

DNA マーカーを利用したいもち病真性抵抗性遺伝子型推定

太田裕貴・野々上慈徳*

(岩手県農業研究センター・*岩手生物工学研究センター)

Estimation of true resistance genotype to rice blast using DNA marker

Yuki OTA and Yasunori NONOUE*

(Iwate Agricultural Research Center・*Iwate Biotechnology Research Center)

1 はじめに

水稻では、いもち病高度圃場抵抗性の品種が求められてきた。そのため、近年の育成系統は、噴霧接種によるいもち病の罹病性病斑が出づらくなり、いもち病の真性抵抗性遺伝子型の推定は難しくなっている。一方、近年いくつかの真性抵抗性遺伝子は単離され¹⁾²⁾、それら遺伝子の DNA マーカーが開発されている。そこで、本報告では、それら DNA マーカーの育種への積極的活用に向け、真性抵抗性遺伝子の推定を DNA マーカーおよび接種の両方で実施し、比較検討した。

2 試験方法

単離された遺伝子上の配列情報を基に、既報の DNA マーカーを利用した (表 1)。また、岩手県農業研究センター (北上) において、岩手県育成系統全 96 系統 (岩手 21 号～岩手 116 号) の葉から全 DNA を抽出し、PCR (Go Taq, promega) および 3% アガロース (SeaKem LE agarose, Lonza) を用いた電気泳動により各系統の遺伝子型を決定した。同様に、同系統について、各年度成績書における噴霧接種 (菌) による真性抵抗性遺伝子の推定結果³⁾と比較した。

3cm の葉切片を TPE バッファー (100mM KCl, 100mM Tris-HCl, 10mM EDTA) 250 μ L の入った 96well チューブ (ST-96, 安井器械) に入れ、マルチビーズショッカー (安井器械) を用いて 1,500 rpm、15 分間の条件で粉碎し、1,500 rpm で 10 分間遠心分離した。また、イソプロパノール 100 μ L の入ったチューブにサンプルの上清を分取し、2,800 rpm で 30 分間遠心分離した。沈殿物に 70% エタノール 150 μ L を加え、1,500 rpm で 10 分間遠心の行程を 2 回繰り返した後、乾燥させ、1/10 Tris-EDTA を 60 μ L ずつ加え、遠心分離し、DNA 抽出サンプルとした。

サーマルサイクラー (Pelitier Thermal Cycler, BIO-RAD) を用いて PCR 増幅 (表 2) 後、3% アガロースゲル (Sea Kem LE agarose, Lonza) を用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで約 30 分間染色し、312 nm 波長で UV 照射しプリントグラフ (AE-6933FXCF, ATTO) で撮影した。

噴霧接種による真性抵抗性の判定はおおむね、培土を入れた 96 穴セルトレイに 10 粒程度乾粒播種し、2.5 葉期でいもち病菌胞子液を噴霧接種後、7 日後に罹病葉を達観により実施

した。

3 試験結果及び考察

Pia, *Pii* のいずれも DNA マーカーで識別できることが確認された (図 1)。供試した 96 品種・系統のうち、12 品種について、噴霧接種による判定と DNA マーカー (*Pia* および *Pii*) による判定結果を比較すると、遺伝子型は「あけのむらさき」を除き一致した (表 3)。これは、わが国の品種に導入された *Pia* が主に京都旭由来と推察されるのに対し、「あけのむらさき」が保有する *Pia* は、インドネシア・ジャワ島のジャワニカ種「BP-1」由来の *Pia* であると推察されることから、本マーカーで識別に用いた配列では識別できなかったためと考えられる。今後、改めて噴霧接種を行い、罹病反応を確認する必要がある。

本マーカーは、「あけのむらさき」のように遺伝子の由来が異なる一部の例外を除き、噴霧接種と同じ判定結果になることから、活用可能であることが示された。ただし、新規の外国稲由来の遺伝子は識別できないことから、系譜上遺伝子の由来が異なると予想される系統については噴霧接種と併用することを推奨したい。

4 まとめ

Pia, *Pii* のいもち病真性抵抗性遺伝子型について、DNA マーカーで推定することができ、育種に活用可能である。特に育成初期世代については、系統数が多いことから、網羅的に遺伝子型を推定することによって、判定効率の向上が期待される。奨励品種決定調査、新配布系統および有望系統等については、噴霧接種と DNA マーカーの併用により精度向上を図ることができる。留意点として、遺伝子の由来が異なる場合、識別できない可能性があることから、系譜を確認し噴霧接種を行い確認する必要がある。

引用文献

- 1) Okuyama Y.; Kanzaki H.; Abe A.; Yoshida K.; Tamiru M.; Saitoh H.; Fujibe T.; Matsumura H.; Shenton M.; Galam DC.; Undan Jerwin.; Ito A.; Sone T.; Terauchi R. 2011. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast

resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. Plant Journal 66: 467-479.

- 2) Takagi H.; Uemura A.; Yaegashi H.; Tamiru M.; Abe A.; Mitsuoka C.; Utsushi H.; Natsume S.; Kanzaki H.; Matsumura H.; Saitoh H.; Yoshida K.; Cano L. M.; Kamoun S.; Terauchi R. 2013. MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny

bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. New Phytologist 200: 276-283.

- 3) 昭和 59~平成 25 年度 水稲新品種育成系統試験成績書 (岩手県農業研究センター資料)

表 1 遺伝子型調査に用いた DNA マーカー

対象遺伝子	プライマー名	配列 (5'→3')	bp
<i>Pia</i> ¹⁾	Pia-F	GCGACTGACACTTTTCAATAGC	21
	Pia-R	CGGTAGAGCAATTTAGAAGCAG	22
<i>Pii</i> ²⁾	Pii_2_SNP02	GATCATCTCATGGATCTTTTAAATGC	25
	Pii_2_SNP03	AGCTCTTCAGCGCTGTTTTTC	20
	Pii-IBRC-F	TCCAATGCTTCTGAAAGGTAGC	22
	Pii-IBRC-R	TGGAAACATGAACCCATATCC	21

表 2 PCR 条件

		サイクル数	温度 (°C)	時間
Step 1	初期熱変性・PCR酵素活性化	1	95	5 min
Step 2	熱変性		95	30 sec
	アニーリング	35	57	30 sec
	伸長反応		72	1 sec
Step 3	最終伸長反応	1	72	5 sec

表 3 接種試験と DNA マーカーによる判定結果比較

品種	高性抵抗性		品種登録時との整合性
	顕露接種による判定	DNAマーカーによる判定	
	品種登録	<i>Pia, Pii</i> 有無	
かけはし	<i>Pii</i>	<i>Pii</i>	○
ゆめさんさ	<i>Pii</i>	<i>Pii</i>	○
ぎんおとめ	<i>Pia, Pii</i>	<i>Pia, Pii</i>	○
どんひしゃり	<i>Pii, Pik</i>	<i>Pii</i>	○
あけのむらさき	<i>Pia</i>	-	×
吟さやか	<i>Pia</i>	<i>Pia</i>	○
ゆきおとめ	<i>Pia, Pii</i>	<i>Pia, Pii</i>	○
かぐやの舞	<i>Pii</i>	<i>Pii</i>	○
つぶみのり	<i>Pia, Pib</i>	<i>Pia</i>	○
つづみ星	<i>Pia</i>	<i>Pia</i>	○
きらほ	<i>Pii</i>	<i>Pii</i>	○
結の香	+	+	○
	<i>Pia, Pii, Pik</i>	<i>Pia, Pii</i>	○

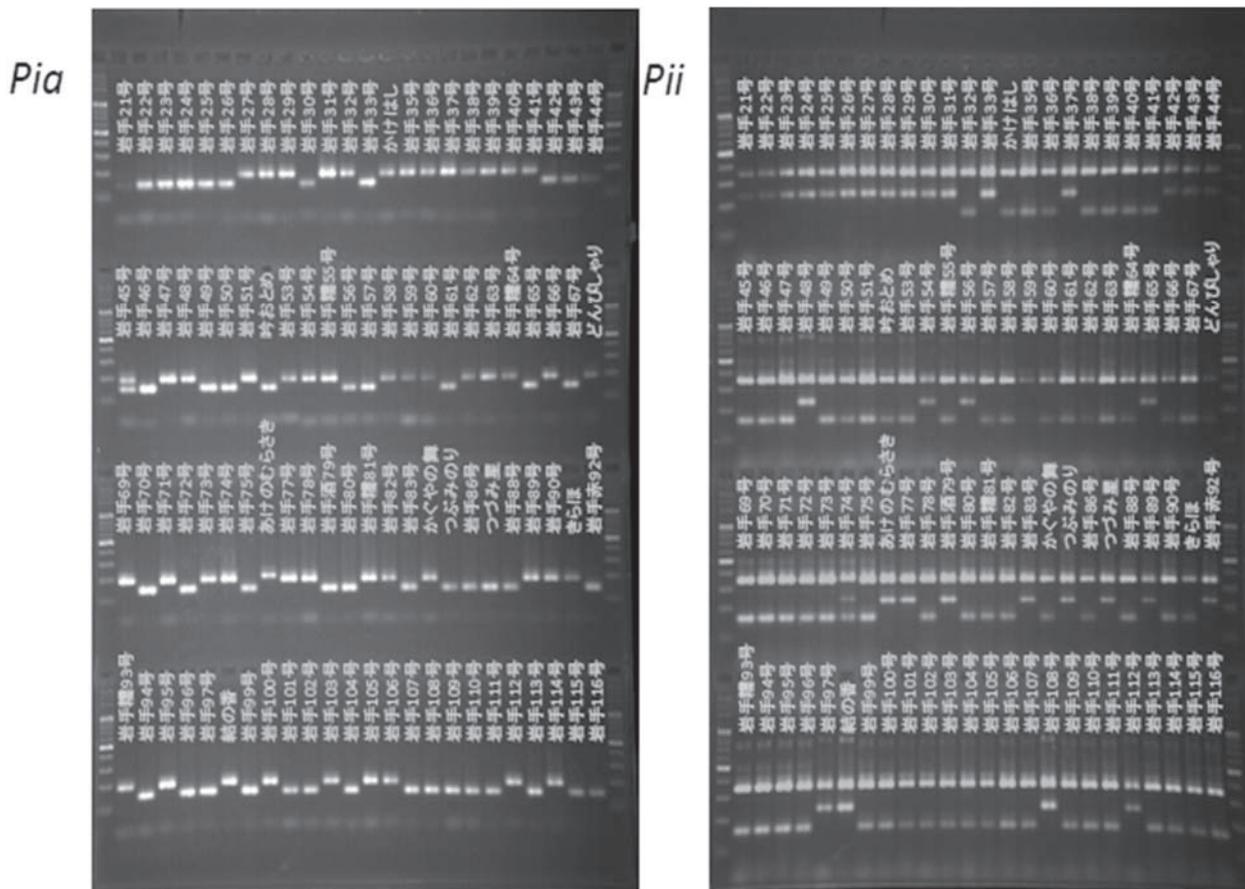


図 1 DNA マーカーを用いた高性抵抗性遺伝子型の識別 (*Pia*、*Pii*いずれも下のバンドが保有することを示す)