

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ーの開発

福田至朗¹⁾・黒柳 悟¹⁾・田中哲司²⁾・浅見逸夫¹⁾

摘要：トマト品種を効率的に選抜するためには、DNAマーカーの利用が有効である。トマト葉かび病抵抗性遺伝子 (*Cf-9*) を選抜できる共優性のDNAマーカーの開発のため、*Cf-9*とそのホモログ遺伝子 (*Hcr9-9A*, *Hcr9-9B*, *Hcr9-9D*, *Hcr9-9E*) との塩基配列の比較から、*Cf-9*および*cf-9*を特異的に増幅することのできるプライマーセットを設計した。これを用いてPCR反応を行った後、制限酵素*HpyCH4V*で切断すると、抵抗性遺伝子 (*Cf-9*) では294 bpと194 bpの2つに切断されたDNA断片、罹病性遺伝子 (*cf-9*) では制限酵素では切断されず、488 bpのDNA断片が検出された。罹病性の「桃太郎8」と抵抗性の「フルティカ」の交雑F₂世代を用い、本マーカーと既報のDNAマーカーによる遺伝子型を比較した結果、すべての個体で一致した。

キーワード：トマト、葉かび病、*Cf-9*、DNAマーカー、共優性マーカー

Development of a Co-dominant DNA Marker for Detecting the *Cf-9* Gene for Resistance to Leaf Mold of Tomato

FUKUTA Shiro, KUROYANAGI Satoru, TANAKA Tetsushi and ASAMI Itsuo

Abstract: DNA marker selection is a useful method for breeding tomato cultivars. We developed a co-dominant DNA marker for detecting the tomato gene *Cf-9* that confers resistance to most races of the leaf mold fungus *Passalora fulva*. One set of primers was designed to amplify a specific region that included only the *Cf-9* gene but not its homologs (*Hcr9-9A*, *Hcr9-9B*, *Hcr9-9D*, and *Hcr9-9E*). The polymerase chain reaction products were digested using restriction enzyme *HpyCH4V* that was expected to cut the specific *Cf-9* sequence. Electrophoresis results revealed 2 bands (294 bp and 194 bp) in the resistance gene *Cf-9*, whereas only 1 band (488 bp) was detected in the susceptible gene *cf-9*. Comparison between this cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker and dominant DNA markers reported previously was performed using 39 F₂ individuals of the susceptible cultivar 'Momotaro 8 (*cf-9/cf-9*)' and the resistant cultivar 'Fruitika (*Cf-9/Cf-9*)'. The genotypes of the CAPS marker corresponded with those of the dominant markers. Our results suggest the usefulness of the co-dominant marker for marker-assisted selection for leaf mold resistance.

Key Words: Tomato, Leaf mold, *Cf-9*, DNA marker, Co-dominant marker

緒言

不完全菌に属す糸状菌 *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous [syn. *Mycovellosiella fulva* (Cooke) Arx, *Fulva fulva* (Cooke) Ciferri, *Cladosporium fulvum*] はトマトの重要病害である葉かび病を引き起こす。葉かび病は世界中のトマト栽培で大きな問題となっているが¹⁾、特に湿度が高くなる施設栽培トマトでの発生が顕著である²⁾。葉かび病の防除には農薬の使用と抵抗性品種の利用が中心であるが、化学薬剤の使用を削減する傾向にあることから、抵抗性品種への依存度が高くなっている¹⁾。現在用いられているトマト品種には野生種が持っている葉かび病抵抗性遺伝子が導入されている²⁻⁴⁾。抵抗性遺伝子 *Cf-2*⁵⁾ と *Cf-9*⁶⁾ は *Solanum pimpinellifolium* に、*Cf-4*⁷⁾ は *S. hirsutum* に、*Cf-5*⁸⁾ は *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* にそれぞれ由来している。葉かび病に対し、上記のように複数の抵抗性遺伝子が見つかるが、葉かび病菌のレースによってはこれらの抵抗性を打破するものも見つかってきている^{2, 9)}。

これらの葉かび病抵抗性遺伝子の中で、*Cf-9* 遺伝子はほとんどのレースに抵抗性を有し、現在のトマト品種に広く利用されている。*Cf-9* を保有する新品種育成のためには、DNAマーカーの利用が有効であるが、これまでに報告された Thomas ら¹⁰⁾ の AFLPマーカー、Truong ら¹⁾ の DNAマーカーは優性マーカーであり、抵抗性遺伝子を保有する個体の識別は可能であるが、ヘテロ型の識別を行うことができない。黒柳ら¹¹⁾ は抵抗性遺伝子および罹病性遺伝子それぞれに対する優性マーカーと共に PCR増幅後に制限酵素 *AfuI* で切断する共優性の CAPSマーカーを報告している。この DNAマーカーは *Cf-9* の遺伝子型を直接認識することのできる有用なマーカー

であるが、多型判定にポリアクリルアミドゲル電気泳動を行わなければならない、バンド検出のための労力や時間が必要となる。

そこで本研究では、実際の育種での利用場面を考慮し、多数の検体を短時間に解析するために、より簡易に遺伝子型を判定することのできる共優性マーカーの開発を行った。

材料及び方法

1 供試トマト

葉かび病抵抗性トマトとして、*Cf-9* をホモで保有していると報告されている「フルティカ」¹¹⁾、ヘテロで保有している「桃太郎コルト」および「桃太郎なつみ」¹¹⁾、*Cf-4* を保有するが *Cf-9* は持たない抵抗性品種「桃太郎ファイト」、「桃太郎ヨーク」、罹病性品種として「桃太郎8」および「強力米寿」を用いた。

また、本研究で開発した DNAマーカーと既報の DNAマーカーによる判定結果の比較のため、罹病性品種「桃太郎8」と抵抗性品種「フルティカ」を交雑して得られた F₂ 世代 39 個体を用いた。

2 DNA抽出

展開直後のトマト葉 200 mg を用い、CTAB法¹²⁾ により DNA を抽出した。抽出した DNA は使用するまで -30°C で保存した。

3 既報の DNAマーカーによる遺伝子型の確認

黒柳ら¹¹⁾ が報告した葉かび病抵抗性遺伝子 (*Cf-9*) を検出するマーカー (CF9-8) および罹病性遺伝子を検出する CAPSマーカー (CF9-6) を用いて *Cf-9* 座の遺伝子型を確認した。PCR反応、制限酵素反応、アガロースゲル電気泳動の条件は、黒柳ら¹¹⁾ の報告に従った。

<i>Cf-9</i>	20064*	CTATACACAA ACTAAGAAAA ATTTAAATTA TATAGTCTTT GGATGGTGAC CTATTTGGAT
<i>Hcr9-9A</i>	3842C. A..... C..... .C..AT. A-- -.GA. .A..
<i>Hcr9-9B</i>	11824G..
<i>Hcr9-9D</i>	28828
<i>Hcr9-9E</i>	37593	.G...T. TTT TG. G...TGC ..G. GTTA. G ..C..GTCG. ...ACT. --- -.G. G. T. T.
⋮		
		←SF2788
<i>Cf-9</i>	20544	AATGCTTCTG ATTATTGTTA CGACATAAGA ACATACGTAG ACATTCAG
<i>Hcr9-9A</i>	4307 TAT. -- -.GG. G.....
<i>Hcr9-9B</i>	12269 T. C CC T..... -- -.GG. CG.. G.....
<i>Hcr9-9D</i>	29273 T. C CC T..... -- -.GG. CG.. G.....
<i>Hcr9-9E</i>	38054A..... T ...GG. T.

図1 *Cf-9* 遺伝子とそのホモログ配列の比較から設計したプライマーの位置

*: DDBJ Accession No.: AJ002236の配列番号。

4 PCRプライマーの設計

Cf-9 および *Cf-9* と塩基配列の相同性が高い4つの遺伝子 *Hcr9-9A*, *Hcr9-9B*, *Hcr9-9D*, *Hcr9-9E* (DDBJ Accession No.: AJ002236) の5'側非翻訳領域とコドンの配列の比較を行い、*Cf-9* および *cf-9* 配列のみを増幅することのできるプライマー-SF2787 (5'-GGATGGTGACCTATTGGAT-3') およびSF2788 (5'-CTGAATGTCTACGTATGTTTC-3') を設計した(図1)。

5 PCR反応

PCRは、1×GoTaq Green Mastermix (プロメガ株式会社、東京)、各0.4 μmol/L プライマー、1.0 μLのDNAを含む全量15 μLで行った。サーマルサイクラーはPC320 (株式会社アステック、福岡)を用い、95°C 2分の後、95°C 1分・55°C 1分・72°C 1分を40サイクル、72°C 5分の温度条件でDNAを増幅した。PCR産物は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、紫外線照射下でバンドパターンを確認した。

6 PCR産物のクローニングおよびシーケンス

PCR増幅産物をpGEM-T Easy Vector (プロメガ株式会社、東京)を用いてクローニング後、Ceq8000 システム (ベックマン・コールター株式会社、東京)により塩基配列を決定した。

7 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 解析

1×*Hpy*CH4V反応緩衝液、1ユニットの*Hpy*CH4V (ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン、東京)、5 μLのPCR増幅断片を加えた全量10 μLの反応液を37°Cで1時間インキュベートした。酵素処理後の断片を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、紫外線照射下でバンドパターンを確認した。

試験結果

1 PCR反応

プライマー-SF2787およびSF2788を用い、「フルティカ」始め7品種のDNAを鋳型にPCR反応を行った。反応産物の電気泳動像を図2に示した。すべてのトマト品種について、約500 bpに1本のバンドが検出された。

2 PCR断片のクローニングと塩基配列の決定

Cf-9 をホモで持つ「フルティカ」と罹病性の「桃太郎8」のDNAを鋳型としたPCRによって得られた断片のシーケンスを行った。これらの断片を既報の配列と比較した結果、抵抗性および罹病性それぞれに特有の配列が得られ、抵抗性の*Cf-9* または罹病性の*cf-9* 遺伝子のみを増幅していた。得られた*Cf-9* および*cf-9* 塩基配列を比較した結果を図3に示した。両PCR断片は488 bpの塩基からなり、そのうち5塩基が抵抗性の*Cf-9* と罹病性*cf-9* の間で異なっていた。294番目の塩基は*Cf-9* でグアニン(G)であるのに対し*cf-9* ではチミン

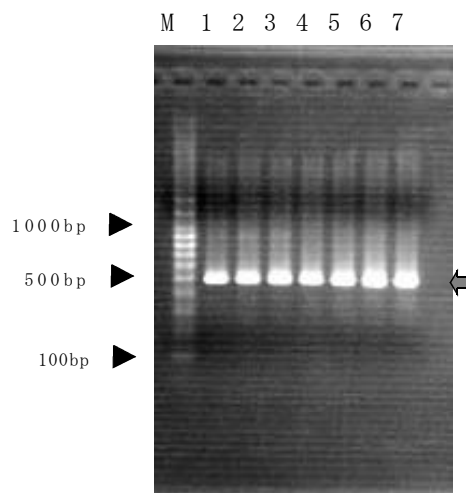


図2 SF2787とSF2788によるPCR増幅産物の電気泳動像

Lane 1: 「フルティカ」(抵抗性、*Cf-9/Cf-9*)
 Lane 2: 「桃太郎コルト」(抵抗性、*Cf-9/cf-9*)
 Lane 3: 「桃太郎なつみ」(抵抗性、*Cf-9/cf-9*)
 Lane 4: 「桃太郎ファイト」(*Cf-4* 保有、*cf-9/cf-9*)
 Lane 5: 「桃太郎ヨーク」(*Cf-4* 保有、*cf-9/cf-9*)
 Lane 6: 「桃太郎8」(罹病性、*cf-9/cf-9*)
 Lane 7: 「強力米寿」(罹病性、*cf-9/cf-9*)
 M: 100 bp ladder

矢印は、*Cf-9* または*cf-9* 遺伝子由来のPCR増幅断片。

(T)となっており、*Cf-9* に存在する制限酵素*Hpy*CH4Vによる認識配列(-TGCA-)が*cf-9* には存在しないことが明らかとなった。その結果、これらのPCR断片を*Hpy*CH4Vで切断するCAPS解析によって、両者の配列を認識できるものと考えられた。

3 CAPS解析

SF2787およびSF2788を用い、7品種のトマトのDNAを鋳型にして得られたPCR増幅産物を、制限酵素*Hpy*CH4Vで切断した。得られた断片を電気泳動した結果を図4に示した。*Cf-9* をホモで保有する「フルティカ」は294 bpと194 bpの泳動度にバンドが認められ、増幅されたPCR断片がすべて*Hpy*CH4Vによって切断された。一方、*Cf-4* を持ち*Cf-9* を持たない「桃太郎ファイト」、「桃太郎ヨーク」および罹病性品種の「桃太郎8」、「強力米寿」は*Hpy*CH4Vによって切断されず、488 bpの断片のみが検出された。また、ヘテロ型の「桃太郎コルト」、「桃太郎なつみ」は488 bp、294 bp、194 bpの3本のバンドが認められ、抵抗性の*Cf-9* と罹病性の*cf-9* を持つヘテロ型であることを明確に判定することができた。

4 「フルティカ」と「桃太郎8」の交雑F₂世代を用いた既報のDNAマーカーとの比較

Cf-9 をホモで持つ「フルティカ」(*Cf-9/Cf-9*)と

```

Cf-9      GGATGGTGAC CTATTTGGAT GGTGACATTA TTGGACCATA CTATTGATAA CGCGGACATT
cf-9      ..... T.....

Cf-9      GTTAGACCAC ACTGAGAAGG ACATGTCTGG ACTCCTGCTC CGTCTTCCAT CAGCAGGTCG
cf-9      ..... A .....

Cf-9      ATTCTTGTGG AAAATTAGCT CGAGGTGGCG CACTATGTGA GGTAAGTAGT ACTAAATTTT
cf-9      ..... T.....

Cf-9      TCTTTGCTTA ATTTGTGCTA TATATACCTC ATCTAAATTA TTGAATAGTC ACACAAAGCA
cf-9      ..... T.....

Cf-9      AACATTCTT GATTTCTTCT CTATCAACAT AACAAAGTTT GATCATTTTT AG GAAA
cf-9      ..... HpyCH4V .....

Cf-9      TGGATTGTGT AAAACTTGTA TTCCTTATGC TATATACCTT TCTCTGTCAA CTGCTTTAT
cf-9      .....

Cf-9      CCTCATCCTT GCCTCATTG TGCCCGAAG ATCAAGCTCT TTCTTCTTA CAATTCAAGA
cf-9      ..... ←SF278 .....

Cf-9      ACATGTTTAC CATTAATCCT AATGCTTCTG ATTATTGTTA CGACATAAGA ACATACGTAG
cf-9      .....

Cf-9      ACATTCAG
cf-9      .....
    
```

図3 SF2787およびSF2788によって増幅された*Cf-9*と*cf-9*の配列

下線はプライマーの位置、白抜きの配列は抵抗性 (*Cf-9*) と罹病性 (*cf-9*) で差の認められた制限酵素 *Hpy*CH4V 認識部位

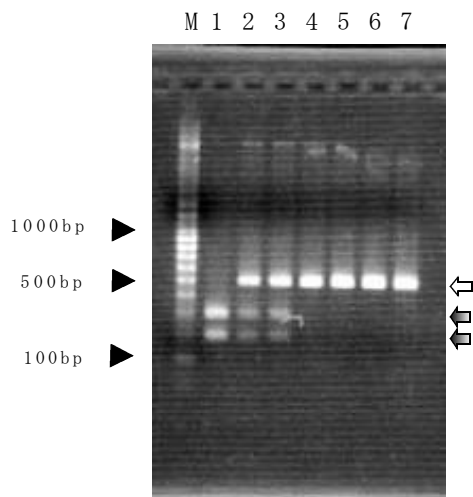


図4 SF2787とSF2788によるPCR増幅産物を *Hpy*CH4V で消化した後の電気泳動像

- Lane 1: 「フルティカ」 (抵抗性、*Cf-9/Cf-9*)
- Lane 2: 「桃太郎コルト」 (抵抗性、*Cf-9/cf-9*)
- Lane 3: 「桃太郎なつみ」 (抵抗性、*Cf-9/cf-9*)
- Lane 4: 「桃太郎ファイト」 (*Cf-4* 保有、*cf-9/cf-9*)
- Lane 5: 「桃太郎ヨーク」 (*Cf-4* 保有、*cf-9/cf-9*)
- Lane 6: 「桃太郎8」 (罹病性、*cf-9/cf-9*)
- Lane 7: 「強力米寿」 (罹病性、*cf-9/cf-9*)

M: 100 bp ladder

黒矢印は *Cf-9* 遺伝子由来の断片; 白抜き矢印は *cf-9* 遺伝子由来の断片

表1 「フルティカ」と「桃太郎8」の交雑F₂世代に対するDNAマーカーの判定結果の比較

系統	優性マーカー		共優性 マーカー ²⁾	系統	優性マーカー		共優性 マーカー
	抵抗性 ¹⁾	罹病性 ¹⁾			抵抗性	罹病性	
F2-1	+	+	H	F2-21	+	-	R
F2-2	+	+	H	F2-22	+	+	H
F2-3	+	+	H	F2-23	+	+	H
F2-4	+	+	H	F2-24	+	+	H
F2-5	+	+	H	F2-25	+	+	H
F2-6	+	+	H	F2-26	+	+	H
F2-7	+	+	H	F2-27	+	+	H
F2-8	+	+	H	F2-28	+	+	H
F2-9	+	-	R	F2-29	-	+	S
F2-10	+	+	H	F2-30	+	+	H
F2-11	+	-	R	F2-31	-	+	S
F2-12	+	+	H	F2-32	+	+	H
F2-13	+	+	H	F2-33	+	-	R
F2-14	+	+	H	F2-34	+	+	H
F2-15	-	+	S	F2-35	+	-	R
F2-16	+	+	H	F2-36	+	-	R
F2-17	-	+	S	F2-37	+	-	R
F2-18	+	+	H	F2-38	+	+	H
F2-19	+	+	H	F2-39	+	+	H
F2-20	+	-	R				

1) 黒柳ら¹¹⁾の優性マーカーによる遺伝子型の判定結果。+は遺伝子を保有、-は非保有を示す。

2) 本研究で開発した共優性マーカーによる遺伝子型の判定結果。Rは抵抗性ホモ、Sは罹病性ホモ、Hはヘテロ型を示す。

罹病性の「桃太郎8」(*cf-9/cf-9*)の交雑F₂世代39個体について、黒柳ら¹¹⁾によって報告された抵抗性遺伝子および罹病性遺伝子それぞれの優性マーカーと本研究で開発したDNAマーカーのそれぞれを用いて判定した遺伝子型を比較した。その結果、39個体のF₂世代の内、7個体が抵抗性ホモ、4個体が罹病性ホモの遺伝子型を示した。また、残りの28個体はヘテロ型を示し、両マーカーの結果は一致した(表1)。

考 察

遺伝的な形質は、それを支配する遺伝子から転写されるタンパク質によって制御されている。しかし、すべての形質に対して遺伝子が特定されている訳ではないため、現在は多くの場合、目的遺伝子の近傍にあると考えられる連鎖マーカーを用いた選抜が行われている。ところが、形質を決定する遺伝子を直接検出していないDNAマーカーによる選抜では、分離世代の個体の中にはマーカーと標的遺伝子の連鎖が外れるものが出る可能性がある。このような危険性をなくすための最も有効な手法として、目的遺伝子自体の配列をDNAマーカーとして用いることが挙げられ、その例として、福田ら¹³⁾の開発した萎凋病レース2抵抗性マーカーなどがある。しかし、この場合、マーカー作出には目的形質を発現させるための遺伝子が見つかっており、そ

の配列が明らかになっていることが前提条件となる。

本研究の対象である葉かび病抵抗性遺伝子(*Cf-9*)の塩基配列はParaniskeら¹⁴⁾によってすでに報告されている。しかし、一般に抵抗性遺伝子と罹病性遺伝子の間の塩基配列にほとんど差がない上、*Cf-9*遺伝子には塩基配列の相同性が極めて高いホモログ配列(*Hcr9*群)があるため、これらの配列を見分ける手法が必要であった。そのため、本研究では、*Cf-9*または*cf-9*遺伝子とそのホモログから区別して増幅することのできるプライマーSF2787およびSF2788を設計した。さらに、得られたPCR断片のシーケンスを行い、抵抗性遺伝子と罹病性遺伝子の塩基配列を比較した結果、抵抗性遺伝子のみ制限酵素*HpyCH4V*による認識配列(TGCA)が認められた。また、本マーカーを、生物検定でその正確性が確認されている既報のマーカーと比較したところ、すべての個体で遺伝子型が一致した。以上の結果からPCR増幅後に*HpyCH4V*で切断するCAPS解析により、抵抗性および罹病性それぞれの遺伝子を見分けることのできる共優性マーカーを開発することができた。

本マーカーは、葉かび病抵抗性遺伝子そのものを認識するものであるため、本マーカーで抵抗性と判定された個体では抵抗性形質を発現する確率が非常に高く、有用なマーカーであると考えられる。また、アガロースゲル電気泳動によって明瞭に遺伝子型を判定できるため短時間で多数のサンプルを解析するのに有利であ

ると考えられた。

引用文献

1. Truong, H. T. H., Choi, H., Cho, M. C., Lee, H. E. and Kim, J. H. Use of *Cf-9* gene-based markers in marker-assisted selection to screen tomato cultivars with resistance to *Cladosporium fulvum*. Hort. Environ. Biotechnol. 52, 204-210 (2011)
2. 山田憲吾. トマト葉かび病菌 *Passalora fulva*. 微生物遺伝資源利用マニュアル. 28, 1-9(2009)
3. Thomas, C. M., Dixon, M. S., Parniske, M., Golstein, C. and Jones, J. D. G. Genetic and molecular analysis of tomato *Cf* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 353, 1413-1424(1998)
4. Jones, D. A., Dickinson, M. J., Balint-Kurti, P. J. and Jones, J. D. G. Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of the *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 6, 348-357(1993)
5. Langford, A. N. The parasitism of *Cladosporium fulvum* Cooke and the genetics of resistance to it. Can. J. Res. 73, 421-424(1993)
6. Thomas, C. M., Jones, D. A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, P. J., Hatzixanthis, K. and Jones, J. D. G. Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. Plant Cell. 9, 2209-2224(1997)
7. Kerr, E. A. and Bailey, D. L. Resistance to *Cladosporium fulvum* Cooke obtained from wild species of tomato. Can. J. Bot. 42, 1541-1553 (1964)
8. Dickinson, M. J., Jones, D. A. and Jones, J. D. G. Close linkage between the *Cf-2/Cf-5* and *Mi* resistance loci in tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 6, 341-347(1993)
9. Enya, J., Ikeda, K., Takeuchi, T., Horikoshi, N., Higashi, T., Sakai, T., Iida, Y., Nishi, K. and Kubota, M. The first occurrence of leaf mold of tomato caused by races 4.9 and 4.9.11 of *Passalora fulva* (syn. *Fulvia fulva*) in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 75, 76-79(2009)
10. Thomas, C. M., Vos, P., Zabeau, M., Jones, D. A., Norcott, K. A., Chadwick, B. P. and Jones, J. D. G. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. Plant J. 8, 785-794 (1995)
11. 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マーカーの開発. 愛知農総試研報. 42, 15-22(2010)
12. Steward, C. N. and Via, L. E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. Biotechniques. 14, 748-750(1993)
13. 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マーカーの開発. 愛知農総試研報. 40, 41-46(2008)
14. Parniske, M., Hammond-Kosack, K. E., Golstein, C., Thomas, C. M., Jones, D. A., Harrison, K., Wulff, B. B. and Jones, J. D. G. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf-4/9* locus of tomato. Cell. 91, 821-832(1997)