

学 位 論 文 要 旨

氏 名 杉 田 亘

題 目 *Capsicum annuum* における分子マーカーの開発と QTL 解析に関する育種学的基礎研究 (Fundamental breeding studies on the development of the molecular markers and QTL analyses in *Capsicum annuum*)

本研究は、ピーマンにおける分子マーカーを用いた選抜育種技術の確立を目的として、まず初めに薬培養技術による種内交雑由来倍加半数体 (DH) 集団の育成とその評価、第 2 に DH 集団を用いた分子マーカーの開発と連鎖地図の作製、第 3 に疫病抵抗性および未熟果実色に関する遺伝的評価とそれに基づいた QTL 解析を行ったものである。

1. ピーマンの種内交雑由来倍加半数体 (DH) 集団の育成に先立ち、効率的な薬培養法について検討した。その結果、ピーマンの薬培養では、0.5mg/L IAA および 30g/L ショ糖を添加した CP 培地を用い、25°C の暗培養条件下において 20 日間培養することで、高い植物体再分化率が得られた。そこで、薬培養由来再分化系統の自然倍加系統である「K9-11」と「AC2258」の種内交雑由来 F₁ を用いて、本研究で確立した薬培養手法により DH 集団の育成を試みたところ、両親の持つ PMMoV 抵抗性、辛み、疫病抵抗性および未熟果実色等の各種形質が分離した DH176 系統を育成することができた。
2. DH176 の自殖集団を用いて、PMMoV に対する抵抗性遺伝子座 (L^3) および辛み発現に関する遺伝子座 (C) に連鎖する分子マーカーを検索したところ、 L^3 は、その近傍部である 2.8 cM に位置する優性および共優性の SCAR マーカーを、C は 0.6 cM に位置する共優性の SSR マーカーを開発した。次に、これらの分子マーカーと HEGS/AFLP および RAPD 等によって得られた合計 530 の分子マーカーを用いて連鎖解析を行ったところ、 L^3 および C 遺伝子座を含む 16 の連鎖群で構成された総連鎖群長 1100.5 cM の連鎖地図を作製することができた。
3. この連鎖地図を用いて疫病抵抗性に関する QTL 解析を行ったところ、3 連鎖群に 3 つの QTL が検出された。疫病抵抗性は、量的な遺伝形質であり、1 つの主働因子および少なくとも 2 つ以上の微働因子が関与していることが示された。また、2 つの QTL、*Phyt-1* および *Phyt-2* をホモ接合で同時に有することで、強度な疫病抵抗性を有するピーマンの育成が可能であることが示された。
4. さらに、この連鎖地図から未熟果実色に関する QTL 解析を行ったところ、6 連鎖群に 7 つの QTL が検出された。黄白色果実の出現に関しては、2 つの質的な遺伝子座 ($W1$ および $W2$) が関与していることが明らかとなり、それらに連鎖した CAPS マーカーを開発した。

以上のことから、本研究においては、ピーマン有用形質に連鎖する分子マーカーの開発、QTL 解析およびその育種的利用について総合的に考察した。本研究の成果は、ピーマンにおける有用形質の遺伝解析およびマーカー選抜育種技術の開発に大きく貢献できるものと思われる。

学位論文要旨

氏名

Toru Sugita

題目

Fundamental breeding studies on the development of the molecular markers and QTL analyses in *Capsicum annuum* (*Capsicum annuum* における分子マーカーの開発と QTL 解析に関する育種学的基礎研究)

With the aim of contributing to marker-assisted selection (MAS) programs for sweet pepper breeding purposes, we performed QTL analyses with a linkage map and evaluated the use of the linkage DNA markers as selection markers in MAS.

1. The efficient anther culture method using one-step culture were established, and revealed regeneration efficiency in six accessions. A DH population (n=176) was developed by one-step culture method of an F₁ hybrid between two accessions of *C. annuum*, 'K9-11' of sweet pepper and 'AC2258' of pepper.
2. The dominant and codominant SCAR markers located at a distance of 2.8 cM from *L*³ locus for PMMoV resistance were developed by applying the bulked segregant analysis method. Also, a microsatellite marker linked to *C* locus for the expression of pungency was found at a distance of 0.6 cM. A genetic linkage map consisting of a total of 16 linkage groups covering a total distance of 1100.5 cM was primarily constructed by HEGS/AFLP and RAPD using a total of 530 molecular markers and two phenotypic loci.
3. Three QTLs for resistance to *Phytophthora capsici* were detected on three LGs. It was suggested that the resistance to *P. capsici* was polygenic and was controlled by a single major gene with a large effect, and some minor genes. The presence of both QTLs, *Phyt-1* and *Phyt-2*, under homozygous conditions will enable the breeding of resistant cultivars of sweet pepper.
4. Seven QTLs for immature fruit color were detected on six LGs. It was suggested that the several quantitative trait loci are involved in various shades of green for immature fruit color. However, it was suggested that the immature fruit color of sulphury white was determined by two qualitative loci (*W1* and *W2*), and we developed CAPS markers linked to *W1* and *W2*.

In conclusion, we developed DNA markers linked to useful traits. It is thought that our results contribute to MAS programs for sweet pepper breeding purposes.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	杉田 亘
審査委員	主査 宮崎大学 教授 明石 良
	副査 宮崎大学 教授 藪谷 勤
	副査 鹿児島大学 助教授 橋本文雄
	副査 宮崎大学 教授 辰巳保夫
	副査 佐賀大学 助教授 鈴木章弘
審査協力者	
題目	<p><i>Capsicum annuum</i> における分子マーカーの開発と QTL 解析に関する育種学的基礎研究</p> <p>(Fundamental breeding studies on the development of the molecular markers and QTL analyses in <i>Capsicum annuum</i>)</p>
<p>DNA マーカーによる選抜育種は、周囲の環境条件等に左右されることなく、また、熟練を必要としないことから、常に安定した結果が得られるという利点があり、幾つかの主要農作物において用いられるようになってきた。しかしながら、ピーマンでは、他の主要作物に比べると、DNA マーカーの開発は遅れており、農業上有用な諸形質に連鎖した DNA マーカーを開発し、それをを用いた積極的なマーカー選抜育種技術の活用が望まれる。そこで、学位申請者は、ピーマンにおいて分子遺伝学的手法を用い、各種有用形質の遺伝様式の解明、有用形質に連鎖する DNA マーカーの開発およびその育種利用について調査研究を行い、以下の知見を得た。</p> <p>まず、ピーマンの種内交雑由来倍加半数体 (DH) 集団を育成するために、一段階培養法による効率的な薬培養技術を確立した。この一段階培養法を用いて、薬培養由来再分化系統の自然倍加系統である「K9-11」とトウガラシ野生種 PI 201234 由来の自殖選抜系統「AC2258」の種内交雑 F₁ における 7,835 個の蕾中の薬を培養し、両親の持つペッパーマイルドモットルウイルス (PMMoV) 抵抗性、辛み、疫病抵抗性お</p>	

よび未熟果実色等の各形質が分離した 176 系統の DH 集団を育成した。

この集団を用いたバルク法により、PMMoV 抵抗性遺伝子座 L^3 から 2.8 cM に位置する優性および共優性の SCAR マーカーを開発した。これを用いて *Capsicum* 属 4 種 19 系統を用い有効性を確認したところ、 L^3 および L^4 抵抗性系統選抜のための DNA マーカーとして有効であった。さらに、辛み発現に関する遺伝子座 C から 0.6 cM に位置するマイクロサテライトマーカーを開発し、*Capsicum* 属 3 種 29 系統を用い有効性を確認した結果、多くのアレルが存在し、選抜マーカーとしての有効性を確認できた。また、DH 集団を用い、HEGS/AFLP および RAPD 等による計 530 の DNA マーカーと 2 表現形質による連鎖解析の結果、16 の連鎖群(LG)から構成された総連鎖群長 1,100.5 cM の連鎖地図を作製した。種間交雑集団に比べ多型検出頻度が低い種内交雑由来 DH 集団においても、HEGS/AFLP を用いることで迅速な連鎖地図の作製が可能であった。

疫病抵抗性に関する QTL 解析を行った結果、LG1、LG6 および LG7 の 3 連鎖群に 3 つの QTL、*Phyt-1* (LOD 値 67.02)、*Phyt-2* (LOD 値 2.54) および *Phyt-3* (LOD 値 2.20) を検出した。*Phyt-1* および *Phyt-2* 近傍の 2 つの DNA マーカー、M10E3-6 および RP13-1 を持つ系統は、どちらか一方しか持たない系統よりも強い抵抗性を示すことから、2 つの DNA マーカー、M10E3-6 と RP13-1 を同時に用いることで、強い抵抗性を持った系統を効率よく選抜できることができた。

ピーマン未熟果実色に関する QTL 解析を行った結果、6 連鎖群にピーマン未熟果実色に関する 7 つの QTL を検出した。LG4 上の QTL、*ifc4.1* は、未熟果実色の緑色強度の増加に関して最も強い影響力を持つことが示された。黄白色果実に関連する 3 つの QTL、*ifc4.2*、*ifc11.1* および *ifc14.1* は、ピーマン第 8 および第 10 染色体上の 2 つの質的な遺伝子座 (*W1* および *W2*) に対応し、これらを劣性ホモで持つことにより、未熟果実色が黄白色になることが明らかとなった。さらに、*W1* および *W2* に連鎖した CAPS マーカーを開発した。

以上のように、本研究はピーマンの各種有用形質に連鎖した DNA マーカーの開発および各種量的形質の遺伝様式について新たな知見を加えた。今後、*Capsicum* における遺伝解析およびマーカー選抜育種技術の開発に大きく貢献するものと思われる。

したがって、審査員一同は、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値があるものと判定した。

学力確認結果の要旨

学位申請者 氏名	杉田 亘
審査委員	主査 宮崎大学 教授 明石 良
	副査 宮崎大学 教授 藪谷 勤
	副査 鹿児島大学 助教授 橋本文雄
	副査 宮崎大学 教授 辰巳保夫
	副査 佐賀大学 助教授 鈴木章弘
審査協力者	
実施年月日	平成19年 1月 11日

試験方法（該当のものを○で囲むこと。）

口答・ 筆答

主査及び副査は、平成19年1月11日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。

また、筆記により外国語（英語）の学力を確認した。

以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに見識を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。

学位申請者 氏名	杉田 亘
[質問]	疫病抵抗性 <i>Phyt-1</i> および <i>Phyt-2</i> をホモで用いることで実用的な抵抗品種が出来るのか？
[回答]	本研究により疫病抵抗性 <i>Phyt-1</i> および <i>Phyt-2</i> をホモで持つことで疫病に対し強い抵抗性を持つことが示されたことから、これらを優良系統に導入していくことで実用的な抵抗性品種が育成できると推測される。しかし、本研究では疫病接種検定菌株として1菌のみを供試していることから、今後の課題として他菌株、特に宮崎県内において発生した菌株を用いて接種検定により抵抗性を確認する必要がある。
[質問]	未熟果実色を用いた QTL 解析を行っているが、本研究で供試した材料はもともと未熟果実色の QTL 解析を行うことを目的に選んだ材料なのか？
[回答]	研究当初は「K9-11」が PMMoV 抵抗性 (L^3) を有し、「AC2258」が疫病抵抗性を有していることから、これらの病害抵抗性に連鎖する DNA マーカーを開発することを目的として選んだ材料である。しかし、「K9-11」は濃緑色で、「AC2258」の果実は黄白色で、DH 系統の未熟果実色が黄白色から濃緑色に分離してきたことから、未熟果実色の QTL 解析を行ったという経緯である。
[質問]	ピーマンの色というのはどのような色が好まれるのか？
[回答]	一般的に市場では緑の濃いピーマンの評価が高いと言われている。しかし、近年需要が伸びてきているカラーピーマンに見られるように、消費者の食の多様化により、完熟果実色を含め様々な色合いのピーマンを揃えておく必要があると考えている。
[質問]	未熟果実色における緑色強度の増加に関する QTL を持っていたとしても、黄白色果実に関連する 2 つの遺伝子座を劣性ホモで有していれば未熟果実色が黄白色になるのか？
[回答]	黄白色果実に関連する 2 つの遺伝子座を劣性ホモ $w1w1w2w2$ で有していれば、緑色強度の増加に関する QTL の有無にかかわらず黄白色の果実となる。
[質問]	PMMoV 抵抗性および辛み発現の遺伝子座において 1:1 の分離比に適合しているものの、少し「K9-11」型に歪んでいる印象を受けたが、そのことについての見解は？
[回答]	確かに 2 遺伝子座についての分離比は「K9-11」型に歪んでいると思われる。DH での分離集団の歪みについては、オオムギ等でも報告があり、再分化能が低い親の持つ遺伝子が淘汰されることによって歪みが生じている可能性がある。つまり、「K9-11」は、薬培養効率が高く、「AC2258」は、薬培養再分化能が低い。「AC2258」の持つ対立遺伝子が薬培養の過程において淘汰され、分離比の歪みを生じているものと思われる。

[質問] 広範なゲノム領域にマッピングを行っていくためにはどのようにすればよいのか？

[回答] 今回は AFLP および RAPD 中心のマッピングを行ってきた。広域なゲノム領域をカバーするためには、一般的にゲノム由来プローブを用いた RFLP が有効であると言われている。また、その他にも SSR マーカーなどの様々な分子マーカーを用いて、マッピングを行うことで広域なゲノム領域をカバーしたマップの作製が可能であると思われる。

[質問] このマップは、12 の染色体に対応していないのか？

[回答] 現在、既報のマーカー情報により 8 の染色体に対応している。しかし、研究当初からの目的が 12 の染色体への対応でなく、有用形質に連鎖する DNA マーカーの開発と QTL 解析と言うことだったので、効率的に広域なゲノム領域をカバーすることのできる本手法を用いた。勿論、各染色体に対応させるためには、コーネル大学のトマトプローブを RFLP マッピングしていくことが確実ではあるが、ピーマンゲノムへのトマトプローブのハイブリダイズは多くの時間と労力を要することから、本研究では積極的に用いていない。

[質問] 育種の観点から、収量性に関する QTL についてはピーマンで取得されているのか？

[回答] 私の知る限り、ピーマンの収量性に関して、他の栽培特性を含め幾つかの QTL が報告されているが、寄与率の高い安定的な QTL は報告されていない。

[質問] 一般的に緑が濃い程アスコルビン酸含量が高いと言われているが、今回の未熟果実色とアスコルビン酸の関係についてはどうか？

[回答] アスコルビン酸についても調査したが、予想に反し、黄白色の果実色を有する「AC2258」の方が、濃緑色の「K9-11」よりも 2 倍近く多く含んでいるという結果を得ている。QTL 解析をするために、DH 集団で調査を行ったが、アスコルビン酸含量の測定に多くの労力を要するため、やむを得ず中断している。

[質問] ここに示されている QTL 等で、他の植物において既に遺伝子が解っているものはあるのか？

[回答] 未熟果実色関連 QTL に関しては、クロロフィル生合成系の遺伝子が関与している可能性もあるかと思うが、今回検出した QTL にどの遺伝子が関与しているのかという正確な情報はない。しかし、今後は候補遺伝子のマッピングも行っていきたい。

[質問] 研究が進んだ一番の要因は何か？

[回答] 分離集団として純系の DH を用いたことで、非常に明確な形質の評価が可能で、かつ何度も形質の評価が行えたと言うことが一番の原因だと思われる。