

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-300296
(P2000-300296A)

(43) 公開日 平成12年10月31日 (2000.10.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 1/00		A 0 1 H 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平11-110570	(71) 出願人	391012442 京都大学長 京都府京都市左京区吉田本町36の1番地
(22) 出願日	平成11年4月19日 (1999.4.19)	(72) 発明者	渡邊 和男 和歌山県那賀郡岩出町根来219-8
		(72) 発明者	笠井 和江 和歌山県那賀郡岩出町西安上37 グリーン フルいがみ211号室
		(72) 発明者	古澤 巖 京都府京都市左京区高野東開町1-23 東 大路高野第三住宅36-303
		(74) 代理人	100059258 弁理士 杉村 暁秀 (外2名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジャガイモのポテトポティウイルスYの抵抗性に関与するR y a d g 遺伝子の有無を識別するためのプライマーセット、R y a d g 遺伝子の有無を識別する方法、R y a d g 遺伝子のS C A R

(57) 【要約】

【課題】 ポテトポティウイルスYに対する高度抵抗性遺伝子であるRyadg を、効率的かつ簡便に検出するための方法を開発する。

【解決手段】 本発明のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応を行う事により、SCARマーカーの生成によりRyadg 遺伝子型を識別する方法が与えられた。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ジャガイモのポテトポティウイルス Y の抵抗性に関する Ryadg 遺伝子の有無を、ポリメラーゼ連鎖反応による SCAR マーカーの生成により識別する事を可能とする作用を有し、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列より成るプライマー及び配列表の配列番号 10 記載の塩基配列より成るプライマーより構成される、プライマーセット。

【請求項 2】 ジャガイモのポテトポティウイルス Y の抵抗性に関する Ryadg 遺伝子の有無を、ポリメラーゼ連鎖反応による SCAR マーカーの生成により識別する事を可能とする作用を有し、配列表の配列番号 5 記載の塩基配列より成るプライマー及び配列表の配列番号 10 記載の塩基配列より成るプライマーより構成される、プライマーセット。

【請求項 3】 配列表の配列番号 1 記載の塩基配列より成るプライマー及び配列表の配列番号 10 記載の塩基配列より成るプライマーより構成されるプライマーセットを使用して、ジャガイモより抽出した DNA につきポリメラーゼ連鎖反応を行い、SCAR マーカーの存在により当該ジャガイモのポテトポティウイルス Y の抵抗性に関する Ryadg 遺伝子の有無を識別する事を特徴とする、Ryadg 遺伝子の有無を識別する方法。

【請求項 4】 配列表の配列番号 5 記載の塩基配列より成るプライマー及び配列表の配列番号 10 記載の塩基配列より成るプライマーより構成されるプライマーセットを使用して、ジャガイモより抽出した DNA につきポリメラーゼ連鎖反応を行い、SCAR マーカーの存在により当該ジャガイモのポテトポティウイルス Y の抵抗性に関する Ryadg 遺伝子の有無を識別する事を特徴とする、Ryadg 遺伝子の有無を識別する方法。

【請求項 5】 配列表の配列番号 1 記載の塩基配列より成るプライマー及び配列表の配列番号 10 記載の塩基配列より成るプライマーより構成されるプライマーセットを使用して、ジャガイモより抽出した DNA につきポリメラーゼ連鎖反応を行う事により得られ、ポテトポティウイルス Y の抵抗性に関する Ryadg 遺伝子の SCAR マーカーとして使用可能である事を特徴とする、ポリメラーゼ連鎖反応生成物。

【請求項 6】 配列表の配列番号 5 記載の塩基配列より成るプライマー及び配列表の配列番号 10 記載の塩基配列より成るプライマーより構成されるプライマーセットを使用して、ジャガイモより抽出した DNA につきポリメラーゼ連鎖反応を行う事により得られ、ポテトポティウイルス Y の抵抗性に関する Ryadg 遺伝子の SCAR マーカーとして使用可能である事を特徴とする、ポリメラーゼ連鎖反応生成物。

【請求項 7】 ジャガイモのポテトポティウイルス Y の抵抗性に関する Ryadg 遺伝子の有無を、ポリメラーゼ連鎖反応による SCAR マーカーの生成により識別するため

のプライマー塩基配列の設計方法であって、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列と配列表の配列番号 4 記載の塩基配列の比較を行い、両者の相違部分を含むようにプライマー塩基配列の設計を行う過程より構成される事を特徴とする、プライマー塩基配列の設計方法。

【請求項 8】 ポテトポティウイルス Y の抵抗性に関する Ryadg 遺伝子と連鎖しており、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列より成る事を特徴とする、ポリメラーゼ連鎖反応生成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ジャガイモのポテトポティウイルス Y に対する高度抵抗性に関する遺伝子である Ryadg の SCAR マーカー、及び Ryadg 遺伝子を検出するための、効率的かつ簡便な方法に関する。

【従来の技術】

【0002】ポテトポティウイルス Y (PVY) は、ジャガイモ、トマト、タバコ等を含むナス科植物に対する最も重要な病原性ウイルスの一種である (Ross 1986)。PVY はしばしばアブラムシによって伝搬され、世界中で収量の低下を引き起こしており、特に北欧、ロシア、カナダ及び米国で大きな被害をもたらしている (Hooker 1981)。ジャガイモ及びその近縁種では、種々の PVY 抵抗性遺伝子が見つかっている。PVY 抵抗性機構は 2 種類あり、それぞれ異なる単一優性遺伝子によって支配されている (Cockerham 1970, Ross 1986)。その一つは過敏反応抵抗性 (Hypersensitive Reaction) と呼ばれ、ウイルスの感染後、感染部周辺の細胞死によりウイルスの移行を防ぐ機構で、単一優性遺伝子 Ny によって支配されている。他方は高度抵抗性 (Extreme resistance) と呼ばれる免疫型抵抗性で、単一優性遺伝子 Ry によって支配されている。下記において、ジャガイモの PVY 抵抗性の表現型について、高度抵抗性を H、過敏反応抵抗性を E、PVY に対する感受性を S (susceptible) と示す。Solanum tuberosum ssp. andigena および S. stoloniferum における PVY 抵抗性遺伝子 Ryadg および Rysto は非常に高い免疫型抵抗性を示すことが知られており (Valkonen et al. 1996)、ジャガイモ育種に広く利用されている (Munoz et al. 1975)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】栽培ジャガイモの主要品種は同質 4 倍性かつ他殖性であり、遺伝形質の操作は 2 倍性のそれに比べて遙かに複雑である。既存の 4 倍体品種の遺伝的変異は限られており、品種育成においては近縁野生種からの有用形質の導入が不可欠である。しかしながら、有用形質についての遺伝情報は十分とは言えず、遺伝マーカーによる目的形質の選抜はいまだ容易ではない。このような問題を抱えているため、従来のジャガイモ育種は品種育成までに巨大な選抜集団が必要であり、多大な労力と時間が費やされてきた。他方、ジャガ

イモはトマト及びタバコとは近縁であり、両植物に対して蓄積されてきた膨大な遺伝情報が適応可能であるという利点を備えている。特にトマトにおいてはすでに高密度遺伝子地図が作製されており(Tanksley et al. 1992)、そこで同定された各種分子マーカーはジャガイモに対しても適用が可能である。

【0004】これまで、植物育種においては表現型の観察あるいはタンパク質のアイソザイム分析により特定形質の有無を判別してきたが、近年の爆発的な分子遺伝学の発達に伴い、種々の分子マーカーが開発されて育種に利用されてきている。なかでも、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction : PCR) のみで特定形質の有無が判別可能なSCAR (sequence characterized amplified region) マーカーは簡便かつ効率的であり、育種における強力な手法であると考えられる。ただし、SCARマーカーの開発には目的形質に関する何らかの配列情報が必要であり、目的形質の遺伝子が単離されていない場合には、既知の関連遺伝子の配列情報が必要となる。

【0005】1992年にコーンのHm1が単離されて以来、種々の植物種から病害抵抗性遺伝子が単離され、配列比較が行われている(Johal and Briggs 1992, Jones et al. 1994)。植物の病害抵抗性遺伝子は遺伝子ファミリーを構成し、信号伝達に関与すると考えられる共通の特徴的な配列を有することが明らかにされた(Bent et al. 1994, Mindrinos et al. 1994, Staskawicz et al., 1995, Whitham et al. 1994)。このような構造上の類似性に基づき、未知の抵抗性遺伝子を単離する試みがなされている。Ryadg はジャガイモの第11番染色体上末端付近に座乗し(Hamalainen et al. 1997 and 1998)、興味深いことにタバコにおけるタバコモザイクウイルス抵抗性遺伝子Nも、タバコゲノム上の相同な領域に座乗することがわかっている(Leister et al. 1996)。このような知見に基づき、タバコとアラビドプシスの抵抗性遺伝子に保存的な領域を増幅させるプライマーを用いて、ジャガイモのゲノミックDNA からPVY 抵抗性Ryadg と共分離するPCR 産物 (ADG2) が得られた。しかしながらADG2は抵抗性と感受性の両方に同一サイズのバンドとして認められ、RFLP解析のプロープとして用いたときのみ抵抗性の検出が可能であった。

【0006】

【課題を解決するための手段】PCR 技術を利用したSCAR (sequence characterized amplified region) (Paran and Michelmore 1993)マーカーは、目的形質の有無がPCR 産物の有無のみで判別でき、きわめて簡便かつ効率的なマーカーである。発明者らは、PVY に対する高度抵抗性を示す、Ryadg を有するジャガイモ植物より単離された抵抗性遺伝子様断片 (RGL : resistance gene-like DNA fragment) 中の塩基配列と、感受性個体の相当する領域の断片中の塩基配列との相違より、SCARマーカーを開発した。即ち、高度抵抗性及び感受性のコントロ

ールとして用いた品種から得られたPCR 産物である、ADG2-2X(V-2)₇ とADG2-84.194.30の配列を比較し、抵抗性系統に特異的な配列に対してプライマーを設計した。多様な品種及び系統のジャガイモに適用したところ、97%以上の確率でRyadg を有する系統でPCR 産物 (ADG2 - SCAR) が得られ、PVY 抵抗性検出マーカーとしての汎用性が確認された。従って、ADG2 - SCARはPVY 抵抗性ジャガイモ品種の育成において有力なマーカーになると考えられる。

【0007】

【実施例】(植物材料)本検討において、4倍体の栽培品種、4倍体及び2倍体の栽培系統等、異なった遺伝的背景を有する植物材料を実験に供試した。PVY 高度抵抗性遺伝子Ryには由来の異なるいくつかの遺伝子が存在する。供試系統には、Ryadg を有する14系統の他、*Solanum stoloniferum*、*S.phureja*、*S.chacoense* あるいは*S.brevidens* のいずれかに由来すると推定されるPVY 高度抵抗性遺伝子Ryを有する10系統が含まれている。また、過敏性反応抵抗性Hを示す系統も13系統含まれている。2X(V-2)₇はRyadg を含む2倍体のジャガイモクローンであり、PVY に対する高度抵抗性のコントロールとして用いた。また、84.194.30 は2倍体のジャガイモ栽培系統であり、PVY に対する感受性のコントロールとして用いた。

【0008】(TA系統の作製方法)TA系統 (*S.tuberosum* × *S.acaule*) は、*S.tuberosum* subsp.*andigena*由来のPVY 高度抵抗性遺伝子Ryadg と過敏性反応遺伝子Nyadg を有する、導入交雑系統である。TA系統の育成過程を図1に示す。Ryadg が導入された栽培系統7XY.1 に4倍体の近縁野生種*S.acaule*の1系統である954.3CA をかけあわせ、AA-3が得られた。7XY.1 と954.3CA とのかけあわせの際には、両者間の交雑不適合性を調節するための2次受粉親として*S.phureja* の1系統IvP35 が用いられた。IvP35 は*S.phureja* に由来すると推定されるPVY 高度抵抗性を有している。後代を2倍体レベルで選抜するため、優良形質を持つ2倍体栽培系統DG81-68 をAA-3に交配させて得られた集団がTA系統である。

【0009】(DNA の抽出)DNA 抽出にはCTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法を用いた。植物細胞には多量の多糖類が存在しDNA と共沈するという問題がある。本法は、CATBと0.7M NaCl 溶液中では核酸のみが溶解するという性質を利用して、DNA サンプルへの多糖類の混入を防ぐものである。インビトロで養生されたジャガイモ植物体(約500mg)を5倍量(2.5ml)の抽出バッファー(350mM ソルビトール、100mM トリス塩基、5mM EDTA、2%(w/v) ポリビニルピロリドン、1%(v/v) メルカプトエタノール、20mM パイスルファイトナトリウム)の存在下で乳鉢及び乳棒を用いて摩砕した。サンプルの2倍量(1ml)の5%ザルコシル溶液及び5倍量(2.5ml)の溶解バッファー(200mM トリス塩基、50mM

EDTA、2M 塩化ナトリウム、2%(w/v) CTAB)を加えて攪拌し、65℃で15分から2時間培養した。培養液と等量(6ml)のクロロホルム液(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)を加えてよく攪拌し遠心分離した(3000rpm x 15分、4℃)。上清に等量のイソプロパノールを加えてDNAを凝集させ、パスツールピペットに巻き付けてすくい上げた。70%エタノールで洗浄後乾燥させ、適量のTEバッファー(10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA)に溶解させた。

【0010】(電気泳動)電気泳動によりDNAの存在を確認した。DNAサンプルの一部を新しいチューブに移し、適量のローディングバッファーを加えて混合した。10xローディングバッファーの組成は0.25%プロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノールFF、15%フィコールより成る。ローディングバッファーはTEバッファーに溶解し、4℃で保存した。サイズ及び濃度のコントロールとして、DNA分子量マーカーII(ベーリンガーマンハイム)を用いた。電気泳動はミュニピッドミニゲル電気泳動槽(アドバンス)内で0.8%アガロースゲル及び0.5xTAEバッファー(1xTAEバッファー:40mMトリリス塩基、40mM酢酸、1mMEDTA)を用いて行った。電圧は50Vに設定し、ローディングバッファーがゲルの3/4程度まで流れたときに終了した。ゲルをエチジウムブロマイド溶液中で10分間振とう培養し、DNAの染色を行った。引き続きゲルを蒸留水中で10分間振とう培養し脱染色を行った。泳動像の確認及び撮影にはイメージマスターVDS(ファルマシアバイオテック、USA)を用いた。

【0011】(DNAの精製)DNAサンプルに50µg/mlサンプル溶液のRNase(ベーリンガーマンハイム)を添加し、37℃で1時間培養した。次いでDNAの精製を行った(Michaels et al. 1994)。DNAサンプルの入ったチューブと99%エタノールを氷上で冷却した。DNAサンプルに1/20倍量の5M NaClと0.35倍量のエタノールを加え、

素早く混合した。そのまま氷上に30分静置し、多糖類を沈殿させた。遠心分離(10000rpm x 5分)により沈殿を除去し、上清に2倍量の冷却した99%エタノールを加え転倒混和した。遠心分離(10000rpm x 1分)によりDNAを沈殿させ、上清を捨てた。70%エタノールを加えて室温に30分置きDNAを洗浄した。遠心分離(10000rpm x 3分)によりDNAを沈殿させ、上清を捨てDNAを乾燥させた後、適量のTEバッファーに溶解させた。

【0012】(ADG2断片のPCRによる増幅)PCRはHama Iainenら(1998)の条件に従い行った。プライマーとして、表1に示すプライマー3.3.3s(配列表の配列番号1)及びプライマー3.3.3as(配列表の配列番号2)(Leister, 1995)を用いた。PCRの反応は、鋳型DNA(50ng/反応チューブ)、1xPCRバッファー、dNTP(0.1mM)、MgCl₂(1.5mM)、Taqポリメラーゼ(1ユニット/反応チューブ)、順方向プライマー(0.25µM)、逆方向プライマー(0.25µM)である。PCRは、以下に示すプロファイルNo.1の条件により行った。プロファイルNo.1においては、93℃で9分間プレヒートを行った後

に、93℃で45秒間変性し、55℃で45秒間アニーリングし、72℃で80秒間伸長する、というサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で10分間伸長して、4℃で保存するという条件を用いた。PCR産物は2%アガロースゲルおよび1xTAEバッファーを用いて電気泳動し、サイズ及び濃度を推定した。サイズマーカーとして、DNA分子量マーカーXIV(ベーリンガーマンハイム)を用いた。泳動及び染色条件はゲノムDNAの場合と同様である。PCR産物はSUPREC-02(宝)を用いて精製した。配列解析はABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionキット(PE Applied Biosystem)とABI PRISM 377(PE Applied Biosystem)を用いて行った。

【0013】

【表1】

プライマー名称	塩基配列
3.3.3s	5'- ATACACTCATCTAAATTTGATGG -3' : 配列番号1
3.3.3as	5'- ACTTAACTGCATCATGTTCAAG -3' : 配列番号2

【0014】(ADG2 PCR産物の塩基配列)上記のADG2プライマーを用いて、高度抵抗性コントロール系統2X(V-2)₇、及び感受性コントロール系統84.194.30から、それぞれ355bpのPCR産物を得た。図2の上段及び配列表の配列番号3に2X(V-2)₇、図2の下段及び配列表の配列番号4に84.194.30由来のPCR産物の塩基配列を示す。配列を検討した結果、2X(V-2)₇と84.194.30のADG2産物の塩基配列には11カ所の変異が認められた。

【0015】(プライマーの設計)これらの変異箇所に対して、2X(V-2)₇に特異的な領域に結合すると期待され

る3組のプライマー(ADG2-1、ADG2-2、ADG2-3)を設計した。SCARマーカーを作成するためのプライマーの設計には、PCRシミュレーションプログラムアンプリファイ1.2(ウイスコンシン大学、ジェネティックス)を用いた。プライマー合成はキコーテックに依頼した。ADG2-1、ADG2-2、ADG2-3の、順方向(F)及び逆方向(R)の塩基配列を表2及び配列表の配列番号5ないし10に示す。

【0016】

【表2】

プライマー名称	塩基配列
ADG2-1F	5'-AGT TCT AGT TGT GCT TGA TAA C-3 : 配列番号 5
ADG2-1R	5'-GTT ATC AAG CAC AAC TAG AAC T-3 : 配列番号 6
ADG2-2F	5'-AAA TAC CTA GCA GGG GAT CTT G-3 : 配列番号 7
ADG2-2R	5'-CAA GAT CCC CTG CTA GGT ATT T-3 : 配列番号 8
ADG2-3F	5'-TCG GAA AAA TGA TGC CGT ATA TCC T-3 : 配列番号 9
ADG2-3R	5'-AGG ATA TAC GGC ATC ATT TTT CCG A-3 : 配列番号 10

【0017】2X(V-2)₇と84.194.30 を標的配列とし、これら3組のプライマー及び表1に示したプライマー3.3.3s、3.3.3as の計8本のプライマー配列を用いて、アンプリファイ1.2によりPCRのシミュレーションを行ったところ、2X(V-2)₇に対しては10本のPCR産物が予想され、84.194.30に対しては3本のPCR産物が予想され

た。2X(V-2)₇に特異的で、かつサイズが140bp以上の増幅産物が得られると予想された4組のプライマーセット及び予想増幅断片長を表3に示す。

【0018】

【表3】

プライマーセット	予想増幅断片長
セット1 3.3.3s ADG2-1R	200bp
セット2 3.3.3s ADG2-2R	243bp
セット3 3.3.3s ADG2-3R	323bp
セット4 ADG2-1F ADG2-3R	147bp

【0019】(PCRによる増幅の確認)これら4組のプライマーセットを用いて、PVYに対する抵抗性の有無がすでに判別している4系統のDNAを鋳型としてPCRを行った。

(1) 2X(V-2)₇ : PVY に対して高度抵抗性でありRyadgを有する。

(2) 84.194.30 : PVY に対して感受性である。

(3) 7XY.1 : PVY に対して高度抵抗性であり、Ryadgを有する。

(4) DG81-68 : PVY に対して感受性である。

【0020】PCR産物を2%アガロースゲル上で電気泳動した結果を図3に示す。図3において、左端に分子重量マーカー、レーン1に2X(V-2)₇、レーン2に84.194.30、レーン3に7XY.1、レーン4にDG81-68を用いて検討した結果を示す。また、左側より4つのレーン毎に、表3のプライマーセット1、2、3、4について検討した結果を示す。図3より、プライマーセット3及びプライマーセット4において、それぞれ予想された大きさの位置に単一のPCR産物が認められ、それらの産物はRyadgを有する高度抵抗性系統である2X(V-2)₇及び7XY.1に特異的であった。プライマーセット3及びプライマーセット4により得られたPCR産物を、それぞれRYSC3、RYSC4と名付けた。

【0021】(PCRプロファイルの検討)さらに供試材料を15系統に増やし、プライマーセット3及び4を用いてPCRを行ったところ、感受性系統においてもごく少量のPCR産物の増幅が確認された。そこで、高度抵抗性

系統に対する特異性を増加させるべく、PCRプロファイルの検討を行った。ミスアニーリングを防ぐためアニーリング温度を高くして(プロファイルNo.2:60 プロファイルNo.3:62)、同時に伸張時間を短縮し45秒とした。プライマーセット3に対しては、以下のプロファイルNo.2を用いてPCRを行った。即ち、プロファイルNo.2においては、93で9分間プレヒートを行った後に、94で45秒間変性し、60で45秒間アニーリングし、72

で60秒間伸長する、というサイクルを35回繰り返し、最後に72で5分間伸長して、4で保存するという条件を用いた。プライマーセット4に対しては、以下のプロファイルNo.3を用いてPCRを行った。即ち、プロファイルNo.3においては、93で9分間プレヒートを行った後に、94で45秒間変性し、62で45秒間アニーリングし、72で60秒間伸長する、というサイクルを35回繰り返し、最後に72で5分間伸長して、4で保存するという条件を用いた。

【0022】(SCARマーカーの適用結果)遺伝的背景の異なる、103系統の品種・栽培系統を用いて、RYSC3及びRYSC4が、SCARマーカーとして使用できるか、検討を行った。これらのジャガイモ遺伝子型において、14種類においてRyadgが含まれている事が報告され、また10種類はS.brevidens、S.chacoens、S.phureja又はS.stoloniferum由来の他の耐性遺伝子により制御される、PVYに対して非常に耐性の高い遺伝子を発現している、と報告されている。プライマーセット3及び4を用いて、それぞれ、プロファイルNo.2及びNo.3の反応条件でPCRを

行った。その結果、RYSC3 はRyadg を含む、14種類全ての遺伝子型において検出され、100%(103/103) の確率でRyadg の有無を識別できた。RYSC4 は、Ryadg を含む全ての遺伝子型において検出されたが、Ryadg を持たない4系統 (Papa Amarilla、Pentland Ace、Pentland Del I、エニワ) においても検出され、Ryadg の存在とPCR産物との相関は96.1% (99/103) であった。結果を表4

に示す。以上の結果よりこれらのSCARマーカー (RYSC3及びRYSC4 : ADG2 - SCARと総称する) は、ポテトポテトウイルスY (PVY) に対する高度抵抗性遺伝子Ryadg の識別及び導入確認等の育種過程において、簡便・安価かつ効率的に使用されうると期待できる。

【0023】

【表4】

ジャガイモクローン	PVY 抵抗性 表現型 ^{a)}	抵抗性 ドナー の種 ^{b)}	倍数性	マーカーバンド の有無 ^{d)}	
				RYSC3	RYSC4
2x(V-2)7	E	adg	2x	+	+
{2x(V-2)7x84.194.30} 62	E	adg	2x	+	+
84.194.30	S		2x	-	-
IvP 35	E c)	phu	2x	-	-
DG81 - 68	S		2x	-	-
954.3CA	S		4x	-	-
AA-3	E	adg	4x	+	+
7XY.1	E	adg	4x	+	+
I12.1	S		4x	-	-
BW5.116	S		4x	-	-
F1 - 1	E c)	chc	2x	-	-
84.35.7	S		2x	-	-
84.36.29	S		2x	-	-
85.37.38	S		2x	-	-
86.54.18	E c)	sto	4x	-	-
86.61.26	E c)	sto	2x	-	-
90.30.47	S		2x	-	-
90.31.42	S		2x	-	-
acI 7-8	S		4x	-	-
87HW13.7	S		2x	-	-
CPC2451	E c)	brd	2x	-	-
TET38.12	E c)		2x	-	-
TET38.13	H		2x	-	-
TET38.2	H		2x	-	-
TET38.9	E c)		2x	-	-
E74-7	E	adg	4x	+	+
HHI-9.3CD	S		4x	-	-
M200.38.4CD	S		4x	-	-
N140-201	E	adg	4x	+	+
Q237-8	E	adg	4x	+	+
S48-6	H		4x	-	-
TA1.26.1.1	S		4x	-	-
TA1.27.1.1	S		4x	-	-
TA3.1.1	E	adg	4x	+	+
TA3.3.3	E	adg	4x	+	+
TA3.5.3.6	E	adg	4x	+	+
TA3.8.3.3	E	adg	4x	+	+

All Blue	S		4x	-	-
Allegany	H		4x	-	-
Alpha	S		4x	-	-
Andover	S		4x	-	-
Atlantic	S		4x	-	-
Atzimba	S or H		4x	-	-
Bintje	S		4x	-	-
Chieftain	S		4x	-	-
Desiree	H		4x	-	-
Garnet Chilli	E c)		4x	-	-
Gineke	S		4x	-	-
Greta	S		4x	-	-
Kanona	S		4x	-	-
King Edward	S		4x	-	-
M. Hindenburg	S		4x	-	-
Maris Piper	S		4x	-	-
Matilda	H		4x	-	-
Mentor	S		4x	-	-
Norchip	S		4x	-	-
NY99	S		4x	-	-
NY101	S		4x	-	-
NY103	E	adg	4x	+	+
NY109	S		4x	-	-
NY112	S		4x	-	-
NY115	S		4x	-	-
NY121	E	adg	4x	+	+
NY123	E	adg	4x	+	+
Papa Amarilla	S		4x	-	+
Pentland Ace	S		4x	-	+
Pentland Crown	H		4x	-	-
Pentland Dell	H		4x	-	+
Pentland Ivory	H		4x	-	-
Pike	S		4x	-	-
Pito	H		4x	-	-
Purple Peruvian	S		4x	-	-
Russet Burbank	S		4x	-	-
Russet Rural	S		4x	-	-
Salem	S		4x	-	-
Serrana	H		4x	-	-
Snowden	S		4x	-	-
Stirling	H		4x	-	-
Superior	S		4x	-	-
Yagana	S		4x	-	-
Yukon Gold	H		4x	-	-
Benimaru (紅丸)	S		4x	-	-
Chidiwa (チヂワ)	S		4x	-	-
Danshaku-Imo (男爵いも)	S		4x	-	-
Dejima (デジマ)	S		4x	-	-
Eniwa (エニワ)	S		4x	-	+
Ezoakari (エゾアカリ)	S		4x	-	-

Hanashibetsu (花標津)	S		4x	-	-
Hatsufubuki (ハツフブキ)	S		4x	-	-
Hokkaishiro (北海白)	S		4x	-	-
Kitaakari (キタアカリ)	S		4x	-	-
Konafubuki (コナフブキ)	EC)	chc	4x	-	-
May Queen (メークイン)	S		4x	-	-
Musamaru (ムサマル)	S		4x	-	-
Myoujou (明星)	S		4x	-	-
Norin No.1 (農林1号)	S		4x	-	-
Ohjiro (オオジロ)	S		4x	-	-
Rishiri (リシリ)	S		4x	-	-
Sakurafubuki (サクラフブキ)	E C)	chc	4x	-	-
Touya (とうや)	S		4x	-	-
Toyoshiro (トヨシロ)	S		4x	-	-
Waseshiro (ワセシロ)	S		4x	-	-
Yukijiro (ユキジロ)	S		4x	-	-
相関性 ^{g)}			100.0%	96.1%	

a) E:高度抵抗性 H:過敏反応抵抗性 S:感受性

b) adg: *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*
 brd: *S. brevidens* chc: *S. chacoense*
 sto: *S. stoloniferum* phu: *S. phureja*
 tbr: *S. tuberosum*

c) *S. t. andigena*以外に由来する、PVY に対する高度抵抗性

d) + : マーカーバンドが検出された
 - : マーカーバンドが検出されなかった

e) 国際ポテトセンター

f) 北海道立根釧農業試験場、日本

g) Ryadg 遺伝子とSCARマーカーバンドの間の相関関係

【0024】SCARマーカーは他の分子マーカーと比較して、簡便かつ短時間で結果が得られるという利点を持つ。例えば、サザンハイブリダイゼーション技術に基づくRFLPマーカーと比較した場合、必要とされるDNA量は1%程度であり、DNAの質に関してもSCARマーカーの場合には粗抽出程度で十分使用可能である。RFLPマーカーが、DNAの制限酵素処理、電気泳動、プロットング、ハイブリダイゼーション及びシグナル検出といった5行程を必要とするのに対して、SCARマーカーの場合にはPCR及び電気泳動の2行程で結果が得られる。大量の献体を短時間で検査する必要がある育種事業において、当該SCARマーカー(ADG2-SCAR)の存在は大幅な省力化に繋がると期待される。

【0025】(参考文献)

(1) Bent, A. F., B. D. Kunkel, D. Dahlbeck, K. L. Brown, R. Schmidt, J. Giraudat, J. Leung and B. J. Staskawicz. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856-1860.

(2) CIP 1999. List of Pathogen Tested Potato Gen

otypes. International Potato Center, Lima, Peru.

(3) Cockerham, G. 1970. Genetic studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* 25: 309-348.

(4) Hamalainen, J. H., K. N. Watanabe, J. P. T. Valkonen, A. Arihara, R. L. Plaisted, E. Pehu, L. Miller and S. A. Slack. 1997. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.* 94: 192-197.

(5) Hamalainen, J. H., V. A. Sorri, K. N. Watanabe, C. Gebhardt and J. P. T. Valkonen. 1998. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1036-1043.

(6) HKAES 1998. Report on potato breeding 1996. Hokkaido Kosen Agricultural Experimental Station, Japan.

(7) Hooker, W. J. 1981. Compendium of potato diseases. APS Press, St. Paul, Minn.

- (8) Hosaka, K. and Hanneman., R.E.Jr. 1994. Random amplified polymorphic DNA markers detected in a segregating hybrid population of *Solanum chacoense* × *S. phureja*. *Jpn. J. Genet.* 69:53-66.
- (9) Iwanaga, M., Freyre, R. and Watanabe, K. 1991. Breaking the crossability barriers between disomic tetraploid *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum*. *Euphytica*, 52:183-191.
- (1 0) Johal, G. S. and S. P. Briggs. 1992. Reductase activity encoded by the Hm1 disease resistance gene in maize. *Science* 258: 985-987.
- (1 1) Jones, R.A.C. 1990. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Ann. Appl. Biol.* 117:93-105.
- (1 2) Jones, D. A., C. M. Thomas, K. E. Hammond-Kosack, P. J. Balint-Kurti and J. D. G. Jones. 1994. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266: 789-793.
- (1 3) Leister, D. 1995. Isolierung von Genomesegmenten aus der Kartoffel, die mit den Resistenzloci R1 und Gro1 gekoppelt sind, mit Hilfe von positioneller Klonierung und heterologer PCR. PhD thesis dissertation, University of Tübingen, Germany.
- (1 4) Leister, D., A. Ballvora, F. Salamini and C. Gebhardt. 1996. APCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics* 14: 421-429.
- (1 5) Michaels, S. D., C. J. Manorama and M. A. Richard. 1994. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *BioTechniques* 17(2): 274-276.
- (1 6) Mindrinos, M., F. Katagiri, G-L. Yu and F. M. Ausubel. 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78: 1089-1099.
- (1 7) Munoz, F. J., R. L. Plaisted and H. D. Thurston. 1975. Resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. *Am. Potato J.* 52: 107-115.
- (1 8) Paran, I and R. W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85f: 985-993.
- (1 9) Plaisted, R. L., Halseth, D. E., Brodie, B. B., Slack, S. A., Sieczka, J. B., Christ, B. J., Paddock, K. M. and Peck, M. W. 1998. Pike: A full season scab and golden nematode resistant chippstock variety. *Amer. J. of Potato Res.* 75: 117-120.
- (2 0) Ross, H. 1986. *Potato breeding - Programs and Perspectives*. Verlag Paul Parey, Berlin, 132 pp.
- (2 1) Russo, P. and Slack, S.A. 1998. Tissue culture methods for the screening and analysis of putative virus-resistant transgenic potato plants. *Virology*, 88(5):437-441.
- (2 2) Solomon-Blackburn, R.M. and Mackay, G.R. 1993. Progeny testing for resistance to potato virus Y: a comparison of susceptible potato cultivars for use in test-crosses with resistant parents. *Potato Research*, 36:327-333.
- (2 3) Sorri, V.A., Watanabe, K.N. and Valkonen, J.P.T. 1999. Predicted kinase 3a motif of a resistance gene-like fragment as a unique marker for PVY resistance. *Theor. Appl. Genet.* (in press).
- (2 4) Staskawicz, B. J., F. M. Ausubel, B. J. Barker, J. G. Ellis and J. D. G. Jones. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
- (2 5) Stegmann, H. and D. Schnick. 1982. Index 1982 of European potato varieties. *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie, Braunschweig, Berlin*.
- (2 6) Stegmann, H. and D. Schnick. 1985. Index 1985 of European potato varieties. *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie, Braunschweig, Berlin*.
- (2 7) Swiezynski, K.M. 1994. Inheritance of resistance to viruses (Chapter 15). In *Potato Genetics*. Edited by J.E. Bradshaw and G.R. Mackay. CAB International, Wallingford, UK. pp. 339-363.
- (2 8) Tanksley S. D., M. W. Ganal, J. P. Prince, M. C. de Vicente, M W. Bonierbale, P. Broun, T. M. Fulton, J. J. Giovannoni, S. Grandillo, G.B. Martin, R. Messeguer, J. C. Miller, L. Miller, A. L. Paterson, O. Pineda, M. S. Roder, R. A. Wing, W. Wu and N. D. Young. 1992. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- (2 9) Valkonen, J. P. T. and J. T. Palohuhta. 1996. Resistance to potato virus A and potato virus Y in potato cultivars grown in Finland. *Agricultural and Food Science in Finland* 5: 57-62.
- (3 0) Valkonen, J. P. T., S. A. Slack, R. L. Plaisted. 1994a. Use of the virus strain group concept to characterize the resistance to PVX and PVYo in the potato cv "Allegany". *Am. Potato J.* 71: 507-5

16.

(31) Valkonen, J. P. T., S. A. Slack, R. L. Plaisted and K. N. Watanabe. 1994b. Extreme resistance is epistatic to hypersensitive resistance to potato virus Y in a *Solanum tuberosum* subsp. andigena-derived potato genotype. *Plant Dis.* 79: 1177-1180.

(32) Valkonen, J. P. T., M. Orrillo, S. A. Slack, R. L. Plaisted, K.N. Watanabe. 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. *PlantBreed.* 114: 421-426.

(33) Valkonen, J. P. T., R. A. C. Jones, S. A. Slack and K. N. Watanabe. 1996. Resistance specificities to viruses in potato: standardization of nomenclature. *Plant Breeding.* 115:433-438.

(34) Valkonen, J.P.T. and Rokka., V.-M. 1998. Combination and expression of two virus resistance mechanisms in interspecific somatic hybrids of potato. *Plant Sci.* 131:85-94.

(35) Watanabe, K. N., M. Orrillo, S. Vega, R. Masuelli and K. Ishiki. 1994a. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Assessment of breeding value of tetraploid F1 hybrids between *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 88: 135-140.

(36) Watanabe, K. N., M. Orrillo, M. M. Iwanaga, R. Ortiz, R. Freyre and S. Perez. 1994b. Diploid potato germplasm derived from wild and land race genetic resources. *Am. Potato. J.* 71: 599-604.

(37) Whitham, S., S. P. Dinesh-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr and B. Baker. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to *Toll* and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115.

【0026】

【発明の効果】本発明により、ポテトポティウイルスYに対する高度抵抗性遺伝子であるRyadgのSCARマーカー、及びRyadg遺伝子の有無を識別するための効率的、かつ簡便な方法が与えられた。

【0027】

【配列表】

<110> 出願人氏名：京都大学長

<120> 発明の名称：ジャガイモのポテトポティウイルスYの抵抗性に関与するRyadg 遺伝子の有無を識別するためのプライマーセット、Ryadg 遺伝子の有無を識別する方法、Ryadg 遺伝子のSCARマーカーとして使用可能なポリメラーゼ連鎖反応生成物

<160> 配列の数：10

<210> 配列番号：1

<211> 配列の長さ：23

<212> 配列の型：核酸

<213> 起源：Solanum tuberosum

<400> 配列

ATACACTCAT CTAATTTGA TGG

10 20 23

<210> 配列番号：2

<211> 配列の長さ：22

<212> 配列の型：核酸

<213> 起源：Solanum tuberosum

<400> 配列

ACTTAACTGC ATCATGTTCA AG

10 20 22

<210> 配列番号：3

<211> 配列の長さ：355

<212> 配列の型：核酸

<213> 起源：Solanum tuberosum

<400> 配列

ATACACTCAT CTAATTTGA TGGTGCTTGT TTCCTTCCGG ACAATAAAGA AAACAAGTAT 60

GAAATACATT CTCTGCAAAG TATCCTTCTC TCTAACTGG TAGGGGAAAA AGAAAATTGT 120

GTGCATGATA AGGAGGACGG GAGGCACCTG ATGGCTCGTA GACTTCGTTT GAAGAAAGTT 180

CTAGTTGTGC TTGATAACAT AGATCATGAA GACCAATTGA AATACCTAGC AGGGGATCTT 240
 GGTGGTTTG GCAATGGCAC CAGAATTATT GCAACAACGA GAGACAAGCA TTTCATTCCG 300
 AAAAAATGATG CCGTATATCC TGTGACTACA CTA CTCTTGAAC ATGATGCAGT TAATA 355

< 2 1 0 > 配列番号 : 4

< 2 1 1 > 配列の長さ : 3 5 5

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : Solanum tuberosum

< 4 0 0 > 配列

ATACACTCAT CTA AATTTGA TGGTGCTTGT TTCCTTCTGG ACAATAAAGA AAACAAGTAT 60
 GAAATACATT CTCTGCAAAG TATCCTTCTC TCTAACTGG TAGGGGAAAA AGAAAATTGT 120
 GTGCATGATA AGGAGGACGG TAGGCACCTG ATGGCTCGTA GACTTCGTTT GAAGAAGGTT 180
 TTAGTTGTGG TTGATAACAT AGATCATGAA GACCAATTGG ATTACCTAGC AGGGGATCTT 240
 GGTGGTTTG GCAATGGCAG CAGAATTATT GCAACAACGA GAGACAAGCA TTTCATACGG 300
 AAAAAATGATG CTGTATATCC CGTGACTACA CTA CTCTTGAAC ATGATGCAGT TAATA 355

< 2 1 0 > 配列番号 : 5

< 2 1 1 > 配列の長さ : 2 2

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : Solanum tuberosum

< 4 0 0 > 配列

AGTTCTAGTT GTGCTTGATA AC
 10 20 22

< 2 1 0 > 配列番号 : 6

< 2 1 1 > 配列の長さ : 2 2

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : Solanum tuberosum

< 4 0 0 > 配列

GTTATCAAGC ACAACTAGAA CT
 10 20 22

< 2 1 0 > 配列番号 : 7

< 2 1 1 > 配列の長さ : 2 2

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : Solanum tuberosum

< 4 0 0 > 配列

AAATACCTAG CAGGGGATCT TG
 10 20 22

< 2 1 0 > 配列番号 : 8

< 2 1 1 > 配列の長さ : 2 2

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : Solanum tuberosum

< 4 0 0 > 配列

CAAGATCCCC TGCTAGGTAT TT
 10 20 22

< 2 1 0 > 配列番号 : 9

< 2 1 1 > 配列の長さ : 2 5

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : Solanum tuberosum

< 4 0 0 > 配列

TCGGAAAAAT GATGCCGTAT ATCCT
 10 20 25

< 2 1 0 > 配列番号 : 1 0

< 2 1 1 > 配列の長さ : 2 5
 < 2 1 2 > 配列の型 : 核酸
 < 2 1 3 > 起源 : Solanum tuberosum
 < 4 0 0 > 配列
 AGGATATACG GCATCATT T TCCGA
 10 20 25

【図面の簡単な説明】

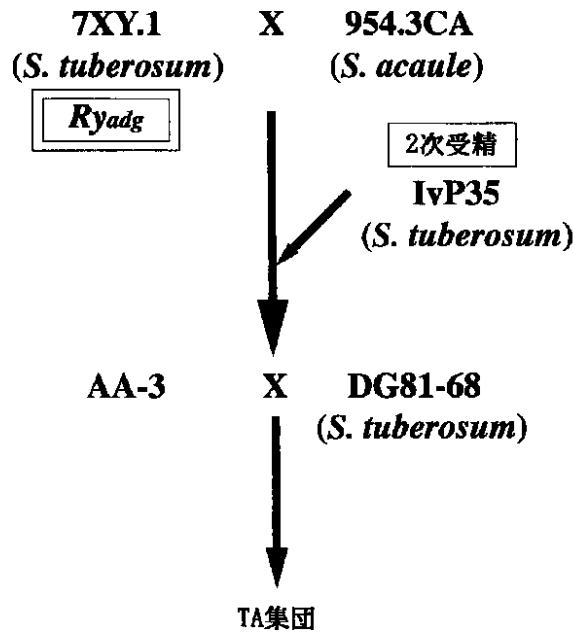
【図1】 図1は、TA系統の集団を育成する過程を示した図である。

【図2】 図2は、ADG2-2X(V-2)₇ と、ADG2-84.194.30

における、ADG2のPCR産物の塩基配列の比較を示した図である。

【図3】 図3はPCRによりSCARマーカーの検討を行った、電気泳動の写真である。

【図1】



【図2】

ADG2-F

ATACACTCATCTAAATTTGATGG

ADG2-2X(V-2) 7 1: ATACACTCATCTAAATTTGATGGTTCCTCCGACAATAAAGAAAACAAGTAT 60
 ADG2-84. 194. 30 1: ATACACTCATCTAAATTTGATGGTTCCTCCGACAATAAAGAAAACAAGTAT 60

ADG2-2X(V-2) 7 61: GAAATACATTCCTCCAAAGTATCCCTCCTAAACTGGTAGCGGAAAAGAAAATTTGT 120
 ADG2-84. 194. 30 61: GAAATACATTCCTCCAAAGTATCCCTCCTAAACTGGTAGCGGAAAAGAAAATTTGT 120

ADG2-2X(V-2) 7 121: GTGCATGATAAGCAGGACCGGAGCCACCTGATGCCCTGGTAGACTTCGTTTGAAGAAGT 180
 ADG2-84. 194. 30 121: GTGCATGATAAGCAGGACCGGAGCCACCTGATGCCCTGGTAGACTTCGTTTGAAGAAGT 180

ADG2-2X(V-2) 7 181: CTAGTTGTCCTTGATAACATAGATCAITGAAGACCAATTGAATACCTACCAGGGATCCT 240
 ADG2-84. 194. 30 181: CTAGTTGTCCTTGATAACATAGATCAITGAAGACCAATTGAATACCTACCAGGGATCCT 240

ADG2-1

ADG2-2X(V-2) 7 241: GGTTCGTTTGGCAATGCCACCAGAAITATTGCCAACACGAGAGACACCAATTCATTCGG 300
 ADG2-84. 194. 30 241: GGTTCGTTTGGCAATGCCACCAGAAITATTGCCAACACGAGAGACACCAATTCATTCGG 300

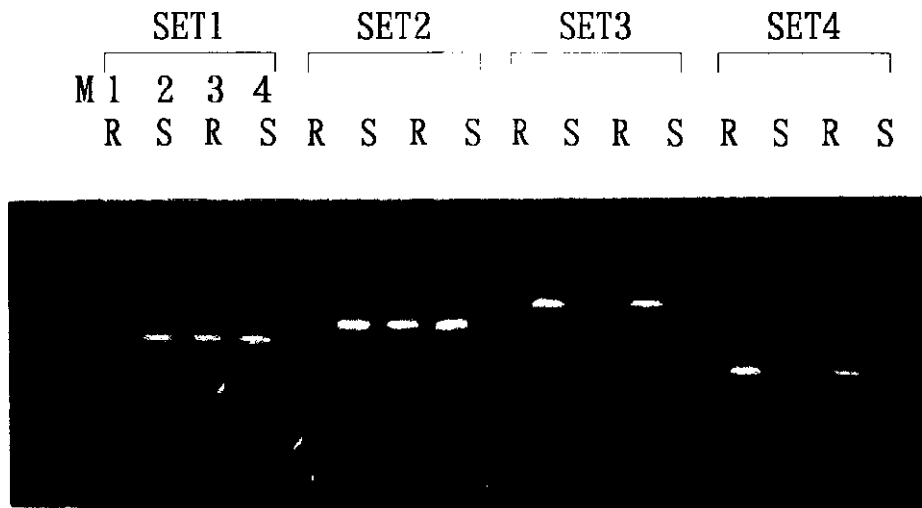
ADG2-2

ADG2-2X(V-2) 7 301: AAAAAATGATCCCGTATATCCTGTGACTACACTACTTGAACATGATCCAGTTAATA 355
 ADG2-84. 194. 30 301: AAAAAATGATCCCGTATATCCTGTGACTACACTACTTGAACATGATCCAGTTAATA 355

ADG2-3

GAACITGTACTACGTCATCA
ADG2-R

【図3】



M : 100 bp Ladder (50 ng)

1 : 2X(V-2)*n* (*Ryadg*)

2 : 84.194.30

3 : 7XY.1 (*Ryadg*)

4 : DG81-68

フロントページの続き

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 CA04 CA06
 CB03 CD03 CD07 CD09
 4B024 AA08 AA11 CA01 CA20 HA11
 4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QQ04
 QQ42 QR08 QR40 QR42 QR62
 QS16 QS25 QX01

(54)【発明の名称】 ジャガイモのポテトポティウイルスYの抵抗性に関与する *Ryadg* 遺伝子の有無を識別するためのプライマーセット、*Ryadg* 遺伝子の有無を識別する方法、*Ryadg* 遺伝子の S C A R マーカーとして使用可能なポリメラーゼ連鎖反応生成物