

バレイショにおける
青枯病抵抗性に関する研究

令和5年
(2023)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科

波部 一平

Studies on resistance to bacterial wilt caused by
the *Ralstonia solanacearum* species complex
in potato

2023

HABE Ippei

Graduate School of
Animal and Veterinary Sciences and Agriculture
Obihiro University of
Agriculture and Veterinary Medicine

目次

諸言	1
----	---

第1章 バレイシヨにおける青枯病抵抗性に対する *in vitro* 検定法の開発

1. 諸言	16
2. 材料および方法	16
3. 結果	19
4. 考察	20

第2章 本邦で採取された *Ralstonia solanacearum* species complex のバレイシヨに対する病原力の差異

1. 諸言	27
2. 材料および方法	28
3. 結果	29
4. 考察	31

第3章 *Ralstonia pseudosolanacearum* に対するバレイシヨの青枯病抵抗性に関する QTL 解析と QTL の集積効果

1. 諸言	39
2. 材料および方法	41
3. 結果	44
4. 考察	46

第4章 *Ralstonia pseudosolanacearum* および *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*
による青枯病に対するバレイショにおける抵抗性の QTL 解析と
QTL の特性評価

1. 諸言	58
2. 材料および方法	59
3. 結果	61
4. 考察	64

第5章 バレイショにおける青枯病抵抗性に関わる主働 QTL に連鎖する
DNA マーカーの開発と利用

1. 諸言	77
2. 材料および方法	79
3. 結果	83
4. 考察	88

総合考察 106

要約 109

Summary 114

引用文献 119

謝辞 148

諸言

バレイシヨは、トウモロコシ、イネとコムギについて、世界で4番目に生産されている作物であり (FAOSTAT 2023)、世界的にも非常に重要な品目である。バレイシヨは少なくとも1万年前にはヒトによって食料として利用されており (Engel 1970)、これまで人間にとって重要な食料源として適応し続けている。この要因の一つとしては、食物繊維、ミネラル、タンパク質、ビタミンCおよびビタミンB6を含む高い栄養的価値を持つからであると考えられる (Kyriakidou et al. 2020)。加えて、日本を含めたアジア地域のみならずオセアニア、アメリカ大陸、ヨーロッパ大陸およびアフリカ大陸の多様な生産環境に適応して栽培が可能なのも大きな要因であると考えられる (Bradeen et al. 2011)。

ナス科に属するバレイシヨは、南アメリカ大陸のアンデス山脈の中央高原地帯が原産とされ、栽培種バレイシヨと近縁野生種に大きく分けられ、全てナス属 (*Solanum*) *Potatoe* 亜属 *Petota* 節に属する (Hawkes 1990; Spooner and Hijmans 2001)。バレイシヨの分類については、分類学者によって考え方が異なるが、Hawkes (1990)によりまずは集大成されており、栽培種7種と野生種226種とされている。一方で、新しい分類の考え方では、栽培種4種と野生種107種に分類されており (Spooner et al. 2014)、2つの分類体系は現在も併存している状況である。本研究では、Hawkes (1990)の分類に則り表記することにする。このように、バレイシヨの分類について考え方の違いはあるが、非常に多くの近縁種が存在し、それらが多くの有用な形質を持っている (Hawkes 1990)。これまで、その近縁種の有用な形質を活用するために、

交配によって栽培種への導入が行われ (Ross 1986; Plaisted and Hoopes 1989), 多様な環境下にバレイショが対応してきた一つの要因であると考えられる (Ross 1986)。

Hawkes (1990)によると, 栽培種には, *Solanum tuberosum*, *S. ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. phureja* および *S. stenotomum* の7種が知られ, 最も重要な栽培種は *S. tuberosum* であり, 亜種として *subsp. tuberosum* および *subsp. andigena* が含まれる。このうち世界中で栽培されているのは, 4倍体の *S. tuberosum subsp. tuberosum* のみである。*S. tuberosum subsp. tuberosum* は, 16世紀末に南米大陸で採取された *S. tuberosum subsp. andigena* を起源としてヨーロッパに導入され, ヨーロッパで長日適応型となり *S. tuberosum subsp. tuberosum* ができたと考えられている (Howard 1970)。その後, *S. tuberosum subsp. tuberosum* は18世紀にアメリカへ導入された (Salaman and Burton 1949)。アメリカでは19世紀後半に新たにチリから導入された *S. tuberosum subsp. tuberosum* が ‘Rough Purple Chili’ として品種化され (Goodrich 1863), その後代として ‘Early Rose’ が育成された (Mendoza and Haynes 1974)。*‘Early Rose’* はアメリカにおいて, 非常に重要な育種素材として利用されたことから, 北米の主要品種のほとんどは ‘Rough Purple Chili’ が起源となり, 遺伝的多様性が非常に狭くなっている (Howard 1970; Mendoza and Haynes 1974)。ヨーロッパでは19世紀に大発生した *Phytophthora infestans* による疫病の影響により, 遺伝的多様性が著しく低下し (Provan et al. 1999), その後, ‘Rough Purple Chili’ の後代がヨーロッパを含めて世界中に広まったことで (Plaisted and Hoopes 1989), 北米やヨーロッパを含めた栽培種バレイショ (*S. tuberosum subsp. tuberosum*) の遺伝的多様性は非常に狭いのが現状である (Mendoza and Haynes 1974)。

日本の栽培種バレイシヨは、19世紀から20世紀にかけて欧米から導入された‘男爵薯’（原名‘Irish Cobbler’）や‘メイクイーン’（浅間 1978）が長年主要な品種となっており、‘Irish Cobbler’も‘Early Rose’の由来とされる（Salaman 1926）。‘男爵薯’は日本のバレイシヨ育種の重要素材としても用いられ、‘農林1号’などの重要な品種が後代として育成されている。日本のバレイシヨ品種系統についても、遺伝子解析を行なった結果、長崎県育成品種を除いて、海外の品種系統の遺伝的多様性と比較して大きな差異はなく、海外の遺伝的多様性の中に含まれる結果となった（Igarashi et al. 2019）。これらから、日本のバレイシヨ育種も海外と同様に遺伝的多様性の乏しさが課題となっており、これからの気候変動に対応するためには、積極的に近縁種を育種の遺伝子プールに導入することで、変異の幅を大きくしていく必要性が示唆されている（Hosaka and Sanetomo 2020a）。

気候変動は、人や動物を含めた社会環境に大きな影響を与え、直接的には地表面の温度上昇や、乾燥・干ばつ、降水量の偏りなどが生じるとされる（Trenberth 2005）。そのため、植物栽培においては、病害を増加させる可能性が考えられ（Luck et al. 2011）、生産性を著しく低下させる大きな要因となり得る（McCarthy et al. 2001）。気候変動による地球温暖化によって深刻な問題となり得る病害の一つとして、高温で発病が促進される青枯病が挙げられる（Patil et al. 2012）。

青枯病は植物病原性細菌の種複合体である *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) による土壌病害である（Fegan and Prior 2005; Safni et al. 2014）。RSSC は、水中、土壌、非宿主の根圏で長期間生存し、潜在的に症状のない宿主に感染することができる（Hayward 1991）。そのため、一度圃場に侵入すると、本菌を完全に除去することは難しく難防除病害となっている。本病

害は、宿主の根部表層に原因菌が定着して、根の傷口 などから侵入し木部導管内を通過して増殖する (Vasse et al. 1995)。そして、木部導管内で Exopolysaccharide を産生し、導管を詰まらせることで水分吸収を阻害し、宿主植物の急速な発育阻害や枯死を引き起こすといわれる (Grimault and Prior 1993)。

青枯病は、1896 年に、バレイショ、トマトおよびナスにおいて病原性の初めての報告があり (Smith 1896)、それ以降 450 以上の植物種を宿主とすることが報告されている (Hayward 1994; Yabuuchi et al. 1995; Elphinstone 2005; Karim and Hossain 2018)。特に、トマト、ナス、タバコ、バレイショなどナス科作物に深刻な経済的被害を与える (Hayward 1994)。そのため、青枯病は学術および経済の面でも世界的に非常に重要である (Mansfield et al. 2012)。本病害の発生は温暖な気候を好むことから、熱帯、亜熱帯および暖温帯地域で多くの作物に影響を与えるが (Hayward 1991)、アンデス高原などの冷涼な地域でも発生し広範囲な地域で被害が報告されている (Fegan and Prior 2005; Ravelomanantsoa et al. 2018)。また、日本ではバレイショの重篤な病害として知られている (成田 1958; Katayama and Kimura 1984)。

RSSC は宿主範囲の違い (race: Buddenhagen and Kelman 1964)、生理型の違い (biovar: Hayward 1964)、病原性関連遺伝子やハウスキーピング遺伝子などの複数の遺伝子における塩基配列の違い (phylo type: Fegan and Prior 2005)、およびエンドグルカナーゼ遺伝子における塩基配列の違い (sequevar: Fegan and Prior 2005; Wicker et al. 2012) などによりさまざまに分類される (Table 1)。Phylo type による分類は、マルチプレックス Polymerase chain reaction (PCR) により簡便に判定でき (Fegan and Prior 2005)、かつ地理的分布と対応することから、近年最も利用されている分類法である (Horita et

al. 2014)。本手法によって RSSC は、I (アジア)、II (アメリカ)、III (アフリカ)、およびIV (インドネシア他) の4つの phylotype に分類される (Fegan and Prior 2005) (Table 1)。近年、ゲノム解析手法の発展により青枯病菌の全ゲノム解析も行われており、表現形質とゲノム配列情報に基づき、RSSC は *R. pseudosolanacearum*, *R. solanacearum*, および *R. syzygii* からなる複合種であると提案された (Safni et al. 2014)。これら3種と phylotype の対応は、*R. pseudosolanacearum* (phylotype I および phylotype III), *R. solanacearum* (phylotype II), *R. syzygii* (phylotype IV) となり、さらに、*R. syzygii* は3つの亜種 (subsp. *indonesiensis*, subsp. *syzygii*, および subsp. *celebesensis*) に類別される (Safni et al. 2014) (Table 1)。これら3つの亜種のうち subsp. *syzygii* は高木のチョウジを宿主としてスマトラ病を引き起こし、subsp. *celebesensis* はバナナを宿主として blood 病を引き起こす。青枯病を引き起こすのは subsp. *indonesiensis* のみである (Safni et al. 2014, 2018)。

日本における青枯病菌は、*R. pseudosolanacearum* (phylotype I) と *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* (phylotype IV) が確認されている (Horita et al. 2010)。これらは、biovar 3 と 4 (phylotype I) と biovar N2 (phylotype IV) に分けられる (Horita et al. 2010)。これらの検出地域は国内でも異なっており、biovar 4 と N2 は全国の広い地域で検出されているが、biovar 3 は、長崎県及び沖縄県の一部地域でのみ検出されている (Horita et al. 2010)。この中で、国内のバレイショ生産における青枯病の主要な原因菌となっているのは biovar 4 と N2 である (Katayama and Kimura 1984; 片山・木村 1986; Horita and Tsuchiya 2001; Horita et al. 2010)。また、この2つのグループは異なる時期にバレイショから検出され、phylotype I (biovar 4) は主に日本の暖地では9月から10月初旬の高温期に、phylotype IV (biovar N2) は10月下旬から11

月に確認され (Katayama and Kimura 1984; 片山・木村 1986), 発病程度が激しい高温期に見られる phylotype I (biovar 4) が国内のバレイショ生産では最も重要な菌株グループである可能性が示唆される。一方, これらバレイショへの病原力は, 菌株グループにより違いがあるとする報告 (Suga et al. 2013) と, 違いがない報告 (片山・木村 1987; 波部 2016) があり, 評価された菌株数が少ないこともあり, 判然としていない。

青枯病は典型的な土壌伝染性の病害であり, 一度汚染された土壌から病原菌を完全に除去することは困難である。本病に対する防除法としては, これまでに輪作 (Adhikari and Basnyat 1998; Katafiire et al. 2005), あるいは抗菌植物を用いる方法や拮抗微生物を利用した生物的防除 (Guo et al. 2004; Ji et al. 2005; 大城ら 2006; 井川ら 2008; Liu et al. 2013; Wachowska et al. 2013) が試みられている。しかし, 効果が不安定で, 商業的なバレイショ生産ではあまり利用されていない。また, 化学農薬による土壌消毒などが利用されているが (Mamphogoro et al. 2020), ほとんどの化学農薬は, 環境, 有益な微生物, 土壌バイオマス, および人間に悪影響を及ぼす (Frank et al. 2002; Navarro et al. 2007; Rokunuzzaman et al. 2016)。

トマトにおいては, 糖含有珪藻土を用いた土壌還元消毒法が新たに確立され, クロルピクリンなどの化学農薬よりも圃場の深層に効果が期待できるとされる (中保 2019)。国内のジャガイモ青枯病防除対策としては, 西南暖地を中心として, 土壌くん蒸剤による土壌消毒, 種芋消毒および高温期を避けて種芋を植え付けるなど総合的な防除体系が主に導入されている (片山・木村 1987)。しかしながら, それらの方法もバレイショにおける青枯病の発生を安定的に抑えることは難しく, 気候変動による栽培に適した期間の短縮化などで, 連作が中心となる九州地域のバレイショ生産では大きな被害を及

ぼしている。一方、トマトやナスでは、新しい防除法として抵抗性台木を利用した高接ぎ法が確立され（三木ら 2012; 鍛冶原ら 2016; 中保 2021）、土壌消毒法と組み合わせて生産現場で利用されている（野津・中保 2014; 鍛冶原ら 2016; 中保 2021）。しかし、バレイショの場合は、台木を利用することはできないため、抵抗性品種の利用が低コストであり、最も有効であると考えられる（Elphinstone 1994; Patil et al. 2012; Horita et al. 2014; Muthoni et al. 2020）。

20 世紀の初めに、青枯病に耐性を持つバレイショ近縁種が確認され（Salaman 1910）、その後青枯病抵抗性系統の探索が行われてきている（Thurston 1963; Sequeira and Rowe 1969; Rowe and Sequeira 1972; Sequeira 1979; Jaworski et al. 1980; Tung et al. 1990a, 1990b）。しかし、今まで青枯病に対して完全な抵抗性を持つバレイショ系統は確認されておらず（Patil et al. 2012; Huet 2014）、他のナス科植物であるトマトやナスにおいてもそのような系統の報告はない（Lebeau et al. 2011; Aslam et al. 2017; Namisy et al. 2019; Kunwar et al. 2020）。青枯病抵抗性は、複数の遺伝子により影響を受ける形質であり（Elphinstone 1994）、ジャガイモシストセンチュウやジャガイモ Y ウィルス抵抗性のような単一遺伝子による支配ではない。このような複数の遺伝子が影響を与える場合は、抵抗性遺伝子を集積させることで抵抗性の向上が期待できる（Pilet-Nayel et al. 2017）。

国内外において、バレイショにおける青枯病抵抗性育種が行われてきた。海外では、1970 年頃から特に国際ポテトセンター（International Potato Center, CIP）で精力的に行われてきた（Muthoni et al. 2020）。加えて、ブラジル、米国、ウルグアイなどでも抵抗性育種が試みられてきた（Schmiediche 1988; Quezado-Soares et al. 1997; French et al. 1998; Siri et al. 2009; Ferreira et al. 2017;

Lopes et al. 2021; Andino et al. 2022)。バレイショにおいて、栽培種 *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* でも青枯病に対して一定の抵抗性を示す品種や系統が報告されているが (Jaworski et al. 1980), 多発している圃場や発病条件が整ってしまうと被害が拡大するため、より強度の抵抗性を持つ品種育成が必要である (Patil et al. 2012)。

これまでの青枯病抵抗性育種の主な方法は、近縁種で見出された抵抗性を栽培種に導入するものである。青枯病抵抗性育種において世界的に利用されている主な近縁種としては、*S. phureja*, *S. commersonii*, および *S. chacoense* などがある (Rowe and Sequeira 1972; Kim-Lee et al. 2005; Lopes et al. 2021; Andino et al. 2022)。近縁種由来の抵抗性を栽培種に導入する際には、普通交配に加えて細胞融合も利用されている (Laferrriere et al. 1999; Fock et al. 2000, 2001; Chen et al. 2013)。さらに、遺伝子組換え技術により、シロイヌナズナの elongation factor-Tu (EFTu) receptor 遺伝子をバレイショの商業品種に導入することで、高い抵抗性を持つ系統が育成されている (Boschi et al. 2017; Fort et al. 2020; Dalla-Rizza et al. 2022)。この遺伝子は、細菌が植物体内へ侵入した際に病原体関連分子パターンや内因性エリシターを認知する機能があり (Kunze et al. 2004), トマトにおいても遺伝子組換え技術でこの遺伝子を導入することで青枯病抵抗性の向上が確認されている (Lacombe et al. 2010)。しかし、ヨーロッパや日本においては、遺伝子組み換え植物の栽培には規制があり、商業的な利用は難しく、少なくとも国内の抵抗性育種では、普通交配が今後も主たる育種方法になると考えられる。

国内では、長崎県を中心としてバレイショにおける青枯病抵抗性育種を普通交配で進めてきた。まずは、‘男爵薯’の後代である‘農林1号’が1943年に育成され(田口 1943), 高い青枯病抵抗性を示すことが確認されたため、

抵抗性育種素材として利用された。青枯病が多発する西南暖地では春と秋の二期作が主体であるため、イモの短休眠性が必要であるが、‘農林1号’は休眠が長いため、‘農林1号’の後代として西南暖地向けの抵抗性品種‘タチバナ’と‘ウンゼン’が育成された。その後、‘ウンゼン’を花粉親として抵抗性品種‘チヂワ’が育成され、さらにその後代として、‘農林1号’と比較して同等以上の抵抗性を示す‘メイホウ’が1986年に育成された(片山・木村 1987; 沢畑ら 1987)。しかし、これら抵抗性品種でも、青枯病の多発圃場では発病を抑制することが難しく、さらなる高い抵抗性を持つ品種の育成が必要であった(片山・木村 1987)。

強度の抵抗性を示す品種育成に向けて、‘農林1号’由来の抵抗性に加えて、国内で未利用の *S. phureja*, *S. tuberosum* subsp. *andigena* および *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* の3つの遺伝資源からなる‘インカのめざめ’(森ら 2009)が抵抗性育種に利用された。‘インカのめざめ’は2倍体品種で、圃場検定において高い青枯病抵抗性を示し(森ら 2009)、この青枯病抵抗性はアンデス原産栽培2倍種 *S. phureja* に由来すると考えられた(Mori et al. 2015)。そのため、これまでと異なる *S. phureja* 由来の抵抗性を新たに導入・集積させることでより高い抵抗性品種を育成することを目的として、染色体倍加処理により‘インカのめざめ’を4倍体として栽培品種‘サクラフブキ’と交配し、‘西海35号’が育成された(Mori et al. 2012)。「西海35号」は高い青枯病抵抗性を圃場検定で示し(Mori et al. 2012)、この系統と‘農林1号’由来で一定程度の青枯病抵抗性を示す‘西海33号’を交配して‘ながさき黄金’が育成された(Sakamoto et al. 2017)(Fig. 1)。「ながさき黄金」は‘農林1号’と比較して高い抵抗性を示し(Sakamoto et al. 2017)、圃場検定においてバレイショ品種の中で最も高い青枯病抵抗性を示す。しかし、完全な抵抗性

を示す訳ではなく、発病に好適な条件に遭遇すると罹病する (Sakamoto et al. 2017)。加えて, Suga et al. (2013)は RSSC による接種試験を行い, ‘ながさき黄金’ を含めた国内で育成された抵抗性品種は *R. pseudosolanacearum* に対しては抵抗性を示すが, *R. syzygii* に対しては罹病性であることを報告している。

これらから, 高い抵抗性を示す ‘ながさき黄金’ を育成したものの, より高い強度の抵抗性を持ち, *R. syzygii* に対しても高い抵抗性を持つ品種の育成が必要とされる。しかし, バレイショ栽培種は 4 倍体が主であり, 4 倍体育種において複数の抵抗性遺伝子を集積させるのは, 2 倍体種での育種と比較して非常に困難である (Hawkes 1990; Watanabe 2015)。加えて, これまで抵抗性系統の選抜は圃場検定に頼っている (Mori et al. 2015)。圃場検定は供試株数も限られ, 発病しやすい秋作の年 1 回に約 30 系統程度しか供試できない (Table 2)。さらに, 検定結果は環境条件に大いに左右されるために, 最低 3 回の反復が必要である。一方で, ジャガイモシストセンチュウ抵抗性やジャガイモ Y ウィルス抵抗性については, 高精度の選抜能力がある DNA マーカーが開発されており (Mori et al. 2015), 系統選抜試験における約 500 系統を対象に検定が可能である (Table 2)。このように, 抵抗性の評価が圃場検定に限られる点が国内外の青枯病抵抗性育種における主要な制限要因となっている (Mendoza 1988)。

そこで, 本研究では, 室内で効率的に青枯病抵抗性を評価できる *in vitro* 検定法を開発した (第 1 章)。そして, 国内の青枯病菌によるバレイショへの病原力について, *in vitro* 検定法で評価することにより, 5 つの病原力型 (病原型) に分けて, 今後の抵抗性育種を行う上での指標を確立しようとした (第 2 章)。第 3 章では, バレイショゲノムを網羅する一塩基多型 (Single

nucleotide polymorphism, 以下 SNP と称する) マーカーを用いた高密度連鎖地図を作成して, 国内の青枯病抵抗性の主要な供給源である ‘西海 35 号’ 由来の青枯病抵抗性について量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus, 以下 QTL と称する) 分析を行なった。その結果見出された複数 QTL についてその集積効果を明らかにしようとした。さらに第 4 章では, 国内の青枯病菌グループを代表する 3 菌株に対して, 2 段階の温度条件下における ‘西海 35 号’ 由来の青枯病抵抗性について QTL 分析を行い, 各 QTL の菌株特異性や温度依存性を明らかにしようとした。第 5 章においては, 前章で主働 QTL として第 6 番染色体に同定された *PBWR-6b* に連鎖する 2 種類の DNA マーカーを開発し, 2 倍体および 4 倍体における選抜マーカーとしての有効性を明らかにし, 他の主要な病虫害抵抗性 DNA マーカーと同時に検定できるマルチプレックス PCR 技術を開発した。これらの知見に基づき総合考察では, 本研究で開発した *in vitro* 検定法および新規に見出した抵抗性 QTL の育種的意義を明らかにし, 今後の青枯病抵抗性育種の方角性について議論する。

Table 1 Classification of the *Ralstonia solanacearum* species complex

Species ^a	<i>R. pseudo-</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudo-</i>	<i>R. syzygii</i> subsp.		
	<i>solanacearum</i>		<i>solanacearum</i>	<i>indonesiensis</i>	<i>syzygii</i>	<i>celebesensis</i>
Phylotype ^b	I	II	III	IV	IV	IV
Originated area ^b	Asia	America	Africa	Asia and Australia	Indonesia	Indonesia
Sequevar ^c	12–18, 31, 34, 44– 48, 54, 55, unknown	1–7, 24–28, 35, 36, 38–41, 50–52, unknown	19–23, 29, 42, 43, 49	8–11, unknown	9	10
Biovar ^d	3, 4, 5, N2	1, 2, N2	1, N2	1, 2, N2	-	-
Race ^d	1, 4, 5	1, 2, 3	not identified	3, not identified	-	-
Disease ^e	Bacterial wilt	Bacterial wilt	Bacterial wilt	Bacterial wilt	Sumatra disease of clove	Blood disease of banana

^aBased on the report of Safni et al. (2014)

^bBased on the reports of Fegan and Prior (2005) and Safni et al. (2014)

^cBased on the reports of Fegan and Prior (2005), Hong et al. (2012), Horita and Tsuchiya (2012), Wicker et al. (2012), Waki et al. (2013), Guttra et al. (2017), and Jiang et al. (2017)

^dBased on the reports of Horita and Tsuchiya (2012) and Horita et al. (2014)

^eBased on the reports of Safni et al. (2014, 2018)

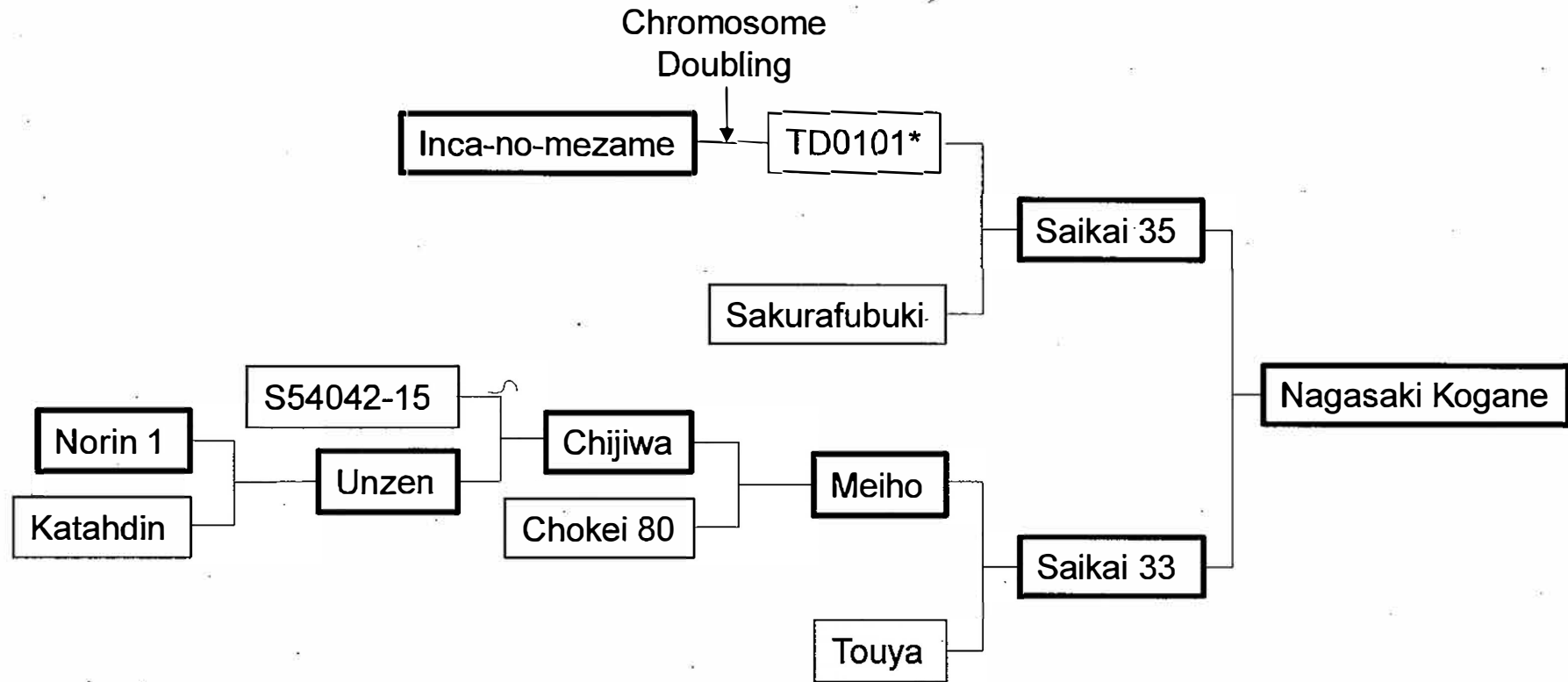


Fig. 1 The pedigree of Nagasaki Kogane

Varieties and breeding lines in bold-lined boxes show a certain level of resistance to bacterial wilt by field tests (Katayama and Kimura 1987; Sawahata et al. 1987; Mori et al. 2009, 2012; Sakamoto et al. 2017).

*Bacterial wilt resistance not evaluated by field test

Table 2 Process of potato breeding in double cropping

Year	Season	Breeding stage	No. of plants/ replicates	No. of genotypes	Note (traits for selection, etc.)
1	Spring	Crossing			Cross with a genotype possessing potato cyst nematode resistance (<i>HI</i>) at least in one of parents, and obtain approximately 300,000 hybrid seeds per season.
	Fall	Seedling selection	1/1	14000	Tuber shape and flesh color.
2	Spring	First clonal selection	1/1	7000	Maturity, growth characteristics, tuber shape, size, and eye depth, and stolon length.
	Fall	Line selection	8/1	500	Maturity, growth characteristics, tuber shape, size, and eye depth, stolon length, and starch content. Disease and pest resistance by DNA marker assays.
3	Spring	Preliminary yield trial	30/1	50	The same traits as done in the line selection. Field evaluation for disease and insect resistance (approximately 30 lines are evaluated for bacterial wilt resistance every year). Cooking tests.
	Fall	Yield trial	40/3	10	Evaluation and selection for growth characteristics, yield potential, starch content, cooking characteristics, processing quality, and field evaluation of disease and insect resistance, which are carried out up to year 6.
4	Spring	Yield and adaptability tests	40/3	5	Conducted in multiple prefectures where dissemination is envisaged, and carried out up to year 5.
	Fall	Yield and adaptability tests	40/3	5	As above
5	Spring	Yield and adaptability tests	40/3	5	As above

Table 2 Continued

Year	Season	Breeding stage	No. of plants/ replicates	No. of genotypes	Note (traits for selection, etc.)
	Fall	Yield and adaptability tests	40/3	5	As above
6	Spring	Yield and regional adaptability tests	40/3	3	Conducted at farmer fields in the main production areas in Nagasaki Prefecture, where dissemination is envisaged.
	Fall	Yield and regional adaptability tests	40/3	3	As above
7		New cultivar		1	

第1章

バレイショにおける青枯病抵抗性に対する *in vitro* 検定法の開発

諸言

国内における青枯病抵抗性系統の選抜は、青枯病汚染圃場において候補系統を栽培して評価・実施している (Mori et al. 2015)。しかし、気候の変動や圃場内の菌の分布が不均一であるため、評価を複数回繰り返す必要があり、検定地域や時期は青枯病が発生しやすい西南暖地の秋作に限られ、評価に多大な時間と労力がかかる。一方で、グロースチャンバーを用いて制御された環境での試験により、より再現性の高い結果が得られると報告されている (Gonzalez et al. 1973)。バレイショの葉齢が青枯病に対する抵抗性の程度に影響することから (Gonzalez et al. 1973), Montanelli et al. (1995)は、試験管内で培養した均一な植物体を、青枯病菌を接種したプラスチックトレイに植える方法を開発した。しかし、この方法は、グロースチャンバーの広いスペースを必要とし、試験中に他の菌株による汚染にも注意を要する。

そこで本研究では、無菌培養植物を試験管内で維持し、均一に増殖した植物体を、無菌条件下の試験管内で評価できるよう、抵抗性個体と罹病性個体を区別するために最適な接種濃度、接種時期 (葉齢)、接種後の培養温度を明らかにすることにより、青枯病抵抗性を試験管内で評価する方法を開発しようとした。

材料および方法

植物材料および培養条件

まず、青枯病抵抗性を有するバレイショ育成系統である‘西海 35 号’ (Mori et al. 2012) および罹病性の米国育成品種である‘Kennebec’ (Jaworski et al. 1980) を用い、これら 2 つの品種系統を区別するための最適条件を検討した。次に、決定された最適条件を用いて、圃場検定において圃場抵抗性の程度が判明している以下のバレイショ品種系統を評価した。抵抗性程度「強」品種として‘ながさき黄金’と‘農林 1 号’、抵抗性程度「中」品種として‘ニシユタカ’と‘さんじゅう丸’、および抵抗性程度「弱」品種として‘アイユタカ’と‘デジマ’ (Mori et al. 2012; Sakamoto et al. 2017) を使用した。これらの品種は、時期は異なるが、長崎県農林技術開発センターの同じ無防除圃場で少なくとも 5 年間抵抗性を評価したものである。この無防除圃場では、RSSC の *R. pseudosolanacearum* (phylotype I) と *R. syzygii* (phylotype IV) が混在している。試験に供試するすべての品種は *in vitro* で維持され、2% のショ糖を含む Murashige and Skoog (MS) 培地 (Murashige and Skoog 1962) 上で定期的に増殖された。検定培地は、ガラス管 (40 mm×130 mm) 中に 30 ml のバーミキュライトと 20 ml の MS 液体培地を入れオートクレーブ滅菌したものである。頂点から 3~4 枚の葉を持つ培養植物片を切り取り、検定培地に移植し、RSSC 菌株を接種するまでグロースチャンバー内で培養した。培養条件は、3,000~4,000 lx で 16 時間明期、8 時間暗期、20°C の恒温であった。

接種試験

R. pseudosolanacearum の MAFF327001 株 (phylotype I/biovar 4) (Horita et al. 2010; Suga et al. 2013) を接種に使用した。この菌株は、日本で最も青枯病の発生が問題となっている長崎県内の圃場において青枯病に感染したバ

レイシヨから分離されたものである (Horita et al. 2010)。本菌株を 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 培地 (Kelman 1954) にプレーティングし、病原性の指標である白色流動コロニーから分離した細菌をカザミノ酸ペプトングルコース (CPG) 培地 (Hendrick and Sequeira 1984) に入れ、30°C 条件下において振とう器で1日間振とうして増殖させた。菌体濃度は、滅菌水で希釈し、600 nm の光学濃度 (Optical density, OD) を測定することにより求めた。OD₆₀₀ が 0.1 であれば、コロニー形成単位 (Colony forming unit, CFU) で 1.13×10^8 CFU ml⁻¹ に相当した。本試験は *in vitro* 条件であるため、接種菌濃度は接種当初は異なってもいずれ一定になると考えられる。このため接種する菌濃度は大きく異なる 1×10^2 と 1×10^8 CFU ml⁻¹ の2種類を設定した。接種時の植物体生育期は葉齢 4~5 枚 (移植後 1 週間培養) と葉齢 6~8 枚 (移植後 2 週間培養) の2種類を設定した。接種は、1 ml の細菌懸濁液を検定培地のバーミキュライトに注入した。長崎県で青枯病が多発する秋作の植え付け時の地温は約 28°C (Katayama and Kimura 1984) であり、バレイシヨの栽培適温は 10°C~23°C (栗原ら 1963) であるため、培養温度は、ジャガイモ最適生育温度の上限に近い 24°C と、地温に相当する 28°C に設定し、菌株の接種後、直ちに植物を 24°C または 28°C のインキュベーターに移した。10 個体を 1 反復として、各品種につき 3 反復行った。

発病評価

接種後 20 日目に目視で発病度を発病指数 (Disease index, DI) として評価した。DI は、葉と茎に分けて、0 (症状なし)、1 (葉または茎が 25% まで萎凋症状有り)、2 (26~50% の萎凋症状有り)、3 (51~75% の萎凋症状有り)、および 4 (76~100% の萎凋症状有り) とした (Fig. 2)。

データ解析

平均 DI を、葉については葉病指数 (Leaf disease index, LDI) として、また茎については茎病指数 (Leaf disease index, SDI) として個別に求めた。‘西海 35 号’ と ‘Kennebec’ の品種系統間差は、Mann-Whitney U 検定を用いた。LDI と SDI の平均値に影響を与える因子を接種菌濃度、バレイショの葉齢、接種後の培養温度とし、三元配置分散分析でその影響を調べた。LDI と SDI の品種間差は Tukey 検定で検討した。統計学的検定はすべて Rcmdr パッケージ (Fox 2005) version 3.3.3. (R Core Team 2017) を用いた。

結果

最適な検定条件の検討

最適な検定条件を決めるため、罹病性を示す ‘Kennebec’ と圃場抵抗性と評価されている ‘西海 35 号’ を *in vitro* で接種し、接種時の植物体生育期 (葉齢 4~5 枚 vs 葉齢 6~8 枚)、接種後の培養温度 (24°C vs 28°C) および接種菌濃度 (1×10^2 vs 1×10^8 CFU ml⁻¹) それぞれ 2 段階の違いが、葉 (LDI) または茎の発病指数 (SDI) に与える影響を比較した (Table 3)。なお、対照区として滅菌水を接種した場合、LDI は 0.00~0.30 となり、SDI は 0.00 となった。

条件によって異なるが、‘西海 35 号’ の平均発病指数は LDI で 0.30~1.53、SDI で 0.00~1.13 であったのに対し、‘Kennebec’ のそれは LDI で 0.60~3.20、SDI で 0.40~3.03 となった (Table 3)。16 処理区中 15 処理区において、‘西海 35 号’ の平均発病指数は ‘Kennebec’ のそれよりも低かった (Table 3)。6~8 葉期に接種して培養温度 24°C の場合のみ、‘西海 35 号’ は ‘Kennebec’

よりも LDI がわずかに高かったが統計的有意差は認められなかった。‘西海 35 号’ と ‘Kennebec’ の発病指数間での有意差は、常に培養温度 28°C のときに得られた。培養温度 24°C では、葉齢 6~8 枚/10² CFU ml⁻¹ の試験区で SDI のみが有意差を示した。分散分析の結果、培養温度は分散に影響を与える最も重要な因子であることが示された (Table 4)。F 値が示すように、培養温度は ‘西海 35 号’ よりも ‘Kennebec’ により大きな影響を与えた。接種時期 (葉齢) と接種菌濃度は、‘西海 35 号’ の SDI にのみ影響を与えた (Table 4)。以上の結果から、青枯病抵抗性に基づき 2 品種を識別する最適条件は、6~8 葉の小植物体に菌濃度 1×10² CFU ml⁻¹ で接種し、培養温度は 28°C であった。

In vitro 検定の評価精度の検証

圃場での抵抗性程度が既知の品種における 6~8 葉期の培養植物体に 1×10² CFU ml⁻¹ 濃度の青枯病菌を接種し、接種後の培養温度を 28°C として試験管内で抵抗性程度を検定した (Fig. 3)。抵抗性品種である ‘ながさき黄金’、‘西海 35 号’、‘メイホウ’、および ‘農林 1 号’ は SDI が 0.43~0.80 で低く、罹病性品種である ‘アイユタカ’、‘デジマ’、および ‘Kennebec’ は SDI が 2.17~2.80 で高かった。抵抗性程度が「中」である ‘ニシユタカ’ と ‘さんじゅう丸’ は中程度の SDI (1.37~1.60) を示した。抵抗性程度が「中」の品種における LDI は中位でないものもあったが、抵抗性品種と罹病性品種の LDI の差は有意であった。

考察

青枯病菌接種後の培養温度は、抵抗性品種と罹病性品種の区別に最も重

要な因子であった。加えて、菌接種時の葉齢もバレイシヨ (Gonzalez et al. 1973) およびトマト (Nakaho et al. 1996) において青枯病抵抗性に大きく影響を与えることが報告されている。したがって、6~8 葉齢の培養植物体に 1×10^2 CFU ml⁻¹ の菌濃度で接種し、接種後の培養温度を 28°C に設定することが、*in vitro* 検定での最適な試験条件であることが明らかとなった。この最適条件下で、圃場検定での抵抗性程度が既知のバレイシヨ品種について *in vitro* 検定で評価した結果、圃場の抵抗性程度 (Mori et al. 2012; Sakamoto et al. 2017) と *in vitro* 検定の抵抗性程度は、特に茎上の発病評価 (SDI) で高い相関性を示した (Fig. 3)。バレイシヨの品種によっては、滅菌水を接種した対照区で葉に僅かであるが萎凋が確認されたため、茎 (SDI) での評価でより安定した結果が得られるものと考えられる。

圃場では、根と微生物が複雑に相互作用する根圏域の生物群集が植物の生産性や病害抵抗性に影響を与えている (Chaparro et al. 2012)。一方、*in vitro* で生育する植物は非常に小さく、水耕栽培の条件下で生育するため、その抵抗性程度が圃場環境下で必ずしも反映されないかもしれない。しかし、*in vitro* 検定はいつでも実施可能であり、圃場検定の再現性に影響を与えがちな環境要因を排除することができる。また、全ての工程を閉鎖環境で行うため、遺伝子組換え植物でも実施可能である。同一圃場で、RSSC の異なる菌株の病原性を評価することはほとんど不可能であるが、*in vitro* 検定を用いれば、異なる系統の RSSC に対する抵抗性を一対一の関係で明らかにすることが可能である。青枯病に対する適切な抵抗性検定法の欠如は、バレイシヨ育種における制限要因の一つである (Mendoza 1988)。最低 3 年は必要とする現状の圃場検定と比較して、*in vitro* 抵抗性検定法は、植物を事前に試験管内で培養する必要はあるものの、青枯病抵抗性個体の効率的な選抜を可能

にするものと考えられる。

以上に述べたように、本研究では青枯病に対する抵抗性の試験管内検定法が開発された。本法は、圃場での評価に比べ、比較的簡便で再現性が高く、育種選抜への利用のみならず、異なる RSSC 菌株の病原性評価など広く応用できると考えられる。

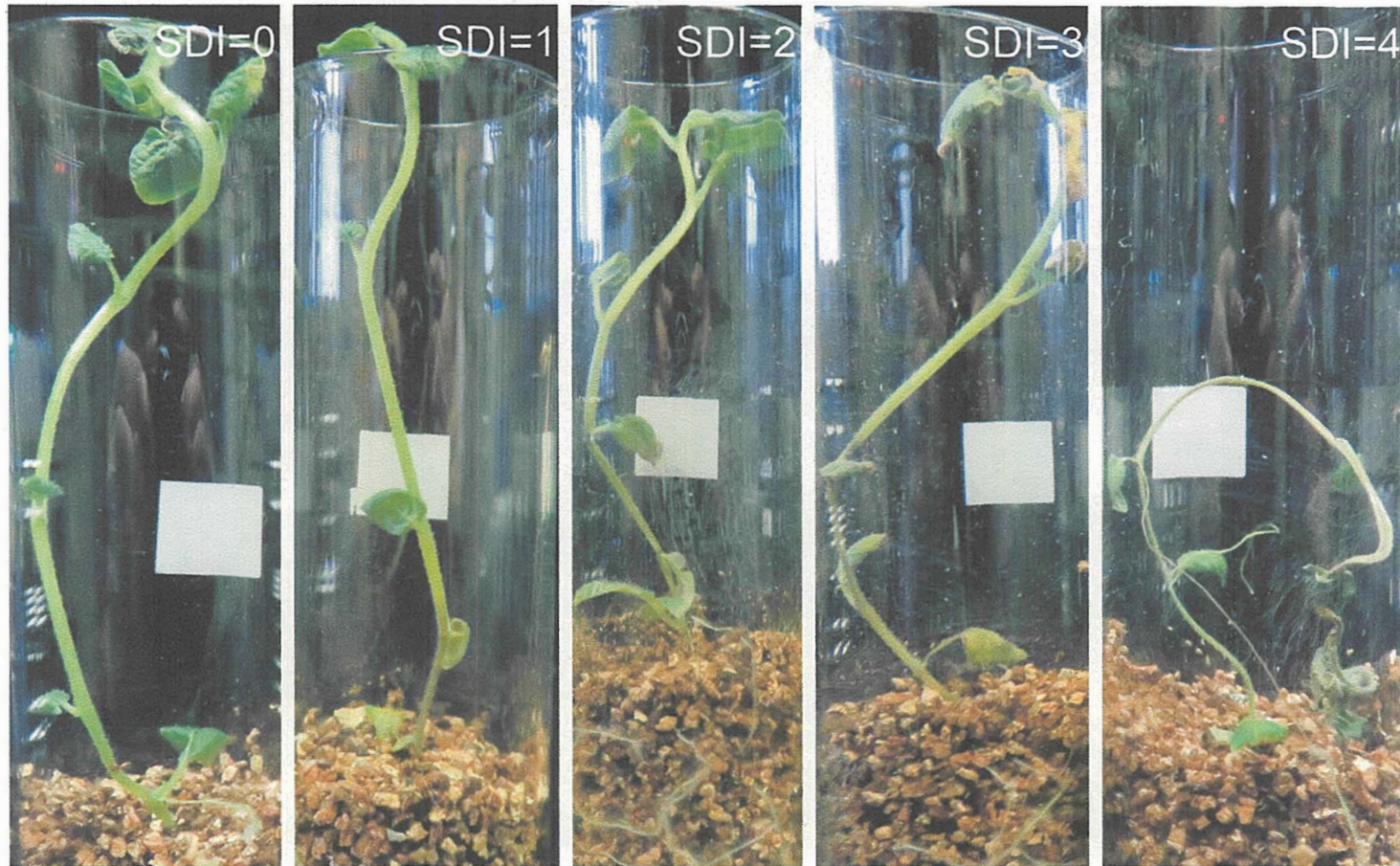


Fig. 2 Potato plants (cv. Kennebec) grown *in vitro* 20 days after inoculation with a strain of *Ralstonia pseudosolanacearum* (MAFF327001, phylotype I/biovar 4) in glass tubes. Caps were removed for photography. The criteria for the 0 – 4 scale stem disease indices (SDI) shown from left to right; 0 = no symptoms, 1 = up to 25% of stem areas wilted, 2 = 26–50% wilted, 3 = 51–75% wilted, and 4 = 76–100% wilted

Table 3 Disease indices, shown as the plot means \pm standard errors among three replicates, obtained by *in vitro* assay for a resistant potato clone, Saikai 35, and a susceptible potato variety, Kennebec

Inoculation timing	Inoculum concentration	Incubation temperature	Leaf disease index (LDI)			Stem disease index (SDI)		
			Saikai 35	Kennebec	Significance	Saikai 35	Kennebec	Significance
1 week after transplanting	10^2 CFU ml ⁻¹	24 °C	0.80 \pm 0.15	1.17 \pm 0.19		0.17 \pm 0.09	0.77 \pm 0.32	
		28 °C	1.53 \pm 0.39	3.07 \pm 0.12	*	0.90 \pm 0.36	2.57 \pm 0.12	*
(4–5 leaf age)	10^8 CFU ml ⁻¹	24 °C	0.87 \pm 0.38	1.67 \pm 0.32		0.47 \pm 0.23	1.13 \pm 0.38	
		28 °C	1.33 \pm 0.24	3.13 \pm 0.32	*	1.13 \pm 0.18	3.03 \pm 0.38	*
2 weeks after transplanting	10^2 CFU ml ⁻¹	24 °C	0.30 \pm 0.10	0.77 \pm 0.24		0.00 \pm 0.00	0.60 \pm 0.30	*
		28 °C	0.97 \pm 0.27	3.07 \pm 0.32	*	0.43 \pm 0.13	2.33 \pm 0.20	*
(6–8 leaf age)	10^8 CFU ml ⁻¹	24 °C	0.87 \pm 0.07	0.60 \pm 0.23		0.10 \pm 0.10	0.40 \pm 0.17	
		28 °C	1.20 \pm 0.23	3.20 \pm 0.36	*	0.90 \pm 0.12	2.93 \pm 0.19	*

*, significantly different between Saikai 35 and Kennebec at $p < 0.05$ by Mann-Whitney *U* test

Table 4 Three-way factorial analysis of variance for bacterial concentration (conc.), inoculation timing (leaf age), and incubation temperature (temp.) on disease index

Disease index	Genotype	Source of variation	df	F value
Leaf (LDI)	Saikai 35	Conc.	1	0.8621
		Leaf age	1	2.7931
		Temp.	1	9.3879**
		Conc. × Leaf age	1	1.6897
		Conc. × Temp.	1	0.6983
		Leaf age × Temp.	1	0.0776
		Conc. × Leaf age × Temp.	1	0.0086
	Kennebec	Conc.	1	0.4794
		Leaf age	1	3.3034
		Temp.	1	115.1760***
		Conc. × Leaf age	1	0.6067
		Conc. × Temp.	1	0.03
		Leaf age × Temp.	1	3.9625
		Conc. × Leaf age × Temp.	1	0.9064
Stem (SDI)	Saikai 35	Conc.	1	4.5756*
		Leaf age	1	5.7521*
		Temp.	1	26.2227***
		Conc. × Leaf age	1	0.0042
		Conc. × Temp.	1	0.3403
		Leaf age × Temp.	1	0.105
		Conc. × Leaf age × Temp.	1	0.7101
	Kennebec	Conc.	1	2.5073
		Leaf age	1	2.5073
		Temp.	1	104.6172***
		Conc. × Leaf age	1	0.3095
		Conc. × Temp.	1	1.3352
		Leaf age × Temp.	1	0.5293
		Conc. × Leaf age × Temp.	1	0.8077

*, ** and *** indicate significant differences at $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

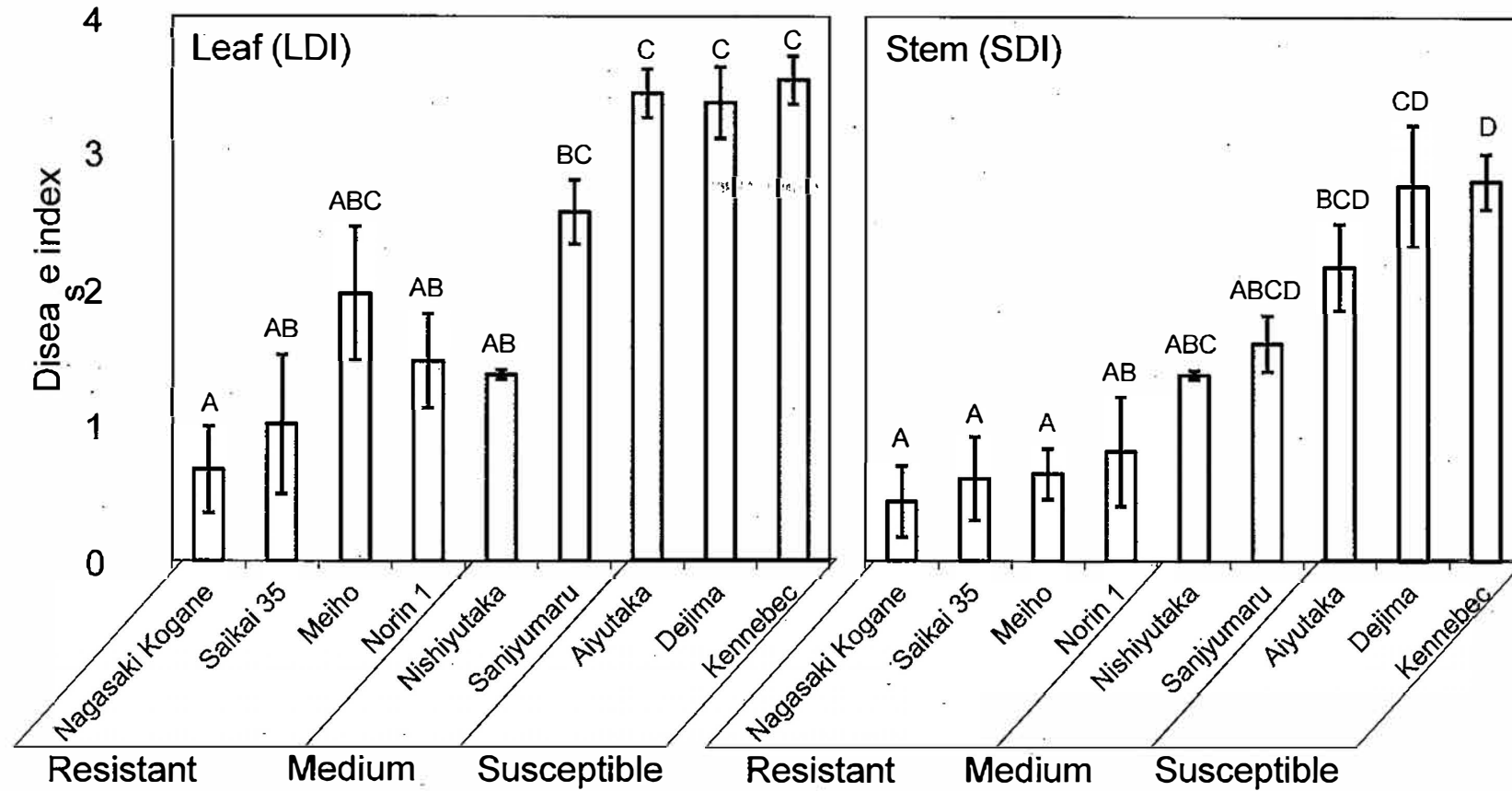


Fig. 3 Disease indices in nine genotypes (highly resistant, Nagasaki Kogane, Saikai 35, Meiho, and Norin 1; medium, Nishiyutaka and Sanjyumaru; susceptible, Aiyutaka, Dejima, and Kennebec) after inoculation with a strain of *Ralstonia pseudosolanacearum* (MAFF327001, phylotype I/biovar 4). The error bars indicate the standard error values ($n=3$). Different letters indicate significant difference ($p<0.05$) according to Tukey test.

第2章

本邦で採取された *Ralstonia solanacearum* species complex のバレイショに対する病原力の差異

諸言

日本では、バレイショに感染する RSSC には2つの phylotype (I と IV) または3つの biovar (N2, 3, および 4) が確認されている (Horita et al. 2010)。phylotype IV (*R. syzygii* subsp. *indonesiensis*) は日本, 韓国, フィリピン, インド, インドネシア, およびオーストラリアから報告されており (Fegan and Prior 2005; Villa et al. 2005; Jeong et al. 2007; Horita et al. 2010; Sagar et al. 2014), 同じ圃場で phylotype I (*R. pseudosolanacearum*) と共存することも確認されている (Katayama and Kimura 1984; 片山・木村 1986)。RSSC のバレイショに対する病原性については, phylotype によって異なる事例 (Suga et al. 2013) と, 同じとする事例 (片山・木村 1987; 波部 2016; Sharma et al. 2021) が報告されており, phylotype の違いによる病原性について判然としておらず, 抵抗性育種を進める上で混乱を招いている。

青枯病の発病程度は, 環境や圃場条件に大きく影響され, 特定の青枯病菌株に対する抵抗性を圃場試験で正確に評価することは困難である。バレイショ育種家は菌株別の抵抗性よりも圃場での実質的な抵抗性に頼らざるを得ないが, これは日本では RSSC 菌株毎のバレイショへの病原性が明らかにされていないことが要因の一つであると考えられる。

そこで, 本研究では, phylotype I と IV を含む広範囲の RSSC 株に対して個別に抵抗性程度を評価できる *in vitro* 検定法を用いて, 日本のバレイショか

ら分離したさまざまな RSSC 菌株について、2 つの温度水準での抵抗性品種と罹病性品種に対する病原性を評価しようとした。

材料および方法

植物材料および培養条件

抵抗性個体としてバレイショ育種系統‘西海 35 号’，および罹病性個体として品種‘アイユタカ’の培養植物体のシュートを，第 1 章の記載に従って，滅菌されたバーミキュライトと液体 MS 培地（Murashige and Skoog 1962）を含む *in vitro* 検定培地で培養し生育させた。培養条件は，グロースチャンバーで 20°C，3000~4000 lx の明度で 16 時間日長とし，2 週間培養した。

接種試験

青枯病菌株として，日本産バレイショの感染植物体から分離され，堀田・土屋（2012）により特徴づけられた 26 株の RSSC を用いた（Table 5）。これらは，*R. pseudosolanacearum*（phyloptype I/biovar 3，ないし phyloptype I/biovar 4），または *R. syzygii*（phyloptype IV/biovar N2）に分類されている（Table 5）。第 1 章の記載と同様に，TTC 培地（Kelman 1954）上の白色流動コロニーから分離した細菌を，CPG 液体培地（Hendrick and Sequeira 1984）中で 30°C，1 日間振とうさせて増殖させた。その後，遠心分離により菌体を沈澱物として回収し，菌体濃度が 10^2 CFU ml⁻¹ になるよう蒸留水で調製した。この細菌懸濁液 1 ml を *in vitro* 検定培地に灌注接種した。

バレイショは圃場へ植え付け後 30 日間の日平均気温が 23°C 以下であれば，青枯病の発生は有意に減少するため（片山・木村 1987），接種後の温度

条件は 23°C より高い 24°C および 28°C に設定した。各温度条件において品種系統当たり 29 または 30 個体の 6~8 葉齢の培養植物体を反復供試した。接種後 20 日目に目視で発病度を評価した。

発病評価

発病指数は、各個体の葉について第 1 章と同様に、0 (症状なし)、1 (0~25% まで萎凋症状有り)、2 (26~50% の萎凋症状有り)、3 (51~75% の萎凋症状有り)、および 4 (76~100% の萎凋症状有り) の 5 段階で評価し、反復植物の平均を各品種系統の発病指数 (Disease index, DI) とした。

データ解析

R パッケージ Rcmdr (Fox 2005) を用いて、供試菌株に対する '西海 35 号' と 'アイユタカ' の DI から、バレイシヨ品種と接種後培養温度を変動因子とする二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を実施した。加えて、各接種後培養温度における両品種の DI を比較するため Welch の t 検定を行った。さらに、R version 3.3.3 (R Core Team 2017) を用いて、階層的 (Ward 法) および非階層的 (K-means 法) クラスタ分析により RSSC 菌株を分類した。非階層的クラスタ分析では、R パッケージ cluster (Maechler et al. 2021) の clusGap 関数を用いて、100 ブートストラップで Gap 統計 (Tibshirani et al. 2001) により k=1 から k=10 まで任意性のない最適クラスタ数を決定した。

結果

培養温度 24°C における RSSC 26 菌株の平均 DI (±標準誤差) は、'アイユタカ' では 2.06 ± 0.23 で、'西海 35 号' では 1.33 ± 0.21 であり、14 菌株

では‘西海 35 号’の方が 5%水準で有意に低かった。また、培養温度 28°C の平均 DI は、‘アイユタカ’では 2.50 ± 0.17 で、‘西海 35 号’では 1.64 ± 0.15 であり、17 菌株では‘西海 35 号’の方が 5%水準で有意に低かった。このうち、いずれの培養温度でも DI が‘西海 35 号’で有意に低かったのは 11 菌株であった (Table 6)。Two-way ANOVA の結果によると、培養温度は 26 菌株中 22 菌株で有意に寄与しており、病原力は温度に敏感であることが示唆された。

Gap 統計に基づくクラスター分析では、K-means 法で最適なクラスター数は 5 と考えられた (Table 6)。一方、階層型クラスター分析である Ward 法を用いると、5 つのクラスターに分けた場合、K-means 法による結果と同じ菌株群に分類された (Fig. 4)。したがって、供試した 26 菌株は、5 つの病原型 (Pathotypes A~E) として分類するのが妥当と考えられた。病原型 A に属する 5 菌株は、両品種の DI において培養温度 24°C で低く ($DI < 1.0$)、28°C では高く、特に‘アイユタカ’で高かった。Two-way ANOVA の結果を見ると、培養温度の違いが大きく影響を及ぼしており、本病原型は温度変化に影響を受け、温度が高くなると病原性が高くなる傾向にあることが示唆された。病原型 B に属する 6 菌株は、培養温度 24°C と 28°C の両温度で、いずれの品種の DI もほとんどが 2.0 未満と比較的低かった。病原型 C に属する 6 菌株は、‘西海 35 号’の DI は 28°C より 24°C で低く、‘アイユタカ’では 24°C および 28°C のいずれでも $DI > 2.0$ の高い病原力を示した。したがって、24°C における品種間の DI には大きな差があり、Two-way ANOVA では 6 菌株すべてにおいて品種の違いが有意な要因であることが示された。また、‘アイユタカ’では温度感受性が低く、‘西海 35 号’では温度感受性が高いため、多くの菌株で交互作用が有意になる傾向が見られた。病原型 D に属する 5 菌

株は、両培養温度で両品種のほとんどが $DI > 2.0$ と比較的高く、‘西海 35 号’に比べ ‘アイユタカ’ に対して概ね高い病原力が認められた。病原型 E に属する 4 菌株は、両品種とも 28°C より 24°C の方が $DI > 2.0$ と高く、さらに 24°C では ‘アイユタカ’ と ‘西海 35 号’ の反応性に差が見られなかった。Ward 法によると、類別した 5 つの病原型は、病原型 A と B、および病原型 C, D, および E の 2 つに大別され、さらに病原型 C, D, および E では、病原型 D と E で類似性が高かった (Fig. 4)。

これら 5 つの病原型による菌株の分類を、従来の分類と比較すると、phyloptype I に分類される菌株はすべての病原型から見出されるが、特に病原型 C, D, および E に属する菌株は 1 例を除くすべてが phyloptype I であった (Table 6)。Phyloptype I はさらに biovar 3 および 4 に類別される。病原型 E の菌株はすべて biovar 3 であった。病原型 A には phyloptype I が 1 菌株含まれ、それは biovar 4 であった。その他の病原型には biovar 3 と 4 の両方が含まれていた。Biovar 4 の菌株はすべて sequevar 15 であったが、biovar 3 の sequevar は少なくとも 4 種類が識別されている (Table 6)。Phyloptype IV は、すべて biovar N2, sequevar 8, および race 3 で共通の特徴を持っていたが、4 菌株は病原型 A, 3 菌株は病原型 B, そして残り 1 菌株は病原型 C に含まれていた (Table 6)。

供試した菌株は、沖縄県、鹿児島県、および長崎県で採取されたもので、病原型 E に類別された 4 菌株はすべて長崎県で採取された。その他の病原型は複数県で採取された菌株が含まれていた (Table 7)。

考察

供試した 26 菌株は、phyloptype の違いから *R. pseudosolanacearum* (phyloptype

I) に属する 18 菌株と, *R. syzygii* (phylo type IV) に属する 8 菌株であり, これを *in vitro* 条件下で抵抗性系統 ‘西海 35 号’ と罹病性品種 ‘アイユタカ’ に接種し, 24°C および 28°C の培養条件で青枯病の発病程度を調査した結果, これらは 5 つの病原型に類別することが妥当と考えられた。

Phylo type I に属する菌株は 5 つの病原型すべてに見られたが, 主に病原型 C, D, および E に属しており, bi ovar および sequevar においても多様性が見られた (Horita et al. 2014) (Table 5)。一方, Phylo type IV に属する菌株は病原型 D と E にはなく, また, DNA 指紋解析で同一の DNA 型であり (Horita et al. 2010), 宿主範囲もより限定されることから (Suga et al. 2013), phylo type I と比較して遺伝的多様性が低いと考えられる。

パレイショ品種系統に対する RSSC の病原力は, 同じ bi ovar や phylo type でも菌株によって病原力が異なることがあり (French and De Lindo 1982; Katayama and Ki mura 1987; Tung et al. 1990), 本研究でも同様に, 病原型は phylo type や sequevar の違いと完全に一致することはなかった。パレイショとゲノムの相同性が高いトマトでは (Fr ary et al. 2016), 青枯病抵抗性に関する 2 つの主要な QTL (*Bwr-6* と *Bwr-12*) が検出され, 第 6 番染色体に座乗する *Bwr-6* は phylo type I と II の両方に対して幅広い抵抗性を付与するが, 第 12 番染色体に座乗する *Bwr-12* は phylo type I のみに抵抗性を付与する (Wang et al. 2013; Shi net al. 2020)。同一の phylo type であっても, パレイショ品種系統によっては異なる病原性が報告されている (Suga et al. 2013)。Suga et al. (2013) によって, ‘西海 35 号’ は phylo type IV 株に罹病性であると報告されているが, 本研究では病原型 A の phylo type IV 株に対して 28°C で培養すると 3 菌株で $DI > 2.0$ となり罹病性となるが, 病原型 B の phylo type IV 株に対してはいずれの培養温度でも $DI < 2.0$ であり抵抗性を示した (Table

6)．‘西海35号’は、phylo type I とIVが混在する圃場で選抜された系統であることから、phylo type IV は病原型 B に属するものであった可能性が考えられた。

以上に述べたように、バレイシヨの青枯病抵抗性育種における接種菌株は、単純な分類 (phylo type や bio var) だけではなく、病原型による識別が重要であると考えられる。また、菌株の病原性は宿主となる品種系統によって異なり、同一菌株を異なる品種に接種した場合、病原型が変化する可能性がある。したがって、菌株の病原型を決めるためには、広く普及しているような品種、または主要な交配母本である抵抗性品種系統を基準宿主とし、*in vitro* 検定を用いて、複数の温度で評価を行うことが肝要である。一方で、抵抗性系統の選抜にあたっては、対象地域において発生している菌株の病原型を的確に把握することが重要であると考えられる。例えば、病原型 E に属する菌株は長崎県でのみ採取され、低温では‘西海35号’であっても発病し秋作では発病期間が長くなると考えられる。このような地域では、病原型 E に属する菌株を接種源として抵抗性系統を選抜することが望まれる。

Table 5 The *Ralstonia solanacearum* species complex strains used in this study

Strain ^a	Phylotype	Biovar	Sequevar	Race
MAFF327048	I	3	14	1
MAFF327049	I	3	14	1
MAFF327052	I	3	-	1
MAFF327054	I	3	14	1
MAFF327062	I	3	44	1
MAFF327065	I	3	17	1
MAFF327120	I	3	13	1
MAFF327121	I	3	13	1
MAFF327133	I	3	-	1
MAFF327142	I	3	13	1
MAFF327001	I	4	15	1
MAFF327051	I	4	15	1
MAFF327086	I	4	15	1
MAFF327100	I	4	15	1
MAFF327105	I	4	15	1
MAFF327113	I	4	15	1
MAFF327128	I	4	15	1
MAFF327139	I	4	15	1
MAFF327032	IV	N2	8	3
MAFF327040	IV	N2	8	3
MAFF327056	IV	N2	8	3
MAFF327087	IV	N2	8	3
MAFF327088	IV	N2	8	3
MAFF327095	IV	N2	8	3
MAFF327135	IV	N2	8	3
MAFF327136	IV	N2	8	3

^aProvided by Horita and Tsuchiya (2012)

Table 6 Pathotypes identified by nonhierarchical clustering of disease indices in bacterial wilt-resistant (Saikai 35) and susceptible (Aiyutaka) potatoes inoculated with various strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex and incubated at 24°C and 28°C

Strain	Disease index ^a				ANOVA ^b			Patho- type ^c	Previous classification ^d			
	24 °C		28 °C		Geno- type	Temp.	Inter- action		Phylo- type	Biovar	Sequevar	Race
	Saikai 35	Aiyutaka	Saikai 35	Aiyutaka								
MAFF327001	0.23 ± 0.08*	0.73 ± 0.23	0.83 ± 0.14*	3.33 ± 0.13	*	*	*	A	I	4	15	1
MAFF327040	0.13 ± 0.06	0.50 ± 0.22	2.10 ± 0.29*	3.30 ± 0.23	*	*		A	IV	N2	8	3
MAFF327088	0.37 ± 0.11	0.40 ± 0.11	2.40 ± 0.27	2.59 ± 0.29		*		A	IV	N2	8	3
MAFF327095	0.33 ± 0.11	0.30 ± 0.10	1.24 ± 0.27*	2.60 ± 0.26	*	*	*	A	IV	N2	8	3
MAFF327136	0.43 ± 0.09*	0.77 ± 0.11	2.40 ± 0.24*	3.43 ± 0.15	*	*		A	IV	N2	8	3
MAFF327048	1.13 ± 0.14*	2.40 ± 0.18	0.97 ± 0.15*	1.57 ± 0.22	*	*		B	I	3	14	1
MAFF327051	0.37 ± 0.09*	0.87 ± 0.13	0.27 ± 0.08*	1.60 ± 0.09	*	*	*	B	I	4	15	1
MAFF327056	0.10 ± 0.06	0.10 ± 0.06	0.70 ± 0.17	1.13 ± 0.23		*		B	IV	N2	8	3
MAFF327087	0.83 ± 0.12	0.90 ± 0.14	1.38 ± 0.32	1.10 ± 0.30				B	IV	N2	8	3
MAFF327128	0.40 ± 0.14	0.60 ± 0.16	0.33 ± 0.09*	1.87 ± 0.16	*	*	*	B	I	4	15	1
MAFF327135	0.83 ± 0.17	1.17 ± 0.17	0.57 ± 0.16	0.30 ± 0.09		*	*	B	IV	N2	8	3
MAFF327032	0.73 ± 0.10*	2.90 ± 0.15	2.73 ± 0.14	2.90 ± 0.15	*	*	*	C	IV	N2	8	3
MAFF327100	0.53 ± 0.12*	2.50 ± 0.18	2.67 ± 0.18*	3.33 ± 0.16	*	*	*	C	I	4	15	1
MAFF327113	1.27 ± 0.14*	2.80 ± 0.25	2.97 ± 0.14	2.83 ± 0.25	*	*	*	C	I	4	15	1
MAFF327120	0.80 ± 0.21*	3.27 ± 0.17	2.10 ± 0.22*	3.27 ± 0.19	*	*	*	C	I	3	13	1
MAFF327121	0.93 ± 0.17*	2.83 ± 0.21	1.43 ± 0.17*	3.17 ± 0.17	*	*		C	I	3	13	1

Table 6 continued

Strain	Disease index ^a				ANOVA ^b			Patho- type ^c	Previous classification ^d			
	24 °C		28 °C		Geno- type	Temp.	Inter- action		Phylo- type	Biovar	Sequevar	Race
	Saikai 35	Aiyutaka	Saikai 35	Aiyutaka								
MAFF327142	1.07 ± 0.13*	2.80 ± 0.22	1.76 ± 0.21*	3.73 ± 0.10	*	*		C	I	3	13	1
MAFF327065	2.03 ± 0.27*	3.27 ± 0.17	2.03 ± 0.27	2.53 ± 0.25	*			D	I	3	17	1
MAFF327086	2.43 ± 0.22*	3.07 ± 0.20	2.30 ± 0.18*	3.53 ± 0.10	*			D	I	4	15	1
MAFF327105	3.27 ± 0.22	3.53 ± 0.16	1.73 ± 0.20*	2.87 ± 0.16	*	*	*	D	I	4	15	1
MAFF327133	2.37 ± 0.19*	3.73 ± 0.14	1.23 ± 0.17*	2.97 ± 0.17	*	*		D	I	3	-	1
MAFF327139	2.17 ± 0.17*	3.43 ± 0.18	2.13 ± 0.18*	3.53 ± 0.11	*			D	I	4	15	1
MAFF327049	3.37 ± 0.16	2.40 ± 0.29*	1.13 ± 0.13*	1.76 ± 0.23		*	*	E	I	3	14	1
MAFF327052	3.53 ± 0.17	2.83 ± 0.17*	2.37 ± 0.22	2.10 ± 0.25	*	*		E	I	3	-	1
MAFF327054	2.17 ± 0.21	2.60 ± 0.16	1.30 ± 0.18*	1.97 ± 0.24	*	*		E	I	3	14	1
MAFF327062	2.80 ± 0.24	2.77 ± 0.16	1.67 ± 0.22	1.63 ± 0.21		*		E	I	3	44	1

^aMean and standard error among 29–30 individuals tested per treatment. *Significantly lower disease index by t-test ($p < 0.05$)

^bSignificant at the 0.05 level (*) by ANOVA

^cFive pathotypes identified by a nonhierarchical cluster analysis

^dProvided by Horita and Tsuchiya (2012)

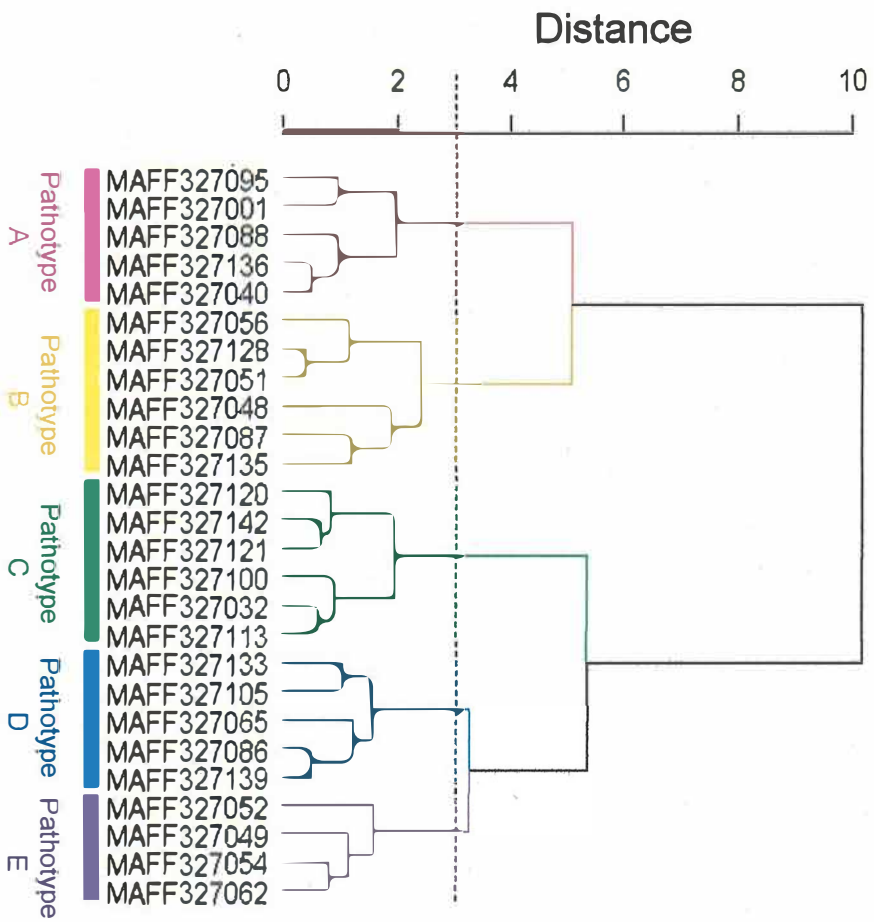


Fig. 4 Dendrogram representing hierarchical clustering of the virulence of 26 strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex on potato. Hierarchical cluster analysis was performed by Ward's method (Ward.D2) based on Euclidean distances using R and the dendrogram was drawn using R package dendextend (Galili 2015). The cluster number was determined to be five, and the dotted line indicates the five pathotype clusters.

Table 7 Collection sites and pathotypes of the *Ralstonia solanacearum* species complex strains used in this study

Strain	Collection site (city and prefecture)	Pathotype
MAFF327001	Unzen, Nagasaki	A
MAFF327040	Unzen, Nagasaki	A
MAFF327088	Tokunoshima, Kagoshima	A
MAFF327095	Kunigami, Okinawa	A
MAFF327136	Kunigami, Okinawa	A
MAFF327048	Hirado, Nagasaki	B
MAFF327051	Hirado, Nagasaki	B
MAFF327056	Hirado, Nagasaki	B
MAFF327087	Tokunoshima, Kagoshima	B
MAFF327128	Ginoza, Okinawa	B
MAFF327135	Kunigami, Okinawa	B
MAFF327032	Unzen, Nagasaki	C
MAFF327100	Ginoza, Okinawa	C
MAFF327113	Tsushima, Nagasaki	C
MAFF327120	Ginoza, Okinawa	C
MAFF327121	Ginoza, Okinawa	C
MAFF327142	Ginoza, Okinawa	C
MAFF327065	Fukue, Nagasaki	D
MAFF327086	Tokunoshima, Kagoshima	D
MAFF327105	Ginoza, Okinawa	D
MAFF327133	Kunigami, Okinawa	D
MAFF327139	Miyakojima, Okinawa	D
MAFF327049	Hirado, Nagasaki	E
MAFF327052	Hirado, Nagasaki	E
MAFF327054	Hirado, Nagasaki	E
MAFF327062	Fukue, Nagasaki	E

第3章

Ralstonia pseudosolanacearum に対するバレイシヨの青枯病 抵抗性に関する QTL 解析と QTL の集積効果

諸言

青枯病はバレイシヨ栽培で最も重要な病害の一つである (French et al. 1998)。化学農薬による土壌消毒も有効であるが、抵抗性品種の開発が青枯病の防除に最も効率的な方法である (Elphinstone 1994; Lebeau et al. 2011)。これまで、さまざまなバレイシヨ栽培種 (*S. tuberosum*, *S. phureja* など) および近縁野生種 (*S. chacoense* など) において、青枯病に対する遺伝的抵抗性が報告されている (Thurston and Lozano 1968; Sequeira and Rowe 1969; Jaworski et al. 1980; Katayama and Kimura 1987; Fock et al. 2000, 2001; Siri et al. 2009; Chen et al. 2013)。ナス科作物における青枯病抵抗性の QTL 解析は、トマト (Wang et al. 2000, 2013; Carmeille et al. 2006)、ナス (Lebeau et al. 2013)、およびタバコ (Qian et al. 2013; Lan et al. 2014) で実施されている。バレイシヨでは、*S. chacoense* と *S. tuberosum* の体細胞融合体 44 系統において、*S. chacoense* 特異的な 109 の Simple sequence repeat (SSR) マーカーを用いて、第 2 番染色体および第 9 番染色体上の 3 つの SSR 座が RSSC 株 (race 1/biovar 3) に対する抵抗性と有意に関連していることが報告された (Chen et al. 2013)。Yanping et al. (2014) は、*S. phureja* に由来する F₁ 分離集団を作成し、Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) マーカーを用いて Bulk segregant 解析を行った。その結果、3 つの抵抗性 QTL を同定したが、それらの座乗染色体は不明であった。バレイシヨは 4 倍体であるため抵抗性個体の出現率

が低く、青枯病抵抗性の遺伝様式は未だ明らかにされていない (Elphinstone 1994)。

日本では, RSSC の *R. pseudosolanacearum* (phyloptype I/biovar 4) と *R. syzygii* (phyloptype IV/biovar N2) が青枯病の主要な原因病原菌である (Katayama and Kimura 1984; Horita and Tsuchiya 2001; Horita et al. 2010)。この 2 つの phyloptype はバレイショ栽培圃場において異なる時期や場所で確認されており, phyloptype I は, 主に日本の暖地において 9 月から 10 月の高温期に検出され (Katayama and Kimura 1984; 片山・木村 1986; Horita et al. 2010), phyloptype IV よりも大きな被害を及ぼす (片山・木村 1986)。

‘西海 35 号’ はジャガイモシストセンチュウ (*HI*) およびジャガイモ Y ウイルス (*Ry_{chc}*) に対する抵抗性遺伝子を持つだけでなく, 高い青枯病抵抗性を示す 4 倍体育種系統である (Mori et al. 2012)。本研究では, ‘西海 35 号’ の *R. pseudosolanacearum* (phyloptype I) に対する青枯病抵抗性遺伝子を明らかにしようとした。4 倍体の *S. tuberosum* はヘテロ接合性が高く, しかも諸形質は二重還元 (double reduction) の影響を受ける四染色体遺伝 (tetrasomic inheritance) に従い, 二染色体遺伝 (disomic inheritance) に比べ雑種後代において複雑な遺伝的分離を示す (Hawkes 1990)。このため, 2 倍体バレイショを用いた遺伝学的解析は, 4 倍体バレイショよりも効率的であり, 潜性遺伝子はより少ない個体数で検出することができる (Peloquin et al. 1990; Ortiz and Peloquin 1994)。そこで本研究では, ‘西海 35 号’ から 2 倍性半数体を誘導し, その抵抗性系統を用いて 2 倍体の分離集団を作成した。そして, ゲノムを網羅する SNP マーカーを用いて, 密度の高い遺伝地図を構築し QTL 解析を行った。

材料および方法

植物材料

青枯病に高い抵抗性を示す‘西海 35 号’は、*S. phureja*, *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* および *S. tuberosum* subsp. *andigena* に由来する 4 倍体育種系統である (Mori et al. 2012)。これに、半数体誘発系統 *S. phureja* ‘460’ (=Ivp35) の花粉を授粉することにより、単為結果によると思われる 2 倍性半数体を獲得した。このうち ‘10-03-30’ (Fig. 5) と名づけられた系統は、長崎県農林技術開発センターでの 3 作にわたる青枯病汚染圃場での圃場評価と *in vitro* 接種検定で、‘西海 35 号’と同程度の高い青枯病抵抗性を示した。これを抵抗性親 (Resistant parent, 以下, RP) とし、罹病性 2 倍体系統 ‘F₁-1’ (Susceptible parent, 以下, SP) を花粉親として F₁ 種子を得た。‘F₁-1’ は *S. chacoense* ‘chc525-3’ と *S. phureja* ‘1.22’ の種間雑種系統である (Hosaka and Hanneman 1998)。得られた F₁ 種子を MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) で試験管内培養し、94 系統からなる F₁ 集団を作出し本研究に用いた。

接種および抵抗性評価

F₁ 植物の抵抗性評価には、第 1 章の記載に従い *in vitro* 接種検定を用いた。接種菌株は *R. pseudosolanacearum* の MAFF327001 株 (phyloptype I/biovar 4/race 1/病原型 A) (Horita et al. 2010; Suga et al. 2013) を使用した。Phyloptype I はアジアに広く分布している (Fegan and Prior 2005) もので、本菌株は日本で最も青枯病菌の発生頻度が高い長崎県で栽培されたバレイショから単離されたものである。接種は、第 1 章と同様に行い、接種後の培養温度は 28°C とした。各供試系統につき 10 個の植物体を 1 つの反復として供試し、3 反復を実験に供した。抵抗性の程度は、接種後 20 日目に、茎の萎凋の程度を

第 1 章と同様に、0~4 スケールで測定し、3 反復の平均 DI を求めた (Fig. 6)。

SNP 遺伝子型の取得

F₁ 植物の培養植物体から約 100 mg の新鮮葉を採取し、CTAB-LiCl 法 (Sul and Korban 1996) を用いて全 DNA を抽出した。DNA 濃度は Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) により測定した。各サンプルの乾燥 DNA 1 µg を GeneSeek (Neogen Corporation, USA) に送り、12K potato V2 SNP array (Bali et al. 2017; da Silva et al. 2017) からデータを取得した。得られた 12,808 箇所のマイクロアレイの蛍光強度データは、GenomeStudio Polyploid Clustering Ver 1.0 (Illumina Inc., USA) を用いて、デフォルトパラメータでクラスター距離は-0.07 とし遺伝子型を推定した。その後、すべての遺伝子型が正確かどうか手作業でチェックし、不正確なデータは欠損データとして扱った。

連鎖地図の作成

得られた 12,808 個の SNP データについては、以下のように質の悪い SNP を除外した。まず、両親の遺伝子型が欠損している SNP は除外し、一方の親の遺伝子型がホモ接合型 (AA ないし BB) でもう一方の親の遺伝子型がヘテロ接合型 (AB) であり、F₁ 集団でホモ接合型とヘテロ接合型に分離する SNP が選択された。さらに、蛍光強度が低い (Norm R<0.2) ものや供試 F₁ 系統の 20%以上で欠損値となった SNP も除外した。

ヘテロ接合性の高い両親系統を交配して得られた 2 倍体集団を用いると、例えば、AB×CD の F₁ 集団では、AC, AD, BC, および BD 遺伝子型を持

つ個体が分離し、遺伝分析が複雑となる。そこで本研究では、遺伝分析を簡略化するために、一方の親でヘテロ接合型、他方の親でホモ接合型を示す SNP 座のみを用いて、供試 F₁ 集団を two-way pseudo-testcross による分離集団とみなし両親の連鎖地図を作成した (Grattapaglia and Sederoff 1994; Iwata et al. 2016)。連鎖地図は CarthaGene Ver 1.0 (de Givry et al. 2005) を用いて、Logarithm of odds (LOD) 値は 10、マーカー間の最大遺伝距離は Kosambi 関数 (Kosambi 1944) で 100 cM と設定し構築した。連鎖地図作成の過程で、対象とする SNP 座が Potato pseudomolecules (PMs) v. 4.03 (Sharma et al. 2013) と異なる染色体上に位置するものや、PMs 上にアンカリングされない場合も除外した。

QTL 解析

QTL 解析は、QTL Cartographer version 2.5 (Wang et al. 2005) の backcross mode で F₁ 集団を戻し交配集団とみなし、QTL 検出に影響するバックグラウンドノイズを軽減させるため composite interval mapping (CIM) 法を用いて実施した。解析のパラメータはモデル 6 で、ウィンドウサイズは 2 cM、'into' の確率は 0.05、'out' の確率は 0.05 とした。QTL 検出のための LOD 閾値は、1,000 回の繰り返しによる permutation test で $p < 0.05$ のレベルで算出した。QTL 解析は両親の連鎖地図のそれぞれについて行われた。連鎖地図と QTL の位置は MapChart 2.30 (Voorrips 2002) によって描かれた。

統計解析

QTL 解析を除く全ての統計解析は、R バージョン 3.3.3 の Rcmdr パッケージ (Fox 2005; R Core Team 2017) を用いて行った。分散分析 (ANOVA)

は, *in vitro* 試験で得られた 3 つの反復データを応答変数とし, 各 QTL の差を評価するために使用された。

結果

青枯病に対する抵抗性の評価

In vitro 接種試験は, 各遺伝子型につき 10 個体, 3 反復で実施した。ANOVA の結果, 3 反復の間に有意差は認められなかった ($P=0.1797$)。したがって, 3 反復の平均 DI を各遺伝子型の DI とした。RP の DI は 0.60 で, SP の DI は 2.77 であり, 抵抗性程度の大きな違いが確認された (Fig. 7)。F₁ 系統の DI は 0.17 から 3.63 の範囲にあり, RP より低い F₁ 系統や, SP より高い F₁ 系統もあった。F₁ 集団の DI は正規分布し, その平均値は 1.69 であった (Fig. 7)。

連鎖地図の作成

得られた 12,808 個の SNP から不明瞭な SNP を除き, さらに RP と SP の間で多型を示す 4,139 個の SNP を選定し遺伝地図を作成した。RP では SNP 座がヘテロ接合 (AB 遺伝子型) であったが, SP ではこれらの SNP はホモ接合 (AA ないし BB 遺伝子型) で, F₁ 集団内で AA (SP 型) および AB (RP 型) 遺伝子型, ないし F₁ 集団内で BB (SP 型) および AB (RP 型) 遺伝子型に分離していた 1,476 個の SNP を RP の連鎖地図作成に用いた。連鎖解析の結果, これらの SNP 座は 12 本の RP 染色体を網羅する 422 遺伝子座にマッピングされた (Table 8)。以下, このマップを RP マップと呼ぶ。SP の連鎖地図は, SP においてヘテロ接合型, RP ではホモ接合型で, F₁ 集団内で RP ホモ接合型と SP ヘテロ接合型に分離する 2,663 個の SNP を用いて作成され

た。これらの SNP 座は、SP の染色体 12 本上の 475 カ所にマッピングされた。RP マップの全長は 981.2 cM で、SP マップの全長は 829.4 cM であった。SNP 座間の平均距離は、RP マップが 2.33 cM で、SP マップが 1.75 cM であった。

QTL 解析

F₁ 集団の各系統における DI に対して、RP マップと SP マップを用いて QTL 解析を行った。1,000 回の permutation test によると、5%有意水準での LOD 閾値は RP マップでは 2.87 であり、SP マップでは 2.80 であった。これらの閾値において、CIM 法を行ったところ、第 1, 3, 7, 10, および 11 番染色体上にそれぞれ 1 つの QTL (*qBWR-1*, *qBWR-2*, *qBWR-3*, *qBWR-4*, および *qBWR-5*) を検出した (Table 9, Fig. 8)。最も高い効果を示した QTL は RP 連鎖地図上で検出された *qBWR-3* で、寄与率は 18.4%であった。*qBWR-3* の最大 LOD 値に最も近い SNP 座 (solcap_snp_c2_4555) では、RP 遺伝子型を持つ系統と SP 遺伝子型を持つ系統の平均 DI はそれぞれ 1.40 と 2.01 となり RP 遺伝子型で有意に抵抗性程度が高くなった。他の 4 つの QTL は SP マップ上に検出された。これらの QTL の最大 LOD 値は 3.26 から 5.54 で、寄与率は 9.3%から 15.6%の範囲であった。最大 LOD 値に最も近い SNP 座における RP 遺伝子型系統と SP 遺伝子型系統の平均 DI は、*qBWR-1* の SNP (solcap_snp_c2_37816) を除き、5%水準で有意差が認められた (Table 9)。

検出されたすべての QTL を要因とした ANOVA では、各 QTL の効果だけでなく、*qBWR-1*, *qBWR-3*, および *qBWR-5* の相互作用も有意となった (Table 10)。すなわち、*qBWR-1* は、*qBWR-3* と *qBWR-5* の両方が抵抗性遺伝子型の場合にのみ抵抗性効果を示し ($p < 0.10$), *qBWR-3* または *qBWR-5* のいずれか

が罹病性遺伝子型である場合は抵抗性効果を示さなかった (Table 11)。また、*qBWR-1* および *qBWR-5* が抵抗性遺伝子型の場合でも、*qBWR-3* が罹病性遺伝子型であれば有意な抵抗性効果が確認されなかった。したがって、*qBWR-1* が *qBWR-3* と *qBWR-5* の両方に対してエピスタティックな効果を示すことが明らかになった。

F₁ 集団において、抵抗性 QTL を全く持たない F₁ 系統の平均 DI は 2.83、QTL が 1 つのものでは 2.41、2 つのものでは 2.13、3 つのものでは 1.54、4 つのものでは 1.17、そして QTL が 5 つのものでは 0.43 となり、個体中の抵抗性 QTL の数が集積されるにつれて平均 DI は低下した。(Fig. 7)。

考察

RP と SP の F₁ 集団では、青枯病抵抗性は量的形質と認められ (Fig. 7)、これは過去の報告 (Rowe and Sequeira 1970; Katayama and Kimura 1987; Tung et al 1990a, 1990b; Watanabe et al 1992, 1999a, 1999b) と一致する。CIM 法による QTL 解析の結果、5 つの抵抗性 QTL (*qBWR-1*, *qBWR-2*, *qBWR-3*, *qBWR-4*, および *qBWR-5*) が検出された (Table 9, Fig. 8)。このうち *qBWR-1*, *qBWR-2*, *qBWR-4*, および *qBWR-5* は SP マップで検出されたことから、SP 親でヘテロ接合型であり RP 親でホモ接合型であったことになる。一方、*qBWR-3* は RP マップで検出されたことから RP 親でヘテロ接合型であり SP 親でホモ接合型であったことになる。また、*qBWR-2*, *qBWR-3*, および *qBWR-4* においては RP 型遺伝子型が SP 型遺伝子型よりも抵抗性程度が高く、*qBWR-1* と *qBWR-5* では SP 型遺伝子型の方が高い抵抗性を示した。したがって、*qBWR-2* と *qBWR-4* は潜性遺伝を示す QTL と考えられ、RP 親は潜性ホモ接合型であり、SP 親はヘテロ接合型、その雑種では抵抗性を示す潜性ホモ接

合型と罹病性を示すヘテロ接合型が分離したと考えられる。一方, *qBWR-1*, *qBWR-3*, および *qBWR-5* については顕性遺伝子が関わる QTL と考えられる (Table 9)。

SP マップで検出された顕性 QTL である *qBWR-1* および *qBWR-5* (第 1 番染色体および第 11 番染色体) は, SP の両親系統である *S. chacoense* ‘chc525-3’ または *S. phureja* ‘1.22’ のいずれかに由来するものと考えられる。一方, RP マップで検出された顕性 QTL である *qBWR-3*, および潜性 QTL である *qBWR-2* と *qBWR-4* は, RP の親系統である *S. phureja*, *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* ないし *S. tuberosum* subsp. *andigena* に由来するものと考えられる。*S. tuberosum* subsp. *tuberosum* の抵抗性は潜性抵抗性遺伝子が関わっており (片山・木村 1987), 耐暑性とも関連していることが示唆されている (Tung et al. 1990a; Watanabe et al. 1999b)。一方, *S. chacoense* と *S. phureja* は, 青枯病抵抗性の供給源として多く利用されてきている (French et al. 1998; Chen et al. 2013)。*S. phureja* は 3 つの主要な青枯病抵抗性遺伝子を持つと報告され (Rowe and Sequeira 1970), *S. chacoense* 由来の青枯病抵抗性遺伝子については第 2 番と第 9 番染色体上にあると報告されている (Chen et al. 2013)。QTL の座乗染色体が異なるのは, 本研究で用いた *S. chacoense* の系統や RSSC の biovar が異なるためと考えられる。したがって, 現時点で本研究で検出された青枯病抵抗性 QTL の由来を明らかにすることは困難である。ただ, 抵抗性反応の全てが RP に由来すると仮定すると, RP は抵抗性を促進する QTL を 3 つ, 抵抗性を抑制する QTL を 2 つ持っていたことになる。しかし, F₁ 集団の中には SP よりも罹病性が高いものや RP よりも抵抗性が高い系統があることを考えると (Fig. 7), 両方の親に抵抗性遺伝子が存在すると考える方がより妥当であると思われる。

本研究で検出された QTL は寄与率 9.3~18.4%を示し、単独で大きな影響を与える QTL は検出されなかった。しかし、5つの抵抗性 QTL を全て持つ F₁ 系統の平均 DI は 0.43 を示し、RP (DI=0.60) よりも抵抗性が高かった (Fig. 7)。バレイショ集団の青枯病抵抗性は、異なる由来の抵抗性を集積することで向上する可能性があり (Tung et al. 1990a)、本研究でも明らかとなった。また、QTL 間の相互作用は、青枯病抵抗性の向上に寄与していた (Table 10)。Tung et al. (1990a) は、交配親の組み合わせによる効果が青枯病に対する抵抗性に影響を及ぼすことを示唆しているが、本研究で示唆された QTL 間の遺伝的相互作用もその一つと考えられる。

qBWR-2 の最近傍に座乗している SNP は *solcap_c2_50637* (Chromosome 3, 15.0 cM) で *CLAVATA1* 遺伝子 (*CLV1*; PGSC0003DMG400016685) に存在する SNP である (Fig. 8)。*CLV1* は、シュートおよび根端分裂組織における幹細胞の恒常性の制御に重要な役割を担っており (Clark et al. 1993, 1997; Stahl et al. 2013)、シロイヌナズナでは、*CLV1* が青枯病に対する抵抗性を高めることが明らかになった (Hanemian et al. 2016)。また、ピーナッツで単離された *CLV1* をタバコで過剰に発現させると青枯病抵抗性が向上した (Zhang et al. 2019)。したがって、*CLV1* と *qBWR-2* は何らかの関係性が存在するものと推察される。トマトとバレイショのゲノムは非常に高いシンテニーを持つ近縁作物である (Tanksley et al. 1992)。トマトでは、RSSC の *R. pseudosolanacearum* (phylotype I) 株と *R. solanacearum* (phylotype II) 株に対する抵抗性について、第 6 番染色体上の *Bwr-6* と第 12 番染色体上の *Bwr-12* と 2 つの主働 QTL が同定されている (Carneille et al. 2006; Wang et al. 2013)。本研究で検出された第 1, 3, 7, 10, および 11 番染色体上の QTL は、トマトの QTL とは異なる QTL であることが明らかとなった。バレイショと

トマトでは、共通に抵抗性遺伝子が集積しているホットスポット領域（ないしクラスター）が第 5 番染色体（2 つのホットスポット）、9 番、11 番、および 12 番に存在することが知られている（Gebhardt and Valkonen 2001）。*qBWR-5* は、ジャガイモがんしゅ病菌抵抗性（*Sen1*; Obidiegwu et al. 2015）、ジャガイモ Y ウィルス抵抗性（*Ryadg*; Hämäläinen et al. 1997）、およびジャガイモシロシストセンチュウ（*Globodera pallida*）抵抗性（*GpaX1^{tar}*; Tan et al. 2009）遺伝子が座乗する第 11 番染色体の抵抗性遺伝子クラスターないしその近傍に同定された。他の 4 つの QTL は、いわゆる抵抗性遺伝子クラスターとは異なるものの、*qBWR-1* はジャガイモがんしゅ病菌抵抗性遺伝子（*Rse1b*; Obidiegwu et al. 2015）の近傍に、*qBWR-2* と *qBWR-3* はジャガイモシロシストセンチュウ（*Globodera rostochiensis*）に対する抵抗性 QTL（*Grol.4* と *Grol*; Barone et al. 1990; Kreike et al. 1996）の近傍に位置した。バレイショにおいて病害虫に対する抵抗性遺伝子はクラスターとして染色体上に座乗していることが報告されており（Gebhardt 2013）、本研究で新たに検出した QTL は新奇の抵抗性遺伝子クラスターを形成する可能性が示唆された。

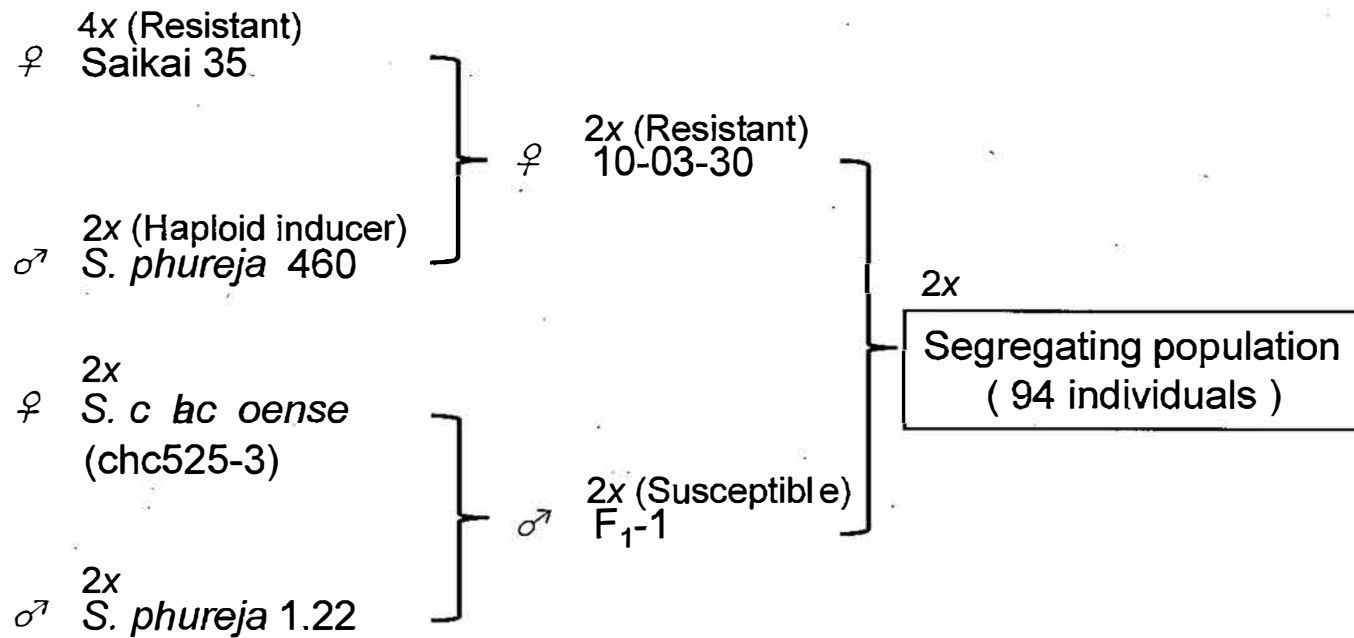


Fig. 5 The pedigree of the segregating F₁ population

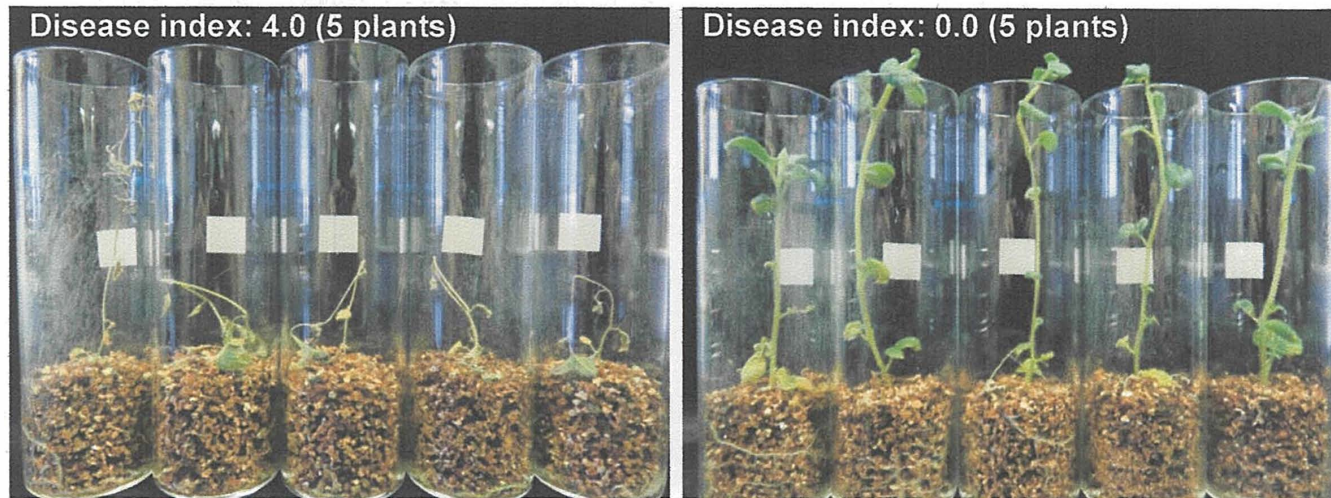


Fig. 6 Plants with the disease index score 0 (no symptom) and score 4 (76–100% wilted) in the *in vitro* potato resistance assay for the *Ralstonia solanacearum* species complex. Caps were removed for photography.

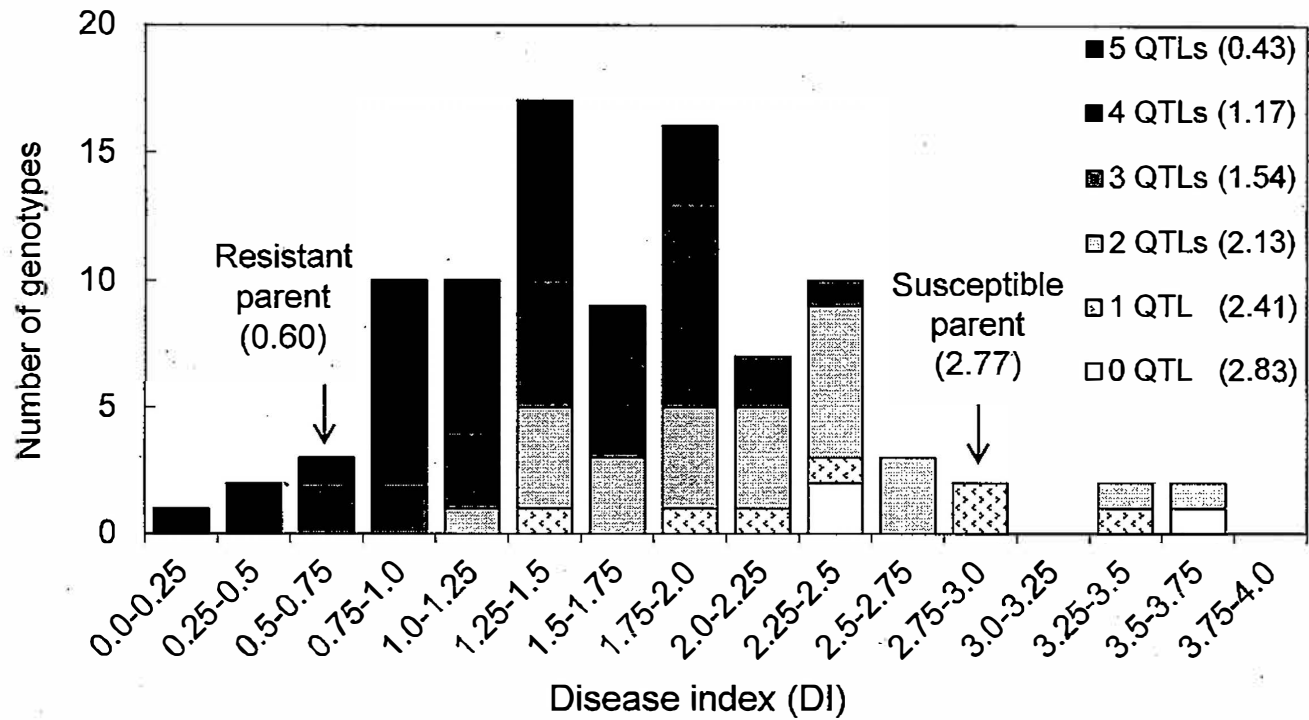


Fig. 7 Distribution of the disease indices (DIs) after inoculation with the *Ralstonia solanacearum* species complex in a segregating population, which consisted of 94 genotypes from the cross between a resistant parent (RP) and a susceptible parent (SP). The number of resistant quantitative trait loci (QTLs) possessed by each F₁ plant is represented by a color density in each bar. In the legend, mean DIs for genotypes with multiple QTLs are indicated in parentheses.

Table 8 The number of SNP markers derived from a resistant parent (RP) and a susceptible diploid parent (SP), and their number of mapped positions and map lengths

Chromosome	Genetic map of RP				Genetic map of SP				Total number of SNPs	Total number of map positions
	No. of SNPs	No. of mapped positions	Map length (cM)	Mean map distance (cM)	No. of SNPs	No. of mapped positions	Map length (cM)	Mean map distance (cM)		
1	239	47	110.5	2.35	381	57	81.3	1.43	620	104
2	50	20	83.0	4.15	324	44	79.1	1.80	374	64
3	95	26	83.6	3.22	309	39	88.0	2.26	404	65
4	135	35	90.2	2.58	163	42	69.1	1.65	298	77
5	91	28	73.7	2.63	217	37	69.6	1.88	308	65
6	107	41	73.0	1.78	186	35	59.9	1.71	293	76
7	121	34	79.3	2.33	191	39	81.0	2.08	312	73
8	118	27	70.8	2.62	111	29	50.5	1.74	229	56
9	200	65	85.0	1.31	108	38	69.4	1.83	308	103
10	77	28	77.0	2.75	179	35	62.0	1.77	256	63
11	136	36	68.9	1.91	238	30	58.8	1.96	374	66
12	107	35	86.2	2.46	256	50	60.7	1.21	363	85
Total	1476	422	981.2	2.33	2663	475	829.4	1.75	4139	897

Table 9 QTLs for bacterial wilt resistance detected in the F₁ population of a resistant (RP) and a susceptible (SP) parent

QTL	Chr.	Map	Position (cM)	Max. LOD (cM)	Max. LOD score	Explained variance (%)	Mean disease index ± standard error at the SNP locus nearest to the max. LOD position				
							SNP	Position (cM)	RP-type genotype	SP-type genotype	<i>p</i> value ^a
<i>qBWR-1</i>	1	SP	76.8–81.2	79.1	4.09	11.0	c2_37816	79.1	1.75 ± 0.09 (<i>n</i> = 50)	1.60 ± 0.12 (<i>n</i> = 42)	0.067
<i>qBWR-2</i>	3	SP	11.8–18.0	15	5.56	15.6	c2_50637	15	1.49 ± 0.08 (<i>n</i> = 56)	1.98 ± 0.12 (<i>n</i> = 38)	<0.005
<i>qBWR-3</i>	7	RP	14.2–26.3	25.3	5.33	18.4	c2_4555	25.3	1.40 ± 0.11 (<i>n</i> = 46)	2.01 ± 0.11 (<i>n</i> = 45)	<0.001
<i>qBWR-4</i>	10	SP	6.6–11.9	8.8	5.54	15.5	c2_32779	8.8	1.46 ± 0.08 (<i>n</i> = 47)	1.91 ± 0.12 (<i>n</i> = 45)	0.007
<i>qBWR-5</i>	11	SP	31.6–37.0	36	3.26	9.3	c2_12333	35	2.17 ± 0.15 (<i>n</i> = 20)	1.54 ± 0.08 (<i>n</i> = 72)	<0.001

^aMann-Whitney *U* test performed between RP- and SP-type genotypes

Table 10 Analysis of variance (ANOVA) representing a significant interaction among three QTLs

QTL	df	F value	<i>p</i> value
<i>qBWR-1</i>	1	12.87	<0.001
<i>qBWR-2</i>	1	22.88	<0.001
<i>qBWR-3</i>	1	14.58	<0.001
<i>qBWR-4</i>	1	20.01	<0.001
<i>qBWR-5</i>	1	17.69	<0.001
<i>qBWR-1</i> × <i>qBWR-3</i> × <i>qBWR-5</i>	1	3.97	0.047

Table 11 Interaction among three quantitative trait loci (QTLs) (*qBWR-1*, *qBWR-3*, and *qBWR-5*)

<i>qBWR-3</i> (c2_4555)	<i>qBWR-5</i> (c2_12333)	<i>qBWR-1</i> (c2_37816) ^a		<i>P</i> value ^b
		SP type (resistant)	RP type (susceptible)	
RP type (resistant)	SP type (resistant)	1.12±0.10 (n=15)	1.35±0.11 (n=21)	0.072
	RP type (susceptible)	1.76±0.16 (n=5)	2.01±0.26 (n=3)	0.653
SP type (susceptible)	SP type (resistant)	1.79±0.24 (n=14)	1.91±0.09 (n=18)	0.143
	RP type (susceptible)	2.47±0.32 (n=6)	2.28±0.35 (n=6)	0.748

^aMean disease indices and the number of individuals without missing data for the three SNP markers

^bMann-Whitney *U* test was performed on the mean disease indices between resistant parent (RP)-type and susceptible parent (SP)-type genotypes.

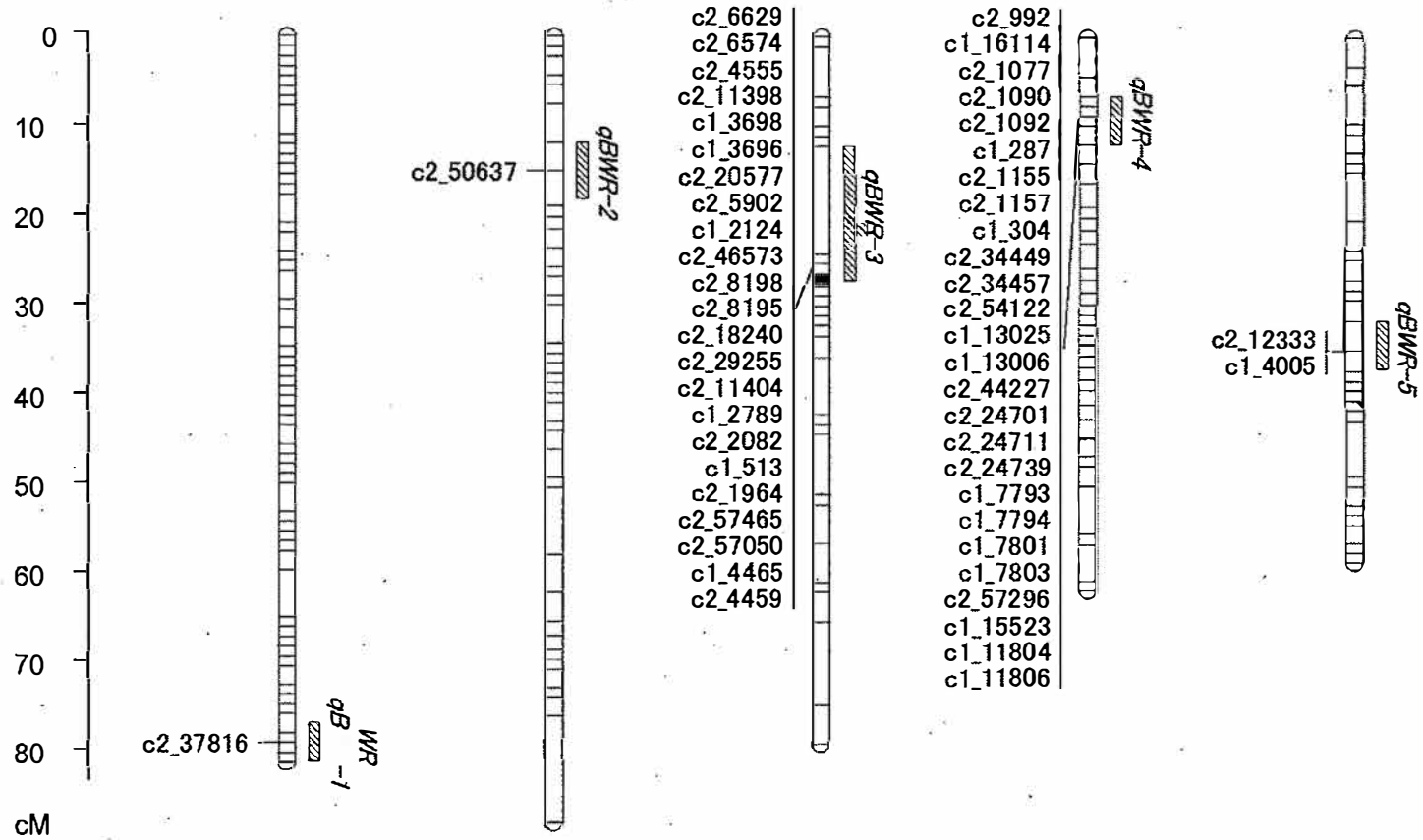


Fig. 8 Five quantitative trait loci (QTLs) detected on susceptible parent (SP) chromosome 1 (*qBWR-1*), SP chromosome 3 (*qBWR-2*), resistant parent (RP) chromosome 7 (*qBWR-3*), SP chromosome 10 (*qBWR-4*), and SP chromosome 11 (*qBWR-5*). The shaded boxes indicate QTL regions, and the nearest SNPs are represented. The order of the markers located at the same position follows that of the physical position in Potato pseudomolecules v. 4.03 (Sharma et al. 2013).

第 4 章

Ralstonia pseudosolanacearum および *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* による青枯病に対するバレイショにおける抵抗性の QTL 解析と QTL の特性評価

諸言

青枯病の防除対策としては、抵抗性品種の利用が費用対効果で優れており、環境にも優しいが、青枯病抵抗性を付与する QTL はほとんど特定されていない (Laferriere et al. 1999; Patil et al. 2012)。一方で、青枯病抵抗性系統は栽培 2 倍体種や近縁野生種で見つかっている (Laferriere et al. 1999; Fock et al. 2001; Kim-Lee et al. 2005; Carputo et al. 2009; Chen et al. 2013; Andino et al. 2022)。そして、2 倍体栽培種 *S. phureja* は、青枯病抵抗性の供給源として多用されてきた (Thurston and Lozano 1968; Sequeira and Rowe 1969; French and De Lindo 1982; Watanabe et al. 1992; French et al. 1998; Fock et al. 2000; Lopes et al. 2021)。*S. phureja* 由来の育成系統‘西海 35 号’は高い青枯病抵抗性を有し (Mori et al. 2012)、その後代として、青枯病強度抵抗性品種‘ながさき黄金’が育成されている (Sakamoto et al. 2017)。

青枯病抵抗性は複数の遺伝子によって制御されている (Rowe and Sequeira 1970; Sequeira 1979; Elphinstone 1994)。トマト品種‘Hawaii 7996’では、2 つの主働 QTL である *Bwr-12* と *Bwr-6*、およびいくつかの微働 QTL が同定された。*Bwr-12* は *R. pseudosolanacearum* (phylotype I) に対して特異的抵抗性を、*Bwr-6* は *R. pseudosolanacearum* (phylotype I) と *R. solanacearum* (phylotype II) の両方に対する広範な抵抗性を与える (Thoquet et al. 1996a,

1996b; Wang et al. 2000, 2013; Carmeille et al. 2006)。バレイシヨでは、*S. tuberosum* と *S. chacoense* の体細胞融合系統で race 1/biovar 3 株に対する青枯病抵抗性が確認され、その抵抗性 QTL が第 2 番染色体および第 9 番染色体に同定されている (Chen et al. 2013)。しかし、バレイシヨにおいて、RSSC における異なる種の菌株に対する抵抗性 QTL の違いについては、ほとんど明らかにされていない。

前章では、*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, *S. chacoense*, *S. phureja*, および *S. tuberosum* subsp. *andigena* 由来の 2 倍体集団を用いて QTL 分析を行い、第 1, 3, 7, 10 および 11 番染色体上に phylotype I/biovar 4 株に対する抵抗性 QTL を同定した。本章では、同じ 2 倍体集団を用いて、異なる RSSC 接種株 (phylotype I と IV, および biovar 3, 4, および N2) と異なる培養温度 (24°C と 28°C) を設定して QTL 解析を実施した。これにより、異なる種の RSSC に対する抵抗性 QTL の比較および特性を明らかにしようとした。

材料および方法

植物材料

前章で述べたように、‘西海 35 号’と同程度の青枯病抵抗性を有する 2 倍体抵抗性系統 ‘10-03-30’ を抵抗性親 (RP) とし、罹病性 2 倍体系統 ‘F₁-1’ (SP) を花粉親として交配した F₁ 植物 94 系統を供試した。

接種および青枯病抵抗性評価

F₁ 集団における青枯病抵抗性を評価するために、*in vitro* 接種試験 (第 1 章で詳述) を実施した。バレイシヨから分離した RSSC 株として、*R. pseudosolanacearum* の MAFF327001 株 (phylotype I/biovar 4/病原型 A), *R.*

syzygii の MAFF327095 株 (phyloptype IV/biovar N2/病原型 A), および *R. pseudosolanacearum* の MAFF327142 株 (phyloptype I/biovar 3/病原型 C) を接種菌株とした。F₁ 植物は系統毎に 9 または 10 個体を 1 反復とし, 3 反復で接種試験を行なった。接種後の培養温度は 24°C と 28°C の 2 処理区設けて培養を行なった。抵抗性の程度は, 接種後 20 日目に, 茎の萎凋程度を第 1 章と同様に, 0~4 スケールで測定し 3 反復の平均 DI を求めた。

QTL 解析

前章で述べたように, F₁ 分離集団を two-way pseudo-testcross (Grattapaglia and Sederoff 1994) による分離集団とみなし, SNP マーカーを用いて構築された両親の連鎖地図 RP マップと SP マップを用いた (Table. 8)。QTL Cartographer version 2.5 (Wang et al. 2005) を用いて, F₁ 集団を戻し交配集団として捉え, パラメータは model 6 で window size は 2 cM とし CIM 法 (Zeng 1994) を行った。QTL 検出のための LOD 閾値は, 1,000 回の permutation test ($p < 0.01$) によって求めた。MAFF327142 株を用いた抵抗性検定では F₁ 集団の DI が正規分布様ではなく, 歪んだ分布を示したため, CIM 法では誤差率をより厳しい 1% に設定した。さらに, R ソフトウェア (R Core Team 2017) の R/qtl パッケージ (Broman et al. 2003) を用いてノンパラメトリックインターバルマッピング法を行った。ノンパラメトリックインターバルマッピング法は Kruskal-Wallis 検定 (Kruskal and Wallis 1952; Kruglyak and Lander 1995) の拡張版であり, model=np, および step=1cM と設定して関数 'scanone' を実行した。LOD 閾値は 1,000 回の permutation test ($p < 0.05$) を用いて決定された。遺伝因子位置の区間推定値は, 1.0-LOD 支持区間に対応する区間位置を計算する 'lodint' 関数を用いて計算した。また, 引数

‘expandtomarkers’により区間の上限値に最も近いマーカーを決定した。QTL解析はRPマップとSPマップのそれぞれについて行われた。連鎖地図とQTLの位置はMapChart 2.30 (Voorrips 2002) を使って描かれた。検出されたQTLはPotato Bacterial Wilt Resistanceの頭文字を取り、PBWR-「連鎖群番号」で表記した。

統計解析

QTL解析を除く全ての統計解析は、Rバージョン3.3.3 (R Core Team 2017) のRcmdrパッケージ (Fox 2005) およびEZRパッケージ (Kanda 2013) を用いて実施した。F₁集団の各処理区における表現型の相関は、Spearmanの順位相関係数を用いて推定した。各QTLに最も近いSNP座における各遺伝子型の平均DIを比較するため、Mann-Whitney U検定を行った。

結果

青枯病抵抗性の評価

F₁集団の94系統の青枯病抵抗性について、RSSCの3菌株 (phylo type I/biovar 3, phylo type I/biovar 4, および phylo type IV/biovar N2) と2つの培養温度 (24°Cまたは28°C) の組み合わせによる合計6処理条件下で評価した。RPのDIは0.00から0.73の範囲であったのに対し、SPのDIは2.00から3.47であり、すべての処理区で両親のDIに明確な差が認められた (Fig. 9)。F₁集団のDIは、すべての処理区で罹病性系統から抵抗性系統へ連続的に変異し、各処理区の平均DIは1.21から2.88の範囲にあった (Fig. 9)。また、処理間ですべて正の有意な相関が認められた ($r=0.25-0.61$, $p<0.05$) (Table 12)。28°Cでの培養はすべての株で相対的に高いDIを示した。また、

すべての処理区で SP よりも高い DI を示す系統や、RP より低い DI を示す系統が観察された。病原型により DI の分布は大きく異なり、病原型 C の MAFF327142 株 (*R. pseudosolanacearum*, biovar 3) に対する DI は温度条件間で大きく変化し、24°C では相対的に低い DI に偏った分布となったが、28°C では相対的に高い DI に偏った分布となった。一方、病原型 A の MAFF327001 株と MAFF327095 株に対する F₁ 集団の DI は正規分布様を示した。

QTL の検出

青枯病抵抗性評価における F₁ 集団の分離は、処理区により正規分布様と非正規分布様の異なる分離を示したため、各 F₁ 植物の DI について CIM 法とノンパラメトリックインターバルマッピング法の両方を実施した。CIM 法により 7 つの染色体上に 10 個の QTL (*PBWR-1a*, *PBWR-1b*, *PBWR-3*, *PBWR-5*, *PBWR-6a*, *PBWR-6b*, *PBWR-7*, *PBWR-10a*, *PBWR-10b*, および *PBWR-11*) が検出された (Table 13)。一方、ノンパラメトリックインターバルマッピング法により、3 つの染色体上に 4 つの QTL (*PBWR-3*, *PBWR-6a*, *PBWR-6b*, および *PBWR-7*) が検出され、いずれも CIM 法で検出されたものと同じ QTL であった。このうち *PBWR-6a*, *PBWR-6b*, および *PBWR-7* は CIM 法とノンパラメトリックインターバルマッピング法の両方で同じ処理区で検出された。一方、*PBWR-3* は CIM 法により 28°C の MAFF327001 株 (*R. pseudosolanacearum*, biovar 4) に対して検出され、ノンパラメトリックインターバルマッピング法では 28°C の MAFF327095 株 (*R. syzygii*, biovar N2) に対して検出された (Table 14)。これらの QTL の座乗位置を、前章で検出された QTL の座乗位置も合わせ Fig. 10 に模式的に示した。前章で検出された 5 つの QTL は本章で検出された QTL と座乗領域が一致しており、前章で

検出された *qBWR-1* (SP 第 1 番染色体の 76.8~81.2 cM の位置に座乗) は *PBWR-1b* に, *qBWR-2* (SP 第 3 番染色体の 11.8~18.0 cM) は *PBWR-3* に, *qBWR-3* (RP 第 7 番染色体の 14.2~26.3 cM) は *PBWR-7* に, *qBWR-4* (SP 第 10 番染色体の 6.6~11.9 cM) は *PBWR-10a* に, そして *qBWR-5* (SP 第 11 番染色体の 31.6~37.0 cM) は *PBWR-11* と遺伝地図上で対応していた。

検出された QTL による青枯病抵抗性への効果

各 QTL の最大 LOD 値に最も近い SNP 座における RP 型遺伝子型と SP 型遺伝子型について, その平均 DI を比較した (Table 15)。すべての QTL は, 程度の差はあるものの少なくとも 1 つ以上の菌株に対して有意な抵抗性効果を示した。*PBWR-6b* の遺伝子座は 24°C と 28°C の両方で MAFF327142 株 (*R. pseudosolanacearum*, biovar 3/病原型 C) に対してのみ非常に有意な抵抗性を示し ($p < 0.001$), 寄与率はそれぞれの培養温度条件で 40.5% および 17.6% であった (Table 13)。*PBWR-6b* は RP マップで検出されたことから, 最近傍 SNP 座における RP の遺伝子型は AB ヘテロ接合型で抵抗性を示し, SP は AA (ないし BB) ホモ接合型で罹病性であったと推定され, F₁ 集団においては RP 型遺伝子型である AB と SP 型遺伝子型である AA (ないし BB) が分離し, 前者がより低い平均 DI 値を示したことから抵抗性は RP 由来の顕性アレルによると考えられた。また, *PBWR-6a* は 28°C で, *PBWR-10b* は 24°C で MAFF327142 株に対して有意な抵抗性を示した。*PBWR-6a* は SP マップで検出されたことから, 最近傍 SNP 座における SP の遺伝子型は AB ヘテロ接合型で罹病性を示し, F₁ 集団においては SP 型遺伝子型である AB と RP 型遺伝子型である AA (ないし BB) が分離し, 前者がより低い平均 DI 値を示したことから抵抗性は SP 由来の顕性アレルによると考えられた。

PBWR-10b も同様に SP マップで検出され、F₁ 集団においては SP 型遺伝子型がより低い平均 DI 値を示したことから抵抗性は SP 由来の顕性アレルによると考えられた。*PBWR-3* は 24°C で MAFF327142 株に対する抵抗性に寄与し、*PBWR-7* は 28°C でこの菌株に対する抵抗性に寄与していた。さらに、*PBWR-3* と *PBWR-7* は、病原型 A に類別される MAFF327001 株 (*R. pseudosolanacearum*, biovar 4) と MAFF327095 株 (*R. syzygii*) に対しても両温度で抵抗性に寄与していた。そして、*PBWR-3* の抵抗性は RP 由来の潜性アレルであり、*PBWR-7* の抵抗性は RP 由来の顕性アレルと考えられた。他の 5 つの QTL (*PBWR-1a*, *PBWR1b*, *PBWR-5*, *PBWR-10a*, および *PBWR-11*) は、24°C よりも 28°C においてより抵抗性に寄与しており、その抵抗性は *PBWR-10a* のみ RP 由来の潜性アレルであり、それ以外の QTL は SP 由来の顕性アレルが寄与していると考えられた (Table 15)。

考察

RP と SP は、phyloptype I/biovar 3/病原型 C, phyloptype I/biovar 4/病原型 A, および phyloptype IV/biovar N2/病原型 A の 3 菌株に対して安定してそれぞれ抵抗性と罹病性を示した。一方、F₁ 集団の発病程度は温度条件と接種菌株の違いにより変化し、青枯病抵抗性が複数の遺伝子に制御されていることが明らかとなった。また、F₁ 集団の発病程度は 6 つの処理区間すべてで有意な正の相関があり、バレイショにおける *R. pseudosolanacearum* (phyloptype I) と *R. syzygii* (phyloptype IV) の間で病原性が類似していることが示された。これは、バレイショにおける RSSC の *R. pseudosolanacearum* (phyloptype I) と *R. syzygii* (phyloptype IV) の間、および *R. solanacearum* (phyloptype II) と *R. pseudosolanacearum* (phyloptype III) の間で病原性に差がないことを示した

過去の知見および第 2 章の結果と一致した (片山・木村 1987; 波部 2016; Sharma et al. 2021)。Suga et al. (2013)は, phylotype IV は phylotype I よりもバレイシヨに対して病原力が高いと報告しているが, トマト, ナス, およびピーマンで示唆されたように (Lebeau et al. 2011), phylotype による分類はバレイシヨへの病原力の程度に対応しないと考えられる。

本研究では, F₁ 集団の青枯病抵抗性を CIM 法およびノンパラメトリックインターバルマッピング法を用いて行い, 10 個の QTL を同定した。これらの QTL はすべて, 寄与率 10%以上を示した。このうち, 最近傍 SNP 座における SNP 遺伝子型間で多くの処理区において有意な差を示す PBWR-3 に加えて, $p < 0.001$ のレベルで有意な差を示す QTL を主要な QTL とみなすと, 5 つの主働 QTL (PBWR-3, PBWR-6a, PBWR-6b, PBWR-7, および PBWR-10b) と 5 つの微働 QTL (PBWR-1a, PBWR-1b, PBWR-5, PBWR-10a, および PBWR-11) が同定された。本研究では, 両親のどちらか一方に抵抗性アレルがヘテロ接合型として存在し, それが F₁ 集団内で分離されることによりマッピングすることができた。したがって, 両親のどちらか一方に抵抗性アレルがホモ接合型として存在していた場合, それが顕性ホモ接合型であろうと潜性ホモ接合型であろうと検出することはできない。このため本研究で同定した 10 個の QTL は, この F₁ 集団を用いて検出できる最小限の数であったと思われる。また, RP よりも抵抗性が高い F₁ 系統や, SP よりも罹病性が低い F₁ 系統も F₁ 集団内に存在していたことから, 抵抗性アレルは, 前章でも述べたように抵抗性親のみならず両方の親に由来したと考えられた。実際に, 6 つの QTL (PBWR-1a, PBWR-1b, PBWR-5, PBWR-6a, PBWR-10b, および PBWR-11) の抵抗性アレルは SP 由来であると考えられた。

5 つの主働 QTL のうち, PBWR-6a, PBWR-6b, および PBWR-10b は菌株

特異的かつ温度依存的な青枯病抵抗性を示し、*PBWR-3* と *PBWR-7* は菌株や温度に依存することなく安定した抵抗性を示した。MAFF327142 株 (*R. pseudosolanacearum*, phylotype I/biovar 3/病原型 C) に対する抵抗性は、温度依存性 QTL が主に寄与しており、RP 由来と考えられる *PBWR-6b* と SP 由来の *PBWR-10b* は 24°C でより効果的であった。F₁ 集団では、24°C では比較的低い DI を示す系統が多く、28°C では高い DI を示す系統が多く観察された (Fig. 9a, b)。これは温度依存性を示し、かつ高い寄与率を示した *PBWR-6b* の効果 (Table 13) によるものと考えられる。*S. phureja* は青枯病抵抗性の供給源としてよく知られており、その抵抗性は菌株特異的であり、かつ高温下では抵抗性が低下する傾向が報告されている (Sequeira and Rowe 1969; Sequeira 1979; Ciampi and Sequeira 1980; French and De Lindo 1982)。したがって、*PBWR-6b* は、‘西海 35 号’ の片親である ‘インカのめざめ’ の青枯病抵抗性の供給源と考えられる *S. phureja* (Mori et al. 2015) に由来すると推測される。*PBWR-6b* は 24°C で 40.5% の寄与率を示すことから (Table 13), Elphinstone (1994) は *S. phureja* の菌株特異的抵抗性は低温において単純な遺伝様式を示すと考えたのであろう。

PBWR-3 と *PBWR-7* は *R. pseudosolanacearum* と *R. syzygii* の接種菌株に依らず、低温と高温で安定した抵抗性を示した。これらの QTL は多様な環境条件下においても抵抗性に寄与する可能性が示唆され、パレイシヨにおける青枯病抵抗性品種の育成に活用することが強く期待される。トマトやナスでは、高温環境下で抵抗性を失う系統が存在することが知られている (Namisy et al. 2019; Kunwar et al. 2020)。トマトでは、QTL の *Bwr-3* と *Bwr-6* は高温でも安定しているが (Carmeille et al. 2006; Kunwar et al. 2020), *Bwr-12* は高温で劣化することが示唆されている (Kunwar et al. 2020)。実際、温度は青

枯病抵抗性を示す植物にとって宿主-病原体の相互作用や土壌中での生存に影響を与える主要な要因である (Muthoni et al. 2012, 2020)。したがって、青枯病抵抗性 QTL の検出に当たっては、本研究で行ったように、異なる温度条件下で抵抗性評価を行う必要があると考えられる。

Chen et al. (2013)は、*S. chacoense* 由来の race 1/biovar 3 の RSSC 菌株に対する青枯病抵抗性 QTL を第 2 番染色体および第 9 番染色体上に同定した。本研究で用いた SP は、*S. chacoense* と *S. phureja* の種間雑種 (Hosaka and Hanneman 1998) であるが、前章と同様に第 2 番染色体および第 9 番染色体には QTL が同定されなかった。この相違は、接種菌株の違いや *S. chacoense* の多様性 (Hawkes 1962) が原因と考えられる。

前章では、同じ F₁ 集団に対して、RSSC の MAFF327001 株 (phyloptype I/biovar 4/病原型 A) を接種し 28°C で培養した結果、第 1, 3, 7, 10, 11 番染色体上にそれぞれ *qBWR-1* (=PBWR-1b), *qBWR-2* (=PBWR-3), *qBWR-3* (=PBWR-7), *qBWR-4* (=PBWR-10a), および *qBWR-5* (=PBWR-11) が検出された。同じ条件で行った本章における結果と比較すると、第 5 番染色体上に寄与率の低い PBWR-5 が新たに検出され、PBWR-11 は検出されなかった (Table 13)。PBWR-11 は同じ病原型 A の MAFF327095 株では検出され、温度条件だけでなく、異なる菌株を接種することによりさらに多くの抵抗性 QTL を検出できる可能性があることを示唆している。しかし、このような QTL はいずれも微働 QTL であり、寄与率も低く、環境に左右されやすいことから、抵抗性育種においては主働 QTL の重要性が強調されたと考えられる。

青枯病抵抗性 QTL は、トマトでは第 3, 4, 6, 8, 10, 11 および 12 番染色体に検出され (Thoquet et al. 1996a, 1996b; Mangin et al. 1999; Wang et al.

2000, 2013; Carneille et al. 2006), ナスでは第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 および 9 番染色体で検出されている (Mimura et al. 2012; Lebeau et al. 2013; Salgon et al. 2017, 2018)。これらの染色体における物理的位置を比較すると, 菌株特異的抵抗性を示す *PBWR-6b* は, 第 6 番染色体上でトマトの QTL (*Bwr-6*) およびナスの QTL (*ERPR6*) の座乗位置と一致している可能性が高い (Fig. 11a)。しかし, *Bwr-6* と *ERPR6* はともに *R. pseudosolanacearum* (phyloptype I) と *R. solanacearum* (phyloptype II) に対する抵抗性を付与する (Carneille et al. 2006; Wang et al. 2013; Salgon et al. 2018; Shin et al. 2020) が, *PBWR-6b* は *R. pseudosolanacearum* (phyloptype I/biovar 3) にのみ抵抗性を示した。*Bwr-6* の座乗位置は接種菌株や圃場条件の違いによってわずかに変化し (Wang et al. 2013), この現象は *ERPR6* でも同様に観察された (Salgon et al. 2018)。これらの知見から, 菌株特異的な単座性抵抗性遺伝子が同じ染色体領域に集積して (Meyers et al. 1998; Andolfo et al. 2013), 表面的には *Bwr-6* や *ERPR6* が幅広い菌株に対する抵抗性遺伝子として見える可能性が考えられた (Salgon et al. 2018)。

第 3 番染色体上には, トマトの QTL (*Bwr-3*) とナスの 2 つの QTL (*ERPR3a* と *ERPR3b*) が報告されている (Thoquet et al. 1996b; Carneille et al. 2006; Wang et al. 2013; Salgon et al. 2018)。*Bwr-3* と *ERPR3b* は座乗位置が一致し, 同じ遺伝子座である可能性がある (Salgon et al. 2018)。バレイショの *PBWR-3* は *ERPR3a* と座乗位置が一致していると思われ (Fig. 11b), *PBWR-3* と同様に, *ERPR3a* は菌株非特異的で広範な菌株に抵抗性を示す QTL であることから (Salgon et al. 2018), *PBWR-3* と *ERPR3a* は同一の QTL であることが示唆される。

前章および本章で明らかにできた QTL は前述の通りバレイショの青枯病

抵抗性に関わる一部であると考えられる。*PBWR-3* や *PBWR-6b* がトマトやナスの重要な QTL と座乗位置が一致したことから類推すると、トマトの QTL である第 12 番染色体の *Bwr-12* (Wang et al. 2013), ナスの第 2 番染色体の *EBWR2* (Salgon et al. 2017), および第 9 番染色体の *EBWR9* (*ERs1*) (Lebeau et al. 2013; Salgon et al. 2017) に相当する QTL がバレイショにおいても存在する可能性が考えられる。他のナス科の QTL の情報を踏まえて、主働 QTL として機能し、かつ育種に利用しやすい顕性の QTL を探索していくことが重要と考えられる。

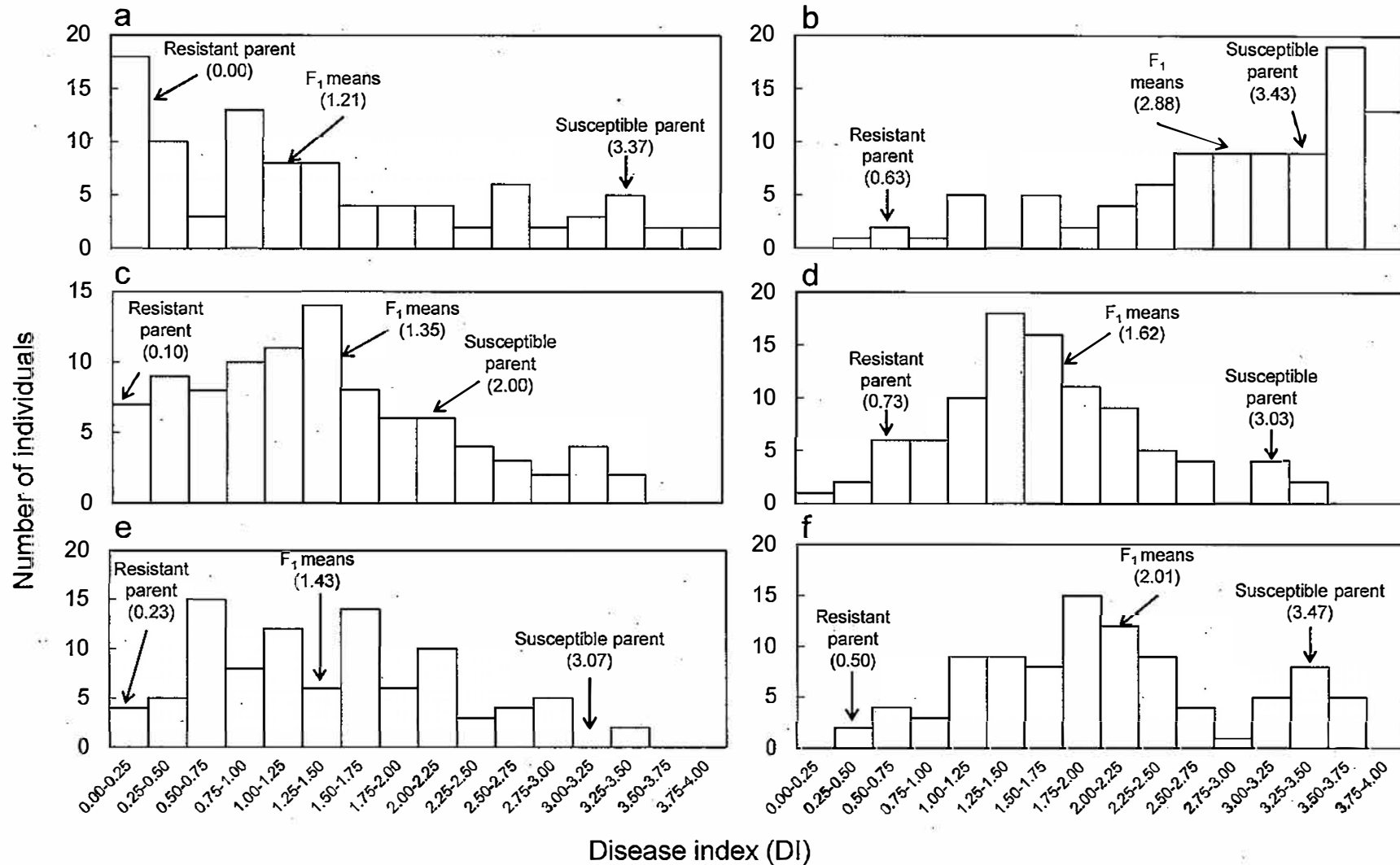


Fig. 9 The DIs in the F₁ population inoculated with *Ralstonia solanacearum* species complex strains MAFF327142 (phylotype I/biovar 3) (a, b), MAFF327001 (phylotype I/biovar 4) (c, d), or MAFF327095 (phylotype IV/biovar N2) (e, f) and incubated at 24 °C (a, c, e) or 28 °C (b, d, f)

Table 12 Spearman's rank correlation coefficients among disease indices in different trials

Trial	MAFF327142/24 °C	MAFF327142/28 °C	MAFF327001/24 °C	MAFF327001/28 °C	MAFF327095/24 °C	MAFF327095/28 °C
MAFF327142/24 °C		0.60***	0.25*	0.39***	0.33**	0.25*
MAFF327142/28 °C			0.36***	0.61***	0.36***	0.56***
MAFF327001/24 °C				0.38***	0.60***	0.51***
MAFF327001/28 °C					0.38***	0.58***
MAFF327095/24 °C						0.47***
MAFF327095/28 °C						

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Table 13 QTLs detected by a composite interval mapping (CIM) method for the resistance to different strains of the *R. solanacearum* species complex in the F₁ population

RSSC strain	Temperature	QTL ^a	Detected map	Chr.	Position (cM)	Position of maximum LOD (cM)	Maximum LOD score	Explained variance (%)
MAFF327142 (Phylotype I/ biovar 3)	24 °C	<i>PBWR-6b</i>	RP map	6	10.8–23.7	21.7	14.17	40.5
		<i>PBWR-10b</i>	SP map	10	53.2–56.6	55.6	4.32	14.5
	28 °C	<i>PBWR-6b</i>	RP map	6	13.8–23.7	21.7	5.51	17.6
		<i>PBWR-6a</i>	SP map	6	0	0	3.93	13.6
MAFF327001 (Phylotype I/ biovar 4)	24 °C	<i>PBWR-7</i>	RP map	7	12.2–27.2	25.3	6.86	20.5
	28 °C	<i>PBWR-1b</i>	SP map	1	79.0–79.1	79.1	3.83	11.4
		<i>PBWR-3</i>	SP map	3	13.8–17.0	15	4.3	13.0
		<i>PBWR-5</i>	SP map	5	54.7–55.7	54.7	3.76	11.2
		<i>PBWR-7</i>	RP map	7	15.2–27.2	25.3	6.64	21.9
	<i>PBWR-10a</i>	SP map	10	6.6–10.9	8.8	4.93	15.1	
MAFF327095 (Phylotype IV/ biovar N2)	28 °C	<i>PBWR-1a</i>	SP map	1	74.6–75.7	74.7	4.91	15.1
		<i>PBWR-7</i>	RP map	7	25.2–26.3	25.3	4.39	15.3
		<i>PBWR-11</i>	SP map	11	32.6–33.6	32.6	3.94	12.4

^a Detection threshold determined by a permutation test (1,000 permutations) at a 0.01 level

Table 14 Genetic factors detected by a nonparametric QTL mapping method for the resistance to different strains of the *R. solanacearum* species complex in the F₁ population

BW strain	Temperature	QTL ^a	Detected map	Chr.	Position (cM) ^b	Position of maximum LOD (cM)	Maximum LOD score
MAFF327142	24 °C	<i>PBWR-6b</i>	RP map	6	10.8–33.6	28	8.66
(Phylotype I/biovar 3)	28 °C	<i>PBWR-6b</i>	RP map	6	10.8–42.0	21.7	3.42
		<i>PBWR-6a</i>	SP map	6	0.0–26.4	2	2.59
MAFF327001	24 °C	<i>PBWR-7</i>	RP map	7	12.2–31.1	27.8	4.82
(Phylotype I/biovar 4)	28 °C	<i>PBWR-7</i>	RP map	7	12.2–65.5	28.9	3.17
MAFF327095	28 °C	<i>PBWR-3</i>	SP map	3	5.4–36.4	18.8	2.91
(Phylotype IV/biovar N2)							

^aDetection threshold determined by a permutation test (1,000 permutations) at a 0.05 level

^bPositions were indicated by the 1.0-LOD interval.

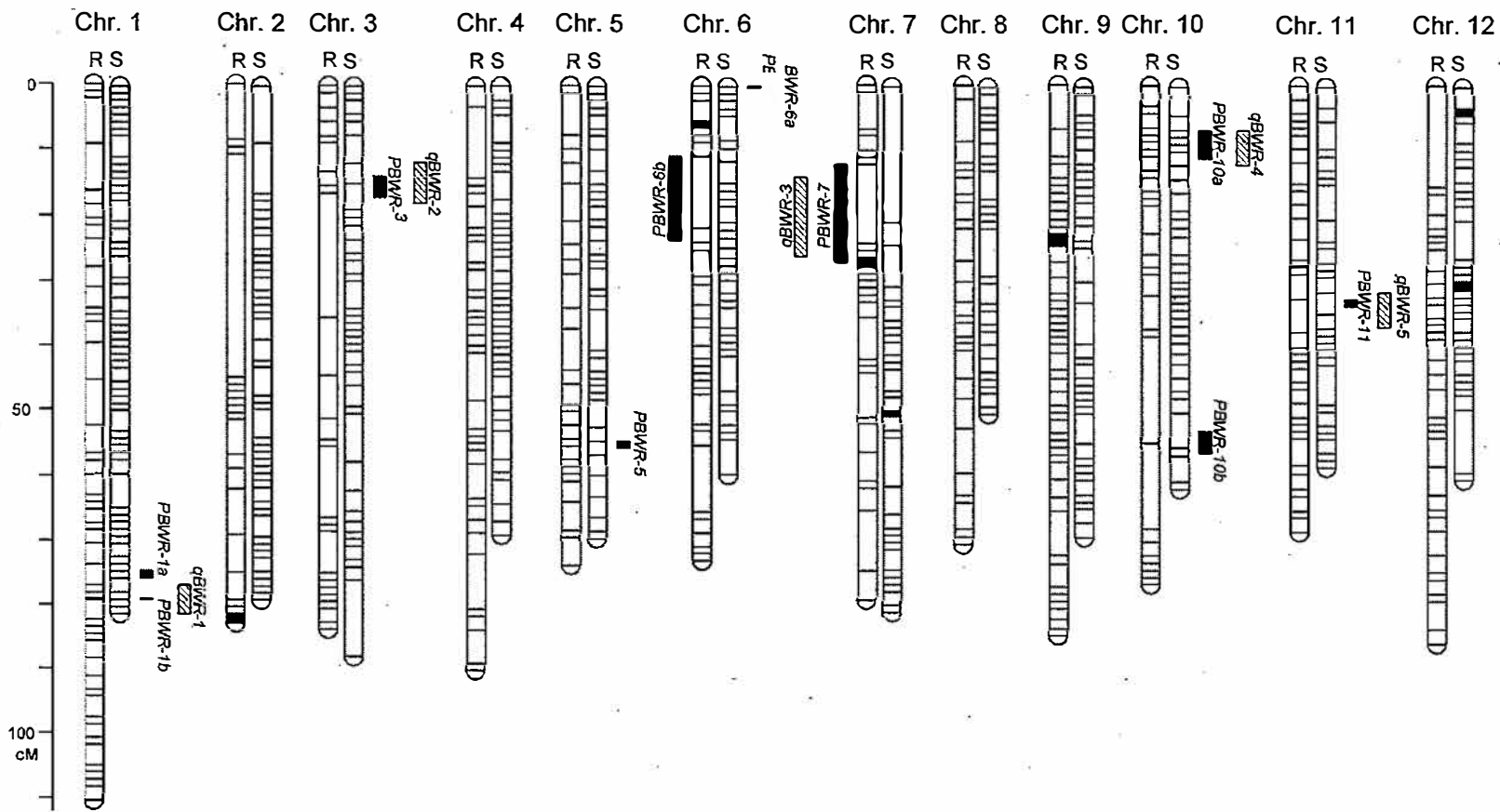


Fig. 10 Locations of the bacterial wilt resistance QTLs on SNP-based genetic maps for the resistant parent chromosomes (R) and the susceptible parent chromosomes (S). The black boxes on the genetic maps indicate the ten QTLs based on the results of the composite interval mapping in this study (Table 12). Shaded boxes indicate the five QTLs previously detected in the Chapter 3. Lines on chromosomes indicate loci on the genetic maps.

Table 15 Mean DIs in resistant parent (RP)-type genotype and susceptible parent (SP)-type genotype

QTL	SNP ^a	Mean DIs in RP-type genotype vs SP-type genotype ^b					
		MAFF327142		MAFF327001		MAFF327095	
		(Phylotype I/biovar 3/pathotype C)		(Phylotype I/biovar 4/pathotype A)		(Phylotype IV/biovar N2/pathotype A)	
		24 °C	28 °C	24 °C	28 °C	24 °C	28 °C
<i>PBWR-1a</i>	c2_4943	1.47 vs 1.25	3.07 vs 2.67*	1.40 vs 1.29	1.71 vs 1.53	1.46 vs 1.40	2.29 vs 1.69**
<i>PBWR-1b</i>	c2_37816	1.46 vs 1.19	3.05 vs 2.64*	1.41 vs 1.30	1.71 vs 1.51	1.45 vs 1.41	2.31 vs 1.68**
<i>PBWR-3</i>	c2_50637	1.10 vs 1.75**	2.76 vs 3.05	1.15 vs 1.64**	1.45 vs 1.88**	1.23 vs 1.74**	1.80 vs 2.32**
<i>PBWR-5</i>	c2_10291	1.47 vs 1.15	2.91 vs 2.83	1.44 vs 1.26	1.82 vs 1.36**	1.49 vs 1.39	2.12 vs 1.90
<i>PBWR-6a</i>	c2_55554	1.63 vs 0.98*	3.15 vs 2.48***	1.39 vs 1.29	1.74 vs 1.45*	1.55 vs 1.26	2.08 vs 1.89
<i>PBWR-6b</i>	c1_12696	0.73 vs 2.19***	2.53 vs 3.31***	1.32 vs 1.38	1.59 vs 1.68	1.46 vs 1.39	2.01 vs 1.99
<i>PBWR-7</i>	c2_4555	1.11 vs 1.57	2.56 vs 3.16**	0.98 vs 1.73***	1.31 vs 1.90***	1.23 vs 1.65**	1.74 vs 2.29**
<i>PBWR-10a</i>	c2_32779	1.45 vs 1.27	2.72 vs 3.05	1.24 vs 1.46	1.45 vs 1.80*	1.38 vs 1.49	2.00 vs 2.03
<i>PBWR-10b</i>	c2_22699	1.70 vs 0.90***	2.96 vs 2.75	1.40 vs 1.32	1.71 vs 1.51	1.41 vs 1.45	2.24 vs 1.76*
<i>PBWR-11</i>	c1_7668	1.54 vs 1.29	3.22 vs 2.77*	1.61 vs 1.27	1.93 vs 1.53*	1.77 vs 1.32*	2.47 vs 1.88**

^aSNP identity given without the prefixed identity "solcap_snp_"

^bStatistical difference tested by Mann-Whitney *U*-test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

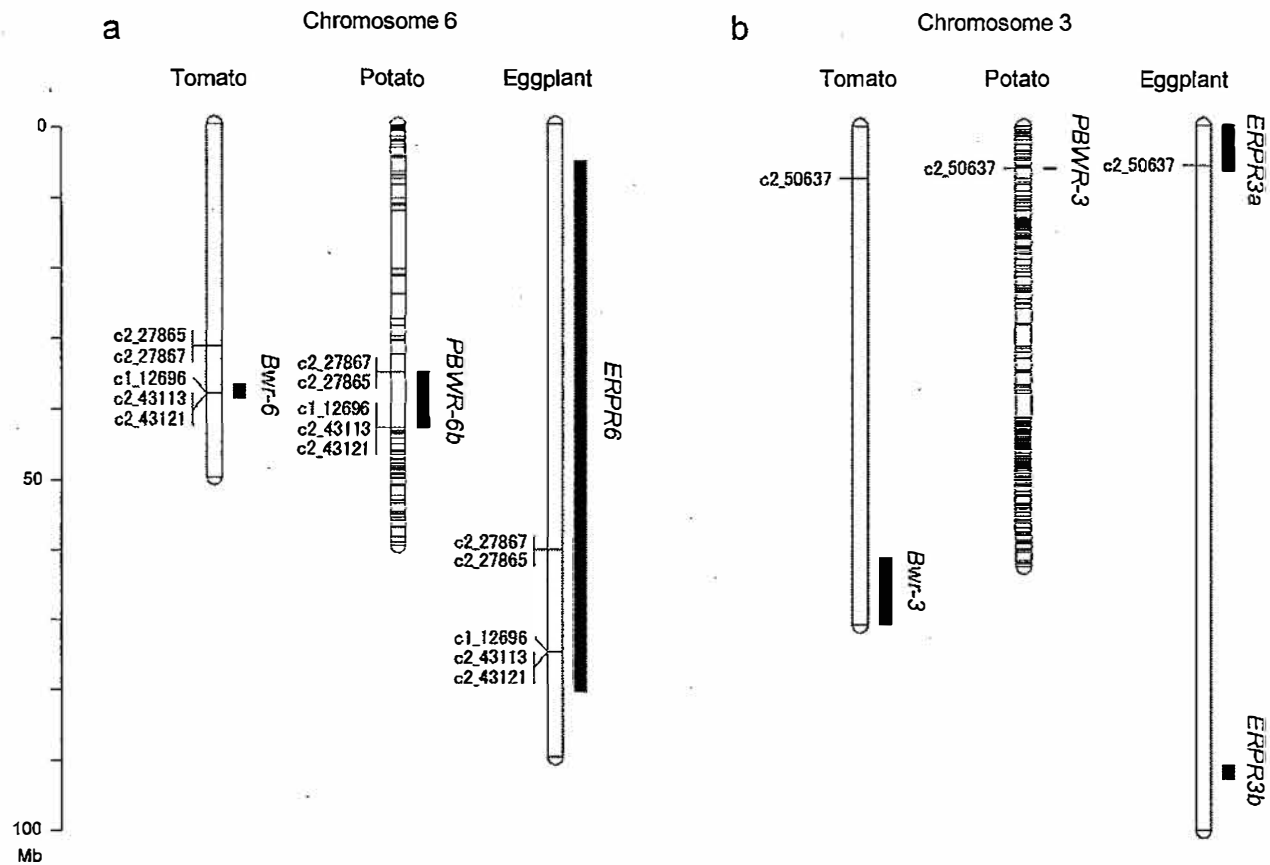


Fig. 11 Comparisons of bacterial wilt resistance QTLs among potato, tomato, and eggplant on chromosomes 6 (a) and 3 (b). SNP identity was given without the prefixed identity “solcap_snp_.” The physical positions of SNPs in the *PBWR-3* and *PBWR-6b* regions in CIM analysis are presented in the potato DM v4.03 genome (Sharma et al. 2013), the tomato SL2.50 genome (<https://solgenomics.net>), and the eggplant HQ-1315 genome (Wei et al. 2020) using the BLASTN program (Zhang et al. 2000) in the Galaxy/NAAC (<https://galaxy.dna.affrc.go.jp/>), with a cut-off value of 1×10^{-15} . The physical locations of *Bwr-3*, *Bwr-6*, *ERPR3a*, *ERPR3b*, and *ERPR6* are shown based on Salgon et al. (2018).

第5章

バレイショにおける青枯病抵抗性に関わる主働 QTL に連鎖する DNA マーカーの開発と利用

諸言

バレイショ栽培において、RSSC による青枯病の被害を軽減するために、さまざまな化学的、生物学的、耕種的管理技術が用いられているが、その有効性は限られている (Muthoni et al. 2020)。現在までのところ、この病害を防除する最も効果的な手段は、抵抗性品種の利用である (Huet 2014; Muthoni et al. 2020)。しかし、青枯病に対する抵抗性の育種は、抵抗性が複数遺伝子により支配され、RSSC は広い宿主域や多様性を持ち、さらに環境因子が病害の発現に大きく影響を及ぼすなど課題が多い (Tung et al. 1990a, 1990b; Hayward 1991; Thoquet et al. 1996b; Fegan and Prior 2005)。

国内では、2 倍体品種 ‘インカのめざめ’ が抵抗性の供給源として用いられ、青枯病に対する高い圃場抵抗性を有する育種系統 ‘西海 35 号’ が育成され、さらにこれより ‘ながさき黄金’ という品種が育成されている (Mori et al. 2012; Sakamoto et al. 2017)。前章において、*R. pseudosolanacearum* (phyloptype I/biovar 3 および phyloptype I/biovar 4) および *R. syzygii* (phyloptype IV/biovar N2) の接種菌株を用いて評価した ‘西海 35 号’ 由来の 2 倍性半数体と罹病性 2 倍体から得られた F₁ 集団において 10 個の QTL が同定された。このうち、抵抗性親に由来する最も有効な QTL は、第 6 染色体上に位置する *PBWR-6b* で、比較的低温下で phyloptype I/biovar 3/病原型 C に対する菌株特異的な抵抗性を示し、40% 以上の高い寄与率を示した。バレイショとゲノ

ムの相同性が高いトマトでは、青枯病に対する 2 つの主要な QTL が同定されており、1 つは第 6 染色体 (*Bwr-6*)、もう 1 つは第 12 染色体 (*Bwr-12*) に位置している。*Bwr-6* は、phyloptype I と II に対して、高温期から低温期にかけて広く安定した抵抗性を示す (Carmeille et al. 2006)。同様に、ナスにおいても、*R. pseudosolanacearum* (phyloptype I および III) に対する広範で安定した効果を示す QTL が第 6 染色体上に検出されている (Salgon et al. 2018)。第 6 染色体における座乗位置のわずかな違いは、異なる接種株と試験条件の差異 (Wang et al. 2013; Salgon et al. 2018) もしくは独立した QTL のクラスター化に由来する (Salgon et al. 2018) と考えられる。仮に抵抗性 QTL がクラスター化していると考えたと、*PBWR-6b* の近傍には他の重要な抵抗性 QTL が座乗している可能性も示唆され、育種上の価値が高いと考えられる。

バレイショは 4 倍体であるため、後代への形質遺伝が複雑であり、目的形質が複数遺伝子によって制御されている場合は、後代で目的形質の出現率が低下する (Watanabe 2015)。さらに、抵抗性遺伝子座はしばしば不良形質と連鎖している場合がある (Muthoni et al. 2020)。そのため、目的とする遺伝子を効率的に導入し、望ましくない遺伝子を排除するために、さまざまな DNA マーカーが開発され、品種育成を効率化するために利用されている (Gebhardt et al. 2006; Mori et al. 2011, 2015; Ramakrishnan et al. 2015)。

本章では、*PBWR-6b* に連鎖する DNA マーカーを開発するため、QTL 領域内に位置する候補遺伝子の 1 つについて配列を明らかにすることにより *PBWR-6b* のアレルを同定し、そのうち抵抗性アレルに連鎖する特異的 DNA マーカーを作成した。作成した DNA マーカーを用いて、バレイショ品種系統を調査しその存在頻度を明らかにするとともに、既存のマルチプレックス PCR 法 (Mori et al. 2011) に本マーカーを組み込み、病害虫抵抗性遺伝子型

の効率的な選抜法の確立を目指した。

材料および方法

植物材料

マーカー開発には、*PBWR-6b* の同定に用いた F_1 集団の親である RP（抵抗性 2 倍体系統 ‘10-03-30’）と SP（罹病性 2 倍体系統 ‘ F_1-1 ’）を用いた。

‘10-03-30’ は *PBWR-6b* のヘテロ接合体である（第 4 章）。 F_1 集団における ‘13A-31-38’ 系統は最も抵抗性の高い系統一つで、‘ F_1-1 ’ から受け継いだ自家不和合性阻害遺伝子 (*Sli*) (Hosaka and Hanneman 1998) の機能によって自殖が可能である。‘13A-31-38’ は *PBWR-6b* に加え、他の菌株に対しても抵抗性を示す *PBWR-3* および *PBWR-7* をヘテロ接合型として保有している。開発したマーカーの評価には、第 3 および 4 章で用いた F_1 集団（‘10-03-30’ × ‘ F_1-1 ’）94 系統と ‘13A-31-38’ の自殖により作出した F_2 集団 63 系統を供試した。さらに、開発したマーカーの 4 倍体での妥当性を検証するため、‘西海 35 号’ と ‘アイユタカ’（青枯病罹病性、第 2 章）の交配から得られた 4 倍体 F_1 集団 70 系統を供試した。

新たに開発した DNA マーカーを用いて、107 の品種および育成系統を評価した。このうち、長崎県農林技術開発センターで RSSC の *R. pseudosolanacearum* (phylo type I) および *R. syzygii* (phylo type IV) が混発した圃場で 3 作以上抵抗性程度を評価した品種系統については、Table 19 に抵抗性の程度を示した。なお、圃場での評価は同じ圃場で抵抗性標準品種として ‘ながさき黄金’ と ‘農林 1 号’ を、罹病性標準品種として ‘アイユタカ’ などを栽培し、供試品種系統の被害程度と比較することにより行われた。

塩基配列の解析

植物体の DNA は、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, The Netherlands) を用いて葉から抽出し、分光光度計 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA) を用いて定量した。標的領域は、PCR により増幅した。すべてのプライマーは Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>) を用いて設計し、その配列を Table 16 に示した。増幅反応は、10 ng の鋳型 DNA, KOD-Plus-Neo 1×PCR バッファー, 0.4 U の KOD-Plus-Neo (Toyobo, Japan), 2.0 μ l の 2 mM dNTPs, 1.2 μ l の 25 mM MgSO₄, および 0.3 pmoles のフォワードプライマーとリバースプライマーからなる総量 20 μ l で行った。PCR 増幅の反応条件は、94°C で 2 分間の後、94°C で 15 秒間、60°C で 30 秒間、68°C で 5 分間のサイクルを 35 回繰り返した後、68°C で 5 分間伸長反応を 1 サイクル行った。増幅された断片は、TOPO TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて、メーカー提供のプロトコルに従い pCR4-TOPO ベクターにクローニングした。シングルコロニーからのプラスミド DNA は、NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel, Germany) を用いて単離し、外部業者 (FASMAC, 日本) に依頼してサンガーシーケンス法により配列を決定した。増幅された配列は、GENETYX ver.15 の ClustalW Alignment (ゼネティックス, 日本) によって比較した。

抵抗性アレル特異的プライマーを用いた DNA マーカー検定

アレル特異的プライマーセット Rbw6-1 は、10 ng の鋳型 DNA, PrimeSTAR GXL DNA polymerase 1×PCR バッファー, 0.2 μ l の PrimeSTAR GXL DNA ポリメラーゼ (1.25U/ μ l) (Takara Bio, Japan), 0.8 μ l の 2.5 mM dNTP mixture, および 0.3 pmoles のプライマーを含む総量 10 μ l で PCR 反応を行った。PCR

増幅の条件は、98°Cで2分間の後、98°Cで10秒間、55°Cで15秒間、68°Cで1分間のサイクルを35回行い、最後に68°Cで5分間伸長反応を行った。次に、増幅されたPCR産物の3 µl (約100 ng) を、メーカー提供のプロトコルに従って、1 µl (10 U) の制限酵素 BtsI-v2 (New England BioLabs, USA) を加え総量10 µl で反応させた。制限酵素処理後、PCR産物は1×TAE緩衝液(40 mM Tris-acetate および1 mM EDTA) による1.4%アガロースゲルを用いて電気泳動で分離した。アレル特異的プライマーセット Rbw6-2 は、10 ng の鋳型 DNA, 5.0 µl の Ampdirect Plus (島津製作所, 日本), 0.05 µl の BIOTAQ HS DNA Polymerase (5 U/µl) (Bioline, UK), および0.3 pmoles のプライマーを含む総量10 µl でPCR反応を行った。Rbw6-2 マーカーを増幅する際、ポジティブコントロールとして顆粒性澱粉合成酵素遺伝子(GBSS, Table 17) のフォワードおよびリバースプライマーを付加した。PCR増幅の反応条件は、95°Cで10分間の後、94°Cで30秒間、57°Cで30秒間、72°Cで1分間のサイクルを35回繰り返した後、最後に72°Cで5分間伸長反応を行った。

***PBWR-6b* に連鎖する DNA マーカーを加えたマルチプレックス PCR 法**

下記の6種類のパレイショにおける病虫害抵抗性遺伝子の診断用DNAマーカーとポジティブコントロールとしてのGBSSを混合し、マルチプレックスPCRとして1つのチューブで増幅させた。

- 青枯病抵抗性 QTL である *PBWR-6b* の Rbw6-2
- ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* に連鎖する N195 (竹内ら 2008)
- ジャガイモ X ウィルス抵抗性遺伝子 *Rx1* の PVX (Ohbayashi 2019)
- 疫病抵抗性遺伝子 *RI* の R1 (Ballvora et al. 2002)

- ‘さやあかね’由来の疫病抵抗性遺伝子 R2 に連鎖する R2-800 (大林ら 2010)
- ジャガイモ Y ウィルス抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* に連鎖する Ry186 (竹内ら 2008)

PCR 増幅は、10 ng の鋳型 DNA、5.0 μ l の Ampdirect plus (島津製作所, 日本)、0.1 μ l の BIOTAQ HS DNA Polymerase (5 U/ μ l) (Bioline, UK) および Table 17 に示すプライマーを含む総量 10 μ l で行った。PCR 増幅の反応条件は、95°C で 10 分間の後、94°C で 30 秒間、68°C で 30 秒間、72°C で 1.5 分間を 5 サイクル繰り返す、その後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 1.5 分間の 35 サイクル、そして最後に 72°C で 5 分間伸長反応を行った。PCR 産物は、1×TAE バッファー (40mM Tris-acetate および 1mM EDTA) による 1.4% アガロースゲルでの電気泳動で分離した。

青枯病抵抗性の評価

抵抗性評価には、*in vitro* 接種試験 (第 1 章で詳述) を用いた。接種菌株には *R. pseudosolanacearum* の MAFF327142 株 (phylo type I/biovar 3/病原型 C) を用いて、2 倍体と 4 倍体の集団を供試した。系統毎に 9 または 10 個体を 1 反復として、3 反復を行った。なお、接種後の培養温度は 24°C に設定した。抵抗性の評価は、接種後 30 日目に、茎の萎凋程度を第 1 章と同様に、0~4 スケールで測定し 3 反復の平均 DI を求めた。

統計解析

統計解析は、2 倍体および 4 倍体 F₁ 集団 (Aa vs aa または Aaaa vs aaaa) については Welch の t 検定、2 倍体 F₂ 集団 (AA vs Aa vs aa) については一

元配置分散分析 (ANOVA) を行った後に Tucky 検定を行い、それぞれの遺伝子型の DI を評価した。R バージョン 3.3.3 のパッケージ Rcmdr (Fox 2005) および EZR (Kanda 2013) (R Core Team 2017) をこれらの解析に用いた。

結果

PGSC0003DMG40011779 領域の塩基配列の決定

PBWR-6b に含まれる SNP 座は, *solcap_snp_c1_12696*, *solcap_snp_c2_43113*, および *solcap_snp_c2_43121* の 3 つであった (第 4 章) (Fig. 12)。 *S. phureja* ‘DM v.4.03’ (Sharma et al. 2013) と *S. chacoense* ‘M6’ (Leisner et al. 2018) の全ゲノム配列を参照すると、QTL 領域内に Nucellin-like aspartic protease 遺伝子 (PGSC0003DMG400011779) が存在することが分かった。シロイヌナズナにおいて、分泌された Aspartic protease は高度に保存された細菌タンパク質を切断し、細菌である *Pseudomonas syringae* の成長を阻害する (Xia et al. 2004; Wang et al. 2019)。そして、Aspartic protease は植物体のストレス応答において重要であり、植物防御における抗菌機構の 1 つとして知られている (Figueiredo et al. 2021)。これらの理由から、本研究では、この遺伝子領域をマーカー開発の対象とした。

PGSC0003DMG400011779 は、AP11779_F2/AP11779_R1 (以下、プライマーセットはフォワードプライマー/リバースプライマーで表記する) および AP11779_F1/AP11779_R26 を用いて RP (‘10-03-30’) および SP (‘F₁-1’) の対象領域を増幅させ、pCR4-TOPO ベクターにクローニングした後、配列を決定した (Fig. 13)。その結果、それぞれ 2 種類の配列が同定された (Figs. 14, 15)。このうち ‘10-03-30’ 由来の B アレルと ‘F₁-1’ 由来の B アレルは互いに同一で、‘DM v.4.03’ の配列と高い相同性があった。‘F₁-1’ のもう

一方の C アレルは, 'M6' の配列に相同性が高かった。これは, 'F₁-1' が *S. phureja* '1.22' と, 'M6' と同等な *S. chacoense* 'chc525-3' (Hosaka and Sanetomo 2020b) との種間雑種であるためと考えられる。'10-03-30' のもう一方の A1 アレルは他の 3 つのアレルの配列とは異なっており, '10-03-30' が高い抵抗性を示すことから, このアレル配列が *PBWR-6b* と連鎖していると類推される。'10-03-30' の A1 アレルの塩基配列は, DNA Databank of Japan (DDBJ) に accession 番号 LC750324 で登録された。

抵抗性アレル特異的マーカーの開発

3 種類のアレル配列の間には, いくつかの SNP や挿入・欠失が見られた (Figs. 14, 15)。このうち, '10-03-30' の第 6 エクソンにある A1 アレルに特異的な SNP の 1 つを利用して, A1 アレルのヘテロ接合体とホモ接合体を区別するために Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) マーカーを開発した (Fig. 14)。プライマーセット AP11779_F34/AP11779_R31 を用いた PCR 反応により 3 種類のアレルは共通して 479 bp のバンドを生成したが, 制限酵素 BtsI-v2 は A1 アレル由来の PCR 産物のみを切断し, 289 bp と 190 bp のバンドとして観察された (Fig. 16)。これにより, '10-03-30' の後代において A1 アレルがヘテロ接合体 (479 bp/289+190 bp バンド) とホモ接合体 (289+190 bp バンド) を区別することができる。この CAPS マーカーを Rbw6-1 (Resistant to Bacterial Wilt) と呼ぶことにする。

A1 アレルの配列では, 9 番エクソンの下流に 20 bp の欠失が見られた (Fig. 15)。この欠失領域を標的にプライマーセット AP11779_F33/AP11779_R30 を設計したところ, A1 アレルからのみ 440 bp の断片が増幅された。この 440 bp のバンドを Rbw6-2 と呼ぶことにした (Fig. 17)。

これらのアレル特異的マーカーを用いて、2倍体 F₁ 集団（‘10-03-30’ × ‘F₁-1’）、2倍体 F₂ 集団（‘13A-31-38’の自殖）、および4倍体 F₁ 集団（‘西海 35 号’ [抵抗性] × ‘アイユタカ’ [罹病性]）を調査した（Table 18）。2倍体 F₁ 集団における Rbw6-2 の有無は、Rbw6-1 による 479 bp/289+190 bp ヘテロ接合体または 479 bp ホモ接合体、および solcap_snp_cl_12696 の遺伝子型と完全に一致した。分離比は 53:41 で、 χ^2 検定により 1:1 に適合した（ $P=0.216$ ）。ヘテロ接合 F₁ 個体である ‘13A-31-38’ を自殖させた 2倍体 F₂ 集団では、Rbw6-2 を示す 48 個体が Rbw6-1 によってホモ接合体（289+190 bp）18 個体とヘテロ接合体（479 bp/289+190 bp）30 個体に分離した。Rbw6-2 が検出されなかった 15 個体は、Rbw6-1 によってすべて 479 bp のホモ接合体となり、1:2:1 の分離比となった（ $p=0.807$ ）。したがって、Rbw6-1 と Rbw6-2 は *PBWR-6b* が座乗する ‘10-03-30’ の A1 アレルを特異的に検出できることが確認された。4倍体 F₁ 集団では、27 個体が Rbw6-2 と Rbw6-1 の 479 bp/289+190 bp バンドの両方を示し、43 個体は Rbw6-2 を欠き Rbw6-1 の 479 bp バンドのみを示した。やや歪みはあるものの、 χ^2 検定により 1:1 に適合するので（ $p=0.056$ ）、‘西海 35 号’ は A1 アレルを一重式（Aaaa）で持つと考えられる（Table 18）。

A1 アレル特異的マーカーと青枯病抵抗性の関連性

2倍体 F₁ 集団、2倍体 F₂ 集団、および4倍体 F₁ 集団について、*in vitro* 検定により、各個体の抵抗性程度を調査した（Fig. 18）。2倍体 F₁ 集団および4倍体 F₁ 集団は、抵抗性親と罹病性親の間で正規分布様の分離を示し、Rbw6-2 および Rbw6-1 の 479 bp/289+190 bp バンドを示す個体（Aa または Aaaa）は DI が低い傾向にあり、Rbw6-2 と Rbw6-1 の 289+190 bp バンドのどちら

も示さない個体 (aa または aaaa) は DI が高い傾向にあった (Fig. 18a, c)。2 倍体 F₁ 集団の Aa 遺伝子型および 4 倍体 F₁ 集団の Aaaa 遺伝子型の平均 DI はそれぞれ 1.49 および 1.35 であり, aa および aaaa 遺伝子型の平均 DI (それぞれ 2.81 および 2.44) に比べ有意に低かった ($p < 0.001$, Table 18)。2 倍体 F₂ 集団は最も抵抗性の高い F₁ 個体の 1 つである '13A-31-38' を自殖して得られたもので, 集団内の分離は '13A-31-38' に近い方, すなわち低い DI に偏っていた (Fig. 18b)。15 個体の aa 遺伝子型のうち 7 個体が DI < 0.5 となり抵抗性個体と判断された。また, aa 遺伝子型の平均 DI も 1.39 であり抵抗性 (DI < 1.5) を示した。この集団では, 親が持つ PBWR-3 や PBWR-7 などの他の抵抗性 QTL も分離していると考えられる。しかし, AA および Aa 遺伝子型個体の平均 DI はさらに低く, それぞれ 0.69 および 0.72 となり, ANOVA により遺伝子型間の平均 DI に有意な差があることが確認された ($p < 0.05$) (Table 18)。

バレイショ品種系統における A1 アレルの検出

107 のバレイショ品種系統に対して, Rbw6-1 および Rbw6-2 マーカーを用いて A1 アレルの有無を調査した (Table 19)。その結果, Rbw6-1 マーカーでは, '西海 35 号', 'インカのめざめ' (森ら 2009), 'はりまる' (Fujimatsu et al. 2018), 'ながさき黄金' (Sakamoto et al. 2017), '北海 98 号' ('インカのめざめ' の変異体), '10H17' (Hosaka and Sanetomo 2020a), そして育成系統である, '西海 43 号', '長系 142 号', '長系 150 号', および '愛系 284' (いずれも '西海 35 号' 由来) で 479 bp と 289+190 bp の両方のバンドが検出された。圃場検定により抵抗性を評価された品種系統のうち, Rbw6-1

で 289+190 bp バンドを有する品種系統はいずれも青枯病抵抗性の程度が「強」または「中」程度の抵抗性を示した (Table 19)。「インカのみざめ」の後代系統である「アイマサリ」, 「西海 38 号」, 「西海 39 号」, および「西海 42 号」では, Rbw6-1 の 289+190 bp バンドが検出されず, 「西海 39 号」を除いて罹病性であった。一方, Rbw6-2 マーカーを用いると, Rbw6-1 の 289+190 bp バンドが検出されたすべての品種系統で, Rbw6-2 のマーカーバンドが検出されたが, さらに品種「LT-7」(PI 527974) でもマーカーバンドが確認された (Table 19)。

Rbw6-2 マーカーを組み込んだマルチプレックス PCR 法の開発

国内の育種プログラムでは, 疫病抵抗性遺伝子 (*R1* および「さやあかね」に由来する *R2*), ジャガイモ X ウィルス抵抗性遺伝子 (*Rx1*), ジャガイモ Y ウィルス抵抗性遺伝子 (*Rychc*), およびジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 (*H1*) の有無を診断する DNA マーカーを組み込んだマルチプレックス PCR 法が開発され利用されている (Mori et al. 2011, 2015)。この従来のマルチプレックス PCR 法では, シストセンチュウ抵抗性遺伝子 (*H1*) を挟む連鎖マーカー N146 と N195 (竹内ら 2008) の両方が組み込まれているが, N146 は Rbw6-2 とバンドサイズが近いことと, N195 でも *H1* が検出できることから, N146 を外し *PBWR-6b* に連鎖する Rbw6-2 を加えた (Table 20)。さらに, 他のマーカーのプライマー濃度を Table 20 のように最適化した (Table 17)。また, 初期変性温度は 94°C から 95°C に変更し, 35 サイクル条件内のアニーリング温度を 58°C から 55°C に変更することにより新たなマル

チプレックス PCR 法を開発した。本法による検定結果の一例を Fig. 19 に示す。

考察

PBWR-6b は RSSC の phylotype I/biovar 3/race 1/病原型 C の菌株に対する系統特異的な青枯病抵抗性の QTL で、比較的低温で高い効果を示す（第 4 章参照）ことから、国内のパレイシヨ栽培において秋作の後半に特に有効であると考えられる。第 6 番染色体上の *PBWR-6b* とほぼ同じ位置に、トマトの青枯病抵抗性 QTL (*Bwr-6*: Carmeille et al. 2006; Wang et al. 2013) およびナスの青枯病の抵抗性 QTL (*ERPR6*: Salgon et al. 2018) が確認されている（第 4 章）。したがって、このゲノム領域はナス科の青枯病に対する重要な抵抗性遺伝子が座乗している可能性が高いが、温度依存性や RSSC のグループの違いによって抵抗性の反応はこれらの作物で異なる（第 4 章参照）。本研究では、*PBWR-6b* の候補遺伝子の一つである Nucellin-like aspartic protease (PGSC0003DMG400011779) の塩基配列に基づいて、抵抗性アレルを特異的に検出する 2 種類の DNA マーカー *Rbw6-1* と *Rbw6-2* を開発した。さらにこれら DNA マーカーを用いて広範な品種系統を調査したところ、両方のマーカーが検出されたのは ‘インカのめざめ’ に由来する品種系統のみであった (Table 19)。このことから、A1 アレルは日本の品種である ‘インカのめざめ’ に由来する新規抵抗性アレルと考えられる。

‘LT-7’ には *Rbw6-2* のみが検出された。‘LT-7’ はペルーのリマ市にある国際ポテトセンターで開発されたもので、耐暑性を有することが知られている (Tung et al. 1990a, 1993; Watanabe et al. 1999b)。‘LT-7’ は青枯病菌 CIP-

204 株 (race 3) に罹病性であるが (Watanabe et al. 1992, 1999b), WP-17 株 (race 1) に高い抵抗性を示すことが報告されている (Tung et al. 1993)。また, CIP-204 株を含む race 1 および race 3 の混合株で汚染された圃場において, 高い収量性が確認されている (Watanabe et al. 1999b)。このことは, ‘LT-7’ が圃場においても有効な菌株特異的抵抗性を示している可能性を示唆し, Rbw6-1 マーカーは検出されなかったものの *PBWR-6b* との類似性が示唆される。

Table 19 に示すように, ‘西海 39 号’ を除く ‘インカのめざめ’ の後代では, A1 アレルを持つものは中程度または高い圃場抵抗性を示すが, A1 アレルを持たないものは罹病性を示す。‘インカのめざめ’ 由来の主働 QTL であり菌株特異性を有する A1 アレルも圃場抵抗性に寄与していると考えられる。ただし, 前章において明らかにしたように, ‘インカのめざめ’ の青枯病抵抗性には *PBWR-6b* だけでなく, *PBWR-3* と *PBWR-7* という他の重要な QTL も関わっている。このため, ‘西海 39 号’ のように, A1 アレルを有していなくても抵抗性を示す系統が存在していた。複数の遺伝子を集積することで抵抗性が向上し (Pilet-Nayel et al. 2017), バレイシヨの青枯病抵抗性においても第 3 章において *PBWR-3* と *PBWR-7* の集積による抵抗性の向上が観察された (Fig. 7)。したがって, 今後, *PBWR-3* および *PBWR-7* と連鎖する DNA マーカーの開発が望まれる。

近年, バレイシヨでは 2 倍体育種, いわゆる F_1 ハイブリッド育種が行われており (Lindhout et al. 2011; Jansky et al. 2016; 實友ら 2023), 東アフリカではその育種プログラムの高い有効性が示唆されている (de Vries et al. 2016)。Rbw6-1 は共優性マーカーであり, 2 倍体における 3 つの遺伝子型

(AA, Aa, および aa) を正確に識別することが可能であり, *PBWR-6b* 遺伝子座の AA ホモ接合体を容易に選抜することができる。さらに, 本研究では, 後代における *PBWR-6b* の出現率は 2 倍体 F₂ 集団においてメンデルの法則による予測値と近く, 青枯病抵抗性に関して顕性遺伝を示し, 致死遺伝子などの有害遺伝子との連鎖は見られなかった。したがって, *PBWR-6b* の A1 アレルに連鎖する分子マーカー Rbw6-1 を F₁ ハイブリッド育種プログラムに組み込むことで, 青枯病抵抗性の効果的な選抜が可能になると考えられる。

本研究で新たに開発されたマルチプレックス PCR 法は, 主要な病害虫抵抗性遺伝子を持つ個体の効率的な選抜を可能すると考えられる (Fig. 19)。日本では現在, ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 (*HI*) の付与が品種化する上で義務付けられ, ジャガイモ Y ウィルス抵抗性遺伝子 (*Ry_{chc}*) は新品種に組み込むことが強く望まれている (Mori et al. 2011, 2015)。新たに開発されたマルチプレックス PCR 法は, 育種家が *HI* や *Ry_{chc}* に加え, 追加的な労力やコストをかけずに青枯病抵抗性遺伝子 (*PBWR-6b*) を有する個体の選抜を可能にしている点でより価値あるものと考えられる。

PBWR-6b は, F₁ 集団 ('10-03-30' × 'F₁-1') において, '10-03-30' に由来する抵抗性アレルとして確認された (Table 18)。*'10-03-30'* とその親である '西海 35 号' の青枯病抵抗性は, 2 倍体品種の 'インカのめざめ' に由来すると推察されている (Mori et al. 2015)。*'インカのめざめ'* の祖父母世代には, 'US-W1' ('Katahdin' の 2 倍性半数体), *S. phureja* '114' (PI 225683), そして *S. tuberosum* subsp. *andigena* の 2 つの半数体系統 (国際ポテトセンター由来) があり (森ら 2009) (Fig. 20), このうち *S. phureja* は青枯病抵抗性の供給源として多用されているため (Thurstun and Lozano 1968; Sequeira and

Rowe 1969; French and De Lindo 1982; Watanabe et al. 1992; French et al. 1998; Fock et al. 2000; Lopes et al. 2021), ‘インカのめざめ’の青枯病抵抗性は前章でも述べたように *S. phureja* ‘114’ と考えられてきた (Mori et al. 2015)。しかし, ‘10-03-30’ の PGSC0003DMG400011779 における A1 アレルの配列は, *S. phureja* ‘DM v4.03’ および ‘1.22’ の当該配列と異なっていた。さらに, US Potato Genebank のデータベース (<https://www.ars-grin.gov>) によると, *S. phureja* ‘114’ (PI 225683) は青枯病に罹病性であるとされ, さらに *S. phureja* ‘114’ と ‘Katahdin’ には Rbw6-1 が検出されなかった (Table 19)。したがって, *S. tuberosum* subsp. *andigena* が ‘インカのめざめ’ の青枯病抵抗性 QTL である *PBWR-6b* の供給源である可能性が高いと考えられる。*S. tuberosum* subsp. *andigena* の青枯病抵抗性に関する研究はほとんど報告されておらず, 青枯病抵抗性育種への利用は限られていた。しかし, 本研究で明らかになったように, *S. tuberosum* subsp. *andigena* は *R. pseudosolanacearum* 株に対して特異性の高い *PBWR-6b* の抵抗性アレルを有しており, 一定の圃場抵抗性を示すと考えられた。このことから, 青枯病抵抗性の新たな供給源として *S. tuberosum* subsp. *andigena* を利用した育種素材を探索することは重要であると考えられる。日本では *S. tuberosum* subsp. *andigena* が育種遺伝子プールの拡大に活用されており (Hosaka and Sanetomo 2020a), その一部が *PBWR-6b* を保有する可能性や他の青枯病抵抗性 QTL を持つ可能性が考えられる。

Table 16 Primers used for development of the allele-specific marker

Primer name	Primer sequence (5'-3')
AP11779_F2	TGACACACCCTTAATTTGTCACA
AP11779_R1	TTCGGCCTTCCATGAGCAAT
AP11779_F1	GCCGTCGCATAACGTGAATT
AP11779_R26	AGCAGACCAGGAAAGATTATCTTCA
AP11779_F34	AGGAGTCAAGGGTCTTCCAA
AP11779_R31	TGTACCGTTCAGTATGCCCA
AP11779_F33	ACCTACACCAAAGTTATCGGGT
AP11779_R30	CAGTTATCCAGAACTACTCAACTTGC

Table 17 Markers and optimized primer concentrations in multiplex PCR

Marker	Target gene	Primer	Primer sequence (5'-3') ^a	Size (bp)	Final conc. (μM)
R1	<i>R1</i>	76-2sf2	CACTCGTGACATATCCTCACTA	1400	0.25
		76-2SR	CAACCCTGGCATGCCACG		0.25
PVX	<i>Rx1</i>	RxSP-S3	ATCTTGGTTTGAATACATGG	1230	1.5
		RxSP-A2	CACAATATTGGAAGGATTCA		1.5
GBSS	GBSS (positive control)	gbss-01	ATGGCAAGCATCACAG	981	0.3
		gbss-02	CAAACTTTAGGTGCCTC		0.3
R2-800	<i>R2</i> (Saya-akane-derived)	R2SP-S7	TACTAACCTTTTCTAGATG	800	0.5
		R2SP-A9	AGAACTTTCTCACAGCTTTT		0.5
Ry186	<i>Ryche</i>	RY186-11	TGGTAGGGATATTTTCTTAGA	587	0.5
		RY186-12	GCAAATCCTAGGTTATCAACTCA		0.5
Rbw6-2	<i>PBWR-6b</i>	AP11779_F33	ACCTACACCAAAGTTATCGGGT	440	0.15
		AP11779_R30	CAGTTATCCAGAACTACTCAACTGC		0.15
N195	<i>H1</i>	N195-09	TGGAAATGGCACCCACTA	337	0.2
		N195-06	CATCATGGTTTCACTTGTCAC		0.2

^a Primer sequences cited from Mori et al. (2011) except for those of the Rbw6-2 marker

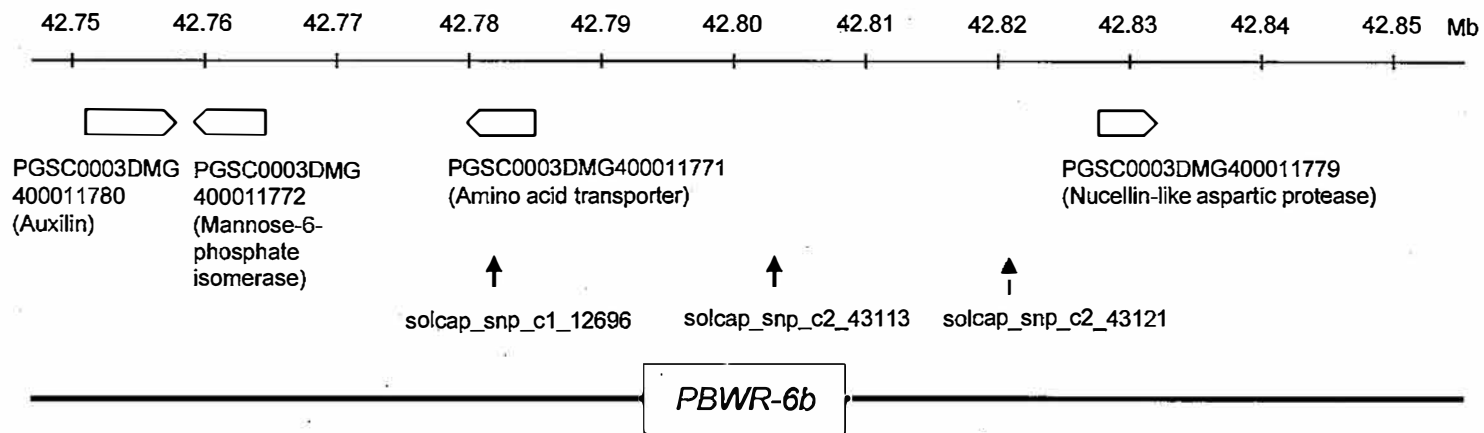
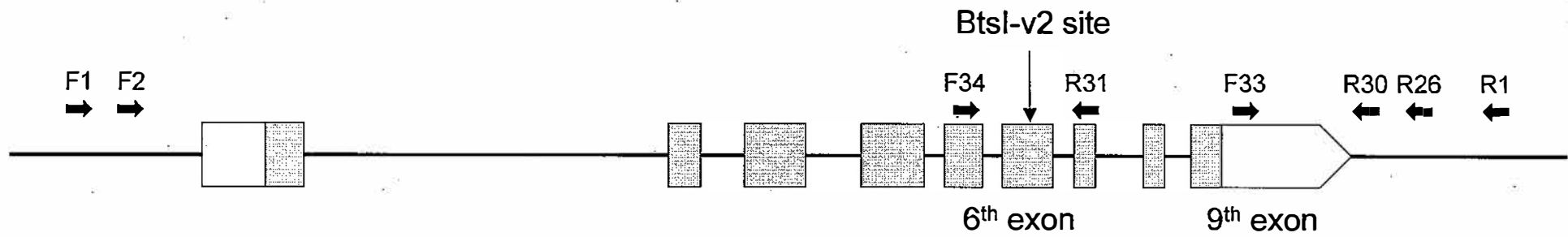


Fig. 12 Schematic representation of *PBWR-6b* on the reference genome DM v. 4.03 (Sharma et al. 2013)



95

Fig. 13 Schematic representation of PGSC0003DMG400011779 and the positions of 'AP11779_' primers developed in this study. PGSC0003DMG400011779 consists of nine exons. Empty regions within exons are untranscribed regions.

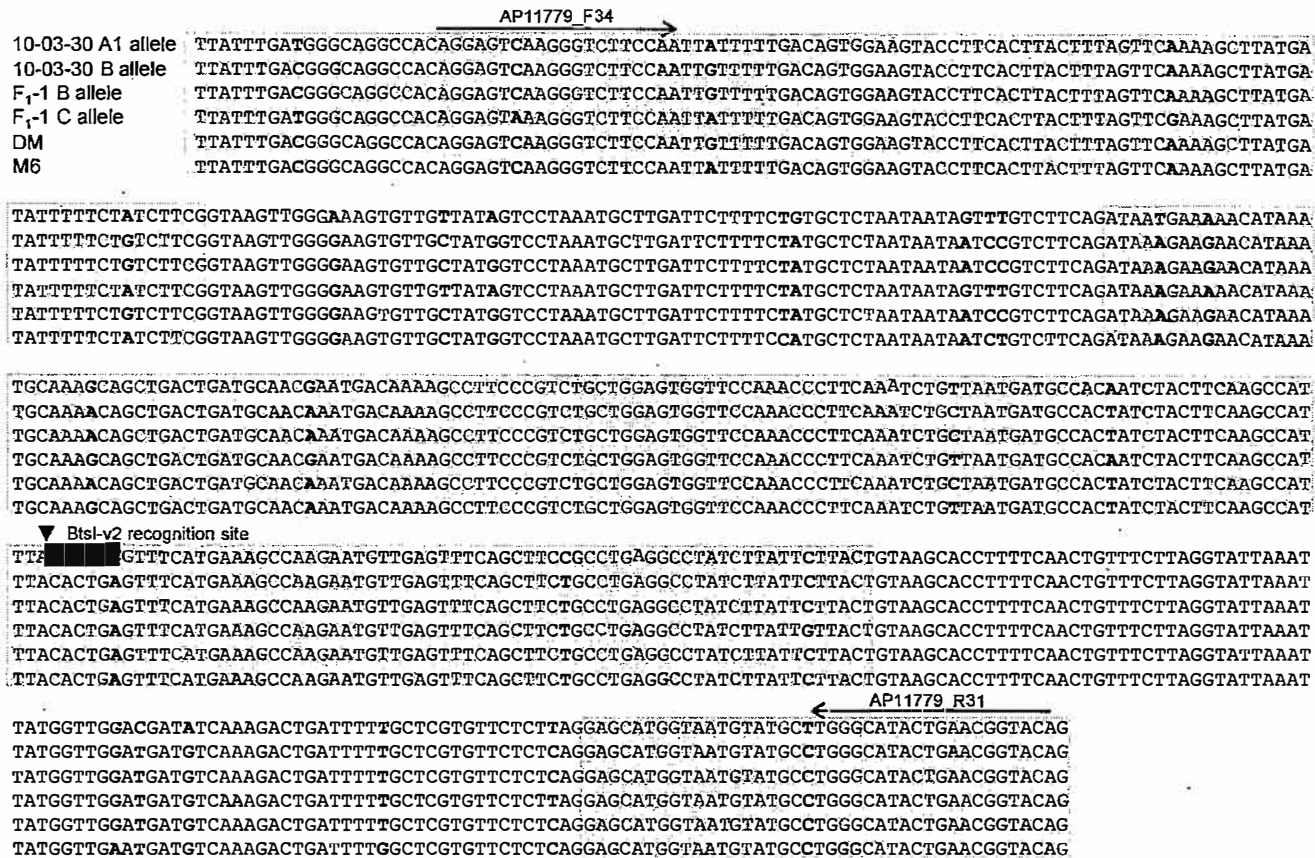


Fig. 14 Sequence comparison of the 5th, 6th, and 7th exons (shaded) of PGSC0003DMG400011779. Nucleotide substitutions were indicated in bold. The PCR products using a primer pair AP11779_F34 and AP11779_R31 were digested by BtsI-v2 to distinguish the A1 allele of 10-03-30 from the other alleles (the Rbw6-1 marker).

AP11779_F33

10-03-30 A1 allele ATATATTACTGAAATGTTCTCTATGACCTACACGAAAGTTATCGGGTTTATCCCAAACACATACAGTAGTACACGTTTAGCCTACATCACAAGA
 10-03-30 B allele ATATATTACTGAAATGTTCCCTATGACCTGCACCGAAGATATCGGGTTTATCCCAAATACATACAGTAGTACACGTTTAGCCTACATCACAAGA
 F₁-1 B allele ATATATTACTGAAATGTTCCCTATGACCTGCACCGAAGATATCGGGTTTATCCCAAATACATACAGTAGTACACGTTTAGCCTACATCACAAGA
 F₁-1 C allele ATATATTACTGAAATGTTCCCTATGACCTGCACCGAAGTTATCGGGTTTATCCCAAATACATACAGTAGTACACGTTTAGCCTACATCACAAGA
 DM ATATATTACTGAAATGTTCCCTATGACCTGCACCGAAGATATCGGGTTTATCCCAAATACATACAGTAGTACACGTTTAGCCTACATCACAAGA
 M6 ATATATTACTGAAATGTTCCCTATGCCCTACACGAAAGTTATCGGGTTTATCCCAAATACATACAGTAGTACACGTTTAGCCTACATCACAAGA

TCATCTCCTAGCTTTGAAATTTTGAATCTTAGTTAGCTGTAGACTTTTGCA-CGCCGTTGTCTGCTTTTATATAAAAATTTGGGCCATTTACAACCTGCAATTGAGTTG
 TCATCTCCTAGCTTTGAAATTTCTGAATCTC-GTTAGCTATACACTTTGGGCCCCCGTTGTGTCTGCTTCTTATATAAAAATTTGGGCCATTTACAACCTGCAATTGAGTTG
 TCATCTCCTAGCTTTGAAATTTCTGAATCTC-GTTAGCTATACACTTTGGGCCCCCGTTGTGTCTGCTTCTTATATAAAAATTTGGGCCATTTACAACCTGCAATTGAGTTG
 TCATCTCCTAGCTTTGAAATTTCTGAATCTC-GTTAGCTATACACTTTGGGCCCCCGTTGTGTCTGCTTCTTATATAAAAATTTGGGCCATTTACAACCTGCAATTGAGTTG
 TCATCTCCTAGCTTTGAAATTTCTGAATCTC-GTTAGCTATACACTTTGGGCCCCCGTTGTGTCTGCTTCTTATATAAAAATTTGGGCCATTTACAACCTGCAATTGAGTTG
 TCATCTCCTAGCTTTGAAATTTCTGAATCTCAGTTAGCTATACACTTTGGGCCCCCGTTGTGTCTGCTTCTTATATAAAAATTTGGGCCATTTACAACCTGCAATTGAGTTG

ATGCAATTCGCGTAATACCTGTCAGAAATGGAAACTACATATTAGATATATTGAAACAAATTTCTTGAGGGTTGTATCTAATATTAGTGTAGTGTGAAAGTTGAAACA
 ATGCAATTCGCGTAATACCTGTCAGAAATGGAAACTACATATTAGATATATTGAAACAAATTTCTTGAGGGTTGTATCTAATATAAGTGTAGTGTGAAAGTTGAAACA
 ATGCAATTCGCGTAATACCTGTCAGAAATGGAAACTACATATTAGATATATTGAAACAAATTTCTTGAGGGTTGTATCTAATATAAGTGTAGTGTGAAAGTTGAAACA
 ATGCAATTCGCGTAATACCTGTCAGAAATGGAAACTACATATTAGATATATTGAAACAAATTTCTTGAGGGTTGTATCTAATATAAGTGTAGTGTGAAAGTTGAAACA
 -----GCATAATACCTGACAGAAATGGAAACTACATATTAGATATATTGAAACAAATTTCTTGAGGGTTGTATCTAATATAAGTGTAGTGTGAAAGTTGAAACA

CAGAATTCATCTTTCAAATAAATAAATACTAGTGTGGCCTTTGATATTTTGGCTTCTTGAGATCCCAAGTAAATTTCCATCTACATTTTAAATATGTAATCTTTGCCAT
 CCGAATTCATCTTTCAAATAAATAAATACTAGTGTGGCCTTTGACATTTTGGCTTCTTGAGATCCCAAGTAAATTTCCATCTACATTTTAAATATGTAATCTTTGCCAT
 CCGAATTCATCTTTCAAATAAATAAATACTAGTGTGGCCTTTGACATTTTGGCTTCTTGAGATCCCAAGTAAATTTCCATCTACATTTTAAATATGTAATCTTTGCCAT
 CAGAATTCATCTTTCAAATAAATAAATACTAGTGTGGCCTTTGACATTTTGGCTTCTTGAGATCCCAAGTAAATTTCCATCTACATTTTAAATATGTAATCTTTGCCAT
 CCGAATTCATCTTTCAAATAAATAAATACTAGTGTGGCCTTTGACATTTTGGCTTCTTGAGATCCCAAGTAAATTTCCATCTACATTTTAAATATGTAATCTTTGCCAT
 CAGAATTCATCTTTCAAATAAATAAATACTAGTGTGGCCTTTGACATTTTGGCTTCTTGAGATCCCAAGTAAATTTCCATCTACATTTTAAATATGTAATCTTTGCCAT

AP11779_R30

TTTGATATAAA-GAAAATTC**CAA**-----GTTGAGTAGTTTCTGGATAACTGAATTTTACTTTTA
 TTTGATATAAA-GAAAATTC**CAA**CTTATAGTACAATTGATCTAGTTGAGTAGTTTTGGATATCTGAATTTTACTTTTA
 TTTGATATAAA-GAAAATTC**CAA**CTTATAGTACAATTGATCTAGTTGAGTAGTTTTGGATATCTGAATTTTACTTTTA
 TTTGATATAAA-GAAAATTC**CAA**CTTATAGTACAATTGATCTAGTTGAGTAGTTTTGGATATCTGAATTTTACTTTTA
 TTTGATATAAAAGAAAATTC**CAA**CTTATAGTACAATTGATCTAGTTGAGTAGTTTTGGATATCTGAATTTTACTTTTA

Fig. 15 Sequence comparison of the ninth exon (shaded) of PGSC0003DMG400011779. Nucleotide substitutions were indicated in bold. The primers AP11779_F33 and AP11779_R30 were designed to distinguish via PCR the A1 allele of 10-03-30 from the other alleles (the Rbw6-2 marker).

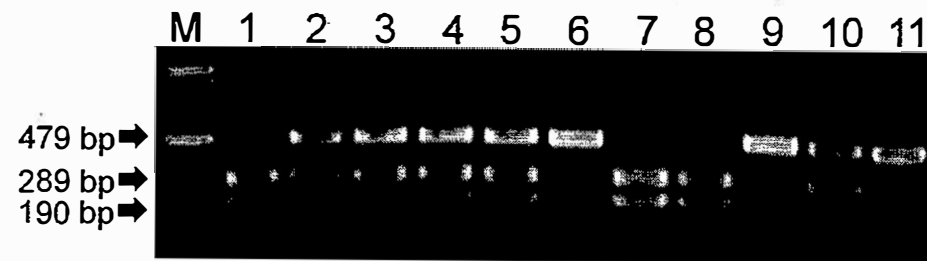


Fig. 16 The Rbw6-1 marker segregating in the $2 \times F_2$ population. 1-9, F_2 genotypes; 10, the resistant parent 10-03-30; 11, the susceptible parent F_1-1 ; and M, a 100bp ladder marker (Nippon Gene, Japan).

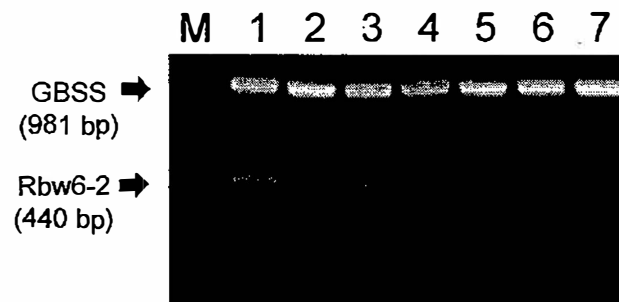


Fig. 17 The Rbw6-2 marker segregating in the 2x F₂ population. 1–5, F₂ genotypes; 6, the resistant parent 10-03-30; 7, the susceptible parent F₁-1; and M, a 100bp ladder marker (Nippon Gene, Japan).

Table 18 Segregations of markers specific to the A1 allele of 10-03-30 in the 2x F₁, 2x F₂, and 4x F₁ populations and the genotype means of disease indices (DIs) and standard errors given in parentheses

Marker	Marker genotype	2x F ₁ (n=94)	2x F ₂ (n=63)	4x F ₁ (n=70)
Rbw6-1	289+190 bp	-	18 (0.69 ± 0.18 a)	-
	479 bp/289+190 bp	53 (1.49 ± 0.12 a)	30 (0.72 ± 0.10 a)	27 (1.35 ± 0.13 a)
	479 bp	41 (2.81 ± 0.14 b)	15 (1.39 ± 0.34 b)	43 (2.44 ± 0.12 b)
	χ^2 test	1:1 ($p=0.216$)	1:2:1 ($p=0.807$)	1:1 ($p=0.056$)
Rbw6-2	Presence	53 (1.49 ± 0.12 a)	48 (0.71 ± 0.09 a)	27 (1.35 ± 0.13 a)
	Absence	41 (2.81 ± 0.14 b)	15 (1.39 ± 0.34 b)	43 (2.44 ± 0.12 b)
	χ^2 test	1:1 ($p=0.216$)	3:1 ($p=0.827$)	1:1 ($p=0.056$)

Significant differences in DIs between genotypes, as detected by t-test ($p<0.05$) or Tucky test ($p<0.10$), shown with different alphabets

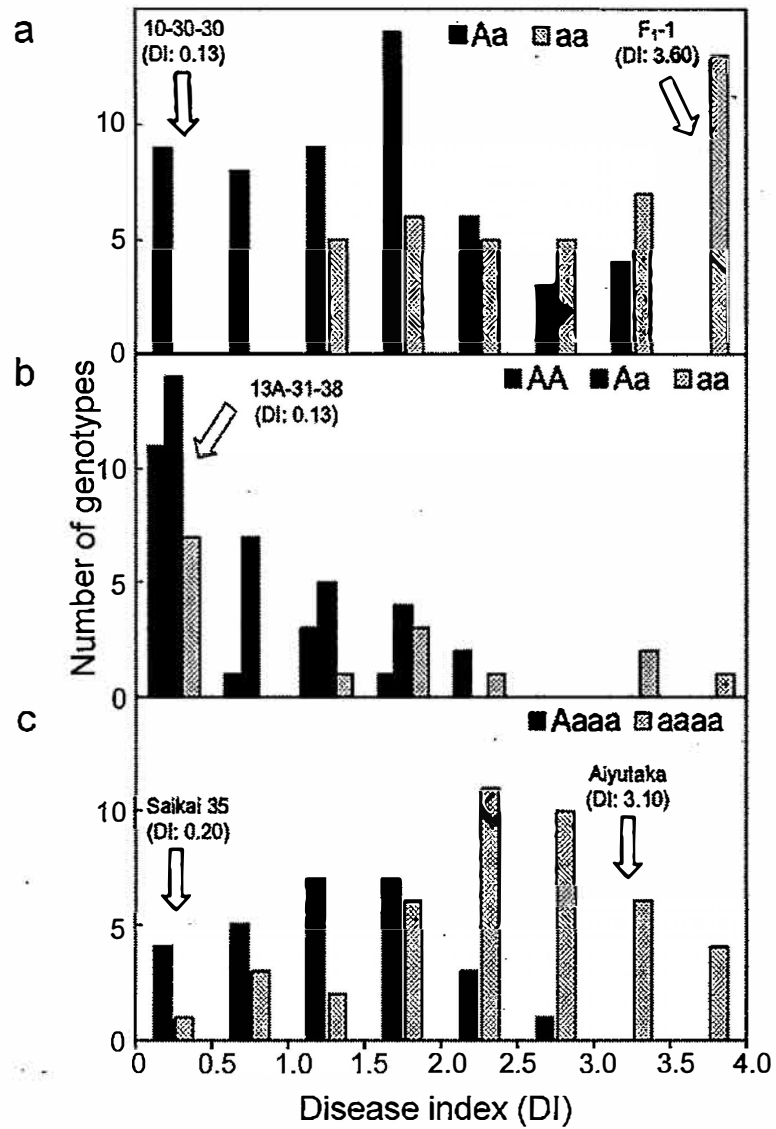


Fig. 18 Segregation of bacterial wilt resistance in a 2x F₁ population derived from a cross between 10-30-30 and F₁-1 (a), a 2x F₂ population derived by selfing one of the most resistant F₁ genotypes, 13A-31-38 (b), and a 4x F₁ population derived from a cross between Saikai 35 and Aiyutaka (c). Genotypes were determined using A1 allele specific markers.

Table 19 The presence of the A1 allele of 10-03-30 determined using the Rbw6-1 and Rbw6-2 markers for cultivars and breeding lines that were evaluated for bacterial wilt resistance in the Japanese field

Category	Rbw6-1	Rbw6-2	Cultivars and breeding lines
Resistant	+	+	Aikei 284*, Inca-no-mezame*, Nagasaki Kogane*, Saikai 35*
	-	-	Meiho, Norin 1, Saikai 39*
Moderately resistant	+	+	Chokei 142*, Choeki 150*, Saikai 43*
	-	-	Aino-aka, Chijiwa, Saikai 33, Setoyutaka, Unzen
Medium	-	-	Nishiyutaka, Shimabara, Tachibana
Susceptible	-	-	Aimasari*, Aiyutaka, Dejima, Eniwa, Fugenmaru, Hanashibetsu, Haru-akari, Konafubuki, Saikai 31, Saikai 38*, Saikai 42*, Sanjyumaru, Sakurafubuki, Saya-akane, Sayaka, Star Queen, Touya, Toyoshiro, Waseshiro
	-	-	Foreign cultivars: Irish Cobbler, May Queen
Not evaluated	+	+	Harimaru*, Hokkai 98 (a sport of Inca-no-mezame)*, 10H17*
	-	+	Foreign cultivar: LT-7
	-	-	Inca Gold, Red Andes, 97H32-6
			Foreign cultivars: Alowa, Andover, Astarte, Atlantic, Atzimba, Bintje, BR-63.74, BR-63.76, Capella, Cherokee, CR-2, Cynthia, Desiree, DTO-33, Early Gem, Early Rose, Gineke, Green Mountain, Greta, Hindenburg, Hudson, I-822, I-853, I-1039, IvP35 (<i>S. phureja</i>), Johanna, Katahdin, Kennebec, King Edward, Koral, Maris Piper, Matilda, Multa, ND860-2, Noordeling, Norchip, Norking Russet, Norland, Ona, Pentland Ace, Pentland Crown, Pentland Dell, Pike, Prevalent, P-7, Russet Burbank, Saco, Sassy, Sebago, Serrana INTA, Shepody, Snowden, Superior, <i>S. phureja</i> 114, Tawa, Tunika, Urtica, USDA 96-56, Wauseon, Yankee Chipper, Yukon Gold

Cultivars or breeding lines marked with "*" descended from Inca-no-mezame, the original source of the A1 allele of 10-03-30

Table 20 The newly developed multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers for six disease and insect resistance genes in potato, compared with previously published conditions (Mori et al. 2011)

Marker	Target gene	Size (bp)	Final concentration (μM)	
			This study	Mori et al. (2011)
R1	<i>R1</i>	1400	0.25	0.25
PVX	<i>Rx1</i>	1230	1.5	1.5
GBSS	<i>GBSS</i>	981	0.3	0.15
R2-800	<i>R2</i> (Saya-akane-derived)	800	0.5	0.25
Ry186	<i>Rychc</i>	587	0.5	0.1
N146	<i>H1</i>	506	-	0.05
Rbw6-2	<i>PBWR-6b</i>	440	0.15	-
N195	<i>H1</i>	337	0.2	0.05

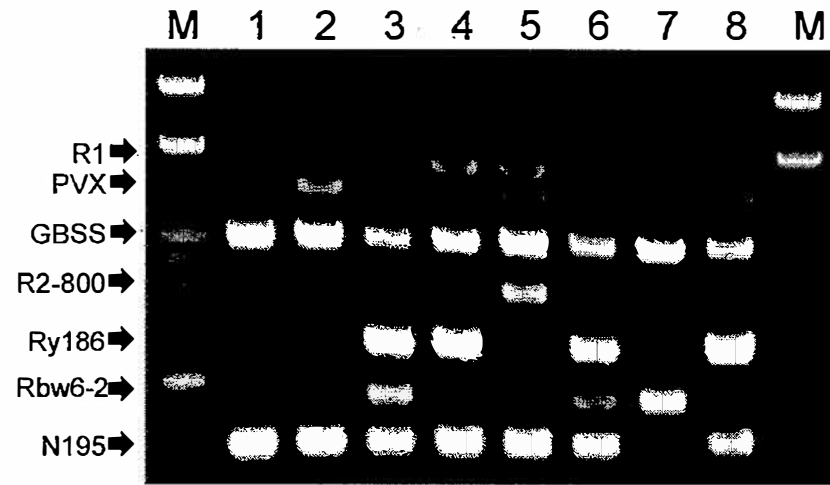


Fig. 19 Multiplex PCR to detect multiple markers for resistance genes to late blight (R1 and R2-800), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (Ry186), bacterial wilt (Rbw6-2), and golden cyst nematode (N195) and for GBSS as a positive control. 1, Hanashibetsu; 2, Aiyutaka; 3, Saikai 35; 4, Aimasari; 5, Saya-akane; 6, Harimaru; 7, Inca-no-mezame; 8, Chohei 159; and M, a 100bp ladder marker (Nippon Gene, Japan).

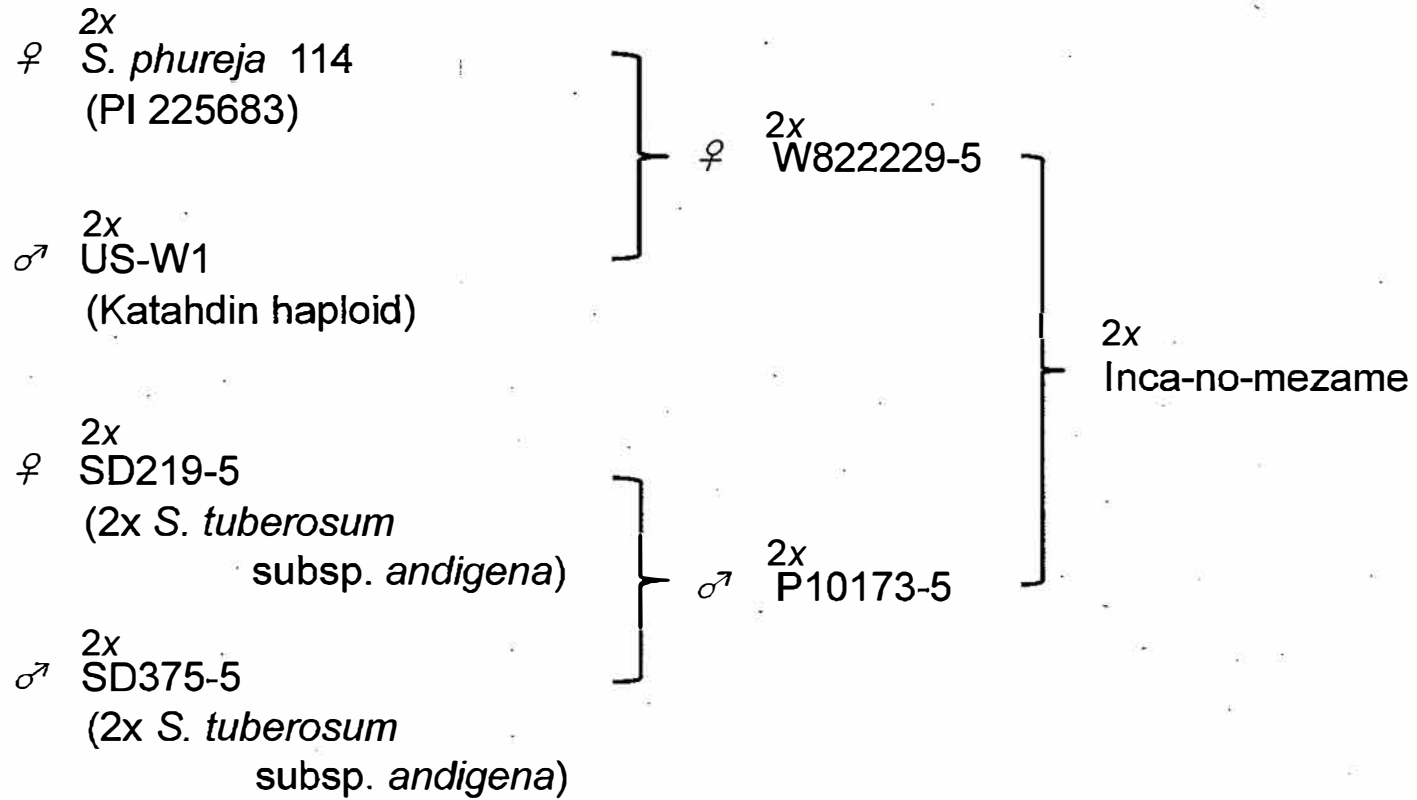


Fig. 20 The pedigree of the potato cultivar Inca-no-mezame (Mori et al. 2009).

総合考察

気候変動による地球温暖化によって深刻な問題となり得る病害の一つとして、高温で発病が促進される青枯病が挙げられる (Patil et al. 2012)。これまで、バレイショにおける青枯病は、我が国においては九州以南でのみ発生し問題視されてきた。しかし、今後温暖化に伴い発生地域は北上するものと考えられる。本研究は、このような背景に立って、国内のバレイショ生産を安定的かつ持続的に続けるために、青枯病抵抗性育種の育種基盤を確立させることを目的として行われたものである。

本研究では、まず室内で効率的に青枯病抵抗性を評価できる *in vitro* 検定法を開発した (第 1 章)。これにより、これまで唯一の抵抗性評価法であった圃場検定に加えて、多検体のバレイショ個体の青枯病抵抗性を評価できるようになった。さらに、本検定法は圃場検定では困難であった菌株毎の病原力を安定して評価できることを可能にした。そこで、国内で採取されたさまざまな青枯病菌によるバレイショへの病原力について、*in vitro* 検定法で評価を行い、5つの病原型に分類することにより今後の抵抗性育種を行う上での指標を確立した (第 2 章)。これにより、5つの病原型に対応した抵抗性個体を選抜することで、国内の青枯病発生地域において安定した抵抗性を示す品種育成を可能にすると考えられる。第 3 章および第 4 章ではゲノムワイドな遺伝解析を行い、10 個の新奇の青枯病抵抗性 QTL を同定し、それらの集積により抵抗性が向上することを明らかにし、さらに QTL 間にはエピスタシスな関係があることを明らかにした。また、各 QTL の特性、すなわち菌株特異性や温度依存性が明らかになった。それにより、環境条件に影響

を受けにくい QTL である *PBWR-3* と *PBWR-7*, 一方で環境条件に影響を受けやすいが寄与率 40%以上を超える主働 QTL である *PBWR-6b* の特性が明らかにされた。さらに, *PBWR-6b* の抵抗性アレルに連鎖する 2 種類の DNA マーカー (*Rbw6-1* および *Rbw6-2*) を開発することにより, *PBWR-6b* が顕性遺伝をして, 2 倍体および 4 倍体においても *R. pseudosolanacearum* に対する高い抵抗性を発揮することが確認された (第 5 章)。*PBWR-6b* の抵抗性アレルは ‘インカのめざめ’ に由来し, 圃場抵抗性にも関与していることが示唆され, バレイショ育種上の高い価値が示された。そのため, 育種プログラムに青枯病抵抗性のマーカー選抜が適用できるよう, 主要な病虫害抵抗性 DNA マーカーを含むマルチプレックス PCR 法に *Rbw6-2* マーカーを組み込み新たなマルチプレックス PCR 法を開発した。

バレイショ品種系統に対して, 青枯病菌には phylotype I と IV による明瞭な病原力の違いはなく, phylotype に依存しない多様な病原型が存在することが明らかになった。これまで国内の青枯病抵抗性個体の選抜は長崎県農林技術開発センターの限られた圃場でのみ行われ (Mori et al. 2015), 本研究で示された全ての病原型に対応した抵抗性評価が現行の育種システムでは難しいことが考えられた。そのため, *in vitro* 検定を現行の育種システムに加えて併用していく必要があると考えられる。特に, biovar 3 のみで構成された病原型 E に類別される菌株は比較的低温で病原力が高まる (Table 6)。国内の圃場環境では高温が多発要因とこれまで考えられているため (片山ら 1983), 病原型 E に類別される菌株に対しては *in vitro* 検定法を用いて対応する必要がある。

バレイショにおける青枯病抵抗性は, Host-pathogen-environment interaction の影響を受けて (Tung et al. 1990b, 1992; Watanabe et al. 1999b), 抵抗性因子

を明らかにすることが困難であった (Patil et al. 2012)。本研究では、各 QTL がエピスタシスを含む菌株特異的抵抗性や温度依存性抵抗性を示すことを明らかにした。その結果、RSSC の種の違いや環境温度に関わらず安定した抵抗性を示す QTL が存在することを示した。これら多くの QTL の中でも主働 QTL は存在し、トマトやナスにおいて近年特に重要視されている第 6 番染色体に位置する QTL (Abebe et al. 2020; Kunwar et al. 2020) と物理位置が重複する *PBWR-6b* が同定された。この QTL の抵抗性アレルに連鎖する DNA マーカーは青枯病抵抗性個体の効率的な選抜を可能にする。さらに他の病虫害抵抗性マーカーをマルチプレックス PCR 化することで迅速かつ簡便な病虫害抵抗性個体の選抜が可能となった。これにより、従来は生産力予備試験に供試される年間 30 系統のみしか青枯病の抵抗性を評価でなかったが (Table 2)、開発したマルチプレックス PCR 法を用いると系統選抜試験に供試される年間 1,000 系統程度について青枯病抵抗性を評価できると考えられ、青枯病抵抗性品種育成の大幅な効率化が期待できる。

以上述べたように、本研究はバレイショを含めたナス科の主要作物における青枯病抵抗性に関する新たな知見を提供するとともに、今後の国内外のバレイショにおける抵抗性育種に大いに貢献するものと期待できる。

要約

ナス科ナス属であるバレイショ類は栽培種 7 種と野生種 226 種に分類される多様な遺伝的背景を持ち、このうち現在世界中で栽培されているのは *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* である。このように多様な遺伝的背景を持つにも関わらず、日本を含めた欧米のバレイショ育種における遺伝子プールの脆弱性が指摘されている。一方で、バレイショは世界中の多様な環境で栽培されており、近縁野生種を育種に利用することで多様な形質を栽培種に導入し各地域の気候や病虫害に対応してきた。しかし、地球温暖化による気候変動が進行するにつれ、バレイショ栽培においてもいくつかの問題が生じることが予測される。その一つとして高温で多発する青枯病による被害がある。これまで、日本を含めた世界各国で青枯病抵抗性育種は行われてきたが、バレイショが 4 倍体であること、青枯病抵抗性が量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus, QTL) により支配されていること、そして青枯病の原因細菌が種複合体 (*Ralstonia solanacearum* species complex, RSSC) でありバレイショへの病原力が多様であることから、普及性の高い抵抗性品種の育成が難しかった。国内における抵抗性個体の選抜は RSSC に汚染された圃場を利用した生物検定に頼っており、青枯病の発病には環境要因が大きく影響を及ぼすため、抵抗性評価に最低 3 年は必要となっている点が抵抗性育種の大きな制限要因となっている。このような問題に対応するためには、抵抗性検定方法の改善、RSSC の病原力および抵抗性に対する理解、そして育種における効率的選抜を可能にする DNA マーカーの開発が必要である。

第1章では、バレイシヨの青枯病抵抗性に関する *in vitro* 検定法を開発するため、抵抗性系統‘西海35号’および罹病性品種‘Kennebec’を *in vitro* 条件下で培養し、*R. pseudosolanacearum* の phylotype I/biovar 4 の菌株を接種株として両系統の発病度を明瞭に識別できる条件を検討した。その結果、最適な検定条件は、6~8葉期の培養植物に対し、接種する菌濃度は 10^2 CFU ml⁻¹、接種後の培養温度は28℃であった。発病程度の評価部位については、葉よりも茎を評価対象とした方の信頼性が高かった。この方法を用いて、圃場での抵抗性程度が異なる9つの品種を評価した。その結果、圃場での抵抗性が高い品種ほど発病指数が低く、本検定法は制御された環境での青枯病抵抗性の評価に有効であると考えられた。

第2章では、RSSCの病原力を明らかにするため、国内で採取されたバレイシヨに被害を及ぼす26菌株（phylotype IおよびIV）について、接種後の培養温度を24℃ないし28℃とし、抵抗性系統‘西海35号’および罹病性品種‘アイユタカ’に対する発病度を *in vitro* 検定法で評価した。多くの菌株で、‘西海35号’の発病指数が‘アイユタカ’より有意に低かった。病原力は菌株によっても異なり、また接種後の温度によっても大きく異なっていた。また、それぞれの菌株の品種および培養温度に対する発病度を基に、階層および非階層クラスター分析を行ったところ、26菌株は5つの病原力型（病原型A, B, C, D, およびE）に分類された。これは phylotype を含むこれまでの分類方法とは一致しなかった。したがって、対象地域で安定した抵抗性品種を育成するためには、その地域の主要病原型菌株に対する選抜を行う必要がある。

第3章では、バレイショにおける青枯病に対する抵抗性の QTL 解析を行った。抵抗性 2 倍体系統 '10-03-30' (RP) と罹病性 2 倍体系統 'F₁-1' (SP) を交配し、94 系統からなる F₁ 集団を育成した。この集団を two-way pseudotestcross とみなし、一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) マーカーを用いて、RP に対しては 1,476 SNPs が 422 座にマップされ、SP に対しては 2,663 SNPs が 475 座にマップされた高密度連鎖地図を構築した。F₁ 集団の抵抗性評価は、*R. pseudosolanacearum* (phyloptype I/biovar 4/race 1/病原型 A) を用いた *in vitro* 検定法により行われた。バレイショの第 1, 3, 7, 10, および 11 番染色体上に 5 つの QTLs (*qBWR-1* ~ -5) が同定され、各 QTL の寄与率は 9.3~18.4%を示した。抵抗性親は *qBWR-2*, *qBWR-3*, および *qBWR-4* に抵抗性アレルを持ち、*qBWR-1* と *qBWR-5* に罹病性アレルを持っていた。5 つの QTLs に抵抗性アレルが集積されることで、抵抗性親と比較して抵抗性程度が向上した。また、第 1, 7, および 11 番染色体における QTLs の相互作用による抵抗性程度の向上効果も確認された。本研究は、ゲノムワイドマーカーを用いてバレイショの青枯病抵抗性に関する新規 QTL を同定した初めての研究である。

第4章では、第3章の結果を拡張するため、同じ 2 倍体 F₁ 集団および SNP マーカーによる RP と SP の連鎖地図を用いた。*In vitro* 検定を用いて 3 種の異なる菌株 (*R. pseudosolanacearum* の phyloptype I/biovar 4/病原型 A 株と phyloptype I/biovar 3/病原型 C 株, および *R. syzygii* の phyloptype IV/biovar N2/病原型 A 株) を接種し、24°C または 28°C で培養した後抵抗性を評価した。その結果、第 1, 3, 5, 6, 7, 10, および 11 番染色体上に 5 つの主働 QTL を含む合計 10 QTLs を同定した。主働 QTL である *PBWR-3* と *PBWR-7* は *R.*

pseudosolanacearum (phylotype I) と *R. syzygii* (phylotype IV) に対して安定した抵抗性を示したが、同じく主働 QTL である *PBWR-6b* は *R. pseudosolanacearum* (phylotype I/biovar 3) に対する菌株特異性を示し、低温でより高い抵抗性を示した。したがって、広範な抵抗性を示す QTL と菌株特異的抵抗性 QTL を組み合わせることで、有効な青枯病抵抗性品種を開発できることが示唆された。

第 5 章では、前章において同定された菌株特異性を示し、低温でより高い抵抗性を示す QTL である *PBWR-6b* のマーカー開発を行った。QTL 領域内に位置する候補遺伝子の 1 つ Nucellin-like aspartic protease 遺伝子の塩基配列を、RP と SP で比較した。その結果、RP の抵抗性アレルに固有の配列を持つ A1 アレルを同定し、これを特異的に検出する 2 つの分子マーカー (Rbw6-1 と Rbw6-2) を開発した。マーカーを用いて RP の系譜を辿ったところ、青枯病抵抗性 QTL である *PBWR-6b* は、‘インカのめざめ’の交配親である *S. tuberosum* subsp. *andigena* に由来すると推定された。また、107 のバレイショ品種系統を調査したところ、‘インカのめざめ’の後代系統でのみ Rbw6-1 と Rbw6-2 が検出されその多くで抵抗性が確認された。2 倍体および 4 倍体の交配集団においてマーカーの有無と抵抗性の程度は一致し、*PBWR-6b* は顕性遺伝により後代に伝わるということが明らかとなった。さらに、Rbw6-2 マーカーを既存のマルチプレックスポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法に組み込み、青枯病 (*PBWR-6b*)、ジャガイモシストセンチュウ (*HI*)、ジャガイモ Y ウイルス (*Ryhc*)、ジャガイモ X ウイルス (*Rx1*)、および疫病 (*R1*, 品種 ‘さやあかね’ 由来の *R2*) に対する抵抗性遺伝子が同時検出できるようになったため、青枯病抵抗性系統の迅速な選抜が可能となった。

以上述べたように、本研究では、新たな青枯病抵抗性の評価方法が開発され、より効率的に抵抗性育種を進めることが可能となった。加えて、国内の青枯病菌が5つの病原力型に分類されたことから、今後は、これら病原力型別に抵抗性を評価することで、国内の幅広い地域で安定した抵抗性を示す品種育成が可能になると考えられる。また、青枯病抵抗性の主働 QTL を同定し、その一つである *PBWR-6b* の抵抗性アレルの有無を判定する DNA マーカーを開発した。このマーカーを従来のマルチプレックス PCR に組み込んだことで、主要な6つの病虫害抵抗性遺伝子の迅速な選抜技術を開発した。これらの得られた知見と開発した技術は、パレイショにおける青枯病抵抗性育種の効率化に大いに寄与するものと期待される。

Summary

Potato and its relatives are classified into 7 cultivated and 226 wild species in the Solanaceae family. Among them, *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* is only species currently cultivated worldwide. The fragility of the genetic diversity is concerned for the gene pools in Western and Japanese potato breeding programs, despite its diverse genetic variability existing in closely related wild species. On the other hand, to grow potatoes under diverse environments, useful traits such as tolerance to biotic and abiotic stresses have been introduced from primitive cultivated and wild potato species. However, climatic changes due to global warming are progressing, which make challenges to continue stable and safe supply of potatoes. One of the significant challenges is against increasing damages caused by bacterial wilt, which occur frequently at high temperatures. However, potatoes are mainly tetraploid, resistance to bacterial wilt is controlled quantitatively, bacterial wilt is caused by a complicated species complex (the *Ralstonia solanacearum* species complex, RSSC), and the virulence of RSSC varies widely depending on strains and potato varieties, altogether making it difficult to rapidly breed resistant cultivars. Since selection of resistant genotypes to bacterial wilt is conducted in the heavily infested field and affected largely by environmental conditions, the resistance assay takes at least three years in Japan, which is considered a major limiting factor for resistance breeding. To overcome these problems, it is desired to develop a simple and reliable resistance assay method, to understand virulence types of the various RSSC strains and resistance types against

different strains, and to develop DNA markers for rapid selection of resistant genotypes.

In Chapter 1, to develop an *in vitro* assay for resistance to bacterial wilt of potatoes, the resistant breeding line 'Saikai 35' and the susceptible variety 'Kennebec' were cultured under *in vitro* conditions. The inoculation conditions were examined by culturing the phylotype I/biovar 4 strain of *R. pseudosolanacearum* as inoculum. The optimal conditions were; inoculating plants at the 6~8 leaf stage at a bacterial concentration of 10^2 CFU ml⁻¹ and an incubation temperature of 28°C. Stems were more reliable as the site for evaluation of disease severity than leaves. This method evaluated nine cultivars with different degrees of resistance in the field. The results showed that varieties with higher resistance in the field had lower disease indices, suggesting that this test method is effective for evaluating bacterial wilt resistance in a controlled environment.

In Chapter 2, virulence of various RSSC strains was investigated. Twenty-six strains (phylotypes I and IV) of RSSC collected in Japanese potato fields were evaluated by *in vitro* assays for virulence against the resistant line 'Saikai 35' and the susceptible variety 'Aiyutaka'. The effect of environmental temperature on the virulence of RSSC strains was very diverse; and virulence varied greatly among strains. Hierarchical and non-hierarchical cluster analyses classified the 26 strains into five virulence types (pathotypes A~E), inconsistent with previous classification methods, including phylotypes. Therefore, selection for breeding stable resistant varieties in the target region should be based on virulence types.

In Chapter 3, QTL analysis was performed for resistance to potato bacterial wilt. The resistant diploid line '10-03-30' was crossed with the susceptible diploid line 'F₁-1' to generate an F₁ population of 94 genotypes. Resistance evaluation of the F₁ population was performed using an inoculation strain of *R. pseudosolanacearum* (phylotype I/biovar 4/race 1/pathotype A) in an *in vitro* assay. Five QTLs (*qBWR-1* to *qBWR-5*) were identified on potato chromosomes 1, 3, 7, 10, and 11, with each QTL contributing 9.3 to 18.4%. The resistant parent had resistance alleles at *qBWR-2*, *qBWR-3*, and *qBWR-4* and diseased alleles at *qBWR-1* and *qBWR-5*. The accumulation of resistance alleles at all five QTLs resulted in increased resistance compared to the resistant parent. The effect of interaction among QTLs at chromosomes 1, 7, and 11 on the degree of resistance was also observed. This is the first study to identify novel QTLs for resistance to bacterial wilt in potatoes using genome-wide markers.

In Chapter 4, a further expansion of the QTL analysis performed in Chapter 3 was conducted using the same F₁ population and the linkage maps with different RSSC strains and temperature conditions. An *in vitro* assay was used to inoculate different strains and species (phylotype I/biovar 3, phylotype I/biovar 4, and phylotype IV/biovar N2) and evaluate resistance under controlled conditions at 24 or 28°C. Ten QTLs were identified, including five major QTLs on chromosomes 1, 3, 5, 6, 7, 10, and 11. *PBWR-3* and *PBWR-7*, the major QTLs, showed stable resistance to *R. pseudosolanacearum* (phylotype I) and *R. syzygii* (phylotype IV), whereas *PBWR-6b*, also a major QTL, showed strain-specific and more effective properties at low temperatures against *R. pseudosolanacearum* (phylotype I/biovar

3). Therefore, it is suggested that effective bacterial wilt resistant cultivars can be developed by combining broad resistance QTL and strain-specific resistance QTL.

In Chapter 5, to develop DNA markers for *PBWR-6b*, the nucleotide sequence of one of the candidate genes located within the QTL region of *PBWR-6b* was compared between the parents used for QTL analysis. The resistance allele was identified, and resistance allele-specific molecular markers Rbw6-1 and Rbw6-2 were developed for *PBWR-6b*. *PBWR-6b* is thought to be derived from *S. tuberosum* subsp. *andigena*, the hybrid parent of 'Inca-no-mezame'. Both markers were detected only in the 'Inca-no-mezame' progeny among 107 potato cultivar and breeding lines. The developed resistance allele-specific DNA markers demonstrated that it is possible to select resistant individuals from diploid and tetraploid populations and inferred that the mode of inheritance of *PBWR-6b* is dominance. Furthermore, Rbw6-2 was incorporated into an existing multiplex polymerase chain reaction (PCR) method to select for resistance to bacterial wilt (*PBWR-6b*), golden cyst nematode (*H1*), *Potato virus Y* (*Ryhc*), *Potato virus X* (*Rx1*), and late blight (*R1* and 'Saya-akane'-derived R2). This method is expected to improve the efficiency of breeding for resistance to bacterial wilt in potato.

In conclusion, the *in vitro* assay method developed in this study is reliable and enable to evaluate bacterial wilt resistance more efficiently. Since the RSSC strains in Japan were classified into five virulence types, varieties with stable resistance in a wide range of regions in Japan could be bred by considering these virulence types. Major resistance QTLs were identified, which made possible to develop DNA markers. One of markers diagnostic to a major resistance QTL,

PBWR-6b, was incorporated into the existing multiplex PCR, which enabled to simultaneously detect six major disease and pest resistance genes. Based on these findings and the developed technologies, it is expected to breed more efficiently bacterial wilt resistant varieties.

引用文献

- Abebe AM, Choi J, Kim Y, Oh CS, Yeam I, Nou IS, Lee JM (2020) Development of diagnostic molecular markers for marker-assisted breeding against bacterial wilt in tomato. *Breed Sci* 70:462–473.
- Adhikari TB, Basnyat RC (1998) Effect of crop rotation and cultivar resistance on bacterial wilt of tomato in Nepal. *Can J Plant Pathol* 20:283–287.
- Andino M, Gaiero P, González-Barrios P, Galván G, Vilaró F, Speranza P (2022) Potato introgressive hybridisation breeding for bacterial wilt resistance using *Solanum commersonii* Dun. as donor: genetic and agronomic characterisation of a backcross 3 progeny. *Potato Res* 65:119–136.
- Andolfo G, Sanseverino W, Rombauts S, Van de Peer Y, Bradeen JM, Carputo D, Frusciante L, Ercolano MR (2013) Overview of tomato (*Solanum lycopersicum*) candidate pathogen recognition genes reveals important *Solanum* R locus dynamics. *New Phytol* 197:223–237.
- 浅間和夫 (1978) 作物品種名雑考 (6) ばれいしょ 1. *農業技術* 33:519–522.
- Aslam MN, Mukhtar T, Hussain MA, Raheel M (2017) Assessment of resistance to bacterial wilt incited by *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. *J Plant Dis Prot* 124:585–590.
- Bali S, Sathuvalli V, Brown C, Novy R, Ewing L, Debons J, Douches D, Coombs J, Navarre D, Whitworth J, Charlton B, Yilma S, Shock C, Stark J, Pavék M, Knowles NR (2017) Genetic fingerprinting of potato varieties from the Northwest Potato Variety Development Program. *Am J Potato Res* 94:54–63.
- Ballvora A, Hesselbach J, Niewöhner J, Leiste D, Salamini F, Gebhardt C (1995)

Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol Gen Genet* 249:82–90.

Ballvora A, Ercolano MR, Weiß J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamini F, Gebhardt C (2002) The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of resistance genes. *Plant J* 30:361–371.

Barone A, Ritter E, Schachtschabel U, Debener T, Salamini F, Gebhardt C (1990) Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Gen Genet* 224:177–182.

Boschi F, Schvartzman C, Murchio S, Ferreira V, Siri MI, Galván GA, Smoker M, Stransfeld L, Zipfel C, Vilaró FL, Dalla-Rizza M (2017) Enhanced bacterial wilt resistance in potato through expression of *Arabidopsis* EFR and introgression of quantitative resistance from *Solanum commersonii*. *Front Plant Sci* 8:1642.

Bradeen JM, Haynes KG (2011) Introduction to potato. In: Bradeen JM, Kole C (eds) *Genetics, genomics and breeding of potato*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp 1–19.

Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889–890.

Buddenhagen IW, Sequeira L, Kelman A (1962) Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726.

Buddenhagen I, Kelman A (1964) Biological and physiological aspects of bacterial

- wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu Rev Phytopathol 2:203–230.
- Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J, Besse P (2006) Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. Theor Appl Genet 113:110–121.
- Carputo D, Aversano R, Barone A, Di Matteo A, Iorizzo M, Sigillo L, Zoina A, Frusciante L (2009) Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. Am J Pot Res 86:196–202.
- Chaparro JM, Sheflin AM, Manter DK, Vivanco JM (2012) Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. Biol Fert Soils 48:489–499.
- Chen L, Guo X, Xie C, He L, Cai X, Tian L, Song B, Liu J (2013) Nuclear and cytoplasmic genome components of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense* somatic hybrids and three SSR alleles related to bacterial wilt resistance. Theor Appl Genet 126:1861–1872.
- Ciampi L, Sequeira L (1980) Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. Am Potato J 57:307–317.
- Cipar MS, Peloquin SJ, Hougas RW (1964) Inheritance of incompatibility in hybrids between *Solanum tuberosum* haploids and diploid species. Euphytica 13:163–172.
- Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM (1993) *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. Development 119:397–418.
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in

Arabidopsis. Cell 89:575–585.

Dalla-Rizza M, Schwartzman C, Murchio S, Berrueta C, Boschi F, Menoni M, Lenzi A, Gimenez G (2022) Field performance of resistant potato genotypes transformed with the EFR receptor from *Arabidopsis thaliana* in the absence of bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). Plant Pathol J 38:239–247.

da Silva WL, Ingram J, Hackett CA, Coombs JJ, Douches D, Bryan GJ, De Jong W, Gray S (2017) Mapping loci that control tuber and foliar symptoms caused by PVY in autotetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). G3 Genes|Genomes|Genetics 7:3587–3595.

de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T (2005) Carthagene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. Bioinformatics 21:1703–1704.

Denny T (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam SS (ed) Plant-associated bacteria. Springer, Dordrecht, pp 573–644.

Elphinstone JG (1994) Inheritance of resistance to bacterial diseases. In: Bradshaw JE, Mackay GR (eds) Potato genetics. CAB international, Wallingford, pp 429–446.

Elphinstone JG (2005) The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St Paul, pp 9–28.

Engel F (1970) Exploration of the Chilca Canyon, Peru. Curr Anthropol 11:55–58.

FAOSTAT (2023) Food and Agricultural Organization statistical database, crop production. <https://www.fao.org/faostat/en/#compareh> (Accessed 1 May 2023).

- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St. Paul, pp 449–461.
- Ferreira V, Pianzola MJ, Vilaró FL, Galván GA, Tondo ML, Rodriguez MV, Orellano EG, Valls M, Siri MI (2017) Interspecific potato breeding lines display differential colonization patterns and induced defense responses after *Ralstonia solanacearum* infection. *Front Plant Sci* 8:1424.
- Figueiredo L, Santos RB, Figueiredo A (2021) Defense and offense strategies: the role of aspartic proteases in plant-pathogen interactions. *Biology* 10:75.
- Fock I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, Sihachakr D. (2000) Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Sci* 160:165–176.
- Fock I, Collonnier C, Luisetti J, Purwito A, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, Sihachakr D (2001) Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. *Plant Physiol Biochem* 39:899–908.
- Fort S, Ferreira V, Murchio S, Schwartzman C, Galván GA, Vilaró F, Siri MI, Dallarizza M (2020) Potato⁴ plants transformed with the *Arabidopsis* EF-Tu receptor (EFR) show restricted pathogen colonization and enhanced bacterial wilt resistance under conditions resembling natural field infections. *Agrocienc Urug* 24:e413.
- Fox J (2005) The R Commander: a basic statistics graphical user interface to R. J

Stat Softw 14:1–42.

Frank MP, Graebing P, Chib JS (2002) Effect of soil moisture and sample depth on pesticide photolysis. *J Agr Food Chem* 50:2607–2614.

Frary A, Doganlar S, Frary A (2016) Synteny among Solanaceae genomes. In: Causse M, Giovannoni J, Bouzayen M, Zouine M (eds) *The tomato genome*. Springer, Berlin, pp 217–243.

French ER, De Lindo L (1982) Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: specificity and temperature sensitivity. *Phytopathology* 72:1408–1412.

French ER, Anguiz R, Aley P (1998) The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum*, for the integrated control of bacterial wilt. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (eds) *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. Springer Verlag, Berlin, pp 381–385.

Fujimatsu M, Hashizume H, Fudan T, Koma Y, Sanetomo R, Ono S, Hosaka K (2018) Harimaru: a new potato variety for a local specialty. *Breed Sci* 68:284–288.

Galili T (2015) dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics* 31:3718–3720.

Gebhardt C, Valkonen JPT (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu Rev Phytopathol* 39:79–102.

Gebhardt C, Bellin D, Henselewski H, Lehmann W, Schwarzfischer J, Valkonen JPT (2006) Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet* 112:1458–1464.

Gillings MR, Fahy P (1994) Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: Hayward AC, Hartman GL

(eds) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, pp 95–112.

Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH, Marco Y (2003) ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J* 36:353–365.

Gonzalez LC, Sequeira L, Rowe PR (1973) A root inoculation technique to screen potato seedlings for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Am Potato J* 50:96–104.

Goodrich CE (1863) The origination and test culture of seedling potatoes. *Trans NYS Agric Soc* 23:89–134.

Grattapaglia D, Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121–1137.

Grimault V, Prior P (1993) Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathol* 42:589–594.

Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong LY, Zhang LX, Sun PH (2004) Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol Control* 29: 66–72.

Gutarra L, Herrera J, Fernandez E, Kreuze J, Lindqvist-Kreuze H (2017) Diversity, pathogenicity, and current occurrence of bacterial wilt bacterium *Ralstonia solanacearum* in Peru. *Front Plant Sci* 8:1221.

波部一平 (2016) ジャガイモにおける青枯病抵抗性 *in vitro* 検定法を利用し

た青枯病菌 phylotype I およびIVの温度による発病特性. 九病虫研究会報 62:20–26.

Hämäläinen JH, Watanabe KN, Valkonen JPT, Arihara A, Plaisted RL, Pehu E, Miller L, Slack SA (1997) Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor Appl Genet* 94:192–197.

Hanemian M, Barlet X, Sorin C, Yadeta KA, Keller H, Favery B, Simon R, Thomma BPHJ, Hartmann C, Crespi M, Marco Y, Tremousaygue D, Deslandes L (2016) *Arabidopsis* CLAVATA1 and CLAVATA2 receptors contribute to *Ralstonia solanacearum* pathogenicity through a miR169-dependent pathway. *New Phytol* 211:502–515.

Hawkes JG (1962) Introgression in certain wild potato species. *Euphytica* 11:26–35.

Hawkes JG (1990) *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press, London.

Hayward AC (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 27:265–277.

Hayward AC (1985) Bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in Asia and Australia: an overview. In: Persley GJ (ed) *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific: proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Baños, Philippines, 8–10 October 1985*. ACIAR, Canberra, pp 15–24.

Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 29:65–87.

Hayward AC (1994) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward AC,

- Hartman GL (eds) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, pp 9–24.
- Hendrick CA, Sequeira L (1984) Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 48:94–101.
- Hong JC, Norman DJ, Reed DL, Momol MT, Jones JB (2012) Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the Southeastern United States. *Phytopathology* 102:924–936.
- Horita M, Tsuchiya K (2001) Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91:399–407.
- Horita M, Suga Y, Ooshiro A, Tsuchiya K (2010) Analysis of genetic and biological characters of Japanese potato strains of *Ralstonia solanacearum*. *J Gen Plant Pathol* 76:196–207.
- Horita M, Tsuchiya K (2012) MAFF microorganism genetic resource manual No. 12 (ver. 2) *Ralstonia solanacearum* (in Japanese). National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba.
- Horita M, Tsuchiya K, Suga Y, Yano K, Waki T, Kurose D, Furuya N (2014) Current classification of *Ralstonia solanacearum* and genetic diversity of the strains in Japan. *J Gen Plant Pathol* 80:455–465.
- Hosaka K, Hanneman RE Jr (1998) Genetic of self-compatibility in a self-incompatible wild diploid potato species *Solanum chacoense*. 1. Detection of an S locus inhibitor (*Sli*) gene. *Euphytica* 99:191–197.
- Hosaka K, Sanetomo R (2020a) Broadening genetic diversity of the Japanese potato gene pool. *Am J Potato Res* 97:127–142.
- Hosaka K, Sanetomo R (2020b) Creation of a highly homozygous diploid potato.

- using the *S* locus inhibitor (*Sli*) gene. *Euphytica* 216:169.
- Howard HM (1970) Genetics of the potato *Solanum tuberosum*. Logos Press, London.
- Huet G (2014) Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Front Plant Sci* 5:715.
- Igarashi T, Tsuyama M, Ogawa K, Koizumi E, Sanetomo R, Hosaka K (2018) Evaluation of Japanese potatoes using single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Mol Breed* 39:9.
- 井川岳士・井出磨美・Yanetri Asi Nion・豊田剛己・黒田哲生・増田和成 (2008) 養液栽培へのリジンおよび拮抗菌の添加がトマト青枯病に及ぼす影響. *土と微生物* 62:9–14.
- Iwata H, Minamikawa MF, Kajiya-Kanegae H, Ishimori M, Hayashi T (2016) Genomics-assisted breeding in fruit trees. *Breed Sci* 66:100–115.
- Jansky SH, Charkowski AO, Douches DS, Gusmini G, Richael C, Bethke PC, Spooner DM, Novy RG, De Jong H, De Jong WS, Bamberg JB, Thompson AL, Bizimungu B, Holm DG, Brown CR, Haynes KG, Sathuvalli VR, Veilleux RE, Miller JC Jr, Bradeen JM, Jiang J (2016) Reinventing potato as diploid inbred line-based crop. *Crop Sci* 56:1412–1422.
- Jaworski CA, Webb RE, Goth RW, Phatak SC (1980) Relative resistance of potato cultivars to bacterial wilt. *Am Potato J* 57:159–165.
- Jeong Y, Kim J, Kang Y, Lee S, Hwang I (2007) Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis* 91:1277–1287.
- Ji P, Momol MT, Olson SM, Pradhanang PM, Jones JB (2005) Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions.

Plant Disease 89:497–500.

Jiang G, Wei Z, Xu J, Chen H, Zhang Y, She X, Macho AP, Ding W, Liao B (2017) Bacterial wilt in China: history, current status, and future perspectives. *Front Plant Sci* 8:1549.

鍛冶原寛・古橋典子・井上興・前田征之・野津あゆみ・瓦朋子・中保一浩 (2013) 夏秋トマト栽培での各種土壌消毒と高接ぎ木栽培による青枯病の防除. *近畿中国四国農研* 22:21–26.

鍛冶原寛・西田美沙子・瓦朋子・中保一浩 (2016) 夏秋栽培での高接ぎ木法によるピーマン青枯病の防除. *関西病虫研報* 58:1–5.

Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48:452–458.

Karim Z, Hossain M (2018) Management of bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) of potato: focus on natural bioactive compounds. *J Biodivers Conserv and Bioresour Manag* 4:73–92.

Katafiire M, Adipala E, Lemaga B, Olanya M, EI-Bedewy R, Ewell P (2005) Management of bacterial wilt of potato using one-season rotation crops in Southwestern Uganda. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. APS Press, St Paul, pp 197–203.

片山克己・木村貞夫・浜久助 (1983) ジャガイモ青枯病に関する研究. 第2報 秋作の多発要因, 特に温度について. *九病虫研会報* 29:15–18.

Katayama K, Kimura S (1984) Prevalence and temperature requirements of biovar II and IV strains of *Pseudomonas solanacearum* from potatoes. *Ann Phytopath Soc Japan* 50:476–482.

- 片山克己・木村貞夫 (1986) ジャガイモ青枯病の発生生態と防除に関する研究. 第1報 発生生態と病原細菌の系統. 長崎農試研報 14:1-30.
- 片山克己・木村貞夫 (1987) ジャガイモ青枯病の発生生態と防除に関する研究. 第2報 各種防除法およびその体系化. 長崎農試研報 15:29-57.
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- Kim B, Hwang IS, Lee HJ, Lee JM, Seo E, Choi D, Oh CS (2018) Identification of a molecular marker tightly linked to bacterial wilt resistance in tomato by genome-wide SNP analysis. *Theor Appl Genet* 131:1017-1030.
- Kim-Lee H, Moon JS, Hong YJ, Kim MS, Cho HM (2005) Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Am J Potato Res* 82:129-137.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12:172-175.
- Kreike CM, Kok-Westeneng AA, Vinke JH, Stiekema WJ (1996) Mapping of QTLs involved in nematode resistance, tuber yield and root development in *Solanum* sp. *Theor Appl Genet* 92:463-470.
- Kruglyak L, Lander ES (1995) A nonparametric approach for mapping quantitative trait loci. *Genetics* 139:1421-1428.
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 47:583-621.
- Kunwar S, Hsu YC, Lu SF, Wang JF, Jones JB, Hutton S, Paret M, Hanson P (2020) Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum*) accessions for resistance to phylotype I and phylotype II strains of *Ralstonia solanacearum* species

- complex under high temperatures. *Plant Breed* 139:389–401.
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16:3496–3507.
- 栗原浩・西川広栄・田畑建司・大久保隆弘（1963）馬鈴薯の栽培条件と生育との関係に関する解析的研究. *東北農試研報* 28:143-200.
- Kyriakidou M, Achakkagari SR, Gálvez López JH, Zhu X, Tang CY, Tai HH, Anglin NL, Ellis D, Strömviik MV (2020) Structural genome analysis in cultivated potato taxa. *Theor Appl Genet* 133:951–966.
- Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz B, Jones JDG, Zipfel C (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotechnol* 28:365–369.
- Laferriere LT, Helgeson JP, Allen C (1999) Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor Appl Genet* 98:1272–1278.
- Lan T, Zheng S, Yang L, Wu S, Wang B, Zhang S, Tong Z, Chen Y, Chen S, Duan Y, Wu W (2014) Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to bacterial wilt in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Breed* 133:672–677.
- Lebeau A, Daunay MC, Frary A, Palloix A, Wang JF, Dintinger J, Chiroleu F, Wicker E, Prior P (2011) Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101:154–165.
- Lebeau A, Gouy M, Daunay MC, Wicker E, Chiroleu F, Prior P, Frary A, Dintinger

- J (2013) Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor Appl Genet* 126:143–158.
- Leisner CP, Hamilton JP, Crisovan E, Manrique-Carpintero NC, Marand AP, Newton L, Pham GM, Jiang J, Douches DS, Jansky SH, Buell CR (2018) Genome sequence of M6, a diploid inbred clone of the high-glycoalkaloid-producing tuber-bearing potato species *Solanum chacoense*, reveals residual heterozygosity. *Plant J* 94:562–570.
- Lindhout P, Meijer D, Schotte T, Hutten RCB, Visser RGF, van Eck HJ (2011) Towards F₁ hybrid seed potato breeding. *Potato Res* 54:301–312.
- Liu Y, Shi J, Feng Y, Yang X, Li X, Shen Q (2013) Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the application of antagonistic strains in combination with organic fertilizer. *Biol Fertil Soils* 49:447–464.
- Lopes CA, Carvalho ADF, Pereira AS, Azevedo FQ, Castro CM, Emygdio BM, Silva GO (2021) Performance of *Solanum phureja*-derived bacterial-wilt resistant potato clones in a field naturally infested with *Ralstonia solanacearum* in Central Brazil. *Hortic Bras* 39:411–416.
- Luck J, Spackman M, Freeman A, Trebicki P, Griffiths W, Finlay K, Chakraborty S (2011) Climate change and diseases of food crops. *Plant Pathol* 60:113–121.
- Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, Hornik K (2021) cluster: cluster analysis basics and extensions. R Package Version 2.1.2.
- Mamphogoro TP, Babalola OO, Aiyegoro OA (2020) Sustainable management strategies for bacterial wilt of sweet peppers (*Capsicum annuum*) and other Solanaceous crops. *J Appl Microbiol* 129:496–508.
- Mangin B, Thoquet P, Olivier J, Grimsley NH (1999) Temporal and multiple

quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* 151:1165–1172.

Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:614–629.

McCarthy JJ, Canziani OF, Leary NA, Dokken DJ, White KS (2001) *Climate change 2001. Impacts, adaptation, and vulnerability*. Cambridge University Press, Cambridge.

Mendoza HA, Haynes FL (1974) Genetic relationship among potato cultivars grown in the United States. *HortScience* 9:328–330.

Mendoza HA (1988) Progress in resistance breeding in potatoes as a function of efficiency of screening procedures. In: *Bacterial disease of the potato. Report of planning conference, CIP, Lima*, pp 39–64.

Meyers BC, Chin DB, Shen KA, Sivaramakrishnan S, Lavelle DO, Zhang Z, Michelmore RW (1998) The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10:1817–1832.

Michel VV, Mew TW (1998) Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. *Phytopathology* 88:300–305.

三木静恵・池田健太郎・瓦朋子・中保一浩 (2012) ナス青枯病に対する高接ぎ木法の防除効果. *関東病虫研報* 59:53–54.

Mimura Y, Inoue T, Minamiyama Y, Kubo N (2012) An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breed Sci* 62:93–98.

Montanelli C, Chiari A, Chiari T, Stefanini F, Nascari G (1995) Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. *Euphytica* 81:35–43.

森元幸・高田明子・梅村芳樹・米田勉・木村鉄也・高田憲和・小林晃・津田昌吾・中尾敬・吉田勉・遠藤千絵・林一也 (2009) 橙黄肉色を有する二倍体のバレイショ品種「インカのめざめ」の育成. *育種学研究* 112:53–58.

Mori K, Sakamoto Y, Mukojima N, Tamiya S, Nakao T, Ishii T, Hosaka K (2011) Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica* 180:347–355.

Mori K, Mukojima N, Nakao T, Tamiya S, Sakamoto Y, Sohbaru N, Hayashi K, Watanuki H, Nara K, Yamazaki K, Ishii T, Hosaka K (2012) Germplasm release: Saikai 35, a male and female fertile breeding line carrying *Solanum phureja*-derived cytoplasm and potato cyst nematode resistance (*H1*) and *Potato virus Y* resistance (*Ryhc*) genes. *Am J Potato Res* 89:63–72.

Mori K, Asano K, Tamiya S, Nakao T, Mori M (2015) Challenges of breeding potato cultivars to grow in various environments and to meet different demands. *Breed Sci* 65:3–16.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.

Muthoni J, Shimelis H, Melis R (2012) Management of bacterial wilt [*Rhalsstonia solanacearum* Yabuuchi et al., 1995] of potatoes: opportunity for host resistance in Kenya. *J Agric Sci* 4:64–78.

Muthoni J, Shimelis H, Melis R, Kinyua ZM (2014) Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al.) in the tropical highlands. *Am J Potato Res* 91:215–232.

Muthoni J, Shimelis H, Melis R (2020) Conventional breeding of potatoes for resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*): any light in the horizon? *Austr J Crop Sci* 14:485–494.

中保一浩 (2019) 新規資材 (糖含有珪藻土, 糖蜜吸着資材) を用いた土壤還元消毒. *植物防疫* 73:738–742.

中保一浩 (2021) トマトの青枯病抵抗性機構と防除に関する研究. *日植病報* 87:117–120.

Nakaho K, Takaya S, Sumida Y (1996) Conditions that increase latent infection of grafted or non-grafted tomatoes with *Pseudomonas solanacearum*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 62:234–239.

Namisy A, Chen JR, Prohens J, Metwally E, Elmahrouk M, Rakha M (2019) Screening cultivated eggplant and wild relatives for resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Agriculture* 9:157.

成田武四 (1958) 北海道における馬鈴薯細菌病に関する研究. *北海道立農試研報* 8:1–80.

Navarro S, Vela N, Navarro G (2007) An overview on the environmental behavior of pesticide residues in soils. *Span J Agric Res* 5:357–375.

野津あゆみ・中保一浩 (2014) 北海道におけるトマト青枯病に対する深耕土壤還元消毒と高接ぎ木の組み合わせ処理の防除効果. *北日本病虫研報* 65:59–63.

Obidiegwu JE, Sanetomo R, Flath K, Tacke E, Hofferbert HR, Hofmann A,

Walkemeier B, Gebhardt C (2015) Genomic architecture of potato resistance to *Synchytrium endobioticum* disentangled using SSR markers and the 8.3k SolCAP SNP genotyping array. BMC Genet 16:38.

大林憲吾・中田（田島）奈津子・茶谷正孝・小村国則（2010）DNA マーカーを利用したバレイシヨ病虫害抵抗性検定法の開発．第 1 報 ジャガイモ X ウイルス，ジャガイモシストセンチュウ，ジャガイモ疫病抵抗性検定法．長崎農技セ研報 1:1-26.

Ohbayashi K (2019) The *Rx* gene derived USDA 41956 and *Rx1* gene derived CPC 1673 confer equal resistance to the migration of *Potato virus X* from potato leaves to tubers. Euphytica 215:90.

大城篤・高江洲和子・田場聡・上原美歌・高江洲賢文・伊良波幸和（2006）アメリカフウロの土壌混和と敷きわら被覆処理によるジャガイモ青枯病の防除．雑草研究 51:28-30.

Ortiz R, Peloquin SJ (1994) Use of 24-chromosome potatoes (diploids and dihaploids) for genetical analysis. In: Bradshaw JE, Mackay GR (eds) Potato genetics. CAB international, Wallingford, pp 133-154.

Paal J, Henselewski H, Muth J, Meksem K, Menéndez CM, Salamini F, Ballvora A, Gebhardt C (2004) Molecular cloning of the potato *Grol-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. Plant J 38:285-297.

Patil VU, Gopal J, Singh BP (2012) Improvement for bacterial wilt resistance in potato by conventional and biotechnological approaches. Agric Res 1:299-316.

Peeters N, Guidot A, Vailliau F, Valls M (2013) *Ralstonia solanacearum*, a

- widespread bacterial wilt plant pathogen in the post-genomic era. *Mol Plant Pathol* 14:651–662.
- Peloquin SJ, Werner JE, Yerk GL (1990) The use of potato haploids in genetics and breeding. In: Tsuchiya T, Gupta PK (eds) *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B*. Elsevier, Amsterdam, pp 79–92.
- Pilet-Nayel ML, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan MC, Fournet S, Durel CE, Delourme R (2017) Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Front Plant Sci* 8:1838.
- Plaisted RL, Hoopes RW (1989) The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. *Am Potato J* 66:603–627.
- Provan J, Powell W, Dewar H, Bryan G, Machray GC, Waugh R (1999) An extreme cytoplasmic bottleneck in the modern European cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is not reflected in decreased levels of nuclear diversity. *Proc Biol Sci* 266:633–639.
- Qian YL, X.S. Wang XS, Wang DZ, Zhang LN, Zu CL, Gao ZL, Zhang HJ, Wang ZY, Sun XY, Yao DN (2013) The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco (*N. tabacum* L.). *Euphytica* 192:259–266.
- Quezado-Soares AM, Lopes CA, Buso JA, Melo PE (1997) Evaluation in Brazil of potato clones resistant to bacterial wilt in the Philippines. *Bact Wilt Newsl* 14:1–3
- Rahman MA, Abdullah H, Vanhaecke M (1999) Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *J Phytopathol* 147:129–140.
- Ramakrishnan AP, Ritland CE, Blas Sevillano RH, Riseman A (2015) Review of

- potato molecular markers to enhance trait selection. *Am J Potato Res* 92:455–472.
- Ravelomanantsoa S, Vernière C, Rieux A, Costet L, Chiroleu F, Arribat S, Cellier G, Pruvost O, Poussier S, Robéne I, Guérin F, Prior P (2018) Molecular epidemiology of bacterial wilt in the Madagascar highlands caused by Andean (Phylotype IIB-1) and African (Phylotype III) brown rot strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Front Plant Sci* 8:2258.
- R Core Team (2017) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. (<https://www.R-project.org/>)
- Rokunuzzaman M, Hayakawa A, Yamane S, Tanaka S, Ohnishi K (2016) Effect of soil disinfection with chemical and biological methods on bacterial communities. *Egypt J Basic Appl Sci* 3:141–148.
- Ross H (1986) Potato breeding-problems and perspectives. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Rowe PR, Sequeira L (1970) Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. *Phytopathology* 60:1499–1501.
- Rowe PR, Sequeira L (1972) Development of potato clones with resistance to bacterial wilt. In: French ER (ed) Prospects for the potato in the developing world. CIP, Lima, pp 206–211.
- Ruggieri V, Nunziata A, Barone A (2014) Positive selection in the leucine-rich repeat domain of *Grol* genes in *Solanum* species. *J Genet* 93:755–765.
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii*

and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 64:3087–3103.

Safni I, Subandiyah S, Fegan M (2018) Ecology, epidemiology and disease management of *Ralstonia syzygii* in Indonesia. Front Microbiol 9:419.

Sagar V, Jeevalatha A, Mian S, Chakrabarti SK, Gurjar MS, Arora RK, Sharma S, Bakade RR, Singh BP (2014) Potato bacterial wilt in India caused by strains of phylotype I, II and IV of *Ralstonia solanacearum*. Eur J Plant Pathol 138:51–65.

Sakamoto Y, Mori K, Matsuo Y, Mukojima N, Watanabe W, Sobaru N, Tamiya S, Nakao T, Hayashi K, Watanuki H, Nara K, Yamazaki K, Chaya M (2017) Breeding of a new potato variety ‘Nagasaki Kogane’ with high eating quality, high carotenoid content, and resistance to diseases and pests. Breed Sci 67:320–326.

Salaman RN (1910) The inheritance of colour and other characters in the potato. J Genet 1:7–46.

Salaman RN (1926) Potato varieties. Cambridge University Press, Cambridge.

Salaman RN, Burton WG (1949) The history and social influence of the potato (revised edition). Cambridge University Press, Cambridge.

Salgon S, Jourda C, Sauvage C, Daunay MC, Reynaud B, Wicker E, Dintinger J (2017) Eggplant resistance to the *Ralstonia solanacearum* species complex

involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci. *Front Plant Sci* 8:828.

Salgon S, Raynal M, Lebon S, Baptiste JM, Daunay MC, Dintinger J, Jourda C (2018) Genotyping by sequencing highlights a polygenic resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum* in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Int J Mol Sci* 19:357.

實友玲奈・梅基直行・波部一平・保坂和良・関根久子 (2023) 新技術バレイショ育種ワークショップ. 育種学研究 (doi: 10.1270/jsbbr.25.W02).

沢畑秀・田淵尚一・藤山俊計・小村国則 (1987) ばれいしょ新品種「メイホウ」について. 長崎農試研報 15:1-19.

Schmiediche P (1988) Breeding for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Bacterial diseases of the potato. In: Report of the Planning Conference on Bacterial Diseases of the Potato 1987. CIP, Lima, pp 19-27.

Sequeira L, Rowe PR (1969) Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Am Potato J* 46:451-462.

Sequeira L (1979) Development of resistance to bacterial wilt derived from *Solanum phureja*. In: Developments in control of potato bacterial diseases. CIP, Lima, pp 55-62.

Sharma SK, Bolser D, de Boer J, Sønderkær M, Amoros W, Carboni MF, D'Ambrosio JM, de la Cruz G, Di Genova A, Douches DS, Eguiluz M, Guo X, Guzman F, Hackett CA, Hamilton JP, Li G, Li Y, Lozano R, Maass A, Marshall D, Martinez D, McLean K, Mejía N, Milne L, Munive S, Nagy I, Ponce O, Ramirez M, Simon R, Thomson SJ, Torres Y, Waugh R, Zhang Z,

- Huang S, Visser RGF, Bachem CWB, Sagredo B, Feingold SE, Orjeda G, Veilleux RE, Bonierbale M, Jacobs JME, Milbourne D, Martin DMA, Bryan GJ (2013) Construction of reference chromosome-scale pseudomolecules for potato: integrating the potato genome with genetic and physical maps. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 3:2031–2047.
- Sharma K, Kreuze J, Abdurahman A, Parker M, Nduwayezu A, Rukundo P (2021) Molecular diversity and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* species complex associated with bacterial wilt of potato in Rwanda. *Plant Dis* 105:770–779.
- Shin IS, Hsu JC, Huang SM, Chen JR, Wang JF, Hanson P, Schafleitner R (2020) Construction of a single nucleotide polymorphism marker based QTL map and validation of resistance loci to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* species complex in tomato. *Euphytica* 216:54.
- Siri MI, Galván GA, Quirici L, Silvera E, Villanueva P, Ferreira F, Franco Fraguas L, Pianzola MJ (2009) Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica* 165:371–382.
- Smith EF (1896) A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato. *US Dept Agric Div Veg Phys Path Bull* 12:1–26.
- Spooner DM, Hijmans RJ (2001) Potato systematics and germplasm collecting, 1989–2000. *Am J Potato Res* 78:237–268.
- Spooner DM, Ghislain M, Simon R, Jansky SH, Gavrilenko T (2014) Systematics, diversity, genetics and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot Rev* 80:283–383.

- Stahl Y, Grabowski S, Bleckmann A, Kühnemuth R, Weidtkamp-Peters S, Pinto KG, Kirschner GK, Schmid JB, Wink RH, Hülsewede A, Felekyan S, Seidel CAM, Simon R (2013) Moderation of *Arabidopsis* root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr Biol* 23:362–371.
- Suga Y, Horita M, Umekita M, Furuya N, Tsuchiya K (2013) Pathogenic characters of Japanese potato strains of *Ralstonia solanacearum*. *J Gen Plant Pathol* 79:110–114.
- Sul IW, Korban SS (1996) A highly efficient method for isolating genomic DNA from plant tissues. *Plant Tiss Cult Biotech* 2:113–116.
- 田口啓作 (1943) 馬鈴薯新優良品種「馬鈴薯農林一号」の特性. *北農* 10:317–322.
- 竹内徹・佐々木純・鈴木孝子・堀田治邦・池谷聡 (2008) ジャガイモ Y ウイルス抵抗性遺伝子 *Ryhc* およびジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *HI* の高密度連鎖地図と高精度 DNA マーカー. *育種学研究* 10(別1):148.
- Tan MYA, Park TH, Alles R, Hutten RCB, Visser RGF, van Eck HJ (2009) *GpaXI^{tar}* originating from *Solanum tarijense* is a major resistance locus to *Globodera pallida* and is localised on chromosome *11* of potato. *Theor Appl Genet* 119:1477–1487.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141–1160.

- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H, Grimsley N (1996a) Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. *Mol Plant Microbe Interact* 9:826–836.
- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Prior P, Anais G, Mangin B, Bazin B, Nazer R, Grimsley N (1996b) Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Mol Plant Microbe Interact* 9:837–842.
- Thurston HD (1963) Bacterial wilt of potatoes in Colombia. *Am Potato J* 40:381–390.
- Thurston HD, Lozano TJC (1968) Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. *Am Potato J* 45:51–55.
- Tibshirani R, Walther G, Hastie T (2001) Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic. *J R Stat Soc B* 63:411–423.
- Trenberth KE (2005) The impact of climate change and variability on heavy precipitation, floods, and droughts. In: Anderson MG (ed) *Encyclopedia of hydrological sciences*. Wiley, Hoboken.
- Tung PX, Rasco ET Jr, Vander Zaag P, Schmiediche P (1990a) Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: I. effects of sources of resistance and adaptation. *Euphytica* 45:203–210.
- Tung PX, Rasco ET, Vander Zaag P, Schmiediche P (1990b) Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: II. aspects of host-pathogen-environment interaction. *Euphytica* 45:211–215.
- Tung PX, Hermsen JGTh, Vander Zaag P, Schmiediche P (1992) Effects of heat tolerance on expression of resistance to *Pseudomonas solanacearum* E. F.

- Smith in potato. *Potato Res* 35:321–328.
- Tung PX, Hermesen JGTh, Vander Zaag P, Schmiediche PE (1993) Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith in tetraploid potato. *Plant Breed* 111:23–30.
- Vasse J, Frey P, Trigalet A (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 8:241–251.
- Villa JE, Tsuchiya K, Horita M, Natural M, Opina N, Hyakumachi M (2005) Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. *J Gen Plant Pathol* 71:39–46.
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93:77–78.
- Wachowska U, Irzykowski W, Jędrzycka M, Stasiulewicz-Paluch AD, Glowacka K (2013) Biological control of winter wheat pathogens with the use of antagonistic *Sphingomonas* bacteria under greenhouse conditions. *Biocontrol Sci Technol* 23:1110–1122.
- Waki T, Horita M, Kurose D, Mulya K, Tsuchiya K (2013) Genetic diversity of Zingiberaceae plant isolates of *Ralstonia solanacearum* in the Asia-Pacific region. *Jpn Agric Res Q* 47:283–294.
- Wang S, Basten CJ, Graffney P, Zeng ZB (2005) Windows QTL Cartographer 2.5 user manual. Bioinformatics Research Center, North Carolina State University, Raleigh.
- Wang Y, Garrido-Oter R, Wu J, Winkelmüller TM, Agler M, Colby T, Nobori T,

- Kemen E, Tsuda K (2019) Site-specific cleavage of bacterial MucD by secreted proteases mediates antibacterial resistance in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 10:2853.
- Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L, Grimsley NH (2000) Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol Plant Microbe Interact* 13:6–13.
- Wang JF, Ho FI, Hong Truong HT, Huang SM, Balatero CH, Dittapongpitch V, Hidayati N (2013) Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar ‘Hawaii 7996’ to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190:241–252.
- Watanabe K (2015) Potato genetics, genomics, and applications. *Breed Sci* 65:53–68.
- Watanabe K, El-Nashaar HM, Iwanaga M (1992) Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR) 2n pollen via 4x×2x crosses in potatoes. *Euphytica* 60:21–26.
- Watanabe JA, Orrillo M, Watanabe KN (1999a) Frequency of potato genotypes with multiple quantitative pest resistance traits in 4x × 2x crosses. *Breed Sci* 49:53–61.
- Watanabe JA, Orrillo M, Watanabe KN (1999b) Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) of potato evaluated by survival and yield performance at high temperatures. *Breed Sci* 49:63–68.
- Wei Q, Wang J, Wang W, Hu T, Hu H, Bao C (2020) A high quality chromosome-

level genome assembly reveals genetics for important traits in eggplant. Hort Res 7:153.

Wicker E, Lefeuvre P, de Cambiaire JC, Lemaire C, Poussier S, Prior P (2012) Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. Int Soc Microb Ecol J 6:961–974.

Xia Y, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z, Patel K, Dixon RA, Lamb C (2004) An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. EMBO J 23:980–988.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol Immunol 39:897–904.

Yanping Z, Hui L, Hairui Z, Gao G (2014) Identification and utility of sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers linked to bacterial wilt resistance genes in potato. Afr J Biotechnol 13:1314–1322.

Zhang C, Chen H, Zhuang RR, Chen YT, Deng Y, Cai TC, Wang SY, Liu QZ, Tang RH, Shan SH, Pan RL, Chen LS, Zhuang WJ (2019) Overexpression of the peanut *CLAVATA1*-like leucine-rich repeat receptor-like kinase *AhRLK1* confers increased resistance to bacterial wilt in tobacco. J Exp Bot 70:5407–5421.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol 7:203–214.

Zeng ZB (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457–1468.

謝辞

多忙の中で依頼研究員として数ヶ月間に渡り研究室に受け入れていただき、本研究における遺伝解析に関する手法について貴重な御指導と御助言を頂いた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門の布目司博士，および宮武宏治博士に深く感謝申し上げます。加えて，遺伝解析全般に無知だった小生を研究室に受け入れていただき，貴重な御指導と御助言を頂いた国立大学法人新潟大学農学部教授の山崎将紀博士に深く感謝申し上げます。そして，連鎖地図の作成方法について貴重な御指導と御助言を頂いた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 農業情報研究センターの林武司博士に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり，長崎県農林技術開発センターの菅康弘博士，森一幸博士，および坂本悠氏には，多数の育種素材および青枯病菌株を御提供いただき，加えて貴重な御助言と叱咤激励をいただき深く感謝申し上げます。農林技術開発センターの中尾敬氏，茶谷正孝氏，向島信洋氏および大林憲吾氏には，多数の育種素材を御提供いただき，加えて貴重な御助言をいただき研究環境を整えていただきました。深く感謝申し上げます。

シーケンス解析手法について貴重な御助言を頂きました理化学研究所環境資源科学研究センターの梅基直行博士に深く感謝申し上げます。

遺伝解析手法について，特に SNP データの取り扱いに関して貴重な御助言を頂きました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 中日本農業研究センターの西中未央氏に深く感謝申し上げます。

さらに本研究の遂行においてご協力いただきました長崎県農林技術開発センターの研究員，農事員，スタッフの皆様に感謝いたします。

本学位論文をまとめるにあたり、国立大学法人北海道国立大学機構帯広畜産大学バレイショ遺伝資源開発学講座特任教授の保坂和良博士には、研究の推進について懇切な御指導と御助言を頂き、そして研究者としての心得をご教示頂き、さらに御校閲を受け賜りました。心より感謝申し上げます。加えて、帯広畜産大学環境農学研究部門准教授の實友玲奈博士には、研究の推進について懇切な御指導と御助言を頂きました。謹んで感謝申し上げます。お二方には、高次倍数性植物であるバレイショの遺伝解析・育種研究に関するその難しさ、深さ、そして面白さに気付かせて頂きました。

最後になりましたが、本研究の遂行にあたり、暖かい激励と協力をしてくれた妻と長女、次女、そして長男にも感謝の意を示します。