環境適応性研究基盤の構築」が遂行中である。今後公開される情報を利用して二つの抵抗性遺伝子の関係を明らかにすることが期待される。

### 第4節 今後のアズキ落葉病抵抗性育種の方向性

千葉ら(1987)は「寿小豆」と「黒小豆(岡山)」の雑種については1対の遺伝子と仮定した場合の適合度がきわめて高かったが、「寿小豆」と「赤豆」を交配した組合せでは、2対の遺伝子により変動を仮定した場合の適合性も若干あったと報告している。また近藤らは、人工接種による全身病徴から判定した抵抗性検定では「赤豆」、「Acc2515」が3レースに抵抗性であると報告している(Kondo *et al.* 2005, 2009)。本試験のように、接種後2ヶ月前後の茎内褐変の有無で抵抗性を判定した場合には「Acc2515」および「赤豆」はレース3に対して感受性と判定されるが、全身病徴を緩和するような、もう一つの抵抗性因子を保有している可能性がある。これ

までのアズキ落葉病抵抗性育種は、3レース抵抗性品種の育成を目標に行われてきた。しかし、本研究によってアズキ落葉病菌レース1, 3抵抗性遺伝子*Pga1*とレース1, 2抵抗性遺伝子*Pga2*は、対立関係にあることが示され、二つの抵抗性遺伝子を同時に保有させることが困難であることが明らかとなった。今後の育種の方向性としては「赤豆」などの有する新たな抵抗性因子を導入することによって、3つのレースに対して実害がでない抵抗性品種を育成することが必要であると考えられる。「赤豆」を系譜にもつ「ハツネショウズ」「アケノワセ」は*Pga2*を保持していないがアズキ落葉病に対して中間的な抵抗性を示すことから、今後はこれらの抵抗性を効率的に導入する手法を検討することが望ましい。また、*Pga1*と*Pga2*のどちらの抵抗性遺伝子を利用するかについては、当面は同時にアズキ萎凋病抵抗性も導入できる*Pga1*を優先的に利用し、レース2抵抗性に対しては*Pga2*以外の抵抗性因子を導入する手法が効率的であると考えられる。*Pga1*と*Pga2*を同時に保持させることは困難であるが、*Pga2*と*Rfoa2*は独立して遺伝することから、*Pga1*と強連鎖していると推察される*Rfoa1*と「Acc259」由来の萎凋病抵抗性である*Rfoa2*は比較的容易に同時に保持させることができる。複数の抵抗性遺伝子を集積させることによって、新たなアズキ萎凋病菌レースに対する対策も可能となるであろう。

### 第5節 結 語

MASの利点については、簡便ですぐに結果が得られる、環境条件に左右されないことに加えて、抽出したDNAを利用して異なる形質を複数調査できるということがあげられる。アズキにおいては、本試験で開発したDNAマーカーによって先の二つの項目については大きな成果が得られているが、現在のところアズキ落葉病抵抗性検定以外のMASは行っていない。複数の形質でMASができる体制になることによって、費用対効果がさらに大きくなると考えられる。現在「Acc259」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーの開発、アズキ茎疫病菌抵抗性遺伝子と連鎖したDNAマーカーの開発、耐冷性と連鎖したDNAマーカーの探索等が行われており、これらのDNAマーカーが早期に実用化されることが期待される。

本試験で精度の高いDNAマーカーを開発できたのは、育成場の担当者が育種事業の傍らで解析用の材料を長い年月をかけて育成したこと、材料の観察をしっかりと行い、精度の高い検定を行ってきたことが背景にある。MASはあくまでも目印(マーカー)を利用して選抜を

行っているだけで、その表現型を見ているわけではない。材料の観察、精度の高い検定があって精度の高い DNA マーカーは開発できるが、どんなに高精度のマーカーであっても、それを利用して表現型が確実に判定できている訳ではないことを利用する側は常に注意する必要がある。MAS を行った際には、選抜した材料について観察によって検証を行うことが望ましい。アズキ落葉病に関しては育成後期に汚染圃場に播種することによって、抵抗性を確認しており、そのシステムが確立されているので理想的な利用の仕方と考えられる。近年のゲノム研究の進捗は非常に早く、アズキにおいても DNA マーカーに関する報告、抵抗性遺伝子に関する報告などが数多くだされるだろう。自分たちが観察によって検証できる形質なのか、どの段階で表現型を確認するのか等を熟慮しながら、それらの報告を利用していくことによって、さらなる育種の効率化、優れた品種が育成されることを期待する。

## 摘 要

アズキ落葉病は土壌伝染性の重要病害で、薬剤防除は難しいあるいは高価であるため、長期輪作以外では抵抗性品種の作付けによる被害回避がもっとも効果的である。本病害は感染から発病までにおよそ2～3ヶ月と時間を要し、発病までの管理に労力を必要とする。また発生圃場を利用した選抜では、抵抗性系統の作付け増加にともなって優占レースに変化が生じたり、新レースの発生を助長する可能性がある。以上のことより、小豆育種の中で育成系統に本病害抵抗性を導入するために、接種試験や病徴の確認を行わずに抵抗性の植物体が判別できる、DNA マーカーを利用した選抜が有効であると考えられた。本研究では、北海道で多く分布しているアズキ落葉病菌レース1に対する抵抗性遺伝子と連鎖したDNA マーカーを開発し、加えて新たに発生が確認されたアズキ落葉病菌レース2に対する抵抗性遺伝子と連鎖したDNA マーカーを開発し、品種改良における有効性を調査した。また、アズキ落葉病菌レース1抵抗性遺伝子、レース2抵抗性遺伝子とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係を調査した。その概略は以下の通りである。

### 1. アズキ落葉病抵抗性遺伝子と連鎖したDNA マーカーの開発に関わる研究成果

#### (1) レース1抵抗性遺伝子 (*Pga1*) と連鎖したDNA マーカーの開発

アズキ落葉病菌レース1抵抗性の「しゅまり」と同感受性の「斑小粒系-1」を交配したF<sub>3</sub>世代105系統を供試して試験を行った。1024組のプライマーセットを利用したAFLP解析によって、抵抗性バルクと感受性バルク間で多型を示した6つのAFLPマーカーを探索し、得られた増幅断片およびその周辺配列の領域を利用して5つのアガローススペースのDNA マーカー (Pg77, Pg118, Pg138, Pg139, Pg126) を開発した。

「しゅまり」×「斑小粒系-1」のF<sub>2</sub>大規模集団4278個体の中で10個体が開発した5つのマーカー間で組み換えを生じていた。従って5つのマーカーは全て抵抗性遺伝子に強連鎖していると考えられ、その中でPg118が最も抵抗性遺伝子に近いDNA マーカーであると考えられた。育成系統を用いた調査においても適用範囲が広いと推察されたPg118をホモ接合型、ヘテロ接合型の区別が可能な共優性マーカーに改良した。

育成品種・系統を調査した結果、Pg118による遺伝子型が「しゅまり」(抵抗性) 型のものは、「赤豆」、「Acc259」および「Acc2515」およびその後代を除いてアズキ落葉病菌レース1に抵抗性を示した。このことにより、これまで育種で利用されてきた「小長品-10」「円葉 (刈63号)」などは「しゅまり」や「黒小豆 (岡山)」と同様の抵抗性遺伝子 *Pga1* を有する可能性が高いと考えられた。また十勝農業試験場で保有している遺伝資源の中で、アズキ落葉病抵抗性の可能性があった209点の中からPg118の遺伝子型でスクリーニングした59の遺伝資源に落葉病菌レース1, 2, 3を接種した結果、56点が *Pga1* を保持していると推察された。

一方でアズキ落葉病レース1かつレース2抵抗性である「赤豆」および「Acc259」などは、Pg118の遺伝子型では「斑小粒系-1」型となり、その抵抗性と遺伝子型が一致しなかったことから *Pga1* 以外の抵抗性遺伝子を持っている可能性が高いと考えられた。

#### (2) レース2抵抗性遺伝子 (*Pga2*) と連鎖したDNA マーカーの開発

アズキ落葉病菌レース2抵抗性の「Acc259」と同感受性の「斑小粒系-1」の交配後代を利用して試験を行った。バルク法を利用したAFLP解析によって、抵抗性バルクと感受性バルク間で多型を示した6つのAFLPマーカーを探索した。レース1抵抗性判別マーカーであるPg118を利用した系統検定の結果から、*Pga1* と *Pga2* は強連鎖あるいは対立遺伝子である可能性が高かったことから、連鎖解析は行わず「Acc259」のPg118対立座領域を利用して「Acc259」を判別できる優性マーカーPg118(R2)を設計した。また両親の配列情報からプライマーを設計しやすいと判断したPg204を共優性マーカーとした。二つのDNA マーカーは *Pga2* と1cM以下で連鎖しており、育種における抵抗性選抜においては十分の精度であると推察された。

F<sub>3</sub>個体および育成系統を利用した調査の結果Pg204とPg118 (R2) の遺伝子型とアズキ落葉病菌レース2抵抗性は一致していた。また十勝農業試験場で保有している遺伝資源の中で、アズキ落葉病抵抗性の可能性があった209点についてPg204の遺伝子型でスクリーニングした22点に落葉病菌レース1, 2, 3を接種した結果、21点が *Pga2* を保持していると推測された。

### (3) *Pga1* と *Pga2* の関係

「しゅまり」×「斑小粒系-1」の  $F_2$  世代 140 個体を供試した連鎖解析の結果、*Pga1* と連鎖している DNA マーカー Pg118 と *Pga2* と連鎖している DNA マーカー Pg204 は第 3 連鎖群の末端の同じ位置にマップされた。また、*Pga1* 保持系統と *Pga2* 保持系統の交配後代からは、二つの抵抗性遺伝子を保持した系統は得られなかった。以上のことより *Pga1* と *Pga2* は対立遺伝子であり、二つの抵抗性遺伝子を同時に保持させることは困難であると推察された。

## 2. アズキ落葉病抵抗性遺伝子とアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の関係

「しゅまり」×「斑小粒系-1」の  $F_2$  世代 192 個体で解析を行った結果、Pg118 の遺伝子型がヘテロ型あるいは「しゅまり」型の個体は 1 個体を除いて萎凋病抵抗性を示し、「斑小粒系-1」型はすべて感受性となった。このことより *Pga1* と「しゅまり」由来のアズキ萎凋病抵抗性遺伝子 *Rfoa1* は強連鎖していると考えられた。一方で「Acc259」×「斑小粒系-1」の  $F_2$  世代 306 個体で解析を行った結果、「Acc259」由来の萎凋病抵抗性は優性の 1 遺伝子に支配されているが、Pg204 の遺伝子型とは一致しておらず、「Acc259」由来の萎凋病抵抗性遺伝子 *Rfoa2* は *Pga2* とは独立して遺伝することが示唆された。

## 謝

本研究をとりまとめるにあたり、終始懇切なご指導とご校閲をいただいた北海道大学大学院農学院生物資源生産学部門教授の近藤則夫博士に深謝する。また、ご校閲の労をいただいた北海道大学大学院農学院生物資源生産学部門教授の増田清博士、講師の秋野聖之博士に深謝する。さらに、本研究のきっかけを与えていただき詳細なご指導とご校閲をいただいた北海道立総合研究機構農業研究本部中央農業試験場作物開発部長の竹内徹氏に感謝申し上げます。

貴重な実験材料を養成、提供していただいた上川農業試験場島田尚典研究主幹、中央農業試験場藤田正平主査、十勝農業試験場佐藤仁主査、田澤暁子研究主任、北見農業試験場青山聡研究主査に感謝の意を表する。

また、中央農業試験場旧遺伝子工学科の紙谷元一氏（現上川農業試験場長）、佐々木純氏（現北見農業試験場主査）、堀田治邦氏（現道南農試主幹）および生物学

## 辞

グループ富田謙一氏（現北見農試研究主幹）、木口忠彦研究主査（現中央農試作物グループ）、鈴木千賀研究主任、山下陽子研究職員には様々な協力とご助言をいただいた。中でも生物学グループ主幹の入谷正樹氏には研究環境、論文執筆環境を整備していただいた。また小倉玲奈研究主任には病気の接種、萎凋病試験に多大なご協力をいただいた。現道南農業試験場長の柳沢朗博士には研究マネジメント、実験計画手法について適切なお助言を賜った。研究補助員諸氏には実験の遂行にあたり多大なご協力をいただいた。元北海道大学大学院吉井孝光氏、武田藍氏にはマーカー開発の一部を担当していただいた。以上の関係各位に篤くお礼申し上げます。

最後に、私の仕事を理解し、終始支えてくれた夫と、気持ちを切りかえて仕事をするを教えてくれた4人の子供たちに感謝の気持ちを捧げる。

## 引 用 文 献

- 1) 青山 聡・島田尚典・長谷川尚輝・村田吉平・藤田正平・松川 勲 (2009) アズキ新品種「きたろまん」の育成. 北海道立農試集報 94 : 1-16
- 2) Botstein, B., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331
- 3) 足立大山・成河智明・千葉一美・村田吉平・原 正紀・島田尚典 (1988) あずき新品種「ハツネショウズ」の育成について. 北海道立農試集報 57 : 13-24
- 4) 千葉一美 (1982) アズキ落葉病抵抗性の育種学的研究 I. 抵抗性の品種間差異. 北海道立農試集報 48 : 56-63
- 5) 千葉一美・成河智明・村田吉平・足立大山 (1987) アズキ落葉病抵抗性の育種学的研究Ⅲ. 抵抗性の遺伝様式とその導入効果. 北海道立農試集報 56 : 1-7
- 6) 藤田正平 (2007) アズキ落葉病およびアズキ茎疫病の抵抗性系統作出に関わる育種学的研究. 北海道立農業試験場報告 115
- 7) Fujita, S., N. Kondo, H. Shimada, K. Murata and S. Naito (2007) Re-evaluation and selection of adzuki beans (*Vigna angularis*) to breed cultivars resistant to a new race of *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola*, the causal agent of adzuki bean brown stem rot (BSR). *Breed. Res.* 9: 87-95.
- 8) 藤田正平・村田吉平・島田尚典・青山 聡・千葉一美・松川 勲・白井滋久・三浦豊雄・越智弘明・近藤則夫 (2002) アズキ新品種「しゅまり」の育成. 北海道立農試集報 82 : 31-40
- 9) 藤田正平・島田尚典・村田吉平・田引 正・三浦豊雄 (1995) あずき新品種「きたのおとめ」の育成について. 北海道立農試集報 68 : 17-31
- 10) Han, O. K., A. Kaga, T. Isemura, X. W. Wang, N. Tomooka, D. A. Vaughan. (2005) A genetic linkage map for azuki bean [*Vigna angularis* (willd.) ohwi & Ohashi] *Theor. Appl. Genet.* 111(7): 1278-1287
- 11) Harrington, T. C. and D. L. McNew (2003) Phylogenetic analysis places the *Phialophora*-like anamorph genus *Cadophora* in the Helotiales. *Mycotaxon* 87: 141-151.
- 12) 北海道農業試験会議 (成績会議) 平成 19 年資料 小麦品質関連遺伝子を判別する DNA マーカー (2007)
- 13) Kobayashi, K., H. Yamamoto, H. Negishi and A. Ogoshi (1991) *Formae specialis* differentiation of *Phialophora gregata* from adzuki bean and soybean in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 57: 225-231.
- 14) 北沢建治・柳田騏策 (1989) アズキ立枯病の病原菌 *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *adzukicola* n.f.sp. 日植病報 55 : 76-78
- 15) 近藤則夫 (1995) アズキ萎凋病に関する研究. 北海道大学農学部邦文紀要 19 : 411-472
- 16) 近藤則夫・小林喜六 (1983) アズキ落葉病菌の生態に関する研究. アズキ落葉病菌分生胞子の土壌中での生存と発芽. 北海道大学邦文紀要 14 : 48-49
- 17) Kondo, N., S. Fujita, K. Murata and A. Ogoshi (1998) Detection of two races of *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola*, the causal agent of adzuki bean brown stem rot. *Plant Dis.* 82: 928-930.
- 18) Kondo, N. and F. Kodama (1989) *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*, casual agent of adzuki bean wilt, and detection of three races of the fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn* 55:451-457
- 19) Kondo, N., K. Nakazawa, S. Fujita H. Shimada and S. Naito (2005) New virulent race of *Phialophora gregata* f. sp. *adzukicola* associated with continuous cultivation of adzuki bean cultivar Acc259. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 360-363.
- 20) Kondo, N., A. Notsu, S. Naito, S. Fujita and H. Shimada (2004) Distribution of *Phytophthora vignae* f. sp. *adzukicola* races in adzuki bean fields in Hokkaido, Japan. *Plant Dis.* 88: 875-877.
- 21) Kondo, N., H. Shimada and S. Fujita (2009) Screening of cultivated and wild adzuki bean for resistance to race 3 of *Cadophora gregata* f. sp. *adzukicola*, cause of brown stem rot. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 181-187.
- 22) Kondo, N. and N. Tomooka (2012) New sources of resistance to *Cadophora gregata* f. sp. *adzukicola* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola* in *Vigna* spp. *Plant Dis.* 96: 562-568.
- 23) Kosambi, D. D. (1943) The estimation of map

- distances from recombination values. *Ann. Hum. Genet.* 12: 172-175
- 24) Lyamichiev, V., M. A. D. Brow and J.E. Dahlberg (1993) Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 260:778-783
- 25) Michelmore, R. W., I. Paran and V. Kesseli (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
- 26) 村田吉平・成河智明・千葉一美・佐藤久泰・足立大山・松川 勲 (1985) あずき新品種「エリモショウズ」の育成について. 北海道立農試集報 53 : 103-113
- 27) 村田吉平・松川 勲・藤田正平 (1998) 系譜作成ソフトによる十勝農試の小豆育種における交配組合せの解析. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会報 39 : 121-122 (講要)
- 28) Murray, M. G. and W. F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucl. Acids Res.* 8(19): 4321-4326.
- 29) 成田武四・赤井 純・坪木和男 (1971) アズキ落葉病とその病原菌. 植物防疫 25 : 353-358
- 30) 小倉玲奈・小松 勉・松浦 準 (2012) アズキ萎凋病菌の新レースの発生. 北日本病害虫研報 63: 242 (講演要旨)
- 31) 島田尚典・藤田正平・千葉一美・村田吉平・足立大山・原 正紀・白井滋久・成河智明・土屋武彦・三浦豊雄 (1992) あずき新品種「アケノワセ」の育成について. 北海道立農試集報 64 : 59-74
- 32) Schuelke, M. (2000) An economic method for fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18: 233-234
- 33) 鈴木孝子 (2012) DNA マーカーを利用した選抜 (MAS : Marker assisted selection) 育種の成果と展望. 北農 79 : 9-13
- 34) 武田藍 (2007) アズキ落葉病およびアズキ萎凋病抵抗性遺伝子の連鎖解析と座乗連鎖解析と座乗連鎖群の決定. 北海道大学大学院農学研究科生物資源生産学専攻. 修士論文
- 35) 土屋貞夫・赤井 純 (1976) アズキ落葉病について. 第8回土壌伝染病談話会資料 : 14-18
- 36) Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- 37) Williams, J. H. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535
- 38) Williams, M. N. V., N. Pande, S. Nair, M. Mohan and J. Bennett (1991) Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theo. Appl. Genet.* 82:489-498

## Studies on the development of DNA markers linked to genes for resistance to brown stem rot of adzuki bean and validation of their efficiency

### Summary

Brown stem rot (BSR) of adzuki bean is a serious soil-borne disease in Hokkaido. Chemical controls of this disease are ineffective, expensive, or both, therefore cultivation of cultivars resistant to this disease is the most effective control method except crop rotation. BSR-resistant adzuki bean lines have been screened in pathogen-infected fields and it takes 2 or 3 months until detection of disease symptoms. This method is time consuming and labor intensive. And continuous cultivation of adzuki bean may promote evolution of new races of the pathogen and may change the dominant race in the field. Due to the above reasons, DNA markers can be used in marker-assisted selection (MAS) programs to aid with introduction of BSR resistance in adzuki bean for effective identification of resistant plants without inoculation and detection of symptoms. In the present study, objectives were as follows: 1) to develop the DNA markers that are located near the BSR resistance gene conferring resistance to *Cadophora gregata* race 1 that have had a wide distribution in Hokkaido; 2) to develop the DNA markers that are located near the BSR resistance gene conferring resistance to *C. gregata* race 2; 3) to research the relationship between BSR resistant gene and resistance gene conferring *Fusarium oxysporum* race 3, and we validated the efficiency of these DNA markers in the breeding programs.

#### (1) Development of the DNA markers linked to BSR race 1 resistance gene (*Pga1*)

We used 105  $F_3$  lines derived from a cross between *V. angularis* cv. 'Syumari' and cv. 'Buchishoryukei-1' to develop DNA markers. 'Syumari', which is derived from cv. 'Kuroshozu' (Okayama), is resistant to race 1 of *C. gregata* f. sp. *adzukicola*, whereas 'Buchishoryukei-1' is highly susceptible to BSR. Six amplified fragment-length polymorphism (AFLP) markers were polymorphic between resistant and susceptible bulked groups based on 1024 primer sets. Five DNA markers (Pg77, Pg118, Pg138, Pg139 and Pg126) were developed from the nucleotide sequences of polymorphic AFLP markers and their flanking regions.

We identified 10  $F_2$  plants that showed recombination for the developed DNA markers in the population of 4278  $F_2$  individuals. Therefore, the five markers were tightly linked to one another, and located near the BSR locus. Pg118 was the marker most closely linked to *Pga1* based on the segregation of BSR resistance in the  $F_3$  progeny of the recombinant plants. Therefore we converted Pg118 into a codominant marker for its easier use in marker-assisted selection for adzuki bean BSR resistance.

We evaluated the resistance to BSR for adzuki bean bred lines and cultivars to confirm the general applicability of the developed markers to the BSR resistance as tagging markers. All lines and cultivars showed 'Syumari' genotype at Pg118 marker were resistant to BSR race 1 except for 'Akamame', 'Acc259' and 'Acc2515' and their progenies. 'Maruba' (Kari 63) and 'Shochohin-10' that had been used as BSR resistant lines may carry the same BSR resistance gene *Pga1* as 'Kuroshozu' (Okayama). In addition 59 germplasms were selected from 209 germplasms in Tokachi Agricultural Experiment Station by identifying the genotype with Pg118 marker and were inoculated with BSR race1, 2 and 3. 56 germplasms were supposed to have *Pga1*.

Whereas 'Akamame' and 'Acc259' that are resistant to BSR races 1 and 2 showed the same genotype as 'Buchishoryukei-1'. Their resistance to BSR was not consistent with the genotype of Pg118. Therefore they are likely to carry different BSR resistance genes.

## (2) Development of the DNA markers linked to BSR race 2 resistance gene (*Pga2*)

We used 105  $F_3$  lines derived from a cross between cv. 'Acc259' and cv. 'Buchishoryukei-1' to develop DNA markers. 'Acc259' is resistant to race 2 of *C. gregata* f. sp. *adzukicola*. AFLP analysis revealed that six fragments were polymorphic between resistance and susceptible bulked groups. The result of some research using Pg118 marker suggested that *Pga1* and *Pga2* were tightly linked or allelic therefore we developed at first dominant marker Pg118 (R2) which identify 'Acc259' genotype using same locus of Pg118 in 'Acc259'. Next we developed Pg204 as co-dominant marker because two parents showed high polymorphism in the nucleotide sequences of polymorphic AFLP markers and their flanking regions. These two markers were linked to *Pga2* less than 1cM and were supposed high accuracy markers for adzuki breeding.

The genotypes of Pg204 and Pg118 (R2) were correspondent with resistance to BSR race 2 in  $F_3$  generation individuals and bred lines. In addition 22 germplasms were selected from 209 germplasms by genotype with Pg204 marker and were inoculated BSR race1, 2 and 3. 21 germplasms were supposed to have *Pga2*.

## (3) Relationship between *Pga1* and *Pga2*

Linkage analysis was performed with 140  $F_2$  individuals from the cross between 'Syumari' and 'Buchishoryukei-1'. Pg118 linked to *Pga1* and Pg204 linked to *Pga2* were mapped to the same locus on terminal of the linkage group 3. There were no lines having both *Pga1* and *Pga2* in the progenies from the cross between *Pga1* resistant line and *Pga2* resistant line. Therefore two genes were allelic and it might be impossible to introduce *Pga1* and *Pga2* together.

## 2. Relationship between BSR resistance gene and Adzuki *Fusarium* wilt (AFW) resistance gene

The plants having 'Syumari' genotype or heterozygous genotype showed resistance to AFW whereas the plants having 'Buchishoryukei-1' genotype showed susceptible to AFW with 192  $F_2$  individuals from the cross between 'Syumari' and 'Buchishoryukei-1'. Therefore we considered that *Pga1* was tightly linked to AFW resistance gene, *Rfoa1* derived from 'Syumari'. On the other hand the result of the genetic analysis with 306  $F_2$  individuals from the cross between 'Acc259' and 'Buchishoryukei-1' suggested AFW resistance was controlled by a single dominant gene but there was no relationship between the genotype of Pg204 and AFW resistance. Accordingly AFW resistance gene *Rfoa2* derived from 'Acc259' was independent to *Pga2*.