

第2章 第2節

リンゴ育種研究の進展とゲノムインフォマティクス

農研機構果樹研究所 品種育成・病虫害研究領域 國久 美由紀

1) 世界および国内におけるリンゴ生産

リンゴ (*Malus domestica* Borkh.) は、年間8千万トンもの生産量を誇る、世界的に最も重要な果樹品目の一つである (表2-2-1)。特に中国における近年の生産量の増加は著しく、2013年の生産量は2001年比で倍増している。国内における農業産出額は年間1,375億円で、農産物で第7位、果樹ではミカンに次いで第2位の経済的にも重要な品目である (2013年度農林水産統計, 2015-05-22)。国内で栽培されている品種の内訳を見ると、‘ふじ’が作付面積の50%超を占めており、次いで‘つがる’、‘王林’となっている (図2-2-1)。近年、‘シナノゴールド’や‘シナノスイート’、‘トキ’など特徴ある新品種がシェアを広げつつあるが、翌年夏まで出荷可能な優れた日持ち性と酸甘適和の良食味を持ち、栽培方法が確立している‘ふじ’の人気は根強い。しかし‘ふじ’は2001年

表2-2-1 世界のリンゴ生産

国名	生産量(トン)
1 中国	39,684,118
2 アメリカ	4,081,608
3 トルコ	3,128,450
4 ポーランド	3,085,074
5 イタリア	2,216,963
6 インド	1,915,000
7 フランス	1,737,482
8 チリ	1,709,589
9 イラン	1,693,370
10 ロシア	1,572,000
:	
19 日本	741,700
:	
計	80,822,521

FAOSTATより(2013年度)

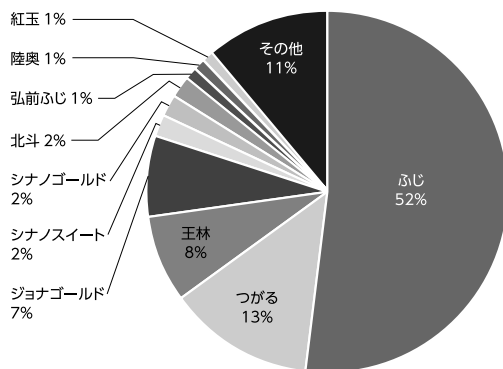


図2-2-1 国内品種作付面積比率（2011年度）

農林水産省生産局農産部園芸作物課「特産果樹生産動態等調査 平成25年12月発行」より

以降、世界においても20%超という最大シェアを占める品種となり（公益社団法人発明協会，2015-09-18），国内リンゴ産業の競争力を高めるためには，新品种開発による差別化が望まれている．現在，育成者権が消滅したものを含めて，243の品種が出願・登録されているが，病虫害や生理障害に強く‘ふじ’に勝る品種や，良着色，早生，難褐変，赤果肉など新しい需要を生み出す品種の育成が急務である．

2) リンゴ育種におけるDNAマーカー選抜

新品种の育成においては，より多くの交配実生（cross progeny）を扱うことにより，優れた品種を獲得できる確率が上昇する．しかしリンゴの果実品質（fruit quality）の優劣を評価するためには，樹が結実するまで5～8年もの長期間栽培を続ける必要があり，労力と圃場面積の限界のために，扱える交配実生の数はイネ・野菜等の草本性作物と比べて非常に限られている．このため，結実を待たず，幼苗の段階で果実品質〔糖度（soluble solids content），酸度（acidity），硬度（firmness），早生性（early ripening），収穫前落果性（pre-harvest fruit drop），日持ち性（shelf life）など〕を予測，選抜できるDNAマーカーの開発が望まれている．低エチレン生成や果皮着色といった形質につい

ては既に原因遺伝子が特定されており (Harada *et al.* 2000 ; Takos *et al.* 2006 ; Ban *et al.* 2007), 遺伝子領域内の変異を利用したDNAマーカーが海外でも利用されている (Ru *et al.* 2015). 一方, 原因遺伝子が特定されていない多くの形質については, 多数のDNAマーカーを用いた連鎖地図 (genetic linkage map) の作成と, 遺伝解析 (genetic analysis) [質的形質 (qualitative traits) については連鎖解析 (linkage analysis), 量的形質 (quantitative traits) については quantitative trait loci (QTL) 解析] により原因遺伝子の座乗する染色体上の位置を推定する作業が必要であり, 選抜用のDNAマーカー (選抜マーカー) の作成には多大な労力を伴っていた. しかし, 近年のゲノムインフォマティクスの発展により, リンゴのDNAマーカー開発と遺伝解析は, 規模およびスピードの両面で著しく進展しており, 選抜マーカーの効率的な作成を可能としている. 海外ではすでに, 黒星病抵抗性 (scab resistance), 酸度などの遺伝子座 (genetic locus) を利用して幼苗のマーカー選抜が試行されている (Ru *et al.* 2015). 本稿では, リンゴ育種におけるDNAマーカーの開発と利用について, 変遷と展望をまとめる.

3) リンゴにおけるDNAマーカー開発の進展

原因遺伝子が特定されていない形質については, まず, 原因遺伝子が座乗する染色体上の位置の推定が必要であり, そのために大量の遺伝マーカーを開発して連鎖地図を作成することが必須となる. この20年間で, 遺伝マーカーの種類は大きく変貌した. アイソザイム (isozyme) 利用に始まり, 検出に大量のDNAを要する restriction fragment length polymorphism (RFLP) マーカー, 少量のDNAで解析可能な polymerase chain reaction (PCR) に基づく random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR) マーカーを経て, 現在, 多型検出用プローブを用いたアレイシステムやシーケンシングに基づく single nucleotide polymorphism (SNP) マーカーが主流になっている. 表2-2-2にリンゴにおける各種DNAマーカー開発の変遷を示した. 1990年代は, マ

表2-2-2 リンゴの遺伝解析に用いられたDNAマーカの種類と変遷

マーカー	報告例
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	Nybohm and Schaal 1990
Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	Koller <i>et al.</i> 1993
Amplification Fragment Length polymorphism (AFLP)	Maliepaard <i>et al.</i> 1998
Simple Sequencing Repeat (SSR)	Guilford <i>et al.</i> 1997
Expressed Sequence Tag (EST)-SSR	Silfverberg-Dilworth <i>et al.</i> 2006
Single Nucleotide Polymorphism (SNP)	Chagné <i>et al.</i> 2008, 2012a Micheletti <i>et al.</i> (2011)
Restriction-site Associated DNA tags (RAD)-seq Genotyping-by-sequencing (GBS)	Baird <i>et al.</i> 2008 Gardner <i>et al.</i> 2014

マーカー開発に塩基配列情報が不要なRFLP, RAPD, AFLPマーカーが主流であり、連鎖地図もこれらのマーカーに基づいて作成されたが (Maliepaard *et al.* 1998), Guilford *et al.* (1997) 以降は、塩基配列情報を活用し、マーカーの安定性や品種間互換性に優れたSSRの開発が進められた (Liebhard *et al.* 2002; Silfverberg-Dilworth *et al.* 2006). また、発現遺伝子配列断片 (expressed sequence tag, EST) の大量シーケンスとデータベース化 (URL1-4-1) に伴い、SSRの探索が容易となり、EST-SSRが大量に蓄積された (Silfverberg-Dilworth *et al.* 2006; Celton *et al.* 2009; van Dyk *et al.* 2010; Moriya *et al.* 2012a). これらのマーカー情報の多くはGenome Database for Rosaceae (GDR, URL1-1-4) またはHigh-quality Disease Resistant Apples for Sustainable Agriculture (HiDRAS, URL2-2-1) に掲載されており、それぞれ1,062および664個のSSRマーカーを検索することが可能である (2015年5月現在). 一方, Chagné *et al.* (2008) は、ESTデータベースから7万超のSNPを検出し、460個のSNPについてマーカー化を試みた. SNPマーカーはSSRマーカーと比較して品種間の互換性は高くはないものの (Micheletti *et al.* 2011), GoldenGate (Illumina社) などのアレイシステムによる迅速大量なSNP遺伝子型判定法が開発された (Fan *et al.* 2006). 2010年にVelascoらにより 'Golden Delicious' の

全ゲノム情報が公開されて以降は、全ゲノム配列から検出した8千個から2万個のSNPマーカーについて、約100個体の遺伝子型を数日で判定できるアレイが設計された (Chagné *et al.* 2012a ; Bianco *et al.* 2014). また近年、シーケンサおよびゲノムインフォマティクス技術の発達とともに、大量のSNPの検出とそれらの遺伝子型判定をシーケンスにより同時に行う restriction-site associated DNA sequencing (RAD-seq) 法や genotyping by sequencing (GBS) 法が開発され、高密度連鎖地図を安価かつ迅速に作成することが可能となった (Baird *et al.* 2008 ; Gardner *et al.* 2014). リンゴにおいても、大量のDNAマーカーの開発とそれらの多型検出にゲノムインフォマティクスが不可欠となりつつある。

4) ‘Golden Delicious’ のゲノム解読

2010年、‘Golden Delicious’ の全ゲノム配列が解読され、GDRのウェブサイトで公開された (Velasco *et al.* 2010). 公開された配列情報では、12万個の配列断片のうち9.6万個が、SNPのマッピングによってリンゴの17本の染色体上に位置づけられている。配列断片のアセンブルの結果、リンゴのゲノムサイズは約750 Mbと推定され、このうち約7割にあたる550 Mbについて染色体上の位置が決定された (図2-2-2). この配列中には約3割の不明塩基 (N) が含まれているため、実質的に利用可能な配列情報は400 Mb以下となる。一方、リンゴゲノムの67%はトランスポゾン (transposon) を含む繰り返し配列で、遺伝子情報を含むゲノム領域は250 Mb程度であることが明らかとなり、これらの領域の coding sequence (CDS) からは約57,000の遺伝子が推定された。こうした公開情報を活用することにより、ターゲットとする遺伝子の塩基配列情報から染色体上の位置を検索すること、または、染色体上の特定の位置に存在する遺伝子や塩基多型を検索することが可能となった。

染色体上に位置づけられた ‘Golden Delicious’ の配列情報は、新規の品種や実生についてゲノム解読を行う際に、非常に有用なアセンブルの鋳型となる。つまり、ある品種のゲノム解読で得られた配列断片について、‘Golden

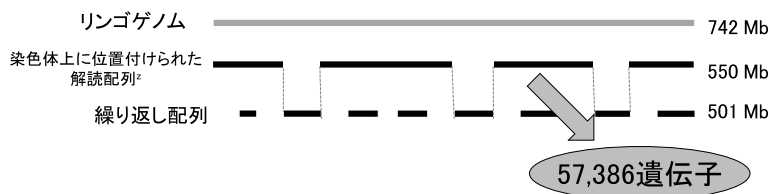


図2-2-2 ‘Golden Delicious’ 公開ゲノムの概要
 *配列は数~数百kbにわたる「N (塩基不明)」領域を約3割含んでいる。

‘Golden Delicious’ 公開配列を参照することで、連鎖解析を行うことなく他の断片との相対位置や染色体上の位置が推定できる。Bianco *et al.* (2014) は、16もの品種や系統、野生種のゲノム解読を行い、‘Golden Delicious’ 公開配列を基準にマッピングすることで、品種間でより多型頻度の高いSNPを選出し、マーカー化している。

一方で、公開配列の正確性については課題が残されている。Antanaviciute *et al.* (2012) は、公開配列をもとにリンゴゲノム全体から均等に選出されたSNPマーカーセット (Chagné *et al.* 2012a) を用いて連鎖地図を作成したところ、14%のマーカーが、公開配列から想定される位置とは異なる位置に座乗したと報告している。著者らの類似の研究でも、約3割のマーカーが想定された位置とは異なる連鎖群上に座乗した。これらの矛盾は、公開配列が作成された際のアセンブルやマッピングのミスに起因するものと考えられる。また図2-2-3に見られるように、同連鎖群上のマーカーであっても、公開配列における物理位置 (physical position) と遺伝位置が逆転するケースが多く見られ、配列断片が染色体上に逆方向に位置づけられている可能性が示唆された。一方で、図2-2-3からは、リンゴの第6番染色体では、約10 Mbにわたって組換え (genetic recombination) の起こりにくい領域が存在し、この領域にDNAマーカーを作成しても遺伝解析には非効率的であることが推測できる。以上のように、‘Golden Delicious’ 公開配列は、大量のマーカー開発、網羅的な遺伝子予測など、リンゴのゲノム構造や特性を大局的に把握する手段として大変有

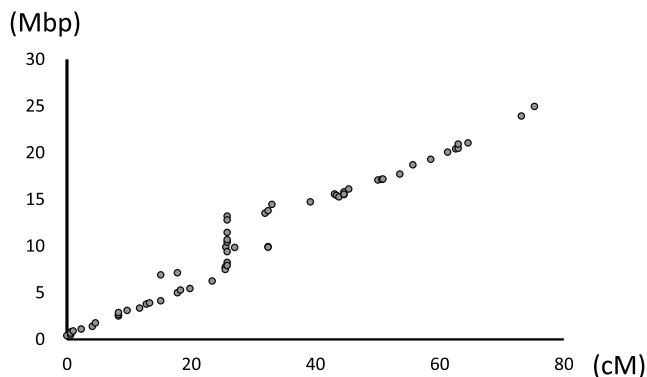


図2-2-3 公開配列における物理位置と遺伝位置の関係

GDRで公開されているintegrated map情報を用いて第6番染色体について作成した。各点はDNAマーカー、縦軸は公開配列上の物理位置、横軸は連鎖地図上の遺伝位置を示す。7-14 Mbの物理位置で、組換えが抑制されていることが分かる。

効である。しかし、特定の位置へのマーカー作成、個々の遺伝子解析など詳細な研究においては、利用者側で検証を行う必要がある。GDRにおいても、公開配列の正確性を向上させるため、新たなシークエンスデータの追加や、SNPマーカーのマッピングにより、配列が随時更新されており、2015年5月現在ではversion 3.0が公開されている。

5) 遺伝解析の発展

～連鎖地図作成から形質との連鎖解析、QTL解析、遺伝子単離まで～

リンゴの遺伝解析において、最も先行した対象形質は黒星病抵抗性である。ヨーロッパにおけるリンゴの最重要病害であることに加え、遺伝様式が単純で、単一遺伝子に支配される質的形質であるためである。同様に質的形質であるカラムナー性 (columnar, 節間が短く、コンパクトな樹形となる性質) についても、近年のゲノム情報の充実により研究が加速されている (表2-2-3)。これらの質的形質は、連鎖地図上のDNAマーカーと形質との連鎖解析により、原因遺伝子の染色体上での位置を推定できる。一方、食味 (taste and flavor) や果

表2-2-3 リンゴにおける連鎖解析およびQTL解析の報告例

形質	目的	主なDNA マーカー	ゲノム/遺伝子 情報の利用	報告
黒星病抵抗性	連鎖解析 原因遺伝子の特定	RAPD SCAR SSR	シーケンス情報 ²	Koller <i>et al.</i> 1994 Paticchi <i>et al.</i> 1999 Vinatzer <i>et al.</i> 2001, 2004
火傷病抵抗性	連鎖解析, QTL解析, 遺伝子領域の絞込み, 候補遺伝子群の予測 原因遺伝子の特定	SSR SNP	EST情報 ³	Peil <i>et al.</i> 2007, 2008 Gardiner <i>et al.</i> 2012 Fahrenttrapp <i>et al.</i> 2013
黒星病抵抗性 うどん粉病抵抗性 火傷病抵抗性	連鎖解析	SNP	ゲノム情報 ⁴	Jänsch <i>et al.</i> 2015
カラムナー性	連鎖解析, 遺伝子領域 の絞込み, 候補遺伝子 群の予測, 原因遺伝子 の特定	RAPD SCAR SSR	ゲノム情報 ⁴ シーケンス情報 ²	Hemmat <i>et al.</i> 1997 Tian <i>et al.</i> 2005 Moriya <i>et al.</i> 2009, 2012b Wolters <i>et al.</i> 2013
挿し木発根性	連鎖解析	SSR	EST情報 ³	Moriya <i>et al.</i> 2012a
萌芽時期	QTL解析	SSR	EST情報 ³	van Dyk <i>et al.</i> 2010
硬さ, 食感に関する指 標	QTL解析	RAPD RFLP	-	King <i>et al.</i> 2000, 2001
収穫日, 果実数, 果実 重, 硬さ, 糖度, 酸度, 葉 面積, 幹径, 樹高, 開花 日, 果肉褐変度など	QTL解析	RAPD AFLP SSR	-	Liebhart <i>et al.</i> 2003 Kenis <i>et al.</i> 2008
硬さ	QTL解析	AFLP SSR SNP	候補遺伝子情報	Costa <i>et al.</i> 2010
低温要求性	QTL解析, 候補遺伝子 群の予測	SSR SNP	ゲノム情報 ⁴	Celton <i>et al.</i> 2011
ポリフェノール類含有 量	QTL解析	SNP	ゲノム情報 ⁴ 候補遺伝子情報	Chagné <i>et al.</i> 2012b Verdu <i>et al.</i> 2014
アスコルビン酸関連形 質	QTL解析	AFLP SNP	候補遺伝子情報	Mellidou <i>et al.</i> 2012
果肉褐変度	QTL解析, 候補遺伝子 群の予測	SSR SNP	候補遺伝子情報	Guardo <i>et al.</i> 2013
酸度	遺伝子領域の絞込み 候補遺伝子群の予測	SSR	ゲノム情報 ⁴	Xu <i>et al.</i> 2012

² ゲノミックライブラリを作成, シーケンス情報をアセンブルして利用

³ 遺伝子発現解析データ(ESTデータ)に含まれる多型をマーカーとして利用

⁴ Velasco *et al.* (2010)により公表された‘Golden Delicious’のゲノム配列情報に含まれる多型をマーカーとして利用, または配列に基づき予測された遺伝子情報を利用

実品質、収穫期 (harvest time) や栄養成分に関わる形質の大部分は複数遺伝子に支配される量的形質で、連続的な変異を示す。これらの原因遺伝子が座乗する染色体上の位置の推定は、連鎖地図と形質値を用いたQTL解析により行う。QTL解析は、質的形質の連鎖解析と比較すると、遺伝子座乗位置の推定誤差が増大する傾向がある。また、解析にはより多くの実生個体数と、定量計測を行った表現型データ (phenotypic data) が必要とされることから、量的形質の遺伝解析は質的形質に比してやや遅れている。

ここでは、すでに原因遺伝子が単離された黒星病抵抗性およびカラムナー性の遺伝研究を例にとり、ゲノム情報の充実が遺伝研究にもたらした恩恵について述べる。野生種 (wild species) である *Malus floribunda* 821が保有する黒星病抵抗性遺伝子 (*Vf*) に連鎖するDNAマーカーの最初の開発は、RAPDマーカーを用いたバルク法 (bulked segregant analysis) によって行われ (Koller *et al.* 1994), *Vf*から10.6 cMの距離にマーカーが見つかった。その後、Maliepaard *et al.* (1998) の作成した連鎖地図により、*Vf*が第1連鎖群末端に座乗することが明らかとなった。原因遺伝子の正確な位置を把握するため、Patocchi *et al.* (1999) はBACライブラリを作成し、*Vf*の両側に座乗する2つのDNAマーカーを起点として染色体歩行 (chromosome walking) を行った。その結果、マーカーに挟まれた*Vf*の候補領域は550 kbであることが判明した。さらに染色体歩行の際に得たシーケンス情報から新たなDNAマーカーを複数作成し、より詳細な連鎖解析を行うことで候補領域を350 kbに絞り込んだ。Vinatzer *et al.* (2001) は、候補領域をカバーするクローン断片をプローブとして抵抗性品種のcDNAライブラリのスクリーニングを行い、101の候補遺伝子を得た。これらの中からトマトの葉かび病抵抗性遺伝子に高い相同性を示す遺伝子配列を発見し、*Vf*の原因遺伝子と特定した。

カラムナー性遺伝子 (*Co*) の連鎖マーカーもまた、RAPDマーカーによるバルク法により行われ、*Co*から10 cM以下の距離に2つのマーカーが作成された (Hemmat *et al.* 1997)。 *Co*は第10連鎖群に座乗し (Maliepaard *et al.* 1998), AFLPやSSRマーカーにより座乗する候補領域が数cMまで絞り込まれた (Tian

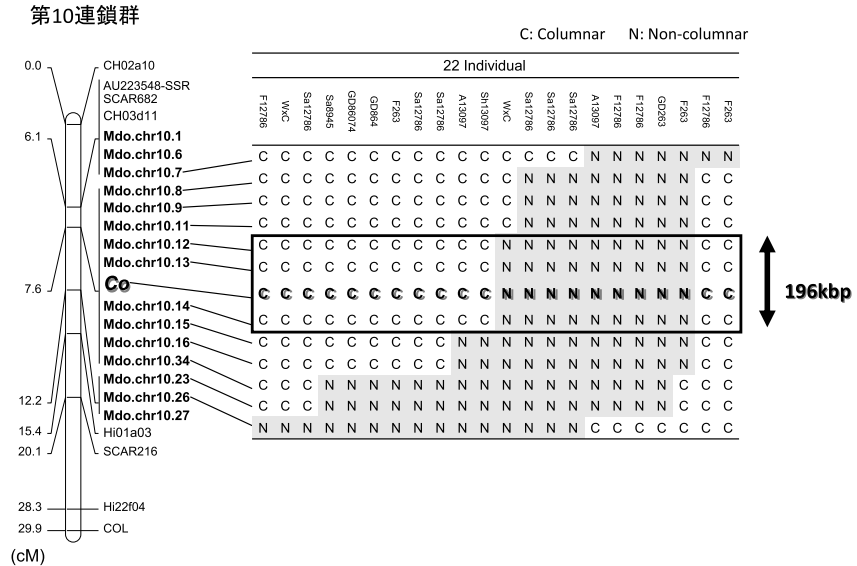


図2-2-4 リンゴゲノム情報を利用した第10連鎖群上部へのSSRマーカー設計とカラムナー性原因遺伝子領域の絞り込み (Moriya *et al.* 2012b)

カラムナー性原因遺伝子 (*Co*) の両側で最も近いとされていたSSRマーカー (CH03d11およびHi01a03) 間 (9.3 cM, 約6 Mb) のゲノム配列情報をもとに15のSSRマーカーを設計した。これにより、*Co*の位置はMdo.chr10.11およびMdo.chr10.16間 (196 kb) に限定された。

et al. 2005, Moriya *et al.* 2009). Moriya *et al.* (2012b) および Baldi *et al.* (2013) は ‘Golden Delicious’ の公開配列を利用して、*Co*が座乗する候補領域にさらに高密度にSSRマーカーを設計し、それぞれ196 kb, 393 kbにまで候補領域を限定した (図2-2-4)。公開配列情報を参照したCDS探索によると、Baldiらの限定した領域に存在する遺伝子数は36であったが、カラムナー性の原因と考えられる遺伝子は見つからなかった。そこで、カラムナー性を有する品種と有しない品種各々について、絞り込まれた領域の配列を次世代シーケンサで解読し、比較した。その結果、カラムナー性の品種にのみ非CDS領域にトランスポゾンの挿入があり、これが周辺の遺伝子発現に影響を及ぼすことでカラムナー性を誘発していることが明らかとなった (Wolters *et al.* 2013; Otto *et al.* 2014)。*Co*の単離では、‘Golden Delicious’ の公開配列を利用することで、染

色体歩行を行うことなく原因遺伝子周辺に大量のDNAマーカーを設計し、遺伝子の座乗位置を絞り込むことができた。さらに絞り込んだ領域に存在する遺伝子情報を獲得するためにcDNAライブラリを作成する必要もなく、シーケンス技術の発展により候補領域の塩基配列を網羅的に解読できた。このことが、原因遺伝子が機能的に予測のつかない類のものであったにも関わらず、単離に成功する要因となった。

質的形質のみならず、量的形質である酸度の原因遺伝子の一つ (*Ma*) についても、単離へ向けた研究が進んでいる。酸度は少なくとも二つの原因遺伝子を持つ形質であるが、*Ma*は酸度の変動の50%以上を説明できる主要な遺伝子であるため、形質が十分に分離する交配集団を利用することにより*Vf*や*Co*と同様に候補領域を絞り込むことが可能である。現時点で候補領域は第16連鎖群上の150 kpで、ここに座乗するアルミニウム活性化型リンゴ酸輸送体様遺伝子 (aluminum-activated malate transporter-like gene) が*Ma*の候補となっている (Bai *et al.* 2012; Xu *et al.* 2012)。

アレイやGBSなど、SNPマーカーの検出法が改良され、数日で数千から数万マーカーのタイピングが可能となった今、高密度連鎖地図の作成にかかる労力は大幅に削減された。今後、さまざまな形質について遺伝解析がすすみ、適切な解析用集団の保有や形質の評価方法が、研究の成功を左右する最重要課題となるであろう。

6) 今後のリンゴゲノムインフォマティクスへの期待

近年、シーケンス技術とゲノムインフォマティクスの発展により、ゲノム解読の簡易化と低価格化が著しく、遺伝解析のために解析集団自体のゲノム解読を行うことも現実味を帯びてきた。すでにBianco *et al.* (2014) は、'Delicious' '紅玉' 'McIntosh' などの主要12品種のゲノム解読を行った。一方でGDRの配列情報も、マッピング情報などを加えて日々更新されている。現時点では 'Golden Delicious' 以外のゲノム情報は公開されていないが、近い将来、主要な品種群のゲノム情報が利用可能となることが期待される。

骨格となる ‘Golden Delicious’ のゲノム配列の公開により、DNAマーカーの設計や標的領域に座乗する遺伝子の把握が効率化され、リンゴの遺伝研究は非常に有用なツールを得た。育種における遺伝解析の目的は、重要な形質の原因遺伝子を特定し、その対立遺伝子のバリエーションを把握して、交配や遺伝子操作によって育種に利用していくことである。現時点では、ターゲットとなる遺伝子配列をピンポイントで増幅し、クローニングおよびシーケンスにより様々な品種が持つ対立遺伝子 (allele) のバリエーションを探索していかなければならない。近隣遺伝子のバリエーションとの連鎖関係も調べる必要がある。今後の遺伝解析では、主要品種のリシーケンスとゲノム情報の比較により、主な育種素材が保有している対立遺伝子のバリエーションとその機能を把握し、有用な対立遺伝子を有する有望な交配親を効率的に選定していくことが期待される。

そのために障害となる一要因が、ゲノムのヘテロ接合性 (heterozygosity) である。ゲノムのヘテロ接合性は、他殖性作物 (allogamous crop) や栄養繁殖性作物 (vegetatively propagated crop) の多くで、ゲノム配列を解析する際の障壁となっている。これらの作物の実生 (seedling) は種子親 (female parent)、花粉親 (male parent) からそれぞれ異なる染色体のセットを受け継ぐため、同じゲノム領域に2種類の配列を保有している。公開されたゲノム情報 (version 1.0p) では、これらの2種類の配列は混合塩基 (ambiguous base) として表されている。そのため、やや離れた位置にある多型との関係性[連鎖の相 (phase): 塩基同士の相引 (coupling phase), 相反 (repulsion phase)] が1通りに決定できない。配列が長くなり多型部位が増えるほど、考える相のパターンは指数関数的に増加する (図2-2-5)。このことは、CDS予測やアミノ酸予測の正確性にも支障をきたし得る。正しい連鎖の相を決定できれば、より正確な転写・翻訳の予測が可能となる。さらに、近接する遺伝子の対立遺伝子のバリエーションとの連鎖関係も把握でき、育種交配親として評価するための有用な情報となる。国内の大部分のリンゴ品種は、‘国光’、‘Delicious’、‘Golden Delicious’、‘紅玉’、‘印度’、‘Worcester Pearmain’、‘McIntosh’、‘Cox

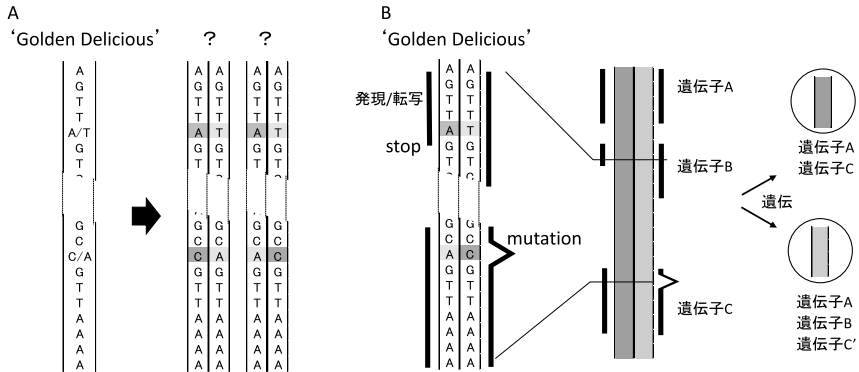


図2-2-5 将来のリンゴゲノム情報への期待

A: 'Golden Delicious' の公開ゲノム配列情報の模式図。ヘテロ接合の多型部位については、相（相引もしくは相反）が不明。

B: 相が決定されたゲノム配列情報の模式図。CDSの予測や変異部位の特定が容易になり、遺伝子のバリエーションと連鎖が明確になる。

'Orange Pipin' の 8 品種に端を発している。つまり、遺伝子領域内での組換えがないと仮定すれば、国内のリンゴ品種の保有する対立遺伝子のバリエーションは16種類程度である。これらの配列上のバリエーションを全て、正しい相で把握することができれば、国内品種の保有する多様な形質を説明できる素地が整う。断片的な次世代シーケンスデータから正しい相を決定するためには、決定したい品種の後代10個体程度のゲノム解読を行い、連鎖関係を調べる方法が考えられる。しかし、より正確な相決定のためには、倍加半数体 (doubled haploid, DH) の利用が効果的である。DHは染色体全体がホモ接合となっているため、半数体の連鎖の相がそのまま単一のシーケンスデータとして得られる。組換えの可能性を考慮すると、相を完全に把握するためには少なくとも10個体程度を解読することが望ましいが、リンゴでのDH作成は必ずしも容易ではなく、全ての主要品種から十分な数のDH個体を得るのは技術的に困難である。そこで、主要品種とDHの交雑後代個体の利用が期待される。通常、リンゴのDHは樹勢が弱く不稔 (infertile) となるが、Okada *et al.* (2009) が作成したDH 'リンゴ中間母本95P6' は花粉稔性 (pollen fertility) があり、容易に

後代を得ることができる。これら後代のゲノムを解読すれば、花粉親側の染色体の配列は常にDHと同一であるため、種子親側の配列および相が決定できる。今後、データベースに対立遺伝子のバリエーションや相に関する情報が付加されれば、遺伝解析および育種選抜における重要性はさらに高まるであろう。

引用文献

- Antanaviciute, L. *et al.* (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, Y. *et al.* (2012) 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. *Molecular Genetics and Genomics*. 287 : 663-678.
- Baird, N. A. *et al.* (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*. 3 : e3376.
- Baldi, P. *et al.* (2013) Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.) . *Molecular Breeding*. 31 : 429-440.
- Ban, Y. *et al.* (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 Physiology*. 48 : 958-970.
- Bianco, L. *et al.* (2014) Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for apple (*Malus × domestica* Borkh.) . *PLoS ONE*. 9 : e110377.
- Celton, J. M. *et al.* (2009) Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. *Tree Genetics and Genomes*. 5 : 93-107.
- Celton, J. M. *et al.* (2011) Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects on flowering dates and positional candidate genes. *New Phytologist*. 192 : 378-392.

- Chagné, D. *et al.* (2008) Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics*. 92 : 353-358.
- Chagné, D. *et al.* (2012a) Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS ONE*. 7 : e31745.
- Chagné, D. *et al.* (2012b) QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit. *BMC Plant Biology*. 12 : 12.
- Costa, F. *et al.* (2010) QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Journal of Experimental Botany*. 61 : 3029-3039.
- Fahrentz, J. *et al.* (2013) A candidate gene for fire blight resistance in *Malus × robusta* 5 is coding for a CC-NBS-LRR. *Tree Genetics and Genomes*. 9 : 237-251.
- Fan, J. B. *et al.* (2006) Highly parallel genomic assays. *Nature Reviews Genetics*. 7 : 632-644.
- Gardiner, S. E. *et al.* (2012) Putative resistance gene markers associated with quantitative trait loci for fire blight resistance in *Malus* “Robusta 5” accessions. *BMC Genetics*. 13 : 25.
- Gardner, K. M. *et al.* (2014) Fast and cost-effective genetic mapping in apple using next-generation sequencing. *G3-Genes Genomes Genetics*. 4 : 1681-1687.
- Guardo, M. D. *et al.* (2013) A multidisciplinary approach providing new insight into fruit flesh browning physiology in apple (*Malus × domestica* Borkh.) . *PLoS ONE*. 8 : e78004.
- Gulford, P. *et al.* (1997) Microsatellites in *Malus × domestica* (apple) : abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*. 94 : 249-254
- Harada, T. *et al.* (2000) An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 101 : 742-746.
- Hemmat, M. *et al.* (1997) A DNA marker for columnar growth habit in apple contains a simple sequence repeat. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 122 : 347-349.
- Jänsch, W. *et al.* (2015) Identification of SNPs linked to eight apple disease resistance loci. *Molecular Breeding*. 35 : 45.
- Kenis, K. *et al.* (2008) Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in

- apple. *Tree Genetics and Genomes*. 4 : 647-661.
- King, G. J. *et al.* (2000) Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics*. 100 : 1074-1084.
- King, G. J. *et al.* (2001) Resolution of quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture of apple (*Malus pumila* Mill.). *Theoretical and Applied Genetics*. 102 : 1227-1235.
- Koller, B. *et al.* (1993) Identification of apple cultivars using rapid markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 85 : 901-904.
- Koller, B. *et al.* (1994) DNA markers linked to *Malus floribunda* 821 scab resistance. *Plant Molecular Biology*. 26 : 597-602.
- 公益社団法人発明協会. “戦後日本のイノベーション100選”.
〈http://koueki.jiii.or.jp/innovation100/innovation_detail.php?eid=00009&age=high-growth〉参照2015-09-17.
- Liebhart, R. *et al.* (2002) Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*. 10 : 217-241.
- Liebhart, R. *et al.* (2003) Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 106 : 1497-1508.
- Maliepaard, C. *et al.* (1998) Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 97 : 60-73.
- Mellidou, I. *et al.* (2012) Allelic variation in paralogs of GDP-L-galactose phosphorylase is a major determinant of vitamin C concentrations in apple fruit. *Plant Physiology*. 160 : 1613-1629.
- Micheletti, D. *et al.* (2011) Genetic diversity of the genus *Malus* and implications for linkage mapping with SNPs. *Tree Genetics and Genomes*. 7 : 857-868.
- Moriya, S. *et al.* (2009) Development of a marker-assisted selection system for columnar growth habit in apple breeding. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 78 : 279-287.
- Moriya, S. *et al.* (2012a) Aligned genetic linkage maps of apple rootstock cultivar ‘JM7’ and *Malus sieboldii* ‘Sanashi 63’ constructed with novel EST-SSRs. *Tree Genetics and Genomes*. 8 : 709-723.
- Moriya, S. *et al.* (2012b) Fine mapping of *Co*, a gene controlling columnar growth

- habit located on apple (*Malus × domestica* Borkh.) linkage group 10. Plant Breeding. 131 : 641-647.
- Nybom, H. *et al.* (1990) DNA “fingerprints” applied to paternity analysis in apples (*Malus × domestica*). Theoretical and Applied Genetics. 79 : 763-768.
- 農林水産統計. “平成25年主要農産物の産出額および構成比”.
〈<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001129518>〉 参照2015-05-22.
- Okada, H. *et al.* (2009) Characterization of fertile homozygous genotypes from anther culture in apple. Journal of the American Society for Horticultural Science. 134 : 641-648.
- Otto, D. *et al.* (2014) The columnar mutation (“*Co* gene”) of apple (*Malus × domestica*) is associated with an integration of a Gypsy-like retrotransposon. Molecular Breeding. 33 : 863-880.
- Patocchi, A. *et al.* (1999) Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple resistance gene *Vf*. Molecular Genetics and Genomics. 262 : 884-891.
- Peil, A. *et al.* (2007) Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus × robusta* located on linkage group 3. Plant Breeding. 126 : 470-475.
- Peil, A. *et al.* (2008) Confirmation of the fire blight QTL of *Malus × robusta* 5 on linkage group 3. Acta Horticulturae. 793 : 297-303.
- Ru, S. *et al.* (2015) Current applications, challenges, and perspectives of marker-assisted seedling selection in Rosaceae tree fruit breeding. Tree Genetics and Genomes. 11 : 8.
- Silfverberg - Dilworth, E. *et al.* (2006) Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. Tree Genetics and Genomes. 2 : 202 - 224.
- Takos, A. M. *et al.* (2006) Light induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. Plant Physiology. 142 : 1216-1232.
- Tian, Y. K. *et al.* (2005) Mapping *Co*, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers. Euphytica. 145 : 181-188.
- van Dyk, M. M. *et al.* (2010) Identification of a major QTL for time of initial vegetative budbreak in apple (*Malus × domestica*, Borkh.). Tree Genetics & Genomes. 6 : 489-502.
- Velasco, R. *et al.* (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). Nature Genetics. 42 : 833-839.

- Verdu, C. F. *et al.* (2014) QTL analysis and candidate gene mapping for the polyphenol content in cider apple. PLoS ONE. 9 : e107103.
- Vinatzer, B. A. *et al.* (2001) Apple contains receptor - like genes homologous to *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance. Molecular Plant - Microbe Interact. 14 : 508-515.
- Vinatzer, B. A. *et al.* (2004) Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab - resistant accessions in *Malus* germplasm. Plant Breeding. 123 : 321 - 326.
- Wolters, P. J. *et al.* (2013) Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe (II) oxygenase. New Phytologist. 200 : 993-999.
- Xu, K. *et al.* (2012) Genetic characterization of the *Ma* locus with pH and titratable acidity in apple. Molecular Breeding. 30 : 899-912.