

信州大学審査学位論文

長野県の主要園芸作物における
夏季の耐ストレス機構の解明と育種法の開発

2021年3月

関 功介

目次

要約	・・・	2
序論	・・・	4
第1章 カーネーションのハダニ耐虫性育種		
緒言	・・・	6
第1節 カーネーションのハダニによる被害の実態把握	・・・	7
第2節 カーネーションのナミハダニ黄緑型に対する感受性品種の存在	・・・	14
第3節 カーネーションのナミハダニ赤色型に対する耐虫性機構の解明	・・・	21
総括	・・・	39
第2章 レタスの高温適応性育種		
緒言	・・・	41
第1節 レタスの高温適応性関連形質を支配する遺伝子のマッピング	・・・	43
第2節 レタス根腐病レース1 高度耐病性個体選抜法の開発	・・・	88
第3節 容易なゲノム DNA 抽出方法の確立	・・・	106
総括	・・・	113
第3章 <i>Brassica oleracea</i> L.における黒斑細菌病に対する罹病性指標としての 葉の表面構造解析	・・・	115
総合考察	・・・	138
謝辞	・・・	144
引用文献	・・・	145

要約

長野県での農業の最大の特徴は夏季でも冷涼な気候を利用した栽培体系を組めることである。産地を変えながら周年栽培されるような主要園芸作物では、季節によって産地がリレーすることから、長野県が主として生産を担当している夏季に発生する問題は長野県が独自に解決を試みる必要がある。そこで本論文では、夏季に発生する問題解決に向けて、第1章でカーネーションのハダニ耐虫性育種、第2章でレタスの晩抽性、生理障害耐性、および根腐病耐病性育種、第3章で *Brassica oleracea* L. の黒斑細菌病耐病性育種の課題解決に取り組むための多面的な形質評価や新たな育種技術の開発を試みた。

第1章では、まずカーネーションに被害を与えるハダニ種の同定を行ったところ、カーネーションだけを生産している場合にはナミハダニ赤色型が、他の農作物も栽培している場合にはナミハダニ黄緑型が優占種として発生していることがわかった。栽培圃場でナミハダニ黄緑型の被害を受けやすい系統「Di-24」と受けにくい系統「Di-7」を実験に供試したところ、カーネーション品種の中にはナミハダニ黄緑型が適応しやすい品種が存在することが示唆され、育成段階から耐虫性を選抜項目に加え感受性個体を選抜の過程で落とすことで、ナミハダニ黄緑型による被害を未然に防ぐことができる可能性が考えられた。次に、カーネーションの自殖で作出した近交系集団からナミハダニ赤色型に対する耐虫性個体と感受性個体を選び出して食害痕を顕微鏡で観察したところ、葉内部の裏側にある柵状組織の厚さに違いが認められた。さらに葉裏の表面から海綿状組織までの距離が長い品種はナミハダニ赤色型の内的自然増加率が低いことが明らかとなった。また圃場試験では、葉裏から海綿状組織までの距離が 120 μ m 以上の品種では被害が顕著に少なく、孵化から成虫化までの間の初期の生育ステージで海綿状組織を吸汁できるかどうかナミハダニ赤色型の生育および増殖に重要な要素であることが示唆された。これらの知見から葉裏表面から海綿状組織までの距離をマーカーとして、実際の栽培環境下でもナミハダニ赤色型に耐虫性を示す個体を選抜する技術を開発することができた。

第2章では、玉レタスのエンパイヤ型（鋸歯状葉）とサリナス型（波状葉）を用いた圃場栽培試験で夏季に問題となる生理障害のチップバーンと抽苔性について調査したところ、エンパイヤ型はサリナス型に比べてチップバーン感受性が高く、晩抽性となる傾向が認められた。そこでエンパイヤ型とサリナス型の交配で作出した F₂ 集団を用いて、葉先の形状と抽苔性の ddRAD-seq による遺伝的マッピングを試みた。これらの解析から、葉先の形状は LG5 の単一遺伝子座によって制御されていることが明らかとなった。さらに詳細なマッピングと RNA-seq により、CIN 様 TCP 転写因子をコードする遺伝子がこの遺伝子座の候補遺伝子であることが判明し、この遺伝子を *LsTCP4* と命名した。エンパイヤ型の対立遺伝子にはレトロトランスポゾンが挿入されており、葉での転写レベルはサリナス型よりも低かった。さらに、TCP ファミリータンパク質は FT との相互作用により開花時期を制御していることが知られていることから、*LsTCP4* がレタスの葉先の形状と抽苔性の両方に多

面的な効果を与えている可能性が高いと考えられた。これらのことから、より具体的な玉レタスの育種戦略を立てることが可能となった。次にレタス品種のレタス根腐病レース 1 に対する耐病性の向上を試みた。このフザリウムによって引き起こされる病害は、夏季の主要病害の一つであり、既存の耐病性品種が高温期に打破されてしまうようになったため、レース 1 に対する耐病性の向上は喫緊の課題となっていた。高度耐病性品種「VI185」と部分耐病性品種「シナノグリーン」の交配で得られた分離集団を用いた QTL 解析の結果、2 つの主要な因子が検出され、その 2 つとも高度耐病性品種「VI185」に由来していた。これらの結果は、レタス根腐病レース 1 に対する耐病性因子を理解するための基礎的知見を提供し、*qFOL7.1* と *qFOL8.1* の 2 つの領域を導入することで既存のレタス品種の耐病性を向上させることが可能であることを示した。育種の場合には、レタスで DNA マーカーを利用した個体選抜を行うには PCR に必要なゲノム DNA を多検体から迅速に抽出する実用性の高い方法を確立する必要がある。そこで、ガラス繊維濾紙をピペットチップ内に入れてゲノム DNA の粗抽出液および 2 種類の洗浄液をそれぞれ数回ピペッティング操作するだけで、PCR の増幅産物が安定的に得られるゲノム DNA を簡易に抽出できる方法を確立した。

第 3 章は、*B. oleracea* L. の黒斑細菌病耐病性育種を目指した検討を行った。この病害は夏季の降雨により、Glossy タイプのワックスを有する品種で多発することが知られている。Glossy タイプの葉の表面構造に罹病性となる要因が存在すると考えられたために葉の表面構造に関する詳細な解析を行った。非破壊で解析を行うため、赤外分光法である偏光変調赤外反射吸収分光法(PM-IRRAS)と全反射減衰赤外分光法(ATR-IR)で分析した結果、葉表面に近いより外側のクチクラ領域にヘミセルロースであるキシランとキシログルカンが存在し、より内側のクチクラ領域(深さ 2 μ m 以下)にはペクチンが多く存在していることが示唆され、クチクラ表面を覆うワックスの特性を明らかにすることができた。*Pseudomonas* は概ね数 μ m の大きさであることと、多くの微生物がキシランを分解できるキシラナーゼを有していることを考慮すると、Glossy タイプが罹病性になってしまう要因として、葉表面から数百 nm の範囲内に局在しているキシランなどの多糖類を病原菌が基質として利用できる可能性が考えられた。

序論

古来より人類は植物に手を加え、自身の生活を豊かにしてきた。生活の道具として、または食料として利用している植物のほとんどは、人類が意図的にその形状や食味などを改良してきたものである。人類は野生植物から好ましい形質を持つ植物を選び出し、長い時間をかけて植物の栽培化を実現してきた。植物を有効に利用する営みが農業であり、有用な形質を持つ新しい植物を作り出すことが育種である。人類の生活を支えるため、安定的かつ持続的に植物の供給を維持出来るように、今でも絶えず植物の改良は続けられている。農業は人工的に制御された環境下で行うものだが、自然と完全に切り離すことはできない。そのため農業は、栽培している植物が病害虫による被害を受けるリスクを常に抱えており、または環境によって変化する各種ストレスとも常に向き合ってきた。育種は、このような外的環境に起因するストレスに適応できる新しい植物を生み出し続ける使命を負っている。

地球規模での気候変動の影響を受けて異常気象が常態化してきている昨今、夏季の最高気温が次々と更新されるような現状では、都市部に近くて高標高地を有した長野県は日本において貴重な地域となっている。その長野県での農業の最大の特徴は夏季でも冷涼な気候を利用した栽培体系を組めることである。産地を変えながら周年栽培されるような主要園芸作物では、季節によって産地がリレーすることから、長野県が主として生産を担当している夏季に発生する問題は長野県が独自に解決を試みる必要がある。野菜類では特にレタス、ハクサイなど葉物野菜の夏季生産量は長野県が9割近くのシェアを有しており、高標高地を活かした高原野菜としてのブランドを確立している。キャベツは群馬県の生産量には敵わないものの、長野県産は食味が良いと高評価を得ており、農業政策上も重要な品目となっている。花き類では、カーネーション、トルコギキョウ、アルストロメリアなど国内トップの生産量がある。特にカーネーションは品質および生産量が他の産地と比べて群を抜いており、国内最大級の生産組合も夏季の高品質生産に向けて絶えず努力を続けている。

夏季に生育する植物にとってストレスになりうる主要な外的要因には、病害虫、温度、水分などが挙げられ、耐病虫性、高温適応性、耐湿性、耐乾燥性などを向上させた品種開発がいろいろな品目において進められている(Da Costa and Jones 1971; Scott and Gordon 2009; Argyris et al. 2011; Matsumoto et al. 2012; Kudo et al. 2014)。農作物をとりまく環境には多様な害虫や病原菌が常に存在している。動けない植物はこれらと必然的にせめぎあって生育せざるを得ないため、害虫や病原菌による攻撃に対して独自の防御機構を発達させてきた。特に、夏季の農業生産にとって耐病虫性は非常に重要な課題である。耐病虫性を有した遺伝資源の探索や、その防御機構解明を軸に品種育成が進められてきているが、害虫の取扱いが難しいなどの理由から耐病性に比べて耐虫性品種の選抜は困難を伴う。それゆえ育種にかなりの時間を要し、さらに多くの害虫は長距離を移動することが可能であるため既存の耐虫性品種を食害できるバイオタイプの出現リスクなども存在し、耐虫性品

種として実用化された品種は極めて少ない。一方で、害虫に比べ病原菌の扱いは容易である場合が多く、栽培圃場で選抜を行いやすいことなどから耐病性品種として実用化された品種はこれまでに数多く存在する。その防御機構はかなり詳細に調べられており、多くの場合は病原菌の侵入を感知して防御応答を誘導する役割を持つ **NBS-LRR** (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat) 遺伝子が抵抗性因子として機能している。この遺伝子の DNA マーカーを用いた戻し交配などにより、短期間で新品種の育成を可能とする育種方法が既に一般的となっており、耐病性品種育成に拍車をかけている。

また、植物にとって温度は非常に重要な環境要因であり、日々変化する温度に適応できる色々な仕組みを有している (Bohnert et al. 1995)。過度な低温は植物体内の水分を凍結させて細胞構造を破壊してしまい、過度な高温は細胞内のタンパク質を不可逆的に変性させて深刻な障害を起こしてしまう恐れがある。そのような事態を避けるために植物は温度ストレスに適応するための様々なメカニズムを有している。例えば、転写活性化因子である **DREB** (dehydration-responsive element-binding protein) は環境ストレスにより発現が誘導され、生体膜の保護や細胞内浸透圧の調節などに関わる遺伝子の発現を調節していることが知られており (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2001; Sakuma et al. 2002)、ストレス応答性遺伝子群のプロモーター領域に存在するシス因子の **DRE/C-Repeat** 配列 (TACCGACAT) を認識して結合することで、各種遺伝子の発現を促進する (Sakuma et al. 2002; Maruyama et al. 2004)。遺伝子導入で得られた **DREB** 過剰発現体ではストレス耐性が向上することが、イネ、コムギ、オオムギ、トマト、レタスなどで確かめられている (Hsieh et al. 2002; Chen et al. 2008; Morran et al. 2011; Kudo et al. 2014)。高温ストレスを含めて浸透圧変化に伴う生理現象が基になっているために複数の耐性が同時に向上することが多いが、レタスの **DREB** 過剰発現体の場合は耐塩性の向上が認められたものの、耐高温性および耐低温性の向上は認められなかった (Kudo et al. 2014)。そのため、これまでにモデル植物等で得られた知見を活用した逆遺伝学ではなく、ストレス耐性に優れた遺伝資源を交配親に用いた、遺伝学に基づく育種戦略で品種育成を行うのが妥当だと考えられている。

これらストレス耐性を有した品種の育成を実現するためには、その機構解明から実用化まで長い時間を要するため、効率的かつ安定した選抜法の開発が不可欠であり、植物資源だけでなく、これまでの経験から得られた体系的な知識や技術も次世代へと確実に継承して育種を継続していくことが大変重要となる。

そこで本論文では、長野県の夏季における園芸作物栽培、中でも農業政策上重要な作物であるカーネーション、レタスおよび *B. oleracea* L. の栽培において発生する問題解決を目指した研究を行った。具体的には、第 1 章でカーネーションのハダニ耐虫性育種、第 2 章でレタスの晩抽性、生理障害耐性、および根腐病耐病性育種、第 3 章で *B. oleracea* L. の黒斑細菌病耐病性育種の課題解決に取り組むための多面的な形質評価や個体選抜を迅速にする DNA マーカー、形質マーカーの開発を試みた。

第1章 カーネーションのハダニ耐虫性育種

緒言

夏季のカーネーション生産を担っている長野県においてナミハダニ(*Tetranychus urticae* Koch)の寄生は食害痕が白く目立つため、切り花の観賞用としての商品価値が損なわれてしまう。特に、活動が活発となる夏季の被害が顕著であるため、夏季のカーネーション生産を担っている長野県においては、高品質生産を脅かす大きな課題となっている(Fig.1-1-1)。ナミハダニは世界的な農業害虫であり、最も広食性な害虫の一つである。急速な発育能力、高い増殖力、および殺ダニ剤に対して迅速に抵抗性を獲得できることなどが知られている(Van Leeuwen et al. 2010)。ナミハダニは、有毒な化合物を蓄積することが知られている種を含め、140種以上の植物科に属する1100種以上の植物を宿主として利用することができる。最近、ナミハダニの完全なゲノム配列が報告され、そのゲノムサイズは90 Mbと節足動物のゲノムとしては非常に小さいものであった。植物の二次化合物の消化・解毒に関わる遺伝子群を多く有しているなどのゲノムの特徴は、本種の広い宿主範囲と一致していると考えられた(Grbić et al. 2011)。本種には黄緑色(Fig.1-1-2A)と赤色(Fig.1-1-2B)の体色で区別される2つの形態があり、宿主の嗜好性が異なることが知られている。ナミハダニによる経済的な被害は甚大であるため、その被害を軽減するために殺ダニ剤の散布が行われるが、ナミハダニにはその殺ダニ剤に対して急速に抵抗性を獲得できる能力があり、殺ダニ剤散布に依存した対処法だけでは、被害を抑え込むことはできないのが現状である(Khajehali et al. 2011)。したがって、ナミハダニなどの害虫による被害を受けないようにカーネーションなどの切り花を生産するためには、総合的病害虫管理(Integrated Pest Management: IPM)が非常に重要となる。殺虫剤や殺ダニ剤の散布や耕種的防除法などの複数の技術を利用して害虫の個体群の増殖を抑制するIPMにとって、宿主植物の耐虫性は重要な手段となりうる。IPMをさらに強化するためには、宿主植物の耐虫性機構を詳細に理解した上で農業技術として発展させる必要がある。ナミハダニによる被害には品種間差異があり、植物の一次代謝産物だけでなく二次代謝産物の質や量にも影響されていると考えられる(Schoonhoven et al. 2005)。植物の二次代謝産物のなかには、毒素、生育抑制、消化抑制などの効果が認められる物質があることが知られている。ウリ科に含まれるククルピタシンは苦味のあるトリテルペノイド化合物であり、ナミハダニなどの害虫に対して毒性を示す(Da Costa and Jones 1971; Balkema-Boomstra et al. 2003)。キュウリなどとは異なりカーネーションでは明確なハダニ類耐虫性がある遺伝資源は同定されていないが、カーネーションのハダニ類被害には品種間差異があると生産現場では言われており、ハダニ類による被害が軽度な品種から重度な品種までであるとされている(Poe and Wilfret 1972)。その要因は明らかにされていなかったため、ハダニ類による被害の実態把握やハダニ類耐虫性機構の解明を行い、効率的な選抜法の開発を試みた。

第1節 カーネーションのハダニ類による被害の実態把握

1. 緒言

ハダニ類は、気温が下がるとパイプの中や耕運機などの管理機が届かないハウスの端などで低温期をやり過ごし、気温の上昇と共に寄生できる植物の葉の裏側に移動し、口針を葉に差し込んで吸汁する。その食害痕は白く抜けて大変目立つため、観賞用である切り花の生産において致命的となる。成虫でも 0.6mm 程度と非常に小さいため目視による確認が難しく、葉裏に寄生することも相まって被害が甚大となってからようやくその発生に気づく場合も少なくない。対処法としては定期的に殺ダニ剤を散布することが挙げられるが、ハダニ類は1世代のサイクルが速いため殺ダニ剤に対する抵抗性を獲得するのも速く、生産現場からは殺ダニ剤の散布だけでは防除しきれないとの声が上がってきている。そこで、まずはカーネーションの生産現場でハダニ類による被害がどの程度問題となっているのか調査し、次に発生しているハダニ種の同定を試みた。

2. 材料と方法

ハダニ類による被害実態調査

2006年度および2007年度に長野県内で開催された切花品評会に出品されたスタンダードタイプおよびスプレータイプのカーネーション切花について、ハダニ類による食害痕の有無について目視で調査した。

ハダニ種の同定

主産地県カーネーション研究会に協力を依頼し、長野県（5カ所）、千葉県、茨城県、神奈川県、滋賀県、栃木県、佐賀県、広島県、宮城県の13カ所からカーネーションに発生していたハダニ類を採集して種の同定に供試した。ガムクロラール溶液（アラビアゴム粉末 8g、抱水クロラール 30g、水 10ml、氷酢酸 1ml、グリセリン 2ml）を用いて各サンプル5頭について雄成虫のプレパレートを作成し、挿入器の形状を横から観察することでハダニ種の同定を行った。挿入器の形状からナミハダニと判断された場合は、インゲン葉上で一世代飼育して次世代の雌の虫体色でナミハダニの赤色型と黄緑型を判別した。

3. 結果と考察

2006年度切花品評会の総出品数は363、2007年度の総出品数は366であった。切花品評会では、各生産者が品質に自信をもって選び出した切花を束ねたものが、会場に並べてある。そのため、一般に流通している切花よりも品質が良いと考えられるのだが、ハダニ類による食害痕が認められた出品数は、2006年は82、2007年については143で、それぞれ食害痕率は22.6%と39.1%であった（Table 1-1-1）。今回の調査により、年によっては切花品評会に出品された切花でさえ40%近くがハダニ類による被害を受けてしまっていると

いう事実が明らかとなり、カーネーション生産現場でのハダニ類による被害は深刻な問題であると考えられた。

次に、カーネーションに発生しているハダニ種の同定を試みた。主産地県カーネーション研究会に協力してもらい、カーネーションに発生していたハダニ類を集めて種の同定を行った。雄成虫の挿入器を横からみた先端部の形状から、供試した全サンプルがナミハダニであると判定でき、調査当初に発生を疑ったカンザワハダニは一頭も検出されなかった (Fig.1-1-3)。ナミハダニには赤色型と黄緑型がある。ナミハダニ赤色型は、ニセナミハダニ (*T.cinnabarinus* (Boisduval)) としてナミハダニ黄緑型と長らく区別されてきたが、交配実験により遺伝子交流が確認されたことから、現在ではナミハダニ (*T.urticae*) の同種とする意見が多く、形態的観点からもその考えが支持されている (Ehara 1999)。各サンプルの雌成虫をそれぞれインゲン葉上に放飼して産卵させ、卵から成虫となった雌の虫体色で赤色型と黄緑型を判別したところ、長野県の全カ所、千葉県、茨城県、神奈川県では赤色型が発生しており、滋賀県、栃木県、佐賀県、広島県、宮城県では黄緑型が発生していることが明らかとなった (Table 1-1-2)。ハダニサンプルの提供者からの聞き取り情報によると、赤色型が発生していた圃場の生産者はカーネーション専作で、黄緑型が発生していた圃場の生産者は多品目を混作していることが判明した。



Fig.1-1-1

A situation that a carnation was infested by two-spotted spider mite.

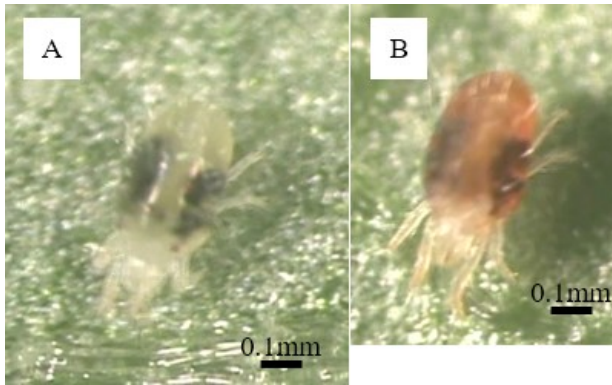


Fig.1-1-2

Images of adult female mites.

Two strains of two-spotted spider mite, distinguished by a green (A) or red (B) body color, have been recognized.

Table 1-1-1

Damage caused by spider mites on cut flowers exhibited at the carnation fairs in Japan.

Year	Type of cut flower	Number of exhibitions	Damage flowers by spider mites	Damage rate by spider mites (Damage flowers / exhibition flowers)
2006	Standard	136	24	17.7%
2006	Spray	227	58	25.6%
2007	Standard	110	42	38.2%
2007	Spray	256	101	39.5%



Fig.1-1-3

Microscopic picture of the male aedeagus in a spider mite collected from carnation leaf.

Table 1-1-2

Relationship between body color of adult female spider mites and their putative host plant species.

Prefectures where spider mites were sampled	Body color of adult females on kidney bean leaf	Variation of cultivated crops in the farmer's fields
Nagano Chiba Ibaraki Kanagawa	Red strain of two-spotted spider mite	Carnation only
Shiga Tochigi Saga Miyagi	Green strain of two-spotted spider mite	Multiple crops including carnation

第2節 カーネーションのナミハダニ黄緑型に対する感受性品種の存在

1. 緒言

ハダニ類は世界中のカーネーションに被害をもたらす主要害虫の一つであるが、これまでカーネーションとハダニ類の相互作用についての報告はほとんどなされていなかった(Poe and Wilfret 1972)。オランダでは、カーネーションにはナミハダニ黄緑型ではなくナミハダニ赤色型が寄生することが報告されている(Van de Bund and Helle 1960)。これと同様に日本でもカーネーションに寄生する優占種はナミハダニ赤色型だと考えられていたが、近年カーネーションのナミハダニ黄緑型による被害が増加していることが高藤(Takafuji 1998)によって報告されている。長野県のほとんどの農家はカーネーションを専作で生産しているため、第1節で示した結果から優占種はナミハダニ赤色型であると思われるが、長野県内においてもナミハダニ黄緑型がカーネーションに発生したとの事例がかつて存在し、当场においても保有していた品種にナミハダニ黄緑型の寄生が確認されたため、ナミハダニ黄緑型に対する育種的なアプローチの可能性を検討することとした。

ナミハダニ黄緑型がカーネーションに寄生できるようになったのは、ナミハダニ黄緑型との相性に品種間差異があるのではないかと考え、当场の圃場でナミハダニ黄緑型による食害を受けていなかった「Di-7」と受けていた「Di-24」の2品種の葉を餌として与えた場合のナミハダニ黄緑型の増殖力を比較することで、カーネーションのナミハダニ黄緑型に対する感受性について検討した。

2. 材料と方法

ハダニ類と植物

1960年代に北海道で採集され、(株)協友アグリ研究所においてインゲンマメ(品種名:ナガウズラマメ)上で累代飼育されていたナミハダニ黄緑型を実験に供試した。長野県千曲市のカーネーション農家が育成した一重のダイアンサス系カーネーションを長野県野菜花き試験場の温室で栽培し、ガラスハウス内で自然発生したナミハダニ黄緑型による食害を受けていた品種「Di-24」と、食害を受けていなかった品種「Di-7」を実験材料として選んで実験に供試した。「Di-7」と「Di-24」について正式な品種名は公表を控える必要があるため便宜的に仮称で示している。

ハダニ類の宿主選好性

ナミハダニ黄緑型の宿主選好性は矢野ら(Yano et al. 1998)の方法で評価した。生物検定は、26°C、相対湿度 60~80%、14L:10Dの光条件で行った。まず、カーネーションとインゲンマメから1cm²の葉片を切り出した。この2つの葉片を、プラスチック製の箱(Fig.1-2-1)の中の濡れた脱脂綿の上に5cm間隔で置いた。カーネーションとインゲンマメの2枚の葉片の間に、細長いプラスチックの棒(0.2×0.2×6cm)を置き、成虫の雌5頭を小さなブラシ

を用いて、カーネーション葉片の上に放飼した。カーネーションの各品種について 20 回の反復を行い、品種あたり合計 100 匹のナミハダニ黄緑型を供試した。放飼してから 24 時間後にカーネーション葉片上に定着していたナミハダニ黄緑型を数えた。Mann-Whitney の *U* 検定を用いて統計処理を行った。

宿主植物上での産卵

3 日齢の雌成虫をカーネーションの葉片 (0.5 cm²) ごとに 1 頭を放飼し、26°C、相対湿度 60~80%、14L:10D の光条件で産卵させ、放飼後 3 日目に新鮮な葉片と交換した。放飼してから 5 日間、24 時間ごとに産卵数を調査した。品種あたり 100 頭の産卵数を調べ、増殖力は 1 日間に 1 匹の雌あたりの産卵数の平均値で示した。2 品種間の産卵数の平均値の差を Welch の *t* 検定を用いて検定した。

発育期間と生存率

約 100 匹の雌成虫を各品種の葉片に放飼し、26°C、相対湿度 60~80%、14L:10D の光条件で産卵させ、放飼後 24 時間程度で雌成虫を取り除いた。産みつけられた卵を葉片 (0.25cm²) に 1 つずつ小さなブラシで乗せ、品種ごとに 100 卵を供試した。24 時間ごとにナミハダニ黄緑型の発育段階を調査し、死亡した個体数も記録した。発育期間の比較は Mann-Whitney の *U* 検定を、生存率の比較は log-rank 検定を用いて行った。

3. 結果と考察

ナミハダニ黄緑型の宿主として不適だと思われていたカーネーションにそれらが発生する理由として、ナミハダニ黄緑型には適する宿主植物と不適な宿主植物を数世代にわたり往復することで徐々に集団として不適だった植物に適応できるようになった個体群が存在する (Gould 1979; Fry 1989; Agrawal 2000)、または、カーネーション品種のなかにはナミハダニ黄緑型に耐性を持つ品種と持たない品種が存在する、という 2 つの可能性が考えられる。本研究で使用したナミハダニ黄緑型は実験室内でインゲンマメを用いて 40 年間以上累代飼育されてきており、カーネーションと接触する機会がなかった個体群であることから本論文では 2 つ目の可能性について検討した。

まずは 5 匹の成虫をカーネーションの葉片に放飼して宿主植物の選好性を調べた。放飼から 24 時間後のカーネーション葉片へのナミハダニ黄緑型の定着数は「Di-24」が 3.0±0.2、「Di-7」が 1.1±0.3 で (Fig.1-2-2)、「Di-24」での定着数は「Di-7」よりも多かった (Mann-Whitney の *U* 検定、*p* < 0.01)。次にカーネーション葉片上での増殖力を調べるために、24 時間間隔で 5 日間の産卵数を調査した。その結果、「Di-24」では 4.0±0.1、「Di-7」では 1.3±0.1 で (Table 1-2-1)、「Di-24」の方が「Di-7」よりも産卵数が多かった (Welch の *t* 検定、*p* < 0.01)。さらに発育期間と生存率を調べるため、ナミハダニ黄緑型の孵化から成虫まで毎日調査した。「Di-24」は「Di-7」に比べて雌雄ともに発育時間が短かった

(Mann-Whitney の U 検定、 $p < 0.01$)。生存率は「Di-24」で 87.0%、「Di-7」で 63.9% (log-rank test, $p < 0.01$) (Table 1-2-1) であり、「Di-24」と比較して「Di-7」では幼虫期間において特に低下した (Fig.1-2-3)。つまり「Di-24」の方が、産卵数が多く、発育期間が短く、生存率が高いことがわかった。このことから、カーネーションにはナミハダニ黄緑型の宿主利用に影響を与える形質が遺伝的に異なる品種があると考えられる。特に「Di-24」はナミハダニ黄緑型に食害を受けやすい形質を有した品種といえる。オランダでは、ナミハダニ黄緑型がカーネーションを食害することが知られているが、卵から成虫までの増殖力や生存率が低いため、寄生できないと考えられていた (Van de Bund and Helle 1960)。本研究の結果では、「Di-24」、「Di-7」共に Van de Bund and Helle の報告よりも葉上に放飼したナミハダニは生存率が高い結果が得られた (Fig.1-2-3, Table 1-2-1)。先行研究ではカーネーション 1 品種のみを用いていたため、当時の他のカーネーション品種の中にもナミハダニ黄緑型による宿主選好性の程度が高い品種が存在した可能性は考えられる。カーネーションの育種家はこれまでナミハダニ黄緑型に対する抵抗性について意識することなく、交配を繰り返してきた。そのため、時間の経過とともに交配の過程でナミハダニ黄緑型に対する抵抗性を持つ品種の割合が低下していったと思われる。このような現象は、世界中のカーネーション品種でも生じている可能性がある。ナミハダニ黄緑型に遺伝的に食害を受けやすい形質を有した品種 (感受性品種) を用いた交配を避けるためには、DNA マーカーなどの利便性の高い方法で食害を受けにくい抵抗性品種を選抜できる必要があるが、多くのカーネーション品種は育成過程が非常に複雑であるため、現存する品種の中からナミハダニ黄緑型に対する抵抗性の遺伝的特徴についての情報を得ることは非常に困難である。従ってナミハダニ黄緑型に対する抵抗性の DNA マーカーを取得するためには、改めて抵抗性と感受性が遺伝的に分離した集団を育成して解析を行う必要がある。さらにカーネーションは世界中で利用可能な遺伝資源を利用して育種されており、種間交雑も容易に行えるという特徴もあることから (Hamilton 1989)、多様なカーネーションの育種に利用可能な抵抗性品種の選抜方法を確立するためには、あらゆる遺伝資源を用いてナミハダニ黄緑型に対する抵抗性のメカニズムを明らかにすることが第一に重要である。

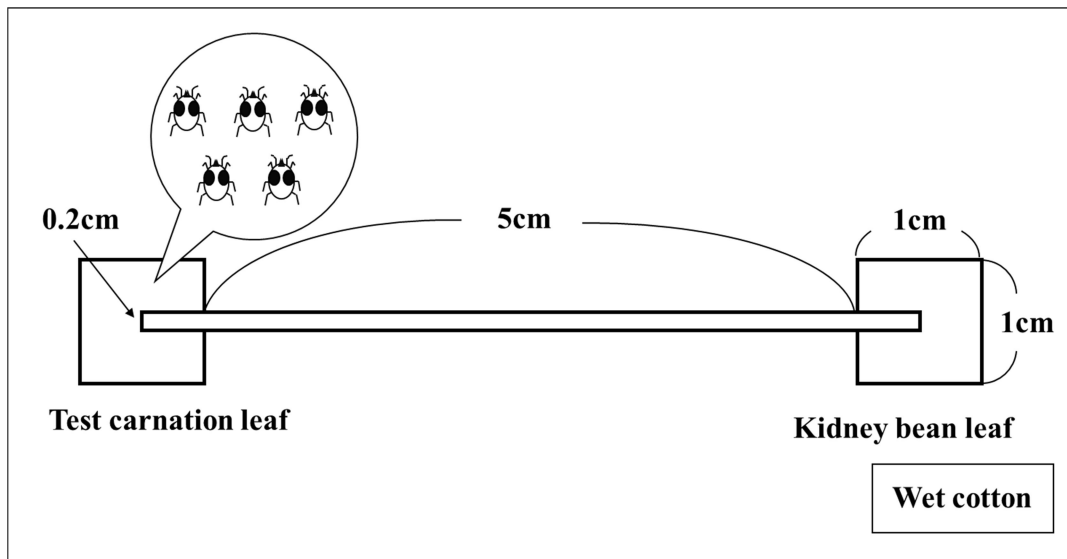


Fig.1-2-1

Evaluation of preference of host plants by the spider mites.

To investigate host plant preference by the spider mites, kidney bean leaf and carnation leaf (Di-24 or Di-7) were placed on the wet cotton and bridged by a plastic bar. Five adult female mites were placed on the carnation leaf, and number of mites remained on the carnation leaf was counted.

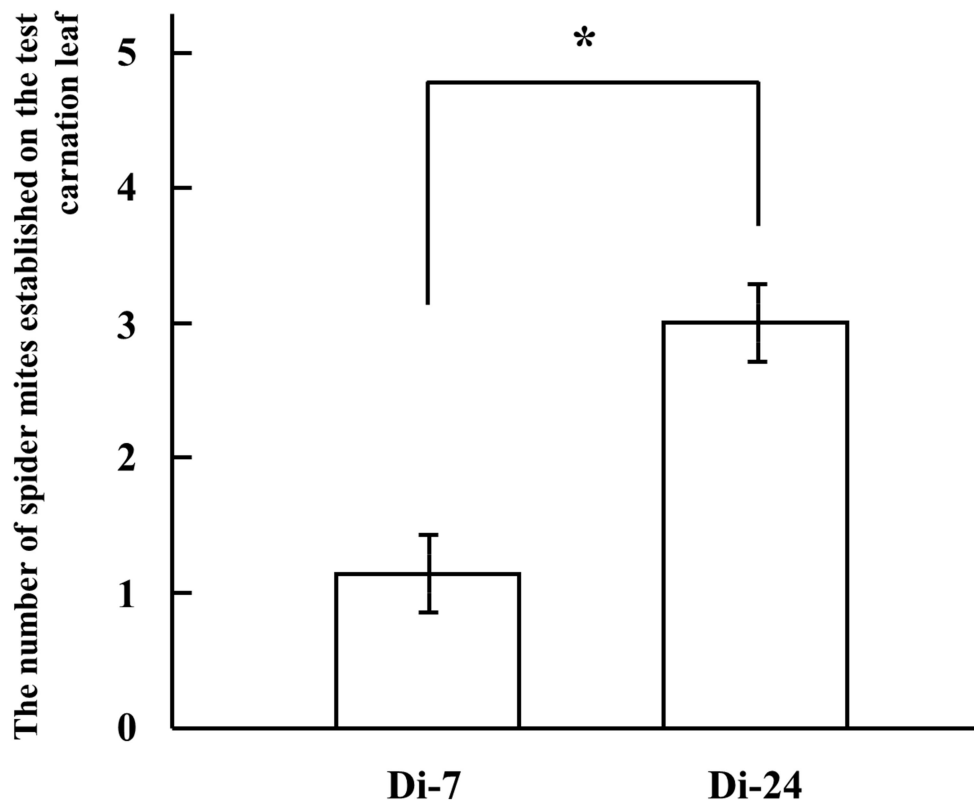


Fig.1-2-2

Preference by the spider mites as the host in two carnation cultivars ('Di-24' and 'Di-7') after 24 hrs.

The mean number of spider mites on the 'Di-24' leaves was significantly more than that that on the 'Di- 7' leaves (Mann-Whitney's U -test, $p < 0.01$). Bars in the graph showed the means number of mites \pm SE (n=20).

Table 1-2-1

Developmental time, survival rate and fecundity of green strain of two-spotted spider mites on carnation leaf tissues.

Cultivar	Developmental time from hatching to adult emergence (days)		Survival rate (%)	Fecundity (eggs/ day/female)
	Males	Females		
	Means±SE	Means±SE		
Di-7	7.7±0.26 (n=26)	8.4±0.15 (n=43)	63.9	1.4±0.1
Di-24	7.0±0.1 (n=52)	7.6±0.17 (n=42)	87.0	4.1±0.1

Statistic comparisons of developmental time, survival rate and fecundity between two cultivars were evaluated by using Mann-Whitney's U -test ($p < 0.01$), the log-rank test ($p < 0.01$), and with Welch's t -test ($p < 0.01$), respectively.

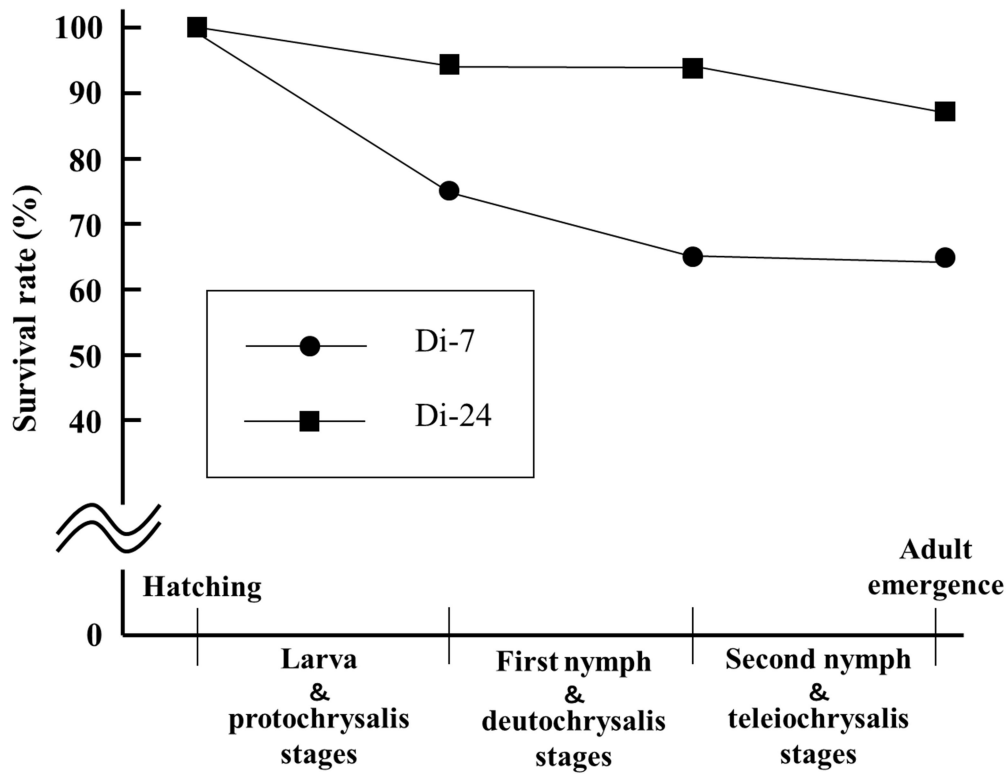


Fig.1-2-3

Survival rate of spider mites on carnation leaf tissues.

Comparisons of the survival rate were made using the log-rank test. The log-rank test indicates a significant difference between the survival curves ($p < 0.01$).

第3節 カーネーションのナミハダニ赤色型に対する耐虫性機構の解明

1. 緒言

生産現場では、圃場での観察からカーネーションのハダニ類による被害には品種間差異があると考えられており、第2節において実際にナミハダニ黄緑型による被害に品種間差異があることは確認できた。ナミハダニ赤色型による被害においても軽度のものから重度のものまで様々な品種間差があると考えられるが、カーネーションの品種の変遷がかなり速いこともあり、その遺伝的要因は不明である。一般にカーネーションは挿し芽で苗を増殖することができるため、栄養繁殖性作物として扱われている。同様に栄養繁殖性作物として扱われているチャにおいて、自殖で作出した後代の個体間には、ハダニ類による被害に差があり、そのなかに耐虫性個体が認められたとの報告が既になされていた(Osakabe 1962)。遺伝的にヘテロな遺伝性を有したまま品種として成立している栄養繁殖性作物の場合、自殖により同様な遺伝的背景を有しているが表現型が異なる集団を作出することが出来ることが期待される。そこでカーネーションにおいても近交系集団を作出し、それらを利用してナミハダニ赤色型に対する耐虫性機構を詳細に解析することを試みた。

2. 材料と方法

ハダニ類と植物

長野県野菜花き試験場のカーネーションから採取し、インゲンマメ（品種：ナガウズラマメ）葉上で飼育したナミハダニ赤色型を室内での実験に供試した。宿主の材料として一重タイプのカーネーション品種「M Red」の自殖により得られた216個体の近交系集団を作出して実験に供試した。

近交系集団からの耐虫性個体と感受性個体の選抜

直径6cmのポリポットで栽培していた近交系集団216個体を8月にガラスハウスに定植した。農薬を散布せずに管理してナミハダニ赤色型が自然発生したところで、耐虫性個体と感受性個体を選抜した。定植後5週目と10週目には葉面の被害程度をもとに、1=極めて軽度な食害、2=軽度な食害、3=中程度の食害、4=重度の食害、5=極めて重度の食害を1から5まで評価して達観での調査を行った。

表現型の再現性

耐虫性個体として選抜した「S1-35」、「S1-53」と、感受性個体として選抜した「S1-265」、「S1-276」の各12個体を2月中に温室内に定植した。すべての個体について、3月中旬から10日ごとに3回、葉10枚あたりの雌成虫数を調査した。試験サンプル間の平均値の差を一因子分散分析(ANOVA)およびTukey-Kramer検定を用いて検定した。

ナミハダニによる食害痕の観察

「M Red」の切花の真ん中よりも上位葉の食害されている葉と食害されていない葉をサンプリングした。葉の表面を反射光および透過光顕微鏡で観察し、デジタルカメラで撮影した。また、葉面の食害痕を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した。

ナミハダニの口針の測定

孵化後の幼虫期、第一静止期、第二静止期、第三静止期、成虫のステージの個体を70%エタノールに浸漬して固定し、ガムクロラル溶液を用いてスライドガラスに封入した。各ステージ10個体について口針の先端から曲がっている部分までの長さを透過型顕微鏡で観察して測定した。

葉内部構造の観察

「S1-35」、「S1-53」、「S1-265」、「S1-276」について切花の真ん中よりも上位の葉をサンプリングした。サージカルナイフを用いてハンドセクションで葉の切片を作成し、70%エタノールに一晩浸漬して脱色した。観察時には、各切片を蒸留水に1分以上浸漬した後、0.5%トルイジンブルーで染色した。内部の葉の構造についてPhotoshopを用いて測定し、同じ倍率でマイクロメーターを用いて撮影した写真と比較して長さを測定した。切片ごとに5箇所を測定した。試験サンプル間の平均値の差は、一因子ANOVAとTukey-Kramer検定を用いて検定した。

内的自然増加率

ナミハダニのLife table変数はBirchの式を用いた(Birch 1948)。葉表面から海綿状組織までの厚さを指標として、アニバル、フランチェスコ、ライトピンクバーバラ、マドカの4品種を選定した。純繁殖率(R_0)は以下の式で求めた・・・(1)

$$R_0 = \sum l_x m_x \quad (1)$$

X は個体の日齢、 L_x は日齢 x で生存している割合である日齢別生存率、 M_x は雌1頭あたりの日齢別繁殖率である。内的自然増加率(r_m)は以下の式で求めた・・・(2)

$$r_m = \frac{\log_e R_0}{T} \quad (2)$$

e は自然対数lnの定数である。平均世代時間(T)は以下のように計算した・・・(3)

$$T = \frac{(\sum x l_x m_x)}{\sum l_x m_x} \quad (3)$$

孵化から成虫化までのステージと、成虫化から死亡までのステージについてそれぞれ分けて増殖に関する実験を行った。

孵化から成虫化までの成育ステージの観察

ナミハダニ赤色型の 10 匹の雌成虫を、水に浸した脱脂綿上のカーネーション品種「ソネットセラー」の葉片（約 2cm²）に放飼し、実験室内で 26℃、相対湿度 60%～80%の条件で、14L : 10D の光条件で産卵させた。合計 40 組を準備し、24 時間後に雌成虫を葉片から取り除いた。このようにして得られた卵を、カーネーション 4 品種の葉片(1cm²)上に 10 個ずつ小さなブラシで乗せた（品種あたり合計 100 個の卵と 10 枚の葉片）。これらの葉上のナミハダニ赤色型の発育ステージを成虫化まで 24 時間ごとに調査し、生存しているナミハダニ赤色型の総数を発育ステージごとに算出した。発育期間の比較は一因子 ANOVA および Tukey-Kramer 検定を、生存率の比較は log-rank 検定を用いて行った。

成虫化から死亡までの成育ステージの観察

成虫化から 24 時間以内に、プラスチック製の箱に水を浸した脱脂綿上のカーネーションの葉片（0.5cm²）上に処女メスを導入し、葉上に産卵させた。カーネーションの葉片に産卵した数を、死亡するまで 24 時間間隔でカウントした。4 品種について 100 回の反復試験を行った。

圃場でのナミハダニ赤色型による被害調査

長野県野菜花き試験場の育成系統の中から、「Di-31」、「Di-32」、「Di-33」、「H81」、「H82」の 5 品種を選抜し、各品種について 12 月中に第 1 圃場に各 30 個体、第 2 圃場に各 6 個体を定植し、農薬を散布する慣行法で管理した。6 月に収穫された切花のうち、第 1 圃場に植えられた各品種の切花 5 本と第 2 圃場に植えられた各品種の切花 8 本について、1 本あたり 6 枚の葉の被害調査を行った。被害の評価は 0～4 の範囲で行い、0＝被害なし、1＝極めて軽度な被害、2＝軽度な被害、3＝重度の被害と相当量の排泄物、4＝極めて重度な被害と相当量の排泄物、とした(Fig.1-3-1)。被害は葉当たりの平均値として算出した。試験サンプル間の平均値の差は、一因子 ANOVA および Tukey-Kramer 検定を用いて検定した。

3. 結果と考察

ナミハダニ赤色型に対するカーネーションの耐虫性機構を調べるためには、耐虫性品種がナミハダニ赤色型の増殖に及ぼす影響を調べる必要がある。キクでは、増殖力、発育期間、生存率に相関があつてナミハダニによる被害に関して品種間差異が認められたものの、遺伝的背景が異なった品種間の比較のみでは、耐虫性の要因を明らかにするのは困難であつた(Kondo et al. 1998)。そこで、自殖により作出したカーネーションの近交系集団から選んだ耐虫性個体と感受性個体がナミハダニ赤色型に及ぼす影響を調べることで、耐虫性機構の解明を試みた。品種「M Red」について自殖を行い、216 個体の後代すなわち近交系集団を作出した。この近交系集団は、表現型は異なるが遺伝的背景がほぼ同じであるという特徴を持つため、耐虫性の遺伝的要因をより詳細な解析が可能ではないかと考えられた。

ガラスハウスにこの近交系集団を定植した後の5週目と10週目にナミハダニによる被害程度を5段階評価したところ、ほとんどの個体は被害程度が3となった。この集団の親品種である「M Red」も3であった。これらの植物はその後、殺ダニ剤を使用しないため時間の経過とともに被害程度が増加した。近交系集団の中でさらに詳細に見ていくと、定植後5週目に行った1回目の調査では、「M Red」よりも被害程度が低かった個体が63.2%、高かった個体が26.3%であったが、定植後10週目に行った2回目の調査では、「M Red」よりも被害程度が低かった個体が50.5%、高かった個体が47.7%となった (Fig.1-3-2)。

1回目と2回目の被害程度の調査結果に基づいてこの集団の中から耐虫性個体の候補として「S1-35」と「S1-53」を選び、感受性個体候補として「S1-265」と「S1-276」を選んだ。調査1回目と2回目の被害程度はそれぞれ、「S1-35」は「1」と「2」、「S1-53」は「1」と「1」、「S1-265」は「4」と「5」、「S1-276」は「4」と「5」であった。

まず、選抜された4個体を用いてナミハダニ赤色型に対する耐虫性についての再現性試験を行った。この4個体を挿し芽で増殖して温室に定植し、葉に発生したナミハダニ赤色型の数を3回調査した。いずれの調査でも、「S1-35」、「S1-53」よりも「S1-265」、「S1-276」の方が多くのナミハダニ赤色型が発生していた。雌成虫数は、「S1-35」では 8.1 ± 1.1 、 6.7 ± 1.3 、 7.0 ± 1.3 、「S1-53」では 13.2 ± 1.6 、 5.0 ± 0.9 、 6.2 ± 1.3 、「S1-265」では 19.3 ± 2.7 、 23.1 ± 3.1 、 25.7 ± 2.7 、「S1-276」では 20.9 ± 2.4 、 15.9 ± 1.9 、 14.5 ± 1.7 であった。3回の調査の平均値の差は、1因子ANOVAおよびTukey-Kramer検定を用いて評価した($P < 0.01$)。その結果、「S1-35」および「S1-53」を耐虫性系統とし、「S1-265」および「S1-276」を感受性系統とした (Fig.1-3-3)。

次に、ナミハダニ赤色型がカーネーション葉のどの部分を摂食しているのか調べるため、「M Red」の食害された葉とされていない葉を顕微鏡で観察したところ、反射光では葉表面に顕著な食害痕は認められなかったが、透過光では表面よりも内部の組織が破壊されていることが観察された (Fig.1-3-4)。またSEMによる観察では葉表面に左右の爪と口針による3つからなる特徴的な食害痕が観察できた (Fig.1-3-5)。このことから、ナミハダニは葉の表面ではなく、葉の内部組織を口針で破壊して食害していると考えられた。

そこでナミハダニ赤色型がカーネーション葉におけるどの内部組織を摂食しているのか調べるために葉の縦断面の切片を作成して顕微鏡観察したところ、カーネーションは一般的な植物と異なる葉の内部構造を有していることが判明した。通常、高等植物の葉内部構造は表皮、柵状組織、海綿状組織、葉裏側の表皮の4つの組織で構成されているが、カーネーションの場合は海綿状組織と葉裏側の表皮との間に柵状組織が存在していた。他の植物では一部のサボテンなどの葉にこの様な組織が存在することが知られているものの、非常に珍しい葉内部構造だと考えられる。葉表側の柵状組織と区別するために、以後は葉裏側の柵状組織のことを「柵状様組織」と呼ぶことにする (Fig.1-3-6)。

ナミハダニ赤色型は葉の裏面から葉を吸汁するため、この柵状様組織側から葉を吸汁していると考えられる。近交系集団から選出された耐虫性系統である「S1-35」と「S1-53」

および感受性系統である「S1-265」と「S1-276」について葉の内部組織を観察したところ、耐虫性系統である「S1-35」と「S1-53」における葉裏の表面から海綿状組織までの平均距離は92.8 μm と104.3 μm であり、一方、感受性系統である「S1-265」と「S1-276」においては77.1 μm と79.1 μm であった。(Fig.1-3-7)。このことから、ハダニは葉表面に近い表皮や柵状様組織ではなく、葉の中央部分にある海綿状組織を好んで摂食していると思われた。

次に葉裏側の表面から海綿状組織までの距離をいくつかの品種で測定し、それを指標にして短い順に80.2 μm の「アニバル」、80.7 μm の「フランセスコ」、104.4 μm の「ライトピンクバーバラ」、128 μm の「マドカ」の4品種を選定し、ナミハダニ赤色型を放飼した。その結果、葉裏側の表面から海綿状組織までの距離が長いすなわち柵状様組織が厚い品種ほど葉上のナミハダニ赤色型の孵化から成虫化までの生存率が低く、発育期間も長いことが明らかとなった。4品種の結果を比較すると、孵化から成虫化までの期間の生存率も異なっていた(Fig.1-3-8、Table 1-3-1)。各供試カーネーション品種におけるナミハダニ赤色型の1日あたりの最大産卵数は、「アニバル」で6.7 \pm 0.26、「フランチェスコ」で6.7 \pm 0.26、「ライトピンクバーバラ」で5.2 \pm 0.41、「マドカ」で4.7 \pm 0.28であった。これらの実験に用いたナミハダニ赤色型の個体群における雌比率は405/546であった。この結果、葉面から海綿状組織に至るまでの柵状様組織が厚い品種の方が、寄生したナミハダニ赤色型の内的自然増加率(r_m)が低いことがわかり、カーネーションの葉裏表面から海綿状組織までの距離とナミハダニ赤色型にとっての宿主適性とが密接に関係していると結論付けられた(Fig.1-3-8、Table 1-3-1)。

さらに、葉裏側の表面から海綿状組織までの距離を指標に用いてカーネーションにおけるナミハダニ耐虫性品種の選抜が可能かどうかを検証した。ハダニによる被害調査は、2つの異なる圃場で行い、宿主の植物材料としては葉裏側の表面から海綿状組織までの距離が74.3 μm の「Di-31」、77.6 μm の「Di-32」、98.5 μm の「H82」、121.2 μm の「H81」、128 μm の「Di-33」の5品種を栽培して収穫された切り花を用いて被害程度の調査を行った。その結果、両圃場とも各品種の被害程度の違いには同様の傾向が見られた。「H81」および「Di-33」の2品種では、供試した品種のなかで有意に被害が少なかった(一因子ANOVAおよびTukey-Kramer検定、 $p < 0.01$)ため、葉裏の表面から海綿状組織までの距離が約120 μm 以上あることが耐虫性と関連あると推測した(Fig.1-3-9)。

ナミハダニ赤色型が葉の内部組織を摂食可能なエリアは口針の長さによって規定されると考えられるため、ナミハダニ赤色型のステージごとに口針の長さを測定した。幼虫、第一静止期、第二静止期、第三静止期、雌成虫の口針の長さは、それぞれ72.9、81.3、90.0、109.2、139.6 μm であった。つまり上記の葉裏の表面から海綿状組織まで120 μm という距離は雌成虫になって初めて海綿状組織まで口針が到達して摂食可能な距離であることが明らかとなった。この結果から、耐虫性品種に寄生したナミハダニ赤色型の生育初期ステージでは表皮と柵状様組織の部分だけを摂食可能であり、感受性品種に寄生した場合は生育初期ステージから海綿状組織まで摂食可能であると考えられる。これらのことから、品種

間における葉の内部構造すなわち葉裏側の表面から海綿状組織までの距離の違いが、初期ステージの発育や圃場でのハダニ被害への影響を制御している可能性が示された (Fig.1-3-10)。



Fig.1-3-1

The cultivation examination at two fields using carnation cut-flowers.

The damage images were rated from 0 to 4, where 0 = no damage, 1 = slight damage, 2 = severe damage, 3 = severe damage and a remarkable amount of mite feces, and 4 = complete damage and a remarkable amount of mite exuvium.

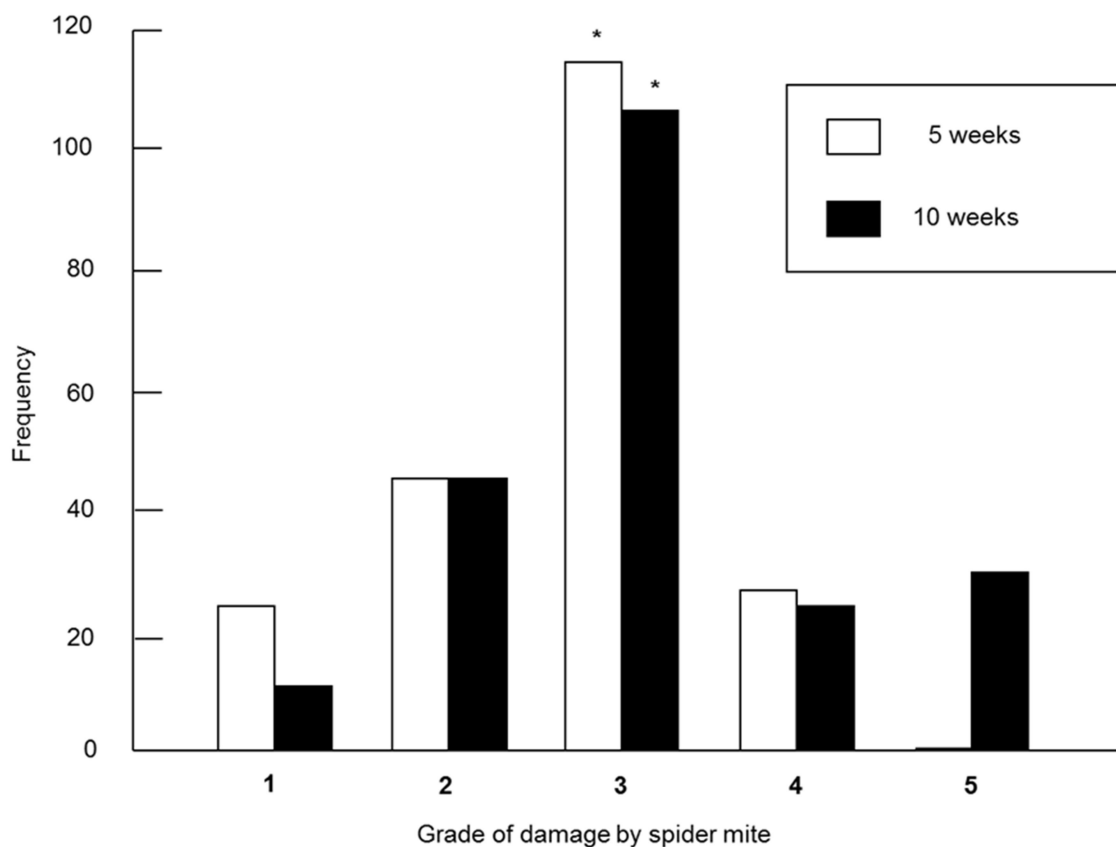


Fig.1-3-2

Frequency distribution of the damage grade by spider mites.

Five and 10 weeks after planting, the investigation was performed in an inbred population and M Red by rating the damage image in the range of 1–5, where 1 = slight damage, 2 = light damage, 3 = moderate damage, 4 = moderately severe damage, and 5 = severe damage. The damage grade of the parental cultivar M Red is indicated by asterisks.

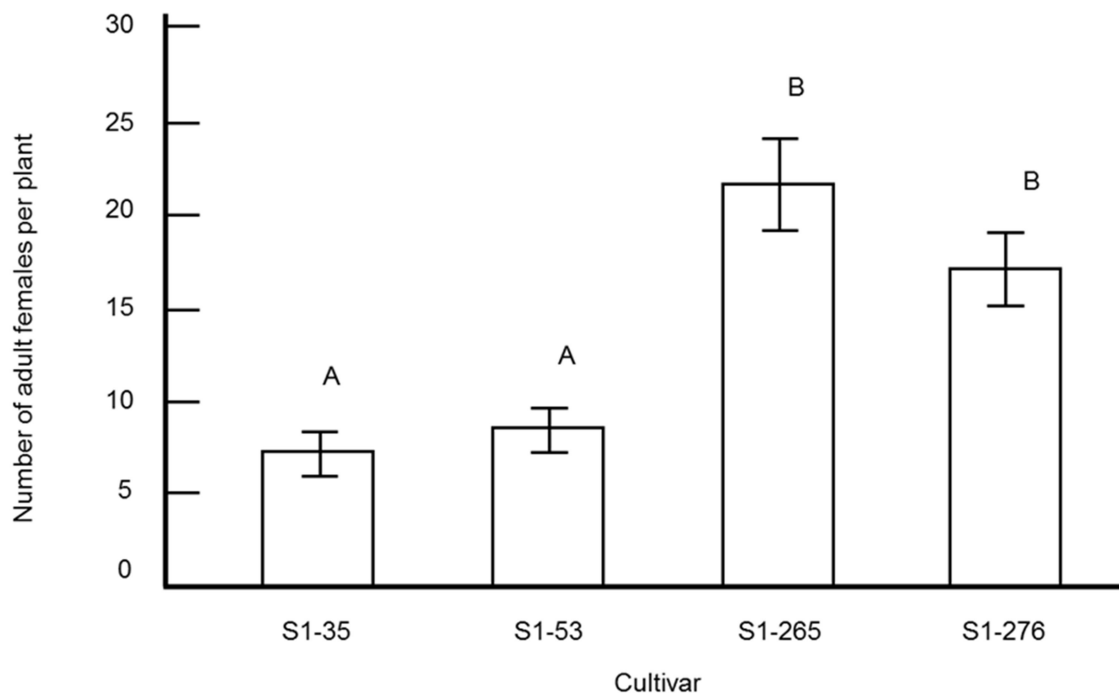


Fig.1-3-3

The phenotypes of the selected four plants.

'S1-35', 'S1-53', 'S1-265', and 'S1-276' were planted in a greenhouse. All individuals were investigated for the number of adult females per 10 leaves. The values followed by the same letter within a column are not significantly different (one-factor ANOVA and Tukey–Kramer test, $p < 0.01$).

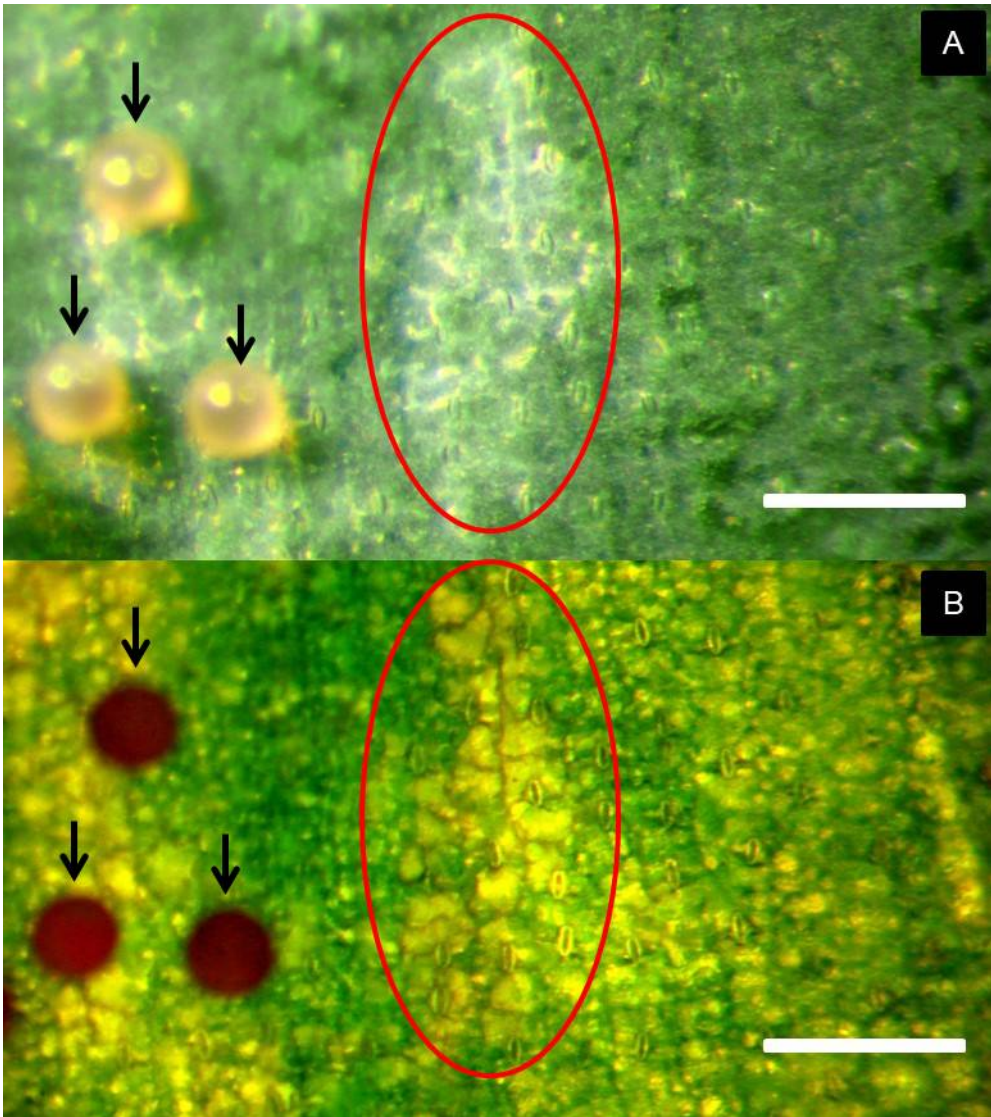


Fig.1-3-4

Microscopy image of the leaf surface damaged by spider mites.

Black arrows denote eggs, and red circles denote area of feeding damage.

(A) Reflected light. (B) Transmitted light. Bars = 200 μm .

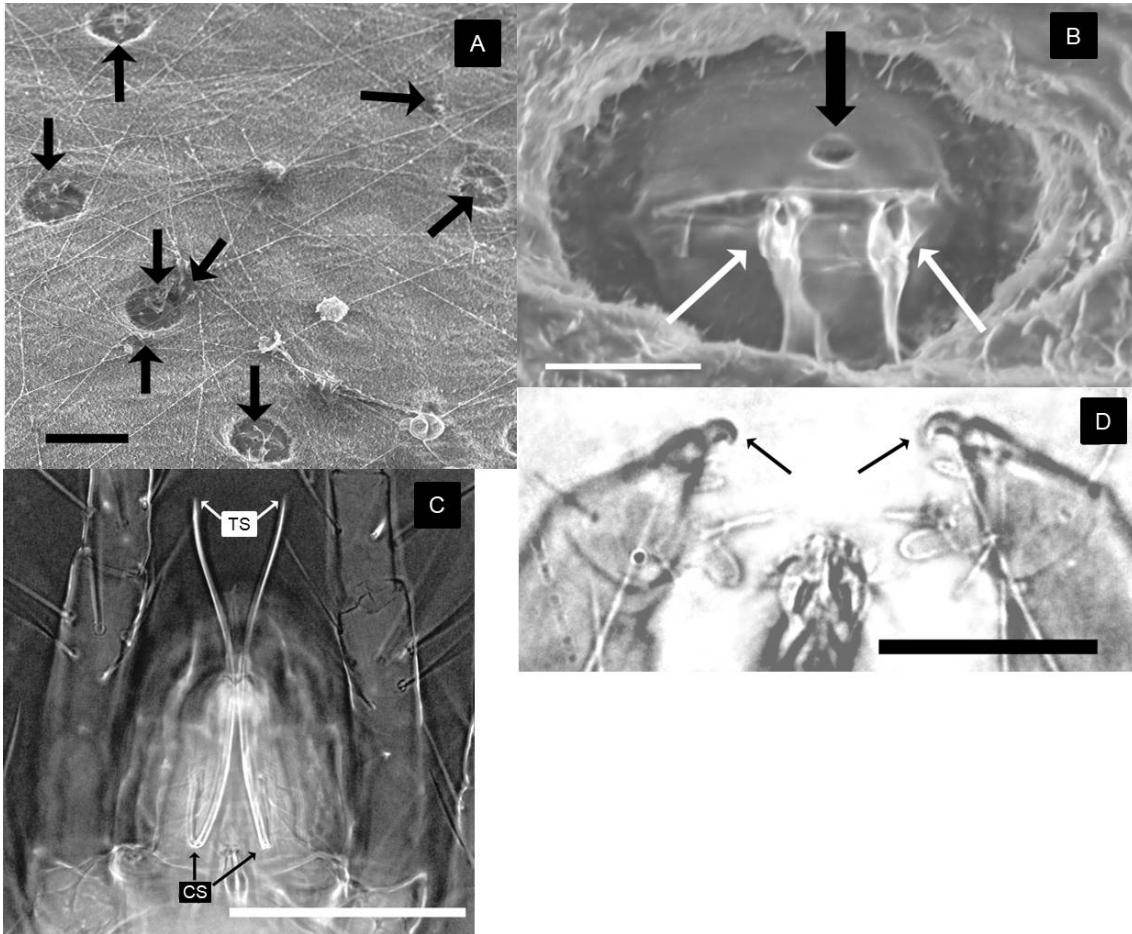


Fig.1-3-5

Scanning electron microscopic observations of damaged carnation leaves and spider mites.

Damaged leaf surface by spider mites (A) and magnified damaged area (B) were observed. The black arrow denotes the position of damage by stylet, and the white arrows denote the position of damage by claws (B). Magnified observation of the structure of stylet (C) and claws (D, indicated by arrows) in spider mite (TS: Top of stylet. CS: Curve of stylet). Scale bars indicate 10 μ m (A), 50 μ m (B), 100 μ m (C) and 30 μ m (D).

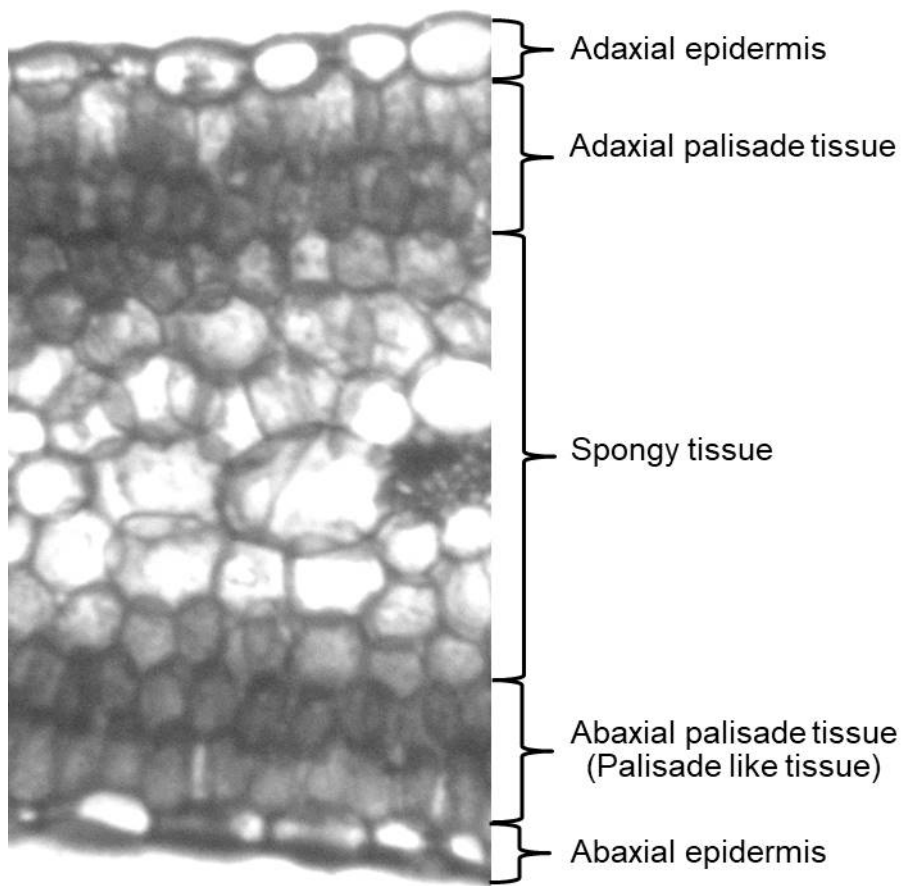
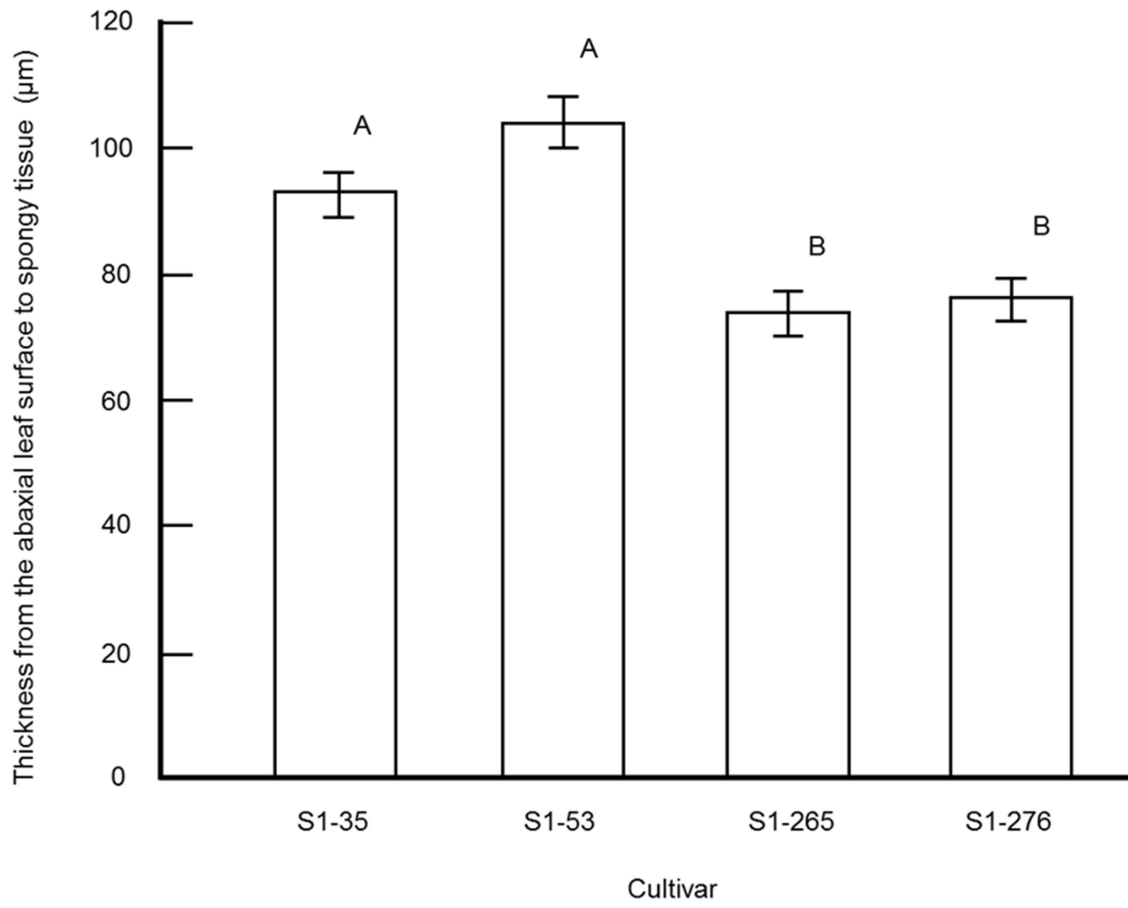


Fig.1-3-6
Internal structure of the carnation leaf.

A



B

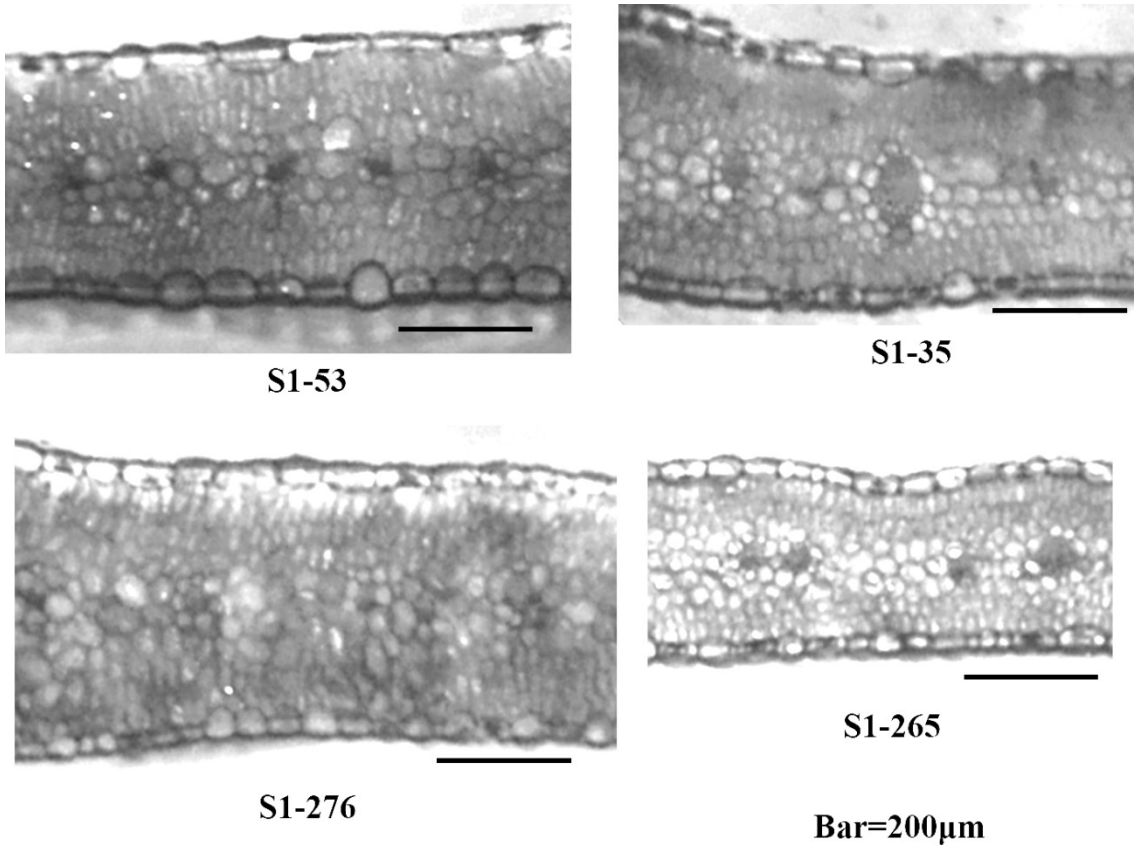


Fig.1-3-7

Thickness between abaxial leaf surface and spongy tissue in inbred lines from 'M Red'. Thickness between abaxial leaf surface and spongy tissue was measured from five positions in the leaf section of each line ('S1-35', 'S1-53', 'S1-265', 'S1-276'), and each averaged length with standard error was shown (A). Different letters of alphabet among columns indicate statistic significance (one-factor ANOVA and Tukey–Kramer test, $p < 0.01$). Leaf section for each line was shown (B).

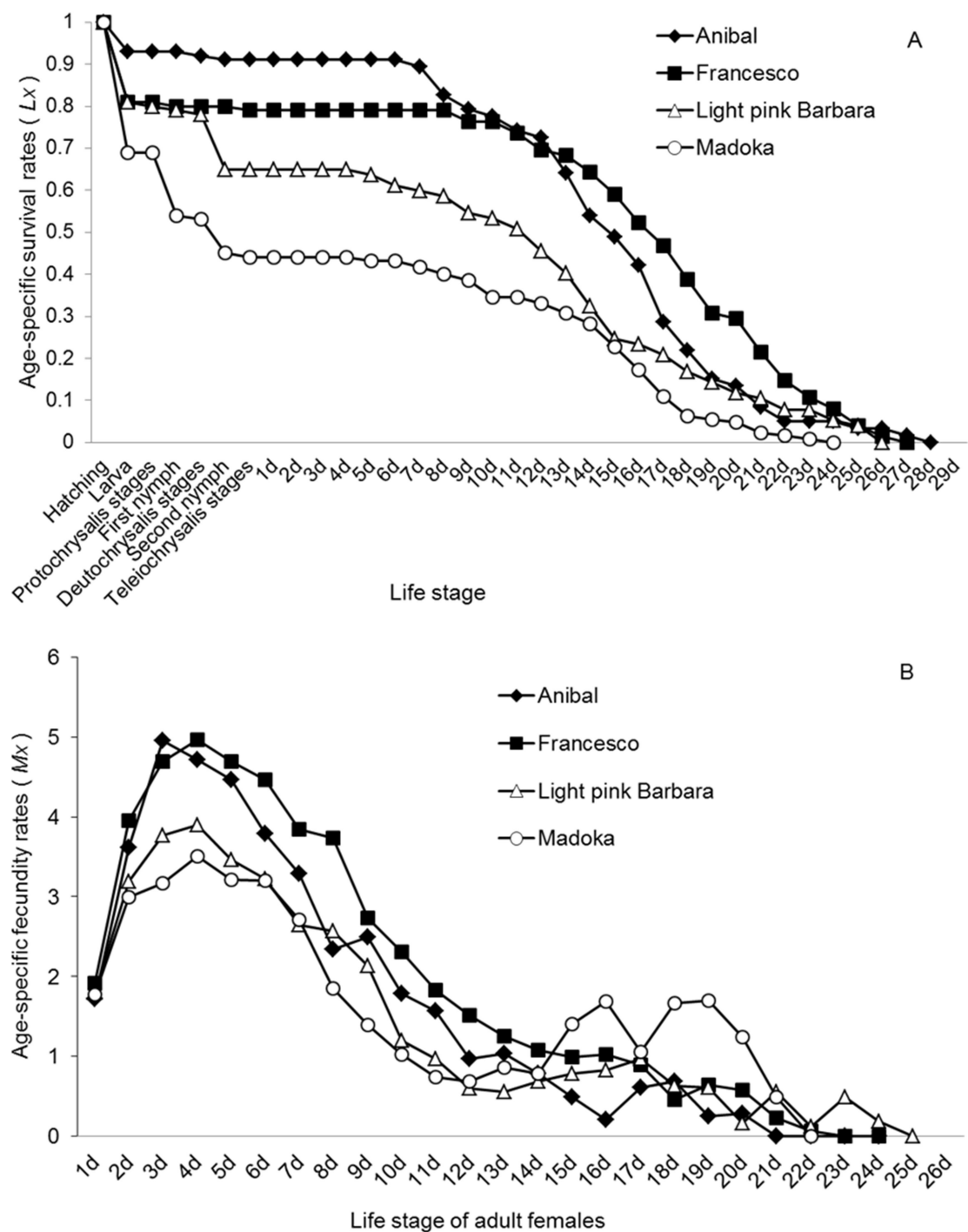


Fig.1-3-8

The life-table variables at age x of spider mites on four cultivars.

(A) The age-specific survival rates, L_x : from hatching to death. (B) The age-specific fecundity rates, M_x : female⁻¹ · generation⁻¹.

Table 1-3-1

Reproductive performance of spider mites on four cultivars.

Cultivar	Thickness from the abaxial leaf surface to spongy tissue(μm) ^x Means \pm SE	Hatching to adult emergence		Life-table parameters		
		Developmental time(days) ^y Means \pm SE	Survival rate(%) ^z	T	R_0	r_m
Anibal	80.2 \pm 2.6a	8.4 \pm 0.14d	91h	21.808	33.075	0.16
Francesco	80.7 \pm 2.19a	9.5 \pm 0.16e	77i	23.673	35.418	0.151
Light pink Barbara	104.4 \pm 2.24b	9.8 \pm 0.16f	66i	23.512	19.228	0.126
Madoka	128.0 \pm 3.55c	10.4 \pm 0.21g	42j	24.604	12.455	0.103

^{xyz} Comparisons of thickness and developmental time were made using One-factor ANOVA and Tukey–Kramer test, survival rate with the log-rank test. The values followed by the same letter within a column are not significantly different ($p < 0.01$). T , R_0 , and r_m of life-table parameters indicate the mean generation time, the net reproductive rate, and the intrinsic rate of increase, respectively.

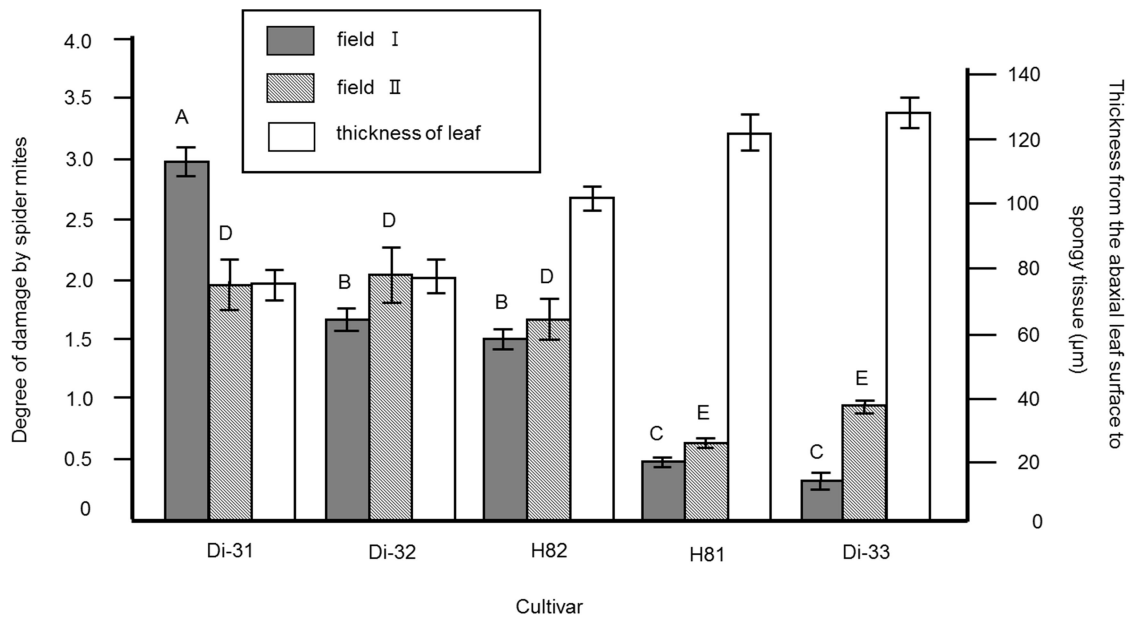


Fig.1-3-9

The harvested flowers were investigated for the damage image of six leaves per cut-flower at two fields. The values followed by the same letter within a column are not significantly different (one-factor ANOVA and Tukey–Kramer test, $p < 0.01$). Thickness from the abaxial leaf surface to spongy tissue were measured five positions for each thin section. Vertical bars represent standard errors.

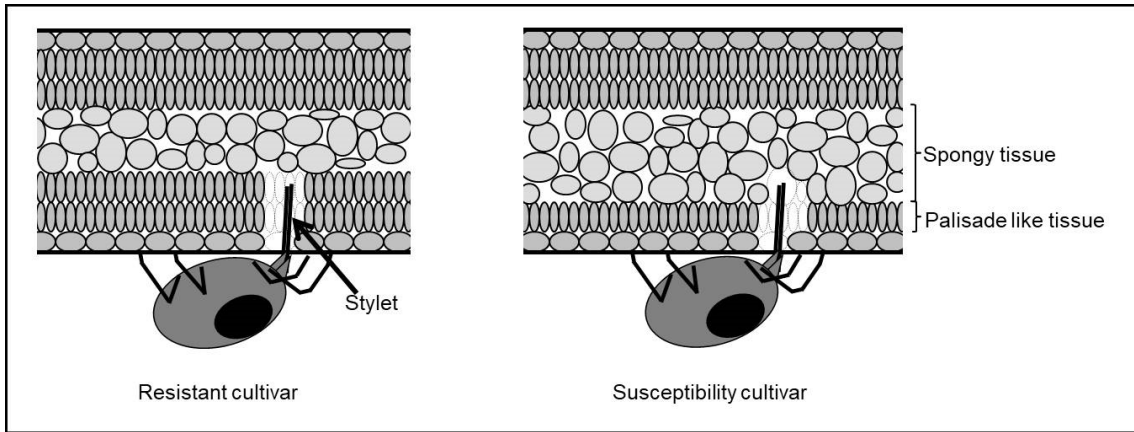


Fig.1-3-10

A predicted model of the internal structure of leaves with regards to the resistant and susceptible cultivar in the carnation.

総括

本章では長野県を含む夏季の国内カーネーション生産におけるハダニ被害の実態調査とそれに対する抵抗性育種の基盤となる知見を得るべく、多面的な解析を試みた。

まずカーネーションに被害を与えるハダニ種を調査するため、カーネーションに発生したハダニをサンプリングして種の同定を行ったところ、カーネーションだけを生産している場合にはナミハダニ赤色型が、他の農作物も栽培している場合にはナミハダニ黄緑型が主として栽培圃場に発生していることがわかった。調査当初に発生を疑ったカンザワハダニは一頭も確認されなかった。かつて、カーネーションに被害を与えるのはナミハダニ赤色型であり、ナミハダニ黄緑型は発生しないと考えられていたが(Takafuji 1998)、近年になってこのようにカーネーションでナミハダニ黄緑型の発生が認められるようになってきた。その理由を明らかにするため、栽培圃場でナミハダニ黄緑型の被害を受けやすい系統「Di-24」と受けにくい系統「Di-7」を選抜して実験に供試し、ナミハダニの選好性、増殖力、生育期間、生存率について調べた。その結果ナミハダニ黄緑型は「Di-24」を餌として利用した場合に高い選好性、増殖力、生存率を示した。また、「Di-24」葉上では「Di-7」葉上よりも成虫となるまでの生育期間が短かった。これらの実験結果から、カーネーション品種の中にはナミハダニ黄緑型が適応しやすい性質を有した品種が存在することが示唆され、これが栽培における被害の原因と考えられる。カーネーションの専作ではナミハダニ黄緑型は発生していない、もしくは発生しにくいということを考慮すると、もともとカーネーションはナミハダニ黄緑型の宿主として最適な植物ではないと推測されるが、本実験の結果からその耐虫性の強さ（有無）に関して遺伝的な違いが存在すると推定される。しかし現状のカーネーション育種においてはナミハダニ黄緑型に対する耐虫性は評価していない。今後は育種選抜の過程でナミハダニ黄緑型に対する耐虫性を失わないように育成段階から耐虫性を選抜項目に加えることでナミハダニ黄緑型の宿主として適してしまう個体（感受性個体）を選抜の過程で落とし、栽培圃場でのナミハダニ黄緑型の発生を未然に防ぐことができる可能性がある。

一方で、カーネーションに被害を与えるハダニ種の最も主要なタイプとして知られていたナミハダニ赤色型に対してはその耐虫性品種育成を目指した解析を行った。そのようなハダニ耐虫性品種の体系的な開発はあまり進んでいなかったが、切り花生産に生態学的・経済的な利益をもたらすことが期待される。カーネーションにおけるナミハダニ赤色型に対する耐虫性育種を行うためには、効果的及び効率的な耐虫性評価指標の確立が重要である。そこで、カーネーション品種の自殖で作出した近交系集団を用いてナミハダニ赤色型に対する耐虫性機構を明らかにすることを目的とした。カーネーションの近交系集団から耐虫性個体と感受性個体を選び出し、ナミハダニ赤色型による食害痕を顕微鏡で観察したところ葉内部の裏側にある柵状様組織の厚さに違いが認められ、ナミハダニ赤色型の宿主適合性は葉の内部構造の違いに影響を受けると考えられた。そこで葉裏の表

面から海綿状組織までの距離を指標に複数の品種を選定し、ナミハダニ赤色型の宿主植物としての適合性を調べた。その結果、葉裏の表面から海綿状組織までの距離が長い品種はナミハダニ赤色型の内的自然増加率が低いことが明らかとなった。また圃場試験でも、葉裏から海綿状組織までの距離が 120 μm 以上の品種では被害が顕著に少なかったことから、ナミハダニ赤色型は海綿状組織を好んで摂食し、孵化から成虫化までの間の初期の生育ステージで海綿状組織までを吸汁できるかどうかはその生育および増殖に重要な要素であることが示唆された。

これらの研究結果から、カーネーションにはハダニによる被害にはっきりとした品種間差が認められたことから、ハダニの個体数を経済的許容水準以下に抑えるために、この耐虫性品種の能力を生産技術として活用すべきである。現行法では感受性品種を基準に殺ダニ剤の散布量を決めているため、葉内部構造の調査により感受性品種を圃場から排除して耐虫性品種だけを栽培した場合は殺ダニ剤の散布量を劇的に減らせる可能性が高い。本研究では、ハダニに対する耐虫性を制御する要因として、葉内部構造の厚さを発見した。葉の厚さは遺伝的には定量的形質と考えられることから、カーネーションの育種家がハダニ耐虫性を育種目標に加える場合には、すべての交配組み合わせにおいてハダニ耐虫性を徐々に高めることも可能だと考えられる。今回の研究は、毒性の強い化合物を含む遺伝資源を用いることなく、農作物の害虫抵抗性の能力を実用レベルにまで高めることができる可能性を示している。

第2章 レタスの高温適応性育種

緒言

レタスなどの葉物野菜の葉の形状は非常に重要な農業形質であるため、世界中の育種家達によって多様化が進められてきた。このようにしてもたらされた栽培品種の多様性は、ストレスの多い栽培環境への適応に重要な役割を果たしていると考えられる。レタスは世界で最も需要のある葉物野菜の一つであり、バターヘッドレタス（サラダナ）を除いて、伝統的に野外で栽培されている(Ryder 1999)。レタスは冷涼な気候を好む野菜であるため、環境要因、特に熱ストレスが収量や品質に悪影響を及ぼす可能性があると考えられる。レタスにおける高温時の生理障害であるチップバーンは活発に生育する葉の頂部や縁部の崩壊や壊死を伴う生理障害であり、温暖な生育条件の下で最も重要な問題の一つである。チップバーンが生じるとストレスが原因で葉先が傷害を受けて茶色になり、商品価値を下げる原因となってしまう。これは目視で確認できる外葉だけでなく、結球内部の葉先にも発生するため、販売後に問題となる。そのため、高温期に安定した生産を行うためには、高温への適応性が重要である。玉レタスにはエンパイヤ型とサリナス型の結球タイプがある(Jenni et al. 2013)。エンパイヤ型は鋸歯状の葉縁で、シャキッとした食感を示し、サリナス型は葉が波打っていて柔らかい食感を示す (Fig.2-1-1A)。エンパイヤ型の鋸歯状の葉縁形状は、チップバーンの発生率の高さと明らかに関連している(Macias-González et al. 2019) (Fig.2-1-1B)。さらに、レタスは高温で抽苔が促進されるため、晩抽性も高温期のレタス栽培において重要な形質である。「Salinas」は、アメリカでは晩抽性品種とされているが(Ryder and Milligan 2005)、日本の盛夏期のような高温条件では「Salinas」は早抽性品種として分類されている。アメリカでは播種から収穫までの期間が70~80日であるのに対し(Turini et al. 2011)、日本の盛夏期のほうが高温であるため50~65日と短い。また、Jenniら(2013)は、サリナス型の栽培品種が長日・温暖な生育条件で早抽性(主茎が伸長する)を示すことを指摘している。真夏の高温期や亜熱帯地域では、チップバーンや抽苔性に対する耐性の向上がレタス育種の重要な目標となっている。そこで第1節では、高温栽培環境下における複数のエンパイヤ型とサリナス型のレタス品種について、チップバーンの発生および抽苔性との相関を調べた。また、エンパイヤ型とサリナス型のF₂集団を対象に、葉先の形状と晩抽性の遺伝的マッピングを行い、両形質の遺伝的関係の解明を通して、結球タイプを選抜できる汎用性の高いDNAマーカーの開発を試みた。

レタス根腐病は世界中で発生しており、日本では1955年に初めて観察された(Matuo 1967)。その後、アメリカ(Hubbard and Gerik 1993; McCreight et al. 2005)、台湾(Huang JH 1998)、イラン(Millani MJ, Erebarian HR 1999)、ポルトガル(Pasquali et al. 2007)、イタリア(Pasquali et al. 2005, 2007)、ブラジル(Cabral et al. 2014)で発生が確認されており、現在ではフザリウム (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*)の4つのレースが確認され

ている(Fujinaga et al. 2001, 2003; Gilardi et al. 2017)。日本では、根腐病は高温期の産地での主要な病害と認識されており、レース 1、レース 2、レース 3 の 3 つのレースの発生が問題となっている(Fujinaga et al. 2001, 2003)。典型的な症状として、発育阻害、葉の黄化、維管束の褐変、枯死などが挙げられる(Gordon and Koike 2015)。レタスはもともと冷涼期の野菜であるため、栽培上の問題は高温期に発生しやすい(Ryder and Milligan 2005)。高温条件下では、根腐病の重症化や病原体の増殖も報告されている(Scott and Gordon 2009)。日本の長野県は標高が高く冷涼な気候であるため、夏期の重要なレタス産地であるが、レース 1・2・3 による被害は生産量を制限する要素となっている。また近年では標高が 1300m を超える地域においても 30 度を超えることが多く、熱ストレスにより根腐病による被害が増加し、レタスの生産量がさらに減少することが懸念される。これらの現状を踏まえ、耐病性品種の作付けを推進することにより安定した生産性を確保する必要がある(Cabral and Reis 2013)。第 2 節では、根腐病レース 1 に対する高度耐病性の遺伝子座を同定することで、複数レースに対する耐病性を集積した新品種育成のための技術開発を試みた。

またレタス(*Lactuca sativa* L.)は、キク科で乳液を植物体全体に有することもあり、ゲノム DNA を抽出するのが難しい植物の一つとされている。その様な農作物からゲノム DNA を抽出する方法が開発されているものの(Kasajima et al. 2013)、1 個体あたりのゲノム DNA 抽出に時間とコストを要することが育種上の問題となっており、ゲノム DNA を抽出する工程の簡素化が強く求められている。実績ある市販のゲノム DNA 抽出キットを用いれば、質的および量的に信頼できるレタスゲノム DNA の抽出が可能であるが、選抜規模によってはランニングコストおよび実験労力の問題から市販キットの導入は難しい場合がある(Martinez 2017; Abdel-Latif and Osman 2017)。そこで第 3 節では、安価で迅速かつ簡易なゲノム DNA 抽出方法として、イネで実績のあるガラス繊維濾紙法(Fukami et al. 2008)に注目し、レタスでのマーカー選抜への適用性について検討した。

第1節 レタスの高温適応性関連形質を支配する遺伝子のマッピング

1. 緒言

レタスは冷涼な気候を好む植物であり、高温期の熱ストレスが収量や品質に悪影響を及ぼすことが知られている。そのため、日本では高温環境への適応がレタス品種に求められる重要な形質となっている。特に高温ストレス障害であるチップバーンはレタスの品質を大きく低下させるため、その障害を抑制できる品種育成は重要な課題である。またレタスは高温で抽苔が促進され、抽苔がはじまると葉が苦くなり商品価値が極端に下がってしまうため、高温条件下でも抽苔しにくい晩抽性が求められている。これら高温時のチップバーン発生や抽苔の早晩性は玉レタスで見られる2つの結球タイプ（サリナス型とエンパイヤ型、Fig.2-1-1A）との関連が知られている。葉縁が鋸歯状となるエンパイヤ型は一般的にチップバーン発生率が高く、晩抽性であると考えられている(Jenni et al. 2013)。これまでにサリナス型は優性で、エンパイヤ型は劣性に遺伝することが知られているが(Ryder 1999)、詳細な研究はされていなかった。そこで本研究では、玉レタスの結球タイプを決定している遺伝子座のマッピングと原因遺伝子の探索を試みた。

2. 材料と方法

圃場栽培試験

長野県野菜花き試験場(長野県塩尻市、北緯 36° 10'、東経 137° 93')において、5年間(2013年～2016年、2018年)の圃場栽培試験を行った。エンパイヤ型5品種(「サマーエース」、「シナノパワー」、「パトリオット」、「オリンピア」、「シナノホープ」)とサリナス型5品種(「ルシナ66」、「マイヤー」、「ラプトル」、「Vレタス」、「シナノグリーン」)からなる合計10品種の玉レタスを用いた。200穴のセルトレイに播種してから約15～20日後に、全面マルチした圃場に27cm間隔で定植した。定植してから概ね35～45日に収穫調査を行った。圃場栽培試験の詳細な気象条件をTable 2-1-1に記載した。

玉レタス「シナノグリーン」(サリナス型)と「VI185」(エンパイヤ型)は長野県野菜花き試験場で育成されたものである。

表現型の評価

圃場栽培試験では、6株の主茎長を測定して抽苔性を評価した。F₂集団では、各個体から種子が採れるように非破壊な方法で測定する必要があったため、開花日によって抽苔性を評価した。開花日は、上部の最初の花が早く咲きすぎて表現型の違いが観察できないことがあるため、2番目の花が咲いた日と定義した。チップバーンは30個体について結球部の外側を、10個体について結球部の内側を発生の有無について調査した。エンパイヤ型とサリナス型の抽苔性およびチップバーン発生率の有意差は、それぞれt検定およびフィッシャーの正確確率検定を用いて評価した。葉先の波打ちの有無については目視で確認した。

各形質の QTL マッピングに用いる集団の育成

「シナノグリーン」(サリナス型) と「VI185」(エンパイヤ型) との交配により、F₂ 集団 96 個体を得た。この集団を用いて、開花日と鋸歯状の葉縁の有無について調査した。各 F₂ 個体の自殖で得られた F₃ 系統は、葉縁の波打ちの有無に関して F₂ 個体の遺伝子型を推定するために使用した。

ddRAD-seq 解析

ddRAD-seq (double digested Restriction Associated DNA tag sequencing) 解析のため、Nucleo-Spin Plant II Extract Kit (Machery-Nagel、Duren、Germany)を用いて各レタス個体の葉からゲノム DNA を抽出した。ddRAD-seq ライブラリーの構築は、Matsumura et al. 2014 の方法に従って行った。要約すると、全サンプル(「VI185」、「シナノグリーン」、および 96 個の F₂ 集団サンプル) からのゲノム DNA を、制限酵素 PaeI (New England Biolabs) および NlaIII (New England Biolabs) で切断した。両制限酵素で切断された DNA 断片の両端にアダプターをライゲーションした後、それらをインデックス配列を含んだプライマーで増幅し、イルミナシーケンシングのために混合した。作成したライブラリーは、HiSeq2500 (Illumina) を使用して塩基配列を決定した。ペアエンドシーケンシングリード (100bp×2) から以下に述べる手順で ddRAD-seq タグの抽出、カウントおよびジェノタイピングを行った。本章の ddRAD-seq におけるシーケンスリードデータ (FASTQ ファイル) は、アクセッション番号 PRJNA523045 として DDBJ Sequence Read Archive (DRA) に登録した。

ddRAD-seq データ解析によるジェノタイピングと連鎖地図の構築

Fig.2-1-2 にシーケンスリードからジェノタイピングまでの RAD タグ抽出の手順を示す。簡潔に記すと、R 言語(R Development Core team 2017)を利用する QuasR パッケージ (Gaidatzis et al. 2015)を用いてアダプタートリミングしたシーケンスリードを RAD タグと定義し、その頻度を R の table 関数を用いてカウントした。また、多型のない領域を調べるために、親品種間に共通の RAD タグを抽出した。これらの「VI185」特異的 RAD タグ、「シナノグリーン」特異的 RAD タグ、親共通の RAD タグの配列を、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (Li and Durbin 2009)の aln モードを用いて、レタスのリファレンスゲノム配列にマッピングした。ゲノム配列の同じ位置にマッピングされた親特異的 RAD タグのペアを対立遺伝子タグとした。96 個体の F₂ 集団において、各対立遺伝子タグにより遺伝子型を決定した。F₂ 個体の半数以上で欠損値を持つか、カイ二乗検定に基づく P 値が 0.001 未満の対立遺伝子タグを遺伝子型データから除外した。次世代シーケンサによる遺伝子型データは、多くの場合、欠損データが多いという欠点があるため(Furuta et al. 2017)、データの補正とインピュテーションには R の ABHgenotypeR パッケージ(Furuta et al. 2017)

を適用した。ABHgenotypeR の maxHapLength のパラメータは 5 に調整した。連鎖マップは MapChart を用いて作図した(Voorrips 2002)。また、各対立遺伝子タグマーカの遺伝的距離と位置の遺伝地図構築は、AntMap プログラム(Iwata and Ninomiya 2006)を用いて計算した。これらの解析用スクリプトは、
https://github.com/KousukeSEKI/RAD-seq_scripts に 1. Parent_script.R、 2. RAD_mapping_script_BWA_aln_script.txt、 3. Map_list_script.R、 4. Population_tagcount_script.R、 5. Genotype_script.R、 6. Convert_ABH_script.R、 7. Post_data_correction_script.R.として公開している。

CIM 法による QTL 解析

上記の方法で解析した各 F₂ 個体における RAD-seq マーカーの遺伝子型データおよび連鎖地図、形質値をもとにした Composite interval mapping (CIM)による QTL 検出は、R/qt1 パッケージ(Broman et al. 2003)の Haley-Knott 回帰を用いて行った。1%有意水準でのゲノム全体の Logarithm of the likelihood ratio (LOD)の閾値は、各形質について 10、000 回の並べ替え検定を用いて個別に決定した。表現型分散の割合は、ピーク時の値から計算した。詳細なスクリプトは、CIM_script.R (https://github.com/KousukeSEKI/RAD-seq_scripts)に記述した。

レタスゲノムのリシーケンス解析と *de novo* アセンブリ

「VI185」および「シナノグリーン」の葉から NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel) を用いて、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA は、Covaris (Covaris Inc.) を用いて 300bp 程度にせん断した後、600 ng の DNA を用いて PCR-free の DNA-seq 用ライブラリーを調製した (the KAPA Hyper Prep Kit (Roche))。ライブラリーの品質確認は、Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, USA) を用いて行った。平均ライブラリーサイズは約 450bp であった。ライブラリーの定量は StepOnePlus system (Applied Biosystems)を用いて定量的リアルタイム PCR を行い、各ライブラリーの濃度を 10 nM に調整した。調製したライブラリーは、Illumina HiSeq 2500 システム (Illumina) を用いて配列決定した。ベースコールデータの FASTQ ファイルへの変換およびアダプタートリミングは、bcl2fastq2 (Illumina) を用いて行った。本シーケンスリードファイルはアクセッション番号 DRA008299 で DDBJ DRA に登録されている。シーケンスリードは CLC Genomics Workbench (QIAGEN) のトリムシーケンスツールを使用して FASTQ ファイルの低品質な塩基 (Q30 未満) をフィルタリングし、30 以上の品質スコアを示したリードのみを保持した。フィルタリングされた配列リードは、Map Reads Reference ツールを用いて *L. sativa* v 8.0 ゲノム(https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Lsativa_er) 上にマップし、Local Realignment ツールを用いて局所的な再アライメントを行った。構造変異を検出するために *de novo* アセンブリを行った。*de novo* アセンブリはデフォルトのパ

ラメータ設定で CLC Genomics Workbench *de novo* アセンブリツールを用いて行った。

PCR マーカーの設計と増幅

連鎖群 5 (LG5) の 251.386-253.367Mbp 領域の多型 (挿入、欠失、SNP を含む) をマーカーとして各領域を増幅するプライマーを設計した。プライマー名は、(連鎖群) _ (ゲノムバージョン) _ (ゲノム位置) とした。プライマーは Primer3 のウェブサイト (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用いて設計し、増幅には KOD FX (TOYOBO、) を使用した。PCR は、0.5 μ L の DNA テンプレート、0.4 μ L の各プライマー (50 μ M)、2 μ L の dNTP (2mM)、5 μ L の 2 \times PCR Buffer、0.2 μ L の KOD FX (1U/ μ L)、蒸留水 (dH₂O) を用いて合計 10 μ L になるように行った。PCR 条件は以下の通りで行った。94 $^{\circ}$ C で 5 分間、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、58 $^{\circ}$ C で 30 秒のサイクルを 30 回行い、その後 72 $^{\circ}$ C で 4 分間の 1 サイクルを行った。増幅後、9 μ L の PCR 産物を 2% アガロースゲル (TaKaRaBio) を用いて 100V で電気泳動した。

トランスクリプトーム解析

「VI185」および「シナノグリーン」から採取した葉からそれぞれ NucleoSpin RNA Plant (TaKaRaBio) を用いて Total RNA を抽出した。これら Total RNA より mRNA を精製し、NEB Next Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を用いて RNA-seq ライブラリーを調製した。ライブラリーの品質確認は、Agilent 2100 BioAnalyzer を用いて行った。ライブラリー内の平均挿入サイズは約 400bp であった。ライブラリーの定量は定量的リアルタイム PCR を用いて行い、各ライブラリーの濃度を 10 nM に調整した。調製したライブラリーは、Illumina HiSeq 2500 システムを用いてシーケンシングした。ベースコールデータの FASTQ ファイルへの変換およびアダプタートリミングは、bcl2fastq2 を用いて行った。シーケンスリードファイルはアクセス番号 DRA008298 として DDBJ SRA に登録されている。CLC Genomics Workbench のトリムシーケンスツールを使用して FASTQ ファイルの低品質な塩基 (Q30 未満) をフィルタリングし、30 以上の品質スコアを示したリードのみを保持した。フィルタリングされた配列のリードは、デフォルトのパラメータで CLC Genomic Workbench を使用して、*L. sativa* v8.0 ゲノム上にマッピングした (Table 2-1-2)。

定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析

RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を用いて、「シナノグリーン」と「VI185」の播種後 1 ヶ月が経った植物の葉から Total RNA を抽出した。各品種の 3 個体からそれぞれ RNA サンプルを抽出した。ProtoScript Reverse transcriptase (New England Biolabs) およびランダムヘキサマーを用いて、各 RNA サンプルから一本鎖 cDNA を合成した。*LsTCP4* cDNA の特異的増幅のために、プライマーセット (5'-ACGACGGCATCTCCGATAAG-3' および

5'-ACCAGTGATGACTGAAGAACCCT-3') を設計した。定量的 PCR の基準遺伝子として、チューブリンをコードする TUB 遺伝子 (Borowski et al 2014) を増幅するためのプライマーを用いた。各 cDNA を 2x TB Green Premix Ex Taq (TakaraBio 社製) を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System (TakaraBio 社製) で増幅し、Second Derivative Maximum (SDM)法に基づいて Ct 値を算出した。この Ct 値をもちいて、各サンプルにおける基準遺伝子の発現で補正した *LsTCP4* の相対発現レベルを推定し、シナノグリーンの 1 つのサンプルの値を 1 とした相対量で示した。

葉表面の電子顕微鏡観察

エンパイヤ型とサリナス型の新鮮な葉を採取し、カーボンテープで台座に取り付け、葉表面の表皮細胞を SEM (VE-7800 ; キーエンス) で観察した。

3. 結果と考察

高温時におけるチップバーン発生の品種間差異

玉レタスのエンパイヤ型 5 品種とサリナス型 5 品種 (計 10 品種) を 5 年間 (2013 年～2016 年、2018 年) 圃場で栽培して 2 種類の表現型の違いを評価した。栽培期間は、真夏期 (6 月～8 月) に行った。エンパイヤ型はすべての品種で葉にうねりのある鋸歯状の葉を示したのに対し、サリナス型は葉縁に鋸歯のない波状の葉を示した (Fig.2-1-1A)。各個体について抽苔の指標である主茎の長さで高温障害であるチップバーンの発生状況を個々の株でスコア化した。エンパイヤ型はサリナス型に比べて主茎長が短く、サリナス型では品種によるバラつきがあったため標準偏差が大きかった (Table 2-1-3、Table 2-1-4)。エンパイヤ型の主茎長は 8cm 未満であり、真夏でも晩抽性であることが示された (Table 2-1-1、Table 2-1-3、Table 2-1-4)。チップバーンは毎年一様に発生するわけではなかったが、エンパイヤ型ではサリナス型よりも頻度が多かった。両タイプとも外葉よりも結球内部での発生が多かった (Table 2-1-5、Table 2-1-6)。これらの結果から、エンパイヤ型とサリナス型の葉の形状は、重要な 2 つの農学的形質である抽苔性とチップバーンの発生と関連があることが示唆された。

葉先形状と抽苔性の遺伝解析

上述のようにレタスにおける高温時の抽苔性とチップバーンの発生が品種間の違い、すなわち遺伝的差異があることが推測され、さらにそれらは葉先形状の異なる品種群 (エンパイヤ型とサリナス型) の違いとの関連も見られた。これら各形質を支配する遺伝子同定のためにそれらの遺伝解析を検討したが、チップバーンについては気候の影響が大きいため安定した形質評価が容易ではないと考え、葉先形状 (葉先の波打ち程度) と抽苔性についての遺伝解析を行った。

玉レタスのエンパイヤ型とサリナス型における葉先の波打ち程度と抽苔性の遺伝を理解

するために、鋸歯状の葉先形状となり晩抽性の「VI185」（エンパイヤ型）と波状の葉先形状となり早抽性の「シナノグリーン」（サリナス型）（Fig.2-1-1A）を交配して F₁ 個体および F₂ 集団を作出し、それぞれの表現型を調査した。その結果、F₁ 個体の葉先は「シナノグリーン」（サリナス型）と同様の形状を示し、波状の葉先を示すサリナス型の表現型が優性と考えられた。F₂ の 96 株のうち、33 株に「VI185」と同様な鋸歯状の葉先形状が認められ、残りの 63 株には「シナノグリーン」と同様な波状の葉先の形状が認められた。さらに、各 F₂ 個体からの F₃ 系統を育成し、その葉先の形状を調査した。「VI185」と同様な鋸歯状の葉先を有する F₂ 個体に由来する F₃ 系統はすべて鋸歯状となったことから、これらの F₂ 個体は葉先が鋸歯状となるために必要な対立遺伝子がホモ接合体であることが示唆された。また、「シナノグリーン」と同様な波状の葉の表現型を示す F₂ 個体では、19 個体に由来する F₃ 系統はすべて親と同様の葉の表現型を示したが、44 個体に由来する F₃ 系統では葉先の形状が分離していた（Table 2-1-7）。このことから、葉の形状（鋸歯状または波状の葉先形状）は単一の遺伝子座によって決定され、波状の葉先形状が優性であることが示唆された。

次に同じ F₂ 集団について各 F₂ 個体の開花日を抽苔性の指標として調査した。これら各個体の開花日と前述の葉先形状に関わる推定遺伝子座の遺伝子型を比較すると明確な連鎖関係があると推定される結果を示した。これらの結果から、葉先の形状と開花日（抽苔性）は同一遺伝子座または強く連鎖した遺伝子座によって制御されており、さらにそのヘテロ接合体の抽苔性は半優性の表現型を示していると考えられた（Fig.2-1-3）。

ddRAD-seq 解析を用いた葉先形状と抽苔性に関わる遺伝子座のマッピング

「VI185」（エンパイヤ型）と「シナノグリーン」（サリナス型）に見られた葉先形状（Fig.2-1-1）と抽苔の早晩性を支配する遺伝子座マッピングのために、F₂ 集団における ddRAD-seq 解析を行い、DNA マーカーの開発と各 F₂ 個体におけるそれらマーカーの遺伝子型決定を行った。まず、「VI185」（エンパイヤ型）と「シナノグリーン」（サリナス型）の 2 つの親品種間のゲノム DNA 多型を PacI と NlaIII の制限酵素を用いた ddRAD-seq 解析を行って探索した。ddRAD-seq ライブラリーのシークエンスの結果、「VI185」および「シナノグリーン」からそれぞれ 6,031,184 および 6,279,218 のシングルリード（100 bp）が得られ、RAD タグの抽出とカウント（タグの出現頻度）を行った。「VI185」と「シナノグリーン」では、それぞれ 2 カウント以上の RAD タグが 366,846 個と 364,689 個得られた。2 つの親品種の RAD タグを比較すると、それぞれ「VI185」特異的なタグが 78,587 個、「シナノグリーン」に特異的なタグが 75,489 個検出され、2 つの親品種に共通する RAD タグは 242,106 個検出された。各親に特異的な RAD タグ配列についてレタスのリファレンスゲノム配列["Salinas" (<https://genomevolution.org/coge/GenomeInfo.pl?gid=28333>) version8] に対してリードマッピングを行った。2 つの親品種間における SNP や InDels を持つ 4,992 組の RAD タグを対立遺伝子タグとして定義し（Table 2-1-8）、これらの対立遺伝子タグを各形質の遺伝的マッピングのための共優性マーカーとして使用した。「VI185」

と「シナノグリーン」との交配で得られた F₂ 集団の 96 個体についても ddRAD-seq 解析を行い、これら 4,992 箇所の共優性マーカー遺伝子座の遺伝子型を決定した。これらの遺伝子型は、各遺伝子座における各対立遺伝子タグの有無に基づいて決定した。F₂ 集団の解析データにおいて欠損の多い RAD タグデータのマーカーを除外した後、96 個の F₂ 個体における 4,517 マーカー遺伝子座の遺伝子型データを連鎖地図構築に用いた (Fig. 2-1-4)。4,517 マーカーのうち連鎖地図上で同一箇所に位置したマーカーを除いて整理した結果、840 遺伝子座の共優性マーカーからなる、1529.2 cM の連鎖地図を作製した。平均マーカー間距離 (cM) は、1 マーカーあたり 0.2cM (LG1、LG2、LG5) から 1.5cM (LG4) までの範囲であった。また連鎖群当たりの座乗マーカー数は 140 個 (LG4) から 810 個 (LG5) であった (Table 2-1-8)。

次に上記の各 F₂ 個体の ddRAD-seq 解析データから作成した共優性マーカーの遺伝子型データおよびそれに基づく連鎖地図を用いて、葉先の形状の形質について CIM による QTL 解析を行った。その結果、葉先の形状を支配すると推測される遺伝子座が LG5 に位置し、6.22cM 間隔で 2 つのマーカー (LG5_v8_244.527Mbp と LG5_v8_256.311Mbp) に挟まれていることがわかった。同様に、開花日に関する遺伝子座をマッピングした結果、LG5 上の葉先の形状に関する遺伝子座と同じ領域に位置していることがわかった (Table 2-1-9)。CIM の結果では、葉先の形状 (葉縁が鋸歯状となる表現型) は、明らかに単一の遺伝子座によって決定されていると推定されたため、この領域周辺にある両親間の多型の遺伝子型と F₂、F₃ 個体の表現型をもとに、その遺伝子座の位置をさらに特定することを試みた (Table 2-1-7, Fig. 2-1-5)。これにより、葉先の形状を決めている遺伝子座は、LG5 上の 251.386Mbp から 253.367Mbp までの 1.98Mbp (遺伝的距離にして 2.1cM) の間に位置しており、その最も近傍に位置する LG5_v8_252.185Mbp と名付けたマーカーの遺伝子型は、解析に供試した F₂ 集団で見ると、葉先の形状における表現型と完全に一致していることが明らかになった。同領域内に位置するさらに 6 つのマーカーについての F₂ 個体における遺伝子型と表現型データから葉先の形状に関する標的遺伝子座の詳細な絞り込みを行った (Table 2-1-10)。その結果、葉縁形状遺伝子座を 1.33Mbp の範囲内に絞り込むことに成功し、この領域に位置する 4 つのマーカー (LG5_v8_251.738Mbp、LG5_v8_252.704Mbp_Ddel、LG5_v8_252.743Mbp、LG5_v8_252.927Mbp) が、解析した F₂ 集団において鋸歯状葉縁表現型と完全な連鎖を示すことがわかった。さらに、これら 6 つのマーカーの遺伝的関連性を評価するために、レタスの園芸 5 種に分類された 51 品種についても、これら 6 つのマーカーの遺伝子型を調べた (Fig. 2-1-5A, B)。この 51 品種のうち葉先が鋸歯状 (エンパイヤ型形質) を示したものは 21 品種で残りの 30 品種はサリナス型と同様な波状であった。全品種の遺伝子型を調べたところ、LG5_v8_252.743Mbp マーカーのみが葉先が鋸歯状である表現型との関連を示した (Table 2-1-10, Fig. 2-1-5)。このことから、原因遺伝子は LG5 の 252.704Mbp から 252.927Mbp の間 (223kbp) に位置していると予測された。この領域について、*L. sativa* V8 のリファレンスゲノム配列の予測遺伝子データを検索したところ、3

つの遺伝子 (*Lsat_1_v5_gn_5_126960*, *Lsat_1_v5_gn_5_127001*, *Lsat_1_v5_gn_5_127021*) が座乗していた (Table 2-1-11)。さらに「シナノグリーン」と「VI185」の全ゲノムシークエンス解析を行ってリファレンスゲノムへリードマッピングを行ったデータからこれら3つの候補遺伝子の配列を比較すると、2つの親系統間で小さな挿入/欠失や非同義置換は見られなかったが、*Lsat_1_v5_gn_5_127021*に長い塩基配列の挿入が見られた (Fig. 2-1-6A, Table 2-1-11)。また、両品種の葉における RNA-seq 解析による発現解析データにおいて *Lsat_1_v5_gn_5_127001* および *Lsat_1_v5_gn_5_126960* の転写物は検出されなかったが、*Lsat_1_v5_gn_5_127021* は発現が見られた (Table 2-1-11)。これらの結果から、*Lsat_1_v5_gn_5_127021* が葉先の形状形質に関与する遺伝子である可能性が示唆された。リファレンスゲノムのアノテーションによると、*Lsat_1_v5_gn_5_127021* 遺伝子座には2つの遺伝子モデルが予測されていたが、この領域への RNA-seq リードのマッピング結果とこの遺伝子モデルとは必ずしも一致しなかった。そこで、RNA-seq リードのマッピング結果に基づいて同遺伝子座の最も有力な遺伝子モデルを再構築し、その予測遺伝子を *LsTCP4* と命名した (Fig. 2-1-6B)。 *LsTCP4* および相同遺伝子の配列を比較した系統解析の結果、*LsTCP4* はシロイヌナズナの鋸歯状葉縁に関連することが知られている TCP ファミリー転写因子をコードする CINCINNATA(CIN)様グループの遺伝子群に分類された (Fig. 2-1-7)。

この TCP は植物界に特有のタンパク質で、発生や形態形成の制御に関与していることが知られている (Navaud et al. 2007; Koyama et al. 2011)。

LsTCP4 は完全な TCP ドメインを有し、シロイヌナズナ CIN 型 TCP ファミリーの *AtTCP4* に最も類似していた (Fig. 2-1-7, Fig. 2-1-8)。「VI185」の全ゲノムシークエンス解析データを *de novo* アセンブルし、その配列に「VI185」の RNA-seq リードをマッピングしたところ、*LsTCP4* の 3'-UTR に 5411 bp の Ty3/gypsy レトロトランスポゾン様配列 (Fig. 2-1-9, Fig. 2-1-10) が挿入されており、挿入箇所の下流には RNA-seq リードがほとんどマップされなかった (Fig. 2-1-6B)。さらに、「VI185」での *LsTCP4* の発現レベルは、RNA-seq および定量的 RT-PCR 分析における RPKM によれば、「シナノグリーン」での *LsTCP4* の発現レベルよりも低かった (Table 2-1-11, Fig. 2-1-6B, Fig. 2-1-11)。

「シナノグリーン」(サリナス型) と「VI185」(エンパイヤ型) の多型検出を容易にするためにマルチプレックス PCR を可能とするプライマーを設定した。「VI185」(エンパイヤ型) の遺伝子型を検出するためにレトロトランスポゾンの挿入配列中にフォワードプライマーを設計し、PCR 産物の大きさと *de novo* アセンブリ解析から予測される配列長とが一致した (Fig. 2-1-12, Fig. 2-1-6, Fig. 2-1-10)。これらの結果から、*LsTCP4* へのレトロトランスポゾン挿入は、「VI185」(エンパイヤ型) 特異的なゲノム構造変異であることが示唆された。

葉表面の電子顕微鏡観察

上記の解析によって「シナノグリーン」と「VI185」の間で *LsTCP4* の配列構造の違い

を同定したが、シロイヌナズナの TCP ファミリー変異体では葉の表皮細胞の形状に異常が見られていることから、レタス両品種についても葉面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、シロイヌナズナの TCP 変異体の特徴である表皮細胞の配列パターンと形状を比較した。「シナノグリーン」の葉の表皮細胞はお互いに入り組んだ一般的なパターンの配列を示したのに対し、「VI185」の葉の表皮細胞は丸みを帯びたシロイヌナズナの TCP 変異体と同様な表皮細胞の形状となっていることが明らかとなった (Fig.2-1-1C)。

本研究では、「VI185」の葉先が鋸歯状となる要因は、*LsTCP4* の 3'-UTR にレトロトランスポゾンが挿入されたことにより、*LsTCP4* の転写量が減少したことが原因であろうと推測した (Fig. 2-1-6A, B, Fig. 2-1-10, Table 2-1-11, Table 2-1-12)。高等植物では長い 3'-UTR が mRNA の不安定性を促すことが報告されている (Schwartz et al. 2006)。そのため、レトロトランスポゾンが挿入された「VI185」の長い 3'-UTR が mRNA の不安定性を引き起こしているのではないかと推測した。「VI185」では、シロイヌナズナの TCP ファミリー変異体で見られるように、葉の表皮細胞が丸みを帯びていたことから (Fig.2-1-1C)、レタスにおける *LsTCP4* 発現と葉の細胞形状との関連が示唆された。TCP 転写因子は、2つのサブクラス：クラス I およびクラス II に分類される (Nicolas and Cubas 2016)。クラス II はさらに CIN 様グループと CYC/TB1 グループの 2つのサブグループに分かれている (Navaud et al. 2007)。配列の類似性によると、*LsTCP4* は CIN 様 TCP グループに分類される (Fig. 2-1-7)。CIN 様 TCP 転写因子は、多くの植物において葉の大きさや形状に影響を与えることが示されており、miRNA による制御によって植物の発生に関与している (Koyama et al. 2010, 2011, 2017)。シロイヌナズナの CIN 様 TCP グループには 8つの遺伝子が知られており、これらの複数の遺伝子の間に機能的な相補性が存在することが示唆されている。このように、単一の CIN 様 TCP 遺伝子のみに変異があっても、葉の形が目に見える形で変化することはないと考えられる。しかし、今回の研究では、*LsTCP4* にトランスポゾンが挿入されて転写量が減少すると、レタスの葉先の形状が変化することが示された。これは、シロイヌナズナとレタスでは、CIN 様 TCP 遺伝子の構造的・制御的な違いがあるためと考えられる。また、シロイヌナズナでは、CIN 様 TCP 遺伝子群の 5つの遺伝子が miR319 の標的となることが知られているが (Palatnik et al. 2003)、レタスでは、CIN 様 TCP 遺伝子群のうち 2つの遺伝子にのみ miR319 の標的と推測される部位が見出され (Fig. 2-1-7, Table 2-1-12)、*LsTCP4* がシロイヌナズナにおける TCP 遺伝子とは発現制御が異なる可能性が示唆された。レタスゲノム中には *LsTCP4* の相同遺伝子

(*Lsat_1_v5_gn_9_99020.1*) が見られたが、「シナノグリーン」と「VI185」のいずれにおいてもその発現レベルは低かった (Table 2-1-12)。したがって、この類縁遺伝子がエンバイヤ型レタスにおける *LsTCP4* の発現低下を補える可能性は低いと考える。シロイヌナズナでは、miR319 の高レベルな発現または低い TCP 活性は、葉先が鋸歯状となる過剰な細胞増殖をもたらすことや (Schommer et al. 2012)、GUS レポーターコンストラクトを用いてシロイヌナズナ TCP 変異体の鋸歯状な葉先における継続的な細胞分裂活性も確認されて

いる(Bresso et al. 2018)。レタスにおける *LsTCP4* の発現レベル低下が同様にこのような細胞レベルでの影響を与えているのかについては今後の課題であるが、エンパイヤ型の葉先にみられる過剰なうねりが高温条件下でのチップバーン発生の原因であることは考えられる。今までの研究で LG5 にチップバーンの主要な QTL が座乗し、その QTL は複数の農業形質間で多面的な効果を持つことが示唆されている(Jenni et al. 2013; Macias-González et al. 2019)。

***LsTCP4* が高温適応性関連形質に与える多面的な影響と育種の可能性について**

シロイヌナズナの TCP ファミリータンパク質は上述のような葉の形態形成への関与以外にも FLOWERING LOCUS T タンパク質と相互作用し、開花時期に影響を与えることが知られている(Mimida et al. 2011; Niwa et al. 2013)。このことから、レタスにおいてもレトロトランスポゾン挿入による *LsTCP4* の変異は「VI185」における葉先の形状と抽苔性の両方に多面的な効果をもたらしていると推察される。

Rider (1999) によると、記録に残っている最も古い公的なレタス育種プログラムは 1923 年にカリフォルニア州で開始された。したがって、玉レタスの育種の歴史はまだ 100 年程度しかない。いくつかの玉レタスの系統解析を行った結果、晩抽性品種はグリーンリーフレタスの「グランドラピッド」に由来することが明らかになった(Thompson and Ryder 1961)。これは、本研究で LG5 に位置する葉先形状に関連する DNA マーカーの遺伝子型が、分析したグリーンリーフレタス品種のすべてで一致したことから裏付けられた (Fig. 2-1-5B)。このように、鋸歯状な葉先に関連する対立遺伝子は、これまでの育種家が新しい玉レタス品種に晩抽性とパリパリした食感を導入するために意図的に選び出した可能性が考えられた。日本の盛夏期に複数の品種の表現型を調べたところ、エンパイヤ型はチップバーンを起こしやすいのに対し、高温条件では晩抽性の表現型を示すことが分かった

(Table 2-1-5、Table 2-1-6)。エンパイヤ型品種「VI185」とサリナス型品種「シナノグリーン」との交配で得られた F₂ 集団では、鋸歯状な葉先と晩抽性との間には遺伝的な連鎖関係があることが示された。その結果、LG5 に鋸歯状な葉先と晩抽性の原因となる遺伝子が 244.527Mbp から 256.311Mbp の間に存在し (Table 2-1-9)、その劣性対立遺伝子が両方の表現型の原因となっていると考えられた。この結果は、葉先が鋸歯状となる形質が劣性であるという Ryder (1999) の知見と一致した。さらに、Jenni ら (2013) は、LG5 上の AVJT-OP4 (別名 CLS_S3_Contig10103) マーカーを用いて、玉レタスのエンパイヤ型とチップバーン感受性との関連性を示したことを報告している。AVJT-OP4 マーカーは、リファレンスゲノム *Lactuca sativa* cv. Salinas V8 上では LG5 の 253.685 Mbp の位置にマップされた (Data not shown)。したがって、本研究で見出した葉先形状に関わる候補遺伝子 *LsTCP4* の染色体上の位置は Jenni ら (2013) が報告したマーカーの位置と一致していた (Fig.2-1-B6、Table 2-1-9)。また最近、Macias-González ら (2019) は、エンパイヤ型品種「Emperor」とサリナス型品種「Calicel」を用いて、葉先形状の遺伝子座が LG5 上のマ

一カーである Lsat_1_v5_g_5_892 (244 Mbp) と Lsat_1_v5_g_5_1614 (269 Mbp) の間に位置すると報告しており、*LsTCP4*はこの領域内に位置していることから、それらの品種における葉先形状の遺伝子が *LsTCP4*である可能性を強く示している。このような本研究で供試した品種群以外のエンパイヤ型レタス品種の全てにおいて本研究で見出した *LsTCP4*の 3'-UTR へのトランスポゾン挿入変異を持つかどうかは調査の必要があるが、エンパイヤ型レタス一般における鋸歯状な葉先形質の原因遺伝子は *LsTCP4*である可能性が高く、同遺伝子やその多型をマーカーとして利用することで高温時の晩抽性の育種に大いに貢献できると考える。

A



VI185
(Empire type)



ShinanoGreen
(Salinas type)

B



Empire type

Salinas type

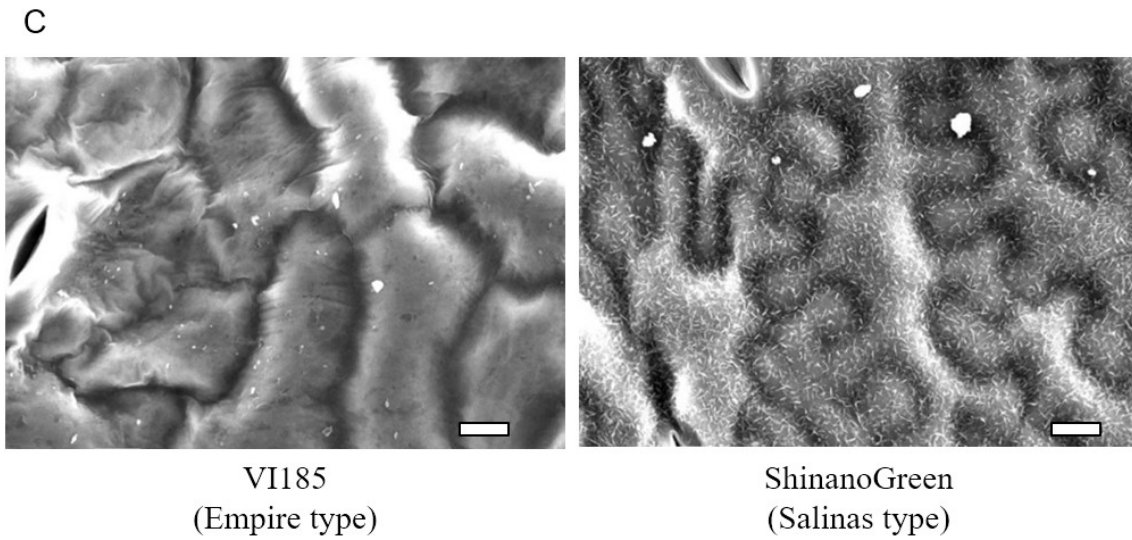


Fig.2-1-1

Features of two types of crisphead lettuce.

(A) The undulation shape of leaf margin differs between 'VI185 (Empire type)' and 'ShinanoGreen (Salinas type)' of crisphead lettuce. Empire type has serrated leaf margin, while Salinas type has wavy leaf. (B) Empire type tend to be more susceptible to tipburn than Salinas type. (C) Paradermal view of epidermal cells in Empire type and Salinas type using SEM. Bar = 100 µm.

Table 2-1-1

Meteorological conditions of field cultivation tests in this study.

Year	Planting	Harvest survey	Cultivation period (Day)	Total precipitation (mm/m ²)	Temperature		
					Highest (°C)	Mean (°C)	Lowest (°C)
2013	21-Jun	1-Aug	41	214.5	35	22.7	12.9
2014	9-Jun	22-Jul	43	139	31.3	20.8	9.9
2015	16-Jun	30-Jul	44	203.5	34.5	21.9	12.7
2016	16-Jun	28-Jul	42	126	33	22.3	11.8
2018	29-Jun	6-Aug	38	38.5	36.7	25.9	17.9

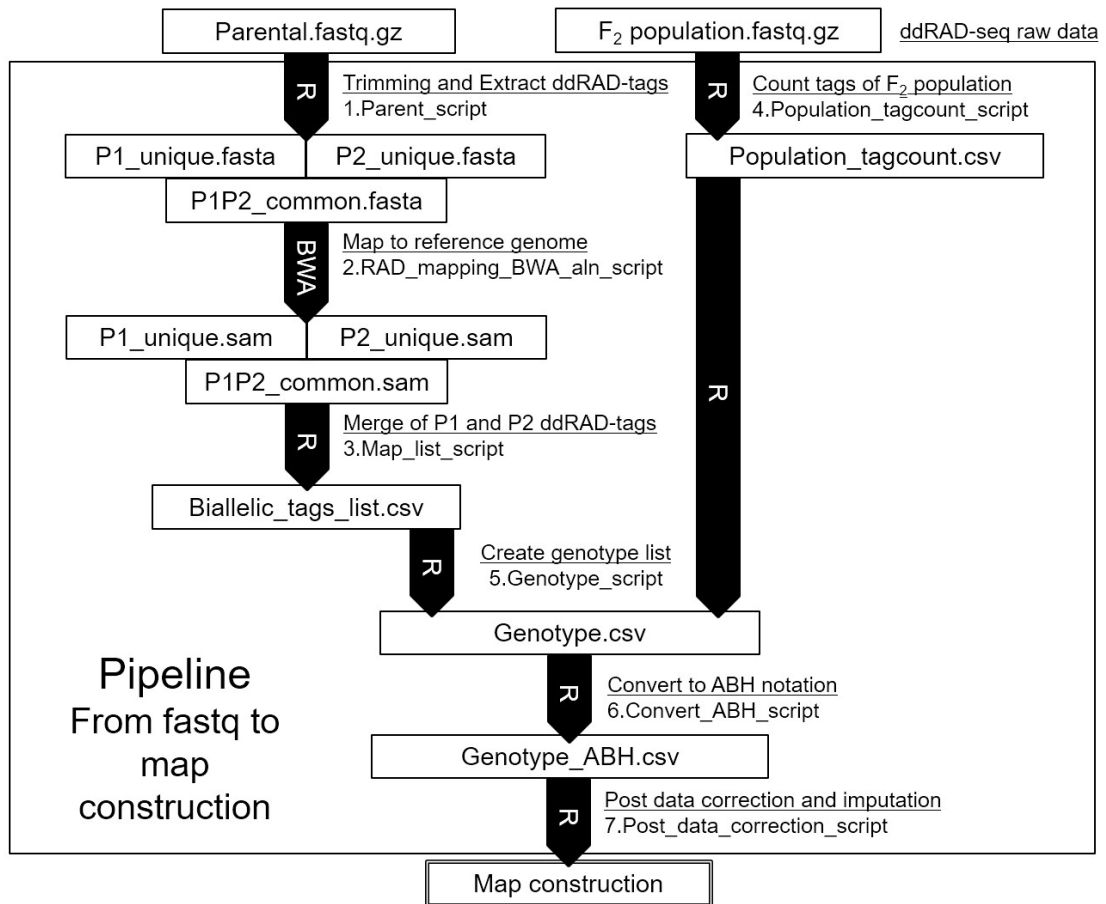


Fig.2-1-2

Pipeline workflow of ddRAD-seq data analysis from sequence reads to linkage map development.

Table 2-1-2

Summary of sequencing and mapping analysis for RNA-Seq reads.

	Reads mapped in pairs	Reads mapped in broken pairs	Reads not mapped	Total reads used for mapping (Q30)
ShinanoGreen_1	56,988,088	6,293,055	1,910,007	65,191,150
ShinanoGreen_2	44,254,928	5,190,976	1,456,048	50,901,952
ShinanoGreen_3	42,965,776	4,884,985	1,566,433	49,417,194
V185_1	44,688,454	5,119,768	1,507,316	51,315,538
V185_2	45,094,752	4,795,157	1,522,819	51,412,728
V185_3	46,718,338	6,844,921	1,617,157	55,180,416

Table 2-1-3

Difference in bolting times in lettuce cultivars between 5 Empire type and 5 Salinas type evaluated by the mean values of stem length inside the head in field cultivation tests.

Year	Type	Stem Length (cm)	SD	<i>P</i> -value
2013	Empire	6.03	±0.97	7.20×10 ⁻³
	Salinas	7.62	±2.9	
2014	Empire	6.80	±1.47	0.9466
	Salinas	6.78	±1.17	
2015	Empire	6.05	±1.03	0.2913
	Salinas	6.40	±1.52	
2016	Empire	8.73	±2.19	0.08999
	Salinas	10.23	±4.2	
2018	Empire	6.44	±1.69	1.76×10 ⁻⁴
	Salinas	11.58	±6.44	
Total	Empire	6.81	±1.82	1.29×10 ⁻⁵
	Salinas	8.48	±4.23	

Table 2-1-4

The mean values of inner stem length for 10 cultivars in field cultivation tests.

Year	Salinas type									
	Empire type					Salinas type				
	SummerAce	ShinanoPower	Patriot	Olympia	ShinanoHope	Lushina66	Mayer	Raptor	Viettuce	ShinanoGreen
Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)	Average (cm)
2013	5.00 ±0.46 a	5.37 ±0.42 ab	5.95 ±0.61 ab	6.88 ±0.56 ab	6.93 ±0.83 ab	4.97 ±0.30 a	5.72 ±0.34 ab	7.52 ±0.59 ab	7.93 ±1.20 b	11.97 ±3.36 c
2014	3.92 ±0.26 a	3.27 ±0.51 a	4.78 ±0.37 ab	5.15 ±0.37 ab	6.05 ±0.85 bc	3.42 ±0.34 a	4.77 ±0.94 ab	5.27 ±0.62 ab	7.37 ±1.05 c	10.13 ±2.19 d
2015	4.23 ±0.91 a	4.95 ±0.65 a	5.68 ±0.76 a	5.82 ±0.43 a	7.20 ±1.70 a	3.70 ±0.67 a	5.22 ±0.93 a	6.93 ±1.66 a	13.63 ±6.18 b	18.53 ±1.79 b
2016	7.92 ±1.35 ab	6.42 ±0.44 a	8.78 ±1.56 ab	10.23 ±2.90 ab	10.32 ±1.43 ab	6.30 ±0.69 a	6.92 ±1.05 ab	10.33 ±1.37 ab	11.37 ±1.33 b	16.25 ±4.51 c
2018	5.53 ±0.44 a	5.43 ±0.45 a	5.83 ±0.47 a	9.27 ±1.78 a	6.13 ±0.62 a	5.32 ±0.58 a	7.15 ±0.77 a	8.48 ±1.30 a	15.85 ±3.71 b	21.10 ±3.39 c
Total	5.32 ±1.62 ac	5.09 ±1.15 ab	6.21 ±1.59 ac	7.47 ±2.47 bc	7.33 ±1.92 bc	4.74 ±1.19 a	5.95 ±1.23 ac	7.71 ±2.03 c	11.23 ±4.55 d	15.60 ±5.09 e

Table 2-1-5

The difference in tipburn susceptibility in lettuce cultivars between 5 Empire type and 5 Salinas type evaluated by both inside and outside the head in field cultivation tests.

Year	Type	Outside Tipburn				Inside Tipburn			
		%Tipburn	No.with tipburn	No. no tipburn	P-value	%Tipburn	No.with tipburn	No. no tipburn	P-value
2013	Empire	34.0	51	99	1.43×10^{-4}	76	38	12	3.22×10^{-7}
	Salinas	14.7	22	128		24	12	38	
2014	Empire	8.1	13	148	0.3658	78	39	11	6.82×10^{-6}
	Salinas	5.2	8	145		32	16	34	
2015	Empire	23.1	40	133	9.00×10^{-14}	100	50	0	1.13×10^{-10}
	Salinas	0.0	0	150		46	23	27	
2016	Empire	20.0	30	120	1.91×10^{-4}	100	50	0	9.98×10^{-5}
	Salinas	5.3	8	142		74	37	13	
2018	Empire	59.3	89	61	$< 2.2 \times 10^{-16}$	84	42	8	2.04×10^{-7}
	Salinas	12.0	18	132		32	16	34	
Total	Empire	28.4	223	561	$< 2.2 \times 10^{-16}$	64.6	219	120	$< 2.2 \times 10^{-16}$
	Salinas	7.4	56	697		36.1	104	184	

Table 2-1-6

Tipburn susceptibility for 10 cultivars in field cultivation tests.

Year	Cultivar	Type	Outside Tipburn			Inside Tipburn		
			%Tipburn	No.with tipburn	No. no tipburn	%Tipburn	No.with tipburn	No. no tipburn
2013	Olympia	Empire	26.7	8	22	40	4	6
2014	Olympia	Empire	13.3	4	26	70	7	3
2015	Olympia	Empire	26.7	8	22	100	10	0
2016	Olympia	Empire	6.7	2	28	100	10	0
2018	Olympia	Empire	46.7	14	16	70	7	3
2013	Patriot	Empire	20.0	6	24	50	5	5
2014	Patriot	Empire	0.0	0	30	70	7	3
2015	Patriot	Empire	0.0	0	30	100	10	0
2016	Patriot	Empire	6.7	2	28	100	10	0
2018	Patriot	Empire	70.0	21	9	70	7	3
2013	ShinanoHope	Empire	26.7	8	22	100	10	0
2014	ShinanoHope	Empire	10.0	3	27	100	10	0
2015	ShinanoHope	Empire	30.0	9	21	100	10	0
2016	ShinanoHope	Empire	16.7	5	25	100	10	0
2018	ShinanoHope	Empire	60.0	18	12	80	8	2
2013	ShinanoPower	Empire	66.7	20	10	100	10	0
2014	ShinanoPower	Empire	16.7	5	25	80	8	2
2015	ShinanoPower	Empire	66.7	20	10	100	10	0
2016	ShinanoPower	Empire	60.0	18	12	100	10	0
2018	ShinanoPower	Empire	80.0	24	6	100	10	0
2013	SummerAce	Empire	30.0	9	21	90	9	1
2014	SummerAce	Empire	3.3	1	29	70	7	3
2015	SummerAce	Empire	10.0	3	27	100	10	0
2016	SummerAce	Empire	10.0	3	27	100	10	0
2018	SummerAce	Empire	40.0	12	18	100	10	0
2013	Lushina66	Salinas	3.3	1	29	30	3	7
2014	Lushina66	Salinas	16.7	5	25	50	5	5
2015	Lushina66	Salinas	0.0	0	30	30	3	7
2016	Lushina66	Salinas	0.0	0	30	40	4	6
2018	Lushina66	Salinas	3.3	1	29	0	0	10
2013	Mayer	Salinas	13.3	4	26	50	5	5
2014	Mayer	Salinas	0.0	0	30	20	2	8
2015	Mayer	Salinas	0.0	0	30	40	4	6
2016	Mayer	Salinas	3.3	1	29	100	10	0
2018	Mayer	Salinas	10.0	3	27	50	5	5
2013	Raptor	Salinas	53.3	16	14	40	4	6
2014	Raptor	Salinas	6.7	2	28	40	4	6
2015	Raptor	Salinas	0.0	0	30	90	9	1
2016	Raptor	Salinas	10.0	3	27	100	10	0
2018	Raptor	Salinas	30.0	9	21	100	10	0
2013	ShinanoGreen	Salinas	0.0	0	30	0	0	10
2014	ShinanoGreen	Salinas	0.0	0	30	20	2	8
2015	ShinanoGreen	Salinas	0.0	0	30	0	0	10
2016	ShinanoGreen	Salinas	0.0	0	30	40	4	6
2018	ShinanoGreen	Salinas	10.0	3	27	10	1	9
2013	Vlettuce	Salinas	3.3	1	29	0	0	10
2014	Vlettuce	Salinas	3.3	1	29	30	3	7
2015	Vlettuce	Salinas	0.0	0	30	70	7	3
2016	Vlettuce	Salinas	13.3	4	26	90	9	1
2018	Vlettuce	Salinas	6.7	2	28	0	0	10

Table 2-1-7

Segregation of leaf shape in F₂ populations derived from 'VI185' and 'ShinanoGreen'.

Population	Total	Serrated leaf	Wavy leaf (Hetero)	Wavy leaf (Homo)	Segregation ratio	χ^2 (1:2:1)
VI185	10	10	-	0	-	-
ShinanoGreen	10	0	-	10	-	-
F ₂	96	33	44	19	1:1.3:0.6	0.09

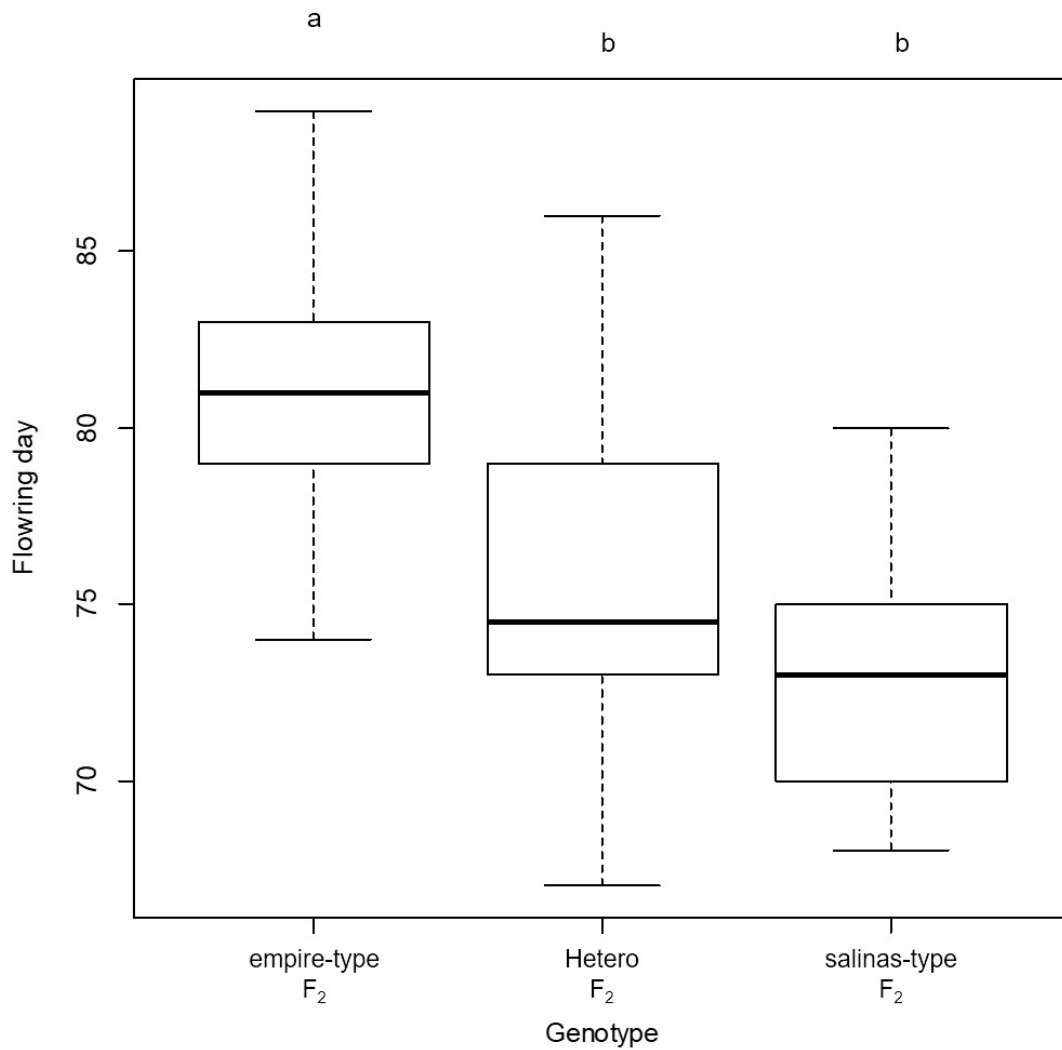


Fig.2-1-3

The difference of bolting tolerance among three genotypes of putative leaf shape locus in F₂ population derived from 'VI185' and 'ShinanoGreen'. The bolting tolerance was evaluated by the days to flowering from planting. Different alphabet above boxplot represents significant difference ($P < 0.01$) among three genotypes.

Table 2-1-8
Summary of integrated lettuce linkage groups.

Linkage groups	Total mapped tags	Linkage construct marker									
		Common tags		ShinanoGreen unique tags		VH185 unique tags		No.biallelic tags	Map length (cM)	Average interval between markers	
		No.RAD-tags	(%)	No.RAD-tags	(%)	No.RAD-tags	(%)				
LG1	42512	21914	51.5	10990	25.9	9608	22.6	682	153.9	0.2	
LG2	40733	22562	55.4	8516	20.9	9655	23.7	588	142.9	0.2	
LG3	52007	31542	60.6	10255	19.7	10210	19.6	504	199.7	0.4	
LG4	70863	47816	67.5	10174	14.4	12873	18.2	140	213.8	1.5	
LG5	66541	38787	58.3	13678	20.6	14076	21.2	810	153.1	0.2	
LG6	36722	23481	63.9	6024	16.4	7217	19.7	227	157.5	0.7	
LG7	37803	23138	61.2	6878	18.2	7787	20.6	306	134.8	0.4	
LG8	61349	36976	60.3	11460	18.7	12913	21.0	644	195.8	0.3	
LG9	40914	23355	57.1	8439	20.6	9120	22.3	616	177.7	0.3	
Total	449444	269571	60.0	86414	19.2	93459	20.8	4517	1529.2	0.3	

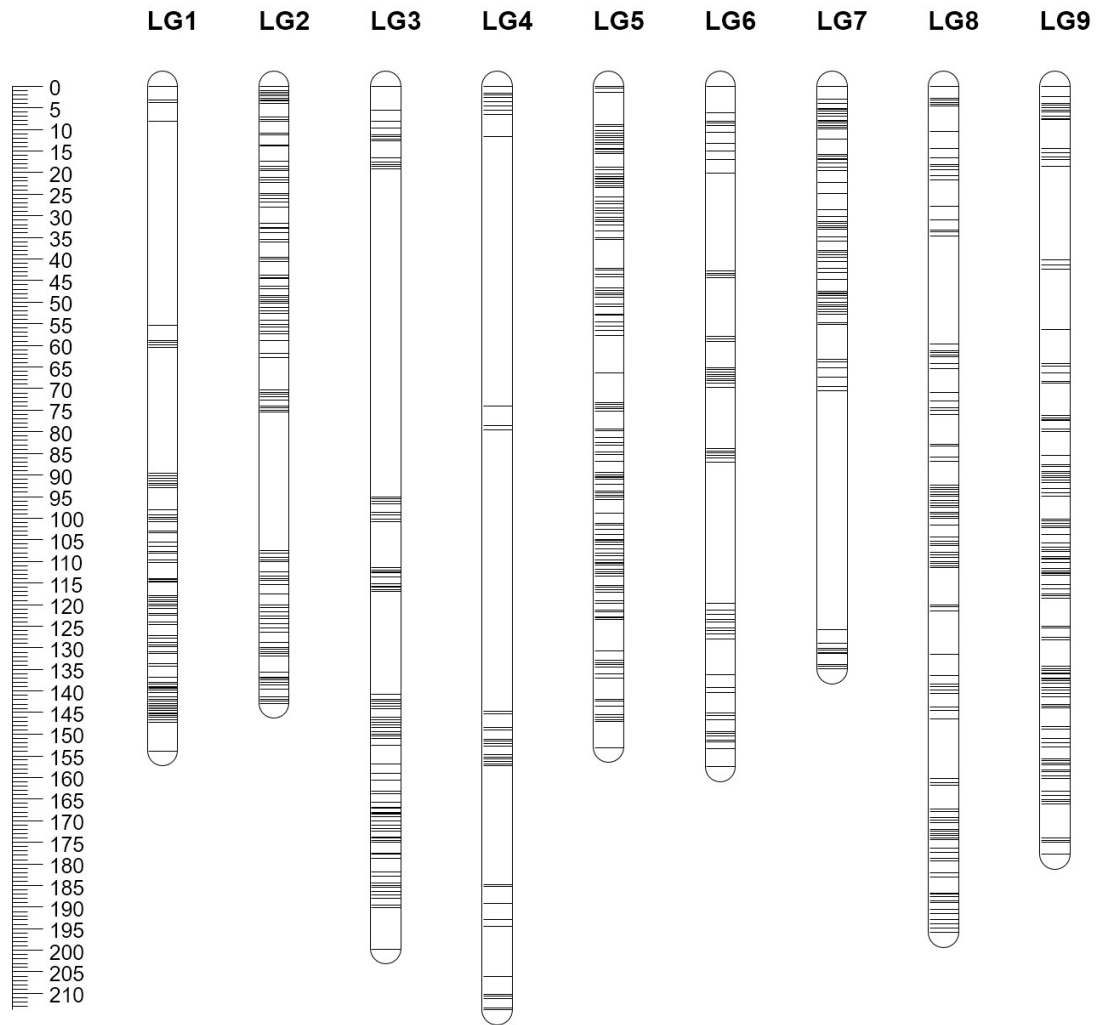


Fig.2-1-4

Consensus linkage map developed by using F₂ population derived from a cross between ‘VI185’ x ‘ShinanoGreen’. Ruler on left indicated the genetic distance (cM) and the horizontal lines in the bars representing linkage groups indicated RAD-seq markers.

Table 2-1-9
Positions of locus for leaf shape and flowering day in the linkage map and their genetic effects.

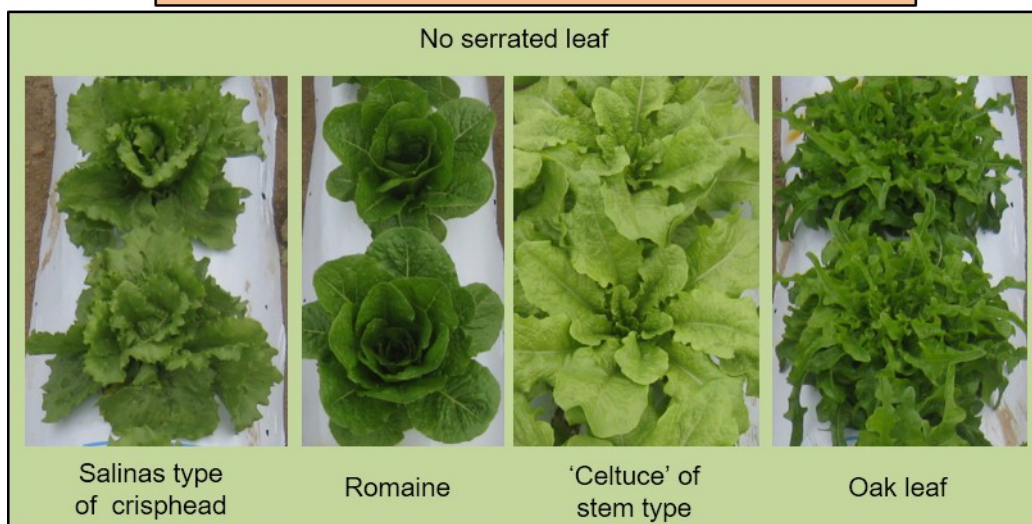
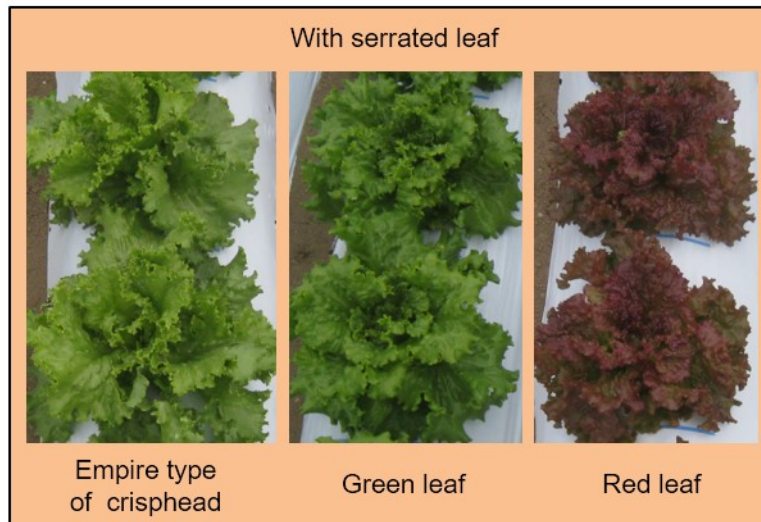
Trait name	Linkage Group	Marker	Genetic distance (cM)	Physical position (cM)	Threshold LOD	LOD	Additive Effect	Dominant Effect	R ² (%)
Leaf marginal serration	LG5	LG5_v8_244.527Mbp to LG5_v8_256.311Mbp	6.22	130.78 - 137.00	4.82	131.36	50	-25.54	99.79
Flowering Day	LG5	LG5_v8_244.527Mbp to LG5_v8_256.311Mbp	6.22	130.78 - 137.00	4.67	6.39	4.65	-1.41	28.68

Table 2-1-10

Markers in LG5 for discriminating between 'VI185' and 'ShinanoGreen'.

Primer name	Marker type	Primer sequence (5'-3')	PCR product size	
			Empire type	Salinas Type
LG5_v8_251.667Mbp_F	Indel	CGTTTATGTATCGGGGAGA	194bp	212bp
LG5_v8_251.667Mbp_R		GGAAATGGAGGAACGGAGTT		
LG5_v8_251.738Mbp_F	Indel	CCTTTTTCCCTCTTTTCTTTCC	236bp	209bp
LG5_v8_251.738Mbp_R		CCAAACGCTGTTTTGCTGTA		
LG5_v8_252.704Mbp_Ddel_F	CAPs (Ddel cut)	GCCAAGGTTTTCGTTGACAT	380bp	243bp
LG5_v8_252.704Mbp_Ddel_R		TCCGGTTCGTGTCTGTGTA		
LG5_v8_252.743Mbp_Salinas_F	Indel	AAACCGAATCCATTCACAGG	744bp	346bp
LG5_v8_252.743Mbp_Empire_F		CTATGGAGTCCGCCTGATGT		
LG5_v8_252.743Mbp_R		TCCCATTGCTCCTCTCATC		
LG5_v8_252.927Mbp_F	Indel	TTGTTGTTGTTGTTGTTGACAGA	196bp	181bp
LG5_v8_252.927Mbp_R		GCGGGATTGGAAGAGAGAT		
LG5_v8_252.999Mbp_F	Indel	CACAAACCGCACTGCATAAT	202bp	212bp
LG5_v8_252.999Mbp_R		TTTCTGTGCCCATCCAGTT		

A



B

Head type	Cultivar name	Serrated leaf	Marker name				
			LG5_v6_251.738Mbp	LG5_v6_252.704Mbp_Ddel	LG5_v6_252.743Mbp	LG5_v6_252.927Mbp	LG5_v6_252.999Mbp
Crisphead Empire	Empire	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	Early empire	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	Great Lakes 407	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	2008-83	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	V185	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	Olympia	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	SummerAce	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	Sun Vally	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	ShinanoPower	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	ShinanoHope	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	Patriot	With	E	E	E	E	E
Crisphead Empire	Let's shinano	With	E	E	E	E	E
Crisphead Salinas	Salinas	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	V Lettuce	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Escort	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Summer Land	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	ShinanoGreen	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	ShinanoSummer	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	ShinanoStar	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	ShinanoFresh	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	ShinanoLead	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Taugh V	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	NaganoVenus	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Version	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Vally	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Blizzard	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Mayer	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Raptor	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Randy	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Lushina66	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Lushina67	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Lushina8	No	S	S	S	S	S
Crisphead Salinas	Wide View No.8	No	S	S	S	S	S
Green Leaf	GrandRapid	With	E	E	E	E	E
Green Leaf	Waldmann's Green	With	E	E	E	E	E
Green Leaf	Warm Green grass	With	E	E	E	E	E
Green Leaf	Early Impulse	With	E	E	E	E	E
Red Leaf	Lollo Rossa	With	E	E	E	E	E
Red Leaf	No.2	With	E	E	E	E	E
Red Leaf	No.7	With	E	E	E	E	E
Red Leaf	Banchu Red Fire	With	E	E	E	E	E
Red Leaf	Flamingo	With	E	E	E	E	E
Romaine	Valmine	No	S	S	S	S	S
Romaine	Costa Rica No.4	No	E	S	S	S	S
Romaine	Paparwa	No	E	S	S	S	S
Romaine	Alex BB	No	E	E	S	E	E
Romaine	Alex S1	No	S	S	S	S	S
Romaine	Romaria	No	E	S	S	S	S
Romaine	Banchu Romaria	No	E	S	S	S	S
Stem	Celtuce	No	E	S	S	S	S
Oak leaf	OakLeaf	No	S	S	S	S	S

Fig. 2-1-5

Leaf shape and genotype of multiple markers in various lettuce cultivars.

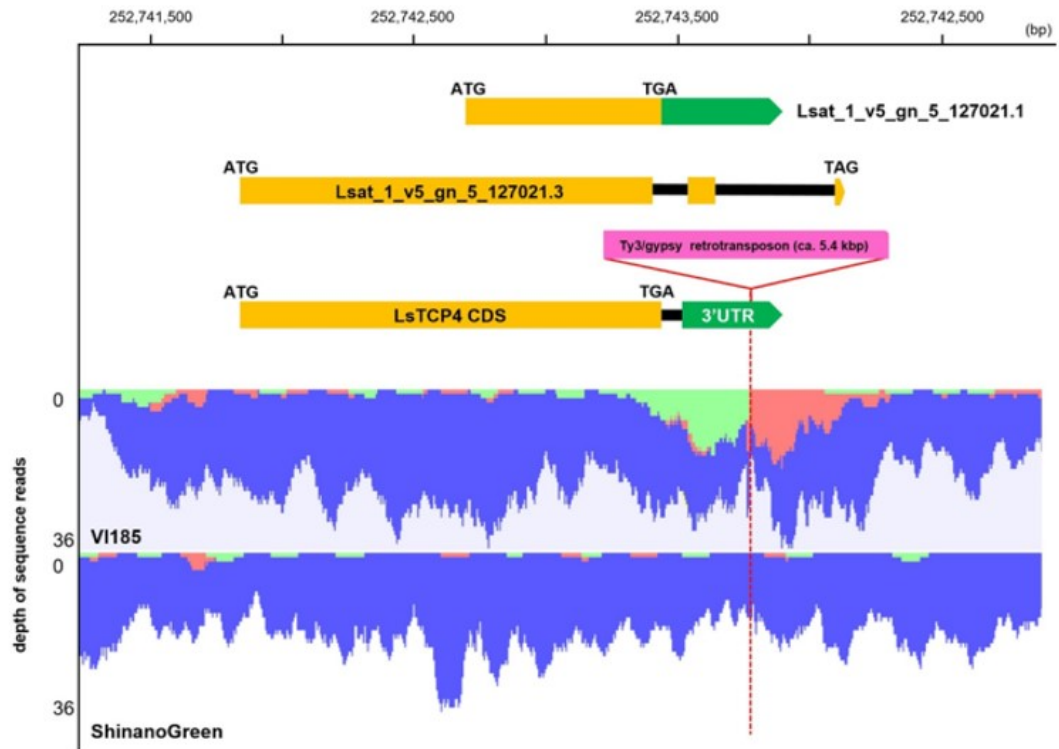
(A) Leaf marginal shape for each lettuce type was separated into “With serrated leaf” or “No serrated leaf”. (B) Phenotype of leaf marginal shape, and genotype using 6 markers were compared in 51 cultivars. 'Empire' indicates the same genotype as Crisphead's 'Empire' cultivar, 'Salinas' indicates the same genotype as Crisphead 'Salinas' cultivar.

Table 2-1-11

Expression of three predicted genes located in the genetically mapped region for leaf marginal shape by RNA-seq analysis.

Gene ID	Position at LG5 of reference genome sequence		P-value	ShinanoGreen		V1185		Putative function
	Start	End		Total reads	RPKM	Total reads	RPKM	
Lsat_1_v5_gn_5_127021	252742702	252743879	2.92×10 ⁻³	1624	57.39	932.3	34.76	TCP family transcription factor 4, putative
Lsat_1_v5_gn_5_127001	252783661	252786449	-	0	0	0	0	Expressed protein
Lsat_1_v5_gn_5_126960	252857424	252857690	-	0	0	0	0	Expressed protein

A



B

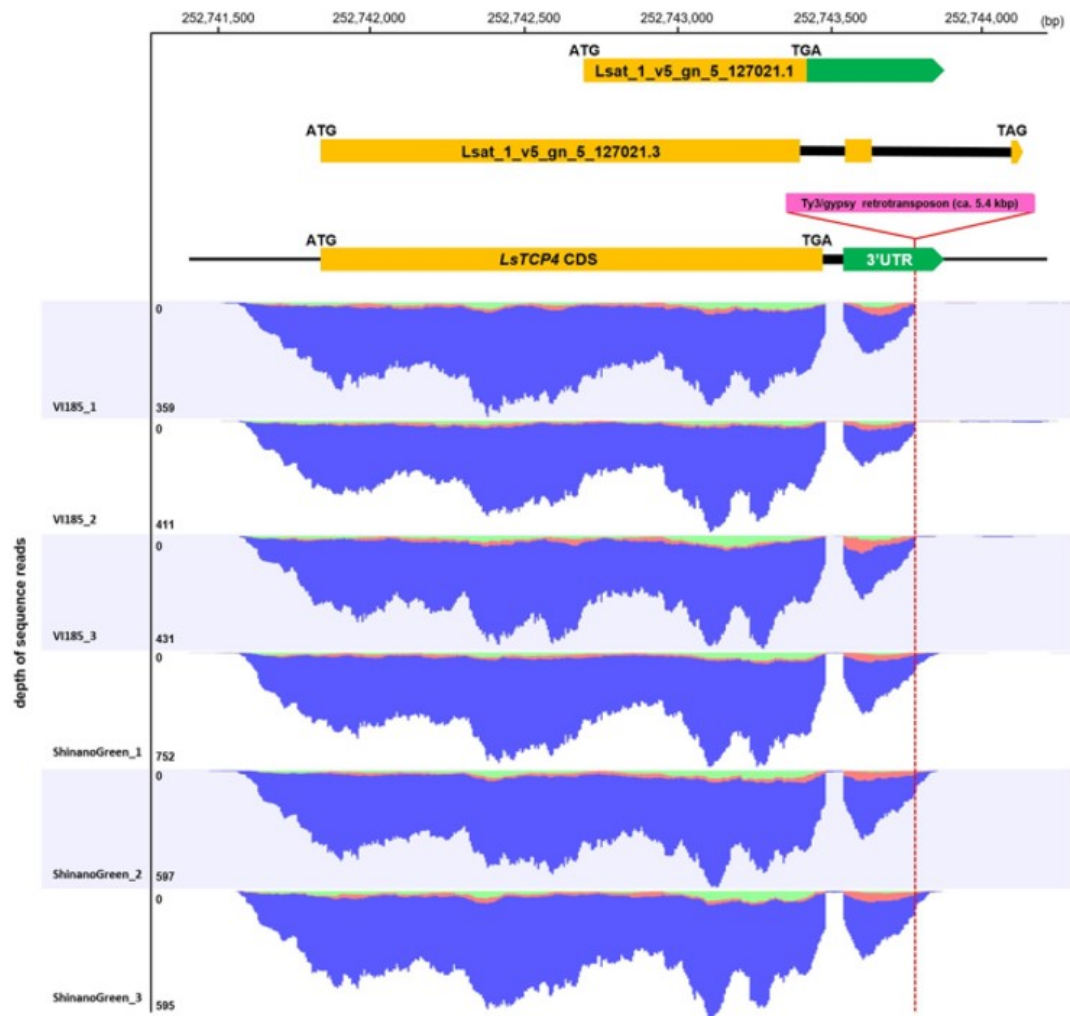


Fig. 2-1-6

Comparison of genomic sequences of *Lsat_1_v5_gn_5_127021* locus between 'VI185' (Empire type) and 'ShinanoGreen' (Salinas type).

(A) Predicted gene models including *LsTCP4* and genome sequence read mapping status in *Lsat_1_v5_gn_5_127021* locus. Paired-end reads from 'VI185' and 'ShinanoGreen' were mapped against *L. sativa* V8 reference genome. Amount of mapped reads were illustrated as blue (pair-mapped reads), green (forward reads as single-mapped) and red (reverse reads as single-mapped). Gene models are shown by orange, green and pink colored boxes, indicating coding sequences (CDS), 3' untranslated region (UTR) and Ty3/gypsy retrotransposon, respectively. Red dotted line indicates inserted position by the Ty3/gypsy retrotransposon. (B) RNA-seq reads mapping in *Lsat_1_v5_gn_5_127021* locus. Paired-end RNA-seq reads from 'VI185' and 'ShinanoGreen' leaves were mapped against *L. sativa* V8 reference sequence. Colors of mapped reads, boxes in gene model and dotted lines were the same as those shown in panel (A).

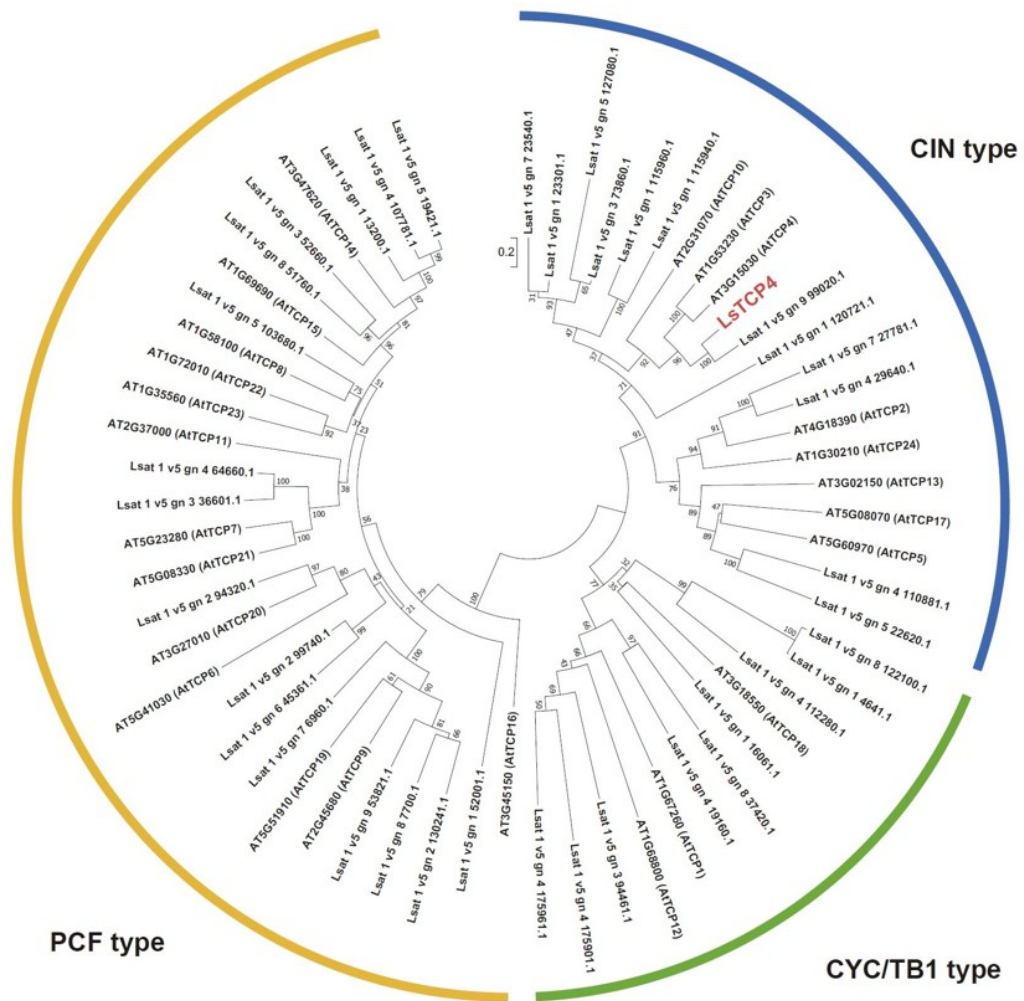


Fig. 2-1-7

Phylogenetic analysis of TCP like proteins in *L. sativa*.

Amino acid sequences of Arabidopsis and TCP family proteins and *L. sativa* TCP domain containing protein from Phytozome v12;

(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) were used for phylogenetic analysis. The sequences were aligned with MUSCLE. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>). A neighbor-joining tree was constructed based on alignment of the amino acid sequences. The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method. Numbers on branches indicate bootstrap values from 100 replicates. The bar represents number of amino acid changes per branch length.

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Identical amino acids are marked with asterisks (*), strongly similar amino acids are marked with two dots (:), and weakly similar amino acids are marked with one dot (·). Putative TCP domains were predicted using Pfam program (<http://pfam.xfam.org>). The amino acid sequences corresponding to putative TCP domain were highlighted with red color.

Ty3/gypsy retrotransposon protein [Beta vulgaris subsp. vulgaris]

Sequence ID: [AFK13856_1](#) Length: 1631 Number of Matches: 1

Range 1: 169 to 1621		GenPept	Graphics			Next Match	Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame	
1771 bits(4588)	0.0	Compositional matrix adjust.	846/1462(58%)	1095/1462(74%)	33/1462(2%)	+3	
Query	780	GTNNRFRKLDMPFDGPNPDGWLRAERYNFYRLSEADRMEEAAVVALEGDALLNYQWEH					959
Sbjct	169	GNNR +KLDMP FD +PDGWILR ER+F FY L++A+KMEAAVVA+EGDAL WYQWE+					228
Query	960	TRRFVTRNDEMKSLLLRQFRPVTAGTLHQQLALIQSGSVLEYQRAFIELLAPLNIPDD					1139
Sbjct	229	RRP W+ MKS +L QFRP+ G+LH+QWL+ Q+ SV EY+R F+E APL+ IP++					288
Query	1140	ITLGHFINGLQEEIRSEVQQLSPISVEQAMTLAIVKVERKLSQLHRKSSLSVTPRTNTS					1319
Sbjct	289	I +G FI+GL E++SE+++L+P +++QAM LA+K+E + +R + FR+ +					343
Query	1320	GTLSGTFIITP-LKTTYFPPRSSTVPTHTPAV-----SIKNSKPG-----GEVRL					1457
Sbjct	344	+ P P L + Y S T + A + S + N P GE+RRL					403
Query	1458	SDRELQYRRSKGLCFRCDEKWSAGHQCKRREL SVLLMQeeetgeedppdeVNEFANLDTN					1637
Sbjct	404	++KELQ KR+KGLCF+CDEKW GHQC+RKELSVL M++ E E + +E T					463
Query	1638	ELPLISGVCNLSVGTGNLNPRTLKLGIIKRDTEVVVLIDPGATHNFLSLATIDQLQIPVNP					1817
Sbjct	464	E+P + V LNSV G NKPT+KL G+I + EVVV+IDPGATHNLSL ID+L IFV					521
Query	1818	TPFGVSLGTGESVTRGNQCGLVLIHQG-LDIREDFPLTLGNSDVILGIONLEKLGAV					1994
Sbjct	522	+ FGVS LG++V G G C+ V +++ G L + EDFLPL LGNSDVILG+QNLG LG V					581
Query	1995	TTNWKIQVMFQIEGHGVTLRGDPSELERAKISLKTMIIRTIGSVGGYVWQLNQVEDQQPV					2174
Sbjct	582	+NWKIQ M FQ+ G TL GDP+L R+K+SLK M+RT+ GGG W++ NQVE					640
Query	2175	NHIDC-----PPFLLPVLRQYASVFSWKGGLPPLRNHQHAINLKECTGVTVPYRYS					2336
Sbjct	641	I+D PPFL +++R+ VF GLPP R H+AI LKEG+ PV VRFVRY					700
Query	2337	HTQKAEIERLLHMDLDSKIIQPSRSPFASPVLLVKKKDGSWRFCDYRALNKVTVKDKFP					2516
Sbjct	701	QKAEIERL+ +ML + IIQPS SPF+SPV+LVKKKDGSWRFCDYRALNK TV DK+P					760
Query	2517	IPVIDELDELHGSRMFSKLDLKSQYHQIRMKVDDIHKTAFRTHEGHYEFVMPFGLTNA					2696
Sbjct	761	IPVIDELDELHG+ +FSKLDL++GYHQI ++ +D HKTAFRTHEGHYEF VMPFGLTNA					820
Query	2697	PATFQSVNNEI FRPHLRKLVVFFDDI LIYSRDESHLKLIVLETLEKQHELYANSACK					2876
Sbjct	821	E+GK ++AYLGHVIS+ FRP LR+PVLVF DDILYISR + +H HL++VL L QH L + N KC					880
Query	2877	EWGKNQIAYLGHVVISKQGVAVDPEKVAIEQWPIPKSLRELRLGLTGYRKFISGYAS					3056
Sbjct	881	EFGKREVAYLGHVISEGGVAMDEKVAVLEWVFNKLELRLGLTGYRKFVANYAR					940
Query	3057	IAAPLTDQLRDKCFGWSPIAIQAFNTLKAALMKAPILAMPDFTKLFIETDASGKIGAV					3236
Sbjct	941	IA FLT+QL+KD F WS A +AF LK+A++ AP+LAMP+P F++ETDASG G+GAV					1000
Query	3237	LLQNKHPVAFYQVGLGVKNRLKSIYEKELMAIVLAVKRWRHVMGRHFLIRTDQRSLKYL					3416
Sbjct	1001	L+Q+ P+A+YS++LG + +LKS+YEKELMAI AV++W++YL+GRHF++RTDQ+SL+Y+					1060
Query	3417	MEQREVGEYQKMYKLLGDFDEIQYKPGATNKVADALSRELSESTEINMLTSTWTFFLG					3596
Sbjct	1061	+QRE+G E+QKW+ KL+G+DFEI YKPG +N+VADALSR+ E+ + +					1120
Query	3597	ELDRTEAEDSFIQQVKKDCIEGKHKHYTMEGGKLMYGRVLVPIQKSELIPKLLKEFHD					3776
Sbjct	1121	ELRREITGDSFLTQVRKEL-QEGRTPSHFTLVGDNLLFRGRVYIPSSSTIIPKLLYEYHD					1179
Query	3777	SVMGGHAGELRTRYQLAAEWYVGMRSVQKHVQACVVCQTQKALTFHAGLLQPLPLPS					3956
Sbjct	1180	+MGHAGEL+TY RLAAEWYV GMR+ V ++V C++CQ QK HF GLLQPLP+PS					1239
Query	3957	QVWEISMDFIEGLFNSHGYNAILVVVDRLTKYSHFIAVKHFFSATTIAAIFIKVVRHL					4136
Sbjct	1240	VW++ISMDFIEGLP S G + ILV+VDRL+KY+HF+ ++HFF+A +A +F+KEVVRHL					1299
Query	4137	GFSSISVSDRDRVFMVSLFWRFLRQGTLLRSTAYHPQTDGQTEIVNKSVMYLRCPFH					4316
Sbjct	1300	GFSSISVSDRDR++F+SLFW+ELFRL GT L RS+AYHPQTDGQTEIVN++E YLRCF+					1359
Query	4317	GKPRSWSQWLPWAEFWHNTAYHTASKITPFPKALYGRDPPRVIRVQQGQTVGLAVEEQIME					4496
Sbjct	1360	G PRSW++WLPWAEF +NT+ HT++K++PFK LYGRDPP V+R +GQT V ++E L +					1419
Query	4497	RDATLDDKSHLLQAAQKMKTDADKGRKDVSYEEGEWYLLKLPYRQSRVTRNRFQKLA					4676
Sbjct	1420	RDA+DD+ +L++AQQ+MK AD R +Y ++ G+ V+L+LQPYRQSR+ RPF+KLA					1479
Query	4677	RFYGFVVIKIKIGAVAYHLQLPEDARIHPVFHVSQLEKKAIGNQASYPKLPHTLMDMRLD					4856
Sbjct	1480	RFYGFV +++IGA AY LQLP ++IHPVFHVS LKK +GN P +P H+ DM L					1539
Query	4857	WEPEALLGVRTRQEDTGRRTTEVIKWKGVDPDFDSTWEDFTTIQGTFFDFLEKLVLLWGQ					5036
Sbjct	1540	EPE LL VR ++ TE LIKWKGP F++TWED + I FP F LEDKV +MG					1599
Query	5037	GNVVH---PPLHFTYQRRKHKR 5093					
Sbjct	1600	G V+H P TY+R+ +KR					
Query	5037	GIVMHQLKKPNLITYKRRGNKK 1621					

Fig. 2-1-9

BLASTX search result of the observed insertion in *Lsat_1_v5_gn_5_127021* of 'VI185'.

ATGTTGATTTTAAAAAGCTGGAACAGGAGGAGGTTGTTTCATCATCGTAAGGGTGT
GATTCTGGATCCTCAGAGGAATCATCATCATCTTCATCTGTATCAACAACCTATTGAA
TTCAAGACAAGAAGAGAAGGAAGAAGATCAAGAAATTCAGATAGGTTTTTCATGGAT
TCCATCAAAATCATCATCAGCTTCAACAAAATCGAGAAATCCCACCTCCCGACAAC
CGTGTCTCCACGGAGGATTAGGTGGTCCGGCAAGGCAGCCGCCGCGGCCACAGA
AGAAACGCCCTTATTTACCTTCTTCTGTGGACCAACTGACCCAAGAAGGAGAAGAA
TATGCACCGAGGCTGCCGAAAAAATGGGAGAAAGTTATCAGTATCACAACCAACA
ACTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAAGCAAGTGGGTGCTCGAGATTG
GGATTGAGGGGCGCAGGTGGCGGAGGCGGTGGCGAGATTGTGGAAGTTCAGGGC
GGTCACATTGTACGATCCACTGGCCGAAAGACCGACACAGCAAGGTGTGCACAG
CGAAAGGACCAAGGGACCGCCGTGTTCTGCTCTCGGCTCACACCGCCATCCAATT
CTACGACGTCCAAGACCGCCTTGGTTACGACCGCCCAAGCAAAGCCGTCGATTGG
CTTATTAATAAAGCCAAGGCTGCCATTGATGAACTCGCGGAGCTTCCGGCATGGAA
GCCCACTGCCACTACGGCGACGACAACCCCAAATTCAACATCGATTGCAGATTTTG
AGCAAACCAGATCAACAAAACCTCAAATCATCATCAACTAAGTCATTTTGAACAA
CACCCAGATGATAGTATTGTTGATAATCAAATGGGTAATTCACAAAACCTCAAGCTTC
TTGCCTCCGTCTCTTGATTCCGACTCTATAGCTGATACAATCAAGTCATTTTTTCCG
ATGGGTGCTTCAACAAATCCAGGAAATAATACTTCTTCAGGTATGCAATTTTCATCAA
AGTTTTCCACCTCAGGATTTGCTTTCAAGAACCAGTAGTCGAAGTCAAGATCTGAG
GCTTTCTCTTCAATCATTCCAAGATCCGATTCTCCAGAACCACCACCATCACCACCA
ACAAAACCTCAGGATTTGTTGATAATCAAATGGGTAATTCACAAAACCTCAAGCTTC
GTCCGACCTTCAAGAAATGGTGGCGTGGGGTGGTGTAGGA
GGCGGAGACCGTCCGCGGATTGTCTTCAGTTCGCAGCCGTGCGCGTTCGA
CGCCTTTTCTGCAACGTTGTTCCGGTCAAACAACAACAATCAGTTATTCAACAATT
CTCAGAGGGGACCCCTTCAGTCCAGTAACGCACCTTCGTTTCGTGCTTGGATCGAC
CCGCTTCAGCCCTTCAGCCCTCTCCGATCGATCAACACCCAACCCTAGCTTTCCA
TCACCCCGGTTTAGGTGGGTTTTCCGGGTTTC
GTATTCCGAGGAACACGACGGCATCTCCGATAA
GCCGTCCTTTGAGTAAAAGAAACCCATCACCTGT
TTCTCAATTCCGATTTTCGTTTTATTCTTAATTTTCATCAATAATTACAGATCATC
TTCATCCTCCATAAATCTCTCAAACAGGAAAATTTACGTCAATCAATGTACTTCAA
AGCAAAGAGAGGAGGGGAGAAGCTTCAATGGCTGCTACACAGTGGGAAAAAGAAA
CCGAATCCATTCACAGGTTCTTCAGTCATCACTGGTGTTTTTACGATTTAGCTTTCA
TGTTTTGAATAGAGCTCTTTGTTTAGCTCTAAACCCTGTTTTAAATTATCTGGATTTAA
TGTTTTTAGACCATGTATGTGACTGTGTGTATGAACTCAGATTCTCTCAAGGATAA
ATTAACCACAACCTGATGGATTACACTTCTTCTGGGATTAATGAACGAAAACAG

miR319 target site

Primer sequence
LG5_v8_252.743Mbp_Salinas_F

AGATTACACAAGAAATTGATAAGAAAAAGAATGAAATAGAAATAGCAATTCGAGCT
GCTACGGACTCCCAGAGAAGTAGAAACTTCTAATATTCTTCCATGCCATCACCAGG
CTCCCTACCCATCCTTATAACGGAATGTCAGTATTTCTCTAAATTCCCACCTTGCCC
CTGCTCCATGTCAGCAACATCCTCCTGGGTGATAGTGGTCCCTTGTCTTTTAGAAT
CTTTTTGTGTTTCTTCTTTGGTACGTGAAATGTAGTGGTGGGTGCACCACATTACC
CTGCCCCCAAAGCAAGACCTTGTCTCAAGGTCAAAGTCTGGAAAGGTGCCTTGA
ATAGTTGTGAAATCTTCCCAGGTGGAATCAAATCAGGAACCCCTTCCATTTGATC
AACACTTCTGTTCTTCGACCTGTGTCTTCTTGCTTGGTACGAACCCCCAGCAATGC
TTCTGGTTCCCAGTCAAGACGCATGTCTTCCATTAGGTGGGTGGCAATTCGGGT
ATGCTGACTGATTGCCTATTGCTTTCTTGAGTTGCGAAACATGAAAGACCGGATGG
ATCCTAGCATCCTCTGGTAGCTGTAAGTGATAAGCAACCGCACCAATTTTTTTGATA
ATCACGAATGGTCCATAAAATCGAGCCGCCAGCTTCTGGAAAGGTCTATTTGTAC
TGACCTTTGTCTATACGGTTGCAATTTTAGATAGACCCACTCTCCTTCTTCATATGA
CACATCTTTTCTACCCTTATCAGCATCTGTCTTCATTTTTTTGTTGAGCCTGAAGCAA
GTGGCCCTTAAGATCATCCAACGTGGCGTCTCTTCCATCAGTTGTTCTCCACAG
CCAAAACCTCCTGTTTGCCCTTGTCTGAACCCGTATAACACGCGGCGGGTCCACGCCA
TACAAGGCCTTAAAAGGCGTGATTTTGCTGGCGGTGTGATAAGCGGTGTTGTGCCA
AAACTCTGCCATGGTAACCATTGCGACCAGGAACGAGGCTTACCGTGGATGAAAC
ACCTTAAATACATCTCCACCGACTTGTTGACGATCTCCGTTTGTCCATCGGTTTGCG
GGTGGTAGGCTGTGCTTCTTAATAACTGAGTCCCTTGTAAATCGAAACAATTCACGC
CAAAACAACTCATAAACACCTTGTCTCGATCAGAGACTATGGAAGATGGAAACCC
ATGAAGACGAACTACTTCTTAATGAAAATTGCTGCAATTGTTGTTGCTGAGAAGG
GGTGTTTAACCGCTATGAAATGGGAGTACTTAGTAAGGCGATCAACTACAACCAATA
TGGCATTGTAACCATGCGAGTTAGGTAGGCCTTCGATAAAATCCATGGATATCTCAT
CCCAAACCTGGCTCGGAAGGGGTAATGGTTGTAATAACCCCGCCGGATGAGTAGTT
AAAGCTTTTTGGGTTTGGCACACGACACAGGCTTGTACATGTTTCTGGACACTCTT
CCTCATTCCTACCCAATACCACTCCGCCGCCAACCTTTGGTAAGTTCTTAATTCCCC
TGCATGTCCTCCCATCACCGAATCATGGAATTCCTTCAATAGCTTGGGAATCAACTC
CGATTTTTGAGGTATGACCAACCTACCTTTATACATCAATTTCCCACCTTCCATTGT
GTAGCCTTTGTGGTGTTCCTTCTCACATATGTCTTTTTTTACCTGCTGAATGAA
GGAATCTTCAGCTATTTCTTTATCCAATTCTCCCAACGGGAAGGTCCAAGTAGATGT
AAGCATGTTGATTTCCGGTTGATTCGGAGAGTTCTCGAGAGAGAGCATCTGCCACCT
TATTGGTAGCCCCGGTTTGTACTGAATCTCAAAGTCGAAGCCCAATAATTTATACA
TCCATTTTTGGTATTCTGGGCCCACTTCTCGTTGTTCCATCAAATATTTGAGACTGC
GTTGGTCTGTTCTAATTAATAAATGGCGTCCCATCAAGTAATGTCTCCACCTTTAA
CAGCCAAAACAATGGCCATCAATTCCTTTTCATAAATCGATTTAAGCCTATTCTTTA

CCCCTAAAACCTTGGCTATAAAAAGCCACTGGATGCTTGTGTTTTGCAGCAGGACTGCT
CCTATCCCTTTTCCGGAAGCATCCGTTTCAATGATAAAACAATTTGGTAAAGTCCGGC
ATGGCCAATATTGGTGCTTTCATTAGGGCTGCCTTTAGAGTGTTGAAAGCTTGGAT
GGCGATTGGTGACCACCCAAAGCAATCCTTGCCTAATTGATCCGTCAGAGGTGCTG
CAATACTCGCATAACCCTGAAATAAACTTTCTGTAATATCCTGTGAGACCCAGGAACC
CCCTGAGTTCACGCAAAGATTTTGGAAATGGGCCATTGTTCAATTGCTTTTACCTTTT
CAGGGTCGACTGCTACCCCTTGTTTTGAAATAACATGGCCTAAGTAGGCTATTTGG
TTTTTACCCCATTCACACTTGGCTGAATTAGCATATAACTCGTGTTGCTTCAATGTT
TCCAAAACAATCTTCAAATGGGACAAATGTTGACTTTCGTCTCGGCTATAAATTAGG
ATGTGCTCAAAGAATACCAGCACAAACTTTCGTAGATGAGGTCTGAAAATCTCATT
CATGACAGATTGAAAGGTGGCTGGGGCATTAGTAAGGCCGAAGGGCATAACCTTG
AACTCATAATGCCCTTCATGCGTCTAAACGCTGTTTTATGAATATCGTCCACCTTC
ATACGGATTTGATGATAACCTGATTTCAAATCCAGCTTGGAAAACATCCGTGATCCG
TGTAATTCATCTAAAAGCTCGTCTATCACGGGTATGGGAAACTTGTCTTTAACCGTC
ACCTTGTTAAGGGCCCGATAGTCAACACAGAACCTCCACGAGCCATCTTTTTTTTTA
ACCAACAACACGGGGCTAGCAAAGGACTTCGGGACGGTTGGATGATTTTGGAGT
CGAGCATGTCGTGAAGCAATCTTTCAATTTCTGCTTTTTGGGTATGAGAGTACCTAT
AAGGACGTACCGTCACCGGTCCAGTTCCTCCTTCAGATTAATGGCGTGCTGGTGA
TTCCTTAGTGGGGGTAGGCCTCCTTTCCAAGAAAAACAGAAGCATACTCTGTAA
TACTGGAAGTAGAAAGGGAGGGCAGTCTTTAATGTGATTCACGGGCTGTTGGTCCT
CCACTTGGTTCAACTGGACCCAATATCCACCTCCACAGAGCCAATGGTTCTAATC
ATGGTTTTTAAGGAAATTTTTGCCCTTTCTAAGGATGGGTCTCCCCGGAGAGTCAC
CCCGTGGCCTTCTATTTGAAACTTCATGACTTGCGTTTTCCAATTAGTAGTCACCGC
CCCTAACTTCTCCAACCATTGGATTCCCAGAATTACGTCTGAATTTCCAAGGTGAG
CGGTAAGAAATCCTCTCTAATATCCAGCCCTTGAATATGTATTAATACCCCTTGGCA
ATTTCTTCCGGTCACTGATTCTCCTGTGCCCAAAGAAACCCCAAACCCCGGAG
TAGGGTTGACTGGAATCTGTAATTGATCTATAGTTGCCAAGGAAAGGAAATTGTGA
GTTGCTCCCGGATCAATGAGTACCACCCTTCTGTGTCCTTAATGATTCCCTTAAGT
TTGAGGGTCTTAGGATTGAGGTTACCAGTAACTGAATTCAAACAGACACCTGATAT
CAATGGGAGTTCGTTAGTGTCAAATTTGCAAATTCATTGACTTCGTCTGGTGGGT
CTTCTTCCCCTGTTTCTTCTTCTTGCAATAAGAGTACACTGAGTTCCTTCTTCTG
ATTGATGCCCTGCACTCCATTTCTCATACAACGAAAGCAAAGCCCTTTTGATCGTT
TATATTGCAGTCTTTATCCGACAATCTTCTCACTTCCCCGCCTGGTTTGCTGGGGT
TCTTAATCGACACGGCTGGGGTGTGGGTGGTACCGTAGACGATCGAGGGGGGAA
ATAAGTGGTTTTGAGCGGGGTATCAGGGGTGTTCCAGAAAGAGTACCTGATGTGT
TAGTCCGAGGAGTTACAGTGGAGAGAGAGGATTTCCGATGGAGTTGGGAATTAAG

CTTGCGTTCGACTTTGATGGCCAACGTCATAGCTTGTCCACTGATATGGGGCTCA
 ATAACCTGGACCTCAGACCTAATTTCCCTCCTGTAGCCCGTTGATGAAGTGGCCCAAG
 GTGATGTCATCAGGTATGTTGTTAATGGGGCAAGTAGTTCAATAAAGGCTCGTTG
 GTATTCTAAAACCGACCCAGATTGAATTAGGGCTAACCCTGCTGGTGTAACGTAC
 CTGCAGTAACCGGACGAACTGTCGTAATAGGAGAGATTTTCATCTCATCCCACCGT
 GTCACCCGGCCGGCGAGTGTGCTCCCCTGTTACCAGAGAAGGGCGTCTCCTTCAA
 GAGCCACCACCGCTGCCTCCATTTTATCAGCTTCTGATAATCTGTAGAAATTGAAAT
 AGCGTTCCTGCACGTAATATCCATCCATCCTGATGATGATGATGATGATGATGATG
 TCGAGTTTCCGAAATCGCCAATTGGTCCCTGATGATGATGATGATGATGATGATG
 GCCGTTGCCCCATCGCCACTACCTCCCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
 CCCCAGCGGATTCTTTTGGTGTGCGCCAAAATGGAAGAAACAGGTTGATGATGATG
 TCCCCTTCTCCTGACTTCATCCCTTAGTTACAGCTCTCAAACCTCTTCCAACTTC
 TGGTCCATCTTAAGCTGATTTTGGTCCATCTTCAGCTGGATGGAAGCTATGGAGTC
 CGCCTGATGTTGGATCTGATTACCTTGGGTCTCTAAGCGATCATAACAACACACCTAA
 TTCTGACTCCAGCGATTCAACCCTCTTGAGTTGAGCTCCTCCAGCCTCTTCCCAC
 CTCCCTTTTCTCCAGCCATAATCCAGGTGGTTGGTTGCTCTGATACCAATTTGTTA
 TGAACCTCAGATTCTCTCAAGATAAATTAACCACAACCTGATGGATTACACTTCTT
 CTGGGATTAATGAACGAAAACAGAGATTACACAAGAAATTGATAAGAAAAAGAATG
 AAATAGAAATAGCAATTCGAGCTGCTACGGACTCCCAGAGAAGTAGAACTTCTAA
 TATTCTTCCATGCCATCACCAGGCTCCCTACCCATCCTTATAACGGAATGTCAGTAT
 TTCTCTAAATTCCCCTTTGCCCTGCTCCATGTCAGCAACATCCTCCTGGGTGATA
 GTGGTCCCTTGTCTTTTAGAATCTTTTGTGTTTCTTTCTTTGGTACGTGAAATGT
 AGTGGTGGGTGCACCACACTGTGCCAATTGCCTTCTTTTGTATATAATTATCAAAA
 ATACTCTGCTAAAAACAGAGCAAGTGATTGTTTTGGTTATAATTTCACTGTTATTC
 GCCCAACTTTAGTAAAAACAAGAATCTTTTGAATATCAACCAAATCAACACATTCTTT
 GTGTGTGATTGATTGAAATTTGAAAGGCCATGATGATGAGAGGAGCAAATGGGAATGT
 TTCCCTTTGTTTAGAAAATTGTCAATTTTTTATGTAATGTTGGGGTTTGAAGAGAGAG
 CTCCAATTTTTGTCTCTCTTTTTACCCAATTCTTTTATCTTGCTTCATATGCTTTTT
 CATTAGTGTGCCCTAATGGAACATGATGAAGCTGATGATGATGATGATGATGATGATG

Primer sequence
LG5_v8_252.743Mbp_Empire_F

CTATGGAGTC

CGCCTGATGT

GATGAGAGGAGCAAATGGGA

Primer sequence
LG5_v8_252.743Mbp_R

- LsTCP4* CDS
- LsTCP4* 3'UTR
- LsTCP4* intron
- Ty3/gypsy retrotransposon-like insertion
- 3'flanking sequence of *LsTCP4*

Fig. 2-1-10

Genomic sequence of *LsTCP4* in 'VI185'.

Boxes indicate positions of LG5_v8_252.743Mbp primers and miR319 target site.

Genomic sequence are shown by yellow, green, light blue, and pink, indicating CDS, 3'UTR, intron, and Ty3/gypsy retrotransposon-like insertion, respectively.

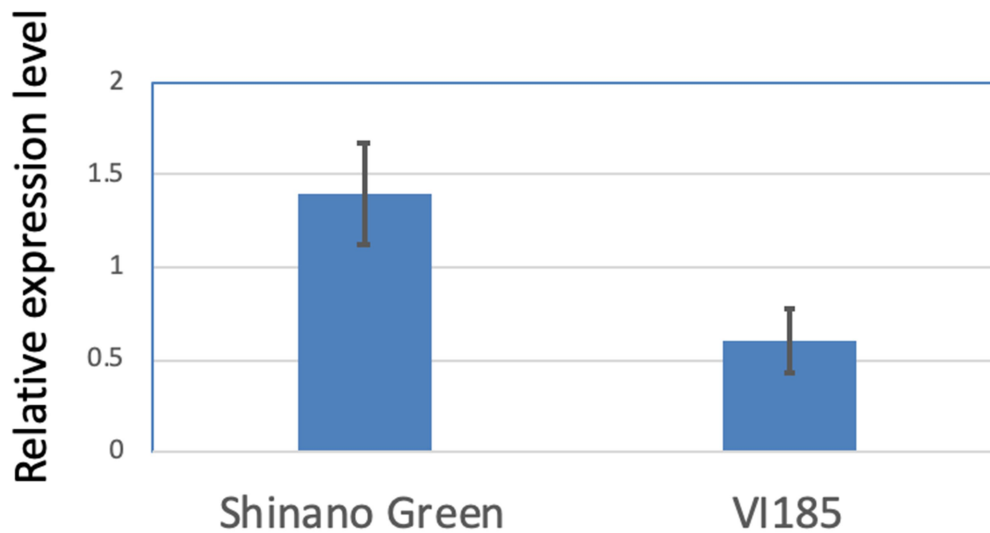


Fig. 2-1-11

Comparison of *LsTCP4* expression in the leaves between ‘ShinanoGreen’ and ‘VI185’ by quantitative RT-PCR.

Quantitative RT-PCR analysis of *LsTCP4* gene was carried out in each three replicated plants of ‘ShinanoGreen’ and ‘VI185’. *LsTCP4* expression level was normalized by the expression of *TUB* gene in each sample. Normalized expression value in one replicate of ‘ShinanoGreen’ was defined as the standard (=1) and relative expression level in other samples were calculated. Averaged relative expression level and standard error among triplicates were indicated.

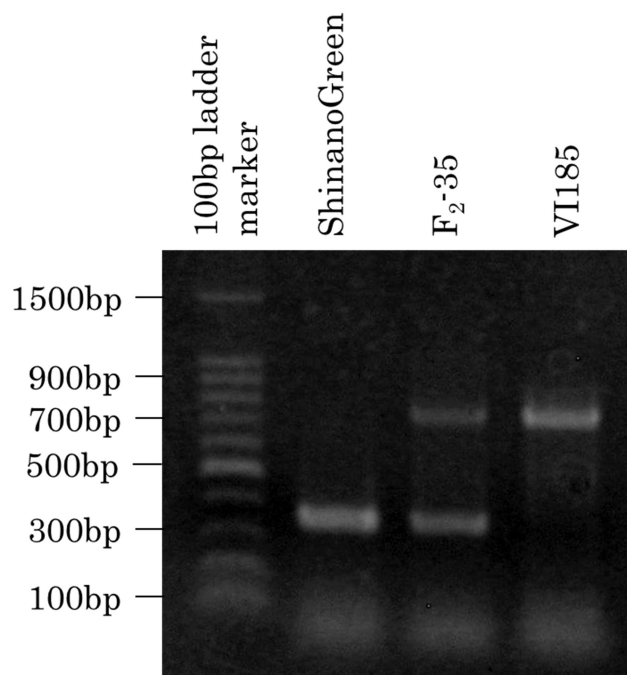


Fig. 2-1-12

Genotyping of 'ShinanoGreen' (Salinas type), 'F₂-35' (Hetero) and 'VI185' (Empire type) by codominant Indel marker LG5_v8_252.743Mbp.

第2節 レタス根腐病レース1 高度耐病性個体選抜法の開発

1. 緒言

フザリウム(*F. oxysporum* f. sp. *lactucae*)が病原菌であるレタス根腐病は世界中で発生が確認されている病害である。世界ではレース4まで発生が確認されているが、日本ではレース1・2・3の3レースの発生が確認されている。残念なことに産地ではレース1に耐病性を示す品種が打破されてしまう事例が発生してしまっている。長野県内だけでも6000ha近い圃場について、クロールピクリン等で土壌消毒をすることは現実的ではない。そこで、遺伝資源を用いてレース1に対する耐病性を向上させる方法の開発を試みた。

2. 材料と方法

植物と病原菌

実験に供試したすべての植物は長野県野菜花き試験場（長野県塩尻市、北緯36°10'、東経137°93'）で栽培したものを使用した。玉レタス品種「VI185」、「シナノパワー」、「シナノグリーン」は長野県野菜花き試験場の育成品種で、レッドリーフタイプの「晩抽レッドファイヤー」はタキイ種苗株式会社の育成品種である。「VI185」と「晩抽レッドファイヤー」の交配、「シナノパワー」と「晩抽レッドファイヤー」の交配、「VI185」と「シナノグリーン」の交配により、3つのF₂集団を作出した。「シナノグリーン」と「VI185」の交配から得られたF₂個体のうち、96個体を連鎖解析に用い、自己増殖したF₃系統を作成した。このF₃系統を用いて、F₂個体の耐病性に関する遺伝子型を推定した。温室での耐病性検定には、SB1-1菌株(*F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1)を用いた。品種は「VI185」、「Nevada」、「Costa Rica No.4」、「Version」、「SunVally」、「ShinanoGreen」、「Oak leaf」、「Valmine」、「Summer ace」、「White paris」を供試した。

耐病性検定方法

耐病性検定はすべて長野県野菜花き試験場の温室で行った。SB1-1 (race 1) 分離株を用いた感染土壌は、小麦ふすま培地と育苗用培土「与作 N=15」(ジェイカムアグリ株式会社)を1:19の割合で混合して調製した。種子は、病原菌を混ぜ込んだ土壌に直接播種した。播種後、自然日長の下で温度15°C~35°Cの温室条件下で生育させた。発芽後約1ヶ月後に、それぞれの苗の地上部および地下部を調査し、病害指数を用いて数値化した(Fig.2-2-1)。病害度の算出は、Aruga et al. (2012)に記載の方法に従った(Aruga et al. 2012)。耐病性程度は、地上部(高:10以下、中:50以下)または地下部(高:50以下、中:90以下)の指標に従って病害度によって分類した。

ddRAD-seq

DNA抽出とライブラリー構築、および配列決定は、第2章 第2節の2. 材料と方法と同

様に行った。

データ解析

テキストデータを変換するための詳細なスクリプトは

https://github.com/KousukeSEKI/RAD-seq_scripts にあり、以下のファイルに記述されている。

- 1.Parent_script.R
- 2.RAD_mapping_script_BWA_aln_script.R
- 3.Map_list_script.R
- 4.Population_tagcount_script.R
- 5.Genotype_script.R
- 6.Convert_ABH_script.R
- 7.Post_data_correction_script.R

QTL 解析の詳細なスクリプトは

CIM_script.R (https://github.com/KousukeSEKI/RAD-seq_scripts) に記述した。

遺伝子型判別と遺伝子地図の構築

R の QuasR パッケージ(Gaidatzis et al. 2015; R Development Core team 2017)を用いて、シーケンスリードからアダプターをトリミングし、トリミングした配列を RAD-tag として定義した。対立遺伝子を抽出するために、どちらかの親では複数存在するが、もう一方の親には存在しない片親に特異的な RAD-tag を選び出した。そして次に「VI185」特異的 RAD-tag、「シナノグリーン」特異的 RAD-tag、および両親共通 RAD-tag の配列を、Burrows-Wheeler Aligner プログラムの aln モードを使用して(Li and Durbin 2009)、玉レタス品種「Salinas」(<https://genomevolution.org/coge/GenomeInfo.pl?gid=28333>) のリファレンスゲノム配列 v8 にマッピングした。

ゲノム配列の同じ位置にマップされた一対の RAD-tag は、一塩基多型と短い挿入・欠失を含む 2 つの対立遺伝子 (すなわち対立遺伝子タグ) であると判断した。各対立遺伝子タグの有無を介して、96 個の F₂ 個体について、対立遺伝子座の遺伝子型を決定した。R を用いて、各 F₂ 個体の遺伝子型は、母方対立遺伝子または父方対立遺伝子のホモ接合体または両方の対立遺伝子が存在する場合のヘテロ接合体のいずれかとして定義された。F₂ 個体の半分以上が欠損値であったタグ、またはカイ二乗検定に基づく P 値が 0.001 未満であったタグのいずれかに当てはまる対立遺伝子タグは、遺伝子型データから除去した。次世代シーケンサを用いて得られた遺伝子型データは、欠落データが多いという欠点があるため (Davey et al. 2011; Furuta et al. 2017)、データの補正とインピュテーション処理に R の ABHgenotypeR パッケージ(Furuta et al. 2017)を使用した。ABHgenotypeR の maxHapLength のパラメータは 5 に設定した。

耐病性の QTL 解析

第 2 章で行った「VI185」と「シナノグリーン」およびその交雑後代 (F₂) の ddRAD-seq 解析データに基づく共優性マーカーの遺伝子型データおよび連鎖地図と F₂ 個体の根腐病耐病性程度の形質データをもとにして、R/qtl パッケージ(Broman et al. 2003)で、Haley-Knott 回帰を用いて CIM による QTL 解析を行った。ゲノム全体の LOD 閾値は 1% の有意水準に設定し、10,000 回の並び替え検定を行った。表現型分散の割合は、CIM で示されるピーク時の値から算出した。さらに、表現型分散の総量と各 QTL との相関関係を多重 QTL モデルで個別に説明するために、耐病性表現型について plotPXM 関数を用いて作図した。詳細なスクリプトは CIM_script.R に記述した。

3. 結果と考察

レタス根腐病については、土屋ら(2004)により温室と圃場の耐病性検定結果の相関関係が報告されていることから(Tsuchiya et al. 2004)、レタスにおける根腐病原因菌である *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 に対する耐病性を温室条件下で評価した。レタス 12 品種について同菌が感染した植物の表現型を観察した結果から (Table 2-2-1、Fig.2-2-2A)、高抵抗性、中抵抗性、感受性に分類した。評価された材料のうち、「VI185」のみが高抵抗性品種であると判断された。「ネバダ」、「コスタリカ 4 号」、「バージオン」、「サンバレー」は中程度の耐病性を持つ品種であった。また、「シナノグリーン」は感受性を示したが、地上部に部分的な耐病性が認められた (Table 2-2-1)。「VI185」は高度耐病性、「シナノパワー」は中度耐病性、「晩抽レッドファイヤー」は感受性と判定された (Fig.2-2-2)。

「VI185」と「晩抽レッドファイヤー」、「シナノパワー」と「晩抽レッドファイヤー」の交配組み合わせでそれぞれ F₂ 集団を作成して耐病性検定を行った。「VI185」、「シナノパワー」、および「晩抽レッドファイヤー」の地上部の病害度はそれぞれ 3.3、78.3、100 で、地下部の病害度は 36.7、100、100 であった (Fig.2-2-2a)。「VI185」と「晩抽レッドファイヤー」由来の F₂ 集団では、病害度は、地上部で平均 79.7、地下部で平均 89.2 であった (Fig.2-2-2b)。一方、「シナノパワー」と「晩抽レッドファイヤー」由来の F₂ 集団の平均病害度は、地上部で 94.1、地下部で 100 であった (Fig.2-2-2c)。これらの結果から、「VI185」は「シナノパワー」よりもレース 1 に対して高度な耐病性遺伝子座を有していることが示唆された。

「VI185」の *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* レース 1 耐病性に関する QTL 解析

「VI185」の *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 (以後「レース 1」と表記) 耐病性遺伝子座のマッピングを、「VI185」と「シナノグリーン」由来の F₂ 集団に関する RAD-seq データを用いて行った。連鎖地図、各 F₂ 個体のマーカーの遺伝子型情報は本章第 1 節における結果を利用した。各 F₂ 個体のレース 1 に対する耐病性を、地上部および地下部の病害度で数値化した結果 (Fig.2-2-3)、F₂ 集団における地上部と地下部の病害度は相関係数 (r) が 0.74 ($P < 0.001$) となり、有意な相関が認められた。また、地上部の病害度は地下部の

病害度に比べて症状が軽い傾向であった。地上部の病害度が 30 以上であったほとんどの個体では、地下部が重度となっていた。逆に、地上部の病害度が 30 以下であった個体では、地下部の病害度は軽度から重度まで様々であった (Fig.2-2-3)。F₂ 世代の 96 個体の病害度と ddRAD-seq で得られたマーカーの遺伝子型データを用いて CIM 解析による QTL マッピングを行った。地上部と地下部の病害度の各々によるマッピングの結果、どちらでも LG7 と LG8 の各同位置に 2 つの主要な QTL を検出し、それぞれ *qFOL7.1* と *qFOL8.1* と命名した (Table 2-2-2、Fig.2-2-4、Fig.2-2-5)。*qFOL7.1* および *qFOL8.1* と強く連鎖するマーカーに基づいて各 QTL の遺伝子型を推定したところ、表現型分散の約 18% を *qFOL7.1* が占め、38% を *qFOL8.1* が占めていた。これらの QTL の耐病性に対する単独効果と複合効果、および両 QTL の耐病性対立遺伝子の相加的効果を Fig.2-2-6 に示した。2 つの QTL の複合効果は、地下部よりも地上部でより顕著であった (Fig.2-2-6A、Fig.2-2-6B)。

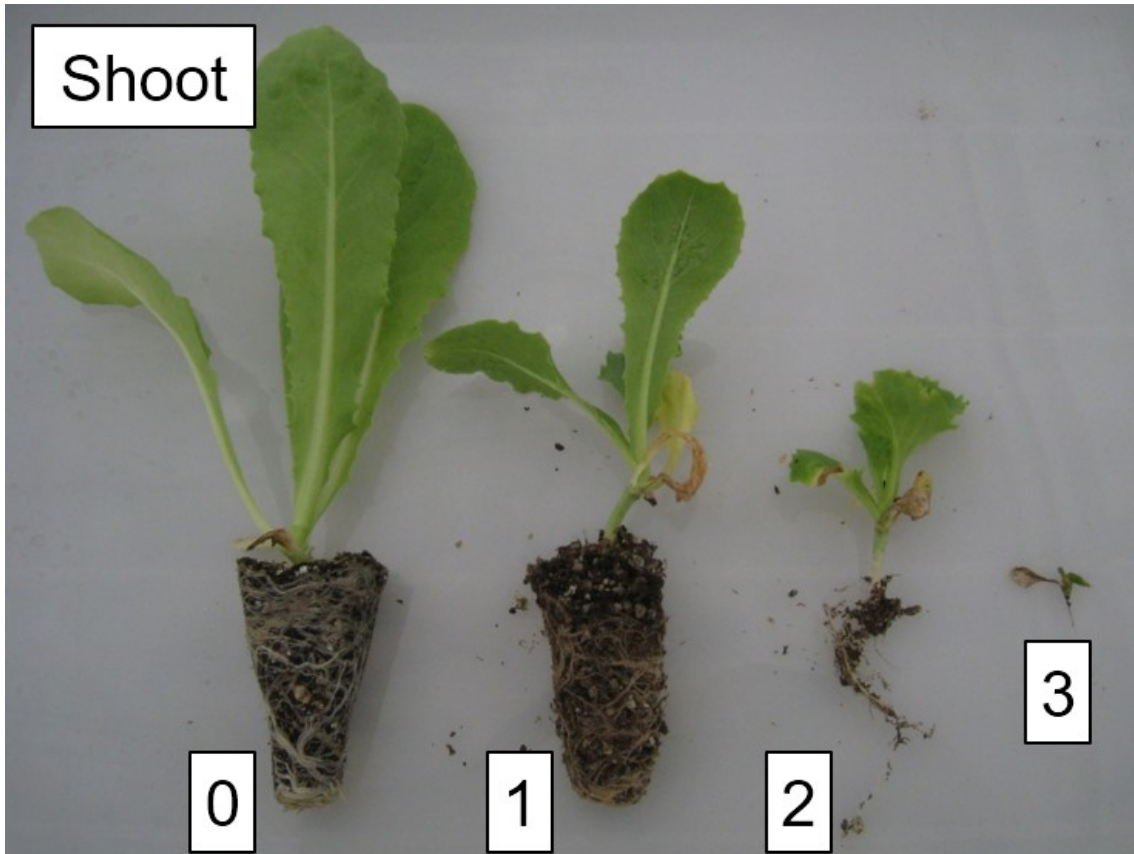
これまで長野県ではレース 1 に耐病性を示す品種を交配親に用いて、農業的に優れた形質を有する「シナノホープ」と「シナノパワー」を育成してきた。「シナノホープ」はアメリカで育成された「Salinas」由来の耐病性を、「シナノパワー」は日本で育成された「V レタス」由来の耐病性を有する。しかしながら、両品種ともに真夏の環境下ではレース 1 に感染してしまう場合があることが問題となっていた。そこで、レース 1 に対する耐病性を向上させるためにより強度な耐病性を有する遺伝資源を探索してみたところ、「Salinas」、「コストリカ 4 号」、「Valmine」など既知の耐病性品種と比較してより強度な耐病性を有した「VI185」を見出した。「Salinas」を交配親にもつ「シナノグリーン」は耐病性検定で部分的な耐病性を、「コストリカ 4 号」は中程度の耐病性を、「Valmine」は感受性を示した

(Table 2-2-1)。さらに、「VI185」と「晩抽レッドファイヤー」との交配で作出した F₂ 集団と、「シナノパワー」と「晩抽レッドファイヤー」との交配で作出した F₂ 集団との比較により、「VI185」は「シナノパワー」よりも強度な耐病性を有し、次世代に強度な耐病性を導入できることが明らかになった (Fig.2-2-2)。これまでの研究では、「Salinas」と「コストリカ 4 号」がレース 1 に対して複数の劣性耐性遺伝子座を持っていることが報告されており (McCreight et al. 2005)、「Salinas」の 1 つの遺伝子座は LG7 に位置し (Michelmore 2010)、「Valmine」由来の他の遺伝子座は LG1 と LG2 に存在すると報告されている (Michelmore 2010)。「シナノグリーン」は「Salinas」と「Ithaca」の交配で育成された品種であることから、「Salinas」由来の耐病性遺伝子を有している可能性が高いと考えられる。さらに別の研究では、「Lolla Rosa」から LG1、LG4、LG8 に耐病性遺伝子座を検出したことが報告された (Michelmore 2013)。以上のことから、レタスの根腐病レース 1 耐病性遺伝子座は LG1、LG2、LG4、LG7、LG8 に位置することが報告されているが、QTL の位置についてはほとんど知られていなかった。今回の研究により、「VI185」の耐病性に関する QTL は、LG7 で 85.7~100.6Mbp、LG8 で 13~30.5Mbp の間に位置していることが明らかになった (Table 2-2-2、Fig.2-2-4、Fig.2-2-5)。*L. sativa* V8 のリファレンスゲノム配列を調査すると、*qFOL7.1* および *qFOL8.1* 遺伝子座に多数の植物における耐病性遺伝子が

コードするヌクレオチド結合ロイシンリッチリピート受容体(NBS-LRR)タンパク質遺伝子がそれぞれ 5 個および 8 個存在することが明らかになった (Christopoulou et al. 2015)。レース 1 病原体は耐病性品種と感受性品種の両方の地下部に感染する能力を持ち、地上部での症状だけでは耐病性の違いを説明できないことが報告されている (Scott et al. 2014)。これらの症状特性は、レース 1 が「VI185」の地下部に感染したことで、F₂集団における地上部と地下部の病害度の違いと一致していた (Fig.2-2-3、Fig.2-2-6)。地下部に感染が認められるものの、2 つの主要な QTL を有する F₂ 個体の地上部の症状は軽度であった

(Fig.2-2-6)。このことから、*qFOL7.1* と *qFOL8.1* はレース 1 病原体の生育を抑制する効果が高いことが推察された。注目すべきは、より表現型の分散が大きい *qFOL8.1* は、8 番染色体上の主要な耐病性遺伝子 (NBS-LRR 遺伝子) クラスター領域に位置していることである (Christopoulou et al. 2015)。この QTL に位置する原因遺伝子を同定するためには、レース 1 病原体の非病原性遺伝子 (*Avr* 遺伝子) を同定し、その産物と相互作用する遺伝子を探索する必要がある。それによってこれらの QTL が新しい遺伝子座なのか以前に同定された他の QTL に対する対立遺伝子なのかについては、さらなる解析が必要である。

A



B

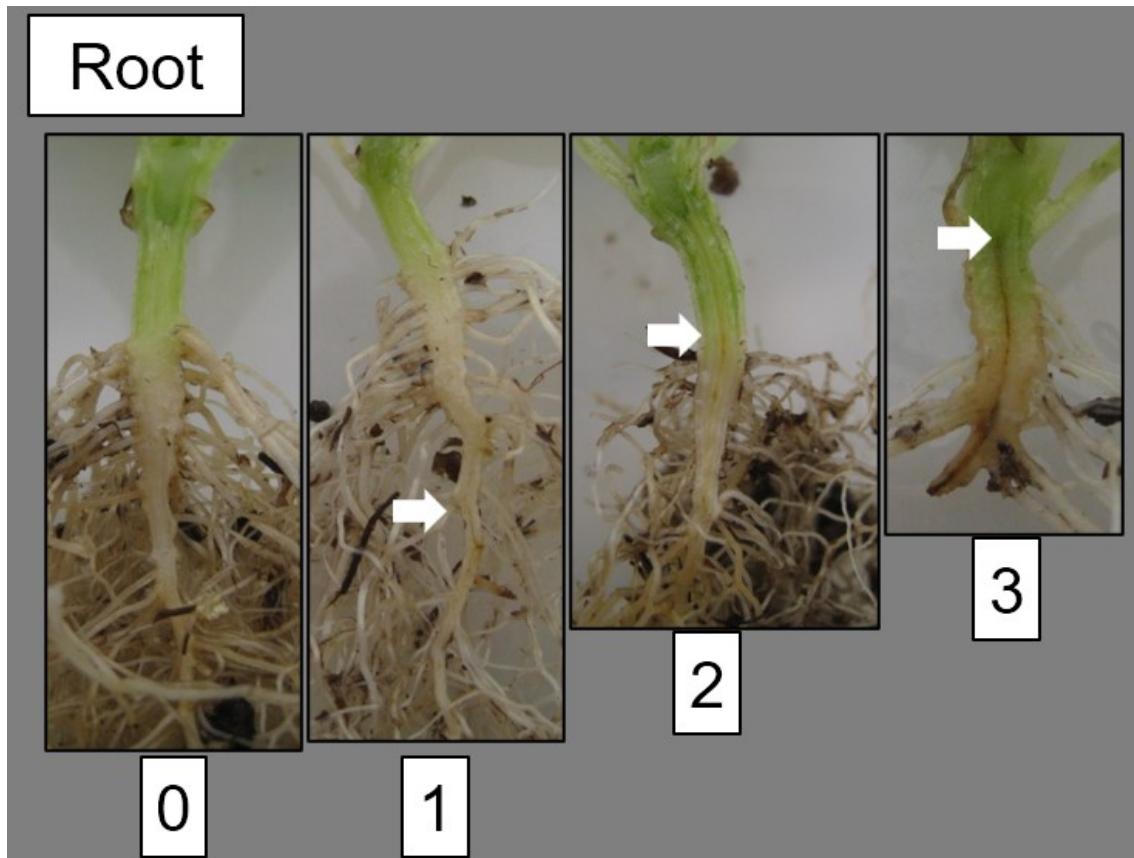


Fig.2-2-1

Symptom of the infected lettuce seedlings by *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1.

The disease index for shoot (upper panel) was as follows, 0:no symptom, 1:slightly wilt, 2:leaf stunting and wilting, 3: sever wilting and death. The disease index for root (lower panel) was as follows, 0:no symptoms, 1:light-browened main root, 2:dark-browened main root, 3:either crown-rotted or dark-browened inside of main root.

Table 2-2-1

Infection assay for evaluating disease resistance in lettuce cultivars by *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1.

Cultivars name	No. of plants tested	Shoot					Root				
		The disease index ^a				Disease ^b severity	The disease index ^a				Disease ^b severity
		0	1	2	3		0	1	2	3	
VI185	10	10	0	0	0	0	4	2	2	2	40
Nevada	10	2	4	1	3	50	0	1	3	6	83
CostaRica No.4	10	0	3	4	3	67	0	1	2	7	87
Version	10	5	2	1	2	33	0	0	3	7	90
SunValley	10	2	0	3	5	70	1	0	0	9	90
ShinanoGreen	10	0	0	2	8	93	0	0	0	10	100
Oak leaf	10	0	0	0	10	100	0	0	0	10	100
Valmine	10	0	0	0	10	100	0	0	0	10	100
SummerAce	10	0	0	0	10	100	0	0	0	10	100
White Paris	10	0	0	0	10	100	0	0	0	10	100

^a The disease index was scored as shown in Fig. 2-2-1.

^b Disease severity was calculated as described by Aruga et al. (2012).

A



VI185

ShinanoPower

BanchuRedFire

B



F₂ generation (VI185 × BanchuRedFire)

C



F₂ generation (ShinanoPower × BanchuRedFire)

Fig.2-2-2

Infection assay for evaluating disease resistance in lettuce cultivars and their progeny (F₂) by *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1.

One-month old seedling was assayed in each plant. (A)parental cultivars, 'VI185', 'ShinanoPower' and 'BanchuRedFire', (B) F₂ population derived from a cross 'VI185' and 'BanchuRedFire, (C) F₂ population derived from a cross 'ShinanoPower' and 'BanchuRedFire'.

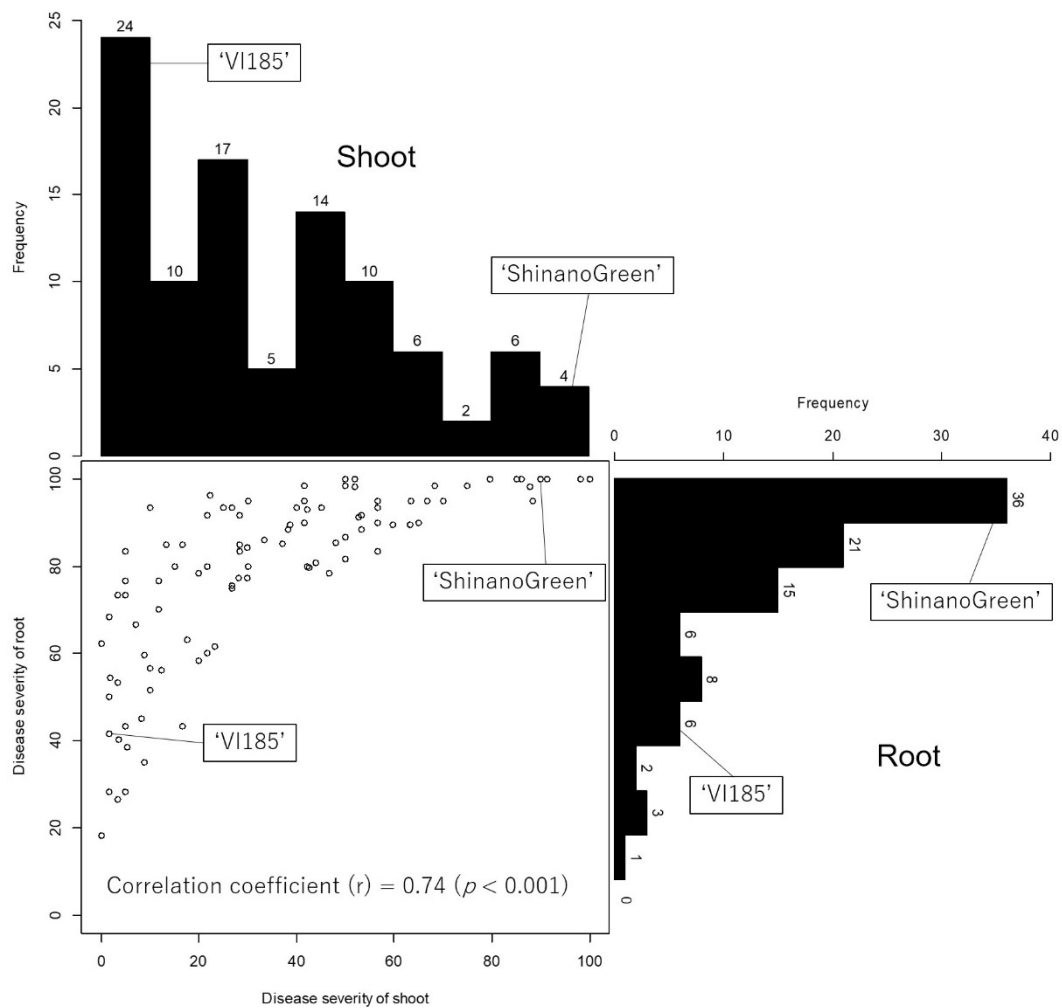


Fig.2-2-3

Relationship of the disease severity between shoot and root in F₂ plants and its parental cultivars.

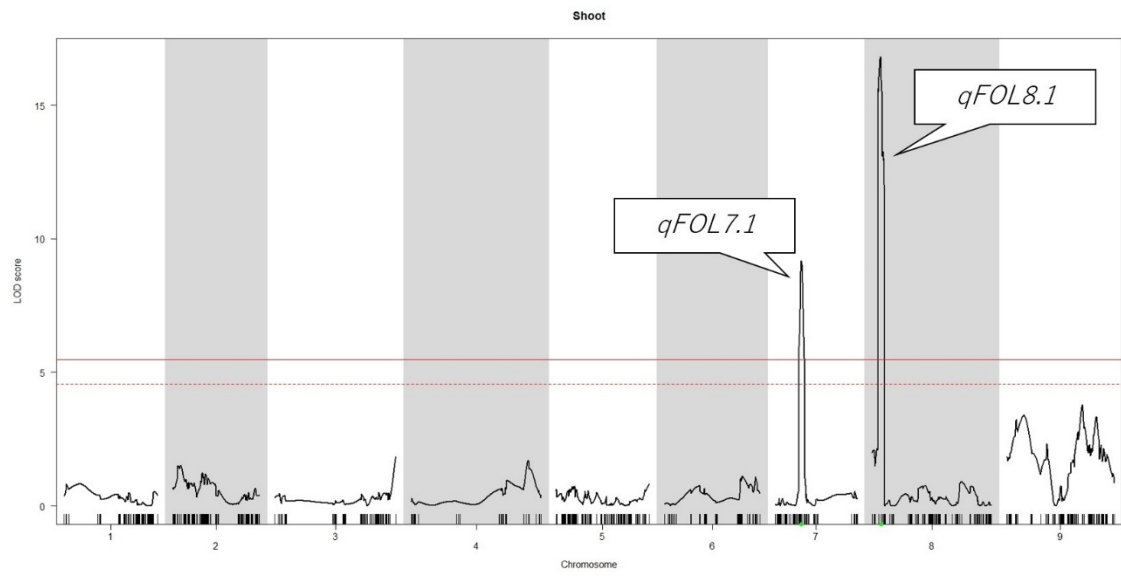
Histograms showed the frequency of F₂ plants showing each disease severity score in shoot or root tissue. Disease severity score in shoot and root of each individual plant was plotted. The correlation coefficient of the disease severity between shoot and root was 0.74 ($p < 0.001$).

Table 2-2-2

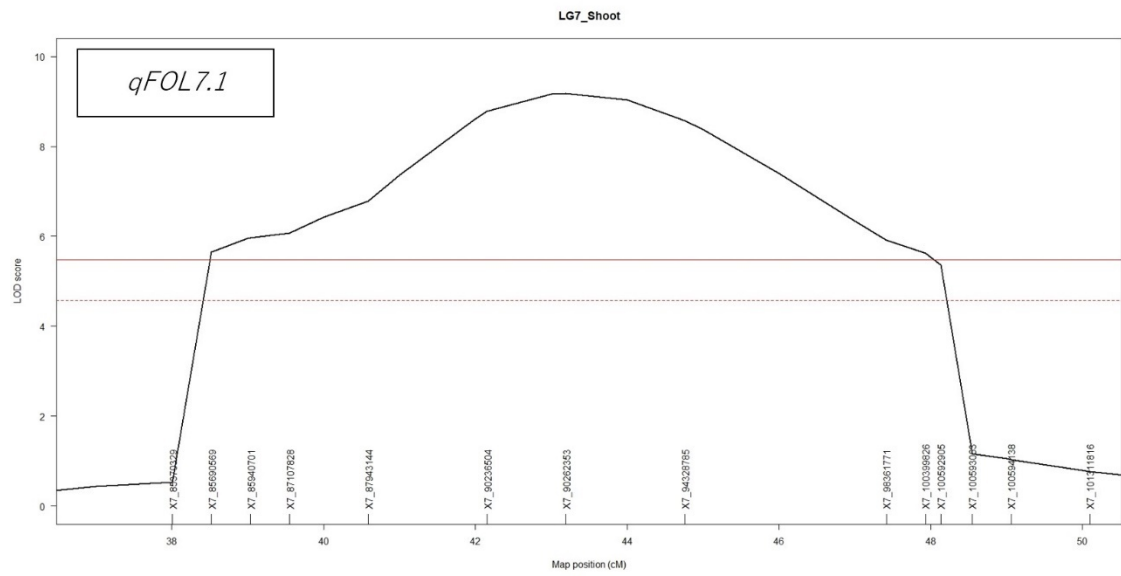
Loci for resistant phenotype to race 1 in the linkage map and their genetic effects.

QTL name	Plant Organ	Linkage Group	Marker	Genetic distance (cM)	Physical position (cM)	Threshold LOD	LOD	Additive Effect	Dominant Effect	R ² (%)
qFOL7.1	Shoot	LG7	LG7_v8_85.690Mbp to LG7_v8_100.592Mbp	9.61	38.52 - 48.13	5.59	9.44	-17.1	-1.94	18.6
qFOL7.1	Root	LG7	LG7_v8_87.943Mbp to LG7_v8_98.361Mbp	6.83	40.59 - 47.41	5.76	8.59	-12.86	0.17	18.7
qFOL8.1	Shoot	LG8	LG8_v8_12.963Mbp to LG8_v8_30.510Mbp	8.2	10.45 - 18.65	5.59	16.83	-25.62	1.86	40.16
qFOL8.1	Root	LG8	LG8_v8_23.914Mbp to LG8_v8_32.187Mbp	6.26	14.47 - 20.73	5.76	14.5	-17.43	6.33	36.82

A



B



C

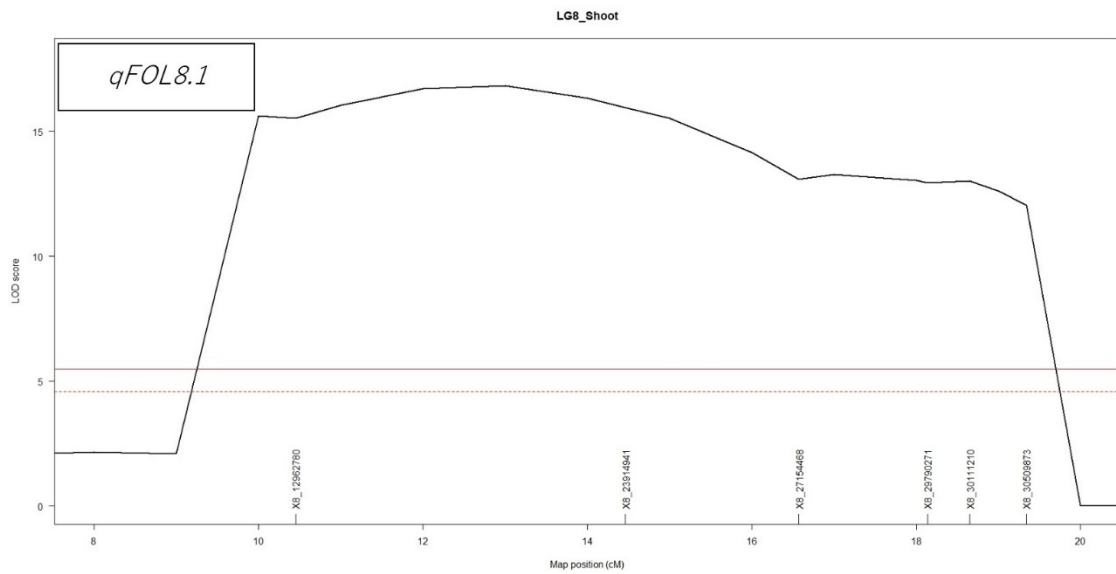
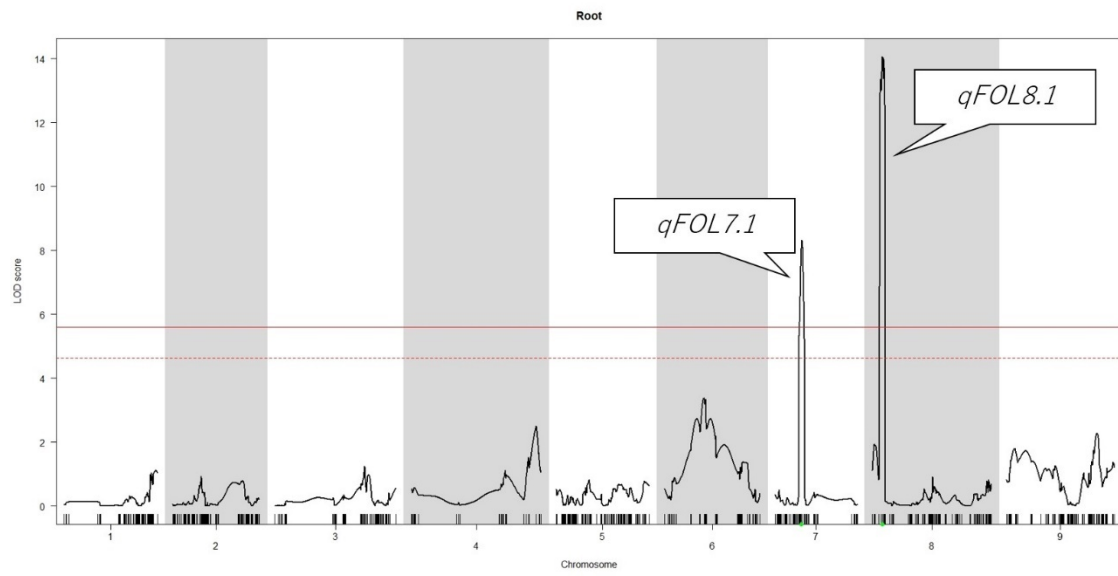


Fig.2-2-4

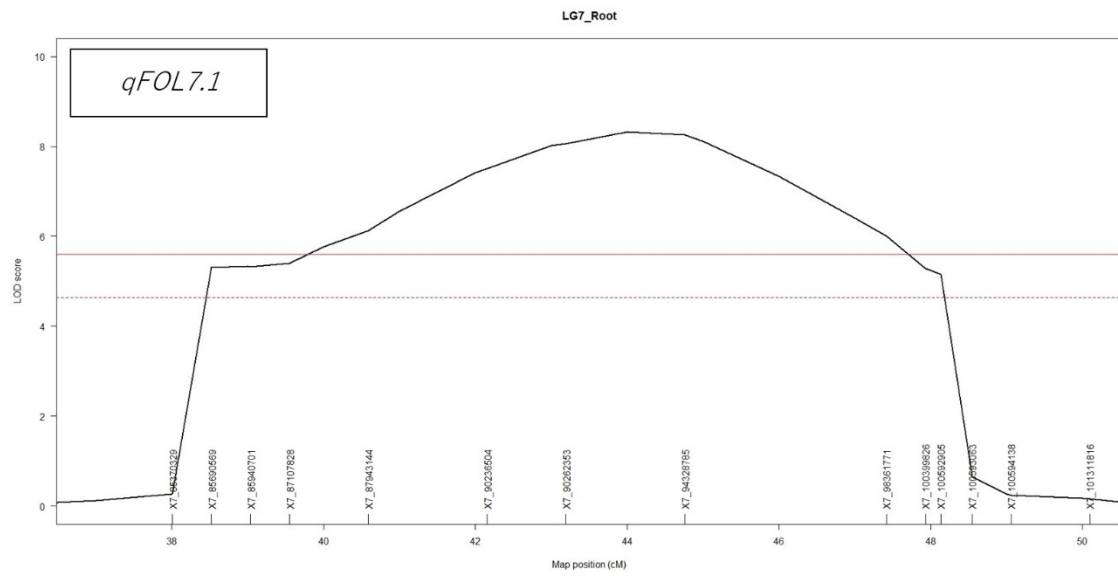
QTLs for resistance to Fusarium wilt race 1 in shoot tissue.

Detected QTLs in all the linkage groups (A), *qFOL7.1* in LG7 (B) and *qFOL8.1* in LG8 (C) were shown. Thresholds of LOD significance were 5.58 (Straight line: 1%) and 4.51 (Dotted line: 5%).

A



B



C

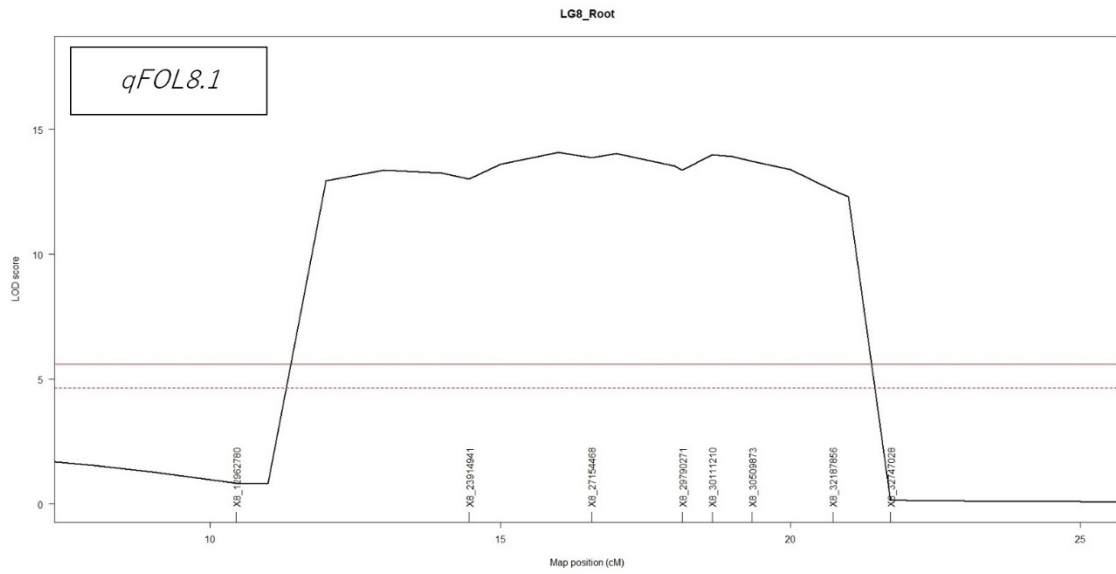


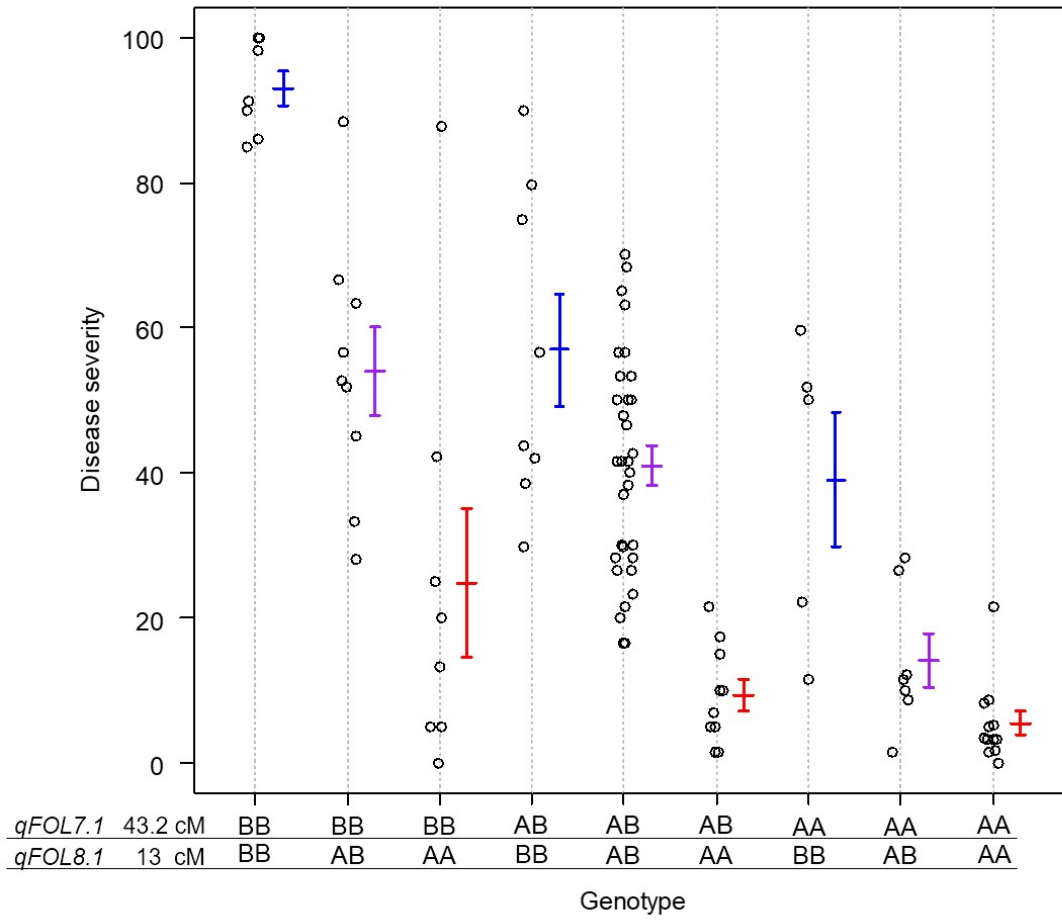
Fig.2-2-5

QTLs for resistance to Fusarium wilt race 1 in root tissue.

Detected QTLs in all the linkage groups (A), *qFOL7.1* in LG7 (B) and *qFOL8.1* in LG8 (C) were shown. Thresholds of LOD significance were 5.83 (Straight line: 1%) and 4.76 (Dotted line: 5%).

A

Shoot



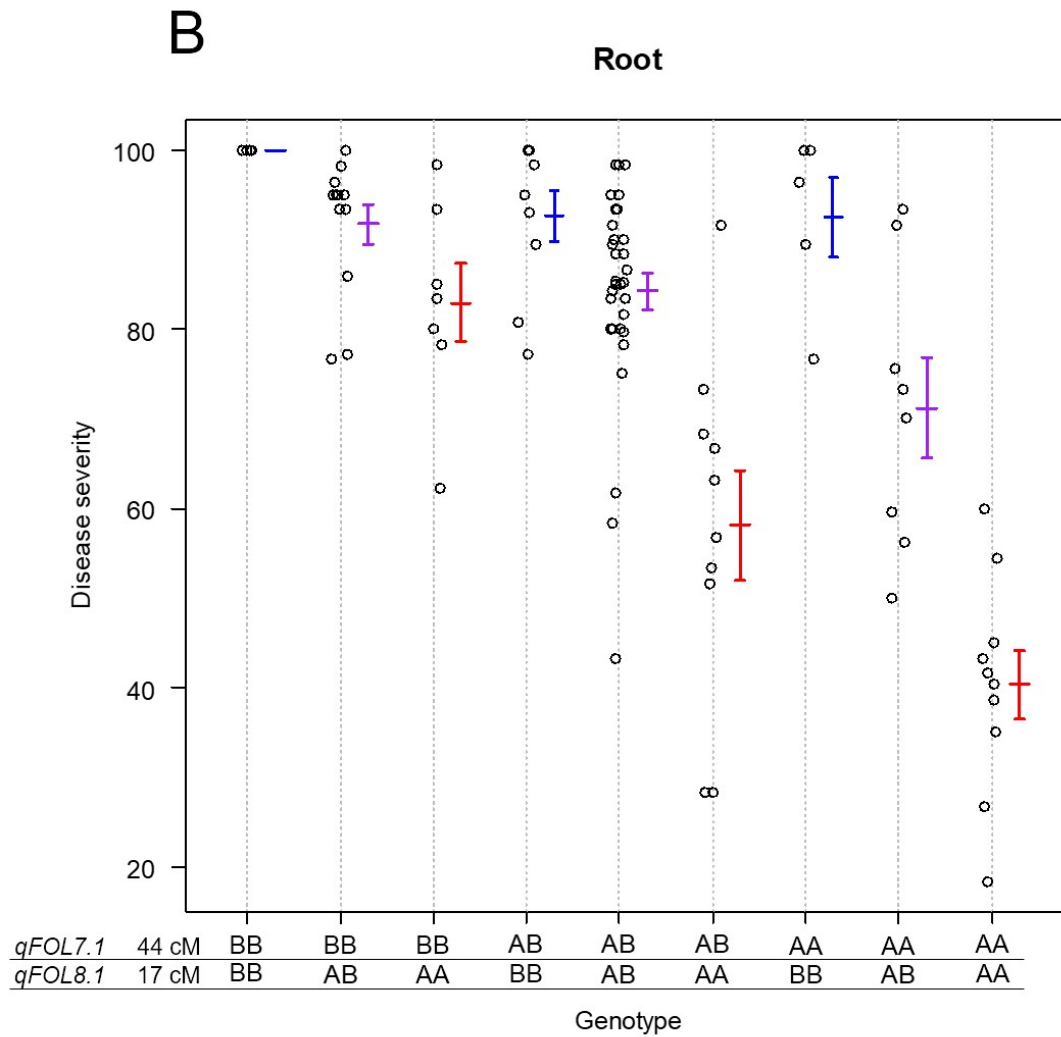


Fig.2-2-6

Correlation of two QTLs effects to the resistance phenotype to Fusarium wilt race 1. Correlation of disease severities in F_{2:3} plants derived from a cross ‘VI185 (highly resistance)’ and ‘ShinanoGreen (partially resistant)’ and genotypes of two QTL loci (*qFOL7.1* and *qFOL8.1*) were plotted. Disease severities in shoot (A) and root (B) were scored and plotted. Horizontal axis in the plotted graphs showed combination of two QTL genotypes, and “A” or “B” indicated the allele from ‘VI185’ or ‘ShinanoGreen’ respectively.

第3節 容易なゲノム DNA 抽出方法の確立

1. 緒言

本章の前節において見出した DNA マーカーを農作物の育種現場で利用して個体選抜を行うには、PCR に必要なゲノム DNA を多検体から迅速に抽出する必要がある。検体数が少ない場合には実績ある市販のゲノム DNA 抽出用キットを利用すれば PCR に用いるゲノム DNA を確実に抽出できるが、検体数が多い場合には実験労力やコストが問題となる。通常、レタスは 200 穴のセルトレイに播種して育苗し、播種後 2～3 週間程度で栽培圃場に定植して栽培する。この定植するまでの短期間のうちに 200 個体についての遺伝子型を判別することが出来れば、目的とする遺伝子型を有した個体だけを圃場に定植して栽培することが可能となる。そこで、DNA が二酸化ケイ素に結合しやすい性質を利用して、より簡易なゲノム DNA 抽出の方法を検討した。

2. 材料と方法

供試材料は新鮮重 100 mg 程度のレタス品種「シナノグリーン」の葉を 5 枚用いた。ゲノム DNA 抽出液および洗浄液の組成は、Fukami と Sassa の報告を参考にした(Sassa 2007; Fukami et al. 2008)。各溶液の基本組成は、ゲノム DNA 抽出液: 4M Guanidine thiocyanate、0.1M Tris-HCl pH8.0、1% Polyvinylpyrrolidone、洗浄液 1: 60% Ethanol、60mM Potassium acetate、10mM Tris-HCl pH8.0、洗浄液 2: 70% Ethanol とした。ゲノム DNA 溶出液は 65°C に温めた蒸留水を用いた。洗浄液 1 と洗浄液 2 は、あらかじめ 96 穴プレートに各々 200 μ L と 100 μ L を分注した。65°C に温めたゲノム DNA 溶出液は、直前に 100 μ L を分注した。ガラス繊維濾紙は、ワットマン社製の Glass microfiber filter GF/F 25mm をハサミで 8 分割して容量が 200 μ L のマイクロピペットチップ内にピンセットで挿入した (Fig.2-3-1)。

ゲノム DNA 抽出液 200 μ L とレタス葉を破砕用チューブに入れ、Multi-beads shocker (安井機械) を用いて 1500rpm で 15 秒の条件で破砕した。上澄み液をガラス繊維濾紙が入ったマイクロチップで吸い上げ、ガラス繊維濾紙にゲノム DNA 抽出液が吸収されたのを目視で確認した後、洗浄液 1 を 5 回ピペッティング、洗浄液 2 を 5 回ピペッティングしてマイクロピペットチップ内のガラス繊維濾紙の洗浄を行った。65°C に温めておいたゲノム DNA 溶出液を 5 回ピペッティングしてゲノム DNA の溶出を行い、ゲノム DNA 粗抽出液とした (Fig.2-3-2)。

PCR は、KOD FX (TOYOBO) を用いて行った。プライマーは、根腐病レース 2 の罹病性個体を判別できる WF25-42-SCAR を用いた (Aruga et al. 2012)。PCR のテンプレートとしてゲノム DNA 粗抽出液を 0.5 μ L 用いて、10 μ L の容量で PCR を行った。反応条件は Aruga の報告を参考に 2 ステップサイクルに改良した。94°C で 30 秒間、58°C で 30 秒間を 35 サイクル行った。ゲノム DNA 粗抽出液は 1% のアガロースゲル、PCR 産物は 3% のアガロー

スゲルを用いて各 10 μ L を電気泳動した。泳動後にエチジウムブロマイドを用いて染色し、UV トランスイルミネーターを用いて目視で確認した。

ゲノム DNA 粗抽出液の濃度測定は Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) で各サンプルについて行った。

3. 結果と考察

ピペッティング操作で抽出したゲノム DNA 粗抽出液を 1%アガロースゲルで電気泳動した結果、5 反復のいずれもバンドがややスメアーな状態で検出された。このことから一部が分解されているものの、ゲノム DNA が抽出されていることが示された (Fig.2-3-3)。

次に、このゲノム DNA 粗抽出液を用いて PCR を行った。PCR の酵素は、夾雑物が多い試料でも増幅可能な KOD FX (TOYOBO) を用いた。3%アガロースゲルで電気泳動した結果、明瞭なバンドが確認できた (Fig.2-3-4)。このことから、ガラス繊維濾紙を入れたマイクロチップを用いてのピペッティング操作のみでレタスのゲノム DNA を抽出可能で、KOD FX (TOYOBO) を PCR の酵素として用いることで安定して増幅産物を得られることが示された。抽出したゲノム DNA の濃度を測定した結果、5 サンプルの濃度の平均は 26.5 ng/ μ l、260/280 は 0.44 であったが、DNA の濃度測定に利用される 260nm の波長領域に小さなピークが見られたことから (Fig.2-3-5)、簡易な方法ではあるが PCR の Template としての利用には耐えうるゲノム DNA が抽出できていると考えられた。

育種工程に新技術を導入するには、再現性、簡便性およびランニングコストが課題となる。一般に DNA マーカーを利用した選抜 (Marker-Assisted selection ; MAS) には、植物体からのゲノム DNA の抽出、PCR、電気泳動の 3 工程がある。このうち PCR と電気泳動の工程ではそれぞれ、夾雑物の多いサンプルでも安定して増幅産物を得られる KOD FX (TOYOBO) などの酵素、マイクロチップを利用した MultiNA (Shimazu) などの全自動電気泳動装置が開発されている。したがって、PCR と電気泳動の 2 工程ではかなりの簡素化が進められているといえる。一方、ゲノム DNA 抽出の工程には煩雑な作業が多く、簡素化が進んでいなかったが、ガラス繊維濾紙を用いた抽出法により簡便性の改善を図ることが可能となった。また、本法を応用して 8 本のマイクロチップを装着できるマイクロピペットを利用すれば、一度の操作で 8 サンプル同時にゲノム DNA を抽出することもできることから、さらに簡便性が向上するものと期待できる。個体選抜では多検体を同時に扱う必要があり、ゲノム DNA を抽出する工程が MAS の律速要因となっている。レタスはゲノム DNA を抽出するのが難しい植物の一つとされていたが、本法が確立できたことで、実際の個体選抜の工程に DNA マーカーを利用した育種手法の導入が可能であると考えられた。多検体を迅速・簡便に処理することが可能な本法は、ゲノム DNA を抽出するのが難しい作物の育種においても、有用な手法といえる。

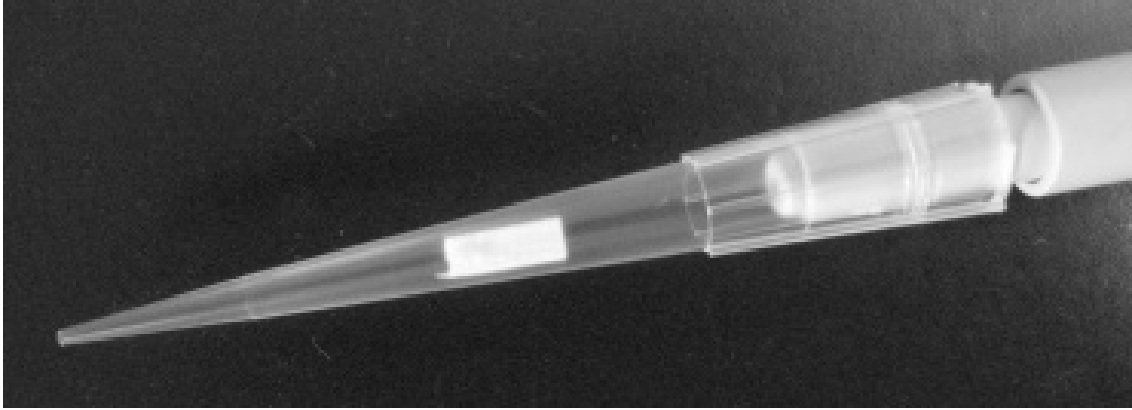


Fig.2-3-1

Glass microfiber filter (GF/F25mm) inserted into a micropipette chip (volume: 200 μ L).

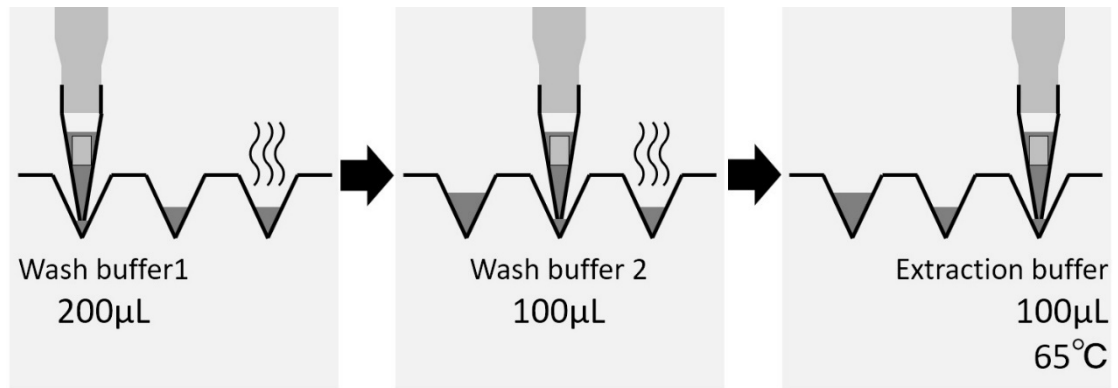


Fig.2-3-2

Operation procedure for extracting genome with the micropipette chip containing glass microfiber filter.

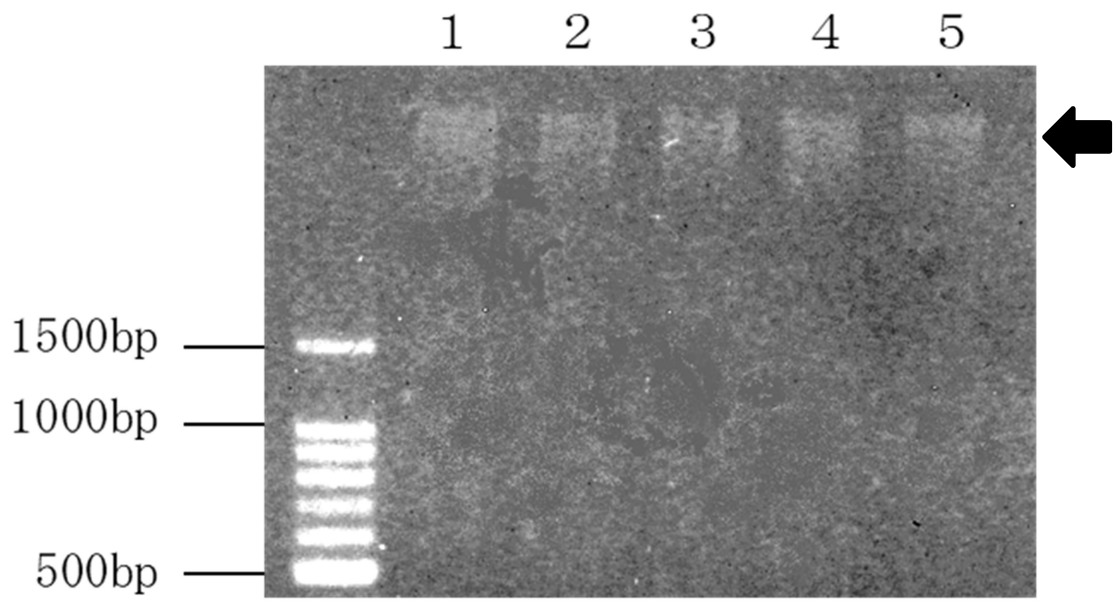


Fig.2-3-3

Genomic DNAs from 5 replicates of crude extracts.

A arrow indicates genomic DNA in the 1% agarose gel.

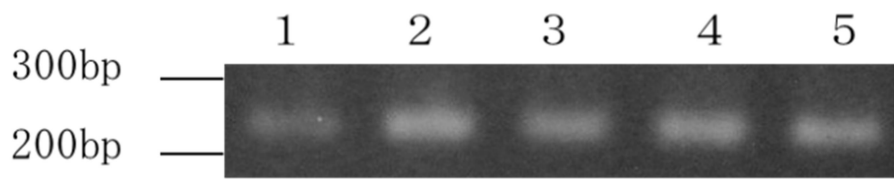


Fig.2-3-4

PCR amplified products of WF25-42-SCAR marker from 5 replicates of extracted genomic DNA.

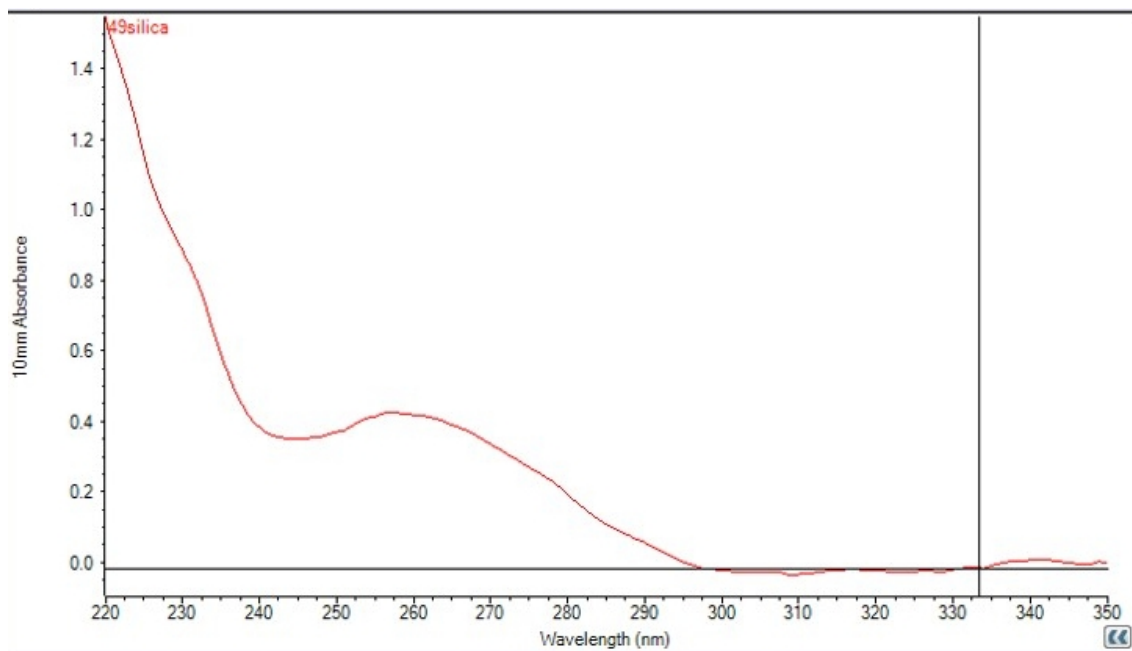


Fig.2-3-5

Absorption spectrum of the crude extracted genomic DNA solution.

Absorbance was measured using NanoDrop 2000.

総括

新しい品種を作り出す上で、遺伝資源から耐病虫性などの有用な形質を見つけ出し、交配によりその形質だけを既存の品種に導入する手法は大変効率的だと考えられる。その有用な形質はゲノムの中に遺伝子として書き込まれており、この有用な遺伝子の近くに DNA マーカーを設定すれば有用な形質を新品種に導入する場合の目印として利用することができる。

RAD-seq の技術を用いて、レタス品種の高温に対する適応性の向上を試みた。そのため、まずは複数品種の形質間の相関関係を調べ、その原因遺伝子の遺伝子マッピングを行った。エンパイヤ型（鋸歯状葉）とサリナス型（波状葉）の圃場栽培試験では、エンパイヤ型はサリナス型に比べてチップバーン感受性が高く、晩抽性となる傾向が認められた。次に

「VI185」（エンパイヤ型）と「シナノグリーン」（サリナス型）を交配させた F₂ 集団を用いて、葉先の形状と抽苔性の ddRAD-seq による遺伝的マッピングを試みた。これらの解析から、両方の形質は LG5 の単一遺伝子座によって制御されていることが示唆された。この遺伝子座に密に連結したマーカー（LG5_v8_252.743Mbp）を用いてレタス 51 品種の遺伝子型解析を行ったところ、その遺伝子型と鋸歯状葉の表現型との間に関連性が認められた。さらに詳細なマッピングとトランスクリプトーム解析により、CIN 様 TCP 転写因子をコードする遺伝子がこの遺伝子座の候補遺伝子であることが判明し、*LsTCP4* と命名した。

「VI185」（エンパイヤ型）の対立遺伝子にはレトロトランスポゾンが挿入されており、その葉の転写レベルは「シナノグリーン」（サリナス型）よりも低かった。「VI185」では、葉の表皮細胞の形状がシロイヌナズナの TCP ファミリー変異体と類似していたことから、葉の形状表現型は *LsTCP4* の機能低下に起因していると考えられる。さらに、TCP ファミリータンパク質は FT との相互作用により開花時期を制御していることが知られていることから、*LsTCP4* がレタスの葉の形状と抽苔性の両方に多面的な効果を与えている可能性が高いと考えられた。これらのことから、サリナス型品種とエンパイヤ型品種とを交配して、チップバーンが発生しにくいサリナス型品種にエンパイヤ型品種由来の晩抽性だけを導入することは、困難であると考えられた。高温条件に適応させるためには、サリナス型品種にエンパイヤ型品種由来の晩抽性とは異なる晩抽化因子を導入する方法を検討するか、エンパイヤ型品種がチップバーンを発生させないような栽培方法を検討するか、より具体的な戦略を立てることが可能となった。

次にレタス品種のフザリウム根腐病レース 1 に対する耐病性の向上を試みた。*F. oxysporum* f. sp. *lactucae* による根腐病レース 1 は、日本の夏場を含む熱帯・亜熱帯地域におけるレタスの主要病害の一つである。日本の産地では、既存の耐病性品種が高温期に根腐れ症状を示すようになってきたことから、レース 1 に対する耐病性の向上は喫緊の課題となっていた。遺伝資源を用いてレース 1 に対する耐病性検定を行ったところ、「VI185」はレース 1 に対して高度な耐病性を有していることが明らかとなった。高度耐病性品種

「VI185」と部分耐病性品種「シナノグリーン」の交配で得られた F₂ 個体を解析し、F₃ 個体をレース 1 の病原体を用いた耐病性検定に供試した。QTL 解析の結果、2 つの主要な因子が検出され、その 2 つとも高度耐病性品種「VI185」に由来していた。これらの結果は、フザリウムによるレタス根腐病レース 1 に対する耐病性因子を理解するための基礎的知見を提供し、*qFOL7.1* と *qFOL8.1* の 2 つの領域を導入することで既存のレタス品種の耐病性を向上させることは可能であることを示した。

農作物の育種現場でこれらの DNA マーカーを利用した個体選抜を行うには、PCR に必要なゲノム DNA を多検体から迅速に抽出する必要がある。検体数が少ない場合には実績ある市販のゲノム DNA 抽出用キットを利用すれば PCR に用いるゲノム DNA を確実に抽出できるが、検体数が多い場合には実験労力やコストが問題となるため、多検体から簡易にゲノム DNA を抽出できる方法が必要である。そこで、DNA が二酸化ケイ素に結合しやすい性質を利用して(Sassa 2007; Fukami et al. 2008)、より簡易なゲノム DNA 抽出の方法を検討した。その結果、ガラス繊維濾紙をピペットチップ内に入れてゲノム DNA の粗抽出液および 2 種類の洗浄液をそれぞれ数回ピペッティング操作するだけで、簡易にゲノム DNA を抽出できることが確認できた。また、この方法で抽出したゲノム DNA を用いて PCR を行ったところ、増幅産物を安定して得られることが明らかとなり、多数の個体を用いた DNA マーカーによる選抜育種を実践可能な基盤技術を確立できた。

第3章 *Brassica oleracea* L.における黒斑細菌病に対する罹病性指標としての 葉の表面構造解析

1. 緒言

近年、各種アブラナ科野菜では黒斑細菌病が多発し、栽培上の問題となっている。感染すると葉に小さな水浸状の斑点が現れ、拡大した後に壊死斑となる。さらに進行すると葉に穴が開き、葉脈だけとなってしまふ。従来は *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* が本病害の原因菌であることが知られていたが、平成 22 年に新たに *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* (以下、Pcal) が病害発生個体から確認され、産地での発生実態を調査した結果、現在ではこの Pcal が主たる原因菌であることが判明した。この Pcal による黒斑細菌病は夏季の降雨により発生が増加し、*Brassica oleracea* L. (キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー、ケール、グリーンボールなど) ではグリーンボールで顕著な発生が認められる。キャベツなど光沢がない Bloom タイプの葉を有する品種での発生は軽微であることから、グリーンボールの特徴である光沢のある Glossy タイプの葉(Fig. 3-1)と黒斑細菌病の発生とになんらかの関係性が疑われた(Fig. 3-2)ため、Glossy タイプについて葉表面のクチクラの構造解析に着手することとした。

植物葉の表面にあるクチクラは地上部組織と周囲の環境との境界として機能しており、植物の発達と生存に不可欠であるとされる。例えば、クチクラは植物の発達中に他の器官との癒着や融合を防ぎ、脱水や紫外線、病原菌、害虫の攻撃などの外的ストレスから植物を保護するバリアとして機能することが知られている(Sieber et al. 2000; Eigenbrode and Jetter 2002; Bargel et al. 2006; Dominguez et al. 2011; Oshima et al. 2013; Yeats and Rose 2013; Serrano et al. 2014; Heredia-Guerrero et al. 2014; Fernández et al. 2016; Domínguez et al. 2017; Liu et al. 2019; Skolik et al. 2019)。クチクラの厚さは、典型的には、植物種に応じて 0.1~10 μ m またはそれ以上(例えば、200 μ m)の範囲である(Nawrath 2006; Dominguez et al. 2011)。ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) を用いてクチクラの構成成分が調べられており、ワックス、クチン、多糖類、およびフェノール化合物の存在が確認されている(Dominguez et al. 2011; Heredia-Guerrero et al. 2014; Fernández et al. 2016; Fich et al. 2016)。しかしながら、その構造を分析するためにはクチクラを溶媒に溶かす必要があり、葉表面での分子構造や物質の局在に関する情報は失われてしまうため、GC/MS 等の機器分析では得られる情報が限られてしまうという問題点があった。そこで、本研究では非破壊的に葉表面のクチクラの構造を明らかにするため、超高真空環境での薄膜の構造分析等に使われていた赤外分光法を葉表面の分析に応用することとした。この赤外分光法は、物質に赤外光を照射し、透過または反射した光を測定することで試料の構造解析や定量を行う分析手法である。前処理無しで測定できることから、非破壊で葉の表面を解析できるという利点がある。これまでにも赤外分光法でクチクラを分析した研究が報告されているが、溶媒で溶かした後に再結晶化させたクチクラワックス

の構造解析に用いられており、赤外分光法の特徴の一つである非破壊での解析を活かした研究成果は報告されていない(Heredia-Guerrero et al. 2014)。

そこで本章では、非破壊で葉表面を調べることができる2つの赤外分光法を用いて、黒斑細菌病に罹病性となる Glossy タイプの表面構造を詳細に調べることで、罹病性要因の解明を試みた。

2. 材料と方法

供試材料

材料としてはカリフラワー品種「PI234599」由来の葉に光沢を有する Glossy タイプの品種「C49FHP」(*Brassica oleracea* L.)を用いた。

偏光変調赤外反射吸収分光法 (PM-IRRAS 法)

PM-IRRAS 法は、FT-IR 分光光度計(Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA)を用いて室温で行った。FT-IR 分光光度計における干渉計の変調周波数は 1.0 ~ 5.0kHz であり、800~4,000 cm^{-1} の波数領域に対応し、バンド分解能は 4 cm^{-1} であった。s-偏光と p-偏光を交互に発生させるために、PEM コントローラ (PEM-100, Hinds Instruments, Hillsboro, OR, USA) を用いて PEM の固有共振周波数を 50kHz に設定した。入射角は、最適な入射角である 76°とした(Itoh et al. 2010)。葉面に二重変調された赤外光を照射し、その反射光をテルル化水銀カドミウム (MCT) 検出器で検出した。葉面に照射された赤外光の焦点サイズは約 4mm であり、入射角が 76°と大きいため、赤外光の方向に沿って大きくなっていた。PM-IRRAS 信号 (S) は、同期サンプリング復調器 (SSD-100-15, GWC Technologies, Madison, WI, USA) を用いて得た。波数の下限は、MCT 検出器上の BaF₂ レンズのカットオフ波数である約 1,000 cm^{-1} であった (Fig. 3-3)。インターフェログラム収集の蓄積数は 1,000 であり、所要時間は約 1,188 秒であった。スペクトルの最大効率波数となる半波遅延周波数を 3,000 または 1,500 cm^{-1} に設定し、それぞれ 3,800~2,600, 1,900~1,000 cm^{-1} の領域で比較的平坦なベースラインを持つ良質なスペクトルを得た (Fig. 3-4)。結果の再現性を確認するために、3 反復で葉を測定した。また、「C49FHP」の葉の表面と裏面のスペクトルを測定したところ、定性的によく似たスペクトルが得られた (Fig. 3-5)。

「C49FHP」の葉を約 4×4cm 角に切断し、クロロホルムとテープストリッピングでワックスを除去した。クロロホルム (99% ; 和光純薬工業株式会社、大阪府、日本) 50 ミリリットルを用いて 5 分間浸漬実験を行った。テープストリッピングは、スコッチテープ (CT-18, ニチバン株式会社、東京、日本) を用いて、葉の表面に対して 3 回行った。

ガスクロマトグラフィー/質量分析

ワックスの分子組成は、GC/MS システム (6890 N GC/5973AMSD, Agilent Technologies,

Santa Clara, CA, USA) を用いて同定した。「C49FHP」の葉のワックスをジクロロメタン (>99.8%、和光純薬工業株式会社、大阪、日本) で超音波抽出し、GC/MS 分析の前にトリメチルシリルエステルに誘導体化した。

走査型電子顕微鏡

SEM による観察は、走査型電子顕微鏡 (JSM-5310 LV、日本電子株式会社、東京都、日本) を用いて、北海道大学農学部研究部電子顕微鏡研究室で行った。「C49FHP」の葉の表面をイオンスパッタコーター (E-101、日立、東京、日本) で金パラジウム (~10 nm) をコーティングした後、加速電圧 15 kV で SEM による観察を行った。

全反射減衰赤外分光法 (ATR 法)

ATR 法は、ダイヤモンドプリズム (Universal ATR Accessory, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) と重水素化トリグリシン硫酸検出器を備えた ATR アクセサリーと結合した FT-IR 分光計 (Spectrum One, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて行った。

「C49FHP」の葉の表面を直接ダイヤモンドプリズム上に置き、スペクトルを蓄積数 100 の非偏光を用いて記録した。バンド分解能は 4cm^{-1} 、スキャン速度は 1cm s^{-1} であった。ATR-IR 分光法では、入射した赤外光は ATR プリズム表面で全反射して検出器に向かう。全反射では、エバネッセント波の電場は試料を透過し、透過深さの増加とともに指数関数的に減衰する。電界の振幅が e^{-1} 倍に減少する深さである浸透深さ(d_p)は、赤外波長(λ)の関数として以下のように表される。

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}}$$

ここで、 n_1 と n_2 はそれぞれ ATR プリズム (ダイヤモンドの場合は $n_1=2.4$) と試料 (有機化合物の場合は $n_2=1.5$) の屈折率であり、 θ は赤外光の入射角 (45°) である (Tasumi 2014; Hasegawa 2017)。ATR-IR 分光に無偏光光を用いた場合、どのような向きで分子が振動しても正のピークとして観測される (Hasegawa 2017)。

3. 結果と考察

黒斑細菌病に罹病性となる *B. oleracea* の Glossy タイプの葉を示す品種「C49FHP」について赤外分光法により葉の表面のクチクラ構造の解析を試みた。本研究で利用する赤外分光では生物学で一般的に利用されている可視光分光と同様に、基本的には物質が固有の波長を吸収することを利用した解析である。赤外分光では波長ではなく波数でエネルギーを表示するが、その波数とは波長の逆数をとったもので、「1 cm あたりにどれだけ波の山と谷が存在するか」を cm^{-1} の単位で表示したものである。波長は数値が小さいほど高エネルギー

ギーという関係になり計算しにくい、波数は数値が大きいほど高エネルギーという素直な関係となって計算しやすいという利点があるため、物理学で光を扱う場合には波長ではなく波数で表すのが一般的となっている。波長が 2.5~20 μm (波数にして 4,000~5,00 cm^{-1}) ほどの赤外光を物質に照射すると、分子の振動による物質固有の吸収パターン (スペクトル) が現れ、分子の構造に関する情報が得られる。例えば、多糖類に反応する 1,171, 1,124, 1,080, 1,039 cm^{-1} の波数は、それぞれ、8.54, 8.90, 9.26, 9.62 μm の波長に相当する。このピーク波長 8.54, 8.90, 9.26, 9.62 μm は、多糖類内の C-O 結合の伸縮振動による吸収に由来しており、この 4 つの波長の違いは、C-O 結合している位置の違いを反映している。具体的には、1,171、1,124 cm^{-1} (8.54, 8.90 μm) の光は糖の環と環をつなぐグリコシド結合に由来する C-O 結合の伸縮振動に反応し、1,080、1,039 cm^{-1} (9.26, 9.62 μm) の光は多糖類の糖の環を構成する C-O 結合の伸縮振動 (ring vibration) に反応することが知られている。このように、物質の構造によって吸収する固有の波長が大きく異なることを利用して、一度にそれぞれの物質について調べることができる。また、ピークの形状は赤外光の p-偏光と s-偏光に強く依存することが知られている。p-偏光は葉表面と平行な方向と垂直な方向に分割でき、s-偏光は葉表面と平行な成分しか持たないことから、p-偏光と s-偏光の反射光強度の差からクチクラの赤外スペクトルが計算できる。例えば、C-O 結合の伸縮振動が葉表面に平行に振動しているか垂直に振動しているかで、p-偏光、s-偏光との相互作用の仕方が変わるため、赤外分光では葉表面での多糖類などの高分子の向きを推測することもできる。このことを赤外分光法における「表面選択則」という (Fig. 3-6)。

本研究における測定では、偏光変調赤外反射吸収分光法 (Polarization Modulation-Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy, PM-IRRAS 法) と全反射減衰赤外分光法 (Attenuated Total Reflection, ATR 法) の測定深度が異なる 2 つの分析法で行った (Fig. 3-7)。

クロロホルムとテープストリッピングによるクチクラワックスの除去

まず本解析で測定しているスペクトルが葉表面のクチクラワックス由来であることを確かめるため、クチクラワックス成分を溶かすのに適した溶媒であるクロロホルム (Riederer and Müller 2006) を用いてクチクラワックスを溶かして葉から除去した場合と、スコッチテープを用いて物理的にクチクラワックスを葉から剥がして除去した場合の、それぞれのスペクトルを比較した。「C49FHP」の葉表面の SEM 画像から、クロロホルムに浸漬したことでクチクラワックスの薄膜がほとんど完全に除去されていること (Fig. 3-8A, Fig. 3-8B) と、スコッチテープ剥離により葉からクチクラワックスの一部を機械的に除去できた

(Fig. 3-8c) ことが示された。クロロホルムに 5 分間浸漬した「C49FHP」の葉のスペクトルとテープストリッピングでクチクラワックスを剥がした葉のスペクトルにおいて、2,916 cm^{-1} の $\nu\text{a}(\text{CH}_2)$ バンドおよび 2,848 cm^{-1} の $\nu\text{s}(\text{CH}_2)$ バンドと、1,473 cm^{-1} と 1,462 cm^{-1} からなる $\delta(\text{CH}_2)$ バンドの 2 つのピークが弱くなっていた (Fig. 3-9, Fig. 3-10)。これらの結果から、 $\nu\text{a}(\text{CH}_2)$ 、 $\nu\text{s}(\text{CH}_2)$ 、 $\delta(\text{CH}_2)$ バンドは、主に有機溶媒に可溶性のクチクラワックスに

由来するものであると推定した。

クチクラワックスの構造解析

Glossy タイプの葉である「C49FHP」の葉のスペクトルを解析したところ、 $3,800\text{--}2,600\text{ cm}^{-1}$ (Fig.3-9A)および $1,900\text{--}1,000\text{ cm}^{-1}$ (Fig.3-9B)の範囲でFig.3-9に示す結果が得られた。試料の前処理を行わずに、PM-IRRAS法で「C49FHP」の葉のクチクラのIRスペクトルを測定したところ、各官能基の配向に応じたスペクトルが得られた。 $2,916\text{ cm}^{-1}$ (Fig.3-9A-a,C-a) および $2,848\text{ cm}^{-1}$ (Fig.3-9A-a, C-a) に二つのピークが現れたことから、クチクラワックスの分子構造が秩序化された全トランスジグザグ構造および高い分子パッキングを有するアルキル鎖の典型的なものであることが分かった (Fig.3-11) (Hasegawa 2017)。対照的に、移動性または無秩序な構造 (ガウシェ構造) を持つアルキル鎖は、 2924 cm^{-1} および $2,855\text{ cm}^{-1}$ にピークを示すか、それ以上のピークを示す (Hasegawa 2017)。全トランスジグザグ構造は、典型的には C20~C40 のアルキル鎖長を有する脂肪族炭化水素からなるクチクラワックスを含む、十分に長いアルキル鎖を有する安定的な構造である。

次に、「C49FHP」のクチクラワックスをGC/MS分析したところ、炭素鎖長 C24~C29 のアルカン及びアルコールを含み、特に炭素鎖長 C26 のアルコール (▲26) を多く含むことが判明した (Fig.3-12)。この結果は、クチクラワックスに含まれる分子のほとんどが、全トランスジグザグ構造のために十分に長いアルキル鎖を有していることを示している。 $1,473\text{ cm}^{-1}$ (Fig.3-9B-a,D-a) および $1,462\text{ cm}^{-1}$ (Fig.3-9B-a,D-a) に二つのピークとして現れる CH_2 シザリング振動バンドからアルキル鎖の結晶性についての情報が得られ、クチクラワックスが斜方晶系の結晶構造をしていることが読み取れる (Snyder 1961, 1979)。結論として、「C49FHP」のクチクラワックスは、全トランスジグザグ構造をしたアルキル鎖が、斜方晶系の結晶構造で葉表面に凝集していることを示している。

クチクラワックスの分子配向

クチクラワックス中のアルキル鎖の平均配向の質的分析は、赤外分光法における表面選択則 (Fig. 3-6) に従ったピークの向き (正または負) に基づいて可能である。表面選択則とは、得られたスペクトルのピークの正負から、分子の振動の向きが分かるというものである。植物の葉に対して赤外光を入射したとき、正のピーク (上向き) は平行な振動、負のピーク (下向き) は垂直な振動を意味する。得られたスペクトルのピークの正負で分子の配向 (振動の向き) が官能基レベルで分かる。Fig.3-9 のスペクトルは $\text{va}(\text{CH}_2)$ 、 $\text{vs}(\text{CH}_2)$ 、 $\delta(\text{CH}_2)$ バンドのピークはすべて正のピーク (上向き) となっていることから、クチクラワックスの炭素鎖の CH_2 基の対称伸縮振動、反対称伸縮振動、はさみ振動が細胞壁に対して平行であることを示している。この条件を満たす炭素鎖の向きは、炭素鎖が細胞壁に対して垂直に立っているときのみである。このことから、クチクラワックスの炭素鎖が細胞壁に対して垂直に配向していると結論付けた (Fig.3-11B)。

クチクラワックス内の多糖類の局在

PM-IRRAS 法により、クチン由来の C=O 伸縮振動の上向きピーク(1,734 cm^{-1})や、ヘミセルロース類であるキシランやキシログルカンといった多糖類に由来する C-O 伸縮振動の下向きピーク(1,171, 1,124, 1,080, 1,039 cm^{-1})が検出された (Fig.3-9、Table 3-1)。

PM-IRRAS 法で分析できる深さはおよそ 500nm 以下であることと、アブラナ科類のクチクラワックスの厚さはおよそ 3-6 μm と考えられていることから、キシランやキシログルカンなどの多糖類がクチクラワックスの表面近くに存在していると考えられた。次に、PM-IRRAS 法よりも深い部分 (1~2 μm) を分析できる ATR 法で測定を行った。その結果、ATR 法で調べられる 1~2 μm の深さにはキシランやキシログルカンといった多糖類に由来するピークは検出されず、ペクチンに由来するピーク(1,147, 1,102, 1,050, 1,016 cm^{-1})が強く観測された (Fig.3-13、Table 3-2)。これらのことから、クチクラワックス内の表面近く (500nm 以下) にはキシランやキシログルカンなどの多糖類が、内部 (1~2 μm) にはペクチン類が局在することが今回の研究で明らかとなった (Fig. 3-7)。

Glossy タイプの葉表面構造の特性

植物のクチクラワックスに含まれるセルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどの多糖類については、まだ十分には解明されていないことが多い。多糖類は細胞壁と接触する最内側部分に局在し、クチクラワックスの外側部分には存在しないと提唱されていた (Fernández et al. 2017)が、探索深度の異なる PM-IRRAS 法と ATR-IR 分光法を用いた分析の結果から、葉表面に近いより外側のクチクラ領域にヘミセルロースであるキシランとキシログルカンが存在し、より内側のクチクラ領域 (深さ 2 μm 以下) にはペクチンが多く存在していることが示唆された (Fig. 3-13)。これは、クチクラワックスの外側部分には多糖類は存在しないという定説が、Glossy タイプについては当てはまらないことを意味する。黒斑細菌病の原因菌である *Pseudomonas* は概ね数 μm であることと、多くの微生物がキシラナーゼなどを有していることなどから、Glossy タイプの葉表面近くに局在する多糖類を病原菌が基質として利用できるため、罹病性となってしまいう可能性が考えられた。

耐病性個体選抜法確立に向けての今後の課題

植物の地上部組織の表面は、ワックス、クチン、多糖類など様々な有機化合物からなる膜であるクチクラで覆われている。クチクラは、様々な環境ストレス要因から植物を保護するために重要な役割を果たしている。本章では *B. oleracea* L.において Glossy タイプと呼ばれる光沢を持つ葉の品種で黒斑細菌病への感受性が高いという現象が見られていたことから、その因果関係を明らかにすべく解析を行った。植物の葉表面に関する詳細な物質構造の情報を得るためには、非破壊で解析を行う必要があることから、赤外分光法の一つである PM-IRRAS 法に着目した。PM-IRRAS 法は数百 nm 以下の探索深度を持ち、クチクラ表面を覆うワックスの結晶構造特性を明らかにすることができた。ATR-IR 分光法を

用いた分析の結果から、葉表面に近いより外側のクチクラ領域にヘミセルロースであるキシランとキシログルカンが存在し、より内側のクチクラ領域（深さ 2 μm 以下）にはペクチンが多く存在していることが示唆された。キシランは β -1,4結合のキシロースを主鎖に持ち、アラビノースやグルクロン酸側鎖等によって修飾されており、キシログルカンは β -1,4-グルカンの主鎖にガラクトース、アラビノース、フコースといった単糖で修飾されたキシロースが結合している多糖類である。黒斑細菌病の病原細菌である *Pseudomonas* は概ね数 μm の大きさであることと、多くの微生物がキシランを分解できるキシラナーゼを有していることを考慮すると、葉表面から数百 nm の範囲内に局在しているキシランなどの多糖類を病原菌が基質として利用できる可能性は大いにあり得る。赤外分光では生体内に存在する物質に関する検量線を作ることが困難であるため、定量的な分析を行う際には、抽出溶媒などを利用した従来の分析方法で測定することが妥当であろう。しかし、本研究では罹病性品種の葉表面の構造解析しかできていないため、今後の課題として、耐病性の程度と病原菌の基質となりうる物質との相関を調べることなどにより耐病性個体の新たな選抜法の確立に貢献するような研究が必要である。



Fig. 3-1

Two leaf types with different leaf-surface structures in *B. oleracea*.



Fig. 3-2

Leaves of the glossy type tend to be more susceptible to Bacteria leaf spot.

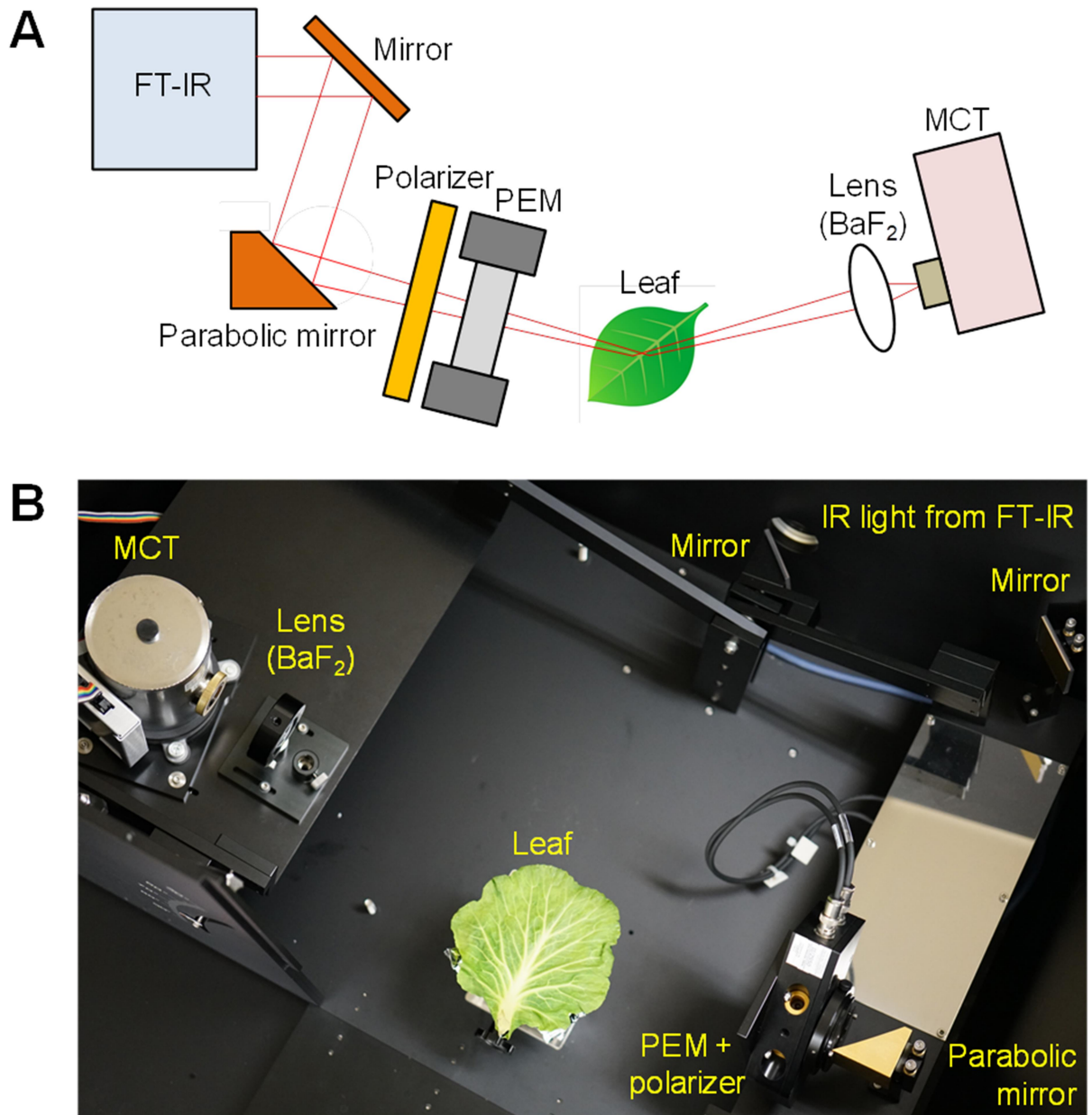


Fig. 3-3

Schematic overview of the PM-IRRAS measurement for *B. oleracea* L. leaves.

(A) Schematic of the PM-IRRAS set-up on a leaf surface. FT-IR: Fourier transform infrared spectrometer; MCT: mercury cadmium telluride detector; PEM: photoelastic modulator. (B) Photograph of the PM-IRRAS measurement of the leaf surface of a *B. oleracea* L. plant.

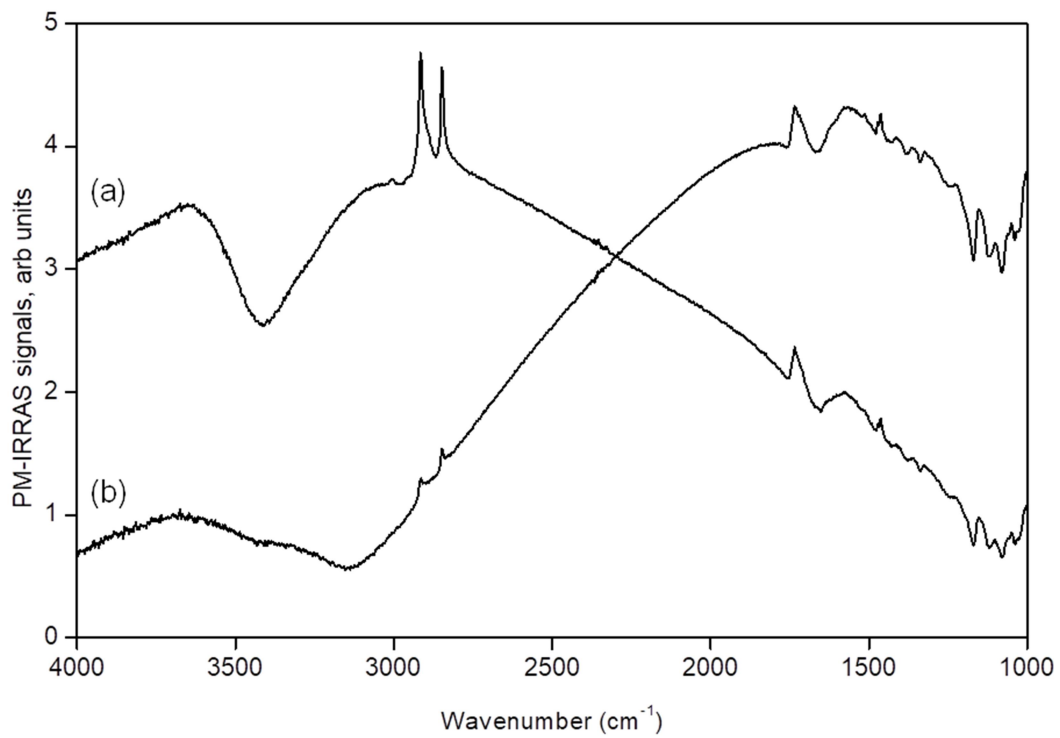


Fig. 3-4

Ratio spectra of a *B. oleracea* L leaf surface. The half-wave-retardation frequencies were set to (a) 3,000 and (b) 1,500 cm⁻¹.

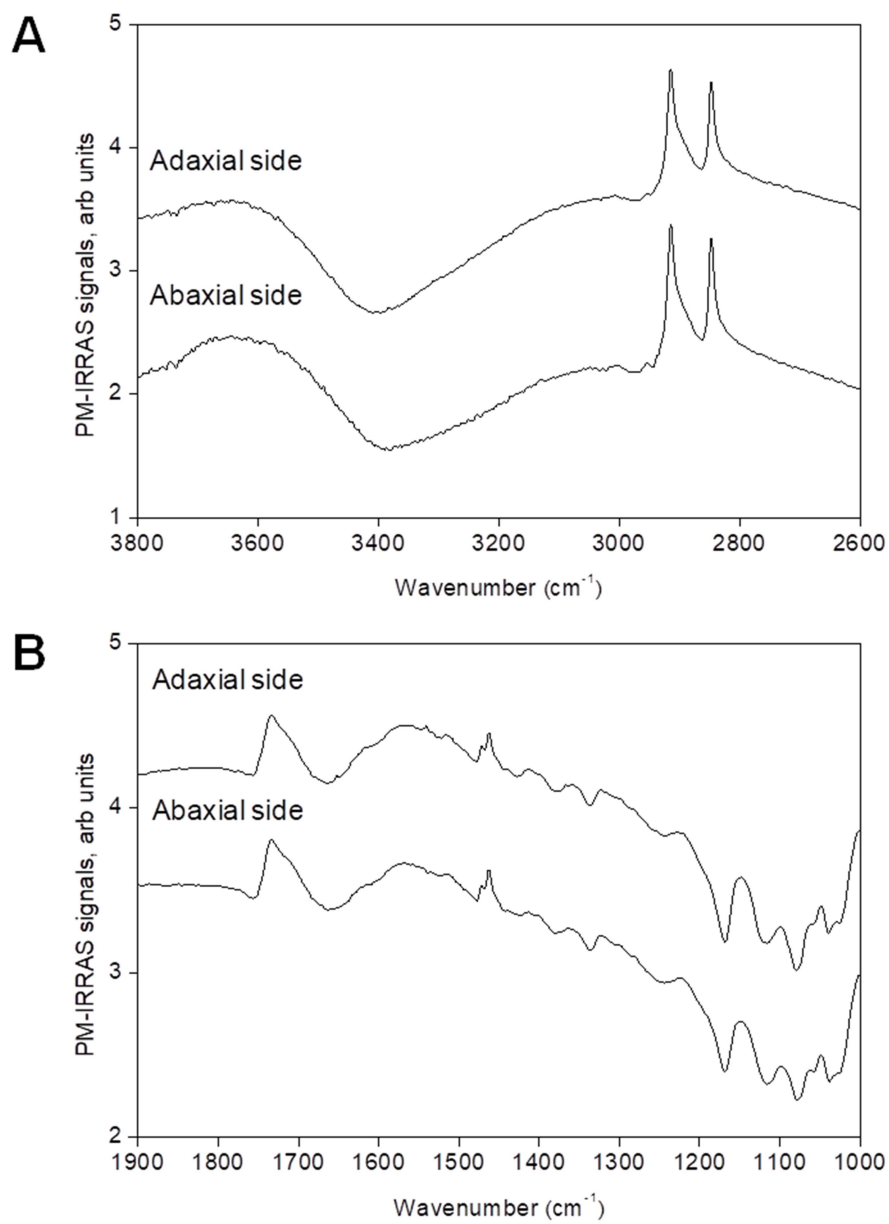


Fig. 3-5

Ratio spectra of the adaxial and abaxial surfaces of a *B. oleracea* L. leaf.

The half-wave-retardation frequencies were set to (A) 3,000 and (B) 1,500 cm^{-1} .

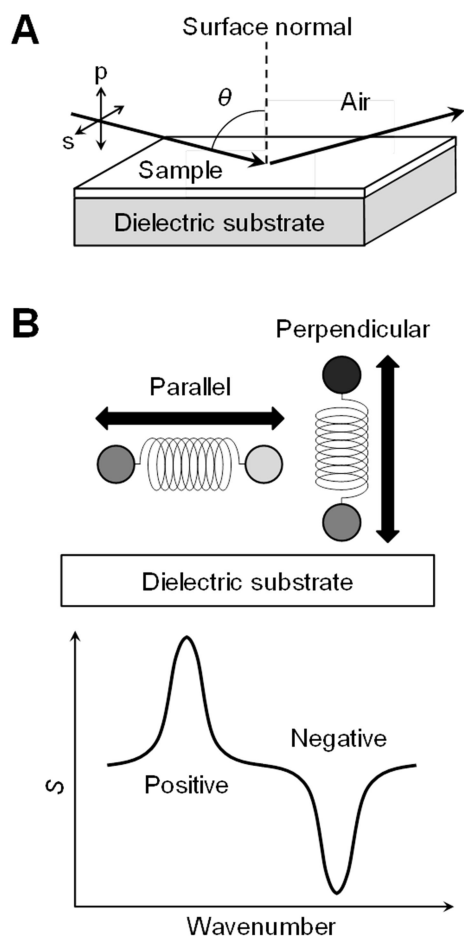


Fig. 3-6

Schematics of PM-IRRAS and the surface selection rule.

(A) Schematic of external reflection spectroscopy using a dielectric substrate. The plane formed by the incident and reflected IR light is called the incident plane. The polarizations of the radiation with electric field vectors parallel and perpendicular to the incident plane are called the p- and s-polarizations, respectively. θ is the angle of incidence. (B) Schematic of the surface selection rule of the ratio spectrum (equation 3) on a dielectric material surface with a large angle of incidence ($\theta = 76^\circ$). The surface-parallel and perpendicular components of a transition moment yield a positive and negative peak, respectively.

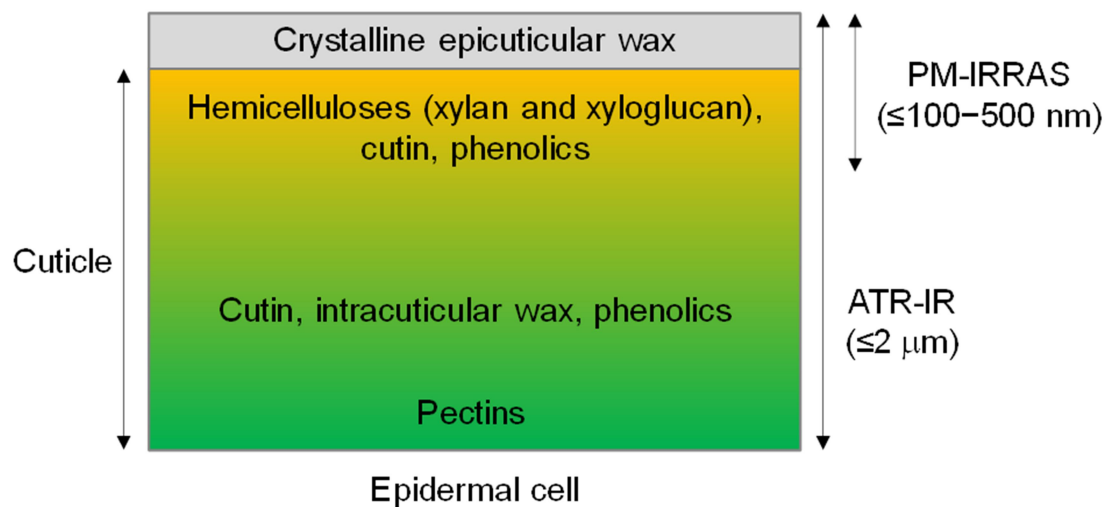


Fig. 3-7

Simplified model of the *B. oleracea* L. leaf cuticle showing the main components and the depth distributions of hemicelluloses and pectins.

PM-IRRAS probes a surface region of the *B. oleracea* L. leaf at a depth of less than several hundred nanometers ($\leq 100\text{--}500\text{ nm}$), in which hemicelluloses, cutin, and phenolic compounds (phenolics) are present. Thin films of the crystalline epicuticular wax cover the outermost cuticle surface. The inner region of the cuticle ($\leq 2\ \mu\text{m}$) is rich in pectins, and the crystalline intracuticular wax, cutin, and phenolics are distributed across the leaf cuticle of *B. oleracea* L.

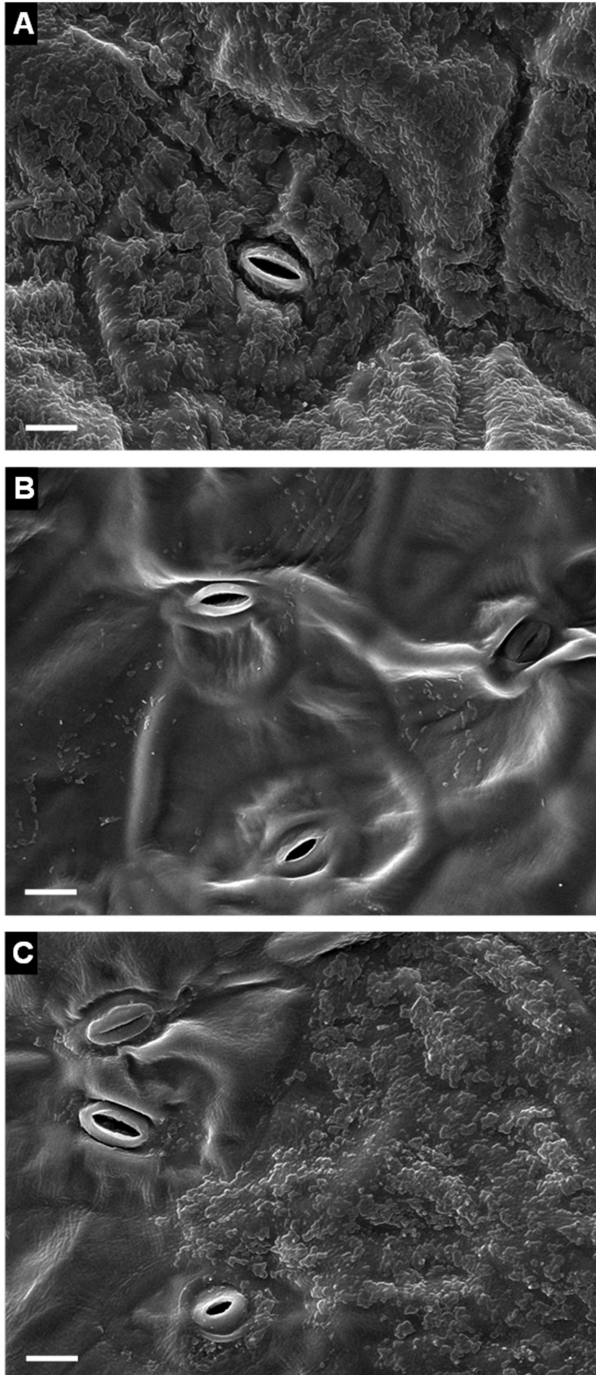


Fig.3-8

Scanning electron micrographs of adaxial *B. oleracea* L. leaf surfaces.

(A) Untreated control. (B) After immersion in chloroform (50 mL) for 5 min. (C) After scotch tape stripping. (scale bars: 10 μ m).

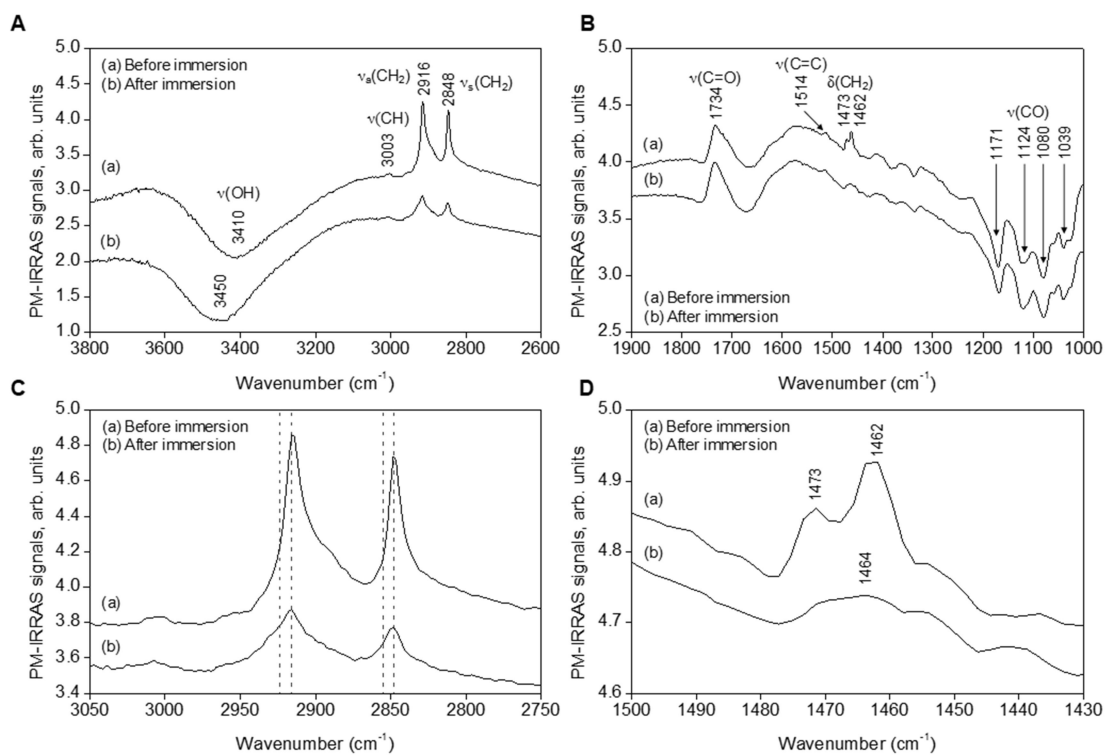


Fig.3-9

Ratio spectra of a *B. oleracea* L. leaf at (A) 3,800–2,600 cm^{-1} and (B) 1,900–1,000 cm^{-1} (a) before solvent treatment and (b) after immersion in chloroform (50 mL) for 5 min. The half-wave retardation frequencies are (A) 3,000 and (B) 1,500 cm^{-1} . (C) Magnification of spectra in (A) in the range of 3,050–2,750 cm^{-1} . The dashed gray guidelines are at 2,924, 2,916, 2,855 and 2,848 cm^{-1} . (D) Magnification of spectra in (B) in the range of 1,500–1,430 cm^{-1} .

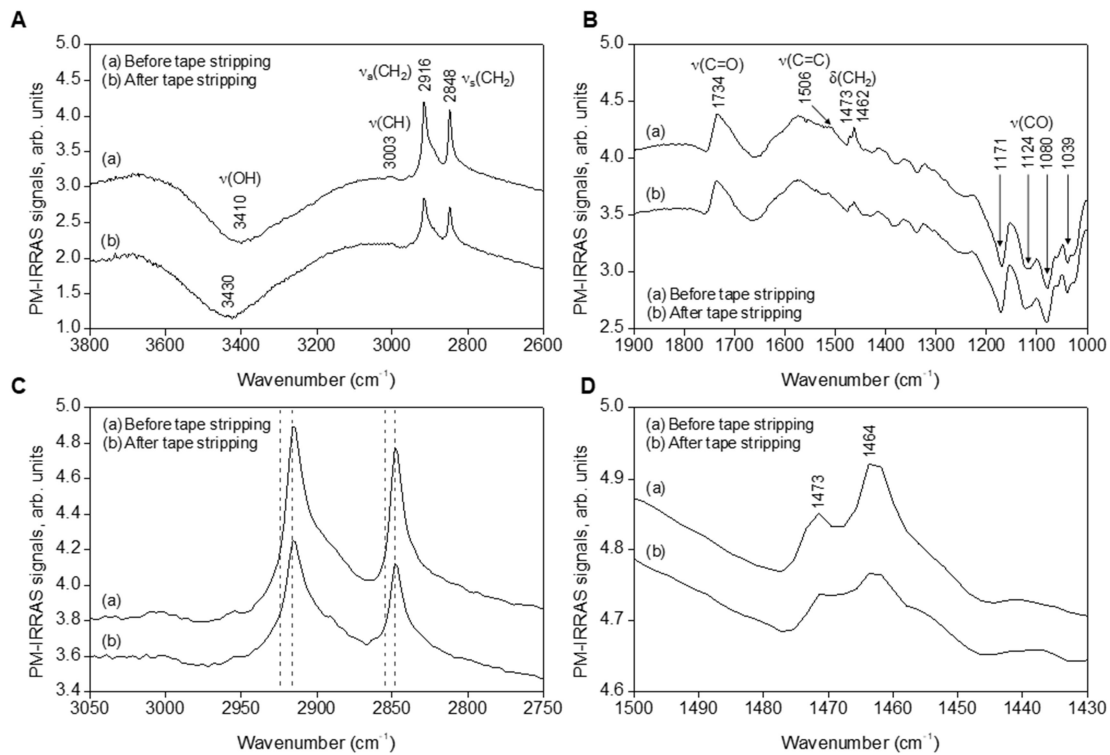


Fig. 3-10

Ratio spectra of a *B. oleracea* L. leaf at (A) 3,800–2,600 cm^{-1} and (B) 1,900–1,000 cm^{-1} (a) before and (b) after scotch tape-stripping.

The half-wave retardation frequencies are set to (A) 3,000 and (B) 1,500 cm^{-1} . (C)

Magnification of spectra in (A) in the range of 3,050–2,750 cm^{-1} . The dashed gray guidelines are at 2,924, 2,916, 2,855, and 2,948 cm^{-1} . (D) Magnification of spectra in (B)

in the range of 1,500–1,430 cm^{-1} .

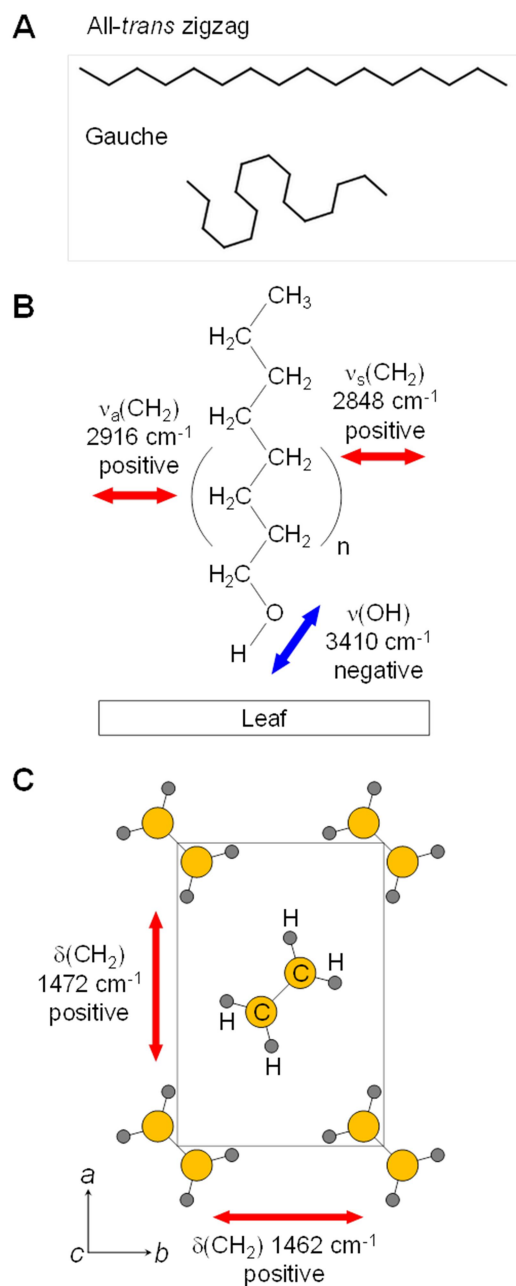


Fig.3-11

Structure of the alkyl chains in the epicuticular wax.

(A) All-*trans* zigzag and gauche conformations of an alkyl chain. (B) All-*trans* zigzag conformation of an alkyl chain with the terminal hydroxyl group oriented perpendicular to the leaf surface. (C) Orthorhombic subcell involving two chains and four methylene groups viewed along the molecular c -axis. Three axes, a , b , and c , are distinct ($a \neq b \neq c$) and intersect at 90° angles for the orthorhombic structure, where the c -axis is parallel to the long axes of the all-*trans* zigzag alkyl chains. The monoclinic structure is similar

to the orthorhombic structure, whereas they differ in that the alkyl chains (c -axis) are tilted with respect to the ab plane (Snyder 1979). The arrows show the direction of the transition moment of the group vibrations. For details of the CH₂ scissoring vibrations [δ (CH₂)], see references (Holland and Nielsen, 1962; Koyama et al. 1977).

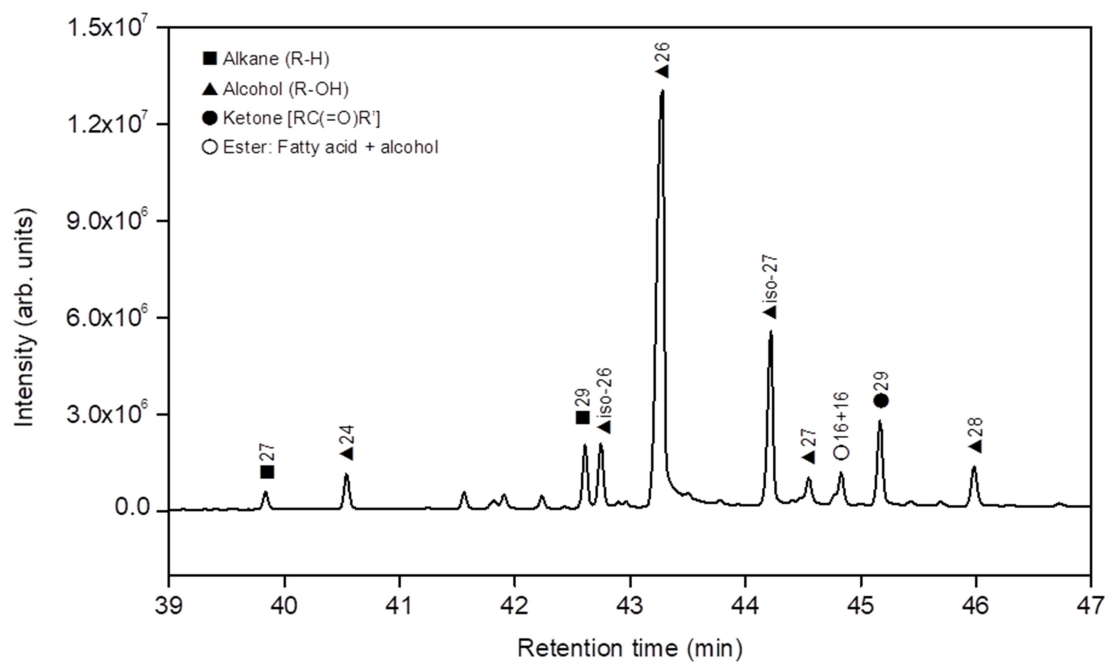


Fig.3-12

Representative GC/MS chromatogram for the cuticular waxes of a *B. oleracea* L. leaf. The numbers represent carbon chain lengths of alkanes, alcohols (alkanols), ketones, and esters.

Table 3-1

Band positions in the PM-IRRAS ratio spectra of the *B. oleracea* L. leaf and characteristic IR absorption bands of wax, cutin, and hemicelluloses (xylan and xyloglucan)^a.

Peak band position (cm ⁻¹)	Group vibration	Positive/negative	Wax ^b	Cutin ^c	Xylan ^d	Xyloglucan ^e	Main components
3410 (broad)	v(OH)	Negative		3390–3304 (broad)			Wax, cutin, hemicelluloses ^f
3012–3003	v(CH)	Positive					Phenolic compounds Wax (cutin) ^g
2916	va(CH ₂)	Positive	All-trans zigzag, 2918–2916	2922–2918			
2848	vs(CH ₂)		2850–2848	2853–2849			
1734	v(C=O)	Positive		1732–1728			Cutin Water ^h
1700–1550	d(OH ₂)	Positive/negative					
1514–1506	v(C-C)	Positive					Phenolic compounds Wax (cutin) ^g
1473	δ(CH ₂)	Positive	Orthorhombic subcell, 1473	1463–1457			
1462			1462				
1171	v(CO)	Negative		1168–1161	1173–1169		Hemicelluloses
1124–1115	v(CO)	Negative		1105–1101	1125	1130–1120	
1080	v(CO)	Negative			1089	1078–1075	Hemicelluloses
1039	v(CO)	Negative			1047–1041	1041–1042	Hemicelluloses

^a Peak position varies by ± 1 cm⁻¹ on *B. oleracea* L. leaves.

^b (Hasegawa, 2017; R. F. Holland and Nielsen, 1962; R. F. Holland and Nielsen, 1962; Snyder, 1979, 1961)

^c (España et al., 2014; Guzmán-Deigado et al., 2016; Guzmán et al., 2014b; Heredia-Guerrero et al., 2014)

^d (Coimbra et al., 1999; Kačuráková et al., 1999)

^e (Kačuráková et al., 2002, 2000; Largo-Gosens et al., 2014)

^f Both organic solvent-soluble cuticular waxes and organic solvent-insoluble compounds, such as cutin, and hemicelluloses, contribute to the broad v(OH) band.

^g See the "Molecular orientation of cutin and polysaccharides" section for details.

^h Overlap of the positive and negative signals suggests that the H₂O molecules in the *B. oleracea* L. leaf cuticle are isotropic (randomly oriented).

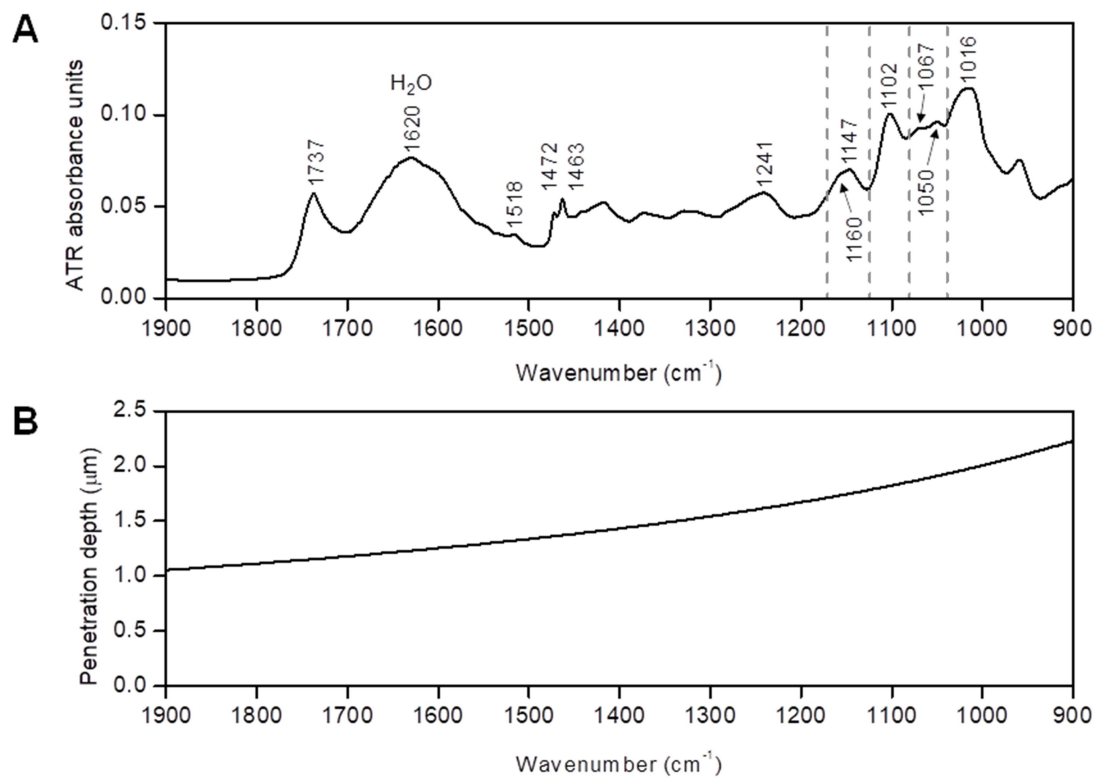


Fig.3-13

ATR-IR spectrum of a *B. oleracea* L. leaf at (A) 1,900–900 cm^{-1} .

The dashed gray guidelines are at 1,171, 1,124, 1,080, and 1,039 cm^{-1} . (B) Wavenumber dependence of the penetration depth of the evanescent wave (for details, see Materials and Methods).

Table 3-2

Band positions in the C-O stretching bands of the ATR-IR spectra of the *B. oleracea* L. leaf and characteristic IR absorption bands of plant cutin, pectins, rhamnogalacturonan, and cellulose^a.

Peak band position (cm ⁻¹)	Cutin ^b	Pectins ^{c,d}	Rhamnogalacturonan ^e	Cellulose ^f	Main components
1241		1247–1235			Pectins
1160 (shoulder)	1168–1161			1160	Cutin, cellulose ^g
1147		1146–1144			Pectins
1102	1105–1101	1104–1100		1109	Cutin, pectins
1067			1070	1060–1057	Rhamnogalacturonan
1050		1051–1043	1043	1040–1030	Pectins, rhamnogalacturonan
1016		1017–1014			Pectins

^a Peak position varies ± 1 cm⁻¹ on *B. oleracea* L. leaves.

^b (Guzmán-Delgado et al., 2016; Guzmán et al., 2014b; Heredia-Guerrero et al., 2014).

^c (Coimbra et al., 1999; Kačuráková et al., 2000; Largo-Gosens et al., 2014; Wellner et al., 1998).

^d The wavenumbers characteristic for galacturonic acid in pectins are 1145, 1104, and 1014 cm⁻¹ (Coimbra et al., 1999).

^e (Kačuráková et al., 2000)

^f (Chung et al., 2004; Largo-Gosens et al., 2014)

^g The contribution of cellulose may be minor in Fig. 9A, considering the absence of peaks at 1109, 1060–1057, and 1040–1030 cm⁻¹.

総合考察

夏季のストレス耐性育種の指標となる形質の解明

本研究は長野県における夏季の園芸作物生産における障害を如何に克服するかを目標として実施したものである。一般に夏季における農作物栽培の障害となるのは、高温など環境由来のストレスによる要因と、病害虫などの生物由来のストレスによる要因とが考えられる。実際に本研究においても対象とした形質は、レタスの高温時のチップバーンや抽苔性という環境ストレスに起因する障害と、カーネーションのハダニによる食害や *B. oleracea* の黒斑細菌病による罹病である。緒言や各章においても述べたようにこれらの障害を克服する手段としては栽培技術や農薬などの利用も重要であるが、抵抗性あるいは耐性品種の育成が非常に重要であるため、国内外において多様な農作物で環境ストレスや病害虫への抵抗性品種の育成が行われている。一般的に育種ではいかに効果的に標的とする形質を評価し、望ましい形質を持つ個体を選抜するかが重要であるが、環境ストレスや病害虫によるダメージはその年の気象条件に大きく影響を受け、年次変動が見られることが多い。従ってそれらへの耐性や感受性といった形質を多数の個体について安定して評価することが困難な事例も多々見られる。また病害虫による被害は異なる生物種間の相互作用によって生じる現象であることから、より安定した評価が難しい形質であり、宿主となる農作物が異なれば感染や食害の機構が全く異なることも考えられるため既知の研究報告例の知見をそのまま適用できるとも限らない。そこで本研究において特に第1章と第3章の研究において、カーネーションにおけるハダニ食害や *B. oleracea* における黒斑細菌病の感染がどのように行われるかに着目した研究を行った。

カーネーションにおいては、驚くべきことに切花品評会に出品された切花にかなり高い割合で食害痕が認められた。これは、肉眼で発見するにはハダニ類はあまりに小さく、同時に生産者の平均年齢もかなり高いために微小なハダニ類を圃場で発見することが難しいことを意味している。このことから、農薬散布に依存している現行の防除法には限界があり、害虫管理に対する考え方を見直す必要性が浮き彫りとなった。一方でほとんどの生産者がカーネーションを専作で栽培している長野県の場合は、ナミハダニ赤色型に対する耐虫性が最重要課題であると考えられ、その耐虫性機構について詳細な観察をした結果、葉裏側の表面から海綿状組織までの距離をマーカーとして、実際の栽培環境下でもナミハダニ赤色型に耐虫性を示すカーネーションを選抜する技術を開発することができた。毒性の強い化合物を含む植物が耐虫性を示す例はこれまで多数報告されているが(Sharma 2008)、品種育成に応用する場面では、化合物の生合成に関与する遺伝子数が多いと交配後代での選抜効率が低くなることや、特定の植物との交配後代からのみ目的とする耐虫性を有した個体を選ばないといけないため、一般農業形質を有した優良品種を育成するまでにはかなりの時間を要することなどが問題となっていた。一方、葉内部構造の厚さには複数の遺伝子が関与していることが想定されるために量的な遺伝をすると考えられる。それは

すべての交配組み合わせの後代についてナミハダニ赤色型に対する耐虫性品種を選抜できることを意味しており、優れた農業形質を有した品種同士の交配後代から、耐虫性品種を直接選抜することもできる。

B. oleracea については黒斑細菌病の発生と何らかの関係が疑われた葉の表面に光沢がある Glossy タイプが有すると推測される罹病性要因を解明することを検討した。そこで、Glossy タイプの葉表面に関する詳細な情報を得るため、非破壊で解析可能な赤外分光法に着目した。探索深度の異なる PM-IRRAS 法と ATR-IR 分光法を用いることで、Glossy タイプの葉表面に近い数百 nm 以下の領域に多糖類であるキシランやキシロースなどが存在することが示され、これら多糖類の存在が黒斑細菌病に対して罹病性となってしまう一因である可能性が考えられた。

各作物における夏季ストレス耐性のゲノム育種の可能性

このように各作物で安定した形質評価が容易ではなかった耐虫性や耐病性の指標となる葉の形態形質を利用することで育種選抜が容易になることが期待できるが、現在多くの農作物では形質と連鎖した DNA マーカーを指標として選抜を行うゲノム育種の推進が進められている。特に長野県のような多様な農作物の育種を必要としている地域では、ゲノム育種は選抜の効率化を行う上で非常に有用な技術である。ゲノム育種において最も鍵となるのは選抜形質の指標となる DNA マーカーの取得であるが、本研究では第 2 章において実際にレタスにおける複数の重要形質に関する DNA マーカーを作出することに成功した。農業形質を大別すると、たった一つの遺伝子座によって支配される質的な遺伝を示す形質と、複数の遺伝子座によって支配される量的な遺伝を示す形質に分かれる。質的形質は表現型が不連続で、例えば、花色が赤なのか白なのかといったように表現型が環境の影響を受けないという特徴があるため、対象形質の調査は容易な場合が多い。一方、草丈の長さや収量の重さなどの代表的な量的形質は複数の遺伝子が関与しており、関与している遺伝子座が n 個あるとすると F_2 世代で分離する遺伝子型数は 3^n となるため、その計測値は連続した数値となる。さらに、質的形質とは異なり、環境の影響を受けやすいという特徴があるため、対象形質をいかに正確に評価するかがマーカー精度を向上させるポイントとなる。選抜の対象形質であるレタスの根腐病耐病性、抽苔性、葉先の形状などの農業形質は複数の遺伝子が関与している量的形質である可能性が高いと考えられたため、 F_2 世代だけでなく F_3 世代においても形質の評価を実施した。これらの形質に連鎖した DNA マーカーを作成するためには、対象とする形質が異なる品種を二つ選び、その品種間の交配で得られた分離集団の遺伝構造を解析して作成した連鎖地図を使って、対象とする形質と連鎖する DNA マーカーを見つけ出すのが一般的な手法である。分離集団の遺伝構造を解析する手法として次世代シーケンサーが登場したことで、分離集団すべての個体について一度の解析でゲノムワイドな遺伝子型データを得られる画期的な技術である RAD-seq(Matsumura et al. 2014)や GBS(Elshire et al. 2011) が開発され、さらに Bulk 法を応用した MutMap(Abe et

al. 2012)や QTL-seq(Takagi et al. 2013)なども開発された。本研究においては、根腐病耐病性、抽苔性、葉先の形状などの複数の農業形質を解析出来る遺伝子型データを一度のシーケンスで得られるように、RAD-seq を採用して DNA マーカーの開発を進めることとした。玉レタスは遺伝的多様性が乏しく、RAPD などでは多型が見つかりにくいと言われていたが、PacI と NlaIII の制限酵素を用いた ddRAD-seq では、「VI185」と「シナノグリーン」との間に 4517 個もの対立遺伝子座の遺伝子型データを用いた連鎖地図を構築することが出来た。QTL 解析を行ったところ、葉先の形状は 1 遺伝子座により支配される質的形質であると考えられた。しかも抽苔性との相関がみられ、両形質ともに同じ遺伝子座によって表現型が支配されていた。根腐病耐病性は 2 遺伝子座により支配されていることが示された。レタスは研究対象としては必ずしもメジャーな植物ではないがこのように既存のゲノム配列情報と RAD-seq 法を活用することで迅速かつ確実に有用形質の DNA マーカーを得ることができた。カーネーションや *B. oleracea* においてもリファレンスゲノム配列は既知であることから、レタスと同様な戦略を用いれば第 1 章および第 3 章において見出した各形質の DNA マーカー取得とゲノム育種の実現は十分可能と考えている。

レタスでは連作障害が起こらないと考えられたため、連作により根こぶ病の発生が問題となるアブラナ科野菜とは異なり、連作を回避するような作型は検討されてこなかった。そのため、根腐病の発生が認められ被害が拡大した後も、連作を可能とする技術の開発を目標として根腐病対策について多くの研究が行われてきている。本研究成果の育種への利用において、特に耐病性品種の利用は土壌中の菌密度を下げる効果も望めることから、産地から求められる新品種への期待は常に大きい。レタス根腐病レース 1 はヨーロッパや南北アメリカでも発生が認められて世界的な問題となっているが、これまで耐病性を選抜可能な DNA マーカーに関する報告はされておらず(Cabral et al. 2019)、本研究が初めての報告となる。長野県内でのレタスの作型は、気温上昇期、高温期、気温下降期の 3 つに分かれる。根腐病は気温との相関が高いため高温期での影響が一番大きいものの、どの作型でも発生が認められている。レタスの栽培体系は、定期的に播種、定植、収穫を繰り返すのが一般的で、定植から収穫までの期間が異なる複数の品種を一度に栽培すると農作業が重なってしまい、収穫適期が 2～3 日と非常に短い品目である玉レタスでは収穫できずに圃場で廃棄せざるを得ない状況を招きかねないため、大面積に同一の品種を作付けするのが常法となっている。夏季生産の責任産地となっている長野県内のレタスは約 6000ha の栽培面積があり、農業形質を伴った耐病性品種が少数でも育成されれば、生産現場にもたらす影響は計り知れない。レース 1 の DNA マーカーに関する成果は特許出願済みで、レタスの品種育成を行っている民間企業と共同研究を組み、産地で高い評価を受けている品種への戻し交配による耐病性の導入を進めている最中であり、その育成完了に高い期待が寄せられている。

いずれの農作物においても今後ゲノム育種が実践される場合にコスト、時間および労働力が重要な課題となる。これに対して第 2 章において、DNA が二酸化ケイ素に結合しやす

い性質に着目し、ガラス繊維濾紙をピペットチップ内に入れて粗抽出液や洗浄液を数回ピペッティングするだけで簡易にゲノム DNA を抽出できる方法を確立した。レタスはキク科で植物体全体に乳液を有することもあり、ゲノム DNA を抽出するのが難しい植物の一つとされていたが本技術が適用できることを示せたことから、DNA マーカーを開発した後の実用化が現実的となった。

栽培技術の改良に対する本研究成果の利用

上述のように本研究は各作物における夏季ストレス耐性の育種を目指したものであるが、本研究で得られた知見は現状の各農作物の栽培においても利用可能ではないかと考える。カーネーション栽培においては、同一の品種を大面積に作付けすることは無く、少量多品種栽培をするのが一般的である。それは品種により開花等のタイミングが異なることを期待して労力の分散を図りつつ、嗜好品としての流行を捉まえるための戦略でもある。そのため、本研究の成果によりナミハダニ赤色型に対する耐虫性程度がかなり高い品種を育成できたとしても、カーネーション品種の変遷は非常に速くほとんどの品種は1～3年で更新されてしまうため、シリーズ化できるほど多数の品種が一度に育成できるまでは生産現場への影響は限定的となってしまう可能性がある。このような生産現場の状況を鑑みると、まずは本技術を用いて既存のカーネーション品種の中からナミハダニ赤色型に対して感受性となってしまう品種を見つけ出す手法として活用することが、すぐにでも本技術を生産現場で活かす方法だと思われる。生産現場では、ハダニによる被害を抑えるために感受性品種での被害状況を参考に殺ダニ剤の散布量を決めている。そのため、本技術を応用して感受性品種を見つけ出し、その品種の作付けを避けることができれば、殺ダニ剤の散布量を抑制することが可能となる。それは経費の削減だけでなく、ハダニと薬剤との接触機会が減るため殺ダニ剤に対する抵抗性の獲得を遅らせる効果も期待できる。生産者自身がカーネーション葉の内部構造を調べることは難しいため、育成者または試験場等の研究機関が情報を発信することでハダニによる被害を減少させていく取り組みの推進が理想であろう。レタスについては、エンパイヤタイプは葉の生長が速いことから、定植後の在圃期間が短くて収穫できるという特徴があり、軟腐病などの地上部病害に侵されるリスクが下がるため、夏季の高温期に生産性を安定化させる重要な農業形質だと考えられる。一方で、エンパイヤタイプの葉先形状は生理障害であるチップバーンの発生を助長している可能性が考えられたが、日没前に散水することでチップバーンの発生を上手に抑制している篤農家達があり、灌水施設がある産地では実際にエンパイヤタイプの玉レタス品種が夏季に広く導入されている。このように、*LsTCP4*の変異の有無によって複数の農業形質の特徴が変化するが、その本質を理解した上で利用の場面を考えるべきであろう。

科学的、技術的な側面からの本研究の成果と展望

本研究の成果について農業利用上の有用性の他にも、科学的、技術的な面において新た

な知見が得られている。

カーネーションにおけるハダニ耐性機構の解明を行なったが、植物の耐虫性は Kogan & Ortman らによって提唱された抗寄生性 (antixenosis)、抗生性 (antibiosis)、耐性 (tolerance) の 3 つに分類されている (Kogan and Ortman 1978)。抗寄生性とは、害虫に対して何らかの毒性を持つ物質を含むなどの理由から食害を受けにくいタイプの耐虫性のことである。抗生性とは、害虫の餌となった場合、発育を抑制するなどの理由から害虫の増殖に悪影響を与えるタイプの耐虫性のことである。耐性とは、食害を受けているにも関わらず、食害を受けていない場合と同様に生育できるタイプの耐虫性のことである。有害物質を蓄積するトマトやキュウリの耐虫性は抗寄生性に分類されるが、カーネーションの耐虫性は、葉の形態がハダニの増殖力に悪影響を与えているため、抗生性に分類できる。ハダニの生息場所は、多くの場合、葉の裏側である。ハダニは葉裏の環境条件に適応し、孵化から死に至るまでの間、葉裏の組織（主に海綿状組織）を餌とするために逆さまに定着している。カーネーションは珍しい葉内部構造をしており、葉裏側の表皮と海綿状組織との間に柵状組織があるため、葉裏側に定着したハダニは孵化後に主として柵状組織を餌にしなければならない。一部の植物では葉表面に蓄積するフラボノイドが耐虫性物質として見出されているが (Treutter 2006)、ハダニがカーネーションの海綿状組織を好む理由については今後の研究課題である。自然界でハダニの増殖に紫外線量が悪影響を及ぼすことが報告されている (Sakai and Osakabe 2010)。自然界においてハダニの増殖は降雨と紫外線がコントロールしていると思われるが、カーネーションは温室で栽培されるため、降雨や紫外線の影響が少ない。そのため、温室の環境はカーネーションだけでなくハダニに対しても増殖に適した環境を提供していると考えられる。これまでに Poe と Wilfret によって 1972 年にカーネーション品種によって葉あたりのハダニ数が異なることが報告されているが、その論文の中で「必要量だけの農薬散布は今後の課題だ。」と述べている (Poe and Wilfret 1972)。それから約 50 年もの間、散布された殺ダニ剤の種類は変わったが、殺ダニ剤に頼っているハダニ管理の基本的な考え方は変わっておらず、依然として解決すべき課題として存在している。カーネーションのハダニによる被害は殺ダニ剤の散布だけで防げるものではない。本研究により、カーネーションに発生するハダニ種を同定し、品種の能力を活用することで、これらのハダニ種による被害を抑制することは可能であることが示された。

レタスにおいては、QTL 解析を行ったところ、葉先の形状は 1 遺伝子座により支配される質的形質であると考えられた。しかも抽苔性との強い相関がみられ、両形質ともに同じ遺伝子座によって表現型が支配されていると結論づけ、*LsTCP4* が原因遺伝子であろうと考えられた。葉先の波打ち程度が大きいエンパイヤタイプでは、3'-UTR にレトロトランスポゾンが挿入されていることで発現量が低下し、葉先部分の細胞分裂に抑制がかかりにくいために細胞分裂を繰り返して葉先の部分が波打ってしまう可能性が考えられた。この *TCP4* はシロイヌナズナで葉先部分の細胞分裂を制御している遺伝子として知られており、変異

体は葉先の形状がレタスのエンパイヤタイプと酷似していることや開花が遅くなることなどが報告されていた。これらのことは、レタスの葉先の形状を決定している因子と晩抽化をもたらした因子が *LsTCP4* であることを支持していた。このように単一の遺伝子が多面的に農業上重要な形質に影響を与えていることは興味深く、より詳細な分子レベルでのメカニズムの解明が必要な遺伝子および形質であると考え。レタスは形質転換系も確立されており、世界中に多様な遺伝資源もあることから同遺伝子の機能解明の研究対象としても有用ではないかと考える。

B. oleracea における本研究のアプローチは一般的な植物への病原体の感染機構や抵抗性機構の解析とは異なる技術を試みている。今回、赤外分光法を葉の表面構造の解析に応用できたのは、供試植物である *B. oleracea* は葉が大きく、かつ、Glossy タイプであったために葉表面に光を錯乱させるような構造物が存在しなかったためだと考えられる。

PM-IRRAS 法は 4mm×10mm の面積に光を照射して測定する必要があり、小さい葉の分析には向いていない。また、シロイヌナズナやイネなどには葉表面にトライコームなどの微細構造があるため、光が乱反射する原因となってしまうことが心配される。しかしながら、今回の結果から赤外分光法を植物の葉の表面構造の分析に適用することは可能であることが示されたため、他の植物でも分析が可能となるように解析方法を改良することが望ましい。その改良方法の一つの手段として、顕微鏡を組み込むことが考えられる。顕微鏡を組み込むことで、分析に必要な光照射面積を劇的に小さくすることが出来れば、光を乱反射させてしまう構造物を避けた顕微分光測定が可能となるため、これまで分析が難しかった植物においても赤外分光法による解析が行える可能性が高いと考えられる。局所的な分析が可能となれば、病原菌を接種した部分だけについて経時的なデータをとることも可能となるため、さらに詳細な分析ができるようになると考えられる。

本研究では園芸作物における夏季のストレス耐性という点に着目した研究を行なったが、実際には複数種の農作物について異なる形質を対象とした解析を行った。しかし、いずれの形質においても葉の形態や形状が重要な鍵であった。光合成におけるいわゆるソースとしての葉の役割に着目した育種および研究は進んでいるが、ストレス耐性特に耐虫性や耐病性といった形質に関わる葉の形態に関する解析はまだ未解明の内容が多いと考えられる。本研究での知見が、今後の育種やより詳細なストレス耐性機構の科学的な解明に貢献することを期待している。

謝辞

本研究の遂行ならびに取りまとめにあたり、信州大学基盤研究支援センター遺伝子実験支援部門 松村 英生 准教授に懇切なご指導とご助言ならびに本論文をご校閲いただきました。

元・東京農業大学 田中 重雄 教授、神戸大学大学院農学研究科 宇野 雄一 教授、東京農業大学 農学部 小松 憲治 助教には研究の計画・遂行にあたり多大なご助言とご協力をいただきました。

北海道大学 低温科学研究所（現・東京大学大学院 総合文化研究科） 羽馬哲也 准教授には赤外分光による葉表面構造解析で多大なるご協力をいただきました。

東京農業大学 ゲノム解析センター 田中 啓介 博士には次世代シーケンサによる解析で多大なるご協力をいただきました。

京都大学 農学研究科 刑部 正博 准教授にはハダニの解析にあたり多大なるご助言とご協力をいただきました。

北海道大学 低温科学研究所 山口 良文 教授、農研機構 農業情報研究センター 鐘ヶ江 弘美 博士、農研機構 遺伝資源センター 内藤 健 博士には論文の取りまとめにあたりご助言とご指導をいただきました。

野菜花き試験場では、矢ヶ崎 和弘 博士、小林 荘一 博士、重盛 勲 博士、豊嶋 悟郎氏、芹澤 啓明氏、坂元 秀彦氏、宮坂幸弘氏、平賀 正浩氏には多大なご助言とご協力をいただきました。

協友アグリ研究所にはナミハダニ黄緑型を提供していただきました。

これらの方々に心から感謝の意を表します。

引用文献

- Abdel-Latif A, Osman G (2017) Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* 13:
<https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, et al (2012) Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol* 30:174–178.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nbt.2095>
- Agrawal AA (2000) Host-range evolution: Adaptation and trade-offs in fitness of mites on alternative hosts. *Ecology* 81:500–508.
[https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[0500:HREAAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[0500:HREAAT]2.0.CO;2)
- Argyris J, Truco MJ, Ochoa O, McHale L, Dahal P, van Deynze A, Michelmore RW, Bradford KJ (2011) A gene encoding an abscisic acid biosynthetic enzyme (LsNCED4) collocates with the high temperature germination locus Htg6.1 in lettuce (*Lactuca* sp.). *Theor Appl Genet* 122:95–108. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1425-3>
- Aruga D, Tsuchiya N, Matsumura H, Matsumoto E, Hayashida N (2012) Analysis of RAPD and AFLP markers linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 2 in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica* 187:1–9.
<https://doi.org/10.1007/s10681-012-0665-5>
- Balkema-Boomstra AG, Zijlstra S, Verstappen FWA, Inggamer H, Mercke PE, Jongsma MA, Bouwmeester HJ (2003) Role of cucurbitacin C in resistance to spider mite (*Tetranychus urticae*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Chem Ecol* 29:225–235.
<https://doi.org/10.1023/A:1021945101308>
- Bargel H, Koch K, Cerman Z, Neinhuis C (2006) Structure-function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes - A smart material? *Funct. Plant Biol.* 33:893–910
- Birch LC (1948) The Intrinsic Rate of Natural Increase of an Insect Population. *J Anim Ecol* 17:15–26. <https://doi.org/10.2307/1605>
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099–1111. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1099>
- Bresso EG, Chorostecki U, Rodriguez RE, Palatnik JF, Schommer C (2018) Spatial control of gene expression by miR319-regulated TCP transcription factors in leaf development. *Plant Physiol* 176:1694–1708. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00823>
- Broman KW, Wu H, Saunak Sen ´, Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinforma Appl NOTE* 19:889–890.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg112>

- Cabral C, Reis A (2013) Screening of lettuce accessions for resistance to *Fusarium*. *Trop Plant Pathol* 38:275–281
- Cabral CS, Brunelli KR, Costa H, Fonseca MEDN, Boiteux LS, Reis A (2014) Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. *Trop Plant Pathol* 39:197–202
- Cabral CS, Fonseca ME de N, Oliveira VR, Boiteux LS, Reis A (2019) A single dominant gene/locus model for control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 resistance in lettuce (*Lactuca sativa*). *Euphytica* 215:114–128.
<https://doi.org/10.1007/s10681-019-2441-2>
- Chen JQ, Meng XP, Zhang Y, Xia M, Wang XP (2008) Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnol Lett* 30:2191–2198.
<https://doi.org/10.1007/s10529-008-9811-5>
- Christopoulou M, Wo SRC, Kozik A, McHale LK, Truco MJ, Wroblewski T, Michelmore RW (2015) Genome-wide architecture of disease resistance genes in lettuce. *G3 Genes, Genomes, Genet* 5:2655–2669. <https://doi.org/10.1534/g3.115.020818>
- Da Costa CP, Jones CM (1971) Cucumber beetle resistance and mite susceptibility controlled by the bitter gene in *Cucumis sativus* L. *Science* (80-) 172:1145–1146.
<https://doi.org/10.1126/science.172.3988.1145>
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, JQB, Catchen JM, Blaxter ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev | Genet* 12:499–510. <https://doi.org/10.1038/nrg3012>
- Dominguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A (2011) The biophysical design of plant cuticles: An overview. *New Phytol.* 189:938–949
- Domínguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A (2017) The plant cuticle: old challenges, new perspectives. *J. Exp. Bot.* 68:5251–5255
- Ehara S (1999) Revision of the Spider Mite Family Tetranychidae of Japan (Acari, Prostigmata) Revision of the Spider Mite Family Tetranychidae of Japan (Acari, Prostigmata). *Species Divers* 4:63–141. <https://doi.org/10.12782/specdiv.4.63>
- Eigenbrode SD, Jetter R (2002) Attachment to Plant Surface Waxes by an Insect Predator 1
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- Fernández V, Bahamonde HA, Peguero-Pina JJ, Gil-Pelegrín E, Sancho-Knapik D, Gil L, Goldbach HE, Eichert T (2017) Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. *J Exp Bot* 68:5293–5306.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx302>

- Fernández V, Guzmán-Delgado P, Graça J, Santos S, Gil L (2016) Cuticle structure in relation to chemical composition: Re-assessing the prevailing model. *Front. Plant Sci.* 7
- Fich EA, Segerson NA, Rose JKC (2016) The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annu Rev Plant Biol* 67:207–233.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111929>
- Fry JD (1989) Evolutionary adaptation to host plants in a laboratory population of the phytophagous mite *Tetranychus urticae* Koch. *Oecologia* 81.4 (1989): 559-565.
- Fujinaga M, Ogiso H, Tsuchiya N, Saito H (2001) Physiological Specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a Causal Organism of *Fusarium* Root Rot of Crisp Head Lettuce in Japan. *J Gen Plant Pathol* 67:205–206. <https://doi.org/10.1007/pl00013012>
- Fujinaga M, Ogiso H, Tsuchiya N, Saito H, Yamanaka S, Nozue M, Kojima M (2003) Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. *J Gen Plant Pathol* 69:23–28.
<https://doi.org/10.1007/s10327-002-0009-8>
- Fukami M, Muramoto Y, Ohkoshi K (2008) Rapid and simple DNA extraction method from rice using a glass-fiber filter inserted pipette tip. *Plant Biotechnol* 25:493–496
- Furuta T, Ashikari M, Jena KK, Doi K, Reuscher S (2017) Adapting genotyping-by-sequencing for rice F2 populations. *G3 Genes, Genomes, Genet* 7:881–893. <https://doi.org/10.1534/g3.116.038190>
- Gaidatzis D, Lerch A, Hahne F, Stadler MB (2015) QuasR: Quantification and annotation of short reads in R. *Bioinformatics* 31:1130–1132.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu781>
- Gilardi G, Franco Ortega S, van Rijswijk PCJ, Ortu G, Gullino ML, Garibaldi A (2017) A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathol* 66:677–688.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12616>
- Gordon TR, Koike ST (2015) Management of *Fusarium* wilt of lettuce. *Crop Prot* 73:45–49
- Gould F (1979) Rapid Host Range Evolution In a Population of the Phytophagous Mite *Tetranychus Urticae* KOCH. *Evolution (N Y)* 33:791–802.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1979.tb04735.x>
- Grbić M, Van Leeuwen T, Clark RM, Rombauts S, Rouzé P, Grbić V, Osborne EJ, Dermauw W, Ngoc PCT, Ortego F, et al (2011) The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* 479:487–492.
<https://doi.org/10.1038/nature10640>
- Hamilton RFL and SMW (1989) *Dianthus* Linnaeus. *The European Garden Flora* Vol. 3. Cambridge University press, Cambridge
- Hasegawa T (2017) Quantitative infrared spectroscopy for understanding of a condensed

- matter. Springer Japan, Tokyo
- Heredia-Guerrero JA, Benítez JJ, Domínguez E, Bayer IS, Cingolani R, Athanassiou A, Heredia A (2014) Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: A review. *Front. Plant Sci.* 5:305. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00305/full>
- Holland RF, Nielsen JR (1962) Infrared spectra of single crystals. Part II. Four forms of octadecanoic acid. *J Mol Spectrosc* 9:436–460. [https://doi.org/10.1016/0022-2852\(62\)90250-3](https://doi.org/10.1016/0022-2852(62)90250-3)
- Holland RF, Rud Nielsen J (1962) Infrared spectra of single crystals. Part I. Orthorhombic n-C₂₄H₅₀, monoclinic n-C₃₆H₇₄, and triclinic n-C₁₈H₃₈ and n-C₂₀H₄₂. *J Mol Spectrosc* 8:383–405. [https://doi.org/10.1016/0022-2852\(62\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0022-2852(62)90039-5)
- Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC, Chan MT (2002) Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol* 129:1086–1094. <https://doi.org/10.1104/pp.003442>
- Huang JH LC (1998) Wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* in Taiwan. *Plant Pathol Bull* 7:150–153
- Hubbard J, Gerik J (1993) A new wilt disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum* forma specialis nov. *Plant Dis* 77:750–754
- Itoh Y, Muro M, Hasegawa T (2010) Quality evaluation of polarization-modulation infrared reflection-absorption spectra of a langmuir monolayer on water dependent on angle of incidence and molecular orientation. In: *Applied Spectroscopy*. Society for Applied Spectroscopy, pp 1374–1378
- Iwata H, Ninomiya S (2006) AntMap: Constructing genetic linkage maps using an ant colony optimization algorithm. *Breed Sci* 56:371–377. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.56.371>
- Jenni S, Truco MJ, Michelmore RW (2013) Quantitative trait loci associated with tipburn, heat stress-induced physiological disorders, and maturity traits in crisphead lettuce. *Theor Appl Genet* 126:3065–3079. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2193-7>
- Kasajima I, Sasaki K, Tanaka Y, Terakawa T, Ohtsubo N (2013) Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpyrrolidone (PVPP). *Sci Hortic (Amsterdam)* 164:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.011>
- Khajehali J, Van Nieuwenhuysse P, Demaeht P, Tirry L, Van Leeuwen T (2011) Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. *Pest Manag Sci* 67:1424–1433.

- <https://doi.org/10.1002/ps.2191>
- Kogan M, Ortman EF (1978) Antixenosis-A New Term Proposed to Define Painter's "Nonpreference" Modality of Resistance. *Bull Entomol Soc Am* 24:175–176.
<https://doi.org/10.1093/besa/24.2.175>
- Kondo A, Chiwaki K, Tanaka F (1998) Development and Population Increase of Two-Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch (Green Form) (Acari: Tetranychidae) on Different Varieties of *Chrysanthemum*. *Japanese J Appl Entomol Zool* 42:28–30.
<https://doi.org/10.1303/jjaez.42.28>
- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2010) TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22:3574–3588. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075598>
- Koyama T, Ohme-Takagi M, Sato F (2011) Generation of serrated and wavy petals by inhibition of the activity of TCP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 6:697–699. <https://doi.org/10.4161/psb.6.5.14979>
- Koyama T, Sato F, Ohme-Takagi M (2017) Roles of miR319 and TCP Transcription Factors in Leaf Development. *Plant Physiol* 175:874–885. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00732>
- Koyama Y, Yanagishita M, Toda S, Matsuo T (1977) The relation between the crystal axes and the dipping direction of built-up films of octadecanoic acid as revealed by polarized infrared transmission spectroscopy. *J Colloid Interface Sci* 61:438–445.
[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(77\)90462-3](https://doi.org/10.1016/0021-9797(77)90462-3)
- Kudo K, Oi T, Uno Y (2014) Functional characterization and expression profiling of a DREB2-type gene from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 116:97–109. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0386-z>
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Liu N, Karunakaran C, Lahlali R, Warkentin T, Bueckert RA (2019) Genotypic and heat stress effects on leaf cuticles of field pea using ATR-FTIR spectroscopy. *Planta* 249:601–613. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3025-4>
- Macias-González M, Truco MJ, Bertier LD, Jenni S, Simko I, Hayes RJ, Michelmore RW (2019) Genetic architecture of tipburn resistance in lettuce. *Theor Appl Genet* 132:2209–2222. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03349-6>
- Martinez J (2017) Rapid and Simple Method for the Extraction of Genomic DNA from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Seedlings. *Adv Res LIFE Sci* 1:21–25.
<https://doi.org/10.1515/arls-2017-0003>
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S,

- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J* 38:982–993.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02100.x>
- Matsumoto E, Ueno H, Aruga D, Sakamoto K, Hayashida N (2012) Accumulation of Three Clubroot Resistance Genes through Marker-assisted Selection in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 81:184-190.
- Matsumura H, Miyagi N, Taniai N, Fukushima M, Tarora K, Shudo A, Urasaki N (2014) Mapping of the gynoecey in bitter melon (*Momordica charantia*) using RAD-seq analysis. *PLoS One* 9:e87138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087138>
- Matuo T and SM (1967) On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* n. f. causing root rot of lettuce. *Trans Mycol Soc Japan* 8:13–15
- McCreight JD, Matheron ME, Tickes BR, Platts B (2005) *Fusarium* wilt race1 on lettuce. *Hortsceince* 40:529–531
- Michelmore R (2010) Genetic variation in lettuce. California leafy greens research program. http://calgreens.org/control/uploads/Michelmore_Variation_report_2009-2010_final_%2082%291.pdf
- Michelmore R (2013) Breeding crisphead and leafy lettuce. California leafy greens research program. <http://calgreens.org/wp-content/uploads/2013/07/Michelmore-GeneticVariation.pdf>
- Millani MJ, Erebarian HR AA (1999) Occurrence of fusarium wilt of lettuce in Shahr-Ray, Varamim and Karaj areas. *Iran J Plant Pathol* 35:44–45
- Mimida N, Kidou SI, Iwanami H, Moriya S, Abe K, Voogd C, Varkonyi-Gasic E, Kotoda N (2011) Apple FLOWERING LOCUS T proteins interact with transcription factors implicated in cell growth and organ development. *Tree Physiol* 31:555–566.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpr028>
- Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Eliby S, Shirley N, Langridge P, Lopato S (2011) Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnol J* 9:230–249.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x>
- Navaud O, Dabos P, Carnus E, Tremousaygue D, Herve´cnrs C (2007) TCP Transcription Factors Predate the Emergence of Land Plants. *J Mol Evol* 65:23–33.
<https://doi.org/10.1007/s00239-006-0174-z>
- Nawrath C (2006) Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:281–287

- Nicolas M, Cubas P (2016) TCP factors: New kids on the signaling block. *Curr Opin Plant Biol* 33:33–41. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.05.006>
- Niwa M, Daimon Y, Kurotani KI, Higo A, Pruneda-Paz JL, Breton G, Mitsuda N, Kay SA, Ohme-Takagi M, Endo M, et al (2013) BRANCHED1 interacts with FLOWERING LOCUS T to repress the floral transition of the axillary meristems in Arabidopsis. *Plant Cell* 25:1228–1242. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.109090>
- Osakabe M (1962) Studies on the Resistance of Tea Plant to the Tea Red Spider Mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA (Acarina Tetranychidae) (1). *Japanese J Appl Entomol Zool* 6:102–107. <https://doi.org/10.1303/jjaez.6.102>
- Oshima Y, Shikata M, Koyama T, Ohtsubo N, Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2013) MIXTA-like transcription factors and WAX INDUCER1/SHINE1 coordinately regulate cuticle development in Arabidopsis and *Torenia fournieri*. *Plant Cell* 25:1609–1624. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110783>
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature Publishing Group*
- Pasquali M, Dematheis F, Gilardi G, Gullino ML, Garibaldi A (2005) Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. *Plant Dis* 89:237–240. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0237>
- Pasquali M, Dematheis F, Gullino ML, Garibaldi A (2007) Identification of Race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on Lettuce by Inter-Retrotransposon Sequence-Characterized Amplified Region Technique. *Am Phytopath Soc* 97:987–996. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-8-0987>
- Poe S, Wilfret G (1972) Factors affecting spidermite (*Tetranychus urticae* Koch) population development on carnation: relative cultivar susceptibility and physical characteristics. *Fla State Hort Soc* 85:384–387
- R Development Core team (2017) R: a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing. <https://cran.microsoft.com/snapshot/2014-09-08/web/packages/dplR/vignettes/xdate-dplR.pdf>
- Riederer M, Müller C (2006) *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell, Oxford, UK:
- Ryder EJ (1999) *Lettuce, Endive and Chicory*. CABI Publishing, Wallingford
- Ryder EJ, Milligan DC (2005) Additional Genes Controlling Flowering Time in *Lactuca sativa* and *L. serriola*
- Sakai Y, Osakabe M (2010) Spectrum-specific Damage and Solar Ultraviolet Radiation Avoidance in the Two-spotted Spider Mite. *Photochem Photobiol* 86:925–932. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00739.x>

- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 290:998–1009. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6299>
- Sassa H (2007) A technique to isolate DNA from woody and herbaceous plants by using a silica-based plasmid extraction column. *Anal Biochem* 363:166–167. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.01.004>
- Schommer C, Bresso EG, Spinelli S V., Palatnik JF (2012) Role of MicroRNA miR319 in Plant Development. pp 29–47
- Schoonhoven LM, Loon JJA, Dicke M (2005) *Insect-plant biology second edition*. Oxford University Press on Demand
- Schwartz AM, Komarova T V., Skulachev M V., Zvereva AS, Dorokhov YL, Atabekov JG (2006) Stability of plant mRNAs depends on the length of the 3'-untranslated region. *Biochem* 71:1377–1384. <https://doi.org/10.1134/S0006297906120145>
- Scott JC, Gordon TR (2009) Effect of Temperature on Severity of Fusarium Wilt of Lettuce Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Plant Dis* 94:13–17
- Scott JC, Mcroberts DN, Gordon TR (2014) Colonization of lettuce cultivars and rotation crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, the cause of fusarium wilt of lettuce. *Plant Pathol* 63:548–553. <https://doi.org/10.1111/ppa.12135>
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux JP (2014) The cuticle and plant defense to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5:274. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00274/full>
- Sharma H (2008) *Host Plant Resistance to Insects*. CAB INTERNATIONAL
- Sieber P, Schorderet M, Ryser U, Buchala A, Kolattukudy P, Métraux J-P, Nawrath C (2000) Transgenic Arabidopsis Plants Expressing a Fungal Cutinase Show Alterations in the Structure and Properties of the Cuticle and Postgenital Organ Fusions. *The Plant Cell*, 12: 721-737.
- Skolik P, McAinsh MR, Martin FL (2019) ATR-FTIR spectroscopy non-destructively detects damage-induced sour rot infection in whole tomato fruit. *Planta* 249:925–939. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3060-1>
- Snyder RG (1961) Vibrational spectra of crystalline n-paraffins. II. Intermolecular effects. *J Mol Spectrosc* 7:116–144. [https://doi.org/10.1016/0022-2852\(61\)90347-2](https://doi.org/10.1016/0022-2852(61)90347-2)
- Snyder RG (1979) Vibrational correlation splitting and chain packing for the crystalline n-alkanes. *J Chem Phys* 71:3229–3235. <https://doi.org/10.1063/1.438752>
- Takafuji A (1998) *The Biology of Spider Mite*. Springer-Verlag, Tokyo
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H,

- Tamiru M, Takuno S, et al (2013) QTL-seq: Rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J* 74:174–183. <https://doi.org/10.1111/tpj.12105>
- Tasumi M (2014) *Introduction to experimental infrared spectroscopy: Fundamentals and practical methods*. John Wiley & Sons. Chichester
- Thompson R, Ryder E (1961) *Descriptions and pedigrees of nine varieties of lettuce*, Tech. bull. Washington, D.C.
- Treutter D (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Env Chem Lett* 4:147–157. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>
- Tsuchiya N, Yoshida K, Usui T, Tsukada M (2004) “Shinano Hope”, a *Fusarium* Root Rot - Resistant Lettuce. *J Japan Soc Hort Sci* 73:429–434
- Turini T, Cahn M, Cantwell M, Jackson L, Koike S, Natwick E, Smith R, Subbarao K, Takele E (2011) *Iceberg Lettuce Production in California*. University of California, Agriculture and Natural Resources
- Van de Bund CF, Helle W (1960) Investigations on the *Tetranychus urticae* complex in north west Europe (Acari: Tetranychidae). *Entomol Exp Appl* 3:142–156. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1960.tb02121.x>
- Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:563–572
- Voorrips RE (2002) MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *J Hered* 93:77–78. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.1.77>
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Novartis Found Symp* 236:176–189. <https://doi.org/10.1002/9780470515778.ch13>
- Yano S, Wakabayashi M, Takabayashi J, Takafuji A (1998) Factors determining the host plant range of the phytophagous mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): A method for quantifying host plant acceptance. *Exp Appl Acarol* 22:595–601. <https://doi.org/10.1023/A:1006138527904>
- Yeats TH, Rose JKC (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* 163:5–20