

学位論文題名

イタリアンライグラスにおけるいもち病抵抗性
DNA マーカーの開発と育種利用に関する研究

学位論文内容の要旨

日本の代表的な飼料作物であるイタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.) における重要病害にライグラスいもち病がある。主に西南暖地において、近年イタリアンライグラスの早播き化に伴い、本病の発生が増加する傾向にあり、収量や飼料品質を著しく低下させている。しかし、本病害に対して圃場抵抗性を有する品種は、極早生の「さちあおば」に限られていることから、新たな抵抗性品種の育成が強く望まれている。いもち病圃場抵抗性の付与を効率的に達成するためには、圃場における抵抗性の強さおよび永続性が明らかとなっている抵抗性素材を探索し、その抵抗性に関与する遺伝子の特定と抵抗性遺伝子に連鎖する DNA マーカーを開発することが重要である。しかしながら、イタリアンライグラスにおいて、いもち病圃場抵抗性に関与する遺伝子情報はなく、抵抗性 DNA マーカーの開発はこれまで行われていない。

そこで本研究では、イタリアンライグラスにおけるいもち病抵抗性品種育成の効率化を図るために、「さちあおば」に由来する抵抗性個体を用いて本抵抗性に関する遺伝解析を行い、抵抗性選抜に利用可能な DNA マーカーの開発を行い、その育種への利用を検討した。また、いもち病抵抗性に関して、イネとの比較ゲノム研究を実施した。

いもち病抵抗性選抜 DNA マーカーを開発する最初の段階として、イタリアンライグラスより得られた発現塩基配列タグ (expressed sequence tag; EST) 配列および病害抵抗性遺伝子アナログ (disease resistance gene analog; RGA) 配列の連鎖地図上への位置づけを試みた。両配列をゲノム特異的に検出する STS (sequence-tagged-sites) 増幅断片より CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) を検出したマーカーについて連鎖解析を行った結果、69 個の EST 配列と 10 個の RGA 配列に由来する遺伝子マーカーを、7 連鎖群で構成されるイタリアンライグラス連鎖地図上に位置づけることができた。

次に、いもち病抵抗性個体と感受性個体間で交配した F_1 解析集団について、いもち病菌接種による抵抗性評価試験を行った。解析集団内における表現型分離の結果から、抵抗性個体由来

のいもち病抵抗性の遺伝様式は優性の1遺伝子 (*LmPil*) によるものと推定した。つづいて、本解析集団を材料に、バルク法により抵抗性に連鎖する AFLP (amplified fragment length polymorphism) マーカーを探索したところ、*LmPil* 座に緊密に連鎖する25個の AFLP マーカーを同定した。

LmPil 座に連鎖する遺伝子マーカーを開発するために、イタリアンライグラス連鎖地図上に位置づけた CAPS マーカーを用いた前述の F₁ 解析集団での遺伝解析から、*LmPil* 座近傍に座乗する EST 由来 CAPS マーカー「P56」を同定することができた。本マーカーによって検出されるバンドの分離パターンから、P56 は *LmPil* 座の抵抗性アレルに相当する特異的断片の検出が認められた。また、イタリアンライグラス連鎖地図情報より、*LmPil* 座は第5連鎖群 (LG 5) に座乗することが明らかとなった。イネとライグラス間における比較ゲノム研究において、LG5 の大部分はイネ第9染色体 (Chr 9) に対応することが報告されている。

そこで、イネとイタリアンライグラスの間で認められる機能遺伝子の配列類似性 (シンテニー) 情報を活用することにより、*LmPil* 座に連鎖する新たな DNA マーカーの作出を検討した。すなわち、イタリアンライグラス LG5 とシンテニーをもつイネ Chr 9 の EST クローン情報を活用し、イネゲノム配列と EST 配列のアライメント解析に基づいてプライマー対を設計した。これらプライマー対をいもち病抵抗性 F₁ 解析集団で SSCP (single strand conformation polymorphism) 解析に供した。連鎖解析の結果、P56 と16個のイネ由来 EST マーカーを含む計17個の DNA マーカーで構築された新たな *LmPil* の部分連鎖地図を作成した。

以上のように、イタリアンライグラスいもち病抵抗性品種を育成するための有用な DNA マーカーが開発でき、また、イネとのシンテニー関係など抵抗性に関する遺伝子情報についての有用な知見を得ることができた。なお、本研究で開発した DNA マーカーを利用して抵抗性品種が育成中であり、近日、品種登録が予定されている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 田 敏 彦
副 査 教 授 荒 木 肇
副 査 准教授 山 崎 健 一
副 査 助 教 平 田 聡 之
副 査 教 授 近 藤 則 夫 (大学院農学研究院)

学位論文題名

イタリアンライグラスにおけるいもち病抵抗性 DNA マーカーの開発と育種利用に関する研究

日本の代表的な飼料作物であるイタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.) における重要病害にライグラスいもち病がある。主に西南暖地において、近年イタリアンライグラスの早播き化に伴い、本病の発生が増加する傾向にあり、収量や飼料品質を著しく低下させている。しかし、本病害に対して圃場抵抗性を有する品種は、極早生の「さちあおば」に限られていることから、新たな抵抗性品種の育成が強く望まれている。いもち病圃場抵抗性の付与を効率的に達成するためには、圃場における抵抗性の強さおよび永続性が明らかとなっている抵抗性素材を探索し、その抵抗性に関与する遺伝子の特定と抵抗性遺伝子に連鎖するDNAマーカーを開発することが重要である。しかしながら、イタリアンライグラスにおいて、いもち病圃場抵抗性に関与する遺伝子情報はなく、抵抗性DNAマーカーの開発はこれまで行われていない。

そこで本研究では、イタリアンライグラスにおけるいもち病抵抗性品種育成の効率化を図るために、「さちあおば」に由来する抵抗性個体を用いて本抵抗性に関する遺伝解析を行い、抵抗性選抜に利用可能なDNAマーカーの開発を行い、その育種への利用を検討した。また、いもち病抵抗性に関して、イネとの比較ゲノム研究を実施した。

いもち病抵抗性選抜DNAマーカーを開発する最初の段階として、イタリアンライグラスより得られた発現塩基配列タグ (expressed sequence tag; EST) 配列および病害抵抗性遺伝子アナログ (disease resistance gene analog; RGA) 配列の連鎖地図上への位置づけを試みた。両配列をゲノム特異的に検出するSTS (sequence-tagged-sites) 増幅断片よりCAPS (cleaved amplified

polymorphic sequence) を検出したマーカーについて連鎖解析を行った結果、69個のEST配列と10個のRGA配列に由来する遺伝子マーカーを、7連鎖群で構成されるイタリアンライグラス連鎖地図上に位置づけることができた。

次に、いもち病抵抗性個体と感受性個体間で交配したF₁解析集団について、いもち病菌接種による抵抗性評価試験を行った。解析集団内における表現型分離の結果から、抵抗性個体由来のいもち病抵抗性の遺伝様式は優性の1遺伝子 (*LmPi1*) によるものと推定した。つづいて、本解析集団を材料に、バルク法により抵抗性に連鎖するAFLP (amplified fragment length polymorphism) マーカーを探索したところ、*LmPi1*座に緊密に連鎖する25個のAFLPマーカーを同定した。

*LmPi1*座に連鎖する遺伝子マーカーを開発するために、イタリアンライグラス連鎖地図上に位置づけたCAPSマーカーを用いた前述のF₁解析集団での遺伝解析から、*LmPi1*座近傍に座乗するEST由来CAPSマーカー「P56」を同定することができた。本マーカーによって検出されるバンドの分離パターンから、P56は*LmPi1*座の抵抗性アレルに相当する特異的断片の検出が認められた。また、イタリアンライグラス連鎖地図情報より、*LmPi1*座は第5連鎖群 (LG 5) に座乗することが明らかとなった。イネとライグラス間における比較ゲノム研究において、LG5の大部分はイネ第9染色体 (Chr 9) に対応することが報告されている。

そこで、イネとイタリアンライグラスの間で認められる機能遺伝子の配列類似性 (シンテニー) 情報を活用することにより、*LmPi1*座に連鎖する新たなDNAマーカーの作出を検討した。すなわち、イタリアンライグラスLG5とシンテニーをもつイネChr 9のESTクローン情報を活用し、イネゲノム配列とEST配列のアライメント解析に基づいてプライマー対を設計した。これらプライマー対をいもち病抵抗性F₁解析集団でSSCP (single strand conformation polymorphism) 解析に供した。連鎖解析の結果、P56と16個のイネ由来ESTマーカーを含む計17個のDNAマーカーで構築された新たな*LmPi1*の部分連鎖地図を作成した。

以上のように、イタリアンライグラスいもち病抵抗性品種を育成するための有用なDNAマーカーが開発でき、また、イネとのシンテニー関係など抵抗性に関する遺伝子情報についての有用な知見を得ることができた。被害が甚大ないもち病に対するイタリアンライグラス抵抗性品種を早期に育成するためのDNAマーカーが本研究で開発されたため、今後、抵抗性品種育成に役立ち、自給飼料の安定供給に貢献することが期待される。なお、本研究で開発したDNAマーカーを利用した抵抗性品種を現在育成中で、2～3年後に、品種登録が予定されている。

よって、申請者は博士 (環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。