

野菜育種への応用事例

京都府立大学大学院 農学研究科
京都府農業資源研究センター 基礎研究部
平井正志

DNA 分析技術は近年著しく進歩した。それにより、ゲノムすなわち遺伝子の総体の研究が進んだが、そればかりではなく、DNA の遺伝マーカーとしての重要性が明らかになり、ヒト、その他の動植物種での様々な応用が考えられてきた。野菜においても育種技術とその周辺技術への DNA 分析の応用が始まっている。野菜ではコーネル大学のタンクスレーらによる RFLP に基づくトマト連鎖地図作製に始まり、多くの作物で連鎖地図が作製された。また地図が作製されないまでも、連鎖を利用した DNA マーカーが得られ、Marker-Assisted Selection(MAS)と呼ばれる技術が提唱され、育種に利用されるようになってきている。この技術は従来からの技術である交配育種そのものをサポートする技術であり、遺伝子操作のような社会的制約はない。

1. 園芸植物の特殊性

繁殖様式の多様性

イネ、麦類などの普通作物と異なり、野菜を含む園芸作物は繁殖様式が多様である。トマト、ナス、レタスなどは自殖性作物であり、イネ等普通作物の育種に準じた育種が可能である。しかし、トマト、ナスなどではヘテロシスが見られ、古くから F1 品種が作られ、栽培の主流になっており、育種では母本そのものの能力ではなく、組み合わせ能力を検定する必要がある。

アブラナ科野菜、ニンジン、タマネギなどは他殖性であり、集団選抜による従来からの品種では均一な生産物を得ることがむずかしく、F1 品種の育成が進められている。自殖系統を得ることが一般的には難しく、農業形質の遺伝解析もあまり進んでいない。また一部には集団選抜による品種が残っている。これらは品種内に遺伝的多型が存在するため、品種特性は多型の存在頻度で表すしかない。連鎖地図の作成はあまり進んでいない。

サトイモ、イチゴ、果樹、多くの花きは栄養繁殖性であり、ランナー、株分けや接ぎ木などにより、同一遺伝子型のものを大量に増殖が可能である。一部の品種では繁殖効率の低いものもある。遺伝解析はほとんど行われておらず、連鎖地図や連鎖マーカーがどれくらい育種に利用できるのか不明な点もある。

病虫害回避の重要性

イネは水田で作るため土壌病害が例外的にほとんどないが、野菜では多くの土壌病害が問題になる。特に臭化メチルがオゾン層破壊の原因となるため、近い将来利用できなくなり、これまで以上に土壌病害、線虫害は多くなるであろう。また順次収穫するキュウリやトマトなどでは薬剤を散布するタイミングが問題になり、病害抵抗性品種のはたす役割は大きい。

多様な形質の利用

野菜では果実、根、葉、茎など様々な部位を利用する。それも成熟したものを利用する

ばかりでなく、ナスやキュウリのように未熟果を利用するものもある。またレタスやキャベツのように結球した葉を利用するものもある。さらにほとんどの野菜で周年供給しているため、1品目で作期や栽培様式に応じた多数の品種が必要とされる。またそのためには本来の生育期間でない、不利な条件でも栽培する場合も多いため、抽台性を制御したり、高温耐性を付加するなど種々の育種が必要となってくる。

2. DNAマーカー

育種における遺伝マーカー

これまで、育種における選抜では主として目的とする形質そのもので選抜してきた。しかし、その形質が環境の影響を大きく受ける形質、すなわち遺伝率の低い形質の場合、必ずしも適切な遺伝子型が選抜されるとは限らない。また成熟果実の形質等形質発現に長時間を要する場合、多くの個体を長期間に渡り圃場で管理しなければならず、育種の選抜の母集団はかなり限定されざるをえない。目的形質に連鎖したマーカーを使った選抜方法が以前から望まれている。DNA分析技術は最近急速に進歩し、DNA多型を選抜指標とすることでMASの利用範囲が大きく広がった。

DNAマーカーの種類

a. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 制限酵素断片長多型

植物のゲノムDNAは、制限酵素で切断すると多くの断片に分かれる。これをクローニングされたプローブを用いて、特定のDNA断片がどこに存在するかを調べ、遺伝子型を判別する手法である。予めプローブとするDNA断片を獲得しておく必要があり、また比較的多量のDNAを必要とし、操作が複雑であるが、バンドは共優性で、ホモ、ヘテロが識別できるため、利用価値は高い。また再現性の高い手法である。

b. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 任意増幅DNA多型

植物のゲノムDNAに、10ないし12塩基の短いDNA断片をプライマーとしてPCRを行い、産物を電気泳動すると数多くのバンドが検出される。増幅されたそれぞれのバンドは優性遺伝する。この手法は植物に特有なDNA断片や配列情報をあらかじめ必要とせず、かつごく少量のDNAで分析できるので非常に便利であり、広く、野生植物も含めた様々な植物で利用されている。しかし、バンドパターンはPCR機種に依存するし、再現性には問題がある。

c. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 増幅断片長多型

制限酵素処理とPCRを組み合わせた手法で、長いアクリルアミドゲルで増幅産物を分析する。作業は複雑であるが、一度の作業で多くの多型を分析できる。再現性も良いとされている。蛍光物質をもつプライマーを用いた手法が多用されている。

d. SSR (Simple-Sequence Repeat) 単純反復配列多型

Microsatellite (MS), Short Tandem Repeat 等多くの呼称がある。植物のゲノムDNAには単純な数塩基の繰り返し配列が数多くある。この部分はDNA複製の際に誤りが生じやすく、進化速度が高いとされている。この部分の変異を見るためにこれに隣接する部位

の塩基配列を決定して、その配列に基づくプライマーを用いて PCR を行い、繰り返し配列の長さの違いを検出する。PCR と電気泳動で容易に、かつ安価に変異が検出でき、変異が多く、かつ共優性のマーカーであるため、利用価値が高い。京都府農業資源研究センターではキュウリおよびトウガラシのマイクロサテライトマーカーを開発中である。また独立行政法人 野菜茶業研究所でもハクサイ、メロンについて開発中である。これらのマーカーは順次発表され育種に利用されるであろう。

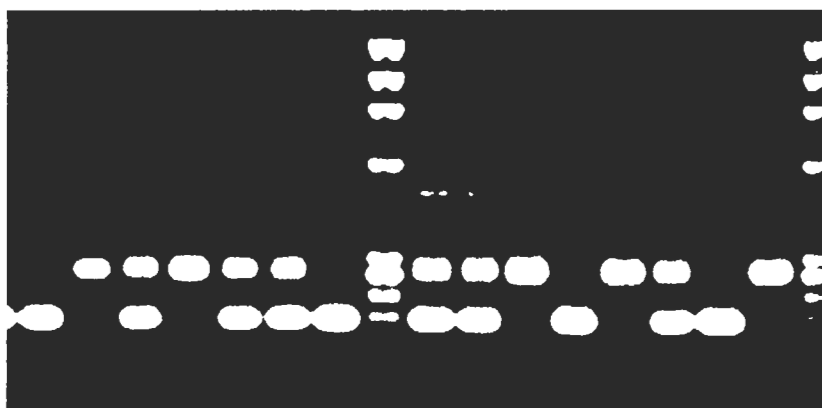


図 1. ハクサイ(Brassica rapa)におけるマイクロサテライト多型の検出

3. 野菜育種における選抜マーカー開発の事例

ピーマンにおける疫病抵抗性遺伝子座の解析

疫病は *Phytophthora* による土壌病害であり、ナス科野菜栽培では常に問題になる。ピーマン、トウガラシではいくつかの抵抗性育種素材があるが、いずれも多因子支配であり、単純な育種がむずかしく、今のところ満足な抵抗性品種はない。宮崎県総合農業試験場では、DNA マーカーを用いて解析し、少なくとも 2 抵抗性遺伝子座が存在することを見つけ、これらに連鎖した DNA マーカーを得た。現在これを用いて育種が進んでいる。またウイルス病であり、以前は TMV のトウガラシ系と呼ばれていた PMMoV については抵抗性遺伝子座に連鎖するマーカーが得られた。

アブラナ科野菜根こぶ病抵抗性の解析

ハクサイやキャベツの根こぶ病は重大な土壌病害であり、著しい場合には産地が壊滅する。抵抗性のハクサイやカブは日本に存在せず、ヨーロッパのカブが抵抗性であることが発見され、それを用いて育種が進み、多くの抵抗性ハクサイ品種が育種された。しかしその後各地でそのハクサイが罹病化した。病原菌を調査すると、各地に存在する病原菌は病原性が異なり、以前より病原性の強い病原菌が現れていると考えられた。独立行政法人野菜茶業研究所によって研究が進み、抵抗性遺伝子座に連鎖するマーカーが取られている。それによると抵抗性遺伝子座は少なくとも 2 座存在する。病原性の弱い従来菌にたいしては第 1 座だけでほぼ十分な抵抗性が得られるが、病原性の強い菌にたいしては 2 座を併せ持つ必要がある。抵抗性カブは種々のものが知られているため、さらに複雑な遺伝を有する可能性がある。いずれにしても連鎖マーカーを用いた抵抗性遺伝子座を集積する育種が必要である。

ナス科野菜の青枯病抵抗性

ピーマンの青枯病はピーマン生産の上で大きな問題である。抵抗性は多因子により、病原菌の青枯病菌は病原性の変異が著しいため、これまで抵抗性品種が作られていない。宮崎県や高知県で抵抗性の遺伝解析が始められている。抵抗性の検定が安定せず、むずかしく、遺伝解析があまり進んでいない。ナスの青枯病抵抗性、野菜茶業研究所で遺伝解析が行われているが、ナス品種間での DNA 多型が乏しく、解析が進んでいない。また育種も台木だけに終わっている。トマトの青枯病についてはアメリカで解析され、いくつかの遺伝子座が明らかになっている。ただし、日本で育種はあまり進んでおらず、やや強い品種が存在するのみである。

メロンのつる割れ病、壊疽斑点病

それぞれ単因子で作用する抵抗性が知られており、連鎖するマーカーが得られている。うどん粉病抵抗性については解析中である。

その他トマトやスイカの糖度などについても連鎖解析が進み、連鎖マーカーが得られている。

4. 選抜マーカー以外の利用

品種識別

野菜では植物の断片や収穫物を見て品種が識別出来ない場合が多く、品種の識別は様々な利用価値がある。イチゴは栄養繁殖性であり 1 品種 1 遺伝子型である。独立行政法人 野菜茶業研究所では最近イチゴの品種識別方法が開発された。へたから DNA を抽出して品種を識別するため、店に並んだ商品から品種が推定できる。権利のかかっている品種の違法生産の摘発に威力を発揮するであろう。識別だけでなしに品種の類縁関係、親子関係を推定することも可能である。野菜ではないが、果樹ではこれまで考えられてきた親子関係がしばしば DNA 判定によって覆されている。その他の自殖性作物は基本的に品種識別が可能である。京都府農業資源研究センターでは来年度からトウガラシについて識別技術を確認する予定である。

一方他殖性野菜では品種内に遺伝的多型が存在するため識別が不可能である。

類縁関係の推定も他殖性野菜ではきわめて難しい。

F1 種子の純度検定

F1 種子を生産する過程では様々なミスがおき、F1 でないものが混入する。メロン、スイカなど人による交配では親株の取り間違いが起こるし、ハチなどにより、親株でない株からの受粉も起きる可能性がある。ダイコンやキャベツなど自家不和合性による採種では自家不和合性が不安定で、しばしば自殖種子が混入する。これらは生産物の均一性を乱し、生産者にとっては大きな問題である。とりわけ、1 粒の種子の値段が高い、メロンやスイカなどでは重大な問題である。従来は種子を播いて、葉や花、実の形質で F1 種子の純度検定をしていたが、時間と手間がかかるし、多くの個体を扱うことは無理である。DNA 判定では一度に多くの個体を扱うことができる上に、ごく少量のサンプルがあればよいので、双葉の時期の植物で判定できるため、たいへん便利である。それぞれの種苗会社で自社の F1 品種の純度検定法を開発している。アブラナ科野菜では経費の関係から、アイソザイム分析が一部でなお使われている。

育種以外への利用 これまで植物生理学や植物病理学の研究では、品種や系統を比較することはあってもそれぞれの品種がどのような遺伝子をもっているかはあまり詳しく検討してこなかった。しかし DNA 多型の利用によってそれぞれの品種の持つ遺伝子座、対立遺伝子が明らかになるので、品種の比較から個々の遺伝子の作用を比較する研究に進むことができる。植物生理学、あるいは植物病理学の研究者とも共同して、DNA 多型解析や連鎖マーカーの成果を大いに利用したい。

5. DNA マーカー開発の問題点

イネなどの普通作物の育種と異なり、野菜育種の大半は民間会社によって行われており、民間会社でも選抜マーカーが開発されているが、開発された選抜マーカーは論文にも発表されず、また特許を取得することが少ないため、特許公報にも載らずに終わることが多い。海外でも同様な傾向である。また大学や農林水産省所属の研究機関が独立行政法人化し、利益追求や産業界への貢献が求められればその傾向は民間会社のみにとどまらないと考えられる。これは科学技術の進歩にとって深刻な問題である。公的性格のある研究機関は積極的に選抜マーカーの開発などの研究成果を発表すべきであろう。

文献

- 杉田 亘 (2002) ピーマン育種における DNA マーカー利用技術の開発。園芸学会雑誌 71 巻 別冊 2 98-99.
- K. Suwabe, H. Iketani, T. Nunome, T. Kage, and M. Hirai (2002) Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1092-1098.
- D. B. Goldstein and C. Schloetterer eds. (1999) *Microsatellites, evolution and applications* Oxford Univ. Press.
- P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 23: 4407-4414.
- T. Hashizume, T. Sato and M. Hirai (1993): Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA(RAPD). *Jpn. J of Breed.* 43: 367-375.
- D. Danesh, S. Aaron, G. E. McGill and N. D. Young (1994) Genetic Dissection of Oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Plant Microbe Interactions* 7: 464-471.
- W. P. Wechter, M. P. Whitehead, C. E. Thomas and R. A. Dean (1995) Identification of a randomly amplified polymorphic DNA marker linked to the *Fom 2* Fusarium wilt resistance gene in muskmelon MR-1. *Phytopathology* 85: 1245-1249.
- S. Baudracco-Arnas and M. Pitrat (1996) A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Theor. Appl. Genet.* 93: 57-64.