

トマト青枯病抵抗性のRAPDマーカー

由比 真美子・門馬 信二*・平井 正志*

(東北農業試験場・*野菜・茶業試験場)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Bacterial Wilt Resistance in Tomato

Mamiko YUI, Shinji MONMA* and Masashi HIRAI*

(Tohoku National Agricultural Experiment Station・*National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea)

1 はじめに

トマト青枯病は土壌伝染性の難防除病害で、被害を回避するには抵抗性品種の利用が効果的である。野菜・茶業試験場では、ハワイから導入した‘Hawaii 7998’を抵抗性親とし、‘トマト中間母本農5号(以下TPL-5とする)’を罹病性親として交配を行い、抵抗性の遺伝解析を進めてきた。この過程で得られた抵抗性及び罹病性の系統を用いてRAPD (random amplified polymorphic DNA) による多型分析を行い、選抜育種に利用しうるマーカーを検索した。

なお、マーカー間連鎖分析をはじめ一連の統計解析は鶴飼保雄教授(東京大学農学部)にご指導いただいた。また、本研究は文部省科学研究費補助金(総合研究A「次世代育種へ向けての生物工学の展開」)を受けて実施したものである。ここに記して謝意を表する。

2 試験方法

(1) プライマーのスクリーニング

CTAB法で両親及び後代のトマト葉全DNAを抽出し、288種類のプライマーでTth DNA合成酵素(東洋紡)を用いPCRを行った。装置はASTEC社製PC-700を用い、前処理94℃30秒に続き94℃30秒・40℃2分・72℃3分で45サイクル反復、後処理72℃7分の条件で反応させた。増幅産物を1.5%アガロースゲルで分析し、抵抗性特異的なバンドを検索した。

(2) F₂集団における抵抗性とマーカーの分離調査

‘TPL-5 × Hawaii 7998’のF₂99個体を青枯病菌汚染圃場に定植し、青枯病菌液を株元灌注接種後枯死するまでの日数に基づき各個体の抵抗性指数(RI)を判定した(接種以前枯死: RI=1, 接種後14日以内枯死: RI=2, 以後4日ごとに1を加算, 55日以上生存: RI=13)。また、同上のPCR法で抵抗性特異的な可能性を示したバンドの分離も調査した。

(3) マーカー及び抵抗性遺伝子の由来の推定

‘Hawaii 7998’の抵抗性遺伝子は*L. pimpinellifolium*由来とされているものの詳細が不明のため、複数のトマト品種及び近縁種におけるマーカーの分布を調査した。

3 試験結果及び考察

(1) 抵抗性特異的なバンドが32種類のプライマーで増幅され、そのうち3種類(マーカー名 RA12-13₄₅₀, RA12-29₁₆₀₀, RA12-84₁₅₀₀)は、抵抗性F₄個体でも特異的に増幅された。また、罹病性F₄で増幅されたもののうち、別系統由来の抵抗性F₄個体での増幅などからさらに4種類(RA10-22₁₆₀₀, RA12-38₃₀₀, RA12-41₄₅₀, RA12-74₁₅₀₀)を候補として残し、合計7個をマーカー候補として選んだ(表1)。

表1 ‘Hawaii 7998’由来の青枯病抵抗性遺伝子を持つ個体の選抜に用いるRAPDマーカー候補

マーカー	プライマー	マーカーサイズ
RA10-22 ₁₆₀₀	5'-GTCTGGGTGAA-3'	1600bp
RA12-13 ₄₅₀	5'-TCATCACACCCG-3'	450bp*
RA12-29 ₁₆₀₀	5'-AGGTTGGCTGAT-3'	1600bp*
RA12-38 ₃₀₀	5'-TGAGAGCGTACG-3'	300bp
RA12-41 ₄₅₀	5'-GACTTGCGCCCA-3'	450bp*
RA12-74 ₁₅₀₀	5'-CACTCGATACGG-3'	1500bp
RA12-84 ₁₅₀₀	5'-CCCTCCCCAGCT-3'	1500bp*

注. *: 表3でF₂集団の選抜に用いた4個のマーカー

(2) F₂集団におけるマーカーの分離は、RA12-29₁₆₀₀が罹病性親型に若干偏ったのを除き、3:1の分離比に適合した(P<0.05)。RA12-13₄₅₀とRA12-29₁₆₀₀は連鎖していた(組換え価は約0.1)。マーカーの有無により個体を2群に分類し、群間の抵抗性の差を分散分析で解析した結果、

表2 RAPDマーカーの有無により2群に分けられたF₂集団の青枯病抵抗性に関する分散分析

マーカー	個体数 (RI平均)	項目	平方和 (SS)	分散 (MS)	分散比 (F)	確率 (P)
RA12-13 ₄₅₀	有 76	マーカー	272.34	272.34	19.44	<0.01
	(7.14)	誤差	1359.32	14.01		
	無 23	計	1631.66			
RA12-29 ₁₆₀₀	有 61	マーカー	414.95	414.95	32.52	<0.01
	(7.70)	誤差	1173.66	12.76		
	無 33	計	1588.61			
	(3.30)					

注. RA12-29₁₆₀₀についてはバンドの有無を明瞭に判別できなかった5個体を除く

RA12-13₄₅₀とRA12-29₁₆₀₀では1%水準で、またRA12-41₄₅₀とRA12-84₁₅₀₀では5%水準で、有意な群間差を認めた(表2)。

表3 RAPD マーカーによる青枯病抵抗性の選抜効果

抵抗性 指数(RI)	F ₂ 母集団の 個体数(A)	選抜集団の 個体数(B)	選抜率(%) (B/A)×100
1 ~ 2	29	1	3.4
3 ~ 5	16	4	25.0
6 ~ 8	30	11	36.7
9 ~ 11	15	9	60.0
12 ~ 13	9	7	77.8
計	99	32	32.3
RI 平均	6.23	9.19	

表4 トマト品種及び近縁種におけるRAPD マーカーの分布

品種・系統名 ¹⁾		RAPD マーカー			
		RA12- 13 ₄₅₀	RA12- 29 ₁₆₀₀	RA12- 41 ₄₅₀	RA12- 84 ₁₅₀₀
Hawaii 7996	esc. (R)	- ²⁾	-	-	+
Hawaii 7997	esc. (R)	-	-	-	+
Hawaii 7998	esc. (R)*	+	+	+	+
TPL-5	esc. (S)*	-	-	-	-
Shugyoku	esc. (S)	-	-	-	-
Money maker	esc. (S)	-	-	+	-
Ponderosa	esc. (S)	-	-	-	-
Timely	esc. (S)	-	-	+	-
Junepink	esc. (S)	-	-	+	(+)
Venus	esc. (R)	-	-	-	-
Saturn	esc. (R)	-	-	-	+
Kewalo	esc. (R)	-	-	+	-
LS 1560	cer. ?	-	-	+	-
LS 1569	cer. ?	-	-	-	-
LS 1585	cer. ?	-	-	+	-
LS 2016	cer. ?	-	-	+	-
LS 496	cer. ?	-	-	+	-
LS 722	pimp. ?	-	-	+	+
LS 1510	pimp. ?	-	-	-	+
LS 1512	pimp. ?	-	-	-	(+)
LS 1514	pimp. ?	-	-	-	(+)
LS 322	pimp. ?	-	-	+	(+)
LS 124	pimp. (R)	-	-	+	+
LS 126	pimp. (R)	-	-	+	+
LS 2371	chees. ?	-	-	+	-
LS 2374	chees. ?	-	-	+	-

注. 1) esc.: *L. esculentum*,
cer.: *L. esculentum* var. *cerasiforme*,
pimp.: *L. pimpinellifolium*,
chees.: *L. cheesmanii*,
(R): 青枯病抵抗性, (S): 青枯病罹病性,
?: 抵抗性未検定, *, 交配親

2) +: マーカー有, -: マーカー無,
(): 不明瞭なバンド

(3) 有意性が認められたマーカー4個をすべて持つ個体をF₂集団から選抜すると32個体あり、もとの集団中の強度抵抗性(RI=12~13)9個体のうち7個体が含まれた。抵抗性指数の平均値も9.19に高まり、これらのマーカーが予備選抜に有効であることが示唆された(表3)。

(4) マーカーRA12-84₁₅₀₀は複数の抵抗性品種・系統で検出され、*L. pimpinellifolium* 由来と推定された。一方RA12-41₄₅₀は抵抗性・罹病性にかかわらず複数のトマト品種・近縁種で検出され、その由来は判然としなかった。最も影響の大きい遺伝子との連鎖が推定されるマーカー、RA12-13₄₅₀とRA12-29₁₆₀₀は、'Hawaii 7998' 以外のどの品種・系統にも見られず、*L. pimpinellifolium* のごく一部の系統に存在していたものが'Hawaii 7998' のみに取り込まれたのではないかと推察された(表4)。

(5) 本病のDNAマーカーは複数のグループで研究され、数個の抵抗性遺伝子座の存在が示唆されており^{1), 2)}, 第6染色体上のマーカーが最も効果の大きい遺伝子に連鎖すると考えられている。RA12-13₄₅₀とRA12-29₁₆₀₀も第6染色体上にあるのかどうかは興味深い。Thoquetら²⁾が解析した'Hawaii 7996'に両マーカーが存在しなかったことから、別の染色体に座乗している可能性もある。多数のマーカーによる連鎖地図の作成や、他の研究で用いられたマーカーとの関連づけなどにより、明らかにする必要がある。

4 ま と め

青枯病抵抗性系統'Hawaii 7998'がもつ抵抗性遺伝子のRAPDマーカーを検索し、4個のマーカーを見出した。F₂集団でこれらをすべて持つ個体を模擬的に選抜すると、集団の大きさを約1/3に縮小でき、しかも強度抵抗性個体の約78%が含まれていた。マーカーRA12-13₄₅₀とRA12-29₁₆₀₀は連鎖しており(組換え価およそ0.1)、最も影響の大きい抵抗性遺伝子との連鎖が推定された。

引 用 文 献

- 1) Danesh, D.; Aarons, S.; McGill, G. E.; Young, N. D. 1994. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 464-471.
- 2) Thoquet, P.; Olivier, J.; Sperisen, C.; Rogowsky, P.; Prior, P.; Anais, G.; Mangin, B.; Bazin, B.; Nazer, R.; Grimsley, N. 1996. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 837-842.