

## 野菜におけるDNAマーカー利用技術の開発 と利用

## 農研機構野菜花き研究部門 安濃野菜研究監 松元 哲

## 講演内容



- •イチゴ品種識別技術
  - 1. 違法に海外に持ち出された日本のイチゴ品種
  - 2. DNAマーカーを用いたイチゴ品種識別
  - 3. 輸入イチゴの調査
- •効率的育種選抜技術
  - 4. DNAマーカーを用いた劣性遺伝子の導入
  - 5. 不良形質の連鎖の切断
  - 6. ゲノムワイドマーカーによる選抜の高効率化



- ・イチゴ品種識別技術
  - 1. 違法に海外に持ち出された日本のイチゴ品種
  - 2. DNAマーカーを用いたイチゴ品種識別
  - 3. 輸入イチゴの調査
- 効率的育種選抜技術
  - 4. DNAマーカーを用いた劣性遺伝子の導入
  - 5. 不良形質の連鎖の切断
  - 6. ゲノムワイドマーカーによる選抜の高効率化



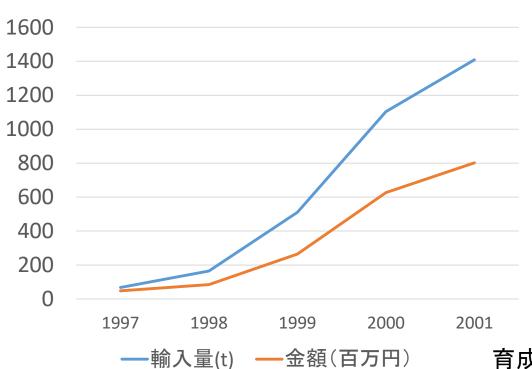


- •1996 年 品種登録
- •とよのか× アイベリー
- ●野菜・茶業試験場(久留米)育成
- ●高収量
- 高ビタミンC含量
- ・固い果実
- 日本国以外では、使用許諾を出していない。

韓国で「さちのか」を栽培したいので、許諾を出して欲しいと 野菜茶業試験場に打診→拒否

韓国では日本のイチゴ品種が栽培されていた。

# 韓国からイチゴの輸入量および金額の推移震農研機構





レッドパール

育成者:西田朝美氏

一部の業者に許諾をして合法的に日本

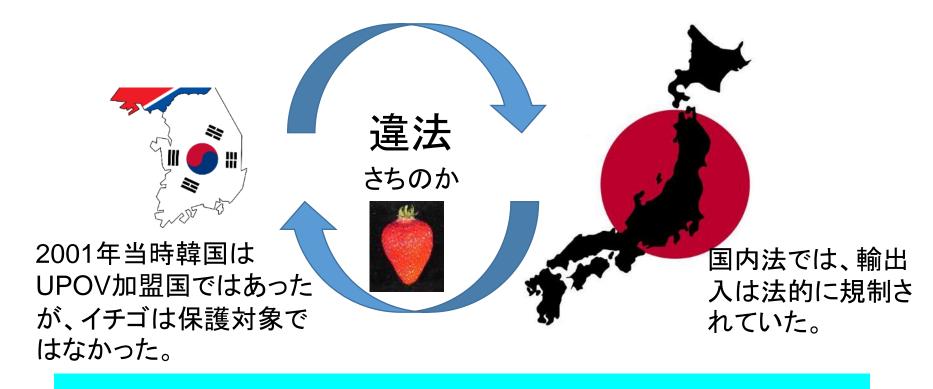
への輸入は可能であった。

当時の韓国で最も栽培されていた品種

## 植物の新品種の保護に関する国際条約



UPOV (International Union for the Protection on New Varieties of Plants)



- 関税定率法の改正(育成者権を侵害する物品の輸入禁制品への追加)
- 種苗法の改正(罰則の強化)





2003年韓国論山イチゴ祭り







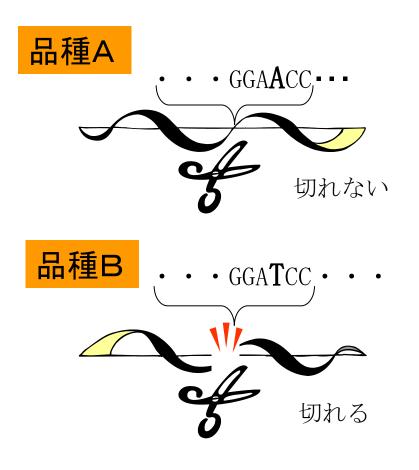
- ・イチゴ品種識別技術
  - 1. 違法に海外に持ち出された日本のイチゴ品種
  - 2. DNAマーカーを用いたイチゴ品種識別
  - 3. 輸入イチゴの調査
- 効率的育種選抜技術
  - 4. DNAマーカーを用いた劣性遺伝子の導入
  - 5. 不良形質の連鎖の切断
  - 6. ゲノムワイドマーカーによる選抜の高効率化

# CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 震 農研機構

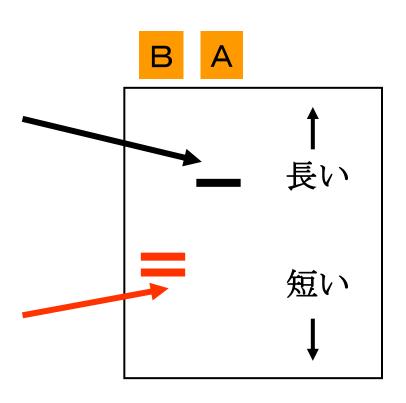


■ 制限酵素による DNA切断

■ 電気泳動法によ る多型の検出



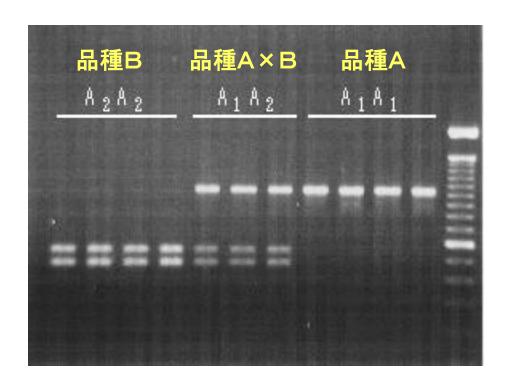
「GGATCC」用制限酵素



制限酵素処理をしなければならない 点で煩雑ではあったが、操作性、信 頼性の点で評価された。

# CAPSマーカー(2倍体植物)の電気泳動像 🥷 農研機構

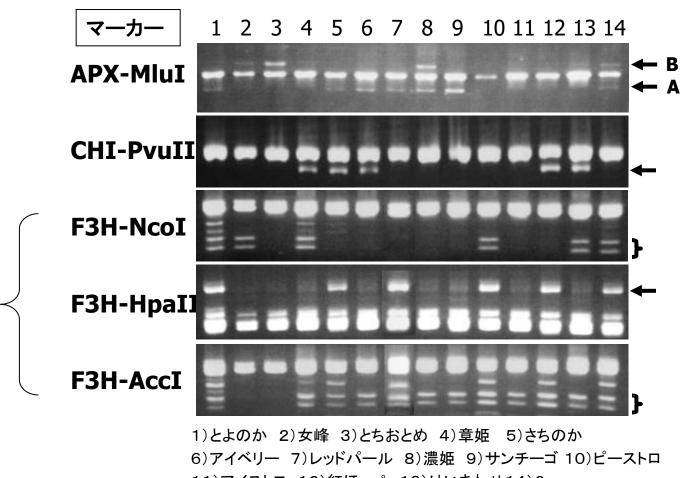




DFRイントロン3のPCR産物を制限酵素 Hind IIIで消化 後の電気泳動パターン

# CAPSマーカーによる品種系統間多型パターン例 🥷 農 研機





11)アイストロ 12)紅ほっぺ 13)けいきわせ14)Cesena

34個の遺伝子から26種のマーカーを作成



プレスリリース

平成14年 7月26日 独立行政法人 農業技術研究機構 野菜茶業研究所

DNAマーカーを用いたイチゴ品種識別技術の開発

#### 1. 背景

近年、食品の虚偽表示問題のほか、輸入品を含めて、育成者権が侵害されて新品種が 栽培・販売されるという事例が見受けられ問題となっています。特に品種名が商品価格に 反映されるイチゴは、これまでの「とよのか」「女峰」の二大品種並立の時代から、「さち のか」「とちおとめ」等新しい品種へ移行しており、全国のイチゴ産地では、それぞれ有望 な新品種を導入して、ブランド化・差別化を進めているところであることから、育成者権 の侵害等は、産地に重大な被害を及ぼすことが予想されます。イチゴの品種判別を見た目 で行うのは困難であることから、現状では、流通段階において育成者権の侵害等を摘発す ることは困難であるが、これを判定する技術として、農業技術研究機構野菜茶業研究所(園 芸研究担当中村浩理事、三重県安芸郡安濃町)では、DNAマーカーを用いたイチゴ品 種識別技術を開発しました。

- 2. 成果の内容・特徴
  - 1) 品種識別 DNA マーカーの開発



### •イチゴ品種識別技術

- 1. 違法に海外に持ち出された日本のイチゴ品種
- 2. DNAマーカーを用いたイチゴ品種識別
- 3. 輸入イチゴの調査
- 効率的育種選抜技術
  - 4. DNAマーカーを用いた劣性遺伝子の導入
  - 5. 不良形質の連鎖の切断
  - 6. ゲノムワイドマーカーによる選抜の高効率化

### 輸入生鮮イチゴ全国調査



韓国産イチゴ品種識別結果(H15-1)

1. 購入日: 平成15年1月18日

2. 購入者:

3. 購入場所:

#### 4. 商品の詳細

1) ふたなし透明イチゴパック入りイチゴ(写真1)

1パック 298 円、20 果実入り(写真 2)。パックおよび売り場に品種 イチゴ売り出しコーナーは、商品搬送用段ボール箱を床から重ねて記 ここにイチゴパックが多数に積み上げられ、「韓国産イチゴ」と表示 透明イチゴパックは標準型で、ふたがなく、イチゴ果実の上から Stra 刷された透明フィルムで覆われていた。

2) ふたつき透明丸型トレイ入りイチゴ(写真3)

1トレイ 198 円、4 果実入り(写真 4)、トレイの自体に品種名表示 ショーケースの果物コーナー(カットフルーツなどの売り場)の一部トレイ数は少量。ショーケースの商品名に「韓国産 女峰」と表示さトレイふたの中央に「STRAWBERY FROM KOREA」と書いた半円形ラベルが貼附されていた。









### 韓国産(女峰種)と表示され販売されていたイチゴ ↓





F3H-AccI

F

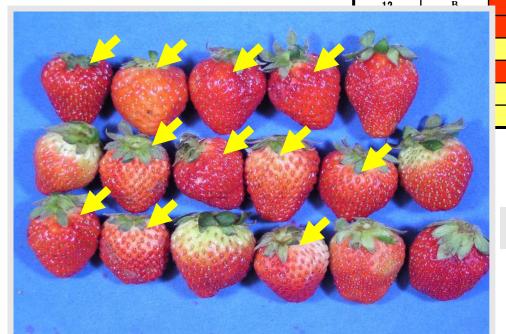
F

識別された品種名

さちのか

さちのか

韓国産(女峰種)と表	示され
販売されていたイチゴ	, 1



果実番号

3

**4** 5

7

9

10 11 APX-MluI

В

В

B B

B B

B B

В

В

**CHI-PvuII** 

C

C

F3H-NcoI

С	-	Е	F	さちのか
С	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
A	-	E	F	レッドパール
A	-	E	F	レッドパール
С	-	E	F	さちのか
С	-	E	F	さちのか
С	-	E	F	さちのか
С	-	E	F	さちのか
A	-	E	F	レッドパール
С	-	E	F	さちのか
С	-	E	F	さちのか
A	-	E	F	レッドパール
С	-	E	F	さちのか
A	-	E	F	レッドパール
A	-	E	F	レッドパール

F3H-HpaII

 $\mathbf{E}$ 

 $\mathbf{E}$ 

「韓国産女峰」は・・・ ↓

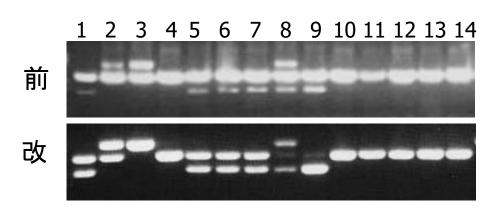
「さちのか」と「レッドパール」の混合

販売していた量販店に警告 (機構本部)

### 改善されたCAPSマーカー



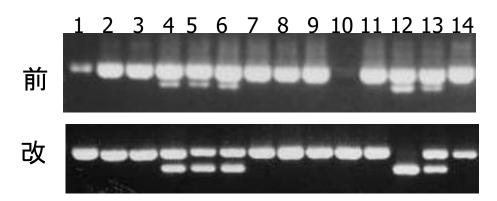
#### APX-Mlu I



### メリット

- 多型が明瞭で誤判定しにくい
- 識別能力の向上 (ホモとヘテロの識別可能)

#### CHI-Pvu II



### 留意点

- PCRの際のアニーリング温度
- Taqポリメラーゼの種類

# DNA品種識別技術の開発の現状 に農研機構

### 少なくても1品種がたまたま品種Vと同じマーカー型を示す確率( $P_{1}$ )

品種数(n) : 200

品種同定理論 鵜飼(2005)

P1:1/1000 以下

								マーカ	一名											
品種名	DFR -	APX	CHI-	F3H-	F3H-	F3H2 -	F3H2 -	ESHS		MSR	PGP -	PGP -		APX 2-	APX 3-	APX 4-		_		P1
四作生力	HhaI	-MluI	PvuII	N)	N)		DdeI( N)	AccI(N)	HinfI	-AluI		RsaI( N)		DraI	Dra <b>I</b> ( N)	TaqI( N)		r i	q	FI
けいきわせ	0.56	0.37	0.40	0.43	0.66	0.39	0.29	0.51	0.43	0.60	0.34	0.39	0.30	0.47	0.34	0.47	1.0E-06	200	0.9997944	0.0002055639
はるよい	0.44	0.23	0.51	0.43	0.34	0.47	0.71	0.49	0.57	0.60	0.49	0.39	0.70	0.47	0.47	0.47	5.9E-06	200	0.9988298	0.0011702454
cv. X(最頻度)	0.56	0.37	0.51	0.43	0.66	0.47	0.71	0.51	0.57	0.60	0.49	0.51	0.70	0.47	0.47	0.47	3.2E-05	200	0.993544	0.0064564881
サンチーゴ	0.56	0.01	0.51	0.43	0.66	0.47	0.29	0.49	0.57	0.36	0.49	0.51	0.70	0.47	0.47	0.47	2.9E-07	200	0.999943	0.0000571624
福岡S6	0.56	0.09	0.51	0.29	0.34	0.47	0.71	0.49	0.43	0.04	0.18	0.39	0.30	0.47	0.47	0.47	1.5E-08	200	0.999997	0.0000030747
さちのか	0.56	0.23	0.40	0.43	0.34	0.47	0.71	0.49	0.57	0.36	0.49	0.39	0.30	0.47	0.47	0.47	1.5E-06	200	0.999708	0.0002922397
さつまおとめ	0.56	0.23	0.51	0.43	0.34	0.39	0.71	0.51	0.43	0.36	0.49	0.39	0.70	0.47	0.47	0.47	2.8E-06	200	0.999430	0.0005695543
とちおとめ	0.56	0.09	0.51	0.29	0.66	0.47	0.71	0.51	0.43	0.36	0.18	0.10	0.30	0.34	0.34	0.34	2.6E-08	200	0.999995	0.0000051857
章姫	0.56	0.37	0.40	0.43	0.66	0.39	0.71	0.51	0.43	0.60	0.34	0.39	0.70	0.47	0.34	0.47	5.9E-06	200	0.998825	0.0011745738

### 16個のマーカーを用いることにより、上記の条件をクリアできる

品種名	$P_1$
けいきわせ	0.2/1,000
はるよい	1.1/1,000
計算上の最頻度マーカー保持品 種	6.4/1,000
さちのか	0.3/1,000
福岡S6(あまおう)	3/1,000,000

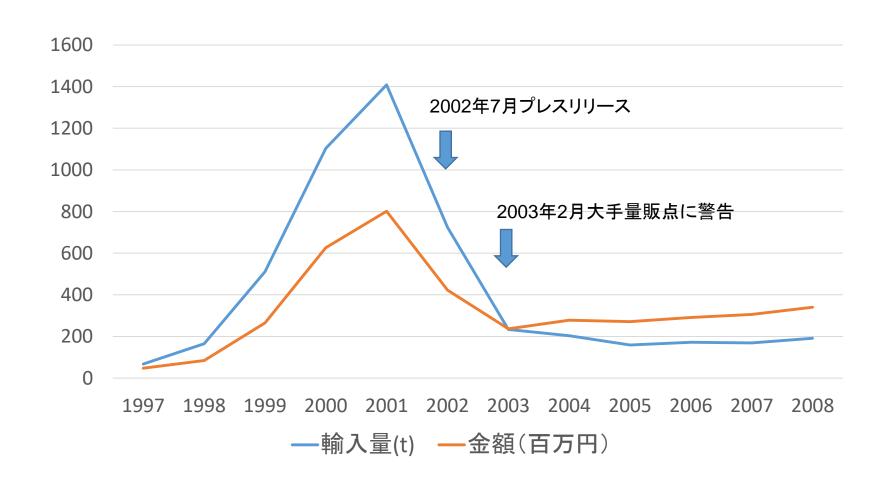
 $P_1$ は、マーカー数、マーカー 遺伝子型頻度、品種数により変動する。



マーカー遺伝子型頻度が少ないマーカーがたまたま重

### 韓国からイチゴの輸入量および金額の推移(その後)







イチゴは品種改良が急速、多様化 2005年から2018年1月まで登録111品種



ジェノタイピングデータが未更新



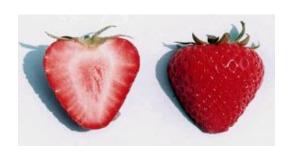
更新•公開



種間交雑による「桃薫」



観光農園用「あまえくぼ」



四季成り性品種「なつあかり」



種子繁殖性「よつぼし」



- •イチゴ品種識別技術
  - 1. 違法に海外に持ち出された日本のイチゴ品種
  - 2. DNAマーカーを用いたイチゴ品種識別
  - 3. 輸入イチゴの調査
- •効率的育種選抜技術
  - 4. DNAマーカーを用いた劣性遺伝子の導入
  - 5. 不良形質の連鎖の切断
  - 6. ゲノムワイドマーカーによる選抜の高効率化





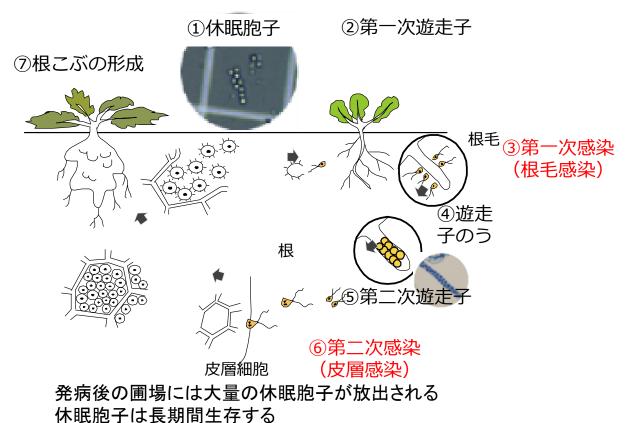
地下部の病徴



病原体: Plasmodiophora brassicae

アブラナ科植物に特異的に発生する土壌病害

- ・根部の異常な肥大
- ・養水分の吸収阻害・収穫不可→減収
- 日本では1892年に最初に発病が報告

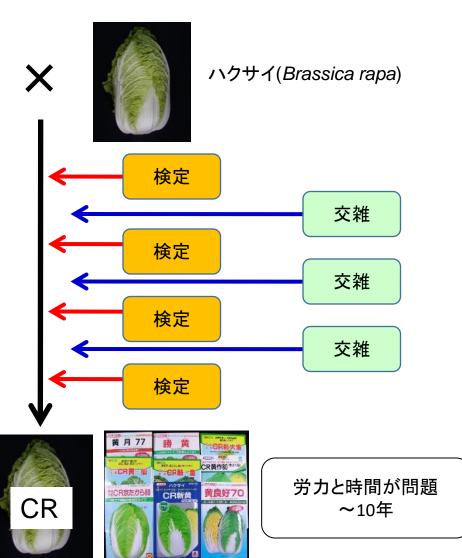


# 農研機構

#### 従来の戻し交雑と接種検定による根こぶ病抵抗性育種

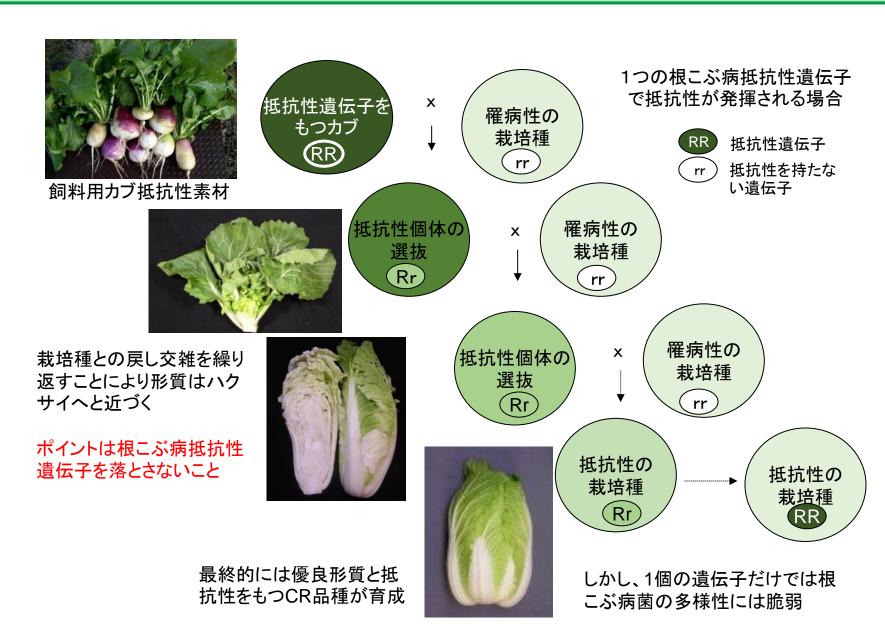






### 根こぶ病抵抗性の主働遺伝子を導入





### ハクサイの市販品種のほとんど は抵抗性を謳っている が、、、、



ほとんどのCR品種は No.5菌に罹病

CR品種名	菌株と抵抗性程度					
して前性石	No.9	No.5				
黄波90	抵抗性	罹病性				
スーパーCRひろ黄	抵抗性	罹病性				
隆徳	抵抗性	罹病性				
きらぼし	抵抗性	罹病性				
スーパーCR新理想	抵抗性	罹病性				
黄福65	抵抗性	罹病性				
明鏡	抵抗性	罹病性				
CR-歓黄No.100	抵抗性	罹病性				
NNH-104	抵抗性	罹病性				
CRさとざき	抵抗性	罹病性				
W-116	抵抗性	罹病性				
黄ごころ65	抵抗性	罹病性				
ゆうき	抵抗性	罹病性				
CR新黄	抵抗性	罹病性				
黄月77	抵抗性	罹病性				
黄月87	抵抗性	罹病性				
黄りょうよし70	抵抗性	罹病性				
萌黄	抵抗性	罹病性				
CRおうけん65	抵抗性	罹病性				
CRせいが65	抵抗性	罹病性				
CR黄こま	抵抗性	罹病性				

Hatakeyama et.al (2004)より一部改変して引用

### 根こぶ病菌系と抵抗性遺伝子



根こぶ病菌は一種類ではない! 日本のハクサイを加害する根こぶ病菌系

口毛 不什么	グループ1	グループ2	グループ3	グループ4
品種•系統名	No.5	No.13	No.14	No.9, Ano-01
SCRひろ黄	S	R	S	R
CR隆徳	S	S	R	R
きらぼし	S	R	R	R
はくさい中間母本農9号	R	R	S	R
無双	S	S	S	S
抵抗性遺伝子	Crr1+Crr2	Crr1, CRk	CRk, CRb	Crr1, CRk, CRb

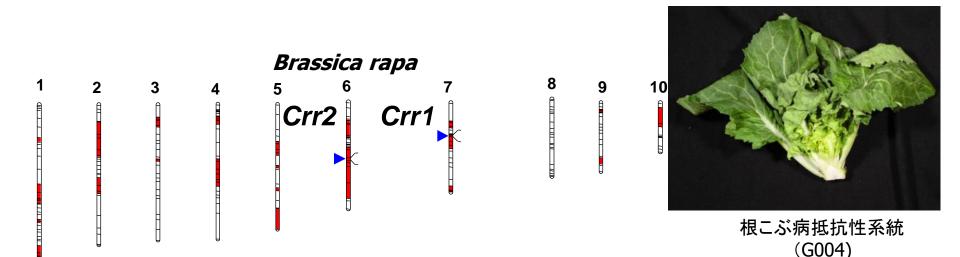
R:抵抗性、S:罹病性

畠山ら、2004より抜粋して掲載

それぞれの品種が持つ抵抗性遺伝子の種類も異なる

すべてのグループに抵抗性を持たせるには複数の抵抗性遺伝子を持たせる必要がある。





### <u>Crr 1</u>

- ・主働的な役割を果たす
- ・Ano-01菌に対しては抵抗性を発揮するが、多犯性の菌(No.5)では 不十分である

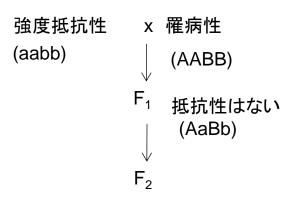
#### <u>Crr 2</u>

- ・No.5菌に対して、Crr1存在下で抵抗性を発揮する
- · Crr1が存在しないとほとんど抵抗性は発揮されない

安定した抵抗性を付与するには、いずれもヘテロではなく、ホモに 有する必要がある。

# 抵抗性が2つの遺伝子座支配でかつ劣性型で発揮の誤して発揮を開発機構





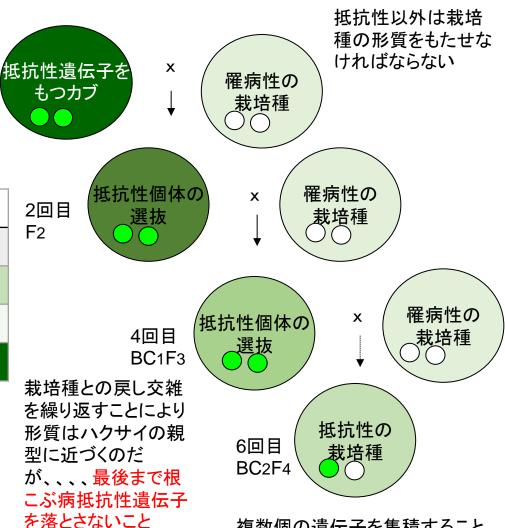
	AB	Ab	аВ	ab
AB	AABB	AAbB	aABB	aAbB
Ab	AABb	AAbb	aABb	aAbb
аВ	AaBB	AabB	aaBB	aabB
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

F。世代で1/16の確率でのみ出現する



簡単だ!(机の上では)

いつも抵抗性検定がうまくいくとは限らない。環境 の影響もある。抵抗性程度がはっきりしない!

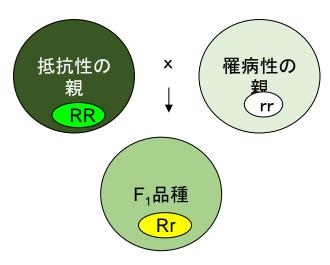


複数個の遺伝子を集積すること

は極めて困難

### 野菜の実用品種はほとんどがF<sub>1</sub>品種





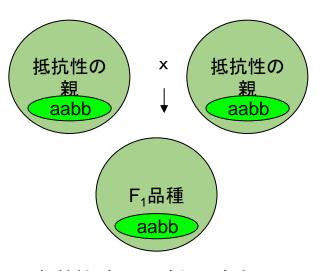
F<sub>1</sub>(雑種第一代)の効果

- ・均一な生育
- •雑種強勢

両親より生育が旺盛

あるいは両親の中間型(縦型と横型を交雑するときれいな形となる)

・優性形質であれば両親どちらかが保有すればOK



抵抗性が2つの遺伝子座支配でかつ劣性型で 発揮される場合

・両親共に2つの抵抗性遺伝子

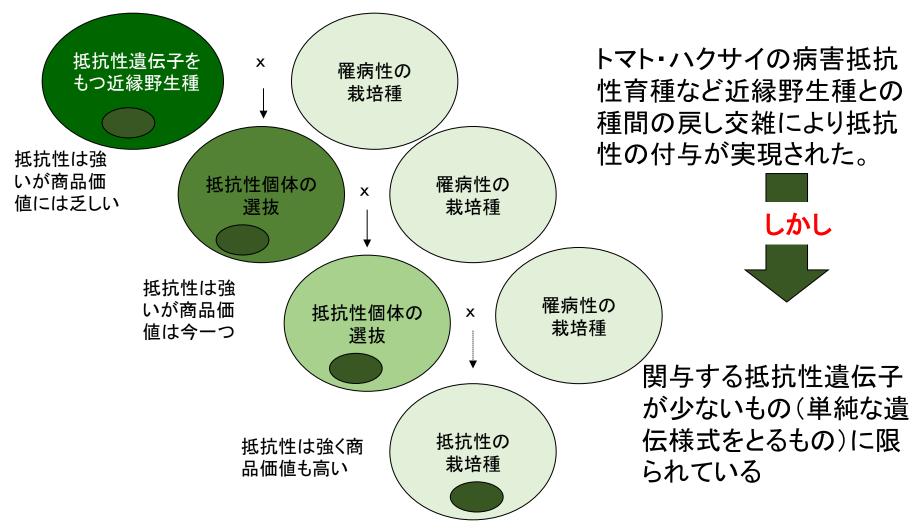




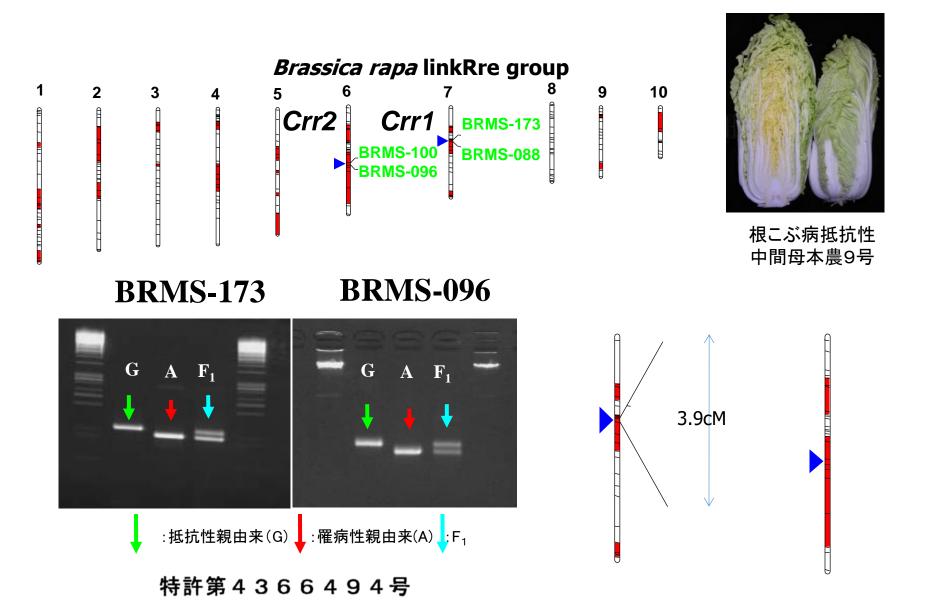
複数因子支配の劣性形質は使いにくい



### 野生近縁種のもつ病害抵抗性遺伝子の栽培品種への導入

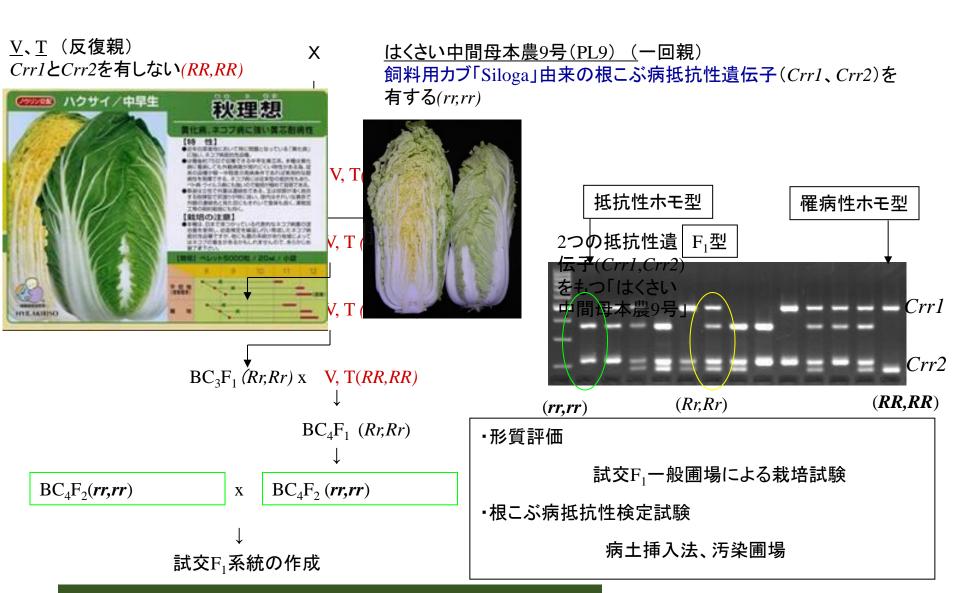






### DNAマーカーによる2つの抵抗性(劣性)遺伝子の導入





複数の劣性遺伝子の育種プログラムへの導入



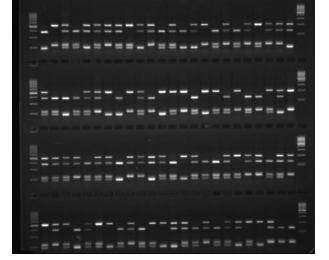
- •イチゴ品種識別技術
  - 1. 違法に海外に持ち出された日本のイチゴ品種
  - 2. DNAマーカーを用いたイチゴ品種識別
  - 3. 輸入イチゴの調査
- 効率的育種選抜技術
  - 4. DNAマーカーを用いた劣性遺伝子の導入
  - 5. 不良形質の連鎖の切断
  - 6. ゲノムワイドマーカーによる選抜の高効率化

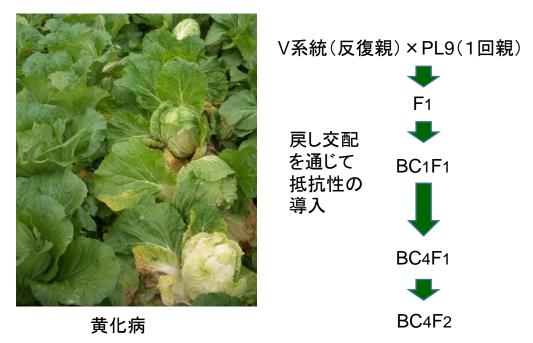
#### 根こぶ病と黄化病の複合病害抵抗性を導入



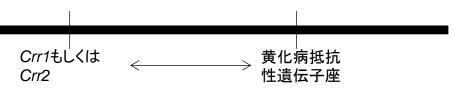


マーカー選抜による抵抗性付与





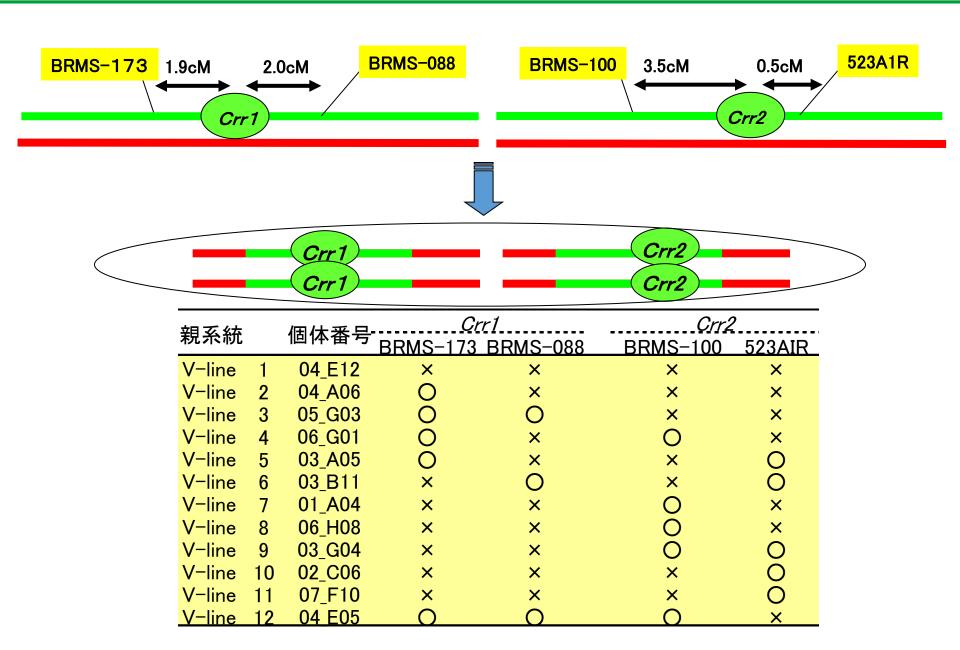
量的遺伝子の集積による抵抗性付与



同一の染色体に座乗し、その距離が近い場合を想定

## Crr1, Crr2近傍での組換え個体の選抜





# 農研機構











#### 各系統の根こぶ病抵抗性近傍マーカーとの連鎖切れ位置と黄化病の病徴程度

供試系統名お <u>Crr1</u> °		Crr2ª			病徴程度 <sup>b</sup>				 - その他調査		平均	
よび品種名	BRMS -173	BRMS -088	BRMS 523 -100 A1R		0	0.5	1	2	3	不可個体 <sup>°</sup>	合計	発病 <u>指数</u>
1 04-E12	_	_	_	_	53	4	1	0	0	6	64	0.05
2 04-A06	0	_	_	_	43	11	7	0	0	3	64	0.20
3 05-G03	0	0	_	_	56	5	2	0	0	1	64	0.07
4 06-G01	0	_	0	_	46	17	0	0	0	1	64	0.13
5 03-A05	0	_	-	0	51	8	3	0	0	2	64	0.11
6 03-B11	_	0	-	0	26	21	12	0	0	5	64	0.38
7 01-A04	_	_	0	_	49	8	1	2	0	4	64	0.15
8 06-H08	_	_	0	_	47	14	2	0	0	1	64	0.14
9 03-G04	_	_	0	0	53	9	2	0	0	0	64	0.10
10 02-C06	_	_	-	0	51	3	6	0	0	4	64	0.13
11 07-F10	_	_	-	0	51	8	5	0	0	0	64	0.14
12 04-E05	0	0	0	_	40	1	1	0	0	2	44	0.04
13 V糸統	_	_	_	_	53	6	2	0	0	3	64	0.08
14 黄久娘65		_	_	_	0	0	0	0	51	0	51	3.00

- a) Crr1 および Crr2 選抜マーカーを挟み込む両側のマーカー, 〇は連鎖が切れたマーカーを示す.
- b) 病徴程度;0:無病徴, 0.5:外葉がわずかに枯れ, 1:結球葉枯れ, 2:半身萎ちょう, 3:落葉または株傾き
- c) その他は軟腐病等他の病害により枯死あるいは生育不良につきデータが取れなかったもの

黄化病抵抗性遺伝子座は、Crr1,Crr2とは別の染色体に座乗

### 根こぶ病と黄化病の抵抗性を有する 高品質のはくさいF<sub>1</sub>品種「あきめき」

- ・ はくさい栽培で問題となる土壌病害、根こぶ病と黄化病の両方に抵抗性を持つ品種の開発
- ・ 生産コストの削減、収益力向上と安定生産に貢献

平成22年3月24日日本農業新聞掲載

#### 技術の内容

病原菌に汚染され

4つの根こぶ病菌系グループすべてに抵抗性の 「あきめき」

品種名	根こぶ病菌系グループ						
四性石	1	2	3	4			
あきめき	R	R	R	R			
SCRひろ黄	S	R	S	R			
CR隆德·秋理想	S	S	R	R			
無双	S	S	S	S			

根こぶ病

た土壌

で

の

栽

培

は困

難



抵抗性:R、罹病性:S

「秋理想」と同等の黄化病抵抗性を示す「あきめき」

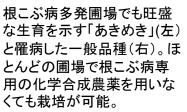
品種名	供試個体数	発病株率	平均発病指数
あきめき	14	14. 3%	0. 18
秋理想	48	16. 7%	0. 13
黄久娘65	90	83. 3%	2. 03
黄久娘80	81	53. 1%	0. 81

黄化病

発病指数;0(発病なし)~3(株全体が黄化)

#### 導入のメリット







は種後約75日で収穫可能で, 出荷 時の球長は約30cm, 重さは2.5~ 3.3kg程度

10aあたり5,000~13,000円の 農薬代が不要となる

減農薬栽培で高品質はくさいの安定生産

茨城県を中心に<mark>約600ha</mark>で栽培されている(平成29年度)

ハクサイ以 外にも応用











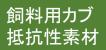


- •イチゴ品種識別技術
  - 1. 違法に海外に持ち出された日本のイチゴ品種
  - 2. DNAマーカーを用いたイチゴ品種識別
  - 3. 輸入イチゴの調査
- •効率的育種選抜技術
  - 4. DNAマーカーを用いた劣性遺伝子の導入
  - 5. 不良形質の連鎖の切断
  - 6. ゲノムワイドマーカーによる選抜の高効率化

### 遺伝資源から実用品種の育成へ







P 100%



1. 戻し交雑によるゲノム 領域の排除



世代促進に時間を要する種に とっては育種年限の長期化 晩抽性キャベツ1年/世代 春どり寒玉2年/世代



抵抗性素材

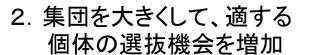
F1 50%



中間母本

BC1F1 25%

BC2F1 12.5%

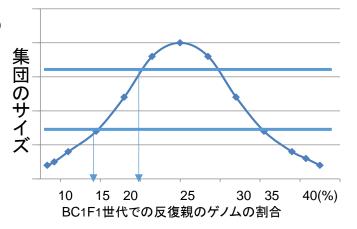






実用品種

遺伝資源の有用形質 に関与するゲノム領域 以外は排除したい



### BioMarkによる96x96ジェノタイピング





96.96 Dynamic Array

IFCコントローラ

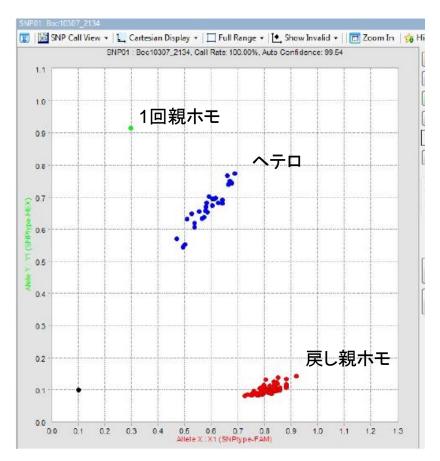
BioMark本体

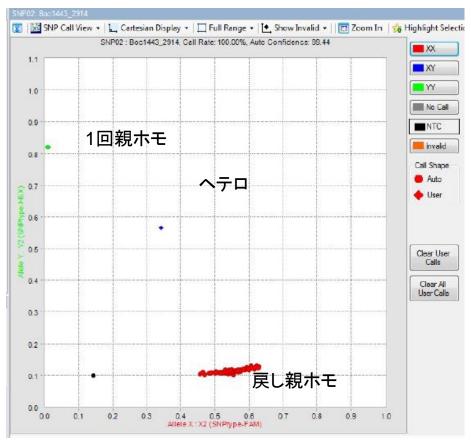


容易に96個のマーカー、96個体分のデータの取得が可能

### BioMarkによるジェノタイピング





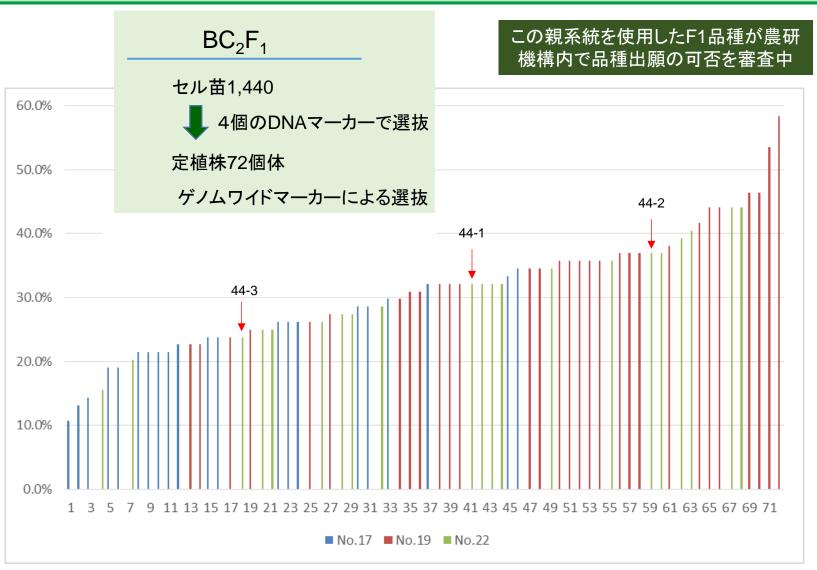


 $F_1(XY) \times P2(XX)$   $BC_1F_1$  XY: XX = 1:1

 $BC_nF_1$  XY:XX = 0:1

#### ゲノムワイドマーカーによる1回親型のマーカー遺伝子型の割合





4つのマーカーで選抜後、ゲノムワイドマーカーで1回親のマーカー遺伝子型をヘテロに有する個体の割合

#### キャベツ根こぶ病抵抗性品種

・DNAマーカーを用いて、複数の抵抗性遺伝子を効率的にキャベツに導入し、抵抗性を有する品種を育成する。

#### 背景•目的

キャベツの根こぶ病防除には、多額の化学農薬(主産県の一つでは年間約800トン)が使用されており、また温暖化に伴いその被害が拡大する恐れがあることから、強度抵抗性の品種を育成する必要がある。

キャベツの根こぶ病抵抗性は複数の遺伝子により支配されると考えられるため、DNAマーカーを用いてそれらを捕捉し、早期に抵抗性品種を育成する。

#### 期待される効果

キャベツの主要産地への普及により、根こぶ病による減収が抑制される。





抵抗性素材



DNAマーカー利用による 強度抵抗性の導入





抵抗性キャベツ品種の早期育成