

博士論文

ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子における
DNA マーカーの開発および遺伝学的解析

平成 25 年 3 月

三重大学大学院生物資源学研究科

加藤 丈幸

目次

序論	1
第 1 章 根こぶ病病原型グループ 3 に対する抵抗性遺伝子座の 同定	
第 1 節 秋理想の抵抗性遺伝子座の遺伝様式の解析および既知 の抵抗性遺伝子座との比較	
緒論	11
材料および方法	13
結果	16
考察	18
第 2 節 秋理想における根こぶ病抵抗性遺伝子座の連鎖解析	
緒論	24
材料および方法	26
結果	28
考察	30
第 2 章 根こぶ病抵抗性遺伝子の存在領域の特定および遺伝子 機能の推定	
緒論	36
材料および方法	38
結果	40
考察	43

第 3 章 抵抗性遺伝子座の異同および既存品種が保持する抵抗性
遺伝子の推定

第 1 節 *CRb* 近傍に座乗する CR 遺伝子座の異同および
機能比較

緒論	50
材料および方法	52
結果	53
考察	55

第 2 節 既存のハクサイ品種におけるマーカー遺伝子型と
病原型グループ 3 に対する抵抗性の関係

緒論	61
材料および方法	62
結果	63
考察	65

総合考察	72
------	----

摘要	78
----	----

引用文献	81
------	----

謝辞	93
----	----

序論

ハクサイ (*Brassica rapa*) と根こぶ病について

ハクサイは我が国で特に消費量が多い「指定野菜」として、14品目(ハクサイ、キャベツ、タマネギ、レタス、ホウレンソウ、ネギ、トマト、キュウリ、ナス、ピーマン、ダイコン、ニンジン、サトイモ、バレイショ)に定められた重要な野菜の一つであり(野菜生産出荷安定法 第2条)、生産量は年間89万トンと、これらの品目中6番目に多い(農林水産省大臣官房統計部、平成22年度統計)。作付面積は18,100haとキャベツ、ホウレンソウ、ネギなど18品目を含む葉茎菜類の作付面積の内、約10%を占める。また、近年輸入量が急増し、国外生産の消費が著しく増加傾向であるタマネギ、ニンニク、ニンジンおよびサトイモ等と異なり、ほぼ100%を国内生産でまかなっている野菜である。

ハクサイの起源は中国で、日本へは1875年(明治八年)に中国から伝搬し(板倉、1994)、大正期にかけて国内で改良が重ねられた「松島白菜」(宮城)、「野崎白菜」(愛知)、「加賀白菜」(石川)の三大品種群が現在の結球ハクサイの基礎となっている(鶴飼ら、2010)。

これら品種群を基に本格的なハクサイの栽培・連作が一般化する一方で、「根こぶ病」の発生が問題になり始めた。根こぶ病菌(学名：*Plasmodiophora brassicae* Woronin)はハクサイ、キャベツ、ナタネなど61属300種以上のアブラナ科植物に広く感染する土壤伝搬性の絶対寄生菌である。根こぶ病菌は栄養体である変形体が変形菌と類似していたため、変形菌門、ネコブカビ綱(Plasmodiophoromycetes)、ネコブカビ目(plasmodiophorales)として、植物病理学上、菌類(カビ)の一つとして分類されていた。しかし、近年の分子系統解析に基づいた分類では寄生性の原生生物として、リザリア(Rhizaria)界、ケルコゾア(Cercozoa)門、フィトミクサ綱(Pythomyxea)、ネコブカビ目

(Plasmodiophorida)に分類されている(Adl et al. 2005)。本病原菌の生活環は主に第一次および第二次感染の二つの相から構成されている(Mithen and Magrath 1992)。土壌中の休眠胞子は宿主となる根の存在下で発芽し、第一次遊走子となり、根毛の表皮細胞(細胞壁)を貫通して宿主に感染する。感染した遊走子は第一次変形体となり、速やかに遊走子のうに分化する(第一次感染または根毛感染)。遊走子のうには無数の第二次遊走子が納まっており、いったん感染根毛から土壌に放出された第二次遊走子は、再度、近くの主根や側根の皮層細胞に侵入、感染する(第二次感染または皮層感染)。侵入した第二次遊走子は増殖と核融合を経て多核の第二次変形体へと成熟し、根部組織の異常肥大(こぶ)を引き起こす。その後、第二次変形体は減数分裂を経て休眠胞子となり、こぶの腐敗に伴って大量に土壌中に放出される。

本病原菌に感染した植物は根がこぶ状に肥大し、根からの養水分の吸収が阻害される(図 1)。その結果、地上部の生育も阻害され、最終的には枯死する。日本での最初の発生記録は明治 25 年とされ、昭和 42 年から 50 年代初期にかけては、ハクサイやキャベツの主要産地である岩手、群馬、長野県で著しい発病が認められ、やがて、昭和 60 年代初期には滋賀、兵庫、岡山県などの西日本から九州までに拡大し、全国各地で急激に被害が蔓延した(後藤および村上、2006)。

本病はひとたび発病すると休眠胞子が数年間土壌に残存するため、連作圃場では土壌中の胞子密度が高まり、休耕や輪作による耕種的防除は困難である(Voorrips et al. 1995、Tsushima et al. 2010)。農薬としてはフルアジナム剤、およびフルスルファミド剤が存在し、前者には若干の殺菌作用が認められるものの、両剤は主に休眠胞子の発芽抑制剤として作用する(鈴木ら、1995)。そのため、圃場の胞子密度を直接低下させることはできない。また、両有機薬剤は土壌微生物によって分解されるため、播種あるいは定植毎に投薬する必要があるため、国内における年間の農薬費は 20 億円を超えるとされている(米山ら、

2004)。

根こぶ病抵抗性品種の育成の背景および近年の問題点

生産コストの削減、化学薬剤による環境負荷への軽減、消費者の安全志向が求められる近年において、根こぶ病抵抗性(Clubroot Resistance :CR)品種の使用が本病の防除に最も有効な手段の一つとなっている。ハクサイは元来、根こぶ病抵抗性を保持しておらず、国内において強度抵抗性を有する遺伝資源(育種素材)は見い出せなかった。そのため、「Siloga」、「Gelria R」、「Debra」および「Milan White」など強度抵抗性を有するヨーロッパ飼料カブから交配育種によってハクサイに導入され、1984年より日本でCR品種の育成が始まった(Yoshikawa 1981、Hirai 2006)。その後、アブラナ科野菜において100以上のCR品種が各種苗会社から発売され、CR品種は育成当初、高い抵抗性を示した。

しかし、1980年代後半から近年にかけて、CR品種における発病が日本各地で報告されるようになり、深刻な問題となっている(Kuginuki et al. 1999)。既存の抵抗性崩壊を解明するには、病原菌と宿主、双方の特性および相互関係を把握することが重要である。根こぶ病菌について、病原性(レース)の分化(Buczacki et al. 1975)および圃場における多様な病原性をもつ菌の混在(Jones et al. 1982)が報告されている。一方、多くのCR品種が単一の優性抵抗性遺伝子をヘテロに持つ一代雑種(F₁)品種として育成されてきたと考えられている。このように、菌の病原性の変化およびCR品種の抵抗性の画一性(単一性)、さらには特定のCR品種の連作により、抵抗性を打破した菌が選択的に増加したことが、CR品種が罹病化するようになった原因であると考えられている(Kuginuki et al. 1999)。

根こぶ病の病原型(Pathotype)の分類および根こぶ抵抗性遺伝子座

病原性の分化に伴い、その病原性の相違を把握しておくことは重要であり、菌の宿主特異性を分類する手法として European Clubroot Differential (ECD)法 (Buczacki et al. 1975)、Williams 法(Williams. 1966)などが提唱されてきた。しかし、日本で発生した菌種には、これら従来の病原性検定法では識別することが困難な病原菌が存在した。このため、Hatakeyama et al.(2004)は、全国各地より収集した菌を用い、2つの抵抗性 F₁ 品種「スーパーCR ひろ黄」および「隆徳」に対する抵抗反応の違いから、両品種を加害する病原型グループ 1、「隆徳」を加害し、「スーパーCR ひろ黄」を加害しない病原型グループ 2、「スーパーCR ひろ黄」を加害し、「隆徳」を加害しない病原型グループ 3、両品種を加害しない病原型グループ 4 の 4つの病原型に大別した(表 1)。

一方、宿主側であるハクサイの根こぶ病抵抗性遺伝子座に関しては 2012 年までに、8つの CR 遺伝子座が同定されている(図 2)。 *Crr1*、*Crr2* および *Crr4* はそれぞれ連鎖群 A8、A1 および A6 に (Suwabe et al. 2006)、*CRc* は A2 に (Sakamoto et al. 2008)、そして、4つの CR 遺伝子座 (*Crr3*、*CRa*、*CRb*、および *CRk*) が A3 に座乗している (Saito et al. 2006、Hayashida et al. 2008、Piao et al. 2004 および Sakamoto et al. 2008)。また、各 CR 遺伝子座に連鎖する DNA マーカーも報告されている。

DNA マーカー選抜技術の開発

分子生物技術の進歩が進むとともに、QTL 解析および DNA マーカーを用いた詳細な連鎖地図の作成が可能となり、抵抗性、生育特性および収量など、様々な有用形質に関する遺伝子座および連鎖マーカーが見出されている。特にマーカー選抜技術 (Marker-assisted selection :MAS) を利用した新たな品種の育成は近年、重要性を増して

いる。育種の成否は選抜効率に大きく影響を受け、有用形質と連鎖した DNA マーカーを用いることで、大幅な育種の効率化が可能になった。具体的には、根こぶ病などの抵抗性検定の場合、接種の規模および労力を大幅に減らすことができる。また、DNA は環境要因の影響を受けないため誤差要因に影響されず、幼苗など植物の生育の初期段階で、多数の個体から選抜することが可能である。また、作用力の弱い多数の微動遺伝子によって支配される量的形質の選抜、ならびに、複数の遺伝子座(あるいは形質)を同時に評価することが可能であり、目的遺伝子座を集積することができる。育種の実用場面のみならず、基礎的研究における DNA マーカーの役割は大きく、イネ、ダイズ、トマト、キュウリ、ネギなど多数の作物・野菜において染色体全体をカバーする DNA マーカーの整備および連鎖地図の構築が近年加速度的に進み、形質に関与する遺伝子座の数、染色体上の位置、遺伝効果など、多数の情報が蓄積されるようになった。

DNA マーカーには RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)、AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)、CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)、SNP(Single Nucleotide Polymorphism)、SSR(Simple Sequence Repeats)など多くの種類が存在する。これら DNA マーカーの特質は様々であるが、大まかに優性マーカーと共優性マーカーの 2 種に区分することができる。優性マーカーは開発が容易である半面、ヘテロ遺伝子型の検出が不可能である。一方、共優性マーカーは開発に労力、時間を要するが、ヘテロ遺伝子型の検出が可能であるため、得られる情報量の点から優れている。遺伝解析から得られる組換え価などの情報量が多ければ、精度の高い遺伝解析が可能となる。DNA マーカーを用いた遺伝解析(連鎖地図構築、QTL 解析、MAS 解析など)には多検体および多数の DNA マーカーを扱うため、正確な遺伝情報をいかに効率的に得るかということは重要

な要因である。

既報の半数の CR 遺伝子座 (*CRa*、*CRb*、*CRc* および *CRk*) に連鎖する DNA マーカーは主に AFLP、RFLP および RAPD 解析等によって開発され、多くが優性マーカーである。また、DNA マーカーの特性上、多型(塩基配列の長さや違い)は基本的にマーカー開発に用いた解析集団の組み合わせに限定されるため、異なる系統・品種間では多型が得られにくく、汎用性が低い。一方、SSR は数ヌクレオチドの単純反復配列であり、真核生物のゲノム中に多数存在している。これらの配列は多型性が高いため、遺伝的に近縁な系統・品種間でも多型が得られやすい。SSR は PCR で増幅し、繰り返し配列の頻度によってはその差異をアガロース電気泳動で容易に多型を検出できる。また、SSR マーカーは一般に共優性を示すことから、利便性と実用性の高い DNA マーカーとして、近年多くの研究ならびに品種識別等の実用面で用いられている (Suwabe et al. 2006、Cheng et al. 2009、Honjo et al. 2011 および Kato et al. 2012)。ハクサイ (*B.rapa*) において、2008 年に部分的なゲノム配列情報が *Brassica rapa* Genome Sequencing Project (BrGSP) から公開され (Mun et al. 2008)、2011 年には全ゲノム塩基配列が *Brassica* database (BRAD) から公開された (Wang et al. 2011)。これらの配列情報を利用することで目的のゲノム領域に SSR を見出し、効率的に DNA マーカーを開発することが可能になった。これらのことから、科学的(基礎的)知見のみならず、MAS などの実用育種への利用も目的とするため、本研究における DNA マーカー開発には、共優性を示す SSR タイプのマーカーを主軸とした。

既存の CR 品種の罹病化が深刻化するなか、病原性が分化した各種の菌に対応可能な抵抗性品種の作出が課題となっている。しかし、既

存の CR 遺伝子座と病原性との関係はほとんど明らかになっていない。Hirai(2006)は複数の CR 遺伝子を集積することによって、多様な病原性の菌に対する抵抗性を付与可能であると報告している。野菜茶業研究所では「Siloga」由来の 2 つの CR 遺伝子、*Crr1* および *Crr2*、を集積させた「はくさい中間母本農 9 号」を作出し、本育成系統は病原型グループ 1、2 および 4 に分類される根こぶ病菌に対して強度抵抗性を示したが、グループ 3 に対する抵抗性は保持していなかった(松元ら、2010)。そのため、より多くの菌に対する抵抗性増強を図るには、病原型グループ 3 に対する抵抗性遺伝子が必要である。

本研究では病原型グループ 3 に抵抗性を示す CR 遺伝子座を解明し、本遺伝子のゲノム上の位置の特定および機能推察を、遺伝学的および分子学的解析を用いて行ったものである。さらに、本研究で開発した DNA マーカーは 100 以上のハクサイ品種において、病原型グループ 3 に対する抵抗性・罹病性品種を高精度に選抜可能であり、MAS によって罹病性品種に抵抗性を付与できることを示した。本論文で得られた知見は、アブラナ科育種の重要な育種目標である根こぶ病抵抗性育種に大きく貢献するものである。

(A)



(B)



図1. ハクサイ圃場における根こぶ病の発病

(A)根こぶ病により収穫不能なハクサイ圃場

(B)発病個体の病徴

表 1. 「スーパーCR ひろ黄」と「隆徳」を用いて分類される根こぶ病菌の病原型

病原菌 ^a	グループ1 Nos. 1, 5	グループ2 Nos. 3, 6, 7, 8 10, 11, 12, 13, 15	グループ3 Nos. 2, 14	グループ4 Nos. 4, 9, Ano-01
スーパーCRひろ黄	S	R	S	R
隆徳	S	S	R	R
はくさい中間母本農9号	R	R	S	R
無双(非CR品種)	S	S	S	S

Hatakeyama et al.(2004) のグループ分けに従った

R: 抵抗性、S: 罹病性

^a 全国各地より収集した菌株名 (No.1~15 および Ano-01) を示す

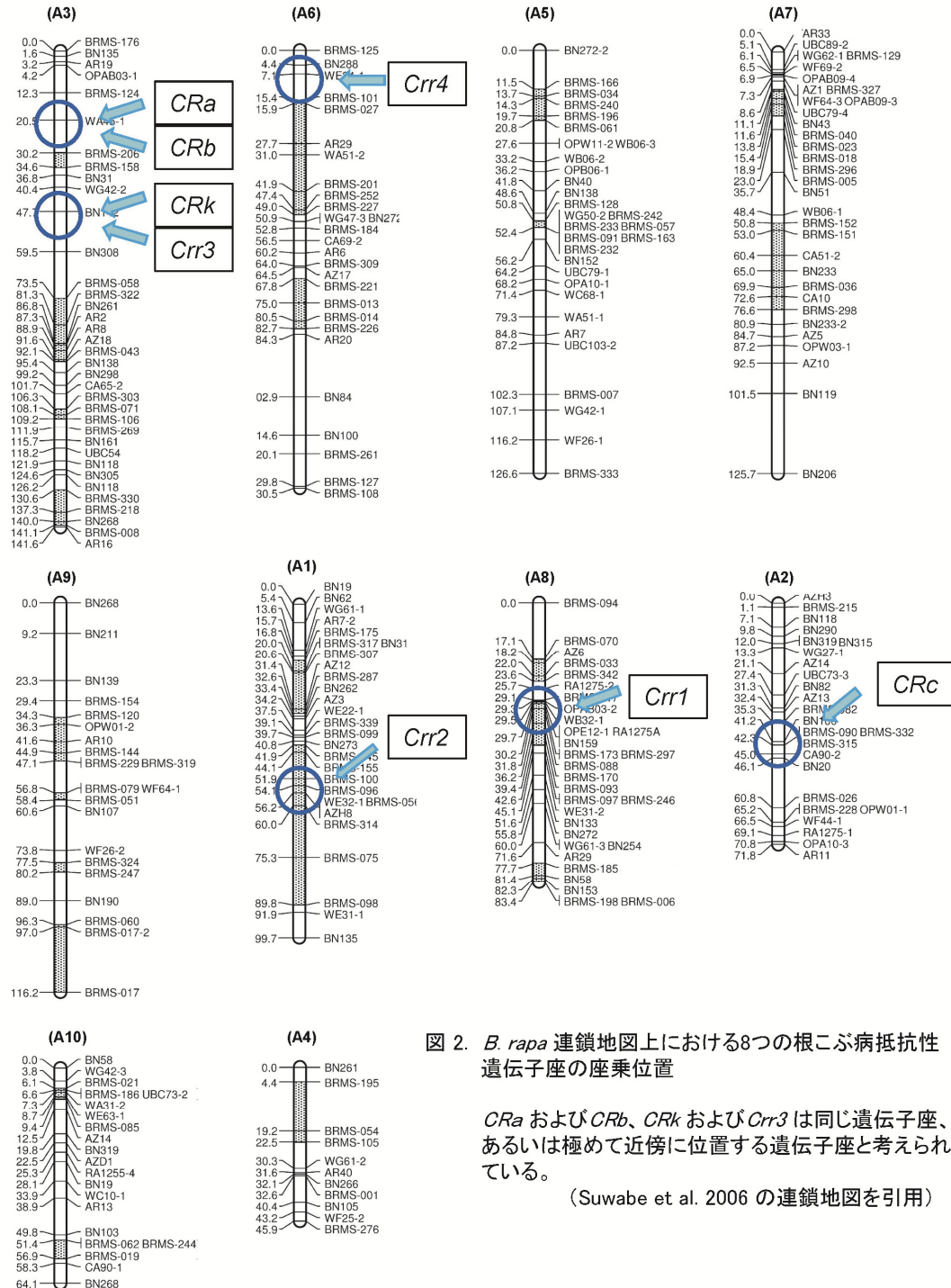


図 2. *B. rapa* 連鎖地図上における8つの根こぶ病抵抗性遺伝子座の座乗位置

CRa および *CRb*, *CRk* および *Crr3* は同じ遺伝子座、あるいは極めて近傍に位置する遺伝子座と考えられている。

(Suwabe et al. 2006 の連鎖地図を引用)

第 1 章 根こぶ病原型グループ 3 に対する抵抗性遺伝子座の同定

第 1 節 秋理想の抵抗性遺伝子座の遺伝様式の解析および既知の抵抗性遺伝子座との比較

緒論

近年、日本における根こぶ病菌の病原性の多様化に伴い、既存の CR 品種の罹病化が進んでいる。様々な病原性の菌に対応するため、複数の CR 遺伝子を集積した新たな抵抗性品種の育成が求められている。*Crr1* および *Crr2* を集積させた「はくさい中間母本農 9 号」は病原型グループ 1、2 および 4 の菌に対して抵抗性を示すが、グループ 3 の菌には罹病する。そのため、病原型グループ 3 に属する‘No.14’に対する抵抗性素材を調査した結果、主に茨城県をはじめとした関東地方の生産地で普及している F₁ 品種「秋理想」が‘No.14’に対して抵抗性を保持していることが明らかになった(松元ら、2010)。

「秋理想」は中心部が濃黄色の黄芯系で、外観は濃緑色と見た目にも鮮やかで食味も良いため、市場価値が高いハクサイである。さらに、本品種は難防除病害である黄化病(菌名:*Verticillium longisporum*)に対する抵抗性も保持しているため、本品種ならびに親系統は有用な育種素材となりうる。しかしながら、‘No.14’に対する抵抗性遺伝子の遺伝様式および既知の CR 遺伝子座との関係は明らかになっていない。

近年、野菜の市販品種のほとんどが F₁ 品種となっているため、目的形質の遺伝様式(優性、不完全優性、劣性など)を把握することは極めて重要である。目的とする形質が根こぶ病抵抗性である場合、CR 遺伝子を F₁ 親の片親だけに付与すればよいのか、両親に付与しなければならないのかによって、抵抗性品種を育種する計画、労力が大きく異なるからである。前者の場合、完全優性の遺伝子を利用することが必要であり、育成過程においても抵抗性遺伝子の有無を当代で抵抗性

検定により確認することができる。一方、不完全優性や劣性の抵抗性遺伝子の場合、 F_1 親のいずれにも導入することが不可欠となる。抵抗性遺伝子がヘテロになる F_1 世代では、不完全優性や劣性の形質では、導入形質の有無を検定で確認することは困難であり、 F_2 および F_3 など遺伝子がホモに固定される世代でのみ確認ができる。このため、優性の遺伝子を用いた場合と比較して、時間的、労力的な負担およびコストが大きくなる。

既知の 8 つの CR 遺伝子座の座乗位置は明らかになっており、各 CR 遺伝子座に連鎖する DNA マーカーが報告されている。一方、「秋理想」の抵抗性遺伝子座は新規の CR 遺伝子座なのか、あるいは既知の 8 つの CR 遺伝子座のいずれかに該当するのかについては不明である。

本節では、病原型グループ 3 に対する「秋理想」の抵抗性遺伝子座（以下、*CRaki* と記載）の遺伝形質を明らかにするため、「秋理想」自殖後代 F_2 集団における抵抗性分離様式を解析した。次に、*CRaki* が既報の CR 遺伝子座か新規の CR 遺伝子座かを検討するため、既報の 8 つの CR 連鎖マーカーを用いて遺伝子型と抵抗性との相関関係を解析した。

材料および方法

1. 植物材料

根こぶ病抵抗性 F₁ 市販品種「秋理想」((株)日本農林社)、およびその親系統である T-line と V-line、さらに「秋理想」の自殖より得られた F₂ 集団 285 個体を解析に用いた。病原型グループ 3 に対する抵抗性の分離様式を調べるため、189 個体を根こぶ病抵抗性に用いた。残りの 96 個体は既報の CR 連鎖マーカーを用いた遺伝子型解析、および根こぶ病抵抗性検定に用い、遺伝子型と表現型(抵抗性)との関係を調べた。

2. 病原菌

根こぶ病抵抗性検定には、Hatakeyama et al.(2004)によって大別された 4 つの病原型の内、グループ 3 に属する菌系 'No.14' を接種菌として用いた。本菌は 2001 年、宮城県にてハクサイ品種「名鏡」((株)渡辺採取場)から採集、分離された菌である。

根こぶ病菌は絶対寄生菌であるため、人工培地上では継代維持・培養が不可能である。このため、'No.14' に感染した「名鏡」の根こぶ組織を採集し、検定に用いるまで -20℃ にて凍結保存した。接種検定時に用いる休眠胞子は Williams et al. (1966) の手法に基づき、凍結した根こぶ組織を摩砕し、ろ過と遠心分離によって精製した後、血球計算盤により孢子密度が 1×10^9 個/ml になるように調整した。調整した菌は、抵抗性検定時毎に指標品種である「隆徳」および「スーパー CR ひろ黄」を用いて病原性の確認を行った。

3. 根こぶ病抵抗性検定

根こぶ病抵抗性検定は、病土挿入法 (Yoshikawa et al. 1981) によって行った。園芸培土を入れた 8cm のジフィーポットに、深さ 3cm、幅 1cm のくぼみに菌密度 5×10^6 個/g 乾土の病土を挿入した。1 ポツ

トあたり 8 粒の F₂ 種子を病土に播種し、パーライトで覆土した後、発芽を揃えるため 5°C の人工気象室内で 48 時間静置した。その後、25/20°C (昼/夜)、14 時間日長 (200 μmol · m⁻² · s⁻¹) の人工気象室で育成した。6 週間後、各個体の根部の病徴を調査し、発病程度を 4 段階の発病指数 (Disease Index, DI; 0: 無病徴、1: 側根に微小、少数のこぶ、2: 主根および側根がやや膨張し、側根に無数のこぶ、3: 主根および側根が大きくこぶ状に肥大し、健全根がほとんど認められない) で評価した (図 3)。0 を完全な抵抗性、1 および 2 を部分的抵抗性とみなし、0~2 は抵抗性、3 を罹病性と位置付けた。F₁ 品種である「秋理想」ならびに親系統である T-line、V-line の抵抗性評価は、各 15~37 個体の発病指数の平均値で表した。

4. ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA は野菜茶業研究所のウェブサイト「園芸マーカープロジェクト」にて公開されている「植物(幼葉)からの DNA 抽出」(https://ml-wiki.sys.affrc.go.jp/engei_marker/dna_ext1)に従って抽出した。20~25mg の葉組織を 180 μl の抽出 Buffer (0.1M 酢酸ナトリウム, 50mM EDTA, 0.5M NaCl, 0.25mM PVP, 1.4% SDS, 20mg/μl RNase, pH 5.5) とともに摩砕した。65°C で 5 分保温した後、遠心分離によって得られた 70 μl の上清を 35 μl の 5M 酢酸ナトリウムと懸濁した。氷上で 5 分静置した後、懸濁液を 50 μl の結合 Buffer (2.7M 塩酸グアニジン, 66.7% EtOH) と混合し、フィルタープレート FiltrEX™ (親水性 PVDF、孔サイズ 0.2 μm (Corning)) でろ過した。濾液をフィルタープレート FiltrEX™ (ガラスファイバーフィルター、厚さ 0.66 mm (Corning)) に移し、再度、70 μl の結合 Buffer を添加し、混合した。混合液をろ過した後、フィルターに結合した DNA 溶液を 80% エタノールで洗浄し、200 μl の 1/2 × TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) で溶出し、DNA 溶液とした。なお、F₂ 各個体における遺

伝子型や表現型(抵抗性)を識別するため、DNA 抽出前に各 F₂ 個体に識別番号のラベルを付与した。

6. DNA マーカー解析

「秋理想」の保持する CR 遺伝子座が既報の 8 つの CR 遺伝子座 (*Crr1*, *Crr2*, *Crr3*, *Crr4*, *CRa*, *CRb*, *CRc* および *CRk*) に連鎖するか否かを調べるため、これら各 CR 遺伝子座に連鎖する DNA マーカーを用いた(表 2)。

PCR 反応液の組成(10 μ l/sample)には、ゲノム DNA 10ng、0.4 μ M 各 primer、および 2 \times Quick Taq HS Dye Mix (TOYOBO)を用いた。PCR は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用いて、94 $^{\circ}$ C \cdot 2 分のヒートショック後、94 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、55 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、68 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒を 35 サイクル、68 $^{\circ}$ C \cdot 5 分の最終伸長反応とした。PCR 産物は 1~2%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色法によって検出した。また、断片長差がアガロースゲルによって検出が困難なマーカーは、プライマーを蛍光色素(FAM、VIC、PET および NED など)で標識化、あるいは、ポスト PCR ラベル法(Kukita and Hayashi, 2002)によって PCR 反応後の産物を蛍光標識化し、ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems)を用いてフラグメント解析を行った。T-line および V-line 間において PCR 増幅断片長に相違が認められたものを多型とした。なお、*CRb* に連鎖する 6 つの DNA マーカー(TCR01、TCR02、TCR05、TCR08、TCR09 および TCR10)、*CRa* に連鎖する HC352b-SCAR および *CRc* に連鎖する m6R においては増幅産物の塩基配列を解析し、T-line および V-line 間において相違が認められた TCR-02 については「秋理想」においても多型が得られるように、STS(sequence tagged sites)化し、TCR02-F と命名した。

結果

病原型グループ 3 の菌系‘No.14’を用いた抵抗性検定の結果、「秋理想」の親系統 T-line は抵抗性(平均 DI=1.08、n=26)を示し、もう一方の親系統 V-line は罹病性(平均 DI=2.96、n=25)であり、「秋理想」は抵抗性(平均 DI=1.49、n=37)を示した(図 4)。189 個体からなる「秋理想」自殖 F₂ 集団は、抵抗性個体と罹病性個体がそれぞれ 140 個体(74%)、49 個体(26%)に分離し、 χ^2 検定の結果、単一優性遺伝子による分離比(3:1)に適合した(図 4 および表 3)。

また、96 個体からなる「秋理想」自殖 F₂ 集団において、既知の 8 つの CR 遺伝子座に連鎖するマーカーを用いた遺伝子型と、表現型(抵抗性)との相関関係を調べた。その結果、*CRb* に連鎖する DNA マーカー、TCR10 が検出された個体は抵抗性を示し(平均 DI=1.18、n=79)、検出されなかった個体は罹病性であった(平均 DI=2.88、n=17)(表 4)。この結果から、*CRaki* は *CRb* と連鎖する可能性が考えられた。なお、*CRb* に連鎖する他の DNA マーカー(TCR01、TCR02、TCR05、TCR08 および TCR09)(Piao et al. 2004)は、全て T-line と V-line との間で多型は認められなかった。これら 5 つの DNA マーカーの増幅産物の塩基配列を解析した結果、TCR02 のみが SSR 配列の相違が認められ、T-line および V-line における (CTA) の繰り返し配列数は、それぞれ 2 および 3 と異なっていた。そこで「秋理想」においても多型が得られるように、STS 化し、TCR02-F と命名した。TCR02-F の遺伝子型と抵抗性表現型の関係を調査した結果、TCR02-F の抵抗性ホモ型の個体は 29 個体、ヘテロ型を示す個体は 45 個体存在し、これらの個体は抵抗性を示した(平均 DI=0.88 および 1.21)(表 4)。一方、罹病性ホモ型の遺伝子型を示した個体のほとんどは罹病性であった(平均 DI=2.86)。

他の CR 遺伝子座に連鎖する DNA マーカー、BRMS-088(*Crr1*)、BRMS-096(*Crr2*)、OPC11-2S(*Crr3* および *CRk*)、BRMS-125(*Crr4*) においては T-line と V-line の間において多型が認められたが、各マー

カー遺伝子型と抵抗性表現型との間に相関は認められなかった。また HC352b-SCAR(*CRa*)および m6R(*CRc*)は、T-line と V-line の間において多型が認められず、増幅産物の塩基配列においても相違は認められなかった。

考察

‘No.14’を用いた「秋理想」F₂集団における抵抗性検定では、抵抗性個体と罹病性個体がほぼ 3:1 に分離した(表 3)。また、「秋理想」の親系統 T-line、V-line はそれぞれ抵抗性および罹病性を示したことから、「秋理想」の抵抗性は T-line のもつ単一優性遺伝子によって支配されていることが明らかになった。既報の CR 遺伝子座の内、優性遺伝子として機能することが報告されているのは *CRa*(Hayashida et al. 2008)および *CRb*(Piao et al. 2004)のみである。一方、*Crr1* は病原性の低い ‘Ano-01’ に対しては単独で抵抗性を発揮するが、より病原性の強い ‘Wakayama-01’ に対しては、*Crr1* 遺伝子および *Crr2* 遺伝子単独では抵抗性を発揮せず、両遺伝子が共に存在したときのみ抵抗性を発揮する(Suwabe et al. 2003)。さらに、両遺伝子が抵抗性ホモ型であるとより効果が高いことが明らかになっている。これらのことから、*CRaki* 遺伝子は、少なくとも *Crr1* 遺伝子や *Crr2* 遺伝子とは異なる遺伝様式を有し、‘No.14’に対して優性に機能する CR 遺伝子であることが明らかになった。

既報の 8 つの CR 遺伝子座に連鎖する DNA マーカーを用いて、「秋理想」F₂ 集団の解析を行った結果、*CRb* に連鎖する TCR10 および TCR02-F において遺伝子型と抵抗性との間に相関関係が認められたことから、*CRaki* は *CRb* に連鎖することが推定された。*B.rapa* の連鎖群 A3 には *CRa*、*CRb*、*CRk* および *Crr3* の 4 つの CR 遺伝子座が座乗しているが(図 2)、本章の結果からは詳細な座乗位置、特に *CRb* との連鎖関係は明確でない。そのため、次節では *CRaki* と *CRb* の間で詳細な連鎖解析を行うことによって、両者の CR 座の異同を調べた。

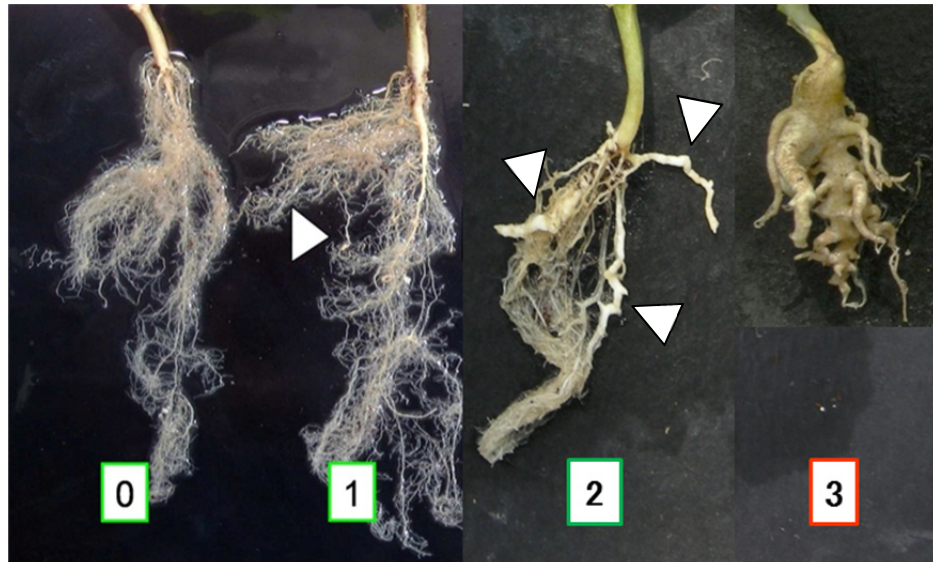


図 3. 根こぶ病抵抗性検定における発病程度

播種後 6 週間育成した根部の病徴

発病程度は、4 段階の発病指数 (DI: Disease Index) で評価した。

- 0: 無病徴
- 1: 側根に微小なこぶ
- 2: 側根がやや膨張、複数のこぶ
- 3: 根部全体がこぶ状に肥大

矢印はこぶ状の病徴箇所を示す。

0 を抵抗性、1 および 2 を部分抵抗性、3 を罹病性と判定した。

表 2. 既報の 8 つの CR 遺伝子座および連鎖マーカー

遺伝子座	近傍連鎖(選抜)マーカー	座乗連鎖群	参考文献
<i>Crr1</i>	BRMS-088	A8	Suwabe et al. 2003, 2006
<i>Crr2</i>	BRMS-096	A1	Suwabe et al. 2003, 2006
<i>Crr3</i>	OPC11-2S	A3	Hirai et al. 2004, Saito et al. 2006
<i>Crr4</i>	BRMS-125	A6	Suwabe et al. 2003, 2006
<i>CRa</i>	HC352b-SCAR	A3	Hayashida et al. 2008
<i>CRb</i>	TCR05	A3	Piao et al. 2004
<i>CRc</i>	m6R	A2	Sakamoto et al. 2008
<i>CRk</i>	OPC11-2S	A3	Sakamoto et al. 2008

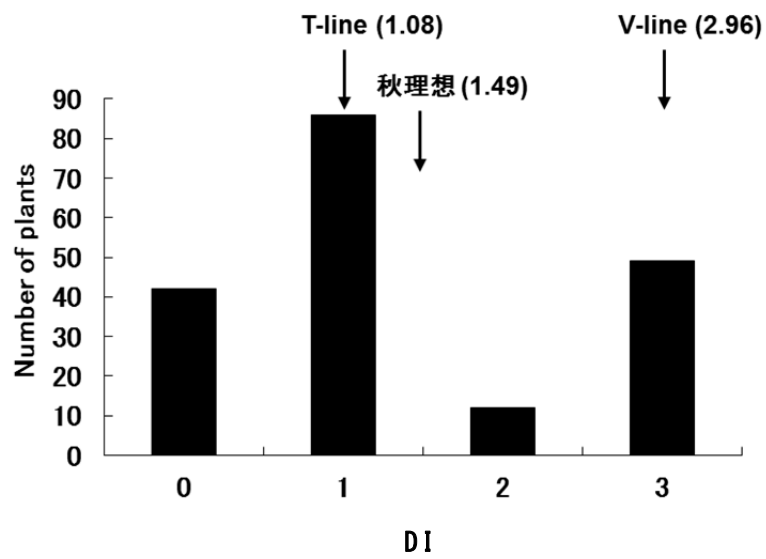


図 4. 「秋理想」自殖 F₂ 集団 (n=189) における発病指数 (DI) の頻度分布
 「秋理想」および両親系統 (T-line および V-line) における
 平均 DI を () 内に記し、矢印は図上における該当位置を示す。

表 3. 「秋理想」自殖 F₂ 集団 (n=189) における 'No.14' に対する抵抗性

表現型 ^a		χ^2 ^b	P値
R	S		
140	49	0.07	0.79

^a R, 抵抗性 (DI 値が 0,1 および 2) の個体数

S, 罹病性 (DI=3) の個体数 (図 4. を参照)

^b 期待値は 3:1

表 4. 「秋理想」自殖 F₂ 集団 (n = 96) における CRb 連鎖に連鎖するマーカー
遺伝子型および 'No.14' に対する抵抗性との相関関係

マーカー	遺伝子型 ^a	個体数	平均 DI	P値
TCR10	<i>RR, Rr</i> ^b	79	1.18	0.1
	<i>rr</i>	17	2.88	
TCR02-F	<i>RR</i>	29	0.88*	0.5
	<i>Rr</i>	45	1.21*	
	<i>rr</i>	22	2.86	

^a *RR*, 抵抗性親型 (T-line) の遺伝子型

rr, 罹病性親型 (V-line) の遺伝子型

Rr, ヘテロ遺伝子型

^b TCR10 は優性マーカーのため、*RR* と *Rr* の合計値を示す。

* 5%水準で有意差なし。

第 2 節 秋理想における根こぶ病抵抗性遺伝子座の連鎖解析

緒論

「秋理想」の有する抵抗性遺伝子座 *CRaki* は *CRb* と連鎖している可能性が前節で示唆された。*CRb* は根こぶ病抵抗性 F₁ 品種「CR 新黄」に由来する倍加半数体系統(Doubled Haploid :DH)を用いた集団において同定された CR 遺伝子座であり(Piao et al. 2004)、抵抗性素材の由来はヨーロッパ飼料カブ「Gerlia R」とされている(Hirai 2006、Piao et al. 2009)。Piao et al. (2004) は *CRb* に連鎖する 6 つの DNA マーカーを報告しているが(図 5.A)、「秋理想」の両親系統間で多型を示すものは 2 つ(TCR02-F および TCR10)のみであった。そのため、*CRaki* と *CRb* の異同を確かめるためには、「CR 新黄」と「秋理想」の両品種で利用可能な共通の DNA マーカーを複数開発し、連鎖地図を構築、比較する必要がある。

CRb は連鎖群 A3 の長腕部に座乗し、Saito et al.(2006)は *CRb* 近傍マーカーである TCR05-R (TCR05 を STS 化したマーカー)が、BRMS-124 および BRMS-206 で挟まれた、約 30cM の領域内に存在することを報告している(図 5.B)。2 つの BRMS マーカーは A3 末端から約 11cM(BRMS-124)および 30~40cM(BRMS-206)離れた位置に座乗し(Saito et al. 2006、Suwabe et al. 2006)、その領域内には KBrH129J08R が存在することが Kakizaki et al.(2011)の部分連鎖地図(図 5.C)から推定された。

ハクサイの全ゲノム解読の一端として Bacterial Artificial Chromosome (BAC) libraries(KBr BAC libraries)の塩基配列解読による国際ハクサイゲノムプロジェクトが 2006 年より始まった。KBrH129J08R は、BAC クローン KBrH129J08 の末端配列から作成したマーカーの一つである。99,456 の KBr BAC libraries における high-information-content fingerprinting 法によって得られた連鎖

地図情報が Mun et al.(2008)によって報告され、*Brassica rapa* Genome Sequencing Project(BrGSP)にて公開されている。*CRb* 近傍に位置すると推定される DNA マーカー KBrH129J08R の周辺に、「秋理想」、「CR 新黄」の両者で適用可能な SSR マーカーを開発し、*CRaki* と *CRb* の部分連鎖地図の構築と比較を行い、両者の異同を調査した。さらに、両 CR 遺伝子座の病原型グループ 3 に対する抵抗性の相違を調べるため、*CRb* を保持する「CR 新黄」の自殖 F₂ 集団を用いて、「No.14」に対する抵抗性遺伝様式を調べ、前節で得られた「秋理想」F₂ 集団の抵抗性遺伝様式と比較した。

材料および方法

1. 植物材料

CRb を有する根こぶ病抵抗性 F_1 品種「CR 新黄」(タキイ種苗(株))の自殖 F_2 集団 172 個体を用いた。

2. 根こぶ病抵抗性検定

「CR 新黄」と「秋理想」の抵抗性遺伝様式を比較するため、「CR 新黄」自殖 F_2 集団と菌系‘No.14’を用いて、前節、材料および方法 3. と同様の手法を用いて根こぶ病抵抗性検定を行った。

3. DNA マーカー(SSR マーカー)の開発

BrGSP (<http://www.brassica-rapa.org/BRGP/index.jsp>) (Mun et al. 2008、2010) で公開されている KBr libraries において、KBrH129J08 周辺の BAC-end の塩基配列情報を用いて、配列内の SSR を挟み込むように、read2Marker program (Fukuoka et al. 2005) を用いてプライマーの設計を行った。「秋理想」においては親系統である T-line と V-line を供試することが可能であったが、「CR 新黄」の親系統は利用不可能だった。「秋理想」と同様、既存の CR 品種の多くは、優性の CR 遺伝子を持つ親と罹病性の親との交配品種である可能性が育種上の歴史背景から示唆されている(Kuginuki et al. 1999)。そこで「CR 新黄」における解析では、 F_2 個体の中で 菌系‘No.14’に対して抵抗性を示し、なおかつ *CRb* 連鎖マーカー TCR05 および TCR02-F の両遺伝子型が抵抗性ホモ型である F_2 個体を仮の抵抗性親とし、一方、罹病性かつ両マーカーが罹病性ホモ型を示した F_2 個体を罹病性親と仮定し、両者間における多型を「CR 新黄」における多型情報として用いることとした。マーカー遺伝子型に相違がないことを確認するため、(仮)抵抗性親、(仮)罹病性親とも各 3 系統の F_2 個体を用いて比較し、「秋理想」の両親系統(T-line, V-line)のマーカー遺伝子

型とも比較を行った。開発した DNA マーカーの配列および多型情報を表 5 に示した。

4. 連鎖地図の作成

3. で得られた DNA マーカーを用いて、189 個体の「秋理想」自殖 F_2 集団、および 172 個体の「CR 新黄」自殖 F_2 集団の遺伝子型を決定し、部分連鎖地図を作製した。連鎖地図の作製には JoinMAP ver. 4.0(van Ooijen 2006)を用いた。

結果

BrGSP の情報に基づいて、KBrH129J08 の周辺に存在する 3 つの各 BAC クローンの末端配列から SSR マーカー、KBrH059N21F、KBrH129J18R および KBrB091M11R を作出した(表 5)。KBrH129J08R および TCR02-F を加えた計 5 つの DNA マーカーを用いて「秋理想」の両親間(T-line および V-line)、および「CR 新黄」における多型を調べた。KBrH129J08R、KBrH059N21F、KBrH129J18R、KBrB091M11R および TCR02-F の両品種における PCR 増幅断片長は、抵抗性系統ではそれぞれ 234 bp、218 bp、254 bp、750 bp および 203 bp を、罹病性系統では 241 bp、236 bp、194 bp、177 bp および 207 bp を示し、これら各 DNA マーカーの多型断片長は、両品種において完全に一致した(表 5)。

5 つの DNA マーカーを用いて、「秋理想」自殖 F₂ 集団における *CRaki* 周辺の部分連鎖地図を作成した結果、5 つのマーカーはすべて *CRaki* に連鎖しており、中でも KBrH059N21F および KBrH129J18R は、*CRaki* から 0.3 cM および 0.4 cM という近傍に、KBrH129J08R、KBrB091M11R および TCR02-F はそれぞれ、3.1 cM、1.0 cM および 3.5 cM に位置した。(図 5.D)。なお、前節でも示したように TCR05 は「秋理想」で多型が得られなかったため、*CRaki* の連鎖地図上に示すことはできなかった。一方、「CR 新黄」自殖 F₂ 集団において、*CRb* 周辺の部分連鎖地図を作成した結果、5 つのマーカーは *CRb* に連鎖しており、特に KBrH059N21F および KBrH129J18R は、*CRb* から 0.2 cM および 0.4 cM という近傍に、KBrH129J08R、KBrB091M11R および TCR02-F は、それぞれ、2.5 cM、1.9 cM および 5.0 cM に位置した(図 5.E)。連鎖解析の結果から、5 つのマーカーの多型情報(表 5)と連鎖地図上の CR 遺伝子座および DNA マーカーの座乗関係は、「秋理想」および「CR 新黄」の間で酷似しており(図 5.D および E)、*CRaki* は *CRb* と同じ遺伝子座か、極めて近い位置関係にあることが推定され

た。既存の *CRb* 選抜マーカーである TCR05(Piao et al. 2004)は *CRb* から末端側、1.4 cM に座乗した(図 5.E)。しかし、*CRb* を同定した Piao et al. (2004) は、TCR05 は *CRb* から基部側、1.97 cM に座乗することを報告しており(図 5.A)、*CRb* と TCR05 の位置関係に違いが認められた。

CRb を有する「CR 新黄」において抵抗性遺伝様式を調べ、「秋理想」と比較するため、菌系‘No.14’を用いて根こぶ病抵抗性検定を行った。その結果、「CR 新黄」は抵抗性(平均 DI=1.25、n=15)を示し(図 6.A)、172 個体からなる F₂ 集団では、126 個体(73%)が抵抗性を、46 個体(27%)が罹病性を示した。χ² 検定の結果、単一優性遺伝子による 3:1 の分離比に適合した(表 6)。また、「CR 新黄」F₂ 集団の発病指数の頻度分布(図 6.A)は、前節で示した「秋理想」の頻度分布(図 6.B)と極めて似ていた。以上の結果から、‘No.14’に対する *CRaki* と *CRb* の抵抗性の遺伝様式は非常に類似していると推定された。

考察

抵抗性遺伝子座周辺に作成した DNA マーカーについて、「秋理想」の抵抗性親(T-line)と罹病性親(V-line)から得られた増幅 DNA 断片長は、「CR 新黄」の F₂ 個体に由来する(仮)抵抗性親と(仮)罹病性親から得られる増幅 DNA 断片長と完全に一致した(表 5)。また両品種の抵抗性遺伝子座(*CRaki* および *CRb*)周辺の連鎖地図を比較した結果、各 DNA マーカーと抵抗性遺伝子座の座乗位置と距離は極めて似ていた(図 5)。さらに両品種において、菌系 'No.14' に対する抵抗性は単一の優性遺伝子によって支配されており(表 3 および表 6)、F₂ 集団の発病指数の頻度分布も極めて類似していることから(図 6)、*CRaki* と *CRb* は同じ遺伝子座である可能性が示唆された。

本研究で開発した SSR マーカー、特に KBrH059N21F および KBrH129J18R は既存の *CRb* 選抜マーカー TCR05 より、*CRb* の近傍に座乗した。さらに両マーカーは *CRb* 遺伝子座を挟み込んでいるため、効率的かつ正確なマーカー選抜が可能である。しかし、本研究では *CRb* が TCR05 から基部側に位置したのに対し(図 5.E)、Piao et al.(2004)の結果では TCR05 から末端側に位置しており(図 5.A)、*CRb* と TCR05 の位置関係に違いが認められた。この違いの要因の一つとして、連鎖地図を構成しているマーカーの性質が考えられる。Piao et al.(2004) が用いた 6 個の DNA マーカーの内、3 個 (TCR08、TCR09 および TCR10) は優性マーカーであるのに対し、本研究で用いた 5 つのマーカーは全て共優性である。共優性マーカーはヘテロ型と両親型を識別可能なため、優性マーカーより情報量が多く、再現性が高い性質を持つ(Jones et al. 1997)。これらマーカーの性質は精度の高い連鎖地図を作製する際に重要な要因である。実際、優性マーカー TCR10 を用いて、「CR 新黄」自殖 F₂ 集団の連鎖解析を行った結果、TCR10 と *CRb* との遺伝距離は約 13 cM であり(データ省略)、Piao et al.(2004) の結果(2.84 cM)と大きく異なった。一方、共優性マーカーで

ある TCR05、TCR02-F および 4 つの KBr マーカーの座乗位置関係(並び順)は、ゲノム塩基配列上の位置関係と一致し(図 5.F)、本実験で開発した連鎖地図の結果を支持する。

「秋理想」は病原型グループ 1 および 2 の菌には罹病し、グループ 3 および 4 の菌には抵抗性を示す(松元ら、2010)。一方、「CR 新黄」も 4 つの病原型グループの菌に対して、「秋理想」と同様の抵抗性反応を示すことが Hatakeyama et al.(2004)によって報告されており、「秋理想」(*CRaki*)と「CR 新黄」(*CRb*)の抵抗性は同じ抵抗性素材(「Gerlia R」)から由来していると推察される。本研究で用いた‘No.14’の病原性が Piao et al. (2004) が用いた‘race 4’と同一であるかは明らかでない。しかし、‘No.14’と同じグループ 3 に属する菌系‘No.2’(表 1 参照)は、‘race 4’と同じ病原性の菌であることが Hatakeyama et al.(2004)によって確かめられている。そのため、‘No.14’と‘race 4’はほぼ同等の病原性であると考えられる。

本章において「秋理想」と「CR 新黄」は病原型グループ 3 の菌系‘No.14’に同様な抵抗性反応を示し、それぞれの品種が有する *CRaki* と *CRb* の両遺伝子座の位置関係は開発したマーカーの連鎖関係から非常に似ていた。以上のことから「秋理想」の抵抗性遺伝子座は「CR 新黄」が保持する *CRb* と同じ可能性が高くなり、病原型グループ 3 に有用な抵抗性遺伝子座は *CRb* であると推定された。

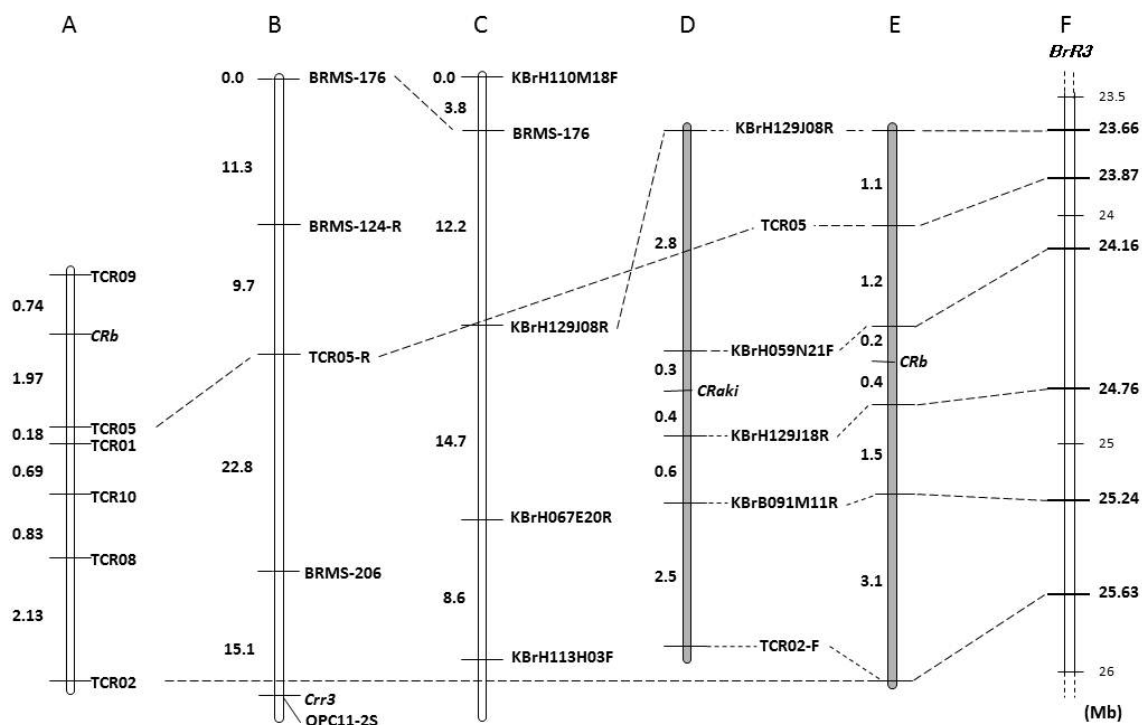


図 5. 第 3 連鎖群 (A3) における連鎖地図間の相関関係および CR 遺伝子座の座乗位置

- (A) Piao et al. (2004) による *CRb* 座の連鎖地図
- (B) Saito et al. (2006) による *Crr3* 座の連鎖地図
- (C) Kakizaki et al. (2011) による連鎖地図
- (D) 「秋理想」の抵抗性遺伝子座 (*CRaki*) の連鎖地図
- (E) 「CR 新黄」における新たな *CRb* 座の連鎖地図
- (F) *Brassica* database (BRAD) のゲノム配列情報に基づいた連鎖群 A3 における各マーカーのゲノム位置

(D)、(E) および (F) は本研究で作製した連鎖および物理地図

A~E の数字は遺伝距離 (cM) を示し、F は物理距離 (Mb) を示す。

表 5. *CRb* 周辺に設計した SSR マーカーの primer 配列および増幅断片長

マーカー	リポート配列 ^a	Forward primer (5' to 3') Reverse primer (5' to 3')	PCR断片長 (bp) ^b			
			T-line	秋理想	V-line	CR 新黄 <i>r</i>
KBrH129J08R ^c	TA	ATGAGATTGAAGAGGGAAACACAA GTTTCCAATGGTGAACCAATCCTA	234	241	234	241
KBrH059N21F	CT	ATCGACGCCGTTTATTAGAACTCG GTTTACGCCACGTCAGCTCACTAACTC	218	236	218	236
KBrH129J18R	TC	AGAGCAGAGTGAACCCAGAACT GTTTCAGTTCAGTCAGGTTTTTGCAG	254	194	254	194
KBrB091M11R	AG	ACTTAAAGCACGAGAATGC AAA GTTTGGTGCGAAGCTATGTGTG	750	177	750	177
TCR02-F	CTA	AGCTCCATTACAGTTACGGTGA GTTAAGAAAACCTTGCAGAAAACCTCG	203	207	203	207

^a *B. rapa* Genome Sequencing Project (BrGSP) の塩基配列情報にて見出された SSR 配列

^b *R* および *r* は「CR 新黄」F₂ 世代における抵抗性、および罹病性型ホモ型個体をそれぞれ示し、前者を(仮)抵抗性親、後者を(仮)罹病性親とした。

^c Kakizaki et al. (2011)により開発されたマーカー

表 6. 「CR 新黄」自殖 F₂ 集団 (n=172) における 'No.14' に対する抵抗性の分離

表現型 ^a		χ^2 ^b	P値
R	S		
126	46	0.24	0.62

^a R, 抵抗性 (DI 値が 0,1 および 2) の個体数

S, 罹病性 (DI=3) の個体数 (図 6.A を参照)

^b 期待値は 3:1

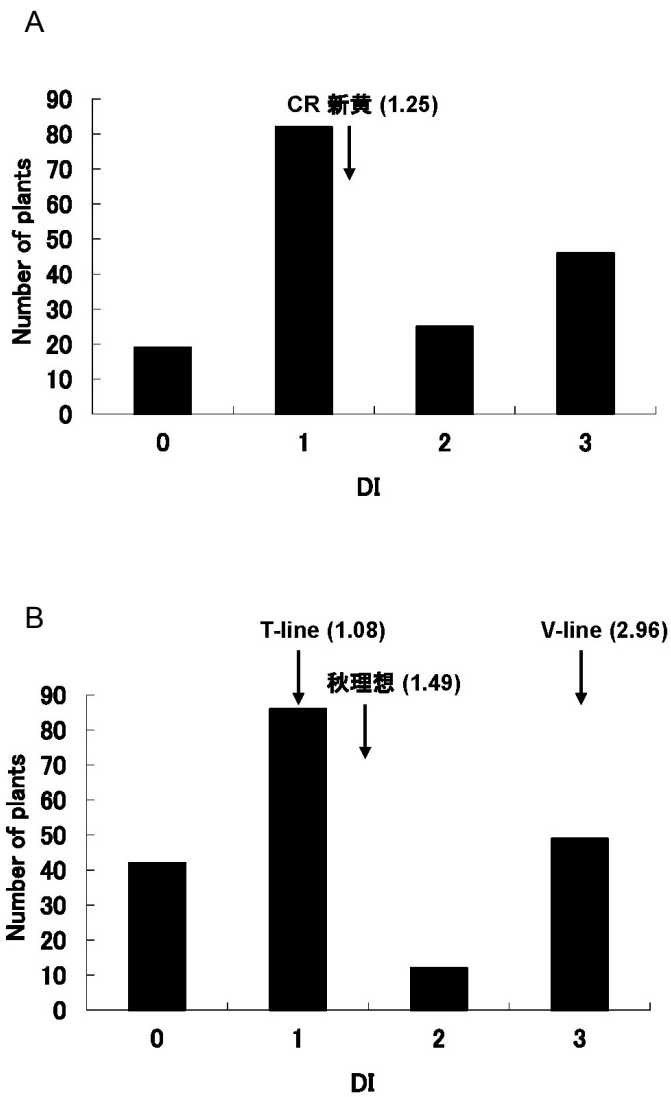


図 6. 「CR 新黄」自殖 F_2 集団 ($n=172$) における「No.14」に対する発病指数 (DI) の頻度分布と「秋理想」との比較

(A) 「CR 新黄」における平均 DI を () 内に記し、矢印は図上における該当位置を示す。

(B) は図 4 で示した「秋理想」 F_2 集団での結果。

第2章 根こぶ病抵抗性遺伝子の存在領域の特定および遺伝子機能の推定

緒論

根こぶ病の病徴であり、多数の休眠胞子がつくられる「こぶ組織」は第二次感染(皮層感染)において、根こぶ病の多角変形体が宿主細胞および近隣細胞に働きかけ、増殖および分裂を促すことで生じると考えられている(Mithen et al. 1992)。「こぶ組織」においてはサイトカイニンやオーキシンなどの植物ホルモンの上昇が報告されており(Butcher et al. 1974、Siemens et al. 2006)、Dekhuijzen(1981)は根こぶ病菌変形体によってサイトカイニン生成が促進され、宿主細胞中に放出されたサイトカイニンが宿主細胞の分裂を誘導することを示唆している。このため、根こぶ病菌が増殖する過程においては、宿主の代謝経路(産物)が利用されていると考えられる。宿主の代謝を自己の増殖、生存に活かすという、根こぶ病原菌側の戦略機構は明らかになりつつあるが、一方、菌の侵入、増殖を防ぐ宿主側の抵抗性機構についてはほとんど明らかになっていない。例えば、同じ絶対寄生菌であるオオムギうどんこ病では表皮細胞からの一次感染の際、侵入菌糸の周辺にパピラと呼ばれる、カロースおよびフェノール類が蓄積した物理的障壁を作り、侵入を拒絶する(一次防御応答)(Kunoh et al. 1982)。万が一、病原菌がその障壁を打破し侵入に成功しても、宿主側の過敏反応(hypersensitive reaction ; HR)によって生じる死細胞の中に閉じ込められ、隣接細胞への感染拡大が妨げられる(二次防御応答)。これに対し、根こぶ病における宿主側の一次防御応答(土壌から根毛表皮細胞への菌の侵入阻害)ならびに、二次的な防御応答(侵入後の宿主細胞内での菌の増殖阻害)など、抵抗性機構についてはほとんど明らかになっていない。

抵抗性の機能解明を進めるためには、CR 遺伝子を単離する必要が

ある。既存の 8 つの CR 遺伝子座の中で遺伝子の構造が明らかになっているものはなかったが、近年、ハクサイから *Crr1* 遺伝子が単離された(畠山ら、2010)。*Crr1* 遺伝子は多くの植物の抵抗性遺伝子(Resistance gene; *R* 遺伝子)で認められる Nucleotide-binding site/leucine-rich repeat (NBS-LRR)の構造を持ち、本遺伝子を形質転換したシロイヌナズナでは根こぶ病に対する抵抗性が付与されることが明らかになり、抵抗性機構の解明の糸口となった。しかし、*CRb* を含む他の CR 遺伝子は単離されておらず、それら遺伝子構造は未だ明らかになっていない。また *CRb* の座乗位置に関して、本研究(前章結果)と Piao et al.(2004)との結果には相違が認められたため(図 5.A および E)、正確な *CRb* 遺伝子の位置を特定する必要がある。

CRb 遺伝子は KBrH059N21F および KBrH129J18R に挟まれた領域に座乗することを前章で示したが(図 5.E)、これら DNA マーカーの基となった 2 つの BAC クローンは不連続であり、また、両 BAC クローン間のゲノム配列は解読されていなかったため、*CRb* 遺伝子近傍に新たな DNA マーカーを開発することは困難であった。しかし、2011 年 8 月、Wang et al.(2011)によって、ハクサイ(*B.rapa*)の全ゲノム配列の解読が完了し、*Brassica* database (BRAD: <http://brassicadb.org/brad/>)で公開された。そこで BRAD で公開されているゲノム配列情報を利用することにより、*CRb* 遺伝子近傍により詳細な DNA マーカーを開発することが可能になった。

本章では、病原型グループ 3 の防除に有用な *CRb* 遺伝子において、ゲノム上の遺伝子存在領域の特定、およびゲノム構造から本遺伝子の機能を推察するため、新たに *CRb* 遺伝子近傍に高密度のマーカーを製作し、高密度連鎖地図の構築および解析を行った。

材料および方法

1. 植物材料

根こぶ病抵抗性 F₁ 市販品種「CR 新黄」の自殖 F₂ 集団(n=2,032)を供試した。

2. DNA マーカーの開発

前章で KBrH129J18R、KBrB091M11R および KBrH059N21F の BAC-end 配列を基にした SSR マーカーが *CRb* 座に連鎖していることを明らかにした(図 7.A)。より詳細なマーカーを開発するため、BrGSP から公開されている KBrH129J18、KBrB091M11、KBrH059N21 および、KBrH059N21 に隣接する KBrH069E08 の 4 つの BAC クローンの全長配列を基に DNA マーカーを作成した。KBrH059N21F および KBrH129J18R に挟まれたゲノム領域における DNA マーカーの開発は、BRAD の配列情報を基に行った。DNA マーカーの開発は前章と同様の手法を用いて行い、KBr-BAC クローンの配列を基に開発したマーカーの頭文字は KB(KB_N)とし、BRAD の配列情報を基に開発したマーカーの頭文字は B(B_N)と命名した。本章で開発したマーカーの一覧は表 7 に示した。

3. 高密度連鎖地図の作成

CRb 遺伝子領域の特定には、マップベースクローニング法(FIRE 法: Kato et al. 1999)を用いた。マーカー遺伝子型と表現型(抵抗性)との間で連鎖が切れた組換え個体を得るため、まず 2,032 の F₂ 集団を TCR05 および KBrB091M11R でスクリーニングした(図 7)。次に、両マーカー間で組換えが認められた F₂ 個体を自殖し、F₃ の種子を得た。1 系統当たり 40~60 粒の F₃ 種子を 'No.14' による根こぶ病抵抗性検定に供試するとともに、各個体における *CRb* 近傍マーカーの遺伝子型を決定した。組換え点を境界にホモ型で組換わっている 9~15 個体の

平均 DI を各 F₃ 系統の発病指数とした。各 F₃ 組換え個体のマーカーの遺伝子型と抵抗性との比較から、*CRb* のゲノム上の存在領域を決定した。なお、TCR05 および KBrB091M11R の間に *CRb* が存在することを確認する対照実験のため、両マーカー間で組換えが認められない抵抗性ホモ型、および罹病性ホモ型の F₃ 系統を無作為に 3 系統ずつ選出し、根こぶ病抵抗性検定を行った。

4. 遺伝子機能の推定

CRb の遺伝子構造を予測するため、3. において決定した *CRb* 存在領域のゲノム塩基配列を BRAD から入手し、翻訳領域(Open Reading Frame :ORF)を予測した。得られた ORF の配列と GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)に登録されているタンパクと BLAST プログラム(BLASTX)(<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)を用いた類似性検索を行うことで *CRb* 候補遺伝子の構造を推定した。

結果

ゲノム情報に基づいた高密度連鎖マーカーの開発

KBrH129J18、KBrB091M11、KBrH059N21 および KBrH069E08 の 4 つの BAC クローンのゲノム配列を基に 54 個、BRAD におけるハクサイのゲノム配列を基に 95 個、計 149 個のプライマーセットを設計した。149 個の内、多型が得られた 46 個(31%)を DNA マーカーとした。*CRb* 遺伝子の存在する可能性が低い TCR05 と KBrH059N21F、および KBrH129J18R と KBrB091M11R の間の領域に存在したマーカー(図 7)はマッピングに用いる数を減らし、また、マーカー間の距離が近すぎるものも解析から除外した(計 13 個)。よって高密度連鎖解析には 33 個の DNA マーカーを用いた(表 7)。

33 個の DNA マーカーの内、15 個が KB_N マーカーであり、KBrH069E08、KBrH059N21、KBrH129J18 および KBrB091M11 の 4 つの BAC 全長配列から、それぞれ、2 個(KB69_N)、5 個(KB59_N)、5 個(KB29_N)および 3 個(KB91_N)のマーカーを作製した(図 7.B および表 7)。また BRAD の情報から、KBrH059N21 と KBrH129J18 の BAC 間は、約 300 kb (連鎖群 A3 における 24.3~24.6 Mb の位置に該当)と推定され、本領域において 18 個の B_N マーカーを作製した(図 7.B および表 7)。特に *CRb* 遺伝子が存在する KBrH059N21F および KBrH129J18R の間には、高密度の 28 個のマーカーを作製することができ、マーカーの平均距離は 20.4 kb であった。なお、33 個のマーカーは全て共優性型のマーカーであり、26 個が SSR マーカー、7 個が Indel(Insertion/deletion)マーカーであった(表 7)。

高密度連鎖地図の作成による *CRb* 遺伝子領域の特定

CRb 遺伝子の正確なゲノム上の位置を決定するため、*CRb* 遺伝子を挟む最近傍マーカーの特定と近傍組換え個体の選抜を行った。2,032 個体からなる「CR 新黄」自殖 F₂ 集団を、TCR05 および KBrB091M11R

でスクリーニングした結果、両マーカー間で組換えが生じた 92 個体を選抜し、組換え点により、下記の①～③の 3 つのグループに分類した。

① TCR05 および KBrH059N21F の間で組換えが生じている個体 (n=37)

② KBrH059N21F および KBrH129J18R の間で組換えが生じている個体 (n=35)

③ KBrH129J18R および KBrB091M11R の間で組換えが生じている個体 (n=20)

CRb 遺伝子は KBrH059N21F および KBrH129J18R の間に存在するため(図 7.A)、グループ②の組換え個体を中心に解析に用いた。そのため、グループ①からは 9 個体、②からは 22 個体、③からは 4 個体の計 35 個体の F₂ を選抜し、F₃ 種子を得た。各系統の F₃ 個体を TCR05 と KBrB091M11R の間の 37 マーカーで遺伝子型を決定するとともに、根こぶ病抵抗性検定を行った(図 8)。その結果、35 の F₃ 系統は、16 の抵抗性(平均 DI < 0.6)系統と 19 の罹病性(平均 DI > 2.8)系統に明確に分かれた。35 系統の内、No.1118、No.1417、No.1866、および No.2002 の 4 系統を除いた 31 の系統の表現型(抵抗性)は、KB59N07 および B1005 の両遺伝子型と密接な相関関係が認められ、TCR05 と KB59N08 の間、および B0902 と KBrB091M11R の間に組換え点が存在しても、表現型との矛盾は認められなかった。KB59N07 および KB59N06 との間で組換えが生じている No.1417、No.1866 および No.2002 の 3 系統は KB59N07 の遺伝子型は抵抗性型を示したが、表現型は罹病性であった。この結果から *CRb* 遺伝子は TCR05 と KB59N07 の間に存在しないことが明らかになった。また、B1005 および B0902 との間で組換えが生じている No.1118 系統では B1005 の遺伝子型が罹病性型を示したが、表現型は抵抗性であった。この結果から、*CRb* 遺伝子は B1005 と KBrB091M11R の間に存在しないこと

が明らかになった。以上、各 F₃ 系統の組換え点およびマーカー遺伝子型と抵抗性検定による表現型との比較から、*CRb* 遺伝子は KB59N07 および B1005 に挟まれた約 140 kb のゲノム領域(連鎖群 A3 上の 24,201~24,342 kb の位置に該当)に存在することが明らかになった(図 7.B および図 8)。なお、TCR05 および KBrB091M11R の間での非組換え系統において、遺伝子型が抵抗性ホモ型、および罹病性ホモ型の系統は、それぞれ抵抗性(平均 DI=0.0)および、罹病性(平均 DI=3.0)を示した(データ省略)。

候補遺伝子の特定

CRb 遺伝子の推定座乗領域約 140kb のゲノム塩基配列を基に ORF を探索した結果、該当ゲノム領域内には 14 の遺伝子が存在することが明らかになった。そこで、各遺伝子のコードしているタンパクをデータベースとの類似性から推定した結果、病害抵抗性に関与するものとして、Rho-binding family protein、Toll-interleukin-1 receptor/nucleotide-binding site/leucine-rich repeat (TIR-NBS-LRR) class disease-resistance protein が存在し、病害抵抗性関連以外では、 β -glucosidase 47、MATE efflux family protein などが存在した(表 8)。

考察

本章では 2011 年に公開されたハクサイ (*B.rapa*) ゲノムの全塩基配列情報 (Wang et al. 2011) を利用することで、前章の時点 (2010 年) では作成が困難なゲノム領域において、詳細な DNA マーカーを開発することができた。これら新規 DNA マーカーを用いた高密度連鎖地図の解析によって、*CRb* 遺伝子が KB59N07 および B1005 に挟まれた約 140 kb のゲノム領域に存在することを明らかにし、*CRb* 遺伝子の詳細な位置の特定に至った。*CRb* 座を最初に見出した Piao et al. (2004) は、*CRb* 座が TCR05 から末端側に位置することを報告しているが (図 5A)、本研究では *CRb* 座は TCR05 より基部側に位置し (図 5.E)、両者間で相違が認められた。本章の高密度連鎖地図の解析は *CRb* 遺伝子の単離を視野に入れて行ったものであるが、Piao et al. (2006) は 2006 年に 487 個体からなる「CR 新黄」DH 系統の F₂ 集団を用い、自身の連鎖地図情報 (図 5.A) を基に *CRb* 遺伝子の単離を試みているが、未だ本遺伝子単離されていない。本章の高密度連鎖地図の結果から、*CRb* 遺伝子は TCR05 より基部側に位置することを証明し、TCR05 から TCR09 側、つまり末端側に存在しないことを明らかにした。これらの結果によって、前章の結果を立証するとともに、*CRb* 遺伝子の単離に重要な遺伝子存在領域を 140 kb まで絞り込むことができた。

CRb が存在するゲノム領域において遺伝子の探索を行った結果、14 の候補遺伝子が存在した (表 8)。その中で、病害抵抗性への関与として Rho-binding family protein および TIR-NBS-LRR class disease resistance protein が挙げられる。Rho family 遺伝子はヒトの癌をはじめとした哺乳動物の免疫システムに関与し (Sahai et al. 2002)、近年、植物の抵抗性においても重要な役割を果たしていることが報告されている (Agrawal et al. 2003、Kawano et al. 2010)。Rho 遺伝子に結合する Rop-binding kinase 1 はオオムギうどんこ病に対する抵抗性に関与していることが報告されており (Huesmann et al. 2012)、

KB59N06 および KB59N05 の間に存在した Rho-binding family protein は *CRb* の一つの候補として考えられる。一方、TIR-NBS-LRR class disease resistance protein は NBS-LRR の遺伝子ファミリーに含まれ、これらの遺伝子は抵抗性遺伝子(Resistance gene :*R* 遺伝子)として、トマト、イネ、ジャガイモ、オオムギ、タバコ、シロイヌナズナ等、多くの植物の抵抗性に関与している(Eitas et al. 2010)。ハクサイにおいても *Crr1* 遺伝子は TIR-NBS-LRR の構造を有し、根こぶ病抵抗性に関与していることが報告されている(畠山ら、2010)。*Crr1* 遺伝子はホモ型あるいは、*Crr2* 遺伝子との共存下以外では病原型グループ 1 および 2 の根こぶ病菌に抵抗性を十分発揮できないのに対し(Suwabe et al. 2006)、*CRb* 遺伝子は単独かつヘテロでも病原型グループ 3 に対して十分な抵抗性を発揮する優性遺伝子である(前章参照)。このように、*Crr1* 遺伝子と *CRb* 遺伝子は遺伝様式および抵抗性を付与できる菌系の病原性が異なるため、遺伝子構造や機能を異にすることが推定された。しかし、本章の結果から候補遺伝子に TIR-NBS-LRR class disease resistance protein が存在したことから、*CRb* 遺伝子も *Crr1* 遺伝子同様、TIR-NBS-LRR 配列を有する遺伝子である可能性が考えられる。ハクサイ (*B.rapa*) のゲノムはシロイヌナズナのそれが 3 倍化したものと考えられており、遺伝子も二重化(duplicate)あるいは三重化(triplication)していることが示唆されている(Mun et al. 2009)。14 の候補遺伝子においても、MATE efflux family protein の三重化、 β -glucosidase 47 および TIR-NBS-LRR class disease resistance protein の二重化が認められた(表 8)。2 つの隣接している TIR-NBS-LRR 構造遺伝子の内一つは、*CRb* 存在領域を決定した末端の DNA マーカー B1005 が ORF 領域内(NBS モチーフ内)に存在し、本マーカー遺伝子型が罹病性型である No.1118 の F₃ 系統は抵抗性を示した(図 8)。そのため、B1005 の配列を含む TIR-NBS-LRR 構造遺伝子(表 8、最下段)は *CRb* の候補遺伝子である可能性が低いと考えられ、

B4732 と B1321 に挟まれた TIR-NBS-LRR 構造遺伝子が *CRb* の候補遺伝子として最も可能性が高いと考えられる。興味深いことに、イネにおける Rho タンパク *OsRac1* は NBS-LRR に属する *Pit* と直接相互作用し、いもち病の抵抗性に関与していることが報告されており (Kawano et al. 2010)、*CRb* 存在領域に認められた Rho 関連タンパクと TIR-NBS-LRR タンパクの双方は、共に根こぶ病抵抗性に必要なのかもしれない。

解読されたハクサイ全ゲノム配列は「Chiifu-401」から収集したゲノム DNA を用いて決定された (Wang et al. 2011)。「Chiifu-401」は罹病性品種であり、そのゲノム配列上には抵抗性品種が有する遺伝子が存在しない可能性がある。そのため、厳密には決定した *CRb* 存在領域において、抵抗性アレルと罹病性アレルのゲノム配列を比較する必要があり、本結果で見出された候補遺伝子においても、抵抗性および罹病性アレルのゲノム配列との間で顕著な違いが見出される候補遺伝子は、*CRb* 遺伝子である可能性が高いと推定される。今後は候補遺伝子をシロイヌナズナやコマツナ等を用いた形質転換実験により、*CRb* 遺伝子を特定する必要がある。

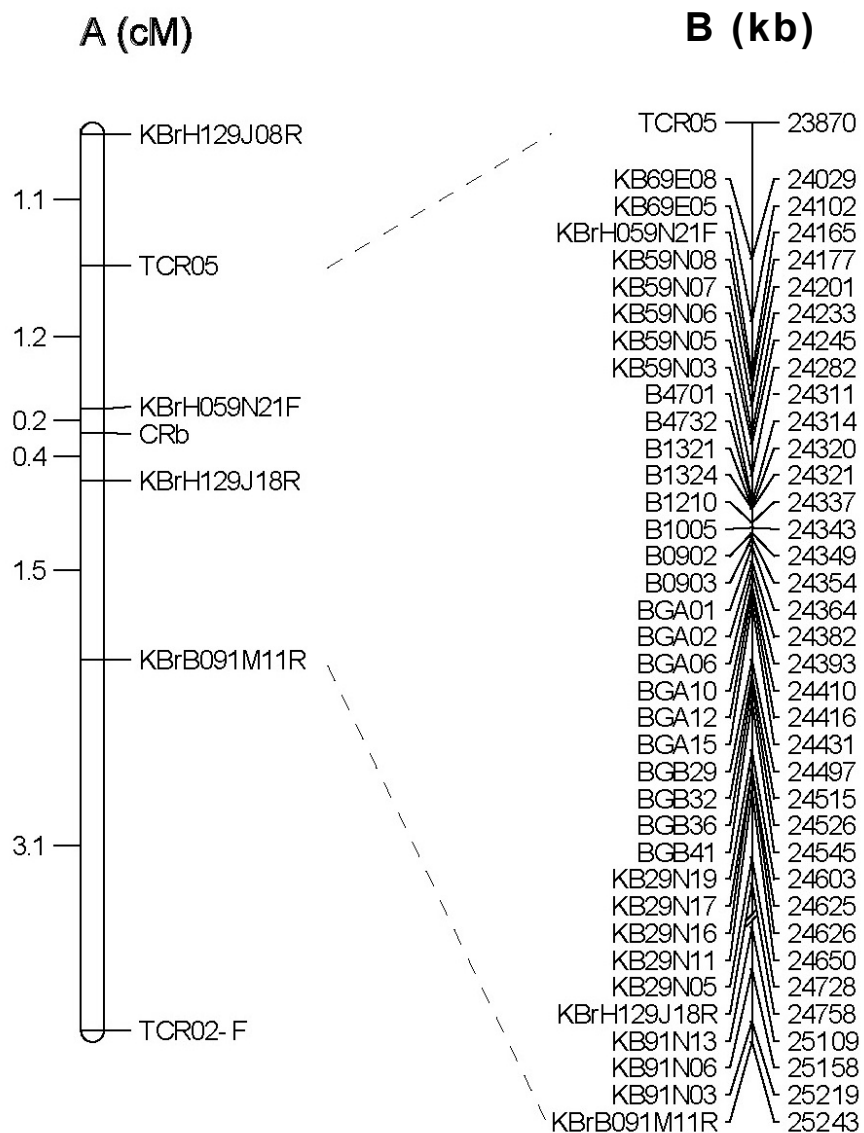


図 7. *Brassica rapa* 連鎖群 A3 における *CRb* 近傍の部分連鎖地図および物理地図

(A) 前章の結果による *CRb* 部分連鎖地図

(B) 本章にて TCR05 および KBrB091M11R の間に新たに作成したマーカーの物理地図

マーカーのゲノム位置(kb)は *Brassica* database (BRAD) のゲノム配列情報を基に決定した。

表 7. 高密度連鎖地図作成に用いた DNA マーカーの情報および配列

マーカー	コアモチーフ ^a	マーカーの種類	Forward primer (5' to 3') Reverse primer (5' to 3')	増幅断片長 (bp)	マーカーの位置 (bp) ^b
KB69E08	TA	SSR	ATTACAGGTCCATGAAAAGAT GTTTGGTTACCGAAACAGAAGGAA	191	24029160
KB69E05	AT	SSR	ATCACAACCAAAATGGAATGAC GTTTCTCAAGCACCGAGACTCATAA	218	24102120
KB59N08	AT	SSR	AGCATCTTGCAAATATTTACGTT GTTTGACCGTGTATTGTTGTAGGG	249	24176750
KB59N07	TC, CT	SSR	ATGTAAGGCTTTCTCCATCAACCACTA GTTTGACACGATGAACCCAGAC	160	24200770
KB59N06	CA, TA	SSR	ATGAAATTGCAACTCTAAAATG GTTTAGGCTTTCTCCATCAACCACTA	249	24233250
KB59N05	AT, AG	SSR	AGTCAACGAAACAAAGATATGC GTTTCTTTTTCTCCACAAAAGGAGAGC	175	24245070
KB59N03	TA	SSR	AGGTAATCCTCAAAAAGCCAT GTTTGGCGAAATTCAGTTGACA	187	24282370
B4701	T	Indel	AGATTCTTGTCTTCTCGCTGG GTTTACGGAGACCATGAAGGATAATG	187	24310840
B4732	A	Indel	ATCTGATGTACCTTTGTGCTGG GTTTGTCAATCATTCAAGCTAAGTGG	226	24313760
B1321	T	Indel	AGTGAACGAGACTATGATTAATGTTTT GTTTCAAGTTTGTATAAGCGTTGAGA	135	24320110
B1324	T	Indel	ATAATGGCTTCAAAATAGTCAAAA GTTTGCATATACACGTTGAGGAAAC	206	24321240
B1210	GA	SSR	ATTGAAAAGTTGACTCCGTTGA GTTTCTTCCCTGAAGTTGCTTCCAGCTCTC	169	24337000
B1005	A	Indel	AGGAAGTTGTGGTGTGTTGAA GTTTATATCCTCGATCATGGCAGC	241	24342740
B0902	TA	SSR	AGCCTTGCGTAAAAGCAACTAC GTTTGAATCCGACAAATACATCCAT	160	24349410
B0903	TC	SSR	ACTTCTCTGCTTTTCTCAGGT GTTTGAACCTCTTCTCCCCCTTC	214	24354490
BGA01	AC	SSR	ATCTGACTGTTTTGTGAAAGCGA GTTTAGAGTTTTGGGTGCAAAATGTT	213	24364000
BGA02	CT, AT	SSR	ACAAATTGCAAGTCTTCCCTCC GTTTACATGCAATTGATGGGAAAA	109	24382330
BGA06	TC	SSR	AGAAATAGCAAAGCTCAAACGG GTTTCCAGAAAAGAGATGCAGACAA	211	24392610
BGA10	AT	SSR	AGATTACAAAAATTTCAAAGTGAGA GTTTCTCACACTTTCCTTAAATAAAAGCTA	277	24409760
BGA12	TC, CT	SSR	ACCCCTCTGCTTTTCTACTTTC GTTTCAATTCATTGGTCATAAGGCAA	182	24416470
BGA15	AT	SSR	ACCAAAAACATCAGCTTTCGTA GTTTCAAGAAATCTTTATGAATAGGTTGC	204	24431330
BGB29	AG	SSR	ATTTGCTCTACACTTTTCCCC GTTTGTCTGAGGAGGCTCATT	248	24496990
BGB32	ACA	SSR	ATAGATCAACTCCATTACCGCT GTTTCCAAGCAAAATATCTACCAGCC	263	24515010
BGB36	AT	SSR	AGCTAACATTGCAAGCTTTGCT GTTTGATAACCATGCTGTAGCGAG	195	24525500
BGB41	ATAAT	SSR	ATCGCATAAACTAATAAAATCAAAA GTTTGACCCACATGATTAACAA	153	24545390
KB29N19	AT	SSR	ATGAGATCGTCAGCCATTTCTC GTTTCCAGTCCGGTTTTTATTACCTT	240	24602980
KB29N17	T	Indel	ACAGCTCCTTTTTAGGTAACGA GTTTGGATTGCAAGTGTATTTCCA	253	24625320
KB29N16	T	Indel	AGACTCGACAAGGTATCGATCT GTTTGACGCCATTATGACACAACCT	214	24626430
KB29N11	TA, AT	SSR	ACTCTCCACCAACACTTCTCTAA GTTTGAAGCTATCTTAGACCACC	152	24650090
KB29N05	AT	SSR	ATACAAGCTCTCAGAGGAGGAA GTTTCAAGCTTGCACACTTGTACTTGC	148	24728250
KB91N13	GGA	SSR	AGACGGAGACTTTGAGATCTGG GTTTCAAGCTTCCAGAAACACG	211	25109110
KB91N06	AT	SSR	AGAATTTCTTGTAGCCAAAT GTTTGTGTTGTTCAATTTCTATTTTCTCAGA	225	25157550
KB91N03	AGA	SSR	ATAATCATGCCACAGATAAGA GTTTGTCTCGCATTTTTGGTTTATG	228	25218530

^a SSR および Indel マーカーの塩基モチーフ

^b BRAD における連鎖群 A3 のゲノム上の位置を示す

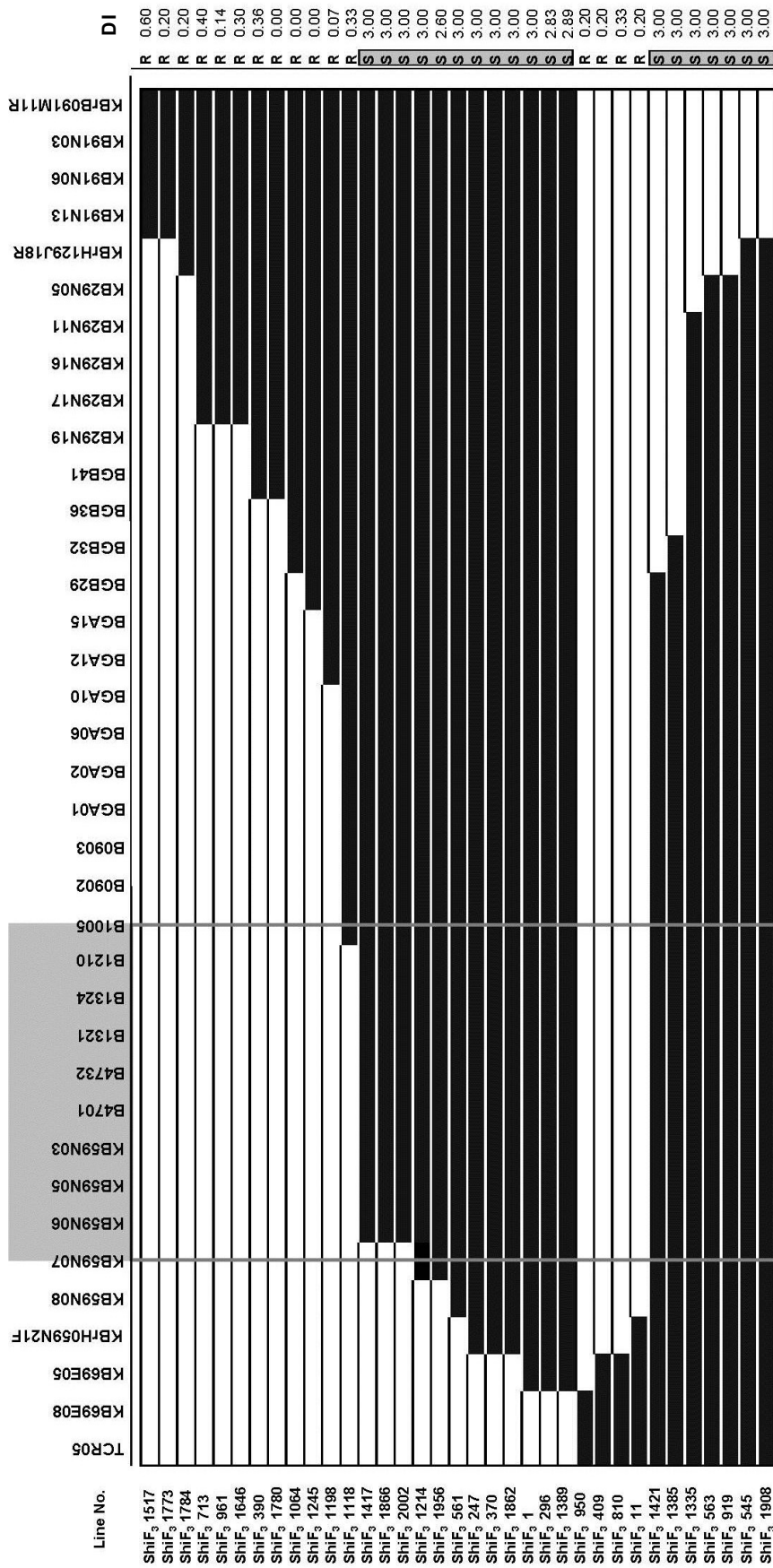


図 8. F₃ 系統における組換え位置と発病指数(DI)

左端 : 各 F₃ の系統番号 上端 : マーカー名 右端 : 発病指数 (DI) R: 抵抗性 S: 罹病性
 □ : 抵抗性アレル領域 ■ : 罹病性アレル領域 ■ で囲まれた領域は CRb の存在領域を示す。

表 8. *CRb* 存在領域において機能が推定されるタンパク質

マーカー ^a	類似タンパク質	E-value
KB59N07	Nitrate transporter	0
	Pentatricopeptide repeat-containing protein	3e ⁻¹⁵⁴
	DNA-directed RNA polymerase	8e ⁻¹⁷⁹
KB59N06	Rho-binding family protein	4e ⁻¹⁷
KB59N05	Homeobox-leucine zipper protein MERISTEM L1	0
	β-glucosidase 47	1e ⁻¹⁴⁶
	β-glucosidase 47	1e ⁻⁷⁷
	Tobamovirus multiplication protein 1	2e ⁻¹⁴
	Peptide methionine sulfoxide reductase	9e ⁻⁸³
	MATE efflux family protein	3e ⁻¹⁶⁷
KB59N03	MATE efflux family protein	9e ⁻⁷¹
B4701	MATE efflux family protein	6e ⁻¹⁷⁶
B4732	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein	1e ⁻¹³³
B1321		
B1324		
B1210		
B1005	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein	3e ⁻¹⁴⁹

^a 図 8 参照

B4701 および B1005 は遺伝子のコード領域に、他のマーカーはフランキング領域に位置する。

第 3 章 抵抗性遺伝子座の異同および既存品種が保持する抵抗性 遺伝子の推定

第 1 節 *CRb* 近傍に座乗する CR 遺伝子座の異同および機能比較

緒論

複数の抵抗性遺伝子を集積し、様々な病原性をもつ根こぶ病菌に対応した新たな抵抗性品種の育成には、各抵抗性遺伝子と菌の病原性との対応関係を明確にし、集積させる抵抗性遺伝子を効率的に選択する必要がある。これまでハクサイ (*B.rapa*) では 8 つの CR 遺伝子座が同定されているが、各 CR 遺伝子座と根こぶ病原性の対応関係はほとんど明らかになっていない。これは各 CR 遺伝子座の同定に用いられた菌系は各研究者に依存し、病原性を把握する統一した指標が用いられてこなかったためである。4 種の *Crr1*、*Crr2*、*Crr3*、*Crr4* および本研究の対象である *CRb* の解析には、主に Hatakeyama et al.(2004) の分類に基づいた菌系を用いているが、残りの *CRa*、*CRc* および *CRk* については主に Williams 法(Williams, 1966)によって区分された菌系を用いているため、統一した見解を得ることは困難であった。しかし、2012 年、Matsumoto et al.(2012)による *CRa*、*CRc* および *CRk* の解析において、Hatakeyama et al.(2004)の病原型判別品種「スーパーCR ひろ黄」および「隆徳」が用いられたため、暫定的ではあるが、既報すべての CR 遺伝子座と病原型との関係を推定することが可能になった。

本研究の目的である病原型グループ 3 に対する抵抗性に言及すると、*Crr1*、*Crr2* および *Crr4* 座は本グループに抵抗性を付与できず(松元ら、2010 および未発表データ)、*Crr3* 座は抵抗性関係が明らかでない。*CRa* 座は抵抗性、*CRc* 座は罹病性を示し、*CRk* 座は幅広い病原性の菌に抵抗性を示すが、不完全優性として機能するため、ヘテロでは病原

型グループ 3 に対して十分な抵抗性を発揮できない(Matsumoto et al. 2012)。これらの報告から、*Crr1* 遺伝子と *Crr2* 遺伝子の集積では補えない病原型グループ 3 に対する抵抗性に有用なのは、本研究で見出した *CRb* 遺伝子か *CRa* 遺伝子のみであると考えられる。一方で、*CRa* 遺伝子と *CRb* 遺伝子は位置関係から同じ遺伝子か、極めて近傍に座乗する遺伝子であると考えられている(Diederichsen et al. 2009)(図 2)。

前章までにおいて、*CRb* 遺伝子の正確な位置を決定し、本遺伝子の極めて近傍に DNA マーカーを開発することができた。また、全ゲノム配列の公開により、各 CR 遺伝子座に連鎖する DNA マーカーの位置を相対的な遺伝距離(組換え価)ではなく、物理地図上における絶対位置(物理距離)から比較することが可能になった。このため、本節では *CRb* 遺伝子と *CRa* 遺伝子の異同を、本研究および既報の結果を統合して推察した。また、*Crr3* 座の病原型グループ 3 への抵抗応答を調査し、*CRb* 遺伝子と *Crr3* 遺伝子との間における抵抗性機能の相違を検証した。

材料および方法

CRb と *CRa* の位置関係を推察するため、第 1 章および第 2 章で供試した「CR 新黄」自殖 F₂ 個体、各 172 個体および 2,032 個体、計 2,204 個体において、*CRa* 最近傍マーカー SC2930(Matsumoto et al. 2012)、および、*CRb* 近傍マーカーを用いて遺伝子型を決定し、両者の遺伝子型を比較した。また、SC2930 のゲノム上の位置を特定するため、増幅産物の塩基配列を決定し、BRAD データベースを用いてハクサイのゲノム配列情報と比較した。

CRb 遺伝子と *Crr3* 遺伝子の抵抗性における機能の相違を調べるため、*Crr3* 遺伝子を保持する「CR 信濃」(Hirai et al. 2004、Saito et al. 2006)の自殖 F₂ 個体(n=11)を用いて、‘No.14’に対する抵抗性検定を行った。各 F₂ 個体の *Crr3* 遺伝子型は OPC11-2S(Hirai et al. 2004)を用いて決定した。

結果

CRa の最近傍マーカーである SC2930 の増幅産物の塩基配列を決定し、BRAD のゲノム配列情報と照合した結果、連鎖群 A3 上の 24,780 ~ 24,781 kb に位置することが明らかになり、SC2930 は本研究で開発した *CRb* 連鎖マーカーの一つである KBrH129J18R とほぼ同じ位置に座乗した(両マーカー間距離は 23 kb) (図 9)。両マーカーの遺伝子型が実際に共分離するかを調べるため、第 1 章で用いた 172 個体、および第 2 章で得られた 92 の組換え体の「CR 新黄」自殖 F₂ 集団において、遺伝子型の分離を調べた。その結果、SC2930 および KBrH129J18R の遺伝子型は全ての個体において一致し、両マーカー間で組換えが生じている個体は認められなかった(図 10.A、20 個体のみ結果を表示)。SC2930 および KBrH129J18R は第 2 章の高密度連鎖解析に用いた TCR05 および KBrB091M11R の間に存在する (図 8 および図 9)。そのため、TCR05 と KBrB091M11R の間で組換えが認められた 92 個体(第 2 章参照)において SC2930 および KBrH129J18R で組換えが生じていなければ、組換え個体の選抜に用いた全 2,032 の F₂ 個体において、組換えが生じていないことを意味する。すなわち、第 1 章における 172 個体、および第 2 章における 2,032 個体を合計した、計 2,204 個の F₂ 個体において、SC2930 および KBrH129J18R は共分離すると考えられる。

一方、*Crr3* 遺伝子を保有する「CR 信濃」自殖 F₂ 集団(n=11)において、'No.14'を用いた根こぶ抵抗性検定を行った結果、すべての個体が罹病(DI=3.0)した(図 10.B)。これらの個体における *Crr3* 連鎖マーカー(OPC11-2S)の遺伝子型を調べた結果、解析 F₂ 集団内で分離が認められ、抵抗性ホモ型を持つ個体が含まれていた。これに対し、5 つの *CRb* 近傍マーカー(KB59N05、KB59N03、B4701、B4732 および B0902) は全ての個体で罹病性ホモ型を示した(図 10.B には B0902 のみを示し

た)。以上の結果から、*Crr3* 遺伝子は‘No.14’への抵抗性に関与しないことが明らかになった。

考察

CRa および *CRb* は同じ遺伝子の可能性が示唆されていたが (Diederichsen et al. 2009)、両 CR 遺伝子座および連鎖マーカークの位置関係の比較は行われてこなかった。本研究において、*CRa* 最近傍マーカー SC2930 (Matsumoto et al. 2012) と *CRb* 近傍マーカー KBrH129J18R は、ハクサイゲノム上のほぼ同じ位置に存在することを明らかにした (図 9)。また、2,204 個からなる「CR 新黄」自殖 F₂ 集団において、両マーカーの遺伝子型は共分離し、組換え体は認められなかった (図 10.A)。SC2930 は *CRa* から基部側 0.6 cM に座乗し (Matsumoto et al. 2012)、KBrH129J18R は *CRb* から同じく基部側 0.4 cM に座乗する (図 9)。*CRa* および *CRb* の連鎖地図は独立した実験から得られた連鎖関係のため直接的な比較は行えないが、両 CR 遺伝子座と連鎖マーカーの距離は同程度と推定される。

CRa の同定に用いられた菌系 'M85' は、近年、Hatakeyama et al. (2004) の病原型判別品種「スーパーCR ひろ黄」および「隆徳」を用いた接種検定が行われ (Matsumoto et al. 2012)、これら 2 品種に対する抵抗性反応から、'No.14' とほぼ同じ病原性であると考えられる。さらに、*CRa* を持つ「T136-8」は抵抗性カブ「ECD02」由来であるが、*CRa* は *CRb* の抵抗性由来の抵抗性カブ「Gelria R」においても、存在することが示唆されている (Matsumoto et al. 2012)。「T136-8」および「CR 新黄」はともに、病原型グループ 1 および 2 に罹病し、グループ 3 および 4 に抵抗性を示す (Hatakeyama et al. 2004、Matsumoto et al. 2012)。以上の点をまとめると、*CRa* および *CRb* の関係において下記①～③の共通点が認められた。

- ① *CRa* 最近傍マーカーは *CRb* の近傍マーカーとほぼ同じゲノム上の位置に存在する (図 9)。
- ② *CRa* および *CRb* 連鎖マーカーと各 CR 遺伝子座への距離は同程度である (図 9)。

③ *CRa* および *CRb* の同定元である両抵抗性素材(「T136-8」および「CR新黄」)は、多様な病原性の菌に対して同一の抵抗反応性を示す。これらのことから、*CRa* と *CRb* は同一遺伝子や対立遺伝子、あるいは極めて近い位置に存在する遺伝子と考えられる。

CRb は一遺伝子座による完全優性であることを明らかにしたが、*CRa* と *CRb* がゲノム上、タンデムに位置する遺伝子の可能性もあり、「CR新黄」が *CRa* 遺伝子を有しているかは明らかでない。また、*CRa* は既存のいずれの CR 品種に利用されているかは明らかでなく、*CRa* の同定に用いられた「T136-8」系統は Matsumoto et al.(1998)によって開発された独自の抵抗性素材のため、本研究では *CRa* の集団を解析に用いることはできなかった。今後、両者の関係をより明確にするには、*CRa* および *CRb* の遺伝子を単離し、両者の配列を比較する必要がある。

一方、*Crr3* 遺伝子を保持する「CR信濃」の自殖 F₂ 集団は、「No.14」に全て罹病したことから、*Crr3* 遺伝子は *CRb* 遺伝子とは異なり、病原型グループ 3 に対する抵抗性に関与していないことが明らかになった。また、*Crr3* と *CRk* は、*CRa* と *CRb* の関係と同様に、同じ遺伝子か否かが明らかになっていない(Diederichsen et al. 2009)(図 2)。*CRk* の由来である「CR歓呼」は既に市販されていないため本実験では解析できなかったが、病原型グループ 3 の菌と同様の病原性を示す「M85」に対して、抵抗性を示すことが報告されている(Matsumoto et al. 2012)。よって、*Crr3* 遺伝子と *CRk* 遺伝子は抵抗性を示す病原型グループが異なることから、両者は互いに独立した遺伝子であることが明らかになった。

本研究の結果および既報の報告(Hatakeyama et al. 2004、Matsumoto et al. 2012)から、既報 8 つの CR 遺伝子座と病原性の異なる 4 つの病原型グループとの対応関係が表 9 のように推定された。*CRa* と *CRb* が異なる遺伝子であることを裏付けるデータは現在まで

に得られておらず、グループ 3 の菌に抵抗性を付与できるのは、*CRa* 遺伝子、*CRb* 遺伝子および *CRk* 遺伝子であると推定される。さらに菌の病原性と CR 遺伝子座の対応関係は、既存の CR 品種が保有する CR 遺伝子の推定、新たな抵抗性品種の育成時における CR 遺伝子の選択、MAS による CR 遺伝子の蓄積などにおいて有用な情報になると思われる。

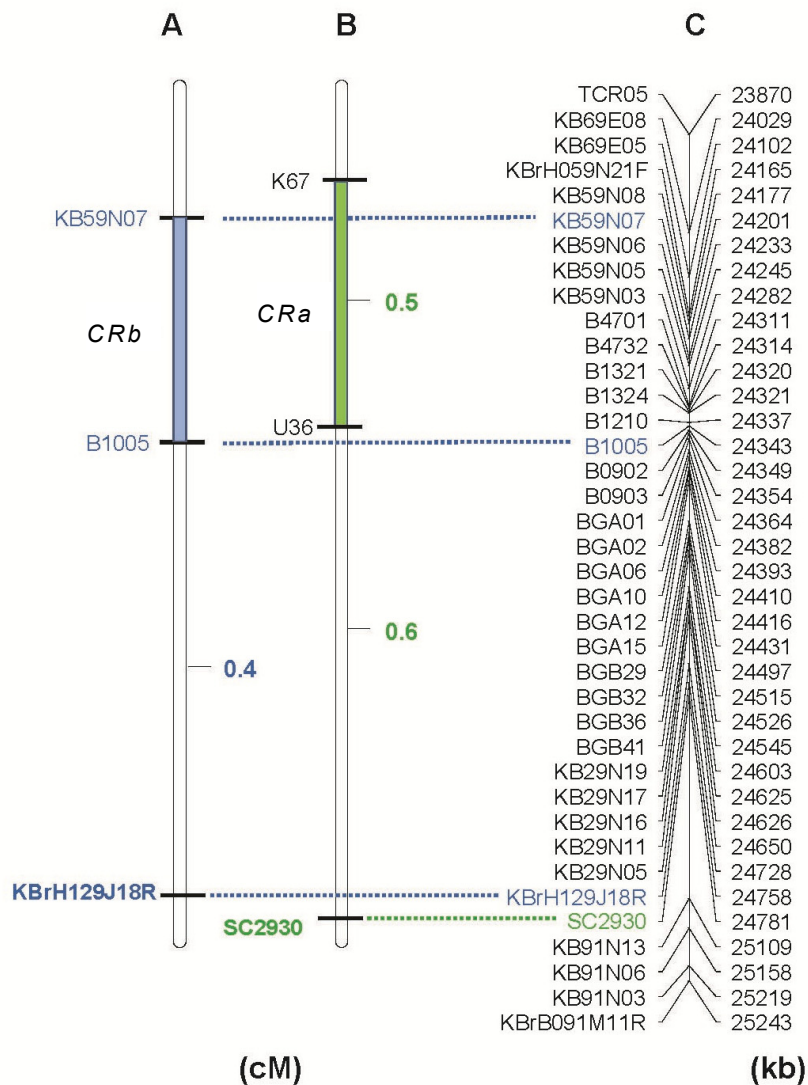


図 9. *CRa* および *CRb* の座乗位置関係

- (A) 高密度連鎖解析によって得られた *CRb* 遺伝子の存在領域
- (B) 上野ら(2011)および Matsumoto et al.(2012)の結果から推定される *CRa* 遺伝子の存在領域
(*CRa* 領域を挟み込むマーカーの配列情報は公開されていない)
- (C) 連鎖群 A3 上の *CRb* 近傍マーカーおよび *CRa* 最近傍マーカー SC2930 のゲノム位置

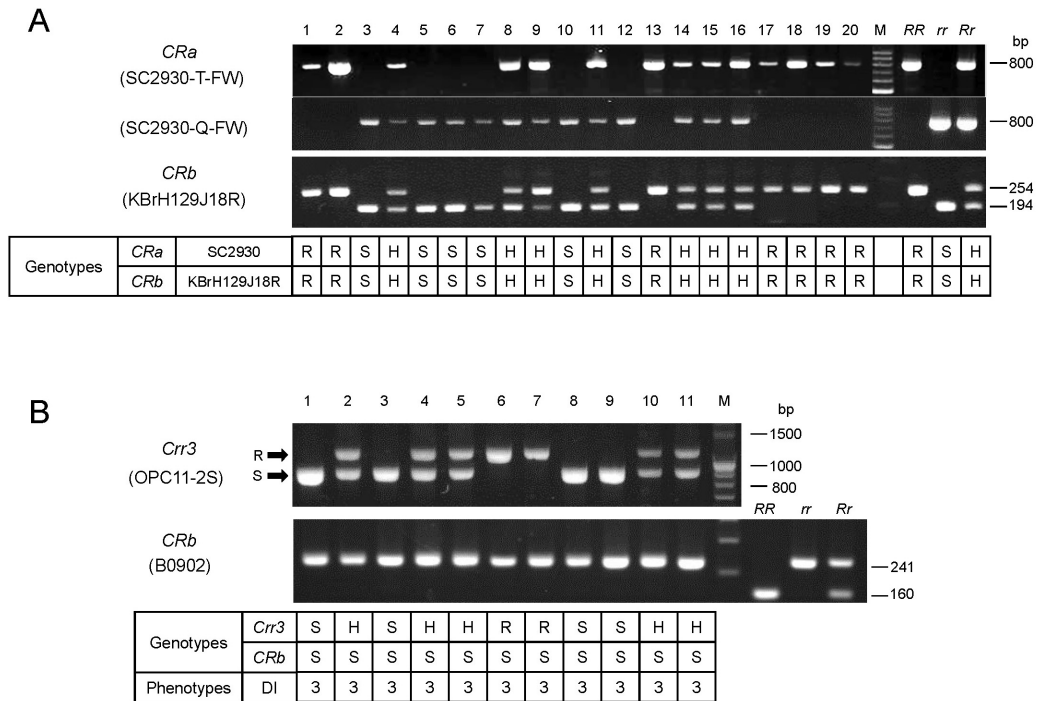


図 10. *CRa* と *CRb* の遺伝子型の比較、ならびに *Crr3* の 'No.14' に対する抵抗性

(A)「CR 新黄」自殖 F₂ 集団における *CRa* および *CRb* 連鎖マーカーにおける遺伝子型

SC2930-T-FW および SC2930-Q-FW はそれぞれ、抵抗性、罹病性アレルを検出し、両者で検出された個体はヘテロ型を意味する (Matsumoto et al. 2012)

(B)「CR 信濃」自殖 F₂ 集団における 'No.14' 菌に対する抵抗性、および *Crr3* マーカー遺伝子型との関係

R: 抵抗性ホモ型、S: 罹病性ホモ型、H: ヘテロ型

表 9. 4 種類の病原型グループの菌に対する各 CR 遺伝子座の抵抗反応

病原型 CR遺伝子座	解析系統(抵抗素材)	グループ				参考文献
		グループ1	グループ2	グループ3	グループ4	
<i>CRa</i>	T136-8 (ECD02)	S	S	R ^a	R	Hayashida et al. 2008, Matsumoto et al., 2012
<i>CRb</i>	CR新黄 (Gerlia R)	S	S	R ^a	R	Hatakeyama et al. 2004, Piao et al. 2004
<i>CRc</i>	C9 (Debra)	R ^b	S	S	-	Sakamoto et al. 2008, Matsumoto et al., 2012
<i>CRk</i>	CR敏呼 (Debra)	PR ^c	PR	PR ^b	-	Sakamoto et al. 2008, Matsumoto et al., 2012
<i>Crr1</i>	G004 (Siloga)	S	PR	S	R	Suwabe et al. 2003, 松元ら(2010)
<i>Crr2</i> *	G004 (Siloga)	S	S	S	S	Suwabe et al. 2003, 松元ら(2010)
<i>Crr1</i> と <i>Crr2</i>	はくさい中間母本豊9号 (Siloga)	R	R	S	R	松元ら(2010および2012)
<i>Crr3</i>	CR信濃 (Milan White)	-	-	S	R	Hirai et al. 2004
<i>Crr4</i>	G004 (Siloga)	-	-	S	R	Suwabe et al. 2003, および未発表データ

R: 抵抗性、PR: 部分的抵抗性、S: 罹病性

a: 優性、b: 不完全優性、c: 劣性

* *Crr2* の抵抗性は *Crr1* との共存下でのみ効果を発揮

—: 詳細不明(未解析)

⊥ は本研究で明らかになった形質を示す

なお、*CRa*、*CRc*および *CRk* における抵抗性は Matsumoto et al.(2012)が用いた病原菌を Hatakeyama et al(2004)の分類法に従って暫定的にグループピングした病原型として示した。

第 2 節 既存のハクサイ品種におけるマーカー遺伝子型と病原型 グループ 3 に対する抵抗性の関係

緒論

既存の CR 品種の罹病化が認められる現在、複数の CR 遺伝子を集積させ、多様な病原性の菌種に抵抗性を発揮する品種の育成が望まれている。前節までにおいて、「はくさい中間母本農 9 号」が持つ *Crr1* 遺伝子および *Crr2* 遺伝子に加え、病原型グループ 3 に有効な *CRb* 遺伝子を集積させることで、幅広い病原性の菌に対応可能であることを示した(表 9)。

しかしながら、多数のハクサイ CR 品種が育成、利用されている現在において、いずれの品種にどの CR 遺伝子が用いられているかは明らかになっていない。前章において、*CRb* の詳細な位置を明らかにし、*CRb* 近傍に複数のマーカーを開発した。これらのマーカーを用いることによって、*CRb* 遺伝子を持つ品種を高精度に識別することが可能だと考えられる。よって、本節では *CRb* に連鎖する各マーカーの遺伝子型と病原型グループ 3 に対する抵抗性との関係について、既存の CR 品種および非抵抗性品種、合計約 100 品種以上を用いて調べた。また、実用的な育種の観点から、MAS を利用して罹病性品種に *CRb* 遺伝子を導入し、病原型グループ 3 への抵抗性付与の可能性を考察した。

材料および方法

B.rapa に属するハクサイ、ツケナおよびカブにおける 51 の市販 CR 品種、54 の非抵抗性品種、および強度抵抗性素材である 3 種のヨーロッパ飼料カブ(「Gelia R」、「Siloga」および「Debra」)、合計 108 品種を用いた(表 10)。

各品種 8 個体において、病原型グループ 3 に属する‘No.14’を用いた抵抗性検定を第 1 章と同様の方法で行い、8 個体の発病指数(DI)の平均を、各々の品種の発病指数とした。なお、12 品種(「黄ごころ 65」、「CR 黄健 65」、「優黄」、「萌黄」、「黄福 65」、「黄良好 70」、「黄月 77」、「黄月 87」、「CR 黄駒」、「W-116」、「Gelia R」および「Siloga」)の発病指数は Hatakeyama et al. (2004)によって報告されている発病指数を用いた。

遺伝子型は、各品種 8 個体から抽出した DNA を鋳型に、第 2 章で開発した 11 個の *CRb* 近傍マーカーを用いて決定した(図 8 参照)。各 DNA マーカーの精度および多品種に対する汎用性の指標として、多型情報含有値(Polymorphic Information Contents :PIC)およびマーカー診断精度を算出した。第 1 章で示したように、*CRb* 遺伝子は優性であるためヘテロ型でも抵抗性を発揮する。そのため、各品種における表現型(抵抗性)とマーカー遺伝子型との相関関係を調べ、108 品種に対する各マーカーの診断精度を下記の式によって算出した(Vidal et al. 2012)。

$$\text{マーカー診断精度(\%)} = (\text{真陽性} + \text{真陰性}) / 108 \times 100$$

真陽性：遺伝子型が抵抗性ホモ型、あるいはヘテロ型を示し、表現型が抵抗性を示す品種(数)

真陰性：遺伝子型が罹病性ホモ型を示し、表現型が罹病性を示す品種(数)

(偽陽性、偽陰性を除いた合計値を総解析数で割った値)

一方、PIC 値は Anderson et al.(1993)の手法に基づいて算出した。

結果

108 品種を用いて‘No.14’に対して抵抗性検定を行った結果、50 品種 (46%)が抵抗性(DI ≤ 1.0)または部分抵抗性(DI = 1.1~2.3)を示し、58 品種(54%)が罹病性(DI=3.0)を示した(表 11)。54 の非抵抗性品種は全て罹病し、一方、CR 品種では 54 品種中、48 品種は抵抗性を示したが、「はくさい中間母本農 9 号」を含む「黄皇 65」、「新世紀」、「CR 大政」、「スーパーCR ひろ黄」および「W-1116」の 6 品種は罹病した(表 11)。各品種の‘No.14’に対する抵抗・罹病性関係と、*CRb* 近傍の 11 マーカーの遺伝子型との関係から、108 品種はおおまかに 5 つのカテゴリー(A、B、C、D および E、表 11)に分類された。

カテゴリーA：表現型が抵抗性であり、ほとんどのマーカー遺伝子型が抵抗性ホモ型あるいはヘテロ型である品種。

カテゴリーB：表現型が罹病性であり、ほとんどのマーカー遺伝子型が罹病性ホモ型である品種。

カテゴリーC：表現型は抵抗性だが、マーカー遺伝子型が罹病性ホモ型とヘテロ型に、およそ 1:1 の比で混在する品種。

カテゴリーD：表現型は抵抗性だが、ほとんどのマーカー遺伝子型が罹病性ホモ型である品種。

カテゴリーE：表現型は罹病性だが、ほとんどのマーカー遺伝子型が抵抗性ホモ型、あるいはヘテロ型である品種。

カテゴリーAには 29 品種が、カテゴリーBには 53 品種が分類され、両カテゴリーに属する計 82 品種(76%)は *CRb* 近傍マーカーの遺伝子型と病原型グループ 3 に対する抵抗性反応と密接な相関関係が認められた。他の 27 品種はカテゴリーC、D および E に、それぞれ 14、7、および 5 品種が分類された。

解析に用いた 108 品種に対する 11 マーカーの、PIC 値は 0.28~0.82(平均 0.48)であり、診断精度は 66.1~99.1%(平均 79.4%)であった。特に、**B0902** は「黄ごころ 90」を除く全ての品種に対して、遺伝子型と表現型(抵抗性)が一致し、高い診断精度を示した。

考察

CRb 近傍マーカーの遺伝子型と病原型グループ 3 の菌系‘No.14’に対する抵抗性との関係において、解析した 108 品種中、76%を占める 82 品種(カテゴリーA および B に属する品種)において密接な相関関係が認められた。この結果は、本研究で開発したマーカーを用いることによって、‘No.14’に対する抵抗性および罹病性品種を、高精度に識別できることを示唆する。また、カテゴリーA に属した 29 品種は表現型が抵抗性であり、11 マーカーのうち 8 以上のマーカーにおいて遺伝子型も抵抗性を示したことから、*CRb* 遺伝子を保持している可能性が高いと考えられる。一方、カテゴリーB に属した 53 品種は表現型が罹病性であり、ほとんどのマーカーにおいて遺伝子型も罹病性型を示したため、*CRb* 遺伝子を保持していないと考えられる。そのため、MAS を利用してカテゴリーA に属する品種を抵抗性素材とし、カテゴリーB に属する罹病性品種に *CRb* 遺伝子を導入することで、抵抗性を付与できると考えられる。また、カテゴリーB には、CR 品種として利用されている品種が 6 品種(「はくさい中間母本農 9 号」、「黄皇 65」、「新世紀」、「CR 大政」、「スーパーCR ひろ黄」および「W-1116」)あったが、グループ 3 の菌系に罹病したため、*CRb* 以外の CR 遺伝子座を持っていると考えられる。*Crr1* 遺伝子と *Crr2* 遺伝子をもつ「はくさい中間母本農 9 号」に *CRb* 遺伝子を導入することによって、全てのグループの菌系に対しての抵抗性が付与されていることから(松元ら、2012)、これらの品種に *CRb* 遺伝子を導入することで、より幅広い菌系に対して抵抗性を付与することが可能であると推定される。

一方、カテゴリーC、D および E に属する 26 品種においては、マーカー遺伝子型と表現型との関係に矛盾が認められた。カテゴリーC に属した 14 品種は抵抗性を示したが、マーカー遺伝子型は罹病性型とヘテロ型が混在した。このため、マーカー遺伝子型からこれらの品種の抵抗性を推定することは困難であり、また抵抗性に関与しているの

が *CRb* か他の *CR* 遺伝子であるかを明らかにするには、各品種の自殖後代(F_2 世代)において、抵抗性の分離様式を解析する必要がある。カテゴリーDに属した7品種は抵抗性を示したが、遺伝子型はほとんどのマーカーで罹病性型であった。よって、これらの品種の抵抗性には *CRb* 以外の *CRa*、*CRk*(表9参照)が関与していると推察される。カテゴリーEの5品種はほとんどのマーカー遺伝子型がヘテロ型または抵抗性ホモ型であったが、表現型は罹病性であった。これら5品種はマーカー遺伝子型から *CRb* のゲノム配列を持っている可能性が高いが、偽遺伝子(pseudogene)や機能喪失突然変異(loss-of-function mutation または null mutation)として、*CRb* 遺伝子本来の抵抗性機能を失っている可能性が挙げられる。この仮説が正しいとすれば、前章で見出した14個の候補遺伝子について、*CRb* 遺伝子として正常に抵抗性を発揮する「CR新黄」(または「秋理想」)とこれら5品種の塩基配列を比較し、変異箇所を特定することにより、*CRb* 遺伝子を特定することができるかもしれない。また、カテゴリーBの罹病性品種と異なり、これら5つの罹病性品種にはマーカー遺伝子型の重複から、MASによって正常に機能する *CRb* 遺伝子を導入し抵抗性を付与することはできず、MASを利用する育種において留意しなくてはならない。

本節で用いたDNAマーカーはいずれも *CRb* の近傍に位置するため、抵抗性と遺伝子型は密接な関係であり、抵抗性および罹病性品種は、マーカー遺伝子型も抵抗性および罹病性型というように、単純かつ明確に2つのカテゴリーに大別されることを推定していた。しかし、実際には少なくとも5つのカテゴリーに分類され、品種間でのゲノム構造は予想以上に複雑であることが示唆された。

108品種に対する11個のマーカー診断精度は平均で79.4%を示し、高精度に病原型グループ3に抵抗性の品種を識別できることを明らかにした。特にB0902は1品種(「黄ごころ90」)を除く全ての品種においてマーカー遺伝子型と表現型が一致し、他のマーカーより高い診断

精度を示した。本マーカーは KB059N07 および B1005 で挟まれた *CRb* の推定座乗領域から 6.7 kb 離れているが(図 9)、*CRb* 推定座乗領域内に見出された 2 つの TIL-NBS-LRR 遺伝子の内、基部側の遺伝子近傍に位置する。B4701、B4732 および B1324 などのマーカーは、もう一方の TIR-NBS-LRR 遺伝子近傍に位置するが、1bp あるいは 4bp の挿入・欠失を検出する Indel マーカーであり(表 7、表 11 における「CR 新黄」の遺伝子型を参照)、このような Indel マーカーは SNP マーカーと同様の性質を持つ(Jones et al. 2007)。これに対し、B0902 は SSR マーカーである。Yang et al. (2011) は 154 のトウモロコシの交配系統を材料に、SSR、SNP の遺伝的関連性を比較した結果、SSR マーカーは SNP マーカーより PIC 値が高く、系統間の多型率も高いことを報告している。実際、B0902 マーカーの PIC 値は 0.51 であるのに対し、上記の Indel マーカーの PIC 値は 0.28~0.38 と低い値を示し、Yang et al.(2011)と同様の傾向が認められた。これらマーカー特性が B0902 の高い診断精度の要因の一つと推察される。また、B0902 は抵抗性型と罹病性型の増幅断片長差が 80 bp 以上あるため、容易にアガロースゲルで判定可能であり(図 10.B 参照)、実用的な面からも汎用性が高い。

本節では、*CRb* 近傍に開発したマーカー(特に B0902)は病原型グループ 3 に対する抵抗性品種を高精度に識別できるとともに、MAS によって、従来 *CRb* 遺伝子を持たない罹病性品種に効率的に導入し、抵抗性を付与することが可能であることを明らかにした。これらの知見は抵抗性品種の選抜、ならびに新たな抵抗性品種の育成において重要な役割を果たすと期待される。

表 10. CRb 近傍マーカー遺伝子型と表現型との相関関係の解析に用いた

B.rapa 108 品種

品種名	CR ^a	供給源
ハクサイ(ツケナ類含む)		
CR 静雅 65	+	(有)石井育種場
黄波 90	+	(有)石井育種場
スーパー CR ひろ黄	+	柿沼育種センター
黄良好 70	+	カネコ種苗(株)
黄月 77	+	カネコ種苗(株)
黄月 87	+	カネコ種苗(株)
萌黄	+	カネコ種苗(株)
勝黄	+	カネコ種苗(株)
極意	-	カネコ種苗(株)
CR 黄駒	+	小林種苗(株)
CR 黄健 65	+	協和種苗(株)
力	-	丸種(株)
CR 京たから 70	+	丸種(株)
CR 京たから 80	+	丸種(株)
春黄作	-	丸種(株)
新はやぶさ	-	丸種(株)
キムさん 75	-	ナント種苗(株)
中間母本農9号	+	(独)野菜茶業研究所
下山千歳	-	(独)野菜茶業研究所
愛知白菜	-	日光種苗(株)
ちりめん白菜	-	日光種苗(株)
広島菜	-	日光種苗(株)
花芯白菜	-	日光種苗(株)
京都三号白菜	-	日光種苗(株)
松島新二号白菜	-	日光種苗(株)
長崎白菜	-	日光種苗(株)
霜しらず菜	-	日光種苗(株)
秋理想	+	(株)日本農林
春理想	+	(株)日本農林
寒次郎	-	(株)日本農林
寒みどり	-	(株)日本農林
黄苑 80	+	(株)日本農林
黄福 65	+	(株)日本農林
黄久娘 65	-	(株)日本農林
黄久娘 70	-	(株)日本農林
黄久娘 80	-	(株)日本農林
NNH-104	+	(株)日本農林
新理想	-	(株)日本農林
スーパー CR 秋にしき	+	(株)日本農林
スーパー CR 新理想	+	(株)日本農林
半結球山東菜	-	野口種苗研究所
黄味小町	-	(株)サカタのタネ
みねぶき 505	+	(株)サカタのタネ
夏緑塔紹菜	-	(株)サカタのタネ
彩黄	-	(株)サカタのタネ
彩星	-	(株)サカタのタネ
さとぶき 613	+	(株)サカタのタネ
ムーンピーチ	-	シンジェンタジャパン(株)
結球 チーフ	-	(株)タカヤマシード
晩輝	-	タキイ種苗(株)
CR 新黄	+	タキイ種苗(株)
晴舞台 65	-	タキイ種苗(株)
晴黄 60	+	タキイ種苗(株)
晴黄 90	+	タキイ種苗(株)
春蒔極早生	-	タキイ種苗(株)
春笑	+	タキイ種苗(株)
加賀白菜	-	タキイ種苗(株)
黄ごころ 65	+	タキイ種苗(株)
黄ごころ 75	+	タキイ種苗(株)

表 10.(続き)

品種名	CR ^a	供給源
黄ごころ 80	+	タキイ種苗(株)
黄ごころ 85	+	タキイ種苗(株)
黄ごころ 90	+	タキイ種苗(株)
きらぼし	+	タキイ種苗(株)
空海 65	+	タキイ種苗(株)
空海 70	+	タキイ種苗(株)
明春	+	タキイ種苗(株)
無双	-	タキイ種苗(株)
お気にいり	-	タキイ種苗(株)
オモニ 75	+	タキイ種苗(株)
オレンジクイン	-	タキイ種苗(株)
おそめ	-	タキイ種苗(株)
プチヒリ	-	タキイ種苗(株)
勝春	+	タキイ種苗(株)
優黄	+	タキイ種苗(株)
晩抽 大福	-	(株)トーホク
晩生大阪しろな	-	(株)トーホク
春こまち	-	(株)トーホク
菊錦	-	(株)トーホク
中生大阪しろな	-	(株)トーホク
新世紀	+	(株)トーホク
耐病豊秋 60	-	(株)トーホク
CR 魁皇	+	トキタ種苗(株)
CR 黄仙	+	トキタ種苗(株)
CR 彩大海	+	トキタ種苗(株)
強黄	-	(株)渡辺採種場
はるさかり	-	(株)渡辺採種場
はるさかり 2号	-	(株)渡辺採種場
黄愛 65	+	(株)渡辺採種場
黄皇 65	+	(株)渡辺採種場
クリーム 2号	-	(株)渡辺採種場
名鏡	-	(株)渡辺採種場
隆徳	+	(株)渡辺採種場
四月しろな	-	(株)渡辺採種場
ストロング CR 75	+	(株)渡辺採種場
春秋	-	(株)渡辺採種場
W-1116	+	(株)渡辺採種場
W-1117	+	(株)渡辺採種場
<i>カブ</i>		
CR 鷹丸	+	(株)武蔵野種苗園
CR 雪峰	+	(株)武蔵野種苗園
CR 大政	+	(株)武蔵野種苗園
白馬	-	(株)武蔵野種苗園
夏蒔き13号	-	(株)武蔵野種苗園
岩手六戸赤長かぶ	-	(独)野菜茶業研究所
聖護院大丸かぶ	-	(株)サカタのタネ
飛騨紅かぶ	-	(株)トーホク
<i>ヨーロッパ飼料カブ</i>		
Gelria R	+	(独)野菜茶業研究所
Siloga	+	(独)野菜茶業研究所
Debra	+	(独)野菜茶業研究所

^a +; 各種苗会社および研究所の品種情報に抵抗性の記載あり

-; 記載なし

表 11. *B.rapa* 108 品種における 'No.14' に対する抵抗性と *CRb* 近傍

マーカー遺伝子型との相関関係

品種名	マーカー ^a	KB59N07	KB59N06	KB59N05	KB59N03	B4701	B4732	B1321	B1324	B1210	B1005	B0902	DI ^b	カテゴリー
ハクサイおよびブツケナなど														
CR 新黄 ^c	158/160	244/249	175/177	187/201	187/188	222/226	135/169	205/206	169/192	240/241	160/241		1.0 (-)	
CR 魁皇	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	1.4	
CR 黄健 65	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	1.5	
空海 65	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.8 (-)	
さとぶき 613	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.4 (-)	
スーパー CR 新理想	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.5 (-)	
黄ごころ 65	H	H	H	H	H	H	R	R	R	H	H	H	0.9 (-)	
CR 黄仙	H	R	R	R	R	H	R	R	R	R	H	R	1.0 (-)	
黄苑 80	R	R	H	H	H	R	R	R	R	H	H	H	0.1 (-)	
明春	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.7 (-)	
空海 70	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.8 (-)	
秋理想	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.9 (-)	A
優黄	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.9 (-)	
萌黄	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	1.3	
NNH-104	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	1.3	
CR 静雅 65	S	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	1.1	
きらぼし	H	H	H	H	H	S	H	H	H	H	H	H	0.2 (-)	
みねぶき 505	H	H	H	H	H	S	H	H	R	H	H	H	0.1 (-)	
晴黄 60	H	H	H	H	H	S	R	R	R	R	H	H	0.8 (-)	
勝春	H	H	H	H	H	S	R	R	R	R	H	H	0.3 (-)	
はるさかり 2号	H	R	H	S	H	R	R	R	R	R	H	H	1.2	
春理想	S	H	H	H	H	S	R	R	R	R	H	H	0.9 (-)	
黄ごころ 85	S	H	H	H	H	S	H	H	H	H	H	R	1.0 (-)	
勝黄	S	R	R	R	R	S	H	H	R	S	R	R	2.3	
黄福 65	H	H	H	H	H	H	S	S	H	S	H	H	1.1	
黄ごころ 80	S	H	H	H	H	S	H	S	H	S	H	H	0.5 (-)	
CR 彩大海	S	H	H	H	H	S	H	S	H	S	H	H	0.4 (-)	
W-1117	H	H	H	H	H	S	S	S	H	S	H	H	0.3 (-)	
隆徳	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	H	H	0.4 (-)	
ストロング CR 75	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	H	H	0.5 (-)	
CR 京たから 80	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	H	H	1.3	
黄月 77	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	H	H	1.4	C
CR 黄駒	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	H	H	1.7	
黄良好 70	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	H	H	1.9	
晴舞台 65	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	H	H	2.3	
黄月 87	S	H	H	H	H	S	S	H	H	S	H	H	0.7 (-)	
黄波 90	S	H	H	S	H	S	H	S	H	S	H	H	0.4 (-)	
晴黄 90	S	H	S	S	H	S	H	S	H	S	H	H	0.3 (-)	
黄ごころ 75	S	H	S	S	H	S	S	S	S	S	H	H	0.2 (-)	
CR 京たから 70	S	H	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	0.2 (-)	
黄愛 65	S	H	S	S	S	S	S	S	S	S	R	H	0.7 (-)	
スーパー CR 秋にしき	S	H	S	S	S	S	H	S	S	S	H	H	0.3 (-)	D
春笑	S	S	S	S	S	S	H	S	S	S	H	H	0.8 (-)	
オモニ 75	S	S	S	S	S	S	H	H	H	S	H	H	0.4 (-)	
黄ごころ 90	S	S	S	S	S	S	H	S	H	S	S	S	2.1	
晩抽 大福	H	H	H	H	H	S	R	R	R	H	S	S	3.0 (+)	
春こまち	H	H	H	H	H	S	R	R	R	H	S	S	3.0 (+)	
京都三号	S	H	H	R	R	H	R	R	R	H	S	S	3.0 (+)	E
菊錦	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	S	S	3.0 (+)	
広島菜	H	H	H	H	H	S	H	H	H	H	S	S	3.0 (+)	
夏緑塔紹菜	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	S	S	3.0 (+)	
おそめ	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	S	S	3.0 (+)	
下山千歳	S	H	H	H	H	S	S	S	H	S	S	S	3.0 (+)	
中生大阪しろな	S	S	H	H	H	S	S	S	H	S	S	S	3.0 (+)	
ちりめん白菜	H	S	H	S	H	S	H	S	S	H*	S	S	3.0 (+)	
お気にいり	H	S	S	S	H	S	S	S	S	S	S	S	3.0 (+)	
長崎白菜	S	S	S	S	H	S	S	S	S	H	S	S	3.0 (+)	
愛知白菜	S	S	S	S	H	S	S	S	S	S	S	S	3.0 (+)	B
黄久娘 65	S	S	S	S	H	S	S	S	S	S	S	S	3.0 (+)	
新はやぶさ	S	S	S	S	H*	S	S	S	S	S	S	S	3.0 (+)	
半結球山東菜	S	H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0 (+)	
ムーンビーチ	S	H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0 (+)	
新理想	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	3.0 (+)	
新世紀	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	3.0 (+)	
黄久娘 70	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	3.0 (+)	

表 11. (続き)

品種名	マーカー ^a											D _I ^b	カテゴリー
	KB59N07	KB59N06	KB59N05	KB59N03	B4701	B4732	B1321	B1324	B1210	B1005	B0902		
強黄	S	S	S	S	S	S	H	S	S	S	S	3.0(+)	
キムさん 75	S	S	S	S	S	S	H	S	S	S	S	3.0(+)	
クリーム 2号	S	S	S	S	S	S	H	S	S	S	S	3.0(+)	
晩輝	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	3.0(+)	
力	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
中間母本農9号	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
極意	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
春黄作	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
春蒔極早生	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
はるさかり	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
加賀白菜	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
寒次郎	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
寒みどり	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
花芯白菜	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
結球 チーフ	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
黄皇 65	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
黄久娘 80	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	B
黄味小町	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
松島新二号白菜	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
名鏡	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
無双	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
オレンジクイン	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
晩生大阪しろな	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
プチヒリ	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
彩黄	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
彩星	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
四月しろな	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
霜しらす菜	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
スーパー CR ひろ黄	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
春秋	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
耐病豊秋60	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
W-1116	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
カブ													
CR 鷹丸	H	H	H	H	H	S	R	R	R	R	H	0.1(-)	A
CR 雪峰	H	H	H	H	H	H	R	R	R	R	R	1.0(-)	
CR 大政	S	S	S	S	S	H	S	S	S	H	S	3.0(+)	
白馬	S	S	S	S	S	S	S	S	-	H	S	3.0(+)	
飛騨紅かぶ	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	B
岩手六戸赤かぶ	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3.0(+)	
夏蒔き13号	S	S	S	S	S	S	H	S	S	H	S	3.0(+)	
聖護院大丸かぶ	H*	S	S	S	H	S	S	S	-	S	S	3.0(+)	
ヨーロッパ飼料カブ													
Gelria R	R	H	R	H	H	H	R	R	R	H	H	0.1(-)	A
Siloga	H	H	H	H	H	S	H	H	R	S	H	1.1	
Debra	H*	S	S	S	H*	S	H	H*	H*	S	H*	2.2	C
PIC	0.43	0.82	0.54	0.71	0.38	0.63	0.33	0.35	0.31	0.28	0.51		
診断精度 (%)	66.7	87.0	82.4	81.5	78.7	69.4	77.8	77.8	86.8	65.7	99.1		

^a R, 抵抗性ホモ型 (「CR 新黄」における抵抗性アレルをホモに持つ)

S, 罹病性型 (抵抗性アレルを持たない) H, ヘテロ型

*は品種内での遺伝子型が抵抗性、罹病性型の分離が認められることを示す。

^b 抵抗性 (-; DI ≤ 1.0)、罹病性 (+; DI = 3.0) および部分抵抗性 (DI = 1.1 ~ 2.3) を示す。

DI 値が斜体の品種は、Hatakeyama et al. (2004) の結果に基づく。

^c 「CR 新黄」における各マーカーの遺伝子型を最上段に示し、下線は抵抗性アレルを示す。

総合考察

根こぶ病はアブラナ科野菜全般に被害を及ぼしている難防除性の重要病害であり、対策として多くの CR 品種が育成、栽培されてきた。しかし、近年単一あるいは少数の抵抗性遺伝子支配と推定される CR 品種の罹病化が深刻な問題となっている。そのため、複数の CR 遺伝子を集積させた新たな抵抗性品種の育成が求められている。松元ら (2010) は *Crr1* 遺伝子および *Crr2* 遺伝子を集積させた「はくさい中間母本農 9 号」を育成し、本系統は病原型グループ 1、2 および 4 に属する複数の菌に抵抗性を示した。しかし、グループ 3 の菌には抵抗性を発揮できなかった。本研究ではまず、2 種の CR 品種「秋理想」と「CR 新黄」を用いて、グループ 3 の菌に抵抗性を示す遺伝子が *CRb* 遺伝子であることを明らかにした。ハクサイやキャベツにおける CR 遺伝子座の研究結果により、根こぶ病抵抗性は「作用力の異なる複数の遺伝子支配」と「単一遺伝子支配」による 2 つの説が考えられてきた。*Crr1* 遺伝子や *Crr2* 遺伝子は前者に該当すると考えられており、本研究において *CRb* 遺伝子は後者に属し作用力の大きい優性遺伝子であることを明らかにした。ハクサイにおいては 8 つの CR 遺伝子座が同定されているが、優性遺伝子と証明されているのは *CRb* 以外では *CRa* (Hayashida et al. 2008) のみである。完全優性の遺伝形質は、F₁ 種子化が進んだハクサイ等の野菜において、両親に導入する必要がないため育種上のメリットが大きい。さらに、本研究結果および既報の報告から (表 9 参照)、病原型グループ 3 の菌に強い抵抗性を示す CR 遺伝子座は *CRa* および *CRb* のみであることが明らかになり、本グループの感染を防ぐ CR 遺伝子座として非常に有用であることを証明した。一方、両 CR 遺伝子座は抵抗性を発揮できる菌の範囲が病原型グループ 3 (および 4) に限られているため、より広範な菌系に抵抗性を発揮するためには他の CR 遺伝子座を集積する必要がある。松元ら

(2012)は *Crr1* 遺伝子および *Crr2* 遺伝子をもつ「はくさい中間母本農9号」と、*CRb* 遺伝子をもつ「秋理想」を育種素材とし、ハクサイ品種「あきめき」を育成した。本品種はグループ 1~4 に属する菌すべてに対して強度抵抗性を示し *CRb* を含む *Crr1*、*Crr2* の3つの CR 遺伝子の集積効果を実証された。

モデル植物のシロイヌナズナやイネの全塩基配列が解読されて以来、多くの発生、生理、形質等のメカニズムが DNA レベルで明らかにされてきている。各生物種のゲノムの解読は重要な研究目標である一方、野菜や果樹など植物育種の対象となる種の数膨大で、ゲノムサイズも大きいため、各種のゲノム解読は不可能と思われてきた。しかし、近年の分子生物学手法の発展、特に 2007 年に発表された次世代シーケンズをはじめ、超高速 DNA シーケンサーの登場に伴い(服部正平、2009)、ブドウ(Jaillon et al. 2007)、キュウリ(Huang et al. 2009)、メロン(Guo et al. 2012)、トマト(Sato et al. 2012)など、全ゲノム解読完了の報告が相次いでおり、今後も多岐にわたる種において、全ゲノム塩基配列が明らかになると思われる。本研究は 2010 年から着手したが、当時、ハクサイ(*B.rapa*)において全ゲノム解読は終了しておらず、BrGSP から公開されている BAC 末端配列を基にした部分的なゲノム情報しか利用できなかった。第 1 章においては既報の *CRb* 選抜マーカーより近傍に座乗し、*CRb* を挟み込む 2 つのマーカー(KBrH059N21F および KBrH129J18R)を開発したものの、当時のゲノム情報からは *CRb* 遺伝子の単離に向けて、両マーカー間に詳細な DNA マーカーを整備することは困難であった。しかし、ハクサイにおいても 2011 年に全ゲノム配列が解読され(Wang et al. 2011)、マーカー開発が加速度的に進展した。第 2 章では、ハクサイゲノム情報を利用することで、*CRb* 近傍に高密度の連鎖マーカーを効率的に開発し、*CRb* 遺伝子が連鎖群 A3 上の 24,201~24,342 kb における約 140 kb のゲノム領域に存在することを明らかにした。以上の結果は、*CRb* 遺

伝子の単離およびマーカー選抜育種技術の開発に向けて、科学的、農業的な双方の観点から重要な発見である。

これまでに *B. rapa* では 8 つの CR 遺伝子座が報告されていたが、CR 遺伝子の単離は報告されていなかった。最近 *Crr1* 遺伝子が畠山ら (2010) によって単離され、TIR-NBS-LRR の構造を持つ本遺伝子が病原型グループ 4 の菌に抵抗性を示すことが明らかにされた。このことから、根こぶ病抵抗性に関与している遺伝子は NBS-LRR モチーフを有している可能性が高い。本研究において明らかにした *CRb* の推定座乗領域約 140 kb 内には、2 つの TIR-NBS-LRR 遺伝子が見出されており、いずれかが *CRb* 遺伝子であると推察される。しかし、他の CR 遺伝子も同様な構造を持つのか、あるいは全く異なる遺伝子構造を持つ CR 遺伝子が存在するのかは興味深い点であり、今後、他の CR 遺伝子の単離および機能解析が注目される。

CRb が存在する連鎖群 A3 には他に 3 つの CR 遺伝子座が座乗しており、*CRa* と *CRb*、および *Crr3* と *CRk* はそれぞれ同一あるいは近接している遺伝子座と考えられていた (Diederichsen et al. 2009)。これらは同定された QTL 領域の重複や DNA マーカーの連鎖関係などの相対的な比較から推察された説であるが、全ゲノム情報が公開されたことによりマーカーの配列や目的の遺伝子配列から、絶対的なゲノム上の位置特定が可能になった。第 3 章では *CRa* の最近傍マーカーが *CRb* の連鎖マーカーと同一ゲノム領域に存在することを見出し、*CRa*、*CRb* の両マーカーは同じ F₂ 集団 (n=2,204) において完全に共分離した。この結果から、*CRa* と *CRb* は同一遺伝子や対立遺伝子、あるいは極めて近傍に位置する遺伝子である可能性が高まった。本研究では *CRb* 遺伝子の単離には至っておらず、両者が同一遺伝子であることを証明するためには、*CRb* として単離した遺伝子が、*CRa* 遺伝子と一致することを検証する必要がある。また、本研究では *Crr3* は 'No.14' への抵抗性に関与しないことを明らかにし、*CRk* は Matsumoto et al.(2012)

によって、病原型グループ 3 の菌と同様な病原性の菌に対して、不完全優性ながら抵抗性を発揮することが報告されている。このため、*Crr3* 遺伝子と *CRk* 遺伝子は抵抗性機能の違いから、異なる遺伝子であると考えられる(表 9)。*Crr1* 遺伝子の単離(畠山ら、2010)や *CRb* 遺伝子の単離が本研究で可能になったように、今後、根こぶ病抵抗性のゲノム解明は、既存の連鎖地図情報から遺伝子本体への究明へと移行することは必至であり、今まで明らかになっていなかった根こぶ病抵抗性のメカニズムも、各 CR 遺伝子の詳細な機能解析により迅速に解明されると思われる。

ハクサイ(非結球ハクサイであるツケナ等を含む)においては 150 以上の品種が存在し、CR 品種だけでもその数は 50 を超える。根こぶ病に侵された圃場が各生産地で認められるようになった現在、発生した菌の病原性の把握(病原型グループ 1~4)とともに、対応した CR 品種の選択、栽培は非常に重要な課題となっている。しかし、各品種がいずれの病原性の菌に抵抗性であり、いずれの CR 遺伝子を持っているかはほとんど明らかになっていなかった。本研究では病原型グループ 3 に属する‘No.14’と *CRb* 遺伝子が対応することを明らかにした。さらに、市販されている 108 品種について、‘No.14’に対する抵抗性反応と *CRb* 近傍マーカー遺伝子型を調査し、*CRb* 遺伝子を持つと考えられる品種を推定することが可能であることを示した。本研究のように特定の病原性を持つ菌(病原型グループ 3)に対する抵抗性、および遺伝子型を網羅的に明らかにした研究は類を見ない。解析に用いたほとんどの品種は市販されており、育種素材として根こぶ病抵抗性のみならず、他の形質(作型や食味形質など)が様々であり、選択的に利用可能である。例えばハクサイは作型上、秋季から冬季の秋冬ハクサイとして 10 月~2 月に供給が集中する一方、2 月以降においては供給量が著しく低下する。しかし、2 月~春先の需要は依然高く、販売単価も高くなる。そのため抽台の遅い春ハクサイとして、近年、晩抽性品種の利用

が拡大している。本研究では罹病性品種の大部分が、春ハクサイ向きの晩抽性品種であった。本研究は栽培が増加しているこれら罹病性品種に、MASによって *CRb* の効率的な導入を可能とし、現状のハクサイ生産に適合した育種において極めて有用であると考えられる。

解析した CR 品種の内、ほとんどの品種は‘No.14’に対して抵抗性を示した。これら CR 品種の内、半数以上がマーカー遺伝子型と抵抗性との相関から *CRb* を有している可能性が明らかになった。この結果は CR 品種の育種の過程で *CRb* が広く普及してきたことが推定される。有賀ら(2012)は 41 の CR 品種のうち、32 品種が *CRa* を有しており、既存の多数の CR 品種の抵抗性は *CRa* に基づいている可能性を報告している。両 CR 遺伝子座は共に優性形質のため、表現型に基づく従来育種の選抜方法において扱いやすく、その結果、根こぶ病抵抗性育種の初期段階から永続的に用いられてきたと推察される。

本研究で用いた Hatakeyama et al. (2004)の菌の分類法において、病原型グループ 4 からグループ 1 にかけて、既存品種に対しての宿主範囲は広くなる傾向があり、グループ 1 の菌系は最も宿主範囲が広く、既存の CR 品種のほとんどが発病する。*CRa* および *CRb* はグループ 3(および 4)の宿主範囲の狭い菌系に対して、単一優性の強い抵抗性を示すことから(表 9)、真性抵抗性とみなすことができる。真性抵抗性とは植物の *R* 遺伝子と、病原菌の非病原力遺伝子(avirulence gene :*avr* 遺伝子)の組み合わせによって生じ(Dangl et al. 2001)、*R* 遺伝子の多くが、*CRb* の候補遺伝子で見出された NBS-LRR モチーフを有していることが明らかになっている。真性抵抗性は発病を完全に阻止する強い抵抗性を発揮する反面、抵抗性スペクトラムが狭く、*avr* 遺伝子の変異によって抵抗性が崩壊しやすいなどの問題点がある。そのため抵抗性品種の育成には抵抗性の崩壊が起こりにくい *R* 遺伝子の利用が望ましい。崩壊しにくい *R* 遺伝子とは、ある *avr* 遺伝子の変異が病原菌の生存にとって負の要因となるとき、対応する *R* 遺伝子は崩

壊しにくいことが示唆されている(Vera et al. 2000)。植物側の抵抗性解明は CR 遺伝子の単離をはじめとし、急速に進歩しているが、病原側における病原性遺伝子のメカニズムなどは依然として未解明のままである。本研究では見い出せなかった既存の CR 品種の抵抗性崩壊の原因を解明するため、また、持続性の高い抵抗性品種の育種のためにも、根こぶ病菌の *avr* 遺伝子を解明し、CR 遺伝子との相互関係を明らかにすることが必須であると考えられる。

開発した *CRb* 近傍のマーカーは同種内(品種間)でも多型頻度が高いため、ナバナ(*B.rapa*)の抵抗性育種の選抜手段として用いられている(押切ら、2012)。また、野菜茶業研究所ではキャベツ(*B.oleracea*)における優性の CR 遺伝子と *CRb* 遺伝子との関連性を調べる一つの手法として、開発したマーカーが利用されている。このように、本研究で開発したマーカーはハクサイをはじめとした *B.rapa* のみだけでなく他の *Brassica* 属にも種を超えて適用可能であり、ブロッコリーやキャベツをはじめ、根こぶ病被害が拡大している他の *Brassica* 属の野菜の育種にも貢献すると思われる。

摘要

根こぶ病は、土壤微生物 *Plasmodiophora brassicae* によって引き起こされる土壤伝染性の難防除病害であり、アブラナ科野菜全般において深刻な被害を及ぼしている。農薬による環境負荷の軽減、消費者の安全志向の高まり、生産コストの削減の観点などから、根こぶ病抵抗性 (**Clubroot Resistance** :CR) 品種は有用な防除手段の一つとなっており、アブラナ科野菜において 100 以上の CR 品種が育成されてきた。しかし、近年、菌の病原性の多様化に伴い、ハクサイにおいては既存の CR 品種の罹病化が問題になっている。そのため、菌の病原性と宿主の抵抗性因子との関係の解明、ならびに、より広範な菌系に対応できる高度抵抗性品種の育成が課題となっている。根こぶ病菌の病原性の分類の一つとして、4 つの病原型グループ(グループ 1~4)に大別できることが報告されており、抵抗性因子としては 8 つの CR 遺伝子座、*Crr1*、*Crr2*、*Crr3*、*Crr4*、*CRa*、*CRb*、*CRc* および *CRk*、が報告されている。*Crr1* および *Crr2* を集積させた「はくさい中間母本農 9 号」は、病原型グループ 1, 2 および 4 に属する根こぶ病菌系に対して強度抵抗性を示したが、グループ 3 に属する菌系に対しては抵抗性を発揮できない。本論文は病原型グループ 3 に対応する根こぶ病抵抗性遺伝子座の解明と、本遺伝子のゲノム上の存在領域の特定、ならびに、既存のハクサイ品種における当該 CR 遺伝子座の分布、近傍に位置する DNA マーカーの育種上の有効性について検証したものである。

病原型グループ 3 に属する 'No.14' に対して抵抗性を有する F₁ 品種「秋理想」の自殖 F₂ 集団 (n=189) を用いて接種検定を行った結果、抵抗性と罹病性の個体がほぼ 3:1 の比に分離し、「秋理想」の抵抗性は優性の一遺伝子支配であることが明らかになった。本遺伝子と既報の上記 8 つの CR 遺伝子座との異同を調べるため、各 CR 遺伝子座と連鎖する DNA マーカーを用いて抵抗性と遺伝子型との比較を行った。そ

の結果、F₂ 個体の抵抗性は *CRb* 連鎖マーカーと穏やかな相関が認められ、「秋理想」の有する抵抗性は *CRb* に連鎖することが推定された。*CRb* は 2004 年に F₁ 品種「CR 新黄」が持つ CR 遺伝子座として同定された。「秋理想」の CR 遺伝子座と「CR 新黄」の *CRb* における詳細な座乗関係を調べるため、両品種において共通の DNA マーカーを開発し、*CRb* 周辺の部分連鎖地図を構築、比較した。その結果、両 CR 遺伝子座および DNA マーカーの座乗位置関係は酷似していた。また、「CR 新黄」自殖 F₂ 集団 (n=172) において‘No.14’を用いた抵抗性検定を行った結果、「秋理想」とほぼ同じ抵抗性分離様式を示した。以上の結果から、「秋理想」の有する病原型グループ 3 に有用な CR 遺伝子座は *CRb* である可能性を明らかにした。

根こぶ病の抵抗性メカニズムの解明には、CR 遺伝子の機能を明らかにする必要がある。*CRb* 遺伝子は新たに開発した KBrH059N21F および KBrH129J18R の両マーカーに挟まれた領域に座乗し、各マーカーと *CRb* の遺伝距離はそれぞれ 0.2 および 0.4 cM であった。*CRb* のゲノム上の詳細な位置を特定するため、両マーカー間に 28 個の高密度 DNA マーカー(マーカー間の平均距離は 20.4 kb)を開発し、「CR 新黄」自殖 F₂ 集団 2,032 個体を用いて、高密度連鎖地図を構築した。その結果、*CRb* 遺伝子は KB59N07 および B1005 のマーカーに挟まれた約 140 kb のゲノム領域に存在することを明らかにした。本領域にはゲノム配列から 14 個の遺伝子が存在すると推定され、その中には病害抵抗性遺伝子に相同性を示す *R* 遺伝子が含まれていた。これらの結果は、既報の *CRb* 遺伝子の位置情報を覆す正確な *CRb* 遺伝子の位置、および存在ゲノム領域を明らかにし、抵抗性候補遺伝子から *CRb* 遺伝子の機能推察を可能にするものである。

既存のハクサイ品種において、病原型グループ 3 に対する抵抗性遺伝子の有無に関する知見はほとんど無く、複数の菌系に抵抗性を持つ品種を育成するには CR 品種が持つ遺伝子の種類の推定とマーカー遺

伝子型との関係を明らかにすることは極めて重要である。*CRb* 近傍領域の 11 個のマーカーの遺伝子型と‘No.14’に対する抵抗性との関係を、既存の 54 の CR 品種および 54 の非 CR 品種、計 108 品種を用いて調べた。その結果、82 品種(76%)において *CRb* 近傍のマーカー遺伝子型と‘No.14’に対する抵抗性・罹病性反応との間には密接な相関関係が認められた。また各マーカーの診断精度は 69%~99%(平均 79.4%)と高い値を示した。これらの結果から、本論文で開発したマーカーを用いることによって‘No.14’に対する抵抗性の個体(品種)を高精度で選抜できるだけでなく、マーカー選抜技術(MAS)により *CRb* を保持すると推定される抵抗性品種を素材とし、罹病性品種に抵抗性を付与することが可能になった。

本研究により、病原型グループ 3 に有用な抵抗性遺伝子が *CRb* 遺伝子であることを見出し、本遺伝子の存在する詳細なゲノム領域を明らかにした。これらゲノム情報および高密度の連鎖マーカーは *CRb* 遺伝子の単離に有用であるだけでなく、抵抗性品種の選抜や抵抗性遺伝子の集積による新たな抵抗性品種の育種においても有用であり、本研究は基礎的、応用的研究の双方において、遺伝学の発展に大きく貢献すると思われる。

引用文献

- Adl, S.M., A.G.B. Simpson, M.A. Farmer, R.A. Andersen, O.R. Anderson *et al.* (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52: 399–451.
- Agrawal, G.K., H. Iwahashi and R. Rakal (2003) Small GTPase 'Rop': molecular switch for plant defense responses. *FEBS letters* 546: 173–180.
- Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181–186.
- 有賀大輔、上野広樹、松村英生、松本悦夫、林田信明 (2012) ハクサイ CR 品種における根こぶ病抵抗性遺伝子座 *CRA* の分布. *育種学研究* 14 (別 2) : 296.
- Buczacki, S.T., H. Toxopeus, P. Mattusch, T.D. Johnston, G.R. Dixon and L.A. Hobolth (1975) Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65: 295–303.
- Butcher, D.N., S. El-Tigani, D.S. Ingram (1974) The role of indole glucosinolates in the clubroot disease of the Cruciferae. *Physiol. Plant Pathol.* 4: 127–140.

- Cheng, X., J. Xu, S. Xia, J. Gu, Y. Yang, J. Fu, X. Qian, S. Zhang, J. Wu and K. Liu (2009) Development and genetic mapping of microsatellitemarkers from genome survey sequences in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 118: 1121–1131.
- Dangl, J.L. and J.D.G. Jones (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826–833.
- Dekhuijzen, H.M. (1981) The occurrence of free and bound cytokinins in plasmodia of *Plasmodiophora brassicae* isolated from tissue cultures of clubroots. *Plant Cell Rep.* 1: 18–20.
- Diederichsen, E., M. Frauen, E.G.A. Linders, K. Hatakeyama and M. Hirai (2009) Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer crops. *J. Plant Growth Regul.* 28: 265–281.
- Eitas, T.K. and J. L. Dangl (2010) NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 472–477.
- Fukuoka, H., T. Nunome, Y. Minamiyama, I. Kono, N. Namiki and A. Kojima (2005) Read2Marker: a data processing tool for microsatellite marker development from a large data set. *Biotechniques* 39: 472: 474–476.
- 後藤逸男および村上圭一 (2006) 根こぶ病 おもしろ生態とかしこい防ぎ方 (社)農村漁村文化協会, pp.17–22.

- Guo, S., J. Zhang, H. Sun, J. Salse, W.J. Lucas, H. Zhang, Y. Zheng, L. Mao, Y. Ren, Z. Wang *et al.* (2012) The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genetics: in press* (epub ahead of print)
- Hatakeyama, K., M. Fujimura, M. Ishida and T. Suzuki (2004) New classification methods for *Plasmodiophora brassicae* field isolates in Japan based on resistance of F₁ cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) to clubroot. *Breed. Sci.* 54: 197–201.
- 畠山勝徳、諏訪部圭太、加藤丈幸、布目司、福岡浩之、松元哲 (2010) ハクサイ根こぶ病遺伝子 *Crr1* のマップベースクローニング. 育種学研究 12 (別2) : 34.
- 服部正平 (2009) 超高速シーケンスが開く次世代の生命科学. 実験医学 27(1)
- Hayashida, N., Y. Takabatake, N. Nakazawa, D. Aruga, H. Nakanishi, G. Taguchi, K. Sakamoto and E. Matsumoto (2008) Construction of a practical SCAR marker linked to clubroot resistance in Chinese cabbage, with intensive analysis of HC352b genes. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 77: 150–154.
- Hirai, M., T. Harada, N. Kubo, M. Tsukada, K. Suwabe and S. Matsumoto (2004) A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 639–643.

- Hirai, M. (2006) Genetic analysis of clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Breed. Sci.* 56: 223–229.
- Honjo, M., T. Nunome, S. Kataoka, T. Yano, H. Yamazaki, M. Hamano, S. Yui and M. Morishita. (2011) Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. *Breed Sci* 61: 420–425.
- Huang, S., R. Li, Z. Zhang, L. Li, X. Gu, W. Fan, W.J. Lucas, X. Wang, B. Xie, P. Ni *et al.* (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics* 41: 1275–1281.
- Huesmann, C., T. Reiner, C. Hoefle, J. Preuss, M.E. Jurca, M. Domoki, A. Fehér and R. Hüchelhoven (2012) Barley ROP binding kinase1 is involved in microtubule organization and in basal penetration resistance to the barley powdery mildew fungus. *Plant Physiol.* 159: 311–320.
- 板倉聖宣 (1994) 白菜のなぞ. 悠書館, pp.8–36.
- Jaillon, O., J.M. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo, C. Jubin *et al.* (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463–467.
- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly *et*

al. (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding* 3: 381–390.

Jones, D.R., D.S. Ingram and G.R. Dixon (1982) Characterization of isolates derived from single resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and studies of their interaction. *Plant Pathol.* 31: 239–246.

Jones, E., H. Sullivan, D. Bhattaramakki and J. Smith (2007) A comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 115: 361–371.

Kakizaki, T., T. Kato, N. Fukino, M. Ishida, K. Hatakeyama and S. Matsumoto (2011) Identification of quantitative trait loci controlling late bolting in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) parental line Nou 6 gou. *Breed. Sci.* 61: 151–159.

Kato, S., A. Matsumoto, K. Yoshimura, T. Katsuki, K. Iwamoto, Y. Tsuda, S. Ishio, K. Nakamura, K. Moriwaki, T. Shiroishi *et al.* (2012) Clone identification in Japanese flowering cherry (*Prunus* subgenus *Cerasus*) cultivars using nuclear SSR markers. *Breed. Sci.* 62: 248–255.

Kato, T., M. Uehara, M. Satou and M. Tasaka (1999) Positional cloning of *SGR* genes in *Arabidopsis* by the FIRE (fast isolation of recombinants) strategy. *Plant Cell Physiol.* 40: Supplement

13S.

Kawano, E., A. Akamatsu, K. Hayashi, Y. Housen, J. Okuda, A. Yao, A. Nakashima, H. Takahashi, H. Yoshida, H. L. Wong *et al.* (2010) Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease Resistance Protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. *Cell Host Microbe*. 7: 362–375.

Kuginuki, Y., H. Yoshikawa and M. Hirai (1999) Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 327–332.

Kukita Y, Hayashi K (2002) Multicolor post-PCR labeling of DNA fragments with fluorescent dideoxynucleotides. *BioTechniques* 33: 502–506.

Kunoh, H., Yamamori, K. and Ishizaki, H. (1982) Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat. VIII. Autofluorescence at penetration sites of *Erysiphe graminis* hordei on living barley coleoptiles. *Physiol. Plant Pathol.* 21: 373–379.

Matsumoto, E., C. Yasui, M. Ohi and M. Tsukada (1998) Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica* 104: 79–86.

Matsumoto, E., H. Ueno, D. Aruga, K. sakamoto and N. Hayashida (2012) Accumulation of three clubroot resistance genes through marker-assisted selection in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81: 184–190.

松元哲、宮崎俊夫、畠山勝徳、高下新二、加藤丈幸、吹野伸子、近藤友宏 (2010) マーカー選抜によるハクサイ根こぶ病抵抗性実用品種の育成. 育種学研究 12 (別 1) : 155.

松元哲、畠山勝徳、高下新二、宮崎俊夫、近藤友宏 (2012) DNA マーカー選抜による根こぶ病と黄化病に抵抗性のハクサイ新品種「あきめき」の育成. 農林水産技術研究ジャーナル 35(5) : 61–64.

Mithen, R. and R. Magrath (1992) A contribution to the life history of *Plasmodiophora brassicae*: secondary plasmodia development in root galls of *Arabidopsis thaliana*. Mycol. Res. 96: 877–885.

Mun, J.H., S.J. Kwon, T.J. Yang, H.S. Kim, B.S. Choi, S. Baek, J.S. Kim, M. Jin, J.A. Kim, M.H. Lim *et al.* (2008) The first generation of a BAC-based physical map of *Brassica rapa*. BMC Genomics 9: 280.

Mun J.H., S.J. Kwon, T.J. Yang, Y.J. Seol, M. Jin, J.A. Kim, M.H. Lim, J. S. Kim, S. Baek, B.S. Choi *et al.* (2009) Genome-wide comparative analysis of the *Brassica rapa* gene space reveals genome shrinkage and differential loss of duplicated genes after whole genome triplication. Genome Biol. 10: R111.

Mun, J.H., S.J. Kwon, Y.J. Seol, J.A. Kim, M. Jin, J.S. Kim, M.H. Lim, S.I. Lee, J.K. Hong, T.H. Park *et al.* (2010) Sequence and structure of *Brassica rapa* chromosome A3. *Genome Biol.* 11: R94.

押切浩江、水野真二、室田有里、鐘ヶ江良彦、加藤丈幸、畠山勝徳、松元哲、三平東作 (2012) 千葉県で発生している食用ナバナの根こぶ病菌の分類及び市販品種の抵抗性. *園芸学研究* 11 (別 1): 164.

Piao, Z.Y., Y.Q. Deng, S.R. Choi, Y.J. Park and Y.P. Lim (2004) SCAR and CAPS mapping of *CRb*, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Theor. Appl. Genet.* 108: 1458–1465.

Piao, Z.Y., W.C. Lee, Y.K. Lee, H.G. Kim, J.Y. Jeong, C.H. Hwang and Y.P. Lim (2006) Towards the cloning of clubroot gene (*CRb*) in Chinese cabbage. *Acta. Hort.* 706: 313–316.

Piao, Z.Y., N. Ramchiary and Y.P. Lim (2009) Genetics of clubroot resistance in *Brassica* species. *J. Plant. Growth Regul.* 28: 252–264.

Sahai, E. and C.J. Marshall (2002) RHO–GTPases and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 133–142.

Saito, M., N. Kubo, S. Matsumoto, K. Suwabe, M. Tsukada and M. Hirai (2006) Fine mapping of the clubroot resistance gene *Crr3* in *Brassica rapa*. *Theor. Appl. Genet.* 114: 81–91.

- Sakamoto, K., A. Saito, N. Hayashida, G. Taguchi and E. Matsumoto (2008) Mapping of isolate-specific QTL for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Theor. Appl. Genet.* 117: 759–767.
- Sato, S., S. Tabata, H. Hirakawa, E. Asamizu, K. Shirasawa, S. Isobe, T. Kaneko, Y. Nakamura, D. Shibata, M. Egholm *et al.* (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641.
- Siemens, J., I. Keller, J. Sarx, S. Kunz, A. Schuller, W. Nagel, T. Schmu" lling, M. Parniske and J. Ludwig-Mu" ller (2006) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots and disease resistance of cytokinin oxidase/dehydrogenase gene overexpressing plants indicate a key role for cytokinin in disease development. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* 19: 480–494.
- Suwabe, K., H. Tsukada, H. Iketani, K. Hatakeyama, M. Fujimura, T. Nunome, H. Fukuoka, S. Matsumoto and M. Hirai (2003) Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wornin) in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.* 107: 997–1002.
- Suwabe, K., H. Tsukazaki, H. Iketani, K. Hatakeyama, M. Kondo, M. Fujimura, T. Nunome, H. Fukuoka, M. Hirai and S. Matsumoto (2006) Simple sequence repeat-based comparative

genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance. *Genetics* 173: 309–319.

鈴木一美、杉本光二、林博之、光明寺輝正 (1995) 新殺菌剤フルアジナムのハクサイ根こぶ病に対する作用特性. *日植病報* 61: 395–398.

Tsushima, S., H. Murakami, T. Akimoto, M. Katahira, Y. Kuroyanagi and Y. Shishido (2010) A practical estimating method of the dose-response curve between inoculum density of *Plasmodiophora brassicae* and the disease severity for long-term IPM strategies. *JARQ* 44: 383–390.

上野広樹、有賀大輔、松村英生、松本悦夫、林田信明 (2011) ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子座 *CRa* の詳細な解析. *育種学研究* 13 (別2): 44.

鵜飼保雄(編著)および大澤良(編) (2010) 品種改良の世界史 作物編. 悠書館, pp.355–382.

van Ooijen, J.W. (2006) JoinMap® 4.0: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, the Netherlands.

Vera Cruz, C.M., J. Bai, I. Ona, H. Leung, R.J. Nelson, T.W. Mew and J.E. Leach. (2000) Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 97: 13500–13505.

Vidal, E., R.K. Yokomi, A. Moreno, E. Bertolini and M. Cambra (2012) Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*: A model for other plant pathogens. *Phytopathology* 102: 114–121.

Voorrips, R.E. (1995) *Plasmodiophora brassicae*: Aspects of pathogenesis and resistance in *Brassica oleracea*. *Euphytica* 83: 139–146.

Wang, X., H. Wang, J. Wang, R. Sun, J. Wu, S. Liu, Y. Bai, J.H. Mun, I. Bancroft, F. Cheng *et al.* The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. (2011) *Nat. Genet.* 43: 1035–1039.

Williams, P.H. (1966) A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology* 56: 624–626.

Yang, X., Y. Xu, T. Shah, H. Li, Z. Han, J. Li and J. Yan (2011) Comparison of SSRs and SNPs in assessment of genetic relatedness in maize. *Genetica* 139: 1045–1054.

米山伸吾、安東和彦、都築司幸(編)(2004) 農薬便覧 第10版. 農山漁村文化協会. 防 38.

Yoshikawa, H. (1981) Breeding for clubroot resistance in Chinese cabbage. In: Taleker NS, Griggs TD (eds) Chinese Cabbage. AVRDC, Shanhua, Tainan, pp. 405–413.

農林水産省大臣官房統計部 (2012) 野菜生産出荷統計

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/index.html

謝辞

本論文を遂行するにあたり、農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 野菜育種・ゲノム研究領域 葉根菜育種グループ長 松元哲博士には懇切丁寧な御指導・御鞭撻を頂き、深甚な謝意を表す。同研究室の主任研究員畠山勝徳博士には、多大な指導および執筆環境を賜り、同研究所の主任研究員吹野伸子博士には有益な助言および激励を頂いた。厚く御礼を申し上げます。また、同研究所の野菜育種・ゲノム研究領域 野菜ゲノムグループ長 福岡浩之博士には研究遂行に不可欠な機器の支援および指導を頂き、厚く感謝申し上げます。

学位論文審査において、有益な御助言を頂いた三重大学生物資源学部教授掛田克行博士、同教授奥村克純博士、同教授高松進博士に厚く御礼を申し上げます。また、三重大学大学院地域イノベーション学研究所教授小林一成博士には、長年にわたり有益な御助言を頂き感謝の意を表す。

京都府立大学農学部教授平井正志博士には貴重な遺伝資源を分譲して頂き、厚く御礼申し上げます。株式会社日本農林社の近藤宏様、近藤友宏様には貴重なハクサイ抵抗性素材を供与して頂き、高下新二様、宮崎俊夫様には栽培現場での指導および御助言を頂いた。ここに深く感謝の意を表す。

最後に、同研究所の非常勤職員山川利美氏、竹内絹枝氏、豊田周子氏をはじめ、多くの研究員、職員の方々にサポートして頂いた。また、本研究遂行にあたり、支援してくれた家族に感謝します。本研究は多くの方々の支援を拝受し、遂行に至った。心より感謝申し上げます。