

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月11日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380018

研究課題名（和文）バラの根頭がんしゅ病と根腐病抵抗性形質に関連する遺伝子マーカーの決定

研究課題名（英文）Determination of gene marker related to resistance against crown gall and root rot disease in rose

研究代表者

福井 博一（FUKUI HIROKAZU）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20183585

研究成果の概要（和文）：

根腐病抵抗性の4倍性*Rosa multiflora*と根頭がんしゅ病抵抗性をのPEKcougelを交配し、複合抵抗性台木の育成を目指した。得られた種子から胚を摘出して胚培養を行った。遺伝子マーカーを用いて交雑後代の検証を行った結果、3個体のF1個体が得られた。これらのF1は根頭がんしゅ病と根腐病に対して高い複合抵抗性が確認できた。接木親和性検定の結果、'F1 No.1'、'F1 No.5'が台木として有望であった。

研究成果の概要（英文）：In order to breed of multiple disease resistant rootstock, tetraploid *Rosa multiflora* with root rot disease resistance and PEKcougel with crown gall disease resistance were crossed. Embryo was excised from the obtained seed and embryo culture was carried out. From result of investigating crossed progenies using a genetic marker, three F1 were obtained. These F1 has identified high multiple disease resistant to root rot disease and crown gall disease. 'F1 No.1' and 'F1 No.5' were promising as a stock as a result of graft compatibility test.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：花き園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：バラ、病害抵抗性、遺伝子マーカー、根頭がんしゅ病、根腐病

1. 研究開始当初の背景

国内の切りバラ消費量は約5億5000万本と推定されているが、インド、韓国、ケニアからの輸入切りバラが年々増加して20%を占め、国内生産量は約4億5000万本と年々減少し続け、国内生産における生産コストの低減と生産性の向上が重要な課題となっている。国内バラ生産は60%がロックウール栽培などの養液栽培となっており、養液を介する土壌伝染性病害による被害は生産コストの増加と生産性の低下の原因の1つとなっている。その主要病害として根腐病と根頭がん

しゅ病を挙げることができる。

根頭がんしゅ病は、切花生産段階での治療法がなく、苗生産段階で徹底した病害の防除を行う以外に対応策がない。本病害に罹病すると生産性や品質の低下が著しい。根腐病は伝染性が著しく高く、ロックウール栽培において甚大な被害をもたらす、罹病した株は枯死するため著しい生産性の低下を招いている。

これらの病害に対する防除法としては、化学薬剤による殺菌処理があるが、近年の環境問題を鑑み、農薬を使用しない対策法を早急に開発

する必要がある。両病害に対して、農薬に頼らない最も有効な方法として抵抗性台木の育成がある。

申請者は、両病害の抵抗性品種に関する研究をこれまで行ってきた。根頭がんしゅ病については、平成13～15年度に科学研究費基盤研究(B)(2)において、PEKcoughelが根頭がんしゅ病に対して抵抗性を持つことを明らかにすると共に、その根頭がんしゅ病抵抗性の発現機構について生化学的、組織学的に検討し明らかにしてきた。また、平成12～17年度には農水省「21世紀グリーンフロンティア研究、遺伝子組換え及びクローン技術による画期的な動植物の開発」においてPEKcoughelの根頭がんしゅ病抵抗性形質が後代に遺伝することを明らかにした。さらに根腐病についても*Rosa multiflora*が抵抗性を示すことを明らかにし、その抵抗性機構を解明すると共に、*Rosa multiflora*が持つ根腐病抵抗性が後代に遺伝することを明らかにした。

平成18年度からは農水省「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」において、両病害に対する複合抵抗性台木の育成についての応用的研究を開始し、複合抵抗性台木の育成に取り組んできている。

これらの研究過程において、根頭がんしゅ病抵抗性を持つPEKcoughelは4倍体であり、根腐病抵抗性を持つ*R. multiflora*は2倍体であることから、両者を交配しても後代の育成が困難であることが明らかとなり、コルヒチン処理による*R. multiflora*の4倍性個体を得ることができた。

2. 研究の目的

国内の切りバラ生産における生産コストの低減と生産性の向上を図るために、主要病害である根腐病と根頭がんしゅ病に対する抵抗性台木の育成を目的とする。

これまでの研究過程において、根頭がんしゅ病抵抗性を持つPEKcoughelは4倍体であり、根腐病抵抗性を持つ*R. multiflora*は2倍体であることから、両者を交配しても後代の育成が困難であることが明らかとなり、コルヒチン処理による*R. multiflora*の4倍性個体を得ることができた。

本研究では、根頭がんしゅ病抵抗性を持つ4倍性のPEKcoughelと4倍性*R. multiflora*を交配して得られるF1について根頭がんしゅ病および根腐病抵抗性の検定を行うとともに、その検定結果を基にDNA解析を行い、根頭がんしゅ病および根腐病抵抗性に関わる遺伝子マーカーの開発を試みる。

3. 研究の方法

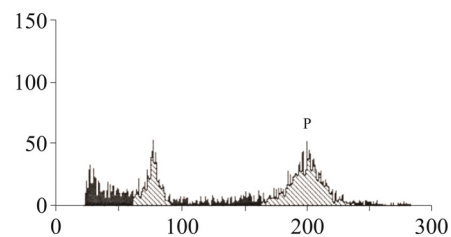
- (1) 4倍性のPEKcoughelと4倍性*R. multiflora*の交配を行う。
- (2) 結実した種子から胚を摘出し、胚培養で個体の獲得を図る。胚培養の条件を検討して、種間雑種による成長点組織の座死を回避してF1個体を獲得する。

- (3) 胚培養によって成長が見られた個体について、順化、鉢上げを行う。
- (4) 鉢上げした個体について、本申請で購入したプロイディーアナライザーを用いて倍数性の確認を行い、4倍体であることを確認する。
- (5) 雑種であることが確認できた個体について、PEKcoughelおよび*R. multiflora*の特異的プライマーを用いて交雑後代の検証を行う。
- (6) 雑種個体について、既開発済みの根頭がんしゅ病検定法(節間部接種法)を用いて根頭がんしゅ病抵抗性検定を実施するとともに、同様に既開発済みの根腐病抵抗性検定法(人工気象装置と循環式Ebb&Fowシステムを用いた検定法)を用いて根腐病抵抗性検定を実施する。
- (7) 抵抗性検定が終了したF1個体について、発根特性および接木親和性を検定すると共に、切花品種を接木して台木特性を検定する。

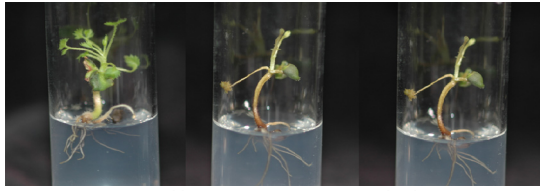
4. 研究成果

4倍性*R. multiflora*×PEKcoughelの交配では4年間で4,830花に交配を行い、4,325個の種子から胚を摘出して胚培養を行った。同様にPEKcoughel×4倍性*R. multiflora*の交配では168花に交配して412個の種子から胚を摘出して胚培養を行った。胚培養では本葉展開後に成長点組織が座死する現象がみられたため、未熟胚培養と成熟胚培養の手法を導入して成長点組織の座死の回避を試みた。

成熟胚培養では、MS培地+GA₃ 10⁻⁶Mの培地(ショ糖3%、ジェランガム0.2%、pH5.7)からMS培地+BPA 10⁻⁵M+GA₃ 10⁻⁶Mの培地(ショ糖3%、ジェランガム0.2%、pH5.7)で継代培養し、交雑種子の発芽後の致死を回避する方法として、交雑個体を37℃の高温条件下で育苗する方法では常温で育苗した時と同じ褐変症状が現れ、生存個体を得ることができなかった。未熟胚からの不定胚培養では6個体の不定胚様組織が形成されたが、その後生育を停止し、交雑個体を得ることができなかった。成熟胚直前に発育した胚を培地上で通常発芽させる方法では6個体の生存個体を獲得できた。6個体についてプロイディーアナライザーを用いて倍数性を確認した結果、3個体のF1個体が4倍体であった。

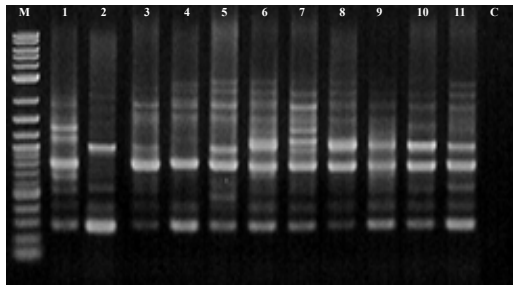


胚培養後に順化した個体のフローサイトメトリー
P: 標準指標の*Petroselinum crispum*



胚培養後に順化した3個体

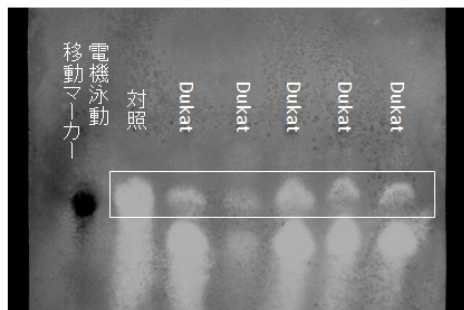
PEKcoughelと*R. multiflora*の特異的プライマーの開発については、PEKcoughelにおいてKSN gene detect;1.2kbプライマーが使用可能であったが、*R. multiflora*については、*R. multiflora*が交配親として用いられている20品種および*R. multiflora*との血縁がない7品種を用いて10merランダムプライマー300種類を用いてRAPD分析を行い、*R. multiflora*特異的なバンドを形成するプライマーOPAK16を特定し、形成された800bpのバンドの塩基配列から独自のプライマーOPAKM1を設計した。



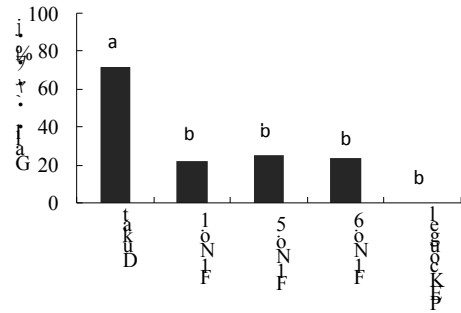
PCR electrophoretic profile of *Rosa multiflora* species amplified with the primer OPAK16. 1, *R. multiflora* 'Matsushima No. 3'; 2, PEKcoughel; 3, *R. multiflora* carnea; 4, *R. multiflora* cathayensis; 5, Apple Blossom; 6, Russelliana; 7, Rambling Rector; 8, Rush; 9, Seagull; 10, Tapis Volant; 11, Gipsy Boy. C, control. Line M, molecular marker (2 kb plus 100 bp DNA ladder)

バラ根頭がんしゅ病抵抗性品種のPEKcoughelとバラ根腐病抵抗性品種の*R. multiflora* 'Matsushima No.3'との交配で得られた3個体F1について、KSNマーカー及びOPAKM1マーカーを用いて交雑後代の検証を行った結果、これらはいずれも交雑後代であることが検証できた。

これら3個体のF1について、既開発済みの根頭がんしゅ病検定法(ex vitro浸漬検定法)を用いて根頭がんしゅ病抵抗性検定を実施した。



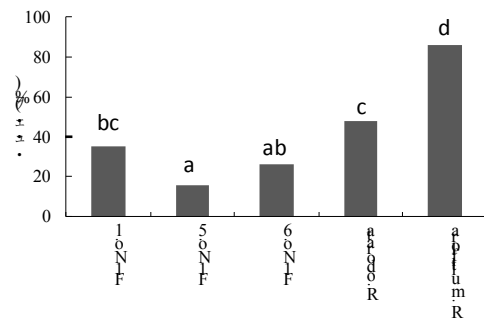
コントロールに用いた'Dukat'のオパインアッセイ結果
対照にはノバリンを用いた
四角の範囲内の蛍光がノバリン



根頭がんしゅ病検定法(ex vitro浸漬検定法)によるF13個体とDukat及びPEKcoughelのgall形成率

根頭がんしゅ病抵抗性検定の結果、F1の3個体はいずれも抵抗性のPEKcoughelと同等の根頭がんしゅ病抵抗性を示した。また、根腐病抵抗性についても同様に抵抗性を示した。

3個体のF1個体の発根特性を検定した結果、F1 No.1が台木として用いられている*R. odorata*と同等の発根率を示し、発根特性に優れていた。



3個体のF1の発根率

切花品種サムライ08を接木し、挿し接ぎ法で苗を育成した結果、F1 No.1での生育が最も優れ、次いでF1 No.5での生育が良く、F1 No.6の生育は著しく劣ったことから、F1 No.1は切花品種との接木親和性が高く、根頭がんしゅ病と根腐病に対する複合抵抗性台木として適していることが明らかとなった。

現在、4収量性検定を実施しており、種苗登録を平成24年度中に行う予定である。

今回得られたF1個体が3個体であったことから、QTL解析による根頭がんしゅ病および根腐病抵抗性に関わる遺伝子解析ができなかったが、平成24年5月にはF1の3個体とも開花することから、F2個体を得てQTL解析を行う。

また、*R. rugosa*が根腐病に対して罹病性であったことから、根腐病罹病性の*R. rugosa*と抵抗性のMatsushima No.3との交配を行い、446個体の種子を獲得し、そのF1個体を128個体が得られている。今後これらの個体について形質調査を行うと共に、F1個体と*R. rugosa*との交雑を行い、BC1個体の形質に基づいてQTL解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- (1) 庄得鳳、李蓮花、立松翼、長岡史祥、景山幸二、福井博一、ノイバラ(*Rosa multiflora*)の根に含まれるフェノール化合物のバラ根腐病抵抗性活性、園芸学研究、査読有、11、2012、印刷中
- (2) Nakamura, N., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Katsumoto, J. Togami, M. Senior, Y. Matsuda, K. Furuichi, M. Yoshimoto, A. Matsunaga, K. Ishiguro, M. Aida, M. Tasaka, H. Fukui, S. Tsuda, S. Chandler, Y. Tanaka, Environmental risk assessment and field performance of rose (*Rosa hybrida*) genetically modified for delphinidin production, Plant Biotechnology, 査読有、28、2011、251-261
- (3) Li, M., T. Asano, H. Suga and K. Kageyama, A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum* and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan, Plant Dis., 査読有、95、2011、1270-1278
- (4) Naher, M., K. Motohashi, H. Watanabe, Y. Chikuo, M. Senda, H. Suga, C. Brasier and K. Kageyama, *Phytophthora chrysanthemi* sp. nov., a new species causing root rot of chrysanthemum in Japan, Mycol Progress, 査読有、10、2011、21-31
- (5) Nakamura, N., U. Tems, M. Fukuchi-Mizutani, S. Chandler, Y. Matsuda, S. Takeuchi, S. Matsumoto and Y. Tanaka, Molecular based evidence for a lack of gene-flow between *Rosa X hybrida* and wild *Rosa* species in Japan, Plant Biotechnology, 査読有、28、2011、245-250
- (6) Ogasawara, R., Y. Kawahara and H. Fukui, Tetraploids Induction by Colchicine Treatment in *Hibiscus mutabilis*, Com. Proc. Inter. Plant Prop. Soc., 査読有、60、2011、636-641
- (7) Matsumoto, S., T. Koketsu, H. Negishi, A. Taneda, H. Fukui and Y. Ueda, Gene flow via pollen spread from cultivated roses used as hosts of transgenic rose to wild roses, Acta Horticulturae, 査読有、870、2010、175-182
- (8) Sugimoto, H., H. Fukui, Y. Aoki, T. Tatematsu and M. Hayashi, Tetraploid Induction by Colchicines in *R. banksiae*, Acta Horticulturae, 査読有、870、2010、147-152
- (9) 于文進、荒井健悟、今井田一夫、加藤克彦、李蓮花、福井博一、補光および遮光栽培条件下におけるミニチュアローズ鉢物の成育および日射量、気温を基にした成育推定式の適用可能性、植物環境工学、査読

有、22、2010、133-139

- (10) Yu, W., R. Kitamura, K. Kato, L. Li and H. Fukui, A computer program for automatic watering based on potential evapotranspiration by penman method and predicted leaf area in miniature pot rose production, Agricultural Sciences in China, 査読有、9、2010、101-105
- (11) 渡辺秀樹、砂川 匡、堀之内勇人、加藤高伸、景山幸二、培管理がバラ根腐病の発病に及ぼす影響、関西病虫研報、査読有、51、2009、49-51
- (12) Yin, L., W. Zhou, K. Motohashi, H. Suga, H. Fukui and K. Kageyama, Development of microsatellite markers for *Pythium helicoids*, FEMS Microbiol. Let., 査読有、293、2009、85-91
- (13) Li, L., W. Yu, Y. Ishiguro, K. Kageyama, S. Matsumoto and H. Fukui, Observation of Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to Rose Cell Surface using TEM in Relation to Resistance Responses to Crown Gall, Acta Horticulturae, 査読有、767、2008、451-456
- (14) 渡辺秀樹、加藤吉成、亀嶋 哲、丹羽智彦、上野 麗、堀之内勇人、田口義広、景山幸二、百町満朗、鉢花の底面吸水栽培における銀セラミックスを用いた水媒伝染性病害の防除、関西病虫研報、査読有、50、2008、87-89
- (15) Watanabe, H., K. Kageyama, Y. Taguchi, H. Horinouchi and M. Hyakumachi, Bait method or detect *Pythium* species that grow at high temperatures in hydroponic solutions, J. Gen. Plant Path., 査読有、74、2008、417-424

[学会発表] (計 17 件)

- (1) 小笠原利恵、西川和男、福井博一、スパテイフィラム‘ニューメリー’の頂端分裂組織への *in vitro* でのコルヒチン処理による倍数体作出、園芸学会、2012年3月27日、大阪府堺市
- (2) 古藤澄久、安食秀一、大西隆、古橋卓、石黒泰、福井博一、雨木若慶、ポットバラ‘パーレッタ・フォーエバー’の成長・開花に及ぼす夜間補光時の光源の影響、園芸学会、2012年3月27日、大阪府堺市
- (3) 林裕作、河村耕史、白武勝裕、松本省吾、バラのトゲ形成に関わる遺伝子の探索と解析、園芸学会、2012年3月27日、大阪府堺市
- (4) 小笠原利恵、福井博一、フヨウのコルヒチン処理による4倍体個体の作出、国際植物増殖者会議日本支部、2010年10月24日、愛知県豊明市
- (5) 東未来、猫橋茉莉、森本玲奈、廣瀬真名、

- 松本省吾、光田展隆、高木優、大島良美、
花卉特異的 *InMYB1* プロモーターの花弁
特異的発現誘導機構の解明. 第1報:LFY
の機能抑制によりがく化させた花弁におけ
る作動、園芸学会、2011年9月24日、岡
山県岡山市
- (6) 古藤澄久、安食秀一、大西隆、古橋卓、石
黒泰、福井博一、雨木若慶、ポットバラ‘グ
ランブルー’の成長・開花に及ぼす夜間補
光時の光源の影響、園芸学会、2011年9
月24日、岡山県岡山市
- (7) 河村耕史、岩田光、山田邦夫、松本省吾、
福井博一、J. Jeauffre, T. Thouroude、栽培
バラに四季咲き性をもたらしたトランスポ
ン:バラゲノム内のコピー数と分布、園芸学
会、2011年9月24日、岡山県岡山市
- (8) Kageyama, K., K. Motohashi, M. Senda
and H. Suga, *Pythium* species isolated from
river water in Iriomote Island located in
subtropical area of Japan、アジア菌学会、
2009年11月15日、台湾
- (9) Motohashi, K., H. M. A. Abdelzaher, K.
Kageyama, and H. Suga, Two new species
of genus *Pythium* isolated from water and
soil of Rishiri Island、アジア菌学会、2009
年11月15日、台湾
- (10) 本橋慶一、H. M. A. Abderzaher、千田昌子、
須賀晴久、景山幸二、北海道利尻島で分
離された *Pythium* 属菌の2新種について、
日本菌学会、2009年8月20日、鳥取県鳥
取市
- (11) Sugimoto, H., H. Fukui, Y. Aoki, T.
Tatematsu and M. Hayashi、Tetraploid
Induction by Colchicines in *R.banksiae*、
The 5th International Symposium on Rose
Research and Cultivation、2009年5月26
日、岐阜市
- (12) 青木八一郎、立松翼、杉本浩基、景山幸
二、石黒泰、福井博一、*Rosa multiflora* 特
異的 DNA マーカーの開発、園芸学会、
2009年3月19日、東京都
- (13) 川原勇太、小笠原利恵、福井博一、紫の花
色を持つケナフの園芸種への導入を目的
としたコルヒチンによる4倍体個体の作出、
園芸学会、2009年3月19日、東京都
- (14) 立松翼、青木八一郎、杉本浩基、景山幸
二、中野浩平、石黒泰、福井博一、ノイバラ
(*Rosa multiflora*)の根に含まれる根腐病抑
制物質、園芸学会、2009年3月19日、
東京都
- (15) 渡辺秀樹、景山幸二、田口義広、堀之内
勇人、百町満朗、高温性ピシウム属菌の水
耕養液中からの簡易検出、日本植物病理
学会関西支部会、2008年9月18日、和
歌山県和歌山市
- (16) Kageyama, K., L. Yin, M. Senda, H. Fukui
and H. Suga, Development of microsatellite

markers for *Pythium helicoides*、9th
International Congress Plant Pathology、
2008年8月26日、Italy

- (17) 窪田昌春、中筋智子、清水将文、景山幸
二、西和文、*Pythium megalacanthum* の分
子系統分類、日本菌学会、2008年5月
31日、三重県津市

〔図書〕(計2件)

- (1) 福井博一、悠書館、品種改良の世界史(作
物編)、第21章 バラ、2011、511-544
- (2) 福井博一、社団法人農山漁村文化協会、
最新農業技術 花卉 vol.2 「ヒートポンプ
の総合活用(暖房, 冷房, 除湿)」、2010、
277-287

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~fukui/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福井 博一(FUKUI HIROKAZU)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号:20183585

(2)研究分担者

景山 幸二(KAGEYAMA KOUJI)
岐阜大学・流域圏科学研究センター・教授
研究者番号:50224366

(3)連携研究者

松本 省吾(MATSUMOTO SHOGO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号:90241489