

福岡県農林業総合試験場特別報告

第7号

福岡県の園芸作物振興のためのDNAマーカー
の開発と実用化に関する研究

平成29年3月

福岡県農林業総合試験場

(福岡県筑紫野市大字吉木)

SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURE AND FORESTRY
RESEARCH CENTER
NO.7

Studies on development and practical use of the DNA markers
for promotion of garden crops in Fukuoka prefecture

by

Katsumi SHIMOMURA

THE FUKUOKA AGRICULTURE AND FORESTRY
RESEARCH CENTER

Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

March 2017

福岡県の園芸作物振興のための DNA マーカー
の開発と実用化に関する研究

下村 克己

2017

*九州大学 審査学位論文

目 次

| | |
|----------------------------------|----|
| 緒言 | 1 |
| 第1章 ナスの新品種開発に向けた DNA マーカーの開発と実用化 | 3 |
| 第2章 育成者権保護に向けた DNA マーカーの開発と実用化 | |
| 第1節 AFLP 法によるイチゴの品種識別 | 12 |
| 第2節 SSR 法によるイチゴの品種識別 | 20 |
| 第3章 植物防疫に向けた DNA マーカーの開発と実用化 | |
| 第1節 カンキツ幼木におけるウイルス耐病性の比較 (1) | 27 |
| 第2節 カンキツ幼木におけるウイルス耐病性の比較 (2) | 37 |
| 第3節 逆転写遺伝子増幅法による温州萎縮ウイルスの高感度検出 | 43 |
| 第4章 総合考察 | 51 |
| 謝辞 | 54 |
| 参考文献 | 55 |

緒 言

福岡県の農業産出額は平成 25 年度産で 2,231 億円である。そのうち園芸作物は約 6 割を占め、県の農業政策上、最も重要な分野の一つとなっている（平成 26 年度 福岡県農林水産白書）。本県の園芸作物としては、野菜、果樹、花、茶などが挙げられるが、その生産振興のためには、新しい品種や栽培技術の開発に加え、知的財産権の維持・確保や病害等の診断や対策も重要であり、県の試験研究機関ではこれら広範な課題に対する品種や技術をできるだけ迅速に開発することが求められてきた。

これらの諸課題に迅速に対応するための最も有効な手法の一つとして DNA マーカーの利用が挙げられる。

ナスの生産現場では、生産者の高齢化に伴う早期リタイアと経営の規模拡大が進まないことが、生産振興上大きな問題となっており、この主な要因となっている総労働時間の約 3 割を占める植物生長調節剤を利用した着果処理作業（門馬，1996）の負担軽減が大きな課題となっている。そこで、本課題を解決するため、着果処理作業を省略できる単為結果性を有する品種開発に取り組み、育種年限短縮のための半数体育種法（岡田ら，2004；武田ら，1990）の適用に加え、ナスの単為結果性に係る DNA マーカーの開発に取り組んだ。

ナスの DNA マーカーに関する研究は、品種識別（古川・谷本，2004）を始め、果色、果形などの諸形質に連鎖するマーカー（Nunome ら，2001）や単為結果性に関する QTL 解析（宮武ら，2007，2005）などに関するものが多く、DNA マーカーをナスの育種へ利用した報告は見当たらない。

そこで、第 1 章では、薬培養による半数体倍加系統（doubled haploid 系統，以下，DH 系統と表記する）を用いたナスの単為結果性に係る DNA マーカーの探索と、これら DNA マーカーの育種への適用性について検討した。

近年、国内で育成されたイチゴやインゲン等の栽培用品種が育成者の許諾を受けなく海外で生産され、我が国へ逆輸入される事例が増加傾向にある。これらは、明らかに知的財産権の侵害であり、この抑止は、育成者権益の保護とともに、国内農業の振興を図る上で、重要な課題となっている。そこで、第 2 章では、福岡県で育成し、重要なブランド品目になっている‘福岡 S 6 号’（商標名：あまおう）（三井ら，2003）の DNA マーカーによる品種識別技術の開発に取り組んだ。イチゴは、イネやダイズなどの主要穀類と比較して遺伝解析が不十分であり（福岡，2002）、遺伝情報に基づいた手法の利用が困難である。一方で、識別については再現性の確保が不可欠である。

そこで、第 2 章第 1 節では、遺伝情報が必要なく、かつ再現性も RAPD 法より高い（Sharma ら，1996；Powell ら，1996；Waugh ら，1997）とされる AFLP 法による品種識別技術の開発について検討した。さらに、第 2 節では、品種識別の迅速化や識別精度の向上を目的に、共優性であり、1 遺伝子座当たり多くの対立遺伝子が得られること、ゲノム上に数多く存在することから、DNA 多型を得るためのより信頼度の高い方法を提供できる点で、他の分

子マーカーよりも優れている (Yamamoto ら, 2002) SSR 法によるイチゴの品種識別技術の開発とその有効性について検討した。

カンキツウイルス病対策の重要性は、近年益々高まってきているが、今のところ有効な方法はウイルスフリー化以外にない。一方、我が国のカンキツの台木として利用されているものは、そのほとんどがカラタチである (池田ら, 1978) が、現在までに育成されたあるいは今後育成される多様な品種の持つ特性を十分発揮するには、カラタチ以外の台木との組み合わせの方が良い場合も考えられる。そこで近年では、栽培品種の持つ優良な性質を最大限に活かすため、カラタチ以外の台木を利用した栽培法についての検討がなされるようになった (池田ら, 1978, 1980 ; 高原ら, 1994, 1995)。しかし、カラタチ以外の台木を利用した場合のウイルスやウイロイド病の樹体への影響や、ウイルス・ウイロイドの保毒と環境条件による樹体への影響を台木品種との関係で検討した詳細な報告はない。

そこで、第3章第1節では、カンキツ実生台木 11 品種と、ウンシュウミカン‘山川早生’およびウンシュウミカン‘宮川早生’と中晩生カンキツ‘トロビタオレンジ’の交雑品種である‘清見’を用いて、各種カンキツウイルスおよびウイロイドが、カンキツ実生台木および苗木の生育に及ぼす影響とその病徴発現程度について検討した。加えて、第2節では、‘太田ポンカン’の幼木を用いて、耐寒性に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響と台木間差異について解析を行った。

カラタチを台木に利用したウンシュウミカンが主力である我が国のカンキツ産地においては、温州萎縮ウイルス (SDV) やカンキツタターリーフウイルス (CTLV) の被害が大きいと考えられ、健全な穂木による苗木増殖の推進が重要である。特に、我が国のカンキツ苗木の約 8 割を生産する福岡県においては、本ウイルスに対する対策とそれに基づく健全な苗木の供給は、最も重要な課題である。そこで、ウイルス病防除に資するための DNA マーカーの開発と実用化について検討した。

CTLV については、リンゴやヤマノイモのウイルスの検出で報告のある逆転写遺伝子増幅法 (Reverse Transcript Polymerase Chain Reaction : RT-PCR) (Kinard ら, 1996 ; Marinho ら, 1998 ; Nemchinov ら, 1995) およびイムノキャプチャー逆転写遺伝子増幅法 (Immuno-Capture RT-PCR : IC-RT-PCR) (亀谷ら, 1999 ; Nemchinov ら, 1995) を適用することにより、ELISA 法よりもさらに高感度な検定が可能であることを既に報告した (下村・草野, 2002)。従って、第3節では、RT-PCR および IC-RT-PCR 法による SDV の高感度検出について論じる。

以上、本論文は、ナスの新品種開発に向けた DNA マーカー (第1章)、イチゴの知的財産権の維持、確保に向けた品種識別用 DNA マーカー (第2章) に加え、カンキツ生産上問題となっているウイルスの影響と我が国の約 8 割の生産量を誇る本県のカンキツ苗木生産において最も重要となる健全種苗供給のためのウイルス病高精度診断用 DNA マーカー (第3章) の開発と実用化について実施した研究をまとめたものである。

第1章 ナスの新品種開発に向けた DNA マーカーの開発と実用化

福岡県の野菜生産において、ナスはイチゴに次いで第2位の生産額を占める主要品目である。本県のナスは、10月～翌年の6月まで出荷する促成栽培が主体で、品種は‘筑陽’が用いられている。一方、生産現場では、単位面積当たりの労働時間が長いことに加え、総労働時間の約3割を占める植物生長調節剤を利用した着果処理作業（門馬，1996）が、生産者の大きな負担となっている。このことが、生産者の高齢化に伴う早期リタイアや経営の規模拡大が進まないことなどの大きな要因となっており、生産振興上の大きな課題となっている。

本課題を解決するためには、この着果処理作業を省略できる単為結果性を有する品種の利用が有効である。ナスの単為結果性品種はヨーロッパで栽培されているが、これらの品種の多くは、やや晩生で、葉や茎に毛じが多く、茎および果実のへたが緑色、果皮が赤紫色であり、分枝性および着花数が少ない傾向にある（齋藤ら，2007）ことから、消費者の嗜好が不明であることや生産性に問題があり、そのまま我が国へ導入、普及させることは困難である。そこで、現在、本県を含めた多くのナス育成地では、ヨーロッパの単為結果性品種を育種素材として、我が国の栽培に適した単為結果性ナスの育種に取り組んでいる（久野・矢部，2005；松本ら，2007）。

一般に作物の育種は、新品種を育成するまでに相当の年月、ほ場面積および労力を要する。これは、単為結果性ナスの育種においても同様であり、促成栽培に適し、高品質な単為結果性ナスを短期間で育成するには、育種材料の効率的な育成に加え、その特性の確実な評価、選抜などにより、育種の効率を高めることが不可欠である。そこで、本県では、育種年限の大幅な短縮を目的として、薬培養による半数体育種法（岡田ら，2004；武田ら，1990）を用いて育種を実施している。その一方で、今後さらに育種の効率化を図るためには、DNA マーカーなどを利用した選抜が有効であると考えられる。

ナスの DNA マーカーに関する研究は、品種識別（古川・谷本，2004）を始め、果色、果形などの諸形質に連鎖するマーカー（Nunome ら，2001）や単為結果性に関する QTL 解析（宮武ら，2005，2007）などについて進められているが、DNA マーカーをナスの育種へ利用した報告は見当たらない。そこで本研究では、薬培養による半数体倍加系統（doubled haploid 系統，以下、DH 系統と表記する）を用いて、ナスの単為結果性に係る DNA マーカーの探索を行うとともに、これらの DNA マーカーの育種への適用性について検討した。なお、ナスの単為結果性については、ヨーロッパの単為結果性ナス品種 ‘Talina’ のように、受粉しなくても果実が着果し正常に肥大する単為結果性（完全肥大型単為結果性）と、‘千両二号’ 等のように、着果はしても石ナスまでしか肥大しない単為結果性がある（吉田，1998）。この意味では、今回、非単為結果性ナスとして試験に供した ‘筑陽’ を始めとする品種は、受粉しなくても着果後石ナスまでは肥大することから、単為結果性を有すると言える。しかし、石ナスは、ナスを生産する上で商品としての価値はないことから、

実用品種の育成を目的に実施した本試験においては、完全肥大型単為結果性ナス以外は、非単為結果性ナスとして扱った。

また、本研究は独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所（現国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所，以下，（国）野菜茶業研究所と表記する）と福岡県との共同研究「九州地域に適したナス単為結果性品種・系統の育成」において実施したものであり、本試験において供試した単為結果性系統‘AE-P03’，‘AE-P05’および‘AE-P11’は、同研究所から分譲を受けたものである。

材料および方法

供試品種および系統

DNA マーカーの選定および選抜には、単為結果性ナスとして、ヨーロッパで育成された F₁ 品種 ‘Talina’ を単為結果性の育種素材として育成された ‘AE-P03’，‘AE-P05’ および ‘AE-P11’（（国）野菜茶業研究所）の 3 系統（齋藤ら，2007）とヨーロッパの単為結果性品種 ‘Diva’，‘Mileda’ および ‘Rondona’（（株）シンジェンタ）の 3 品種を、非単為結果性ナスとして、‘筑陽’，‘黒陽’（（株）タキイ種苗，‘橘田’（JP 番号:33269）および‘中生真黒’（JP 番号:33263）（独立行政法人 農業生物資源研究所ジーンバンク：現国立研究開発法人 農業生物資源研究所）の 4 品種を用いた（以下，すべてを品種と表記する）。また，DNA マーカーの検証には，‘筑陽’もしくは‘黒陽’に‘AE-P03’，‘AE-P05’または‘AE-P11’をそれぞれ交配して得られた F₁の蒴培養によって作出した DH 系統 211 系統を用いた。

単為結果性の評価

単為結果性の評価は以下のようにして実施した。2006 年 8～9 月に 10 花の柱頭を開花 1～3 日前に切除し，その後 100 g 以上に正常肥大した果数（以下，正常肥大果数と表記する）を調査した。単為結果性ナスとして交配母本に用いた‘AE-P03’，‘AE-P05’，‘AE-P11’の正常肥大果数の平均値は，それぞれ 7.5，7.75，8.0 であり，実用品種の育成を前提とした場合，少なくともこれら母本と同程度あるいはそれ以上の単為結果性を示す系統を選抜していく必要がある。したがって，本試験においては，実用品種の育成を目的として，正常肥大果数が 7 果以上の系統を実用的な単為結果性を有する（以下，実用的単為結果性有りとは表記）系統と判定した。なお，その際には種子の有無についても確認した。

DNA 抽出

供試品種，系統ごとに成葉 50 mg を採取し，DNeasy Plant mini Kit（QIAGEN 社製）を用い，添付のプロトコルに準じて DNA を抽出した（Dellaporta，1983）。

AFLP 法による多型検出

DNA 断片の増幅には AFLP Plant Mapping Kit (ABI 社製) を用い, PRISM310 ジェネティックアナライザーおよび解析用ソフト GENE SCAN (いずれも ABI 社製) を用いて解析した. なお, PCR 条件などについては, AFLP Plant Mapping Kit に添付されたプロトコルに準じて実施した (Vos ら, 1995) .

結 果

プライマー組合せの検討

‘AE-P03’, ‘AE-P05’, ‘筑陽’ および ‘黒陽’ の 4 品種を用い, AFLP Plant Mapping Kit に用意されている 64 プライマー組合せについて検討した結果を表 1-1 に示した. 64 組合せ中 14 組合せにおいて, 単為結果性品種または非単為結果性品種に特異的なピークが認められ, 両者の間に多型が検出された.

DNA マーカーの選定

多型が検出された 14 のプライマー組合せから得られたマーカーについて, ピークの高さや独立性などを検討し, 単為結果性に係る DNA マーカー候補として, smpc35, smpc42a, smpc42b および smpc77, 非単為結果性に係る DNA マーカー候補として, smnpc64a, smnpc64b および smnpc74 の合計 7 つの DNA マーカー候補を選定した (データ略) . これら 7 つの DNA マーカー候補について, 単為結果性ナスとして ‘AE-P11’, ‘Diva’, ‘Mileda’ および ‘Rondona’ の 4 品種, 非単為結果性ナスとして ‘橘田’ と ‘中生真黒’ の 2 品種を追加して, それぞれの DNA マーカーの有無を調査した (表 1-2) . その結果, smpc35, smpc42a, smpc42b および smpc77 は単為結果性品種のみに, smnpc64b は非単為結果性品種のみに特異的なピークが認められた. さらに, ほ場検定で実用的単為結果性 (正常肥大果数 7 果以上) および非単為結果性 (正常肥大果数 0 果) を示した DH 系統 (‘筑陽’ または ‘黒陽’ に ‘AE-P03’, ‘AE-P05’ または ‘AE-P11’ をそれぞれ交配して得た F₁ の葯培養由来) をそれぞれ 10 系統ずつ供試して, これら 5 つの DNA マーカーに係るピークの有無を調査した結果を表 1-3 に示した. smpc77 は, ほ場で実用的単為結果性有り と判定された系統の 10 系統中 7 系統を捕捉した. 一方, smpc35, smpc42a および smpc42b は供試した系統に対して非特異的であったほか, 非単為結果性に係る DNA マーカー候補の smnpc64b は, 実用的単為結果性有り系統を全く捕捉しなかったものの, 非単為結果性系統の内半数しか捕捉できなかった.

以上のことから, smpc77 (プライマー組合せ [EcoRI-AGG, MseI-CTG], 増幅断片サイズ 168 bp) を単為結果性マーカーとして選定した.

DNA マーカーの検証

DNA マーカーsmpc77 について、単為結果性品種と非単為結果性品種の交配組合せに由来する後代から得られた 211 の DH 系統を用い、単為結果性ナス育種に係る選抜マーカーとしての有効性を検討した結果を表 1-4 に示した。smpc77 を有する系統の割合は、‘筑陽’由来の 99 系統で 50.5%、‘黒陽’由来の 112 系統で 51.8%であった。また、smpc77 を有する系統の正常肥大果数の平均値は、‘筑陽’由来の系統で 3.82 個、‘黒陽’由来の系統で 4.28 個であった。それに対し、smpc77 を有しない系統の正常肥大果数の平均値は、それぞれ 1.88 個と 1.45 個であった。このように、本マーカーを有する系統の正常肥大果数の平均値は、それを有しない系統より明らかに多かった。また、本マーカーを有する系統のうち、ほ場で実用的単為結果性有りと判定された系統の比率は、‘筑陽’由来の系統では 22.0%、‘黒陽’由来の系統では 29.3%となり、本マーカーを有しない系統の比率よりも明らかに高かった。

また、試験に用いた DH 系統の正常肥大果数の分布と smpc77 の有無の関係を図 1-1 に示した。本マーカーを持たない系統は正常肥大果数が少ない傾向が認められ、そのうちほ場で実用的単為結果性有りと判定された系統の比率は、約 5%であった。

表 1-1 プライマー組み合わせごとの単為結果性関連マーカーの出現

| EcoRI側プライマー | MseI側プライマー | | | | | | | |
|-------------|----------------|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|
| | CAA | CAC | CAG | CAT | CTA | CTC | CTG | CTT |
| ACT | — ^x | — | — | — | — | — | — | P |
| ACA | — | — | P | P | P | — | — | — |
| AAC | — | P | — | — | — | — | P | — |
| ACC | P ^z | — | — | — | — | N ^y | N | P |
| AGC | — | — | P | — | — | — | N | — |
| AAG | — | — | — | — | — | — | P・N | — |
| AGG | — | — | — | — | — | — | P | — |
| ACG | — | — | — | — | — | — | — | — |

^zP: 単為結果性品種に特異的なピークが認められた

^yN: 非単為結果性品種に特異的なピークが認められた

^x—: 単為結果性、非単為結果性いずれの品種にも特異的なピークが認められなかった

表1-2 単為結果性および非単為結果性品種とマーカーの有無

| マーカー | プライマー | | 増幅断片 サイズ (bp) | 単為結果性品種 | | | | 非単為結果性品種 | | | | | |
|----------|--------|-------|---------------------|----------------|--------|--------|------|----------|---------|----|----|----------|----|
| | EcoRI側 | MseI側 | | AE-P03 | AE-P05 | AE-P11 | Diva | Mileda | Rondona | 筑陽 | 黒陽 | 中生 真黒 | 橘田 |
| smpc35 | AGC | CAG | 311 | ○ ^z | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| smpc42a | ACA | CAT | 208 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| smpc42b | ACA | CAT | 403 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| smnpc64a | ACC | CTC | 141 | - ^y | - | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| smnpc64b | ACC | CTC | 148 | - | - | - | - | - | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| smnpc74 | ACC | CTG | 182 | - | - | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| smnpc77 | AGG | CTG | 168 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

^z○: それぞれのマーカーによるピークが認められたことを示す

^y-: 認められなかったことを示す

表1-3 各マーカーを有する品種・系統の割合

| 品種・系統 | マーカー | | | | |
|-------------------------|------------------|---------|---------|----------|--------|
| | smpc35 | smpc42a | smpc42b | smnpc64b | smpc77 |
| 単為結果性品種 ^z | 2/2 ^v | 2/2 | 2/2 | 0/2 | 2/2 |
| 非単為結果性品種 ^y | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 2/2 | 0/2 |
| 単為結果性DH系統 ^x | 4/10 | 5/10 | 4/10 | 0/10 | 7/10 |
| 非単為結果性DH系統 ^w | 6/10 | 6/10 | 6/10 | 5/10 | 2/10 |

^z 単為結果性品種: 'AE-P03', 'AE-P05'

^y 非単為結果性品種: '筑陽', '黒陽'

^x 単為結果性DH系統: 上記品種の組合せによって得られたF₁の葯培養由来の半数体倍加系統で、ほ場で実用的単為結果性有りと判定された系統

^w 非単為結果性DH系統: ほ場で単為結果性無し(正常肥大果数0果)と判定された系統

^v それぞれのマーカーを有する品種, 系統数/供試した品種, 系統数

表1-4 DH系統におけるDNAマーカー-smpc77の有無と単為結果性

| 組合せ | smpc77の有無 | 系統数 | 正常肥大果数 ^z (果/株) | 単為結果性系統率 ^y (%) |
|----------------|-----------|-----|------------------------------|------------------------------|
| '筑陽' × 単為結果性品種 | あり | 50 | 3.82 ^x ** | 22.0 |
| | なし | 49 | 1.88 | 6.1 |
| '黒陽' × 単為結果性品種 | あり | 58 | 4.28** | 29.3 |
| | なし | 54 | 1.45 | 3.7 |

^z 正常肥大果数: 柱頭除去処理10果中の正常肥大果数の平均値 2006年8~9月に実施

'AE-P03', 'AE-P05', 'AE-P11'を一括して単為結果性品種とした

交配親の正常肥大果数(果/株)の平均は, '筑陽' および '黒陽' は0, 'AE-P03', 'AE-P05'

および 'AE-P11' は, それぞれ7.5, 7.75および8.0であった

^y 単為結果性系統率: 実用的単為結果性有り系統数/各区の総系統数 × 100

実用的単為結果性有り系統とは, 交配に用いた母本以上の正常肥大果数(7果以上)を有した系統

^x **: 1%水準で有意差有り(t検定)

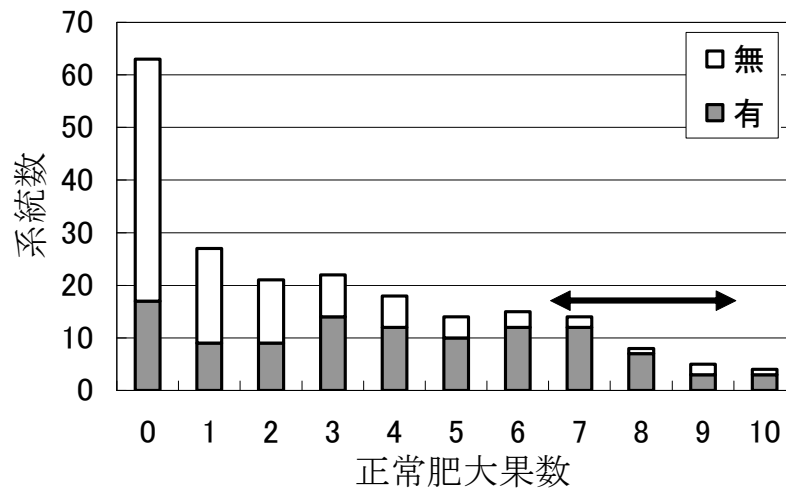


図1-1 DH 系統における smpc77 の有無と正常肥大果数
 矢印は、交配に用いた単為結果性品種の分布範囲
 単為結果性品種の正常肥大果数は 0

考 察

DNA マーカーに関する研究は各作物で進められており、野菜においては、イチゴやナスなどの品種識別への利用（古川・谷本，2004；Kunihisa ら，2003；Shimomura・Hirashima，2006）やハクサイ根こぶ病やピーマン青枯れ病の病害抵抗性などに関する育種への利用が報告されている（Nishi ら，2003；杉田，2008；Suwabe ら，2003）。ナスに関しては、果形や果色などの農業生産上の有用形質に連鎖する DNA マーカーが開発され（Nunome ら，2001），今後の育種への利用が期待される。

一方、ナスの単為結果性に関する遺伝解析に関する研究も進められている（久野・矢部，2005；宮武ら，2005，2007；齋藤ら，2004；吉田ら，1998）。この中で、（国）野菜茶業研究所で育成され、本試験にも供試した単為結果性系統の遺伝資源として利用されたヨーロッパの品種 ‘Talina’ が有する単為結果性に関しては、着果には複数の遺伝子が関与し、その後の正常肥大には不完全優性を示す 1 つの遺伝子に支配されるとする報告（吉田ら，1998），正常肥大には少なくとも 2 つ以上の遺伝子が関与するとする報告（齋藤ら，2004）がある。また、単為結果性の選抜には、開花期まで植物体を養成し、その後に除雄や柱頭切除して果実肥大を観察する必要がある（齋藤ら，2007）ことから多大な手間と時間を要するなどの問題がある。しかし、単為結果性に係る DNA マーカーの育種への利用は図られていない。

そこで、本研究では、単為結果性ナスの育種の効率化を目的として、AFLP 法を用いて DNA マーカーを探索し、このマーカーが多数の育種素材の中から実用的な単為結果性を有する系統を選抜するのに有効であるか否かを検討した。その結果、選定した DNA マーカ

一smpc77を持つ蒔培養由来のDH系統の正常肥大果数の平均値は、持たない系統の値よりも明らかに多かった。また、本マーカーを持たない系統の約95%は、単為結果性が無いかもしくは単為結果性の発現が低く、実用的単為結果性が無いと判定された系統（正常肥大果数6果以下）であったことから、これらの系統を除くことで単為結果性ナス育種の効率化が可能であると考えられた。

一方、本研究ではほ場で実用的単為結果性有りと判定された系統の選抜に有効なマーカーは1つのみであった。今回実施したプライマー組合せの検討においては、供試した64プライマー組合せ中14組合せで多型が検出されたが、品種識別を目的に国内の市場流通品種10品種を対象に実施し、53組合せで多型が検出されたイチゴの事例（下村ら、2005）と比較すると非常に少なかった。この原因として、古川・谷本（2004）の報告にもあるようにナスは多型頻度がかかなり低いこと、今回試験に供した単為結果性系統‘AE-P03’、‘AE-P05’および‘AE-P11’は、（国）野菜茶業研究所において、実用品種の育成を目的にヨーロッパ品種の‘Talina’と日本の品種との交雑により得られた単為結果性を含む諸形質に優れる系統として選抜、固定されてきた（齋藤ら、2007）ため、日本の品種に遺伝的に類似していたと考えられた。ヨーロッパの単為結果性品種は分枝性および着花数が少なく（齋藤ら、2007）、収量性は必ずしも高くない。一方、‘千両二号’などの国内品種は、石ナスまでしか肥大しないものの、着果促進効果の高い単為結果性を有し、‘Talina’由来の完全肥大型単為結果性と組み合わせることにより、着果安定に寄与することが示唆された（吉田、1998）。しかしながら、実用的な単為結果性ナスの育種を進めるに当たっては、少なくとも本試験に供試した3品種‘AE-P03’、‘AE-P05’および‘AE-P11’と同等かそれ以上の正常肥大果数を有することが必要であると考えられる。本マーカーによって選抜されたDH系統のうち、ほ場で実用的単為結果性有りと判定された系統の比率は、‘筑陽’由来の系統で22.0%、‘黒陽’由来の系統で29.3%であった。このことは、単為結果性に関しては、着果後の正常肥大には不完全優性を示す1つの遺伝子に支配されるとする報告（吉田、1998）や正常肥大には少なくとも2つ以上の遺伝子が関与するとする報告（齋藤ら、2004）にあるように、1つのマーカーでは不十分であることを示唆している。従って、今後、単為結果性ナスの育種をさらに効率的に進めていくためには、単為結果性に係る遺伝子の解析を進めながら、本形質とより密接に連鎖するマーカーの開発を図っていく必要がある。

摘 要

本研究では、単為結果性ナス育種の効率化を図るため、AFLP法によるマーカーの探索を実施し、単為結果性に係るDNAマーカーとしてsmpc77（プライマー組合せ[EcoRI-AGG, MseI-CTG]、断片サイズ168bp）を選定した。試験に供した半数体倍加系統のうち、本マーカーを持つ系統の正常肥大果数の平均値は、持たない系統の値よりも明らかに多かった。また、本マーカーを持たない系統の95%は、正常肥大果数が0ないし少なく、実用性が低

いと考えられた。以上のことから、本マーカーは、単為結果性ナスの育種に有効であると
考えられた。

第2章 育成者権保護に向けたDNAマーカーの開発と実用化

第1節 AFLP法によるイチゴの品種識別

我が国の園芸作物の主要品目であるイチゴにおいては、産地間競争の激化に伴い、競争力強化が重要な課題となり、新品種の育成が各県で進められている。そうした中、本県でも、新たなイチゴ品種‘福岡S6号’（商標名：あまおう）を育成した（三井ら，2003）。

一方、近年、国内で育成された栽培用品種が育成者の許諾を受けることなく、海外で違法に生産され、我が国へ逆輸入される事例が増加傾向にあり、この抑止は、育成者権益の保護とともに、国内農業の振興を図る上で、重要な課題となっている。

育成者権益を確保するためには、当該品種の生産についての違法性を証明する必要がある。イネを始めいくつかの作物については、DNAによる品種識別が行われている。その手法については、PCR（Polymerase Chain Reaction）を利用したRAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）法（河野ら，2000；大坪ら，1997；Welsh and McClelland，1990；Williamsら，1990）が広く利用されてきたが、再現性の低さから、RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）法（河野ら，2000；國久，2002；Powellら，1996）やAFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）法（Sharmaら，1996；Vosら，1995）等の利用が進められている。イチゴは、イネやダイズなどの主要穀類と比較して遺伝解析が不十分である（福岡，2002）ため遺伝情報に基づいた手法の利用が困難であること、識別については再現性の確保が不可欠であることなどから、遺伝情報が必要なく、かつ再現性もRAPD法より高い（Sharmaら，1996；Powellら，1996；Waughら，1997）とされるAFLP法による品種識別技術の開発が最適と考えられた。

そこで、本県で育成したイチゴ品種‘福岡S6号’の識別を主な目的として、AFLP法によるイチゴの品種識別技術の開発に取り組んだ。

材料および方法

供試品種

野菜茶業試験場 久留米支場（現国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター）から株の分譲または葉の提供を受けた‘とよのか’，‘さちのか’，‘さがほのか’，‘章姫’，‘レッドパール’，栃木県農業試験場から分譲された‘とちおとめ’，‘女峰’，奈良県農業技術センターから分譲された‘アスカルビー’，株式会社ミヨシから分譲された‘アイベリー’および当場で育成した‘福岡S6号’の計10品種を供試した。

DNA抽出

上記品種の未展開葉またはガク片各50mgをジルコニアボールを入れた2.0mLのエッペンチューブにそれぞれ分取し、 -80°C で保存した。これらのチューブを液体窒素中に沈め

た後、ワーリングブレンダー300MM (Retch 社製) にセットし、30 秒間破碎した。破碎後、0.1%チオグリコール酸を添加した 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (5mMEDTA, 350mMSorbitol, 10%PEG 含む) を各 1 mL 分注し、攪拌した。その後、4°C下、6,000 rpm, 5 分間遠心し、上清をできるだけ除いた後、DNA 抽出キット Nucleon PHYTO Pure (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて、全 DNA を抽出した。

抽出した DNA は、100 μ L の TE 緩衝液 (10mMTris-HCl, 1mMEDTA, pH7.5) に溶解し、紫外吸光測定器 DU640 (BECKMAN 社製) で定量し、濃度を調整して以下の実験に供試した。

抽出した DNA の制限酵素処理

DNA 純度検定のための制限酵素処理は、各イチゴ品種の葉またはガク片から抽出した DNA と、制限酵素 *EcoRI* (15 u/ μ L, Takara 社製), *MseI* (10 u/ μ L, BioLabs 社製) を用いてそれぞれ以下のように実施した。DNA 0.5 μ g, 酵素 10 u および 10 倍濃度緩衝液を用い、滅菌蒸留水で 20 μ L に調製して、37°C, 2 時間処理した後、1.5%アガロースゲル電気泳動を実施した。

AFLP 法

AFLP 法は、Vos ら (1995) に準じて実施し、実施に当たっては、PE Applied Biosystems 社製 AFLP スタートアップモジュール (レギュラー用) および PRISM 310 ジェネティックアナライザーを使用し、解析用ソフト Gene Scan を用いて解析した。

なお、セレクトティブプライマー組合せの選定については、まず、‘とよのか’、‘さちのか’ および ‘福岡 S 6 号’ の 3 品種で検討し、次に、その結果を踏まえて、他の 7 品種を加えて実施した。

結果および考察

抽出した DNA の純度

2 種類の制限酵素 *EcoRI*, *MseI* による処理は、AFLP 法を実施する上で、必須かつ前提となる操作である (Vos ら, 1995)。そこで、抽出した DNA が AFLP 法に供試可能な程度の純度を有していることを確認するために、制限酵素処理を実施した。また、本識別技術を実用化するに当たっては、イチゴ果実での識別も必要となることが予想されることから、葉とともにガク片から抽出した DNA についても処理した。

その結果、葉、ガク片いずれの部位から抽出した DNA も、本処理によって十分消化されたことから (図 2-1), 今回用いた抽出法によって得られる DNA は、AFLP 法に供試するに十分な純度を有していると考えられた。

セレクトティブプライマーの選定

当場で育成した‘福岡S 6号’の識別を目的に、この品種と交配親株の育成に利用した‘とよのか’，‘さちのか’を加えた3品種間のAFLP法による識別を試みた。その結果、64通りのセレクトティブプライマー組合せ中53組合せで多型が検出された(表2-1)。この内、MseI側プライマーにMseI-CAAまたはMseI-CTAを用いた5組合せで、供試した3品種を互いに区別できた(表2-1)。

以上の結果を踏まえ、イチゴ10品種の多型検出には、MseI側プライマーにMseI-CAA, MseI-CTAを用いた組合せについて検討することとした。

AFLP法によるイチゴの品種識別

供試したイチゴ10品種に対して、MseI側プライマーMseI-CAAおよびMseI-CTAに、8種類のEcoRI側プライマーを組み合わせた16プライマー組合せによるAFLPを実施した。

その結果、すべての組合せで多型が検出された(データ略)。中でも[MseI-CAA, EcoRI-AGC]の組合せでは、8個の多型が認められ(図2-2に一部を示す)、これらにより10品種すべての識別が可能であった(表2-2)。

特に、[MseI-CAA, EcoRI-AAC]の組合せでは、‘とちおとめ’と‘章姫’に、[MseI-CTA, EcoRI-ACT]では、‘とよのか’，‘さがほのか’，‘レッドパール’および‘章姫’に、さらに、[MseI-CAA, EcoRI-ACG]および[MseI-CTA, EcoRI-ACC]では、‘福岡S 6号’と‘アイベリー’に特異的な多型パターンが認められ、品種識別に有効と考えられた(表2-2)。

一方、品種同定の目的において、比較品種nが互いに異なるマーカータイプを持つ品種の割合Rは、

$$R = \frac{rC_n \cdot n!}{a^{nk}} = \frac{n! a^k!}{a^{nk} \cdot n! (a^k - n)!} = \frac{a^k!}{a^{nk} (a^k - n)!}$$

(ただし、a : アリル数, k : ローカス数とする。)

で表される(DNA品種識別技術検討会, 2003b)。

したがって、与えられた比較品種が互いに異なるマーカータイプを示すためには、Rが限りなく1に近いkの値を求めると良い。よって、供試したイチゴ10品種の場合、a=2であるので、R=0.999以上とすると、k≥16となる。

以上のことと識別精度の確保を考慮した上で、最終的に7つのプライマー組合せを用いたAFLPによって得られる20個のマーカータイプを選抜した(表2-2)。

選抜したマーカータイプによる識別精度

ある持ち込まれた品種に対し、比較品種中に1品種以上の同一マーカータイプが偶然存在す

る確率 P_1 は,

$$P_1 = 1 - (1 - P_0^k)^n$$

ただし, $P_0 = \exp[1/k \sum \log(p_i)]$, k : マーカー数
 p_i : i 番目ローカスのアリル頻度とする。

で表される (DNA 品種識別技術検討会, 2003a).

したがって, ある品種が今回行った 10 種の比較品種中の‘福岡 S 6 号’のマーカー型と偶然一致する確率 P_1 は, $n=10$, $k=20$ であるから, $P_1=0.0000006$ となる. よって, もしマーカー型が一致するものが見られた場合は, ‘福岡 S 6 号’である可能性が非常に高いと判断できる.

今回の結果から, 本県で育成した‘福岡 S 6 号’を含むイチゴ 10 品種の識別は, AFLP 法により可能と考えられた. しかし, 新たに育成あるいは流通する品種の識別については, 今後検討する必要がある.

また, AFLP 法は, RAPD 法に比較して再現性は高いとされるが, 操作が煩雑であることや識別に要する時間が抽出操作を含めて 4 日程度かかる点が問題である. したがって, 今後は, 今回得られた結果を基に品種識別に有効であったマーカーを STS 化し (Monna ら, 1994), 簡便かつ迅速な識別技術を確立する必要がある. 一方, イチゴの品種識別については PCR-RFLP 法の利用が最近報告された (國久, 2002). 今後, イネなどで報告 (河野ら, 2000; Sharma ら, 1996; Powell ら, 1996) があるように, イチゴの品種識別についても, 識別能力が特に高いとされる SSR (Simple Sequence Repeat) 法 (Akkaya ら, 1992; Gianfranceschi ら, 1998; Powell ら, 1996; Yamamoto ら, 2001, 2002) を含めた手法の比較等を行い, 識別精度の向上や簡易化のための研究を進める必要がある.

表2-1-1 イチゴ3品種におけるAFLP法に用いるプライマー組合せによる比較

| EcoRI プライマー | Mse I プライマー | | | | | | | | | |
|----------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | CAA | CAC | CAG | CAT | CTA | CTC | CTG | CTT | CTC | CTT |
| ACT | ● | ○ | ● | ● | ◎ | ◎ | ◎ | ● | ◎ | ○ |
| ACA | ● | ● | ○ | ● | ◎ | ◎ | ◎ | ● | ◎ | ◎ |
| AAC | - | ● | - | ○ | ◎ | ◎ | - | - | ◎ | - |
| ACC | ◎ | ◎ | ● | ● | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ |
| AGC | ◎ | ◎ | - | ● | ○ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ |
| AAG | ● | - | ● | ● | - | ○ | ◎ | ◎ | ◎ | - |
| AGG | ● | ● | ● | ● | ● | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ |
| ACG | - | ● | ◎ | ○ | - | ◎ | - | ◎ | ◎ | ● |

◎: '福岡 S6 号' の識別に有効なプライマー組合せ

●: 'とよのか' の識別に有効なプライマー組合せ

○: 'さちのか' の識別に有効なプライマー組合せ

-: 識別に有効なピークが認められなかったプライマー組合せ

表2-2 AFLP法によるイチゴ主要10品種品種識別
 フライマープア、DNA増幅サイズ(bp) および マーカー番号

| 品種名 | MseI | | | | | | | | | | EcoRI | | | | | | | | | |
|--------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | CAA | | AAC | | CAA | | ACC | | CAA | | ACG | | CAA | | ACT | | ACA | | CTA | |
| | 195 | 265 | 283 | 289 | 306 | 165 | 127 | 167 | 10 | 11 | 12 | 249 | 97 | 187 | 293 | 119 | 127 | 137 | 209 | 317 |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 福岡S6号 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | + | + | - |
| とよのか | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - | + | - | + | - | + | + | + | + | - | - |
| さちのか | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| 女峰 | + | + | + | + | - | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| とちおとめ | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| アスカルビー | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| レッドパール | + | + | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| さがほのか | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 章姫 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - |
| アイベリー | + | + | - | - | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + |

十：増幅産物あり、-：増幅産物なし

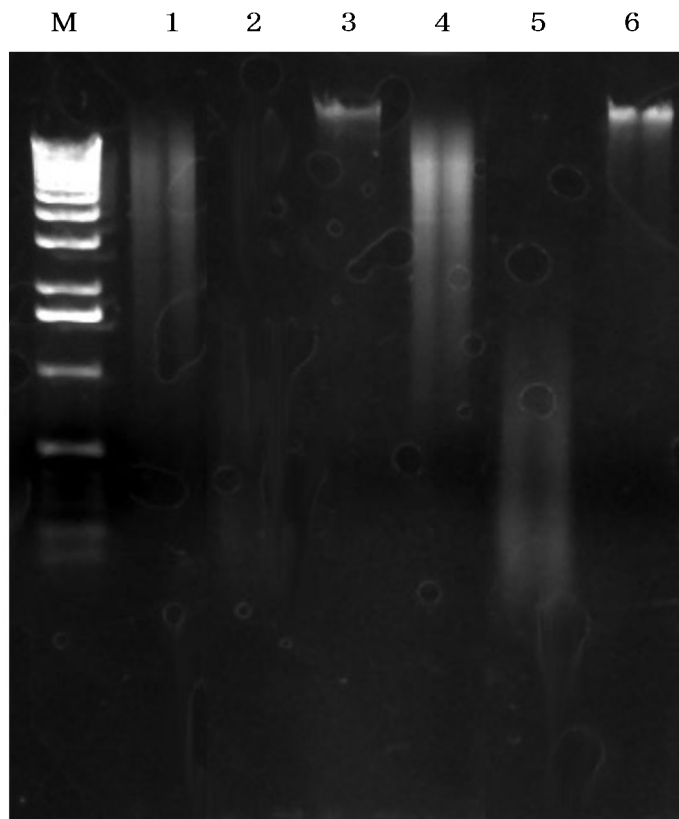


図2-1 制限酵素処理後の‘とよのか’ DNAの電気泳動像
M: 1kb DNAラダー, 1-3: 葉からの DNA
4-6: へたからの DNA, 1,4: *EcoRI* 処理
2,5: *MseI* 処理, 3,6: 無処理

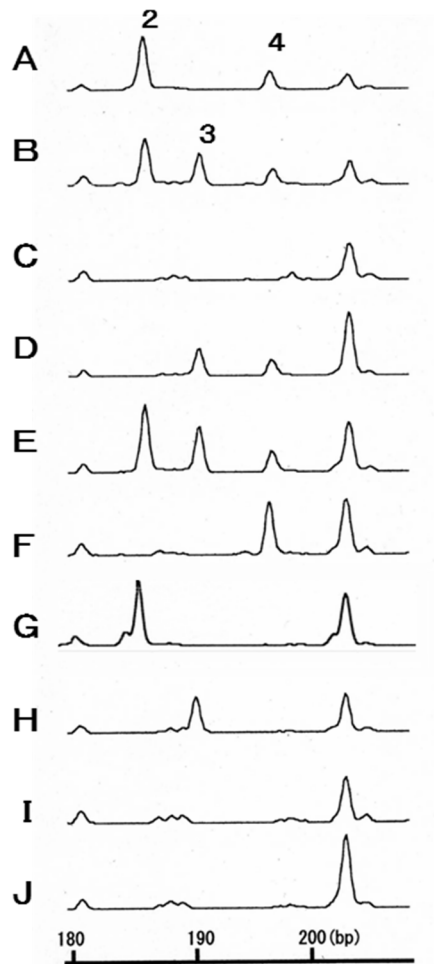


図2-2 プライマーペア[MseI-CAA, EcoRI-AGC]を用いたAFLP法によるイチゴ主要10品種の多型パターン
 A: 福岡S6号, B: とよのか, C: さちのか, D: 女峰, E: とちおとめ, F: アスカルビー
 G: レッドパール, H: さがほのか, I: 章姫, J: アイベリー
 ピーク上の数字は, 表2-2のマーカ番号と同じ

摘 要

近年、国内育成品種の海外での違法使用や違法生産が重大な問題となっている。福岡県では、園芸農業振興のためにイチゴ新品種‘福岡S6号’（商標名：あまおう）を育成した。こういった問題はこの品種についても起きる可能性が考えられることから、その違法使用や生産を抑止することを目的にDNAによる‘福岡S6号’の識別技術の開発に取り組んだ。

DNAによる品種識別技術の一つであるAFLPは、遺伝情報がない、あるいは少ない作物の品種識別に有効な手法とされている。イチゴは、イネやダイズに比べ遺伝解析が十分に行われていない作物である。そこで、AFLPがイチゴの品種識別に適用可能か否かについて検討した。

その結果、AFLPに用いるセレクトィブプライマー組合せの内、[MseI-CAA, EcoRI-AGC]は、供試した10品種の識別が可能であり、イチゴの品種識別に最も有効であると考えられた。識別精度を向上させるため、最終的に7つのプライマー組合せを用いたAFLPによって得られる20個のマーカーを選抜した。これらのマーカーにより、本県で育成した‘福岡S6号’を含む主要なイチゴ10品種の識別が可能であった。

第2節 SSR法によるイチゴの品種識別

イチゴの8倍性栽培品種 (*Fragaria × ananassa* Duch.) は、世界的に最も重要な果菜類の一つであり、我が国においては、国公立研究機関や民間において多くの品種が開発されている。近年、これら日本で開発された栽培品種が、許諾を受けることなく他国で利用、逆輸入されることが問題となり、育成者権益を守る方法が必要となってきた。遺伝解析や品種識別をする方法としては、RAPD, RFLP, AFLP, SSR等、いくつかの手法がある (Akkayaら, 1992; Gianfranceschiら, 1998; Powellら, 1996; Sharmaら, 1996; Yamamotoら, 2002)。イチゴ品種の遺伝的研究は、品種育成のための着果や品質および病害抵抗性等に関するものが多かった (井上ら, 1997; 松田ら, 1988; 門馬ら, 1990; 森, 2000; 森・北村, 2001; 高橋ら, 1991) が、最近、イチゴに関するいくつかの分子生物学的研究が報告されるようになった (Ashleyら, 2003; Foltaら, 2005; Jamesら, 2003; Lerceteau-Köhlerら, 2003)。しかしながら、その研究の数は、イネなどと比較して、まだ十分とは言えない。

Foltaら (2005) は、イチゴの農業形質に関するゲノム構造や分子機能についての詳細な研究を実施するに当たって、8倍体であることが大きな障害となっているとしている。加えて、栽培されているイチゴの経済的な重要性にもかかわらず、高次倍数性植物のマイクロサテライトマーカーの開発は、2倍性植物よりも大きく遅れている (Ashleyら, 2003) とされる。

日本のイチゴ栽培品種のほとんどは8倍体で、それらの分子生物学的情報は、品種識別に直接利用するには主要穀物と比較して非常に断片的である。そこで我々は、遺伝情報が

ないあるいは少ない植物の研究に最も適した方法の一つとして知られる AFLP 法が、イチゴ品種の識別に有効かどうか検討し、本手法が日本のイチゴの栽培品種の識別に有効であることを前節で明らかにした。AFLP 法は、一度の操作で多くの多型を得ることが可能で、再現性が高いことが知られているが、分析操作が煩雑で DNA 抽出からマーカー識別までに 4 日程度を要することが欠点である。一方、SSR マーカーは、分析操作が比較的簡便で DNA 抽出からマーカー識別までの期間も 1~2 日程度ですみ、共優性であること、1 遺伝子座当たり多くの対立遺伝子が得られること、ゲノム上に数多く存在すること、再現性が極めて高いことなど DNA 多型を得るためのより信頼度の高い方法を提供できる点で、他の分子マーカーよりも優位である (Yamamoto ら, 2002)。イチゴに関しては、James ら (2003) は、SSR マーカーが 2 倍体野生種である *F. vesca* L. において、実生間の区別に有効であったことを報告している。

そこで、本研究では、より信頼性の高い品種識別技術を確立することを目的に、8 倍体イチゴ ‘とよのか’ (*F. × ananassa*) を用いて SSR マーカーを新たに開発し、8 倍体イチゴ品種の識別に有効か否か検討した。

材料および方法

供試材料

SSR マーカーの開発には、日本で最も良く知られている品種の一つである ‘とよのか’ の DNA を用いた。イチゴ品種の識別には、‘とよのか’、‘さちのか’、‘福岡 S 6 号’、‘女峰’、‘とちおとめ’、‘アスカルビー’、‘章姫’、‘レッドパール’、‘さがほのか’、‘アイベリー’ の主要栽培 10 品種を用いた。これらの品種は、前節の AFLP 法の試験に供試したのと同じである。

ゲノムライブラリーの構築と繰り返し配列クローンの選抜

‘とよのか’ の DNA は、以下のようにして得た。50 mg の未展開葉を入れた 2 mL のエッペンドルフチューブを液体窒素中で凍結し、ビーズショッカー (Retch 社製, ドイツ) を用いてパウダー状になるまで破碎した。得られたパウダーを 0.1% のメルカプトエタノールを含む 1 mL の抽出バッファー (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 350 mM sorbitol, 10% PEG6000) に懸濁し、4 °C 下 5,000×g で遠心後、Nucleon PHYTOPURE (Amasham LIFE SCIENCE 社製, イギリス) で DNA を抽出し、TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH7.5) に溶解した。ゲノム DNA は、制限酵素 *EcoR* I または *Hind* III で消化し、1.5% アガロースゲル電気泳動後、300~500 bp の断片を切り出して得た。DNA は、切り出したゲルの断片から QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製, USA) を用いて溶出し、プラスミド pBluescript (STRATAGENE, USA) へ挿入後、*Escherichia coli* 由来のコンピテントセル XL1-Blue (TAKARA 社製, 日本) に形質転換した。繰り返し配列を含むクローンは、ビオ

チン標識した(AG)₁₀ および (AT)₁₀ プローブと DNA HyBr & Detection Kit (PALL 社製, USA) を用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより得た。得られたクローンを一晩培養した後、プラスミドDNAを回収し、ABI 310 DNA シークエンサー (PE Applied Biosystems 社製, USA) による塩基配列解析に供試した。

SSR 用プライマーの設計と増幅

ゲノムライブラリーのスクリーニングにより選抜したクローンから得られたプラスミド DNA を増幅して得られた PCR 産物を用い、Big Dye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems 社製, USA) で直接 PCR 反応させ、ABI 310 DNA シークエンサーで塩基配列を解析した。得られた塩基配列情報を基に GENETYX ver.6.0 (GENETYX 社製, Japan) を用いて、繰り返し配列部分を挟む領域にプライマーを設計した。

設計したプライマーは、まず、‘とよのか’ DNA を用いて増幅確認後、10 品種の識別試験に供試した。PCR は、200 μM dNTPs, 0.5 μM の各プライマー、50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ および 1.25 u の ExTaq (TAKARA 社製) を含む 50 μL の反応液中で実施した。増幅は、PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-808 (ASTECC 社製, Japan) を用いて実施し、PCR 反応は、95°C-2 分の後、熱変性 94°C-60 秒、アニーリング 55°C-60 秒、伸長反応 72°C-2 分を 35 回実施し、最終伸長反応を 72°C-10 分間実施した。増幅確認は、1.5%アガロースゲル電気泳動によって実施した。

イチゴ栽培品種の識別

供試したイチゴ 10 品種の DNA の抽出、増幅は、前述のとおり実施した。増幅産物を用いて、7M尿素変性 5%ポリアクリルアミド電気泳動 (以下、7M尿素変性 5%PAGE) を Martin ら (2005) に準じて行った。

結果および考察

本研究においては、およそ 1,000 株のクローンを得た。得られたゲノムライブラリーのスクリーニングにより、繰り返し配列を含むクローンを 4 株選抜した。得られたクローンはすべてビオチン標識した(AG)₁₀ プローブに反応したものであった。繰り返し配列を持つクローンのうち 3 株は、繰り返し配列 (GA/CT) _n を有し、残りの 1 株は、(CA/GT) _n を有していた。繰り返し配列部位を増幅するために設計したプライマーを表 2-3 に示した。これらはすべて‘とよのか’の DNA を用いた SSR により想定される大きさのバンドに増幅した (データ略)。7M尿素変性 5%PAGE により、各イチゴ品種は、1~5 本のバンドが認められた。そのうちの 2~3 本は全ての品種に共通していたが、それ以外のバンドには多型

が認められ、特に2つのプライマー*Fa1A-6*と*Fa2A-6*で特異性が高かった(表2-4)。それらは供試したイチゴ10品種全てを区別でき、識別に十分有効であると考えられた(図2-3, 2-4)。一方で、2倍体野生種の*F.vesca* L.においては、SSRの多型レベルは驚くほど低かったとの報告がある(Jamesら, 2003)。しかし、今回開発したSSRマーカー*Fa1A-6*と*Fa2A-6*による多型レベルは高く、これらのマーカーは特異的で、本試験において供試した8倍体イチゴ品種の識別に有効であった。これらのマーカーの多型レベルが低くなかったのは、8倍体イチゴ品種は、2倍体品種の4倍の遺伝子座を有しており、しかも種間雑種起源であるためと考えられた。しかし、他の2つのSSRマーカー、*Fa3C-2*と*Fa4A-1*の多型レベルは、比較的lowであった。この要因としては、これらのマーカーが繰り返し数の保存性が比較的高い領域を捕捉したためと考えられる。

Ashleyら(2003)は、8倍体野生種*F. virginiana* Duch.のSSRマーカーを開発し、それらのマーカーはイチゴの栽培品種*F. × ananassa*のDNAを増幅できることを報告した。イチゴの栽培品種*F. × ananassa*は、ヨーロッパの植物園において2つの8倍体品種*F. virginiana*と*F. chiloensis* Duch.間の交配が起源とされる(Lerceteanu-Köhlerら, 2003)。このことは、8倍体イチゴに由来するSSRマーカーは、8倍体イチゴ栽培品種を識別する上で、より信頼性が高く、有効なDNA多型検出技術の確立を可能にすることを示唆している。加えて、SSRマーカーは、高い多型頻度を有するとともに、自動化にも適する(Weber・May, 1989)。今後、SSRマーカーを用いて、他の多くのイチゴ品種のカタログ化を進めていく必要がある。最近、Kunihisaら(2003)は、CAPS法により14の栽培品種の識別が可能で、育成者権益の確保に有効であることを報告した。イチゴの品種識別において、その信頼性はいくつかの異なる手法を用いることによって、向上させることが可能と思われる。

表2-3 SSR マーカーの配列

| マーカー名 | 繰返し配列 | プライマーの塩基配列 (5'-3') | 増幅産物(bp) |
|----------------|--------------------|--|------------------|
| <i>Fa</i> 1A-6 | (GA) ²⁶ | F: CCACCCTCCAATATAACCC R: AGGAGAACCAAGATTAAGCC | 190 ^z |
| <i>Fa</i> 2A-6 | (CT) ¹⁰ | F: GGAGGTTTGAAACCAAAGCC R: CACTGTCCAGTTCCCTTTCC | 203 |
| <i>Fa</i> 3C-2 | (AC) ³ | F: TCTGCTTCTCTTGAAGCTGG R: GTATCTGGAGCCAAGAGG | 226 |
| <i>Fa</i> 4A-1 | (CT) ¹⁴ | F: AGGACAACCTTCGAGAAGG R: CGAATTCGCTCTTCACAG | 343 |

^z ‘とよのか’由来クローンの配列から予想される増副産物サイズ

表2-4 イチゴ 10 品種における SSR 多型

| 品種名 | SSRマーカー | |
|--------|--------------------|----------------|
| | <i>Fa</i> 1A-6 | <i>Fa</i> 2A-6 |
| とよのか | acdef ^z | acde |
| さちのか | acdf | acde |
| 福岡S6号 | acde | acdef |
| 女峰 | bcdf | abdef |
| とちおとめ | bcd | acdef |
| アスカルビー | abcdf | acdef |
| レッドパール | acdf | bcdef |
| さがほのか | cdf | cdef |
| 章姫 | cdf | adef |
| アイベリー | cdef | abdef |

^z アルファベット小文字は、図2-3, 4に同じ

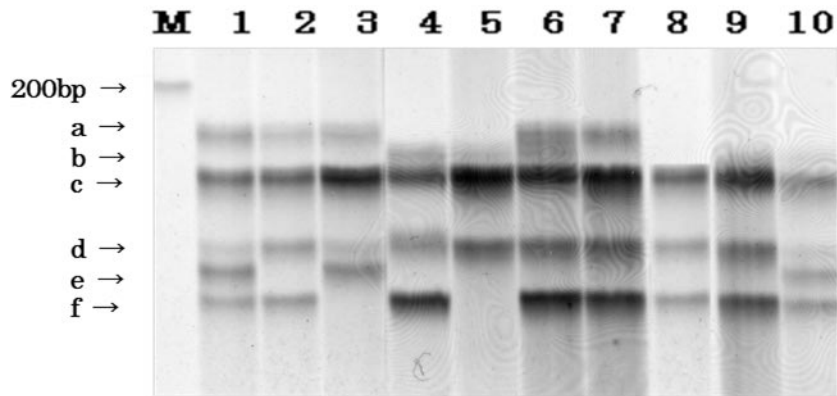


図2-3 SSR マーカー*Fa1A-6*による 7M 尿素変性 5%PAGE 像

レーン M:100bp ラダーマーカー, レーン 1-10: 順にとよのか, さちのか, 福岡 S6 号, 女峰, とちおとめ, アスカルビー, レッドパール, さがほのか, 章姫, アイベリー
矢印の英小文字は, 各品種のアリル由来のバンドを示す

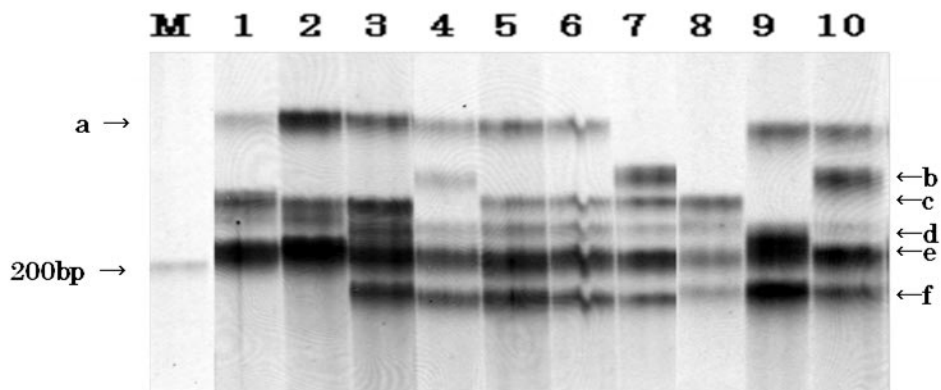


図2-4 SSR マーカー*Fa2A-6*による 7M 尿素変性 5%PAGE 像

レーン M:100bp ラダーマーカー, レーン 1-10: 順にとよのか, さちのか, 福岡 S6 号, 女峰, とちおとめ, アスカルビー, レッドパール, さがほのか, 章姫, アイベリー
矢印の英小文字は, 各品種のアリル由来のバンドを示す

摘 要

近年、国内で育成されたイチゴやインゲン等の品種の海外での違法使用、生産物の逆輸入が増加し問題となっている。そこで、そうした違法使用抑制を目的にイチゴの SSR マーカーを開発し、その品種識別における有効性を検討した。開発した 4 つの SSR マーカーのうち 2 つは多型性が特に高く、これらにより供試した主要栽培 10 品種の識別が可能であった。このことから、SSR は 8 倍体であるイチゴ栽培品種の識別にも有効と考えられ、今回開発した SSR マーカーは、育成者権益の確保に役立つことが期待できると考えられた。

第3章 植物防疫に向けたDNAマーカーの開発と実用化

第1節 カンキツ幼木におけるウイルス耐病性の比較(1)

ウンシュウミカン‘山川早生’およびウンシュウミカンとの交雑品種‘清見’の幼木の生育に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響と台木間差異

近年、カンキツウイルス病対策の重要性は益々高まってきているが、今のところ有効な方法はウイルスフリー化以外にない。しかし、最近の栽培品種の変遷と多様化は、消費者嗜好の変化と相まって目を見張るものがあり、新品種のフリー化が需要に追いつかないことや、虫媒伝染をはじめとする自然感染性のウイルスに対する対策が確立されていないなどの問題点も残されている。さらに、果実品質から見た栽培品種と台木の組合せの良否は、多くの事例が報告(平松・飛驒, 1939; 猪崎・丸橋, 1989; 熊谷・上林, 1925; 野呂・梶本, 1955; 田中, 1935)されているが、ウイルス耐病性から見た穂木品種と台木の組合せの良否に関する報告はほとんどない。また、良果生産の観点からこれまで選択・普及されてきたカラタチについても、最近のカンキツエクソコーティスウイロイドの感染拡大やカンキツトリステザウイルスに対する感受性が報告(吉田, 1993)される等の問題もある。そこで、苗木養成期から若年生期において、台木自体の生育に及ぼすウイルスの影響および栽培品種と台木品種・系統との組合せにおけるウイルス耐病性を検討した。

なお、苗木とは、本圃に定植するまでの接ぎ木養成1年目ないし2年目までの幼木を指す言葉であるが、本研究においては苗木から接ぎ木後3年生までの期間を対象に調査したものであり、正確には苗木から若年生樹におけるウイルス耐病性とすべきであるが、成木になる前という意味で、幼木と表記した。

材料および方法

1 実生台木の耐病性

供試実生台木

カラタチ属の‘カラタチ(中葉系)’(以下, ‘カラタチ’と表記), ‘ヒリュウ’, カラタチとオレンジの雑種の‘トロイヤーシトレンジ’, ‘ラスクシトレンジ’, カンキツ属の‘シイクワシャー’, ‘クレオパトラ’, ‘回青橙’, ‘サワーオレンジ’, ‘ラフレモン’, ‘サンキツ’及びキンカン属の‘福州キンカン’の計11の品種または系統の実生を1989年3月に播種し, その後6月に生育の揃った苗を口径15cmのポットに移植して, 実生台木を養成した。なお, 移植ポットの土壌にはUCソイルミックスを用い, 施肥は1ポット当たり油粕約10gを施用し, ガラス室内で管理した。

供試ウイルス・ウイロイドと接種

上記実生台木に供試ウイルス・ウイロイド(表3-1)保毒株の枝や葉脈を, 1989年6月に腹接ぎの要領で各区15本接ぎ木接種した。接種当年は, 主幹径及び20葉位までの主

幹長を計測し、接種2年目は、主幹径、新梢伸長量、葉数を計測し、生育を比較した。なお、CTV、SDV、CTLVについては、酵素結合抗体法（ELISA）により1991年6～9月に保毒の有無を確認した。

また、表3-1に示したSDV、CTLV、CEVdの保存株については、ELISAによりCTVの保毒の有無を確認したが、カンキツトリステザウイルスは、2～3年枝の木部のピッチェングの程度から強毒か否か確認できる（小泉，1993）ことから、接種樹の病徴調査より強毒系統ではないと判断された（表3-6）。

表3-1 供試ウイルス・ウイロイド

| ウイルス・ウイロイドの種類 | 導入元 | 導入年 | 略号 |
|--|---------------------|-------|-----------------|
| カンキツトリステザウイルス ^z ステムピッチェング系 (CTV-SP) | 愛媛県果樹試験場 | 1988年 | CP ^y |
| カンキツトリステザウイルス シードリングイエローズ系 (CTV-SY) | 愛媛県果樹試験場 | 1988年 | CY |
| 温州萎縮ウイルス (SDV) | 農林水産省果樹試験場 口之津市場 | 1980年 | CS |
| カンキツタターリーフウイルス (CTLV) | 徳島県果樹試験場 | 1981年 | CT |
| カンキツエクソコーティス ウイロイド (CEVd) | 門司植物防疫所 | 1983年 | CE |

^z SDV、CTLVおよびCEVdの保存株は、酵素結合抗体法(ELISA)によりCTVの保毒(重複感染)を確認した

^y ウイルス・ウイロイド接種区の略称

2 カンキツ幼木の耐病性の台木間差異

供試品種

熱処理と茎頂接ぎ木法の併用によって作出し、接種対象ウイルス・ウイロイド全ての無毒が確認された母樹より採取したウンシュウミカン‘山川早生’ならびにウンシュウミカン‘宮川早生’とオレンジ‘トロビタオレンジ’の交雑品種である‘清見’の穂木を、供試実生台木と同様にして養成し、ウイルス・ウイロイドを接種した‘カラタチ’、‘ヒリュウ’、‘シイクワシャー’を台木として、1990年4月に各区5本切り接ぎした。供試樹の仕立ては、接ぎ木1年目は主幹1本仕立てとし、2年目以降は、自然整枝とした。また、そ

の他の管理は実生台木試験と同様とし、主幹径、樹高、葉数を計測し生育を比較した。

3 ‘山川早生’および‘清見’における病徴発現の台木間差異

2で接種試験を行った個体について、「カンキツの調査方法」(農林水産省果樹試験場興津支場編, 1987b)に準じて調査した。すなわち、SDVは、樹の萎縮、舟型葉、さじ型葉、枝の叢生、節間の短縮を、CTVは、2~3年枝のピッチングを、CTLVは、接ぎ木部における離層形成の有無と接ぎ木部肥大率(接ぎ木部径/台木基部径×100)を調査した。

結果および考察

1 実生台木の耐病性

播種後2年間における実生台木自体の生育差を、カンキツの台木として一般的な‘カラタチ’の生育と比較したところ、‘ヒリュウ’は、主幹径・新梢伸長量・葉数全て劣り、‘福州キンカン’は、新梢伸長量で劣った。他の実生台木は、‘カラタチ’よりも旺盛な生育を示し、‘福州キンカン’も葉数では、‘カラタチ’を上回った(データ略)。台木の生育の良否の指標となる主幹径の肥大とウイルスの関係を見てみると、ウイルス接種の影響が最も小さいと思われたのは‘ラフレモン’、‘福州キンカン’であった(表3-2)。しかし、‘ラフレモン’は、耐寒性に乏しく果実品質が不良であること(池田ら, 1978; 熊谷・上林, 1925)、『福州キンカン’は、‘丸キンカン’を極矮性台木であるとする猪崎・丸橋(1989)の著述と同様、実生台木自体の新梢伸長量が‘カラタチ’の約8割、‘ラフレモン’の約4割と小さく(データ略)、樹勢が弱い傾向が認められ、台木としての利用は検討の必要がある。また、ウイルス接種の影響が最も大きいと思われたのは‘トロイヤースイトレンジ’と‘クレオパトラ’であり、‘トロイヤースイトレンジ’は5接種区中4区、‘クレオパトラ’は全接種区においてウイルスフリー区よりも主幹径が小さかった(表3-2)。また、‘トロイヤースイトレンジ’は、CP区の生育はウイルスフリー区と同等であったが、CY区では生育が劣った。このことは、‘トロイヤースイトレンジ’はシードリングイエローには冒されやすいという猪崎・丸橋(1989)や‘トロイヤースイトレンジ’は、ステムピッチングの生じやすいスイートオレンジの血が入っているため、トリステザウイルスの影響を受ける可能性は十分考えられるという池田ら(1980)の報告と一致する。接種ウイルスの種類では、CP、CY区に比べCS、CT、CE区において主幹径が小さい傾向がみられ、中でもCS区が最も影響が大きく、11種の台木中8種において生育が劣り、特に‘ヒリュウ’、‘ラスクシトレンジ’、‘トロイヤースイトレンジ’、‘回青橙’では、接種1年目から生育が劣った(表3-2)。また、CE区では、‘シイクワシャー’、‘サワーオレンジ’、‘トロイヤースイトレンジ’、‘クレオパトラ’の生育が1年目から劣った(表3-2)。CEVdに弱いとされる‘カラタチ’では、接種1年目の生育はフリー区と同等であったが、2年目の生育調査においては、フリー区に対し新梢伸長量、葉数で約8割の生育量となり、1年目からCEVd

の影響を受けたと思われる4種の台木の数値と比較しても1~2割劣ることから(データ略), 供試台木中最も CEV d の影響を受けたと考えられる。

表3-2 主幹径に及ぼすウイルス接種の影響

| 品種・系統 | フリー区の 主幹径(mm) | 接種区 ^z | | | | | 平均 |
|------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|
| | | CP | CY | CS | CT | CE | |
| カラタチ | 7.7 | 100 | 100 | 92 ^y | 100 | 92 ^y | 97 |
| ヒリュウ | 7.0 | 98 | 95 | 88 ^x | 100 | 100 | 96 |
| シイクワシャー | 10.2 | 99 | 100 | 100 | 84 ^x | 94 ^x | 95 |
| サワーオレンジ | 10.7 | 100 | 98 | 93 ^y | 100 | 85 ^x | 95 |
| ラフレモン | 13.0 | 98 | 100 | 97 | 100 | 100 | 99 |
| 福州キンカン | 7.7 | 100 | 100 | 99 | 100 | 96 | 99 |
| ラスクシトレンジ | 10.9 | 100 | 100 | 94 ^x | 100 | 100 | 99 |
| トロイヤーシトレンジ | 12.4 | 100 | 89 ^y | 87 ^x | 88 ^y | 88 ^x | 90 |
| サンキツ | 8.3 | 100 | 100 | 91 ^y | 97 | 100 | 98 |
| 回青橙 | 10.2 | 100 | 100 | 92 ^x | 88 ^x | 94 ^y | 95 |
| クレオパトラ | 11.6 | 93 ^y | 93 ^y | 86 ^y | 94 ^y | 87 ^x | 91 |

^z 数値は、各台木フリー区を100とした場合の値

^y フリー区と比較して、接種2年目から生育が劣った

^x フリー区と比較して、接種1年目から生育が劣った

2 カンキツ幼木の耐病性と台木間差異

(1) ‘山川早生’の生育に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響と台木間差異

各台木におけるフリー樹の生育を比較すると、主幹径・樹高・葉数全ての調査項目において‘シイクワシャー’台が優り、‘ヒリュウ’台の生育が最も劣った(図3-1)。接種2年目以降は、自然整枝としたため接種ウイルスの影響を葉数で比較したところ、‘カラタチ’台では5接種区中2区、‘ヒリュウ’台では3区、‘シイクワシャー’台では2区で生育が劣った(表3-3)。ウイルスの種類別に見てみると、ウンシュウミカンが耐病性とされるCTV(池田ら, 1980; 猪崎・丸橋, 1989)については、強毒株であるSP系・SY系共にどの台木においてもステムピッチングの発生は認められず、葉数もCY区の‘ヒリュウ’台で劣った以外、生育に対する影響は認められなかった。しかし、‘カラタチ’台ではCTLV(CT区)、‘ヒリュウ’台ではCEV d(CE区)、‘シイクワシャー’台ではSDV(CS

区)の影響を強く受けたと考えられ、生育も接種1年目から劣った(表3-3)。

このように今回供試した3種の台木では、ウイルス及びウイロイドの種類によってウンシュウミカン‘山川早生’の生育が異なることが明らかとなったが、今後も供試品種・系統以外の台木も含めてさらにウイルスの影響を検討する必要があると考えられた。

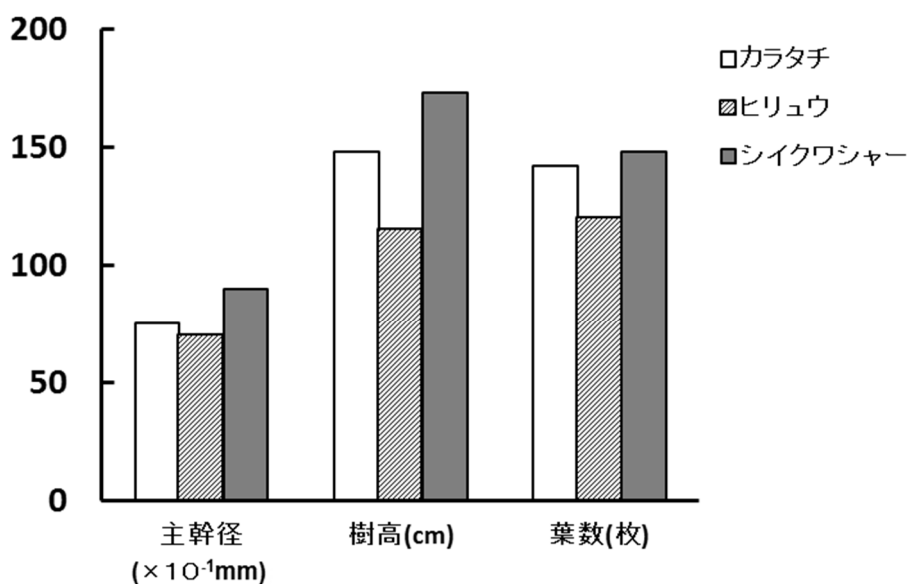


図3-1 ウイルスフリー‘山川早生’の生育と台木間差異

表3-3 ‘山川早生’の葉数に及ぼすウイルスの影響

| 台木の種類 | フリー区の 葉数(枚) | 接種区 ² | | | | |
|---------|----------------|------------------|-----|-----|----|-----|
| | | CP | CY | CS | CT | CE |
| カラタチ | 148 | 100 | 100 | 97 | 58 | 100 |
| ヒリュウ | 123 | 100 | 91 | 100 | 74 | 67 |
| シイクワシャー | 152 | 100 | 100 | 67 | 86 | 100 |

² 数値は、各台木フリー区を100とした場合の値

(2) ‘清見’の生育に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響と台木間差異

各台木におけるフリー樹の生育を比較すると、主幹径は‘シイクワシャー’台および‘ヒリュウ’台がやや大きく、樹高は‘ヒリュウ’台、葉数では‘カラタチ’台が最も良く、それぞれの調査項目において相違がみられたが、‘カラタチ’台と比較すると‘シイクワシャー’台および‘ヒリュウ’台の生育が良かった(図3-2)。

接種ウイルスの影響をしてみると、‘カラタチ’台および‘ヒリュウ’台では5接種区中2区で生育が劣り‘シイクワシャー’台では生育が劣った区はなかった。‘カラタチ’台および‘ヒリュウ’台では、CTLV(CT区)の影響が大きく、特に‘カラタチ’台では葉数がフリー区の約4割しかないなど著しい生育阻害が認められた(表3-4)。

以上のことから、‘清見’の台木には‘シイクワシャー’台を利用することで、良好な生育が確保され、かつウイルス・ウイロイドの影響も低く抑えることが可能と考えられた。

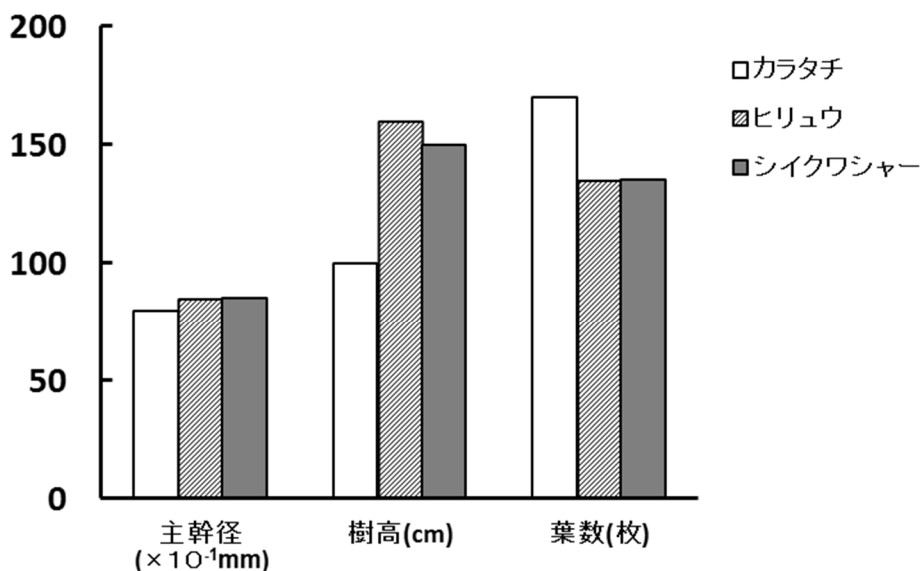


図3-2 ウイルスフリー‘清見’の生育と台木間差異

表3-4 ‘清見’の葉数に及ぼすウイルスの影響

| 台木の種類 | フリー区の 葉数(枚) | 接種区 ² | | | | |
|---------|----------------|------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | CP | CY | CS | CT | CE |
| カラタチ | 167 | 100 | 80 | 100 | 38 | 100 |
| ヒリュウ | 138 | 86 | 100 | 100 | 58 | 100 |
| シイクワシャー | 139 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

² 数値は、各台木フリー区を100とした場合の値

3 ‘山川早生’および‘清見’における病徴発現の台木間差異

(1) カンキツトリステザウイルス

各樹の2～3年枝のステムピッチングの発生程度を調査したところ、‘山川早生’はELISAにより保毒は認められたが、病徴の発生は認められなかった。これは、‘カラタチ’及び‘山川早生’が共にトリステザウイルスに耐病性を有するという池田ら(1980)の報告と一致する。また、‘清見’においては、ステムピッチングの発生が認められ(表3-5)、特に‘ヒリュウ’台のCP区、‘カラタチ’台のCY区は、それによる生育阻害の程度が大きかったと考えられた(表3-4)。「シイクワシャー」台は、生育も良好であったが、ステムピッチングの発生程度も軽度のものが多かった(表3-5)。

また、SDV, CTLV, CEV dの接種源が保毒していたCTVについては、CP区やCY区と比較して、ステムピッチングの発生率、発病度共に低いことから強毒系統ではなく、これらの接種源が保毒していたCTVが生育に与えた影響は、小さいと考えられた(表3-6)。

表3-5 ステムピッチング発生程度^z

| 品 種 | 接種区 | 台 木 | | |
|------|-----|------|------|---------|
| | | カラタチ | ヒリュウ | シイクワシャー |
| 山川早生 | CP | 0 | 0 | 0 |
| | CY | 0 | 0 | 0 |
| 清見 | CP | 26.7 | 40.0 | 16.0 |
| | CY | 33.3 | 13.3 | 10.0 |

^z 発生程度により、軽:1, 中:3, 強:5とし、(軽×1+中×3+強×5) / (供試数×5) × 100で算出

表3-6 ‘清見’のステムピッチング発生程度^z

| フリー区 | | 接 種 区 | | | | |
|----------------------|---|-------|------|-----|-----|------|
| | | CP | CY | CS | CT | CE |
| 発生率 ^y (%) | 0 | 72.7 | 50 | 25 | 8.3 | 11.1 |
| 発病度 ^x | 0 | 21.8 | 16.7 | 6.6 | 1.7 | 2.2 |

^z 供試した全ての台木を接種区毎に一括して算出した

^y 各区の病徴発生個体数 / 各区の全個体数 × 100で算出

^x 表3-5と同様にして算出

(2) 温州萎縮ウイルス

‘山川早生’のCS区についてSDVに特有の症状、すなわち萎縮・舟型葉・さじ型葉・枝の叢生・節間の短縮の有無と程度を調査した。フリー区においては、いずれもSDVの症状は認められず、生育も良好であった。接種区は全ての台木で症状が認められ、その程度も‘カラタチ’台と‘シイクワシャー’台で大きかった(表3-7)。

(3) カンキツタターリーフウイルス

‘山川早生’および‘清見’のCT区について、接ぎ木部の肥大症状の程度を肥大率により調査し、併せて接ぎ木部の離層(写真1)形成の有無を検討した。

接ぎ木部異常病は、‘カラタチ’及びその交雑種において発生することが知られている(小泉, 1993)が、今回の試験においても‘山川早生’、‘清見’共に‘カラタチ’台、‘ヒリュウ’台のCT区において接ぎ木部に離層が認められた。また、台木基部径と接ぎ木部径からその肥大率を算出し比較したところ、離層が形成された区の肥大率はすべてフリー区を上回り、なかでも‘山川早生’の‘カラタチ’台と‘清見’の‘カラタチ’台、‘ヒリュウ’台のCT区とフリー区の肥大率には有意な差が認められ、接ぎ木部異常病により生育阻害が引き起こされたことが示唆された。しかし、‘シイクワシャー’台では、両品種とも離層の形成は認められず、また、CT区とフリー区の接ぎ木部の肥大率の間にも有意な差は認められなかった(表3-8)。

(4) カンキツエクソコーティスウイロイド

ウイロイド接種実生台木の生育については、供試台木中6種で影響が認められ、中でも‘カラタチ’の生育が劣ったが、主幹表皮の亀裂・剥皮などの病徴は認められなかった。また、苗木の生育については、‘山川早生’の‘カラタチ’台においては主幹径の肥大と樹高が劣り、‘ヒリュウ’台においては、調査項目全てにおいて劣ったが、‘清見’ではいずれの台木区も生育に対する影響は認められず、病徴も認められなかった(データ略)。

当初、実生台木について病徴が認められなかったのは、台木の育成期間が2年という短期間の調査であったためと考えられた。しかし、3年間の苗木の調査においても病徴発現が認められなかったことや、‘カラタチ’台の‘バレンシアオレンジ’において接種30ヶ月で生育抑制並びに台木部に亀裂が認められたとする Calavan・Weathers (1961) の報告から、今回の試験に用いた病原は、今まで報告されたエクソコーティスウイロイドとは異なる可能性が示唆された。また、カンキツエクソコーティスウイロイドには、塩基数に違いの見られる系統が存在し、指標植物であるエトログシトロン(アリソナ 861-S1)に対する病徴発現の程度と塩基数の違いから、4グループに類別されるとする Semancik・Duran-Vila (1989) の報告から、本分場保存株はCEVdのいずれかの系統である可能性が高く、現在接種源に用いた保存樹を同定中である。

以上のことから、台木の生育に対するウイルス・ウイロイドの影響は、台木育成期間の生育比較においては‘ラフレモン’が最も小さく、‘トロイヤーシトレンジ’や‘クレオパトラ’を始め、多くの台木で生育に対する影響が大きかったSDVの影響も少なかった。ただし、台木自体の耐病性については、その後の生育や病徴発現程度を調査する必要がある。また、栽培品種と台木品種・系統の組み合わせにおけるウイルス・ウイロイドの影響については、‘清見’では‘シイクワシャー’台を用いることで、‘カラタチ’や‘ヒリュウ’で影響の大きかったCTLVの影響やCTVの影響をより低く抑えることが可能と考えられるが、今後、成木時の生育や果実品質・収量等に及ぼす影響を検討する必要がある。また、‘山川早生’については、ここで供試した台木品種・系統以外の台木も含めて検討し、より優良な台木を探索する必要がある。

表3-7 温州萎縮ウイルスによる‘山川早生’の病徴発現程度²

| 試験区 | 台木の種類 | 病徴 | | | | |
|------|---------|----|-----|------|------|------|
| | | 萎縮 | 舟型葉 | さじ型葉 | 枝の叢生 | 節間短縮 |
| フリー区 | カラタチ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ヒリュウ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | シイクワシャー | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SD区 | カラタチ | 10 | 60 | 40 | 80 | 60 |
| | ヒリュウ | 20 | 100 | 20 | 60 | 0 |
| | シイクワシャー | 10 | 80 | 20 | 80 | 20 |

² 病徴毎に発生程度を3段階に分け、表3-5と同様にして算出

表3-8 カンキツタターリーフウイルスによる
接ぎ木部肥大率と離層形成の有無

| 品種名 | 台木の種類 | フリー区 | | CT区 | |
|------|---------|------|----|-------|----|
| | | 肥大率 | 離層 | 肥大率 | 離層 |
| 山川早生 | カラタチ | 111 | - | 149** | + |
| | ヒリュウ | 129 | - | 131 | + |
| | シイクワシャー | 139 | - | 143 | - |
| 清見 | カラタチ | 107 | - | 124** | + |
| | ヒリュウ | 112 | - | 138** | + |
| | シイクワシャー | 126 | - | 123 | - |

**：フリー区の同一台木と比較して、1%水準で有意差有り(t検定)

-：離層形成なし，+：離層形成あり

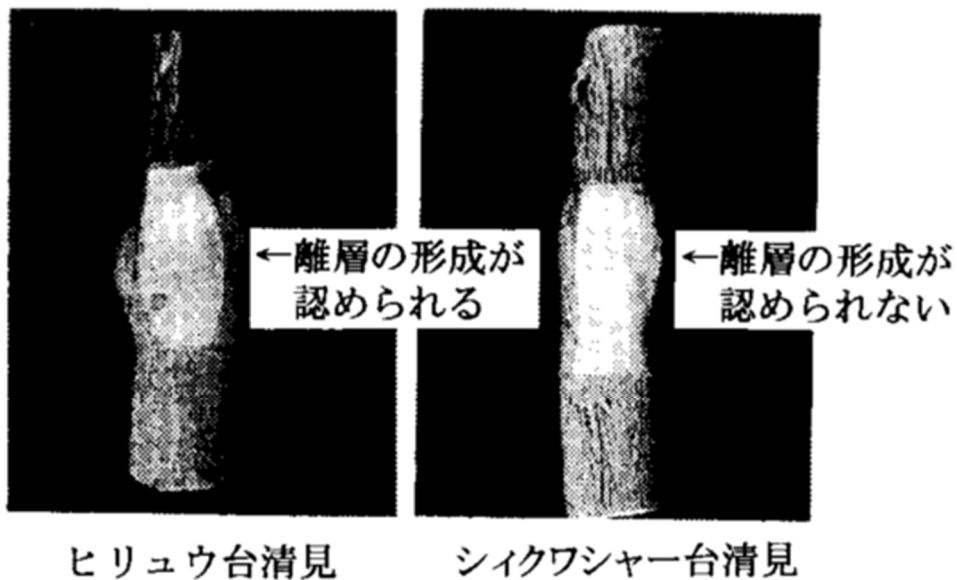


写真1 カンキツターリーフウイルスによる離層の形成

摘 要

各種カンキツウイルスおよびウイロイドが、カンキツ実生台木および苗木の生育に及ぼす影響とその病徴発現程度を検討した。実生台木の生育に対するウイルスの影響は、供試した11種の品種・系統の中では‘ラフレモン’が最も小さく、他の実生台木の生育に対して影響の大きかった温州萎縮ウイルスの影響も認められなかった。しかし、耐寒性が弱い点で、台木としての利用は検討の必要がある。‘山川早生’の生育は、ウイルスフリー区においては‘シイクワシャー’台が最も良かったが、温州萎縮ウイルスを保毒すると舟型葉の発生や枝の叢生が多く認められた。また、生育に対する影響も‘カラタチ’台や‘ヒリュウ’台よりも大きかった。‘清見’では、‘カラタチ’台、‘ヒリュウ’台に比較して、‘シイクワシャー’台の生育が良好であった。また、‘シイクワシャー’台‘清見’では、カンキツトリステザウイルスによる病徴発現程度も軽度であった。そのため、‘清見’には、‘シイクワシャー’を台木として利用することにより、ウイルスの影響をより低く抑え、かつ良好な生育が確保されると考えられた。

第2節 カンキツ幼木におけるウイルス耐病性の比較（2）

中晩生カンキツ品種‘太田ボンカン’幼木の耐寒性に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響と台木間差異

我が国のカンキツの台木として利用されているものは、そのほとんどがカラタチである（池田ら，1978）．しかし，現在までに育成された，あるいは今後育成される多様な品種の持つ特性を十分發揮するには，カラタチ以外の台木との組み合わせの方が良い場合も考えられる．そこで最近，栽培品種の持つ優良な形質を最大限に活かすため，カラタチ以外の台木を利用した栽培法についての検討がなされるようになった（池田ら，1978，1980；高原ら，1994，1995）．例えば，‘青島温州’では‘ヒリュウ’を台木に用いることで，高品質な果実を効率的に生産できる（小林ら，1995）という報告がなされ，現場へ普及され始めようとしている．このような試みは今後益々さかんになると考えられるがカラタチ以外の台木を利用した場合のウイルスやウイロイド病の影響についての調査事例は少ない．特に，ウイルス・ウイロイドを保毒した場合の環境条件に対する影響を台木品種との関係で詳細に検討した報告はない．

そこで今節では，本県で露地栽培が可能な早生のボンカンとして普及している‘太田ボンカン’について，幼木の耐寒性に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響と台木間差異について検討した．

材料および方法

供試台木品種

台木品種は，カラタチ属の‘カラタチ（中葉系）’（以下，‘カラタチ’と表記），‘ヒリュウ’，カラタチとオレンジの雑種の‘ラスクシトレンジ’，‘トロイヤーシトレンジ’，カンキツ属の‘シイクワシャー’，‘クレオパトラ’，‘サンキツ’，‘サワーオレンジ’，‘回青橙’，‘ラフレモン’およびキンカン属の‘福州キンカン’の計11の品種・系統を供試した．これらの実生を1989年3月に播種し，その後生育の揃った苗を6月に口径15 cmのポットに移植して，3年間養成し接ぎ木に供試した．なお，移植ポットの土壌にはUCソイルミックスを用い，施肥は1ポット当たり油粕10 gを施用してガラス網室内で管理した．

供試ウイルス・ウイロイドと接種

ウイルス・ウイロイド（表3-1）保毒株の枝や葉脈を，1989年6月に腹接ぎの要領で，各実生台木15本に接種した．なお，各ウイルスの感染については酵素結合抗体法（ELISA）によって，ウイロイドについては指標植物であるエトログシトロン（アリソナ861-SI）を用いて確認した．

供試品種

穂木は，福岡県農業総合試験場果樹苗木分場（以下当分場，現福岡県農林業総合試験場

資源活用センター)において熱処理と茎頂接ぎ木の併用により接種対象ウイルス・ウイロイド全ての無毒が確認された・太田ポンカン'の母樹から採取した。この穂木を前述のように養成して生育の揃った各実生台木5本に1992年4月に切り接ぎし、主幹1本仕立てで苗木を育成した。こうして養成した苗木は、当分場内露地圃場に設置したベッド(底面に防根シートを敷いた幅1m・長さ20m・深さ0.2mで作成、土壌はUCソイルミックス)に1993年5月に0.5m間隔で移植した。移植後の仕立ては自然整枝とし、その他の管理は慣行に従った。

調査項目は主幹径、樹高、葉数とし、1992～1996年の10月に調査した。

耐寒性の調査方法

本試験において、接ぎ木後3年目の冬季である1994年12月から1995年1月に3度の寒波が到来し、樹体に対する影響が懸念された。そこで、各台木品種に接ぎ木した'太田ポンカン'の耐寒性と接種ウイルス・ウイロイドの関連を明らかにするために、「カンキツの調査方法」(1987a)に準じて、落葉率と枝枯れ率を調査した。落葉率は、1995年の3月に供試樹の全葉数を計数し、その後5月に再度葉数を計数して、その差を落葉数として算出した。また、枝枯れ率は、1995年5月に供試樹の全1年枝の健全部と枯れ枝部を計測して、枝枯れ率を調査した。さらに、耐寒性調査終了後枯死株の発生が認められたので、枯死株数を調査した。

結果および考察

1 '太田ポンカン' 幼木の生育に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響

'太田ポンカン' 幼木の生育に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響について、前節の'山川早生'および'清見'と同様にして調査した。その結果、各種台木に接ぎ木した幼木の生育から見た'太田ポンカン'に適すると考えられる台木は、'カラタチ'以外の供試した台木品種・系統の中では、'ラスクシトレンジ'、'トロイヤーシトレンジ'、'シイクワシャー'、'サワーオレンジ'、'ラフレモン'であった(データ略)。なお、'福州キンカン'は、前述の通り主幹径、樹高ともに顕著に小さく台木としての利用は検討の余地があると考えられたことから、以後の調査については、'福州キンカン'を除く10の品種・系統の台木について検討した。

2 '太田ポンカン' 幼木の耐寒性に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響

接ぎ木後3年目の冬期にあたる1994年12月から1995年1月にかけて寒波が到来した。図3-3は、当分場における半旬別最低気温の観測データである。これは、半旬毎の平均値で示したもので、実際は12月17日に -3.6°C 、1月15日に -5.1°C 、1月31日には -6.9°C とかなりの低温に遭遇し、樹体に対する影響が懸念された。

表3-9は、枝枯れ発生率を示したものである。各台木のフリー区の枝枯れ率について比較したところ、‘シイクワシャー’、‘クレオパトラ’は、耐寒性に優れる（猪崎・丸橋、1989）とされる‘カラタチ’、‘ヒリュウ’よりも明らかに耐寒性が劣ると考えられた。また、耐寒性が劣る（猪崎・丸橋、1989）とされる‘ラフレモン’は、今回の調査では、‘シイクワシャー’より枝枯れ率が低くなった。

ウイルス・ウイロイド接種区では、CT区の枝枯れ率は、すべての台木で高くなり、中でも‘ラスクシトレンジ’、‘トロイヤーシトレンジ’、‘サワーオレンジ’、‘回青橙’、‘ラフレモン’で顕著に高かった。特に、‘カラタチ’との雑種である‘ラスクシトレンジ’と‘トロイヤーシトレンジ’は、カラタチに次いで耐寒性に優れるが、‘ラスクシトレンジ’は雑種の中でもタタリーフウイルスに弱い（河瀬、1995）とされ、このウイルス接種による耐寒性の低下が示された。

また、‘シイクワシャー’のCT区は、フリー区と同等の枝枯れ発生率であったが、耐寒性調査終了後の枯死株調査では、フリー区が5本中2本枯死したのに対し、CT区では供試した5本全て枯死したことから、最も影響が大きい可能性が示唆された（表3-10）。

そこで、台木品種・系統およびウイルス・ウイロイド接種の2つの要因と枝枯れ発生率との関係を解析した。表3-11は、枝枯れにおける台木とウイルス・ウイロイドそれぞれの要因についての分散分析の結果と寄与率を示したものである。その結果、枝枯れに対する影響は台木とウイルス・ウイロイドの2要因ともに有意な差が認められ、これらの要因が‘太田ポンカン’の枝枯れに影響したことが明らかとなった。さらに、その影響の程度を寄与率で見ると、この2つの要因では、台木品種の影響が大きく、ウイルス・ウイロイドの約2倍影響したと考えられた。各要因における期待値（ここでは、枝枯れ率）を意味する水準に付与される係数を見ても、まず、台木の種類では‘シイクワシャー’および‘回青橙’が高いことから、枝枯れ率が高く耐寒性が劣る傾向が認められた。一方、供試台木中最も耐寒性に優れると考えられたのは‘カラタチ’および‘ヒリュウ’であった。このことは、カラタチ台の‘ポンカン’に対する耐凍性の試験において、 -6°C の3時間処理では、枝枯れは発生せず、 -8°C の3時間処理でも軽～中程度席の枝枯れの発生であったという報告（河瀬ら、1982）とほぼ一致する。次に、ウイルス・ウイロイドの種類では、CT区の係数が特に高いことから、この分析結果からも本ウイルスにより耐寒性が低下した可能性が示唆された。

なお、生育調査において、主幹径、樹高ともに劣った‘カラタチ’のSD区および‘シイクワシャー’のCE区の枝枯れ率は、ともに各々のフリー区の数値と同程度か低いことから、各種ウイルス・ウイロイドの生育に対する影響と耐寒性の関係については、今後さらに検討する必要がある。

‘太田ポンカン’は、福岡県の補助品種として導入推進され、県の南部を中心に露地で栽培されている。この品種は、年内収穫が可能な早生のポンカンであり、高しょう系のポ

ンカンよりも耐寒性がある（吉田，1996）とされている。しかし，今回の調査から耐寒性は台木の種類による影響はもちろんであるが，ウイルスを保毒することにより低下する可能性が示唆された。したがって，今後カンキツ栽培においては，栽培品種と台木の種類の組み合わせにおけるウイルス・ウイロイドの影響も十分考慮する必要があると考えられた。

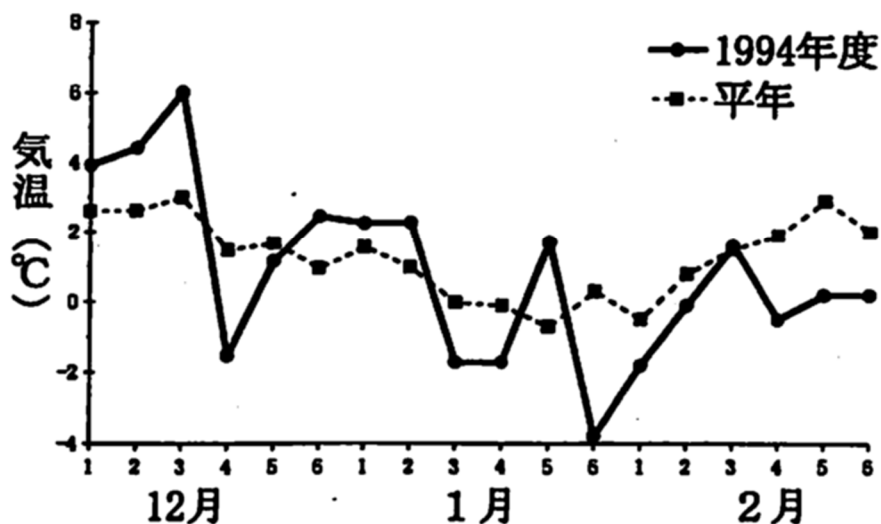


図3-3 半月別最低気温の推移

表3-9 ‘太田ボンカン’ 幼木の枝枯れ率に対するウイルス・ウイロイドの影響と台木間差異

| 品種・系統 | フリー区 | 接種区 | | | | |
|-------------|--------------------|------|------|------|------|------|
| | | CP | CY | CS | CT | CE |
| カラタチ | 0.0 ^a | 16.5 | 3.8 | 1.3 | 2.5 | 0.0 |
| ヒリュウ | 0.0 ^a | 3.6 | 1.5 | 12.5 | 11.5 | 3.4 |
| シイクワシャー | 47.5 ^c | 25.6 | 45.7 | 43.6 | 60.9 | 23.2 |
| サワーオレンジ | 22.2 ^{ab} | 5.0 | 20.0 | 9.9 | 63.6 | 25.5 |
| ラフレモン | 19.8 ^{ab} | 9.4 | 29.9 | 7.3 | 74.8 | 45.5 |
| ラスクシトレンジ | 15.3 ^{ab} | 6.8 | 16.7 | 12.5 | 47.2 | 34.7 |
| トロイヤースシトレンジ | 8.3 ^{ab} | 9.4 | 18.3 | 20.3 | 24.7 | 15.2 |
| サンキツ | 12.7 ^{ab} | 17.6 | 21.4 | 2.1 | 23.9 | 30.1 |
| 回青橙 | 28.1 ^{ab} | 68.9 | 25.8 | 19.7 | 77.2 | 71.3 |
| クレオパトラ | 34.7 ^b | 5.0 | 36.2 | 9.2 | 36.5 | 22.9 |

英小文字は，逆正弦変換後，Tukeyの多重検定で異符号間に1%水準で有意差有り
単位は，%

表3-10 '太田ポンカン' 幼木の枯死数

| 品種・系統 | フリー区 | 接 種 区 | | | | |
|------------|------|-------|----|----|----|----|
| | | CP | CY | CS | CT | CE |
| カラタチ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ヒリュウ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| シイクワシャー | 2 | 0 | 0 | 2 | 5 | 0 |
| サワーオレンジ | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| ラフレモン | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| ラスクシトレンジ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| トロイヤーシトレンジ | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| サンキツ | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 回青橙 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 1 |
| クレオパトラ | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |

数値は、供試 5 本中の枯死株数

表3-11 枝枯れ率の分散分析と要因の寄与率

| 要因 | 水準に付与される係数 | | | | | | | | | | 平方和 | 自由度 | 平均平方 | F値 | 寄与率 | |
|--------------------|------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-------|-----|------|------|-----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | | | | |
| 台木 | -19.5 | -18.1 | 17.6 | 0.9 | 7.6 | -1.3 | -7.5 | -5.5 | 25.0 | 0.6 | 10728 | 9 | 1192 | 6.80 | ** | 38.2 |
| ウイルス・ウイロイド (誤差) | -4.6 | -6.7 | -1.6 | -9.7 | 18.8 | 3.7 | | | | | 5289 | 5 | 1058 | 6.03 | ** | 18.4 |
| 合計 | | | | | | | | | | | 7893 | 45 | 176 | | | 43.4 |
| | | | | | | | | | | | 23910 | 59 | | | | 100.0 |

** : 1%水準で有意差有り

水準：台木品種 1.カラタチ, 2.ヒリュウ, 3.シイクワシヤー, 4.サワーオレンジ, 5.ラフレモン,
6.ラスクシトレンジ, 7.トロイヤーシトレンジ, 8.サンキツ, 9.回青橙, 10.クレオパトラ
ウイルス・ウイロイド 1.フリー, 2. CP, 3. CY, 4. CS, 5. CT, 6. CE

摘 要

各種台木に接ぎ木した‘太田ポンカン’苗木の生育と耐寒性に及ぼすウイルス・ウイロイドの影響について調査した。その結果、樹の生育から見た‘太田ポンカン’に適すると考えられる台木は、‘カラタチ（中葉系）’以外の供試した台木品種・系統の中では、‘ラスクシトレンジ’、‘トロイヤーシトレンジ’、‘シイクワシャー’、‘サワーオレンジ’、‘ラフレモン’であった。しかし、これらの台木に接ぎ木した‘太田ポンカン’では、カンキツタターリーフウイルスを保毒すると耐寒性が低下する可能性が示唆された。したがって、今後台木の選定に当たっては、ウイルスやウイロイド等の影響についても考慮する必要があると考えられた。

第3節 逆転写遺伝子増幅法による温州萎縮ウイルスの高感度検出

我が国のカンキツ生産においては高品質な果実生産が求められ、外観はもちろん高糖度などを念頭に多くの品種が育成され、現場へ導入・普及されている。しかし、早期の成園化を急ぐあまり各種ウイルス・ウイロイドのチェックを行わずに高接ぎ更新を行い、それによる被害事例も多く、大きな問題となってきた。

前節において述べたように、カラタチを台木に利用したウンシュウミカンが主力である我が国のカンキツ産地においては、温州萎縮ウイルス（SDV）やカンキツタターリーフウイルス（CTLV）の被害が大きいと考えられ、健全な穂木による苗木増殖の推進が重要である。特に、我が国のカンキツ苗木の約8割を生産する福岡県においては、本ウイルスに対する対策とそれに基づく健全な苗木の供給は、最も重要な責務である。

そこで、本節では、これらウイルス防除に資するための遺伝子診断法による検出法の開発について述べる。

なお、CTLVは、ゲノム構造の解析からリンゴの高接ぎ病の病原とされるリンゴステムグルーピングウイルス（ASGV）と同一であることが報告（Magome, 1997）されたことから、本節以降についてはASGVと表記する。

温州萎縮病は、わが国の主要なカンキツであるウンシュウミカン（*Citrus unshu* Marc.）において、葉の奇形や樹勢および収量の低下を招く重要病害である（岸國平編，1998）。本病は、温州萎縮ウイルス（SDV）によって引き起こされ、その伝染様式は接ぎ木や汁液によるほか、土壌伝染する（岸國平編，1998）とされ、ウイルスフリー化も抜本的な対策とはなっていない。土壌による伝染機構については十分解明されていないため、本病の防除においては、母樹の早期検定による伝染拡大防止が、実用上最も有効な対策の一つとなっている。

本県では、その防除対策の一環として、酵素結合抗体法（Enzyme-linked Immunosorbent Assay：ELISA）（Clark・Adams, 1977；平島ら，1990）による検定を、年間3,500試料について実施している。本法は、大量の検定を行う際には簡易かつ効率的であるが、検出感

度の限界から判定が困難な擬陽性の試料が存在すること、また試料の採取時期がウイルス濃度の高い時期に限定されるなどの問題がある。特に、擬陽性の試料について正確な再検定を実施するには、樹体内のウイルス濃度が高まる翌年の春期の新芽を供試するか、あるいは生物検定を行う必要があり、いずれも判定に長期間を要する。一方、最近の苗木生産現場では、生産計画が整う冬季における検定の要望が増加しており、それが可能な検定法の確立が望まれている。

筆者らは、カンキツ栽培において SDV と並んで重要なウイルスであるリンゴステムグルービングウイルス (Apple Stem Grooving Virus : ASGV) の検定法について検討し、リンゴやヤマノイモのウイルスの検出で報告のある逆転写遺伝子増幅法 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction : RT-PCR) (Kinard ら, 1996 ; Marinho ら, 1998 ; Nemchinov ら, 1995) およびイムノキャプチャー逆転写遺伝子増幅法 (Immuno-Capture RT-PCR : IC-RT-PCR) (亀谷ら, 1999 ; Nemchinov ら, 1995) を適用することにより、ELISA 法よりもさらに高感度な検定が可能であることを報告した (下村・草野, 2002)。

そこで今回は、RT-PCR および IC-RT-PCR 法が、SDV の高感度検出に適用可能か否かについて検討した。

材料および方法

供試ウイルス

独立行政法人 農業技術研究機構 果樹研究所 (現 (国) 果樹研究所) において各種カンキツから分離・保存 (Iwanami ら, 1991, 1993) されている SDV の 2 系統, SDV-58, MIE-88 およびその近縁ウイルスであるカンキツモザイクウイルス (CiMV) の 3 系統 Ci-968, CiMV 下津, CiK⑤を供試した。

休眠期の試料からの検出の検討には、1980 年に農林水産省 果樹試験場 口之津支場 (現 (国) 果樹研究所) から分譲され、当场においてウイルスフリー化した‘林温州’に接種し、無加温ビニールハウス内で保存している SDV (平島ら, 1990) を供試した。

RT-PCR 法

検出用プライマーは、Iwanami ら (1998) が報告した SDV の強毒系統 SDV-58 の外被タンパク領域 (CP) およびその上流の塩基配列に基づき設計した (表 3-1 2, 図 3-4)。

ウイルス RNA は、供試ウイルス各系統を保毒したカンキツ旧葉の 0.05 g から、核酸抽出剤 ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて全核酸を抽出後、20 μ L の再蒸留水に懸濁して調製した。

RT-PCR は、抽出・調整した全核酸 1 μ L を鋳型に用い、既報 (下村・草野, 2002) に準じて実施した。

表3-12 設計したSDV検出用プライマー

<FORWARD>

S58-s1(+):5'-GAT GAT GAC TTC TTC TTC AC-3'(84- 103*)

CP-L1(+):5'-TCT TTA CGT TCC GTC TAT GC-3'(3084-3103)

CP-L3(+):5'-AGC GCT GAT CAC TAC TCT CA-3'(3928-3947)

CP-S1(+):5'-TGC CTA TTA CTA TGG GAC AC-3'(4460-4479)

<REVERSE>

BCP-2(-):5'-TGG ATA CGC ACG AGC ATT GA-3'(1853-1834)

CPL-R(-):5'-TAC CTG CAA ATA TAT CGC AG-3'(4237-4218)

S58-r1(-):5'-ACG CAG CGA TGG CAT CAG GA-3'(5013-4994)

* SDV-58 塩基配列情報 (Iwanami ら, 1998)に基づく位置

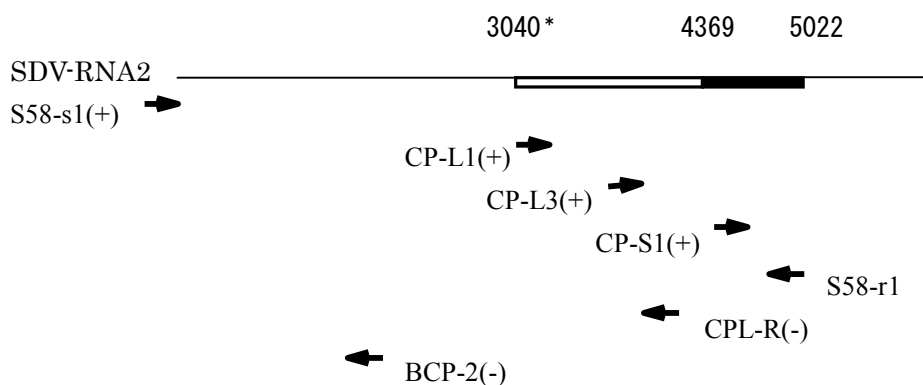


図3-4 SDV 検出用に設計したプライマーの SDV-58 の塩基配列上の位置

□, ■ は, それぞれ大, 小の外被タンパクをコードする領域を示す

* は, 塩基配列上の位置を示す

IC-RT-PCR 法と ELISA 法の感度の比較

SDV-58 を保毒したラフレモン (*Citrus jambhiri* LUSH.) の新芽 0.05 g を、10 倍容の 0.1% チオグリコール酸を含む 0.02M クエン酸緩衝液 (pH5.5) で磨砕後、遠心 (5,000 rpm, 10 分間) して得られた上清を、同様にして調製した健全なラフレモン汁液で段階希釈し、ELISA 法と IC-RT-PCR 法に供試した。

ELISA および IC-RT-PCR は、既報 (下村・草野, 2002) に準じて行った。

結果および考察

RT-PCR 法における検出用プライマーの選抜

今回新たに設計した相補、相同プライマー (表 3-12) の組み合わせのうち、理論上増幅可能な 8 組み合わせについて、SDV-58 を保毒したラフレモンから抽出した全核酸を供試して検討した。その結果、5 組み合わせ、[S58-s1(+), BCP-2(-)]、[CP-L1(+), CPL-R(-)]、[CP-S1(+), S58-r1(-)]、[CP-L3(+), CPL-R(-)]、[CP-L3(+), S58-r1(-)] において、想定されたサイズの DNA の増幅が認められ (図 3-5)、[S58-s1(+), CPL-R(-)]、[S58-s1(+), S58-r1(-)] および [CP-L1(+), S58-r1(-)] の組み合わせでは、認められなかった (データ略)。

そこで、増幅が認められた 5 つのプライマー組み合わせによる RT-PCR を、SDV の 2 系統および CiMV の 3 系統から抽出した全核酸を用いて実施した。その結果、SDV の 2 系統については、すべての組み合わせにおいて想定されたサイズの DNA の増幅が認められたのに対して、CiMV の 3 系統については、[CP-L1(+), CPL-R(-)] の組み合わせのみ増幅が認められた (表 3-13)。

これは、CiMV を検出できなかった組み合わせのプライマーのうち、少なくとも相同、相補いずれかがアニールする位置に SDV とは異なる塩基配列が存在するためと考えられた。

このことから、カンキツのウイルス検定においては、プライマーとして [CP-L1(+), CPL-R(-)] の組み合わせを用いることにより、SDV だけでなく CiMV の検出も可能と考えられた。

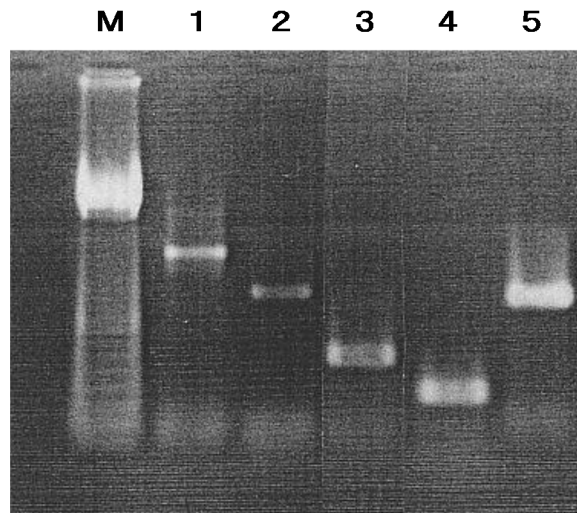


図3-5 SDV-58罹病カンキツ葉からのRT-PCRによる1.5%アガロースゲル電気泳動像

レーン M: 100bp ラダー
 レーン1: [S58-s1(+), BCP-2(-)]
 レーン2: [CP-L1(+), CPL-R(-)]
 レーン3: [CP-S1(+), S58-r1(-)]
 レーン4: [CP-L3(+), CPL-R(-)]
 レーン5: [CP-L3(+), S58-r1(-)]

表3-13 新規プライマー組合せを用いたRT-PCRによるSDVおよびCiMV系統の検出

| ウイルス系統 | プライマー組合せ | | | | |
|--------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | S58-s1(+) BCP-2(-) | CP-L1(+) CPL-R(-) | CP-S1(+) S58-r1(-) | CP-L3(+) CPL-R(-) | CP-L3(+) S58-r1(-) |
| SDV-58 | + | + | + | + | + |
| MIE-88 | + | + | + | + | + |
| Ci-968 | - | + | - | - | - |
| CiMV-Shimozu | - | + | - | - | - |
| CiMV-Cik⑤ | - | + | - | - | - |

+ : 増幅有り, - : 増幅なし

IC-RT-PCR 法と ELISA 法の感度の比較

SDV-58 を保毒したラフレモンの新葉から得た汁液をラフレモンの実生の新葉から得た汁液で段階希釈して調製した液を用いて ELISA 法により検定した結果、270 倍希釈液まで判定可能であった（図 3-6）。

一方、IC-RT-PCR 法では、7,290 倍希釈液でも判定に十分な量の DNA の増幅が認められ（図 3-7）、約 30 倍高感度な検出が可能であった ASGV の場合（下村・草野，2002）と同様、ELISA 法では判定が不正確な擬陽性の試料のより正確な検定が可能であり、SDV の検定に有効であると考えられた。

休眠期の試料からの SDV の検出

カンキツの休眠期に当たる 1 月に、無加温ビニールハウスにおいて保存している SDV 保毒‘林温州’の葉および樹皮を用いて、全核酸を抽出し、RT-PCR 法により検定した。その結果、葉、樹皮いずれの部位からも判定に十分な量の DNA の増幅が認められた（図 3-8）ことから、休眠期における母樹の検定も十分実施可能であると考えられた。

以上のことから、IC-RT-PCR 法は、ASGV 同様 SDV においても ELISA 法よりも高感度の検定が可能と考えられた。また、RT-PCR 法は、従来、ウイルス濃度が低く、検定が不可能であった休眠期の検定を可能にすることから、接ぎ木直前の母樹や穂木の検定に基づくウイルスフリー苗の効率的な生産を可能にするものと考えられた。なお、Iwanami ら（1993）は、SDV には抗血清の反応が異なるいくつかの系統が存在することを報告している。このことから、今後、これら系統に対する RT-PCR および IC-RT-PCR 法の適応性を検討し、本手法による SDV 諸系統およびその近縁ウイルスの検出法を早急に確立する必要がある。

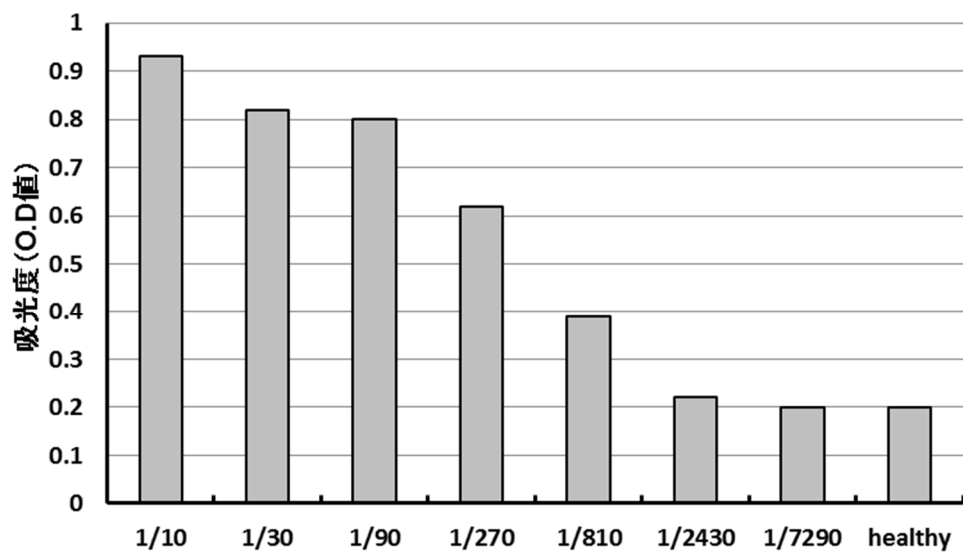


図3-6 ELISAによる感染葉汁液の希釈液からのSDV-58の検出

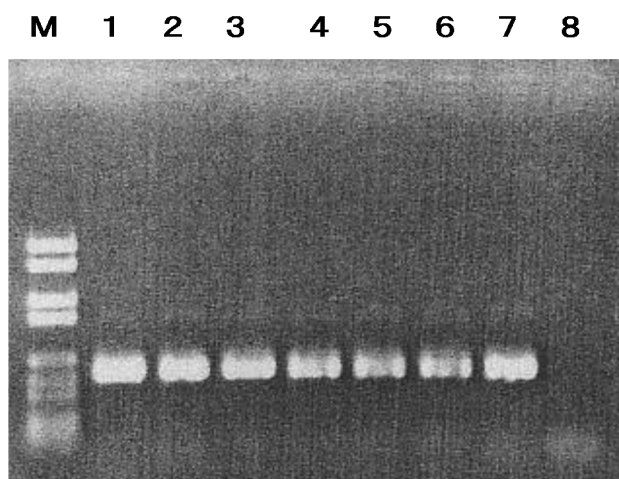


図3-7 IC-RT-PCRによる感染葉汁液の希釈液からのSDV-58の検出

M: DNA分子量マーカーIV (Beilinger Manheime 社)

レーン1~7: 1/10~1/7,290 までの3倍希釈液

レーン8: 健全葉

使用プライマー: [CP-L1(+), CPL-R(-)]

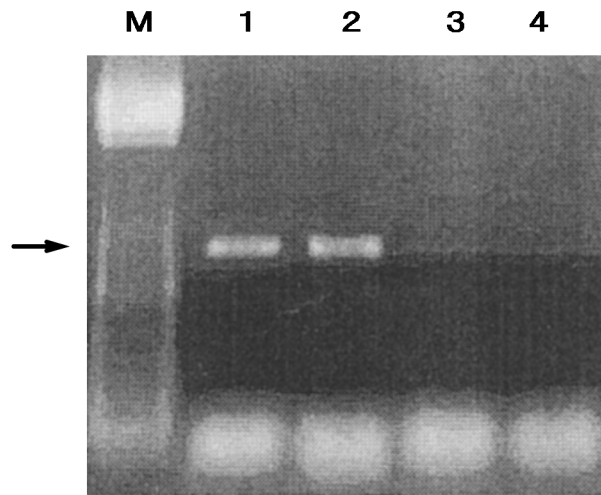


図3-8 RT-PCRによる冬季サンプルからのSDVの検出
 [CP-L1(+), CPL-R(-)]を用いたRT-PCR後の
 1.5%アガロースゲル電気泳動像
 1:感染葉, 2:感染樹皮, 3:健全葉, 4:健全樹皮,
 M:マーカー
 矢印は, SDV 特異的バンド

摘 要

温州萎縮ウイルスの高感度検出にRT-PCRおよびIC-RT-PCR法が適用可能か否かについて検討した。その結果、新たに設計したプライマー [CP-L1(+), CPL-R(-)] を用いた RT-PCR 法は、今回供試した SDV の 2 系統およびその近縁ウイルスである CiMV の 3 系統の検出に有効であった。IC-RT-PCR 法の検出感度は、ELISA 法の 30 倍以上であった。また、ELISA 法では検定が不可能な冬季のカンキツの葉や樹皮からも RT-PCR 法によって SDV の検出が可能であった。

以上のことから、RT-PCR および IC-RT-PCR 法は、SDV および CiMV の高感度検定に有効であることが明らかとなった。

第4章 総合考察

近年、我が国における農作物の品種開発競争は、各県のブランド化戦略とも相まって激化している。特に園芸作物では、ブランド化による優位性が販売単価に直結しやすいため、優良な形質を持った新品種の開発が求められている。新品種開発に当たっては、「おいしい」、「外観が綺麗」など、消費行動に大きく訴求できる形質を具備することが重要である。その意味で、イチゴ「あまおう（商標名、品種名：福岡 S6 号）」は、福岡県におけるブランド化戦略における最大の成功事例として、他の品目の手本となっている。

一方、そういった農産物を提供するに当たって不可欠な生産現場の状況を見てみると、先ほどの「あまおう」でも、生産者数 1,650 戸、栽培面積 339ha で、全盛期の 1990 年対比で生産者数 60.1%、栽培面積 67.9%（JA 全農ふくれん調べ、2012 年）と大変脆弱な状況となっている。特に、生産者の高齢化は深刻で、同 JA 全農ふくれん調べによるイチゴ「あまおう」の生産者の年齢構成を見てみると、65 歳以上の比率が 46% を占めており、5 年後、10 年後の生産現場の状況は察するにあまりある。こうした状況は、イチゴだけでなく、今回本論文で取り扱ったナスやカンキツはじめ全ての品目で直面している問題である。この状況下、福岡県においては、生産力の維持・向上に向けて、規模拡大や雇用を前提とした企業化を施策として推進しているところであり、それを後押しする品種・技術の開発も急務となっている。

その一環として、ナスでは生産に必要となる労働時間の約 3 割を占める合成オーキシシン（パラフェノキシ酢酸）を用いた着果処理作業（門馬、1996）が不要となる単為結果性ナス新品種の開発に取り組み、2014 年 5 月に単為結果性ナス F₁ 品種「省太」を育成した（古賀ら、2013）。ナスの単為結果性品種については、ヨーロッパで栽培されているが、これらの品種の多くは、やや晩生で、葉や茎に毛じが多く、茎および果実のへたが緑色、果皮が赤紫色であり、分枝性および着花数が少ない傾向にある（齋藤ら、2007）ことから、そのまま我が国へ導入、普及させることは困難である。そこで、現在、本県を含めた多くのナス育成地で、我が国の栽培に適した単為結果性ナスの育種に取り組み（久野・矢部、2005；松本ら、2007）、最近では、タキイ種苗（株）から単為結果性を有するナス新品種が開発された。

ナスの単為結果性は、省力的なナス生産を実現し規模拡大や雇用を前提とした企業化を促進する上で、これからのナス品種に不可欠の形質となっていくと考えられる。その意味で、今回開発したナスの単為結果性マーカーや国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所で研究が進められている SSR マーカー等が、ナス育種に大いに活用されることを期待している。

ブランド化戦略の一環として、知的財産権の維持・確保も重要となっている。近年、国内で育成されたイチゴやインゲン等の栽培用品種が育成者の許諾を受けることなく、生産、逆輸入される事例が増加傾向にある。これらは、明らかに違法な行為であり、この抑止は、

育成者権益の保護とともに、国内農業の振興を図る上で、重要な課題となっている。

こういった状況を受けて、福岡県では、イチゴ「あまおう」の品種識別技術開発が急務となり、AFLP法（下村ら，2005）、SSR法（Shimomura・Hirashima，2006）による品種識別技術を開発した。前述のような種苗利用の違法性を証明するには、識別手法をオンライン化する必要がある。そこで、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所（現国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所）では、CAPS法（Kunihisaら，2003；2005）をもとに、「DNAマーカー（CAPS法）によるイチゴ品種識別マニュアル」（2007）を策定した。

また、イチゴは青果物であると同時に加工品材料でもあり、品種名を用いて差別化した商品の販売も行われている。こうした加工品の場合は、熱処理をはじめとする製造過程でDNAの細断化が起りやすく、従来の青果物や植物体を対象とした比較的大きなDNA断片を用いる識別技術では、検出が困難な場合が想定される。そこで、平田ら（2015）は、レトロトランスポゾン挿入多型を利用したイチゴ加工品の品種識別マーカーを開発した。本マーカーは、100bp以下のDNA断片を識別に用いるので、DNAの細断化が起りやすい加工品からの品種識別にも有効と考えられる。DNAマーカーにかかる技術開発は日進月歩であり、新たな手法の開発と適用化を図っていく必要がある。

果樹の新品種開発は、農林水産省 果樹試験場（現国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所）を中心に取り組みが進められてきた。カンキツについても主に中晩生のカンキツの優良品種を多数育成してきたが、生産現場でも優良系統選抜等を実施し、最近、福岡県では、ウンシュウミカン‘北原早生’を選抜し、広く普及させようとしている。こうした新品種の導入にあたっては、生産農家の経済的損失を最小限に抑えるため、既存樹への高接ぎ更新が広く実施されてきた。その中で、リンゴステムグルーピングウイルス（ASGV）の感染により、接ぎ木後の生育不良や枯死が発生し、廃園に追い込まれる事例も見られ、大きな問題となった。福岡県は、我が国のカンキツ苗木の約8割を生産、供給する一大産地であり、健全種苗の供給が重要な使命である。そのために、福岡県ではウイルスフリー苗育成、供給のため、年間3,500点の酵素結合抗体法（ELISA）によるウイルス検定を行ってきた。しかし、本手法では、樹体内のウイルス濃度が高まる春先の新梢による診断が主体とならざるを得ず、その他の時期の検定手法の確立が望まれていた。

そこで、ASGVと温州萎縮ウイルス（SDV）の遺伝子診断法開発に取り組み、IC-RT-PCR法による診断法を確立した。これにより、苗木養成のための接ぎ木を実施する前の段階で、しかも時期を問わずに母樹を検定することが可能となったことから、健全種苗の供給に大いに役立っている。

このように、DNAマーカーは園芸作物に広く活用でき、今後も色々な場面で貢献が期待できることが明らかとなった。また、DNAに関する分野は、次世代シーケンサーの登場

やゲノム編集の進展など、益々発展すると思われることから、今後ともそういった最新技術を活用していくことで、さらなる園芸作物の振興を図っていく必要があると考えられる。

謝 辞

本研究を取り纏めるに当たり、懇切にご指導を賜りました九州大学大学院 生物資源環境科学府 昆虫ゲノム科学分野 日下部宜宏教授,並びに植物病理学分野 土屋健一教授,農業生産生態学分野 尾崎行生准教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、材料の提供をはじめ貴重なご助言を賜りました元独立行政法人 農業技術研究機構 野菜茶業研究所（現国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所） 齋藤猛雄博士,並びに元独立行政法人 農業技術研究機構 果樹研究所（現国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所） 岩波 徹博士,元国立大学法人 山口大学 農学部 生物資源環境科学科（現 創成科学研究科（農学系学域）） 執行正義教授,東洋大学 生命科学部 応用生物科学科 梅原三貴久教授に厚く感謝の意を表します。

本研究を実施するに当たり、前福岡県農林業総合試験場長 濱地勇次博士、元福岡県農業総合試験場 草野成夫博士、野口保弘氏、福岡県農林業総合試験場 平島敬太氏、三井寿一氏、小賦幸一氏、佐藤公洋氏、松岡 強氏、末吉孝行氏、古賀 武氏、加藤尚亮氏、児嶋勇夫氏はじめ、職場並びにチームの皆様には大変お世話になりました。心より感謝の意を表します。

本研究を進める過程でご指導・ご尽力頂きました上記並びに全ての職員、臨時職員の皆様に心より感謝申し上げます。

参考文献

- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B. (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 32:1131-1139.
- Ashley, M. V., Wilk, J. A., Styan, S. M. N., Craft, K. J., Jones, K. L., Feldheim, K. A., Lewers, K. S. and Ashman, T. L. (2003) High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). *Theor. Appl. Genet.* 107:1201-1207.
- Calavan, E. C. and Weathers, L. G. (1961) Evidence for strain difference and stunting with exocortis virus. *IOCV 2nd* : 26-33.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- DNA 品種識別技術検討委員会 農林水産省生産局種苗課 (2003a) 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項—技術開発と利用のガイドライン—. (別添資料) 植物品種識別における品種同定理論 : p.3.
- DNA 品種識別技術検討委員会 農林水産省生産局種苗課 (2003b) 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項—技術開発と利用のガイドライン—. (別添資料) 植物品種識別における品種同定理論 : p.8.
- Folta, K. M., Staton, M., Stewart, P. J., Jung, S., Bies, D. H., Jesdurai, C. and Main, D. (2005) Expressed sequence tags (EST's) and simple sequence repeat (SSR) markers from octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *BMC Plant Biology.* 5. 12.:1-11.
- 福岡浩之 (2002) 野菜における DNA マーカー育種の現状と展望「研究開発ターゲットシンポジウム」—DNA マーカー育種の推進—. (独) 農業技術研究機構:pp.5-8.
- 古川 真・谷本秀夫 (2004) DNA 多型によるナス品種識別法の開発. *育学研.* 6 (別 1) :82.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. and Gessler, C. (1998) Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96:1069-1076.
- 平松文一・飛驒元暁 (1939) 早生温州の台木種類比較試験成績. *園学雑* 10 (1) :52-61.
- 平島敬太・野口保弘・山田耕路・村上浩紀 (1990) モノクローナル抗体による温州萎縮ウイルスの検出. 第 1 報 ウイルスの純化とモノクローナル抗体の作出. *福岡農総試研報 B-10:87-90.*
- 平田千春・和氣貴光・下村克己・和田卓也・田中征矢・内村要介・平島敬太・中澤佳子・岡田香織・生井潔・門田有希・田原誠 (2015) レトロトランスポゾン挿入多型を利用したイチゴ加工品の品種識別マーカーの開発. *園学研.* 14 (別 1) :305.
- 池田 勇・中谷宗一・小林省蔵 (1978) ネーブルオレンジの台木に関する研究. *果樹試報.* E2:39-57.

- 池田 勇・中谷宗一・小林省蔵 (1980) ネーブルオレンジの台木に関する研究. 果樹試報. E3:25-47.
- 猪崎政敏・丸橋亘 (1989) 果樹繁殖法. 養賢堂, 東京 : pp. 237-251.
- 井上治郎・内田景子・北 宜裕・武田敏幸・中澤靖彦 (1997) イチゴのうどんこ病抵抗性育種に関する研究 (第 1 報) うどんこ病抵抗性の品種間差異と抵抗性の遺伝解析. 園学雑. 66 (別 2) :460.
- Iwanami, T., Koizumi, M. and Ieki, H. (1993) Diversity of among satsuma dwarf virus and related viruses. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 59:642-650.
- Iwanami, T., Omura, M. and Ieki, H. (1991) Susceptibility of several citrus relatives to satsuma dwarf virus. In Proc. 12th Conf. IOCV. IOCV, Riverside.:352-356.
- Iwanami, T., Kondo, Y., Makita, Y., Azeyanagi, C. and Ieki, H. (1998) The nucleotide sequence of the coat protein genes of satsuma dwarf virus and navel infectious mottling virus. Archives of Virology. 143:405-412.
- James, C. M., Wilson, F., Hadonou, A. M. and Tobutt, K. R. (2003) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in diploid strawberry (*Fragaria vesca* L.) for mapping, diversity studies and clone identification. Molecular Ecology. 3:171-173.
- 河野いずみ・竹内善信・島野公利・佐々木卓治・矢野昌裕 (2000) DNA マーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. 育種学研究 2:197-203.
- 亀谷満朗・山口和彦・原 知子・伊藤真一・藤 晋一・鍛冶原寛・田中秀平 (1999) イミューノキャプチャー PCR によるイチヨウイモ (*Dioscorea opposita* Thunb. cv. Ichoimo) からのヤマノイモモザイクウイルス (JYMV) の検出とその PCR-RFLP による強毒株と弱毒株の判別. 日植病報. 65:494-497.
- 河瀬憲次 (1995) 果樹台木の特性と利用 (河瀬憲次編). 農文協 : pp.22-23, pp.118-121.
- 河瀬憲次・吉永勝一・内田 誠・廣瀬和栄 (1982) カンキツ類の耐凍性に関する研究. 果樹試報. D4 : 25-46.
- Kinard, G.R., Scott, S. W. and Barnett, O. W. (1996) Detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus by RT-PCR. Plant Dis. 80:616-621.
- 岸國平編(1998)日本植物病害大事典. 全国農村教育協会, 東京 : p.868
- 古賀 武・下村克己・末吉孝行・三井寿一・浜地 勇次・齊藤猛雄・松永 啓・斎藤 新(2013). 単為結果性ナス新品種「省太」の育成. 福岡農総試研報. 32:52-58.
- 小林康志・大野文征・岡田正道・鹿野英士・牧田好高・加々美裕・井口 功・原 節夫・黒柳栄一・佐々木俊之 (1995) ‘ヒリュウ’ 台木が ‘青島温州’ の生育・収量・果実品質に及ぼす影響. 静岡柑橘試研報. 26:23-30.
- 小泉銘珊 (1993) 作物ウイルス病事典 (土崎常男・栃原比呂志・亀谷満朗・柳瀬春夫編). 全国農村教育協会, 東京 : pp.597-598.

- Koizumi, M., Kano, T., Ieki, H. and Mae, H. (1988) A symptomless carrier of satsuma dwarf virus which accelerates natural transmission in the Fields. *In Proc. 10th Conf. IOCV. IOCV, Reverside:348-352.*
- 熊谷八十三・上林諭一郎 (1925) 果樹繁殖論. 明文堂, 東京 : pp.285-304.
- 國久美由紀 (2002) イチゴ品種識別に有効な DNA マーカーの開発. 育種学研究 4 (別 2) :259
- Kunihisa, M., Fukino, N. and Matsumoto, S. (2003) Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134: 209-215.
- Kunihisa, M., Fukino, N. and Matsumoto, S. (2005) CAPS markers improved by cluster-specific amplification for identification of octoploid strawberry (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) cultivars, and their disomic inheritance. *Theor. Appl. Genet.* 110:1410–1418
- 久野哲志・矢部和則 (2005) ナスの単為結果性 F₁ 品種ととげなし性系統間の F₂ 分離世代における単為結果性及びとげなし性の遺伝解析. 愛知農総試研報. 37: 29-33.
- Lerceteau-Köhler, E., Guérin, G., Laigret, F. and Denoyes-Royhan, B. (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) using AFLP mapping. *Theor. Appl. Genet.* 107: 619-628.
- Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T. and Miyakawa, T. (1997) Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology* 87:389-396.
- Marinho, V. L. A., Kummert, J., Rufflard, G., Colinet, D. and Lepoivre, P. (1998) Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR. *Plant Dis.* 82:785-790.
- Martin, W. J., McCallum, J., Shigyo, M., Jakse, J., Kuhl, J. C., Yamane, N., Pither-Joyce, M., Gokce, A. F., Sink, K. C., Town, C. D. and Havey, M. J. (2005) Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity. *Mol. Gen. Genomics.* 274:197-204.
- 松田照男・原 弘道・猪崎政敏 (1988) イチゴ (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) の諸形質の遺伝. 茨城大学農学部学術報告. 36 : 1-18.
- 松本満夫・岡田昌久・小松秀雄・石井敬子・宮崎清宏・猪野亜矢 (2007) 単為結果性ナス ‘はつゆめ’ の育成. 高知農技セ研報. 16 : 53-58.
- 三井寿一・藤田幸一・末吉孝行・伏原 肇 (2003) イチゴ新品種‘福岡 S6 号’, ‘福岡 S7 号’ の育成. 福岡農総試研報. 22 : 61-68.
- 宮武宏治・根来里美・布目 司・大山暁男・山口博隆・齋藤猛雄・福岡浩之 (2007) PCR ベースマーカーを利用したナス連鎖地図の詳細化と新たに見いだされた単為結果

- 性関連 QTL. 育学研. 9 (別1) : 106.
- 宮武宏治・布目 司・山口博隆・齋藤猛雄・福岡浩之 (2005) SSR マーカーを用いたナス単為結果性の QTL 解析. 育学研. 7 (別1・2) : 283.
- 門馬信二 (1996) 単為結果性ナスの特性と今後の利用. 施設園芸. 38 : 30-33.
- 門馬信二・興津伸二・高田勝也 (1990) イチゴの四季成り性の遺伝. 野菜・茶業試験場研究報告. C : 21-29.
- Monna, L., Miyao, A., Inoue, T., Fukuoka, S., Yamazaki, M., Zhong, H. S., Sasaki, T. and Minobe, Y. (1994) Detection of RAPD markers in rice and their conversion into sequence tagged sites (STSs) and STS-specific primers. DNA Res.1:139-148.
- 森 利樹 (2000) イチゴの果実硬度に関する遺伝率と選抜の効果. 園学雑. 69 (1) : 90-96.
- 森 利樹・北村八祥 (2001) 一季成り性イチゴにおける早晩性の遺伝. 園学雑. 70 (別2) : 171.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., Candresse, T., Foster, J. A. and Verdevskaya, T. D. (1995) Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR, or multiplex IC-RT-PCR. Acta Hort. 386:51-62.
- Nishi, T., Tajima, T., Noguchi, S., Ajisaka, H. and Negishi, H. (2003) Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance. Theor. Appl. Genet. 106: 765-770.
- 野呂癸巳次郎・梶本諭 (1955) 柚砧の温州蜜柑の成長に及ぼす影響. 香川県立農科大学各術報告 7 (1) : 36-40.
- 農林水産省果樹試験場興津支場編 (1987a) カンキツの調査方法. pp.32-33.
- 農林水産省果樹試験場興津支場編 (1987b) カンキツの調査方法. pp.43-45.
- Nunome, T., Yoshida, T. and Hirai, M. (2001) Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. Breed. Sci. 51: 19-26.
- 岡田昌久・松本満夫・石井敬子 (2004) 単為結果性ナス育種における葯培養の有効性. 園学雑. 73 (別1) : 281.
- 大坪研一・藤井剛・橋野陽一 (1997) RAPD 法を用いた国内産精米の品種判別技術. 日本食品工業学会誌 44 (5) : 386-390.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Moleculer Breeding. 2:225-238.
- 齋藤猛雄・宮武宏治・齋藤 新・山田朋宏・福岡浩之 (2004) ナス単為結果性の評価法. 育学研. 6 (別2) : 248.
- 齋藤猛雄・吉田建美・門馬信二・松永 啓・佐藤隆徳・齋藤 新・山田朋宏 (2007) 単為結果性ナス品種‘あのみり’の育成経過とその特性. 野菜茶研研報. 6 : 1-11

- Semancik, J. S. and Duran-Vila, N. (1989) The grouping of citrus viroids : Additional physical and biological determinants and relationships with diseases of citrus. IOCV 10th : 178-188.
- Sharma, S.K., Knox, M.R. and Ellis, T. H. N. (1996) AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 93:751-758.
- Shimomura, K. and Hirashima, K. (2006) Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75: 399-402.
- 下村克己・草野成夫 (2002) イムノカプチャー逆転写遺伝子増幅法 (IC-RT-PCR) によるカンキツからのリンゴステムグルーピングウイルスの検出. 福岡農総試研報 21 : 87-91
- 下村克己・三井寿一・藤田幸一・佐藤公洋 (2005) Amplified fragment length polymorphism 法によるイチゴ‘福岡S 6号’の品種識別. 福岡農総試研報. 24: 43-47.
- 杉田 亘 (2008) ピーマンにおける青枯れ病抵抗性 DNA マーカーの開発と台木品種の育成. 平成 20 年度課題別研究会資料 (野菜における DNA マーカー利用育種の現状と展望) . pp.68-72.
- Suwabe, K., Tsukazaki, H., Iketani, H., Hatakeyama, K., Fujimura, M., Nunome, T., Fukuoka, H., Matsumoto, S. and Hirai, M. (2003) Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. Theor. Appl. Genet. 107: 997-1002.
- 高橋春實・高井隆次・松本 勤 (1991) イチゴ黒斑病菌に対するイチゴ品種の感受性の遺伝. 園学雑. 60 : 113-118.
- 高原利雄・河瀬憲次・村松 昇・岩垣 功・吉永勝一・小野祐幸・山田彬雄・廣瀬和榮・緒方達志 (1995) 各種台木がハッサクの生育と果実品質に及ぼす影響. 果樹試報 28 : 25-37.
- 高原利雄・緒方達志・河瀬憲次・岩垣 功・村松 昇・小野祐幸・吉永勝一・広瀬和榮・山田彬雄・高辻豊二・内田 誠 (1994) 大谷伊予柑の生育と果実品質に及ぼす各種台木の影響. 果樹試報 26 : 39-60.
- 武田恭明・三輪龍士・浅平 端 (1990) ナスの蒴培養における胚様体形成の促進 園学雑 59 (別1) : 244-245.
- 田中諭一郎 (1935) 園芸植物繁殖法. 明文堂, 東京 : p. 301.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Theo van de Lee, Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.
- Waugh, R., Bonar, N., Baird, E., Thomas, B., Graner, A., Hayes, P. and Powell, W. (1997) Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. Mol. Gen. Genet.

255:311-321.

- Weber, J. K. and P. E. May (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Kotobuki, K., Ban, Y., Hayashi, T. and Matsuta, N. (2001) SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor. Appl. Genet.* 102:865-870.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Shouda, M., Ban, Y., Hayashi, T. and Matsuta, N. (2002) Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *Molecular Ecology Notes* 2:14-16.
- 吉田建美(1998) ナスの単為結果性育種. 平成 10 年度日種協育技研シンポジウム. PP.13-21.
- 吉田建美・松永 啓・佐藤隆徳(1998) ナスの単為結果性の遺伝特性. 園学雑. 67 (別 2) : 257.
- 吉田俊雄 (1993) カラタチのカンキツトリステザに対する免疫性のカラタチ属間雑種における遺伝様式. 果樹試報 25 : 33-43.
- 吉田俊雄 (1996) 原色果物図説 (小崎 格 外監修). 養賢堂 : p.336.

福岡県農林業総合試験場特別報告
第7号

福岡県の園芸作物振興のためのDNAマーカー
の開発と実用化に関する研究

発行 平成29年3月

福岡県農林業総合試験場
〒818-8549 福岡県筑紫野市大字吉木587
TEL 092-924-2971

著者 下村 克己

印刷所 よしみ工産株式会社
〒804-0094 北九州市戸畑区天神1丁目13番5号
TEL 093-882-1661

