

Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) マーカーによる バレイショ品種群での *Ryadg* 由来PVY抵抗性の選抜

森川 陽子¹、笠井 和江¹、京谷 淳子¹、白仁田 明生²、
V. A. Sorri³、J. P. T. Valkonen³、渡邊 純子¹、渡邊 和男^{1, 4}

要 約

優性単一遺伝子 *Ryadg* は植物病害に対して非常に強い効果を持つことが知られており、多様なジャガイモ品種及び育種系統において *Ryadg* に連鎖することを利用した CAPS マーカーが作成された。この分子マーカーは特定のジャガイモ品種及び育種系統だけでなく、多くのジャガイモ品種及び育種系統へ適用できることが望ましい。そこで、それらの汎用性を確認するために本実験を行った。また、CAPS マーカーをより簡易化する試みを行い、プロトコール A とそれを簡易化させたプロトコール B で実験を行った。プロトコール A では CAPS マーカーと PVY- 抵抗性の品種及び育種系統で高い相関関係が得られた。しかし、プロトコール B では十分な再現性が得られない結果となった。よって、プロトコール A を用いて、PVY- 抵抗性選抜の CAPS マーカーに適用可能であると考えられた。

緒 言

植物病害抵抗性について

植物抵抗性の遺伝学的基礎の確証から90年が経った (Hammond-Kosack *et al.* 1997)。それ以来、抵抗性遺伝子 (以下 R = resistance 遺伝子) は、歴史的に育種上重要な形質であり、“耐病性” 育種により、世界中で食料増産を安定的に供給することに貢献してきた。植物病害は収獲損失10億ドルをもたらし、またその損失は人々に厳しい影響を与えている (Bent 1996)。そのため、作物種の植物防御を行う必要性があり、植物病害のコントロールに R 遺伝子を用いる方法が以前からとられてきた。用いる利点として、R 遺伝子は単一遺伝子座として働くので簡単な戻し交雑で栽培系統に組み入れが可能であることや、いったん R 遺伝子が栽培種の中に存在すれば、本来の病害コントロールや栽培者による農薬散布よりも安価で済むということなどが挙げられる。しかし、欠点として、R 遺伝子は非常に特異的であるため、病原菌が avr 遺伝子 (非病原性遺伝子) に変異を起こすと簡単に抵抗性が破られるという問題を抱えている (Baker *et al.* 1997; Martin 1996)。

一方、植物 R 遺伝子は60年以上の間使用され続け、病害農業システムにおいて効果を示してきた (Bent 1996)。それらの知見をもとにして改変された植物 R 遺伝子はおそらく将来の植物防御において中心的な役割を果たし続けるだろうと考えられている。また、経済的重要性に加えて、R 遺伝子は、Plant-microbe 相互作用に関する基礎的な生物学の分野を理解するための新しい開拓をももたらしている (Martin 1996)。

最近の研究によって、植物 R 遺伝子のいくつかの構造が明らかになり、それらの遺伝子間に高い相似性が発見された (Hammond-Kosack *et al.* 1997)。そして R 遺伝子には、(a) 植物において Avr 遺伝子特異的病原菌分子の発見を可能にするということ、(b) 植物防御を活性化させるためのシグナル認識を始めるということ、(c) 新しい R 遺伝子特異性をすばやく発達させるための能力があるということな

1. 近畿大学生物理工学部
2. 近畿大学大学院生物理工学研究科
3. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
4. 近畿大学生物理工学研究所

どが推定された (Bent 1996, Hammond-Kosack *et al.* 1997)。

以上の能力を発見、推定するためには植物 R 遺伝子の単離が必要であった。だが、cDNA ライブラリーの differential screening、抗体を持つ発現ライブラリーのスクリーニングによって導かれたタンパクの精製、他の種由来の単離された遺伝子の相同性をもとにした単離などの技術は、植物 R 遺伝子の単離に成功しなかった。そのかわり、目的とする遺伝子産物の知識を必要としない新しい戦略が開発、適用された。すなわち、1) 抵抗性に関係するリガンドと結合したタンパクの単離、2) ランダム cDNA やゲノムクローンを使った機能的な相補性、3) endogenous や heterologous トランスポゾンシステムを使ったトランスポゾンタギング、4) 遺伝的連鎖解析をもとにした chromosome walking である (Martin 1996)。

以上のような方法を用いた R 遺伝子の単離によって、R 遺伝子がコードしたタンパク質の構造機能解析や他の R 遺伝子の単離、防御シグナル形質導入経路の概念に関係した機能の特定、植物体を改良した病害抵抗性の研究が活発に行われている (Barker *et al.* 1997, Bent 1996)。

さらに R 遺伝子産物の 4 つの種類が、防御メカニズムの相同な領域を活性化するということが明らかになってきた。それによって R 遺伝子産物は、以下に示した 4 つの主要なクラスに分類された (Hammond-Kosack *et al.* 1997)。これらは、LZ (ロイシンジッパー)、NBS (ヌクレオチド結合部位)、LRR (ロイシンリッチリピート)、TIR (Toll-IL-1 R 相同性領域)、TM (トランスメンブレンドメイン) (Baker *et al.* 1997) である。

<クラス I (NBS-LRR)>

このクラスのタンパク質は、C 末端側に不完全な LRR (ロイシンリッチリピート) を持ち、N 末端側に NBS (ヌクレオチド結合部位) を持っている。NBS は ATPase, GTPase (単量体 G タンパクを含む) などに見られるタイプで、P ループを含む 3 つのモチーフから構成されている。

<クラス II (プロテインキナーゼ)>

セリン/スレオニンキナーゼとしてのドメインを持っており、ミリスチル基を通して膜にアンカーされていると想像されている。

<クラス III (細胞外 LRR をもつ膜タンパク質)>

このクラスは、クラス III、*Xa21* の C 末端プロテインキナーゼドメインが、短いアミノ酸配列で書き換えられたような構造を持っている。

<クラス IV (レセプタープロテインキナーゼ様タンパク質)>

N 末端にシグナル配列を持ち、LRR を含む領域、transmembrane と予測される領域、プロテインキナーゼドメインと続いていることから、レセプターキナーゼ様の構造を持っていると推定されている。(片桐 1997)

PVY に対する抵抗性について

PVY (potato Y potyvirus) は、ジャガイモの収量を平均 20% 近くも低下させる主要なウイルスである (Hooker 1981)。これらのようなウイルス病や病害による被害はジャガイモ生産にとって深刻な問題である。一方、ジャガイモの近縁 *Solanum* 属内には、200 種類近くの野生種が存在しており、ウイルスやウイロイドに対する抵抗性など既存の栽培種にはない優れた有用形質の存在が分かっている (Ross 1986, Watanabe *et al.* 1995)。

PVY 抵抗性遺伝子は多様なバレイショ近縁種で見つけられている (Hinrichs *et al.* 1998, 渡邊 1999)。そのなかでも、高度抵抗性遺伝子 *Ryadg* は本研究グループらによって様々な知見が得られている

(Kasai *et al.* 1999, Shiranita *et al.* 1999, 渡邊 1999)。詳細は CAPS マーカーとの関連で以下に述べる。

分子マーカーについて

上述した技術によって、野生種の有用形質の利用が増加していき、有用な形質を持った雑種や後代の作成が早期にできるようになっている。これらの知見の発展に伴い、目的遺伝子のモニタリングのため分子生物学的技術を用いて RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) や RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNAs) などの分子マーカーの探索が盛んに行われてきた (Karp *et al.* 1997, Watanabe 1994)。

RFLP 分析や RAPD 分析は、ある目的遺伝子と連鎖している分子マーカーを探すものであり、目的遺伝子を探る第一段階である。この技術によって目的遺伝子と非常に近い距離で連鎖している分子マーカーが見つければ、この分子マーカーを使い、目的遺伝子の有無を DNA レベルで調べることができる。これは、植物の表現型の観察やアイソザイム・タンパク質の分析による間接的な分析に比べ、正確かつ早期に遺伝子型を決定することができる (Watanabe *et al.* 1994)。この結果、有用形質の選抜が容易にできるようになる。そして、分子マーカーを見つけることにより連鎖している目的遺伝子の周囲の情報が得られるため、R 遺伝子の配列を調べる手がかりになると考えられている。R 遺伝子の配列が決定すれば、この遺伝子を持たない植物に導入することにより、人間や環境に有用な形質転換植物の作出が可能となるだろう。

CAPSマーカーについて

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) は PVY 抵抗性育種に関しては遺伝的バックグラウンドや倍数性レベルに関係なくジャガイモにおいて重要な特性を選択することができる初めての PCR-based マーカーである。本実験では *Ryadg* と連鎖したマーカーとして Sorri *et al.* (1999) によって開発された CAPS マーカーについてのみ述べる。

このマーカーが開発された要因にプライマーとなる DNA 断片の発見がある。Hamalainen *et al.* (1997, 1998) により *Ryadg* と共分離する 2 X (V-2) 7 由来の PCR 産物が得られ、Resistance Gene Like (RGL) 断片と名付けられた。さらに、プライマーの組み合わせから ADG 1, ADG 2, ADG 3 という 3 つの断片に分類された。それら 3 つの PCR 産物のヌクレオチド配列には、47-79% の同一性があることも発見された (Hamalainen *et al.* 1998)。

その後、他のジャガイモ系統から Leister *et al.* (1996) によって増幅された RGL 断片と 2 X (V-2) 7 から PCR によって増幅された RGL 断片は、非常に高い相同性 (91-98% の相同性) があるとわかり、2 つの NBS を含んだタバコの N 遺伝子に相当する領域と全く相同であったと報告されている (Hamalainen *et al.* 1998)。

RGL 断片のうち ADG1 と ADG 2 は、PVY- 抵抗性の親系統である 2 X (V-2) 7 と感受性の親系統である 84. 194. 30 の交雑により生み出された二倍体マッピングポピュレーションにおいて *Ryadg* と共分離する (Hamalainen *et al.* 1998)。2 X (V-2) 7 と 84. 194. 30 との両方で増幅された ADG 2 断片は同じサイズ (310bp, プライマー配列は含まない) で、11ヌクレオチドの違いを含んでいることが分かった (Sorri *et al.* 1999)。両断片の配列解析の結果、84. 194. 30 由来の ADG 2 断片内には、*Bbv* I 制限酵素認識部位があり、2 X (V-2) 7 由来の ADG 2 断片内には、その制限酵素認識部位中に一塩基の違いがあることが発見された。つまり、PVY- 感受性系統由来の ADG 2 断片は制限酵素 *Bbv* I によって

切断され、PVY-抵抗性系統由来の ADG 2 断片は切断されないという特性である。この発見を利用して CAPS マーカーが開発された (Sorri *et al.* 1999)。

CAPS マーカーを用いる利点として、技術的に容易であり、必要な DNA の量が RFLP 解析に比べても少なく済むという点が挙げられる。また、*Bbv* I のような高価な制限酵素を用いても RFLP 解析の半分のコストで行うことができるという点 (Sorri *et al.* 1999) も魅力的である。本研究では、Sorri *et al.* (1999) が CAPS 解析に用いた植物材料を含む多様なジャガイモ育種系統及び品種を材料として本 CAPS マーカーの汎用性を確認した。また、Sorri *et al.* (1999) が用いたプロトコールをさらに簡易化したプロトコールによる汎用性確認調査の結果についても合わせて報告する。

材料および方法

植物 DNA の抽出法

植物体のゲノム DNA 抽出法には CTAB 法 (Doyle and Doyle 1987) を修正した方法 (Hamalainen *et al.* 1997) を用いた。

2-1. プロトコール A による CAPS

プロトコール A は Sorri *et al.* (1999) のオリジナルであり、プロトコール B はプロトコール A を簡易化させたものである。

鋳型の植物 DNA 50ng/ μ l に対して反応混合液は dH₂O (蒸留水をオートクレーブしたもの) 34.3 μ l、10X PCR-バッファ-5.0 μ l、2 mM dNTP (ATGC) 2.5 μ l、25 mM MgCl₂ 3.0 μ l、6.25 μ M primer (ADG 2 forward) 2.0 μ l、6.25 μ M primer (ADG 2 reverse) 2.0 μ l、Ampli Taq Gold™ 0.2 μ l (5 unit/ μ l) とし、鋳型 DNA 1 μ l (50ng/ μ l) を加え、計50 μ lとした。サーマルサイクラーは (PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc. USA)) を使用した。表 1 に PCR のプロファイルを示す。

表 1 プロトコール A の PCR プロファイル

	temperature (°C)	time (sec)	
preheating	93	540	} 40 cycles
denaturation	93	45	
annealing	45	45	
extention	72	60	
final extention	72	300	

エタノール沈殿

PCR 産物の水溶液の体積を見積もり、その 1/10倍量の 3 M 酢酸ナトリウムを加えて混ぜ、99% エタノールを PCR 産物の水溶液の 2.5倍量加え、均一になるまでよく混ぜ、室温で約 20 分間静置した。室温で 12,000 rpm Xg、10 分間遠心し、核酸の沈殿を確認して上清みをキムタオルに捨て、70% エタノールを 1 ml 加えてチューブの中身を軽く混ぜ、12,000rpm Xg で 2 分間遠心し、上清みを捨て、クリーンベンチ又はドラフト内で乾燥させた。TE を 6 μ l 加え、一晩冷蔵庫 (4°C) で沈殿物を溶かした。

濃度確認のための電気泳動

エタノール沈殿後の PCR 産物 6 μ l から 1 μ l 取り、PCR 産物の濃度確認を行った。泳動はアガロースゲル 2.0% で、1.0X TAE バッファー、50V、1.5時間で行った。

制限酵素処理

確認した PCR 産物を 10ng/ μ l 程度に濃度調整し、計 50ng を制限酵素 *Bst* 71 I (Promega, USA) で処理した。*Bst* 71 I は *Bbv* I のアイソシゾマーであり、同一の認識部位を持つ制限酵素である。反応混合液は dH₂O 3.78 μ l、10X バッファー 1 μ l、10X BSA (Bovine Serum Albumin Acetylated ; 10 mg/ μ l) 0.2 μ l、*Bst* 71 I 0.12 μ l (0.6 unit) で、*Bst* 71 I 以外は、1.5ml チューブのなかで混合液を作り、0.5 ml チューブに 5 μ l ずつ分注してから PCR 産物を加えて計 10 μ l にした後、50°C で 3 時間インキュベートした。

電気泳動

制限酵素処理した後の反応液 10 μ l に Blue juice を 5 μ l を加え制限酵素処理後の結果確認を行った。電気泳動は、アガロースゲル 4.0% で、1.0X TAE バッファー、50V、2 時間で行った。EtBr 染色 30 分間、脱染色 10 分間の後、UV トランスイルミネーターで写真を撮り、確認した。このときのバンドのサイズと濃度確認には 50ng の分子量マーカー XIV を用いた。

プロトコール A の判定基準

完全長の ADG 2 マーカーバンド (以下 RYCAP355) が存在するか、または、切断されたバンド (以下 RYCAP280) より濃く RYCAP355 が存在する場合は抵抗性と見なした。RYCAP355 より RYCAP 280 が濃く存在する場合は感受性と見なした (図 1)。

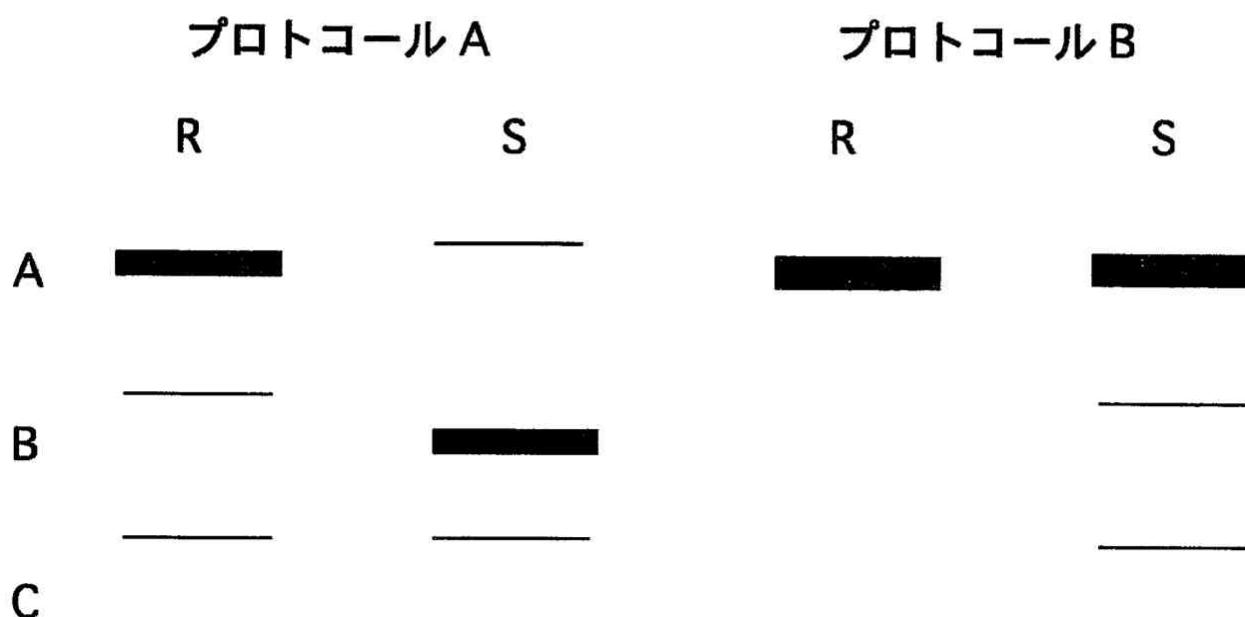


図 1 制限酵素処理後の CAPS マーカーバンドの様子
A ; 355bp, B ; 280bp, C ; 75bp, R ; 抵抗性, S ; 感受性

2-2. プロトコール B による CAPS

PCR のカクテル調整はプロトコール A と同様である。プロファイルは表 2 に示す。

表 2 プロトコール B の PCR プロファイル

	temperature (°C)	time (sec)	
preheating	93	540	} 35 cycles
denaturation	93	45	
annealing	55	45	
extention	72	80	
final extention	72	600	

制限酵素処理および電気泳動

合計30 μ l の反応溶液になるように PCR 産物を精製せずにそのまま 20 μ l を反応混合液 dH₂O 7.0 μ l、10X バッファー-2.0 μ l、10X BSA (Bovine Serum Albumin Acetylated ; 10 mg/10 ml) 1.0 μ l、Bst 71 I 1.0 μ l (1.25 unit) に加えて反応させた。その他は、プロトコール A と同様である。

制限酵素処理した後の反応液30 μ l に Blue juice を 5 μ l 入加え、その中から20 μ l を用いて、アガロースゲル4.0%、1.0 TAE バッファー、50V、2 時間で泳動を行った。その他は、プロトコール A と同様である。

プロトコール B の判定基準

RYCAP355 のみが存在する場合を抵抗性で見なし、それ以外は感受性で見なした (図 1)。

結果および考察

DNA 濃度調整と RNase 処理について

PCR に用いる DNA 濃度は50 ng を基準とし、濃度調整を行った。だが、実際は50~100 ng の間であればバンドの増幅には問題なかった。DNA 抽出後のクオリティーチェックで多量の RNA が見られた場合にのみ RNase 処理を行ったが、行わなくてもバンドの増幅に問題はなかった。

制限酵素処理条件について

条件設定のために酵素濃度、処理時間、サンプル量を変えた方法を行った。プロトコール A (以下 A) とプロトコール B (以下 B) において酵素処理濃度を0.6 unit、1.25 unit、5 unit の3つに設定した。オリジナルでは0.6 unit と設定されていたので、0.6 unit を採用した。B では エタノール沈殿によるバッファー交換の過程を省略したので高めの制限酵素処理濃度1.25 unit と 5 unit を設定したがどちらの場合も大きな差は見られなかった。

次に処理時間を長くすれば切断できるのではないかと考え、制限酵素処理時間を1 時間、3 時間、6 時間、24時間の4つに設定した。A も B も処理時間が長くなるにつれて PCR 産物はスメアーになってしまい、24時間処理ではバンドの判別が不可能となった。これは3つの酵素濃度のどの条件においても同じ結果が得られた。

最後に A では PCR 産物濃度を調整 (50 ng/μl, 100 ng/μl, 200 ng/μl) し、B では PCR 産物量を変えた場合 (10 μl, 20 μl, 30 μl) の実験を行った。A においては 50 ng/μl を超えると切れのこりが目立ち正しい判定を行うことが困難となった。B においては 10 μl では薄すぎてバンドの有無を判別することが不可能であり、30 μl では判別可能であるが濃すぎるようである。以上の結果に基づき、A では 2-5-4、B では 2-6-2 に記した条件設定で制限酵素処理を行った。

CAPS マーカーによる抵抗性品種と感受性品種の判別について

当初、切断された断片 (以下 RYCAP 280) が存在した場合を感受性と見なしていたが、7 XY.1, A A-3 等の *Ryadg* を有する系統においても完全長断片 (以下 RYCAP355) と共に RYCAP 280 が検出されたため、図 1 に示したように RYCAP 355 が存在する場合を抵抗性と見なすように評価方法を変更した。いくつかの感受性系統において RYCAP 355 が検出されたが、RYCAP 355 と RYCAP 280 との比率において抵抗性と感受性との間には明らかな相違が認められ、本判別方法により抵抗性及び感受性の判定をすることが可能であると考えた (図 2)。プロトコール A においてはこのような評価法による判定と既知の表現型との間に、表 3 および表 4 に示したようなかなり高い相関が認められた。遺伝子型とマーカーバンド (RYCAP 355) との対応関係は表 3 のようになった。

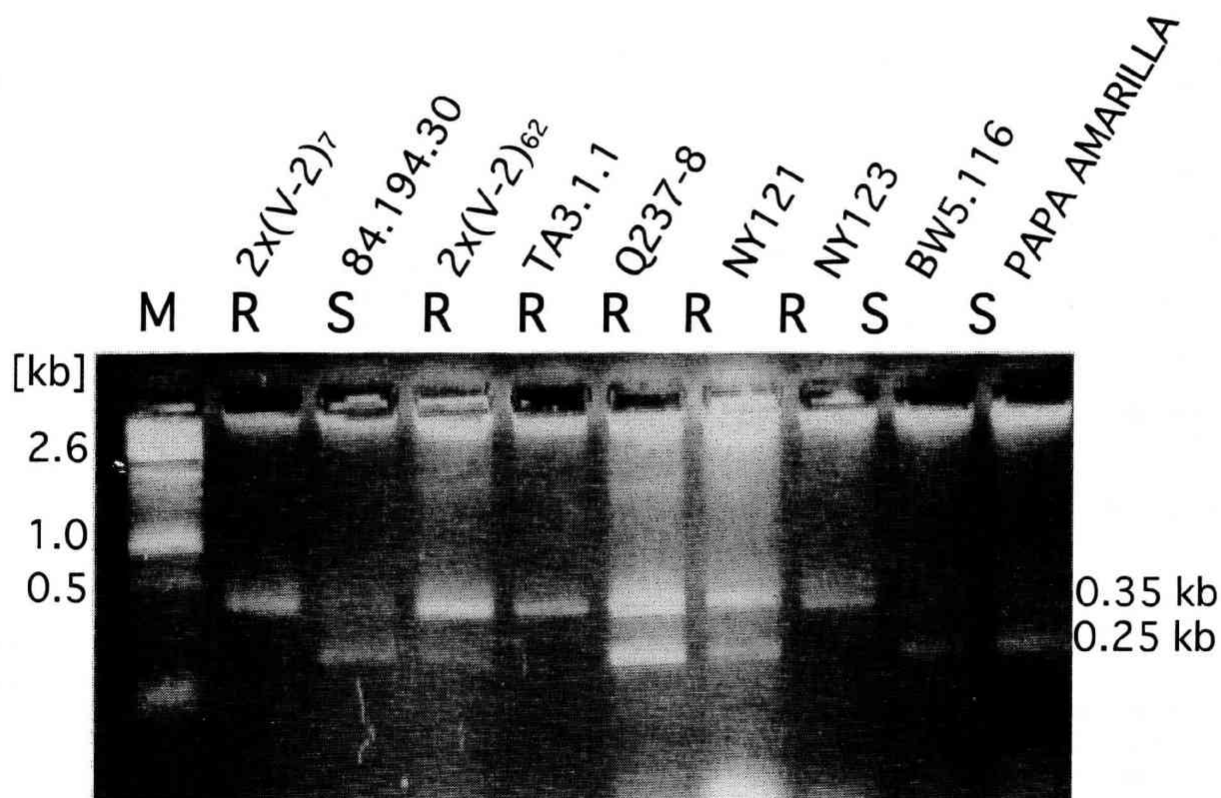


図 2 *Bst* 711 (0.6 unit) 処理による ADG 2-CAPS

表3 ジャガイモ栽培種と育種系統へのCAPSマーカー適用の実験結果

Potato Clone	PVY 抵抗性	抵抗性提供種 ^b	倍数性	判定結果 ^d	系統とPVY抵抗性の参考・引用文献
	表現型 ^a			プロトコールA	
2x(V-2) ^f	E	<i>adg</i>	2x (haploid)	R	Valkonen <i>et al.</i> 1994b, Watanabe <i>et al.</i> 1994b
{2x(V-2) ^f x 84.194.30} ^{e2}	E	<i>adg</i>	2x	R	Sorri <i>et al.</i> 1999
84.194.30	S		2x	S	Valkonen <i>et al.</i> 1994b, Watanabe <i>et al.</i> 1994b
DG.81-68	S		2x	S	Swieczynski <i>et al.</i> 1989
954.3CA	S		4x	S	Watanabe <i>et al.</i> 1994a
AA-3	E	<i>adg</i>	4x	R	Watanabe <i>et al.</i> 1994a, Iwanaga <i>et al.</i> 1991
7XY.1	E	<i>adg</i>	4x	R	Watanabe <i>et al.</i> 1994a, Iwanaga <i>et al.</i> 1991
BW5.116	S		4x	S	E. Fernandez-Northcote, personal communication
87HW13.7	S		2x	S	Valkonen <i>et al.</i> 1995
TET38.12	E ^c	<i>brd</i>	2x	S	Valkonen <i>et al.</i> 1995
TET38.13	H		2x	S	Valkonen <i>et al.</i> 1995
TET38.9	E ^c	<i>brd</i>	2x	R	Valkonen <i>et al.</i> 1995
E74-7	E	<i>adg</i>	4x	R	Hamalainen <i>et al.</i> 1997
N140-201	E	<i>adg</i>	4x	R	Hamalainen <i>et al.</i> 1997
S48-6	H		4x	S	R. L. Plaisted, personal communication, 1999
TA1.26.1.1	S		4x	S	Watanabe <i>et al.</i> 1992, 1997
TA1.27.1.1	S		4x	S	Watanabe <i>et al.</i> 1992, 1997
TA3.1.1	E	<i>adg</i>	4x	R	Watanabe <i>et al.</i> 1992, 1997
TA3.3.3	E	<i>adg</i>	4x	R	Watanabe <i>et al.</i> 1992, 1997
TA3.5.3.6	E	<i>adg</i>	4x	R	Watanabe <i>et al.</i> 1992, 1997
TA3.8.3.3	E	<i>adg</i>	4x	R	Watanabe <i>et al.</i> 1992, 1997
All Blue	S		4x	S	CIP 1998
Andover	S		4x	S	Anonymous 1994
Atlantic	S		4x	S	Russo and Slack 1998, Valkonen <i>et al.</i> 1994a
Atzimba	S or H		4x	S	CIP 1998
Bintje	S		4x	S	Valkonen and Palohuhta 1996, Stegemann and Schnick 1982
Chieftain	S		4x	S	CIP 1998
Desiree	H	<i>tbr</i>	4x	S	Jones 1990, Stegemann and Schnick 1982
Greta	S		4x	S	CIP 1998
NY 103	E	<i>adg</i>	4x	R	R. L. Plaisted, personal communication, 1999
NY 115	S		4x	S	R. L. Plaisted, personal communication, 1999
NY 123	E	<i>adg</i>	4x	R	R. L. Plaisted, personal communication, 1999
Purple Peruvian	S		4x	S	CIP 1998
Snowden	S		4x	S	CIP 1998
Stirling	H		4x	S	CIP 1998
Yagana	S		4x	S	CIP 1998
(日本品種)					
紅丸	S		4x	S	HKAES 1998
チヂワ	S		4x	S	HKAES 1998
男しゃくいも	S		4x	S	HKAES 1998
メークイン	S		4x	S	HKAES 1998
ムサマル	S		4x	S	HKAES 1998
サクラフブキ	E ^c	<i>chc</i>	4x	R	HKAES 1998
ワセシロ	S		4x	S	HKAES 1998

^a E, extreme resistant; H, hypersensitive; S, susceptible

^b *adg* : *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* , *brd* : *S. brevidens* , *chc* : *S. chacoense* , *tbr* : *S. tuberosum*

^c *S. t. andigena* 由来ではない PVY に対する Extreme resistance

^d R: 抵抗性、S: 感受性

^e International Potato Center

^f Hokkaido Konsen Agricultural Experimental Station, Japan.

表4 遺伝子型とマーカーバンド (RYCAP₃₅₅) との対応関係

		全供試数	RYCAP ₃₅₅	相関(%)
Extreme	<i>Ry_{adg}</i>	12	12	100
	other <i>Ry</i>	3	2	66.7
Hypersensitive/Susceptible		28	28	100
Total		43	42	97.7

ND; Not determined

プロトコール A では、PVY- 抵抗性を有すると報告されている TET 38. 12 で感受性型の CAPS が示された。しかし、当系統は *S. brevidens* 由来の抵抗性であると考えられており、遺伝解析が行われていないため、必ずしも *Ry_{adg}* と同じ遺伝子であるとは限らない (Valkonen *et al.* 1995)。また、表 4 に供試した系統すべての要約を示したが、全体の相関関係は約 97.7% (42/43 系統及び品種) という結果が得られた。この中には、否 *Ry_{adg}* の抵抗性系統も含まれているが、これらを除くと、100% の高い相関になる。

簡易化プロトコール B においては、2 X (V-2)₇, {2 X (V-2)₇ X 84.194.30}₆₂, NY 123 の 3 系統では常に RYCAP 355 のみが検出された。しかし、他の系統については再現性の確認が難しく既知の抵抗性及び感受性との間にほとんど相関が認められなかった。従って CAPS マーカーの汎用性確認はプロトコール A についてのみ行うこととした。

分子マーカーを用いた PVY 選抜効率との比較

Hamalainen *et al.* (1998) は、PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{adg}* を持つ 2 X (V-2)₇ と感受性 84. 194. 30 との交配によって得られた計 77 個体から成るマッピングポピュレーションに対して ADG 2 をプローブとした RFLP 解析を行い 100% の相関で *Ry_{adg}* と連鎖するシグナルを見つけた。これを広範な遺伝的背景の品種群に適用すると、必ずしも 100% 一致ではなかったがやはり 80% 以上の高い相関が得られた (Shiranita *et al.* 1999)。また、本実験以前に行われた Sorri *et al.* (1999) に基づく PVY 抵抗性選抜のための CAPS マーカーを用いた実験によると、*Ry_{adg}* との間に 100% の相関があると報告された (Sorri *et al.* 1999)。本報告においても異なる遺伝的背景の品種群を用いて上記が確認された。

他の病害抵抗性に連鎖した PCR-based マーカーについては、イネ blast 抵抗性遺伝子 *Pi-2* (t) に連鎖した CAPS マーカーの例が挙げられる (Hittalmani *et al.* 1995)。この場合、95% 以上の相関が得られており、CAPS マーカーの信頼度を支援するものと考えられる。Shen *et al.* (1998) によるとレタスでの抵抗性遺伝子の CAPS/SCAR マーカーの有用度が報告されており、同タイプのマーカーの有効性を指示するものである。

実際の育種現場においては、80%以上の確率で目的形質と連鎖していればマーカーとして利用可能であるとされている。従って、本研究で用いた PVY-抵抗性遺伝子に連鎖した該 CAPS マーカーはジャガイモの病害抵抗性の分子育種において十分使用可能であると考えられる。この CAPS マーカー以外に、*Ryadg* には SCAR (Kasai *et al.* 2000), RAPD (Watanabe *et al.* 1997), RAPD-STs (白仁田ら 1999) 等のマーカーが本グループにより作成され、これらの併用で確実な抵抗性・感受性系統の識別が保証されることが考えられる。

謝 辞

当研究は学術振興会未来開拓事業 JSPS-RFTF-96-L00603 による多大な支援を賜りました。ここに御礼を厚く申し上げます。

引用文献

1. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE (1992) PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucl Acid Res* 20 : 6221-6225
2. Baker B, Patricia Z, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276 : 726-733
3. Bent AF (1996) Plant disease resistance genes : Function meets structure. *The Plant Cell* 8 : 1757-1771
4. Brigneti G, Garcia-Mas J, Baulcombe DC (1997) Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Rysto* in potato. *Theor Appl Genet* 94 : 198-203
5. de Bokx JA, van der Want JPH (1987) Viruses of potatoes and seed-potato production. PUDOC, Wageningen, The Netherlands.
6. Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull* 19 : 11-15
7. Ehlenfeldt MK and Hanneman RE Jr (1988) Genetic control of Endosperm Balance Number (EBN) three additive loci in a threshold-like system. *Theor Appl Genet* 75 : 825-832
8. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Zneve RL, Orkin SA, Bruns GAP (1990) Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343 : 774-778
9. Hamalainen JH, Sorri VA, Watanabe KN, Gebhardt C, Valkonen JPT (1998) Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. *Theor Appl Genet* 96 : 1036-1043
10. Hamalainen JH, Watanabe KN, Valkonen JPT, Arihara A, Plaisted RL, Pehu E, Miller L, Slack SA (1997) Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor Appl Genet* 83 : 49-57
11. Hamalainen JH, Sorri VA, Watanabe KN, Gebhardt C, Valkonen JPT (1998) Molecular examination of a chromosome region that contains resistance to potato virus Y and A potyvirus in potato. *Theor Appl. Genet.* 96 (June) : 1036-1043.
12. Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev.*

Plant Physiol. Plant Mol Biol 48 : 575-607

13. Hinrichs J, Berger S, Shaw JG (1998) A hypersensitive response-like mechanism is involved in resistance of potato plants bearing the *Rysto* gene to the potyviruses potato virus Y and tobacco etch virus. J Gen Virol 79 : 167-176
14. Hittalmani S, Foolad MR, Mew T, Rodriguez RL, Huang N (1995) Development of a PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, *Pi-2 (t)*, in a segregating population. Theor Appl Genet 91 : 9-14
15. Hooker WJ (1981) Compendium of potato disease. St. Paul. Minn
16. Karp A, Kresovich S, Bhat V, Ayad WG, Hodgkin T (1997) Molecular tools in plant genetic resources conservation : a guide to the techniques. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 45p.
17. Kasai K, Morikawa Y, Sorri VA, Valkonen JPT, Gebhardt G, Watanabe KN (2000). Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ryadg* based on a common feature of plant disease resistance genes. Genome 43 : 1-8.
18. 片桐文章 (1997) 2. 抵抗性遺伝子と病原体認識機構 In. 分子レベルから見た植物の耐病性植物と病原菌の相互作用に迫る. 株式会社 秀潤社 : 90-99
19. Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. Nature Genetics 14 : 421-429
20. Martin GB (1996) Molecular cloning of plant disease resistance genes. In : Gary S, Noel TK (eds) Plant-Microbe interactions. Thomson Publishing, pp 1-22
21. O'Brian SJ (ed) (1990) Genetic maps. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
22. Ross (1986) Potato breeding-programs and perspectives. Verlag Paul Parey, Berlin
23. Shen KA, Meyers BC, Islam-Faridi NM, Chin DB, Stelly DM, Michelmore RW (1998) Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. Mole Plant Microbe Int 11 : 815-822
24. Shiranita A, Kasai K, Hamalainen JH, Valkonen JPT, Watanabe KN (1999) Selection of resistance to potato Y potyvirus (PVY), using the resistance gene-like fragment ADG 2 as an RFLP probe. Pl. Biotechnology 16 (5) : 361-369.
25. 白仁田明生・辻川裕昭・笠井和江・J. P. T. Valkonen・渡邊純子・渡邊和男 (1999) バレイショ抵抗性育種への分子マーカーの利用 VII. *S. acaule* 由来系統群における PCR 由来の分子マーカーの PVY 抵抗性選抜への適用。Breed. Sci. 49 Suppl. 1 : 259.
26. Sorri VA, Watanabe KN, Valkonen JPT (1999) Predicted kinase 3a motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance. Theor Appl Genet. 99 : 164-170.
27. Valkonen JPT, Orrillo M, Slack SA, Plaisted RL, Watanabe KN (1995) Resistance to viruses in F1 hybrids produced by direct crossing between diploid *Solanum* series *Tuberosa* and diploid *S. brevidens* (series *Etuberosa*) using *S. phureja* for rescue pollination. Plant Breed 114 : 421-426
28. Watanabe KN (1994) Potato Molecular Genetics. In Bradshaw JE and Mackey G (eds.),

Chapter 10, Potato Genetics, CAB International, Wallingford, UK, pp213-235.

29. Watanabe KN, Orrillo M, Golmirzaie AM (1995) Potato germplasm enhancement for resistance to biotic stresses at CIP. Conventional and biotechnology-assisted approaches using a wide range of *Solanum* species. *Euphytica* 85 : 457-464
30. Watanabe KN, Tsujikawa Y, Watanabe JA, Valkonen JPT, Orrillo M (1997) Use of molecular markers for resistance breeding in potato. III. Relationships between virus resistance and agronomic traits with molecular markers in *S. acaule* introgression lines. *Breed. Sc.* 47 Supple (2) : 121.
31. 渡邊和男 (1999) 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 : 223-231.

英文要旨

Marker-assisted Selection for the *Ryadg*-derived Extreme Resistance to PVY in Potato Cultivars using a Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Marker

Yoko Morikawa¹, Kazue Kasai¹, Junko Kyotani¹, Akio Shiranita², Virpi A. Sorri³,
Jari P. T. Valkonen³, Junko A. Watanabe¹ and K. N. Watanabe^{1, 4}

Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) markers were tested for the applicability in marker-assisted selection for the extreme resistance to Potato Virus Y (PVY). A simplification of the procedure was also attempted, however, the original protocol revealed more prominently reproducible result than the simplified method. Overall, it was confirmed that the CAPS marker should be used effectively in a wide range of genetic background in potato genotypes for molecular breeding on the *Ryadg*-derived PVY resistance.

1. Faculty of BOST, Kinki Univ.
2. Division of BOST, Graduate School, Kinki Univ.
3. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
4. BOST Institute, Kinki Univ.