

# トマトのTMV抵抗性遺伝子(Tm-2a)と連鎖するRAPDマーカーのSTS化

誌名	愛知県農業総合試験場研究報告 = Research bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center
ISSN	03887995
著者名	石田,朗 福田,至朗 水上,優子 大矢,俊夫 神戸,三智雄
発行元	愛知県農業総合試験場
巻/号	37号
掲載ページ	p. 99-103
発行年月	2005年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## トマトの TMV 抵抗性遺伝子 ( $Tm-2^a$ ) と連鎖する RAPD マーカーの STS 化

石田 朗\*・福田至朗\*\*・水上優子\*\*・大矢俊夫\*\*・神戸三智雄\*\*

**摘要：**トマトの TMV 抵抗性遺伝子 ( $Tm-2^a$ ) と連鎖する RAPD マーカーの Sequence Tagged Site (STS) 化を試みた。その結果、1 組のプライマーセット(TM2A9: 5' -GAGGTGTTTCATCTTGACGGG-3'、TM2A6: 5' -TTACTGTCCAGCAGAAAAGC-3') を用いた PCR 反応により、 $Tm-2^a$  抵抗性ホモ接合品種において 1200bp の断片、TMV 感受性品種において 1400bp の断片が 1 本ずつ増幅された。また、 $Tm-2^a$  抵抗性ヘテロ接合品種においては、1200bp および 1400bp の断片がそれぞれ 1 本ずつ増幅された。

**キーワード：**トマト、タバコモザイクウイルス (TMV)、 $Tm-2^a$ 、RAPD、STS マーカー

## Conversion of an RAPD Marker for the Tobacco Mosaic Virus Resistance, $Tm-2^a$ , in Tomato to an STS Marker

ISHIDA Akira, FUKUTA Shiro, MIZUKAMI Yuko, OHOYA Toshio and KANBE Michio

**Abstract:** A n RAPD Marker linked to the Tobacco Mosaic Virus resistance,  $Tm-2^a$ , in tomato was tried to converse into an Sequence Tagged Site (STS) Marker. A set of primers(TM2A9: 5'-GAGGTGTTTCATCTTGACGGG-3', TM2A6: 5'-TTACTGTCCAGCAGAAAAGC-3') amplified a 1200bp fragment specific in  $Tm-2^a$  resistant homozygote lines and a 1400bp fragment specific in sensitive lines. It also amplified both of 1200bp and 1400bp fragments in resistant heterozygote lines.

**Key words:** Tomato, *Tobacco mosaic virus* (TMV),  $Tm-2^a$ , RAPD, STS marker

## 緒言

近年、野菜の育種では遺伝子解析による抵抗性遺伝子の検出法が確立されてきている<sup>1)</sup>。遺伝子解析を利用すると、発芽直後の子葉でも十分解析が可能になるため、時期を選ばない、選抜が確実にできる等の利点がある。また、一度 DNA の抽出が行われれば、その他の形質についても同様の方法で同時に判定が可能であり、調査した株をそのまま交配に用いることもできる。

トマトの TMV 抵抗性品種では、 $Tm-1$ 、 $Tm-2$ 、 $Tm-2^a$  の 3 個の抵抗性遺伝子が確認されている<sup>2)</sup>。これに対して病原ウイルスは 4 ないし 5 種類のストレインが知られているものの、これらはすべて  $Tm-2^a$  の抵抗性遺伝子を持った品種には感染しない<sup>2)</sup>。そのため、現在育成されている多くの品種は  $Tm-2^a$  の抵抗性遺伝子を保有している。 $Tm-2^a$  の抵抗性遺伝子の有無を判別する RAPD マーカーもいくつか報告されている<sup>3-5)</sup>。しかし、RAPD マーカーは、複数のバンドが認められるため、再現性やバンドの見間違えなどの点で信頼性が他のマーカーに比べて低い<sup>6)</sup>。また、優性マーカーであるため、検定当代で検定個体の遺伝子接合型がホモ接合かヘテロ接合かの判別はできていない。

そこで、本研究では DNA マーカーを用いた育種効率の向上を目指して、これまでに報告された RAPD マーカーの Sequence Tagged Site (STS) 化を行うことにより、 $Tm-2^a$  抵抗性に特異的なシングルバンドを示し、かつホモ接合個体とヘテロ接合個体を判別できるマーカーの作出を目的とした。

## 材料及び方法

### 1 供試材料

プライマーの選抜を行うために、 $Tm-2^a$  抵抗性遺伝子を持つ「スーパーファースト」および  $Tm-2^a$  抵抗性遺伝子を持たない「大型福寿」の 2 品種を用いた。また、作出したマーカーの汎用性を検討するために、上記 2 品種に加え、当時園芸研究部育成の 9 系統および市販 6 品種 ( $Tm-2^a$  抵抗性品種；「ハウス桃太郎」、「ファーストパワー」、「Pask-1」、「M-33」、「ルネッサンス」、感受性品種；

「ファースト」を用いた。園芸研究部育成系統のうち、8 系統 (11-7-1-2、11-7-5-2、11-7-5-4、11-7-5-5、11-7-5-6、168-4-6-9、43-8-3-7、43-8-3-9) は TMV (千葉株) を用いた生物検定で抵抗性があるとされ、1 系統 (43-8-3-9) は抵抗性がないとされた。

### 2 DNA の抽出と RAPD プライマーの選抜

トマトの新鮮な葉 100mg から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。Ohmori ら<sup>4)</sup> の報告により TMV 抵抗性 ( $Tm-2^a$ ) と感受性を判別できるとされる 10 塩基プライマーのうち 7 種類 (オペロン社、表 1) を用いて PC-320 (Astec) で PCR 反応を行った。反応液の組成は、DNA 抽出液を  $1 \mu\text{l}$ 、 $20 \mu\text{M}$  プライマーを  $1.2 \mu\text{l}$ 、 $2\text{mM}$  dNTP Mix (Roche)  $2.5 \mu\text{l}$ 、 $10\times$  反応バッファー (Roche)  $2.5 \mu\text{l}$ 、Ampli Taq Gold ポリメラーゼ (Roche) 1.5unit を混合し、 $25 \mu\text{l}$  とした。反応サイクルは、熱変性を  $94^\circ\text{C}$  で 1 分、アニーリングを  $37^\circ\text{C}$  で 1 分、伸長を  $72^\circ\text{C}$  で 2 分とし、45 サイクル行った。反応終了後、 $5 \mu\text{l}$  の PCR 産物について、1.2% ゲルで電気泳動を行った。

### 3 多型断片の解析とマーカーの改良

良好な多型が確認されたプライマーの PCR 産物から多型を示した断片について、pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いて TA クローニング<sup>7)</sup> を行った。プライマー除去 (MILLIPRE Montage PCR Cleanup kit) 後、DCTS Quick Start Kit (Beckman) によりシーケンシング反応を行った。その反応液について、Autoseq G-50 (Amersham) で DNA 精製後、CEQ8000 (Beckman) により塩基配列を解読した。これをもとにそれぞれ新たな 20 塩基プライマーを設計し、PC-320 (Astec) で PCR 反応を行った。反応液の組成は、DNA 抽出液を  $1 \mu\text{l}$ 、 $20 \mu\text{M}$  プライマーをセンス側、アンチセンス側ともに  $0.5 \mu\text{l}$ 、 $2\text{mM}$  dNTP Mix (Roche)  $2.5 \mu\text{l}$ 、 $10\times$  反応バッファー (Roche)  $2.5 \mu\text{l}$ 、Ampli Taq Gold ポリメラーゼ (Roche) 1.25unit を混合し、 $25 \mu\text{l}$  とした。反応サイクルは、熱変性を  $94^\circ\text{C}$  で 1 分、アニーリングを  $57^\circ\text{C}$  で 1 分、伸長を  $72^\circ\text{C}$  で 2 分とし、40 サイクル行った。反応終了後、 $5 \mu\text{l}$  の PCR 産物について、1.2% ゲルで電気泳動を行った。

## 試験結果

$Tm-2^a$  抵抗性遺伝子を持つ「スーパーファースト」および  $Tm-2^a$  抵抗性遺伝子を持たない「大型福寿」における 10 塩基プライマーを用いた PCR 反応では、OPH11 を用いた場合、 $Tm-2^a$  抵抗性品種「スーパーファースト」のみで約 1500bp に特異的かつ明瞭な DNA 断片が検出された。

表 1 選抜に用いた RAPD マーカー

プライマー名	塩基配列	多型が認められる断片長 (bp)
OPE16	GGTGACTGTG	900
OPF02	GAGGATCCCT	2500
OPG09	CTGACGTCAC	700
OPH09	TGTAGCTGGG	1000
OPH11	CTTCCGCAGT	1500
OPM09	GTCTTGCGGA	800
OPN13	AGCGTCACTC	1000

## 1500bp断片 センス側

10	20	30	40	50
CTTCCGCAGT	TACACCTACT	TATTTTCGGT	<u>CCTAACAAAGT</u>	<u>GGTATCAGAG</u>
				(TM2A7)
60	70	80	90	100
<u>CCAAATTCAA</u>	TGATGGAGTC	AGGTTTAGTG	GTTTGATAAA	TCGATGATTG
110	120	130	140	150
AACCAGATTA	<u>GAAGGAGGTG</u>	<u>TTCATCTTGA</u>	<u>CGGGTGTAGT</u>	<u>TCTAGCCACA</u>
		(TM2A9)		(TM2A5)
160	170	180	190	200
<u>ACCTTTTTGA</u>	CAGTAATAAA	GATTTTGTTG	GAGAAATTGT	TTAAGAGAGG
210	220	230	240	250
TTCTCTGTGT	TGAGATATAA	ATTTTGCAA	TGAGATAATG	GAGAGGAAAA
260	270	280	290	300
GCAAGTTGTT	TTAGATTAAG	TAAAGAAGGT	GGACAAATTT	ATTTTGTCAG
310	320	330	340	350
AAATTCAGGC	CAAGGGGGAG	AGTTGTTGGA	TTTTATTTGC	CCTAAATTTT
360	370	380	390	400
TTACAATAAA	TAGTTTTCT	TTTAGGAAA	TGTTTTAAAT	TAACATAATCA

## 1500bp断片 アンチセンス側

10	20	30	40	50
CTTCCGCAGT	AGGTGAATAA	TCTTTTCCTC	CGTTGCAAAA	AAGTAGCTCA
60	70	80	90	100
GGATCTTTAA	<u>CAAAAAGTAG</u>	<u>CCAAGTCTGC</u>	<u>AGCAGAATTT</u>	CATAAAGACT
		(TM2A8)		
110	120	130	140	150
TGAGATACCA	TTCAATGATA	CTTCAAAGAT	AAAGGAAAAA	ATATACTCAA
160	170	180	190	200
ATGCTAGAGT	TCATAAGTTC	<u>ATTTACTGTC</u>	<u>CAGCAGAAAA</u>	<u>GCTGAGTTTT</u>
			(TM2A6)	
210	220	230	240	250
TCTGTCCTTT	TGTTAGTTCT	TCCAATCTTC	ATTAAGTCTG	TAGATT <u>AGGA</u>
260	270	280	290	300
<u>TGAATCTTGT</u>	<u>ACAACCGCAT</u>	TTATAAGTTT	GCTGCAAGCT	ATACCATACA
		(TM2A10)		
310	320	330	340	350
ATATTTTGAT	GATTCAACAA	AAATTATATT	ATTCTGTCTG	TTATAATGCA
360	370	380	390	400
AAATAACCAT	CATCTTTGTG	TTTTTGTGCT	TGCAGCATCT	AAAAGTGGAC

図1 OPH11を用いたPCRで抵抗性品種から得られた約1500bp断片の両末端の塩基配列

※太字下線：新たにプライマーを設計した部位、括弧内：プライマー名

表2 STSプライマー

プライマー名	塩基配列
TM2A5	GTGTAGTCTAGCCACAACC
TM2A7	CCTAACCAAGTGGTATCAGAGCC
TM2A9	GAGGTGTTTCATCTTGACGGG
TM2A6	TTACTGTCCAGCAGAAAAGC
TM2A8	AAAGTAGCCAAGTCTGCAGC
TM2A10	AGGATGAATCTGTACAACCGC

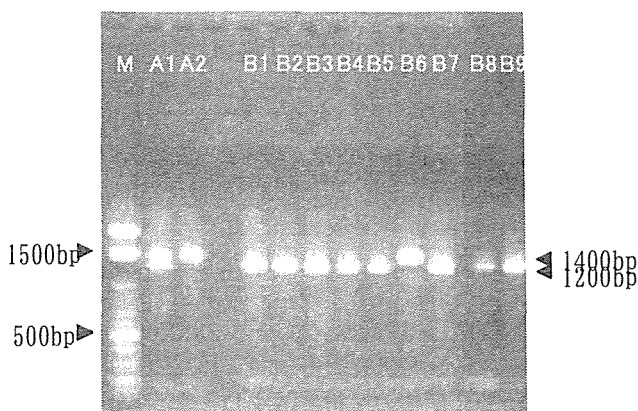


図2 STSプライマー (TM2A9, TM2A6) による PCR泳動像 (1)

M : 100bp Ladder

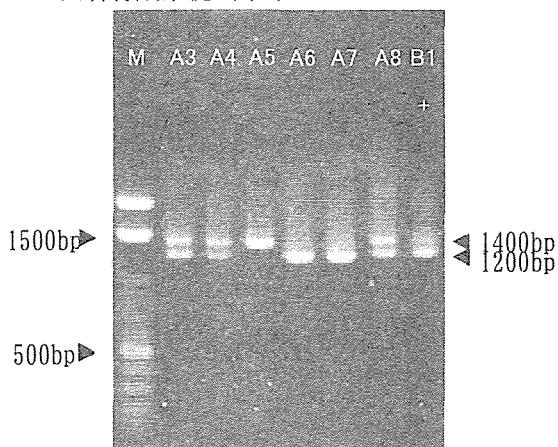
A1 : スーパーファースト ( $Tm-2^a/+$ )、A2 : 大型福寿 (+/+)B1-B5、B7-B9 : 園研育成系統 ( $Tm-2^a$ 抵抗性)、B6 : 園研育成系統 (+/+)

図3 STSプライマー (TM2A9, TM2A6) による PCR泳動像 (2)

M : 100bp Ladder

A3 : ハウス桃太郎 ( $Tm-2^a$ 抵抗性)、A4 : ファーストパワー ( $Tm-2^a/+$ )、A5 : ファースト (+/+)、A6 : Pask-1 ( $Tm-2^a$ 抵抗性)、A7 : M-33 ( $Tm-2^a$ 抵抗性)、A8 : ルネッサンス ( $Tm-2^a$ 抵抗性)

その他のプライマーを用いた PCR 反応では、目的とする多型の検出が不安定であったが、OPH11 による PCR 反応では安定していた。しかし、電気泳動像には Ohmori ら<sup>4)</sup>と同様に目的のバンド以外にも数本のバンドが見られた。

そこで、この 1500bp 断片の両末端約 400bp の塩基配列をシーケンスし (図 1)、センス側、アンチセンス側でそれぞれ 3 個のプライマーを作成した (図 1、表 2)。これらを各々組み合わせた 9 組のプライマーセットにより上記 2 品種で PCR 反応を行ったところ、8 組のプライマーセットでは、複数のバンドがでる、安定したバンドが得られないなど良好な結果が得られなかった。一方、1 組のプライマーセット (TM2A9 : GAGGTGTTTCATCTTGACGGG, TM2A6 : TTACTGTCCAGCAGAAAAGC) では、「スーパーファースト」で約 1200bp、「スーパーファースト」「大型福寿」で約 1400bp の明瞭なバンドが検出された (図 2)。

これら 1400bp および 1200bp のバンド 2 本の検出パターンにどの程度汎用性があるかを検証するために、TM2A9 および TM2A6 のプライマーセットを用いて園芸研究部育成の 9 系統および市販 6 品種で多型を調査した (図 2、図 3)。育成系統では、感受性系統で約 1400bp、抵抗性系統で 1200bp とそれぞれ 1 本のバンドのみが確認された。市販の 6 品種では、 $Tm-2^a$  抵抗性の 5 品種すべてで約 1200bp の断片が確認された。また、そのうち「ハウス桃太郎」、「ファーストパワー」、「ルネッサンス」の 3 品種および園芸研究部育成抵抗性 1 系統と感受性 1 系統の DNA 抽出液を混合したサンプルでは、同時に約 1400bp のバンドも確認された。感受性の「ファースト」では約 1400bp のバンドのみ確認された。

## 考 察

STS 特異的プライマーセット (TM2A9, TM2A6) は、OPH11 で増幅された抵抗性遺伝子に連鎖する 1500bp の断片の両端からそれぞれ 100bp および 200bp 内側に設定された (図 1)。したがって、抵抗性品種/系統において、このプライマーセットを用いて増幅された 1200bp の断片は、ほぼ想定されたサイズであった。一方、1400bp の断片は、感受性品種/系統でその 1 本のみが検出されたばかりでなく、 $Tm-2^a$  抵抗性品種/系統の中にも 1200bp の断片とともに検出されるものがあった。これらの抵抗性品種/系統のうち詳細な遺伝子型が判明している「スーパーファースト」「ファーストパワー」は、ともに  $Tm-2^a/+$  のヘテロ接合体であった。さらには園芸研究部育成抵抗性 1 系統と感受性 1 系統の混合 DNA においても 1400bp および 1200bp の 2 本のバンドが確認された。以上のことから、1400bp の断片は、 $Tm-2^a$  を持たない染色体に特有な塩基配列が増幅され、感受性のホモ接合では 1 本のみ、抵抗性のヘテロ接合では 1200bp と同時に検出できたと考えられる。

抵抗性の園芸研究部育成系統は、TMV (千葉株) にお

いて抵抗性が確認されていることから、*Tm-2* 抵抗性遺伝子を保有していると推察される。また、適宜 TMV 抵抗性を確認しながら自家受粉による継代が進められてきているため(大藪 私信)、優性遺伝子である *Tm-2* 抵抗性遺伝子がホモ接合になる確率が高くなっており、今回調査した 8 系統すべてでバンドが 1 本だけ確認されたものと考えられる。この結果から、本マーカーが当場の育種素材の TMV 抵抗性遺伝子型確認に有用であることが示唆された。

本研究では、これまでに報告されている RAPD マーカーを STS 化し、シングルバンドによりトマトの TMV 抵抗性の中で最も安定している *Tm-2* 抵抗性と感受性のホモ接合体およびヘテロ接合体を判別できるマーカーを作出することができた。不要バンドが消失し検出バンドが 1 本になったことにより、RAPD 法の問題点である再現性と識別誤認の問題が改善され、判別の安定性が向上した。また、このマーカーは共優性であるために、育種素材の TMV 抵抗性遺伝子保有の確認だけでなく、生物検定ではできない TMV 抵抗性遺伝子ホモ接合体の選別が可能になると考えられる。さらに、今後、萎凋病やネコブセンチュウなどの抵抗性遺伝子を検出できる DNA マーカーを作出することにより、育種素材に必要な複数の形質を 1 回の DNA 抽出で判定することが可能となり、育種効率の向上に役立つことが期待される。

## 引用文献

1. 大澤良. 野菜育種における DNA マーカーの利用. 園芸学研究. 3 (1), 1-6 (2004)
2. 山川邦夫. 新版野菜の病害虫 - 診断と防除 -. 全国農村教育協会. 東京. p. 607-627 (1982)
3. Dax, E., Livneh, O., Edelbaum, N., Kedar, N., Gavish, J., Milo, I., Sela, I., Rabinowitch, H. D. A random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker for the *Tm-2* gene in tomato. Euphytica. 74, 159-163 (1994).
4. Ohmori, T., Murata, M., Motoyoshi, F. Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in Tomato. Theoretical Applied Genetics. 90, 307-311 (1995)
5. 藤晋一, 辻孝子, 岩田久史. トマト TMV 抵抗性品種・系統のもつ特異的 DNA の解析. 愛知県農業総合試験場研究報告. 28, 101-104 (1996)
6. 遠山孝通, 藤晋一, 坂紀邦, 辻孝子, 井澤敏彦, 中前均. 水稲トビイロウンカ抵抗性遺伝子の DNA マーカーによる解析 (第 2 報) - 関東 PL5 に由来する抵抗性系統から得られたクローンの STS 化 -. 愛知県農業総合試験場研究報告. 30, 19-25 (1998)
7. 安田純. PCR 産物の解析. TA クローニング. 蛋白質核酸酵素. 542, 518-521 (1996)