

DNA マーカーを用いたバレイショの 効率的な選抜と育種素材の作出

長崎県農林技術開発センター農産園芸研究部門
馬鈴薯研究室 主任研究員

森 一幸

1. 背景

国内のバレイショの栽培面積は約 8 万 5,000ha（平成20年）である。そのうち、沖縄県を含む九州地域のバレイショの栽培面積は 1 万 388ha（平成20年）で、北海道産バレイショの端境期である 2～6 月にかけては、生食用、一部加工用として日本中に出荷され、国産バレイショの周年供給を支えている。

バレイショは生育適温となる 10～23℃の時期であれば、日本全国どこでも栽培できるが、西南暖地では、生育適温の時期が春と秋に分かれる（図 1）。このため、春作と秋作の年 2 作栽培される。栽培品種は北海道での主要品種である「男爵薯」、「メークイン」などは休眠性、生育、収量性の面から暖地二期作には適さない。秋作では、高温で発生しやすい青枯病もあり、栽培に

は暖地二期作に適した品種が必要となる。

長崎県農林技術開発センター農産園芸研究部門馬鈴薯研究室では、昭和26年より暖地二期作向けバレイショ品種に取り組んでおり、これまで「ウンゼン」、「タチバナ」（昭和30年）の育成に始まり、「さんじゅう丸」（平成22年）まで14品種を育成している。育成品種のうち、九州地域における「ニシユタカ」の栽培面積は5,577ha（平成20年）、「デジマ」は1,167ha（平成20年）であり、両品種で九州全体の栽培面積の65%を占めている（図 2）。

暖地二期作向け品種に求められる特性（育種目標）は、生産面では、「多収性」、「栽培のしやすさ」、塊茎が短い生育期間でも早く肥大する「早期肥大性」、「短休眠」、「病虫害抵抗性」であり、消費・加工面では、「塊茎の外観」、「食味の良さ」、「調理適性」な

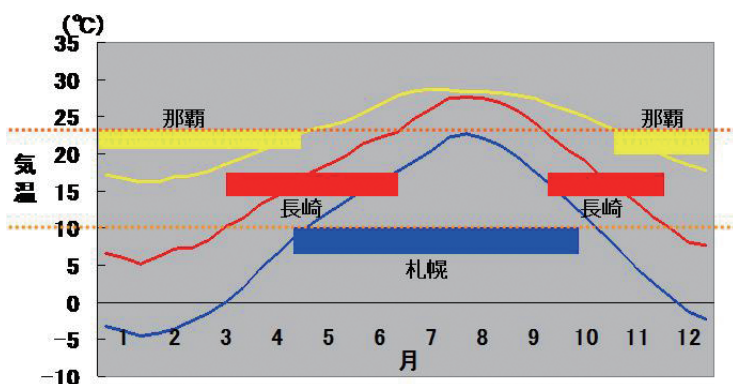


図 1 各地域の平均気温とバレイショの栽培時期

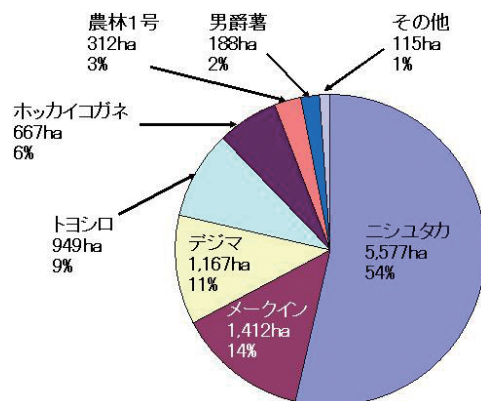


図2 九州における品種別作付け割合（平成20年産）

どが挙げられる。

「病虫害抵抗性」は、当研究室でも最も重要とする育種目標である。現在の主要品種「ニシユタカ」、「デジマ」などは、多くの病虫害に対して抵抗性がないため、生産者は栽培期間中に農薬による防除を行っている。しかし、「食の安全・安心」の観点から、より農薬使用回数が削減できる病虫害抵抗性品種が必要となる。

バレイシヨの病虫害のうち、特に国際的な重要害虫であるジャガイモシストセンチュウの発生が長崎県では平成4年に確認されているが、九州地域の主要品種は同センチュウ抵抗性を有していない。ジャガイモシストセンチュウが発見された圃場では種ばれいしょ生産が永久にできないため、産地の維持が危惧される。このため、品種育成においてもジャガイモシストセンチュウ抵抗性の付与が必須となっている。また、ウイルス病の中でも特にジャガイモYウイルス（PVY）は大きな被害をもたらしている。さらに、ジャガイモ疫病、ジャガイモXウイルスなどの病害も多発傾向にある。

以上、述べた病虫害に対して、これまで当研究室では無防除圃場での評価や各ウイ

ルスの接種検定を行い、抵抗性判定を行ってきたが、平成14年以降、DNAマーカーを利用した選抜に取り組んだ。DNAマーカーを利用した選抜（Marker-assisted selection、MAS）は、従来の温室および圃場での検定による病虫害抵抗性の判別に比べ、検定のための施設や圃場を必要とせず、また検定個体の生育段階や、温度、湿度等の生育環境に左右されことなく短時間で正確に判別することができる。このため、病虫害抵抗性などの有用遺伝子に連鎖するDNAマーカーは世界中で開発されている（Watanabe and Watanabe 2000）。DNAマーカーによる選抜は従来の検定に比べ効率的であるが、実際の育種段階では、利用できるDNAマーカーの数が増加すると、試薬や酵素類の検定コストや作業時間が増加するため、検定の効率化が課題である。

また、DNAマーカーを利用しながら育成系統に目的とする有用な遺伝子を導入、集積する過程で育成系統が雄性不稔、つまり、花粉親として交配ができない場合もある。不稔となると交配可能な親が制限される。このため、多くの優良な交配親の利用することで、育種を効率的に進めるために

は、有用な遺伝子を集積し、かつ稔性が高い系統の育成が重要な課題となる。

そこで、DNA マーカー検定の効率化のための複数のDNA マーカーを同時に検出できるマルチプレックスPCR法の開発および有用な育種素材として複合病虫害抵抗性で、良食味かつ雌雄稔性が高い「西海35号」を育成したので紹介する。

2. DNA マーカー用いた効率的な選抜

バレイショ育種において、病虫害抵抗性個体を効率よく選抜するため、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1*、ジャガイモXウイルス抵抗性遺伝子 *Rx1* およびジャガイモ疫病真性抵抗性遺伝子 *R1* と *R2* に連鎖する4つのDNA マーカー（それぞれPCN、PVX、R2-974（大林ら 2010）およびR1（Ballvora *et al.* 2002））の同時検出が可能なマルチプレックスPCR法の開発を試みた。21品種・系統を材料とし、PCR反応液中にPCN、R1、R2-974およびPVXのプライマーセットをそれぞれのPCR産物の増幅に影響を与えない濃度で

添加することにより、DNA マーカーごとにPCRを行って、マーカーバンドの有無を見た場合と同じ結果が得られた（森ら 2010）。

実際の育種段階で4つのDNA マーカーを同時に検出できるマルチプレックスPCR法を利用すると、1) ジャガイモシストセンチュウに対して感受性であるにもかかわらず、DNA マーカーが検出される。2) ジャガイモ疫病抵抗性個体であるにもかかわらず、DNA マーカーが検出されない。3) すべての病虫害に対して抵抗性を持たない個体とPCR反応ミスの判断ができないなど問題点があった。これらの問題点の改善を目指し、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1* は、これを密に挟むDNA マーカーN146とN195（竹内ら 2009）に、ジャガイモ疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* は、より特異性の高いR2-800（大林ら 2010）に組み換え、さらにPVY抵抗性遺伝子 *Ry_{che}* に密に連鎖するDNA マーカーRy186（竹内ら2009）を組み込むマルチプレックスPCR法を開発した（図3）。

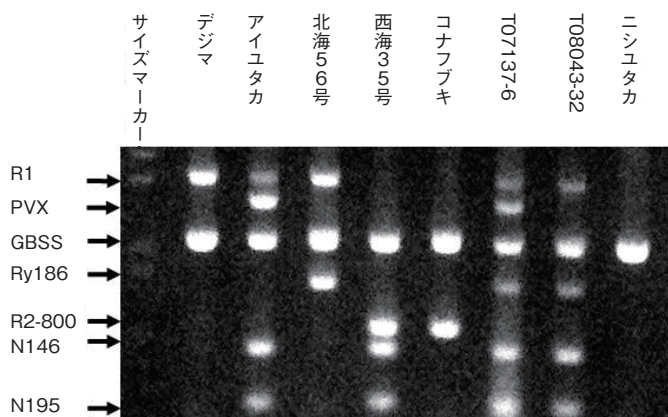


図3 マルチプレックスPCRによる電気泳動結果

R1：疫病真性抵抗性遺伝子 *R1*、PVX：ジャガイモXウイルス抵抗性遺伝子 *Rx*
GBSS：顆粒性澱粉合成酵素遺伝子 *GBSS*、R2-800：疫病真性抵抗性遺伝子 *R2*
Ry186：ジャガイモYウイルス抵抗性遺伝子 *Ry_{che}*
N146、N195：ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1*

表1 雑種集団T09068を用いた個別PCRとマルチプレックスPCRの
検定結果と検定に要する時間

DNA マーカー	個別PCR				マルチプレックスPCR			
	検定 数	DNA マーカー		検定 時間 (分)	検定 数	DNA マーカー		検定 時間 (分)
		あり	なし			あり	なし	
PVX	96	49	47	224		49	47	
R2	49	18	31	202		40	56	
PVY	18	13	5	189	96	48	48	308
H1	13	6	7	199		45	51	
R1	6	5	1	183		86	10	
のべ 検定数	182			997	96			308

注) 検定時間：PCRのためのサンプル調整、PCR反応、電気泳動、DNA
マーカーの有無の判別に要する時間

ポジティブコントロールとしてすべてのバ
レイショが有する顆粒澱粉合成酵素遺伝子
*GBSS*のDNAマーカー（竹内ら2009）を
組み込むことで、PCR反応ミスによって
生ずる誤判定を避けることができるように
なった（図3）。96系統からなる雑種集団
に本手法を適用して、5つのすべての抵抗
性遺伝子を持つと推定される5系統を選抜
することができた。これはDNAマーカー
ごとに検定個体を絞り込んでいく選抜法に
比べ、検定数を半減させ、所要時間を1/3
に減少させることができた（表1）。また、
DNA自動抽出装置で抽出されたDNA濃
度は3～83ng/ μ lであり、いずれもDNA
マーカーの検出限界以上の濃度を有するこ
とから、DNA自動抽出装置とマルチプレッ

クスPCR法を併用することにより、実用
的な育種技術となり得ることが明らかにな
った（Mori *et al* 2011.）。

3. 育種素材の作出

日本で初めて育成された良食味で青枯病
抵抗性を示す2倍性品種「インカのめざめ」
（森ら2009）をチューバーディスク培養法
（小村・大林 2002）により倍加した4倍
体系統「TD0101」（向島ら 2003）を母親
とし、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性
遺伝子*H1*とPVY抵抗性遺伝子*Ry_{chc}*を持
つ「サクラフブキ」（村上ら 1995）を花粉
親として交配し、これらの優良形質を併せ
持つ育種系統「西海35号」を育成した（図
4）。「西海35号」は良食味で、生イモ100



図4 複合病虫害抵抗性で、雌雄稔性が高い「西海35号」
（左）地上部（右）塊茎

g当たりカロテノイド系色素のゼアキサントンを $17.4\mu\text{g}$ 、ルテインを $58.8\mu\text{g}$ を含有していた。本系統は、*H1*遺伝子と Ry_{chc} 遺伝子を有し、青枯病抵抗性を併せ持つ病虫害複合抵抗性系統である。また、本系統は、*S. phureja*に由来するS/ ϵ 型細胞質ゲノムを持つため、花粉親として他品種に交雑すると、結実率は35.4%~68.2%で、果実当たり平均種子数は84.5~255.9粒と高い交雑能力を示した。母親として用いても、結実率は46.8%~58.6%で、果実当たり平均種子数は126.9~135.3粒と高い交雑能力を示した。また、「西海35号」を花粉親として育成した後代系統「西海38号」、「西海39号」「愛系172」、「T04204-13」は、母本（細胞質ゲノム）の影響を受け、平均結実率は0~22.9%で、果実当たりの平均種子数も0~44.9粒と少なかった。一方、「西海35号」を母本として育成した後代系統「西海37号」、「長系131号」を花粉親とすると、平均結実率は41.9%~50.9%と高く、果実当たりの平均種子数も149.2~159.5粒と多かった。したがって、「西海35号」は、高い雌雄稔性を有し、母本として育成した後代系統（「西海37号」、「長系131号」など）においても高い雌雄稔性が期待できるため、病虫害複合抵抗性系統の育種素材として極めて有用性が高いと考えられる（Mori *et al.* 2012）。

4. 今後の育種について

DNAマーカーは世界中で開発されているが、実際の育種の現場でいかに効率的に活用していくかは重要な課題である。今回開発したマルチプレックスPCR法のように、各育種研究機関で問題となっている病

虫害についてDNAマーカーが開発されていれば、育種の効率化のために、積極的にDNAマーカーを活用していく必要があると考える。

また、今後の育種に有用な育種素材の作出は、品種育成と併せて進める重要な課題であると考えられる。当研究室で育成した「西海35号」は、青枯病抵抗性に加え、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子*H1*とPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} を併せ持つ病虫害複合抵抗性で、S/ ϵ 型細胞質ゲノムを持つため花粉親としての交雑能力が高いなど優れた特性を有する。このように有用遺伝子が集積した稔性が高い育種素材があれば、情勢の変化に応じて交配親を選択し、雑種後代の作出が可能となる。さらに新たなDNAマーカーが開発されれば、これらを利用した選抜、育成も可能になる。

近年、地球温暖化に伴い、気象変動に対応できる品種の育成や病虫害の多発が懸念され、これまでの育種素材では対応できない場合も考えられる。しかし、バレイショの近縁野生種にはまだ有用な素材が存在しており、今後、積極的な育種への利用が必要であると考えられる。

引用文献

- 1) Ballvora A, Ercolano MR, Weiß J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamini F, Gebhardt C (2002) The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of resistance genes. Plant J 30 : 361-371
- 2) 小村国則, 大林憲吾 (2002) 三倍体バ

- レイショ「アンデス赤」の倍加個体と普通品種との雑種後代系統の育成. 九州沖縄農業64: 46
- 3) Mori, K., Y. Sakamoto, N. Mukojima, S. Tamiya, T. Nakao, T. Ishii, and K. Hosaka. (2011) Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica* 180: 347-355.
- 4) 森一幸, 大林憲吾, 田宮誠司, 坂本悠, 向島信洋, 中尾敬, 保坂和良 (2010) マルチプレックスPCRを用いた4種のバレイショ病虫害抵抗性遺伝子マーカーの検出法. 育種学研究 12: 22-25
- 5) Mori, K., N. Mukojima, T. Nakao, S. Tamiya, Y. Sakamoto, N. Sohbaru, K. Hayashi, H. Watanuki, K. Nara, K. Yamazaki, T. Ishii, K. Hosaka, (2012) Germplasm Release: Saikai 35, a Male and Female Fertile Breeding Line Carrying *Solanum Phureja*-Derived Cytoplasm and Potato Cyst Nematode Resistance (H1) and Potato Virus Y Resistance (Rychc) Genes, *American Journal of Potato Research* 89: 63-72
- 6) 森元幸, 高田明子, 梅村芳樹, 米田勉, 木村鉄也, 高田憲和, 小林晃, 津田昌吾, 中尾敬, 吉田勉, 遠藤千絵, 林一也 (2009) 橙黄肉色を有する二倍体のバレイショ品種「インカのめざめ」の育成. 育種学研究11: 53-58
- 7) 向島信洋, 中尾敬, 森一幸 (2003) 二倍体バレイショの倍加処理による特性の変化. 九州沖縄農業 65: 37
- 8) 村上紀夫, 松永浩, 千田圭一, 奥山善直, 入谷正樹, 浅間和夫, 三井康, 清水啓 (1995) ばれいしょ新品種「粉無双」(サクラフブキ)の育成について. 北海道農試集報 68: 1-16
- 9) 大林憲吾, 中田奈津子, 茶谷正孝, 小村国則 (2010) DNAマーカーを利用したバレイショ病虫害抵抗性検定法の開発 第1報 ジャガイモXウイルス、ジャガイモシストセンチュウ、ジャガイモ疫病抵抗性検定法. 長崎農林技セ研報 1: 1-26
- 10) 竹内徹, 佐々木純, 鈴木孝子, 堀田治邦, 樋浦里志, 池谷聡, 藤田涼平, 千田圭一 (2009) ばれいしょの病虫害抵抗性選抜に有効なDNAマーカー. 平成20年度北海道農業試験会議(成績会議)資料. 1-26
- 11) Watanabe JA, Watanabe KN (2000) Pest resistance traits controlled by quantitative loci and molecular breeding strategies in tuber-bearing *Solanum*. *Plant Biotechnology* 17: 1-16