

試験研究成果普及情報

| 部門 | 稲 | 対象 | 研究 |
|--|---------------|------------|---------|
| 課題名：水稲の穂いもち抵抗性遺伝子 <i>Pb1</i> を簡易に検出できる DNA マーカーの開発 | | | |
| 〔要約〕水稲の穂いもち抵抗性遺伝子 <i>Pb1</i> は、開発したプライマーセットを用いた PCR により増幅される DNA 断片長の違いから存在の有無を判別できる。これにより、穂いもちに抵抗性をもった水稲を選抜できる。 | | | |
| キーワード 水稲、穂いもち抵抗性、 <i>Pb1</i> 、DNA マーカー、品種改良 | | | |
| 実施機関名 | 主 査 | 農林総合研究センター | 生物工学研究室 |
| | 協力機関 | 農林総合研究センター | 水田利用研究室 |
| 実施期間 | 2012年度～2016年度 | | |

〔目的及び背景〕

Pb1 遺伝子は、イネの穂いもち抵抗性の優性主働遺伝子であり、水稲の抵抗性品種の育種において有用な遺伝子である。この *Pb1* 遺伝子に連鎖する DNA マーカーとして N2-3RG 及び NA-2RG-4 が知られているが、その検出にはコストや労力がかかる CAPS 法が用いられている。そこで、PCR 法のみで簡易に検出できる DNA マーカーを開発する。

〔成果内容〕

- 1 水稲の穂いもち抵抗性遺伝子 *Pb1* 近傍に位置する DNA マーカー N2-3RG 及び NA-2RG-4 を検出できる PCR プライマーセットを開発した（表 1、3）。N2-3RG 及び NA-2RG-4 は染色体上で *Pb1* 遺伝子の両側に位置している。
- 2 調査対象から一般的な手法によって DNA を抽出し、表 1 または 3 に記載したプライマーセットを用いて、表 2 または表 4 の反応液組成で PCR を行う。PCR 産物を 3% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、DNA 断片長を測定する（図 1、2）。DNA 断片長から *Pb1* 遺伝子の有無を判別する。
- 3 従来の CAPS 法では制限酵素による PCR 産物の切断が必要であったが、今回開発した手法では制限酵素を用いた切断の作業が不要なため、コストと時間を削減できる。

〔留意事項〕

- 1 本マーカーの利用にあたっては、（国研）農業・食品産業技術総合研究機構と特許実施許諾契約を締結する必要がある。（特許第 4775945 号「*Pb1* 遺伝子と連鎖する分子マーカーを指標にイネの穂いもち抵抗性を識別する方法」）
- 2 DNA を末端から分解する 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA 合成酵素を使用した場合、プライマーが分解されて DNA マーカーによる判別ができなくなる可能性があるため、本実験には同活性を保有しない酵素を使用する。

〔普及対象地域〕

〔行政上の措置〕

〔普及状況〕

[成果の概要]

表 1 DNA マーカーN2-3RG の検出に用いる PCR プライマー

| プライマー名 | 塩基配列 | 塩基数 (bp) |
|------------|---------------------------|----------|
| N2-3RGRES5 | ACAAACTTTCCCAAACATACTGATC | 25 |
| NA-3RGS | G TTCATTCTGGATTCTAAAACGAC | 24 |
| N2-3RGF | TGACGCAGCAACTAAGATGG | 20 |

表 2 DNA マーカーN2-3RG の PCR 反応液組成

| 成分 | 量 (μ l) |
|------------------------|---------|
| 滅菌蒸留水 | 7.2 |
| 10×PCRバッファー | 1.5 |
| 2.5mM dNTPs | 1.2 |
| 25mM MgSO ₄ | 0.9 |
| 10 μ M N2-3RGRES5 | 0.375 |
| 10 μ M NA-3RGS | 0.375 |
| 10 μ M N2-3RGF | 0.375 |
| 5U/μ l DNA合成酵素 | 0.075 |
| 鋳型DNA | 3 |
| 合計 | 15.0 |

注) 反応温度条件は、94℃5 分間の熱変性後、94℃30 秒間・55℃30 秒間・72℃30 秒間を 35 サイクル繰り返し、72℃5 分間の反応を行う

表 3 DNA マーカーNA-2RG-4 の検出に用いる PCR プライマー

| プライマー名 | 塩基配列 | 塩基数 (bp) |
|------------|----------------------|----------|
| NA-2RG-4RF | CAATATCAGCTGAACCAGCT | 20 |
| NA-2RG-4SF | CCTTTCTGAAGCACATCTAG | 20 |
| NA-2RG-4R | CATGTGCCTTGCATTTCTTC | 20 |

表 4 DNA マーカーNA-2RG-4 の PCR 反応液組成

| 成分 | 量 (μ l) |
|-------------------|---------|
| 滅菌蒸留水 | 8.325 |
| 10×PCRバッファー | 1.5 |
| 2.5mM dNTPs | 1.2 |
| 10 μ M NA-2RG-4RF | 0.3 |
| 10 μ M NA-2RG-4SF | 0.3 |
| 10 μ M NA-2RG-4R | 0.3 |
| 5U/μ l DNA合成酵素 | 0.075 |
| 鋳型DNA | 3 |
| 合計 | 15.0 |

注) 反応温度条件は、94℃5 分間の熱変性後、94℃30 秒間・55℃30 秒間・72℃30 秒間を 35 サイクル繰り返し、72℃5 分間の反応を行う

[発表及び関連文献]

平成 29 年度試験研究成果発表会 (作物部門)

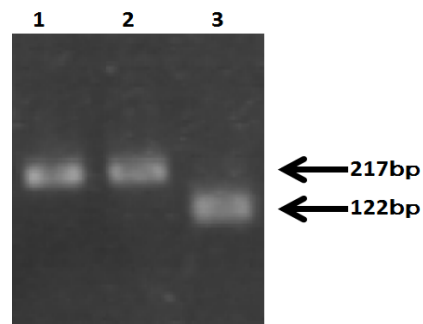


図 1 DNA マーカーN2-3RG の電気泳動像

注 1) レーン 1: 「中母農 6 号」(穂いもち感受性)
 レーン 2: 「ふさおとめ」(穂いもち感受性)
 レーン 3: 「祭り晴」(穂いもち抵抗性)
 注 2) Pb1 遺伝子と連鎖した DNA を保持する系統からは 122bp のバンドが検出される。

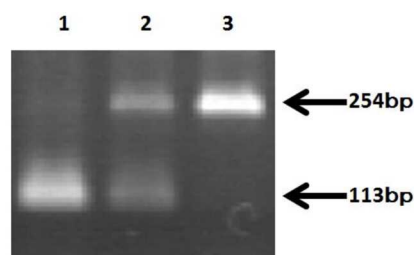


図 2 DNA マーカーNA-2RG-4 の電気泳動像

注 1) レーン 1: 「ふさおとめ」(穂いもち感受性)
 レーン 2: ヘテロ型個体 (穂いもち抵抗性)
 レーン 3: 「祭り晴」(穂いもち抵抗性)
 注 2) Pb1 遺伝子と連鎖した DNA を保持する系統からは 254bp のバンドが検出される。