

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-135554
(P2004-135554A)

(43) 公開日 平成16年5月13日(2004.5.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2002-302280 (P2002-302280)	(71) 出願人 501203344
(22) 出願日 平成14年10月16日 (2002.10.16)	独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年8月26日 日本育種学会発行の「育種学研究 第4巻 別冊2号」に発表	茨城県つくば市観音台3-1-1
	(74) 代理人 100102978
	弁理士 清水 初志
	(74) 代理人 100108774
	弁理士 橋本 一憲
	(72) 発明者 松元 哲
	三重県津市大字小舟904-75
	(72) 発明者 平井 正志
	三重県安芸郡安濃町田端上野910-49
	(72) 発明者 布目 司
	三重県津市一身田中野718-4
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アブラナ科植物根こぶ病に対する抵抗性遺伝子検出用マイクロサテライトマーカー、およびその利用

(57) 【要約】

【課題】アブラナ科植物における根こぶ病抵抗性の新規 Q T L に連鎖するマイクロサテライトマーカーを提供し、このマーカーを用いた根こぶ病抵抗性個体の効率的な選抜方法を提供することにある。

【解決手段】多数のマイクロサテライトマーカーから罹病性個体と抵抗性個体との間で多型性を示すマーカーをまず選抜し、次いで、罹病性個体との抵抗性個体交配後代集団を用い、根こぶ病の病原菌に対する表現型の分離パターンと、マーカーの多型分布を調査した結果、4つのマーカーが、根こぶ病抵抗性 Q T L と連鎖していることを見出した。該マイクロサテライトマーカーを有する D N A 断片を検出することにより、根こぶ病新規抵抗性遺伝子を有する個体を識別することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1～4のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA。

【請求項 2】

以下の(a)～(d)のいずれかに記載のマイクロサテライト配列を含むDNA。

(a) 配列番号：1に記載の塩基配列において、55～96位のマイクロサテライト配列

(b) 配列番号：2に記載の塩基配列において、150～164位または227～241位のマイクロサテライト配列

(c) 配列番号：3に記載の塩基配列において、468～530位のマイクロサテライト配列

(d) 配列番号：4に記載の塩基配列において、179～226位のマイクロサテライト配列

10

【請求項 3】

請求項1または2に記載のDNAをPCR法によって検出することを特徴とする、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体の識別方法。

【請求項 4】

以下の(i)～(iii)の工程を含む、請求項3に記載の識別方法。

(i) 請求項1の(a)～(d)のいずれかに記載のマイクロサテライト配列を含むDNA領域を増幅する工程

(ii) 増幅したDNAをゲル上で分離する工程

20

(iii) 分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

【請求項 5】

請求項3または4に記載の識別方法により、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体を選抜する方法。

【請求項 6】

アブラナ科植物がハクサイである、請求項3～5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

請求項3～6に記載の方法に使用されるPCRプライマーであって、請求項2の(a)～(d)のいずれかに記載のマイクロサテライト配列を含むDNA領域を増幅するための合成オリゴヌクレオチド。

30

【請求項 8】

配列番号：5～12のいずれかに記載の塩基配列からなる、請求項7に記載の合成オリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項7または8に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、アブラナ科植物から抽出されたDNAを鋳型とするPCR法によって増幅されるDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アブラナ科植物の根こぶ病抵抗性個体の選抜に用いるDNAマーカー及び選抜法に関するものである。詳しくは特定のマイクロサテライト遺伝子座を検出する合成オリゴヌクレオチド並びに合成オリゴヌクレオチドを用いるDNA分析によって、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物を識別し、根こぶ病抵抗性個体を選抜する方法に関する。

40

【0002】

【従来技術】

根こぶ病はアブラナ科野菜における最も重要な土壌病害の1つである。根こぶ病に罹病した根には、特徴的なこぶが形成され、栄養分や水分の吸収が阻害され、最終的には生育阻害、収量減を引き起こす。根こぶ病菌は休眠孢子の形で土壌中に長期間生育が可能であり、一旦発生すると防除が甚だ困難である。そのため、抵抗性品種の利用が本病害の回避に

50

極めて効果的と言える。しかし、根こぶ病菌に対する抵抗性は多因子（量的形質； *Quantitative trait loci*, *QTL*）による遺伝を示す。そのため、抵抗性の育種素材を用い、交配による経済品種育成を試みる場合、形質の集積が困難で、かつ長期に渡る。本 *QTL* の主動遺伝子に連鎖する *DNA* 断片は同定されているが（非特許文献 1 参照）、この *DNA* 断片はヘテロ接合体を識別できない優性マーカーであるため、抵抗性個体の選抜に用いる *DNA* マーカーとしては必ずしも有効ではなかった。また根こぶ病菌には複数に分化したレースに対応した抵抗性、すなわち実用レベルでの抵抗性を発現させるまでには至っていない。したがって、本病害の抵抗性に関わる他の *QTL* の同定が抵抗性品種開発の上で強く望まれていた。

【0003】

一方、育種現場においては、形質に連鎖した *DNA* マーカーの利用が、作業の効率化において非常に有効である。*DNA* マーカーには、*RFLP* (*Restriction fragment length polymorphism*)、*AFLP* (*Amplified fragment length polymorphism*)、*RAPD* (*Random amplified polymorphic DNA*)、*STS* (*Sequence-tagged sites*)、マイクロサテライト (*SSR*; *simple sequence repeat*) マーカーなどが知られているが、*RFLP*、*SSR* マーカーのみが共優性マーカーであり、他は優性マーカーである。ダブルハプロイド系統を用いて、ブラシカ・ラパの根こぶ病抵抗性遺伝子に連鎖する優性マーカーである *RAPD* マーカーについては、既に知られている（特許文献 1 参照）。共優性マーカーは、供試個体の遺伝子型（ホモ/ヘテロ）の判別が可能で、育種における導入形質の固定に非常に有効である。しかし、*RFLP* マーカーは、純度の高い *DNA* を単離する必要があり、また、その後の分析も煩雑であるなど、労働時間さらには設備等におけるコスト面からも問題が多い。一方、*SSR* マーカーは、*PCR*（ポリメラーゼ連鎖反応）ベースのマーカーであることから、純度の高い *DNA* は必要とせず、また、操作が極めて簡便で、高度な設備も必要としない。さらに、運用コストも低く抑えることが可能であることから、育種現場で利用しうるマーカーとしては現時点で最も優れていると言える。しかしながら、根こぶ病抵抗性遺伝子と連鎖した *SSR* マーカーが開発された例はない。

【0004】

【特許文献 1】

特許第 2730670 号公報

【0005】

【非特許文献 1】

Kuginukiら著, 「*Euphytica*」, 1997年, Vol. 98, p. 149 - 154

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、アブラナ科植物における根こぶ病抵抗性の新規 *QTL* に連鎖するマイクロサテライトマーカーを提供し、このマーカーを用いた根こぶ病抵抗性個体の効率的な選抜方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、2～数塩基の短いヌクレオチド単位の繰り返し配列よりなるマイクロサテライト配列に着目し、ハクサイのゲノム *DNA* から数多くのマイクロサテライト配列を単離した。これらマイクロサテライト配列の両側の塩基配列を利用することで、それぞれのマイクロサテライト遺伝子座を特異的に増幅できるマーカーに変換した。さらに、これらマーカーから罹病性個体と抵抗性個体との間で多型性を示すマーカーをまず選抜し、次いで、罹病性個体との抵抗性個体交配後代集団を用い、本病原菌に対する表現型の分離パターンと、マーカーの多型分布を調査した。その結果、*BRMS088*（配列番号：1）、*BRMS173*（配列番号：2）、*BRMS096*（配列番号：3）と *BRMS100*（

10

20

30

40

50

配列番号：4)のマーカが、飼料用カブ(系統名：Siloga)由来の抵抗性親G004に由来する根こぶ病抵抗性QTLの2つと連鎖していることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

本発明は配列番号：1、2、3および4に記載したマイクロサテライト配列を増幅しうる合成オリゴヌクレオチド配列、例えば、配列番号：5～12を提供すると共に、アブラナ科植物より抽出したDNAを鋳型とし、当該合成オリゴヌクレオチドを用いて増幅されたマイクロサテライト配列の長さの差異(多型)を調査することにより抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体を選抜する方法に関し、より具体的には、

〔1〕配列番号：1～4のいずれかに記載の塩基配列を含むDNA、

10

〔2〕以下の(a)～(d)のいずれかに記載のマイクロサテライト配列を含むDNA

(a)配列番号：1に記載の塩基配列において、55～96位のマイクロサテライト配列

(b)配列番号：2に記載の塩基配列において、150～164位または227～241位のマイクロサテライト配列

(c)配列番号：3に記載の塩基配列において、468～530位のマイクロサテライト配列

(d)配列番号：4に記載の塩基配列において、179～226位のマイクロサテライト配列

〔3〕〔1〕または〔2〕に記載のDNAをPCR法によって検出することを特徴とする、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体の識別方法、

20

〔4〕以下の(i)～(iii)の工程を含む、〔3〕に記載の識別方法、

(i)請求項1の(a)～(d)のいずれかに記載のマイクロサテライト配列を含むDNA領域を増幅する工程

(ii)増幅したDNAをゲル上で分離する工程

(iii)分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

〔5〕〔3〕または〔4〕に記載の識別方法により、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体を選抜する方法、

〔6〕アブラナ科植物がハクサイである、〔3〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕〔3〕～〔6〕に記載の方法に使用されるPCRプライマーであって、〔2〕の(a)～(d)のいずれかに記載のマイクロサテライト配列を含むDNA領域を増幅するための合成オリゴヌクレオチド、

30

〔8〕配列番号：5～12のいずれかに記載の塩基配列からなる、〔7〕に記載の合成オリゴヌクレオチド、

〔9〕〔7〕または〔8〕に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、アブラナ科植物から抽出されたDNAを鋳型とするPCR法によって増幅されるDNA、を、提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、まず、罹病性の'はくさい中間母本農7号'の展開葉よりDNAを抽出し、制限酵素Sau3AIで消化した。これをアガロースゲル電気泳動で分離後、200bp-1000bpの断片を単離し、ベクター、ZAP express(ストラタジーン社)に連結し、ゲノムライブラリーを作製した。ディゴキシゲニン(DIG、ロシュ社)標識した2塩基(GAあるいはGT)または3塩基(GCG)の15個の繰り返し配列をプローブとしてゲノミックライブラリーのスクリーニングを行い、マイクロサテライトクローンを単離した。これらクローンの塩基配列を決定後、得られた配列情報を基に各クローンあたり2種のマイクロサテライト特異的プライマーを設計した(以下マイクロサテライトマーカと記載する場合あり)。これらマーカのうち、'はくさい中間母本農7号'のDNAを鋳型としたPCRにおいて、マイクロサテライト遺伝子座を増幅しうるマーカをまず選抜した。次いで、罹病性親'はくさい中間母本農7号'および抵

40

50

抗性親 G 0 0 4 の 2 種間でマイクロサテライト配列に多型が見出されるマーカーをさらに選抜した。

【 0 0 1 0 】

一方、罹病性親 'はくさい中間母本農7号' および抵抗性親 G 0 0 4 を交雑し、その F₂ および F₃ 世代の後代集団を得た。これら F₃ 後代において根こぶ病抵抗性検定を実施し、抵抗性の程度を指標化して評価し、この値を F₂ 世代各系統の評価値として還元した。さらにこれら F₂ 後代集団の DNA を鋳型とし、上記で選抜されたマーカーを用いて PCR を行い、F₂ 集団間における各マーカー（遺伝子型）の分離と抵抗性評価値とを比較した。その結果、配列表の配列番号：1、2、3 および 4 を増幅しうるマイクロサテライトマーカー、BRMS088（配列番号：5、6）、BRMS173（配列番号：7、8）、BRMS096（配列番号：9、10）および BRMS100（配列番号：11、12）により分類された各系統の遺伝子型と抵抗性評価値との間に高い相関が見出された。従って、これらのマーカーは、根こぶ病抵抗性個体を効率的に選抜する際に非常に有効であることが判明した。これらマーカーを利用することにより、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体を容易に識別することが可能である。

10

【 0 0 1 1 】

以下に本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 2 】

本発明はまず、抵抗性遺伝子の QTL に連鎖するマイクロサテライト配列を検出することを特徴とする、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体の識別方法を提供する。

20

【 0 0 1 3 】

本発明の好ましい態様においては、抵抗性遺伝子の QTL に連鎖するマイクロサテライト配列を含む DNA の検出を行い、該マイクロサテライト配列の長さの差異に基づいて、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体であるか否かの識別（判定）を行う。上記 DNA の検出は、該 DNA を増幅できる方法であれば特に制限されないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR； polymerase chain reaction）法により、好適に実施することができる。PCR 反応の鋳型となる DNA 配列中のマイクロサテライト配列において、その配列の長さの差異が見られる場合、増幅される DNA 断片の長さにも差異が生じる。一般的に、この増幅 DNA 断片長の差は、電気泳動によってバンド

30

【 0 0 1 4 】

本発明の上記「マイクロサテライト配列を含む DNA」としては、好ましくは、配列番号：1～4のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA、もしくは該塩基配列を含む DNA を挙げることができる。配列番号：1～4に記載された配列は、それぞれ、以下に示すマイクロサテライト配列を含む。

(a) 配列番号：1に記載の塩基配列において、55～96位のマイクロサテライト配列

(b) 配列番号：2に記載の塩基配列において、150～164位または227から241位のマイクロサテライト配列

(c) 配列番号：3に記載の塩基配列において、468～530位のマイクロサテライト配列

40

(d) 配列番号：4に記載の塩基配列において、179～226位のマイクロサテライト配列

【 0 0 1 5 】

本発明においては、上記マイクロサテライト配列の長さの差異に基づいて根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体であるか否かの識別を行うことから、必ずしも、配列番号：1～4のいずれかに記載の DNA 領域全体の検出を行わなくともよい。即ち、検出すべき DNA 領域は、上記マイクロサテライト配列の長さを調べ得る程度の範囲の DNA 領域であれば特に制限されない。従って、例えば、上記マイクロサテライト配列を含む配列番号：1～4のいずれかに記載の塩基配列の部分断片 DNA を検出することによっても

50

、本発明の方法を実施することができる。尚、上記マイクロサテライト配列、および該配列を含む配列番号：1～4のいずれかに記載のDNA、並びに該DNAを含むDNAもまた本発明に含まれる。

【0016】

本発明の上記識別方法における「PCR」は、上記マイクロサテライト配列を含むDNAを鋳型（テンプレート）として、該マイクロサテライト配列を増幅し得るプライマーセット（フォワードプライマーおよびリバースプライマー）を用いることにより、当業者においては容易に実施することができる。

【0017】

また本発明は、本発明の識別方法に使用されるPCRプライマーであって、上記(a)～(d)のいずれかに記載のマイクロサテライト配列を含むDNA領域を増幅するための合成オリゴヌクレオチドを提供する。

10

【0018】

本発明において使用されるマイクロサテライト配列を増幅し得るプライマーオリゴヌクレオチドの配列は、当業者においては、鋳型となるDNAの配列情報に基づいて、適宜、設計することが可能である。より具体的には、下記のプライマーを好適に例示することができるが、これらのプライマーのみに特に限定されるものではない。下記で例示するプライマーオリゴヌクレオチドの塩基配列において、例えば、5'末端側に数ベース程度の他の塩基への置換変異を有する、もしくは5'末端側に任意の塩基が付加されたオリゴヌクレオチドであっても、本発明のプライマーとして利用することが可能であるものと考えられる。従って本発明の合成オリゴヌクレオチドは、上記マイクロサテライト配列を増幅し得るプライマーであれば、下記の配列番号：5～12のいずれかに記載の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチドに特に限定されない。配列番号：5～12のいずれかに記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、あるいは該配列において置換・付加等の変異を有するオリゴヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

20

【0019】

・上記(a)マイクロサテライト配列増幅用プライマーセット

フォワードプライマー： 5' - t a t c g g t a c t g a t t c g c t c t t c
a a c - 3' (配列番号：5)

リバースプライマー： 5' - a t c g g t t g t t a t t t g a g a g c a g a
t - 3' (配列番号：6)

30

・上記(b)マイクロサテライト配列増幅用プライマーセット

フォワードプライマー： 5' - g a g g a t g c a g t t g c t g t t g t t
- 3' (配列番号：7)

リバースプライマー： 5' - c t t c t t c g a t g g a t t c a a g a g a a
c (配列番号：8)

・上記(c)マイクロサテライト配列増幅用プライマーセット

フォワードプライマー： 5' - a g t c g a g a t c t c g t t c g t g t c t
c c c - 3' (配列番号：9)

リバースプライマー： 5' - t g a a g a a g g a t t g a a g c t g t t g t
t g - 3' (配列番号：10)

40

・上記(d)マイクロサテライト配列増幅用プライマーセット

フォワードプライマー： 5' - c t c t t g a g a a t c a g a g a g a g a t
t a c - 3' (配列番号：11)

リバースプライマー： 5' - g a t c t t c a t t a t a t t c a t c t c t c
t c - 3' (配列番号：12)

【0020】

本発明の上記オリゴヌクレオチドは、当業者においては、通常、市販されたオリゴヌクレオチド合成機もしくは合成オリゴヌクレオチド受託サービスを利用して容易に取得することが可能である。

50

【0021】

さらに、本発明の上記オリゴヌクレオチドをプライマーとして、アブラナ科植物から抽出されたDNAを鋳型とするPCR法によって増幅されるDNAもまた、本発明に含まれる。

【0022】

本発明の好ましい態様においては、例えば、以下のようにして実施される。まず、上記(a)～(d)のいずれかに記載のマイクロサテライト配列を含むDNA領域を増幅し(工程(A))、次いで、増幅したDNAをゲル上で分離し(工程(B))、分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較を行う(工程(C))。

【0023】

上記工程(A)においては、好ましくは、まず被検アブラナ科植物からDNA試料の調製(DNAの抽出)を行う。DNA試料の調製は、例えば、被検植物の葉、根、種子、カルス、葉鞘、培養細胞等を用いて行うことができるが、これらに特に限定されない。これらの植物体もしくは植物細胞からのDNAの抽出は、当業者においては一般的に公知の方法、例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)法(Murray and Thompson, Nucleic Acids Research 8, p. 4321-4325, 1980)等によって行うことができる。また、DNAの抽出処理を行わず、例えば、直接細胞破砕液等を用いてPCRを行い、本発明の識別方法を実施することも可能である。

【0024】

本発明におけるPCRは、当業者においては、その反応条件等について実験または経験によって最適な条件を適宜選択して実施することが可能である。通常、PCRは、反応液および耐熱性ポリメラーゼを含む市販の試薬キット、および市販のPCR装置等を利用して、簡便に実施することができる。

【0025】

工程(B)における、PCR増幅産物であるDNAのゲル上での分離は、通常、電気泳動によって行うことができる。電気泳動によるPCR増幅DNA断片の分離は、当業者においては、ゲルの組成、電圧、泳動時間等を適宜判断して簡便に実施することができる。

【0026】

工程(C)においては、通常、予めサイズが既知のDNA断片(例えば、サイズマーカー)を対照として、分離されたDNA断片のサイズを測定する。使用したプライマーの種類、および測定されたDNAサイズを基に、増幅されたDNAにおけるマイクロサテライト配列の有無もしくは該マイクロサテライト配列の長さを検出することができる。

【0027】

また、上記工程(B)および(C)においては、以下のような方法によって実施することも可能である。まず、増幅したDNAを一本鎖に解離させ、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する。次いで、分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する。該方法としては、例えばPCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism; 一本鎖高次構造多型)法が挙げられる。

【0028】

PCR-SSCP法においては、二本鎖DNA断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離したDNA鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖DNAが異なる位置に移動する。例えば、マイクロサテライト配列の長さの差異によっても一本鎖DNAの高次構造は変化を生じ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することにより増幅されたDNA断片に存在するマイクロサテライト配列の長さを検出することができる。また、増幅産物に多型を生じるような制限酵素認識部位がある場合は、PCR法によって増幅し、その増幅産物を制限酵素で処理した後、電気泳動を行う方法(例えば、PCR

10

20

30

40

50

- RFLP法)によっても、本発明を実施することができる。多くの品種・系統を取り扱う場合、必ずしも長さによる多型が生じないことも考えられることから、この場合は、PCR-RFLP法を好適に用いて、本発明の方法を実施することができる。

【0029】

また、増幅DNA断片のバンドの数を基に、被検植物個体が根こぶ病抵抗性遺伝子をヘテロあるいはホモとして有するかどうかについて評価することが可能である。通常、上記工程においてバンドが1本検出される場合には、「ホモ」と判定され、バンドが2本検出される場合には「ヘテロ」と判定される。

【0030】

本発明においては、被検植物DNAにおける検出されたマイクロサテライト配列の長さが、上記(a)~(d)のマイクロサテライト配列の長さと同じ場合に、被検植物は根こぶ病に対する抵抗性遺伝子(遺伝子座)を有するものと判定される。例えば、配列番号:5に記載の塩基配列からなるフォワードプライマー、および配列番号:6に記載の塩基配列からなるリバースプライマーを使用して、本発明の識別方法を実施した場合、上記(a)に記載のマイクロサテライト配列と同一の長さのマイクロサテライト配列が検出された場合、被検植物は、根こぶ病抵抗性遺伝子(遺伝子座)を有するものと判定される。

10

【0031】

本発明において根こぶ病抵抗性遺伝子を有するか否かの識別が可能なアブラナ科植物としては、例えば、ハクサイ、カブ等を挙げることができる。また、本発明の方法を実施するのに好ましい品種としては、例えば、飼料用カブ系統名Siloga(シロガ)由来の系統および品種等を挙げることができる。

20

【0032】

また本発明は、本発明の識別方法により、根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体を選抜する方法を提供する。本方法により根こぶ病抵抗性遺伝子を有するアブラナ科植物個体を効率的かつ簡便に選抜することが可能である。

【0033】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0034】

30

[実施例1] アブラナ科植物根こぶ病の新規QTLを識別するためのマイクロサテライトマーカーの同定

罹病性親'はくさい中間母本農7号'に抵抗性親G004を交雑し、そのF₁の自殖によって得られたF₂系統について、BRMS088、BRMS173、BRMS096およびBRMS100マーカーの分離を調査した。F₂の自殖により得られたF₃個体について、根こぶ病抵抗性の評価を行い、抵抗性親由来のDNAマーカーを有しない個体の抵抗性程度を検定した。

【0035】

抵抗性の評価には、2種類の根こぶ病菌、すなわち安濃菌と和歌山菌を用いた。直径9cmのピートポットに根こぶ病菌を混入した園芸培土を入れて、独立したF₂系統を自家受粉し得られたF₃の種子を1系統ずつ、5~8個を1つのピートポットに播種した。播種後、それぞれのピートポットを20,000ルクス16時間明期、8時間暗期、気温25度に調節された室内で管理した。播種から6週間後、根におけるこぶの発生程度により抵抗性程度を指標化した。指標化した数字は0,1,2,3であり、無病徴(抵抗性強)は0で、支根に1個の根こぶが発生する症状を1、支根に2個以上の根こぶが連続的に発生する症状を2、主根に根こぶが発生する症状を3で最も抵抗性が弱いことを示す(図1)。1系統について2個の反復を設け、検定試験を行った。植物体の根こぶ病発生程度を指標化し、1ピートポット毎に播種したF₃5~8個体の値を平均しF₂の解析とした。

40

【0036】

マーカー分離は以下のように実施した。F₂後代各系統の葉よりDNAを常法、例えばセ

50

チルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 法 (Murray and Thompson, Nucleic Acids Research 8, p4321-4325, 1980) により抽出した。この DNA 2 ng を鋳型として、200 μ M dNTPs、2.5 pmol オリゴヌクレオチドプライマー (4種類、配列番号: 5および6、あるいは7および8、あるいは9および10、あるいは11および12) および 1 unit rTaq polymerase (Takara社) を加え、10 μ l の反応液とし、GeneAmp PCR system 9700 (アプライドバイオシステムズ社) により PCR を行った。反応条件は、94 1分後、94 1分、60 1分、72 1分の PCR サイクルを 35 回繰り返し、伸長反応の補足のため 72 で 4 分間とした。なお、BRMS100 のプライマーセットの場合には、アニーリング温度を 60 から 50 に変更した。

【0037】

増幅産物は 0.5 mg/l のエチジウムブロミドを含む 2.5% アガロースゲルにより分離、分析した。罹病性親に由来する断片長はそれぞれ BRMS088 マーカーが 243 bp、BRMS173 が 244 bp、BRMS096 マーカーが 189 bp、BRMS100 マーカーが 128 bp であるが、抵抗性親に由来するものはこれらとは異なる断片長であるため、抵抗性親と罹病性親を確認できる (図2および図3)。遺伝子型がホモである個体での増幅産物はどちらかの親由来の1種類で、一本のバンドとして検出され、ヘテロ個体は両親由来の2種類の増幅産物が2本のバンドとして検出される。表1に各 DNA マーカーの遺伝様式を示した。

【0038】

【表1】

DNAマーカー	遺伝子型			合計
	gg	ag	aa	
BRMS088	9	47	38	94
BRMS173	8	50	36	94
BRMS096	24	51	19	94
BRMS100	24	49	21	94

【0039】

抵抗性親 (G004) に由来する DNA マーカーを g、罹病性親 (ハクサイ中間母本農7号) に由来する DNA マーカーを a で表した。すなわち、抵抗性親由来のマーカーをホモで有する場合を gg、抵抗性親と罹病性親由来のマーカーを1個ずつヘテロに有する場合を ag、罹病性親由来のマーカーをホモに有する場合を aa で表した。BRMS088、BRMS173 マーカーの分離比が理論値 1:2:1 からはずれるものの、BRMS096 と 100 は理論値に合致した分離比を示し、これらの DNA マーカーは後代に確実に遺伝することが明らかであった。表2に BRMS088 マーカーの遺伝子型を有する集団と安濃菌および和歌山菌に対する抵抗性程度 (発病指数) との関係を示した。表3に BRMS173 マーカーの遺伝子型を有する集団と安濃菌および和歌山菌に対する抵抗性程度 (発病指数) との関係を示した。

【0040】

【表2】

10

20

30

40

遺伝子型	個体数	発病指数	
		安濃菌	和歌山菌
gg	9	0.74	2.28
ag	47	1.84	2.61
aa	38	2.94	2.99
合計または平均	94	2.18	2.73

【 0 0 4 1 】

10

【表 3】

遺伝子型	個体数	発病指数	
		安濃菌	和歌山菌
gg	8	0.74	2.34
ag	50	1.83	2.60
aa	36	2.99	3.00
合計または平均	94	2.18	2.73

20

【 0 0 4 2 】

F₂ 集団 94 系統を用いて、根こぶ病の接種検定を行ったところ、94 系統の発病指数の平均は、安濃菌で 2.18、和歌山菌で 2.73 であった。94 系統の中で、抵抗性親由来の BRMS088 マーカーをヘテロに有する 47 系統は 1.84 で、さらにホモに有する 9 系統の平均は 0.74 であった。

【 0 0 4 3 】

これらに対し、抵抗性由来の BRMS088 マーカーを有しない 38 系統の発病指数の平均は、2.94 であった。また、抵抗性親由来の BRMS173 マーカーをヘテロに有する 50 系統は 1.83 で、さらにホモに有する 8 系統の平均は 0.74 であった。

【 0 0 4 4 】

30

これらに対し、抵抗性由来の BRMS088 マーカーを有しない 36 系統の発病指数の平均は、2.99 であり、ほぼすべての系統で根こぶ病菌による著しい被害を受けた。

【 0 0 4 5 】

実際栽培上は発病指数を 2 以下に抑えれば、経済栽培には支障がないと考えられるため、安濃菌に対しては抵抗性親由来の BRMS088 マーカーまたは BRMS173 を有する個体を選抜することで抵抗性の系統が得られることが明らかになった。BRMS088 と BRMS173 は Kuginukira (1997, Euphytica 98: 149-154) によって考案された根こぶ病抵抗性用の DNA マーカー RA1275 と連鎖関係にあり、2つのマーカーは同じ根こぶ病抵抗性の QTL に連鎖していると考えられる。しかし RA1275 は優性マーカーであるため、抵抗性親由来の DNA マーカーをホモに有する系統とヘテロに有する系統とを区別できない。94 系統の中で、発病指数が 1 未満の強度抵抗性個体の割合は、抵抗性親由来の BRMS088 マーカーをホモに有する 9 系統の中では 7 個体であるのに対し、ヘテロで有する系統では 47 個体中 4 個体にすぎない。同様に BRMS173 マーカーでは、8 系統中 6 個体で、ヘテロで有する系統では 50 系統中 5 個体にすぎない。したがって RA1275 では強度抵抗性個体を高頻度で選抜することはできず、BRMS088 または BRMS173 を使用する優位性が確認できた。

40

【 0 0 4 6 】

一方、和歌山菌に対しては、抵抗性親由来の BRMS088、BRMS173 マーカーをホモに有しても発病指数が 2.28、2.34 であり、抵抗性の素材を選抜するには不十

50

分であった。94系統に別の集団20系統を加えた合計114系統について和歌山菌についての抵抗性を調べた。表4および表5にBRMS088とBRMS096およびBRMS100の、表6および表7にBRMS173とBRMS096およびBRMS100マーカーの各遺伝子型を有する集団と和歌山菌に対する抵抗性程度（発病指数）との関係を示した。

【0047】

【表4】

遺伝子型		個体数	発病指数
BRMS088	BRMS096		
gg	gg	7	0.80
	ag	3	2.23
	aa	4	2.94
ag	gg	22	2.01
	ag	28	2.69
	aa	10	2.99
aa	gg	15	2.91
	ag	20	2.99
	aa	5	2.98
合計または平均		114	2.56

10

20

【0048】

【表5】

遺伝子型		個体数	発病指数
BRMS088	BRMS100		
gg	gg	6	0.78
	ag	3	2.23
	aa	5	2.54
ag	gg	22	2.01
	ag	28	2.69
	aa	10	2.99
aa	gg	14	2.96
	ag	19	2.99
	aa	7	2.86
合計または平均		114	2.56

30

40

【0049】

【表6】

遺伝子型		個体数	発病指数
BRMS173	BRMS096		
gg	gg	6	0.64
	ag	3	2.23
	aa	4	2.94
ag	gg	25	2.00
	ag	29	2.70
	aa	11	2.98
aa	gg	13	3.00
	ag	19	3.00
	aa	4	3.00
合計または平均		114	2.56

10

【 0 0 5 0 】

【 表 7 】

遺伝子型		個体数	発病指数
BRMS173	BRMS100		
gg	gg	6	0.64
	ag	3	2.23
	aa	4	2.94
ag	gg	25	2.02
	ag	29	2.70
	aa	11	2.91
aa	gg	13	3.00
	ag	19	3.00
	aa	4	3.00
合計または平均		114	2.56

20

30

【 0 0 5 1 】

全体の発病指数の平均は 2.56 であり、抵抗性親由来の DNA マーカー BRMS088 をヘテロで BRMS096 (または BRMS100) をホモに有する 22 系統は発病指数が 2.01 となり、さらに BRMS088 と BRMS096 をホモに同時に有する 7 (BRMS100 では 6) 系統は発病指数が 0.80 と著しく低下し、強度抵抗性を示した。

【 0 0 5 2 】

また抵抗性親由来の BRMS088 と BRMS096 の 2 つのマーカーを、両方もしくはどちらか一方を有しない 5 系統、つまり BRMS088 と BRMS096 の両方もしくはどちらかが aa タイプの発病指数は、それぞれ 2.94、2.99、2.91、2.99、2.98 であった。

40

【 0 0 5 3 】

さらに抵抗性親由来の DNA マーカー BRMS173 をヘテロで BRMS096 (または BRMS100) をホモに有する 25 系統は発病指数が 2.00 となり、さらに BRMS173 と BRMS096 をホモに同時に有する 6 (BRMS100 でも 6) 系統は発病指数が 0.64 と著しく低下し、強度抵抗性を示した。

【 0 0 5 4 】

50

また抵抗性親由来のBRMS173とBRMS096の2つのマーカーを、両方もしくはどちらか一方を有しない4系統、つまりBRMS088とBRMS096の両方もしくはどちらかがaaタイプの発病指数は、それぞれ2.94、2.98、3.00、3.00、3.00であり、いずれも和歌山菌に対して罹病性であった。BRMS100はBRMS096と連鎖関係にあり、BRMS096とほぼ同じ効果を示した。以上のように抵抗性親由来のBRMS088とBRMS096またはBRMS100およびBRMS173とBRMS096またはBRMS100のDNAマーカーをホモにもつ個体を選抜することによって、多犯性の和歌山菌に対して極めて選抜の効果が高かった。

【0055】

これら4種のマーカーは、根こぶ病抵抗性主導遺伝子及び補足的に作用するQTLに連鎖するものであり、かつ、アブラナ科植物の根こぶ病抵抗性の選抜マーカーとして極めて有効であることが示された。

10

【0056】

なお本発明によるDNAマーカーの選抜効果は、飼料用カブ系統名「Siloga」を由来とする系統を抵抗性親に用いた場合に有効である。「Siloga」を由来しない抵抗性親を用いた場合には、鎖長の異なるDNA断片が生じる場合がある。

【0057】

【発明の効果】

本発明により、アブラナ科植物根こぶ病の新規QTLを識別するためのマイクロサテライトマーカーが提供され、単独または4つのマイクロサテライト遺伝子座をPCRによって増幅し、そのサイズを調べることで、抵抗性の強弱を簡便かつ精度高く判別することができる。この方法により抵抗性個体の選抜が容易になり、また、共優性マーカーの特性上、導入した抵抗性QTLの固定の判別が極めて容易になる。したがって、アブラナ科植物の根こぶ病抵抗性品種育成が大幅に効率化されることになる。

20

【0058】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Agricultural Research Organization

<120> Micro-satellite DNA makers for detecting resistant genes against clubroot disease in Cruciferae, and use thereof

10

<130> ARO-X0203

<140>

<141>

<160> 12

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 353

<212> DNA

<213> Brassica rapa

30

<400> 1

```

gatcaaaacc ttatcggtag tgattcgtc ttaactacg ccgggagggtt accttctctc 60
tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctcgtgg tgctaggaat atgttttgcg 120
tctcatcggt ctcagctctgt tactttgctt ctgttttttt ttaaactggt acacgcaatt 180
acttgcagtc caagtaacct gagaagcctt tagacttgca atctgctctc aaataacaac 240
cgatggactt actgaancaa ttgtgaanct tccattgcaa gaagaactcn aggtctcata 300
cagctcactc tcagctgagt ccttgaaagt tgtaggccgg tcttgtcttg atc      353

```

40

<210> 2

<211> 484

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 2

catcigaigc tgcggctgag gtaggtgatg ctggtagga tgcagttgct gttgttgctg 60
 ctggtagc tgaggctgat gcggtgcgag agagcccga aggtaagcgg tggtagcag 120
 ccigagaigt ggaggtagga cccattagcg cggcggcggc ggcgttaggg tiacggttgt 180
 aggagcccat taggaacca ggaggtaggt gaagctgctg atgctgttgt tgttgttgtt 240
 gcigtgttg gtaggttct ctgaaacca tcgaagaagg gttagagaaa gtaaaggaag 300
 aaactttctc ttgggttaa ttagggtaa taattttctc gtgagacca gtttttttc 360
 ttttttctg tttcgcaat tccgagataa tagacgagaa agtggagggt tttgagtttt 420
 aggcgaaaagc gtgtgagcta gctaacacca gagatattag agagagagag agagagagag 480
 agac 484

10

20

<210> 3

<211> 605

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 3

gatcttctat catacgtttt ggaaccaca tgcaactctc tgctttgctt ttatatctac 60
 caagtgactt ggttctttaa gaacggttcc tgccgtgttt gccaatgctc ccgigtgtgt 120
 agctttaggc gtttacttt tetcaattaa aattttggta tactcttita ttagattcat 180
 ccatcaagac tcttctcca catctttac ttcttggtaa actcataatt acagtgaaca 240

40

cagattcigg aactttcag aaccaataat tgctaatac aatattaaag cttctgaaat 300
 caaccgaagc agagagaagg tatgatttaa tttccttggg igttagtaa acggtgcaag 360
 cctaaaaggt attcagcata tcaatatcga atgactaatc ttttaacagt cgagatctcg 420
 ttcgtgtctc ccaagtctga acctgggtt tngcccaatc gctctcgtct ctctctctct 480
 ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct gigtccaatg 540
 aacaagtctc tetctctccc atggtgtggc tcaacaacag ctccaatct tcttcaacat 600
 tgatc 605

10

<210> 4

<211> 243

<212> DNA

<213> Brassica rapa

20

<400> 4

gatcccatct tgccactgag ttgactcgtt aacatcgtec caccaattct tcatccccgt 60
 cgccggagiat igtgctatct tttccggtaa tgatggatta cacttcccta atccgctctt 120
 gagaatcaga gagagattac ttgtttatat atatgcaaaa cctctctggtc ngatggcaga 180
 gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagatgaa tataatgaag 240
 atc 243

30

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

40

<400> 5

tatcggctact gattcgtctt tcaac

25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

10

<400> 6

atcggttggtt attgagagc agat

24

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

30

<400> 7

gaggatgcag ttgctgttgt t

21

40

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

cttcttcgat ggattcaaga gaac

24

10

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

agtcgagatc tcgttcgtgt ctccc

25

30

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

tgaagaagga ttgaagctgt tgttg 25

10

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

20

<400> 11

ctcttgagaa tcagagagag attac 25

30

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

40

<400> 12

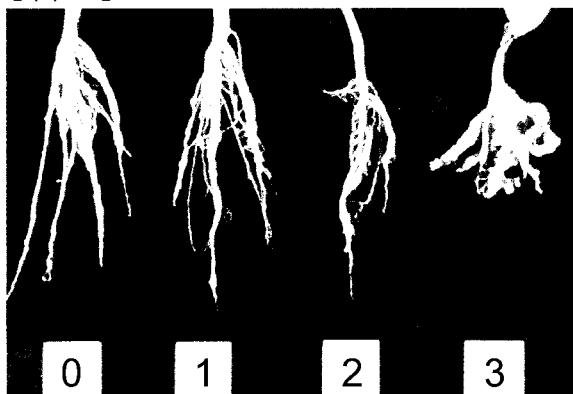
gatcttcatt atattcatct ctctc 25

【図1】根こぶ病の発病程度を示した根の写真である。0：発病なし（抵抗性）、1、2、3：発病（罹病性）

【図2】各プライマーペアを用いてPCR後、増幅産物を2.5%アガロースゲルで分離した場合の泳動像（両側にDNAマーカー、左より抵抗性親型、罹病性親型、ヘテロ型の各泳動パターン）写真である。

【図3】各プライマーペアを用いてPCR後、増幅産物を2.5%アガロースゲルで分離した場合の泳動像（両側にDNAマーカー、左より抵抗性親型、罹病性親型、ヘテロ型の各泳動パターン）写真である。

【図1】



【図2】

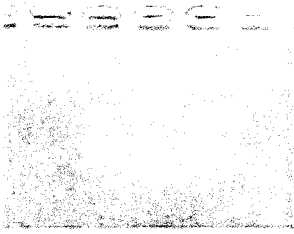
BRMS088

BRMS173

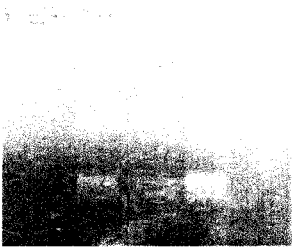


【 図 3 】

BRMS096



BRMS100



フロントページの続き

(72)発明者 塚崎 光

三重県安芸郡安濃町大塚 2 4 1 番地 C - 2 0 1 号

(72)発明者 諏訪部 圭太

三重県津市河辺町 3 0 8 1 - 7

(72)発明者 藤村 みゆき

三重県安芸郡芸濃町棕本 8 9 2 番地 1 6 5

F ターム(参考) 4B024 AA07 AA11 CA01 CA09 CA11 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ04 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QR82

QS25 QS34 QS36 QX02