

DNA マーカー選抜によるイチゴ優良系統の作出と病害抵抗性評価

道祖土博一*・小山浩由**・宇賀博之***・宗方淳****・内田裕也*****

Generation of excellent phyletic lines of strawberry using DNA marker selection and disease resistance evaluation

Hirokazu SAIDO, Hiroyoshi KOYAMA, Hiroyuki UGA, Jun MUNAKATA
and Hironari UCHIDA

Abstract Anthracnose, fusarium wilt, and powdery mildew are critical diseases observed in strawberry cultivation. These diseases result in reduced harvest and decreased quality of fruit. Hence, this study aimed to quickly generate strawberry lines resistant to these diseases by utilizing DNA markers. Two phyletic lines ('198788' and '198688') were selected after DNA marker screening. The results of disease inoculation testing revealed that the line '198788' was resistant to anthracnose and powdery mildew, and the line '198688' was resistant to all three diseases. These phyletic lines may be used as breeding mother plants for effectively incorporating disease resistance to strawberries.

要約 イチゴ栽培において、炭疽病、萎黄病及びうどんこ病は、収量や果実品質の低下を招く重要病害である。本研究では、DNA マーカーを活用し、これらの病害に抵抗性を持つイチゴ系統の早期育成を試みた。

DNA マーカー検定により、「198788」と「198688」の2系統を選抜し、さらに病害接種試験の結果、「198788」は炭疽病及びうどんこ病、「198688」は炭疽病、萎黄病、うどんこ病の全ての抵抗性を有していた。これらの系統は、イチゴに効率的に病害抵抗性を付与する育種母本としての活用が期待できる。

イチゴ (*Fragaria×ananassa*) 生産における病害の発生は大きな課題である。特に、炭疽病、萎黄病、うどんこ病の3病害は、収穫量の減少や果実品質の低下を招き生産者の経営的損失に繋がるため、本県においても重要な病害となっている。

イチゴ炭疽病には *Glomerella cingulata* および *Colletotricum acutatum* の2種類の病原菌が知ら

れており (Howard et al. 1992)、日本国内では *G. cingulata* による被害が大きく、発病すると急性萎凋症状を示し、株が枯死することで直接的な減収を招く。特に、育苗ほで蔓延すると苗を廃棄せざるを得ないため、経済的被害がとりわけ大きい病害である。

イチゴ萎黄病は、*Fusarium oxysporum* f. sp.

* 野菜育種担当, ** 遺伝子情報活用担当, *** 病害虫研究担当, **** 遺伝子情報活用担当 (現加須農林振興センター), ***** 野菜育種担当 (現大里農林振興センター)

fragariae によって引き起こされる病害であり、急性萎凋症状は示さないが奇形葉の他、矮化症状を引き起こすため、感染したイチゴ株の収量は大きく低下する。

イチゴうどんこ病は *Podosphaera aphanis* によって引き起こされる病害である。日本国内では 2 レースの存在が知られており(内田ら, 1998), レース 1 はイチゴ品種間で広範囲に病原性を示し、発病程度もは品種間で差がある。一方, レース 0 については、「とよのか」や「さちのか」等の品種が質的な抵抗性を示し、その抵抗性は単一の優性遺伝子支配と推定されている(本城, 2015)。また、うどんこ病に罹病すると株自体は枯死しないものの、果実表面にも標徴が現れるため商品価値を著しく低下させる。

埼玉県内の主力品種は「とちおとめ」や「やよいひめ」であるが、各病害に対する抵抗性を持たず、農薬散布に多大な経費と労力がかかっている。「いちご新規参入経営支援マニュアル」(栃木県, 2012)によると、栽培規模 20 a の場合、農薬代は年間 30 万円になるという試算結果がある。また、平成 19 年度産品目別経営統計(確報)では、イチゴ栽培での 10 a 当りの除草・防除に係る時間の全国平均は 75 時間であり、作業全体に係る約 2092 時間の約 4% となっている(農林水産省, 2007)。そのため、イチゴの炭疽病、萎黄病、うどんこ病等の主要な病害に抵抗性を有する品種が開発されれば、農薬の経費や薬剤散布に係る労力の削減や農薬曝露低減、生産者の病害蔓延に対する不安感の軽減などに寄与できる。

病害抵抗性を有する品種の育成には、抵抗性系統の探索や交配作業、病原菌の接種試験や個体選抜に至るまでに多大な労力と時間を要する。一方で、近年では病害に対する抵抗性判別 DNA マーカーの開発が進んでおり、育種に利用できる環境が整いつつある。具体的な例として、イチゴ炭疽病に関しては、「いちご中間母本農 2 号」と「さちのか」の交配集団を用いた量的形質遺伝子座(QTL)解析により、炭疽病抵抗性の量的形質遺伝子座と連鎖する DNA マーカーが明らかにされている(榎ら: 特許第 6253132 号)。また、イチゴ萎黄病については、「アスカウェイブ」から抵抗性の主働遺伝子に連鎖すると考えられる 1 領域を含む複数の QTL が検出されている(飯村ら, 2021)。加えて、イチゴうどんこ病については、「さちのか」由来のレース 0 抵抗性に

関する QTL が検出され、QTL に連鎖する DNA マーカーも公開されている(小石原ら: 特許第 6566480 号)。

そこで本研究では、これらの DNA マーカーを利用した選抜によって、炭疽病、萎黄病及びうどんこ病レース 0 に抵抗性を有する系統の効率的な育成を試みるとともに、病害接種試験を実施して作出した系統の病害抵抗性の評価を行った。

なお、本研究は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構とトヨタ自動車株式会社の共同開発による「イチゴ属植物の炭疽病抵抗性関連マーカーとその利用(特許第 6253132 号)」および「イチゴ属植物のうどんこ病抵抗性関連マーカーとその利用(特許第 6566480 号)」の技術を用いて得られた成果である。また、イチゴ萎黄病抵抗性に関与する遺伝子座を判別する DNA マーカーは、栃木県農業試験場よりプライマー配列情報を提供いただいた。この場を借りて、厚く御礼申し上げる。

材料および方法

1 育成経過

イチゴ炭疽病抵抗性の「いちご中間母本農 2 号」、イチゴ萎黄病抵抗性の「アスカウェイブ」、イチゴうどんこ病レース 0 抵抗性の「さちのか」の 3 品種を抵抗性遺伝子の導入親として用い、さらに本県育成品種である「埼園い 3 号」と「べにたま」を交配親に加えることで、病害抵抗性付与と同時に果実品質や早晩性の改良も試みた。

まず、2017 年に「埼園い 3 号」と「アスカウェイブ」を交配し、DNA マーカーで萎黄病抵抗性と判定された系統‘175844-1’及び‘175844-2’を選抜した。続いて、2018 年に「さちのか」と‘175844-1’及び‘175844-2’の 2 系統を交配し、DNA マーカーにより萎黄病とうどんこ病レース 0 の両方に抵抗性と判定された‘175844-2’の後代である‘181575-1’と‘181575-2’の 2 系統を選抜した。一方で‘175844-1’の後代は食味等の形質が劣ると判断し選抜から落とした。また同年、「べにたま」と「いちご中間母本農 2 号」の正逆交配を行い、それぞれの組み合わせから炭疽病抵抗性と判定された‘181871’と‘187118’を選抜した。

2019 年に‘181575-1’及び‘181575-2’のそれ

それぞれに対して, '181871' 及び '187118' を交配した. '181575-1' と '181871', '181575-2' と '181871' の組み合わせ後代において, DNA マーカーで炭疽病, 萎黄病, うどんこ病レース 0 の全てに抵抗性と判定された '198688' 及び '198788' の 2 系統を選抜した. なお, '181575-1' 及び '181575-2' のそれぞれに '187118' を交配した 2 組み合わせから得られた後代についても食味等の形質が劣ると判断し選抜から落とした (図 1).

なお, うどんこ病レース 0 抵抗性遺伝子の判定に用いた DNA マーカーは, 「さちのか」由来の抵抗性遺伝子を持たない '175844-2' と「いちご中間母本 2 号」も抵抗性と判定してしまうことが判明した. そのため, 後述する方法で「さちのか」型の遺伝子型を判別する方法を利用し, 2018 年の「さちのか」× '175844-2' の交配においては, うどんこ病抵抗性遺伝子の判定が「さちのか」型の個体を選抜した. また, 同年の「いちご中間母本 2 号」×「べにた

ま」の交配では, うどんこ病抵抗性の PCR 産物が検出されない個体を選抜した.

2 DNA マーカーアシスト選抜

交配によって得られた実生苗から葉 2~3 mm 角を採取し, 4 mm ステンレスビーズと抽出液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 5% polyclar VT (富士フイルム和光純薬)) 300 µL を加え, マルチビーズショッカー MB1200 (安井器械) で粉碎した. その後遠心分離し, 上澄み液を鋳型 DNA として PCR 反応に用いた.

イチゴ炭疽病抵抗性遺伝子座の判定には IA200826 マーカー (特許第 6253132 号), イチゴうどんこ病抵抗性遺伝子座の判定には IB535110 マーカー (特許第 6566480 号) を用いた. また, イチゴ萎黄病抵抗性遺伝子の判定には Rff4 マーカー (栃木県より配列情報提供) を用いた. PCR 反応に

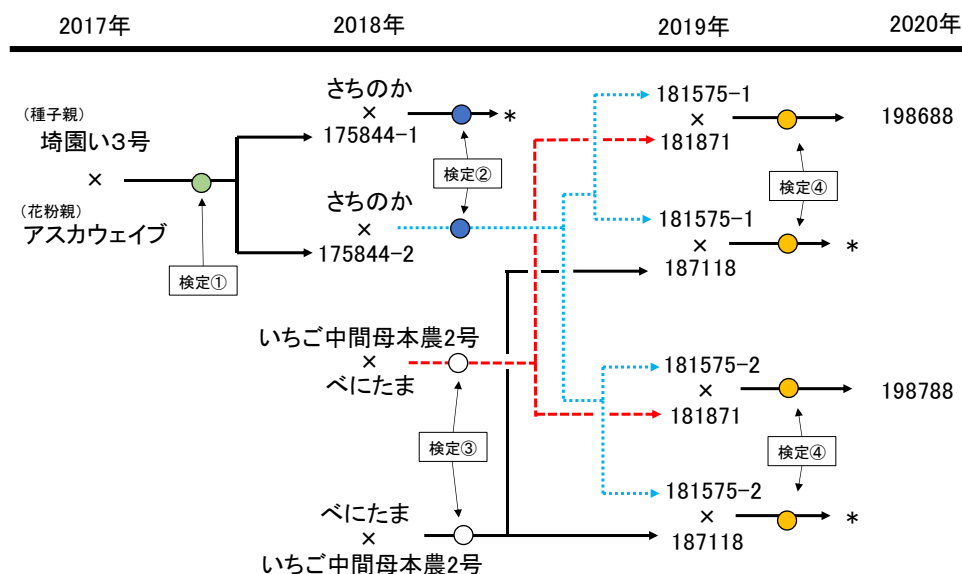


図 1 育成系譜図

各交配組み合わせで得られた実生に対して DNA マーカー検定を実施した.

検定①~④が示すものは以下の通りである.

検定① 萎黄病抵抗性マーカーの検定

検定② 萎黄病・うどんこ病抵抗性マーカーの検定

検定③ 炭疽病・うどんこ病抵抗性マーカーの検定

検定④ 炭疽病・萎黄病・うどんこ病抵抗性マーカーの検定

図中の「*」は選抜から除外したことを示す

は Tks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ社) を用い、各プライマー濃度を 200 nM とした。PCR 条件について、IA200826 マーカーは、98°C2 分の後、98°C10 秒、55°C10 秒、68°C1 分を 35 サイクル繰り返し、68°C3 分の最終伸長を行った。Rff4 マーカーは、95°C10 分の後、98°C15 秒、60°C20 秒、68°C40 秒を 35 サイクル繰り返し、68°C5 分の最終伸長を行った。IB535110 マーカーは、94°C1 分の後、98°C10 秒、60°C15 秒、68°C30 秒を 35 サイクル繰り返した。PCR 反応物は 2%アガロースゲルで電気泳動し、増幅産物の有無によって抵抗性遺伝子の判定を行った。

3 うどんこ病レース 0 抵抗性マーカーの遺伝子型判定

(1)IB535110 マーカーの配列解析

「いちご中間母本農 2 号」「さちのか」‘175844-2’ の 2 品種 1 系統について、うどんこ病レース 0 抵抗性マーカーである IB535110 マーカー増幅産物の配列解析を行った。各品種・系統の葉から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出し、前述の条件で IB535110 マーカーの PCR を行った。増幅産物は BigDye Terminator v3.1 でサイクルシーケンス反応させ、3500 ジェネティックアナライザ (Thermo Fisher Scientific 社) を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析した。

(2)IB535110 マーカーの遺伝子型判定

IB535110 マーカー増幅産物配列の比較により検出された一塩基多型に基づき、制限酵素 *Ear I* (New England Biolabs 社) 処理による IB535110 マーカー増幅産物の切断を確認し、切断なしを「さちのか」型の抵抗性、切断ありを‘175844-2’型の擬陽性と定義した。さらに、2018 年の「さちのか」×‘175844-2’の交配では、後代を対象に *Ear I* 処理による IB535110 マーカーの遺伝子型を判定した。

4 病害接種試験

選抜系統‘198688’及び‘198788’、対照品種として「とちおとめ」を供試した。また、うどんこ病接種試験のみ「さちのか」を対照品種に加えて供試した。

(1)炭疽病抵抗性

炭疽病の抵抗性評価は、稲田 (2010) を参考に、以下の通りとした。MAFF239775 株を PD 液体培

地で振とう培養し、11 日後の 2022 年 7 月 19 日に培地をミキサーで粉砕後、キムワイプでろ過した。この懸濁液を 10.5 cm ポリポット苗 1 株当り 10 ml 噴霧接種した。2 日間温室下に静置後、温室内で管理した。1 品種・系統当り 7 株を供試し、7 日後の 7 月 26 日に 1 株当り 3 複葉に形成された病斑数を計測し、1 株当りの病斑数に応じて以下の発病指数別に分けて発病度を算出した。

$$\text{発病度} = \frac{\sum (\text{指数別株数} \times \text{指数})}{(\text{調査株数} \times 4)} \times 100$$

指数 0 : 0 個, 1 : 1~3 個, 2 : 4~9 個, 3 : 10~19 個, 4 : 20 個以上

(2)萎黄病抵抗性

萎黄病の抵抗性評価は、岩館 (2012) を参考に、以下の通りとした。MAFF305557 株を用い、炭疽病と同様に培養し分生胞子を得た。2022 年 6 月 15 日に 2×10^5 個/ml となるように調整し、10.5 cm ポリポット苗 1 株当り 50 ml を灌注した。1 品種・系統当り 8 株を供試し、温室で管理した。経時的に調査を行い、発病程度を以下の発病指数別に調査して発病度を算出した。

$$\text{発病度} = \frac{\sum (\text{指数別株数} \times \text{指数})}{(\text{調査株数} \times 4)} \times 100$$

指数 0 : 発病なし, 1 : 葉の黄変, 2 : 葉の奇形, 3 : 株の萎縮, 4 : 枯死

(3)うどんこ病抵抗性

うどんこ病の抵抗性評価は、内田 (2009) を参考に、以下の通りとした。国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センターから分譲された菌株および加須市から採取した菌株を用いた。直径 9 mm のコルクボーラーで打ち抜いた展開葉をシャーレ内の水道水で湿らせたろ紙上に置き、上方から発病葉に形成された分生子を均一に散布した。1 品種・系統当り裏面と表面を 4 枚ずつとし、合計 8 枚を供試した。25°C の温室下に静置し、10 日後に発病状況を調査した。発病程度を以下の発病指数別に調査して発病度を算出した。

$$\text{発病度} = \frac{\sum (\text{指数別葉数} \times \text{指数})}{(\text{調査株数} \times 4)} \times 100$$

指数 0：発病なし，1：わずかに発病を認める，2：25%まで菌糸で覆われる，3：50%まで菌糸で覆われる，4：50%以上が菌糸で覆われる

5 選抜系統の開花・収量性

系統‘198688’及び‘198788’，対照品種として「とちおとめ」を供試した。

栽培は当センター（熊谷市須賀広）内の高設ハウス内で実施した。調査は，2021年，2022年の2か年実施した。開花日調査に関しては，第1花房の第1花にのみ行った。また，各品種・系統当り半数以上が開花した日を50%開花日とした（n=18）。収穫調査は，6株当りの果実総重量を計測し，収穫開始の12月から3月までの期間に調査を実施し，この期間の合計値を総収量とした（n=3）。

結 果

1 DNA マーカーアシスト選抜

2018年に「いちご中間母本農2号」と「べにたま」の正逆交配から得られた実生148および211個体に対して炭疽病及びうどんこ病抵抗性遺伝子マーカーによる検定を行った。炭疽病に対しては「陽性」かつ，うどんこ病に対しては「陰性」を示した35および45個体を選抜した（表1）。

「さちのか」に‘175844-1’並びに‘175844-2’を交配した組み合わせから得られた実生188および94個体に対して，萎黄病及びうどんこ病抵抗性遺伝子の検定を行った。萎黄病に対して「陽性」かつ，うどんこ病に対しても「陽性」を示した60および40個体を選抜した。

2019年に‘181575-1’または‘18157-2’に‘181871’または‘187118’を交配した計4組み合わせから得られた実生270，264，159および246個体に対して，炭疽病，萎黄病，うどんこ病の抵抗性遺伝子マーカーによる検定を行った。全てのマーカーを有する37，36，19および23個体を選抜した。

2 うどんこ病レース0抵抗性マーカーの遺伝子型判定

うどんこ病レース0抵抗性マーカーであるIB535110マーカーを用いて交配親のPCR増幅産物を解析した。その結果，うどんこ病レース0抵抗性を持つ「さちのか」以外に「いちご中間母本農2号」‘175844-2’で同じサイズの増幅産物が確認された（図2）。さらに，IB535110マーカー増幅産物の塩基配列を解析した結果，133番目と366番目の塩基にシトシン（C）/チミン（T）の一塩基多型（SNPs）が検出され，‘175844-2’はいずれもTとなっていた。一方，「いちご中間母本農2号」は「さちのか」の塩基配列と同一であった。

表1 病害抵抗性マーカーによる各実生集団の選抜結果

実施年	交配組合せ		対象マーカー ^{a)}	検定個体数	選抜個体数
	種子親	花粉親			
2018	いちご中間母本農2号	べにたま	炭，う	148	35 ^{b)}
	べにたま	いちご中間母本農2号	炭，う	211	45 ^{b)}
	さちのか	175844-1	萎，う	188	60 ^{c)}
	さちのか	175844-2	萎，う	94	40 ^{c)}
2019	181575-1	181871	炭，萎，う	270	37
	181575-2	181871	炭，萎，う	264	36
	181575-1	187118	炭，萎，う	159	19
	181575-2	187118	炭，萎，う	246	23

a) “炭” “萎” “う” はそれぞれ炭疽病，萎黄病，うどんこ病抵抗性マーカーを示す

b) 炭疽病抵抗性で「陽性」，うどんこ病抵抗性で「陰性」を示した個体数

c) 萎黄病抵抗性で「陽性」，うどんこ病抵抗性で「陽性（擬陽性含む）」を示した個体数

道祖土ら：DNA マーカー選抜によるイチゴ優良系統の作出

さちのか	1:	ACACATATATGAATCGGAGCCATGGATGCAGCCTTAGTTTCAGGTACTTTGATTATCAAT	60
いちご中間母本農2号	1:	ACACATATATGAATCGGAGCCATGGATGCAGCCTTAGTTTCAGGTACTTTGATTATCAAT	60
175844-2	1:	ACACATATATGAATCGGAGCCATGGATGCAGCCTTAGTTTCAGGTACTTTGATTATCAAT	60
さちのか	61:	AGTTTCAGCCGCAGTAACAAACAACATATGGCCCTTTCGCATTTTATGAATGTCTCATCTG	120
いちご中間母本農2号	61:	AGTTTCAGCCGCAGTAACAAACAACATATGGCCCTTTCGCATTTTATGAATGTCTCATCTG	120
175844-2	61:	AGTTTCAGCCGCAGTAACAAACAACATATGGCCCTTTCGCATTTTATGAATGTCTCATCTG	120
133番目			
さちのか	121:	TTCTGTCTATACTTGAATAATATTATTACATACCAAACTACTTCTCGTTGTCCGACGT	180
いちご中間母本農2号	121:	TTCTGTCTATACTTGAATAATATTATTACATACCAAACTACTTCTCGTTGTCCGACGT	180
175844-2	121:	TTCTGTCTATACTTGAATAATATTATTACATACCAAACTACTTCTCGTTGTCCGACGT	180
さちのか	181:	AAGTATATTAATCTATTTGAACAGCTATGGAGTTCCAATTTTAAATGCATGAAGTAGGAG	240
いちご中間母本農2号	181:	AAGTATATTAATCTATTTGAACAGCTATGGAGTTCCAATTTTAAATGCATGAAGTAGGAG	240
175844-2	181:	AAGTATATTAATCTATTTGAACAGCTATGGAGTTCCAATTTTAAATGCATGAAGTAGGAG	240
さちのか	241:	AAAATTTAGAAACCATGAATTAAGATATTAGAATTCCATCATCACCACCCAGAGCCA	300
いちご中間母本農2号	241:	AAAATTTAGAAACCATGAATTAAGATATTAGAATTCCATCATCACCACCCAGAGCCA	300
175844-2	241:	AAAATTTAGAAACCATGAATTAAGATATTAGAATTCCATCATCACCACCCAGAGCCA	300
さちのか	301:	AGAGAGTTTGGTGGTGTTCATTTTCAGCCCAAGTTTCTCTATTTCGTCGTCTCCTTCTC	360
いちご中間母本農2号	301:	AGAGAGTTTGGTGGTGTTCATTTTCAGCCCAAGTTTCTCTATTTCGTCGTCTCCTTCTC	360
175844-2	301:	AGAGAGTTTGGTGGTGTTCATTTTCAGCCCAAGTTTCTCTATTTCGTCGTCTCCTTCTC	360
366番目			
さちのか	361:	CCTCTCTCCATTATTTCCATTACATGACAGTTGAAACGCTTTCTCCCGATCGTGTACAA	420
いちご中間母本農2号	361:	CCTCTCTCCATTATTTCCATTACATGACAGTTGAAACGCTTTCTCCCGATCGTGTACAA	420
175844-2	361:	CCTCTCTCCATTATTTCCATTACATGACAGTTGAAACGCTTTCTCCCGATCGTGTACAA	420
さちのか	421:	TTCATTTTCGATTGAGCATCTTGAGC	446
いちご中間母本農2号	421:	TTCATTTTCGATTGAGCATCTTGAGC	446
175844-2	421:	TTCATTTTCGATTGAGCATCTTGAGC	446

図2 IB35110 マーカー増幅産物配列の品種間比較

‘175844-2’の366番目のSNPの配列周辺が制限酵素 *Ear I* の認識配列 (CCTCTT) となっていた。そこで「さちのか」「いちご中間母本農2号」及び‘175844-2’のPCR増幅産物を *Ear I* 処理した結果、‘175844-2’のみに切断が確認された (図3(a))。また、「さちのか」× ‘175844-2’において、IB535110マーカーで抵抗性として選抜された18個体について、IB535110マーカー増幅産物を *Ear I* で処理した結果、個体ごとにうどんこ病レース0抵抗性、擬陽性、ヘテロの3つの多型を示した (図3(b))。

3 病害接種試験

(1)炭疽病抵抗性

炭疽病の検定結果を表2に示した。「とちおとめ」の発病度は71であった。系統‘198688’は発病が見られず、高い抵抗性を示した。‘198788’の発病度は11であり、耐病性を示した。

(2)萎黄病抵抗性

萎黄病の検定結果を図4に示した。接種58日後の地上部における発病度は「とちおとめ」が84であった。‘198688’は9と高い抵抗性を示したが、‘198788’は38と感受性であった。

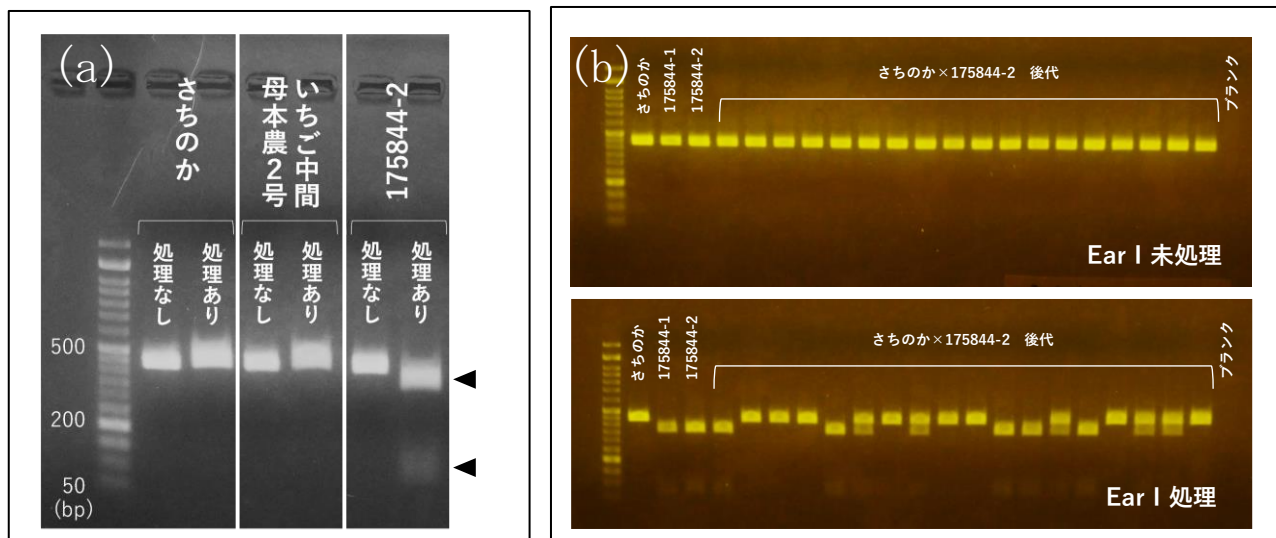


図3 制限酵素処理によるうどんこ病レース0抵抗性マーカーの遺伝子型判定
 (a) 交配親における処理結果，トリミング処理により比較対象のみを图示，図中の矢印は制限酵素処理により生じるDNA断片長の位置を示す
 (b) 交配後代における処理結果

表2 炭疽病の接種試験結果

品種・系統	指数別発病株数					発病株率 (%)	発病度
	0	1	2	3	4		
198688	7	0	0	0	0	0	0
198788	4	3	0	0	0	43	11
とちおとめ	0	1	1	3	2	100	71

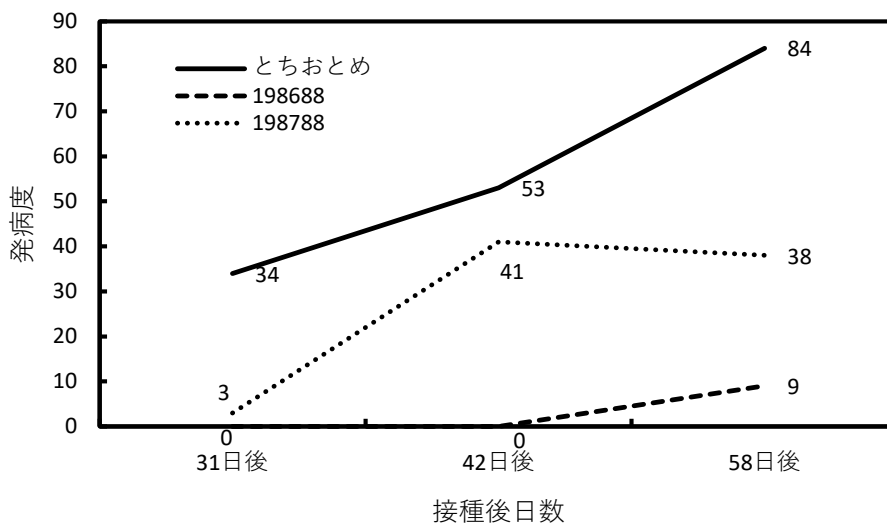


図4 萎黄病接種試験の結果

(3)うどんこ病抵抗性

分譲菌株および加須市からの採取菌株の「さちのか」に対する発病度は、それぞれ 0 および 59 であったことから、前者はレース 0、後者はレース 1 と判断した (表 3)。

「とちおとめ」は、うどんこ病レース 0 およびレース 1 の両レースに対して感受性であった。一方で「198688」および「198788」は両レースに対していずれも発病度 3 と高い抵抗性を示した。

4 選抜系統の開花・収量性

「とちおとめ」を比較対象としたときの第 1 花房第 1 花の 50%開花日は、2021 年では「198688」は同程度であり、「198788」は 26 日遅かった。2022 年では、「198688」は 13 日遅く、「198788」は 38 日遅かった (表 4)。

12 月から翌 3 月までの 6 株当りの総収量は、両系統とも年次間差があるものの「とちおとめ」と同程度であった (表 5)。

表 3 うどんこ病の接種試験結果

品種・系統	レース 0 ^{a)} に対する指数別発病葉数						レース 1 ^{a)} に対する指数別発病葉数					
	0	1	2	3	4	発病度	0	1	2	3	4	発病度
198688	7	1	0	0	0	3	7	1	0	0	0	3
198788	7	1	0	0	0	3	7	1	0	0	0	3
さちのか	8	0	0	0	0	0	1	2	1	1	3	59
とちおとめ	0	1	3	3	1	63	0	3	2	2	1	53

a) 「さちのか」に対する罹病性の有無によって、レース 0 またはレース 1 を判断した

表 4 第 1 花房第 1 花の 50%開花日

品種・系統	2021 年	2022 年	n
198688	11 月 6 日	11 月 21 日	18
198788	12 月 2 日	12 月 16 日	18
とちおとめ	11 月 6 日	11 月 8 日	18

各品種・系統は 18 株の調査を実施した

標本個体の半数以上が開花した日を 50%開花日とした

表 5 総収量 (g/6 株)

品種・系統	2021 年	2022 年	n
198688	2023 ± 213	2170 ± 155	3
198788	2471 ± 284	1813 ± 73	3
とちおとめ	2434 ± 156	1872 ± 160	3

各品種・系統は 6 株×3 反復で調査を実施した

数値は平均値±標準偏差を示す

収穫期間は 12 月～翌 3 月までとした

考 察

DNA マーカーアシスト選抜により、炭疽病、萎黄病、うどんこ病レース 0 の 3 病害に抵抗性を持つ‘198688’と炭疽病とうどんこ病レース 0 の 2 病害で抵抗性を持つ‘198788’の 2 系統を 4 年という短期間で作出し、当初の育種目標を達成することができた。‘198788’については、Rff4 マーカーで萎黄病抵抗性であったが、病害接種試験では「とちおとめ」より発病度が低い傾向にあったものの、感受性と判定された。

Pincot *et al.* (2018, 2022) は、ゲノムワイド関連マッピング (genome wide association mapping) 解析によって萎黄病抵抗性に関与する遺伝子 (FW1-5) に連鎖する QTL を検出しており、中でも *FW1*, *FW2*, *FW5* に連鎖する QTL は第 2 染色体上で検出されている。また、飯村ら (2021) は「アスカウェイブ」の保有する萎黄病抵抗性遺伝子に連鎖する QTL が第 2 染色体に座上することを示唆しており、Pincot *et al.* (2018, 2022) が検出した遺伝子と同様のものである可能性を指摘している。しかしながらいずれも主働遺伝子の特定には至っておらず、抵抗性の遺伝子型の選抜には近傍マーカーを用いる必要がある。本試験で使用したマーカーである Rff4 も第 2 染色体上に存在する主働遺伝子の近傍に設計されたマーカーであるため、交配の過程でマーカーの標的領域と主働遺伝子間の連鎖が切れた結果、‘198788’は目的の抵抗性遺伝子を保有せず、DNA マーカーと病害接種試験の結果が一致しなかったと推察される。

うどんこ病レース 0 抵抗性を判定する IB535110 マーカーの配列について、「いちご中間母本農 2 号」は「さちのか」と同一のものであった。また、「いちご中間母本農 2 号」は葉身、葉柄等の植物体上でのうどんこ病の発生が少なく、果実の発病も極めて少ないことが報告されている (沖村ら, 2004)。「いちご中間母本農 2 号」は「ひのみね」及び海外品種である「Florida693」、

「Dover」を親に持ち、「ひのみね」の片親は「はるのか」である。「はるのか」は「とよのか」の片親でもあり、「とよのか」を片親に持つ「さちのか」と系譜が同じである。このため「いちご中間母本農 2 号」が「さちのか」と同一のうどんこ病レース 0 抵抗性遺伝子を保有している可能性がある。

IB535110 マーカーの配列を解析した結果、2 か所の C/T SNPs の存在が判明したが、「埼園い 3 号」は 2 か所とも T である遺伝子型 (T 型) の SNP を有しており (データ未掲載)、後代の‘175844-2’に遺伝したと考えられる。「埼園い 3 号」は「やよいひめ」と「ふくはる香」を両親とし (尾田ら, 2018)、さらにその系譜には様々なイチゴ品種の交配親として利用された「章姫」や「とちおとめ」等の品種が存在するため、多くのイチゴ品種が T 型の遺伝子型を保有している可能性がある。IB535110 マーカー単独での利用では、「さちのか」が有する C 型と擬陽性を示す T 型との判別ができないため、交配組合せによっては正確な検定ができない危険性がある。うどんこ病レース 0 抵抗性をより高精度に判定するためには、主働遺伝子の同定とともに遺伝子保有の有無を直接判定可能な DNA マーカーの開発が求められる。

本研究で育成された 2 系統は病害抵抗性を保有するものの、共通して開花が遅い傾向にあった。また、総収量は「とちおとめ」と同程度であったが、‘198688’は小果で果皮色が暗褐色であること、‘198788’は前者よりも大果であるが果形が乱れやすいなどの不良形質を有しており、実用品種としての現地適応性は低いと判断した (図 5)。一方で、これらの系統は、一度の交配で複数の病害抵抗性遺伝子を同時に導入することができるだけでなく、自殖で各病害抵抗性遺伝子をホモ化させることにより、DNA マーカー検定を必要としなくとも病害抵抗性遺伝子を付与できるため、交配素材としての利用価値は極めて高い。今後、本研究で育成した系統を活用し、病害抵抗性に優れた品種の効率的かつ迅速な育成が期待される。

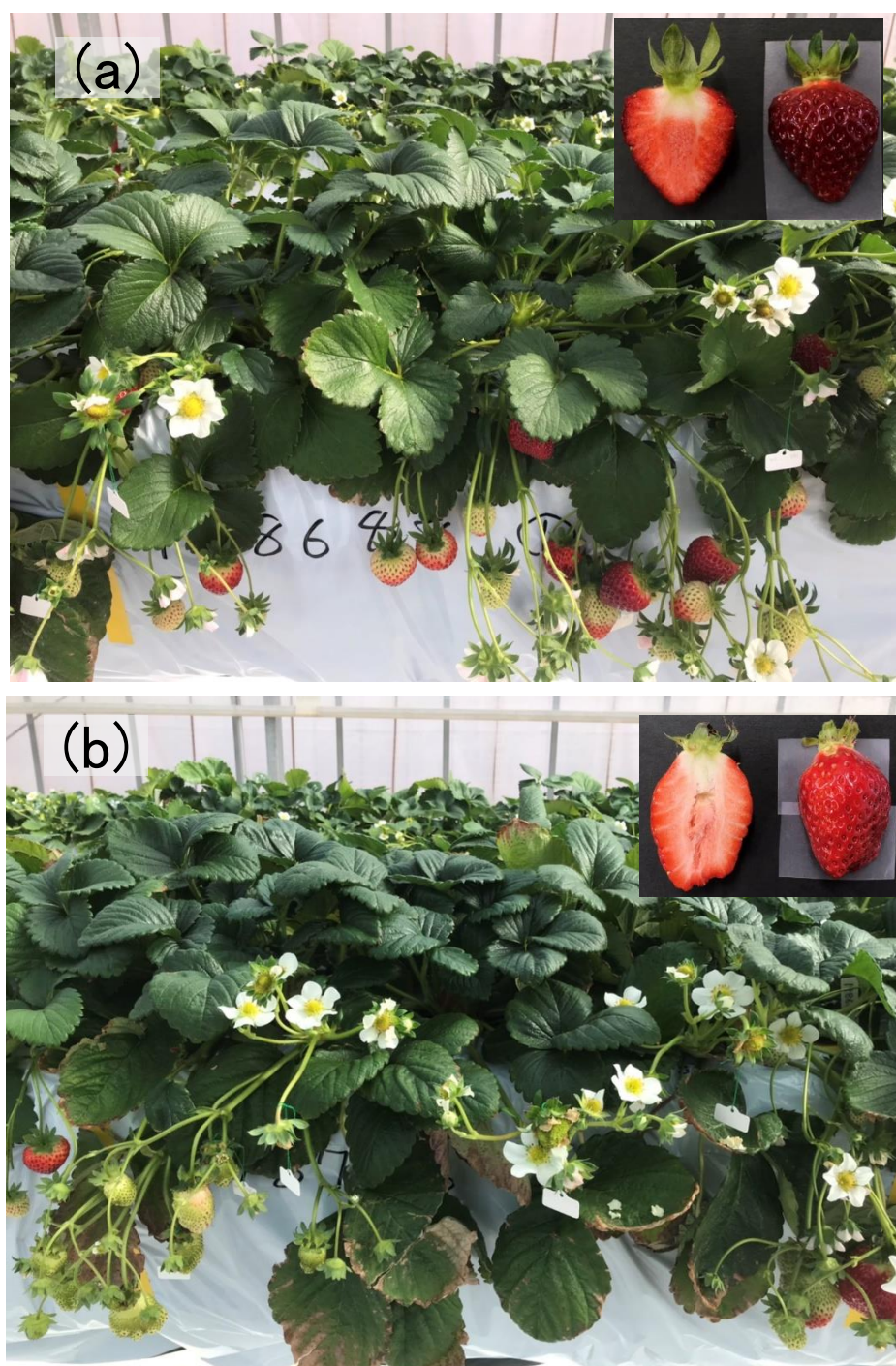


図5 病害複合抵抗性系統の植物体外観および果実写真

(a) 系統‘198688’, (b) 系統‘198788’

各写真の右上に各系統の果実断面及び外観を示したが縮尺は一定ではない.

引用文献

- 本城正憲 (2015) : イチゴうどんこ病 (レース 0) 抵抗性に連鎖する DNA マーカー. 研究成果情報 .
<https://www.naro.affrc.go.jp/org/tarc/seika/jyuhou/H27/yasaikaki/H27yasaikaki015.html>
(2023-10-12 閲覧).
- Howard, C.M., J.L. Maas, C.K. Chandler and E.E. Albregts (1992) : Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Dis.* 76, 976-981.
- 飯村一成・田崎公久・中澤佳子・森島正二・生井潔・天谷正行 (2021) : イチゴ栽培種における萎黄病抵抗性 QTL の検索. *育種学研究* 23, 101-108.
- 稲田 稔 (2010) : イチゴ炭疽病菌の薬剤感受性検定法と耐性菌の発生状況. *植物防疫* 64(12), 790-793.
- 岩館康哉 (2012) : 岩手県の主要な四季成り性イチゴ品種の萎黄病抵抗性について. *北日本病虫研報* 63, 97-99.
- 農林水産省 (2007) : 平成 19 年産品目別経営統計 (いちご). 2010-2-5 公開.
<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500201&tstat=00001013460&cycle=7&year=20070&month=0&tclass1=000001013649&tclass2=000001020117&tclass3=000001034993> (2023-10-13 閲覧).
- 尾田秀樹・内田裕也・小林延子 (2018) : イチゴ新品種「埼園い 1 号」および「埼園い 3 号」の育成. *埼玉農技研研報* 17, 7-13.
- 沖村誠・野口裕司・望月龍也・曾根一純・北谷恵美 (2004) : 炭そ病抵抗性の「いちご中間母本農 2 号」の育成とその特性. *園学研* 3 (3), 257-260.
- Pincot D.D.A., Feldmann M.J., Hardigan M.A., Vachev M.V., Henry P.M., Gordon T.R., Bjornson M., Rodriguez A., Cobo N., Famula R.A., Cole G.S., Coaker G.L. and Knapp S.J. (2022) : Novel fusarium wilt resistance genes uncovered in natural and cultivated strawberry populations are found on three non-homoeologous chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 135 : 2121-2145.
- Pincot D.D.A., Poorten T.J., Hardigan M.A., Harshman J.M., Acharya C.B., Cole G.S., Gordon T.R., Stueven M., Edger P.P. and Knapp S.J. (2018) : Genome-wide association mapping uncovers *FwI*, a dominant gene conferring resistance to fusarium wilt in strawberry. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8: 1817-1828.
- 栃木県農業試験場 いちご研究所 (2012) : いちご新規参入経営支援マニュアル. チェックポイントと経営試算, 先輩からの助言. 2012-3 発行.
<https://www.agrinet.pref.tochigi.lg.jp/nousi/singijutu/singi16.pdf> (2023-10-16 閲覧)
- 内田景子 (2009) : イチゴうどんこ病菌. *植物防疫特別増刊号*, 90-92.
- 内田景子・井上治郎 (1998) : イチゴうどんこ病のレース分化とイチゴのうどんこ病抵抗性の遺伝. *植物防疫* 52, 224-227.