

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580057

研究課題名(和文)ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子群の特性の解明とレース判定系統の作出

研究課題名(英文) Analysis of clubroot resistant genes and development of differential lines in Brassica rapa.

研究代表者

松元 哲 (Matsumoto, Satoru)

独立行政法人農業・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・上席研究員

研究者番号：00355629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ハクサイ類の根こぶ病菌には4種類の病原型(G1～G4)が知られており、CRbを有する、ハクサイF1品種「CR新黄」はG1、G2に罹病し、G3とG4に抵抗性を示した。既存のCRbのマーカーを改良しヘテロ個体を識別可能な共優性型の新たなDNAマーカーを開発するとともに、「CR新黄」のF2後代2,032個体を用いて詳細連鎖地図を作成し、CRb抵抗性遺伝子がKB59N07とB1005との間の約140kbのゲノム領域に座乗することを明らかにした。CRkを有するKiE75はP1には罹病したが、G2からG4に抵抗性を示した。新たに開発したCRkに連鎖するマーカーは、Crr3にも連鎖関係が認められた。

研究成果の概要(英文)：Plasmodiophora brassicae which causes clubroot disease has been classified into four different pathotypes (G1 - G4). Chinese cabbage F1 cultivar, CR Shinki having CRb which is one of resistance genes, showed resistant to G3 and G4. We constructed a fine map of CRb locus using 2,032 F2 plants and developed new selective DNA markers. The position of CRb was narrowed to about 140kb between two new markers, KB59N07 and B1005. KiE7 (Brassica rapa) harboring another resistant gene, CRk, was resistance to P2, P3, P4. Using Brassica rapa DNA database, new DNA markers linked to CRk were developed. These DNA markers also linked to Crr3, another clubroot resistant gene. We cleared that the relationship between three resistance genes (CRb, CRk and Crr3) and the pathotypes of clubroot fungus.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：根こぶ病 DNAマーカー ハクサイ

### 1. 研究開始当初の背景

根こぶ病は土壤中の絶対寄生真核生物 *Plasmodiophora brassicae* によって引き起こされ、日本ではハクサイ、カブ、キャベツを含むアブラナ科野菜で甚大な被害がある。本病の対策には、化学合成農薬の使用、土壌 pH の調節等耕種的防除に加え、抵抗性品種の導入を組み合わせた総合防除が重要である。日本においてハクサイ類 (*Brassica rapa*) を加害する根こぶ病菌のレース (菌系) は、少なくとも 4 つが推定されるなど、多様である。一方で、抵抗性遺伝子座もこれまでに 8 個が報告されている。抵抗性遺伝子と根こぶ病菌系の親和性の違いから、特定の抵抗性遺伝子を有する品種が罹病すると考えられている。そこで抵抗性品種の開発を加速するには、根こぶ病菌系と抵抗性遺伝子の関係を明らかにすることと、効率的な選抜技術のためにマーカー情報を蓄積することが急務である。

### 2. 研究の目的

根こぶ病抵抗性遺伝子 (座) と根こぶ病菌レースの対応関係の解明

現在までに報告されている 8 個の根こぶ病抵抗性遺伝子 (座) の中で、*CRb*、*CRk*、*Crr3* をそれぞれ単独で有する系統および判別品種に用いられている「SCR ひろ黄」と 4 つの根こぶ病菌系を用いて抵抗性検定を行い、各抵抗性遺伝子がどの菌系に有効に働いているかを明らかにする。また、各系統の自殖後代または分離後代を育成し、抵抗性と罹病性が分離する世代で、根こぶ病抵抗性検定を行い、抵抗性の優劣性を明らかにする。さらに *CRb* については遺伝子単離に向けて詳細連鎖地図の構築を行うとともに、日本で栽培されているハクサイ、コマツナ、カブの抵抗性品種の中で *CRb* の保有している可能性について調べる。*CRk* では新たなマーカーの開発と *Crr3* との違いを明らかにする。

根こぶ病菌レース判別系統の育成

「はくさい中間母本農 7 号」(PL7) は根こぶ病抵抗性遺伝子を持たず、小孢子培養における高い胚形成能を有する中間母本であるが、マーカーの蓄積量も多く、これを元に連鎖地図が作成されている。各抵抗性遺伝子を有する品種および系統に PL7 を連続戻し交配し、抵抗性遺伝子座領域以外は PL7 型の準同質遺伝子系統を作成する。これにより抵抗性遺伝子の作用を正確に判断することが可能となるだけでなく、分子遺伝学的手法を用いた解析が容易に行いやすい系統群となる。

### 3. 研究の方法

根こぶ病抵抗性遺伝子 (座) と根こぶ病菌レースの対応関係の解明

*CRb*、*CRk*、*Crr3* を有する品種・系統として「CR 新黄」、「歓呼」(または「黄苑」)、「SN」をそれぞれ用いた。抵抗性遺伝子を有しない「はくさい中間母本農 7 号」(PL7) にこれら

を交配して得られた後代の中から抵抗性を有する系統を選抜した。さらに選抜した系統を自殖し得られた F<sub>2</sub> 種子を用いて病土挿入法に抵抗性検定を行った。根こぶ病菌は、「CR 隆徳」と「SCR ひろ黄」の抵抗性の違いから 4 つのグループ (G1~G4) に大別されており各グループに属する菌株を抵抗性検定に用いた。供試した F<sub>2</sub> では抵抗性が分離するため報告されているマーカー遺伝子型との比較が可能になる。根こぶ病抵抗性検定に用いた個々の個体のマーカー遺伝子型を決定し抵抗性との異同を調査した。

「SCR ひろ黄」は根こぶ病菌の判別品種として用いられているが、その抵抗性遺伝子は不明のままである。「SCR ひろ黄」の候補遺伝子を推定するために「SCR ひろ黄」の自殖後代または PL7 との交雑後代に由来する分離集団を用いて抵抗性検定を行った。

*CRb* の詳細連鎖地図を構築するため、*CRb* をヘテロで有する F<sub>1</sub> 品種「CR 新黄」の自殖後代を得た。既存のマーカー TCR05 の地図情報よりその周辺に存在すると推定されたマーカーを見出し、172 個体の F<sub>2</sub> 個体について抵抗性検定を実施し、抵抗性と新たに見出したマーカーの遺伝子型との異同を調べた。さらに本研究期間中に公開された *Brassica rapa* のゲノムデータベースを用いて、開発した DNA マーカー KBrH059N21F と KBrB091M11R 間の詳細連鎖地図を構築した。F<sub>2</sub> 世代 2,032 個体をスクリーニングし、この 2 つのマーカーで組換えを起こしている個体を選抜した。選抜した個体を自殖し得られた F<sub>3</sub> 世代の根こぶ病抵抗性を調べ選抜した F<sub>2</sub> 親の抵抗性遺伝子の有無を推定した。2 つのマーカー間に大量の多型マーカーを作成し、抵抗性遺伝子の有無と組換え場所から *CRb* の座乗位置を絞り込んだ。次にゲノムデータベースを活用して絞り込んだ領域にどのような遺伝子が存在するのかを明らかにした。*CRb* は優性形質であるためヘテロで抵抗性が発揮されるために F<sub>1</sub> 育種では片親のみに *CRb* を導入することにより抵抗性品種となる。抵抗性品種の罹病化を避けるためには、より多様な抵抗性遺伝子の導入が望まれているが、ハクサイ、コマツナ、カブ類の根こぶ病抵抗性品種群においてどのような抵抗性遺伝子が用いられているか、その概要は明らかではない。そこで 48 の抵抗性品種について G3 に属する根こぶ病菌株 No. 14 を用いて抵抗性の有無と *CRb* 近傍の 10 個のマーカー遺伝子型を比較し抵抗性品種群における *CRb* の有無を推定した。

*CRk* と *Crr3* は近傍に位置しているが、その正確な場所は特定されていない。そこで、既存のマーカーの配列を決定し、ゲノムデータベースを活用して、位置を確定するとともに詳細連鎖地図の構築に向けてマーカーの開発を行った。*CRk* と *Crr3* の分離集団の根こぶ病抵抗性とマーカー遺伝子型を比較し 2 つの遺伝子座の位置関係の解明を行った。

#### 根こぶ病菌レース判別系統の育成

*CRb*, *CRk*, *Crr3* の各遺伝子の効果を詳細に明らかにするには、抵抗性遺伝子座領域以外を同じゲノム構造にする必要がある。そこで、抵抗性遺伝子を有しない「はくさい中間母本農7号」(PL7)を戻し親に用いた準同質遺伝子系統(NIL)の作成に試みた。これらの遺伝子を有する系統にPL7を戻し交雑を繰り返した。また抵抗性が確実に遺伝しているかを確かめるために、各系統について、G4に属するAno-01菌を用いて抵抗性検定を行うとともに供試した各個体にタグ付けを行い、DNAを個別に抽出しマーカー遺伝子型を決定した。マーカー遺伝子型と抵抗性との関係を調査した。

#### 4. 研究成果

##### 根こぶ病抵抗性遺伝子(座)と根こぶ病菌レースの対応関係の解明

異なる根こぶ病抵抗性遺伝子を有するハクサイ(*Brassica rapa*) F<sub>1</sub>品種や実験系統を用いて4種類の病原菌系G1、G2、G3、G4の根こぶ病菌を接種した結果、*CRb*を有する「CR新黄」およびその後代系統はG1とG2には罹病し、G3とG4に対して抵抗性を示した。*CRk*を有するKiE75およびその後代系統は、G1には罹病性、G2に対しては部分的な抵抗性を、G3とG4には抵抗性を示した。*Crr3*を有する系統の後代系統は、G1とG3に罹病性でG2とG4には抵抗性を示した。*CRb*, *CRk*, *Crr3*を有する分離集団ではいずれも抵抗性と罹病性とがほぼ3:1に分離し、マーカー遺伝子型との比較では、抵抗性ホモ型:ヘテロ型:罹病性ホモ型が1:2:1の分離比に遺伝した。抵抗性ホモ型とヘテロ型の個体の発病程度はほぼ同じであった。これらの結果から、3つの遺伝子ともに、優性形質であることが

明らかになった。*CRk*はG2、G3にも抵抗性を付与することから、*CRb*や*Crr3*とは機能的な違いが認められた。*CRb*, *CRk*および*Crr3*は、いずれも*Brassica rapa*の第3連鎖群に座乗しているが、抵抗性遺伝子の機能は病原菌型によってそれぞれ異なることが明らかになった。

菌系の判別品種に用いられている「SCRひろ黄」は保有している抵抗性遺伝子の詳細が不明であるが、G1とG3には罹病性で、G2とG4に抵抗性であった。この結果は報告されている内容と一致した。G1とG3に罹病しG2とG4に抵抗性を示す遺伝子としては、これまで*Crr1*が知られていたが、これに*Crr3*が加わり、「SCRひろ黄」が有する抵抗性遺伝子として、*Crr1*と*Crr3*が候補遺伝子と考えられた。

*CRb* 遺伝子座について、座乗位置の検討を行ったところ、新たに開発したマーカーKBrH059N21FとKBrB091M11R間に存在することが明らかとなり(図1)。周辺のSSRをマーカーにすることにより既存のマーカーよりも近傍でかつ選抜しやすい共優性のマーカーセットを開発した(Kato et al, 2012)。*Brassica rapa*のゲノム配列情報(BRAD: <http://brassicadb.org/brad/>)を用いて多数のマーカーを開発し、「CR新黄」のF<sub>2</sub>後代2,032個体のマーカーの分離から詳細遺伝地図を作成した。マーカー間で組換えを生じた個体のF<sub>3</sub>の根こぶ病菌系G3に対する抵抗性の有無に基づき、*CRb*はKB59N07とB1005との間の約140kbのゲノム領域に座乗すると推定された(図1)。このゲノム領域には、14個の遺伝子が推定され、植物の病害抵抗性遺伝子に共通するモチーフ(TIR-NBS-LRR)を有する遺伝子も含まれることを見出した。G3に分類される菌系「No.14」に抵抗性を示すハクサイ・コマツナ類およびカブの48品種において*CRb*周辺に座乗する10個のマーカー遺伝子型が罹病性ホモ型を示す品種数は1~11(平均4.4)と低く、*CRb*は抵抗性品種群に高い割合で存在することが示唆された(Kato et al, 2013)。

これまでの研究から*CRk*と*Crr3*はハクサイゲノムの第3連鎖群上の近くに存在することが示唆されていた。一方で、本研究結果から、*CRk*と*Crr3*は抵抗性を発揮する菌系に違いがあることが明らかとなった。2つの遺伝子座の位置関係を明らかにすることに着手した。2つの遺伝子座に連鎖するそれぞれのマーカーである、HC688とBrSTS78の塩基配列のハクサイゲノム上の位置を、ゲノムデータベースを用いて解析したところ、これらのマーカー間は約714kb離れていると推定された。この間にSSR配列を検索し8個の共優性と9個の優性の計17マーカーを開発し、さらにこの2つの抵抗性遺伝子座の位置関係を詳細に調べた。

80個体からなる*Crr3*分離集団を用いて、G4に属する根こぶ病菌Ano-01に接種し、個々の発病程度から抵抗性遺伝子の有無を推定

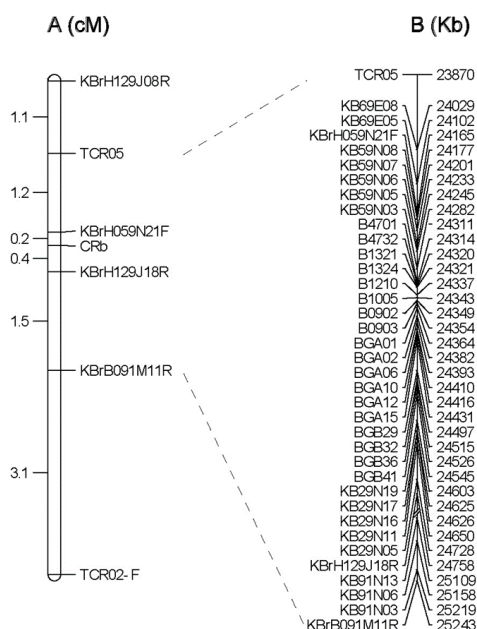


図1 *Brassica rapa* 3番染色体上における*CRb*近傍の部分連鎖地図および物理地図

するとともに、既存の *Crr3* マーカー BrSTS78、BrSTS61、OPC11-2S、BrSTS33 に加えて、新たに開発した 17 個の *CRK* 連鎖マーカー遺伝子型をすべて決定し、*Crr3* の集団における抵抗性と *CRK* 近傍のマーカー遺伝子型との関係を調べた。その結果、抵抗性と罹病性の個体数はそれぞれ 62 と 18 でほぼ 3 : 1 に分離し、一つの遺伝子座で制御されている可能性の高いことが観察された。抵抗性とマーカー遺伝子型との比較では、*CRK* に連鎖する 17 個の DNA マーカーおよび BrSTS78、BrSTS61 のマーカー遺伝子型と表現型はほぼ一致したが、OPC11-2S と BrSTS33 は、罹病性個体であってもマーカー遺伝子型がヘテロを示すなど、遺伝子座間で組換えが生じたと考えられた個体が観察された。そのため *Crr3* の座乗位置は、*CRK* に近い BrSTS78、BrSTS61 側であることが示唆された。本実験では *CRK* と *Crr3* の座乗位置を明確に区別できる実験結果は得られず、ゲノムデータ解析結果を加味するとこの 2 つの遺伝子座は近傍に存在することが改めて示された。

#### 根こぶ病菌レース判別系統の育成

各根こぶ病抵抗性遺伝子を有する品種・系統と PL7 を戻し親に用いた準同質遺伝子系統 (NIL) の作成のために、抵抗性遺伝子を有する系統に PL7 を戻し交雑を行った。Ano-01 菌への抵抗性とマーカー遺伝子型の分離はほぼ同様であり、連鎖関係を確認し、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代を得た。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 2 件)

Takeyuki Kato, Katsunori Hatakeyama, Nobuko Fukino, Satoru Matsumoto. Fine mapping of the clubroot resistance gene *CRb* and development of a useful selectable marker in *Brassica rapa*. *Breeding Science*, 査読あり, 63No.1, 2013, 116-124

DOI: 10.1270/jsbbs.63.116

Takeyuki Kato, Katsunori Hatakeyama, Nobuko Fukino, Satoru Matsumoto. Identificaiton of a clubroot resistance locus conferring resistance to a *Plasmodiophora brassicae* classified into pathotype group 3 in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.), *Breeding Science*, 査読あり, 62No.3, 2012, 282-287  
DOI: 10.1270/jsbbs.62.282

##### [学会発表](計 5 件)

松元哲、畠山勝徳、ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子座 *CRK* に連鎖する DNA マーカーの開発、日本育種学会、2013 年 10 月 12 日 ~ 10 月 13 日、鹿児島大学

Satoru matsumoto, Recent advances on clubroot disease resistance of Brassica, The workshop on the Golden Seed Project of Cabbage at Sunchon National University (招待講演), 2013 年 2 月 16 日、順天大学 (韓国)

Satoru matsumoto, Takeyuki kato, Katsunori Hatakeyama, Shinji Takashita, Toshio Miyazaki, Tomohiro Kondo, Development of highly clubroot resistant Chinese cabbage F1 cultivar, 'Akimeki', accumulating three resistance Genes, *Crr1*, *Crr2* and *CRb* ISHS rassica2012 symposium, 2012 年 11 月 12 日 ~ 11 月 16 日、カタール大学 (イタリア)

加藤丈幸、畠山勝徳、吹野伸子、松元哲、根こぶ病抵抗性品種における *CRb* 近傍マーカー遺伝子型とグループ 3 菌系に対する抵抗性の関係、園芸学会東海支部会報、2012 年 8 月 31 日、三重県農業研究センター

加藤丈幸、松元哲、畠山勝徳、吹野伸子、ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子 *CRb* の詳細マッピング、日本育種学会、2011 年 9 月 24 日、福井県立大学

##### [図書](計 1 件)

松元哲 他、農林水産・食品産業技術振興協会、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」(農林水産技術 研究ジャーナル)、2012、4

##### [その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松元 哲 (MATSUMOTO, Satoru)

(独)) 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・上席研究員

研究者番号: 00355629