

学位論文要旨

DNA 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*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
果樹研究所リンゴ研究領域
020-0123 岩手県盛岡市Development of marker-assisted selection methods for young apple
seedlings possessing four important traits

Shigeki MORIYA*

Apple Research Division, Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture
and Food Research Organization (NARO)

まえがき

リンゴは、新エングレー体系（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。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、数種のリンゴ属植物が交雑されてヨーロッパにおいて成立した栽培品種群である。明治時代に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。また、リンゴの苗木は接ぎ木繁殖されているが、その際の台木としては、マルバカイドウ (*M. prunifolia*) やミツバカイドウ (*M. sieboldii*) のような日本在来のリンゴ属野生種、もしくは 'M. 9' や 'M. 26' などの海外から導入されたリンゴ台木用品種、およびそれらの雑種が用いられている。

日本においては高品質なリンゴ果実に対する消費者の要望が強く、これに応えることを主な目的とした交雑育種が民間育種家や公設機関によって明治時代末から始められ、現在においても継続して取り組まれている。しかしながら、リンゴの交雑育種には、穂木として用いて果実を生産する栽培品種の育種においても、台木として用いて根系と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、これらを削減して育種効率を上げることが求められている。そのため、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 DNA マーカー選抜法を用いて早期選抜を行うことが有効であると考えられる。

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り DNA マーカー選抜を行う優位性が高いと考えられるものの、早期選抜に利用可能な DNA マーカーが開発されていない 4 種類の形質を早期に選抜可能な DNA マーカーを開発することとした。一つ目として斑点落葉病抵抗性（第 1 章）、二つ目としてカラムナー性（第 2 章）、三つ目として台木用品種にお

* Corresponding author. E-mail: moriyas@affrc.go.jp

ける根頭がんしゅ病抵抗性（第3章）、四つ目として台木用品種における挿し木発根性（第4章）について、DNAマーカーを開発することとした。

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、リンゴ栽培において最も重点的に防除を要する病害の一つであることから、本病害に対して抵抗性の栽培品種の育成が強く求められている。斑点落葉病に対する抵抗性は、罹病性が優性の1遺伝子 *Alt* (*Alternaria*) によって制御されることが明らかにされている。そこで、本章では *Alt* の座乗する連鎖群を明らかにし、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。

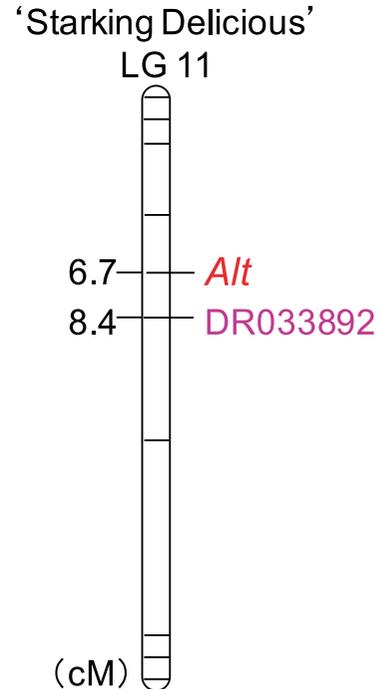
まず初めに、斑点落葉病に罹病性の‘Starking Delicious’ と抵抗性の‘Jonathan’を正逆交雑して得られたF1集団(114個体)を用いて、*Alt* の座乗する連鎖群を同定した。その結果、*Alt* は‘Starking Delicious’の第11連鎖群(LG 11)にマッピングされた(第1図)。このとき、DNAマーカーDR033892が*Alt*の最も近傍に座乗しており、遺伝距離1.7 cMで連鎖していることが示された。DNAマーカーDR033892による429 bpの増幅産物の有無と、抵抗性・罹病性との関係は、一致していた(第2図)。以上の結果から、DR033892は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

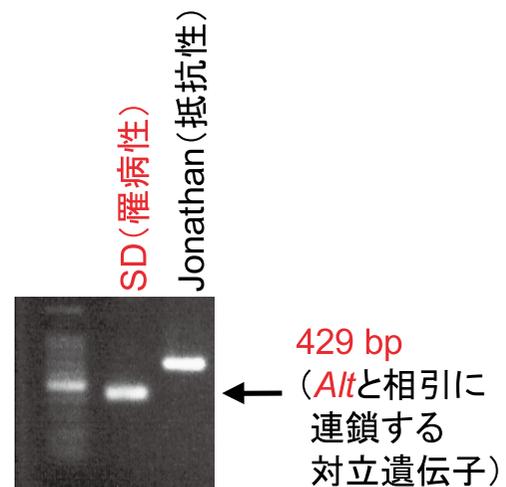
リンゴのカラムナー性とは、新梢の節間が短く太くなり、細長い円筒形の樹形を示す性質であることから、剪定を簡略化して省力栽培を行うことができると考えられている。しかしながら、果実品質が劣る観賞用の品種は育成されているものの、生食用の品種は育成されていない。カラムナー性は1個の優性遺伝子 *Co* (*Columnar*) によって発現する形質である。これまで、*Co* がLG 10に座乗していることと、*Co* に連鎖するいくつかのDNAマーカーは明らかにされているものの、それらのDNAマーカーを用いた選抜技術は開発されていない。そこで、本章ではカラムナー性を示す樹形(カラムナータイプ)の実生個体を選抜するための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

通常型の樹形を示す品種‘ふじ’とカラムナータイプの選抜系統「5-12786」、および‘ふじ’とカラムナータイプの選抜系統「8H-9-45」を交雑して得られたF1集団を用いて、LG 10の連鎖地図を構築し、既知のDNAマーカーと *Co* の連鎖関係を調べた。その結果、既知のDNAマーカーのうち、*Co* の最も近傍に連鎖していたDNA



第1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。



第2図 ‘Starking Delicious’ (SD) と ‘Jonathan’ 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。

マーカーは simple sequence repeat (SSR) マーカー CH03d11 と Hi01a03 であることが示された (第 3 図)。しかしながら、Co と SSR マーカー CH03d11 と Hi01a03 との間には一定の遺伝距離が存在していたので、Co のさらに近傍に新規 SSR マーカーを開発することとした。

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

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得られた 31 交雑組合せの F1 集団 1,000 個体と、通常型の品種 ‘Golden Delicious’ の公開ゲノム配列から開発した新規 SSR マーカーを用いて高解像度マッピングを行った。その結果、Co の最も近傍で組換えを起こしていた 3 個体のグラフ遺伝子型から、Co が座乗する領域は新規 SSR マーカー Mdo.chr10.11 と Mdo.chr10.15 の間に絞り込まれ (第 4 図)、新規 SSR マーカー Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.13 と Mdo.chr10.14 は、1,000 個体の F1 集団において Co と 0 cM で連鎖していることが示された。次に、これら 3 種類の SSR マーカー (Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.13 と Mdo.chr10.14) を用いて、近年育成されているリンゴ栽培品種群の祖先にあたる品種から対立遺伝子を検出した結果、Mdo.chr10.12 と Mdo.chr10.14 を用いたときに 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 (第 1 表)。以上の結果から、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。

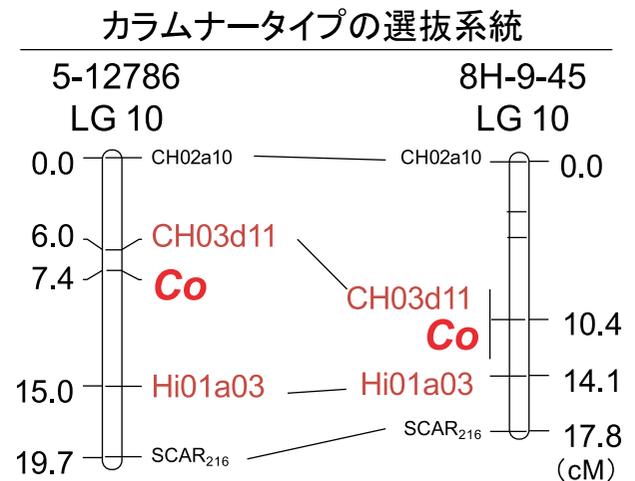
第 3 章 台木用品種における根頭がんしゅ病抵抗性個体の早期選抜法

リンゴの台木における根頭がんしゅ病は、土壤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、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あげられる。そこで、本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

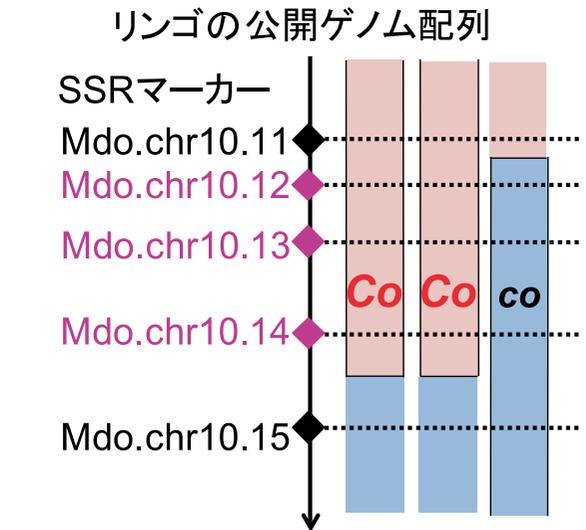
品種や系統を探索しようとした。次に、探索した抵抗性の品種や系統を交雑親とする交雑実生集団を育成して、抵抗性の遺伝性について明らかにすることとした。さらに、抵抗性遺伝子をマッピングすることを通して、抵抗性の実生個体を選抜するための DNA マーカーを開発しようとした。

第 1 節 根頭がんしゅ病抵抗性の評価手法の改良

植物材料には、台木用品種の ‘JM7’ とミツバカイドウ (*M. sieboldii*) の ‘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、接種源には根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株を用いた。抵抗性検定の方法としては、従来行われている挿し木苗基部 (地下部)



第 3 図 カラムナータイプの選抜系統 5-12786 と 8H-9-45 における第 10 連鎖群 (LG 10) の連鎖地図。



第 4 図 カラムナー性を示す原因遺伝子 Co の最も近傍で組換えを起こしていた 3 個体のグラフ遺伝子型。

における抵抗性検定法と、新たに開発した接ぎ木苗の穂木から発生した新梢（地上部）における抵抗性検定法を行った。抵抗性の評価の際には、がんしゅ形成率として得られた評価基準を用いて、地上部と地下部における抵抗性の関係を調べた。その結果、地上部と地下部のがんしゅ形成率に $R=0.684$ のゆるやかな正の相関が認められたので、新たに開発した接ぎ木苗の穂木から発生した新梢（地上部）における抵抗性検定法を用いると台木の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（第5図）。

次に、接ぎ木苗の穂木から発生した新梢（地上部）に

おける抵抗性検定法を用いて、台木用品種や野生種の根頭がんしゅ病菌（Peach CG8331株と ARAT-001株）に対する抵抗性を調べた。その結果、日本在来の野生種で台木として用いられるミツバカイドウの‘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すことが示された（第6図）。供試した他の台木用品種や野生種の中に、両菌株に対して抵抗性を示す品種や系統は認められなかった。

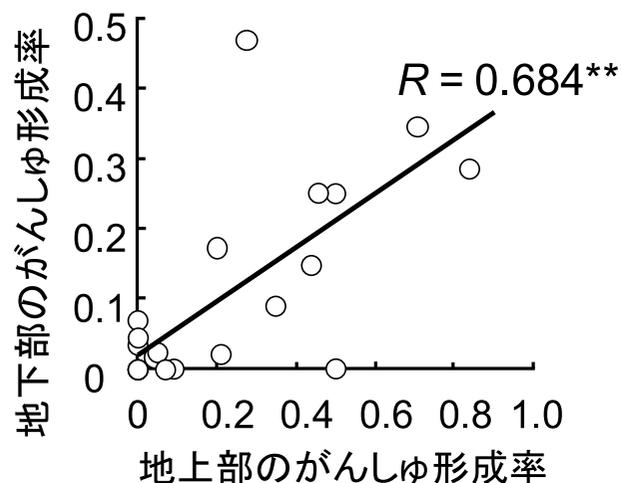
また、接ぎ木苗の穂木から発生した新梢（地上部）における抵抗性検定法を用いて、Peach CG8331株に対して罹病性の‘JM7’と抵抗性の‘サナシ63’を交雑して

第1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 と Mdo.chr10.13 と Mdo.chr10.14 を用いてリング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。

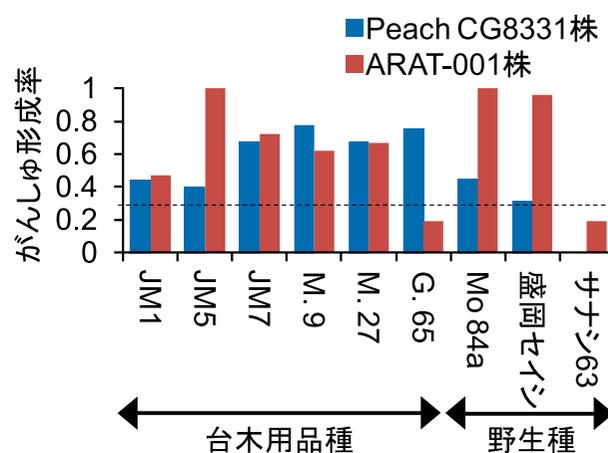
品種	表現型	SSR マーカー		
		Mdo.chr10.12	Mdo.chr10.13	Mdo.chr10.14
Wijcik ^z	カラムナータイプ	309 bp/ <u>311 bp</u> ^y	123/ <u>123</u>	84/ <u>138</u>
McIntosh (旭)	通常型	309/311	123/123	84/138
Delicious	通常型	291/299	119/123	84/110
Golden Delicious	通常型	297/299	119/119	110/110
Jonathan (紅玉)	通常型	291/291	123/123	84/84
Cox's Orange Pippin	通常型	299/313	119/123	110/131
Ralls Janet (国光)	通常型	299/299	119/119	110/110
印度	通常型	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 カラムナー性を示す原因遺伝子 *Co* と相引に連鎖する対立遺伝子に下線を付して示す。



第5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。



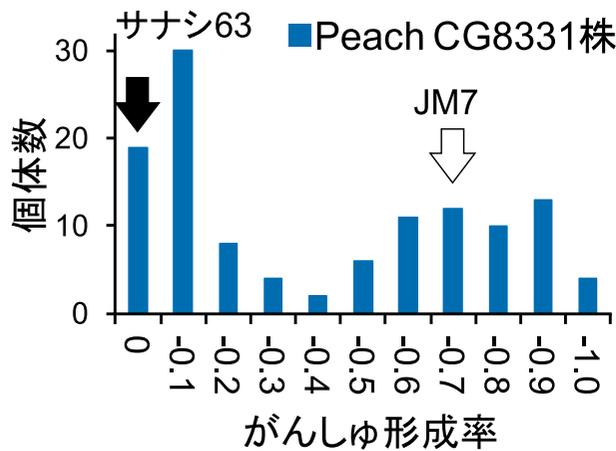
第6図 台木用品種と野生種の新梢（地上部）における根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331株と ARAT-001株によるがんしゅ形成率。がんしゅ形成率 0：抵抗性、0～0.3：中程度抵抗性、0.3～1.0：罹病性。

得られた F1 集団 (119 個体) の Peach CG8331 株に対する抵抗性を調べた。その結果、F1 集団のがんしゅ形成率はがんしゅ形成率 0.3 を境として 2 群に分離した (第 7 図)。したがって、‘サナシ 63’ における 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* (*Crown gall*) によって決定されていると考察された。

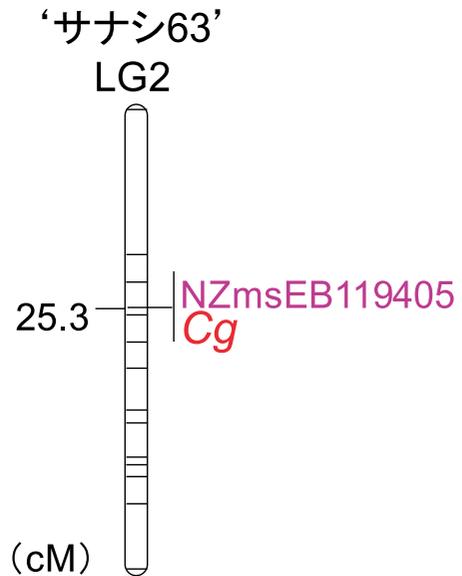
雑して得られた F1 集団における根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対する抵抗性を調べた結果を用いて、*Cg* の座乗する連鎖群を同定した。その結果、*Cg* は ‘サナシ 63’ の LG 2 に座乗しており、SSR マーカー NZmsEB119405 と 0 cM で連鎖していることが示された (第 8 図)。次に、‘サナシ 63’ を交雑親として用いた後代において、SSR マーカー NZmsEB119405 を用いると *Cg* を保有する個体が識別できることが示された (第 9

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

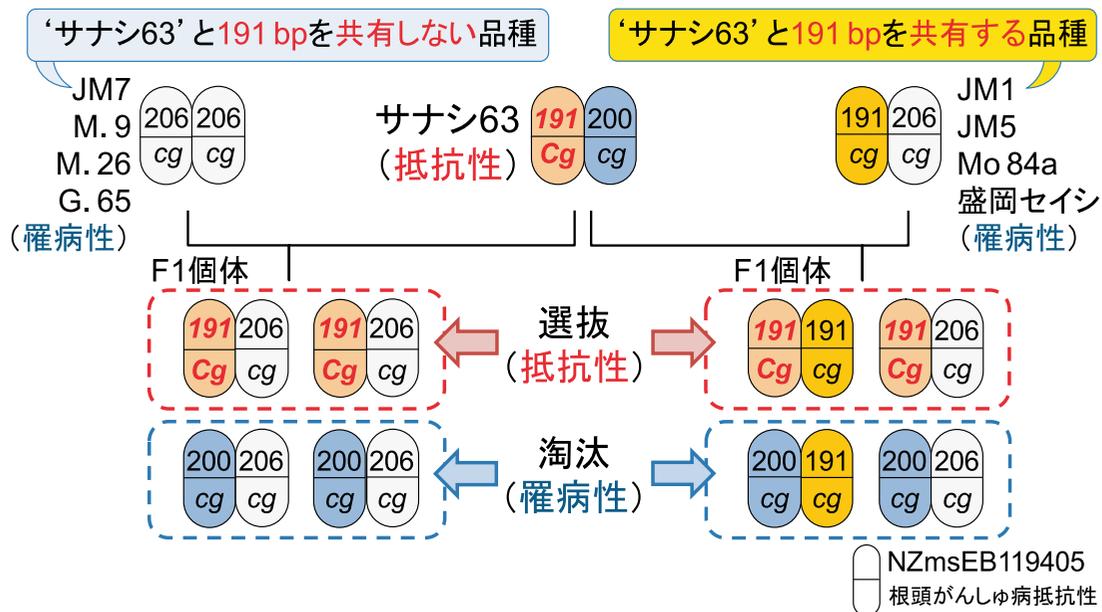
本章の第 1 節で供試した ‘JM7’ と ‘サナシ 63’ を交



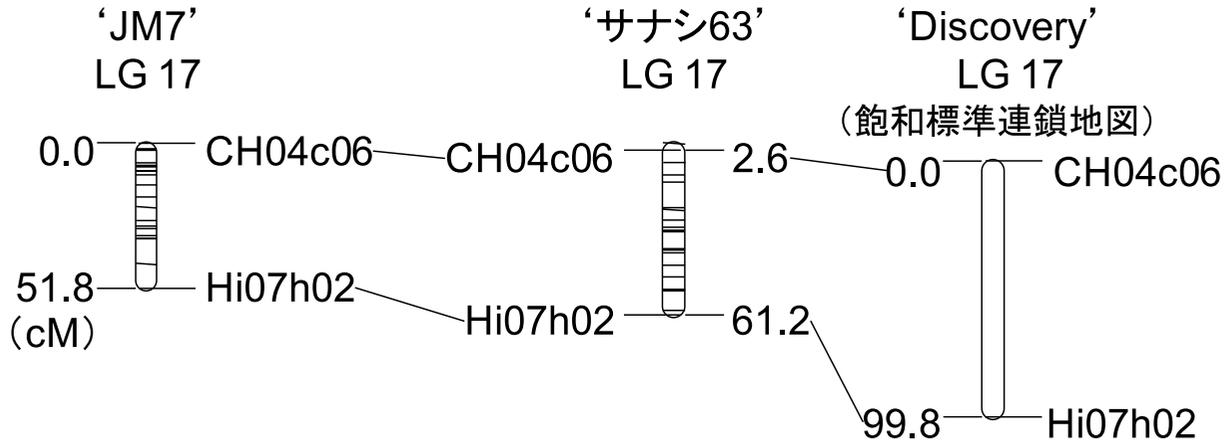
第 7 図 ‘JM7’ と ‘サナシ 63’ を交雑して得られた F1 集団 (119 個体) の新梢 (地上部) における根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株によるがんしゅ形成率。



第 8 図 根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対して抵抗性の ‘サナシ 63’ における第 2 連鎖群 (LG 2) の連鎖地図。



第 9 図 ‘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 を用いて根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331 株に対して抵抗性を示す主働遺伝子 *Cg* を保有する個体を識別する方法。



第10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120個体を用いて構築された‘JM7’と‘サナシ63’の連鎖地図。
構築された連鎖地図の第1連鎖群(LG 1)～LG 17から、LG 17のみを示す。

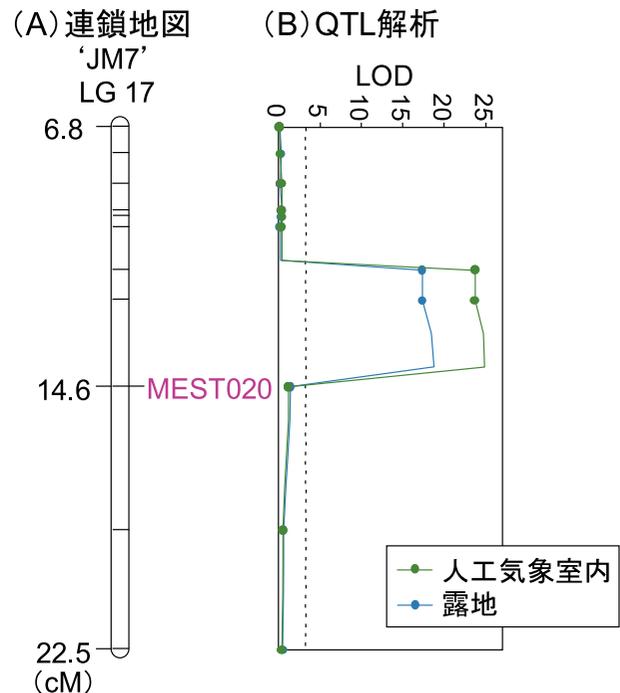
図). したがって、NZmsEB119405は根頭がんしゅ病菌 Peach CG8331株に対する抵抗性個体を早期に選抜するDNAマーカーとして利用可能であると判断された。

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

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)によって繁殖された台木を用い、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。そこで、本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 locus: 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。

第1節 連鎖地図の構築

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集団の120個体を用いて構築した‘JM7’と‘サナシ63’の連鎖地図を、共通に座乗していたSSRマーカーを基準にしてリンゴの飽和標準連鎖地図と比較した。その結果、‘JM7’と‘サナシ63’の連鎖地図が構築された領域はほぼ全ゲノムにわたっていると判断された(第10図)。



第11図 人工気象室内と露地における挿し木床での休眠枝挿しの発根率に対するQTL解析。
(A) ‘JM7’における第17連鎖群(LG 17)の連鎖地図(一部の抜粋)。
(B) MQMマッピング法によるQTL解析。
点線は1000回の並べ替え検定で得られた有意水準5%の閾値。

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。

本章の第1節で構築した連鎖地図を用いて、人工気象室内と露地における挿し木床での休眠枝挿しの発根率に対するQTL解析を行った。その結果、発根を促進する

第2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 MEST020 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	品種名	挿し木発根性	MEST020
JM 系台木	JM1, JM8	あり	<u>248 bp²/280 bp</u>
	JM2, JM5, JM7	あり	248/278
マルバカイドウ	盛岡セイシ	あり	<u>248/256</u>
	Mo 84a	あり	246/256
ミツバカイドウ	サナシ63	なし	251/265
M 系, G 系台木	M. 9	なし	278/280
	M. 27	なし	246/278
	G. 65	なし	<u>246/267</u>

² 発根を促進する QTL の対立遺伝子と相引に連鎖する対立遺伝子に下線を付して示す.

主働 QTL が 'JM7' の LG 17 に見出された (第11図). 次に, 主働 QTL の近傍に座乗していた SSR マーカー MEST020 を用いて, リンゴの台木用品種や野生種で検出される対立遺伝子を調べた. その結果, 発根を促進する QTL の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や野生種から検出されなかった (第2表). したがって, SSR マーカー 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考えられた.

まとめ

本研究によって, 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 4 種類の遺伝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. 本

研究で開発されたこれらの 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の中にすでに採用されている. たとえば, 栽培品種の交雑育種において, 直近の 3 年間 (2011~2013年) に DNA マーカー選抜によって淘汰された 1 年生の実生苗の個体数は 1,500 個体以上であり, これは交雑育種において 1 年間に定植される個体数に匹敵する個体数であった. また, 台木用品種の交雑育種においても, DNA マーカー選抜を行うことで選抜前の 1 年生の実生苗 1,200 個体から 9 割以上の個体を淘汰することに成功した.

以上のように, 本研究で開発した 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た. 今後は, 各遺伝子の対立遺伝子間の相互作用などに関する遺伝的知見を充実させ, 本研究で解析した 4 種類の重要形質の発現を支配する遺伝子本体の発見と, その機能の解明が期待される.