

## 試験研究成果普及情報

部門	その他	対象	研究
課題名：DNAマーカーを利用したツマグロヨコバイ抵抗性イネの効率的選抜技術			
[要約] ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子をもつイネのDNAマーカーによる選抜には、SNP判別PCRを用いる方法が、CAPS法を用いる（従来）方法より、簡便、正確かつ低コストである。			
キーワード：育種選抜、DNAマーカー、ツマグロヨコバイ抵抗性、SNP判別PCR、品種判別			
実施機関名	主 査	農業総合研究センター生物学部遺伝子工学研究室	
	協力機関	農業総合研究センター育種研究所水稻育種研究室	
実施期間	2002年度～2006年度		

### [目的及び背景]

交配系統のツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子座の検出は、これまではCAPS法を用いて行っていたが、この方法ではバンドが不明瞭になることがあり、遺伝子型の判定ができない場合があった。また、CAPS法によるDNA多型の検出は、PCRによる増幅と制限酵素による切断の2つの手順をふむため作業が煩雑になり、用いる制限酵素の種類によっては結果が不安定になる。さらに、ランニングコストが高いなどの欠点がある。このため、育種選抜のように多数のサンプルを処理する場合にはCAPS法は不適切であると考えられた。そこで、DNA多型の検出を簡便かつ正確、低コストで行える技術開発を行った。

### [成果内容]

- 1 SNPs（一塩基多型）を検出するためのmodified allele-specific PCR method（Hayashi et al., 2004；以下SNP判別PCRとする）は、PCRの増幅だけでDNA多型の検出が可能であり、手順が簡単で低コストであることが知られている。イネ育種系統のツマグロヨコバイ抵抗性の判別に、この方法の応用を試みた。ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子Grh4に連鎖するDNAマーカーG144プローブの末端配列情報を基にHayashi et al. (2004)の方法に従って表1のようにプライマーを設計した。抵抗性系統の「中母農6号」では約240bpのバンドが、感受性系統の「ふさおとめ」では約380bpのバンドが明瞭に認められ、PCRのみでG144の遺伝子型の判別が可能となった（図1）。
- 2 交配系統141個体のDNAを用いて、SNP判別PCRによる方法とCAPS法の結果を比較したところ、6個体で両方法の結果が異なった。これらの個体について両方法で再度実験を行ったところ、いずれも1回目のCAPS法の結果に誤りがあることが判明した。制限酵素切断が不安定であることなどが原因と考えられた（表2）。以上の結果から、SNP判別PCRによる遺伝子型の判別法はCAPS法に比較して、制限酵素切断の過程が不要であることから簡便で正確かつ安価であると判断した。

[留意事項]

1 この方法は、ツマグロヨコバイ抵抗性だけでなく、品種判別や他の形質の選抜に用いることも可能である。

[普及対象地域]

育種関係研究者

[行政上の措置]

[普及状況]

育種選抜に利用している。

[成果の概要]

表1 SNP判別PCRの実験条件

使用プライマー		反応液の組成		反応条件		
名前	塩基配列		添加量(μl)	step	温度	時間
G144S	TGCATGCATGCAATCCCCGC	X10Buffer	2	1	94℃	5分
G144R	ATCATTACCGCAAAAAACG	2.5mM dNTPs	1.6	2	94℃	30秒
G144fow	TCGATCGCCTTTTCTACGCA	25mM MgSO4	1.2	3	54℃	30秒
		10 μM G144Sプライマー	0.5	4	72℃	30秒
サーマルサイクラーとして		10 μM G144Rプライマー	0.5	(ステップ2~4		
GeneAmp PCR system9700		10 μM G144fowプライマー	0.5	を30サイクル)		
((株)アプライドバイオシステムズジャパン)		TaKaRaTaqHS	0.1	(株)タカラバイオ)		
を用いた		テンプレートDNA	4			
		水	13.6			
		全量	20			

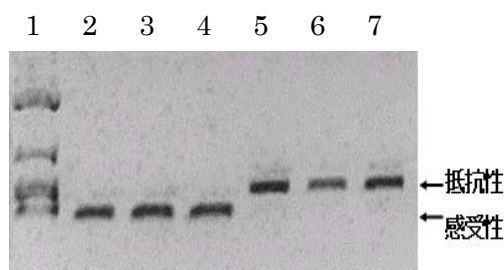


図1 SNP判別PCRの増幅結果

レーン1:サイズマーカー (左端)  
 レーン2~4:「ふさおとめ」(感受性)  
 レーン5~7:「中母農6号」(抵抗性)  
 いずれも3反復

表2 SNP判別PCRとCAPS法の結果の比較

1回目		2回目	
判定	個体数	判定	個体数
不一致	6	1回目のSNPに一致	6
		1回目のCAPSに一致	0
一致	135		

\*1回目の実験で両方法で結果が一致した個体は「一致」、異なった個体は「不一致」とした。  
 1回目の実験で両方法で結果が異なった個体について2回目の実験を行った。  
 2回目の実験で結果がSNP判別PCRの結果と一致した個体について「1回目のSNPに一致」、CAPS法の結果と一致した個体について「1回目のCAPSに一致」とした。

[発表及び関連文献]

K. Hayashi・N. Hashimoto・M. Daigen・I. Ashikawa (2004) Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. Theor. Appl. Genet. 108:1212-1220

<http://rgp.dna.affrc.go.jp/J/index.html>(イネゲノムプロジェクトのサイト)

田村克徳 DNAマーカーを利用した耐虫性遺伝子に関する効率的選抜技術の開発 平成12年度先端技術等地域実用化研究促進事業(バイオテクノロジー実用化型)成績概要集3-12

[その他]