

博士(環境科学) 平田球子

学位論文題名

牧草におけるSSRマークターの開発およびイタリアンライグラス
冠さび病抵抗性に関するマークター選抜育種

(Development of SSR markers in forage grasses and marker-assisted selection for crown rust disease of Italian ryegrass)

学位論文内容の要旨

近年、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 、SSR (Simple Sequence Repeats) など様々なDNAマークターが開発され、遺伝解析などに利用されている。わが国においてオーチャードグラスとイタリアンライグラスは重要な牧草であるにもかかわらず、これまでの研究で利用してきたDNAマークターはRAPD、AFLPのような非種特異的で優性なマークターのみであった。SSRは共優性マークターで対立遺伝子数が多く、ゲノム全体を解析できることからRFLP、RAPD、AFLPに比べ有利な点が多い。しかし、開発には労力や時間、費用がかかるため、これまで両草種ではSSRマークターの開発が行われなかった。そこで本研究ではオーチャードグラスでは品種識別を目的に、またイタリアンライグラスは連鎖地図作製および品種識別を目的として、SSRマークターを、それぞれのゲノムDNAから開発した。またEST (expressed sequence tag)情報に基づくSSRマークター (EST-SSRマークター) は翻訳領域由来であることから保存性が高く遺伝子機能の変異を検出できる可能性があること、種間の識別においてより正確な遺伝解析ができる特徴がある。イタリアンライグラスは近縁種のペレニアルライグラス、ドクムギ、トルフェスクやメドウフェスクと交雑が可能なため、EST-SSRはイタリアンライグラスと他種との種間雑種育種に有用であると考えられる。そこで、イタリアンライグラスおよび近縁種なペレニアルライグラスとドクムギのESTシークエンス情報から、EST-SSRマークターを開発した。また、作成したSSRマークターの利用例としてイタリアンライグラス連鎖地図を作成し、その連鎖地図情報をを利用して冠さび病抵抗性遺伝子の同定と連鎖群を特定した。また特定した冠さび病抵抗性遺伝子は近傍マークターを利用してマークター選抜を行い、冠さび病抵抗性品種を育成した。

イタリアンライグラスのゲノムDNAの(CA)濃縮ライブラリーから1,544クローンの塩基配列を決定し、357組み合わせのSSRマークターを開発した。また、オーチャードグラスゲノムDNAの4つの濃縮ライブラリー (GA/TC、GA/TC、AAG/TTC、TAGA/TCTA)

を用いて各1,000クローン（合計4,000クローン）の塩基配列から606組み合わせのSSRマークターを開発した。ESTシークエンス情報からは、イタリアンライグラスにおいて54,811のESTから49プライマー組み合わせのSSRマークターを、ペレニアルライグラスにおいて1,661のESTから124プライマー組み合わせのSSRマークターを、ドクムギにおいて6,336のESTから46プライマー組み合わせのSSRマークターをそれぞれ開発した。本研究で開発したイタリアンライグラスゲノムDNA由来のSSRマークターはイタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、ハイブリッドライグラス、トルフェスクの品種識別に利用され、オーチャードグラスのゲノムDNA由来SSRマークターはオーチャードグラス品種識別に利用されている。

既にAFLPとRFLPマークターで高密度連鎖地図が作製されている細胞質雄性不稔の解析集団（11S2×11F3のF₁集団60個体）を利用してtwo-way pseudo-testcross法により、開発したイタリアンライグラスゲノムDNA由来SSRマークターを用いて、選抜したAFLPマークターと全てのRFLPマークターを加えて遺伝解析を行い連鎖地図を構築した。マッピング集団の親で多型が見られた260組み合わせのSSRのうち、218プライマー組み合わせが連鎖地図に座乗し、この連鎖群は11S2および11F3ともに染色体数と同じ7本であった。11S2の連鎖地図は887.8cM、11F3の連鎖地図は795.8cM、11S2と11F3の連鎖地図を合わせて1683.6cMを網羅した。このSSRマークターに基づく連鎖地図は供試個体数が少ないものの、選抜AFLPマークターの配置が既存高密度連鎖地図のAFLPの位置と全く同じであることから、信頼性の高い連鎖地図であると考えられた。またRFLPマークター情報から国際コンソーシアムILGI（International *Lolium* Genome Initiative）の連鎖群に対応した連鎖群の番号を付けたことにより、今後のマークター解析で連鎖群の情報を持つこのSSRマークターはreference mapとして役立つと思われる。

イタリアンライグラスにおいて冠さび病は重要病害の一つであることから、開発したSSRマークターにAFLPマークターを加えて、冠さび病抵抗性遺伝子の特定を行った。はるかぜ32×ワセアオバ17のF₁（151個体）を解析集団として、357組み合わせのSSRマークターと1,024組み合わせのAFLPマークターについてバルク法を用いて多型解析を行った。44のAFLPマークターと11のSSRマークターからなる連鎖地図に抵抗性遺伝子（*LmPc2*）が座乗し、主働遺伝子*LmPc2*は4つのAFLPマークター（atg.ctct170, ata.ccca200, aat.cggg70, atg.cgaa225）と0cMで連鎖し、SSRマークター11-03E307と12.3cMで連鎖した。*LmPc2*の近傍のAFLPマークターから作出したSTSマークターのうちSTS-cccaは、品種「はるかぜ」において抵抗性個体のみを選抜することができ育種を行う際の選抜マークターとして有用なマークターであった。

特定したイタリアンライグラスの冠さび病抵抗性遺伝子*LmPc2*は、畜産草地研究所において特定された他の冠さび病抵抗性遺伝子*LmPc3*, *LmPc4*とともに育種に用いた。3種類の冠さび病抵抗性遺伝子（*LmPc2*, *LmPc3*, *LmPc4*）のうち、*LmPc2*と*LmPc3*についてマークター選抜を行い、*LmPc4*は冠さび病の人工接種による選抜のみで育種を行った。育成方法はそれぞれの抵抗性遺伝子を持つ個体に冠さび病感受性の耐倒伏性系統と2回交配し、2世代目で3つの遺伝子を集団内交雑する方法を用い、これにより3種の抵抗性遺伝子を保有する冠さび病抵抗性や耐倒伏性などに優れる系統「JFIR-11」を育成し、「レジストR」として2010年に品種登録出願された。他殖性植物においてMAS（marker-assisted selection）により遺伝子を集積した新品種の育成はまだ少なく、マークター選抜育種の一例となった。

以上、本研究において開発したSSRマークターは連鎖地図作製や品種識別に有用であり、マークターを利用することにより効率的に冠さび病抵抗性品種を育成することができた。今後、牧草においていろいろな育種目標に関してSSRマークターを利用した効率的で迅速な品種の育成に利用できると期待される。

学位論文審査の要旨

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

学位論文題名

牧草におけるSSRマーカーの開発およびイタリアンライグラス 冠さび病抵抗性に関するマーカー選抜育種

(Development of SSR markers in forage grasses and marker-assisted selection
for crown rust disease of Italian ryegrass)

重要な牧草であるイタリアンライグラスとオーチャードグラスでは、連鎖地図作製とマーカー選抜および品種識別の目的として、共優性マーカーで対立遺伝子数が多くゲノム全体を解析できる SSR (simple sequence repeats) マーカーの開発が望まれていた。そこで本研究ではこの2草種を中心にゲノム DNA および EST(expressed sequence tag)から SSR マーカーを開発した。また、開発した SSR マーカーの利用例としてイタリアンライグラスにおいて連鎖地図を作成して冠さび病抵抗性遺伝子の同定と連鎖群を特定するとともに、冠さび病抵抗性遺伝子近傍マーカーを用いてマーカー選抜を行い、冠さび病抵抗性を示すイタリアンライグラス品種を育成した。

イタリアンライグラスのゲノム DNA の (CA) 濃縮ライブラーから 357 組み合わせの SSR マーカーを、また、オーチャードグラスのゲノム DNA の 4 つの濃縮ライブラー (GA/TC, GA/TC, AAG/TTC, TAGA/TCTA) から 606 組み合わせの SSR マーカーをそれぞれ開発した。一方 EST-SSR マーカーの開発として、54,811 個のイタリアンライグラス EST から 49 組み合わせの SSR マーカーを、1,661 個のペレニアルライグラス EST から 124 組み合わせの SSR マーカーを、6,336 個のドクムギ EST から 46 組み合わせの SSR マーカーをそれぞれ開発した。本研究で開発したイタリアンライグラスゲノム DNA 由来の SSR マーカーはイタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、ハイブリッドライグラス、トールフェスクの品種識別に利用され、オーチャードグラスのゲノム DNA 由来 SSR マーカーはオーチャードグラス品種識別に利用されている。

AFLP (amplified fragment length polymorphism) と RFLP (restriction fragment length polymorphism) マーカーで高密度連鎖地図が既に作製されている解析集団 (11S2×11F3 の F₁ 集団 60 個体) を利用して two-way pseudo-testcross 法により、本研究で開発した

イタリアンライグラスゲノム由来 SSR マーカーを用いて、一部の AFLP と全ての RFLP マーカーを加えて遺伝解析を行い、新たな連鎖地図を構築した。集団の親で多型が見られた 260 組み合わせの SSR マーカーのうち、218 の SSR マーカーが連鎖地図に座乗し、この連鎖群は 11S2 および 11F3 ともにイタリアンライグラス基本染色体数と同じ 7 本であった。11S2 は 887.8cM、11F3 は 795.8cM の連鎖地図で、両親の連鎖地図を合わせて 1,683.6cM を網羅した。この SSR マーカーに基づく連鎖地図は、解析集団の供試個体数が少ないので、AFLP マーカーの配置が既存高密度連鎖地図の AFLP の位置と全く同じであることから、信頼性は高いと考えられた。また、これらの座乗している SSR マーカーは、RFLP マーカー情報に基づき国際コンソーシアム ILGI (International *Lolium* Genome Initiative) に対応した連鎖群番号を付けることができたため、遺伝解析に有用であると考えられた。

冠さび病はイタリアンライグラスの重要な病害の一つであり、抵抗性遺伝子の特定を行った。イタリアンライグラス解析集団 [はるかぜ 32×ワセアオバ 17 の F_1 (151 個体)] を供試して、357 組み合わせの SSR マーカーと 1,024 組み合わせの AFLP マーカーを用いてバルク法により多型解析を行った。44 組み合わせの AFLP マーカーと 11 組み合わせの SSR マーカーからなる連鎖地図に抵抗性遺伝子 (*LmPc2*) が座乗し、*LmPc2* は 4 つの AFLP マーカー (atg.ctct170, ata.ccca200, aat.cggt70, atg.cgaa225) と 0cM で連鎖し、SSR マーカー 11-03E307 と 12.3cM で連鎖した。*LmPc2* の近傍 AFLP マーカーから作出した STS マーカーのうち、STS-ccca は品種「はるかぜ」において抵抗性個体のみを選抜することができ、選抜マーカーとして有用であった。

実際の育種事業において、特定した冠さび病抵抗性遺伝子 *LmPc2* に、他の冠さび病抵抗性遺伝子 *LmPc3*、*LmPc4* との集積を図った。3 種類の抵抗性遺伝子のうち、*LmPc2* と *LmPc3* についてはマーカーにより選抜し、*LmPc4* は人工接種のみで選抜した。育種方法はそれぞれの抵抗性遺伝子を持つ個体に冠さび病感受性の耐倒伏性系統と 2 回交配した。選抜 2 世代目で 3 つの遺伝子を有する個体を集団内交雑することにより、3 種の抵抗性遺伝子を保有し冠さび病抵抗性を示すとともに耐倒伏性や収量性などに優れる系統「JFIR-11」を育成した。イタリアンライグラス品種「レジスト R」として 2010 年に品種登録出願した。他殖性植物では MAS (marker-assisted selection) により遺伝子を集積した品種の育成はまだ少なく、マーカー選抜育種の一例となった。

以上、本研究において開発した SSR マーカーは連鎖地図作製や品種識別に有用であり、マーカーを利用することにより冠さび病抵抗性を示す実用品種を効率的に育成することができた。今後、いろいろな育種場面で、これらの SSR マーカーを利用して効率的に品種が育成されることが期待される。

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