

DNA マーカーを利用したバレイシヨ病虫害抵抗性検定法の開発

第1報 ジャガイモ X ウイルス, ジャガイモシストセンチュウ, ジャガイモ疫病抵抗性検定法

大林憲吾, 中田 (田島) 奈津子¹⁾, 茶谷正孝, 小村国則¹⁾

キーワード: バレイシヨ, ジャガイモ X ウイルス, ジャガイモシストセンチュウ, ジャガイモ疫病, 抵抗性, 検定法, DNA マーカー

Development of a detection method of resistance to potato disease and pest using DNA markers

1. Detection methods of resistance *potato virus X*, potato cyst nematode and late blight.

Kengo OHBAYASHI, Natuko NAKATA, Masataka CHAYA, Kuninori KOMURA

目次

1. 序論	2
2. DNA マーカーを利用したジャガイモ X ウイルス抵抗性検定法の開発	2
1) 緒言	2
2) 材料および方法	3
3) 結果および考察	5
3. DNA マーカーを利用したジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定法の開発	7
1) 緒言	7
2) 材料および方法	8
3) 結果および考察	9
4. DNA マーカーを利用したジャガイモ疫病抵抗性検定法の開発	12
1) DNA マーカーを利用した疫病真性抵抗性遺伝子 <i>RI</i> の検出	12
2) 疫病真性抵抗性遺伝子 <i>R2sto</i> 及び <i>R2adg</i> に連鎖する DNA マーカーを利用した疫病抵抗性検定法の開発	14
5. 総合考察	21
6. 摘要	22
7. 引用文献	22
Summary	25

1. 序論

長崎県のバレイショ生産量は、全国第2位³⁰⁾で、栽培技術を駆使してほぼ1年中供給されている。特に4月下旬から6月下旬にかけての市場流通量は全国的に大きなシェアを占めている。

栽培されている主な品種は、暖地春・秋作用の「ニシュタカ」、「デジマ」と全国的に栽培されている「メークイン」の3品種であり、作付面積の99パーセントを占めている²⁸⁾。これらの品種は、収量や品質の低下を招く病害虫であるジャガイモシストセンチュウやウイルス病、疫病などに弱いため、防除対策の一つとして抵抗性品種の育成が望まれる。

これまで育種現場における抵抗性検定は、対象病害虫発生圃場や無防除圃場で実際に栽培して判定していた。このため、検定圃場は制限され、一度に検定できる数が限られる上、判定までに約3~4ヶ月の期間を要するなど問題があった。従来の検定法による選抜方法では、多大な労力と時間を必要とする上、栽培期間中の温度や降水量等様々な環境要因に左右されるため、検定精度は高くない。さらに、検定圃場から周囲の作物に病害虫が拡大する危険性も伴うため、これらのリスク

を回避し、短期間で検定が可能なDNAマーカーによる検定法⁹⁾¹³⁾の適用が望まれる。

DNAマーカーは、系統間における塩基配列の違いを利用したDNAの目印であり、医療をはじめ様々な分野で活用されている。農業分野においては、系統および品種特異的なDNAマーカーが開発され、品種保護や農産物検査を目的とした品種判別も積極的に行われてきている¹⁰⁾²³⁾。DNAマーカーを利用した病害虫抵抗性検定法は、周囲の環境条件等に左右されることなく、常に安定した結果が得られるという利点がある。また、DNAマーカーによる検定は、2日間程度で結果が判り、検定に要する所要時間が大幅に短縮される。育種の早期世代でDNAマーカー検定を行うことで、これまで以上に多くの個体を取り扱うことが可能となり、効率的な新品種育成が可能となる。

本報は、バレイショにおけるDNAマーカーを利用した検定法の開発を目的に、分子遺伝学的手法を用い、病害虫抵抗性遺伝子に連鎖するDNAマーカーの開発および病害虫抵抗性遺伝子を検出するDNAマーカーの利用についての研究をとりまとめたものである。

2. DNAマーカーを利用したジャガイモXウイルス抵抗性検定法の開発

1) 緒言

ジャガイモXウイルス (*potato virus X*: PVX) はジャガイモYウイルス (*potato virus Y*: PVY) との重複感染によりバレイショに激しいモザイク症状を呈し収量を低下させる³²⁾⁴¹⁾。しかし、PVX

の単独感染株は、病徴が不明瞭であるため⁴¹⁾病株の抜き取りが困難であり、PVXの種いも伝搬が問題となる。このため、抵抗性品種の育成が望まれる。

PVX抵抗性検定は、ガラス室等で栽培した検定

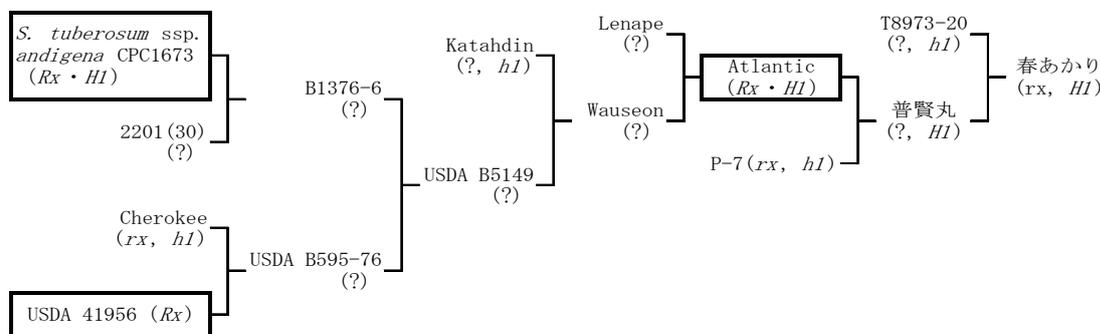


図1 「Atlantic」「普賢丸」「春あかり」の系譜
 注) Rx: ジャガイモXウイルス抵抗性遺伝子を持つ品種・系統
 HI: ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子を持つ品種・系統
 rx: ジャガイモXウイルス抵抗性遺伝子を持たない品種・系統
 hI: ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子を持たない品種・系統
 ?: 遺伝子の有無が不明な品種・系統

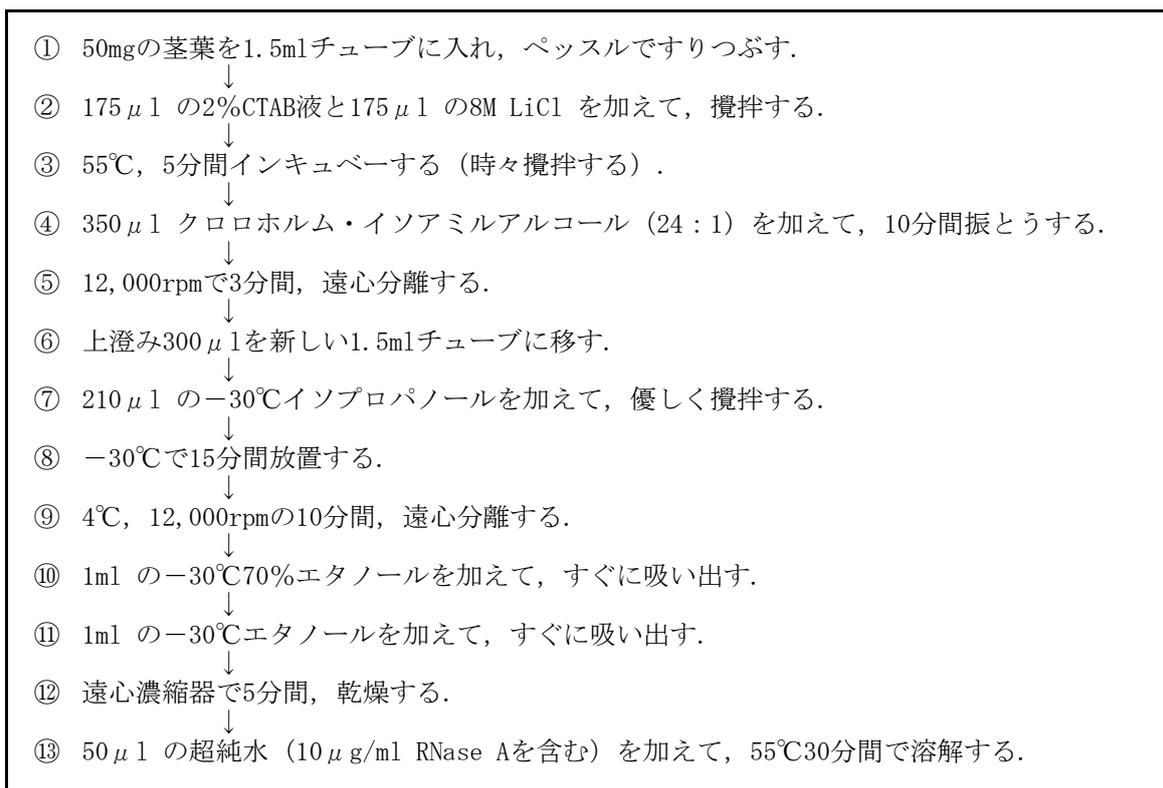


図2 CTAB-LiCl法によるバレイショ茎葉からのDNA抽出手順（Su1らの方法を改変）

植物体にウイルスを接種し、種いもによる伝搬の有無や次作での茎葉のウイルス感染の有無をエライザ等の検定によって識別する方法が用いられている³⁵⁾。PVXは汁液の他、人や管理機等によって接触伝搬するため³²⁾、隔離温室での栽培が必要となり、結果を得るまでに多くの労力と時間を要する。

PVX 抵抗性遺伝子として、①USDA 41956 由来の *Rx*、②*Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC1673 由来の *Rx1*、③*S. acule*由来の *Rx2*などがあり⁷⁾、*Rx1*、*Rx2* 遺伝子は既に単離されている⁴⁵⁾。西南暖地向け品種育成に中間母本として使われている加工用品種「アトランチック」は、PVX に抵抗性を示すことが知られており¹²⁾⁵⁰⁾、系譜から *Rx*、*Rx1* 遺伝子のいずれかが導入されている⁷⁾（図1）。

本章では、*Rx1* 遺伝子に特異的なプライマーを作成し、これを用いて「アトランチック」のF₁集団を使ったバルク法²⁰⁾とPCR-RFLP分析¹⁾により抵抗性遺伝子に特異的なCAPS マーカー¹⁷⁾バンドを検出後、このマーカーバンドの塩基配列を決定し、PVX 抵抗性を検定できる有効な STS マーカーを得たので報告する。

2) 材料および方法

(1) 材料

「アトランチック」とPVX罹病性品種「Desiree」のF₁集団（交配組み合わせ番号「01-17」）を作成し、DNA マーカー探索に供試した。また、44品種・系統の抵抗性とDNA マーカーの有無との関係を調査した。

(2) 接種検定

「01-17」集団にはPVX-o（普通系統）を、44品種・系統にはPVX-oとPVX-b（強系統）を接種した。カーボランダム法により植付け後6週目から1週間おきに3回接種した。接種株から得られた塊茎すべてについて、全RNAを抽出し、RT-PCR法³⁶⁾によりウイルス感染の有無を判定した。1反復あたり1~3株を調査し、1~4反復実施した。PVX-oは（独）種苗管理センター雲仙農場保持系統を、PVX-bは（独）種苗管理センター中央農場保持系統を用いた。

(3) DNAの抽出

バレイショからのDNA抽出は、若い上位葉を用いて、CTAB-LiCl法（Su1ら³⁹⁾の方法を改変）により行った（図2）。

表1 ジャガイモXウイルス抵抗性に特異的なDNAマーカー開発に供試したプライマー配列

プライマー名	塩基配列 (5' → 3')	アニーリング温度 (°C)
Rx1-S6	GAGGATGAACAGATTTCTGT	50
Rx1-A2	CTCAGAACACCTTAACACTCG	50
Rx1-A6	CAATAAGAGCTAGTGTGGTT	50
RxSP-S3	ATCTTGGTTTGAATACATGG	58
RxSP-A2	CACAATATTGGAAGGATTCA	58

表2 adx3領域のPCR-RFLP分析に用いた制限酵素と消化温度

制限酵素名	消化温度
<i>Alu I</i> , <i>Eco R I</i> , <i>Hae III</i> , <i>Hha I</i> , <i>HindIII</i> , <i>Hinf I</i> , <i>Msp I</i> , <i>Rsa I</i> , <i>Pst I</i> , <i>Sty I</i>	37°C
<i>Taq I</i>	65°C

注) 消化時間: 2時間

(4) *Rx1* 遺伝子領域特異的なプライマーの作成

「アトランチック」のPVX抵抗性遺伝子に特異的な領域を解析するために、*Rx1* 遺伝子の塩基配列情報⁴⁾を基に*Rx1* 遺伝子領域の一部 (adx3 領域)を増幅するためのプライマーセット (Rx1-S6・Rx1-A2)を作成した(図3, 表1)。

(5) バルク法によるPCR-RFLP分析

抵抗性個体 10 個体および罹病性個体 10 個体から抽出したDNAをそれぞれ等量ずつ混ぜて抵抗性混合DNA試料および罹病性混合DNA試料とし、これによりプライマーセット (Rx1-S6・Rx1-A2)で増幅されたPCR産物 (adx3 領域)を11種類の制限酵素(表2)で消化し、その電気泳動パターンを比較した。PCR反応液組成は、10 μl 反応液中、10ng 鋳型DNA, 各 0.5 μM プライマー, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 各 100 μM dNTPs, 0.25units *Taq* DNA polymerase (*TaKaRa Taq*TM, タカラバイオ)とした。PCR反応は、初め94°Cで3分間の熱変性を行い、次いで94°Cで30秒間の熱変性, 50°Cで30秒間のアニーリング, 72°Cで75秒間の伸長反応を35サイクル行って増幅し、最後に72°Cで5分間の反応を行った。PCR産物および制限酵素消化産物は、TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH8.0)の2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色した。

(6) PVX抵抗性に特異的なSTSマーカーの開発

PCR-RFLP分析で検出されたCAPSマーカーをSTSマーカーに変換するため、「アトランチック」

または「アトランチック」由来二倍性半数体「A37」⁴²⁾を使って抵抗性に特異的なプライマーを作成した。上流プライマーは、*Rx1* 遺伝子の塩基配列を基に作成したプライマーセット (Rx1-S6・Rx1-A6)で増幅されるCAPSマーカー領域の一部を含む「アトランチック」のバンドをアガロースゲルで分離後、ゲルから切り出し、これをTAクローニング後、抵抗性に特異的な断片と非特異的な断片の塩基配列を決定・比較することで作成した(図3)。下流プライマーは、検出したCAPSマーカーをアガロースゲルで分離後、抵抗性に特異的なバンドと非特異的なバンドをゲルから切り出し、塩基配列を決定・比較することで作成した。アガロースゲルからの切り出しはQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)、クローニングはTOPO TA Cloning[®] Kit (インビトロジェン)、シーケンシング反応はBigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ)、塩基配列はABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ)を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、GENETYX Ver.4 software (ゼネティックス)を使って比較し、抵抗性に特異的なプライマーを作成した。

「01-17」集団および品種・系統を使ったSTSマーカーの有無を調査し、接種検定との相関を調査した。STSマーカーのPCR反応液組成と電気泳動はPCR-RFLP分析と同様に行った。PCR反応は、アニーリング温度を58°Cとし、その他の条件は、PCR-RFLP分析と同様に行った。

3) 結果および考察

(1) F₁ 集団の抵抗性評価

「01-17」集団 77 個体について、PVX-o を接種し、接種株の塊茎への感染の有無を調査した結果、抵抗性は 38 個体で残る 39 個体は罹病性であった (表 3)。これは、PVX 抵抗性遺伝子を *R* とした場合、遺伝子型で *Rrrr* × *rrrr* に適合する遺伝的分離比を示し (期待値 1:1, $\chi^2=0.01$, 有意水準 5%), 「アトランチック」の PVX 抵抗性が単一優勢遺伝子 (*Rrrr*) に支配されていることが判明した。

(2) PVX 抵抗性に特異的な CAPS マーカーの検出と評価

バルク法による PCR-RFLP 分析で、*adx3* 領域を制限酵素 *Hae*III ないし *Taq*I で消化すると、抵抗性混合 DNA 試料に特異的な DNA マーカーバンド (CAPS マーカーバンド) *adx3-Hae*III, および *adx3-Taq*I が検出された (図 3)。他の 9 種類の制限酵素では抵抗性混合 DNA 試料に特異的な DNA マーカーバンドが検出されなかった。

混合 DNA 試料に用いた抵抗性 10 個体および罹病性 10 個体について、CAPS マーカーは、抵抗性 10 個体で検出され、罹病性 10 個体では検出されなかった (図 4)。このことから、*RxI* 遺伝子領域から作成されたプライマーを用いて PCR-RFLP 分析を行うと、「アトランチック」の PVX 抵抗性に特異的な DNA 領域をマーカーバンドとして検出することができた。

(3) CAPS マーカーの STS マーカー化

PVX 抵抗性に特異的な SCAR マーカーを検出する下流プライマーを作成するため、「アトランチック」由来 PVX 抵抗性二倍性半数体「A37」(遺伝子型 *Rr*) からプライマーセット (*Rx1-S6*・*Rx1-A2*) のプライマーを用いて PCR 増幅後、制限酵素 *Taq*I で消化すると 1 本の *R* に特異的なバンド (約 400bp : *adx3-Taq*I), *Hae*III で消化すると 2 本の *R* に特異的なバンド (約 1,500bp と約 450bp : これらを *adx3-Hae*III) とともに *r* に相当する DNA バンドを検出できた。そこで、それぞれの DNA バンドの塩基配列を比較し、*R* 遺伝子に特異的な下流プライマー (*RxSP-A2*) を作成した (図 3, 表 1)。

次に、「アトランチック」から *RxI* 遺伝子の塩基配列を基に作成したプライマーセット (*Rx1-S6*・*Rx1-A6*) を用いて、*adx3-Hae*III を含む広領域を PCR 増幅し、増幅バンドを TA クローニングによりクローン化した。*Hae*III で消化されるクローン (*R*) と消化されないクローン (*r*) の塩基配列を比較し *R* 遺伝子に特異的な上流プライマー (*RxSP-S3*) を作成した (図 3, 表 1)。

(4) STS マーカーの評価

「01-17」集団 77 個体について、プライマーセット (*RxSP-S3*・*RxSP-A2*) を用いて検出される約 1,230bp の STS マーカーバンド (*Rx-1230*) は、抵抗性 38 個体中 37 個体で検出され、罹病性 39 個体では検出されなかった (図 5, 表 3)。組換え価

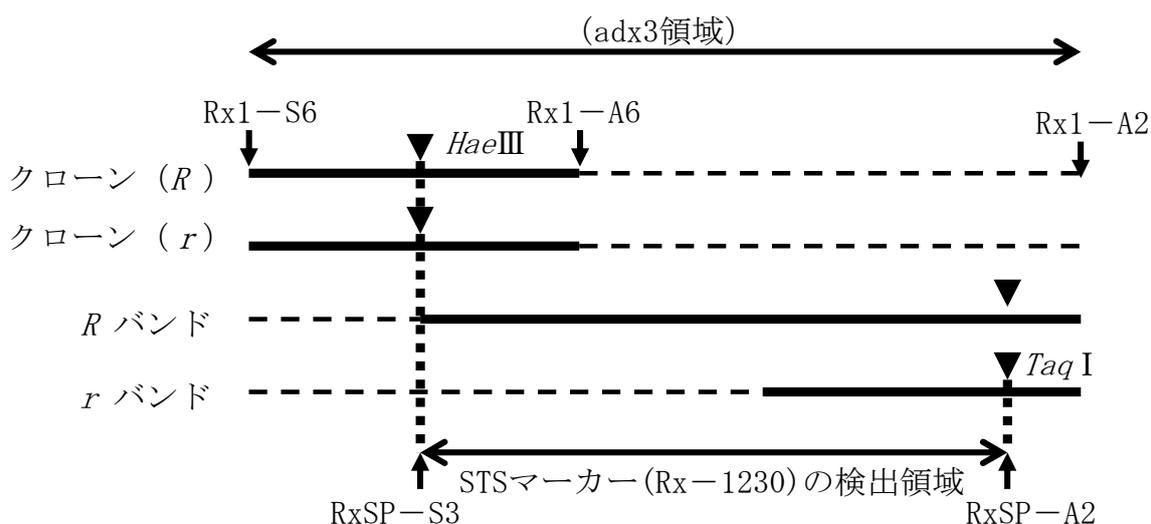


図3 ジャガイモXウイルス抵抗性に特異的な領域 (*adx3*) の塩基配列比較箇所と制限酵素認識部位およびプライマー位置
注) ▼ : 制限酵素認識部位, ↓・↑ : プライマー位置

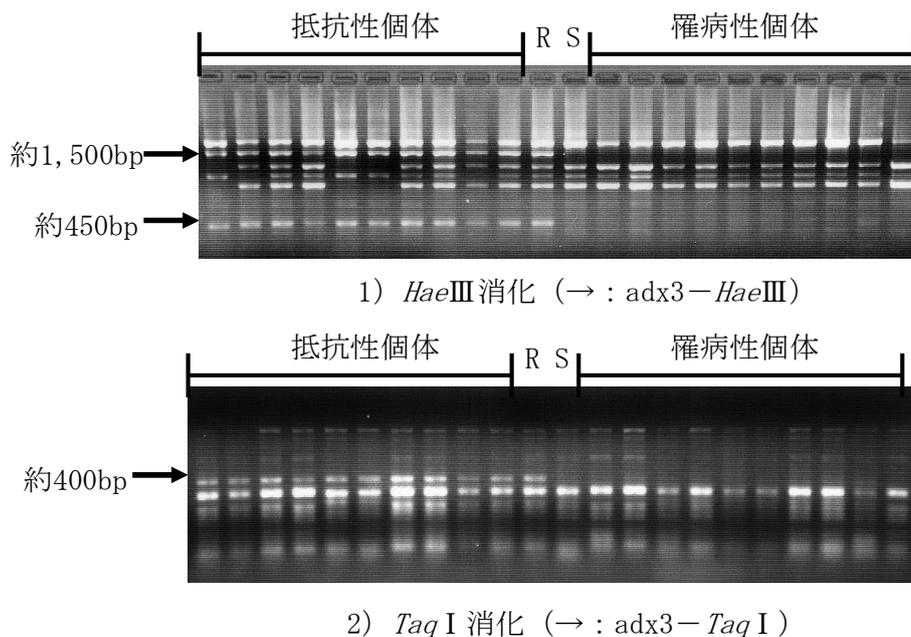


図4 「01-17」 集団のジャガイモXウイルス抵抗性および罹病性混合DNA試料とバルク集団の個々のPCR-RFLP分析
 注) R : 抵抗性混合DNA試料, S : 罹病性混合DNA試料
 → : 検出されたCAPSマーカー

表3 「01-17」 集団 (アトランチック×Desiree) のジャガイモXウイルス (PVX-o) 抵抗性とSTSマーカー (Rx-1230) の有無

マーカー検定	PVX-o接種検定		計
	抵抗性	罹病性	
Rx-1230有	37	0	37
Rx-1230無	1	39	40
計	38	39	77

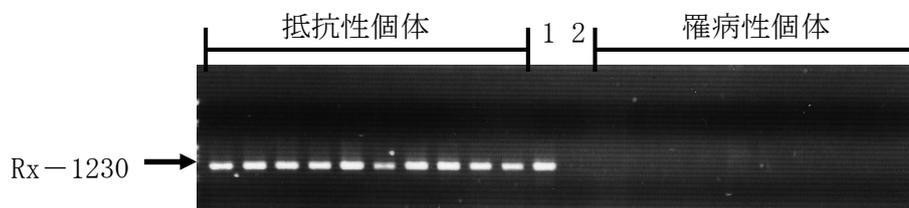


図5 「01-17」 集団20個体のジャガイモXウイルス抵抗性に特異的なSTSマーカー (Rx-1230) の検出
 注) 1. アトランチック, 2. : Desiree
 Rx-1230 : プライマーセット (RxSP-S3・RxSP-A2) で検出されるSTSマーカー (約1,230bp)

表4 バレイシヨ44品種・系統のジャガイモXウイルス (PVX-o, PVX-b) に
対する抵抗性とSTSマーカー (Rx-1230) の有無

抵抗性の有無 ¹⁾²⁾	Rx-1230の有無 ³⁾	品種・系統名					
抵抗性	あり	アイユタカ 北海88号	アトランチック Multa	金時薯 Saco	さやか I-822	とうや	長系108号
罹病性	なし	アイノアカ コナフブキ 農林1号 長系111号	アンデス赤 スタークイーン 春あかり 長系113号	インカゴールド インカパープル タチバナ メークイン 長系117号	エニワ 男爵薯 西海30号	エニワ デジマ 長系65号	ケネベック ニシユタカ 長系101号

注) 1) 抵抗性 (PVX-o, PVX-b検出なし), 罹病性 (PVX-o, PVX-bの両方またはいずれかを検出)
2) Rx-1230: プライマーセット (RxSP-S3・RxSP-A2) で増幅されるSTSマーカー
3) PVX-o, PVX-bを別々に接種し, 接種株の塊茎からRT-PCR法によりウイルスを検出

は1.3%であった。また、Rx-1230は77個体のうち37個体で検出, 40個体で検出されなかった(図5, 表3)ことから, PVX抵抗性遺伝子をRとした場合, 遺伝子型でRrrr×rrrrに適合する遺伝的分離比を示し(期待値1:1, $\chi^2=0.12$, 有意水準5%), 「アトランチック」のRx-1230が単一優性遺伝していることが判明した。

バレイシヨ44品種・系統のPVX-oおよびPVX-bに対する抵抗性とRx-1230の有無を調査した。「アイユタカ」「アトランチック」「金時薯」「長系108号」「さやか」「とうや」「北海88号」「I-822」

「Multa」「Saco」の10品種・系統は抵抗性を示すRx-1230が検出され, 残り30品種・系統からは検出されなかった。また, 上記10品種・系統は, PVX-o, PVX-bの接種検定で得られた塊茎すべてからPVX両系統ともに検出されず, 抵抗性(免疫性)を示した(表4)。

このことから, 上記10品種・系統を交配母本としてPVX抵抗性品種を育成する際, 開発したSTSマーカー(Rx-1230)は有効な抵抗性検定法となり得ると考えられた。

3. DNAマーカーを利用したジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定法の開発

1) 緒言

ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*: PCN) は, バレイシヨの重要害虫である。PCNが寄生したバレイシヨは, 養分吸収が阻害され, 下葉が黄化してしおれ, 収量や品質が低下する。PCNは, 土中では卵を内蔵したシストを形成し10年以上の長期間生存が可能のため, 汚染圃場での撲滅は困難となっている⁴³⁾。このため, 抵抗性品種の育成が進められている。

育種現場において, 育成系統のPCN抵抗性検定として汚染圃場等で栽培しバレイシヨの根への寄生の有無によって判別する方法²⁶⁾が行われているが, 結果を得るまでに約3~4ヶ月の期間と, 多くの労力を要する。また, 汚染圃場での検定は気象条件やシストの密度によって影響されるため, 検

定精度は高くない。また, 人や車による周辺圃場や他の地域への汚染拡大を防ぐ必要がある。

PCN抵抗性遺伝子として, *S. tuberosum* ssp. *andigena* CPC1673由来のHI遺伝子があり, 第5番染色体上に座乗していることが明らかとなっている¹¹⁾³³⁾。また, Bakkerら²⁾は, HI遺伝子近傍のAFLP⁴⁶⁾マーカーを特定している。西南暖地向け品種育成に中間母本として使われている加工用品種「アトランチック」は, PCN遺伝子を持っており³³⁾, 系譜からCPC1673由来のHI遺伝子が導入されている(図1)。「アトランチック」由来のHI遺伝子を持つ品種としては, 「普賢丸」²⁴⁾, 「春あかり」²⁷⁾が知られており, 今後育成される品種はHI遺伝子の導入が必須となっている。

「アトランチック」のHI遺伝子に連鎖する

表5 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性に特異的なDNA
マーカー開発に供試したプライマー配列

プライマー名	塩基配列 (5' → 3')	アニーリング 温度 (°C)
CM1+A	GAGCTCAGAA	35
CM1+G	GAGCTCAGAG	35
CM1+C	GAGCTCAGAC	35
CM1+T	GAGCTCAGAT	35
H1SP-S1	ATGGTGAGTTCCTTTCCT	60~66
H1SP-A1	TCGACGGCAAATGGGG	60~66
OPB-03	CATCCCCCTG	35
H1SP-S2	GAGCTCAGAGGTGAAAAATA	58
H1SP-A5	CATCCCCCTGCATATAAAG	58
H1SP-S4	AACACCAATCAACAAAGTAC	64
H1SP-A6	GGAACAATGTTGAATGCAAG	64

CP113 遺伝子²⁹⁾を利用して PCN 抵抗性を判別する DNA マーカー⁴²⁾が開発されているが, *HI* 遺伝子を持たない幾つかの品種でこの CP113 由来のマーカーバンド (H1-CP113) が検出され, 適用できる品種に制限があった³¹⁾⁴²⁾.

本章では, *HI* 遺伝子に強く連鎖する AFLP マーカーから特定の RAPD プライマーを作成し, これを用いて「アトランチック」の二倍性半数体集団を使ったバルク法と RAPD 分析⁵¹⁾により抵抗性遺伝子に特異的なマーカーバンドを検出後, このマーカーバンドの塩基配列を決定し, 適用品種に制限の少ない PCN 抵抗性を検定できる有効な STS マーカーを得たので報告する.

2) 材料および方法

(1) 材料

四倍体品種「アトランチック」由来の二倍性半数体集団⁴²⁾を DNA マーカー探索に供試した. また, PCN 発生圃場で抵抗性検定済みの抵抗性系統「西海 30 号」と抵抗性品種「サクラフブキ」の F₁ 集団 (愛野馬鈴薯支場 (現: 農産園芸研究部門・馬鈴薯研究室) より分譲) および 51 品種について DNA マーカーの有無を調査した.

(2) DNA の抽出

バレイショからの DNA 抽出は, 若い上位葉を用いて, CTAB-LiCl 法 (Sui ら³⁹⁾ の方法を改変) により行った (図 2).

(3) バルク法による RAPD 分析

HI 遺伝子に強く連鎖する AFLP マーカー²⁾の *Sac* I selective プライマー (*Sac* I-AGA) の塩基配列を基に 10 塩基のプライマー 4 種類 (CM1+A, CM1+G, CM1+C, CM1+T) を作成した (表 5). 「アトランチック」の二倍性半数体の抵抗性個体 10 個体

および感受性個体 10 個体から抽出した DNA をそれぞれ等量ずつ混ぜて抵抗性混合 DNA 試料および感受性混合 DNA 試料とし, 作成したプライマーと 10 塩基のランダムプライマーの組合せで RAPD 分析を行った. RAPD 分析の PCR 反応液組成は, 10 μ l 反応液中, 5ng 鋳型 DNA, 各 0.5 μ M プライマー, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 各 100 μ M dNTPs, 0.25units *Taq* DNA polymerase (*TakaRa Taq*TM, タカラバイオ) とした. PCR 反応は, 初め 94°C で 3 分間の熱変性を行い, 次いで 94°C で 30 秒間の熱変性, 35°C で 30 秒間のアニーリング, 72°C で 1 分間の伸長反応を 45 サイクル行って増幅し, 最後に 72°C で 5 分間の反応を行った. PCR 産物は, TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH8.0) の 1.4% アガロースゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイド溶液で染色した.

(4) PCN 抵抗性に特異的な STS マーカーの開発

検出された RAPD マーカーを STS マーカーに変換するため, 抵抗性混合 DNA 試料を使って *HI* 遺伝子に特異的なプライマーを作成した. RAPD マーカーバンドをアガロースゲルで分離後, 目的のバンドをゲルから切り出し, TA クローニングを行った. その塩基配列はシーケンス反応後, 塩基配列を決定し, バンドの両端を挟み込むプライマーセットを作成した. 次に, 感受性混合 DNA 試料をバンドの両端を挟み込むプライマーセットで増幅後, 増幅バンドを RAPD マーカーバンドと同様に塩基配列を決定し, RAPD マーカーバンドの塩基配列と比較した. アガロースゲルからの切り出し, クローニング, シークエンス反応, 塩基配列の決定と解析は第 2 章 2) (6) と同様に実施した.

「アトランチック」由来二倍性半数体集団, 「西

海 30 号」と「サクラフブキ」の F₁ 集団および品種を使った STS マーカーの有無を調査した。STS マーカーの PCR 反応液組成は、各 0.5 μM プライマーセット以外は本章 2) (3) の RAPD 分析と同様に実施した。PCR 反応は、初め 94°C で 3 分間の熱変性を行い、次いで 94°C で 30 秒間の熱変性、64°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応を 35 サイクル行って増幅し、最後に 72°C で 5 分間の反応を行った。PCR 産物は、TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH8.0) の 1.4% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色した。

また、田中・小村⁴⁰⁾の「アトランチック」の *H1* 遺伝子に連鎖する CP113 遺伝子を利用して開発した PCN 抵抗性を判別する DNA マーカーと新たに開発した STS マーカーとの検出結果を比較した。PCR 反応液組成は、10 μl 反応液中、25ng 鋳型 DNA、4 μM H1SP-S1 プライマー、4 μM H1SP-A1 プライマー、1xExpand HF buffer、2mM MgCl₂、各 200 μM dNTPs、0.49units Enzyme mix、high fidelity (Expand High Fidelity PCR System、ロシュ・ダイアグノスティック) とした。PCR 反応は、初め 94°C で 9 分間の熱変性を行い、次いで 94°C で 30 秒間の熱変性、66°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応を 2 サイクル、64.5°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応を 2 サイクル、63.0°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応を 2 サイクル、61.5°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応を 2 サイクル、60.0°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応を 2 サイクル、62.0°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 1 分間の伸長反応を 25 サイクル行って増幅し、最後に 72°C で 8 分間の反応を行った。PCR 産物は、TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH8.0) の 0.8% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色した。

3) 結果および考察

(1) PCN 抵抗性に特異的な RAPD マーカーの検出と評価

作成したプライマー 1 種類あたり 10 塩基のランダムプライマー 37 種類の組合せの計 148 組合せでバルク法による RAPD 分析を行った。CM1+G と OPB-03 の組合せにおいて、抵抗性混合 DNA 試料に特

異的な約 490bp の DNA マーカーバンド (RAPD マーカーバンド) GB03-490 が検出された (図 6)。

混合 DNA 試料に用いた抵抗性 10 個体および罹病性 10 個体について、GB03-490 は、抵抗性 10 個体、罹病性 1 個体で検出され、罹病性 9 個体では検出されなかった (図 7)。このことから、プライマーセット (CM1+G・OPB-03) で検出される RAPD マーカーバンド (GB03-490) は PCN 抵抗性遺伝子に特異的なマーカーバンドであることが分かった。

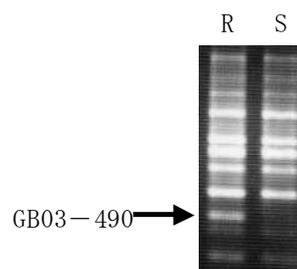


図 6 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性個体に特異的な RAPD マーカーの検出
注) GB03-490: プライマーセット (CM1+G, OPB-03) で検出された抵抗性個体に特異的な DNA マーカーバンド (約 490bp)
R: 二倍性半数体の抵抗性混合 DNA 試料
S: 二倍性半数体の罹病性混合 DNA 試料

2) RAPD マーカーの STS マーカー化

得られた RAPD マーカーを STS マーカー化するために、GB03-490 の塩基配列から、両端を挟み込むようにプライマーセット (H1SP-S2・H1SP-A5) を作成した (表 5)。プライマーセット (H1SP-S2・H1SP-A5) は抵抗性混合 DNA 試料と感受性混合 DNA 試料で同じ長さの増幅バンドを検出した (図 8)。次に、感受性混合 DNA 試料の増幅バンドの塩基配列と GB03-490 の塩基配列と比較し、PCN 抵抗性に特異的なプライマーセット (H1SP-S4・H1SP-A6) を作成した (図 8, 表 5)。

(3) STS マーカーの評価

「アトランチック」由来二倍性半数体 27 個体について、プライマーセット (H1SP-S4・H1SP-A6) を用いて検出される約 320pb の PCR バンド (H1-320) は、抵抗性 12 個体すべてと、感受性 15 個体中 2 個体で検出され、組換え率は 7.4%であった (図 9, 表 6)。

「西海 30 号」と「サクラフブキ」の F₁ 集団 29 個体について、H1-320 は、抵抗性 22 個体中 18 個体、感受性 7 個体 1 個体で検出され、組換え率は

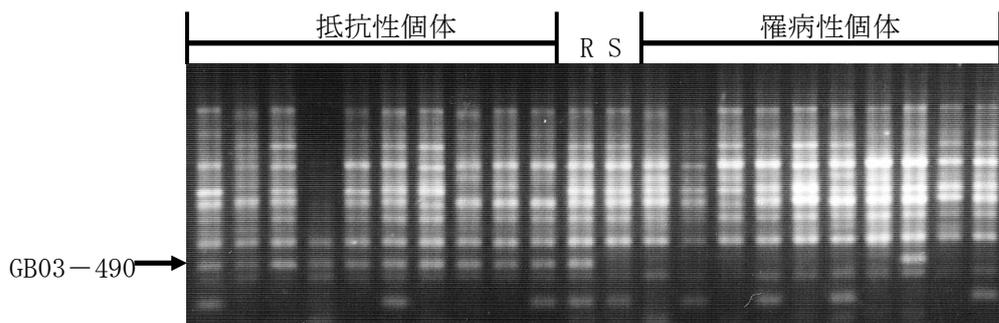


図7 「アトランチック」由来二倍性半数体におけるジャガイモシストセンチュウ抵抗性および感受性混合DNA試料とバルク集団の個々のRAPD分析

注) R：抵抗性混合DNA試料，S：感受性混合DNA試料

GB03-490：プライマーセット（CM1+G・OPB-03）で検出される抵抗性個体に特異的なRAPDマーカースバンド（約490bp）

表6 「アトランチック」由来二倍性半数体集団のジャガイモシストセンチュウ抵抗性とSTSマーカ－（H1-320）の有無

マーカ－検定	PCN接種検定		計
	抵抗性	罹病性	
H1-320有	12	2	14
H1-320無	0	13	13
計	12	15	27

表7 F₁集団（「西海30号×サクラフブキ」）のジャガイモシストセンチュウ抵抗性とSTSマーカ－（H1-320）の有無

マーカ－検定	PCN接種検定		計
	抵抗性	罹病性	
H1-320有	18	1	19
H1-320無	4	6	10
計	22	7	29

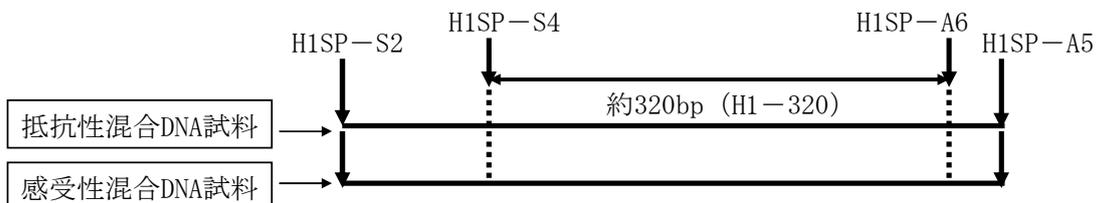


図8 プライマーセット（H1SP-S2・H1SP-A5）で検出される「アトランチック」由来二倍性半数体の抵抗性および感受性混合DNA試料の領域とプライマー位置

注) H1-320：プライマーセット（H1SP-S4・H1SP-A6）で検出されるSTSマーカ－領域

↓：プライマー位置

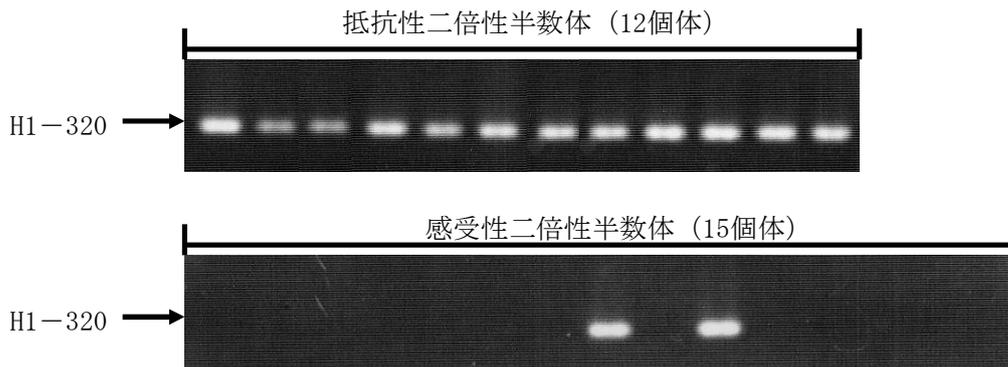


図9 「アトランチック」由来二倍性半数体27個体のジャガイモシストセンチュウ抵抗性に特異的なSTSマーカー (H1-320) の検出
 注) H1-320 : プライマーセット (H1SP-S4・H1SP-A6) で検出されるSTSマーカー (約320bp)

表8 バレイシヨ51品種のジャガイモシストセンチュウ抵抗性とSTSマーカー (H1-320, H1-CP113) の有無

	H1-320 の有無	H1-CP113 の有無	品 種 名						
抵抗性 品種	あり	あり	アーリースターチ	アイユタカ	アトランチック	ベニアカリ	エゾアカリ	普賢丸	
			花標津	春あかり	キタアカリ	ムサマル	サクラフブキ	さやか	
			スタークイーン	とうや	十勝こがね	トヨアカリ			
			ワセシロ						
感受性 品種	なし	あり	紅丸	ビホロ	チヂワ	ホッカイコガネ	インカのめざめ	コナフブキ	
			メイホウ	ニセコ	シマバラ	シレットコ	トヨシロ		
		なし	アイノアカ	チトセ	男爵薯	デジマ	エニワ	ホッカイアカ	
			ハツフブキ	インカパープル	インカレッド	ケネベック	金時薯	メークイン	
			ニシユタカ	アンデス赤	農林1号	オオジロ	リシリ	セトユタカ	
			タチバナ	タルマエ	ウンゼン	ユキジロ	ユキラシャ		

注) H1-320 : プライマーセット (H1SP-S4・H1SP-A6) で増幅されるSTSマーカー
 H1-CP113 : プライマーセット (H1SP-S1・H1SP-A1) で増幅されるSTSマーカー

17.2%であった (表7)。また、H1-320は29個体のうち19個体で検出、10個体で検出されなかったことから、「西海30号」「サクラフブキ」²⁵⁾はともにPCN抵抗性であり、HI遺伝子をHとした場合、遺伝子型で $Hhhh \times Hhhh$ に適合する遺伝的分離比を示し (期待値 3:1, $\chi^2=1.43$, 有意水準 5%)、「西海30号」や「サクラフブキ」はH1-320を単式に持っていることを確認した。

バレイシヨ51品種におけるH1-320は、抵抗性16品種すべてと、感受性品種35品種中1品種で検出された。一方、H1-CP113は、抵抗性16品種

すべてと、感受性品種35品種中12品種で検出された。PCN感受性でありながらH1-CP113が検出される12品種中11品種でH1-320は検出されず、感受性品種「ワセシロ」でH1-320が検出された (表8)。

このことから、H1-CP113で判別不能であった感受性品種またはPCN抵抗性を持つ品種との雑種からPCN抵抗性品種を育成する際、開発したSTSマーカーH1-320は有力な抵抗性検定法となり得ると考えられた。

4. DNA マーカーを利用したジャガイモ疫病抵抗性検定法の開発

ジャガイモ疫病 (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) は、世界のバレイショ栽培における重要病害である。疫病は冷涼で多湿な気象条件下で発生し、減収やイモの腐敗などの被害をもたらす²¹⁾。長崎県をはじめとする西南暖地では、春作において疫病による被害が問題となりやすい。疫病は一旦発生すると進展を抑えることが困難なため、降雨の多い本県では予防を目的として1作あたり2~3回の農薬散布が行われており、バレイショ栽培における農薬散布の大半を占める。減農薬栽培や環境保全型農業の推進、薬剤費節減のためには、疫病抵抗性品種が必要である。

育種現場において、無防除栽培圃場等での検定は、結果を得るまでに3~4ヶ月かかり、多くの労力を要する。また、気象条件や発生する疫病菌raceによって影響され、検定精度が高くない。切りとった葉に接種する室内検定法もあるが、スペースが限られるため、検定数に限界がある。

近縁野生種には抵抗性のものが多数見いだされている。このうち、*S. demissum* では、抵抗性遺伝子 *RI* ~ *RII* が見出されており、これを母本として育成した品種には種々の組合せの *R* 遺伝子を持つものが出ている¹⁵⁾。この抵抗性は疫病菌の特定の race に対し特異的な抵抗性を示し、真性抵抗性と呼ばれる。*R* 遺伝子は優性で独立に遺伝する。一方、疫病菌 race の方も次々と分化して *rece* 1, 2, 3, 4 をはじめ種々の病原性のものが見出されている。これら疫病菌 race と抵抗性遺伝子の対応関係は、Black ら⁶⁾による国際命名法が一般的に使

われている。

R 遺伝子による抵抗性は極めて強力であるが、一旦対応する race が発生するとひどく罹病するものがあり、不安定な要素がある。そこで、近年は再び圃場抵抗性に着目した育種が始められている。疫病圃場抵抗性は複数の遺伝子に支配されるものといわれ、どの疫病菌 race にも同様の抵抗性を示し、罹病するものの程度が軽く、育種によりかなり強力なものにすることができる。

圃場抵抗性を正確に評価するためには、真性抵抗性遺伝子を把握することが重要である。しかしながら、真性抵抗性遺伝子型の判別に必要な疫病菌 race が保存されていないため、個体が持っている遺伝子型をほとんど判別することができない。よって、疫病抵抗性育種を効率的に行うためには、どの真性抵抗性遺伝子を持っているかを判別する DNA マーカーが必要となる。

本章では、疫病抵抗性遺伝子そのものを検出する DNA マーカーの利用法および連鎖した DNA マーカーの開発を行い、効率的な疫病抵抗性検定法を開発したので報告する。

1) DNA マーカーを利用した疫病真性抵抗性遺伝子 *RI* の検出

(1) 緒言

S. demissum 由来ジャガイモ疫病真性抵抗性遺伝子 *RI* は、第5番染色体上に座していることが明らかとなっており¹⁸⁾、すでに単離されている³⁾。

本節では、疫病抵抗性遺伝子 *RI* を検出する DNA マーカー³⁾を使い、品種・系統の *RI* 遺伝子の有無

表9 ジャガイモ疫病真性抵抗性遺伝子の検出および抵抗性に特異的なDNAマーカー開発に供試したプライマー配列

プライマー名	塩基配列 (5' → 3')	アニーリング温度 (°C)
76-2sf2	CACTCGTGACATATCCTCACTA	65
76-2SR	CAACCCTGGCATGCCACG	65
E-AGC+A	GAATTCAGCA	35
E-AGC+G	GAATTCAGCG	35
E-AGC+C	GAATTCAGCC	35
E-AGC+T	GAATTCAGCT	35
R2SP-S1	GAATTCAGCGCCTAAGGG	62
R2SP-A1	TTTGCCCGGTGATAAAGGA	62
R2SP-A2	CTTGTGATGTAAAAATCCGA	62
R2SP-S7	TACTAACCTTTTCTTAGATG	57
R2SR-A9	AGAACTTTCTCACAGCTTTT	57

を調査し、race0 の接種検定との比較により、遺伝子型の推定を試みた。

(2) 材料および方法

7) 材料

83 品種・系統 (表 10) を race0 に対する接種検定と DNA マーカー検出に供試した。

1) 接種検定

ガラス室で栽培したバレイシヨの上位葉を採取した。一週間バレイシヨ塊茎切片上で培養した疫病菌 race0 (名古屋大学より分譲) の菌糸をかきとり、1ml 蒸留水に懸濁後、17°C で、1 時間培養した。1.1~2.3×10⁴ 個/ml に調整した遊走子懸濁液を 1 葉あたり 16~40 μl ずつ滴下接種し、2~7 回反復した。接種後 7 日後に遊走子のう形成の有無を調査し、遊走子のうが確認された割合を罹病率 (x) % とした。

2) DNA の抽出

バレイシヨからの DNA 抽出は、若い上位葉を用いて、CTAB-LiCl 法 (Sul ら³⁹⁾ の方法を改変により行った (図 2)。

3) PCR による *RI* 遺伝子の検出

Ballvora ら³⁾ の *S. demissum* 由来ジャガイモ疫病抵抗性遺伝子 *RI* を検出するプライマーセット (76-2sf2・76-2SR) を使い (表 9) *RI* 遺伝子の検出を試みた。PCR 反応液組成は、10 μl 反応液中、5ng 鋳型 DNA、0.5 μM 76-2sf2 プライマー、0.5 μM 76-2SR プライマー、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、2mM MgCl₂、各 100 μM dNTPs、0.25units *Taq* DNA polymerase (*TaKaRa Taq*TM, タカラバイオ)

とした。PCR 反応は、初め 94°C で 3 分間の熱変性を行い、次いで 94°C で 30 秒間の熱変性、65°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 75 秒間の伸長反応を 35 サイクル行って増幅し、最後に 72°C で 5 分間の反応を行った。PCR 産物は、TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH8.0) の 1.4% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色した。

(3) 結果および考察

疫病菌 race0 株の接種検定で、83 品種・系統のうち、52 品種・系統は罹病率 20% 以下、31 品種・系統は罹病率 20% 超であった (表 10)。

プライマーセット (76-2sf2・76-2SR) で検出される約 1,400bp の DNA マーカーバンド (R1-1400) は、83 品種・系統のうち、40 品種・系統で検出され、43 品種・系統で検出されなかった。罹病率 20% 以下の 52 品種・系統で R1-1400 が検出されたのは 38 品種・系統、検出されなかったのは 14 品種・系統、罹病率 20% 超の 31 品種・系統で R1-1400 が検出されたのは 2 品種、検出されなかったのは 29 品種・系統であった (表 10, 図 10)。

R1-1400 が検出された 40 品種・系統のうち、罹病率が 20% 以下の 38 品種・系統は *RI* 遺伝子を持つことが確認された。しかしながら、罹病率 20% 超の 2 品種は *RI* 遺伝子を検出したにもかかわらず罹病性を示した。R1-1400 が検出されなかった 43 品種・系統のうち、罹病率が 20% 以下の 14 品種・系統は、*RI* 遺伝子を持たないが他の抵抗性遺伝子を持つことが考えられた。また、罹病率 20% 超の

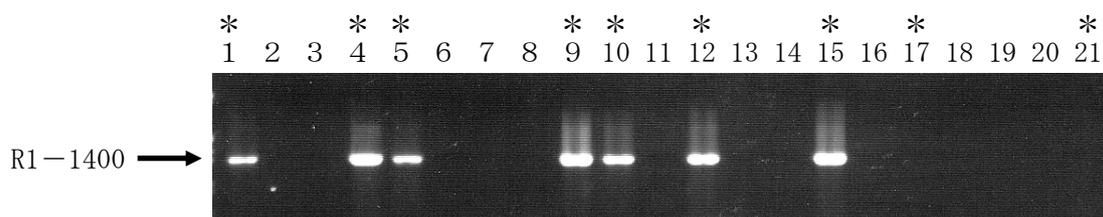


図10 品種・系統における疫病真性抵抗性遺伝子 *RI* (R1-1400) の検出

注) 1. サイズマーカー, 2. デジマ, 3. メークイン, 4. ニシユタカ, 5. アイユタカ, 6. アイノアカ, 17. 長系101号, 8. 長系111号, 9. 長系113号, 10. 普賢丸, 11. アトランチック, 12. Desiree, 13. 十勝こがね, 14. インカパープル, 15. スタークイン, 16. とうや, 17. 花標津, 18. ムサマル, 19. キタアカリ, 20. 農林1号, 21. アンデス赤, 22. W553-4

R1-1400 : プライマーセット (76-2sf・76-2SR) で検出されるDNAマーカーバンド (約1,400bp)

* : 疫病菌race0に抵抗性の品種・系統

表10 バレイシヨ83品種・系統の疫病菌 (race0) に対する罹病率とDNAマーカー (R1-1400) の有無

罹病率 (%) ¹⁾	R1-1400の有無 ²⁾		品種・系統名					
	あり	なし						
0 ≤ x ≤ 20	あり		アイノアカ さやあかね トヨアカリ 普賢丸 長系65号 Greta 98033-15	アイユタカ さやか トヨシロ ホッコイコガネ 長系109号 I-1039 98033-20	アトランチック シレットコ ナツフブキ ユキジロ 北育1号 I-853	エニワ スタールビー ノースチップ リシリ 北海56号 Pentland Dell	きたひめ デジマ ハツフブキ レッドムーン 北海82号 R392-50	ケネバック とうや ひかる 西海31号 Atzimba 98033-5
	なし		アーリースターチ ホッコイアカ Krasneufimsk	インカの星 マチルダ W553-4	金時薯 ヨウラク	根育4号 島系284号	サクラフブキ 85015-13	花標津 I-822
20 < x ≤ 100	あり		十勝こがね	ワセシロ				
	なし		アンデス赤 ニシユタカ 愛系88 長系94号 Desiree	インカゴールド 農林1号 愛系97 長系101号 Norchip	インカのめざめ ムサマル 西海22号 長系108号 P-7	インカパープル メークイン 西海24号 長系111号 V-2	キタアカリ 愛系30 西海25号 長系113号 WB88055-8	スタークイン 愛系77 西海35号 1512-c (16)

注) 1) 疫病菌03001株を含む水滴を葉裏に接種し、7日後に葉表の遊走子の有無を確認

2) R1-1400: プライマーセット (76-2sf2・76-2SR) で検出されるDNAマーカーバンド

29 品種・系統は *R1* 遺伝子並びにそれ以外の抵抗性遺伝子を持たないことが明らかとなった。

2) 疫病真性抵抗性遺伝子 *R2sto* 及び *R2adg1* に連鎖する DNA マーカーを利用した疫病抵抗性検定法の開発

(1) 緒言

わが国におけるジャガイモ疫病菌には、主に交配型と酵素多型、培養的性質の指標によって識別される6つの系統が存在する。1987年には交配型がA1型のUS-1系統とA2型のJP-1系統はほぼ同じ割合で分離されたが、その後1990年代前半にかけてA2型の割合が増加した。しかし、1996年に従来の系統とは異なる性質を持つ新しいA1型が分離され、以降その分布を広げて現在に至っている¹⁶⁾。

長崎県島原半島における2002年の調査では、新しいA1型の分離割合が66%を占め、その多くは主要な疫病防除薬剤のメタラキシル剤に耐性を示すrace1, 3, 4の疫病菌であり、これに抵抗性を示す*R2* 遺伝子を有する品種の育成が防除対策として有効である⁸⁾¹⁶⁾³⁷⁾。

真性抵抗性遺伝子として、*R2* 遺伝子は、*S. demissum*由来のものがあり、第4番染色体上に座乗していることが明らかとなっている¹⁹⁾。*S. demissum* の他、近縁野生種 *S. stoloniferum* においても *R2*, *R3*, *R4*, *R6* などの遺伝子の存在が明らかにされ¹⁵⁾ 育種上利用されており、「北海56号」に *S. stoloniferum* 由来の *R2* 遺伝子が導入

されている⁴⁵⁾。また、栽培種である *S. tuberosum* ssp. *andigena* の系統「W553-4」とそれに由来する品種「花標津」「さやあかね」は強い疫病抵抗性を持つ¹⁴⁾³⁸⁾。これらの品種・系統はメタラキシル耐性疫病菌 race1, 3, 4 株に対して抵抗性を示し西南暖地向け疫病抵抗性育種素材として有用である⁸⁾⁴⁰⁾。

本節では、*S. demissum* 由来の *R2* 遺伝子に強く連鎖する AFLP マーカーから特定の RAPD プライマーを作成し、これを用いて「北海56号」の *F*₁ 集団を使ったバルク法と RAPD 分析により抵抗性特異的なマーカーバンドを検出し、このマーカーバンドの塩基配列を決定後、*S. stoloniferum* および由来の疫病抵抗性を検定できる有効な DNA マーカーを開発したので報告する。また、さらに RAPD マーカーバンドの塩基配列から疫病抵抗性に特異的なプライマーを作成し、これを用いて「さやあかね」の *F*₁ 集団を使ったバルク法と PCR-RFLP 分析により抵抗性個体に特異的なマーカーバンドを検出後、このマーカーバンドの塩基配列を決定し、*S. tuberosum* ssp. *andigena* の系統「W553-4」由来の疫病抵抗性を検定できる有効な DNA マーカーも開発したので報告する。

(2) 材料および方法

7) 材料

「北海56号」と疫病罹病性品種「Norchip」との *F*₁ 集団 (交配組合せ番号「K87057」; 北海道立北見農試より分譲)、および「さやあかね」と疫病

罹病性品種「農林1号」とのF₁集団(交配組合せ番号「05-10」)をDNAマーカー探索に供試した。また、バレイシヨ83品種・系統を接種検定およびDNAマーカー有無の検出に供試した。

1) 接種検定

ガラス室で栽培したバレイシヨの上位葉を採取した。一週間バレイシヨ塊茎切片上で培養した疫病菌03001株(race1,3,4;愛野馬鈴薯支場(現:農産園芸研究部門・馬鈴薯研究室)より分譲)を用いた。接種試験は、本章1)(2)イと同様に実施した。ただし、遊走子懸濁液は遊走子のうを17°Cで3時間培養して調整した。

ウ) DNAの抽出

バレイシヨからのDNA抽出は、若い上位葉を用いて、CTAB-LiCl法(Sulら³⁹⁾の方法を改変により行った(図2)。

エ) バルク法によるRAPD分析

*S. demissum*由来のR2遺伝子に強く連鎖するAFLPマーカー¹⁹⁾のEcoRI Selectiveプライマー(EcoRI-AGC)の塩基配列を基に10塩基のプライマー4種類(E-AGC+A, E-AGC+G, E-AGC+C, E-AGC+T)を作成した(表9)。「K87057」集団の罹病率20%以下であった抵抗性個体10個体および罹病率80%超であった罹病性個体10個体から抽出したDNAをそれぞれ等量ずつ混ぜて抵抗性混合DNA試料および感受性混合DNA試料とし、作成したプライマーと10塩基のランダムプライマーの組合せでRAPD分析を行った。RAPD分析のPCR反応液組成およびPCR反応と検出は、第3章2)(3)と同様に実施した。

オ) 「北海56号」の疫病抵抗性に特異的なSTSマーカーの開発

検出されたRAPDマーカーをSTSマーカーに変換するため、「北海56号」を使ってR2遺伝子に特異的なプライマーを作成した。RAPDマーカーバンド

をアガロースゲルで分離後、目的のバンドをゲルから切り出し、TAクローニングを行った。その塩基配列はシーケンス反応後、塩基配列を決定し、プライマーセットを作成した。アガロースゲルからの切り出し、クローニング、シーケンス反応、塩基配列の決定と解析は第2章2)(6)と同様に実施した。

「北海56号」と「Norchip」のF₁集団および品種・系統を使ったSTSマーカーの有無を調査した。STSマーカーのPCR反応液組成は、各0.5μMプライマーセット以外はRADD分析と同様に実施した。PCR反応は、初め94°Cで3分間の熱変性を行い、次いで94°Cで30秒間の熱変性、62°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで1分間の伸長反応を35サイクル行って増幅し、最後に72°Cで5分間の反応を行った。

カ) バルク法によるPCR-RFLP分析

「05-10」集団の罹病率20%以下であった抵抗性個体10個体および罹病率80%超であった罹病性個体10個体から抽出したDNAをそれぞれ等量ずつ混ぜて抵抗性混合DNA試料および罹病性混合DNA試料とし、「北海56号」の疫病抵抗性に特異的なRAPDマーカーのSTS化のために作成したプライマーセットを用いてPCRを行い、PCR産物を19種類の制限酵素(表11)で消化し、その電気泳動パターンを比較した。PCR反応液組成は、10μl反応液中、10ng鋳型DNA、各0.5μMプライマー、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、2mM MgCl₂、各100μM dNTPs、0.25units *Taq* DNA polymerase (*TaKaRa Ex Taq*TM, タカラバイオ)とした。PCR反応は、初め94°Cで3分間の熱変性を行い、次いで94°Cで30秒間の熱変性、53°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで90秒間の伸長反応を35サイクル行って増幅し、最後に72°Cで5分間の反応を行った。PCR産物および制限酵素消化産物は、TAE buffer(40mM

表11 プライマーセット(R2SP-S1・R2SP-A1)で増幅される領域のPCR-RFLP分析に用いた制限酵素と消化温度

制限酵素名	消化温度
<i>Apa</i> I, <i>Bam</i> H I, <i>Eco</i> R I, <i>Hae</i> III, <i>Hha</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Hinf</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Nic</i> I, <i>Not</i> I, <i>Msp</i> I, <i>Rsa</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Sty</i> I, <i>Xba</i> I	37°C
<i>Taq</i> I	65°C

注) 消化時間: 2時間

Tris-acetate, 1mM EDTA pH8.0) の2%アガロースゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイド溶液で染色した。

わ) 「さやあかね」の疫病抵抗性に特異的な STS マーカーの開発

PCR-RFLP 分析で検出された CAPS マーカーバンドをアガロースゲルで分離後, 目的のバンドをゲルから切り出し, TA クローニングを行った。その塩基配列はシーケンス反応後, 塩基配列を決定し, プライマーセットを作成した。アガロースゲルからの切り出し, クローニング, シーケンス反応, 塩基配列の決定と解析は第 2 章 2) (6) と同様に実施した。

「05-10」集団および品種・系統を使った STS マーカーの有無を調査した。STS マーカーの PCR 反応液組成は, 各 0.5 μM プライマーセット以外は第 4 章 2) (2) の RADD 分析と同様に実施した。PCR 反応は, 初め 94°C で 3 分間の熱変性を行い, 次いで 94°C で 30 秒間の熱変性, 57°C で 30 秒間のアニーリング, 72°C で 1 分間の伸長反応を 35 サイクル行って増幅し, 最後に 72°C で 5 分間の反応を行った。

3) 結果および考察

(1) F₁ 集団の抵抗性評価

「K87057」集団の 45 個体について, 疫病菌 03001 株の接種検定の結果, 罹病率 20%以下は 13 個体, 20<x≤40%は 5 個体, 40<x≤60%は 1 個体, 60<x≤80%は 5 個体, 80%超は 21 個体となり, 20%

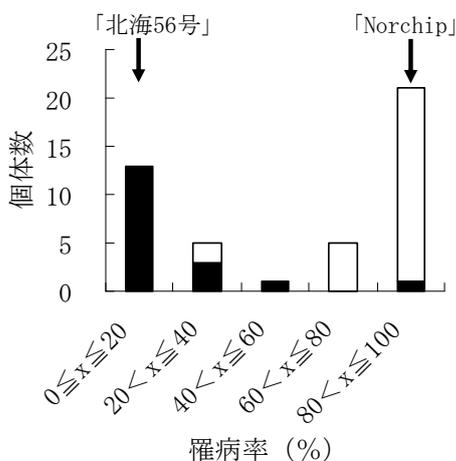


図11 「K87057」集団 (「北育56号」×「Norchip」) の疫病菌03001株に対する罹病率の変異と STS マーカー (R2-974) の有無 (n=45)

注) ■ : R2-974あり, □ : R2-974なし, ↓ : 交配親品種・系統の罹病率

以下の強い抵抗性と 80%超の罹病性に大きな個体の分布が見られた (図 11)。「K87057」集団の母本である「北海 56 号」は R2 遺伝子を持つことが知られており, 強い抵抗性を示した 20%以下の 13 個体は R2 遺伝子を有し, 罹病性を示した 80%超の 21 個体は, R2 遺伝子を有しないことが考えられた。

「05-10」集団の 65 個体について, 疫病菌 03001 株の接種検定の結果, 罹病率 20%以下は 24 個体, 20<x≤40%は 5 個体, 40<x≤60%は 3 個体, 60<x≤80%は 4 個体, 80%超は 29 個体となり, 「K87057」集団と同様に 20%以下の強い抵抗性と 80%超の罹病性に大きな個体の分布が見られた (図 12)。「05-10」集団は「K87057」集団に似た分布を示したことから, 「05-10」集団の母本「さやあかね」は R2 遺伝子を持つ可能性があるかと推察された。

(2) 「北海 56 号」の疫病抵抗性に特異的な RAPD マーカーの検出

作成したプライマー 1 種類あたり 10 塩基のランダムプライマー 80 種類の組合せとの計 320 組合せでバルク法による RAPD 分析を行った。E-AGC+G と OPI-08 の組合せにおいて, 抵抗性混合 DNA 試料に特異的な約 1,300bp の DNA バンド (GI-1300) が検出された (図 13)。

「K87057」集団の混合 DNA 試料に用いた抵抗性 10 個体および罹病性 10 個体について, GI-1300 は, 抵抗性 10 個体すべてで検出され罹病性個体で

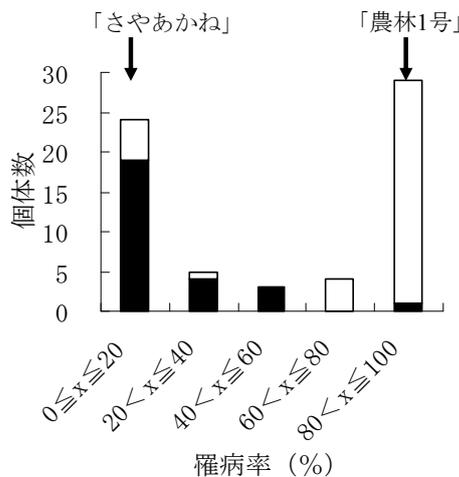


図12 「05-10」集団 (「さやあかね」×「農林1号」) の疫病菌03001株に対する罹病率の変異と STS マーカー (R2-800) の有無 (n=65)

注) ■ : R2-800あり, □ : R2-800なし, ↓ : 交配親品種の罹病率

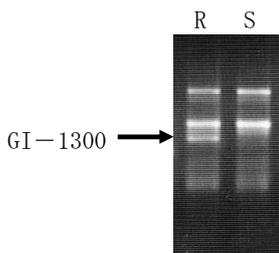


図13 疫病菌race1, 3, 4 (03001株) 抵抗性個体に特異的なRAPDマーカーの検出

注) GI-1300 : RAPDプライマーセット (E-AGC+G・OPI-08) で検出された抵抗性個体に特異的なRAPDマーカーバンド (約1300bp)

R : 「K87057」集団10個体の抵抗性混合DNA試料

S : 「K87057」集団10個体の罹病性混合DNA試料

は検出されなかった(図14). このことから, 検出されたRAPDマーカーバンド (GI-1300) は「北海56号」の疫病抵抗性に特異的なマーカーバンドであることが分かった.

(3) RAPD マーカーの STS マーカー化

得られたRAPDマーカーをSTSマーカー化するために, GI-1300の塩基配列から両端を挟み込むプライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A1) と途中から増幅するプライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A2) を作成した (図15, 表9). プライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A2) の組み合わせにおいて, 増幅バンドは抵抗性混合DNA試料のみに検出された. プライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A1) では, 抵抗性混合DNA試料と感受性混合DNA試料で同じ長さの増幅バンドを検出し, 抵抗性・罹病性を識別できなかった.

(4) 「さやあかね」の疫病抵抗性に特異的な CAPS マーカーの検出と評価

RAPDマーカーをSTSマーカー化するのに作成し, 抵抗性・罹病性を識別できなかったプライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A1) を使ってバルク法によるPCR-RFLP分析を行ったところ, 制限酵素 *Hind*IIIないし *Mbo* I で消化すると, 抵抗性混合DNA試料に特異的なDNAバンド (CAPSマーカー) が検出された (図16). 他の17種類の制限酵素では抵抗性混合DNA試料に特異的なDNAバンドが検出されなかった.

「05-10」集団の母本である品種「さやあかね」, 混合DNA試料に用いた抵抗性10個体および罹病性10個体について, CAPSマーカーは, 「さやあかね」と抵抗性9個体で検出され, 抵抗性1個体および罹病性10個体では検出されなかった. このことから, 検出されたCAPSマーカーバンドは, 「さやあかね」の疫病抵抗性に特異的なマーカーバンドであることが分かった.

(5) CAPS マーカーの STS マーカー化

得られたCAPSマーカーをSTSマーカー化するために, 「さやあかね」からCAPSマーカーを検出するためのプライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A1) を用いてPCR増幅し, 増幅バンドをTAクローニングによりクローン化した. 制限酵素 *Hind*IIIないし *Mbo* I で消化して *R2adg* 遺伝子に連鎖するCAPSマーカーが検出されるクローンと検出されないクローンの塩基配列を比較し, *R2agd* 遺伝子に特異的なプライマーセット (R2SP-S7・R2SP-A9) を作成した (図17, 表9).

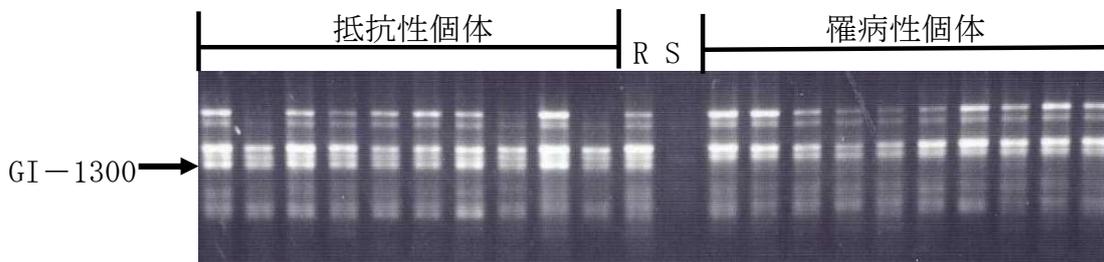


図14 疫病菌race1, 3, 4 (03001株) 抵抗性および感受性混合DNA試料とバルク集団の個々のRAPD分析

注) GI-1300 : RAPDプライマーセット (E-AGC+G・OPI-08) で検出された抵抗性個体に特異的なRAPDマーカーバンド (約1,300bp)

R : 「K87057」集団10個体の抵抗性混合DNA試料

S : 「K87057」集団10個体の罹病性混合DNA試料

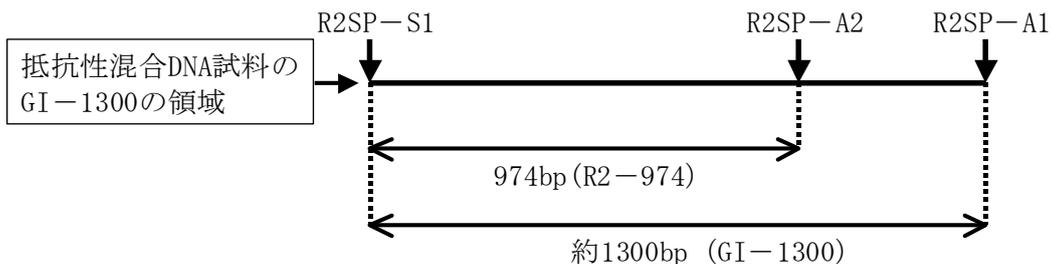


図15 「05-10」 集団の抵抗性混合DNA試料のプライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A1) と (R2SP-S1・R2SP-A2) で検出される領域とプライマー位置

注) GI-1300: プライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A1) で検出されたSTSマーカーバンド領域
 R2-974: プライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A2) で検出される疫病抵抗性に特異的なSTSマーカーバンド領域

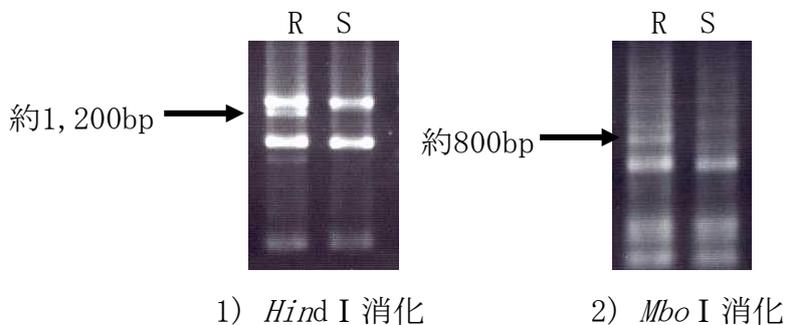


図16 疫病菌race1, 3, 4 (03001株) 抵抗性に特異的なCAPSマーカーの検出

注) →: プライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A1) を用いたPCR-RFLP分析で検出されたCAPSマーカー
 R: 「05-10」 集団10個体の抵抗性混合DNA試料
 S: 「05-10」 集団10個体の罹病性混合DNA試料

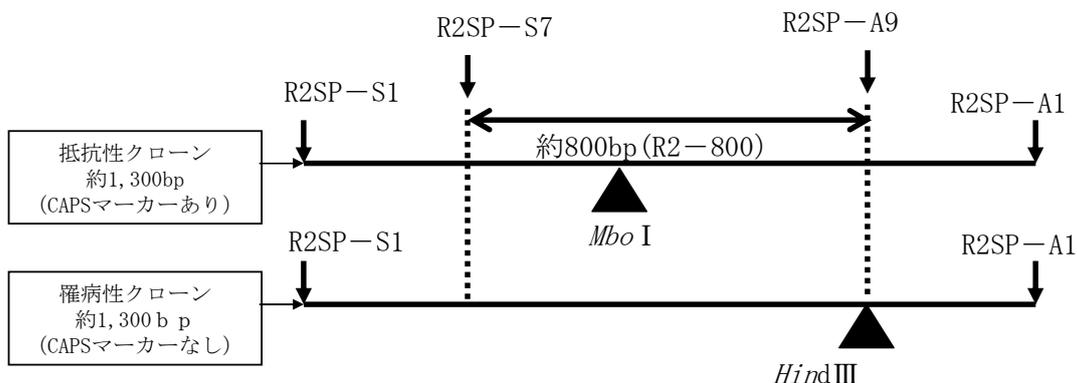


図17 プライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A1) で検出される領域の制限酵素消化部位とプライマー位置

注) R2-800: プライマーセット (R2SP-S7・R2SP-A9) で検出されるSTSマーカーバンド領域
 ↓: プライマー位置, ▲: 制限酵素認識部位

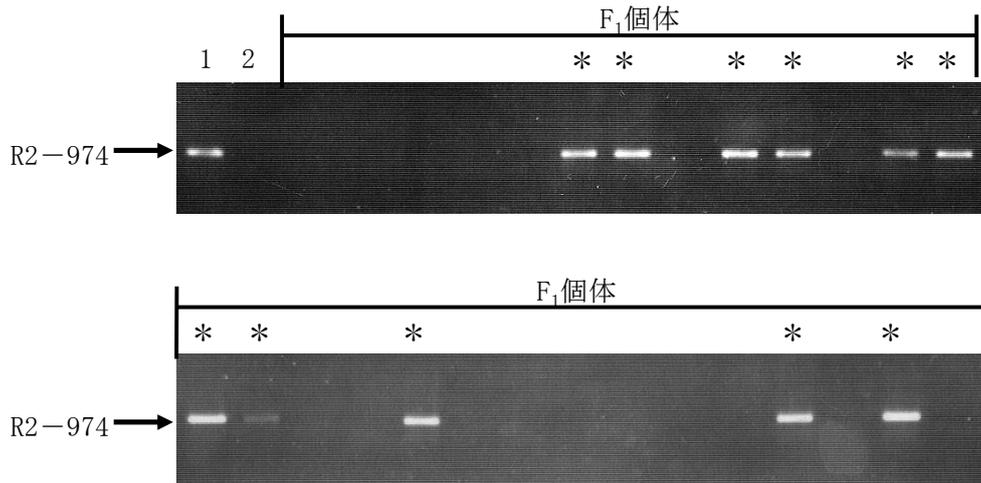


図18 「K87057」集団28個体におけるR2-974の検出

注) 1. 北海56号, 2. Norchip

R2-974: プライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A2) で
検出されるSTSマーカースバンド (974bp)

*: 疫病菌race1, 3, 4 (03001株) 抵抗性個体

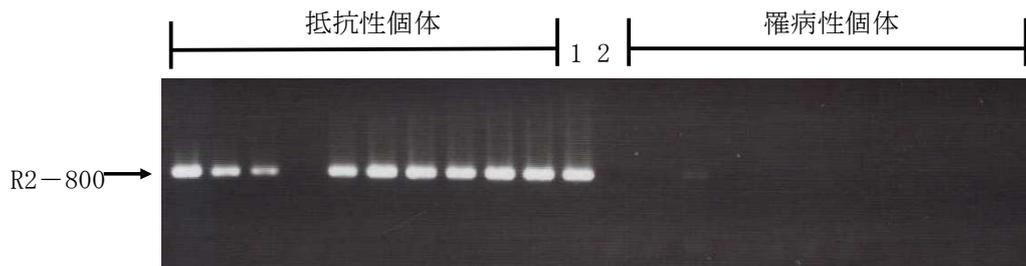


図19 「05-10」集団20個体におけるR2-800の検出

注) 1. さやあかね, 2. 農林1号

R2-800: プライマーセット (R2SP-S7・R2SP-A9) で
検出されるSTSマーカースバンド (約800bp)

*: 疫病菌race1, 3, 4 (03001株) 抵抗性個体

(6) STS マーカーの評価

「K87057」集団のプライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A2) を用いて検出される 974bp の STS マーカー (R2-974) は、45 個体中 18 個体で検出され、27 個体では検出されなかった (図 18)。これは、「北海56号」の疫病抵抗性遺伝子を *R* とした場合、遺伝子型で $Rrrr \times rrrr$ に適合する遺伝的分離比を示し (期待値 1:1, $\chi^2=1.80$, 有意水準 5%), R2-974 が単一優性遺伝 ($Rrrr$) していることを確認した。また、R2-974 は、罹病率 20%以下の 13 個体中すべてで、 $20 < x \leq 40\%$ の 5 個体中 3 個体、 $40 < x \leq 60\%$ の 1 個体すべてで、80%超の 21 個体中 1 個体で検出され、個体レベルにおいて、疫病菌 03001 株による接種検定の結果によく対応して

いた (図 11)。このことから検出された STS マーカー R2-974 は「北海 56 号」の疫病抵抗性遺伝子 *R2sto* に特異的な領域をマーカーバンドとして検出することが出来た。

「05-10」集団のプライマーセット (R2SP-S7・R2SP-A9) を用いて検出される約 800bp の STS マーカー (R2-800) は、65 個体中 27 個体で検出され、38 個体では検出されなかった (図 19)。これは、「さやあかね」の疫病抵抗性遺伝子を *R* とした場合、遺伝子型で $Rrrr \times rrrr$ に適合する遺伝的分の 3 品種・系統は、疫病菌 03001 株に対して罹病率 20%以下の強い抵抗性を示した。

また、「WB88055-8」「V-2」「I-1039」「Atzimba」「島系 284 号」「西海 22 号」「ヨウラク」も抵抗性

表12 バレイシヨ83品種・系統の疫病菌03001株 (race1, 3, 4) に対する罹病率とR2-800およびR2-974の有無

罹病率 (%) ¹⁾	R2-800の有無 ²⁾	R2-974の有無 ³⁾	品種・系統名						
0 ≤ x ≤ 20	あり	あり	インカの星	北海56号	WB88055-8				
		なし	さやあかね	花標津	W553-4	I-1039	V-2		
20 < x ≤ 100	なし	なし	西海22号 1512-c(16)	島系284号 Atzimba	シレトコ Krasneufimsk	ゆきつぶら Pentland Dell	ヨウラク	ホッカイアカ	
			アーリースターチ インカパープル ナツフブキ ホッコイコガネ レッドムーン 西海25号 P-7 F1-1 I-853 Norchip Saco	アイノアカ きたひめ ニシユタカ マチルダ ワセシロ 西海31号 98033-5 Fina Jubel Ona Serrana Inta	アイユタカ サクラフブキ 農林1号 ムサマル 愛系30 長系94号 BR63-74 Gineke Kameraz Pentland Ace Urtica	アスタルテ スタールビー ノースチップ メークイン 愛系77 長系101号 Cherokee Greta Maris Piper Prevalent WB81051-8	アトランチック デジマ ひかる ユキジロ 根育4号 長系108号 Conchita Hindenburg Mulita <i>S. phureja</i> 1.22	インカゴールド トヨアカリ 普賢丸 リシリ 西海24号 長系113号 Desiree I-822 Noordeling <i>S. phureja</i> 460 Yankee Chipper	

注) 1) 疫病菌03001株を含む水滴を葉裏に接種し、7日後に葉表の遊走子の有無を確認

2) R2-800: プライマーセット (R2SP-S7・R2SP-A9) で検出されるSTSマーカー (約800b)

3) R2-974: プライマーセット (R2SP-S1・R2SP-A2) で検出されるSTSマーカー (974bp)

を示した。R2-974は、*S. stoloniferum* 由来の品種・系統「北海56号」「インカの星」と「WB88055-8」で検出された(表12)。「WB88055-8」の片親は「北海56号」であり、*S. stoloniferum* 由来の疫病真性抵抗性遺伝子 *R2sto* による抵抗性であることが考えられた。また、R2-800は、「W553-4」とこれに由来する品種・系統「さやあかね」「花標津」および *R2sto* を持つ「北海56号」「インカの星」「WB88055-8」で検出された(表12)。そこで、「K87057」集団におけるR2-800の有無を調査したところ、R2-974の有無と完全に一致した。このことから、R2-800が *R2sto* を持つ品種・系統の疫病抵抗性に特異的なマーカーとなり得ることが分かった。また、「V-2」および「I-1039」で

R2-800が検出され、これらの系統が育成される過程で *S. tuberosum* ssp. *andigena* や *S. stoloniferum* との交雑が行われた可能性が考えられた。本試験において *S. demissum* 由来の *R2* 遺伝子 (*R2dem*) を持つ品種・系統や抵抗性遺伝子が不明の「Atzimba」「島系284号」「西海22号」「ヨウラク」では、R2-974およびR2-800とも検出されなかったことから、開発したマーカーは *R2dem* 遺伝子を持つ品種・系統には使えないことが分かった(表12)。

これらのことから、*R2adg* および *R2sto* を持つ品種・系統を交配親として疫病抵抗性品種を育成する際に、開発したSTSマーカーは有効な抵抗性検定法となりうると考えられる。

5. 総合考察

バレイショの主要品種は同質四倍体の他殖性で、遺伝的にヘテロである。また、対立遺伝子座においては、最高4種類の対立遺伝子が当てはまることにより、非常に複雑な遺伝的分離を示す。これは、品種改良上難点ともいえるが、多様な変異や強力な病虫害抵抗性等の育種形質を備えている遺伝的多様性の宝庫ともいえる⁴⁷⁾。

バレイショは、食用部分が多量に水分を含む塊茎であり、土壌に存在するためさまざまな病虫害の影響を受ける。バレイショには、500種類以上の病虫害が報告されており、抵抗性品種の育成は有効な対策である⁴⁸⁾。抵抗性育種の主要対象としては、ジャガイモXウイルス (*Potato Virus X*: PVX)、ジャガイモYウイルス (*Potato Virus Y*: PVY)、葉巻病 (*potato leafroll virus*: PLRV) などのウイルス病、青枯病 (*Ralstonia solanacearum*)、軟腐病 (*Erwinia* spp.) などの細菌病、疫病 (*Phytophthora infestans*) などの糸状菌病、そうか病 (*Streptomyces* spp.) などの放線菌病、ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*) などの線虫がある⁷⁾³⁴⁾⁴⁹⁾。抵抗性育種を行う際に重要なのは、再現性のある抵抗性評価法を確立することであるが、往々にして多くの時間や労力が要求される場合が多い。精度が高く簡便な評価方法により育種過程を効率化することが期待される。

RFLP, RAPD, AFLP 等の分子マーカーの発達によって、バレイショの染色体操作が可能となりつつある。これは、野生種由来の有用遺伝子の栽培種への導入や、育種操作上、常に難しい量的抵抗性の選抜に非常に役立つ。特定のバレイショ集団について、疫病抵抗性遺伝子¹⁸⁾、PVY抵抗性遺伝子¹³⁾、シストセンチュウ抵抗性遺伝子²⁾¹¹⁾³³⁾など、抵抗性遺伝子に連鎖するマーカーの同定が報告されている。しかし、適応できるマーカーの種類や対応する形質はいまだに少なく、実際の育種へ利用できない問題がある。

本研究では、PVX抵抗性遺伝子 *Rx1*、PCN抵抗性遺伝子 *H1*、疫病真性抵抗性遺伝子 *R1*、*R2sto*、*R2adg* について DNA マーカーを利用した病虫害抵抗性検

定法を開発した。F₁ 集団の各種抵抗性の有無が、従来の汚染圃場や無防除栽培圃場における検定に比べ、短期間で精度良く判別できること、また、圃場検定や接種検定は、実施時期が限られていたが、マーカーの開発によってバレイショが栽培されない時期でも検定が可能となったことから、今まで以上に多くの個体を取り扱うことができ、新品種育成を効率よく行うことができるようになる。近年、一部の育種現場では PCN 圃場検定から DNA マーカー検定へ移行しており、効率化が図られている。

DNA マーカー検定に際し、技術の簡素化やコストダウンも必要である。実際の検定には、それぞれの抵抗性形質ごとに検定する必要があることから、時間と労力を要しており、複合抵抗性個体を効率的に選抜できるマルチプレックス PCR 法の開発が期待される。この方法ではプライマーを使い同時に増幅するため、増幅条件が単純なことが求められる。

田中・小村⁴²⁾が開発したマーカーは、適用できる品種に制限があり、PCR 反応条件が特殊であることから、マーカーを同時に検出できるマルチプレックス PCR 法の障壁となっていた。本研究で開発した抵抗性を判別するマーカーは、PCR 増幅で目的の DNA バンドのみのあるなしで判別できる STS マーカーで、マルチプレックス PCR 法の実用化が期待された。最近、森ら²²⁾はバレイショにおける複合抵抗性を同時に検出できるマルチプレックス PCR 法の実用化に成功している。

しかしながら、疫病抵抗性は、発生している疫病菌 race が交代すると罹病化する恐れがあり、真性抵抗性遺伝子を集積し、race の交代に備える必要がある。また、バレイショの重要な育種目標となる青枯病、そうか病など病虫害抵抗性の形質は、量的遺伝するため、その遺伝様式や育種での選抜は複雑である。これらの形質は QTL (量的形質遺伝子座) に支配されており、いくつかの遺伝子が関与している。染色体上のどの位置に存在するかを解析する QTL 解析⁴⁴⁾が今後必要となる。

6. 要約

効率的なバレイショ病虫害抵抗性育種のために、ジャガイモ X ウイルス (PVX) 抵抗性遺伝子 *Rx1* (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena* 由来), ジャガイモシストセンチュウ (PCN) 抵抗性遺伝子 *HI* (*S. tuberosum* ssp. *andigena* 由来), ジャガイモ疫病真性抵抗性遺伝子 *R2sto* (*S. stoloniferum* 由来) および *R2adg* (*S. tuberosum* ssp. *andigena* 由来) に特異的な 4 種類の DNA マーカーを利用した抵抗性検定法を開発した。また, 既存のジャガイモ疫病抵抗性遺伝子 *RI* の品種への適用を検討した。

PVX 抵抗性を検定するための STS マーカー「Rx-1230」は, PVX 抵抗性を持つ 10 品種・系統で検出された。

PCN 抵抗性を検定するための STS マーカー「HI

-320」は, PCN 抵抗性を持つ 16 品種で検出されたが, 感受性 1 品種でも検出された。

疫病抵抗性を検定するための STS マーカー「R2-974」および「R2-800」は, 疫病菌 race1, 2, 3 に対する抵抗性をもつ 8 品種・系統で検出された。

既存の疫病真性抵抗性遺伝子 *RI* を検出する DNA マーカー「R1-1400」は, 疫病菌 race0 に対する抵抗性を持つ 38 品種・系統で検出されたが, 罹病性 2 品種でも検出された。

これらの DNA マーカーは, バレイショ育種において *Rx1*, *HI*, *R2sto*, *R2adg*, *RI* による抵抗性を DNA マーカーで選抜する際の有効な検定法となる。

7. 引用文献

1) Akopyanz, N. , N. O. Bukanov, T. U. Westblom & D. E. Berg : PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nucleic Acids Res*, 20, 6221~6225 (1992)

2) Bakker, E. , U. Achenbach, J. Bakker, J. Vliet, J. Peleman, B. Segers, S. Heijden, P. Linde, R. Graveland, R. Hutten, H. Eck, E. Coppoolse, E. Vossen, J. Bakker & A. Goverse : A high-resolution map of the *HI* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*, *Theor Appl Genet*, 109, 146~152 (2004)

3) Ballvora, A. , M. R. Ercolano, J. Weiß, K. Meksem, C. A. Bormann, P. Oberhagemann, F. Salamini & C. Gebhardt : The *RI* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes, *The Plant Journal*, 3

4) Bendahmane, A. , Kanyuka & D. C. Baulcombe : The *Rx* gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses, *Plant Cell*, 11, 781~791 (1999)

5) Bendahmane, A. , M. Querci, K. Kanyuka & D. C. Baulcombe : *Agrobacterium* Transient

expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato, *Plant J*, 21, 73~81 (2000)

6) Black, W. , C. Mastenbroek, W. R. Mills & L. C. Peterson : A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives, *Euphytica*, 2, 173~179 (1953)

7) Bradshaw, J. E. & G. R. Mackay : *Potato Genetics*. CAB International, Willingford, UK (1994)

9) Brigneti, G. , J. Garcia-Mas & D. C. Baulcombe : Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry_{sto}* in potato, *Theor Appl Genet*, 94, 198~203 (1997)

8) 茶谷正孝, 小村国則 : バレイショメタラキシル耐性疫病菌に対する品種系統間差異 第 1 報切離葉による抵抗性検定, *九州農業研究*, 67, 23 (2005)

9) 福田伸二, 稗圃直史, 山本俊哉, 寺井理治, 根角博久 : ビワがんしゅ病抵抗性遺伝子 (*Pse a*) と連鎖する DNA マーカーの開発, *園芸学会雑誌*, 74-(4), 345~349 (2005)

10) 福田伸二, 長門潤, 山本俊哉, 稗圃直史, 寺井理治 : RAPD 分析によるビワ品種・系統の識別, *園芸学会雑誌*, 71-(6), 826~828 (2002)

- 11)Gebhardt, C. , D. Mugniery, E. Ritter, F. Salamini & E. Bonnel : Identification of RFLP markers closely linked to the *HI* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato, Theor Appl Genet, 85, 541~544 (1993)
- 12)Goth, R. W. , R. E. Webb : Detection and Distribution of Latent Viruses in the Potato Cultivar Atlantic, plant disease, 69-(10), 851-853(1985)
- 13)Hosaka, K. , Y. Hosaka, M. Mori, T. Maida & H. Matsumaga : Detection of a simplex RAPD marker linked to resistance to potato virus Y in a tetraploid potato, Amer J Potato Res, 78, 191~196 (2001)
- 14)池谷聡, 藤田涼平, 入谷正樹, 千田圭一 : 無農薬栽培に向くばれいしょ新品種「さやあかね」の育成, 育種学研究, 9- (別2) , 63 (2007)
- 15)Jean, F. M. & W. Black : New *R* genes in *Solanum demissum* lindl. And their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de bary, Euphytica, 15, 199~203 (1966)
- 16)加藤雅康 : ジャガイモ疫病菌の系統の分布変動とその要因, 植物防疫, 55-(10), 467~470 (2001)
- 17)Koniczny, A. , F. M. Ausubel : A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers, The Plant Journal, 4-(2), 403~410 (1993)
- 18)Leonards-Schippers, C. , W. Gieffers, F. Salamini & C. Gebhardt : The *RI* gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V, Mol Gen Genet, 232, 278~283 (1992)
- 19)Li, X. , H. J. van Eck, J. N. A. M. R. van der Voort, D. J. Huigen, P. Stam & E. Jacobsen : Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers : the *R2* allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4, Theor Appl Genet, 96, 1121~1128 (1998)
- 20)Michelmore, R. W. , I. Paran & R. V. Kesseli : Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations, Proc Natl Acad Sci USA, 88, 9828~9832 (1991)
- 21)Mitani, S. : Chemical Control of Potato Late Blight in Japan, Japanese Journal of Plant Science, 1- (2) 77~84 (2007)
- 22)森一幸, 向島信洋, 坂本悠, 中尾敬, 保坂和良 : バレイショ育種における5種類の病虫害抵抗性検定用 DNA マーカーを同時検出できるマルチプレックス PCR 法の開発, 育種学研究, 11- (別2) , 124 (2009)
- 23)Mori, M. , K. Hosaka. , Y. Umemura & Y. Kaneda : Chukichi ; Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs, The Japanese journal of genetics, 68-(3), 167~174 (1993)
- 24)森元幸, 石橋祐二, 茶谷正孝, 田淵尚一, 小村国則, 中尾敬 : バレイショ新品種「普賢丸」, 長崎県総合農林試験場研究報告 農業部門, 24, 19~37 (1998)
- 25)村上紀夫, 松永浩, 千田圭一, 奥山善直, 入谷正樹, 浅間和夫, 三井康, 清水啓 : ばれいしょ新品種「粉無双」の育成について, 北海道立農業試験場集報, 68, 1~16 (1995)
- 26)中尾敬, 向島信洋, 石橋祐二, 森一幸 : ジャガイモシストセンチュウ抵抗性の早期世代検定による育種の効率化, 九州農業研究, 64, 45 (2002)
- 27)中尾敬, 向島信洋, 森一幸, 石橋祐二, 茶谷正孝, 森元幸, バレイショ新品種「春あかり」 : 長崎県総合農林試験場研究報告 農業部門, 29, 1~32 (2003)
- 28)中尾敬, 向島信洋, 森一幸, 石橋祐二, 茶谷正孝, 森元幸 : バレイショ新品種「アイユタカ」, 長崎県総合農林試験場研究報告, 農業部門, 30, 1~28 (2004)
- 29)Niewöhner, J. , F. Salamini & C. Gebhardt : Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles *GroI* and *HI*, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato, Mol Breed, 1, 65~78 (1995)
- 30)農林水産省 : いも・でん粉に関する資料, 農林水産省 (2009)

- 31) 大林憲吾, 小村国則: DNA マーカーを用いたジャガイモシストセンチュウ及びジャガイモ Y ウイルス抵抗性個体の選抜, 育種学研究, 5- (別 2), 212 (2003)
- 32) 大島信行: 馬鈴薯 X ウイルスに関する研究, 北海道農業試験場報告, 53, 1~159 (1959)
- 33) Pineda, O., M. W. Bonierbale, R. L. Plaisted, B. B. Brodie & S. D. Tanksley: Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*, Genome, 36, 152~156 (1993)
- 34) Ross: Potato Breeding—Problems and Perspectives, Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg, Germany, p64~94 (1986)
- 35) 佐藤仁敏: 馬鈴薯原原種増殖体系におけるウイルス病の診断法に関する研究, 種苗管理センター調査研究報告, 4, 1~81 (2001)
- 36) 佐藤仁敏, 畑谷達児, 岩崎真人: RT-PCR によるジャガイモ休眠塊茎からの 4 種ウイルスの検出, 北日本病害虫研究会報, 51, 87~92 (2000)
- 37) 佐山充, 小川哲治, 迎田幸博: 2002 年に長崎県島原半島で分離されたジャガイモ疫病菌の系統について, 九州病害虫研究会報, 49, 9~12 (2003)
- 38) 千田圭一, 伊藤武, 関口建二, 村上紀夫, 奥山善直, 入谷正樹, 松永浩: ばれいしょ新品種「花標津」の育成について, 北海道立農業試験場集報, 74, 1~17 (1998)
- 39) Sul, I. -W., & S. S. Korban: A highly efficient method for isolating genomic DNA from plant tissues, Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2, 113~116 (1996)
- 40) 田島奈津子, 大林憲吾, 茶谷正孝: バレイショメタラキシル耐性疫病菌に対する品種系統間差異第 2 報室内検定による茎葉および塊茎の抵抗性品種の探索, 九州農業研究, 69, 33 (2006)
- 41) 田中智: ジャガイモ品種のジャガイモ X, A および Y ウイルス抵抗性に関する試験, 馬鈴薯原原種農場調査報告, 14, 1~49 (1980)
- 42) 田中俊憲, 小村国則: 遺伝子診断技術によるジャガイモシストセンチュウ抵抗性の検定法 (1), 長崎県総合農林試験場研究報告 農業部門, 26, 1~18 (2000)
- 43) 寺本健, 中須賀孝正, 松尾和敏, 菅康弘, 小川哲治: 長崎県におけるジャガイモシストセンチュウの発生生態と防除, 長崎県総合農林試験場研究報告 農業部門, 24, 39~62 (1998)
- 44) 鶴飼保雄: 量的形質の遺伝解析, 医学出版 (2002)
- 45) 内澤啓, 西部幸男: 北海道農業試験場研究資料, 27, 87~90 (1985)
- 46) Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman & M. Kuiper: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Res, 23, 4407~4414 (1995)
- 47) 渡邊和男: バレイショの遺伝育種学と遺伝資源についての一連の研究, 育種学研究, 1-(4), 223~231 (1999)
- 48) 渡邊和男: ジャガイモの育種「植物育種学各論」(日向康吉, 西尾剛編), 文永堂出版, p145~157 (2003)
- 49) Watanabe, J. A., K. N. Watanabe: Pest Resistance Traits Controlled by Quantitative Loci and Molecular Breeding Strategies in Tuber-bearing Solanum, Plant biotechnology, 17-(1), 1~16 (2000)
- 50) Webb, R. E., D. R. Wilson, J. R. Shumaker, B. Graves, M. R. Henninger, J. Watts, J. A. Frank & H. J. Murphy: Atlantic: A new potato variety with high soils, good processing quality, and resistance to pests, Am Potato J, 55, 141~154 (1978)
- 51) Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski & S. V. Tingey: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Res, 18, 6531~6535 (1990)

Summary

Detection methods of four disease and pest resistance to *potato virus X* (PVX), potato cyst nematode (PCN) and late blight using DNA markers were developed, based on resistance-specific fragment isolated from a potato plant carrying *Rx1*, *H1* and *R2sto/R2adg*, with confers extreme resistance to PVX, PCN and late blight, respectively. Furthermore, *R1* gene, was already isolated, was tested to detect in cultivar. *Rx1*, *H1* and *R2adg* originated from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, *R2sto* originated from *S. stoloniferum* and *R1* originated from *S. demissum*.

The STS marker Rx-1230 for test of resistance to PVX was detected in 10 potato cultivars and breeding lines carrying resistance to PVX.

The STS marker H1-320 for test of resistance to PCN was detected in 16 resistant cultivars, but also in one PCN-susceptible phenotype.

These STS markers R2-974 and R2-800 for test of resistance to race 1,3,4 of *Phytophthora infestans* were detected in 8 cultivars and breeding lines genotypes.

The DNA marker R1-1400 for resistance to race 0 of *P. infestans* was detected in 38 resistant cultivars and breeding lines, but also in 2 late blight-susceptible phenotypes.

Therefore, these DNA markers should be powerful tools in marker-assisted selection for *Rx1*, *H1*, *R2sto* and *R2adg*, *R1* in potato breeding.