

# 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)

田中 俊憲・小村 国則

キーワード：ジャガイモ，ジャガイモシストセンチュウ，DNA マーカー，PCR，CP113，抵抗性遺伝子

Development of a genetic diagnosis technique for detection of resistant feature to  
*Grobodera rostochiensis* in potato

Toshinori TANAKA, Kuninori KOMURA

## 目 次

1. 要 約	2
2. はじめに	2
3. シストセンチュウのパソタイプと抵抗性遺伝子	4
4. 結 果	5
1) アトランチック由来二倍性半数体からの CP113 遺伝子の単離	5
2) ジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定用プライマーの設計	7
3) アトランチック二倍性半数体を用いた PCR	8
4) H1SP-S1・H1SP-A1 の汎用性検定	8
5) アニーリング温度条件の検討	9
6) 蛍光光度計を用いた PCR 産物の検出	9
5. 考 察	10
6. 材料と試験方法	13
1) 材料	13
2) DNA 抽出方法	13
3) PCR 条件	14
4) PCR 増幅 DNA 断片のプラスミド挿入	14
5) プラスミド精製	14
6) アガロースゲル電気泳動	14
7) 塩基配列決定	14
8) 塩基配列のコンピューター解析	14
7. 謝 辞	15
8. 引用文献	15
Summary	18

## 1. 要 約

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性に連鎖するDNA マーカーを開発した。CP113 遺伝子<sup>1) 2)</sup>の塩基配列について、抵抗性四倍体品種アトランチック由来の二倍性半数体の抵抗性・感受性両系統を比較し、抵抗性系統に特異的な塩基配列を見出した。抵抗性系統に特異的な塩基配列を3'末端に配置したプライマー (H1SP-A1) を設計・合成し

た。抵抗性・感受性両系統に共通なプライマー (H1SP-S1) と H1SP-A1 を用いた PCR により、アトランチック由来の二倍性半数体36系統では、100%の確率でジャガイモシストセンチュウ抵抗性を判定することができた。四倍体の品種・系統では30種中28種で連鎖性が認められた。

## 2. はじめに

ジャガイモに寄生するシストセンチュウにはジャガイモシストセンチュウ (*Grobodera rostochiensis*) とジャガイモシロシストセンチュウ (*G. pallida*) の2種が存在し、ヨーロッパ、南米約50カ国に広く分布し、国際植物防疫上第1級の有害線虫として恐れられている。ジャガイモシストセンチュウは、ジャガイモ同様、南米のペルー・アンデス地域を原産地とし、1881年にドイツで発見されたあと、欧州、アフリカ、インド、カナダ、アメリカ合衆国の一部、南米各国に広く伝播している<sup>3)</sup>。

日本では、1972年に北海道虻田郡真狩村でジャガイモシストセンチュウの発生が初めて確認された<sup>4)</sup>。その後、徐々に発生面積は拡大し、現在で

は、十勝を除く北海道の主要ジャガイモ栽培地に広がっている。北海道以外では、長崎県で1992年8月に始めて発生が確認された<sup>5)</sup>。

ジャガイモシストセンチュウはナス科植物を寄生宿主とし、ジャガイモの他、トマト、ナスにも寄生し、作物の生育障害、減収をもたらし、ジャガイモ栽培では、平均9%減収、場合によっては収穫皆無となる<sup>6)</sup>。長崎県のジャガイモ栽培における影響は、寺本ら(1998)<sup>7)</sup>により、0~58%の減収となることが報告されている。ジャガイモシストセンチュウによる影響は、生育不良・減収の他、種いも栽培に大きい。特に採種圃では、発生が確認されると種いも栽培が禁止されるため、汚染防止策が極めて重要となっている。

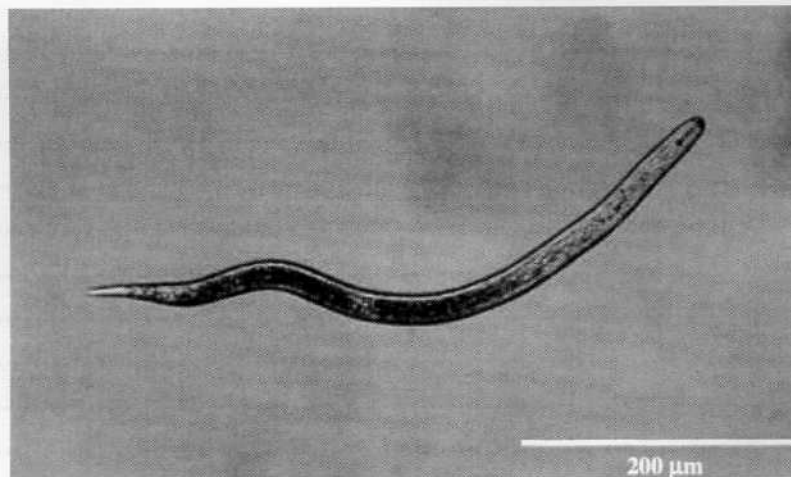


図1 ジャガイモシストセンチュウの2期幼虫  
卵からふ化した時点で2期幼虫に成長しており、右上の口針を利用してジャガイモの根に進入する。

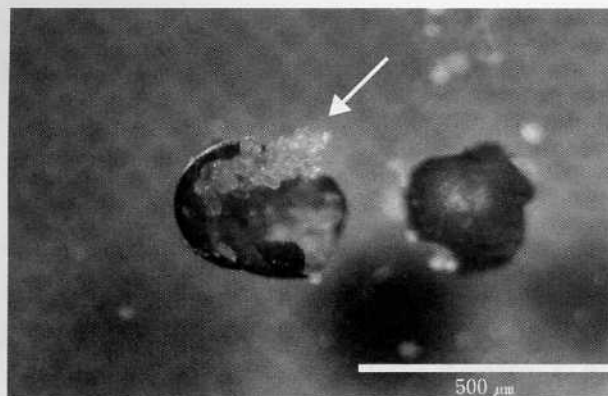


図2 ジャガイモシストセンチュウのシスト  
雌成虫が球形に変化したもので、数百の卵(→)が内蔵されている。

ジャガイモシストセンチュウの防除は、殺線虫剤が有効であることが報告されている<sup>7) 8) 9) 10)</sup>。しかし、薬剤購入による経済的負担や近年高まりを見せている環境保全型農業に照らすと、薬剤に頼らない防除法が期待される。また、水稲—ジャガイモの作付圃場でジャガイモシストセンチュウの発生が確認されておらず、耕種的防除技術になる可能性が示されているが<sup>7)</sup>、現状ではそのような作付体系が活用できる圃場は限られる。

一方、抵抗性品種を用いた栽培は、殺線虫剤と同等、あるいはそれ以上の効果が期待でき、経済的・環境保全的な観点からも有効である。また、ジャガイモ栽培地域の広範囲に展開することで、ジャガイモシストセンチュウ汚染地域の拡大防止に非常に効果的な手立てとなる。

上記のとおり、1992年に長崎県でジャガイモシストセンチュウの発生が確認されてから当試験場愛野馬鈴薯支場で育成する品種には、原則的にジャガイモシストセンチュウ抵抗性を付加する方針がとられ、平成9年には、暖地向品種ではじめてジャガイモシストセンチュウ抵抗性を有する品種“普賢丸”が育成された<sup>11)</sup>。今後、普賢丸の栽培面積の展開が期待されるが、さらなる優良な抵抗性品種の育成も必要である。

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性品種の育成は、通常の交配育種選抜に加えて、抵抗性検定が必要である。通常、抵抗性検定は、ポット栽培したジャガイモにジャガイモシストセンチュウの二期幼虫を接種し、一定期間栽培後、根に形成され

たシストの有無を確認して行う。したがって、検定は、気象条件の影響を受け、判定が困難となったり、時間的にも長期を要する。また、ジャガイモシストセンチュウ自体を取り扱うため、汚染源となる可能性があり、近くにジャガイモ栽培圃場がある場合、好ましくない。したがって、効率的な抵抗性品種育成を進めるためには、短時間、高再現性で、かつジャガイモシストセンチュウを取り扱わない検定方法が必要となる。

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性に関する研究は、世界的に進められており、Pinedaら(1993)<sup>12)</sup>は、RFLP分析により、トマト由来のクローンCD78がジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* に連鎖することを、Gebhardtら(1993)<sup>13)</sup>は、ジャガイモ第5染色体端部に位置するジャガイモ cDNA クローンCP113が *HI* に強く連鎖することを報告している。また、複数のジャガイモシストセンチュウパソタイプに有効な抵抗性遺伝子 *Gro1* (日本には未導入) は第7染色体に位置することが判明し、 $<1$  cM のマーカーを用いてポジショナルクローニングが進められている<sup>13)</sup>。作物は異なるが、テンサイでは、1997年世界で初めてテンサイシストセンチュウ抵抗性遺伝子が単離された<sup>14)</sup>。

Niewöhnerら(1995)は、*HI* に連鎖するCP113の解析から、育種選抜用PCRマーカーの作出を試みたが、抵抗性形質を有する136品種中PCRマーカーが連鎖したのは4品種にのみであった<sup>2)</sup>。我々は、アトランチック由来二倍性半数体を用いて、Niewöhnerら(1995)の追試を行ったところ、再現性が見られず(未公表データ)、有効性が疑問視された。

本研究では、以上の背景から、実用に耐えうるジャガイモシストセンチュウ抵抗性判定の遺伝子診断システムの構築を試み、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性品種アトランチック由来の二倍性半数体について、CP113遺伝子を解析し、PCRプライマーを設計・合成することで一定の成果を得たので報告する。

### 3. シストセンチュウのパソタイプと抵抗性遺伝子

ジャガイモに寄生するシストセンチュウは、ジャガイモ、あるいはその近縁種7種における寄生性により数種のパソタイプに分けられている。表1には、Kort et al. (1977)<sup>15)</sup>とCanto-Saenz and de Scurrah (1977)<sup>16)</sup>がそれぞれ提唱したシストセンチュウのパソタイプ分類を載せている。この2種類のパソタイプ分類のうち、ジャガイモシストセンチュウをRo1~Ro5の5種、ジャガイモシロシストセンチュウをPa1~Pa3の3種に分けたKort et al. (1977)<sup>15)</sup>の分類が広く利用されている。これらのパソタイプのうち、国内で発生が確認されているのは、ジャガイモシストセンチュウのRo1のみである。このRo1は、表1にあるように、他のパソタイプに比べて、寄生宿主の範囲は狭いものの、発生が確認された当初、国内には、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性を有するジャガイモが導入されておらず、また防除対策も確立

されていなかったため、発生面積が広がった。

ジャガイモシストセンチュウに対する抵抗性形質を持つ遺伝子資源は、ペルーの国際ジャガイモ研究センターを中心に探索が進められ、表2の7種が、主なジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子資源として交雑育種に利用されている。学名からわかるように、これらの抵抗性遺伝子資源は、すべてジャガイモ近縁種から同定されている。

それぞれの遺伝子資源がもつ抵抗性遺伝子は、遺伝学的解析から、*S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673, *S. multidissectum* のように単一遺伝子座からなる場合、*S. kurtzianum*, *S. spgazzinii* のように2遺伝子座からなる場合、もしくは、*S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC 2802, *S. vernei* のように多遺伝子座によって支配されている場合など多様である。*S. spgazzinii* は、*Fa*, *Fb* の2遺伝子座支配であるが、ジャガイモシストセンチュウ

表1 ジャガイモに寄生するシストセンチュウのパソタイプ

宿主	A分類:	ジャガイモシストセンチュウ					ジャガイモシロシストセンチュウ					
		Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Pa1	Pa2	Pa3			
	B分類:	R1A	R2A	R3A	R1B		P1A	P4A	P5A	P1B	P3A	P2A
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> CPC 1673		-	+	+	-	+	+	+	+			
<i>S. kurtzianum</i> 60.21.19		-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>S. vernei</i> GLKS 58.1642/4		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. vernei</i> 62.33.3		-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>S. vernei</i> 65.346/19		-	-	-	-	-	+	+	+			
<i>S. multidissectum</i>		+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

A分類: Kort et al. (1977)<sup>15)</sup>, B分類: Canto-Saenz and de Scurrah (1977)<sup>16)</sup>  
Bradshaw and Mackay (1994)<sup>40)</sup> を一部改変

表2 育種交配に利用される主なシストセンチュウ抵抗性の遺伝子資源

遺伝子資源	抵抗性遺伝子	原著論文
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> CPC 1673	<i>H1</i>	Ellenby 1952, Toxopeus and Huijisman 1953, Dunnett 1963
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> CPC 2802	多遺伝子支配	Dale and Phillips 1982
<i>S. multidissectum</i>	<i>H2</i>	Dunnett 1963
<i>S. kurtzianum</i>	<i>A(K1)</i> , <i>B</i>	Huijisman 1960, Kort et al. 1977
<i>S. spgazzinii</i>	<i>Fa</i> , <i>Fb</i> → <i>Gro1</i>	Ross 1962
<i>S. vernei</i>	多遺伝子支配	Ellenby 1948, Goffart and Ross 1954, Rothacker 1958, Dale and Phillips 1982

Bradshaw and Mackay (1994)<sup>40)</sup> を一部改変



ユウ Ro1, Ro5 に対する抵抗性は *Fab* に対応する *Gro1* と呼ばれる 1 遺伝子座に支配されていることが示唆されている<sup>13)</sup>。

これらの抵抗性遺伝子は、ジャガイモシストセンチュウの全てのパソタイプに有効というわけではなく、遺伝子毎に適応範囲が決まっている。*S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 (Ro1, Ro4), *S. kurtzianum* 60.21.19 (Ro1, Ro2) のように 2 種のパソタイプにのみ有効であるものから *S. multidissectum* のようにすべてのパソタイプに抵抗性を示すものまで多様である。

このうち日本に導入されているのは、*S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 由来の *H1* 遺伝子のみである。*H1* 遺伝子は、抵抗性を示すジャガイモシストセンチュウのパソタイプが Ro1, Ro4

の 2 種に限定されているものの、優性形質、単一遺伝子座で、ジャガイモの育種プログラムに組み込みが容易であること、また、日本で発生しているジャガイモシストセンチュウは、Ro1 のみであるため、現在のところ、非常に有効な抵抗性遺伝子である。*H1* 遺伝子は、暖地向けで始めてのジャガイモシストセンチュウ抵抗性品種である普賢丸を始めとして、トヨアカリ、キタアカリ、さやか等、種々のジャガイモ品種に広く導入・利用されている。

本研究では、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性品種の効率的な育種を進めるため、上記 *H1* 遺伝子を有するジャガイモを効率的に判別する遺伝子診断方法の確立を目指した。

## 4. 結 果

### 1) アトランチック由来二倍性半数体からの CP113 遺伝子の単離

*H1* 遺伝子は、RFLP 解析により、ジャガイモ第 5 染色体端部に位置する cDNA クローン CP113 と強く連鎖することが示唆されている<sup>1)</sup>。

そこで、CP113 遺伝子解析による DNA マーカーの作出を試みるため、まず、アトランチック由来二倍性半数体から CP113 遺伝子の単離を行った。Niewöhner ら (1995)<sup>2)</sup> の報告を基に CP113 増幅用 PCR プライマーを設計・合成した (図 3)。これらを用いて PCR を行ったところ、約 1.1 kb の DNA 断片が抵抗性・感受性両系統から得られた (図 4)。増幅された DNA 断片長は、Niewöhner ら (1995)<sup>2)</sup> の報告より長かったものの、彼らの報告が cDNA を中心に解析され、またイントロン部分は、完全に解析されていなかったため、DNA 断片長の差が生じたものと推測された。

得られた DNA 断片は、アガロースゲルより精製し、プラスミド pBluescript II に挿入した (実験方法参照) 後、DNA シークエンサーを用いて塩基配列を分析した。抵抗性・感受性各 4 系統からそれぞれ 2 クローンずつ、合計 16 クローンについて、得られた DNA 断片全長約 1.1 kb を解析した結果、1 箇所の塩基において、抵抗性系統に特異的な配

CP113S1: 5'CAACTCGACATCAAAGCAGT (20 mer)

CP113AS1: 5'AAGAGTAATAGTAAGAGTGACG (22 mer)

図 3 CP113 単離用 PCR プライマー  
末尾の ( ) に長さを記している。

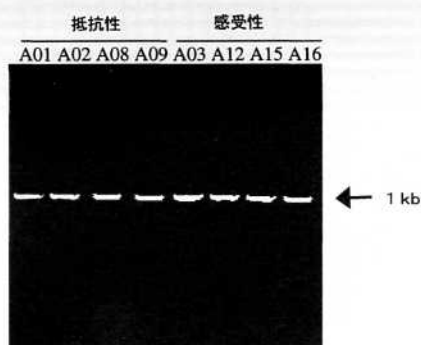


図 4 アトランチック二倍性半数体から PCR 増幅された CP113 遺伝子 ←: PCR で増幅された CP113 遺伝子  
左側 4 つが抵抗性系統を用いたもの、右側 4 つが感受性系統を用いたもの。

列が見つかった (図 5, 6)。図 5 の ↓ で表した抵抗性系統特異的な塩基配列は、抵抗性 8 クローンのうち、4 クローンのみで見つかった。これは、図 16 の模式図からわかるように、材料とした二倍性半数体は対立遺伝子を 2 つ持つ二倍体で、抵抗性遺伝子 *H1* をそのうちの一方のみ持つことから説明される。図 6 にあるように、感受性系統では



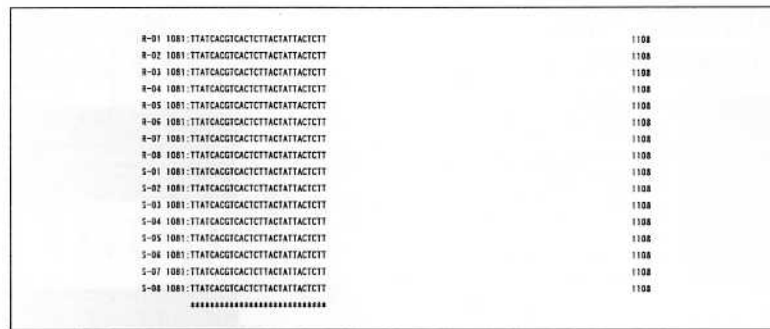


図5 抵抗性・感受性系統における CP113 遺伝子の塩基配列の比較

R : 抵抗性系統  
 S : 感受性系統  
 \* : すべての系統で一致したことを表す  
 N : 未同定の塩基配列  
 — : プライマー H1SP-S1 のアニーリング位置  
 — : プライマー H1SP-A1 のアニーリング位置  
 ↓ : 抵抗性特異的な塩基配列の場所

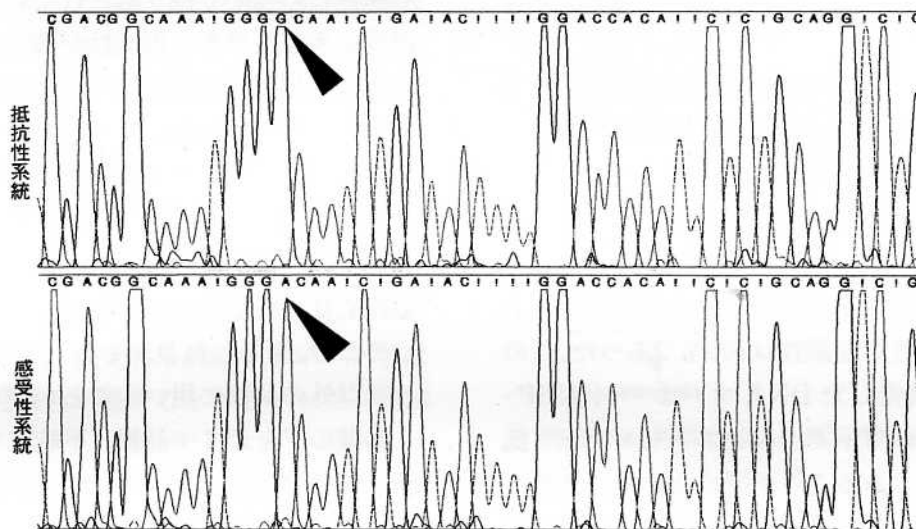


図6 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性特異的な塩基配列 (DNA シークエンサーの波長データ) 抵抗性特異的な塩基配列部分を▲で示した。

GGGA とグアニン 3 塩基に続きアデニン 1 塩基が連続する箇所が、抵抗性系統では GGGG とグアニン 4 塩基が連続している。この配列は、Niewöhner ら<sup>2)</sup>が報告した配列と異なり、今回新たに見出された抵抗性特異的配列である。なお、図 5 と 6 では、見出された抵抗性特異的塩基配列が異なるが、これは、塩基配列分析を行う際、部分的に相補鎖を用いて解析を行ったためである(図 6)。塩基配列分析後、5'上流側から整理したものが図 5 にあたる。

ジャガイモは、他殖性植物のため遺伝子組成は、バラエティーに富むと考えられるが、CP113 を解析した限りでは、全領域にわたって非常に保存性が高かった(図 5)。

## 2) ジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定用プライマーの設計

上記の抵抗性特異的塩基配列を考慮しながら、遺伝子解析ソフト Genetyx win ver. 4 を用いて、PCR プライマー設計を行ったところ、図 7 に示したプライマーの配列が導き出された。このプライマー (H1SP-S1, H1SP-A1) は、それぞれ 18mer と 16mer の長さを持ち、予想される Tm 値はともに 52°C である。H1SP-S1 は、図 5 の 654-671 に、H1SP-A1 は 936-951 に位置し、予想される PCR 断片長は 298bp となる。特徴は、3'側のアンチセンスプライマー (H1SP-A1) の 3'末端が抵抗性特異的塩基配列になっていることである。

一般的に、PCR におけるプライマーの 5'側の塩基配列は認識がゆるく、多少の違いがあっても、



プライマーとして機能し、DNAを増幅する危険性を有している。しかし、今回のプライマー設計では、抵抗性特異的な塩基配列をが3'末端に配置し、1塩基の違いだけでも、判別が可能なるよう工夫した。

H1SP-S1: 5' ATGGTGAGTTCCTTTCTTCT 3'

H1SP-A1: 5' TCGACGGCAAATGGGGG 3'

図7 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定用PCRマーカー  
G: 抵抗性系特異的な塩基配列

### 3) アトランチック二倍性半数体を用いた PCR

設計・合成したプライマー (H1SP-S1, H1SP-A1) の有効性を検証するため、アトランチック二倍性半数体を用いて PCR を行った。

抵抗性・感受性両系統それぞれ16系統を用いて解析した結果、図8にあるように抵抗性系統の全てにおいて約300bpのDNAがシングルバンドとして観察された。一方、感受性系統では全てにおいてDNAのバンドが観察されず、36系統における結果は、増幅DNAの出現とジャガイモシストセンチュウ抵抗性の連鎖性は100%であった。この結果により、開発したDNAマーカー (H1SP-S1, H1SP-A1) がジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定に有効であることが認められた。また、増幅されたDNAも十分量あり、通常の臭化エジウム染色による検出に十分耐えうるものであった。

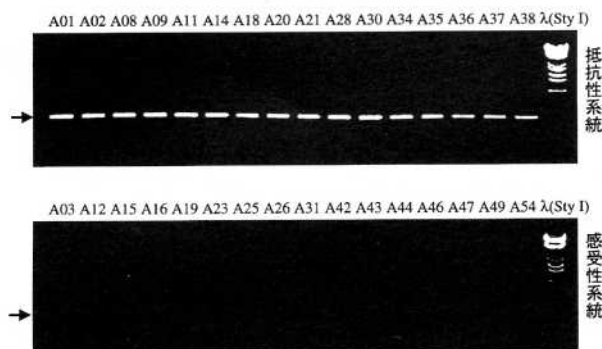


図8 二倍性半数体系統における H1SP-S1・H1SP-A1 を用いた PCR  
→: 300bp の位置を表す  
λ (Sty I): DNA 分子量マーカー

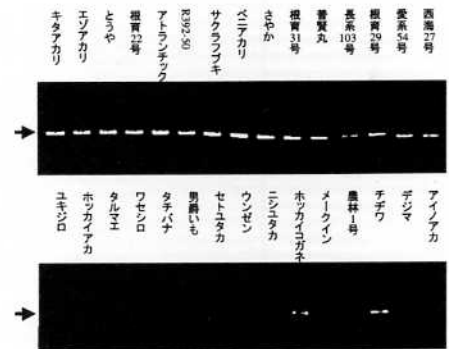


図9 H1SP-S1・H1SP-A1 の汎用性検定  
→: 300bp の位置を表す

### 4) H1SP-S1・H1SP-A1 の汎用性検定

ジャガイモは他殖性で、長い交雑育種の過程で近縁種との交配も繰り返されているため、遺伝子組成に多様性がある可能性が高い。また、通常栽培される品種は四倍体であるため、その多様性も大きいと考えられる。したがって、開発したジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定用DNAマーカー (H1SP-S1・H1SP-A1) は、1塩基の違いだけを基礎としているため、アトランチック以外の品種では適応できない可能性がある。

そこで、開発したDNAマーカーが、アトランチック以外の品種に用いることができるか検討した。

30種のジャガイモ品種、系統について、H1SP-S1・H1SP-A1を用いたPCRを行った結果を図9に示した。抵抗性品種・系統 (キタアカリ, エゾアカリ, とうや, 根育22号, アトランチック, R392-50, サクラフブキ, さやか, 根育31号, 普賢丸, 長系103号, 根育29号, 愛系54号, 西海27号) の15種においては、全てにおいて約300bpのDNAバンドが観察され、H1SP-S1・H1SP-A1が検討した全ての抵抗性品種・系統で有効であることが認められた。一方、感受性品種では、ユキジロ, ホツカイアカ, タルマエ, ワセシロ, タチバナ, 男爵いも, セトユタカ, ウンゼン, ニシユタカ, メークイン, 農林1号, デジマ, アイノアカの13種ではDNAバンドが観察されず、H1SP-S1・H1SP-A1が、幅広い品種で適応可能であることが判明した。しかし、ホツカイコガネとチヂワにおいては、両品種が感受性であるにも関わらず、H1SP-S1・H1SP-A1を用いたPCRでDNAが増幅された。



5) アニーリング温度条件の検討

H1SP-S1・H1SP-A1 を用いた PCR では、場合によっては、感受性の系統でもうすいバンドがでることがあった(図10A)。そこで、PCR の温度条件を検討し、疑似的なうすいバンドが出現しない方法を模索した。

PCR は、基本的に3ステップを要する。まず、高温での熱変性(ステップ1)、低温(30°C~70°C)でのプライマーと鋳型 DNA の会合を行うアニーリング(ステップ2)、そしてプライマーを起点として DNA 合成を行う伸長反応(ステップ3)の3つのステップを1セットとし、これを20~40回繰り返し行うことにより DNA を増幅する。このうち、2ステップ目のアニーリング温度が特異性を決める重要な条件となる。

そこで、PCR 条件のうち、アニーリング温度について検討した。

アニーリング温度について、50°C、55°C、60°C の3段階を検討した。その他の条件は、すべて同じとした。50°C の場合では、場合によって感受性の系統でもうすいバンドが検出された。しかし、55°C 以上になると、感受性系統のうすいバンドは検出されず、特異性が増すことがわかった(図10B、C)。

以上のことから、H1SP-S1・H1SP-A1 を用いた PCR では、アニーリング温度を55°C 以上にすることが重要であることが判明した。

6) 蛍光光度計を用いた PCR 産物の検出

H1SP-S1・H1SP-A1 を用いたジャガイモシストセンチュウ抵抗性の検定は、RAPD、RFLP 法などのように多型を見るものではなく、1本の DNA が増幅されたかどうかを見る単純なものである。したがって、DNA が検出されれば、煩雑な操作である電気泳動は必ずしも必要としない。

そこで、H1SP-S1・H1SP-A1 で増幅された DNA をヘキスト33258で検出することを試みた。ヘキスト33258は、二本鎖 DNA 特異的に結合する蛍光色素で高感度な DNA 定量などに広く用いられている<sup>17)</sup>。通常、DNA の定量には、紫外線(260 nm) の吸光度を測定する方法が用いられているが、この方法は二本鎖以外の核酸もすべてを検出するため、PCR 反応液のようにプライマー、ヌク

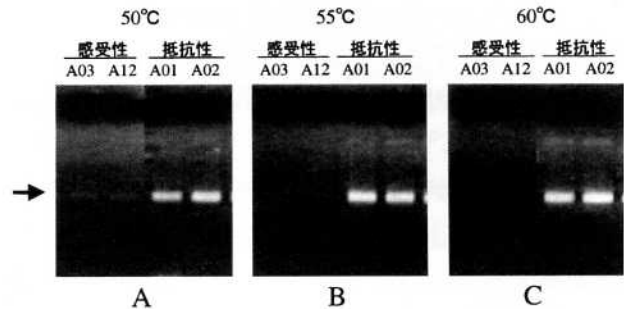


図10 H1SP-S1・H1SP-A1 使用時におけるアニーリング温度の検討  
上段から、アニーリング温度、材料の抵抗性・感受性の識別、二倍性半数体の系統名を記している。  
→: 300bp の位置を表す

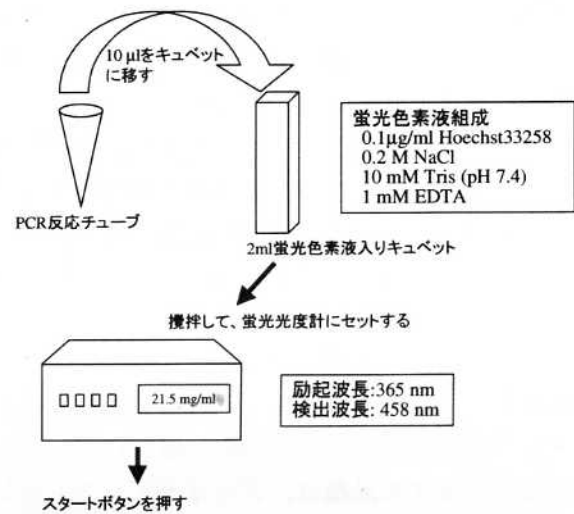


図11 ヘキスト33258による PCR 産物検出のフローチャート

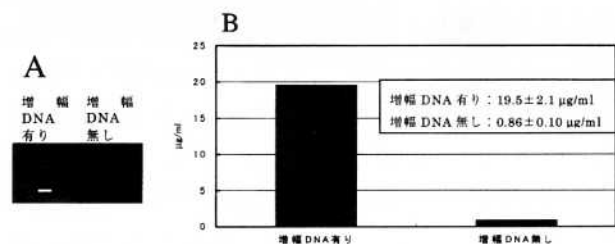


図12 蛍光光度計による PCR 増幅された DNA の定量  
A: 電気泳動写真  
B: ヘキスト33258を用いた定量

レオチドが大量に混入している場合は使用できない。

H1SP-S1・H1SP-A1 を用いて PCR 反応を行い、10µl の反応液を 2 ml のヘキスト33258溶液(図11)に加え、励起光365nm、検出光458nm で検出した。その結果、増幅された DNA がある場合は、およそ20µg/ml の濃度の DNA となり、増幅された DNA がない場合は、1 µg/ml 以下の濃度となり、明確に判定可能であった(図12)。

増幅された DNA がない場合において、0 µg/

mlとならなかったのは、PCR 反応液にトータル DNA12.5ng を加えており、また、プライマー、ヌクレオチドも親和性は低いものの少量がヘキスト 33258 と結合して蛍光を発したためと解釈された。

現在、我々が使用している機器を用い場合、32 検体では、電気泳動による検出ではおよそ 1.5～2 時間要する。これは、アガロースゲルの調製、PCR

反応液とローディングバッファーとの混合、電気泳動、染色、紫外線による検出と写真撮影といった操作が必要なためである。しかし、蛍光光度分析では、PCR 反応液を蛍光色素液に添加し、蛍光光度計に入れるだけでよいので、1 検体あたり数 10 秒、32 検体では 20 分以内で結果を得ることが可能である。

## 5. 考 察

今回、我々は、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性を判別するための遺伝子診断法の確立に向けた DNA マーカーの探索、開発について報告した。ジャガイモシストセンチュウの発生は、世界的に広がり、ジャガイモ栽培に大きな影響を与えている。このセンチュウは、名前の由来のとおりシストと呼ばれる卵の集合体を形成することに特徴がある。このシストは、化学的・物理的に強固で、薬剤による対処が困難であるばかりでなく、土壤中に 20 年以上にわたり活性を保持したまま残留した<sup>18)</sup>との報告があるように根絶が難しい。しかし、抵抗性ジャガイモ品種は、ジャガイモシストセンチュウ汚染圃場において、生育、収量を維持するばかりでなく、ジャガイモシストセンチュウ幼虫のふ化を促進し、結果としてふ化した幼虫を餓死させる作用もある<sup>19) 20) 21) 22)</sup>ことから、薬剤使用なしに汚染圃場からジャガイモシストセンチュウ密度を低下させる効果を有する。また、ふ化した幼虫は薬剤に弱いため、薬剤の効果を高める働きも有している。しかし、このような抵抗性品種の重要性は広く認識されているものの、収量、品質、市場評価など既存品種の能力を上回る品種が育成されていないために、北海道では抵抗性品種の栽培面積が伸び悩んでいる。

高品質の抵抗品種を育成するためには、鍵を握る抵抗性の判定技術の改良が重要であると思われる。これまでは、ジャガイモシストセンチュウ自体を接種して、シストを形成するかどうかで判定が行われてきたが、この方法では、気象条件、時間的問題、労力、そして何よりジャガイモシストセンチュウを直に扱うため、汚染拡大の危険性がある。

それに対して遺伝子診断による方法は、栽培を

必要とせず、気象条件に影響を受けない。また、ジャガイモシストセンチュウを取り扱わないため、汚染の危険性がないなど優れた検定技術である。また、法医学でも採用が増えているように、遺伝子工学の進展に伴い、信頼性も高まっている。

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性の遺伝子分析については、アメリカのコネル大学やドイツのマックスプランク研究所など世界有数の研究機関が進めてきた<sup>1) 2) 12) 13) 14) 23) 24) 25) 26) 27)</sup>が、これらのグループは、あくまで抵抗性遺伝子の単離を目標としており、育種現場で用いるような遺伝子診断技術の確立に関する報告は少ない。唯一、マックスプランクのグループが PCR マーカーの開発を試みた<sup>2)</sup>が、抵抗性との連鎖性は確認できていない。これは、ヨーロッパでは、ジャガイモシストセンチュウ発生歴史が古く、抵抗性育種素材をいち早く、また、多種を導入してきたため、数種の抵抗性遺伝子が混入し、抵抗性形質と遺伝子(座)との対応が困難になっているものと推測される。

そこで、我々は、マックスプランク研究所の Niewöhner ら(1995)<sup>2)</sup>の結果を基に、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性判定用の DNA マーカー開発を試みた。

抵抗性遺伝子に連鎖しているとみなされる CP113 遺伝子を、愛野支場で抵抗性の育種母本として利用されているアトランチックから単離し、塩基配列を詳しく分析した。その結果、これまでに報告のない抵抗性系統に特異的な塩基配列が見つかった。見つかった塩基配列は、約 1 kb のうち、ただ 1 箇所のみであったが、その配列をもとに、PCR 用プライマー“H1SP-S1・H1SP-A1”を設計・合成した(図 7)。このジャガイモシストセンチュウ抵抗性判定用 DNA マーカー H1SP-

S1・H1SP-A1 は、検討した二倍性半数体32系統では、100%の確率で、また四倍体の栽培品種・系統でも30種中28種で有効性が認められ、これまでで最も育種選抜に有効な DNA マーカー (PCR マーカー) と見なされた。特に、調べた抵抗性品種・系統すべてで DNA バンドが検出されたことは、特異的な配列が、抵抗性の起源である *S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 の染色体 DNA 由来である可能性を示唆した。

H1SP-S1・H1SP-A1 は、1塩基のみの違いを利用して、プライマーと鋳型 DNA の mismatches が生じやすく、ホットスタートが望ましい。現在、各メーカーからワックスを利用した方法、DNA 合成酵素 (Taq) の抗体を利用した方法など種々の方法を用いたホットスタート用試薬が販売されているが、今回利用した方法は、Taq をあらかじめ化学的に不活性化しておき、高温で長時間インキュベートすることにより徐々に活性を回復していく方法である (商品名: AmpliTaq Gold, PE バイオシステム社)。この方法は、検討したホットスタート法のなかで、最も特異性が高く (データ未公表)、簡便である。また、アニーリング温度を55°C以上にすることで疑似バンドを抑えることが可能となった (推奨温度、55°Cあるいは60°C)。この不活性化酵素と適度なアニーリング温度を用いることで非常に簡便に、特異性を高めることが可能となった。

図13に、ドイツマックスプランク研究所の Niewöhner ら (1995)<sup>2)</sup> が報告した CP113 遺伝子の塩基配列と我々が決定したアトランチック CP113 の塩基配列を比較した。

Niewöhner らは、ジャガイモ品種 “Amaryll” 由来の二倍性半数体を材料として用いている。Amaryll は、我々が材料として用いたアトランチックと同様、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性を *S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 から導入したとされている。

CP113 の 5', 3' 両端の配列は、両者で類似性が高いものの、イントロン部となる中央域では、両者の配列は、かなり異なっている (図13)。これは、一般的に言われているように、翻訳領域よりも非翻訳領域で変異が大きいことと矛盾しない<sup>28)</sup>。Niewöhner らは、抵抗性特異的配列をこのイント

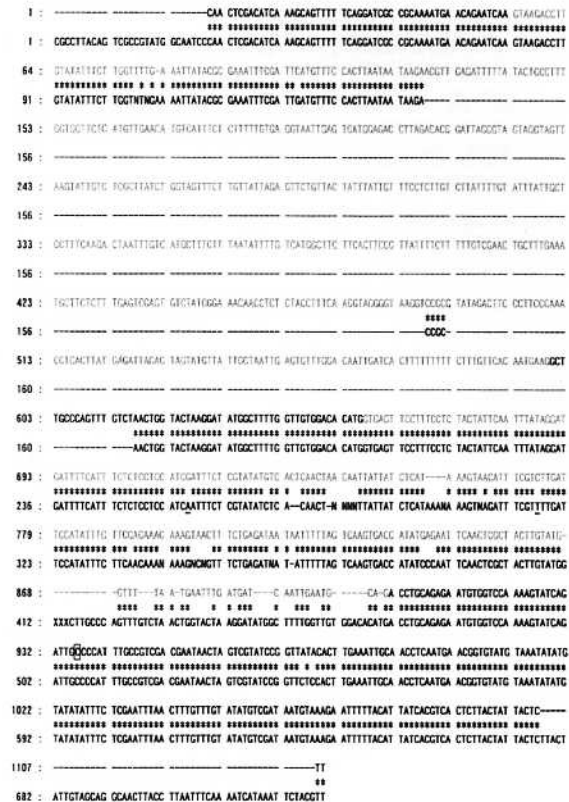


図13 CP113 遺伝子の比較

上段に、今回我々が決定したアトランチック由来 CP113 遺伝子 (抵抗性特異的塩基配列を含む) の塩基配列を、下段に、Gebhardt ら<sup>2)</sup> が報告したドイツ品種由来 CP113 遺伝子の塩基配列を並べた。アトランチック由来 CP113 遺伝子配列については、エクソンとイントロンを推定し、区別した。

- 上段の黒字: 推定エクソン
- 上段の灰字: 推定イントロン
- \*: 両配列で一致したことを表す。
- =: Gebhardt ら<sup>2)</sup> が抵抗性特異的な配列と報告した配列
- : 今回報告した抵抗性特異的配列
- : アライメントするために挿入したギャップを表す。

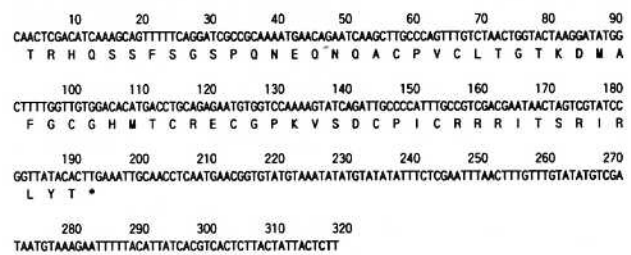


図14 アトランチックCP113遺伝子の塩基配列と予想アミノ酸配列

- \*: 終結コドンを表す
- なお、配列は PCR で増幅した部分塩基配列

ロン部で2箇所見出しているが、これらの配列は、今回の解析では抵抗性・感受性間で差が認められなかっただけでなく、塩基配列が異なっていた (図13)。259塩基にあたる A は、今回の解析では G、317番目の T が C となっていた。また、Niewöhner らは、イントロンの全領域について塩基配列を決定していないため、我々が決定した配列と比べて約500bp ほどの欠失領域があった。



<p><b>1. アラビドプシス <i>C. elegans</i> Zinc フィンガー-C3HC4 領域タンパク質</b>                  gb AAD30238.1 AC007202.20 (AC007202) Similar to gi13844589 F3105.2 gene product from <i>Caenorhabditis elegans</i> cosmid gb U28841 and contains PF100087 Zinc (Ring) Finger C3HC4 domain. ESTs gb F19953 and gb 142582 come from this gene.                  [Arabidopsis thaliana]                  Length = 401                  Score = 87.8 bits (214). Expect = 1e-17                  Identities = 34/50 (68%). Positives = 43/50 (86%)</p> <p>CP113: 14 EQWACPVLTGTGDMAFGCGDMTCRECGPKVSDPCICRRITSRIRLY 63                  EQ QHPVCLT KDMAF CGDMTC GCG K45KPCICR RITRRHLYT                  Sbjct: 352 EQTQSPICLTNRKDAFVFCGDMTCGCGGK15MCPICRVRTIRMLKLYT 40 1</p>	<p><b>6. ニワトリ アトポースインヒビタータンパク質</b>                  sp Q99881 IAP_D122 (INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEIN (IAP) (INHIBITOR OF T CELL APOPTOSIS PROTEIN))                  gi11335774 gb 14848111.1 U27465 IAP-like protein [Gallus gallus]                  Length = 611                  Score = 45.7 bits (100). Expect = 4e-05                  Identities = 22/63 (35%). Positives = 31/63 (49%). Gaps = 8/63 (12%)</p> <p>CP113: 8 SCSPQNEQ-----NQACPVLTGTGDMAF-GCGDMT-CRECGPKVSDPCICRRITSRIRLY 62                  SC P EQ + C VCA + F CGH CHEC P + CPICR I + R +                  Sbjct: 547 SGLPNEQLRRLDEERTCKVDMVEYVIFPCGHLVYKCECAPSLRKPICRGTIKGIV RIF 608</p>
<p><b>2. アラビドプシス未知タンパク質</b>                  gb AA01562.1 AC009325.32 (AC009325) unknown protein [Arabidopsis thaliana]                  Length = 489                  Score = 73.7 bits (178). Expect = 2e-13                  Identities = 29/46 (63%). Positives = 35/46 (76%)</p> <p>CP113: 17 QACPVLTGTGDMAFGCGDMTCRECGPKVSDPCICRRITSRIRLY 62                  Q CPVCL KMAFGCGH TC ECP + CPICR I RHLT                  Sbjct: 444 QLCPCILSNPKNMAFGCGGHTCCCG PDLKPCICRPIQIRIKLY 489</p>	<p><b>7. ドブネズミ アトポースインヒビタータンパク質</b>                  gi AA04585.1 AF180028.1 (AF180028) inhibitor of apoptosis protein 2 [Rattus norvegicus]                  Length = 589                  Score = 45.3 bits (105). Expect = 6e-05                  Identities = 19/51 (37%). Positives = 28/51 (54%). Gaps = 2/51 (3%)</p> <p>CP113: 14 EQWACPVLTGTGDMAF-GCGDMT-CRECGPKVSDPCICRRITSRIRLY 62                  EQ + C VCA + F CGH CHEC P + CPICR I R +                  Sbjct: 527 QERTKQVDMVEYVIFPCGHLVYKCECAPSLRKPICRGTIKGIVRIF 587</p>
<p><b>3. アラビドプシス未知タンパク質</b>                  gb AA026931.1 AC008113.2 (AC008113) F12A21.5 [Arabidopsis thaliana]                  Length = 479                  Score = 68.3 bits (164). Expect = 7e-12                  Identities = 29/55 (52%). Positives = 34/55 (61%)</p> <p>CP113: 8 SCSPQNEQDQACPVLTGTGDMAFGCGDMTCRECGPKVSDPCICRRITSRIRLY 62                  S + Q CPVCL KMAF CGH TC CG + CPICR I RHLT                  Sbjct: 425 STTHNESQQQCPVCLVSAKNN AFNGHQHACGGEDRHWPCIRSS15VRIKLY 479</p>	<p><b>8. <i>Buzura sudpressaria</i> nucleopolyhedra ウイルス アトポースインヒビタータンパク質</b>                  gi AAC33732.1 AF045936  apoptosis inhibitor IAP-1 [Buzura sudpressaria nucleopolyhedrovirus]                  Length = 275                  Score = 44.8 bits (104). Expect = 8e-05                  Identities = 18/51 (35%). Positives = 22/51 (43%). Gaps = 2/51 (3%)</p> <p>CP113: 14 EQWACPVLTGTGDMAF-GCGDMT-CRECGPKVSDPCICRRITSRIRLY 62                  E +VAC IC + + F CGH TC IC + RCP C R H + RHT                  Sbjct: 224 EGRKACRIFPEEERHVPFPCGHATCGCAVALQHPICRKNIMAWVMT 274</p>
<p><b>4. Chilo iridescent ウイルスの推定 Zinc フィンガータンパク質</b>                  gi AAB94476.1 AF003534  putative zinc finger protein [Chilo iridescent virus]                  Length = 184                  Score = 46.1 bits (107). Expect = 3e-05                  Identities = 17/44 (38%). Positives = 25/44 (56%)</p> <p>CP113: 15 QNACPVLTGTGDMAFGCGDMTCRECGPKVSDPCICRRITSRIR 58                  +N CPVCL + F C H+ C C + + CPICR I +                  Sbjct: 133 ERLCPVCLIKVYNTVFNCTHVSQS SCARLRLVWPCIRMP1RHX 176</p>	<p><b>9. Chilo iridescent ウイルス Zinc フィンガータンパク質</b>                  gi AAB94468.1 AF003534  putative zinc finger protein [Chilo iridescent virus]                  Length = 28                  Score = 44.5 bits (103). Expect = 1e-04                  Identities = 16/44 (36%). Positives = 24/44 (54%)</p> <p>CP113: 14 EQWACPVLTGTGDMAFGCGDMTCRECGPKVSDPCICRRITSRIR 57                  +N CPVCL + C H C C H + CPICR H                  Sbjct: 40 KRNVLPCILAKVYVLECHVLCNCKVKN VPCIRCKTFS 83</p>
<p><b>5. ニワトリ アトポースインヒビタータンパク質</b>                  gb AAB80044.1 AF008592  IAP homolog [Gallus gallus]                  Length = 610                  Score = 45.7 bits (106). Expect = 4e-05                  Identities = 23/63 (36%). Positives = 31/63 (49%). Gaps = 8/63 (12%)</p> <p>CP113: 8 SCSPQNEQ-----NQACPVLTGTGDMAF-GCGDMT-CRECGPKVSDPCICRRITSRIRLY 62                  SC P EQ + C VCA + F CGH CHEC P + CPICR I + R +                  Sbjct: 546 SGLPNEQLRRLDEERTCKVDMVEYVIFPCGHLVYKCECAPSLRKPICRGTIKGIV RIF 608</p>	<p><b>10. アラビドプシス未知タンパク質</b>                  gi AAC27158.1 AC003028  unknown protein [Arabidopsis thaliana]                  Length = 124                  Score = 44.5 bits (103). Expect = 1e-04                  Identities = 22/61 (36%). Positives = 32/61 (52%). Gaps = 6/61 (9%)</p> <p>CP113: 9 SCSPQNEQDQACPVLTGTGDMAF-GCGDMT-CRECGPKVSD-----CPICRRITSRIRLY 63                  C H + C H C H D F CGH + C ECG + + CPICR + RHT                  Sbjct: 63 GEARARRRRLCALICFVPHDFPFCGHLVYKCECAPSLRKPICRGTIKGIV RIF 124</p>

図15 CP113 タンパク質と類似性が認められたタンパク質

類似性 (Score) が高い順に並べた。

上段から、タンパク質の名称、長さ (Length)、類似性 (Score)・期待値 (Expect)、同一アミノ酸 (Identities)・相同アミノ酸 (Positive)、挿入残基 (Gaps) のデータを記した。最後の段に、CP113 タンパク質のアミノ酸配列と類似性があつたタンパク質アミノ酸配列を並列した。2 配列間には、一致した場合、一致したアミノ酸名を、相同性アミノ酸であつた場合、+ を表記した。

今回、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性判定用の DNA マーカー開発の基となつた CP113 遺伝子については、機能が全くわかっていない。そこで、CP113 遺伝子の翻訳領域をアミノ酸配列に変換し、データベースとのホモロジー検索を行った。

翻訳領域は、既報との比較<sup>2)</sup>、およびイントロンスプライシング部位のコンセンサス配列 (GT/AG)<sup>28)</sup> をもとに推定した。CP113 遺伝子は、全長が単離されていないため、アミノ酸翻訳のフレームは不明であつたが、アミノ酸置換を行ったところ、3 フレームの内、2 フレームは置換開始すぐに終結コドンが位置しており、残りの 1 フレームが本来のアミノ酸配列と推測された (図14)。

米国 NCBI (National Center for Biotechnology Information) の検索システム PSI-BLAST<sup>29)</sup> を用い、全アミノ酸データベースを対象に検索を行った。条件は、Expect value10 で、

無意味な頻出配列を削除するためフィルターをかけて行った。

ホモロジー検索の結果、類似性が認められた配列のうち、上位10個を図15に示した。1, 4, 9 番目の配列は、転写制御に関連がある Zinc Finger 蛋白質、あるいはそのホモログであつた。特に、1 番目のアラビドプシスの Zinc フィンガー蛋白質ホモログとは、86%の類似性が認められた。5, 6, 7, 8 番目の配列は、アトポース蛋白質のインヒビターと高い類似性が見られた。Zinc Finger 蛋白質との比較においては、Zinc (亜鉛) と結合する機能を持つシステイン残基は、100%保存されており、CP113 が Zinc フィンガー蛋白質である可能性は高いと思われた。これらのシステイン残基は、アトポース蛋白質インヒビターでも保存されており、重要な機能を担っている可能性が高い。2, 3, 10 番目に類似性が高かつた配列は、機能が不明のものであつたが、これらの配列



との比較においても、システイン残基は100%保存されていた。

CP113 と抵抗性形質との関連は、全くわかっていないが、これまで単離された病害虫抵抗性遺伝子は、その多くがシグナルトランスダクションに関連している<sup>30) 31) 32) 33) 34) 35) 36) 37)</sup>。Zinc Finger 蛋白質も転写制御に重要なシグナルトランスダクション関連タンパク質の一つと観ることが可能であり、また、連鎖性が非常に高いことを考えると、今後、抵抗性との関連を調べることは重要であると考えられる。

遺伝子診断法には、RFLP, AFLP, SSCP, RAPD 法など種々の方法がある。しかし、育種現場で利用するためには、一度 STS 化し、単純な PCR に還元することが重要である。今回、開発した H1SP-S1・H1SP-A1 は、DNA が増幅されればジャガイモシストセンチュウ抵抗性、増幅されなければ感受性というように単純な PCR に還元され、操作性が高いシステムである。しかし、PCR 遺伝子診断全体で考えると、その他 DNA 抽出、検出の過程も簡略化する必要がある。

DNA の検出については、図12に示したように、ヘキスト33258を用いた蛍光分析法により、簡略化が可能となったが、DNA 抽出法は今後さらに改良する必要があると思われる。今回、使用した CTAB-LiCl 法は、従来の CTAB 法に比べて、煩雑性や時間的問題はかなり改良されているが、DNA 分析の未経験者が行うにはまだ複雑である。我々は、DNA 抽出を大きく簡略化した方法を研究・開発中であるが、培養植物では有効なもの、圃場での栽培植物では再現性に乏しい。今後、DNA 抽出についてさらなる改良を進める必要がある。

また、開発した H1SP-S1・H1SP-A1 は、これまでの報告と比べて、連鎖性、操作性に優れ、実用に耐えうるものと考えられる。しかし、図9にあるように、一部の品種では、感受性にも関わらず DNA バンドが検出され、利用できない。そこで、現在さらなる改良を進めるため、CP113 上流域をインバース PCR で単離した。今後、上流域を解析することで、汎用性が高い DNA マーカーを開発する予定である。

## 6. 材料と試験方法

### 1) 材料

DNA マーカー探索の材料として、ジャガイモシストセンチュウセンチュウ抵抗性品種アトランチックを用いた。アトランチックに単為生殖誘発系統 *S. phureja* 460 を花粉親として交配し、アトランチック由来の二倍性半数体系統を得た(図16)。得られた二倍性半数体系統は、ポット栽培し、ジャガイモシストセンチュウ幼虫を寄生させた後、根に形成させるシストの有無により抵抗性、感受性を判別した(表3)。

表3 アトランチック由来二倍性半数体系統

	系統名
抵抗性系統	A01, A02, A08, A09, A11, A14, A18, A20, A21, A28, A30, A34, A35, A36, A37, A38
感受性系統	A03, A12, A15, A16, A19, A23, A25, A26, A31, A42, A43, A44, A46, A47, A49, A54

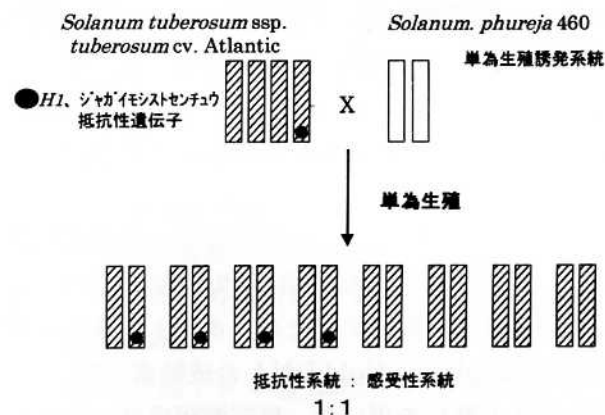


図16 アトランチック二倍性半数体作出の模式図

### 2) DNA 抽出方法

ジャガイモからの DNA 抽出は、Sul (1995)<sup>38)</sup>らの方法を一部改変して行った。2 g の葉組織を乳鉢を用いて液体窒素中で粉碎し、2% CTAB 溶液(2% 臭化ヘキサデシルメチルアンモニウム、0.1M Tris pH8.0, 1.4M 塩化ナトリウム, 1% ポリビニルピロリドン, 1%メルカプトエタノー

ル), および 8 M 塩化リチウム溶液をそれぞれ 3 ml 加えた後, 65°C で 5 分間保温した。遠心チューブに移した後, 6 ml のクロロホルム・イソアミルアルコール (24: 1) 溶液を加え, 攪拌し, 7,000g で 1 分間遠心した。上層液を別の遠心チューブに移し, クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を更に 2 回繰り返した。3 回目の抽出後, 上層を別の遠心チューブに移し, 2 倍容量のエタノールを加え, 7000g で 1 分間遠心した。形成された DNA の沈殿物を 70% エタノール 3 ml で洗浄し, もう一度遠心した。精製されたトータル DNA は, RNaseA 処理後, TE 緩衝液に溶解し, ヘキスト 33258 を用いた蛍光分析により濃度を決定した<sup>17)</sup>。蛍光光度計は, アマシャムファルマシア社の DyNA Quant200 を用いた。

### 3) PCR 条件

アトランチック CP113 遺伝子の単離のための PCR は, Taq DNA 合成酵素と Pwo DNA 合成酵素からなる酵素ミックスを使用した DNA 合成精度が高い Expand high fidelity PCR system (ベーリンガーマンハイム社) を用いた。反応液組成は, トータル DNA 50ng, 200 $\mu$ M dNTP, 0.3  $\mu$ M プライマー (図 3), 1x 酵素添付緩衝液 (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 酵素ミックス 1.3U, 反応液量 50  $\mu$ l とし, 温度条件は, 予備加熱 94°C 2 分に続き, 94°C 20 秒, 50°C 30 秒, 72°C 1 分のサイクルを 25 回, さらに 94°C 20 秒, 50°C 30 秒, 72°C 1 分 (1 サイクル毎に 20 秒の延長) のサイクルを 10 回とした。

H1SP-S1, H1SP-A1 を用いたジャガイモシストセンチュウ抵抗性判定用の PCR は, プライマーの特異性を有効にするため, ホットスタートが容易な AmpliTaq Gold DNA 合成酵素 (PE バイオシステム社) を用いた。反応液組成は, トータル DNA 12.5ng, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M dNTP, 0.3 $\mu$ M プライマー (図 8), 1x 酵素添付緩衝液, 0.5U 酵素, 反応液量 20 $\mu$ l とし, 温度条件は, 予備加熱 95°C 9 分に続き, 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒のサイクルを 35 回とした。

なお, 実験に用いたプライマーは, アマシャムファルマシア社の OligoExpress PCR で合成した。

### 4) PCR 増幅 DNA 断片のプラスミド挿入

PCR で増幅した DNA 断片は, リン酸化, および平滑末端化処理した後, プラスミドに挿入し, 塩基配列分析を行った。

PCR 反応液を限外ろ過フィルター付き遠心チューブ “SUPREC02” (宝酒造株式会社) で精製・エタノール沈殿した DNA 断片を, 100 $\mu$ M ATP, 1x 酵素添付緩衝液, T4 リン酸化酵素 10U (MBI 社), 反応液量 50 $\mu$ l で 37°C 1 時間, リン酸化処理した。75°C 10 分間の酵素失活処理後, DNA 断片を SUPREC02 で精製・エタノール沈殿し, 250 $\mu$ M dNTP, 1x 酵素添付緩衝液, T4DNA 合成酵素 6 U (MBI 社), 反応液量 10 $\mu$ l で 37°C 5 分間, 平滑末端化処理を行った。フェノール抽出・エタノール沈殿後, 常法によりプラスミド pBluescript II (KS-) の Sma I 部位に挿入した<sup>39)</sup>。

### 5) プラスミド精製

常法により, プラスミドを大腸菌で増幅し<sup>39)</sup>, Wizard plus miniprep DNA purification system (Promega 社) を用いてプラスミド DNA を精製した。

### 6) アガロースゲル電気泳動

PCR により増幅された DNA は, アガロースゲル電気泳動により, バンドを検出した。PCR 反応液にローディングバッファーを加えた後, 0.8% アガロース, 100V で電気泳動し, 0.5 $\mu$ g/ml 臭化エチジウムで染色し, ImageMasterVDS (アマシャムファルマシア社) で観察した。

### 7) 塩基配列決定

プラスミドに挿入された DNA 断片の塩基配列は, Dye terminator cycle sequencing FS ready reaction kit (PE バイオシステム社) を用いて蛍光標識し, エタノール沈殿による精製後, DNA シークエンサー ABI373A, あるいは ABI PRISM 310 (PE バイオシステム社) を用いて電気泳動・解析を行った。

### 8) 塩基配列のコンピューター解析

得られた塩基配列の分析は, ソフトウェア開発株式会社の Genetyx-win ver. 4 を用いて解析した。

ホモロジー検索は、米国 NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベ

ースを用いた。アルゴリズムとして、PSI-BLAST を使用した<sup>29)</sup>。

## 7. 謝 辞

本報告を取りまとめるにあたり、当场次長兼新技術開発部長 三好祐二氏、愛野馬鈴薯支場長宮崎孝氏、環境部長 小川義雄氏、佐賀大学助教授 大島一里氏には綿密なご高閲とご指導を賜った。

ジャガイモシストセンチュウ抵抗性の検定では、農林水産省北海道農業試験場線虫研究室長 百田洋二氏にご協力を頂いた。

環境部病害虫科研究員 寺本健氏には、本研究全体を通じて多大なご指導、ご教示を頂いた。

元愛野馬鈴薯支場育種栽培科長 森元幸氏(現農

水省北海道農業試験場)、愛野馬鈴薯支場専門研究員 中尾敬氏、元研究員 茶谷正孝氏、研究員 向島信洋氏には、貴重なアドバイス、材料提供など親身なご協力を頂いた。

環境部加工化学科研究員(生物工学科兼務) 大林憲吾氏にはご協力を頂いた。

佐賀里昭人氏、吉井留美子氏、広瀬文子氏、南清美氏には、実験作業のご協力を頂いた。

以上の各位に衷心より感謝の意を表する。

## 8. 引用文献

- 1 C. Gebhardt, D. Mugniery, E. Ritter, F. Salamini and E. Bonnel. Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring to *Globodera rostochiensis* in potato. Theor. Appl. Genet. 85, 541-544. 1993.
- 2 J. Niewohner, F. Salamini and C. Gebhardt. Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles *Gro1* and *H1*, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Mol. Breed. 1, 65-78. 1995
- 3 K. Evans and B. B. Brodie. The origin and distribution of the golden nematode and its potential in the U. S. A. Am. Potato J. 57, 79-89. 1980.
- 4 三枝敏郎・氣賀澤和男・湯原巖・堤正明・稲垣春郎・桜井嘉郎・山田英一・高倉重義・一戸稔：北海道負真狩・留寿郡地区におけるジャガイモシストセンチュウの発生分布，日線虫研誌，2，45-46 (1973)
- 5 寺本健：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，九病虫研会報，45，72-75，(1995)
- 6 B. B. Brodie. Nematodes parasites of potato. In Plant and insect nematodes. Edited by W. R. Nickel. Marcel Dekker Inc., New York and Brussels. pp. 167-212. 1984.
- 7 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，長崎県農試報，24，39-62，(1998)
- 8 農林水産技術会議事務局：ジャガイモシストセンチュウの防除に関する研究，研究成果，127 (1980)
- 9 稲垣春郎：ジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*) の生態並びに防除に関する研究，北海道農試報，139，73-144，(1984)
- 10 山田英一：ジャガイモシストセンチュウの生態と防除に関する研究，北海道立農試報，61，1-98 (1987)
- 11 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”，長崎県農試報，24，19-38，(1998)

- 12 O. Pineda, M. W. Bonierbale and R. L. Plaisted. Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Genome* 36, 152-156. 1993.
- 13 A. Ballvova, J. Hesselbach, J. Niewohner, D. Leister, F. Salamini and C. Gebhardt. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Grol*. *Mol. Gen. Genet.* 249, 82-90. 1995.
- 14 D. Cai, M. Kleine, S. Kifle, H. Harloff, N. N. Sandal, K. A. Marcker, R. M. Klein-Lankhorst, E. M. J. Salentijn, W. Lange, W. J. Stiekema, U. Wyss, F. M. W. Grundler and C. Jung. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275, 832-834. 1997.
- 15 J. Kort, H. Ross, H. J. Rumpfenhorst and A. R. Stone. An international scheme to identifying and classing pathotypes of potato cyst-nematodes *Grobodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica* 23, 333-339. 1977.
- 16 M. Canto-Saenz and M. M. de Scurrah. Races of the potato cysto nematode in the Andean region and a new system of classification. *Nematologica* 23, 340-349. 1977.
- 17 C. Cesarone, C. Bolognesi and L. Santi. Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal. Biochem.* 100, 188-198. 1979.
- 18 P. Jatala. Biology and manegement of nematode parasites of potato in developing countries. In *Advances in potato pest biology and manegement*. Edited by G. W. Zhender, M. L. Powelson, R. K. Jansson and K. V. Raman. APS press, Minnesota, USA. 1994.
- 19 M. Piegat and A. Wilski. Cytological differences in root cells of susceptible and resistant potato varieties invaded by potato root eelworm (*Heterodera rostochiensis* Woll.) larvae. *Nematologica* 11, 109-115. 1965.
- 20 R. W. Hoopes, R. E. Anderson and W. F. Mai. Internal response of resistant and susceptible potato clones to invasion by potato cyst nematode, *Heterodera rostochiensis*. *Nematoropica* 8, 13-20. 1978.
- 21 H. Ross. Potato breeding. Problems and perspectives. *Adv. Plant Breed.* 13. 1986.
- 22 V. M. Williamson and R. S. Hussey. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell.* 8, 1735-1745. 1996.
- 23 A. Barone, E. Ritter, U. Schachttschabel, T. Debener, F. Salamini and C. Gebhardt. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 224, 177-182. 1991.
- 24 C. Gebhardt and F. Salamini. Restriction fragment length polymorphism analysis of plant genomes and its application to plant breeding. *Int. Rev. Cytol.* 135, 201-233. 1992.
- 25 C. M. Kreike, J. R. A. de Koning, J. H. Vinke, J. W. von Ooijen, C. Gebhardt and W. J. Stiekema. Mapping of loci involved in quantiatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1. *Theor. Appl. Genet.* 87. 464-470. 1993.
- 26 C. M. Kreike, J. R. A. de Koning, J. H. Vinke, J. W. von Ooijen and W. J. Stiekema. Quantiatively-inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* 88. 764-769. 1994.
- 27 J. R. van der Voort, P. Wolter, R. Folkertsma, R. Hutten, P. van Zandvoort, H. Vinke, K. Kanyuka, A. Bendahmane, E. Jacobsen, R. Janssen and J. Bakker. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in



- potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95, 874-880. 1997.
- 28 B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. Watson. *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. Garland Publishing, Inc., New York and London. 1994.
- 29 S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids Res.* 25, 3389-3402. 1997.
- 30 M. Mindrinos, F. Katagiri, G. Yu and F. M. Ausubel. The *A. thaliana* resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78, 1089-1099. 1994.
- 31 S. Whitham, S. P. Dinesh-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr and B. Baker. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78, 1101-1115. 1994.
- 32 M. R. Grant, L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald, A. Sattler, R. W. Innes and J. L. Dang. Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269, 843-846. 1995.
- 33 W. Song, G. Wang, L. Chen, H. Kim, L. Zhu, C. Fauquet and P. Ronald. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa 21*. *Science* 270, 1804-1806. 1995.
- 34 D. A. Jones, C. M. Thomas, K. E. Hammond-Kosack, P. J. Balint-Kurti and J. D. G. Jones. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266, 789-792. 1994.
- 35 A. F. Bent, B. N. Kunkel, D. Dahbeck, K. L. Brown, R. Schmidt, J. Giraudat, J. Leung and B. J. Staskawicz. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265, 1856-1860. 1994.
- 36 G. B. Martin, S. H. Brommonschenkel, J. Chuwongse, A. Frary, M. W. Ganai, R. Spivey, T. Wu, E. D. Earle and S. D. Tanksley. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262, 1432-1436. 1993.
- 37 A. F. Bent. Plant Disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell*. 8, 1757-1771. 1996.
- 38 I. W. Sul and S. S. Korban. A highly efficient method for isolating genomic DNA from plant tissue. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 2, 113-116. 1996.
- 39 J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis. *Molecular cloning, A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- 40 J. E. Bradshaw and G. R. Mackay. *Potato genetics*. CAB International, Willingford, UK, 1994.

Development of a genetic diagnosis technique for detection of resistant feature to  
*Globodera rostochiensis* in potato

Toshinori TANAKA, Kuninori KOMURA

Summary

Potato cyst nematode is one of most important pests, and a resistant feature to the nematode is a beneficial agronomic trait. *H1* gene from *S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 confers resistance to potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis* and has been widely introduced into many of potato varieties. However, the test whether a F1 line harbors the *H1* or not is affected by climate conditions, and requires technical skill, long time, high financial input and so on. To make the test simple and fast, we have tried to develop a PCR assay. CP113 gene (Niewohner et al 1995) which have been reported to be linked to the *H1* has been cloned and its sequence was compared between resistant and susceptible lines. Only one nucleotide sequence was identified as a resistant specific sequence, and resistance-specific PCR primer (H1SP-A1) was designed based the unique sequence. Using the primer H1SP-A1 and common primer H1SP-S1, 36 dihaploid lines (18 resistant and susceptible lines each) were tested. The result indicated that the primers were correlated with the resistance at a 100% value as far as tested. The primers were correlated also with 15 tetraploid potato varieties resistance to the nematode at a 100% value, but there were 2 exceptions (Chijiwa and Hokkai-kogane) among 15 susceptible varieties. These results indicate the PCR maker developed in this study was linked to resistance to the nematode at a high frequency and useful in potato breeding as a practical technique.