

茨城農総七  
生工研研報  
Bull. Ibaraki  
Plant Biotech. Inst.  
No. 7 2004

ISSN 1341-2809

BULLETIN  
OF THE  
PLANT BIOTECHNOLOGY INSTITUTE  
IBARAKI AGRICULTURAL CENTER

NO. 7  
March 2004

---

---

茨城県農業総合センター  
生物工学研究所研究報告

第 7 号

平成 16 年 3 月

---

---

茨城県農業総合センター

生物工学研究所

茨城県西茨城郡岩間町安居 3 1 6 5 - 1  
Ago, Iwama, Nishi-Ibaraki, Ibaraki, 319-0292, Japan

# 目 次

## 報 文

- グラジオラス野生種の香りを識別する RAPD マーカー作出の試み  
高津康正・鈴木一典・郷内 武・霞 正一 ..... 1
- キュウリ緑斑モザイクウイルス外皮タンパク質遺伝子を導入した組換えメロンの作出  
鹿島美咲・大友綾子・江面 浩・富田健夫 ..... 11
- 日本のイチゴ品種における収量，硬度，糖度に関する AMMI モデルによる月別変化のパターン解析  
八城和敏・富田健夫・岩田洋佳 ..... 17

## グラジオラス野生種の香りを識別する RAPD マーカー作出の試み

高津康正・鈴木一典・郷内 武・霞 正一

グラジオラス野生種 (*Gladiolus gracilis*) の香りを識別する RAPD マーカーの選抜を試みた。*G. tristis* × *G. gracilis* の組み合わせで得られた分離集団 (F<sub>2</sub> 集団) における香りの有無を官能評価により判定したところ、有香個体と無香個体は 1:3 に分離した。香りの有無と花色との間には特に関連はみられなかった。次に有香個体と無香個体をそれぞれ 10 個体ずつ用いてゲノム DNA のバルクを作成し、両親間で多型を示す 84 種類のプライマーを用いて PCR を行ったところそれぞれのバルクに特異的な RAPD が見出された。これらのうち有香、無香の各個体に共通するそれぞれ 1 種類ずつの RAPD を STS 化し、有香個体特異的マーカー (K16-420STS) および無香個体特異的マーカー (K7-245STS) として選抜した。さらに新たに供試した有香個体と無香個体を用いて、表現型と特異的マーカーの有無の一致をみることにより選抜したマーカーの有用性を確認したところ、単独では有用性がやや低いものの両方のマーカーを併せて利用することで実際の育種選抜に利用できることが明らかとなった。

キーワード: DNA marker, gladiolus, RAPD, floral scent, wild species

### 1. 緒 言

グラジオラス (*Gladiolus x grandiflora*) はアヤメ科に属する球根花きで、球根生産では全国第一位、切花生産でも全国第二位のシェアを占める本県の主要な花き品目の一つである。グラジオラス属植物は南部アフリカを中心に、中央アフリカ、マダガスカルおよびユーラシアに分布が確認されており、本属に属する野生種の数も現在 255 種とされている (Goldblatt and Manning 1998)。しかしながら、現在の栽培種はわずか 6~7 種の野生種を祖先として育成されたという記述があり (Anderton and Park 1989, Barnard 1972)、またその後の育種の過程を含めても系統の育成には約 12 の野生種が関与しているにすぎないとされていることから (今西 1989)、その他大部分の野生種は現在の夏咲き系栽培種の成立にはかかわっておらず、潜在的な遺伝資源としての可能性を秘めているものと考えられる。これまでに南部アフリカ原産の野生種を収集・評価したところ、中には香りを有するもの

も存在することが明らかとなった (高津ら 2002)。香りは花き育種において重要な形質であり、多様化した消費者の要求に応える品種開発の素材としてその利用が期待される。このことから、我々は野生種を利用した種間交雑育種により香りを有するグラジオラスの育成に取り組んでいるところであるが、グラジオラスは播種から開花までに 2~3 年を要するため育種の効率が悪いことが問題となっており、目的とする形質を有する個体を早期に選抜するための効率的な選抜方法が求められている。

DNA マーカー選抜育種とは、目的形質の遺伝子またはそれに強く連鎖する DNA 配列をマーカーとして選抜を行う育種技術であり、検出方法の違いにより RFLP (Random Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), SSR (Single Sequence Repeat) および SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) 等がその手法として知られている。また、イネではいも

ち病抵抗性 (Miyamoto ら 2001) および縞葉枯病抵抗性 (早野 ら 2000) 等, 野菜類ではハクサイの根こぶ病抵抗性 (Suwabe ら 2002), ナスの果形・果皮色 (Nunome ら 2001) ピーマンの Pepper Mild Mottle Virus 抵抗性 (杉田 ら 2000), 同疫病抵抗性 (杉田 ら 2003) およびメロンの日持ち性 (遠山 ら 1999) 等, 果樹ではリンゴの斑点落葉病抵抗性 (深澤 ら 1999) およびニホンナシの果皮色 (天野 ら 2001) 等, また花きではバラの黒星病抵抗性 (Malek ら 2000), カーネーションの萎凋病抵抗性 (小野崎 ら 2003), キク白さび病抵抗性 (百瀬・工藤 2003) およびスイートピーの巻きひげ性 (Hanada and Hirai 2003) 等, 種々の有用形質に連鎖した DNA マーカーが作出され実際の育種を効率化するために利用されつつある。

これらのことから, 本研究ではグラジオラスにおける香りの成分育種の効率化を図るため, 野生種 (*G. gracilis*) の香りを識別できる DNA マーカーの作出を試みた。なお本研究は, 農林水産省から先端技術等地域実用化研究促進事業 (バイオテクノロジー型) 「グラジオラスの種間交雑育種における DNA マーカー利用技術の開発」(1997 ~ 2002) の助成を受けて実施したものである。

## II. 材料および方法

### 1. 分離集団の育成および特性調査

分離集団の育成のための交雑親としては, RAPD の共有バンド率をもとに作成したデンドログラム (Takatsu ら 2001) 上で, 異なるクラスターに属する *G. tristis* および *G. gracilis* を用いた (Fig. 1)。このうち子房親として用いた *G. tristis* は淡黄色の花を有し, チョウジ様の香りを暗条件下で発散する夜香性の種である。また *G. gracilis* は淡青色の花を有し, 開花中はスミレ様の芳香を発散する今後の育種素材として有望な種である (高津 ら 2002)。これらの種子を Silverhill Seeds Co. (ケープタウン, 南アフリカ) より購入し, 外皮を取り除いた後, 園芸培土を詰めた素焼き鉢 (直径 12 cm) に播種して当研究所のガラス温室内 (12℃ ~ 30℃, 500 ~ 900  $\mu$  mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) で育成し, 開花個体を得た。生育中は月に一度の割合で追肥 (N:P:K = 6.5:6:19, 1000 倍液) を行った。次に *G. tristis* × *G. gracilis* の組合せで作出した F<sub>1</sub> 個体を自殖して 1997 年 4 月に分離集団 (F<sub>2</sub> 集団) を得た。

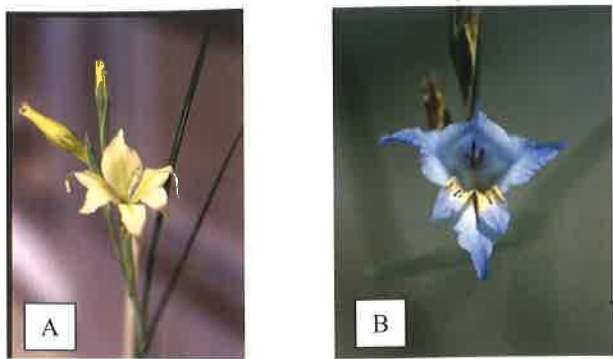


Fig.1. Wild gladiolus species *Gladiolus tristis* (A), and *G. gracilis* having good scent and blue flower color (B). Segregation population (F<sub>2</sub>) that used for selection of RAPD markers, have been produced by interspecific hybridization between these two species.

分離集団の栽培は上記の条件で行い 1999 年 4 月に開花個体を得た。これらの開花個体について開花時期, 到花日数, 花色および香りの有無等について調査を行った。到花日数は球茎を定植してから一番花が開花するまでの日数とし, また香りの有無については次に述べる方法で評価した。

### 2. ゲノム DNA バルクの作成

分離集団における各個体の香りの有無については, 1 名の経験のある評価者が官能評価によって識別した。香りの強さは気象条件等により若干変化することが知られているので, 評価は晴天の午前 10 時頃に行うことに統一し, また 1 個体について少なくとも 2 日間にわたり評価を行った。さらに 2 年間または 3 年間にわたり球茎で維持した同一個体の香りの有無を評価した。このようにして分離集団において香りあり, または香りなしと評価された個体 (以下, それぞれ有香個体, 無香個体とする) をそれぞれ 10 個体ずつ選抜した。

次にこれらの個体の生葉 100 mg から, Nucleon Phytopure キット (Amersham Pharmacia Biotech., UK) により DNA を抽出した。抽出した DNA を 0.8% アガロースゲルを用いた電気泳動により標品とともに展開して定量した後, 25 ng ずつ混合してバルクを作製した (以下, 香りを有する個体で構成するバルクを「有香バルク」, また香りを有さない個体で構成するバルクを「無香バルク」と称する)。

### 3. 香りの有無を識別する DNA マーカーの選抜

まず 260 種類の任意のプライマー (Operon, 10-mer kits) を用いて PCR を行い, *G. tristis* と *G. gracilis* の間で多型を示す PCR 産物を増幅するプライマーを選抜した. 次にこれらのプライマーを用いて, 2 種類 (有香バルクおよび無香バルク) のバルク DNA を鋳型として PCR を行い, それぞれのバルクに特異的な RAPD の選抜を試みた. PCR の温度条件は 95 °C・9 分の保温の後, 94 °C・1 分, 40 °C・2 分, 72 °C・3 分 (40 サイクル) とした. また PCR 反応液 (50  $\mu$ l) の組成は, 10 mM Tris-HCl (pH8.5), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$  M dNTP mix, 0.2  $\mu$  M プライマー, 250 ng 鋳型 DNA, 2.5 ユニットの AmpliTaq Gold™ とした. PCR 産物は 5  $\mu$ l ずつ 2.5 % アガロースゲル (NuSieve 3:1) を用いた電気泳動に供試し, バンドパターンを比較した.

次に, 有香バルクまたは無香バルク特異的として選抜された RAPD のうち, バルクを構成する各個体に共通して存在するものを有香個体特異的マーカーまたは無香個体特異的マーカーとして選抜した. すなわち, 両バルクに特異的な RAPD を増幅するプライマーを用いて, それぞれのバルクを構成する 10 個体の植物体から抽出した DNA を鋳型として PCR を行い, 当該の RAPD が各個体に共通して認められるか否かを確認した. PCR の条件等は上記のとおりとした.

さらに共通して認められた特異的マーカー (PCR による増幅断片) については, アガロースゲルより切り出して, GeneClean kit II (フナコシ) を用いて精製することにより回収した. また, これらの増幅断片について塩基配列を明らかにするとともに, 5' 末端および 3' 末端の適当な部位に STS 化のためのプライマー・セットを設定した. 次いで両バルクを構成するそれぞれの個体より抽出した DNA を鋳型としてこれらのプライマー・セットにより PCR を行い, 特異的マーカーの STS (Sequence Tagged Site) 化を確認した. PCR の温度条件は, K16-420STS マーカーについては 95 °C・9 分の保温の後, 94 °C・1 分, 65 °C・2 分, 72 °C・1 分 (25 サイクル) とし, また K7-245STS マーカーについては 95 °C・9 分の保温の後, 94 °C・1 分, 55 °C・2 分, 72 °C・2 分 (35 サイクル) とした. また PCR 反応液 (50  $\mu$ l) の組成は基本的に上記と同様としたが, プライマーについては 0.5  $\mu$  M

ずつ添加した.

また, STS 化したマーカーの有用性を確認するための材料として, 当初, 両バルクを構成するのに使用しなかった有香個体, または無香個体を 10 個体ずつ分離集団の中から新たに選抜した. 次いでそれぞれの個体から抽出した DNA を鋳型として, 上記のプライマー・セットおよび条件による PCR を行って香りの有無と STS 化した特異的マーカーの有無とを比較した.

## III. 結果および考察

### 1. 分離集団の特性調査等

*G. tristis* × *G. gracilis* の組合せで, 119 個体の分離集団 (F<sub>2</sub> 集団) が得られた. このうち 56 個体を用いて各個体の香りの有無を官能評価したところ, *G. gracilis* 様の芳香を有する有香個体と無香個体の分離頻度は 1:3 に適合することが示された (Table 1). このことから, *G. gracilis* の香り形質には単一の劣性遺伝子が関与している可能性が示唆された. 香りという形質については通常, 複数の遺伝子が関与していることが予想されるが, イネにおける香り米のように単一の遺伝子に支配されると推定される場合もある (Cordeiro ら 2002). 今回のグラジオラスの場合は後で述べるようにさらに検討が必要ではあるものの, この時点では遺伝分析の結果を踏まえてその後の実験を行うこととし, 有香個体 10 個体 (No.13, 33, 40, 44, 52, 86, 87, 93, 100 および 111), 無香個体 10 個体 (No.1, 5, 17, 19, 75, 91, 95, 97, 103 および 104) をそれぞれ選抜し, ゲノム DNA バルクを作製した.

ところで, *G. gracilis* の香りを劣性形質と考えると, RAPD は優性マーカーであるために無香個体のうちのホモ個体とヘテロ個体を識別できない (Fig. 2). そのため

Table 1. Segregation of scented plants and unscented plants among F<sub>2</sub> population derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*

No. of scented plants	No. of unscented plants	Total	$\chi^2$ -value (1:3)
13	43	56	0.09 (P=0.75)

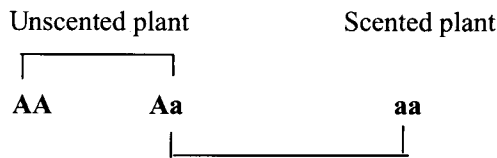


Fig.2. This plate shows a relationship between phenotype and putative zygote type of segregation population ( $F_2$ ) derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*. RAPD as a dominant marker is not able to divide homozygote (aa) plant from heterozygote (Aa) plant.

「有香個体に特異的なマーカー」として選抜されたマーカーは、無香個体のうちのヘテロ個体にも存在する可能性がある。一方、「無香個体に特異的なマーカー」を選抜

すれば、無香個体を確実に識別し排除できるため、育種効率の面からは有用性が高い。これらのことから、本研究では有香個体に特異的なマーカーに加え、無香個体に特異的なマーカーについても選抜を行った。

なお、分離集団における各個体について特性調査を行ったところ、到花日数は181～190日に (Fig. 3)、また開花時期は4月上旬ころにそれぞれピークを示した (Fig. 4)。各個体の香りの有無と花色との間には一定の関連はみられず、*G. gracilis* の花色である青色の花弁を有する個体は見出されなかった (Table 2)。

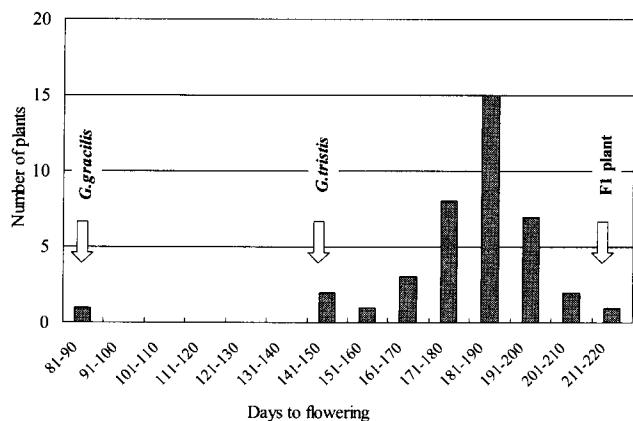


Fig.3. Distribution of days to flowering among  $F_2$  plants derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*. White arrows indicate the days to flowering of parent species (*G. tristis* and *G. gracilis*), and their  $F_1$  plant, respectively.

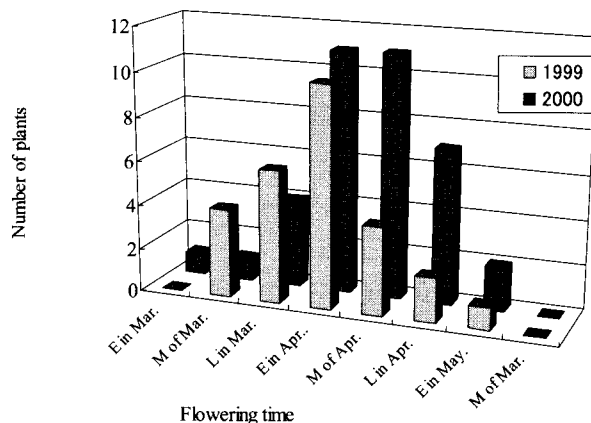


Fig.4. Distribution of flowering time among  $F_2$  plants derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*. This plate shows a comparison of flowering time in 1999 and 2000. Many plants flowered in April. E: early, M: middle, L: late.

Table 2. Number of scented or unscented plants in each flower color among  $F_2$  population derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*. No relationship was observed in a trait of scent and flower color

Trait	Flower color				Total
	White(%)	Pink	Purple	Other	
Scented	6(46.1)	4(30.7)	2(15.4)	1(0.8)	13
Unscented	11(25.6)	20(46.5)	9(20.9)	3(0.7)	43
Total	17	24	11	4	56

## 2. 香りの有無を識別する DNA マーカーの選抜

260 種類のプライマーを用いて PCR を行ったところ、84 種類のプライマーで *G. tristis* と *G. gracilis* の間で多型が検出された。これら 84 種類のプライマーによる PCR の結果、10 種類のプライマーでバルク間に多型が見られ

た。このうち 8 種類 (OPA3, OPD2, OPE18, OPG10, OPG18, OPK1, OPK16 および OPN15) では有香バルクに特異的な、また 2 種類 (OPC2 および OPK7) では無香バルクに特異的な RAPD が認められた (Fig. 5)。次にバルクを構成する個体ごとにこれらの RAPD の有無を検討



したところ、有香個体では OPK16 プライマーにより 900 bp 付近に、無香個体では OPK7 プライマーにより 350 bp

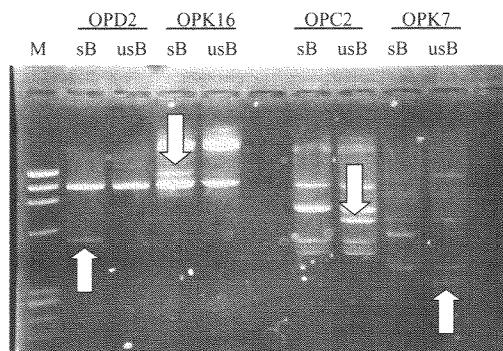


Fig.5. This plate shows the specific bands amplified by PCR in the bulks consisted with scented plants (sB) or with unscented plants (usB) derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*. White arrows show the specific RAPD in each bulk. OPD2, OPK16, OPC2 and OPK7 indicate name of 10-mer kits of OPERON. M:  $\phi$  X174/*Hae* III +  $\lambda$  /*Hind* III.

付近にそれぞれ増幅されるバンドのみが各個体に共通していた (Fig. 6). 次いでこれらのバンドの STS 化を試みたところ、まず有香個体特異的のバンドについては、設計した K16-U98 (ACCTCACATCTCggCACAgT) プライマーおよび K16-L498 (CgAATCCTATTTTggACCTC) プライマーにより期待されるサイズ (420 bp) に単一の増幅断片が得られた。また無香個体特異的のバンドについても K7-U46 (gTggCgAgAAAggAgACAAA) プライマーおよび K7-L271 (AAACTgATTCggCTggTgAT) プライマーにより期待されるサイズ (245 bp) に単一の増幅断片が得られ、これらの STS マーカーは有香個体と無香個体を識別する特異的な DNA マーカーとして利用できる可能性が示された (それぞれ K16-420STS および K7-245STS と称する : Fig. 7).

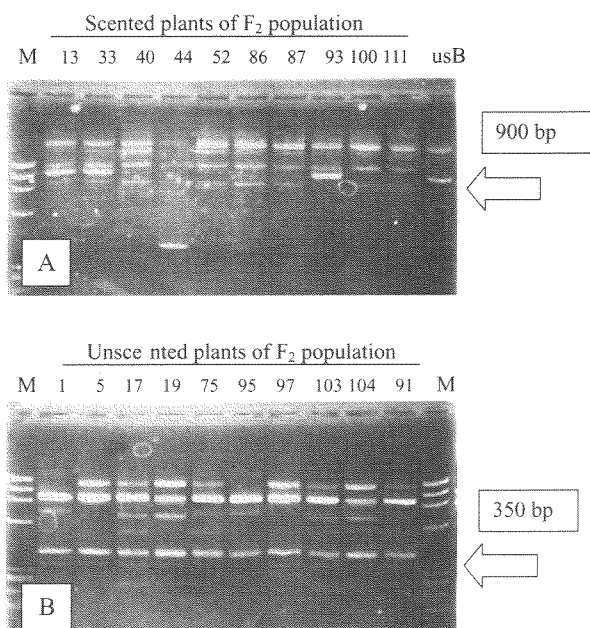


Fig.6. Specific bands amplified by PCR among individual plants in segregating population derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*. A: The RAPD of 900 bp generated by OPK16 primer is amplified in all of 10 scented plants, but not in the bulk consisted with unscented plants (nsB). B: The RAPD of 350 bp is generated by OPK7 primer amplified in all of 10 unscented plants. usB: The bulk consisted with unscented plants. M:  $\phi$  X174/*Hae* III +  $\lambda$  /*Hind* III.

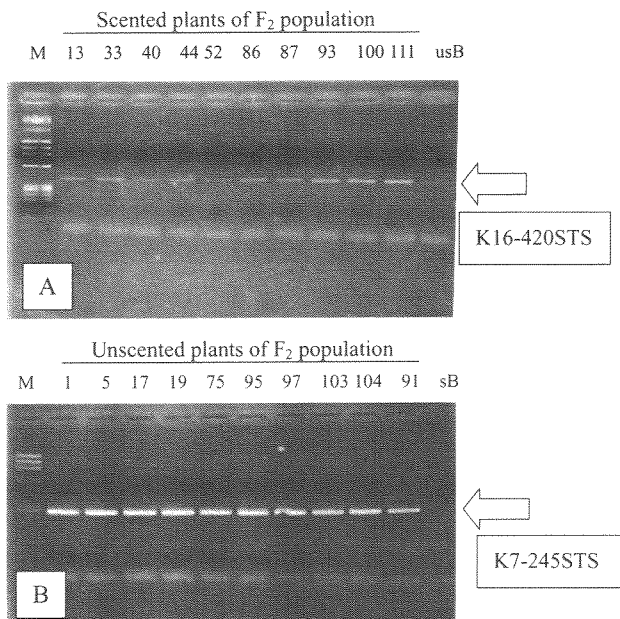


Fig.7. Specific RAPDs were converted to two sequence tagged site. A: K16-420STS marker was amplified by PCR using specific primers (KU46 and KL271) in all of 10 scented plants. B: K7-245STS marker was amplified by PCR using specific primers (K16U98 and K16L498) in all of 10 unscented plants. sB: The bulk consisted with scented plants. usB: The bulk consisted with unscented plants. M:  $\phi$  X174/*Hae* III +  $\lambda$  /*Hind* III.

### 3. 選抜した STS マーカーの有用性確認

次いで、新たに選抜した有香個体 (No.8, 11, 31, 34, 47, 80, 83, 90, 96 および 110) ならびに無香個体 (No.3, 4, 18, 20, 29, 30, 37, 43, 46 および 48) を用いて、選抜した STS マーカーの有用性について検討した。その結果を Fig. 8 および Fig. 9 に示す。K16-420STS (有香個体特異的マーカー) については、新たに選抜した有香個体にはすべて現れたものの (Fig. 8A), 新たに選抜した無香個体 10 個体のうち 7 個体においても認められた (Fig. 8B)。このうち、Fig. 8B においてマーカーの存在が認められた個体は Fig. 2 に示したように無香個体のうちのヘテロ個体であろうと推察される。この点については現在、無香の各個体を自殖することにより作出した F<sub>3</sub> 集団を育成中であり、今後それらの香りの分離程度を観察するこ

とにより確認できるものと考えられる。このように K16-420STS については、*G. gracilis* の香り形質とある程度の関連を有していることが示唆された。今後、別な交雑組み合わせにより分離集団を育成して再度有用性の検討を行う必要があるものの、本マーカーを指標として選抜を行った場合には、マーカーを有する個体の少なくとも半数は香りを有する個体が選抜できるものと期待される。また、上記のように K16-420STS については香りを有するという形質と一致して現れていることから香り成分の産生に関わる遺伝子の断片である可能性もあるが、DNA の塩基配列をもとにした相同性検索の結果、有意な遺伝子との一致はみられなかった。現在花きの香り遺伝子として単離されているものは、サンジソウ (*Clarkia breweri*) の LIS (S-Linalool synthase: Dudareva ら 1996),

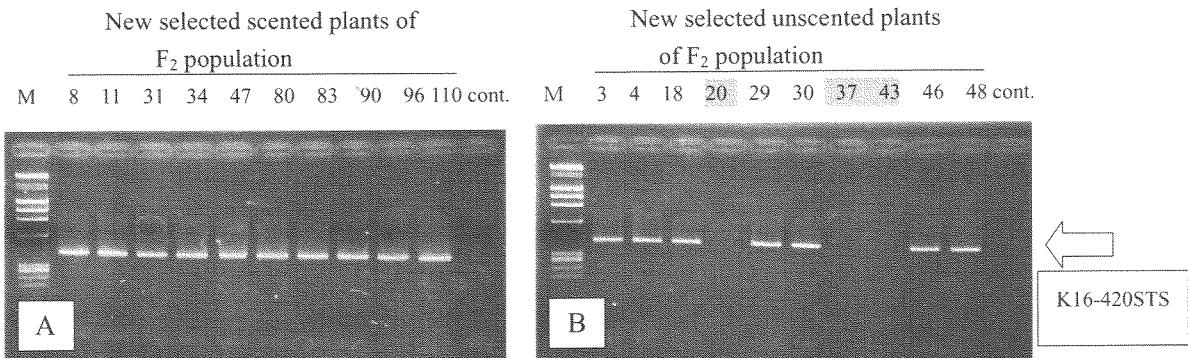


Fig.8. Amplifications of the specific STS marker in new selected scented plants or unscented plants of segregating population derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*. A: K16-420STS marker, specific to scented plant, appeared in all of 10 new selected scented plants. B: K16-420STS marker appeared 7 plants of 10 new selected unscented plants. cont.: water. M:  $\phi$  X174/Hae III +  $\lambda$  /Hind III .

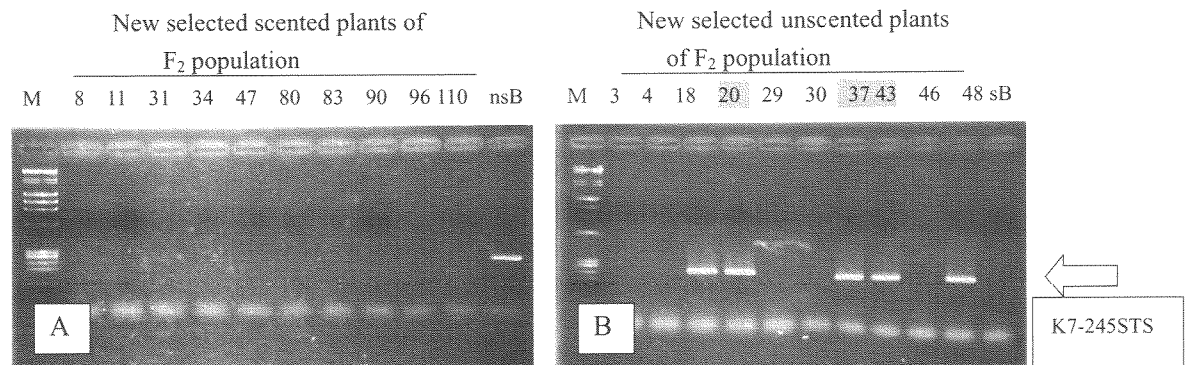


Fig.9. Amplifications of the specific STS marker in new selected scented plants or unscented plants of segregating population derived from interspecific hybridization between *Gladiolus tristis* and *G. gracilis*. A: K7-245STS marker, specific to unscented plant, did not appear in new selected scented plants. B: K7-245STS marker appeared only 5 plants of 10 new selected unscented plants. nsB: The bulk consisted with unscented plants. sB: The bulk consisted with scented plants. M:  $\phi$  X174/Hae III +  $\lambda$  /Hind III .



IEMT (iso-eugenol O-methyltransferase: Csekeら1998)および BEAT (benzylalcohol acetyltransferase: Dudarevaら1998), バラ (*Rosa hybrida*) の OMT (*O*-methyltransferase: Vainsteinら2003) などいくつかに限られ, このことも相同性検索の結果, 一致する遺伝子が見出されなかったことの原因の一つであると考えられる. 今後は本マーカーをプローブとして *G. gracilis* の cDNA ライブラリーのスクリーニング等を行うことで, 香り成分の産生等の何らかの機能性を有する遺伝子が得られる可能性もある. また近年, マイクロアレイによる効率的なスクリーニングによって特にバラの香り成分に関わる遺伝子の候補が数多く単離されつつある (Vainsteinら2003). 今後これらの研究が進むことにより香りに関わる遺伝子の情報が集積されることが期待される.

一方, K7-245STS (無香個体特異的マーカー) については, 有香個体にはまったく現れなかったが (Fig. 9A), 無香個体においても認められた個体は10個体中5個体に留まった (Fig. 9B). このように本マーカーについては単独では有用性が低いことが示唆されたが, Fig. 8および Fig. 9において無香個体における有香個体特異的および無香個体特異的マーカーの有無を比較すると, 無香個体のうち K16-420STS を有さず, かつ K7-245STS を有する個体 (Fig. 8B ならびに Fig. 9B における No.20, 37 および 43) は, 無香個体のうちのホモ個体であると推察される. この点についても各個体を自殖して育成した F<sub>3</sub> 集団の香りの分離程度を観察することにより今後確認できるものと考えられるが, 現時点では上記のように両方のマーカーを組み合わせて利用することで, 確実に香りを有さない個体を識別し排除することが可能であることが示された.

ところで, 選抜したマーカーの有用性確認において K7-245STS (無香個体特異的マーカー) の認められた個体が, 無香個体10個体中5個体に留まった理由は明らかではないが, 原因の一つとして分離集団における有香個体と無香個体の識別においてなんらかの不備があったことが考えられる. 今回は官能評価により分離集団の各個体について香りの有無を識別したが, 近年の生花の香りに関する研究の進展に伴い, 香り成分の中には沸点が 200 ~ 300 °C と高く, 常温では気化せずに花卉の細胞中に溜め込まれている量 (内生量) の方が多い成分もあることが指摘されている (中山, 私信). グラジオラス野生

種の香り成分について予備的に調査したところ, やはりリナロールなどの沸点の高い成分が主であることが推察されている (未発表データ). このため花卉から発散する香り成分が微量であったために, 香り成分を産生していても「香りが無い」という判断になった個体が存在した可能性があり, 分離集団における香りの有無の識別において, 有香個体を無香個体と誤認したことも考えられる. 有用な DNA マーカーの選抜のためには, 分離集団における目的とする形質の正確な識別が重要なポイントとなる. これらのことから, 分離集団の識別にあたって発散量に加え機器分析等により香り成分の内生量を測定して指標とすることで, 今後関与する遺伝子の数を再検討することも必要であると思われる. 一方, 内生量がいくら高くても実際に香り成分が発散しなくては育種には利用できないという指摘もあるが, この点に関しては近年, バラの香り形成に関わる物質の同定 (Watanabeら2001), ペチュニアの香り成分の発散量と内生量の昼夜リズム (大久保ら2003), カスミソウのにおい成分の合成経路の推定 (土井ら2003) および温度・光強度がペチュニアの花香の発散におよぼす影響 (半田2003) など, 生花の香り成分の生合成および発散のメカニズムについての研究が進みつつあり, 今後の進展が待たれるところである.

以上のように, 本研究では育種効率を向上させると期待できる DNA マーカーを得ることができたが, *G. gracilis* の香りに確実に連鎖することを確認したマーカーは得られなかった. 今後, 分離集団の無香個体におけるホモ個体とヘテロ個体の区別をした上で再度香りの有無について機器分析等を加えて識別を行うことで, 分離集団の正確な評価が可能となり精度の高いマーカーの選抜につながるものと考えられる. また, グラジオラス野生種には, 今回利用した *G. gracilis* 以外にもさまざまなタイプの香りを有するものがみだされている (Goldblatt and Manning 1998, 高津ら2002). 今後は *G. gracilis* 以外の野生種についても育種素材として利用していくことを前提として, それぞれの香りに連鎖した DNA マーカーの設定も行っていきたい.

## 謝 辞

本研究を行うに当り、茨城県農業総合センター園芸研究所本岡竹司博士，独立行政法人農業生物資源研究所矢野昌弘博士，同森中洋一博士，同農業・生物系特定産業技術研究機構花き研究所中山真義博士，同，大久保直美博士，同山田哲也博士，同九州沖縄農業研究センター土門英司博士，茨城大学農学部丹羽勝博士，同丸橋亘博士ならびに同遺伝子実験施設井上栄一博士より有益な助言を賜った。ここに記して感謝の意を表します。

## 引用文献

- Anderton, E.W. and R. Park (1989) "Growing gladioli" Timber Press, Oregon, 12-13.
- 天野克紀・井上栄一・霞正一・早出好孝・矢田和寛・林幹夫・佐久間文雄・長南茂・原弘道・月橋輝男 (2001) ニホンナシの果皮色に連鎖した SCAR マーカーの作製。育種学研究 3 (別 1) :79.
- Barnard, T. T. (1972) On hybrids and hybridization. In: G. J. Lewis, Obermeyer, A. A., Barnard, T. T. (Eds.), *Gladiolus, a revision of the South African species*. J. S. Afr. Bot. Suppl. vol.10, 304-310.
- Cordeiro, G.M., Christopher, M.J., Henry, R.J., Reinke, R.F. (2002) Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence. *Mol. Breed.* 9:245-250
- Cseke, L., N. Dudareva and E. Pichersky (1998) Structure and evolution of the linalool synthase. *Mol. Biol. Evol.* 15:1491-1498.
- 土井元章・杉原ゆうこ・ハタイティップニミケットカイ・上田悦範・今西英雄 (2003) *Gypsophila* 属花序から発散されるメチル酪酸の生成経路の推定。園学雑 72 (別 1) :303.
- Dudareva, N., L. Cseke, V. M. Blanc and E. Pichersky (1996) Evaluation of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-Linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* 8:1137-1148.
- Dudareva, N., J. C. D'Auria, K. H. Nam, R. A. Raguso and E. Pichersky (1998) Acetyl-CoA: benzyl-alcohol acetyltransferase-an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J.* 14:297-304.
- 深澤 (赤田) 朝子・工藤剛・番保徳・今智之・斎藤彰・初山慶道・白鳥孝子・中澤憲夫・鈴木正彦 (1999) リンゴ斑点落葉病感受性遺伝子に連鎖する RAPD マーカーの探索。育種学研究 1 (別 1) :17.
- Goldblatt, P. and Manning, J. (1998) *Gladiolus in Southern Africa*. Fernwood Press, Vleaberg, S.A.
- Hanada, H. and M. Hirai (2003) Development of a genetic marker linked to the tendril trait of sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.). *Breed. Sci.* 53:7-13.
- 半田高・柄本真吾・大久保直美・安藤敏夫・中山真義 (2003) 温度と光強度がペチュニア・アキシラリスにおける花香の発散と成分組成に及ぼす影響。園学雑 72 (別 2) :476.
- 早野由里子・斎藤浩二・藤井潔・遠山孝通・辻孝子・杉浦直樹・井澤敏彦・岩崎真人 (2000) イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* を検出する SCAR マーカー。育種学研究 2:67-72.
- 今西英雄 (1989) グラジオラス，植物遺伝資源集成，松尾孝嶺監修，養賢堂，東京，1077-1080.
- Miyamoto M., M. Yano and H. Hirasawa (2001) Mapping of quantitative trait loci conferring blast field resistance in the Japanese upland rice variety Kahei. *Breed. Sci.* 51:247-261.
- Malek, B. V., W. E. Weber and T. Debener (2000) Identification of molecular markers linked to Rdr1, a gene conferring resistance to blackspot in roses. *Theor. Appl. Genet.* 101:977-983.
- 百瀬真幸・工藤博司 (2003) キク白さび病抵抗性遺伝子に連鎖する分子マーカー。育種学研究 5 (別 1) :180.
- Nunome, T., K. Ishiguro, T. Yoshida and M. Hirai (2001) Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breed. Sci.* 51:19-26.
- 小野崎隆・種谷光泰・柴田道夫 (2003) カーネーションの萎凋細菌病抵抗性育種に関する研究 (第 9 報) 連鎖地図を用いた抵抗性の QTL 解析。園学雑 72 (別 1) :349.
- 大久保直美・安藤敏夫・中山真義 (2003) ペチュニア

- における香気成分の発散量と内生量の昼夜リズム. 園学雑 72 (別 1) :302.
- 杉田亘・畠中幸代・長田龍太郎・山口和典・湯地健一・轟篤 (2000) ピーマンの PMMoV 抵抗性に連鎖した PCR マーカーの開発. 育種学研究 2 (別 2) :11.
- 杉田亘・山口和典・長田龍太郎・湯地健一・木下哲次・轟篤 (2003) ピーマンの疫病抵抗性に連鎖した CAPS マーカーの開発. 園学雑 72 (別 1) :351.
- Suwabe, K., H. Iketani, T. Nunome, T. Kage and M. Hiai (2002) Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. Theor. Appl. Genet. 104:1092-1098.
- Takatsu, Y., M. Miyamoto, E. Inoue, T. Yamada, T. Manabe, M. Kasumi, M. Hayashi, F. Sakuma, W. Marubashi and M. Niwa. (2001) Interspecific hybridization among wild *Gladiolus* species of southern Africa, based on random amplified polymorphic DNA markers. Scientia Hort. 91:339-348.
- 高津康正・眞部徹・霞正一・山田哲也・青木隆治・井上栄一・森中洋一・丸橋亘・林幹夫 (2002) 南部アフリカ原産グラジオラス野生種の遺伝資源収集評価. 育種学研究 4:87-94.
- 遠山孝通・浅見逸夫・大藪哲也・矢部和則・菅原真治 (1999) アールスメロン温室メロンの日持ち性形質(非黄化)と連鎖する RAPD 及び CAPS マーカー. 育種学研究 1 (別 2) :346.
- Vainstein, A., Z. Adam, D. Zamir, D. Weiss, E. Lewinsohn and E. Pichersky (2003) Rose fragrance : Genomic approaches and metabolic engineering. Proc. 21st Int. Syn. on Classical versus molecular breeding of ornamentals. Acta Hort. 612:105-113.
- Watanabe, S., I. Hashimoto, K. Hayashi, K. Yagi, T. Asai, H. Knapp, M. Straubinger, P. Winterhalter, N. Watanabe (2001) Isolation and identification of 2-phenylethyl disaccharide glycosides and its mono glycosides from rose flowers, and their potential role in scent formation. Biosci. Biotech. Biochem. 65:442-445.

# **Trials for Selection of RAPD Markers Linked to the Floral Scent Trait of Wild Gladiolus Species**

Yasumasa Takatsu, Kazunori Suzuki, Takeru Gonai and Masakazu Kasumi

*Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center  
Ago, Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki, 319-0292, Japan*

## **Summary**

We tried to select RAPD markers linked to the floral scent trait of wild gladiolus species (*Gladiolus gracilis*), as breeding of gladiolus using interspecific hybridization needs a long period to flowering and selection. Floral scent of each plants was evaluated by sensory evaluation in segregation population derived from *G. tristis* X *G. gracilis*, and it was showed that a segregation ratio of scented plant and unscented plant fit to 1:3 ( $\chi^2$ -value=0.09). Genomic DNA extracted from 10 of each plants (scented and non-scented) was mixed and consisted two bulks (scented bulk and unscented bulk). Specific RAPD were screened by a bulked segregant analysis using these two bulks, and one of each RAPD specified to scented or unscented plants were selected. Selected RAPDs were converted to STS markers named as K16-420STS or K7-245STS, respectively. Efficiency of these markers was confirmed by bulk segregant analysis using new plants, and this analysis showed that it is possible to divide unscented plants from select scented plants among progeny by combination use of these markers.

Key words: DNA marker, gladiolus, RAPD, floral scent, wild species

## キュウリ緑斑モザイクウイルス外被タンパク質遺伝子を 導入した組換えメロンの作出

鹿島美咲・大友綾子<sup>1)</sup>・江面 浩<sup>2)</sup>・富田健夫

キュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) 抵抗性をメロンに付与することを目的として、赤肉系メロン品種 'Vedrantais' に CGMMV 外被タンパク質遺伝子をセンス方向に導入した。外皮タンパク質の発現が確認された組換えメロンの後代への CGMMV 接種検定において非組換え体に比べ発病が3日から22日程度遅延する耐病性組換え体が得られた。

キーワード：メロン，CGMMV，外被タンパク質，遺伝子組換え，ウイルス耐病性

### I. 緒 言

メロンでのキュウリ緑斑モザイクウイルス (以下 CGMMV と略記) 病の発生防止は、臭化メチル等による苗床等の土壌消毒により対策を講じてきた。しかし、臭化メチルはモントリオール議定書によりオゾン層破壊物質に指定されており、先進国における使用については2005年に全廃することが取り決められている。そこで、本県農業粗生産額第3位のメロンでのCGMMV被害発生を未然に防止する新たな手法の開発が急がれている。

植物への遺伝子組換えによるウイルス抵抗性の付与については、Powell *et al.* (1986) が TMV の外被タンパク質遺伝子を導入した組換えタバコを作出し、それが TMV に対して抵抗性を示すことを報告して以来、外被タンパク質遺伝子を導入した組換え体の例が多く報告されている。例えば、Gonsalves (1998) はパパイア輪点ウイルス (PRV-S) の外被タンパク質遺伝子を導入した組換えパパイアに PRVS を接種したところ、非組み換え体は77日で罹病したのに対し、組換え体は25月間健全であったと報告している。その抵抗性機作は組換え植物

にウイルスを接種すると、ウイルスは感染するものの非組換え体に比べて植物全体へのウイルスの広がりが抑制され、病徴は緩和され、病徴発現の時期も遅くなるというものである (石田・小川 1997)。

本研究では実用レベルにおけるメロンでの CGMMV 抵抗性獲得を目標に CGMMV の外被タンパク質 (以下 CGMMV-CP) 遺伝子をセンス方向に導入することにより、組換えメロンを作出し、ウイルス抵抗性を検定したので報告する。なお本研究は農林水産省からの委託研究「21世紀グリーンフロンティア研究 遺伝子組換え及びクローン技術による画期的な動植物の開発 コートタンパク質遺伝子を用いた CGMMV 抵抗性メロンの作出」(2001 ~ 2003) で実施したものである。

### II. 材料および方法

#### 1. メロンへの遺伝子導入処理

定法の *Agrobacterium* 法 (*A. t.* LBA4404 株) に従って、目的遺伝子を赤肉メロンの育種素材である 'Vedrantais' へ導入処理を行った。

<sup>1)</sup> 茨城県農業総合センター 園芸研究所

<sup>2)</sup> 筑波大学 農林学系遺伝子実験センター

### 1) 導入遺伝子

独立行政法人農業生物資源研究所分子遺伝部遺伝子応答研究室が構築した pCG-CP (CGMMV-CP 遺伝子のセンス遺伝子) (図 1) を用いた。

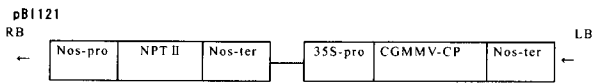


図 1 形質転換に用いた pCG-CP の構造

### 2) 導入処理

- ① メロンの種子を 1/2 MS 培地 (sucrose 2%, Gellrite 0.2%) に無菌播種した (25°C)。
- ② 7 日後、発芽した幼植物の子葉を切り出し、6 分割し、前培養培地 (MS + BAP 1.0 mg/l + glucose 2% + Gellrite 0.2%) で培養した (25°C, 2 日間)。
- ③ *Agrobacterium* を液体培地 (LB + Km 50mg/l) で振とう培養した (27°C, 24 ~ 36 時間)。
- ④ 2 日間前培養した子葉に集菌した *Agrobacterium* を接種した。その後、外植片を共存培地 (MS + BAP 1.0 mg/l + glucose 2% + Gellrite 0.4%) に置床して、暗黒下で共存培養した。
- ⑤ 3 日後、外植片を除菌培地 (MS + BAP 1.0 mg/l + sucrose 2% + Gellrite 0.2% + Augumentin 375 mg/l) に移植して、明条件で培養した。
- ⑥ 7 日後、外植片を選抜培地 (MS + BAP 1.0mg /l + sucrose 2% + Gellrite 0.2% + Augumentin 375 mg/l + Km 200 mg/l) に移植して培養した。以降、2 週間を目安に新しい選抜培地へ継代した。
- ⑦ 不定芽が分化してきた時点で外植片から切り離し、シュート伸長培地 (MS + BAP 0.1 mg/l + sucrose 2% + Gellrite 0.3% + Augumentin 375 mg /l + Km 100 mg/l) に移植して培養し、シュートが伸びるまで継代した。
- ⑧ 伸びてきたシュートを切り離し、発根培地 (MS + sucrose 2% + Gellrite 0.3% + Augumentin 375 mg/l) に移植した。

### 3) 形質転換体の選抜

供試個体のうちカナマイシン耐性個体からフローサイトメーターにより 2 倍体を選抜した。

## 2. 遺伝子導入メロンの CGMMV 抵抗性検定

### 1) 次代における CGMMV 抵抗性

作出した組換え体から採種した次代の種子 5 系統および 'Vedrantais' を培土に播種育成した。各系統 13 ~ 29 株の子葉にカーボランダム法により粗ウイルス液 (CGMMV 罹病葉を 0.1M リン酸バッファーで磨砕したもの) を綿球を用いて接種後、本葉のモザイクの発現、葉脈透過症状などを発病指標として、発病の推移を調査し、罹病率 (%) [(罹病個体数 / 供試個体数) × 100] を算出した。

### 2) 葉面でのウイルス増殖抑制による抵抗性検定

当代の順化栽培メロン本葉の切離葉に CGMMV 純化ウイルス (20 μg/ml) を接種してプラスチックカップに入れ 25°C に静置し、7 日後エライザ法によりウイルスの増加量を調査した。なお、エライザ法は高橋 (1988) (日本植物防疫協会研究所) の方法に準じて実施した。

## 3. 導入遺伝子の発現

pCG-CP 導入系統については、CGMMV-CP 抗体を用いて以下のドットプロット法により外被タンパク質の検出を行った。

- ① メロンの葉を磨砕用バッファー (0.01M EDTA, 0.1%BSA, 0.15% PVP-40, 0.1% 2ME / 0.1MPB) で磨りつぶして試料液とした。
- ② プロテインアッセイ Lowry キット (N 社製) により、試料液のタンパク質濃度を測定した。濃度標準線は BSA (牛血清アルブミン) を用いて作成した。試料液を一定タンパク質濃度に希釈し、その 1 μl をニトロセルロースメンブレンに滴下した。
- ③ メンブレンを CGMMV-CP 1 次抗体で処理した。
- ④ メンブレンを洗浄後、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識の 2 次抗体で処理した。
- ⑤ NBT, BCIP 混合 AP 液を用いた化学発色 (紫色) により、タンパクの検出を行った。

## Ⅲ. 結 果

### 1. 遺伝子導入メロンの CGMMV 抵抗性検定

- 1) 赤肉系メロン 'Vedrantais' へ pCG-CP を *Agrobacterium*



法により導入処理した。合計24,575切片の外植片に処理を行い、カナマイシンによる選抜で得た個体からフローサイトメーターで‘Vedrantais’と同じ倍数性である2倍体再生個体を選抜し、順化後閉鎖系温室内のワゲネルポットへ移植して育成し、自殖により5系統(a, b, c, d, e)からT<sub>1</sub>を採種した。

2) 採種した5系統の種子を播種し、T<sub>1</sub>世代でウイルス抵抗性を調査した結果を図2に示した。播種後9日目の子葉にウイルスを接種し経時的に本葉の状態を観察した。その結果、接種後4日目には対照区(非組換えメロン‘Vedrantais’: W.T.)及びpCG-CP導入メロンのT<sub>1</sub>世代全区で、本葉にCGMMV感染葉の病徴であるモザイク症状を発現した個体が観察された。試験系統ごとの罹病率(罹病した株数の割合)の推移をみると組換え体T<sub>1</sub>系統においても接種後4日目で25.0%から69.2%発病した。しかし接種後8日目では対照区(W.T.)で100%発病したのに対し、組換え体においては健全な株の割合がd系統の15.4%からb系統の33.3%と各系統で発病しない個体が確認された。接種後20日目になって組換え体a, b, d系統が100%罹病し、c系統は25日目、e系統は30日目に100%罹病した。

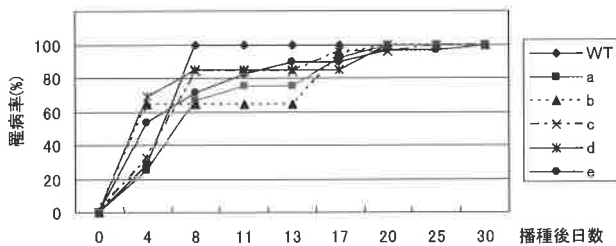


図2. pCG-CP導入個体から採種したCGMMV(センス) T<sub>1</sub>世代のウイルス抵抗性調査  
注) 罹病率(%) = (罹病個体数 / 供試個体数) × 100

このようにメロンへpCG-CPを導入することにより、非組換えメロンに比べ、CGMMVの発病が3日から22日遅延する耐病性組換え体が作出された。

3) T<sub>1</sub>種子a, b, e系統を播種育成し、切離葉でのウイルス増殖程度を調査し、その結果を図3に示した。閉鎖系温室内で生長した本葉の切離葉にウイルスを接種し、その1週間後の増加量をエライザ法により調査し

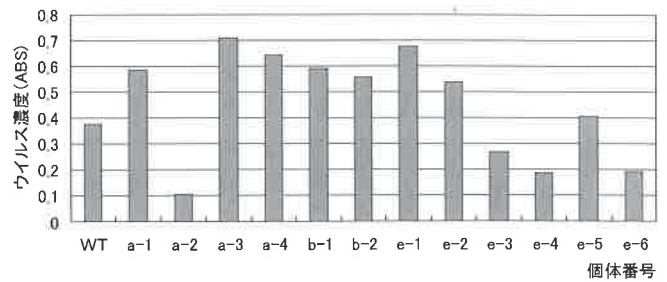


図3. pCG-CP導入個体から採種したCGMMV-CP(センス) T<sub>1</sub>世代における接種ウイルス増加量  
注) 切離葉に接種した7日後にエライザ分析を行った。  
WTは2個体の平均値。

た。接種したT<sub>1</sub>世代において対照区(W.T.)に比べウイルス増加量の少ない個体は、a系統で4個体中1個体、e系統では6個体中3個体確認された。

以上のように、CGMMV-CP遺伝子をセンス方向に導入し、作出した組換えメロンではその次代の葉においてウイルス増殖が抑制される個体が確認された。

## 2. 組換えメロンの当代における導入遺伝子の発現

組換え体T<sub>1</sub>世代で発病が遅延した5系統のT<sub>0</sub>について非組換え体を対照としてドットプロット法により、CPの発現を調査した。試料のタンパク濃度を調整し、2種類の濃度でメンブレンに滴下した。試料濃度200ng/μlのとき、組換え体5系統で発色によりタンパク質が検出された。このことにより、CGMMV抵抗性を示した組換えメロンの当代5系統で導入遺伝子CGMMV-CPによるタンパク質発現が確認された(図4)。

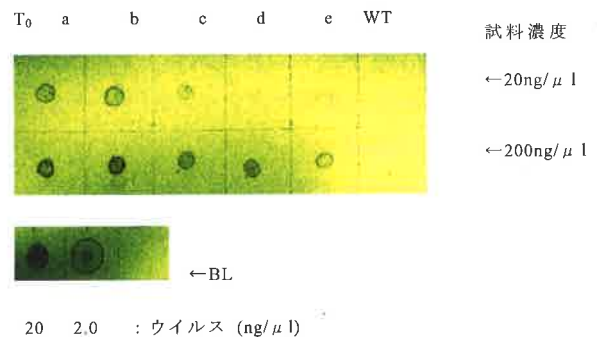


図4. ドットプロット法によるpCG-CP導入メロンのCPの発現(T<sub>0</sub>)

#### IV. 考 察

本研究では、CGMMVの外被タンパク質遺伝子をセンス方向に導入しCGMMV抵抗性の組換えメロンを作出した。組換え体当代では導入遺伝子によるタンパク発現が確認された。その次代では、切離葉面上でウイルス増加が抑制された個体が得られた。さらに、子葉接種によりCGMMV抵抗性の確認された系統が選抜された。ウイルスのCPを導入した植物のウイルス抵抗性については、CPがウイルスの脱外被を阻害することや、CPがウイルス複製の負の調節に働いている可能性が考えられている(石田・小川1997)。本研究ではCGMMV接種試験において、他のCP遺伝子導入作物の例と同様に組換えメロンの発病が非組み換え体に比べ遅延する結果が得られたがその程度は3日から最大で22日の遅延であった。しかし、効率的な組換え体の作出手法等を用いてより多くの組換え体を作成し選抜することで、ここで得られた組換え体よりもさらに強いCGMMV抵抗性をもったメロンの作出も期待できるものと考える。交配育種によるウイルス抵抗性メロン母本の育成には抵抗性素材の検索並びに交配系統からの選抜等長年月を要することから、育種における組換え技術の利用は優良母本の作出、新品種の開発において、効率的な技術であると考える。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり、愛媛大学農学部生物資源学科教授西口正通博士、独立行政法人農業生物資源研究所新生物資源創出研究グループ長岡成美博士(前生物工学研究所長)、独立行政法人農業生物資源研究所分子遺伝研究グループ遺伝子修飾研究チーム望月淳子氏にはご指導を賜った。筑波大学農林学系遊橋健一博士には貴重なご助言をいただいた。深く御礼申し上げます。

#### 引用文献

- Gonsalvs, D. (1998) Control of Papaya Ringspot Virus in Papaya: A Case Study. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:415-437.
- 石田功・小川俊也(1997) 分子レベルからみた植物の耐

病性. 秀潤社. 東京. : 177-184.

- Powell A. P, R. S. Nelson, D. Barun, N. Hoffman, S.G.Rogers, R.T.Franley and R.N.Beachy (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the TMV coat protein gene. *Science* 232 : 738-743.

高橋義行(1988) ELAISA法-その特徴と実施上の注意点. *植物防疫* 42 (2) : 22-26.

## **Production of Transgenic Melon Inserted Cucumber Green Mottle Mosaic Virus Coat Protein Gene**

Misaki Kashima, Ayako Otomo<sup>1)</sup>, Hiroshi Ezura<sup>2)</sup> and Ken-o Tomita

*Plant-Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki, 319-0292, Japan*

*1) Ibaraki Horticultural Research Institute, Ago Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki, 319-0292, Japan*

*2) Institute of Agricultural and Forestry, Gene Research Center, University of Tsukuba, Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan*

### **Summary**

In order to increase the disease resistance of melon against cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), CGMMV coat protein gene was introduced into the red melon variety 'Vedrantais' in the sense direction. The progeny CGMMV test of transgenic melon producing the coat protein revealed that the first signs of infection in the transgenic melon were delayed 3 to 22 days compared to those of the non- transgenic melon.

Key Words: melon, CGMMV, coat protein, gene recombination, virus disease resistance

## 日本のイチゴ品種における収量，硬度，糖度に関する AMMI モデルによる月別変化のパターン解析

八城和敏・富田健夫・岩田洋佳<sup>1)</sup>

イチゴは栄養繁殖性作物であるため，品種育成には一般に複数の組み合わせによる交配を行い，多数の実生集団を用いた選抜が行われている。選抜には育種家の主観にたよる部分も多く，熟練と労力を必要とする。本研究では，イチゴの主要形質の月別変化パターンを相加主効果・相乗交互作用（AMMI）モデルで解析することで，客観的な各品種の変化パターンの分類・評価を試みた。日本のイチゴ9品種を供試し，収量（個数，重さ），硬度，糖度を測定した。これらの各形質について，月別の10株あたりの平均値を求め，品種と収穫月を要因とした二元配置の分散分析を行った。さらに，品種と収穫月の交互作用についてAMMI解析を行い，各品種の月別変化パターンを評価した。分散分析の結果，全形質において品種および収穫月の効果が0.1%水準で有意であった。すなわち，品種，収穫月による変異のあることが分かった。これら交互作用も0.1%水準で有意であり，月別変化のパターンが品種ごとに異なることが分かった。AMMIモデルを用いた解析の結果，品種の月別変化のパターンをみると時期ごとに品種によって平均収量，糖度，硬度の特徴が異なることがわかった。このように，AMMIモデルを用いることで品種特性を理解すれば，月別変化パターンの違いをうまく利用して，効率的な育種が期待できる。

キーワード：相加主効果・相乗交互作用（AMMI）モデル，イチゴ，栄養繁殖性作物，収量，硬度，糖

### I. 緒 言

イチゴは従来の露地栽培では，5月上旬～6月下旬が収穫期であるが，日本ではほとんどのイチゴの品種が，12月に収穫できる促成作型の品種である。この作型は，生態特性の解明に基づいた電照技術の開発および農業用ビニールの普及によって昭和40年代から始まった（木村1974）。この作型が普及した背景は，消費者の需要があることと，11月～3月までの長期採りが可能であり農家の冬期間の貴重な収入源となること等が考えられる。しかし，イチゴは1株から長期間に栽培して収穫するため，

収穫時期によって収量や果実の品質が変化することが多い。品種ごとにこの変化のパターンが異なれば，その変化のパターン自体が重要な品種特性の一つとなる。すなわち，品種ごとに変化のパターンにより，時期ごとに作付け品種の順位付けが異なることになる。例えば，収穫期を通しての全体の収量や品質が優れている品種も各時期においては必ずしも優れているとは限らない。したがって，品種ごとにこのような変化パターンを的確に捉えることが重要である。さらに，その変化パターンを考慮に入れた交配組合せにより，効率的な新品種の育種が期待できる。

<sup>1)</sup> 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センター農業情報研究部

ここで、ある形質について品種と収穫月を主効果とする二元配置の分散分析モデルを考えると、その形質の変化パターンの違いは、これら効果の交互作用部分に反映される。統計遺伝学の分野において、交互作用の解析は、遺伝子型×環境交互作用について精力的に行われ、数々のモデルが提唱されている。そのうちの一つに相加主効果・相乗交互作用 (AMMI: Additive Main effect and Multiplicative Interaction) モデルがある (奥野 1950, Gauch and Zobel 1997)。

AMMI モデルは、遺伝子型および環境による主効果について通常の分散分析を行い、交互作用については遺伝子型×環境行列の主成分分析により、遺伝子型×環境交互作用を評価する方法である。AMMI モデルの利点のひとつは、遺伝子型×環境行列内に含まれる情報のパターンを視覚的に評価できることにある。特に、Gauch and Zobel (1997) によって提案された図示法は、環境の類型化や、ある環境における最良の遺伝子型の決定に有効である。この方法により、遺伝資源などの系統の様々な環境下における潜在的な能力を把握することが可能となる。AMMI モデルは、遺伝子型×環境交互作用以外の交互作用パターン解析においても有効と考えられるが、適用例はほとんどない。

イチゴは栄養繁殖性作物であるため、品種育成には一般に複数の組み合わせによる交配を行い、多数の実生集団を用いた選抜が行われている。栄養繁殖性作物の育種の重要なことは望ましい特性を多くもつ優秀な実生集団を作ることであり、いかに効率的にその遺伝子型を評価して選抜するかということである。実際の育種の現場においては、選抜のために統計解析を取り入れている場合もあるが、育種家の経験によることが多く、熟練と労力を必要とする。本研究では、イチゴ品種における重要形質について収穫期間を通じての変化パターンの客観的評価法の確立を明らかにすることを目的として行った。そのために、以下の視点からデータを解析した。(1) 品種間に収穫期ごとの変化パターンの違いがあるか。(2) 品種と収穫期に交互作用があった場合、AMMI モデルの適用が有効か。(3) AMMI モデルの適用は育種学的にどのような知見をもたらすのか。

なお、本研究は「新品種育成普及促進事業・野菜新品種育成および地域適応性検定試験 イチゴ新品種の育

成」(平成 6-16 年度) の中で実施したものである。

## II. 材料および方法

日本の代表的なイチゴ 9 品種 '愛ベリー'、'章姫'、'アンテール'、'さちのか'、'とちおとめ'、'とよのか'、'女峰'、'はるのか' および 'レッドパール' を供試した。各品種とも 2000 年夏に親株より採苗し、9 月 19 日にガラス温室内に 10 株 3 反復で定植した。収穫開始より毎週月、木曜日に 6g 以上の全果実を収穫し、収量 (個数、重さ)、硬度、糖度を調査した。硬度 (Kg) は収穫日において各品種 3 果実を供試し、直径 5mm の円筒形プランジャーの貫入硬度計 KM-1 (株式会社藤原製作所、東京) を用いて測定した。また、糖度は、硬度を測定した果実を潰して、糖度計 N-1 (株式会社アタゴ、東京) による Brix (%) 値を測定した。これらの各形質について、月別の 10 株あたりの収量、平均糖度、平均硬度を求め、品種と収穫月を要因とした二元配置の分散分析を行った。さらに、品種と収穫月の交互作用について相加主効果・相乗交互作用 (AMMI) モデルによる解析を行い、各品種の月別変化のパターン分類を行った。AMMI 解析は GEST (Ukai *et al.* 1996) のソフトウエアにより解析した。AMMI 解析による図の縦軸は遺伝子型交互作用第一主成分得点 (IPCA) を示す。

## III. 結 果

供試したイチゴの品種について二元配置の分散分析を行った結果、全形質において品種および収穫月の効果が 0.1% 水準で有意であった (Table 1)。すなわち、品種、収穫月によって収量、糖度、硬度が異なることが分かった。これらの交互作用も 0.1% 水準で有意であり、月別変化のパターンが品種ごとに異なることが分かった。AMMI 解析における第一主成分の寄与率は収量が 53.8%、糖度が 57.3% および硬度が 64.9% であった。また、収穫月の交互作用第一主成分得点 (IPCA) は Table 2 に示すとおりであった。これは絶対値が大きいほど、その月に有利であることを示す。すなわち、Fig. 1 においては縦軸正方向にあるほど、1 月～2 月に有利であることを意味する。次に、AMMI モデルを用いた解析の結果、品種の月

Table 1. Two-way ANOVA (F value) with average by month of yield, mean percent soluble solid (Brix %) and mean firmness (kg/  $\phi$  5mm) in strawberry cultivars

Factor	Degree of freedom	Yield		percent soluble solid	firmness
		Number	Weight		
Cultivar (G)	8	8.34***	3.89***	12.78***	56.82***
Month (M)	3	11.46***	10.96***	34.96***	38.86***
G $\times$ M	24	7.20***	5.75***	3.38***	2.83***

\*\*\*: significant at 0.1%.

Table 2. IPCA score for each month of yield, percent soluble solid and firmness

	December	January	February	March
Yield	-24.00	18.32	9.07	3.41
Percent soluble solid	1.33	-0.14	-0.45	-0.73
firmness	0.22	-0.00	-0.11	-0.11

別変化のパターンをみると平均収量は‘章姫’が最も高いが、収穫時期によって最大値を示す遺伝子型（以下、

勝者と呼ぶ）が異なっていた（Fig. 1）。例えば、‘さちのか’と‘レッドパール’はどちらも900g程度であったが‘さちのか’はFig. 1の縦軸、すなわち、第一主成分得点（IPCA）の正方向に位置することから、1月～2月の時期にかけて勝者となり、‘レッドパール’は縦軸で0に近いところに位置することから、3月頃に勝者となった。‘とちおとめ’は全収量が少ないものの縦軸負方向に位置することから、12月頃に勝者となった。また、糖度についても多くの品種が約11%の高糖度を示したが、月別に勝者がやや異なっていた（Fig. 2）。‘はるのか’は12月頃に勝者となり、‘とちおとめ’は2月～3月の時期に勝者となった。さらに、硬度は‘とちおとめ’が平均0.29kg/ $\phi$  5mmを示しており、全収穫期を通じて最も硬い、すなわち普遍的勝者（universal winner, Gauch and Zobel 1997）となった（Fig. 3）。

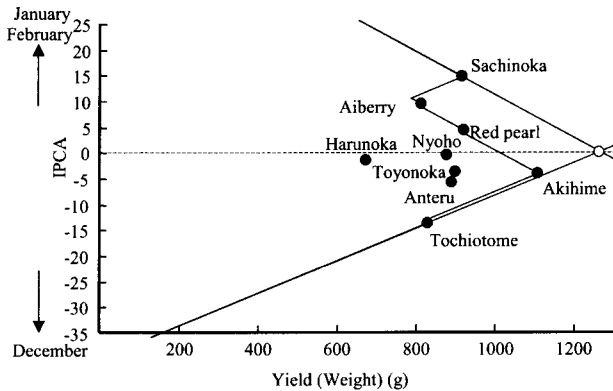


Fig. 1. AMMI model of yield by month for nine strawberry cultivars. IPCA is Cultivar  $\times$  month interaction principal component analysis axis. ● is average. ○ is universal winner.

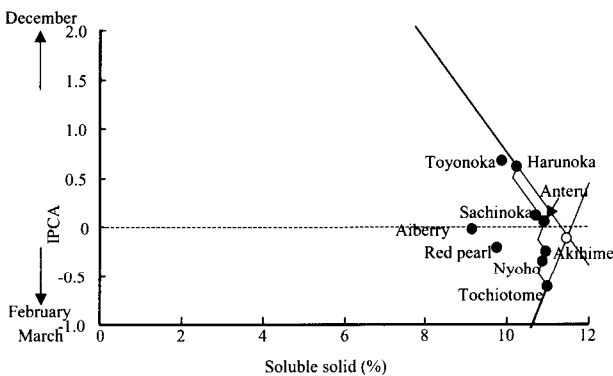


Fig. 2. AMMI model of percent soluble solid by month for nine strawberry cultivars. IPCA is Cultivar  $\times$  month interaction principal component analysis axis. ● is average. ○ is universal winner.

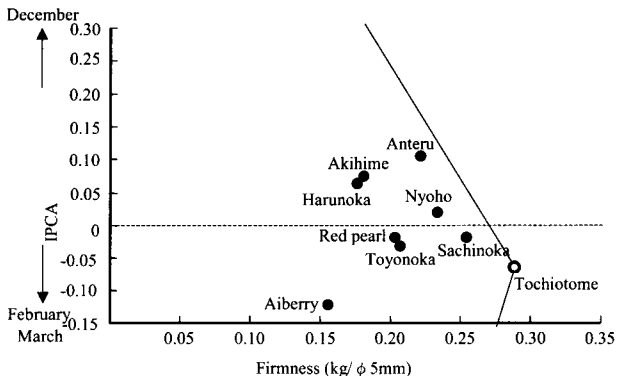


Fig. 3. AMMI model of firmness by month for nine strawberry cultivars. IPCA is Cultivar  $\times$  month interaction principal component analysis axis. ● is average. ○ is universal winner.



#### IV. 考 察

AMMI モデルは通常、遺伝子型×環境交互作用の解析を行うために用いられる。Zobel *et al.* (1988) はダイズ品種の収量と遺伝子型×環境交互作用解析において、分散分析、主成分分析、結合直線回帰、AMMI の4つのモデルについて有効性の比較を行い、AMMI が高度に有意な主成分が得られることを示している。また、Crossa *et al.* (1990) はトウモロコシの収量試験に対して AMMI モデルを用いた解析を行い、その有効性を示している。本研究では、長期間収穫するイチゴについて、AMMI モデルを品種間の月別の変化のパターンの違い、すなわち、品種×収穫月の交互作用に適用して、イチゴの重要形質である収量、糖度、硬度について、各品種の変化パターンの特性を視覚的に把握できるかどうかを検討した。

イチゴ9品種の収量、糖度、硬度を調査した結果、これらの月別変化のパターンに品種間での違いが見られた。このことは、これらの月別変化のパターンが遺伝的形質であることを示唆し、パターンの違いを利用した育種の可能性を意味している。例えば、平均収量が高いというだけでなく、ある時期の収量に目標を絞って交配親を決定するといったことが考えられる。

AMMI モデルを用いた解析の結果、イチゴの収量、糖度、硬度の3つの重要形質について月別変化のパターンを明らかにし、これまでにない視点から品種の特徴づけができた。すなわち、各形質について各収穫時期に有利な品種や、収穫期をとおして安定した品種などをグラフにより視覚的に判断できた。解析した AMMI モデルによると、平均収量は「章姫」が最も高いが、月別に勝者が異なっていたことから、これらの品種の特性を生かして時期別の多収品種の育成が可能であるものと考えられる。糖度についても多くの品種が高糖度を示したが、月別に勝者が異なっていたことから、これら収量や糖度に関する品種の特性を生かして良食味で多収品種の育成が可能であるものと考えられる。硬度は「とちおとめ」が普遍的勝者となったことから、これらの品種に基づいた遺伝子の集積よりも新たな遺伝資源を導入する方が高い硬度のイチゴを育種するには効率的であると考えられる。このように、AMMI モデルを用いて品種の特性を理解すれば、目的とする収穫時期に有利な品種を交配親として

供試するなど、今回明らかとなった変化パターンを生かした効率的な育種を行うことも可能であろう。

明らかにしたこれらの品種特性は、今後の効率的なイチゴ育種に貢献するものと考えられる。なお、実際の育種においては、今後、変化パターンの遺伝性も評価していく必要がある。

これまで、主に遺伝子型×環境交互作用解析に用いられてきた AMMI モデルが、月別変化パターンの解析においても有効であることが示された。イチゴと同じように長期にわたって収穫できる作物においても同じように AMMI モデルによる解析が有効であると思われる。この方法では、交互作用のパターンを視覚的に評価できるため、解析結果に基づいて具体的に育種戦略を立てるなどの場合にも最適な方法である。

#### 引用文献

- Crossa, J., P. N. Fox, W. H. Pfeiffer, S. Rajaram and H. G. Gauch (1991) AMMI adjustment for statistical analysis of an international wheat yield trial. *Theor. Appl. Genet.* 81: 27-37.
- Gauch, H. G. and R. W. Zobel (1997) Identifying mega-environments and targeting genotypes. *Crop Sci.* 37:311-326.
- 木村雅行 (1974) I. 起源と来歴, 野菜編 3 イチゴ, 農村漁村文化協会. 東京. pp 基 3- 基 10.
- 奥野忠一 (1950) 数ヶ所で実施した同種の生産力検定試験の成績を一括して分析する 1 つの方法について. *農業技術* 5: 10.
- Ukai, Y. H. Nesumi and Y. Takano (1996) GEST: a package of computer programs for the statistical analysis of genotype x environment interaction and stability. *Breed. Sci.* 46: 73-79.
- Zobel, R., M. J. Wright and H. G. Gauch (1988) Statistical analysis of a yield trial. *Agron. J.* 80: 388-393.

## AMMI Analysis of Monthly Fluctuation in Yield, Firmness and Sweetness on Japanese Strawberry Cultivars

Kazutoshi Yashiro, Ken-o Tomita and Hiroyoshi Iwata<sup>1)</sup>

*Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago, Iwama, Nishi-Ibaraki, Ibaraki 319-0292, Japan*

<sup>1)</sup> *Department of Information Science and Technology, National Agricultural Research Center, National Agricultural and Bio-oriented Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, 305-8666, Japan*

### Summary

A lot of seedlings by several crossing combinations are necessary for the breeding of vegetative propagable crops such as strawberries. Though the statistical methods for the selection have been studied, the selection depends on breeders' experiences in many cases. The possibilities of AMMI (Additive main effect and multiplicative interaction) model were investigated for the pattern analysis of economical traits of strawberry. Main traits investigated for nine strawberry cultivars were yield (the number of berries and weight), percent soluble solid and firmness. Two-way ANOVA by cultivar and month was calculated with average by month of these traits in ten individuals. The pattern of cultivar  $\times$  month interaction was evaluated by AMMI analysis. As a result, the effect of cultivar and month was significant at 0.1 %. The effect of cultivar  $\times$  month interaction was also significant at 0.1 %, indicating that each cultivar had its own pattern of monthly fluctuation. Though the average yield of 'Akihime' was the highest among nine cultivars, the graphical analysis based on AMMI model indicated that the winner, a cultivar which showed the highest yield, the monthly highest yield was different in each month. These patterns extracted by AMMI model characters will be practical for the selection of plant materials for breeding of high yield cultivar. Percent soluble solid also showed similar pattern. Regarding firmness, 'Tochiotome' was the winner over whole harvest periods, i.e., the universal winner. If more firmness is demanded, the use of new plant genetic resources may be more effective for the genetic improvement of firmness than the use of these cultivars. AMMI model facilitates visual understanding of the pattern of temporal change in the economical traits of strawberry, and the result of AMMI analysis will provide the quite useful information for the strawberry breeding.

Keyword: additive main effect and multiplicative interaction (AMMI) model, strawberry, vegetative propagation, yield, firmness, percent soluble solid

所 長 松 井 武 彦

編集委員長 石 井 卓 朗

編集委員 富 田 健 夫  
鈴 木 一 典  
池 上 隆 文

茨城県農業総合センター生物工学研究所研究報告 第7号  
平成16年3月20日発行

発行所 茨城県農業総合センター生物工学研究所  
〒319-0292 西茨城郡岩間町安居3165-1  
電話 0299-45-8330

印刷所 ワタヒキ印刷株式会社  
〒310-0012 水戸市城東1丁目5番21号  
電話 029-221-4381(代)

Bulletin  
of the  
Plant Biotechnology Institute  
Ibaraki Agricultural Center  
No.7 (2004)

Contents

Original Papers

- Trials for Selection of RAPD Markers Linked to the Floral Scent Trait of Wild  
Gladiolus Species. .... 1  
Yasumasa Takatsu, Kazunori Suzuki, Takeru Gonai and Masakazu Kasumi
- Production of Transgenic Melon Inserted Cucumber Green Mottle Mosaic Virus  
Coat Protein Gene. .... 11  
Misaki Kashima, Ayako Otomo, Hiroshi Ezura and Ken-o Tomita
- AMMI Analysis of Monthly Fluctuation in Yield, Firmness and Sweetness on  
Japanese Strawberry Cultivars. .... 17  
Kazutoshi Yashiro, Ken-o Tomita and Hiroyoshi Iwata

Plant Biotechnology Institute  
Ibaraki Agricultural Center  
Ago, Iwama, Nishi-Ibaraki, Ibaraki 319-0292, Japan