

D N A マーカーを利用して
4種類の重要形質を備えた
リンゴの実生個体を
早期に選抜する手法の開発

森谷茂樹

緒 言

リンゴは、新エングラ体系（1964）の分類ではバラ科 Rosaceae, ナシ亜科 Maloideae, リンゴ属 *Malus* に分類され、APG 分類体系（APG III, 2009）ではバラ科 Rosaceae, シモツケ亜科 Spiraeoideae, ナシ亜連 Pyrinae, リンゴ属 *Malus* に分類されている植物である。リンゴ属の基本種は約 30 種あるとされており、北半球の温帯域に分布している。最も一般的な 2 倍体の染色体数は $2n = 2x = 34$ であり、3 倍体や 4 倍体も存在する。現在、わが国において経済栽培されているセイヨウリンゴ（単にリンゴとも呼ばれる。 *M. × domestica*）は、カスピ海と黒海に挟まれたコーカサス山脈地域から中央アジアに分布している *M. sieversii* を起源とし、ヨーロッパ原生の *M. sylvestris* や *M. orientalis*, およびアジア原生の *M. prunifolia*, *M. baccata* などとも自然交雑を繰り返して、ヨーロッパにおいて成立した栽培品種群であると考えられている（阿部, 2010）。その後、ヨーロッパからの移民の手でアメリカ大陸に栽培品種が導入された後に、ヨーロッパ品種の実生から当地の環境に適した個体が選抜されて、アメリカ系の多数の品種が成立した。日本には、明治初期にヨーロッパとアメリカから多数の栽培品種が導入されて試作された。栽培品種が日本に導入された当初、漢字で記載する場合は在来のリンゴ属植物の名称である林檎（りんご、またはりんきん）と区別されて苹果（りんご）などと記載されたが、次第に再び林檎（りんご）と記載されるようになっていく。試作された品種の中から、アメリカで育成された品種の ‘Ralls Janet’（日本名：‘国光’）と ‘Jonathan’（日本名：‘紅玉’）が当時の主要品種として定着した。

その後の日本において、リンゴは日常の食卓や贈答用の進物として定着したことで生産量は増加し、昭和から平成にかけて一時は 100 万 t を超える生産量を記録した。しかし、その後の生産量は減少し、2012 年（平成 24 年）の生産量は 79 万 t, 栽培面積は 37,400 ha となっている。それでもなお、日本の果樹の中ではウンシュウミカンに次いで第 2 位の、1,316 億円（2011 年：平成 23 年）

の生産額を誇っている。

明治時代の日本に主要品種として定着した‘Ralls Janet’は肉質と着色が劣り、‘Jonathan’は貯蔵障害が発生しやすいという問題を抱えていたので、品種更新によって克服する目的で、交雑育種の取り組みが開始された。日本における計画的な交雑育種の端緒は、20世紀初頭の1909年（明治42年）に青森県の民間育種家である前田顕三によって開始された例であるといわれている。公的機関としては、1928年（昭和3年）に開始された青森県農事試験場園芸部（青森県黒石市）、現・地方独立行政法人青森県産業技術センターりんご研究所（以下、（地独）青森県産技センターりんご研究所と略す）や、1939年（昭和14年）に開始された農林省園芸試験場（青森県藤崎町、その後1961年（昭和36年）に岩手県盛岡市に移転）、現・（独）農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所（以下（独）農研機構果樹研究所と略す）の例が挙げられる。その成果として、青森県りんご試験場、現・（地独）青森県産技センターりんご研究所から1975年（昭和50年）に早生の‘つがる’が、農林省園芸試験場、現・（独）農研機構果樹研究所から1962年（昭和37年）に晩生の‘ふじ’が育成され、今日の主要品種となっている。さらに、極めて高品質なリンゴ果実に対する日本の消費者の強い要望に応えるために、（独）農研機構果樹研究所等の公立機関や、民間育種家によってリンゴの交雑育種が現在においても継続されている。

栽培品種の苗木は接ぎ木繁殖されているが、近代に至るまで、台木として用いられていた植物は栽培品種や栽培品種に近縁なリンゴ属野生種を種子繁殖させた実生苗であったので、リンゴの台木として用いる植物に対しては栽培品種のような品種の概念がなかった。その後、取り木や挿し木などの方法で台木が栄養繁殖されるようになった19世紀に、台木に対する品種の概念が生まれたと考えられている（Webster・Wertheim, 2003）。そして、20世紀初めにイギリスのイースト・モーリング試験場において、台木用品種の選抜事業および交雑育種が世界に先駆けて行われ、その成果として、台木として用いたときに、穂木として接ぎ木された品種がわい化する‘M. 9’と‘M. 8’を含む台木用品種（M

系台木)が発表されている。日本では、(独)農研機構果樹研究所において日本の環境条件に適したわい性台木の育成を目標とする台木用品種の交雑育種が行われ、‘JM1’、‘JM7’などのJM系の台木用品種5品種が育成されている(副島ら, 2010, 2013)。

リンゴの交雑育種は、1代の交雑とその後の個体選抜で成り立っている(山田, 2011)。しかしながら、いくつかの要因が個体選抜の効率化を妨げている。たとえば、栽培品種と台木用品種の両者において、リンゴの苗木1個体の占める圃場面積は野菜や花卉やイネなどと比較して極めて大きいので、交雑育種を行う圃場の利用効率が悪い。さらに、リンゴは播種後の一定期間、花芽を形成しない性質(幼若性)を有するので、播種後少なくとも5年以上を経過しないと、開花・結実して果実を収穫することができない。穂木として栽培して果実を利用する栽培品種の育種においては、そうして初めて、最も重要である果実形質の選抜を始めることができる。また、台木として根系を利用する台木用品種の交雑育種においては、交雑して得られた個体を台木として用いて、栽培品種を穂木として接ぎ木した場合の特性を調べる台木試験を行う必要がある。しかしながら、交雑して得られた多数の個体について特性を評価しようとする、10年以上の長期間にわたる大規模な試験を要する。そこで、台木用品種を効率的に育種するには、台木試験を始めるまでに、交雑して得られた多数の個体からできるだけ少数の有望個体を選抜することが重要である。

以上のように、リンゴの交雑育種には果実を利用する栽培品種の育種においても、根系を利用する台木用品種の育種においても長い時間と多くの労力を要するので、これらを削減して効率を上げることが求められている。リンゴの交雑育種にかかる時間と労力を削減するには、一般に以下の2つの方法が考えられる。

第1の方法は、開花および結実に至るまでの期間を短縮することである。この方法はさらに、交雑して得られた個体の穂木をわい性台木へ接ぎ木する(Tydeman・Alston, 1964)などの耕種的方法によって開花を促す方法と、遺伝

子組換え技術を用いて花成関連遺伝子等の発現を制御して開花を早める方法 (Flachowsky et al., 2011, 2012; Kotoda et al., 2006) に分けられる。わい性台木への接ぎ木は、すでに育種現場で取り入れられている技術である一方、花成関連遺伝子の制御に関しては、遺伝子組換え体を育種の過程に利用することに対する理解が得にくいという社会的背景があるので、海外での利用例はあるものの (Le Roux et al., 2012)、日本国内においては実用的とは言えない状況にある。さらに、早期開花を促す方法は果実の特性を問われる栽培品種の育種には有利であるが、個体選抜の過程において果実の特性を問われない台木用品種の育種の効率化には繋がらない。

第2の方法は、幼若期の間に、選抜の対象となる耐病性や樹の特性などの形質について調査と判定を行い、その結果を基に個体の選抜を行って、圃場に定植する個体数をあらかじめ絞り込むことである。このような方法を早期選抜法と言い、選抜を行わない場合と比較して、苗木の定植段階から圃場の面積を削減できるという利点がある。一方で、開花・結実時期は早まらないので、1世代あたりの選抜に要する年数が必ずしも短くなるわけではないという課題が残る。早期選抜法は、栄養系の器官で検定できる耐病性などの形質の表現型に基づいて選抜する方法 (表現型選抜法) と、ある形質を支配する遺伝子もしくは遺伝子に連鎖する塩基配列から開発された DNA マーカーの遺伝子型に基づいて選抜する方法 (DNA マーカー選抜法) に分けられる。

表現型選抜法では、苗の生育ステージや検定期間などの環境要因に検定結果が影響されたり、検定に長期間を要するという問題がある。一方、DNA マーカー選抜法では、抽出した DNA を用いて、形質の種類を問わずに汎用性の高い手法を用いて解析可能であるとともに、短時間で定性的な結果が得られることから、表現型選抜法よりも優位性があるといえる。さらに、表現型選抜法では複数の形質について同時に検定することができない場合があるが、DNA マーカー選抜法ではそのような問題は生じない。DNA マーカーの開発と分析には一定の期間や費用がかかるが、近年のゲノム研究や技術の進展に伴って、この問題

は解決しつつある。したがって、開花を促進する手法よりも早期選抜法の方が高い汎用性を有し、さらに、早期選抜法の中では、表現型選抜法よりも DNA マーカー選抜法の方が応用できる範囲が広いので、優位性があると考えられている。以上のように、リンゴの交雑育種を効率化するためには、DNA マーカーを用いた早期選抜の手法を開発することが必要である。

選抜に用いられる DNA マーカーの種類として、形質の発現に関わる遺伝子の塩基配列から開発された DNA マーカーと、そのような遺伝子（形質）と一定の遺伝距離で連鎖している塩基配列から開発された DNA マーカーが挙げられる。形質の発現に関わる遺伝子から開発された DNA マーカーの例として、果実の収穫前に起きる生理落果に関わる *MdACSI* (*M. × domestica 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase*; Sato et al., 2004) や、果皮の着色性に関わる *MdMYB1* (*M. × domestica myeloblastosis*; Takos et al., 2006; Ban et al., 2007) から開発された DNA マーカーが挙げられる。遺伝子の塩基配列から開発された DNA マーカーには、塩基配列の挿入・欠失や 1 塩基多型 (SNP) を利用した DNA マーカーがよく用いられる。しかしながら、ある形質の発現には多数の遺伝子に関わっており、形質の発現を決定する鍵となる遺伝子を、発現解析などの手法によって見出せる例は多くない。そのような場合には、遺伝解析の手法を用いて、遺伝子（形質）と一定の遺伝距離で連鎖する DNA マーカーを開発することが有効である。

遺伝子（形質）と一定の距離で連鎖する DNA マーカーを開発する基盤となるリンゴの連鎖地図に関する研究は、2000 年以降に飛躍的な発展を遂げている。最も顕著な成果は、共優性を示す simple sequence repeat (SSR) マーカー等の DNA マーカーが多数位置付けられていて、リンゴの染色体基本数である $x = 17$ に等しい連鎖群で構成された飽和標準連鎖地図が発表されたことである (Silfverberg-Dilworth et al., 2006)。この成果によって、形質に連鎖する DNA マーカーを効率的に開発する基盤が整い、選抜に利用される DNA マーカーとして randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) マーカーを基にして改変され

た sequence characterized amplified region (SCAR) マーカーに加えて、SSR マーカーが利用される例が増えている。飽和標準連鎖地図 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) を活用した結果、リンゴの黒星病抵抗性やうどんこ病抵抗性などの形質に連鎖する DNA マーカーが開発されて、選抜に用いられている (Kellerhals et al., 2013)。さらに、2010 年にはリンゴのゲノム情報が公開され (Velasco et al., 2010)、『Golden Delicious』のゲノム配列や、そこから推定される遺伝子情報などが利用できるようになってきている。リンゴの火傷病抵抗性などの形質では、抵抗性に連鎖する DNA マーカーの開発に加えて、抵抗性を示す遺伝子本体の機能の解明も進められている (Fahrenttrapp et al., 2013)。

以上のように、近年、リンゴの交雑育種を効率化するために有効な、DNA マーカーを用いた早期選抜の手法を開発することが容易になってきている。そこで、本研究においては、リンゴの交雑育種を行う上で重要な育種目標であるものの、表現型選抜の技術開発が未完成または完成していても評価に長期間を要するという理由で DNA マーカー選抜を行う優位性が高いと考えられる形質の中から、斑点落葉病抵抗性、カラムナー性など 4 種類の重要形質について、目的の形質をそれぞれ備えた個体を早期に選抜可能な DNA マーカーを開発することを目的とした。

リンゴの斑点落葉病は、斑点落葉病菌 (*Alternaria altanata* apple pathotype) を病原としているリンゴの重要病害の一つである。本病害が多発すると早期落葉を引き起こし、果実にも病斑を生じることから、リンゴの果実の生産において最も重点的に防除することが求められている。このような理由から、本病害に対して抵抗性を示す栽培品種の育成が強く求められている。これまでに、多くの品種について抵抗性と罹病性の評価がなされており (Abe et al., 2010)、抵抗性は、罹病性が優性を示す単一の遺伝子 *Alt* によって制御されることが明らかにされている (齋藤・武田, 1984)。また、幼苗に分生子を噴霧接種して、発病程度を評価することにより表現型選抜を行う方法が提唱されている (齋藤, 1975)。しかしながら、幼苗を用いた接種検定では、苗の生育段階や接種圧を一

定にすることが難しいという問題がある．そこで，本研究の第 1 章では斑点落葉病の罹病性の原因となる遺伝子 *Alt* に連鎖する DNA マーカーを明らかにし，斑点落葉病抵抗性の実生個体を選抜するための DNA マーカーを開発しようとした．

リンゴのカラムナー性は，新梢の節間が短く太くなり，細長い円筒形の樹形を示す性質であることから，剪定を簡略化して，省力栽培を実現できると考えられている．これまで，果実品質が劣る観賞用の品種は育成されているものの，生食用の品種はいまだ育成されていない．カラムナー性は単一の優性遺伝子 *Co* (*Columnar*) によって発現する形質であるので，カラムナー性の樹形（カラムナータイプ）を示す個体と通常型の樹形を示す栽培品種の交雑からは，カラムナータイプの個体と通常型の個体が 1:1 の割合で出現するとされる (Lapins, 1976)．しかしながら，交雑して得られた後代の樹形を評価するには，少なくとも 2 年間は苗圃で養成する必要があるので，この期間を短縮することが求められている．これまで，*Co* が座乗している連鎖群と，*Co* に連鎖するいくつかの DNA マーカーは明らかにされているものの (Hemmat et al., 1997; Kim et al., 2003; Tian et al., 2005)，それらの DNA マーカーを用いた選抜技術は開発されていない．そこで，本研究の第 2 章では，カラムナータイプの実生個体を選抜するための DNA マーカーを開発しようとした．

リンゴの台木における根頭がんしゅ病は，近年，リンゴの接ぎ木苗を生産している現場で顕在化している病害である (猫塚ら，2001)．根頭がんしゅ病は，土壌に生息する細菌である根頭がんしゅ病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) が根や地際に生じた傷口から侵入し，不整形のこぶ状の組織 (がんしゅ) を形成することで発病する．本病の被害は抵抗性台木を利用することで軽減されることが期待されるので，根頭がんしゅ病に抵抗性を示す台木用品種の育成が求められている．しかしながら，根頭がんしゅ病に抵抗性を示すリンゴの台木用品種や野生種は見つかっていない．その理由として，従来の抵抗性検定法では，発根しにくい台木用品種や野生種の抵抗性を適切に評価することができなかった

ことが挙げられる。そこで、本研究の第3章では従来行われていた根頭がんしゅ病抵抗性の評価手法を改良して、従来よりも広範な台木用品種や野生種から抵抗性の素材を探索しようとした。次に、探索した抵抗性の品種や系統を交雑親とする交雑実生集団を育成して、抵抗性の遺伝性について明らかにしようとした。さらに、抵抗性遺伝子をマッピングすることを通して、抵抗性の実生個体を選抜するためのDNAマーカーを開発しようとした。

リンゴの台木における挿し木発根性は、台木の繁殖性を向上させる重要な形質である。休眠期の1年生枝を用いた挿し木（休眠枝挿し）によって、1回の接ぎ木で苗木を出荷することが可能になると、従来の二重台木方式のように2回の接ぎ木を要せずに苗木の繁殖が可能となる。しかしながら、挿し木発根性については遺伝性の検討が行われたことがほとんどなく、量的遺伝をする形質であることが推測されているにすぎない（Pop et al., 2011）。また、休眠枝挿しの検定には休眠枝を用いる必要があることから、1年に1回しか検定を実施できず、表現型の評価には時間がかかる。そこで、本研究の第4章では、全ゲノムをカバーする連鎖地図を構築して、休眠枝挿しにおける発根性に関わる量的形質遺伝子座（quantitative trait loci: QTL）を探索し、挿し木発根性の優れる実生個体を選抜するためのDNAマーカーを開発しようとした。

以上、第1章から第4章の研究を行うことによって、リンゴの交雑育種において重要な育種目標とされている形質をそれぞれ備えた実生個体を選抜するためのDNAマーカーを開発して、目的とする形質を備えた個体を早期に選抜する手法を開発することで、リンゴ交雑育種の効率化に貢献しようとした。

第1章. 斑点落葉病抵抗性個体の早期選抜法

リンゴの斑点落葉病は、斑点落葉病菌 (*Alternaria altanata* apple pathotype) を病原とし、リンゴの果実を生産する上で、最も重点的に防除を要する病害の一つである。本病は展開して間もない葉ほど発生しやすく、罹病葉には当初褐色から暗褐色の小斑点が生じるが、次第に病斑は拡大し、多発すると落葉に至る。また、果実や新しょうにも感染・発病が見られ、時にはコルク化して、かさぶた状の病斑となる。このように、斑点落葉病が多発すると果実の商品性を落とし、早期落葉に伴う花芽形成への悪影響も起こりうるので、経済的な損失が大きい。日本におけるリンゴの栽培面積の65%以上が斑点落葉病に罹病しやすい品種で占められることから、抵抗性品種を育成することによって生産コストと環境負荷を低減することが求められている。

斑点落葉病の発病は、まず始めに斑点落葉病菌の産生する宿主特異的毒素であるAMトキシンがリンゴに作用することで起きる。低分子量の二次代謝産物であるAMトキシンは、リンゴの細胞膜と葉緑体に作用して、細胞膜の陥入と電解質の漏出を引き起こす (Tsuge et al., 2013)。また、このような罹病性の反応は、葉のような緑色の組織で起きることが知られている (Tsuge et al., 2013)。細胞膜と葉緑体に対してAMトキシンが作用する過程において、抵抗性の品種と罹病性の品種の間に何らかの違いがあると予想されるが、どのような機構が存在しているのか、分かっていない。

一方、これまで、多くのリンゴ品種について、斑点落葉病に対する抵抗性の強弱が明らかにされている (Abe et al., 2010; 齋藤・武田, 1984)。また、遺伝性については、正逆交雑が後代の抵抗性と罹病性の分離に影響しないこと (工藤, 1968)、抵抗性には一対の主働遺伝子 *Alt* (*Alternaria*) が関与し、抵抗性は *alt/alt*、罹病性は *Alt/alt* または *Alt/Alt* と記述されること (齋藤・武田, 1984) が明らかにされている。罹病性が優性の遺伝様式と、宿主特異的毒素が関わっている発病機構から、*Alt* の機能はAMトキシンの受容体であると考えられている

が、いまだ *Alt* の機能は明らかにされていない。さらに、これまでに *Alt* のマッピングは試みられておらず、*Alt* が座乗する連鎖群は不明である。

斑点落葉病の抵抗性を調べる方法としては、分生子の懸濁液を幼苗に噴霧接種する方法が開発されているが（齋藤，1975），実際に育種に利用する際には，部位によって接種圧に差が生じたり，実生苗の生育ステージを揃えることが難しいなどの課題が示されている。

そこで本章においては，以上のような課題を解決し，斑点落葉病に抵抗性の実生個体を早期選抜する方法として，DNA マーカー選抜法を利用しようとした。DNA マーカー選抜法では，各個体から DNA を抽出した後に安定した検出が可能であるので，幼苗を用いた接種検定のように，接種圧の差や苗の生育ステージの違いに影響されない。そのような理由から，本章では *Alt* が座乗する連鎖群を明らかにして，斑点落葉病に抵抗性の実生個体を選抜するための DNA マーカーを開発することとした。

材料および方法

1. 植物材料の育成および斑点落葉病抵抗性の検定方法

斑点落葉病に罹病性の品種 ‘Starking Delicious’ (*Alt/alt*) と抵抗性の品種 ‘Jonathan’ (*alt/alt*; 日本名は ‘紅玉’) を正逆交雑して得られた，各 57 個体からなる合計 114 個体の F1 集団を実験に供試した（第 1-1 表）。接種源として斑点落葉病菌の AKI-3 株を供試した。接種には Abe et al. (2010) の方法に準じ，detached-leaf 法を用いた。すなわち，伸長中の新梢の先端部分から第 2 番目または第 3 番目の展開葉を 5 枚採取して，湿らせたろ紙を敷いたプラスチックシャーレ内に葉を静置し， 2×10^5 個/ml の濃度に調整した分生子の懸濁液を噴霧器によって接種した。20°C で 48 時間，暗黒条件に保持した後，葉に形成された壊死斑の形成程度で抵抗性を 0，罹病性を 5 とする 6 段階のスコアで評価した（第 1-1 図）。各個体の抵抗性の強弱については，葉ごとの壊死斑形成程度の平均値を求め，0.5 以下の場合を抵抗性，0.5 より大きく 2.5 以下の場合を中程

度抵抗性, 2.5 より大きい場合は罹病性として判定した.

2. ゲノムスキニングアプローチによる *Alt* が座乗する連鎖群の同定方法

各個体のゲノム DNA は, 自動 DNA 抽出装置 PI-50 α (クラボウ (株)) を用いて幼葉から抽出した. -80°C で保存しておいた 100 mg の幼葉をビーズ式破碎装置 SH-48 (クラボウ (株)) で破碎し, 1 ml の分離緩衝液 (10% polyethylene glycol (#6000), 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 350 mM ソルビトール, 50 mM EDTA (pH 8.0)) 中で 30 分間保持した. その後はクラボウ (株) が提供する定法に従い, PI-50 α によって DNA を抽出した.

Alt が座乗する連鎖群を定める目的で, ゲノムスキニングアプローチ (genome scanning approach: GSA) による解析を行った. GSA の第一段階の解析として, リンゴの飽和標準連鎖地図 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) もしくは第 4 章で述べるリンゴの台木用品種 'JM7' の連鎖地図に座乗する SSR マーカーから, リンゴの染色体基本数 ($x = 17$) と等しい 17 個存在する連鎖群ごとに, 上部, 中央部, 下部に座乗する 3 種類, もしくは上部と下部に座乗する 2 種類を供試して, 'Starking Delicious' と 'Jonathan', および両品種を交雑して得られた F1 集団から任意に選択した 22 個体の罹病性個体で検出される対立遺伝子を調べた (第 1-2 表).

SSR マーカーの PCR は, プライマーの合成方法が異なる 2 種類の方法のいずれかで行った. 一つ目の方法は直接標識法 (Ziegle et al., 1992) であり, フォワードプライマーの 5' 末端を蛍光物質 D2, D3, D4 のいずれかで標識した. PCR には Go taq Hot Start Colorless Master Mix (プロメガ (株)) を用い, 反応液の容量を 10 μl とした. 反応液にはゲノム DNA を 5 ng と, フォワードプライマーとリバースプライマーをいずれも 0.2 μM の濃度になるように加えた. PCR は, 94°C で 4 分の加熱の後, 94°C で 30 秒, 55°C で 1 分 30 秒, 72°C で 30 秒のサイクルを 35 回行った後, 60°C で 10 分間の伸張反応を行った. 二つ目の方法は T7 配列付加法 (Schuelke, 2000) であり, フォワードプライマーの合成時に 5' 末端に 17 塩基の T7 プロモーター配列 (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3')

を付加したものをを用いた。さらに、PCR産物を蛍光標識するためのユニバーサルプライマーとして、5'末端を蛍光物質 D2, D3, D4 のいずれかで蛍光標識した 17塩基の T7プロモーター配列のプライマーも用いた。反応液には、フォワードプライマーとリバースプライマー、ユニバーサルプライマーをそれぞれ 0.04 μ M, 0.2 μ M, 0.2 μ M の濃度になるように加えた。その他の条件は直接標識法と同様に行った。

いずれの方法で得られた PCR産物も、DNAシーケンサーCEQ8000（ベックマン・コールター（株））によってキャピラリー電気泳動を行い、分離・検出した。増幅産物のサイズは、内部標準 DNA（DNA Size Standard Kit-400, ベックマン・コールター（株））と比較して求めた。

ある SSR マーカーについて、罹病性の 22 個体における ‘Starking Delicious’ に由来する対立遺伝子の分離比が 1:1 に適合しなかった場合 (χ^2 検定; $P < 0.05$), その SSR マーカーを用いて GSA の第二段階の解析を行った。GSA の第二段階の解析では、F1 集団の全個体において対立遺伝子を検出し、調べた SSR マーカーと *Alt* とが連鎖しているかどうか、連鎖解析によって調べた。

3. *Alt* が座乗する領域に対する既知の DNA マーカーの追加

第 11 連鎖群 (LG 11) に既知の SSR マーカー (第 1-3 表) をマッピングすること、および、公的データベースに登録されている発現遺伝子情報 (expressed sequence tag ; EST) を DNA マーカーとして利用することで、LG 11 の連鎖地図に DNA マーカーを追加した。本実験では、既知の SSR マーカーとしてリンゴ属で開発された SSR マーカー (Celton et al., 2009b; Chagne et al., 2008; Gianfranceschi et al., 1998; Hokanson et al., 1998; Liebhard et al., 2002; Moriya et al., 2012; Silfverberg-Dilworth et al., 2006) に加えて、ナシ属 (Fernandez-Fernandez et al., 2006; Inoue et al., 2007), およびサクラ属 (Testolin et al., 2000) で開発されたものも解析の対象にした。EST においては、うどんこ病抵抗性遺伝子 *Pl₂* と *Pl_{MIS}* に連鎖すると報告されている 5 種類の遺伝子 (DR033886, DR033888, DR033891, DR033892, DR033893 ; Gardiner et al., 2007) について、DNA マーカーとしての

利用を検討した(第1-4表). 塩基配列の内部に SSR を含む EST である DR033893 は SSR の両側を挟み込むようにプライマー (DR033893-F, DR033893-R) を設計し, その他の EST は配列の両端付近にプライマー ((EST 名) -F と (EST 名) -R) を設計した. PCR は 1×Ex Taq Buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM フォワードプライマー, 0.2 μM リバースプライマー, 0.25 U Ex Taq (タカラバイオ(株)), および鋳型 DNA 10 ng を含む 10 μl の反応液中において, 94°C で 5 分を 1 サイクルの後, 94°C で 1 分, 55°C で 1 分, 72°C で 3 分のサイクルを 35 回行った. SSR マーカー化した DR033893 についての増幅産物は DNA シーケンサー CEQ8000 (ベックマン・コールター(株)) で電気泳動した. その他の増幅産物はアガロースゲルで電気泳動した後, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外光を照射して検出した.

4. うどんこ病抵抗性遺伝子に連鎖する DNA マーカー DR033892 を検出する方法の改変

DR033892 の両端を挟むプライマー (DR033892-F と DR033892-R; 第1-4表) によって得られた PCR 産物は, DNA Ligation Kit (タカラバイオ(株)) を用いて, pMD19 ベクター (タカラバイオ(株)) にクローニングした. プラスミド DNA は, DTCS Quick Start Kit (ベックマン・コールター(株)) を用いてシーケンシング反応を行い, CEQ8000 で電気泳動を行って, 塩基配列を決定した.

検出方法を改変する目的で, 決定した塩基配列を用いて, 新たにプライマー DR033892-F5 (5'-ATG GAG TGG TAG ATT TAT CAT ATT T-3'), DR033892-S-R2 (5'-TTC AAC AGC ATA ACC GGC-3') を設計した. PCR は 1×Ex Taq Buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.0 μM DR033892-F5, 0.15 μM DR033892-S-R2, 1.0 μM DR033892-R, 0.5 U Ex Taq および鋳型 DNA 20 ng を含む 20 μl の反応液中において, 94°C で 5 分を 1 サイクルの後, 94°C で 30 秒, 55°C で 30 秒, 72°C で 1 分のサイクルを 35 回行った. 増幅産物はアガロースゲルで電気泳動した後, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外光を照射して検出した.

上記のように, 新たにプライマーを設計して改変した DNA マーカー

DR033892 について、様々な品種・選抜系統における増幅を確かめて、抵抗性個体を選抜するための DNA マーカーとしての検証を行った。供試した品種・選抜系統は、‘Starking Delicious’の枝変わり前の品種である‘Delicious’の後代で斑点落葉病に罹病性の‘Redgold’、‘金星’、‘きたかみ’、盛岡 59 号、盛岡 60 号、盛岡 61 号と、抵抗性の‘はるか’、‘さんたろう’、および近年育成されている栽培品種群の祖先にあたる抵抗性の‘Golden Delicious’、‘Ralls Janet’（日本名：‘国光’）、‘McIntosh’（日本名：‘旭’）、罹病性の‘印度’である。

5. 連鎖解析

上記の実験を行って得られた DNA マーカーの連鎖解析、および連鎖地図の構築には JoinMap 4 ソフトウェア (Kyazma B. V.) を用いた。シュードテストクロス法、および Kosambi の地図関数を用いて計算を行った。連鎖群を決めるための最小 LOD 値には 10.0 を採用した。なお、LOD とは logarithm of odds の略語であり、オッズ比の常用対数のことである。本章においては、連鎖関係の確からしさを示す目的で用いており、LOD 値が一定の値（閾値）を越えたときに連鎖関係があると判定した。

結 果

1. 表現型の評価

‘Starking Delicious’と‘Jonathan’の正逆交雑に由来する、F1 集団 114 個体の斑点落葉病に対する壊死斑形成程度は、抵抗性と罹病性の 2 群に明瞭に分離し、中程度抵抗性と判定された個体は認められなかった（第 1-1 表）。抵抗性と罹病性の分離比は 48:66 であり、 χ^2 検定の結果、1:1 の分離比に適合した ($\chi^2 = 2.8$, $P = 0.09$)。

2. GSA による *Alt* が座乗する連鎖群の同定

GSA の第一段階の解析の結果、供試した 48 種類の SSR マーカー中、35 種類で‘Starking Delicious’の対立遺伝子が多型を示した（第 1-2 表）。多型を示した 35 種類のうち、4 種類 (CH03e03 (LG 3), Hi03d06 (LG 3), CH02b07 (LG 10),

MEST070 (LG 11)) において ‘Starking Delicious’ 由来の対立遺伝子の分離が χ^2 検定の有意水準 5% で 1:1 の分離比に適合しなかった。そこで、これら 4 種類のマーカーを用いて GSA の第二段階の解析を行ったところ、LG 11 の MEST070 と *Alt* との連鎖関係が認められた。*Alt* と MEST070 の組換え価は 0.073 (LOD = 20.17) であった。その他の SSR マーカーと *Alt* との間に有意な連鎖関係は認められなかった (データ省略)。

3. LG 11 において *Alt* が座乗する領域に対する既知の DNA マーカーの追加

LG 11 に座乗する 19 種類の既知の SSR マーカー (第 1-3 表) を用いて、‘Starking Delicious’ の対立遺伝子を検出した結果、リンゴ属由来の 12 種類の SSR マーカー (CH02d12, CH01c11, CH02d08, CH03d02, CH04h02, CH05g11, CN491050, Hi01d06, Hi07d11, NZmsCN905667, MEST070, MEST092) が ‘Starking Delicious’ の連鎖地図にマッピングできる多型を示したので、これら 12 種類の SSR マーカーを用いて F1 集団において検出される対立遺伝子を調べた。12 種類の SSR マーカーのうち 2 種類 (CN491050 と MEST092) は、連鎖解析のグループ解析の際に LG 11 から排除された。

DNA マーカー DR033892 についてプライマー DR033892-F と DR033892-R を用いて PCR を行ったところ、‘Starking Delicious’ において 2.0 kbp と 1.3 kbp の 2 つの増幅産物が得られたので、DR033892 のマッピングが可能であった (データ省略)。同様に、SSR マーカーを設計した DR033893 もマッピング可能な多型を示した (データ省略)。DR033886 および DR033888 はアガロースゲル電気泳動で多型を示さなかったため、塩基配列の比較も行ったが、多型は認められなかった (データ省略)。また、DR033891 については増幅産物が得られなかった。

上記の実験で得られた遺伝子型のデータを用いて連鎖解析を行ったところ、‘Starking Delicious’ における LG 11 の連鎖地図が構築された (第 1-2 図)。その結果、*Alt* は Hi07d11 および Hi01d06 によって得られた遺伝子座と、DR033892 との間にマッピングされた。*Alt* の最も近傍に座乗していた DNA マーカーは DR033892 であり、その遺伝距離は 1.7 cM であった。

4. うどんこ病抵抗性遺伝子に連鎖する DNA マーカー DR033892 を検出する方法の改変

DR033892 についてプライマー DR033892-F と DR033892-R で PCR を行った際に, ‘Starking Delicious’ において 2.0 kbp の対立遺伝子が *Alt* と相引に連鎖していた (データ省略). 一方, ‘Jonathan’ の対立遺伝子型は 2.0 kbp のホモ型であったので, *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子の特異的に識別できなかった. そこで, *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子の特異的に識別できるように検出方法を改変することを目的として, PCR 増幅産物の塩基配列を解読した (第 1-3 図). その結果, ‘Starking Delicious’ から増幅した対立遺伝子の塩基長は 2028 bp および 1333 bp であった. 一方, ‘Jonathan’ から増幅した 2 種類の対立遺伝子は, 内部にいくつかの SNP を含むものの, どちらも 2032 bp であった. これら 4 種類の対立遺伝子を比較したところ, *Alt* と相引に連鎖する 2028 bp の対立遺伝子に特異的な, 2 か所の SNP と 2 か所の塩基欠失が認められた. SNP は 1741 bp 目の T/C 置換と, 1753 bp 目の C/A 置換であり, 塩基欠失は 720 bp 目の 1 bp と 1367 bp 目の 3 bp であった. そこで, 1753 bp 目の C/A 置換を利用して, *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子に特異的にアニーリングするプライマー DR033892-S-R2, およびその近辺の塩基配列からプライマー DR033892-F5 を設計した. これら 2 種のプライマー, および DR033892-R を含む PCR の反応液を調整して PCR を行ったところ, *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子から特異的に増幅する 429 bp の増幅産物と, *alt* から増幅する 692 bp の増幅産物が検出された (第 1-4 図). プライマーを設計した際, *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子から 689 bp の増幅産物が得られることを期待したが, 実際は 429 bp の増幅産物しか認められなかった.

‘Starking Delicious’ の枝変わり前の品種である ‘Delicious’ の後代にあたる 7 品種および選抜系統と, 近年育成されている栽培品種群の祖先にあたる 4 品種 (‘Golden Delicious’, ‘Ralls Janet’, ‘McIntosh’, ‘印度’) について, DR033892-S-R2, DR033892-F5 および DR033892-R を用いて多型を検出した (第

1-4 図). その結果, 全ての罹病性品種から 429 bp の増幅産物が検出され, 抵抗性品種からは検出されなかった. ‘Golden Delicious’ からは 692 bp の増幅産物の他に, 約 600 bp の増幅産物が検出された.

考 察

病害抵抗性などの 1 遺伝子座で説明できる質的形質のマッピングにあたって, 従来はバルク法 (Michelmore et al., 1991) がよく採用されていた. しかし, 近年, リンゴのゲノム情報や研究例が充実してきたことを背景に, リンゴやナシにおいては全ゲノムを SSR マーカーでスキャンする GSA の利用例が増してきた (Erdin et al., 2006; Patocchi et al., 2005; Terakami et al., 2007). バルク法は, 遺伝子に連鎖する DNA マーカーの開発を主目的とするのに対して, GSA では, 座乗する連鎖群と其中での位置が既知である DNA マーカーと遺伝子との連鎖関係を明らかにすることに主眼を置いている. ここで, 本章で行った斑点落葉病に対する抵抗性検定の結果について考えると, ‘Starking Delicious’ と ‘Jonathan’ の正逆交雑に由来する F1 集団の斑点落葉病に対する壊死斑形成程度は 2 群に分離し, その分離比は 1:1 に適合した. このことは, 一対の主働遺伝子 *Alt* が斑点落葉病に対する抵抗性・罹病性を支配するという仮説 (齋藤・武田, 1984) を支持することから, リンゴの斑点落葉病に対する罹病性を質的形質と解釈して, GSA を用いて *Alt* が座乗する連鎖群の特定を試みることにした.

GSA の第一段階, および第二段階の解析の結果, LG 11 に *Alt* が座乗することが示された (第 1-2 表, 第 1-2 図). したがって, 第一段階の解析に用いた罹病性の 22 個体において, 2 つの連鎖群 (LG 3, LG 10) で対立遺伝子の分離に偏りが生じた (第 1-2 表) のは, これらの個体を選択した際に, 一方の対立遺伝子に分離比が偏っていた状態の 22 個体を偶然に選んだことが原因と考えられた.

ナシ属およびサクラ属は, リンゴ属のゲノムとシテニーがあることが報告

されている (Dirlewanger et al., 2004). 特にナシ属は, APG 分類体系においてリンゴ属と同じナシ亜連に属し, ゲノム全域にわたるシンテニーがある (Celton et al., 2009a; Yamamoto et al., 2005). このような理由から, ‘Starking Delicious’ の LG 11 に既知の DNA マーカーを追加する過程で, ナシ属とサクラ属で開発された SSR マーカーから, リンゴでも利用できる DNA マーカーが得られることを期待したが, マッピング可能な多型を示したものはなかった. しかしながら, 供試する SSR マーカーの数を増やすことによって, 多型を示す SSR マーカーは得られると考えられた.

Alt の最も近傍に座乗していた DNA マーカー DR033892 が示した多型は *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子の特異的に識別できなかつたので, このままでは DNA マーカー選抜に利用しにくいと考えられた. そこで, *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子の特異的に識別できるように, プライマーを新たに設計して検出方法を改変した (第 1-4 図). プライマーを改変した DNA マーカー DR033892 を用いて, ‘Delicious’ 後代の品種および選抜系統や, 近年育成されている栽培品種群の祖先にあたる 4 品種 (‘Golden Delicious’, ‘Ralls Janet’, ‘McIntosh’, ‘印度’) が示す多型を検出したところ, *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子は 429 bp の増幅産物で特異的に識別され, 抵抗性・罹病性の関係と 429 bp の増幅産物の有無が一致したので, 改変した DR033892 は広範な交雑組合せにおいて, 斑点落葉病に抵抗性を示す個体を早期に選抜するための DNA マーカーとして利用できると考えられた. しかしながら, 本 DNA マーカーは *Alt* と 1.7 cM の遺伝距離があるために, *Alt* と DNA マーカー間で組換えが生じた個体が誤選抜される恐れがある. そこで, DNA マーカーを用いて選抜された個体に対して, 果実形質等の選抜を進める過程で, 斑点落葉病に対する抵抗性を表現型によって確認することが必要であると考えられた.

ところで, ‘印度’ は ‘Delicious’ とは直接的な親子関係が知られていない品種である, 斑点落葉病に罹病性の品種であるが, 改変した DR033892 において ‘Delicious’ と同様に 429 bp の増幅産物が得られた (第 1-4 図). また, ‘印度’

の斑点落葉病に対する罹病性の遺伝は、‘Delicious’と同じ遺伝様式を示す（齋藤・武田，1984）ので、‘印度’と‘Delicious’の持つ *Alt* は共通の祖先に由来していると考えられた。

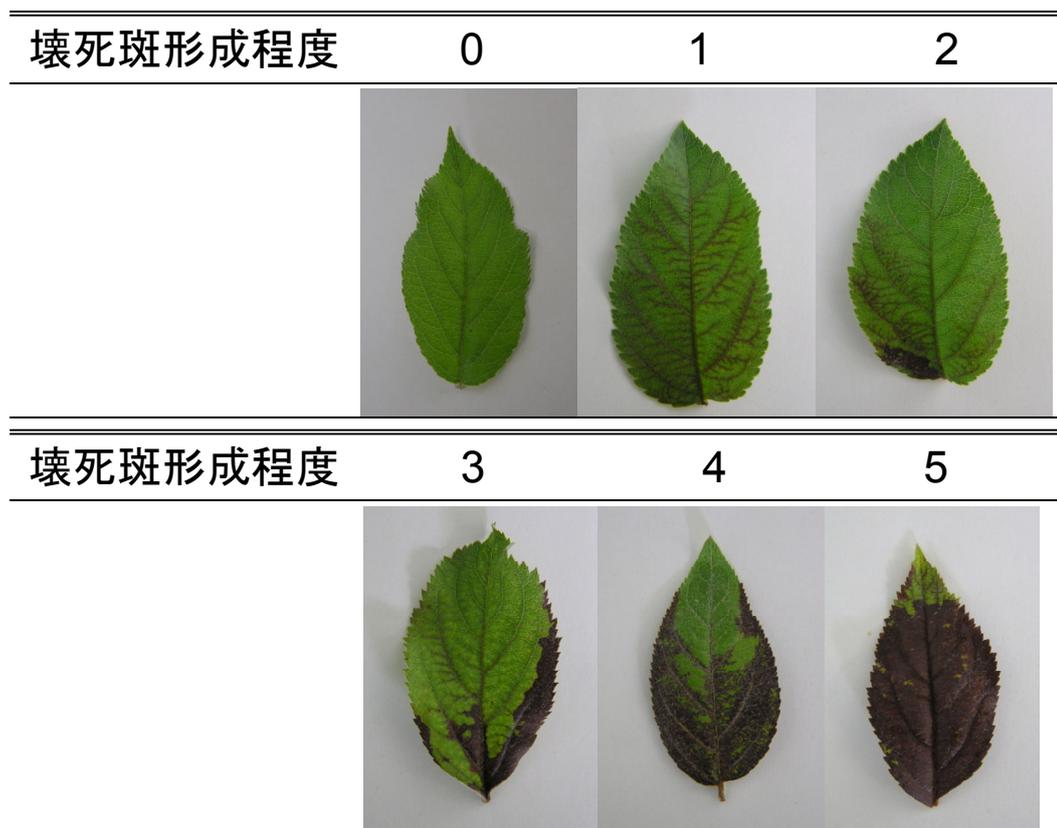
本章において行った実験から、*Alt* が座乗している連鎖群と其中での位置が判明した一方で、*Alt* の機能に関する知見は得られなかった。今後、ウェブサイト「Genome Database for Rosaceae (GDR)」(<http://www.rosaceae.org/>) 上で公開されている‘Golden Delicious’のゲノム情報（Velasco et al., 2010）を利用して、*Alt* の座乗する詳細な候補領域を定めることで、*Alt* の候補遺伝子が明らかにされることが期待される。また、この過程において、*Alt* との遺伝距離が DR033892 の 1.7 cM よりも小さい DNA マーカーが開発される可能性が非常に大きいので、DNA マーカー選抜の高度化が図られると考えられた。

最近、中国においても斑点落葉病の研究がなされているが、本章の結果とはいくつかの相違点が見られることから、日本で発生している斑点落葉病と同じ病害であるかどうか疑問が残る。たとえば、斑点落葉病に対する同じリンゴ品種の抵抗性／罹病性の表現型は、中国（Li et al., 2012b）と日本（Abe et al., 2010）で異なっている例が多い。さらに、中国で分離された斑点落葉病菌を用いて‘Golden Delicious’に由来する罹病性の主働遺伝子に連鎖する SSR マーカー CH05g07 が明らかにされている（Li et al., 2011）。しかしながら、SSR マーカー CH05g07 は LG 12 および LG 14 に座乗することが知られており（Silfverberg-Dilworth et al., 2006）、本章でマッピングされた LG 11 の *Alt* と独立に遺伝すると思われる。そもそも、Li et al. (2011) によって罹病性品種とされ、罹病性主働遺伝子に連鎖する SSR マーカーの開発に用いられた‘Golden Delicious’は、本章で接種した斑点落葉病菌の菌株 AKI-3 に対して抵抗性である（Abe et al., 2010）。以上のような理由から、本章で実験を行った *Alt* と Li et al. (2011) において研究対象とされた遺伝子とは異なる遺伝子である可能性が高いと考えられた。

第 1-1 表. 交雑実生集団における斑点落葉病に対する抵抗性程度の分布.

交雑組合せ	個体数	抵抗性 (0-0.5 ²)	中程度 抵抗性 (0.5-2.5)	罹病性 (2.5-5)	χ^2 値 (P)
Starking Delicious × Jonathan	57	23	0	34	2.1 (0.14)
Jonathan × Starking Delicious	57	25	0	32	0.8 (0.35)
	114	48	0	66	2.8 (0.09)

² 壊死斑の形成程度の評価基準については第 1-1 図を参照.



第 1-1 図. 斑点落葉病菌の接種に対するリンゴ葉における壊死斑の形成程度.

0 = 病徴なし, 1 = 1 mm 以下の小壊死斑点, 2 = 葉面積 10%以下の壊死斑, 3 = 10 – 50%の壊死斑, 4 = 50%以上の壊死斑, 5 = ほぼ全面が壊死.

第 1-2 表. ゲノムスキヤニングアプローチの第一段階の解析において, ‘Starking Delicious’ の対立遺伝子が多型を示した SSR マーカーを用いて, 斑点落葉病に罹病性を示した 22 個体で検出された対立遺伝子の分離.

連鎖群	SSR マーカー ^z	‘Starking Delicious’ 由来の		χ^2 値 ^x
		対立遺伝子の分離比 ^y		
		短い増幅長の 対立遺伝子	長い増幅長の 対立遺伝子	
1	Hi02c07	13	9	0.73
1	CH-Vf1	10	12	0.18
2	CH02f06	14	8	1.64
2	CH02b10	12	10	0.18
3	CH03e03	5	17	6.55*
3	Hi03d06	16	6	4.55*
3	MS14h03	11	11	0
4	CH04e02	7	15	2.91
4	CH02h11a	13	9	0.73
5	CH05e06	14	8	1.64
5	CH02b12	13	9	0.73
6	CH03d07	15	7	2.91
6	Hi03a03	9	13	0.73
7	Hi03a10	14	8	1.64
8	CH02g09	10	12	0.18
9	MEST032	10	12	0.18
9	CH05c07	13	9	0.73
9	CN444542	10	12	0.18
10	CH02b07	16	6	4.55*
10	CH03d11	13	9	0.73

第 1-2 表. (続き)

連鎖群	SSR マーカー ^z	‘Starking Delicious’ 由来の		χ^2 値 ^x
		対立遺伝子の分離比 ^y		
		短い増幅長の 対立遺伝子	長い増幅長の 対立遺伝子	
10	CH02b03b	12	10	0.18
11	MEST070	22	0	22.0***
11	CH04d10	10	12	0.18
12	CH05d04	14	8	1.64
12	CH03c02	11	11	0
13	GD147	10	12	0.18
14	CH05g11 ^w	11	11	0
14	Hi03a03	8	14	1.64
15	CH01d08	9	13	0.73
15	CH02d11	13	9	0.73
15	CH02c09	13	9	0.73
16	CH05c06 ^w	8	14	1.64
16	CH05a04	8	14	1.64
17	Hi07h02	10	14	0.91

^z以下の SSR マーカー (連鎖群) を用いたとき, ‘Starking Delicious’ の対立遺伝子は多型を示さなかった: CH05g08 (1), CH03d01 (2), MEST049 (4), Hi04a08 (5), MEST054 (7), CH01h10 (8), CH04a12 (11), CH04d02 (12), CH05h05 (13), CH05f04 (13), CH01e01 (14), CH05g03 (17), Hi02f12 (17).

^y植物材料には, ‘Starking Delicious’ と ‘Jonathan’ を正逆交雑して得られた F1 集団から, 斑点落葉病に罹病性を示す 22 個体を任意に選択して用いた.

^x χ^2 検定において, 有意水準があることを示す: *0.05; **0.01; ***0.001.

^w第 2 遺伝子座から増幅した対立遺伝子は, 本解析から除外した.

第 1-3 表. 斑点落葉病に罹病性を示す主働遺伝子 *Alt* が座乗していた ‘Starking Delicious’ の第 11 連鎖群に対して DNA マーカーを追加する際に供試された既知の SSR マーカー.

SSR マーカー	開発源	参考文献
CH02d12	<i>Malus</i>	Gianfranceschi et al. (1998)
CH01c11	<i>Malus</i>	Liebhard et al. (2002)
CH02d08	<i>Malus</i>	Liebhard et al. (2002)
CH03d02	<i>Malus</i>	Liebhard et al. (2002)
CH04h02	<i>Malus</i>	Liebhard et al. (2002)
CH05g11	<i>Malus</i>	Liebhard et al. (2002)
CN491050	<i>Malus</i>	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
Hi01d06	<i>Malus</i>	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
Hi07d11	<i>Malus</i>	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
GD15	<i>Malus</i>	Hokanson et al. (1998)
NZmsCN892357	<i>Malus</i>	Celton et al. (2009b)
NZmsCN855456b	<i>Malus</i>	Chagne et al. (2008)
NZmsCN905667	<i>Malus</i>	Chagne et al. (2008)
MEST044	<i>Malus</i>	Moriya et al. (2012)
MEST070	<i>Malus</i>	Moriya et al. (2012)
MEST092	<i>Malus</i>	Moriya et al. (2012)
EMPc11	<i>Pyrus</i>	Fernandez-Fernandez et al. (2006)
IPPN02	<i>Pyrus</i>	Inoue et al. (2007)
UDP98-416	<i>Prunus</i>	Testolin et al. (2000)

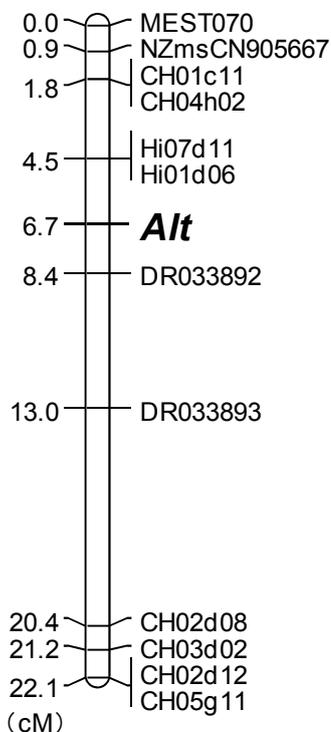
第 1-4 表. 斑点落葉病に罹病性を示す主働遺伝子 *Alt* が座乗していた ‘Starking Delicious’ の第 11 連鎖群に対して DNA マーカーを追加する際に供試された EST に設計されたプライマーの塩基配列.

GenBank 登録番号	フォワードプライマー(F) (5'-3')	リバースプライマー(R) (5'-3')
DR033886	AGTCCTCTGGTACCTCGGAAG	AAAGTATGCGAGCTTTTCTGC
DR033888	TGTCCCTTAAAGAAAGGTTGG	CTTTGCCGTCAATGGAACAC
DR033891	CCTCCAGAGATGTTGTTACAG	CGACTCGTAACGTGGAATTT
DR033892	GCCACTGGCACCTATATTTCT	TGGTGAAGAAACAAGAAAATGC
DR033893	CACTAGGGTGTATGGGTGTGA	gtttcttTCATTTTGGGCAGGCACT ^z

^z 明瞭な増幅を得るために pigtail 配列 (gtttctt) を付加した.

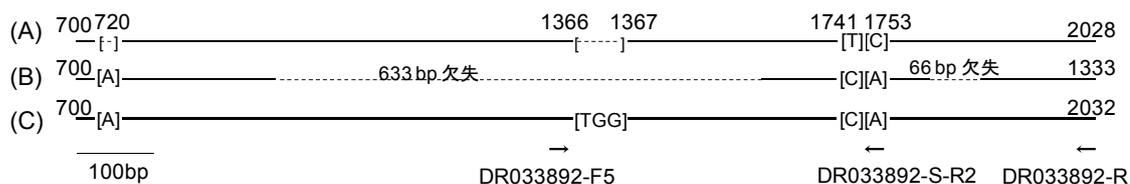
‘Starking Delicious’

LG 11



第 1-2 図. 斑点落葉病に罹病性の品種 ‘Starking Delicious’ における第 11 連鎖群 (LG 11) の連鎖地図.

斑点落葉病に罹病性を示す主働遺伝子 *Alt* を太字で示す.



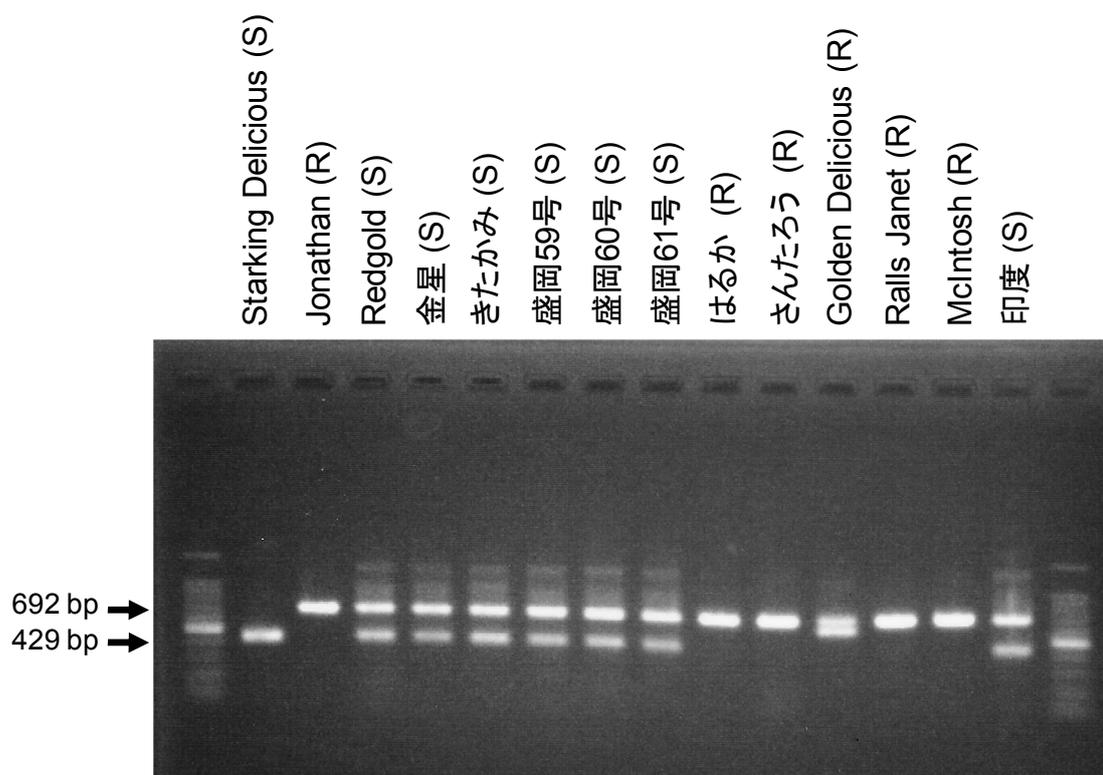
第 1-3 図. DNA マーカー DR033892 における対立遺伝子間の塩基配列の多型.

- (A) ‘Starking Delicious’ の *Alt* と相引に連鎖する対立遺伝子を示す.
- (B) ‘Starking Delicious’ の *alt* と相引に連鎖する対立遺伝子を示す.
- (C) ‘Jonathan’ の対立遺伝子を示す.

(A) の対立遺伝子が多型的に識別される多型を模式的に示す.

プライマー DR033892-F を起点とする塩基数を直線の上部に示す.

プライマーを設計した場所を矢印で示す.



第 1-4 図. リンゴ品種・選抜系統が示す DNA マーカーDR033892 による多型と斑点落葉病に対する表現型との関係.

DNA マーカーDR033892 の PCR はプライマーDR033892-F5, -R, -S-R2 を用いて行った.

品種・選抜系統名の後に, 斑点落葉病に対する抵抗性 (R), 罹病性 (S) を Abe et al. (2010) の結果に従って示す.

第2章. カラムナー性個体の早期選抜法

リンゴの樹形や主枝と側枝の形態は、花芽の着生や整枝・剪定などを通して果実の収量に影響する。樹形や枝の形態には品種ごとに決まった生育を示す特性がある。したがって、これらの特性は、たとえば樹の下部から発生した側枝が強く伸長しやすいスパータイプや、逆に、樹の上部から発生した側枝が強く伸長しやすい‘Rome Beauty’タイプなどに分けられている (Lauri et al., 1995; Lespinasse・Delort, 1986)。一方、遺伝的な背景が樹形や枝の形態に与える影響は複雑であり、ほとんど明らかにされていない。

新梢の節間が短く太くなり、細長い円筒形の樹形を示す性質 (カラムナー性; 第2-1 図) は、1960年代の初めにカナダのブリティッシュ・コロンビア州のリンゴ生産者である Tony Wijcik 氏の園地において、‘McIntosh’ (日本名: ‘旭’) の枝変わり品種 (突然変異体) として発見された ‘Wijcik’ を起源としている (Fisher, 1995)。カラムナー性の樹形 (カラムナータイプ) を示す ‘Wijcik’ は、原品種の ‘McIntosh’ や他の主要なリンゴ品種に比べて、枝分かれが少なく、主幹と長く伸長した側枝に短果枝の着生が多いので、結果として円筒形 (column) に近い樹形を示す。カラムナータイプは、最小限の整枝・剪定しか要さない省力栽培につながるので、‘Wijcik’ は重要な育種素材となっている。しかしながら、これまでに果実品質が劣るカラムナータイプの観賞用品種は育成されているものの、いまだ生食用の品種は育成されていない。これまでに、カラムナー性の決定には単一の優性遺伝子 *Co* (*Columnar*) が関与していることが明らかにされている (Lapins, 1976)。また、交雑試験の結果、実生苗に現れるカラムナータイプの個体数が予想された数よりも常に少なかったことから、いくつかの変異遺伝子がカラムナータイプの発現に関与している可能性も示唆されている (Lapins, 1976)。

(独) 農研機構果樹研究所におけるカラムナータイプのリンゴの育種試験は1987年から開始されている。‘Wijcik’ の果実品質は原品種の ‘McIntosh’ と同

じであるので、日本の生産者および消費者に好まれる形質を備えていない。すなわち、‘Wijcik’の果実は糖度が低く、酸含量が多く、果肉は柔らかめで日持ち性に劣っているうえに、収穫前落果が多い。このような理由から、カラムナータイプの生食用リンゴ品種の育種目標は、果実品質の改良に重点が置かれている。この育種目標を達成することを目的として、カラムナータイプのリンゴ品種・系統と、‘ふじ’などの果実品質が優良な品種との交雑が行われている。

‘Wijcik’を親に用いて交雑を始めると、形質の改良に多世代・長期間を要すると考えられていたので、カナダのサマーランド農業試験場において‘Wijcik’と‘Golden Delicious’などを交雑した後代から選抜されたカラムナータイプの選抜系統が（独）農研機構果樹研究所に導入され、交雑親として用いられている。

ある実生個体について、樹形や枝の形態を基にカラムナータイプかどうかを識別するには、苗圃において少なくとも2年間の養成を必要とするので、カラムナータイプの個体と通常型の個体が混在した状態で長期間にわたり苗を養成すると、病虫害防除に要する農薬や枝の誘引・雑草管理などにかかるコストが大きい。このようなコストを削減するには、DNAマーカーを用いた早期選抜によってカラムナータイプの実生個体を選抜して、苗圃で養成する個体数を減らすことが有効である。

カラムナー性は、樹形や枝の形態において特異な表現型を示すので、植物ホルモンの含量や遺伝子発現の面からの解析が進められている。カラムナータイプの樹の内生サイトカイニン含量が通常型の品種よりも多く、この傾向は腋生の新梢よりも、頂生の新梢において顕著であることが明らかにされている

(Watanabe et al., 2004, 2006)。しかし同時に、インドール酢酸/サイトカイニン比はカラムナータイプであるかどうかにかかわらず、品種間、および部位間で差が見られないとも述べられている (Watanabe et al., 2006)。一方、カラムナータイプの樹は通常型の樹と比べてインドール酢酸含量が多く、インドール酢酸/サイトカイニン比が高く、 GA_3 /インドール酢酸比が低いという異なる結果も示

されている (Bendokas・Stany, 2009). 最近では, カラムナータイプと通常型の樹の遺伝子発現が網羅的に解析され, 植物ホルモン合成経路上の酵素遺伝子を含む 200 個以上の遺伝子発現が顕著に異なっていることが判明しているが, カラムナータイプを示す原因となる遺伝子の特定には至っていない (Krost et al., 2012, 2013; Zhang et al., 2012). このように, 植物ホルモン合成経路上に関わる遺伝子発現の情報から, カラムナータイプの個体を選抜するための DNA マーカーを開発することは困難である. このため, *Co* に連鎖する遺伝子を解析する手法を用いることが DNA マーカーの開発に有効と考えられる.

そこで, 本章においては, 交雑実生集団からカラムナータイプの個体を DNA マーカーによって選抜するための手法を確立することを目的として実験を行った. はじめに, 既知の報告では不明であった, カラムナー性の原因遺伝子である *Co* の近傍に座乗する DNA マーカーと *Co* との正確な連鎖関係を明らかにしようとした. 次に, 新たに開発した DNA マーカーを用いて, *Co* の高解像度マッピングを行い, カラムナータイプの実生個体を選抜するための DNA マーカーを開発しようとした.

第 1 節. 既知の DNA マーカーによるカラムナー性遺伝子の座乗位置の推定

DNA マーカーを用いてカラムナータイプの実生個体を選抜するための研究は, 早くから世界的に取り組まれている. その成果として, これまでに *Co* に連鎖する DNA マーカーがいくつか報告されている. たとえば, SSR マーカーである SSR_{co} (Hemmat et al., 1997) や, SCAR マーカーである SCB82₆₇₀ (Kim et al., 2003), SCAR₆₈₂, SCAR₂₁₆ (Tian et al., 2005) が開発されている.

一方, 時を同じくして, 連鎖地図の研究が著しく進展して, SSR マーカー等の共優性の DNA マーカーが数多く位置付けられ, 染色体基本数 ($x = 17$) に等しい 17 個の連鎖群に収束する標準連鎖地図が構築されている. 最初に公表されたリンゴの標準連鎖地図には, 67 種類の共優性の DNA マーカーが位置付けら

れている (Maliepaard et al., 1998). 本標準連鎖地図には, SSRco (Hemmat et al., 1997) のプライマーが改変された SSR マーカーである COL (Gianfranceschi et al., 1998) が LG 10 にマッピングされており, *Co* が LG 10 に座乗することが示唆されている. その後, 300 種類以上の SSR マーカーが新たに開発され (Liebhard et al., 2002, 2003; Silfverberg-Dilworth et al., 2006), ゲノム全領域の 85% をカバーする飽和標準連鎖地図が構築されている (Silfverberg-Dilworth et al., 2006). 飽和標準連鎖地図の LG 10 には COL を含めて 29 種類の SSR マーカーがマッピングされている. しかし, これらの研究は異なる材料を用いていたり, そもそもカラムナー性を対象にしたマッピングではなかったという背景がある.

以上のように, 既知の DNA マーカーを用いてカラムナータイプの実生個体を選抜する手法は開発されていない. DNA マーカーを用いてカラムナータイプの実生個体を選抜する手法を開発するためには, まず初めに, 既知の SCAR マーカーおよび飽和標準連鎖地図上の SSR マーカーと *Co* との連鎖関係を共通の連鎖地図上において検討して, *Co* の近傍に座乗する DNA マーカーを明らかにする必要がある. そこで本節では, カナダのサマーランド農業試験場, および (独) 農研機構果樹研究所で選抜されてきたカラムナータイプを示す系統 (選抜系統) の *Co* が座乗する LG 10 について, 既知の SCAR マーカーと SSR マーカーを用いて連鎖地図を構築し, *Co* と既知の DNA マーカーとの正確な連鎖関係を明らかにすることとした.

材料および方法

1. 植物材料の育成

カナダのサマーランド農業試験場, および (独) 農研機構果樹研究所で選抜されてきたカラムナータイプを示す 31 品種・選抜系統, およびそれらと通常型の品種との交雑によって得られた 21 交雑組合せからなる F1 集団の 357 個体を, 表現型と DNA マーカーの評価に供試した (第 2-1, 2-2, 2-3 表). これらの個体の表現型は, 休眠期の樹形と枝の形態を観察することによって判定した (第 2-1

図). 判定基準は, Hemmat et al. (1997) の方法に従い, 主幹部の新梢の直径が基部と先端部であり変わず, 主幹から発生した枝の角度が狭くほぼ主幹に平行である場合, カラムナータイプであると判定した. LG 10 の連鎖地図の構築には, ‘ふじ’ (co/co : 通常型の品種) × 5-12786 (Co/co : カラムナータイプの選抜系統) の F1 集団の 68 個体, および ‘ふじ’ × 8H-9-45 (Co/co : カラムナータイプの選抜系統) の F1 集団の 55 個体, ‘ふじ’ × ‘Tuscan’ (Co/co : カラムナータイプの品種) の F1 集団の 64 個体を供試した. ‘ふじ’ × 5-12786 の F1 集団 (68 個体) は, 台木用品種の ‘JM1’ に接ぎ木された 2 年生苗で表現型を判定した. ‘ふじ’ × 8H-9-45 の F1 集団 (55 個体) は, 1 年生の自根の実生苗の段階で, 達観によりカラムナータイプに似た樹形を示した個体のみを選抜し, さらにその後の生育が良好な個体だけを解析に供試した. ‘ふじ’ × ‘Tuscan’ の F1 集団 (64 個体) は 1 年生の自根の実生苗を供試して表現型を判定した. また, この他の 18 交雑組み合わせの F1 集団については, 1999 年に 4 年生の自根の実生苗においてカラムナータイプと判定した後, その中から 170 個体を採穂して, 台木用品種の ‘JM1’ または ‘JM7’ に接ぎ木を行って, 7 年生の時点 (2006 年) で再度, 表現型を判定した.

2. DNA マーカーの分析

各個体のゲノム DNA は第 1 章の方法に準じて抽出した.

LG 10 の連鎖地図の構築にあたっては, リンゴの飽和標準連鎖地図 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) において LG 10 に座乗していた 10 種類の SSR マーカー (AU-223548-SSR, CH01f12, CH02a10, CH02c11, CH03d11, Hi01a03, Hi01b01, Hi03c04p, Hi22f04, COL) を供試した. これら 10 種類のうちの 2 種類 (Hi01a03 と Hi01b01) は, インターネットのホームページ「HiDRAS プロジェクト (<http://users.unimi.it/hidras>)」で公開されている情報によると, 同一の反復配列をターゲットとして開発された SSR マーカーである. 本節において, この 2 つの SSR マーカーで得られる PCR 産物は増幅長が異なるだけで, 同じ増幅パターンを示したので, 本節においては Hi01a03 のデータのみを示した. こ

これらの SSR マーカーの PCR, および検出は第 1 章の方法に準じて行った.

また, SCAR マーカー SCB82₆₇₀ (Kim et al., 2003) と SCAR₆₈₂, SCAR₂₁₆ (Tian et al., 2005) を実験に供試した. それぞれの SCAR マーカーについて, 論文に記載された条件に従って PCR を行い, 増幅産物をアガロースゲルによる電気泳動で分離し, エチジウムブロマイドによる染色後に紫外線を照射して検出した. SCB82₆₇₀ を用いて得られた増幅産物の塩基配列は, DTCS Quick Start Kit (ベックマン・コールター (株)) と CEQ8000 (ベックマン・コールター (株)) を用いて, ダイレクトシーケンス法によって決定した.

3. 連鎖解析

上記の実験を行って得られた DNA マーカーの連鎖解析には JoinMap 3 ソフトウェア (Kyazma B. V.) を用い, シュードテストクロス法および Kosambi の地図関数を用いて連鎖地図を構築した. 連鎖群を決めるための最小 LOD 値には 5.0 を採用した.

結 果

1. 表現型の評価

‘ふじ’ と選抜系統 5-12786 を交雑して得られた F1 集団の表現型を判定したところ, カラムナータイプと通常型の分離比は 30:38 であり, 1:1 の分離比に適合した ($\chi^2 = 0.9$, $P = 0.332$) ので, 5-12786 が単一の優性遺伝子 *Co* をヘテロで持つ (*Co/co*) ことが確認された (第 2-1 表). 一方, ‘ふじ’ と選抜系統 8H-9-45 を交雑して得られた F1 集団では, カラムナータイプと通常型の個体が出現したものの, 分離比は 47:8 であり, 1:1 に適合しなかった. ‘ふじ’ と ‘Tuscan’ を交雑して得られた F1 集団では, 表現型の判定が困難であった.

2. DNA マーカーの分析および連鎖地図の構築

実験の結果得られた DNA マーカーの遺伝子型を用いて連鎖解析を行ったところ, DNA マーカーと *Co* の連鎖関係が確認されたので, LG 10 の連鎖地図が構築され, *Co* は ‘ふじ’ × 5-12786 の F1 集団を用いて構築された選抜系統 5-12786

の連鎖地図と、‘ふじ’×8H-9-45のF1集団を用いて構築された選抜系統8H-9-45の連鎖地図にマッピングされた(第2-2図A, B)．‘ふじ’×‘Tuscan’のF1集団においては、表現型のデータが得られなかったため、Coを含まない‘Tuscan’の連鎖地図が構築された(第2-2図C)．

4種類のSSRマーカー(CH02a10, CH03d11, Hi01a03, COL)と2種類のSCARマーカー(SCAR₆₈₂, SCAR₂₁₆)は、3つの連鎖地図(第2-2図A, B, C)のいずれにおいてもマッピングされた．その他のDNAマーカーはカラムナータイプの交雑親において多型を示さなかったり、PCRによって増幅産物が得られなかったため、これら3つの連鎖地図の全てにマッピングされたものではなく、連鎖地図間の比較に用いることができなかった．5-12786の連鎖地図(第2-2図A)において、CoはSCAR₆₈₂とCH03d11で得られた遺伝子座とHi01a03との間にマッピングされた．8H-9-45の連鎖地図(第2-2図B)において、CoはSCAR₆₈₂およびCH03d11と0cMで連鎖していた．いずれのF1集団においても、Coと相引に連鎖する対立遺伝子は、CH03d11では177bpであり、Hi01a03では174bpであった．‘Tuscan’の連鎖地図(第2-2図C)においては、CH03d11とHi01a03が0cMで連鎖していた．また、F1集団中の各個体についてグラフ遺伝子型を作成したところ、表現型の判定およびDNAマーカーの遺伝子型の誤りと思われる二重組換え等は認められなかった(データ省略)．

Coの近傍にマッピングされたSCARマーカーSCAR₆₈₂、およびSSRマーカーCH03d11とHi01a03の染色体上での物理的な位置関係をさらに検証することを目的として、SCARマーカーSCAR₆₈₂、およびSSRマーカーCH03d11とHi01a03を用いて、カラムナータイプの品種・選抜系統と通常型の品種‘McIntosh’において検出される対立遺伝子を調べた(第2-2表)．その結果、CH03d11で検出される177bpの対立遺伝子およびSCAR₆₈₂で検出される682bpの対立遺伝子は、選抜系統5-263を除くすべてのカラムナータイプの品種・選抜系統で検出された．このうち、一部の選抜系統(8C-7-20, 8C-9-111, 8C-14-8, 5-400)では、CH03d11において177bpのホモ型を示していた．一方、SCAR₆₈₂は優性マーカー

一なので、ホモ型とヘテロ型を識別できなかった。Hi01a03 で検出される 174 bp の対立遺伝子は全てのカラムナータイプの品種・選抜系統で認められ、一部の選抜系統（8C-7-20, 8C-14-8, 5-128, 5-263, 5-400）では 174 bp のホモ型を示した。選抜系統 5-263 において CH03d11 と SCAR₆₈₂ によって *Co* と相引に連鎖する対立遺伝子が検出されなかった理由は、DNA マーカーと *Co* 間で起きた染色体の組換えが原因と考えられた（第 2-3 図）。同様に、SCAR マーカー SCAR₆₈₂、および SSR マーカー CH03d11 と Hi01a03 を用いて、通常型の品種とカラムナータイプの選抜系統との交雑で育成された 18 交雑組合せの F1 集団から選抜されたカラムナータイプの 170 個体において検出される対立遺伝子を調べた（第 2-3 表）。その結果、CH03d11 で検出される 177 bp の対立遺伝子は全ての個体（170 個体）で認められた。また、SCAR₆₈₂ で検出される 682 bp の対立遺伝子と Hi01a03 で検出される 174 bp の対立遺伝子は、それぞれ 168 個体（98.8%）、165 個体（97.1%）で認められた。

SCAR マーカー SCB82₆₇₀（Kim et al., 2003）は 1.8 cM の遺伝距離で *Co* と連鎖しているとされているが（Kim et al., 2003）、本実験の供試材料のうち、SCB82₆₇₀ によって増幅産物が検出されたのは、カラムナータイプの品種 ‘Tuscan’ の他、通常型の品種 ‘Jonathan’（日本名：‘紅玉’）、および ‘Tuscan’ の交雑親にあたる通常型の品種 ‘Greensleeves’ のみであった（データ省略）。「Tuscan」および ‘Greensleeves’ から得られた増幅産物の塩基配列は、論文に記載されている SCB82₆₇₀ の塩基配列（Kim et al., 2003）と一致していた。「ふじ」× ‘Tuscan’ の F1 集団において、SSR マーカー CH03d11 と SCB82₆₇₀ の組換え価は 0.484 であり、連鎖関係は認められなかった。

考 察

これまで報告されている多くの論文では、カラムナー性の表現型を判定する際に、2 年生以上の自根苗が用いられている（Hemmat et al., 1997; Kim et al., 2003; Tian et al., 2005; Zhu et al., 2007）。一方、表現型を判定する際に、‘Telamon’

(カラムナータイプ) と ‘Braeburn’ (通常型) の F1 集団を用いて集団に含まれる全ての個体について、自根苗と台木用品種 ‘M. 9’ を台木とした接ぎ木苗の 2 種類が育成されて、実験に用いられている例がある (Kenis・Keulemans, 2007). このときは、カラムナータイプと通常型で違いがある節間長などの表現型について、接ぎ木苗の方が両者の違いがよく現れていたため、台木の影響によってカラムナー性が明確に発現しやすくなるなど、根系が樹形に関わる形質に対して大きな影響を与えると結論付けられている (Kenis・Keulemans, 2007). 同時に行われた QTL 解析の結果、カラムナー性の表現型に与える主な効果は *Co* で説明できるが、その他のいくつかの QTL もカラムナー性の発現に関与していることが明らかにされている (Kenis・Keulemans, 2007). このことから、カラムナータイプを示すかどうかは *Co* の有無で決定されているが、その発現強度は *Co* と独立に遺伝する QTL の影響を受けていると考えられている。

本節においても、Kenis・Keulemans (2007) と同じように接ぎ木苗を用いた材料において、明確にカラムナータイプと通常型が識別された。一方、自根苗は、5 年生で生育が旺盛であった個体を用いた ‘ふじ’ × 8H-9-45 の F1 集団において、カラムナータイプの識別が可能であったが、1 年生であった ‘ふじ’ × ‘Tuscan’ の F1 集団においては、両者の中間的な特徴を持った個体が出現したため、表現型の判定ができなかった。このような個体は、主に生育不良の個体に多かったため、カラムナータイプと通常型の中間型を示す個体が出現している例 (Lapins, 1976; Hemmat et al., 1997; Kim et al., 2003) については、生育不良な自根苗において評価がなされた可能性があると考えられた。

次に、カラムナータイプの選抜系統 5-12786, 選抜系統 8H-9-45, および ‘Tuscan’ の連鎖地図 (第 2-2 図), および、通常型の品種とカラムナータイプの選抜系統との交雑で育成された 18 交雑組合せの F1 集団から選抜されたカラムナータイプの 170 個体において、既知の DNA マーカーを検出した結果 (第 2-3 表) から、*Co* 近傍の DNA マーカーの並び順は、SCAR₆₈₂, CH03d11, Hi01a03 であることが確認された。これら 3 種類の DNA マーカーと *Co* との遺伝距離を、DNA マ

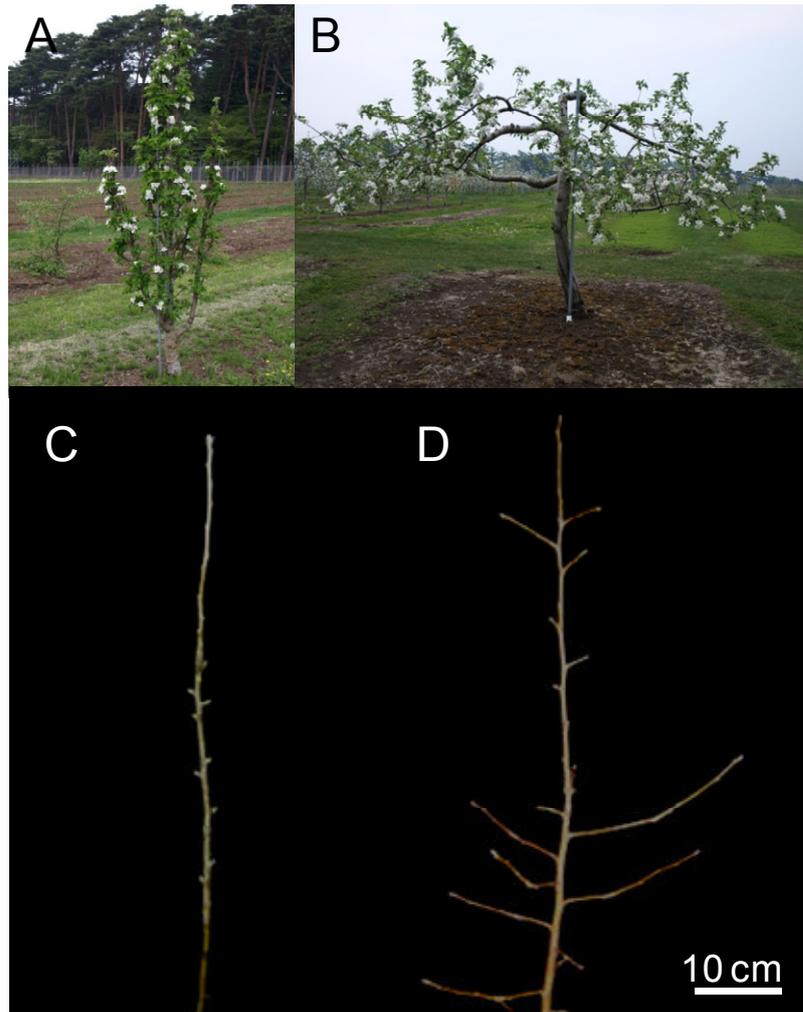
ーカーと *Co* との間で組換えが生じていた個体数から推定すると、*Co* と最も強く連鎖している DNA マーカーは CH03d11 であり、次いで SCAR₆₈₂, Hi01a03 の順であると判断された。この DNA マーカーの並び順は、リンゴの飽和標準連鎖地図 (Silfververg-Dilworth et al., 2006) および 4 つの交雑実生集団の統合連鎖地図 (N'Diaye et al., 2008) と一致していた。これらの結果から、CH03d11 は SCAR₆₈₂ よりも *Co* の近傍に座乗しており、Hi01a03 は *Co* を挟んでこれらの反対側に座乗していることが示された。

本節で明らかにされた、*Co* と既知の DNA マーカーの位置関係は、これまでに報告されている結果と一部異なっていた。たとえば、SCAR₆₈₂ が CH03d11 よりも *Co* の近傍に座乗するとされていたり (Tian et al., 2005), CH03d11 と CH02c11 間に *Co* がマッピングされていた (Fernandez-Fernandez et al., 2008)。このように、既知の DNA マーカーと *Co* の位置関係が一致していない主要因として、DNA マーカーの密度が低いことや、表現型および DNA マーカー遺伝子型の評価ミス、もしくは Tian et al. (2005) や Fernandez-Fernandez et al. (2008) の用いた材料が、*Co* の近傍で二重組換えを起こして、連鎖解析の結果に影響を与えていたことなどが考えられた。

また、カラムナータイプの品種 ‘Tuscan’ から開発された DNA マーカー SCB82₆₇₀ (Kim et al., 2003) は、LG 10 に座乗していない可能性が示唆された。本節において行った連鎖解析の結果、SCB82₆₇₀ は LG 10 の DNA マーカーとの連鎖関係が認められなかった。さらに、‘Tuscan’ 以外のカラムナータイプの品種・選抜系統からこの DNA マーカーが検出できないとされている報告が多い (Fernandez-Fernandez et al., 2008; Kenis・Keulemans, 2007; Tian et al., 2005)。そこで、SCB82₆₇₀ の由来を確認するために ‘Tuscan’ とその交雑親である通常型の品種 ‘Greensleeves’ において得られた SCB82₆₇₀ の塩基配列を比較したところ、両者が一致していたので、SCB82₆₇₀ は ‘Greensleeves’ から ‘Tuscan’ に遺伝しており、*Co* とは連鎖していないことが示唆された。

本節において、*Co* と強く連鎖すると着目した SCAR マーカー SCAR₆₈₂, およ

び SSR マーカー CH03d11 と Hi01a03 では、カラムナータイプの選抜系統である 5-263 を交雑親とした集団から DNA マーカーを用いて選抜を行うことができないと考えられた。すなわち、5-263 において CH03d11 による対立遺伝子型は 118 bp のホモ型であり、Hi01a03 による対立遺伝子型も 174 bp のホモ型であったので、Co と相引に連鎖する対立遺伝子が識別できないと判断された。さらに、SCAR₆₈₂ による 682 bp の増幅産物も検出されなかったため、5-263 を交雑親とする交雑実生集団において DNA マーカーを用いた選抜を行うためには、Co のさらに近傍に連鎖する DNA マーカーを開発する必要があると考察された。



第 2-1 図. カラムナータイプと通常型のリンゴ樹の形態.

開花期の (A) カラムナータイプの樹 (21 年生), (B) 通常型の樹 (20 年生).

休眠期の ‘ふじ’ × 8H-9-45 の F1 集団の 5 年生の自根苗のうち, (C) カラムナータイプの個体, (D) 通常型の個体.

第 2-1 表. カラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* のマッピングに用いた交雑実生集団.

交雑 組合せ	表現型評価時の樹齡/ 台木・自根の別	個体数	表現型		P 値
			通常型	カラムナー タイプ°	
ふじ × <u>5-12786^z</u>	2 年生 / JM1 接ぎ木苗	68	38	30	0.332
ふじ × <u>8H-9-45</u>	5 年生 / 自根苗	55	8	47	0.000 ^y
ふじ × <u>Tuscan</u>	1 年生 / 自根苗	64	— ^x	—	—

^zカラムナータイプの交雑親 (*Co/co*) に下線を付して示す.

^y χ^2 検定において 1:1 の分離比に 1%水準で適合しないことを示す.

^x—は 1 年生の実生苗なので表現型の判定がなされなかったことを示す.

第 2-2 表. SCAR マーカー SCAR₆₈₂ と 2 種類の SSR マーカー CH03d11, Hi01a03 を用いて, カラムナータイプの品種・選抜系統と通常型の品種 ‘McIntosh’ で検出された対立遺伝子.

品種・ 選抜系統	来歴または交雑組合せ	SCAR ₆₈₂	CH03d11	Hi01a03
Wijcik	McIntosh の枝変わり	+	126 bp/ <u>177 bp</u> ^y	167/ <u>174</u>
McIntosh	偶発実生	+	126/177	167/174
Tuscan	Wijcik × Greensleeves	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
Trajan	Golden Delicious × Wijcik	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
Telamon	Wijcik × Golden Delicious	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-1-13	8N-24-57 ^z × 8N-24-49 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-2-11	8N-24-57 ^z × 8N-24-49 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-2-16	8N-24-57 ^z × 8N-24-49 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-2-26	8N-24-57 ^z × 8N-24-49 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-4-27	不明	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-5-3	8N-24-50 ^z × 8N-25-23 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-5-29	8N-24-50 ^z × 8N-25-23 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-6-4	8N-24-50 ^z × 8N-25-23 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-6-5	8N-24-50 ^z × 8N-25-23 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-7-15	8N-24-50 ^z × 8N-25-23 ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-9-1	Wijcik × Alkmene	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-9-45	不明	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8H-12-50	不明	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8C-7-20	Wijcik × Empire ^z	+	<u>177</u> /177	<u>174</u> /174
8C-7-42	Wijcik × Empire ^z	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
8C-9-111	Wijcik × Cox's Orange Pippin	+	<u>177</u> /177	<u>174</u> /211
8C-14-8	8N-24-59 ^z × Wijcik	+	<u>177</u> /177	<u>174</u> /174
8S-60-74	不明	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
5-128	8H-1-14 の放任授粉	+	122/ <u>177</u>	<u>174</u> /174
5-263	8H-6-4 の放任授粉	—	118/ <u>118</u>	<u>174</u> /174
5-296	8H-6-4 の放任授粉	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /187
5-305	8H-6-4 の放任授粉	+	122/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
5-306	8H-6-4 の放任授粉	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /211
5-375	8H-12-50 の放任授粉	+	122/ <u>177</u>	<u>174</u> /187
5-400	8H-6-5 の放任授粉	+	<u>177</u> /177	<u>174</u> /174
5-8246	TSR29T219 × 8H-9-1	+	114/ <u>177</u>	<u>174</u> /190
5-12786	ふじ × 8H-2-26	+	118/ <u>177</u>	<u>174</u> /187

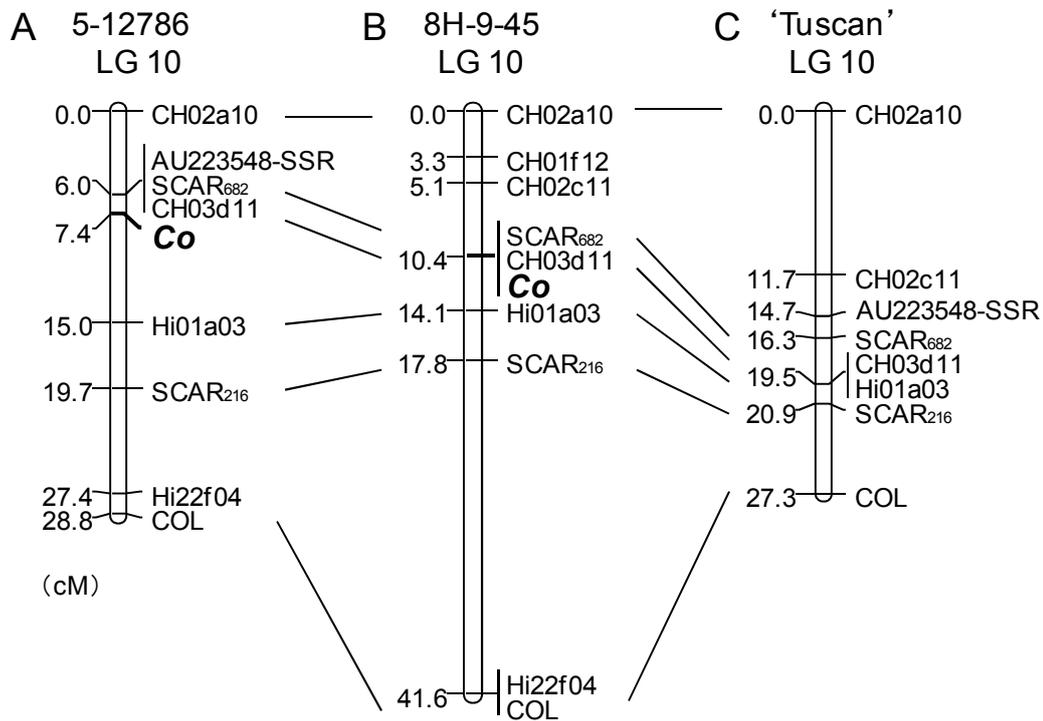
^z8N-24-49, 8N-24-50, 8N-24-57, 8N-24-59, 8N-25-23 は ‘Golden Delicious’ × ‘Wijcik’, ‘Empire’ は ‘McIntosh’ × ‘Delicious’ から選抜された系統 (選抜系統).

^yCo と相引に連鎖する対立遺伝子に下線を付して示す.

第 2-3 表. SCAR マーカー SCAR₆₈₂ と 2 種類の SSR マーカー CH03d11, Hi01a03 を用いて, 通常型の品種とカラムナータイプの選抜系統との交雑で育成された 18 交雑組合せの F1 集団から選抜されたカラムナータイプを示す 170 個体で検出された対立遺伝子.

交雑組合せ 通常型品種×カラムナータイプ ^z	個体数	SCAR ₆₈₂	CH03d11	Hi01a03
		あり /なし	177 bp あり /177 bp なし	174 bp あり /174 bp なし
Jonathan × <u>8H-2-26</u> ^z	9	9/0	9/0	9/0
ふじ × <u>8H-2-26</u>	15	15/0	15/0	15/0
千秋 × <u>8H-2-26</u>	7	7/0	7/0	7/0
Golden Delicious × <u>8H-6-4</u>	5	5/0	5/0	4/1
Jonathan × <u>8H-6-4</u>	5	5/0	5/0	5/0
千秋 × <u>8H-6-4</u>	19	19/0	19/0	19/0
さんさ × <u>8H-6-4</u>	14	14/0	14/0	14/0
ふじ × <u>8H-6-5</u>	7	7/0	7/0	7/0
Jonathan × <u>8H-7-15</u>	5	5/0	5/0	5/0
ふじ × <u>8H-7-15</u>	9	8/1	9/0	8/1
千秋 × <u>8H-7-15</u>	6	6/0	6/0	5/1
さんさ × <u>8H-7-15</u>	11	11/0	11/0	11/0
Golden Delicious × <u>8H-9-1</u>	16	16/0	16/0	16/0
ふじ × <u>8H-9-1</u>	10	10/0	10/0	9/1
Golden Delicious × <u>8S-60-74</u>	6	6/0	6/0	5/1
Jonathan × <u>8S-60-74</u>	7	6/1	7/0	7/0
Ralls Janet × <u>8S-60-74</u>	2	2/0	2/0	2/0
千秋 × <u>8S-60-74</u>	17	17/0	17/0	17/0
合計	170	168/2	170/0	165/5
(%)		(98.8)	(100)	(97.1)

^zカラムナータイプの交雑親に下線を付して示す.



第 2-2 図. カラムナータイプの選抜系統 5-12786, 選抜系統 8H-9-45, ‘Tuscan’ における第 10 連鎖群 (LG 10) の連鎖地図.

(A) ‘ふじ’ × 5-12786 の F1 集団 (68 個体) を用いて構築された 5-12786 の連鎖地図.

(B) ‘ふじ’ × 8H-9-45 の F1 集団 (55 個体) を用いて構築された 8H-9-45 の連鎖地図.

(C) ‘ふじ’ × ‘Tuscan’ の F1 集団 (64 個体) を用いて構築された ‘Tuscan’ の連鎖地図.

カラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* を太字で示す.

3 つの連鎖地図に共通して座乗している DNA マーカーを実線で結ぶ.

DNAマーカー/ 遺伝子	遺伝距離 (cM)	Wijcik		8H-6-4 (8N-24-50 × 8N-25-23)		5-263 (8H-6-4の放任授粉)	
		195	173	195	167	167	161
CH02a10	0.0	195	173	195	167	167	161
SCAR682	6.0	+	-	+	-	-	-
CH03d11	6.0	177	126	177	118	118	118
Co	7.4	Co	co	Co	co	Co	co
Hi01a03	15.0	174	167	174	211	174	174
SCAR216	19.7	+	-	-	-	-	-
COL	28.8	241	233	241	221	241	221

第 2-3 図. カラムナータイプの選抜系統 5-263 の来歴から推測された, 世代の推移に伴う第 10 連鎖群のカラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* の近傍における対立遺伝子型の変化.

矢印は 1 世代の経過を示す.

選抜系統名の下 () 内は, 選抜系統の来歴を示す.

SSR マーカーを用いて検出される対立遺伝子は増幅長 (bp) で示す.

‘Wijcik’ において *Co* が座乗する染色体を紫色で, 相反側の染色体を緑色で, それ以外の染色体を白色で示す.

選抜系統 8N-24-50, 8N-25-23 の交雑組合せは, いずれも ‘Wijcik’

× ‘Golden Delicious’.

第2節. カラムナー性個体を早期に選抜するための DNA マーカーの開発

前節では, LG 10 に座乗する 2 種類の SSR マーカー CH03d11 と Hi01a03 との間に *Co* が座乗することを明らかにした. DNA マーカー選抜を行う際に, 選抜対象の遺伝子と DNA マーカーとの遺伝距離は, 選抜の効率を決定する本質的な要素である. 対象遺伝子のごく近傍に座乗し, 極めて強く連鎖する DNA マーカーを選抜に用いることによって, 対象遺伝子と DNA マーカーの間で起きた組換えに起因する, 望ましくない表現型の個体を誤選抜するリスクが減らせる. しかしながら, 前節で得られた 2 種類の SSR マーカー (CH03d11, Hi01a03) と *Co* の間には一定の遺伝距離があるので, 選抜に用いる DNA マーカーとしては, より近傍に連鎖して, かつカラムナータイプを示す個体を識別しやすい DNA マーカーの開発が求められる.

最近, ‘Golden Delicious’ のゲノム情報がウェブサイト「Genome Database for Rosaceae (GDR)」(<http://www.rosaceae.org/>) に公開されている (Velasco et al., 2010). リンゴのゲノム情報においては, 標準連鎖地図の連鎖群番号に対応させて染色体番号が付けられている. したがって, ゲノム情報を利用することで, 染色体ごとの塩基配列情報がその位置情報とともに利用できるようになったので, コンピューターを用いた解析によって, 新規 DNA マーカーを目的の位置に容易に設計することが可能になっている. この手法によって, リンゴ果実の酸含量を決定する遺伝子 *Ma* の高解像度マッピングが進められ, ゲノム情報から推定されている遺伝子の機能から *Ma* の候補遺伝子が絞り込まれている (Bai et al., 2012a; Khan et al., 2012; Xu et al., 2012).

そこで本節においては, カラムナータイプの実生個体を早期に選抜することが可能な DNA マーカーを開発することとした. まず初めに, 公開リンゴゲノム情報を利用して既知の 2 種類の SSR マーカー (CH03d11, Hi01a03) 間の領域に新規 SSR マーカーを設計して, *Co* 近傍の高解像度マッピングを行うこととした. 次に, その結果を基に, カラムナータイプの実生個体を選抜するため

の DNA マーカーを開発することとした。

材料および方法

1. 植物材料の育成

Co の高解像度マッピングには、通常型の品種とカラムナータイプの選抜系統を交雑して育成された 31 交雑組合せの F1 集団の 1,000 個体を供試した（第 2-4 表）。このうち、集団 1~20 の F1 集団には前節と共通の材料を用いた。なお、前節で用いた‘ふじ’×‘Tuscan’の F1 集団（64 個体）は表現型が未評価であったので、高解像度マッピングには供試しなかった。また、前節で用いた集団 1~20 に加えて、集団 21~31 として、通常型の品種とカラムナータイプの選抜系統との交雑によって得られた 11 交雑組合せの F1 集団から育成された 707 個体を追加して供試した。集団 21（6-837×5-8246）は、実験に供試するまで無選抜の状態で養成されていた集団である。集団 22~26 は、自根苗が 1 年生であった時点でカラムナータイプ様の樹形を示していた個体である。集団 27~31 については、播種後、本葉が 1~2 枚展開した時点で SCAR マーカー SCAR₆₈₂ を用いて多型を検出した結果、682 bp の増幅産物が得られた個体を選抜して供試した。

表現型がカラムナータイプか、通常型かを判定するための評価基準は前節に
ならい、Hemmat et al. (1997) の方法を用いた。‘ふじ’×8H-9-45（集団 2，第
2-4 表）を除く全ての供試個体については、自根苗から穂木を採取して台木用
品種‘JM1’に接ぎ木し、2 年生以上に養成してから、表現型を判定した。‘ふ
じ’×8H-9-45 については、5 年生の自根苗を用いて表現型を判定した。集団 1
~25 については全個体の表現型を判定した。一方、集団 26~31 については、
後述する特定の DNA マーカー間で組換えが起きていた個体のみ、表現型を判
定した。

2. リンゴゲノム情報を利用した DNA マーカーの開発

前節で実験に用いた SSR マーカー（CH03d11, Hi01a03）と SCAR マーカー

SCAR₆₈₂ の塩基配列情報をウェブサイト <http://www.hidras.unimi.it/>, もしくは GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) からダウンロードした。ダウンロードした塩基配列情報を用いて GDR のウェブサイト上で利用できる blastn プログラムによって相同性検索を行い、リンゴゲノム情報の中から高い相同性を示すコンティグ（リンゴゲノム情報を構成する塩基配列群の最小単位）を探索した。2種類の SSR マーカー（CH03d11, Hi01a03）と最も高いホモロジーを示したコンティグの間から、10~80 kbp 間隔で任意のコンティグを選び、その塩基配列から目視によって 2 bp または 3 bp 繰り返しの SSR 配列を探した。次に、Primer3 プログラムを用いてそれらの SSR 配列を挟み込むプライマー対を設計した。

供試材料からのゲノム DNA 抽出, PCR および PCR 産物の電気泳動は第 1 章にならって行った。設計した新規 SSR マーカーの PCR による増幅確認と、座乗する連鎖群の同定は、既存の連鎖地図に SSR マーカーを領域マッピング（任意の DNA マーカーが座乗する連鎖群、および連鎖群における一定範囲の座乗領域を明らかにできる手法）することで行った。この作業には、リンゴの台木用品種 ‘JM7’ およびミツバカイドウ (*M. sieboldii*) の ‘サナシ 63’ と、これらの F1 集団 126 個体から、なるべく多くの領域を同定できるように選抜した 14 個体の領域マッピングセットを用いた。領域マッピングの結果、LG 10 に座乗した SSR マーカーは、あらためて集団 1（‘ふじ’ × 5-12786）を用いて構築された選抜系統 5-12786 の連鎖地図へマッピングした。

3. 高解像度マッピング

選抜系統 5-12786 の LG 10 の連鎖地図において、*Co* の最も近傍で組換えを起こしていた個体が得られた SSR マーカー Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.27 を用いて、通常型の品種とカラムナータイプの選抜系統を交雑して育成された 31 交雑組合せの F1 集団の 1,000 個体で検出される対立遺伝子を調べた。このとき、本来は Mdo.chr10.27 ではなく *Co* のさらに近傍に座乗していた Mdo.chr10.26 を用いるべきであったが、得られる対立遺伝子が識別しやすいという理由で便宜的

に Mdo.chr10.27 を用いた。カラムナータイプの交雑親に由来する染色体が SSR マーカー Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.27 間で組換えを起こしていると判断された個体については、さらに SSR マーカー Mdo.chr10.26 を検出した。得られた対立遺伝子型をもとに、Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.26 間で組換えを起こしている個体（組換え型個体）を選抜した。これらの組換え型個体を供試して、両 SSR マーカー間に座乗しているその他の SSR マーカーを用いて検出される対立遺伝子を調べた。得られた遺伝子型から、カラムナータイプの交雑親に由来する染色体について Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.26 間のグラフ遺伝子型を作成した。

4. 栽培品種群の祖先にあたる品種における対立遺伝子型の評価

開発した SSR マーカーが DNA マーカー選抜に利用可能かどうか、近年育成されている栽培品種群の祖先にあたる 7 品種（‘Delicious’，‘Golden Delicious’，‘Jonathan’（日本名：‘紅玉’），‘Cox’s Orange Pippin’，‘McIntosh’，‘Ralls Janet’（日本名：‘国光’），‘印度’）で検出される対立遺伝子を調べて検証した。

5. 連鎖解析

上記の実験を行って得られた DNA マーカーの連鎖解析には JoinMap 4 ソフトウェア（Kyazma B. V.）を用い、シュードテストクロス法および Kosambi の地図関数を用いて連鎖地図を構築した。連鎖群を決めるための最小 LOD 値には 10 を採用した。

結 果

1. 表現型の評価

集団 1~25 の 634 個体について表現型を判定したところ、167 個体がカラムナータイプ、467 個体が通常型と判定された（第 2-4 表）。集団 21（6-837×5-8246）の種子親である 6-837 は ‘Red Jade’ に由来するしだれ性の個体である。カラムナータイプの個体としだれ型の個体を交雑すると、両者の中間的な表現型を示す個体が出現することが知られている（Brown et al., 2004）。集団 21 においても、カラムナータイプとしだれ型の中間的な表現型を示す個体が出現したが、この

ような個体でもカラムナータイプの特徴，すなわち主幹，および長く伸長した側枝に短果枝の着生が多く，節間長が短いことが維持されていたので，表現型の判定に支障はないものと判断した．集団 26～31 の 366 個体のうち，組換え型個体であるとして表現型を判定した集団 29～31 の 9 個体は，5 個体がカラムナータイプ，4 個体が通常型と判定された．

2. DNA マーカーの分析および連鎖地図の構築

リンゴゲノム情報から，*Co* に連鎖する DNA マーカーの塩基配列と高い相同性を示すコンティグがリンゴゲノムの第 10 染色体（連鎖地図の LG 10 と対応する染色体）に見いだされた（第 2-5 表）．これらのコンティグの位置情報は連鎖地図上の DNA マーカーの並び順と一致した．SSR マーカー CH03d11 と相同性の高かったコンティグ MDC015757.243 と SSR マーカー Hi01a03 と相同性の高かったコンティグ MDC001120.265 との間に位置するコンティグの塩基配列から，28 種類のプライマー対（Mdo.chr10.1～Mdo.chr10.27, Mdo.chr10.34）を設計し，新規 SSR マーカーとした（第 2-6 表）．設計した SSR マーカーを領域マッピングした結果，28 種類のうち，Mdo.chr10.10 を除く 27 種類から増幅産物が得られ，このうち 22 種類はマッピング可能な多型を示した．22 種類のうち 19 種類は，LG 10 において *Co* が座乗する領域と相同な領域にマッピングされた．一方，Mdo.chr10.19 と Mdo.chr10.20 は LG 17 に，Mdo.chr10.21 は LG 3 にマッピングされた．そこで，LG 10 にマッピングされた 19 種類の SSR マーカーについて，選抜系統 5-12786 の連鎖地図へのマッピングを試みた（第 2-4 図）．その結果，19 種類のうち 4 種類（Mdo.chr10.2, Mdo.chr10.4, Mdo.chr10.8, Mdo.chr10.13）においては，選抜系統 5-12786 の連鎖地図にマッピングできる多型を示さなかった．また，Mdo.chr10.3 と Mdo.chr10.25 については増幅が安定しなかった．そこで，これら 6 種類の SSR マーカーを除く 13 種類の SSR マーカーを用いて連鎖解析を行い，連鎖地図を構築した．その結果，8 種類の SSR マーカー（Mdo.chr10.9, Mdo.chr10.11, Mdo.chr10.12, Mdo.chr10.14, Mdo.chr10.15, Mdo.chr10.16, Mdo.chr10.34, Mdo.chr10.23）は *Co* と 0 cM で連鎖していた．3

種類の SSR マーカー (Mdo.chr10.1, Mdo.chr10.6, Mdo.chr10.7) は CH03d11 と 0 cM で連鎖していた。また, 2 種類の SSR マーカー (Mdo.chr10.26, Mdo.chr10.27) は *Co* と Hi01a03 の間に座乗していた。以上の結果から, *Co* は Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.26 の間に座乗していると判断された。

3. 高解像度マッピング

高解像度マッピングには, 供試した F1 集団の中から, *Co* のごく近傍で組換えを起こしていると判断された個体, すなわち Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.26 間でカラムナータイプの交雑親に由来する染色体が組換えを起こしていた個体 (組換え型個体) を選抜して用いた。F1 集団から組換え型個体を探索した結果, 組換え型個体は 1,000 個体中に 22 個体 (2.2 %) 認められた (第 2-4 表, 第 2-5 図)。選抜系統 5-263 においても, ‘Wijcik’ に由来する典型的な *Co* に相引に連鎖する対立遺伝子が検出されたので, 後代集団から組換え型個体が識別され, 5-263 を交雑親とする集団 22~25 においては 4 個体の組換え型個体が認められた。22 個体のうち 11 個体は Mdo.chr10.7 と *Co* の間, 残りの 11 個体が Mdo.chr10.26 と *Co* の間で組換えを起こしていた。

次に, Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.26 間に座乗する 12 種類の SSR マーカーを用いて, 組換え型個体で検出される対立遺伝子を調べた (第 2-5 図)。Mdo.chr10.8 と Mdo.chr10.13 は, 選抜系統 5-12786 の連鎖地図にはマッピングできなかったが, 領域マッピングでは *Co* に対応する領域に座乗する結果が得られたので, 両 SSR マーカーについても同様に解析を行った。組換え型個体において対立遺伝子を調べた結果, 組換えが起きた領域がそれぞれの個体で 1 箇所ずつ特定されたので, Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.26 間における 22 個体のグラフ遺伝子型が得られた (第 2-5 図)。グラフ遺伝子型と表現型を比較したところ, Mdo.chr10.12, Mdo.chr10.13, Mdo.chr10.14 が *Co* と 0 cM で連鎖していた。*Co* の最も近傍で組換えが起きていた 3 個体 (7-4121, 7-4189, WxC-9) の対立遺伝子型から, *Co* が座乗すると考えられる候補領域は Mdo.chr10.11 と Mdo.chr10.15 の間に絞り込まれた。この領域は ‘Golden Delicious’ のゲノム情報に換算すると 196 kbp で

あった。

4. 栽培品種群の祖先にあたる品種における対立遺伝子型の評価

Coと0 cMで連鎖していた3種類のSSRマーカー(Mdo.chr10.12, Mdo.chr10.13, Mdo.chr10.14)を用いて、近年育成されている栽培品種群の祖先にあたる7品種(‘Delicious’, ‘Golden Delicious’, ‘Jonathan’, ‘Cox’s Orange Pippin’, ‘McIntosh’, ‘Ralls Janet’, ‘印度’)で検出される対立遺伝子を調べた(第2-7表)。その結果, ‘McIntosh’は3種類のSSRマーカー全てで‘Wijcik’と同じ対立遺伝子型を示した。Mdo.chr10.12とMdo.chr10.14においてCoと相引に連鎖する対立遺伝子は311 bpと138 bpであり、同じ増幅長の対立遺伝子は‘McIntosh’と‘Wijcik’のみで検出された。一方, Mdo.chr10.13では, Coと相引に連鎖する123 bpの対立遺伝子と同じ増幅長の対立遺伝子が‘Delicious’, ‘Jonathan’, ‘Cox’s Orange Pippin’でも検出された。

考 察

‘Golden Delicious’のゲノム情報を利用して、CH03d11とHi01a03の間から28種類(第2-6表)のSSRマーカーを設計し、そのうち27種類から増幅産物が得られた。このことは‘Golden Delicious’のゲノム情報に含まれる塩基配列がSSRマーカーなどのDNAマーカーの設計に有用であることを示す。しかしながら、ゲノム情報に付随する位置情報には若干の疑問があると考えられた。たとえば、いずれかの連鎖群にマッピングできた22種類のSSRマーカーのうち、3種類(Mdo.chr10.19, Mdo.chr10.20, Mdo.chr10.21)は設計した連鎖群(LG 10)とは異なる連鎖群(LG 3またはLG 17)にマッピングされたので、これら3種類のSSRマーカーを設計したコンティグに付与されている位置情報が誤っている可能性を示唆している。

シュードテストクロス法による連鎖解析の結果、13種類のSSRマーカーが選抜系統5-12786のLG 10の連鎖地図にマッピングされた(第2-4図)。この他の4種類(Mdo.chr10.2, Mdo.chr10.4, Mdo.chr10.8, Mdo.chr10.13)は選抜系統

5-12786 においてマッピングに使える多型が得られなかったので、5-12786 の連鎖地図中にマッピングすることができなかったが、これらについては、他の SSR マーカーとの物理的な位置関係がゲノム情報の通りであると仮定して、高解像度マッピングに用いた。その結果、全ての組換え型個体について、組換えが起きた領域を明らかにできたので、少なくとも供試した SSR マーカーにおいては、遺伝子座の物理的な位置とコンティグの位置情報は一致していると判断された。また、Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.26 間の物理距離は ‘Golden Delicious’ のゲノム情報に換算して 1,116 kbp であり、この間で得られた組換え型個体は 22 個体であるので、この領域では約 50 kbp ごとに 1 回の組換えが起きた計算になるが、実際に組換えが起きた領域の分布は均等でなかった (第 2-5 図)。たとえば、Mdo.chr10.7 と Mdo.chr10.8 間は組換えが起きやすい「ホットスポット」と考えられ、54 kbp の物理距離の間で 5 個体が組換えを起こしていた。一方、Mdo.chr10.8 と Mdo.chr10.11 間、および Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.14 間は組換えが起きにくい「コールドスポット」と考えられ、それぞれ 144 kbp と 102 kbp の物理距離があるが、この領域で組換えを起こしていた組換え型個体は認められなかった。

Co が座乗すると考えられる候補領域は *Co* の最も近傍で組換えを起こしていた 3 個体 (7-4121, 7-4189, WxC-9) によって同定され、Mdo.chr10.11 と Mdo.chr10.15 間の 196 kbp に絞り込まれた (第 2-5 図)。*Co* の高解像度マッピングについては他の研究グループにおいても取り組まれている。これまでに本節の研究とほぼ同じ個体数の交雑実生集団を用いた高解像度マッピングがなされており、*Co* の座乗する候補領域は本研究とほぼ重複する領域に定められている (Bai et al., 2012b; Baldi et al., 2012)。一方で、リンゴにおいてはこれまでに、病害虫抵抗性 (Patocchi et al., 1999; Cevik・King, 2002; Galli et al., 2010; Parravicini et al., 2011) や果実品質 (Khan et al., 2012; Xu et al., 2012) の高解像度マッピングが行われているが、用いられた F1 集団の個体数の多少と、目的の遺伝子の座乗する候補領域が絞り込まれた範囲との関係は一定ではない。このことは、絞

り込める領域の大きさが、目的とする領域での組換えの起こりやすさに依存していることを示唆している。このような理由から、高解像度マッピングに必要な個体数を一様に定めることは困難であると考えられた。

実際に DNA マーカー選抜を行う際には、DNA マーカーと目的の遺伝子が強く連鎖していることに加えて、DNA マーカーで識別される目的の対立遺伝子が育種素材中で特異的に識別できることも重要である (田中, 2006)。Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.14 は 1,000 個体の F1 集団において *Co* と 0 cM で連鎖していた (第 2-5 図) ことに加え、*Co* と相引に連鎖する対立遺伝子は栽培品種の祖先にあたる品種で検出された対立遺伝子とは異なる塩基長を示したので (第 2-7 表)、*Co* とその他の対立遺伝子を容易に識別することが可能である。このような理由から、Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.14 はカラムナータイプの個体を早期に選抜するための DNA マーカーとして有用であると判断された。しかし、‘McIntosh’ の後代の品種・系統においては、Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.14 を用いても *Co* と相引に連鎖する対立遺伝子と同じ塩基長の対立遺伝子が増幅される可能性があるため注意が必要である。したがって、カラムナー性のリンゴ育種に DNA マーカー選抜を採り入れる場合は、‘Wijcik’ と ‘McIntosh’ をも識別することが可能な、*Co* を特異的に増幅する DNA マーカーを開発することが最も理想的と考えられる。すなわち、このような DNA マーカーであれば、‘McIntosh’ の後代品種であっても *Co* を特異的に検出して、選抜に利用可能である。

第2-4表. カラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* の高解像度マッピングに用いた交雑実生集団.

集団 番号 ^z	交雑組合せ ^y 通常型品種×カラムナータイプ ^o	個体数	表現型		組換え型 個体 ^x
			通常型	カラムナータイプ ^o	
1	ふじ × <u>5-12786</u>	68	38	30	4
2	ふじ × <u>8H-9-45</u>	55	8	47	1
3	Jonathan × <u>8H-2-26</u>	9	0	9	0
4	ふじ × <u>8H-2-26</u>	15	0	15	0
5	千秋 × <u>8H-2-26</u>	7	0	7	0
6	Golden Delicious × <u>8H-6-4</u>	5	0	5	1
7	Jonathan × <u>8H-6-4</u>	5	0	5	0
8	千秋 × <u>8H-6-4</u>	19	0	19	0
9	さんさ × <u>8H-6-4</u>	14	0	14	0
10	ふじ × <u>8H-6-5</u>	7	0	7	0
11	Jonathan × <u>8H-7-15</u>	5	0	5	0
12	ふじ × <u>8H-7-15</u>	9	0	9	0
13	千秋 × <u>8H-7-15</u>	6	0	6	0
14	さんさ × <u>8H-7-15</u>	11	0	11	0
15	Golden Delicious × <u>8H-9-1</u>	16	0	16	0
16	ふじ × <u>8H-9-1</u>	10	0	10	0
17	Golden Delicious × <u>8S-60-74</u>	6	0	6	1
18	Jonathan × <u>8S-60-74</u>	7	0	7	0
19	Ralls Janet × <u>8S-60-74</u>	2	0	2	0
20	千秋 × <u>8S-60-74</u>	17	0	17	0
21	6-837 × <u>5-8246</u>	100	54	46	2
22	ふじ × <u>5-263</u>	68	26	42	3
23	Golden Delicious × <u>5-263</u>	59	15	44	1
24	はつあき × <u>5-263</u>	68	14	54	0
25	さんさ × <u>5-263</u>	46	12	34	0
小計		634	167	467	13
26	シナノスイート × <u>5-13097</u>	82	- ^w	-	0
27	ふじ × <u>5-8246</u>	19	-	-	0
28	つがる × <u>5-8246</u>	12	-	-	0
29	さんさ × <u>5-12786</u>	142	-	-	6
30	秋映 × <u>5-13097</u>	63	-	-	2
31	新世界 × <u>5-13097</u>	48	-	-	1
合計		1000			22

^z 集団番号 1-20 は第1節で用いた材料と同一.

^y カラムナータイプの交雑親に下線を付して示す.

^x SSR マーカー *Mdo.chr10.7* と *Mdo.chr10.26* 間でカラムナータイプの交雑親に由来する染色体が組換えを起こしていた個体.

^w - は表現型の判定がなされなかったことを示す.

第 2-5 表. リンゴゲノム情報に対する blastn による相同性検索.

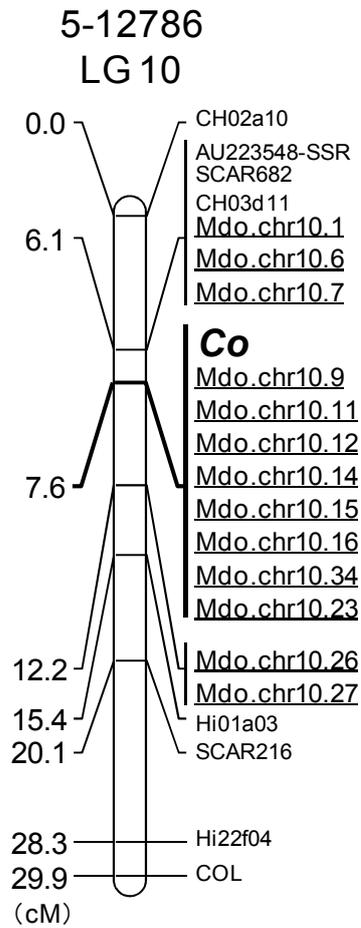
DNA	Apple genome v1.0 中でトップヒットした コンティグ / 位置情報 (染色体番号 : bp)	<i>E</i> -value
SCAR ₆₈₂ ^z	MDC011771.458 / chr10:17,535,637–17,544,447	0
CH03d11	MDC015757.243 / chr10:18,197,057–18,229,728	1.00E-130
Hi01a03	MDC001120.265 / chr10:19,893,418–19,911,277	0

^zGenBank 登録番号は AY335182.

第 2-6 表. リンゴゲノム情報から開発された新規 SSR マーカー.

SSR マーカー	開発に用いた コンティグ	リンゴゲノム chr10 中の SSR の位置 (bp)	反復配列	マッピング された連鎖群
Mdo.chr10.1	MDC017675.49	18,247,223	(ct)4t(ct)14	LG 10
Mdo.chr10.2	MDC010376.277	18,313,048	(tg)12	LG 10
Mdo.chr10.3	MDC018604.401	18,366,301	(ta)8	LG 10
Mdo.chr10.4	MDC010659.331	18,456,195	(ct)6ttctg (tc)10	LG 10
Mdo.chr10.5	MDC004247.204	18,466,065	(ct)5at(ct)5	不明 ^z
Mdo.chr10.6	MDC004247.202	18,524,586	(ta)12	LG 10
Mdo.chr10.7	MDC035953.13	18,567,822	(tc)29	LG 10
Mdo.chr10.8	MDC002260.360	18,622,443	(ta)11	LG 10
Mdo.chr10.9	MDC038765.9	18,665,537	(at)20	LG 10
Mdo.chr10.10	MDC008980.251	18,719,173	(ta)14	増幅無し
Mdo.chr10.11	MDC010450.949	18,766,185	(ta)13	LG 10
Mdo.chr10.12	MDC009292.256	18,797,464	(tc)16	LG 10
Mdo.chr10.13	MDC008849.307	18,836,789	(ta)5tt(ta)5	LG 10
Mdo.chr10.14	MDC004959.251	18,898,144	(ta)13	LG 10
Mdo.chr10.15	MDC027247.53	18,961,535	(ca)11g(ca)12 (ta)6(ga)8	LG 10
Mdo.chr10.16	MDC018470.84	19,013,189	(ta)11	LG 10
Mdo.chr10.17	MDC005612.328	19,090,559	(tcaa)3	不明 ^z
Mdo.chr10.18	MDC007196.123	19,185,439	(ttc)6	不明
Mdo.chr10.19	MDC037848.9	19,247,391	(ca)5ta(taa)11	LG 17
Mdo.chr10.20	MDC019509.316	19,291,384	(ga)6(ta)16 (tg)10	LG 17
Mdo.chr10.21	MDC007118.292	19,369,566	(ta)14gagat (ag)12	LG 3
Mdo.chr10.22	MDC007100.297	19,427,303	(ga)9	不明 ^z
Mdo.chr10.34	MDC020397.150	19,442,789	(at)12	LG 10
Mdo.chr10.23	MDC006530.429		(ga)8	LG 10
Mdo.chr10.24	MDC000928.226	19,545,250	(at)15	不明 ^z
Mdo.chr10.25	MDC006536.318	19,608,174	(at)13	LG 10
Mdo.chr10.26	MDC006536.318	19,684,274	(at)9	LG 10
Mdo.chr10.27	MDC007223.300	19,765,072	(at)16	LG 10

^z得られた PCR 増幅産物が多型を示さず、マッピングに供試できなかった。

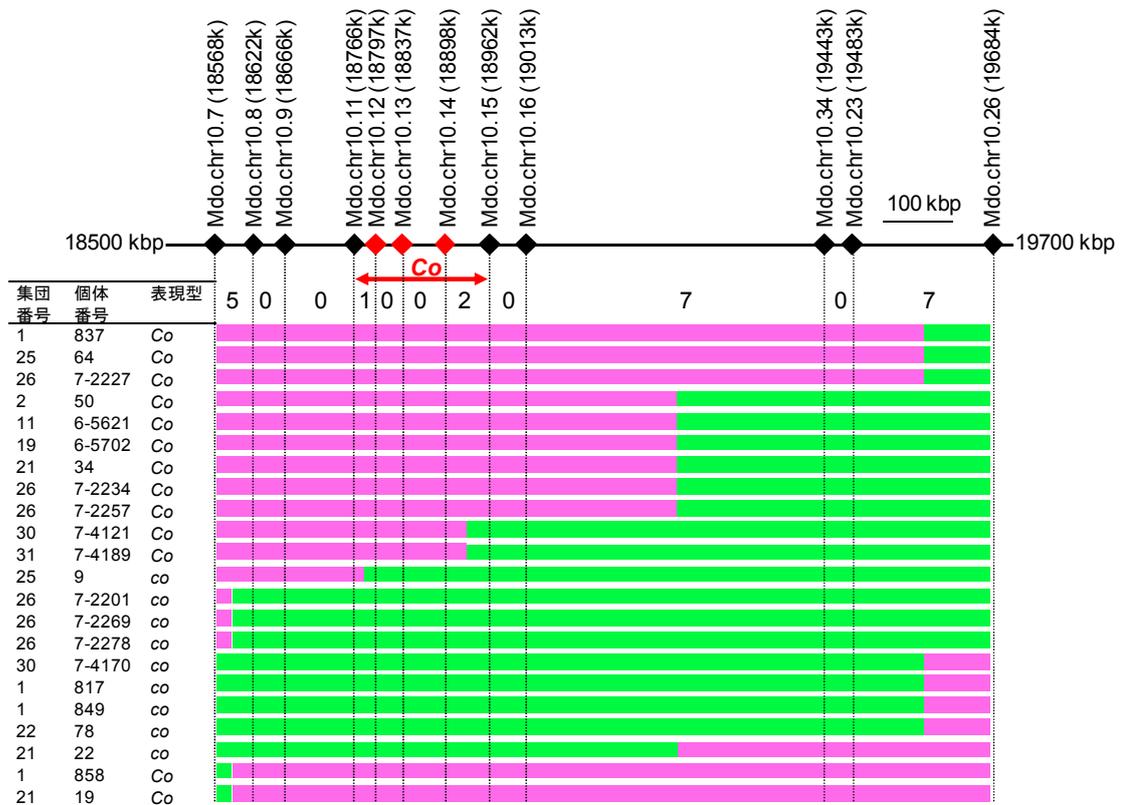


第 2-4 図. カラムナータイプの選抜系統 5-12786 における第 10 連鎖群 (LG 10) の連鎖地図.

植物材料には ‘ふじ’ に選抜系統 5-12786 を交雑して得られた F1 集団 (68 個体) を用いた.

カラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* を太字で示す.

新たにマッピングした SSR マーカーに下線を付して示す.



第 2-5 図. 第 10 連鎖群の SSR マーカー Mdo.chr10.7 (18,568 kbp) と Mdo.chr10.26

(19,684 kbp) の間の領域で組換えを起こしていた 22 個体における、
 カラムナータイプの交雑親に由来する染色体のグラフ遺伝子型。

集団番号は第 2-4 表を参照。

数直線上の◆はリンゴゲノム配列上に SSR マーカーを開発した位置
 を示す。

◆はカラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* と 0 cM で連鎖した SSR マー
 カーを示す。

Co が座乗すると考えられる候補領域を矢印で示す。

数直線の下に数字は、当該領域で組換えが起きていた個体数を示す。

カラムナータイプの品種に由来する染色体を紫色で、それ以外の交雑
 親に由来する染色体を緑色で示す。

第 2-7 表. カラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* と 0 cM で連鎖していた SSR マーカー Mdo.chr10.12, Mdo.chr10.13, Mdo.chr10.14 を用いてリンゴ栽培品種群の祖先にあたる品種で検出された対立遺伝子.

品種	SSR マーカー		
	Mdo.chr10.12	Mdo.chr10.13	Mdo.chr10.14
Wijcik ^z	309 bp/ <u>311 bp</u> ^y	123/ <u>123</u>	84/ <u>138</u>
McIntosh (旭)	309/311	123/123	84/138
Delicious	291/299	119/123	84/110
Golden Delicious	297/299	119/119	110/110
Jonathan (紅玉)	291/291	123/123	84/84
Cox's Orange Pippin	299/313	119/123	110/131
Ralls Janet (国光)	299/299	119/119	110/110
印度	299/299	119/119	110/110

^zカラムナータイプの 'Wijcik' は, 通常型の品種 'McIntosh' の枝変わり品種.

^y*Co* と相引に連鎖する対立遺伝子に下線を付して示す.

第3章. 台木用品種における 根頭がんしゅ病抵抗性個体の早期選抜法

苗木の主幹の地際部および接ぎ木部または細根に不整形のこぶ状の組織（がんしゅ）を形成する根頭がんしゅ病は、根頭がんしゅ病菌（*Agrobacterium tumefaciens*）を病原とする病害で、果樹生産の上ではリンゴ、ブドウ、オウトウなど、様々な樹種が罹病する難防除病害として知られている。根頭がんしゅ病菌は細菌学的な性質に基づいて3種類の biovar（生理型）に分けられており、リンゴに感染する種類は biovar 1 および biovar 2 である（Moore, 1990）。根頭がんしゅ病菌が植物体の傷口から侵入して、そこにがんしゅを形成することで本病害が発病すると、がんしゅ部で水と養分の移動が妨げられたり、がんしゅ部から他の病害虫の二次感染（侵入）を招くので、樹勢が低下し、新梢の発生が抑制される。また、地際部のがんしゅには細かいこぶえが多く発生して、除草剤を散布する際の妨げとなることがある。

リンゴの栽培品種の穂木をわい性台木に接ぎ木した苗木を用いる栽培法（わい化栽培）は、マルバカイドウ（*M. prunifolia*）を台木にした樹よりも、樹が小型化することで作業能率が向上し、果実生産力が高いことで土地生産性や労働生産性が向上する。このため、わい化栽培が導入されて以来、過去40年にわたり、リンゴの栽培面積に占めるわい化栽培の割合は、一貫して伸び続けている。

わい化栽培では、わい性台木に接ぎ木した苗木を高密度で栽植するので、わい化栽培を普及させるには大量の苗木の供給が不可欠である。しかし、出荷前の苗木が根頭がんしゅ病に罹病すると商品価値を失うので、苗木の供給が滞るだけでなく、苗木生産者にとっては経済的損失も大きい。このため、苗木生産のうえでは本病の発生防止に相当な注意が払われている（駒村, 2011）。しかし近年、リンゴ苗木の生産現場において、出荷前の苗木が高頻度で根頭がんしゅ病に罹病している例が報告されており、実際に大規模な被害が生じている（猫塚ら, 2001）。

根頭がんしゅ病は一度発病すると、根頭がんしゅ病菌の有無にかかわらず症状が進行して治療できないので、防除は予防が主体となっている。一般的には圃場に苗木を植付ける前に土壌消毒が行われるが、完全に防除できないことが知られているうえ (Schroth et al., 1971), 有用微生物も死滅するという問題が生じる。また、生物農薬として、拮抗菌である *A. radiobactor* の K84 株を利用できるが、処理に要するコストが高いため、普及していない (須崎・福士, 2011)。そこで、これらに代わる方法として、抵抗性台木の利用が考えられる。ブドウにおいては、根頭がんしゅ病に抵抗性の台木を利用した圃場試験の結果、根頭がんしゅ病の被害が軽減されている (Sule・Burr, 1998)。同様の手法はリンゴにおいても有効と考えられるので、根頭がんしゅ病に抵抗性を示す台木の育成が求められている。しかし、リンゴにおいて、根頭がんしゅ病に抵抗性を示す台木用品種や野生種は知られていない。

そこで本章においては、まず初めに、従来行われていた根頭がんしゅ病抵抗性の評価手法を改良し、これまでに抵抗性の調査が行われたことがないリンゴ属植物から、抵抗性の台木用品種や野生種を探索しようとした。次に、探索の結果として見出された根頭がんしゅ病に抵抗性の台木用品種や野生種から交雑実生苗を育てて、遺伝性について明らかにしようとした。さらに、根頭がんしゅ病菌の接種試験によらずに実生個体の抵抗性を検査できるようにすることを目的として、抵抗性の実生個体を早期に選抜するための DNA マーカーを開発しようとした。

第 1 節. 根頭がんしゅ病抵抗性の評価手法の改良

これまでブドウ属 (*Vitis* spp.), サクラ属 (*Prunus* spp.), およびポプラ属 (*Populus* spp.) などの木本植物において、根頭がんしゅ病に抵抗性を示す品種や野生種を探索する試みがなされ、野生種の中に抵抗性を示す種が存在することが知られている (Beneddra et al., 1996; Bliss et al., 1999; Mahmoodzadeh et al., 2004; Stover et

al., 1997; Szegedi et al., 1984). その中で、根頭がんしゅ病抵抗性の遺伝様式について、ブドウでは単一の遺伝子、アンズでは複数の遺伝子が関与していることが明らかにされている (Szegedi・Kozma, 1984; Tsiantos et al., 2002). しかし、これまでのところ、リンゴにおいて根頭がんしゅ病抵抗性の台木用品種や野生種および遺伝に関する知見は、ほとんど見あたらない。

日本において長年リンゴの台木として用いられている ‘M. 9’, ‘M. 26’, マルバカイドウ, および (独) 農研機構果樹研究所で近年育成された台木用品種のうちの ‘JM7’, ‘JM1’ (副島ら, 2010) には根頭がんしゅ病が発生するので (猫塚ら, 2001), これらの台木用品種は根頭がんしゅ病に罹病性であると推測される. 従来, 根頭がんしゅ病の抵抗性検定は, 挿し木や取り木などを行って発根させた台木用品種の苗木を用いて, 苗木の基部に根頭がんしゅ病菌を接種した後に覆土する方法で行われていたが, この方法では, 発根しにくい台木用品種や野生種に対して接種試験が行えず, 抵抗性を適切に評価することができないという問題がある. そこで, 本節では, 抵抗性を検定しようとする台木用品種および野生種や, それらの後代の個体を穂木として接ぎ木した苗の新梢に根頭がんしゅ病菌を接種し, 抵抗性の程度を評価する手法を開発することとした. 次に, 探索した抵抗性の品種や系統を交雑親とする交雑実生集団を育成して, 抵抗性の遺伝性について明らかにすることとした.

材料および方法

1. 供試した植物材料と根頭がんしゅ病菌

植物材料には, リンゴの台木用品種として ‘JM1’, ‘JM5’, ‘JM7’, ‘M. 9’, ‘M. 27’, ‘G. 65’ を供試した. そのほかに, 野生種としてワリンゴ (*M. asiatica*) の3品種 (‘リンキ’, ‘リンキ (北農試)’, ‘リンキ (青り試)’), ナガサキズミ (*M. micromalus*) の ‘ナガサキズミ’, エゾノコリンゴ (*M. baccata*) の ‘ニッコウズミ’, マルバカイドウ (*M. prunifolia*) の ‘Mo 84a’ と ‘盛岡セイシ’, ミツバカイドウ (*M. sieboldii*) の ‘サナシ 63’, また, セイヨウリンゴ (*M. ×*

domestica) として ‘Golden Delicious’ を供試した (第 3-1 表). また, ‘JM7’ と ‘サナシ 63’ を交雑して得られた F1 集団の 119 個体を根頭がんしゅ病抵抗性の遺伝性の検定に供試した.

接種源の根頭がんしゅ病菌として, 2 種類 (Peach CG8331 株と ARAT-001 株) を供試した. Peach CG8331 株は biovar 2 に属し, 山形県においてモモの罹病樹から単離された菌株である. ARAT-001 株は biovar 1 に属し, 青森県においてリンゴの罹病樹から単離された菌株である. これらの菌株は Suzaki et al. (2004) の方法を用いて, 接種してから 2 週間程度で発病が見られるトマト ‘Ponderosa’ の幼苗に対して接種を行い, 病原性を確認した.

2. リンゴの台木用品種または野生種の新梢 (地上部) に対する根頭がんしゅ病菌の接種方法 (試験 1)

リンゴの台木用品種および野生種において, 根頭がんしゅ病菌を接ぎ木苗の穂木から発生した新梢 (地上部) に接種する目的で, 抵抗性を検定する台木用品種および野生種の休眠期の新梢を採取して, 接ぎ木の際の穂木とした. これらの穂木を用いて, ‘JM7’ の 1 年生の挿し木苗を台木とした接ぎ木を行い, 1 品種あたり 3 本の接ぎ木苗を養成した (第 3-1 図). 接ぎ木苗の穂木から 3 本の新梢を発生させて, ほとんどの新梢が 30 cm 以上に成長したところで, 根頭がんしゅ病菌を新梢の節間に接種した (第 3-1 図). 1 本の接ぎ木苗に対して, 液体培地で培養した複数の菌株を接種した. 接種後の苗はガラス室内で栽培した.

Peach CG8331 株と ARAT-001 株のグリセロールストックを 3 ml の YP 培地で前培養した後, 100 ml の YP 培地中で激しく振とうしながら 28°C で 2 日間培養し, その後回収した菌懸濁液を接種に用いた. 接種と平行して dilution plate technique (Baker et al., 2006) によって菌濃度を求めた. 2005 年は, 適切な接種濃度を検討することを目的として, Peach CG8331 株を供試し, 菌濃度を 10^7 cfu/ml および 10^9 cfu/ml に調整して接種した. 2006 年は異なる菌株を接種した際の抵抗性を比較することを目的として, 10^9 cfu/ml の菌濃度に調整した Peach CG8331 株および ARAT-001 株を用いて接種した. これらの菌懸濁液を滅菌注射

針 (0.55 × 25 mm, テルモ (株)) を取り付けたディスプレイ注射筒 (1 ml, テルモ (株)) に充填して, 新梢の節間に注射針を刺して, 1 滴分 (約 6 μl) の菌懸濁液を接種した. 対照として, 滅菌水を接種した.

3. ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団の新梢 (地上部) に対する根頭がんしゅ病菌の接種方法 (試験 2)

根頭がんしゅ病抵抗性の遺伝性を検定する目的で, ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団から接ぎ木に用いる穂木を採取した. これらの穂木を用いて, 試験 1 と同様の方法で, 1 個体あたり 3 本の接ぎ木苗を養成した. 試験 1 と同じように, 2005 年は適切な接種濃度を検討することを目的として, Peach CG8331 株を供試し, 菌濃度を 10^7 cfu/ml および 10^9 cfu/ml に調整して接種した. 2006 年は異なる菌株を接種した際の抵抗性を比較することを目的として, 10^9 cfu/ml の菌濃度に調整した Peach CG8331 株および ARAT-001 株を用いて接種した. 新梢に対する接種操作は試験 1 と同様に行った.

4. ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団の挿し木苗基部 (地下部) に対する根頭がんしゅ病菌の接種方法 (試験 3)

接種方法の違いによるがんしゅ形成率の違いを調べる目的で, 2006 年に, ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団の実生苗から, 挿し木によって繁殖させることが可能な 21 個体 (No. 4, 8, 12, 28, 37, 39, 45, 53, 54, 63, 64, 88, 95, 97, 106, 110, 112, 119, 121, 124, 135) を選抜して, 挿し木苗基部 (地下部) における根頭がんしゅ病菌の接種試験に供試した. これらの個体から休眠枝を採取してバーミキュライトに挿し木し, 2 ヶ月後に掘り上げて, 各個体あたり 5 本から 28 本 (平均 13.5 本) の挿し木苗を養成した. 得られた挿し木苗の基部に, 以下の要領で根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株を接種した.

Peach CG8331 株のグリセロールストックを 3 ml の YP 培地で前培養した後, 2 リットルの YP 培地で激しく振とうしながら, 28°C で 2 日間培養した. その後, 3000 rpm, 5 分間の遠心分離を行った後に上澄液を捨て, 2 リットルの滅菌水に根頭がんしゅ病菌を再懸濁して, 10^9 cfu/ml の菌懸濁液を作製した. 菌濃度は試

験 1 の方法と同様に dilution plate technique (Baker et al., 2006) により求めた。挿し木苗基部に剪定鋏で 1 cm 間隔に傷を付け、菌懸濁液に一晩、浸漬した。その後、滅菌した土壌を充填したビニールポットに定植した。このとき、傷を付けた部位（接種部位）が全て土中に隠れるように植え付けた。菌を接種して定植した後の苗木はガラス室内で栽培した。

5. 根頭がんしゅ病に対する抵抗性の評価

試験 1～3 において、接種から 6 ヶ月後に、接種部位にがんしゅが形成されているかどうか、目視によって評価し、がんしゅを形成した接種箇所数を全接種箇所数で除して各品種・系統および F1 個体のがんしゅ形成率 (0～1) を求めた。接種部位において、がんしゅの形成の有無を評価した一例を第 3-2 図に示した。各品種・系統のがんしゅ形成率は、抵抗性 (0：全ての接種箇所ではがんしゅを形成しないとき)、中程度抵抗性 (0 – 0.3：がんしゅを形成した接種箇所数が全接種箇所数の 30%以下のとき)、罹病性 (> 0.3：がんしゅを形成した接種箇所数が全接種箇所数の 30%より多いとき) の 3 段階で表した。

結 果

1. 接ぎ木苗の新梢（地上部）に異なる濃度の根頭がんしゅ病菌を接種したときの抵抗性反応（2005 年の試験）

抵抗性を検定するリンゴの台木用品種および野生種（試験 1）と ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団（試験 2）を接ぎ木苗の穂木として育てた苗から発生した新梢（地上部）に対して菌濃度 10^7 cfu/ml の根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株を接種したところ、供試した材料の 90 %以上でがんしゅ形成率が 0.2 よりも低い値であった（データ省略）。一方、Peach CG8331 株を 10^9 cfu/ml で接種した場合、がんしゅ形成率は 0 から 1 まで分離し、明確な違いが見られた（第 3-1 表、第 3-3 図）。対照として滅菌水を接種した部位には、がんしゅが形成されなかった（データ省略）。この結果から、根頭がんしゅ病菌の接種検定を行う際の菌濃度は 10^9 cfu/ml が適切と判断された。

2. リンゴの台木用品種または野生種の新梢（地上部）に根頭がんしゅ病菌を接種したときの抵抗性反応（試験 1）

接ぎ木苗の穂木として育てた苗木の新梢(地上部)に対して 10^9 cfu/ml の Peach CG8331 株を接種した結果, ミツバカイドウ ‘サナシ 63’ は, がんしゅ形成率が 0 であり, 抵抗性を示した (第 3-1 表). その他の台木用品種と野生種はがんしゅの形成が見られ, その形成率は ‘リンク (青り試)’ で 0.18, ‘ナガサキズミ’ で 0.27, ‘ニッコウズミ’ で 0.13 と, 中程度の抵抗性を示した. その他の品種 (‘JM1’, ‘JM5’, ‘JM7’, ‘M. 9’, ‘M. 27’, ‘G. 65’, ‘リンク’, ‘リンク (北農試)’, ‘盛岡セイシ’, ‘Golden Delicious’) はがんしゅ形成率が 0.31~1.0 と, 罹病性を示した.

10^9 cfu/ml の ARAT-001 株を接種した結果, ‘G. 65’ と ‘サナシ 63’ のがんしゅ形成率は 0.19 であり, 中程度抵抗性を示した. その他の台木用品種と野生種のがんしゅ形成率は 0.47~1.0 と, 罹病性を示した (第 3-1 表). 中でも ‘JM5’, ‘Mo 84a’, ‘盛岡セイシ’ はいずれも 0.96 以上の極めて高いがんしゅ形成率を示した.

3. ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団の新梢（地上部）に根頭がんしゅ病菌を接種したときの抵抗性反応（試験 2）

‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団の 119 個体を, 接ぎ木苗の穂木として育てた苗から発生した新梢 (地上部) に Peach CG8331 株 (10^9 cfu/ml), および ARAT-001 株 (10^9 cfu/ml) を接種したところ, がんしゅ形成率は 0 から 1.0 まで分離した (第 3-3 図). Peach CG8331 株の接種に対しては, 両親それぞれのがんしゅ形成率を分布の中心とした 2 群に分離する傾向が認められた. ARAT-001 株の接種に対しては, 0 から 1 までの連続的な分布を示した. 全くがんしゅを形成せず (がんしゅ形成率が 0), 抵抗性と判断された個体は, Peach CG8331 株に対して 19 個体 (15.9 %), および ARAT-001 株に対し 5 個体 (4.2 %) であった. このうちの 2 個体 (No.32, 43) は, 両菌株に対してがんしゅを形成しなかった.

4. ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団の挿し木苗基部（地下部）に根頭がんしゅ

ゆ病菌を接種したときの抵抗性反応（試験3）

‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団から選抜した挿し木繁殖が可能な 21 個体において、挿し木苗基部（地下部）に Peach CG8331 株（ 10^9 cfu/ml）を接種したところ、がんしゅ形成率は 0 から 0.47 まで分離した（第 3-4 図）。同一個体の地上部（試験 2）と地下部（試験 3）のがんしゅ形成率には、 $R = 0.684$ のゆるやかな正の相関が認められた。また、地下部のがんしゅ形成率は地上部よりも低い傾向が認められた。

考 察

根頭がんしゅ病に対する抵抗性程度を評価する場合、がんしゅの大きさは新梢の長さや接種部位に影響される一方で、がんしゅ形成率はほとんど影響されないため、がんしゅの大きさよりもがんしゅ形成率が指標として適している（岩波ら，2006）。そこで、本節では、各台木用品種、野生種、および F1 集団の各個体の抵抗性程度について、がんしゅ形成率を指標に判定することにした。

‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団から選抜した 21 個体の接ぎ木苗の新梢（地上部）と挿し木苗基部（地下部）に対して Peach CG8331 株を接種したところ、地上部と地下部のがんしゅ形成率にはゆるやかな正の相関が認められた（第 3-4 図）。したがって、挿し木によって繁殖できるかどうかに関わらず、発根性が劣る台木用品種や野生種においても、地上部を用いて抵抗性検定が行えることから、根頭がんしゅ病に抵抗性を示す台木用品種や野生種を従来よりも幅広く探索できるようになると考えられた。

‘サナシ 63’ は Peach CG8331 株に対して抵抗性、ARAT-001 株に対して中程度抵抗性であったので、根頭がんしゅ病に抵抗性を示すと考えられた（第 3-1 表）。この他の台木用品種や野生種においては、抵抗性を示した品種と菌株の組合せはなかった。また、台木用品種 ‘G. 65’ を除く台木用品種と野生種において、ARAT-001 株に対するがんしゅ形成率は Peach CG8331 株と比較して同等か、わずかに高いので、ARAT-001 株は Peach CG8331 株よりもリンゴ属植物に対し

て病原性が強いことが示唆された。ブドウにおいては、アムールブドウ (*V. amurensis*) の持つ抵抗性が菌株特異的であることが報告されている (Szegedi et al., 1984)。本節の研究においても、‘G. 65’ は、Peach CG8331 株に対する抵抗性程度は弱いものの、ARAT-001 株に対する抵抗性程度が高かったため、菌株特異的な抵抗性をもたらす要因の存在が示唆された。以上のように、根頭がんしゅ病に対する抵抗性は、それぞれの菌株ごとに、異なった遺伝的要因に制御されている可能性があると考えられた。そこで、多くの菌株に対して安定して抵抗性を示す台木を利用することが、根頭がんしゅ病の被害を回避するために有効と考えられたので、今後は、より多くの菌株を用いた抵抗性検定が必要であると考えられた。

‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団に対して、Peach CG8331 株を接種したところ、‘サナシ 63’ 並みの抵抗性を示す個体が多数得られた (第 3-3 図 A) ので、‘サナシ 63’ の持つ抵抗性は後代に遺伝すると考えられた。F1 集団の 119 個体において、Peach CG8331 株の接種による抵抗性程度の分離は、抵抗性と中程度抵抗性を合計した個体数が 61 個体、罹病性が 58 個体であった。 χ^2 検定の結果、この分離比は 1:1 に適合した ($\chi^2 = 0.075, P = 0.78$) ので、‘サナシ 63’ の Peach CG8331 株に対する抵抗性は、1 個の主働遺伝子による制御を受けていると考えられた。ただし、中程度抵抗性の個体においては、ある程度のがんしゅ形成が見られたので、抵抗性の程度には微働遺伝子も関与していることが示唆された。主働遺伝子の詳しい遺伝様式については、追加の交雑実生集団を用いた検証を必要とするが、罹病性品種同士の交雑実生集団においては、抵抗性と判定された個体が出現しないことを確認しているため (データ省略)、主働遺伝子は抵抗性が罹病性に対して優性を示す可能性が高いと推察される。また、アムールブドウの根頭がんしゅ病菌 biovar 3 に対する抵抗性は単一の遺伝子で制御され、抵抗性が罹病性に対して優性に遺伝することが知られており (Szegedi・Kozma, 1984)、本節において Peach CG8331 株を接種して得られた結果と似ている。そこで、‘サナシ 63’ の持つ根頭がんしゅ病抵抗性に関与する主働遺伝子を *Cg*

(*Crown gall*) とすると, ‘サナシ 63’ の遺伝子型は *Cg/cg* であり, ‘JM7’ は *cg/cg* であると推定された.

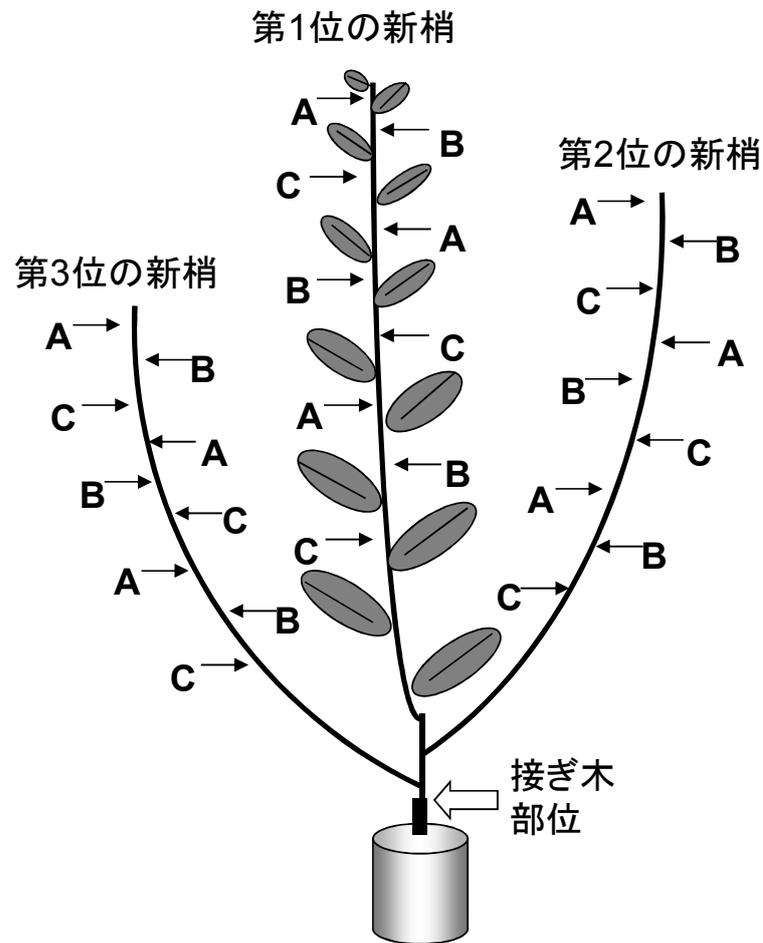
一方, ARAT-001 株の接種に対して, ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団にみられたがんしゅ形成率は, 0 から 1 まで連続的な分布を示し, 抵抗性もしくは中程度抵抗性と判定された個体は 28 個体であった (第 3-3 図 B) ことから, ‘サナシ 63’ の ARAT-001 株に対する中程度抵抗性は後代に遺伝するものの, 微働遺伝子の集積によって抵抗性が発現している可能性が高いと推察された.

本実験ではミツバカイドウとして ‘サナシ 63’ だけを供試したが, (独) 農研機構果樹研究所で保存しているミツバカイドウには, 他にも国内に野生している個体を採集してきた系統などが存在する. 今後はこれらの系統から, ‘サナシ 63’ よりも強い根頭がんしゅ病抵抗性を有する系統を探索する必要がある.

第 3-1 表. リンゴ台木用品種または野生種を接ぎ木苗の穂木として育てた苗木から発生した新梢（地上部）における根頭がんしゅ病菌（Peach CG8331 株と ARAT-001 株）によるがんしゅ形成率.

穂木とした品種	来歴	Peach CG8331 株によるがんしゅ形成率 ^z	ARAT-001 株によるがんしゅ形成率
JM 系台木（台木用品種）			
JM1	盛岡セイシ × M. 9	0.44	0.47
JM5	盛岡セイシ × M. 9	0.40	1.00
JM7	盛岡セイシ × M. 9	0.67	0.72
M 系, G 系台木（台木用品種）			
M. 9		0.77	0.62
M. 27	M. 13 × M. 9	0.67	0.67
G. 65	M. 27 × Beauty	0.75	0.19
ワリンゴ（野生種）			
リンキ		0.39	—
リンキ（北農試）		1.00	—
リンキ（青り試）		0.18	—
ナガサキズミ（野生種）			
ナガサキズミ		0.27	—
エゾノコリンゴ（野生種）			
ニッコウズミ		0.13	—
マルバカイドウ（野生種）			
Mo 84a		0.45	1.00
盛岡セイシ		0.31	0.96
ミツバカイドウ（野生種）			
サナシ 63		0	0.19
セイヨウリンゴ（栽培品種）			
Golden Delicious		0.76	—

^z がんしゅ形成率は、がんしゅを形成した接種箇所（第 3-2 図 B）の数を全ての接種箇所の数で除して求め、0（がんしゅが形成された接種箇所なし）から 1（全ての接種箇所でがんしゅが形成）の範囲で示した。



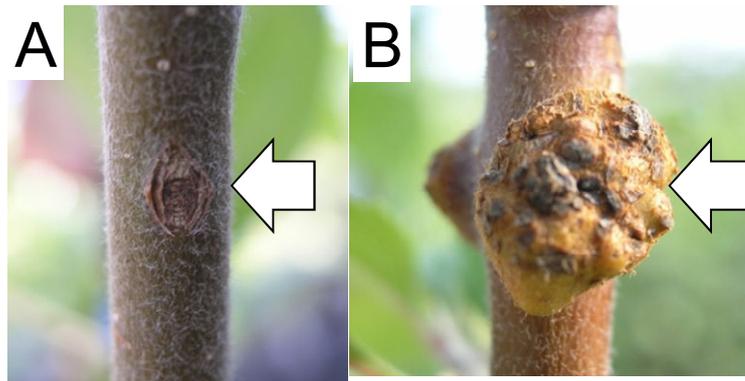
第 3-1 図. 抵抗性を検定する台木用品種と野生種, および F1 個体を接ぎ木苗の穂木として育てた苗木から発生した新梢 (地上部) に根頭がんしゅ病菌を接種したときの接種部位の模式図.

(A) および (B) : それぞれ異なる菌濃度または菌株の接種箇所.

(C) : 滅菌水 (対照) の接種箇所.

1 つの品種または F1 集団の 1 個体あたり, 接ぎ木苗を 3 本作成した. 穂木には台木用品種または野生種 (試験 1) および台木用品種 'JM7' とミツバカイドウ 'サナシ 63' を交雑して得られた F1 個体 (試験 2) を供試した.

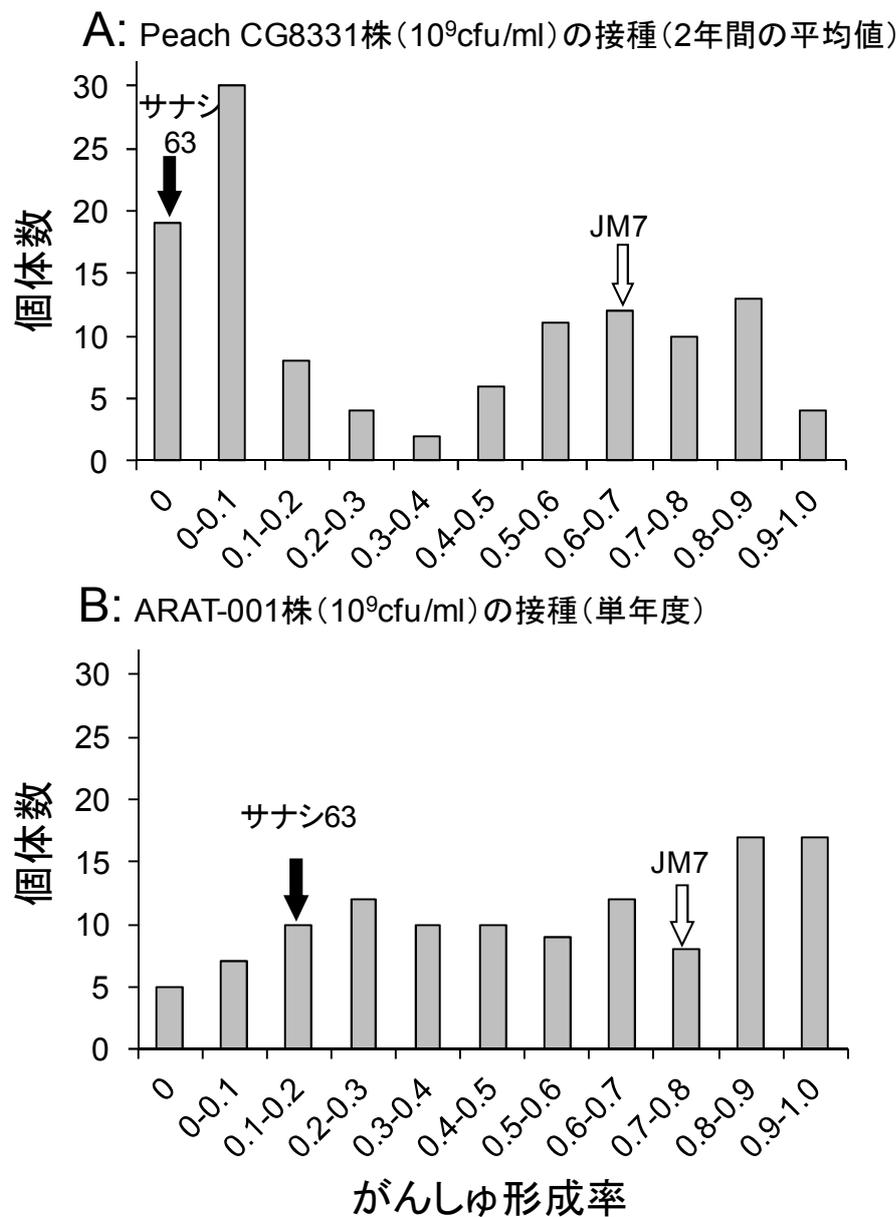
台木には 'JM7' の 1 年生挿し木苗を供試した.



第 3-2 図. 抵抗性を検定する台木用品種と野生種, および F1 個体を接ぎ木苗の穂木として育てた苗木から発生した新梢 (地上部) に対して根頭がんしゅ病菌を接種した状態.

(A) 接種 90 日後にがんしゅが形成されなかった状態.

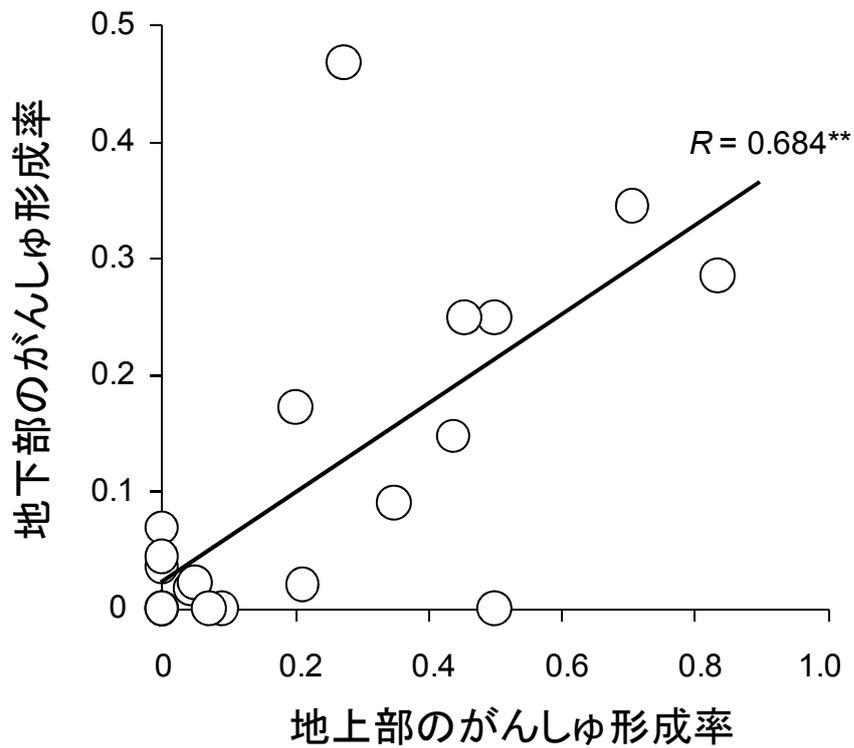
(B) 接種 90 日後にがんしゅが形成された状態.



第3-3 図. 台木用品種‘JM7’とミツバカイドウ‘サナシ 63’を交雑して得られた F1 集団を接ぎ木苗の穂木として育てた苗木から発生した新梢（地上部）における根頭がんしゅ病菌（Peach CG8331 株と ARAT-001 株）によるがんしゅ形成率.

(A) Peach CG8331 株 (10⁹ cfu/ml) によるがんしゅ形成率 (2 年間の平均値).

(B) ARAT-001 株 (10⁹ cfu/ml) によるがんしゅ形成率 (単年度).



第3-4図. 根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株による新梢（地上部）のがんしゅ形成率と挿し木苗基部（地下部）のがんしゅ形成率との関係。

植物材料には、台木用品種‘JM7’とミツバカイドウ‘サナシ63’を交雑して得られた F1 集団から選抜した 21 個体を用いた。

**は 1%水準で有意であることを示す。

第2節. 根頭がんしゅ病抵抗性個体を早期に選抜するための DNA マーカーの開発

前節では、ミツバカイドウ‘サナシ 63’が根頭がんしゅ病に抵抗性を示すことを明らかにした。しかしながら、ミツバカイドウは強勢台木として知られており、穂木として接ぎ木した品種が初結実、および盛果期に達するには長期間を要することから、わい化栽培において‘サナシ 63’を台木として利用することは難しい。また、‘サナシ 63’は挿し木による繁殖も困難であることから、苗木を大量に増殖するうえでは不都合な品種である。

前節で考察したように、‘サナシ 63’の Peach CG8331 株に対する抵抗性は、主働遺伝子である Cg に支配され、後代に遺伝すると考えられる。そこで、ミツバカイドウの欠点を補うために、挿し木による発根が容易なわい性台木である台木用品種‘JM7’などと‘サナシ 63’を交雑して得られた後代から、挿し木発根が容易で根頭がんしゅ病に抵抗性を示すわい性台木用品種を育成することが求められる。しかしながら、根頭がんしゅ病菌を接種して抵抗性を検定する方法は、接種から評価までに約 6 ヶ月を要するので、1 回の生育期間中（1 年）に 1 度しか検定することができない。さらに、検定に用いる苗木を養成するための接ぎ木、根頭がんしゅ病菌を接種する操作、およびその後の苗木の管理に熟練を要するので、試験規模を拡大することは困難である。

このような問題を克服し、抵抗性個体の選抜を行うためには、DNA マーカー選抜法を開発することが有効と考えられる。しかし、抵抗性遺伝子 Cg が座乗する連鎖群は不明であり、Cg に連鎖する DNA マーカーも得られていない。そこで、本節においては、ゲノムスキャニングアプローチ（GSA）を適用して、Cg が座乗する連鎖群を同定し、Cg に連鎖する DNA マーカーを開発することとした。また、得られた DNA マーカーを用いて抵抗性の実生個体を選抜する方法を考案することとした。

材料および方法

1. ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団における根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対する抵抗性の判定

本節の実験を行う際の、‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団における Peach CG8331 株に対する抵抗性の判定には、前節で得られた試験 2 の結果を利用した。具体的には、前節の試験 2 (‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団の新梢 (地上部) に対して根頭がんしゅ病菌を接種した試験) のうち、2005 年と 2006 年に 10^9 cfu/ml の Peach CG8331 株を接種した際に示したがんしゅ形成率 (第 3-3 図 A) を用いて Peach CG8331 株に対する抵抗性を判定した。本節においては、抵抗性の判定基準を前節から一部改変し、がんしゅ形成率が 0.3 以下の個体は抵抗性、0.3 より大きい個体を罹病性とする 2 段階で判定を行った。

2. GSA による C_g が座乗する連鎖群の同定

各個体のゲノム DNA は第 1 章の方法に準じて抽出した。 C_g が座乗する連鎖群を定める目的で、GSA による解析を行った。GSA の第一段階の解析として、リンゴの飽和標準連鎖地図 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) に含まれる 17 個の連鎖群をそれぞれ上部、中部、下部の 3 カ所、もしくは上部と下部の 2 カ所に大別し、そこに座乗する SSR マーカーを用いて、‘JM7’ と ‘サナシ 63’、および ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団の 119 個体から任意に選択した抵抗性の 22 個体における対立遺伝子を検出した (第 3-2 表)。ある SSR マーカーについて、抵抗性の 22 個体における ‘サナシ 63’ に由来する対立遺伝子の分離比が 1:1 に適合しなかった場合 (χ^2 検定; $P < 0.05$)、その SSR マーカーを用いて GSA の第二段階の解析を行った。GSA の第二段階の解析では、対象とした SSR マーカーを用いて F1 集団の全 119 個体において対立遺伝子を検出し、SSR マーカーと C_g とが連鎖しているかどうか、連鎖解析によって調べた。実験に用いた SSR マーカーの PCR、および検出は第 1 章に準じて行った。

3. C_g が座乗する連鎖群に対する既知 DNA マーカーの追加

C_g が座乗する連鎖群を特定した後、その連鎖群に対して、既存の連鎖地図

(Celton et al., 2009b; Fernandez-Fernandez et al., 2008; Liebhard et al., 2002; Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Yamamoto et al., 2007) に座乗する SSR マーカー (第 3-3 表) を追加した。

4. *Cg* の近傍に連鎖する SSR マーカーを用いて台木用品種・野生種で検出される対立遺伝子型の評価

既知の SSR マーカーが追加された‘サナシ 63’の連鎖地図に座乗していた SSR マーカーの中から、抵抗性の実生個体を選抜するための SSR マーカーを選定することを目的として、*Cg* の近傍に座乗していた SSR マーカーを用いて、リンゴの台木用品種(‘JM1’, ‘JM5’, ‘JM7’, ‘M. 9’, ‘M. 26’, ‘M. 27’, ‘G. 65’) および台木として用いられている野生種(‘Mo 84a’, ‘盛岡セイシ’, ‘サナシ 63’) で検出される対立遺伝子を調査した (第 3-4 表)。

5. 連鎖解析および QTL 解析

実験を行って得られた DNA マーカーのデータの連鎖解析, および連鎖地図の構築には JoinMap 4 ソフトウェア (Kyazma B. V.) を用いた。シュードテストクロス法, および Kosambi の地図関数を用いて連鎖解析を行った。連鎖群を決めるための最小 LOD 値には 10 を採用した。

各個体のがんしゅ形成率の値を逆正弦変換した後, この値について MapQTL 6 ソフトウェア (Kyazma B. V.) を用いて QTL 解析を行った。初めに, インターバルマッピング法によって予備解析を行ったのち, 得られた LOD 値のピークに最も近傍の DNA マーカーを co-factor に設定して, MQM マッピング法 (multiple-QTL models : QTL 解析の 1 手法であり, 複数の QTL を検出する能力が高いという特徴がある。) によって再解析した。QTL の有意性を判定する閾値は, 繰り返し回数 1,000 回の並べ替え検定によって得られた, 有意水準 5% の LOD 値を採用した。

結 果

1. GSA による *Cg* が座乗する連鎖群の同定

GSA の第一段階の解析において、各連鎖群あたり 2~8 種類を選抜した 71 種類の SSR マーカーを供試したところ、各連鎖群に 2 ないし 3 種類、合計して 41 種類の SSR マーカーにおいて、‘サナシ 63’ の対立遺伝子が多型を示した (第 3-2 表)。多型を示した 41 種類のうちの 8 種類 (Hi02c07, CH03d10, CH05e03, Hi03a10, CH04e05, CH03d11, CH02d11, CH03b10) において、‘サナシ 63’ に由来する対立遺伝子の分離が χ^2 検定の有意水準 5 % で 1:1 の分離比に適合しなかった。これら 8 種類の SSR マーカーが座乗していた連鎖群は LG 1, 2, 7, 10, 15 であった。次に、これら 8 種類の SSR マーカーを用いて GSA の第二段階の解析を行ったところ、LG 2 の CH03d10 と CH05e03 において、Cg とそれぞれの SSR マーカーとの組換え価は 0.202 と 0.252 であったので、Cg とこれらの SSR マーカーとが約 20~25 cM の距離で連鎖しており、Cg が LG 2 に座乗していることが示された。その他の 6 種類の SSR マーカー (Hi02c07, Hi03a10, CH04e05, CH03d11, CH02d11, CH03b10) と Cg の間に連鎖関係は認められなかった (データ省略)。

2. LG 2 に対する既知の DNA マーカーの追加

Liebhart et al. (2002), および Silfverberg-Dilworth et al. (2006) によって開発された 18 種類の SSR マーカー (第 3-3 表) のうち、10 種類が LG 2 にマッピングされた (第 3-5 図 A)。同様に Celton et al. (2009b) によって開発された 7 種類のうち 4 種類、Yamamoto et al. (2007) によって開発された 1 種類が LG 2 にマッピングされた (第 3-3 表, 第 3-5 図 A)。SSR マーカー CN494139-SSR (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) は ‘サナシ 63’ において多型が得られなかったため、マッピングできなかったが、Silfverberg-Dilworth et al. (2006) の連鎖地図を参照した際の本 SSR マーカーの座乗位置が Cg の近傍である可能性が高かったため、さらに解析を継続した。新たに設計したプライマー (CN493139-F: 5'-AAA CTG GTA CAT ACC GCT GGA -3', および CN493139-R: 5'-GCA GGA TTT CTA TAA TAT CGG AAA AG -3') を用いて得られた PCR 増幅産物を、塩基配列 AATT で特異的に切断する制限酵素 *Tsp* 509I (ニュー・イングランド・バイオラ

ボ・ジャパン (株)) で切断した後、アガロースゲルを用いた電気泳動によって検出したところ、マッピング可能な多型が得られた。増幅産物の *Tsp* 509I 認識部位には SNP が存在しており、その対立遺伝子型は‘サナシ 63’では塩基“A”と“G”のヘテロ型であり、‘JM7’では“A”のホモ型であった。このうち、‘サナシ 63’の対立遺伝子“A”と *Cg* が相引に連鎖していた。得られた対立遺伝子型を用いた連鎖解析の結果、構築された‘サナシ 63’の LG 2 の連鎖地図は 17 種類の DNA マーカーで構成され、全長は 58.7cM であった。SSR マーカー NZmsEB119405 (Celton et al., 2009b) は *Cg* と 0 cM で連鎖していた。

3. LG 2 に対する QTL 解析

連鎖地図が構築された LG 2 に対して、Peach CG8331 株による 2 カ年の平均がんしゅ形成率を用いた QTL 解析を行った (第 3-5 図)。インターバルマッピング法を用いた解析の結果、SSR マーカー NZmsEB119405 とほぼ同じ位置に LOD 値 47.0 の極めて大きなピークが検出された (データ省略)。次に、NZmsEB119405 を co-factor として MQM マッピング法による解析を行ったところ、インターバルマッピング法を用いた解析と同様に NZmsEB119405 とほぼ同じ位置に、LOD 値 47.0 のピークが認められ、QTL の存在が確認された (第 3-5 図 B)。この QTL のがんしゅ形成率に対する寄与率は 83.5 %であった。

4. *Cg* の近傍に連鎖する SSR マーカーを用いて台木用品種・野生種で検出される対立遺伝子型の評価

Cg の近傍にマッピングされた 5 種類の SSR マーカー (Hi02a07, NZmsEB119405, AT000400-SSR, CH03b01, NZmsPal92) を用いて、台木用品種 (‘JM1’, ‘JM5’, ‘JM7’, ‘M. 9’, ‘M. 26’, ‘M. 27’, ‘G. 65’) および台木に用いられている野生種 (‘Mo 84a’, ‘盛岡セイシ’, ‘サナシ 63’) で検出される対立遺伝子を調べた (第 3-4 表)。*‘サナシ 63’* 以外の 9 品種は、猫塚ら (2001) の圃場での観察 (‘JM1’, ‘JM7’, ‘M. 26’, ‘Mo 84a’) や、前節の接種試験 (‘JM5’, ‘M. 9’, ‘M. 27’, ‘G. 65’, ‘盛岡セイシ’) の結果と照らし合わせたところ、いずれも根頭がんしゅ病に罹病性であると考えられた。NZmsEB119405 におい

て、Cg と相引に連鎖している 191 bp の対立遺伝子と同じ増幅長を示す対立遺伝子は、‘JM1’、‘JM5’、‘Mo 84a’、‘盛岡セイシ’においても検出された。一方、‘サナシ 63’において、Cg と相反に連鎖する 200 bp の対立遺伝子と同じ増幅長の対立遺伝子は、‘M. 27’において検出された。Cg と相引に連鎖する対立遺伝子が特異的に識別できた SSR マーカーは、193 bp の対立遺伝子が Cg と相引に連鎖する CH03b01、および PCR によって増幅されないヌル型の対立遺伝子が Cg と相引に連鎖する NZmsPal92 であった。

考 察

GSA による解析の結果、Cg が座乗していた‘サナシ 63’の LG 2 に対して、既知の SSR マーカーおよび CAPS マーカーを追加したところ、Cg と 5 cM 以内の遺伝距離に連鎖している SSR マーカーが 5 種類認められた (第 3-5 図 A)。なかでも、SSR マーカー NZmsEB119405 は Cg と 0 cM で連鎖していたので、Cg と極めて強く連鎖すると考えられた。SSR マーカー CN493139-SSR は、SSR マーカー Hi02a07 と AT000400-SSR 間にマッピングされており (Silfverberg-Dilworth et al., 2006)、本節の研究における Cg の座乗位置と対応していたので、CN493139-SSR は Cg と極めて強く連鎖している可能性があると考えられた。そこで、CAPS 分析によるマッピングを試みたが、マッピングされた CAPS マーカー CN493139-CAPS は、座乗すると期待された Hi02a07 と AT000400-SSR 間にはマッピングされなかった (第 3-5 図 A)。Silfverberg-Dilworth et al. (2006) の報告の後に、CN493139-SSR は LG 2 中の異なる位置にある 2 つの遺伝子座と LG 5 にある 1 つの遺伝子座を合計した 3 つの遺伝子座にマッピングされている (Patocchi et al., 2009)。これらのことから、本節の実験において、CN493139-CAPS で得られた遺伝子座は、目的としていた Hi02a07 と AT000400-SSR 間にある遺伝子座ではない、別の遺伝子座が増幅されたものと推察された。

本節の研究に用いた‘JM7’×‘サナシ 63’の F1 集団におけるがんしゅ形成率は、Cg を保有する群と保有しない群の中で連続的な分布を示したので、がん

しゅ形成率を量的な形質として解釈することが可能であると考えられた。そこで、*Cg* が表現型に及ぼす効果の大きさ（寄与率）を QTL 解析によって求めた（第 3-5 図 B）ところ、*Cg* とほぼ同じ位置に検出された QTL の寄与率は 83.5 % と極めて高かった。この結果から、根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対する抵抗性は、主働遺伝子である *Cg* だけでほぼ説明できると考えられた。このため、*Cg* を有する個体におけるがんしゅ形成率のバラツキには、環境要因が関わっていると推察された。

Cg の近傍にマッピングされた 5 種類の SSR マーカーのうち 3 種類（NZmsEB119405, Hi02a07, AT000400-SSR）において、‘サナシ 63’ で検出された *Cg* と相引に連鎖する対立遺伝子と同じ増幅長を示す対立遺伝子が、罹病性品種からも検出された（第 3-4 表）。したがって、それらの品種と ‘サナシ 63’ を交雑して得られた実生個体において、*Cg* と相引に連鎖する対立遺伝子を特異的に識別することは困難であると考えられた。一方、SSR マーカー CH03b01 と NZmsPal92 においては、‘サナシ 63’ で検出された *Cg* と相引に連鎖する対立遺伝子を罹病性品種の持つ対立遺伝子から特異的に識別することが可能であった（第 3-4 表）。しかしながら、罹病性品種と ‘サナシ 63’ を交雑して得られた実生個体に対する *Cg* の選抜指標として用いるためには不都合な点が認められた。すなわち、CH03b01 では、*Cg* と相引に連鎖している 193 bp の対立遺伝子と近い増幅長を持つ非特異的な増幅産物が検出されたので、*Cg* と相引に連鎖している対立遺伝子の識別が難しくなる場合があると考えられた。また、NZmsPal92 では *Cg* と相引に連鎖する対立遺伝子がヌル型なので、この対立遺伝子を識別できない場合が生じると考えられた。

そこで、*Cg* と極めて強い連鎖関係にあると推定された SSR マーカー NZmsEB119405 を用いて、‘サナシ 63’ と 191 bp の対立遺伝子を共有しない品種と、共有する品種を交雑に用いた場合を区別して、後代から根頭がんしゅ病抵抗性遺伝子 *Cg* を保有する実生個体を識別して選抜する方法を検討した（第 3-6 図）。まず初めに、191 bp の対立遺伝子を共有しない品種（‘JM7’、‘M. 9’、‘M.

26', 'M. 27', 'G. 65') との交雑実生集団においては, 191 bp の対立遺伝子を保有する個体を選抜することで, 抵抗性個体が得られると考えられた. また, 191 bp の対立遺伝子を共有する品種 ('JM1', 'JM5', 'Mo 84a', '盛岡セイシ') においては, 'サナシ 63' から 200 bp が遺伝した個体を淘汰し, 遺伝していない個体を選抜することで抵抗性個体が得られると考えられた. したがって, SSR マーカー NZmsEB119405 は根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対する抵抗性個体を早期に選抜する DNA マーカーとして利用可能であると判断された. しかしながら, 抵抗性と判定した個体の中には, 根頭がんしゅ病菌の接種に対してある程度のがんしゅを形成する個体が含まれると考えられるので, 選抜の過程において, 実際に表現型を検定する必要がある.

また, Cg は ARAT-001 株に対する抵抗性を制御していないので, ARAT-001 株に対して抵抗性を示す個体は本節で開発した方法では選抜できいと判断された. 第 3 章第 1 節で行った接種試験の結果からは, ARAT-001 株に対する抵抗性は, 複数の遺伝子座によって決定されていると考察された. そこで, ARAT-001 株に対する抵抗性を制御する遺伝子座を同定するためには, 染色体基本数と等しい 17 個の連鎖群を網羅する連鎖地図を構築し, QTL 解析を行う必要があると考えられた.

根頭がんしゅ病菌がリンゴなどの宿主となる植物に感染してから, 根頭がんしゅ病を発病するまでの過程は, 根頭がんしゅ病菌の持つ tumor-inducing プラスミド (Ti-プラスミド) から transferred-DNA (T-DNA) 領域が植物のゲノムに組み込まれるまでの第 1 の過程と, 組み込まれた T-DNA が植物細胞の代謝経路を変化させて細胞分裂を引き起こされ, がんしゅが形成される第 2 の過程の 2 つに分けられている (Escobar・Dandekar, 2003; Pacurar et al., 2011). 一方, 宿主となる植物側が根頭がんしゅ病の発病を防御する機構については, シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の変異体を用いた研究がなされており, 発病の防御反応の起きている段階が異なる複数の変異体が見出されている (Nam et al., 1999). 本章において行った実験からは, Cg の抵抗性が発現する段階を明らかに

することはできなかったが、今後、*Cg* が抵抗性を示す際の機構が明らかにされることが期待される。また、*Cg* が座乗していたリンゴの LG 2 はリンゴの黒星病などに対する病害抵抗性遺伝子がクラスター状に存在していることが知られている (Calenge et al., 2005) ので、*Cg* とこれらの病害抵抗性遺伝子との関係についても明らかにされることが期待される。

第 3-2 表. ゲノムスキヤニングアプローチの第一段階の解析において, ‘サナシ 63’ の対立遺伝子が多型を示した SSR マーカーを用いて, 根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に抵抗性を示した 22 個体で検出された対立遺伝子の分離.

連鎖群	SSR マーカー ^z	‘サナシ 63’ 由来の 対立遺伝子の分離比 ^y		χ^2 値 ^x
		短い増幅長の 対立遺伝子	長い増幅長の 対立遺伝子	
1	CH05g08	14	8	1.64
1	Hi02c07	16	6	4.55*
2	CH03d10	4	18	8.91**
2	CH05e03	6	16	4.55*
3	CH03g07	14	8	1.64
3	MS14h03	13	9	0.73
4	CH02h11a	11	11	0
4	CH02c02b	12	10	0.18
5	CH05e06	11	11	0
5	CH04e03	11	11	0
6	CH03d07	10	12	0.18
6	CH05a05	11	11	0
7	Hi03a10	20	2	14.73****
7	CH04e05	5	17	6.55*
8	CH01c06	11	11	0
8	CH02g09	10	12	0.18
8	CH01h10	10	12	0.18
9	NH029a	11	11	0
9	CH05c07	10	12	0.18
9	CH01h02	8	14	1.64
10	CH01f12	7	15	2.91
10	CH03d11	16	6	4.55*
11	CH02d08	12	10	0.18
11	CH02d12	11	11	0
11	Hi06b06	13	9	0.73

第 3-2 表. (続き)

連鎖群	SSR マーカー ^z	‘サナシ 63’ 由来の 対立遺伝子の分離比 ^y		χ^2 値 ^x
		短い増幅長の 対立遺伝子	長い増幅長の 対立遺伝子	
		12	CH05d04	
12	CH04g04	10	12	0.18
12	CH03c02	12	10	0.18
13	Hi04g05	15	7	2.91
13	CH03a08	12	10	0.18
14	CH01g05	14	8	1.64
14	CH01e01	8	14	1.64
14	CH05g11 ^w	7	15	2.91
15	CH03b06	14	8	0.2
15	CH02d11	17	5	6.55*
15	CH03b10	16	6	4.55*
16	CH05c06 ^w	9	13	0.73
16	CH05a04	12	10	0.18
17	CH05g03	7	15	2.91
17	CH01h01	7	15	2.91
17	Hi07h02	12	10	0.67

^z以下の SSR マーカー (連鎖群) を用いたとき, ‘サナシ 63’ の対立遺伝子は多型を示さなかった. CH03g12 (1), KA4b (1), CH-Vf1 (1), CH02f06 (2), Hi15b02 (3), Hi01e10p (4), CH01d03 (4), Hi04a08p (5), CH03a09 (5), Hi04d02p (5), CH03a04 (5), Hi04d10p (6), CH01f03 (9), Hi05e07p (9), CH02b07 (10), CH02a08 (10), AF057134-SSR (10), CH02a10 (10), CH02c11 (10), COL (10), CH02g12 (12), CH01d09 (12), CH05h05 (13), AU223486-SSR (13), CH03h03 (13), CH05f04 (13), CH01d08 (15), CH02c09 (15), CH04f10 (16), Hi02f12 (17).

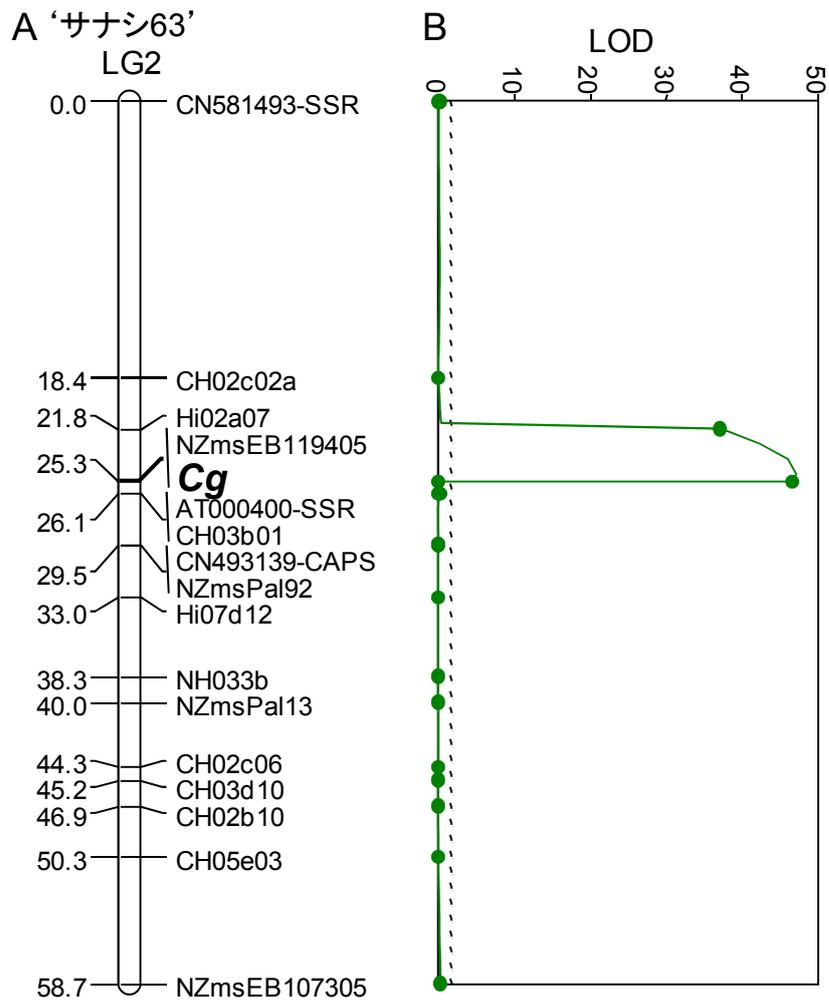
^y植物材料には, ‘JM7’ と ‘サナシ 63’ を交雑して得られた F1 集団から, 根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に抵抗性を示す 22 個体を任意に選択して用いた.

^x χ^2 検定において有意水準があることを示す: *:0.05, **:0.01, ***:0.001.

^w第 2 遺伝子座から増幅した対立遺伝子は, 本解析から除外した.

第 3-3 表. 根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対する抵抗性遺伝子 *Cg* が座乗していた ‘サナシ 63’ の第 2 連鎖群に既知の SSR マーカーを追加する際に供試された SSR マーカー.

SSR マーカー	参考文献
CH02c02a	Liebhard et al. (2002)
CH02c06	Liebhard et al. (2002)
CH02b10	Liebhard et al. (2002)
CH02f06	Liebhard et al. (2002)
CH03b01	Liebhard et al. (2002)
CH03d01	Liebhard et al. (2002)
CH03d10	Liebhard et al. (2002)
CH04e12b	Liebhard et al. (2002)
CH05e03	Liebhard et al. (2002)
AJ251116-SSR	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
AT000400-SSR	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
CN493139-SSR	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
CN581493-SSR	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
Hi02a07	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
Hi05g12	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
Hi08g12	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
Hi22d06	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
Hi07d12	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
NZmsPal13	Celton et al. (2009b)
NZmsPal92	Celton et al. (2009b)
NZmsEB149808	Celton et al. (2009b)
NZmsEB153909	Celton et al. (2009b)
NZmsEB106592	Celton et al. (2009b)
NZmsEB119405	Celton et al. (2009b)
NZmsEB107305	Celton et al. (2009b)
NH033b	Yamamoto et al. (2002b)



第3-5図. 根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対して抵抗性を示す‘サナシ63’における第2連鎖群 (LG2) の連鎖地図および QTL 解析.

(A) ‘サナシ63’における LG2 の連鎖地図.

根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対する抵抗性遺伝子を Cg で示す.

(B) Peach CG8331 株による2年間の平均がんしゅ形成率に対する QTL 解析 (MQM マッピング法).

Co-factor として, NZmsEB119405 を設定した.

●が連鎖地図上の SSR マーカーに対応する.

点線は 1,000 回の並べ替え検定で得られた有意水準 5% の閾値.

第3-4表. 根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対する抵抗性遺伝子 Cg の近傍に座乗する SSR マーカーを用いてリンゴの台木用品種と野生種で検出された対立遺伝子.

	Cg 遺伝子型	Hi02a07	NZmsEB119405	AT000400-SSR	CH03b01 ^z	NZmsPal92
Cg との遺伝距離 (cM)		3.4	0	0.9	0.9	4.3
サナシ 63	<u>Cg/cg</u>	<u>257 bp</u> ^y /null	<u>191/200</u>	<u>232/244</u>	<u>159/193</u>	<u>264/null</u>
JM1	cg/cg	257/299	191/206	232/244	171/185	245/277
JM5	cg/cg	257/299	191/206	232/244	171/185	245/277
JM7	cg/cg	274/299	206/206	232/232	183/185	277/279
M. 9	cg/cg	299/299	206/206	232/232	185/185	271/277
M. 26	cg/cg	272/299	206/206	232/244	185/185	269/277
M. 27	cg/cg	265/299	200/206	228/232/249	181/185	271/277
G. 65	cg/cg	299/299	206/206	228/232/249	181/185	255/277
Mo 84a	cg/cg	257/274	191/206	232/244	171/183	245/283
盛岡セイシ	cg/cg	257/274	191/206	232/244	171/183	245/279
対立遺伝子数		6	3	4	5	9

^z190-215 bp に非特異的な増幅産物が検出される.

^y下線を付して示した対立遺伝子が Cg と相引に連鎖している. 斜体で示した対立遺伝子は Cg と相引に連鎖する対立遺伝子と同じ増幅長を示すが, cg と相引に連鎖している.

第4章. 台木用品種における 挿し木発根性に優れた個体の早期選抜法

明治時代の初めに、日本政府がセイヨウリンゴ(栽培品種群, *M. × domestica*)の改良品種をヨーロッパやアメリカから導入したとき、台木は主に日本在来のリンゴ属植物であるマルバカイドウ (*M. prunifolia*) とミツバカイドウ (*M. sieboldii*) が用いられていた。マルバカイドウを台木として用いると穂木は喬木性を示すが、マルバカイドウは休眠枝挿しによる繁殖が極めて容易であり、栽培品種との接木親和性に優れ、日本の環境条件にも適していたので、昭和初期(1930年代)には80%を越える苗木でマルバカイドウが台木として利用されるに至った(土屋, 1998)。一方、ミツバカイドウは明治時代に台木として最も盛んに利用されていたものの、休眠枝挿しでは全く発根せず、台木に用いた場合に穂木はマルバカイドウを台木として用いた場合よりも喬木性を示すため、台木としての利用は行われなくなった。1960年代になると、欧米諸国で行われていた、栽培品種の穂木をわい性台木に接ぎ木した苗木を用いる栽培法(わい化栽培)を日本でも取り入れる気運が高まり、栽培試験が始められた。その結果、イギリスのイースト・モーリング試験場から導入されたわい性台木の品種である‘M. 26’と‘M. 9’(M系台木: *M. pumila*) や、イースト・モーリング試験場とイギリスのジョン・イネス研究所が共同で育成した‘MM. 106’(MM系台木: *M. pumila*) などを利用して、日本でもわい化栽培が行われ始めた。

しかしながら、日本で最も普及している‘M. 26’と‘M. 9’は、マルバカイドウと比較して、繁殖性が劣っていることが知られるようになった。すなわち、M系やMM系の台木用品種は休眠枝挿しによる繁殖が困難であり、取り木によって養成された苗木も根系が貧弱で枯死しやすい。このため、日本では通常、マルバカイドウ台木に‘M. 26’や‘M. 9’を穂木として接ぎ木して、さらにその先に栽培品種を接ぎ木するという、二重台木方式で苗木が養成される場合が多い。この方法では、苗木の生産に2回の接ぎ木を要するとともに、苗木の定

植後は台木として用いたマルバカイドウから発根する影響によって樹勢が強くなり、‘M. 26’や‘M. 9’本来のわい化性が発現しにくいという問題が生じてきた。

これらの問題は、マルバカイドウの1品種である‘盛岡セイシ’に‘M. 9’を交雑した実生から選抜された台木用品種である‘JM7’等のJM系台木が、(独)農研機構果樹研究所において育成されたことで解決をみている(副島ら, 2010, 2013)。JM系台木はその特性として、マルバカイドウの挿し木発根性と、M系台木のわい化性を併せ持つので、M系台木では困難であった、わい性台木の容易な繁殖と1回の接ぎ木による苗木の養成が可能になった。さらに、JM系台木の中でも特に‘JM7’は、M系台木よりも果実の生産性が高く、環境適応性と耐病虫性に優れるので、最も普及が進んでいる。

しかしながら、第3章で触れたように、近年、JM系台木に発生する根頭がんしゅ病が問題になっており(猫塚ら, 2001)、現在では、JM系台木の優良形質と根頭がんしゅ病に抵抗性の形質を合わせ持った台木用の新品種が求められている。そこで、(独)農研機構果樹研究所において根頭がんしゅ病抵抗性台木の育成が試みられていて、その際の育種目標として、根頭がんしゅ病抵抗性と合わせて、挿し木発根性などのJM系台木の持つ優れた特性を引き継ぐことが設定されている。

ところで、休眠枝挿しにおける発根とは、挿し穂から不定根が形成される現象であり、不定根を形成する過程にはオーキシンが深く関わっていると考えられている(Han et al., 2009; Pop et al., 2011)。また、リンゴにおいて、組織培養条件で不定根が形成される際に発現が上昇する遺伝子として、*Adventitious Rooting Related Oxygenase-1 (ARRO-1)*が報告されており(Butler・Gallagher, 1999)、*ARRO-1*の発現量を減少させた遺伝子組換え体では、不定根の発生が抑えられることが報告されている(Smolka et al., 2009)。しかし一方では、組織培養条件においてリンゴの台木用品種(‘M. 9’と‘Chistock #1’)にインドール酢酸を処理すると*ARRO-1*の発現量が上昇するものの、培養シュートからの発根はみられなかった

ので、*ARRO-1* は発根に対して直接的に関わっていないと考えられている (Li et al., 2012b).

休眠枝挿しについては、挿し穂の発根率に影響を与える要因について明らかにされており、例えば、挿し木に用いる穂木の採取時期は落葉後すぐか発芽直前が適しており、厳冬期は適さないことや、挿し木前に合成オーキシシン剤であるインドール酪酸を処理することによって発根率が上昇することなどが知られている (Webster, 1995). JM 系台木の休眠枝挿しについても、挿し木条件の検討が行われており (副島ら, 2002, 2004), その結果、挿し木床に堆肥を混入したり、土壌鎮圧を行うことによって、70 %以上の挿し穂から発根が得られている (副島ら, 2010).

このように、休眠枝挿しを含む不定根の形成や発根性に関する実験は盛んに行われているにもかかわらず、その遺伝性に関する知見は、ほとんど得られていない. JM 系台木を育成する過程においては、交雑して得られた個体の発根性を休眠枝挿しで検定し、50 %以上の挿し穂から発根が得られた個体を選抜する手法が採られているので、挿し木発根性が遺伝形質であることは明らかであるが、遺伝様式についての言及はみられない (吉田ら, 1985). 交雑実生集団において休眠枝挿しの発根性を評価するためには、複数回の挿し木試験を行う必要がある. しかしながら、休眠枝挿しの検定は1年に1回しか行うことができないという制約がある. さらに、樹齢を重ねて樹体が大きく成長しないと、挿し穂数の反復が取れないので、正確な評価は困難である. さらには、多大な時間と労力を要する形質評価を交雑実生集団のような多数の個体に対して行うことは、極めて困難を伴う.

上記のような問題を解決するためには、DNA マーカーを用いて、休眠枝挿しで良好に発根する少数の実生個体を早期に選抜し、これらの個体について集中的に表現型の評価を行うことが有効と考えられる. そこで、本章においては、挿し木発根性に優れる実生個体を選抜するためのDNA マーカーを開発しようとした. これまでの知見から、休眠枝挿しにおける発根性は単一の遺伝子によっ

て制御される質的形質というよりは、むしろ複数の QTL に制御される量的形質と解釈の方が適切であると判断されている (Pop et al., 2011). そこで、本章においても、休眠枝挿しにおける発根性を QTL に制御される量的形質と仮定して、QTL 解析の手法を用いて発根性に関与する QTL を同定しようとした。本章ではまず初めに、リンゴの染色体基本数である $x = 17$ に等しい、17 個の連鎖群で構成される連鎖地図を構築することとした。次に、連鎖地図と休眠枝挿しの検定結果を用いて QTL 解析を行うこととした。最後に、挿し木発根性に優れた実生個体を選抜するための DNA マーカーを開発することとした。

第 1 節. 連鎖地図の構築

量的形質に関与する QTL を同定するためには、全ゲノムをカバーする連鎖地図を構築して、QTL 解析を行うことが必要である。リンゴでは、染色体基本数に等しい 17 個の連鎖群で構成され、全ゲノムをカバーする連鎖地図は、主にセイヨウリンゴ (栽培品種群, *M. × domestica*) で構築されている (Maliepaard et al., 1998; Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Fernandez-Fernandez et al., 2008; van Dyk et al., 2010)。リンゴの台木用品種とリンゴ属野生種、およびそれらの種間交雑種において構築された連鎖地図は ‘M. 9’ と ‘Robusta 5’ (Celton et al., 2009b) のみである。また、これまでに報告されているリンゴの QTL 解析はすべて、耐病性や果実形質に関わるものであり (Troggio et al., 2012)、挿し木発根性に関する研究はみられない。

このように、リンゴの台木用品種に関する形質の研究例は少ないが、栽培品種で得られている潤沢な知見を活用することで、台木用品種や野生種であっても連鎖地図は構築できることが分かっている。すなわち、栽培品種から開発された SSR マーカーは、‘M. 9’ と ‘Robusta 5’ の連鎖地図の構築に用いられており、その座乗する位置は、栽培品種と台木用品種・野生種との間で保存されていることが判明している。このため、‘M. 9’ と ‘Robusta 5’ の連鎖地図は、互

いに共通に座乗する SSR マーカーを基準として、リンゴの飽和標準連鎖地図である‘Discovery’と‘Fiesta’の連鎖地図 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) と直接、比較することができる。そこで、‘JM7’とミツバカイドウの‘サナシ 63’の連鎖地図を構築するにあたり、栽培品種で開発された既知の SSR マーカーから、‘JM7’と‘サナシ 63’で多型を示すものを選抜し、連鎖地図の骨格としてマッピングして、飽和標準連鎖地図と比較することとした。骨格とした SSR マーカーの間の領域は、新たに開発した EST 由来の SSR マーカー (EST-SSR マーカー) の検出、および amplified fragment length polymorphism (AFLP) 分析を行って、連鎖地図全体に SSR マーカーと AFLP マーカーを追加することとした。

材料および方法

1. 植物材料

‘JM7’と、ミツバカイドウ‘サナシ 63’、および‘JM7’と‘サナシ 63’の交雑によって得られた F1 集団の 120 個体を供試した。これらの材料は第 3 章で用いたものと共通であった。各個体のゲノム DNA は第 1 章の方法に準じて抽出した。

2. 連鎖地図の骨格となる SSR マーカーの検出

リンゴ属 (Guilford et al., 1997; Gianfranceschi et al., 1998; Liebhard et al., 2002; Hokanson et al., 1998; Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Fernandez-Fernandez et al., 2008; Celton et al., 2009b; Costa et al., 2008), およびナシ属 (Yamamoto et al. 2002a,b; Sawamura et al., 2004; Nishitani et al., 2009) で開発された 275 種類の既知の SSR マーカーを、連鎖地図の骨格とする SSR マーカーとして実験に供試した。これらの SSR マーカーの PCR および検出は、第 1 章の方法に準じて行った。解析の結果、両親のうち的一方、もしくは両方で多型が検出された SSR マーカーを用いて、F1 集団の全個体で対立遺伝子を検出した。

3. EST-SSR マーカーの開発と検出

‘ふじ’の花芽、幼果、成熟果、葉、および‘紅玉’の果皮と茎頂から作成

した 6 種類の相補的 DNA (cDNA) ライブラリーから、合計で 17,774 クローンについて 5'側から塩基配列を解析した。これらの配列から、Pregap4 ソフトウェアと Gap 4 ソフトウェア (Bonfield et al., 1995) を用いて、同一の遺伝子に由来するクローンの塩基配列を 9,010 件の非冗長配列 (non-redundant sequences) に整理した。得られた非冗長配列から、Genome Database for Rosaceae (GDR: <http://www.rosaceae.org/>) のホームページ上で利用できる SSR 検索・プライマー設計プログラムを用いて SSR を検索し、塩基配列に SSR を含む非冗長配列を抽出した後、SSR を挟み込むプライマー対を設計した。この際、2 bp の反復配列の場合には、5 回以上の繰り返しを含む非冗長配列を検索し、同様に、3 bp の反復配列では 4 回以上、4 bp の反復配列では 3 回以上の繰り返しを含む非冗長配列を検索した。2 bp, 3 bp, 4 bp の反復配列ごとに、繰り返し回数が多い非冗長配列から順に、2 bp では 170 種類、3 bp では 9 種類、4 bp では 21 種類のプライマーを合成した (MEST001~MEST200: *Malus Expressed Sequence Tag*)。合成したプライマーを用いて、第 1 章の方法に準じて 'JM7' と 'サナシ 63' で検出される対立遺伝子を調べた。両親のうち的一方、もしくは両方で多型が検出されたプライマーを新規 EST-SSR マーカーとした。次に、それらの新規 EST-SSR マーカーを用いて F1 集団の全個体で対立遺伝子を検出した。

4. AFLP マーカーの検出

AFLP 法 (Vos et al., 1995) によって、AFLP マーカーを検出した。実験には AFLP Analysis System II kit (ライフテクノロジー (株)) を用いた。Selective amplification においては、いずれも 5'末端を蛍光物質 FAM で標識した 8 つの *EcoRI* 側プライマー (E31, E32, E33, E34, E39, E40, E41, E42) と、5 つの *MseI* 側のプライマー (M48, M50, M59, M61, M62) を組み合わせ、合計で 15 種類のプライマー組合せ (E31-M48, E32-M48, E32-M59, E33-M48, E34-M48, E39-M48, E39-M61, E40-M48, E40-M50, E40-M59, E41-M48, E41-M59, E41-M62, E42-M48, E42-M50) について、実験を行った。Selective amplification で得られた PCR 産物は ABI PRISM 3100 DNA シーケンサー (ライフテクノロジー (株))

を用いて分離・検出した。AFLP マーカーの命名にあたっては、プライマー名の後に多型が得られた塩基長を記載した。

5. 連鎖地図の構築

上記で得られた DNA マーカーのデータの連鎖解析には JoinMap 4 ソフトウェア (Kyazma B. V.) を用い、シュードテストクロス法および Kosambi の地図関数を用いて、連鎖地図を構築した。連鎖群を決めるための最小 LOD 値には 8 を採用した。構築した連鎖地図の各連鎖群は、リンゴの飽和標準連鎖地図 (Silfverberg-Dilworth et al., 2006) と共通の SSR マーカーを基準として、飽和標準連鎖地図に対応するように整列させた上で、連鎖群番号を付けた。

連鎖地図の構築にあたり、初めに AFLP マーカーを除く DNA マーカーだけを用いて、連鎖解析を行った。次に、全ての AFLP マーカーを含めて、連鎖解析を行った。AFLP マーカーを加えずに構築した連鎖地図と、AFLP マーカーを加えて構築した連鎖地図を比較して、以下のような状態を示した AFLP マーカーについては信頼性の観点から、この後に行った最終的な連鎖解析から除外した。その状態とは、1) 解析に加えることで、連鎖地図の骨格として用いた SSR マーカー、および EST-SSR マーカーの連鎖地図内での並び順が変わってしまうもの、2) 連鎖群の末端に位置する SSR マーカーからさらに末端側に 20 cM 以上離れて座乗したもの、3) 当該 AFLP マーカーの近傍に座乗した SSR マーカーと分離比が明らかに異なっているもの、である。このような AFLP マーカーを除いた後に、再び連鎖解析を行って、最終的な連鎖地図を構築した。

結 果

1. 連鎖地図の骨格となる SSR マーカーの検出

リンゴ属から開発された 256 種類の既知の SSR マーカーのうち、192 種類において交雑親のうち少なくとも一方で、マッピング可能な多型が得られた。ナシ属から開発された 19 種類の SSR マーカーのうち 12 種類において、少なくとも一方の交雑親でマッピング可能な多型が得られた。多型が得られた 204 種類

の中で、既報の連鎖地図において遺伝距離が離れた関係にある 155 種類を用いて、F1 集団の 120 個体で検出される対立遺伝子を調べたが、近接した関係にある 49 種類については、連鎖地図上で遺伝子座の分離がみられないことが予想されたので、F1 集団における対立遺伝子を検出しなかった。その結果、マッピングに供試することが可能な遺伝子座として、‘JM7’において 180 遺伝子座、‘サナシ 63’において 154 遺伝子座が得られた（第 4-1 表）。

2. EST-SSR マーカーの開発と検出

同じ塩基配列を持つ EST を同一の遺伝子と見なして整理・統合した 9,010 件の非冗長配列について、SSR 配列を検索したところ、2 bp の反復配列が 1,316 種類、3 bp の反復配列が 1,110 種類、4 bp の反復配列が 393 種類、見出された。合成したプライマーを用いて、‘JM7’と‘サナシ 63’において PCR を行い、2 bp では 151 種類、3 bp では 9 種類、4 bp では 21 種類について、増幅産物が得られた。このうち、連鎖地図上に位置付けられる多型が得られた 137 種類（2 bp では 119 種類、3 bp では 7 種類、4 bp では 11 種類）のプライマーセットを新規 EST-SSR マーカーとした（第 4-2 表）。

3. AFLP マーカーの検出

15 種類のプライマー組合せ (E31-M48, E32-M48, E32-M59, E33-M48, E34-M48, E39-M48, E39-M61, E40-M48, E40-M50, E40-M59, E41-M48, E41-M59, E41-M62, E42-M48, E42-M50) から、‘JM7’では 125 遺伝子座、‘サナシ 63’では 64 遺伝子座が得られた。平均すると 1 プライマー組合せあたり、‘JM7’では 7.8 遺伝子座、‘サナシ 63’では 4.0 遺伝子座が得られた。連鎖解析の過程で ‘JM7’で得られた 18 遺伝子座と ‘サナシ 63’で得られた 5 遺伝子座は連鎖地図の構築から除外されたので、連鎖地図に含まれる遺伝子座数は ‘JM7’では 107 遺伝子座、‘サナシ 63’では 59 遺伝子座であった（第 4-1 表）。

4. ‘JM7’および‘サナシ 63’の連鎖地図の構築

上記の実験によって得られた、‘JM7’×‘サナシ 63’の F1 集団における遺伝子座の分離データを用いて、‘JM7’と‘サナシ 63’それぞれの連鎖地図を構

築した（第 4-1 表，第 4-1 図）．連鎖地図は‘JM7’では 415 遺伝子座を含み，全長は 998.0 cM であり，‘サナシ 63’では 310 遺伝子座を含み，全長は 981.8 cM であった．また，‘JM7’と‘サナシ 63’の連鎖地図において，遺伝子座の密度はそれぞれ 0.42 遺伝子座/cM，0.32 遺伝子座/cM であった．これら 2 つの連鎖地図には，共通する SSR マーカーおよび EST-SSR マーカーで得られた遺伝子座が 185 個含まれていた．また，‘JM7’の連鎖地図の連鎖群の長さは 38.2 cM から 84.0 cM の範囲であり，連鎖群に含まれる遺伝子座数は 13 個から 40 個の範囲であった．‘サナシ 63’の連鎖地図の連鎖群の長さは 24.7 cM から 90.5 cM の範囲であり，連鎖群に含まれる遺伝子座数は 12 個から 29 個の範囲であった．連鎖地図中に 20 cM よりも長いギャップ領域が生じた連鎖群は，両連鎖地図の LG 6，および‘サナシ 63’の LG 1 と LG 4 であった．

本節において得られた連鎖地図を，リンゴの飽和標準連鎖地図である‘Discovery’の連鎖地図（Silfverberg-Dilworth et al., 2006）と比較すると，LG 7 の下部，および LG 8 と LG 13 の上部に，飽和標準連鎖地図の末端の SSR マーカーよりも，さらに末端部に座乗している SSR マーカーが得られた（第 4-1 図）．一方，‘JM7’と‘サナシ 63’の連鎖地図において，連鎖地図が構築できていない箇所は，両連鎖地図の LG 12 の下部，‘JM7’の LG 11 の上部，‘サナシ 63’の LG 3 と LG 9 の下部であった．

考 察

‘JM7’と‘サナシ 63’の連鎖地図（第 4-1 表，第 4-1 図）の遺伝距離はリンゴの飽和標準連鎖地図（Silfverberg-Dilworth et al., 2006）よりも短い連鎖群が多く，長かったのは‘JM7’の LG 4 と LG 14，および‘サナシ 63’の LG 7 と LG 14 だけであった．しかしながら，連鎖地図間で共通の SSR マーカーを対応付けることによって推定された，連鎖地図のカバーしている領域は飽和標準連鎖地図とほとんど変わらなかったため，‘JM7’と‘サナシ 63’の連鎖地図は，ほぼ全ゲノムがカバーされていると判断された．連鎖地図が構築できなかった 4 箇

所の領域（両連鎖地図の LG 12 の下部，‘JM7’ の LG 11 の上部，‘サナシ 63’ の LG 3 と LG 9 の下部）は，実験に用いた全ての SSR マーカーにおいて，マッピングできる多型が得られなかった．多型が得られなかったという結果から，‘JM7’ と ‘サナシ 63’ はこれらの領域においてほとんど多型を示さないと推察された．

本節の研究に着手した段階で，リンゴの台木用品種と野生種において，17 個の連鎖群で構成されている連鎖地図は，Celton et al. (2009b) が報告した ‘M. 9’ と ‘Robusta 5’ しか存在しておらず，その他は全てセイヨウリンゴ（栽培品種）の連鎖地図であった（Maliepaard et al., 1998; Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Fernandez-Fernandez et al., 2008; van Dyk et al., 2010）．本節において材料として供試した ‘JM7’ は，‘M. 9’ とマルバカイドウ ‘盛岡セイシ’ を交雑して得られた実生から選抜されており，遺伝的な背景は Celton et al. (2009b) が用いた ‘M. 9’ と近い材料である．一方，ミツバカイドウ ‘サナシ 63’ は，分類上，リンゴ属ズミ節（Sect. *Sorbomalus*）の植物で，リンゴ属リンゴ節（Sect. *Malus*）に属するセイヨウリンゴやマルバカイドウとは遠縁のリンゴ属植物である．本節で構築された ‘サナシ 63’ の連鎖地図は，ズミ節に属する野生種としては初めての事例であった．

最近，リンゴの台木用品種を対象とした連鎖地図が相次いで報告されており，わい化性，接ぎ木親和性，果実の生産効率，リンゴワタムシに対する抵抗性，発芽直後のみアルビノ形質を示す性質（偽白子性）等に対する連鎖解析を行う計画が立てられている（Fernandez-Fernandez et al., 2012; Antanaviciute et al., 2012）．本節で構築された連鎖地図は，‘JM7’ ではマルバカイドウに由来する挿し木発根性，‘サナシ 63’ では根頭がんしゅ病に対する抵抗性など，Fernandez-Fernandez et al. (2012) と Antanaviciute et al. (2012) によって用いられている ‘M. 27’ × ‘M. 116’（‘MM. 106’ × ‘M. 27’）の F1 集団では分離しない形質を解析することができる．このような理由で，本節の研究で構築された連鎖地図は，こ

これらの形質に連鎖する DNA マーカーの開発を通して、リンゴの台木用品種の交雑育種を効率化するために多いに貢献すると考察された。

第 4-1 表. 台木用品種 ‘JM7’ とミツバカイドウ ‘サナシ 63’ を交雑して得られた F1 集団 (120 個体) を用いて構築された ‘JM7’ と ‘サナシ 63’ の連鎖地図.

遺伝子座数	連鎖群 ^z																	合計
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	
既知 SSR 遺伝子座	9	12	15	12	15	9	7	6	9	10	12	7	12	11	15	10	9	180
新規 EST-SSR 遺伝子座	9	6	5	4	5	3	6	7	9	7	8	10	13	3	19	5	8	127
AFLP 遺伝子座	10	5	8	6	9	1	5	7	3	5	6	9	5	5	6	10	7	107
その他の遺伝子座	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
合計	28	23	28	22	29	13	18	20	21	22	26	26	30	19	40	25	25	415
連鎖群の長さ (cM)	72.1	59.6	53.5	84.0	67.8	51.0	51.9	55.0	47.3	61.1	65.8	38.2	53.3	50.9	65.3	69.6	51.8	998
遺伝子座の密度 (遺伝子座/cM)	0.39	0.39	0.52	0.26	0.43	0.25	0.35	0.36	0.44	0.36	0.40	0.68	0.56	0.37	0.61	0.36	0.48	0.42

遺伝子座数	連鎖群 ^z																	合計
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	
既知 SSR 遺伝子座	9	16	10	11	12	7	5	9	4	6	10	4	9	9	12	9	12	154
新規 EST-SSR 遺伝子座	6	6	3	3	7	2	5	7	9	5	5	6	10	3	11	1	5	94
AFLP 遺伝子座	0	5	1	3	2	3	4	3	2	2	9	2	2	2	6	9	4	59
その他の遺伝子座	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
合計	15	29	14	17	21	12	14	19	15	13	24	12	21	14	29	19	22	310
連鎖群の長さ (cM)	56.6	59.7	54.8	57.5	71.1	59.3	62.1	41.8	58.9	61.8	63.3	24.7	57.8	47.1	90.5	53.5	61.2	981.8
遺伝子座の密度 (遺伝子座/cM)	0.27	0.49	0.26	0.30	0.30	0.20	0.23	0.45	0.25	0.21	0.38	0.49	0.36	0.30	0.32	0.36	0.36	0.32

^z連鎖群番号は第 4-1 図に示した連鎖地図の連鎖群番号と対応しており, ‘JM7’, ‘サナシ 63’ の連鎖群をそれぞれ J1~J17, S1~S17 と示す.

第 4-2 表. 台木用品種 ‘JM7’ およびミツバカイドウ ‘サナシ 63’ の連鎖地図に
マッピングされた新規 EST-SSR マーカー.

EST-SSR	GenBank 登録番号	反復配列	マッピングされた連鎖群 ^z	
			‘JM7’	‘サナシ 63’
MEST001	AB627185	(tc)33	J6	
MEST003	AB627186	(ag)29	J13	S13
MEST006	AB627187	(ag)25	J5	S5
MEST007	AB627188	(ga)8g(ga)25	J15	S15
MEST008	AB627189	(at)5(ta)25		S5
MEST009	AB627190	(ag)24	J16	
MEST011	AB627191	(ct)24	J12	S12
MEST012	AB627192	(ag)23	J2	S2,S7
MEST013	AB627193	(ag)23	J15	S15
MEST014	AB627194	(ct)22	J9	
MEST016	AB627195	(ag)21	J11	
MEST017	AB627196	(ct)21	J13	S13
MEST019	AB627197	(ga)21g(ga)6	J8,J15	
MEST020	AB627198	(ga)21	J17	S17
MEST021	AB627199	(ga)21	J13	
MEST022	AB627200	(ga)20	J15	S15
MEST023	AB627201	(ga)20	J10	
MEST024	AB627202	(ta)20	J2,J7	S11
MEST026	AB627203	(tc)20	J15	S8,S15
MEST028	AB627204	(ag)19	J2	S2
MEST029	AB627205	(ag)19	J17	S17
MEST031	AB627206	(ct)19		S3
MEST032	AB627207	(ct)19	J9	S9
MEST033	AB627208	(ct)19	J11	
MEST034	AB627209	(ct)19	J9	S9
MEST036	AB627210	(ct)18	J8	
MEST037	AB627211	(ct)18(ca)6	J7	S7
MEST038	AB627212	(ga)18		S10
MEST039	AB627213	(ga)18	J9	
MEST041	AB627214	(tc)18	J14	S14
MEST043	AB627215	(ag)17		S10
MEST044	AB627216	(ag)17		S11
MEST045	AB627217	(at)17	J11	
MEST049	AB627218	(tc)17	J4	
MEST050	AB627219	(tg)17	J15	S15

第 4-2 表. (続き)

EST-SSR	GenBank 登録番号	反復配列	マッピングされた連鎖群	
			‘JM7’	‘サナシ 63’
MEST052	AB627220	(ag)16	J13	S13
MEST054	AB627221	(ag)16	J7	S7
MEST056	AB627222	(at)16	J6	
MEST060	AB627223	(ct)16	J3	
MEST061	AB627224	(ct)16	J8	S8
MEST062	AB627225	(ct)16	J15	S15
MEST063	AB627226	(ct)16	J9	S9
MEST064	AB627227	(ct)16	J9	
MEST065	AB627228	(ct)16	J5	S5
MEST066	AB627229	(ct)16ca(ct)8	J10	
MEST067	AB627230	(tc)16	J2	S2
MEST069	AB627231	(ct)15	J17	S17
MEST070	AB627232	(ga)15	J11	
MEST071	AB627233	(ga)15	J13	
MEST073	AB627234	(tc)15	J9	S9
MEST074	AB627235	(tc)15	J17	
MEST076	AB627236	(ag)14	J3	S3
MEST080	AB627237	(ct)14	J3	S3
MEST082	AB627238	(ct)14	J15	
MEST083	AB627239	(ga)14		S7
MEST084	AB627240	(ga)14	J12	S12
MEST086	AB627241	(tc)14	J15	S15
MEST088	AB627242	(ag)13	J13	S13
MEST089	AB627243	(ag)13	J5	S5
MEST091	AB627244	(ct)13	J4	
MEST092	AB627245	(ct)13	J15	S11
MEST093	AB627246	(tc)5(ct)13	J13	S13
MEST095	AB627247	(ct)13	J10	S5, S10
MEST096	AB627248	(ct)13	J17	S17
MEST097	AB627249	(at)12(ag)25	J9	S9
MEST098	AB627250	(at)11	J16	
MEST099	AB627251	(cctc)5(ct)13	J1	
MEST100	AB627252	(tg)12	J11, J12	
MEST101	AB627253	(tc)12	J8	S8
MEST102	AB627254	(tc)12(ac)10	J15	S15

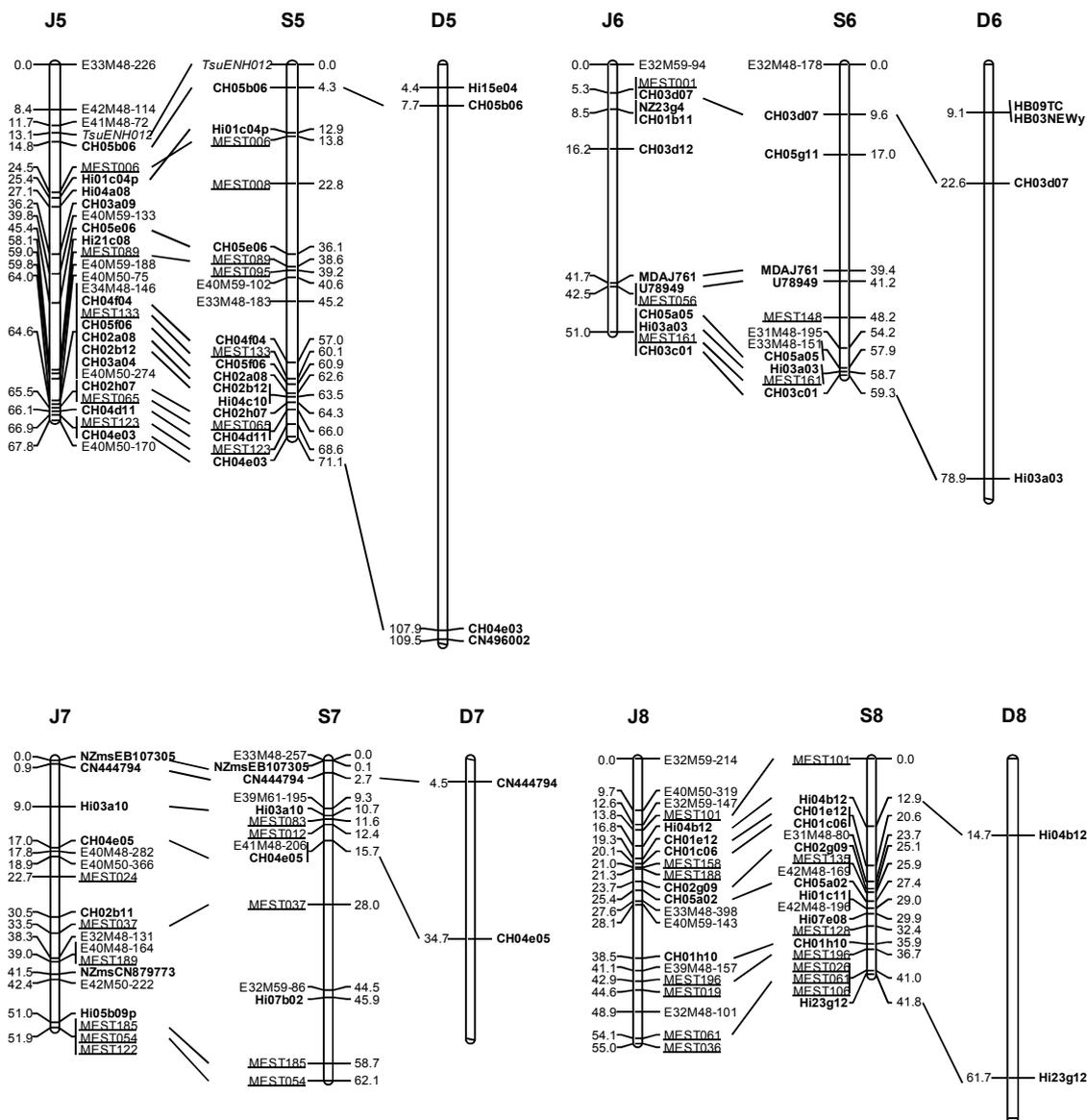
第 4-2 表. (続き)

EST-SSR	GenBank 登録番号	反復配列	マッピングされた連鎖群	
			‘JM7’	‘サナシ 63’
MEST105	AB627255	(ta)12		S2
MEST106	AB627256	(ta)12		S8
MEST108	AB627257	(tc)11(ta)12		S15
MEST109	AB627258	(ta)12	J10	
MEST111	AB627259	(at)12	J10	S10
MEST112	AB627260	(tc)8tt(tc)11	J12, J14	S12, S14
MEST113	AB627261	(ag)12	J1	
MEST117	AB627262	(ag)12	J3, J11	S11, S11
MEST118	AB627263	(ag)12	J11	
MEST119	AB627264	(at)11	J17	S17
MEST120	AB627265	(ag)11	J1	
MEST122	AB627266	(at)11	J7	
MEST123	AB627267	(ct)11	J5	S5
MEST124	AB627268	(ga)11	J10	S10
MEST125	AB627269	(tc)11		S4
MEST126	AB627270	(at)11	J15	S15
MEST127	AB627271	(ga)11	J12	
MEST128	AB627272	(tc)11	J15	S8
MEST129	AB627273	(ag)11		S1
MEST132	AB627274	(ta)11	J12	S12
MEST133	AB627275	(tc)11	J5	S5
MEST134	AB627276	(ct)11	J3	
MEST135	AB627277	(ta)11		S8
MEST136	AB627278	(ct)10	J16	
MEST138	AB627279	(ct)10	J4, J12	S4, S12
MEST139	AB627280	(ag)10	J13	
MEST140	AB627281	(tc)10	J11	
MEST141	AB627282	(ct)10	J14	
MEST142	AB627283	(at)10		S2
MEST143	AB627284	(ag)10	J1	
MEST144	AB627285	(ag)10	J16	S16
MEST145	AB627286	(ag)10		S9
MEST147	AB627287	(tc)9	J15	
MEST148	AB627288	(tc)9		S6
MEST150	AB627289	(ct)9	J15	S15

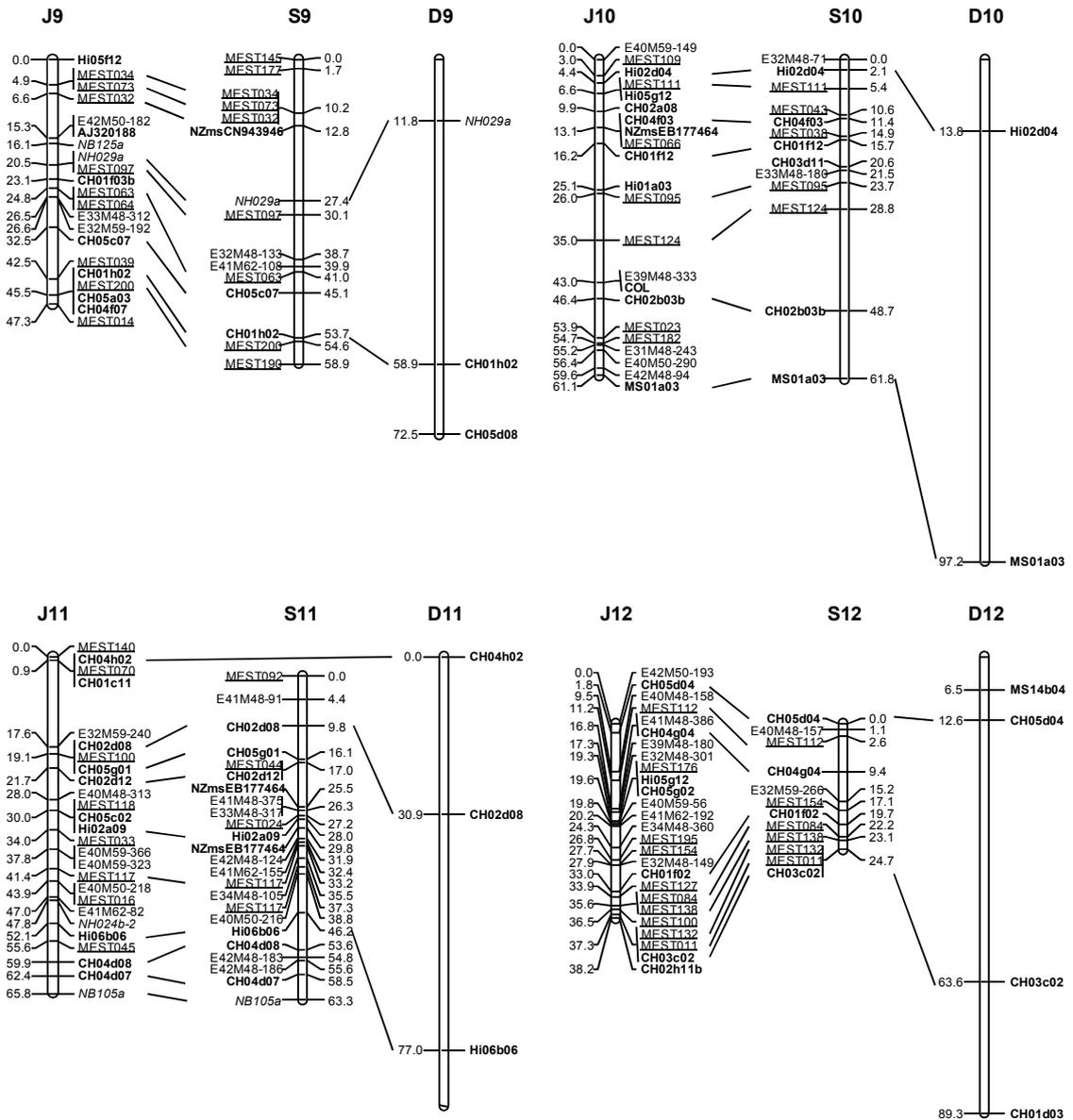
第 4-2 表. (続き)

EST-SSR	GenBank 登録番号	反復配列	マッピングされた連鎖群	
			‘JM7’	‘サナシ 63’
MEST153	AB627290	(tc)9a(at)5	J13	S13
MEST154	AB627291	(tc)9	J12	S12
MEST155	AB627292	(ct)8ttt(tc)5	J2, J15	S2
MEST157	AB627293	(ct)9		S1
MEST158	AB627294	(ct)9	J8	
MEST159	AB627295	(at)9	J13	S13
MEST160	AB627296	(ct)9ag(tc)5	J1	S1
MEST161	AB627297	(ag)9	J6	S6
MEST162	AB627298	(ct)9	J13	S13
MEST163	AB627299	(ga)9	J1	S1
MEST164	AB627300	(ac)9	J17	
MEST165	AB627301	(ag)9	J15	
MEST168	AB627302	(ct)9	J13	S13
MEST170	AB627303	(tctg)6	J16	
MEST171	AB627304	(ggag)6ga (aggg)3		S14
MEST174	AB627305	(gaaa)5	J13	
MEST176	AB627306	(ccag)5	J12	
MEST177	AB627307	(agac)5		S9
MEST178	AB627308	(aaag)5	J15	
MEST182	AB627309	(gaaa)4	J10	
MEST185	AB627310	(tc)11	J1, J7	S1, S7
MEST187	AB627311	(catt)4	J4	S4
MEST188	AB627312	(agga)4	J8	
MEST189	AB627313	(agaa)4	J7	
MEST190	AB627314	(aatt)4		S9
MEST193	AB627315	(tat)10	J1	
MEST195	AB627316	(tcc)10	J12	
MEST196	AB627317	(ctc)10	J8	
MEST197	AB627318	(gag)9	J17	
MEST198	AB627319	(gca)9	J2, J15	S13
MEST199	AB627320	(cct)8	J1	S1
MEST200	AB627321	(gtt)8	J9	S9

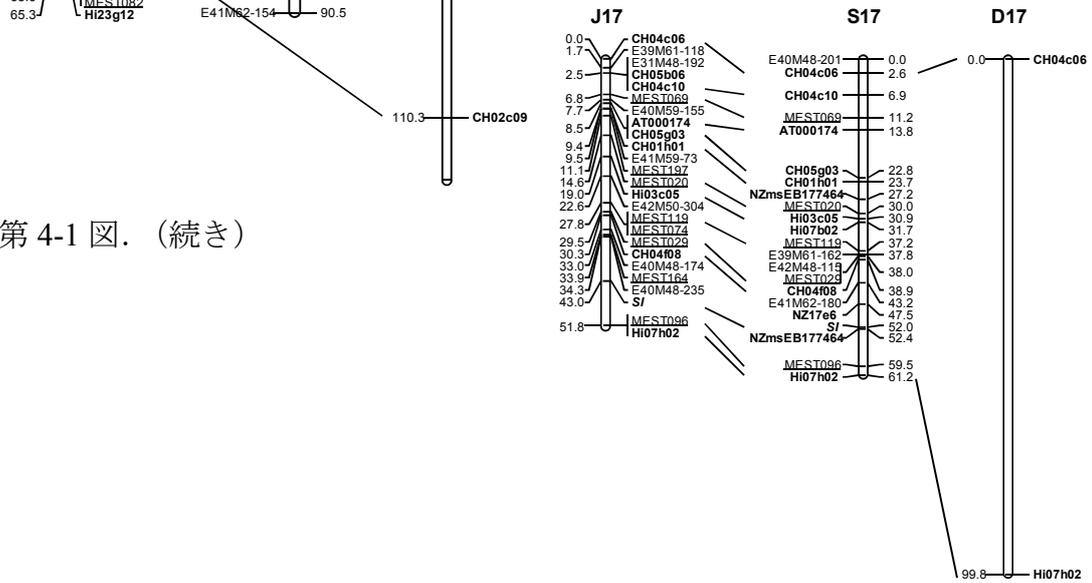
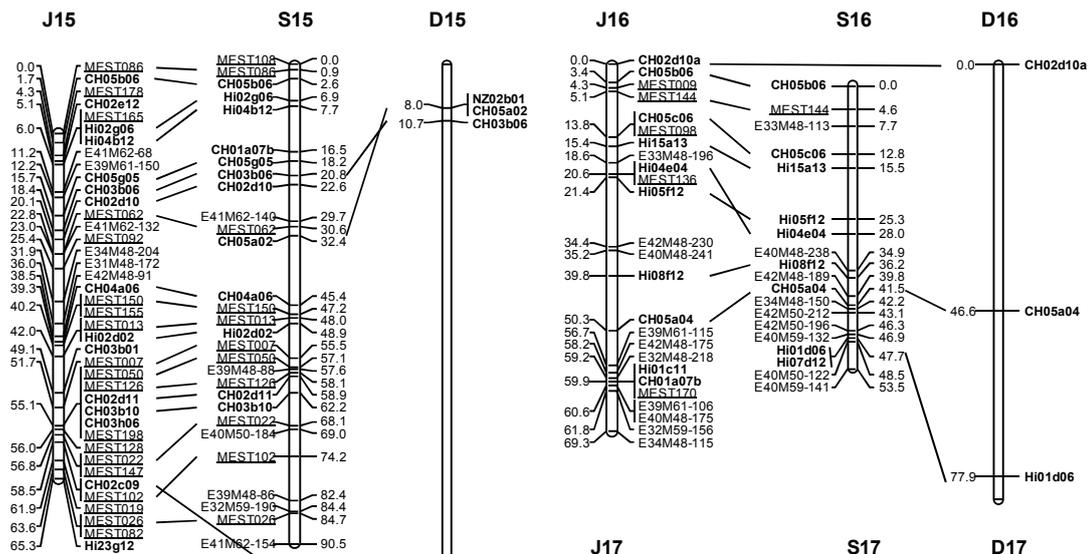
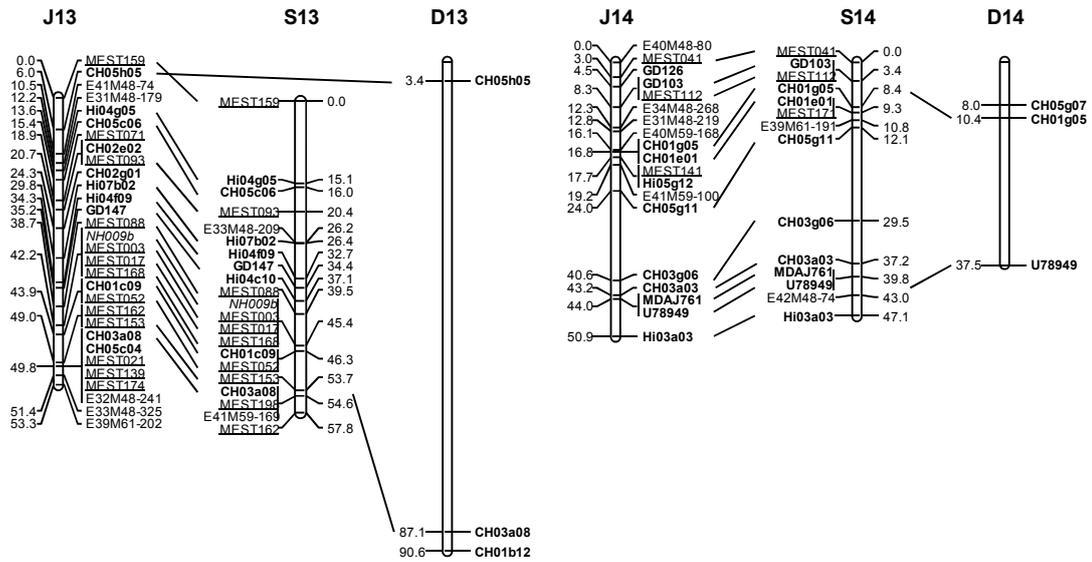
^z連鎖群番号は第 4-1 図の連鎖地図の連鎖群番号と対応しており, ‘JM7’, ‘サナシ 63’ の連鎖群をそれぞれ J1~J17, S1~S17 と示す.



第 4-1 図. (続き)



第 4-1 図. (続き)



第 4-1 図. (続き)

第2節. 挿し木発根性に優れた個体を早期に選抜するための DNA マーカーの開発

量的形質の DNA マーカー選抜を行う場合は、表現型に対する効果がなるべく大きい QTL を対象に選抜を行うことが必要である。このため、選抜の対象とする QTL が示す表現型に対する寄与率は、検討すべき重要な要素である。普通、形質ごとに選抜基準となる形質値が設けられているので、DNA マーカー選抜が有効かどうか検討する際に、QTL の望ましい対立遺伝子を持つ個体が選抜基準に適合するか、見極めることが重要である。

挿し木発根性を評価する場合、JM 系台木の育成過程ではバーミキュライトを挿し木床とする評価方法がとられていたが、苗木業者や生産者等の実需者が台木を繁殖させる際には、露地の土壌で挿し木が行われることがほとんどである。このため、実用的な挿し木発根性を解析するためには、バーミキュライトを挿し木床に用いた試験と、露地で土壌を挿し木床に用いた試験の 2 種類で形質評価を行うことが求められる。

そこで、本節では、2 つの挿し木床を用いて発根性を調べ、得られた発根率の値を用いて QTL 解析を行い、発根性に関与する QTL を見出すこととした。次いで、挿し木発根性に優れる実生個体を選抜するための DNA マーカーを開発することとした。

材料および方法

1. 植物材料

‘JM7’ と、ミツバカイドウ ‘サナシ 63’、および ‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の交雑によって得られた F1 集団の 120 個体を供試した。これらの材料は前節で用いたものと共通であった。

2. 休眠枝挿しにおける発根性の検定

落葉後の 12 月上～中旬に、各個体から新梢を採取して、乾燥を避けるために

ビニールシートで覆ってから、1°C に設定された冷蔵庫に保存した。3月中旬～下旬にかけて、各新梢から 20～25 cm の長さの穂木を切り出し、最上部の 1 芽を残して、他の芽を掻き取ってから挿し木用の穂木（挿し穂）として供試した。

2004 年から 2007 年にかけて、人工気象室内でバーミキュライトを挿し木床とする試験を行った。人工気象室内は、気温 18°C、地温 20°C に設定した。挿し木は 4～6 月に行った。挿し穂に対する発根促進処理として、挿し木直前にオキシベロン 4 倍希釈液（0.1 %インドール酪酸）を瞬間浸漬した。挿し木から 1 ヶ月後に挿し穂を掘り上げ、発根が 1 本でも見られた挿し穂を「発根あり」と評価した。F1 集団の個体ごとに 2004 年から 2007 年の結果を合算し、発根ありと評価された挿し穂数を総挿し穂数で除して、個体ごとの発根率を求め、0～1 の値で表した。個体当たりの 4 年間の総挿し穂数は 2 本から 125 本であり、平均で 48.4 本であった。総挿し穂数が合計で 5 本に満たなかった個体（個体番号 20, 21, 35, 123, 125）は、その後の解析から除外した。

2010 年から 2011 年にかけては、露地の挿し木床で試験を行った。野外の圃場において、4 月上旬に耕耘後、すぐにローラーで鎮圧し、黒色ポリエチレンフィルムで被覆して挿し木床とした。その後、4 月中旬に挿し木を行った。挿し穂に対する発根促進処理として、挿し木直前にオキシベロン 4 倍希釈液を瞬間浸漬した。11 月下旬に挿し穂を掘り上げ、発根が 1 本でも見られた挿し穂を「発根あり」と評価した。F1 集団の個体ごとに 2 年間の試験結果を合算し、個体ごとに発根率を求め、0～1 の値で表した。個体当たりの 2 年間の総挿し穂数は 9 本から 55 本であり、平均で 34.6 本であった。総挿し穂数が合計で 5 本に満たなかった個体（個体番号 81, 82, 125）は、その後の解析から除外した。

3. QTL 解析

QTL 解析には、MapQTL 6 (Kyazma B. V.) ソフトウェアを用いた。上記で得られた個体ごとの発根率を逆正弦変換した値を QTL 解析に用いた。また、連鎖地図として、前節で構築した‘JM7’と‘サナシ 63’の連鎖地図（第 4-2 表、第 4-1 図）を用い、integrated two-way pseudo-testcross approach (van Ooijen, 2009)

によって QTL を同定した。すなわち、それぞれが 17 個の連鎖群で構成されている両連鎖地図を並列に配置して、仮想的に構築した 34 個の連鎖群からなる連鎖地図を用いて、QTL 解析を行った。QTL の有意性を判定する閾値は、繰り返し回数 1,000 回の並べ替え検定によって得られた、有意水準 5% の LOD 値を採用した。インターバルマッピング法で予備解析を行ったのち、LOD 値が閾値を越えた領域の近傍に対して既知の SSR マーカーを追加した（後述）。その後、LOD 値のピークの最も近傍に位置していた DNA マーカーを co-factor に設定して、MQM マッピング法で再度、QTL 解析を行った。

4. 発根性に関与する QTL の近傍に対する既知の SSR マーカーの追加

発根性に関与する QTL が座乗している連鎖群を特定した後、既存の連鎖地図（Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Yamamoto et al., 2007; van Dyk et al., 2010）の当該連鎖群に座乗している既知の SSR マーカー（NB125a, AJ001681-SSR, CH02g04, NZmsEB177464, SAmCN492417, SAmCN490324）を連鎖地図に追加した。これらの SSR マーカーの PCR および検出は、第 1 章の方法に準じて行った。

5. LG 17 の QTL の近傍に座乗している SSR マーカーを用いて台木用品種で検出される対立遺伝子の調査

挿し木発根性の優れる実生個体を選抜するための DNA マーカーを選定することを目的として、QTL の近傍に座乗していた SSR マーカーを用いて、台木用品種（‘JM1’、‘JM2’、‘JM5’、‘JM7’、‘JM8’、‘M. 9’、‘M. 27’、‘G. 65’）と台木として用いられている野生種（‘盛岡セイシ’、‘Mo 84a’、‘サナシ 63’）で検出される対立遺伝子を調べた。

結 果

1. 休眠枝挿しにおける発根性の検定

人工気象室内、および露地の試験とも、‘JM7’ × ‘サナシ 63’ の F1 集団が示した発根率の分布は連続的であった（第 4-2 図 A, B）。人工気象室内の試験においては、発根率が 0 の個体（挿し木に供試した全ての挿し穂が発根しなか

った F1 個体)は存在せず,半数以上の個体が 50 %以上の発根率を示した.一方,露地の試験では,発根率が 0 の個体が存在し, F1 集団全体でも人工気象室内の試験と比べて発根率が劣る傾向があった.‘サナシ 63’はいずれの挿し木床においても供試した全ての挿し穂が発根しなかったので,発根率は 0 であった.

2. インターバルマッピングおよび QTL 近傍に対する既知の SSR マーカーの追加

‘JM7’×‘サナシ 63’の F1 集団の人工気象室内の試験で得られた発根率(第 4-2 図 A)を用いてインターバルマッピングによる解析を行った結果,‘JM7’の LG 17 の 14.0 cM の位置に LOD 値が 23.6 のピークが検出された(第 4-3 表).また,露地の試験で得られた発根率(第 4-2 図 B)を用いて同様の解析を行った結果,‘JM7’の LG 17 の 13.0 cM の位置に LOD 値が 13.2 のピークが検出された.この他の連鎖群に,閾値(LOD 値 3.2)を越えるピークは検出されなかった.そこで,‘JM7’の LG 17 に既知の SSR マーカーを追加することにした.その結果,実験に用いた SSR マーカー(NB125a, AJ001681-SSR, CH02g04, NZmsEB177464, SAmsCN492417, SAmsCN490324)はいずれも‘JM7’で多型を示し,連鎖地図の LG 17 にマッピングされた(第 4-3 図 A).

3. MQM マッピング

LG 17 に対して SSR マーカーを追加した‘JM7’の連鎖地図(第 4-3 図 A)を用い,MQM マッピング法によって,‘JM7’と‘サナシ 63’の全連鎖群に対する QTL 解析を行った結果,人工気象室内の試験では,‘JM7’の LG 17 に座乗する SSR マーカー SAmsCN492417 と SAmsCN490324 との間に LOD 値が最大を示す QTL が検出された(第 4-4 表,第 4-3 図 B).この QTL の LOD 値は 24.8 であり,表現型に対する寄与率は 56.2 %であった.この他に,‘JM7’の LG 13 の AFLP マーカー E33M48-325 上に,LOD 値 3.9,寄与率 5.8 %の,効果が小さい QTL が検出された.

露地の試験では,人工気象室内の試験と同様に,SAmsCN492417 と SAmsCN490324 との間に LOD 値が最も大きい QTL が検出された(第 4-4 表,第

4-3 図 B). このとき, LOD 値は 18.7, 寄与率は 45.8 %であった. さらに, ‘JM7’ の LG 12 の DNA マーカー E34M48-360, および ‘サナシ 63’ の LG 8 の SSR マーカー CH05a02 上に, それぞれ LOD 値が 3.7, 4.2, 寄与率は 7.0, 9.0 %の, 効果が比較的小さい QTL が検出された.

人工気象室内および露地の試験において F1 集団が示した発根率ごとの個体数を示した分布図 (第 4-2 図 A, B) を改変して, ‘JM7’ の LG 17 に検出された QTL 近傍の SSR マーカー MEST020 の対立遺伝子型によって F1 集団の各個体を区別して表示した分布図を示す (第 4-2 図 C, D). その結果, 人工気象室内の試験において発根率が 0.9 以上を示した全ての個体が QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖する対立遺伝子 (248 bp) を有していることが明らかにされた. 同様に, 露地の試験では発根率 0.8 以上を示した全ての個体が QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖する対立遺伝子を有していることが明らかにされた. また, いずれの試験においても, QTL の発根を促進する対立遺伝子を有する個体と, 有しない個体の両方が出現する発根率の範囲が存在することが示された.

4. LG 17 の QTL の近傍に座乗している SSR マーカーを用いて台木用品種で検出される対立遺伝子の調査

‘JM7’ の LG 17 に検出された QTL の近傍に座乗している SSR マーカー (SAmsCN492417, SAmsCN490324, MEST020) を用いて, 台木用品種と台木として用いられている野生種で検出される対立遺伝子を調べた (第 4-5 表). その結果, ‘JM7’ では, SSR マーカー SAmsCN492417 と SAmsCN490324 の間でマルバカイドウ ‘盛岡セイシ’ に由来する染色体が組換えを起こしていることが推定された (第 4-4 図). すなわち, 連鎖地図上で QTL の上側に座乗している SAmsCN492417 を用いて ‘JM7’ で検出された, QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖している 147 bp の対立遺伝子は, 同じ交雑組合せの交雑実生集団から選抜された他の JM 系台木 (‘JM1’, ‘JM2’, ‘JM5’, ‘JM8’) においては検出されなかった. 一方で, QTL の下側に座乗している SAmsCN490324 と

MEST020 を用いると、全ての JM 系台木で同じ対立遺伝子型が検出された。

SSR マーカー MEST020 を用いて検出される 248 bp の対立遺伝子は、‘JM7’ において QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖しており、挿し木発根性を示す品種に特異的に出現する対立遺伝子であった（第 4-5 表）。一方、SSR マーカー SAmCN492417 を用いて検出される 143 bp の対立遺伝子は、‘JM1’、‘JM2’、‘JM5’、‘JM8’、‘盛岡セイシ’ において QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖しているものの、挿し木発根性を示さない 3 品種（‘M. 9’、‘M. 27’、‘G. 65’）においても同じ増幅長の対立遺伝子が検出された。同様に、SAmCN490324 を用いて検出される 260 bp の増幅長を示す対立遺伝子は、QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖しているものの、挿し木発根性を示さない ‘M. 27’ と ‘G. 65’ においても同じ増幅長の対立遺伝子が検出された。

考 察

本節の研究によって、休眠枝挿しの際の発根率に關与する QTL を ‘JM7’ の LG 17 に見出した（第 4-4 表、第 4-3 図）。この QTL に匹敵する寄与率を持つ QTL は他に検出されなかったため、本 QTL は休眠枝挿しにおいて発根性を支配し、発根を促進する主働 QTL であると判断された。この発根を促進する主働 QTL は、木本植物において似た効果を持つとして知られている QTL の中で、表現型に対する寄与率が 2 番目に大きかった。挿し木などによる発根性について、最も多くの QTL 解析例があるのはユーカリ属 (*Eucalyptus* spp.) である (Grattapaglia et al., 1995; Marques et al., 1999; Thumma et al., 2010)。ユーカリ属において報告されている、発根を促進する効果が最も大きい QTL の寄与率は 21.0 % である。ユーカリ属と同じフトモモ科に属する *Corymbia* 属では、*in vitro* での実験であるものの、寄与率が 66 % と、木本植物では最大の効果を持つ QTL が同定されている (Shepherd et al., 2008)。果樹では、ミカン科のカラタチにおいて 2 個の QTL が同定されており、寄与率はそれぞれ 20.9 と 15.8 % である (Siviero et al., 2003)。他の木本植物では、ヤナギ科のポプラでは寄与率が 37 %、ブナ科のヨーロッパ

ナラで寄与率が 13.8%であることが明らかにされている (Han et al., 1994; Scotti-Saintagne et al., 2005). 以上のことから, 本節で検出された主働 QTL の寄与率 (45.8~56.2%) は, 他の木本植物との比較において, 表現型に対する寄与が大きい QTL であると考えられた. さらに, リンゴ属において発根性に関与する QTL はこれまでに同定されておらず, 本節の研究が初めての事例であった.

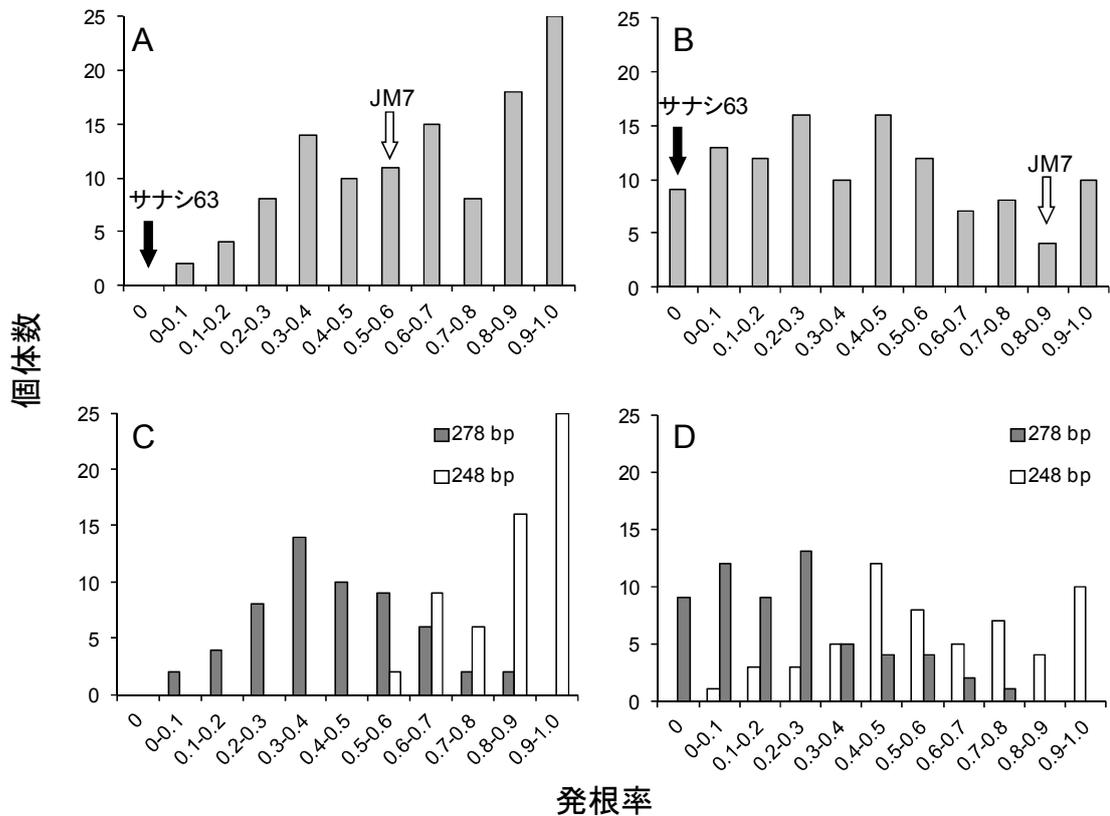
また, ‘JM7’ の LG 17 に検出された発根を促進する主働 QTL は, 人工気象室内の試験において, 露地の試験よりも高い寄与率を示した (第 4-4 表, 第 4-3 図). この理由として, 人工気象室内の気温や水分などの環境条件によって主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子を持つ個体の発根が一段と促進された結果, 発根を促進する対立遺伝子を持たない個体との発根率の差が大きくなったことが挙げられると推察された.

JM 系台木の育成過程では, バーミキュライトを挿し木床とする挿し木試験を行い, 発根率が 0.5 を越える個体が選抜されている (吉田ら, 1985). 本節で得られた人工気象室内のバーミキュライトにおける発根率の分布に基づくと, 主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子を持つ全ての F1 個体は発根率が 0.5 を越えており, 吉田ら (1985) の選抜基準を満たしていた (第 4-2 図 C) ので, 本集団の場合, 主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子を持つ個体を選抜することで, 選抜水準を超える個体が得られると判断された. 一方, 露地の試験において, 主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子を持つ 58 個体のうち, 34 個体 (58%) は発根率が 0.5 以上であったが, 残りの 24 個体 (42%) は 0.5 未満であった (第 4-2 図 D). このことは, 主働 QTL や, 3 箇所 (‘JM7’ の LG 12, 13 と, ‘サナシ 63’ の LG 8) に検出された寄与率の小さい QTL のみではなく, 環境要因によっても発根率が影響を受けていることを示唆している. しかしながら, 主働 QTL 以外の遺伝的要因や環境要因が発根率にどのように関与するか, 本節の結果からは明らかにすることはできなかった. このような理由から, リンゴの台木用品種の交雑育種を実際に行う時は, 休眠枝挿しによる発根率が高い交雑実生個体を得るために, 交雑実生集団から DNA マーカーを用いて LG 17 の主働

QTL の発根を促進する対立遺伝子を持つ個体を選抜し、それらの個体に対して挿し木試験を行って、発根性の表現型を検定することが必要と考察された。さらに、今回の結果はあくまで 1 家系だけで行った実験であるので、本実験で供試した交雑親とは遺伝的な背景が異なる品種間での交雑を行った際に、主働 QTL がどの程度の効果を発現するか、今後検討していく必要があると考えられた。

また、SSR マーカー MEST020 において ‘JM7’ の主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖する 248 bp の対立遺伝子は、挿し木発根性の低い台木用品種から検出されない増幅長であった（第 4-5 表）。このことから、挿し木発根性のある品種と、挿し木発根性のない品種とを交雑した場合、後代の選抜には MEST020 を用いて、主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖している 248 bp の対立遺伝子を持つ個体を選抜することで、挿し木発根性に優れた個体が選抜されると考えられた。このような理由から、MEST020 は挿し木発根性に優れた個体を早期に選抜するための DNA マーカーとして適していると判断された。

‘JM7’ において見出された発根を促進する主働 QTL に関して、本節で得られた実験結果からは、QTL の本体がどのような機能を持つ遺伝子なのか明らかにすることはできなかった。しかしながら、今後、この主働 QTL の機能を明らかにし、リンゴにおける不定根形成の機構を理解することを通して、挿し木による繁殖が極めて容易な新品種の開発や、挿し木による繁殖が困難な台木用品種の繁殖性を改善する手法が開発されると考察された。このような理由から、今後、主働 QTL についての遺伝子機能が解明されることが望まれる。



第 4-2 図. 挿し木発根性の優れる‘JM7’と不良な‘サナシ 63’を交雑して得られた F1 集団（119 個体）における休眠枝挿しによる発根率.

(A) 人工気象室内でバーミキュライト（2004～2007 年）を挿し木床にした場合の発根率ごとの個体数の分布.

(B) 露地の土壌（2010～2011 年）を挿し木床にした場合の発根率ごとの個体数の分布.

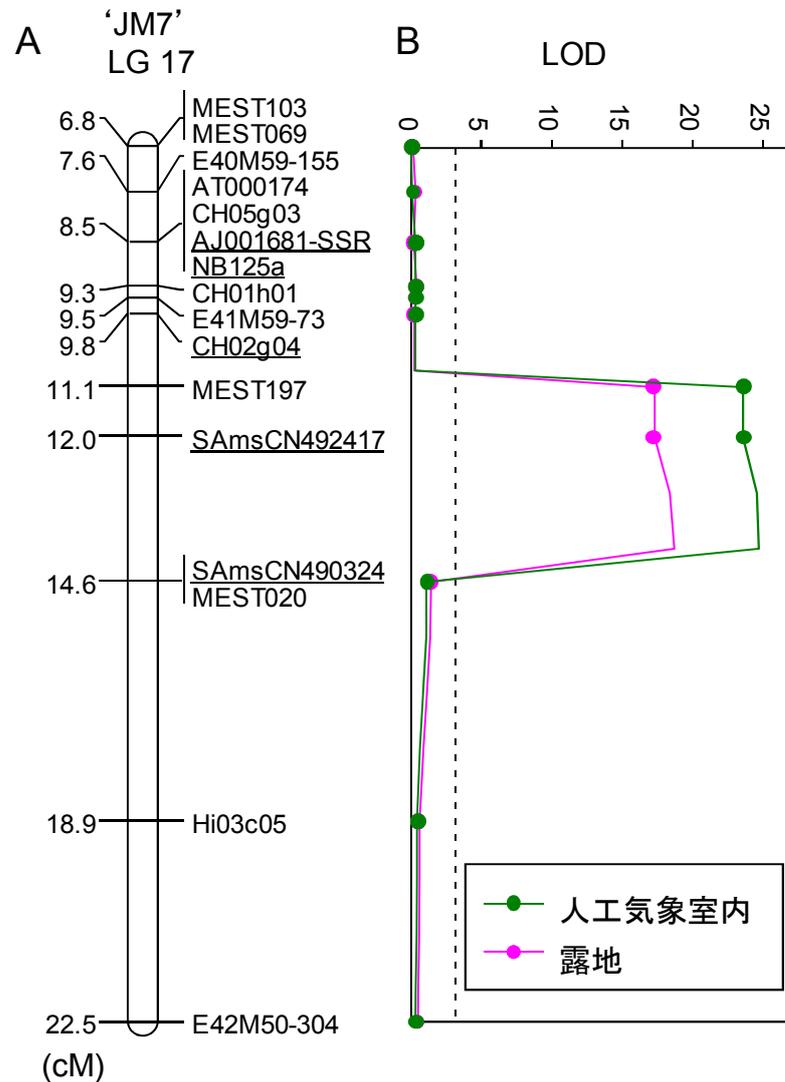
(C) 人工気象室内でバーミキュライトを挿し木床にした場合の発根率ごとの個体数の分布について、‘JM7’の第 17 連鎖群に検出された QTL 近傍の SSR マーカー MEST020 の対立遺伝子型によって、集団に含まれる個体を区別して示す. 248 bp が主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖し、278 bp が発根を促進する対立遺伝子と相反に連鎖する.

(D) 露地の土壌を挿し木床にした場合の発根率ごとの個体数の分布を、‘JM7’の第 17 連鎖群に検出された QTL 近傍の SSR マーカー MEST020 の対立遺伝子型によって、集団に含まれる個体を区別して示す.

供試個体とは、‘JM7’×‘サナシ 63’の F1 集団のうち、総挿し穂数が 5 本以上得られた個体を示す.

第 4-3 表. ‘JM7’ および ‘サナシ 63’ の連鎖地図に対するインターバルマッピング.

挿し木床	LOD 値のピークの位置	LOD
人工気象室内	JM7 LG17, 14.0 cM	23.6
露地	JM7 LG17, 13.0 cM	13.2



第 4-3 図. 人工気象室内と露地の挿し木床における休眠枝挿しの発根率に対する QTL 解析.

(A) 新たに DNA マーカーを追加した 'JM7' における第 17 連鎖群 (LG 17) の連鎖地図 (抜粋).

追加された SSR マーカーに下線を付して示す.

(B) MQM マッピング法による QTL 解析結果.

Co-factor として SSR マーカー SAmCN492417 を設定した.

点線は 1,000 回の並べ替え検定で得られた有意水準 5% の閾値.

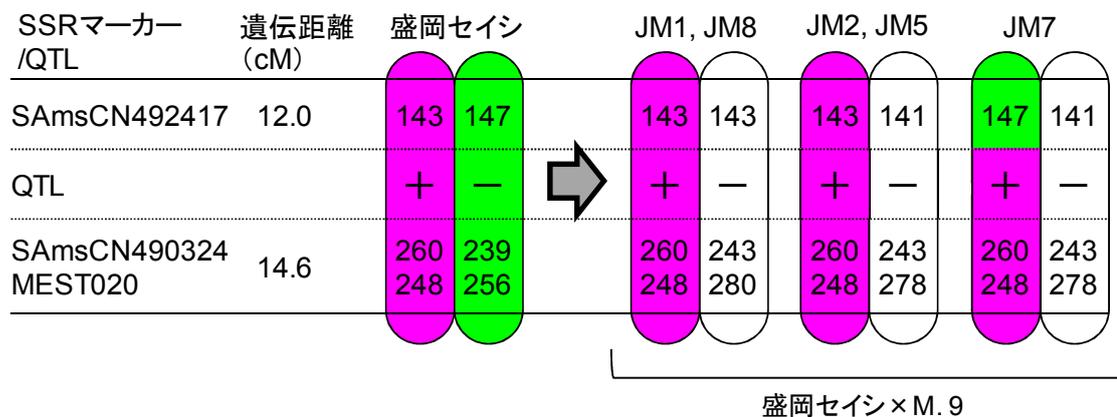
第 4-4 表. ‘JM7’ および ‘サナシ 63’ の連鎖地図に対して, MQM マッピングによる解析を行って検出された休眠枝挿しにおける発根性に関する QTL.

挿し木床	QTL の位置		LOD	寄与率 (%)
人工気象室内	JM7	LG 17, 14.0 cM	24.8	56.2
	JM7	LG 13, 51.4 cM	3.9	5.8
露地	JM7	LG 17, 14.0 cM	18.7	45.8
	JM7	LG 12, 24.3 cM	3.7	7.0
	サナシ 63	LG 8, 27.4 cM	4.6	8.8

第 4-5 表. ‘JM7’ の第 17 連鎖群に検出された発根を促進する主働 QTL の近傍に座乗する SSR マーカーを用いて台木用品種と野生種で検出された対立遺伝子.

台木用品種 ・野生種	交雑組合せ	発根性	SSR マーカー		
			SAmS CN492417	SAmS CN490324	MEST020
JM 系台木					
JM1	盛岡セイシ×M. 9	あり	143 bp/ <u>143 bp^z</u>	243/ <u>260</u>	<u>248/280</u>
JM2	盛岡セイシ×M. 9	あり	141/ <u>143</u>	243/ <u>260</u>	<u>248/278</u>
JM5	盛岡セイシ×M. 9	あり	141/ <u>143</u>	243/ <u>260</u>	<u>248/278</u>
JM7	盛岡セイシ×M. 9	あり	141/ <u>147</u>	243/ <u>260</u>	<u>248/278</u>
JM8	盛岡セイシ×M. 9	あり	143/ <u>143</u>	243/ <u>260</u>	<u>248/280</u>
マルバカイドウ					
盛岡セイシ	—	あり	<u>143/147</u>	239/ <u>260</u>	<u>248/256</u>
Mo 84a	—	あり	143/147	239/260	246/256
ミツバカイドウ					
サナシ 63	—	なし	137/139	238/238	251/265
M 系, G 系台木					
M. 9	—	なし	141/143	243/243	278/280
M. 27	M. 13 × M. 9	なし	141/143	243/260	246/278
G. 65	M. 27 × Beauty	なし	143/153	241/260	246/267

^z 主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖している対立遺伝子に下線を付して示す.



第 4-4 図. 挿し木発根性に優れる‘盛岡セイシ’とその後代であり挿し木発根性に優れる JM 系台木における，発根を促進する主働 QTL 近傍のグラフ遺伝子型.

矢印は 1 世代の経過を示す.

発根を促進する主働 QTL の座乗位置は QTL 解析からの推定.

主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子を“+”，それ以外の対立遺伝子を“-”と表記する.

各 SSR マーカーの対立遺伝子は増幅長 (bp) で示す.

紫色と緑色は‘盛岡セイシ’，白色は‘M.9’由来の染色体を示す.

総合考察

果樹の育種において中核となる2つの方法は、交雑と選抜である(山田, 2011). 果樹の育種において品種の育成に成功するかどうかは、交雑によって目的の形質を備えた個体を生み出せるか、そして、生み出した個体を確実に、効率的に選抜できるかどうかにかかっている。本研究は、リンゴの交雑育種において、交雑して得られた個体を選抜する過程に着目し、育種目標としている重要形質を備えた個体を効率的に選抜することを目的として、DNA マーカーを用いた早期選抜の手法を開発しようとしたものである。本研究の第1章では斑点落葉病に対する罹病性の原因遺伝子 *Alt* を‘Starking Delicious’のLG 11 にマッピングして、抵抗性を示す個体を選抜するためのDNA マーカーDR033892を開発した。第2章ではカラムナー性を示す個体を選抜するためのSSR マーカーMdo.chr10.12とMdo.chr 10.14を開発した。これら2種類のSSR マーカーは1,000個体のF1集団において、カラムナー性の原因遺伝子 *Co* と0 cM で連鎖していた。第3章では、台木用品種の形質である根頭がんしゅ病抵抗性について、抵抗性検定法を改良した結果、ミツバカイドウ‘サナシ 63’が抵抗性を示すことを明らかにした。さらに、抵抗性遺伝子 *Cg* を‘サナシ 63’のLG 2 にマッピングして、抵抗性個体を選抜するためのSSR マーカーNZmsEB119405を開発した。第4章では、同じく台木用品種の形質である挿し木発根性について、発根を促進する主働QTLを‘JM7’のLG 17に見出し、挿し木発根性の優れる個体を選抜するためのSSR マーカーMEST020を開発した。以上のように、本研究によってリンゴの4つの重要な育種目標について、目的の形質をそれぞれ備えた個体を選抜するためのDNA マーカーが開発された。

そこでここでは、本研究で開発されたDNA マーカーを含めて、一般的にリンゴの交雑育種においてDNA マーカーを用いて早期選抜を行う際に考慮しなければならない諸問題について考察するとともに、今後のDNA マーカー選抜の方向性について総合的に考察を行った。

リンゴにおいて、実際に DNA マーカーを用いた早期選抜を行う際の工程としては、交雑によって得られた実生苗を育成して各個体から DNA を抽出すること、次に、選抜する形質に連鎖する DNA マーカーもしくは原因遺伝子そのものから開発された DNA マーカーを検出すること、最後に、その検出結果をもとにして選抜または淘汰を個体ごとに判定することが挙げられる。これらの工程のうち実生苗の育成、DNA 抽出、DNA マーカーの検出を簡便かつ低コストで行うことによって、DNA マーカー選抜法は、もう一つの早期選抜法である表現型選抜法に対して優位性を増す。したがって、DNA マーカー選抜の一連の工程に要する作業量とコストについて考慮することが必要である。

DNA マーカー選抜の最初の工程である実生苗の育成では、交雑して得られた種子を温室内で播種してから DNA マーカーによる選抜が完了して圃場に定植するまでの間、実生苗の養成が行われる。播種を行った後の育苗法については、播種用のピートモスポットであるジフィーセブン（ジフィー プレフォーマ プロダクション（株））を用いて、縦 8 列×横 12 列の配置になるようにプラスチック製のバットにジフィーセブンを並べる方法が提唱されている（森谷ら，2012）。この並べ方は、ジフィーセブンの位置（座標）と 96 ウェル PCR プレート（多数のサンプルを 1 度に PCR する際によく用いられる、96 本連結型のプラスチック製 PCR チューブ）のウェルの座標が対応するので、DNA を抽出する目的で葉を採取する際に個体ごとに識別番号を付ける作業が省略される。また、この方法では実際のリンゴの交雑育種に既に取り入れられている資材を利用するので、特別な手法や新たな機器などは必要とされない。さらに、発芽後まもない時期に選抜ができるので、苗圃に実生苗を定植する段階から圃場面積を削減できることも利点としてあげられる。

次に、実生苗からの DNA 抽出の工程については、これまでに多くの方法が提唱されている（Bashalkhanov・Rajora, 2008; Dilworth・Frey, 2000; Mace et al., 2003; Ohta et al., 2013; Thomson・Henry, 1995; Xin et al., 2003）。このうち、採取した葉を緩衝液中で加熱するだけで DNA の抽出（粗抽出）が完了し、PCR の

鋳型として用いることができる Thomson・Henry (1995) と Dilworth・Frey (2000) の方法は操作方法が単純かつ短時間で作業が終わるので、優れていると言える。この他に、採取した葉をつまようじで突き、そのつまようじに付いた組織を PCR 反応液に浸すことで、DNA 抽出操作が省略される Ohta et al. (2013) の方法は極めて簡便である。しかしながら、Ohta et al. (2013) の方法で抽出された DNA を鋳型として PCR を行うには、割高な試薬を用いる必要がある。実用上は、Thomson・Henry (1995) の方法が、リンゴの実生苗からの DNA 抽出に用いられている実績 (森谷ら, 2012) があり、PCR に用いる試薬も安価な製品でよいので、現時点では最も適した方法であると判断される。以上のように、リンゴの DNA マーカーを用いた早期選抜における育苗と DNA 抽出の方法に関しては、一定の水準に達する優れた方法が既に確立されていると言える。

次に、DNA マーカーの検出の工程において考慮すべき要素は、検出に用いる方法である。SSR マーカーの検出には DNA シーケンサーを用いた電気泳動を伴うので、試薬代が高くなる問題があるが、実験操作の自動化を図れるという利点がある。一方、SCAR マーカーなどのアガロースゲルを用いた電気泳動で遺伝子型を判定する DNA マーカーでは試薬代を低く抑えられるが、実験操作に人手と時間を要する。このような理由から、用いる DNA マーカーの種類に関しては、実験の従事者数や、機器の整備状況に応じて最適な選択を行う必要があると考察される。今後、LAMP 法などに代表される、特別な機器を必要とせず迅速な判定が可能な検出法が取り入れられることによって、検出に関する問題点が解決されることが期待される。

以上のように、実生苗の育成、DNA 抽出、DNA マーカーの検出に関して、優れた方法が整備されつつあるので、DNA マーカー選抜法の表現型選抜法に対する優位性は、対象とする形質の表現型選抜の難易度や精度に依存すると判断される。そこで、本研究において実験を行った形質 (第 1 章の斑点落葉病抵抗性、第 2 章のカラムナー性、第 3 章の根頭がんしゅ病抵抗性、第 4 章の挿し木発根性) について、表現型選抜の難易度を考慮すると、それぞれの形質は、現

段階の評価方法では多数の個体を扱う際に困難が伴う形質（第 1, 2, 3, 4 章）、再現性の高い評価を行うのに数ヶ月～2 年以上の長期間を要する形質（第 2, 3, 4 章）、環境要因に伴う形質値の変動があるので検定の反復が必要な形質（第 4 章）、樹体がある程度大きく成長しないと検定に必要な材料が得られない形質（第 4 章）であるので、いずれの形質においても表現型選抜よりも DNA マーカー選抜を行う優位性が高いと考察される。

ところで、本研究において開発された、目的の形質を備えた個体を選抜するための DNA マーカーは、原因遺伝子に連鎖しているものの、原因遺伝子そのものが DNA マーカー化されたものではないので、DNA マーカーと原因遺伝子間での組換えに起因する誤選抜が生じることに注意する必要がある。たとえば、斑点落葉病に対して抵抗性を示す個体を選抜するための DNA マーカー DR033892 は罹病性の原因遺伝子 *Alt* と 1.7 cM の距離で連鎖していたので、100 個体の実生苗においては、1～2 個体の確率で *Alt* と DNA マーカー DR033892 との間に組換えが起きている個体が存在し、DNA マーカー選抜時にこれらの個体が誤選抜される可能性が極めて高い。誤選抜を減らすためには、原因遺伝子を挟み込むように開発された複数の DNA マーカーを用いる方法が有効であるが、実験操作は増加するので、1 個体を複数の DNA マーカーで検定する場合は、1 種類の反応液中で複数の DNA マーカーを同時に増幅できる PCR 法（マルチプレックス PCR 法）の利用を検討すべきである。これまでの知見として、リンゴの場合、8 種類の SSR マーカーを同時にマルチプレックス PCR で増幅した後、DNA シーケンサーを用いて 1 度に検出する実験例が報告されている (Frey et al., 2004)。また、カラムナー性については、リンゴのゲノム情報 (Velasco et al., 2010) を利用したことで、原因遺伝子 *Co* と極めて強く連鎖している DNA マーカーが開発されている（第 2 章）。したがって、原因遺伝子 *Co* と極めて強く連鎖している DNA マーカーを用いた選抜では、誤選抜の危険性が低いので、カラムナー性を示す個体を DNA マーカーによって選抜する方法は完成度が高いと判断された。

本研究で開発された目的の形質を備えた個体を選抜するための DNA マーカーは、(独) 農研機構果樹研究所で行われているリンゴの交雑育種事業にすでに採用されている。たとえば、2011 年から 2013 年までの 3 年間に於いて、斑点落葉病抵抗性に関しては 5 種類の交雑組合せの 1,104 個体を DNA マーカーで検定して、抵抗性の 265 個体を選抜されている。カラムナー性については、同じく 3 年間で 9 種類の交雑組合せの 1,336 個体を DNA マーカーで検定して、カラムナータイプの 604 個体を選抜されている。以上の 2 つの形質について選抜を行った交雑組合せの中には、果皮着色性の DNA マーカー (森谷ら, 2012) も同時に検定して選抜を行った交雑組合せも存在している。(独) 農研機構果樹研究所で行われているリンゴの栽培品種の交雑育種では、1 年間に 1,500~2,000 個体が新たに定植されているので、上記の DNA マーカー選抜の結果、3 年間で淘汰された個体数は 1,571 個体で、この数は 1 年間に定植される個体数に匹敵する規模である。また、台木用品種の育成にあたっては、2 種類の交雑組合せの 1,204 個体を、3 種類の形質 (根頭がんしゅ病抵抗性と挿し木発根性とわい化性 (Pilcher et al., 2008)) について DNA マーカーで検定を行い、根頭がんしゅ病に対して抵抗性を示し、かつ挿し木発根性に優れ、かつ穂木として接ぎ木した栽培品種がわい化すると期待される 88 個体を選抜されている。以上のように、DNA マーカー選抜法を採用したことによって、交雑実生個体の選抜が大幅に効率化されている。しかしながら、DNA マーカーを用いて選抜された個体が適切に選抜されていたかどうかを今後検証していく必要がある。今後の検証方法として、斑点落葉病抵抗性については、結実後、まず初めに果実品質による選抜を行い、選抜された個体に対して斑点落葉病菌の接種検定を実施して検証することが必要である。また、カラムナー性については、目視で判定できる形質であるので、選抜された全個体の表現型を経時的に観察して検証することが必要である。さらに、根頭がんしゅ病抵抗性と挿し木発根性については、DNA マーカーを用いて選抜された個体であっても表現型が幅をもって出現するので、選抜された全ての個体に対して、今後表現型の評価を行う必要がある。

ここまで、本研究において DNA マーカーを開発した形質について考察してきたが、リンゴの交雑育種においては、他にも DNA マーカーを開発すべき育種目標が多数存在している。たとえば、栽培品種における果実の形質があげられる。なかでも、重要性が高い糖度、酸度、大きさ、日持ち性などの量的形質についての DNA マーカーを開発することが求められる。このうち、酸度に関しては、LG 16 に効果の大きな QTL が見出されており (Xu et al., 2012)、原因となる候補遺伝子まで明らかにされている (Bai et al., 2012a; Khan et al., 2012)。また、日持ち性に関しては、LG 10 に座乗していて、細胞壁の合成と分解に関わる遺伝子 *MdPG1* (*M. × domestica polygalacturonase*) が深く関わっていることが明らかにされている (Costa et al., 2010; Longhi et al., 2013)。これらの形質については、対立遺伝子が表現型に与える効果を検証することによって、DNA マーカー選抜に用いることができる段階にあると判断される。

一方、果実の糖度や大きさについては、大きな効果を持つ QTL はこれまで知られていない。このような形質については、ゲノム選抜 (genomic selection: GS) の手法を用いた選抜が必要になると考えられる。GS とは、ある個体についてゲノム全体に分布する多数 (数千個以上) の DNA マーカーの遺伝子型を決定した後、その個体の遺伝的能力を予測した結果をもとに選抜する手法であり、糖度のように効果の小さい QTL の集積で決定される形質についても選抜を行うことができるとされている (岩田, 2012)。これまで技術的な課題であった多数の DNA マーカーを検出する方法については、リンゴのゲノム情報を利用した 8K SNP アレイ (1 回の実験で約 8,000 個の SNP マーカーを検出できる方法) が開発され (Chagne et al., 2012)、ゲノムワイドに SNP マーカーを検出できるようになったことで、すでに解決している。リンゴにおける GS の先行研究では、糖度についての GS が実現できる可能性があることが示されている (Kumar et al., 2012)。

以上のように、大きな効果を持つ QTL が検出されない糖度などの量的形質についての知見が蓄積されつつあるので、近い将来、質的形質だけではなく量

的形質も含めた形で DNA マーカー選抜を行うための基盤が構築されると考えられる。その際には、本研究で取り上げた斑点落葉病抵抗性やカラムナー性と、糖度などを同時に検定可能な選抜手法の開発が期待される。しかしながら、研究の進展に伴って、ある特定の染色体領域が様々な形質に対して多面的な効果を及ぼす例が報告されるようになってきている。たとえば、LG 16 の上部には、酸含量に関与する主要な QTL の他にも、果実の渋みや果皮と果肉の着色性に関する QTL が存在していることが示されており (Kumar et al., 2012)、LG 16 の上部が 2 次代謝産物の含量に深く関わっていることが示唆されている。特定の染色体領域が様々な形質に対して影響を及ぼす場合、ある形質を選抜した時に、意図していない他の形質を同時に選抜してしまう可能性があると考えられる。また、イネでは、いもち病抵抗性遺伝子 *pi21* のごく近傍に、食味を低下させる遺伝子が連鎖している例が報告されており、これらの遺伝子の中で組換えが起きた個体を DNA マーカーによって選抜した結果、いもち病に抵抗性で食味の良い品種‘ともほなみ’が育成されている (Fukuoka et al., 2009)。そこで、今後の DNA マーカー選抜には、複数の形質について総合的に考慮した上で構築された選抜システムが必要であると考えられ、このような総合的な選抜システムによって、リンゴの交雑育種が劇的に効率化されることが期待される。総合的な選抜システムの構築にあたっては、本研究で得られた知見を含めた既存の知見が大いに貢献すると考えられる。

一方、台木用品種の交雑育種においては、現在までに、台木としての形質に関する遺伝解析は世界的にも実施例が少なく、早期選抜法の開発についても未だ発展途上であるので、状況は栽培品種と少し異なっている。台木としての形質のうち、選抜に利用可能な DNA マーカーが開発されている形質は‘M. 9’に由来するわい化性 (Pilcher et al., 2008) と‘Northen Spy’, ‘Robusta 5’, ‘Aotea 1’に由来するリンゴワタムシ抵抗性 (Bus et al., 2008) のみである。このような理由から、本研究において、新たに根頭がんしゅ病抵抗性 (第 3 章) と挿し木発根性 (第 4 章) について選抜に利用可能な DNA マーカーが開発された意

義は大きい。台木用品種の交雑育種を効率化するためには、今後も、育種目標とされる形質の遺伝解析や、形質に連鎖する DNA マーカーの開発を通して、新たな知見を蓄積することが重要と考察された。

台木用品種の交雑育種の効率化に関する今後の展望の1つとして、根頭がんしゅ病抵抗性(第3章)に関する DNA マーカーの開発を挙げることができる。第3章の第1節において、根頭がんしゅ病菌の ARAT-001 株を‘JM7’×‘サナシ 63’の F1 集団の全個体に対して接種した結果、抵抗性が複数の遺伝子に制御される量的形質であることが明らかとなり、一方で、第4章の第1節において、同じ F1 集団を用いて全ゲノムをカバーする‘JM7’と‘サナシ 63’の連鎖地図を構築した。今後、これらのデータを用いて QTL 解析を行うことで、ARAT-001 の抵抗性に関する QTL を明らかにし、早期に DNA マーカーを開発できると考えられる。また、同様に、‘JM7’×‘サナシ 63’の F1 集団は高接ぎ病抵抗性についても解析できる集団であると考えられた。すなわち、‘サナシ 63’は高接ぎ病の病原ウイルスの1種である Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) に感受性であり、優性の感受性遺伝子 *Cv* をヘテロに有する(羽生田ら, 1984)。一方、‘JM7’は ACLSV に抵抗性であり、*cv* のホモ型と推測される。このような理由から、‘JM7’×‘サナシ 63’の F1 集団は ACLSV の感受性についての表現型が分離し、DNA マーカーの開発に利用可能であると判断された。以上のように、様々な形質について選抜に利用可能な DNA マーカーを開発することは、より効率的な選抜システムの構築に寄与し、台木用品種の交雑育種における選抜効率の向上に貢献できると考えられた。

総合摘要

第 1 章. 斑点落葉病抵抗性個体の早期選抜法

1. 斑点落葉病に罹病性を示す原因遺伝子 *Alt* は ‘Starking Delicious’ の LG 11 にマッピングされた. このとき, DNA マーカー DR033892 が *Alt* の最も近傍に座乗しており, 遺伝距離 1.7 cM で連鎖していた.
2. リンゴの品種・選抜系統が示した DNA マーカー DR033892 による多型と斑点落葉病に対する表現型の関係が一致した.
3. 以上の結果から, DR033892 は斑点落葉病に抵抗性を示す個体を早期に選抜するための DNA マーカーとして利用可能であると判断された.

第 2 章. カラムナー性個体の早期選抜法

4. リンゴの LG 10 に座乗する既知の DNA マーカーのうち, カラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* の最も近傍に連鎖していたのは 2 種類の SSR マーカー CH03d11 と Hi01a03 であった.
5. 1,000 個体の F1 集団を用いた高解像度マッピングの結果, ‘Golden Delicious’ の公開ゲノム配列から開発された SSR マーカー Mdo.chr10.12, Mdo.chr10.13, Mdo.chr10.14 は *Co* と 0 cM で連鎖していた.
6. Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.14 を用いると, *Co* と相引に連鎖する対立遺伝子とその他の対立遺伝子とを容易に識別することが可能であった.
7. 以上の結果から, Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.14 はカラムナー性を示す個体を早期に選抜するための DNA マーカーとして利用可能であると判断された.

第 3 章. 台木用品種における根頭がんしゅ病抵抗性個体の早期選抜法

8. 接ぎ木苗の穂木から発生した新梢 (地上部) と挿し木苗基部 (地下部) に対して根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株を接種した際のがんしゅ形成率にはゆるやかな正の相関が認められたので, 地上部において根頭がんしゅ病に対

する抵抗性を評価することが可能であると考えられた。

9. 接ぎ木苗の穂木から発生した新梢（地上部）を用いた抵抗性検定において、ミツバカイドウ‘サナシ 63’は Peach CG8331 株に対して抵抗性、ARAT-001 株に対して中程度抵抗性を示した。この他に供試した台木用品種や野生種の中に、両菌株に対して抵抗性を示した品種や系統は認められなかった。
10. ‘サナシ 63’の Peach CG8331 株に対する抵抗性は、抵抗性が優性を示している 1 個の主働遺伝子 *Cg* によって決定されていると考えられた。
11. *Cg* は‘サナシ 63’の LG 2 に座乗しており、*Cg* は SSR マーカー NZmsEB119405 と 0 cM で連鎖していた。
12. ‘サナシ 63’を交雑親として用いた F1 集団において、SSR マーカー NZmsEB119405 を用いると *Cg* を保有する個体が識別できることが示された。
13. 以上の結果から、NZmsEB119405 は根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対する抵抗性個体を早期に選抜する DNA マーカーとして利用可能であると判断された。

第 4 章. 台木用品種における挿し木発根性に優れた個体の早期選抜法

14. ‘JM7’と‘サナシ 63’を交雑して得られた F1 集団を用いて構築された‘JM7’と‘サナシ 63’の連鎖地図が含む領域は、ほぼ全ゲノムにわたっていると判断された。
15. 休眠枝挿しの際に発根を促進する主働 QTL が‘JM7’の LG 17 に見出された。
16. ‘JM7’に見出された主働 QTL の近傍に座乗する SSR マーカー MEST020 を用いて検出される、主働 QTL の発根を促進する対立遺伝子と相引に連鎖する 248 bp の対立遺伝子は、挿し木発根性の低い台木用品種から検出されなかった。
17. 以上の結果から、MEST020 は挿し木発根性の優れる個体を早期に選抜するための DNA マーカーとして利用可能であると判断された。

謝 辞

本論文の取りまとめに当たり、ご多忙中にもかかわらず懇切丁寧なご指導とご校閲を賜りました東北大学大学院農学研究科園芸学研究室の金濱耕基教授に深く感謝いたします。また、本論文の取りまとめに当たり、ご指導とご校閲、ならびに有益なご示唆を賜りました東北大学大学院農学研究科の西尾剛教授、陶山佳久准教授、金山喜則准教授に深く感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、常日頃からご指導とご鞭撻をいただき、多大なるご示唆を賜りました（独）農研機構果樹研究所リンゴ研究領域品種育成ユニット上席研究員の阿部和幸博士と品種育成・病害虫研究領域ゲノムユニット上席研究員の山本俊哉博士に心より御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたり多大なるご協力とご助言をいただきました（独）農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点の岩波宏博士と岡田和馬博士、また、以前リンゴ研究拠点に在籍されていた須崎浩一博士、土師岳博士、古藤田信博博士、耳田直純博士、住吉佐栄氏、さらに（独）農研機構果樹研究所本所の品種育成・病害虫研究領域の寺上伸吾博士に心より御礼申し上げます。

本研究に供試した多くの材料の維持・管理にご協力いただきました業務第1科盛岡班の皆様、心より御礼申し上げます。また、表現型の検定や DNA を扱った実験に際してご協力いただきました立花眞由美氏、岡本幸子氏、齋藤美智子氏に心より御礼申し上げます。

引用文献

- 阿部和幸. 2010. リンゴ. p. 463-485. 鶴飼保雄・大沢 良編著. 品種改良の世界史・作物編. 悠書館. 東京.
- Abe, K., H. Iwanami, N. Kotoda, S. Moriya, and S. Takahashi. 2010. Evaluation of apple genotypes and *Malus* species for resistance to *Alternaria* blotch caused by *Alternaria alternata* apple pathotype using detached-leaf method. *Plant Breed.* 129: 208-218.
- Antanaviciute, L., F. Fernandez-Fernandez, J. Jansen, E. Banchi, K.M. Evans, R. Viola, R. Velasco, J.M. Dunwell, M. Troggio, and D.J. Sargent. 2012. Development of a dense SNP-based linkage map of an apple rootstock progeny using the *Malus* Infinium whole genome genotyping array. *BMC Genomics* 13: 203.
- Bai, T.H., Y.D. Zhu, F. Fernandez-Fernandez, J. Keulemans, S. Brown, and K.N. Xu. 2012a. Fine genetic mapping of the *Co* locus controlling columnar growth habit in apple. *Mol. Genet. Genomics* 287: 437-450.
- Bai, Y., L. Dougherty, M. Li, G. Fazio, L. Cheng, and K. Xu. 2012b. A natural mutation-led truncation in one of the two aluminum-activated malate transporter-like genes at the *Ma* locus is associated with low fruit acidity in apple. *Mol. Genet. Genomics* 287: 663-678.
- Baker, S., J. Nicklin, N. Kahn, and R. Killington. 2006. *Instant notes in microbiology*. Taylor and Francis, London.
- Baldi, P., P.J. Wolters, M. Komjanc, R. Viola, R. Velasco, and S. Salvi. 2013. Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 31: 429-440.
- Ban, Y., C. Honda, Y. Hatsuyama, M. Igarashi, H. Bessho, and T. Moriguchi. 2007. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant Cell Physiol.* 48: 958-970.

- Bashalkhanov S., and O.P. Rajora. 2008. A high throughput DNA extraction system suitable for conifers. *Plant Methods* 4: 20
- Bendokas, V., and Stany V. 2009. Variation of hormones in apple trees with different canopy architecture. *Zemdirbyste-Agriculture* 96: 76-82
- Beneddra, T., C. Picard, A. Petit, and X. Nesme. 1996. Correlation between susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivars. *Phytopathology* 86: 225-231.
- Bliss, F. A., A. A. Almehdi, A. M. Dandekar, P. L. Schuerman, and N. Bellaloui. 1999. Crown gall resistance in accessions of 20 *Prunus* species. *HortScience* 34: 326-330.
- Bonfield, J.K., K.F. Smith, and R. Staden. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23: 4992-4999.
- Broothaerts, W., G.A. Janssens, P. Proost, and W.F. Broekaert. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.* 27: 499-511.
- Bus, V.G.M., D. Chagne, H.C.M. Bassett, D. Bowatte, F. Calenge, J.M. Celton, C.E. Durel, M.T. Malone, A. Patocchi, A.C. Ranatunga, E.H.A. Rikkerink, D.S. Tustin, J. Zhou, and S.E. Gardiner. 2008. Genome mapping of three major resistance genes to woolly apple aphid (*Eriosoma lanigerum* Hausm.). *Tree Genet. Genomes* 4: 223-236.
- Butler, E.D., and T.F. Gallagher. 1999. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase which is up-regulated during adventitious root formation in apple (*Malus domestica* 'Jork 9') stem discs. *J. Exp. Bot.* 50: 551-552.
- Calenge, F., C.G. Van der Linden, E. Van de Weg, H.J. Schouten, G. Van Arkel, C. Denance, and C.E. Durel. 2005. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance

- in apple. *Theor. Appl. Genet.* 110: 660-668.
- Celton, J.M., D. Chagné, S.D. Tustin, S. Terakami, C. Nishitani, T. Yamamoto, and S.E. Gardiner. 2009a. Update on comparative genome mapping between *Malus* and *Pyrus*. *BMC Res. Notes* 2: 182.
- Celton, J.M., D.S. Tustin, D. Chagne, and S.E. Gardiner. 2009b. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. *Tree Genet. Genomes* 5: 93-107.
- Cevik, V., and G.J. King. 2002. High-resolution genetic analysis of the *Sd-1* aphid resistance locus in *Malus* spp. *Theor. Appl. Genet.* 105: 346-354.
- Chagne, D., K. Gasic, R.N. Crowhurst, Y. Han, H.C. Bassett, D.R. Bowatte, T.J. Lawrence, E.H.A. Rikkerink, S.E. Gardiner, and S.S. Korban. 2008. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics* 92: 353-358.
- Chagne, D., R.N. Crowhurst, M. Troggio, M.W. Davey, B. Gilmore, C. Lawley, S. Vanderzande, R.P. Hellens, S. Kumar, A. Cestaro, R. Velasco, D. Main, J.D. Rees, A. Lezzoni, T. Mockler, L. Wilhelm, E. van de Weg, S.E. Gaediner, N. Bassil, and C. Peace. 2012. Genomu-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS ONE* 7: e31745.
- Costa, F., C.P. Peace, S. Stella, S. Serra, S. Musacchi, M. Bazzani, S. Sansavini, and W.E. Van de Weg. 2010. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.). *J. Exp. Bot.* 61: 3029-3039.
- Costa, F., W.E. Van de Weg, S. Stella, L. Dondini, D. Pratesi, S. Musacchi, and S. Sansavini. 2008. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genet. Genomes* 4: 575-586.
- Dilworth, E. and J.E. Frey. 2000. A rapid method for high throughput DNA extraction

- from plant material for PCR amplification. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 61-64.
- Dirlewanger, E., E. Graziano, T. Joobeur, F. Garriga-Caldere, P. Cosson, W. Howad, and P. Arus. 2004. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9891-9896.
- Erdin, N., S. Tartarini, G.A.L. Broggin, F. Gennari, S. Sansavini, C. Gessler, and A. Patocchi. 2006. Mapping of the apple scab-resistance gene *Vb*. *Genome* 49: 1238-1245.
- Escobar, M.A., and A.M. Dandekar. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci.* 8: 380-386.
- Fahrenttrapp, J., G.A.L. Broggin, M. Kellerhals, A. Peil, K. Richter, E. Zini, and C. Gessler. 2013. A candidate gene for fire blight resistance in *Malus × robusta* 5 is coding for a CC–NBS–LRR. *Tree Genet. Genomes* 9: 237-251.
- Fernandez-Fernandez, F., K.M. Evans, J.B. Clarke, C.L. Govan, C.M. James, S. Maric, and K.R. Tobutt. 2008. Development of an STS map of an interspecific progeny of *Malus*. *Tree Genet. Genomes* 4: 469-479.
- Fernandez-Fernandez, F., L. Antanaviciute, M.M. van Dyk, K.R. Tobutt, K.M. Evans, D.J.G. Rees, J.M. Dunwell, and D.J. Sargent. 2012. A genetic linkage map of an apple rootstock progeny anchored to the *Malus* genome sequence. *Tree Genet. Genomes* 8: 991-1002.
- Fisher, D. V. 1995. The ‘Wijcik Spur McIntosh’. *Fruit Var. J.* 49: 212-213.
- Flachowsky, H., I. Szankowski, S. Waidmann, A. Peil, C. Trankner, and M.-V. Hanke. 2012. The *MdTFL1* gene of apple (*Malus × domestica* Borkh.) reduces vegetative growth and generation time. *Tree Physiol.* 32: 1288-1301.
- Flachowsky, H., P.M. Le Roux, A. Peil, A. Patocchi, K. Richter, and M.-V. Hanke. 2011. Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus × domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection *New Phytol.* 192: 364-377.

- Frey, J.E., B. Frey, C. Sauer, and M. Kellerhals. 2004. Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. *Plant Breed.* 123: 554-557.
- Fukuoka, S., N. Saka, H. Koga, K. Ono, T. Shimizu, K. Ebana, N. Hayashi, A. Takahashi, H. Hirochika, K. Okuno, and M. Yano. 2009. Loss of function of a plotline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325: 998-1001.
- Galli, P., G.A.L. Brogini, M. Kellerhals, C. Gessler, and A. Patocchi. 2010. High-resolution genetic map of the *Rvi15* (*Vr2*) apple scab resistance locus. *Mol. Breed.* 26: 561-572.
- Gardiner, S.E., V.G.N. Bus, R.L. Rusholme, D Chagné, E.H.A. Rikkerink. 2007. Apple. p. 1-62. In: C. Kole (ed.). *Genome Mapping and Molecular Breeding*, Vol. 4, Fruits and Nuts. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc, and C. Gessler. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076.
- Grattapaglia, D., F.L. Bertolucci, and R.R. Sederoff. 1995. Genetic-mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucaryptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 933-947.
- Guilford, P., S. Prakash, J.M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett, and R. Forster. 1997. Microsatellites in *Malus* × *domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249-254.
- Han, H., S. Zhang, and X. Sun. 2009. A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 348-353.
- Han, K.-H., H.D. Bradshaw Jr., and M.P. Gordon. 1994. Adventitious root and shoot regeneration *in vitro* is under major gene control in an F2 family of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*). *For. Genet.* 1: 139-146.

- 羽生田忠敬・吉田義雄・真田哲朗. 1984. リンゴの高接ぎ病に関する研究 第4報 リンゴ台木の ACLSV 及び ASPV に対する抵抗性の遺伝. 果樹試報 C. 11: 1-11
- Hemmat, M., N.F. Weeden, P.J. Conner, and S.K. Brown. 1997. A DNA marker for columnar growth habit in apple contains a simple sequence repeat. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122: 347-349.
- Hokanson, S.C., S.-M.A. K., L.W. F., and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus* × *domestica* Borkh. core subset collection. Theor. Appl. Genet. 97: 671-683.
- Inoue E., Y. Matsuki, H. Anzai, and K. Evans. 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Mol. Ecol. Notes 7: 445-447
- 岩波 宏・森谷茂樹・高橋佐栄・古藤田信博・須崎浩一・阿部和幸. 2006. リンゴ新梢への根頭がんしゅ病菌接種におけるがんしゅの形成と肥大との関係. 園学雑. 75 (別2) : 456.
- 岩田洋佳. 「ゲノム育種」再び. 次世代シーケンサーは新しい育種の扉を開くのか?. 作物研究. 57: 77-82.
- Janssens, G.A., I.J. Goderis, W.F. Broekaert, and W. Broothaerts. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theor. Appl. Genet. 91: 691-698.
- Kellerhals, M., I.O. Baumgartner, L. Leumann, J.E. Frey, and A. Patocchi. 2013. Progress in Pyramiding disease resistances in apple breeding. Acta Hort. 976: 487-491.
- Kenis, K., and J. Keulemans. 2007. Study of tree architecture of apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) by QTL analysis of growth traits. Mol. Breed. 19: 193-208.
- Khan, S.A., J. Beekwilder, J.G. Schaart, R. Mumm, J.M. Soriano, E. Jacobsen, and H. J. Schouten. 2012. Differences in acidity of apples are probably mainly caused

- by a malic acid transporter gene on LG16. *Tree Genet. Genomes* 9: 475-487.
- Kim, M.Y., K.J. Song, H.J. -H., Y.-U. Shin, and H.J. Lee. 2003. Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Co* gene conferring columnar growth habit in apple (*Malus pumila* Mill.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 78: 512-517.
- 駒村研三. 2011. 果樹の根頭がんしゅ病アンケート調査の取りまとめ. 果樹種苗. 124: 22-23.
- Kotoda, N., H. Iwanami, S. Takahashi, and K. Abe. 2006. Antisense expression of *MdTFL1*, a *TFL1*-like gene, reduces the juvenile phase in apple. *J. Amer. S. Hort. Sci.* 131: 74-81.
- Krost, C., R. Petersen, and E.R. Schmidt. 2012. The transcriptomes of columnar and standard type apple trees (*Malus × domestica*): A comparative study. *Gene* 498: 223-230.
- Krost, C., R. Petersen, S. Lokan, B. Brauksiepe, P. Braun, and E.R. Schmidt. 2013. Evaluation of the hormonal state of columnar apple trees (*Malus × domestica*) based on high throughput gene expression studies. *Plant Mol. Biol.* 81: 211-220.
- 工藤祐基・大友義規・福島千万男・瀬川一衛・中田良一・松中謙次郎・山田 隆. 1968. リンゴ斑点落葉病に関する研究. 青森りんご試報. 12 : 25-122.
- Kumar, S., D. Chagne, M.C.A.M. Bink, R. K. Volz, C. Whitworth, and C. Carlisle. 2012. Genomic selection for fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *PLoS ONE* 7: e36674.
- Lapins, K.O. 1976. Inheritance of compact growth type in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101: 133-135.
- Lauri, P. E., E. Terouanne, J. M. Lespinasse, J.-M. Regnard, and J.-J. Kelner. 1995. Genotypic differences in the axillary bud growth and fruiting pattern of apple fruiting branches over several years—An approach to regulation of fruit bearing. *Sci. Hortic.* 64: 265-281.
- Le Roux, P.M., H. Flachowsky, M.-V. Hanke, C. Gessler, and A. Patocchi. 2012. Use

- of a transgenic early flowering approach in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) to introgress fire blight resistance from cultivar Evereste. *Mol. Breed.* 30: 857-874.
- Lespinasse, J. M., and J. F. Delort. 1986. Apple tree management in vertical axis: appraisal after ten years of experiments. *Acta Hort.* 160: 139-155.
- Li, T.-Y., Y. Wang, X.-Z. Zhang, and Z.-H. Han. 2012a. Isolation and characterization of *ARRO-1* genes from apple rootstocks in response to auxin treatment. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30: 1408-1414.
- Li, Y., L.Y. Zhang, Z. Zhang, P.H. Cong, and Z.M. Cheng. 2011. A simple sequence repeat marker linked to the susceptibility of apple to *Alternaria* blotch caused by *Alternaria alternata* apple pathotype. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 136: 109-115.
- Li, Y., P.M. Hirst, Y.Z. Wan, Y.J. Liu, Q. Zhou, H. Gao, Y.Z. Guo, Z.Y. Zhao, L.C. Wang, and M.Y. Han. 2012b. Resistance to *Marssonina coronaria* and *Alternaria alternata* apple pathotype in the major apple cultivars and rootstocks used in China. *HortScience* 47: 1241-1244.
- Liebhart, R., L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. Van de Weg, and C. Gessler. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10: 217-241.
- Liebhart, R., B. Koller, L. Gianfranceschi, and C. Gessler. 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) genome. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1497-1508.
- Longhi, S., M.T. Hamblin, L. Trainotti, C.P. Peace, R. Velasco, and F. Costa. 2013. A candidate gene based approach validates *Md-PGI* as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.). *BMC Plant Biol.* 13: 37.
- Mace, E.S., H.K. Buhariwalla, and J.H. Crouch. 2003. A high-throughput DNA extraction protocol for tropical molecular breeding programs. *Plant Mol. Biol.*

- Rep. 21: 459a-459h.
- Mahmoodzadeh, H., A. Nazemieh, I. Majidi, I. Paygami, and A. Khalighi. 2004. Evaluation of crown gall resistance in *Vitis vinifera* and hybrids of *Vitis* spp. *Vitis* 43: 75-79.
- Maliepaard, C., F.H. Alston, G.v. Arkel, L.M. Brown, E. Chevreau, F. Dunemann, K.M. Evans, S. Gardiner, P. Guilford, A.W.v. Heusden, J. Janse, F. Laurens, J.R. Lynn, A.G. Manganaris, A.P.M.d. Nijs, N. Periam, E. Rikkerink, P. Roche, C. Ryder, S. Sansavini, H. Schmidt, S. Tartarini, J.J. Verhaegh, M.V.-v. Ginkel, and G.J. King. 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 60-73.
- Marques, C.M., J. Vasquez-Kool, V.J. Carocha, J.G. Ferreira, D.M. O'Malley, B.H. Liu, and R. Sederoff. 1999. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 936-946.
- Michelmore, R.W., I. Paran, and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis - a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
- Moore, L.W. 1990. Crown gall. p. 64-65. In: A.L. Jones, and H. S. Aldwinkle (eds.). *Compendium of apple and pear diseases*. APS press, St. Paul, USA.
- Moriya, S., H. Iwanami, N. Kotoda, T. Haji, K. Okada, S. Terakami, N. Mimida, T. Yamamoto, and K. Abe. 2012. Aligned genetic linkage maps of apple rootstock cultivar 'JM7' and *Malus sieboldii* 'Sanashi 63' constructed with novel EST-SSRs. *Tree Genet. Genomes* 8: 709-723.
- 森谷茂樹・岡田和馬・土師 岳・寺上伸吾・山本俊哉・阿部和幸. 2012. 斑点落葉病抵抗性および果皮色の選抜マーカーを用いたリンゴ幼苗（実生）のDNA マーカー選抜. *園学研*（別1）. 11: 261.
- Nam, J., K.S. Mysore, C. Zheng, M.K. Knue, A.G. Matthyse, and S.B. Gelvin. 1999.

- Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 429-438.
- N'Diaye, A., W.E.V. de Weg, L.P. Kodde, B. Koller, F. Dunemann, M. Thiermann, S. Tartarini, F. Gennari, and C.E. Durel. 2008. Construction of an integrated consensus map of the apple genome based on four mapping populations. *Tree Genet. Genomes* 4: 727-743.
- 猫塚修一・川村武寛・仲谷房治・佐々木仁・小野田和夫. 2001. JM 台苗木におけるリンゴ根頭がんしゅ病の発生. *北日本病虫研報.* 52: 105-108.
- Nishitani, C., S. Terakami, Y. Sawamura, N. Takada, and T. Yamamoto. 2009. Development of novel EST-SSR markers derived from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breed. Sci.* 59: 391-400.
- Ohta, S., K. Yano, Y. Kurita, M. Kita, T. Shimizu, and H. Nesumi. 2013. A sample preparation method for direct and non-direct PCR in woody plants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82: 14-21.
- Pacurar, D.I., H. Thordal-Christensen, M. L. Pacurar, D. Pamfil, C. Botez, and C. Bellini. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 76: 76-81.
- Parravicini, G., C. Gessler, C. Denance, P. Lasserre-Zuber, E. Vergne, M.N. Brisset, A. Patocchi, C.E. Durel, and G.A.L. Brogini. 2011. Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar 'Evereste'. *Mol. Plant Pathol.* 12: 493-505.
- Patocchi, A., F. Fernandez-Fernandez, K. Evans, D. Gobbin, F. Rezzonico, A. Boudichevskaia, F. Dunemann, M. Stankiewicz-Kosyl, F. Mathis-Jeanneteau, C.E. Durel, L. Gianfranceschi, F. Costa, C. Toller, V. Cova, D. Mott, M. Komjanc, E. Barbaro, L. Kodde, E. Rikkerink, C. Gessler, and W.E. van de Weg. 2009. Development and test of 21 multiplex PCRs composed of SSRs spanning most of

- the apple genome. *Tree Genet. Genomes* 5: 211-223.
- Patocchi, A., L. Gianfranceschi, and C. Gessler. 1999. Towards the map-based cloning of *Vf*: fine and physical mapping of the *Vf* region. *Theor. Appl. Genet.* 99: 1012-1017.
- Patocchi, A., M. Walser, S. Tartarini, G.A.L. Brogini, F. Gennari, S. Sansavini, and C. Gessler. 2005. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm*. *Genome* 48: 630-636.
- Pilcher, R.L.R., J.M. Celton, S.E. Gardiner, and D.S. Tustin. 2008. Genetic markers linked to the dwarfing trait of apple rootstock 'Malling 9'. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 100-106.
- Pop, T.I., D. Pamfil, and C. Bellini. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 39: 307-316.
- 齋藤健一. 1975. リンゴ斑点落葉病抵抗性の幼苗検定. 農業および園芸. 49: 923-924.
- 齋藤健一・武田和義. 1984. リンゴ斑点落葉病抵抗性の遺伝 リンゴの交雑育種に関する研究 (第8報). 育種学雑誌. 34: 197-209.
- Sato, T., T. Kudo, T. Akada, Y. Wakasa, M. Niizeki, and T. Harada. 2004. Allelotype of a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene defines the rate of fruit drop in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129: 32-36.
- Sawamura, Y., T. Saito, N. Takada, T. Yamamoto, T. Kimura, T. Hayashi, and K. Kotobuki. 2004. Identification of parentage of Japanese pear 'Housui'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73: 511-518.
- Schroth, M. N., A. R. Weinhold, A. H. McCain, D. C. Hildebrand, and N. Ross. 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia* 40: 537-552.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnol.* 18: 233-234.

- Scotti-Saintagne, C., E. Bertocchi, T. Barreneche, A. Kremer, and C. Plomion. 2005. Quantitative trait loci mapping for vegetative propagation in pedunculate oak. *Ann. For. Sci.* 62: 369-374.
- Shepherd, M., S. Kasem, D.J. Lee, and R. Henry. 2008. Mapping species differences for adventitious rooting in a *Corymbia torelliana* × *Corymbia citriodora* subspecies variegata hybrid. *Tree Genet. Genomes* 4: 715-725.
- Silfverberg-Dilworth, E., C.L. Matasci, W.E. Van de Weg, M.P.W. Van Kaauwen, M. Walser, L.P. Kodde, V. Soglio, L. Gianfranceschi, C.E. Durel, F. Costa, T. Yamamoto, B. Koller, C. Gessler, and A. Patocchi. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet. Genomes* 2: 202-224.
- Siviero, A., M. Cristofani, and M.A. Machado. 2003. QTL mapping associated with rooting stem cuttings from *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* hybrids. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 3: 83-88.
- Smolka, A., M. Welander, P. Olsson, A. Holefors, and L.H. Zhu. 2009. Involvement of the *ARRO-1* gene in adventitious root formation in apple. *Plant Sci.* 177: 710-715.
- 副島淳一・阿部和幸・古藤田信博・加藤秀憲・小森貞男・別所英男・伊藤祐司. 2002. リンゴ JM 系わい性台木の挿し木結果に及ぼす各種要因の検討. 園学雑. 71 (別 1) : 201.
- 副島淳一・高橋佐栄・岩波宏・古藤田信博・阿部和幸. 2004. リンゴわい性台木 JM1, JM7 の挿し木結果に及ぼす土壌鎮圧等の影響. 園学雑. 73 (別 2) : 114.
- 副島淳一・吉田義雄・羽生田忠敬・別所英男・土屋七郎・増田哲男・小森貞男・真田哲朗・伊藤祐司・定盛昌助・檜村芳記. 2010. リンゴわい性台木の新品種 'JM1', 'JM7' および 'JM8'. 果樹研報. 11: 11-16.
- 副島淳一・吉田義雄・羽生田忠敬・別所英男・土屋七郎・増田哲男・小森貞男・

- 真田哲朗・伊藤祐司・定盛昌助・檜村芳記・阿部和幸・古藤田信博. 2013. リンゴの半わい性台木および極わい性台木の新品種 ‘JM2’, ‘JM5’. 果樹研報. 16: 19-36.
- Stover, E. W., H. J. Swartz, and T. J. Burr. 1997. Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. Am. J. Enol. Vitic. 48: 26–32.
- Sule, S., and T. J. Burr. 1998. The effect of resistance of rootstocks to crown gall (*Agrobacterium* spp.) on the susceptibility of scions in grapevine cultivars. Plant Pathol. 47: 84-88.
- 須崎浩一・福士好文. 2011. 果樹の根頭がんしゅ病を巡る技術開発の現状. 果樹種苗. 124: 17-21
- Suzaki, K., K. Yoshida, and H. Sawada. 2004. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. J. Gen. Plant Pathol. 70: 342-347.
- Szegedi, E., J. Korbuly, and I. Koleda. 1984. Crown gall resistance in east-Asian *Vitis* species and in their *V. vinifera* hybrids. Vitis 23: 21–26.
- Szegedi, E. and P. Kozma. 1984. Studies on the inheritance of resistance to crown gall disease of grapevine. Vitis 23: 121-126.
- Takos, A.M., F.W. Jaffe, S.R. Jacob, J. Bogs, S.P. Robinson, and A.R. Walker. 2006. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. Plant Physiol. 142: 1216-1232.
- 田中淳一. 2006. チャの育種レベルの飛躍的向上を目指した DNA マーカー等による早期選抜と世代促進を組合せた育種システム : 野菜茶業研究所枕崎茶業研究拠点におけるとりくみ. 育種学研究. 8: 119-126.
- Terakami, S., Y. Adachi, H. Iketani, Y. Sato, Y. Sawamura, N. Takada, C. Nishitani, and T. Yamamoto. 2007. Genetic mapping of genes for susceptibility to black spot disease in Japanese pears. Genome 50: 735-741.

- Testolin R., T. Marrazzo, G. Cipriani, R. Quarta, I. Verde, M. T. Dettori, M. Pancaldi, and S. Sansavini. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43: 512-520
- Thomson, D., and R. Henry. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19: 394-400.
- Thumma, B.R., B.S. Baltunis, J.C. Bell, L.C. Emebiri, G.F. Moran, and S.G. Southerton. 2010. Quantitative trait locus (QTL) analysis of growth and vegetative propagation traits in *Eucalyptus nitens* full-sib families. *Tree Genet. Genomes* 6: 877-889.
- Tian, Y.K., C.-H. Wang, J.-S. Zhang, C. James, and H.-Y. Dai. 2005. Mapping *Co*, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers. *Euphytica* 145: 181-188.
- Troggio, M., A. Gleave, S. Salvi, D. Chagne, A. Cestaro, S. Kumar, R.N. Crowhurst, and S.E. Gardiner. 2012. Apple, from genome to breeding. *Tree Genet. Genomes* 8: 509-529.
- Tsiantos, J., P. Psallidas, and J. M. S. Martins. 2002. Assessment of genetic resistance to crown gall in roots of apricot hybrid descents. *Plant Protection Sci.* 38: 555-557.
- 土屋七郎. 1998. マルバカイドウの由来と系統特性. 果樹種苗. 72: 1-6.
- Tsuge, T., Y. Harimoto, K. Akimitsu, K. Ohtani, M. Kodama, Y. Akagi, M. Egusa, M. Yamamoto, and H. Otani. 2013. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 44-66.
- Tydeman, H.M., and F.H. Alston. 1964. The influence of dwarfing rootstocks in shortening the juvenile phase of apple seedlings. *Rep. E. Malling Res. Sta. for 1964 (1965)*: 98-99.
- van Dyk, M.M., M.K. Soeker, I.F. Labuschagne, and D.J.G. Rees. 2010. Identification

- of a major QTL for time of initial vegetative budbreak in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.). *Tree Genet. Genomes* 6: 489-502.
- van Ooijen, J.W. 2009. MapQTL 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- Velasco, R., A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro, A. Kalyanaraman, P. Fontana, S.K. Bhatnagar, M. Troggio, D. Pruss, S. Salvi, M. Pindo, P. Baldi, S. Castelletti, M. Cavaiuolo, G. Coppola, F. Costa, V. Cova, A. Dal Ri, V. Goremykin, M. Komjanc, S. Longhi, P. Magnago, G. Malacarne, M. Malnoy, D. Micheletti, M. Moretto, M. Perazzolli, A. Si-Ammour, S. Vezzulli, E. Zini, G. Eldredge, L.M. Fitzgerald, N. Gutin, J. Lanchbury, T. Macalma, J.T. Mitchell, J. Reid, B. Wardell, C. Kodira, Z. Chen, B. Desany, F. Niazi, M. Palmer, T. Koepke, D. Jiwan, S. Schaeffer, V. Krishnan, C. Wu, V.T. Chu, S.T. King, J. Vick, Q. Tao, A. Mraz, A. Stormo, K. Stormo, R. Bogden, D. Ederle, A. Stella, A. Vecchietti, M.M. Kater, S. Masiero, P. Lasserre, Y. Lespinasse, A.C. Allan, V. Bus, D. Chagne, R.N. Crowhurst, A.P. Gleave, E. Lavezzo, J.A. Fawcett, S. Proost, P. Rouze, L. Sterck, S. Toppo, B. Lazzari, R.P. Hellens, C.E. Durel, A. Gutin, R.E. Bumgarner, S.E. Gardiner, M. Skolnick, M. Egholm, Y. Van de Peer, F. Salamini, and R. Viola. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus* × *domestica* Borkh.). *Nature Genet.* 42: 833-839.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeke, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Watanabe, M., A. Suzuki, S. Komori, and H. Bessho. 2004. Comparison of endogenous IAA and cytokinins in shoots of columnar and normal type apple trees. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73: 19-24.
- Watanabe, M., A. Suzuki, S. Komori, and H. Bessho. 2006. Effects of heading-back

- pruning on shoot growth and IAA and cytokinin concentrations at bud burst of columnar-type apple trees. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75: 224-230.
- Webster, A.D. 1995. Temperate fruit tree rootstock propagation. *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* 23: 355-372.
- Webster, A.D., and S.J. Wertheim. Apple rootstocks. 2003. p. 90-124. In: Ferree, D.C., and I.J. Warrington (eds.). *Apples: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Xin, Z., J.P. Velton, M.J. Oliver, and J.J. Burke. 2003. High-throughput DNA extraction suitable for PCR. *BioTechniques* 34: 820-826.
- Xu, K., A. Wang, and S. Brown. 2012. Genetic characterization of the *Ma* locus with pH and titratable acidity in apple. *Mol. Breed.* 30: 899-912.
- 山田昌彦. 2011. 果樹の交雑育種法. p. 4-13. 養賢堂. 東京.
- Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, T. Imai, T. Saito, Y. Sawamura, K. Kotobuki, T. Hayashi, and N. Matsuta. 2002a. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theor. Appl. Genet.* 106: 9-18.
- Yamamoto, T., T. Kimura, S. Terakami, C. Nishitani, Y. Sawamura, T. Saito, K. Kotobuki, and T. Hayashi. 2007. Integrated reference genetic linkage maps of pear based on SSR and AFLP markers. *Breed. Sci.* 57: 321-329.
- Yamamoto, T., T. Kimura, T. Saito, K. Kotobuki, N. Matsuta, R. Liebhard, C. Gessler, W.E. van de Weg, and T. Hayashi. 2005. Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map. *Acta Hort.* 663: 51-56.
- Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, T. Manabe, K. Kotobuki, T. Hayashi, Y. Ban, and N. Matsuta. 2002b. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica* 124: 129-137.
- 吉田義雄・羽生田忠敬・増田哲男・別所英男. 1985. リンゴの優良台木育成試験 ①二面交雑による実生の育成と選抜. 昭和 59 年度果樹試験場盛岡支

場試驗研究年報. : 3-4.

Zhang, Y., J. Zhu, and H.Y. Dai. 2012. Characterization of transcriptional differences between columnar and standard apple trees using RNA-Seq. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30: 957-965.

Zhu, Y.D., W. Zhang, G.C. Li, and T. Wang. 2007. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping the *Co* gene in apple (*Malus pumila* Mill.). *J. Hort. Sci. Biotech.* 82: 371-376.

Ziegle, J.S., Y. Su, K.P. Corcoran, L. Nie, P.E. Mayrand, L.B. Hoff, L.J. McBride, M.N. Kronick, and S.R. Diehl. 1992. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14: 1026-1031.