

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 特 許 公 報 ( B 1 )

(11) 特許番号

特許第3047022号  
(P3047022)

(45) 発行日 平成12年5月29日 (2000. 5. 29)

(24) 登録日 平成12年3月24日 (2000. 3. 24)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68 A
A 0 1 H 1/00		A 0 1 H 1/00 A
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 8 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平11-110570

(22) 出願日 平成11年4月19日 (1999. 4. 19)

審査請求日 平成11年4月19日 (1999. 4. 19)

(73) 特許権者 391012442  
京都大学長  
京都府京都市左京区吉田本町36の1番地

(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)

審査官 加藤 浩

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) 【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、Ryad g 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、Ryad

g 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、効率の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)の中の塩基配列と、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、異なる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、両者間の交雑不和合性を調節するための2次受粉親として*S.phureja*の1系統lvP35が用いられた。lvP35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。インピ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 バ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(クロロフォルム:イソアミルアルコール=2:4:1)を加えてよく攪拌し遠心分離した(3000rpm × 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。10×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(ペーリンガーマンハイム)を用いた。電気泳動はミュージ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0.5×TAEバッファー(1×TAEバッファー:40mM トリス塩基、40mM 酢酸、1mM EDTA)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(ペ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×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×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×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 lainen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)、1×PCRバッファー、dNTP(0.1mM)、MgCl<sub>2</sub>(1.5mM)、Taqポリメラーゼ(1ユニット

トノ反応チューブ)、順方向プライマー(0.25 μM)、逆方向プライマー(0.25 μM)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秒間アニールし、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1×TAE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SUPREX-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)<sub>7</sub>、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)<sub>7</sub>、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)<sub>7</sub>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)<sub>7</sub>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(ウィスコンシン大学、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)<sub>7</sub>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)<sub>7</sub>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)<sub>7</sub>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)<sub>7</sub>: 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、左端に分子量マーカー、レーン1に2X(V-2)<sub>7</sub>、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、それらの産生はRyadgを有する高度抵抗性系統である2X(V-2)<sub>7</sub>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 Dell、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 <sup>a)</sup>	抵抗性 ドナー の種 <sup>b)</sup>	倍数性	マーカーバンド の有無 <sup>d)</sup>	
				RYSC3	RYSC4
2x(V-2) <sub>7</sub>	E	adg	2x	+	+
{2x(V-2) <sub>7</sub> x84.194.30} 62	E	adg	2x	+	+

84.194.30	S		2x	-	-
lvP 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)	E <sup>c)</sup>	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	-	-
Ohjiri (オオジロ)	S		4x	-	-
Rishiri (リシリ)	S		4x	-	-
Sakurafubuki (サクラフブキ)	E <sup>c)</sup>	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 <sup>9)</sup>			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、プロッティング、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 Genotypes. 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.

(10) Johal, G. S. and S. P. Briggs. 1992. Reductase activity encoded by the Hm1 disease resistance gene in maize. *Science* 258: 985-987.

(11) 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.

(12) 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.

(13) Leister, D. 1995. Isolierung von Genomsegmenten 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.

(14) 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.



- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) 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 fall season scab and golden nematode resistant chipstock variety. *Amer. J. of Potato Res.* 75: 117-120.
- (20) Ross, H. 1986. *Potato breeding - Programs and Perspectives*. Verlag Paul Parey, Berlin, 132 p.
- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) 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).
- (24) 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.
- (25) Stegmann, H. and D. Schnick. 1982. *Index 1982 of European potato varieties*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie, Braunschweig, Berlin.
- (26) Stegmann, H. and D. Schnick. 1985. *Index 1985 of European potato varieties*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Biochemie, Braunschweig, Berlin.
- (27) 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.
- (28) Tanksley S. D., M. W. Ganai, 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.
- (29) 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.
- (30) 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: 507-516.
- (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. *Plant Breed.* 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. Diploidy

d 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 geneN: 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】

< 1 1 0 > 出願人氏名：京都大学長  
 < 1 2 0 > 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  
 < 1 6 0 > 配列の数：10  
 < 2 1 0 > 配列番号：1  
 < 2 1 1 > 配列の長さ：23  
 < 2 1 2 > 配列の型：核酸  
 < 2 1 3 > 起源：Solanum tuberosum  
 < 4 0 0 > 配列  
 ATACACTCAT CTAAATTTGA TGG  
 10 20 23  
 < 2 1 0 > 配列番号：2  
 < 2 1 1 > 配列の長さ：22  
 < 2 1 2 > 配列の型：核酸  
 < 2 1 3 > 起源：Solanum tuberosum  
 < 4 0 0 > 配列  
 ACTTAACTGC ATCATGTTCA AG  
 10 20 22  
 < 2 1 0 > 配列番号：3  
 < 2 1 1 > 配列の長さ：355  
 < 2 1 2 > 配列の型：核酸  
 < 2 1 3 > 起源：Solanum tuberosum  
 < 4 0 0 > 配列  
 ATACACTCAT CTAAATTTGA TGGTGCTTGT TTCCTCCGG ACAATA  
 AAGA AAACAAGTAT 60  
 GAAATACATT CTCTGCAAAG TATCCTTCTC TCTAACTGG TAGGGG  
 AAAA AGAAAATTGT 120  
 GTGCATGATA AGGAGGACGG GAGGCACCTG ATGGCTCGTA GACTTC  
 GTTT GAAGAAAGTT 180  
 CTAGTTGTGC TTGATAACAT AGATCATGAA GACCAATTGA AATACC  
 TAGC AGGGGATCTT 240  
 GGTTGGTTTG GCAATGGCAC CAGAATTATT GCAACAACGA GAGACA  
 AGCA TTTCATTCGG 300

AAAAATGATG CCGTATATCC TGTGACTACA CTACTIONGAAC ATGATG  
 CAGT TAATA 355  
 < 2 1 0 > 配列番号：4  
 < 2 1 1 > 配列の長さ：355  
 < 2 1 2 > 配列の型：核酸  
 < 2 1 3 > 起源：Solanum tuberosum  
 < 4 0 0 > 配列  
 ATACACTCAT CTAAATTTGA TGGTGCTTGT TTCCTTCTGG ACAATA  
 AAGA AAACAAGTAT 60  
 GAAATACATT CTCTGCAAAG TATCCTTCTC TCTAACTGG TAGGGG  
 AAAA AGAAAATTGT 120  
 GTGCATGATA AGGAGGACGG TAGGCACCTG ATGGCTCGTA GACTTC  
 GTTT GAAGAAGTT 180  
 TTAGTTGTGG TTGATAACAT AGATCATGAA GACCAATTGG ATTACC  
 TAGC AGGGGATCTT 240  
 GGTTGGTTTG GCAATGGCAC CAGAATTATT GCAACAACGA GAGACA  
 AGCA TTTCATACGG 300  
 AAAAATGATG CTGTATATCC CGTGACTACA CTACTIONGAAC ATGATG  
 CAGT TAATA 355  
 < 2 1 0 > 配列番号：5  
 < 2 1 1 > 配列の長さ：22  
 < 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：22  
 < 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：22  
 < 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：22  
 < 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：25  
 < 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 GCATCATTTT 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。

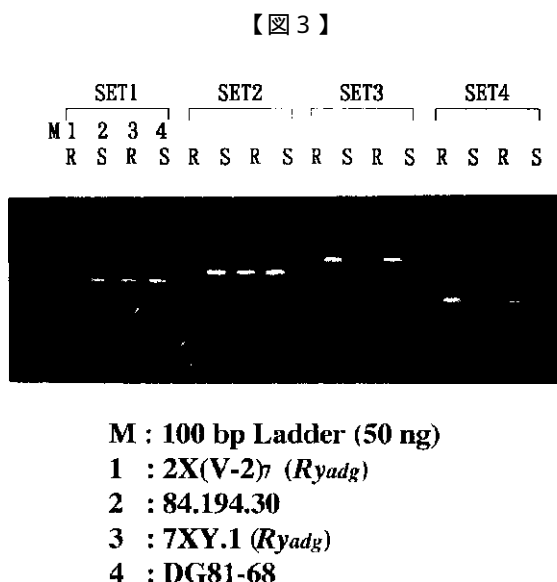
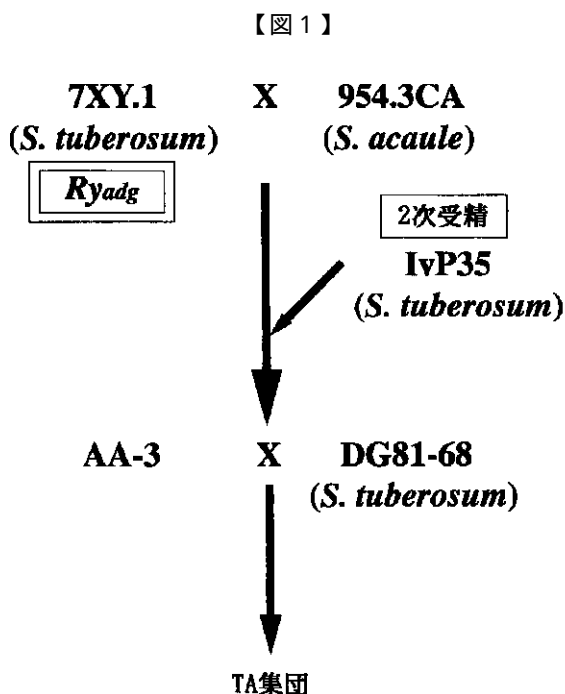
【図2】 図2は、ADG2-2X(V-2)7 と、ADG2-84.194.30 における、ADG2のPCR 産物の塩基配列の比較を示した図である。

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

【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マーカの生成によりRyadg 遺伝子型を識別する方法が与えられた。



【図2】

```

ADG2-F
ATACACTCATCTAAATTTGATGG
ADG2- 2X(V-2)7 1: ATACACTCATCTAAATTTGATGGTCTTGTTCCTCCGGACAATAAAGAAAAACAAGTAT 60
ADG2- 84. 194. 30 1: ATACACTCATCTAAATTTGATGGTCTTGTTCCTCCGGACAATAAAGAAAAACAAGTAT 60
ADG2- 2X(V-2)7 81: GAAATACATTCCTCTCAAAGTATCCTTCCTCTAAACTGGTAGCGGAAAAAAGAAATTTGT 120
ADG2- 84. 194. 30 81: GAAATACATTCCTCTCAAAGTATCCTTCCTCTAAACTGGTAGCGGAAAAAAGAAATTTGT 120
ADG2- 2X(V-2)7 121: GTGCATGATAACGAGGACCGGAGCCACCTGATGCCCTCGTAGACTTCGTTTGAAGAAAGTT 180
ADG2- 84. 194. 30 121: GTGCATGATAACGAGGACCGGAGCCACCTGATGCCCTCGTAGACTTCGTTTGAAGAAAGTT 180
ADG2- 2X(V-2)7 181: CTAGTTGTCCTTGATAACATAGATCATGAAGACCAATTTGAAATACCTAGCAGGGGATCTT 240
ADG2- 84. 194. 30 181: TTAGTTGTCCTTGATAACATAGATCATGAAGACCAATTTGAAATACCTAGCAGGGGATCTT 240
ADG2- 2X(V-2)7 241: CGTTGGTTTGGCAATGCCACGAGAATATTGCAACAACGAGAGACAAGCATTTTCATTCGG 300
ADG2- 84. 194. 30 241: CGTTGGTTTGGCAATGCCACGAGAATATTGCAACAACGAGAGACAAGCATTTTCATTCGG 300
ADG2- 2X(V-2)7 301: AAAAAATGATCCCGTATATCCTGTGACTACACTACTTGAACATGATCCAGTTAATA 365
ADG2- 84. 194. 30 301: AAAAATGATCCCGTATATCCTGTGACTACACTACTTGAACATGATCCAGTTAATA 365
ADG2-3 GAACCTGTACTAAGTCAATTC
ADG2-R
  
```

フロントページの続き

(56)参考文献 特表 平10 - 501972 ( J P , A )  
Nature Genetics , v  
ol . 14 ( 1996 ) p . 421 - 429  
Cell , vol . 78 ( 1994 ) p .  
1101 - 1115

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)  
W P I ( D I A L O G )  
B I O S I S ( D I A L O G )  
C A S O N L I N E  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G  
e n e s e q

(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 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  
マ カ として使用可能なポリメラ ぜ連鎖反応生成物