

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580003

研究課題名(和文)ブラシカ オレラセアの根こぶ病抵抗性遺伝子のポジショナルクローニングと機能解析

研究課題名(英文)Positional cloning and functional analysis of CR-genes in Brassica oleracea

研究代表者

岡崎 桂一 (OKAZAKI, KEIICHI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20270936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：キャベツの根こぶ病抵抗性遺伝子の単離を目的とする。これを達成するため、抵抗性と罹病性親の間で多型が検出できる30マーカーを抵抗性遺伝子領域にマップできた。これらのマーカーを用い、抵抗性と罹病性親後代のF2分離集団から抵抗性遺伝子領域内に組み換えを起こしている個体を選抜しグラフィカルジェノタイプを作成し、抵抗性遺伝子が座乗する領域をある程度絞り込んだほか、抵抗性と罹病性親の次世代シーケンサー解析から抵抗性遺伝子が座乗する領域のシーケンスを決定した。今後、本研究で単離したPbBoAnju1領域に対応するBACおよびコスミドから、候補遺伝子を含むサブクローンを育成し相補性検定を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：In order to isolate clubroot resistance gene (CR-gene) in cabbage, we mapped 30 markers that can detected polymorphism in CR-gene regions of the susceptible and resistance parents. The recombinant plants, which had crossovers in the CR-gene region, were genotyped using our designed markers to obtain graph genotypes. The inoculation to the graph genotypes revealed that the CR-gene region is located around the KBr marker. We determined the DNA sequence of the CR-gene region from next-generation sequencing analysis of the susceptible parent resistance. The candidate gene region will be sub-cloned from BAC and cosmid clones, already cloned and contained the target region.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：根こぶ病 Brassica oleracea 病害抵抗性遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

アブラナ科作物をおかす根こぶ病は、土壌伝染性病害で休眠孢子が長年に渡り土壌中の残存するため、薬剤での防除が極めて困難であり、生産の現場では本病害に対する病害抵抗性品種が切望されている。しかしながら、*Brassica rapa* を除き、根こぶ病抵抗性遺伝子の遺伝様式等はわかっておらず、計画的に本病害の抵抗性育種を行うことはできない状況である。また、根こぶ病抵抗性遺伝子の実態も未だ明らかでない。そこで、本研究では、野菜として重要な *B. oleracea* の根こぶ病抵抗性遺伝子をクローニングし、その特徴を明らかにすることを目的とする。

### 2. 研究の目的

根こぶ病抵抗性遺伝子をクローニングし、その特徴を明らかにするため、以下のことを行う。

(1) 病害抵抗性遺伝子の位置を絞り込むため、極めて多数の F2 個体を用いて、根こぶ病抵抗性 QTL 領域に組み換えをもつ congenic 個体を選抜、

(2) congenic 個体の接種試験による候補遺伝子座乗領域の絞り込み、

(3) 根こぶ抵抗性品種のゲノム DNA 断片を導入した BAC ライブラリーの作成と、目的 DNA を含む BAC クローンの選抜、

(4) 候補遺伝子の発現解析、

(5) 候補遺伝子クローンを罹病性個体へ導入し、形質転換実験による候補遺伝子が真の病害抵抗性遺伝子であることの確定試験

これらによって、根こぶ病抵抗性遺伝子を同定することが最終目的である。

### 3. 研究の方法

花粉培養で育成した倍加半数体(DH)系統の GC P04(罹病性プロッコリー系統)を花粉親、DH 系統の AnjuP01(抵抗性キャベツ系統)を種子親とした F1 雑種を自家受粉し、得られた F2 分離集団を組み換え系統の育成に用いた。また、BAC のスクリーニングには、*B. oleracea* var. *alboglabra* より作成された市販の BAC ライブラリー(JBo Library)を用い、コスミドのスクリーニングには AnjuP01 から育成したものをを用いた。

根こぶ病抵抗性遺伝子が座乗する領域に DNA マーカーを作成するため、本研究では、*B. oleracea* の近縁種である *B. rapa* と *A. thaliana* のゲノム情報を利用して新規マーカーを開発した。前者は、AnjuP01 の座乗する領域と第 2 染色体が、後者は第 5 染色体が相同性を持つ。現在、*B. rapa* と *A. thaliana* の全ゲノムの塩基配列はウェブ上で公開されており、それぞれ、Brassica Database (<http://brassicadb.org/brad/index.php>) と TAIR (The Arabidopsis Information Resource) で閲覧が可能である。*B. oleracea* に関しては遺伝子の CDS の情報のみ Bolbase(<http://www.ocri-genomics.org/bolbase/>) に公開されている。マーカー作製に

あたり、高い多型率が得られるよう変異を蓄積しているイントロン領域を挟むようにエキソンにプライマーを設計した。AnjuP01 の座乗する領域に設計するプライマーは、抵抗性遺伝子と関連する遺伝子を GO により優先的に選択して作成した。遺伝子のアノテーションは Swiss-Prot を参考にした。設計したプライマーセットで複数のバンドが見られるものについては SCAR (Sequence characterized amplified region) 化を試みた。増幅した両親系統のバンドサイズに差がない場合は、4 塩基認識制限酵素「Afa」「Alu」「Mbo」「Msp」を用いた CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 法によるアガロース電気泳動による多型検出が可能か検証した。

作成したマーカーは、まず、両親である GC P04, AnjuP01 のゲノム DNA でスクリーニングを行い、その内、多型の見られたものについて、Nagaoka et al. (2010) が連鎖地図の作成に用いた F2 集団(46 個体)にマップし PbBo(Anju)1 領域に座上していることを確かめた。

マーカーの作成とファインマッピングと平行して、*B. oleracea* var. *alboglabra* A12 系統から作成された BAC ライブラリーから、ファインマッピングから絞り込まれた PbBo(Anju)1 領域を含むクローンの選抜を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) マーカーの開発

根こぶ病抵抗性 QTL (PbBo(Anju)1) が座乗する BRMS228 と pW176 のマーカーで挟まれた領域には、Bolbase の検索結果では、約 260 個の遺伝子が座乗している。これらの遺伝子と *B. rapa* のオルソログ遺伝子と相同性をもつ 84 個の遺伝子から 48 マーカーをデザインした。両親間で PCR による増幅が見られたものは、42 マーカーあり、Nagaoka et al. (2010) の F2 分離集団 75 個体を用いて連鎖を確認したところ PbBo(Anju)1 領域に 20 の新規マーカーを座上させることができた(図 1)。

これらに加えて、PbBo(Anju)1 領域とシロイヌナズナの染色体領域の EST 情報を利用して作成した 9 個のマーカーのうち、6 個が PbBo(Anju)1 領域にマップできた(図 1)。

#### (2) グラフィカルジェノタイプの作成と接種試験

抵抗性 AnjuP01 と罹病性 GC P04 の交雑から得た F2 分離集団の中から BRMS228 と pW176 マーカー間で染色体組み換えが起こっている個体を 20 個体選抜し、本研究で作成したマーカーを用い組み換え個体群のグラフィカルジェノタイプを作成した。次に、これらの組み換え個体へ接種試験を行い各個体の罹病度とマーカーの遺伝子型(Anju 型か GC 型か)を調べ、根こぶ病抵抗性 QTL(PbBo(Anju)1) が座乗する領域を推定し



〔学会発表〕(計4件)

MD.ASAD-UD-DOULLAH, H. TOMITA,  
M. SHIMIZU, MATSUMOTO, R.  
FUJIMOTO AND K. OKAZAKI (2012) 12  
月 18 日

Recent progress of clubroot resistance  
breeding through marker-assisted  
selection in *Brassica oleracea* and *B. rapa*.  
5th International symposium for the  
development of integrated pest  
management for sustainable agriculture in  
Asia and Africa, Kota Kinabalu , Malaysia

TOMITA, M. SHIMIZU, M. A.  
UD-DOLLAH, R. FUJIMOTO and K.  
OKAZAKI (2012) 10 月 11 日

Towards cloning a clubroot resistance  
minor gene PbBo(Anju)4 in *Brassica*  
*oleracea*. (Poster presentation).

International symposium on Comparative  
Genomics and Breeding of *Brassicaceae*  
crops. Sendai, Japan.

富田寛也・清水元樹・藤本龍・U. Doullah  
MA・松本哲・岡崎桂一 (2012) 3 月 29 日  
*Brassica oleracea* 根こぶ病抵抗性遺伝子の  
集積による抵抗性育種。日本育種学会，宇都  
宮大学

TOMITA, M. SHIMIZU, R. FUJIMOTO,  
M. A. UD-DOULLAH, S. MATSUMOTO  
and K. OKAZAKI (2012) 1 月 14 日

The cumulative effect of five Clubroot  
resistant genes in *Brassica oleracea*.  
(Poster presentation), PLANT & ANIMAL  
GENOME XX, San Diego , US.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岡崎 桂一 (Keiichi Okazaki)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：20270936