

トマトモザイクウイルス抵抗性遺伝子 ($Tm-2^a$) に連鎖した DNAマーカーの開発

黒柳 悟¹⁾・福田至朗¹⁾・高橋麗子¹⁾・浅見逸夫¹⁾

摘要：トマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus*) 抵抗性遺伝子 ($Tm-2^a$) に連鎖するDNAマーカーの開発のため、抵抗性遺伝子 $Tm-2^a$ 、 $Tm-2$ 及び罹病性遺伝子 $tm-2$ の塩基配列を比較して、3つの遺伝子を増幅するプライマーセットを設計した。このプライマーセットを用いたPCRにより約670 bpの断片が増幅された。この断片を制限酵素 *AflII* で切断処理したところ、 $Tm-2^a$ を保有する品種では約320 bpと約200 bpに特異的な断片を検出し、 $Tm-2^a$ を保有しない品種では約520 bpに特異的な断片を検出した。また、 $Tm-2^a$ のヘテロ接合体品種では約520 bp、約320 bp及び約200 bpの3つの断片を検出した。この結果、ホモ接合体及びヘテロ接合体を判定できる共優性マーカーを開発することができた。

次に、開発したDNAマーカーの正確性を確認するために生物検定を行った。トマトモザイクウイルスを「桃太郎8」のF₂個体に接種し、抵抗性と感受性を判定した結果、DNAマーカーによる検定結果と一致した。これにより、トマト育種で利用できるトマトモザイクウイルス抵抗性遺伝子 ($Tm-2^a$) に連鎖したDNAマーカーの実用性を確認した。

キーワード：トマト、トマトモザイクウイルス、 $Tm-2$ 、DNAマーカー、制限酵素

Development of a DNA Marker Tightly Linked to the Tomato Mosaic Virus Resistance Gene $Tm-2^a$

KUROYANAGI Satoru, FUKUTA Shiro, TAKAHASHI Reiko and ASAMI Itsuo

Abstract: We attempted to develop a DNA marker linked to the tomato mosaic virus resistance gene $Tm-2^a$. A primer set was designed by comparing the sequences of the resistance genes $Tm-2^a$ and $Tm-2$ with that of the susceptible gene $tm-2$. The primers yielded 670 bp amplified fragments, as revealed by polymerase chain reaction. Digestion of the amplified fragments using the restriction enzyme *AflII* yielded 320 and 200 bp fragments indicating the presence of the resistance gene $Tm-2^a$ in the homozygote lines. The presence of a 520 bp fragment indicated the absence of $Tm-2^a$ in the homozygote lines. Presence of both the 520 bp and the 320 and 200 bp fragments indicated the presence of $Tm-2^a$ in heterozygote lines. Thus, we developed a DNA marker that could identify $Tm-2^a$ in both homozygote and heterozygote lines.

A bioassay was conducted to confirm the availability of the developed DNA marker. The tomato mosaic virus was inserted into the F₂ individuals of 'Momotaro eight'. This led to the development of resistance in some F₂ populations, whereas some remained susceptible. The bioassay results were confirmed using the DNA marker results. This study confirmed that the DNA marker linked to the tomato mosaic virus resistance gene $Tm-2^a$ will be practical use in breeding tomatoes.

Key Words: Tomato, *Tomato mosaic virus*, $Tm-2^a$, DNA marker, Restriction enzyme

緒言

トマトのモザイク病はトマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus*, ToMV) の感染によって発生し、葉脈を中心に黄色、淡黄緑色のモザイク症状が現れ、ときに葉が小型になったり奇形になることもあり、トマトの最も重要な病害となっている¹⁾。近年、トマトの商業品種はToMV抵抗性を保有していることから、新品種育成の際には、確実にToMV抵抗性形質を保有させる必要がある。ToMV抵抗性遺伝子には、*Tm-1*、*Tm-2*及び*Tm-2^a*があるが、*Tm-2^a*を持った品種は、ToMVに強い抵抗性を示す²⁾。そのため、*Tm-2^a*を保有した品種が主流になっている。

育種選抜において、生物検定で選抜することは、他の形質の評価が困難になるばかりでなく、検定のために多大な労力と時間を要する。さらに、現在のトマト品種には、ToMV抵抗性の他、トマト葉かび病抵抗性、黄化葉巻病抵抗性など、複数の病害抵抗性形質も具備する必要がある、これら複数の生物検定を同時に行うには莫大な労力を要する。そこで、それぞれの病害抵抗性遺伝子に連鎖したDNAマーカーを利用した育種選抜が行われるようになってきている³⁾。DNAマーカーの利用は、育種年限の短縮や抵抗性個体の確実な選抜など、育種の効率化に大きく役立っている。愛知県農業総合試験場においても、トマト育種選抜用のDNAマーカーとして、ToMV抵抗性⁴⁾、ネコブセンチュウ抵抗性⁵⁾、萎凋病抵抗性⁶⁾、葉かび病抵抗性⁷⁾、黄化葉巻病抵抗性⁸⁾に連鎖したDNAマーカーを開発している。

DNAマーカーを利用した育種選抜では、多くのサンプルを短期間で検定する必要があるため、DNA抽出作業の労力と時間は少ない方が望ましい。2005年に石田ら⁴⁾が開発したToMV抵抗性遺伝子 (*Tm-2^a*) に連鎖するDNAマーカーは、CTAB法⁹⁾やDNA抽出キットのDNeasy Plant Mini Kit (株式会社キアゲン、東京) で抽出したDNAでは、明瞭なPCR増幅断片を確認することができる。しかし、村元ら¹⁰⁾の報告したガラス繊維濾紙法などの簡易な方法で抽出したDNAを利用して検定したところ、明瞭なPCR増幅断片を確認することができなかった。また、石田ら⁴⁾が開発したDNAマーカーは、RAPD法から作成したもので、*Tm-2^a*そのものから作成したのではないため、確実に*Tm-2^a*の保有を判定できるものではないことから、新たなDNAマーカーを開発をする必要があった。

そこで本研究では簡易で安価な方法で抽出したDNAでも確実にToMV抵抗性遺伝子 *Tm-2^a* の保有を判定することができるDNAマーカーの開発を試み、成果が得られたので報告する。

材料及び方法

1 供試材料

供試品種には、ToMV抵抗性品種として、抵抗性遺伝

子 *Tm-2* をホモ接合体で保有する「GCR236」¹¹⁾、抵抗性遺伝子 *Tm-2^a* をホモ接合体保有する「GCR267」¹¹⁾「PASK1」¹²⁾、*Tm-2^a* をヘテロ接合体で保有する「桃太郎8」「ハウス桃太郎」(タキイ種苗株式会社、京都)、*Tm-2* 及び *Tm-2^a* を保有しない感受性品種として「愛知純系ファースト」(愛知県農業総合試験場)「強力米寿」「大型福寿」(タキイ種苗株式会社、京都) の合計8品種を用いた。

2 DNA抽出

新鮮な葉2.5 gからCTAB法⁹⁾によりDNAを抽出した。得られたDNAは、トリス-EDTA緩衝液(以後TE: 10 mmol/m³ トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl)、1 mmol/m³ EDTA) 500 μ Lに定溶し鑄型DNAとして用いた。分光光度計 (UbestV-520、日本分光株式会社、八王子) により鑄型DNAの原液濃度を算出し、1/10TEで10 ng/ μ Lに調整して用いた。

また、簡易で安価な方法で抽出したDNAでも確実に検出できるかを確認するため、次の方法でDNAを抽出した(以下簡易CTAB法とする)。トマトの幼葉を50~100 mgを1.5 mLチューブに入れ、1.5 \times CTABを100 μ Lと3.0 mmのジルコニアビーズを添加して、Tissue Lyser (株式会社キアゲン、東京) を用い30回/秒で120秒間、葉を粉碎した。粉碎した液を55°Cで10分加温した後、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を100 μ L添加してボルテックスした後、17609 \times gで10分間遠心分離した。上清に2-プロパノールを100 μ L添加して混和後、17609 \times gで10分間遠心した。沈殿を70%エタノール200 μ Lで洗浄して、エタノールを除去後、真空乾燥させ、50 μ Lから100 μ LのTEを加え溶解した。

3 プライマーの設計と制限酵素認識部位の確認

DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されているToMV抵抗性遺伝子 *Tm-2^a* (Genbank Accession No. AF536201) とToMV抵抗性遺伝子 *Tm-2* (Genbank Accession No. AF536200) 及び感受性 *tm-2* (Genbank Accession No. AF536199) の塩基配列を比較して、すべての遺伝子をPCRで増幅するプライマーセットTMKS-1 (Forwardプライマー: 5'-GCTCACACGTCTAGAGACCA-3', Reverseプライマー: 5'-TCCGTGCACGTTACTTCAGA-3') を設計した。さらに、解析ソフトDNASIS Pro (株式会社日立ソリューションズ、東京) を用いて、多型を検出するための制限酵素の認識部位を検索した。

4 PCR及び制限酵素処理による多型解析

PCR反応組成液は、2.0 μ Lの10 \times 反応緩衝液 (100 mol/m³ Tris-HCl (pH8.3)、500 mol/m³ 塩化カリウム、15 mol/m³ 塩化マグネシウム、0.01% (w/v) ゼラチン)、2.0 μ Lの2 mol/m³ dNTP Mixture、1.0 μ Lの0.01 mol/m³ Forwardプライマー、1.0 μ Lの0.01 mol/m³ Reverseプライマー、0.1 μ LのAmpli Taq Gold DNAポリメラーゼ (5U/ μ L、ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京)、1.0 μ Lの鑄型DNA (10 ng/ μ L)、12.9 μ Lの滅菌水を混合し全量20 μ Lに調製した。サ

ーマルサイクラーは、PC-320（株式会社アステック、福岡）を用いた。PCR条件は、初期活性化ステップを94℃10分、変性94℃1分、アニーリング60℃1分、伸長72℃2分を1サイクルで、40反復行い、最終伸長を72℃10分とした。

PCR増幅断片を含む反応液（以後PCR産物とする）5.0 μ Lに、1.0 μ Lのローディング緩衝液（グリセリン25%、ブロムフェノールブルー0.25%、キシレンシアノール0.25%、滅菌水74.5%）を加え、1.0%アガロースゲルで、電気泳動装置（ミューピッド、株式会社アドバンス、東京）を用いて100 Vで25分間電気泳動した。その後、エチジウムブロマイドで10分間染色し、紫外線照射・撮影装置（FASIII、東洋紡績株式会社、大阪）によって撮影し、PCR増幅断片を検出した。

PCR産物を制限酵素AflII（ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社、東京）で切断処理した。反応液は0.5 μ L（10 U/ μ L）の制限酵素、1.0 μ LのNEB緩衝液4（50 mol/m³、酢酸カリウム（C₂H₃KO₂）、20 mol/m³トリス酢酸（Tris-C₂H₄O₂）、10 mol/m³酢酸マグネシウム4水和物（C₄H₁₄MgO₈）、1 mol/m³ DDT）、7.0 μ LのPCR産物、1.5 μ Lの滅菌水を混合し全量を10 μ Lに調製した。その後、37℃で120分間処理した。

制限酵素で切断処理したPCR産物10 μ Lにローディング緩衝液1.0 μ Lを加え、2.0%アガロースゲルで、電気泳動装置を用いて100 Vで30分間電気泳動した。その後、エチジウムブロマイドで10分間染色し、上記撮影装置によって切断断片を検出した。

5 トマトモザイクウイルスの接種による生物検定

開発したDNAマーカーの正確性を確認するために、抵抗性品種「桃太郎8」を自殖して得たF₂18個体を用い、トマトモザイクウイルスの接種試験を行った。

接種には、播種後約6週間経過し、本葉が5枚展開した苗を用いた。ToMV感染葉に5倍量の0.1 Mリン酸緩衝液（pH 7.0）を添加して磨砕し、あらかじめカーボンランダムをふりかけておいたトマトの葉の表面に綿棒で磨砕液をこすりつけ、すぐに水道水で洗い流した。その後、ガラス温室内で2週間栽培し、モザイク症状の発生を調査して抵抗性または感受性の形質評価を行った。

結 果

1 *Tm-2^o*を保有するToMV抵抗性個体を判定するDNAマーカーの作出

感受性 *tm-2*ならびにToMV抵抗性遺伝子 *Tm-2^o* と *Tm-2* を比較したところ、配列の異なる部位が数か所あった。その中に *Tm-2^o* の配列のみ制限酵素AflIIの切断認識部位「5' -CTTAAG-3'」が2か所あることが分かった（図1）。

プライマーセットTMKS-1でPCRを行ったところ、*Tm-2^o* を保有する品種、*Tm-2*を保有する品種及び感受性品種

の全8品種すべてで約670 bpの増幅断片が検出された（図2）。この増幅断片を制限酵素AflIIで処理したところ、約160 bp、約200 bp、約320 bp及び約520 bpの断片が検出された（図2）。この結果を遺伝子型と比較したところ、*Tm-2^o* を保有する品種は、約200 bpと約320 bpの断片を有し、*Tm-2^o* を保有しない品種は、約520 bpの断片を有することが確認できた。さらに *Tm-2^o* をヘテロ接合体で保有する品種は、約200 bp、約320 bp及び520 bpの3つの断片を有することが確認できた。したがって、*Tm-2^o* を保有するToMV抵抗性個体を判別できる共優性マーカーを作出することができた。

2 トマトモザイクウイルスの接種による生物検定

ToMVを接種した各個体の幼葉から簡易CTAB法で抽出したDNAを用いて、DNAマーカーによる *Tm-2^o* の保有を判定すると同時に生物検定によるToMVの発病を調査した。

その結果、DNAマーカーによる検定では、簡易CTAB法で抽出したDNAを用いても明瞭なPCR増幅断片を検出することができ、制限酵素による切断処理も十分に可能であった（図3）。したがって、簡易CTAB法により抽出したDNAでも検定が可能なDNAマーカーであることを確認した。次に生物検定において、DNAマーカーで *Tm-2^o* を保有しないと判定した個体では、葉にモザイクの症状が現れ（図4）、*Tm-2^o* を保有すると判定した個体ではモザイクの症状が現れなかった（図3、表1）。DNAマーカーと生物検定の結果が一致したことから、DNAマーカーの正確性を確認できた。

考 察

本DNAマーカーの開発にあたり、DDBJに登録されている *Tm-2^o*、*Tm-2*及び感受性 *tm-2* の塩基配列を比較し、異なる塩基配列部位を特定した。さらに解析ソフトの利用によって、その異なる塩基配列の部位に *Tm-2^o* のみ、制限酵素AflIIで切断される配列があることが確認できた。ここまでの解析をシーケンスなどの実験操作を行うことなく、プライマーセットの設計とPCR及び制限酵素処理による多型の検出でも想定通りの結果が得られたので、既存の塩基配列情報等がDNAマーカー作出に非常に有効であることが実証できた。

生物検定により、*Tm-2^o* の保有についてDNAマーカーの正確性を確認することができた。しかし、生物検定では *Tm-2^o* の遺伝子型（ホモ接合体、ヘテロ接合体）の判定ができない。そこで、遺伝子型を確認するために石田ら⁴⁾の開発したDNAマーカーを用いてF₂の遺伝子型の検定を行ったところ、本研究で開発したDNAマーカーと遺伝子型の結果が一致した（データ未掲載）。したがって、遺伝子型の判定もできる共優性マーカーとしての正確性も確認することができた。

さらに、石田ら⁴⁾の開発したDNAマーカーは、簡易CTAB法のような方法で抽出したDNAを利用した場合、PCR増幅断片の検出が不明瞭なことがあった。これは、

感受性	:	1981	gtgaaaactgccaaatagtagtattgtcaagctcacacgtctagagaccatagacattgatc	2040
<i>Tm-2</i>	:	1980	gtgaaaactgccaaatagtagtattgtcaagctcacacgtctagagaccatagacattgatc	2039
<i>Tm-2^o</i>	:	8041	gtgaaaactgccaaatagtagtattgtcaagctcacacgtctagagaccatagacattgatc	8100
TMKS-1 Foward primer				
感受性	:	2041	gacgtagcctcattcaacctccttctggtgtttgggagtctaaacatttgagacatcttt	2100
<i>Tm-2</i>	:	2040	gacgtagcctcattcaacctccttctggtgtttgggagtctaaacatttgagacatcttt	2099
<i>Tm-2^o</i>	:	8101	gacgtagcctcattcaacctccttctggtgtttgggagtctaaacatttgagacatcttt	8160
感受性	:	2101	gttatagagattatggacaagcatgtaacagttgcttttctataagctcattttacccaa	2160
<i>Tm-2</i>	:	2100	gttatagagattatggacaagcatgtaacagttgcttttctataagctcattttacccaa	2159
<i>Tm-2^o</i>	:	8161	gttatagagattatggacaagcatgtaacagttgcttttctataagctcattttacccaa	8220
感受性	:	2161	acatttactcattgcatcctaacaatctacaaaccttgatgtggataacctgataaatttt	2220
<i>Tm-2</i>	:	2160	acatttactcattgcatcctaacaatctacaaaccttgatgtggataacctgataaatttt	2219
<i>Tm-2^o</i>	:	8221	acatttactcattgcatcctaacaatctacaaaccttgatgtggataacctgataaatttt	8280
感受性	:	2221	ttgaaccgaggttgttgcaccgattgatcaatttaagaaaactgggtatactgggagtgt	2280
<i>Tm-2</i>	:	2220	ttgaaccgaggttgttgcaccgattgatcaatttaagaaaactgggtatactgggagtgt	2279
<i>Tm-2^o</i>	:	8281	ttgaaccgaggttgttgcaccgattgatcaatttaagaaaactgggtatactgggagtgt	8340
感受性	:	2281	ccaattcaaccgttaagatattatcaacatgtcgccctgtgccaaggcgctaaagggttc	2340
<i>Tm-2</i>	:	2280	ccaattctaccgttaagatgttatcaatatttagccctgtgctcaaggcgctggaggttc	2339
<i>Tm-2^o</i>	:	8341	ccaattctaccgttaagatgttatcaatatttagccctgtgcttaaggcgctggaggttc	8400
<i>AfI</i> II				
感受性	:	2341	tgaagctcaggtttttcagtgatccgagtgagcaataaacttgtcatcctatccaaaaa	2400
<i>Tm-2</i>	:	2340	tgaagctcaggtttttccagtgacccgagtgaaacaataaagttgtcatcgtatccacata	2399
<i>Tm-2^o</i>	:	8401	tgaagctcaggtttttccagtgacccgagtgaaacaataaagttgtcatcgtatccacata	8460
感受性	:	2401	ttgttaagttgcatttgaatggtgacagaacaatagccttgaactctgaagcattccctc	2460
<i>Tm-2</i>	:	2400	ttgctaagttgcatttgaatggttaacagaacaatggccttgaactctcaatcatttcctc	2459
<i>Tm-2^o</i>	:	8461	ttgctaagttgcatttgaatggttaacagaacaatggccttgaactctcaatcatttcctc	8520
感受性	:	2461	caaatattatcaagcttactcttctgtctttaggtagacagttgtctactggcagtgcc	2520
<i>Tm-2</i>	:	2460	caaatctcatcaagcttactctagccaactttacggtagaccgttatatactggcagtac	2519
<i>Tm-2^o</i>	:	8521	caaatctcatcaagcttactctagccacttttagttagaccgttatatactggcagtac	8580
感受性	:	2521	ttaagacattacccaaattaagaaaacttaaaatggtcatctgcaagtataatgaagaaa	2580
<i>Tm-2</i>	:	2520	ttaagacatttccaaattaagaaaacttaaaatggtcatctgcaagtataatgaagaaa	2579
<i>Tm-2^o</i>	:	8581	ttaagacatttccaaattaagaaaacttaaaatggtcatctgcaagtataatgaagaaa	8640
<i>AfI</i> II				
感受性	:	2581	agatggctctctcgggagaggcaaatggttatagctttccgcaacttgaagttttgcata	2640
<i>Tm-2</i>	:	2580	agatggatctctcgggagaggcaaatggttatagctttccgcaacttgaagttttgcata	2639
<i>Tm-2^o</i>	:	8641	agatggatctctcgggagaggcaaatggttatagctttccgcaacttgaagttttgcata	8700
感受性	:	2641	ttcatagcccgaatgggttgtctgaagtaacatgacggatgatgtcagtatgccaaat	2700
<i>Tm-2</i>	:	2640	ttcatagcccgaatgggttgtctgaagtaacatgacggatgatgtcagtatgccaaat	2699
<i>Tm-2^o</i>	:	8701	ttcatagcccgaatgggttgtctgaagtaacatgacggatgatgtcagtatgccaaat	8760
TMKS-1 Reverse primer				

図1 *Tm-2^o*、*Tm-2*、感受性の塩基配列の比較

注) 数字はDDBJに登録されている塩基配列を示す。

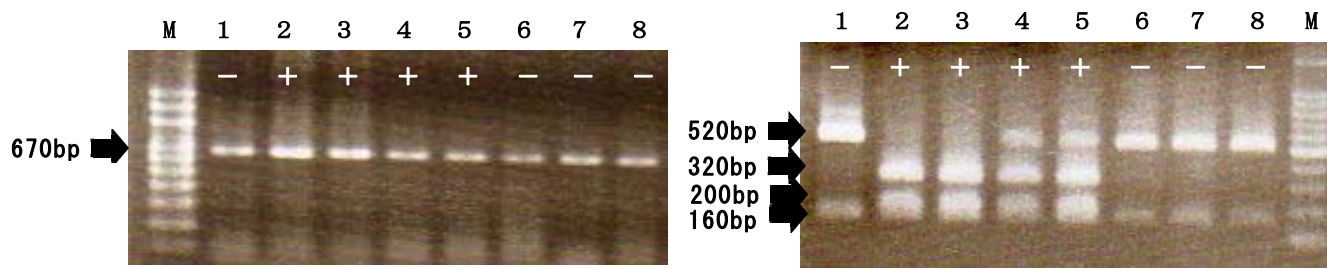


図2 プライマーセットTMKS-1によるPCRの電気泳動像（左図）とその増幅断片を用いた制限酵素AflII処理後の電気泳動像（右図）

M : 100bp ladder 1 : GCR236 ($Tm-2/Tm-2$) 2 : GCR267 ($Tm-2^a/Tm-2^a$) 3 : PASK1 ($Tm-2^a/Tm-2^a$)
 4 : 桃太郎8 ($Tm-2^a/tm-2^a$) 5 : ファーストパワー ($Tm-2^a/tm-2^a$) 6 : 愛知純系ファースト ($tm-2^a/tm-2^a$)
 7 : 強力米寿 ($tm-2^a/tm-2^a$) 8 : 大型福寿 ($tm-2^a/tm-2^a$)

+ : $Tm-2^a$ を保有する品種 - : $Tm-2^a$ を保有しない品種

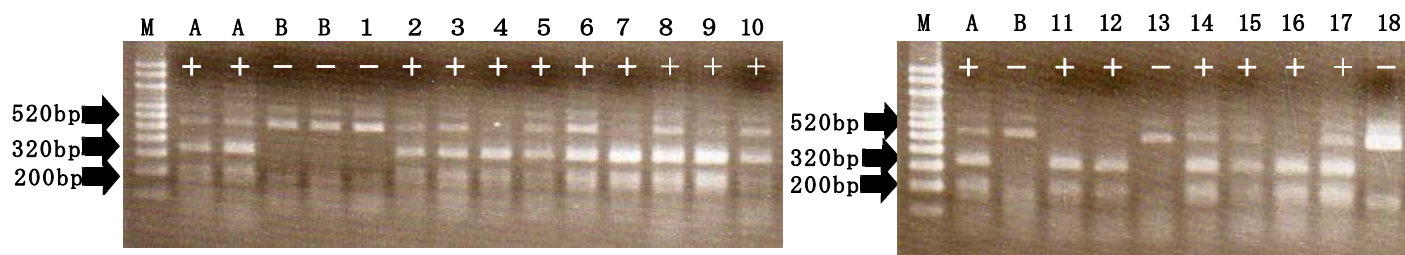


図3 プライマーセットTMKS-1によるPCRと制限酵素AflII処理による桃太郎8F₂個体のマーカー検定

M : 100bp ladder A : 桃太郎8 B : 強力米寿 1~18 : 桃太郎8F₂個体の番号
 + : PCR増幅断片検出 ($Tm-2^a$ 有) - : 検出なし ($Tm-2^a$ 無)



図4 ToMVの接種によりモザイク症状が現れた感受性個体の葉

石田ら⁴⁾が開発したDNAマーカーの増幅断片が1200 bp、1400 bpと比較的長いことが原因ではないかと考えた。そこで今回、我々は670 bpと約半分の長さにしたことで、簡易CTAB法で抽出したDNAを用いても明瞭な増幅断片を検出できたと考えられる。さらに、本研究で開発したDNAマーカーは、ToMV抵抗性遺伝子 $Tm-2^a$ の塩基配列を利用して作成しているため、RAPD法から作成した石田ら⁴⁾ DNAマーカーと異なり、確実に $Tm-2^a$ の保有の有無を検定することができる。

本研究で開発したToMV抵抗性DNAマーカーとともに、愛知県農業総合試験場が開発した、ネコブセンチュウ抵抗性⁵⁾、萎凋病抵抗性⁶⁾、葉かび病抵抗性⁷⁾及び黄化葉巻病ウイルス抵抗性⁸⁾ DNAマーカーと併せて、1回のDNA抽出で、複数の抵抗性の有無とその遺伝子型も簡易に判定することができるので、複合病害抵抗性トマト育種の効率化に一層役立てることができる。

表1 「桃太郎8」自殖F₂個体におけるToMV接種検定結果

自殖後代個体と品種名	症状	判定	マーカー検定
桃太郎 8F ₂ -1	M	S	S
桃太郎 8F ₂ -2	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -3	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -4	—	R	R
桃太郎 8F ₂ -5	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -6	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -7	—	R	R
桃太郎 8F ₂ -8	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -9	—	R	R
桃太郎 8F ₂ -10	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -11	—	R	R
桃太郎 8F ₂ -12	—	R	R
桃太郎 8F ₂ -13	M	S	S
桃太郎 8F ₂ -14	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -15	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -16	—	R	R
桃太郎 8F ₂ -17	—	R	H
桃太郎 8F ₂ -18	M	S	S
桃太郎 8-1	—	R	H
桃太郎 8-2	—	R	H
強力米寿-1	M	S	S
強力米寿-2	M	S	S

M:モザイク症状 —:無病徴

R:抵抗性 S:感受性 H:抵抗性(ヘテロ接合体)

引用文献

1. 植物ウイルス研究所編. 野菜のウイルス病. 養賢堂. 東京. p. 1-19(1984)
2. 山川邦夫. 新版野菜の病害虫—診断と防除—. 全国農村教育協会. 東京. p. 607-627(1982)
3. 大澤良. 野菜育種におけるDNAマーカーの利用. 園学研究. 3(1), 1-6(2004)
4. 石田朗, 福田至朗, 水上優子, 大矢俊夫, 神戸三智雄. トマトのTMV抵抗性遺伝子 (*Tm-2^a*) と連鎖するRAPDマーカーSTS化. 愛知農総試研報. 37, 99-103(2005)
5. 黒柳悟, 石田朗, 福田至朗, 大矢俊夫. トマトのネコブセンチュウ抵抗性遺伝子 (*Mi*) に連鎖したDNAマーカーの開発. 愛知農総試研報. 40, 35-40(2008)
6. 福田至朗, 黒柳悟, 大藪哲也, 大矢俊夫. トマト萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) レース2の抵抗性遺伝子 *I-2* に連鎖するDNAマーカーの開発. 愛知農総試研報. 40, 41-46(2008)
7. 黒柳悟, 福田至朗, 山田真人. トマト葉かび病抵抗性遺伝子 (*Cf-9*) に連鎖したDNAマーカーの開発. 愛知農総試研報. 42, 15-22(2010)
8. 福田至朗, 吉川友紀, 田中哲司, 加藤政司, 山田真人. 「Athyla」由来のトマト黄化葉巻病抵抗性遺伝子 *Ty-1* に連鎖する共優性DNAマーカーの開発. 愛知農総試研報. 42, 7-14(2010)
9. 渡辺格, 杉浦昌弘. クローニングとシーケンス植物バイオテクノロジー実験マニュアル. 農村文化社. 東京. p. 252-256(1989)
10. 村元靖典, 沢野定憲. ガラス繊維濾紙を利用した植物からの迅速・簡便・低コストなDNA抽出法. 関東東海北陸農業・生物工学成果情報. (2005)
11. Ohmori. T, Murata. M and Motoyoshi. F. Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in tomato. Theor Appl Genet, 90, 307-311(1995)
12. 菅原真治, 榎本真也, 大藪哲也, 矢部和則, 野口博正. 完熟収穫型単為結果性トマト品種「ルネッサンス」の育成経過と特性. 愛知農総試研報. 34, 37-42(2002)