

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

2020年1月

田沢 純子

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

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
先端農業技術科学専攻  
博士（農学）学位論文

田沢 純子

## 略語

AFLP: amplified fragment length polymorphism

CAPS: cleaved amplified polymorphic sequence

DHAR: dehydroascorbate reductase

GGP: GDP-L-galactose phosphorylase

GWAS: genome-wide association study

HCT/HQT: hydroxycinnamoyl CoA shikimate/  
quinate hydroxycinnamoyl transferase

INB: index-number of browning

LAR: leucoanthocyanidin reductase

LD: linkage disequilibrium

LOD: logarithm of odds

PAL: phenylalanine ammonia lyase

PPO: polyphenol oxidase

QTL: quantitative trait loci

RAPD: random amplified polymorphic DNA

RFLP: restriction fragment length polymorphism

SCAR: sequence characterized amplified region

SNP: single nucleotide polymorphism

SSR: simple sequence repeat

## 目次

### 第 1 章

緒論	1
----	---

### 第 2 章

#### 果肉褐変性に関する QTL 解析

緒論	21
材料及び方法	24
結果	31
考察	38

### 第 3 章

#### 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

緒論	66
材料及び方法	69
結果	71
考察	75

### 第 4 章

#### GWAS による果肉褐変関連遺伝子領域の解析

緒論	91
材料及び方法	94
結果	97
考察	101



第 5 章	
総合考察	123
摘要	140
Summary	143
謝辞	146
引用文献	148
研究業績	174

## 第 1 章

### 緒論

#### 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](http://www.rosaceae.org)) や High-quality Disease Resistant Apples for Sustainable Agriculture (HiDRAS: [www.hidras.unimi.it](http://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、‘ゴールデンデリシャス’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 F<sub>2</sub> 世代の作出が困難なため、F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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)。Liebhard et al. (2003b)は*‘フィエスタ’* × *‘ディスカバリー’*のF<sub>1</sub>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 (Takos 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 (Liebhard et al., 2003a; Kenis et al., 2008; Kuniyama 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、

香気成分等の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。

## 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甚大であり (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 Gaillard, 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℃であり、70~80℃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気が高まっている。しかし、リンゴは切ってすぐ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。

### 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、ポリフェノール生合成経路上 (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 CoA shikimate* (*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、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*, *APO5*, *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「ゴールドデンデリシャス」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」×「マへ 7」(5 号(「印度」×「ゴールドデンデリシャス」)×「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、第 2 章において、‘あおり 27’を片親とする 2 つの F<sub>1</sub> 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、第 3 章において、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、第 4 章において、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、第 5 章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。

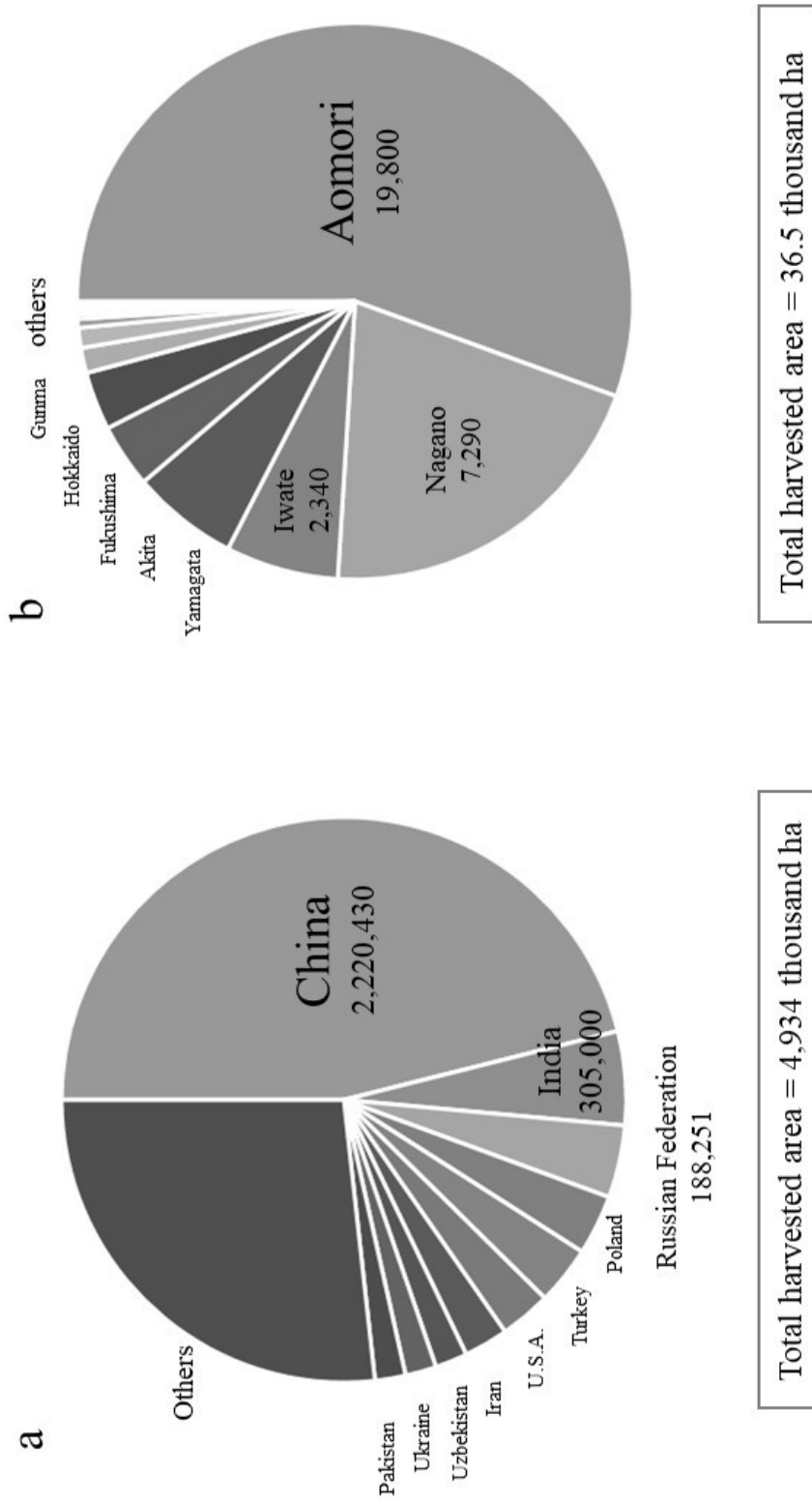
**Table 1-1.** Fruit characteristics of ‘Aori 27’ compared to ‘Fuji’ at Aomori<sup>a</sup>.

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

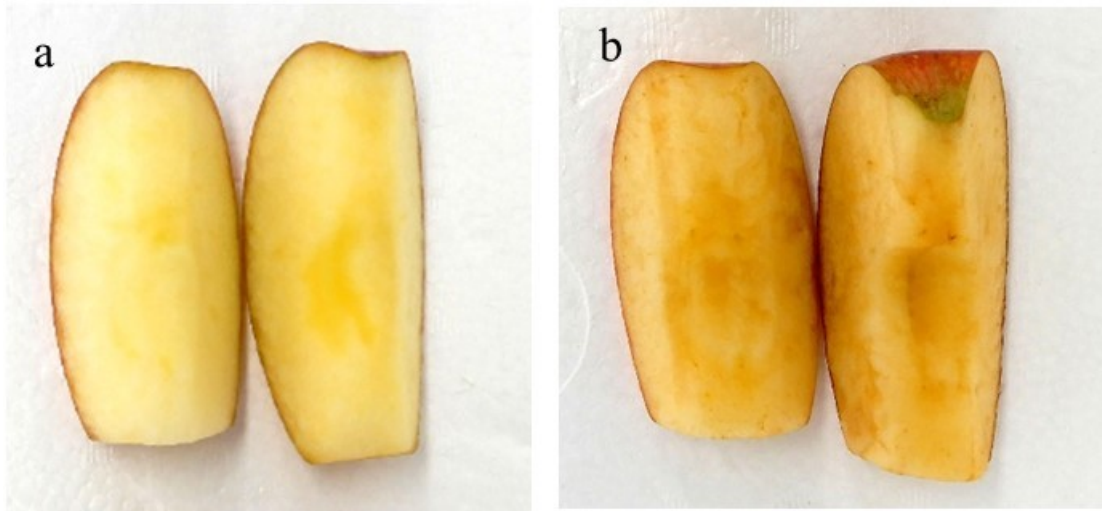
<sup>a</sup> Average of 2007 to 2017 using five fruits every year.

<sup>b</sup> Titratable acidity as malic acid.

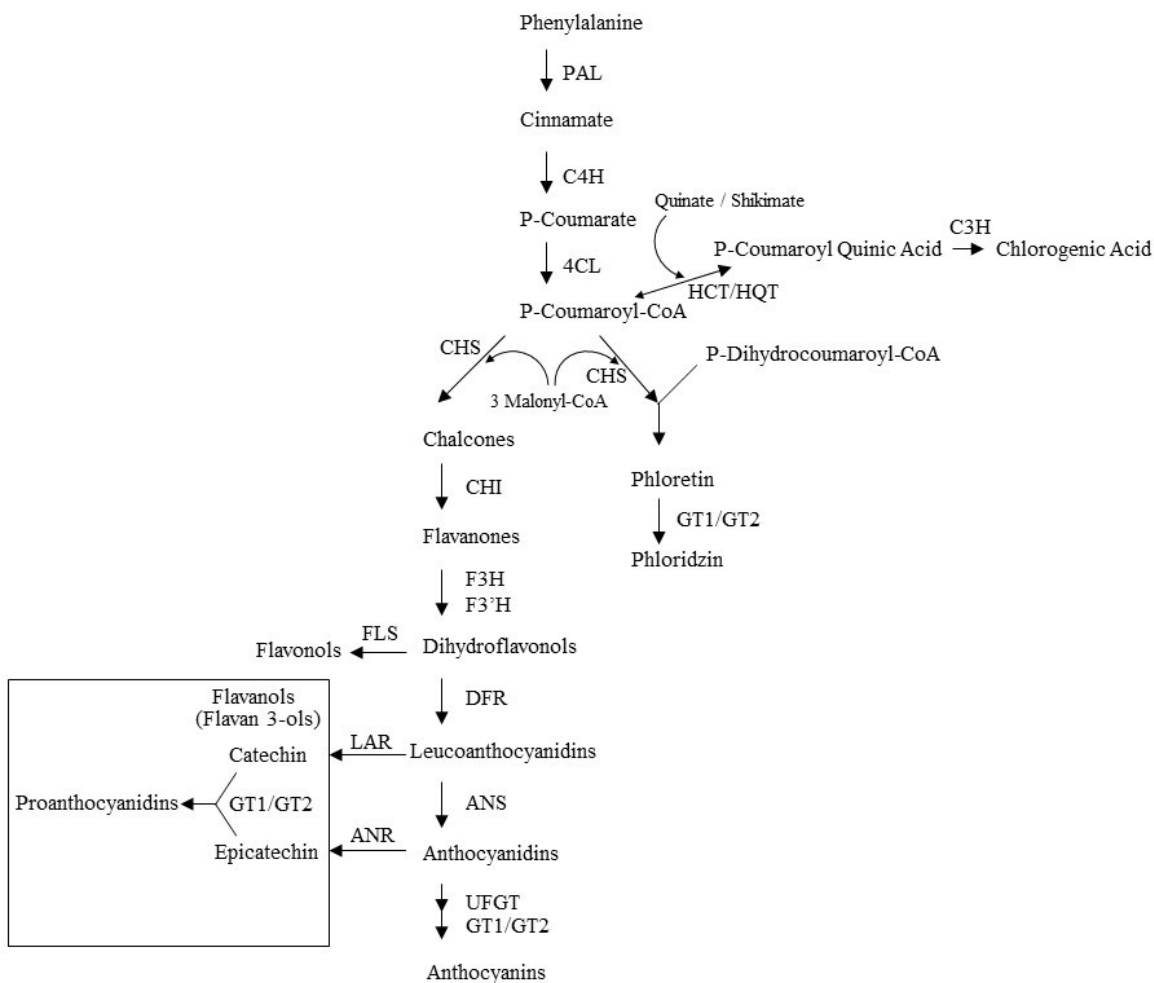




**Figure 1-1.** Harvested area (ha) of apple in the world (a; FAOSTAT 2017, <http://faostat.fao.org>) and in Japan (b; Statistics Department, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2018).



**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, flavanol 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.

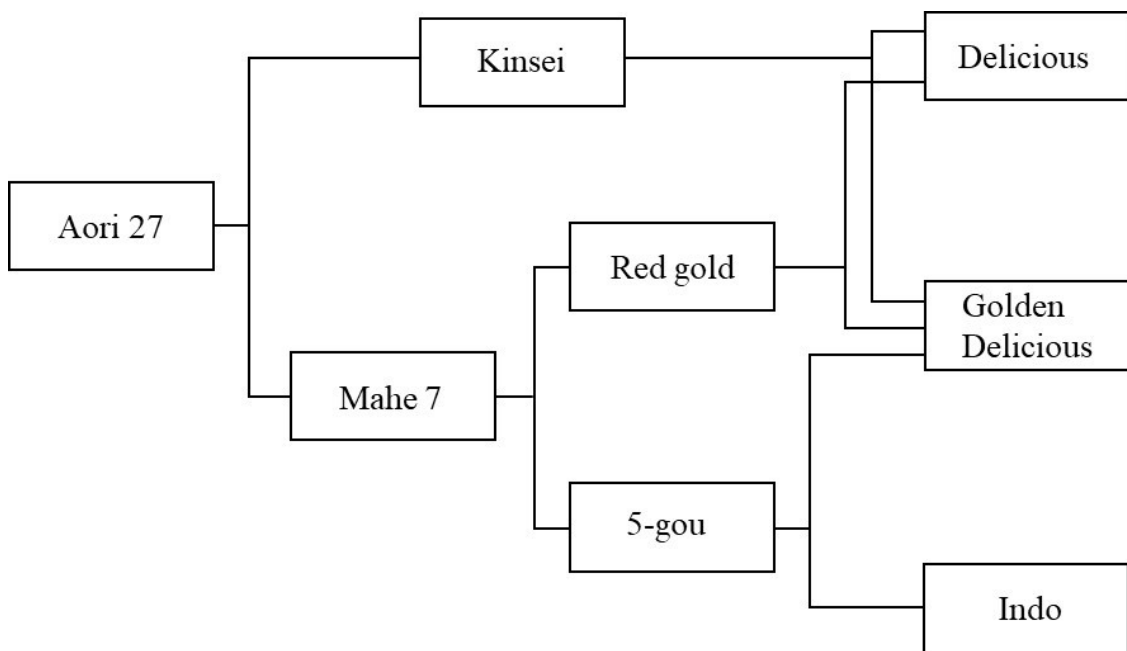
a



b



**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.

## 第 2 章

### 果肉褐変性に関する QTL 解析

#### 緒論

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、9、10、11、14、15、16 及び 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定と 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’ × ‘マへ 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希少な品種であり、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 F<sub>1</sub> 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。



## 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 F<sub>1</sub> 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

F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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、F<sub>1</sub> 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  $\Delta A_{400}$  値として算出して用いた ( $\Delta A_{400} = A_{400}$  (24 時間後) -  $A_{400}$  (0 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 A<sub>400</sub> (24 時間後) 値とした。A<sub>400</sub> (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、physcotron 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 Physcotron 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 $-20^{\circ}\text{C}$ 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  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $29,000 \times g$  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  $\mu\text{L}$ 、超純水 1000  $\mu\text{L}$ 、McIlvaine butter 700  $\mu\text{L}$ 、1 mM クロロゲン酸溶液 200  $\mu\text{L}$  とした。反応液はウォーターバスを用いて  $30^{\circ}\text{C}$  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。 $30^{\circ}\text{C}$ 、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スャーで絞り、果汁を濾紙で濾過したものを使用した。糖度 ( $^{\circ}$  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 ( $\Phi 11\text{mm}$ ) 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 ( $\text{cm}^2$ ) 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

F<sub>1</sub>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。F<sub>1</sub>集団のジェノタイピングには 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<sub>SSR1\_02</sub> 及び LAR<sub>SSR1\_11</sub>)、*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 Kuniyama 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; Kuniyama 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。

#### 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。

## 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 F<sub>1</sub> 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)。

## 2. F<sub>1</sub>-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、F<sub>1</sub>-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; Kuniyama 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 $LOD = 4.0 \sim 6.0$ 、‘あおり27’は $LOD = 3.0 \sim 5.0$ 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F<sub>1</sub>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<sub>SSR1\_11</sub>であった。そこで、LAR<sub>SSR1\_11</sub>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<sub>SSR1\_11</sub>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<sub>SSR1\_11</sub>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<sub>SSR1\_11</sub>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<sub>SSR1\_11</sub>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、 $\text{INB} < 1.5$ を示す個体は少なかったが、集団の形質分離はLAR<sub>SSR1\_11</sub>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<sub>SSR1\_11</sub>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 $\Delta A_{400}$ 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<sub>SSR1\_11</sub>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。

## 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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つたため、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‘ゴールデンデリシャス’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、F<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>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 *LARI* 周辺に検出され、*LARI* 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 とも一致した。これらのことから、第16連鎖群上部の *LARI* 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 *LARI* の両側に SSR マーカーを設計し (*LAR<sub>SSR1\_02</sub>* 及び *LAR<sub>SSR1\_11</sub>*)、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<sub>SSR1\_11</sub>* マーカーで最も高かったが、公開ゲノム情報 (Daccoed 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 *LARI* 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 カテキン に 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 (*LARI*) に座乗する。*LARI* 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 *LARI* 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](http://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して報告している。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 *LARI* 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F<sub>1</sub>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。

#### 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（‘ゴールドンデリシャス’）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。

**Table 2-1. Phenotypic traits used for the QTL analysis in the F<sub>1</sub> 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 ( $\Delta A_{400}$ )	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 F<sub>1</sub> progeny of F1-165 × ‘Aori 27’ and ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’**

Marker type	Marker designation	References	
Apple SSRs	AF, AI, AT, AU, CN, HI, U, Z, GD, MDAJ	Silfverberg-Dilworth et al. (2006)	
	CH, MS, COL	Liebhart et al. (2002)	
	CH-VI, CH-VIZ	Vnatzler et al. (2004)	
	LAR <sub>SSR</sub>	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 <sub>SSR</sub>	Present study (Table 2-3)	
	SAmS	Van Dyk et al. (2010)	
	U50187SSR	<a href="http://www.hidras.unimi.it/indexxx.php">http://www.hidras.unimi.it/indexxx.php</a>	
	Pear SSRs	EMPc	Fernández-Fernández et al. (2006)
		HGA, KA	Yanamoto et al. (2002c)
		IPPn	Inoue et al. (2007)
		NH	Yanamoto et al. (2002a, 2002b), Sawamura et al. (2004), AB302413-302421
NB		Yanamoto et al. (2002a), Sawamura et al. (2004), AB302423-302443	
TsuENH		Nishitani et al. (2009), AB621906-621908, AB853161-853256, Present study (Table 2-3)	
TsuGNH		Yanamoto et al. (2013), AB733186-733293, AB851450-851453, Present study (Table 2-3)	

**Table 2-3. Newly designed SSR markers**

SSR locus	Chr position <sup>a</sup>	Origin	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Motif	PCR product size (bp)
LAR <sub>ssr</sub> _l_01	chr16_3352356	apple	GTGGATGGGGGAGACTGTGA	CTCCACCTAAAAACGCCAAAA	(GAG) <sup>7</sup>	135
LAR <sub>ssr</sub> _l_02	chr16_3352925	apple	TGCCATGTTTATGGGATTGA	CGTTACATGGTGCATGAGG	(GA) <sup>9</sup>	248
LAR <sub>ssr</sub> _l_03	chr16_3408352	apple	GGTAGTCCCTTCTCCCTCGGC	TTAATGGCAGGTGCATCAGA	(AAT)(ATT) <sup>5</sup>	280
LAR <sub>ssr</sub> _l_04	chr16_3409136	apple	TGGATACAGGGAACCAAAACA	GCCCTTCCACTGCAAAATTA	(AT) <sup>15</sup>	239
LAR <sub>ssr</sub> _l_05	chr16_3410788	apple	GTTCGCCACCAITAAAGCG	TAGCAACAGCGAGTCTACG	(TTTATT) <sup>4</sup>	275
LAR <sub>ssr</sub> _l_06	chr16_3417038	apple	TCAGCTGAGCTTTGGAGGTT	TTTCCATGGTTTACTGGCG	(AAAAACC) <sup>4</sup>	209
LAR <sub>ssr</sub> _l_07	chr16_3420761	apple	CTTCATGCAACCATGCAGAT	CACCCTTTAAATTTCTTGGAGGA	(AC) <sup>9</sup>	202
LAR <sub>ssr</sub> _l_11	chr16_3424458	apple	GGGGATGGATCCCCTTCTTA	CCCTGGCTACCTCTCCTCCT	(AG) <sup>23</sup>	264
LAR <sub>ssr</sub> _l_12	chr16_3424863	apple	TATTTCCATGCCACCCCTTC	CGACATGAGACTGAAAGCCA	(TC) <sup>8</sup>	134
LAR <sub>ssr</sub> _l_13	chr16_3426877	apple	ACACGCATGGCTAGTTTGGT	GGTGCAGCTATCATCAA	(TA) <sup>35</sup>	250
LAR <sub>ssr</sub> _l_15	chr16_3429885	apple	CACCATAGACATCTGTACACTCG	TTTTGGTTCAATGGAGATGC	(ATT) <sup>11</sup>	270
LAR <sub>ssr</sub> _l_16	chr16_3428667	apple	CGGGATTCGGGAAAAATAAT	TGACTCGGTGCTGAGTTTTG	(AT) <sup>8</sup>	172
LAR <sub>ssr</sub> _l_18	chr16_3440092	apple	ACGACGGGTAAGGTGATGTC	CCCCTTTTCTACTGCCACAA	(AGA) <sup>5</sup>	255
LAR <sub>ssr</sub> _l_19	chr16_3442129	apple	GGCATCCTAAATCCCTTGGT	CAGGACCTGCAATTTGTACATC	(AT) <sup>9</sup>	225
LAR <sub>ssr</sub> _l_20	chr16_3445530	apple	TTGGCAITTCACAAAGTGC	TCCTGAGGACAAGTGAGGCT	(AC) <sup>9</sup>	171
Mdo.chr1.02	chr01_11388751	apple	GCTGGTTCCTCCACTGAAAGC	CTCCGACTCCCGACTCAAATA	(CT) <sup>10</sup>	225
Mdo.chr1.03	chr01_14186381	apple	CGAAGGAGGTTCCGACATA	TTAAAAGACGTTCCGACCTGGG	(AT) <sup>6</sup>	240
Mdo.chr1.07	chr01_15519912	apple	TCCTTTGAGGAAAAATGCACC	TCATCAAAATCCTCACCCACA	(TA) <sup>13</sup>	307
Mdo.chr1.12	chr01_28202027	apple	CCGTTAGTGCACCAAACTAAG	GTGGCTACGATTACTTCCC	(AT) <sup>11.5</sup>	338
Mdo.chr1.13	chr01_27442990	apple	TCATGGGGCTCTCCATAAAG	CAACACGGGAGCACAACTAC	(TA) <sup>13.5</sup>	347
Mdo.chr1.14	chr01_27769117	apple	GCTGAGCCTGTTCTTCCATC	CCCAATGTTCCGGATACCA	(CT) <sup>15.5</sup>	211
MEST055	chr13_2731944	apple	GAATGTGATTTGGCTTGCCT	GAAGACGACTAGCTGGAA	(AG) <sup>13</sup>	188
MEST087	chr2_3489378	apple	ACGGHTTCCGATTCCTCTT	CCCTAAAATCCCTCCCTCT	(AG) <sup>14</sup>	134
PPO <sub>ssr</sub> _chr10_04	chr10_38664835	apple	TCCTGTCCCTTTTCCATCTTG	TGCGTGTATCCTTCAAATCCT	(AT) <sup>13.5</sup>	269
PPO <sub>ssr</sub> _chr10_06	chr10_38692774	apple	TGACCCCAATACACATTCCA	AACCCGAAAACCTGTCAAAACCG	(AT) <sup>10.5</sup>	188
PPO <sub>ssr</sub> _chr10_14	chr10_38760327	apple	ACGTTGGGATGCTCAAAATC	TGATACGACCTTCGGCTCTC	(GA) <sup>8.5</sup>	110
PPO <sub>ssr</sub> _chr10_16	chr10_38774645	apple	AACITGGAGAAAGCATTTGGG	GAAACAACACCCCTACCCCT	(AG) <sup>9</sup>	165
TsuENH030		pear	TTATCGGATGATGCGTGTGAGC	ATCATAGCCCCCAATTACAGACA	(CT) <sup>12.5</sup>	187
TsuENH237		pear	AAAAGACGACGACGACGA	ATACACCACAACCTCCTCC	(TC) <sup>23.5</sup>	333
TsuGNH077		pear	CGGTGCATGCTCAGGTACTA	CCTCTCCTCTGGAGCTCTTT	(TAGC) <sup>6</sup>	337
TsuGNH231		pear	TCCAGGTTGAAAAGACGACC	GGGGTCTGTGGAATGTGAAT	(AACAA) <sup>4</sup>	346

<sup>a</sup> Apple Genome GDDH13 by Daccord et al. (2017)

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

Population	Genetic variance ( $\sigma_g^2$ )	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 F<sub>1</sub> progeny of F1-165 × ‘Aori 27’

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

<sup>a</sup> nd: no data

<sup>b</sup> Min: minimum value

<sup>c</sup> Max: Maximum value

**Table 2-6.** Distribution of fruit phenotypic traits of parents and F<sub>1</sub> progeny of ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’

Traits	2014						2015					
	Kotaro			Aori 27			F <sub>1</sub> progeny			F <sub>1</sub> progeny		
	Mean	Median	Max <sup>c</sup>	Min <sup>b</sup>	Max <sup>c</sup>	Mean	Min	Max	Mean	Median	Max	
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 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	4	0	0	4.3	1.7	1.7
Juice browning ( $\Delta A_{400}$ )	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 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21.9	52.9	6.5	82.3	25.2	32.7

<sup>a</sup> nd: no data

<sup>b</sup> Min: minimum value

<sup>c</sup> Max: Maximum value

**Table 2-7.** Details of the genetic linkage maps of F1-165 (F1) and 'Aori 27' (A1) obtained from F<sub>1</sub> individuals of F1-165 × 'Aori 27'.

Marker type	Linkage group																				Total		
	F1_1	F1_2-1	F1_2-2	F1_3	F1_4	F1_5	F1_6-1	F1_6-2	F1_6-3	F1_7	F1_8	F1_9	F1_10	F1_11	F1_12	F1_13	F1_14-1	F1_14-2	F1_15	F1_16		F1_17-1	F1_17-2
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	6	6	5	5	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	
	A1 <sup>a</sup> _1	A1_2	A1_3	A1_4-1	A1_4-2	A1_5-1	A1_5-2	A1_6-1	A1_6-2	A1_7	A1_8	A1_9	A1_10	A1_11	A1_12	A1_13	A1_14	A1_15	A1_16	A1_17-1		A1_17-2
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

<sup>a</sup> A1: linkage groups of Aori27 in F<sub>1</sub> population 165A27.

**Table 2-8.** Details of the genetic linkage maps of ‘Kotaro’ (Ko) and ‘Aori 27’ (A2) obtained from F<sub>1</sub> individuals of ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’.

Marker type	Linkage group																	Total		
	Ko_1	Ko_2	Ko_3-1	Ko_3-2	Ko_4	Ko_5-1	Ko_5-2	Ko_6	Ko_7	Ko_8	Ko_9	Ko_10	Ko_11	Ko_12	Ko_13	Ko_14	Ko_15		Ko_16	Ko_17
Apple SSRs	18	13	4	4	9	14	11	7	9	1	7	23	20	16	13	13	24	16	9	231
Pear SSRs	11	4	2	3	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	20	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	61.5	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 <sup>a</sup> _1	A2_2	A2_3	A2_4-1	A2_4-2	A2_5-1	A2_5-2	A2_6	A2_7	A2_8	A2_9	A2_10	A2_11	A2_12	A2_13	A2_14	A2_15-1		A2_15-2	A2_16	A2_17
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	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

<sup>a</sup> A2: linkage groups of Aori27 in F<sub>1</sub> population KA27.

**Table 2-9. QTLs for fruit phenotypic traits identified by Kruskal-Wallis and rMQM methods for F<sub>1</sub> progeny of F1-165 × ‘Aori 27’**

Traits	Kruskal-Wallis				rMQM <sup>a</sup>							
	Parent	Linkage group	Year	Position (cM)	K value	Significance <sup>b</sup>	Locus	Position (cM)	LOD <sup>c</sup>	Significance <sup>d</sup>	% var. <sup>e</sup>	Nearest marker
Index-number of browning (24-h)	F1-165	F1_16	2014	2	33.67	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	2	14.1	**	73.4	LAR <sub>SSR</sub> _1_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	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
	F1-165	F1_16	2014	2	32.5	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	2	9.88	**	60.5	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
Total polyphenol (mg/100 g FW)	F1-165	F1_16	2014	2	32.58	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	3	13.31	**	71.4	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
	F1-165	F1_8	2014	12.4	12.15	#	CH04g12					
PPO activity (units/g FW)	F1-165	F1_16	2014	2	30.53	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	2	8.27	**	41.3	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
	Aori 27	A1_4	2014	20.6	12.72	#	H108c04					
Harvest time (week)	Aori 27	A1_6	2014					41.6	2.83	*	23.4	IPPNI8
	Aori 27	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	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	2	4.44	**	38.5	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
Anthocyanin content in peel (µg/cm <sup>2</sup> )	Aori 27	A1_16	2015					5	3.31	*	30.4	LAR <sub>SSR</sub> _1_02
	Aori 27	A1_9	2015	25	20.81	##	CN444542 <sub>SSR</sub>					
	Aori 27	A1_9	2015	64.7	20.72	##	CH04c03	50.1	4.72	**	39.1	CH04c03

<sup>a</sup>rMQM: restricted multiple QTL mapping

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

<sup>c</sup>LOD: logarithm of the odd score

<sup>d</sup>Asterisks (\* and \*\*) represent significance level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively

<sup>e</sup>var.: variance

<sup>f</sup>A1: linkage groups of Aori27 in F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> progeny of ‘Kotaro’ × ‘Aori27’**

Traits	Kruskal-Wallis										rMQM <sup>a</sup>	
	Parent	Linkage group	Year	Position (cM)	K value	Significance <sup>b</sup>	Locus	Position (cM)	LOD <sup>c</sup>	Significance <sup>d</sup>	% var. <sup>e</sup>	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	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	7.5	7.23	**	32.1	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
	Kotaro	Ko_16	2015	7.5	20.61	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	4	5.9	**	40.7	LAR <sub>SSR</sub> _1_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 <sub>400</sub> )	Kotaro	Ko_16	2014	7.5	37.52	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	7	16.56	**	76.9	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
Total polyphenol (mg/100 g FW)	Kotaro	Ko_13	2014	26.7	15.41	##	SamsCO052555					
	Kotaro	Ko_16	2014	7.5	39.12	##	LAR <sub>SSR</sub> _1_11	7.5	7.41	**	34.2	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
PPO activity (units/g FW)	Kotaro	Ko_16	2014	15	13.9	#	CH05e04	14.2	6.27	**	41.4	CH05e04
	Kotaro	Ko_16	2014	33.6	14.86	#	TsuENH182-2					
Harvest time (week)	Kotaro	Ko_3	2014					0	3.37	*	20	NBI09a
	Kotaro	Ko_3	2015					0	3.81	**	20.9	NBI09a
	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 <sup>2</sup> )	Kotaro	Ko_16	2015					7.5	2.87	*	21.7	LAR <sub>SSR</sub> _1_11
	Aori27	A2/_9	2015	60.5	26.76	##	CN444542 <sub>SSR</sub>	60.5	7.79	**	48.5	CN444542 <sub>SSR</sub>

<sup>a</sup>rMQM: restricted multiple QTL mapping

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

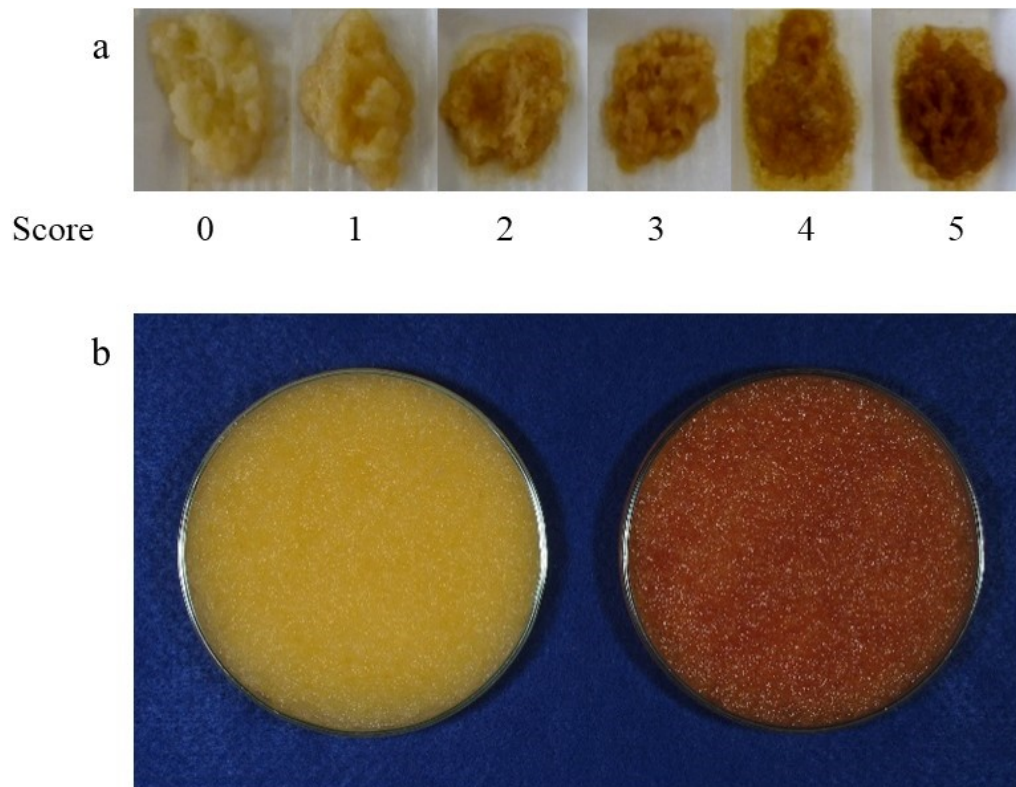
<sup>c</sup>LOD: logarithm of the odd score

<sup>d</sup>Asterisks (\* and \*\*) represent significance level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively

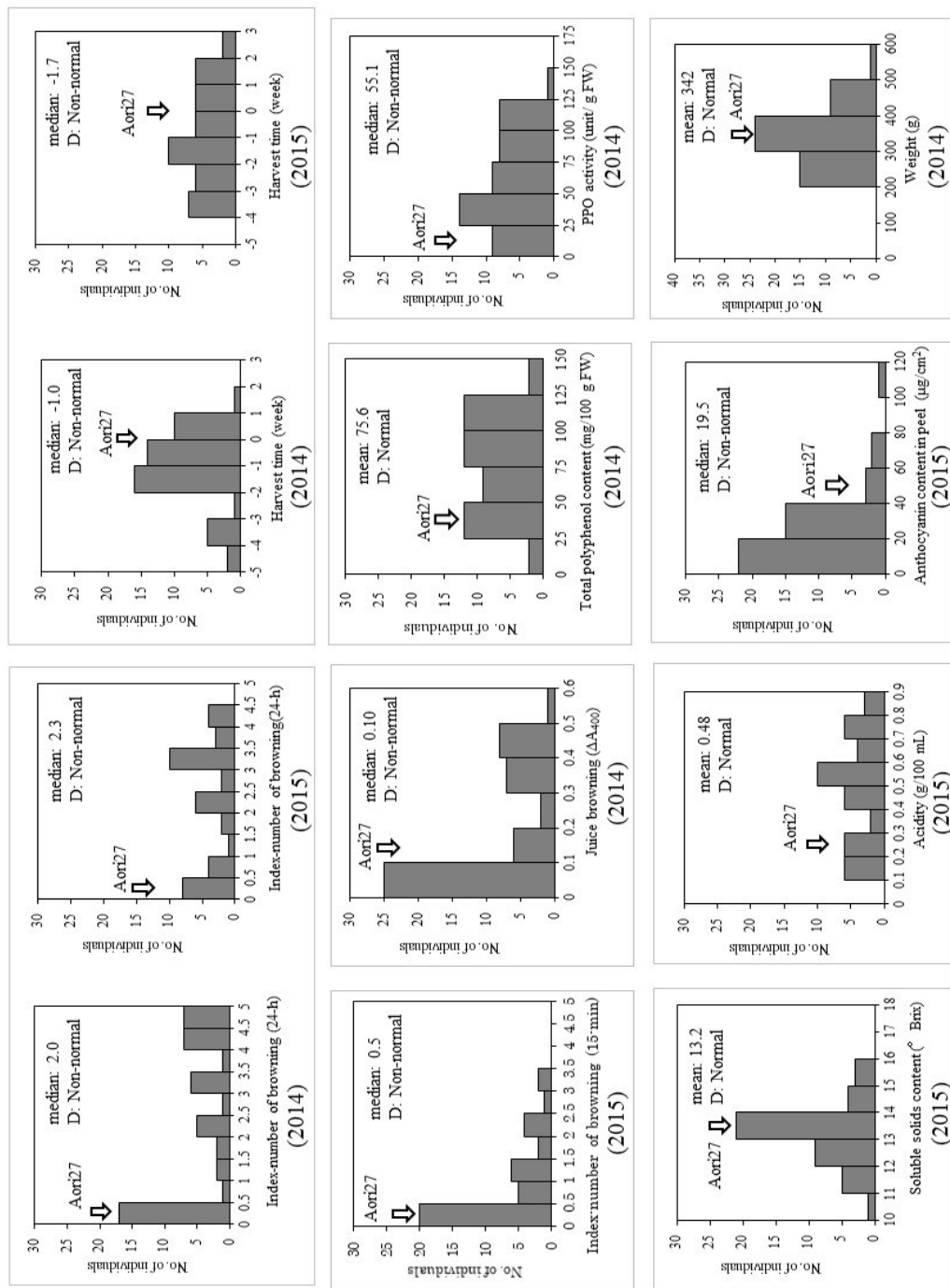
<sup>e</sup>var.: variance

<sup>f</sup>A2: linkage groups of Aori27 in F<sub>1</sub> 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

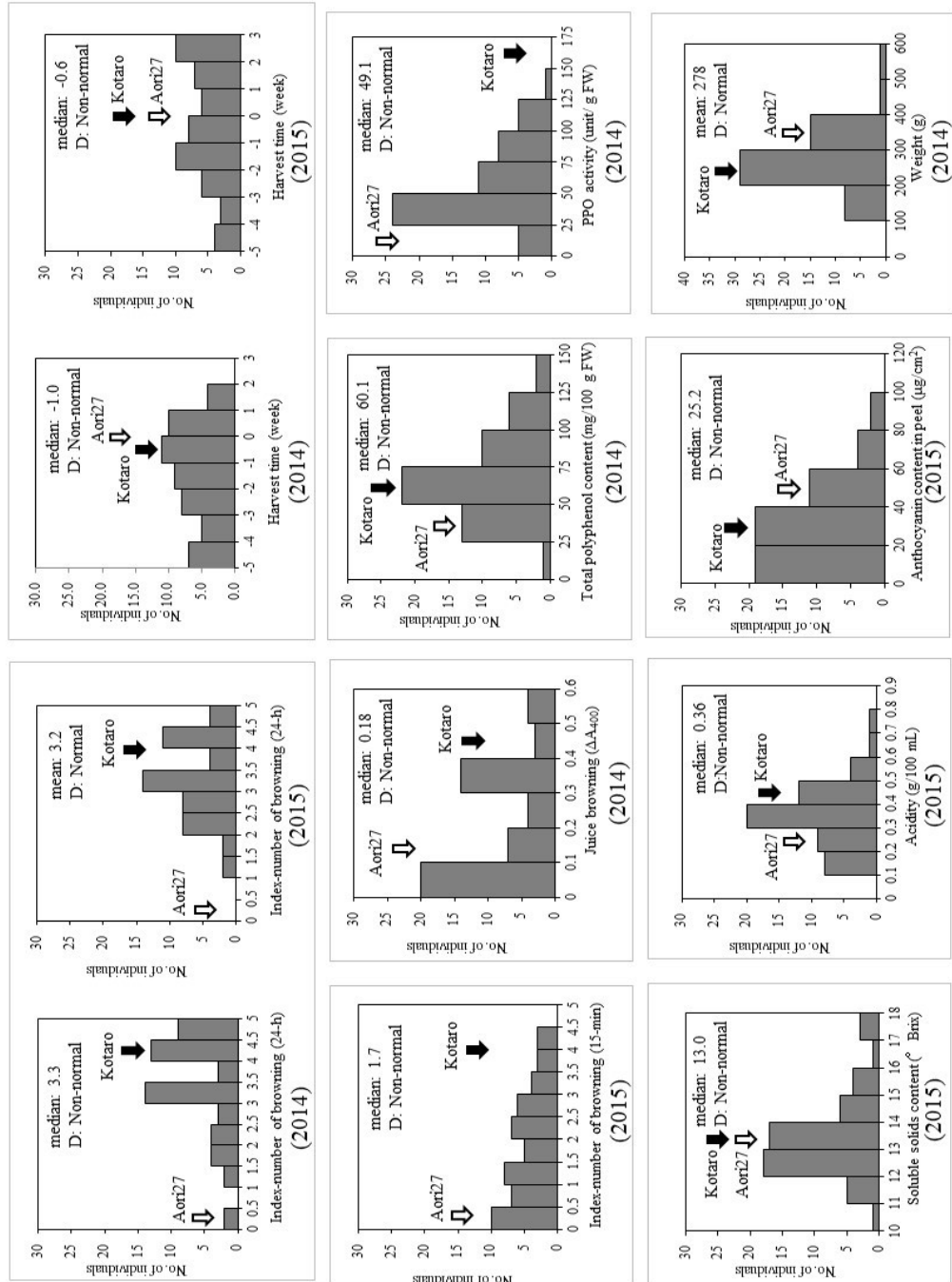


**Figure 2-1.** Scores for index-number of browning evaluated in this study. Visual representations of scores for INB are indicated as: 0, none; 1, slight; 2, mild; 3, moderate; 4, severe; 5, extremely severe (a). Examples of INB (24-h) of parental cultivars ‘Aori 27’ (score 0, b, left) and ‘Kotaro’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

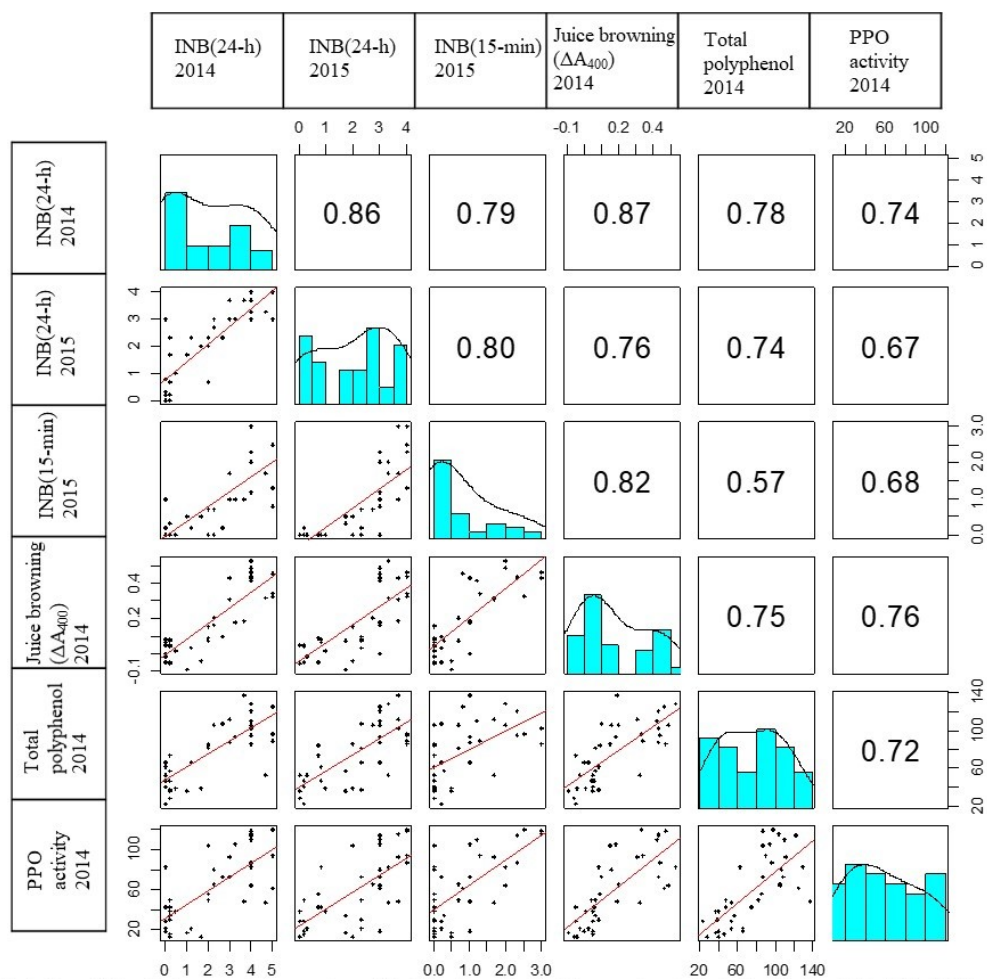


**Figure 2-2.** Frequency distribution of 12 fruit phenotypic traits in  $F_1$  individuals of  $F1-165 \times$  'Aori 27'. Normality of distribution examined by using the Shapiro-Wilk normality test are shown in each panel. "Mean value" are also shown for normal distributing traits and "Median value"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

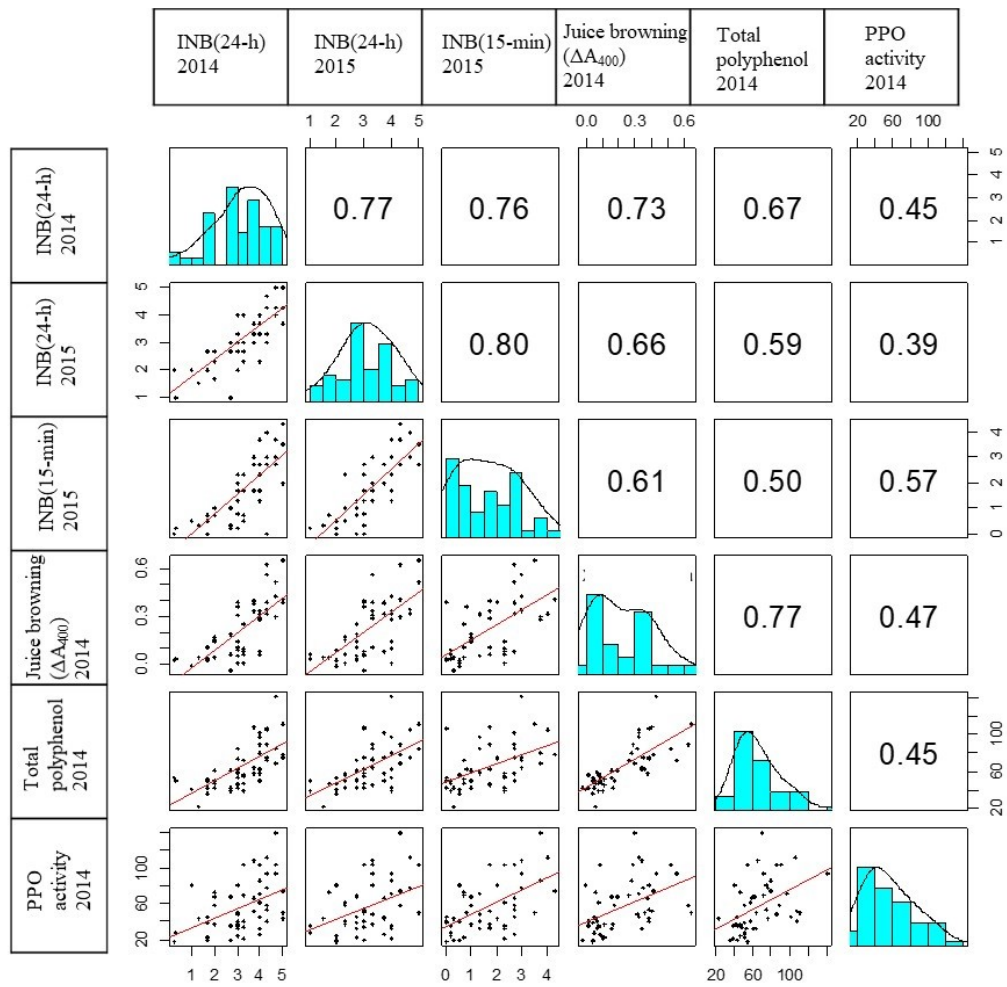




**Figure 2-3.** Frequency distribution of 12 fruit phenotypic traits in F<sub>1</sub> individuals of 'Kotaro' × 'Aori27'. Normality of distribution examined by using the Shapiro-Wilk normality test, "Mean value" are shown for Normal distributions and "Median value" are shown for Non-normal distributions each panel.



**Figure 2-4.** Correlation between six browning-related traits with flesh browning in  $F_1$  individuals of  $F1-165 \times$  '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.

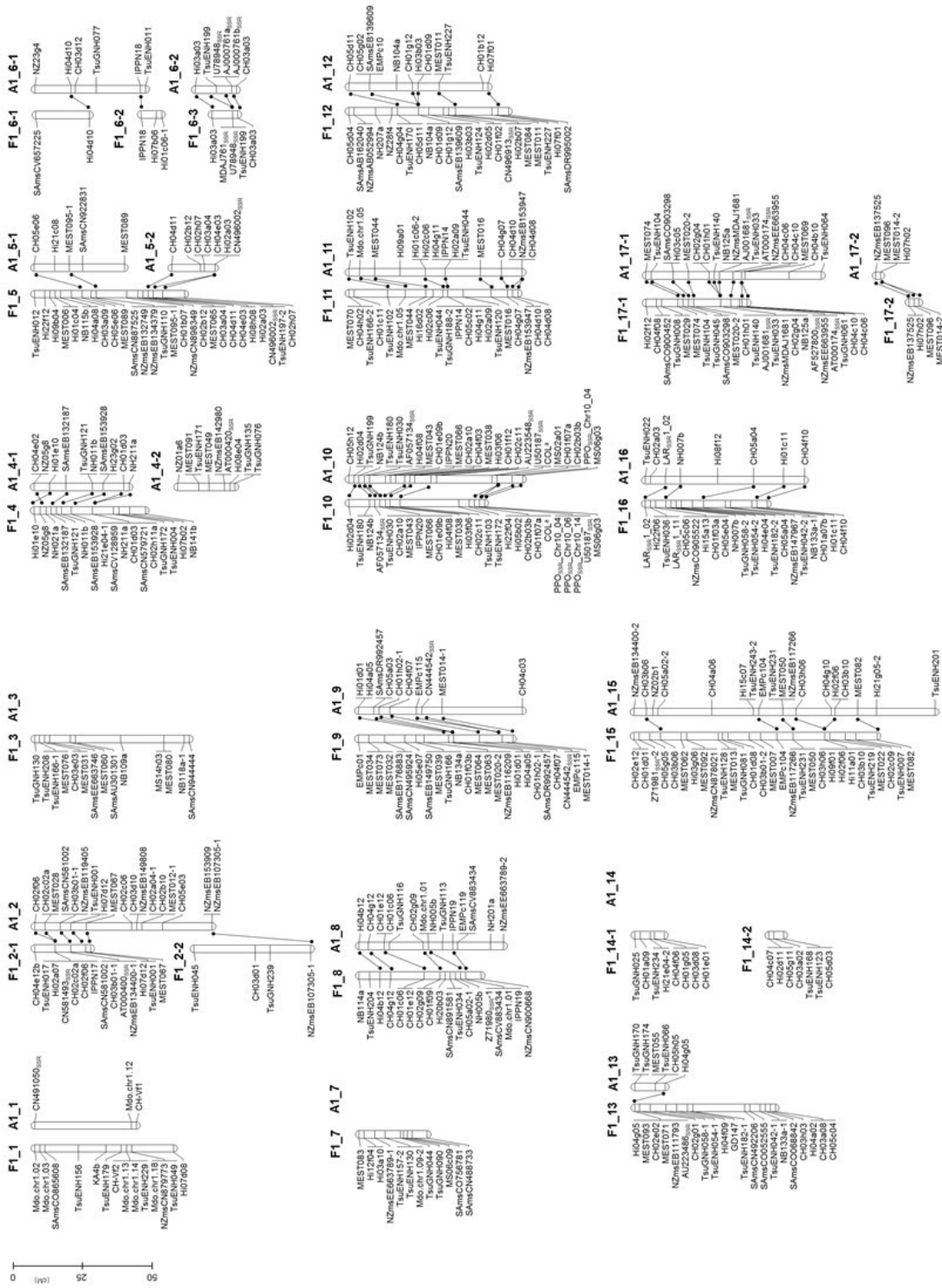
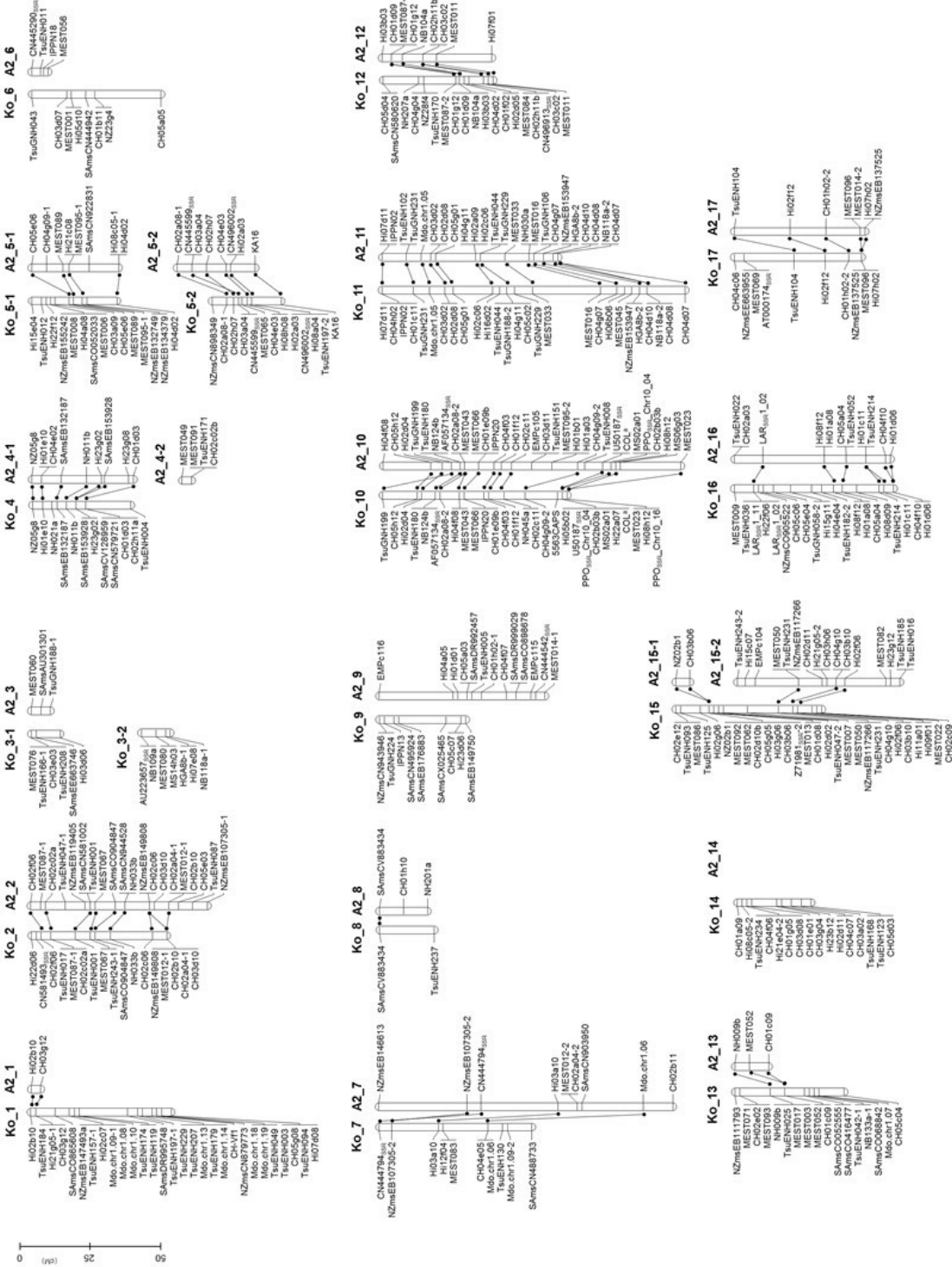
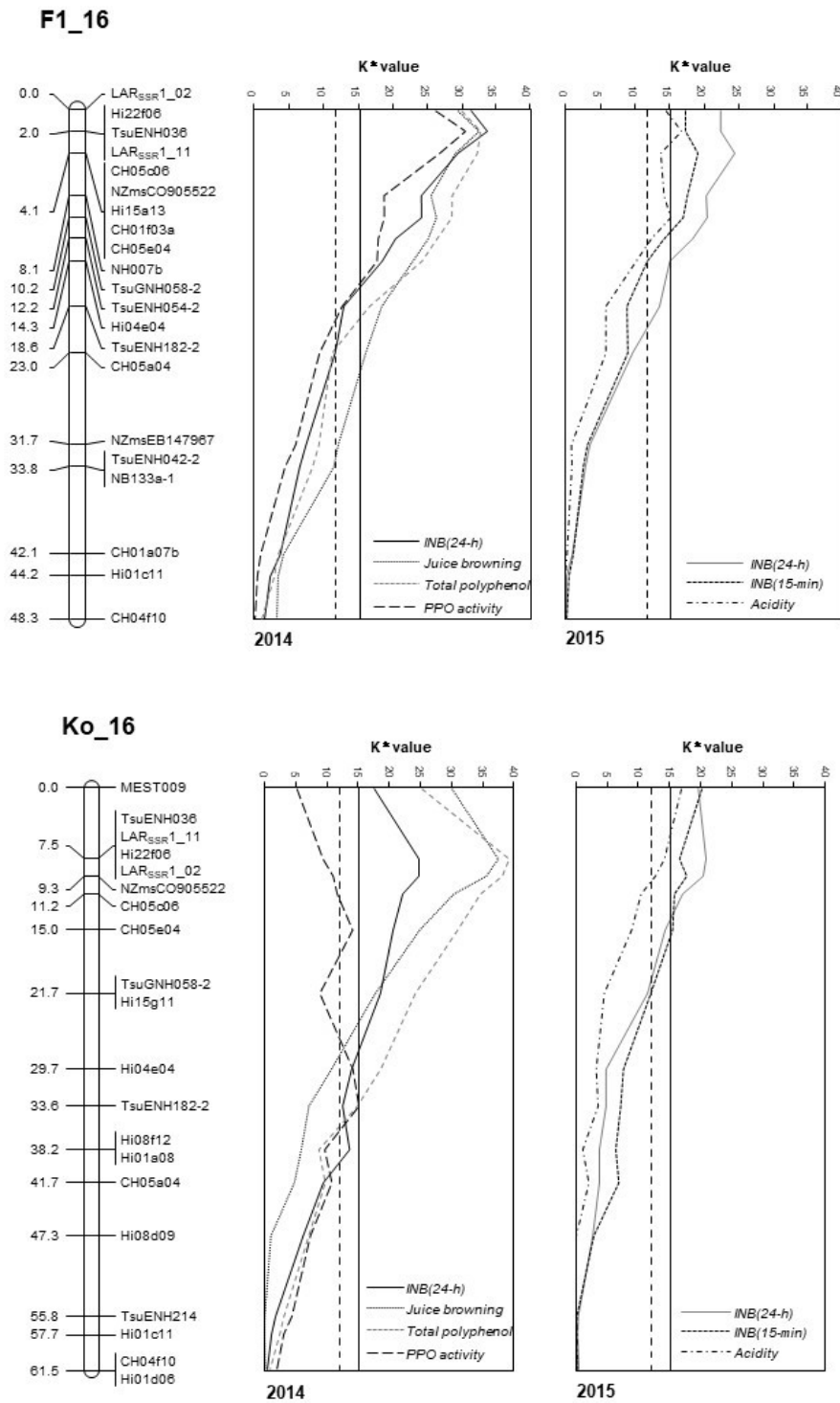


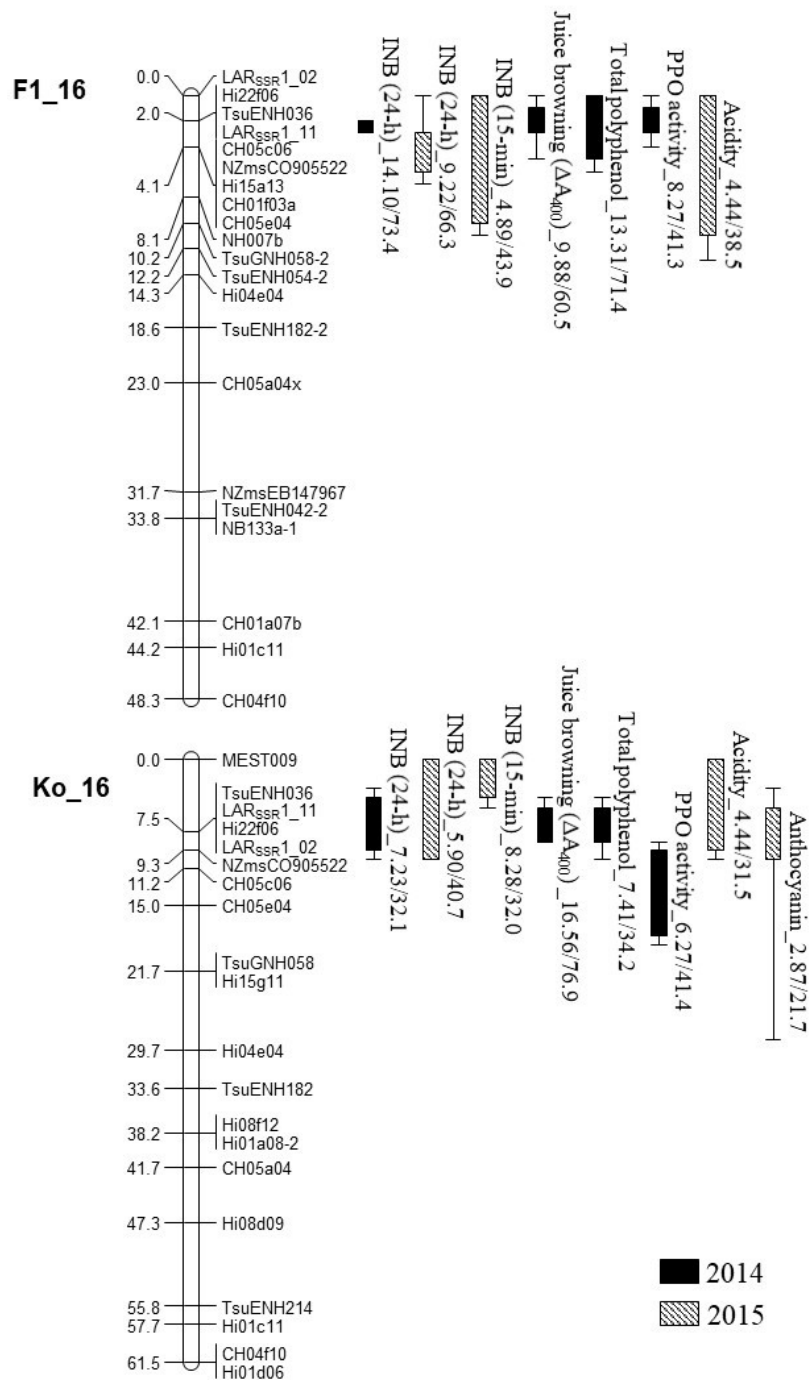
Figure 2-6. The genetic linkage maps of F1-165 and 'Aori 27' obtained from F<sub>1</sub> individuals of F1-165 × 'Aori 27'. Linkage groups (LGs) are designated as F1\_1 to F1\_17 for F1-165 and as A1\_1 to A1\_17 for 'Aori 27'.



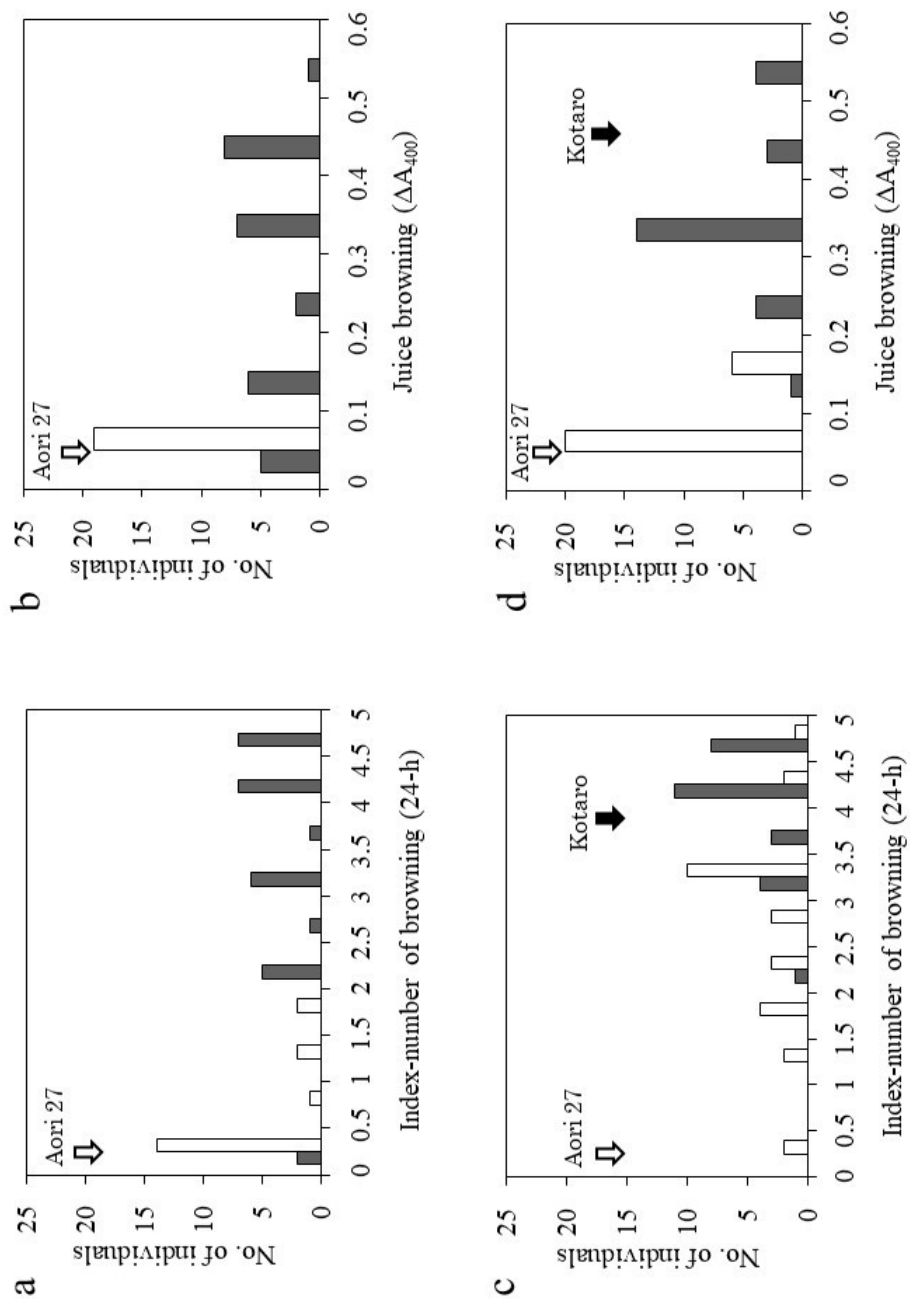
**Figure 2-7.** The genetic linkage maps of ‘Kotaro’ and ‘Aori 27’ obtained from F<sub>1</sub> individuals of ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’. Linkage groups (LGs) are designated as Ko\_1 to Ko\_17 for ‘Kotaro’ and as A2\_1 to A2\_17 for ‘Aori 27’.



**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.

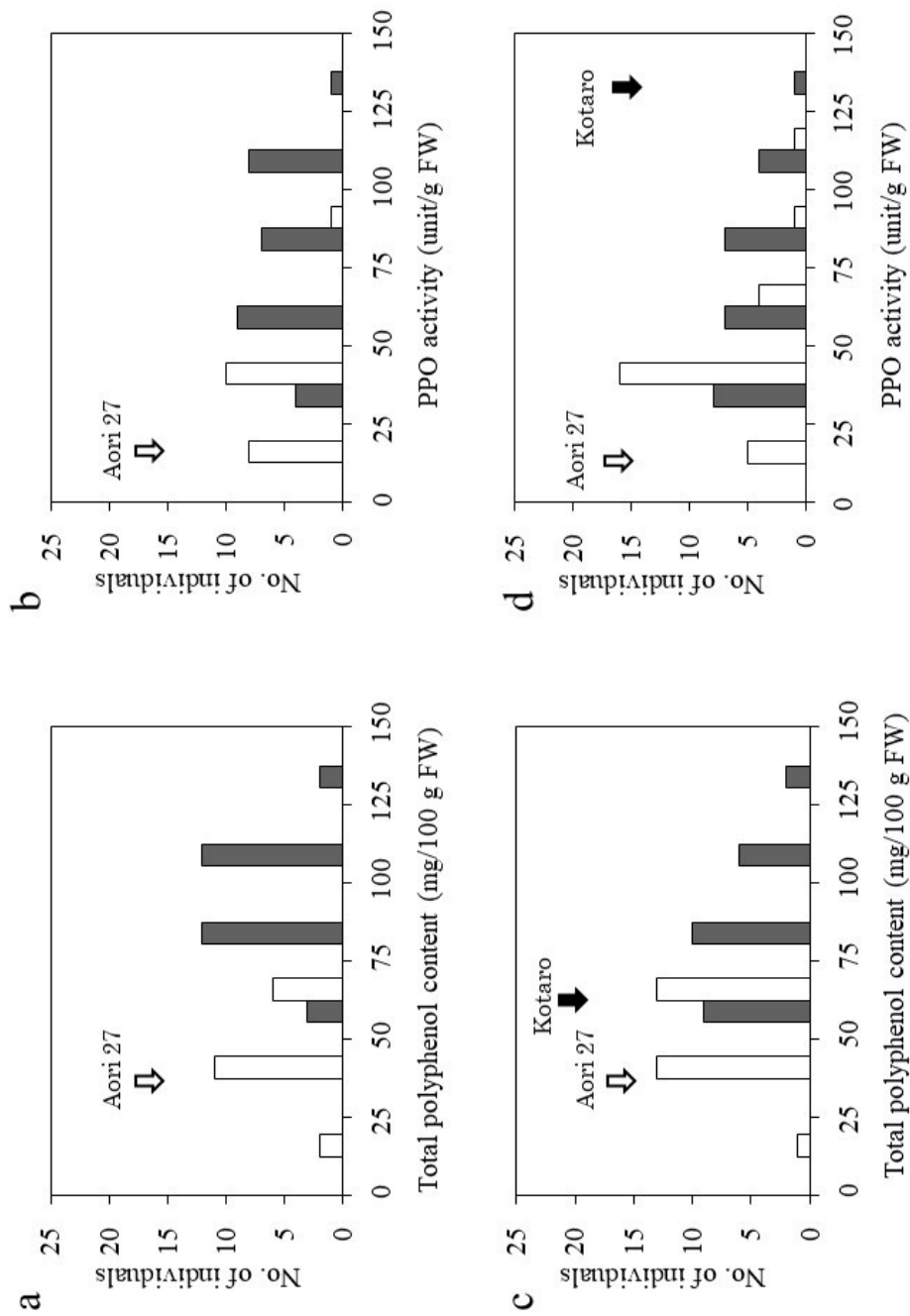


**Figure 2-9.** Significant QTLs for seven and eight fruit traits identified in linkage group 16 of F1-165 (LG F1\_16) and ‘Kotaro’ (LG Ko\_16), respectively. Marker loci and significant QTLs in rMQM analysis with significance level of  $P < 0.01$  are shown to the right of LGs. Boxes and range lines 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.

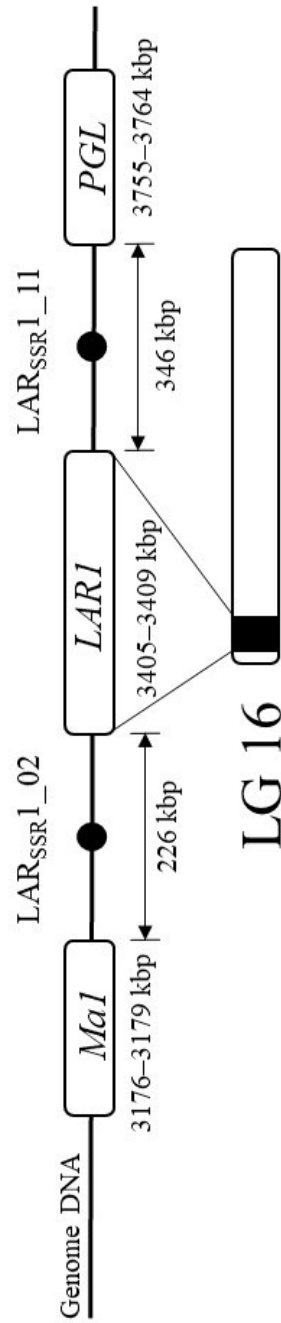


**Figure 2-10.** Frequency distribution of F<sub>1</sub> individuals of (a, b) F1-165 × ‘Aori 27’ and (c, d) ‘Kotaro’ × ‘Aori 27’ crosses. Two genotypes of LAR<sub>SSR</sub>1\_11 are indicated (■ 284 bp/280 bp, □ 284 bp/284 bp) for (a, c) index-number of browning (24-h) evaluated in 2014 and (b, d) juice browning ( $\Delta A_{400}$ ). Parental LAR<sub>SSR</sub>1\_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  $F_1$  individuals of (a, b)  $F1-165 \times 'Aori\ 27'$  and (c, d)  $'Kotaro' \times 'Aori\ 27'$  crosses. Two genotypes of  $LAR_{SSR11}$  are indicated ( $\blacksquare$  284 bp/280 bp,  $\square$  284 bp/284 bp) for (a, c) total polyphenol content and (b, d) PPO activity. Parental  $LAR_{SSR11}$  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 2-12.** Physical map of the top region in linkage group (LG) 16 in apple. Positional relationships between genes near the QTL and SSR markers (LAR<sub>SSR1\_02</sub> and LAR<sub>SSR1\_11</sub>) on LG16. *MaI* (malic acid), *LARI* (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 (Daccord et al., 2017).

## 第 3 章

### 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

#### 緒論

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（‘ゴールデンデリシャス’、‘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稻への導入が 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 *Mal* (Bai et al., 2012)

と致死遺伝子 *MdPHYLLLO* (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。

## 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F<sub>1</sub>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。

### 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、*LARI*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*Mal*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、*LARI*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<sub>1</sub>個体の*LARI*領域のハプロタイプの起源は、*LARI*の両側に設計された2種類のSSRマーカー（LAR<sub>SSR1\_02</sub>及びLAR<sub>SSR1\_11</sub>）を使用し、両親である‘あおり27’、F1-165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。

## 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、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<sub>1</sub>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<sub>SSR1\_11</sub>マーカー型”で表す。‘あおり27’は‘デリシャス’(D284)及び‘印度’(I284)、F1-165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<sub>1</sub>個体群(INB(24-h) < 0.5、No. 60、65、67、71、75、75、81及び84)はF1-165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<sub>1</sub>個体群(INB(24-h) ≥ 2.5、No. 68、74、79、88、92、96、100及び101)はF1-165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<sub>1</sub>個体は‘ゴールドデリシャス’、‘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‘ゴールドデリシャス’、‘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、F1-165から‘紅玉’由来のハプロタイプ（J280）を継承しているF<sub>1</sub>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‘ゴールドデリシャス’由来のハプロタイプ（Fig. 3-3、薄いカーキ、G284、F1-165と共通）を持っていた。KA27集団では、‘こうたろう’から‘ゴールドデリシャス’由来のハプロタイプ（G284）を継承しているF<sub>1</sub>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）≥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、‘ゴールドデリシャス’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でもつF<sub>1</sub>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。

## 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*MdPHYLLO*及び酸度の主動遺伝子である*Mal*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‘ゴールドデリシヤス’（薄いカーキ、G284）、‘デリシヤス’（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、‘ゴールドデリシヤス’及び‘デリシヤス’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F<sub>1</sub>集団の全個体についてLAR<sub>SSR1\_11</sub>及び*Mal*遺伝子型を調査し、形質との関連性を調べた（Fig. 3-4）。LAR<sub>SSR1\_11</sub>と*Mal*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、‘ゴールドデリシヤス’、‘デリシヤス’及び‘印度’由来の非褐変性アレル（LAR<sub>SSR1\_11</sub>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*Mal*遺伝子型が*Ma/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、*Ma/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。

## 考察

### 1. 非褐変性形質の起源

第2章の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 $INB(24-h) \geq 2.5$ 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’、‘マへ7’及び‘レッドゴールド’）やKA27集団のLAR<sub>SSR1\_11</sub>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かか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リンゴ 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*Mal*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*LARI*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*LARI*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と予測しており、非褐変性リンゴ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*Mal*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、非褐変性リンゴの育種では、酸味が強いリンゴ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。

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

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

<sup>a</sup>Registration / Publication year: Year of cultivar registration or appearance in commercial / test production.

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

Marker name	Position_GDDH13_genome <sup>a</sup>	Kunihisa_2014_map <sup>b</sup>	Founders									
			'Ralls Janet'		'Delicious'		'Jonathan'		'Golden Delicious'		'Indo'	
			INB <sup>c</sup> = 3.0	INB = 5.0	INB = 3.7	INB = 4.3	INB = 4.7					
CH02d10a	16 554,954	2.2	223	222	223	223	222	231	222	222	223	223
TsuENH205	16 720,270	4.4	347	345	347	347	345	347	345	345	347	347
TsuGNH053	16 842,899	5.4	166	170	166	166	170	166	170	170	166	166
TsuENH022	16 2,229,990	7.6	86	91	86	91	91	86	91	91	91	91
CH02a03	16 2,427,811	7.6	160	155	160	155	155	160	155	155	155	155
<i>Mal</i>	16 3,179,256		Ma	ma	Ma	ma	ma	Ma	ma	Ma	ma	ma
LAR1 01	16 3,352,448		173	164	173	164	164	173	164	173	-	164
LAR1 02	16 3,353,100		289	370	289	378	384	289	386	289	299	378
LAR1 03	16 3,408,452		300	297	300	297	297	300	297	300	297	297
LAR1 04	16 3,409,282		258	240	258	240	240	258	240	258	240	254
LAR1 05	16 3,410,880		298	300	298	300	300	298	300	298	300	299
LAR1 06	16 3,417,149		226	221	226	221	221	226	221	226	226	226
LAR1 07	16 3,420,638		220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
LAR1 11	16 3,424,514		284	280	284	280	280	284	280	284	282	284
LAR1 12	16 3,424,905		153	151	153	151	151	153	151	153	151	153
LAR1 13	16 3,426,986		268	215	268	215	215	268	215	268	215	268
LAR1 15	16 3,430,077		290	286	290	274	286	290	286	290	286	290
LAR1 16	16 3,438,576		188	191	188	191	191	188	191	188	184	188
LAR1 18	16 3,440,146		276	282	276	282	282	276	282	276	279	276
LAR1 19	16 3,442,183		246	262	246	260	262	246	262	246	250	246
LAR1 20	16 3,445,424		207	209	207	209	209	207	209	207	209	207
<i>MdPHYLLO</i>	16 3,762,382		WT	pgl	WT	WT	pgl	WT	pgl	WT	WT	WT
CH05e04	16 4,367,809	9.2	154	169	173	173	164	173	164	173	164	173
CH01f03a	16 4,512,186	7.3	229	229	229	229	218	229	218	229	217	229
Hi15g11	16 5,966,413	16.7	161	158	161	161	161	161	161	161	158	161
TsuENH054	16 6,209,697	17.5	200	203	200	203	191	203	191	203	203	203
Hi04e04	16 6,905,393	18.9	214	225	214	226	220	244	244	244	214	244
TsuENH182	16 9,636,461	23.4	282	267	286	280	282	284	284	280	267	284
Hi08f12	16 9,521,764	24.3	200	127	129	219	216	112	216	216	127	112
Hi01a08	16 9,521,568	24.3	164	90	91	183	180	-	180	180	90	-
TsuENH052	16 12,340,093	26.5	-	157	163	157	157	157	157	163	157	157
CH05a04	16 12,645,931	32.1	167	195	158	189	189	189	195	165	195	164
Hi08d09	16 13,957,450	37.3	182	182	182	185	182	185	182	182	182	182
NZmsEB147967	16 15,594,538	35.5	173	173	173	173	173	173	173	187	173	173
Hi02b10	0	37.3	-	-	228	224	226	224	-	-	-	226
TsuENH042	13 17,703,361	40.6	164	164	113	164	155	164	164	113	164	155
TsuENH214	16 25,166,944	45.5	220	220	201	222	201	222	202	220	220	220
Hi01c11	16 25,258,361	45.1	145	145	-	149	-	149	176	141	145	145
CH04f10	16 33,600,024	43.2	253	253	251	201	238	317	195	195	253	317

The 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.

<sup>a</sup>Position\_GDDH13\_genome: marker order according to the GDDH13 ('Golden Delicious' doubled haploid #13)

<sup>b</sup>Kunihisa\_2015\_map: marker order according to the reported linkage map (Kunihisa et al. 2014)

<sup>c</sup>INB: Index-number of browning (24-h) evaluated in 2014.

<sup>d</sup> -: no data



(continued)

Marker name	Position_GDDH 13 _genome <sup>a</sup>	Kunihisa _2014 _map <sup>b</sup>	Descendant											
			'Sekaiichi'		'Haruka'		'Megumi'		'Fuji'		'Iwakami'		'Himekami'	
			INB = 2.3		INB = 3.0		INB = 3.0		INB = 4.0		INB = 5.0		INB = 4.7	
			'Delicious'	'Golden Delicious'	'Golden Delicious'	'Delicious'	'Ralls Janet'	'Jonathan'	'Ralls Janet'	'Delicious'	'Fuji'	'Jonathan'	'Fuji'	'Jonathan'
CH02d10a	16 554,954	2.2	223	222	222	223	222	231	222	223	223	222	223	222
TsuENH205	16 720,270	4.4	347	345	345	347	345	347	345	347	347	345	347	345
TsuGNH053	16 842,899	5.4	166	170	170	166	170	166	170	166	166	170	166	170
TsuENH022	16 2,229,990	7.6	91	91	91	91	91	86	91	86	86	91	86	91
CH02a03	16 2,427,811	7.6	155	155	155	155	155	160	155	160	160	155	160	155
<i>Mal</i>	16 3,179,256		ma	Ma	Ma	ma	ma	Ma	ma	Ma	Ma	ma	Ma	ma
LARI 01	16 3,352,448		164	173	173	164	164	173	164	173	173	164	173	164
LARI 02	16 3,353,100		378	289	289	378	370	289	370	289	289	384	289	384
LARI 03	16 3,408,452		297	300	300	297	297	300	297	300	300	297	300	297
LARI 04	16 3,409,282		240	258	258	240	240	258	240	258	258	240	258	240
LARI 05	16 3,410,880		300	298	298	300	300	298	300	298	298	300	298	300
LARI 06	16 3,417,149		221	226	226	221	221	226	221	226	226	221	226	221
LARI 07	16 3,420,638		220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
LARI 11	16 3,424,514		280	284	284	280	280	284	280	284	284	280	284	280
LARI 12	16 3,424,905		151	153	153	151	151	153	151	153	153	151	153	151
LARI 13	16 3,426,986		215	268	268	215	215	268	215	268	268	215	268	215
LARI 15	16 3,430,077		274	290	290	274	286	290	286	290	290	286	290	286
LARI 16	16 3,438,576		191	188	188	191	191	188	191	188	188	191	188	191
LARI 18	16 3,440,146		282	276	276	282	282	276	282	276	276	282	276	282
LARI 19	16 3,442,183		260	246	246	260	262	246	262	246	246	262	246	262
LARI 20	16 3,445,424		209	207	207	209	209	207	209	207	207	209	207	209
<i>MdPHYLLLO</i>	16 3,762,382		WT	WT	WT	WT	pgl	WT	pgl	WT	WT	pgl	WT	pgl
CH05e04	16 4,367,809	9.2	173	173	173	173	169	164	169	173	173	164	173	164
CH01f03a	16 4,512,186	7.3	229	229	229	229	229	218	229	229	229	218	229	218
Hi15g11	16 5,966,413	16.7	161	161	161	161	158	161	158	161	161	161	161	161
TsuENH054	16 6,209,697	17.5	203	203	203	203	203	191	203	200	200	191	200	191
Hi04e04	16 6,905,393	18.9	214	244	244	226	225	220	225	214	214	220	214	220
TsuENH182	16 9,636,461	23.4	286	280	280	280	267	282	267	280	280	282	280	282
Hi08f12	16 9,521,764	24.3	129	216	216	219	127	216	127	219	219	216	219	216
Hi01a08	16 9,521,568	24.3	91	180	180	183	90	180	90	183	183	180	183	180
TsuENH052	16 12,340,093	26.5	163	163	163	157	–	157	157	157	157	157	157	157
CH05a04	16 12,645,931	32.1	158	165	165	189	167	189	195	189	189	189	189	189
Hi08d09	16 13,957,450	37.3	182	182	182	185	182	182	182	185	185	182	185	182
NZmsEB147967	16 15,594,538	35.5	173	173	187	173	173	173	173	173	173	173	173	173
Hi02b10	0	37.3	228	–	–	224	–	226	–	224	224	226	224	226
TsuENH042	13 17,703,361	40.6	113	164	113	164	164	155	164	164	164	155	164	155
TsuENH214	16 25,166,944	45.5	201	202	220	222	220	201	220	222	222	201	222	201
Hi01c11	16 25,258,361	45.1	–	176	141	149	145	–	145	149	149	–	149	–
CH04f10	16 33,600,024	43.2	251	195	195	201	253	238	253	201	201	238	253	238

(continued)

Marker name	Position_GDDH 13 _genome <sup>a</sup>	Kunihisa _2014 _map <sup>b</sup>	Descendant											
			'T sugaru'		'Golden Melon'		'Toko'		'Orin'		'Redgold'		'Kinsei'	
			INB = 2.0		INB = 4.0		INB = 3.0		INB = 5.0		INB = 4.0		INB = 3.3	
			'Golden Delicious'	'Jonathan'	'Golden Delicious'	'Indo'	'Golden Delicious'	'Indo'	'Golden Delicious'	'Indo'	'Golden Delicious'	'Richared Delicious'	'Golden Delicious'	'Delicious'
CH02d10a	16 554,954	2.2	222	222	222	223	222	223	222	223	222	223	222	223
TsuENH205	16 720,270	4.4	345	345	345	347	345	347	345	347	345	347	345	347
TsuGNH053	16 842,899	5.4	170	170	170	166	170	166	170	166	170	166	170	166
TsuENH022	16 2,229,990	7.6	91	91	91	91	91	91	91	91	91	86	91	86
CH02a03	16 2,427,811	7.6	155	155	155	155	155	155	155	155	155	160	155	160
<i>Mal</i>	16 3,179,256		Ma	ma	ma	ma	Ma	ma	Ma	ma	Ma	Ma	Ma	Ma
LAR1 01	16 3,352,448		173	164	164	164	173	164	173	–	173	173	173	173
LAR1 02	16 3,353,100		289	384	386	378	289	378	289	299	289	289	289	289
LAR1 03	16 3,408,452		300	297	297	297	300	297	300	297	300	300	300	300
LAR1 04	16 3,409,282		258	240	240	254	258	254	258	240	258	258	258	258
LAR1 05	16 3,410,880		298	300	300	299	298	299	298	300	298	298	298	298
LAR1 06	16 3,417,149		226	221	221	226	226	226	226	226	226	226	226	226
LAR1 07	16 3,420,638		220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
LAR1 11	16 3,424,514		284	280	280	284	284	284	284	282	284	284	284	284
LAR1 12	16 3,424,905		153	151	151	153	153	153	153	151	153	153	153	153
LAR1 13	16 3,426,986		268	215	215	268	268	268	268	215	268	268	268	268
LAR1 15	16 3,430,077		290	286	286	290	290	290	290	286	290	290	290	290
LAR1 16	16 3,438,576		188	191	191	188	188	188	188	184	188	188	188	188
LAR1 18	16 3,440,146		276	282	282	276	276	276	276	279	276	276	276	276
LAR1 19	16 3,442,183		246	262	262	246	246	246	246	250	246	246	246	246
LAR1 20	16 3,445,424		207	209	209	207	207	207	207	209	207	207	207	207
<i>MdPHYLLO</i>	16 3,762,382		WT	pgl	pgl	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
CH05e04	16 4,367,809	9.2	173	164	164	173	173	173	173	173	173	173	173	173
CH01f03a	16 4,512,186	7.3	229	218	218	229	229	229	229	229	229	229	229	229
Hi15g11	16 5,966,413	16.7	161	161	161	161	161	158	161	161	161	161	161	161
TsuENH054	16 6,209,697	17.5	203	191	191	203	203	203	203	203	203	200	203	200
Hi04e04	16 6,905,393	18.9	244	220	244	244	244	214	244	244	244	214	244	214
TsuENH182	16 9,636,461	23.4	280	282	284	284	280	267	280	284	284	286	284	286
Hi08f12	16 9,521,764	24.3	216	216	216	112	216	127	216	112	216	129	216	129
Hi01a08	16 9,521,568	24.3	180	180	180	–	180	90	180	–	180	91	180	91
TsuENH052	16 12,340,093	26.5	163	157	157	157	163	157	163	157	157	163	157	163
CH05a04	16 12,645,931	32.1	165	189	195	164	165	195	165	164	195	158	195	158
Hi08d09	16 13,957,450	37.3	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182
NZmsEB147967	16 15,594,538	35.5	187	173	173	173	187	173	173	173	173	173	173	173
Hi02b10	0	37.3	–	226	–	226	–	–	–	226	–	228	–	228
TsuENH042	13 17,703,361	40.6	113	164	164	155	113	164	164	155	164	113	164	113
TsuENH214	16 25,166,944	45.5	220	201	202	220	220	220	202	220	202	222	202	222
Hi01c11	16 25,258,361	45.1	141	–	176	145	141	145	176	145	176	149	176	149
CH04f10	16 33,600,024	43.2	195	238	195	317	195	253	195	317	195	201	195	201

(continued)

Marker name	Position_GDDH 13 _genome <sup>a</sup>	Kunihisa _2014 _map <sup>b</sup>	Descendant									
			'Mahe7'		'Hatsuaki'		'Kotaro'		'F1-165'		'Aori 27'	
			INB = 5.0		INB = 3.7		INB = 4.3		- <sup>d</sup>		INB = 0.0	
			'Indo' × 'Golden Delicious'	'Redgold'	'Jonathan'	'Golden Delicious'	'Fuji'	'Hatsuaki'	'Jonathan'	'Golden Delicious'	'Kinsei'	'Mahe7'
CH02d10a	16 554,954	2.2	223	223	222	222	222	222	222	222	223	223
TsuENH205	16 720,270	4.4	347	347	345	345	345	345	345	345	347	347
TsuGNH053	16 842,899	5.4	166	166	170	170	170	170	170	170	166	166
TsuENH022	16 2,229,990	7.6	91	86	91	91	91	91	91	91	86	91
CH02a03	16 2,427,811	7.6	155	160	155	155	155	155	155	155	160	155
<i>Mal</i>	16 3,179,256		ma	Ma	ma	Ma	ma	Ma	-	-	Ma	ma
LAR1 01	16 3,352,448		164	173	164	173	164	173	164	173	173	164
LAR1 02	16 3,353,100		378	289	384	289	370	289	384	289	289	378
LAR1 03	16 3,408,452		297	300	297	300	297	300	297	300	300	297
LAR1 04	16 3,409,282		254	g	240	258	240	258	240	258	258	254
LAR1 05	16 3,410,880		299	298	300	298	300	298	300	298	298	299
LAR1 06	16 3,417,149		226	226	221	226	221	226	221	226	226	226
LAR1 07	16 3,420,638		220	220	220	220	220	220	220	220	220	220
LAR1 11	16 3,424,514		284	284	280	284	280	284	280	284	284	284
LAR1 12	16 3,424,905		153	153	151	153	151	153	151	153	153	153
LAR1 13	16 3,426,986		268	268	215	268	215	268	215	268	268	268
LAR1 15	16 3,430,077		290	290	286	290	286	290	286	290	290	290
LAR1 16	16 3,438,576		188	188	191	188	191	188	191	188	188	188
LAR1 18	16 3,440,146		276	276	282	276	282	276	282	276	276	276
LAR1 19	16 3,442,183		246	246	262	246	262	246	262	246	246	246
LAR1 20	16 3,445,424		207	207	209	207	209	207	209	207	207	207
<i>MaPHYLL0</i>	16 3,762,382		WT	WT	pgl	WT	pgl	WT	-	-	WT	WT
CH05e04	16 4,367,809	9.2	173	173	173	173	169	173	164	173	173	173
CH01f03a	16 4,512,186	7.3	229	229	229	229	229	229	218	229	229	229
Hi15g11	16 5,966,413	16.7	158	161	161	161	158	161	161	161	161	161
TsuENH054	16 6,209,697	17.5	203	200	203	203	203	203	191	203	200	200
Hi04e04	16 6,905,393	18.9	214	214	244	244	214	244	220	244	214	214
TsuENH182	16 9,636,461	23.4	267	286	284	284	280	284	282	280	286	286
Hi08f12	16 9,521,764	24.3	127	129	112	216	219	216	216	216	216	129
Hi01a08	16 9,521,568	24.3	90	91	-	180	183	180	180	180	180	91
TsuENH052	16 12,340,093	26.5	157	163	157	157	157	157	157	163	157	163
CH05a04	16 12,645,931	32.1	195	158	189	195	189	195	189	165	195	158
Hi08d09	16 13,957,450	37.3	182	182	185	182	185	182	182	182	182	182
NZmsEB147967	16 15,594,538	35.5	173	173	173	173	173	173	173	187	173	173
Hi02b10	0	37.3	-	-	224	-	224	-	226	-	-	-
TsuENH042	13 17,703,361	40.6	164	164	155	164	164	164	155	113	164	164
TsuENH214	16 25,166,944	45.5	220	202	201	202	222	202	201	220	202	220
Hi01c11	16 25,258,361	45.1	145	176	-	176	149	176	-	141	176	145
CH04f10	16 33,600,024	43.2	253	195	238	195	201	195	238	195	195	253



(continued)

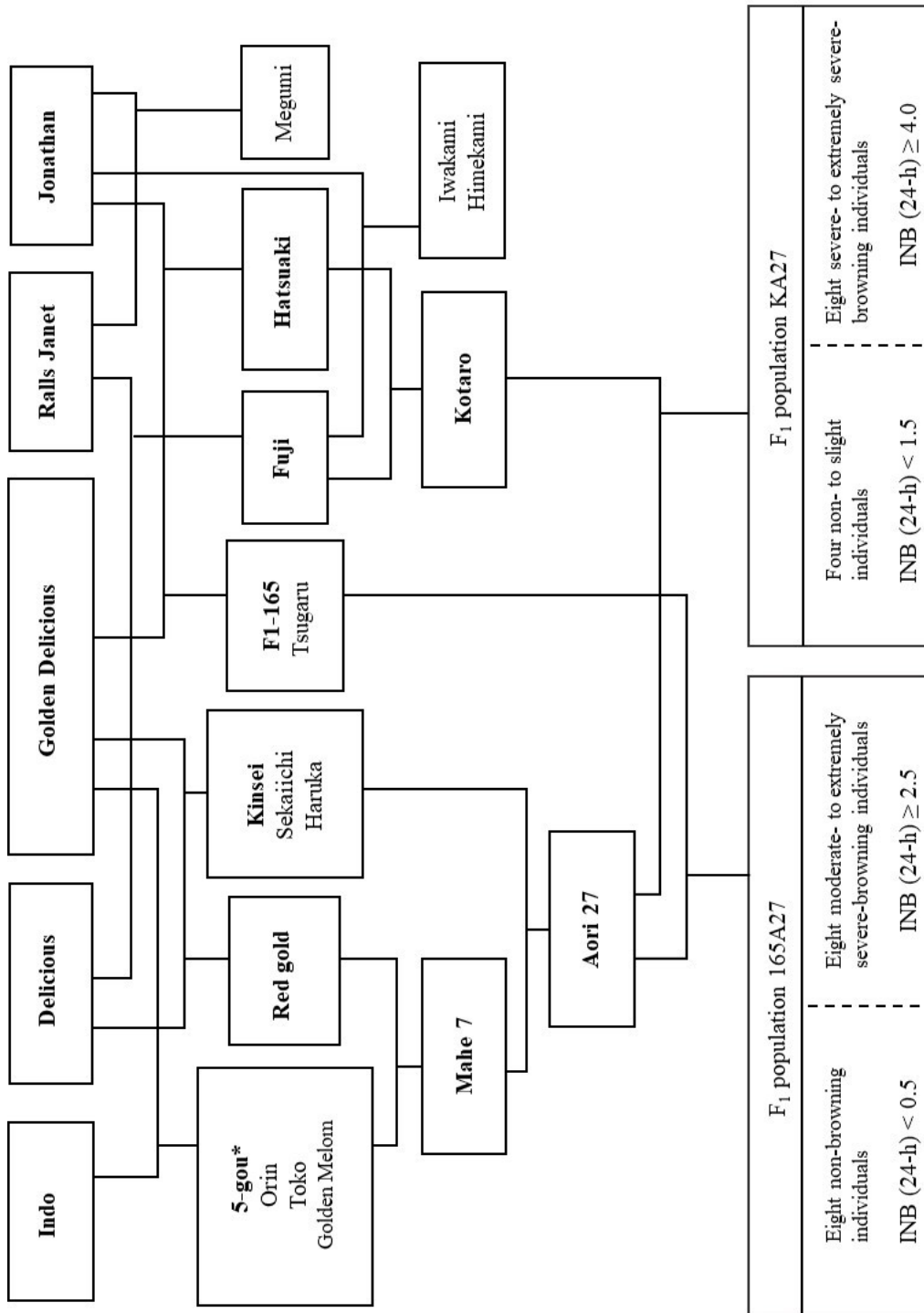
Marker name	Position_GDDH13 _genome <sup>d</sup>	Kumihisa _2014 _map <sup>h</sup>	'Aori 27'				'F1-165'				Moderate- to extremely severe-browning individuals in F <sub>1</sub> population 165A27											
			INB = 0.0		- <sup>d</sup>		INB = 3.0		INB = 3.3		INB = 3.0		INB = 3.7		INB = 4.7		INB = 4.0		INB = 5.0		INB = 5.0	
			'Kinsei'	'Mahe'	'Jonathan'	'Golden Delicious'																
CH02d10a	16 554,954	2.2	223	223	222	222																
TsuENH205	16 720,270	4.4	347	347	345	345																
TsuGNH053	16 842,899	5.4	166	166	170	170																
TsuENH022	16 2,229,990	7.6	86	91	91	91																
CH02a03	16 2,427,811	7.6	160	155	155	155																
Mal	16 3,179,256		Ma	ma	-	-																
LAR1 01	16 3,352,448		173	164	164	173																
LAR1 02	16 3,353,100		289	378	384	289	384	289	384	289	384	289	384	378	384	378	384	378	384	378	384	378
LAR1 03	16 3,408,452		300	297	297	300																
LAR1 04	16 3,409,282		258	254	240	258																
LAR1 05	16 3,410,880		298	299	300	298																
LAR1 06	16 3,417,149		226	226	221	226																
LAR1 07	16 3,420,638		220	220	220	220																
LAR1 11	16 3,424,514		284	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284
LAR1 12	16 3,424,905		153	153	151	153																
LAR1 13	16 3,426,986		268	268	215	268																
LAR1 15	16 3,430,077		290	290	286	290																
LAR1 16	16 3,438,576		188	188	191	188																
LAR1 18	16 3,440,146		276	276	282	276																
LAR1 19	16 3,442,183		246	246	262	246																
LAR1 20	16 3,445,424		207	207	209	207																
MdPHYLLO	16 3,762,382		WT	WT	-	-																
CH05e04	16 4,367,809	9.2	173	173	164	173																
CH01f03a	16 4,512,186	7.3	229	229	218	229																
Hi15gl1	16 5,966,413	16.7	161	161	161	161																
TsuENH054	16 6,209,697	17.5	200	200	191	203																
Hi04e04	16 6,905,393	18.9	214	214	220	244																
TsuENH182	16 9,636,461	23.4	286	286	282	280																
Hi08f12	16 9,521,764	24.3	216	129	216	216																
Hi01a08	16 9,521,568	24.3	180	91	180	180																
TsuENH052	16 12,340,093	26.5	157	163	157	163																
CH05a04	16 12,645,931	32.1	195	158	189	165																
Hi08d09	16 13,957,450	37.3	182	182	182	182																
NZmsEB147967	16 15,594,538	35.5	173	173	173	187																
Hi02b10	0	37.3	-	-	226	-																
TsuENH042	13 17,703,361	40.6	164	164	155	113																
TsuENH214	16 25,166,944	45.5	202	220	201	220																
Hi01c11	16 25,258,361	45.1	176	145	-	141																
CH04f10	16 33,600,024	43.2	195	253	238	195																

(continued)

Marker name	Position_GDDH13 _genome <sup>a</sup>	Kunihisa _2014 _map <sup>b</sup>					Non- to slight-browning individuals in F <sub>1</sub> population KA27												
			'Aori 27'		'Kotaro'		41		19		25		26						
			INB = 0.0		INB = 4.3		INB = 0.2		INB = 1.3		INB = 1.0		INB = 0.3						
			'Kinsei'	'Mahe7'	'Fuji'	'Hatsuaki'													
CH02d10a	16 554,954	2.2	223	223	222	222													
TsuENH205	16 720,270	4.4	347	347	345	345													
TsuGNH053	16 842,899	5.4	166	166	170	170													
TsuENH022	16 2,229,990	7.6	86	91	91	91													
CH02a03	16 2,427,811	7.6	160	155	155	155													
<i>Mal</i>	16 3,179,256		Ma	ma	ma	Ma													
LAR1 01	16 3,352,448		173	164	164	173													
LAR1 02	16 3,353,100		289	378	370	289	289	289	289	378	289	378	289	378					
LAR1 03	16 3,408,452		300	297	297	300													
LAR1 04	16 3,409,282		258	254	240	258													
LAR1 05	16 3,410,880		298	299	300	298													
LAR1 06	16 3,417,149		226	226	221	226													
LAR1 07	16 3,420,638		220	220	220	220													
LAR1 11	16 3,424,514		284	284	280	284	284	284	284	284	284	284	284	284					
LAR1 12	16 3,424,905		153	153	151	153													
LAR1 13	16 3,426,986		268	268	215	268													
LAR1 15	16 3,430,077		290	290	286	290													
LAR1 16	16 3,438,576		188	188	191	188													
LAR1 18	16 3,440,146		276	276	282	276													
LAR1 19	16 3,442,183		246	246	262	246													
LAR1 20	16 3,445,424		207	207	209	207													
<i>MdPHYLL0</i>	16 3,762,382		WT	WT	pgl	WT													
CH05e04	16 4,367,809	9.2	173	173	169	173													
CH01f03a	16 4,512,186	7.3	229	229	229	229													
Hi15g11	16 5,966,413	16.7	161	161	158	161													
TsuENH054	16 6,209,697	17.5	200	200	203	203													
Hi04e04	16 6,905,393	18.9	214	214	214	244													
TsuENH182	16 9,636,461	23.4	286	286	280	284													
Hi08f12	16 9,521,764	24.3	216	129	219	216													
Hi01a08	16 9,521,568	24.3	180	91	183	180													
TsuENH052	16 12,340,093	26.5	157	163	157	157													
CH05a04	16 12,645,931	32.1	195	158	189	195													
Hi08d09	16 13,957,450	37.3	182	182	185	182													
NZmsEB147967	16 15,594,538	35.5	173	173	173	173													
Hi02b10	0	37.3	-	-	224	-													
TsuENH042	13 17,703,361	40.6	164	164	164	164													
TsuENH214	16 25,166,944	45.5	202	220	222	202													
Hi01c11	16 25,258,361	45.1	176	145	149	176													
CH04f10	16 33,600,024	43.2	195	253	201	195													

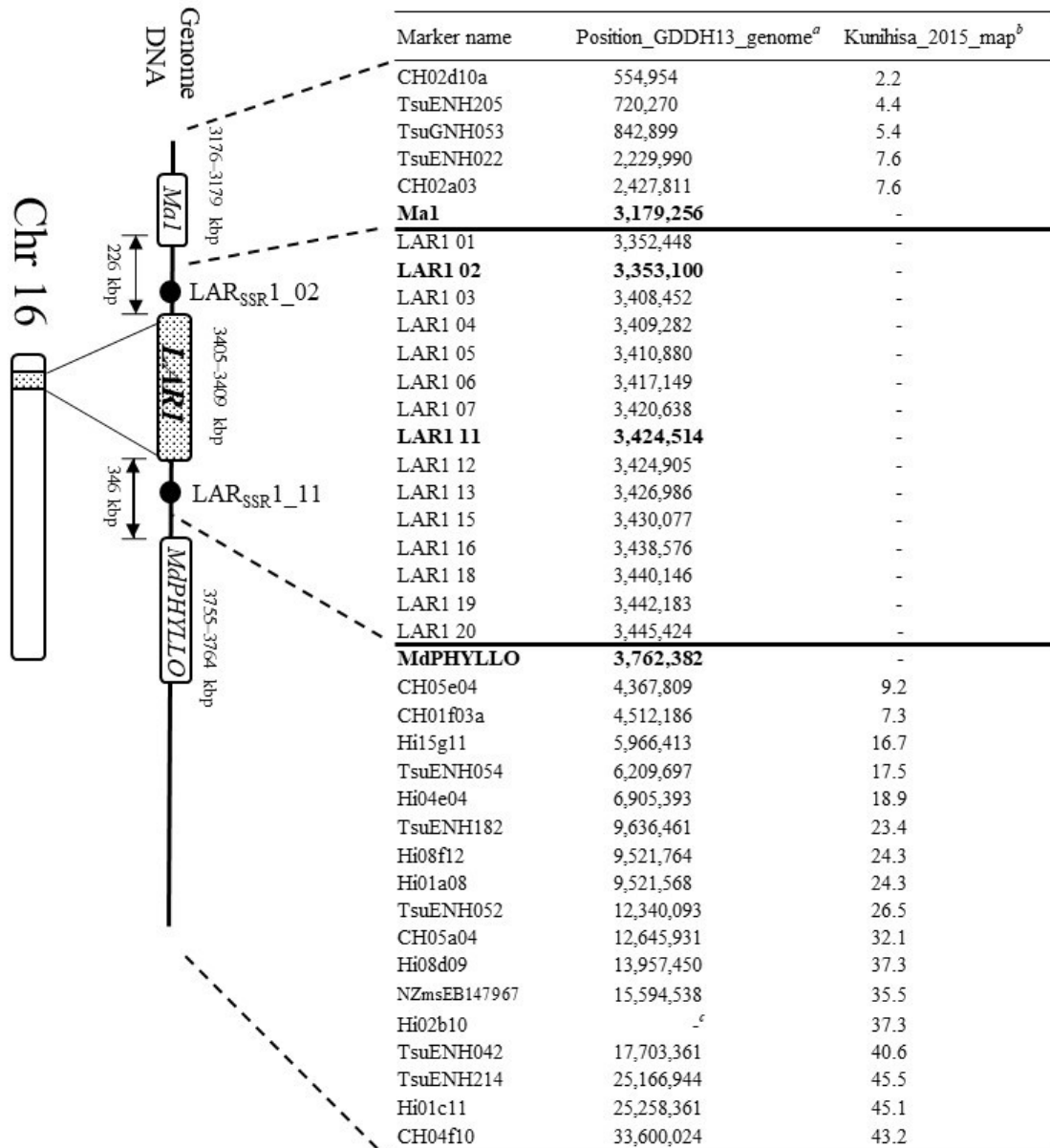
(continued)

Marker name	Position_GDDH13 _genome <sup>a</sup>	Kunihisa _2014 _map <sup>b</sup>	Severe- to extremely severe-browning individuals in F <sub>1</sub> population KA27															
			'Aori 27'		'Kotaro'		14	27	40	46	18	32	37	54				
			INB = 0.0		INB = 4.3		INB = 4.0	INB = 4.3	INB = 5.0	INB = 4.0	INB = 5.0	INB = 5.0	INB = 5.0	INB = 5.0	INB = 5.0			
			'Kinsei'	'Mabe7'	'Fuji'	'Hatsuaiki'												
CH02d10a	16 554,954	2.2	223	223	222	222												
TsuENH205	16 720,270	4.4	347	347	345	345												
TsuGNH053	16 842,899	5.4	166	166	170	170												
TsuENH022	16 2,229,990	7.6	86	91	91	91												
CH02a03	16 2,427,811	7.6	160	155	155	155												
<i>Mal</i>	16 3,179,256		Ma	ma	ma	Ma												
LAR1 01	16 3,352,448		173	164	164	173												
LAR1 02	16 3,353,100		289	378	370	289	370	289	370	289	370	378	370	378	370	378	370	378
LAR1 03	16 3,408,452		300	297	297	300												
LAR1 04	16 3,409,282		258	254	240	258												
LAR1 05	16 3,410,880		298	299	300	298												
LAR1 06	16 3,417,149		226	226	221	226												
LAR1 07	16 3,420,638		220	220	220	220												
LAR1 11	16 3,424,514		284	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284	280	284
LAR1 12	16 3,424,905		153	153	151	153												
LAR1 13	16 3,426,986		268	268	215	268												
LAR1 15	16 3,430,077		290	290	286	290												
LAR1 16	16 3,438,576		188	188	191	188												
LAR1 18	16 3,440,146		276	276	282	276												
LAR1 19	16 3,442,183		246	246	262	246												
LAR1 20	16 3,445,424		207	207	209	207												
<i>MdPHYLL0</i>	16 3,762,382		WT	WT	pgl	WT												
CH05e04	16 4,367,809	9.2	173	173	169	173												
CH01f03a	16 4,512,186	7.3	229	229	229	229												
Hi15gl1	16 5,966,413	16.7	161	161	158	161												
TsuENH054	16 6,209,697	17.5	200	200	203	203												
Hi04e04	16 6,905,393	18.9	214	214	214	244												
TsuENH182	16 9,636,461	23.4	286	286	280	284												
Hi08f12	16 9,521,764	24.3	216	129	219	216												
Hi01a08	16 9,521,568	24.3	180	91	183	180												
TsuENH052	16 12,340,093	26.5	157	163	157	157												
CH05a04	16 12,645,931	32.1	195	158	189	195												
Hi08d09	16 13,957,450	37.3	182	182	185	182												
NZmsEB1479 67	16 15,594,538	35.5	173	173	173	173												
Hi02b10	0	37.3	--	--	224	--												
TsuENH042	13 17,703,361	40.6	164	164	164	164												
TsuENH214	16 25,166,944	45.5	202	220	222	202												
Hi01c11	16 25,258,361	45.1	176	145	149	176												
CH04f10	16 33,600,024	43.2	195	253	201	195												



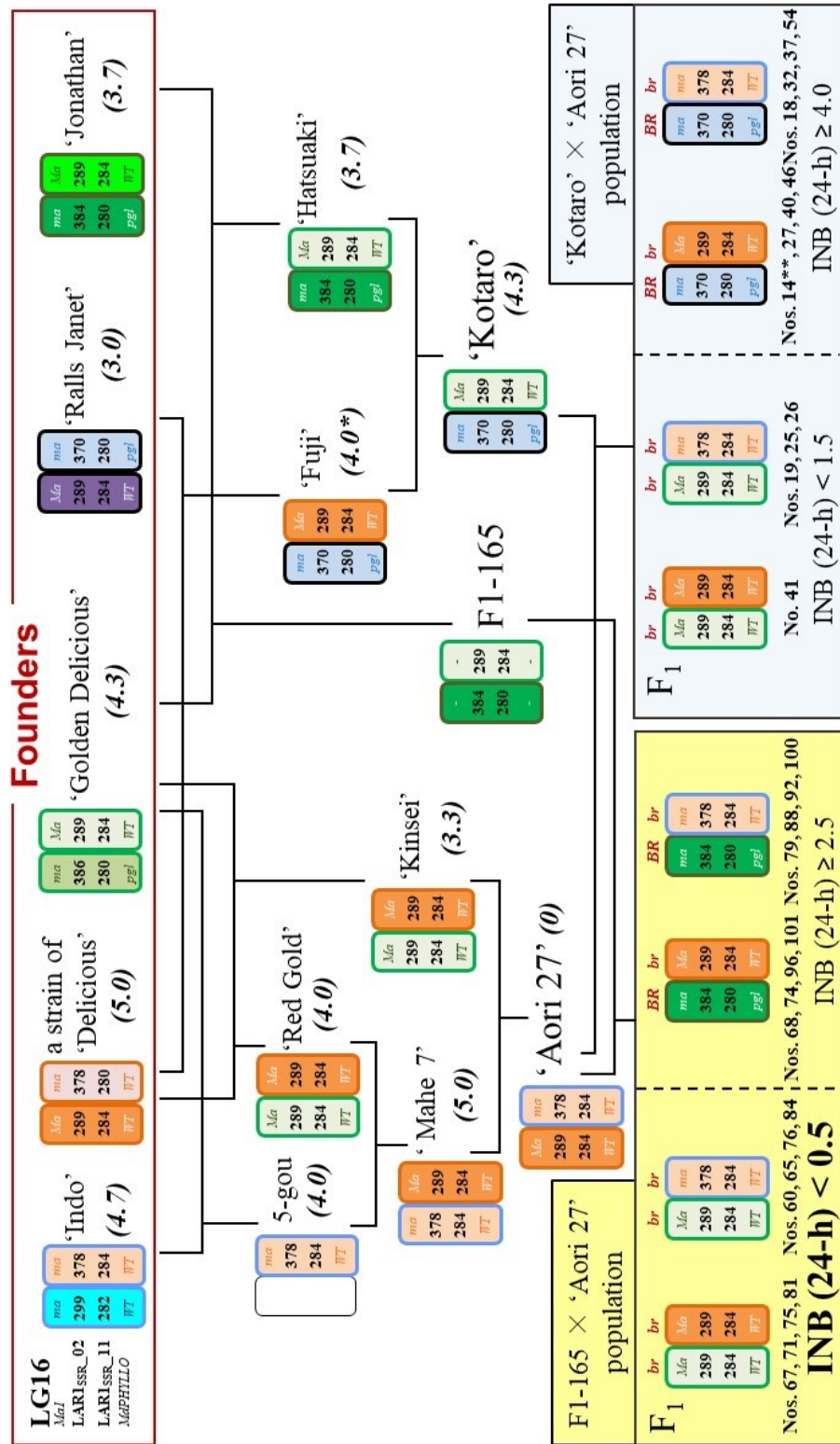
**Figure 3-1.** Pedigree of apple cultivars, selections and F<sub>1</sub> individuals used for haplotyping of Chr.16. The **Bold** indicated the ancestor of the populations used for QTL analysis. \*5-gou was not used for haplotyping.



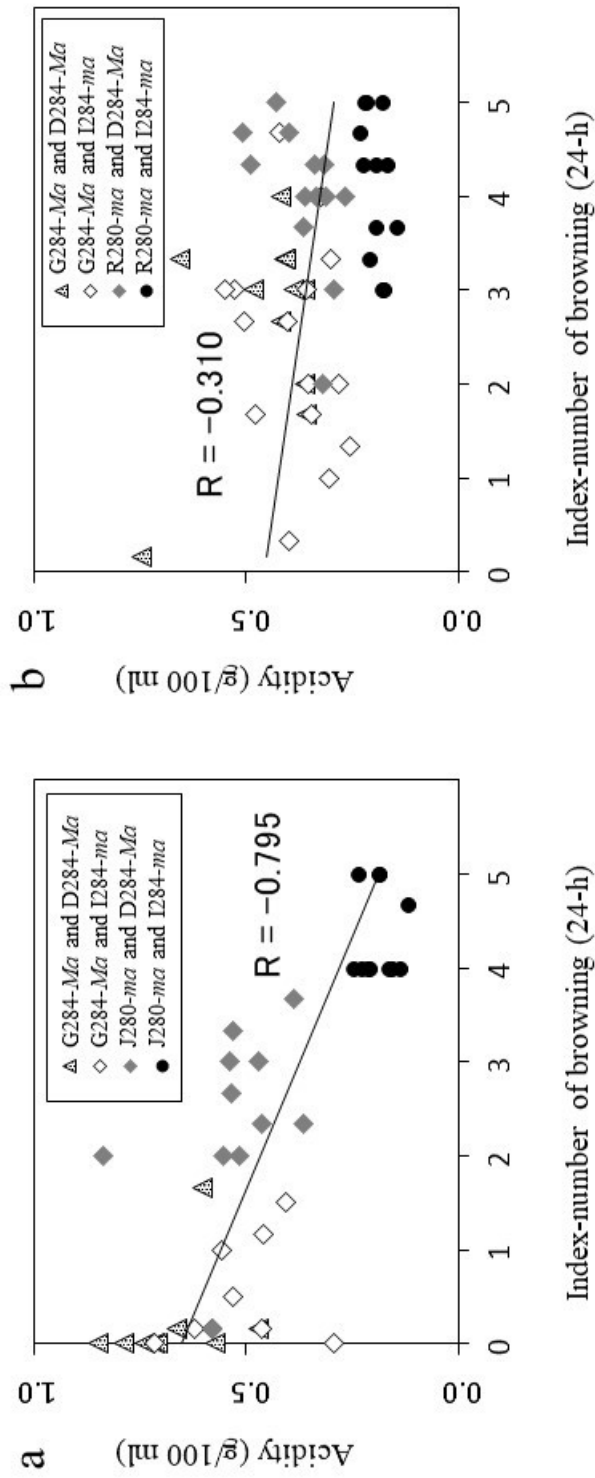


**Figure 3-2.** Information of positional relationships between physical map for genes near the QTL and 39 DNA markers used for estimate haplotype of Chr16.

<sup>a</sup>Position\_GDDH13\_genome: marker order according to the GDDH13 ('Golden Delicious' doubled haploid #13). <sup>b</sup>Kunihiisa\_2015\_map: marker order according to the reported linkage map (Kunihiisa et al. 2014). <sup>c</sup>:-: 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<sub>SSR\_02</sub> and LAR<sub>SSR\_11</sub>—positioned immediately either side of the major QTL in LG 16. *Br* and *br* above each haplotype of F<sub>1</sub> 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. F<sub>1</sub> individuals were classified according to haplotypes. In F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 *MdPHYLL02* marker genotypes is added, referring to Table 3-2. *Ma* and *ma* link to high and low acidity, respectively. The *pgf* 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<sub>SSR\_11</sub> in No. 14.



**Figure 3-4.** Relationship between index-number of browning (24-h, 2014) and acidity of  $F_1$  individuals from the (a) F1-165  $\times$  'Aori 27' and (b) 'Kotaro'  $\times$  'Aori 27' crosses. R-value as correlation coefficient are shown in each panel. Four genotypes were identified around LAR<sub>SSR1\_11</sub> and *Mal*. Two alleles of LAR1\_11<sub>SSR</sub>, 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.

## 第 4 章

### GWAS による果肉褐変関連遺伝子領域の解析

#### 緒論

第2章及び第3章より、‘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’ 由来の非褐変性ハ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’ 等は上記ハ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、種間横断的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-STC 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。

## 材料及び方法

### 1. 材料

現在日本で栽培されている2倍体のリンゴ栽培品種、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、おい性台木 (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。

### 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℃ 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、Kunihisa 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。

## 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 F<sub>1</sub> 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、第二章で使用した F<sub>1</sub> 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。

## 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。

## 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F<sub>1</sub>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F<sub>1</sub>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*LAR1*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’、‘ゴールデンデリシャス’、‘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’、‘ゴールデンデリシャス’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F<sub>1</sub>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、F<sub>1</sub>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 F<sub>1</sub> 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 (*LARI*) 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 か年平均値）、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 か年平均値）、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 *LARI* 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。

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

Cultivar / selection	Phenotypic evaluation		Pedigree		Registration / Publication year <sup>b</sup>	Origin
	2015	2016	Seed parent	Pollen parent		
Aikanokaori	○	○	Fuji	Tsugaru	2001	Japan
Akagi		○	Golden Delicious	Jonathan	1975	Japan
Akane		○	Jonathan	Worceter 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 <sup>a</sup>		○	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

<sup>a</sup>For juice browning in 2016, we investigated 84 cultivars and selections except for 'Elster'.

<sup>b</sup>Registration / Publication year: Year of cultivar registration or appearance in commercial / test production.

(continued)

Cultivar / selection	Phenotypic evaluation		Pedigree		Registration / Publication year <sup>b</sup>	Origin
	2015	2016	Seed parent	Pollen parent		
Mahe 7	○	○	5 gou (Golden Delicious × Indo)	Redgold	-	Japan
Maoi		○	Mantet	HAC 6	2004	Japan
McIntosh		○	-	-	-	Canada
Megumi	○	○	Ralls Janet	Jonathan	1950	Japan
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
Sekaichi	○	○	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	○	○	Wjick	Golden Delicious	1989	UK
Toki	○	○	Orin	Fuji	2004	Japan
Toko	○	○	Golden Delicious	Indo	1962	Japan
Trajan		○	Golden Delicious	Wjick	1989	UK
Tsugaru	○	○	Golden Delicious	Jonathan	1975	Japan
Tuscan	○	○	Wjick	Greensleeves	1989	UK
Worceter Pearmain		○	-	-	1870s	UK
Yoko	○	○	Golden Delicious	Jonathan	1981	Japan
4-23	○	○	Fuji	Mahe 7	-	Japan
230-1		○	Tsugaru	Sansa	-	Japan

<sup>a</sup> For juice browning in 2016, we investigated 84 cultivars and selections except for 'Elster'.

<sup>b</sup> Registration / Publication year: Year of cultivar registration or appearance in commercial / test production.

**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 ( $h^2$ )
Index number of browning (24-h)	$\sigma_g^2$ (genotype)	0.88	72.6	0.73
	$\sigma_y^2$ (year)	0	0	
	$\sigma_e^2$ (error)	0.33	27.4	
Index number of browning (15-min)	$\sigma_g^2$ (genotype)	1.60	70.9	0.71
	$\sigma_y^2$ (year)	0.06	2.6	
	$\sigma_e^2$ (error)	0.60	26.5	
Total polyphenol content (mg/100g FW)	$\sigma_g^2$ (genotype)	209.3	43.3	0.43
	$\sigma_y^2$ (year)	20.1	4.2	
	$\sigma_e^2$ (error)	254.0	52.5	
PPO activity (units/g FW)	$\sigma_g^2$ (genotype)	3145.7	56.3	0.56
	$\sigma_y^2$ (year)	595.1	10.7	
	$\sigma_e^2$ (error)	1843.6	33.0	

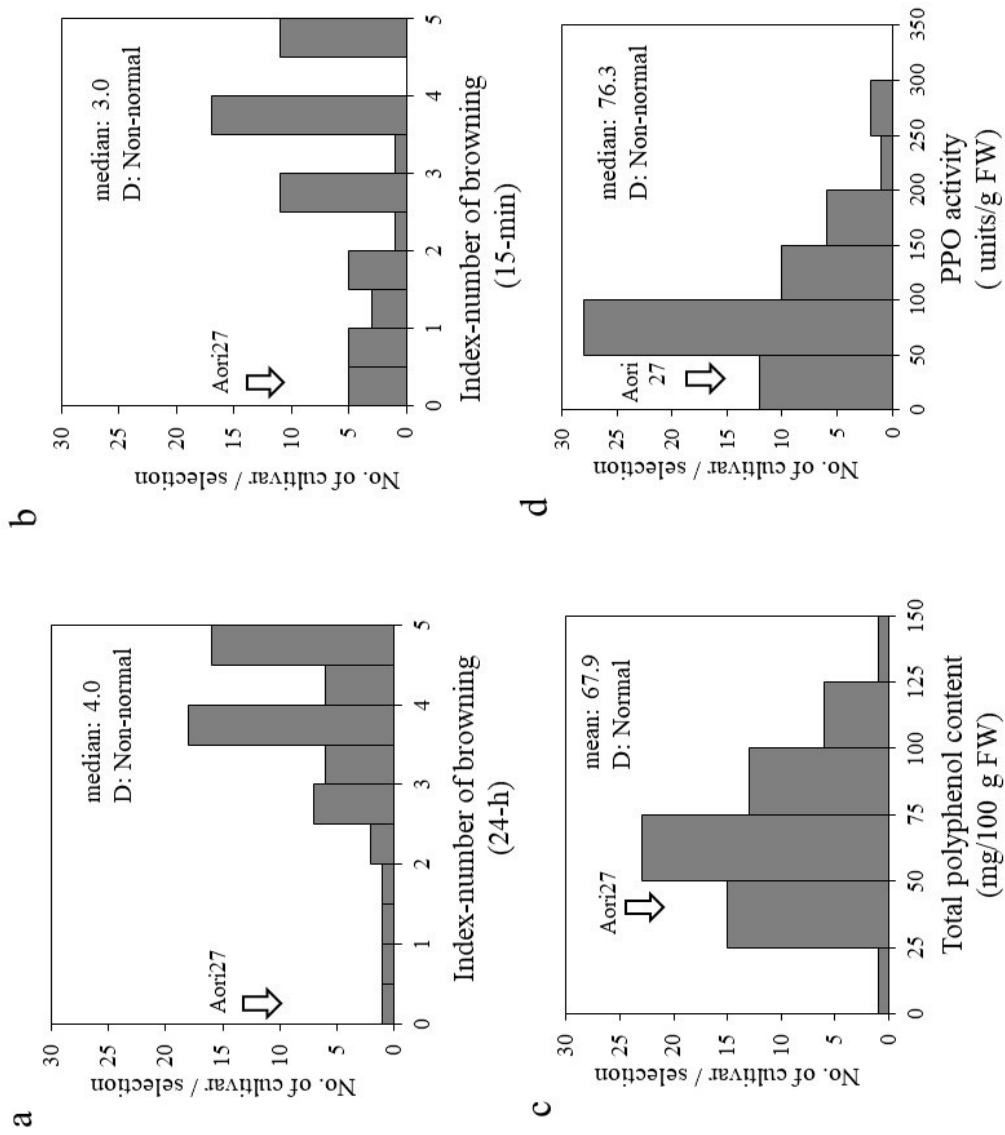


**Table 4-4.** Significant SNPs identified by GWAS for browning related traits

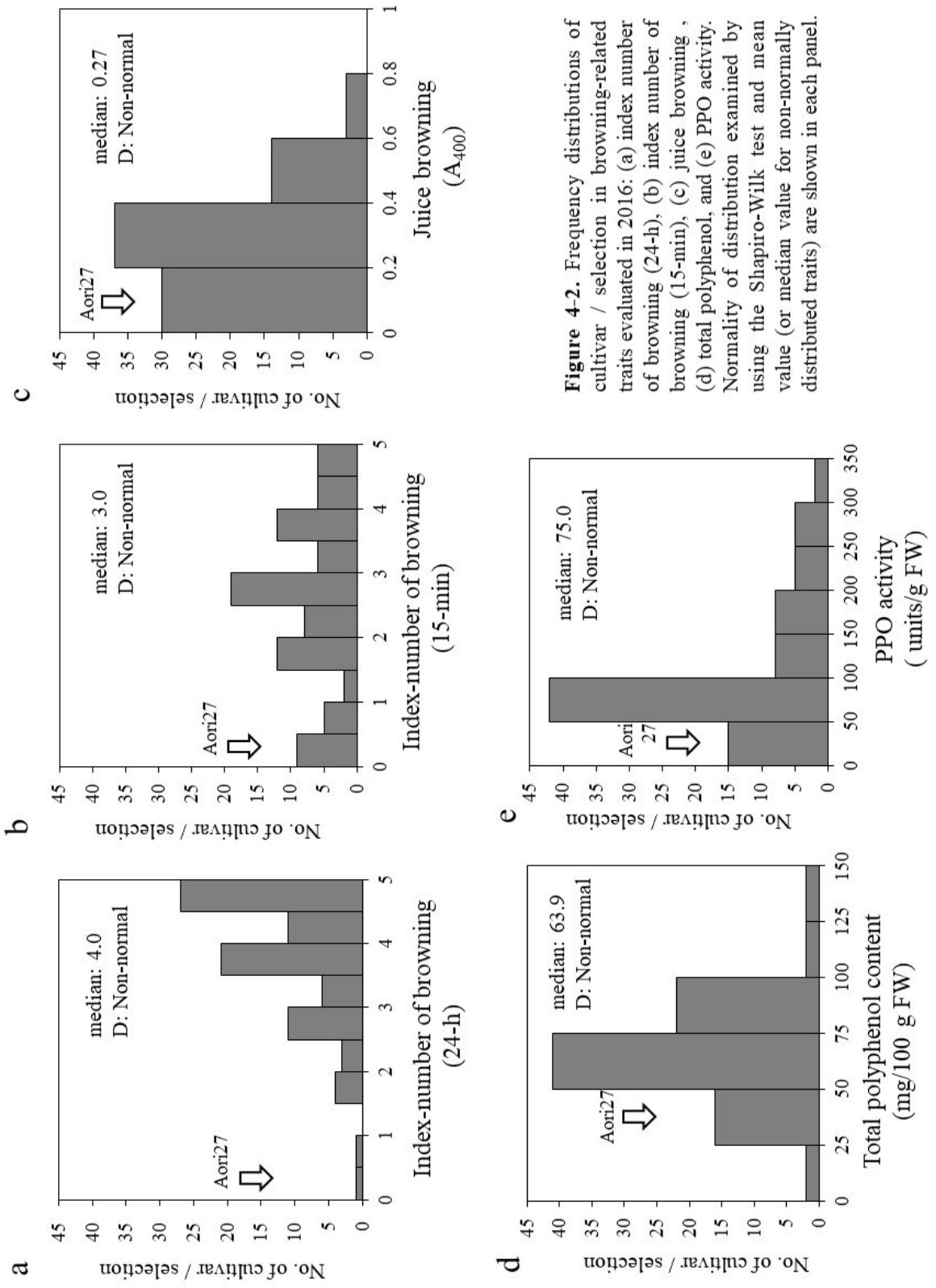
Traits	Year	SNP name <sup>a</sup>	-log10(p)	Chr	Position (bp) <sup>b</sup>
INB (15-min)	2016	SNP_FB_0598996	6.93	5	45098730
	2016	SNP_FB_0049856	4.12	10	39839876
	2016	SNP_FB_0935827	6.30	17	27359258
Juice browning	2016	RosBREEDSNP_SNP_CT_1540624_Lg16_LARI_MAF40_1618769_exon2	5.61	16	3409834
Total polyphenol content	2015	GDsnp00047	7.19	16	3856528
	2016	RosBREEDSNP_SNP_CT_1540624_Lg16_LARI_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

<sup>a</sup> SNP with the smallest *p*-value among those exceeding threshold in identical chromosome.

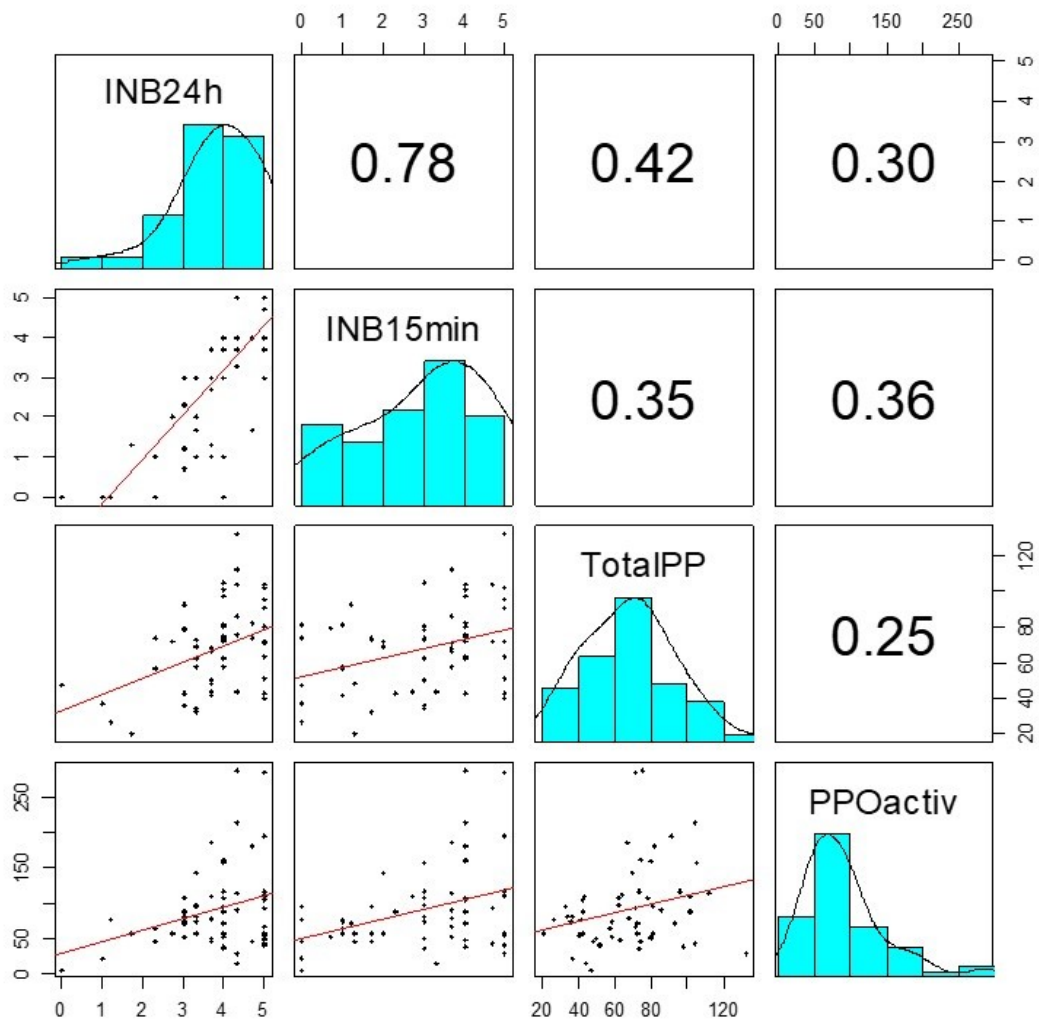
<sup>b</sup> Position were estimated referring the GDDH13 ('Golden Delicious' doubled haploid #13) genome sequence (Daccord et al., 2017).



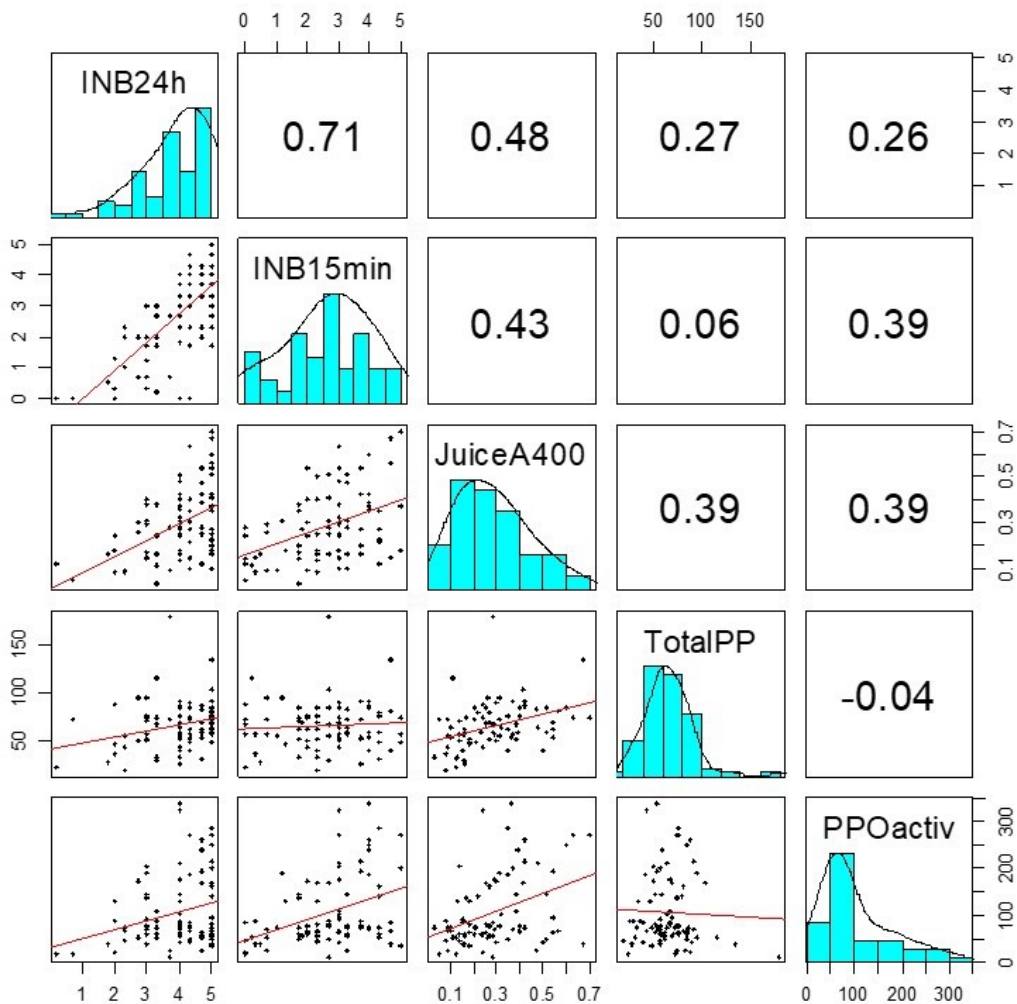
**Figure 4-1.** Frequency distributions of cultivar / selection in browning-related traits evaluated in 2015: (a) index number of browning (24-h), (b) index number of browning (15-min), (c) total polyphenol, (d) PPO activity. Normality of distribution examined by using the Shapiro-Wilk test and mean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



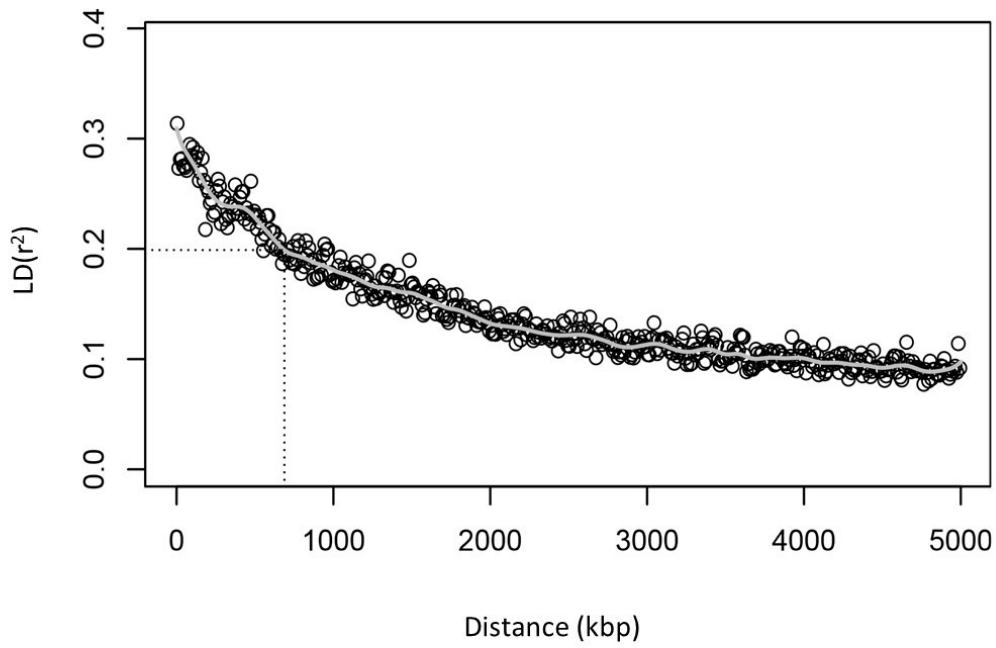
**Figure 4-2.** Frequency distributions of cultivar / selection in browning-related traits evaluated in 2016: (a) index number of browning (24-h), (b) index number of browning (15-min), (c) juice browning, (d) total polyphenol, and (e) PPO activity. Normality of distribution examined by using the Shapiro-Wilk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



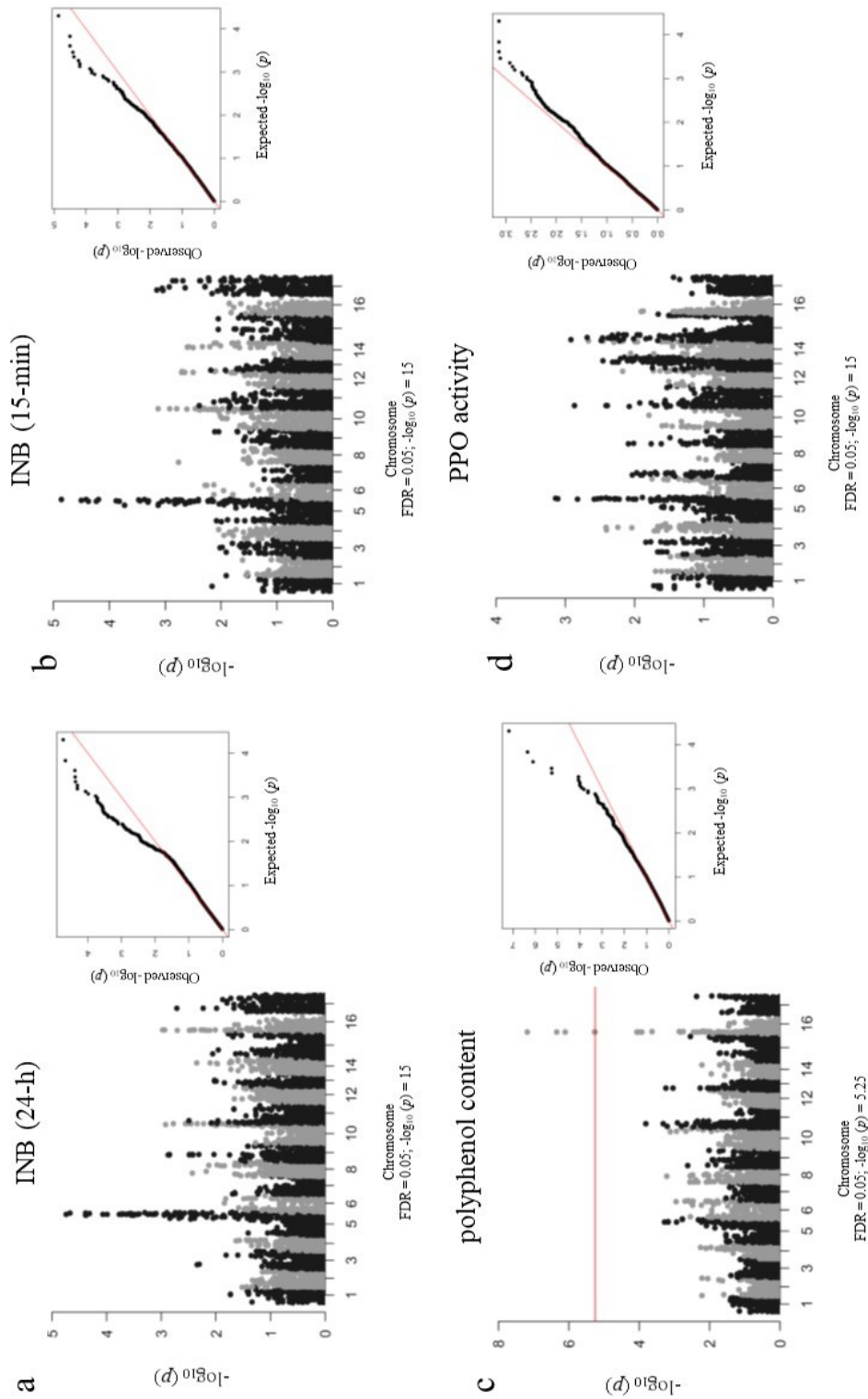
**Figure 4-3.** Correlation between four browning-related traits with flesh browning in cultivars / selections in 2015. Units are the same as in Table 2-1. R-value as correlation coefficient are shown in each panel.



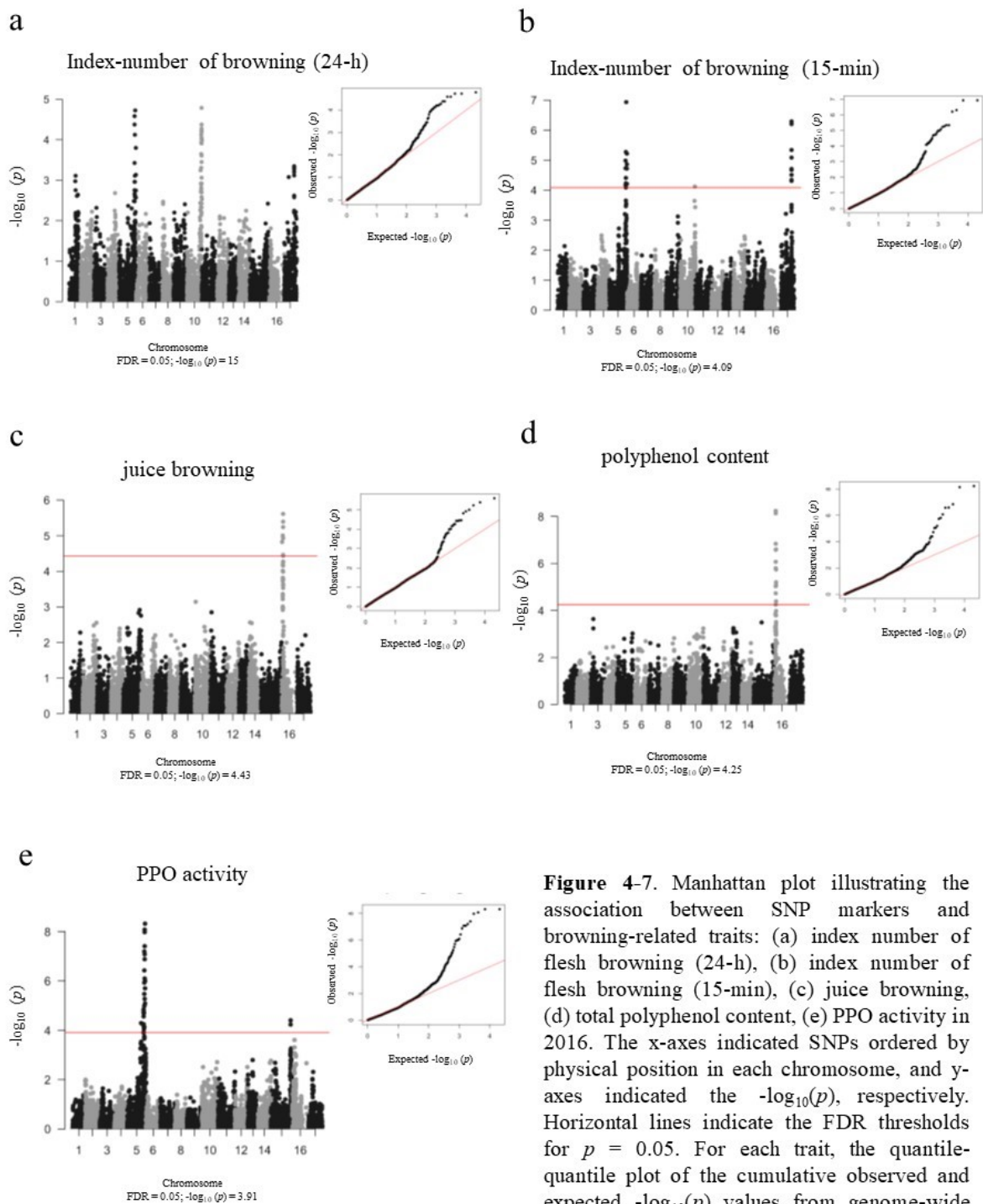
**Figure 4-4.** Correlation between five browning-related traits with flesh browning in cultivars / selections in 2016. Units are the same as in Table 2-1. R-value as correlation coefficient are shown in each panel.



**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 10kb. Curves show local polynomial fits obtained using kernel smoothing regression.

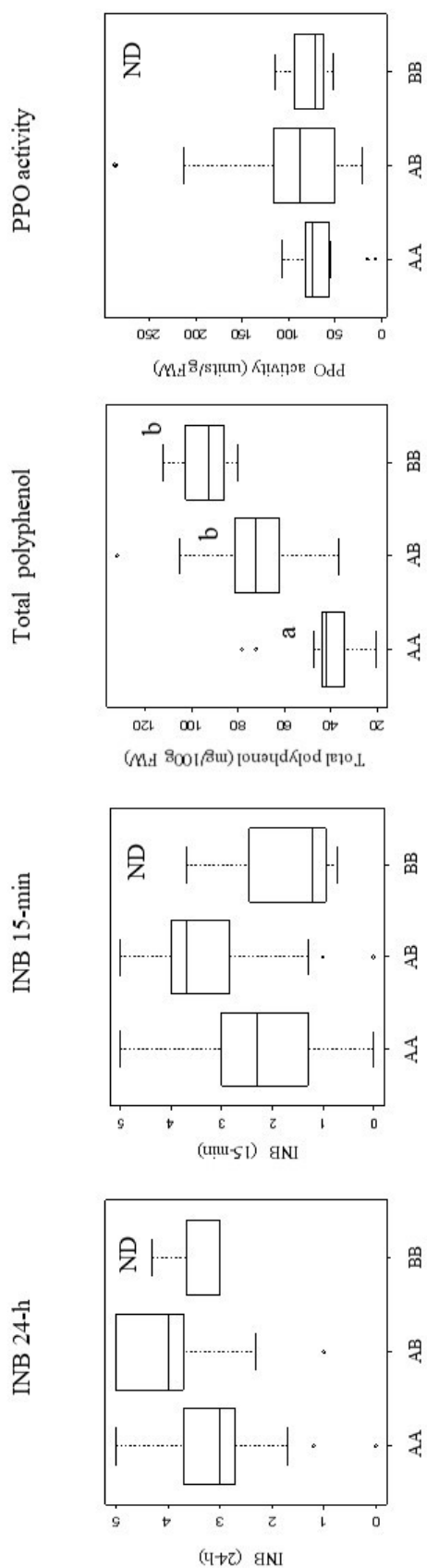


**Figure 4-6.** Manhattan plot illustrating the association between SNP markers and browning-related traits in 2015: (a) index number of flesh browning (24-h), (b) index number of flesh browning (15-min), (c) total polyphenol content, (d) PPO activity. The x-axes indicated SNPs ordered by physical position 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.

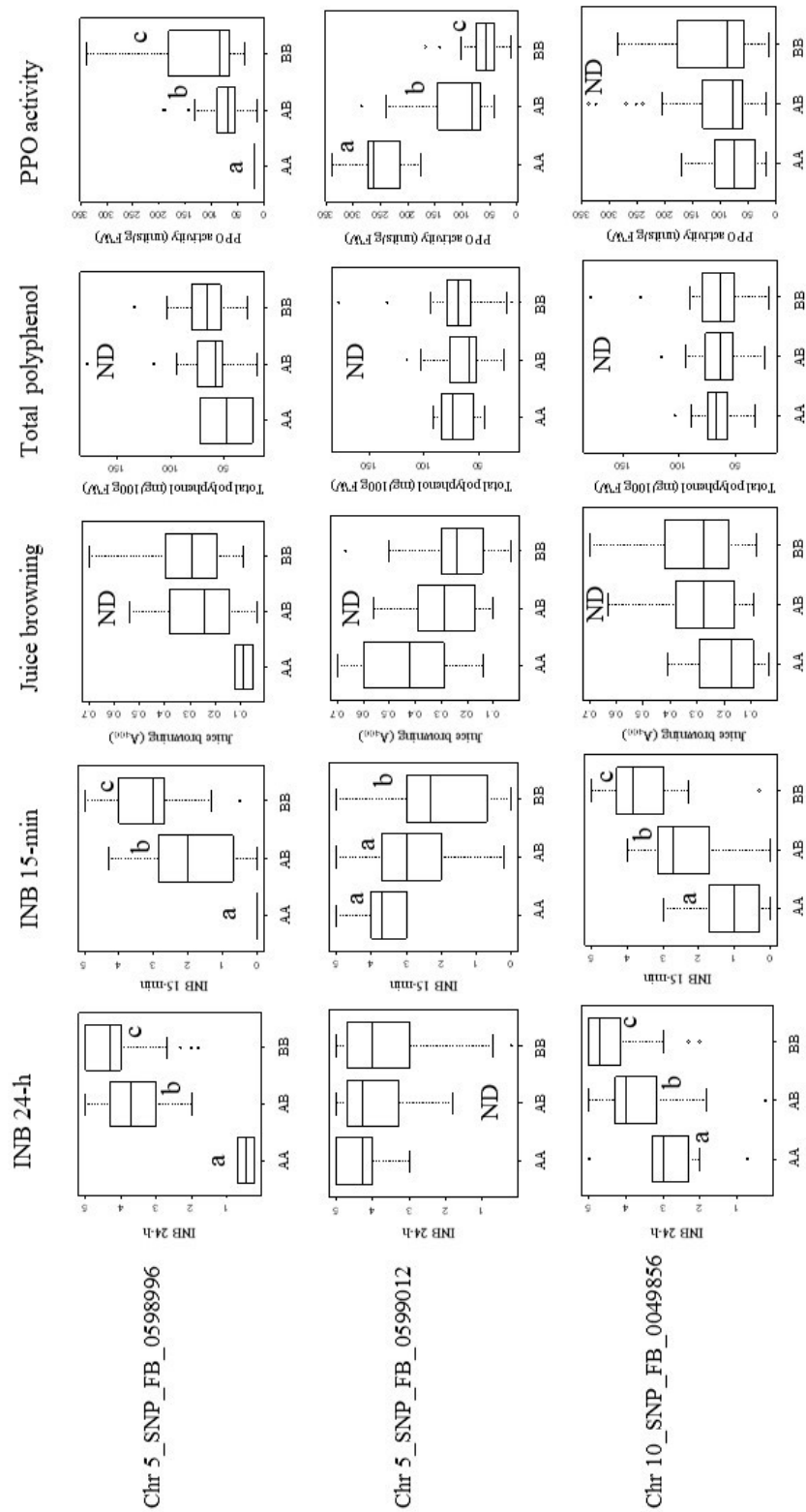


**Figure 4-7.** Manhattan plot illustrating the association between SNP markers and browning-related traits: (a) index number of flesh browning (24-h), (b) index number of flesh browning (15-min), (c) juice browning, (d) total polyphenol content, (e) PPO activity in 2016. The x-axes indicated SNPs ordered 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 Wilcoxon 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.

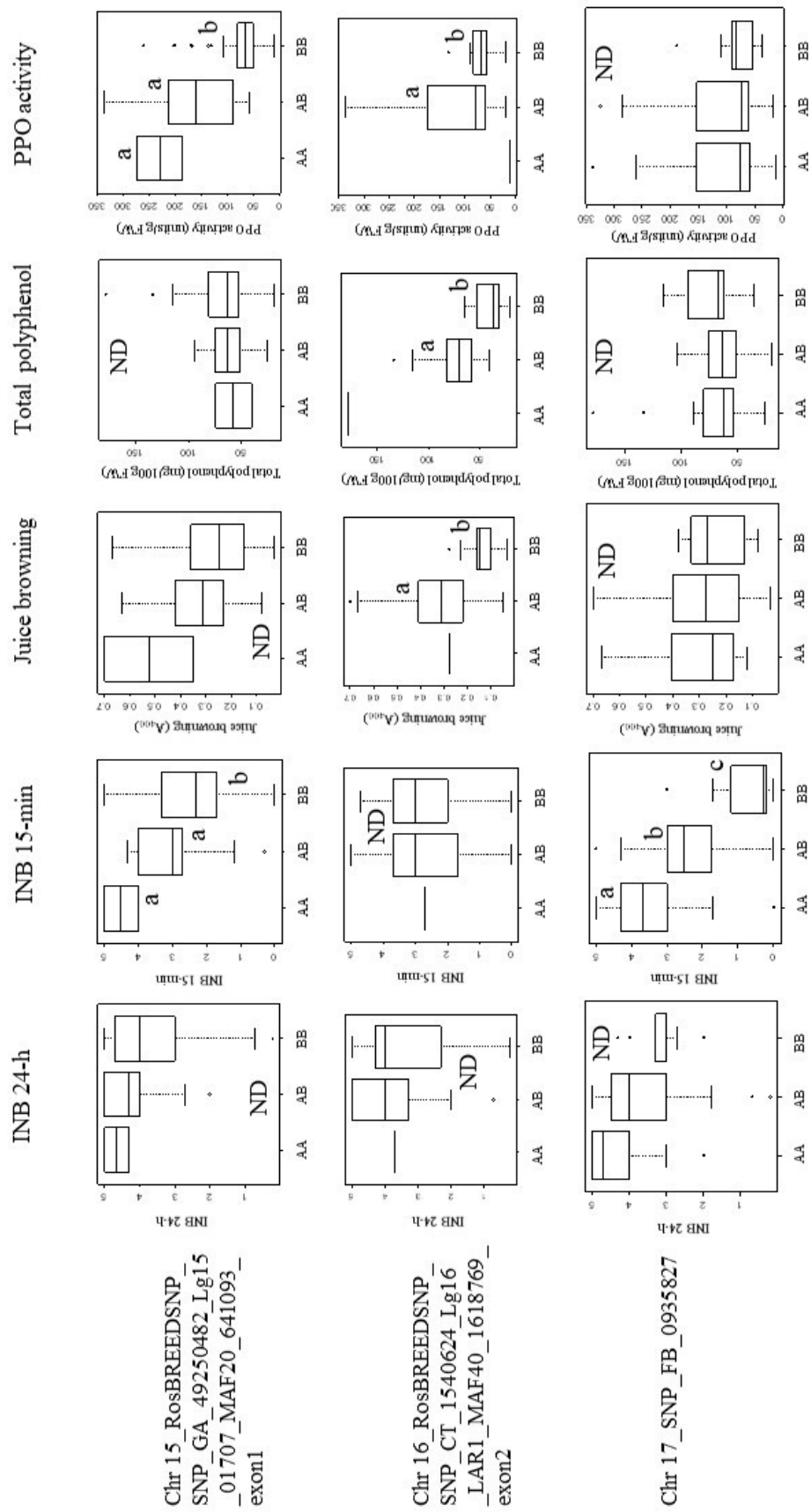


Figure 4-9. (continued)

## 第 5 章

### 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 F<sub>1</sub> 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）。

第 2 章では、‘あおり 27’と褐変性を有する親（F1-165 及び‘こうたろう’）の F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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。

第3章では、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。

第4章では、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

シヤス’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、‘ゴールデンデリシヤス’、‘デリシヤス’、‘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 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（カットりんご、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-F7QTL*)、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 個体を選抜、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 個体を選抜しており (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; Kunihiisa 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、*LARI*、*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 *LARI* 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<sub>1</sub> 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、ビワ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 (Ogundiwin 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<sup>®</sup> 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、カッターリンゴ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、販路拡大の道のは険しい。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 品種ではリリース販売できず、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が高い。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 <sup>a</sup>
	LAR1_02	LAR1_11	Ma1	
Indo	378	284	ma	Aori 27*, Golden Melon, Mahe 7*, Toko*
Delicious	289	284	Ma	Aori27*, Fuji, Himekami, Iwakami, Kinsei*, Mahe 7*, Redgold*
Golen Delicious	289	284	Ma	Haruka, Hatsuaki, Kinsei*, Kotaro, Orin, Redgold*, Sekaichi, Toko*, Tsugaru

<sup>a</sup> Asterisks (\*) represent cultivars having non-browning allele homozygously.

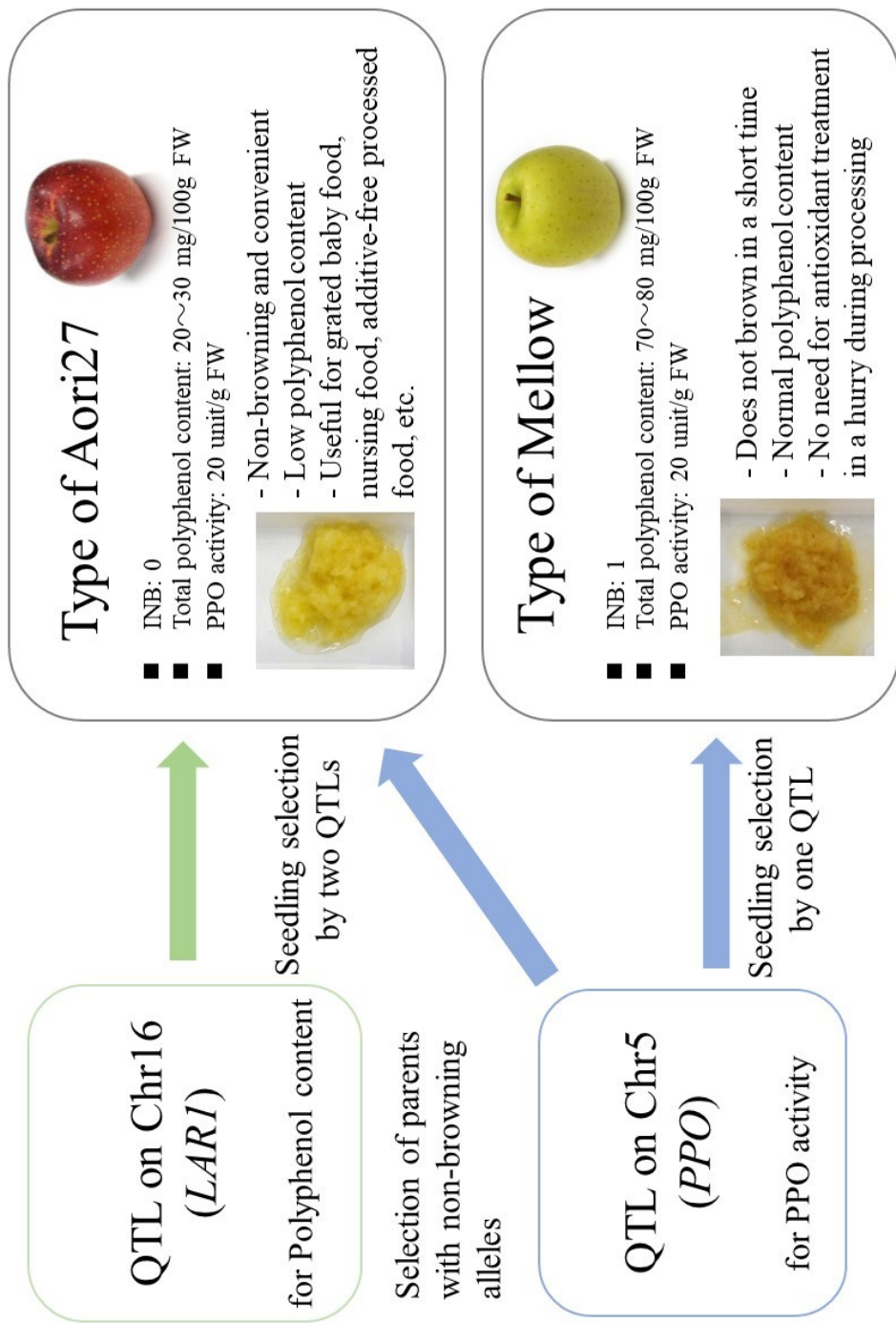
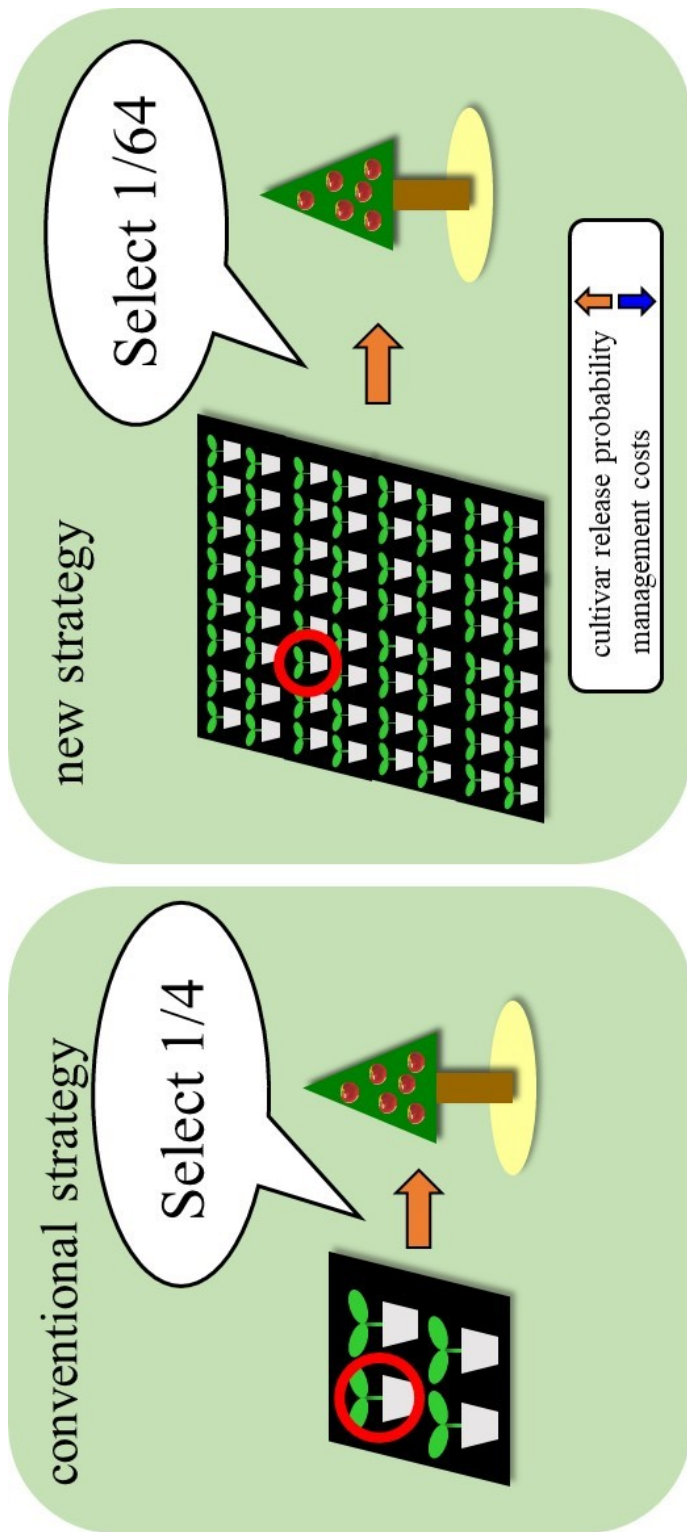


Figure 5-1-1. Strategy for marker assisted breeding for non- to slight- browning apple with various polyphenol content.



Select  $\frac{1}{4}$  of seedlings based on each genotype of three markers linking to *ACSI*, *LARI* and *PPO* (QTL on Chr5).

Select  $\frac{1}{4}$  of seedlings based on genotype of *ACSI*.

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).

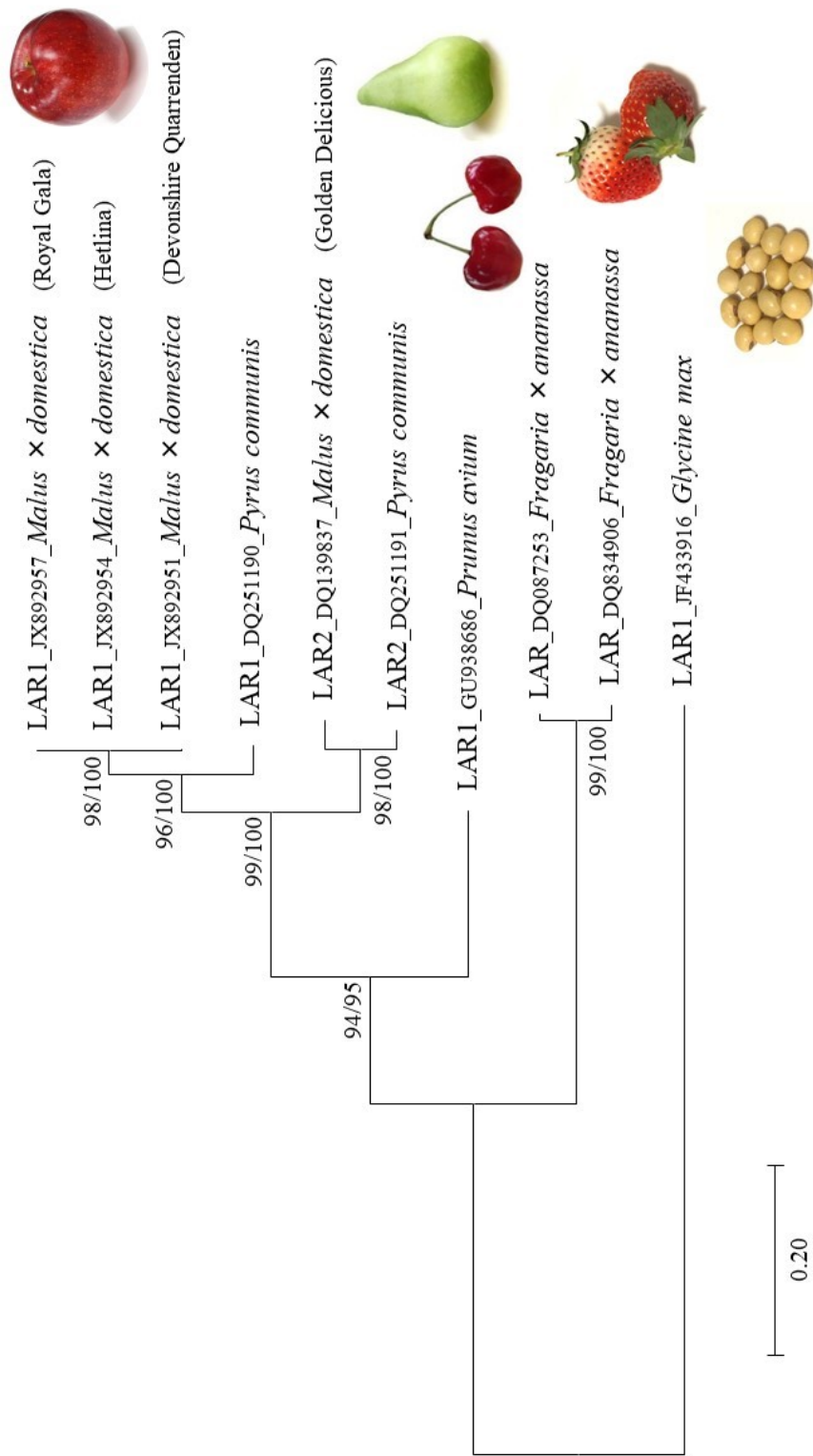


Figure 5-3. Neighbor-joining (NJ) tree of LAR genes of Rosaceae or other crops constructed by MEGA version 7.0. NJ and maximum parsimony (MP) bootstrap support (BS) values are indicated at the nodes as NJBS/MPBS. GenBank accession No. are noted before the species names. The tree was rooted to *Glycine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

## 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 F<sub>1</sub> 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 *LARI* 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

生合成経路上の遺伝子 *LARI* 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 ‘ゴールドデリシャス’ 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、‘ゴールドデリシャス’、‘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。

## 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 F<sub>1</sub> 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 (LARI)*, 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 F<sub>1</sub> 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.

## 謝辞

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。

（地独）青森県産業技術センターの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き、渋谷義仁理事長ならびに成田勝治理事長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の荒井茂充所長、今村友彦所長、福士好文所長をはじめ職員の方々に深く感謝の意を表す。

‘あおり 27’ 及び QTL 解析に供試した実生集団の育成、ならびにリンゴの果肉褐変性に関する研究の素地を構築された今智之氏に心より感謝の意を表す。

本研究は「実需者等のニーズに対応する園芸作物の DNA マーカ

一の開発」(DHR)事業のために農林水産省からの助成金によって部分的に支援を賜り、ここに感謝の意を表する。

## 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, Kinae 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, Choisne 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 volatilome 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) Reversedphase 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-

- 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, Schrevens 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
- Liebhard 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
- Liebhard 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
- Liebhard 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, Vrielink-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  $\alpha$ -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-Illzarbe 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, Gaillard 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, Kunihiya 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.



## 研究業績

### 原著論文

Tazawa J, Oshino H, Kon T, Kasai S, Kudo T, Hatsuyama Y, Fukasawa-Akada T, Yamamoto T and Kunihiisa M (2019) Genetic characterization of flesh browning trait in apple using the non-browning cultivar 'Aori27'. *Tree Genet Genomes* 15: 49

森谷茂樹、後藤聡、久保隆、國久美由紀、田沢純子、工藤剛、葛西智、工藤悠、岡田和馬、山本俊哉、深澤（赤田）朝子、初山慶道、阿部和幸（2019）岩手県盛岡市に分布するリンゴ黒星病菌（*Venturia inaequalis*）レース同定の試みおよびリンゴ‘あかね’のリンゴ黒星病抵抗性に関与する QTL の同定．園芸学研究 第 18 巻： 349-361

工藤悠、工藤剛、田沢純子（2018）醸造用リンゴ品種の特性評価．東北農業研究 71: 53-54

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

久保隆、鈴木均、葛西智、後藤聡、田沢純子、工藤剛、深澤（赤田）朝子（2014）リンゴ‘あおり 21’の反射資材を利用した着色促進によるやけ病低減．東北農業研究 67: 83-84

### 報文

田沢純子（2019）高品位加工りんごの現状と課題．令和元年度りんご研究所参観デー資料集： 6-11

- 田沢純子、工藤剛、工藤悠、坂本康純、初山慶道、柴理人、奈島賢児、山田昌彦（2019）リンゴ 22 品種における果実重の遺伝および環境変異．園学研 18（別 1）：287
- 田沢純子、工藤剛、工藤悠、坂本康純、本島哲、奈島賢児、山田昌彦（2018）リンゴ 22 品種における果実糖度および収穫期の品種間差異と環境変動．園学研 17（別 1）：281
- 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．園学研 17（別 1）：48
- 田沢純子、國久美由紀、押野秀美、初山慶道、深澤（赤田）朝子、山本俊哉（2017）ハプロタイプによるリンゴ裂果性の予測と検証．園学研 16（別 2）：148
- 押野秀美、田沢純子、國久美由紀、寺上伸吾、西谷千佳子、初山慶道、深澤（赤田）朝子、山本俊哉（2017）リンゴ‘あおり 27’の果肉褐変関連特性に関する候補遺伝子 LAR の発現解析とハプロタイプ解析．園学研 16（別 2）：346
- 田沢純子、國久美由紀、押野秀美、今智之、葛西智、工藤剛、久保隆、後藤聡、工藤悠、初山慶道、西谷千佳子、深澤（赤田）朝子、山本俊哉（2017）リンゴ「あおり 27」の F<sub>1</sub> 集団を用いた褐変特性等果実形質に関する QTL 解析．平成 29 年度果樹バイオテクノロジー研究会抄録集：9
- 田沢純子、國久美由紀、押野秀美、今智之、葛西智、工藤剛、久保隆、後藤聡、工藤悠、初山慶道、山本俊哉、深澤（赤田）朝子（2016）リンゴ‘あおり 27’の F<sub>1</sub> 集団を用いた果肉褐変関連特性に関する QTL 解析．園学研 15（別 2）：287



田沢純子、國久美由紀、押野秀美、今智之、葛西智、工藤剛、久保隆、後藤聡、工藤悠、初山慶道、山本俊哉、深澤（赤田）朝子（2016）褐変しないリンゴ品種の開発に向けた研究. 2016年度青森県保健医療福祉研究発表会・日本ヒューマンケア科学学会第9回学術集会合同集会抄録集: 56-57

田沢純子（2016）加工適性もあるリンゴ品種、「千雪（あおり 27）」. 最新農業技術果樹 9: 292-293

田沢純子（2015）話題の品種 244 リンゴ「あおり 27」（千雪）. 果実日本 70（11）: 8

田沢純子、國久美由紀、押野秀美、今智之、葛西智、工藤剛、久保隆、後藤聡、工藤悠、初山慶道、山本俊哉、深澤（赤田）朝子（2015）リンゴの果肉褐変性に関する選抜DNAマーカーの開発. 平成27年度果樹バイテク研究会抄録集: 17

田沢純子（2014）りんご「あおり 15」（商標名・星の金貨）食べきりサイズの美味しい黄色品種. 平成26年版農業日誌 368-369

## 品種登録

地方独立行政法人青森県産業技術センター（工藤剛、後藤聡、葛西智、田沢純子、赤田朝子、今智之、佐藤耕、北山弘、町田郁夫）（2018）*Malus Mill.* 紅はつみ. 第26826号