

バレイショ育種のための病虫害複合抵抗性系統の育成と マーカー選抜の効率化

森 一幸

The development of multi-pest resistant line and the efficiency of MAS (marker assisted selection)
in potato breeding

Kazuyuki Mori

目 次

緒言	3
第1章 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 <i>HI</i> およびジャガイモYウイルス抵抗性遺伝子 <i>Ry_{chc}</i> を有し、雄性稔性および雌性稔性が高い育種系統「西海35号」の育成	
1) 緒論	7
2) 材料および方法	
(1) 材料	8
(2) 育種方法	9
(3) 栽培特性調査	9
(4) 品質特性調査	10
(5) 病虫害抵抗性調査	10
(6) DNA マーカーバンドの検出	10
(7) 交雑特性調査	10
3) 結果	
(1) 育成経過	10
(2) 生育特性と収量性	10
(3) イモの特性	14
(4) 病虫害抵抗性	15
(5) 「西海35号」の後代系統	16
(6) 「西海35号」およびその後代系統における交雑特性	16
4) 考察	17
第2章 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検出法の開発	
1) 緒論	20
2) 材料および方法	
(1) 材料	21
(2) DNA抽出	21
(3) PCR反応液組成および反応条件	21
3) 結果および考察	23

第3章 5種類の病虫害抵抗性遺伝子に連鎖するDNAマーカーの同時検出が可能なマルチプレックス

PCR法の開発

1) 緒論	25
2) 材料および方法	
(1) 材料	26
(2) DNA抽出およびDNAマーカー検定法	26
(3) ジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定	26
(4) PVYおよびPVX抵抗性検定	26
(5) 疫病抵抗性検定	27
3) 結果	
(1) DNA濃度と個別PCRによる検定	28
(2) マルチプレックスPCR法の開発	28
(3) 異なる鋳型DNA濃度に対する検出感度	28
(4) R1およびPVXマーカーの検出感度の改善	29
(5) 雑種集団の評価と遺伝的分離	29
(6) 選抜個体の抵抗性検定結果	29
(7) 操作時間の比較	29
4) 考察	29
総合考察	33
要約	34
謝辞	35
Summary	36
引用文献	37

緒言

2008年におけるバレイショの作付け面積は日本全体で84,900 haであり、生産量は約274万tであった。作付け面積は1960年の約20万haから約60%減少しているが、ha当たりの収量が向上したため(2008年で32 t/ha)、生産量の減少率は約25%にとどまっている(表1)⁵⁹⁾。北海道の作付け面積は55,200 ha(全体の67%)であり、生産量は213万t(全体の78%)であった。北海道に次いで作付け面積が多いのは九州地方で、作付け面積は10,797ha(2008年)である。主に鹿児島県と長崎県で栽培され北海道産バレイショの端境期にあたる春から初夏(2~6月)に収穫される春作と、初冬(11~12月)に収穫される秋作の二期作で栽培されている。本県におけるバレイショ栽培の記録は1876年以前からあり、1882年頃から春作・秋作の二期作栽培の記録がある⁸⁰⁾。また、本県のバレイショは、1873年から輸出の記録があり、1910年には総生産量の約40%は輸出され、全国の比率(1.6%)を大きく上回り、フィリピン、香港、中国へ輸出されていた。また明治末期以降、国内の都市向けの出荷が徐々に増加し、戦後、バレイショの需要に対応して、本県の作付け面積は1955年中頃から増加が著しく、1979年にはピークの8,570 haに達した。本県のバレイショは市場出荷向け中心に栽培されており、2008年の作付け面積は4,240 ha、生産量は11万tで、全国2位の産地であるとともに、北海道産バレイショの出荷の端境期(4~6月)に全国に向けて出荷できるため、国内産バレイショの周年供給を支える重要な役割を担っている。

国民1人あたりの年間消費量は、1960年頃まで17 kg/年以上であったが(表1)、主食の代用としての役割がなくなり急激に減少した。1974年に最低(12.9 kg/年)になったが、その後、消費量は増加し、1990年以降は17~18 kg/年で推移している。この消費量の増加は、生イモを購入して家庭で調理する消費形態から、加工されたバレイショを購入する消費形態(食の外部化)への変化を伴っている。

「有機農業をはじめとする環境保全型農業に関する意識・意向調査結果」⁵⁸⁾では、「環境に配慮した農産物」(有機農業により生産された農産物および化学肥料、化学合成農薬を通常使用する量や回数から5割以上低減して生産した農産物)の購入に関して、消費者の9割以上、流通加工業者では8割が「現在購入している(取り扱っている)」または「一定条件がそろえば購入したい(取り扱いたい)」という意向を持っている。消費者が「環境に配慮した農産物」を購入したい理由は「安全な農産物だと思うから」で、その割

合は8~9割と最も多く、流通加工業者も同様な理由で7割を越えており、消費者ニーズに応じて流通加工業者の意識も強い。しかし、流通加工業者が取り扱う条件として最も重要と考えているのは「一年通して一定量が安定的に供給されること」で、その割合は6割を超えている。今後、「環境に配慮した農産物」に対するニーズはますます高まることが予想される。一方で、「環境に配慮した農産物」に関して、5割の生産者は「現在、有機農業に取り組んでいないが、条件を整えば取り組みたい」という意向を持っている。また、有機農業に取り組む条件として、「収量・品質を確保できる技術の確立」および「生産コストに見合う価格で取引してくれること」を挙げている。「収量・品質を確保できる技術の確立」として生産者が考える「技術」の一つは、栽培中に発生する病虫害に対する管理であり、その対策として病虫害抵抗性品種の利用がある。農薬散布による予防や防除が不可欠な品種から抵抗性品種への転換は、単に農薬を使用しない栽培というだけでなく、抵抗性品種を軸として栽培体系を大きく転換することが期待できる。これらのことから、消費者の安全志向および生産者のニーズに応えるため、病虫害抵抗性品種は、有機農業を含めた「環境に配慮した農産物」を生産するための重要な要件であり、今後、その必要性はさらに高まることが予想される。

バレイショは同質4倍体で、かつ他殖性を基本とするためヘテロ接合性が高く、複雑な遺伝子構成を有するため交雑後代で表現型の分離が大きい。農業形質(生育特性、収量性)で優れた系統を選抜すると、これを栄養系世代であるイモ(塊茎)で増殖して品種とする。したがって、交配種子数が変異幅となるため、最初に多数の交配種子を確保し、望ましい表現型をいかにして絞り込むかが重要となる。バレイショは栄養系繁殖作物であるとは言え、育種においては種子繁殖作物と同様に交雑育種を主な手法とする。暖地二期作向けバレイショ育種の過程を表2にまとめた。交配を1作目とすると、2作目は実生1次個体選抜、3作目は実生2次個体選抜、4作目は系統選抜、5作目は生産力検定予備試験、6~12作目は生産力検定試験に供試される。実生1次個体選抜では、イモの肥大開始時期が早い個体を選抜し、実生2次個体選抜では、イモの外観、肉色、二次生長の発生程度など主に質的形質で選抜する。バレイショは1作当たりの増殖率が低いため増殖と選抜を並行して行い、収量性のような量的形質の選抜には長期の栽培年限を要する。また、バレイショを侵す疫病、そうか病、ジャガイモシストセンチュウ、青枯病等の各種

表1 国内のバレイショ需給量

年次	栽培面積 (ha)	単収 (kg/10a)	国内生産 量 (1,000t)	貿易 (1,000t)		国内 消費 仕向量 (1,000t)	需要量 (1,000t)					国民1人 当たりの 年間 消費量 (kg)
				輸入量	輸出量		飼料	種子	加工	消耗	粗食	
1960	204,300	1,760	3,594	-	22	3,572	547	328	1,007	55	1,635	17.5
1965	212,500	1,910	4,056	-	12	4,044	601	395	1,382	129	1,537	15.6
1970	158,800	2,270	3,611	-	6	3,605	396	298	1,365	156	1,390	13.4
1975	139,400	2,340	3,216	28	-	3,229	151	216	1,168	241	1,453	13.0
1980	125,600	2,770	3,421	211	-	3,632	91	224	1,417	160	1,740	14.9
1985	130,100	2,860	3,727	200	-	3,927	60	245	1,582	178	1,862	15.4
1990	115,800	3,070	3,552	392	2	3,942	47	240	1,280	248	2,127	17.2
1995	104,400	3,220	3,365	682	1	4,046	32	212	1,307	259	2,236	17.8
2000	94,600	3,060	2,898	820	3	3,715	17	178	1,023	209	2,288	18.0
2005	86,900	3,170	2,752	807	1	3,558	8	165	1,058	221	2,106	16.5

表2 日本の暖地二期作地域向けバレイショの育種過程

年	作型	選抜試験	供試個体数	供試数	備考 (選抜指標)
1年目	春作	交配			少なくとも片親にジャガイモシストセンチュウ抵抗性を有する品種系統を利用。1作当たり約300,000粒の交配種子を確保。
	秋作	実生1次個体選抜試験	14000粒	1	塊茎の形、肉色
2年目	春作	実生2次個体選抜試験	7000個体	1	熟性、生育特性、塊茎の形、大きさ、目の深さ、ストロンの長さ
	秋作	系統選抜試験	500系統	8	熟性、生育特性、塊茎の形、収量、でん粉価、大きさ、目の深さ、ストロンの長さ DNAマーカーによる病虫害抵抗性の判定
3年目	春作	生産力検定予備試験	50系統	30	系統選抜試験と同様な形質で選抜。圃場での病虫害抵抗性検定および調理検定の評価
3-6年目	秋作	生産力検定試験	10系統	40株 ×3反復	3反復で実施。生育特性、収量性、でん粉価、調理特性、加工適性を評価 病虫害抵抗性検定を実施
4-5年目		系統適応性試験	5系統	4 圃場	生産力検定試験と同様に実施。普及が想定される4県で実施。
6年目		地域適応性試験	3系統	2 圃場	生産力検定試験と同様に実施。普及が想定される長崎県内主産地の生産者圃場で実施
7年目以降		品種登録	1系統		品種名および農林番号が付与される。

病害虫に対する抵抗性検定は、系統数が少なくなつた生産力検定予備試験以降併行して実施される。北海道では交配から約10年を経て約15万粒の交配種子から1つの割合で新品種が育成されている。暖地二期作栽培地域における育種過程は、北海道における育種過程と基本的には同じであるが、春作・秋作の年2回の栽培が可能であり、育種の早期世代（実生1次個体選抜から生産力検定予備試験）の選抜に要する期間は短縮されるために品種登録までの育種年限が異なり、最短で交配から7年（13作目）以降で品種登録申請となる。

育種の第1段階となる交配において、交配親の雄性稔性および雌性稔性の有無は重要な問題である。なぜなら育種家は抵抗性遺伝子などの有用形質を持つ交配親が不稔であるという問題にたびたび直面する。それは、「メーカー」や「男爵薯」から花粉がほとんど出ないように、普通バレイショの多くが雄性不稔性を示すからである。同様に、暖地二期作向け品種の「デジマ」や「ニシユタカ」も花粉が形成されないため、母親のみに利用される。青枯病に対して強い抵抗性を示す「メイホウ」⁷¹⁾を花粉親として1994年から1997年にかけて6組合せ570花に対して交配が行われたが、結実数はわずか11果（結実率2%）で、得られた種子数は159粒であった。また、その後代系統である「西海33号」を花粉親として、2004年から2005年にかけて9組合せ1,244花に交配が行われたが、結実数は61果（結実率5%）で、得られた種子数は2,116粒に過ぎない。このように、花粉が形成されない場合には交配親の選択が制限され、花粉稔性が低いと目的とする交配種子を得るために授粉花数が多くなり非効率となる。

Grun *et al.*²⁴⁾は、普通バレイショの細胞質ゲノムには少なくとも7つの雄性不稔性を引き起こす遺伝因子（[ASF], [Fm], [In], [SM], [Sp], [TA] および [VSA]）が存在し、核ゲノムが7つの優性遺伝子（ASF, Fm, In, SM, Sp, TA および VSA）のいずれか一つでも持つとそれぞれの遺伝子に応じた異常な表現型を示し、雄性不稔となることを明らかにした。細胞質ゲノムを構成するのは葉緑体DNAとミトコンドリアDNAの2つである。栽培バレイショには葉緑体DNAの制限酵素分析によってT, A, S, CおよびWの5つの葉緑体DNA型が知られており²⁵⁾、さらにマイクロサテライトマーカーによってCとW型はそれぞれ多くの異なるタイプに細分されている⁷⁵⁾。我が国で育成された農林登録品種のうち農林60号（「はるか」）までを見ると、43品種がT型葉緑体DNAを持つ。歴史的に重要な品種「Garnet Chili」, 「Beauty of Hebron」, 「Irish Cobbler」, 「Early Rose」, 「Burbank」, 「Early Ohio」, 「Bliss

Triumph」, 「Green Mountain」, 「Rural New Yorker No. 2」および「White Rose」もすべてT型葉緑体DNAを持つ¹⁸⁾。また、ヨーロッパの56品種のうち44品種⁶⁴⁾、178品種のうち151品種⁶⁵⁾、あるいは47%のドイツ品種⁴²⁾がT型葉緑体DNAを持つと報告されている。一方、栽培バレイショのミトコンドリアDNAは、Lössl *et al.*⁴¹⁾による制限酵素分析から、 α , β , γ , δ および ϵ の5型に類別されている。普通バレイショ144品種を調べると、46品種は α 型、79品種は β 型、19品種は γ 型であったと報告している。また、 β 型ミトコンドリアDNAを持つものはT型葉緑体DNAを持ち、 α , γ および δ 型ミトコンドリアDNAを持つものはW型葉緑体DNAを持つ。このような葉緑体DNA型とミトコンドリアDNA型の組み合わせから識別される細胞質ゲノムは、普通バレイショ品種では少なくともT/ β , A/ ϵ , S/ ϵ , W/ α およびW/ γ 型の5種類がある（保坂 未発表）。細胞質雄性不稔因子はおそらくミトコンドリアDNAに存在するが³⁰⁾・⁴²⁾、 β 型ミトコンドリアDNAを持つものは、これまでのところすべてT型葉緑体DNAをもつことから⁴²⁾、T/ β 型細胞質ゲノムを持つものは細胞質雄性不稔因子を持つと理解できる。T/ β 型細胞質ゲノムは野生2倍種 *S. tarijense* (Spooner *et al.*⁷⁴⁾により *S. berthaultii* Hawkes に含まれた) に由来し²⁷⁾、上述のとおり普通バレイショにおいて最も多数を占めており³¹⁾・⁸⁵⁾・⁶⁴⁾・¹¹⁾・⁶⁵⁾・⁴²⁾、Grun *et al.*²⁴⁾が示したさまざまなタイプの雄性不稔性を引き起こす。このため、T/ β 型細胞質ゲノムによって引き起こされる細胞質雄性不稔は育種上避けられない問題である。一方、S/ ϵ 型は、アンデス原産栽培2倍種 *S. phureja* に由来する細胞質ゲノムで、「インカのみざめ」と「インカのひとみ」がS/ ϵ 型を持つ。花粉稔性は一般に高い。W/ α 型は、メキシコ産野生6倍種 *S. demissum* Lindl. に由来する細胞質ゲノムである。*S. demissum* は疫病抵抗性遺伝子を持つことから育種で頻繁に使われた⁶⁹⁾・⁶⁸⁾・⁶³⁾。普通バレイショとの交雑において、*S. demissum* を母親とすると容易に5倍雑種種子が得られる⁸⁾・¹⁵⁾・³⁵⁾。また、得られた5倍雑種は花粉を産出するものの、普通バレイショとの戻し交雑において花粉親としては機能せず、母親としてのみ使われ、その後代でも同様の現象を示す¹⁷⁾。したがって、過去に *S. demissum* が使われるとW/ α 型細胞質ゲノムを持つことになり、農林登録品種のうち「ヨウラク」, 「リシリ」, 「チヂワ」, 「シレットコ」, 「セトユタカ」, 「トヨアカリ」, 「メイホウ」, 「エゾアカリ」, 「ムサマル」, 「花標津」, 「ナツブキ」, 「こがね丸」, 「キタムラサキ」, 「ノーザンルビー」および「シャドークイーン」がW/ α 型細胞質ゲノムを持っている。このように、細胞質ゲノムによって花粉稔性や

交雑特性が異なるので、細胞質ゲノム型を明確にした上で有用遺伝子を集積させた育種素材は、利用価値の高いものとなり得る。

バレイショ育種における病虫害抵抗性の付与は重要な課題である。バレイショに寄生するシストセンチュウは、ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*) とジャガイモシストセンチュウ (*G. pallida*) の2種類が知られており、ヨーロッパ、南米各国など50カ国以上で分布が認められている¹⁰⁾。我が国では、1972年に北海道でジャガイモシストセンチュウの発生が確認され、その後、1992年に長崎県でも発生が確認された。さらに2003年に青森県、2007年に三重県でも発生が確認され、全国的に広がっており、全国の発生面積は10,000 haに達し、さらに増加傾向にある。日本で発生しているシストセンチュウはジャガイモシストセンチュウのパソタイプ (レース) Rolのみであり、他の種およびパソタイプは確認されていない⁴⁰⁾。種イモ栽培地域では、一旦、発生が確認されると種イモの外部への持ち出しが許されない⁵⁴⁾。本センチュウのシスト中には200~500個の卵があり、バレイショの根から分泌された物質に反応して孵化し、幼虫が根に侵入する。この卵は経年で約70%が活性を維持し、孵化するまで10年以上も生存してバレイショの根を待ち続ける。根に侵入した幼虫は、ホルモン様物質を分泌してセンチュウ頭部付近に巨大細胞を形成させ、ここから栄養を吸収して成長する。根の内部に寄生した幼虫が養分を吸収するとバレイショの生育は停滞し、高密度圃場では下葉から枯れ上がり、収量は減少する。雌成虫は頭部のみを根内に残し、球状の虫体の大部分を根面に露出した状態になる。交尾後の雌成虫は体内に卵を形成し、体表は徐々にタンニン化して死に、直径約0.6 mmのシストとなる。バレイショ1作でジャガイモシストセンチュウは1世代を経過するため、暖地二期作栽培地域では年に2世代が経過することとなり、北海道を含めた寒地一期作栽培地域よりセンチュウ密度の年間増加率が高い⁷⁹⁾。本センチュウ対策としては、抵抗性品種の栽培が有効である。発生圃場に抵抗性品種を栽培すると、卵が孵化して根に侵入するまでは罹病性品種と同じであるが、その後、根中に巨大細胞を形成できないため、幼虫は餓死する。このようにしてシスト内の卵を孵化させ、幼虫をすべて死滅させることから、土壌中のセンチュウ密度は大幅に低下する。抵抗性品種はセンチュウから直接的被害を避けることのみならず、圃場を浄化することができることから抵抗性品種の育成が急務である。*S. tuberosum* ssp. *andigena* のCPC1673系統から導入されたジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* は、パソタイプ Rol に対して高

い抵抗性を示すため³³⁾、新品種を育成する上でその付加は必須である。

バレイショは、イネやコムギと異なり栄養系繁殖により増殖し、種イモが生産され、一般栽培へ利用される。種イモがウイルスに感染すると、その当代、さらに次代にウイルスが蔓延し大きな被害をもたらす。日本では現在12種のウイルスの発生が確認され⁴⁴⁾、特にジャガイモYウイルス (PVY) の発生が他のウイルスに比較して多い。PVYはバレイショにモザイク病、塊茎えそ病など被害の大きい病害を引き起こす重要な病原ウイルスである。本ウイルスはアブラムシにより伝搬されるため、対策としてウイルスに感染していない健全な種イモを使用するとともに、アブラムシに対する薬剤防除が実施されている。佐山ら⁷²⁾は、長崎県における一般農家圃場の外観上健全な約2,500株のバレイショから採集した葉の約3割からELISA法によりPVYの感染を確認している。また、PVYえそ系統のバレイショへの感染は病徴が不明瞭で、生産者が圃場で感染株を抜き取ることは難しい。このため、PVYに感染した種イモが県内外に移出されると、広範囲にウイルスが拡大し、本ウイルスによる黄斑えそ病をタバコに引き起こす⁵⁶⁾。井上・坂口³⁴⁾はPVYに対する耕種的対策および薬剤の散布時期等について研究し、PVYのような非循環型、非永続型伝搬によるウイルス病に対しては殺虫剤散布の防除効果が低いことを報告している。最も効果的なPVY対策は抵抗性品種の栽培であるが、現在、暖地二期作向けPVY抵抗性品種はない。PVY抵抗性遺伝子として、*S. stoloniferum* Schlecht. et Bché. 由来の *Ry_{st}*¹⁴⁾、*S. tuberosum* ssp. *andigena* 由来の *Ry_{tdg}*⁵⁵⁾ および *S. chacoense* Bitt. 由来の *Ry_{chc}*¹¹⁾ の3つの抵抗性遺伝子が知られており、いずれもPVYに対して非特異的な強度抵抗性 (Extremeあるいはimmune抵抗性と呼ばれる) を示す。

これまで、多くの病虫害抵抗性検定は、汚染圃場での検定や無防除圃場での栽培による検定、さらに温室内での接種検定により行われるため、抵抗性の判別は多くの時間を要するとともに、圃場の広さにも制限を受ける。一方、DNAマーカーを利用した選抜 (Marker-assisted selection, MAS) は、抵抗性検定のための圃場や特別の施設を必要とせず、検定個体の生育段階や、温度、湿度、光強度等の生育環境に左右されることなく、短時間で正確に判定できる。また、育種の早期世代からの検定が可能となり、効率的に抵抗性遺伝子を有する個体を選抜できる²⁾・⁸³⁾。*S. chacoense* 由来のPVY抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* は、日本の主要品種「コナフブキ」で同定されたもので³²⁾、第9番染色体の最末端に座乗している⁷⁰⁾。さらに *Ry_{chc}* と組み換え頻度16.3%で連鎖している

RAPD マーカー38-530 が見ついている³²⁾。しかし、DNA マーカー検定を実際のバレイショ育種事業に組み込む場合には、いくつかの問題点がある。まず、各系統に対する DNA マーカーの有無を判定するためには、系統ごとに DNA 抽出が必要になる。2つ目は、開発された各 DNA マーカーはそれぞれにプライマーセットの濃度やアニーリング温度などの PCR 条件が異なるため、DNA マーカーごとに検定を行う必要がある。このため、利用できるマーカーの数が増えるに従い、比例的に検出時間とコストが増加することである。DNA 抽出法の簡易化については、Hosaka²⁹⁾がバレイショの葉から簡易に DNA 抽出が可能なる「1分間 DNA 抽出法」を開発し、森ら⁴⁹⁾・⁴⁸⁾がその有効性を報告している。イモからの簡易な DNA 抽出法についても、森・田宮⁴⁷⁾が報告している。また、DNA 自動抽出装置も市販されており、DNA 抽出のための労力は削減された。しかし、利用できる DNA マーカー数の増加に伴う、検出時間とコストの増大は、育種現場での経済性、選抜規模、効率性などを考慮すると重要な問題である⁸³⁾。Gebhardt *et al.*²³⁾は、バレイショ育種における抵抗性個体の選抜に DNA マーカーを利用した最初の例を報告し、さらなる検定の効率化のためには、マルチプレックス PCR 法の利用を提案している。マルチプレックス PCR 法は、複数のプライマーセットを一つの PCR 反応にまとめる手法で、1回の PCR 反応で複数の DNA マーカーを同時検出することができる。マルチプレックス PCR 法は、遺伝子組み換え作物の判定¹⁶⁾・⁶⁶⁾、コムギ高分子グルテインサブユニット遺伝子の検出⁴⁵⁾、あるいはウイルス検出⁴³⁾などさまざまな分野

で利用されており、低コストで効率的な判定法であることが明らかにされている¹⁹⁾・⁴³⁾・⁸²⁾。したがって、バレイショ育種におけるマルチプレックス PCR 法の導入は、DNA マーカーによる選抜の効率化に大きく貢献できる技術であると考えられる。

本研究では、良食味で知られる 2 倍性栽培品種「インカのめざめ」の倍加個体に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}* を付与し、かつ花粉稔性の高い、暖地二期作向けバレイショ品種育成に利用可能な育種系統「西海 35 号」を育成した(第 1 章)。さらにこれを利用した交雑後代において、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 (PVX) 抵抗性遺伝子 *Rx1*、および疫病真性抵抗性遺伝子 *R1* と *R2* に連鎖する 4 つの DNA マーカーの同時検出が可能なるマルチプレックス PCR 法を開発した(第 2 章)。第 3 章では、第 2 章で開発したマルチプレックス PCR 法を改善し、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1* と疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* を検出する DNA マーカーは、精度と汎用性の高いマーカーに代え、PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* の DNA マーカーを新たに加え、さらに、すべてのバレイショで有する顆粒性澱粉合成酵素遺伝子 *GBSS* の DNA マーカーを付加することにより、PCR 反応の正否を確認のためのポジティブコントロールを加えた。総合考察では、本研究で得られた病虫害複合抵抗性系統「西海 35 号」およびマルチプレックス PCR 法のバレイショ育種における意義について議論した。

第 1 章 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1* およびジャガイモ Y ウイルス抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* を有し、雄性稔性および雌性稔性が高い育種系統「西海 35 号」の育成

1) 緒論

北海道を中心とする一期作栽培地域では、圧倒的な知名度を誇る「男爵薯」や「メイクイン」が栽培されているが、西南暖地を含む暖地二期作栽培地域では、早期肥大性を示し、収量の高い「ニシユタカ」や「デジマ」が栽培されている。食味は「デジマ」が「ニシユタカ」に比べ優れるが、市場ではほとんど価格差がないのが現状である。また、両品種はジャガイモシストセンチュウやウイルス病に対する抵抗性を持たない。そこで、これら既存品種と明らかに異なり、良食味で、病虫害抵抗性を有する暖地二期作向け品種の育成が望まれる。

これまで、良食味の 4 倍性品種として、「キタ

アカリ」(1986 年) や「デジマ」(1971 年) など数多く育成されている。病虫害抵抗性品種として、国内初のジャガイモシストセンチュウ抵抗性品種の「トヨアカリ」(1985 年) が育成され、それ以降「キタアカリ」、「とうや」(1992 年) などが育成されている。また、PVY 抵抗性品種として「コナフブキ」(1981 年) や「サクラフブキ」(1994 年) が育成されている。

「インカのめざめ」は、アンデス原産栽培バレイショの核ゲノムを 75% 有し、*S. phureja* に由来する細胞質ゲノム (*S/e* 型) で構成される雑種後代から長日条件でも塊茎を形成する系統として選抜された日本初の 2 倍性品種である⁵³⁾。本品種は、通常の 4 倍性品種に比べイモが小さく低収

であるが、良食味であるため 2001 年に品種登録された。本品種は、カロテノイド系色素のゼアキササンチン含有し、既存品種とは異なる独特の風味と食味を有する⁵³⁾。イモの休眠期間が極めて短く、暖地二期作地域での栽培は可能であるが、他品種に比べて生育適温範囲が狭いため、生育期間が短い暖地二期作では収量が低くなる。また、ジャガイモシストセンチュウやPVYに対する抵抗性はなく、特にPVYに感染すると激しいモザイク症状を示す。しかし、「インカのめざめ」は良食味で青枯病に強いなど優れた特性を有していることから、ジャガイモシストセンチュウやPVYに対する抵抗性を付与した4倍体育種素材が作出できれば、暖地二期作向け品種育成への利用価値が高いと考えられる。

このような背景から、向島ら⁵⁴⁾は「インカのめざめ」と4倍体品種との交配を実施したが、交配種子がほとんど得られなかったことを報告している。また向島ら⁵⁴⁾は「インカのめざめ」をチューバーディスク培養法³⁷⁾により倍加処理して「TD0101」を作出し、花粉稔性の回復、休眠期間の延長などの特性変化を確認し、4倍性品種との交配種子が得られたことを報告した。

本章では、2倍性品種の「インカのめざめ」を倍加処理した4倍体系統の「TD0101」を母本とし、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子

HI と PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* を持つでん粉原料用品種「サクラフブキ」を父本として交配し、収量は暖地二期作向けの主要品種に比べて低い、良食味で、*HI* および *Ry_{chc}* を供与でき、さらに高い雄性稔性および雌性稔性を有する育種系統「西海35号」を育成した。以下に、その育成経過と特性について述べる。

2) 材料および方法

(1) 材料

「西海35号」の父本系統は、北海道立北見農業試験場(現:地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部北見農業試験場)(以下「北見農業試験場」)で育成され、ドイツの品種「ツニカ」由来のジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* と *S. chacoense* 由来の PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* を持つでん粉原料用品種「サクラフブキ」⁵⁶⁾であり、母本系統は独特の食味とカロテノイドを含み青枯病抵抗性を有する「インカのめざめ」⁵³⁾をチューバーディスク培養法³⁷⁾により倍加処理した4倍体の「TD0101」⁵⁴⁾であった(図1)。本研究で供試した他の品種・系統は表3に示した通りである。なお、これら供試品種・系統の葉緑体DNA型ならびにミトコンドリアDNA型はそれぞれ Sukhotu *et al.*⁷⁵⁾ および Lössl *et al.*⁴²⁾ の方法により保坂(未発表)によって決められた。

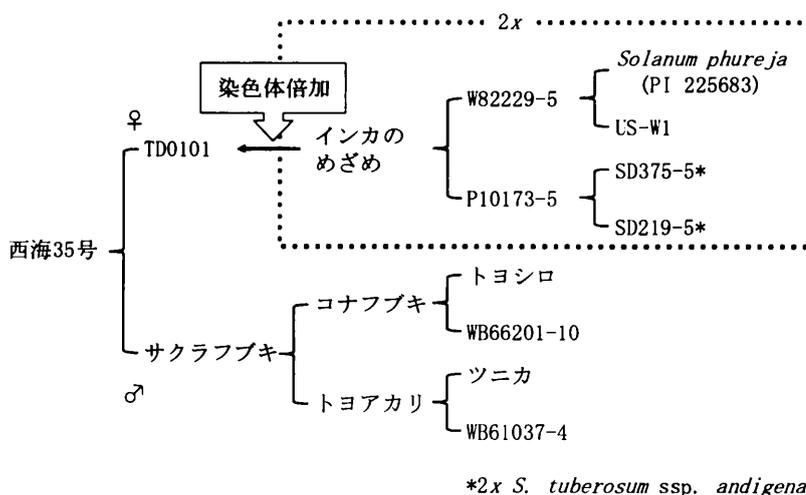


図1 西海35号の系譜

表3 本研究で利用した品種および育成系統

品種系統名	育成年	細胞質ゲノムのタイプ ²⁾	交配組み合わせ		PVY 抵抗性 (Ry_{chc})	
			♀	♂	表現型 ³⁾	マーカー
デジマ	1971	T/b	北海31号	ウンゼン	S	-
ニシユタカ	1978	T/b	デジマ	長系65号	S	-
Pike ¹⁾	1995	T/ β	Allegany	Atlantic	S	-
アイユタカ	2003	T/ β	デジマ	長系108号	S	-
春あかり	2002	T/b	T8973-20	普賢丸	S	-
北海56号	-	W/g	WB60139-3	北海44号	ND	-
西海35号	-	S/e	TD0101	サクラフブキ	R	+
西海37号	-	S/e	西海35号	西海33号	R	+
西海38号	-	T/b	ニシユタカ	西海35号	R	+
西海39号	-	W/a	愛系125	西海35号	R	+
長系124号	-	T/b	愛系90	春あかり	ND	-
長系131号	-	S/e	西海35号	西海33号	R	+
愛系172	-	T/b	愛系147	西海35号	ND	+
T04204-13	-	(W/a)	愛系128	西海35号	ND	+
T03097-19	-	T/ β	アイユタカ	北海87号	ND	+
T05003-1	-	A/e	V2	春あかり	ND	-
10H15	-	S/e	西海35号	Pike	ND	+
10H16	-	S/e	西海35号	Pike	ND	+
10H17	-	S/e	西海35号	Pike	ND	+

1) アメリカ育成品種

2) 葉緑体DNAタイプ/ミトコンドリアDNAタイプ: Sukhotu *et al.* (2004) および Lössl *et al.* (2001)の手法により決定された。

3) S=感受性, R=抵抗性, ND=未検定

(2) 育種方法

長崎県総合農林試験場愛野馬鈴薯支場(雲仙市愛野町)(現:長崎県農林技術開発センター,以下「愛野支場」)において,常法の育種法(緒言および表2参照)に従い,春作マルチ栽培,秋作普通栽培で行った.系統選抜試験において,ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 HI および PVY 抵抗性遺伝子 Ry_{chc} の有無を,これらに連鎖する DNA マーカー PCN⁷⁷⁾ および RAPD マーカー 38-530³²⁾ を用いて推定した. PCN マーカー検出法は田中・小村⁷⁷⁾, RAPD マーカー38-530の検出は Hosaka *et al.*³²⁾ に従った.

(3) 栽培特性調査

栽培特性調査は愛野支場における慣行基準に従い,春作マルチ栽培では2005年から2010年の6カ年の平均値,秋作普通栽培では2005年から2009年の5カ年の平均値を二期作栽培の主要品種「デジマ」および「ニシユタカ」と比較した.特性調査における10a当たりの施肥量は,Nが12.6 kg, P_2O_5 が11.2 kg, K_2O が11.2 kg および MgO が2.8 kg とした.植え付け時期は,春作マルチ栽培では2月上旬,秋作普通栽培では9月上旬であり,いずれも畦間65 cm,株間25 cmで種イモを植え付け,収穫時期は,春作マルチ栽培では5月中旬,秋作普通栽培では11月下旬であ

った。春作マルチ栽培では、植え付け後に透明ポリフィルムを被覆した。春作マルチ栽培では30g以上、秋作普通栽培では40g以上を上イモとし収量を求めた。でん粉価(%)は、(比重-1.05)×214.5+7.5で算出した。

(4) 品質特性調査

食味調査は、蒸しイモで実施し、食味が「良」を5、「不良」を1とする5段階評価で行い、「デジマ」を「やや良」(4)とした相対的評価を行った。

カロテノイド系色素量($\mu\text{g}/100\text{g}$ 生イモ)は、Kobayashi *et al.*³⁶⁾に従い、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法により測定した。

(5) 病虫害抵抗性調査

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定は、北見農業試験場で圃場検定により実施され、PVY抵抗性検定は北海道立中央農業試験場(現:地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部中央農業試験場)で2006年から2007年にPVY⁰系統およびPVY^g系統を用いて接種検定により実施された。青枯病、そうか病、疫病に対する抵抗性検定は慣行法に従い、2004年から2009年にかけて愛野支場で実施した。

(6) DNA マーカーバンドの検出

供試DNAサンプルは、パレイシヨの生鮮葉(5×5mm程度)からDNA自動抽出システム(KURABO製SH-48, CS-16およびPI-80Xから構成される)を用いて抽出した。

竹内ら⁷⁶⁾が開発したジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子HIを密に挟む連鎖マーカーN146およびN195、およびPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} を密に挟む連鎖マーカーRy186およびRy364(マーカーの詳細については第3章緒論を参照)の検出には、それぞれ2つのDNAマーカーに加え、ポジティブコントロールとして、すべての個体で検出される顆粒性澱粉合成酵素遺伝子GBSSを増幅するDNAマーカーGBSSを含めたマルチプレックスPCR法を行った。PCR反応液組成は、2 μl のDNA溶液(濃度約5ng/ μl)、5 μl のAmpdirect® Plus(島津製作所)、0.25 unitsのTaq DNA polymerase(NovaTaq™ Hot Start DNA Polymerase, Novagen®, USA)、最終濃度0.3 μM になるように各プライマーセット(表4)をそれぞれ加え、滅菌水により全量を10 μl とした。PCR反応には、サーマルサイクラー(Veriti™ 96 well, アプライドバイオシステムズ)を用い、まず、熱変性を95°Cで10分間処理して酵素の活性化を行い、その後、94°Cで30秒間の熱変性、55°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで1.5分間の伸長反応を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返した後、さらに伸長反応を72°Cで5分間行った。

さらに第3章に述べる、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子HI、PVY抵抗性遺伝子

Ry_{chc} 、PVX抵抗性遺伝子 $Rx1$ 、ジャガイモ疫病真性抵抗性遺伝子RIおよびR2を識別するDNAマーカーを同時検出可能なマルチプレックスPCR法でもマーカーバンドの有無を調査した。

いずれもPCR反応後の増幅DNA産物は、1.4%アガロースゲルを用いた電気泳動法により分離された。

(7) 交雑特性調査

花粉はアセトカーミン溶液により染色し、染色率(=100×染色された花粉数/全体の花粉数)を算出した。

交雑試験は常法に従い、結実率(=100×果実数/授粉花数)および果実当たりの種子数を調査した。

3) 結果

(1) 育成経過

2002年5月に愛野支場において、「TD0101」の22花について「サクラフブキ」の花粉を授粉し、13果実から1,007粒の交配種子を得た。2002年9月に温室内で400粒を播種して実生(F₁)個体を養成し、イモを形成する159個体を選抜した。2003年2月に圃場において、159個体から各1個のイモを植え付け(実生2次個体選抜試験)、肉色が橙黄肉色を呈する14個体を選抜した。同年9月の系統選抜試験において農業形質(生育特性および収量性)を調査するとともに、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子HIおよびPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} の有無をDNAマーカーPCNおよびRAPDマーカー38-530を用いて推定した(図2)。この結果選抜された2系統を2004年春作の生産力検定予備試験に供し、農業形質に優れ良食味の「T02128-14」を選抜した。2004年秋より生産力検定試験および現地適応性試験などを繰り返す。2005年には「長系126号」の系統番号を付し、さらに2006年2月より「西海35号」を付して2009年まで系統適応性試験などを実施した。

(2) 生育特性と収量性

2005年から2010年にわたる「西海35号」の主要特性を表5および6に示す。「デジマ」に比べ、出芽期は春作マルチ栽培では1日早く、秋作普通栽培では3日遅かった。草型はやや直立していた(図3A)。収穫時の茎葉の黄変程度は「デジマ」より同等もしくはやや早かった。花色は紫系であった(図3B)。茎長および茎数は「デジマ」と同等であり、「ニシユタカ」に比べると茎長は春・秋作のいずれも有意に長かった。

「西海35号」の上いも収量は、春作マルチ栽培で331kg/a、秋作普通栽培で185kg/aとなり、「デジマ」のそれぞれ416kg/aと271kg/a、「ニシユタカ」のそれぞれ419kg/aと183kg/aに比べかなり劣っていた。株あたり上いも数は、春作マルチ栽培では6.2個で、「デジマ」の4.7個や

表4 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子H1およびジャガイモYウイルス抵抗性遺伝子Ry_{chc}を検出する診断マーカー(竹内ら2009)

標的遺伝子	マーカー	プライマー配列(5' - 3')	大きさ(bp)
<i>H1</i>	N146	N146-17 (AAGCTCTTGCCCTAGTGCTC)	506
		N146-22 (AGGCGGAACATGCCATG)	
<i>H1</i>	N195	N195-09 (TGGAATGGCACCCTACTA)	337
		N195-06 (CATCATGGTTTCACTTGTCAC)	
<i>Ry_{chc}</i>	Ry186	RY186-11 (TGGTAGGGATATTTTCCTTAGA)	587
		RY186-12 (GCAAATCCTAGGTTATCAACTCA)	
<i>Ry_{chc}</i>	Ry364	RY364-14 (CTATTATAAGTCTGGTACTAGGACG)	298
		RY364-19 (GGCTATATGTTCAATGAATTCATGCTAA)	
GBSS	GBSS	GBSS-01 (ATGGCAAGCATCACAG)	981
		GBSS-02 (CAAACTTTAGGTGCCTC)	

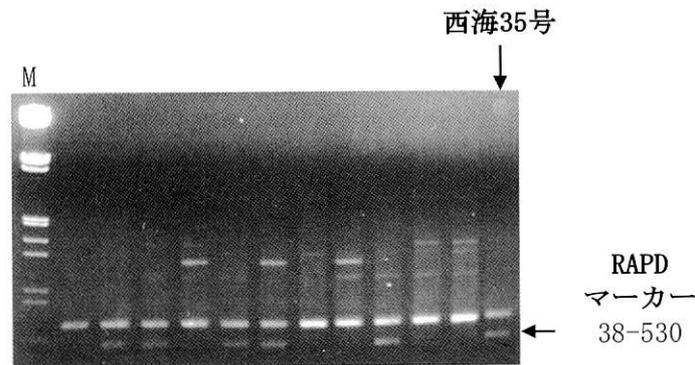


図2 PVY抵抗性遺伝子に対するRAPDマーカー38-530を利用した雑種集団T02128の評価

注1) M : サイズマーカー (λ DNA *Hind*III/*Eco*RI double-digests)

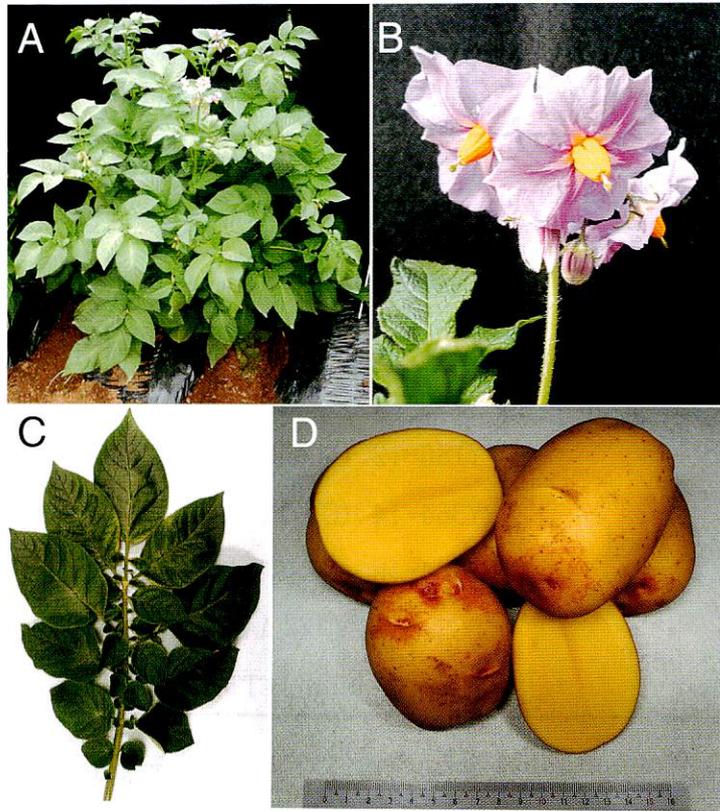


図3 「西海35号」の形態

(A)植物体, (B)花房, (C)葉, (D)塊茎

表5 西海35号の形態的形質および生育特性(2005-2010)

特性	作型	西海35号	デジマ	ニシユタカ
出芽期	春作	3月16日	3月17日	3月19日
	秋作	9月28日	9月25日	10月1日
草性	春作	やや直立性	やや直立性	直立性
	秋作	やや直立性	直立性	直立性
茎長 (cm)	春作	51±5.8 a	50±5.0 a	40±2.7 b
	秋作	39±4.5 a	36±3.9 ab	28±7.0 b
茎数(本/株)	春作	1.8±0.3 a	1.6±0.2 ab	1.4±0.2 b
	秋作	2.2±0.4 a	2.5±0.4 a	1.9±0.5 a
休眠期間 (日)	春作	60±8.0 a	82±4.1 b	106±4.1 c
	秋作	86±6.7 a	95±2.6 ab	100±2.8 b
花色		紫色	白色	白色
塊茎の形		短卵形	短卵形	短卵形
目の深さ		浅	やや浅	やや浅-中
皮の粗滑		滑	やや滑	中
皮色		淡黄	淡ベージュ	淡ベージュ
目の色		赤	淡ベージュ	淡ベージュ
肉色		明黄	淡黄	淡黄

同一文字は、チューキー検定において、5%水準で有意差がないことを示す。

表6 西海35号の収量特性

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	平均値
A) 春作マルチ栽培(2005-2010)							
1) 上いも数(個/株)							
西海35号	7.4±0.2 a	6.7±0.5 a	7.7±0.0 a	4.9±0.2 a	5.5±0.1 a	5.2±0.1 a	6.2±1.1
デジマ	4.8±0.1 b	5.9±0.2 ab	5.9±0.2 b	4.3±0.3 a	4.0±0.1 b	3.2±0.1 b	4.7±1.0
ニシユタカ	4.9±0.1 b	5.1±0.1 b	5.4±0.3 b	4.7±0.2 a	4.7±0.2 c	4.0±0.2 c	4.8±0.4
2) 平均1個重(g)							
西海35号	82±2 a	80±5 a	87±2 a	68±1 a	104±7 a	93±4 a	86±11
デジマ	139±5 b	132±4 b	144±8 b	112±14 b	164±7 b	170±7 b	144±19
ニシユタカ	125±5 c	155±2 c	161±2 c	114±4 b	157±10 b	151±6 c	144±18
3) 上いも重(kg/a)							
西海35号	376±5 a	333±9 a	413±7 a	208±4 a	362±27 a	295±5 a	331±66
デジマ	409±18 a	477±21 b	523±16 b	293±38 ab	456±26 b	337±20 ab	416±80
ニシユタカ	375±24 a	483±6 b	534±21 b	330±29 b	421±32 ab	370±8 b	419±70
4) でん粉価(%)							
西海35号	15.0±0.3 a	14.7±0.4 a	14.9±0.1 a	13.2±0.3 a	16.3±0.6 a	15.8±0.1 a	15.0±1.0
デジマ	10.8±0.5 b	11.1±0.2 b	11.5±0.1 b	11.2±0.4 b	11.8±0.1 b	12.0±0.2 b	11.4±0.4
ニシユタカ	10.4±0.3 b	11.1±0.4 b	10.6±0.1 c	10.8±0.5 b	11.4±0.6 b	12.0±0.3 b	11.1±0.5
B) 秋作普通栽培(2005-2009)							
1) 上いも数(個/株)							
西海35号	3.3±0.2 a	3.4±0.3 a	2.9±0.2 a	4.4±0.7 ab	4.0±0.1 a	-	3.6±0.5
デジマ	3.3±0.3 a	3.1±0.2 ab	2.6±0.1 ab	4.9±0.3 a	4.1±0.1 a	-	3.6±0.8
ニシユタカ	2.3±0.4 b	2.5±0.3 b	2.0±0.3 b	2.4±0.8 b	3.3±0.2 b	-	2.5±0.4
2) 平均1個重(g)							
西海35号	100±5 a	76±7 a	71±2 a	79±4 a	89±3 a	-	83±10
デジマ	143±8 b	127±12 b	97±8 b	119±8 b	120±3 b	-	121±15
ニシユタカ	121±13 ab	124±7 b	103±5 b	110±13 b	126±7 b	-	117±9
3) 上いも重(kg/a)							
西海35号	203±7 a	161±28 a	128±3 a	217±34 a	217±10 a	-	185±35
デジマ	286±12 b	246±10 b	157±8 a	361±32 b	303±15 b	-	271±68
ニシユタカ	172±23 a	192±31 ab	128±17 a	164±42 a	257±26 ab	-	183±43
4) でん粉価(%)							
西海35号	15.1±0.1 a	15.9±0.2 a	16.2±0.5 a	14.0±0.2 a	13.0±0.4 a	-	14.8±1.2
デジマ	12.5±0.1 b	12.7±0.1 b	13.3±0.1 b	11.2±0.2 b	10.4±0.1 b	-	12.0±1.1
ニシユタカ	10.0±0.1 c	11.9±0.1 c	12.0±0.2 c	8.8±0.2 c	9.1±0.3 c	-	10.4±1.4

注1) 同一文字は、チューキー検定において、5%水準で有意差がないことを示す。

「ニシユタカ」の4.8個より多く、秋作では3.6個で、「デジマ」の3.6個と同等、あるいは「ニシユタカ」の2.5個より多かった。しかし、「西海35号」のイモの平均1個重は春作マルチ栽培で86g、秋作普通栽培で83gとなり、「デジマ」のそれぞれ144gと121g、あるいは「ニシユタカ」のそれぞれ144gと117gに比べ有意に小さ

く、結果として上いも重が低くなった。

(3) イモの特性

「西海35号」のイモの外観を図3Dに示した。「西海35号」のイモは「デジマ」、「ニシユタカ」に比べわずかに長い短卵形で、皮色、肉色はともに黄色である。目は浅く、赤く着色するのが特徴である。春作マルチ栽培で収穫された「西海

35号」のイモの休眠期間は60日で、「デジマ」の82日や「ニシュタカ」の106日に比べて有意に短かった(表5)。でん粉価は、春作マルチ栽培で平均15.0%、秋作普通栽培では14.8%となり、「デジマ」のそれぞれ11.4%と12.0%、「ニシュタカ」のそれぞれ11.1%と10.4%に比べ有意に高かった(表6)。「西海35号」の食味官能評価は4.8で、「インカのめざめ」の評価5.0とほぼ同等、「デジマ」(同評価4.0)や「ニシュタカ」(同評価2.6)に比べ良食味であった(表7)。

カロテノイド系色素について、「デジマ」はゼアキサントンを含まないが、ルテインを生イモ100g当たり48.1 μ gを含有していた。「インカのめざめ」は高い濃度でカロテノイド系色素を含むことが知られているが(生イモ100g当たり1131.7 μ gのゼアキサントンをおよび79.7 μ gのルテインを含有)、「西海35号」も生イモ100g当たりゼアキサントンを17.4 μ g含有し、ルテインを58.8 μ g含有していた(表7)。

(4) 病虫害抵抗性

「西海35号」は、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* に連鎖するDNAマーカーPCNおよびPVY抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* に連鎖するRAPDマーカー38-530のいずれも持っていた(図2)。さらに精度の高い竹内ら⁷⁶⁾のDNAマーカーによっても「西海35号」が両遺伝子を有すると推察された(図4Aおよび4B)。接種検定によっても、ジャガイモシストセンチュウ(パソタイプRo1)およびPVY(PVY⁰系統およびPVY^N系統)に対して抵抗性を示した(表8)。したがって、「西海35号」は *HI* と *Ry_{chc}* 遺伝子を有することが明らかとなった。

5種の病虫害抵抗性遺伝子を同時検出可能なマルチプレックスPCR法(詳細は第3章)でマーカーバンドの有無を見ると、「西海35号」は1回のPCR反応で *HI* と *Ry_{chc}* 遺伝子を有することが推測できた(図4C)。

HI 遺伝子に連鎖するDNAマーカーPCNの分離を「西海35号」と「デジマ」の雑種集団「T04090」を用いて、また、DNAマーカーN146およびN195

表7 西海35号の食味およびカロテノイド含量

品種系統名	食味評価 ¹⁾		ゼアキサントニン含量	ルテイン含量
			(μ g /100g)	(μ g /100g)
西海35号	4.8	ab ²⁾	17.4	58.8
インカのめざめ	5.0	a	1131.7	79.7
デジマ	4.0	b	0	48.1
ニシュタカ	2.6	c	-	-

注1) データ: 3カ年の平均値 食味は食味可能評価で行い、1(否)~5(良)の5段階評価した。

2) 同一文字はチューキー検定において、5%水準で有意差がないことを示す。

3) - データなし

表8 病虫害抵抗性

品種系統名	ジャガイモシストセンチュウ	ジャガイモYウイルス	青枯病	疫病	そうか病
西海35号	R	R	R	MS	M
デジマ	S	S	S	MS	MS
ニシュタカ	S	S	M	S	S

1) R: 抵抗性, M: 中, MS: やや弱, S: 弱

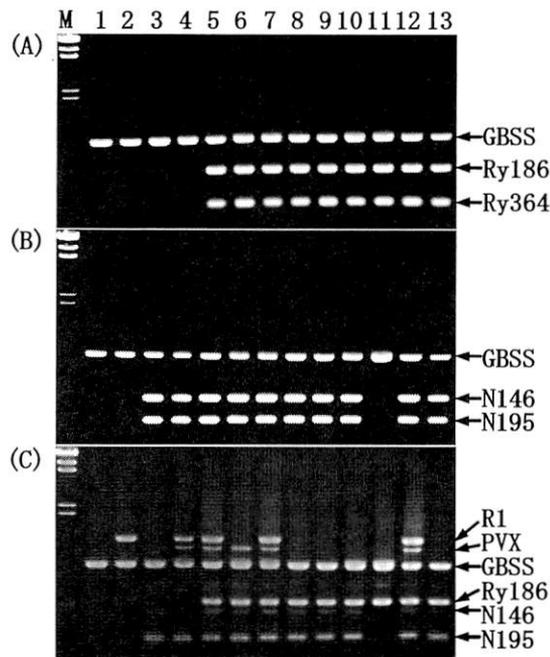


図4 PVY抵抗性遺伝子Ryhc(A)とジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子H1 (B)の判別のための診断マーカーバンドと5種類の病虫害抵抗性遺伝子を同時検出するためのマルチプレックスPCRによる検定結果 (C)

注1) M: サイズマーカー (*Hind*III-digested λ DNA)

- 1 ニシユタカ, 2 デジマ, 3 春あかり, 4 パイク, 5 10H15, 6 10H16, 7 10H17, 8 西海37号, 9 西海38号, 10 西海39号, 11 長系131号, 12 愛系172, 13 西海35号

の分離を「西海 35 号」と「北海 56 号」の雑種集団「T06026」を用いて調査した。同様に雑種集団「T04090」と「T06026」を用いて *Ry_{hc}* 遺伝子に連鎖する RAPD マーカー 38-530 の分離も調査した (表 9)。いずれのマーカーも雑種集団で 1:1 の分離を示すことから、「西海 35 号」はジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1* および PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{hc}* をそれぞれ一重式に持つと推定される。

圃場検定により実施した青枯病抵抗性検定では、本病に対して「西海 35 号」は強程度の抵抗性を示した。また、そうか病に対して「デジマ」より強い「中」程度の抵抗性を示し、疫病に対して「やや弱」であった (表 8)。

(5) 「西海 35 号」の後代系統

表 3 に示したように、「西海 35 号」を片親として、農業形質に優れた「西海 37 号」、「西海 38 号」、「西海 39 号」、「長系 131 号」、「愛

系 172」、「T04204-13」、「10H15」、「10H16」および「10H17」を育成した。これらはいずれも PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{hc}* の DNA マーカーを持ち、「西海 37 号」、「西海 38 号」、「西海 39 号」および「長系 131 号」については接種試験においても PVY 抵抗性が確認された (表 3, 図 4)。また、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1* については、「長系 131 号」がマーカーバンドを持たず、「T04204-13」は未供試だが、その他の系統はすべてマーカーバンドを示した (図 4)。

(6) 「西海 35 号」およびその後代系統における交雑特性

「西海 35 号」の花粉はアセトカーミン染色により 80.7% と非常に高い染色率を示した。「西海 35 号」を花粉親として 7 品種・系統に交雑すると、結実率は 35.4% から 68.2% と高く、1 果実当たり平均種子数は 84.5 から 255.9 粒と高い交

表9 DNAマーカーの遺伝的分離

交配番号	交配組み合わせ ¹⁾		検定数	DNAマーカー		χ ² 検定によるP値 ²⁾	
	♀	♂		あり	なし	1:01	0.87:1
PCN マーカー							
T04090	デジマ	西海35号	41	21	20	0.876	0.546
N146/N195 マーカー							
T06026	北海56号	西海35号	167	80	87	0.588	0.721
RAPD マーカー 38-530							
T04090	デジマ	西海35号	41	22	19	0.639	0.360
T06026	北海56号	西海35号	178	81	97	0.243	0.785

注1) マーカーバンドをしない母親×マーカーバンドを有する花粉親

2) 零式 (aaaa) × 単式 (Aaaa) の遺伝子型間の交配の場合の染色体無作為分配モデル (1A:1a) もしくは染色分体無作為分配モデル(0.87A:1a)の期待される分離比

雑能力を示した (表 10). 母親として用いても, 結実率は 46.8%から 58.6%で, 果実当たり平均種子数は 126.9から 135.3粒と高い交雑能力を示した (表 10). これらの結果は, 「西海 35 号」が顕著に高い雄性稔性および雌性稔性を有することを示している.

次に, 「西海 35 号」を片親として育成した系統について花粉親としての交配能力を調査した. なお, 「西海 38 号」, 「愛系 172」, 「西海 39 号」および「T04204-13」は「西海 35 号」を父本として育成した系統であり, 「西海 37 号」と「長系 131 号」は「西海 35 号」を母本として育成した系統である (表 3).

普通パレイシヨ (*S. tuberosum*) 由来の T/β型細胞質ゲノム有する「西海 38 号」と「愛系 172」のうち, 「西海 38 号」は全く花粉が出なかった. 「愛系 172」は 77.2%の花粉が染色された. これを花粉親として 4 品種・系統に交配すると, 結実率は 9.0%から 30.1%であり, 果実当たり種子数は 24.6 から 37.2 粒であった (表 11). *S. demissum* に由来する W/α型細胞質ゲノムを有する「西海 39 号」と「T04204-13」は, いずれも大量の花粉粒を産出した. 「西海 39 号」の花粉染色率は 79.6%であり高い花粉稔性が予想されたが, 4 つの品種・系統のいずれに対しても全く果実は形成されなかった. 一方, 「T04204-13」は 4.3%から 13.7%と低い結実率であり, 果実当たり種子数は 28.0 から 69.6 粒であった (表 11).

「西海 37 号」と「長系 131 号」は, 「西海 35 号」に由来する S/ε型細胞質ゲノムを有する系統である (表 3). 「西海 37 号」の花粉染色率は 87.9%であった. これら 2 系統の花粉親としての結実率は 28.1%から 55.9%で, 果実当たり種子数は 101.5 から 219.3 粒と高い雄性稔性を示した (表 11).

4) 考察

DNA マーカーを早期 (系統選抜試験) に用いることによって, 「インカのめざめ」の優良形質にジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* および PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* を導入し, 良食味で, 短休眠性を持ち, ジャガイモシストセンチュウ抵抗性, PVY 抵抗性および青枯病抵抗性を有する「西海 35 号」を育成することができた.

PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* は, これまでの検定結果ではいずれの PVY 系統に対しても非特異的に強度抵抗性 (Extreme resistance) を示している. この PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* およびシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* は, いずれも竹内ら⁷⁶⁾によって開発された DNA マーカーを用いると非常に有効な選抜が可能となり, 既に PVY 抵抗性とジャガイモシストセンチュウ抵抗性を併せ持ち農業形質に優れた複数の系統が選抜されている (表 3). これらの系統の中には図 4C に示すように, さらに複数の抵抗性遺伝子を併せ持つと推測さ

表10 西海35号の交雑能力

母親	花粉親	受粉 花数	結実数	結実率 (%)	1果実当たり の種子数
アイユタカ	西海35号	115	66	57.4	152
デジマ	西海35号	64	28	43.8	156
ニシユタカ	西海35号	123	51	41.5	100
長系124号	西海35号	45	23	51.1	256
春あかり	西海35号	57	25	43.9	155
T03097-19	西海35号	48	17	35.4	85
T05003-1	西海35号	44	30	68.2	110
西海35号	春あかり	222	104	46.8	127
西海35号	T03097-19	58	34	58.6	129
西海35号	T05003-1	89	44	49.4	135

表11 西海35号の後代系統の花粉親としての交雑能力

母親	花粉親	受粉 花数	結実数	結実率 (%)	1果実当た りの種子数
1) T/β × T/β					
アイユタカ	愛系172	84	25	29.8	31
長系124号	愛系172	58	11	19.0	28
デジマ	愛系172	67	6	9.0	37
春あかり	愛系172	83	25	30.1	25
2) T/β × W/α					
アイユタカ	西海39号	92	0	0	0
長系124号	西海39号	116	0	0	0
デジマ	西海39号	67	0	0	0
春あかり	西海39号	33	0	0	0
ニシユタカ	西海39号	28	0	0	0
長系124号	T04204-13	88	12	13.6	37
春あかり	T04204-13	46	2	4.3	28
ニシユタカ	T04204-13	51	7	13.7	70
3) T/β × S/ε					
アイユタカ	西海37号	58	26	44.8	139
長系124号	西海37号	60	33	55.0	129
デジマ	西海37号	92	35	38.0	207
春あかり	西海37号	78	31	39.7	147
ニシユタカ	西海37号	32	9	28.1	123
アイユタカ	長系131号	31	15	48.4	102
長系124号	長系131号	68	38	55.9	165
デジマ	長系131号	29	15	51.7	219
春あかり	長系131号	47	22	46.8	172
ニシユタカ	長系131号	37	18	48.6	139

れる「10H15」, 「10H17」や「愛系172」が選抜されている。

さらに「西海35号」の優れた点は、S/ε型細胞質ゲノムを有することである。普通バレイショ品種に最も多いT/β型細胞質ゲノムは、Grun *et al.*²⁴⁾が示したさまざまなタイプの雄性不稔性を引き起こすことが知られているが⁴²⁾、*S. phureja*に由来するS/ε型細胞質ゲノムは、一般に花粉稔性は高いことが知られている。本研究でも、「西海35号」は高い雌性稔性ととも高い雄性稔性が示され、さらに「西海35号」のS/ε型細胞質ゲノムを引き継ぐ後代系統「西海37号」および「長系131号」においても高い雄性稔性(結実率で41.9および50.9%)が確認された。

一方、同じ「西海35号」の後代であっても、T/β型細胞質ゲノムを持つ「西海38号」は全く花粉を作らない完全不稔で、「愛系172」は平均結実率が22.9%と低かった。また、*S. demissum*に由来するW/α型細胞質ゲノムを持つと推定された「西海39号」と「T04204-13」の平均結実率は0%および11.4%と極端に低かった。これは、Dionne¹⁷⁾が述べた*S. demissum*と普通バレイショとの戻し交雑後代系統は花粉親としては機能しないという見解を支持しているものと考えられる。したがって、これまで報告されている普通バレイショの細胞質ゲノムT/β型や、*S. demissum*由来の細胞質ゲノムW/α型、および*S. stoloniferum*由来の細胞質ゲノムW/γ型で引き

起こされる雄性不稔を、「西海35号」を母親とする後代系統を利用することにより避けることができる。このようなことから、病虫害抵抗性などの有用遺伝子を集積でき、雄性稔性を有する雑種後代を作出するためには「西海35号」を母親として利用することが有効であると考えられる。

暖地二期作栽培地域で問題となる青枯病には、

これまで、*S. demissum*由来の細胞質ゲノム W/α型を有する「メイホウ」⁷¹⁾を交配親として利用し、抵抗性品種の育成を行ってきた。しかし、「メイホウ」の後代系統は、上述した理由で花粉稔性が低く交配作業に困難を伴った。「西海35号」は*S. phureja*に由来する青枯病抵抗性を持つことが明らかになり、新たな青枯病抵抗性遺伝子給源としても期待される。

第2章 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検出法の開発

1) 結論

バレイショ育種において病虫害抵抗性の付与は重要な育種目標である。バレイショ育種において、国際的な難防除害虫として知られており、抵抗性の付与が必須なジャガイモシストセンチュウに対する抵抗性検定を例にすると、ジャガイモシストセンチュウが発生している圃場へ育成系統の種いもを植え付け、根に付着するシストの目視による確認まで3カ月を要する。この間、他の病虫害に対する薬剤防除や圃場の栽培管理を必要とするとともに、検定個体の出芽不良や生育期間中の気象条件により検定できない場合もある。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生物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る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⁸⁴⁾。また、野生種から目的とする有用遺伝子を失うことなく、栽培品種への戻し交雑による遺伝的背景の置換は、MAS技術の利用により容易になっている⁷⁸⁾・⁵⁾。愛野支場におけるバレイショ育種プログラムでは、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI*、PVY抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}*、PVX抵抗性遺伝子 *Rx1* と疫病真性抵抗性遺伝子 *RI* および *R2* に連鎖するDNAマーカーを利用し、病虫害複合抵抗性個体の選抜を行っている。

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* は、第5番染色体上に座乗している⁶²⁾・²²⁾。大林ら⁶¹⁾は、AFLPマーカーを利用して作成された *HI* 遺伝子の高精度連鎖地図³⁾に基づき、*HI* 遺伝子に密に連鎖するAFLPマーカーを Sequence-tagged site (STS) マーカーに変換したPCNを開発している。*HI* 遺伝子とPCNとの組み換え頻度は7.4%であった⁶¹⁾。

先に述べたように、19世紀半ばに疫病菌がヨ

ーロッパに入り、当時の栽培バレイショは壊滅状況となった。疫病は、*Phytophthora infestans* によって引き起こされる病害であり、茎、葉およびイモに感染するバレイショの生産上世界的に最も重要な病害である。感染初期の病斑は葉に形成される筋状の褐線で、次第に拡大し、大きな病斑となる。また、葉の裏側には、白いカビのような胞子のうを形成し、茎や葉柄には褐色病斑を形成する。また、罹病したイモが土中に残ると次作の伝染源となる。本病は暖地の主要な作型である春作栽培では4~6月にかけて発生し、天候不順などにより適期に薬剤防除ができない場合には、数日間のうちに圃場全体に拡大し、大きな被害を引き起こす。このため生産現場では、本病を対象にした薬剤の予防散布を7~10日間隔で実施しており、総散布回数に占める本病対象薬剤が最も多くなっている⁶⁰⁾。疫病に対する抵抗性遺伝子は、これまで、*S. demissum*由来の11種類の真性抵抗性遺伝子 (*R*遺伝子) が報告され、栽培種に導入されてきた⁹⁾・⁶⁸⁾。我が国においても、バレイショ野生種 *S. demissum* にジャガイモ疫病抵抗性遺伝子が発見されて以降、連続戻し交雑による *R*遺伝子の栽培種への導入が行われ、「ヨウラク」(1958年)、「エニワ」(1961年)、「シレットコ」(1967年)、「コナフブキ」¹⁾ など *R*遺伝子を保有する品種が数多く育成された。しかしながら、*R*遺伝子はレース特異性を示し、これを持つ新しい品種の栽培が始まると、新たなレースの出現によって直ぐに抵抗性が打破され、疫病に対して一過性の抵抗性にとどまっている¹⁹⁾。

疫病真性抵抗性遺伝子 *RI* は、第5番染色体上に座乗しており³⁹⁾、Ballvora *et al.*⁴⁾により *RI* 遺伝子は単離され、これに特異的なプライマー配列が報告されている(マーカー名は *RI*)。日本では、*RI* 遺伝子による疫病抵抗性は打破され、抵抗性付与の効果はない。疫病菌の様々なレース、異なる抵抗性検定により、ジャガイモ疫病抵抗性に対する量的遺伝子座

(QTL) が、多くのバレイショから検出されており、その QTL は第 5 番染色体上の *R1* の領域に位置していることが報告されている⁷³⁾。この報告は、ジャガイモ疫病に対する質的および量的抵抗性の表現型は、同一遺伝子座の異なる遺伝子による防御応答の程度の差であり、*R1* により誘導される過敏細胞死は、量的防御応答の極端な場合であるという仮説²¹⁾を支持している。したがって、現在でも *R1* の MAS への利用には何らかの意義があるかもしれない。

疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* は第 4 番染色体上に座乗していることが報告されている⁴⁰⁾。日本国内では、*R2* 遺伝子は「北海 56 号」から導入され、現在、この抵抗性遺伝子を有する系統の罹病は確認されておらず、本病に対する効果的な抵抗性遺伝子となっている。大林ら⁶¹⁾は、*R2* 遺伝子に強く連鎖する AFLP マーカーの配列情報⁴⁰⁾をもとに、「北海 56 号」(抵抗性)と「ノーチップ」(感受性)の雑種集団を利用して、STS マーカー R2-974 を開発した。

PVX 抵抗性遺伝子 *Rx1* (*Rx*) は *S. tuberosum* ssp. *andigena* から、*Rx2* (*Rx_{acc1}*) は *S. acaule* から栽培種へ導入され、それぞれ第 12 番染色体および第 5 番染色体上に座乗し⁶⁷⁾、いずれも既に単離されている⁶⁾、⁷⁾。大林ら⁶¹⁾は、*Rx1* の塩基配列情報を基に *Rx1* 遺伝子領域の一部を増幅する STS マーカー PVX を開発しており、その組換え頻度は 1.3% である。

従来、PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* を検出する RAPD マーカー 38-530³²⁾ を含むこれら 5 種類の DNA マーカーを利用して個別に PCR 反応、電気泳動、および DNA マーカーバンドの有無を判定していた。MAS 技術を育種における実用的手法として利用するためには、経済性、選抜規模、あるいは選抜効率などを考慮する必要がある⁸³⁾。

Gebhardt *et al.*²³⁾ は、バレイショ育種において PCR マーカーを利用して病虫害複合抵抗性個体を選抜する最初の例を報告した。110 個体の雑種集団について、まず PVY 抵抗性を判別する Sequence-characterized amplified region

(SCAR) マーカー RYSC3 を用いて選抜し、次に、RYSC3 の DNA マーカーを有する個体についてジャガイモシストセンチュウ抵抗性を判別する Gro-1 を用いて選抜し、最後に 2 つの DNA マーカーを有する個体について、PVX 抵抗性を判別する Cleaved amplified polymorphic

sequences (CAPS) マーカーの CP60 で選抜した。このように、DNA マーカーを有する個体だけに絞り込んで順次選抜し、検定時間とコストを削減させている²³⁾。また、Gebhardt *et al.*²³⁾ は、さらに効率化を図る方法として、複数マーカーを混合して 1 回の PCR 反応で検出するマルチプレックス PCR 法を提案している。マルチプレックス PCR 法は様々な分野で利用されており、低コストで、効率的な判定が可能となっている¹⁹⁾、⁴³⁾、⁸²⁾。

そこで本研究では、MAS の効率化を図るため、RAPD マーカーである 38-530 を除く 4 種類の DNA マーカーについて、マルチプレックス PCR 法を利用して同時検出できるように試みた。

2) 材料および方法

(1) 材料

「北海 56 号」、「アイユタカ」およびこれらの雑種集団「T07137」の 17 個体と、暖地二期作向けの主要品種である「デジマ」と「ニシユタカ」を加えた 21 品種・系統を用いた(表 12)。

(2) DNA 抽出

DNA は、バレイショの生鮮葉 (5 × 5 mm 程度) から DNA 自動抽出システム (KURABO 製 SH-48, CS-16 および PI-80X から構成される) で抽出した。

(3) PCR 反応液組成および反応条件

抵抗性遺伝子 *H1*, *Rx1*, *R1* および *R2* の有無をそれぞれ判定する DNA マーカー PCN⁶¹⁾, PVX⁶¹⁾, *R1*⁴⁾ および R2-974⁶¹⁾ のプライマー塩基配列とこれらを個別で検出するためのアニーリング温度を表 13 に示した。個別検出のための PCR 反応液組成は、2 μl の DNA 溶液、0.5 μM の各プライマーセット、5 μl の Ampdirect® Plus (島津製作所) と 0.25 units の *Taq* DNA polymerase (Nova *Taq*™ Hot Start DNA Polymerase, Novagen®, USA) を加え全量を 10 μl とした。PCR 反応は、サーマルサイクラー (Veriti™ 96 well, アプライドバイオシステムズ) を用い、まず 94°C で 10 分間処理して酵素の活性化を行い、その後、94°C で 30 秒間の熱変性、表 13 に示したアニーリング温度で 30 秒間、72°C で 1 分間 (*R1* のみ 1.5 分間) の伸長反応を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル繰り返した後、さらに伸長反応を 72°C で 5 分間行った。1.4% アガロースゲル電気泳動により DNA マーカーの検出を行った。

表12 各品種系統のDNAマーカーの有無

品種系統名	PCN	PVX	R1	R2
デジマ	-	-	+	-
ニシユタカ	-	-	-	-
アイユタカ	+	+	+	-
北海56号	+	-	+	+
T07137-1	+	+	+	-
T07137-2	-	+	-	-
T07137-3	+	+	+	+
T07137-4	+	-	+	+
T07137-5	+	+	+	+
T07137-6	+	+	+	+
T07137-7	+	+	+	+
T07137-8	-	+	-	+
T07137-9	+	+	+	+
T07137-10	-	-	-	+
T07137-11	+	-	+	+
T07137-12	+	-	+	-
T07137-13	+	-	-	+
T07137-14	-	+	+	-
T07137-15	+	-	+	-
T07137-16	-	-	+	-
T07137-17	+	+	-	-

注1) + : DNAマーカーあり, - : DNAマーカーなし

表13 個別PCR反応におけるDNAマーカーを検出する最適条件

DNAマーカー	標的遺伝子	プライマー	プライマー配列 (5' -3')	アニーリング温度 (°C)	大きさ (bp)
PCN	<i>H1</i>	H1SP-S4	AACACCAATCAACAAAGTAC	63.5	320
		H1SP-A6	GGAACAATGTTGAATGCAAG		
PVX	<i>Rx1</i>	RxSP-S3	ATCTTGGTTTGAATACATGG	58.0	1,230
		RxSP-A2	CACAATATTGGAAGGATTCA		
R1	<i>R1</i>	76-2sf2	CACTCGTGACATATCCTCACTA	65.0	1,400
		76-2SR	CAACCCTGGCATGCCAG		
R2	<i>R2</i>	R2SP-S1	GAATTCAGCGCCTAAGGG	62.0	974
		R2SP-A2	CTTGTGATGTAAAAATCCGA		

3) 結果および考察

21品種・系統についてDNAマーカーPCN, PVX, R1およびR2の有無をマーカーごとに個別に調査すると、表12に示す結果が得られた。すなわち、「ニシユタカ」は4つのマーカーバンドのいずれも持たないが、「デジマ」はR1のみを持ち、「アイユタカ」と「北海56号」はそれぞれPCN, PVX, R1およびPCN, R1, R2を持っていた。いずれの品種・系統もこれらのマーカーについて一重式遺伝子型(Aaaaで表される遺伝子型)であるので、その雑種集団においては遺伝的分離が見られた(表12)。

個別検出と同じ反応液組成で4つのプライマーセットをそれぞれ0.5 μMの濃度になるよう混合し、94°Cで30秒間の熱変性、59.8°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで1分間の伸長反応とした場合、「デジマ」と「ニシユタカ」のいずれからプライマーの非特異的アニーリングによると考えられる濃度の低いバンドがPCNとほぼ同じ位置に見られた(図5A)。また、雑種集団「T07137」の個体のうち個別PCRではPCNを持たないと判断された個体からも検出された。これまでも個別PCRによるPCNの検出において、アニーリング温度がやや低い、あるいは鋳型DNA濃度やプライマー濃度が高いと非特異的アニーリングによると考えられるPCNと同じサイズの薄いバンドが出現することが知られている。一方、個別PCRでは「アイユタカ」および雑種集団「T07137」の約半数から検出されたPVXは、いずれにおいても検出されなかった。R1とR2の有無は個別PCRの結果と一致していたが、バンドの検出感度はやや低かった

(図5A)。そこで、プライマーの添加量を検討し、PCN, R1およびR2検出用プライマーセットの濃度をそれぞれ0.125 μMに下げ、PVX検出用プライマーセットの濃度を1.0 μMに上げた場合、PCNとほぼ同じ大きさを示す非特異的バンドは検出されず、各プライマーセットを単独で用いた個別PCRで得られるバンドパターンの和に相当するパターンが得られた(図5B)。

マルチプレックスPCRにおいては、プライマーセットの組み合わせ、それぞれの添加量、あるいはアニーリング温度がPCR増幅に影響を与えることが報告されている^{13), 57), 12)}。本研究においても、非特異的バンドを生じ易いPCNのプライマーセットの濃度を下げ、逆に増幅されにくいPVXは、PVXのプライマー濃度を上げるとともにR1とR2プライマー濃度を0.125 μMに下げることによって同時検出が可能となった。

浦崎ら⁸¹⁾は、鋳型DNA濃度が低い場合には、マルチプレックスPCR反応により増幅されるDNAマーカーの検出感度は、個別PCRで増幅されるDNAマーカーの検出感度よりも低くなることを報告している。そこで、4つのDNAマーカーを有する「T07137-3」と、これらをすべて欠く「ニシユタカ」を用いて、PCR反応液1 μl中の鋳型DNA量を0.02, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 10, 18 ngに調整し、個別PCRおよびマルチプレックスPCRを行った(図6)。

「T07137-3」では、個別PCRで検出できる最低限界濃度はR1とPVXでそれぞれ0.5 ng/μlであり、R2とPCNではそれぞれ0.2 ng/μlであった(図6A)。マルチプレックスPCRによっても

ほぼ同様の検出感度を示し、PCNについては0.02 ng/μlの鋳型DNA量でもバンドを確認することができた(図6B)。PCNの検出感度が個別PCRに比べてマルチプレックスPCRの方が高いのは、前者ではアニーリング温度が高く設定されている(63.5°C)のに対し、後者ではやや低い(59.8°C)ため増幅されやすいのが原因と考えられる。一方、「ニシユタカ」では、少なくとも0.02から18 ng/μlの範囲内においては非特異的の反応による過剰なバンドは検出されな

かった(図6B)。マルチプレックスPCRによって検出されるマーカースバンドは、現実的にはPCR反応液1 μl中の鋳型DNA量が1 ng未満になるとバンド濃度が薄すぎて判定が困難となる。しかし、本研究においてDNA自動抽出システムで抽出されたDNA濃度は3から138 ng/μlの範囲であり、その平均は56 ng/μl(SD=29.4)であったので、そのまま2 μlを鋳型DNAとしてマルチプレックスPCRに利用できるものと考えられる。

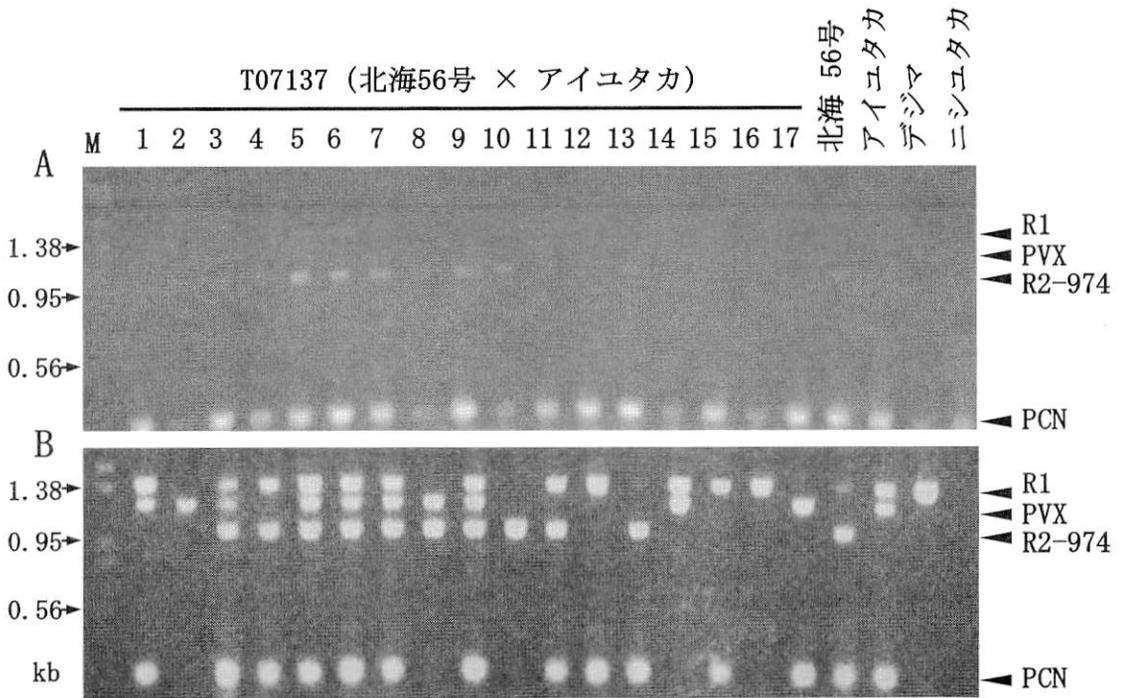


図5 PCN, PVX, R1 およびR2-974を検出するためのプライマーを同濃度で混合した場合のマルチプレックスPCRによるバンドパターン (A) とプライマーの濃度を最適化した場合のバンドパターン (B)

注1) M : サイズマーカー (λ DNA *Hind*III/*Eco*RI double-digests)

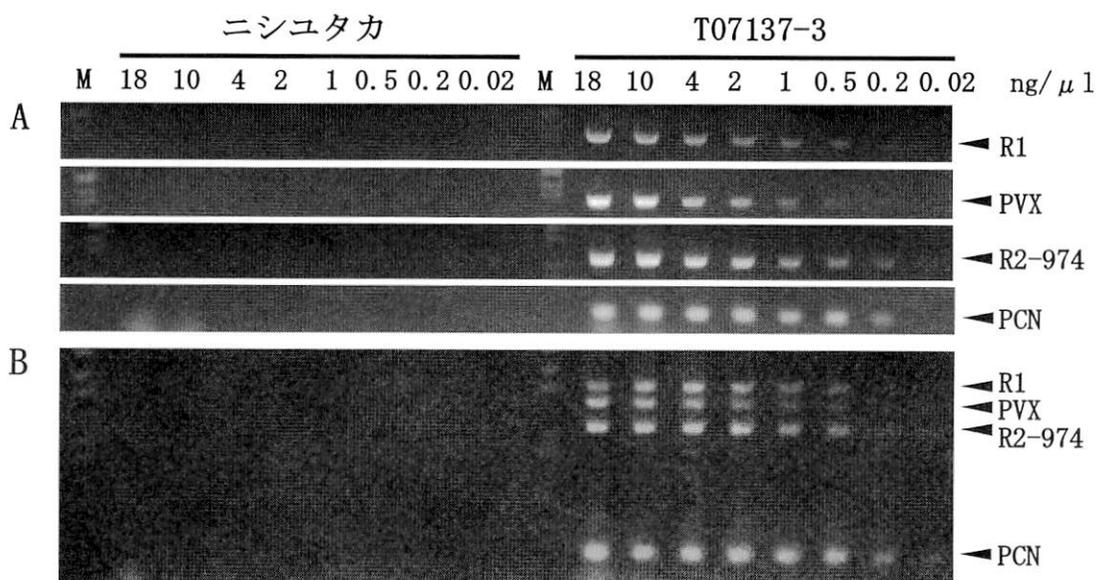


図6 個別PCR (A) およびマルチプレックスPCR (B) におけるPCR反応液中に含まれる鋳型DNA濃度の影響

注1) T07137-3 : 4種類のDNAマーカーを有する.

ニシユタカ : すべてのDNAマーカーを有しない.

注2) M : サイズマーカー (DNA *Hind*III/*Eco*RI double-digests)

第3章 5種類の病虫害抵抗性遺伝子に連鎖するDNAマーカーの同時検出が可能なマルチプレックスPCR法の開発

1) 緒論

第2章では、病虫害抵抗性遺伝子 *HI*, *Rx1*, *R1* および *R2* を検出するために、DNAマーカーPCN, PVX, R2-974 および R1 のマルチプレックスPCR法の開発について述べた。実際の育種現場で本手法を利用しているといくつかの問題点が明らかとなった。まず、疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* の遺伝子供給源として利用している「北海56号」は、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* を有しないにもかかわらず、大林ら⁶¹⁾ が開発した *HI* を判別するDNAマーカーPCNではバンドが検出され、「北海56号」が抵抗性として判定されること。2つ目は、R2-974は、疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* の遺伝子供給源として知られる「さやあかね」およびその雑種後代では、抵抗性個体であるにも関わらず、DNAマ

ーカーが検出されないこと。3つ目は、すべてのDNAマーカーを持たない個体は、これらすべてに感受性であるのか、PCR反応ミスにより各DNAマーカーが検出されなかったのか判定が困難であったことである。また、PVY抵抗性遺伝子 *Ry^{chc}* はRAPDマーカー38-530³²⁾ を用い、これまで個別に検定を実施していた。これは、RAPDマーカー38-530を増幅させるためのアニーリング温度(43°C)が、マルチプレックスPCR法のアニーリング温度(59.8°C)と大きく異なっていたためである。

竹内ら⁷⁶⁾ は、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* 近傍の高密度連鎖地図を作製し、*HI* 遺伝子を両端から挟み込むDNAマーカーN146およびN195を開発した。N146およびN195の *HI* 遺伝子との組み換え頻度はそれぞれ

0.109%および0.207%と報告されている。また、竹内ら⁷⁶⁾は、PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* に密に連鎖する STS マーカー *Ry186* を開発しており、その組み換え頻度は0.203%と報告している。また、疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* について、大林ら⁶¹⁾は、「さやあかね」(抵抗性)と「農林1号」(感受性)の分離集団を用いて、「北海56号」および「さやあかね」が持つ *R2* 遺伝子を特異的に判別できる STS マーカー *R2-800* を開発した。

そこで本章では、上に述べた問題点の改善と選抜の効率化を図るために、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* の DNA マーカーを PCN から N146 と N195 に、疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* を検出する DNA マーカーを *R2-974* から *R2-800* に代え、さらに PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* の DNA マーカー *Ry186* を組み込むマルチプレックス PCR 法の開発を試みた。竹内ら⁷⁶⁾は、すべてのバレイショ個体から PCR 反応によって検出可能な顆粒性澱粉合成酵素遺伝子 *GBSS* のマーカーを開発している。そこで、この DNA マーカーもマルチプレックス PCR に付加することにより、PCR 反応の正否を確認できるよう改善した。また、実際の育種の選抜過程で、新たに開発したマルチプレックス PCR 法を利用した場合の検定個体数および検定に要する時間の削減効果について検討した。

2) 材料および方法

(1) 材料

本研究では、日本の主要品種「コナフブキ」と育成系統「T07137-6」およびその雑種集団「T09068」の96系統、さらに3つの品種(「デジマ」、「ニシユタカ」および「アイユタカ」)、3つの育成系統(「北海56号」、「西海35号」および「T08043-32」)を用いた。雑種集団「T09068」の親系統および品種・系統の病虫害抵抗性遺伝子の有無を表14に示した。

(2) DNA 抽出および DNA マーカー検定法

各品種・系統の DNA は、バレイショの生鮮葉(約1 cm × 1 cm 程度)から、DNA 自動抽出システム(KURABO 製 SH-48, CS-16 および PI-80X から構成される)を用いて抽出し、雑種集団「T09068」の96個体の DNA 濃度は、DNA 濃度測定装置(DQ200 DyNA Quant™ 200 Fluorometer, アマシヤムバイオサイエンス)を用いて測定した。

各病虫害抵抗性遺伝子 *HI*, *Rx1*, *R1*, *R2* および *Ry_{chc}* の有無をそれぞれ検出する DNA マーカーは、N146 と N195⁷⁶⁾, PVX⁶¹⁾, R1⁴⁾, R2-800⁶¹⁾, および *Ry186*⁷⁶⁾ を用い、ポジティブコントロールとして、すべての個体で検出される顆粒性澱粉合成酵素遺伝子 *GBSS* を増幅する DNA マーカー *GBSS*⁷⁶⁾ を用いた。各プライマーの塩基配列とこれらを個別に検出するための PCR 反応のアニ

ーリング温度、プライマーセットの濃度および増幅されるバンドの長さを表15に示した。

個別の DNA マーカー検出のための PCR 反応液組成は、2 μl の DNA 溶液、5 μl の Ampdirect® Plus (島津製作所)、0.25 units の *Taq* DNA polymerase (Nova *Taq*™ Hot Start DNA Polymerase, Novagen®, USA)、および表15に示した最終濃度でプライマーセットをそれぞれ添加し、滅菌水により全量を10 μl とした。

PCR 反応には、サーマルサイクラー (Veriti™ 96 well, アプライドバイオシステムズ) を用い、まず、熱変性を94°Cで10分間処理して酵素の活性化を行い、その後、94°Cで30秒間の熱変性後、表15に示すアニーリング温度で30秒間、72°Cで1分間(R1のみ1.5分間)の伸長反応を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返した後、さらに伸長反応を72°Cで5分間行った。PCR 産物は、1.4%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離された。

マルチプレックス PCR 反応条件を確立するために、PCR 反応液中のプライマーセットの濃度、*Taq* DNA polymerase の添加量および PCR 反応温度条件を検討した。最終的に決定されたマルチプレックス PCR 反応のための各プライマーセットの最適濃度は表15に示したとおりで、7つのプライマーセットは同一 PCR 反応液中に混合され、0.5 units の *Taq* DNA polymerase を用いた。PCR 反応条件は、94°Cで10分間を1サイクル、その後、94°Cで30秒間の熱変性後、68°Cで30秒間、72°Cで1.5分間の伸長反応を1サイクルとする5サイクル行い、次に94°Cで30秒間、58°Cで30秒間、72°Cで1.5分間の伸長反応を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返した後、さらに伸長反応を72°Cで5分間行った。

(3) ジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性は、2010年にカップ検定法⁴⁶⁾により判定した。雑種集団「T09068」の96個体のうち、すべての DNA マーカーが検出された5個体について、生土50g 当たりシスト73個を含む土を入れたプラスチックカップに種イモを植え付け、20°Cの暗黒条件下のインキュベータ内で管理し、植え付け60日後に、イモから伸長した根に付着するシストを目視により確認し、抵抗性を判定した。

(4) PVY および PVX 抵抗性検定

PVY (0系統および Y28 系統) および PVX (0-IC249 系統) に感染したタバコ葉0.5 g を0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.2) で10倍に希釈し、接種源とした。2010年に、防虫温室内で供試系統の種イモを植え付け、1ヵ月後にカーボラナム法により各ウイルスを植物体に接種した。

接種後は自然条件下で管理し、接種4週間後、各個体から接種葉および十分に展開した上位葉を採取し、RNeasy Plant mini Kit (QIAGEN) を用いて全RNAを抽出した。抽出した全RNAからcDNAを合成するために、Maoka *et al.* ⁴⁾ に従い、各個体から抽出した全RNA溶液2 μ lに、0.06 μ lのAMV逆転写酵素 (35 units/ μ l, TOYOBO), 14.34 μ lのNuclease free water (Promega), 2 μ lの10 \times Reaction buffer (TOYOBO), 0.4 μ lのウイルス検出用50 μ Mプライマー (PVYにはPVYCP6M 5' -TCTGTGTACTGATGCCAC -3', PVXにはPVX1M 5' -ATCTAGGCTGGCA AAGTCG-3'), 1 μ lの10 mM dNTPs, および0.2 μ lのブタ肝臓由来リボヌクレアーゼインヒビター (40 units/ μ l, TaKaRa) を混合し、全量を20 μ lとした。サーマルサイクラー (Veriti[®] 96 well, アプライドバイオシステムズ) を用いて、30 $^{\circ}$ Cで10分間、42 $^{\circ}$ Cで60分間、さらに99 $^{\circ}$ Cで5分間反応させ、全RNAから逆転写反応によりcDNAを合成した。各ウイルスの感染を確認するためのPCR反応液は、各個体から調製した2 μ lのcDNA溶液に、10 μ lのAmpdirect[®] Plus (島津製作所), 0.25 units

のTaqDNA polymerase (NovaTaq[™] Hot Start DNA Polymerase, Novagen[®], USA), 各ウイルスを検出する50 μ Mプライマーセット (PVYにはPVYCP6P^c 5' -GGTCCAAAATGAGAATGCC-3' と上述のPVY CP6M, PVXにはPVX1P 5' -TCCTTATCCAAACGGCATC-3' と上述のPVX1M) を、検出するウイルスの種類に応じて、それぞれPVYの場合には0.4 μ l, PVXの場合には0.2 μ lを加えて、Nuclease free water (Promega) により全量を20 μ lとした。PCR反応は、サーマルサイクラー (Veriti[®] 96 well, アプライドバイオシステムズ) を用い、まず94 $^{\circ}$ Cで9分間処理して酵素の活性化を行い、その後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、55 $^{\circ}$ Cで2分間、72 $^{\circ}$ Cで3分間の伸長反応を1サイクルとし、これを30サイクル繰り返した後、さらに伸長反応を72 $^{\circ}$ Cで7分間行った。1%アガロースゲル電気泳動により各ウイルスの存在を示すバンドを確認した。

(5) 疫病抵抗性検定

2010年3月に、愛野支場内の圃場において、供試系統の種イモを植え付け、6月の収穫まで疫病に対する薬剤防除を行わず、本病の自然発病下で罹病の有無を調査した。

表14 親系統および品種の個別PCR反応によるDNAマーカーの有無

品種系統名	抵抗性遺伝子	N146	N195	PVX	R1	R2-800	Ry186
デジマ	R1	-	-	-	+	-	-
アイユタカ	H1, Rx1, R1	+	+	+	+	-	-
北海56号	R1, R2	-	-	-	+	+	-
西海35号	H1, Ry _{chc}	+	+	-	-	-	+
コナフブキ	Ry _{chc}	-	-	-	-	-	+
T07137-6	H1, Rx1, R1, R2	+	+	+	+	+	-
T08043-32	未検定	+	+	-	+	+	-
ニシユタカ	なし	-	-	-	-	-	-

注1) + : DNAマーカーあり, - : DNAマーカーなし

表15 DNAマーカーと個別PCRおよびマルチプレックスPCRの最適条件

DNAマーカー	標的遺伝子	プライマー	プライマー配列 (5' -3')	大きさ (bp)	個別 PCR		マルチプレックスPCR
					濃度 (μM)	アニーリング温度 (°C)	濃度 (μM)
N146	H1	N146-17	AAGCTCTTGCCTAGTGCTC	506	0.125	55	0.05
		N146-22	AGGCGGAACATGCCATG		0.125		0.05
N195	H1	N195-09	TGGAATGGCACCCACTA	337	0.125	55	0.05
		N195-06	CATCATGGTTTCACTTGTAC		0.125		0.05
PVX	Rx1	RxSP-S3	ATCTTGGTTTGAATACATGG	1230	0.5	58	1.5
		RxSP-A2	CACAATATTGGAAGGATTCA		0.5		1.5
R1	R1	76-2sf2	CACTCGTGACATATCCTCACTA	1400	0.5	65	0.25
		76-2SR	CAACCCTGGCATGCCACG		0.5		0.25
R2-800	R2	R2SP-S7	TACTAACCTTTTCTAGATG	800	0.5	55	0.25
		R2SP-A9	AGAACTTTCTCACGCTTTT		0.5		0.25
Ry186	Ry _{che}	RY186-11	TGGTAGGGATATTTTCCTTAGA	587	0.4	55	0.1
		RY186-12	GCAAATCCTAGGTTATCAACTCA		0.4		0.1
GBSS	GBSS	gbss-01	ATGGCAAGCATCACAG	981	0.2	55	0.15
		gbss-02	CAAACTTTAGGTGCCTC		0.2		0.15

3)結果

(1)DNA 濃度と個別 PCR による検定

DNA 自動抽出装置で抽出された雑種集団「T09068」の96系統のDNA濃度は、3から83 ng/μlの範囲で、平均濃度は23.6 ng/μl (SD=16.9)であった。この雑種集団および8品種・系統は、DNA濃度の調整をすることなく以下の実験で用いた。

8品種・系統について、個別PCRによってDNAマーカーの有無を調査した(表14)。その結果、「ニシユタカ」はすべてのDNAマーカーを持たず、他の品種・系統は各DNAマーカーのいずれかもしくは複数有していた。また、報告されている品種の抵抗性の表現型とDNAマーカーの有無はすべて一致していた。ジャガイモシストセンチュウに対して感受性である「北海56号」は、先に大林ら⁶¹⁾によって開発されたDNAマーカーPCNではプラスに判定されたが、本研究で用いた、より精度の高いN146およびN195マーカーを用いると期待通りマイナスに判定された。

(2)マルチプレックス PCR 法の開発

8品種・系統について、PCR反応におけるアニーリング温度は58°Cに固定し、プライマー添加濃度だけをPVX, R1, R2-800, Ry186, N146, N195, GBSSの順に変えながら加え、個別PCRの検定結果と一致するよう最適濃度を決定した。図7に示すように、各プライマーセットの添加

濃度が低いとマーカーバンドは不鮮明となり、高いとマーカーバンドの強度は増すが、図7のStep5におけるN195では、0.10 μMまで濃度を高めると非特異バンドが検出された。まず、PVXとR1のプライマー添加濃度は、それぞれ1.5 μMおよび0.75 μMの組み合わせが最も鮮明に両マーカーバンドを検出することができた。以下、図7のStep2からStep6に示すように、各プライマーセットの最適濃度は、R2-800では0.25 μM、Ry186では0.10 μM、N146およびN196はいずれも0.05 μMであり、ポジティブコントロールであるGBSSでは0.15 μMであった。しかし、こうして得られた最適濃度でPCRを行うと、すべてのマーカーバンドの強度はやや不鮮明になった。そこで、サンプルあたりTaq DNA polymeraseを0.25 unitsから0.5 unitsに増加させると、いずれのマーカーバンドも検出感度は高まった(図7, Step7)。

(3)異なる鋳型 DNA 濃度に対する検出感度

雑種集団「T09068」の系統のうち、7つのDNAマーカーすべてを有する「T09068-57」とポジティブコントロールGBSS以外のDNAマーカーは全く持たない「ニシユタカ」を用いて、PCR反応液中の鋳型DNA濃度を変えて(15, 10, 5, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5および0.1ng/μl)マルチプレックスPCR反応を行い、各DNAマーカーバンドの検出限界を調査した(図8A)。

「T09068-57」では、鋳型DNA濃度が2.5 ng/μl

もしくはそれ以上の濃度ですべてのマーカーバンドは検出された。一方、「ニシユタカ」では、ポジティブコントロールGBSSが0.5 ng/ μ lでも検出されたが、他のDNAマーカーおよび非特異的バンドはいずれの濃度においても検出されなかった(図8A)。

(4) R1 および PVX マーカーの検出感度の改善

ポジティブコントロールGBSSは、鋳型DNA濃度が0.5 ng/ μ lでも検出されたが、2.5 ng/ μ lより低い濃度では、PVXやR1マーカーの検出は困難であった。したがって、あるサンプルの鋳型DNA濃度が2.5 ng/ μ lより低いと、仮に*Rx1*や*R1*を持っている個体であっても、PVXやR1マーカーが検出されないことで感受性として誤って判断されることとなる(図8A)。

前章で得られた結果も併せて考えると、PVXとR1の各プライマーセットは、PCR反応中におそらくプライマー間の相互作用を起こして、PVXのマーカーバンドの検出感度が低下しているものと思われる。そこで、PVXマーカーの検出感度を向上させるために、R1プライマーセットの濃度を0.75 μ Mから0.25 μ Mに低下させ、その代わりR1マーカーを前段階で選択的に増幅させるため、これまでのPCR反応サイクルの前に、熱変性94°Cで30秒、アニーリング68°Cで30秒、伸長反応72°Cで1.5分間を1サイクルとする5サイクルを追加した。これは、唯一R1マーカーが高いアニーリング温度(68°C)でも増幅可能であったためである(表15)。その結果、R1およびPVXのマーカーバンドの検出感度が高まり、鋳型DNA濃度が0.5 ng/ μ lの低濃度であっても、すべてのDNAマーカーバンドを検出することができた(図8B)。

(5) 雑種集団の評価と遺伝的分離

「コナフブキ」および「T07137-6」の雑種集団「T09068」の96系統を用い、改善されたマルチプレックスPCR反応により検定した結果、PCR反応ミスおよび非特異的バンドの発現もなく、すべてのDNAマーカーの有無を同時に得られ、個別に各プライマーセットを用いたPCR反応による検定結果とすべて一致した(図9)。

集団中のマーカーバンドの有無を見ると、N146とN195マーカーは完全に共分離し、組み換え型は得られなかった。また、分離比から判断して、親系統はR1を除くすべてのDNAマーカーについて一重式遺伝子型であると推定される(表16)。R1マーカーは、96個体中86個体で見られ、染色体無作為分配モデル(Random chromosome assortment model)や染色分体無作為分配モデル(Random chromatid assortment model)に基づく一重式遺伝子型から期待される分離比から大きく外れ、染色分体無作為分配モデル(Random chromosome assortment

model)に基づく二重式遺伝子型からの分離比に適合していた。したがって、R1マーカーを持つ親系統「T07137-6」は*R1*遺伝子を2つ持つ可能性が高いことを示唆している。ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子*HI*と疫病真性抵抗性遺伝子*R1*は第5番染色体上に座乗しているが、96系統中55系統(57.3%)はN146とN195マーカーを併せ持つか、R1マーカーを持つかのいずれかであった(表16)。

(6) 選抜個体の抵抗性検定結果

雑種集団「T09068」の96系統のうち、すべてのDNAマーカーを有していたのは「T09068-3」、「T09068-17」、「T09068-31」、「T09068-57」

および「T09068-91」の5系統であった。

これら5系統のうち、イモが確保できたものについて病虫害抵抗性検定を行った。ジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定には5系統すべてを供試することができ、カップ検定法によりいずれもジャガイモシストセンチュウ寄生型Ro1に対して抵抗性と判定された(表17)。

「T09068-17」および「T09068-31」の2系統は、PVYおよびPVXの接種検定により、接種葉および上位葉とも各ウイルスの感染時に検出される特異的な増幅バンド(PVYでは577 bp、PVXでは337 bpのバンド)⁴⁴⁾は確認されず、両系統とも抵抗性と判定した。出芽しなかった

「T09068-3」を除く4系統は、疫病無防除圃場でも疫病の発病は確認されず、すべてを抵抗性と判定した。したがって、病虫害抵抗性検定結果に基づく表現型は、調査した範囲内ではすべてDNAマーカーの結果と一致していた。

(7) 操作時間の比較

雑種集団「T09068」の96系統を用いて個別PCRを行い、DNAマーカーを有する系統のみを、PVX、R2-800、*Ry186*、N146+N195、R1の順に選抜した場合、のべPCRサンプル数は182サンプルであり、所要時間は997分であった(表18)。一方、マルチプレックスPCR法では、1回のPCR反応ですべてのサンプルについて同時に各マーカーバンドを増幅できるため、サンプル数は96で、所要時間は308分であり、個別PCRに比べ、サンプル数で52.7%、所要時間で30.9%に短縮した(表18)。

4) 考察

本章では、病虫害抵抗性遺伝子*HI*、*Rx1*、*R1*、*R2*および*Ry_{chc}*の有無を判別するDNAマーカーを同時検出できるマルチプレックスPCR法を開発した。この方法は、前章において開発したマルチプレックスPCR法に比べ、以下の点で優れていた。1) ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子*HI*は、これを密に挟むDNAマーカー(N146およびN195)によって置き換えられ、

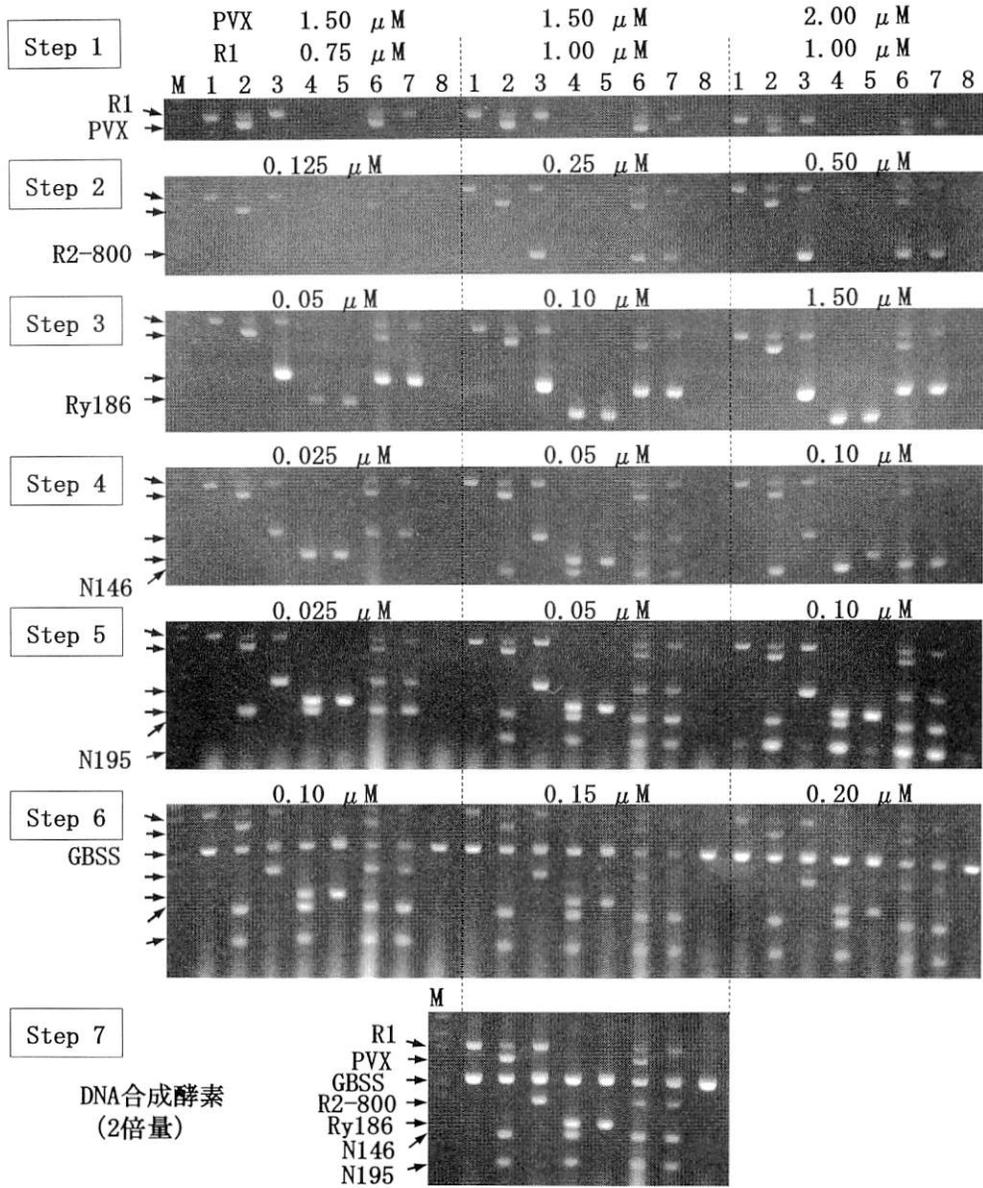


図7 新たに追加されるプライマーの添付濃度の改変と *Taq* DNA ポリメラーゼの添付量の最適化

注1) M : サイズマーカー (λ DNA *Hind*III/*Eco*RI double-digests)
 1 デジマ, 2 アイユタカ, 3 北海56号, 4 西海35号, 5 コナフブキ,
 6 T07137-6, 7 T08043-32, 8 ニシユタカ

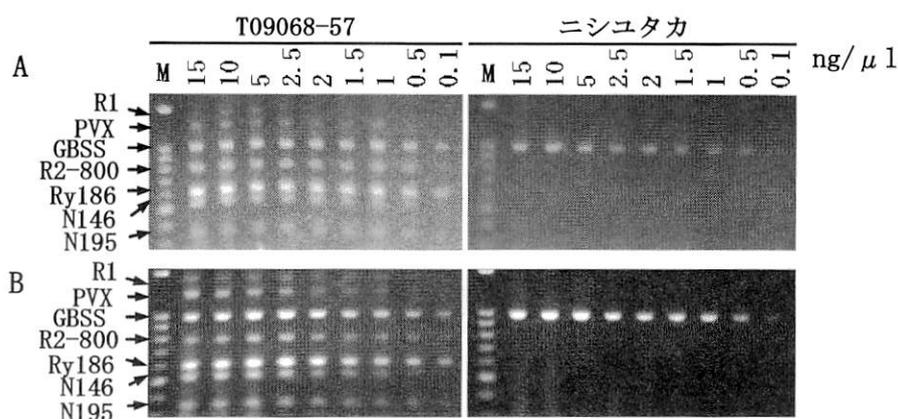


図8 PCR反応液中の鋳型DNA濃度とPCR反応の温度条件におけるDNAマーカーの検出感度の影響

注1) アニーリング温度：(A) 58°C (45サイクル)

(B) 68°C (5サイクル) → 58°C (35サイクル)

注2) T09068-57：5種類のDNAマーカーを有する.

ニシユタカ：すべてのDNAマーカーを有しない.

注3) M：サイズマーカー (100 bp DNA ラダー (0.1-1.0 and 1.5 kbp))

表16 4倍体雑種集団T09068 (96個体) のDNAマーカーの遺伝的分離

DNAマーカー	染色体 ₁₎	交配親 ¹⁾		DNAマーカー		一重式 ³⁾ (<i>Rrrr</i> × <i>rrrr</i>)		二重式 ³⁾ (<i>RRrr</i> × <i>rrrr</i>)	
		コナフブキ	T07137-6	あり	なし	A (1:1)	B (0.87:1)	A (5:1)	B (3.7:1)
N146	5	-	+	45	51	0.54	0.945		
N195	5	-	+	45	51	0.54	0.945		
PVX	12	-	+	49	47	0.838	0.375		
R1	5	-	+	86	10	<0.001 **	<0.001 **	0.1	0.009 **
R2-800	4	-	+	38	58	0.041	0.173		
Ry186	9	+	-	48	48	1	0.495		

注1) 標的遺伝子を有する染色体

2) + : DNAマーカーあり, - : DNAマーカーなし

3) 観察された分離比は, 染色体無作為分配モデル (A) と染色分体無作為分配モデル(B) の期待値に対する χ^2 検定による検定結果. **: 期待値と有意差 ($P < 0.01$) があることを示している.

表17 病虫害抵抗性検定結果

系統名	ジャガイモシストセンチュウ	ジャガイモYウイルス	ジャガイモXウイルス	疫病
T09068-3	R	NT	NT	NT
T09068-17	R	R	R	R
T09068-31	R	R	R	R
T09068-57	R	NT	NT	R
T09068-91	R	NT	NT	R

注) R 抵抗性, S 感受性, NT 未検定

表18 96個体の5つの病虫害抵抗性遺伝子を検出するための個別PCRおよびマルチプレックスPCRにおける作業時間および検定個体数の比較

DNA マーカー	個別PCR					新しく開発したマルチプレックスPCR			
	段階	サンプル数	あり	なし	作業時間(分) ¹⁾	サンプル数	あり	なし	作業時間(分) ¹⁾
PVX	1	96	49	47	224	96	49	47	308
R2-800	2	49	18	31	202		40	56	
Ry186	3	18	13	5	189		48	48	
N146+N195	4	13	6	7	199		45	51	
R1	5	6	5	1	183		86	10	
合計		182			997	96			308

注1) 作業時間には、DNAサンプルのチューブへの添付、PCR反応液の調整、PCR反応、電気泳動およびその判定時間を含む

高精度に検出できた。事実、供試した96系統のうちマーカー間で組み換え型は検出されなかった。2) PVY抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* は、新たに加えた密に連鎖するDNAマーカーRy186によって同時に検出することができた。3) 疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* は、新たに置き換えたDNAマーカーR2-800によって、*R2*を持つ「北海56号」および「さやあかね」のいずれの雑種後代でも利用できた。4) ポジティブコントロールGBSSのDNAマーカーを組み込むことで、PCR反応ミスによって生ずる誤判定を避けることができた。

DNAマーカーの検出に要する時間とコストは、MASを利用した育種プログラムでは重要な問題である^{83), 43), 82)}。新たに開発したマルチプレックスPCR法は、Gebhardt *et al.*²³⁾が行ったDNAマーカーごとに絞り込んでいく選抜法に比べ、

PCRサンプル数で半減し、所要時間では1/3に減少させることができた。PCR反応に用いる *Taq* DNA polymeraseの使用量は2倍になったが、全体のコストは明らかに減少した。また、DNA自動抽出装置で抽出された平均DNA濃度は23.6 ng/ μ lであり、PCR反応液10 μ l中にDNA溶液2 μ lを用いたので、平均鋳型DNA濃度は4.72 ng/ μ lであったことになる。また、最も低いDNA濃度は3 ng/ μ lで、これは鋳型DNA濃度0.6 ng/ μ lに相当する。図8で明らかにしたように、0.5 ng/ μ lの鋳型DNA濃度が各DNAマーカーを同時検出できる検出限界であるので、すべてのDNAサンプルはマーカー検出に必要な濃度があったことになる。したがって、事前にDNA濃度を測定する必要はなく、DNA自動抽出装置とマルチプレックスPCRを利用することにより、実用的

な育種技術となることが期待される。

「コナフブキ」と「T07137-6」を親とする4倍体雑種集団「T09068」におけるR1マーカーの分離比から、「T07137-6」はRIを二重式に持つことが示唆された。「T07137-6」の両親である「北海56号」と「アイユタカ」が両方ともRIを持つことから(表14)、その雑種はRIを2つ持つよ

うになったと考えられる。また、「T07137-6」は、第5番染色体に座乗しているRIとHIの両方を持っている(表16)。しかし、雑種後代系統の57.3%はRIとHIのマーカーのいずれか一つしか持たなかったことから、「T07137-6」は4本の相同な第5番染色体のうち、2本がRIを持ち、これと別の1本がHIを持つと推定される。

総合考察

本研究では、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子HI、PVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} および青枯病に対して抵抗性を持ち、良食味でカロテノイドを含む「西海35号」を育成した。本系統は、育種の途中段階(系統選抜試験)でDNAマーカーを利用して選抜した我が国で最初の系統である。

普通バレイショの多くが持つT/β型細胞質ゲノム^{18), 26), 64), 65), 42)}は、細胞質と核遺伝子の相互作用によってさまざまな雄性不稔性を引き起こし²⁴⁾、交配父本の選定に大きく制限をかけている。しかし、「西海35号」はS/ε型細胞質ゲノムを持つため、高い雄性稔性を持ち、かつ雌性稔性も高い。これを母本とした後代系統は同じS/ε型細胞質ゲノムを持つため、「西海35号」と同様に高い雌雄稔性を持つことが明らかにされた。

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子給源としてHI遺伝子を二重式で持つ「R392-50」⁵¹⁾は抵抗性品種の育成に大きな役割を果たし、近年育成されたほとんどの品種はHI遺伝子を持っている⁵⁰⁾。しかし、ウイルス病で最も被害の大きいPVYに抵抗性を示す品種は、でん粉原料用品種「コナフブキ」(1981年)と「サクラフブキ」(1994年)のみで、暖地二期作向け品種はすべて感受性である。したがって、「西海35号」はPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} の供給源として利用価値が高い。

さらに本研究では、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子HIとPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} の他に、PVX抵抗性遺伝子 $Rx1$ 、疫病真性抵抗性遺伝子RIおよびR2の有無を、これらに密に連鎖するDNAマーカーを用いて、同時検出可能なマルチプレックスPCR法を開発し、育種の実用レベルで高精度に判定できるようになった。例えば、愛野支場の育種プログラムを例

にとると、2002年ではジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子HIおよびPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} に連鎖するDNAマーカーを用いて、のべ334個体に対して検定が実施された。その後、使用可能なDNAマーカーの増加により2005年以降のべ検定個体数は年間1,000個体を越え、さらに2007年以降マルチプレックスPCR法の開発に着手し、2009年にはのべ3,000個体を越えた。この間、マルチプレックスPCR法の開発により、検定個体数が増加しても所要時間やコストはほとんど増加することはない。

以上に述べたように、本研究で育成した「西海35号」は、ジャガイモシストセンチュウ、PVYおよび青枯病に対する抵抗性遺伝子供与親として重要であり、特にジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子HIおよびPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} はこれらに強連鎖するDNAマーカーが利用できるため(図4)、育種の効率化に果たす役割は大きい。また、「西海35号」を母親として利用する限りその後代系統で高い雄性稔性が維持されるので花粉親としての利用価値は高い。既に「西海35号」を交配親として、ジャガイモシストセンチュウおよびPVY抵抗性で、良食味かつ高カロテノイド含有系統である「西海37号」および「西海39号」、あるいは極多収系統「西海38号」が選抜・育成されている。したがって、「西海35号」は暖地二期作主要品種である「デジマ」や「ニシユタカ」に比べ上イモ重は明らかに低いものの、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子HIおよびPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} を供与するための育種系統として極めて有用性が高いと考えられる。さらにこれら有用遺伝子を効率よく利用できるマルチプレックスPCRを併用は、今後のバレイショ育種にとって大きな意義を持つものと考えられる。

要約

食に対する消費者の安全志向および生産者のニーズに応えるため、病虫害抵抗性品種は、有機農業を含めた「環境に配慮した農産物」を生産するための重要な要件であり、今後、その必要性はさらに高まることが予想される。近年、パレイショ (*Solanum tuberosum* L.) ではジャガイモシストセンチュウの拡大が大きな問題となっており、品種育成において抵抗性遺伝子 *HI* 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。しかし、PVYに対する抵抗性育種はまだ緒についたばかりで、雌雄稔性の高い病虫害複合抵抗性系統、ならびに効率的な選抜手法の開発が望まれる。

第1章では、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」をチューバーディスク培養法により倍加した4倍体系統「TD0101」を母親とし、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* とPVY抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* を持つ「サクラフブキ」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。「西海35号」は良食味で、生イモ100g当たりゼアキサントンを17.4 μ g、ルテインを58.8 μ gを含有していた。*HI* 遺伝子と *Ry_{chc}* 遺伝子について一重式遺伝子型であり、青枯病抵抗性を併せ持つ病虫害複合抵抗性系統である。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%から68.2%で、果実当たり平均種子数は84.5から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%から58.6%で、果実当たり平均種子数は126.9から135.3粒と高い交雑能力を示した。また、「西海35号」を父本として育成した後代系統は、母本(細胞質ゲノム)の影響を受け平均結実率はそれぞれ0~22.9%で、果実当たりの平均種子数も0から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を花粉親とすると、平均結実率は41.9%から50.9%と高く、果実当たりの平均種子数も149.2から159.5粒と多かった。したがって本系統は、高い雌雄稔性を有し、母本として育成した後代系統においても高い雌雄稔性が期待でき、病虫害複合抵抗性系統として極めて有用性が高いと考えられる。

第2章では、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 *HI*、ジャガイモXウイルス抵抗性遺伝子 *Rx1*、および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, R1 およびR2-974)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、PCN, R1 およびR2-974のプライマーセットについてはそれぞれ0.125 μ M, PVXについては1.0 μ Mになるよう混合することにより、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。また、DNAサンプル濃度は、1 ng/ μ l以上であれば、マーカーの同時検出が可能であることを明らかにした。

第3章では、前章で開発したマルチプレックスPCR法の改善を目指し、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* はこれを密に挟むDNAマーカーN146とN195に、疫病真性抵抗性遺伝子 *R2* はより特異性の高いR2-800に組み換え、さらにPVY抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* に密に連鎖するDNAマーカーRy186を組み込むマルチプレックスPCR法を開発した。ポジティブコントロールとしてすべてのパレイショで有する顆粒性澱粉合成酵素遺伝子 *GBSS* のDNAマーカーを組み込むことで、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。96系統からなる雑種集団に本手法を適用して、5つ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マーカーごとに絞り込んでいく選抜法に比べ、PCRサンプル数で半減し、所要時間では1/3に減少させることができた。またDNA自動抽出装置で抽出されたDNA濃度は3から83 ng/ μ lであり、いずれも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。

したがって、本研究で育成された「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 *HI* とPVY抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* を併せ持つ病虫害複合抵抗性系統で、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。これら抵抗性遺伝子を効率よく選抜できるマルチプレックスPCRと併せ、今後のパレイショ育種にとって大きな意義を持つものと考えられる。

謝辞

神戸大学大学院農学研究科の石井尊生教授には指導教員として終始懇切丁寧なご指導ならびに本稿の詳細なご校閲と貴重な意見を賜った。また、神戸大学大学院農学研究科の伊藤一幸教授、ならびに森直樹准教授には副指導教員として終始懇切丁寧なご指導とご助言を頂き、謹んで感謝申し上げます。本論文をとりまとめるにあたり、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センターバレイショ先端遺伝特別研究室の保坂和良博士には、終始懇切丁寧なご指導とご助言を頂き、さらに本稿のご校閲を賜った。心より感謝申し上げます。

元愛野馬鈴薯支場長の小村国則氏は、他の研究機関に先立ちDNAマーカーの開発に着手され、さらに、バレイショの倍数性操作や有用遺伝子の導入可能なチューバーディスク培養技術を確立された。バレイショ育種の基礎的研究やその先見性に敬意を払うとともに、本研究の端緒を与えられたことに深く感謝申し上げます。

地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部北見農業試験場の竹内徹氏には、ジャガイモシストセンチュウおよびジャガイモYウイルス抵抗性遺伝子に連鎖するDNAマーカーの配列情報を提供いただいた。独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センターの眞岡哲夫博士には、本研究で用いた親系統のウイルス接種検定の実施およびウイルスの提供をいただいた。また、奈良部孝博士には、カップ検定によるジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定を実施していただいた。心より感謝申し上げます。

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バレイショ育種に取り組んだ中尾敬氏、田宮誠司氏、向島信洋氏、坂

本悠氏、草原典夫氏に深く感謝申し上げます。また、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小川哲治氏には、ウイルス抵抗性検定についてご協力いただいた。深く感謝申し上げます。バレイショ育種に利用可能な数多くのDNAマーカーを開発した長崎県農林技術開発センター農産園芸研究部門花き・生物工学研究室大林憲吾氏には、マルチプレックスPCR法に関して貴重な助言をいただいた。

本研究は、大林氏が開発したDNAマーカーなくして遂行することは不可能であり、その功績に敬意を払い感謝申し上げます。選抜系統のジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定にご協力いただいた長崎県病虫害防除所小川恭弘氏ならびに長崎県県央振興局河原幹子氏に深く感謝申し上げます。カロテノイド分析において、東京家政学院大学生生活現代生活学部健康栄養学科教授林一也博士ならびに綿貫仁美氏、東京家政学院大学生生活現代生活学部生活デザイン学科奈良一寛氏、山崎薫氏にご協力いただいた。深く感謝申し上げます。「西海35号」の病虫害抵抗性検定試験の担当者にはそれぞれの分野でご尽力いただいた。

さらに、馬鈴薯研究室の溝上勝志氏、松島常幸氏、大町慎吾氏、鹿屋登氏、迎田幸博氏、酒井真二氏、金崎美弘氏ならびに臨時職員各位には、育種試験を支える圃場管理やDNAマーカーの検定作業の業務にご尽力いただいた。事務職員各位には育種研究に関わる事務会計業務にご尽力頂きました。ここに記して、深く感謝申し上げます。長崎県農林技術開発センター所長江頭正治氏をはじめ歴代長崎県総合農林試験場長ならびに歴代愛野馬鈴薯支場長には、本研究を遂行するにあたり多くの支援をいただいた。深く感謝申し上げます。

Summary

We have been breeding the potato varieties suitable for warmer double-cropping regions in Japan at Nagasaki Agriculture and Forestry Experiment Station. Our breeding objectives are to add not only high-yielding ability, yield stability and early tuber growth habit but also multiple resistances to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* (PCN) that appeared in our prefecture in 1992, potato virus X (PVX), potato virus Y (PVY), late blight and so on.

For use as a parent in breeding, male and female fertility is an important concern, because breeders often encountered sterility problems in genotypes with desirable resistance traits. For this reason, we need favorable line with high male and female fertility. We planned to combine desirable characters of Inca-no-mezame (good taste, bacterial wilt resistance, short tuber dormancy and *S/ε* cytoplasm) with *H1* and *Ry_{chc}* genes.

The resultant Saikai 35 was bred from a cross between TD0101 as the female, which was created by chromosome-doubling of a good-tasting and bacterial wilt resistant diploid variety, Inca-no-mezame, and Sakurafubuki as the male, the latter of which has *H1* and *Ry_{chc}* genes showing resistance to potato cyst nematode (PCN) and *Potato virus Y* (PVY), respectively. All favorable traits were combined into Saikai 35, although marketable yield in the spring cropping was 20.4 - 21.0% lower than those of major double-cropping varieties. Saikai 35 is particularly useful for having *Solanum phureja*-derived cytoplasm (*S/ε*), which resulted in high male and female fertility. In addition, sets of very tightly linked DNA markers sandwiching *H1* and *Ry_{chc}* are available. Therefore, Saikai 35 is being released as a breeding line, which can confer efficiently PCN and PVY resistance genes.

The evaluation of pest resistances was always time-consuming and tedious using disease-infected fields or inoculation tests. Recently, DNA markers, genetically linked with the resistance genes to PCN, PVX, PVY, R1 and R2 genes to late blight, were developed, which have facilitated marker-assisted selection (MAS) of resistant lines at an early selection stage. However, there are still some problems to apply MAS to the practical breeding program. We need an easier method to extract hundreds of DNA samples that are suitable to PCR for MAS, and an adjusted PCR condition that makes all DNA marker amplification in one tube, although the best PCR condition has been reported separately for each of DNA markers.

We tried a multiplex PCR method for DNA markers for four resistance genes. We optimized the concentration of each primer sets for DNA markers into the PCR reaction mixture and the best annealing temperature of PCR. The results of DNA markers fit completely to those obtained by the primer set used separately.

We had developed and were using a multiplex PCR method for selection of resistance genes to cyst nematode (*H1*), *Potato virus X* (*Rx1*) and late blight (*R1* and *R2*). Since then, more reliable and tightly linked markers for *H1* and *R2*, and a new marker for resistance to *Potato virus Y* (*Ry_{chc}*) were developed. All these superior markers, including a positive marker to eliminate PCR-failed samples, were incorporated into one multiplex PCR assay. We optimized the concentration of each primer sets for DNA markers and the enzyme which amplified DNA markers into the PCR reaction mixture and the best annealing temperature of PCR. The results of DNA markers fit completely to those obtained by the primer set used separately. Using the newly developed multiplex PCR technique, five plants potentially harboring all five resistance genes were selected from 96 hybrid plants approximately five hours after DNA extraction, which is a third of the operation time compared with separate PCR reactions for each marker.

引用文献

- 1) 浅間和夫, 伊藤平一, 村上紀夫, 伊藤武, ばれいしょ新品種「コナフブキ」の育成について, 北海道立農業試験場集報 48, 75~84(1982)
- 2) Babu R, Nair SK, Prasanna BM, Gupta HS
Integrating marker-assisted selection in crop breeding - Prospects and challenges. *Cur Sci* 87, 607~619(2004)
- 3) Bakker E, Achenbach U, Bakker J, van Vliet J, Peleman J, Segers B, van der Heijden S, van der Linde P, Graveland R, Hutten R, van Eck H, Coppoolse E, van der Vossen E, Bakker J, Goverse A, A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor Appl Genet* 109, 146~152(2004)
- 4) Ballvora A, Ercolano MR, Weiß J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamini F, Gebhardt C, 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(2002)
- 5) Barone A, Molecular marker-assisted selection for potato breeding, *Am J Pot Res* 81, 111~117(2004)
- 6) Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC, The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses, *Plant Cell* 11, 781~791(1999)
- 7) Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes, application to the *Rx2* locus in potato, *Plant J* 21, 73~81(2000)
- 8) Black W, Inheritance of resistance to two strains of blight (*Phytophthora infestans* de Bary) in potatoes. *Trans Roy Soc Edinburgh* 61, 137~147(1943)
- 9) Black W, Mastenbroek C, Mills WR, Peterson LC, A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives, *Euphytica* 3, 173~179(1953)
- 10) Brodie BB, Potato cyst nematodes, In, *Compendium of Potato Diseases*, second edition (edited by Stevenson RW, Loria R, Franc GD, Weingartner DP), APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp 45~50(2001)
- 11) Bryan GJ, McNicol J, Ramsay G, Meyer RC, De Jong WS, Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants, *Theor Appl Genet* 99, 859~867 (1999)
- 12) Choo BK, Moon BC, Ji Y, Kim BB, Choi G, Yoon T, Kim HK, Development of SCAR markers for the discrimination of three species of medicinal plants, *Angelica decursiva* (*Peucedanum decursivum*), *Peucedanum praeruptorum* and *Anthriscus sylvestris*, based on the Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), *Biol Pharm Bull* 32, 24~30(2009)
- 13) Chuma T, Hashimoto S, Okamoto K, Detection of thermophilic amphylobacter from sparrows by multiplex PCR, The role of sparrows as a source of contamination of broilers with camphylobacter, *J Vet Med Sci* 62, 1291~1295(2000)
- 14) Cockerham G, Potato breeding for virus resistance, *Ann Appl Biol* 30, 105~108(1943)
- 15) Cooper JP, Howard HW, The chromosome numbers of seedlings from the cross *Solanum demissum* × *tuberosum* backcrossed by *S. tuberosum*, *J Genet* 50, 511~521(1952)
- 16) de la Cerda CGM, Herrera RR, Gonzalez CNA, Valdés MHR, Multiplex-PCR detection of accompanying GMO transgenic sequences, *Int J Engineer Techn* 1, 285~287(2009)
- 17) Dionne LA, Cytoplasmic sterility in derivatives of *Solanum demissum*. *Amer Potato J* 38, 117~120(1961)
- 18) Douches DS, Ludlam K, Freyre R, Isozyme and plastid DNA assessment of pedigrees of nineteenth century potato cultivars, *Theor Appl Genet* 82, 195~200(1991)
- 19) Frey JE, Frey B, Sauer C, Kellerhals M, Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding, *Plant Breed* 123, 554~557(2004)
- 20) Fry WE, Goodwin SB, Resurgence of the Irish potato famine fungus, *BioScience* 47, 363~371(1997)

- 21) Gebhardt C, RFLP mapping in potato of qualitative and quantitative genetic loci conferring resistance to potato pathogens, *Amer Potato J* 71, 339~345 (1994)
- 22) Gebhardt C, Mugniery D, Ritter E, Salamini F, Bonnel E, Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato, *Theor Appl Genet* 85, 541~544 (1993)
- 23) Gebhardt C, Bellin D, Henselewski H, Lehmann W, Schwarzfischer J, Valkonen JPT, Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato, *Theor Appl Genet* 112, 1458~1464 (2006)
- 24) Grun P, Ocha C, Capage D, Evolution of cytoplasm factors in tetraploid cultivated potatoes (*Solanaceae*), *Am J Bot* 64, 412~420 (1977)
- 25) Hosaka K, Who is the mother of the potato? - restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA of cultivated potatoes, *Theor Appl Genet* 72, 606~618 (1986)
- 26) Hosaka K, Similar introduction and incorporation of potato chloroplast DNA in Japan and Europe, *Jpn J Genet* 68, 55~61 (1993)
- 27) Hosaka K, T-type chloroplast DNA in *Solanum tuberosum* L, ssp. *tuberosum* was conferred from some populations of *S. tarijense* Hawkes, *Am J Pot Res* 80, 21~32 (2003)
- 28) Hosaka K, Evolutionary pathway of T-type chloroplast DNA in potato, *Am J Pot Res* 81, 153~158 (2004a)
- 29) Hosaka K, An easy, rapid, and inexpensive DNA extraction method, "One-minute DNA extraction," for PCR in potato, *Am J Pot Res* 81, 17~19 (2004b)
- 30) Hosaka K, Hanneman RE Jr, The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA, *Theor Appl Genet* 76, 172~176 (1988)
- 31) Hosaka K, de Zoeten GA, Hanneman RE Jr, Cultivated potato chloroplast DNA differs from the wild type by one deletion - evidence and implications, *Theor Appl Genet* 75, 741~745 (1988)
- 32) Hosaka K, Hosaka Y, Mori M, Maida T, Matsunaga H, Detection of a simplex RAPD marker linked to resistance to potato virus Y in a tetraploid potato, *Am J Pot Res* 78, 191~196 (2001)
- 33) Huijsman CA, Breeding for resistance to the potato root eelworm, 2, Data on the inheritance of resistance in Andigenum-Tuberosum crosses obtained in 1954, *Euphytica* 4, 133~140 (1955)
- 34) 井上平, 坂口壮一, 暖地の春秋作ジャガイモにおける葉巻病およびジャガイモYウイルスによるモザイク病防除, 長崎総農林試報 14, 31~59 (1986)
- 35) 入倉幸雄, ばれいしょ種間交雑に関する研究, I 倍数体および半数体利用による異種ばれいしょと普通ばれいしょとの交雑不和合性の克服, 北海道農業試験場彙報 92, 21~37 (1968)
- 36) Kobayashi A, Ohara-Takada A, Tsuda S, Matsuura-Endo C, Takada N, Umemura Y, Nakao T, Yoshida T, Hayashi K, Mori M, Breeding of potato variety "Inca-no-hitomi" with a very high carotenoid content, *Breed Sci* 58, 77~82 (2008)
- 37) 小村国則, 大林憲吾, 三倍体バレイショ「アデス赤」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 (2002)
- 38) 串田篤彦, 百田洋二, ジャガイモシストセンチュウ国内地域個体群のH1抵抗性品種での増殖性, 日本線虫学会誌 35, 87~90 (2005)
- 39) Leonards-Schippers C, Gieffers W, Salamini F, Gebhardt C, The *R1* gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V, *Mol Gen Genet* 233, 278~283 (1992)
- 40) Li X, van Eck HJ, Rouppe van der Voort JNAM, Huigen DJ, Stam P, Jacobsen E, Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers, the *R2* allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4, *Theor Appl Genet* 96, 1121~1128 (1998)
- 41) Lössl A, Adler N, Horn R, Frei U, Wenzel G, Chondriome type characterization of potato, mt α , β , γ , δ , ϵ and novel

- plastid-mitochondrial configurations, *Theor Appl Genet* 99, 1~10(1999)
- 42) Lössl A, Götz M, Braun A, Wenzel G, Molecular markers for cytoplasm in potato, male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production, *Euphytica* 116, 221~230(2000)
- 43) Mahony JB, Blackhouse G, Babwah J, Smieja M, Buracond S, Chong S, Ciccotelli W, O' Shea T, Alnakhli D, Griffiths-Turner M, Goeree R, Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infection, *J Clin Microbiol* 47, 2812~2817(2009)
- 44) Maoka T, Sugiyama S, Maruta Y, Hataya T, Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 potato viruses, *Plant Dis* 94, 1248~1254(2010)
- 45) Moczulski M, Salmanowicz BP, Multiplex PCR identification of wheat HMW glutenin subunit genes by allele-specific markers, *J Appl Genet* 44, 459~471(2003)
- 46) 百田洋二, 串田篤彦, 植原健人, 森元幸, 高田明子, プラスチックカップによるジャガイモシストセンチュウ抵抗性の新検定法, 平成 14 年度「新しい研究成果~北海道地域~」, 北海道農研, pp 116~118(2003)
- 47) 森一幸, 田宮誠司, バレイショ塊茎を用いた病虫害抵抗性マーカー検定用 DNA 簡易抽出法の開発, *育種学研究* 8(2), 108(2006)
- 48) 森一幸, 小村国則, 保坂和良, 1 分間 DNA 抽出法を用いたバレイショ育種における DNA マーカー選抜, *育種学研究* 5(2), 191(2003)
- 49) 森一幸, 田宮誠司, 向島信洋, 「1 分間 DNA 抽出法」による各種 DNA マーカーを用いたバレイショ病虫害抵抗性個体の選抜法, *育種学研究* 8(1), 77(2006)
- 50) 森元幸, 日本におけるジャガイモシストセンチュウ抵抗性品種の育成, *北農* 76, 7~13(2009)
- 51) 森元幸, 梅村芳樹, ジャガイモのシストセンチュウ抵抗性品種の育成, *線虫研究の歩み*, 日本線虫研究会, pp 272~276(1992)
- 52) Mori M, Tsuda S, Mukojima N, Kobayashi A, Matsuura-Endo C, Ohara-Takada A, Zaidul ISM, Breeding of potato cyst nematode resistant varieties in Japan, In, *Potato production and innovative technologies* (edited by Haverkort AJ, Anisimov BV), Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp 328~339(2007)
- 53) 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, 橙黄肉色を有する二倍体のバレイショ品種「インカのみぎめ」の育成, *育種学研究* 11, 53~58(2009)
- 54) 向島信洋, 中尾敬, 森一幸, 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(2003)
- 55) Munoz FJ, Plaisted RL, Thurston HD, Resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, *Amer Potato J* 52, 107~115(1975)
- 56) 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, 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(1995)
- 57) 新村和則, 金川寛, 三上隆司, 福森武, イネ品種判別用マルチプレックス PCR プライマーセットの開発, *育種学研究* 7, 87~94(2005)
- 58) 農林水産省大臣官房情報課, 有機農業をはじめとする環境保全型農業に関する意識・意向調査結果(2007)
- 59) 農林水産省生産局生産流通振興課, いも・でん粉に関する資料(2010)
- 60) 小川哲治, 佐山充, 迎田幸博, ジャガイモ疫病防除薬剤の耐雨性の評価, *九病虫研報* 54, 13~17(2008)
- 61) 大林憲吾, 中田奈津子, 茶谷正孝, 小村国則, 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(2010)
- 62) Pineda O, Bonierbale MW, Plaisted RL, Identification of RFLP markers linked to the *HI* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*, *Genome* 36, 152~156(1993)
- 63) Plaisted JL, Hoopers RW, The past record and future prospects for the use of

- exotic potato germplasm, Amer Potato J 66, 603~627 (1989)
- 64) Powell W, Baird E, Doucan N, Waugh R, Chloroplast DNA variability in old and recently introduced potato cultivars, Ann Appl Biol 123, 403~410(1993)
- 65) Proven J, Powell W, Dewar H, Bryan G, Machray GC, Waugh R, An extreme cytoplasmic bottleneck in the modern European cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is not reflected in decreased levels of nuclear diversity, Proc R Soc Lond B 266, 633~639(1999)
- 66) Randhawa GJ, Singh M, Sharma R, Validation of *ST-LSI* as an endogenous reference gene for detection of *AmA1* and *cryIAb* genes in genetically modified potatoes using multiplex and real time PCR, Am J Pot Res 86, 398~405(2009)
- 67) Ritter E, Debener T, Barone A, Salamini F, Gebhardt C, RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX), Mol Gen Genet 227, 81~85(1991)
- 68) Ross H, Potato breeding-problems and perspectives, Verlag Paul Parey, Berlin (1986)
- 69) Rudorf W, Methods and results of breeding resistant strains of potatoes, Amer Potato J 27, 332~339(1950)
- 70) Sato M, Nishikawa K, Komura K, Hosaka K, *Potato virus Y* resistance gene, *Ry_{chc}*, mapped to the distal end of potato chromosome 9, Euphytica 149, 367~372(2006)
- 71) 沢畑秀, 田渕尚一, 藤山俊計, 小村国則, ばれいしょ新品種“メイホウ”について, 長崎総農林試研報 15, 1~19(1987)
- 72) 佐山充, 小川哲治, 迎田幸博, アルミ蒸着テ〜プおよび防虫ネットがバレイシヨの Potato Virus Yの感染に与える影響, 九病虫研報 51, 6~10(2005)
- 73) Simko I, Comparative analysis of quantitative trait loci for foliage resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing *Solanum* species, Am J Pot Res 79, 125~132(2002)
- 74) Spooner DM, Fajardo D, Bryan GJ, Species limits of *Solanum berthaultii* Hawkes and *S. tarijense* Hawkes and the implications for species boundaries in *Solanum* sect, *Petota* Taxon 6, 987~999 (2007)
- 75) Sukhotu T, Kamijima O, Hosaka K, Nuclear and chloroplast DNA differentiation in Andean potatoes, Genome 47, 46 56(2004)
- 76) 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, ばれいしょの病害虫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(2009)
- 77) 田中俊憲, 小村国則, 遺伝子診断技術によるジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定法, 長崎総農林試研報 26, 1~18 (2000)
- 78) Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW, RFLP mapping in plant breeding, New tools for an old science, BioTechnology 7, 257~263(1989)
- 79) 寺本健, 中須賀孝正, 松尾和敏, 菅康弘, 小川哲治, 長崎県におけるジャガイモシストセンチュウの発生生態と防除, 長崎総農林試研報 24, 39~62(1998)
- 80) 月川雅夫, 長崎ジャガイモ発達史, 長崎県種馬鈴薯協会(1990)
- 81) 浦崎直也, 上原司, 河野伸二, スクロース合成酵素遺伝子を内部コントロールに用いたカンキツグリーンング病の高精度PCR診断法, 日植病報 73, 25~28(2007)
- 82) Utomo HS, Wenefrida I, Blanche SB, Linscombe SD, Low-cost method for streamlining marker-assisted selection and breeding line development in rice (*Oryza sativa* L.), Int J Genet Mol Biol 1, 64~74(2009)
- 83) Xu Y, Crouch JH, Marker-assisted selection in plant breeding, From publications to practice, Crop Sci 48, 391~407(2008)
- 84) Watanabe JA, Watanabe KN, Pest resistance traits controlled by quantitative loci and molecular breeding strategies in tuber-bearing *Solanum*, Plant Biotechnology 17, 1~16 (2000)
- 85) Waugh R, Glendinning DR, Duncan N, Powell W, Chloroplast DNA variation in European potato cultivars, Potato Res 33, 505~513(1990)