

# ジャガイモシストセンチュウ抵抗性に連鎖する PCR マーカーの開発

田中俊憲・小村国則 (長崎県総合農林試験場)

Toshinori TANAKA and Kuninori KOMURA : Development of PCR-Based Selection Marker for screening of the potato lines resistant to cyst nematode

ジャガイモシストセンチュウ (PCN) は、バレイシヨの重要害虫で、バレイシヨの根に寄生 繁殖する。PCNのシストと呼ばれる卵 (あるいは幼虫) の集合体は、土壌中で 10 年以上の長期間にわたり活性を失わず、また、物理的 化学的に強固なため、一度 PCN が発生した圃場では PCN の完全除去は困難となる。

これまで、PCN 対策として抵抗性を有する野生種が選抜され、バレイシヨ育種に導入・利用されてきた。数種ある PCN 抵抗性遺伝子のうち、HI 遺伝子は、優性形質で、日本において特に広く利用されてきた。しかしながら、PCN 抵抗性検定は汚染拡散を防ぐため施設が必要で、かつ長期間を要し、気候条件に影響されることから、抵抗性系統を選別するための効率的な方法が求められている。

我々は、抵抗性品種の効率的育成のため、遺伝子診断による抵抗性検定技術の開発を進めている。今回、HI 遺伝子に連鎖する CP113 遺伝子<sup>1)</sup> の塩基配列分析により、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性を判別する PCR マーカーを開発した。

## 1. 材料および方法

HI 遺伝子を有するバレイシヨ品種アトランチックと単為生殖誘発系統フレハの交配により二倍性半数体の抵抗性、および感受性系統を得た。Niewohner ら<sup>2)</sup> の報告を基に、PCR プライマー (5'CAACTCGACATCAAAGC-AGT3', 5' GAGTAATAGTAAGAGTGACG3') を設計合成し、抵抗性 感受性両系統の全 DNA (合計 12 系統) を用いて PCR を行い、CP113 遺伝子を増幅した。得られた CP113DNA は蛍光式 DNA シークエンサーを用いて塩基配列を決定した。

## 2. 結果および考察


PCR より約 1 kb の CP113DNA 断片を得た。得られた DNA 断片の塩基配列を分析した結果、抵抗性系統に特異的な“G 配列”を見出した (第 1 図)。“G 配列”は、

```

8-1 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
8-2 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
8-3 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
8-4 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
8-5 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
8-6 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
9-1 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
9-2 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
9-3 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
9-4 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
9-5 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180
9-6 121: AATTTCAAGTGTATAACCGGATACGCACTAGTATTTCCTCGACGGCAAAATGGGCAATCTG 180

```

第 1 図 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性に特異的な塩基配列

H1SP-S1: 5' ATGGTGAGTTCCTTTCCT 3'  
H1SP-A1: 5' TCGACGGCAAAATGGG 3'  
 : 抵抗性系統特異的配列

第 2 図 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性判定用 PCR プライマー

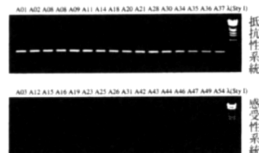
抵抗性系統由来 DNA 断片の 50% の確率で観察された。これは、交配親のアトランチック (4 倍体) が HI 遺伝子を一重式に持ち、単為生殖により得られた PCN 抵抗性の二倍性半数体は HI 遺伝子をヘテロに保持すること、および HI 遺伝子による PCN 抵抗性が優性形質であることと一致する。そこで、得られた PCN 抵抗性系統の特異的な“G 配列”を基に、PCN 抵抗性検定用 PCR プライマー H1SP-S1 H1SP-A1 を設計 合成した (第 2 図)。H1SP-S1 H1SP-A1 を用いて、二倍性半数体の PCR を行ったところ、抵抗性の全系統において約 300bp の増幅 DNA 断片が観察された。感受性系統においては、増幅 DNA が観察されず、開発した PCR プライマーが PCN 抵抗性と連鎖することが確認された (第 3 図)。

また、増幅 DNA を簡便に検出するため、2 本鎖特異的蛍光色素ヘキスト 33258 を用いて PCR 溶液の DNA 定量を行った。その結果、増幅 DNA が存在する PCR 反応液では、 $19.5 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ 、存在しない反応液では  $0.9 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$  となり、明瞭に判別可能であった (第 4 図)。電気泳動による DNA 検出は、煩雑で、時間を要するため、ヘキスト 33258 による検出を行うことで作業効率が改善されると考えられる。

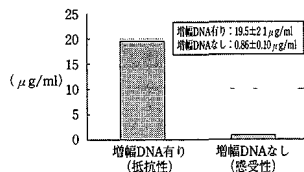
以上、PCN 抵抗性の PCR マーカーを開発してきたが、今後、広範な塩基配列解析を進め、判定精度・コストを向上させていく予定である。

## 引用文献

- 1) Gebhardt, C, Mugniery, D, Ritter, E, Salamini, F and Bonnel, E Theor Appl Genet 85 :541-544, 1993
- 2) Niewohner, J, Salamini, F S and Gebhardt, C Mol Breed 1 :65-78, 1995



第 3 図 二倍性半数体系統における H1SP-S1/A1 を用いた PCR



第 4 図 ヘキスト 33258 による PCR マーカーの検出