

トマト病害抵抗性遺伝子 (*Cf-9*、*FrI*、*I-1*、*I-2*) の 共優性 SCAR マーカーの開発

鈴木良地¹⁾・加藤周平¹⁾・田中はるか¹⁾・加藤政司²⁾・大野 徹¹⁾

摘要：トマトの効率的な育種には共優性マーカーの利用が不可欠である。トマトの重要な病害抵抗性遺伝子である葉かび病抵抗性遺伝子 (*Cf-9*)、根腐萎凋病抵抗性遺伝子 (*FrI*)、萎凋病レース1抵抗性遺伝子 (*I-1*) および萎凋病レース2抵抗性遺伝子 (*I-2*) について、特異的な配列を増幅するプライマーセットを組合せた共優性 SCAR (sequence characterized regions) マーカーを開発した。これらのマーカーの増幅サイズは約550 bp以下であり、PCR反応条件をほぼ同じに揃えることができた。また、一般的な2%アガロースゲルによる電気泳動でもヘテロのバンドを容易に認識できた。これらの共優性マーカーを用いて、トマト47品種の遺伝子型を調べたところ、*Cf-9*、*I-1*、*I-2*については、メーカーの品種カタログで遺伝子の保有が明記してある品種は、抵抗性ホモまたはヘテロとなり、カタログ表記と完全に一致した。*FrI*については、「ルネッサンス」、「アイタキ1号」および「TYファースト」の3品種を除いて、カタログの表記と一致した。

キーワード：トマト、*Cf-9*、*FrI*、*I-1*、*I-2*、SCAR、共優性マーカー

Development of Co-dominant SCAR Marker for Disease Resistance Genes *Cf-9*, *FrI*, *I-1* and *I-2* in Tomato

SUZUKI Ryoji, KATO Shuhei, TANAKA Haruka, KATO Masashi
and OHNO Tooru

Abstract : The use of co-dominant markers is indispensable for effective breeding of tomato (*Solanum lycopersicum*). The leaf mold resistance gene *Cf-9*, fusarium crown and root rot resistance gene *FrI*, fusarium wilt race 1 resistance gene *I-1*, and fusarium wilt race 2 resistance gene *I-2* are important disease resistance genes of tomato. In this study, we developed a co-dominant SCAR (sequence characterized regions) marker combining primer sets that amplify the specific sequences of these genes. The amplification size of these markers was around 550 bp or less, in similar PCR conditions. In addition, heterozygous bands could be easily recognized by electrophoresis using a 2% agarose gel. Using these co-dominant markers, the genotypes of 47 tomato varieties were examined. The varieties which were reported to contain *Cf-9*, *I-1*, and *I-2*, in their manufacturers' catalogs completely matched the catalog notation (either as resistant homozygotes or heterozygotes). Regarding *FrI*, it was consistent with the notation of the catalog, except for the varieties 'Renaissance', 'Aitaki 1 gou', and 'TY First'.

Key Words : Tomato, *Cf-9*, *FrI*, *I-1*, *I-2*, SCAR, Co-dominant marker

緒言

近年の急速な遺伝子解析技術の進歩により、様々な作物でDNA情報の蓄積が進んでいる。トマトについては、特に病害抵抗性遺伝子の解析が進んでおり、これらの遺伝子を保有する品種の育成が極めて重要となっている^{1,2)}。また、作物の育種改良の現場では、DNA情報を基にしたマーカー選抜がもはや標準的な技術として活用されている^{1,2)}。トマトの主な病害抵抗性遺伝子としては、ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子 (*Mi*)、トマトモザイクウイルス抵抗性遺伝子 (*Tm-1*, *Tm-2*, *Tm-2a*)、葉かび病抵抗性遺伝子 (*Cf-9*)、半身萎凋病レース1抵抗性遺伝子 (*Ve-1*)、根腐萎凋病抵抗性遺伝子 (*Fr1*)、萎凋病レース1抵抗性遺伝子 (*I-1*)、萎凋病レース2抵抗性遺伝子 (*I-2*)、斑点病抵抗性遺伝子 (*Sm*)、黄化葉巻病抵抗性遺伝子 (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a*, *Ty-4*, *ty-5*, *Ty-6*) などがあり、それぞれについて、遺伝子あるいはそれに連鎖したDNAマーカーが開発されている^{3,4)}。

DNAマーカーは優性マーカーと共優性マーカーに分けることができる。優性マーカーは抵抗性または感受性遺伝子の有無を識別するマーカーである。優性マーカーがその遺伝子をホモで持つかヘテロで持つかは識別できないのに対して、共優性マーカーはヘテロで持つ個体も識別できる。従って、育種に広く活用するためには、優性マーカーよりも共優性マーカーのほうが遥かに有用である。DNAマーカーはその検出手法によりSSR (simple sequence repeats) マーカー、RAPD (random amplified polymorphic DNA) マーカー、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) マーカーなど様々な種類がある。このうち、CAPSマーカーはPCRによる増幅産物を制限酵素で切断して断片のサイズを識別するものであり、一般的な共優性マーカーとして広く利用されている。一

方、ゲノム上の特異的な変異部分に配置したプライマーにより、特定の配列のみを増幅するSCAR (sequence characterized regions) マーカーは、抵抗性検出用と感受性検出用を組合せることで共優性マーカーとして利用でき、操作が極めて簡単な上に、制限酵素を必要としないため、低コストなマーカー検定が可能である。

本研究では、トマトの病害抵抗性遺伝子のうち、現在のトマト品種に必須の遺伝子として *Cf-9*, *Fr1*, *I-1* および *I-2* の4種類の抵抗性遺伝子に着目した。*Cf-9* 遺伝子は葉かび病の原因菌である *Passalora fulva* のほとんどのレースに抵抗性を有するため、現在のトマト品種の多くに導入されている⁵⁾。*Fr1* は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-Lycopersici* によって引き起こされる根腐萎凋病に対する抵抗性遺伝子であり、国内の多くの大玉品種に導入されている。*I-1* および *I-2* は *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* によって引き起こされる萎凋病に対する抵抗性遺伝子であり、それぞれレース1とレース2に対応している。*I-1* については1960年代から栽培種トマトへの遺伝子の導入が進み、現在ではほとんどの品種が保有している⁶⁾。*I-2* についても、大玉品種を中心に導入が進んでいる⁶⁾。これらのDNAマーカーとしては、*Cf-9* では、黒柳ら⁷⁾ や Truongら⁸⁾ の優性マーカーおよび福田ら⁹⁾ のCAPSマーカー、*Fr1* では Staniaszekら¹⁰⁾ のCAPSマーカー、*I-1* では、Arensら¹¹⁾ の優性マーカー、*I-2* では El Mohtarら¹²⁾、福田ら¹³⁾ および Arensら¹¹⁾ の優性マーカー、Tanyolac & Akkale¹⁴⁾ のCAPSマーカー等の報告がある。

本研究では、*Cf-9*, *Fr1*, *I-1* および *I-2* の4種の病害抵抗性遺伝子について、育種に利用しやすいDNAマーカーを作出することを目的として、操作が容易で、かつ低コストな共優性SCARマーカーの開発を行った。

材料及び方法

表1 プライマーの配列とPCR反応条件

プライマー名	配列 (5' - 3')	μmol / L	サイクル数	熱変成		アニーリング		伸張	
				温度	時間	温度	時間	温度	時間
<i>Cf-9</i>	Cf9-1F 抵抗性検出用 Forward	TGGGATATTGCCCGAAAGAG	0.3	95°C	30秒	55°C	30秒	72°C	30秒
	Cf9-1R 抵抗性検出用 Reverse	GCCGTTCAAGTTGGGTGTTA	0.3						
	Cf9-2F 感受性検出用 Forward	GGAAATAACAACCTTACAcGGT	0.7						
	Cf9-2R ¹⁾ 感受性検出用 Reverse	TGATGACAAGAAGAGCCgTC	0.7						
<i>Fr1</i>	Fr1-F 共通 Forward	GAAGATTCACATTTGAAAACCA	0.5	95°C	30秒	55°C	30秒	72°C	30秒
	Fr1-R 共通 Reverse	CACTTAATATGTGGAAAGCG	0.5						
	Fr1-2R ¹⁾ 感受性検出用 Reverse	CTTACCATATGTGAAGAGcAC	0.5						
<i>I-1</i>	I1-1F 抵抗性検出用 Forward	TGATTTTTCGAAGCACACTTG	0.5	95°C	30秒	60°C	30秒	72°C	30秒
	I1-1R 抵抗性検出用 Reverse	CAATTTGCATGCATCTCGACT	0.5						
	I1-2F 感受性検出用 Forward	GGTGAATACCGATCATATGCAT	0.3						
	I1-2R 感受性検出用 Reverse	GGAGCTGGCAATTTGGTAAA	0.3						
<i>I-2</i>	I2-1F 抵抗性検出用 Forward	CAAGTGCTTCCAGAACTCC	0.5	95°C	30秒	55°C	30秒	72°C	30秒
	I2-1R 抵抗性検出用 Reverse	TAGGGCAATCATCTATCTCC	0.5						
	I2-2F 感受性検出用 Forward	AGGCAACCAATTTCTTCTCG	0.5						
	I2-2R 感受性検出用 Reverse	TCTCAAACCTCACCATCATTGAC	0.5						

1) Cf9-2RおよびFr1-2Rの配列中のアルファベット小文字はミスマッチ配列を示す。

	5' 21403	Forward	Reverse	21790 3'
<i>Cf-9(9-C)</i>		T A T T T G A A A A G C T C A A G A G G	* * * * T T A C T T C T C C T T T C A C A C A A	
<i>9-A</i>		G A T T T G A A A A G C T C A A C G A C	* * * * T T T C T T C T C C T T T C A C A C A A	
<i>9-B</i>		G A T T T G A A A A G C T C A A C G A C	* * * * C T C C T T C T C C T T T C A C A C A A	
<i>9-D</i>		T A T T T G A A A A G C T C A A G A G G	* * * * T T C C T T C T C C T T A C A C A C A A	
<i>9-E</i>		G A T T T G A A A A G C T C A A G A G C	* * * * T A T C T T C T C C T T T C A C A C A A	

図1 *Cf-9*遺伝子検出用のPCRプライマー

GenBank Accession No. AJ002236の登録配列のうち、*Cf-9*は20403-21790、ホモログ*9-A*は5163-5559、*9-B*は13125-13521、*9-D*は30129-30528、*9-E*は38913-39306を示した。

1 配列のアライメント解析およびPCRプライマーの設計

(1) *Cf-9*

葉かび病抵抗性遺伝子*Cf-9*は第1染色体に座上している。Parniskeら¹⁵⁾によって、遺伝子が特定されており(GenBank Accession No. AJ002236)、また配列が極めて類似した4つのホモログ配列(*9-A*、*9-B*、*9-D*、*9-E*)に隣接している。そこで、*Cf-9*遺伝子とホモログ配列のアライメント比較により、*Cf-9*遺伝子だけを増幅できるプライマーを設計した(図1)。既報のDNAマーカー^{7,9)}を用いて、当試験場育成系統のRiA系F₈世代¹⁶⁾の中から、*Cf-9*遺伝子をホモで持つ抵抗性系統「RiA1-5 (仮称)」および感受性系統「RiA3-12 (仮称)」を選抜した。この2系統のDNAを抽出し、図1に示した*Cf-9*遺伝子検出用のプライマーによりPCRを行ったところ、ともに397 bpの増幅産物を得た。これらのPCR産物をMicrocon(メルク株式会社、東京)で精製し、Ceq8000システム(ベックマン・コールター株式会社、東京)を用いてシークエンスした結果、それぞれに特異的な配列が確認できた(図2)。これらの特異的な配列を元に、抵抗性検出用*Cf9-1F/Cf9-1R*および感受性検出用*Cf9-2F/Cf9-2R*のプライマーを設計した(図2、表1)。このうち、*Cf9-1R*は黒柳ら⁷⁾のプライマー*CF9-8*と同一である。なお、特異性を高めるため、プライマー*Cf9-2R*の3'末端から3番目の塩基をアデニンからグアニンにミスマッチ置換した。

(2) *Fr1*

根腐萎凋病抵抗性遺伝子*Fr1*は第9染色体に座上していると考えられている。*Fr1*遺伝子をホモで持つ抵抗性品種「GCR267」および感受性品種「サターン」について、*Fr1-F*(5'-GAAGATTCCTCCATTTGAAAACCA-3')および*Fr1-R*(5'-CACTTAATATGTGGAAAGCG-3')でPCRを行い、Staniaszekら¹⁰⁾のCAPSマーカーの増幅領域をシークエンスした。その結果、CAPSマーカー¹⁰⁾の制限酵素*ApoI*認識部位(R/AATY)でプライマー設計が可能だった(図3)。そこで、*Fr1-F*および*Fr1-R*に加えて、感受性検出用のReverseプライマー*Fr1-2R*を設計した(図3、表1)。なお、特異性を高めるため、プライマー*Fr1-2R*の3'末端から3番目の塩基をアデニンからシトシンにミスマッチ

置換した。これら3種のプライマーを混合して共優性マーカーとした。

(3) *I-1*

萎凋病レース1抵抗性遺伝子*I-1*は第11染色体に座上していると考えられている。Arensら¹¹⁾の優性マーカー情報を基に、*I-1*に連鎖する領域の配列として栽培種トマト「M-82」の配列(GenBank Accession No. HG975523)を特定し、抵抗性由来の配列とした。また、感受性の配列は栽培種トマト「PI 286255」の配列(GenBank Accession No. EU937023)を用いた。これらの約700 bpの配列をアライメント比較した結果、抵抗性の配列では、Arensら¹¹⁾がReverseプライマーに用いた箇所に7塩基(GTCGAGA)の挿入があった(図4)。そこで抵抗性検出用として、*I-1*に特異的な7塩基を含むReverseプライマー(*I1-1R*)と、これに対応するForwardプライマー(*I1-1F*)を設計した(図4、表1)。また、感受性検出用として、7塩基の欠損部位を含むForwardプライマー(*I1-2F*)およびこれに対応するReverseプライマー(*I1-2R*)を設計した。これら4種のプライマーを混合して共優性マーカーとした。

(4) *I-2*

萎凋病レース2抵抗性遺伝子*I-2*は第11染色体に座上し、Simonsら¹⁷⁾により遺伝子が特定されている。また近傍には配列が酷似したホモログ(*I2C-1*、*I2C-2*、*I2C-3*、*I2C-4*、*I2C-5*)の遺伝子が存在する。従って、ホモログが反応しないようにプライマーを設計する必要がある。比較に用いた配列は、*I-2*、*I2C-1*、*I2C-2*、*I2C-3*、*I2C-4*、*I2C-5*について、それぞれGenBank Accession No. AF118127(塩基配列:1-3685)、AF004875(300-3850)、AF004879(204-3742)、AF004880(1-800)、AF004881(1-1150)、AF408704(301-3872)を、また感受性の配列としてGenBank Accession No. CP023767(54918215-54921809)を用いた。これらをアライメント比較したところ、*I-2*および感受性配列にそれぞれ特異的な部位が確認できたため、抵抗性検出用として*I2-1F/I2-1R*を、感受性検出用として*I2-2F/I2-2R*を設計した(図5、表1)。これら4種のプライマーを混合して共優性マーカーとした。

2 解析に用いたトマト品種およびDNA抽出

各種苗メーカーの代表的な品種を中心に47品種のトマトを用いた(表2)。展開直後の葉30 mgからCTAB法によりDNAを抽出し、使用するまで-30℃で保存した。

3 PCR反応

PCR反応は、1×Go Taq Mastermix(プロメガ株式会社、東京)を用い、1.0 μLのDNAを含む全量10 μLで行った。PCR反応後は2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後にUV照射下でバンドパターンを確認した。プライマーの混合濃度およびPCR反応条件は表1に示した。

試験結果

1 *Cf-9*

*Cf-9*共優性マーカー(*Cf9-1F*, *Cf9-1R*, *Cf9-2F*, *Cf9-2R*)によるPCR結果を図6に示した。抵抗性品種(「桃太郎コルト」、「アニモTY-12」、「AMS-015」、「桃太郎なつみ」、「麗旬」、「りんか409」、「TYみそら86」)は400 bp、または400 bpおよび157 bpにバンドが生じ、それぞれ*Cf-9*ホモまたはヘテロと判定できた。一方、感受性品種の「サターン」、「ルネッサンス」および「TYファースト」は157 bpにのみバンドが生じた。また、これらの品種を含む全47品種の遺伝子型を本マーカーで判定し、表2に示した。品種カタログ等で*Cf-9*を保有するとされる17品種のうち、7品種は*Cf-9*ホモ、10品種は*Cf-9*ヘテロと判定できた。*Cf-9*を保有しない15品種は全て感受性と判定できた。

2 *Fr1*

*Fr1*共優性マーカー(*Fr1-F*, *Fr1-R*, *Fr1-2R*)によるPCR結果を図7に示した。抵抗性品種(「GRACE」、「GCR267」、「桃太郎ファイト」、「アニモTY-12」、「麗旬」)は539 bp、または、539 bpおよび151 bpにバンドが生じ、それぞれ*Fr1*ホモまたはヘテロと判定できた。感受性品種の「マイロック」、「りんか409」、「TYみそら86」、「桃太郎T93」および「桃太郎なつみ」は151 bpにのみバンドが確認できた。また、47品種のトマトDNAを用いて、本マーカーの有効性を検証したところ、品種カタログ等で*Fr1*保有が明らかな17品種のうち、2品種が*Fr1*ホモ、12品種が*Fr1*ヘテロとなった。しかし「ルネッサンス」、「アイタキ1号」、「TYファースト」の3品種は感受性と判定された(表2)。これら3品種については、Staniaszekら¹⁰⁾のCAPSマーカーでも同様に感受性と判定された(データ省略)。

3 *I-1*

*I-1*共優性マーカー(*I1-1F*, *I1-1R*, *I1-2F*, *I1-2R*)によるPCR結果を図8に示した。全品種に共通のバンド(約600 bp)が生じたが、抵抗性品種(「桃太郎コルト」、「麗旬」、「アニモTY-12」、「TYみそら86」、「ファ

ーストパワー」、「TYファースト」、「スーパーファースト」)は393 bp、または、393 bpおよび250 bpにバンドが生じ、それぞれ*I-1*ホモまたは*I-1*ヘテロと判定できた。感受性品種の「大型福寿」、「純系愛知ファースト」および「GCR267」は250 bpにバンドが確認できた。トマト47品種の遺伝子型判定では、*I-1*を保有する32品種のうち、31品種が*I-1*ホモ、1品種がヘテロと判定された(表2)。*I-1*保有が不明の15品種のうち、11品種は*I-1*ホモまたはヘテロであり、4品種が感受性だった。

4 *I-2*

*I-2*共優性マーカー(*I2-1F*, *I2-1R*, *I2-2F*, *I2-2R*)によるPCR結果を図9に示した。抵抗性品種(「桃太郎なつみ」、「アニモTY-12」、「TYみそら86」、「アイタキ1号」、「桃太郎コルト」、「麗旬」、「りんか409」)は485 bp、または、485 bpおよび230 bpにバンドが生じ、それぞれ*I-2*ホモまたはヘテロと判定できた。感受性品種の「サターン」、「ルネッサンス」および「TYファースト」は230 bpにのみバンドが認められた。トマト47品種の遺伝子型判定では*I-2*の保有が明らかな20品種のうち、10品種が*I-2*ホモ、10品種が*I-2*ヘテロと判定された(表2)。また、*I-2*を保有していないと考えられた12品種のうち、「サンチェリーピュア」を除く11品種が感受性と判定された。

考 察

1 *Cf-9*

47品種のトマトに対する*Cf-9*共優性マーカーによる検定では、品種カタログ記載の*Cf-9*保有情報と遺伝子型による判定が完全に一致した。また、黒柳ら⁷⁾の優性マーカーや福田ら⁹⁾のCAPSマーカーによる結果とも一致した(データ省略)。このことから本共優性マーカーは有用であると考えられた。本共優性マーカーは制限酵素が不要で、明瞭なバンドを生じるため、遺伝子型を正確に判定できるメリットがある。また、*Cf-9*遺伝子は不完全優性であり、抵抗性ホモは抵抗性ヘテロよりも葉かび病に対する抵抗性が強い¹⁸⁾。従って、本共優性マーカーを使って抵抗性ホモを選抜することで、より強い抵抗性を付与した品種を育成できると考えられる。

2 *Fr1*

47品種のトマトに対する検定では、品種カタログ記載の*Fr1*保有情報と遺伝子型による判定がほぼ一致したが、「ルネッサンス」、「アイタキ1号」、「TYファースト」、「TYまもる」の4品種について、予想と反した結果となった。特に根腐萎凋病抵抗性の「ルネッサンス」、「アイタキ1号」および「TYファースト」の3品種については、マーカー検定では感受性と判定された。これについては、本共優性マーカーの設計で参考としたStaniaszekらのマーカー¹⁰⁾でも同様だった。*Fr1*遺伝子は未だ特定されておらず、本共優性マーカーを含め既報

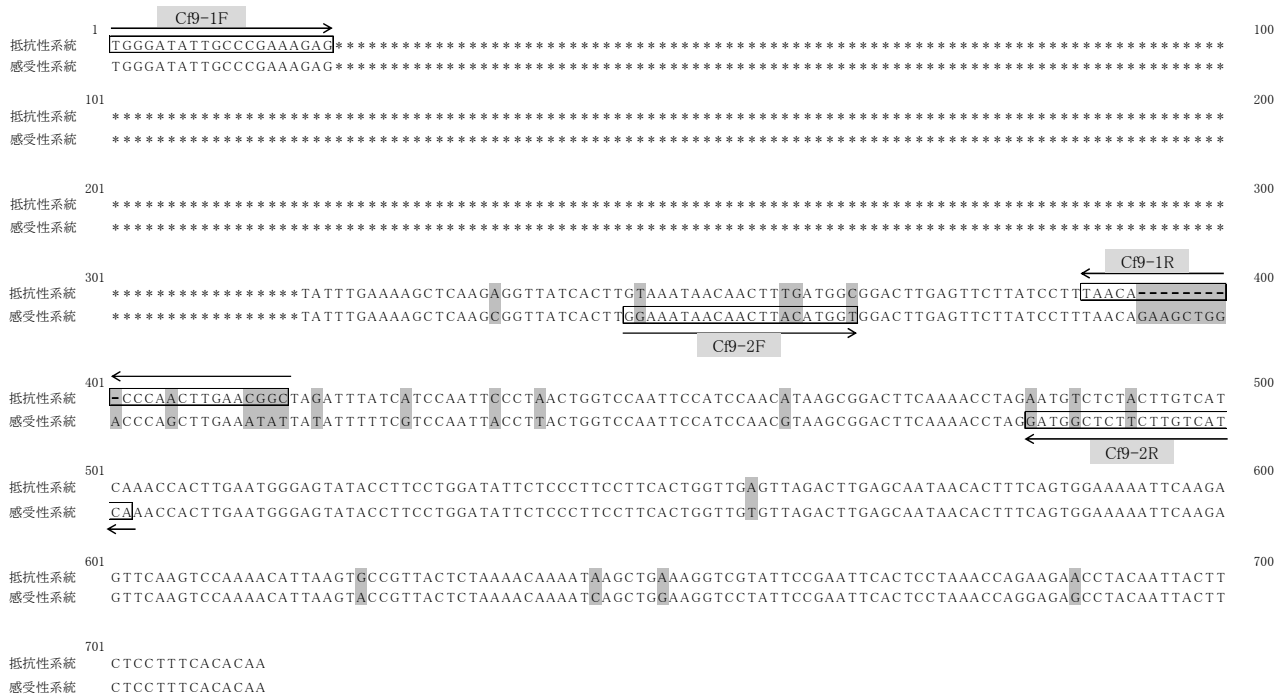


図2 Cf-9抵抗性系統および感受性系統の配列比較

抵抗性系統は「RiA1-5(仮称)」を、感受性系統は「RiA3-12(仮称)」を用いた。1番から317番はAJ002236(21086-21402)の配列を、318番から714番はCf-9遺伝子検出用プライマーのPCRおよびシークエンスで得た配列を示し、*の塩基は省略した。網掛けは差異のあった塩基を、-は欠損を示す。枠付きおよび矢印はプライマーの位置を示す。

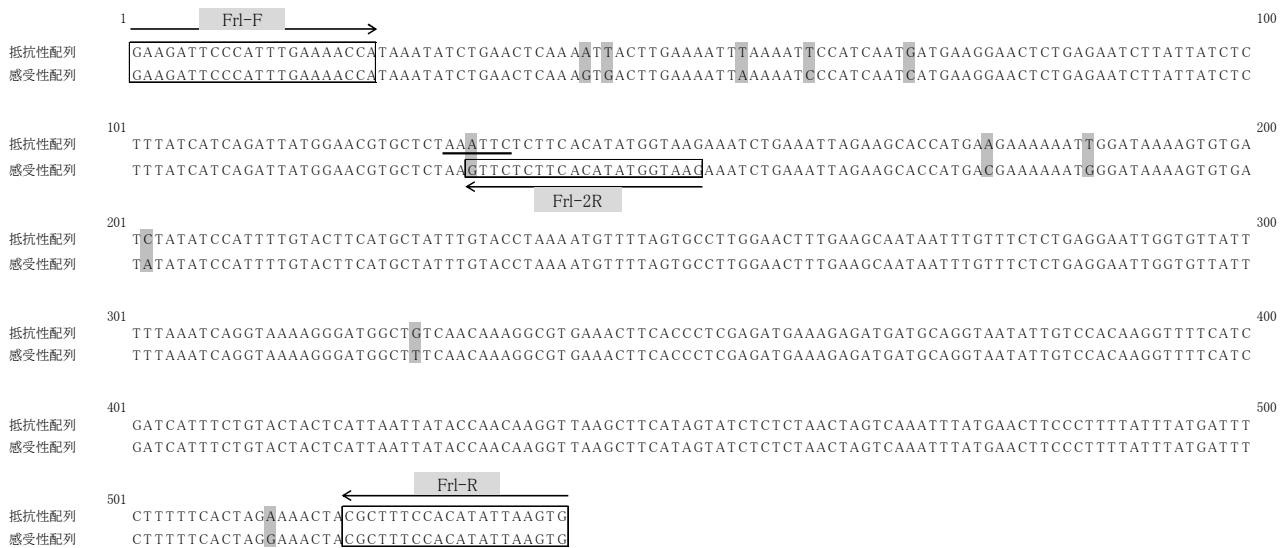


図3 Frl 抵抗性および感受性の配列比較

抵抗性はHG975448(5889658-5890196)を、感受性はHG975521(5497986-5498524)の配列を用いた。下線は制限酵素ApoIの認識部位、網掛けは差異のある塩基、枠付きおよび矢印はプライマーの位置を示す。

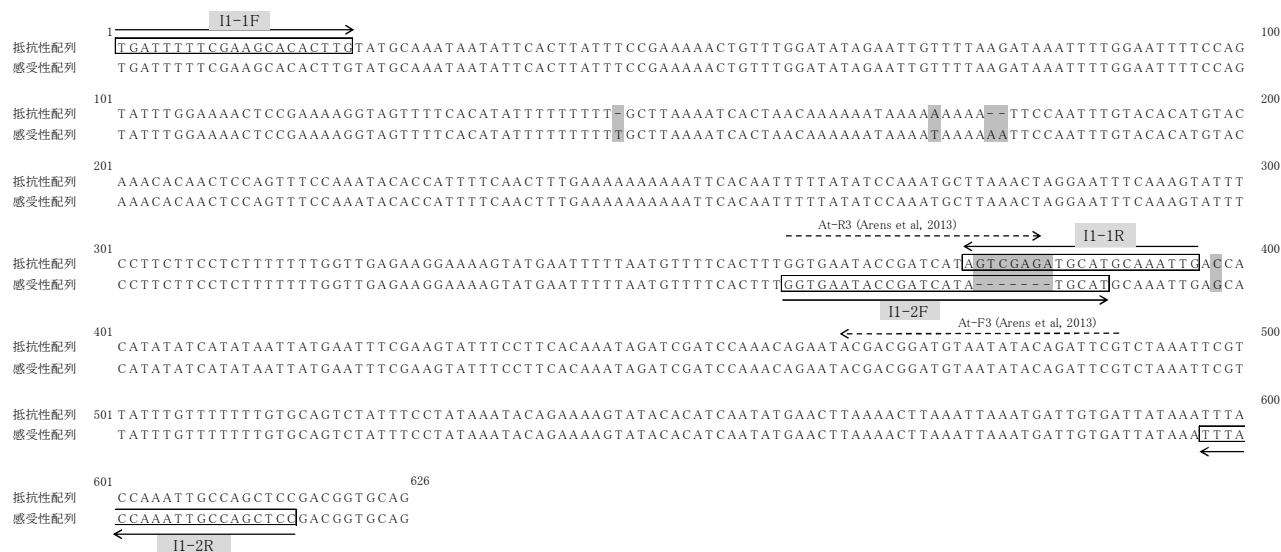


図4 *I-1*抵抗性および感受性の配列比較

抵抗性はHG975523 (3706684-3707306) を、感受性はEU937023 (48-666) の配列を用いた。網掛けは差異のある塩基、-は欠損を示す。破線矢印はArensら¹¹⁾のForwardプライマーの位置、枠付きおよび矢印は本研究のプライマーの位置を示す。

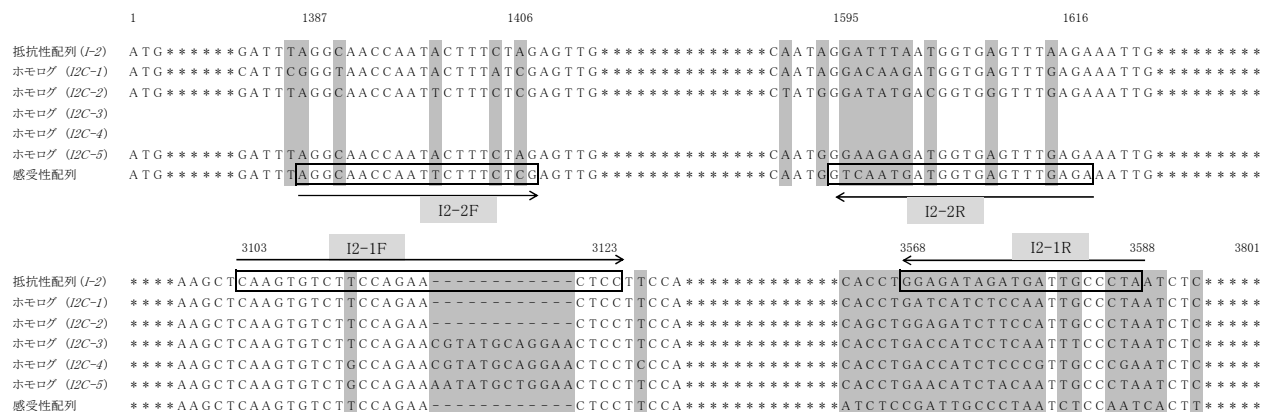


図5 *I-2*抵抗性および感受性の配列比較

比較した配列情報のうち、*I2C-3*および*I2C-4*については、プライマー472I2/473I2の増幅領域に相当する部位が未解読となっている。*の塩基は省略した。網掛けは差異のある塩基を、-は欠損を示す。枠付きおよび矢印は本研究のプライマーの位置を示す。

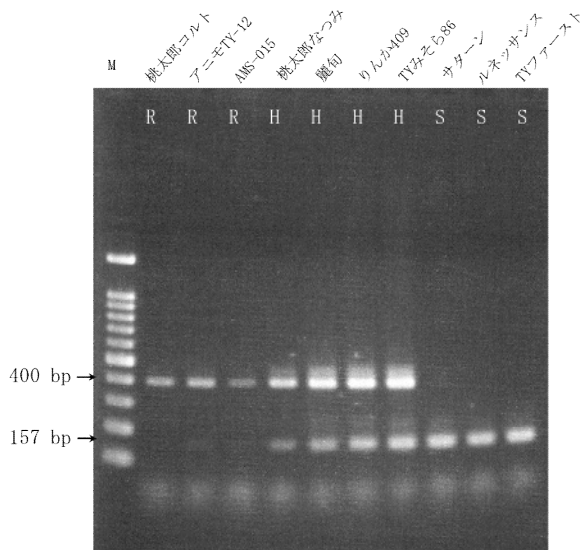


図6 *Cf-9*共優性マーカーによるPCR結果

M : 100 bp ladder、Rは抵抗性ホモ、Hは抵抗性ヘテロ、Sは感受性を示す。Rは400 bpに、Hは400 bpと157 bpに、Sは157 bpにバンドが検出された(矢印)。

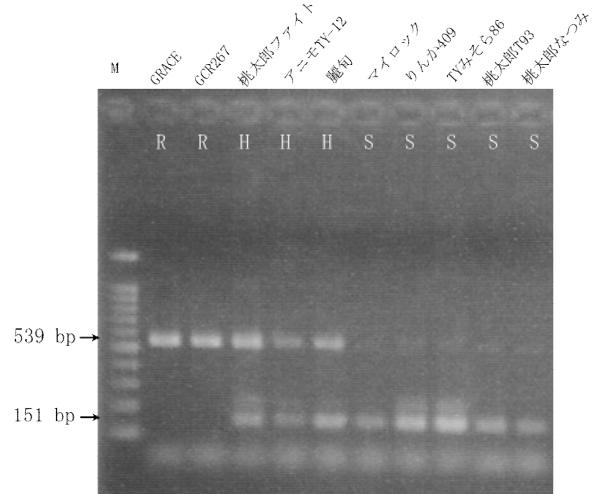


図7 *Fr-1*共優性マーカーによるPCR結果

M : 100 bp ladder、Rは抵抗性ホモ、Hは抵抗性ヘテロ、Sは感受性を示す。Rは539 bpに、Hは539 bpと151 bpに、Sは151 bpにバンドが検出された(矢印)。

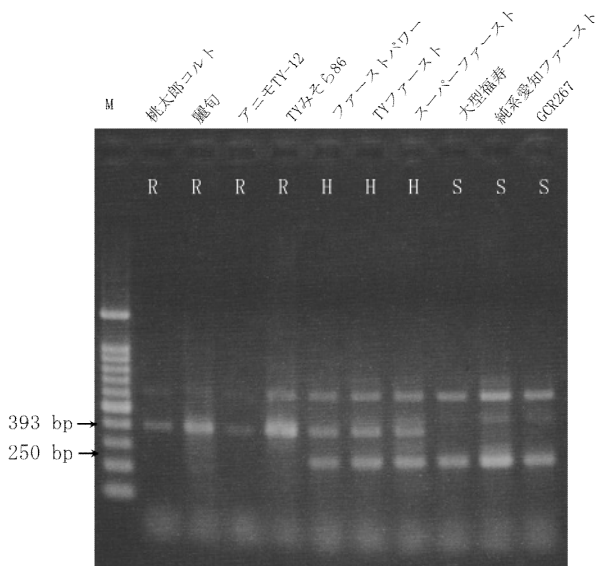


図8 *I-1*共優性マーカーによるPCR結果

M : 100 bp ladder、Rは抵抗性ホモ、Hは抵抗性ヘテロ、Sは感受性を示す。Rは393 bpに、Hは393 bpと250 bpに、Sは250 bpに特異的なバンドが検出された(矢印)。

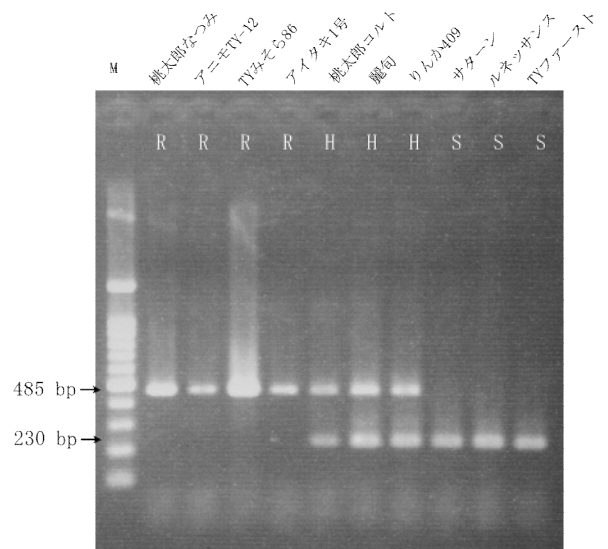


図9 *I-2*共優性マーカーによるPCR結果

M : 100 bp ladder、Rは抵抗性ホモ、Hは抵抗性ヘテロ、Sは感受性を示す。Rは485 bpに、Hは485 bpと230 bpに、Sは230 bpにバンドが検出された(矢印)。

表2 トマト47品種のマーカー検定結果

品種名	Cf-9		Fr1		I-1		I-2	
	カタログ	マーカー検定	カタログ	マーカー検定	カタログ	マーカー検定	カタログ	マーカー検定
1 桃太郎コルト	○ ¹⁾	R ²⁾	○	H	○	R	○	H
2 桃太郎ファイト	×	S	○	H	○	R	○	H
3 桃太郎ヨーク	×	S	○	H	○	R	○	H
4 桃太郎T93	×	S	×	S	○	R	×	S
5 桃太郎8	×	S	×	S	○	R	○	H
6 桃太郎なつみ	○	H	×	S	○	R	○	R
7 桃太郎はるか	-	H	○	H	○	R	×	S
8 TY桃太郎さくら	×	S	○	H	○	R	×	S
9 ハウス桃太郎	×	S	×	S	○	R	×	S
10 フルティカ	○	R	×	S	-	R	×	S
11 強力米寿	×	S	×	S	○	R	×	S
12 サターン	×	S	×	S	○	R	×	S
13 大型福寿	×	S	-	S	-	S	-	S
14 ごほうび	○	H	○	H	○	R	○	H
15 マイロック	○	H	×	S	○	R	○	R
16 麗夏	○	H	×	S	○	R	○	H
17 麗容	○	H	×	S	○	R	○	H
18 麗旬	○	H	○	H	○	R	○	H
19 りんか409	○	H	×	S	○	R	○	H
20 ルネッサンス	×	S	○	S	○	R	×	S
21 ファーストパワー	-	S	-	S	-	H	-	S
22 おどりこ	×	S	×	S	○	R	×	S
23 サンチェリービューア	○	R	×	S	○	R	×	H
24 サンチェリースマイル	○	R	×	S	○	R	×	S
25 タイニーティム	-	R	-	S	-	R	-	S
26 アニモTY-10	○	R	○	H	○	R	○	R
27 アニモTY-12	○	R	○	H	○	R	○	R
28 TYみそら86	○	H	×	S	○	R	○	R
29 みそら64	○	H	×	S	○	R	○	R
30 TYまもる	×	S	×	H	○	R	○	R
31 アイタキ1号	○	H	○	S	○	R	○	R
32 TYファースト	×	S	○	S	○	H	×	S
33 スーパーファースト	×	S	○	H	-	H	-	R
34 純系愛知ファースト	-	S	-	S	-	S	-	S
35 サンドバル	×	S	-	H	○	R	○	R
36 HTA (非品種)	-	S	-	R	-	R	-	S
37 DP (非品種)	-	S	-	S	-	R	-	R
38 新メイト	-	S	○	H	○	R	○	H
39 ツエーゼ	-	S	○	R	○	R	-	S
40 Mottele	-	S	×	S	-	R	-	R
41 AMS-015	○	R	○	H	○	R	○	R
42 GRACE	-	H	○	R	-	R	-	R
43 GCR267	-	S	-	R	-	S	-	S
44 Athyla	-	S	-	R	-	R	-	R
45 VFNT cherry	-	S	-	S	-	S	-	S
46 Tropic	-	S	-	S	-	R	-	S
47 Micro-Tom	-	S	-	S	-	R	-	S

1) カタログに抵抗性遺伝子の保有が明記してある場合を「○」、明記してない場合を「×」、不明または未確認を「-」で示した。

2) 抵抗性ホモをR、抵抗性ヘテロをH、感受性をSで示した。

のマーカ―は、*Frl*遺伝子の近傍の領域を検出する連鎖マーカ―である。従って、連鎖マーカ―は、正確に遺伝子を検出できない場合があり、齟齬のあった3品種についても、組換え等により、本マーカ―の認識部位を欠いているために、本来あるはずの*Frl*遺伝子を検出できなかった可能性が高いと考えられる。今後、*Frl*遺伝子が特定され、遺伝子を直接検出できるDNAマーカ―が開発されることを期待したい。なお、これら3品種以外については、正確に遺伝子型を識別できていることから、本マーカ―は共優性マーカ―として有用と考えられた。

3 I-1

I-1のマーカ―検定の結果、47品種中43品種で保有が確認され、品種カタログの記載と完全に一致した。ファースト系の3品種(「ファーストパワー」、「スーパーファースト」、「TYファースト」)だけがヘテロで、他の品種は全て抵抗性ホモだった。これらの判定結果はArensら¹¹⁾の優性マーカ―の結果と一致しており(データ省略)、またバンドは明瞭に確認できたことから、本マーカ―は共優性マーカ―として有用と考えられた。I-1の共優性マーカ―の報告は本研究が初めてである。

4 I-2

47品種のマーカ―検定では、品種カタログの記載と遺伝子型がほぼ一致した。ミニトマト品種の「サンチェリーピュア」だけが一致しなかったが、少なくともI-2保有が明記してある品種については、抵抗性ホモまたは抵抗性ヘテロの遺伝子型を正確に判定できた。バンドは明瞭であり、共優性マーカ―として有用と考えられた。

トマト種苗メーカーでは、自社品種の病害抵抗性に関する情報を全て公表しているわけではない。また、抵抗性判定の方法も公表されていない。従って、品種カタログで病害抵抗性情報が記載されていないからといって、必ずしもその品種が感受性であるとは限らない。しかし、少なくとも抵抗性の記載がある品種については、*Frl*検定で用いた3品種を除いて、本研究で開発した共優性SCARマーカ―により、*Cf-9*、*Frl*、I-1およびI-2について、抵抗性ホモまたは抵抗性ヘテロの判別が可能だった。特に、I-1についてはこれまで優性マーカ―しかなかったが、本研究により初めて共優性マーカ―を開発できた。これらの共優性SCARマーカ―は、増幅サイズが最大でも約550 bp程度に揃えてあるため、PCR反応が短時間で済む。また、2%アガロースゲルで容易にバンドを識別できるなど、これまでにはない利点がある。こうしたことから、本研究で開発した共優性SCARマーカ―を活用することで、トマトの育種を一層効率化できると考えられる。

引用文献

- Bai, Y. and Lindhout, P. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*. 100, 1085-1094(2007)
- Foolad, M. R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007, 1-52(2007)
- Lee, J. M., Oh, C. S. and Yeam, I. Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs. *Plant Breed. Biotech.* 3(4), 308-322(2015)
- Hanson, P., Lu, S. F., Wang, J. F., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C. W., Tee, K. L., Wang, Y. Y., Hsu, Y. C., Schafleitner, R., Ledesma, D. and Yang, R. Y. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*. 201, 346-354(2016)
- 飯田祐一郎. トマト葉かび病菌の新たな病原性系統の収集. 微生物遺伝資源探索収集調査報告書. 23, 1-8(2010)
- 住田敦, 加屋隆士, 畠中誠. 完熟トマト‘桃太郎’系品種の育種と普及. 園芸学研究. 7 (1), 1-4(2008)
- 黒柳悟, 福田至朗, 山田真人. トマト葉かび病抵抗性遺伝子(*Cf-9*)に連鎖したDNAマーカ―の開発. 愛知農総試研報. 42, 15-22(2010)
- Truong, H. T. H., Choi, H., Cho, M. C., Lee, H. E. and Kim, J. H. Use of gene-based *Cf-9* markers in marker-assisted selection to screen tomato cultivars with resistance to *Cladosporium fulvum* Hort. Environ. Biotechnol. 52, 204-210(2011)
- 福田至朗, 黒柳悟, 田中哲司, 浅見逸夫. トマト葉かび病抵抗性遺伝子(*Cf-9*)を検出する共優性マーカ―の開発. 愛知農総試研報. 44, 1-6(2012)
- Staniaszek, M., Szczechura, W. and Marczewski, W. Identification of a new molecular marker C2-25 linked to the *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance *Frl* gene in tomato. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 50(4), 285-287(2014)
- Arens, P., Mansilla, C., Deinum, D., Cavellini, L., Moretti, A., Rolland, S., Van der Schoot, H., Calvache, D., Ponz, F., Collonnier, C., Mathis, R., Smilde, D., Caranta, C. and Vosman, B. Development and evaluation of robust Molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theor. Appl. Genet.* 120, 655-664(2010)
- El Mohtar, C. A., Atamian, H. S., Dagher, R. B. and Abou-Jawdah, Y. Marker-assisted selection of tomato genotypes with the *I-2* gene for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2. *Plant Disease*. 91(6), 758-762(2007)
- 福田至朗, 黒柳悟, 大藪哲也, 大矢俊夫. トマト萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)レース2の抵抗性遺伝子I-2に連鎖するDNAマーカ―の開発.

1. Bai, Y. and Lindhout, P. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and

- 愛知農総試研報. 41, 41-46(2008)
14. Tanyolac, B. and Akkale, C. Screening of resistance genes to fusarium root rot and fusarium wilt diseases in F3 family lines of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using RAPD and CAPs markers. African Journal of Biotechnology. 9, 2727-2730(2010)
15. Parniske, M., Hammond-Kosack, K. E., Golstein, C., Thomas, C. M., Jones, D. A., Harrison, K., Wulff, B. B. and Jones, J. D. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. Cell 91(6), 821-832(1997)
16. 加藤政司, 田中哲司, 大藪哲也. 耐暑性を示すトマト育種素材の特性およびその利用. 愛知農総試研報. 49, 9-14(2017)
17. Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrand, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. and Vos, P. Dissection of the fusarium *I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. Plant Cell. 10, 1055-068(1998)
18. Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. Incomplete dominance of tomato *Cf* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 7, 58-70(1994)