

ふ り が な モハマド アサド ウド ドウラ  
氏 名 Md. Asad ud-doullah  
学 位 博 士 ( 学 術 )  
学 位 記 番 号 新大院博 ( 学 ) 第 173 号  
学位授与の日付 平成 18 年 9 月 21 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博 士 論 文 名

Screening and analysis of resistance to dark spot (*Alternaria brassicicola*) and black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) in *Brassica* crops

(アブラナ科作物の黒すす病と黒腐れ病菌に対する病害抵抗性の品種スクリーニングと病害抵抗性の遺伝分析)

論文審査委員 主査 教授 池田 武  
副査 教授 福山利範  
副査 教授 新美芳二  
副査 教授 堀 秀隆  
副査助教授 岡崎桂一

#### 博士論文の要旨

キャベツ、ブロッコリ (*Brassica oleracea*)、カブ、ハクサイ、ツケナ類 (*B. rapa*) などのアブラナ科野菜は重要な野菜のひとつであるが、その生産においては、各種の病害が生産上の問題となる。各種病害のうち、黒すす病、黒腐れ病はもっとも重要な病害のひとつである。前者の黒すす病は、糸状菌 (*Alternaria spp*) が、葉、茎、さく果に感染し、褐色や黒色の同心円上の病斑を生じるものである。黒腐れ病は、細菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) によって葉縁部の葉脈を中心に V 字型に広がった黄色病斑を生じる導管病であり、ひどくなると茎の導管部まで黒変する。両病害とも圃場では被害残さから感染するほか、種子伝染する。このため、特に黒すす病菌はナタネ油生産に大きな被害をもたらしている。

そこで、本研究では、*B. rapa* の幼苗期と登熟期のさく果における黒すす病の発病要因 (孢子濃度、葉位、植物体の齢、温度) を検討し、抵抗性程度を簡易に検定する方法を開発した。さらに、多数の品種の抵抗性をスクリーニングし高度抵抗性を示す品種を探索した。同様に *B. oleracea* の抵抗性素材 (品種) のスクリーニングも行った。次に、スクリーニングで得られた抵抗性品種が持つ抵抗性遺伝子の解析を行うため、抵抗性系統と罹病性系統の交雑後代を用いて、連鎖地図の作成、遺伝分析、QTL 解析を行った。QTL 解析については細菌苗の黒腐れ病についても行った。その概要は以下の通りである。

1) 黒すす病検定法として、播種後 30 日齢の実生の接種 (実生接種) と播種後 30 日齢の植物体から第 3, 4 葉を採取し容器内で接種する方法 (以下、切除葉接種法) を比較した。どちらの方法とも、各品種の感受性程度が識別可能であり、両法によって判定した各品種の発病指数の間には高い相関関係 ( $r=0.76, n=42, p<0.001$ ) があつた、切除葉接種法の病徴発現

が、実生接種法より早く安定していた。さらに、切除葉接種法は、接種条件をインキュベーター内で正確に設定できるほか、省力的に行えるため、抵抗性品種を絞り込むための予備スクリーニング法として適していると考えられた。病徴発現に影響する要因として、老化した葉は若い葉より罹病性になることや、葉位が異なっても出葉からの日数が同じであれば、罹病性の程度に差がないことが明らかになった。これらの要因のほか、散布液の孢子濃度、インキュベーション温度の試験結果を考慮し、標準的な切除葉接種法として、播種後 30 日齢の植物体の第 3, 4 葉の切除葉を用い、接種箱内に置き、 $5 \times 10^4$  個/ml の孢子懸濁液を葉の上面に均一に散布し、接種箱内を飽和湿度にし、20-25℃で 3 日置く方法が考えられた。

2) 上記の切除接種法を用いて *B. rapa* の幼苗（播種後 30 日）を用い 281 品種スクリーングしたところ、‘時なし体菜’、‘矢島カブ’、‘ぶらら’、‘ノウリン F<sub>1</sub> べか菜’、‘立岩カブ’が黒すす病に対して比較的強い抵抗性を示した。

3) *B. oleracea* の幼苗（播種後 30 日）を用い抵抗性素材（40 品種）のスクリーングを行ったところ、‘麗峰’から育成した DH 系統が比較的強い抵抗性を示したが、他の品種はすべて罹病性であった。また、葉表面をティシュペーパーでこすり表面のワックス層を部分的に除去した葉の接種区と無処理区を比較したところ、罹病性程度に差がなかった。

4) 黒すす病は油糧のナタネ (*B. rapa*) の生産に大きな被害をもたらすので、登熟過程のさく果に対する接種要因を検討したほか、43 品種を用い高度抵抗性品種を検索した。各種の接種条件の検討結果から、切除さく果接種法とし、交配後 25 日のさく果を接種箱内に置き、 $5 \times 10^3$  個/ml の孢子懸濁液をさく果の上面に均一に散布し、接種箱内を飽和湿度にし、至適温度は 20-25℃で 2 日置くと多数の品種の抵抗性程度の差が明瞭に示されることがわかった。

品種スクリーングの結果、‘矢島カブ’、‘サイシン’、‘下総カブ’が抵抗性、‘スワン’、‘あゆみ’、‘おそめ’、‘沖縄カラシナ’の 4 品種がやや抵抗性と判定された。

5) 次に、スクリーングで得られた黒すす病抵抗性品種が持つ抵抗性遺伝子の解析を行うため、抵抗性系統と罹病性系統の交雑後代を育成し、黒すす病抵抗性の遺伝率を求めた。その際、F<sub>2</sub> 集団の分散を用いた場合（以下 F<sub>2</sub> 値）と各 F<sub>2</sub> 個体を自家受粉して育成した F<sub>3</sub> 系統の平均値を F<sub>2</sub> 個体の値として分散を計算した場合（以下、F<sub>2</sub>(F<sub>3</sub>) 値）を行った。その結果、*B. oleracea* の広義の遺伝率は、F<sub>2</sub> 値を用いた場合は 70%、F<sub>2</sub>(F<sub>3</sub>) 値を用いた場合は 33.0%であった。*B. rapa* の広義の遺伝率は F<sub>2</sub> 値を用いた場合には 45.0%、F<sub>2</sub>(F<sub>3</sub>) 値を用いた場合では 26.0%であった。さらに、*B. rapa* については狭義の遺伝率も求めその値は 25.0%であった。*B. rapa* と *B. oleracea* の F<sub>2</sub> 値を用いた広義の遺伝率は比較的高かったものの、F<sub>2</sub>(F<sub>3</sub>) 値を用いた計算では、広義の遺伝率は低かった。これは、F<sub>3</sub> 系統では優性効果が減じられ広義の遺伝率は低くなったものと思われた。以上の結果、黒すす病抵抗性の狭義の遺伝率は低いと推定され、育種集団における本抵抗性の選抜に際しては、十分な接種検定を行い抵抗性程度を正確に把握し、選抜必要性があると考えられた。

6) 本研究で同定された黒すす病菌抵抗性の QTL(Quantitative trait loci)を同定するため、抵抗性の DH 麗峰（キャベツ系統）× DH GC（ブロッコリ系統）の交雑後代において、CAPS および SRAP マーカーを用いた連鎖地図を作成するとともに、QTL 解析を行った。また、DH 麗峰と DH GC

(ブロッコリ系統)の交雑後代において、CAPS および SRAP マーカーを用いた連鎖地図を作成するとともに、QTL 解析を行った。また、DH 麗峰と DH GC は、細菌病の黒腐れ病菌に対してそれぞれ抵抗性と罹病性であることが予備実験でわかったので、本病害抵抗性も合わせて分析した。各  $F_2$  個体を自家受粉して育成した  $F_3$  系統の平均値を  $F_2$  個体の値として QTL をもとめた。その結果、38 CAPS マーカーと 60 SRAP マーカーを含む 10 連鎖群が得られた。全長 320.5cM であった。黒すす病の接種検定では、DH 麗峰は発病指数 3.1、DH GC は発病指数 7.0 を示し、 $F_2$  の発病指数は 2.67～7.5 の範囲であった。黒すす病抵抗性に関する QTL は第 2 連鎖群の CAM1 - GSA1 間と第 7 連鎖群の IPI - FLC3 の間に得られた。

黒腐れ病の接種試験では、DH 麗峰は発病面積  $0.49\text{cm}^2$ 、DH GC は発病面積  $2.22\text{cm}^2$  を示し、 $F_2$  の発病面積は  $0.16\sim 2.11\text{cm}^2$  の範囲であった。黒腐れ病抵抗性に関する QTL は第 2 連鎖群の DGAT-GSA1 および第 9 連鎖群の F12-R12e-BORED 間に得られた。それぞれの QTL の寄与率は、10% と 16% であった。第 2 連鎖群の QTL はの DH GC の遺伝子座が抵抗性に働き、第 9 連鎖群の QTL は麗峰の遺伝子座が抵抗性に寄与していた。

#### まとめ

本研究では、品種の抵抗性程度を簡易に判定するため、いろいろな発病要因を調べ、品種の抵抗性程度が正確に判定できる切除葉接種および切除さく果接種の接種条件を示した。この方法は今後、黒すす病の耐病性育種に寄与するものと思われた。また、本スクリーニング法を用いることにより、幼苗期では‘江戸の夏’、‘さおり’、登熟期のさく果ステージでは‘矢島カブ’が高度抵抗性を示すことを示した。これらは、ハクサイ、ツケナ類 (*B. rapa*) などのアブラナ科野菜の重要な遺伝資源となるばかりでなく、油糧のナタネ (*B. rapa*, *B. napus*) の品種改良へも利用されることが期待される。遺伝解析では、黒すす病の対する抵抗性に寄与する QTL を 2 つ、黒腐れ病抵抗性に関する QTL を 4 つ同定した。これら QTL の近傍に位置する分子マーカーの情報は耐病性の marker-assisted selection を進めるうえで有効と思われた。

#### 審査結果の要旨

以上のように、本研究は、アブラナ科植物の耐病性育種および病害抵抗性の遺伝機構に新知見を与えるものであった。よって、本論文は博士(学術)の博士論文として充分であると認定した。