

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-44935
(P2012-44935A)

(43) 公開日 平成24年3月8日(2012.3.8)

(51) Int.Cl. F1 テーマコード(参考)
AO1H 1/02 (2006.01) AO1H 1/02 ZNAZ 2B030

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 18 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2010-191005 (P2010-191005) (22) 出願日 平成22年8月27日 (2010.8.27)</p> <p>特許法第30条第1項適用申請有り 平成22年4月1日 インターネットアドレス「http://hortsci.ashspublications.org/content/vol145/issue4/」「http://hortsci.ashspublications.org/cgi/content/abstract/45/4/534」に発表</p>	<p>(71) 出願人 504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町1番</p> <p>(74) 代理人 110000578 名古屋国際特許業務法人</p> <p>(72) 発明者 松本 省吾 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内</p> <p>(72) 発明者 関戸 景子 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内</p> <p>(72) 発明者 林 裕作 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内</p>
--	---

最終頁に続く

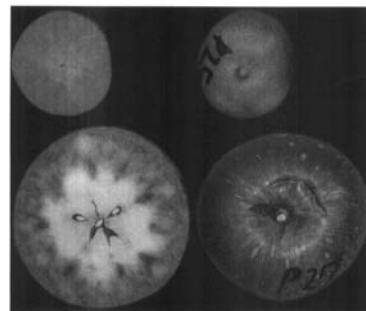
(54) 【発明の名称】 赤果肉リンゴ及びその育種方法

(57) 【要約】

【課題】甘味が強く、酸味が弱い赤果肉リンゴ及びその育種方法を提供すること。

【解決手段】赤果肉・赤果皮かつS遺伝子座近傍に赤果肉形質原因遺伝子を有するリンゴ。また、赤果肉・黄果皮かつ糖度12°Brix以上を有するリンゴ。また、上記のリンゴを、ピンクパール由来の赤果肉形質原因遺伝子と自家・交雑不和合性に関わるS遺伝子の連鎖を利用して育種する方法。

【選択図】 図2



「ピンクパール」× JPP35 No.25 (上) と 「ピンクパール」× JPP35 No.27 (下) の果肉色と果皮色

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

赤果肉・赤果皮かつ S 遺伝子座近傍に赤果肉形質原因遺伝子を有するリンゴ。

【請求項 2】

赤果肉・黄果皮かつ糖度12°Brix以上を有するリンゴ。

【請求項 3】

ピンクパール由来の赤果肉形質原因遺伝子と自家・交雑不和合性に関わる S 遺伝子の連鎖を利用して、請求項 1 又は 2 記載のリンゴを育種する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、赤果肉リンゴ及びその育種方法に関する。

【背景技術】

【0002】

リンゴの着色はアントシアニンの蓄積によるもので、温度・紫外線・成熟の3つのファクターが関わっている。アントシアニンはフラボノイドの一種の二次代謝産物であり、リンゴの果皮においては、cyanidin 3-O-galactosideの形で存在しているものが多い。アントシアニンは、植物の光ストレスに対する防御や、動物との相互作用において重要な役割を果たす。また、身体にとっても有益で、リンゴ果皮は強い抗酸化作用を示し、高濃度にアントシアニンを蓄積させたトマトでは、ガンを持つマウスの寿命を延ばしたとされている。このように、リンゴは機能性食品としても価値のある果実である。日本では、生食では皮を剥いて食べることが主流であることから、アントシアニンが蓄積した果肉の赤いリンゴを新しく創出することで、生食でより多くの機能成分を摂取することが可能となる。また、加工品としても、ケーキ・タルト・パイなどの材料やリンゴ100%の赤いジャム・ジュース等に利用することが出来る。

20

【0003】

赤果肉・黄果皮リンゴとして、1944年にAlbert F. Etter氏により、' Surprise ' の偶発実生としてカリフォルニアで選抜された、との記載のあるリンゴ品種 ' ピンクパール ' が知られている（非特許文献 1 参照）。

【先行技術文献】

30

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】The Brooks and Olmo Register of Fruit & Nut Varieties, third edition, ASHS press, 1997 (ISBN 0-9615027-4-6), pp. 74

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

' ピンクパール ' の食味の指標である糖度と酸度の値を、生食用として市場に最も出回っている ' ふじ '、加工用として人気の高い ' 紅玉 ' の値と比較すると、' ピンクパール ' は糖度が低く酸度が高い。' ピンクパール ' の食味評価は「評価 1」であり、食用に適さない。なお、食味の評価は、1 が非常にまずい、2 がまずい、3 が普通、4 がうまい、5 が非常にうまいに相当する。評価形質は、甘味が大きなウエートを占め、他に酸味（あまり強酸でない）、肉質（適度である）、香り（異臭がない）、果汁（多い）がわずかに加わる。

40

【0006】

本発明は以上の点に鑑みなされたものであり、甘味が強く、酸味が弱い新規赤果肉リンゴ及びその育種方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本願発明者は、鋭意研究の結果、

50

- (1) 赤果肉・赤果皮かつS遺伝子座近傍に赤果肉形質原因遺伝子を有するリンゴ
 (2) 赤果肉・黄果皮かつ糖度12°Brix以上を有するリンゴ
 (3) ピンクパール由来の赤果肉形質原因遺伝子と自家・交雑不和合性に関わるS遺伝子の連鎖を利用して、前記(1)又は(2)記載のリンゴを育種する方法を發明した。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】JPP35の断面と表面を表す写真である。

【図2】‘ピンクパール’×JPP35により得られた赤果肉リンゴである「No. 25」(上段)及び「No. 27」(下段)を表す写真である。

10

【図3】リンゴ野生種、栽培種、系統のMdMYB10プロモーター領域のPCR解析結果を表す説明図である。

【發明を実施するための形態】

【0009】

1. 赤果肉・赤果皮かつS遺伝子座近傍に赤果肉形質原因遺伝子を有するリンゴを育種する方法

次のようにして、赤果肉・赤果皮かつS遺伝子座近傍に赤果肉形質原因遺伝子を有するリンゴ(以下、新規リンゴAとする)を育種した。

【0010】

まず、‘紅玉’を胚珠親とし、‘ピンクパール’を花粉親として交配し、後代交雑個体群(F₁集団)を得た。ここで、‘ピンクパール’は、1944年にAlbert F. Etter氏により、‘Surprise’の偶発実生としてカリフォルニアで選抜された、との記載のあるリンゴ品種で、The Brooks and Olmo Register of Fruit & Nut Varieties, third edition, ASHS press, 1997 (ISBN 0-9615027-4-6), pp. 74に掲載されている。

20

【0011】

上記のように得られた後代交雑個体群(F₁集団)より、赤果肉であること、及び果肉のテクスチャーが良いことを基準として、個体を選抜した(以下、この選抜された個体を「JPP35」とする)。このJPP35の断面と表面を図1に示す。「JPP35」は、赤果肉・赤果皮の新奇赤果肉リンゴであるが、糖度は「ピンクパール」より上昇したものの、酸度が高く食味評価は2以下であった(表1参照)。

30

【0012】

【表1】

リンゴ10品種・系統の糖度および酸度

品種	用途	酸度 (リンゴ酸 g/100ml)	糖度 (° Brix)
ピンクパール	加工	1.27	11.0
紅玉	加工	0.57	14.5
ひめかみ	加工	0.50	15.2
恵	加工	0.44	15.8
きざし	加工	0.74	13.5
JPP35 (系統)	加工	1.43	12.5
シナノスイート	生食	0.31	15.8
王林	生食	0.24	14.9
ふじ	生食	0.34	14.9
No. 38 (系統)	未定	0.64	12.7

40

50

【0013】

そこで、この「JPP35」を中間母本とし、さらに甘味を向上させるとともに酸味を低下させるため、もしくは赤果肉形質をより安定させるため、「シナノスイート」、「王林」、及び「ピンクパール」のいずれかを胚珠親とし、それぞれを、花粉親「JPP35」と交配した。そして、「シナノスイート」×「JPP35」より得られたF₁集団から、赤果肉であること、果肉のテクスチャーが良いこと、高糖度であること、及び生理障害（斑点性の果面障害や裂果）が少ないことを基準として、新規赤果肉・赤果皮リンゴ（以下、「No. 38」とする）を選抜した。「No. 38」は、糖度がやや上昇するとともに酸度が低下しており、3から4の食味評価を得た（上記表1参照）。この「No. 38」が、新規リンゴAに該当する。「No. 38」は、後述する方法により、S遺伝子座近傍に赤果肉形質原因遺伝子を有することが確かめられている。

10

【0014】

2. 赤果肉・黄果皮かつ糖度12°Brix以上を有するリンゴを育種する方法

次のようにして、赤果肉・黄果皮かつ糖度12°Brix以上を有するリンゴ（以下、新規リンゴBとする）を育種した。

【0015】

「王林」を胚珠親とし、花粉親「JPP35」と交配して得られたF₁集団から、赤果肉であること、低酸であること、果肉のテクスチャーが良いこと、高糖度であること、及び生理障害（斑点性の果面障害や裂果）が少ないことを基準として、2種の個体（以下、「No. 31」、「No. 96」とする）を選抜した。「No. 31」、「No. 96」は、いずれも、赤果肉・黄果皮であり、食味評価が4であった。また、「No. 31」、「No. 96」の糖度は、いずれも、12以上であり、「ピンクパール」よりはるかに食味が向上していることが示された。この「No. 31」、「No. 96」が新規リンゴBに該当する。

20

【0016】

なお、果実の糖度測定は以下に述べる方法に従って行った。品種・系統毎に果実5個体を収穫し、陽光面（日光の当る側）と陰光面（陽光面の反対側）から、それぞれ1cm程度縦に切れ目を入れて果実片を取り出す（10gから15g程度、果実当たり20gから30g程度）。10果実片をまとめて果汁搾り器（イトージュウサー（ITO Co., Ltd., Itabashi, Tokyo, Japan））にて押しつぶして果汁を搾り、約1mlの果汁液の糖度をデジタル糖度計PR-10alpha (Brix 0~45o; ATAGO Co., Ltd., Itabashi, Tokyo, Japan)を用いて計測した。

30

【0017】

3. S遺伝子群と赤果肉形質との関係についての新たな知見

上述した新奇赤果肉個体（新規リンゴA、B）を作出する過程において、交配により得られたF₁集団の赤果肉と白果肉の分離比から、赤果肉形質原因遺伝子が17番染色体上に座乗する自家・交雑不和合性に関わるS遺伝子群と連鎖していることを新たに見出した。

【0018】

交配では、「ピンクパール」の赤果肉形質は、すでに明らかにされている果皮色形質と同様、単一の優性遺伝子によって支配されていると仮定した。リンゴ品種は、同形花配偶体型自家・交雑不和合性を有していることから、ほとんどの遺伝子座がヘテロ接合型であると考えられる。したがって「紅玉」、「ひめかみ」、「恵」、「きざし」の白果肉リンゴを胚珠親とし「ピンクパール」を花粉親として交配すると、F₁集団における赤果肉と白果肉の分離比は1:1となることが期待される。しかしながら、上記交配の内、「きざし」×「ピンクパール」では、赤果肉個体が全く出現せず、分離実測比が0:1と大きく期待比とずれていた（表2）。

40

【0019】

【表 2】

‘紅玉’×‘ピンクパール’、‘ひめかみ’×‘ピンクパール’、‘恵’×‘ピンクパール’、‘きざし’×‘ピンクパール’の果肉色（赤、白）の分離比と χ^2 検定の値（1995年～2001年の調査結果）。

胚珠親	花粉親	分離比		χ^2
		期待比 赤：白	実測比 赤：白	
紅玉 (S_7S_9)	ピンクパール (S_3S_x)	1：1	13：20	1.48 ^{NS}
ひめかみ (S_7S_9)	ピンクパール (S_3S_x)	1：1	12：13	0.04 ^{NS}
恵 (S_2S_9)	ピンクパール (S_3S_x)	1：1	15：20	0.71 ^{NS}
きざし (S_2S_3)	ピンクパール (S_3S_x)	1：1	0：26	26.0
		0：1 ^z	0：26	

10

^{NS}, 有意差なし

^z, S_3 -allele と ‘ピンクパール’ の赤果肉形質が連鎖している場合

【0020】

この段階では、その原因を偶発的に ‘ピンクパール’ 以外の花粉が交配に利用されたことによると考え、赤果肉リンゴの出現した ‘紅玉’ × ‘ピンクパール’ より、JPP35を新奇赤果肉・赤果皮リンゴとして選抜した。

20

【0021】

このJPP35を中間母本とし、‘ピンクパール’、‘シナノスイート’、‘王林’を胚珠親に用いてJPP35と交配した。‘ピンクパール’ × JPP35では両品種・系統ともに赤果肉形質を有していることから、 F_1 集団における赤果肉と白果肉の分離期待比は3：1であり、‘シナノスイート’ × JPP35と‘王林’ × JPP35では、‘シナノスイート’と‘王林’は白果肉、JPP35は赤果肉であることから、 F_1 集団における赤果肉と白果肉の分離期待比は1：1である。驚いたことに、‘ピンクパール’ × JPP35では分離実測比が1：1、‘シナノスイート’ × JPP35と‘王林’ × JPP35では1：0に近くなり、期待分離比と大きくずれていた（表3）。

30

【0022】

【表3】

‘ピンクパール’ × JPP35、‘シナノスイート’ × JPP35、‘王林’ × JPP35の果肉色（赤、白）の分離比と χ^2 検定の値（2007年～2009年の観察結果）。

胚珠親	花粉親	分離		χ^2
		期待比 赤：白	実測比 赤：白	
ピンクパール (S_3S_x)	JPP35 (S_3S_7)	3：1	13：19	20.17
		1：1 ^z	13：19	1.13 ^{NS}
シナノスイート (S_1S_7)	JPP35 (S_3S_7)	1：1	67：3	30.62
		1：0 ^z	67：3	-
王林 (S_2S_7)	JPP35 (S_3S_7)	1：1	51：8	31.34
		1：0 ^z	51：8	-

10

^{NS}, 有意差なし

^z, S_3 allele と ‘ピンクパール’ の赤果肉形質が連鎖している場合

【0023】

20

この原因として、前述の、偶発的に異なった花粉が用いられたとの説明では無理があることから、自家・交雑不和合性に関わるS遺伝子との関連を考えた。

自家不和合性は、S遺伝子座に座乗するS複対立遺伝子群によって制御される植物の自己認識反応であり、リンゴは同形花配偶体型自家不和合性を示す。同形花配偶体型自家不和合性では雌しべと雄しべ（花粉）のS遺伝子の間に共通のものがあるとき不和合となる。例えば、雌しべのS遺伝子型が S_1S_2 であるとき、自身の花粉 S_1 、 S_2 はともに花粉管の伸長が阻害され自家不和合となる。これに対し、他からの花粉 S_3 は受精にいたる。また、自身の花粉 S_1 および S_2 は、 S_3S_7 のような異なるS遺伝子型を有する他品種の雌しべ上では受精にいたる。つまり、‘ふじ’ (S_1S_9) の雌しべに‘ふじ’の花粉 (S_1 もしくは S_9) が受粉しても受精に至らず結実しないが、‘つがる’ (S_3S_7) のような遺伝的に異なる品種由来の花 30
粉 (S_3 もしくは S_7) が受粉する他家受粉では受精に至り結実する。ただし、他家受粉でも同じS遺伝子型を有する栽培種同士、例えば、‘ふじ’ (S_1S_9) と‘アルプス乙女’ (S_1S_9) は交雑不和合となり、共通の遺伝子が1つ存在している場合は不完全和合となる。すなわち、‘ふじ’ (S_1S_9) に‘紅玉’ (S_7S_9) を交雑した場合‘紅玉’の S_7 花粉は受精に至るが、 S_9 花粉は受精に至らない。

30

【0024】

S遺伝子と赤果肉形質との関連について、‘ピンクパール’ と ‘ピンクパール’ に由来するJPP35の S_3 対立遺伝子の近傍に赤果肉原因遺伝子が連鎖していると仮定すると、全ての分離実測比の値が分離期待比の値とほぼ一致することを発見した（上記表2、表3）。すなわち、‘きざし’ (S_2S_3) × ‘ピンクパール’ (S_3S_x) は、胚珠親に S_3 があったため、赤果肉形質は遺伝せず、‘紅玉’ (S_7S_9)、‘ひめかみ’ (S_7S_9)、‘恵’ (S_2S_9) は胚珠親のS遺伝子型が‘ピンクパール’ (S_3S_x) と重複していないため、メンデル遺伝の法則に則って赤果肉形質が遺伝したと考えられた。また、‘紅玉’ (S_7S_9) × ‘ピンクパール’ (S_3S_x) から選抜されたJPP35のS遺伝子型は S_3S_7 であり、‘ピンクパール’由来の S_3 対立遺伝子を持っている。JPP35を‘ピンクパール’に戻し交雑した場合、JPP35の S_3 は遺伝しないため、‘ピンクパール’ (S_3S_x) × JPP35 (S_3S_7) の赤果肉と白果肉は1：1に分離すると考えられた。一方、‘シナノスイート’ (S_1S_7) × JPP35 (S_3S_7)、‘王林’ (S_2S_7) × JPP35 (S_3S_7) では、胚珠親と花粉親で S_7 が一致しているため、すべての F_1 集団にJPP35の S_3 が遺伝することになり、理論上完全連鎖していれば全て赤果肉形質を示すと考えられた。

40

50

【 0 0 2 5 】

そこで、開発してきたS遺伝子型同定法（表4（MdMYB10遺伝子、S遺伝子解析に使用したプライマー配列とPCR反応条件））を用いて交配に用いた品種、系統のS遺伝子型の確認ならびに同定を行った（表5）。

【 0 0 2 6 】

遺伝子	名前	F/R	塩基配列 (5'→3')	PCR 産物 (bp)	制限酵素	切断後 PCR 産物 (bp)	文献
<i>MdMYB</i>	<i>MdMYB10M_fw</i>	F	GGAGGGGAATGAAGAAGAGAGG	392 (R ₁)			Espley
	promoter	<i>MdMYB10M_rv</i>	R	TCCACAGAGAAGCAACACTGAC	496 (R ₆)		et al., 2009
<i>MdMYB</i>	<i>MdMYB1_fw</i>	F	CCTGAACACCGTGGGAACCCGCC CGTTGGTAAC	291	<i>Bst</i> E II	291	Takos
	promoter	<i>MdMYB1_rv</i>	R	GTGAAGGTTGTCTTTATTAGTGA CGTG		263 (<i>MdMYB1-1</i>)	et al., 2006
<i>S₁+S₂₀+S₂₄</i>	<i>S₁ sense2</i>	F	ATTAAATCTGCCTCGCACTTG	1047 (<i>S₁</i>)	<i>Rsa</i> I	337+329+265+116 (<i>S₁</i>)	Matsumoto
	<i>S₁ antisense2</i>	R	TTGGTGGGGCAGAAATTCC	1021 (<i>S₂₀</i>)		329+265+122+116+111+78 (<i>S₂₀</i>)	et al., 1999b
				1042 (<i>S₂₄</i>)		550+265+116+111 (<i>S₂₄</i>)	
<i>S₂</i>	<i>OWB122</i>	F	GTTCAAACGTGACTTATGCG	449	<i>Eco</i> RV	349+100	Broothaerts
	<i>OWB123</i>	R	GGTTTGGTTCCTTACCATCG				et al., 1995
<i>S₃</i>	<i>OWB134</i>	F	ATGGATCCGGAATTCTTGAACAAA YATTAATTCAATG	375	<i>Pst</i> I	226+149	Broothaerts
	<i>OWB145</i>	R	TAGAATTTCATTTGCAGGACATC GATC				et al., 1995
<i>S₇+S₁₀</i>	<i>S₇ sense</i>	F	AACAAATCTTAAAGCCOCAGC	282	<i>Ehe</i> I	Uncut (<i>S₃</i>)	Kitahara and
	<i>S₇ antisense</i>	R	GGTTTCTTATAGTCGATACTTTTG			185+97 (<i>S₁₀</i>)	Matsumoto, 2002a
<i>S₇</i>	<i>OWB126</i>	F	GCCTTCAGACTCGAATGGACA	440	<i>Acc</i> I	228+212	Matsumoto
	<i>OWB127</i>	R	TGGCATTTACAATATCTACC				et al., 1999a

【表 4】

【表5】

‘ピンクパール’、JPP35、‘シナノスイート’、‘王林’とJPP35後代交雑個体群のS遺伝子型解析

品種	色		個体数	S遺伝子型(個)			
	果皮	果肉					
ピンクパール	Y ^{z)}	R ^{x)}					S_3S_x
JPP35	R ^{y)}	r					S_3S_7
ピンクパール×JPP35	R	r	8	7	S_3S_7	1	S_7S_x
	Y	r	5	5			
	R	w ^{w)}	11	11	S_7S_x		
	Y	w	8	8			
シナノスイート	R	w					S_1S_7
シナノスイート×JPP35	R	r	67	30	S_1S_3	37	S_3S_7
	R	w	3	3	S_3S_7		
王林	Y	w					S_2S_7
王林×JPP35	R	r	25	11	S_2S_3	14	S_3S_7
	Y	r	26	17			
	R	w	5	4	S_2S_3	1	S_3S_7
	Y	w	3	2			

z) Y:黄果皮色、y) R:赤果皮色、x) r:赤果肉色、w) 白果肉色

【0028】

‘ピンクパール’×JPP35のF₁集団32個体、‘シナノスイート’×JPP35のF₁集団70個体、‘王林’×JPP35のF₁集団59個体のS遺伝子型解析を行ったところ、‘ピンクパール’(S_3S_x)×JPP35(S_3S_7)は、赤果肉形質を示した13個体の内、12個体が S_3S_7 、1個体が S_7S_x であり、白果肉を示した19個体は全て S_7S_x であった(上記表5)。また、‘シナノスイート’(S_1S_7)×JPP35(S_3S_7)は赤果肉形質を示した67個体の内、30個体が S_1S_3 、37個体が S_3S_7 であり、白果肉の3個体は S_3S_7 であった(第5表)。さらに、‘王林’(S_2S_1)×JPP35(S_3S_7)は赤果肉形質を示した51個体の内、28個体が S_2S_3 、23個体が S_3S_7 であり、白果肉を示した8個体の内、6個体が S_2S_3 、2個体が S_3S_7 であった(上記表5)。

【0029】

以上の結果をまとめると、赤果肉形質を示した131個体中、 S_3 を有していたのは130個体となった。また、 S_3 を有していながら白果肉形質を示したものが11個体となった(上記表5)。したがって、 S_3 を有する赤果肉個体の割合は $130/142 \times 100 = 94.3\%$ であり、‘ピンクパール’に由来する S_3 -RNase遺伝子が、赤果肉形質原因遺伝子と強く連鎖していることが示唆された。すなわち、本発見により S_3 -RNaseのもつ交雑不和合性を利用することにより、交配親の組み合わせにより赤果肉個体が94.3%を占めるF₁集団を産み出せる画期的な育種法を提供できることが示された。今のところ、JPP35(S_3S_7)と、 S_7 を有し S_3 を有しない‘シナノスイート’(S_1S_7)、‘王林’(S_2S_7)、‘紅玉’(S_7S_9)、‘あかね’(S_7S_{24})、‘ひめかみ’(S_7S_9)、‘いわかみ’(S_1S_7)、‘きおう’(S_1S_7)、‘さんさ’(S_5S_7)、‘千秋’(S_1S_7)、‘シナノドルチェ’(S_2S_7)等の品種との交配、「No. 38」個体(S_1S_3)と、 S_1 を有し S_3 を有しない‘ふじ’(S_1S_9)、‘祝’(S_1S_{20})、‘いわかみ’(S_1S_7)、‘きおう’(S_1S_7)、‘国光’(S_1S_2)、‘涼夏の季節’(S_1S_9)、‘千秋’(S_1S_7)、‘シナノスイート’(S_1S_7)等の品種との交配により、ほぼ赤果肉個体のみをF₁集団を産み出すことができる。また、赤果肉形質に連鎖した‘ピンクパール’ S_3 遺伝子座上にある S_3 -RNase遺伝子のイントロン配列と‘つがる’、‘ゴールドンデリシャ

ス'、'シナノゴールド'、'シナノレッド'を始め100種以上の栽培種に存在する赤果肉形質と連鎖しない S_3 -RNase遺伝子のイントロン配列の間に塩基多型のあることを新たに見出した。この多型を利用して、 F_1 集団の実生段階で確実に赤果肉形質に連鎖したピンクパール由来の S_3 を特定できる。

【0030】

S遺伝子型を同定した中で、'ピンクパール' × JPP35「No. 25」個体は、 S_3 を有していないにも関わらず、赤果肉形質を示した(図2)。「No. 25」では、 S_3 近傍にあると考えられる赤果肉形質原因遺伝子と S_3 -RNase遺伝子との間で組換えが起きたと考えられる。すなわち、「No. 25」: のS遺伝子型が S_7S_x であることから、組換えにより S_7 もしくは S_x 近傍に赤果肉形質原因遺伝子が存在していると考えられる。我々は、未知であった'ピンクパール'由来の S_x 対立遺伝子が、 S_{11} であることを新たに見出した(未発表データ)。

'No. 25'個体を交配親に用いれば、より広範な栽培種を、前述のほぼ赤果肉のみの F_1 集団を産み出せる育種法に活用できる。例えば、 S_{11} に赤果肉原因遺伝子が連鎖していれば、'つがる'(S_3S_7) × No. 25 (S_7S_{11})の F_1 集団のS遺伝子型は S_3S_{11} 、 S_7S_{11} のいずれかとなり、全て S_{11} を有していることからほとんど赤果肉形質のみを示すと考えられる('つがる'(S_3S_7) × 'JPP35'(S_3S_7)は交雑不和合となり F_1 集団が得られず、'つがる'(S_3S_7) × No. 38 (S_1S_3)は、ほぼ白果肉のみの F_1 集団となる)。さらに、'ピンクパール'(S_3S_{11}) × No. 25 (S_7S_{11})の F_1 集団中の S_3S_7 個体、JPP35 (S_3S_7) × 'No.25' (S_7S_{11})の F_1 集団中の S_3S_{11} 個体のいずれかは、赤果肉形質の原因遺伝子をホモに持つ個体となる。ヘテロに持つ個体よりもホモ個体は赤果肉形質がより強くかつ安定であることが期待される。またホモ個体を交配親に用いれば、交雑不和合性を示さない全ての栽培種との交配によりほぼ赤果肉形質のみの F_1 集団を得ることができる。

【0031】

これまでに、果肉色原因遺伝子としてMdMYB10遺伝子が赤果肉、赤葉のリンゴアントシアニンの蓄積を調節しているという報告がなされている。MdMYB10遺伝子はそのプロモーター領域に6つの23塩基対(bp)の繰り返し単位が存在している R_6 プロモータータイプのMdMYB10と、1つしか存在していない R_1 プロモータータイプのMdMYB10の2つの対立遺伝子が存在すると報告されており、 R_6 プロモータータイプの対立遺伝子を持つ個体は、赤果肉、赤葉の形質を示す。さらに、MdMYB10タンパク質は自身のプロモーター領域に存在する23bpの繰り返し単位に結合し、自己発現を促すことが示唆されており、繰り返し単位の数が多きほどMdMYB10遺伝子発現も高くなることが示されている。そこで、Espleyら(2009)の方法に従い、プライマーとしてMdMYB10M_fwとMdMYB10M_rv(上記表4)、TaqポリメラーゼとしてGo Taq(Promega,USA)を使用し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を94 30秒、55 30秒、72 30秒、30サイクルの条件にて行い、得られたPCR産物を4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。なお、PCR産物の内、増幅断片長496 bpが R_6 プロモータータイプ、394 bpが R_1 プロモータータイプの存在を意味する。

解析の結果、赤果肉形質の'ピンクパール'、JPP35からは394 bpの増幅断片しか得られず、これらにはMdMYB10の R_6 プロモータータイプの対立遺伝子が存在しないことが判明した(図3参照)。なお、図3は、リンゴ野生種、栽培種、系統のMdMYB10プロモーター領域のPCR解析結果を表す説明図である。図3において、496塩基対(bp)のDNA断片は R_6 プロモータータイプ、394塩基対(bp)のDNA断片は R_1 プロモータータイプを示す。

496 bpの増幅断片が検出された'トミーコ'、'メイポール'、'マカミッククラブ'は、いずれも赤果肉、赤葉の形質を示し、'ピンクパール'、JPP35は赤果肉、緑葉であることから、MdMYB10の R_6 プロモータータイプ対立遺伝子は、赤果肉、赤葉形質の品種のみに存在すると考えられた。なお、Espleyら(2009)も、赤果肉、赤葉形質を持つものはMdMYB10の R_6 プロモータータイプ対立遺伝子を、白果肉、緑葉形質を持つものは、 R_1 プロモータータイプ対立遺伝子を持つことを報告している。図3に示した'トミーコ'、'メイポール'、'マカミッククラブ'は赤果皮、赤果肉、赤葉形質、'ふじ'、'つがる'、'シナノスイート'、M.sieversii、'紅玉'は赤果皮、白果肉、緑葉形質、'ピンクパール'は黄果皮、赤果肉、緑葉形質、JPP35は赤果皮、赤果肉、緑葉形質である。'ピンク

パール'、JPP35が赤果肉形質であるにも関わらず R_6 プロモータータイプのMdMYB10対立遺伝子を有していなかったことから、これらの品種では、新奇遺伝子等により R_6 プロモータータイプによるものとは異なる分子機構により赤果肉色を呈しているものと思われる。また、MdMYB10は9番染色体上に位置しており、'ピンクパール'、JPP35の赤果肉原因遺伝子とは染色体上の位置が異なっていることからこのことは支持される。すなわち、'ピンクパール'、JPP35の赤果肉形質原因遺伝子は、17番染色体上に位置するS遺伝子座近傍に位置しており、これまでに唯一報告されている赤果肉(赤葉)原因遺伝子のMdMYB10とは異なる位置にある。

果肉色(葉色)を調節すると言われているMdMYB10遺伝子の位置する9番染色体上には、果皮色を調節すると言われているMdMYB1遺伝子も存在している。両者は塩基配列レベルで98%一致しており、推定アミノ酸配列レベルでわずか3アミノ酸しか異なっていない。さらに、MdMYB1は、そのプロモーター領域にMdMYB10遺伝子の持つ23 bpの繰り返し単位を一つ持っている。そのため、両者が対立遺伝子の関係にあるのか、異なる独立した2つの遺伝子の関係にあるのか不明である。

【0032】

'ピンクパール'、JPP35の果皮色原因遺伝子が赤果肉原因遺伝子の存在する17番染色体上に存在するのか、すなわち、果皮色も果肉色同様17番染色体上の S_3 対立遺伝子と連鎖しているのが調べた。'王林'(黄果皮白果肉) × JPP35(赤果皮赤果肉)の F_1 集団では、赤果皮:黄果皮=1:1に分離しており(表6)、赤果肉:白果肉=1:0の分離比(上記表4)と大きく異なっていた。

【0033】

【表6】

'ピンクパール' × JPP35、'王林' × JPP35の果皮色(赤、白)の分離比と χ^2 検定の値

胚珠親	花粉親	分離		χ^2
		期待比	実測比	
		赤:白	赤:白	
ピンクパール (S_3S_x)	JPP35 (S_3S_7)	1:1	19:13	1.12 ^{NS}
王林 (S_2S_7)	JPP35 (S_3S_7)	1:1	30:29	0.02 ^{NS}

NS, 有意差なし

【0034】

また、赤果皮形質を示した30個体の内、 S_2S_3 が15個体、 S_3S_7 が15個体であり、黄果皮形質を示した29個体の内、 S_2S_3 が18個体、 S_3S_7 が11個体であった(上記表4)。一方、'ピンクパール'(黄果皮赤果肉) × JPP35(赤果皮赤果肉)の F_1 集団では赤果皮:黄果皮=1:1に分離しており(上記表6)、赤果肉:白果肉=1:1の分離比(上記表4)と同じであった。しかしながら、 S_3 対立遺伝子との連鎖について見てみると、赤果皮形質を示した17個体の内、 S_3S_7 が7個体、 S_7S_x が8個体であり、黄果皮形質を示した13個体の内、 S_3S_7 が5個体、 S_7S_x が8個体であった(上記表4)。以上の結果から、果皮色は果肉色と異なり、17番染色体上の S_3 対立遺伝子と連鎖していないことが判明した。

これまで、果皮アントシアニンの蓄積を促す遺伝子として、MdMYB1-1が'Cripps Red'から、MdMYBAが'つがる'から単離されている。MdMYB1-1とMdMYBAは同一の遺伝子であると考えられており、MdMYB1(MdMYBA)の対立遺伝子として1-1~1-3までが報告されている。MdMYB1-1対立遺伝子の存在する個体は赤果皮の形質を示し、1-2~1-3のホモもしくはヘテロ接合体であると黄果皮の形質を示すことが報告されている(Takosら2006)。そこで、Takosら(2006)の方法に従い、プライマーとしてMdMYB1_fwとMdMYB1_rv(上記表4)、TaqポリメラーゼとしてGo Taq(Promega)を使用し、PCRを94 30秒、55 30秒、72 30秒、30サイクルの条件下にて行った。得られたPCR産物は制限酵素Bst EII(Promega)にて切断処理後、4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。なお、PCR産物の内、

増幅断片長263 bpがMdMYB1-1、291 bpがMdMYB1-1以外のMdMYB1の存在を意味する。

【0035】

MdMYB1-1対立遺伝子をR、MdMYB1-1以外の対立遺伝子をrと記すと、‘ピンクパール’ (rr) × JPP35 (Rr) のF₁集団では、赤果皮19個体の内、Rrが17個体、rrが2個体であった。また、黄果皮12個体全てrrであった。‘シナノスイート’ (RR) × JPP35 (Rr) のF₁集団では、全て赤果皮であり、RRが37個体、Rrが32個体であった。‘王林’ (rr) × JPP35 (Rr) では、赤果皮30個体の内、Rrが27個体、rrが3個体であり、黄果皮29個体の内、rrが26個体、Rrが3個体であった(表7)。

【0036】

【表7】

10

‘ピンクパール’ × JPP35、‘シナノスイート’ × JPP35、‘王林’ × JPP35 後代交雑個体群のMdMYB1対立遺伝子の解析

品種	色		個体数	MdMYB1 遺伝子型			
	果皮	果肉					
ピンクパール	Y ^{z)}	r ^{x)}		rr			
JPP35	R ^{y)}	r		Rr			
ピンクパール×JPP35	R	r	8	8	Rr	2	rr
	R	w ^{w)}	11	9			
	Y	r	5	5	rr	7	rr
	Y	w	7	7			
シナノスイート	R	w		RR			
シナノスイート×JPP35	R	r	66	36	RR	30	Rr
	R	w	3	1			
王林	Y	w		rr			
王林×JPP35	R	r	25	23	Rr	2	rr
	R	w	5	4			
	Y	r	26	2	Rr	24	rr
	Y	w	3	1			

20

30

^{z)} Y: 黄果皮色、^{y)} R: 赤果皮色、^{x)} r: 赤果肉色、^{w)} 白果肉色

MdMYB1-1由来 DNA 断片(263 bp)を有する個体を R、MdMYB1-1以外のMdMYB1由来 DNA 断片(291bp)を有する個体を r とする。

【0037】

これらの結果から、‘ピンクパール’ × JPP35のF₁集団31個体、‘王林’ × JPP35のF₁集団59個体中MdMYB1-1対立遺伝子を有すると思われる個体の94.9%が赤果皮の形質を示し、持っていないと思われる個体の88.4%が黄果皮の形質を示すと考えられた。以上の結果から、‘ピンクパール’、JPP35を交配親とするF₁集団にもMdMYB1 DNAマーカーの適用が可能であり、結実以前の実生の段階で果皮色を特定し早期選抜できることが示された。

40

【0038】

最後に、MdMYB1とMdMYB10の関係を調べるために、‘トミーコ’、‘メイポール’、‘王林’、‘紅玉’、‘ウィチャック’、‘ふじ’、‘ピンクパール’、JPP35、‘ピンクパール’ × JPP35のF₁集団由来4個体「No. 25」(赤果皮、赤果肉)、「No. 27」(赤果皮、赤果肉)、「No. 29」(黄果皮、白果肉)、「No. 67」(黄果皮、赤果肉)のMdMYB翻訳開始点の178 bp上流から約2000 bp(プロモーター領域と5'UTR)の塩基配列を決定した。方法は以下の通りである。リンゴの幼葉から抽出した全 DNAを鋳型として、プライマーに

50

MdMYB_fw (Forward : 5'-GGTTCATGTATAACAGTATCAGTTCG-3') とMdMYB10M_rv (第4表) を用い、TaqポリメラーゼとしてEx Taq HS (TaKaRa, Japan) を使用し、PCRを94 10秒、60 30秒、72 2分30秒の条件にて30サイクル行った。PCR産物を1% 低融点アガロースゲル電気泳動に供した後、2000 bp付近のバンドを切り出し、フェノールクロロホルム法によりDNAを抽出した。得られたDNA断片をDNA Ligation Kit Mighty Mix (TaKaRa) を用いてpT7Blue T-Vector (TaKaRa) に導入した後、大腸菌DH5 (TaKaRa) 株に形質転換した。抗生物質アンピシリンを加えたLB plateに形質転換した大腸菌を塗布して37、16時間培養し、得られた白色コロニーに対してコロニーダイレクトPCRを行い導入されたDNA断片長を確認した。2000 bp付近にDNA導入が確認出来た菌懸濁液をLB培地で増殖させ、High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Germany) を用いてDNAを精製した。塩基配列の決定は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、ABI3130ジェネティックアナライザ (Applied Biosystem) により行った。各塩基配列の比較は、DNASIS Pro (HITACHI, Japan) を用いて1対1Smith-Waterman検索によって行った。なお、実験に用いたプライマーは、データベース上の配列を基に設計し、MdMYB10、MdMYB1-1~1-3のいずれも増幅させることが出来るプライマーである。塩基配列を決定したところ、'トミーコ'、'紅玉'に一種類の配列が、'王林'、'ウイチャック'、'ピンクパール'、JPP35に2種類の配列が、'ふじ'に3種類の配列が見られた。公表されていない種類の配列をMdMYB10(P)、10(PP) ('ピンクパール'由来)、MdMYB1-4、1-6 ('ふじ'由来)、MdMYB1-5 ('メイポール'由来)と名付けた。なお、'ふじ'の新規MdMYB1-4、1-6、'メイポール'の新規1-5、JPP35の新規10(P)、'ピンクパール'の新規10(PP)、'トミーコ'の新規10(R6)についてはDNAデータベース登録を行った。それぞれの塩基配列は非常に類似していた(93.7~99.6%一致)が、多型により見分けることが可能であった(表8)。

10

20

【0039】

10 20 30 40

リンゴ栽培種、系統の MdMYB1、10 対立遺伝子上の塩基多型部位の比較

MdMYB 対立遺伝子	栽培種	決定した DNA 塩基配列の長さ (bp)	アクセスジョン番号
1-1 ²	Cripps	1904	DQ886414
1-2 ²	ゴールデンデリシヤス	1902	DQ886415
1-3 ²	Cripps	1906	DQ886416
1-4 ²	ふじ	1847	AB557638
1-5	メイベール	1908	AB557639
1-6	ふじ	1900	AB557640
10 (P)	JPP35	1903	AB557641
10 (PP)	ピンクパール	1903	AB557642
10 (RI) ×	Royal Gala	1906	EU518429
10 (R6) ×	トミーコ	2006	AB557643
MdMYB 挿入種			
対立遺伝子	決定した DNA 塩基配列の長さ (bp)		
1-1 ²	Cripps	1904	G-----ACATTTT---AGAACTTCTATTGATGTGT---AG
1-2 ²	ゴールデンデリシヤス	1902	G-----ACATTTT---AGAACTTCTATTGATGTGT---AG
1-3 ²	Cripps	1906	GA-GAATATCTTTT---AGAACTTCTATTGATGTGT---AG
1-4 ²	ふじ	1847	TATGAAACACATTTT---GAGACTTCTATTGATGTGT---AA
1-5	メイベール	1908	GAGAAACATTT---ACAGCTTCTATTGATGTGTGTAG
1-6	ふじ	1900	G-----ACATTTT---AGAACTTCTATTGATGTGT---AG
10 (P)	JPP35	1903	GAGAAACATTT---ACAGCTTCTATTGATGTGT---AG
10 (PP)	ピンクパール	1903	GAGAAACATTT---GGGAATCTTCTATTGATGTGT---AG
10 (RI) ×	Royal Gala	1906	G-----ACATTTT---AGAACTTCTATTGATGTGT---AG
10 (R6) ×	トミーコ	2006	GAGAAACATTTT---GAGAAACATTAAGTAAAGGT---TG

*Takes 5 (2006) のデータを引用。
*MdMYB1-4 には 52 塩基対の欠失 (1412 から 1463 の位置)、MdMYB10 (R6) には 101 塩基対の挿入 (1807 から 1907 の位置) が見られた。

*BspIy 5 (2009) のデータを引用。
カラムノの 34, 35, 64 等の塩基番号は、解析した栽培種の配列を参照させた 2019 塩基上の位置を示す (塩基配列を決定した領域の 5 末端塩基を 1 とする)。なお、MdMYB1-1

において、1 の位置は ATG 翻訳開始コドンの 2082 塩基上流の位置に相当する。) 塩基置換、欠失 (-)、挿入部位には影を付けてある。

【表 8】

【0040】

表 9 に決定した塩基配列を基にした品種ごとの遺伝子型を示した。

【0041】

【表 9】

りんご栽培種、系統の *MdMYB1* と 10 対立遺伝子型

栽培種・系統	表現型	<i>MdMYB1</i> と 10 対立遺伝子型
紅玉	GRW ^z	<i>MdMYB1</i> -1/1-1
ふじ	GRW	<i>MdMYB1</i> -1/1-4/1-6
ウイチャック	GRW	<i>MdMYB1</i> -1/1-5
王林	GYW ^y	<i>MdMYB1</i> -2/1-3
トミーコ	RRR ^x	<i>MdMYB10</i> (R6)/10(R6)
メイポール	RRR	<i>MdMYB1</i> -5/10(R6)
ピンクパール	GYR ^w	<i>MdMYB10</i> (P)/10(PP)
JPP35	GRR ^v	<i>MdMYB1</i> -1/10(P)
ピンクパール x JPP35 No.25	GRR	<i>MdMYB1</i> -1/10(P)
ピンクパール x JPP35 No.29	GYW	<i>MdMYB10</i> (P)/10(P)
ピンクパール x JPP35 No.67	GYR	<i>MdMYB10</i> (P)/10(P)

10

20

^zGRW: 緑葉、赤果皮、白果肉^yGYW: 緑葉、黄果皮、白果肉^xRRR: 赤葉、赤果皮、赤果肉^wGYR: 緑葉、黄果皮、赤果肉^vGRR: 緑葉、赤果皮、赤果肉

【 0 0 4 2 】

‘ふじ’以外の全ての品種が1種類もしくは2種類の塩基配列に収束したことから、*MdMYB1*と*MdMYB10*は別の遺伝子ではなくアリル(対立遺伝子)の可能性が高いと考えられた。

‘ピンクパール’、JPP35およびその後代(No. 25, 29, 67)には*MdMYB10* R₆プロモータータイプ対立遺伝子は存在せず、赤果肉形質が*MdMYB10* R₆プロモータータイプ対立遺伝子によらないことが再確認された。JPP35には*MdMYB10*のR₆タイプともR₁タイプとも構造の異なる遺伝子(*MdMYB10*(P)と命名)が存在していたが、10(P)は白果肉後代である「No. 29」にも見られたため、*MdMYB10*(P)は赤果肉形質の原因遺伝子ではないことが示唆された。JPP35の赤果肉形質はS遺伝子座近傍にあるMYBとは全く異なる未知の遺伝子によって制御されているのかもしれない。一方、‘メイポール’は赤果皮の原因遺伝子である*MdMYB1*-1を持っていないにも関わらず赤果皮であることから*MdMYB10* R₆プロモータータイプの対立遺伝子の存在は、従来言われていた赤果肉と赤葉に加えて赤果肉、赤葉、赤果皮形質を示すことが示唆された。すなわち、形質と関連付けると、*MdMYB1*-1もしくは*MdMYB10* R₆プロモータータイプ対立遺伝子の存在する品種は赤果皮形質を示し、どちらもなければ黄果皮形質を示し、*MdMYB10* R₆プロモータータイプ対立遺伝子が存在すると赤果肉、赤葉形、赤果皮形質を示すことが示唆された。

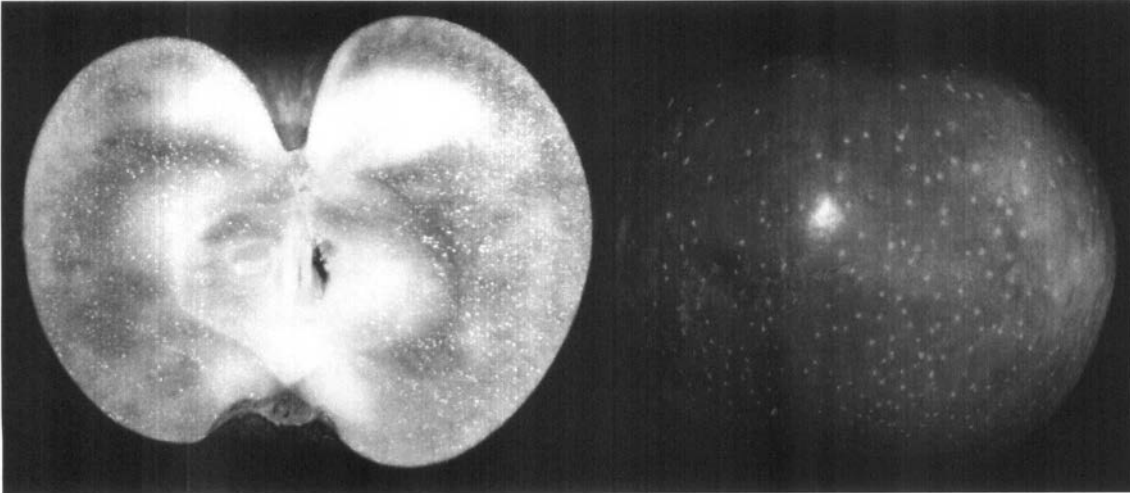
30

40

【 0 0 4 3 】

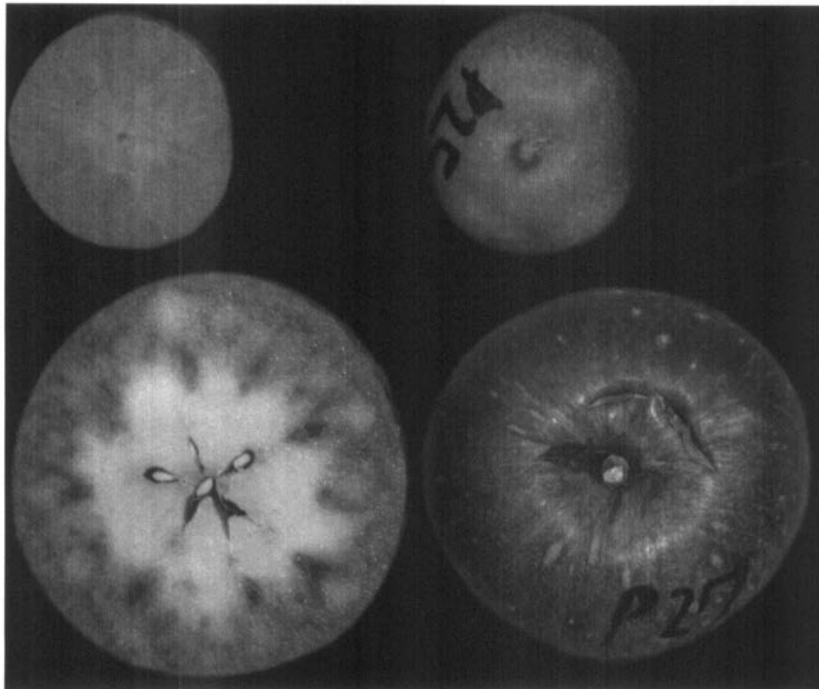
尚、本発明は前記実施形態になんら限定されるものではなく、本発明を逸脱しない範囲において種々の態様で実施しうることはいうまでもない。

【 図 1 】



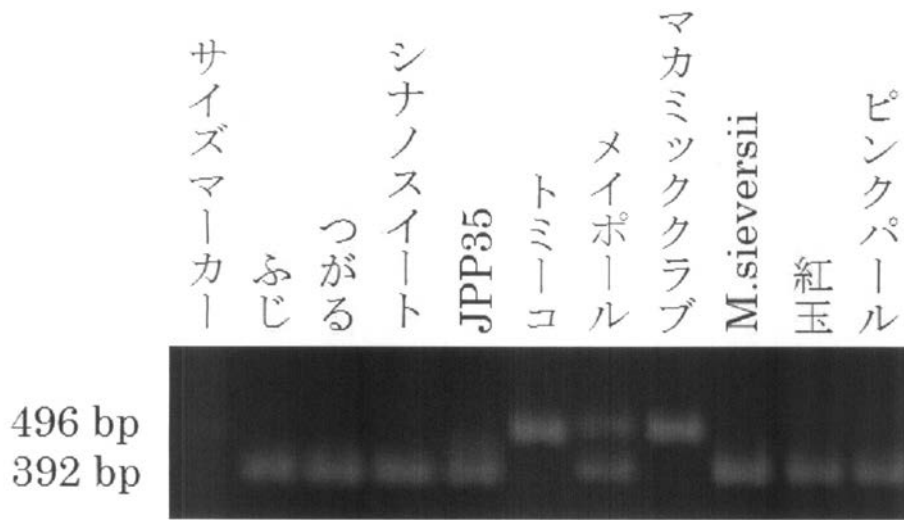
‘JPP35’ の果肉色（左）と果皮色（右）

【 図 2 】



‘ピンクパール’ × JPP35 No.25（上）と ‘ピンクパール’ × JPP35 No.27（下）の果肉色と果皮色

【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 小松 宏光

長野県諏訪市高島1丁目11-4

(72)発明者 前島 勤

長野県長野市北尾張部474-2

Fターム(参考) 2B030 AB02 AD16 AD20 CA05 CB02