

野菜茶業研究所ニュース

No5. 2002.9

CONTENTS

表紙	園芸試験場百周年記念中央式典	1
視点	野菜茶業研究所におけるバイオテクノロジー研究	2
研究情報	小孢子からの植物体再分化能が高いはくさい中間母本農7号	3
	チャやツバキに応用できる珪藻土を用いた植物DNAの迅速単離法	4
	ピーマンにおけるPMMoV抵抗性遺伝子(L ²)に連鎖したDNAマーカー	5
	ナスの果形、果色、茎色、ヘタ色と連鎖するDNAマーカー	6
所の動き	1. 園芸試験場百周年記念中央式典と記念行事	7
	2. 特許・実用新案	7
	3. 新品種・中間母本、人の動き	8



園芸試験場百周年記念中央式典が6月20日、430人余りの参会者を得て盛大に開催された。式辞を述べる独立行政法人農業技術研究機構中村浩園芸研究担当理事。
壇上、右から矢澤進園芸学会副会長、野間起農林水産副大臣、三輪睿太郎農業技術研究機構理事長。
(7ページに関連記事)

視点

野菜茶業研究所における バイオテクノロジー研究

機能解析部長 山下 市二

DNAの迅速単離法の開発

当所におけるバイオテクノロジー研究において、各種植物体からのDNA抽出操作は欠くことができないが、果菜類やチャは多糖類やカテキンなどのポリフェノール含量が高いため、DNA抽出が難しい。これを解決するため、各種の植物材料から迅速・安価かつマーカー検出に利用出来るDNAを抽出する技術を研究している。この成果は、野菜とチャ以外にも広く利用出来るものと期待される。

育種効率化のための小孢子培養及び DNAマーカーの開発

従来の育種には多くの年月と投資が必要である。当所では、ハクサイの小孢子培養による育種年限の短縮化に有用な中間母本を育成した。また、育種の効率化を目指して、ピーマンのトウガラシマイルドモットルウイルス（PMMoV）抵抗性、ハクサイの根こぶ病抵抗性（野菜・茶業試験場ニュースNo.61）、ハクサイの抽台性（野菜・茶業試験場ニュースNo.54）、メロンのうどんこ病抵抗性、茶のクワシロカイガラムシ抵抗性、ナスの果形・果色などの優良形質に連鎖するDNAマーカーの開発に取り組んでいる。

品種識別のためのDNAマーカーの開発

最近、野菜や茶の品種およびその表示の信頼

性に対する消費者の関心が高まっている。また、品種登録された種苗は、育成権者に無断で増殖し、販売することはできないが、これに違反する事例がみられる。当所では、安全・安心の確保および育成者の権利保護に資するため、DNAレベルでの品種鑑定技術の確立に取り組んでいる。現在、茶の生葉（野菜茶業研究所ニュースNo.3）、製茶葉およびイチゴのDNA品種識別法の確立と迅速・簡便化および普及に向けて研究中である。ブレンド茶におけるチャ品種判別、輸入イチゴの品種識別等への応用が可能になってきた。

有用な機能を付与するための遺伝子組換え

キュウリモザイクウイルス（CMV）の外被タンパク質（CMV-CP）遺伝子を導入した耐病性トマトの作出、酸性インベルターゼのアンチセンス遺伝子を導入した糖組成改変トマトの作出、アミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素のセンスおよびアンチセンス遺伝子を導入した日持ちの優れたトマトの作出（野菜・茶業試験場ニュース No.54）、栄養機能高度化のためビタミンCの合成遺伝子を導入したレタスの作出など遺伝子組換え野菜の開発に取り組んでいる。遺伝子組換え野菜が消費者の理解を得られるかという問題はあるが、ブレークスルー技術として、また生理学の遺伝子レベルでの解明のために重要な研究と位置づけている。

小孢子からの植物体再分化能が高い ‘はくさい中間母本農7号’

研究のねらい

現在流通しているほとんどのハクサイ品種はF₁品種で、遺伝的に固定した系統(純系)同士をかけあわせることにより育成される。純系を作るには通常、自殖を何度も繰り返す必要があるため長年月を要するが、小孢子から半数性植物体を再分化させた後、その染色体数を倍加させると、短期間で純系を作ることができる。しかしながら、日本型ハクサイでは、低温下(15℃以下)で栽培しなければ小孢子からの植物体再分化率が低く、しかも品種間差が大きいことから利用が困難であった。野菜茶業研究所では、南方型品種群に属する Homei が、通常条件(20-25℃)で栽培しても植物体再分化率が高く、しかも再分化植物の中には、染色体数を自然に倍加した個体が高頻度で含まれることを見出した。そこで、‘Homei’の高再分化能を持つ日本型ハクサイを育種することにした。

研究の成果

‘Homei’と日本型ハクサイとの交雑F₁について、小孢子からの植物体再分化能について選抜を行った。選抜個体にさらに日本型ハクサイを交雑し、小孢子からの植物体再分化能について選抜を行うことを5回繰り返し、‘はくさい中間母本農7号’を育成した(図1)。

‘はくさい中間母本農7号’は、再分化能が‘Homei’と同等以上で、小孢子1×10⁶個当たり60の植物体を再生し、アブラナ科野菜で最も高い再分化能を示す系統の一つである(図2)。しかも、小孢子由来の再分化植物での自然倍加率が高く、高頻度で純系が得られる。



図1 ‘はくさい中間母本農7号’ (中央)
左: ‘Homei’、右: 日本型ハクサイ

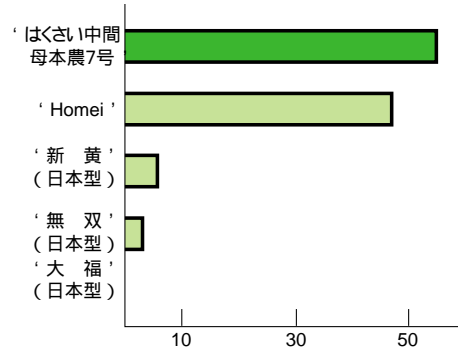


図2 小孢子1×10⁶個当たりの植物体再分化数

成果の活用面・留意点

‘はくさい中間母本農7号’と有用形質を持つ低再分化能品種・系統との交雑後代を小孢子培養することにより、短期間で純系が育成できる(図3)。
‘はくさい中間母本農7号’の維持・増殖は、蓄受粉等を利用した強制自殖により行う。

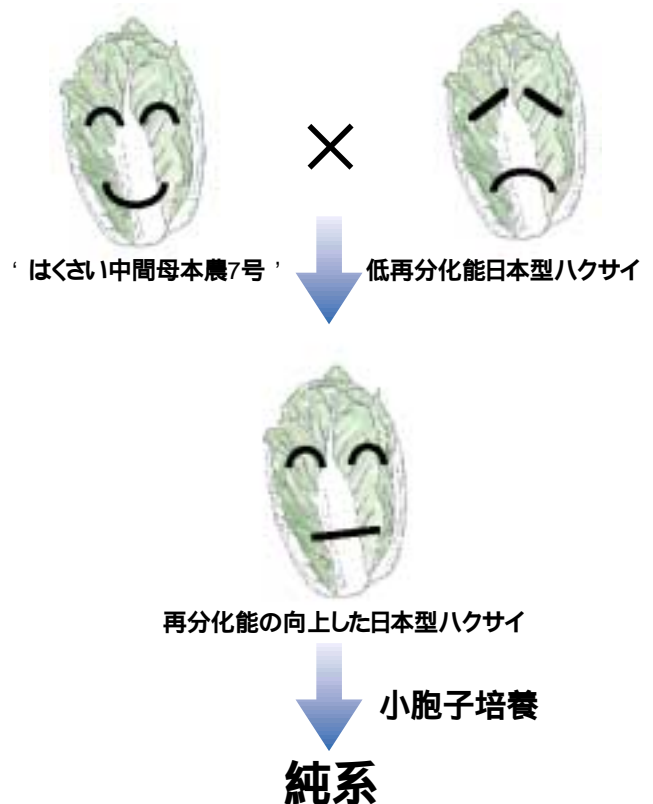


図3 ‘はくさい中間母本農7号’の利用法

[葉根菜研究部・アブラナ科育種研究室]

チャやツバキに応用できる珪藻土を用いた植物DNAの迅速単離法

研究のねらい

DNAマーカーによる選抜(Marker-Assisted Selection (MAS))の実用化のためにはDNA抽出を含むマーカー検出作業の効率化が不可欠である。イネ等で行われている極めて簡易なDNA抽出方法ではチャの選抜に耐え得る品質のDNAが得られない。また、ツバキ等の一部の木本性植物では、現在、用いられている主要な方法ではDNA抽出が困難である。これはポリフェノールや多糖類等を多量に含むためと考えられる。近年、バクテリアからのDNA抽出に珪藻土を用いる方法が開発・実用化された。珪藻土は安価でDNA吸着能が高い特徴を有する。

そこで珪藻土とスピンフィルターを用いて植物材料から短時間かつ安価にマーカー検出に耐え得る品質のDNAを抽出する方法を開発する。

研究の成果

DNA抽出法のアウトライン

破碎した植物組織を緩衝液に懸濁・抽出の後、遠心にて粗抽出液を得、酢酸カリウム等を用いた塩析による除タンパクの後、スピンフィルター上に移してカオトロピックイオンを含む溶液を加えて混和する。これに珪藻土を懸濁してDNAを吸着させ、スピンフィルターの遠心にてエタノールを含む緩衝液を用いて洗浄の後、DNA用緩衝液で溶出する。抽出用サンプルは新鮮重30～200 μgの葉組織でよい。

抽出DNAの品質・他植物への応用

イネ及びチャより抽出されたDNAのOD₂₆₀ / OD₂₈₀値は1.70～1.82であり、PCRによるDNA多型の検出やLong-PCR、制限酵素による消化、その後のアダプターの連結等に問題なく使用することができる。

この方法はチャやツバキをはじめ、DNA抽出が困難なものを含む48種の植物種のうち、オランダイチゴ、イヌマキ、フェイジョア、キウイフルーツを除く44種の植物からのDNA抽出に有効であり、DNA

多型検出に使用可能である(図)。

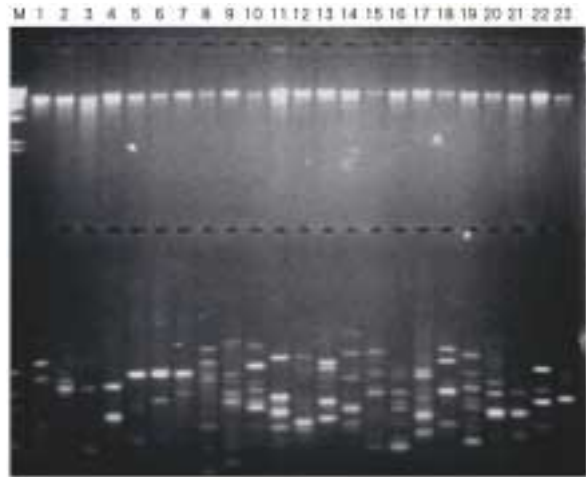


図 抽出DNA(上段)とそれを鋳型として使用したRAPD PCR産物(下段)の例

M: 分子量マーカー, 1: スギナ, 2: イヌワラビ, 3: ソテツ, 4: ゲッケイジュ, 5: チャ, 6: キンカチャ, 7: ツバキ, 8: ブロッコリ, 9: アジサイ, 10: モモ, 11: シロツメクサ, 12: ダイズ, 13: ナツミカン, 14: ナンキンハゼ, 15: アサガオ, 16: ルコウソウ, 17: シバザクラ, 18: トマト, 19: コーヒー, 20: マリーゴールド, 21: モントブレチア, 22: イネ, 23: ソルゴー

利用上の留意点

本方法はDNA抽出が困難な植物種における分子生物学実験を容易にするにとどまらず、多くの作物においてDNAマーカー選抜を実用化する上で有効である。

当方法の具体的プロトコル等の詳細は下記を参照されたい。

Tanaka, J. and S. Ikeda (2002) :The Rapid and Robust DNA Extraction Method from Various Plant Species Using Diatomaceous Earth and a Spin Filter. *Breeding Science* 52: 151-155.

(茶業研究部・田中淳一)

ピーマンにおけるPMMoV抵抗性遺伝子 (L^4) に連鎖したDNAマーカー

研究のねらい

PMMoV(トウガラシマイルドモットルウイルス)はピーマン生産における重要なウイルス病であり、効果的な防除法がないため抵抗性品種の利用が期待される。既に L^4 遺伝子を導入した抵抗性品種が育成されているが、これを侵すストレイン($P_{1,2,3}$)が発生しているため、より広範な抵抗性を示す L^4 遺伝子の利用が必要である。一方、PMMoVは伝染能力が高く、取り扱いに嚴重な注意を要し、選抜を行う上での障害となっている。そこで、PMMoV抵抗性の L^4 遺伝子に連鎖したDNAマーカーを開発する。

研究の成果

L^4 遺伝子によるPMMoV抵抗性系統と罹病性品種との交雑 F_2 集団65個体を用い、抵抗性に連鎖したRAPDマーカーを検索した(表1)。その結果、塩基配列5'-AAGGCGCGAACG-3'のプライマー(WA31)で得られる約1500bpのDNA断片(WA31-1500)は、主に抵抗性個体にみられ、罹病性個体ではみられなかった(図1)。

次に、トウガラシ属植物21品種・系統について検討した結果、WA31-1500が増幅された品種・系統のほと

んどが L^4 遺伝子を有していた(表2)。

したがって、WA31-1500は L^4 遺伝子と密に連鎖し、DNAマーカーとして利用できると考えられた。

成果の活用面・留意点

DNAマーカーによりPMMoVを接種することなく、抵抗性個体を選抜でき、育種の効率化が図れる。但し、WA31-1500は罹病性個体でも増幅されることがまれにあるので、最終的には接種検定等により抵抗性を確認する必要がある。



図2 L^4 遺伝子を有する抵抗性素材のPI260429 (*C. chacoense*) 果実は小さく辛い

表1 F_2 集団におけるPMMoV抵抗性とDNAマーカー(WA31-1500)の連鎖

PMMoV抵抗性	WA31-1500の有無	個体数
抵抗性	+	49
抵抗性	-	0
罹病性	+	4
罹病性	-	12

‘AP-PM03’ と ‘三重みどり’ との交雑 F_2 集団を用いた

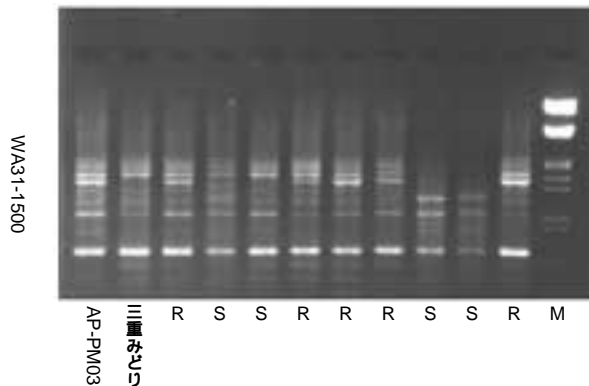


図1 ‘AP-PM03’ と ‘三重みどり’ との交雑 F_2 集団のRAPD解析 R: 抵抗性個体、S: 罹病性個体、M: /EcoR I+Hind III

表2 トウガラシ属品種・系統におけるPMMoV抵抗性とDNAマーカー(WA31-1500)の有無

品種・系統名	PMMoV抵抗性 ^z	WA31-1500 ^y
[L^4 遺伝子保有品種・系統]		
PI260429 (<i>C. chacoense</i>)	R	+
SA185 (<i>C. chacoense</i>)	R	+
スーザン	R	+
スペシャル	R	+
AP-PM01	R	+
AP-PM02	R	+
AP-PM03	R	+
AP-PM04	R	+
AP-PM05	R	+
AP-PM06	R	+
[その他の品種・系統]		
ベルマサリ	S	-
京波	S	-
エース	S	-
カリフォルニアワンダー	S	-
ビメント	S	-
昌介	S	-
三重みどり	S	-
SCM334	S	+
AC2258	S	-
トウガラシ安濃1号	S	-
トウガラシ安濃2号	S	-

^z PMMoVの $P_{1,2,3}$ に対して、R: 抵抗性、S: 罹病性

^y + : WA31-1500が増幅される、

- : WA31-1500が増幅されない

AP-PM01 ~ 06 : 野菜茶業研究所選抜の抵抗性固定系統

[果菜研究部・松永 啓*、吉田建実]

* 現: 東北農業研究センター 野菜花き部

ナスの果形、果色、茎色、へた色と連鎖するDNAマーカー

研究のねらい

有用形質と連鎖するDNAマーカーを見出すことができれば、育種年限の短縮や有用形質を効率よく蓄積することができる。しかしナスは、連鎖地図の作成やDNAマーカーの開発が遅れており、その促進が求められている。そこでナスのDNAマーカーの開発と連鎖地図の作成を行うとともに有用形質に連鎖するマーカーを検索する。

研究の成果

作成したナスの連鎖地図は、88のRAPDマーカー、93のAFLPマーカーからなる全長779.2cM・21連鎖群で

構成される(図1)。

見出されたDNAマーカーは、ナス近縁種などの広範囲の植物に適用可能である。

見出されたDNAマーカーは、有用形質であるナスの果形、果色、茎色、へた色と連鎖する(図2)。

今後の発展方向

DNAマーカーを充実させ、病害抵抗性や機能性成分などの形質と連鎖するマーカーを検索し、有用形質を蓄積した新品種の開発へとつなげる。

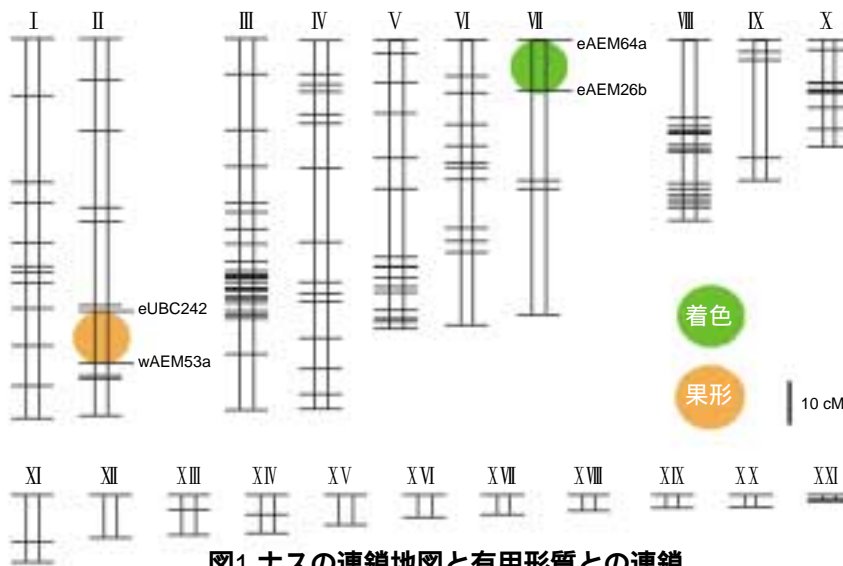


図1 ナスの連鎖地図と有用形質との連鎖

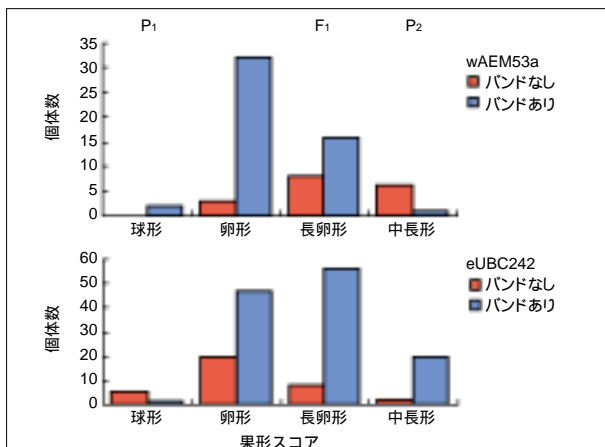


図2 果形に関連するDNAマーカーにより作成されたF₂集団の頻度分布

wAEM53aマーカーが検出されると卵形に近づき、eUBC242マーカーが検出されると中長形に近づく。



P₁: WCGR112-8

P₂: ナス中間母本農1号

図3 解析に用いた系統

(機能解析部 育種工学研究室・布目 司)

所の動き

園芸試験場百周年記念中央式典と記念行事

明治35年、農商務省農事試験場園芸部が静岡県興津町に設立され、国レベルとして統一かつ体系的に園芸の試験研究が開始されてから、今年でちょうど百年になる。

これを記念して、園芸試験場百周年記念中央式典が6月20日に東京で、同安濃記念行事が6月21日に三重県津市で開催された。

中央式典(東京・虎ノ門パストラル)では、各界、各分野からの来賓祝辞のあと、園芸試験場百年の歩みをまとめたビデオ上映、「日本人の食生活における園芸作物の役割」と題する畑江敬子お茶の水女子大学教授による記念講演、「初夏に歌う」と題する岩崎由紀子国立音楽大学助教授の独唱、ピアノ演奏などが式典を盛り上げた(写真右上)。その後、引き続いて、同会場で祝賀会が催された。



究部長、西村繁夫筑波大学教授による記念講演が行われた。

閉会后、安濃桜会総会が催され、引き続いての祝賀会では、OB・現役が交歓し、久しぶりに旧交を温めた。



安濃記念行事(津市・高田青少年会館)では事前に野菜茶業研究所見学会も催され(写真右下)、研究担当者から最新の研究成果などが紹介された。

式典では西貞夫百周年記念事業協賛会会長による挨拶(写真左下)のあと、栗山尚志元野菜試験場長、野口正樹果菜研



(百周年記念行事実行委員会・五十嵐勇)

特許・実用新案

出願中の特許・実用新案権

(平成14年3月21日～平成14年6月30日)

種類	件名	発明者	出願番号	出願年月日	備考
特許権	茶園管理方法並びに装置	深山大介、宮崎昌宏、荒木琢也 大久保玄禎*、宮原英誌*、山本光二* (*カワサキ機工㈱)	2002-053493	平成14.2.28	
特許権	イチゴ品種識別方法	國久美由紀、松元哲、吹野伸子	2002-155547	平成14.5.29	

新品種・中間母本

品種登録済み品種

(平成14年3月21日～平成14年6月30日)

作物名	品種名	登録番号	登録年月日	育成場所及び育成者	特徴
茶	茶中間母本農 3号	第10244号	H14. 6. 20	野菜茶業研究所(枕崎) 根角厚司、武田善行 八戸三千男、武弓利雄 和田光正、佐波哲次 大前 英、田中淳一	インドより導入した茶遺伝資源の中から 選抜した品種。高カテキン・高カフェイン及 び花香用の香気を持つ品種を育成するた めの中間母本として利用価値が高い。



野菜茶業研究所ニュース 第5号 【2002年(平成14年)9月発行】

編集・発行 独立行政法人 農業技術研究機構 野菜茶業研究所

〒514-2392 三重県安芸郡安濃町大字草生360番地

TEL. 059 (268) 4626 (情報資料課) FAX. 059 (268) 3124 Web URL: vegetea.naro.affrc.go.jp

印刷：株式会社 高山