

育種現場で利用できるイチゴ萎黄病耐病性個体選抜技術の確立

1. 試験のねらい

イチゴ萎黄病はいちごの最重要病害の一つであり、耐病性品種開発への期待が大きい。しかし、病原菌接種による耐病性検定等に多大な労力を要することから、これらの省力化が図れる萎黄病耐病性を判別するDNAマーカーを開発した（研究成果集第31号）。

本研究では、これを育種現場へ導入するための、さらなる低コスト省力化技術を確立する。

2. 試験方法

(1) とちおとめおよびアスカウェイブの塩基配列解読

これまでに開発した萎黄病耐病性判別 DNA マーカーは、検出が不安定になる場合があった。そこで、更に DNA マーカーを改良するため、萎黄病罹病性品種とちおとめと耐病性品種アスカウェイブの DNA マーカー周辺の塩基配列を解読し、品種特異的な配列を探した。

(2) マーカーの高精度化

品種特異的な塩基配列をもとに、より安定的に検出できるよう萎黄病耐病性判別 DNA マーカーの改良を試みた。また、改良した DNA マーカーの信頼性を確認するため、萎黄病耐病性に関する分離集団や主要なイチゴ萎黄病耐病性品種を供試し、DNA マーカーの増幅を確認した。

(3) 簡易検査法の検討

育種現場で DNA マーカーを簡易に検出できるよう、改良した萎黄病耐病性判別 DNA マーカーを供試してダイレクト PCR 法を検討した。また、検出時間やコストについて試算を行った。

3. 試験結果および考察

(1) とちおとめおよびアスカウェイブについて、DNA マーカー周辺の DNA 配列を解読して比較解析した結果、アスカウェイブに特異的な 869bp の挿入配列が認められた。挿入配列以外では、数塩基の違いは多数見つかったが、大きな違いはなかった（図-1）。

(2) アスカウェイブに特異的な挿入配列を用いて DNA マーカーの改良を試みた結果（図-1）、これまでのマーカーに比べてより安定して耐病性品種・系統を判別できることが明らかとなった（図-2）。

(3) マーカー検出をダイレクト PCR 法で行った場合、96 検体あたりの DNA マーカー検出に要する延べ時間は 11 時間（1.4 日）、コストは 1 検体あたり 50 円であった（表）。これは、比較した検出法と比べ、大幅に時間・コストともに改善しており、萎黄病耐病性個体の選抜にはダイレクト PCR 法が望ましいと考えられた。

4. 成果の要約

改良したイチゴ萎黄病耐病性判別 DNA マーカーを用いると、アスカウェイブ由来の萎黄病耐病性を持つ個体を、より安定的に選抜できた。また、選抜にダイレクト PCR 法を用いると、従来の方法より早く、安価に DNA マーカーを検出することができ、育種現場での利用が図れる。

（担当者 生物工学研究室 松島雄大*、飯村一成**）

*現 下都賀農業振興事務所、**現 農業大学校

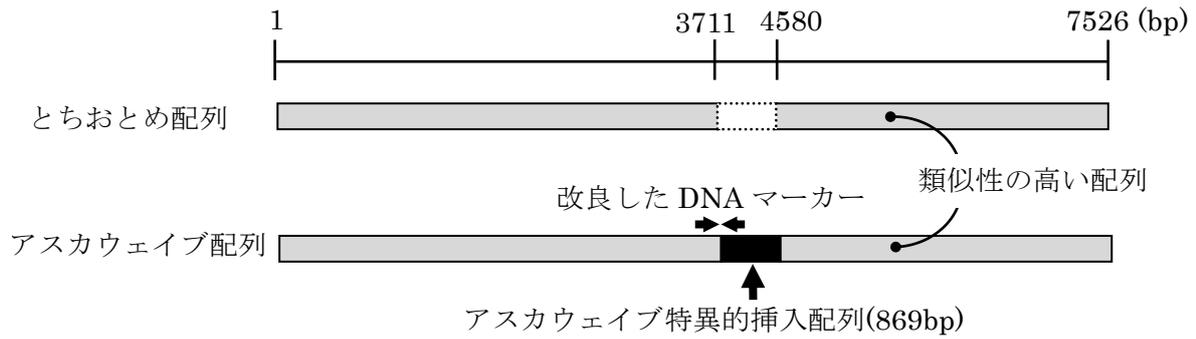


図-1 とちおとめとアスカウェイブの DNA マーカー周辺配列模式図

注. 改良した DNA マーカーは、矢印で挟まれた部分を増幅する。

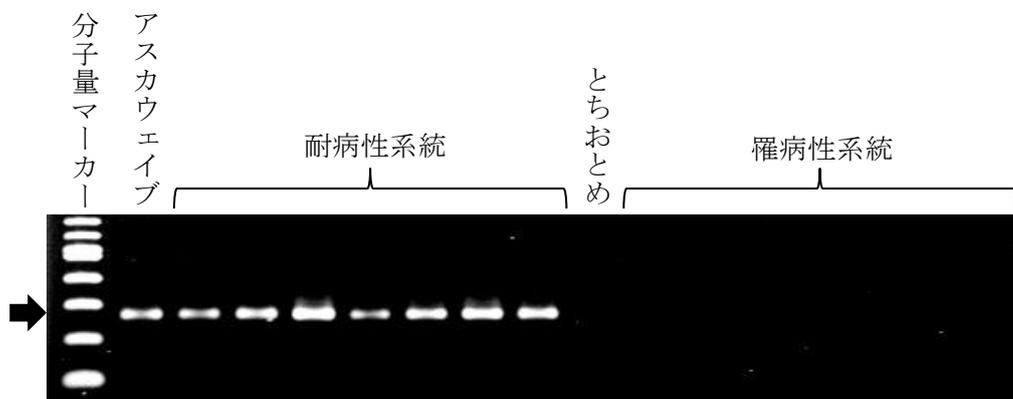


図-2 イチゴ萎黄病耐病性判別マーカーの検出例

表 96 サンプルあたりのマーカー検出法の比較

検出法	作業ごとの必要時間 (必要人員)			延べ 検出時間	1検体あたり の検出費用
	サンプリング サンプル調整	DNA抽出 調整時間	PCR 泳動時間		
従来法	2日間 (2人)	6日間 (1人)	4時間 (1人)	10.5日	150円
DNA抽出キット使用	2日間 (2人)	4~5日間 (1人)	4時間 (1人)	8.5~9.5日	630円
ダイレクトPCR法	3時間 (2人)	1時間 (1人)	4時間 (1人)	1.4日	50円

注. 作業時間は8時間を1日として計算した。