

# 生物工学研究室

ゲノム情報を用いて新品種の開発の効率化に取り組んでいます

本研究室では、様々な農作物で解読が進んでいるゲノム情報（DNA配列情報）を活用して、病気に強い等の優れた形質を苗の段階で選抜できるDNAマーカーの開発やその遺伝子の単離を進めています。また、開発品種の知的財産権保護のため、DNA鑑定技術の開発に取り組んでいます。

## ●DNAマーカーとは・・・

- DNAの目印（マーカー）のことをいいます。例えば、病気に強い個体のみを選抜する場合は、病気に強い個体のみが持つDNAの部分のマーカーとして利用します。
- DNAマーカーを利用すると、苗の段階でDNAを調べることで、優良個体のみを選抜することができます。
- いちご、水稲、大麦等の様々な農産物でゲノム解読が進められています。国内外の研究機関ではそれらを利用することにより、DNAマーカーを開発しています。



DNA（4種類の塩基（A、G、C、T）で構成）  
ゲノムの大きさ：植物によって異なる  
イチゴゲノム：約8億塩基対  
イネゲノム：約3億8千万塩基対  
ニラゲノム：約300億塩基対

有用形質（病気に強い等）個体のみが持つDNAの部分を検出し、苗の段階で選抜します

DNAマーカーにより病気に強い個体のみ検出

病気に弱い 病気に強い

## ●本県オリジナル品種の開発のためのDNAマーカーの利用

- いちご、水稲、大麦、にら、なし、あじさいでDNAマーカーの開発や利用を進めており、本県オリジナル品種の開発のため使用しています。



いちご  
・萎黄病耐病性  
・四季成り性



水稲  
・縞葉枯病耐病性



大麦  
・縞萎縮病耐病性  
・萎縮病耐病性



なし  
・黒星病耐病性  
・自家和合性



あじさい  
・八重咲き性



にら  
・単為発生性  
・複相大孢子形成性

### いちごにおける実生選抜

年度	全個体数	萎黄病耐病性・四季成り性	
		マーカー有	マーカー無
2020	6,268	3,211	3,057
2021	5,179	2,698	2,481
2022	5,607	2,862	2,745



F1実生苗集団  
耐病性有と無が混在



植える！



植えない！

## ●品種識別におけるDNAマーカーの利用

- 知的財産権の保護や原種生産に混種防止のため、DNAマーカーを利用しています。

いちご：本県育成品種「とちあいか」、「ミルクベリー」、「スカイベリー」等を識別  
水稲：本県育成品種「なすひかり」、「とちぎの星」、「夢ささら」等を識別

# いちごの萎黄病耐病性を識別する DNAマーカーの開発と利用

萎黄病に強い新品種を効率よく開発するため、ゲノム情報を利用して耐病性遺伝子と強く関連するDNAマーカー開発を行っています。

## ● 「萎黄病」とは・・・

- 土壌から感染するいちご栽培における重要病害の一つです。
- 発病すると、葉が黄化し、萎れ、やがて枯死に至り、収量の低下を招きます。
- ランナーを通じて親株から子苗へも伝染します。
- 「とちあいか」は抵抗性ですが、「とちおとめ」は罹病性です。



定植株の症状（小葉の一つが小さく黄化）



耐病性品種  
の育成

導管が褐変

## ● ゲノム（DNA配列）情報を活用したDNAマーカー開発



耐病性強

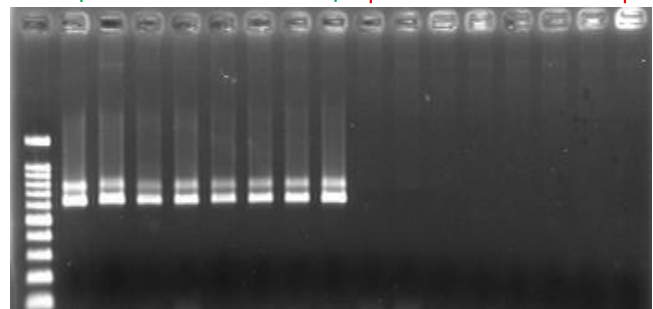


耐病性弱

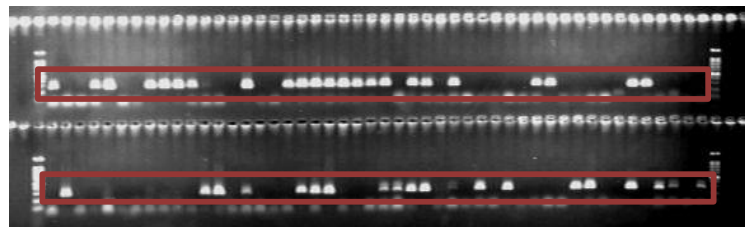
①耐病性の強さが異なる品種間のDNA配列情報を比較します。

耐病性強

耐病性弱



②耐病性の強弱と関連するDNA配列を見つけることに成功しました。



③実生苗の段階でDNAを抽出し、PCRによるDNAマーカー増幅後、電気泳動による判定を行います。

耐病性個体の選抜には、病害に汚染した圃場で数年に渡る検定が必要ですが、DNAマーカーによる検定なら、耐病性個体だけを圃場に展開することができます。品種開発が確実に進むことに加え、年限の短縮と圃場の利用効率、労力の軽減にもつながっています。

# いちごの四季成り性を識別するDNAマーカーの開発と利用

周年栽培に適したいちご品種を効率的に開発するため、四季成り性を識別するDNAマーカーの開発を進めています。

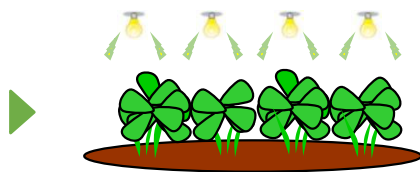
## ●四季成り性とは・・・

- 四季成り性とは、日長（昼の長さ）に関わらず開花する性質のことです。
  - ・「とちおとめ」：一季成り性品種のため、高温・長日（昼が長い）では開花しません。
  - ・「なつおとめ」：四季成り性品種のため、夏でも開花し、収穫することができます。

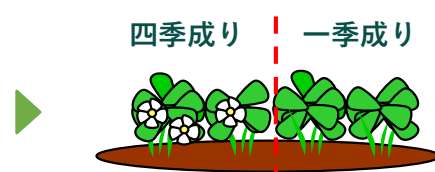
四季成り性を判定するには・・・



ほ場に定植



一定期間24時間日長条件で栽培

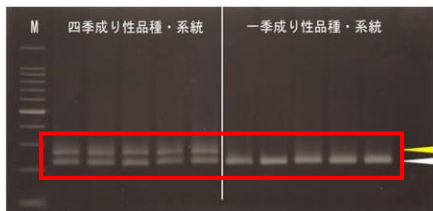


開花したものを四季成り性と判定

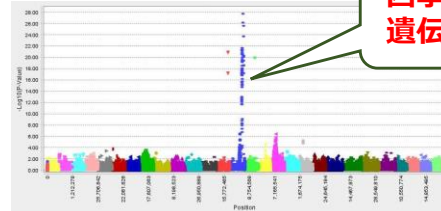
- ・判定までにかかる時間・栽培面積・労力が大きい

## ●DNAマーカーの開発と精度向上を図っています

- 効率的に四季成り性個体を判定するため、DNAマーカーを開発してきました。
- 近年では、ゲノム情報を活用して、幅広い交配組合せに対応できるDNAマーカーの開発を進めています。
- 四季成り性に関連する遺伝子領域の特定することにより、更なる高精度な識別マーカーの開発を進めています。



アガロース電気泳動による検出



解析集団におけるGWAS解析結果

## ●DNAマーカーを用いて効率的な選抜をしています

- 苗の段階で判定できるため、四季成り性の個体のみを定植できます。
- DNAの抽出から判定まで短期間で行うことが可能です。

### DNAマーカーによる実生苗選抜の流れ

いちごの葉からDNAを抽出



PCR法によりDNAを増幅



PCR装置

増幅したDNAを調べる（主に2つの方法で実施）



アガロースゲル



DNAシーケンサー

### 四季成り性の実生苗選抜実績

年度	個体数	マーカー有	マーカー無	判定不能
R2(2020)	2,880	1,459	1,372	49
R3(2021)	1,966	1,032	903	31
R4(2022)	1,920	989	904	27

植える

植えない

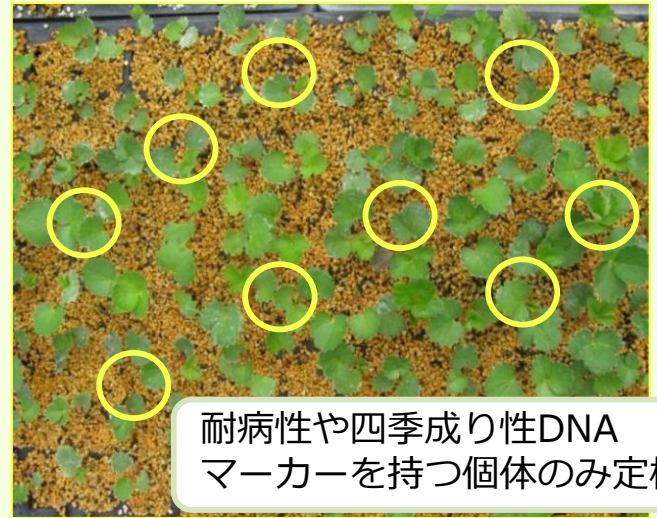
# いちごの萎黄病耐病性・四季成り性 DNAマーカーによる交配実生苗の選抜

## ● 萎黄病耐病性・四季成り性DNAマーカーによる選抜の利点

- 迅速に耐病性個体や四季成り性個体が判定できる（菌接種試験や24時間日長処理の省力化）
- 苗の段階で判別できるため、定植株（生育調査株）の削減や施設の利用率が上がる

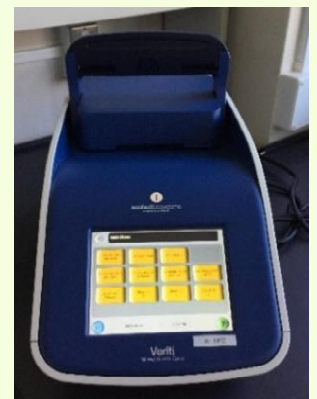
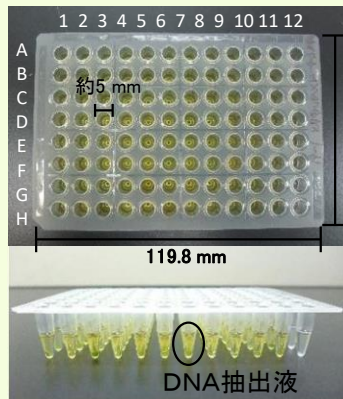
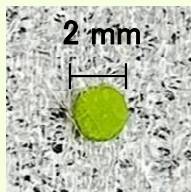


品種開発の効率化やスピードアップ！！



耐病性や四季成り性DNAマーカーを持つ個体のみ定植

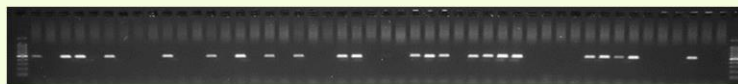
## ● 実生苗からのDNAマーカー検出手順



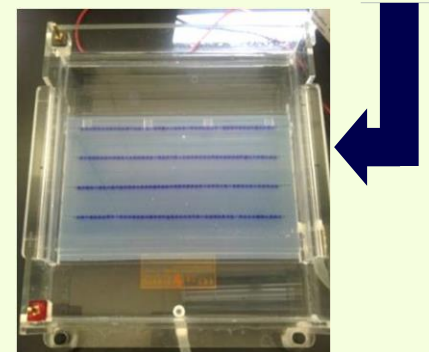
① セルトレーの実生苗から直径約2 mmの葉を採取し、抽出液（アルカリ性）の入った96穴プレートへ入れる。

② 95℃で10分加熱し、中和液を加える。

③ PCRによりDNAマーカーを増幅

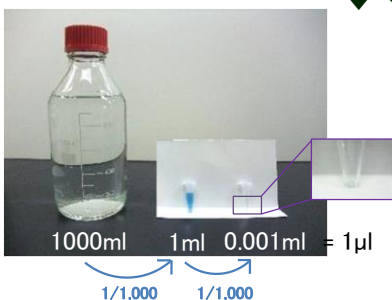


⑤ DNAマーカーの検出



④ 電気泳動によりDNAマーカーを分離

### ◆ マーカー検出に使う量のはなし



DNA抽出液を希釈し、1 $\mu$ l（マイクロリットル）をPCRの反応に使用します。1 $\mu$ lは1リットルの1/1,000,000の量です。このような微量の液体を扱うには専用の器具（マイクロピペット）を使用します。また、多検体を扱うため一度に8サンプルを扱う8連ピペットも使用します。

# いちごの炭疽病耐病性を識別できるDNAマーカーを開発しています

いちごの炭疽病に強い品種の育成に向けて、炭疽病耐病性DNAマーカーの開発に取り組んでいます。

## ●「炭疽病」とは・・・

- 過去も現在も、いちご栽培における重要病害の1つです。
- 発病すると、苗不足や大幅な収量の低下を招きます。
- 「とちおとめ」を含む国内の大多数の品種が罹病性です。



耐病性品種の育成



葉の斑点型病斑



葉柄の黒色陥没病斑

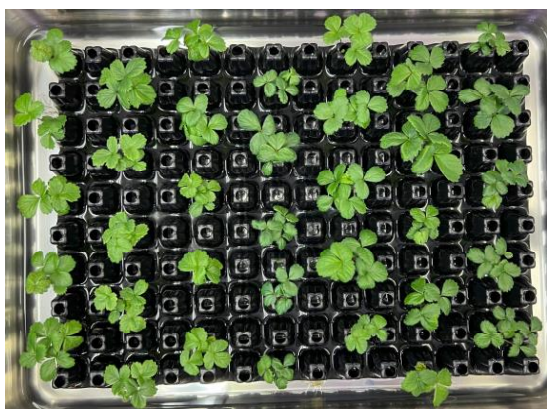


本ぼ定植後の萎凋症状

写真は、栃木県農業環境指導センター植物防疫ニュースより引用

## ●ゲノム（DNA配列）情報を活用したDNAマーカー開発

### ① 耐病性の強弱（表現型）を評価



耐病性×罹病性のF<sub>1</sub>集団をつくる  
↓  
培養苗を使用した接種試験を実施  
↓  
各個体の**耐病性の強弱**を評価！

### ② 表現型とゲノム情報の関連を解析



耐病性と罹病性の**ゲノム情報**を比較  
↓  
DNA配列に違いがある領域を見つける  
↓  
その違いから**DNAマーカー**を作製！

DNAマーカーを利用した耐病性個体の選抜・耐病性素材の育成を目指します！

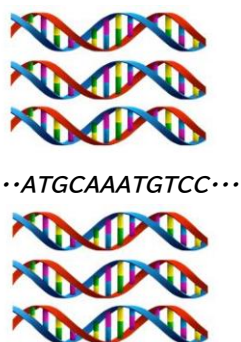
# ゲノム情報を利用した 新たな育種法の開発

近年、次世代シーケンサー（NGS）の普及により、多くの生物種でゲノムが解読されています。育種分野ではDNA配列情報と有用な遺伝的形質の関係性を調べ、その情報を基に最適な交配組合せや育種選抜を行うゲノム育種の研究が進められています。

## ゲノム育種法の開発



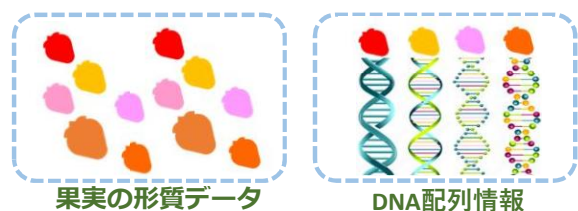
< 育種改良形質の例 >  
甘さ、硬さ、大きさ  
耐病性 など



作物のゲノムを解読して、情報解析により育種への活用法を試験しています。

## ゲノミックセレクション法

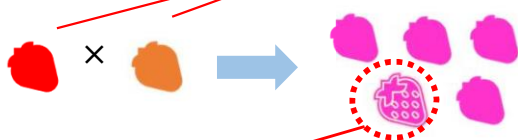
品種・系統間の特徴とDNA情報の関係性を数式化し、DNA配列情報から形質値を予測する数式を作成する（予測モデル）。



DNA配列と形質値の関係を数式化

### 【育種への活用ケース】

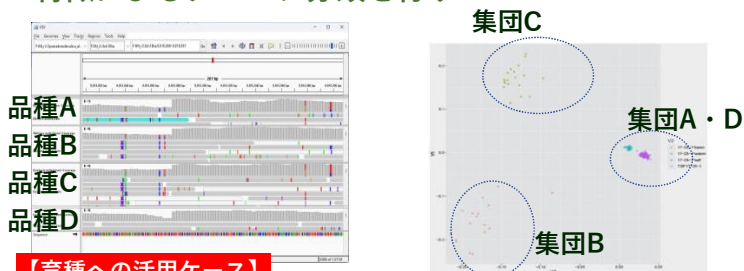
▶ DNA情報から遺伝的能力の高い交配組合せを決定



▶ DNA情報から形質の優れた個体を早期選抜

## 品種系統間のDNA配列の比較

品種、系統間のDNA配列を比べたり、DNA配列の特徴によるグループ分類を行う

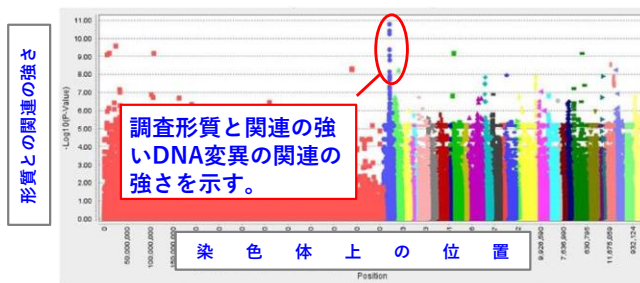


### 【育種への活用ケース】

DNAマーカーの作成、育種材料基礎情報

## ゲノムワイド関連解析（GWAS解析）

ある形質（果実形質や耐病性など）について、様々な個体の形質値とDNA変異の関係を統計的に調べることで、その形質に関連するDNA配列がどの染色体のどの領域の存在するかを推定できる。

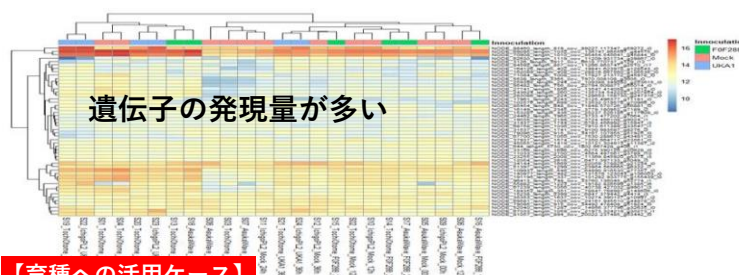


### 【育種への活用ケース】

形質（硬さ、耐病性など）を選抜するDNAマーカーの作成

## 遺伝子発現解析（RNA-Seq）

ある条件で発現する遺伝子やその発現量をみる



### 【育種への活用ケース】

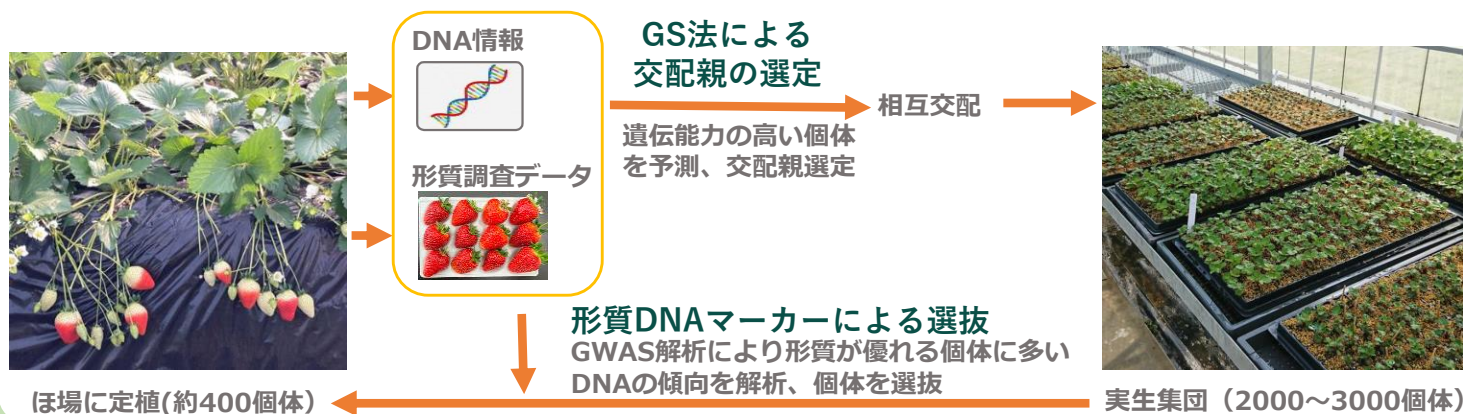
有用な形質（耐病性など）の遺伝子発現を捉え、育種素材や品種の特徴を調べる

# ゲノム情報利用によるいちごの育種選抜効果の実証

輸送性に優れ、果実が大きくて甘く、そして周年出荷が可能ないちご品種の育成を目指し、ゲノミックセレクション(GS)法とゲノムワイド関連解析(GWAS)を用いた選抜方法の効果を検証しています。

## ●選抜手法の流れ

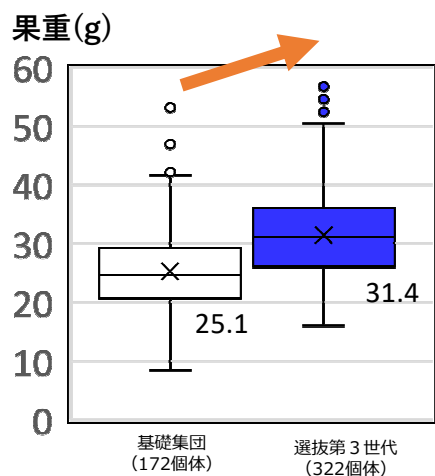
- 特徴的な形質を持ついちご6品種・系統由来の集団を作成し、GS法とGWASを用いた選抜を3年間行いました。



## ●選抜効果の検証

### GS法による選抜効果

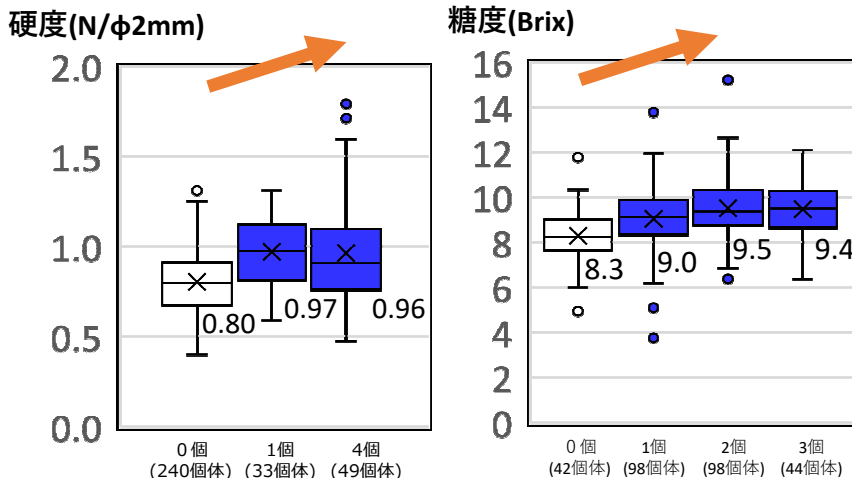
選抜を3年間繰り返したことで、果重が大きく向上しました。



果重が約2割上昇

### 形質DNAマーカーによる選抜効果

形質DNAマーカーを持つ個体は、果実の硬さ、甘さともに高くなりました。



マーカーを持つことにより硬さや甘さが上昇

今後、GS法による予測値やGWASにより選ばれた形質DNAマーカーによる選抜の有効性について検証し、実用化に向けて開発を進めていきます。

# 遺伝子の働きを解明するための技術確立に取り組んでいます

ウイルスベクターを用いていちごの重要な形質に関わる遺伝子の機能解析を行っています。

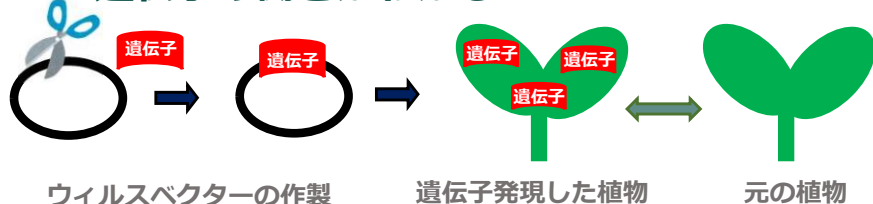
## ●ウイルスベクターとは

- ・ウイルスに目的遺伝子を連結し植物に感染させることで、遺伝子の働きを調べるためのツールです。
- ・リンゴ小球形潜在ウイルス（ALSV）ベクターを用いて、いちごの遺伝子機能解析を試んでいます。

### ◆遺伝子の機能解析

ウイルスベクターを感染させた植物（目的遺伝子が発現した植物）と元の植物を比較し、性質の違いを明らかにします。

⇒ 遺伝子の働きがわかる！



リンゴ小球形潜在ウイルス  
(Apple latent spherical virus: ALSV)

- 岩手県盛岡市のリンゴの木から発見
- 植物に感染はするが、病徴がほとんど現れない無毒なウイルス
- 岩手大学にてウイルスベクター開発

## ●ALSVベクターによるいちごの遺伝子解析の流れ

病徴が出やすい植物であるキノアでウイルスを増殖・濃縮したのち、いちごに感染させます。

ウイルスをキノアに感染させる



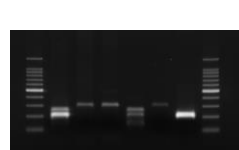
ウイルス濃縮



濃縮ウイルスをパーティクルガンでいちごに接種



RT-PCRにて感染確認



いちごの形質を確認（耐病性や開花等）

## ●いちごの遺伝子解析から高精度DNAマーカーの開発へ

- ・ALSVベクターを用いて、いちごの萎黄病や炭疽病等の耐病性遺伝子や四季成り性遺伝子の特定を試んでいます。
- ・遺伝子を特定することにより、高精度な選抜マーカー（遺伝子マーカー）の開発が可能になります。

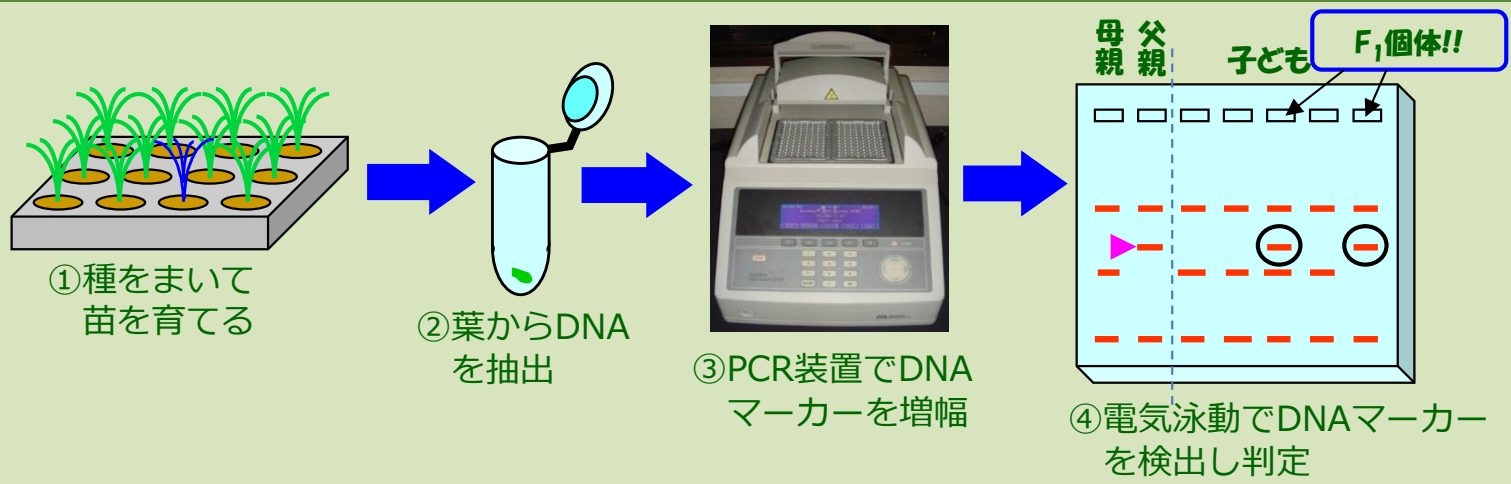




# にら新品種「ゆめみどり」は DNAマーカー選抜第1号の品種です

にらは、交雑し難い「単為生殖」という性質を持っています。そこで、DNAマーカーを使った親子鑑定を行い、確実に交雑したF<sub>1</sub>株を選ぶ技術を開発し、その結果、「ゆめみどり」の育成につながりました。

## ●DNAマーカーによるF<sub>1</sub>株判定のフロー



## ●にら新品種「ゆめみどり」の登録と特徴

### 品種登録情報

「ゆめみどり」は、DNAマーカー選抜を利用した第一号のにら新品種として開発され、平成26年7月28日に農林水産省に品種登録を出願し、平成29年2月22日に品種登録（登録番号第25640号）されました。



### 品種の特徴

- 葉がピンと立っていて（立性）、株元が長く、収穫調製しやすい。
- 葉が厚く、葉幅が広く、品質がよい。
- 莖数は少なめでも、1莖、1莖が重く、収量が多い。
- 生育は旺盛で、収穫回数が進んでも品質が安定している。

# 栃木オリジナル「にら」育種システムの開発と実用化

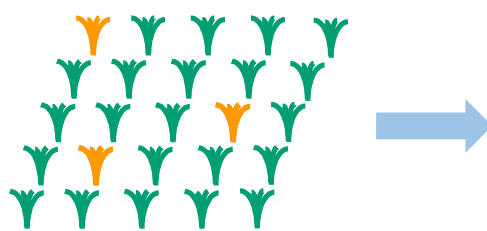
交雑率が極めて低い「にら」で、両性生殖性の個体を見出し、それを交配親に利用することで交雑率100%を実現しました。さらにはDNAマーカーで生殖性を判定することにより、有望個体の育種用途を決定し、育種の効率を大幅に向上しました。

## <従来の育種>

「にら」は「単為生殖性」という性質があり、交配してもその後代のほとんどは母親のクローンのため、育種効率が極めて低いことが課題でした。



約9割は母親のクローン



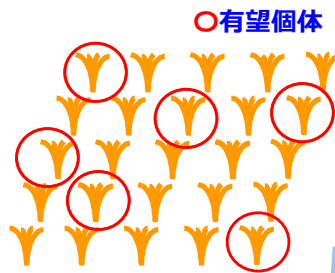
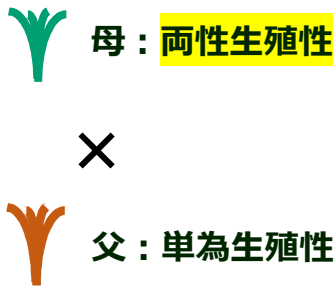
少ない交雑個体から、有望個体を選抜



## <現在の育種>

- ・「単為生殖性」にら同士の交雑個体の中から、稀に「両性生殖性」のにらが存在することを発見、これを交配親に利用！
- ・生殖性を判定するDNAマーカーを開発し、育種に利用

交雑率100%→多くの個体から有望個体を選抜



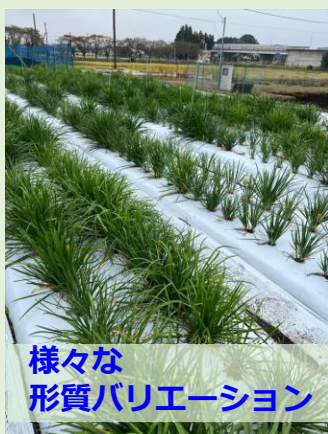
DNAマーカーで生殖性判定

単為生殖性 品種候補

「単為生殖性」は、種子生産上はクローンができるため有利

両性生殖性 交配母本

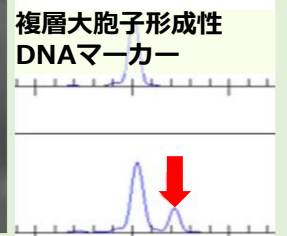
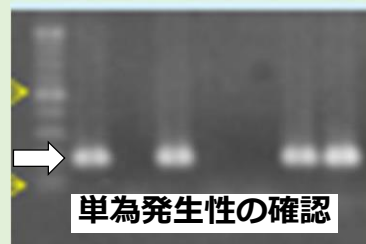
交配が可能のため、次世代の交配親に利用



## 有望個体の生殖性を判定



生殖性に関与する2つの因子（複相大孢子形成、単為発生）の有無をDNAマーカーで調べ、生殖性を決定



# あじさいの八重咲き性を識別するDNAマーカーの開発と利用

あじさいの八重咲き性新品種を効率的に開発するため、八重咲き性を識別するDNAマーカーを開発し、交配実生苗の選抜に利用しています。

## ●八重咲き性識別DNAマーカーの開発



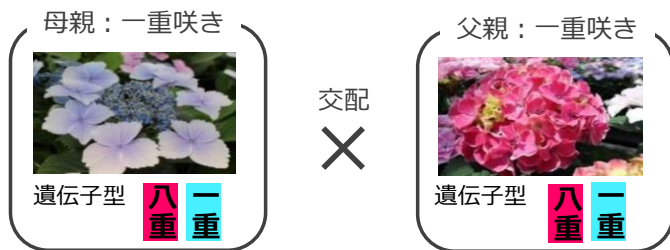
八重咲き性あじさい (きらきら星)

- ・八重咲き性あじさいは、「“隅田の花火”グループ」と「“城ヶ崎”グループ」があり、**劣性（潜性）の異なる遺伝子**によって制御されています。
- ・開発したDNAマーカーを使うことにより、それぞれの八重咲き性の遺伝子型（ホモか、ヘテロか、持っていないか）を判定できるようになりました。

## ●DNAマーカーを利用した効率的な八重咲き性品種の開発

### ステップ1：交配親の遺伝子型を調査

→八重咲き性個体が現れる組合せがわかる



これまでは・・・

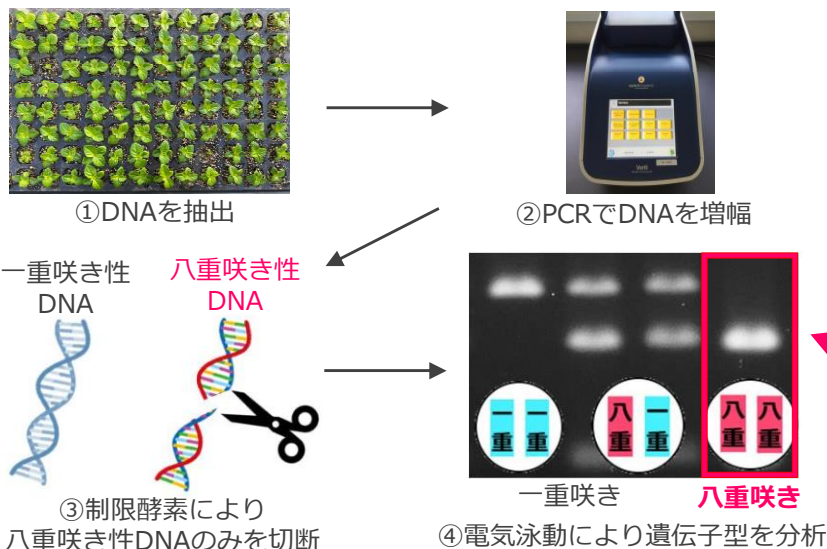
遺伝子型が分からないと、次の世代が八重咲きになるか分からないなあ…



すべての実生苗を鉢上げし、2年後の開花まで育てる必要があった

### ステップ2：交配実生の遺伝子型を調査

→花が咲く前に八重咲き性あじさいを選抜できる



ここまで1～2か月！  
八重咲き性個体のみ鉢上げすることで、栽培面積や資材、労力が**4分の1\***に軽減されました！  
\*八重咲き性個体の出現率25%

※本成果は、日本大学、かずさDNA研究所、福岡県、宇都宮大学及び滋賀県立大学との共同研究によるものです。

# なしの黒星病耐病性と自家和合性をDNAマーカーで判別しています

なしの黒星病耐病性及び自家和合性品種を効率的に開発するため、DNAマーカーによる検定を行っています。

## ●黒星病とは

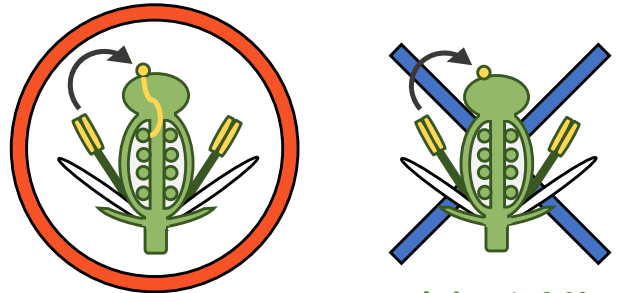


葉柄にできた病斑

裂果した果実

- ・**黒星病**とは、葉や果実に黒い斑点状の病斑が発生する病気です。
- ・感染力が強く、一度発生すると園内に広がってしまいます。症状が進むと果実が裂ける（裂果）ことがあり、商品として出荷できなくなってしまいます。

## ●自家和合性とは



自家和合性

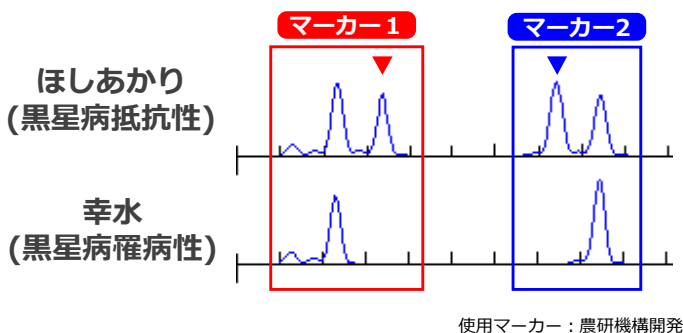
自家不和合性

- ・なしは、自らの花粉で受精できる**自家和合性**と、他の品種の花粉を受粉しないと結実しない自家不和合性という性質があります。
- ・結実の安定や受粉作業の省力化が期待できることから、自家和合性品種の開発が進められています。

## ●DNAマーカーで判別できます！

### 黒星病抵抗性個体の判別

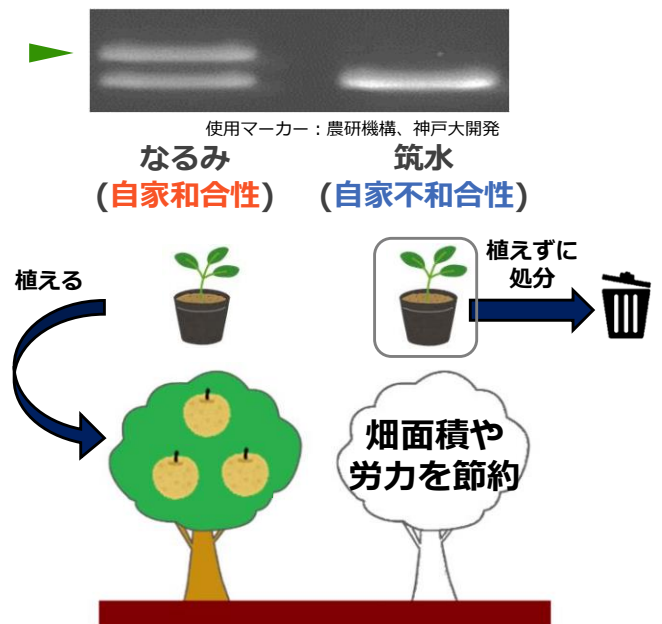
マーカーの検出にはDNAシーケンサーを使います。耐病性品種にだけピーク(▼, ▲)が検出されます。



従来の育種法では、全ての苗を畑に植え、十分に育ててから調査していました。しかし、DNAマーカーを活用すると、苗の段階でなしの性質が分かるため、効率的に新品种の育成を行うことができます。

### 自家和合性個体の判別

マーカーの検出には電気泳動装置を使います。自家和合性品種にだけバンド(▶)が検出されます。



# 市場に流通するいちご品種はDNAマーカーにより識別できます！

市場に流通するいちごについて、苗や果実を見た目だけで品種を識別することは大変困難です。そこで、DNAマーカーを利用し、本県が開発したいちご品種を含む国内流通品種を識別できる技術を開発しました。

## ●本県が育成したいちご品種

- これまでに本県が開発し、品種登録・出願公表されたいちご品種は10品種です。
- 苗や果実の外見だけで品種を識別することはとても困難です。



とちあいか



ミルキーベリー



スカイベリー



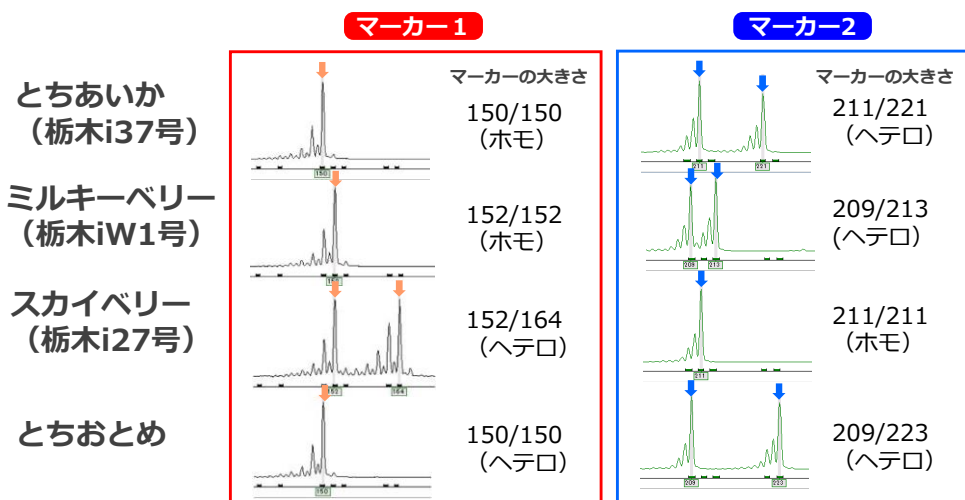
左：とちあいか、右：スカイベリー



## ●DNAマーカーで品種識別が可能です

### DNAマーカーの一つであるSSRマーカーを用いて品種識別ができます

※SSRマーカー：DNAに存在する繰り返し配列の長さを検出するマーカー。品種によって異なる。2本対で検出されるので、ホモ（同じDNAが対）とヘテロ（異なるDNAが対）がわかります。



### 検出方法

DNA抽出後、PCRを行い、DNAシーケンサーでマーカーを検出します。



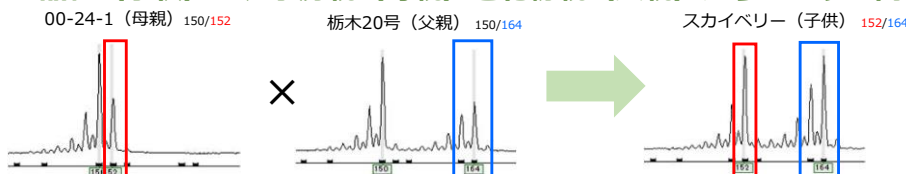
PCR装置



DNAシーケンサー

## ●品種の交配親がわかり、多くの品種を識別できます

- 品種（子供）は、子房親（母親）と花粉親（父親）から一つずつ同じDNA型を受け継ぎます。



7種類のSSRマーカーにより、国内外223品種・系統の識別が可能です

# 栃木県が開発した水稲品種はDNAマーカーで識別できます！

栃木県が開発した品種の知的財産の保護および原種の安定生産のためにDNAマーカーによる品種識別を行っています。

## ●見た目で品種の違いはわかりません



収穫前の水稲の様子(立札ごとに品種が異なります)

### 栃木農試が開発した品種の玄米



**なすひかり**

良食味  
寒さに強い  
倒伏しにくい



**とちぎの星**

良食味  
暑さ・病気に強い



**夢ささら**

酒造好適米  
病気に強い  
倒伏しにくい



**コシヒカリ**

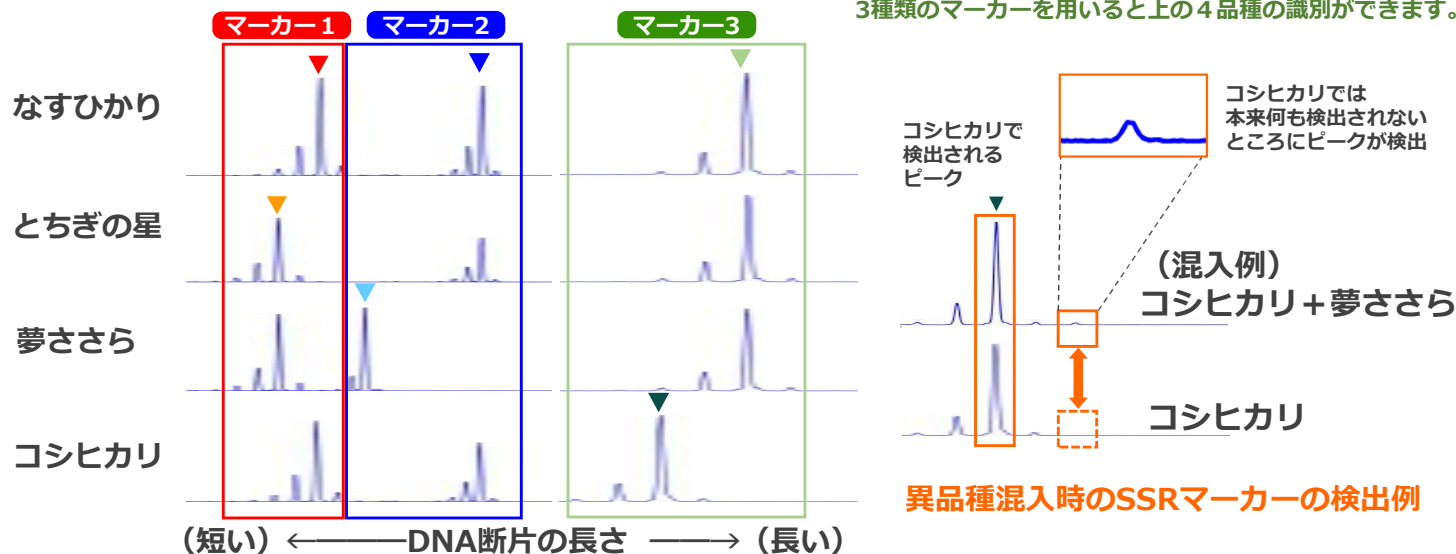
福井県開発  
良食味

## ●DNAマーカーを使うと品種の違いがわかります！

- 品種によって各マーカーが検出されるDNA断片の長さが異なります。
- 8種類のマーカーを用いると、栃木県で栽培されている水稲13品種が識別できます。
- また、原種の異品種混入も判定でき、種子の安定生産に活用されています。

### 栃木農試が開発した品種のSSRマーカー※の検出結果

※SSRマーカー・・・DNAマーカーの一種。品種によって塩基の繰り返し配列の長さが異なるため検出されるDNA断片の長さが異なります。3種類のマーカーを用いると上の4品種の識別ができます。



品種識別にはこんな機械を使います



#### PCR装置

DNAの一部を何万倍にも増幅します。ヒトのDNA鑑定にも使います。



#### DNAシーケンサー

増幅したDNA断片を検出します。

