

## イネのツマグロヨコバイ抵抗性のDNAマーカー選抜のための SNP判別PCRの利用

深見 正信・西川 康之・青木 孝一\*

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

### I 緒 言

近年、農作物生産の現場における減農薬栽培及び省力・低コスト栽培に対する要請から、病害虫抵抗性品種育成への期待が高まっている。一方、各種の病害虫抵抗性形質に連鎖するDNAマーカーの開発が進み、新品種の育成促進に寄与している（安藤、2005）。さらに、各種植物のゲノムの一部もしくは全体の塩基配列が解明され、この情報を用いることによって有用形質に連鎖するDNAマーカー開発が従来より容易になっている。

イネ萎縮ウイルスを媒介するツマグロヨコバイ *Nephotettix cincticeps* (Uhler) に関しては、数種の抵抗性遺伝子が見出されている (Takita and Nishiyama, 1989; Saka et al., 2006; Fukuta et al., 1998)。この一つである抵抗性遺伝子 *Grh4* は単独では抵抗性を示さないものの、*Grh2* と組み合わせてイネに導入することにより、安定した抵抗性を示すことが知られており、これまでのところ、この抵抗性を打破するバイオタイプの出現は認められていない (Hirae et al., 2007)。

*Grh4* については、イネゲノム塩基配列を利用することにより、この遺伝子と連鎖するDNAマーカーG144が見出されており、このDNAマーカーの判別にはCAPS法 (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, Konieczny and Ausubel, 1993) が用いられている (田村, 2000)。本法はPCR増幅産物を特定の制限酵素で切断して制限酵素断片長多型を見出す手段である。しかし、CAPS法はPCRによる増幅と制限酵素による切断の2つの手順が必要となるため、作業が煩雑であり、用いる制限酵素の種類によってはランニングコストが高いという欠点がある。また、PCR反応液を精製せずに制限酵素処理をすると、制限酵素による消化が不十分でバンドパターンが不明瞭となり、判別が困難になる場合がある。このため、多数のサンプルを処理する育種選抜の場合には、さらに簡便でコストの低い方法の開発が望まれる。一方、一塩基多型

(SNPs, Single-Nucleotide Polymorphisms) をPCRで識別するHayashi et al. (2004) の方法 (以下SNP判別PCRとする) は、判別プライマーの3' 端をSNP位置に設定し、そのミスマッチを利用した遺伝子型判別法であり、CAPS法のように制限酵素切断を必要としないため、手順が簡単で低コストである。また、本方法はゲノム上に多数存在すると考えられるSNPsを判別できるため、CAPS法よりも応用範囲が広いと考えられる。

そこで、CAPS法の代わりにSNP判別PCRを用いてG144の遺伝子型の判別を試みた結果、簡便、正確かつ低コストで判別できることが明らかになったので報告する。

### II 材料及び方法

#### 1. 供試材料

供試品種として、ツマグロヨコバイに対する抵抗性系統の「イネ中間母本農6号 (以下「中母農6号」とする)」及び感受性品種「ふさおとめ」を用いた。また、千葉県農林総合研究センター育種研究所水稲育種研究室において「中母農6号」と「ふさおとめ」を交配した個体 (以下「交配個体」とする) を用いた。さらに、同研究室で育成しているツマグロヨコバイ抵抗性系統 (以下「抵抗性育成系統」とする) を用いた。これらの個体から、最も若い展開葉の組織をDNA抽出用として採取した。

#### 2. イネからのゲノムDNA抽出

葉組織から、ガラス繊維ろ紙を利用した簡易迅速なDNA抽出法である村元・沢野 (2004) の方法に従って、DNAを抽出した。すなわち、ガラス繊維ろ紙にDNAを固定後、洗浄液で不純物を洗浄し、その後緩衝液にろ紙を浸すことにより、DNAをろ紙から溶出した。

#### 3. 供試DNAマーカー及びCAPS法による遺伝子型の判別

ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子 *Ghr4* に連鎖するDNAマーカーG144の情報を公開データベース (Accession No. D13527及びD14745) から得て、抽出したDNAのG144の遺伝子型をCAPS法で判別した。すなわち、抽出したDNAからG144マーカーの領域を含むDNA断片をPCRで増幅

受理日2008年9月30日

\*現千葉県農業大学校

し、増幅産物を制限酵素Mbo IIで切断して、アガロースゲル電気泳動による切断パターンから遺伝子型を判断した(田村, 2000)。

#### 4. SNP判別PCRによる遺伝子型の判別

「中母農6号」及び「ふさおとめ」のDNAを鋳型に用いて、CAPS法と同様の方法でPCRを行い、G144マーカーの領域を含むDNA断片を得た。この増幅DNA断片の塩基配列を、CAPS法と同じプライマーを用いたダイナーミネーター法により、DNAシーケンサー(377, PE Applied Biosystems, Calif, USA)で解読した。「中母農6号」及び「ふさおとめ」の塩基配列間にSNPsが認められたので、これをもとにHayashi et al. (2004)の方法に従ってプライマーを作製した。「中母農6号」、「ふさおとめ」及び「交配個体」から抽出したDNAを鋳型にして、以下の条件でPCRを行った。PCR増幅反応液15 $\mu$ Lの組成はDNA液3 $\mu$ L、耐熱性ポリメラーゼとしてHot Start Taq polymerase (Takara, Osaka, Japan 濃度は5ユニット/ $\mu$ L) 0.075 $\mu$ L、酵素に添付されていたPCR緩衝液1.5 $\mu$ L、2.5 $\mu$ M dNTPs 1.2 $\mu$ L、25mM MgSO<sub>4</sub> 0.9 $\mu$ L、10 $\mu$ Mのプライマーをそれぞれ0.38 $\mu$ Lを含むものとした。増幅のためのプログラムは94 $^{\circ}$ C30秒間、54 $^{\circ}$ C30秒間、72 $^{\circ}$ C30秒間を1サイクルとして、35サイクルとした。PCR反応はGene Amp PCR System 9700(PE Applied Biosystems)を用いて行った。その後、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイドによる蛍光染色を行い、増幅したDNA断片のバンドの有無と大きさを調べた。

#### 5. 「抵抗性育成系統」におけるSNP判別PCRとCAPS法の結果の比較

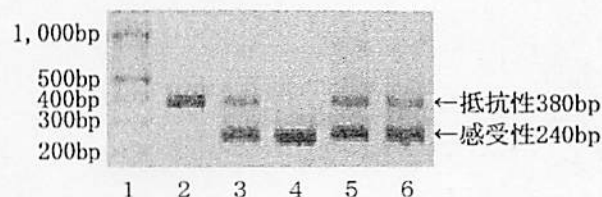
抵抗性育成系統からランダムに選んだ141個体を材料としてDNAを抽出し、SNP判別PCR及びCAPS法の両方法でG144の遺伝子型を判別した。

### III 結果及び考察

#### 1. SNP判別PCRによるDNAマーカーG144の遺伝子型の判別

「中母農6号」及び「ふさおとめ」の塩基配列間に認められたSNPsをもとに3種類のプライマーG144S (5'-TGCATGCATGCAATCCCCGC-3'), G144R (5'-ATCATTACCGCCAAA AAACG-3'), G144Fow (5'-TCGATCGCCTTTTCTACGCA-3')を

作製した。これらのプライマーを用いてPCRを行ったところ、抵抗性系統の「中母農6号」では約380bpのバンドが、感受性系統の「ふさおとめ」では約240bpのバンドが明瞭に認められた(第1図)。また、「交配個体」の場合には、抵抗性と感受性の両方のバンドが認められたことから、G144の遺伝子型判別は可能と考えられた。



第1図 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: 「中母農6号」(抵抗性)  
レーン4: 「ふさおとめ」(感受性)  
レーン3, 5, 6: 「交配個体」(抵抗性と感受性の混合)

#### 2. 抵抗性育成系統におけるCAPS法とSNP判別PCRの結果の比較

抵抗性育成系統141個体のDNAを用いて、CAPS法とSNP判別PCRによるG144の遺伝子型の判別結果を比較したところ、全個体について両方法で同一の結果が得られた(第1表)。したがって、SNP判別PCRの遺伝子型判別精度はCAPS法と同等と考えられた。

第1表 CAPS法とSNP判別PCRで判別したG144の遺伝子型の比較

G144の遺伝子型	CAPS法	SNP判別PCR
感受性	49	49
抵抗性	36	36
混合型	56	56
計	141	141

SNP判別PCRによる遺伝子型の判別法はこれまで用いていたCAPS法に比較して、制限酵素による切断が不要で、PCRのみで判別が可能である。また、SNP判別PCRはプライマーの設計に制約が少ないことから、増幅領域の長さを、増幅が良好である約500bp以下の長さに設定することができるため、鋳型DNAの調製やPCR反応にCAPS法で推奨されるような高価なキットや酵素類を必要としない。このため、簡便かつ安価であり、害虫抵抗性品種の育成において、大量の交配個体から選抜する手法として活用できる。本報告はツマグロヨコバイ抵抗性の判別に本方法を用いた最初の報告であるが、本方法は様々な塩基配列多型の判別に柔軟に適用できることから、品種判別や病害虫の遺伝子診断等、様々な分野で利用可能と考えられる。

#### IV 摘 要

DNAマーカー用いたイネのツマグロヨコバイ抵抗性系統の選抜技術を開発する目的で、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の遺伝子型を判別する手法に、SNP判別PCRを応用した。

1. CAPS法でG144の遺伝子型を判別する際に得られるPCRの増幅DNAを用い、その塩基配列を解読してSNPsを解析し、新たにプライマーを作製した。
2. 作製したプライマーを用いてPCRを行った結果、抵抗性系統「中母農6号」では約380bpのバンドが、感受性品種「ふさおとめ」では約240bpのバンドが明瞭に認められた。SNP判別PCRは高価なキットや酵素類が不要で、簡便かつ低コストなことから、大量の交配個体からの選抜手段として有用である。

#### V 引用文献

- 安藤郁男 (2005). 稲育種におけるDNAマーカー利用の現状と展望. 研究ジャーナル. 28 : 10-15.
- Fukuta, Y., K. Tamura, M. Hirae and S. Oya (1998). Genetic analysis of resistance to green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler) in rice parental line, Norin-PL6, using RFLP markers. Breed. Sci. 48 : 243-249.
- Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daigen and I. Ashikawa (2004). Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. Theor Appl Genet. 108 : 1212-1220.

- Hirae, M., Y. Fukuta, K. Tamura and S. Oya (2007). Artificial selection of biotypes of green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler (Homoptera: Cixiidae), and virulence to resistant rice varieties. Appl. Entomol. Zool. 42 : 97-107.
- Konieczny, A. and F. M. Ausubel (1993). A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J. 4 : 403-410.
- 村元靖典・沢野定憲 (2004). ガラス繊維濾紙を利用した植物からの迅速・簡便・低コストなDNA抽出法. 「関東東海北陸農業」研究成果情報 (生物工学会) : 6.
- Saka, N., T. Tsuji, T. Toyama, M. Yano, T. Izawa and T. Sasaki (2006). Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers linked to a green rice leafhopper resistance gene, *Grh3(t)*. Plant Breed. 125 : 140-143.
- Takita, T. and H. Nishiyama (1989). Selection of biotypes of green rice leafhopper and genetic analysis for the resistance in rice. Bull. Kyushu Agric. Expt. Stn. 25 : 251-259.
- 田村克徳 (2000). DNAマーカーを活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成績概要集 pp.3-12.

## Detection of green rice leafhopper resistance gene *Grh4* by a modified allele-specific PCR method

Masanobu FUKAMI, Yasuyuki NISHIKAWA and Kohichi AOKI

Key words : Marker-assisted selection, DNA marker, Green Rice Leafhopper, Allele-specific PCR

### Summary

For typing of green rice leafhopper resistance, we tried to apply a modified allele-specific PCR method.

1. Nucleotide sequences from the resistant line 'Norin-PL6' and susceptible cultivar 'Fusaotome' were determined by direct sequencing of the PCR-amplified fragments of the DNA marker, G144, which were linked with *Grh4*. For typing of DNA marker, G144, we designed primers on the basis of sequence variants between these cultivars.
2. A 380-bp and a 240-bp fragments were amplified clearly from 'Norin-PL6' and 'Fusaotome', respectively. The typing of this DNA marker by means of this method was simpler and cheaper than the Cleaved Amplified Polymorphic Sequence method.