

ISSN 2187-3771

BULLETIN
OF
APPLE RESEARCH INSTITUTE
LOCAL INDEPENDENT ADMINISTRATIVE INSTITUTION
AOMORI PREFECTURAL INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH CENTER
No. 37
March, 2025

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
研究報告
第 37 号
令和 7 年 3 月

APPLE RESEARCH INSTITUTE
LOCAL INDEPENDENT ADMINISTRATIVE INSTITUTION
AOMORI PREFECTURAL INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH CENTER
KUROISHI, AOMORI, JAPAN

(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所
036-0332 青森県黒石市大字牡丹平字福民 24

地方独立行政法人
青森県産業技術センター
りんご研究所研究報告

第 37 号

地方独立行政法人
青森県産業技術センター
りんご研究所研究報告

第 37 号

令和 7 年 3 月

目 次

リンゴの果肉褐変性に関する包括的形質解析による遺伝要因の研究

田沢純子 1 ~ 70

リンゴ新品種 ‘あおり 24’ ・ ‘あおり 25’ ・ ‘紅はつみ’ について

工藤 剛・今 智之²⁾・鈴木長蔵²⁾・石山正行²⁾・佐藤 耕²⁾・北山 弘²⁾・
町田郁夫²⁾・深澤(赤田)朝子¹⁾・後藤 聡・葛西 智・田沢純子

..... 71 ~ 94

¹⁾弘前工業研究所 ²⁾退職

BULLETIN
OF
APPLE RESEARCH INSTITUTE
LOCAL INDEPENDENT ADMINISTRATIVE INSTITUTION
AOMORI PREFECTURAL INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH CENTER
No, 37
March, 2025

Contents

Studies for Genetic Factor of Flesh Browning in Apple by Comprehensive Traits
Analysis

Junko Tazawa 1 ~ 70

New Apple Cultivars, 'Aori24', 'Aori25', 'Benihatsumi'

Tsuyoshi Kudo, Tomoyuki Kon²⁾, Chozo Suzuki²⁾, Masayuki Ishiyama²⁾,
Takashi Sato²⁾, Hiroshi Kitayama²⁾, Ikuo Machita²⁾, Tomoko Fukasawa-Akada¹⁾,
Satoshi Goto, Satoshi Kasai, Junko Tazawa

..... 71 ~ 94

¹⁾Hirosaki Industrial Research Institute

²⁾Retired

リンゴの果肉褐変性に関する包括的形質解析による遺伝要因の研究

田沢 純子

(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)

Studies for Genetic Factor of Flesh Browning in Apple by Comprehensive Traits Analysis

Junko Tazawa

Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center
Kuroishi, Aomori, 036-0332 Japan

キーワード：リンゴ，果肉褐変，果汁褐変，難褐変性リンゴ，ポリフェノール含量，ポリフェノール酸化酵素，QTL解析，ハプロタイプ，GWAS

2024年12月26日受理

本報告は筑波大学大学院生命環境科学研究科学学位論文として提出された。

目 次

I 緒 言	3
1. リンゴの起源と遺伝解析	3
2. 酵素的褐変	4
3. 褐変性に関する遺伝解析と育種	5
II 果肉褐変性に関する QTL 解析	9
1. 材料及び方法	10
2. 結 果	13
3. 考 察	21
4. 摘 要	28
III QTL に関するハプロタイプ解析及び主要形質との連鎖関係	28
1. 材料及び方法	29
2. 結 果	31
3. 考 察	36
4. 摘 要	37
IV GWAS による果肉褐変関連遺伝子領域の解析	37
1. 材料及び方法	38
2. 結 果	40
3. 考 察	49
4. 摘 要	50
V 総合考察	51
VI 総合摘要	56
引用文献	57
Summary	69

I 結 言

1. リンゴの起源と遺伝解析

リンゴ (*Malus ×domestica* Borkh.) はバラ科 (Rosaceae) モモ亜科 (Amygdaloideae), ナシ連 (Pyreae), リンゴ属 (*Malus*) に分類される。バラ科には約 90 属 2500 種があり, 温帯地域由来の種を中心に多様な植物が含まれる (Hummer and Janick, 2009)。リンゴ, アンズ (*Prunus armeniaca* L.), オウトウ (*Prunus avium* L.), モモ (*Prunus persica* L.), スモモ (*Prunus salicina*), ウメ (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.), セイヨウナシ (*Pyrus communis* L.), ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai), ビワ (*Eriobotrya japonica* Lindl.), イチゴ (*Fragaria ×ananassa*), マルメロ (*Cydonia oblonga* Mill.) 等の果実やアーモンド (*Prunus dulcis* Mill.) 等のナッツ, 観賞用のバラ (*Rosa* sp.) といった多くの商業作物が属しており, 特にリンゴとイチゴは経済的に重要である。

果樹の多くは, モモ連 (核果類) とナシ連 (仁果類) に属している。核果類には, モモ, オウトウ, スモモ, アンズ, ウメ等が含まれ, 仁果類には, リンゴ, ナシ, マルメロ, ビワ等が含まれる。いずれも基本的には 2 倍体で, 核果類の染色体基本数は 8 本, 仁果類の染色体基本数は 17 本である。半数体あたりの推定ゲノムサイズはモモが 265 Mbp であるのに対し, リンゴは 742.3 Mbp, セイヨウナシは 600 Mbp である (Yamamoto et al., 2016)。現在栽培されているリンゴは *M. pumila* と *M. sylvestris* (Dunemann et al., 1994), *M. sieversii*, *M. orientalis*, *M. prunifolia* (Juniper et al., 1999) を起源とし, 原産地はユーラシア大陸中央部のコーカサス地方とトルキスタン地方とされている (Vavilov, 1930)。

リンゴは歯ざわりが良く, 多果汁であり, 甘酸のバランスのとれた食味から, 生果のみならず加工品への利用も多く, 重要な商業果樹として位置付けられている。糖分, ペクチン, 食物繊維, ビタミン, ミネラル, 抗酸化物質であるポリフェノール等栄養分が多く, 低脂肪である。生食用のほかに, 加工利用としてカット製品, ジュース, プレザーブ (缶詰), シードル, ドライフルーツ等の製品へも使用されている。世界生産量は, 果物ではバナナ, カンキツに次いで第 3 位 (年間 8 千 314 万トン) であり, 栽培面積は 4,933,841 ha にも及ぶ (FAOSTAT, <http://faostat.fao.org>, 2017)。温帯地域や亜寒帯地域を中心に世界各地で栽培されており, 中国, インド, ロシア, 欧州諸国やアメリカで栽培面積が広い (Fig. 1-1a)。国内においては, 青森県が 54.2% を占める 19,800 ha と最も栽培面積が広く, 次いで長野県が 7,290 ha, 岩手県が 2,340 ha となっている (農林水産省大臣官房統計部, 2018, Fig. 1-1b)。

世界には 10,000 以上の品種があるとされている (Way et al., 1990)。最も生産量が多い品種は‘ふじ’

であり (O'Rourke et al., 2003), 広く栽培されている品種として, ‘ゴールデンデリシャス’, ‘デリシャス’, ‘グラニースミス’, ‘ガラ’等があげられる。公的機関や企業を中心に, 食味や外観の良さ, 貯蔵性等品質の向上と, 収量や病害抵抗性等, 安定生産性を重視して品種開発が行われてきた。近年ではこれらに加えて, 地球温暖化による品質低下や果実障害の発生, 消費量の漸減等へ対応するために, 温暖化への適応力の高さ, 省力栽培適性, 調理・加工適性等, 優れた特性を備えた魅力ある新品種の開発が求められている。

リンゴの新品種開発には長い年月と労力を要する。要因として, 個体サイズが大きいこと, 幼若期が長く樹が成熟するまで果実の評価ができないことがあげられる (Luby and Shaw, 2001; Rikkerink et al., 2007)。10a あたり 300~400 個体が圃場に定植できる個体数の限界であり, 育成できる実生数には限りがある。また, 交配から結実, 果実形質の評価までは 8~10 年の時間を要するため, 評価ができないまま長期間圃場が占拠され, その間の維持管理にも労力を要する。さらに, 自家不和合性であるため雑種性が高く, 栽培品種であってもイネ等の様に遺伝的に均一ではないため, 後代の形質予測やコントロールは非常に困難である。形質が優れた品種同士の交配でも, 不良な形質を持つ後代が多数出現し, 優良個体が得られる確率は極めて低い。

育種効率化のために, 遺伝解析やゲノム育種の進展が求められるが, 果樹のゲノム解析は上述の問題のために時間を要する。原因遺伝子が同定できない形質の遺伝解析では, 多数の DNA マーカーを用いた連鎖地図の作成や, DNA マーカーと対象形質との連鎖解析によって原因遺伝子の座乗する染色体やその位置を推定する必要がある。リンゴの遺伝マーカー開発はアイソザイムに始まり, RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeat), SCAR (sequence characterized amplified region) が利用されてきた (Karp and Edwards, 1998; Pereira-Lorenzo et al., 2009)。これらのマーカー情報は Genome Database for Rosaceae (GDR: www.rosaceae.org) や High-quality Disease Resistant Apples for Sustainable Agriculture (HiDRAS: www.hidras.unimi.it) で公開されており, 検索・利用することが可能である。近年では, SSR マーカーより費用対効果が高く, ハイスループットのスクリーニングと高密度マッピングが可能な SNP (single nucleotide polymorphism) マーカーが開発されており, リンゴでは Illumina Infinium II システム, Axiom 等の SNP アレイが開発された (Chagné et al., 2012a; Bianco et al., 2014, 2016)。また, ‘ゴールデンデリ

ジャス'の全ゲノムが解読されて GDR のウェブサイトで公開となり (Velasco et al., 2010), さらに, 倍加半数体である GDDH13 を使った更新版が公開され (Daccord et al., 2017), リンゴのゲノム構造や特性の把握に役立っている. これにより, ゲノムワイドな DNA マーカーの設計効率が高まり, 詳細な遺伝解析が可能となっている.

量的形質遺伝子座の解析 (quantitative trait loci 解析, 以下 QTL 解析) では, 異なる形質をもつ親同士の交配により育成した分離集団の連鎖地図を作成し, DNA 多型と表現型との関係から関与する遺伝子の数や染色体上の位置, 遺伝効果及び交配親の保有する形質関連因子の変異を推定することができる. リンゴでは, 自家不和合性のために自殖 F₂ 世代の作出が困難なため, F₁ 世代を使ったダブルシュードテストクロス法 (Grattapaglia and Sederoff, 1994) によって両親の 2 つの連鎖地図を作成し, 解析に用いてきた.

欧州では'プリマ'×'フィエスタ'の F₁ 集団を用いた連鎖地図が作成され (King et al., 1991; King, 1994), 黒星病抵抗性 (Vf), 酸度, アブラムシ抵抗性の遺伝子座がマッピングされた (Maliepaard et al., 1998; King et al., 1999). 'プリマ'では 194 マーカー-842 cM, 'フィエスタ'では 163 マーカー-984 cM の全 17 連鎖群をカバーする連鎖地図が構築された. また, 両親の地図に共通する 67 マーカーを含む 290 マーカー (124 の RFLP マーカー, 133 の RAPD マーカー, 10 の SSR マーカー, 17 のアイソザイム, 4 種類の AFLP, CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) と 2 つの SCAR マーカー) からなる統合連鎖地図も作成され, 果肉の食感についての QTL 解析も行われた (King et al., 2000). Liebhart et al. (2003b) は'フィエスタ'×'ディスカバリー'の F₁ 集団を用いて合計 840 の AFLP, RAPD, SSR 及び SCAR マーカーを座乗させた両親の地図を報告し, これらは現在も有用な参照地図となっている.

リンゴではこれまでに, 黒星病抵抗性 (Belfanti et al., 2004), 低エチレン生成 (Harada et al., 2000), 果皮色 (Takov et al., 2006; Ban et al., 2007) 等の有用な質的形質について原因遺伝子が特定されており, これらの遺伝子から開発された DNA マーカーはリンゴの育種プログラムの中でマーカー利用選抜に利用されている (Ru et al., 2015). 近年は, 量的形質である果汁酸度 (Xu et al., 2011; Zhang et al., 2012), 果実の肉質 (Chagné et al., 2014; Longhi et al., 2012, 2013a, 2013b; Sun et al., 2015), 果肉硬度 (Chagné et al., 2014; Sun et al., 2015), 果肉の硬さと軟化 (Costa et al., 2010), 収穫期 (Liebhart et al., 2003a; Kenis et al., 2008; Kunihisa et al., 2014) について QTL が報告されている. また, 多様な遺伝資源を用いた genome-wide association study (GWAS) も行われており, 果肉質, 硬度, 酸度, 香氣成分等の QTL が報告されている (Kumar et al., 2013). GWAS は集団における DNA マーカー多型と表現型の関係から QTL を検出

する方法であり, 連鎖地図に基づく QTL 解析のように交配によって分離集団を作成することなく, 遺伝資源をそのまま利用することができる. 集団における連鎖不平衡 (linkage disequilibrium: LD) をカバーする高密度なマーカー使用が必要であるが, 連鎖地図に基づく QTL 解析で親の効果に差がなかった場合には検出できない広範囲の QTL を明らかにできる可能性がある.

これらの解析によって育種上重要な形質を支配する原因遺伝子や QTL が特定され, DNA マーカーが開発されることにより, 交配親の選定や圃場定植前の交雑実生のスクリーニングを効率的に行うことができ, 品種誕生の確率は飛躍的に向上する. そのため, 特に樹体サイズと幼若期の問題を抱える果樹育種においては DNA マーカーの利用価値は非常に高く, 今後更なる発展が期待される.

2. 酵素的褐変

食品の酵素的褐変は外観の新鮮さを損なう重大な負の現象であり, 多くの加工業者は褐変防止に多大な労力を費やしている. 褐変により商品価値が低下して問題となっている青果物は, レタスやキャベツ等の葉物野菜, イモ類 (ジャガイモ, サツマイモ, ビート), マッシュルーム, アボカド, バナナ, ブドウ, リンゴ, モモ, ナシ等多岐にわたる. ジャガイモでは褐変により収穫から出荷, 貯蔵, 流通, 販売過程で生産量の 20% が廃棄されるなど, 褐変による食品のロスは大であり (Whitaker and Lee, 1995), そのコントロールは食品の加工, 貯蔵上重要な課題である (Haruta et al., 1998; Martinez and Whitaker, 1995).

酵素的褐変は食品中のポリフェノール類が酵素的に酸化し反応性に富んだキノン体を生じ, その後, 化学的な重合反応により安定的な褐色の色素に変化することで起こる (Murata et al., 1995a). 細胞内では, 基質であるポリフェノール類は液胞中に, 酸化酵素であるポリフェノールオキシダーゼ (polyphenol oxidase: PPO; EC 1.10.3.1) はプラスチドもしくは葉緑体中に局在する. リンゴ果肉では果実の成熟に伴って一部の PPO は可溶化, 分解するものの (Murata et al., 1997), 液胞内のポリフェノールとは分かれて存在するため, 反応は起こらない. しかし, 細胞の老化による構造の崩壊や, カット等による細胞の破壊により, 局在性が失われることで基質と酸素が接触して反応し, 褐変してしまう.

褐変を防止する方法としては, 酸素の除去, pH の調節 (pH 4.0 以下), 温度の調節 (5~10°C の低温), 褐変防止剤の利用がある. 褐変防止剤には, PPO 阻害剤又は還元剤があり, 阻害剤としては PPO の活性中心の銅を封鎖する銅キレート剤 (NaCl 等) や, 基質と競合して PPO の活性中心部に優先的に結合し, 基質の酸化を防止する拮抗的阻害剤 (桂皮酸等), PPO の疎水領域に結合して活性を阻害する非拮抗的阻害剤 (アルコール等) がある. その他, 蜂蜜等から天然の PPO 阻害作用を示すペプチドが報告

されている (Oszmianski and Lee, 1990). 還元剤は PPO の作用で基質から最初に生成されるキノンを還元して元に戻すもので、アスコルビン酸や亜硫酸塩等がある. しかし添加物として使用される場合、亜硫酸塩を含むものは健康に悪影響を及ぼす懸念がある (Lester, 1995). また、褐変防止剤の浸漬処理では、その後のカットや損傷等による二次的な褐変までは抑えることができない.

野菜や果物には多種多様なフェノール類と、PPO をはじめとするフェノール類の酸化酵素が存在するため、褐変を引き起こしやすい. アンズやナシではクロロゲン酸、カテキン、エピカテキン等が PPO の主な基質として報告されている (Radi et al., 1997; Richard-Forget and Gauillard, 1997). リンゴでは、クロロゲン酸、フロレチン配糖体及びプロシアニジン類が主なポリフェノール成分である. ポリフェノールは褐変を引き起こす主要因のひとつであるが、一方でその抗酸化作用が健康によいとされており、機能性成分として注目されている. 抗酸化、抗炎症、抗腫瘍及びエストロゲン活性等を有しており、心臓病や癌予防効果が示唆されている (Hertog et al., 1993; Jang et al., 1997; Steinberg et al., 1989; Frankel et al., 1998; Arai et al., 2000). また、苦みや甘さ、渋さ等の味や香り (風味) にも影響している (Tomás-Barberán and Espín, 2001).

PPO は一般に pH 4.0~7.0 の間でよく作用し、最適触媒温度は 25~50°C であり、70~80°C で失活することが知られている. 植物における PPO の役割は完全には分かっておらず、一部の植物で害虫に対する防御反応が報告されているにとどまる (Barbehenn et al., 2007; Wang and Constabel, 2004). PPO は一部の植物種には存在しないため、植物において必須酵素ではないと考えられており、ジャガイモ (Bachem et al., 1994) では PPO のアンチセンス DNA を組み込んで PPO 活性を制限した組換え体が作出されたが、生育への明らかな害は報告されていない.

様々な植物種で、褐変程度に対するポリフェノール含有量及び PPO 活性の関与が報告されている. Tsurutani et al. (2000) はナシとリンゴの褐変性を比較し、ナシでは PPO 活性はリンゴと同程度だが、基質量が少ないため褐変程度は低いことを報告している. モモの果肉の褐変では品種間差が報告されており、数品種の果実の褐変程度と PPO 活性、クロロゲン酸とプロアントシアニジン量を測定した結果、PPO 活性はいずれも褐変を起こすのに十分な強さをもっているが、褐変程度の小さい品種では基質であるクロロゲン酸が著しく少ないことから、ポリフェノール含量が褐変の支配因子であることが報告されている (中林ら, 1963; Lee et al., 1990). ビワにおいてもポリフェノール含量と褐変の強さに密接な相関が認められている (Ding et al., 1998). ヤムイモ (Ozo and Caygill, 1986)、ジャガイモ (Sapers et al., 1989)、アボカド (Golan et al., 1977)、オリーブ (Sciancalepore, 1985) ではポリフェノール含量の他に PPO 活性にも褐変程度が制

御されていることが報告されている. 一方、スモモでは、ポリフェノール量と PPO 活性が十分にあるにもかかわらずほとんど褐変しない品種があり、PPO 活性を阻害する成分の存在が示唆されている (小宮山, 1987).

リンゴでは、一般に基質であるポリフェノール類と PPO が十分に存在するため即時に褐変し (村田, 2007)、'ふじ' (Fig. 1-2) をはじめとするほとんどの品種は褐変する. 果肉の褐変程度は品種によって異なること (Coseteng and Lee, 1987; Murata et al., 1995a)、また、果実のポリフェノール含量と PPO 活性にも品種間差があることが知られている (Podsdek et al., 2000; Holderbaum et al., 2010). 褐変程度は、PPO 活性、ポリフェノール含量、アスコルビン酸含量等の要因の組合せによって異なると考えられている (Janick et al., 1996). 褐変後のリンゴ果肉ではポリフェノール含量の低下が報告されており (Amiot et al., 1992; Murata et al., 1995a)、抗酸化能が低下すると考えられる.

近年、食の簡便化・外部化といった生活スタイルの変化から、より手軽に食べられる果物や品種の人氣が高まっている. しかし、リンゴは切っただけ食べなければ褐変する、皮をむくのが面倒など、口へ運ぶまでの煩雑さは否めず、これが購入頻度を制限する要因のひとつといえる. 最近では持ち運びしやすく食べやすいカットりんごやドライ加工品等の需要が増加傾向にあり、酸化防止処理や密封包装技術によって商品性が維持されている. 褐変し難い特性をもつ「難褐変性品種」を利用することで、加工過程での褐変防止処理の軽減に繋がり、処理コストや人件費の削減のみならず、製菓用、離乳食・介護食、無添加加工品のほか、中食・外食産業での新規利活用も期待できる. 「褐変し難い」特性は消費者が煩わしいと感じていた問題を解決し、分かりやすいフレーズでアピールできるため、消費拡大の一助となることが期待される.

3. 褐変性に関する遺伝解析と育種

褐変性はリンゴやモモにおいて遺伝的に安定した形質であり (Sun et al., 2014; Peace et al., 2005)、かつ商業作物にとって負の形質である. 褐変性を抑えた品種の育成は様々な作物において目標となっており、原因遺伝子や遺伝様式の解明に多くの研究者が取り組んでいる. モモでは貯蔵中に生じる果肉の内部褐変に関する QTL 解析の報告がある (Ogundiwin et al., 2008). リンゴの果肉褐変性に関する遺伝解析については、Mellidou et al. (2012)、Guardo et al. (2013)、Sun et al. (2014) による QTL 解析、Kumar et al. (2013) による GWAS の報告がある.

基質であるポリフェノールに関する遺伝解析では、ポリフェノール合成経路上 (Fig. 1-3) の遺伝子が深く関わっていることが示されている. ナシでは、*phenylalanine ammonia lyase (PAL)* 発現量とフェノール類合成の密接な関連 (Yan et al., 2014)、クロロゲン酸合成経路の *hydroxycinnamoyl*

CoAshikimate (*PbHCT1* 及び *PbHCT3*) 遺伝子の発現量とクロロゲン酸含有量の関連が報告されている (He et al., 2017). また、リンゴのポリフェノール類についての QTL 解析では、ポリフェノール生合成経路上の遺伝子の関与が, Chagné et al. (2012b), Khan et al. (2012) によって報告された。

PPO 遺伝子 (*PPO*) は、多くの植物種において報告のある multi-gene family である。トマトでは 7 つの遺伝子ファミリーがあり (Thipyapong and Steffens, 1997), タバコでは 10 個, 豆では 5 個の *PPO* が存在する (Cary et al., 1992). 異なる種間の遺伝子間の相同性は通常低く約 50% だが, トマトとジャガイモのような近縁種間では相同性が 80~95% と高い。ジャガイモでは, *PPO* として報告がある *Pot32* 遺伝子について, 遺伝子組換えで働きを抑制し褐変し難いジャガイモが育成された (Llorente et al., 2011). また, *Pot32* 対立遺伝子を利用した選抜による品種育成の可能性も示された (Werij et al., 2007). リンゴの *PPO* の多くは第 5, 第 10 連鎖群に座乗するとされている。カナダの企業 Okanagan Specialty Fruits Inc. はリンゴの *PPO* 遺伝子ファミリーを 4 つのグループ (*PPO2*, *GPO3*, *AP05*, *pSR7*) に分類し, これらの配列について特許を出願している (Armstrong and Lane, 2009). さらに, これら 4 つの *PPO* の発現を遺伝子導入による RNAi で抑制した Arctic® Apples を開発した (Carter, 2012). ‘グラニースミス’や‘ゴールデンデリシャス’の成熟果の *PPO* 活性を 90% 抑制し, 果実の褐変を大幅に抑えることにより, 収穫や輸送による切り傷や押し傷, 収穫後の細胞死等に起因する褐変による商品ロスを最小限に抑え, カットフルーツの褐変防止剤の使用を削減し, リンゴのカットフルーツ市場への普及を促進することで利益を得ることができると宣伝している。

交配育種で育成された難褐変性品種はほとんどなく, 海外では‘エデン’, ‘ゴールドラッシュ’, NY674 (Khanizadeh et al., 2006; Janick et al., 1996) の報告に限られる。その理由として, 交配における難褐変性個体の出現率が低い, あるいは難褐変性形質と劣悪形質が連鎖している等の原因により, 難褐変性品種の育成が難しいことが考えられる。日本国内では, りんご研究所 (青森県黒石市) においてすり下ろした果肉が 5 日間経っても褐変しない, 世界的にも稀少な特性をもつ‘あおり 27’ (品種登録番号 16787, 商標登録名「千雪」, 商標登録番号第 5129548 号) が育成された (Fig. 1-4). この優れた特性についてアメリカで特許を取得し (2008, No. US 8,704,050 B2; Noro et al., 2009; Igarashi et al., 2016), ‘Chiyuki’ として中国 (登録番号 20156221, 2015) と韓国 (登録番号 6239, 2016) で品種登録された。‘あおり 27’の果肉が褐変しない要因は, *PPO* 活性が極めて低く, 果肉のポリフェノール含量が少

ないためと考えられている (Noro et al., 2009; Igarashi et al., 2016).

‘あおり 27’は, 1983 年に‘金星’×‘マヘ 7’ (5 号 (‘印度’×‘ゴールデンデリシャス’) ×‘レッドゴールド’) を交配した実生集団から, 1995 年に着色と食味の良さで一次選抜され, 2004 年に系統名「青り 27 号」として二次選抜, 2008 年に品種登録された (Fig. 1-5). 育成地における収穫期は 10 月中下旬で, 果形は円～円錐形, 果重は 300~350g 程度, 果皮色は濃紅色でさび状の果点が目立つ特徴的な外観である。硬度は 18 lbs, 糖度は 15 °Brix, 酸度は 0.3 g/100 mL 程度で, 甘味で果汁が多く芳香があり, 食味良好である (Table 1-1). 収穫前落果はみられず, 樹勢は中程度で生育に問題はなく, 斑点落葉病には‘つがる’並に強い抵抗性を示し, その他病害虫に対しては一般防除で問題ない。貯蔵性は普通冷蔵で約 2 か月, CA (Controlled Atmosphere) 貯蔵で約 5 ヶ月程度である。カットしてもすり下ろしても果肉が褐変しないことから, カットフルーツや離乳食, 介護食, 既存品種では難しかった酸化防止剤無添加製品の製造等への利用といった新たな加工用途の需要喚起が期待され, 本研究では難褐変性品種の中でも特に‘非’褐変性品種と定義する。しかし, ‘あおり 27’ 1 品種では周年供給は不可能であり, 早生から晩生までの様々な収穫期の品種や, 長期貯蔵が可能な品種の開発が必要である。前述したとおり, 通常の交配育種での育成は極めて困難なため, 遺伝解析によって遺伝様式と原因遺伝子領域を明らかにし, 早期実生選抜に利用可能な DNA マーカーを開発する必要がある。これまで, ‘あおり 27’の非褐変特性に関する遺伝様式は不明であり, 後代へ遺伝するかどうかも明らかになっていなかった。さらに, ‘あおり 27’の交配親やその祖先は全て褐変する品種であり, その遺伝的背景も未解明であった。‘あおり 27’や, その後代, 祖先及び多様な遺伝資源を対象とした遺伝解析を行うことで, 褐変性と関連する遺伝子領域や遺伝特性, 果肉の褐変程度を抑えるために必要な遺伝的条件を明らかにすることができれば, 育種利用への道が開ける。

本研究では, II において, ‘あおり 27’を片親とする 2 つの F₁ 集団を用いて, 果肉褐変性, 果汁褐変性, 総ポリフェノール含量, *PPO* 活性及び果実形質を調査し, 連鎖地図を用いた QTL 解析によって遺伝特性及び原因遺伝子領域を明らかにすることを試みた。また, III において, 原因遺伝子領域のハプロタイプ解析により, その由来と成立条件について考察するとともに, 酸度等の主要形質との連鎖関係を明らかにした。さらに, IV において, 多様な品種群を対象とした褐変関連形質の GWAS を行うことで, より広範な原因遺伝子領域の解明を試み, V の総合考察において, 褐変性に関与する作用因子及び利用価値の高い非褐変性リンゴ品種育成への利用と今後の展望について考察した。

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり、終始適切なご指導、ご鞭撻を賜り、また多大なる御校閲の労をとっていただいた筑波大学大学院生命環境科学研究科 國久美由紀准教授ならびに山本俊哉教授に深く感謝の意を表す。また、深遠なるご助言と温かい激励を賜り、また御校閲の労をとっていただいた筑波大学生命環境科学研究科 菅谷純子教授、杉浦俊彦教授、森口卓哉教授、林武司教授に深く感謝の意を表す。

本研究の遂行にあたり、適切なご助言と叱咤激励を賜った(地独)青森県産業技術センターりんご研究所品種開発部長(当時)赤田朝子氏、初山慶道氏に深く感謝の意を表す。

農研機構果樹茶業研究部門(当時)押野秀美氏には本研究の遺伝解析実施にあたり、多大な労力を賜り、心より感謝の意を表す。

中核研究者育成事業により大学院派遣に際して多大なるご支援をいただいた、(地独)青森県産業技術センター理事長(当時)の渋谷義仁理氏ならびに成田勝治氏をはじめ関係者の方々に深謝の意を表す。また、本研究を遂行するにあたり、ご理解及びご支援いただいた、(地独)青森県産業技術センターりんご研究所長(当時)の荒井茂充氏、今村友彦氏、福士好文氏をはじめ職員の方々に深く感謝の意を表す。

Table 1-1. Fruit characteristics of ‘Aori 27’ compared to ‘Fuji’ at Aomori ^a.

Cultivar	Date of harvest	Fruit weight (g)	Flesh firmness (lbs)	Soluble solids content (°Brix)	Acidity ^b (g/100 mL)
Aori 27	October 19	325	18.8	15.0	0.32
Fuji	November 7	341	16.0	14.4	0.36

^a Average of 2007 to 2017 using five fruits every year.

^b Titratable acidity as malic acid.

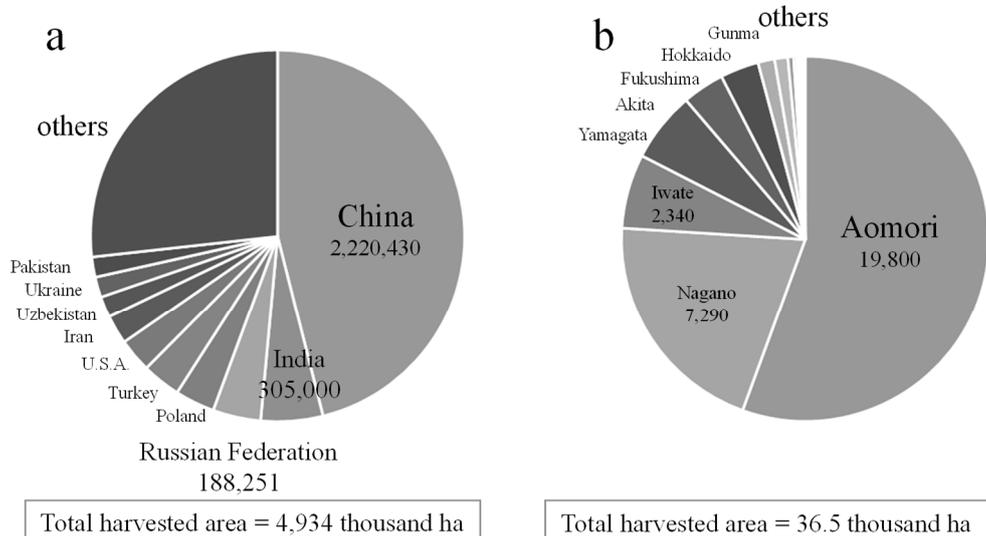


Figure 1-1. Harvested area (ha) of apple in the world (a; FAOSTAT 2017, <http://faostat.fao.org>) and in Japan (b; Statistics Department, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2018).

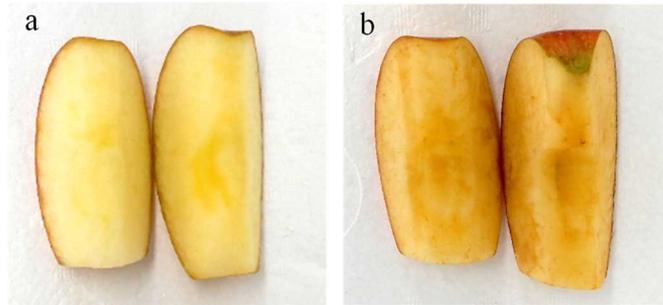


Figure 1-2. Apple slices of ‘Fuji’; after cutting 0-h (a) and 24-h (b).

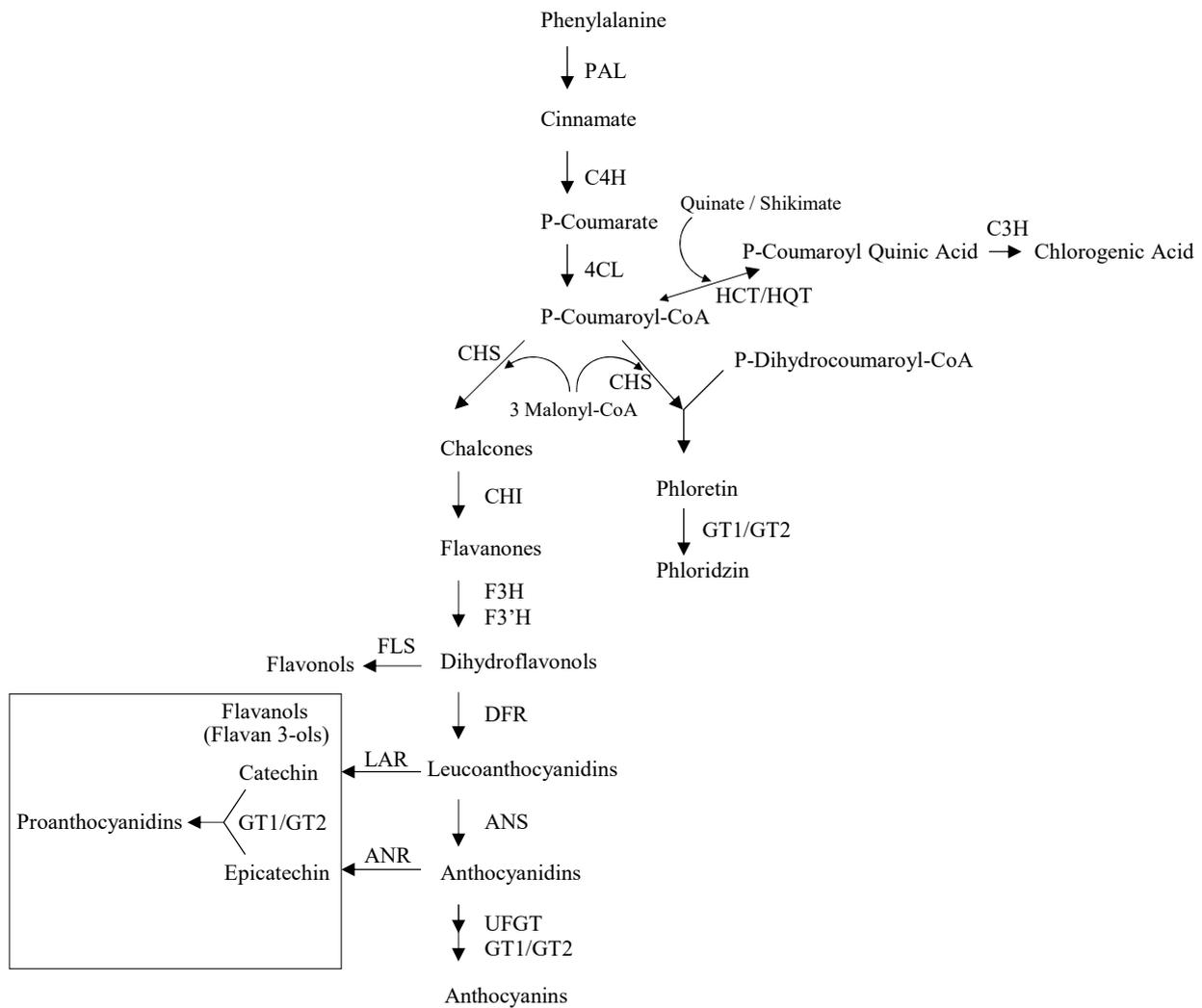


Figure 1-3. Polyphenol biosynthesis pathway in apple. Chemical compounds, synthetic substrates and enzymes were shown in the pathway. The explanation of abbreviations is as follows; ANR, anthocyanin reductase (BANYULS); ANS, anthocyanin synthase (LDOX); C3H, p-coumarate 3-hydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CHI, chalcone isomerase; CHS, chalcone synthase; DFR, dihydroflavonol reductase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavanone 3'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; GT1, glucosyl transferase; GT2, glucosyl transferase; HCT/HQT, hydroxycinnamoyl CoA shikimate/quinic hydroxycinnamoyl transferase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; PAL, phenylalanine ammonia lyase; UFGT, UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase.

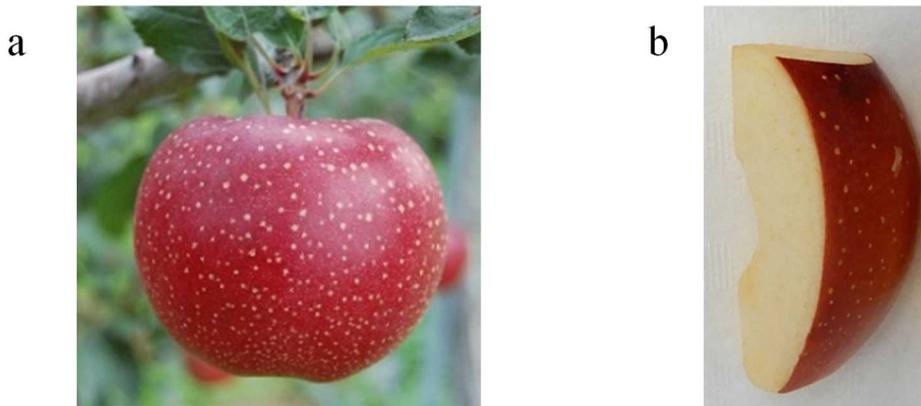


Figure 1-4. Apple cultivar ‘Aori 27’ (a), which was bred from a ‘Kinsei’ × ‘Mahe 7’ cross at the Apple Research Institute of Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center. The slice after cutting (24-h) was shown (b).

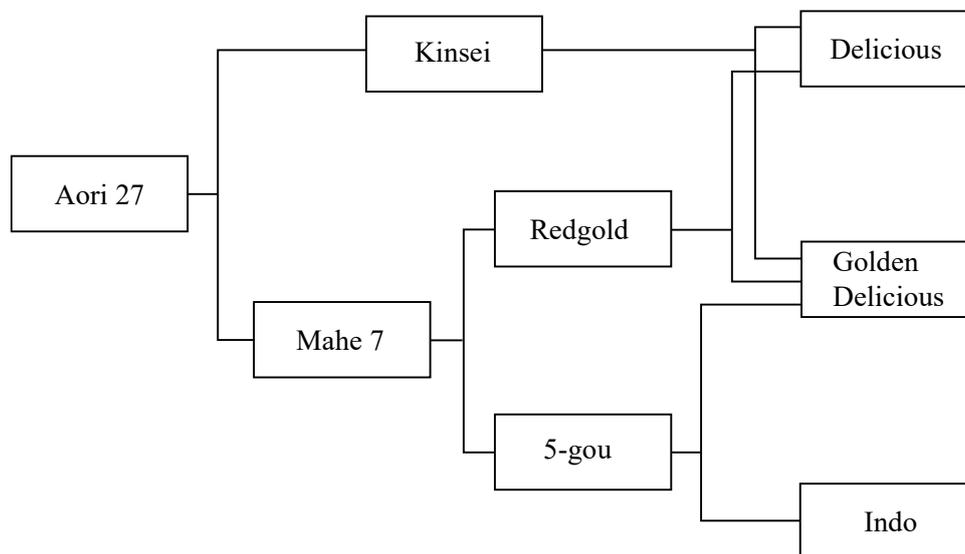


Figure 1-5. Pedigree of the ‘Aori 27’ apple.

II 果肉褐変性に関する QTL 解析

褐変は外観の新鮮さを損ね、流通販売業者、加工業者及び消費者にとって商品性を低下させる負の現象である。カット等により細胞が破壊されると、褐変基質であるポリフェノール類とそれを酸化する PPO の細胞内での局在性が失われて反応し、生じたキノン体の化学的重合反応等によって褐色の色素が生じる (Murata et al., 1995a)。リンゴの果肉ではポリフェノール類と PPO が十分に存在するため、細胞が破壊された場合、ほとんどの品種は数分で褐変する。リンゴ果肉の褐変の程度、ポリフェノール含量及び PPO 活性は品種によって異なる (Coseteng and Lee, 1987; Murata et al., 1995a)。褐変性は安定な遺伝形質であり (Coseteng and Lee,

1987; Murata et al., 1995a)、他作物の先行研究では、果実のポリフェノール含量との相関が報告されている (Lee et al., 1990; Ding et al., 1998)。

リンゴの果肉褐変性に関する遺伝解析については、Mellidou et al. (2012), Guardo et al. (2013), Sun et al. (2014) による QTL 解析, Kumar et al. (2013) による GWAS の報告がある。第 3 番, 第 9 番, 第 10 番, 第 11 番, 第 14 番, 第 15 番, 第 16 番及び第 17 番染色体に QTL が報告されているが、これらが検出される領域は同染色体上でも報告によって異なる場合があり、寄与率は小～中程度で、効果の大きい QTL は見つかっていない。現段階では原因遺伝子や遺伝様式は不明であり、品種育成へ

の利用は難しい。基質であるポリフェノール含量に関する遺伝解析の報告では、ポリフェノール生合成経路上の遺伝子が深く関わっていることが示されている (Chagné et al., 2012b; Khan et al., 2012) が、褐変性との関連は示されていない。PPO 活性についての遺伝解析の報告は無いが、カナダの企業 Okanagan Specialty Fruits Inc. が PPO の発現抑制により開発した Arctic® Apples は果肉の褐変性が大幅に抑制されたことから (Carter, 2012), PPO が重要な褐変要因であることが予測される。交配による難褐変性品種の育成は難しいと考えられ、原因遺伝子領域及び遺伝様式の特異性と DNA マーカーの開発が不可欠である。

りんご研究所において‘金星’×‘マヘ 7’の交配育種で育成された‘あおり 27’は、すり下ろした果肉が 5 日間経っても褐変しない稀少な品種であり、本研究では難褐変性品種の中でも特に、非褐変性品種と定義した。‘あおり 27’の非褐変性は、PPO 活性が極めて低く、果肉のポリフェノール含量が少ないためと考えられている (Noro et al., 2009; Igarashi et al., 2016)。この優れた非褐変特性によって加工労力の軽減や付加価値をつけた新製品の開発、果実の消費拡大への寄与が期待されるが、‘あおり 27’1 品種のみでは周年供給は出来ないため、リレー販売が可能な収穫期の異なる品種や長期貯蔵向け品種の育成が必要である。しかし、‘あおり 27’の非褐変特性に関する遺伝様式は不明であり、さらに、育成過程で使用された交配親やその祖先は全て褐変する品種であるため、遺伝的背景も未解明である。

‘あおり 27’の非褐変特性に関して 2 つの遺伝的要因が考えられる。まず、突然変異による‘あおり 27’のポリフェノール生合成経路あるいは PPO 生合成に関わる遺伝子の破壊と、機能喪失の可能性があげられる。もう一つは、育成過程において、祖先品種が保有するポリフェノール含量や PPO 活性の低下を引き起こすアレルが集積された可能性である。これまで、‘あおり 27’のような素材を用いた集団での遺伝解析の報告例はない。

本章では果肉褐変性に関する原因遺伝子や遺伝様式の特異性の解明のために、‘あおり 27’と褐変性を有する親 (F1-165 及び‘こうたろう’) を交配した 2 つの F1 集団について、それぞれの両親の連鎖地図を構築し、褐変関連形質について QTL 解析を行った。形質調査について、既報 (Millidou et al., 2012; Guardo et al., 2013; Sun et al., 2014) では果実のカット面で褐変程度を評価しているが、本研究ではより厳しい酸化条件であるすり下ろしによって褐変性を高感度に検出した。さらに、褐変性に関連する複数形質 (果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO 活性) 及び酸度等の果実形質を調査し、それぞれの QTL と果肉褐変性との関連を考察した。

1. 材料及び方法

1) 材料

F1-165×‘あおり 27’ 50 個体 (165A27 集団) 及び‘こうたろう’×‘あおり 27’ 55 個体 (KA27 集団) を供

試した。F1-165 はりんご研究所において 1976 年に‘ゴールデンデリシャス’と‘紅玉’を交配した実生集団から一次選抜された系統であるが、既に淘汰され、DNA のみ保存されている。2000 年、2003 年、2005 年の果実調査の記録では (未発表データ)、果実重 340 g、糖度 14.5 °Brix、酸度 0.8 g/100 mL でやや酸味がある赤い果皮の系統であり、すり下ろした果肉は褐変するが、果汁の褐変程度は低い。‘こうたろう’は‘ふじ’×‘はつあき’の交配で育成され (Soejima et al., 2012)、甘酸適和で赤い果皮の品種であり、すり下ろした果肉や果汁は数分で褐変する。

‘あおり 27’と F1-165 及び‘こうたろう’の交配は 2002 年に実施し、2003 年に交雑種子を播種した。各個体から採取した穂木を‘青台 3’台木に接ぎ木して F1 集団を育成し、りんご研究所藤崎圃場 (青森県南津軽郡藤崎町) に栽植距離 4 m×0.5 m で定植した。

2) 果実形質評価

F1 集団の各個体と、交配親である‘あおり 27’及び‘こうたろう’について、すり下ろし 24 時間後及び 15 分後の果肉褐変指数 (Index-number of brownig: INB)、24 時間後の果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO 活性、収穫期、果実重、果汁の滴定酸度、糖度、果皮のアントシアニン含量の 10 項目の果実形質を評価した (Table 2-1)。

2014 年及び 2015 年の 9 月中旬から 11 月上旬にかけて F1 集団の果実の熟度を調査し、ヨードでんぷん反応指数 (青森県りんご生産指導要項, 2014) 2.5 を下回った個体について、中庸な 3 果を供試した。形質評価には、果皮及び芯を取り除いた果肉部分を用い、太陽光等の環境要因によるばらつきを補正するために、各果実の陽向面と陰向面の果肉を混合した。果肉褐変性はすり下ろし後室温下で放置した果肉について、6 段階の指数で評価した (Fig. 2-1a: INB)。

すり下ろし 24 時間後の INB (24-h) は 2014 年及び 2015 年に、15 分後の INB (15-min) は 2015 年のみ調査した。果実ごとに 0 (無)、1 (微)、2 (僅か)、3 (中程度)、4 (強)、5 (甚) として評価し、各個体の 3 果平均値を解析に使用した。すり下ろし 24 時間後の INB 平均値に基づき、F1 個体を非褐変性 ($0 \leq \text{INB} < 0.5$)、難褐変性 ($0.5 \leq \text{INB} < 1.5$)、弱褐変性 ($1.5 \leq \text{INB} < 2.5$)、中褐変性 ($2.5 \leq \text{INB} < 3.5$)、強褐変性 ($3.5 \leq \text{INB} < 4.5$)、甚褐変性 ($4.5 \leq \text{INB}$) に分類した。これにより、本研究では $0 \leq \text{INB} < 0.5$ 、 $0.5 \leq \text{INB} < 1.5$ 及び $1.5 \leq \text{INB} < 5$ の品種/個体について、それぞれ非褐変性、難褐変性及び褐変性と定義した。また、2 年間の INB (24-h) を用い、Kunihisa et al. (2014) の方法に従って遺伝率を算出した。

果汁褐変性の評価には、搾汁後 0 時間から 24 時間までの 400 nm の吸光度の変化を ΔA_{400} 値として算出して用いた ($\Delta A_{400} = A_{400} (24 \text{ 時間後}) - A_{400} (0 \text{ 時間})$)。10 g の果肉をナイフで 3 mm 角程度にカットし、蒸留水 20 mL を加えて process homogenizer

(PH91/SMT Inc., Tokyo, Japan) で 15,000 rpm で 30 秒間破碎後、直ちに濾紙を用いて吸引濾過し、濾液を 1.5 mL マイクロチューブに移して 9,700 ×g で 15 分間遠心分離した。上清 1 mL を 2.5 mL マイクロチューブに移して 25°C で 24 時間インキュベートした後、4% (w/v) メタリン酸溶液 1 mL を加えて酵素反応を停止させ、分光光度計 (UV-1800; Shimadzu, Kyoto, Japan) で 400 nm の吸光度を測定して A₄₀₀ (24 時間後) 値とした。A₄₀₀ (0 時間) の測定は同一果実を用いて行い、カット後の果肉に 2% (w/v) メタリン酸溶液 20 mL を加えて上記と同様に調製し、24 時間インキュベート後に等量の 2% (w/v) メタリン酸溶液を加えて吸光度を測定した。

総ポリフェノール含量の測定は、3 mm 角程度にカットした果肉 1 g を直ちに 80% メタノール 3 mL が入った 15 mL チューブに移し、90°C で 10 分間煮沸して PPO を失活させた。その後、phycotron homogenizer (Microtec Inc., Chiba, Japan) を用いて 12,000 rpm で破碎し、プローブを 80% メタノール 3 mL でウォッシュした溶液と併せ、蒸留水で 10 mL に定容した。1,600 ×g で 10 分間遠心分離し、上清を分析まで -20°C で保存した。総ポリフェノール含量は Folin-Denis 法 (Folin and Denis, 1915; Swain and Hillis, 1959) で定量し、果肉 100 g あたりのカテキン含量として換算した。

PPO 活性は Murata et al. (1995a) の方法を改変して測定した。果肉 0.5 g をポリプロピレンチューブに入れ、氷冷下で冷 100% アセトン 2 mL を加えて Phycotron homogenizer を用いて 12,000 rpm で破碎した。その後、4°C、13,000 ×g で 5 分間遠心分離して上清を捨て、沈殿に 4 mL の冷 80% アセトンを加えて攪拌後に遠心分離して上清を捨て、沈殿物をドラフトで風乾させてアセトンパウダーとし、分析まで -20°C で保存した。酵素活性測定には、アセトンパウダー全量に氷冷した 5 mL の McIlvaine buffer (0.1M citrate, 0.2M phosphate pH 5.0) を加え、30 秒間ホモジナイズして 4°C、29,000 ×g で 5 分間遠心分離した上清を PPO 粗酵素抽出液として使用した。活性測定時の酵素反応液の組成は、PPO 粗酵素抽出液 100 μL、超純水 1000 μL、McIlvaine buffer 700 μL、1 mM クロロゲン酸溶液 200 μL とした。反応液はウォーターバスを用いて 30°C でプレインキュベートし、PPO 粗酵素抽出液を活性測定直前に加えた。30°C、325 nm での吸光度を活性測定開始から 10 秒間隔で 8 分間測定し (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)、測定サンプル毎に反応曲線を作成して酵素活性の算出に用いた。Murata et al. (1995a) の定義に従い、1 分間あたりの吸光度 0.01 の低下を 1 unit とし、果肉 1 g あたりに換算した (この単位 (unit) は国際標準単位とは異なるものである)。

収穫期は‘あおり 27’の収穫日を基準 (0) として週数の差を算出し、それ以前に収穫された個体は (-)、後に収穫された個体は (+) 週数として数値化した。糖度及び酸度の測定には果肉をジューサーで絞リ、

果汁を濾紙で濾過したものを使用した。糖度 (°Brix) は屈折糖度計 (PR-101; Atago CO., LTD., Tokyo, Japan) で測定し、酸度は滴定酸度を測定後、リンゴ酸含量 (g/100 mL) に換算した。果皮のアントシアニン含量は Siegelman and Hendricks (1958) の方法を改変して測定した。コルクボーラー (Φ11mm) を用いて陽向面及び陰向面の果皮から 5 枚ずつディスクを採取し、それぞれ 1% 塩酸メタノール溶液 5 mL 中で 24 時間暗黒化に静置して色素を抽出した。抽出液の 530 nm での吸光度を測定し、陽向面及び陰向面の単位面積当たり (cm²) のアントシアニン含量を算出し、それらの平均値を cyanidin-3-galactoside 含量に換算した。

形質分布の正規性は R v. 3.3.3 software (R Core Team, 2017) を用いて、Shapiro-Wilk test により閾値 $P = 0.05$ で検定した。

3) 連鎖地図の作成

F₁ 集団の各個体と、‘あおり 27’及び‘こうたろう’の幼葉から DNeasy plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。F₁-165 は現存しないため、CTAB 法で抽出、保管しておいたゲノム DNA を使用した。F₁ 集団のジェノタイプングには 547 の SSR マーカー (リンゴ由来 401 マーカー、ナシ (*Pyrus* spp.) 由来 146 マーカー) 及び 1 種類のリンゴ由来 CAPS マーカーを使用した。これらの多くは既報の DNA マーカーであるが (Table 2-2), *Leucoanthocyanidin reductase 1* (*LARI*) 近傍に作成した 2 種類の SSR マーカー (LAR_{SSR1_02} 及び LAR_{SSR 1_11})、PPO 近傍に作成した 4 種類の SSR マーカーと 1 種類の CAPS マーカー (‘5563 CAPS’: forward primer 5'-TCCCAAGTTTCCCTACTCACAA-3', reverse primer 5'-GATTGGCGTTGATTGTGGTTTC-3', 増幅産物を *Pst*I 酵素で処理することにより 222 bp と 550 bp に切断) を含む 19 の新規マーカーを解析に加えた (Table 2-3)。SSR の増幅は Kunihisa et al. (2014) の方法に従った。PCR 増幅産物は DNA シーケンサー (3130 xl Genetic Analyzer, ABI Life Technologies, CA, USA) を使用して分離、検出し、GeneMapper v. 3.1 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用してフラグメント解析を行った。1 つのマーカーで複数の座が検出された場合は、マーカー名に番号を付加して区別した。連鎖地図は JoinMap v. 4.1 software (Van Ooijen, 2006) を使用し、ダブルシュードテストクロス法 (Grattapaglia and Sederoff, 1994) により作成した。マーカーの分離データは“BC” (back cross) 集団解析モジュール用に変換し、regression mapping 法により LOD (logarithm of odds) 3.0~9.0 でグループ化した。地図の距離はソフトウェアが提供する Kosambi マッピング機能を使用して算出した。構築された連鎖群 (linkage group:LG) は既報の地図 (Liebhard et al., 2003b; Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Kunihisa et al., 2014) を参照して番号をつけ、SSR 座の並び順の妥当性を確認した。

Table 2-1. Phenotypic traits used for the QTL analysis in the F₁ progeny of F1-165 × ‘Aori 27’ and ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’

Traits	Description of measured parameter and assessment type	Evaluated year
Index-number of browning (24-h)	Visual inspection of browning degree of the fruit juice after 24 h: 0, none; 1, slight; 2, mild; 3, moderate; 4, severe; 5, extremely severe	2014, 2015
Index-number of browning (15-min)	Visual inspection of browning degree of the fruit juice after 15 min: 0, none; 1, slight; 2, mild; 3, moderate; 4, severe; 5, extremely severe	2015
Juice browning (ΔA_{400})	Difference of absorbance at 400 nm (24-h measurement minus 0-h measurement)	2014
Total polyphenol content (mg/100g FW)	Total polyphenol content of the flesh, measured by the Folin-Denis method	2014
PPO activity (units/g FW)	PPO (polyphenol oxidase) activity of flesh, determined spectrophotometrically using chlorogenic acid as the substrate at 30 °C, pH 5.0. Decrease of absorbance at 325 nm of 0.01 per minute was considered to be 1 unit of PPO activity	2014
Harvest time (week)	Number of weeks after (or before) fruit of ‘Aori 27’ reached harvest time	2014, 2015
Weight (g)	Average weight of mature fruits	2014
Acidity (g/100 mL)	Acidity of juice, measured by titrating the sample with 0.1 N NaOH. Titratable acidity was calculated as malic acid (g) per 100 mL of sample	2015
Soluble solids content (°Brix)	Brix value of juice obtained using a refractometer	2015
Anthocyanin content in peel ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Average anthocyanin content in fruit peel	2015

Table 2-2. Molecular markers mapped on the genetic linkage maps obtained from the F₁ progeny of F1-165 × ‘Aori 27’ and ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’

Marker type	Marker designation	References
Apple SSRs	AF, AJ, AT, AU, CN, Hi, U, Z, GD, MDAJ	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)
	CH, MS, COL	Liebard et al. (2002)
	CH-Vf1, CH-Vf2	Vinatzer et al. (2004)
	LAR _{SSR}	Present study (Table 2-3)
	MEST	Moriya et al. (2012), Present study (Table 2-3)
	Mdo.chr	Kunihisa et al. (2014), Present study (Table 2-3)
	NZ	Guilford et al. (1997)
	NZms	Celton et al. (2009)
	PPO _{SSR}	Present study (Table 2-3)
	SAmS	Van Dyk et al. (2010)
	U50187SSR	http://www.hidras.unimi.it/indexx.php
	Pear SSRs	EMPC
HGA, KA		Yamamoto et al. (2002c)
IPPN		Inoue et al. (2007)
NH		Yamamoto et al. (2002a, 2002b), Sawamura et al. (2004), AB302413-302421
NB		Yamamoto et al. (2002a), Sawamura et al. (2004), AB302423-302443
TsuENH		Nishitani et al. (2009), AB621906-621908, AB853161-853256, Present study (Table 2-3)
TsuGNH		Yamamoto et al. (2013), AB733186-733293, AB851450-851453, Present study (Table 2-3)

Table 2-3. Newly designed SSR markers

SSR locus	Chr position ^a	Origin	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Motif	PCR product size (bp)
LAR _{SSR1_01}	chr16_3352356	apple	GTGGATGGGGGAGACTGTTA	CTCCACCTAAAACGCAAAA	(GAG)7	135
LAR _{SSR1_02}	chr16_3352925	apple	TGCCATGTTTATGGGATTTGA	CGTTACATTGGTGCATGAGG	(GA)9	248
LAR _{SSR1_03}	chr16_3408352	apple	GGTAGTCCTTTCTCCTCGGC	TAAATGGCAGGTGCATCAGA	(AAT)6(ATT)5	280
LAR _{SSR1_04}	chr16_3409136	apple	TGGATACAGGAACCAAAACA	GCCCTTCCACTGCAAAATTA	(AT)15	239
LAR _{SSR1_05}	chr16_3410788	apple	GTCTGCCACCATTAAAGCG	TAGCAACAGCGAGTCTACG	(TTATT)4	275
LAR _{SSR1_06}	chr16_3417038	apple	TCAGCTGAGCTTTGGAGGTT	TTTCCATGGTTTTACTGGCG	(AAAAC)4	209
LAR _{SSR1_07}	chr16_3420761	apple	CTCATGCAACCATGCAGAT	CACCCTTAATTTCTTGAGGA	(AC)9	202
LAR _{SSR1_11}	chr16_3424458	apple	GGGGATGGATCCCTTCTCTA	CCTGGCTACCTCTCCTCTT	(AG)23	264
LAR _{SSR1_12}	chr16_3424863	apple	TATTTCCATGCCACCCTTTC	CGCATGAGACTGAAAGCCA	(TC)8	134
LAR _{SSR1_13}	chr16_3426877	apple	ACACGCATGGCTAGTTTGGT	GGTGTGCAGTATCATCAA	(TA)35	250
LAR _{SSR1_15}	chr16_3429885	apple	CACCATAGACATCTGTTACACTCG	TTTTGGTTCAITGGAGATGC	(ATT)11	270
LAR _{SSR1_16}	chr16_3428667	apple	CGGGATTCGGGAAAATAAAT	TGACTCGGTGCTGAGTTTTG	(AT)8	172
LAR _{SSR1_18}	chr16_3440092	apple	ACGACGGGTAAGGTGATGTC	CCCCTTTTCTACTGCCACAA	(AGA)5	255
LAR _{SSR1_19}	chr16_3442129	apple	GGCATCTAATCCCTTGGT	CAGGACCTGCAATTGTACATC	(AT)9	225
LAR _{SSR1_20}	chr16_3445530	apple	TTGGCATTCAACAGCTGC	TCCTGAGGACAAGTGAGGCT	(AC)9	171
Mdo.chr1.02	chr01_11388751	apple	GCTGGTTCTCCACTGAAGC	CTCCGACTCCCGACTCAATA	(CT)10	225
Mdo.chr1.03	chr01_14186381	apple	CGAAGGAGGTTCCGACATA	TAAAGACGTTTCGACCTGGG	(AT)6	240
Mdo.chr1.07	chr01_15519912	apple	TCCTTTGAGGAAAATGCACC	TCATCAAATCCTCACCCACA	(TA)13	307
Mdo.chr1.12	chr01_28202027	apple	CCGTTAGTGCAACAACTAAG	GTGGCTCACGATTACTTCCC	(AT)11.5	338
Mdo.chr1.13	chr01_27442990	apple	TCATGGGCTCTCCATAAAG	CAACACGCGAGCACAACACTAC	(TA)13.5	347
Mdo.chr1.14	chr01_27769117	apple	GCTGAGCCTGTCTCCATC	CCCAATGTCTTCGGATACCA	(CT)15.5	211
MEST055	chr13_2731944	apple	GAATGTGATTTCCTTGCCT	GAAAGCAGCTAGCTGCGAA	(AG)13	188
MEST087	chr2_3489378	apple	ACGGTTTTCCGATTCTCCTT	CCCTAAAATCCCTCCCTCT	(AG)14	134
PPO _{SSR} _chr10_04	chr10_38664835	apple	TCCTGTCCTTTCACTCTTG	TGCGTATCTCTTCAATCTCT	(AT)13.5	269
PPO _{SSR} _chr10_06	chr10_38692774	apple	TGACCCATTACACATTCCA	AACCGAAACTGTCAAACCG	(AT)10.5	188
PPO _{SSR} _chr10_14	chr10_38760327	apple	ACGTTGGGATGCTCAAATTC	TGATACGACCTTCGGCTCTC	(GA)8.5	110
PPO _{SSR} _chr10_16	chr10_38774645	apple	AACTGGAGAAGGCATTGTGG	GAAACAACACCCCTACCTCT	(AG)9	165
TsuENH030		pear	TTATCGATATGATGCGTGTGAGC	ATCATAGCCCCATTTACAGACA	(CT)12.5	187
TsuENH237		pear	AAAAGACGACGACGACGA	ATACACCACCAACCTCTCC	(TC)23.5	333
TsuGNH077		pear	CGGTGCATGCTCAGGTA	CCTCTCTTCTGGAGCTCTTT	(TAGC)6	337
TsuGNH231		pear	TCCAGGTTGAAAAGACGACC	GGGGTCTGGAATGTGAAT	(AACAA)4	346

^a Apple Genome GDDH13 by Daccord et al. (2017)

4) QTL 解析

165A27 集団については F1-165 と‘あおり 27’, KA27 集団については‘こうたろう’と‘あおり 27’の連鎖地図を用いて, INB (15 分及び 24 時間後), 果汁褐変性 (24 時間後), 総ポリフェノール含量, PPO 活性, 収穫期, 果実重, 酸度, 糖度, 果皮アントシアニン含量について年次ごとの形質データで QTL 解析を行った. QTL 解析には MapQTL v. 6.0 software (Van Ooijen, 2009) を使用した. 評価形質の多くは非正規分布であったため, 解析はノンパラメトリック検定である Kruskal-Wallis (KW) test module を用いて行い, K^* 値のピークが $P < 0.0005$ であった座を QTL として同定した. KW test で検出された QTL の寄与率を評価するために, Restricted multiple QTL mapping (rMQM) を以下の手順で行った. まず 5000 回の permutation test によりゲノムワイドで有意 ($P < 0.05$) な LOD の閾値を決定し, 次に, interval mapping で閾値を超えるピークが検出されたゲノム領域を仮の QTL とし, 最も近いマーカーを cofactor に設定して multiple QTL mapping (MQM) analysis を行った. MQM で cofactor を設定した同一連鎖群に, 他に有意な QTL が検出されないことを確認した上で, rMQM を実施し, QTL の信頼区間及び寄与率を確認し, 参考とした.

2. 結果

1) 形質評価

親品種である‘あおり 27’と‘こうたろう’のすり下ろし 24 時間後の褐変程度は明らかに異なっており, INB (24-h) はそれぞれ 0 と 4 であった (Fig. 2-1b). 本研究において‘あおり 27’は非褐変性 ($0 \leq \text{INB} < 0.5$), ‘こうたろう’は褐変性 ($1.5 \leq \text{INB} < 5$) と定義された. F1-165 については現存しないため調査することはできなかった.

165A27 集団では, 2014 年は褐変関連形質 (INB (24-h), 果汁褐変性, ポリフェノール含量, PPO 活性), 収穫期, 果実重について 49 個体を調査し, 2015 年は INB (24-h 及び 15-min) について 41 個体, 収穫期, 酸度, 糖度及び果皮アントシアニン含量について 43 個体を調査した. 2014 年及び 2015 年の 2 か年の調査で, 全 50 個体の INB (24-h) を

評価した. 本集団の INB (24-h) は 0 から 5 の範囲に広く分布し, 2014 年は集団の約 1/3 にあたる 17 個体, また, 2015 年は 1/6 にあたる 8 個体が非褐変性個体 ($0 \leq \text{INB} < 0.5$) と判定された (Fig. 2-2). INB (24-h) の広義の遺伝率は 0.826 と高く, 果肉褐変性は遺伝的要因によって制御されていることが示された (Table 2-4). 果汁褐変性に関しては, 集団の半分を占める 25 個体が‘あおり 27’の値 ($\Delta A_{400}=0.1$) よりも低い値であった. 総ポリフェノール含量は 22.5 mg/100g FW から 137.2 mg/100g FW の範囲に分布し (平均 75.6 mg/100g FW), PPO 活性は 12.1 units/g FW から 145.3 units/g FW の範囲に分布した (中央値 55.1 units/g FW) (Table 2-5).

KA27 集団では, 上述の形質について 2014 年は 54 個体, 2015 年は 53 個体を調査し, 2 か年の調査で全 55 個体の INB (24-h) を評価した. 本集団では 2014 年は 2 個体が非褐変性個体 ($0 \leq \text{INB} < 0.5$) であったが, 2015 年は 0 個体であった (Fig. 2-3). INB (24-h) の広義の遺伝率は 0.753 であり, 165A27 集団と同様, 遺伝的要因の強さを示した (Table 2-4). 果汁褐変性については集団の約 1/3 が‘あおり 27’ ($\Delta A_{400}=0.1$) よりも低い値を示した. 総ポリフェノール含量は 22.7 mg/100g FW から 148.0 mg/100g FW の範囲に分布し (中央値 60.1 mg/100g FW), PPO 活性は 16.6 units/g FW から 139.6 units/g FW (中央値 49.1 units/g FW) の範囲に分布した (Table 2-6).

他の全ての形質も F₁ 集団で広い分離を示した (Fig. 2-2, Fig. 2-3). Shapiro-Wilk test の正規性検定の結果, ほとんどの形質が非正規分布であり, 165A27 集団の総ポリフェノール含量, 糖度, 酸度, 果重及び KA27 集団の INB (24-h) (2015 年), 果実重のみ正規分布であった. 形質間の相関関係を比較すると, 165A27 集団においては, 果汁褐変性, 総ポリフェノール含量, PPO 活性が INB (24-h) と高い相関を示し (各々相関係数 $R=0.87, 0.78, 0.74$), これらが果肉褐変性の重要な要因であることが示された (Fig. 2-4). これらの形質は KA27 集団においても INB (24-h) と相関を示したが (各々相関係数 $R=0.73, 0.67, 0.45$), 165A27 集団より低い傾向があった (Fig. 2-5).

Table 2-4. Genetic variance and heritability of INB (24-h)

Population	Genetic variance (σ_g^2)	Broad-sense heritability (h^2)
165A27	2.08	0.826
KA27	0.876	0.753

Table 2-5. Distribution of fruit phenotypic traits of parents and F₁ progeny of F1-165 × ‘Aori 27’

Traits	2014						2015					
	F1-165	Aori 27	F ₁ progeny				F1-165	Aori 27	F ₁ progeny			
			Min ^b	Max ^c	Median	Mean			Min	Max	Median	Mean
Index-number of browning (24-h)	nd ^a	0	0	5.0	2.0	2.1	nd	0	0	4.0	2.3	2.1
Index-number of browning (15-min)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0	0	3.0	0.5	0.8
Juice browning (ΔA ₄₀₀)	nd	0.10	-0.09	0.53	0.10	0.17	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total polyphenol content (mg/100g FW)	nd	36.4	22.5	137.2	81.9	75.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PPO activity (units/g FW)	nd	3.5	12.1	145.3	55.1	60.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Harvest time (week)	nd	0	-5	2	-1	-1.2	nd	0	-4.0	2.0	-1.7	-1.2
Weight (g)	nd	365	227	543	339	342	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acidity (g/100 mL)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.28	0.12	0.89	0.53	0.48
Soluble solids content (°Brix)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	14.8	10.9	15.2	13.2	13.2
Anthocyanin content in peel (μg/cm ²)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	52.9	1.7	103.7	19.5	24.4

^and: no data

^bMin: minimum value

^cMax: Maximum value

Table 2-6. Distribution of fruit phenotypic traits of parents and F₁ progeny of ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’

Traits	2014						2015					
	Kotaro	Aori 27	F ₁ progeny				Kotaro	Aori 27	F ₁ progeny			
			Min ^b	Max ^c	Median	Mean			Min	Max	Median	Mean
Index-number of browning (24-h)	4.0	0	0.2	5.0	3.3	3.3	4.3	0	1.0	5.0	3.0	3.2
Index-number of browning (15-min)	nd ^a	nd	nd	nd	nd	nd	4	0	0	4.3	1.7	1.7
Juice browning (ΔA ₄₀₀)	0.48	0.10	-0.03	0.65	0.18	0.23	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total polyphenol content (mg/100g FW)	73.6	36.4	22.7	148.0	60.1	68.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PPO activity (units/g FW)	177.4	3.5	16.6	139.6	49.1	57.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Harvest time (week)	-0.7	0	-5.0	2.0	-1.0	-1.0	0	0	-5.0	3.0	-0.6	-0.7
Weight (g)	264	365	104	507	274	278	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acidity (g/100 mL)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.43	0.28	0.14	0.75	0.36	0.35
Soluble solids content (°Brix)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	15	14.8	10.9	17.5	13.0	13.5
Anthocyanin content in peel (μg/cm ²)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21.9	52.9	6.5	82.3	25.2	32.7

^and: no data

^bMin: minimum value

^cMax: Maximum value

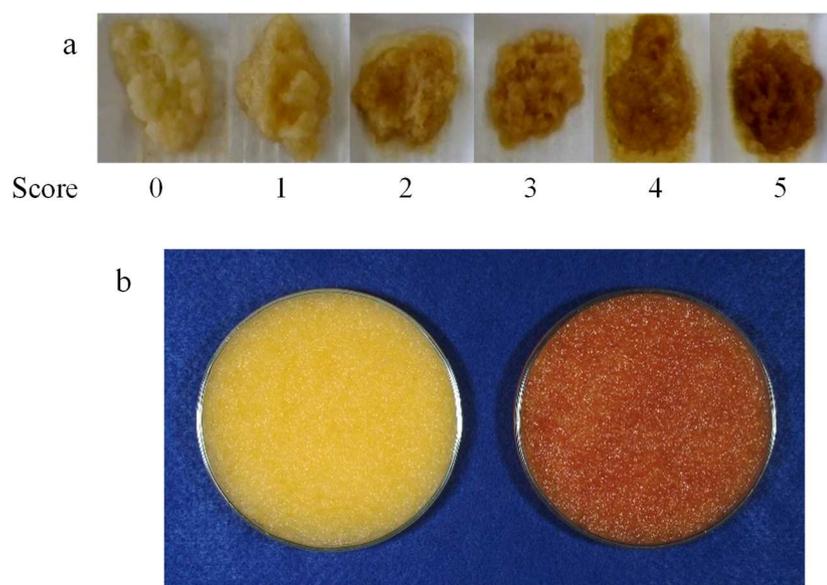


Figure 2-1. Scores for index-number of browning evaluated in this study. Visual representations of scores for INB are indicated as: 0, none; 1, slight; 2, mild; 3, moderate; 4, severe; 5, extremely severe (a). Examples of INB (24-h) of parental cultivars ‘Aori 27’ (score 0, b, left) and ‘Kotaro’ (score 4, b, right) are shown

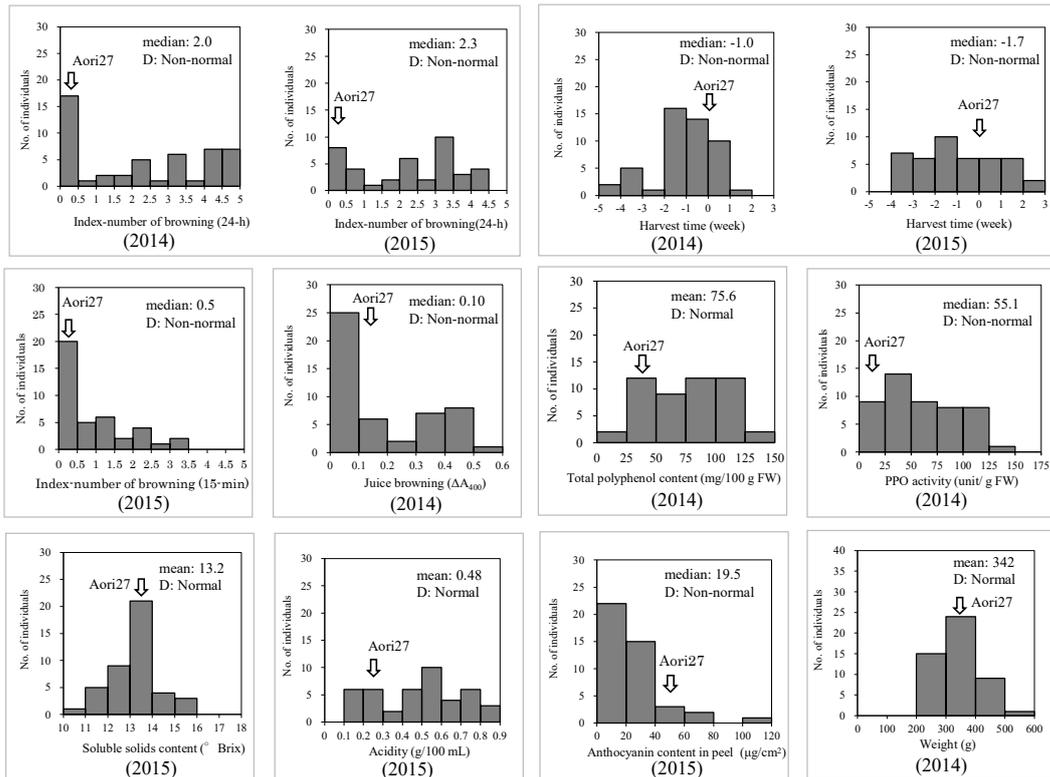


Figure 2-2. Frequency distribution of 12 fruit phenotypic traits in F_1 individuals of $F1-165 \times$ 'Aori 27'. Normality of distribution examined by using the Shapiro-Wilk normality test are shown in each panel. "Mean value" are also shown for normal distributing traits and "Median value" are shown for non-normal distributing traits.

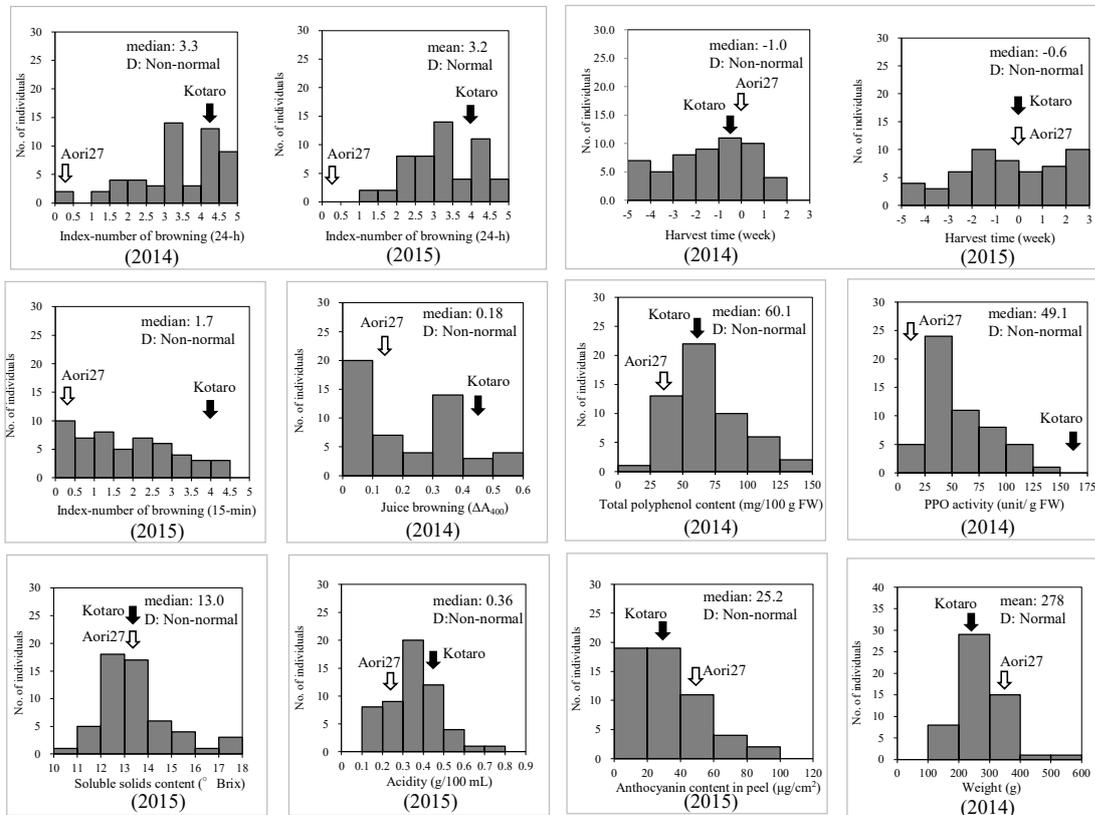


Figure 2-3. Frequency distribution of 12 fruit phenotypic traits in F_1 individuals of 'Kotaro' \times 'Aori 27'. Normality of distribution examined by using the Shapiro-Wilk normality test, "Mean value" are shown for Normal distributions and "Median value" are shown for Non-normal distributions each panel.

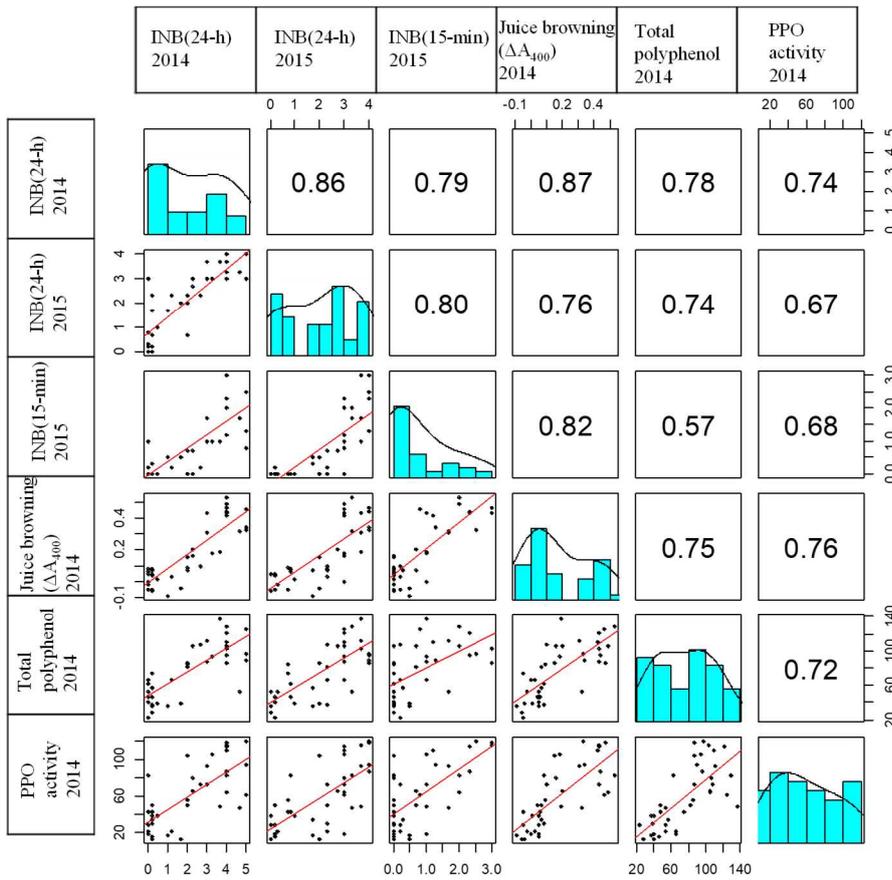


Figure 2-4. Correlation between six browning-related traits with flesh browning in F_1 individuals of F_1 -165 \times 'Aori 27'. Units are the same as in Table 2-1. R-value as correlation coefficient are shown in each panel.

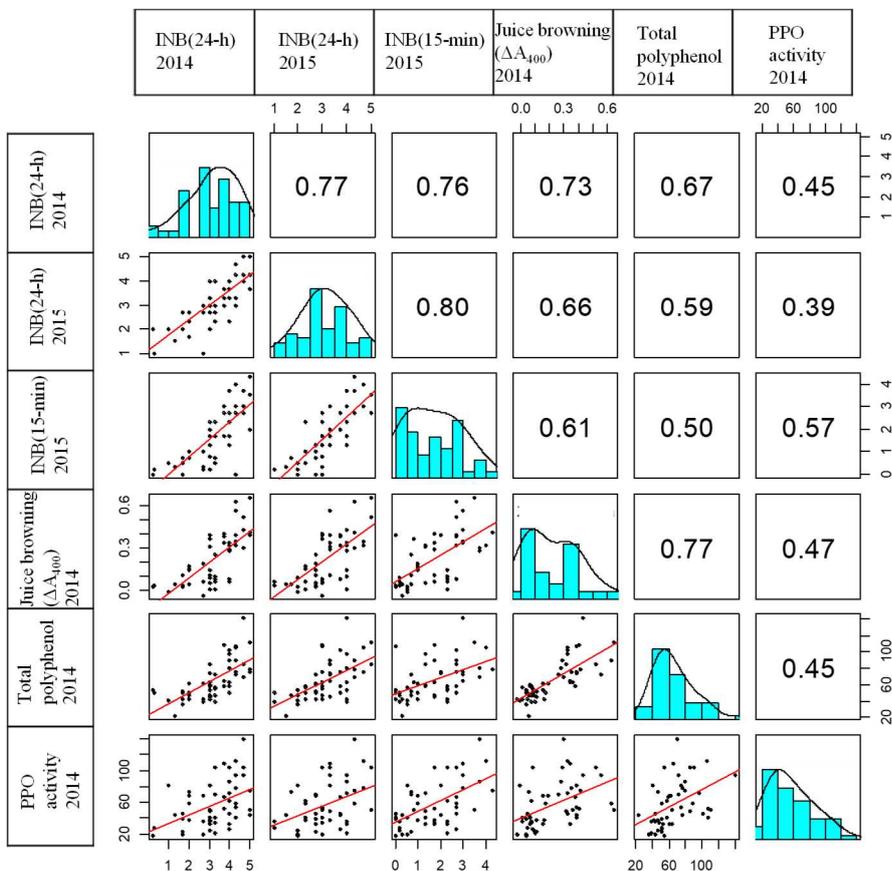


Figure 2-5. Correlation between six browning-related traits with flesh browning in F_1 individuals of 'Kotaro' \times 'Aori 27'. Units are the same as in Table 2-1. R-value as correlation coefficient are shown in each panel.

2) F1-165, ‘こうたろう’, 及び‘あおり 27’の連鎖地図

165A27 集団を用いた連鎖地図作成では, F1-165 は LOD = 5.0~9.0, ‘あおり 27’は LOD = 3.0 でグルーピングして連鎖地図を構築した (Table 2-7, Fig. 2-6). F1-165 の連鎖地図は 337 座 (326 マーカー) から構成され, 総地図距離 910 cM, 平均マーカー間距離 0.45 座/cM であった. ‘あおり 27’の連鎖地図は, 196 座 (195 マーカー) から構成され, 総地図距離 863 cM, 平均マーカー間距離 0.30 座/cM であった. これらの地図を既報の‘フィエスタ’, ‘ディスカバリー’, ‘王林’及び‘あかね’の連鎖地図 (Liebhard et al., 2003b; Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Kunihisa et al., 2014) と共通する SSR マーカーをアンカーとして比較したところ, F1-165 の地図は全 17 連鎖群のほとんどの領域をカバーしていたが, ‘あおり 27’の地図は第 3 連鎖群, 第 7 連鎖群, 第 14 連鎖群の全領域, 及び第 13 連鎖群の大部分が欠落していた.

KA27 集団を用いた連鎖地図作成では, ‘こうたろう’は LOD = 4.0~6.0, ‘あおり 27’は LOD = 3.0~5.0 でグルーピングし, 連鎖地図を構築した (Table 2-8, Fig. 2-7). ‘こうたろう’の連鎖地図は 293 座 (287 マーカー) から構成され, 総地図距離 814 cM, 平均マーカー間距離 0.38 座/cM であった. ‘あおり 27’の地図は, 186 座 (177 マーカー) から成り, 総地図距離 806 cM, 平均マーカー間距離 0.31 座/cM であった. ‘こうたろう’の連鎖地図は全 17 連鎖群のほぼ全ての領域をカバーしたが, ‘あおり 27’では少なくとも 6 つの領域 (第 1 連鎖群, 第 3 連鎖群, 第 6 連鎖群, 第 8 連鎖群, 第 13 連鎖群の大部分の領域と第 14 連鎖群の全領域) が欠如していた.

3) 果肉褐変性, 果汁褐変性, 総ポリフェノール含量及び PPO 活性の QTL

KW 解析による QTL 解析の結果, 褐変関連形質 (INB, 果汁褐変性, ポリフェノール含量及び PPO 活性) に関する主要 QTL は, 両集団とも, 褐変性親 (F1-165 及び‘こうたろう’) の第 16 連鎖群上部の同一領域に検出された (Table 2-9, Table 2-10, Fig. 2-8).

165A27 集団では, KW 解析において INB (24-h 及び 15-min) と果汁褐変性に関する QTL は F1-165 由来の第 16 連鎖群 (LG F1_16) に $P < 0.0001$ の有意水準で検出された (Table 2-9, Fig. 2-8). rMQM 解析でも, これらの形質に関する QTL は KW 解析と同一領域に検出され, 2014 年及び 2015 年の INB (24-h) の QTL の LOD 値は 14.1 及び 9.2, 寄与率は 73.4 及び 66.3% であった. 2015 年の INB (15-min) の QTL は, LOD 値 4.9, 寄与率 43.9% であり, 果汁褐変性の QTL は, LOD 値 9.9, 寄与率 60.5% で, それぞれ形質分散の大部分を説明していた (Fig. 2-9).

KA27 集団では, KW 解析において INB (24-h 及び 15-min), 果汁褐変性に関する QTL が‘こうたろう’由来の第 16 連鎖群 (LG Ko_16) に $P < 0.0001$

の有意水準で検出された. また, INB (15-min) については, $P < 0.0005$ の水準の QTL が第 15 連鎖群 (LG Ko_15) に検出された (Table 2-10, Fig. 2-8). これらの褐変形質の QTL は, rMQM 解析でも同等の領域に検出され, 2014 年及び 2015 年の INB (24-h) に関する QTL は, LOD 値 7.2 及び 5.9 (寄与率 32.1% 及び 40.7%) で, 2015 年の INB (15-min) の QTL は LOD 値 8.3 (寄与率 32.0%) であった. また, 果汁褐変性の QTL は LOD 値 16.6, 寄与率 76.9% で第 16 連鎖群 (LG Ko_16) に検出された (Fig. 2-9).

総ポリフェノール含量と PPO 活性の主要 QTL も両 F1 集団の褐変性親の第 16 連鎖群に検出された (Table 2-9, Table 2-10). 165A27 集団では, KW 解析においてこれらの QTL は $P < 0.0001$ 水準で F1_16 の上部に検出された (Fig. 2-8). 同等の QTL が rMQM 解析でも検出され, LOD 値はそれぞれ 13.3 及び 8.3 で, 表現型分散の 71.4% 及び 41.3% を説明した (Fig. 2-9). KA27 集団では, 総ポリフェノール含量の主要 QTL は KW 解析において Ko_16 に $P < 0.0001$ 水準で検出され, PPO 活性については近傍に $P < 0.0005$ 水準で検出された (Fig. 2-8). rMQM 解析でも, これらと同領域に, 総ポリフェノール含量 (LOD = 7.4; 34.2%) 及び PPO 活性 (LOD = 6.3; 41.4%) の QTL が検出された (Fig. 2-9). また, 総ポリフェノール含量と PPO 活性の QTL がそれぞれ第 13 連鎖群 (LG Ko_13) と第 4 及び第 8 連鎖群 (LG A1_4 及び LG F1_8) に KW 解析のみで検出されたが, これらは rMQM 解析では検出されなかった.

ほとんどの形質において, 第 16 連鎖群に検出された主要 QTL に最も近いマーカーは LAR_{SSR1_11} であった. そこで, LAR_{SSR1_11} マーカーの遺伝子型に着目して各褐変関連形質の分布を調べた (Fig. 2-10, Fig. 2-11). 両親の LAR_{SSR1_11} マーカー遺伝子型については, ‘あおり 27’が 284 bp/284 bp 型, F1-165 及び‘こうたろう’が 284 bp/280 bp 型であった. 165A27 集団では, LAR_{SSR1_11} の遺伝子型分離は果肉褐変性 (INB (24-h)) の形質分布を良く説明しており, 遺伝子型によってスコア 2 未満及び 2 以上のグループにほぼ二分された (Fig. 2-10a). 遺伝子型が 284 bp/284 bp 型の 19 個体のうち 14 個体が非褐変性個体 ($0 \leq \text{INB} < 0.5$), 3 個体が難褐変性個体 ($0.5 \leq \text{INB} < 1.5$) であったのに対し, 284 bp/280 bp 型では, 29 個体のうち 27 個体が $2 \leq \text{INB} < 5$ の範囲で褐変した. LAR_{SSR1_11} が本集団の表現型分散の大部分を説明し, 非褐変性~難褐変性個体 ($0 \leq \text{INB} < 1.5$) と, 褐変性個体 ($1.5 \leq \text{INB} < 5$) を区別したことから, 本集団の果肉褐変性はほぼこの領域の単一座で制御されていると考えられた. 一方, 非褐変性品種 ($0 \leq \text{INB} < 0.5$) である‘あおり 27’の連鎖群には INB (24-h 及び 15-min) の QTL は検出されなかった. このことから, ‘あおり 27’の LAR_{SSR1_11} に連鎖する QTL は機能的にホモ接合と考えられ, 非褐変性は劣性形質で, 褐変性親である F1-165 はヘテロ接合体であったために表現

Table 2-7. Details of the genetic linkage maps of F1-165 (F1) and 'Aori 27' (A1) obtained from F₁ individuals of F1-165 × 'Aori 27'

Marker type	Linkage group																				Total		
	FI_1	FI_2	FI_3	FI_4	FI_5	FI_6	FI_7	FI_8	FI_9	FI_10	FI_11	FI_12	FI_13	FI_14	FI_15	FI_16	FI_17	FI_17-2	Total				
Apple SSRs	10	11	2	9	10	23	2	2	4	8	13	20	20	15	18	16	5	6	23	14	16	4	251
Pear SSRs	4	3	2	5	7	4	0	1	1	4	5	4	5	4	5	2	2	2	6	7	7	0	86
No. of mapped loci	14	14	4	14	17	27	2	3	5	12	18	24	26	21	23	21	7	8	29	21	23	4	337
Length of linkage groups (cM)	55.5	22.4	46.8	61.8	44.0	59.3	21.2	8.1	10.1	26.8	48.2	60.9	53.5	66.7	62.9	55.7	6.0	11.7	96.3	48.3	40.0	4.0	910.2
Marker density (loci/cM)	0.25	0.62	0.09	0.23	0.39	0.46	0.09	0.37	0.50	0.45	0.37	0.39	0.49	0.31	0.37	0.38	1.16	0.68	0.30	0.43	0.58	1.00	0.45

Marker type	Linkage group																				Total	
	AI ^a _1	AI_2	AI_3	AI_4	AI_5	AI_6	AI_7	AI_8	AI_9	AI_10	AI_11	AI_12	AI_13	AI_14	AI_15	AI_16	AI_17	AI_17-2	Total			
Apple SSRs	3	17	0	7	6	5	7	3	5	0	8	9	21	12	9	3	0	14	6	14	4	153
Pear SSRs	0	1	0	3	3	0	0	3	1	0	6	1	5	3	3	3	0	4	2	5	0	43
No. of mapped loci	3	18	0	10	9	5	7	6	6	0	14	10	26	15	12	6	0	18	8	19	4	196
Length of linkage groups (cM)	40.6	71.0	0.0	37.5	22.6	35.6	17.1	43.7	16.3	0.0	57.0	64.7	68.5	68.3	54.9	12.1	0.0	119.2	63.0	69.3	2.0	863.3
Marker density (loci/cM)	0.07	0.25	0.00	0.27	0.40	0.14	0.41	0.14	0.37	0.00	0.25	0.15	0.38	0.22	0.22	0.49	0.00	0.15	0.13	0.27	2.00	0.30

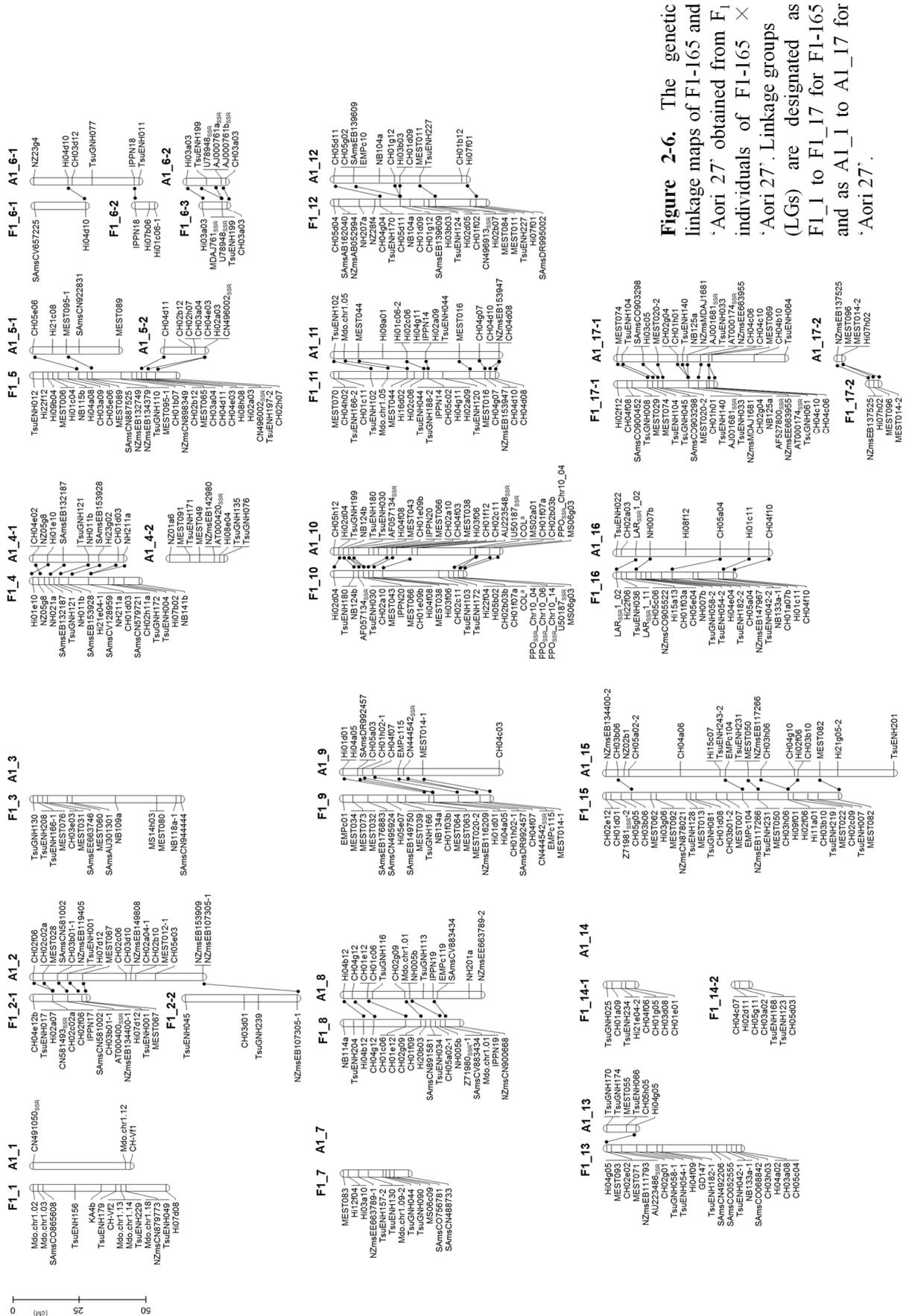
^a AI: linkage groups of Aori27 in F₁ population 165A27.

Table 2-8. Details of the genetic linkage maps of 'Kotaro' (Ko) and 'Aori 27' (A2) obtained from F₁ individuals of 'Kotaro' × 'Aori 27'

Marker type	Linkage group																	Total		
	Ko_1	Ko_2	Ko_3	Ko_4	Ko_5	Ko_6	Ko_7	Ko_8	Ko_9	Ko_10	Ko_11	Ko_12	Ko_13	Ko_14	Ko_15	Ko_16	Ko_17		Total	
Apple SSRs	18	13	4	9	14	11	7	9	1	7	23	20	16	13	13	24	16	9	231	
Pear SSRs	11	4	2	3	1	2	1	1	1	2	5	7	3	4	3	4	4	1	62	
No. of mapped loci	29	17	6	7	12	15	13	8	10	2	9	28	27	19	17	16	28	10	293	
Length of linkage groups (cM)	54.2	52.2	11.1	11.0	37.9	32.9	26.5	49.9	59.1	21.2	33.4	71.2	73.9	42.4	41.9	28.4	56.5	49.1	814.2	
Marker density (loci/cM)	0.54	0.33	0.54	0.64	0.32	0.46	0.49	0.16	0.17	0.09	0.27	0.39	0.37	0.45	0.41	0.56	0.50	0.33	0.20	0.38

Marker type	Linkage group																	Total			
	A2 ^a _1	A2_2	A2_3	A2_4	A2_5	A2_6	A2_7	A2_8	A2_9	A2_10	A2_11	A2_12	A2_13	A2_14	A2_15	A2_16	A2_17		Total		
Apple SSRs	2	16	2	8	3	8	7	2	9	2	10	24	15	8	2	0	2	11	8	6	145
Pear SSRs	0	4	1	1	0	1	2	0	1	3	7	9	1	1	0	0	5	3	1	41	
No. of mapped loci	2	20	3	9	4	8	8	4	9	3	13	31	24	9	3	0	2	16	11	7	186
Length of linkage groups (cM)	3.6	68.1	7.3	39.2	3.6	33.6	30.1	6.4	113.8	18.6	64.1	114.9	67.8	42.3	12.9	0.0	5.5	63.0	60.2	50.5	805.5
Marker density (loci/cM)	0.55	0.29	0.41	0.23	1.10	0.24	0.27	0.63	0.08	0.16	0.20	0.27	0.35	0.21	0.23	0.00	0.37	0.25	0.18	0.14	0.31

^a A2: linkage groups of Aori27 in F₁ population KA27.



型が分離したと考えられる。これに対し、KA27 集団では、非褐変性及び難褐変性は後代へあまり継承されず、 $INB < 1.5$ を示す個体は少なかったが、集団の形質分離は LAR_{SSR1_11} 遺伝子型によって良く説明され、 INB スコア 3.5 未満及び 3.5 以上のグループに二分できた (Fig. 2-10c)。この結果から、本集団の果肉褐変性には、 LAR_{SSR1_11} 座だけでなく、他の要因も関係しており、非褐変性を示すためには複数の QTL を考慮する必要があることが示唆された。

果汁褐変性については、165A27 集団では、284 bp/284 bp 型の全ての個体が‘あおり 27’よりも低い値 ($\Delta A_{400} < 0.1$) を示した。また、KA27 集団でも 284 bp/284 bp 型の全個体の ΔA_{400} 値は 0.2 未満であり、284 bp/280 bp 型の個体と比較して明確な非褐変性を示した (Fig. 2-10b, d)。このことから、果汁の褐変性はいずれの供試集団においても、第 16 連鎖群の単一の遺伝因子によって制御されていると考えられた。これは果肉の褐変性が、集団によって制御因子の数が異なると考えられたこととは対照的であった。総ポリフェノール含量と PPO 活性の分布も LAR_{SSR1_11} 遺伝子型の分離を反映しており (Fig. 2-11)、総ポリフェノール含量ではより顕著に反映されていた。

4) 他の形質の QTL

KW 解析により、165A27 集団では、酸度に関する QTL が第 16 連鎖群 (LG F1_16) に、果皮アントシアニン含量に関する QTL が第 9 連鎖群 (LG A1_9) に検出された (Table 2-9)。KA27 集団では、収穫期の QTL が第 15 連鎖群 (LG Ko_15) に、酸度の QTL が第 16 連鎖群 (LG Ko_16) に、果皮アントシアニン含量の QTL が第 9 連鎖群 (LG A2_9) に、それぞれ検出された (Table 2-10)。いずれの集団でも、果実重及び糖度に関する QTL は得られなかった。

3. 考察

1) 果実形質

果肉の褐変程度はポリフェノール含量と PPO 活性に影響を受けると考えられている (Gil et al., 1998)。本研究で供試した F₁ 集団では、ポリフェノール含量は果肉及び果汁褐変性のいずれの形質とも高い相関関係が認められ (Fig. 2-4, Fig. 2-5)、褐変の重要な要因であるという報告と一致した。しかしながら、PPO 活性と果肉及び果汁褐変性については、165A27 集団では高い相関があったが、KA27 集団ではやや低い値であった。このことは、KA27 集団では、PPO 活性の QTL は他の褐変関連形質とほぼ同じ領域に検出されたが、有意性が低かったことと矛盾しない。これらの結果は、ポリフェノール含量及び PPO 活性は両集団の褐変性に大きく影響しているが、KA27 集団では他の因子も寄与していることを示している。

2 つの F₁ 集団は INB (24-h) について高い遺伝率を示しており、これまでの報告通り (Sun et al.,

2014)、果肉褐変性は年次間で安定した遺伝形質であることを確認した。165A27 集団では集団の 1/3 が非褐変であり、表現型の分布は二項分布を示したことから (Fig. 2-2)、『あおり 27』の果肉の非褐変性は後代に遺伝することが明らかとなった。また、本集団では、非褐変性は単一の遺伝子によって制御されている可能性が高く、遺伝解析材料として有用であると考えられた。

2) 連鎖地図

‘フィエスタ’と‘ディスカバリー’の連鎖地図 (Liebhard et al., 2003b; Silfverberg-Dilworth et al., 2006) を参照すると、本研究で構築された F₁-165 と‘こうたろう’の連鎖地図は全 17 連鎖群をカバーしており、欠けている領域はなかった。しかしながら、『あおり 27』の 2 つの連鎖地図では、第 3、第 13 及び第 14 連鎖群について、これらの領域に座乗すると想定していた全てのマーカーで多型の分離が観察されずマッピングできなかったため、ほぼ全ての領域が欠けたものとなった。‘あおり 27’の連鎖地図でこれほど顕著な領域の欠落が起こった原因は、品種育成過程で‘ゴールドデンリシャス’と‘デリシャス’、またこれらを親とする品種が多用されており、遺伝的にホモ接合性が高いためであると考えられる。理論上、『あおり 27』でホモ接合になっている対立遺伝子は、F₁ 集団における表現型の分離を引き起こさないため、これらの連鎖群の欠如は QTL 解析には問題がないと考えられる。

3) 褐変性、総ポリフェノール含量、PPO 活性の QTL

本研究で使用した F₁ 集団は 165A27 集団 50 個体、KA27 集団 55 個体であり集団サイズとしては比較的小さい。小集団での QTL 解析は偽陽性による誤検出の危険性が伴う。このため、PPO 活性について第 8 連鎖群 (LG F1_8) や第 4 連鎖群 (LG A1_4) に検出された有意性が低い QTL は、偽陽性の可能性もある。しかしながら、複数の褐変関連形質に関して第 16 連鎖群の同一領域に検出された QTL は、有意性が高いのみならず、2 つの異なる親 (F₁-165 及び‘こうたろう’) で、複数年安定して検出されたことから、十分に信頼性が高く、非常に大きな効果があると考えられた。既報では、リンゴの果肉褐変性に関する QTL は第 3、第 10、第 11、第 14、第 15、第 16 及び第 17 連鎖群に報告されている (Mellidou et al., 2012; Guardo et al., 2013; Sun et al., 2014)。これらの研究はポリフェノール合成や PPO 活性に関連する遺伝子が果肉褐変を引き起こすと予測しており、本研究でこれらの形質間に相関が見られたことは、この予測を裏付けるものであった (Fig. 2-4, Fig. 2-5)。

Guardo et al. (2013) は、果肉をカットした後の遺伝子発現を経時的に調査し、PPO (apple genome v. 1.0, Velasco et al. 2010 では第 10 連鎖群上) が果肉褐変性の候補遺伝子であると考えた。一方で、Chagné et al. (2012b) はポリフェノール化合物に

Table 2-9. QTLs for fruit phenotypic traits identified by Kruskal-Wallis and rMQM methods for F₁ progeny of F1-165 × ‘Aori 27’

Traits	Parent	Linkage group	Year	Kruskal-Wallis				rMQM ^a				
				Position (cM)	K value	Significance ^b	Locus	Position (cM)	LOD ^c	Significance ^d	% var. ^e	Nearest marker
Index-number of browning (24h)	F1-165	F1_16	2014	2	33.67	##	LARssr1_11	2	14.1	**	73.4	LARssr1_11
	F1-165	F1_16	2015	4.1	24.6	##	CH05c06	4.1	9.22	**	66.3	CH05c06
Index-number of browning (15-min)	F1-165	F1_16	2015	4.1	19.17	##	CH05c06	3	4.89	**	43.9	LARssr1_11
	F1-165	F1_16	2014	2	32.5	##	LARssr1_11	2	9.88	**	60.5	LARssr1_11
Total polyphenol (mg/100 g FW)	F1-165	F1_16	2014	2	32.58	##	LARssr1_11	3	13.31	**	71.4	LARssr1_11
	F1-165	F1_8	2014	12.4	12.15	#	CH04g12					
PPO activity (units/g FW)	F1-165	F1_16	2014	2	30.53	##	LARssr1_11	2	8.27	**	41.3	LARssr1_11
	Aori27	A1_4	2014	20.6	12.72	#	Hi08e04					
Harvest time (week)	Aori27	A1_6	2014					41.6	2.83	*	23.4	IPPNI18
	Aori27	A1_16	2014					2	3.04	*	19	CH02a03
Acidity (g/100 mL)	F1-165	F1_16	2014					31.7	2.67	*	22.2	NZmsEB147967
	F1-165	F1_16	2015	2	16.71	##	LARssr1_11	2	4.44	**	38.5	LARssr1_11
Anthocyanin content in peel (µg/cm ²)	Aori27	A1_16	2015					5	3.31	*	30.4	LARssr1_02
	Aori27	A1_9	2015	25	20.81	##	CN444542ssr					
Harvest time (week)	Aori27	A1_9	2015	64.7	20.72	##	CH04c03	50.1	4.72	**	39.1	CH04c03

^a rMQM: restricted multiple QTL mapping

^b Asterisks (# and ##) represent significance level of $P < 0.0005$ and $P < 0.0001$, respectively

^c LOD: logarithm of the odd score

^d Asterisks (* and **) represent significance level of $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

^e var.: variance

^f A1: linkage groups of Aori27 in F₁ population 165A27

The Kruskal-Wallis analysis and the rMQM analysis were performed separately, and we detected QTLs by the peak of K-value, LOD above the threshold, respectively.

Table 2-10. QTLs for fruit phenotypic traits identified by Kruskal-Wallis and rMQM methods for F₁ progeny of 'Kotaro' × 'Aori 27'

Traits	Parent	Linkage group	Year	Kruskal-Wallis			rMQM ^d					
				Position (cM)	K value	Significance ^b	Locus	Position (cM)	LOD ^c	Significance ^d	% var. ^e	Nearest marker
Index-number of browning (24-h)	Kotaro	Ko_15	2014				14.7	3.02	*	11.1	MEST013	
	Kotaro	Ko_16	2014	7.5	24.67	##	LARsSR1_11	7.5	7.23	**	32.1	LARsSR1_11
	Kotaro	Ko_16	2015	7.5	20.61	##	LARsSR1_11	4	5.9	**	40.7	LARsSR1_11
Index-number of browning (15-min)	Kotaro	Ko_5	2015				12.9	3.95	**	12.3	CH05e06	
	Kotaro	Ko_15	2015	14.7	14.5	#	MEST013	14.7	3.62	**	11.2	MEST013
	Kotaro	Ko_16	2015	0	20.14	##	MEST009	0	8.28	**	32	MEST009
Juice browning (ΔA ₄₀₀)	Kotaro	Ko_16	2014	7.5	37.52	##	LARsSR1_11	7	16.56	**	76.9	LARsSR1_11
	Kotaro	Ko_13	2014	26.7	15.41	##	SAnsCO052535					
Total polyphenol (mg/100 g FW)	Kotaro	Ko_16	2014	7.5	39.12	##	LARsSR1_11	7.5	7.41	**	34.2	LARsSR1_11
	Kotaro	Ko_16	2014	15	13.9	#	CH05e04	14.2	6.27	**	41.4	CH05e04
PPO activity (units/g FW)	Kotaro	Ko_16	2014	33.6	14.86	#	TsuENH182-2					
	Kotaro	Ko_3	2014					0	3.37	*	20	NB109a
Harvest time (week)	Kotaro	Ko_3	2015					0	3.81	**	20.9	NB109a
	Kotaro	Ko_15	2014					39.7	3.36	*	20	NZmsEB117266
Acidity (g/100 mL)	Kotaro	Ko_15	2015	39.7	13.91	#	NZmsEB117266	39.7	4.39	**	24.7	NZmsEB117266
	Kotaro	Ko_16	2015	0	16.96	##	MEST009	2	4.44	**	31.5	MEST009
Anthocyanin content in peel (μg/cm ²)	Kotaro	Ko_16	2015					7.5	2.87	*	21.7	LARsSR1_11
	Aori 27	A2/_9	2015	60.5	26.76	##	CN444542sSR	60.5	7.79	**	48.5	CN444542sSR

^arMQM: restricted multiple QTL mapping^bAsterisks (# and ##) represent significance level of $P < 0.0005$ and $P < 0.0001$, respectively^cLOD: logarithm of the odd score^dAsterisks (* and **) represent significance level of $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively^evar.: variance^fA2: linkage groups of Aori27 in F₁ population KA27

The Kruskal-Wallis analysis and the rMQM analysis were performed separately, and we detected QTLs by the peak of K-value, LOD above the threshold, respectively

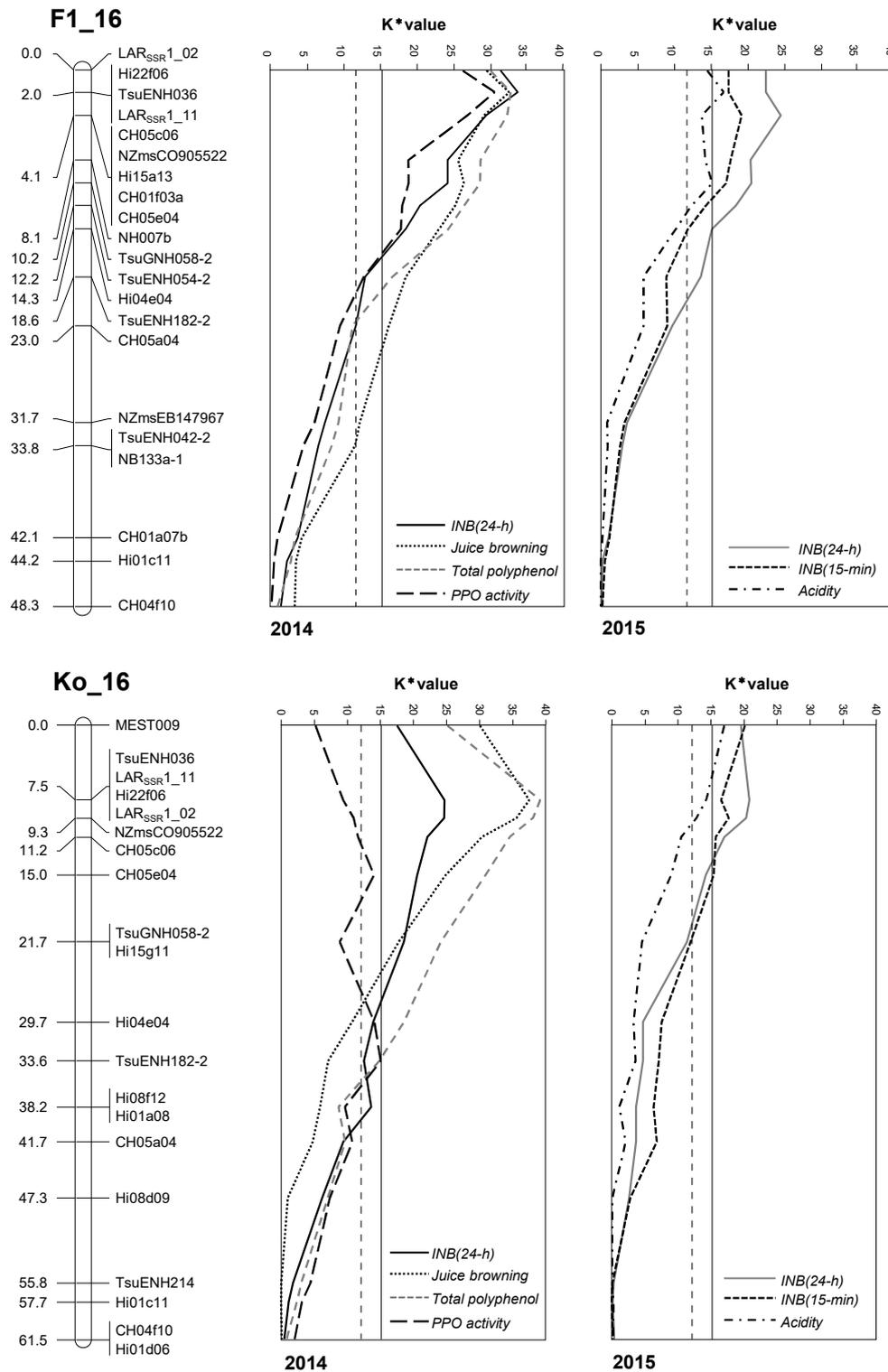


Figure 2-8. Significant QTLs ($P < 0.0005$) for evaluated fruit traits identified in linkage group 16 of F1-165 (LG F1_16) and ‘Kotaro’ (LG Ko_16) in the Kruskal-Wallis test. Marker loci and K^* value are shown to the right of each LG. The $P = 0.0001$ and $P = 0.0005$ thresholds are shown by vertical solid and dashed lines, respectively.

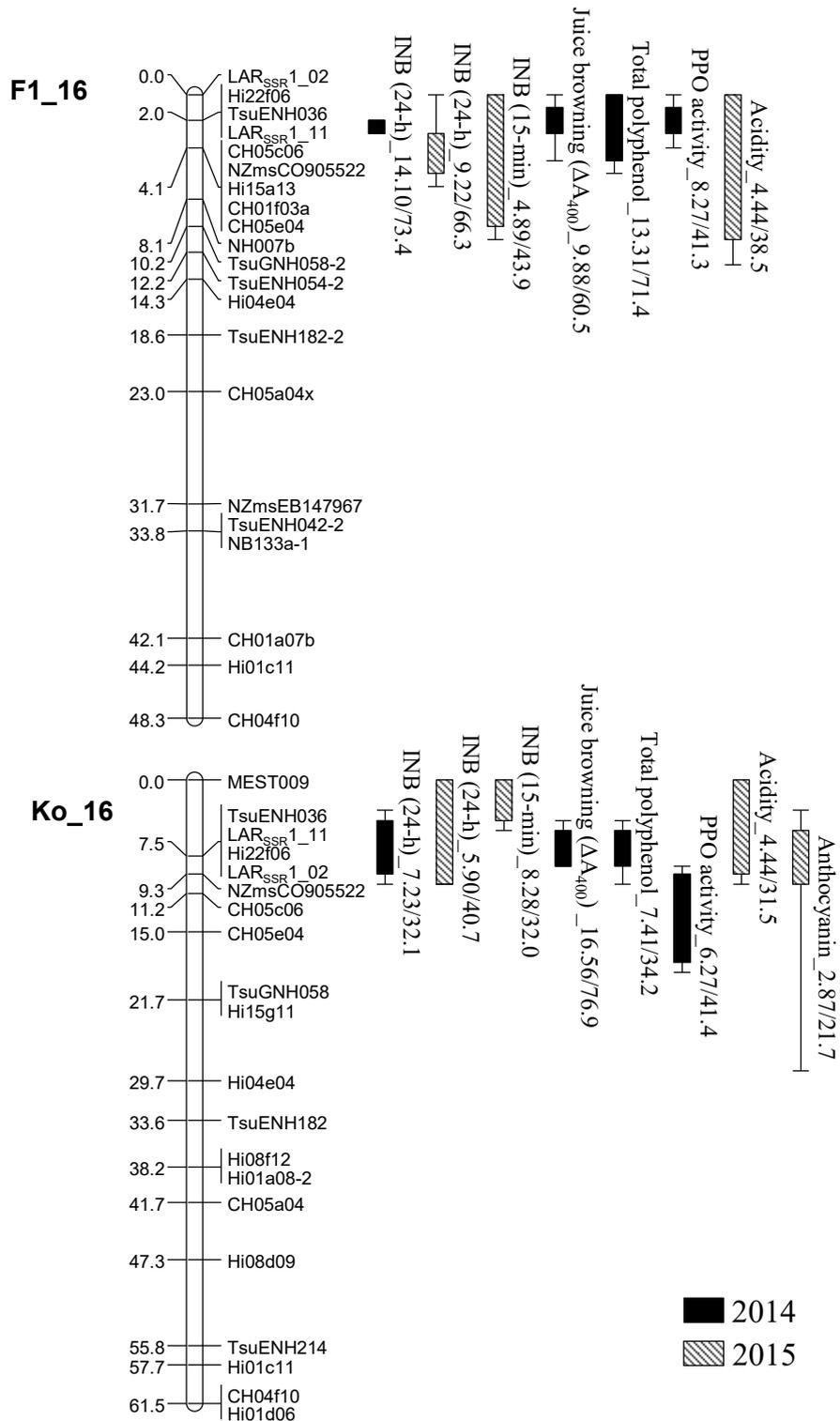


Figure 2-9. Significant QTLs for seven and eight fruit traits identified in linkage group 16 of F1-165 (LG F1_16) and ‘Kotaro’ (LG Ko_16), respectively. Marker loci and significant QTLs in rMQM analysis with significance level of $P < 0.01$ are shown to the right of LGs. Boxes and range lines indicate 1-LOD and 1.5-LOD support intervals, respectively. LOD and the contribution ratio (% var.) are presented after the QTL name as LOD/contribution ratio.

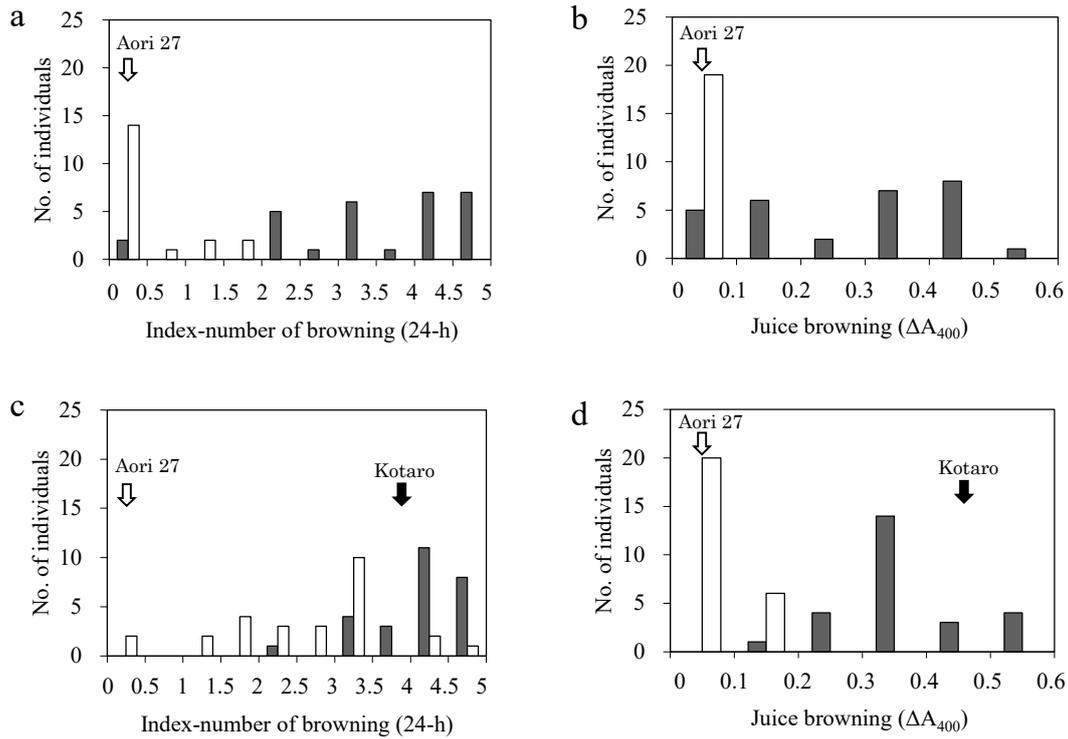


Figure 2-10. Frequency distribution of F₁ individuals of (a, b) F1-165 × ‘Aori 27’ and (c, d) ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’ crosses. Two genotypes of LAR_{SSR1_11} are indicated (■ 284 bp/280 bp, □ 284 bp/284 bp) for (a, c) index-number of browning (24-h) evaluated in 2014 and (b, d) juice browning (ΔA_{400}). Parental LAR_{SSR1_11} genotypes are indicated as below; ‘Aori 27’ has genotype 284 bp/284 bp, both F1-165 and ‘Kotaro’ have genotype 284 bp/280 bp.

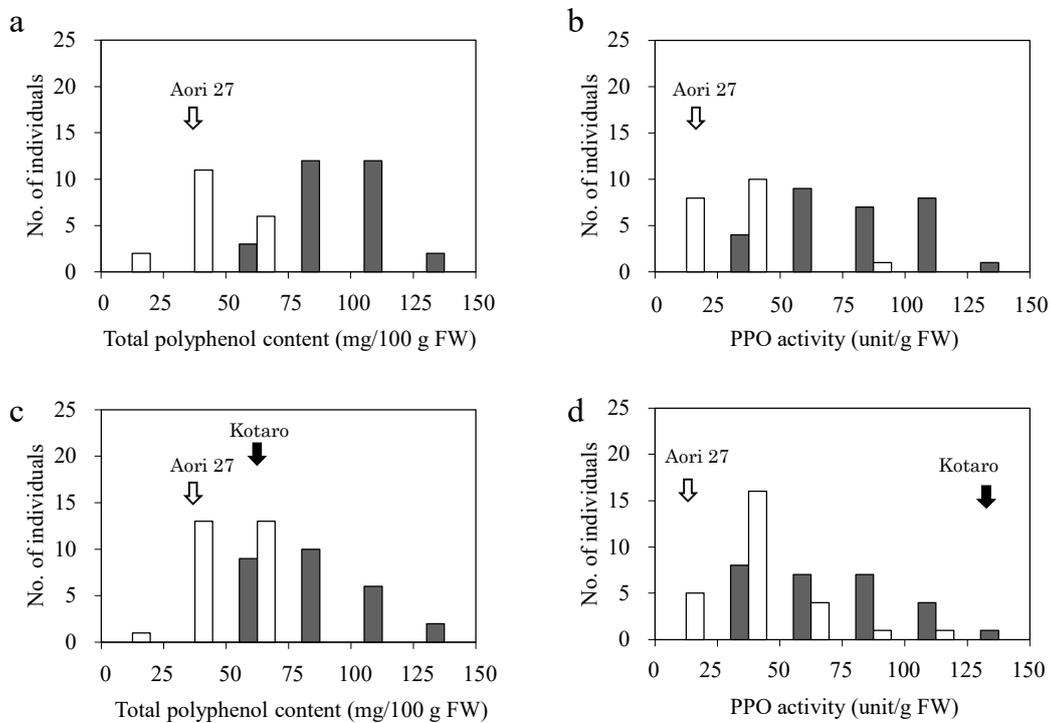


Figure 2-11. Frequency distribution of F₁ individuals of (a, b) F1-165 × ‘Aori 27’ and (c, d) ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’ crosses. Two genotypes of LAR_{SSR1_11} are indicated (■ 284 bp/280 bp, □ 284 bp/284 bp) for (a, c) total polyphenol content and (b, d) PPO activity. Parental LAR_{SSR1_11} genotypes are indicated as below; ‘Aori 27’ has genotype 284 bp/284 bp, both F1-165 and ‘Kotaro’ have genotype 284 bp/280 bp.

関する QTL を、リンゴのポリフェノール生合成に関与する遺伝子の周辺に報告している (Fig. 1-3). クロロゲン酸の QTL は、その合成酵素に関する *hydroxycinnamoyl CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyl transferase* (HCT/HQT) 遺伝子が位置する第 17 連鎖群下部に検出された. カテキンやプロシアニジンダイマー、5 つのプロシアニジンモノマーといった、様々なポリフェノール化合物の QTL は、第 16 連鎖群上の *LAR1* 周辺に検出され、*LAR1* の多型は、果皮と果肉のフラバノール濃度と関連があった. Khan et al. (2012) もフラバン-3-オールとプロアントシアニジンの QTL を第 16 連鎖群上に検出している. リンゴ果実のプロアントシアニジンはフラバン-3-オール (+) -カテキン及び (-) -エピカテキンから生成され、総ポリフェノール量の 60~65% を占める (Perez-Illarbe et al., 1992; Yanagida, 1997; Guyot et al., 1998). 本研究で果肉褐変性、果汁褐変性、総ポリフェノール含量及び PPO 活性に関する明瞭な QTL が検出された第 16 連鎖群上部は、これまでに様々なポリフェノール成分の QTL が報告されている領域であった. これらの QTL の位置は、Kunihisa et al. (2014) と Morimoto et al. (2014) によって報告された果汁褐変性の QTL と一致した. これらのことから、第 16 連鎖群上部の *LAR1* は褐変に直接関与する有力な候補遺伝子であると考えられた. そこで、本研究では *LAR1* の両側に SSR マーカーを設計し (*LAR_{SSR1_02}* 及び *LAR_{SSR1_11}*), QTL 解析に加えた (Fig. 2-12). INB, 果汁褐変性、総ポリフェノール含量及び PPO 活性に関する KW 解析の K^* 値は *LAR_{SSR1_11}* マーカーで最も高かったが、公開ゲノム情報 (Daccod et al., 2017) によればこの領域には *PPO* は存在しないことから、第 16 連鎖群の *LAR1* はポリフェノール含量のみならず PPO 活性にも強い影響を与え、結果として果肉と果汁を褐変させている可能性が示唆された. しかし、この QTL によって、165A27 集団においては果肉と果汁両方の非褐変性が説明できたが、KA27 集団で説明でき

たのは果汁の非褐変性のみであった (Fig. 2-10). このことから、果肉の組成は果汁より複雑であり、果肉が非褐変性~難褐変性となるメカニズムには、より多くの因子が関与していると予測される. KA27 集団の果肉褐変性はこれらの未知の因子によって影響を受けている可能性がある.

LAR は縮合タンニン合成の触媒作用に関与する重要な構造遺伝子である. リンゴでは、ロイコアントシアニジンを変換する酵素をコードしており、第 13 番染色体 (*LAR2*) 及び第 16 番染色体 (*LAR1*) に座乗する. *LAR1* は、リンゴの主要ポリフェノール成分であるフラバノール含量の制御遺伝子候補として報告されている (Chagné et al., 2012b). ブドウでは、アントシアニンを触媒してフラバン-3-アルコールを形成し、プロアントシアニジンの種類や蓄積量を調節することが報告されている (Pfeiffer et al., 2006; Bogs et al., 2005). また、イチゴでは、果実のフラボノイドの種類と蓄積量を制御すると考えられており (Almeida et al., 2007), リンゴでも *LAR1* が総ポリフェノール含量に影響している可能性は高い.

PPO 活性の主要 QTL は、果肉褐変性や果汁褐変性、総ポリフェノール含量の QTL と同じ第 16 連鎖群上部に検出された. リンゴの *PPO* は第 5 及び第 10 番染色体上に報告があり (GDR: www.rosaceae.org), 第 16 番染色体上には見つからない. Guardo et al. (2013) は、リンゴの果肉細胞が損傷した場合、*PAL* の発現によりポリフェノール生産が活性化され、これが *PPO* の発現増加を引き起こしていると報告している. 本研究では *PPO* 活性の QTL は *PAL* や *PPO* の近傍には検出されなかったが、*PPO* の発現が *LAR1* の代謝物であるポリフェノール類の増加によって活性化された可能性が考えられた. あるいは、本研究で供試した F₁ 集団では、*PPO* は機能的にホモ接合で分離しなかった可能性があり、*PPO* 活性が基質となるポリフェノール含量に依存した可能性もある.

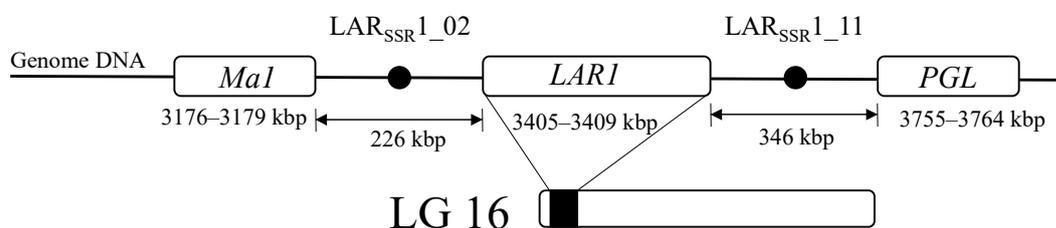


Figure 2-12. Physical map of the top region in linkage group (LG) 16 in apple. Positional relationships between genes near the QTL and SSR markers (*LAR_{SSR1_02}* and *LAR_{SSR1_11}*) on LG16. *Mal* (malic acid), *LAR1* (leucoanthocyanidin reductase 1) and *PGL* (pale green lethal) genes are indicated in adjacent regions of LG16. The two SSR markers are positioned at sites 3,352,925 bp and 3,424,458 bp, respectively, in LG 16, according to Apple Genome GDDH13 (Daccod et al., 2017).

4) 非褐変性の遺伝様式

果肉の非褐変性の遺伝様式について、第16番染色体の主要な単一のQTLによって形質が制御されている165A27集団(QTL寄与率73.4%)の解析結果を用いて推定した。本集団で、QTLは褐変性親であるF1-165の連鎖地図上でのみ検出され、非褐変性親である‘あおり27’では検出されなかった。このことから、本QTLにおいて、‘あおり27’は非褐変性アレルのホモ接合体、F1-165は褐変性/非褐変性アレルのヘテロ接合体であり、このQTLによって制御されている非褐変性は劣性形質であると推定された。また、‘あおり27’が非褐変性となった原因は、‘あおり27’における突然変異ではなく、品種育成過程における非褐変性アレルの集積である可能性が高いと考えられた。その理由として、まず、‘あおり27’の両方の相同染色体の同じ遺伝子に突然変異が起こる確率は極めて低いことがあげられる。加えて、F1-165は‘あおり27’の後代ではないにも関わらず、‘あおり27’との交配によって劣性形質である非褐変性を有する個体を多数出現させた。F1-165は‘あおり27’と共通の祖先(‘ゴールドデリシャス’)をもっているため、非褐変性アレルを保有していたと考えられる。

4. 摘要

‘あおり27’と褐変性を有する親(F1-165及び‘こうたろう’)を交配した2つのF₁集団(165A27集団50個体及びKA27集団55個体)を用いたQTL解析によって、果肉褐変性に関連する複数形質(果肉及び果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO活性)の主要QTLが、褐変性親の第16連鎖群上部に複数年安定して検出された。このことから、QTL上に位置するリンゴのポリフェノール生合成経路上の遺伝子*LARI*が、褐変基質であるポリフェノールの含量を制御することで、果汁および果肉褐変性を制御していると推察された。非褐変性親である‘あおり27’に有意なQTLは検出されなかったこと、QTLの寄与率が66.3–73.4%と高く、連鎖マーカーの遺伝子型と褐変指数の分離が概ね一致したことから、解析集団において褐変性はほぼ単因子支配であり、非褐変性は劣性形質であると推定された。また、交配親であるF1-165は‘あおり27’の後代ではないにも関わらず、多数の非褐変性F₁個体を出現させたことから、非褐変性は複数の祖先品種由来の非褐変性アレルの集積によるもので、‘あおり27’固有の突然変異によるものではないことが示唆された。

III QTLに関するハプロタイプ解析及び主要形質との連鎖関係

ハプロタイプ(haplotype)とは、生物が保有する単一の染色体上のDNA配列(二倍体生物であれば母もしくは父から受け継いだ片方の染色体の配列)を指し、遺伝的に連鎖しているアレルの組合せともいえる。ハプロタイプは、特定の染色体領域内で少数の遺伝子またはDNAマーカーのアレルの連鎖関係を同定することで明らかにすることができる。ハプロタイプ解析は、遺伝資源や実生から共通の由来を持つ染色体を保有する個体や品種を探索する場合や、連鎖関係にある複数遺伝子についてアレルの機能を予測する場合に有用である。

カンキツでは、マーカー情報と系譜情報を基にしたハプロタイプ解析によって、‘宮川早生’から‘清見’に伝搬された単胚性ハプロタイプの推定が行われた(Nakano et al., 2008)。また、Sugiyama et al. (2010)は、ウンシュウミカンに特異的なカロテノイド蓄積に関与する遺伝子領域のハプロタイプ構造を報告した。リンゴでは、Kunihisa et al. (2016)が国内の主力品種である‘ふじ’及びその家系品種のハプロタイプ解析を行い、収穫期、酸度、蜜入り、低粉質化を制御する領域とその由来する祖先品種を明らかにしている。

第2章において、果肉及び果汁褐変性に関する主要QTLが褐変性親(F1-165及び‘こうたろう’)の第16連鎖群上部の*LARI*近傍に検出され、このQTLは供試集団の褐変性分布の大部分を説明していた。このQTLにおいて‘あおり27’は非褐変性ア

レルのホモ接合体、F1-165及び‘こうたろう’は褐変性/非褐変性アレルのヘテロ接合体であり、非褐変性は劣性形質であると推定された。また、‘あおり27’の突然変異によるものではなく、祖先品種に由来する非褐変性アレルの集積によるものと考えられた。日本では、青森県で育成された極早生品種を除き、多くの品種が8つの祖先品種(‘ゴールドデリシャス’、‘紅玉’、‘デリシャス’、‘印度’、‘国光’、‘ウースターペアメン’、‘旭’、‘コックスオレンジピピン’)に由来する(Kunihisa et al., 2014)。品種育成に用いられる頻度は祖先品種によって異なるが、比較的遺伝子の集積が起こりやすい。第16連鎖群のQTLについては、これらの祖先品種が非褐変性アレルを保有していることが推察され、このアレルが既に日本の品種群の中に遍在していると考えられる。

目的とする遺伝子領域の近傍に他の形質の遺伝子が連鎖している場合、育種への実用化が難しい場合がある。イネで深刻な病害である「いもち病」に強い品種の開発では、陸稲由来の「いもち病」圃場抵抗性遺伝子の水稲への導入が80年以上試みられてきたが、食味が良い個体が得られてなかった。Fukuoka et al. (2009)は、陸稲がもつ圃場抵抗性遺伝子を特定し、最も効果が高い*Pi21*遺伝子近傍に食味を低下させる遺伝子が存在することを明らかにした。遺伝子の正確な位置関係に基づき、これらの連鎖を切ることで、良食味でいもち病に強い品種の作出に成功している。本研究では、第16連鎖

群の褐変性の QTL 近傍に酸度に関する QTL も検出されている (第 2 章). *LARI* 近傍には酸度遺伝子 *Ma1* (Bai et al., 2012) と致死遺伝子 *MdPHYLLO* (Orcheski et al., 2015) が存在することが分かっている. 酸度遺伝子は高酸型と低酸型が存在し, ヘテロ接合体が国内品種のほとんどを占めることから, 食味に適した酸度となると考えられる. 致死遺伝子は野生型と致死型が存在し, 致死型のホモ接合体では致死となる. *LARI* マーカーを用いて品種となりうる後代を得るためには, 非褐変性アレルが酸度及び致死遺伝子に関してどの遺伝子型と連鎖しているのかを考慮しなければならない.

そこで本章では, QTL のハプロタイプ解析によって非褐変性アレルが由来する祖先品種と, これを受け継いでいる品種を明らかにし, 非褐変性品種育成のための交配親となりうる素材の探索を行った. さらに, 第 16 連鎖群の QTL 近傍のハプロタイプ解析により, 非褐変性アレルと酸度及び致死遺伝子アレルとの連鎖関係を明らかにすることを試みた.

1. 材料及び方法

1) 材料

‘あおり 27’, F1-165, ‘こうたろう’, それらの祖先にあたる 5 品種 (‘デリシャス’, ‘ゴールデンデリシャス’, ‘印度’, ‘紅玉’, ‘国光’), 及びこれらを祖先とする 14 品種 (‘ふじ’, ‘ゴールデンメロン’, ‘はるか’, ‘はつあき’, ‘ひめかみ’, ‘いわかみ’, ‘金星’, ‘マヘ 7’, ‘恵’, ‘王林’, ‘レッドゴールド’, ‘世界一’, ‘東光’, ‘つがる’) を第 16 番染色体全領域のハプロタイプ解析に使用した (Table 3-1, Fig. 3-1). また, *LARI* 領域に限定したハプロタイプ解析には, 第 2 章で使用した‘あおり 27’の F₁ 集団の中から, 褐変程度に差のある 28 個体 (165A27 集団から, INB (24-h) < 0.5 の No. 60, 65, 67, 71, 75, 76, 81, 84, INB (24-h) ≥ 2.5 の No. 68, 74, 79, 88, 92, 96, 100, 101. KA27 集団から, INB (24-h) < 1.5 の No. 19, 25, 26, 41, INB (24-h) ≥ 4.0 の No. 14, 18, 27, 32, 37, 40, 46, 54) を使用した.

Table 3-1. Apple cultivars / selections used for haplotyping of Chr16

Cultivar / selection	Pedigree		Registration / Publication year ^a	Origin
	Seed parent	Pollen parent		
founders	Delicious	-	1880s	USA
	Golden Delicious	Grimes Golden	-	USA
	Indo	-	-	Japan
	Jonathan	-	-	USA
	Ralls Janet	-	-	USA
parents used for QTL analysis	Aori 27	Kinsei	2008	Japan
	F1-165	Golden Delicious	-	Japan
	Kotaro	Fuji	2001	Japan
	Fuji	Ralls Janet	1962	Japan
	Golden Melon	Golden Delicious	1949	Japan
	Haruka	Golden Delicious	2002	Japan
	Hatsuaki	Jonathan	1976	Japan
	Himekami	Fuji	1985	Japan
cultivars or selections related for parents used for QTL analysis	Iwakami	Fuji	1985	Japan
	Kinsei	Golden Delicious	1972	Japan
	Mahe 7	5 gou (Golden Delicious × Indo)	-	Japan
	Megumi	Ralls Janet	1950	Japan
	Orin	Golden Delicious	-	Japan
	Redgold	Golden Delicious	1946	USA
	Sekaiichi	Delicious	1974	Japan
	Toko	Golden Delicious	1962	Japan
Tsugaru	Golden Delicious	1975	Japan	

^aRegistration / Publication year: Year of cultivar registration or appearance in commercial / test production.

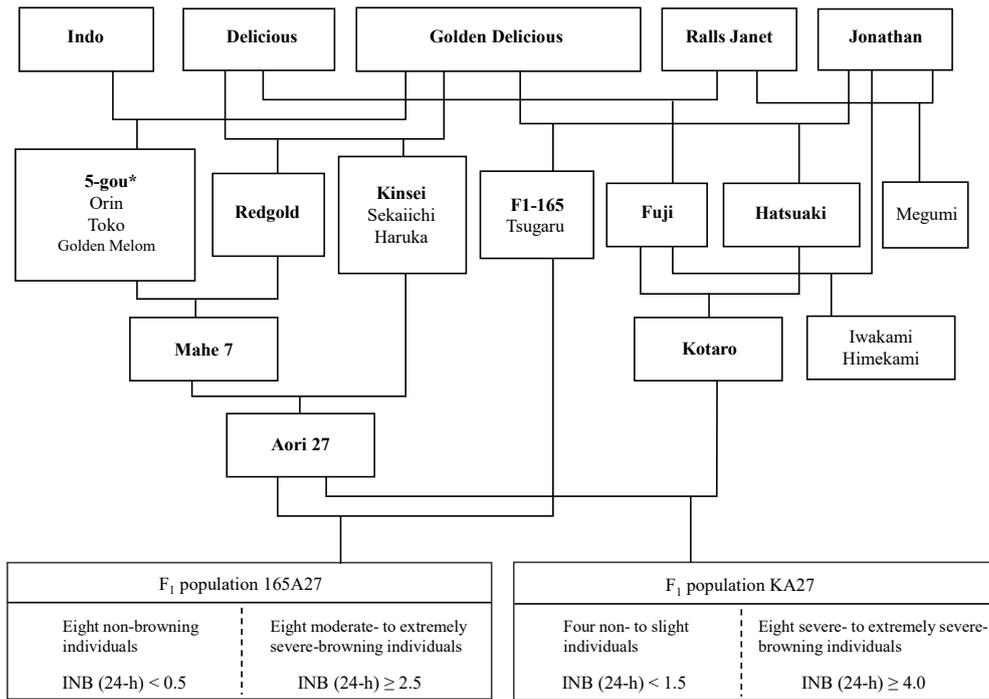


Figure 3-1. Pedigree of apple cultivars, selections and F₁ individuals used for haplotyping of Chr16. The Bold indicated the ancestor of the populations used for QTL analysis. *5-gou was not used for haplotyping.

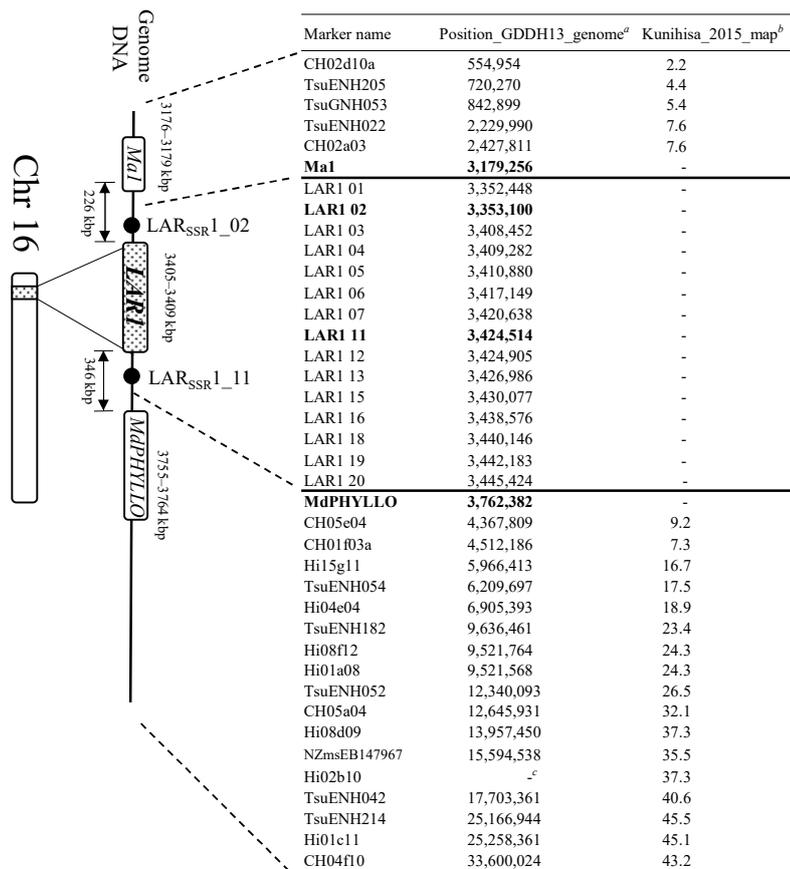


Figure 3-2. Information of positional relationships between physical map for genes near the QTL and 39 DNA markers used for estimate haplotype of Chr16.

^aPosition_GDDH13_genome: marker order according to the GDDH13 ('Golden Delicious' doubled haploid #13). ^bKunihisa_2015_map: marker order according to the reported linkage map (Kunihisa et al. 2014). ^c:- no data.

2) ハプロタイプ解析

第 16 番染色体全領域のハプロタイプ解析には、*LAR1* 近傍に新規に作成した 15 の SSR マーカー (Table 2-3), 既報 (Bai et al., 2012) のプライマーデザインを改変した酸度に関する *Ma1* マーカー, 致死に関する *MdPHYLLLO* マーカー (Orcheski et al., 2015) を含め, 第 16 連鎖群に座乗する 39 の DNA マーカーを使用した (Fig. 3-2). DNA 抽出及びマーカーの多型検出方法は第 2 章に準じた. マーカー多型のハプロタイプとそれらの起源は Kunihisa et al. (2016) の方法を一部改変し, 品種の系譜とマーカー間の連鎖関係を考慮して推定した. マーカー位置の順序は GDDH13 ('Golden Delicious' doubled haploid#13) ゲノムシーケンスデータ (Daccord et al., 2017) や, 既報の連鎖地図 (Kunihisa et al., 2014) を参考に決定し, ハプロタイプが矛盾した場合は部分的に再配置した. また, *LAR1* 周辺の 0.1cM 以内の範囲に設計された 15 の SSR マーカー間では組換えは起こっていないと仮定した. 起源が特定できないハプロタイプブロックが連鎖群の端から 10 cM 未満の場合, データに矛盾がない限り隣接するハプロタイプブロックと同一の由来を持つと仮定した. また, 各 F_1 個体の *LAR1* 領域のハプロタイプの起源は, *LAR1* の両側に設計された 2 種類の SSR マーカー (*LAR_{SSR1_02}* 及び *LAR_{SSR1_11}*) を使用し, 両親である 'あおり 27', F_1 -165 及び 'こうたろう' で決定されたハプロタイプを参照して推定した.

2. 結果

1) 'あおり 27' 及びその家系品種・系統のハプロタイプ解析

第 16 連鎖群に検出された果肉褐変性の主要 QTL が褐変性親の連鎖地図でのみ検出されたことから, 'あおり 27' は非褐変性アレルのホモ接合体であり, F_1 -165 及び 'こうたろう' は褐変性/非褐変性アレルのヘテロ接合体であると推定された (第 2 章). 本章では, 非褐変性アレルが由来する祖先品種を明らかにするため, 主要 QTL を含むゲノム領域のハプロタイプとその由来を, 'あおり 27' 及びその家系品種・系統を用いて決定した (Table 3-2). 祖先品種から 'あおり 27' 及びその F_1 個体への非褐変性アレルの伝播を Fig. 3-3 に示した. 本文中では各ハプロタイプを "祖先品種の頭文字 (印度, I; デリシャス, D; ゴールデンデリシャス, G; 国光, R; 紅玉, J) と *LAR_{SSR1_11}* マーカー型" で表す. 'あおり 27' は 'デリ

シャス' (D284) 及び '印度' (I284), F_1 -165 は '紅玉' (J280) 及び 'ゴールデンデリシャス' (G284) に由来するハプロタイプを持っていた. 165A27 集団では, 非褐変性 F_1 個体群 (INB (24-h) < 0.5, No. 60, 65, 67, 71, 75, 75, 81 及び 84) は F_1 -165 から 'ゴールデンデリシャス' 由来のハプロタイプ (Fig. 3-3, 薄いカーキ, G284) を継承しており, 'あおり 27' からは 'デリシャス' (Fig. 3-3, オレンジ, D284) または '印度' (Fig. 3-3, ベージュ, I284) のいずれかのハプロタイプを受け継いでいた. これに対し, 褐変性 F_1 個体群 (INB (24-h) \geq 2.5, No. 68, 74, 79, 88, 92, 96, 100 及び 101) は F_1 -165 から '紅玉' (Fig. 3-3, 緑色, J280), 'あおり 27' からは 'デリシャス' (D284) または '印度' (I284) のハプロタイプを継承していた.

これらのことから, 'あおり 27' 及び 165A27 集団の非褐変性 F_1 個体は 'ゴールデンデリシャス', 'デリシャス' または '印度' のハプロタイプ (G284, D284, I284) の組合せをもつことが示された. 非褐変性が劣性形質であることを考慮すると, これら 3 つのハプロタイプ, つまり 'ゴールデンデリシャス', 'デリシャス' 及び '印度' の片方のアレルが非褐変性因子と考えられる. 一方, F_1 -165 から '紅玉' 由来のハプロタイプ (J280) を継承している F_1 個体は, 'あおり 27' 由来の非褐変性因子を受け継いでいるにも関わらず褐変した. このことから, '紅玉' の片方のアレルは優性的に果肉褐変を引き起こすと考えられた.

'こうたろう' は, '国光' 由来のハプロタイプ (Fig. 3-3, 薄紫, R280) と 'ゴールデンデリシャス' 由来のハプロタイプ (Fig. 3-3, 薄いカーキ, G284, F_1 -165 と共通) を持っていた. KA27 集団では, 'こうたろう' から 'ゴールデンデリシャス' 由来のハプロタイプ (G284) を継承している F_1 個体群 (No. 19, 25, 26 及び 41) は INB (24-h) < 1.5 であり, '国光' 由来のハプロタイプ (R280) を継承した個体群 (No. 14, 18, 27, 32, 37, 40, 46 及び 54) は INB (24-h) \geq 4.0 であった (Fig. 3-3). 165A27 集団と同様に, 非~難褐変性は劣性形質であり, 'ゴールデンデリシャス' 由来のハプロタイプ (G284) は非褐変性, '国光' 由来のハプロタイプ (R280) は褐変性アレルと考えられた. しかしながら, この集団では非褐変性アレルをホモ接合体でもつ F_1 個体のうち, 非褐変性形質 (INB (24-h) < 0.5) を示す個体はごく僅かであったことから, 第 16 連鎖群の主要 QTL 以外にも果肉褐変性に関与する因子が存在すると考えられた.

Table 3-2. Definition of haplotype of chr16 for estimate of non-browning haplotype of the nearby QTL

Marker name	Position: GDDH13 genome ^a	Founders										Precedent										'Aoni 27'	
		'Ralls Janet'	'Delicious'	'Jonathan'	'Golden Delicious'	'Indo'	'Sakurami'	'Hanku'	'Megan'	'Fuji'	'Yokami'	'Hiemachi'	'T'sugami'	'Golden Melon'	'Toko'	'Onix'	'Redgold'	'Kinsei'	'Malet'	'Hitasaki'	'Kotomo'	'F1165'	INB = 0.0
		INB = 3.0	INB = 5.0	INB = 4.7	INB = 3.0	INB = 2.3	INB = 3.0	INB = 3.0	INB = 4.0	INB = 5.0	INB = 4.7	INB = 2.0	INB = 4.0	INB = 3.0	INB = 5.0	INB = 4.0	INB = 3.3	INB = 5.0	INB = 3.7	INB = 4.3	'F1165'	INB = 0.0	
CH020a	16_554,954	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223	223
Tsushenz05	16_702,270	347	345	347	345	347	345	347	345	347	345	345	345	347	345	347	345	347	347	345	345	345	347
Tsushenz053	16_842,899	166	170	166	170	166	170	166	170	166	170	166	170	166	170	166	170	166	170	170	170	170	166
Tsushenz022	16_2,229,990	86	91	86	91	86	91	86	91	86	91	86	91	86	91	86	91	86	91	86	91	91	86
CH020b3	16_2,427,811	160	155	160	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	155	160
Ma	16_3,179,236	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma
LARI 01	16_3,352,448	173	164	173	164	173	164	173	164	173	164	173	164	173	164	173	164	173	164	173	164	173	164
LARI 02	16_3,353,100	289	370	289	370	289	370	289	370	289	370	289	370	289	370	289	370	289	370	289	370	289	370
LARI 03	16_3,408,452	300	297	300	297	300	297	300	297	300	297	300	297	300	297	300	297	300	297	300	297	300	297
LARI 04	16_3,409,282	258	240	258	240	258	240	258	240	258	240	258	240	258	240	258	240	258	240	258	240	258	240
LARI 05	16_3,410,880	298	300	298	300	298	300	298	300	298	300	298	300	298	300	298	300	298	300	298	300	298	300
LARI 06	16_3,417,149	226	221	226	221	226	221	226	221	226	221	226	221	226	221	226	221	226	221	226	221	226	221
LARI 07	16_3,420,638	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
LARI 11	16_3,424,514	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	284	284	284	284	284
LARI 12	16_3,424,985	153	151	153	151	153	151	153	151	153	151	153	151	153	151	153	151	153	153	153	153	153	153
LARI 13	16_3,426,986	268	215	268	215	268	215	268	215	268	215	268	215	268	215	268	215	268	215	268	215	268	215
LARI 15	16_3,430,077	290	286	290	286	290	286	290	286	290	286	290	286	290	286	290	286	290	286	290	286	290	286
LARI 16	16_3,438,576	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191	188	191
LARI 18	16_3,440,146	276	282	276	282	276	282	276	282	276	282	276	282	276	282	276	282	276	282	276	282	276	282
LARI 19	16_3,442,183	246	262	246	262	246	262	246	262	246	262	246	262	246	262	246	262	246	262	246	262	246	262
LARI 20	16_3,445,424	207	209	207	209	207	209	207	209	207	209	207	209	207	209	207	209	207	209	207	209	207	209
ADPH2LO	16_3,762,382	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
CH050A	16_4,367,809	154	169	154	169	154	169	154	169	154	169	154	169	154	169	154	169	154	169	154	169	154	169
CH010Ba	16_4,512,186	7.3	229	229	229	218	229	218	229	218	229	218	229	218	229	218	229	218	229	218	229	218	229
H15g11	16_5,986,413	16.7	161	158	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161	161
Tsushenz054	16_6,209,697	17.5	200	203	200	203	200	203	200	203	200	203	200	203	200	203	200	203	200	203	200	203	200
H040A1	16_6,905,393	18.9	214	225	214	226	214	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244
Tsushenz182	16_9,636,461	23.4	282	287	282	284	286	280	282	284	286	280	282	284	286	280	282	284	286	280	282	284	286
H0802	16_9,521,764	24.3	200	127	129	219	216	112	216	112	216	112	216	112	216	112	216	112	216	112	216	112	216
H010A8	16_9,521,568	24.3	164	90	183	180	180	90	183	180	180	180	180	90	183	180	180	180	90	183	180	180	90
Tsushenz052	16_12,340,093	26.5	157	163	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157	157
CH050A4	16_12,645,931	32.1	167	195	158	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189	189
H08009	16_15,957,480	37.3	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182
Zsushenz056	16_15,984,538	35.5	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173
H02010	0	37.3	-	228	224	224	-	228	224	224	-	228	224	224	-	228	224	224	-	228	224	224	-
Tsushenz042	13_17,703,361	40.6	164	164	113	164	155	113	164	155	113	164	155	113	164	155	113	164	155	113	164	155	113
Tsushenz114	16_25,166,944	45.5	220	220	201	222	201	222	201	222	201	222	201	222	201	222	201	222	201	222	201	222	201
H01e11	16_28,238,361	48.1	145	145	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149	149
CH090	16_33,600,024	49.2	253	253	251	201	238	117	195	195	253	317	251	195	195	253	317	251	195	195	253	317	253

^aThe 10 haplotypes derived from 5 founders were color-coded. Those from 'Ralls Janet', purple / pale purple; those from 'Delicious', orange / pink; those from 'Jonathan', green / light green; those from 'Golden Delicious', khaki / pale khaki; those from 'Indo', light blue / beige.

^bPosition_GDDH13_genome: marker order according to the GDDH13 ('Golden Delicious' doubled haploid #13)

^cKunhisu_2015_map: marker order according to the reported linkage map (Kunhisu et al. 2014)

^dINB: Index-number of browning (24-h) evaluated in 2014.

^e-: no data

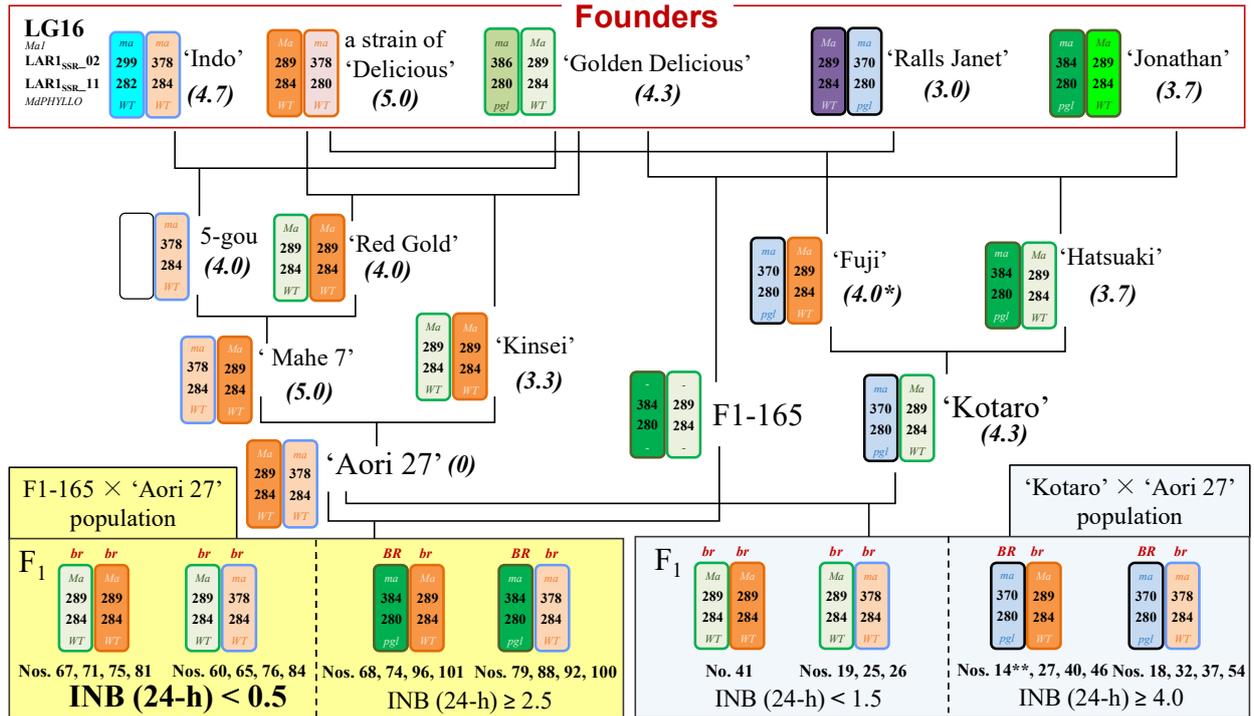


Figure 3-3. Genetic information and definition of haplotypes for 'non-browning' in F1-165 × 'Aori 27' and 'lower degree of browning' in 'Kotaro' × 'Aori 27' crosses, estimated using two SSR loci in LG 16—LAR_{SSR1_02} and LAR_{SSR1_11}—positioned immediately either side of the major QTL in LG 16. *Br* and *br* above each haplotype of F₁ individuals indicate the browning and non-browning effect, respectively. Visual inspection of browning degree of the fruit flesh (INB 24-h) in 2014 is indicated within parentheses. F₁ individuals were classified according to haplotypes. In F₁ population 165A27, non-browning individuals have haplotype of 'Golden Delicious' in common, and moderate to extremely severe browning individuals have haplotype of 'Jonathan' in common. In F₁ population KA27, non-to slight-browning individuals have haplotype of 'Golden Delicious' in common, and severe-to extremely severe-browning individuals have haplotype of 'Ralls Janet' in common. The haplotypic information for *Mal* and *MdPHYLLLO* marker genotypes is added, referring to Table 3-2. *Ma* and *ma* link to high and low acidity, respectively. The *pgl* links to pale green lethal, in contrast with wild type (*WT*). **Fuji' showed extremely severe-browning (INB = 5.0) in a previous report (Noro et al. 2009). **The recombination had occurred between *Mal* and LAR_{SSR1_02} in No. 14.

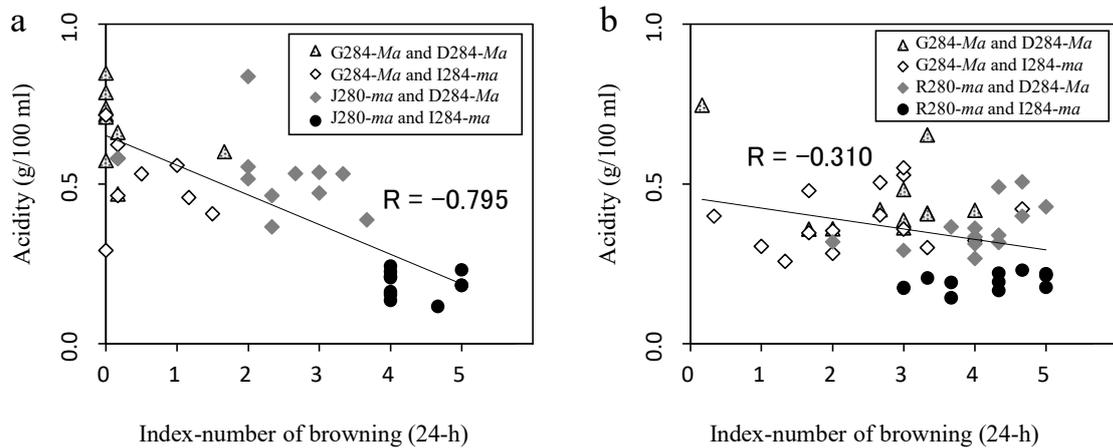


Figure 3-4. Relationship between index-number of browning (24-h, 2014) and acidity of F₁ individuals from the (a) F1-165 × 'Aori 27' and (b) 'Kotaro' × 'Aori 27' crosses. R-value as correlation coefficient are shown in each panel. Four genotypes were identified around LAR_{SSR1_11} and *Mal*. Two alleles of LAR₁₁_{SSR}, detected as 280-bp and 284-bp fragments, were classified into five allele forms according to founder cultivar of origin, i.e., G284, D284, I284, J280, and R280 (where G = 'Golden Delicious'; D = 'Delicious'; I = 'Indo'; J = 'Jonathan'; and R = 'Ralls Janet'). The dominant allele *Ma* showed high acidity, whereas the recessive allele *ma* showed low acidity.

2) 主要形質との連鎖関係

第2章のQTL解析において、果肉及び果汁褐変性に関するQTLと酸度に関するQTLはF1-165及び‘こうたろう’の第16連鎖群の近接する位置に検出された (Fig. 2-8, Fig. 2-9). 致死遺伝子 *MdPHYLLLO* 及び酸度の主動遺伝子である *Ma1* はこれらのQTL近傍に位置することが分かっている。

本章のハプロタイプ解析で明らかとなった‘ゴールドデンデリシャス’ (薄いカーキ, G284), ‘デリシャス’ (オレンジ, D284) 及び‘印度’ (ベージュ, I284) の非褐変性アレルは野生型の非致死アレル (*WT*) と連鎖していた。酸度の遺伝子については、‘ゴールドデンデリシャス’及び‘デリシャス’の非褐変性アレル (G284 及び D284) は高酸性アレル (*Ma*) と、‘印度’の非褐変性アレル (I284) は低酸性アレル (*ma*) と連鎖していた (Table 3-2, Fig. 3-3)。そこで、この連鎖を確認するため、2つのF₁集団の全個体についてLAR_{SSR1_11} 及び *Ma1* 遺伝子型を調査し、形質との関連性を調べた (Fig. 3-4)。LAR_{SSR1_11} と *Ma1* の間で組換えが見られた1個体については解析から除いた。

両集団において、‘ゴールドデンデリシャス’、‘デリシャス’及び‘印度’由来の非褐変性アレル (LAR_{SSR1_11} マーカーで G284/D284 または G284/I284) をもつグループは、褐変性アレル (J280 または R280) をもつグループより褐変程度が低かった。G284/D284 グループの酸度は4つの遺伝子型グループの中で最も高く、このグループの *Ma1* 遺伝子型が *Mal/Ma* であるという結果と一致しており、これらの非褐変性アレル (G284 及び D284) が高酸性アレル (*Ma*) と連鎖していることが確認された。一方、*Mal/ma* 遺伝子型を示す G284/I284 グループは、J280/D284 及び R280/D284 グループと同水準の適度な酸度を示しており、‘印度’由来の非褐変性アレル (I284) と低酸性アレル (*ma*) との連鎖関係が確認できた。

3. 考察

1) 非褐変性形質の起源

IIのQTL解析によって、第16連鎖群の主要QTLに制御されている非褐変性形質は劣性遺伝することが示された。165A27 集団の INB (24-h) < 0.5 の非褐変性個体及び INB (24-h) ≥ 2.5 の褐変性個体について、本QTL周辺のハプロタイプを定義し、それらのハプロタイプの由来する祖先品種を調べたところ、3つの祖先品種 (‘ゴールドデンデリシャス’、‘デリシャス’及び‘印度’) が、それぞれ少なくとも1つの非褐変性アレルを保有していると結論づけられた (Fig. 3-3)。また、これらの非褐変性アレルは‘ふじ’、‘つがる’、‘王林’等、多くの品種に継承されており (Table 3-2)、本QTLに関する限り、非褐変性品種を育成するために必ずしも‘あおり27’を交配親として用いる必要はなく、広い遺伝資源の選択が可能であることが明らかとなった。

しかし、‘あおり27’の育成過程で用いられた品種 (‘金星’、‘マヘ7’及び‘レッドゴールド’) や KA27 集

団の LAR_{SSR1_11} マーカー遺伝子型が 284 bp/284 bp 型の個体の約半数は、本QTLについて非褐変性アレルのホモ接合体であるにも関わらず果肉が褐変することも分かった。このことから、果肉が非褐変性となるためには、本QTLの非褐変性アレルがホモ接合体となることが必須条件ではあるが、他に存在する未検出のQTLにおいても適切なアレル組合せが必要であることが推察された。褐変し難い遺伝子組換えりんご Arctic® Apples が、*PPO* の発現を抑制することによって開発されていることから、*PPO* が果肉褐変性を制御できることは明らかであり、QTLの有力候補である。本研究において *PPO* 周辺にQTLが検出されなかった要因として、交配に用いた親の *PPO* が機能的にホモ接合体であり、後代で表現型が分離しなかった可能性がある。そのため、多様な交配親を用いたQTL解析や、幅広い遺伝資源を用いたGWASによって、新たなQTLを同定する必要がある。

2) 酸度及び致死遺伝子との連鎖関係と有用な遺伝資源‘印度’

酸度の原因遺伝子 *Ma1* と致死遺伝子 *MdPHYLLLO* は、本研究で果肉褐変性に関するQTLが検出された *LAR1* の近くに存在し (Fig. 2-12)、裂果や果汁の量、果肉質に関するQTLもまたこの領域に報告されている (Kumar et al., 2013; Longhi et al., 2012; Tazawa et al., 2017)。Chagné et al. (2012b) は、有用な *LAR1* アレルの選抜によって、連鎖による不良形質の導入が引き起こされる可能性があることと予測しており、非褐変性りんごの育成過程でも同様の危険性が懸念されるため、連鎖関係を考慮する必要がある。

第2章で明らかとなった非褐変性アレルは野生型 (*WT*) の非致死アレルと連鎖していたため、本QTLでの選抜によって致死が引き起こされる危険性はないことが示された。一方、酸度の原因遺伝子 *Ma1* に関して、Khan et al. (2012) は‘プリマ’と‘フィエスタ’について、高ポリフェノール含量に関する優性アレルは、低酸に関する劣性アレルと連鎖していると報告している。Kunihisa et al. (2014) と Morimoto et al. (2014) は、‘あかね’及び‘ふじ’について、第16連鎖群の低果汁褐変性アレルと高酸性アレルが連鎖していると述べている。これらの連鎖により、非褐変性りんごの育種では、酸味が強いりんごが育成される可能性がある。

本研究でも、酸度の主要QTLは第16連鎖群の果肉褐変性のQTL近傍に検出されており (Fig. 2-8, Fig. 2-9)、多くの既報と一致した (Kenis et al., 2008; Liebhard et al., 2003a; Xu et al., 2011)。果肉褐変性と酸度のQTLの連鎖関係は、INB (24-h) と酸度 (g/100 mL) の相関 (Fig. 3-4) によっても確認された。しかし、ハプロタイプ解析により、‘デリシャス’及び‘ゴールドデンデリシャス’由来の非褐変性アレルは高酸性のアレル (*Ma*) と連鎖しているが (D284-*Ma*, G284-*Ma*)、‘印度’由来の非褐変性アレルは低酸性のアレル (*ma*) と連鎖している (I284-

ma) ことが明らかとなった (Table 3-2, Fig. 3-3). ‘あおり 27’が非褐変性にもかかわらずマイルドな酸味を示すのは (0.3 g/100 mL), ‘印度’に由来する非褐変性アレルを保有しているためと考えられた. 非褐変性リンゴ品種の育成においては, ‘印度’由来の非褐変性アレルを利用することによって, 適度な酸味の品種を選抜することが可能であると考えられる.

4) 摘要

第 16 連鎖群の QTL (*LARI*) における非褐変性アレルの起源を明らかにするために, QTL 解析に用いた 2 集団とその祖先品種及び近縁品種について, QTL 周辺のプロタイプ解析を行い, 非褐変性アレルの由来する祖先品種を推定した. ‘あおり 27’及び非褐変性 F₁ 個体は, ‘ゴールデンデリシャス’, ‘デリシャス’及び‘印度’に由来する非褐変性アレルのいずれかをホモ接合で持っており, これによ

り褐変程度が低くなっていることが明らかとなった.

本 QTL 近傍には酸度及び致死遺伝子が存在する. 品種育成では, 望ましい形質に関する遺伝子を導入すると, それに連鎖する不良形質も一緒に取り入れてしまうことがあるため (リンケージドラッグ), 非褐変性アレルと酸度及び致死遺伝子のアレルとの連鎖関係を明らかにした. 大部分の非褐変性アレルが高酸性アレルと連鎖している一方で, ‘印度’由来の非褐変性アレルのみ低酸性アレルと連鎖していた. 高酸性アレルのホモ接合体は酸度が高くなる傾向があることから, 生食に適した適度な酸味の品種を育成するためには, ‘印度’由来の非褐変性アレルが有用であると考えられた. また, いずれの非褐変性アレルも野生型の非致死アレルと連鎖しており, 非褐変性アレルの選抜により致死が引き起こされる危険性はないことが明らかとなった.

IV GWAS による果肉褐変関連遺伝子領域の解析

II 及び III より, ‘あおり 27’及び後代の非褐変性形質は第 16 連鎖群の QTL において‘ゴールデンデリシャス’, ‘デリシャス’及び‘印度’由来の非褐変性プロタイプのいずれかをホモ接合で持つことが必要条件であると推定された. 一方で, ‘マヘ 7’, ‘金星’等は上記プロタイプをホモ接合で持つにも関わらず褐変することから, 他の未検出 QTL の関与が考えられた.

GWAS は形質と塩基配列多型との関連から, 表現型を制御する QTL と効果を推定する手法のひとつであり, 研究用に分離集団を作成することができないヒトの病気に関する遺伝子検出のために開発され, 発展してきた (Hamblin et al., 2011). QTL 解析のように分離集団を作成する必要がなく, 既存の遺伝資源や QTL 解析には利用できないような小規模集団を使用して解析することが可能である. 解析集団において, マーカーと目的遺伝子座が連鎖不平衡 (linkage disequilibrium: LD) 状態にあることを前提としており, DNA マーカーによってカバーできる領域の広さは LD の程度に依存する. 解析に必要なマーカー密度を判断するために, LD の程度が重要な情報となる (Flint-Garcia et al., 2005; Slatkin, 2008; Uchiyama et al., 2013). LD の程度が高い集団ではゲノム全体をカバーするために必要なマーカー数は少ないが, LD の程度が低い集団では高密度な大量マーカーが必要となる. また, QTL 検出の解像度も LD の程度に依存し, LD が低いと解像度が高くなる. 多くの GWAS ではゲノム全体を高密度でカバーする多数のマーカーを使用する必要があり, SSR マーカーや SNP マーカーが用いられることが多い. SSR マーカーは共優性で再現性も高く, 種間横断の利用も可能で利点が多いが (Miah et al., 2013), 近年では SSR マーカーより

費用対効果が高く, ハイスループットの高密度マッピングが可能な SNP マーカーが注目されている. リンゴでは, Illumina Infinium II システム, Axiom 等の SNP アレイ (Chagné et al., 2012a; Bianco et al., 2016) が開発されて有用な分析手段となっており, GWAS に利用されている (Kumar et al., 2013).

果樹における GWAS は, リンゴ (Kumar et al., 2013), ナシ (Iwata et al., 2013) 等で最初の報告がある. Kumar et al. (2013) は 7 家系の 1,200 実生, 2,500 SNP を用いた解析によって硬度, 褐変性, 酸度, 裂果等の 6 形質で有意な SNP を検出し, それらのいくつかは既知の候補遺伝子座と一致していた. Iwata et al. (2013) は, 日本ナシ 76 品種について 155 の SSR マーカー, 4 の RAPD-STS マーカー等を含む合計 162 のマーカーを用いた 9 形質の解析によって, 収穫期, 黒斑病耐性, 短果枝数に有意な QTL を検出し, 有効性を示した. また, Cao et al. (2012) らはモモ 104 系統, 53 の SSR マーカーを用いて果肉質や果重, 低温要求性等の 10 形質についての解析を行い, 既報と一致する多くの QTL を検出している.

GWAS では, 多様な由来をもつ広範囲の遺伝子プールを解析に組み込むことが可能なため, 連鎖地図に基づく QTL 解析で分離集団の親のアレル効果に差がなかった場合には検出できないような QTL も明らかとなる可能性がある. 前述のように, リンゴの果肉褐変性には *PPO* 等複数の因子の関与が考えられるが, 遺伝解析による検証は十分とはいえない.

そこで本章では, 多様な遺伝資源を用いた GWAS によって褐変関連形質 (果肉及び果汁褐変性, 総ポリフェノール含量, *PPO* 活性) を解析し, 新たな QTL を同定することを目的とした.

1. 材料及び方法

1) 材料

現在日本で栽培されている 2 倍体のりんご栽培品種、及びそれらと近縁の 86 品種・系統を供試し、2015 年は 59 品種、2016 年は 85 品種について 1 品種あたり 1 樹の形質調査を行った (Table 4-1)。こ

れらの品種及び系統は、わい性台木 (M.9, JM1, JM7, M26 のいずれか) またはマルバ台木に接ぎ木され、りんご研究所の黒石圃場または藤崎圃場に栽植された 10~20 年生のものを使用した。なお、栽培管理は慣行法に従った。

Table 4-1. Apple cultivars / selections used for GWAS

Cultivar / selection	Phenotypic evaluation		Pedigree		Registration / Publication year ^b	Origin
	2015	2016	Seed parent	Pollen parent		
Aikanokaori	○	○	Fuji	Tsugaru	2001	Japan
Akagi		○	Golden Delicious	Jonathan	1975	Japan
Akane		○	Jonathan	Worcester Pearmain	1970	Japan
Akibae	○	○	Sensyu	Tsugaru	1993	Japan
Akitabeniakari	○	○	Orin	Sensyu	2005	Japan
Akitabenihoppe		○	Sensyu	Sansa	2009	Japan
Akita Gold	○	○	Golden Delicious	Fuji	1992	Japan
Aori 3 gou		○	Toko	Richared Delicious	-	Japan
Aori 11		○	Kitanosachi	Jersy Mac	2004	Japan
Aori 13	○	○	Richared Delicious	Tsugaru	2003	Japan
Aori 15	○	○	Fuji	Aori 3 gou	2004	Japan
Aori 16		○	67-45 (Akane × Rero 11)	Natsumidori	2004	Japan
Aori 21	○	○	Fuji	Rei 8	2008	Japan
Aori 24	○	○	Granny Smith	Rei 8	2013	Japan
Aori 25	○	○	Mellow	Liberty	2013	Japan
Aori 27	○	○	Kinsei	Mahe 7	2008	Japan
Aori 29 gou		○	Tsugaru	Sansa	-	Japan
Benihatsumi		○	Tugaru	Sansa	2018	Japan
Beniminori		○	Tsugaru	Gala	2019	Japan
Chinatsu		○	Akane	Stark Earliest	2001	Japan
Cute		○	Sensyu	Tsugaru	2003	Japan
Delicious	○	○	-	-	1880s	USA
Elstar ^a		○	Ingrid Marie	Golden Delicious	1950s	Netherlands
First Lady		○	Sansa	Tsugaru	2009	Japan
Fuji	○	○	Ralls Janet	Delicious	1962	Japan
Gala	○	○	Kid's Orange Red	Golden Delicious	1974	USA
Golden Delicious	○	○	Grimes Golden	Golden Reinette	-	USA
Golden Melon	○	○	Golden Delicious	Indo	1949	Japan
Granny Smith	○	○	-	-	1868	Australia
Gunma Meigetsu	○	○	Akagi	Fuji	1991	Gunma
Haruka	○	○	Golden Delicious	Delicious	2002	Japan
Hatsuaki	○	○	Jonathan	Golden Delicious	1976	Japan
Hida	○	○	Fuji	Golden Delicious	1985	Japan
Himekami	○	○	Fuji	Jonathan	1985	Japan
Hinoazuma	○	○	Sensyu	Himekami	2006	Japan
Honey Queen	○	○	Megumi	Sekaiichi	1995	Japan
Hozuri	○	○	Fuji	Jonathan	1996	Japan
Indo	○	○	-	-	-	Japan
Iwakami	○	○	Fuji	Jonathan	1985	Japan
Jersey Mac		○	NJ-24	July Red	1971	USA
Jonathan	○	○	-	-	-	USA
Kanki	○	○	Sensyu	Tsugaru	1992	Japan
Kaori	○	○	Richared Delicious	#111	-	Japan
Kinsei	○	○	Golden Delicious	Delicious	1972	Japan
Kio		○	Orin	Sensyu	1994	Japan
Kitanosachi		○	Tsugaru	American Summer Pearmain	1981	Japan
Kitaro	○	○	Fuji	Hatsuaki	2000	Japan
Kizashi		○	Gala	Stark Earliest	1991	Japan
Koukou	○	○	Hirodai 1 gou	Fuji	1999	Japan
Kotaro	○	○	Fuji	Hatsuaki	2001	Japan
Mahe 7	○	○	5 gou (Golden Delicious × Indo)	Redgold	-	Japan
Maoi		○	Mantet	HAC 6	2004	Japan
McIntosh		○	-	-	-	Canada
Megumi	○	○	Ralls Janet	Jonathan	1950	Japan

^aFor juice browning in 2016, we investigated 84 cultivars and selections except for 'Elster'.

^bRegistration / Publication year: Year of cultivar registration or appearance in commercial / test production.

(continued)

Cultivar / selection	Phenotypic evaluation		Pedigree		Registration / Publication year ^b	Origin
	2015	2016	Seed parent	Pollen parent		
Mellow	○	○	19 gou (Golden Delicious × Indo)	Golden Delicious	1990	Japan
Miki Life		○	Sensyu	Tugaru	1992	Japan
Morinokagayaki	○	○	Tsugaru	Gala	2011	Japan
Morioka 68		○	Sansa	Sensyu	-	Japan
Narihoko		○	Golden Delicious	Fuji	1985	Japan
Orei	○	○	Golden Delicious	Delicious	1951	Japan
Orin	○	○	Golden Delicious	Indo	-	Japan
Ralls Janet	○	○	-	-	-	USA
Redgold	○	○	Golden Delicious	Richared Delicious	1946	USA
Rero 11	○		Toko	Richared Delicious	-	Japan
Sansa		○	Gala	Akane	1988	Japan
Sekaiichi	○	○	Delicious	Golden Delicious	1974	Japan
Sensyu	○	○	Toko	Fuji	1980	Japan
Shinano Dolche	○	○	Golden Delicious	Sensyu	2005	Japan
Shinano Gold	○	○	Golden Delicious	Sensyu	1999	Japan
Shinano Piccoro	○	○	Golden Delicious	Akane	2006	Japan
Shinano Pucchi	○	○	Tsugaru	Sansa	2010	Japan
Shinano Red		○	Tsugaru	Vista Bella	1997	Japan
Shinano Sweet	○	○	Fuji	Tsugaru	1996	Japan
Shinsekai	○	○	Fuji	Akagi	1988	Japan
Syusei	○	○	Fuji	Tsugaru	2005	Japan
Slim Red	○	○	Fuji	Akagi	1995	Japan
Telamon	○	○	Wijcik	Golden Delicious	1989	UK
Toki	○	○	Orin	Fuji	2004	Japan
Toko	○	○	Golden Delicious	Indo	1962	Japan
Trajan		○	Golden Delicious	Wijcik	1989	UK
Tsugaru	○	○	Golden Delicious	Jonathan	1975	Japan
Tuscan	○	○	Wijcik	Greensleeves	1989	UK
Worcester Pearmain		○	-	-	1870s	UK
Yoko	○	○	Golden Delicious	Jonathan	1981	Japan
4-23	○	○	Fuji	Mahe 7	-	Japan
230-1		○	Tsugaru	Sansa	-	Japan

2) 果実形質の評価

褐変関連形質として、すり下ろし 24 時間後及び 15 分後の INB (24-h 及び 15-min), 果汁褐変性 (吸光度 400nm), 総ポリフェノール含量, PPO 活性の 5 項目の果実形質を評価した。2015 年と 2016 年 (果汁褐変性については 2016 年のみ) の 2 か年調査し、各品種とも適熟に達した中庸な果実 3 果を使用した。調査方法は第 2 章の形質調査方法に従い、果汁褐変性のみ一部改変して行った。

果汁褐変性は、果肉 10 g を量り取って 3 mm 角程度に細断し、蒸留水 20 mL を加えてブレンダーで破碎 (15,000 rpm, 30 秒) 後直ちに濾紙を用いて吸引濾過し、1.4 mL をマイクロチューブに移して 10,000 rpm で 10 分遠心した。上清 1 mL を 2.5 mL マイクロチューブに移して 25°C で 24 時間インキュベート後、同量の 4% メタリン酸水溶液を加えて酵素反応を停止させ、分光光度計 (UV-1800 UV spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan) で 400 nm の吸光度を測定し、評価値 (A_{400} (24 時間後)) とした。

形質の正規性は第 2 章と同様に Shapiro-Wilk test により閾値 $P=0.05$ で検定した。2 年間共通して調査した 58 品種の INB (15-min, 24-h), ポリフェノール含量, PPO 活性について, Kunihiya et al. (2014) の方法に従って遺伝率を計算した。また, INB の分散成分は、二元配置分散分析モデル

(ANOVA) を用いて推定した。

3) SNP ジェノタイピング

ゲノム DNA の抽出は各サンプルの幼葉より DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて行った。86 品種の遺伝子型は Apple 20K Infinium (Bianco et al., 2014; Illumina, San Diego, CA, USA) を使用し, Illumina の標準的なプロトコールに従って決定した。遺伝子型データは GenomeStudio Data Analysis software (Illumina) を用いて GenCall threshold of 0.15 で解析した。GenTrain score 0.6 以下あるいは cluster separation score 0.4 以下の SNP は目視で確認してクラスターを再設定し, 明瞭な分離を示すものを取捨選択した。また, 品種間で多型のない SNP も削除した。

4) 連鎖不平衡 (LD) の推定と GWAS

LD の推定と GWAS には 20K SNP array で得られた 11,796 SNP の多型データを用いた。SNP の位置データは公開されている SNP 情報 (Bianco et al., 2014) に基づいて, GDDH13 参照配列 (Daccord et al., 2017) へマッピングした結果を使用した。GDDH13 にマッピングされなかった SNP については, GD v1.0p (Velasco et al., 2010) へのマッピング結果または Infinium に付随する位置情報に基づ

き, GDDH13 と両方にマッピングできた近傍の SNP をアンカーとして GDDH13 上の位置を推定した. これにより位置情報が得られなかった SNP は解析から除き, 最終的に 11,730 SNP を解析に使用した.

マーカー間の LD 程度 (r^2) は R package “genetics” の “LD” 機能により, 物理距離が 5-Mb 以内の全ての SNP マーカー間で算出した. マーカー間の r^2 値と物理的距離の関係は, R package “KernSmooth” の “locpoly” 機能を用いて局所多項式で近似した.

GWAS は, R package “rrBLUP” (Endelman, 2011) に実装された “GWAS” 機能の混合モデル (Yu et al., 2006) を用いて行った. 同 package の “A.mat” 機能 (Endelman and Jannink, 2012) により, 遺伝子型データから血縁関係のマトリックスを算出した. モデルに含まれる集団構造の PC (主成分) の数は, R の “prcomp” 機能により算出した寄与率 10% 以上の PC の数を設定することとした. マイナーアレル頻度が 0.05 未満の SNP は解析から除いた.

2. 結果

1) 表現型の分布と遺伝率

2015 年は 59 品種, 2016 年は 85 品種について評価し, 2 か年とも調査したのは 58 品種であった. いずれの年にも, INB (15-min) 及び INB (24-h) は 0 (無) から 5 (甚) まで分離したが (Table 4-2,

Fig. 4-1, Fig. 4-2), 非褐変性 ($0 \leq \text{INB (24-h)} < 0.5$) と判定されたのは, ‘あおり 27’ のみであった. 総ポリフェノール含量及び PPO 活性も両年とも幅広く分布したが, Shapiro-Wilk test では, 2015 年のポリフェノール含量を除く全ての形質が非正規分布を示した.

形質間の相関関係を見ると, 総ポリフェノール含量は, INB (15-min) との相関係数 (R 値) は 0.35 (2015) 及び 0.06 (2016) であるのに対し, INB (24-h) との相関は 0.42 及び 0.27 であり, すりおろし 24 時間後の果肉褐変性との相関が比較的高かった. 一方, PPO 活性は, INB (15-min) との相関係数 (R 値) は 0.36 (2015) 及び 0.39 (2016) であるのに対し, INB (24-h) との相関は 0.30 及び 0.26 となり, すりおろし後短時間での果肉褐変性との相関が高かった. 総ポリフェノール含量と PPO 活性との相関は低く, 第 2 章で QTL 解析に用いた F₁ 集団とは異なる傾向であった (Fig. 4-3, Fig. 4-4).

分散成分及び遺伝率は 2 か年形質調査した 58 品種・系統のデータを使用して計算した (Table 4-3). 広義の遺伝率は, INB (15-min) は 0.71, INB (24-h) は 0.73 と, 第 2 章で使用した F₁ 集団と同様に高値であったのに対し, 総ポリフェノール含量の遺伝率は 0.43, PPO 活性は 0.56 であり, 果肉褐変性と比較して低かった.

Table 4-2. Ranges in phenotypic data collected from apples used for GWAS

Traits	2015					2016				
	Min	Max	Median	Mean	SD	Min	Max	Median	Mean	SD
Index number of browning (24-h)	0	5	4	3.8	1.1	0	5	4	3.9	1.0
Index number of browning (15-min)	0	5	3	3.0	1.5	0	5	3	2.6	1.4
Juice browning (A ₄₀₀)	-	-	-	-	-	0	0.70	0.27	0.29	0.15
Total polyphenol content (mg/100 g FW)	20.3	132.1	71.5	67.9	23.5	19.5	178.6	63.9	66.0	23.9
PPO activity (units/g FW)	6.5	287.1	76.3	91.7	57.6	11.6	337.5	75.0	105.7	75.3

Table 4-3. Variance components and heritability of browning related traits over 2 years

Traits	Variance component	Estimate	Percentage explained (%)	Broad-sense heritability (<i>h</i> ²)
Index number of browning (24-h)	σ_g^2 (genotype)	0.88	72.6	0.73
	σ_y^2 (year)	0	0	
	σ_e^2 (error)	0.33	27.4	
Index number of browning (15-min)	σ_g^2 (genotype)	1.60	70.9	0.71
	σ_y^2 (year)	0.06	2.6	
	σ_e^2 (error)	0.60	26.5	
Total polyphenol content (mg/100g FW)	σ_g^2 (genotype)	209.3	43.3	0.43
	σ_y^2 (year)	20.1	4.2	
	σ_e^2 (error)	254.0	52.5	
PPO activity (units/g FW)	σ_g^2 (genotype)	3145.7	56.3	0.56
	σ_y^2 (year)	595.1	10.7	
	σ_e^2 (error)	1843.6	33.0	

Table 4-4. Significant SNPs identified by GWAS for browning related traits

Traits	Year	SNP name ^a	-log ₁₀ (p)	Chr	Position (bp) ^b
INB (15-min)	2016	SNP_FB_0598996	6.93	5	45098730
	2016	SNP_FB_0049856	4.12	10	39839876
	2016	SNP_FB_0935827	6.30	17	27359258
Juice browning	2016	RosBREEDSNP_SNP_CT_1540624_Lg16_LAR1_MAF40_1618769_exon2	5.61	16	3409834
Total polyphenol content	2015	GDsnp00047	7.19	16	3856528
	2016	RosBREEDSNP_SNP_CT_1540624_Lg16_LAR1_MAF40_1618769_exon2	8.14	16	3409834
PPO activity	2016	SNP_FB_0599012	8.32	5	45095152
	2016	RosBREEDSNP_SNP_GA_49250482_Lg15_01707_MAF20_641093_exon1	4.40	15	50579830

^aSNP with the smallest *p*-value among those exceeding threshold in identical chromosome.

^bPosition were estimated referring the GDDH13 ('Golden Delicious' doubled haploid #13) genome sequence (Daccord et al., 2017).

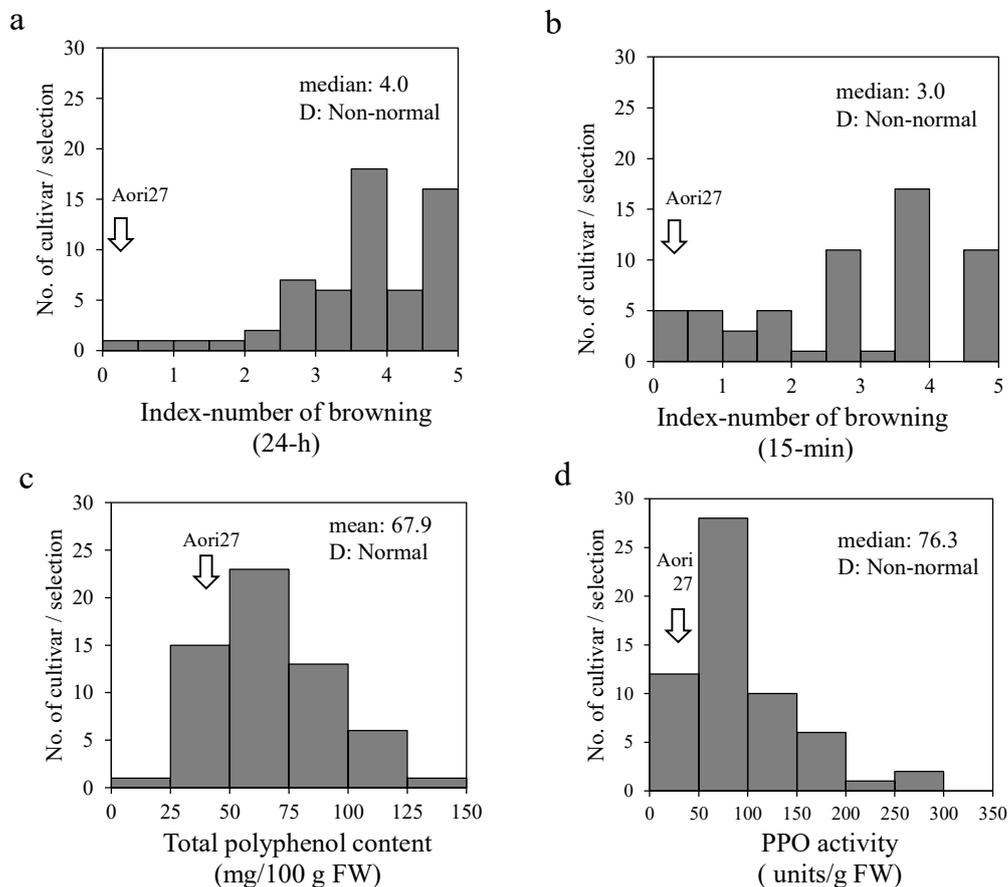


Figure 4-1. Frequency distributions of cultivar / selection in browning-related traits evaluated in 2015: (a) index number of browning (24-h), (b) index number of browning (15-min), (c) total polyphenol, (d) PPO activity. Normality of distribution examined by using the Shapiro-Wilk test and mean value (or median value for non-normally distributed traits) are shown in each panel.

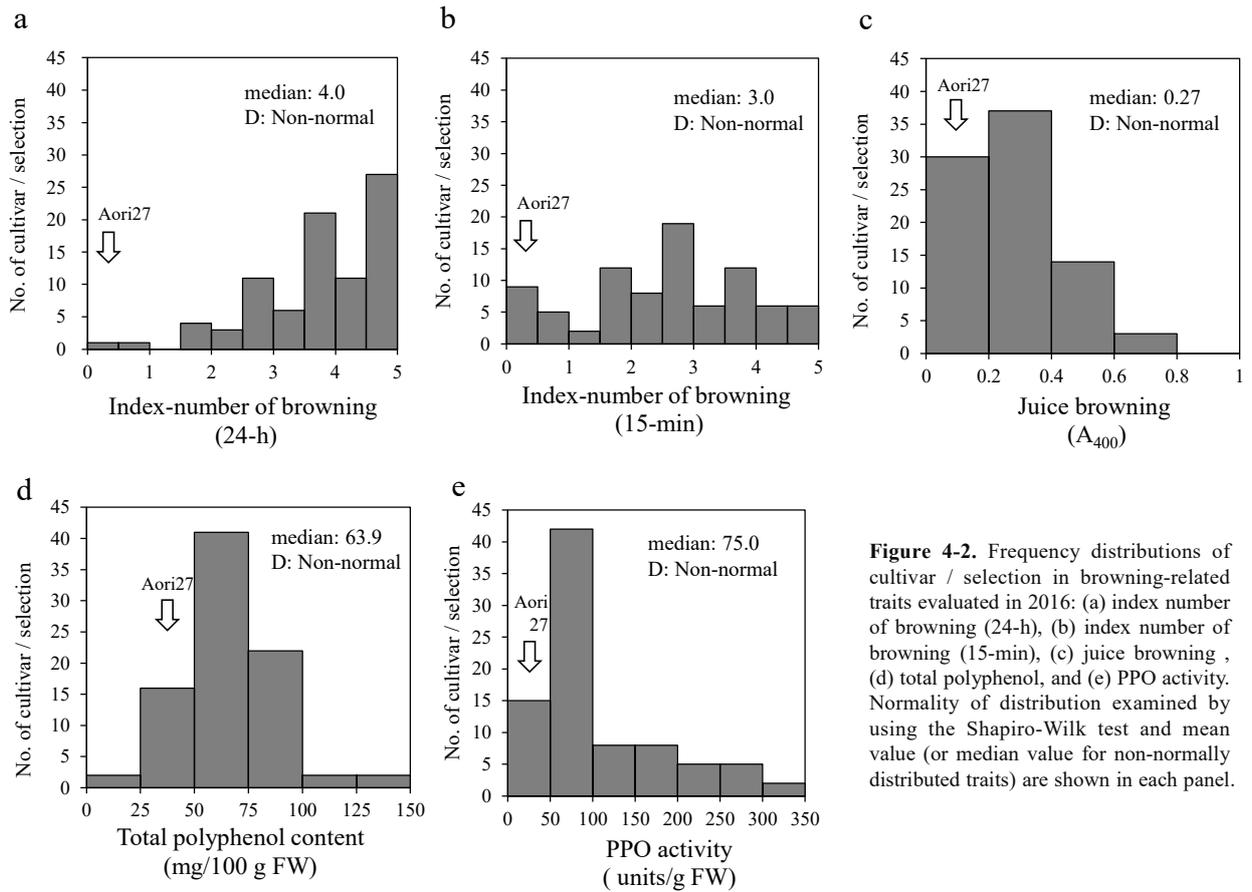


Figure 4-2. Frequency distributions of cultivar / selection in browning-related traits evaluated in 2016: (a) index number of browning (24-h), (b) index number of browning (15-min), (c) juice browning, (d) total polyphenol, and (e) PPO activity. Normality of distribution examined by using the Shapiro-Wilk test and mean value (or median value for non-normally distributed traits) are shown in each panel.

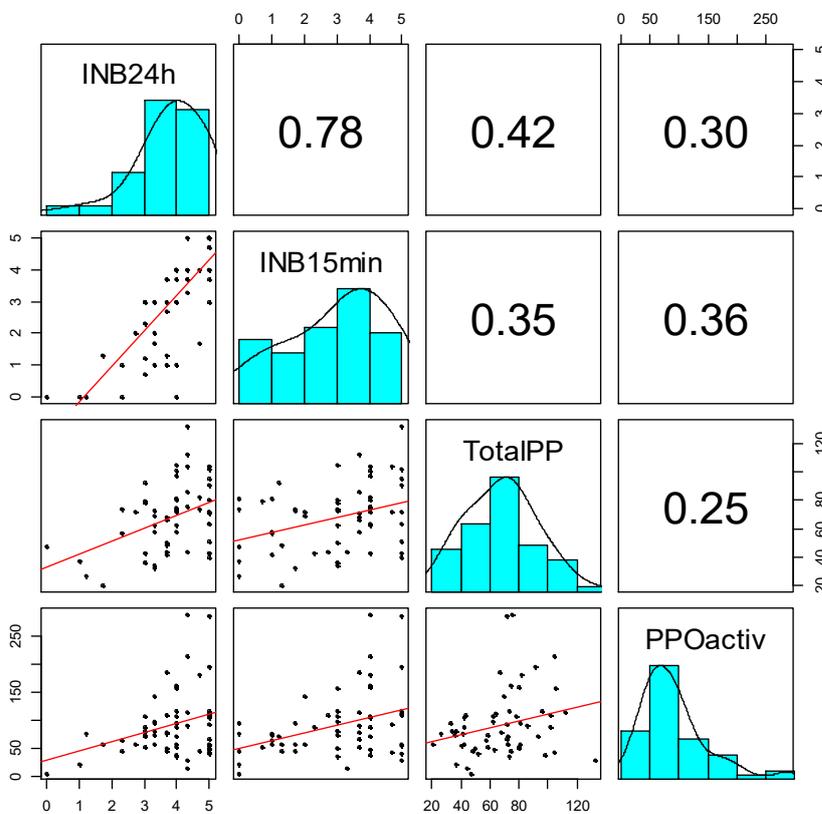


Figure 4-3. Correlation between four browning-related traits with flesh browning in cultivars / selections in 2015. Units are the same as in Table 2-1. R-value as correlation coefficient are shown in each panel.

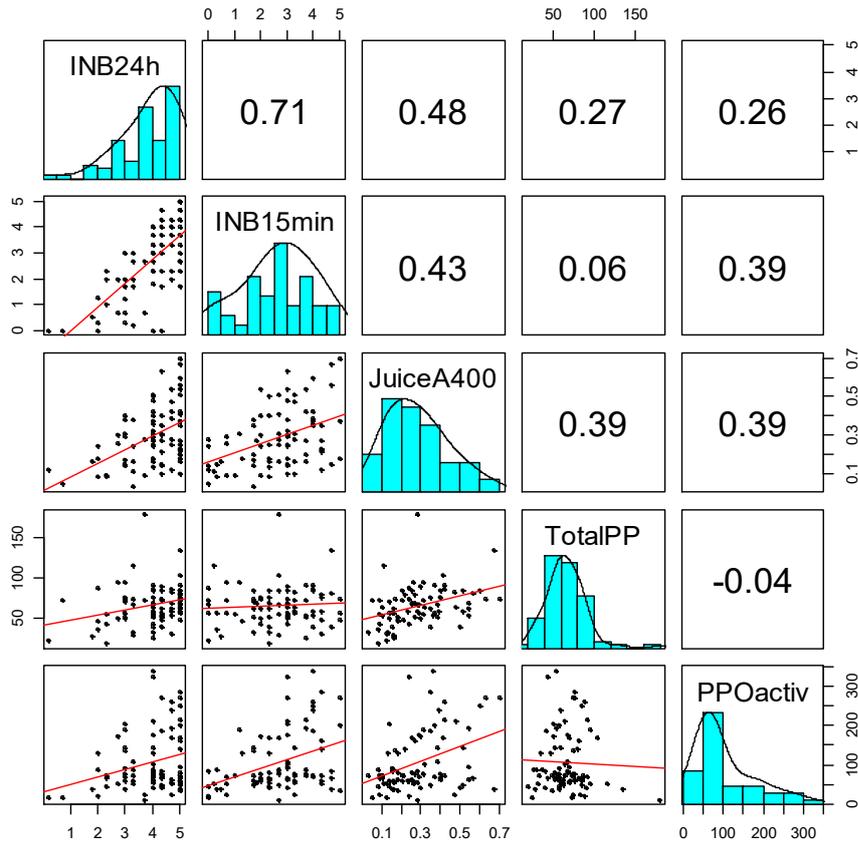


Figure 4-4. Correlation between five browning-related traits with flesh browning in cultivars / selections in 2016. Units are the same as in Table 2-1. R-value as correlation coefficient are shown in each panel.

2) 連鎖不平衡 (LD) の推定及び主成分分析

LDの程度を推定するため、86品種・系統について11,730 SNPの多型データを使用してマーカー間の r^2 値を算出し、マーカー間の物理距離10 kbpごとに r^2 の平均値をプロットした(Fig. 4-5)。その結果、本集団においてLDが保たれている($r^2 > 0.2$)範囲は約700 kbpと推定され、約750 Mbpのリンゴゲノムに11,730 SNPを配置した本GWASでのマーカー密度は10.9 SNP/700 kbpとなり、解析には十分であると考えられた。

一方、主成分分析の結果、本集団の第一、第二主成分の寄与率はそれぞれ8.9%、7.0%であったため(data not shown)、集団の構造化は微少と判断し、PC=0でGWASを行うこととした。

3) GWASによる褐変関連形質のQTLの検出

GWASは11,730個のSNPマーカーと、2か年の褐変関連形質データ(INB(24-h及び15-min)、総ポリフェノール含量及びPPO活性)、及び2016年の果汁褐変性データを用いて年次ごとに行った。算出した全SNPの $-\log_{10}(p)$ 値を染色体ごとに推定物理位置順にプロットしたところ(Fig. 4-6, Fig. 4-7)、INB(15-min)については2016年に3つの染色体に、果汁褐変性については2016年に1つの染色体に、総ポリフェノール含量については2か年とも同一染色体に、PPO活性については2016年に2つの染色体に閾値(False Discovery Rate=0.05)を越え

るQTLが検出された。

各形質で検出されたQTLについて、染色体ごとに最も有意性の高いSNPをTable 4-4に示した。2015年は総ポリフェノール含量で1つのQTLが検出され、GDsnp00047(第16番染色体上端、 $-\log_{10}(p) = 7.19$)が最も有意性が高いSNPであった。2016年に果肉褐変性(15-min)で検出された3つのQTLについて最も有意性が高いSNPは、それぞれSNP_FB_0598996(第5番染色体上部末端、 $-\log_{10}(p) = 6.93$)、SNP_FB_0049856(第10番染色体下部、 $-\log_{10}(p) = 4.12$)及びSNP_FB_0935827(第17番染色体下部、 $-\log_{10}(p) = 6.30$)であった。2016年に果汁褐変性で検出されたQTLではLARI上に設計されたRosBREEDSNP_SNP_CT_1540624_Lg10_LAR1_MAF40_1618769_exon2(第16番染色体上部末端、 $-\log_{10}(p) = 5.61$)が最も有意性が高かった。2016年に検出された総ポリフェノール含量のQTLについても、本マーカーがピークを示した($-\log_{10}(p) = 8.14$)。PPO活性で2016年に検出された2つのQTLでは、SNP_FB_0599012(第5番染色体上部末端、 $-\log_{10}(p) = 8.32$)及びRosBREEDSNP_SNP_GA_49250482_Lg15_01707_MAF20_641093_exon1(第15番染色体末端、 $-\log_{10}(p) = 4.40$)が最も有意性の高いSNPであった。

これらのマーカー遺伝子型(AA, AB, BB)に基づいて各形質の2015年及び2016年の表現型分布を比較した(Fig. 4-8, Fig. 4-9)。総ポリフェノール

含量の 2015 年の QTL に連鎖する GDSnp00047 では、総ポリフェノール含量のみ遺伝子型間に有意差があった。2016 年に検出された第 5 番染色体の INB (15-min) の QTL に連鎖する SNP_FB_0598996 の遺伝子型 AA 群, AB 群及び BB 群では, INB (15-min 及び 24-h), PPO 活性が有意に異なっており, AA 群で最も褐変性及び PPO 活性が低く, 次いで AB 群, BB 群の順であった。なお, 果汁褐変性及び総ポリフェノール含量では有意差が見られなかった。第 10 番染色体に検出された INB (15-min) の QTL に連鎖する SNP_FB_0049856 の異なる遺伝子型間には, INB (15-min 及び 24-h) に有意な差が見られたが, 他の形質については差がなかった。第 17 番染色体の INB (15-min) の QTL に連鎖する SNP_FB_0935827 では, INB (15-min) のみ遺伝子型間に有意差があり, AA 群は褐変性が高く, 次いで AB 群, BB 群であった。果汁褐変性及び総ポリフェノール含量の QTL が検出された第 16 番染

色体の RosBREEDSNP_SNP_CT_1540624_Lg10_LAR1_MAF40_1618769_exon2 については, AA 群の品種は 1 個体のみであったため, AB 群及び BB 群についてのみ有意差検定を行ったところ, 果汁, 総ポリフェノール含量, PPO 活性については AB 群が有意に高い値を示したが, 果肉褐変性については差がなかった。

PPO 活性の QTL が検出された第 5 番染色体の SNP_FB_0599012 においては, PPO 活性が AA 群で有意に高く, 次いで AB 群, BB 群の順であった。果肉褐変性 (15-min) でも類似した傾向が見られ, BB 群は他の 2 群に比べて有意に低い値を示した。また, 第 15 番染色体の PPO 活性に連鎖する RosBREEDSNP_SNP_GA_49250482_Lg15_01707_MAF20_641093_exon1 では, BB 群が PPO 活性及び果肉褐変性 (15-min) で有意な低値を示した。

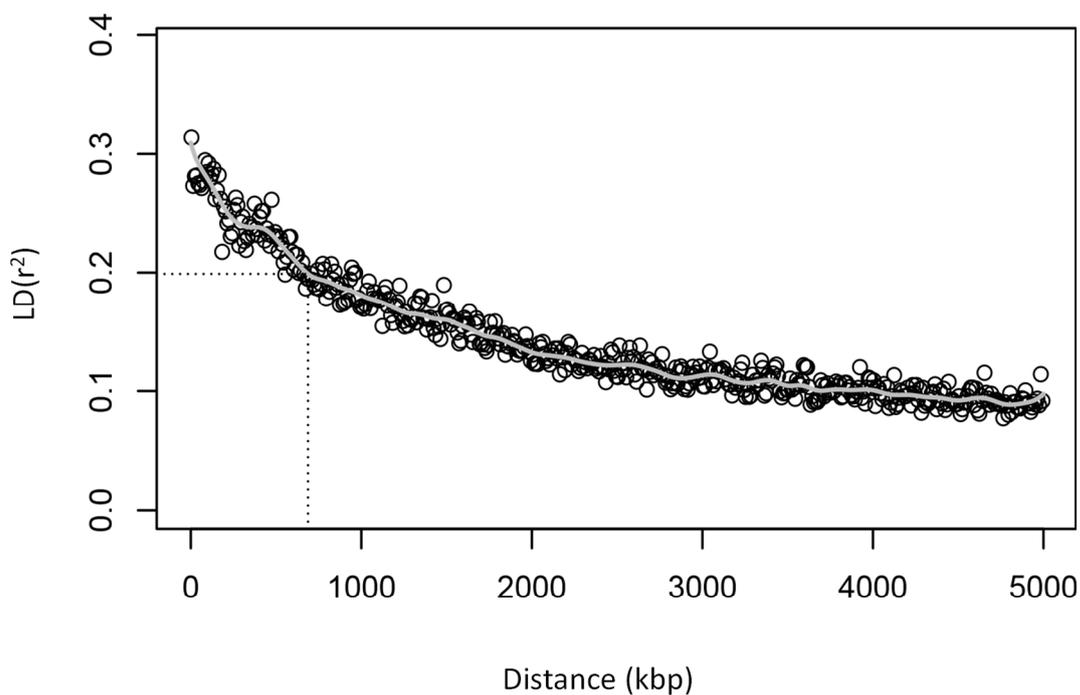


Figure 4-5. Genome-wide LD decay estimated from 86 accessions. Plots of average linkage disequilibrium (LD) values (r^2) against physical distances in increments of 10kbp. Curves show local polynomial fits obtained using kernel smoothing regression.

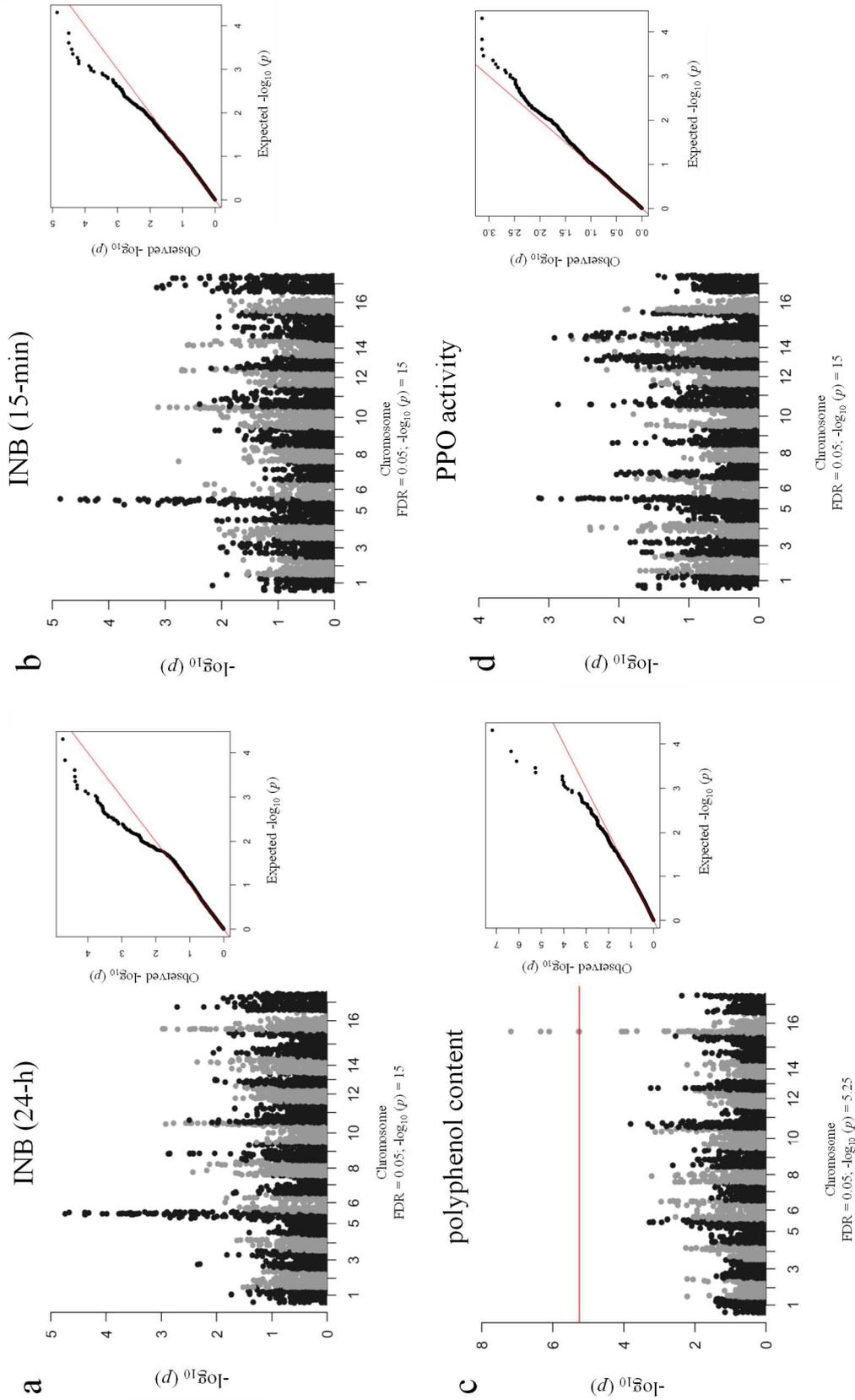


Figure 4-6 Manhattan plot illustrating the association between SNP markers and browning-related traits in 2015: (a) index number of flesh browning (24-h), (b) index number of flesh browning (15-min), (c) total polyphenol content, (d) PPO activity. The x-axes indicated SNPs ordered by physical position in each chromosome, and y-axes indicated the $-\log_{10}(p)$, respectively. Horizontal lines indicate the FDR thresholds for $p = 0.05$. For each trait, the quantile-quantile plot of the cumulative observed and expected $-\log_{10}(p)$ values from genome-wide scan is also shown.

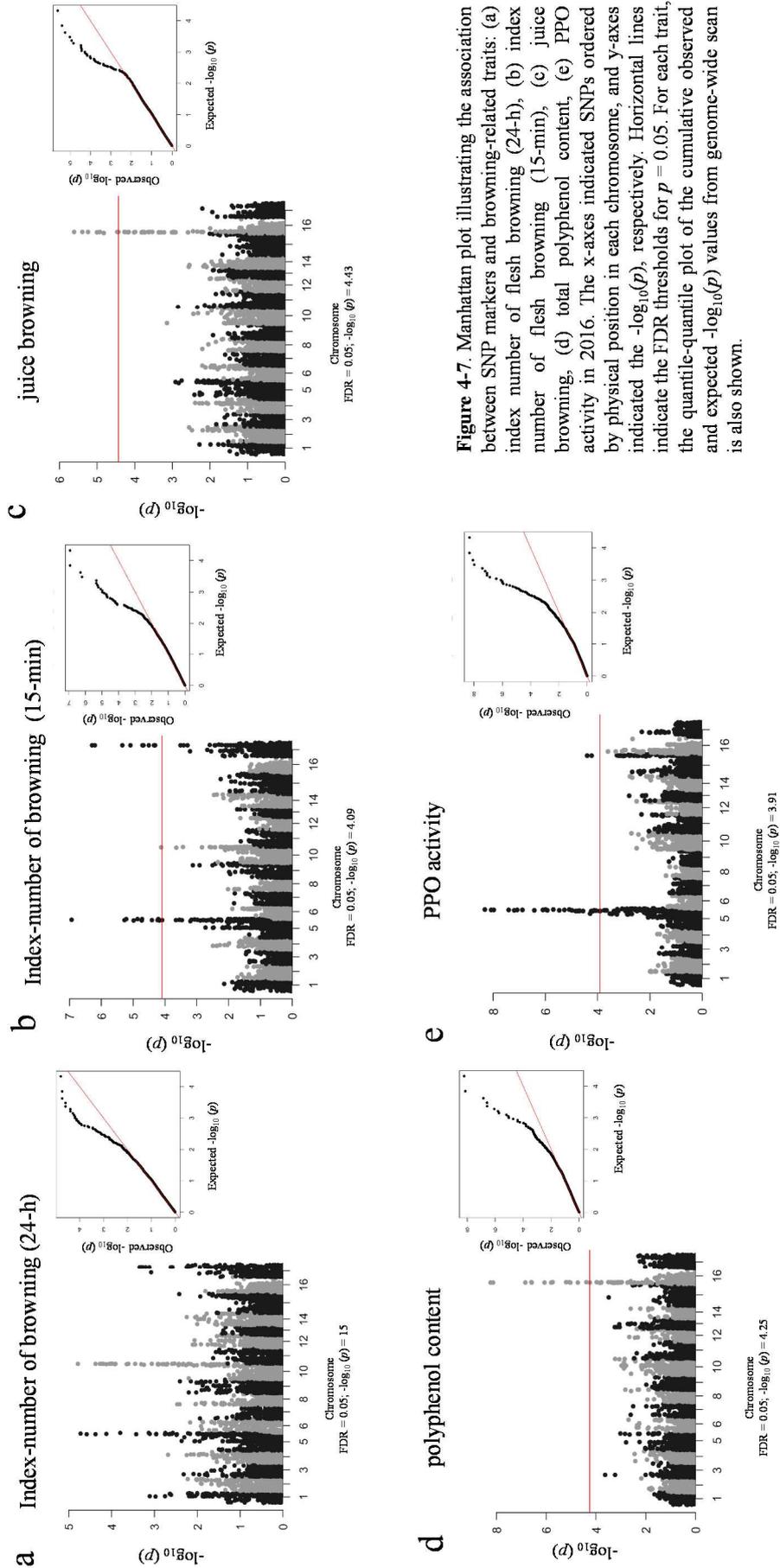


Figure 4-7. Manhattan plot illustrating the association between SNP markers and browning-related traits: (a) index number of flesh browning (24-h), (b) index number of flesh browning (15-min), (c) juice browning, (d) total polyphenol content, (e) PPO activity in 2016. The x-axes indicated SNPs ordered by physical position in each chromosome, and y-axes indicated the $-\log_{10}(p)$, respectively. Horizontal lines indicate the FDR thresholds for $p = 0.05$. For each trait, the quantile-quantile plot of the cumulative observed and expected $-\log_{10}(p)$ values from genome-wide scan is also shown.

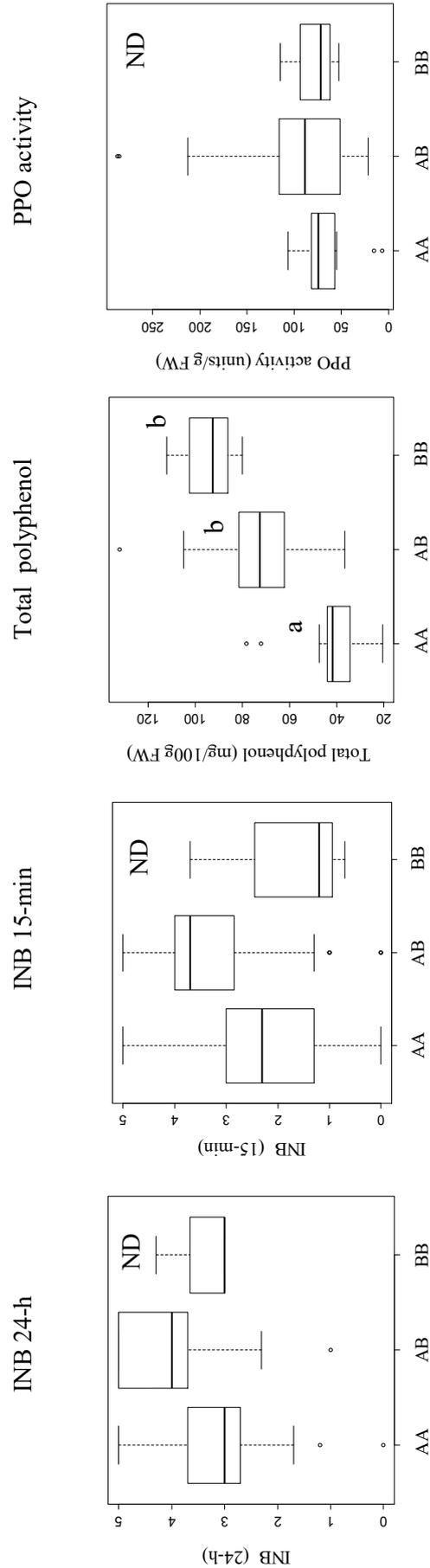


Figure 4-8. Box plots showing the association of four browning related traits in 2015 with genotype of SNP Chr16_GDsnp00047, which was significant in GWAS of total polyphenol content in 2015. Different alphabets in the figures indicate significant difference with $p < 0.05$ and “ND” indicates no significant difference among groups by Willcoxon rank sum test. Box edges represent the first and third quartiles, and the median value shown as a bold line. Lines above and below the box represent the maximum and minimum values, and dots outside the lines are outlier.

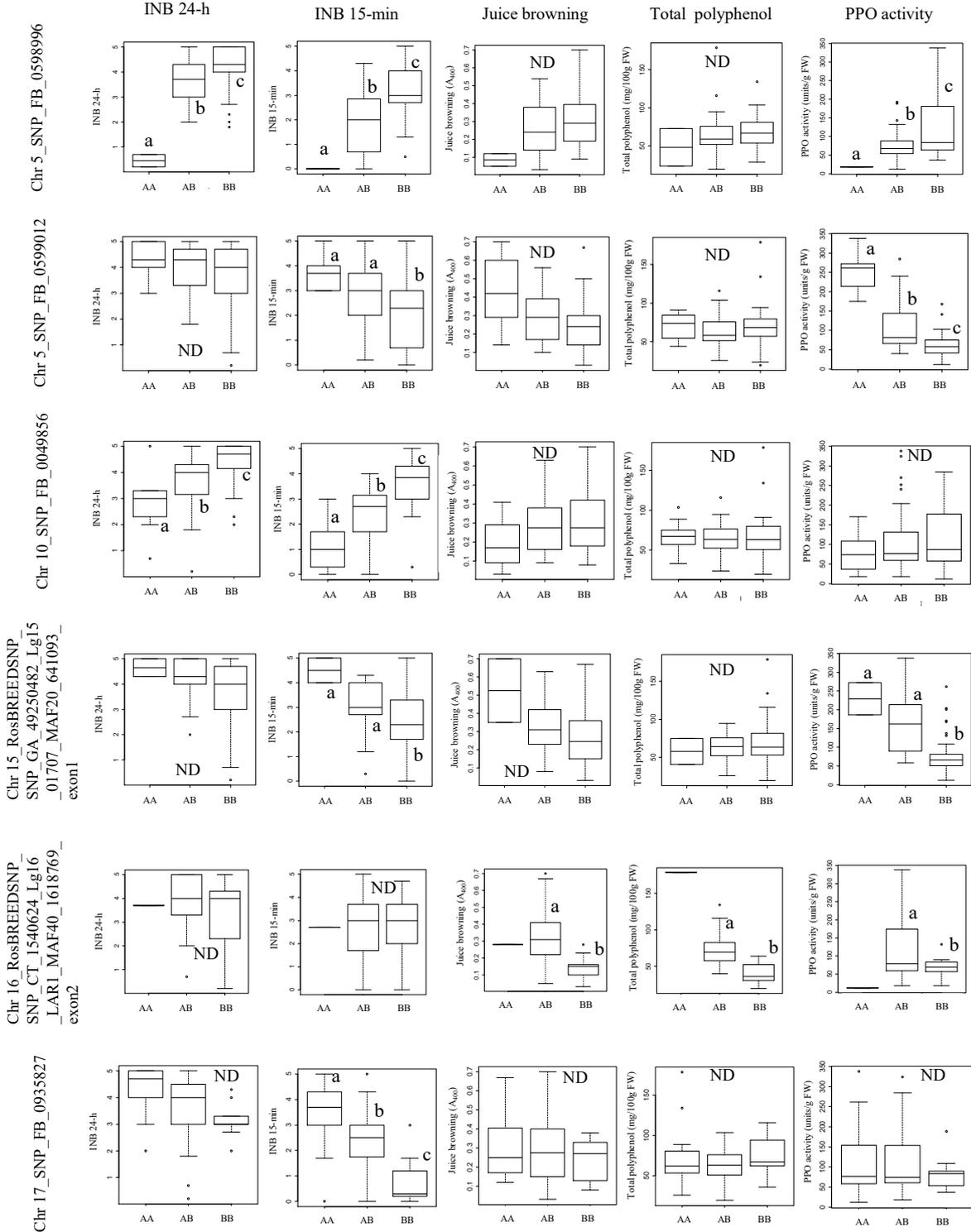


Figure 4-9. Box plots showing the association of five browning related traits in 2016 with genotype of SNPs, which were significant in GWAS in 2016. Chr 5_SNP_FB_0598996, Chr 10_SNP_FB_0049856 and Chr 17_SNP_FB_0935827 were significant for INB (15-min); Chr 16_RosBREEDSNP_SNP_CT_1540624_Lg16_LAR1_MAF40_1618769_exon2 was significant for juice browning and total polyphenol content; Chr 5_SNP_FB_0599012 and Chr 15_RosBREEDSNP_SNP_GA_49250482_Lg15_01707_MAF20_641093_exon1 were significant for PPO activity in GWAS. Different alphabets in the figures indicate significant difference with $p < 0.05$ and “ND” indicates no significant difference among groups by Willcoxon rank sum test. Box edges represent the first and third quartiles, and the median value shown as a bold line. Lines above and below the box represent the maximum and minimum values, and dots outside the lines are outlier.

3. 考 察

2年間で合わせて86品種・系統について5つの褐変関連形質を評価し、全ての形質は幅広い分布を示した (Fig. 4-1, Fig. 4-2). しかし、非褐変性 (INB (24-h) < 0.5) を示したのは‘あおり 27’のみであった. 第2章でQTL解析に用いたF₁集団と、本章でGWASに用いた品種集団で各形質の中央値を比較すると、165A27集団のINB (15-min) は0.5, KA27集団は1.7であるのに対し、GWAS集団は3.0と高い傾向であった (Table 2-5, Table 2-6, Table 4-2). INB (24-h) については、165A27集団は2.0-2.3, KA27集団は3.0-3.3であるのに対し、GWAS集団は4.0と高かった. PPO活性は165A27集団及びKA27集団ではそれぞれ55.1及び49.1であったのに対し、GWAS集団は75.0-76.3と顕著に高かった. 一方で、総ポリフェノール含量は165A27集団、KA27集団、及びGWAS集団で81.9, 60.1, 63.9-71.5と差は少なかった. このように、本章のGWASで用いた品種・系統集団は第2章で用いたF₁集団と比較してPPO活性及び果肉褐変性が高い特徴があった (Fig. 2-2, Fig. 2-3, Fig. 4-1, Fig. 4-2).

果肉褐変性に関するGWASはKumar et al. (2013)の報告があり、第9番及び第16番染色体に内部褐変に関するQTLが検出されている. 一方、マッピングによる解析では、第3, 第10, 第11, 第14, 第15, 第16及び第17連鎖群にQTLが報告されているが (Mellidou et al., 2012; Guardo et al., 2013; Sun et al., 2014), いずれも効果は小~中程度のものである. 本研究では第5, 第10, 第15, 第16及び第17番染色体に褐変関連形質のQTLが検出された. INB (15-min) で検出された第5, 第10, 第17番染色体のQTLのうち、第5及び第10番染色体の座は、INB (24-h) で閾値には達しなかったものの、高い $-\log_{10}(p)$ 値を示した (Fig. 4-7). これらのうち、最も高い有意性を示した第5番染色体のQTLに連鎖するSNP_FB_0598996の各遺伝子型のINB (15-min) 平均値は、AAで0, ABで1.9, BBで3.2であった. また、INB (24-h) の平均は、AA, AB, BB群で各々0.4, 3.6, 4.2であり、Bアレルが褐変の誘導に強く関連していることを示唆した (Fig. 4-9). 非褐変性に連鎖しているアレルAは、第3章のハプロタイプ分析で用いた5つの祖先種のうち、‘ゴールデンデリシャス’のみに由来していた (data not shown). 一方、PPO活性についても第5番染色体上部末端に有意性の高いQTL (SNP_FB_0599012) が検出されたが、本SNPにおいて低PPO活性に連鎖するBアレルは、‘ゴールデンデリシャス’, ‘紅玉’, ‘国光’及び‘印度’に由来していた. 果肉褐変性及びPPO活性のQTLが第5番染色体の同位置に検出されたこと、また、褐変し難い遺伝子組換えリンゴ Arctic® Apple で発現抑制された4つのPPO (PPO2, GPO3, APO5, pSR7) のうち (Carter, 2012), PPO2及びpSR7が本QTLに存在することから、PPOが果肉褐変性の原因遺伝子のひとつである可能性が高い. しかし前述のように、非褐変性アレルと低PPO活性アレルの由来は

完全には一致しなかった. PPO活性について形質値を比較すると、‘ゴールデンデリシャス’由来のアレルをホモ接合で持つ‘あおり 27’及び‘メロー’は、それ以外の低PPO活性アレルをホモ接合で持つ‘ファーストレディ’等と比較して極めてPPO活性が低く、由来によって機能が異なる可能性がある. また、PPOの基質特異性が果肉中で褐変に大きく寄与するポリフェノール成分と、PPO活性測定の基質として用いたクロロゲン酸とで異なっていた可能性も考えられる.

リンゴのPPOタンパクはMurata et al. (1992)によって単離され、cDNAおよびゲノムDNAも特定されている (Boss et al., 1995; Haruta et al., 1998). リンゴのPPOは複数の遺伝子ファミリーを形成しており (Boss et al., 1995), 公開ゲノム (GDDH13) のアノテーション情報に基づくと、これらは第5番及び10番染色体に18か所も存在している. 一方で、タンパクの電気泳動解析では単一のバンドしか検出されていない (Murata et al., 1992; Haruta et al., 1998). Kim et al. (2001) はリンゴの果実で2つのPPOの発現解析を行い、幼果で発現し肥大に伴って急速に発現量が減少すると報告している. 果実のPPO活性についても、幼果で高く、肥大、成熟とともに低下することから (Murata et al., 1995b; Holderbaum et al., 2010), PPOの大部分は幼果の段階で蓄積されている可能性がある. しかし、複数のPPOが存在する可能性があるにもかかわらず、発現時期や局在性の差異を観察した報告は少なく、実際に機能しているPPOは特定に至っていない. 今後、さらに詳細な分類や遺伝子発現解析、タンパク質レベルの機能解析が必要である.

‘ちなつ’, ‘北の幸’及び‘ウースターペアメン’のPPO活性は‘あおり 27’及び‘メロー’並に低かったが (data not shown), 本解析集団ではマイナーな祖先に由来しているため、近縁の品種及び系統を用いた解析が期待される. これらの褐変性はINB (24-h) がそれぞれ2, 4.7及び3.7であり、いずれも‘メロー’より高い. 本研究のGWASで得られたQTLの遺伝子型を比較すると、これらの品種はINB (15-min) で検出された第17番染色体の遺伝子型が褐変性の高いAA群であることから、本QTLの原因遺伝子の推定と利用も今後の課題である.

第16番染色体上部には果汁及び総ポリフェノール含量のQTLが検出され、Kumar et al. (2013)の報告及び本研究第2章のQTL解析の結果と一致した. 特に総ポリフェノール含量のQTLは高い有意性で2か年とも安定して検出された. この領域にはLARIが存在し、これまでリンゴの主要ポリフェノールであるフラバン-3-オールやプロアントシアニジン (Khan et al., 2012), カテキンやプロシアニジンといった様々なポリフェノール含有量のQTLが報告されており (Chagné et al., 2012b), 果汁褐変性のQTLも報告されている (Kunihisa et al., 2014; Morimoto et al., 2014). 本QTLで最も有意性の高い RosBREEDSNP_SNP_CT_1540624_

Lg16_LAR1_MAF40_1618769_exon2 の各遺伝子型の形質分布 (果汁及び総ポリフェノール含量) は、いずれも AB 群の値が BB 群より有意に高く、B アレルが難果汁褐変性及び低ポリフェノール含量に連鎖していることを示した。B アレルは、‘デリシャス’、‘ゴールドデンドリシャス’、‘印度’、‘紅玉’及び‘国光’の片側のアレルに由来していた。‘デリシャス’、‘ゴールドデンドリシャス’及び‘印度’由来の難果汁褐変性アレルは、第 2 及び第 3 章の F₁ 集団を用いた QTL 解析及びハプロタイプ解析でも非褐変性アレルとして同定されており、これらの因子は同一であると考えられた。しかし、ポリフェノール含量及び果汁褐変性に関する本領域の QTL は、F₁ 集団を用いた QTL 解析では果肉褐変性の QTL と一致したのに対し、品種群を用いた GWAS では一致しなかったことから、本 GWAS 用集団においては、果肉褐変性への影響が大きいのは PPO 活性であり、ポリフェノール含量の影響は小さいと考えられた。

INB (15-min) の QTL は第 10 番染色体と第 17 番染色体にも検出された。連鎖する SNP_FB_0049856 及び SNP_FB_0935827 の各遺伝子型の表現型分布は INB (15-min) で有意差が確認され (Fig 4-9)、前者は INB (24-h) でも有意差を示した。これらの領域に総ポリフェノール含量や PPO 活性の QTL は検出されなかったことから、他の因子に関係する領域である可能性が高い。Mellidou et al. (2012) と Guardo et al. (2013) は、第 10 連鎖群に果肉褐変性に関する QTL を報告しており、候補遺伝子を *GDP-L-galactose phosphorylase 1 (MdGGP1)* と推定している。さらに、Mellidou et al. (2012) は第 17 連鎖群下部に果肉褐変性、果肉のアスコルビン酸 (AsA) 及び還元型アスコルビン酸 (DHA) 含量の QTL を検出しており、発現解析によって AsA 含量と褐変程度に正の相関がみられたことから、これらの QTL 近傍の *dehydroascorbate reductase 3-3 (Md DHAR3-3)* を候補遺伝子として挙げている。また、第 17 連鎖群同領域付近には、Sun et al. (2014) も果肉褐変性の QTL を報告しており、Chagné et al. (2012b) はクロロゲン酸含量の QTL を報告している。本領域には、ヒドロキシケイ皮酸/キナ酸転移酵素に関する *HCT/HQT* や、p-クマロイルキナ酸をクロロゲン酸へ変換する酵素をコードしている *p-coumarate 3-hydroxylase* が位置している。本研究では第 17 番染色体に総ポリフェノール含量の QTL は検出されなかったが、解析集団の詳細なポリフェノール組成は不明であることから、ポリフェノール生合成遺伝子が関与している可能性は排除できない。PPO 活性に関する QTL は第 15 番染色体にも検出された。本染色体には、Sun et al. (2014) による果肉褐変性の QTL や、Change et al. (2012) による p-クマロイルキナ酸の QTL の報告があるが、PPO 遺伝子自体は座乗していないため、PPO 活性に作用する何らかの因子が存在する可能性が考えられた。

以上から、本解析集団での果肉褐変性 (15-min 及

び 24-h) には第 5 番染色体の QTL が大きく影響しており、その原因遺伝子は *PPO* で、PPO 活性を通じて果肉褐変性に影響を及ぼしていると考えられた。第 2 章の QTL 解析に用いた F₁ 集団では褐変性の主動因子であると考えられた第 16 番染色体の QTL (*LAR1*) は、GWAS 用集団では果汁褐変性及び総ポリフェノール含量に大きく影響していたが、果肉褐変性への影響はほとんど見られなかった。

第 5 番染色体の QTL において、非褐変性因子である‘ゴールドデンドリシャス’由来のアレルをホモ接合でもつ品種は、供試 86 品種・系統のうち‘あおり 27’及び‘メロー’のみであり、これらの PPO 活性は極めて低かった (2015 年は 6.52 及び 21.67 unit/g FW, 2016 年は 18.27 及び 18.10 unit/g FW)。*‘あおり 27’*は第 16 番染色体の QTL についても非褐変性アレルのホモ接合体であり、総ポリフェノール含量は低く (35.53 mg/100g FW, 2 年平均値)、非褐変性 (INB (24-h) = 0 (2015) 及び 0.2 (2016)) であった。*‘メロー’*はこの QTL が褐変性/非褐変性アレルのヘテロ接合体であり、総ポリフェノール含量は中庸で (54.98 mg/100g FW, 2 年平均値)、すり下ろした果肉はわずかに褐変した (INB (24-h) = 1.0 (2015) 及び 0.7 (2016))。従って、第 5 番染色体の *PPO* は難褐変性 ($0.5 \leq \text{INB} < 1.5$) に関する重要な因子であるが、非褐変性 ($0 \leq \text{INB} < 0.5$) を成立させるためには、第 16 番染色体の *LAR1* も非褐変性アレルのホモ接合とする必要があると推測される。第 5 及び第 16 番染色体の 2 つの因子を使用したマーカー利用選抜は、非褐変性リンゴの育成に有効であると考えられる。

しかし、本 GWAS で供試した集団は比較的小規模なものであり、偽陽性・偽陰性の可能性も否定できない。今後は集団サイズの増大や、これらの QTL の効果を検証することが必要である。

3. 摘要

遺伝資源 85 品種及び系統を用いた GWAS によって褐変関連形質 (果肉及び果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO 活性) を解析し、第 5 番、10 番及び 17 番染色体上に果肉褐変性の新たな QTL を同定した。本集団の果肉褐変性には 5 番染色体上の QTL が大きく影響していた。PPO 活性の QTL も同領域に検出されたことから、本領域に位置する *PPO* が QTL の原因候補遺伝子と考えられ、本 QTL で‘ゴールドデンドリシャス’由来のアレルがホモ接合となることで、PPO 活性及び果肉の褐変性が低下することが示唆された。また、総ポリフェノール含量及び果汁褐変性に関する QTL は 16 番染色体の *LAR1* 上に検出され、第 3 章の QTL 解析の結果を裏付けた。褐変基質であるポリフェノール含量を低下させる *LAR1* のアレルは、‘ゴールドデンドリシャス’、‘デリシャス’、‘印度’の 3 品種に加えて‘紅玉’及び‘国光’も保有している可能性が示唆された。

V 総合考察

褐変は食品の外観を著しく損ない、商品価値を喪失させることから、生産者、流通業者、加工業者にとって重大な負の現象であり、そのコントロールは食品の加工、貯蔵上重要な課題である (Haruta et al., 1998; Martinez and Whitaker, 1995). 世界中で広く栽培されている‘ふじ’, ‘ゴールデンデリシャス’, ‘デリシャス’, ‘グラニースミス’, ‘ガラ’及び‘旭’はいずれも褐変する品種である. 近年は、食の簡便化や外部化を背景として、カットフルーツやドライ等、加工品の需要が高まっているが、加工業者には酸化防止処理や特殊包装といったコストや、加工工程の時間的制約が課せられる. 消費者にとっても、外観の新鮮さを保つためにはカット後の塩水等による褐変防止処理が必須となり、離乳食や介護食用にすり下ろした場合は特に褐変のスピードが速く、褐変防止は難しい. 調理後すぐに食べなければ褐変して外観が損なわれる煩わしさは、リンゴの利用頻度を制限する一因であり、褐変防止処理の軽減が期待できる非~難褐変性リンゴ品種の作出が望まれる.

交配育種における非~難褐変性品種の育成例は極めて少なく、効率良く作出するためには、遺伝様式と原因遺伝子座の解明、及び DNA マーカーの開発が不可欠である. リンゴの果肉褐変性の遺伝解析についてはいくつかの報告があるが (Millidou et al., 2012; Guardo et al., 2013; Sun et al., 2014; Kumar et al., 2013), 用いられている材料は、基本的に褐変する品種・個体であり、その褐変程度は果実カット面で評価されているため正確な計測と再現が難しく、得られた QTL は小~中程度であった. そのため、原因遺伝子や遺伝様式は特定されておらず、品種開発に活用するための知見は不足していた. 本研究では、非~難褐変性リンゴ品種育成のために、果肉褐変性の原因遺伝子領域及びその遺伝様式と、非褐変性の成立条件を明らかにすることを目的として、①果肉褐変性の評価において、より厳しい酸化条件であるすり下ろしにより高感度の検出を試み、②褐変性と関連が予想される複数形質 (果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO 活性) を同時に分析・比較し、③稀少な非褐変性品種である‘あおり 27’の F₁ 集団を材料とした QTL 解析及び主要 QTL のハプロタイプ解析と (第 2 章及び第 3 章)、④多様な遺伝資源を利用した GWAS を行った (第 4 章).

II では、‘あおり 27’と褐変性を有する親 (F₁-165 及び‘こうたろう’) の F₁ 集団を用いた QTL 解析により、果肉褐変性に関連する複数形質 (果肉及び果汁褐変性、ポリフェノール含量、PPO 活性) の主要 QTL が褐変性親の第 16 連鎖群上部の *LARI* 近傍に検出されたことから、リンゴのポリフェノール生合成経路上 (Fig. 1-3) の遺伝子 *LARI* が褐変基質であるポリフェノール含量を制御していると推察された. 本 QTL は両集団で複数年安定して検出されており、十分に信頼性が高く、非常に大きな効果が

あると考えられた. 非褐変性親である‘あおり 27’に有意な QTL は検出されなかったこと、165A27 集団において褐変性はほぼ単因子支配であることから、非褐変性の遺伝様式は劣性遺伝であると推定された. また、交配親である F₁-165 は‘あおり 27’の後代ではないにも関わらず、多数の非褐変性 F₁ 個体を出現させたことから、非褐変性は複数の祖先品種由来の非褐変性アレルの集積によるもので、‘あおり 27’の突然変異によるものではないことが示唆された.

III では、第 16 連鎖群に検出された QTL のハプロタイプ解析により、非褐変性の *LARI* アレルは 3 つの祖先品種 (‘ゴールデンデリシャス’, ‘デリシャス’及び‘印度’) に由来し、これらの組み合わせにより褐変程度が低くなることを明らかとした. 非褐変性アレルは‘ふじ’, ‘つがる’, ‘王林’等、複数の品種に継承されており、本 QTL に関する限り、非褐変性品種を育成するために広い遺伝資源の選択が可能であることが明らかとなった. 一方、本 QTL 近傍には酸度および致死遺伝子が存在した. 品種育成では、望ましい形質に関する遺伝子を導入すると、それに連鎖する不良形質も一緒に取り入れてしまうことがあるため (リンケージドラッグ), 非褐変性アレルと酸度及び致死遺伝子アレルとの連鎖関係を明らかにした. その結果、‘ゴールデンデリシャス’及び‘デリシャス’由来の非褐変性アレルは高酸性のアレル (*Ma*) と連鎖していたが、‘印度’由来の非褐変性アレルは低酸性のアレル (*ma*) と連鎖しており、‘印度’由来の非褐変性アレルを利用することによって、適度な酸味の品種育成が可能であると考えられた. 一方、いずれの非褐変性アレルも致死型のアレルと連鎖していないため、本 QTL での選抜により致死が引き起こされる危険性はないことが明らかとなった.

IV では、遺伝資源 85 品種及び系統を用いた GWAS によって褐変関連形質 (果肉及び果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO 活性) を解析し、果肉褐変性には第 5 番染色体の *PPO* と推定される QTL がより大きく影響していることが示された. 第 5 番染色体の QTL で非褐変性アレルとして検出されたのは‘ゴールデンデリシャス’由来のものであり、GWAS 集団の中でこのアレルをホモ接合で持つ‘あおり 27’及び‘メロー’の 2 品種は明らかに他品種より PPO 活性が低く、褐変程度も低かったことから、第 5 番染色体の非褐変性アレルがホモ接合となることで、PPO 活性及び果肉の褐変性が低下することが示唆された. また、総ポリフェノール含量及び果汁褐変性に関する QTL は第 16 番染色体の *LARI* 上に検出され、第 2 章の結果を裏付けた. さらに、基質である総ポリフェノール含量を低下させる *LARI* のアレルは、‘ゴールデンデリシャス’, ‘デリシャス’, ‘印度’の 3 品種に加えて‘紅玉’及び‘国光’も保有している可能性が示唆された. これら 2 因子に

加え、果肉褐変性について検出された第 17 番染色体上の QTL も選抜マーカーとして有望であり、今後、原因遺伝子を特定することで新たな褐変のメカニズムの解明につながると考えられる。今後は、多様な遺伝的背景の集団を使用して、第 5 番及び 16 番染色体上の QTL の果肉褐変性に対する効果を検証し、DNA マーカーによる選抜効果を確認していく必要がある。また、様々な褐変程度を示す品種を用いて *LARI* や *PPO* 等の発現解析を行うことにより、褐変性の原因遺伝子の特定や、遺伝子（転写調節）領域の構造変異解析が進展することが期待される。

‘あおり 27’のような非褐変性リンゴは、酸化防止剤の浸漬処理では抑えられない、加工後のカットや損傷等による二次的な褐変にも対応することができる。また、すり下ろしによる離乳食や介護食、生果流通によるサラダやデザート、無添加の加工品（カットリンゴ、ジュース、シャーベット）等への利用といった、新たな用途も期待できる。一方で、健康によいとされているカテキンやプロシアニジン等のポリフェノール含量（Eberhardt et al., 2000）の低下が懸念される。しかし、ペクチン、食物繊維、ビタミン、ミネラル、ウルソール酸等リンゴの他の機能性成分（Slavin and Lloyd, 2012; Hyson, 2011; Andre et al., 2016）については維持されるため、非褐変性付与によるリンゴの利便性の向上は、摂取量の増大を通して健康に寄与する可能性もある。一方、‘メロー’のような難褐変性リンゴは、わずかに褐変するがポリフェノール含量は維持される。すり下ろしや酸化防止剤不使用での利用は難しいものの、*PPO* 活性が極めて低く、短時間では褐変しにくいいため、加工や調理過程での変色が少なく、作業時間が制約されないメリットがある。第 5 番及び 16 番染色体上の QTL の組合せで、果肉褐変性に関するこれらのタイプの品種が育成できる可能性が示された（Fig. 5-1）。第 16 番染色体上の QTL に関しては、非褐変形質と機能性成分含量維持のいずれを優先するか、育種目標を明確にして選抜を行わなければならない。

果樹における GWAS はリンゴ、ナシ、モモ等で最初に報告され（Kumar et al., 2013; Iwata et al., 2013; Aranzana et al., 2010）、様々な樹種で多様な形質を対象に行われてきた。Nishio et al. (2018) はクリの 99 品種及び系統で、162 の SSR マーカー及び 741 の SNP マーカーを使用して 5 形質について解析を行い、収穫期と虫の食入について育種に有用な QTL を報告した。Imai et al. (2018) はカンキツ 110 品種及び系統について、費用効率の高いハイスループットな GBS (genotyping-by sequencing) によって得られた 2,309 SNP を使用し、果重、果皮色、果肉及びじょうのうの硬さについて、交配育種に有効な 7 つの QTL を同定した。また、Farneti et al. (2017) はリンゴ 162 品種を用いて 9,142 SNP で解析し、果肉質と香り成分について重要な候補遺伝子座を報告した。本研究でも GWAS で有意性の高い新規の QTL が検出され、GWAS が果樹におい

ても効果的な手法であることがあらためて確認された。今後もシーケンス技術の向上とともに活発に利用され、育種に有用な QTL が明らかとなることが期待される。

バラ科果樹におけるマーカー利用選抜はリンゴやオウトウで報告がある（Ru et al., 2015）。リンゴでは黒星病抵抗性について *Rvi6* (*Vf*) 遺伝子及び表現型でのスクリーニングを 1,000 個体以上で実施し、マーカーの信頼性を実証した（Tartarini et al., 2000）。また、収穫後の貯蔵性について、約 3,000 個体の *Md-ACS1* 遺伝子型判定を行い、苗木の初期選抜によって従来コストの約 60% が節約できることが示された（Edge-Garza et al., 2010）。また、Kellerhals et al. (2011) は 2 つの実生集団からリンゴ火傷病抵抗性 (*FB-F7*)、黒星病抵抗性 (*Rvi4* 及び *Rvi6*)、うどんこ病の複合抵抗性 (*P12*) をもつ複合抵抗性個体を DNA マーカーによって選抜した。オウトウでは、自家和合性及び果実サイズについて約 2,300 個体を解析しており、コストの削減につながっている（Haldar et al., 2010; Rowland et al., 2012）。アメリカでは遺伝情報やツールを応用してバラ科作物の育種効率化を図るため、2009 年から 2013 年に資金提供された大規模プロジェクト RosBREED が組織され、リンゴのマーカー選抜が促進された。ワシントンリンゴ育種計画では 9,000 実生を対象に貯蔵性、硬さ、食感、果汁、酸度についてマーカー選抜が行われており（Sebolt, 2013）、ミネソタ大学リンゴ育種計画では果皮色、酸度、ビターピット、黒星病抵抗性について 1,700 実生を対象に実施されている（Peace, 2013）。青森県では、2008 年に青り 4 号と黒星病抵抗性品種‘あおり 25’（Kudo et al., 2013）の交雑実生 228 個体について、黒星病抵抗性遺伝子 (*Vf*) に連鎖する DNA マーカーを用いて 112 個体を選抜した（Kudo et al., 2009）。また、2015 年に‘あおり 15’と青り 14 号の交雑実生 1,176 個体を果皮色 (*Rf*) マーカーで 563 個体に選抜、2015 年～2016 年に黒星病抵抗性系統である青り 28 号と‘さんさ’の交雑実生 2,104 個体を *Vf* 及び *ACS1* (Harada et al., 2000) マーカーで 435 個体に選抜しており（data not shown）、圃場で評価する個体を 1/2～1/4 に絞り込み、育種の効率化を図っている。イネやコムギでは既にマーカー利用選抜で育成された品種の事例がある（Tomita, 2009; 藤田, 2013）。リンゴや他の果樹についても活発に実施されていることから、今後の報告が期待される。

本研究により褐変性の遺伝様式と原因遺伝子座が明らかとなったことから、交配親の選定と非褐変性個体の出現確率の予測及び DNA マーカー選抜が実施可能となり、利用効果も高いことが期待できる。既に報告のある低エチレン生成（Harada et al., 2000）、硬さと軟化（Costa et al., 2010）、収穫期（Liebhard et al., 2003a; Kenis et al., 2008; Kunihisa et al., 2014）の QTL に関する知見と併せて選抜することで、早生～晩生の様々な収穫期で、貯蔵性に優れた非～難褐変性品種が効率良く育成でき、将来的にはリレー販売による周年供給が可能

となることが期待される。例として、*LAR1*, *PPO* 近傍 QTL 及びエチレン生成遺伝子 (*ACS1*) の 3 座において、種子親及び花粉親の遺伝子型がヘテロ接合体である交配親を選択した場合のマーカー選抜モデルを示す。これまでは *ACS1* を利用して 1/4 を選抜するに留まっていたが、今後はそれに加えて *LAR1* 及び *PPO* 近傍 QTL の 2 座において非褐変性アレルのホモ接合体となる個体を選抜すると 1/64 まで個体数を絞り込むことが可能となる (Fig. 5-2)。Luby and Shaw (2001) は従来の育種とマーカー利用選抜でのコストを比較し、幼若期の長いリンゴやブドウにおいて幼苗段階での実施はメリットが多く、特に単一遺伝子座で選抜可能な形質や遺伝率の高い形質では効果が大きいとしており、早期選抜によって経費や労力の削減が期待できる。あるいは、圃場面積を維持した場合、64 倍規模での育種が可能となり、優良品種の出現確率は格段に高まると考えられる。

育種に用いる交配親選定には、対象形質の遺伝子型に加えてハプロタイプの由来や連鎖関係を考慮する必要がある。系譜情報が有用だが、交配組合せに矛盾が生じる例もあり、遺伝解析によって補完された正確な親情報が役立っている (Abe et al., 2006)。第 16 番染色体上の QTL の非褐変性アレルは複数の祖先品種に由来し、既に日本の様々な品種に継承されていることが明らかとなった (Table 5-1)。特に‘あおり 27’、‘マへ 7’、‘東光’、‘金星’、‘レッドゴールド’は非褐変性アレルのホモ接合体であり、高い確率で非褐変性の後代が得られる交配親として期待できる。特定した全ての非褐変性アレルは、野生型の非致死アレルと連鎖していることが判明し、非褐変性個体の選抜により致死が引き起こされる危険性はないことが明らかとなった。一方、酸度遺伝子に関しては、‘印度’由来の非褐変性アレルを除いて、全ての非褐変性アレルが高酸性アレルに連鎖していた。食味に関する他の QTL との兼ね合いもあるが、高酸性アレルのホモ接合体は、酸度が高く生食用として適さない可能性があり、非褐変性かつ適酸の品種を育成するためには‘印度’由来のアレルが有用な資源となる。‘印度’由来の非褐変性アレルは‘あおり 27’の他、‘ゴールデンメロン’、‘東光’及び‘マへ 7’が保有しており (Table 5-1)、これらの後代にも受け継がれている可能性が高い。一方で、第 16 番染色体上部には、この他にも、裂果性や、斑点性障害、肉質に関する QTL の報告がある (Kumar et al., 2013; Longhi et al., 2012; Tazawa et al., 2017)。そのため、品種育成において本領域で実生選抜を行う場合には、これらの形質への影響について慎重に検証を行っていく必要がある。第 5 番染色体 QTL の非褐変性アレルも同様に、既に種々の品種に伝播しており、‘あおり 27’はホモ接合、‘マへ 7’、‘世界一’、‘レッドゴールド’、‘東光’、‘ゴールデンメロン’及び‘金星’はヘテロ接合で非褐変性アレルを保有していると推定される (data not shown)。これらの非褐変性アレルを保有する品種を交配親に用い、候補遺伝子近傍に設計した DNA マーカーによ

り、非褐変性アレル集積個体を選抜することで、遺伝子組換えに頼らない非褐変性リンゴの育成が可能であると考えられる。

一例として、主力品種‘ふじ’を交配親に用いる非褐変性品種の育成戦略について示す。‘ふじ’と非褐変性アレルを保有する親を交配することで、‘ふじ’の優れた食味と貯蔵性を引き継ぐ非褐変性品種の育成が期待できる。‘ふじ’の第 16 番染色体上の QTL は褐変性/非褐変性アレルのヘテロ接合であるため、同座に非褐変性アレルを持つ親と交配することにより、 F_1 世代で非褐変性アレルのホモ個体が得られる。しかし、‘ふじ’の第 5 番染色体上の QTL は褐変性アレルのホモ接合であるため、非褐変性アレルのホモ個体を得るためには、非褐変性アレルを持つ親との交配を少なくとも 2 回繰り返す必要があり、比較的長い時間を要すると考えられる。

リンゴの品種育成を加速する新たな手法として、早期開花技術の利用が報告されている (Flachowsky et al., 2011)。野生種から病害抵抗性遺伝子を導入する場合、果実の品質を向上するためには 5 回ほど栽培品種との戻し交配を繰り返し、世代を進める必要があるが、リンゴでは 1 世代に約 10 年を要するため、実用化までには相当な時間を要する。そこで、シラカバの *BpMADS4* 遺伝子を過剰発現する早期開花系統を遺伝子組換えによって作出し、世代促進とマーカー利用選抜を組み合わせることで、火傷病、黒星病及びうどんこ病抵抗性遺伝子を早期に品種へ導入する手法が確立されており、野生種からの形質導入や、複数形質の集積を進める上で非常に期待されている。褐変性に関しては、‘ふじ’を利用した前述の戦略の場合は 2 世代にわたる交配が必要であるが、早期開花技術の利用により、数年間での品種候補系統の獲得が見込める。

近年、ゲノム編集技術の進展も目覚ましく、これまで利用されてきた人工制限酵素より扱いが容易な CRISPR/Cas9 が発表されたことで、哺乳類、魚類、植物など様々な生物に適用されるようになった (Pennisi, 2013)。受粉不要なトマト (Ueta et al., 2017) や、ソラニンを作らないジャガイモが作出され (Nakayasu et al., 2018)、ウイルス病耐性のあるバナナの育成への利用も報告されている (Tripathi et al., 2019)。リンゴでは、Nishitani et al. (2016) がフィトエン不飽和化酵素 (PDS) 機能を破壊してカロテノイド生合成を抑制し、葉緑素の損傷によるアルビノ個体を作成し、視覚及びゲノム DNA 解析の双方でゲノム編集の成功を確認した。現時点では、人工制限酵素を送り込む手段として遺伝子組み換え技術を用いているが、直接人工制限酵素を導入する研究も進められている。果肉褐変性には複数の遺伝子が関与することが示されたが、マルチプレックスでゲノム編集が可能であることがトマトで報告されている (Hashimoto et al., 2018)。ターゲットの数が増えると成功率は低くなるものの、個体数を増やすことで応用できると考えられ、褐変関連遺伝子の機能破壊によって、既存の主力品種へ非褐変性を付与できる可能性がある。

本研究の知見は、褐変性が問題となるモモやナシ、ピロ等他作物への応用も期待できる。GDR (<https://www.rosaceae.org>) Web サイトではリンゴを含む様々なバラ科果樹における *LAR* 及び *PPO* の遺伝子の位置や配列が公開されている。*LAR* の塩基配列を作物間で比較すると、バラ科果樹では比較的遺伝子の共通性が高い (Fig. 5-3)。また、モモでは生理障害である内部褐変の QTL 解析の結果から、アントシアニン生合成経路においてロイコシアニジンを生シアニジンに変換する酵素をコードする *leucoanthocyanidin dioxygenase* が原因遺伝子として報告されている (Oguniwin et al. 2008)。褐変性が問題視される他作物でも、*LAR* や *PPO* と同様の機能をもつ遺伝子が原因となっている可能性が考えられ、遺伝子配列の類似性や機能比較、発現解析によって、褐変性の原因遺伝子が明らかになれば、ゲノム編集で遺伝子を改変するアプローチが可能となる。

Okanagan Specialty Fruits 社が開発した果肉が褐変し難い遺伝子組換えリンゴ Arctic® Apple は 2003 年から試験栽培を開始し、2015 年に米国農務省の許可を得て商業栽培を開始した。大豆やトウモロコシといった加工品に利用される作物ではなく、生食するリンゴであるため、安全性に疑問を抱く消費者が多く、農家や市民団体からも反発は根強い。このため、褐変しないジャガイモは 2 年間で認可されたのに対し、Arctic® Apple は 5 年の評価期間を要した。2017 年に果実販売が開始され、カットりんごやスナック等の加工品も流通しており、同社は 2019 年～2020 年にかけて約 3,600 トンの生産を見込んでおり、今後も生産量を増やすとしている。消費者の public acceptance が順調であれば魅力的な商品であるが、現状では表示義務のない米国であっても「遺伝子組換え」表記を求める声は多い。EU で

は遺伝子組換えの表示基準を厳しく取り決めており、事実上欧州等諸外国への輸出は困難であり、販路拡大の道は険しい。生産量の多い中国でも遺伝子組換えに対する積極的な動きはなく、明確なスタンスは示されていない。果樹の遺伝子組換え作物の成功例では、ハワイで遺伝子組換えパパイヤが栽培面積の 8 割を占める事例があるが、産業に壊滅的な被害を与えるパパイヤリングスポットウイルス病への抵抗性獲得が目的のため、受け入れざるを得ないという背景がある。交配育種によって作出された品種では上述のような問題は生じず、「あおり 27」は既に輸出もされている。

これまで、遺伝子組換えでなければ作出は難しいと考えられてきた非褐変性品種だが、鍵となる遺伝子領域と遺伝様式が明らかとなり、DNA マーカーが開発されたことで、交配育種による作出及びマーカー利用選抜の道が開けた。「あおり 27」1 品種ではリレー販売できず、非褐変性リンゴの加工品利用や流通は制限されてきたが、育種目標に沿って各 QTL で望ましい遺伝子型を組み合わせていくことで、多様な非～難褐変性リンゴ品種を効率的に育成することができると考えられ、加工作業効率の上昇や、付加価値をつけた新製品による新たな市場展開が期待される。消費者にとっても「褐変しない」という付加価値により家庭での利用の幅が広がることから、果実購入頻度の向上も期待できる。また、日本産輸出リンゴのシェアが高い台湾等では新品種の需要が増加しており、付加価値のあるリンゴとして輸出へ貢献できる可能性もある。近年は、皮を剥かずに食べられる、手がよごれない、種がない等、より手軽に口に出来る作目や品種の人気の高い。今後、本研究の知見を利用した育種により、褐変性を克服した魅力ある新品種が誕生し、リンゴの消費拡大及び産業の活性化へ貢献することが期待される。

Table 5-1. Haplotypes of non-browning alleles on Chr16, and cultivars inheriting them

Origin of haplotype	Marker types near QTL				cultivars ^a
	LAR1_02	LAR1_11	Ma1	MdPHYLL0	
Indo	378	284	ma	WT	Aori 27*, Golden Melon, Mahe 7*, Toko*
Delicious	289	284	Ma	WT	Aori27*, Fuji, Himekami, Iwakami, Kinsei*, Mahe 7*, Redgold*
Golen Delicious	289	284	Ma	WT	Haruka, Hatsuaki, Kinsei*, Kotaro, Orin, Redgold*, Sekaiichi, Toko*, Tsugaru

^a Asterisks (*) represent cultivars having non-browning allele homozygously.

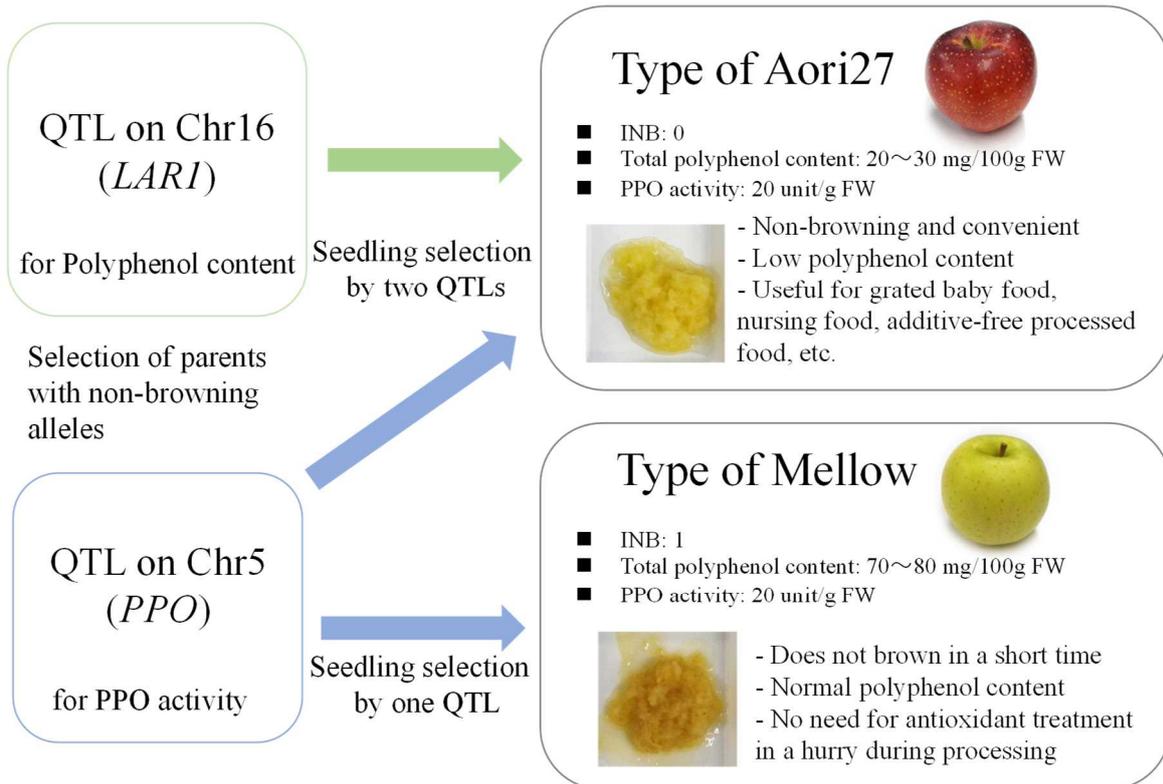


Figure 5-1. Strategy for marker assisted breeding for non- to slight- browning apple with various polyphenol content.

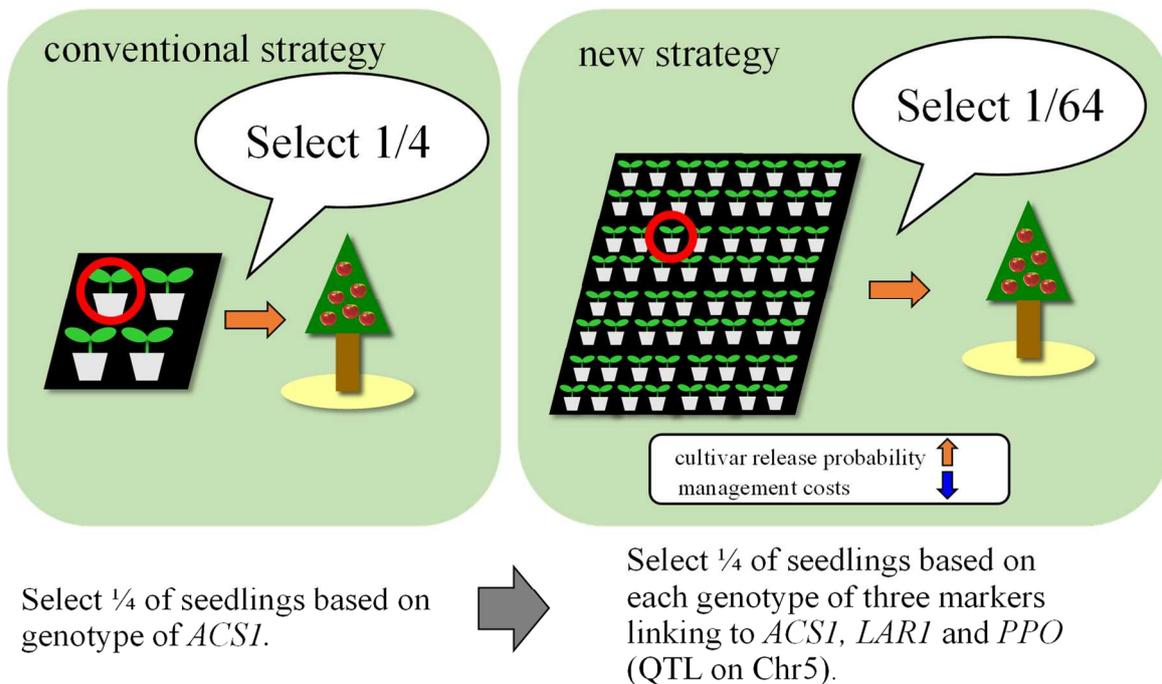


Figure 5-2. Marker assisted breeding for non-browning apple, using together with *ACSI* (low-ethylene marker). Cross parents are assumed to be heterozygote for all QTLs. We select seedlings which are homozygous of low-ethylene allele for *ACSI*, and homozygous of non-browning allele for *LARI* and *PPO* (QTL in Chr5).

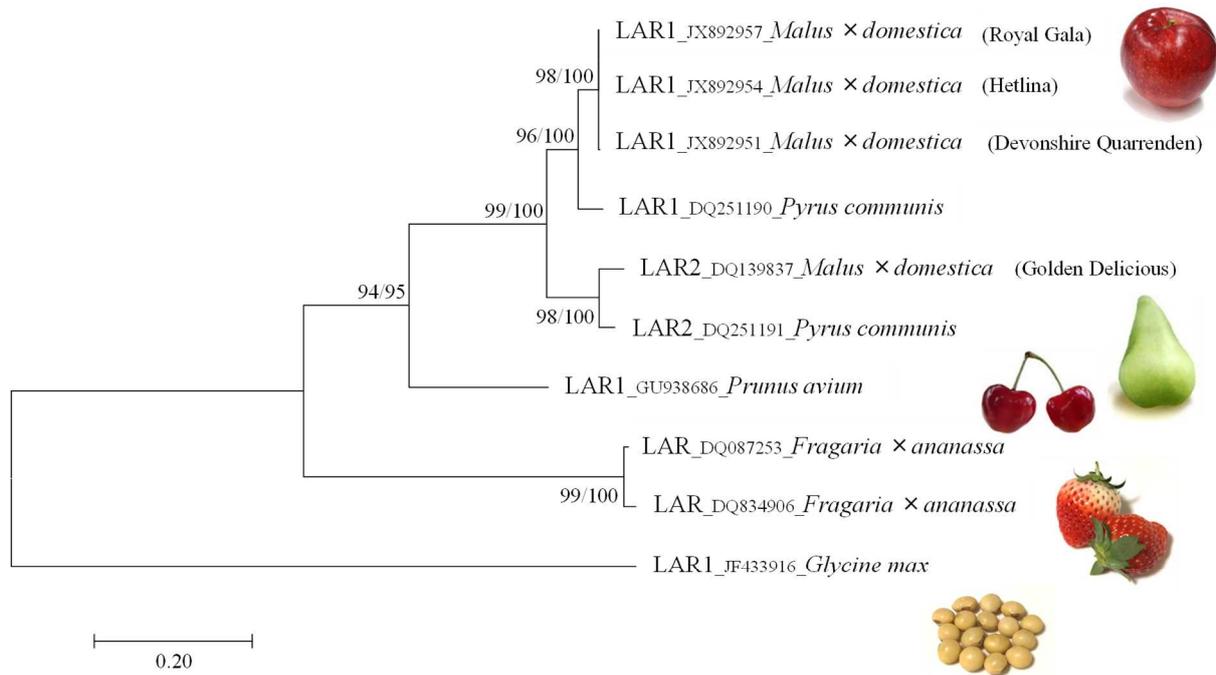


Figure 5-3. Neighbor-joining (NJ) tree of LAR genes of Rosaceae or other crops constructed by MEGA version 7.0. NJ and maximum parsimony (MP) bootstrap support (BS) values are indicated at the nodes as NJBS/MPBS. GenBank accession No. are noted before the species names. The tree was rooted to *Glycine max*.

VI 総合摘要

リンゴは、世界の生産量が果樹で第3位の経済的に重要な商業作物であり、生食のほか加工利用もさかんである。果実をカットしたときに生じる果肉褐変は外観を著しく損ない、商品価値を喪失させる重大な負の現象である。青森県で育成されたリンゴ品種‘あおり 27’は、すり下ろし5日後も果肉が褐変しない希有な非褐変特性から、新たな需要を喚起する品種として期待されるが、‘あおり 27’1品種では周年供給することができない。リレー販売が可能な収穫期が異なる新たな非褐変性リンゴ品種の作出のためには、非褐変特性の原因遺伝子領域や遺伝特性の解明、DNA マーカーによる選抜育種が不可欠である。そこで本研究では、‘あおり 27’やその後代、祖先品種及び多様な遺伝資源を対象とした遺伝解析を行い、果肉褐変性の原因遺伝子領域及び遺伝様式を明らかにすることを目的とした。

‘あおり 27’と褐変性を有する親 (F1-165 及び‘こうたろう’) を交配した2つのF₁集団 (165A27 集団 50 個体及び KA27 集団 55 個体) を用いた QTL 解析によって、褐変性に関連する複数形質 (果肉及び果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO 活性) の主要 QTL が褐変性親の第16連鎖群上部の *LAR1* 近傍に検出された。一方で、非褐変性親である‘あおり 27’に有意な QTL は検出されなかった。165A27 集団では QTL の寄与率が 66.3–73.4% と高く、連

鎖マーカーの遺伝子型と褐変指数の分離が概ね一致したことから、本集団において褐変性はほぼ単因子支配であり、非褐変性の遺伝様式は劣性遺伝であると推定された。QTL 上に位置するポリフェノール合成経路上の遺伝子 *LAR1* が、褐変の基質であるポリフェノール含量を制御していると推察された。F1-165 は‘あおり 27’の後代ではないにも関わらず、多数の非褐変性 F₁ 個体を出現させたことから、非褐変性は複数の祖先品種由来の非褐変性アレルの集積によるもので、‘あおり 27’固有の突然変異によるものではないことが示唆された。

非褐変性アレルの起源を明らかにするために、QTL 解析に用いた2集団とその祖先品種及び近縁品種について、第16連鎖群の QTL 周辺のハプロタイプ解析を行い、非褐変性アレルの由来する祖先品種のハプロタイプを推定した。‘あおり 27’及び非褐変性 F₁ 個体は、‘ゴールドデンリシャス’、‘デンリシャス’及び‘印度’に由来する非褐変性アレルのいずれかをホモ接合で持っており、これにより褐変程度が低くなることが明らかとなった。QTL 近傍には酸度及び致死遺伝子が存在し、大部分の非褐変性アレルが高酸性アレルと連鎖している一方で、‘印度’由来の非褐変性アレルのみ低酸性アレルと連鎖していた。高酸性アレルのホモ接合体は酸度が高くなる傾向があることから、生食に適した適度な酸味の品種を

育成するためには、‘印度’由来の非褐変性アレルが有用であると考えられた。また、いずれの非褐変性アレルも野生型の非致死アレルと連鎖しており、非褐変性アレルの選抜により致死が引き起こされる危険性はないことが明らかとなった。

また、QTL解析と並行して、遺伝資源85品種及び系統を用いたGWASによって褐変関連形質（果肉及び果汁褐変性、総ポリフェノール含量、PPO活性）を解析し、第16番染色体以外に5番、10番及び17番染色体上に新たなQTLを同定した。果肉褐変性には第5番染色体のQTL上に位置するPPOがより大きく影響していると推定され、本QTLで‘ゴールデンデリシャス’由来のアレルがホモ接合となることで、PPO活性及び果肉の褐変性が低下すると考えられた。また、総ポリフェノール含量及び果汁褐変性に関するQTLは第16番染色体のLARI上

に検出され、QTL解析の結果を裏付けた。基質であるポリフェノール含量を低下させるLARIのアレルは、‘ゴールデンデリシャス’、‘デリシャス’及び‘印度’の3品種に加えて‘紅玉’及び‘国光’も保有している可能性が示唆された。

本研究により、褐変性を制御する原因遺伝子座、遺伝様式及び非褐変性アレルの由来が明らかとなったことから、交配親の選定と非褐変性個体の出現確率の予測及びDNAマーカー選抜が実施可能となり、交配育種による非褐変性品種育成の道が開けた。既に報告のある収穫期や日持ち性等に関する知見と併せてマーカー選抜に利用することで、早生～晩生の様々な収穫期で、貯蔵性に優れた非褐変性品種が育成できると考えられる。今後は、多様な遺伝的背景の集団を使用して、これらのDNAマーカーによる選抜効果を確認していく必要がある。

引用文献

- Abe Y, Igarashi M, Hatsuyama Y, Ueda T, Kon T, Fukasawa-Akada T, Kudo T, Sato T, Suzuki M. 2006. Test for parentage of apple cultivars bread in Aomori prefectural district by SSR genotypes. Hort Res Japan 75 (Suppl 1): 297.
- Almeida JR, D’Amico E, Preuss A, Carbone F, de Vos CR, Deiml B, Mourgues F, Perrotta G, Fischer TC, Bovy AG, Martens S, Rosati C. 2007. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*). Arch Biochem Biophys 465: 61-71.
- Amiot MJ, Tacchini M, Aubert S, Nicolas J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. J Food Sci 57: 958-962.
- Andre CM, Legay S, Deleruelle A, Nieuwenhuizen N, Punter M, Brendolise C, Cooney JM, Lateur M, Hausman J, Larondelle Y, Laing WA. 2016. Multifunctional oxidosqualene cyclases and cytochrome P450 involved in the biosynthesis of apple fruit triterpenic acids. New Phytol 211: 1279-1294.
- 青森県りんご生産指導要項編集委員会. 2014. 栽培の手引き. りんご生産指導要項. 平成26年度改訂版. 青森県りんご協会. 青森: P. 159, 327-328.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinoshita N. 2000. Dietary intake of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol. J Nutr 130: 2378-2383.
- Aranzana MJ, Abbassi EK, Howad W, Arús P. 2010. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. BMC Genet 11: 69.
- Armstrong J, Lane WD. 2009. Genetically modified reduced-browning fruit-producing plants and produced fruit thereof, and method of obtaining such. U.S. Patent No. 8,563,805. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Bachem CW, Speckmann GJ, van der Linde PC, Verheggen FT, Hunt M D, Steffens JC, Zabeau M. 1994.

- Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Nature Biotechnol* 12: 1101-1105.
- Bai Y, Dougherty L, Li M, Fazio G, Cheng L, Xu K. 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. *Mol Genet Genom* 287: 663-678.
- Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T. 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.
- Barbehenn RV, Jones CP, Yip L, Tran L, Constabel CP. 2007. Limited impact of elevated levels of polyphenol oxidase on tree-feeding caterpillars: assessing individual plant defenses with transgenic poplar. *Oecologia* 154: 129-140.
- Belfanti E, Sifverberg-Dilworth E, Tartarini S, Patocchi A, Barbieri M, Zhu J, Vinatzer BA, Gianfranceschi L, Gessler C, Sansavini S. 2004. The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 886-890.
- Bianco L, Cestaro A, Sargent DJ, Banchi E, Derdak S, Di Guardo M, Salvi S, Jansen J, Viola R, Gut I, Laurens F, Chagné D, Velasco R, van de Weg E, Troggio M. 2014. Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for apple (*Malus × domestica* Borkh.) *PLoS One* 9: e110377.
- Bianco L, Cestaro A, Linsmith G, Muranty H, Denancé C, Théron A, Poncet C, Micheletti D, Kerschbamer E, Di Pierro EA, Larger S, Pindo M, van de Weg E, Davassi A, Laurens F, Velasco R, Durel CE, Troggio M. 2016. Development and validation of the Axiom® Apple480K SNP genotyping array. *The Plant Journal* 86: 62-74.
- Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP. 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol* 139: 652-663.
- Boss PK, Gardner RC, Janssen BJ, Ross GS. 1995. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Mol Biol* 27: 429-433.
- Cao K, Wang L, Zhu G, Fang W, Chen C, Luo J. 2012. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and association mapping analyses of peach (*Prunus persica*) landraces in China. *Tree Genet Genomes* 8: 975-990.
- Carter N. 2012. Petition for determination of nonregulated status: Arctic™ Apple (*Malus × domestica*) events GD743 and GS784. United States Department of Agriculture—Animal and Plant Health Inspection Service.
- Cary JW, Lax AR, Flurkey WH. 1992. Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. *Plant Mol Biol* 20: 245-253.
- Celton JM, Tustin DS, Chagné D, Gardiner SE. 2009. 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.

- Chagné D, Crowhurst RN, Troglio M, Davy MW, Glimore B, Lawley C, Vanderzande S, Hellens RP, Kumar S, Cestaro A, Velasco R, Main D, Rees JD, Iezzoni A, Mockler T, Wilhelm L, van de Weg E, Gardiner SE, Bassil N, Peace C. 2012a. Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. PLoS One 7: e31745.
- Chagné D, Dayatilake D, Diack R, Oliver M, Ireland H, Watson A, Gardiner SE, Johnston JW, Schaffer RJ, Tustin S. 2014. Genetic and environmental control of fruit maturation, dry matter and firmness in apple (*Malus × domestica* Borkh.). Hort Res 1: 14046.
- Chagné D, Krieger C, Rassam M, Sullivan M, Fraser J, André C, Pindo M, Troglio M, Gardiner SE, Henry RA, Allan AC, McGhie TK, Laing WA. 2012b. QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit. BMC Plant Biol 12: 12.
- Coseteng MY, Lee CY. 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. J Food Sci 52: 985-989.
- Costa F, Peace CP, Stella S, Serra S, Musacchi S, Bazzani M, Sansavini S, van de Weg WE. 2010. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.). J Ex Bot 61: 3029-3039.
- Daccord N, Celton JM, Linsmith G, Becker C, Choisine N, Schijlen E, van de Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, Di Pierro EA, Gouzy J, Rees DJG, Guérif P, Muranty H, Durel CE, Laurens F, Lespinasse Y, Gaillard S, Aubourg S, Quesneville H, Weigel D, van de Weg E, Troglio M, Bucher E. 2017. High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. Nat Genet 49: 1099-1106.
- Ding CK, Chachin K, Ueda Y, Mochioka R. 1998. Changes in polyphenol concentrations and polyphenol oxidase activity of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits in relation to browning. J Jpn Soc Hort Sci 67: 360-366.
- Dunemann F, Kahnau R, Schmidt H. 1994. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD 'fingerprinting' of cultivars and wild species. Plant Breed 113: 150-159.
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. Nature 405: 903-904.
- Edge-Garza DA, Zhu Y, Peace CP. 2010. Enabling marker-assisted seedling selection in the Washington apple breeding program. Acta Hort 859:369-373.
- Endelman JB. 2011. Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. Plant Genome 4: 250-255.
- Endelman JB, Jannink JL. 2012. Shrinkage estimation of the realized relationship matrix. G3: Genes Genomes Genet 2: 1405-1413.
- Farneti B, Di Guardo M, Khomenko I, Cappellin L, Biasioli F, Velasco R, Costa F. 2017. Genome-wide association study unravels the genetic control of the apple volatillome and its interplay with fruit texture. J Exp Bot 68: 1467-1478.
- Fernández-Fernández F, Harvey NG, James CM. 2006. Isolation and characterization of polymorphic

- microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis* L.). *Mol Ecol* 6: 1039-1041.
- Flachowsky H, Le Roux PM, Peil A, Patocchi A, Richter K, Hanke M V. 2011. Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus × domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist* 192: 364-377.
- Flint-Garcia SA, Thuillet AC, Yu J, Pressoir G, Romero SM, Mitchell SE, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES. 2005. Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant J* 44: 1054-1064.
- Folin O, Denis W. 1915. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem* 22: 305-308.
- Frankel EN, Bosanek CA, Meyer AS, Silliman K, Kirk LL. 1998. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem* 46: 834-836.
- 藤田由美子. 2013. 日本のコムギ品種育成および品種保証における DNA マーカーの開発と利用. *Bull NARO Inst Crop Sci* 14: 23-35.
- Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, Yano M. 2009. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 5943: 998-1001.
- Gil MI, Gorny JR, Kader AA. 1998. Responses of 'Fuji' apple slices to ascorbic acid treatments and low-oxygen atmospheres. *Hort Sci* 33: 305-309.
- Golan A, Kahn V, Sadovski AY. 1977. Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison between the fuerte and lerman cultivars. *J Agric Food Chem* 25: 1253-1260.
- Grattapaglia D, Sederoff R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
- Guardo MD, Tadiello A, Farneti B, Lorenz G, Masuero D, Vrhovsek U, Costa G, Velasco R, Costa F. 2013. A multidisciplinary approach providing new insight into fruit flesh browning physiology in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *PLoS One* 8: e78004.
- Guilford P, Prakash S, Zhu JM, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R. 1997. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor Appl Genet* 94: 249-254.
- Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleau JF. 1998. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *J Agric Food Chem* 46: 1698-1705.
- Haldar S, Haendiges S, Edge-Garza DA, Oraguzie NC, Olmstead J, Peace CP. 2010. Applying genetic markers for self-compatibility in the WSU sweet cherry breeding program. *Acta Hort* 859: 375-380
- Hamblin MT, Buckler ES, Jannink JL. 2011. Population genetics of genomics-based crop improvement methods. *Trends Genet* 27: 98-106.
- Harada T, Sunako T, Wakasa Y, Soejima J, Satoh T, Niizeki M. 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. *Theor Appl Genet* 101: 742-746.
- Haruta M, Murata M, Hiraide A, Kadokura H, Yamasaki M, Sakuta M, Shimizu S, Homma S. 1998. Cloning genomic DNA encoding apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in *Escherichia coli* and apple. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 358-362.
- Hashimoto R, Ueta R, Abe C, Osakabe Y, Osakabe K. 2018. Efficient multiplex genome editing induces precise, and self-ligated type mutations in tomato plants. *Frontiers in Plant Science* 9: 916.
- He JG, Cheng YD, Guan JF, Ge WY, Zhao Z. 2017. Changes of chlorogenic acid content and its synthesis-associated genes expression in Xuehua pear fruit during development. *J Integr Agric* 16: 471-477.
- Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juice. *J Agric Food Chem* 41: 1242-1246.
- Holderbaum DF, Kon T, Kudo T, Guerra MP. 2010. Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. *Hort Sci* 45: 1150-1154.
- Hummer KE, Janick J. 2009. Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In *Genetics and genomics of Rosaceae*: Springer. New York: 1-17.
- Hyson DA. 2011. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Adv Nutr* 2: 408-420.
- Igarashi M, Hatsuyama Y, Harada T, Fukasawa-Akada T. 2016. Biotechnology and apple breeding in Japan. *Breed Sci* 66: 18-33.
- Imai A, Nonaka K, Kuniga T, Yoshioka T, Hayashi T. 2018. Genome-wide association mapping of fruit-quality traits using genotyping-by-sequencing approach in citrus landraces, modern cultivars, and breeding lines in Japan. *Tree Genet Genomes* 14: 24.
- Inoue E, Matsuki Y, Anzai H, Evans K. 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol Ecol* 7: 445-447.
- Iwata H, Hayashi T, Terakami S, Takada N, Sawamura Y, Yamamoto T. 2013. Potential assessment of genome-wide association study and genomic selection in Japanese pear *Pyrus pyrifolia*. *Breed Sci* 63: 125-140.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Fransworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220.
- Janick J, Cummins JN, Brown SK, Hemmat M. 1996. Fruit breeding, tree and tropical fruits (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Juniper BE, Watkins R, Harris SA. 1999. The origin of the apple. *Acta Hort* 484: 27-33.
- Karp A, Edwards KJ. 1998. DNA markers: a global overview. In: Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (eds), DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. Wiley. New York: 1-13.
- Kellerhals M, Franck L, Baumgartner IO, Patocchi A, Frey JE. 2011. Breeding for fire blight resistance in apple. *Acta Hort* 896: 385-389.

- Kenis K, Keulemans J, Davey MW. 2008. Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple. *Tree Genet Genomes* 4: 647-661.
- Khan SA, Chibon PY, de Vos RC, Schipper BA, Walraven E, Beekwilder J, van Dijk T, Finkers R, Visser RGF, van de Weg E, Bovy A, Cestaro A, Velasco R, Jacobsen E, Schouten HJ. 2012. Genetic analysis of metabolites in apple fruits indicates an mQTL hotspot for phenolic compounds on linkage group 16. *J Exp Bot* 63: 2895-2908.
- Khanizadeh S, Groleau Y, Levasseur A, Charles MT, Tsao R, Yang R, DeEll J, Hampson CR, Toivonen P. 2006. 'SJCA38R6A74' (Eden). *Hort Sci* 41: 1513-1515.
- Kim JY, Seo YS, Kim JE, Sung SK, Song KJ, An G, Kim WT. 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Sci* 161: 1145-1152.
- King GJ. 1994. Progress in mapping agronomic genes in apple (The European Apple Genome Mapping Project). *Euphytica* 77: 65-69.
- King GJ, Alston FH, Batlle I, Chevreau E, Gessler C, Janse J, Lindhout P, Manganaris AG, Sansavini S, Schmidt H, Tobutt K. 1991. The 'European Apple Genome Mapping Project'-developing a strategy for mapping genes coding for agronomic characters in tree species. *Euphytica* 56: 89-94.
- King GJ, Maliepaard C, Lynn JR, Alston FH, Durel CE, Evans KM, Griffon B, Laurens F, Manganaris AG, Schrevels E, Tartarini S, Verhaegh J. 2000. Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit fresh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theor Appl Genet* 100: 1074-84.
- King GJ, Tartarini S, Brown L, Gennari F, Sansavini S. 1999. Introgression of *Vf* source of scab resistance and distribution of linked marker alleles within the *Malus* gene pool. *Theor Appl Genet* 99: 1039-46.
- 小宮山美弘. 1987. スモモ果実の品質保持及び利用に関する生化学的研究. *日食工誌* 34: 203-210.
- Kudo T, Igarashi M, Fukasawa-Akada T, Hatsuyama Y, Kon T. 2009. Breeding of scab resistance apples in Aomori and application of DNA markers assisted selection. *Hort Res Japan* 8 (Suppl 1): 35.
- Kudo T, Fukasawa-Akada T, Igarashi M, Goto S, Kon T, Sato T. 2013. New apple cultivar, 'Aori25'. *Hort Res Japan* 13 (Suppl 1): 256.
- Kumar S, Garrick DJ, Bink MC, Whitworth C, Chagné D, Volz RK. 2013. Novel genomic approaches unravel genetic architecture of complex traits in apple. *BMC Genom* 14: 393.
- Kunihisa M, Moriya S, Abe K, Okada K, Haji T, Hayashi T, Kim H, Nishitani C, Terakami S, Yamamoto T. 2014. Identification of QTLs for fruit quality traits in Japanese apples: QTLs for early ripening are tightly related to preharvest fruit drop. *Breed Sci* 64: 240-251.
- Kunihisa M, Moriya S, Abe K, Okada K, Haji T, Hayashi T, Kawahara Y, Itoh R, Itoh T, Katayose Y, Kanamori H, Matsumoto T, Mori S, Sasaki H, Matsumoto T, Nishitani C, Terakami S, Yamamoto T. 2016. Genomic dissection of a 'Fuji' apple cultivar: re-sequencing, SNP marker development, definition of haplotypes, and QTL detection. *Breed Sci* 66: 499-515.

- Lee CY, Kagan V, Jaworski AW, Brown SK. 1990. Enzymic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J Agric Food Chem* 38: 99-101.
- Lester MR. 1995. Sulfite sensitivity: significance in human health. *Journal of the American College of Nutrition* 14: 229-232.
- Liebhart R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder CD, Tarchini R, van de Weg E, Gessler C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol Breeding* 10: 217-241.
- Liebhart R, Kellerhals M, Pfammatter W, Jertmini M, Gessler C. 2003a. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Mol Biol* 52: 511-526.
- Liebhart R, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C. 2003b. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theor Appl Genet* 106: 1497-1508.
- Llorente B, Alonso GD, Bravo-Almonacid F, Rodríguez V, López MG, Carrari F, Héctor N, Torres HN, Flawiá MM. 2011. Safety assessment of nonbrowning potatoes: opening the discussion about the relevance of substantial equivalence on next generation biotech crops. *Plant Biotechnol J* 9: 136-150.
- Longhi S, Moretto M, Viola R, Velasco R, Costa F. 2012. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *J Exp Bot* 63: 1107-1121.
- Longhi S, Cappellin L, Guerra W, Costa F. 2013a. Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol Breed* 32: 841-852.
- Longhi S, Hamblin MT, Trainotti L, Peace CP, Velasco R, Costa F. 2013b. A candidate gene based approach validates Md-PG1 as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *BMC Plant Biol* 13: 37.
- Luby JJ, Shaw DV. 2001. Does marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? *HortSci* 36: 872-879.
- Maliepaard C, Alston FH, van Arkel G, Brown LM, Chevreau E, Dunemann F, Evans KM, Gardiner S, Guilford P, van Heusden AW, Janse J, Laurens F, Lynn JR, Manganaris AG, Den Nijs APM, Periam N, Rikkerink E, Roche P, Ryder C, Sansavini S, Schmidt H, Tartarini S, Verhaegh JJ, Vrieling-van Ginkel M King GJ. 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theor Appl Genet* 97: 60-73.
- Martinez MV, Whitaker JR. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci Technol* 6: 195-200.
- Mellidou I, Chagné D, Laing WA, Keulemans J, Davey MW. 2012. Allelic variation in paralogs of GDP-L-galactose phosphorylase is a major determinant of vitamin C concentrations in apple fruit. *Plant Physiol* 160: 1613-1629.
- Miah G, Rafii MY, Ismail MR, Puteh AB, Rahim HA, Islam K, Latif MA. 2013. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *Int J*

Mol Sci 14: 22499-22528.

- Morimoto T, Yonemushi K, Ohnishi H, Banno K. 2014. Genetic and physical mapping of QTLs for fruit juice browning and fruit acidity on linkage group 16 in apple. *Tree Genet Mol Breed* 4: 1-10.
- Moriya S, Iwanami H, Kotoda N, Haji T, Okada K, Terakami S, Mimida N, Yamamoto T, Abe K. 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.
- 村田容常. 2007. 酵素的褐変とその制御. *化学と生物* 45: 403-410.
- Murata M, Kurokami C, Homma S. 1992. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1705-1710.
- Murata M, Noda I, Homma S. 1995a. Enzymatic browning of apples on the market: relationship between browning, polyphenol content, and polyphenol oxidase. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 42: 820-826.
- Murata M, Tsurutani M, Hagiwara S, Homma S. 1997. Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 1495-1499.
- Murata M, Tsurutani M, Tomita M, Homma S, Kaneko K. 1995b. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 43: 1115-1121.
- 中林敏郎, 鶴飼申易雄. 1963. 酸化酵素による桃果肉のかっ変現象. *日食工誌* 10: 211.
- Nakano M, Shimizu T, Fujii H, Shimada T, Endo T, Nesumi H, Kuniga T, Omura M (2008) Marker enrichment and construction of haplotype-specific BAC contigs for the polyembryony genomic region in Citrus. *Breed Sci* 58: 375-383.
- Nakayasu M, Akiyama R, Lee HJ, Osakabe K, Osakabe Y, Watanabe B, Sugimoto Y, Umemoto N, Saito K, Muranaka T, Mizutani M. 2018. Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiol Biochem* 131: 70-77.
- Nishio S, Hayashi T, Yamamoto T, Terakami S, Iwata H, Imai A, Takada N, Kato H, Saito T. 2018. Bayesian genome-wide association study of nut traits in Japanese chestnut. *Mol Breed* 38: 99.
- Nishitani C, Terakami S, Sawamura Y, Takada N, Yamamoto T. 2009. Development of novel EST-SSR markers derived from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breed Sci* 59: 391-400.
- Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K, Yamamoto T, Osakabe Y. 2016. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6: 31481.
- Noro S, Sato T, Kon T, Akada T, Kudo T, Kasai S. 2009. Non-browning apple, method for producing the same, and drink and food using the same. U.S. Patent 8704050 B2 2014-4-22.
- 農林水産省大臣官房統計部. 2018. 平成30年産りんごの結果樹面積, 収穫量及び出荷量. *農林水産統計2019年5月16日公表*: <http://www.maff.go.jp/j/tokei/>.
- Ogundiwin EA, Peace CP, Nicolet CM, Rashbrook VK, Gradziel TM, Bliss FA, Parfitt CH, Crisosto CH. 2008. Leucoanthocyanidin dioxygenase gene (PpLDOX): a potential functional marker for cold storage browning in peach. *Tree Genet Genomes* 4: 543-554.
- Orcheski B, Parker R, Brown S. 2015. Pale green lethal disorder in apple (*Malus*) is caused by a mutation

- in the PHYLLO gene which is essential for phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis. *Tree Genet Genomes* 11: 131.
- O'Rourke D, Janick J, Sansavini S. 2003. World apple cultivar dynamics. *Chronica Horticulture Chronica Hort* 43: 10-13.
- Oszmianski J, Lee CY. 1990. Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J Agric Food Chem* 38: 1892-1895.
- Ozo ON, Caygill JC. 1986. O-dihydroxyphenoloxidase action on natural polyhydric phenolics and enzymic browning of edible yams. *J Sci Food Agric* 37: 283-288.
- Peace CP. 2013. RosBREED by the numbers. *RosBREED Q Newsl* 4: 4.
- Peace CP, Crisosto CH, Garner DT, Dandekar AM, Gradziel TM, Bliss FA. 2005. Genetic control of internal breakdown in peach. In *VI International Peach Symposium* 713: 489-496.
- Pennisi E. 2013. The CRISPR craze. *Science* 341: 833-836.
- Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrer AM, Fischer M. 2009. Breeding apple (*Malus × domestica* Borkh). In *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*. Springer New York: 33-81.
- Perez-Ilzarbe FJ, Martinez V, Hernandez T, Estrella I. 1992. Liquid chromatographic determination of apple pulp procyanidins. *J Liq Chrom Rel Technol* 15: 637-646.
- Pfeiffer J, Kühnel C, Brandt J, Duy D, Punyasiri PN, Forkmann G, Fischer TC. 2006. Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus × domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiol Biochem* 44: 323-334.
- Richard-Forget FC, Gauillard FA. 1997. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *J Agric Food Chem* 45: 2472-2476.
- Podsdek A, Wilska-Jeszka J, Anders B, Markowski J. 2000. Compositional characterisation of some apple varieties. *Eur Food Res Technol* 210: 268-272.
- Radi M, Mahrouz M, Jaouad A, Tacchini M, Aubert S, Hugues M, Amiot MJ. 1997. Phenolic composition, browning susceptibility, and carotenoid content of several apricot cultivars at maturity. *Hort Sci* 32: 1087-1091.
- R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna [https:// www.R-project.org/](https://www.R-project.org/). Accessed 23 Oct 2017.
- Rikkerink EHA, Oraguzie NC, Gardiner SE. 2007. Prospects of association mapping in perennial horticultural crops. In: *Association mapping in plants*. Springer, New York, pp 249-269.
- Rowland T Jr, Edge-Garza D, Oraguzie N, Peace CP. 2012. Routine marker-assisted seedling selection in the Pacific Northwest sweet cherry breeding program provides resource savings. Poster presentation at 6th Rosaceous Genomics Conference, Mezzocorona, Italy.
- Ru S, Main D, Evans K, Peace C. 2015. Current applications, challenges, and perspectives of marker-

- assisted seedling selection in Rosaceae tree fruit breeding. *Tree Genet Genomes* 11: 8.
- Sapers GM, Douglas FW, Bilyk A, Hsu AF, Dower HW, Garzarella L, Kozempel M. 1989. Enzymatic browning in Atlantic potatoes and related cultivars. *J Food Sci* 54: 362-365.
- Sawamura Y, Saito T, Takada N, Yamamoto T, Kimura T, Hayashi T, Kotobuki K. 2004. Identification of parentage of Japanese pear 'Housui'. *J Jpn Soc Hort Sci* 73: 511-518.
- Sciancalepore V. 1985. Enzymatic browning in five olive varieties. *J Food Sci* 50: 1194-1195.
- Sebolt A. 2013. Breeder profile: Kate Evans. *RosBREED Q Newsl* 4: 6-7.
- Siegelman HW, Hendricks SB. 1958. Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. *Plant Physiol* 33: 185-190.
- Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, van de Weg WE, van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel CE, Costa F, Yamamoto T, Koller B, Gessler C, Patocchi A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet Genomes* 2: 202-224.
- Slatkin M. 2008. Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* 9: 477.
- Slavin JL, Lloyd B. 2012. Health benefits of fruits and vegetables. *Adv Nutr* 3: 506-516.
- Soejima J, Bessho H, Yoshida Y, Haniuda T, Masuda T, Komori S, Tsuchiya S, Ito Y, Sanada T, Abe K, Kotoda N, Kashimura Y, Kato H. 2012. New apple cultivar 'Kotaro'. *Bull Natl Inst Fruit Tree Sci* 14: 11-23.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. 1989. Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915-924.
- Sugiyama A, Ikoma Y, Fujii H, Shimada T, Endo T, Shimizu T, Omura M. 2010. Structure and expression levels of alleles of citrus zeaxanthin epoxidase genes. *J Jpn Soc Hort Sci* 79: 263-274.
- Sun R, Chang Y, Yang F, Wang Y, Li H, Zhao Y, Chen D, Wu T, Zhang X, Han Z. 2015. A dense SNP genetic map constructed using restriction site-associated DNA sequencing enables detection of QTLs controlling apple fruit quality. *BMC Genom* 16: 747.
- Sun R, Li H, Zhang Q, Chen D, Yang F, Zhao Y, Wang Y, Han Y, Zhang X, Han Z. 2014. Mapping for quantitative trait loci and major genes associated with fresh-cut browning in apple. *Hort Sci* 49: 25-30.
- Swain T, Hillis WE. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—the quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10: 63-68.
- Takos AM, Jaffé FW, Jacob SR, Bogs J, Robinson SP, Walker AR. 2006. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiol* 142: 1216-1232.
- Tartarini S, Sansavini S, Vinatzer B, Gennari F, Domizi C. 2000. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the *Vf* scab resistance gene. *Acta Hort* 538: 549-552.
- Tazawa J, Kunihiisa M, Oshino H, Hatsuyama Y, Fukasawa-Akada T, Yamamoto T. 2017. Verification of apple fruit cracking using causal haplotype prediction. *Hort Res Japan* 16 (Suppl 1): 148.

- Thipyapong P, Steffens JC. 1997. Tomato polyphenol oxidase (differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals). *Plant Physiol* 115: 409-418.
- Tomás-Barberán FA, Espín JC. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric* 81: 853-876.
- Tomita M. 2009. Introgression of Green Revolution sd1 gene into isogenic genome of rice super cultivar Koshihikari to create novel semidwarf cultivar 'Hikarishinseiki' (Koshihikari-sd1). *Field Crops Research* 114: 173-181.
- Tripathi JN, Ntui VO, Ron M, Muiruri SK, Britt A, Tripathi L. 2019. CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Communications Biology* 2: 46.
- Tsurutani M, Murata M, Homma S. 2000. Comparison of enzymatic browning of Japanese pear and apple. *Food Sci Technol Res* 6: 344-347.
- Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K. 2017. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports* 7: 507.
- Uchiyama K, Iwata H, Moriguchi Y, Ujino-Ihara T, Ueno S, Taguchi Y, Tsubota M, Mishima K, Iki T, Watanabe A, Futamura N, Shinohara K, Tsumura Y. 2013. Demonstration of genome-wide association studies for identifying markers for wood property and male strobili traits in *Cryptomeria japonica*. *PLoS One* 8: e79866.
- Van Dyk MM, Soeker MK, Labuschagne IF, Rees DJG. 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 JW. 2006. JoinMap 4 Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma, BV, Wageningen.
- Van Ooijen JW. 2009. MapQTL 6 Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma, BV, Wageningen.
- Vavilov NI. 1930. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and Caucasus and problem of the origin of fruit trees. In: *Rep 9th Int Hort Congr R Hort Soc, London*, 271-286.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troglio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagné D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat Genet* 42: 833-839.

- Vinatzer BA, Patocchi A, Tartarini S, Gianfranceschi L, Sansavini S, Gessler C. 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.
- Wang J, Constabel CP. 2004. Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta* 220: 87-96.
- Way RD, Aldwinckle HS, Lamb RC, Rejman A, Sansavini S, Shen T, Watkins R, Westwood MM, Toshida Y. 1990. Apples (*Malus*) Moore JN and Ballington JR Jr(eds). Genetic resources of temperate fruit and nut. Int Soc Hort Sci Wageningen. *Acta Hort* 290: 1-62.
- Werij JS, Kloosterman B, Celis-Gamboa C, De Vos CR, America T, Visser RG, Bachem CW. 2007. Unravelling enzymatic discoloration in potato through a combined approach of candidate genes, QTL, and expression analysis. *Theor Appl Genet* 115: 245-252.
- Whitaker JR, Lee CY. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In “Enzymatic Browning and It’s Prevention”, in American Chemical Society Symposium Series 600: 2-7.
- Xu K, Wang A, Brown S. 2011. Genetic characterization of the *Ma* locus with pH and titratable acidity in apple. *Mol Breed* 30: 899-912.
- Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, Imai T, Saito T, Sawamura Y, Kotobuki K, Hayashi T, Matsuta N. 2002a. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theo Appl Genetics* 106: 9-18.
- Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N. 2002b. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol Ecol* 2: 14-16.
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Manabe T, Kotobuki K, Hayashi T, Ban Y, Matsuta N. 2002c. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica* 124: 129.
- Yamamoto T, Terakami S. 2016. Genomics of pear and other Rosaceae fruit trees. *Breed Sci* 66: 148-159.
- Yamamoto T, Terakami S, Moriya S, Hosaka F, Kurita K, Kanamori H, Katayose Y, Saito T, Nishitani C. 2013. DNA markers developed from genome sequencing analysis in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Acta Hort* 976: 477-483.
- Yan HB, Cheng YD, He JG, Ge WY, Yang K, Guan JF. 2014. Cloning of *PAL* gene in ‘Yali’ pear and its expression during fruit development and wounding. *Scientia Agricultura Sinica* 21: 4341-4348.
- Yanagida A. 1997. Antioxidant component and biological adjustment mechanism of apple polyphenol. *Fragrance J* 4: 63-69.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S, Buckler ES. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38: 203-208.
- Zhang Q, Ma B, Li H, Chang Y, Han Y, Li J, Wei G, Zhao S, Khan MA, Zhou Y, Gu C, Zhang X, Han Z, Korban SS, Li S, Han Y. 2012. Identification, characterization, and utilization of genome-wide simple sequence repeats to identify a QTL for acidity in apple. *BMC Genom* 13: 537.

**Studies for Genetic factor of flesh browning in apple
by comprehensive traits analysis**

Junko Tazawa

Keywords : apple, flesh browning, juice browning, non-browning apple, polyphenol content, PPO activity, QTL analysis, GWAS

Summary

Flesh browning spoils both the appearance and commercial value of apple fruits (*Malus × domestica* Borkh.). Market demand for non-browning apples is increasing, but such cultivars rarely arise in cross-breeding. This makes marker-assisted selection indispensable, but the genetic causes and the patterns of inheritance are not known. The purpose of this study was to identify causal genetic regions and patterns of inheritance of the non-browning trait and how non-browning apples might be developed in order to facilitate cultivar development.

By QTL analysis using genetic linkage maps constructed for two F₁ populations (165A27 and KA27) derived from crosses between the non-browning cultivar ‘Aori 27’ and two different browning lines, we detected major QTLs for multiple browning-related traits—flesh browning, juice browning, total polyphenols, and polyphenol oxidase activity—in almost the same region (upper part of LG 16) in the browning parents of both populations, but few in ‘Aori 27’. The flesh non-browning trait of ‘Aori 27’ was inherited by its progeny, notably one-third of the 165A27 population. A QTL for flesh browning detected in the 165A27 population explained most of the phenotypic variance (73.4% and 66.3% in 2014 and 2015), suggesting that the non-browning trait was inherited through a single recessive locus or gene. The most probable candidate gene in that QTL region is *leucoanthocyanidin reductase 1 (LAR1)*, the key gene in polyphenol synthesis. We concluded that the origin of the non-browning factor is not a mutation in ‘Aori 27’, but a mutation in a common ancestor of the multiple founder cultivars, because of the incidence of many non-browning individuals from the cross between ‘Aori 27’ and F1-165, which is a line having a common ancestor with ‘Aori 27’.

To determine the origin of the non-browning alleles, we analyzed haplotypes around this major QTL in the two populations and their ancestors, and showed that ‘Aori 27’ and non-browning F₁ individuals were functionally homozygous for non-browning alleles derived from ‘Golden Delicious’, ‘Delicious’, or ‘Indo’. Genes for acidity and pale green lethal disorder lie near this QTL. We consider the non-browning allele from ‘Indo’ to be a valuable resource for the breeding of apples with moderate acidity, because

unlike the alleles from the other cultivars, it is not linked with high acidity. All non-browning alleles are linked to wild-type alleles of otherwise lethal genes so there is little risk of lethality by the selection of non-browning individuals.

Genome-wide association study using 85 of various genetic resources detected other QTLs for multiple browning-related traits on chromosomes 5, 10, 16 and 17. The results suggest that *PPO* on chromosome 5 might have a large effect on flesh browning. The non-browning allele of this QTL was derived from 'Golden Delicious', and cultivars homozygous for this allele had low PPO activity and low flesh browning. QTLs for total polyphenol content and juice browning were detected near *LARI*, corresponding to the result of the mapping QTL analysis. The alleles for non-browning might be derived from not only 'Golden Delicious', 'Delicious', and 'Indo', but also 'Jonathan' or 'Ralls Janet'. The QTL detected on chromosome 17 might also be useful for breeding selection.

This study clarified major causal loci and the inheritance pattern of flesh browning, and the origin of non-browning alleles, allowing selection of parents, calculation of the probability of appearance of non-browning individuals in cross populations, and DNA marker-assisted selection for breeding of non-browning apple. The effect of selection of non-browning apples by DNA markers linked to identified QTLs should be validated in populations with various genetic backgrounds. Information about QTLs for flesh browning obtained in this study and for harvest day or storability previously reported would be helpful for the breeding of new non-browning cultivars with excellent storability or various harvest times. In future, it is expected that new cultivars bred using the knowledge of this study contribute to the expansion of consumption and the revitalization of industry for apple.

リンゴ新品種 ‘あおり 24’ ・ ‘あおり 25’ ・ ‘紅はつみ’ について

工藤 剛・今 智之²⁾・鈴木長蔵²⁾・石山正行²⁾・佐藤 耕²⁾・北山 弘²⁾・町田郁夫²⁾・
深澤(赤田)朝子¹⁾・後藤 聡・葛西 智・田沢純子

(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)

New Apple Cultivars, ‘Aori24’, ‘Aori25’, ‘Benihatsumi’

Tsuyoshi Kudo, Tomoyuki Kon²⁾, Chozo Suzuki²⁾, Masayuki Ishiyama²⁾, Takashi Sato²⁾,
Hiroshi Kitayama²⁾, Ikuo Machita²⁾, Tomoko Fukasawa-Akada¹⁾, Satoshi Goto,
Satoshi Kasai, Junko Tazawa

(Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

Kuroishi, Aomori 036-0332, Japan

キーワード：リンゴ新品種，‘あおり 24’，‘あおり 25’，‘紅はつみ’ 品種登録，自家不和合性
遺伝子型，中生種，黒星病抵抗性，早生種

1) 弘前工業研究所 2) 退職

目 次

I 緒 言	73
II あおり 24	
1. 育成経過	73
2. 特性の概要	
(1) 樹体	74
(2) 受粉・摘果	74
(3) 果実の特性	75
(4) 加工適性	75
3. 栽培上の留意点	76
4. 普及方法	77
5. 育成担当者	77
6. 摘要	77
III あおり 25	
1. 育成経過	78
2. 特性の概要	
(1) 樹体	78
(2) 受粉・摘果	78
(3) 果実の特性	78
(4) 病害抵抗性	80
(5) 加工適性	81
3. 栽培上の留意点	81
4. 育成担当者	81
5. 摘要	81
IV 紅はつみ	
1. 育成経過	82
2. 特性の概要	
(1) 樹体	82
(2) 受粉・摘果	82
(3) 果実の特性	83
3. 栽培上の留意点	85
4. 育成担当者	86
5. 摘要	86
引用文献	87
Summary	88
写 真	90

I 緒 言

青森県のリンゴ栽培は、明治初期に海外から導入した多くの品種の中から本県の気象や日本人の嗜好に適した品種を選抜することによって始まっている。その後、継続的な品種導入と独自品種の育成によって発展・維持されてきた。栽培面積は1968年の‘国光’、‘紅玉’の価格の大暴落や病害の発生等で、それまで維持されてきた25,000haを割り込んだが、その後、品種更新やわい性台樹の普及等で、1988年には25,600haまで回復した。しかしながら、高齢化や担い手不足等により再び減少し、2022年には20,000ha程度となっている(青森県りんご生産指導要項編集部会 2024)。りんご栽培の衰退を進行させないためにも、品種更新は重要であり、新品種の開発は必要不可欠である。

青森県のリンゴ育種は、明治初期の日本初となる弘前市の民間育成品種‘印度’に始まり、国公立の試験研究機関等で次々と新品種が開発された。1962年には、当時藤崎町にあった農林省園芸試験場東北支場(現 国立研究開発法人農業・食品産業総合技術研究機構果樹茶業研究部門リンゴ研究拠点：盛岡市)において、‘ふじ’が発表され、圧倒的な食味の良さと貯蔵力の高さで、国内第1位のシェアを誇る品種となっただけではなく、海外においても主力品種となった。

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、りんご研究所)では、1929年よりリンゴ育種を開始し、収穫時期にかかわらず、良食味のものを積極的に選抜し、これまで数多くの品種を発表してきた。1929年～1951年までの第1期新品種育成試験では‘つがる’、‘陸奥’、‘世界一’等、1952年～1969年までの第2期新品種育成試験では‘北の幸’、‘メロー’、1970年～1983年までの第3期新品種育成では‘北斗’、‘あおり9’(彩香)、‘あおり15’

(星の金貨)等が育成され(今ら2012)、現在は1984年～2008年まで交配が行われた第4期新品種育成試験において選抜が行われ、‘あおり16’(恋空)、‘あおり27’(千雪)等4品種が登録された。また、1960年代後半から1970年代前半にかけての斑点落葉病の異常発生を契機に耐病性品種の育成試験に着手し、さらに1985年からは、黒星病・斑点落葉病複合抵抗性品種の育成試験が開始された。一方で、我が国のリンゴ生産は生食用が主体で、品種構成では‘ふじ’の偏重が進んできた。国内流通の主体は、糖度が高く酸度が低い甘味系の品種で、近年公表された品種では、この高糖低酸の傾向が強まっているが、酸味のあるリンゴを好む消費者と、調理・加工需要向けの品種への要望等、ニーズが多様化してきている(深澤(赤田)ら2013, 工藤ら2013)。さらに、現在、リンゴの早生品種は主力の‘つがる’が着色不良や軟化、落果防止剤が必須といった諸問題を抱えている。生産現場からは着色が良く、収穫前落果の少ない早生品種が求められてきた(工藤ら2018)。

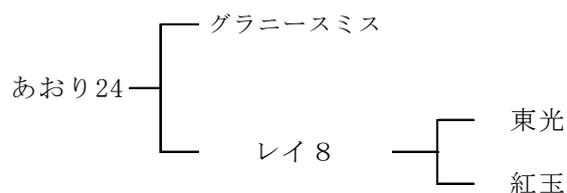
本研究報告では、1984年以降に交配され品種となったものから、果皮色が緑色で酸味があり、生食、調理・加工需要の双方をターゲットにした‘あおり24’、黒星病・斑点落葉病複合抵抗性品種育成試験より、黒星病真性抵抗性品種として初めて品種登録された‘あおり25’、着色が良好で、落果防止剤が不要な早生品種‘紅はつみ’の3品種について、その育成過程と特性について報告する。

本論文の作成にあたり、多大なご協力をいただいた弘前工業研究所の五十嵐恵氏、ならびにりんご研究所歴代職員、現地試験に協力して頂いたリンゴ生産者に対して深く感謝の意を表する。

II ‘あおり24’

1. 育成経過

1984年に青森県りんご試験場(現 りんご研究所)において、青森県の気象環境条件に適応し、栽培性に優れた早生・中生種の育成(第4期新品種育成試験)を育種目標に‘グラニースミス’にレイ8(東光×紅玉)を交配し(第1図)、育成した62個体の実生の中から1993年に一次選抜、2003年に二次選抜し、「青り24号」として2004年から現地適応性試験に供試した。2011年9月に品種名‘あおり24’として品種登録を申請し、2013年3月6日に品種登録が認められた。登録番号は22367号である(深澤(赤田)ら2013)。



第1図 ‘あおり24’の育成系統図

2. 特性の概要

(1) 樹体

樹勢は中，樹の型は分枝型，樹姿は開張，枝の太さは中，節間長は中，皮目の多少は中，葉身の長さはやや長，葉身の長さ／幅はやや大，葉身の緑色の濃淡はやや淡，葉柄の長さは短，つぼみの色は濃桃，花の大きさは中である(農林水産省 2013, 第1表, 写真1, 2).

樹の生育特性は，若木の時は‘王林’に似ており，樹勢がやや強く，枝がやや直立するが，成り込んでくると樹勢が落ち着き，中位となる．開花日から落花日までの生育ステージは‘ふじ’より1日程度早

い(第2表)．早期落果がややみられるが後期落果はみられない．隔年結果はほとんどみられない．斑点落葉病に対しては‘つがる’並に強い抵抗性を示し，その他の病害虫は慣行防除で問題ない(第3表)．

(2) 受粉・摘果

自家不和合性(S)遺伝子型は S_2S_{23} で，主要品種である‘ふじ’，‘つがる’，‘王林’とは和合性である(第4表)．摘果の強さは，4頂芽に1果の割合で，‘ふじ’程度が適当である．摘果剤(NAC水和剤)は，満開後2週間の散布では過剰落果となるが，満開後3週間の散布では効果がみられ，‘紅玉’との同時散布が可能である(工藤ら2014, 第5表)．

第1表 ‘あおり24’の葉，花の形質(2010年)

品種名	葉の大きさ	葉身 (cm)	葉幅 (cm)	葉身の形	葉縁の鋸歯	葉の色	葉裏の毛じ	花の大きさ (cm)	雄ずいの数	つぼみの色	花弁の形
あおり24	小	8.6	5.5	中	鋭	3707 黄緑	中	5.4	20	9713 濃桃	長円
王林	小	8.4	4.5	やや長	鋭	3708 濃緑	中	5.0	20	9713 濃桃	長円
シナノゴールド	小	8.2	5.1	中	鋭	3716 緑	中	4.9	20	9713 濃桃	長円

- 注) 1 葉の色，つぼみの色：日本園芸植物標準色票 農林水産省編を使用。
 2 葉身，葉幅：葉10枚の計測値の平均値。
 3 花の大きさ，雄ずいの数：20花の計測値の平均値。
 4 その他の形態は達観で調査。

第2表 ‘あおり24’の生育ステージ

年	開花日		満開日		落花日	
	あおり24	ふじ	あおり24	ふじ	あおり24	ふじ
2008	4/30	5/1	5/4	5/4	5/12	5/12
2009	5/4	5/6	5/9	5/9	5/13	5/13
2010	5/11	5/15	5/18	5/18	5/22	5/22
2011	5/13	5/15	5/18	5/19	5/22	5/22
2012	5/8	5/10	5/15	5/15	5/19	5/20
平均	5/7	5/9	5/12	5/13	5/17	5/17

注) 調査樹は2012年で8年生のM.26台樹。

第3表 ‘あおり24’の斑点落葉病抵抗性 (2017年)

品種名	発病葉率(%)	被害度	判定
あおり24	0	0	強
スターキング・テリシャス	100	74	弱
ふじ	80	41	やや弱
つがる	0	0	強

- 注) 1 接種試験による調査。
 2 被害度 = $\sum (G \times n) \times 100 / 6 \times N$
 n：各病斑指数に該当する葉数 N：調査葉数
 G：病斑指数，0：なし，1：1～5個／葉，2：6～10個／葉，
 3：11～30個／葉，4：31～50個／葉，
 5：51個以上／葉，6：落葉。

第4表 ‘あおり24’の交雑和合性

品種名	S遺伝子型	交雑和合性
あおり24	S ₂ S ₂₃	-
ふじ	S ₁ S ₉	○
つがる	S ₃ S ₇	○
王林	S ₂ S ₇	○
ジョナゴールド	S ₂ S ₃ S ₉	○

注) DNA マーカーによる調査

第5表 ‘あおり24’に対するNAC水和剤の摘果効果

年	品種名	散布日 (月/日)	中心果 横径(mm)	調査日 (月/日)	区	落果率(%)		効果判定
						側果	中心果	
2011	あおり24	6/2, 2W	8.6	6/16	処理	87	30	過剰落果
					無処理	56	10	
	ふじ(対照)	6/2, 2W	9.5	6/16	処理	27	0	
					無処理	11	0	
2012	あおり24	6/5, 3W	13.8	6/19	処理	82	17	効果あり
					無処理	50	0	
	ふじ(対照)	5/28, 2W	8.0	6/12	処理	26	0	
					無処理	12	0	

- 注) 1 供試樹：2012年で10年生のM.26台樹、樹勢は弱。
 2 調査数：30果そう。
 3 散布日の2Wは‘ふじ’の満開後2週間頃、3Wは‘ふじ’の満開後3週間頃。

(3) 果実の特性

果実の大きさは中、果実の形は球形、果実の王冠の強弱は無または弱、果実のがくの開閉は小、果皮のろう質の多少は中、果面の粗滑は滑、果皮の地色は黄緑、果皮を被う色の面積は無または極小、こうあ周辺のさびの量は無または小、果実側面のさびの量は無または小、がくあ周辺のさびの量は無または小、果点の数は少、果点の大きさは小、スカーフスキンの多少は無、果柄の長さは短、果柄の太さはやや太、こうあの深さは浅、こうあの幅は中、がくあの深さはやや浅、がくあの幅は狭である(農林水産省2013, 写真3, 4)。

収穫時期は、育成地(黒石市)において10月中旬の中生品種である。大きさは300g程度で、玉揃いが良く、光沢のある鮮やかな緑色の外観が特徴であ

る。果肉の色は黄白色で肉質はややち密、硬度は18lbs程度、糖度は14%程度、酸度は0.7~0.8g/100mL程度で、酸味は強いが糖度も高く、食味は濃厚である(第6, 7表)。貯蔵性は、普通冷蔵で3か月程度である(第8表)。つる割れ、心かび病、蜜入り果の発生は少ない。

(4) 加工適性

‘あおり24’は酸味や風味を生かした調理・加工用としての適性が高く、親品種である‘グラニースミス’や‘ブルームリーズシードリング’に似た、加熱すると崩れる肉質で、ジャム、アップルパイ、ジュースに向く。調理・加工用としての評価は高く、生食用としても一定のニーズが見込まれる(第9表, 写真5)。

第6表 ‘あおり24’の果実品質

年	満開日 (月/日)	収穫日 (月/日)	満開から収穫 までの日数	1果重 (g)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100ml)	ヨードでんぷん 反応(0-5)
2012	5/15	10/18	156	283	20.1	13.9	0.69	1.9
2013	5/24	10/21	150	356	18.5	13.8	0.79	1.9
2014	5/11	10/17	159	329	18.3	14.7	0.74	2.0
2015	5/3	10/20	170	393	17.6	13.0	0.69	1.2
2016	5/9	10/17	161	341	18.5	14.6	0.73	2.2
平均	5/12	10/18	159	340	18.6	14.0	0.73	1.8

注) ヨードでんぷん反応：全面染色5(未熟)~染色なしを0とした指数

第7表 現地圃場における‘あおり24’の果実品質(2011年)

調査圃地	台木	収穫日 (月/日)	1果重 (g)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100mL)	ヨードでんぷん 反応(0-5)
	苗木・高接ぎの別						
弘前市大沢	M.9/マルバ [®] (高)	10/22	310	17.0	13.4	0.60	1.2
弘前市富栄	M.26/マルバ [®] (高)	10/27	349	15.2	16.3	0.87	1.2
弘前市紙漉沢	マルバ(高)	10/22	292	17.6	13.4	0.65	1.4
黒石市三島	M.26/マルバ [®] (高)	10/22	330	17.8	14.6	0.62	1.6
平川市金屋	マルバ(高)	10/22	324	17.2	14.0	0.67	2.1
藤崎町藤崎	M.26(苗)	10/22	332	19.1	15.3	0.74	2.2
つがる市森田町森田	マルバ(高)	10/20	246	17.4	12.6	0.59	1.5
板柳町野中	マルバ(高)	10/20	348	17.2	12.6	0.63	0.5
鶴田町大巻	M.26(苗)	10/20	344	17.1	12.6	0.60	0.8

注) ヨードでんぷん反応：第6表に準ずる。

第8表 ‘あおり24’の貯蔵後の果実品質

年産	収穫日 (月/日)	調査日 (月/日)	1果重 (g)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100mL)	評定
2014	10/17	1/9	316	15.6	14.8	0.62	○：良好
		2/9	317	14.4	14.0	0.59	△：やや粉質化
2015	10/20	1/19	314	16.6	13.7	0.58	○：良好
2016	10/19	1/17	315	15.7	13.5	0.61	○：良好
		2/21	296	15.4	13.3	0.53	△：やや粉質化

注) 1 普通冷蔵(0℃)で貯蔵。

2 評定 ○：良好，△：やや不適，×：不良。

第9表 ‘あおり24’を材料とした試作品の評価(2012年)

試作例	評価・コメント等
ジュース	濃厚な酸味と甘味で風味があり，高評価．製菓素材としても利用できる．
シードル	甘味でフルーティー．良好．
ジャム	酸味，風味があり，良好．
真空調理りんご	果肉は軟らかめ．酸味があり良好．
乾燥りんご	酸味，甘味，風味があり，高評価．
高糖度りんご	酸味，風味があり，良好．
アップルパイ	果肉は軟らかめで生地に調和．酸味，風味があり，高評価．
タルトタタン	果肉が崩れるので不向き．
その他菓子類	特性を生かしたい場合はシンプルな菓子が向く．バターや香味料を多く使う菓子では特徴なし．
料理	サラダやスープ等の試作品は高評価．果皮色を活かすると面白い．

注) ‘あおり24’，‘あおり25’プレデビューイベントにおけるアンケートより抜粋．69名より回答．

3. 栽培上の留意点

樹勢が衰弱すると，果台枝がほとんど出なくなり，玉伸びが悪くなるため，切り返しを入れるなどして，樹勢を維持することが必要である．斑点性障害が圃地や樹，年によって発生し，特に若木に多い(第10表，写真6)．対策として，白一重袋を6月下旬～7

月上旬に被袋し，収穫の20～30日前に除袋すると斑点性障害を効果的に軽減できる(青森産技セリんご研2023)．また，日当たりの良い樹では陽向面着色や果皮の黄化がみられる(写真7)．

第10表 ‘あおり24’の斑点性障害発生率

調査園地	樹齢/台木 苗木・高接の別	斑点性障害発生果率 (%)		
		2009	2010	2011
弘前市A園	高7年生/不明	0	10	3
つがる市	高7年生/マルハカイトウ	0	4	0
りんご研1	10年生/M.26	1	0	0
りんご研2	10年生/M.26	2	0	1
弘前市B園	高7年生/M.26マルハ付	3	10	4
りんご研3	高18年生/M.26	3	12	0
藤崎町	8年生/M.26	9	9	3
りんご研4	13年生/M.26EMLA	14	0	1
板柳町	高7年生/マルハカイトウ	18	5	1
弘前市C園	高7年生/マルハカイトウ	32	9	4
平川市	高7年生/マルハカイトウ	50	11	3
弘前市D園	高7年生/M.26マルハ付	62	0	0
黒石市	高7年生/M.26マルハ付	90	0	0

注) 各樹の全収穫果について斑点が5個以上、あるいは直径5mm以上の斑点が1個以上発生している果実の割合を調査。

4. 普及方法

‘あおり24’は一定のニーズがあるものの、現状の産地市場や農協を主体とする流通・販売の体制では普及は難しいため、生産・利用・販売を一元的に管理するクラブ制による普及を試みている。2010～2011年に青森県産業技術センターのモデル事業の中で、当時の現地委託試験栽培を行っている生産者や製菓・加工業者、流通業者等が生産、加工・利用、

流通・販売の各研究会を立ち上げ、生産量の把握、集荷・出荷の一元化、素材の特長を生かした加工品試作や調理方法、試験販売等各種調査を行った。2012年にそれらを母体として「あおり24生産・利用研究会」が組織された。2014年に‘あおり24’の商標「はつ恋ぐりん」(登録5684167号)を取得し、2015年に会の名称を「はつ恋ぐりんの会」と改称した(農文協2023)。

5. 育成担当者

本品種の育成担当者は第11表のとおりである。

第11表 ‘あおり24’の育成担当者

氏名	担当期間
鈴木 長蔵	1984.4.1～1990.3.31
石山 正行	1984.4.1～1991.3.31
北山 弘	1984.4.1～1996.3.31
佐藤 耕	1984.4.1～2002.3.31
町田 郁夫	1991.4.1～1995.3.31
今 智之	1992.4.1～2000.3.31, 2002.4.1～2012.3.31
工藤 剛	1995.4.1～2012.3.31
深澤(赤田)朝子	2002.4.1～2012.3.31
後藤 聡	2009.4.1～2012.3.31

注) 担当期間は、交配から品種登録出願までの期間または品種開発部(育種部)在籍期間。

6. 摘要

1) ‘あおり24’は1984年に‘グラニースミス’にレイ8(東光×紅玉)を交配し、育成した緑色品種で、2013年3月6日付けで品種登録が認められた。登録番号は22367号である。

2) 樹の性質は、若木の時は‘王林’に似ており、樹勢がやや強く、枝がやや直立するが、成り込んでくると樹勢が落ち着き、中位となる。

3) 斑点落葉病に対しては‘つがる’並に強い抵抗性を示し、その他の病害虫は慣行防除で問題ない。

4) 自家不和合性(S)遺伝子型はS₂S₂₃で、主要品種である‘ふじ’、‘つがる’、‘王林’とは和合性であ

る。

5) 果実の大きさは300g程度、果形は円形で、玉揃いが良く、果皮色は、光沢のある鮮やかな緑色である。硬度は181bs程度、糖度は14%程度、酸度は0.7～0.8g/100mL程度で、酸味は強いが糖度も高く、食味は濃厚である。斑点性障害が園地や樹、年によって発生する。

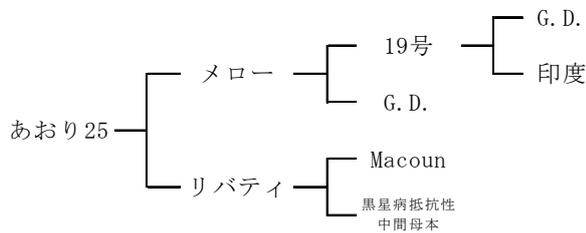
6) 収穫時期は育成地(黒石市)において10月中旬旬で、貯蔵性は、普通冷蔵で3か月程度である。

7) 生産・利用・販売を一元的に管理する「はつ恋ぐりんの会」でクラブ制による普及を試みている。

Ⅲ ‘あおり 25’

1. 育成経過

1985年にりんご研究所の黒星病・斑点落葉病複合抵抗性品種育成試験において‘メロー’に‘リバティ’を交配(第2図)し、育成した赤色品種で、黒星病接種検定後の43個体の実生の中から1998年に一次選抜、2004年に「青り25号」として二次選抜され、現地適応性試験を含めた特性調査を経て、2011年9月に品種名‘あおり25’として品種登録出願し、2013年3月6日に品種登録が認められた。登録番号は22368号である(工藤ら2013)。



第2図 ‘あおり25’の育成系統図
注) G.D.: ゴールデン・デリシャス。

2. 特性の概要

(1) 樹体

樹勢は弱、樹の型は分枝型、樹姿は開張、枝の太さは中、節間長は中、皮目の多少は中、葉身の長さはやや長、葉身の長さ/幅は大、葉身の緑色の濃淡は濃、葉柄の長さはやや短、つぼみの色は淡桃、花の大きさは中である(農林水産省2013, 第12表, 写真8, 9)。

樹の生育特性は‘紅玉’にやや似ており細かい枝が多い。成り枝は下垂する。開花日から落花日までの生育ステージは‘ふじ’より3日程度早い(第13表)。早期落果、後期落果はともにみられない。

(2) 受粉・摘果

自家不和合性(S)遺伝子型は S_3S_5 で、‘ふじ’、‘つがる’、‘玉林’等主要品種と和合性であるが、‘ファーストレディ’、‘高野1号’(紅ロマン)とは不和合性である(第14表)。摘果の強さは、4頂芽に1果の割合で、‘ふじ’程度が適当である。

(3) 果実の特性

果実の大きさは中、果実の形は扁円形、果実の王冠の強弱は無または弱、果実のがくの開閉は小、果皮のろう質の多少は中、果面の粗滑は滑、果皮の地色は黄緑、果皮を被う色の面積は大、果皮を被う色は赤、果皮を被う色の濃淡は中、果皮を被う色の型は不明瞭な縞模様を伴った全面着色、こうあ周辺のさびの量は中、果実側面のさびの量は無または小、がくあ周辺のさびの量は無または小、果点の数は中、果点の大きさは中、スカーフスキンの多少は多、果柄の長さは短、果柄の太さは太、こうあの深さはやや浅、こうあの幅は中、がくあの深さは中、がくあの幅は狭である(農林水産省2013, 写真10, 11)。

収穫時期は、育成地(黒石市)において10月下旬である。大きさは250g程度とやや小玉である。果肉の色は黄白色で、硬度は16lbs程度、糖度は14%程度、酸度は0.6~0.7g/100mLである(第15, 16表)。酸味が強いが、果汁が多く、肉質はクリスピーである。つる割れ、心かび病、蜜入り果の発生は少ない。果梗が短く、つるさび果が発生する。貯蔵期間は、普通冷蔵で3か月程度である(第17表)。

第12表 ‘あおり25’の葉、花の形質(2010年)

品種名	葉の 大きさ	葉身 (cm)	葉幅 (cm)	葉身 の形	葉縁の 鋸歯	葉の色	葉裏の 毛じ	花の大きさ (cm)	雄ずい の数	つぼみ の色	花卉 の形
あおり25	中	9.4	5.4	長	鈍	3716 緑	中	5.3	19.9	9211 淡桃	長円
紅玉	小	7.0	4.1	長	鈍	3708 濃緑	多	4.2	20.0	9211 淡桃	長円
シナノスイート	小	7.1	4.3	長	鈍	3716 緑	中	4.4	20.0	9211 淡桃	長円

注) 1 葉の色、つぼみの色: 第1表に準ずる。

2 葉身、葉幅: 第1表に準ずる。

3 花の大きさ、雄ずいの数: 第1表に準ずる。

4 その他の形態: 第1表に準ずる。

第13表 ‘あおり25’の生育ステージ

年	開花日		満開日		落花日	
	あおり25	ふじ	あおり25	ふじ	あおり25	ふじ
2008	4/29	5/1	5/2	5/4	5/8	5/12
2009	5/2	5/6	5/6	5/9	5/12	5/13
2010	5/10	5/15	5/16	5/18	5/21	5/22
2011	5/11	5/15	5/16	5/19	5/19	5/23
2012	5/7	5/9	5/11	5/15	5/18	5/20
平均	5/5	5/9	5/10	5/13	5/15	5/18

注) 調査樹は2012年で8年生のM.26台樹。

第14表 ‘あおり25’の交雑和合性

品種名	S遺伝子型	交雑和合性
あおり25	S ₃ S ₅	-
ふじ	S ₁ S ₉	○
つがる	S ₃ S ₇	○
王林	S ₂ S ₇	○
ファーストレディ	S ₃ S ₅	×
高野1号	S ₃ S ₅	×

注) DNAマーカーによる調査。

第15表 ‘あおり25’の果実品質

年	満開日 (月/日)	収穫日 (月/日)	満開から収穫 までの日数(日)	1果重 (g)	硬度 (lbs.)	糖度 (Brix%)	酸度 (g/100mL)	ヨードでんぷん 反応(0-5)
2008	5/2	10/23	174	267	15.4	13.9	0.63	1.0
2009	5/6	10/26	173	266	14.6	13.5	0.60	0.6
2010	5/16	11/1	169	263	16.8	14.1	0.66	0.6
2011	5/16	10/26	163	284	16.2	14.8	0.75	1.1
2012	5/11	10/26	168	267	17.6	14.1	0.59	1.4
平均	5/10	10/26	169	269	16.1	14.1	0.65	0.9

注) 1 調査樹は2012年で8年生のM.26台樹。

2 ヨードでんぷん反応：第6表に準ずる。

第16表 現地圃場における‘あおり25’の果実品質(2010年)

調査園地	台木		収穫日	1果重 (g)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100mL)	着色割合 (%)	ヨードでんぷん 反応(0-5)
	苗木・高接の別								
弘前市下湯口	M.26(苗)		10/27	311	16.6	14.3	0.74	82	0.3
弘前市鳥井野	わい性台		10/27	281	16.3	12.8	0.66	84	0.7
黒石市三島	M.26/マルバ(苗)		11/4	235	14.9	11.9	0.55	81	1.0
平川市尾崎	マルバ		10/28	262	15.3	12.9	0.60	78	1.0
平川市金屋	マルバ(高)		10/27	189	16.5	13.4	0.63	79	0.6
つがる市森田町森田	マルバ(高)		10/27	221	15.6	10.9	0.55	80	0.2
大鱈町居士	わい性台		10/27	273	16.5	14.0	0.70	83	0.5

注) ヨードでんぷん反応：第6表に準ずる。

第 17 表 ‘あおり 25’ の貯蔵後の果実品質 (2010 年産)

調査園地	収穫日	調査日	冷蔵 日数	1果重 (g)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100mL)	評定
りんご研 (黒石1)	11/1	2/1	92	273	16.4	13.1	0.51	○
りんご研 (黒石2)	11/2	2/1	91	217	16.5	13.5	0.43	○
りんご研 (藤崎)	11/4	2/1	89	194	14.2	11.5	0.39	△
弘前市下湯口	10/30	2/1	94	284	14.5	11.7	0.48	△
弘前市鳥井野	11/2	2/1	91	267	15.7	13.8	0.56	○
黒石市三島	11/3	2/1	90	213	17.3	13.8	0.52	○
平川市尾崎	10/28	2/1	96	245	14.3	11.1	0.54	△
平川市金屋	11/2	2/1	91	188	15.7	12.3	0.39	○
つがる市森田町森田	10/29	2/1	95	164	14.7	11.1	0.45	△
大鰐町居士	10/26	2/1	98	264	14.7	11.8	0.47	△

注) 1 普通冷蔵 (0℃) で貯蔵
2 評定: 第 8 表に準ずる.

(4) 病害抵抗性

‘あおり 25’ は黒星病真性抵抗性 *Rvi6* (旧名 *Vf*) 遺伝子の DNA マーカーを有し, 分生子の接種試験で抵抗性を示すことが確認されている (工藤ら 2012, 第 18 表, 第 3 図). 黒星病には抵抗性を示すが, うどんこ病にはり病性である. 斑点

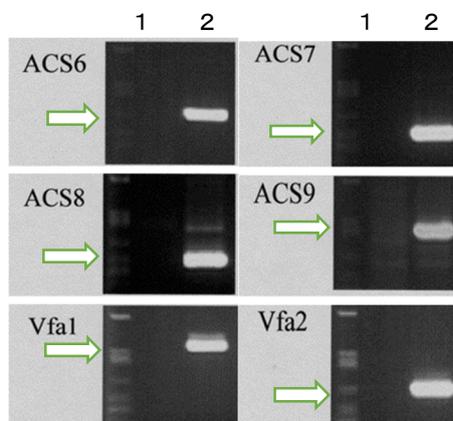
落葉病に対しては‘つがる’並に強い抵抗性を示す (第 19 表). 2013~2015 年に行われた耐病性品種を取り入れた散布回数削減試験では, 黒星病は抑えられたが, うどんこ病を抑えることは実用上困難であることが示唆された (花岡ら 2016).

第 18 表 ‘あおり 25’ の黒星病抵抗性

品種名	発病程度		判定
	2005年	2006年	
あおり 25	1	1	強
国光	4	4	弱
つがる	—	4	弱
ふじ	3	—	弱
あかね	2	—	強
さんさ	—	1	強
プリマ	0	—	強
プリシラ	—	0	強

注) 接種検定による調査.

- 0 : 無病徴.
- 1 : クロロシス病斑で胞子形成なし.
- 2 : クロロシス病斑で胞子形成あり.
- 3 : 胞子形成病斑で葉面積の 50% 未満.
- 4 : 胞子形成病斑で葉面積の 50% 以上.



第 3 図 黒星病抵抗性 *Rvi6* 遺伝子の DNA マーカーによる検定

注) レーン 1 : 青り 4 号 (黒星病り病性).
レーン 2 : あおり 25 (黒星病抵抗性).
矢印は, *Rvi6* 遺伝子の近傍で検出された 6 個のマーカーを表すバンド.

第 19 表 ‘あおり 25’ の斑点落葉病抵抗性

品種名	発病葉率 (%)		被害度		判定
	2005年	2006年	2005年	2006年	
あおり 25	0	0	0	0	強
スターキング・テリシャス	93	100	51	89	弱
ふじ	33	53	10	13	やや弱
つがる	0	0	0	0	強

注) 1 接種試験による調査.
2 被害度: 第 3 表に準ずる.

(5) 加工適性

果肉は加熱調理しても崩れにくく、タルトタタンやシードル等、酸味や風味を生かした調理や加

工用途への適性がある。調理・加工用としての評価は高く、生食用としても減農薬栽培農産物として一定のニーズが見込まれる(第20表)。

第20表 ‘あおり25’を材料とした試作品の評価(2012年)

試作例	評価・コメント等
ジュース	さっぱりとした酸味で、風味があり、良好。
シードル	酸味が活かされ、香りがあり、すっきりとした味わい。高評価。
ジャム	酸味、風味がある。良好。果肉ジャムは食感があり、高評価。
乾燥りんご	酸味、甘味、風味がある。良好。
アップルパイ	果肉が煮崩れせずに残り、酸味があり、良好。
タルトタタン	果肉が煮崩れしないため最適。高評価。

注) 第9表に準ずる。

第21表 ‘あおり25’に対するNAC水和剤の摘果効果

年	品種名	散布日 (月/日)	中心果 横径(mm)	調査日 (月/日)	区	落果率(%)		効果判定
						側果	中心果	
2010	あおり25	6/4, 2W	13.1	6/18	処理	44	0	効果なし
					無処理	46	0	
	ふじ(対照)	6/4, 2W	8.9	6/18	処理	68	0	
					無処理	37	0	
2011	あおり25	6/2, 2W	12.1	6/16	処理	35	10	効果なし
					無処理	39	0	
	ふじ(対照)	6/2, 2W	9.5	6/16	処理	27	0	
					無処理	11	0	

注) 1 供試樹：2011年で高接ぎ8年目のM.26台樹，樹勢は中。
2 調査数：第5表に準じる。
3 散布日：第5表に準じる。

3. 栽培上の留意点

摘果剤(NAC水和剤)は、ほとんど効果がない(工藤ら2014, 第21表)。果梗が短いため、着色管理では玉回しが困難である。

4. 育成担当者

本品種の育成担当者は第22表のとおりである。

第22表 ‘あおり25’の育成担当者

氏名	担当期間
鈴木 長蔵	1985.4.1~1990.3.31
石山 正行	1985.4.1~1991.3.31
北山 弘	1985.4.1~1996.3.31
佐藤 耕	1985.4.1~2002.3.31
町田 郁夫	1991.4.1~1995.3.31
今 智之	1992.4.1~2000.3.31, 2002.4.1~2012.3.31
工藤 剛	1995.4.1~2012.3.31
深澤(赤田)朝子	2002.4.1~2012.3.31
後藤 聡	2009.4.1~2012.3.31

注) 第11表に準ずる。

5. 摘要

1) ‘あおり25’は、1985年に‘メロー’に‘リバティ’を交配し、育成した赤色品種で、2013年3月6日付けで品種登録が認められた。登録番号は

22368号である。

2) 樹の性質は開張性で、‘紅玉’にやや似ており細かい枝が多い。成り枝は下垂する。

3) 自家不和合性(S)遺伝子型は S_3S_5 で、‘ふ

じ’, ‘つがる’, ‘王林’等主要品種と和合性であるが, ‘ファーストレディ’, ‘高野1号’とは不和合性である。

4) 果実の大きさは250g程度とやや小玉で, 果色は紅色で縞が不明瞭に入り, 果形は扁円形である。硬度は16lbs程度, 糖度は14%程度, 酸度は0.6~0.7g/100mLである。酸味が強いが, 果汁が多く, 食味は良い。

5) 収穫時期は, 育成地(黒石市)において10月下旬である。貯蔵期間は普通冷蔵で3か月程度である。

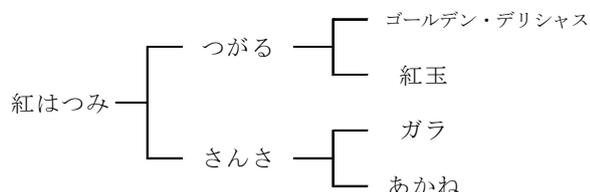
6) 黒星病真性抵抗性 *Rvi6* 遺伝子を有し, 接種試験で抵抗性を示すことが確認されている。うどんこ病にはり病性である。斑点落葉病に強い。耐病性品種を取り入れた散布回数削減試験では, 黒星病は抑えられたが, うどんこ病を抑えることは実用上困難であることが示唆された。

7) 酸味や風味を生かした調理や加工用途への適性がある。調理・加工用としての評価は高く, 生食用としても減農薬栽培農産物として一定のニーズが見込まれる。

IV ‘紅はつみ’

1. 育成経過

1992年にりんご研究所において, 青森県の気象環境条件に適応し, 栽培性に優れた早生・中生種の育成(第4期新品種育成試験)を育種目標に‘つがる’に‘さんさ’を交配・育成した(第4図)赤色品種で, 207個体の実生の中から一次選抜を経ずに2003年に「青り26号」として二次選抜し, 現地適応性試験を含めた特性調査を経て, 2016年3月に品種名‘紅はつみ’として品種登録出願し, 2018年5月21日に品種登録が認められた。登録番号は26826号である(工藤ら2018)。



第4図 ‘紅はつみ’の育成系統図

2. 特性の概要

(1) 樹体

樹勢は中, 樹の型は分枝型, 樹姿は開張, 枝の太さは中, 節間長は短, 皮目の多少は中, 葉身の長さの中, 葉身の長さ/幅はやや大, 葉身の緑色の濃淡は中, 葉柄の長さは中, つぼみの色は淡桃, 花の大きさは小である(農林水産省2018, 第23表, 写真12, 13)。

樹の生育特性は, 若木の時は枝はやや立ち気味であるが, 着果量が多くなるにつれて開張し, 樹勢は急速に落ち着いて中程度~やや弱めとなり‘つがる’に似てくる。開花日から落花日までの生育ステージは‘ふじ’より1~4日程度遅い(第24表)。早期落果, 後期落果はともにみられない。斑点落葉病に対しては‘つがる’並に強い抵抗性を示し, その他の病害虫は慣行防除で問題ない(第25表)。

(2) 受粉・摘果

自家不和合性(S)遺伝子型は *S3S5* で, ‘ふじ’, ‘つがる’, ‘王林’等主要品種と和合性であるが, ‘あおり25’, ‘ファーストレディ’, ‘高野1号’とは不和合性である(第26, 27表)。摘果の強さは, 4頂芽に1果の割合で, ‘ふじ’程度が適当である。

第23表 ‘紅はつみ’の葉, 花の形質(2015年)

品種名	葉の大きさ	葉身 (cm)	葉幅 (cm)	葉身の形	花の大きさ (cm)	つぼみの色	花卉の重なり	花柱の位置
紅はつみ	中	9.8	6.1	中	5.5	3.5 桃	重なる	下位
つがる	小	8.2	4.9	やや長	5.9	4 濃桃	中間	同等
未希ライフ	小	8.2	5.4	中	4.9	4 濃桃	重なる	下位

- 注) 1 葉身, 葉幅: 第1表に準ずる。
 2 花の大きさ: 第1表に準ずる。
 3 つぼみの色: 1(白)~4(濃桃)~7(紫), 農林水産省品種登録審査特性表の調査基準。
 4 その他の形態: 第1表に準ずる。

第 24 表 ‘紅はつみ’の生育ステージ

年	開花日		満開日		落花日	
	紅はつみ	ふじ	紅はつみ	ふじ	紅はつみ	ふじ
2014	5/8	5/8	5/12	5/11	5/18	5/15
2015	5/1	4/30	5/4	5/4	5/9	5/7
2016	5/7	5/4	5/10	5/9	5/18	5/13
2017	5/9	5/7	5/13	5/12	5/19	5/16
2018	5/5	5/4	5/10	5/8	5/16	5/13
平均	5/6	5/4	5/9	5/8	5/16	5/12

注) 調査樹は 2018 年で高接ぎ 11 年生の M. 26 台樹.

第 25 表 ‘紅はつみ’の斑点落葉病抵抗性

品種名	発病葉率(%)		被害度		判定
	2015年	2016年	2015年	2016年	
紅はつみ	0	0	0	0	強
スターキング・テリヤス	93	100	41	81	弱
ふじ	73	93	37	33	やや弱
つがる	0	0	0	0	強

注) 1 接種試験による調査.
2 被害度：第 3 表に準ずる.

第 26 表 ‘紅はつみ’の交雑和合性(2016 年)

品種名	S遺伝子型	交雑和合性
紅はつみ	S ₃ S ₅	-
ふじ	S ₁ S ₉	○
つがる	S ₃ S ₇	○
王林	S ₂ S ₇	○
あおり25	S ₃ S ₅	×
ファーストレディ	S ₃ S ₅	×
高野1号	S ₃ S ₅	×

注) DNA マーカーによる調査.

第 27 表 交配試験による‘紅はつみ’の交雑和合性(2017 年)

組み合わせ	結実率(%)	交雑和合性
ふじ×紅はつみ	54	○
紅はつみ×ふじ	87	○
あおり25×紅はつみ	0	×
紅はつみ×あおり25	0	×

注) 30 花による交配試験.

(3) 果実の特性

果実の大きさは中, 果実の形は円錐形, 果実の王冠の強弱は無または弱, 果実のがくの開閉は小, 果皮のろう質の多少は無または少, 果面の粗滑は滑, 果皮の地色は黄緑, 果皮を被う色の面積は大, 果皮を被う色は鮮紅, 果皮を被う色の濃淡は濃, 果皮を被う色の型は全面着色, こうあ周辺のさびの量は中, 果実側面のさびの量は中, がくあ周辺のさびの量は中, 果点の数は中, 果点の大きさは小, スカーフスキンの多少は無, 果柄の長さは中, 果柄の太さは中, こうあの深さはやや深, こうあの幅は中, がくあの深さはやや深, がくあの幅はやや広である(農林水

産省 2018, 写真 14~16).

収穫時期は, 育成地(黒石市)において9月上旬であり, ‘つがる’よりやや早い. 大きさは 300~350g で, 夏場の気温が高い年でも良く着色する(第 28 表). 果肉の色は黄白色で, 硬度は 16lbs 程度, 糖度は 13~14%, 酸度は 0.4g/100mL 程度である(第 29, 30 表). 甘酸適和で, 早生種としては濃厚な味である.

肉質は‘つがる’よりやや緻密で, 果汁が多く, 収穫時の日持ちは 20℃で7日間程度, 貯蔵期間は普通冷蔵で1か月程度である(第 31, 32 表). 裂果, 斑点性障害, 心かび病の発生はほとんどみられない.

第28表 ‘紅はつみ’の着色面積

年	紅はつみ		つがる(対照)	
	収穫日	着色面積(%)	収穫日	着色面積(%)
2014	9/2	84	9/4	72
2015	8/31	83	9/4	70
2016	9/4	88	9/9	72
2017	9/4	90	9/6	80
2018	9/3	89	9/6	72
平均	9/2	87	9/5	73

注) ‘つがる’は普通系統.

第29表 ‘紅はつみ’の果実品質

年	満開日 (月/日)	収穫日 (月/日)	満開から収穫 までの日数(日)	1果重 (g)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100mL)	ヨードでんぷん 反応(0-5)	食味 (1-5)
2014	5/12	9/2	113	350	16.1	12.7	0.41	3.1	3.3
2015	5/4	8/31	119	321	17.2	13.9	0.38	3.7	3.7
2016	5/10	9/4	117	334	16.7	13.8	0.34	3.2	3.2
2017	5/13	9/4	114	298	15.3	13.9	0.38	3.1	3.6
2018	5/10	9/4	117	328	18.0	13.7	0.36	2.5	3.4
平均	5/9	9/2	116	326	16.7	13.6	0.37	3.1	3.4

- 注) 1 調査樹は2018年で高接ぎ11年生のM.26台樹.
 2 ヨードでんぷん反応:第6表に準ずる.
 3 食味:5(非常に良好)~1(不適)とした指数.

第30表 現地圃場における‘紅はつみ’の果実品質(2015年)

調査園地	台木 苗木・高接の別	収穫日 (月/日)	大きさ (g)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100mL)	ヨードでんぷん 反応(0-5)	備考
弘前市十面沢	M.26(高)	8/25 9/3	298 348	16.9 16.2	11.8 13.1	0.38 0.36	3.8 3.2	やや未熟
平川市新館	M.26(高)	8/25 8/28	285 344	16.2 15.8	12.7 12.3	0.32 0.33	3.4 3.4	収穫1回目 収穫2回目
五所川原市金山	マルバ(苗)	8/25 9/3	276 294	18.1 17.3	13.3 14.6	0.45 0.40	4.0 3.4	未熟

注) ヨードでんぷん反応:第6表に準ずる.

第31表 ‘紅はつみ’の日持ち性(2013年)

品種名	調査日	ヨードでんぷん 反応(0-5)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100mL)	油あがり (0-3)	食味 (1-5)	
								紅はつみ
つがる姫 (対照)	収穫時 3日後 5日後 7日後	9/13 9/16 9/18 9/20	3.4 2.9 2.6 2.4	13.9 13.7 13.5 12.5	13.0 13.4 13.6 14.0	0.34 0.31 0.32 0.30	0 0 0 0.1	3.2 3.6 3.8 3.8

- 注) 1 日持ち性試験の保管条件:20℃恒温.
 2 調査果数:各調査時とも30果.
 3 ヨードでんぷん反応,食味:第29表に準ずる.
 4 油あがり:0(なし),1(少し感じる),2(商品性に影響あり),3(かなり強く感じる).
 5 対照の‘つがる姫’は‘つがる’の着色枝変わり系統.

第 32 表 ‘紅はつみ’の貯蔵 1 か月後の果実品質(2013 年)

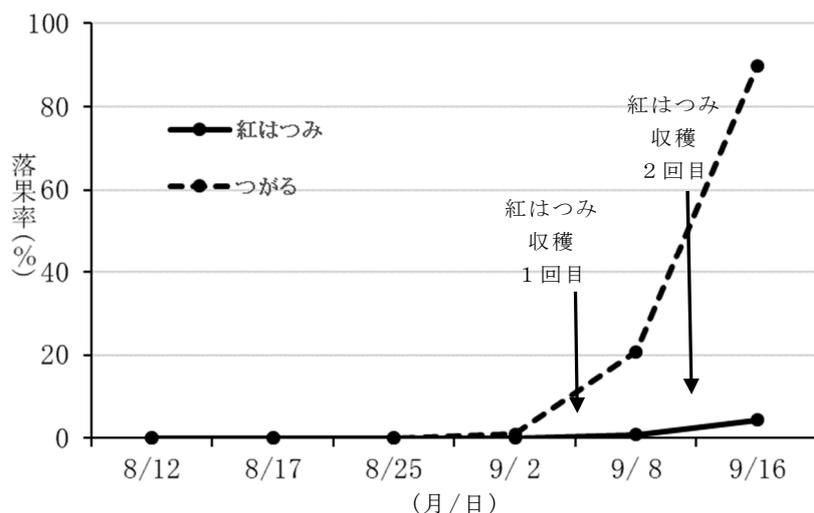
品種名	調査日	ヨードでんぷん 反応(0-5)	硬度 (lbs)	糖度 (%)	酸度 (g/100mL)	油あがり (0-3)	食味 (1-5)	
紅はつみ	出庫時	10/4	2.2	14.0	13.9	0.35	0	4.2
	3日後	10/7	1.4	12.1	13.9	0.32	0	4.0
	5日後	10/9	0.9	10.7	14.0	0.33	0	3.4
	7日後	10/11	0.4	9.4	13.8	0.31	0	2.2
つがる姫 (対照)	出庫時	10/11	2.6	13.3	13.7	0.27	0	3.9
	3日後	10/14	2.1	12.9	14.0	0.25	0	3.9
	5日後	10/16	1.8	12.0	13.9	0.25	0.5	3.2
	7日後	10/18	1.6	11.0	14.2	0.24	1.1	3.0

- 注) 1 収穫日：‘紅はつみ’は9月6日、‘つがる姫’は9月13日。
 2 普通冷蔵(0℃)で貯蔵。
 3 日持ち性試験の保管条件：20℃恒温。
 4 調査果数：各調査時とも30果。
 5 ヨードでんぷん反応, 食味：第29表に準ずる。
 6 油あがり：第31表に準ずる。

3. 栽培上の留意点

収穫前落果は少なく、落果防止剤の散布は必要ない(第5図)。「紅はつみ」に落果防止剤のストップール液剤を誤って散布した場合、果実の熟度が極端に早まるので、「つがる」、「未希ライフ」、「きおう」等が混植されている園地ではかかからないように注意する。こうあ部、がくあ部にさびが発生しやすい(第33表、写真17)。がくあ部のさびは、果実の側面ま

で広がるような程度でなければ流通上大きな問題はない。つる元の奇形がやや多く、高温下では外みつが発生し、それに由来した褐変が発生する場合がある。樹齢が進むとしょうが芽が多くなるので、強めの切り返しを丁寧に入れる。枝が柔らかく下垂するので、枝吊り等を行い樹勢の維持に努め、先刈りにより枝の発出を促し、丈夫に育成する。



第 5 図 ‘紅はつみ’の収穫前落果率(2015 年)

注) ‘紅はつみ’，‘つがる’ともに落果防止剤無散布。

第 33 表 ‘紅はつみ’ の果実さびの発生状況 (2013 年)

さびの 発生か所	品種名	さびの程度別発生果率 (%)				
		程度 1	程度 2	程度 3	計	程度 2 以上
こうあ部	紅はつみ	22.9	2.5	0.4	25.8	2.9
	つがる姫 (対照)	12.5	1.7	0.4	14.6	2.1
がくあ部	紅はつみ	27.9	16.7	0.4	45.0	17.1
	つがる姫 (対照)	8.8	2.9	0	11.7	2.9

注) 1 調査果数: ‘紅はつみ’, ‘つがる姫’ ともに 240 果.

- 2 さびの程度: 1 (こうあ部またはがくあ部を越えない),
2 (こうあ部またはがくあ部をやや越える),
3 (こうあ部またはがくあ部を越えて果実側面に達する).

4. 育成担当者

本品種の育成担当者は第 34 表のとおりである.

第 34 表 ‘紅はつみ’ の育成担当者

氏名	担当期間
北山 弘	1992. 4. 1~1996. 3. 31
佐藤 耕	1992. 4. 1~2002. 3. 31
町田 郁夫	1992. 4. 1~1995. 3. 31
今 智之	1992. 4. 1~2000. 3. 31, 2002. 4. 1~2012. 3. 31
工藤 剛	1995. 4. 1~2016. 3. 31
深澤(赤田)朝子	2002. 4. 1~2015. 3. 31
後藤 聡	2009. 4. 1~2013. 3. 31
葛西 智	2012. 4. 1~2015. 3. 31
田沢 純子	2013. 4. 1~2016. 3. 31

注) 第 11 表に準ずる.

5. 摘要

1) ‘紅はつみ’ は, 1992 年に ‘つがる’ に ‘さんさ’ を交配し, 育成した赤色品種で, 2018 年 5 月 21 日付けで品種登録が認められた. 登録番号は 26826 号である.

2) 樹の生育特性として, 枝はやや立ち気味であるが, 着果量が多くなるにつれて開張し, 樹勢は急速に落ち着いて中程度~やや弱めとなる.

3) 斑点落葉病に対しては ‘つがる’ 並に強い抵抗性を示し, その他の病害虫は慣行防除で問題ない.

4) 自家不和合性(S)遺伝子型は S_3S_5 で, ‘ふじ’, ‘つがる’, ‘王林’ 等の主要品種とは和合性であるが, ‘あおり 25’, ‘ファーストレディ’, ‘高野 1 号’ とは不和合性である.

5) 果実の大きさは 300~350g で, 果色は鮮紅色で縞が無~不明瞭に入り, 果形は円錐形である. 硬度は 16lbs 程度, 糖度は 13~14%, 酸度は 0.4g/100mL 程度である. 甘酸適和で, 早生種としては濃厚な味で ‘つがる’ とは異なる食味である.

6) 収穫時期は, 育成地(黒石市)において 9 月上旬であり, ‘つがる’ よりやや早い. 収穫時の日持ちは 20℃で 7 日間程度, 貯蔵期間は普通冷蔵で 1 か月程度である. 着色は良好で, 夏場の気温が高い年でも良く着色する. こうあ部, がくあ部にさびが発生する.

7) 収穫前落果は少なく, 落果防止剤の散布は必要ない.

引用文献

- 青森県りんご生産指導要項編集委員会編. 2024. りんご生産と消費の動向. りんご生産指導要項令和6年度改訂版. 10-17.
- 青森県産業技術センターりんご研究所編. 2023. りんご中生緑色品種「あおり24」の斑点性障害の軽減方法. 令和5年度技術情報資料
- 深澤(赤田)朝子・工藤剛・後藤聡・今智之・佐藤耕. 2013. リンゴ新品種‘あおり24’. 園芸学研究 12(別1):255.
- 花岡朋絵・赤平知也・平山和幸. 2016. 耐病性品種における散布回数を削減した黒星病及び斑点落葉病防除体系の評価. 東北農業研究 69:69-70
- 今智之・工藤剛・深澤(赤田)朝子・後藤聡・赤平知也・町田郁夫・白川真美子・秋田奈津子. 2012. リンゴ新品種‘あおり9’・‘あおり13’・‘あおり15’について. 青森産技セリんご研報. 36. 45-72.
- 工藤剛・五十嵐恵・深澤(赤田)朝子・後藤聡・今智之. 2012. 黒星病真性抵抗性リンゴ新品種「あおり25」. 平成24年度東北農業研究成果情報
- 工藤剛・五十嵐恵・後藤聡・今智之・佐藤耕・深澤(赤田)朝子. 2013. リンゴ新品種‘あおり25’. 園芸学研究 12(別1):256.
- 工藤剛・今智之・後藤聡・深澤(赤田)朝子・葛西智・田沢純子・佐藤耕・北山弘・町田郁夫・工藤悠・坂本康純・初山慶道. 2018. リンゴ新品種‘紅はつみ’の育成. 園芸学研究 17(別1):48.
- 工藤剛・田沢純子・後藤聡・久保隆・葛西智・深澤(赤田)朝子. 2014. リンゴ新品種に対するNAC水和剤の摘果効果(第2報). 東北農業研究 67:81-82
- 農文協編. 2023. リンゴ最新品種と栽培特性. 最新農業技術 果樹 Vol.14. 135-136.
- 農林水産省. 2013. ‘あおり24’. 品種登録データベース
- 農林水産省. 2013. ‘あおり25’. 品種登録データベース
- 農林水産省. 2018. ‘紅はつみ’. 品種登録データベース

Bull. Apple Res. Inst. Aomori Prefec. Ind. Tec. Res. Cent. 37: 71 - 94. 2025

New Apple Cultivars, 'Aori24' , 'Aori25' , 'Benihatsumi'

Tsuyoshi Kudo, Tomoyuki Kon²⁾, Chozo Suzuki²⁾, Masayuki Ishiyama²⁾, Takashi Sato²⁾,
Hiroshi Kitayama²⁾, Ikuo Machita²⁾, Tomoko Fukasawa-Akada¹⁾, Satoshi Goto,
Satoshi Kasai, Junko Tazawa

Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center
¹⁾Hirosaki Industrial Research Institute
²⁾Retired

Key words: New Apple Cultivar, 'Aori24', 'Aori25', 'Benihatsumi'. Plant patent.
Self-incompatibility gene. Middle harvest variety. Scab resistance.
Early harvest variety.

Summary

1. 'Aori24'

(1) Origin

A new apple cultivar 'Aori24' was introduced by the Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center. It originated from the cross, Granny Smith × Rei8(Toko × Jonathan) made in 1984 and selected from a population of 67 seedlings in 1993. It was released on March 6, 2013 under plant patent 22367.

(2) Fruit

'Aori24' matures in middle October at Kuroishi, Aomori, one week after 'Jonagold'. The fruit size is medium, being about 300g. The general shape is globose. The hue of over color is glossy green. The refractometer index is about 14% and malic acid content is 0.7 to 0.8g/100mL. The fruit flesh is cream in color, medium firmness and juicy. Taste is high acid and moderately sweet.

(3) Tree

The tree is vigorous and upright like 'Orin' when young but become weak and spreading after fruiting. The blossoming season is one or two days earlier than 'Fuji'. 'Aori24' is resistant to Alternaria leaf blotch. Self-incompatibility genotype is *S2S23*.

2. 'Aori25'

(1) Origin

A new apple cultivar ‘Aori25’ was introduced by the Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center. It originated from the cross, Mellow × Liberty made in 1985 and selected from a population of 43 seedlings in 1998. It was released on March 6, 2013 under plant patent 22368.

(2) Fruit

‘Aori25’ matures in late October at Kuroishi, Aomori, two weeks before ‘Fuji’. The fruit size is a little small, being about 250g. The general shape is obolid. The hue of over color is dark red. The refractometer index is about 14% and malic acid content is 0.6 to 0.7g/100mL. The fruit flesh is cream in color, medium firmness, crisp and juicy. Taste is high acid and moderately sweet.

(3) Tree

The tree is weak and slightly drooping like ‘Jonathan’. The thickness of one-year-old shoot is thin. The blossoming season is three or four days earlier than ‘Fuji’. ‘Aori25’ is resistant to Apple scab and Alternaria leaf blotch. Self-incompatibility genotype is *S3S5*.

3. ‘Benihatsumi’

(1) Origin

A new apple cultivar ‘Benihatsumi’ was introduced by the Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center. It originated from the cross, Tsugaru × Sansa made in 1992 and selected from a population of 207 seedlings in 2003. It was released on May 21, 2018 under plant patent 26826.

(2) Fruit

‘Benihatsumi’ matures in early September at Kuroishi, Aomori, one week before ‘Tsugaru’. The fruit size is medium, being about 300g. The general shape is globose to conic. The hue of over color is blight red. The relative area of over color is larger than ‘Tsugaru’. The refractometer index is about 13 to 14% and malic acid content is 0.3 to 0.4g/100mL. The fruit flesh is cream in color, medium firmness and juicy. Taste is medium acid and sweet.

(3) Tree

The tree is vigorous and slightly upright when young but become weak and spreading after fruiting like ‘Tsugaru’. The blossoming season is one to four days later than ‘Fuji’. ‘Benihatsumi’ is resistant to Alternaria leaf blotch. Self-incompatibility genotype is *S3S5*.



写真1 ‘あおり24’の樹姿



写真3 ‘あおり24’の果実

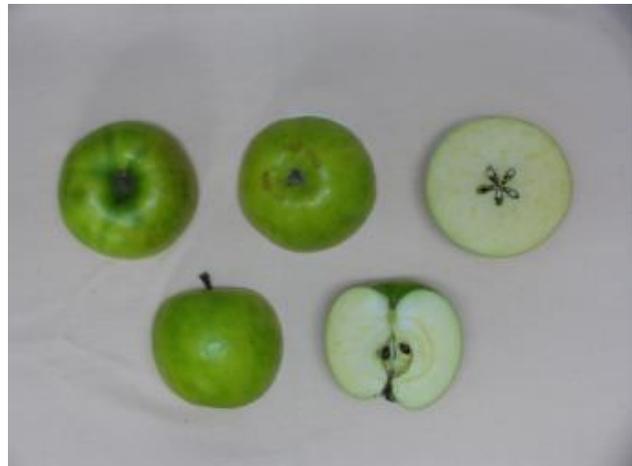


写真4 ‘あおり24’の果実外観
上段左：上面，上段中：下面，下段左：側面
上段右：横断面，下段右：縦断面



写真2 ‘あおり24’の花の形態



写真5 ‘あおり24’（はつ恋ぐりん）を使用した加工品



写真6 ‘あおり24’の斑点性障害



写真7 ‘あおり24’の熟度別の表面色
左：未熟，中：適熟，右：過熟



写真8 ‘あおり25’の樹姿



写真10 ‘あおり25’の果実



写真11 ‘あおり25’の果実外観

上段左：上面，上段中：下面，下段左：側面
上段右：横断面，下段右：縦断面



写真9 ‘あおり25’の花の形態



写真 12 ‘紅はつみ’の樹姿



写真 14 ‘紅はつみ’の果実



写真 13 ‘紅はつみ’の花の形態



写真 15 ‘紅はつみ’の果実上面(左),
下面(中), 側面(右)



写真 16 ‘紅はつみ’の果実縦断面(左), 横断面(右)



1

2

3

写真17 ‘紅はつみ’のさびの程度

注) さびの程度：第33表に準ずる.

所 長 磯 辺 慶

編集委員会

編集委員長 前 田 一 春

編 集 委 員 後 藤 聡

木 村 佳 子

赤 平 知 也

内 藤 誠

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研究報告第 37 号

令和 7 年 3 月 発行

編集発行 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

青森県黒石市大字牡丹平字福民 24

印 刷 所 有限会社新和印刷