

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マーカーの開発

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	福田,至朗 黒柳,悟 大藪,哲也 大矢,俊夫
発行元	愛知県農業総合試験場
巻/号	40号
掲載ページ	p. 41-46
発行年月	2009年2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マーカーの開発

福田至朗*・黒柳 悟*・大藪哲也**・大矢俊夫***

摘要：トマト萎凋病は萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* によって引き起こされる重要な病害である。現在、萎凋病を防除するための最も有効な方法は、抵抗性品種の利用であると考えられている。優性の単一遺伝子 *I-2* は萎凋病菌のレース2に対する抵抗性遺伝子であり、トマトの第11番染色体上に座している。本研究では、*I-2* の塩基配列とその3' 非翻訳領域を元にプライマーを設計し、*I-2* 遺伝子の有無を検出できる優性のDNAマーカーを開発した。このDNAマーカーにより、萎凋病に抵抗性を持ったトマト品種育成を効率的に行うことができる。

キーワード：トマト萎凋病、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*、*I-2*、DNAマーカー

Development of DNA Marker Linked to *I-2* Gene for Resistance to *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Race 2

FUKUTA Shiro, KUROYANAGI Satoru, OYABU Tetsuya and OYA Toshio

Abstract: *Fusarium* vascular wilt incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is one of the most important diseases in tomatoes worldwide. Development of resistant varieties of tomato would be regarded as an effective approach of the disease management. A single dominant gene (*I-2*) on chromosome 11 confers fusarium vascular wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2. We designed the primers based on the *I-2* gene and the 3' non-translated region, and developed a molecular marker that can differentiate *I-2* genotypes from the genotypes without the *I-2* gene.

Key Words: *Fusarium* vascular wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *I-2*,
Molecular marker

緒言

トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*) の感染によって引き起こされる萎凋病はトマト栽培において最も重要な土壌伝染性病害の一つである¹⁾。トマトに感染した萎凋病菌は、導管部に侵入し導管組織を壊死させる。罹病トマトは、根から吸い上げた養水分を地上部に送ることができないため、萎れ症状を呈し、やがて枯死する。現在、トマト萎凋病は世界中のトマト産地で発生しており、防除対策が求められている。しかし、トマト萎凋病菌は土壌中において耐久性を持った厚膜胞子を形成しており、数年間は感染能力を維持しているうえ、農薬散布などでも死滅しないことから、防除困難とされている。防除対策として最も効果があり、広く普及しているのが抵抗性品種の利用である。トマト萎凋病菌は、現在までに3つのレース(レース1、2、3)の発生が確認されており、それぞれのレースに対する抵抗性遺伝子 *I-1*、*I-2*、*I-3* が知られている。これらのうち、*I-1* と *I-2* はトマトの野生品種 *Solanum pimpinellifolium* 由来の抵抗性遺伝子であり、12本あるトマトの染色体のうち、第11番染色体の短腕 (*I-1*) と長腕 (*I-2*) に座乗している²⁻⁶⁾。トマトについては、1980年代にはRFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析による連鎖地図が作成されており、その後、簡易に多型を得ることが可能なSSRマーカーが開発されるなど、現在までに極めて詳細な遺伝子地図が公開されている。

また、1998年にはSimonsら⁷⁾によって *I-2* 遺伝子の塩基配列が決定されている。*I-2* 遺伝子は抵抗性遺伝子に特有の nucleotide binding site、leucin zipper、leucin-rich repeatなどを有し、抵抗性遺伝子としての機能を有する一つの転写読取枠と6つのホモログからなるクラスターで構成されていることが明らかとなった。

本研究においては、すでに塩基配列が明らかとなっている *I-2* について、その塩基配列を利用することにより、トマト育種を効率的に行うためのDNAマーカーを作出することを目的とした。

材料及び方法

1 トマト品種とDNA抽出

トマト (*Solanum lycopersicum*) は萎凋病レース2に抵抗性を有する「walter」、「マイロック」、「桃太郎エイト」、「桃太郎ヨーク」の4品種、及び罹病性の「ルネッサンス」、「強力米寿」、「大型福寿」、「興津3号」の4品種を用いた。これらのトマトは温室内で栽培した。DNA抽出には、展開直後の新葉を採集し、抽出に用いる

まで-80℃で保存した。

トマト葉からのDNA抽出はDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて行った。また、簡易なDNA抽出法として、村元ら⁸⁾の報告したガラス繊維濾紙法を用いた。この方法は、亜硫酸ナトリウム溶液 (20 mM Tris-HCl pH8.0、2mM EDTA-Na₂、10% Na₂SO₃) に浸漬した後に乾燥させた5 mm角程度のガラス繊維濾紙 (Filter Paper GA-55; ADVANTEC) にほぼ同じ大きさのトマト葉をペッスルを用いて擦りつけた。濾紙をマイクロチューブに移し、200 μLの固定液 (100 mM Tris-HCl pH 8.0、5mM EDTA-Na₂、7 M グアニジン塩酸) を添加し5分静置した。15,000×gで1分間遠心し、上清を取り除いた後、200 μLの洗浄液 (50 mM Tris-HCl pH8.0、5 mM EDTA-Na₂、200 mM NaCl、60% Et-OH) で2回、200 μLの70% Et-OHで1回遠心洗浄した。濾紙を遠心真空乾燥させた後、チューブに100 μLのTEを添加し、上清1 μLをPCRに用いた。

2 Tail-PCR

萎凋病抵抗性遺伝子 *I-2* はGenbank Accession No. AF118127を参照した。この配列を元にTail PCR用のプライマー (Tail-1st、Tail-2nd、Tail-3rd) を設計した (表1)。これらのプライマーの遺伝子上の位置を図1に示した。Tail-PCRは劉らの方法を用いて行った⁹⁾。

3 PCR産物のクローニング及びシーケンス

PCR反応によって増幅されたDNA断片をpGEM-T Easy Vector (Promega) を用いてTAクローニングした。クローニングした断片の塩基配列はCeq8000システム (Beckman Courtar) を用いてシーケンスした。

4 PCR反応

PCR反応には、20 mM Tris-HCl pH7.5、8 mM MgCl₂、7.5 mM DTT、0.2 mM dNTP、0.4 μM プライマー、0.5 units KOD Dash (Toyobo)、11 μLのDNAを含む全量20 μLの反応液を用いた。PCR反応は、94℃ 30秒、55℃ 20秒、74℃ 30秒を30サイクル繰り返すことにより行った。

結果及び考察

1 *I-2* の3' 非翻訳領域の塩基配列

3種の任意 primer-1、2、3と *I-2* の塩基配列 (Tail-1st、2nd、3rd) を元にTail-PCRを行った。鋳型として、抵抗性の「マイロック」及び罹病性の「強力米寿」を用いた。その結果、どちらの品種においても任意primer-3において約150bpの明瞭なバンドが認められた。増幅されたDNA断片をシーケンスした結果を図1に示した。抵抗性と罹病性遺伝子の間には1塩基の置換が頻繁に認められた。「強力米寿」でもDNAが増幅されたこと

から、罹病性品種にも I-2 と極めて似た配列がある。

しかし、塩基置換または欠損によって抵抗性遺伝子としての機能を失っているものと考えられた。

2 STSマーカーの作出

抵抗性と罹病性の遺伝子の差を明瞭にするため、得

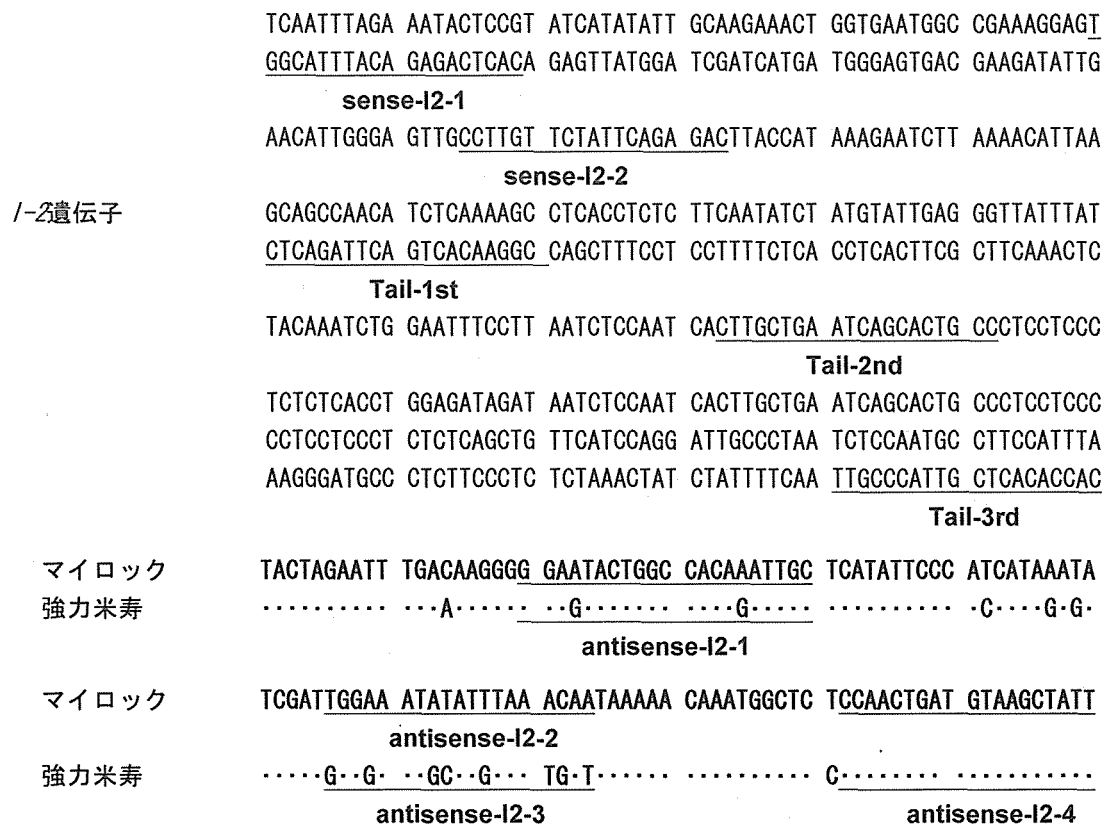


図1 トマトI-2遺伝子(Genbank Accession No. AF118127)と、「マイロック」及び「強力米寿」に対し行ったTail-PCRの結果得られた3' 非翻訳領域の配列
 太字は本研究で行ったTail-PCR産物の塩基配列。網掛けは3' 非翻訳領域。中点は「マイロック」と「強力米寿」の間に差異の無かった配列。矢印付の下線は本研究で設計したプライマー配列。

表1 本研究に用いたプライマーの塩基配列

Primer name	Sequence	アニーリング温度	文献
Tail-1st	5' -CTCAGATTCAGTCACAAGGC-3'		本研究
Tail-2nd	5' -CTTGCTGAATCAGCACTGCC-3'		本研究
Tail-3rd	5' -TTGCCCATTTGCTCACACCAC-3'		本研究
任意primer-1	5' -NGTCGA (G/C) (A/T) GANA (A/T) GAA-3'		9
任意primer-2	5' -GTNCGA (G/C) (A/T) CANA (A/T) GTT-3'		9
任意primer-3	5' -(A/T) GTGNAG (A/T) ANCANAGA-3'		9
sense-I2-1	5' -TGGCATTACAGAGACTCA-3'	55℃	本研究
sense-I2-2	5' -CCTTGTTCTATTTCAGAGAC-3'	55℃	本研究
antisense-I2-1	5' -GCAAT (T/C) TGTGTCCAGTA (T/C) TC-3'	55℃	本研究
antisense-I2-2	5' -TTGTTTTAAATATATTTCCA-3'	50℃	本研究
antisense-I2-3	5' -ATCTTTACATGCTATCCCC-3'	55℃	本研究
antisense-I2-4	5' -GAATAGCTTACATCAGTTGG-3'	55℃	本研究
TFusF1	5' -CTGAAACTCTCCGTATTTTC-3'	55℃	15
TFusrr2	5' -CCTGGATGAACAGCTGAG-3'	55℃	15

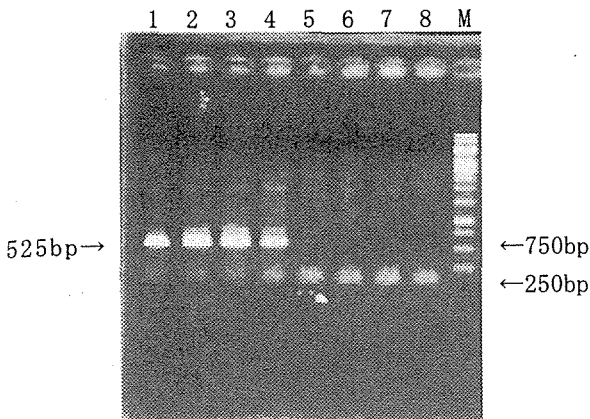


図2 *I-2*に連鎖したDNAマーカーを用いたトマト品種の解析

1: walter (R)、2: マイロック (R)、3: 桃太郎エイト (R)、4: 桃太郎ヨーク (R)、5: ルネッサンス (S)、6: 強力米寿 (S)、7: 大型福寿 (S)、8: 興津3号 (S). M: 1kbラダー. R: 抵抗性品種、S: 罹病性品種。抵抗性品種では525bpに増幅断片が検出される(左矢印)。

られた配列を元に、antisense-I2-1、antisense-I2-4の2種のプライマーを設計した。また、抵抗性遺伝子に特異的な配列からantisense-I2-2、罹病性遺伝子に特異的な配列からantisense-I2-3を設計した(図1、表1)。さらに、既報の抵抗性遺伝子からsense-I2-1、sense-I2-2の2種のプライマーを設計した(図1、表1)。これらのセンス及びアンチセンスプライマーの組み合わせを用い、供試トマト8品種の精製DNAを鋳型にしてPCRを行った。その結果、ほとんどの組み合わせでは、単一のバンドが得られず、抵抗性品種と罹病性品種を明確に識別することができなかった。しかし、sense-I2-2及びantisense-I2-4の組み合わせにおいて、抵抗性品種では525bpの増幅断片が認められたが、*I-2*を持たない罹病性の品種では増幅断片は認められなかった(図2)。PCRに用いたプライマーのうち、antisense-I2-4は抵抗性品種と罹病性品種の共通配列から設計したものである。そのため、DNA増幅の有無はsense-I2-2プライマー部位の配列の相違によるものと考えられた。

3 *I-2* マーカーの利用性の検討

本研究で開発した*I-2* マーカーを実際の育種で活用するためには、簡易に抽出されたDNAで利用できることが求められる。そのため、村元ら⁸⁾の報告した「ガラス繊維濾紙法」で抽出したDNAを鋳型にしてPCRを行った。その結果、DNeasy Plant Mini Kitで精製したDNAと同様、抵抗性トマトについては525bpの断片が検出されたが、罹病性品種ではこのようなバンドは検出できなかった。

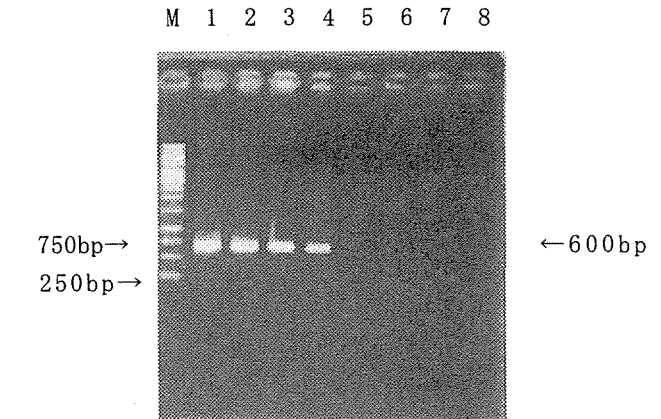


図3 El Mohtarらの報告した*I-2*に連鎖したDNAマーカーを用いたトマト品種の解析

1: walter (R)、2: マイロック (R)、3: 桃太郎エイト (R)、4: 桃太郎ヨーク (R)、5: ルネッサンス (S)、6: 強力米寿 (S)、7: 大型福寿 (S)、8: 興津3号 (S). M: 1kbラダー. R: 抵抗性品種、S: 罹病性品種。

植物におけるDNAマーカーの開発は植物の遺伝研究に革命的な進展をもたらした¹⁰⁾。DNAマーカーの検出技術についても、煩雑な作業を要するRFLP解析に代わってPCR法が急速に普及し、より簡易にしかも微細な違いを検出できる技術が確立されている¹¹⁻¹³⁾。近年では、シロイヌナズナやイネの全ゲノム塩基配列が解読され、遺伝子解析のツールとしてDNAマーカーの役割はさらに大きくなってきている。トマトやトウモロコシなどでもゲノム塩基配列の解読プロジェクトが始まっており、主要な農作物の塩基配列情報は今後さらに充実していくものと考えられる。これらの情報を利用したDNAマーカーは、農作物の交雑育種を行ううえで極めて有効な手段として活用されている。

現在、トマトについても病害抵抗性に連鎖したマーカー^{11,14-16)}や果実品質や形状を決定するQTL解析¹⁷⁾が急速に進められている。

本研究では、Simonsら⁷⁾によって報告された*I-2*の塩基配列を元に、萎凋病に抵抗性を持つ品種を選抜できる優性マーカーを開発することができた。このマーカーは、目的とする遺伝子そのものを利用しており、交配を進める過程で実際の形質とマーカーが分離することがない。同様の優性マーカーはEl Mohtarらによっても報告されている¹⁵⁾。本研究に用いた8品種のトマトに対し、El Mohtarらの報告したDNAマーカーを用いて解析を行ったところ、本研究で開発されたプライマーと同じ結果が得られ(図3)、これらのマーカーが共に抵抗性トマトを選抜できることが明らかとなった。

育種を行う過程でより効率的な選抜を行うためには、

抵抗性遺伝子と罹病性遺伝子をとともに検出できる共優性のマーカーが望ましい。石田らは、Ohmoriらの報告した *Tm-2* に連鎖した優性のRAPDマーカー¹⁸⁾をSTS化し、共優性のPCRマーカーを開発している¹⁹⁾。今後、*I-2* マーカーについても利用性向上のため共優性化を進める必要があると考えられる。

また、PCR法に比べ短時間で簡易にDNAを増幅する技術にLoop-mediated isothermal amplification (LAMP)法がある。本研究で開発したPCRマーカーについては、DNA抽出で1時間、PCR反応で2時間、電気泳動で30分、併せて3.5時間程度必要である。一方、LAMP法を用いたDNAマーカーでは、植物の磨砕液などを利用して1時間程度反応させることにより、容易に遺伝子型を識別できる。このようなLAMP法を用いたDNAマーカーの開発についても近年報告されている^{20,21)}。本研究で取り組んだ *I-2* マーカーもLAMPマーカー化することにより大幅な時間短縮が可能である。今後、これらの新しい技術を利用し、効率的な選抜技術を確立していくことが必要である。

引用文献

- Alon, H., Katan, J. and Kedar, N. Factors affecting penetrance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Phytopathology*. 64, 455-461(1974)
- Bourmival, B. L., Vallijos, C. E. and Scott, J. W. Genetic analysis of resistance to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* from the wild tomato *Lycopersicon pennellii*. *Theor. Appl. Genet.* 79, 641-645(1990)
- Segal, G., Sarfatti, M., Schaffer, M. A., Ori, N., Zamir, D. and Fluhr, R. Correlation of genetic and physical structure in the region surrounding the *I-2* *Fusarium oxysporum* locus in tomato. *Mol. Gen. Genet.* 231, 179-185(1992)
- Sarfatti, M., Abu-Abied, M., Katan, J. and Zamir, D. RFLP mapping of *Il*, a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1. *Theor. Appl. Genet.* 82, 22-26 (1991)
- Sarfatti, M., Katan, J., Fluhr, R. and Zamir, D. An RFLP marker in tomato to *Fusarium oxysporum* resistance gene *I-2*. *Theor. Appl. Genet.* 78, 755-759 (1989)
- Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D. and Fluhr, R. The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat super family of plant resistance genes. *Plant Cell.* 9, 521-532(1997)
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergarrde, P., Vander Lee, T., Bleeker, M., Onstek, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. and Vos, P. Dissection of the *Fusarium I-2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell.* 10, 1055-1068(1998)
- 村元靖典, 沢野定憲. ガラス繊維濾紙を利用した植物からの迅速・簡便・低コストなDNA抽出法. 関東東海北陸農業・生物工学 成果情報. (2005)
- 劉 耀光. Tail-PCRによる未知DNA配列の増幅とシーケンシング. 新版 植物のPCR実験プロトコール. 秀潤社. 東京. p. 83-89(1997)
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Grandillo, S., Martin, B. G., Messeguer, R., Miller, J. C., Miller, L., Paterson, A. H., Pineda, O., Röder, M. S., Wing, R. A., Wu, W. and N. Young, D. High density molecular linkage maps of the 132, 1141-1160(1992)
- Barone, A. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding? Session I: MAS in Plants. p. 29-35(2007)
- Tam, S. M., Mhiri, C., Vogelaar, A., Kerkveld, M., Pearce, S. R. and Grandbastien, M. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theor. Appl. Genet.* 110, 819-831(2005)
- Bredemeijer, G. M. M., Cooke, R. J., Ganai, M. W., Peeters, R., Isaac, P., Noordijk, Y., Rendell, S., Jackson, J., Röder, M. S., Wendehake, K., Dijk, M., Amelaine, M., Widkaert, V., Bertrand, L. and Vosman, B. Construction and testing of an microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105, 1019-1026 (2002)
- Doganlar, S., Dodson, J., Gobor, B. and Beck-Bunn, T. Molecular mapping of the *py-1* gene for resistance to corky root rot (*Pyrenochaeta lycopersici*) in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 97, 784-788(1998)
- El Mohtar, C. A., Atamian, H. S., Dagherand, R. B. and Abou-Jawdah, A. Marker-assisted selection of tomato genotypes with the *I-2* gene for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2.

- Plant Disease. 96(6), 758-762(2007)
16. Fazio, G., Stevens, M. R. and Scott, J. W. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Fr1*) in tomato. *Euphytica*. 105, 205-210(1999)
 17. Gorguet, B., Eggink, P. M., Ocaña, J., Tiwari, A., Schipper, D., Finkers R., Visser, R. G. F. and van Heusden, A. W. Mapping and characterization of novel parthenocarp QTLs in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 116, 755-767(2008)
 18. Ohmori, T., Murata, M. and Motoyoshi, F. Identification of RAPD markers linked to the Tm-2 locus in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 90, 307-311 (1995)
 19. 石田朗, 福田至朗, 水上優子, 大矢俊夫, 神戸三智雄. 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. *愛知農総試研報.* 37, 99-103 (2005)
 20. Fukuta, S., Mizukami, Y., Ishida, A. and Kanbe, M. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) -based SNP markers for shelf-life in melon (*Cucumis melo* L.). *J. Appl. Genet.* 47 (4), 303-308(2006)
 21. Mizukami, Y., Fukuta, S., Ishida, A., Kato, T., Ueda, J. and Kanbe, M. Convenient DNA marker based on loop-mediated isothermal amplification reaction (LAMP) for rice breeding. *Breeding Res.* 6, 225-228(2004)