

AAL 毒素感受性を決定する *AscI* 遺伝子の多様性解析に基づく

トマト栽培化・進化に関する研究

Study on tomato domestication and evolution

based on diversity analysis of *AscI* gene determining AAL-toxin susceptibility

2021.3

東京農工大学

生物システム応用科学府

食料エネルギーシステム科学専攻

都筑 麟

## 目次

1	総合序論 .....	1
2	中南米産トマトの採集と形態学的同定 .....	6
2.1	緒言 .....	6
2.2	材料および方法 .....	9
2.2.1	食用トマト .....	9
2.2.2	メキシコ産トマト .....	9
2.2.3	エクアドル産トマト .....	9
2.2.4	ペルー産トマト .....	10
2.2.5	トマト小葉の形態観察と同定 .....	10
2.3	結果 .....	21
2.3.1	メキシコ産トマトの形態学的特徴に基づく同定 .....	21
2.3.2	エクアドル産トマトの形態学的特徴に基づく同定 .....	27
2.3.3	ペルー産トマトの形態学的特徴に基づく同定 .....	27
2.4	考察 .....	39
3	中南米産トマトの分子系統解析 .....	63
3.1	緒言 .....	63
3.2	材料および方法 .....	65
3.2.1	食用トマト .....	65
3.2.2	TGRC コレクショントマト .....	65
3.2.3	メキシコ産トマト .....	65
3.2.4	エクアドル産トマト .....	71
3.2.5	ペルー産トマト .....	71
3.2.6	ゲノム DNA 抽出 .....	71
3.2.7	PCR .....	72
3.2.8	アガロースゲル電気泳動 .....	72

3.2.9	DNA シーケンシング .....	74
3.2.10	分子系統解析 .....	76
3.3	結果 .....	79
3.3.1	DNA シーケンス .....	79
3.3.2	COSII 領域を用いて構築した分子系統樹 .....	79
3.4	考察 .....	83
4	中南米産トマトの AAL 毒素感受性検定 .....	85
4.1	緒言 .....	85
4.2	材料および方法 .....	87
4.2.1	供試菌株 .....	87
4.2.2	AAL 毒素の調製 .....	88
4.2.3	供試トマト .....	88
4.2.3.1	対照トマト .....	88
4.2.3.2	メキシコ産トマト .....	89
4.2.3.3	エクアドル産トマト .....	89
4.2.4	ペルー産トマト .....	89
4.2.5	トマトの AAL 毒素感受性／抵抗性検定 .....	89
4.3	結果 .....	90
4.3.1	食用トマト品種の AAL 毒素感受性／抵抗性 .....	90
4.3.2	メキシコ産移行期トマトの AAL 毒素感受性／抵抗性 .....	91
4.3.3	エクアドル産の野生種および移行期トマトの AAL 毒素感受性／抵抗性 .....	91
4.3.4	ペルー産の野生種および移行期トマトの AAL 毒素感受性／抵抗性 .....	91
4.4	考察 .....	102
5	中南米産トマトの <i>Asc1</i> 遺伝子の多様性 .....	104
5.1	緒言 .....	104
5.2	材料および方法 .....	105
5.2.1	植物体からのゲノム DNA の抽出 .....	105

5.2.2	PCR 反応溶液の調製.....	105
5.2.3	プライマー.....	105
5.2.4	<i>Asc1</i> 欠失領域検出用プライマー .....	105
5.2.5	DNA シーケンシング.....	108
5.2.6	分子系統解析 .....	108
5.3	結果 .....	108
5.3.1	野生種トマトおよび移行期トマトにおける 400 bp 欠失の有無 .....	108
5.3.2	<i>Asc1</i> 遺伝子領域に基づいた分子系統解析.....	110
5.4	考察 .....	118
6	総合考察.....	124

謝辞

引用文献

要旨



## 1 総合序論

人類は、移動を伴う採集・狩猟生活から、一定の地域に定住して植物を栽培する生活スタイルに移行したことによって、食料を安定的に確保する手段を確立した。植物栽培の歴史は約 1 億 2000 年前にさかのぼり、肥沃な三日月地帯（Fertile Crescent）と呼ばれるナイル川、チグリス川およびユーフラテス川に囲まれた地域において始まったとされる（Meyer & Purugganan, 2013）。その後、約 1 億年前には中国、メソポタミア、メソアメリカ、アンデス、オセアニアに広がり、その後 8000 年前にはサブサハラへ、そして 6000 年前に北アメリカへと食用植物の栽培が広がっていった（Meyer & Purugganan, 2013）。その過程で人類は、野生種の多様な遺伝子プールから優良な形質を持つものを選抜・栽培化、交配と選抜の繰り返しで、収量が多く栽培しやすく食味が良いなど人類にとって有利な形質を持つ食用品種を育種、現在の食用植物を創成してきた。結果として、食用植物では遺伝的多様性が保持されにくくなり遺伝的に単純化、栽培管理がしやすくなった一方で、病害抵抗性が低下した。

植物病原微生物は世界中で、食用植物の可能生産量の 12~14%に及ぶとされる多大な被害をもたらしている（白石ら, 2012）。この被害を低減するための 1 つの方法が病害抵抗性品種の育種であり、そのためには近縁野生種からの抵抗性遺伝子の導入が一般的であるため、野生種における遺伝的多様性の理解と保全が重要である。植物と病原菌の歴史を振り返ると、例えば重要な穀物の 1 つであるトウモロコシ（*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis）の重要病害であるトウモロコシ黒穂病菌（*Mycosarcoma maydis* (DC.) Bref. ; synonym *Ustilago maydis* (DC.) Corda）は、トウモロコシの栽培化以前から存在していたことが示唆されている（Munkacsi *et al.*, 2008）。Munkacsi *et al.* (2008) は、約 1 億年~6000 年前に

はメキシコにおけるトウモロコシの育種が始まり、それと同時に 2 種の黒穂病菌 (*M. maydis* および *M. bouriquetii* (Maubl. & Roger) McTaggart, R.G. Shivas & Begerow) が分岐したことを明らかにしている。野生種のイネから食用イネ (*Oryza sativa* L.) が栽培化されたのは 1000 年以上前であると考えられており (Huang *et al.*, 2012)、初めてイネの病害であるいもち病が報告されたのは 1637 年に中国であった (Couch *et al.*, 2005)。また、バレイショ (*Solanum tuberosum* L.; またはジャガイモ) 栽培化の歴史をみると、バレイショの起源は約 1 億年前の白亜紀にまでさかのぼり (Hawkes, 1990)、歴史上有名なアイルランドのジャガイモ飢饉の原因が疫病菌 (*Phytophthora infestans*) だと明らかになったのが 1861 年であることを考えれば (Grunwald & Flier, 2005)、人類は長い間食用植物の栽培と病害のコントロールのはざまに戦っている。

一方、トマト (*Solanum lycopersicum* L. var. *lycopersici*, 以前は *Lycopersicon esculentum* Mill. とされた; *SLL*) は、全世界での栽培面積約 500 万ヘクタール、生産量約 2 億トンに達する、最重要蔬菜である (2018 年現在、FAO、<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>、2021 年 1 月 29 日アクセス) が、その食用化の歴史はさほど長くない。トマトは、南米のアンデス地域原産とされ、人あるいは鳥類の移動に伴って約 2000 年前までに中米へ運ばれメキシコで栽培化、約 500 年前にスペイン征服軍によって観賞用植物としてヨーロッパに持ち込まれたとされる (橘, 1999)。現在でも近縁野生種 (以下、“野生種トマト”) は、ペルー、エクアドル、チリ、ボリビアに亘って広く自生している (Peralta *et al.*, 2008、Arie, 2010、Blanca *et al.*, 2012、Inami *et al.*, 2014)。 *Solanum* L. section *Lycopersicon* (Miller) に属する *S. cheesmaniae* (Riley) Fosberg (syn. *Lycopersicon cheesmaniae* Riley ; SC)、 *S. chilense* (Dunal) Reiche (syn. *L. chilense* Dunal)、 *S. chmielewskii* Rick *et al.* (syn. *L. chmielewskii* Rick *et al.*)、 *S. galapagense* Darwin et Peralta (syn. *L. cheesmaniae* Riley ; SG)、 *S.*

*habrochaites* Knapp et Spooner (syn. *L. hirsutum* Dunal) 、 *S. neorickii* Spooner *et al.* (syn. *L. parviflorum* Rick *et al.*) 、 *S. pennellii* Correll (syn. *L. pennellii* [Correll] D'Arcy) 、 *S. peruvianum* L. (syn. *L. peruvianum* [L.] Miller) 、 *S. pimpinellifolium* L. (syn. *L. pimpinellifolium* [L.] Miller ; *SP*) などである。*SP* は現在の食用トマトの原種とされる。南米アンデス地域の史料にはトマト栽培に関する絵画や記述は見られないが、*SP* と *SLL* の中間種とされる *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) A.Gray (*SLC*) が現在もアンデス地域に生息しており、栽培トマトへの過程を示す遺産と考えられている。一方、16 世紀のメキシコ・アステカ文明では Chinampas と呼ばれる人工の浮島上で植物を栽培する農法が確立され、トマトも栽培されていたと考えられている (Jenkins, 1948) 。トマト栽培化の地とされるメキシコには現在でも、現地のスペイン語で “jitomate criollo” (ヒトマテ クリオージョ) と呼ばれる伝統品種 (*S. lycopersicum* “jitomate criollo” ; *SLJ*) が山岳部の村などで継代・栽培される (Inami *et al.*, 2014) とともに、*SLC* も自生している。本研究では、*SLC* と *SLJ* を併せて “移行期トマト” と称する。

上記のように、植物栽培の歴史は病害との戦いの歴史でもある。トマトはその生育のあらゆるステージで、昆虫、ダニ、線虫、ウイルス、細菌、菌などによる傷害を受ける。これまでに、世界中で 200 種以上がトマトの病原として報告されており、収穫量の減少につながっている (Singh *et al.*, 2017) 。

植物病原微生物の中でも菌による被害は重大であり、例えば *Fusarium* 属によって引き起こされる病害は多く報告されている (Foolad *et al.*, 2008、Nowicki *et al.*, 2012) 。特に *F. oxysporum* は、萎凋病、萎黄病、つる割病、苗立枯病、株立枯病、乾腐病、立枯病、根腐病、半立枯病など、多様な植物に土壌伝染性維管束病を引き起こす。Ma *et al.* (2010) は *F.*

*oxysporum* が持つ小型染色体が病原性や宿主特異性の決定に重要であることを明らかにした。

トマトに萎凋病を引き起こす *F. oxysporum* forma specialis (f. sp.) *lycopersici* (*Fol*) において、トマト植物体導管抽出液の解析が行われ、14 のエフェクター遺伝子 (Secreted in xylem ; *SIX*) が見出された (Rep *et al.*, 2002)。*Fol* に対するトマトの抵抗性遺伝子 *I* あるいは *I-1*、*I2*、*I3* はトマトに近縁な野生種 *Solanum* spp. から導入されている (Huang & Lindhout, 1977、Arie *et al.*, 2007)。*I* および *I2* は *S. pimpinellifolium* 由来、*I-1* および *I3* は *S. pennelli* 由来である。*I* および *I-1* の産物は *SIX4* の産物、*I2* は *SIX3*、*I3* は *SIX1* を認識して、全身が抵抗性になる。このような育種の歴史を踏まえ、Inami *et al.* (2014) は、野生種 *Solanum* spp. の原産地であるエクアドル、ペルー、チリ、および移行期トマトの自生地であるメキシコにおいて *S. chilense*、*S. peruvianum*、*S. pimpinellifolium*、*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* および *S. lycopersicum* var. *lycopersici* “jitomate criollo” の根圏から *F. oxysporum* の分離を試みたが、いずれの分離株も萎凋症状を示さなかった。また、これらの *F. oxysporum* の中に、萎凋病菌 *Fol* と近縁の菌株が存在すること、しかしながらこれらの株は、*Fol* が持つ病原性や宿主特異性の決定に関わる小型染色体を持たないことを明らかにした (Inami *et al.* 2014)。このことから、メキシコにおける栽培化の過程、もしくはその後に *Fol* と近縁な非病原性 *F. oxysporum* の一部に病原関連の小型染色体が水平移動したと考えられている。このように、野生種トマトおよび移行期トマトは、病原菌と植物側の共進化の歴史を探るためには最適なモデルである。

トマトに重要病害を引き起こす菌として、*F. oxysporum* の他に、*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (あるいは *A. alternata* tomato pathotype ; *Aal*) が引き起こすアルターナリア茎枯病がある。アルターナリア茎枯病は 1975 年にアメリカのカリフォルニア州における *SLL* 栽培品種 (cultivar ; cv.) Earlypak 7 での発生初報告 (Grogan *et al.*, 1975) を皮切りに、2 年後

の 1977 年に日本の三重県において *SLL* cv. 愛知ファーストで発生するなど世界的に拡大した（田上ら, 1984）。*Aal* は宿主特異的毒素である AAL 毒素を生産し、この毒素が発病因子として特定のトマト品種に病気を引き起こす。

従来、愛知ファーストなどの特定の *SLL* 栽培品種のみが AAL 毒素感受性とされていたが、近年、ガラパゴス諸島に自生する野生種 *SC* および *SG* も AAL 毒素に感受性であることが報告された（吾郷ら, 2016）。トマトの AAL 毒素に対する抵抗性／感受性は、*Asc1*（*Alternaria Stem Canker resistance protein 1*）遺伝子によって決定される。*ASC1* はセラミド合成を司り、セラミドが正常に合成されれば AAL 毒素による細胞の壊死を免れて抵抗性になる。*SLL* の殆どの品種や殆どの野生種は AAL 毒素抵抗性である。一方で *ASC1* に変異が生じて正常なセラミドが合成されないと、AAL 毒素によって細胞が壊死し（Brandwagt *et al.*, 1997）、感受性となる。愛知ファースト等 AAL 毒素感受性の *SLL* 品種や *SC* および *SG* では *Asc1* に変異が生じており、その結果 *ASC1* が変異し、AAL 毒素感受性になっている。愛知ファースト等 AAL 毒素感受性の *SLL* 品種では *Asc1* 内の 2 塩基欠失（Brandwagt *et al.*, 1997）、*SC* および *SG* では *Asc1* の上流とそのプロモーター領域を含む約 400 bp の欠失が報告されている（吾郷ら, 2016）。

本研究では、「*SLL* と *SC* および *SG* の共通の祖先である野生種トマト *SP* の *Asc1* には構造や塩基配列に多様性があり、愛知ファースト等 AAL 毒素感受性の *SLL* 栽培品種や *SC* および *SG* に見られる変異型の *Asc1* は、ペルーの *SP* の *Asc1* を起源としている」との仮説を立て、これを検証するとともに、トマト栽培化の歴史を *Asc1* の変異に基づいて考察することを目的に研究を行った。

## 2 中南米産トマトの採集と形態学的同定

### 2.1 緒言

現在市場に流通している“食用トマト” (*Solanum lycopersicum* L. var. *lycopersici* ; 以前は *Lycopersicon esculentum* Mill. とされた ; *SLL*) は、南米アンデス地域に自生する野生種トマトを起源とし (Razifard *et al.*, 2020) 、その後の栽培化と育種において、人類にとって有利な形質を持つ品種として創出されてきた。今でも南米のペルー、エクアドル、チリ北部、ボリビアなどには 16 の“野生種トマト”が自生している (図 1) 。果実が緑色や黒色の種として、*S. arcanum* Peralta、*S. chilense* (Dunal) Reiche、*S. chmielewskii* (C. M. Rick *et al.*) 、*S. corneliomulleri* J. F. Macbr.、*S. habrochaites* S. Knapp & D. M. Spooner、*S. huaylasense* Peralta、*S. neorickii* D. M. Spooner *et al.*、*S. pennellii* Correll、*S. peruvianum* L.、*S. juglandifolium* Dunal、*S. ochranthum* Dunal、*S. lycopersicoides* Dunal および *S. sitiens* I. M. Johnst. がある。一方、赤～オレンジ～黄色の果実をつける *Lycopersicon* species group (Rodriguez *et al.*, 2009) には、*S. pimpinellifolium* L. (*SP*) 、ガラパゴス諸島にのみ自生している *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg (*SC*) および *S. galapagense* S. C. Darwin & Peralta (*SG*) が存在する。*SC* と *SG* は、*SP* が *SLL* の原種であると考えられている (Blanca *et al.*, 2012、Blanca *et al.*, 2015、Lin *et al.*, 2014) 。また、*SP* から *SLL* に至る中間期のトマトに相当するとされる *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) A.Gray (*SLC*) がペルー等南米各地とメキシコに自生する。さらに、*SLC* から栽培化された当時の性状を維持しているとされる伝統栽培品種“jitomate criollo” (スペイン語で腎臓型のトマトの意 ; *SLJ*) がメキシコの山村などで細々と栽培されている。本研究では、*SLC* と *SLJ* を併せて“移行期トマト” (transition tomato) と呼ぶ。

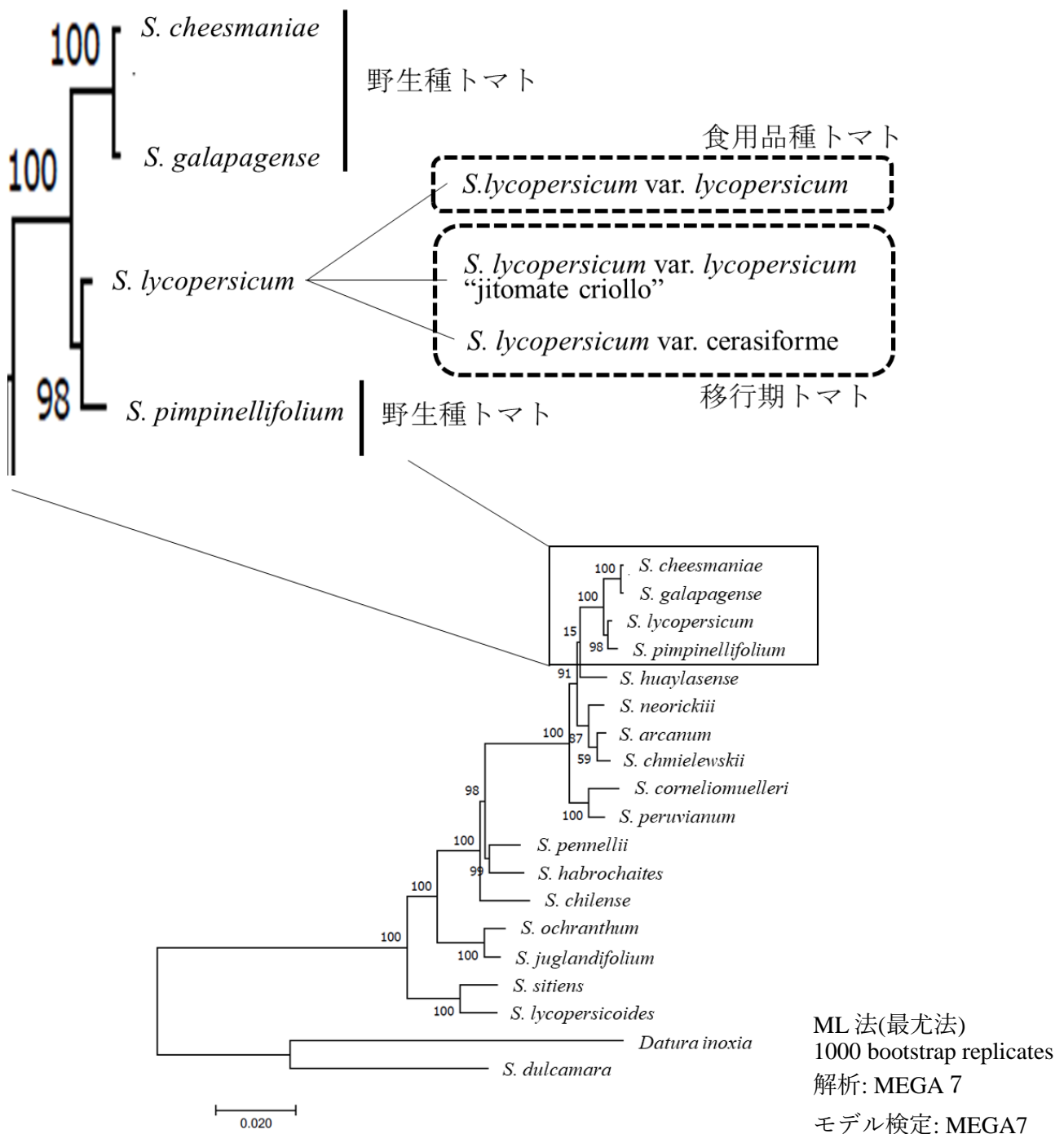


図1 18COSII 領域に基づくトマトの分子系統学的解析

Rodriguez *et al.*, (2009) で用いた配列を使って再度系統樹を作成した。本論文では *S. cheesmaniae*、*S. galapagense* および *S. pimpinellifolium* を野生種トマト、*S. lycopersicum* var. *lycopersicum* を食用品種トマト、*S. lycopersicum* var. *lycopersicum* "jitomate criollo" および *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* を移行期トマトと定義する。

野生種トマトの自生地はアンデスの山中から市街地まで及んでおり、身近な存在である一方、エル・ニーニョ現象などの気候変動によって洪水や大干ばつが起こり、また、急速な都市開発によって、生息域の「場」が消失し、貴重な遺伝資源としての保全が危機に瀕している（Gibson *et al.*, 2020）。そのためペルーでは、農業省に属する研究機関の1つで、植物から家畜まで広く研究対象として、主に育種研究を行っている国立農業研究所（Instituto Nacional de Innovación Agraria ; INIA、<https://www.inia.gob.pe/quienes-somos/>、2020年11月20日アクセス）が野生種の動植物の遺伝資源を多く収集、維持・管理している。トマトについても形態分類の権威である Iris Peralta 博士とともに 2011 年に収集を開始している。

本章では、ペルー、エクアドル、メキシコで採集したトマト、および INIA が維持・管理しているペルー産トマトを対象に、形態に基づく同定を行った。なお、2008 年から 2010 年にかけて、農工大、鳥取大、エクアドル農業大学、チャピング自治大学、Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias（メキシコ、INIFAP）の研究者チームがエクアドルおよびメキシコから採集したトマト（Inami *et al.*, 2014）を TUAT コレクション、2016 年から 2019 年にかけて筆者も含む、農工大、鳥取大、ラモリーナ農業大学、聖アウグスチン大学の研究者チームがペルーで採集したトマトを UNALM-TUAT コレクション、INIA で保管されているトマトを INIA コレクションと呼ぶ。また Charles M. Rick 博士の採集したコレクションをもとに創設されたトマト種子バンク Tomato Genetics Resource Center（Davis, CA, USA）を TGRC コレクションと呼ぶ。



## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 食用トマト

食用トマト (*SLL*) cv. 愛知ファースト (松永種苗、愛知) および、cv. 桃太郎 8 (タキイ種苗、京都) を用いた (表 1)。

ピクニカコップ (約 200 ml ; イノタマ化学、大阪) にくみあいニッピ園芸培養土 1 号 (日本肥料、東京) を入れ、5 粒/コップ播種し、ビニール温室 (グローバルフルーツファクトリー、東京農工大学、府中) において温度なりゆき (15~35°C) で栽培、冬の間は 15°C が下回らないように暖房を使用した。その後、葉の形態を記録した。

### 2.2.2 メキシコ産トマト

TGRC コレクションから、*SLC LA1456*、*SLC LA1623* を、TUAT コレクションから、アクセッション M5-3、M5-4、M-UX、MC-5a、MC-5b および ML-1 を用いた (表 1)。形態観察用植物の栽培は 2.2.1 に準じた。

### 2.2.3 エクアドル産トマト

TGRC コレクションから *SP LA3123*、*SP LA1242*、*SC LA0437*、*SC LA0521*、*SG LA0438*、*SG LA0528* を、TUAT コレクションから E0040W、E0043、ECU0043 および ECU0045 を用いた (表 1)。形態観察用植物の栽培は 2.2.1 に準じた。

#### 2.2.4 ペルー産トマト

TGRC コレクションから、*SLC* LA1909 を、UNALM-TUAT コレクションから表 1 に示すアクセスションを用いた。サンプリング場所は図 2-1、2-2 に示した。これらの形態観察及びゲノム DNA 抽出用植物の栽培は 2.2.1 に準じた。

また、INIA コレクションは表 1 に示すアクセスションを用いた。形態観察用植物の栽培は、INIA のリマ研究所（INIA - Centro Experimental La Molina, Lima, Peru）の温室、およびドノソ研究所（INIA - Estación Experimental Agraria Donoso, Huaral, Peru）の圃場で行い、葉の形態を記録した。使用後は全ての植物を INIA 内にて処分した。

#### 2.2.5 トマト小葉の形態観察と同定

トマトの種の同定基準として、Rick *et al.* (1990)、Peralta & Spooner (2001)、Peralta *et al.* (2006) および Peralta *et al.* (2008) は、果実の色や大きさ、花卉の色などの形態学的特徴に基づいて行うこと (<https://tgrc.ucdavis.edu/key.aspx>, 2020 年 11 月 20 日アクセス) を提唱している。一方、Darwin *et al.* (2003) は、果実や花卉の色、小葉の形態を同定の基準として提示している。これらの形態学的同定法で共通している点は、果実が赤～オレンジ～黄であり、かつ花卉の色が黄色の場合は *Lycopersicon* species group (*SG*、*SC*、*SP*、*SLL* または *SLC*) に属するという点である (Darwin *et al.*, 2003、Rick *et al.*, 1990、Peralta & Spooner, 2001、Peralta *et al.*, 2006、Peralta *et al.*, 2008)。Rick *et al.* (1990) によると、*SP* は赤い果実をつけ、果実の直径が約 1.1 cm (> 0.8 cm) ~ 1.6 cm であること、*SLC* は同じく赤い果実をつけるが、*SP* と比較して果実が大きく、直径 2.2 cm (> 2.0 cm) ~ 4 cm であるとされる。一方、Darwin *et al.* (2003) は、小葉の葉縁の鋸歯を観察、鋸歯の切れ込みが深い

ものを *SLC*、鋸歯がないか浅いものを *SP* としている。

本研究では、果実の観察が困難なアクセッションが多かったことから、*Darwin et al.* (2003) に基づいて、小葉の形態を基準として、メキシコ、エクアドル、ペルー由来のトマトの種および品種の同定を行った（図 3）。鋸歯の切り込みは先行研究（門松、松浦, 1984）を参考に、鋸歯の長さ（*Serrate Length* : *SL*）、鋸歯の幅（*Serrate Wide*: *SW*）、鋸歯の深さ（*Serrate Depth* : *SD*）を計測し（図 4）、第 3 葉から第 5 葉の小葉の最先端の鋸歯を対象とし（図 5）、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>、2021 年 1 月 29 日アクセス) を用いて計測し、平均値を求めた。1 アクセッションにつき 3 個体から 1 枚ずつ小葉を切り取り、そのうちの最先端の小葉計 3 枚を用いて鋸歯を計測し、平均値を求めた。また、茎の太さは茎頂から 15 cm 下を剪定ばさみで切り、1 アクセッションにつき 3 個体を用いて断面の直径を計測した。

表1 本研究で採集および使用したトマトアクセッション

Species and accessions	Sampling site				
	Country	Region	Longitude	Latitude	Date <sup>a</sup>
TUAT Collection (Inami et al.2014)					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> “jitomate criollo” (SLJ)					
M5-1	Mexico	Queretaro	N21°16'00"	W99°24'20"	20100530
M5-3	Mexico	Queretaro	N21°16'00"	W99°24'20"	20100530
M5-4	Mexico	Queretaro	N21°16'00"	W99°24'20"	20100530
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
E0040W	Ecuador	Santa Cruz	S00°39'06"	W90°24'21"	20080113
E0041W	Ecuador	Santa Cruz	S00°39'06"	W90°24'21"	20080113
E0043	Ecuador	Santa Cruz	S00°41'45"	W90°19'36"	20080113
MC-1	Mexico	Hidalgo	N21°00'08"	W98°32'18"	20100528
MC-5a	Mexico	Hidalgo	N21°00'08"	W98°32'18"	20100528
MC-5b	Mexico	Hidalgo	N21°00'08"	W98°32'18"	20100528
ML-1	Mexico	Hidalgo	N21°01'06"	W98°31'46"	20100529
M-UX	Mexico	Yucatan	N20°24'35"	W89°45'04"	20051229
099-2012	Peru	Lambayeque	N06°30'50"	W79°50'52"	20121003
105-2012	Peru	Lambayeque	N06°29'18"	W79°46'34"	20121005
2005.12.09 Mexico	Mexico	Yucatan	N20°35'04"	W90°00'02"	20051209
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
ECU0043	Ecuador	Santa Cruz	S00°41'23"	W90°19'10"	20080113
ECU0045	Ecuador	Santa Cruz	S00°40'05"	W90°16'08"	20080113
ECU017a	Ecuador	Santa Cruz	S00°41'10"	W90°18'08"	20080116
UNALM - TUAT Collection					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
BRC014	Peru	Lima	S12°08'23"	W77°01'35"	20161104
BRC015	Peru	Lima	S12°08'21"	W77°01'35"	20161104
BRC016	Peru	Lima	S12°08'21"	W77°01'35"	20161104
BRC017	Peru	Lima	S12°08'21"	W77°01'35"	20161104
BRC021	Peru	Lima	S12°08'59"	W77°01'25"	20161104
CCY132	Peru	Lambayeque	S06°45'05"	W79°43'31"	20170130
CCY134	Peru	Lambayeque	S06°45'05"	W79°43'31"	20170130
CCY137	Peru	Lambayeque	S06°44'07"	W79°32'43"	20170130
CCY138	Peru	Lambayeque	S06°44'06"	W79°32'46"	20170130
CCY139	Peru	Lambayeque	S06°44'07"	W79°32'44"	20170130
CCY146	Peru	Lambayeque	S06°29'49"	W79°52'07"	20170131
CCY147	Peru	Lambayeque	S06°29'49"	W79°52'08"	20170131
CCY149	Peru	Lambayeque	S06°29'50"	W79°52'08"	20170131
CCY152	Peru	Lambayeque	S06°30'07"	W79°52'14"	20170131
CCY153	Peru	Lambayeque	S06°30'07"	W79°52'15"	20170131
CCY154	Peru	Lambayeque	S06°30'07"	W79°52'14"	20170131
CCY155	Peru	Lambayeque	S6°30'06"	W79°52'14"	20170131
CCY156	Peru	Lambayeque	S06°30'05"	W79°52'13"	20170131
CCY159	Peru	Lambayeque	S06°12'03"	W79°41'56"	20170131
CCY160	Peru	Lambayeque	S6°12'21"	W79°41'56"	20170131

aDate, yyyyymmdd.

表1 本研究で採集および使用したトマトアクセッション(続き)

Species and accessions	Sampling site				
	Country	Region	Longitude	Latitude	Date <sup>a</sup>
CCY162	Peru	Lambayeque	S06°12'01"	W79°41'55"	20170131
CCY163	Peru	Lambayeque	S06°12'02"	W79°41'53"	20170131
CCY165	Peru	Lambayeque	S06°12'06"	W79°41'53"	20170131
CCY166	Peru	Lambayeque	S06°12'06"	W79°41'55"	20170131
CGA023	Peru	Lima	S12°01'34"	W76°40'9"	20161108
CGA028	Peru	Lima	S12°01'35"	W76°41'22"	20161108
CGA029	Peru	Lima	S12°02'07"	W76°42'42"	20161108
CGA031	Peru	Lima	S12°02'07"	W76°42'44"	20161108
CGA032	Peru	Lima	S12°02'07"	W76°42'44"	20161108
ICA034	Peru	Ica	S13°59'24"	W75°44'31"	20190204
IND096	Peru	Lima	S12°04'38"	W76°57'00"	20161221
IND097	Peru	Lima	S12°04'42"	W76°57'01"	20161221
IND098	Peru	Lima	S12°04'42"	W76°57'01"	20161221
IND099	Peru	Lima	S12°04'42"	W76°56'50"	20161221
IND100	Peru	Lima	S12°04'40"	W76°57'00"	20161221
IND101	Peru	Lima	S12°04'42"	W76°56'59"	20161221
IND102	Peru	Lima	S12°04'42"	W76°56'60"	20161221
IND103	Peru	Lima	S12°04'42"	W76°57'01"	20161221
IND104	Peru	Lima	S12°04'42"	W76°57'00"	20161221
IND105	Peru	Lima	S12°04'45"	W76°57'05"	20161221
IND106	Peru	Lima	S12°04'45"	W76°57'04"	20161221
IND107	Peru	Lima	S12°04'45"	W76°57'04"	20161221
JAE035	Peru	Cajamarca	S05°33'13"	W78°50'52"	20190209
JAE036	Peru	Cajamarca	S05°33'15"	W78°51'02"	20190209
JAE037	Peru	Cajamarca	S05°39'26"	W78°41'28"	20190209
LAM002	Peru	Lima	S12°04'57"	W76°56'56"	20161025
LAM003	Peru	Lima	S12°04'45"	W76°56'59"	20161025
LAM006	Peru	Lima	S12°05'05"	W76°56'38"	20161031
LAM007	Peru	Lima	S12°05'07"	W76°56'37"	20161031
LAM008	Peru	Lima	S12°05'01"	W76°56'52"	20161102
LAM009	Peru	Lima	S12°04'57"	W76°56'55"	20161102
LAM011	Peru	Lima	S12°05'04"	W76°56'56"	20161102
LAM035	Peru	Lima	S12°04'58"	W76°56'59"	20161110
LAM036	Peru	Lima	S12°05'00"	W76°56'58"	20161110
LIM027	Peru	Lima	S10°26'51"	W77°42'31"	20190115
LIM038	Peru	Lima	S12°04'53"	W76°56'59"	20190115
MTP033	Peru	Lambayeque	S06°11'49"	W79°44'28"	20190126
PIU029	Peru	Piura	S05°02'33"	W80°34'31"	20190121
PIU168	Peru	Piura	S05°10'41"	W80°37'00"	20170201
PIU169	Peru	Piura	S05°10'39"	W80°37'02"	20170201
PIU172	Peru	Piura	S05°10'40"	W80°37'02"	20170201
PIU174	Peru	Piura	S05°10'39"	W80°37'02"	20170201
PIU181	Peru	Piura	S5°06'21"	W80°10'22"	20170201
PIU185	Peru	Piura	S05°15'08"	W80°37'20"	20170201
PKC040	Peru	Lima	S12°10'54"	W76°51'26"	20161119
PRG121	Peru	Lambayeque	S06°42'25"	W79°54'29"	20170130

aDate, yyyyymmdd.

表1 本研究で採集および使用したトマトアクセスン(続き)

Species and accessions	Sampling site				
	Country	Region	Longitude	Latitude	Date <sup>a</sup>
QBB190	Peru	Cusco	S12°53'45"	W72°40'33"	20170226
QBB192	Peru	Cusco	S12°53'45"	W72°40'32"	20170226
QBB194	Peru	Cusco	S12°54'06"	W72°40'35"	20170226
QBB195	Peru	Cusco	S12°54'06"	W72°40'35"	20170226
QBB196	Peru	Cusco	S12°54'06"	W72°40'35"	20170226
QBB197	Peru	Cusco	S12°53'49"	W72°40'22"	20170226
QBB200	Peru	Cusco	S12°54'30"	W72°39'53"	20170226
QBB202	Peru	Cusco	S12°54'29"	W72°39'53"	20170226
QBB203	Peru	Cusco	S12°54'30"	W72°39'54"	20170226
QBB204	Peru	Cusco	S12°54'22"	W72°39'58"	20170226
QBB205	Peru	Cusco	S12°57'14"	W72°39'52"	20170226
QBB206	Peru	Cusco	S12°57'10"	W72°39'45"	20170226
QBB207	Peru	Cusco	S12°57'52"	W72°39'51"	20170226
QBB207-2	Peru	Cusco	S12°54'37"	W72°40'40"	20170226
QBB208	Peru	Cusco	S12°57'53"	W72°39'51"	20170226
QBB208-2	Peru	Cusco	S12°51'03"	W72°42'00"	20170226
QBB209	Peru	Cusco	S12°50'23"	W72°41'15"	20170226
QBB210	Peru	Cusco	S12°50'37"	W72°41'22"	20170226
QBB211	Peru	Cusco	S12°50'37"	W72°41'21"	20170226
QBB212	Peru	Cusco	S12°51'01"	W72°41'28"	20170226
QBB213	Peru	Cusco	S12°51'12"	W72°41'30"	20170226
QBB214	Peru	Cusco	S12°51'05"	W72°41'48"	20170226
QBB215	Peru	Cusco	S12°51'05"	W72°42'02"	20170226
QBB216	Peru	Cusco	S12°51'06"	W72°41'49"	20170226
QBB218	Peru	Cusco	S12°51'10"	W72°41'41"	20170226
QBB221	Peru	Cusco	S12°50'46"	W72°42'32"	20170226
QBB222	Peru	Cusco	S12°50'46"	W72°42'32"	20170226
QBB223	Peru	Cusco	S12°50'46"	W72°42'32"	20170226
QBB224	Peru	Cusco	S12°50'47"	W72°42'35"	20170226
QBB225	Peru	Cusco	S12°50'47"	W72°42'31"	20170226
QBB226	Peru	Cusco	S12°50'47"	W72°42'31"	20170226
QBB227	Peru	Cusco	S12°50'47"	W72°42'31"	20170226
QBB230	Peru	Cusco	S12°50'51"	W72°42'29"	20170226
QBB231	Peru	Cusco	S12°50'52"	W72°42'28"	20170226
QBB232	Peru	Cusco	S12°50'53"	W72°42'26"	20170226
QBB234	Peru	Cusco	S12°50'53"	W72°42'24"	20170226
QBB235	Peru	Cusco	S12°50'53"	W72°42'24"	20170226
QBB238	Peru	Cusco	S12°50'05"	W72°41'58"	20170226
STP087	Peru	Junin	S11°01'21"	W74°58'20"	20161218
STP088	Peru	Junin	S11°01'21"	W74°58'20"	20161218
STP089	Peru	Junin	S11°01'21"	W74°58'21"	20161218
STP090	Peru	Junin	S11°01'22"	W74°58'20"	20161218
STP091	Peru	Junin	S11°01'21"	W74°58'21"	20161218
STP092	Peru	Junin	S11°01'21"	W74°58'21"	20161218
STP093	Peru	Junin	S11°01'21"	W74°58'22"	20161218
STP094	Peru	Junin	S11°01'21"	W74°58'20"	20161218

aDate, yyyyymmdd.

表1 本研究で採集および使用したトマトアクセッション(続き)

Species and accessions	Sampling site				
	Country	Region	Longitude	Latitude	Date <sup>a</sup>
STP095	Peru	Junin	S11°01'20"	W74°58'21"	20161218
TRJ108	Peru	La Libertad	S07°39'07"	W79°14'36"	20170128
TRJ111	Peru	La Libertad	S07°39'01"	W79°14'27"	20170128
TRJ112	Peru	La Libertad	S07°40'03"	W79°19'24"	20170128
TRJ113	Peru	La Libertad	S07°39'58"	W79°19'19"	20170128
TRJ116	Peru	La Libertad	S07°23'14"	W79°30'08"	20170129
TRJ117	Peru	La Libertad	S07°23'13"	W39°30'08"	20170129
TRJ120	Peru	La Libertad	S07°23'30"	W79°30'13"	20170129
TUM001	Peru	Tumbes	S03°31'51"	W80°13'46"	20181216
TUM004	Peru	Tumbes	S03°31'51"	W80°13'24"	20181216
TUM007	Peru	Tumbes	S03°31'39"	W80°13'36"	20181216
TUM011	Peru	Tumbes	S03°31'40"	W80°13'46"	20181216
TUM012	Peru	Tumbes	S03°31'25"	W80°13'27"	20181216
TUM015	Peru	Tumbes	S03°32'10"	W80°13'05"	20181216
TUM016	Peru	Tumbes	S03°32'06"	W80°13'07"	20181216
TUM017	Peru	Tumbes	S03°32'28"	W80°13'02"	20181216
TUM021	Peru	Tumbes	S03°32'27"	W80°12'44"	20181216
TUM023	Peru	Tumbes	S03°32'37"	W80°12'29"	20181216
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
CCY128	Peru	Lambayeque	S06°45'05"	W79°43'32"	20170130
CCY129	Peru	Lambayeque	S06°45'05"	W79°43'32"	20170130
CCY130	Peru	Lambayeque	S06°45'05"	W79°43'33"	20170130
CCY131	Peru	Lambayeque	S06°45'05"	W79°43'32"	20170130
CCY133	Peru	Lambayeque	S06°45'05"	W79°43'31"	20170130
CCY140	Peru	Lambayeque	S06°44'06"	W79°32'45"	20170130
CCY141	Peru	Lambayeque	S06°44'07"	W79°32'45"	20170130
CCY142	Peru	Lambayeque	S06°44'08"	W79°32'30"	20170130
CCY143	Peru	Lambayeque	S06°29'50"	W79°52'09"	20170131
CCY144	Peru	Lambayeque	S06°29'49"	W79°52'07"	20170131
CCY145	Peru	Lambayeque	S06°29'49"	W79°52'07"	20170131
CCY157	Peru	Lambayeque	S06°30'04"	W79°52'15"	20170131
CCY158	Peru	Lambayeque	S06°30'03"	W79°52'15"	20170131
CCY164	Peru	Lambayeque	S06°12'02"	W79°41'53"	20170131
CGA022	Peru	Lima	S12°01'28"	W76°40'17"	20161108
CGA024	Peru	Lima	S12°01'31"	W76°40'10"	20161108
CGA025	Peru	Lima	S12°01'34"	W76°40'10"	20161108
CGA026	Peru	Lima	S12°01'35"	W76°40'10"	20161108
CGA027	Peru	Lima	S12°01'34"	W76°40'10"	20161108
CGA030	Peru	Lima	S12°01'55"	W76°42'00"	20161108
CGA033	Peru	Lima	S12°02'07"	W76°42'44"	20161108
CGA034	Peru	Lima	S12°04'49"	W76°46'10"	20161108
CPN032	Peru	La Libertad	S07°07'14"	W79°28'06"	20190125
LAM001	Peru	Lima	S12°04'57"	W76°56'55"	20161025
LAM005	Peru	Lima	S12°05'06"	W76°56'38"	20161031
LAM010	Peru	Lima	S12°05'06"	W76°56'51"	20161102
LAM012	Peru	Lima	S12°04'45"	W76°56'55"	20161102
LAM013	Peru	Lima	S12°04'44"	W76°56'52"	20161102

<sup>a</sup>Date, yyyyymmdd.

表1 本研究で採集および使用したトマトアクセスン(続き)

Species and accessions		Sampling site				
		Country	Region	Longitude	Latitude	Date <sup>a</sup>
LAM037		Peru	Lima	S12°05'00"	W76°56'58"	20161110
PIU030		Peru	Piura	S04°50'08"	W80°30'35"	20190122
PIU031		Peru	Piura	S05°07'09"	W80°11'57"	20190124
PIU188		Peru	Piura	S05°18'14"	W80°42'08"	20170201
PRG122		Peru	Lambayeque	S06°42'24"	W79°54'29"	20170130
PRG123		Peru	Lambayeque	S06°42'24"	W79°54'29"	20170130
PRG125		Peru	Lambayeque	S06°42'24"	W79°54'29"	20170130
PRG126		Peru	Lambayeque	S06°42'24"	W79°54'29"	20170130
TRJ109		Peru	La Libertad	S07°39'01"	W79°14'27"	20170128
TRJ110		Peru	La Libertad	S07°39'00"	W79°14'26"	20170128
TRJ115		Peru	La Libertad	S07°42'20"	W79°19'40"	20170128
TUM002		Peru	Tumbes	S03°32'12"	W80°13'30"	20181216
TUM003		Peru	Tumbes	S03°32'12"	W80°13'28"	20181216
TUM005		Peru	Tumbes	S03°31'44"	W80°13'32"	20181216
TUM006		Peru	Tumbes	S03°31'39"	W80°13'37"	20181216
TUM010		Peru	Tumbes	S03°31'39"	W80°13'42"	20181216
TUM013		Peru	Tumbes	S03°32'07"	W80°13'04"	20181216
TUM014		Peru	Tumbes	S03°32'07"	W80°13'05"	20181216
TUM018		Peru	Tumbes	S03°32'25"	W80°12'44"	20181216
TUM019		Peru	Tumbes	S03°32'26"	W80°12'43"	20181216
TUM020		Peru	Tumbes	S03°32'27"	W80°12'43"	20181216
TUM022		Peru	Tumbes	S03°32'36"	W80°12'30"	20181216
TUM024		Peru	Tumbes	S03°33'11"	W80°12'24"	20181216
TUM025		Peru	Tumbes	S03°33'11"	W80°12'25"	20181216
TUM026		Peru	Tumbes	S03°34'20"	W80°27'35"	20181216
TUM028		Peru	Tumbes	S10°26'51"	W77°42'31"	20190115
INIA collection						
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)						
PER018792	TS - 013	Peru	Lima	S11°35'80"	W76°45'30"	20150818
PER018793	TS - 014	Peru	Lima	S11°35'11"	W76°44'81"	20150818
PER018795	TS - 016	Peru	Lima	S11°41'69"	W76°52'11"	20150819
PER018832	TS - 053	Peru	Cajamarca	S06°61'55"	W78°48'17"	20111012
PER018835	TS - 056	Peru	Cajamarca	S06°19'01"	W78°41'87"	20111013
PER018836	TS - 057	Peru	Cajamarca	S06°19'12"	W78°41'90"	20111013
PER018837	TS - 058	Peru	Cajamarca	S06°19'66"	W78°42'48"	20111013
-	TS - 085	Peru	Cusco	S13°19'36"	W72°42'47"	20111024
PER018878	TS - 099	Peru	Cusco	S12°43'41"	W72°32'44"	20111025
PER018879	TS - 100	Peru	Cusco	S12°41'31"	W72°31'07"	20111025
PER018894	TS - 115	Peru	Huanuco	S09°50'08"	W76°07'05"	20111109
PER018901	TS - 122	Peru	Huanuco	S09°48'06"	W76°04'08"	20111110
PER018902	TS - 123	Peru	Huanuco	S09°10'52"	W75°57'36"	20111111
PER018909	TS - 130	Peru	Huanuco	S09°22'55"	W75°01'57"	20111113
PER018913	TS - 134	Peru	Huanuco	S09°22'15"	W75°02'01"	20111113
PER018923	TS - 144	Peru	Ucayali	S08°23'30"	W75°07'41"	20111116
PER018928	TS - 149	Peru	Ucayali	S08°36'56"	W74°18'22"	20111117
PER018932	TS - 153	Peru	Ayacucho	S12°54'24"	W74°17'05"	20111213

aDate, yyyyymmdd.



表1 本研究で採集および使用したトマトアクセッション(続き)

Species and accessions		Sampling site				
		Country	Region	Longitude	Latitude	Date <sup>a</sup>
-	TS - 156	Peru	Ayacucho	S13°01'36"	W73°58'14"	20111214
PER018936	TS - 157	Peru	Ayacucho	S13°03'49"	W73°57'27"	20111214
PER018938	TS - 159	Peru	Ayacucho	S13°06'28"	W73°54'36"	20111214
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)						
PER018780	TS - 001	Peru	Lima	S11°02'22"	W77°37'37"	20110816
PER018781	TS - 002	Peru	Lima	S11°02'22"	W77°37'36"	20110816
PER018782	TS - 003	Peru	Lima	S11°01'15"	W77°37'20"	20110816
PER018783	TS - 004	Peru	Lima	S10°59'37"	W77°35'55"	20110816
PER018784	TS - 005	Peru	Lima	S10°43'48"	W77°43'38"	20110816
PER018785	TS - 006	Peru	Lima	S10°39'50"	W77°45'66"	20110816
PER018786	TS - 007	Peru	Lima	S10°39'82"	W77°41'10"	20110817
PER018787	TS - 008	Peru	Lima	S10°39'98"	W77°41'19"	20150817
PER018788	TS - 009	Peru	Lima	S10°40'52"	W77°44'07"	20150817
PER018789	TS - 010	Peru	Lima	S10°48'97"	W77°42'21"	20150818
PER018790	TS - 011	Peru	Lima	S10°48'98"	W77°42'26"	20150818
PER018791	TS - 012	Peru	Lima	S11°49'15"	W76°59'61"	20150818
PER018794	TS - 015	Peru	Lima	S11°29'46"	W76°32'77"	20150817
PER018796	TS - 017	Peru	Lima	S11°29'73"	W77°15'61"	20150819
PER018797	TS - 018	Peru	Lima	S11°29'74"	W77°15'64"	20150819
PER018798	TS - 019	Peru	Lambayeque	S06°27'45"	W79°37'01"	20110914
PER018799	TS - 020	Peru	Lambayeque	S06°27'44"	W79°37'01"	20110914
PER018800	TS - 021	Peru	Lambayeque	S06°26'61"	W79°36'36"	20110914
PER018801	TS - 022	Peru	Lambayeque	S06°26'62"	W79°36'37"	20110914
PER018802	TS - 023	Peru	Lambayeque	S06°25'24"	W79°34'96"	20110914
PER018803	TS - 024	Peru	Lambayeque	S06°25'18"	W79°33'91"	20110914
PER018804	TS - 025	Peru	Lambayeque	S06°20'40"	W79°26'78"	20110914
PER018805	TS - 026	Peru	Lambayeque	S06°20'38"	W79°26'22"	20110914
PER018806	TS - 027	Peru	Lambayeque	S06°18'95"	W79°27'02"	20110914
PER018807	TS - 028	Peru	Lambayeque	S06°07'70"	W79°40'78"	20110914
PER018808	TS - 029	Peru	Lambayeque	S06°08'57"	W79°41'69"	20110915
PER018809	TS - 030	Peru	Lambayeque	S06°38'53"	W79°46'70"	20110916
PER018810	TS - 031	Peru	Lambayeque	S06°38'56"	W79°46'69"	20110916
PER018811	TS - 032	Peru	Lambayeque	S06°38'59"	W79°46'36"	20110916
PER018812	TS - 033	Peru	Lambayeque	S06°38'63"	W79°46'34"	20110916
PER018813	TS - 034	Peru	Lambayeque	S06°38'80"	W79°46'10"	20110916
PER018814	TS - 035	Peru	Lambayeque	S06°38'35"	W79°44'08"	20110916
PER018815	TS - 036	Peru	Lambayeque	S06°39'46"	W79°43'42"	20110916
PER018817	TS - 038	Peru	Lambayeque	S06°41'34"	W79°42'20"	20110916
PER018819	TS - 040	Peru	Lambayeque	S06°43'34"	W79°29'20"	20110916
PER018820	TS - 041	Peru	Lambayeque	S06°43'84"	W79°38'25"	20110916
PER018821	TS - 042	Peru	Lambayeque	S06°44'05"	W79°32'96"	20110916
PER018823	TS - 043	Peru	Lambayeque	S06°38'55"	W79°23'14"	20110917
-	TS - 044	Peru	Lambayeque	S06°38'02"	W79°24'63"	20110917
PER018824	TS - 045	Peru	Lima	S11°27'86"	W77°08'14"	20111007
PER018825	TS - 046	Peru	Lima	S11°27'86"	W77°08'14"	20111007
PER018842	TS - 063	Peru	Cajamarca	S05°41'45"	W78°47'78"	20111014

aDate, yyyyymmdd.

表1 本研究で採集および使用したトマトアクセッション(続き)

Species and accessions		Sampling site				
		Country	Region	Longitude	Latitude	Date <sup>a</sup>
PER018854	TS - 075	Peru	Cajamarca	S05°42'62"	W78°49'46"	20111014
PER018862	TS - 083	Peru	Cajamarca	S05°71'16"	W78°82'40"	20111014
PER018877	TS - 098	Peru	Cusco	S12°43'44"	W72°32'45"	20111025
PER018926	TS - 147	Peru	Ucayali	S08°23'41"	W75°05'32"	20111116
PER018937	TS - 158	Peru	Ayacucho	S13°06'28"	W73°54'37"	20111214
PER018940	TS - 161	Peru	Ayacucho	S13°37'34"	W74°08'44"	20111215
PER018942	TS - 163	Peru	Huancavelica	S13°36'20"	W75°26'06"	20111216
TGRC Collection used as references						
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)						
LA 1456		Mexico	Veracruz	N19°10'00"	W96°08'00"	1971
LA 1623		Mexico	Campeche	N20°28'59"	W90°16'59"	19750310
LA 1909		Peru	Cusco	S12°51'00"	W72°41'00"	197807
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)						
LA 3123		Ecuador	Santa Cruz Island	S00°37'00"	W90°22'59"	19910516
<i>S. cheesmaniae</i> (SC)						
LA 0437		Ecuador	Isabela Island	S00°57'09"	W90°58'39"	19561125
LA 0521		Ecuador	Frenandina Island	S00°22'00"	W91°33'00"	1957
<i>S. galapagense</i> (SG)						
LA 0438		Ecuador	Isabela Island	S00°58'39"	W91°01'16"	19561126
LA 0528		Ecuador	Santa Cruz Island	S00°45'00"	W90°19'00"	19570809
Commercial cultivars used as references						
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> (SLL)						
cv. Aichi-first (Matsunaga Seed, Konan, Aichi, Japan)						
cv. Block (Sakata seed Co, Kanagawa, Japan)						
cv. Early Pack7 (Heirloom tomato farm, Gifu, Japan)						
cv. Momotaro-8 (Takii & Co, Kyoto, Japan)						
cv. Momotaro (Takii & Co, Kyoto, Japan)						
cv. Money maker (Baker creek heirloom seed Co, Missouri, USA)						
cv. Ponderosa (Noguchi seed Lab, Saitama, Japan)						

aDate, yyyymmdd.

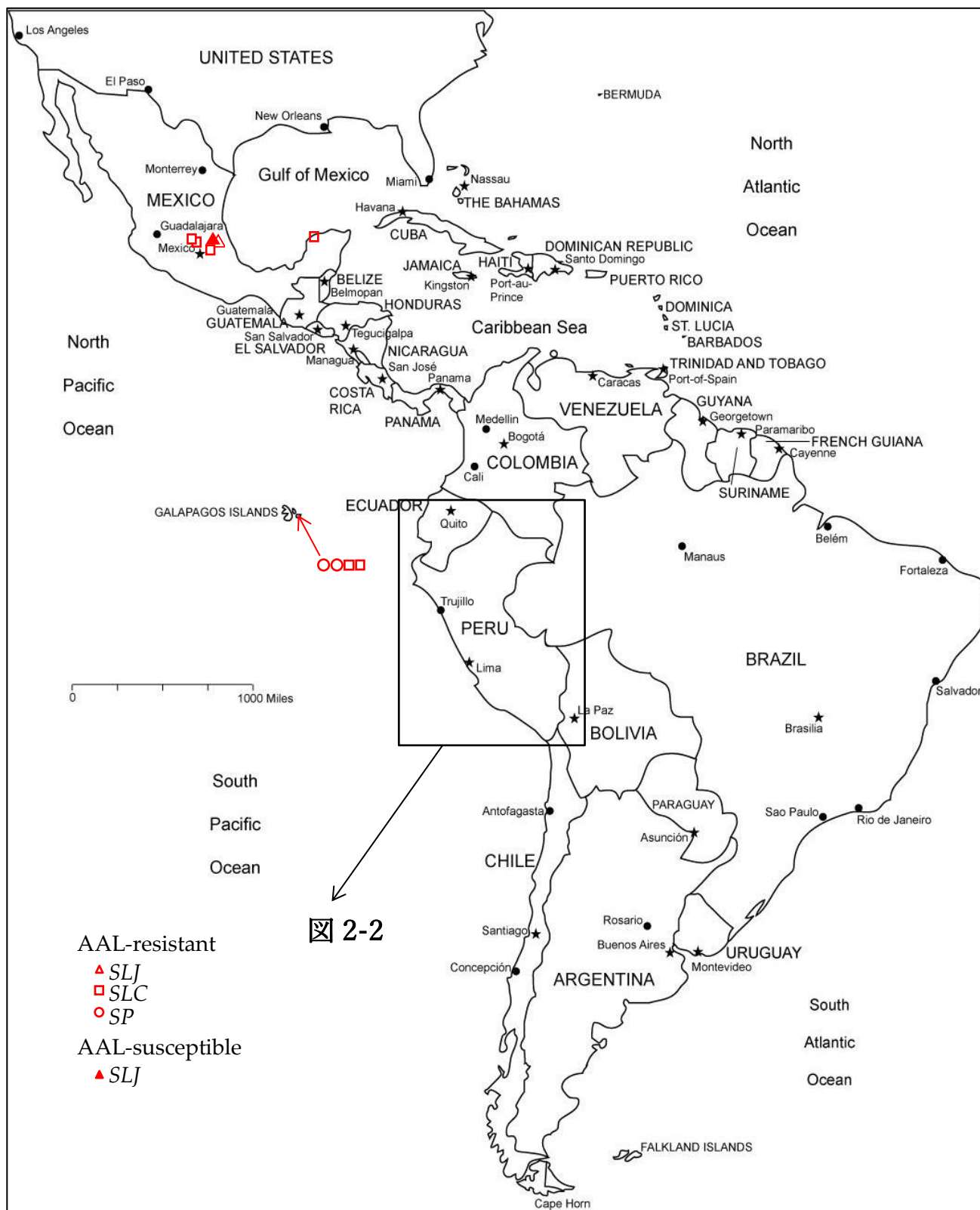


図 2-1 本研究で使したトマトの採集地

赤い○、□ および△は採集地を示す。△は *SLJ* (*S. lycopersicum* var. *lycopersicum* “jitomate criollo”)、□は *SLC* (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*)、○は *SP* (*S. pimpinellifolium*) を示す。AAL 毒素に感受性の場合には赤く塗りつぶした。エクアドル由来のトマトはすべて Santa Cruz 島から採集した。ペルー由来のトマトは、図 2-2 に示す。地図は <https://www.pinterest.es/> からダウンロードした。

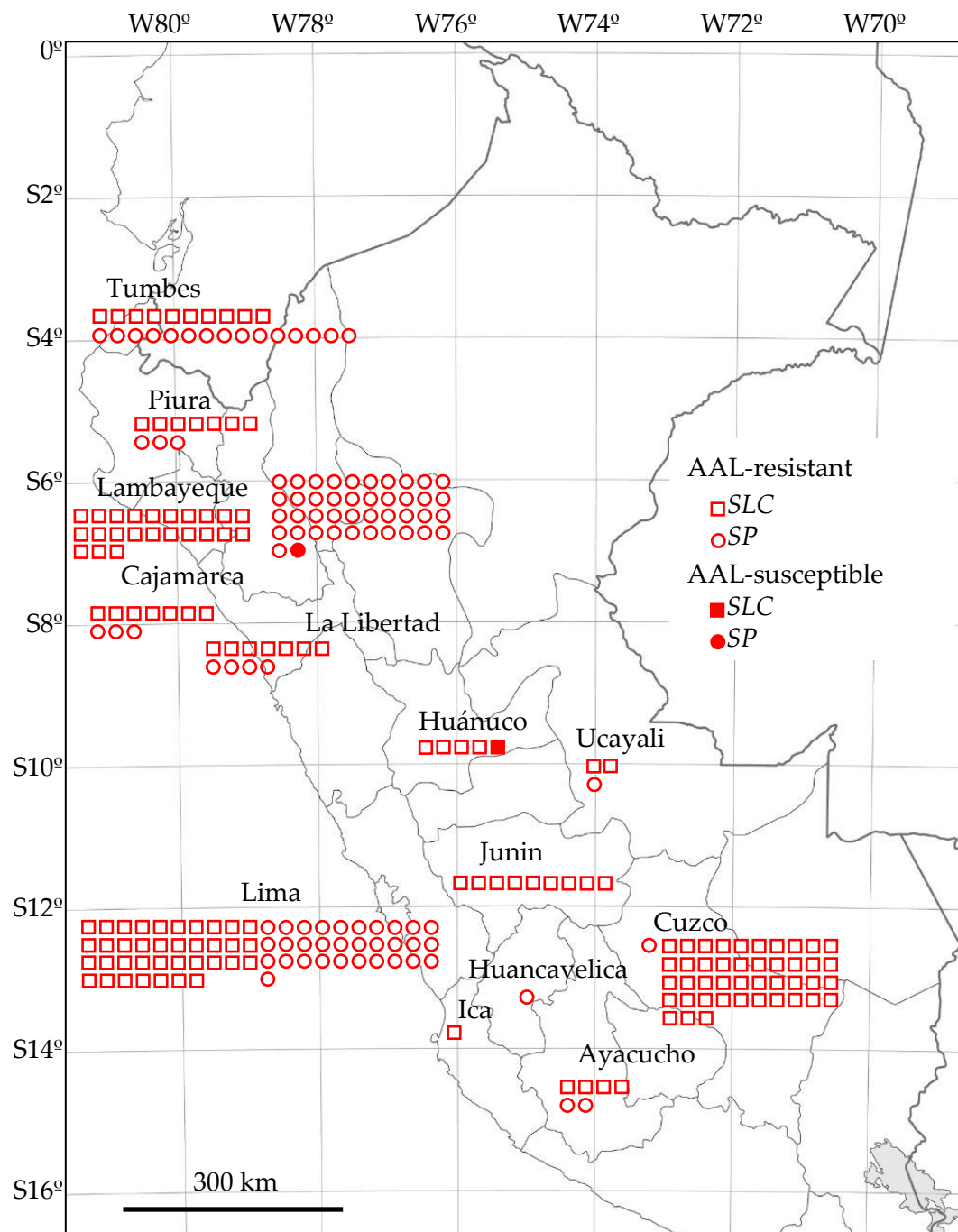


図 2-2 本研究で使したトマトの採集地 (ペルー)

□および○が採集地を示す。□は *SLC* (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*)、○は *SP* (*S. pimpinellifolium*) を示す。AAL 毒素に感受性の場合には赤く塗りつぶした。地図は Aflo Co. (<http://mall.aflo.com/>) からダウンロードした。

## 2.3 結果

### 2.3.1 メキシコ産トマトの形態学的特徴に基づく同定

TUAT コレクションの 6 つのアクセッションのうち、2 アクセッションを *SLJ*、4 アクセッションを *SLC* と同定した（表 1、図 2-1）。

*SLJ* の小葉の鋸歯は *SLL* (cvs. 愛知ファースト、桃太郎 8) に似て深く、成長するにしたがって鋸歯の切れ込みはさらに深くなり、小葉の大きさも *SLL* と同様に大きくなった。鋸歯茎頂から 15 cm 下の部分において茎の太さを計測したところ、*SLJ* M5-4 は 4.43 mm で、*SLL* 愛知ファースト (4.27 mm) と同程度であり、*SP* LA1242 (1.53 mm) と比較して太かった。また *SLJ* の花卉や萼片も *SP* や *SLC* と比較して大きく（図 6、表 2）、*SLL* cv. 愛知ファーストに似て第一花の子房が腎臓型になり、*SP* や *SLC* より太かった。

*SLC* は、*SLL* や *SLJ* と比較して茎が細く、小葉にゆるやかな鋸歯がみられるものの成長しても切れ込みが深くなり、*SLL* や *SLJ* と比較して一回り小さな小葉であった（図 6、図 7）。*SLJ* と同様に茎の太さを計測したところ、*SLC* ML-1 は 2.40 mm で、*SLL* cv. 愛知ファーストおよび *SLJ* M5-4 (4.43 cm) より細かった（表 2）。

一方で、花卉は *SLL* や *SLJ* より小さいか *SP* と同程度だった（図 6）。*SLC* ML-1 は、*SLL* や *SLJ* と比較すると茎は細いものの、*SP* LA3123 と比較すると茎は太かった。茎は立性であった。

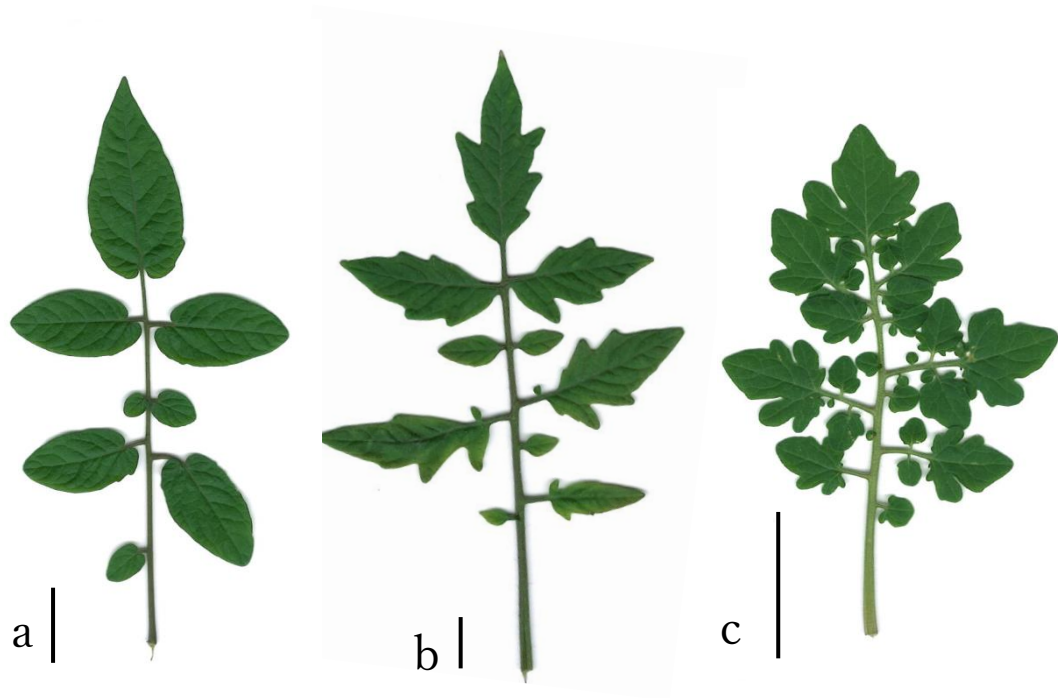


図3 *S. pimpinellifolium* および *S. lycopersicum* の小葉の形態的同定基準

Darwin et al. (2003) Figure 4 における図を参考に *S. pimpinellifolium* および *S. lycopersicum* の小葉の切れ込みを確認し、基準株を設定した。

a : 小葉に鋸歯が無い～ほぼ無い *S. pimpinellifolium* (LA1242) 、b: 小葉に鋸歯がある *S. lycopersicum* (cv. 愛知ファースト) 、c : 小葉が細かく分かれているが鋸歯ではない *S. galapagense* (LA0528) 。縦線は各アクセッションにおける 1 cm を示す。

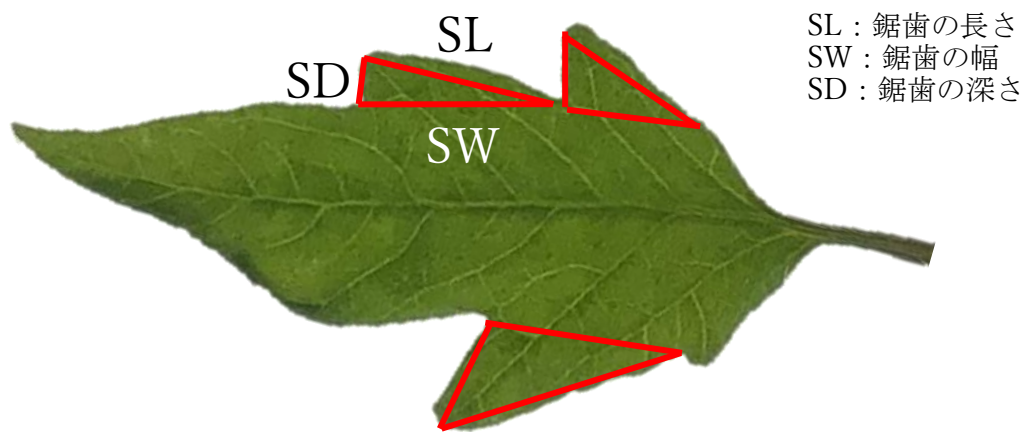


図4 トマト小葉の鋸歯計測

門松、松浦（1984）図－2 を参考に、トマト小葉の鋸歯の長さ、幅、深さを図のように設定し、それぞれ測定した。





図5 トマトの第1小葉から第5小葉までの数え方の基準

鋸歯の計測には第3、第4、第5小葉の先端にある、一番大きい小葉を用い、平均値を求めた。



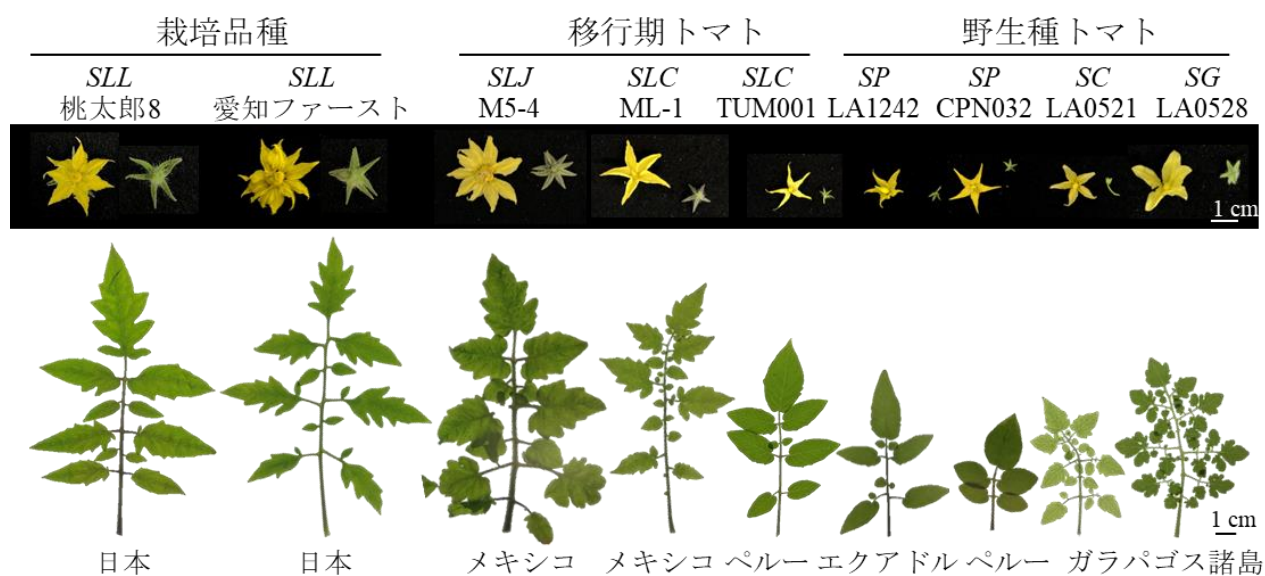


図6 トマトの小葉、花卉および萼

各トマトの第5小葉、花卉および萼の写真。日本産食用トマト*SLL* cv. 桃太郎8、愛知ファースト、メキシコ由来*SLJ* M5-4、ペルーおよびエクアドル由来の *SLC* ML-1、TUM001、エクアドル本土およびペルー由来*SP* LA1242 (TGRCアクセッション)、CPN032、ガラパゴス諸島由来*SC* LA0521 (TGRCコレクション)、*SG* LA0528 (TGRCコレクション)。

*SLL* ; *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*, *SLJ* ; *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* “jitomate criollo”, *SLC* ; *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *SP* ; *S. pimpinellifolium*, *SC* ; *S. cheesmaniae*, *SG* ; *S. galapagense*.

表 2 供試したトマトの鋸歯、茎直径、樹形

Solanum	Accession	Conutry	鋸齒(mm)			茎 直径 (mm)	樹形
			SL	SW	SD		
栽培品種							
<i>SLL</i>	桃太郎 8	日本	1.46±0.49	1.17±0.37	0.69±0.28	4.13	立性
<i>SLL</i>	愛知 ファースト	日本	0.84±0.23	0.83±0.24	0.33±0.12	4.27	立性
移行期トマト							
<i>SLJ</i>	M5-4	メキシコ	0.78±0.21	0.82±0.17	0.40±0.15	4.43	立性
<i>SLC</i>	ML-1	メキシコ	0.57±0.18	0.61±0.13	0.22±0.08	2.40	立性
<i>SLC</i>	TUM001	ペルー	0.48±0.19	0.47±0.19	0.16±0.07	2.07	立性
野生種トマト							
<i>SP</i>	LA1242	エクアドル	-	-	-	1.53	立性
<i>SP</i>	CPN032	ペルー	-	-	-	2.17	立性
<i>SC</i>	LA0521	エクアドル	0.39±0.17	0.37±0.09	0.13±0.05	2.57	地這性
<i>SG</i>	LA0528	エクアドル	0.76±0.21	0.57±0.20	0.44±0.27	2.89	地這性

SL: Serrate Length (鋸歯の長さ), SW: Serrate Wide (鋸歯の幅), SD: Serrate Depth (鋸歯の深さ), - : データなし。

### 2.3.2 エクアドル産トマトの形態学的特徴に基づく同定

TUAT コレクションの 4 つのアクセッションのうち、2 アクセッションを *SLC*、2 アクセッションを *SP* と同定した（表 1）。GPS 情報から、4 つのアクセッションは全て極めて近い距離に自生していた（表 1）。エクアドル産の *SP* および *SLC* アクセッションはいずれも *SLL* (cvs. 愛知ファースト、桃太郎 8) と比較して小葉にゆるやかな鋸歯があり、成長しても切れ込みが深くならなかった。茎の太さを計測したところ、*SLL* cv. 愛知ファーストおよび *SLJM5-4* (4.43 cm) より細かった（図 6、図 7、表 2）。

*SP* は、*SLL* や *SLJ* と比較して茎が細く、小葉にゆるやかな鋸歯がみられるものの成長しても切れ込みが深くならず、メキシコ産 *SLC* と比較して一回り小さな小葉であった（図 6）。茎の太さを計測したところ、*SP* LA1242 は 1.53 mm で、*SLL* より細かった（表 2）。

### 2.3.3 ペルー産トマトの形態学的特徴に基づく同定

UNALM - TUAT コレクションの 60 アクセッションのうち、41 アクセッションを *SLC*、19 アクセッションを *SP* と同定した（表 1）。

*SLC* は、*SLL* や *SLJ* と比較して茎が細く、小葉にゆるやかな鋸歯があるが成長しても切れ込みが深くならなかった。ペルー産 *SLC* は、メキシコ産 *SLC* (ML-1) よりも花卉、がく、果実の大きさが小さく、*SP* に似る傾向があった（図 6）。Junin 州 Satipo 県で採集した *SLC* (STP088、STP089、STP090、STP091、STP092) では、果実の平均直径が 2.8 cm になるものもあった（図 7）。

ペルー産の *SP* は、エクアドル産 *SP* および *SLC* と類似し、茎は、2.17 mm で、*SLL* や *SLJ*

より細く、小葉に浅い鋸歯がある場合でも、成長しても切込みは深くならなかった。茎は立性で *SLL* と比較すると徒長しやすい形質を持っていた。

ペルーにおいて *SP* や *SLC* を採集できた場所は海岸地域が多く、休耕中の畑やバナナ圃場の畦などが多かった（図 7）。大学構内の空き地や家庭の軒先、ゴミ貯まりのような場所に自生していることが多く、1 か所見つかるとその周辺に多く見つかった。アンデス山脈を越えたジャングル地域に自生しているトマトはほとんどが *SLC* で、UNALM - TUAT コレクションには Huauco 州と Junin 州由来の *SP* は見られなかった。Tumbes 州では人が滅多に出入りしないジャングル地帯にはトマトは生息せず、水田の畦や車道の脇などに自生していた。

BRC014



BRC015



BRC016



BRC017



BRC021



CCY132



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。

CCY134



CCY137



CCY138



CCY139



CCY146



CCY147



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
30



CCY149



CCY152



CCY153



CCY154



CCY155



CCY156



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
31

CCY159



CCY160



CCY162



CCY163



CCY165



CCY166



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
32



CGA023



CGA028



CGA029



CGA031



CGA032



ICA034



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
33

IND096



IND097



IND098



IND099



IND100



IND101



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。



IND102



IND103



IND104



IND105



IND106



IND107



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。

JAE035



JAE036



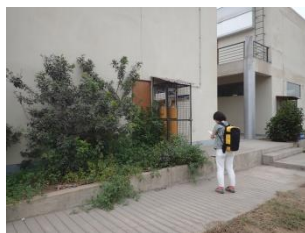
JAE037



LAM002



LAM003



LMA006



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。  
36



JAE035



JAE036



JAE037



LAM002



LAM003



LAM006



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。

LAM007



LAM008



LAM009



LAM011



LAM035



LAM036



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。  
38



LIM027



LIM038



MTP033



PIU029



PIU168



PIU169



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。  
39

PIU172



PIU174



PIU181



PIU185



PKC040



PRG121



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。  
40



QBB190



QBB192



QBB194



QBB195



QBB196



QBB197



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
41

QBB200



QBB202



QBB203



QBB204



QBB205



QBB206



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。  
42



QBB207



QBB207-2



QBB208



QBB208-2



QBB209



QBB210



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
43

QBB211



QBB212



QBB213



QBB214



QBB215



QBB216



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
44



QBB218



QBB221



QBB222



QBB223



QBB224



QBB225



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。  
45

QBB226



QBB227



QBB230



QBB231



QBB232



QBB234



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
46



QBB235



QBB238



STP087



STP088



STP089



STP090



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
47

STP091



STP092



STP093



STP094



STP095



TRJ108



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。



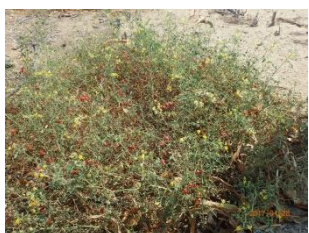
TRJ111



TRJ112



TRJ113



TRJ116



TRJ117



TRJ120



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。  
49



TUM001



TUM004



TUM007



TUM011



TUM012



TUM015



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
50

TUM016



TUM017



TUM021



TUM023



CCY128



CCY129



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。



CCY130



CCY131



CCY133



CCY140



CCY141



CCY142



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
52

CCY143



CCY144



CCY145



CCY157



CCY158



CCY164



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。



CGA022



CGA024



CGA025



CGA026



CGA027



CGA030



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。

CGA033



CGA034



CPN032



LAM001



LAM005



LAM010



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。



LAM012



LAM013



LAM037



PIU030



PIU031



PIU188



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。



PRG122



PRG123



PRG125



PRG126



TRJ109



TRJ110



図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。  
57

TRJ115



TUM002



TUM003



TUM005



TUM006



TUM010

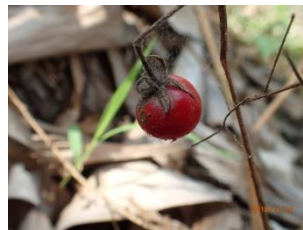


図 7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表 1 に記した。



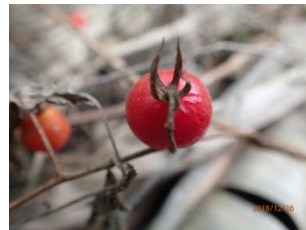
TUM013



TUM014



TUM018



TUM019



TUM020



TUM022



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。  
59

TUM024



TUM025



TUM026



TUM028



図7 ペルー由来のトマト(続き)  
各アクセッションの情報は表1に記した。

## 2.4 考察

本研究では、ペルー、エクアドル、メキシコの“野生種トマト”および“移行期トマト”の種や品種を Darwin *et al.* (2003) に基づいて同定した。これは、材料および方法に記したように、Rick *et al.* (1990) の同定基準として重要な果実が多くのアクセッションで得られなかったためである。Darwin *et al.* (2003) では、主に小葉とその鋸歯の切れ込みを基準としていて、その同定結果は Rick *et al.* (1990) の基準での同定結果と矛盾しないとされる。INIA では Darwin *et al.* (2003) を同定の基準にしている。そこで本研究では、TUAT コレクションおよび UNALM-TUAT コレクションを対象に、Darwin *et al.* (2003) に準じ、鋸歯がない場合に *SP*、鋸歯がある場合には *SLC* または *SLJ*、さらにその中でも鋸歯の切れ込みが深くメキシコ由来トマトを *SLJ* と同定した。この分類基準は、実際にフィールドでサンプリングする際には簡便であり役立った。しかし観察を重ねる中で、葉縁に緩やかな鋸歯がある *SP* と *SLC* の中間の様なアクセッションも存在しており、小葉の形態を基本とした同定の問題点を見出した。そのため、分子生物学的解析による同定も必要であると考え、第 3 章では、トマトアクセッションの分子系統解析を行った。その結果と、小葉の形態に基づく同定の比較考察は第 3 章の考察に記す。

メキシコ由来の *SLC* とペルー由来の *SLC* で果実が得られたアクセッションを比較してみると、メキシコの *SLC* は花卉が大きく *SLJ* に類似した形質を持っていた。ペルーの一部の地域（Junin 州 Satipo 県）では、メキシコの *SLC* と同様に比較的大きな果実をつける *SLC*（STP088、STP089、STP090、STP091、STP092）が見いだされた。Razifard *et al.* (2020) は、ペルー北部の *SP* が一度南下し *SLC* となり、その後 *SLC* が再び北上してメキシコに移動したとしていて、今回 Satipo 県で採集されたアクセッション（STP088、STP089、

STP090、STP091、STP092) はこれを支持している。この結果は、野生種トマトから移行期トマトへの栽培化の歴史の片鱗を顕していると考えられる。

ペルーには **Lomas** (スペイン語で谷) と呼ばれる砂漠地帯に点在する小さなオアシスのような場所が多く存在し、砂漠地帯の海岸部であっても霧が発生することで生じる水分によって植物が生き延びることができる。トマトは、雨季と乾季の繰り返しの中でその時々にあった場所に自生して種を保持していると考えられる。**Peralta et al.** (2008) は、*SP* が基本的に海岸部に自生していると報告しているが、**Lomas** と呼ばれる海岸から離れた砂漠地帯のオアシスにもトマトが自生していること、6000 m 級のアンデス山脈を越えたジャングル地域においても *SP* が存在していることを示している。筆者も **Lomas** において *SP* が自生していることを確認、さらにジャングル地域からもサンプリングを実施した。これらの結果から、現在も当時と同様に **Lomas** やジャングル地域がトマトの自生地であることが確認できた。このように海岸部と物理的に分断されている場所にも *SP* が自生しているのは大変興味深い。

### 3 中南米産トマトの分子系統解析

#### 3.1 緒言

*Solanum* 属 *Lycopersicon species group* の分類はこれまでも多く議論されてきた。ガラパゴス諸島の *Lycopersicon species group* の野生種トマトの分類に関する議論は 1847 年までにさかのぼる (Hooker, 1847)。もともと 1827 年に John Scouler 氏がガラパゴス諸島においてサンプリングを実施しており、1835 年に Charle Darwin が同じく行ったサンプリングの結果と合わせて Joseph D. Hooker が報告書をまとめ上げた。その結果、当時のガラパゴス諸島由来のトマトが、アメリカ本土の南部に自生している 3 種のトマト (*Lycopersicon pimpinellifolium* - Chatham Island, *L. esculentum* var. *minor* - James Island, *L. peruanum* var. *parviflorum* - Chatham Island) と形態が似ていることが報告された。その後 1855 年に Andersson は葉縁の切れ込みや植物としての樹形、繊毛の有無など細かい観察結果を報告したが、その際に当時の命名法に従わず、*L. peruanum* var. *parviflorum* - a や *L. peruanum* var. *parviflorum* - b といった独自の命名法を用いたため、その後のガラパゴス諸島に自生しているトマトの分類は混乱した。時代は進み、世界は第二次世界大戦に突入し研究の継続が困難となる中、終戦後はトマトの新たな品種改良のため遺伝資源に注目が集まるようになった。現在 TGRC コレクションで管理されているガラパゴス諸島由来のトマトは、1940 年に Muller が提唱した 3 種のトマト (*L. cheesmanii* forma *minor* : 現在の *S. galapagense*, *L. cheesmanii* forma *typicum* : 現在の *S. cheesmaniae*, *L. pimpinellifolium* : 現在の *S. pimpinellifolium*) を軸として同定されたものである。このように、形態的指標に基づく分類は 170 年以上も前から議論されており、第 2 章で用いた小葉の形態を基準とする方法 (Darwin *et al.*, 2003) 以外にも、花卉の大きさ、果実の色や大きさ、茎の節間長や萼片の大きさ、トライコームの長さなど、数値化することができる基準を用いて行われる (Rick

*et al.*, 1990、Peralta & Spooner, 2001、Peralta *et al.*, 2006、Peralta *et al.*, 2008。しかし、Rick (1971) が、ガラパゴス諸島産の *SC* から分化した種として *SG* を提案した際に、形態的に同定が困難な中間的なアクセッションが確認された。これらは現在 Academy Bay (ガラパゴス諸島サンタ・クルス島のチャールズダーウィン研究所のある湾の名称を引いて困難な分類であることを示している) と呼ばれる種間の自然交雑によって生まれたと考えられるアクセッションであり、自然界にはこのような中間的形質を持つ個体や人間の移動によって運ばれたと考えられる個体がしばしば存在するため、分類は混乱をきたしている。さらに、*SP*、*SC*、*SG* の同定は花卉の色が、まぶしい黄色なのか、ただの黄色なのかなど、個人の観察に頼った基準で同定が行われてきた (Rick, 1971、Darwin *et al.*, 2003) 経緯もあり、熟達した研究者以外は同定が困難であった。そのため *Lycopersicon species group* の野生種の一般的な同定方法が求められていた。

近年、DNA の塩基配列を用いた分子系統に基づく同定が行われるようになり、例えば、DArTseq (Diversity Arrays Technology sequence) を用いた SNPs (Single-Nucleotide Polymorphism) の解析によって *SC* と *SG* の区別だけでなく、Academy Bay のアクセッションがどのくらい *SC* あるいは *SG* に遺伝的に近縁であるのかを明らかにすることで、ガラパゴス諸島に自生する野生種トマトの分化の考察が行われている (Pailles *et al.*, 2017)。

植物の分子系統関係では、細胞壁合成酵素、キチナーゼ、転写因子、シグナル伝達に関与する遺伝子を含む COSII 領域を用いることが普及しつつあり (Wu *et al.*, 2009) その妥当性は、コーヒーやジャガイモなどで確認されている。また野生種トマトにおける COSII の最適な組み合わせについては、Rodriguez ら (2009) が 18 の COSII 領域 (以下、18COSII) を用いた系統解析を報告しており、*Lycopersicon species group* 以外の野生種トマトを含んだ



分子系統解析や同定に用いることができるとしている。

そこで、本研究では、第 2 章で小葉の形態に基づいて同定した *SP*、*SLC*、*SLJ* のアクセッションからランダムに 14 のアクセッションと先行研究で読まれた 6 アクセッション (LA1673、LA1581、LA1450、LA0317、LA1326、LA2185) を用いて、18COSII 領域に基づく分子系統解析を行った。

## 3.2 材料および方法

### 3.2.1 食用トマト

食用トマト *SLL* は cvs. 愛知ファーストおよび桃太郎 8 を用いた (表 3)。植物は 2.2.1 に準じて栽培し、DNA 抽出に供試した。

### 3.2.2 TGRC コレクショントマト

TGRC コレクションから、*SC* LA0521 を用いた (表 3)。植物は 2.2.1 に準じて調製し、DNA 抽出に供試した。

また、Rodriguez ら (2009) によって解析された TGRC コレクション *SLC* LA1673、*SP* LA1581、*SC* LA1450、*SG* LA0317、*S. neorickii* LA1326、*S. arcanum* LA2185 の 18COSII 配列をリファレンス配列として系統解析に用いた (表 3、表 4)。

### 3.2.3 メキシコ産トマト

第 2 章で同定した *SLJ* M5-3 および、*SLC* ML-1 を用いた (表 3)。植物は 2.2.1. に準じて栽培し、DNA 抽出に供試した。

表3 本研究で18COSII分子系統解析に使用したトマトアクセッション

種名と アクセッション	採集場所				
	採集国	州名	経度	緯度	採集日 <sup>a</sup>
TUAT コレクション (Inami <i>et al.</i> , 2014)					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> “jitomate criollo” (SLJ)					
M5-3	Mexico	Queretaro	N21°16'00"	W99°24'20"	20100530
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
ML-1	Mexico	Hidalgo	N21°01'06"	W98°31'46"	20100529
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
ECU0043	Ecuador	Santa Cruz	S00°41'23"	W90°19'10"	20080113
UNALM - TUAT コレクション					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
BRC016	Peru	Lima	S12°08'21"	W77°01'35"	20161104
CCY152	Peru	Lambayeque	S06°30'07"	W79°52'14"	20170131
JAE036	Peru	Cajamarca	S05°33'15"	W78°51'02"	20190209
JAE037	Peru	Cajamarca	S05°39'26"	W78°41'28"	20190209
STP088	Peru	Junin	S11°01'21"	W74°58'20"	20161218
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
CPN032	Peru	La Libertad	S07°07'14"	W79°28'06"	20190125
INIA コレクション					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
PER018894	Peru	Huanuco	S09°50'08"	W76°07'05"	20111109
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
PER018805	Peru	Lambayeque	S06°20'38"	W79°26'22"	20110914
TGRC コレクション					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
§ LA 1673	Peru	Lima	S11°59'00"	W76°50'00"	1976
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
§ LA 1581	Peru	Chiclayo	S06°36'00"	W79°53'24"	1974
<i>S. cheesmaniae</i> (SC)					
LA 0521	Ecuador	Frenandina Island	S00°22'00"	W91°33'00"	1957
§ LA 1450	Ecuador	Isabela Island	S00°58'28"	W91°26'24"	1971
<i>S. galapagense</i> (SG)					
§ LA 0317	Ecuador	Santiago Island	S00°17'00"	W90°33'00"	1954
<i>S. neorickii</i>					
§ LA 1326	Peru	Abancay	S13°44'00"	W72°55'30"	1970
<i>S. arcanum</i>					
§ LA 2185	Peru	Amazonas	S05°30'00"	W78°33'00"	1981
食用トマト					
<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> (SLL)					
cv. Aichi-first (Matsunaga Seed, Konan, Aichi, Japan)					
cv. Momotaro-8 (Takii & Co, Kyoto, Japan)					

<sup>a</sup>Date, yyyyymmdd. TGRC コレクションについては採集年を示す。先行研究 (Rodriguez *et al.*, 2009) にて解析されたアクセッションに§を記した。

表4 18COSII領域のGenBankアクセス番号

	COSIIマーカー				
	C2At1g30580	C2At1g32130	C2At1g73180	C2At2g15890	C2At2g36930
	ラボコード				
	X2	3	4	5	8
<b>TUATコレクション (Inami et al., 2014)</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> “jitomate criollo” (SLJ)					
M5-3	LC593116	LC596589	LC596603	LC596617	LC596631
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
ML-1	LC593122	LC596595	LC596609	LC596623	LC596637
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
ECU0043	LC593121	LC596594	LC596608	LC596622	LC596636
<b>UNALM-TUATコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
BRC016	LC593118	LC596591	LC596605	LC596619	LC596633
CCY152	LC593119	LC596592	LC596606	LC596620	LC596634
JAE036	LC593123	LC596596	LC596610	LC596624	LC596638
JAE037	LC593124	LC596597	LC596611	LC596625	LC596639
STP088	LC593120	LC596593	LC596607	LC596621	LC596635
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
CPN032	LC593125	LC596598	LC596612	LC596626	LC596640
<b>INIAコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
PER018894	LC593115	LC596588	LC596602	LC596616	LC596630
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
PER018805	LC593114	LC596587	LC596601	LC596615	LC596629
<b>TGRCコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
§ LA 1673	FJ599004	FJ598924	FJ599045	FJ599085	FJ599126
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
§ LA 1581	FJ599005	FJ598925	FJ599046	FJ599086	FJ599127
<i>S. cheesmaniae</i> (SC)					
LA 0521	LC593117	LC596590	LC596604	LC596618	LC596632
§ LA 1450	FJ599002	FJ598922	FJ599043	FJ599083	FJ599124
<i>S. galapagense</i> (SG)					
§ LA 0317	FJ599003	FJ598923	FJ599044	FJ599084	FJ599125
<i>S. neorickii</i>					
§ LA 1326	FJ599007	FJ598927	FJ599048	FJ599088	FJ599129
<i>S. arcanum</i>					
§ LA 2185	FJ599008	FJ598928	FJ599049	FJ599089	FJ599130
<b>食用トマト</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> (SLL)					
cv. Aichi-first	LC593113	LC596586	LC596600	LC596614	LC596628
cv. Momotaro-8	LC593112	LC596585	LC596599	LC596613	LC596627

先行研究 (Rodriguez et al., 2009) にて解析されたアクセス番号に§を記した。

表4 18COSII領域のGenBankアクセッション番号(続き)

	COSIIマーカー				
	C2At2g38020	C2At5g14320	C2At1g16210	C2At1g77470	C2At2g24270
	ラボコード				
	9	11	1B	7B	8B
<b>TUATコレクション (Inami et al., 2014)</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> “jitomate criollo” (SLJ)					
M5-3	LC596645	LC596659	LC596673	LC596687	LC596701
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
ML-1	LC596651	LC596665	LC596679	LC596693	LC596707
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
ECU0043	LC596650	LC596664	LC596678	LC596692	LC596706
<b>UNALM-TUATコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
BRC016	LC596647	LC596661	LC596675	LC596689	LC596703
CCY152	LC596648	LC596662	LC596676	LC596690	LC596704
JAE036	LC596652	LC596666	LC596680	LC596694	LC596708
JAE037	LC596653	LC596667	LC596681	LC596695	LC596709
STP088	LC596649	LC596663	LC596677	LC596691	LC596705
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
CPN032	LC596654	LC596668	LC596682	LC596696	LC596710
<b>INIAコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
PER018894	LC596644	LC596658	LC596672	LC596686	LC596700
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
PER018805	LC596643	LC596657	LC596671	LC596685	LC596699
<b>TGRCコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
§ LA 1673	FJ599145	FJ599225	FJ598965	FJ599064	FJ599104
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
§ LA 1581	FJ599146	FJ599226	FJ598966	FJ599065	FJ599105
<i>S. cheesmaniae</i> (SC)					
LA 0521	LC596646	LC596660	LC596674	LC596688	LC596702
§ LA 1450	FJ599143	FJ599223	FJ598963	FJ599062	FJ599102
<i>S. galapagense</i> (SG)					
§ LA 0317	FJ599144	FJ599224	FJ598964	FJ599063	FJ599103
<i>S. neorickii</i>					
§ LA 1326	FJ599148	FJ599228	FJ598968	FJ599067	FJ599107
<i>S. arcanum</i>					
§ LA 2185	FJ599149	FJ599229	FJ598969	FJ599068	FJ599108
<b>食用トマト</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> (SLL)					
cv. Aichi-first	LC596642	LC596656	LC596670	LC596684	LC596698
cv. Momotaro-8	LC596641	LC596655	LC596669	LC596683	LC596697

先行研究 (Rodriguez et al., 2009) にて解析されたアクセッションに§を記した。

表4 18COSII領域のGenBankアクセッション番号(続き)

	COSIIマーカー				
	C2At3g03100	C2At3g10920	C2At3g16150	C2At3g55800	C2At4g34700
	ラボコード				
	9B	10B	11B	13B	15B
<b>TUATコレクション (Inami et al., 2014)</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> “jitomate criollo” (SLJ)					
M5-3	LC596715	LC596729	LC596743	LC596757	LC596771
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
ML-1	LC596721	LC596736	LC596749	LC596763	LC596777
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
ECU0043	LC596720	LC596737	LC596748	LC596762	LC596776
<b>UNALM-TUATコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
BRC016	LC596717	LC596731	LC596745	LC596759	LC596773
CCY152	LC596718	LC596732	LC596746	LC596760	LC596774
JAE036	LC596722	LC596734	LC596750	LC596764	LC596778
JAE037	LC596723	LC596735	LC596751	LC596765	LC596779
STP088	LC596719	LC596733	LC596747	LC596761	LC596775
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
CPN032	LC596724	LC596738	LC596752	LC596766	LC596780
<b>INIAコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
PER018894	LC596714	LC596728	LC596742	LC596756	LC596770
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
PER018805	LC596713	LC596727	LC596741	LC596755	LC596769
<b>TGRCコレクション</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)					
§ LA 1673	FJ598905	FJ599164	FJ599184	FJ599204	FJ598943
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)					
§ LA 1581	FJ598906	FJ599165	FJ599185	FJ599205	FJ598944
<i>S. cheesmaniae</i> (SC)					
LA 0521	LC596716	LC596730	LC596744	LC596758	LC596772
§ LA 1450	FJ598903	FJ599162	FJ599182	FJ599202	FJ598941
<i>S. galapagense</i> (SG)					
§ LA 0317	FJ598904	FJ599163	FJ599183	FJ599203	FJ598942
<i>S. neorickii</i>					
§ LA 1326	FJ598908	FJ599167	FJ599187	FJ599207	FJ598946
<i>S. arcanum</i>					
§ LA 2185	FJ598909	FJ599168	FJ599188	FJ599208	FJ598947
<b>食用トマト</b>					
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> (SLL)					
cv. Aichi-first	LC596712	LC596726	LC596740	LC596754	LC596768
cv. Momotaro-8	LC596711	LC596725	LC596739	LC596753	LC596767

先行研究 (Rodriguez et al., 2009) にて解析されたアクセッションに§を記した。



表4 18COSII領域のGenBankアクセッション番号(続き)

	COSIIマーカー		
	C2Atlg13380	C2Atlg20050	C2Atlg50020
	ラボコード		
	1C	3C	5C
<b>TUATコレクション (Inami <i>et al.</i>, 2014)</b>			
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> “jitomate criollo” ( <i>SLJ</i> )			
M5-3	LC596785	LC596799	LC596813
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ( <i>SLC</i> )			
ML-1	LC596791	LC596805	LC596819
<i>S. pimpinellifolium</i> ( <i>SP</i> )			
ECU0043	LC596790	LC596804	LC596818
<b>UNALM-TUATコレクション</b>			
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ( <i>SLC</i> )			
BRC016	LC596787	LC596801	LC596815
CCY152	LC596788	LC596802	LC596816
JAE036	LC596792	LC596806	LC596820
JAE037	LC596793	LC596807	LC596821
STP088	LC596789	LC596803	LC596817
<i>S. pimpinellifolium</i> ( <i>SP</i> )			
CPN032	LC596794	LC596808	LC596822
<b>INIAコレクション</b>			
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ( <i>SLC</i> )			
PER018894	LC596784	LC596798	LC596812
<i>S. pimpinellifolium</i> ( <i>SP</i> )			
PER018805	LC596783	LC596797	LC596811
<b>TGRCコレクション</b>			
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ( <i>SLC</i> )			
§ LA 1673	FJ598886	FJ598985	FJ599024
<i>S. pimpinellifolium</i> ( <i>SP</i> )			
§ LA 1581	FJ598887	FJ598986	FJ599025
<i>S. cheesmaniae</i> ( <i>SC</i> )			
LA 0521	LC596786	LC596800	LC596814
§ LA 1450	FJ598884	FJ598983	FJ599022
<i>S. galapagense</i> ( <i>SG</i> )			
§ LA 0317	FJ598885	FJ598984	FJ599023
<i>S. neorickii</i>			
§ LA 1326	FJ598889	FJ598988	FJ599027
<i>S. arcanum</i>			
§ LA 2185	FJ598890	FJ598989	FJ599028
<b>食用トマト</b>			
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> ( <i>SLL</i> )			
cv. Aichi-first	LC596782	LC596796	LC596810
cv. Momotaro-8	LC596781	LC596795	LC596809

先行研究 (Rodriguez *et al.*, 2009) にて解析されたアクセッションに§を記した。

### 3.2.4 エクアドル産トマト

第 2 章で *SP* と同定した ECU0043 を用いた（表 3）。植物は 2.2.1 に準じて栽培し、DNA 抽出に供試した。

### 3.2.5 ペルー産トマト

第 2 章で同定した *SLC* BRC016、CCY152、JAE036、JAE037、STP088、および、*SP* CPN032 を用いた（表 3）。植物は 2.2.1 に準じて栽培し、DNA 抽出に供試した。

また、INIA コレクションから、*SP* PER018805、*SLC* PER018894 を用い、2.2.4 に準じて植物を栽培し DNA 抽出に供試した。

### 3.2.6 ゲノム DNA 抽出

PCR で鋳型として用いるトマトのゲノム DNA の抽出には、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN、Venlo、Netherland) または CTAB 法 (Murray, 1980) を用いた。トマト小葉 2 ～3 枚を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で破碎した。DNeasy Plant Mini Kit を使用した場合は、プロトコールに従って DNA 抽出を行った。CTAB 法を使用した場合は、破碎した植物組織に 700  $\mu$ l の 2 $\times$  CTAB buffer を添加しボルテックスでよく混和し、その後、10 分間に一度ずつ転倒混和しながらヒートブロックを用いて 65 $^{\circ}$ C で 45 分間インキュベートした。その後、PCI を 700  $\mu$ l 添加しボルテックスしたのちに、室温 12000  $\times g$  で 10 分間、遠心分離した。その後上清 500  $\mu$ l をピペットマンで吸い取り新しい 1.5 ml チューブに移し、10 $\times$  CTAB buffer を 60  $\mu$ l 添加しよく混和させた後、PCI を 700  $\mu$ l 添加しボルテックス後、同様に室温 12000  $\times g$  で 10 分間、遠心分離してタンパク質および糖を除去した。その後、別の

1.5 ml チューブに移した水層 500  $\mu$ l に 2-プロパノールを 500  $\mu$ l 加え、ゆっくりと転倒混和した。その後、4°C、12000  $\times g$  で 30 分間、遠心分離し、DNA ペレットを得た。デカンテーションして上清を捨てた後、遠心分離し残りの水分を除去し、99% (v/v) エタノールを 500  $\mu$ l 添加し、4°C、12000  $\times g$  で 10 分間、遠心分離を 2 回繰り返す、風乾させたのち、50  $\mu$ l の滅菌 MilliQ 水に溶解した。DNA 溶液は、-30°C で保存した。

### 3.2.7 PCR

PCR には *Ex Taq* DNA polymerase (タカラバイオ、滋賀) または KOD-Plus-Neo (東洋紡、大阪) を使用した。*Ex Taq* を使用した場合の PCR 反応溶液 10  $\mu$ l の組成は、40 ng 鋳型 gDNA、20  $\mu$ M (each) プライマー、1 $\times$  *Ex Taq* buffer、200  $\mu$ M (each) dNTP、0.25 U *Ex Taq* polymerase とした。KOD-Plus-Neo を使用した場合の PCR 反応溶液 10  $\mu$ l の組成は、40 ng 鋳型 gDNA、20  $\mu$ M (each) プライマー、1 $\times$  KOD-Plus-Neo Buffer、20  $\mu$ M (each) dNTP、0.2 U KOD-Plus-NEO polymerase とした。サーマルサイクラーは TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) または MiniAmp Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州、USA) を用いた。反応条件はいずれも、94°C、2 分間；(94°C、10 秒間；56°C、30 秒間；72°C、1 分間)  $\times$  30 サイクル；72°C  $\times$  7 分間を基本としたが、プライマーや増幅サイズによって変更した。使用したプライマーは表 5 に示した。

### 3.2.8 アガロースゲル電気泳動

PCR 産物は 1.0% (w/v) アガロースゲルを用いて、0.5 $\times$  TAE buffer 中で、135 V、20 分間、電気泳動で分離した。泳動後のアガロースゲルは 0.5  $\mu$ g/mL エチジウムブロマイド溶

表5 本研究で用いた18COSII領域の増幅およびシーケンシングに用いたプライマー

ラボコード	配列 (5'-3')	COSIIマーカー	Tm 値
X2-F	TTCTGCCGAAGATTCATGCATGG	C2At1g30580	58
X2-R	TCTCTCCACAGCAGCACTGAAAGG		61
3-F	TCAACAAGAGTACACGGTTTGAAGAC	C2At1g32130	58
3-R	TTGCTCTAGCCCTGGCCCTAAC		61
4-F	AGGACTTACAAAGTCAACCTGTTGCTC	C2At1g73180	60
4-R	ACCATTGAACATCATGAATAGGGC		56
5-F	AGCCTATTTTGAAGTCAAAGATCTTG	C2At2g15890	55
5-R	TTCTCTCGACTTTGGCAATCCATC		58
8-F	TCACAGGAGCGTGAAGAAGCG	C2At2g36930	60
8-R	TCTTCGTCTTGAAATGCTCATCCC		58
9-F	TGCAGCTTTGCTTTATGATGCC	C2At2g38020	56
9-R	AAAGGCTTGGCCGTAGCTTGC		60
11-F	TTCTCTTTCCCTTATCTGCAACAC	C2At5g14320	56
11-R	TCCTTCAATCATGTACTTAGAGACTTC		57
1B-F	AGGAAGGAGGCGGAGCAGGC	C2At1g16210	64
1B-R	TCCTTCAGAGCACGAAGCTCAGC		61
7B-F	TGCCCTACAATCACGATGTACACG	C2At1g77470	60
7B-R	AAACCACCCTCAGGGACATCAAG		60
8B-F	TGGAAATGAAAGGACCAAATACTG	C2At2g24270	54
8B-R	AGGAGCAATCTTGGAGACGGC		60
9B-F	TGGTGCAACACTTGTTGGTGTGG	C2At3g03100	60
9B-R	TGGAGCCAGCCATGCCATTC		60
10B-F	TGGCTTGGTGTGGACAAAGAGC	C2At3g10920	60
10B-R	TGCAAGTAGTATGCGTGTTC		58
11B-F	AAGCAACTCCTTACTCGTTGCC	C2At3g16150	58
11B-R	TGGAGATACCAGAAACGGCG		57
13B-F	TTTGAAATCAAGCTCATTATTTGG	C2At3g55800	60
13B-R	AGCTGTTCCCTCCACAAGAAGCTG		51
15B-F	TGAAGCATCCTACAATAAGTGGCG	C2At4g34700	58
15B-R	TCTGTTGAAGTTGGAACCACCAGG		60
1C-F	AGGTGCTTTCTTGTTTCTTCTTC	C2At1g13380	54
1C-R	AGAGCATATCACGATACTTGGTGTG		58
3C-F	ATGATCTAAAATTGCCTGGTTTTG	C2At1g14000	53
3C-R	AATAGCCCTCAAGGACCATGTGG		60
5C-F	TTGCTTACTCTTGGTGGAAACATTC	C2At1g50020	56
5C-R	TGTCTGTGATATCCTCTCTTCTTC		56

Rodriguez *et al.*, (2009)のプライマーセットを用いた。



液に 15 分間、浸漬し、トランスイルミネーター（WUV-M20；アトー、東京）を用いて泳動像を確認した。

### 3.2.9 DNA シーケンシング

PCR で増幅した DNA 断片（200 ng 程度）を鋳型として、東京農工大学（府中、東京）で、またはユーロフィンジェノミクス（大田区、東京）に外注でダイレクトシーケンシングを行った。

東京農工大学でシーケンシングした際には以下の手順で実施した。3.2.7 で得られた PCR 産物 3  $\mu$ l に 2  $\mu$ l の ExoSAP-IT（Affymetrix、CA、USA）と滅菌 MilliQ 水 2  $\mu$ l を加え、37°C、15 分間、80°C 15 分間の反応後、これを鋳型 DNA 溶液として用いた。シーケンシング用反応溶液の調製は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific）または BrilliantDye Terminator（v3.1）Cycle Sequencing kit（Nima Gen、Nijmegen、Netherlands）を用いて行った。BigDye Terminator を用いた場合の反応溶液（10  $\mu$ l）の組成は、鋳型 DNA 溶液 1  $\mu$ l、Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 0.5  $\mu$ l、1× Sequencing buffer、3.2 pmol プライマーとし、STeP PCR（Platt *et al.*, 2007）を用いて蛍光試薬を反応させ、シーケンシングに用いた。STeP PCR の反応条件は 96°C、1 分間；（96°C、10 秒間；50°C、5 秒間；60°C、1 分 15 秒間）× 15 サイクル；（96°C、10 秒間；50°C、5 秒間；60°C、1 分 45 秒間）× 5 サイクル；（96°C、10 秒間；50°C、5 秒間；60°C、2 分 45 秒間）× 5 サイクルとした。BrilliantDye Terminator を用いた場合の反応溶液（10  $\mu$ l）の組成は、鋳型 DNA 溶液 1  $\mu$ l、BrilliantDye ready-reaction premix 0.5  $\mu$ l、1× BrilliantDye Terminator Sequencing buffer、3.2 pmol プライマーとし、同じく STeP PCR 処理後、シーケンシングに用いた。

反応産物の精製には、エタノール沈殿または Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter、CA、USA) を用いた。エタノール沈殿法を用いた場合は、反応産物 (10  $\mu$ l) に 125 mM EDTA を 2.5  $\mu$ l 加え、99%エタノール 30  $\mu$ l とともにタッピングにより混和した。アルミで覆いつつ 15 分間、室温でインキュベートしたのち、4°C、12000  $\times g$ 、30 分間、遠心分離後、上清を捨て、70%エタノールを 150  $\mu$ l 加え、再び 4°C、12000  $\times g$  で 20 分間、遠心分離した。その後、上清を丁寧に取り除き、減圧乾燥機<sup>1</sup>を用いて 15 分間、乾燥させたのち、Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific) を 15  $\mu$ l 加え、2 分間、ボルテックスした。その後 95°C に設定したヒートブロックで 10 分間、ヒートショック処理を行い、さらに氷上に 2 分間以上置いた後、シーケンシングに供した。Agencourt CleanSEQ を用いた場合は、STeP PCR 済みの反応産物 10  $\mu$ l に Agencourt CleanSEQ を 10  $\mu$ l 加え、Agencourt CleanSEQ のプロトコールに従って精製した。

塩基配列の取得には、3130xl Genetic Sequencing Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いた。シーケンシングに用いたプライマーは表 5 に記した。

ユーロフィンジェノミクスでの DNA シーケンシングは以下の手順で行った。PCR 産物を HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience、New Taipei City、Taiwan) を用いて精製後、プライマーを 9.2 pmol 加え、精製した PCR 産物と合わせて 21  $\mu$ l になるように滅菌 MilliQ 水で調整した。PCR 産物の量はユーロフィンの濃度指定に従い、フラグメントの長さによって適宜調整した。

---

<sup>1</sup> 遠心エバポレーター CVE-2000 (東京理化器械株式会社、東京)

### 3.2.10 分子系統解析

出力された塩基配列データは 4 peaks version 1.7 (<https://nucleobytes.com/4peaks/>) または GeneStudio version 2.2.0.0. (<http://genestudio.com>) を用いて波形を確認したのち、MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) および MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) を用いてアセンブリを行い、塩基配列を決定した。配列決定には少なくとも 3 つの異なるチューブで反応させた PCR 産物を用い、シーケンシングエラーを防ぎ、必要な場合は適宜シーケンスを追加して実施した。配列決定後、系統樹に用いるモデル検定のため MAFFT version 7 (Kato *et al.*, 2019 ; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) によるアライメント処理を行った。

最尤法 (Maximum Likelihood method、ML 法) を用いて作成した系統樹では、Modeltest-NG v. 0.1.6 (Darriba *et al.*, 2020) を用いて AIC (Akaike Information Criterion) を確認し、AIC が最小となるモデルを選択した (表 6)。モデル検定は RAxML-NG v. 1.0.0 (Kozlov *et al.*, 2019) を用い、18 の各領域で実施した。モデル検定で決定した最適モデルを用い、ブートストラップ値を 1000 に設定し、系統樹を作成した。

ベイズ法を用いて作成した系統樹では、MrBayes v. 3.2.7a (Huelsenbeck *et al.*, 2001) を用い、モデル選択は最尤法と同様に実施した (表 6)。MrBayes を使用したツリー検索は、100 世代ごとにサンプリングされたツリーを使用し、1000000 世代分、実行し、サンプルのばらつきが収束したことを確認したのち、系統樹の作成に使用した。

系統樹作成には *Lycopersicon species group* に最も近縁な野生種トマトである *S. neorickii* LA1326 (18COSII 領域 : FJ599007、FJ598927、FJ599048、FJ599088、FJ599129、FJ599148、FJ599228、FJ598968、FJ599067、FJ599107、FJ598908、FJ599167、FJ599187、FJ599207、FJ598946、FJ598889、FJ598988、FJ599027) および *S. arcanum* LA2185 (18COSII 領域 :

FJ599008、FJ598928、FJ599049、FJ599089、FJ599130、FJ599149、FJ599229、FJ598969、  
FJ599068、FJ599108、FJ598909、FJ599168、FJ599188、FJ599208、FJ598947、FJ598890、  
FJ598989、FJ599028) をアウトグループとした (表 4)。



表6 各領域において選択した塩基置換モデル

COSII 領域	ラボコード	最尤法	ベイズ法
C2At1g30580	X2	TrN+I	GTR+I
C2At1g32130	3	TPM3uf+I	F81+I
C2At1g73180	4	TPM1uf+I+G4	HKY+I+G4
C2At2g15890	5	HKY+I	HKY+I
C2At2g36930	8	F81+I	F81+I
C2At2g38020	9	TVM+I+G4	HKY+I+G4
C2At5g14320	11	HKY+I	HKY+I
C2At1g16210	1B	TIM3+I	HKY+I+G4
C2At1g77470	7B	TIM3+I+G4	GTR+I+G4
C2At2g24270	8B	TIM3+I+G4	GTR+I+G4
C2At3g03100	9B	TIM3+I+G4	GTR+I+G4
C2At3g10920	10B	TPM2uf+I+G4	HKY+I+G4
C2At3g16150	11B	HKY+I+G4	HKY+I+G4
C2At3g55800	13B	TPM2uf+I+G4	HKY+I+G4
C2At4g34700	15B	HKY+I+G4	HKY+I+G4
C2At1g13380	1C	HKY	HKY
C2At1g20050	3C	HKY+I+G4	HKY+I+G4
C2At1g50020	5C	TPM3uf+G4	HKY+I+G4

### 3.3 結果

#### 3.3.1 DNA シーケンス

*SLL*、*SLJ*、*SLC*、*SP* の 14 アクセッションの得られた COSII 領域のシーケンスは、DDBJ データベースに登録した。各アクセッション番号は表 4 に示した。

#### 3.3.2 COSII 領域を用いて構築した分子系統樹

18COSII 領域を用いて、最尤法およびベイズ法で系統樹を作成した。

最尤法を用いた系統樹中では、大きく 3 つのクレード (S1~S3) が形成され、そのうち S3 クレード中には 2 つのサブクレード (S3a および S3b) が形成された (図 8)。

S1 クレードは *SC* および *SG* のみで形成された。Rodriguez *et al.* (2009) の報告では、*SC* LA1450 および *SG* LA0317 の配列のみを使用し、これらが 1 つのクレードを形成することが示されていたが、今回、*SC* LA0521 を加えても同じく *SC* および *SG* のみで 1 つのクレードを形成し、Rodriguez *et al.* (2009) の結果を指示した。

S2 クレードには、ペルー産の *SLC* (BRC016 および PER018894)、メキシコ産の *SLC* (ML-1) と *SLJ* (M5-3)、食用トマト *SLL* (cvs. 桃太郎 8 および愛知ファースト) が属した。メキシコ産の *SLC* と *SLJ* のアクセッションおよび、食用トマト *SLL* のアクセッションはすべて S2 クレードに属し、他のクレードには属さなかった。

S3 クレードには、ペルー産の *SLC* (LA 1673、JAE036、JAE037、STP088 および CCY152) と *SP* (CPN032 および PER018805)、および、エクアドル産の *SP* (ECU0043) が属した。供試したすべての *SP* は S3 クレードに含まれた。Rodriguez *et al.* (2009) では、ペルー由来の *SP* (LA1581) および *SLC* (LA1673) は同一クレードに属すとされており、今回の結果

と矛盾しない。S3 クレードは、2つのサブクレード S3a および S3b に分かれた。S3a サブクレードには、*SLC* JAE0361、*SLC* JAE037、*SP* CPN032 が属した。一方、S3b サブクレードには *SLC* CCY152、*SP* LA1581、*SP* PER018805 が属した。

ベイズ法を用いた系統樹では、大きく 4 つのクレード (L1~L4) を形成した (図 9) 。L1 クレードには最尤法系統樹 S1 クレードと同じのアクセッションが属し、L2 クレードには S2 クレードと同じのアクセッションが属した。一方、L3 クレードには S3a サブクレードに属したアクセッションに加えてエクアドル産の *SP* ECU0043 およびペルー産の *SLC* STP088 が属した。L4 クレードには S3b サブクレードと同じのアクセッションが属した。*SLC* LA 1673 はどのクレードにも属さなかった。

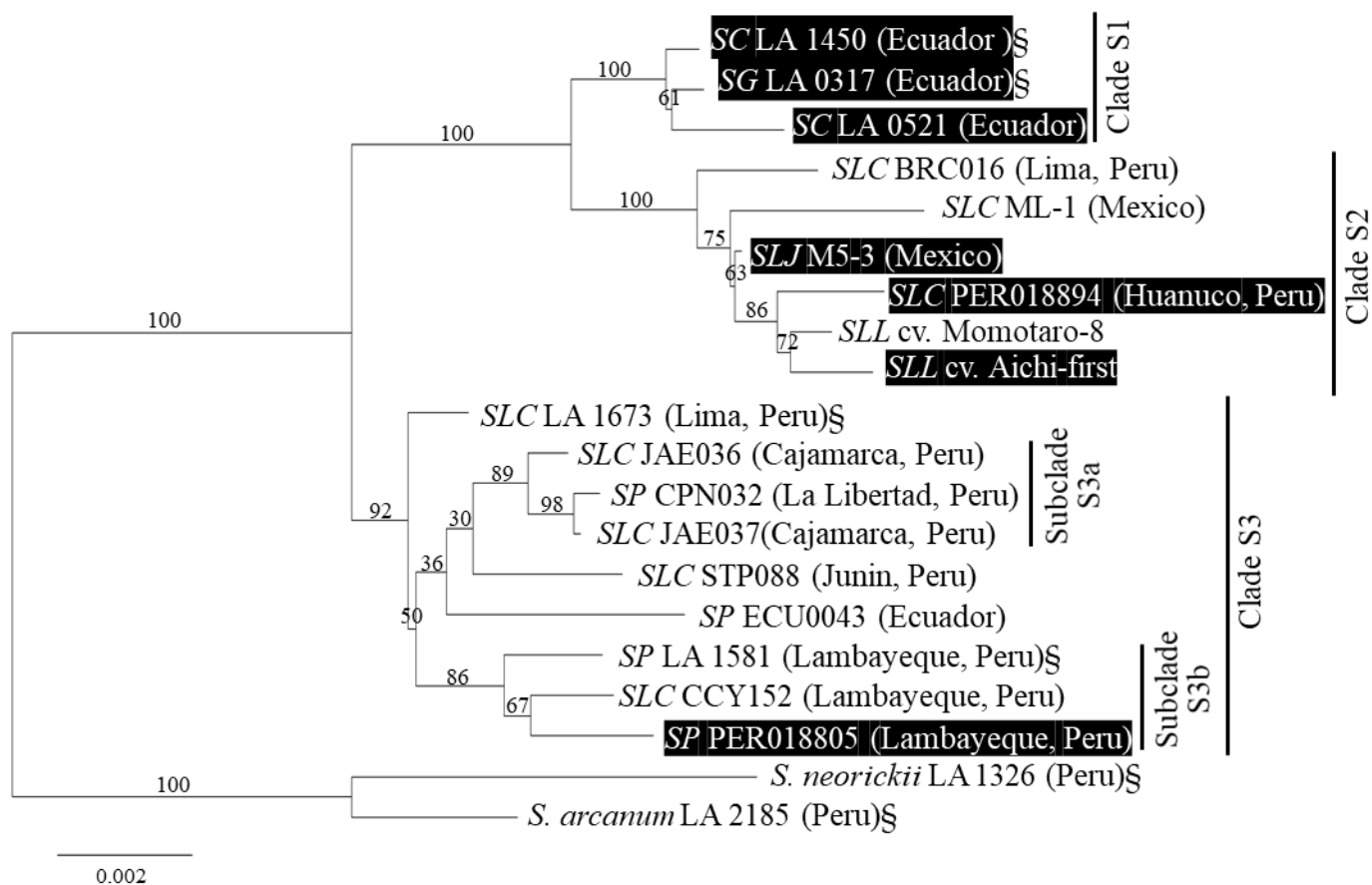


図 8-18 COSII 領域の塩基配列に基づき構築した分子系統樹（最尤法、ML 法）

数値はブートストラップ値を示す。先行研究（Rodriguez *et al.*, 2009）にて解析されたアクセシオンに§を記し、AAL 毒素感受性を示したアクセシオンは背景を黒で塗りつぶした。SC : *S. cheesmaniae*、SG : *S. galapagense*、SP : *S. pimpinellifolium*。

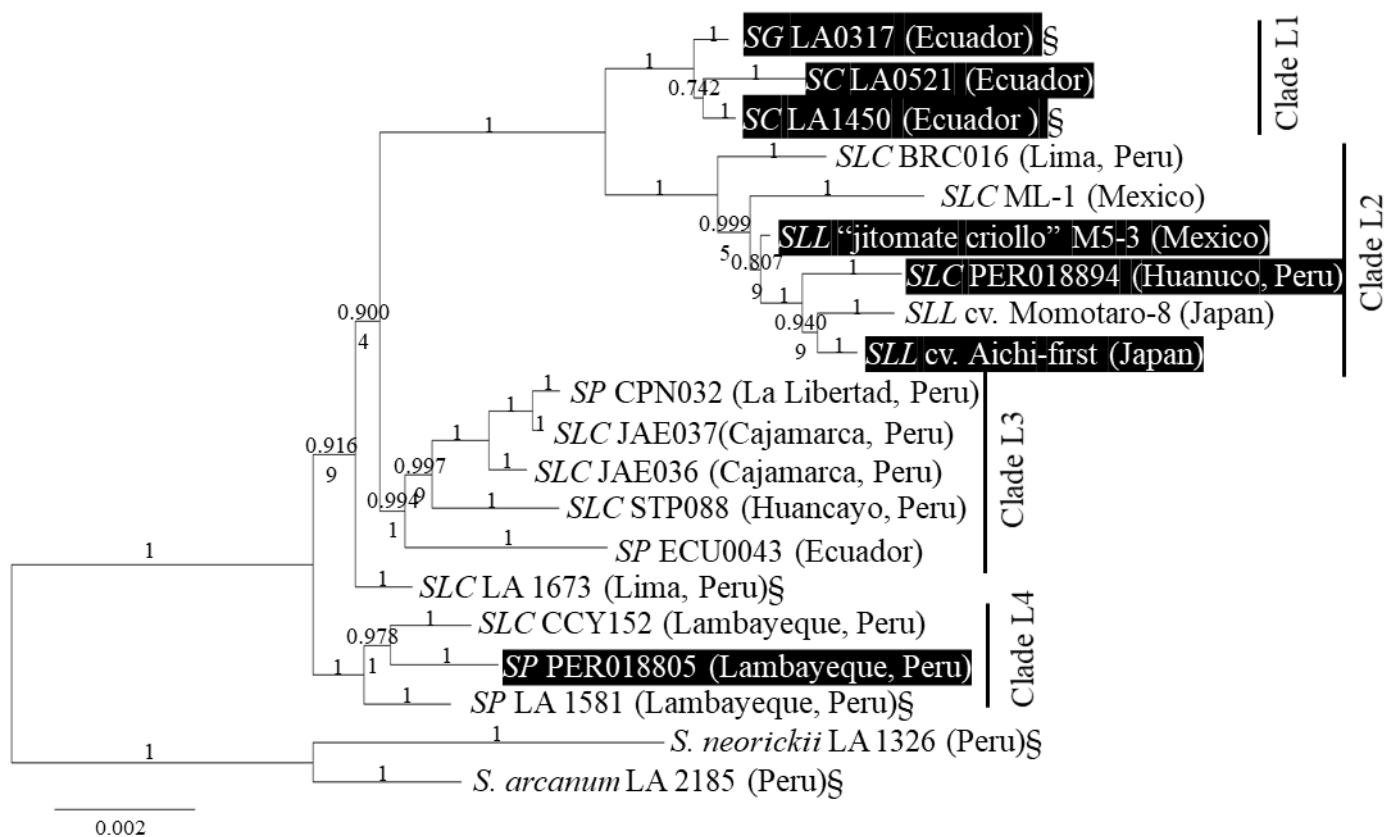


図 9 18 COSII 領域の塩基配列に基づき構築した分子系統樹（ベイズ法、BI 法）

数値は事後確率（posterior probability : PP）値を示す。先行研究（Rodriguez *et al.*, 2009）にて解析されたアクセッションに§を記し、AAL 毒素感受性を示したアクセッションは背景を黒で塗りつぶした。  
*SC* : *S. cheesmaniae*、*SG* : *S. galapagense*、*SP* : *S. pimpinellifolium*。



### 3.4 考察

最尤法で描いた系統樹中の S3 クレードには、ペルー産およびエクアドル産の野生種トマト *SP* と、ペルー産の移行期トマト *SLC* のアクセッションが含まれた (図 8)。最尤法で描いた系統樹中の S3 クレードは、さらにサブクレード (S3a と S3b) に分かれた (図 8)。このことから、多様性があることが示唆された。これは、一般的に、食用植物の原種が豊かな遺伝的多様性を持つことと矛盾しない。ベイズ法でも、これらのアクセッションはクラスター L3 および L4 を形成した。これらのクラスターおよびサブクラスター内に、*SP* と *SLC* が混在した。第 2 章において、*SP* と *SLC* が形態に基づく識別が困難な場合がある、あるいは中間的な形態の個体があることを述べた。*SP* と *SLC* のような近縁種は、分子系統解析と形態観察を組み合わせる必要があると考えられた。

一方、最尤法 (図 8) およびベイズ法 (図 9) のいずれの系統樹においても、*SC* と *SG* は独立したクレード (それぞれ、S1 と L1) を形成した。これは、今回用いた全ての種および品種の原種と考えられている *SP* から *SC* と *SG* が分岐して、*SP* から *SLL* へとは異なる進化をしていることを示唆している。*SC* および *SG* はいずれもガラパゴス諸島固有の野生種であることから、地域的隔離による異所的種分化の結果であると考えられる。

また、最尤法による S2 クレード (図 8) およびベイズ法による L2 クレード (図 9) には、食用トマト *SLL* とメキシコ産移行期トマト *SLJ* およびペルーの中南部産 *SLC* が含まれた。第 2 章で述べたように、ペルー北部の *SP* が一度南下し *SLC* となり、その後再び北上してメキシコに移動し、栽培化に繋がったとされていて (Razifard *et al.*, 2020)、今回の分子系統解析の結果はこれを支持している。

ペルー産 *SLC* には、*SLL* と共通のクレード (S2 あるいは L2) に属するアクセッションと、

*SP* と共通のクレード (*S3* あるいは *L3*、*L4*) に属するアクセッションが存在した。すなわち、ペルー産 *SLC* には、比較的食用トマト *SLL* に近いものと、野生種トマト *SP* に近いものの 2 系統が存在することが示された。メキシコ産 *SLC* および *SLJ* は *S2* あるいは *L2* クレードにのみ属し、*SLL* と極めて近縁であることから、*S2* あるいは *L2* に属する *SLC* がペルーから運ばれ、メキシコで栽培化されたことが示唆された。

*S3b* サブクレードおよび *L4* に属した 3 アクセッションは全てペルー北部海岸地域の *Lambayeque* 由来であり、遺伝的に近縁であることが示唆された。またベイズ法においては *Lambayeque* において野生種トマト *SP* から、*S1* クレードあるいは *L1* クレード、および、*S2* クレードあるいは *L2* クレードに至る枝が先に分岐し、その後、ガラパゴス諸島野生種トマト *SC* および *SG* と食用トマト *SLL* が分岐していることが明らかになった。これらの結果から、ペルー北部がトマトの原産地である可能性が示唆された。

## 4 中南米産トマトの AAL 毒素感受性検定

### 4.1 緒言

子囊菌 *Alternaria* spp. は、一般に腐生的に生活することができ、空気中を含む環境中に普遍的に存在している。一方で、*Alternaria* 属には植物に病気を起こす病原も存在し、中でも、宿主特異的毒素 (host specific toxin、HST) をエフェクターとして生産し、能動的に宿主範囲を限定的に決定しているものがある。これまでに、このような HST を生産する *Alternaria* spp. としては、ナシ黒斑病菌 (*A. kikuchiana*) やトマトアルターナリア茎枯病菌 (*A. alternata* f. sp. *lycopersici*) など、宿主と生産する HST が異なる 10 の分化型 (forma specialis、f. sp. ; 従来は病原型、pathotype とされてきた) が報告されている (尾谷ら, 2004、Meena *et al.*, 2017) 。これらの宿主範囲には多様性があり、柑橘類全般を宿主としえる *A. citri* (ACT 毒素を産生) や、ナシ (*Pyrus serotina* Rehd.) の限られた品種 (例、cv. 二十世紀) にのみを宿主とし得る *A. kikuchiana* (AK 毒素産生) など、宿主範囲の広さには大きな違いがみられる (Otani *et al.*, 1975) 。

HST は分生子の発芽時に生産される。また、Tanaka (1933) が *A. kikuchiana* の菌体除去培養ろ液をナシ cv. 二十世紀に有傷接種すると病徴が見られることを報告したように、HST は病原性因子そのものである。HST は、限られた宿主では感作した組織に障害を与え、その結果、菌の受容化 (植物が持つ菌に対する抵抗力を抑制して、菌が組織に入り進展しやすくなる) を誘導する機能を持つ。

*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (Aal) は、HST である AAL 毒素を生産し、食用トマト *SLL* の一部栽培品種 (例、cvs. 愛知ファーストや EarlyPak 7) や一部の野生種トマト (SC および SG) にのみ、アルターナリア茎枯病を引き起こす。分生子が風媒によって伝搬されると考えられている。

トマトアルターナリア茎枯病は、総合序論にも記したとおり、1975 年にアメリカのカリフォルニア州における *SLL* cv. Earlypak 7 での発生初報告 (Grogan *et al.*, 1975) を皮切りに、2 年後の 1977 年に日本の三重県において *SLL* cv. 愛知ファーストで発生するなど世界的に拡大した (田上ら, 1984)。田上ら (1984) が記した病徴の記述を転載 (一部編集) すると、トマトの脇芽を欠いた後に茎の支柱や誘引ひもとの接触部を中心に暗褐色~黒色の大形輪紋あるいは不正形病斑を生じ、発病後期には患部表面に多数の菌の分生子を形成、あるいは、地際部の茎に暗褐色~黒色の大形病斑を形成、病徴の進展に伴って、罹病部から上位が萎凋し、枯死に至る茎枯れ症状を示す。一方、茎枯れ症状の発生した株では、茎内部の道管組織に褐色壊死、茎表面に暗緑褐色条斑の形成を認め、萎凋の進展に伴って頂葉を中心に多数の黒色壊死斑点が葉に出現するが、これは病原が産生する AAL 毒素による特徴的な症状であり、このような葉からは病原菌は検出されない。なお、本病が果梗に発生すると果実にすじ腐れ症状が現われ、商品価値を失う。

AAL 毒素の生合成には、*Aal* の生育には必須でない染色体 (Conditionally Dispensable chromosome、CD 染色体) に座乗する AAL-toxin biosynthesis gene (*ALT*) クラスターが関与しており、*ALT* クラスターは *Aal* のみが保有する 1 Mb の CD 染色体に約 100 kb にわたって存在し、少なくとも 13 のポリケチド生合成遺伝子を含むことが明らかにされている (Akagi *et al.*, 2009a、Akagi *et al.*, 2009b、Tsuge *et al.*, 2013、Yamagishi *et al.*, 2006、Kodama, 2019)。

一方、野生種および移行期トマトにおいてアルターナリア茎枯病の報告は無い。さらに、ペルーなど中南米地域での食用トマト *SLL* におけるアルターナリア茎枯病の発生報告もない (Tsuzuki *et al.*, 2021)。

Kodama (2019) は、2000~2019 年に、ペルー、エクアドル、チリ、メキシコにおいて、



自生の野生種 (*SP*、*S. chilense*、*S. peruvianum*、*S. penellii*) および移行期トマト (*SLC* および *SLJ*) および栽培中の食用トマト (*SLL*) の組織やその周辺の環境から、選択培地を用いて *Alternaria* 属菌を採集した。得られた 163 株の *Alternaria* spp.の中に、食用トマト cv.愛知ファーストにアルターナリア茎枯病を引き起こす株や AAL 毒素を産生する株は見いだされていない。一方で、いくつかの株は、*Aal* が保持する AAL 毒素生産を司る *ALT* 遺伝子クラスターは持たないものの、*ALT* 遺伝子クラスターが座乗する CDS と相同性を持つ染色体を保有することが判明している (赤木ら, 2019)。

本章では、野生種は遺伝的多様性が豊かで、これが遺伝子プールとなっていることを想定し、野生種および移行期トマトのアクセッションを対象に、AAL 毒素に対する感受性／抵抗性の検定を試みた。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 供試菌株

AAL 毒素を生産することが確認されているアルターナリア茎枯病菌 *Alternaria alternata* f. *sp. lycopersici* (*Aal*) As-27 株 (Akagi *et al.*, 2009a、Akagi *et al.*, 2009b) は、鳥取大学植物病理学研究室より分譲していただいた。*Aal* を V-8 寒天培地上で 28°C、暗黒条件下で 2 週間培養した。V-8 培地は、V8 ジュース (Campbell Soup Company、NJ、USA) 400 ml に RO 水 600 ml および CaCO<sub>3</sub> を 4.5 g 加え、攪拌後、880 ×g で、10 分間、遠心分離し、上清 (200 ml) に RO 水 800 ml および寒天 18 g を加えて調製した。長期保存の場合は V-8 寒天培地で培養した菌体片を培地ごと 25% (v/v) グリセロールに浸漬し、2 ml セラムチューブに入れ、-80°C で維持した。

#### 4.2.2 AAL 毒素の調製

V-8 寒天培地上で培養した *Aal* の菌体を培地片ごと変法リチャーズ培地 (Akamatsu *et al.*, 1997) にて 25°C、2 週間培養した。リチャーズ培地は、0.5% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.0% (w/v)  $\text{KNO}_3$ 、0.25% (w/v)  $\text{MgO}_4\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.002% (w/v) 塩化鉄 (II) 、2.5% (w/v) グルコース、0.1% (w/v) 酵母エキスを含む。培養後の培養液をキムワイプ (日本製紙クレシア、東京) でろ過後、ろ液をテルモシリンジ SS-10Sz (テルモ、東京) で吸い取り、マイレクス (Millex) -HV フィルター (0.45  $\mu\text{m}$ 、PVDF、33 mm ; Merck、Darmstadt、Germany) を用いてろ過し、菌体を除去した培養ろ液とした。菌体を除去した培養ろ液は-80°C で予備凍結させた後、凍結乾燥機 (FDU-2200、東京理科器械、東京) で乾燥した。凍結乾燥物に 10% (v/w) 容の 70% (v/v) アセトニトリルを加え、よく攪拌して溶解し、AAL 毒素抽出液とした。ペルーINIA で AAL 毒素感受性／抵抗性検定を実施する際は、凍結乾燥物を INIA に運んだ後に 70%アセトニトリルを加えて AAL 毒素抽出液として使用した。AAL 毒素抽出液に AAL 毒素が含まれていることは、4.2.4 で述べる対照トマトを用いて、4.3 で述べる方法で、感受性食用トマト *SLL* cv. 愛知ファーストでの壊死斑形成で確認した (4.3.1)。

#### 4.2.3 供試トマト

##### 4.2.3.1 対照トマト

AAL 毒素感受性食用トマト *SLL* cv. 愛知ファースト (松永種苗、愛知) および AAL 毒素抵抗性食用トマト *SLL* cv. 桃太郎 8 (タキイ種苗、京都) を用いた (表 1)。2.2.1 と同様に、ピクニカコップにくみあいニッピ園芸培養土 1 号を入れ、5 粒／カップ播種し、温度なりゆき (15~35°C) のビニール温室で栽培した。

#### 4.2.3.2 メキシコ産トマト

TGRC コレクションから *SLC* LA1456 および LA1623 を、その他に表 1 に示す TUAT コレクション中のアクセッションを用いた。栽培方法は 2.2.1 に準じた。

#### 4.2.3.3 エクアドル産トマト

TGRC コレクションから、*SC* LA 0437 および LA 0521、*SG* LA0438 および LA0528、*SP* LA3123 を、この他に表 1 に示す TUAT コレクション中のアクセッションを用いた。栽培方法は 2.2.1 に準じた。

#### 4.2.4 ペルー産トマト

TGRC コレクションから *SLC* LA1909、および、表 1 に示した UNALM-TUAT コレクション、INIA コレクションのアクセッションを用いた。TGRC コレクションおよび UNALM-TUAT コレクションのアクセッションの栽培方法は 2.2.1 に準じた。INIA コレクション中のアクセッションの栽培は 2.2.4 と同様に INIA 敷地内温室内で、許可を受けて実施した。

#### 4.2.5 トマトの AAL 毒素感受性／抵抗性検定

検定は、先行研究（Akamatsu *et al.*, 1997、Yamagishi *et al.*, 2006、Akagi *et al.*, 2009b）に準じて行った。

ろ紙（No. 1、東洋濾紙、東京）をハサミで 3 mm 四方に切ったもの、または 2 穴パンチで切り取りろ紙片（直径約 5 mm）を作成、ろ紙片に 4.2.2 で調製した AAL 毒素抽出液を 3

μl ずつ滴下後、風乾してアセトニトリルを揮発除去した後に供試した。対照には無処理ろ紙片を用いた。

インキュベート方法は、滅菌 2 号角シャーレ（栄研化学、東京）の底面に、滅菌 RO 水で湿らせたティッシュペーパーを壁に沿わせるように置いた。トマト小葉の裏面を乾いたペーパータオルで軽くこするようにして 2 mm 四方程度の傷をつけ、水で湿らせたティッシュペーパーに触れないようにシャーレ底に置き、付傷部に滅菌 RO 水を 30 μl 滴下したのち、毒素を含んだろ紙を置いた。各アクセッションの小葉を 5 枚ずつ供試した。シャーレは、密閉できるタッパーに入れ、湿室条件下で、25℃、3 日間保持した。毎回の実験には AAL 毒素感受性食用トマト cv. 愛知ファーストをポジティブコントロールとして、AAL 毒素抵抗性食用トマト cv. 桃太郎 8 をネガティブコントロールとして供試し、cv. 愛知ファーストには葉脈に沿った病斑が形成されること、cv. 桃太郎 8 には病斑が形成されないことを実験毎に確認した。検定は 3 反復実施した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 食用トマト品種の AAL 毒素感受性／抵抗性

AAL 毒素感受性の SSL cv. 愛知ファーストでは、小葉の葉脈に沿った壊死病斑が観察された（図 10-1）。一方、AAL 毒素抵抗性である SSL cv. 桃太郎 8 には病斑が形成されなかった（図 10-1）。これによって、AAL 毒素抽出液に AAL 毒素が含まれていること、および、AAL 毒素感受性／抵抗性の検定が正確に行えることが確認できた。

#### 4.3.2 メキシコ産移行期トマトの AAL 毒素感受性／抵抗性

TUAT コレクション中の *SLJ* (M5-3 および M5-4) 、*SLC* (M-UX、MC-5a、MC-5b および ML-1) 、TGRC コレクション中の *SLC* (LA 1456 および LA 1623) のうち、*SLJ* M5-3 の 1 アクセッションを AAL 毒素感受性、残りを AAL 毒素抵抗性と判定した (図 10-1) 。

#### 4.3.3 エクアドル産の野生種および移行期トマトの AAL 毒素感受性／抵抗性

TUAT コレクション中の *SLC* (E0040W、E0043) 、*SP* (ECU0043、ECU0045) 、TGRC コレクション中の *SP* (LA 3123) 、*SC* (LA 0437、LA 0521) 、*SG* (LA 0438、LA 0528) のうち、*SC* LA0437 および LA0521、*SG* LA0438 および LA0528 の計 4 アクセッションを AAL 毒素感受性、残りを AAL 毒素抵抗性と判定した (図 10-1、図 10-9) 。

#### 4.3.4 ペルー産の野生種および移行期トマトの AAL 毒素感受性／抵抗性

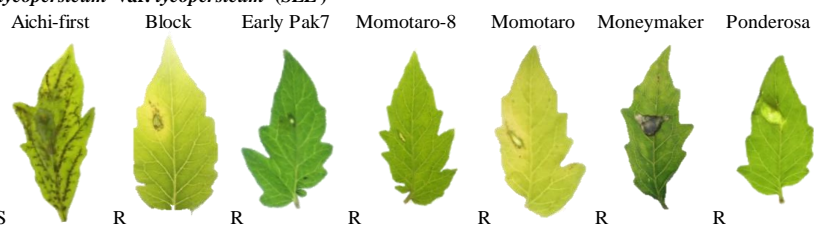
UNALM & TUAT コレクション中の野生種および移行期トマト計 189 アクセッション、および、INIA コレクション中の野生種トマトおよび移行期トマト計 67 アクセッションのうち、*SLC* PER018894、および、*SP* PER018805 の 2 アクセッションを AAL 毒素感受性、残りを AAL 毒素抵抗性と判定した (図 10-3、図 10-4、図 10-5、図 10-6) 。



---

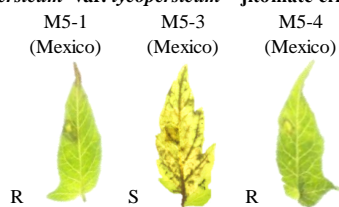
**Commercial cultivars**

*Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* (SLL)

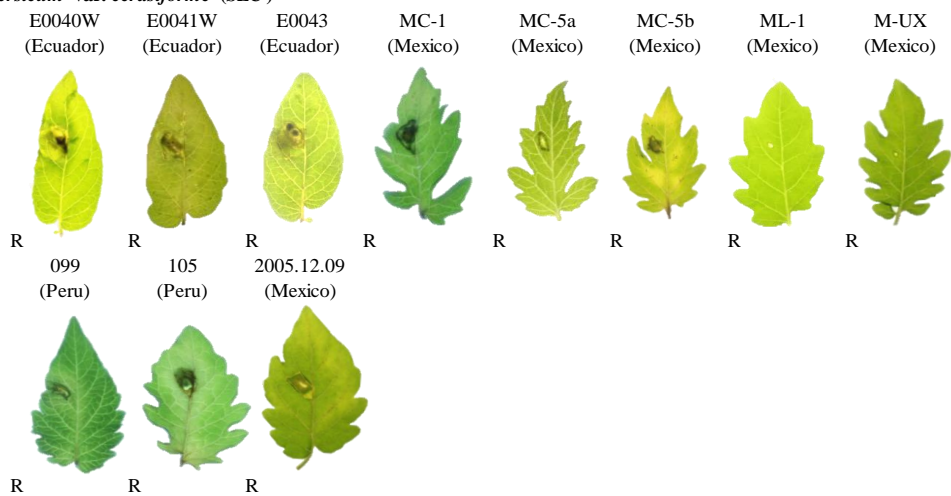


**TUAT collection (Inami *et al.*, 2014)**

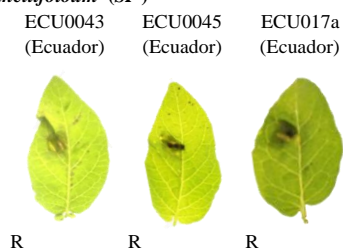
*S. lycopersicum* var. *lycopersicum* “jitomate criollo” (SLJ)



*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC)



*S. pimpinellifolium* (SP)



**図10-1** 本研究で実施したAAL毒素検定  
感受性をS、抵抗性をRで示した。

UNALM & TUAT collection from Peru  
*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC)

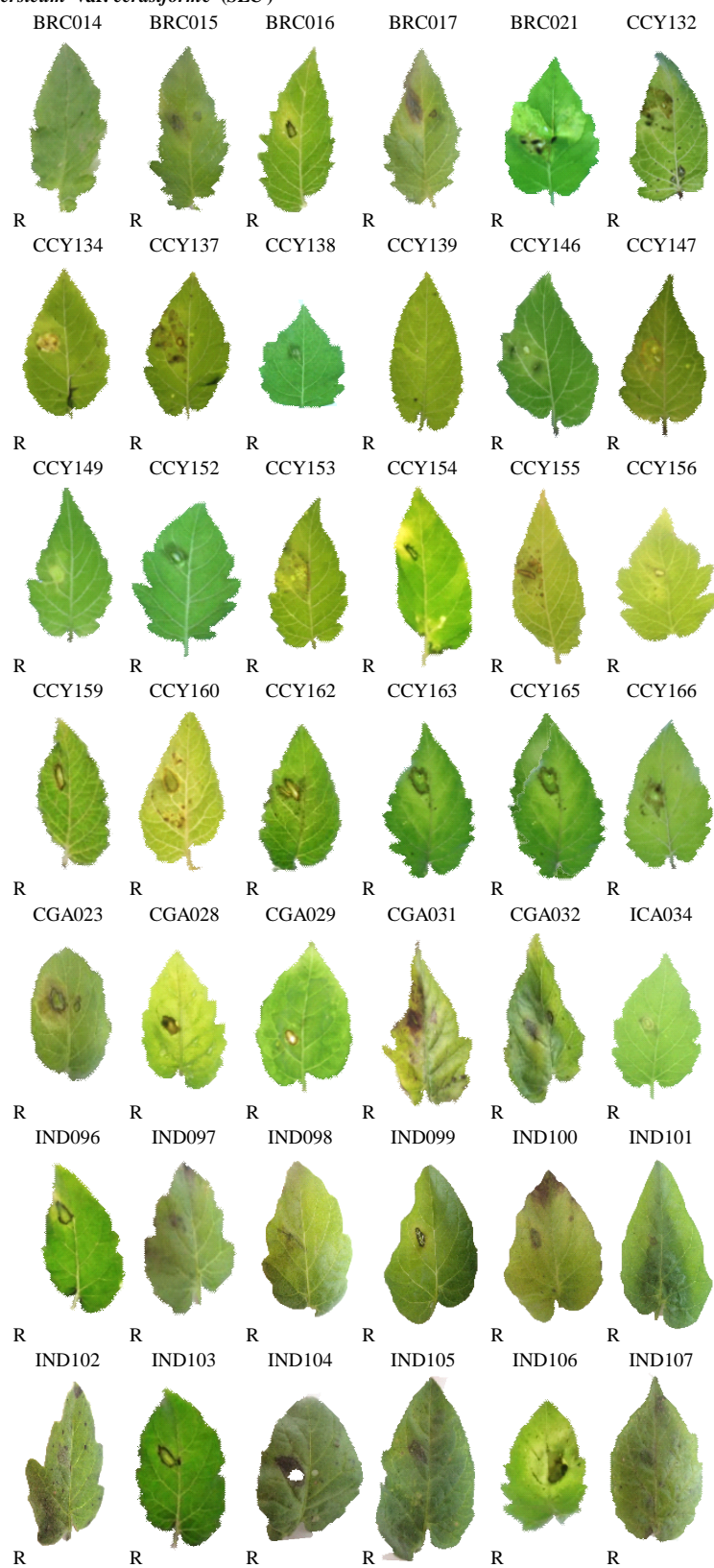


図10 本研究で実施したAAL毒素検定（続き）  
 感受性をS、抵抗性をRで示した。

エラー!  
ブジェク  
ありませ

UNALM & TUAT collection from Peru  
*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC)

埋め込みオ  
トが正しく  
ん。

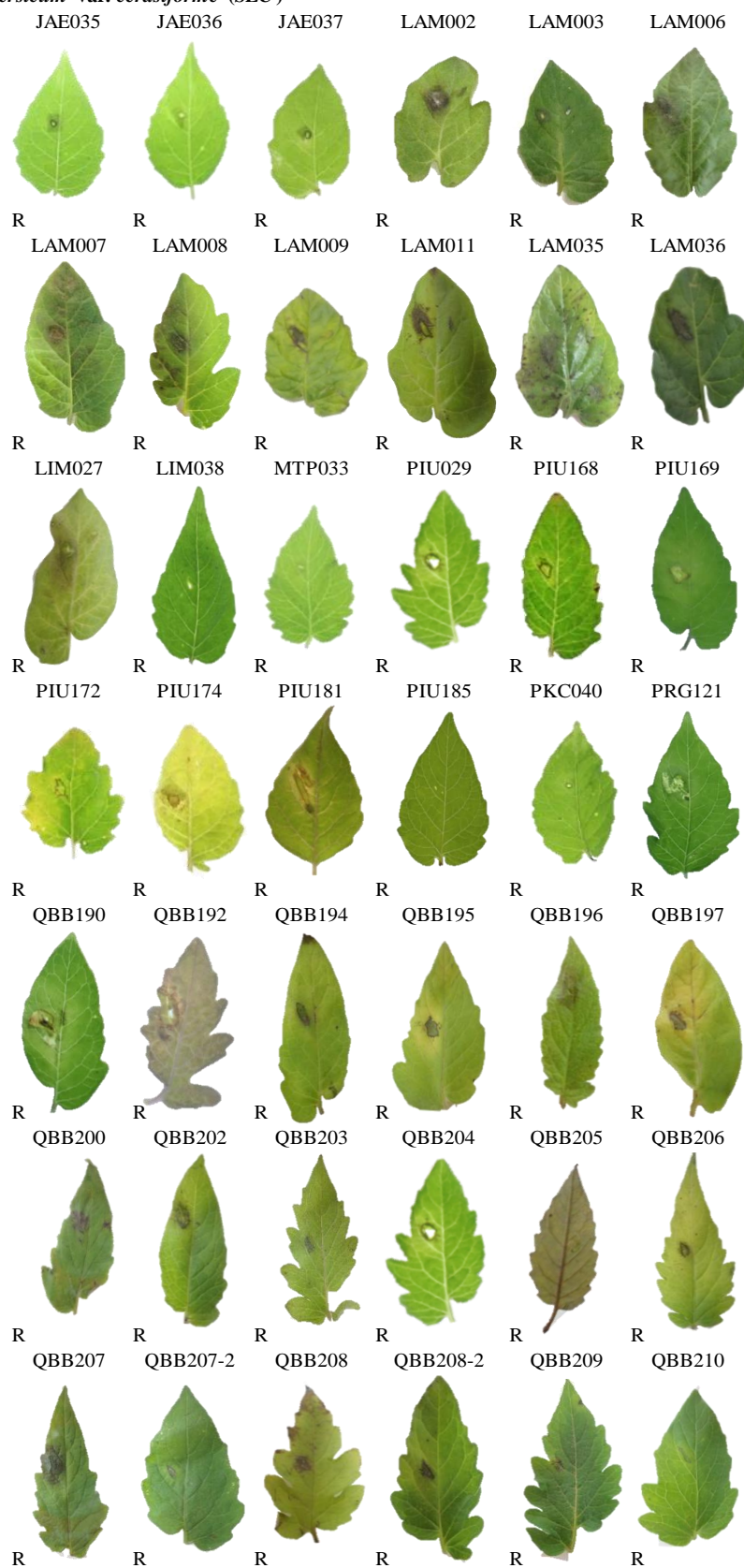


図10-2 本研究で実施したAAL毒素検定（続き）  
感受性をS、抵抗性をRで示した。

UNALM & TUAT collection from Peru  
*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC)

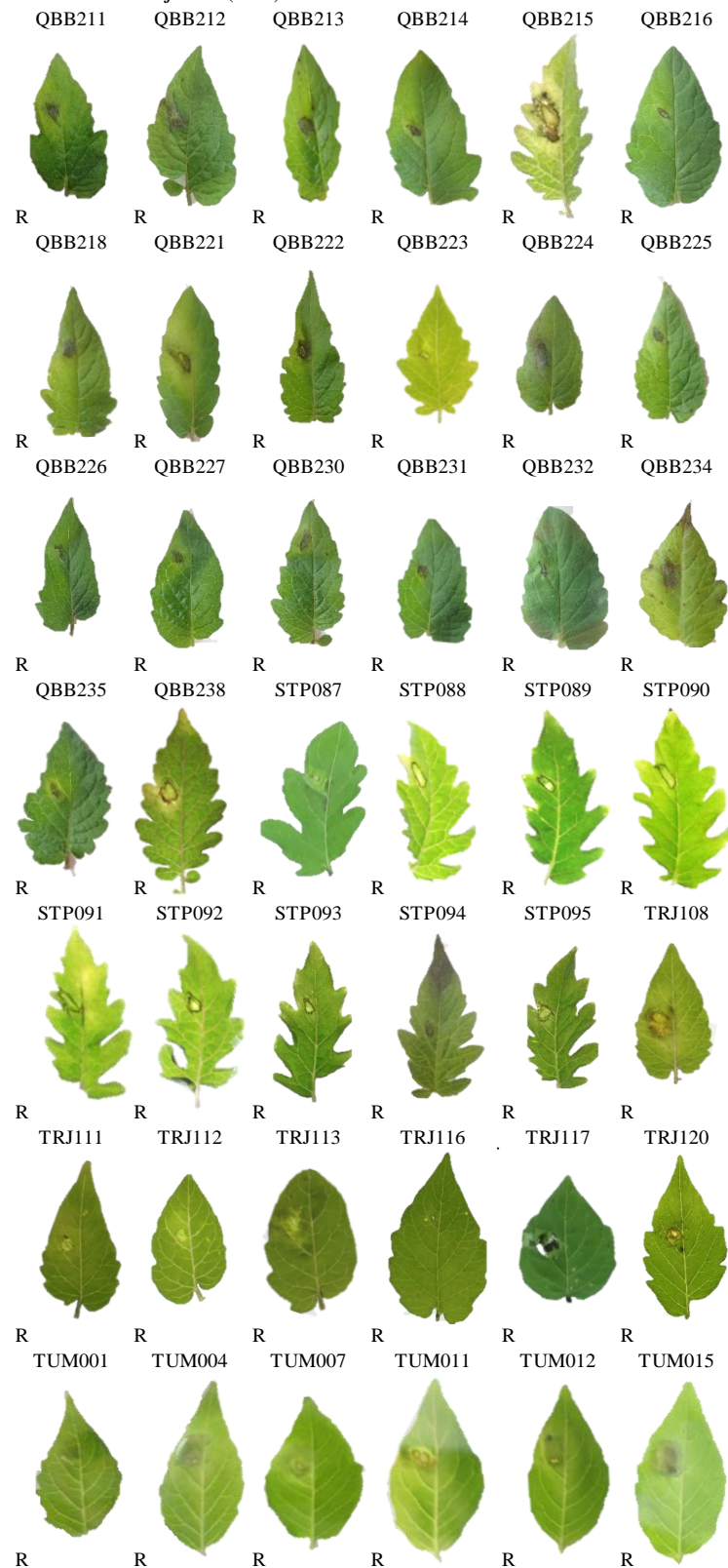
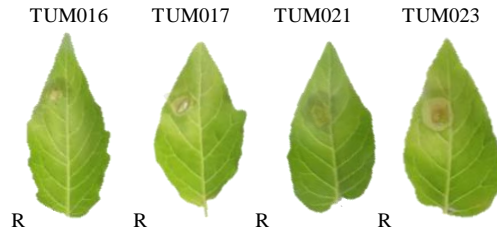


図10-3 本研究で実施したAAL毒素検定 (続き)  
 感受性をS、抵抗性をRで示した。

UNALM & TUAT collection from Peru

*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC)



*S. pimpinellifolium* (SP)

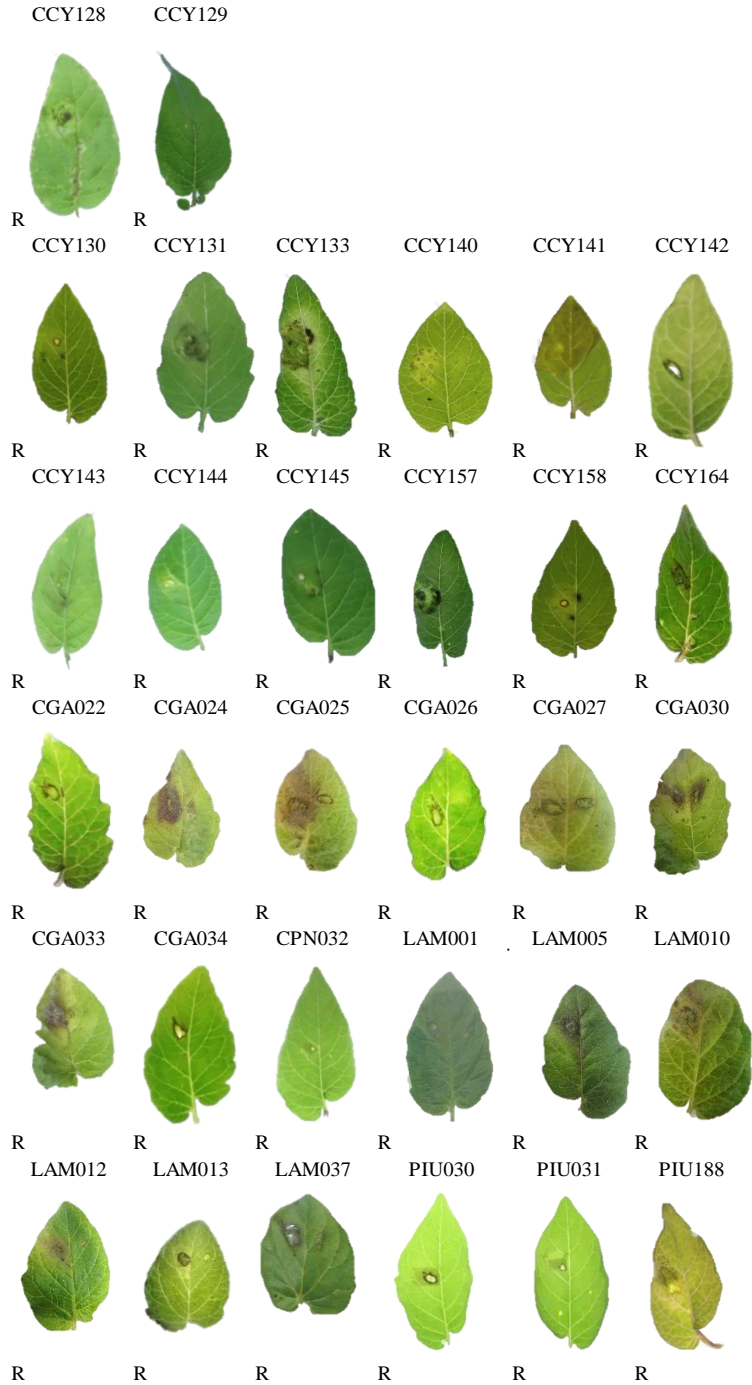


図10-4 本研究で実施したAAL毒素検定（続き）

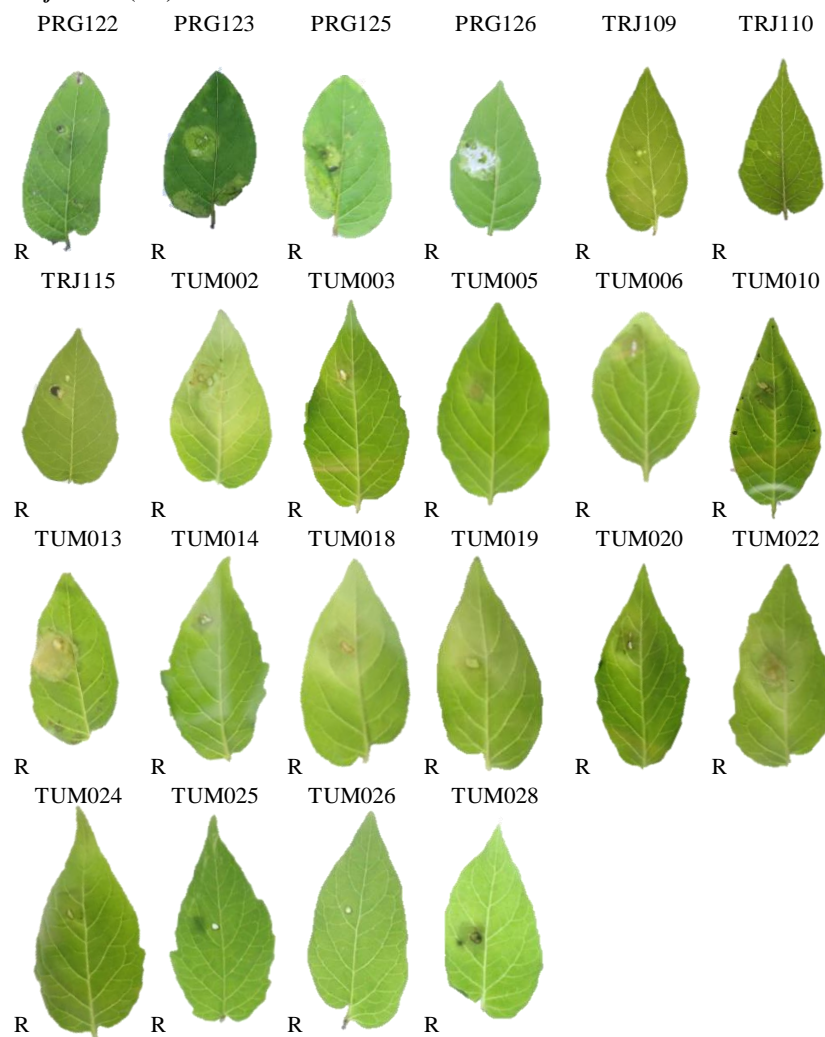
感受性をS、抵抗性をRで示した。



---

UNALM & TUAT collection from Peru

*S. pimpinellifolium* (SP)




---

図10-5 本研究で実施したAAL毒素検定（続き）

感受性をS、抵抗性をRで示した。

INIA collection from Peru

*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC)

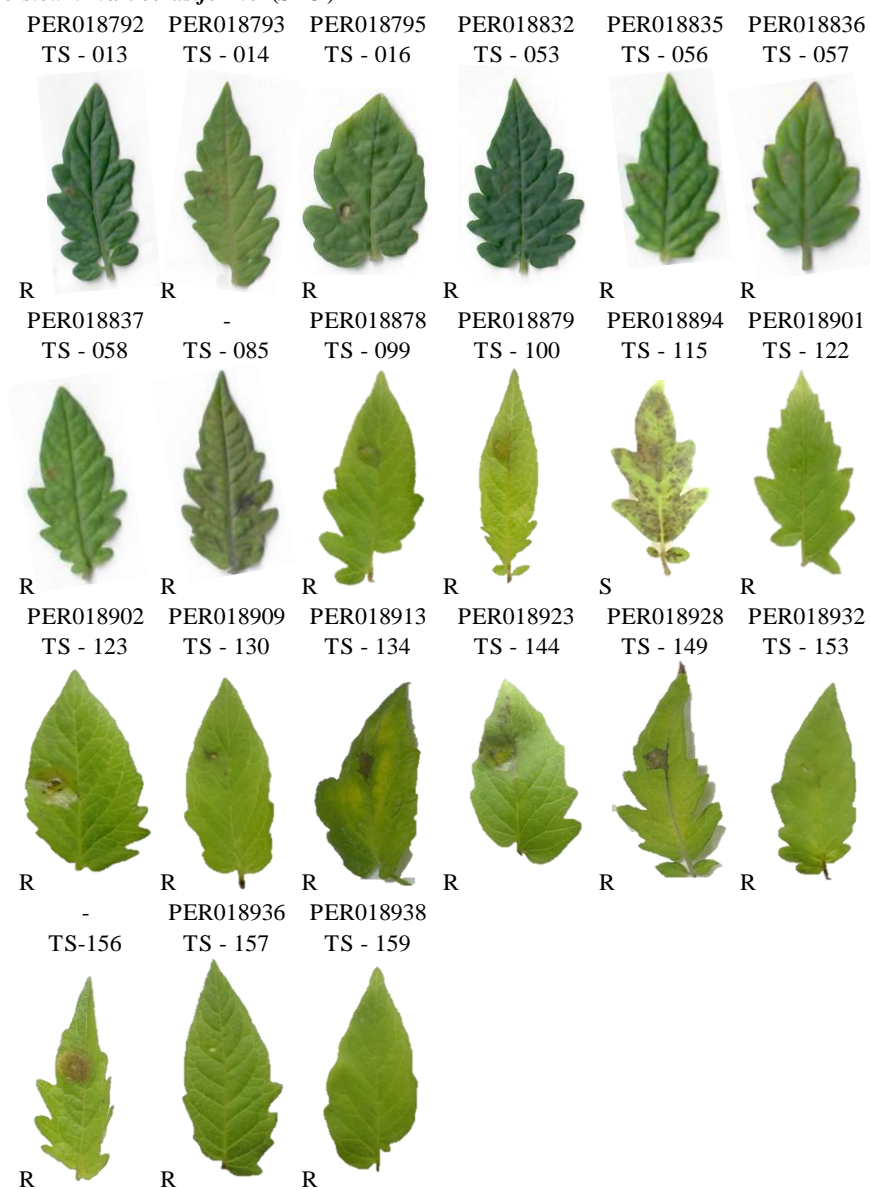


図10-6 本研究で実施したAAL毒素検定（続き）

感受性をS、抵抗性をRで示した。

INIA collection from Peru  
*S. pimpinellifolium* (SP)

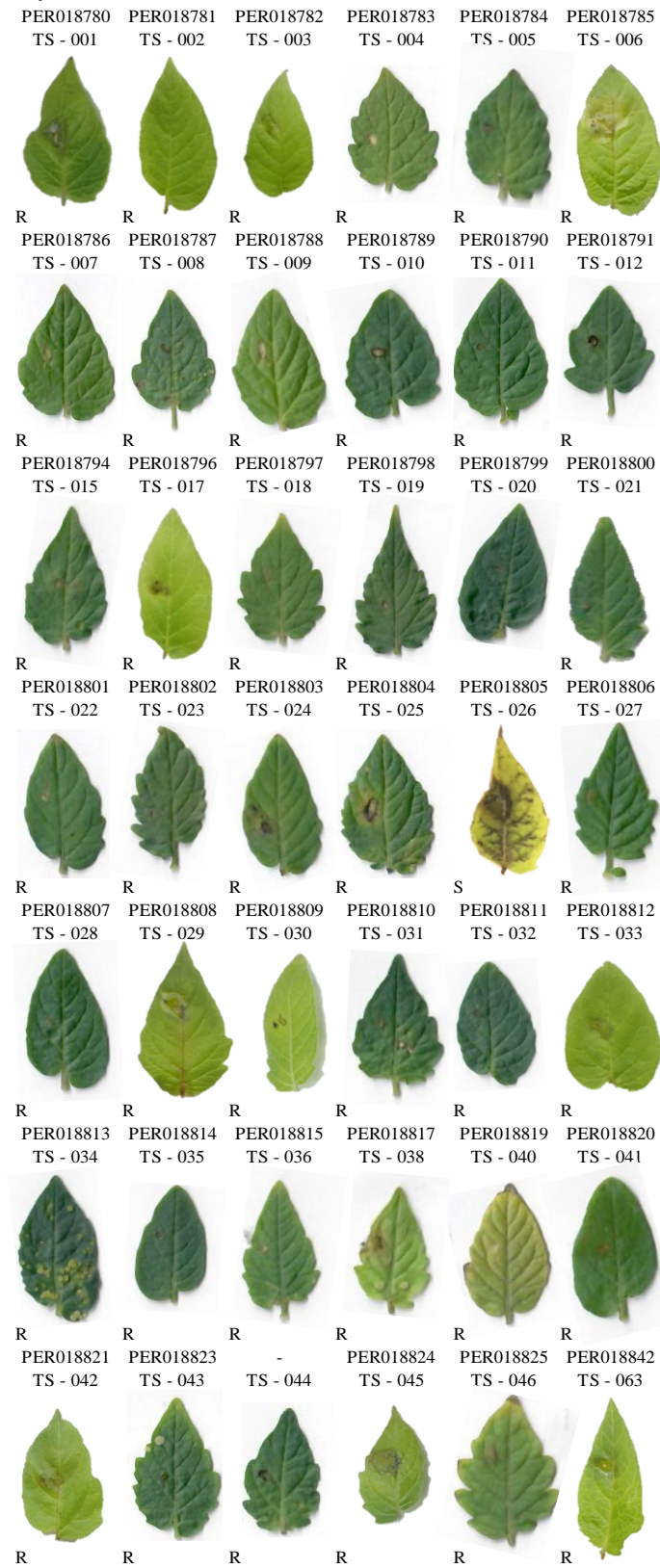


図10-7 本研究で実施したAAL毒素検定（続き）

感受性をS、抵抗性をRで示した。

INIA collection from Peru

*S. pimpinellifolium* (SP)

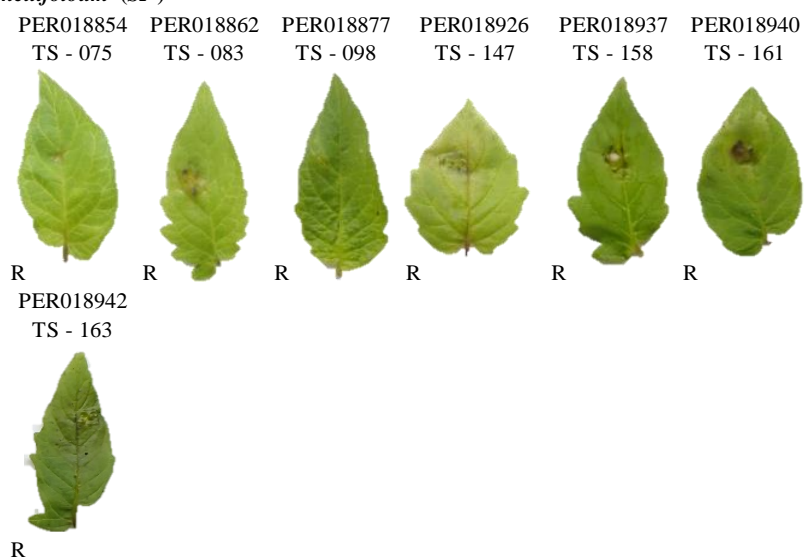
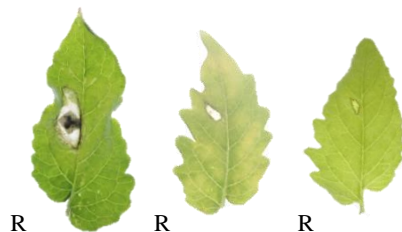


図10-8 本研究で実施したAAL毒素検定（続き）  
感受性をS、抵抗性をRで示した。

**TGRC collection**

***S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC)**

LA 1456      LA 1623      LA 1909  
(Mexico)      (Mexico)      (Peru)



R

R

R

***S. pimpinellifolium* (SP)**

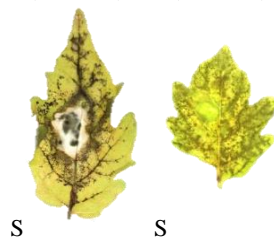
LA 3123  
(Ecuador)



R

***S. cheesmaniae* (SC)**

LA 0437      LA 0521  
(Ecuador)      (Ecuador)

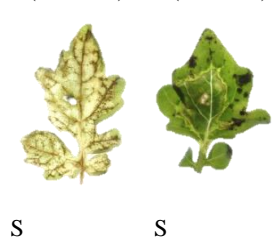


S

S

***S. galapagense* (SG)**

LA 0438      LA 0528  
(Ecuador)      (Ecuador)



S

S

**図10-9 本研究で実施したAAL毒素検定（続き）**  
感受性をS、抵抗性をRで示した。



#### 4.4 考察

本研究では、移行期トマトとして、2 種類の *SLJ* アクセッションおよび 169 の *SLC* アクセッション、野生種トマトとして、103 の *SP* アクセッション、2 つの *SC* アクセッション、2 つの *SG* アクセッションの、合計 276 アクセッションの AAL 毒素感受性／抵抗性の検定を行った。これらのうち、AAL 毒素感受性と判定したのは、ガラパゴス諸島由来の *SC* LA 0437、*SC* LA 0521、*SG* LA 0438 および *SG* LA 0528 に加え、メキシコ産の *SLJ* M5-3、ペルー産の *SLC* PER018894、および、ペルー産の *SP* PER018805 の計 7 アクセッションであった。移行期トマト（*SLJ* および *SLC*）、野生種トマトの *SP* での AAL 感受性アクセッションは、初の報告である。また、ペルーからの AAL 感受性アクセッション（*SLC* PER018894、および、*SP* PER018805）も初の報告になる。

ガラパゴス諸島特有種の *SC* および *SG* は、AAL 毒素感受性であるとされており、これまでも、TGRC コレクション中の *SC* LA1035、LA1037、LA1406、LA1450、および、*SG* LA0438、LA1126、LA 1141、LA1410 が AAL 毒素感受性であることを報告していた（吾郷ら, 2016、澄川ら, 2017、永井ら, 2018）。本研究で供試した 2 アクセッションずつの *SC* および *SG* すべてが AAL 毒素感受性であることを確認したことから、*SC* および *SG* には AAL 毒素抵抗性のアクセッションは存在せず、種内に AAL 毒素感受性／抵抗性の多様性は無いことが示唆され、*SC* から *SG* が分化したとされる（Rick, 1971）こととも矛盾しない。これについては、AAL 毒素感受性／抵抗性に関与する *AscI* 遺伝子の解析結果も踏まえ、第 5 章で再度考察する。

一方、*SC* および *SG* の祖先であるとされる *SP* は、大多数のアクセッションが AAL 毒素抵抗性で、AAL 毒素感受性を示したものは 1 アクセッションのみであった。*SC* および *SG* は全て AAL 毒素感受性であることから、その起源種にあたるペルー由来のトマトにも

AAL 毒素感受性のアクセッションが多く存在していると予想していた。しかし予想に反して 272 アクセッション中 2 アクセッションのみが感受性を示した。*SC* および *SG* が由来するとされるペルー北東部を含め、今後さらに多くのアクセッションの検定を行いたい。

一方、移行期トマトであるペルー産 *SLC* PER018894 とメキシコ産 *SLJ* M5-3 が AAL 毒素感受性であることを見出した。この 2 アクセッションは、第 3 章の分子系統解析に置いて、どちらも最尤法での S2 あるいはベイズ法での L2 クレードに属すること、また、*SLC* PER018894 が採集された Huanuco 州などのペルー中南部がメキシコで栽培化されたトマトの由来である (Razifard *et al.*, 2020) とされていることから、AAL 毒素感受性がトマト栽培化の歴史を検証するマーカーになり得ることを示唆している。これについては、AAL 毒素感受性／抵抗性に関与する *Asc1* 遺伝子の解析結果も踏まえ、第 5 章で再度考察する。

## 5 中南米産トマトの *AscI* 遺伝子の多様性

### 5.1 緒言

アルターナリア茎枯病菌から生産される AAL 毒素は、4 章でも述べた通りトマトに限られた品種や種に対してプログラム細胞死（アポトーシス）を誘導することが知られている。AAL 毒素に耐性を持つトマトは、セラミドを合成することによってアポトーシスを抑制しており、トマト内の *AscI*（*Alternaria Stem Canker resistance protein 1*）がセラミド生合成に関与する酵素をコードしていることが明らかにされている（Brandwagt *et al.*, 2000）。AAL 毒素はセラミドの前駆体であるスフィンガニンおよび *Fusarium verticillioides*（syn. *F. moniliforme*）から生産されるマイコトキシン（フモニシン B1）と構造が類似しており、セラミド合成系を攪乱することにより宿主植物にプログラム細胞死を誘導すると考えられているが（Yamagishi *et al.*, 2006）、ASC1 がセラミド合成の際にサルベージ経路として機能することで、植物側に AAL 毒素抵抗性を付与していることが示唆されている（Brandwagt *et al.*, 2000、Chen *et al.*, 2020）。現在までに、*SLL* 感受性 cv. 愛知ファーストでは *AscI* 上の ORF（エキソン 2 の中）に 2 bp 欠失（nt 854\_855del）、一方、SC と SG は *AscI* ORF（エキソン 1 の一部）と上流領域を含む約 400 bp の欠失が報告されているが（吾郷ら, 2016、澄川ら, 2017）、中南米産の野生種および移行期トマトにおける *AscI* 遺伝子について詳しく調査した例は見当たらない。また起源種トマトの *AscI* には、*SLL* および SC と SG の *AscI* の元を含む、多様な *AscI* 遺伝子のパターン（遺伝子プール）が存在している可能性がある。そこで本章では SC と SG に存在する約 400 bp 欠失が中南米産トマトにも存在するかを PCR バンドレベルで確かめるとともに、*AscI* のシーケンス解析を実施し、AAL 毒素に対する感受性と *AscI* を比較することで、AAL 感受性の起源を明らかにすることを試みた。

## 5.2 材料および方法

### 5.2.1 植物体からのゲノム DNA の抽出

*Asc1* 遺伝子の解析には 2.2.1～2.2.4 と同様のトマトアクセッションを供試した。DNA 抽出は 3.2.6 に準じて調製した。

### 5.2.2 PCR 反応溶液の調製

PCR は 3.2.7 に準じて調製し、アガロースゲル電気泳動は 3.2.8 に準じて行い、バンドの有無を確認した。

### 5.2.3 プライマー

*Asc1* 遺伝子増幅用プライマーおよびシーケンス解析用プライマーは表 7、位置は図 11 に示した。

### 5.2.4 *Asc1* 欠失領域検出用プライマー

鳥取大学のグループの先行研究から、ガラパゴス諸島に自生する *SG* および *SC* では *Asc1* 遺伝子のプロモーター領域および ORF の上流が約 400 bp 欠失していることが明らかになっている（吾郷ら, 2016）。そこで本研究においても同様な欠失パターンが存在しているのか確かめるために、特異的検出用プライマーペア（F10/F10 および F11/R11）を用いて検出を試みた（表 7、図 11）。吾郷らのプライマーペアでは、約 400 bp の欠失がない場合は PCR 産物は約 800 bp の長さに増幅され、欠失がある場合には約 400 bp の長さで増幅される。

表7 *AscI* 遺伝子増幅用プライマー兼シーケンス用プライマー

プライマー名	配列 (5'-3')	位置 <sup>a</sup>	引用文献
BASC87	GGAATTCCTGCAATTCATTTGAACTACAAC	<i>Eco</i> R I + nt 424–447	Brandwagt <i>et al.</i> (2000)
F12	GTTTTGAGGTAGTAGCTCGG	nt 637–657	This study
R11	GCCAAATTCGAATCAACCAG	nt 1103–1084	This study
F9	ACGGGTACAGCCATTTGCTC	nt 1258–1277	This study
R8	CTTCCGTCATGAAGTGCTAGAAC	nt 1384–1362	This study
F4	ACTGCGGATGGTCAAGAACC	nt 1739–1758	This study
BASC86	CGGGATCCCGATCAGTCTTTGTGGTCATCATC	<i>Bam</i> H I +nt 1922–1900	Brandwagt <i>et al.</i> (2000)
R12	CAAGTAGTGCTGCCTCTACAAG	nt 2017–1996	
400塩基欠失検出プライマー兼シーケンス用プライマー			
F10	GAAACGATCAAACGTGTT	nt 178–198	
R10	CAGGTCCTGCCCAGAAATAC	nt 986–967	
F11	GTGTCTTAGCTTAGAAAGAAATG	nt 216–238	Ago <i>et al.</i> (2016)
R11	GCCAAATTCGAATCAACCAG	nt 1103–1084	

<sup>a</sup>塩基配列の位置は#AF198177に準じた。下線は制限酵素サイトを示す。



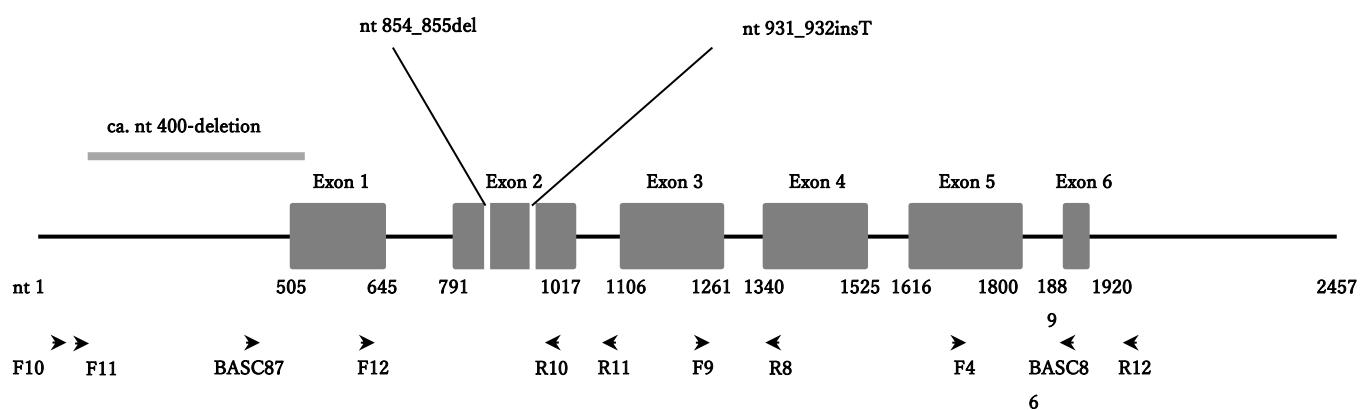


図 10 *AscI* の物理地図

各塩基位置は #AF198177 に準じた。黒色の線はイントロン、灰色のボックスはエキソン、矢印はプライマーを示す。Exon 2 の白線は、*SLJ* M5-3 および *SLC* PER018894 の 2 塩基欠失 (nt 854\_855del) と、SP PER018805 の 1 塩基挿入 (nt 931\_932insT) を示す。

### 5.2.5 DNA シーケンシング

DNA のシーケンシングは 3.2.9 に準じて行った。シーケンシングに用いたプライマーは表 7 に記した。

### 5.2.6 分子系統解析

出力された塩基配列データは 3.2.10 に準じて解析を行った。配列決定後は EMBOSS Six pack (Rice *et al.*, 2000) または SnapGene Viewer v 5.1.7. (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>) を用いて推定アミノ酸を決定した。

## 5.3 結果

### 5.3.1 野生種トマトおよび移行期トマトにおける 400 bp 欠失の有無

吾郷ら (2016) が見出した *SC* および *SG* に特異的な 400 bp 欠失を検出するため、特異検出用のプライマーを用いて PCR 後、バンドの長さを用いてスクリーニングを行った。その結果、今回供試した 119 アクセッションには 400 bp 欠失を持つ *SP*、*SLC* および *SLJ* は存在しなかった (図 12)。

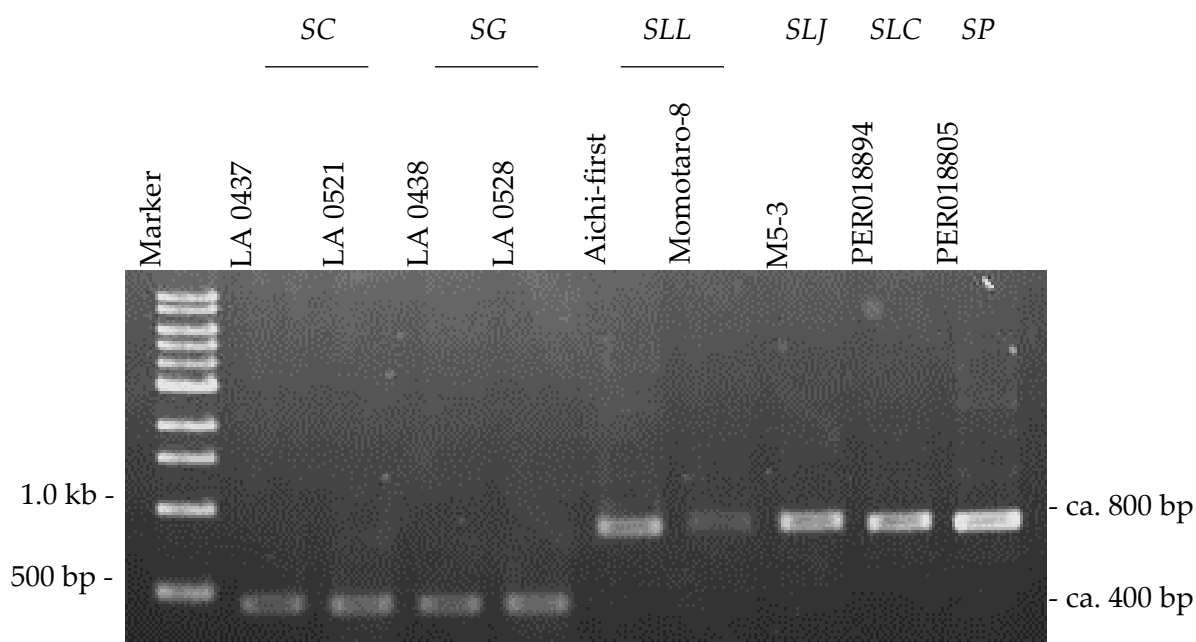


図 12 ガラパゴス諸島野生種トマト *S. cheesmaniae* および *S. galapagense* に特有の *Asc1* 約 400 bp 欠失の検出

PCR バンドの長さによって約 400 bp 欠失の有無を確認した。今回供試した全ての中南米産トマトには約 400 bp 欠失は見出されなかった。

SC ; *S. cheesmaniae*、SG ; *S. galapagense*、SLL ; *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*、SLJ : *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* “jitomate criollo”、SLC ; *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*、SP ; *S. pimpinellifolium*。

### 5.3.2 *AscI* 遺伝子領域に基づいた分子系統解析

今回のシーケンシング解析では *SC* 2 アクセッション、*SG* 2 アクセッション、*SLJ* 2 アクセッション、*SLC* 51 アクセッションおよび *SP* 23 アクセッションの計 80 アクセッションを用い、得られた塩基配列およびアミノ酸配列は #AF198177 と比較した。その結果、AAL 毒素感受性 *SLC* PER018894 および *SLJ* M5-3 では 2 番目のエキソンに 2 塩基欠失 (nt 854\_855del) が存在し (図 13-a)、フレームシフトが起こることによって 86 番目のアミノ酸が stop コドンに置換されることが示された (図 13-b)。この 2 塩基欠失は感受性 *SLL* cv. 愛知ファーストなどにおいて報告された変異 (Brandwagt *et al.*, 2000、吾郷ら, 2016) と同一であった。

同じく AAL 毒素感受性 *SP* PER018805 では 2 番目のエキソンに一塩基挿入 (nt 931\_932insT) が存在し (図 13-a)、フレームシフトが起こることによって 97 番目のアミノ酸が stop コドンに置換されることが示された (図 13-b)。この突然変異は今までに報告されておらず、新規の変異であった。

AAL 毒素抵抗性アクセッションを含む 80 アクセッションを解析した結果、ミスセンスの種類は 11 種類 (509A>G、569A>C、570G>A、572A>G、617G>A、807T>C、836A>T、911G>A、1010A>C、1366T>C、1693T>G) 存在した (表 8)。また、塩基配列は 24 パターンに分かれた (表 9、表 10)。

a	
<i>SLL</i> #AF198177	843 GTCGTGAAGAGAGGAAGAAGATCAACAAATTCAAAGAGTCAGCATGGAAATTTGTATATTTCTATCTGCTGAGCTACTTGCACTTTCT GTGACTTGT 940
<i>SLL</i> cv. Aichi-first	339 GTCGTGAAGAGAGGAAGAAGATCAACAAATTCAAAGAGTCAGCATGGAAATTTGTATATTTCTATCTGCTGAGCTACTTGCACTTTCT GTGACTTGT 940
<i>SLL</i> cv. Momotaro-8	339 GTCGTGAAGAGAGGAAGAAGATCAACAAATTCAAAGAGTCAGCATGGAAATTTGTATATTTCTATCTGCTGAGCTACTTGCACTTTCT GTGACTTGT 940
<i>SLJ</i> M5-3	339 GTCGTGAAGAGAGGAAGAAGATCAACAAATTCAAAGAGTCAGCATGGAAATTTGTATATTTCTATCTGCTGAGCTACTTGCACTTTCT GTGACTTGT 940
<i>SLC</i> BRC016	339 GTCGTGAAGAGAGGAAGAAGATCAACAAATTCAAAGAGTCAGCATGGAAATTTGTATATTTCTATCTGCTGAGCTACTTGCACTTTCT GTGACTTGT 940
<i>SLC</i> PER018894	339 GTCGTGAAGAGAGGAAGAAGATCAACAAATTCAAAGAGTCAGCATGGAAATTTGTATATTTCTATCTGCTGAGCTACTTGCACTTTCT GTGACTTGT 940
<i>SP</i> CPN032	339 GTCGTGAAGAGAGGAAGAAGATCAACAAATTCAAAGAGTCAGCATGGAAATTTGTATATTTCTATCTGCTGAGCTACTTGCACTTTCT GTGACTTGT 940
<i>SP</i> PER018805	339 GTCGTGAAGAGAGGAAGAAGATCAACAAATTCAAAGAGTCAGCATGGAAATTTGTATATTTCTATCTGCTGAGCTACTTGCACTTTCT GTGACTTGT 940
b	
<i>SLL</i> #AF198177	1 MKNLDHIAASVDWEKESLPEYQDLIFLLFFALFFPVLRFILDRFVFEALAKRMIFGKKTVVNINGREERKKINKFKESAWKFVYFLSAE LLALSVTCNEP 100
<i>SLL</i> cv. Aichi-first	1 MKNLDHIAASVDWEKESLPEYQDLIFLLFFALFFPVLRFILDRFVFEALAKRMIFGKKTVVNINGREERKKINKFKESAWKFVYFLSAE LLALSVTCNEP 86
<i>SLL</i> cv. Momotaro-8	1 MKNLDHIAASVDWEKESLPEYQDLIFLLFFALFFPVLRFILDRFVFEALAKRMIFGKKTVVNINGREERKKINKFKESAWKFVYFLSAE LLALSVTCNEP 100
<i>SLJ</i> M5-3	1 MKNLDHIAASVDWEKESLPEYQDLIFLLFFALFFPVLRFILDRFVFEALAKRMIFGKKTVVNINGREERKKINKFKESAWKFVYFLSAE LLALSVTCNEP 86
<i>SLC</i> BRC016	1 MKNLDHIAASVDWEKESLPEYQDLIFLLFFALFFPVLRFILDRFVFEALAKRMIFGKKTVVNINGREERKKINKFKESAWKFVYFLSAE LLALSVTCNEP 100
<i>SLC</i> PER018894	1 MKNLDHIAASVDWEKESLPEYQDLIFLLFFALFFPVLRFILDRFVFEALAKRMIFGKKTVVNINGREERKKINKFKESAWKFVYFLSAE LLALSVTCNEP 86
<i>SP</i> CPN032	1 MKNLDHIAASVDWEKESLPEYQDLIFLLFFALFFPVLRFILDRFVFEALAKRMIFGKKTVVNINGREERKKINKFKESAWKFVYFLSAE LLALSVTCNEP 100
<i>SP</i> PER018805	1 MKNLDHIAASVDWEKESLPEYQDLIFLLFFALFFPVLRFILDRFVFEALAKRMIFGKKTVVNINGREERKKINKFKESAWKFVYFLSAE LLALS CDL* 97
<i>SLL</i> #AF198177	101 WFTDSRYFWAGPGDVVWPNLKMKLKLLLYMYAGGFFYFYSIFATLYWETRRYDFAAQIHHVTTVSLIVLSYVYGPARIGSVVLALHDGSDVFMEIAKMS 200
<i>SLL</i> cv. Momotaro-8	101 WFTDSRYFWAGPGDVVWPNLKMKLKLLLYMYAGGFFYFYSIFATLYWETRRYDFAAQIHHVTTVSLIVLSYVYGPARIGSVVLALHDGSDVFMEIAKMS 200
<i>SLC</i> BRC016	101 WFTDSRYFWAGPGDVVWPNLKMKLKLLLYMYAGGFFYFYSIFATLYWETRRYDFAAQIHHVTTVSLIVLSYVYGPARIGSVVLALHDGSDVFMEIAKMS 200
<i>SP</i> CPN032	101 WFTDSRYFWAGPGDVVWPNLKMKLKLLLYMYAGGFFYFYSIFATLYWETRRYDFAAQIHHVTTVSLIVLSYVYGPARIGSVVLALHDGSDVFMEIAKMS 200
<i>SLL</i> #AF198177	201 KYSGFDLIADIFFSLFALVFTSLRIICYPPFWIIRSTCYELLYVLDIQKERTTGIIILYFVFNALLICLLVLHLFWFKIILRMVKNQILSRGHITDDVREDS 300
<i>SLL</i> cv. Momotaro-8	201 KYSGFDLIADIFFSLFALVFTSLRIICYPPFWIIRSTCYELLYVLDIQKERTTGIIILYFVFNALLICLLVLHLFWFKIILRMVKNQILSRGHITDDVREDS 300
<i>SLC</i> BRC016	201 KYSGFDLIADIFFSLFALVFTSLRIICYPPFWIIRSTCYELLYVLDIQKERTTGIIILYFVFNALLICLLVLHLFWFKIILRMVKNQILSRGHITDDVREDS 300
<i>SP</i> CPN032	201 KYSGFDLIADIFFSLFALVFTSLRIICYPPFWIIRSTCYELLYVLDIQKERTTGIIILYFVFNALLICLLVLHLFWFKIILRMVKNQILSRGHITDDVREDS 300
<i>SLL</i> #AF198177	301 ESDDDHKD* 309
<i>SLL</i> cv. Momotaro-8	301 ESDDDHKD* 309
<i>SLC</i> BRC016	301 ESDDDHKD* 309
<i>SP</i> CPN032	301 ESDDDHKD* 309

図 13 *Asc1* の多重アラインメント

a. *Asc1* の塩基配列における変異箇所。2 番目のエキソンの部分領域 (nt 843\_940) における変異箇所を示した。

b. *Asc1* のアミノ酸における変異箇所。\*は終止コドンの位置を示した。

ナンセンス変異になったアクセッション、*SLL*、その他は比較のため同じ種であるアクセッションから得られた配列を用いた。

*SLL* ; *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*、*SLJ* : *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* “jitomate criollo”、*SLC* ; *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*、*SP* ; *S. pimpinellifolium*。



**表8** 本研究で用いたトマトアクセスシヨンのAAL毒素感受性および*AscI* 変異

Species and accessions	Sampling site		AAL-toxin susceptibility	GenBank accession no.	Mutations in <i>AscI</i> in comparison to the reference sequence #AF198177 <sup>b</sup>				
	Country	Region			ca. 400 bp- deletion <sup>c</sup>	Frameshift mutation	Missense mutation	Silent mutation	
								Exon	Intron
TUAT Collection (Inami et al.2014)									
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> "jitomate criollo" (SLJ)									
M5-1	Mexico	Queretaro	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
M5-3	Mexico	Queretaro	Susceptible	LC596579	No deletion	854_855del	911G>A		1065G>A, 1306T>G
M5-4	Mexico	Queretaro	Resistant	LC596581	No deletion		911G>A		1065G>A, 1306T>G
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)									
E0040W	Ecuador	Santa Cruz	Resistant	LC596555	No deletion		911G>A, 1010A>C		1306T>G
E0041W	Ecuador	Santa Cruz	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
E0043	Ecuador	Santa Cruz	Resistant	LC596554	No deletion		911G>A, 1010A>C		1306T>G
MC-1	Mexico	Hidalgo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
MC-5a	Mexico	Hidalgo	Resistant	LC596505	No deletion				
MC-5b	Mexico	Hidalgo	Resistant	LC596504	No deletion				
ML-1	Mexico	Hidalgo	Resistant	LC596503	No deletion				
M-UX	Mexico	Yucatan	Resistant	LC596506	No deletion				
099-2012	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
105-2012	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
2005.12.09 Mexico	Mexico	Yucatan	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)									
ECU0043	Ecuador	Santa Cruz	Resistant	LC596553	No deletion		911G>A, 1010A>C		1306T>G
ECU0045	Ecuador	Santa Cruz	Resistant	LC596552	No deletion		911G>A, 1010A>C		1306T>G
ECU017a	Ecuador	Santa Cruz	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
UNALM - TUAT Collection									
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)									
BRC014	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
BRC015	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
BRC016	Peru	Lima	Resistant	LC596570	No deletion		911G>A		1306T>G
BRC017	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
BRC021	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY132	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY134	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY137	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY138	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596583	No deletion		911G>A, 1366T>C		649G>A, 1306T>G
CCY139	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY146	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY147	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY149	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY152	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596577	No deletion		509A>G, 569A>C, 570G>A, 911G>A	823G>A	727_728insT, 748G>A, 1048T>A, 1306T>G
CCY153	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY154	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596578	No deletion				1048T>A, 1065G>A, 1306T>G
CCY155	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY156	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596510	No deletion				1306T>G
CCY159	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596556	No deletion		911G>A		1306T>G, 1599C>T
CCY160	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY162	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596511	No deletion				1306T>G
CCY163	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY165	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY166	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA023	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA028	Peru	Lima	Resistant	LC596512	No deletion				1306T>G
CGA029	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA031	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA032	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
ICA034	Peru	Ica	Resistant	LC596564	No deletion				728delT, 1306T>G, 1843A>C
IND096	Peru	Lima	Resistant	LC596529	No deletion				728delT, 1306T>G
IND097	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
IND098	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
IND099	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
IND100	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
IND101	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
IND102	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
IND103	Peru	Lima	Resistant	LC596531	No deletion				728delT, 1306T>G
IND104	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
IND105	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
IND106	Peru	Lima	Resistant	LC596532	No deletion				728delT, 1306T>G
IND107	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
JAE035	Peru	Cajamarca	Resistant	LC596507	No deletion		911G>A	516G>A	727_728insT, 1306T>G
JAE036	Peru	Cajamarca	Resistant	LC596508	No deletion		911G>A	516G>A	727_728insT, 1306T>G
JAE037	Peru	Cajamarca	Resistant	LC596509	No deletion		911G>A	516G>A	727_728insT, 1306T>G
LAM002	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM003	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM006	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM007	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT

aDate, yyyymmdd. bBlank, identical to #AF198177; NT, not tested. cAn approximately 400 bp-deletion including the 5' UTR and a part of the 5' ORF of *AscI* as determined by PCR.

表8 本研究で用いたトマトアクセッションのAAL毒素感受性および*AscI* 変異(続き)

Species and accessions	Sampling site		AAL-toxin susceptibility	GenBank accession no.	Mutations in <i>AscI</i> in comparison to the reference sequence #AF198177 <sup>b</sup>				
	Country	Region			ca. 400 bp- deletion <sup>c</sup>	Frameshift mutation	Missense mutation	Silent mutation	
								Exon	Intron
LAM008	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM009	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM011	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM035	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM036			Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LIM027	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LIM038	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
MTP033	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596558	No deletion				1306T>G, 1599C>T
PIU029	Peru	Piura	Resistant	LC596584	No deletion		1693T>G	1784T>G	1306T>G
PIU168	Peru	Piura	Resistant	LC596522	No deletion		911G>A		1306T>G
PIU169	Peru	Piura	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
PIU172	Peru	Piura	Resistant	LC596557	No deletion		911G>A		1306T>G, 1599C>T
PIU174	Peru	Piura	Resistant	LC596523	No deletion		911G>A		1306T>G
PIU181	Peru	Piura	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
PIU185	Peru	Piura	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
PKC040	Peru	Lima	Resistant	LC596559	No deletion				1306T>G, 1599C>T
PRG121	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB190	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB192	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB194	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB195	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB196	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB197	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB200	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB202	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB203	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB204	Peru	Cusco	Resistant	LC596513	No deletion				1306T>G
QBB205	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB206	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB207	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB207-2	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB208	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB208-2	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB209	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB210	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB211	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB212	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB213	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB214	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB215	Peru	Cusco	Resistant	LC596514	No deletion				1306T>G
QBB216	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB218	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB221	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB222	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB223	Peru	Cusco	Resistant	LC596515	No deletion				1306T>G
QBB224	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB225	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB226	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB227	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB230	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB231	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB232	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB234	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB235	Peru	Cusco	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
QBB238	Peru	Cusco	Resistant	LC596516	No deletion				1306T>G
STP087	Peru	Junin	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
STP088	Peru	Junin	Resistant	LC596574	No deletion		911G>A	862G>A	769A>T, 771A>T, 1306T>G
STP089	Peru	Junin	Resistant	LC596582	No deletion		807T>C, 911G>A		1057_1058insC, 1306T>G
STP090	Peru	Junin	Resistant	LC596525	No deletion		911G>A		1306T>G
STP091	Peru	Junin	Resistant	LC596526	No deletion		911G>A		1306T>G
STP092	Peru	Junin	Resistant	LC596527	No deletion		911G>A		1306T>G
STP093	Peru	Junin	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
STP094	Peru	Junin	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
STP095	Peru	Junin	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ108	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ111	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ112	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ113	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ116	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ117	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ120	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TUM001	Peru	Tumbes	Resistant	LC596530	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM004	Peru	Tumbes	Resistant	LC596517	No deletion				1306T>G
TUM007	Peru	Tumbes	Resistant	LC596533	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM011	Peru	Tumbes	Resistant	LC596534	No deletion				728delT, 1306T>G

aDate, yyyyymmdd. bBlank, identical to #AF198177; NT, not tested. cAn approximately 400 bp-deletion including the 5' UTR and a part of the 5' ORF of *AscI* as determined by PCR.

表8 本研究で用いたトマトアクセッションのAAL毒素感受性および*AscI* 変異(続き)

Species and accessions	Sampling site		AAL-toxin susceptibility	GenBank accession no.	Mutations in <i>AscI</i> in comparison to the reference sequence #AF198177 <sup>b</sup>				
	Country	Region			ca. 400 bp- deletion <sup>c</sup>	Frameshift mutation	Missense mutation	Silent mutation	
								Exon	Intron
TUM012	Peru	Tumbes	Resistant	LC596535	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM015	Peru	Tumbes	Resistant	LC596536	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM016	Peru	Tumbes	Resistant	LC596573	No deletion				727_728del, 1306T>G
TUM017	Peru	Tumbes	Resistant	LC596537	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM021	Peru	Tumbes	Resistant	LC596538	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM023	Peru	Tumbes	Resistant	LC596539	No deletion				728delT, 1306T>G
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)									
CCY128	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY129	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY130	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY131	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY133	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY140	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY141	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY142	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596560	No deletion		617G>A		1306T>G, 1599C>T
CCY143	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY144	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY145	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY157	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY158	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CCY164	Peru	Lambayeque	Resistant	LC596561	No deletion				1306T>G, 1599C>T
CGA022	Peru	Lima	Resistant	LC596518	No deletion				1306T>G
CGA024	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA025	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA026	Peru	Lima	Resistant	LC596519	No deletion				1306T>G
CGA027	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA030	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA033	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
CGA034	Peru	Lima	Resistant	LC596540	No deletion				728delT, 1306T>G
CPN032	Peru	La Libertad	Resistant	LC596528	No deletion		911G>A		1306T>G
LAM001	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM005	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM010	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM012	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM013	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
LAM037	Peru	Lima	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
PIU030	Peru	Piura	Resistant	LC596562	No deletion				1306T>G, 1599C>T
PIU031	Peru	Piura	Resistant	LC596563	No deletion				1306T>G, 1599C>T
PIU188	Peru	Piura	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
PRG122	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
PRG123	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
PRG125	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
PRG126	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ109	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ110	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TRJ115	Peru	Trujillo	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TUM002	Peru	Tumbes	Resistant	LC596541	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM003	Peru	Tumbes	Resistant	LC596542	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM005	Peru	Tumbes	Resistant	LC596543	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM006	Peru	Tumbes	Resistant	LC596544	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM010	Peru	Tumbes	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TUM013	Peru	Tumbes	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TUM014	Peru	Tumbes	Resistant	LC596545	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM018	Peru	Tumbes	Resistant	LC596546	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM019	Peru	Tumbes	Resistant	LC596547	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM020	Peru	Tumbes	Resistant	LC596548	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM022	Peru	Tumbes	Resistant	LC596549	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM024	Peru	Tumbes	Resistant	LC596550	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM025	Peru	Tumbes	Resistant	LC596551	No deletion				728delT, 1306T>G
TUM026	Peru	Tumbes	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
TUM028	Peru	Tumbes	Resistant	NT	No deletion	NT	NT	NT	NT
INIA collection									
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)									
PER018792	TS - 013	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018793	TS - 014	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018795	TS - 016	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018832	TS - 053	Peru	Cajamarca	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018835	TS - 056	Peru	Cajamarca	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018836	TS - 057	Peru	Cajamarca	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018837	TS - 058	Peru	Cajamarca	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
-	TS - 085	Peru	Cusco	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018878	TS - 099	Peru	Cusco	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018879	TS - 100	Peru	Cusco	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018894	TS - 115	Peru	Huanuco	Susceptible	LC596580	No deletion	854_855del	911G>A	1065G>A, 1306T>G
PER018901	TS - 122	Peru	Huanuco	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018902	TS - 123	Peru	Huanuco	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018909	TS - 130	Peru	Huanuco	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018913	TS - 134	Peru	Huanuco	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018923	TS - 144	Peru	Ucayali	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018928	TS - 149	Peru	Ucayali	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT
PER018932	TS - 153	Peru	Avacucho	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT

aDate, yyyyymmdd. bBlank, identical to #AF198177; NT, not tested. cAn approximately 400 bp-deletion including the 5' UTR and a part of the 5' ORF of *AscI* as determined by PCR.

表8 本研究で用いたトマトアクセッションのAAL毒素感受性および*AscI* 変異(続き)

Species and accessions		Sampling site		AAL-toxin susceptibility	GenBank accession no.	Mutations in <i>AscI</i> in comparison to the reference sequence #AF198177 <sup>b</sup>				
						ca. 400 bp- deletion <sup>c</sup>	Frameshift mutation	Missense mutation	Silent mutation	
		Country	Region						Exon	Intron
-	TS - 156	Peru	Ayacucho	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018936	TS - 157	Peru	Ayacucho	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018938	TS - 159	Peru	Ayacucho	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)										
PER018780	TS - 001	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018781	TS - 002	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018782	TS - 003	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018783	TS - 004	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018784	TS - 005	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018785	TS - 006	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018786	TS - 007	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018787	TS - 008	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018788	TS - 009	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018789	TS - 010	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018790	TS - 011	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018791	TS - 012	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018794	TS - 015	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018796	TS - 017	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018797	TS - 018	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018798	TS - 019	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018799	TS - 020	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018800	TS - 021	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018801	TS - 022	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018802	TS - 023	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018803	TS - 024	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018804	TS - 025	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018805	TS - 026	Peru	Lambayeque	Susceptible	LC596576	No deletion	931_932insT	911G>A		1306T>G
PER018806	TS - 027	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018807	TS - 028	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018808	TS - 029	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018809	TS - 030	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018810	TS - 031	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018811	TS - 032	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018812	TS - 033	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018813	TS - 034	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018814	TS - 035	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018815	TS - 036	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018817	TS - 038	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018819	TS - 040	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018820	TS - 041	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018821	TS - 042	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018823	TS - 043	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
-	TS - 044	Peru	Lambayeque	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018824	TS - 045	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018825	TS - 046	Peru	Lima	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018842	TS - 063	Peru	Cajamarca	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018854	TS - 075	Peru	Cajamarca	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018862	TS - 083	Peru	Cajamarca	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018877	TS - 098	Peru	Cusco	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018926	TS - 147	Peru	Ucayali	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018937	TS - 158	Peru	Ayacucho	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018940	TS - 161	Peru	Ayacucho	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PER018942	TS - 163	Peru	Huancavelica	Resistant	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TGRC Collection used as references										
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> (SLC)										
LA 1456		Mexico	Veracruz	Resistant	LC596520	No deletion				1306T>G
LA 1623		Mexico	Campeche	Resistant	LC596569	No deletion				
LA 1909		Peru	Cusco	Resistant	LC596521	No deletion				1306T>G
<i>S. pimpinellifolium</i> (SP)										
LA 3123		Ecuador	Santa Cruz Island	Resistant	LC596565	No deletion		836A>T		
<i>S. cheesmaniae</i> (SC)										
LA 0437		Ecuador	Isabela Island	Susceptible	LC596568	400 bp-deletion				
LA 0521		Ecuador	Frenandina Island	Susceptible	LC596567	400 bp-deletion				
<i>S. galapagense</i> (SG)										
LA 0438		Ecuador	Isabela Island	Susceptible	LC596566	400 bp-deletion				
LA 0528		Ecuador	Santa Cruz Island	Susceptible	LC596571	400 bp-deletion				761G>C, 1306T>G
Commercial cultivars used as reeferences										
<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> (SLL)										
cv. Aichi-first (Matsunaga Seed, Konan, Aichi, Japan)				Susceptible	LC596575	No deletion	854_855del	911G>A		1306T>G
cv. Block (Sakata seed Co, Kanagawa, Japan)				Resistant	NT	NT	NT	NT		
cv. Early Pack7 (Heirloom tomato farm, Gifu, Japan)				Resistant	NT	NT	NT	NT		
cv. Momotaro-8 (Takii & Co, Kyoto, Japan)				Resistant	LC596572	No deletion		911G>A		1306T>G
cv. Momotaro (Takii & Co, Kyoto, Japan)				Resistant	NT	NT	NT	NT		
cv. Money maker(Baker creek heirloom seed Co, Missouri, USA)				Resistant	NT	NT	NT	NT		
cv. Ponderosa (Noguchi seed Lab, Saitama, Japan)				Resistant	NT	NT	NT	NT		

aDate, yyyymmdd. bBlank, identical to #AF198177; NT, not tested. cAn approximately 400 bp-deletion including the 5' UTR and a part of the 5' ORF of *AscI* as determined by PCR.

表9 塩基配列のパターン

パターン	アクセッション
A	AF198177, ML-1, MC-5a, MC-5b, M-UX, LA1623
B	JAE035, JAE036, JAE037
C	CCY156, CCY162, CGA028, CGA022, CGA026, QBB204, QBB215, QBB223, QBB238, TUM004, LA1456, LA1909
D	CPN032, BRC016, PIU168, PIU174, SMO068, STP090, STP091, STP092, 桃太郎8
E	CGA034, IND096, IND103, IND106, TUM001, TUM002, TUM003, TUM005, TUM006, TUM007, TUM011, TUM012, TUM014, TUM015, TUM017, TUM018, TUM019, TUM020, TUM021, TUM022, TUM023, TUM024, TUM025
F	ECU0045, ECU0043, E0043, E0040W
G	CCY159, PIU172
H	CCY142, CCY164, MTP033, PIU030, PIU031, PKC040
I	LA0437, LA0438, LA0521
J	愛知ファースト
K	CCY138
L	CCY152
M	CCY154
N	ICA034
O	LA0528
P	LA3123
Q	M5-3
R	M5-4
S	PIU029
T	PER018805
U	PER018894
V	STP088
W	STP089
X	TUM016

各アクセッションの詳細は表1に、各パターンの塩基変異は表10に記載。

表10 *AscI* の変異パターン

エキソン (e) /イントロン (i)	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
塩基位置 <sup>a</sup> (nt)	509	516	569	570	572	637	640	643	644	645
A										
B		G>A								
C										
D										
E										
F										
F										
G										
H										
I						G>T	T>C	G>T	A>T	G>A
Aichi-first										
CCY138										
CCY152	A>G		A>C	G>A						
CCY154										
ICA034										
LA0528						G>T	T>C	G>T	A>T	G>A
LA3123										
M5-3										
M5-4										
PIU029										
PER018805										
PER018894										
STP088										
STP089										
TUM016					A>G					

<sup>a</sup>塩基位置は#AF198177に基づいて記した。



表10 *AscI* の変異パターン (続き)

エキソン (e) /イントロン (i)	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
塩基位置 <sup>a</sup> (nt)	647	649	650	652	653	718	727	727_728	728	748
A										
B								insT		
C										
D						delT		insT		
E							delT			
F							delT			
F						delT		insT		
G										
H										
I	T>A	G>A	T>G	G>A	C>A					
Aichi-first						delT		insT		
CCY138		G>A								
CCY152								insT		G>A
CCY154										
ICA034							delT			
LA0528	T>A	G>A	T>G	G>A	C>A					
LA3123										
M5-3										
M5-4										
PIU029										
PER018805						delT		insT		
PER018894										
STP088						delT		insT		
STP089						delT		insT		
TUM016						delT	delT		C>T	

<sup>a</sup>塩基位置は#AF198177に基づいて記した。

表10 *AscI* の変異パターン (続き)

エキソン (e) /イントロン (i)	i	i	i	e	e	e	e	e
塩基位置 <sup>a</sup> (nt)	761	769	771	807	823	836	854	855
A								
B								
C								
D								
E								
F								
F								
G								
H								
I								
Aichi-first							delA	delG
CCY138								
CCY152					G>A			
CCY154								
ICA034								
LA0528	G>C							
LA3123						A>T		
M5-3							delA	delG
M5-4								
PIU029								
PER018805								
PER018894							delA	delG
STP088		A>T	A>T					
STP089				T>C				
TUM016								

<sup>a</sup>塩基位置は #AF198177に基づいて記した。

表10 *AscI* の変異パターン (続き)

エキソン (e) /イントロン (i)	e	e	e	e	i	i	i	i
塩基位置 <sup>a</sup> (nt)	862	911	931_932	1010	1048	1057_1058	1065	1306
A								
B		G>A						T>G
C								T>G
D		G>A						T>G
E								T>G
F								T>G
F		G>A		A>C				T>G
G		G>A						T>G
H								T>G
I								
Aichi-first		G>A						T>G
CCY138		G>A						T>G
CCY152		G>A			T>A			T>G
CCY154					T>A		G>A	T>G
ICA034								T>G
LA0528								T>G
LA3123								
M5-3		G>A					G>A	T>G
M5-4		G>A					G>A	T>G
PIU029								T>G
PER018805		G>A	insT					T>G
PER018894		G>A					G>A	T>G
STP088	G>A	G>A						T>G
STP089		G>A				insC		T>G
TUM016								T>G

<sup>a</sup>塩基位置は#AF198177に基づいて記した。

表10 *AscI* の変異パターン (続き)

エキソン (e) /イントロン (i)	e	i	e	e	i
塩基位置 <sup>a</sup> (nt)	1366	1599	1693	1784	1843
A					
B					
C					
D					
E					
F					
F					
G		C>T			
H		C>T			
I					
Aichi-first					
CCY138	T>C				
CCY152					
CCY154					
ICA034					A>C
LA0528					
LA3123					
M5-3					
M5-4					
PIU029			T>G	T>G	
PER018805					
PER018894					
STP088					
STP089					
TUM016					

<sup>a</sup>塩基位置は #AF198177に基づいて記した。

## 5.4 考察

本章では、AAL 毒素抵抗性アクセッションを含む 80 アクセッションに対して *AscI* シーケンス解析を実施した。

その結果、今回 3 つの AAL 毒素感受性アクセッションからミスセンス変異を伴うような *AscI* 変異が見出され、ペルーの *SP* から 1 アクセッション (*SP* PER018805)、*SLC* から 1 アクセッション (*SLC* PER018894)、メキシコの *SLJ* から 1 アクセッション (*SLJ* M5-3) を見出した。*SLC* PER018894 及び *SLJ* M5-3 は共通の 2 塩基欠失 (nt 854\_855del) を *AscI* の ORF に保持しており、*SP* PER018805 には 1 塩基挿入 (nt 931\_932insT) が確認された。*SLC* PER018894 および *SLJ* M5-3 は共通の 2 塩基欠失 (nt 854\_855del) は、感受性食用トマト cv. 愛知ファーストと同様の箇所に変異が生じていた。これら 2 つの変異はどちらも第 2 エキソンに存在し、フレームシフトが起こることで短いアミノ酸が合成されたために *AscI* が正常に発現せず、毒素感受性を示したと示唆された。

*SLC* PER018894 および *SLJ* M5-3 から共通の 2 塩基欠失 (nt 854\_855del) が見出されたことで、食用トマト *SLL* cv. 愛知ファーストの変異はもともとペルーに存在していたものが、メキシコで栽培化される際にも引き継がれた可能性を示した。第 3 章における 18COSII 領域を用いたトマトの分子系統解析においても示されており、*SLC* PER018894、*SLJ* M5-3 および *SLL* cv. 愛知ファーストが同じクレード (図 8 Clade S2、図 9 Clade L2) に属していることと矛盾しない。また *SP* PER018805 における 1 塩基挿入 (nt 931\_932insT) は、本研究で新たに見出された *AscI* 変異であった。図 8 Clade S3 にはペルーの様々な場所から採集されたアクセッションが属していることから、ペルーに自生しているトマトには多様性があることが示され、さらに調査を続けることで新たに AAL 毒素感受性を引き起こす *AscI* 変異が見出される可能性がある。

*AscI* 塩基配列のパターン分けから、地理的な *AscI* 塩基配列のパターンの存在が明らかになった。パターン A の配列はメキシコ由来のアクセッションと基準とした AF198177 と同様の *AscI* 塩基配列であった。パターン B はペルー北部 Jaen 州由来のアクセッション、パターン F はエクアドル由来のアクセッション、パターン I は SC と SG が同じ *AscI* 塩基配列を持つことが明らかになった。このことから、地理的に近いアクセッションが同じ塩基配列を持つことが示された。



## 6 総合考察

本論文では、「*SLL* と *SC* および *SG* の共通の祖先である野生種トマト *SP* の *Asc1* には構造や塩基配列に多様性があり、愛知ファースト等 AAL 毒素感受性の *SLL* 栽培品種や *SC* および *SG* に見られる変異型の *Asc1* は、ペルーの *SP* の *Asc1* を起源としている」との仮説を立て、この仮説を検証するとともに、トマト栽培化の歴史を *Asc1* の変異に基づいて考察することを目的に研究を行った。

現在も野生種トマトや移行期トマトが自生しているペルー、エクアドル、メキシコにおいてサンプリングを実施し、小葉の形態に基づく同定と分子系統解析による同定を実施した。その結果ペルーのアクセッションはメキシコや栽培品種が属するクレード (Clade S2) にも、エクアドルのアクセッションが属するクレード (Clade S3) にも散らばったことが明らかになった。このことからペルーのアクセッションはガラパゴス諸島トマト *SC* と *SG* とは異なり、多様性があることが明らかになった。

また、トマトの採集場所を考察すると、GPS の多少のずれを考慮してもどこの採集箇所も谷あいであり、民家や川が近くにある様子がみえる。そのことから、ペルーにおける野生種トマトが川をつたって太平洋側に流れ出て、ペルー海流または鳥類などによってガラパゴス諸島に定着した可能性が示唆された。さらにガラパゴス諸島トマト *SC* および *SG* は *SP* や *SLC* と比較して発芽に時間がかかるものがあり、長いものでは発芽までに 1 か月を要するアクセッションも存在する。ガラパゴス諸島には現在も *SP* および *SLC* が自生しているが、*SP* や *SLC* は人間活動によって後から持ち込まれた種であると考えられている。よって *SC* および *SG* はガラパゴス諸島で独自の進化をした可能性が示唆されている。このような独自の進化の過程で、水分が多い場合にも発芽しにくくなるような性質を手に入れたの

かもしれない。このことから、野生種トマトには洪水などの気候変動が収まった頃に発芽するという生き残り戦略を持つ可能性が示唆された。

*Lycopersicon species group* における AAL 毒素を用いたスクリーニングからは、3 つの AAL 毒素感受性アクセッションが得られた。

この結果は AAL 毒素感受性アクセッションにおける *AscI* 突然変異においても示されており、ペルーで見いだされた 2 塩基欠失はメキシコにおける移行期トマト中にも存在していた。この変異は感受性栽培品種における *AscI* 変異と同様であるため、ペルーの野生種トマトに存在していた変異が、メキシコにおける栽培化を経てもなお保存され、近代育種まで継続して存在する変異であることを示した。現在報告されている感受性品種はファースト系統のみであるが、奈良県で 1983 年に激甚な被害を及ぼした栽培品種トマト cv. 強力脚光は、育種の段階でファースト系統は導入されていないにもかかわらず、茎枯病菌に感受性を示す（堀本ら, 1985）。このトマトに関してシーケンス解析は実施されていないが、ファースト系統のみならず、今後感受性トマトが新たに見出され、大きな被害を及ぼす可能性が考えられる。

茎枯病菌側に関して、中南米では AAL 毒素を生産する *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (*Aal*) は報告されておらず、Kodama (2019) の先行研究からも見出されていない。よってペルー、エクアドル、チリ、メキシコの野生のトマトには AAL 毒素による選択圧がかかっておらず、現代においても毒素感受性アクセッションが自生していると示唆された。同様にガラパゴス諸島においても茎枯病菌の発生は報告されていない。そのため毒素感受性の SC と SG は茎枯病菌に淘汰されずにガラパゴス諸島に定着したと考えられる。いまだガラパゴス諸島に特有の 400 bp 欠失を南米大陸からは見出した例はない。今後、さらに検定数を増やして

AAL 毒素感受性の有無と *AscI* 遺伝子を解析する必要がある。

また、今回の研究の新規性として、茎枯病菌が生産する AAL 毒素の感受性という視点から、トマトの進化を遡ることができた点があげられる。Inami ら（2014）の先行研究においても、トマト萎凋病菌がメキシコでのトマト栽培化、あるいは近代育種のなかで病原性を獲得したことを明らかにした。同じトマトの病原菌である茎枯病菌も、病原菌と宿主の共進化を明らかにするための優れたモデルであることが示唆された。

本研究は、野生種トマトおよび移行期トマトを形態観察および分子系統解析を用いて同定し、AAL 毒素の抵抗性／感受性の有無を調べ、*AscI* に関する新規変異をまとめた。この研究によって、茎枯病菌とトマトの栽培化の歴史を考察することが出来た。植物の育種は通常野生種と交配することで行われるため、野生種の豊富な遺伝資源を保護することは重要な課題である。このような野生のトマトの豊富な遺伝資源は、この世界的に重要な作物の将来の育種において、重要な役割を果たし続けるだろう。

## 謝辞

本学大学院食料エネルギーシステム科学専攻の有江 力教授には温かいご支援をいただきました。研究の面白さだけでなく、実際の栽培現場を国内外において広く知る機会をいただけたことで、研究が社会実装することの重要性、世界のどんな場所においても植物病理学が重要であることを身をもって学ぶことができました。お忙しい中、沢山の時間を頂戴しご指導いただけたこと、心より感謝いたします。

本学大学院農学研究院の小松 健准教授には、研究におけるアドバイスだけでなく日々の研究生活における姿勢や考え方を学ぶ機会を多くいただいた。お忙しい中いつも気にかけていただいたこと、心より感謝いたします。

本学の寺岡 徹元教授には、退職後も研究に対する姿勢をお教えいただいた。著者が農工大への進学を意識するきっかけともなった。心より感謝いたします。

本学のイノベーション推進機構の皆様には、EDGE のエコシステムフォーラムへの参加や特別研究員として採択していただけたことにより、研究を推し進めることができた。とくに二谷貴夫博士、前田由美氏、一條洋子特任准教授にはいつも気にかけていただいたこと、心より感謝いたします。特に二谷博士には本学のリーディング大学院への入学のきっかけをいただけたこと、心より感謝いたします。前田由美氏、一條特任准教授には親身になって就職の相談に乗っていただけたこと、心より感謝いたします。

また鳥取大学大学院の児玉基一朗教授、赤木靖典博士には菌株の分譲および毒素の接種方法をお教えいただいた。心より感謝いたします。

他にも多くのペルーの研究者にご協力いただいた。INIA コレクションを用いた実験では、

ペルー政府より許可を取得（#53-2020-MINAGRI-SERFOR）、ペルー国内の実験を実施した。La Molina 国立農業大学の Ms. Liliana Aragon、Ms. Heidi Huarhua、Dr. Raul Blas、植物病院の皆様（Clínica de diagnóstico）、Ms. Mildreck Cerna、INIA 国立農業イノベーション研究所の Dr. Cinthya Zorrilla、Mr. Jorge Biondi、Dr. Juan Carlos Guerrero、Dr. Dina Gutierrez、Ms. Rosa Cabrera ほかにも Dr. Ana Panta、Ms. Carla Trigos、Ms. Cledy Ureta には大変お世話になった。

本学 LaCEP プログラム（世界展開力強化事業～中南米等どの大学間交流形成支援～）において千年 篤教授および歴代のコーディネーターの皆様には、研究の発展のみならず、世界に目を向けることの面白さを学ばせていただいた。心より感謝いたします。

島根大学の上野 誠教授には、著者が本学に進学する一番初めのきっかけを作ってくださり、卒業後も気にかけてくださったこと、心より感謝いたします。

最後に、食料エネルギーシステム科学専攻の先生方、同期の皆様、本学植物病学研究室の皆様、家族、友人に、このような充実した 5 年間の研究生活を送らせていただけたこと、心より感謝いたします。

## 引用文献

- Arie, T.; Takahashi, H.; Kodama, M.; Teraoka.** Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnol.* **2007**, 24, 135–147.
- Arie, T.** Phylogeny and phytopathogenicity mechanisms of soilborne *Fusarium oxysporum*. *J. Gen. Plant Pathol.* **2010**, 76, 403–405.
- Akagi, Y.; Akamatsu, H.; Otani, H.; Kodama, M.** Horizontal chromosome transfer, a mechanism for the evolution and differentiation of a plant-pathogenic fungus. *Eukaryot. Cell* **2009a**, 8, 1732–1738.
- Akagi, Y.; Taga, M.; Yamamoto, M.; Tsuge, T.; Fukumasa-Nakai, Y.; Otani, H.; Kodama, M.** Chromosome constitution of hybrid strains constructed by protoplast fusion between the tomato and strawberry pathotypes of *Alternaria alternata*. *J. Gen. Plant Pathol.* **2009b**, 75, 101–109.
- Akamatsu, H.; Itoh, Y.; Kodama, M.; Otani, H.; Kohmoto, K.** AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* **1997**, 87, 967–972.
- Blanca, J.; Cañizares, J.; Cordero, L.; Pascual, L.; Diez, M.J.; Nuez, F.** Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the Tomato. *PLoS ONE* **2012**, 7, e48198.
- Brandwagt, B.F.; Mesbah, L.A.; Laurent P.L.; Takken, F.L.; Kneppers, T.J.A.; John, H.; Nijkamp, H.J.J.; Hille J.** The interaction of *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* and its AAL-toxins with tomato. In *Molecular genetics of host-specific toxins in plant disease*;



- Kohmoto, K.; Yoder, O.C., Ed.; Springer, Dordrecht, The Netherlands, **1997**; pp. 317–330.
- Brandwagt, B.F.; Mesbah, L.A.; Takken, F.L.W.; Laurent, P.L.; Kneppers, T.J.A.; Hille, J.; Nijkamp, H.J.J.** A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 4961–4966.
- Chen, J.; Li, Z.; Cheng, Y.; Gao, C.; Guo, L.; Wang, T.; Xu, J.** Sphinganine-Analog Mycotoxins (SAMs) : Chemical Structures, Bioactivities, and Genetic Controls. *J. Fungi* **2020**, *6*, 312.
- Couch, B.C.C.; Fudal, I.; Lebrun, M.H.; Tharreau, D.; Valent, B.; Kim, P.V.; Notteghem, J.L.; Kohn, L.M.** Origin of Host-Specific Populations of the Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in Crop Domestication With Subsequent Expansion of Pandemic Clones on Rice and Weeds of Rice. *Genetics*. **2005**, *170*: 2, 613–630.
- Darriba, D.; Posada, D.; Kozlov, A.M.; Stamatakis, A.; Morel B.; Flouri T.** ModelTest-NG: A new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, *37*, 291–294.
- Darwin, S.C.; Knapp, S.; Peralta, I.E.** Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: Native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae) . *System. Biodivers.* **2003**, *1*, 29–53.
- Gibson, M.J.S.; de Lourdes Torres, M.; Moyle, L.C.** Local extirpation is pervasive among historical populations of Galápagos endemic tomatoes. *Evol. Ecol.* **2020**, *34*, 289–307.
- Grogan, R.G.; Kimble, K.A.; Misaghi, I.** A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* **1975**, *65*, 880–886.
- Grunwald, N.J.; Flier, W.G.** The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annu.*

*Rev. Phytopathol.* **2005**, 43, 171–190.

**Foolad, M.R.; Merk, H.L.; Ashrafi, H.** Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. *Crit Rev Plant Sci.* **2008**, 27, 75–107.

**Hawkes, J.G.** The Potato. Evolution, biodiversity and genetic resources. Washington, DC, *Belhaven Press* **1990**.

**Huang, X.; Kurata, N.; Wei, X.; Wang, Z.X.; Wang, A.; Zhao, Q.; Zhao, Y.; Liu, K.; Lu, H.; Li, W.; Guo, Y.; Lu, Y.; Zhou, C.; Fan, D.; Weng, Q.; Zhu, C.; Huang, T.; Zhang, L.; Wang, Y.; Feng, L.; Furuumi, H.; Kubo, T.; Miyabayashi, T.; Yuan, X.; Xu, Q.; Dong, G.; Zhan, Q.; Li, C.; Fujiyama, A.; Toyoda, A.; Lu, T.; Feng, Q.; Qian, Q.; Li, J.; Han, B.** A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature* **2012**, 490, 7421.

**Huelsenbeck, J.P.; Ronquist, F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **2001**, 17, 754–755.

**Inami, K.; Kashiwa, T.; Kawabe, M.; Onokubo-Okabe, A.; Ishikawa, N.; Pérez, E.R.; Hozumi, T.; Caballero, L.A.; de Baldarrago, F.C.; Roco, M.J.; Madadi, K.A.; Peever, T.L.; Teraoka, T.; Kodama, M.; Arie, T.** The tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* shares common ancestors with nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from wild tomatoes in the Peruvian Andes. *Microb. Environ.* **2014**, 29, 200–210.

**Jenkins, J.A.** The origin of the cultivated tomato. *Econ. Bot.* **1948**, 2, 379–392.

**Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D.** MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinf.* **2019**, 20, 1160–1166.

**Kodama, M.** Evolution of pathogenicity in *Alternaria* plant pathogens. *J. Gen. Plant Pathol.* **2019**,

85, 471–474.

**Kozlov, A.M.; Darriba, D.; Flouri, T.; Morel, B.; Stamatakis, A.** RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 4453–4455.

**Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874.

**Ma, L.J.; van der Does, H.; Borkovich, K.A.; Coleman, J.J.; Daboussi, M.J.; Pietro, A.D.; Dufresne, M.; Freitag, M.; Grabherr, M.; Henrissat, B.; Houterman, P.M.; Kang, S.; Shim, W.B.; Woloshuk, C.; Xie, X.; Xu, J.R.; Antoniw, J.; Baker, S.E.; Bluhm, B.H.; Breakspear, A.; Brown, D.W.; Butchko, R.A.E.; Chapman S.; Coulson, R.; Coutinho, P.M.; Danchin, G.J.E.; Diener, A.; Gale, L.R.; Gardiner D.M.; Goff, S.; Hammond-Kosack, K.E.; Hilburn, K.; Hua-Van, A.; Jonkers, W.; Kazan, K.; Kodira, C.D.; Koehrsen, M.; Kumar L.; Lee, Y.H.; Li, L.; Manners J.M.; Miranda-Saavedra, D.; Mukherjee, M.; Park, G.; Park, J.; Park, S.Y.; Proctor R.H.; Regev, A.; Ruiz-Roldan M.C.; Sain, D.; Sakthikumar, S.; Sykes, S.; Schwartz, D.C.; Turgeon B.G.; Wapinski1, I.; Yoder, O.; Young, S.; Zeng, Q.; Zhou, S.; Galagan, J.; Cuomo, C.A.; Kistler, H.C.; Rep, M.** Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **2010**, *464*, 367–373.

**Darwin, S.C.; Knapp, S.; Peralta, I.E.** Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: Native and introduced species of *Solanum* section Lycopersicon (Solanaceae) . *System. Biodivers.* **2003**, *1*, 29–53.

**Hooker, J.D.** An enumeration of the plants of the Galapagos archipelago; with descriptions of those which are new. *Trans.Linn.Soc.Lond.* **1947** (‘1851’) , 20, 2, 163–233.

- Meena, M.; Gupta, S.K.; Swapnil, P.; Zehra, A.; Dubey, M.K.; Upadhyay, R.S.** *Alternaria* Toxins: Potential Virulence Factors and Gene Related to Pathogenesis. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1451.
- Meyer, R.S.; Purugganan, M.D.** Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 12, 840-52.
- Munkacsi, A.B.; Stoxen, S.; May, G.** *Ustilago maydis* populations tracked maize through domestication and cultivation in the America. *Proc. R. Soc. B.* **2008**, *275*, 1037–1046.
- Murray, M.G.; Thompson, W.F.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acids. Res.* **1980**, *8*, 4321–4325.
- Nowicki, M.; Foolad, M.R.; Nowakowska, M.; Kozik, E.U.** Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant Dis.* **2012**, *96*, 4–17.
- Pailles, Y.; Ho, S.; Pires, I.S.; Tester, M.; Negrao, S.; Schmockel, S.M.** Genetic Diversity and Population Structure of Two Tomato Species from the Galapagos Islands. *Front Plant Sci.* **2017**, *15*, 8, 138.
- Peralta, I.E.; Spooner, D.M.** Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*) . *Am. J. Bot.* **2001**, *10*, 1888-1902.
- Peralta, I.E.; Knapp, S., Spooner, D.M.** Feature article Nomenclature for Wild and Cultivated Tomatoes. *TGC Report.* **2006**, *56*, 6–12.
- Peralta, I.E.; Spooner, D.M.; Knapp, S.** Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Junglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae) . *Sys. Bot.*

*Monogr.* **2008**, 84, 1–186.

**Platt, A.R.; Woodhall, R.W.; George, A.L.** Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques* 2007, 43, 58–62.

**Razdan, M.K.; Mattoo, A.K.** Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2: Tomato. *CRC Press*. **2006**; pp. 15.

**Razifard, H.; Ramos, A.; Della, Valle, A.L.; Bodary, C.; Goetz, E.; Manser, E.J.; Li, X.; Zhang, L.; Visa, S.; Tieman, D.; van der Knaap, E.; Caicedo, A.L.** Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, 37, 1118–1132.

**Rep, M.; van der Does, H.C.; Meijer, M.; van Wijk, R.; Houterman, P.M.; Dekker, H.L.; de Koster, C.G.; Cornellissen, V.J.C.** A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol. Microbiol.* **2004**, 53, 1373–1383.

**Rick, C.M.** *Lycopersicon*. In Wiggins, I.L. & Porter, D.M. (eds) , *Flora of the Galapagos Islands*. *Stanford University Press*, Stanford, **1971**, pp. 468–471.

**Rodriguez, F.; Wu, F.; Ané, C.; Tanksley, S.; Spooner, D.M.** Do potatoes and tomatoes have a single evolutionary history, and what proportion of the genome supports this history? *BMC Evol. Biol.* **2009**, 9, 191.

**Singh, V.K.; Singh, A.K.; Kumar, A.** Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech.* **2017**, 7, 4, 255.

**Tanaka, S.** Studies on black spot disease of the Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) . *Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ.* **1933**, 28, 1–31.

- Tsuge, T.; Harimoto, Y.; Akimitsu, K.; Ohtani, K.; Kodama, M.; Akagi, Y.; Egusa, M.; Yamamoto, M.; Otani, H.** Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, 37, 44–66.
- Tsuzuki, R.; Cabrera Pintado, R.M.; Biondi Thorndike, J.A.; Gutiérrez Reynoso, D.L.; Amasifuen Guerra, C.A.; Guerrero Abad, J.C.; Aragón Caballero, L.M.; Huarhua Zaquinaula, M.H.; Ureta Sierra, C.; Alberca Cruz, O.I.; Elespuru Suna, M.G.; Blas Sevillano, R.H.; Torres Arias, I.C.; Flores Ticona, J.; de Baldárrago, F.C.; Pérez, E.R.; Hozum, T.; Saito, H.; Kotera, S.; Akagi, Y.; Kodama, M.; Komatsu, K.; Arie, T.** Mutations Found in the *AscI* Gene That Confer Susceptibility to the AAL-Toxin in Ancestral Tomatoes from Peru and Mexico. *Plants* **2021**, 10, 47.
- Yamagishi, D.; Akamatsu, H.; Otani, H.; Kodama, M.** Pathological evaluation of host-specific AAL-toxins and fumonisin mycotoxins produced by *Alternaria* and *Fusarium* species. *J. Gen. Plant Pathol.* **2006**, 72, 323–327.
- Wu, F.; Mueller, L.A.; Crouzillat, D.; Periard, V.; Tanksley, S.D.** Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: A test case in the Euasterid plant clade. *GSA.* **2006**, 174, 3, 1407–1420.
- 吾郷亜希、赤木靖典、板井章浩、有江 力. **2016**. トマト野生種におけるアルターナリア茎枯病感受性に関与する抵抗性遺伝子 *AscI* の欠失. *日本植物病理学会報* 82, 1, 49.
- 門松昌彦、松浦 堯. **1984**. ミズナラの葉形質の反復率について. *日本林学会北海道支部論文集* 32, 127–129.
- 白石友紀、秋光和也、一瀬勇規、寺岡 徹、吉川信幸. **2012**. *新植物病理学概論*：養賢堂.



澄川敦馬、永井瞭汰、吾郷亜希、赤木靖典、板井章浩、有江 力、児玉基一郎. **2017**. トマト野生種におけるトマトアルターナリア茎枯病菌抵抗性遺伝子 *AscI* の欠失は AAL 毒素感受性に関与する. *日本植物病理学会報* 83, 3, 178.

田上征夫、富川 章、山本敏夫、片桐直衛、甲元啓介、西村正暘. **1984**. トマトの新病害, アルターナリア茎枯病の発生. *関西病虫害研究報* 26: 29–32.

橘 みのり. **1999**. トマトが野菜になった日—毒草から世界一の野菜へ: 草思社

都筑 麟、Arargon, L.M., Blas, R.H., Angel, J., 児玉基一郎、小松 健、有江 力. **2019**. ペルーおよびエクアドルの野生種トマト *Solanum pimpinellifolium* における *AscI* 遺伝子の多様性解析. *日本植物病理学会報* 85, 1, 48.

永井瞭汰、澄川敦馬、吾郷亜希、赤木靖典、板井章浩、有江 力、児玉基一郎. **2018**. トマト野生種におけるトマトアルターナリア茎枯病菌抵抗性遺伝子 *AscI* の欠失による AAL 毒素感受性化. *日本植物病理学会報* 84, 3, 191.

堀本圭一、小玉孝司、小島博文、岡山健夫. **1985**. 奈良県下で発生したトマトのアルターナリア茎枯病. *奈良県農業試験場研究報告* 16, 71–76.

## 要旨

今日における植物の育種は、野生種に存在する優良な形質を選抜することに依存しており、栽培のしやすさ、ストレス耐性の有無など、人類にとって有利に働く形質を選抜し、新品種の作出が行われてきた。このような選抜方法は、植物の単一化をもたらし、栽培管理がしやすくなる一方で、野生種において存在していた遺伝的多様性が保持されにくくなり、病害抵抗性も低下していった。

トマト (*Solanum lycopersicum* L., formerly *Lycopersicon esculentum* Mill; *SLL*) は世界で最も生産されている野菜であり、世界全体で約 500 万ヘクタールにわたって生産されており、収量は約 2 億トンにもなる重要な野菜であるが、その栽培化の歴史は短い。トマトの栽培化の歴史は約 2000 年前に始まり、約 500 年前にスペインの征服軍によって観賞用としてヨーロッパに持ち込まれた。トマトの原産地は南米のアンデス山脈のふもとだと考えられており、現在でも野生種のトマトがエクアドル、ペルー、チリ、ボリビアにわたって広く自生している。栽培化の始まりの地はメキシコだと考えられており、現地のスペイン語では“jitomate criollo” (ヒトマテ クリオージョ) と呼ばれる栽培化と野生種の間である「移行期トマト」が今でもメキシコ山岳部の村の中で継代、保持されている。

トマトの重要病害の 1 つに *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (*Aal*) が引き起こすアルターナリア茎枯病がある。*Aal* は 1975 年にアメリカのカリフォルニア州における cv. *Earlypak 7* の病害発生を皮切りに、その 2 年後の 1977 年に愛知県における cv. 愛知ファーストにおいて病害発生が報告されている。*Aal* は宿主特異的毒素である AAL 毒素を生産し、この毒素がファクターとなって特定の宿主にのみ病気を引き起こす。*Aal* が生産する AAL 毒素はトマトの特定の品種にのみ病斑を形成することが報告されているが、近年では特定の栽

培品種だけではなく、野生種トマトの中でもガラパゴス諸島に自生している *S. cheesmaniae* (SC) および *S. galapagense* (SG) においても AAL 毒素感受性が報告されており、野生種と栽培品種の共通の祖先に AAL 感受性アクセッションが存在するのではないかと研究がおこなわれてきた。AAL 毒素に対する感受性の決定はトマト側の遺伝子である *Asc1* (Alternaria Stem Canker resistance protein 1) 遺伝子に起こる変異の有無によって決定される。*Asc1* はセラミド合成能を司り、セラミドが正常に合成されれば AAL 毒素による細胞の壊死を免れるが、*Asc1* に変異が生じ、セラミドが正常に合成されないと、AAL 毒素によって細胞は壊死する。

AAL 毒素感受性と *Asc1* の関係に注目すると、感受性栽培品種においては *Asc1* 内の 2 塩基欠失が報告されており、感受性野生種トマトにおいては *Asc1* の上流とそのプロモーター領域を含む約 400 bp の大きな欠失が報告されているが、感受性の起源やその獲得の歴史については明らかにされていない。

そこで本研究では野生種トマトにおける *Asc1* 遺伝子には多様性が存在していると仮定し、その遺伝子プールを解析し AAL 毒素感受性と関連付けて考察することで、いつ、どこからトマトは AAL 毒素に対して感受性を示すようになったのか、トマトの栽培化の歴史と共に病原菌の進化の歴史についても考察するべく研究を行った。

今回の研究では 276 アクセッションの野生種トマトと移行期トマトを対象とし、栽培品種トマトの起源である野生種トマトと移行期トマトにおける AAL 毒素感受性の有無を確認し、*Asc1* のシーケンス解析と AAL 毒素感受性の関係をトマトの分子系統樹と合わせて考察した。

その結果、AAL 毒素に感受性を示すアクセッションは全部で 3 アクセッションあり、ペルーの *S. pimpinellifolium* L. (SP) から 1 アクセッション (SP PER018805)、*S. lycopersicum*

var. *cerasiforme* (Dunal) A.Gray (*SLC*) から 1 アクセッション (*SLC* PER018894)、メキシコの *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* “jitomate criollo” (*SLJ*) から 1 アクセッション (*SLJ* M5-3) を見出した。*SLC* PER018894 及び *SLJ* M5-3 は共通の 2 塩基欠失 (nt 854\_855del) を *AscI* の ORF に保持しており、*SP* PER018805 には 1 塩基挿入 (nt 931\_932insT) が確認された。18COSII 領域をもとにした分子系統樹では、S1、S2、および S3 の 3 つのクレードを形成した。クレード S1 は *SC* と *SG* で構成されており、クレード S2 は、*SLL*、*SLJ*、および *SLC* で構成された。クレード S3 は、ペルーとエクアドルの *SLC* および *SP* で構成された。AAL 毒素感受性アクセッション *SP* PER018805 を含む分子系統学的解析に用いたすべての *SP* アクセッションはクレード S3 に属することが明らかになった。2 つの AAL 毒素感受性アクセッションである *SLC* PER018894 および *SLJ* M5-3 は、*SLL* 感受性の食用トマトとともにクレード S2 に属することが明らかになった。*SLC* は *SLL* の祖先であると考えられており、*SLJ* は *SLC* と *SLL* の中間のトマトであるため、2 塩基欠失 (nt 854\_855del) を含む *AscI* 遺伝子と、突然変異のない *AscI* 遺伝子は、トマトの栽培化の歴史を通じてどちらも現代に受け継がれている可能性が示唆された。

植物の育種は通常野生種と交配することで行われるため、野生種の豊富な遺伝資源を保護することは重要な課題である。野生のトマトの豊富な遺伝資源は、この世界的に重要な作物の将来の育種において、重要な役割を果たし続けるだろう。