

カーネーションのゲノム研究と育種への利用

八木 雅史 (農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門)
myagi@affrc.go.jp

イネの全ゲノムの解読は DNA マーカーを利用した新品種の育成に期待をもたらし、実際の育種や遺伝子の単離の場面で積極的に利用されている。一方、ゲノム情報に乏しく、形質に関する遺伝情報の蓄積も少ない園芸作物、特に花きにおいては、これまでほとんどゲノム研究は進まなかった。ところが、近年の次世代シーケンス技術の誕生と低コスト化はあらゆる植物種でゲノム情報へのアクセスを容易にし、花きにおいてもゲノム情報の積極的な活用の期待が高まっている。本稿では、我々がこれまで取り組んできたカーネーションの重要病害である萎凋細菌病抵抗性の育種における DNA マーカーを利用した品種開発ならびに並行して進めてきたゲノム育種基盤の開発について述べる。

はじめに

カーネーションは、キク、バラと並んで生産の多い世界3大切り花の一つである。日本でもキクに次いで出荷本数が第2位の重要な花きである (2.5 億本、2016 年)。近年、コロンビア、中国からの輸入が急増しており、流通量に占める輸入品の割合が 50% を超え、国内生産は危機的な状況である。農研機構では、こうした現状を打破し、輸入品に対抗するための方策の一つとして、評価に時間がかかり、従来法では取り組みの難しい病害抵抗性や日持ち性といった新しい形質をターゲットにした日本オリジナル品種の開発という育種面からのアプローチを試みてきた。

萎凋細菌病抵抗性品種「花恋ルーージュ」の育成

急激な立ち枯れ症状を引き起こすカーネーション萎凋細菌病は、日本の暖地におけるカーネーション栽培上最も重要な土壌伝染病害として恐れられてきた。1964 年に神奈川県で最初の発生が報告がされてから、瞬く間に国内に蔓延し、壊滅的な被害をもたらした。現場では、隔離ベンチ栽培、土壌消毒の徹底、無病苗の利用など様々な対策技術を開発し、発病の回避を図ってきたが、一旦発病すると有効な薬剤が無いことから、抵抗性品種の開発が強く望まれてきた。農研機構では、1988 年から萎凋細菌病に対する抵抗性の評価法の開発を開始し、抵抗性を有する遺伝資源探索の結果、カーネーションが属するナデシコ属野生種の中に非常に強い抵抗性を有する *Dianthus capitatus* ssp. *andrzejowskianus* を見出していた。

従来は浸根接種による検定を行って抵抗性個体の選抜を行ってきたが、選抜の効率化を図るために DNA マーカーの開発に取り組んだ。カーネーションで初めての連鎖地図を作成し、QTL 解析を実施した結果、*D. capitatus* の抵抗性には主



図1 「花恋ルーージュ」と病原菌接種後 49 日目の検定の様子

働抵抗性因子と少なくとも二つの作用の小さい因子が関与していることを明らかにした¹⁾。また、主働抵抗性因子の近傍に存在する STS-WG44 マーカーを見出し、STS-WG44 を用いることで抵抗性個体のみを効率よく選抜できることを実証した²⁾。さらに2004年からはDNAマーカー選抜を育種に取り入れ、最終的に7回の交配と選抜を繰り返して *D. capitatus* から世代を進めた結果、2010年に世界初の抵抗性カーネーション実用品種「花恋ルージュ」を育成した³⁾ (図1)。

カーネーションのゲノム解析基盤の構築

連鎖地図は、多数の DNA マーカーと多くの形質の遺伝子座について地図上の位置を決定し、詳細にすることで有用性が高まる。連鎖地図の高密度化、高精度化を図るため、EST情報の収集やゲノムライブラリーを作成し、カーネーションで広く利用可能な SSR (マイクロサテライト) マーカーを多数開発し、カーネーションで初めての SSR マーカー主体の連鎖地図を作成した⁴⁾。この地図を用いて、育成系統の中から新規に見出された萎凋細菌病抵抗性系統 85-11 の有する抵抗性に連鎖した DNA マーカーを開発した (図2)。地図の高密度化をさらに進め、連鎖群の数がカーネーションの基本染色体数 15 に一致し、カーネーションの品種で広く利用可能な 412 個の SSR マーカーが座乗した標準連鎖地図を作成した⁵⁾。標準連鎖地図を活用し、八重咲き、一重咲きの花型を判別可能な SSR マーカーの開発やアントシアニン含量に基づく花色の濃淡を支配する QTL などを明らかにした⁶⁾。近年では、次世代シーケンス技術を用いた double-digest restriction site-associated DNA sequencing (ddRad-Seq) 法をカーネーションに初めて適用し、2119 個の RAD マーカーと 285 個の SSR マーカーが座乗した連鎖地図を作成し、高密度連鎖地図を短期間に迅速に作成できる技術基盤を構築した⁷⁾。

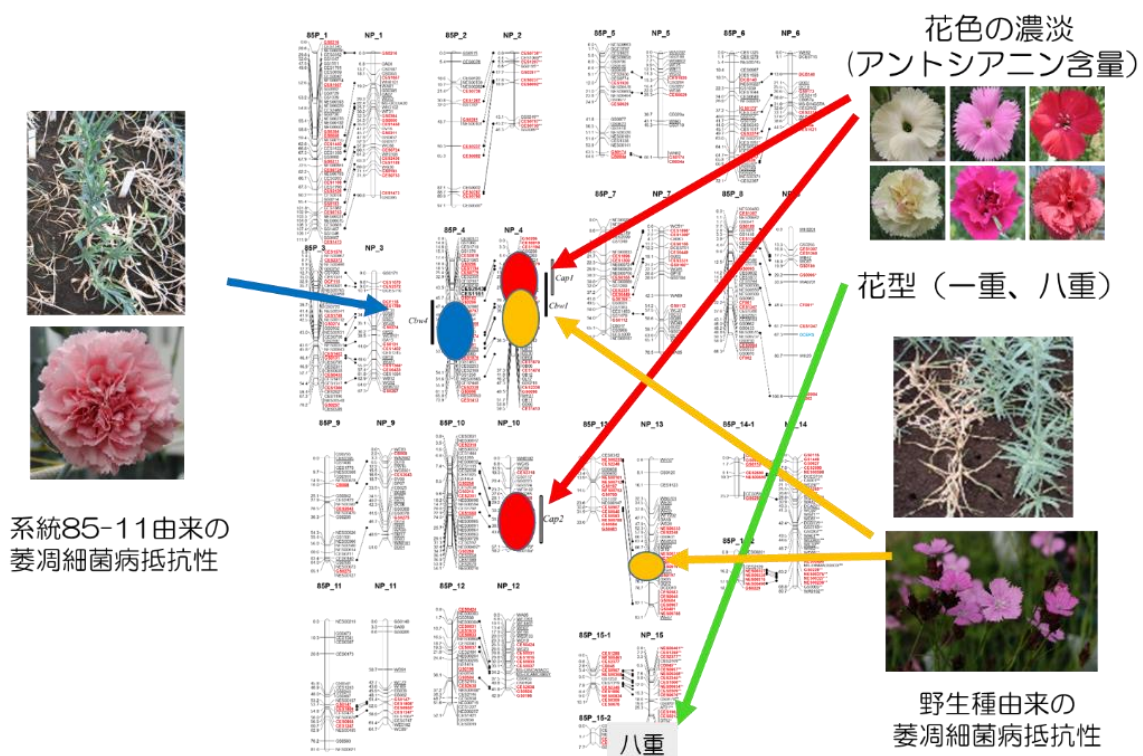


図2 カーネーションの標準連鎖地図とこれまでにマッピングされた形質



図3 カーネーションのゲノムデータベース

カーネーションの全ゲノム解読

カーネーション研究の新たな展開を図るため、かずさDNA研究所、東京農工大学、サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社と共同で全ゲノム解読を行った⁸⁾。複数のDNAライブラリーについて次世代型シーケンサー（HiSeq1000、GS FLX+）を組み合わせ、日本で生産量の多い赤色品種「フランセスコ」のゲノムを解読した。推定されるゲノムサイズ622Mbの91%に相当する569Mb（45,088scaffold、N50=60.7kb）の領域の解読に成功し、その配列の中に43,266個の遺伝子領域を明らかにした。栄養繁殖性

で遺伝的に雑ばくな花き品目では、世界で初めての成果である。得られたゲノム配列とアノテーションに関する情報はデータベースにまとめて公表している（Carnation DB、<http://carnation.kazusa.or.jp>、図3）。ゲノム解読の成功により、さらなる育種の効率化を図ることが可能になった。また、カーネーションが持つ多様な花色や模様形成機構に関わる遺伝子群の詳細が明らかになり、その成果は他の花きでも活用できることが期待される。

共同育種による新品種開発

愛知県、長崎県、静岡県では、「花恋ルージュ」をはじめとした萎凋細菌病抵抗性系統とDNAマーカーによる選抜を利用した県オリジナルの抵抗性品種の開発が進められている。また、愛知県では農研機構育成の日持ち性に優れた品種「ミラクルルージュ」などを育種素材とした良日持ち性の育種を進め、スプレーカーネーション「カーネ愛農1号」を共同で育成した（2015年9月出願公表、図4）。水に生けただけでも約3週間もつ優れた日持ち性に加えて、6月定植の暖地作型でも10月から茎の硬い高品質な花が出荷可能である。それらの優れた特性が評価され、栽培が急速に増えており、「ドリーミーブロッサム」の名前で流通、販売されている。



図4 日持ち性の優れた「カーネ愛農1号」

おわりに

これまで花きにおけるモデルとしてカーネーションのゲノム研究を推進してきた。ある程度のゲノム情報は整備できたと考えているが、十分にそれらを活用した成果がまだ創出できたわけではない。今後は、ゲノム情報をフルに活用し、品種育成のみならず国内の生産振興につながる技術開発に発展するよう更なる努力をしたい。もともと研究勢力が小さい花きの分野では、先行研究をうまく活用するとともに、ゲノム解読を推進した時のように強みを活かした連携を図ることで、効率的に研究を進めていきたい。

謝辞

本受賞にあたりましては、一般財団法人園芸学会ならびに農研機構野菜花き研究部門よりご推薦を頂きました。土井元章会長、坂田好輝部門長、市村一雄花き研究監をはじめ関係の諸先生方にお礼申

上げます。本研究の推進あたりましては、農研機構野菜花き研究部門小野崎 隆博士ならびに農研機構果樹茶業研究部門山本俊哉博士に終始ご指導とご支援を賜りました。また、農研機構野菜花き研究部門ならびにつくば技術支援センターの皆様には本研究の推進にあたりまして多大なご協力をいただき深くここに感謝いたします。また、共同研究機関のかずさ DNA 研究所、東京農工大学、サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社、愛知県、長崎県の研究員の方々にも深く感謝いたします。最後にいつも支えとなる家族に心から感謝します。

引用文献

- 1) Yagi, M., T. Onozaki, M. Taneya, H. Watanabe, T. Yoshimura, T. Yoshinari, Y. Ochiai, M. Shibata (2006) Construction of a genetic linkage map for the carnation by using RAPD and SSR markers and mapping quantitative trait loci (QTL) for resistance to bacterial wilt caused by *Burkholderia caryophylli*. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 75: 166-172.
- 2) 八木雅史・小野崎 隆・谷川奈津・柴田道夫. (2006) カーネーションの萎凋細菌病抵抗性育種における DNA マーカー選抜の有効性の実証. 園芸学研究 5: 241-245.
- 3) 八木雅史・小野崎 隆・池田 広・谷川奈津・柴田道夫・山口 隆・棚瀬幸司・住友克彦・天野正之 (2010) 萎凋細菌病抵抗性カーネーション ‘花恋ルージュ’ の育成経過とその特性. 花き研究所研究報告 10: 1-10.
- 4) Yagi, M., T. Kimura, T. Yamamoto, S. Isobe, S. Tabata, T. Onozaki (2012) QTL analysis for resistance to bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) in carnation (*Dianthus caryophyllus*) using an SSR-based genetic linkage map. Mol. Breed. 30: 495-509.
- 5) Yagi, M., T. Yamamoto, S. Isobe, H. Hirakawa, S. Tabata, K. Tanase, H. Yamaguchi, T. Onozaki (2013) Construction of a reference genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). BMC Genomics, 14: 734.
- 6) Yagi, M., T. Yamamoto, S. Isobe, S. Tabata, H. Hirakawa, H. Yamaguchi, K. Tanase, T. Onozaki (2014) Identification of tightly linked SSR markers for flower type in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Euphytica 198: 175-183.
- 7) Yagi, M., K. Shirasawa, T. Waki, T. Kume, S. Isobe, K. Tanase, H. Yamaguchi (2016) Construction of an SSR and RAD marker-based genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Mol. Biol. Rep. 35: 110-117.
- 8) Yagi, M., S. Kosugi, H. Hirakawa, A. Ohmiya, K. Tanase, T. Harada, K. Kishimoto, M. Nakayama, K. Ichimura, T. Onozaki, H. Yamaguchi, N. Sasaki, T. Miyahara, Y. Nishizaki, Y. Ozeki, N. Nakamura, T. Suzuki, Y. Tanaka, S. Sato, K. Shirasawa, S. Isobe, Y. Miyamura, A. Watanabe, S. Nakayama, Y. Kishida, M. Kohara, S. Tabata (2014) Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). DNA Research, 21: 231-241.