

PDF issue: 2024-10-20

交配とS-Rnase解析に基づくセイヨウナシのS遺伝子 型に関する研究

守谷, 友紀

<mark>(Degree)</mark> 博士(農学)

(Date of Degree) 2007-03-25

(Date of Publication) 2010-12-03

(Resource Type) doctoral thesis

(Report Number) 甲3971

(URL) https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003971

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

交配とS-RNase解析に基づく セイヨウナシのS遺伝子型に関する研究

平成19年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

守谷友紀

目次

| 序論 | | 1 |
|------|--|-----|
| 第1章 | 交配による不和合・和合の判定方法の確立 | 13 |
| 第2章 | 日本の栽培品種のS遺伝子型推定と 10種類のS対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステムの開発 | 29 |
| 第3章 | 国外の栽培品種のS遺伝子型推定と 17種類のS対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステムの確立の確立 | 69 |
| 第4章 | 三倍体品種のS遺伝子型推定 | 139 |
| 第5章 | 'グランド・チャンピオン (Grand Champion)'の部分的自家和合性 | 161 |
| 総合考察 | Ę | 183 |
| 謝辞 | | 193 |
| 参考文献 | Ŕ | 195 |

序 論

自家不和合性およびS遺伝子型の研究の背景

植物の自家不和合性は,自殖を回避して他殖を促すことから,種の遺伝的な多様性を維持す るしくみであると理解されている (de Nettancourt 2001).日本における自家不和合性の研究は 遺伝育種分野を中心に進み,近年,機構解明に関する分子生物学的研究が進展している (日向 ら 2001).育種では,自家不和合性を示す植物は自殖による形質の分離や遺伝的な固定が困難 であるので,集団選抜育種や組み合わせ能力に基づく一代雑種育種が行なわれる (日向ら 2000).また,果樹生産では,自家不和合性は結実を支配する要因であり,結実の安定および生 産性,さらには果実の品質に大きく関わっている.果樹の中で,バラ科果樹の大部分,すなわち ナシ亜科のリンゴ,ナシ類,サクラ亜科のオウトウ,ウメ,アンズ,スモモ,アーモンドなどは, ほとんどの品種が自家不和合性を有し,栽培における結実管理が必須である (杉浦ら 1991).

リンゴやセイヨウナシにおいては、結実不良の原因究明が行なわれ、古くから自家不和合性 の存在が知られていた (Knight 1917; Dorsey 1923). 菊池 (1929)は、わが国の在来果樹であるニ ホンナシについて、黒斑病抵抗性などを目的とした交雑育種に取り組み、自家不和合性ととも に品種間の交雑不和合性を見出している. また、自家不和合性の遺伝様式について、雑種後代 の遺伝分析から偏父不和合性を明らかにしている. 偏父不和合性は、East (1925)がタバコの自家 不和合性の遺伝解析において雌ずいと花粉の S (Sterile)遺伝子の作用について提起した離反因 子説に基づくもので、交雑親がS遺伝子を1つ共有する場合、後代の半数が花粉親と不和合とな る性質である. 菊池はニホンナシで明らかにした偏父不和合性をこの離反因子説で説明した. その後、ニホンナシでは、交雑不和合性と偏父不和合性に基づいて、SI~S7 の対立遺伝子が同定 され、23 品種が 10 種類のS遺伝子型に分類された (寺見ら 1946). また、これらS遺伝子型が明 らかな品種群との交雑不和合・和合の関係に基づいて品種のS遺伝子型を決定する方法が確立 され、栽培における受粉樹の選定や育種における交配関係の指標として用いられてきた.

リンゴでは、ドイツの Kobel et al. (1939)が、花柱内での花粉管伸長の観察に基づいて品種間 に11 個のS対立遺伝子を同定するとともに、24 品種を21 種類のS遺伝子型に分類した. しかし、 S 遺伝子型が推定された品種は当時のヨーロッパにおける栽培品種に限られていたので、その 後の改良品種やアメリカで育成された品種、さらにそれらを導入した日本の栽培品種のS遺伝 子型の推定には適用できなかった. また、セイヨウナシにおいても、品種の自家不和合性およ

び品種間の交雑不和合性が調査されたが, 交雑不和合を示す組み合わせが少なかったことから, S遺伝子型の決定には至らなかった (Kobel et al. 1939; Crane and Lewis 1942; Griggs and Iwakiri 1954; Lewis and Modlibowska 1942; Modlibowska 1945; Rawes 1933). 交配によってS遺伝子型を 決定する場合には, 交雑後代における S対立遺伝子の分離比や広範な品種の交雑不和合・和合 関係に基づいて対立遺伝子を同定し, S遺伝子型の種類ごとにテスター品種を選定する必要が ある. しかしながら, 果樹では, 交雑後代の実生樹の養成および開花に年数を要すること, 交配 実験においては受粉の労力や品種間における開花時期の不一致が問題となること, 品種・系統 の維持管理に多大な労力および広大な土地などが必要となることから, 生産や育種計画におけ る重要性にも関わらず, S遺伝子の同定と品種のS遺伝子型の決定は極めて困難であった.

S遺伝子型研究の展開

自家不和合性の研究は、遺伝様式の解析からメカニズムの解明へと発展し、花粉管の伸長の 生理学的研究(Linskens, 1967)から雌しベ側および花粉側 S 遺伝子産物の同定へと進歩してき た. アブラナ科、ナス科、バラ科、ゴマノハグサ科の自家不和合性では、S 遺伝子座に雌しベ側 および花粉側のS遺伝子が座乗し、S対立遺伝子として配偶子に遺伝する. 近年では、S遺伝子を 雌しベ側と花粉側S遺伝子の組として捉え、S対立遺伝子の代わりにSハプロタイプという用語 を使用するようになってきている(McCubbin and Kao 2000). 胞子体型自家不和合性では、花粉 の表現型は親植物(胞子体)のハプロタイプにより決定され、花粉側および雌しベ側の両方に優 性、劣性、共優性が存在する. 遺伝子型 SIS2 の親個体に由来する花粉が共優性の場合、花粉は S1 と S2 の両方の表現型を示すが、S1 が S2 に対して優性である場合、花粉の表現型は全て S1 となり、どちらも花粉の表現型と同じハプロタイプを持つ雌しべに拒絶される(図 0-1). 一方、 配偶体型では、花粉の表現型は花粉(配偶体)のハプロタイプにより決定され、雌しベ側は共優 性である. 遺伝子型 SIS2 の親個体に由来する花粉の表現型は S1 または S2 のどちらかであり、 花粉と同じハプロタイプを持つ雌しべに拒絶される(図 0-1).

対立遺伝子特異的な S 遺伝子産物の探索により, 1977 年に胞子体型自家不和合性を示すアプ ラナ科植物の雌しべから, S 複対立遺伝子に特異的な S 糖タンパク質が初めて見出された (Nishio and Hinata 1977). 一方, 配偶体型自家不和合性では, 1986 年になってナス科のタバコの 雌しべから, S 遺伝子に特異的な塩基性糖タンパク質が見出されるとともに (Anderson et al. 1986), RNase 活性を有することが明らかにされ, S-RNase と呼ばれるようになった (McClure et al. 1989). ニホンナシでも, 2D-PAGE により *SI~S7* 遺伝子に対応する S1~S7-RNase が同定された



図0-1 胞子体型および配偶体型自家不和合性の模式図. (雌しべ側に優劣がない場合)

(Sassa et al. 1993, 1994, 1996; Ishimizu et al. 1996). ニホンナシにおいて, これらのS-RNase は自家 不和合性が発現し始める開花 3~1 日前から急増する (Ishimizu et al. 1996). また, 自家和合性品 種の'おさ二十世紀' (*S2S4sm*)では, 花柱タンパク質中に S4-RNase が検出されず (Ishimizu et al. 1996), その原因は *S4-RNase* 遺伝子の欠失によることが示され (Sassa et al. 1997), ニホンナシに おける自家不和合性の雌しべ側の *S* 遺伝子産物が明らかになるとともに, その分子的な研究が 開始された.

Norioka et al. (1996)はニホンナシの花柱から S-RNase をコードする cDNA をクローニングし, それらの塩基配列を決定している. 各 S-RNase の推定アミノ酸配列には N 末端に 22~27 残基 のシグナルペプチドが認められ, RNase 活性に必須な 2 つのヒスチジン残基, 立体構造に関わる 8 つのシステイン残基が保存されている. 推定アミノ酸配列の比較から, S-RNase には 5 つの保 存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5)とアミノ酸配列の変化に富んだ 1 つの超可変領域 (HV 領域)が同 定されている (図 0-2). HV 領域の推定アミノ酸配列は S 対立遺伝子特異的であり, 花粉との自 他認識に関与すると推測されている (Norioka et al. 1996; Sassa et al. 1996; Ishimizu et al. 1998).

ニホンナシでは、この S-RNase の塩基配列情報に基づいて、ゲノミック PCR を利用した S 遺 伝子型の推定方法が検討された. S-RNase 特異的なコンセンサスプライマーを用いたゲノミッ ク PCR により約 350~1300 bp の断片 (HV 領域とイントロンを含む)を増幅し、6 種類の制限酵 素で S 対立遺伝子特異的に切断する方法が考案された (Ishimizu et al. 1999). Castillo et al. (2002) は、この S-RNase の塩基配列に基づく CAPS マーカーシステムによりニホンナシ品種の既知 S 遺伝子型を再検討するとともに、未確定の品種の S 遺伝子型を推定した. '赤穂'など既知の S 遺 伝子型との不一致が見出された 4 品種の S 遺伝子型については、交配実験の結果に基づき S 遺 伝子型を修正するとともに、新たに推定された'早生幸蔵'と'真鍮'の S 遺伝子型についても、交 配による検証を行ない、S-RNase に基づく CAPS マーカーシステムによる推定方法の信頼性を確 認した. また、近年の育成品種には SI~S7-RNase 以外の新規の S 遺伝子が存在したことから、新 たに S8-および S9-RNase がクローニングされ、SI~S9-RNase を増幅できるコンセンサスプライマ ーを用いたゲノミック PCR と9 種類の制限酵素処理からなる CAPS マーカーシステムが確立さ れた (Castillo et al. 2002; Takasaki et al. 2004). この CAPS マーカーシステムと交配により、ニホ ンナシの栽培品種全体の S 遺伝子型推定が可能になっている.

ニホンナシにおける S-RNase に基づいた遺伝子型推定システムの開発に続いて、リンゴにおいてもS遺伝子型の推定方法が開発された.小森ら (1998a, b)は、わが国で栽培されているリンゴ品種で知られてきた交雑不和合・和合関係から6種類のS対立遺伝子を同定するとともに、主

| MGVTGMTYMFTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFQFTQQYQPAVCNSNPTPCNDPTDK | KLFTVHGLWPSNRNGPDPEKCKTTALNSQKIGN-MTAQLEIIWPNVLNRSDHVGFWEKEWIKHGTCG 121 | L |
|--|--|---|
| MRITGMIYIFTMVFSLNVLILSSSAAR-YDYFOFTOOYOOAFCNSNPTPCKDPPDK | KLFTVHGLWPSTKVGRDPEYCK-TKRY-KIOR-LEPQLEIIWPNVSDRKANRGFWRKQWYKHGSCA 120 | ð |
| MVHVVMMVFLLIVLILCSSTVG-YDYFÖFTÖÖYÖLAVCNSNRTLCKDPPDK | KLFTVHGLWPSNMVGPDPSKC-PIK-NIRKRÉKLLEHÕLEIIWPNVFDRTKNNLFWDKÉWMKHGSCG 116 | õ |
| MGIT GMTYMFTMVLSLIVLIFSASTVG-FDYFOFTOOYOPAVCNSNPTPCNDPTDK | KLFTVHGLWPSNRNGPDPEKCKTTTMNSQKIGN-MTAQLEIIWPNVLNRSDHVGFWEREWLKHGTCG 121 | L |
| MGITGMVYVVTMVFLLIVLILSSSTVG-YDYFÖFTÖÖYÖLAVCNSNRTPCKDPPDK | KLFTVHGLWPSSMAGPDPSNC-PI-RNIRKREKLLEPÕLAIIWPNVFDRTKNKLFWDKEWMKHGTCG 120 | ٥ |
| MGIT GMIYMVPMVFSLIVLISCSSTMG-YNYFÖFTÖÖYÖPAVCNSNPTPCKDPPDK | KLFTVHGLWPSNDVGDDPIYCKNKTIKSOOIGN-LTAÕLIIIWPNVLDRTDHVGFWNROWNKHGSCG 121 | L |
| MGITGMIY IVTWVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTOOYOPAVCNSKPTPCKDPPDK | KLFTVHGLWPSNLNGPHPENCTNATVNPHŘIKN-IOAOLKIIWPNVLDRTNHVGFWNKOWIKHGSCG 121 | L |
| MGTTGMTYMVTMVFSLTVLTLSSSKA00YDYFOFTOOYOPAVCNSNPTPCKDSPDK | KLETVHGLWPSNSSGPHPHNCTNTTVKSOTIRS-LKAOLETIWPNVLNPNDHVGFWSROWGKHGTCA 122 | 2 |
| MGTT GMTY MVTMV FSI TVI TSSSPVMK - FDY FOFTOOY OPAV (SSNPTPCRDPPDK | KLETVHGLWPSNVNGSDPKKCKTTTLNPOTTTN-LTTOLETTWPNVLNRBANVREWRKOWRKHGTCG 121 | Ē |
| MV-TGMTYVVMMVESI TI L TI SSSTVG-EDYYOFTOOYOPAVCNSNPTPCKDPPDK | KLETVHGLWPSNSNGNDPEYCKAPP-Y-HTTKM-LEPOLVTTWPNVLNRNDHEGEWRKOWDKHGSCA 119 | 3 |
| MGTTRMVY TVTMI ESI TVI TI SSSTVG-YDYFOFTOOYOPAACNSNPTPCKDPPDK | KLETVHGLWPSNMNRSELENCSSSNVTYAKTON-TRTÖLENTWPNVENRKNHLGEWNRÈWNKHGACG 121 | Ē |
| MGTT CMTYMVTMVESI TVLTI SSSAVK-EDY FOFTOOY OPAVCSSNPTPCK DPPDK | KI FTYHGI WPSNYNGSDPKKCKTTTI NPOTTN-I TAQI FTTWPNVI NRKAHABEWRKOWRKHGTCG 121 | ĩ |
| MGTTRMTYMVTMI FSLLVSTLSSSTVG-EDVEDETOOYOPAACNSNPTPCKDPTDK | | ž |
| MGTTCHTYM/TM/ESITVITISPSAAK-YDYIOFTOOYOPAACKEHHTPCKDPDK | | ź |
| MGTTCMTYM/TTVESITVIIISSSAAR-YDYEOFTOOYOLAACNSKPTPCKDPDK | | ĩ |
| MGTTCMTYM/TM/ESITVITISSOTVG_YDYEOFTOOYOPAVCHENDTPCRODDDK | | ĩ |
| MGTTCMTYM/TMVFSLTVLHLSSSTVVG TDTTQTTQTQQTQTAVCII NTTCCOPPD | | ĩ |
| MGTTCMTSMTTM/ESILVITI SSSTVC-EDYEOFTOYOPAVCNENPTPCKDPTD | | ã |
| MGTTCMTYMETMVESI TVI TI SSSTVG TO FTOOY OPAV (NSNPTPCNDPPE) | | í |
| MG_TGTTYM/MM/ESITILTISSSTVG-EDY/OFTO/YOPA/CHSNPTPCKDPDD | | ā |
| MG_TCMTYM/MM/ESITILTI PSSTVG-FDY/OFTO/OPA/CNSNPTPCKDPTD | | á |
| MGTMGMTYM/MM/ESITVITI SSSTVG-EDYEOFTHOYOPAV(NSNRTPCKDPD) | KL FTVHGLWPSNBNGPDPEYCKNTTLDVTKTGN-LOADLDTTWPNVYDBTNNVGEWSKOWAKHGTCG | í |
| MGTTGTTYW/TMVFSLTVLTLSSSTVG TDFTQTTNQTQFAVCISNICTCKDPDD | KL FTVHGLWPSNSTGRDPKYCNPSNVTSHMLKN-TOAOLETTWPNVLNRTDHTGEWEROWKKHGSCG | ī |
| | | - |
| | | |
| | | |
| -YOTTKDOMHYL OTV TONY TTOKONY SATL SKAATOPNOTNODI VOTENATOPOTN | | |
| -SDALDNOKHY FETV TOMELA EKONVSDTL SMATTEDEGKNDTLLETONATDAGTA | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| -SSPLUNUKITTOVONVEDTI SKANTEDOONTDTOKETVDA TOKETVDA | | |
| | AGKEPNEKCONNIOMTELVEVILCSDONEKOTDCPARPAGSKANCPINALTY 229 | |
| | DTKKPKLKCKNNNQITELVEVGLCSDNNLIQFIDCPNPFPQGSPFFCPINNIQT 229 | |
| -YPI IQNENDY FETVIKMY ITEKQNV SKIL SNAKIEPDGQSKPLVDIENAIKNG F | HNKPKFKCQKNNGVIELVEIILCSDKNKAHFIDCPNFEPGSPILCPNISIKY 228 | |
| -SPILLDKNHYFEIVIKMYLIEKQNVSYLLSKANINPDGKGRIKKDIQLAIKNSIN | NDKEPKLKCQIKNGIIELVEVSLCSNYFGKNFINCPNKIPGKIKYSCPINDIHY 230 | |
| -HPIIMNDIHYFQIVIKMYIIQKQNVSKILSKAKIEPEGKPRKQVDIVNAIRKGIN | NDKEPKLKCQKNNQVTELVEVILCSNRNLIGFINCPRHIPNGSRYSCPTKNILY 229 | |
| -HPAIQNDMHYLQIVIKMYIIQKQNVSEILSKAKIEPVGKFRIQKEIEKAIRKGIN | NNKEPKLKCQKNSQRTELVEVTICSDRNLNQFIDCPRPILNGSRYYCPTNNILY 229 | |
| -YPIIADDMHYFSTVIEMYITKKQNVSEILSKAKIKPEGRFRTRDDIVNAISQSI | DYKKPKLKCKINNQITELVEVGLCSDNNLIQFINCPNPFPQGSPYFCPTNNIQY 229 | |
| -YPTIQNENDYFETVVKMYITEKQNVSKILSNAKIEPDGIKRTLADLEIAIRSGT | UNKKPK-KCQKKRRVIELVEVTLCSDKNRAHFIDCPNPFQPGSPYLCPTNNILY 228 | |
| | NNMKPKFKCOKNTRT-TTELVEVTLCRDRDLTKFINCPOPPO-GSRYLCPAD-VOY 228 | |
| -IFTIRDUMITERTVIRMITIORQUV SATLARAMIQFINOQURSEVDIENAIRSOT | | |
| -SSPIQNQKHYFDTVIKMYTTQKQNVSEILSKANIKPGRKNRTLVDIENAIRNVIN | NNMTPKFKCQKNTRTSLTELVEVGLCSDSNLTQFINCPRPFPQGSRYFCPTS-IQY 228 | |
| -SSPIQNQKHYFDTVIKMYTTQKQNVSEILSKANIKPGRKNRTLVDIENAIRNVIN -SSPIQNQKHYFDTVIKMYTTQKQNISEILSKANIKPGRKNRTLVDIENAIRNVIN | NNMTPKFKCQKNTRTSLTELVEVGLCSDSNLTQFINCPRPFPQGSRYFCPTS-IQY 228 NNMTPQFKCQKNTRTSLTELVEVGLCSDSNLTQFINCPRPFPRGSRYFCPTN-IQY 228 | |
| -SSPIQNQKHYFDTVIKMYTTQKQNVSEILSKANIKPGRKNRTLVDIENAIRNVIN -SSPIQNQKHYFDTVIKMYTTQKQNISEILSKANIKPGRKNRTLVDIENAIRNVIN -SPTIQDDVNYLETVINLYIIKKQNVFEILSNAKIEPEGKNRTRKDIVKAIRSGT | NNMTPKFKCÓKNTRTSLTELVEVGLCSDSNLTOFINCPŘPFPQGSRYFCPTS-IQY 228 NNMTPQFKCÓKNTRTSLTELVEVGLCSDSNLTOFINCPRPFPRGSRYFCPTN-IQY 228 KGKRPKLKCÓKNNRTTELVEVTLCSDRNLTOLINCPNLIKPKSPYFCPLKSIQY 229 | |
| -SSPIQNQKHYFDTVIKMYTTQKQNVSEILSKANIKPGRKNRTLVDIENAIRNVIN -SSPIQNQKHYFDTVIKMYTTQKQNISEILSKANIKPGRKNRTLVDIENAIRNVIN -SPTIQDDVNYLETVINLYIIKKQNVFEILSNAKIEPEGKNRTRKDIVKAIRSGT -RPAITNEVDYFQTVIKMYITQKQNVSKILSKAKIEPEGRIRMLKDIEDAIRNGT | NNMTPKFKCQKNTRTSLTELVEVGLCSDSNLTQFINCPRPFPQGSRYFCPTS-IQY 228 NNMTPQFKCQKNTRTSLTELVEVGLCSDSNLTQFINCPRPFPRGSRYFCPTN-IQY 228 KGKRPKLKCQKNNRTTELVEVTLCSDRNLTQLINCPNLIKPKSPYFCPLKSIQY 229 NNKKPKLKCQKNSRMTELVEVTLCRDSNLTQFINCPSPILPGSPFLCPAN-IRY 228 | |
| | MGVT GMTYMFTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MRITGMIYIFTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQYQAAFCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVFMVFLLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQYQAAVCNSNRTPCKDPPD MGITGMIYMVFMVFSLIVLISSSTVG-YDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVFMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-PDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAACNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAACNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAACNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAACNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAACNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAACNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAACNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMVMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGHIYVTMVFSLIVLILSSSTVG-FDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGHIYVTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGMIYMMMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGHIYVTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGHIYVTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGHIYVTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPPD MGITGHIYVTMVFSLIVLILSSSTVG-YDYFOFTQQYQAAVCNSNPTPCKDPTD MGITGHIYYTMVFSLIVLINYTTCKQNVSAILSKAKIEPDGKKRALLDIENAINRGAI -YPTIDNENHYFFTVIKMYTTCKQNVSAILSKAKIEPDGKKRALLDIENAINRGAI -YPTIDNHYFTYTIKMYTTCKQNVSELLSKAKIEPDGGKRRALDDINAINSGNI -YPTIDNNDHYFGTVIKMY | MGYTGYTMFTMYFSLIVLI.SSTVG-PYPFOTOXYQAACKINPTPCNDPTDK.FTViGLWPSINVQRDPFYC.TALKSQKIGH-HYAQLETIWPNVQRKSGKWKGGK HUTGGYTTHWFINFSLIVLI.SSTVG-PYPFOTOXYQAACKINPTPCNDPTDK.FTViGLWPSINVQRDPFYC.TALKSQKIGH-HYAQLETIWPNVGRKMKGGC 114 GTTGGYTVFTMYFLLVI.ISSTVG-PYPFOTOXYQAACKINPTCNDPTDK.FTViGLWPSINVQRDPFYC.TALKSQKIGH-HYAQLETIWPNVGRKMKGGC 115 GTTGGYTVFTMYFLLVI.ISSTVG-PYPFOTOXYQAACKINPTCNDPTDK.FTViGLWPSINVQRDPFYC.TTMK.FKIGH-LEPQLATIWPNVGRKMKGGC 116 GTTGGYTVFTMYFLLVI.ISSSTVG-PYPFOTOXYQAACKINPTCNDPTDK.FTViGLWPSINVQPDPEKCKTTTMKSQKIGH-HYAQLETIWPNVGRKMKGGC 117 GTTGGYTVFTMYFLVI.ISSSTVG-PYPFOTOXYQAACKINPTCNDPTDK.FTViGLWPSINVQPDPEKCKTTTMKSQKIGH-HYAQLETIWPNVGRKKGGC 117 GTTGGYTVFTMYFLVI.ISSSTVG-PYPFOTOXYQAACKINPTCNDPDK.FTViGLWPSINVQPDPEKCKTTTMKSTVGHTGG 117 GTTGGYTVFTMYFSLVI.ISSSTVG-PYPFOTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTViGLWPSINVGSDPKKCKTTILNPTINLFTWUGHWSINVGKKGGG 117 GTTGGYTVFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTViGLWPSINNGSDPKKCKTTILNPTTINLFTUGHWFNINKGKGGG 117 GTTGGYTVFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTViGLWPSINNGSDPKKCKTTILNPTTINLFTWUGHWFNRKKGKGGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTVIGLWPSINNGSDPKKCKTTILNPTTINLFTUGHWFNINKGKGGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTVIGLWPSINNGSDPKKCKTTILNPTTINLFLDQLUTIWPVVFKRKKGGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSXVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTVIGLWPSINNGSDPKKCKTTILNPTTIN-LTQLETIWPVVLRKAHARINKQNKKHGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTVIGLWPSINNGSDPKKCKTTILNPTTIN-LTQLETIWPVVLRKAHARINKQNKKHGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTVIGLWPSINNGSDPKKCKTTILNPTTIN-LTQLETIWPVVLRKAHARINKQNKKHGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPDK.FTVIGLWPSINNGSDPKKCKTTILNPTIN-LTAQLETIWPVVLRKAHARINKQNKKHGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDPDKXCFTYGUWPSINNGSDPKKCKTTILNPTIN-LTAQLETIWPVVLRKAHARINKQNKKHGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTOXYQAAXINPTCKDDPKXCFTTVGUWPSINNGSDPKKCKTTILNPTIN-LTAQLETIWPVVLRKAHARINKQNKKHGGG 117 GTTGGYTYFTMFSLVI.ISSSTVG-FDYYGTQXQAAXINPTFCKDPDKXCFTTVGUWPSINNGSDPKKCKTTILNPTINTYSSTVGFPNXGY 117 GTGGGYTYFTMFS |

図 0-2 ニホンナシ (Pp)S-RNase とリンゴ (Md)S-RNase の推定アミノ酸配列の比較.

青色は保存領域 (C1~C5)を,赤色は超可変 (HV)領域を示す. 17 種類の S-RNase は下記の accession number で DDBJ に登録されている: Pp S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9-RNase (AB014073, AB002139, AB025421, AB009385, AB045711, AB002142, AB002143, AB104908, AB104909). Md S1, S2, S3, S4, S5, S7, S9, S10, S16, S19, S20, S24, S25, S26-RNase (D50837, U12199, U12200, AF327223, U19791, AB032246, D50836, AB052683, AF016919, AB035273, AB019184, AB032247, AB062100, AF016918).

要 11 品種を 7 種類の S 遺伝子型に分類した. また, S-RNase に基づく S 遺伝子型推定がヨーロッパ, アメリカ, 日本で進められた (Janssens et al. 1995; Matsumoto et al. 1999a, b; Sakurai et al. 2000; Broothaerts 2003). これらの研究から, S-RNase 対立遺伝子に特異的なプライマーセットを用いたゲノミック PCR により約 200~920 bp の S-RNase 断片 (これら断片は必ずしも HV 領域 およびイントロンを含まない)を増幅し, その後の追加的な制限酵素処理と併せて, S-RNase 対 立遺伝子を識別し, 品種の遺伝子型推定を可能にするシステムが構築された. したがって, リンゴでは S 遺伝子型が未確定な品種の推定には, すべての S 遺伝子特異的プライマーセットを用いたゲノミック PCR が必要である.

これらシステムにより推定された品種の S 遺伝子型は交配により確認される必要がある. ニ ホンナシにおいては、交配により決定された S 遺伝子型を持つテスター品種が存在し、交雑不 和合・和合の判定により確認できる. また、新規 S 遺伝子の同定には、S-RNase の難しべにおけ る特異的発現、および、対立性検定としての後代検定が必須とされ、交配による不和合・和合の 機能性の確認を行なってシステムに対する信頼性を確認する必要が指摘されている (Castillo et al. 2002; Takasaki et al. 2004). しかしながら、必ずしも同じ S 遺伝子型を持つ品種が存在すると は限らず、交配により全ての S 遺伝子型を確認できないことから、推定システム自体の信頼性 を高める必要がある.

セイヨウナシの栽培品種群

セイヨウナシ (Pyrus communis L.)はリンゴ (Malus×domestica Borkh.)やニホンナシ (Pyrus pyrifolia Nakai)と同じバラ科ナシ亜科の落葉果樹である. ナシ亜科植物の原生地はヒマラヤ山 脈北側から天山山脈にわたる地域とされ,各樹種の祖先種はそこから東西に伝播しつつ種分化 を遂げている. ナシ属 (Pyrus)のうち,東へ伝播したグループは,チュウゴクナシ (Pyrus ussuriensis Maxim)やニホンナシ (Pyrus pyrifolia Nakai)を含むアジア種群を形成している. また 西部ユーラシアから中央アジア方面で種分化したグループからは,種間交雑により現在のセイ ヨウナシ (Pyrus communis)の祖先種が成立し,栽培種として中央アジア,小アジア,アフリカ さらにヨーロッパへと広まったと推測されている (Janick Fruit Breeding 1996).

セイヨウナシの栽培の歴史は極めて古く、約3000年前の古代ギリシャ時代には既に栽培が始まり、ローマ時代の文献には41品種が紹介されている (Janick Fruit Breeding 1996). 16~17世紀にはベルギー、フランス、イギリスなどの王侯貴族の下で栽培が盛んになり、1750~1850年代はセイヨウナシ育種の黄金期として、現在に伝わる多くの品種が育成された. 'Flemish Beauty'、

'Winter Nelis', 'Beurré d'Anjou', 'Beurré Bosc'などはベルギーの育種家達が育成した品種で, Buttery と呼ばれるセイヨウナシ特有の優れた肉質が選抜されている. イギリスにはセイヨウナ シは自生していなかったが, ローマ人の遠征以前には持ち込まれており, 1770 年に野生のナシ から発見された'Williams (Bartlett)'や 1860 年頃に育成された'Conference'は, 現在, 世界的な経 済品種となっている. The Pears of New York (Hedrick 1921)には 2927 品種が掲載されており, そ の後もヨーロッパや北米を中心に活発な育種が行なわれていることから, 品種数は3000を超え ると予想される.

現在, 落葉果樹の中でブドウ, リンゴに次ぐ生産量を持つナシ類は, 世界 82 ヶ国で生産され ており、そのうちセイヨウナシは、ヨーロッパと南北アメリカ、南アフリカ、オセアニアでの生 産が多い (岩堀 2002). 生産の多くは自国消費であるが、アルゼンチンとチリではそれぞれ生 産量の 75%および 50%が輸出されている (Sanchez 2002). ヨーロッパ諸国における栽培は長い 歴史を持ち,国内消費を主体としていることから,品種構成に地域的な特色が認められる(表 0-1). 'Williams (Bartlett)'はフランス, オーストリア, ルクセンブルクで, 'Conference'はイギリス, オランダ、ベルギー、ドイツでそれぞれ首位を占めている. また、イタリアでは'Abbé fétal'、ス ペインは'Blanguila'、ポルトガルは'Rocha'がそれぞれ主要品種であり、さらにイタリアの 'Coscia', フランスの'Docteur jules Guyot (Precoce)'および'Doyenné du Comice', ベルギーの 'Durondeau', スウェーデンおよびデンマークの'Clara Frijs'なども栽培品種として取り上げられ ている. アメリカなどヨーロッパ以外の地域においては、'Bartlett (Williams)'が国内向けとして、 'Beurré d'Anjou', 'Beurré Bosc', 'Packam's Triumph'などが輸出用として栽培されている. 世界的 にみると、セイヨウナシの生産は増加傾向にあり、新品種の導入による栽培適地の拡大が図ら れている.病害虫抵抗性や栽培特性などの重要な育種目標は、広範な品種を基盤とする交配・選 抜により育成されようとしているが(岩堀 2002)、一方で、果実特性や生産性の改良に関しては、 主要品種同士や主要品種の後代を用いて交配が行なわれる場合が多く、新品種に占める特定品 種の後代の割合が増加している (Sanzol et al. 2002).

日本では、在来果樹のニホンナシがナシ類栽培の主体となってきた. セイヨウナシは、リン ゴやブドウなど同様、明治のはじめにアメリカやフランスから導入されて栽培が始まった(梶 浦 農業技術体系 1983). 導入品種の多くは、わが国の高温多湿の気候条件に適応しなかったが、 開花期に雨の少ない東北地方や長野県などの一部地域には定着し、小規模の栽培で推移した. 昭和 40 年代には、園芸振興策に沿って'バートレット'が缶詰用として奨励され、栽培面積も1、 900 ha までに増加したが、その後は加工産業の衰退により約 700 ha 程度に減少した(果実日本

表0-1 セイヨウナシ主要栽培国における生産量と主要品種

| 国名 | 生産量 (t)* | 主要栽培品種" |
|---------|----------|--|
| イタリア | 844,551 | Abate Fetel, William's (Bartlett), Conference, Doyenne du Comice, Beurré Bosc, Coscia |
| アメリカ | 773,810 | William's (Bartlett), Doyenne du Comice, Beurré Anjou, Red Anjou, Red Clapp's, Seckel, Forelle |
| スペイン | 679,400 | Blanquilla, Coscia, Conference, Ercolini, Docteur Jules Guyot |
| アルセンチン | 509,749 | William's (Bartlett), Packham's Triumph, Beurré Anjou |
| ドイツ | 400,000 | Alexandra Lucas, William's (Bartlett), Conference, Louise Bonne d'Avranches |
| 南アフリカ | 342,928 | Packham's Triumph, Beurré Bosc, William's (Bartlett), Forelle |
| トルコ | 340,000 | Akca, Ankara, Santa Maria, William's (Bartlett) |
| フランス | 279,000 | William's (Bartlett), Docteur Jules Guyot, Conference, Doyenne du Comice, Passe Crassane |
| ベルギー | 231,000 | Conference, Doyenne du Comice, Durondeau, Triomphe de Vienne, Beurre Hardy, Concorde |
| チリ | 212,000 | Packham's Triumph, Beurré Bosc, William's (Bartlett) |
| オランダ | 208,000 | Conference, Doyenne du Comice, Triomphe de Vienne, Alexandra Lucas |
| インド | 200,000 | William's (Bartlett), Conference, Early China, Max Red Bartlett, Starkrimson, Flemish Beauty |
| ポルトガル | 131,000 | Rocha, Clapp's Favourite, Passe Crassane |
| オーストラリア | 130,000 | Packham's Triumph, Beurré Bosc, William's (Bartlett), Joséphine de Malines |
| オーストリア | 125,000 | William's (Bartlett). Beurré Bosc, Louise Bonne d'Avranches |

生産量の多い国のうち,品種に関する文献がみられた国を掲載した.品種は概ね生産量の多い順に記載した. *:国連食糧農業機関 2005年統計.

^y: Eurostat統計 2006, 岩堀 2002, USDA/FAS 2006, Australian Bureau of Statistics 2006, Sharma et al. 2002, Karadeniz 1997.

1999).

近年の予冷・追熟技術の進歩や、山形、新潟、長野などを中心とした産地における栽培技術の 向上努力により、セイヨウナシの果実品質は著しく向上している. 特に芳香, 食感, 食味に優れ た'ラ・フランス'は評価の高まりとともに生食用果実としての需要が増加している. また、'ラ・ フランス'の消費拡大に伴い、セイヨウナシ自体の認知度・評価も高まり、多様な品種が市場に 流通するようになっている. その結果、セイヨウナシ全体の栽培面積 (約 1,750 ha)および生産 量 (32,200 t)はともに回復してきている (農林水産統計 2006). 栽培品種は、'ラ・フランス'が栽 培面積の 62.4%を占め、以下'バートレット'(7.6%)、'ル・レクチェ'(6.5%)、'シルバー・ベル' ('ラ・フランス'の自然交雑実生)(4.0%), 'ゼネラル・レクラーク' (3.7%)と続く. 早生優良品種と して'オーロラ'(3.0%)、中生優良品種として'マルゲリット・マリーラ'(2.8%)も栽培面積が増加 している (表0-2, 図0-3). この他に, 生産量は少量であるが, 18品種が栽培品種として取り上げ られており、古くからの品種として、'アレクサンドリン・デュイヤール'、'ウィンター・ネリス'、 'コンファレンス', 'グランド・チャンピオン', 'セニョール・デスペラン', 'ドワイエネ・デュ・ コミス', 'プレコース', 'フレミッシュ・ビューティー', 'マックス・レッド・バートレット', 'パ ス・クラサン', 新品種あるいは新規の導入品種として、'エル・ドラド', 'カリフォルニア', 'スタ ークリムソン', 'デボー', 'ボートヌ', 'ミクルマス・ネリス', '越さやか', 'バラード'が挙げられ, 総計は 25 品種に及んでいる. これらの中には、新潟県の'ル・レクチェ'、青森県の'ゼネラル・ レクラーク',山形県の'シルバー・ベル'など各地域の特産品種となっている品種もある、したが って、セイヨウナシは日本においても、他の樹種に比べて品種構成に地域性があり、世界にお ける生産の状況と同様の傾向にある.

日本のセイヨウナシ栽培は、導入の経緯や栽培適地に関して、同様に北部温帯果樹として定 着したオウトウとの類似点が多い.オウトウは、導入品種である、ナポレオン、の品質向上が優 先的に行なわれ、市場に定着した. '佐藤錦'が育成された 1912 年以降は、品質的に優れた新品種 が育成され、アメリカからの輸入チェリーと競合しつつも需要と生産を活性化させてきた. 'ラ・フランス'によって生食用果樹としての定着を成し遂げたセイヨウナシについても、今後の 需要と生産の規模拡大の観点から、ラ・フランス'中心の品種構成の見直しが検討されてきた. 特 に、出荷量の 71%を占める、ラ・フランス'が晩生品種であることから、早生および中生品種の出 荷量を増やすことにより需要拡大と宣伝効果がもたらされると期待されている. そのため、 'ラ・フランス'より早い時期に収穫できる優良品種の育成が最も重視され、'バートレット'と 'ラ・フランス'の雑種後代から中生品種の'越さやか'と'バラード'が選抜・育成されている.

表0-2 日本におけるセイヨウナシ品種別栽培割合(2004年)

| 品種 | 品種別割合 (%) ^z | 栽培面積 (ha) ^y |
|-----------------|------------------------|------------------------|
| ラ・フランス | 62.4 | 1196.8 |
| バートレット | 7.6 | 146.5 |
| ル・レクチェ | 6.5 | 124.9 |
| シルバー・ベル | 4.0 | 76.9 |
| ゼネラル・レクラーク | 3.7 | 70.2 |
| オーロラ | 3.0 | 57.6 |
| マルゲリット・マリーラ | 2.8 | 54.1 |
| フレミッシュ・ビューティー | 2.0 | 38.8 |
| セニョール・デスペラン | 1.7 | 33.5 |
| プレコース | 1.3 | 24.2 |
| マックス・レッド・バートレット | 1.0 | 19.8 |
| バラード | 1.0 | 18.7 |
| その他 | 2.9 | 55.3 |

*: 耕地及び作付面積統計 2005に基づき, 2004年の栽培総面積を 1917.3 haとして算出した.

»: 栽培面積は特産果樹生産動態等調査 2004に基づいた.



図0-3 日本におけるセイヨウナシ品種別栽培割合 平成16年の作付総面積を1917.3 haとし,各品種の栽培面積は 「平成16年産特産果樹生産動態等調査西洋なし」に基づいた. 他の果樹に比べて生産国や地域ごとの栽培品種の構成に差があるセイヨウナシにおいては, 結実に関する研究にはその地域で主に栽培されている特定品種を供試する場合が多く,この状 況はセイヨウナシの結実管理に大きく影響する自家不和合性や単為結果性についての研究でも 同様である (Brown and Childs 1929; Griggs and Iwakiri 1954; Westwood and Grim 1962; Ruiz 1977; Marcucci and Visser 1983). しかしながら,これら研究は、気象および土壌条件,栽培方法などの 環境条件が異なる上,実験方法が統一されていないことから,結果を比較して議論することが できない場合が多い. それぞれの結果は、その地域の栽培現場への応用など農学的側面では非 常に有益であるが、セイヨウナシの結実に関与する自家不和合性や単為結果性の理解という生 物学的側面では、品種と地域が限定された知見にとどまっている. したがって、セイヨウナシ の結実安定性を議論する上では、同じ環境条件下で多数の品種を扱った実験による知見、およ び、異なる環境下における実験結果の比較を可能にする方法が必要である.

本研究では、セイヨウナシの生産と育種の両方に関連する自家不和合性を取り上げ、セイヨ ウナシ品種の交雑不和合・和合関係を明らかにすることを目的とした. 交配実験においては、セ イヨウナシの単為結果性を考慮した交配による不和合・和合の判定方法を確立し、異なる調査 地・調査年における自家不和合性の評価を可能にした(第1章).一方で、セイヨウナシにおい ても雌しべ側S遺伝子産物はS-RNaseであるという仮定に基づき、S-RNaseの同定により日本お よび世界的な栽培品種のS遺伝子型を推定した. 対立遺伝子特異性の認識の分子的機構が未解 明である点を考慮に入れて、S-RNase 対立遺伝子のクローニングにおいては完全長塩基配列を 決定するとともに、S-RNaseの多型性に基づくS遺伝子型の推定システムを構築した(第2,3,4 章). さらに、自家不和合性を有するバラ科果樹の生産および育種や学問的研究において重要な 自家和合性について、S-RNase を基にした解析を行なった(第5章).

第1章

交配による不和合・和合の判定方法の確立

く摘要>

セイヨウナシの自家および交雑不和合性は結実率や種子数により判定されてきたが、それら の評価は明確ではない.本章では交配による不和合・和合の判定方法を確立するため、セイヨウ ナシ 10 品種を用いて1花そう1花の除雄無受粉、自家受粉、他家受粉を行ない、各品種の単為 結果性、自家不和合性、品種間の交雑不和合性を調査した.供試したすべての品種が単為結果 性を有していたことから、結実率では不和合・和合を識別できなかった.しかし、新たに提案し た SI (Self-Incompatibility) index [(評価対象の交配における交配花数当たりの充実種子数)×(100]により不和合・和合の判定が可能になった. その結果、'グランド・チャンピオン'は部分的自家和合であり、他の品種は自家不和合であると 判定された.有種子果実の品質は単為結果果実よりも優れており、単為結果性を有するセイヨ ウナシでも安定的な良質果実の生産には和合花粉の受粉が必要であることが明らかになった. 'フレミッシュ・ビューティー'と'スタークリムソン'および'バートレット'と'セニョール・デス ペラン'の2つの組み合わせが交雑不和合を示した.

<赭言>

セイヨウナシにおける品種の自家不和合性および品種間の交雑不和合性は、和合受粉に対す る不和合受粉の結実率や種子数を指標として調査されている (Crane and Lewis 1942; Griggs and Iwakiri 1954; Lewis and Modlibowska 1942; Modlibowska 1945; Rawes 1933). 二倍体の'Fertility'は 部分的自家不和合,四倍体の'Fertility'および'バートレット'は完全な自家和合であるが、その 他のほとんどのセイヨウナシニ倍体品種および三倍体品種は自家不和合と報告されている (Crane and Thomas 1939). 自家不和合品種において結実を確保するには、ニホンナシやリンゴと 同様に*S*遺伝子型に基づいた受粉樹の混植が必要とされる. しかし, Modlibowska (1945)が挙げ た7種類の品種組み合わせ、'Belle Lucrative (セニョール・デスペラン)'בLouise Bonne de Jersey (Loise Bonne d'Avranches)'、'Belle Lucrative'בSeckel'、'Louise Bonne de Jersey'בSeckel'、'Louise Bonne de Jersey'×'William's Bon Chrétien (バートレット)', 'William's Bon Chrétien'×'Seckel', 'Beurré d'Amanlis (3x)'×'Conference (2x)', 'Fertility (4x)'×'Fertility (2x)'以外に, 交雑不和合の組 み合わせを見出せなかったことから, セイヨウナシの*S*遺伝子型は決定されていない.

セイヨウナシには、種子が形成されなくても結実する単為結果性を持つ品種が多いが (Nyéki et al. 1994),上記の初期報告では、結実率に対する単為結果性の影響が考慮されていな い.単為結果性能力の高い品種を交配親とした場合、不和合受粉でも多くの果実を結実するこ とから、不和合を和合と誤って判定している可能性も考えられる.また、和合受粉は不和合・和 合の判定においてコントロールとして用いられるため、100%に近い安定した結実率が求められ るが、結実率4.0%以上を和合と判定している Rawes (1933)の実験など、低い結実率ながら和合 とされている交配も数多く記載されている.その要因として、生理落果による結実数の減少が 考えられるが、果実数に影響すると予想される1 花そうあたりの交配花数や結実数の調査時期 は言及されていない.

セイヨウナシにおいて、結実率に基づく不和合・和合の判定には課題が多く存在したことか ら、Sanzol and Herrero (2002)は花粉管伸長試験を行ない、胚珠に到達した花粉管数から不和合・ 和合を判定する方法を開発し、'バートレット'、'Coscia'、および、'バートレット'בCoscia'の交 雑後代に4種類のS対立遺伝子を見出し、6品種のS遺伝子型を推定している. この方法は不和 合・和合を明確に判定できるが、花器官を必要とするため交雑後代のS遺伝子型を早期に推定 することができない. 一方、ニホンナシとリンゴでは結実率や種子数を指標とする不和合・和合 の判定方法が取り入れられている. ニホンナシでは1花そう2花で交配を行ない、結実率 30% 以上を和合、30%未満を不和合とみなしている(佐藤ら 1992). リンゴでは1花そう1花で交配 し、結実率 30%以上を和合、15%以上 30%未満を混合領域、15%未満を不和合とし、果実当たり 種子数3.0個以上を和合、1.5個以上3.0個未満を混合領域、1.5個未満を不和合とし、2年間の交 配結果から判定している(小森ら 1998a). また、どちらにおいても和合受粉の結実率と充実種 子数により花粉および雌性組織の稔性が確認されている. したがって、セイヨウナシでも結実 率や種子数を指標とする不和合・和合の判定方法を確立することが望まれる.

そこで、本章では、結実率や種子数を指標とするセイヨウナシの不和合・和合の判定方法を検 討するために、日本の栽培品種 10 品種に対して除雄無受粉、自家受粉、他家受粉を行ない、着 果率、結実率、果実中の充実種子数を調査した.その結果から、品種の単為結果性と自家不和合 性、および、品種間の交雑不和合性を評価し、交配によるセイヨウナシの不和合・和合の判定方 法を考案した.また、無種子果実(単為結果果実)と有種子果実の形質を比較し、セイヨウナシ

においても和合他家受粉が必要であるかを検証した.

く材料および方法>

材料

弘前大学農学生命科学部生物共生教育研究センター藤崎農場 (青森県藤崎町)および長野県 果樹試験場 (長野県須坂市)に栽植されているセイヨウナシ 10 品種, 'ラ・フランス', 'グランド・ チャンピオン', 'バートレット', 'プレコース', 'フレミッシュ・ビューティー', 'コンファレンス', 'スタークリムソン', 'セニョール・デスペラン', 'パス・クラサン', 'ル・レクチェ'を実験に供し た.供試した樹はいずれも変則主幹形もしくは遅延開心形仕立ての成本 (樹齢不明)で,樹冠下 を清耕,樹間を草生とする部分草生により圃場管理がなされ,慣行法により栽培されている.

方法

交配実験

2000 年 5 月 7~12 日, 2001 年 5 月 1~7 日, 2002 年 4 月 21~26 日にかけて弘前大学藤崎農場 において, 2001 年 4 月 21~26 日, 2002 年 4 月 13~17 日にかけて長野県果樹試験場において交配 を行なった. 交配前日にバルーンステージの蕾から採葯し, 白熱灯下で開葯させて花粉を採取 した. 短果枝に着花したバルーンステージの 3~5 番花の蕾を除雄した後, リップブラシを用い て柱頭に受粉した. 交配後に他の花粉が混入するのを防ぐため, パラフィン紙で作製した小袋 を被せた. 自家受粉と他家受粉は1花そう1花または2花で行なった. 除雄無受粉はバルーンス テージの蕾を1花そう1花に調整して除雄した後, パラフィン紙製の小袋を被せた.

着果・結実数調査

交配約4週間後 (June drop 前)に着果数を調査して着果率を算出するとともに、パラフィン紙 製の小袋をニホンナシ用果実袋 (大袋)に付け替えた. また、交配約 10 週間後 (June drop 後)に 果実を収穫して結実数から結実率を算出するとともに、これらの果実に含まれる充実種子数、 未熟種子数、種子総数を調査した.

果実形質の比較

2002 年に行なった除雄無受粉および和合他家受粉により結実した無種子果実および有種子

果実を適期に収穫した. 'バートレット'9月4日 (弘前), 'コンファレンス'9月9日 (長野), 'フレ ミッシュ・ビューティー', および, 'グランド・チャンピオン' 10月1日 (弘前), 'ラ・フランス' 10月16日 (長野), 'ル・レクチェ', および, 'パス・クラサン' 10月19日 (長野)に収穫を行ない, 果実重量, 縦径, 横径を測定した. 4℃で7~10日間予冷した後, 室温で追熟させ, 可溶性固形成 分含量 (糖含量)と有機酸含量を測定した. 糖含量は屈折糖度計 (㈱エルマ)により測定した. 有 機酸含量は滴定により測定した. 測定の前に, 1gのフェノールフタレインを 100 mlの 50%エタ ノールに溶解し (50 mlの 100%エタノールに溶解後, 50 mlの蒸留水で定量), フェノールフタレ イン指示薬を作製した. また, 0.1 Nの NaOH (4 gの特級 NaOH を脱塩水に溶かして 1000 ml に 定量) 10 mlを0.1 N (0.05 M)のシュウ酸で滴定し, 滴定量 (ml)/10 mlをfactor とした. 果実の赤 道部の果肉をガーゼによって絞り, フェノールフタレイン指示薬を 2,3 滴添加し, 標定済みの 0.1 Nの NaOH で滴定した. セイヨウナシの主要な有機酸はリンゴ酸であるので, 果実の有機酸 含量 (リンゴ酸 g/100 ml)=0.0067 g× (滴定量 ml)×100/(果汁量 ml)×factor の計算式で算出 した.

<結果および考察>

花そう当たりの交配花数が結実に与える影響

国内でも日本の栽培品種を用いた交配実験が行なわれ、結実率や種子数を指標としたセイヨ ウナシの自家および交雑不和合・和合性の調査が行なわれている.小野田ら (1987)は1花そう 2花で交配し、交配後2ヶ月後に結実調査を、久保ら (1989)は1花そう3花で交配し、交配後1 ヶ月後に結実調査を行なっている.和合と判定された交配では、果実当たり平均4~9個の充実 種子が含まれているにもかかわらず、'バートレット'、'フレミッシュ・ビューティー'、'ル・レク チェ'の結実率は50%以下を示している.

2000年に弘前大学藤崎農場において、セイヨウナシ5品種に対して1花そう2花で他家受粉 を行ない、着果率と結実率を調査した(表1-1). 'フレミッシュ・ビューティー'の着果率は71.7% と低く、'グランド・チャンピオン'と'ラ・フランス'は90.0%と86.7%の着果率を示したものの、結 実率は75%以下になった. セイヨウナシの和合受粉における結実率の低さは幼果間の養分競合 による生理落果に起因すると考え、2001年に弘前大学藤崎農場および長野県果樹試験場に栽植 されている日本の栽培品種10品種に対して1花そう1花または2花で他家受粉を行ない、着果 率と結実率を調査した(表1-1,-2).2000年の結果をふまえて、'グランド・チャンピオン'、'フレ

| | | | 花そう | | | | 3. U.S. | | |
|---------------|------|---------------|------|----|-------|-------|---------|------------------|-------|
| 種子親 | 調査 | 花粉親 | あたり | 交配 | 着果率 | 結実率 | Seeds | Seeds | SI |
| | 年 | | 交配花数 | 花数 | (%) | (%) | /Fruit | /Flower | index |
| バートレット | 2000 | フレミッシュ・ビューティー | 2 | 58 | 93.3 | 91.4 | 6.2 | 5.7 ^z | |
| | | バートレット | 2 | 30 | 10.0 | 3.3 | 1.0 | 0.1 | 0.1 |
| | 2001 | フレミッシュ・ビューティー | 2 | 30 | 96.7 | 96.7 | 4.1 | 4.0 ^z | |
| | | バートレット | 2 | 30 | 36.7 | 36.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 2002 | グランド・チャンピオン | 2 | 30 | 100.0 | 83.3 | 8.1 | 6.8 | |
| | | | 1 | 30 | 100,0 | 100.0 | 6.5 | 6.5 ^z | |
| | | バートレット | 1 | 30 | 46.7 | 40.0 | 0.4 | 0.2 | 3.1 |
| | | セニョール・デスペラン | 1 | 30 | 33.3 | 26.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | スタークリムソン | 1 | 10 | 100.0 | 100.0 | 6.3 | 6.3 | |
| フレミッシュ・ビューティー | 2000 | ラ・フランス | 2 | 60 | 71.7 | 61.7 | 3.5 | 2.2 | |
| | | フレミッシュ・ビューティー | 2 | 30 | 66.7 | 50.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | 2001 | ラ・フランス | 1 | 28 | 100.0 | 96.4 | 7.4 | 6.9 ^z | |
| | | フレミッシュ・ビューティー | 1 | 29 | 93.3 | 93.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 2002 | ラ・フランス | 2 | 28 | 100.0 | 75.0 | 7.2 | 5.4 | |
| | | | 1 | 28 | 100.0 | 96.4 | 7.4 | 6.9 ^z | |
| | | フレミッシュ・ビューティー | 1 | 27 | 93.3 | 88.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | スタークリムソン | 1 | 30 | 73.3 | 65.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | セニョール・デスペラン | 1 | 10 | 100.0 | 100.0 | 9.1 | 9.1 | |
| グランド・チャンピオン | 2000 | バートレット | 2 | 30 | 90.0 | 73.3 | 4.4 | 3.2 | |
| | | グランド・チャンピオン | 2 | 28 | 85.7 | 78.6 | 2.7 | 2.1 | |
| | 2001 | バートレット | 1 | 15 | 100.0 | 100.0 | 6.9 | 6.9 ^z | |
| | | グランド・チャンピオン | 1 | 30 | 96.7 | 96.7 | 4.1 | 4.1 | 59.4 |
| | 2002 | バートレット | 1 | 58 | 100.0 | 96.6 | 6.3 | 6.1 ^z | |
| | | グランド・チャンピオン | 1 | 69 | 94.3 | 85.5 | 1.2 | 1.0 | 16.4 |
| ラ・フランス | 2000 | フレミッシュ・ビューティー | 2 | 60 | 86.7 | 75.0 | 4.2 | 3.1 | |
| | | ラ・フランス | 2 | 28 | 64.3 | 25.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | 2001 | フレミッシュ・ビューティー | 1 | 29 | 100.0 | 82.8 | 4.6 | 3.8 ^z | |
| | | ラ・フランス | 1 | 28 | 100.0 | 57.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 2002 | グランド・チャンピオン | 1 | 10 | 100.0 | 80.0 | 8.3 | 6.6 ^z | |
| × | | ラ・フランス | 1 | 29 | 100.0 | 58.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| ブレコース | 2000 | フレミッシュ・ビューティー | 2 | 60 | 98.3 | 95.0 | 5.7 | 5.4 ² | |
| | | ブレコース | 2 | 30 | 36.7 | 26.7 | 0.4 | 0.1 | 1.9 |
| | 2001 | グランド・チャンピオン | 2 | 30 | 100.0 | 100.0 | 7.5 | 7.5 ² | |
| | | フレコース | 2 | 28 | 43.3 | 25.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 2002 | フレミッシュ・ビューティー | 2 | 30 | 100.0 | 80.0 | 3.8 | 3.0 | |
| | | b | 1 | 30 | 100.0 | 86.7 | 4.8 | 4.0 ^z | |
| | | プレコース | 1 | 40 | 82.5 | 27.5 | 0.3 | 0.1 | 2.5 |

表1-1 1花そう1花または2花の自家および他家受粉による結実数と充実種子数(弘前大学藤崎農場)

² SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

| | | ······································ | 花そう | | | | | * Neve - | |
|-------------|------|--|------|----|-------|-------|--------|------------------|-------|
| 種子親 | 調査 | 花粉親 | あたり | 交配 | 着果率 | 結実率 | Seeds | Seeds | SI |
| | 年 | | 交配花数 | 花数 | (%) | (%) | /Fruit | /Flower | index |
| コンファレンス | 2001 | パス・クラサン | 2 | 30 | 76.7 | 36.7 | 1.5 | 0.6 | |
| | | コンファレンス | 2 | 30 | 90.0 | 10.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | 2002 | スタークリムソン | 2 | 30 | 93.3 | 83.3 | 3.4 | 2.6 | |
| | | | 1 | 49 | 98.0 | 93.9 | 3.2 | 3.0 ^z | |
| | | コンファレンス | 1 | 28 | 82.1 | 35.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| ラ・フランス | 2001 | パス・クラサン | 1 | 30 | 93.3 | 93.3 | 4.0 | 3.8 ^z | |
| | | ラ・フランス | 1 | 30 | 96.7 | 86.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 2002 | パス・クラサン | 2 | 30 | 100.0 | 100.0 | 8.0 | 8.0 | |
| | | | 1 | 58 | 98.3 | 98.3 | 7.9 | 8.1 ^z | |
| | | ラ・フランス | 1 | 27 | 100.0 | 92.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| ル・レクチェ | 2001 | パス・クラサン | 2 | 30 | 83.3 | 56.7 | 2.1 | 0.8 | |
| | | ル・レクチェ | 2 | 30 | 50.0 | 33.3 | 0.0 | 0.0 | |
| | 2002 | パス・クラサン | 2 | 30 | 90.0 | 83.3 | 7.3 | 6.1 | |
| | | | 1 | 59 | 98.3 | 93.2 | 6.8 | 6.6 ^z | |
| | | ル・レクチェ | 1 | 28 | 71.4 | 64.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| パス・クラサン | 2001 | ラ・フランス | 2 | 30 | 66.7 | 26.7 | 0.6 | 0.2 | |
| | | パス・クラサン | 2 | 30 | 40.0 | 20.0 | 0.0 | 0.0 | |
| | 2002 | ラ・フランス | 2 | 26 | 100,0 | 69.2 | 7.3 | 5.1 | |
| | | | 1 | 58 | 98.3 | 86.2 | 7.6 | 6.5 ^z | |
| | | パス・クラサン | 1 | 29 | 89.7 | 79.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| セニョール・デスペラン | 2001 | ラ・フランス | 2 | 28 | 92.9 | 39.3 | 0.7 | 0.3 | |
| | | セニョール・デスペラン | 2 | 30 | 93.3 | 26.7 | 0.0 | 0.0 | |
| | 2002 | ラ・フランス | 2 | 30 | 100.0 | 96.7 | 4.2 | 4.1 | |
| | | | 1 | 31 | 100.0 | 100.0 | 7.7 | 7.7 ^z | |
| | | セニョール・デスペラン | 1 | 30 | 73.3 | 70.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| スタークリムソン | 2001 | ラ・フランス | 2 | 30 | 46.7 | 46.7 | 2.1 | 1.0 | |
| | | スタークリムソン | 2 | 30 | 3.3 | 3.3 | 0.0 | 0.0 | |
| | 2002 | ラ・フランス | 2 | 30 | 93.3 | 93.3 | 7.5 | 7.0 | |
| | | | 1 | 29 | 96.7 | 96.6 | 8.8 | 8.5 ^z | |
| | | スタークリムソン | 1 | 30 | 43.3 | 40.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

表1-2 1花そう1花または2花の自家および他家受粉による結実数と充実種子数(長野県果樹試験場)

² SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

ミッシュ・ビューティー', 'ラ・フランス'の3品種に対しては1花そう1花で, それ以外の品種 は1花そう2花で交配した.1花そう2花で受粉した品種のうち, 'プレコース', 'コンファレンス', 'ル・レクチェ', 'パス・クラサン', 'セニョール・デスペラン', 'スタークリムソン'の着果率は43.3 ~92.9%であったが, 6~7月の著しい生理落果により結実率は25.0~56.7%となった. 'バートレ ット'は着果率が36.7%と低かったが, その後の生理落果はなく, 結実率も36.7%となった. 一方, 1花そう1花で受粉した'グランド・チャンピオン', 'フレミッシュ・ビューティー', 'ラ・フラン ス'の着果率と結実率はともに80%以上となり, 生理落果はほとんど観察されなかった.

2002年には弘前大学藤崎農場および長野県果樹試験場で、1 花そう1 花と2 花で他家受粉を行 ない、着果率と結実率を調査し、比較した(表 1-1, -2).1 花そう2 花の交配により、パス・クラ サン'と'フレミッシュ・ビューティー'以外の8 品種は80%以上の高い結実率を示した.パス・ クラサン'と'フレミッシュ・ビューティー'は着果率こそ100.0%と高かったが、6~7 月の生理落 果によりそれぞれ69.2%と75.0%の結実率になった.これら2 品種では幼果間の養分競合による とみられる生理落果が起こりやすいと考えられた.一方、1 花そう1 花交配は'パス・クラサン' と'フレミッシュ・ビューティー'においても86.2%と96.4%の結実率を与え、すべての品種に安 定した結実率をもたらした.

1 花そう1 花で交配することにより,和合受粉における幼果の生理落果を防ぐことができた. 交配による不和合性の評価においては,和合受粉における結実率や種子数をコントロールとし て用いることにより,評価対象の受粉の不和合・和合が判定されることから,和合受粉には安定 した高い結実率が要求される.よって,セイヨウナシの不和合・和合の判定は1 花そう1 花での 交配により行なうことが適当である.

単為結果性の評価

2000 年に弘前大学藤崎農場で行なった自家受粉において, 'グランド・チャンピオン'から充実 種子を含む果実が得られたが, 'バートレット', 'フレミッシュ・ビューティー', 'プレコース', 'ラ・フランス'からは無種子果実が得られた.小野田ら (1987)は'ラ・フランス'と'シルバー・ ベル'の, 久保ら (1989)は'フレミッシュ・ビューティー'の除雄無受粉によりそれぞれ 92.2%, 38.9%, 25.8%の割合で無種子果実 (単為結果果実)が得られたことを報告している.

結実率を左右すると考えられる単為結果性の影響を調査するため、2001年と2002年に弘前大 学藤崎農場と長野県果樹試験場のセイヨウナシ10品種、'バートレット'、'フレミッシュ・ビュー ティー'、'グランド・チャンピオン'、'プレコース'、'ラ・フランス'、'ル・レクチェ'、'セニョール・

デスペラン', 'コンファレンス', 'パス・クラサン', 'スタークリムソン'に対して1花そう1花で 除雄無受粉を行ない,着果率と結実率を調査した(表1-3). 'スタークリムソン'以外の9品種は 単為結果果実を結実した. 'フレミッシュ・ビューティー'と'グランド・チャンピオン'は, 2001 年にそれぞれ43.3%と6.7%の低い結実率を示したが,2002年には90.0%と71.4%の高い結実率 を示した.2年間の'ラ・フランス'の結実率は,弘前では46.7%(2001年),24.1%(2002年)であっ たのに対し,長野では86.2%(2001年),96.7%(2002年)と弘前の2倍以上を示した.これらの結 果から,自動的単為結果性の程度は品種により異なるとともに,各樹の生育状態や年次や場所 といった環境要因に強く左右されることが明らかになった.

2001年と2002年の自家受粉により、スタークリムソン、を含むすべての品種が結実したが、、グ ランド・チャンピオン、以外の果実はほとんど無種子結実であった. 、グランド・チャンピオン、 以外の9品種について除雄無授粉と自家受粉の結実率を比較したところ、2001年の、フレミッシ ュ・ビューティー、、、ラ・フランス、(弘前)、2002年の、ラ・フランス、(弘前)、、プレコース、、、ル・ レクチェ、、、パス・クラサン、、、スタークリムソン、は自家受粉における結実率が除雄無受粉時よ り高くなる傾向があり、これら品種では受粉刺激により単為結果性が強まる可能性が示唆され た (表 1-1、-2、-3).

自動的および受粉刺激による他動的単為結果性の程度は品種により異なるとともに、各樹の 生育状態や年次や場所といった環境要因に強く左右された.よって、各品種の単為結果性の程 度を品種特性としてとらえることは難しく、単為結果性に影響されない不和合・和合の判定指 標が必要であることが示された.

また、6 月から7月 (June Drop 期)にかけて、ゲランド・チャンピオン、、プレコース、、コンフ ァレンス、、、ル・レクチェ、、パス・クラサン、の単為結果した幼果が数多く落果したことから (表 1-1、-2、-3)、セイヨウナシの不和合・和合を判定する時期は June Drop 期を過ぎた交配約 10 週間 後が適当であると考えられた。

自家不和合・和合の判定基準

多くのセイヨウナシ品種が単為結果性を有することから,結実率を指標とした不和合・和合の判定は容易ではない.2002年の1花そう1花交配における結実率を比較してみると,'ラ・フランス','フレミッシュ・ビューティー','グランド・チャンピオン','セニョール・デスペラン', (パス・クラサン'の自家受粉と他家受粉の結実率はほぼ同じであり,結実率だけでセイヨウナシの不和合・和合を区別することは困難であることが分かった.

表1-3 セイヨウナシ10品種の単為結果性の評価

| 調査地 | 品種 | 調査年 | 処理 花数 | 着果率 (%) | 結実率 (%) |
|----------|---------------|------|----------|------------|------------|
| 弘前大学藤崎農場 | パートレット | 2002 | 30 | 46.7 | 40.0 |
| | フレミッシュ・ビューティー | 2001 | 30 | 43.3 | 43.3 |
| | | 2002 | 30 | 90.0 | 90.0 |
| | グランド・チャンピオン | 2001 | 15 | 13.3 | 6.7 |
| | | 2002 | 56 | 90.0 | 71.4 |
| | ラ・フランス | 2001 | 29 | 63.3 | 46.7 |
| | | 2002 | 29 | 100.0 | 24.1 |
| | プレコース | 2002 | 56 | 100.0 | 17.9 |
| 長野県果樹試験場 | コンファレンス | 2002 | 45 | 100.0 | 46.7 |
| | ラ・フランス | 2001 | 29 | 86.2 | 86.2 |
| | | 2002 | 61 | 98.4 | 96.7 |
| | ル・レクチェ | 2002 | 59 | 49.1 | 40.7 |
| | パス・クラサン | 2002 | 55 | 76.3 | 58.2 |
| | セニョール・デスペラン | 2002 | 29 | 69.0 | 65.5 |
| | スタークリムソン | 2002 | 30 | 0.0 | 0.0 |

配偶体型自家不和合性のセイヨウナシでは、不和合花粉の花粉管は花柱の途中で伸長を停止 するのに対し、和合花粉の花粉管は胚珠に到達して受精し、種子を形成する (Sanzol and Herrero 2002). 充実種子数を利用した指標は不和合・和合の判定に適していると考えられ、1 果 実当たりの充実種子数を表す Seeds/Fruit を指標にした判定がセイヨウナシでも行なわれている (Crane and Thomas 1939; Crane and Lewis 1942; Modlibowska 1945; Griggs and Iwakiri 1954; 小野田 ら 1987; Nyéki et al. 1994; Nyéki and Soltsz 1998). そこで, 1 花そう 1 花交配の自家受粉と他家受 粉における Seeds/Fruit を算出し、比較した (表 1-1, -2). 'フレミッシュ・ビューティー'、'ラ・フ ランス'、'ル・レクチェ'、'セニョール・デスペラン'、'コンファレンス'、'パス・クラサン'、'スタ ークリムソン'の7品種では自家受粉により得られた果実に充実種子は含まれておらず、自家受 粉の Seeds/Fruit は 0 と算出された. 'グランド・チャンピオン'の自家受粉によるすべての果実は 複数の充実種子数を含んでいたが, 'バートレット'と'プレコース'の種子を含む果実はわずかで あり、ほとんどは無種子果実であった.これら3品種の自家受粉における Seeds/Fruit は、・グラン ド・チャンピオン'で 1.2 (2001 年)および 4.1 (2002 年), 'バートレット'で 0.4, 'プレコース'で 0.3 と算出された. 他家受粉の Seeds/Fnuit は、'グランド・チャンピオン'を含む 10 品種において 3.2 ~8.8 となった. 一見すると, Seeds/Fruit はセイヨウナシの不和合・和合の判定に適した指標と 思われるが、(1) 2000年の'バートレット'の自家受粉のように、生理落果した幼果の数が含まれ ないために結実率が低い品種のSeeds/Fruitが過大評価されてしまう,(2)単為結果により生じた 無種子果実が含まれるために単為結果性の強い品種の Seeds/Fruit が過小評価されてしまう. と いう2つの問題が生じる.

Zuccherelli et al. (2002)は交配した花数に対してどれだけの充実種子が得られたかを示す Seeds/Flower を指標として、セイヨウナシの和合・不和合の判定している. Seeds/Flower は交配 する花数を固定することで充実種子数を直接その値に反映させる指標であるので、生理落果や 単為結果性による結実数の変動を排除でき、上記の問題を解決できる. 'グランド・チャンピオ ン'以外の9品種の自家受粉の Seeds/Flower は 0~0.2,他家受粉の Seeds/Flower は 3.0~8.5 と算 出された (表 1-1, -2). よって、自家受粉と他家受粉における Seeds/Flower を比較することでセ イヨウナシの不和合・和合の判定が可能であると考えられた.

しかし, 2002 年の'グランド・チャンピオン', 'バートレット', 'プレコース'における自家受粉 の Seeds/Flower はそれぞれ 1.0, 0.2, 0.1 と算出された. これら品種の他家受粉の Seeds/Flower は 6.1, 6.5, 4.0 であり, 種子形成の難易にも品種間差があることが分かった. そのため, 自家受粉 の Seeds/Flower の単純な比較から, 'グランド・チャンピオン'が部分的和合か不和合であるのか

を判定できなかった. そこで,自家受粉の Seeds/Flower を他家受粉の Seeds/Flower で割り,100 をかけて算出した SI (Self-Incompatibility) index を新たな判定基準として導入した. 他家受粉の Seeds/Flower は'ラ・フランス'で 3.8 (2001 年長野), 8.1(2002 年長野), 3.8 (2001 年弘前), 6.6 (2002 年弘前)と算出されたことから,他家受粉における種子形成数は場所および年次により変化す ることが明らかになった. そこで,同じ調査年の同じ調査地における Seeds/Flower を用いて SI index を算出することで,年次や場所による結実率および種子形成数の変動を補正できると考 えた. 'コンファレンス', 'フレミッシュ・ビューティー', 'ラ・フランス', 'ル・レクチェ', 'パス・ クラサン', 'セニョール・デスペラン'は SI index が 0 であったことから,自家不和合と判定され た. 自家受粉により充実種子を含む果実が得られた 3 品種の SI index は, 'グランド・チャンピオ ン'で 59.4 (2001 年)と 16.4 (2002 年), 'バートレット'で 3.1 (2002 年), 'プレコース' (2002 年)で 2.5 と算出された. この値の比較から, 'グランド・チャンピオン'は自家受粉によっても充実種子が 形成されるが,他家受粉の種子数に比べて十分ではないと判断し,部分的自家和合性に分類し た. 一方, 'バートレット'と'プレコース'の自家受粉による種子形成は他家受粉に比べ十分少な いことから,両品種を自家不和合性に分類した. したがって,供試 10 品種中, 'グランド・チャ ンピオン'以外は自家不和合性を持つことが示された.

以上のことから、1 花そう1 花で調査対象の交配および和合他家受粉の交配を行ない、交配約 10週間後 (June Drop 終了後)に果実に含まれる充実種子数を調査し、両交配の Seeds/Flower から 算出した SI index を用いることで、セイヨウナシの不和合・和合を判定することができると結 論づけた. SI index を用いた判定方法により、他にも部分的自家和合性に分類される品種が見つ かるかもしれない.

無種子果実と有種子果実間における果実形質の比較

多くの品種が自家不和合性を有するとともに、単為結果性を持つことが示された.そこで、 除雄無受粉処理により単為結果した無種子果実と和合他家受粉により結実した有種子果実の果 実形質を比較した (表 1-4). 'ラ・フランス'と'パス・クラサン'の無種子果実と有種子果実の大 きさには有意な差は認められなかったが、'バートレット'、'フレミッシュ・ビューティー'、'コン ファレンス'、'ル・レクチェ'の有種子果実は無種子果実より大きかった (図 1-1). また、有種子 果実でも、充実種子が多いほど果実重量が重くなる傾向がみられた (図 1-2). 無種子果実の多 くは有種子果実より縦長で、果形に歪みがみられた.

追熟後の糖度と酸度は適切に追熟できた果実のみを用いた.他家受粉果実の糖度は、'フレミ

表1-4 無種子果実と有種子果実の追熟前の形質比較

| | | | 果実 | 果実 | 果実 | 果実 | | | 追熟後 |
|---------------|-----------------|------------------|----------------------|---------------------|----------------|--------------|--------------|--------|---------------|
| 品種 | 交配処理 | 果実数 ^z | あたり | 重量 | 縦径 | 横径 | 縦径 | 糖度 | 酸度(リンゴ酸) |
| | | | 種子数 | (g) | (cm) | (cm) | /横径 | (Brix) | (g/100ml) |
| パートレット | 除雄無受粉 | 7 (7) | 0.0 | 178.4a ^y | 9.1a | 6.2a | 1.45 | 10.3a | 0.23a |
| | 他家受粉 | 12 (12) | 8.2±0.3 | 251.5b | 9.8a | 7.5b | 1.31 | 11.1a | 0.24b |
| | (× グランド・チャンピオン) | | | | | | | | |
| コンファレンス | 除雄無受粉 | 9 (9) | 0.4 | 188.9a | 9.7a | 6.6 a | 1.48 | 16.0a | 0.1 7a |
| | 他家受粉 | 18 (14) | 2.1±0.5 | 237.1b | 10.4a | 7.4b | 1.42 | 15.8a | 0.1 2b |
| | (× スタークリムソン) | | | | | | | | |
| フレミッシュ・ビューティー | 除雄無受粉 | 8 (8) | 0.0 | 306.1a | 9.4a | 8.2a | 1.15 | 10.4a | 0.11a |
| | 他家受粉 | 12 (12) | 7.3±0.4 | 443.7b | 10. 5 b | 9.2b | 1.28 | 11.2b | 0.13b |
| | (× ラ・フランス) | | | | | | | | |
| ラ・フランス | 除雄無受粉 | 28 (4) | 0.0 | 468.9a | 97.8a | 99.3a | 0. 98 | 16.5 | 0.26 |
| | 他家受粉 | 26 (6) | 7. 9± 0.5 | 500.2a | 95.3a | 101.7a | 0.94 | 17.5 | 0.30 |
| | (× パス・クラサン) | | | | | | | | |
| ル・レクチェ | 除雄無受粉 | 8 (8) | 0.0 | 334.3a | 11.3a | 8.3a | 1.36 | 17.5a | 0.23a |
| | 他家受粉 | 24 (22) | 7.4±0.3 | 436.3b | 11.0a | 9. 5b | 1.16 | 17.9a | 0.22a |
| | (× パス・クラサン) | | | | | | | | |
| パス・クラサン | 除雄無受粉 | 10 (3) | 0.0 | 441.2a | 9.6a | 9.5a | 1.01 | 15.9 | 0.41 |
| | 他家受粉 | 18 (13) | 6.6 ± 0.4 | 480.2a | 9.9a | 9.9a | 1.00 | 12.7 | 0.26 |
| | (× ラ・フランス) | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

²:()内は追熟後の糖度および酸度の計測に用いた果実の数、追熟中に輪紋病や内部褐変などのため適正に追熟できなかった果実は除外して計測を行なった、'ラ・フランス'と'パス・クラサン'については、除雄無受粉果実が少なかったので統計処理を行なっていない、 ^y異なる文字は単為結果果実と他家受粉果実間でおこなったt検定 (5%水準,両側検定)において有意差ありを示す。



有種子果実

図1-1 種子の有無による果実サイズの違い (・フレミッシュ・ビューティー')



ッシュ・ビューティー'で有意に高く、'バートレット'、'ラ・フランス'、'ル・レクチェ'でも高く なる傾向にあった. 他家受粉果実の酸度は、'バートレット'と'フレミッシュ・ビューティー'で 有意に高く、反対に'コンファレンス'は有意に低かった. 甘味と酸味は、含有量だけでなく両者 のバランスもセイヨウナシの食味の決定に関与するため、他家受粉果実と自家受粉果実におけ る酸度の違いを一概に品質と結びつけることは難しい. しかしながら、果樹全体として糖度の 高い果実が求められる傾向があることから、糖度の高い有種子果実は無種子果実よりも品質が 優れていると考えられる. また、他家受粉により果形の整った大玉果実が得られることも生産 上の利点になると考えられる.

・グランド・チャンピオン、については、除雄無受粉による無種子果実、開花自家受粉による有 種子果実、他家受粉による有種子果実の間で果実形質に有意差は見られなかった (表 1-5). 種 子の有無は果実品質に影響しなかったが、単為結果性の弱い、グランド・チャンピオン、では結実 に種子形成が必要である. 和合花粉の受粉による種子形成は当然であるが、開花自家受粉にお ける部分的自家和合性による種子形成によっても十分結実が安定し、良質な果実が生産できる と考えられる.

日本では、セイヨウナシ='ラ・フランス'と思われるほど生産・消費に占める'ラ・フランス' の割合が高い.山形県では'ラ・フランス'の単植化が進み、単為結果果実が市場に流通すること も多い.本実験では'ラ・フランス'の無種子果実と有種子果実の大きさ・糖度には有意な差は認 められなかったが、山形県農業総合研究センターにおける 2002 年の調査では、充実種子が多い ほど糖度が高くなる傾向があり、10 個の充実種子が含まれる果実でもっとも食味が良いことが 報告されている.また、'バートレット'でも無種子果実は品質が劣ることが報告されている (Janick Fruit Breeding 1996).本章では、この2品種以外の'フレミッシュ・ビューティー'、'コン ファレンス'、'ル・レクチェ'、'パス・クラサン'について充実種子と果実品質の関係をはじめて 調査し、いずれも有種子果実の品質が無種子果実よりも優れる傾向があることを明らかにした. したがって、単為結果性を有するセイヨウナシにおいても、良質果実の安定的な生産のために 和合花粉の受粉による種子形成が必要である.

交雑不和合性

セイヨウナシ品種間で交雑不和合を示す組み合わせはほとんど見出されていなかったが (Crane and Lewis 1942; Griggs and Iwakiri 1954; Lewis and Modlibowska 1942; Modlibowska 1945; Rawes 1933), 供試した 10 品種間の交雑不和合性を 2001 年に各組み合わせに対して 5 花を用い

表1-5 'グランド・チャンピオンの除雄無受粉,開花自家受粉,他家受粉による果実の形質比較

| | | | 果実 | 果実 | 果実 | 果実 | | |
|-------------|--------------------|-----|---------|---------------------|-------|------|------|--------|
| 品種 | 交配処理 | 果実数 | あたり | 重量 | 縦径 | 横径 | 縦径 | 糖度 |
| | | (個) | 種子数 | (g) | (cm) | (cm) | /横径 | (Brix) |
| グランド・チャンピオン | 除雄無受粉 | 10 | 0.0 | 228.0a ^z | 10.7a | 6.9a | 1.55 | 13.2a |
| | 開花自家受粉 | 15 | 2.0±0.3 | 241.7a | 10.7a | 7.0a | 1.52 | 12.7a |
| | 他家受粉 (× バートレット) | 7 | 5.7±0.4 | 295.2a | 11.4a | 7.7a | 1.48 | 13.4a |
| | | | | | | | | |

*同じ文字は除雄無受粉,開花自家受粉,他家受粉による果実間の分散分析 (5%水準)において有意差なしを示す.

て調査した (データ省略). この結果に基づいた 2002 年の再調査の結果, 'バートレット'בセニ ョール・デスペラン'と'フレミッシュ・ビューティー'בスタークリムソン'の他家受粉の Seeds/Flower および SI index は 0 となった (表 1-1). 'セニョール・デスペラン'と'スタークリム ソン'の花粉は'フレミッシュ・ビューティー'と'バートレット'に対して多くの充実種子を形成 したことから (表 1-1), 両品種の花粉稔性が確認された. したがって, 'バートレット'と'セニョ ール・デスペラン', および, 'フレミッシュ・ビューティー'と'スタークリムソン'が交雑不和合 の関係にあることが明らかになった.

近年,新品種の育成に伴い,新品種が花粉親品種と交雑不和合を示すことが報告されている (阿部ら 1996; Sanzol and Herrero 2002). 'バラード'は山形県園芸試験場で'バートレット'בラ・ フランス'の交雑後代から選抜・育成された品種で, 'ラ・フランス'と交雑不和合性を示す. 一方, 'バートレット'と'セニョール・デスペラン', 'フレミッシュ・ビューティー'と'スタークリムソ ン'の間には親子関係は存在しない. これら品種のように親子関係にない品種間でも交雑不和 合となる品種組み合わせが多く存在する可能性があり,本章で確立した交配による不和合・和 合の判定方法を用いることにより見出されるかもしれない.

Tomimoto et al. (1996)はセイヨウナシの花柱タンパク質を二次元電気泳動 (2D-PAGE)により 解析し、検出された S-RNase のスポットから'バートレット'と'フレミッシュ・ビューティー'の 遺伝子型を SSS6 と推定している. しかしながら, 2000 年と 2001 年に, 'バートレット'בフレミ ッシュ・ビューティー'の交配を行なったところ, 1 花そう 2 花の交配ではあったが結実率 90% 以上, Seeds/Flower は 4.0 および 5.7 となり (表 1-1), 'フレミッシュ・ビューティー'と'バートレ ット'は交雑和合と判定された. 推定 S遺伝子型と交配結果が一致しなかった原因は, おそらく, 類似の移動度を示す異なる S-RNase を同一の S-RNase と混同したことによると推測される. し たがって, 交配実験により裏付けられる方法を用いた S遺伝子型の推定が必要と考えられる.

本章では、多くのセイヨウナシ品種が単為結果性を有するため、結実率や果実当たりの種子 数を指標とした不和合・和合の識別がセイヨウナシには適応できないことを示した.そこで、単 為結果性と種子形成能力の品種差異の要因を排除した新たな判定基準として SI index を考案し、 'グランド・チャンピオン'を部分的自家和合性、他9品種を自家不和合性と判定し、セイヨウナ シでも交雑不和合の関係があることを見出した.また、和合花粉受粉により結実した有種子果 実は単為結果による無種子果実より優れた品質を持っていたことから、セイヨウナシでも安定 的な良質果実の生産には和合花粉の受粉が必要であることを指摘した.和合受粉を効率よく行 なうためには、ニホンナシやリンゴと同様に品種の S 遺伝子型情報が必要であろう.

第2章

CAPS マーカーシステムを用いた日本の栽培品種のS遺伝子型推定

く摘要>

日本の栽培品種25品種のS遺伝子型を推定するため、セイヨウナシの雌しべ側S遺伝子産物 もS-RNase であると仮定し、自家不和合性の10品種の花柱から10種類のS-RNase cDNA をク ローニングした。10種類のcDNAの推定アミノ酸配列はナシ亜科のS-RNase に特徴的な1次構 造および異なるアミノ酸配列で構成される HV 領域を有していたことから、これら cDNA は S-RNase をコードすると考えられた。本研究の進行中にゲノミック PCR により増幅された 13 種類の推定 S-RNase 対立遺伝子の部分配列がデータベースに登録された (Zuccherelli et al. 2002a, b; Zisovich et al. 2004a). それらの配列と照合した結果、7種類のcDNA は推定 Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sh-, Sk-, SI-RNase 対立遺伝子に対応し、残り3 種類は新規 S-RNase 対立遺伝子 (Sg-, Sq-, Sr-RNase)と同定された.

S 遺伝子型を迅速に推定するため、CAPS マーカーシステムの開発を試みた. ゲノム DNA か らプライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR により 10 種類の S-RNase 断 片 (HV 領域とイントロンを含む)を増幅した. 増幅断片を cDNA の塩基配列と照合し, 各 S-RNase 対立遺伝子と対応付けた. Sg, Sl, Se, Sb は 1,906, 1,414, 998, 440 bp の断片として, Sq と Sk は約 1.3 kb 断片, Sa, Sd, Sh, Sr は約 350 bp 断片として検出された. 断片長による識別が困難な 約 1.3 kb と約 350 bp 断片はそれぞれ, 6 種類の制限酵素, Bg/II (Sk), HindIII (Sq), SphI (Sa), EcoO109I (Sd), BssHII (Sh), BaeI (Sr)で切断されることで識別し, 10 種類のS対立遺伝子を識別す る CAPS マーカーシステムを開発した.

このシステムを用いて S 遺伝子型を推定したところ,日本の栽培品種 25 品種は 17 種類の S 遺伝子型に分類された.そのうち,6 種類には複数の品種が分類され,同じ S 遺伝子型に推定された品種間の交配は全て交雑不和合性を示した.

以上の結果から、セイヨウナシにおいても雌しべ側 S 遺伝子産物は S-RNase であることが証明された.また、日本の栽培品種 25 品種間の交雑和合・不和合関係が明らかになり、6 種類の交雑不和合グループの存在が示された.

<諸言>

日本の栽培品種は計25品種により構成されている(表 2-1).22品種は海外からの導入品種で、 (ラ・フランス', 'バートレット', 'ル・レクチェ', 'ドワイエネ・デュ・コミス', 'コンファレンス', 'セニョール・デスペラン', 'プレコース', 'フレミッシュ・ビューティー', 'アレクサンドリン・ デュイヤール', 'ウィンター・ネリス', 'パス・クラサン'の導入は古く,明治・大正時代に遡る.戦 後, 'マックス・レッド・バートレット' ('バートレット'の赤色系枝変わり), 'エル・ドラド' ('バ ートレット'の自然交雑実生), 'マルゲリット・マリーラ', 'グランド・チャンピオン' ('Gorham' の銹系枝変わり)が, 1970年以降には、ゼネラル・レクラーク' (1977年導入), 'オーロラ' ('マルゲ リット・マリーラ'×、'バートレット'の交雑実生, 1983年導入), , 'ミクルマス・ネリス' ('ウィン ター・ネリス'の自然交雑実生), 'カリフォルニア' ('マックス・レッド・バートレット'×、ドワイ エネ・デュ・コミス'の交雑実生), 'スタークリムソン' ('Clapp's Favourite'の赤色系枝変わり), 'デ ボー' ('Clapp's Favourite'の自然交雑実生), 'ボートヌ' ('コンファレンス'×'Doyenné d'hiver'の交 雑実生)が導入されている. 残り3品種, 'シルバー・ベル' ('ラ・フランス'の自然交雑実生, 1990 年育成)と、バラード' ('バートレット'×、'ラ・フランス', 1999年登録), および, '越さやか' ('バー トレット'×、'ラ・フランスの交雑実生, 1998年登録), 'は山形県および新潟県の育成品種である.

晩生品種の、ラ・フランス、によって多くの消費者に認知されるようになったセイヨウナシで あるが、消費者に対する宣伝効果およびその結果として期待される消費の拡大、さらに生産者 側における労働力の分散などの点から、、ラ・フランス、中心の品種構成の見直しが検討されてい る. 早生優良品種では、果実品質のよい、オーロラ、や果皮が暗赤色で美しい、スタークリムソン、 が挙げられる. 中生品種では、大果品種で栽培しやすい、マルゲリット・マリーラ、、比較的大果 で食味良好な、ゼネラル・レクラーク、、果面が鮮紅色で美しい、カリフォルニア、肉質の良い、ド ワイエネ・デュ・コミス、などがあるが、特に近年は、わが国で育成された、バラード、および、越 さやか、が品質の良い中生品種として期待されている. 晩生品種では、果実品質が非常に優れて いる、ル・レクチェ、や貯蔵性のよい、シルバー・ベル、が有望品種である. 今後の日本におけるセ イヨウナシ栽培では、、ラ・フランス、よりも収穫期が早く食味の優れる品種、もしくは外観の美 しい赤果皮性の品種が増加し、品種構成は多様化すると予想される.

第1章において、他家受粉により結実した有種子果実は単為結果による無種子果実より優れ た品質を持っていたことから、良質なセイヨウナシ果実の安定的な生産には和合花粉の受粉が 必要であることを指摘した.また、10品種間の相互交配により、'フレミッシュ・ビューティー' と'スタークリムソン'および'バートレット'と'セニョール・デスペラン'の2つの組み合わせが

表2-1 日本の栽培品種の由来および諸特性

| П ## | 百女司 | ····································· | 88- 11: 89 | 収穫 | 追熟日数 | 果皮色 | 果実重量 | 糖度 | 酸度 | 内市 | <u></u> |
|-----------------|------|---------------------------------------|-----------------------|-------|------|---------------|------|------|------|-----|-----------------|
| 節悝 | 尿產團 | 祝伯性 | 用化剂 | 盛期 | (日) | (追熟前→後) | (g) | (%) | (%) | 内資 | その他 |
| スタークリムソン | アメリカ | Clapp's Favorite 着色系突然変異 | +2 | 8.06 | 10 | 全面暗赤色 | 193 | 12.1 | 0.50 | 中 | 果面の紅色が美しい,甘味少 |
| デボー | アメリカ | Clapp's Favorite 自然交雑実生 | +1 | 8.11 | 14 | 黄色, 陽光面赤色 | 334 | 14.3 | 0.26 | やや粗 | 淡泊,果肉軟 |
| バートレット | イギリス | 不明 | +3 | 8.27 | 11 | 黄緑色→黄色 | 327 | 12.5 | 0.50 | 中 | 豐産性, 栽培易, 甘味少 |
| マックス・レッド・バートレット | アメリカ | バートレット枝変わり | +3 | 8.27 | 11 | 鮮紅食 | - | - | - | - | 果面の紅色が美しい,甘味少 |
| プレコース | フランス | 不明 | +3 | 8.28 | 8 | 緑色→黄色 | 350 | 11.3 | 0.27 | やや粗 | 淡泊 |
| オーロラ | アメリカ | マルゲリット・マリーラ×バートレット | +2 | 9.03 | 8 | 褐色,薄い銹 | 355 | 15.4 | 0.28 | 密 | 肉質良,甘味多,多汁,芳香 |
| セニョール・デスペラン | ベルギー | 不明 | +3 | 9.03 | 11 | 緑黄色→黄色 | 186 | 14.5 | 0.18 | 中 | 酸味少, 繊維質少 |
| マルゲリット・マリーラ | フランス | 不明 | +3 | 9.06 | 12 | 淡黄色→黄金色 | 711 | 13.2 | 0.24 | やや粗 | 大果,多汁,栽培易,繊維質多 |
| ミクルマス・ネリス | イギリス | ウィンター・ネリス自然交雑実生 | +2 | 9.10 | 11 | 緑色→緑黄色 | 212 | 15.1 | 0.20 | 密 | 肉質良, 甘味多, 酸味少 |
| フレミッシュ・ビューティー | ベルギー | 不明 | +1 | 9.13 | 12 | 陽光面赤色 | 327 | 12.5 | 0.20 | やや粗 | 陽光面着色,食味淡泊 |
| コンファレンス | イギリス | 不明 | +1 | 9.13 | 15 | 黄緑色→緑黄色 | 249 | 12.5 | 0.23 | やや密 | 果肉淡桃色,酸味少 |
| カリフォルニア | アメリカ | マックス・レッド・バートレット × ドワイエネ・デュ・コミス | +4 | 9.17 | 11 | 黄色,陽光面紅色 | 403 | 12.3 | 0.26 | 中 | 陽光面着色,食味淡泊 |
| ゼネラル・レクラーク | フランス | 不明(ドワイエネ・デュ・コミス自然交雑実生) | +1 | 9.25 | 14 | 黄緑色,銹 | 410 | 14.9 | 0.45 | 中 | 多汁,芳香・肉質よい |
| バラード | 日本 | バートレット×ラ・フランス | +3 | 9.25 | 14 | 黄緑色→黄色 | 441 | 15.5 | 0.25 | 中 | 多汁,糖度高く良食味 |
| アレクサンドリン・デュイヤール | フランス | 不明 | +4 | 9.25 | 17 | 黄緑色→黄色 | 305 | 14.5 | 0.33 | やや密 | 肉質やや良,甘酸適和 |
| 越さやか | 日本 | バートレット × ラ・フランス | +2 | 9.25 | 11 | 黄緑色→黄色 | 273 | 14.5 | - | 密 | 多汁,食味爽やかで良好 |
| ドワイエネ・デュ・コミス | フランス | 不明 | +4 | 10.01 | 13 | 黄緑色→黄色 | 379 | 15.5 | 0.26 | やや密 | 食味濃厚 |
| グランド・チャンピオン | アメリカ | ゴーラム枝変わり | +4 | 10.04 | 8 | 全面銹 | 319 | 14.6 | 0.41 | 密 | 肉質良, 芳香やや多, 貯蔵良 |
| エル・ドラド | アメリカ | バートレット自然交雑実生 | +2 | 10.04 | 11 | 緑色→緑黄色 | 363 | 12.7 | 0.24 | 中 | 多汁,食味やや淡白 |
| ラ・フランス | フランス | 不明 | 0 | 10.11 | 14 | 緑色→緑黄色, 銹 | 389 | 14.8 | 0.27 | 密 | 食味芳香極めて優良 |
| ボートヌ | フランス | コンファレンス × Doyenné d'hiver | +3 | 10.17 | 24 | 緑黄色,銹 | 304 | 15.3 | 0.12 | 密 | 豊産性,多汁.肉質軟 |
| シルバー・ベル | 日本 | ラ・フランス自然交雑実生 | +3 | 10.22 | 21 | 緑黄色, 銹 | 499 | 13.7 | 0.46 | 密 | 豊産性,貯蔵性よい |
| ウィンター・ネリス | ベルギー | 不明 | +4 | 10.25 | 14 | 緑色→黄色, 銹 | 232 | 14.1 | 0.21 | 密 | 肉質良,酸味少,微かに渋味 |
| ル・レクチェ | フランス | バートレット×Bergamotte Fortunee | +2 | 10.29 | 29 | 緑色→黄色 | 390 | 14.7 | 0.26 | 密 | 多汁,芳香・肉質よい |
| パス・クラサン | フランス | 不明 | +1 | 10.29 | 21 | <u>黄緑色→黄色</u> | 428 | 14.3 | 0.42 | 密 | 豊産,貯蔵性極めて良 |

品種:収穫盛期の順.

開花期: 'ラ・フランス'の開花日を0とした場合の開花日.「西洋ナシの作業便利帳」の満開日,「バラエティー西洋なし」の開花日および農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点(盛岡)での開花日を参考に修正した.長野 県果樹試験場平成16年果樹生態調査における'ラ・フランス'の平年の開花日は4月25日. (-)は記載およびデータなし.

収穫盛期:山形県農業総合研究センター2001年度調査による. '越さやかは新潟県園芸研究センターの調査を修正. 'プレコース'は1992年の, 'デボー'は1998年の山形県農業総合研究センター調査, 'ボートヌ'は2002 年農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点(盛岡)における調査に基づく.

追熟日数:予冷後の日数.山形県農業総合研究センター2001年度調査による.

果皮色:「西洋ナシの作業便利帳」および「バラエティー西洋なし」による.

果実重量, 糖度, 酸度, 肉質, その他特性:山形県農業総合研究センター2001年度調査による. 'マックス・レッド・バートレット'は記載がないがバートレットとほぼ同じと考えられる. '越さやか'は新潟県園芸研究センター調査 (酸度は'ラ・フランス' pH 4.1に対し'越さやか' pH 3.8). 'プレコース'は1992年の, 'デボー'は1998年の山形県農業総合研究センター調査, 'ボートヌ'は2002年農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点(盛岡)における調査に基づく.

交雑不和合であることを見出した. さらに, 'バートレット'בラ・フランス'の交雑後代から育 成された'バラード'は'ラ・フランス'と交雑不和合性を示すことが確認されている (阿部ら 1996).

効率の良い混植を実現するには、日本の栽培品種 25 品種間の交雑不和合・和合関係を明らか にし、各品種の S 遺伝子型を決定することが望まれる.しかし、現在までのところ、セイヨウナ シでは4種類の S 対立遺伝子が、バートレット、と、Coscia、の交雑後代から同定され、5 つの S 遺伝 子型が決定されているにすぎない (Sanzol and Herrero 2002). 第1章において確立した方法によ り交配実験の結果から不和合・和合の判定は可能になったが、交配による S 遺伝子型の決定に は、交配に対する労力、品種間における開花時期の不一致、交雑後代の実生樹の養成に要する 期間や土地など多くの困難がある.

日本のセイヨウナシ栽培品種のうち8品種は、二次元電気泳動 (2D-PAGE)を用いた花柱タン パク質の解析からS遺伝子型の推定が試みられている (Tomimoto et al. 1996). しかし、同じS遺 伝子型 (S5S6)に推定された'バートレット'と'フレミッシュ・ビューティー'は交雑和合であり、 異なるS遺伝子型を持つことが示唆されたことから (第1章)、これら 2D-PAGE による推定遺 伝子型には疑問が生じている. 2D-PAGE における移動度による S-RNase の識別は困難であると 推測されので、信頼できる推定システムの構築が必要である.

ニホンナシにおいては、雌しベ側 S 遺伝子産物をコードする S-RNase を約 350~1300 bp の断 片 (C2 領域と HV 領域、イントロンを含む)として増幅し、これを制限酵素により S 対立遺伝子 特異的に切断することで増幅断片を識別する PCR-RFLP 法、別名 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences)マーカーシステムが開発されている. このシステムにより迅速かつ確実 な S 対立遺伝子の識別、そして品種の S 遺伝子型推定が可能になっている (Ishimizu et al. 1999; Takasaki et al. 2004; Janssens et al. 1995; Broothaerts 2003). ニホンナシやリンゴの S-RNase には N 末端に 22~27 残基のシグナルペプチドが存在し、RNase 活性に必須な 2 つのヒスチジン残基、 立体構造に関わる 8 つのシステイン残基が保存されている. 推定アミノ酸配列の比較から、 S-RNase に 5 つの保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5)とアミノ酸配列の変化に富んだ1 つの超可変領 域 (HV 領域)が同定されている (図 0-2). この HV 領域の推定アミノ酸配列は S 対立遺伝子特異 的であり、花粉と花柱間の自他認識に関与すると推測されている (Norioka et al. 1996; Sassa et al. 1996; Ishimizu et al. 1998).

本章では、セイヨウナシの雌しベ側 S 遺伝子産物も S-RNase であるという仮定に基づき、日本の栽培品種から 10 種類の S-RNase cDNA をクローニングした. また、S-RNase 断片をゲノム

DNA から増幅して識別する CAPS マーカーシステムを開発した. このシステムを用いて,日本の栽培品種の S 遺伝子型を推定し,交配実験により日本の栽培品種 25 品種間の交雑不和合・和 合関係を明らかにした.

<材料および方法>

材料

弘前大学生物共生教育研究センター藤崎農場 (青森県藤崎町),長野県果樹試験場 (長野県須 坂市),独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡 市)に栽培されているセイヨウナシ 25 品種 (表 2-1)から未展開葉を採取した. 'ラ・フランス', 'バ ートレット', 'ル・レクチェ', 'ゼネラル・レクラーク', 'オーロラ', 'コンファレンス', 'ドワイエ ネ・デュ・コミス', 'フレミッシュ・ビューティー', 'ウィンター・ネリス', 'パス・クラサン'の white stage (Norioka et al. 1996)の花から花柱を採取した. 未展開葉および花柱は液体窒素で急速 冷却後, -80℃で保存した.

方法

交配実験

交配および調査は第1章で確立した方法により行なった. 交配約10週間後に結実数と充実種子数を調査した. 結実率, Seeds/Flower, SI index を算出し,不和合・和合を判定した.

Total RNA の抽出

Total RNA の抽出には RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いた. 凍結保存しておいた white stage の花柱約 250 本 (新鮮重約 150 mg)を液体窒素下で十分に粉砕した. 粉砕物に 450 µL の RLC buffer と 4.5 µL の β -メルカプトエタノールを加え,室温で 3 分間回転振盪した. 抽出液を QIA shredder column に移し,室温,15,000 rpm で 2 分間遠心した. 流出液を新しいチューブに移 し,225 µL の 100%エタノールを加えて良く混和した. 混和液を RNeasy spin column に移し, 10,000 rpm で 15 秒間遠心した. 流出液を捨てた後, column に700 µL の Buffer RW1 を加え, 10,000 rpm で 15 秒間遠心した. column を付属の collection tube に移し,500 µL の Buffer RPE を column に加えた後,室温,10,000 rpm で 15 秒間遠心した. 室温,15,000 rpm で 1 分間遠心してメンプランを乾かした
後, column を新しいチュープに移し, 30 µL の RNase free water を加えて 15 分間放置した. 室温, 10,000 rpm で1分間遠心して total RNA を抽出し, 分光光度計で濃度を測定した後, -80℃に保存した.

mRNA の単離

mRNA の単離には Micro-FastTrackTM 2.0Kit (Invitrogen)を用いた. 抽出した total RNA を Lysis Buffer (1 mL の Stock Buffer に RNase/Protein Degrader を 20 µL 添加) に加え, 45°C, 20 分間回転振 盪した. 63 µL の 5M NaCl を加えて懸濁した後, 懸濁液を Oligo (dT) Cellulose パウダーが入った チューブに移し, 十分に混和してから室温で 20 分間回転振盪した. 室温, 7000 rpm で 8 分遠心 した後, 上清を取り除き, 1.3 mL Binding Buffer を加えて再懸濁した. この操作を Buffer が透明 になるまで 3 回以上繰り返した後, Spin-column に懸濁液を移し, 室温, 7800 rpm で 10 秒遠心し た. Spin-column に 700 µL の Binding Buffer を加え, 室温, 7800 rpm で 10 秒遠心した. この操作を さらに 2 回繰り返した. 200 µL の Low Salt Wash Buffer を Spin-column に加え, 室温, 7800 rpm で 10 秒遠心した後, この操作をもう一度繰り返した. Spin-column を新しいチューブに移し, 100 µL の Elution Buffer を加えて Cellulose を懸濁し, 10 分放置した後, 室温, 7800 rpm で 1 分遠心し た. この操作をもう一度繰り返し, 200 µL の溶出液を回収した. 溶出液に 10 µL の Glycogen (2 mg/mL)と 30 µL の NaOAc, 600 µL の 100%エタノールを加えて -80℃に一晩放置した. 4℃, 14,000 rpm で 20 分間遠心した後, 上清を完全に取り除き, 沈殿を乾燥させた. 1~10 µL の Elution Buffer を加えて 15 分間放置し再懸濁した後, 分光光度計で mRNA の濃度を測定した.

プライマーの設計

本章の RACE クローニングおよびゲノミック PCR やプライマーウォーキングに用いたプラ イマーの塩基配列を表 2-2, -3 および図 2-1 にまとめた.

RT-PCR

Titan[™]One Tube RT-PCR system (Roche Diagnostics)を用いて RT-PCR を行なった.約1 µg の花 柱 total RNA を鋳型にし, 0.4 µM フォワードプライマー'FTQQYQ', 0.4 µM リバースプライマー 'anti-(I/T)IWPNV', 5 mM DTT, 10 µL 5×RT-PCR Buffer, 0.2 mM dNTP mix, 1 µL Enzyme mix (Taq DNA polymerase, Pwo DNA polymerase, AMV reverse transcriptase)と滅菌水を加えた 50 µL の反応 液を作成した. 'FTQQYQ'と'anti-(I/T)IWPNV'プライマーは、ニホンナシ S-RNase の C1 領域およ

| プライマー | 配列(5′-3′) | プライマーの位置 |
|------------------|--------------------------------|----------|
| FTQQYQ | TTTACGCAGCAATATCAG | C1 |
| C2FI | TCTAATCCTACTCCTTGT | C2上流 |
| C2F2 | GATCCTCCTGACAAGT | C2 |
| HVSa | GGGCTGTCAGATTTGCT | HV |
| HVSb | GGGGTTCGAGTATTTTC | HV |
| HVSd | GCTGCCATATTTCCTATCT | HV |
| HVSe | GGTTTGAGTGATGGATCTA | HV |
| HVSg | CTTGGAGATTTCCTATCTTGG | HV |
| HVSh | GGGGTTCGAGTTTTTTGC | HV |
| HVSk | GGCTTTAAGATCTGTTATCG | HV |
| HVSI | GGGGTTTGAGTGATGTATCTA | HV |
| HVSq | CTTATCGTTCGAGGTTTC | HV |
| HVSr | GCTTGGATATTTGTTATCC | HV |
| anti-IIWPNV | AC (A/G) TTCGGCCAAATAATT | HV下流 |
| EpSg-anti-IIWPNV | ACGTTCGGCCAAATAATG | HV下流 |
| anti-(I/T)IWPNV | AC (A/G) TTCGGCCAAATA (A/G) TT | HV下流 |
| EP-anti-IIWPNV | AC (A/G) TT (C/T) GGCCAAATAATT | HV下流 |
| EPSq-anti-IIWPNV | ACGTTTGGCCAAATAATT | HV下流 |
| IIWPN-F | G (A/G) HAATTATTTGGCCG | HV下流 |
| E-IIEPNV-F | ATTATTTGGCCAAACGTA | HV下流 |

表2-2 本章のRACEクローニングおよびゲノミックPCRに用いたS-RNase特異的プライマー.

表2-3 本章のイントロンウォーキングで設計したプライマー.

| プライマー | 配列(5′-3′) | プライマーの位置 |
|-------------|------------------------|----------|
| Se-INTF1 | GCAAGGTTTTGTAGCC | Seイントロン |
| Sg-INTF1 | CATTTTAACGAAAACC | Sgイントロン |
| Sg-INTR1 | CAAATATTTTCACACGTGC | Sgイントロン |
| Sg-INTFzero | GGGAATTTTAACGAAAAAC | Sgイントロン |
| Sg-INTF2 | GGAATATCACTAGACTGGAG | Sgイントロン |
| Sg-INTR2 | GAATCAAATGGCTAAAAAC | Sgイントロン |
| Sk-INTF1 | CAATTCCAAACATTTCC | Skイントロン |
| Sk-INTF2 | CTTATATGGGGACATTC | Skイントロン |
| Sk-INTR1 | GATTTTGAATAAAATCCAC | Skイントロン |
| SI-INTF1 | GGGTTTTAATACTCACAC | SIイントロン |
| SI-INTF2 | GATTTTTCAAATTCTTAATC | SIイントロン |
| Sl-INTF2a | CAAATTCTTAATCCTAAATG | SIイントロン |
| SI-INTR I | CTGAAACTTTGTTGGTG | SIイントロン |
| SI-INTR2 | CACACACACACACATGG | SIイントロン |
| SI-INTR3 | TTTACATATAACAAATTGATAC | SIイントロン |
| Sq-INTF1 | GTAATTGAAGCTTACACCC | Sqイントロン |
| Sq-INTF2 | CCATTTATTTTAAGTTATCC | Sqイントロン |
| Sq-INTR1 | GAAAAATTAAAATTTGTGG | Sqイントロン |
| Sq-INTR2 | CTAAACAAAGCTATTGTACC | Sqイントロン |



<gDNAを鋳型にしたPCR> SxUTRf1 Ep-HVf-Sb FTQQYQ SxUTRf2 HV C4EpC5R anti-Epend-Sb イントロンウォーキング用プライマー EP-anti-IIWPNV, SxUTRf1 EPSg-anti-IIWPNV. Sq-INTF1, 2, Sq-INTR1, 2, SxUTRf2 SI-INTF1, 2, 2a, SI-INTR1, 2, 3 **EP-anti-IIWPNV2** (EP-anti-IIWPNV+EPSg-anti-IIWPNV) Se-INTF1, Sg-INTF1, zero, 2, Sg-INTR1, 2, Sk-INTF1, 2, Sk-INTR1, St-INTF1, 2, St-INTR1

図2-1 本論文で用いたプライマーの位置. 矢印(赤):3'RACE, 矢印(青):5'RACE, 矢印(緑):半定量的RT-PCR, 矢印(紫):CAPSマーカーシステムにおけるゲノミックPCR, 矢印(橙):Sb-RNaseの解析, 矢印(茶):Sv-RNaseの解析, 矢印(黒):Sx-RNaseの解析.

び HV 領域下流の保存領域の塩基配列からそれぞれ設計されている (Takasaki et al. 2004). 50℃ 30分で逆転写反応を行なった後, PCR は始めに94℃ 2分の熱変性, 続いて94℃ 30秒の熱変性, 55℃ 30秒のアニーリング, 68℃ 45秒の伸長反応を 30 サイクル行ない, 最後に 68℃ 7分で伸 長反応を行なった.

3'Rapid Amplification of cDNA Ends (3'RACE)

3'RACE は花柱 total RNA を鋳型にして行なった. 始めに Titan One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostics)を用いて RT-PCR を行なった. 100 ng の mRNA を鋳型にし, フォワードプラ イマーに'FTQQYQ', リバースプライマーに'*Not*I-(dT)₁₈' (5'-ATTCGCGGCCGCAGGAAT₁₈-3')を 用いた. 反応液の組成と反応サイクルは RT-PCR の項と同じである.

RT-PCR 産物を鋳型にし, セイヨウナシ Sd-および Se-RNase の C1 領域直後の塩基配列に基づ き設計した'C2F1', または, リンゴ S-RNase の C2 領域直前の塩基配列に基づき設計した'C2F2' をフォワードプライマーに, 'Nofl' (5'-ATTCGCGGCCGCAGGAAT-3')をリバースプライマーに 用いた Nested PCR を行なった. Nested PCR には GeneAmp High Fidelity PCR System (Applied Biosystems) を用いた. 2 µL の RT-PCR 産物に 0.2 mM dNTP mix, 0.3 µM のフォワードプライマ - 'C2F2'または'C2F1', 0.3 µM のリバースプライマー'Nofl', 3 µL 10×Buffer, 0.2 µL Enzyme mix と滅菌水を加えた 30 µL の反応液を作成した. PCR は始めに 94℃ 2 分の熱変性を行なった. 続 いて, 94℃ 15 秒の熱変性, 48℃ 30 秒のアニーリング, 72℃ 2 分の伸長反応を 10 サイクル行な い, 94℃ 15 秒の熱変性, 48℃ 30 秒のアニーリング, 72℃ 2 分30 秒の伸長反応を 20 サイクル行 ない, 最後に 72℃ 7 分で伸長反応を行なった. 反応終了後, PCR 産物を 1%アガロースゲルで電 気泳動し, エチジウムプロマイドで染色して増幅断片を確認した.

3'RACE でクローニングした Sq-RNase 断片はプライマーセット'C2F2'および'E-IIWPNV-Fを, Sd-, Se-RNase 断片はプライマーセット'C2F1'および'IIWPN-F'を, その他の S-RNase 断片はプラ イマーセット'C2F2'および'IIWPN-F'を用いて塩基配列を決定した.

5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)

5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (Invitrogen)を用いて 5'RACE を行なった. 始めに, 100 ng の花柱 mRNA に 2.5 pM リバースプライマー'EPSq-anti-IIWPNV' (*Sq-RNase* 増幅用)または'anti-IIWPNV' (*Sq-RNase* 以外の *S-RNase* 増幅用)と DEPC 処理水を加え て作成した 15.5 µL の反応液を70℃で 10 分間加温した後, 氷上に1 分放置した. 反応液に 2.5 µL

の 10×PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.4 mM dNTP mix を加えた反応液 24 µL を穏やか に混和した後, 42℃で 1 分加温した. 反応液に Super Script II RT を 1 µL 加えて穏やかに混和し た後, 42℃で 50 分間反応させた. Super Script II RT を 70℃15 分間で失活させた. 反応液を 5000 rpm で 10~20 秒遠心した後, 37℃に加温した. 反応液に 1 µL RNase mix を加えて穏やかに混和 した後, 37℃で 30 分間加温して, 一本鎖 cDNA を作成した.

ー本鎖 cDNA 溶液に 120 µL の binding solution (6 M NaI)を加えた後, S.N.A.P. Column に移し, 11,500 rpm で 20 秒遠心した. 流出液を除いた後, 4℃に冷やしておいた 1×Wash Buffer 400 µL を column に加え, 11,500 rpm で 20 秒遠心した. この操作をさらに 3 回繰り返した後, 4℃の 70%エ タノール 400 µL を加えて column を洗浄した. この洗浄をもう一度繰り返した. 11,500 rpm で 1 分間遠心して, column から完全にエタノールを除去した後, column を新しいチューブに移し, 予 め 65℃に温めておいた滅菌水 50 µL を加えて 3 分間放置した. 11,500 rpm で 20 秒遠心して, column から一本鎖 cDNA を溶出させた.

溶出した一本鎖 cDNA 10 μ L に 5 μ L の 5×tailing buffer, 200 μ M dCTP, 6.5 μ L の DEPC 処理水 を加えた反応液を作成した. 94℃で 2~3 分加温後, 氷上 1 分に放置した. 反応液に 1 μ L の TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) を加えて穏やかに混和した後, 37℃で 10 分間加温して, 一 本鎖 cDNA の 3'末端にポリ dC-tail を付加した. 65℃で 10 分間加熱して TdT を不活化させた.

dC-tailed cDNA を鋳型にし, High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics)を用いて First PCR を 行なった. 5 µL の dC-tailed cDNA に 5 µL の 10×buffer, 200 µM dNTP, 0.4 µM のフォワードプラ イマー'AAP' (Abridged Anchor Primer: 5′-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG -3′), 0.4 µM のリバースプライマー'anti-IIWPNV'または'EPSq-anti-IIWPNV', 0.5 µL enzyme と滅 菌水を加えた 50 µL の反応液を作成した. PCR は 94℃ 2 分の熱変性に続き, 94℃ 1 分の熟変性, 48℃ 1 分のアニーリング, 72℃ 2 分の伸長反応を 35 サイクル行ない, 最後に 72℃ 7 分で伸長 反応を行なった.

Nested PCR には High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics)を用いた. 5 µL の First PCR 産物 に 5 µL の 10×buffer, 200 µM dNTP, 0.4 µM のフォワードプライマー'AUAP' (Abridged Universal Anchor Primer: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'), 0.4 µM の各 *S-RNase* の HV 領域に特異的 なリバースプライマー ('HVSa', 'HVSb', 'HVSd', 'HVSe', 'HVSg', 'HVSh', 'HVSk', 'HVSl', 'HVSq', 'HVSr'), 0.5 µL enzyme と滅菌水を加えて 50 µL の反応液を作成した. PCR は 94℃ 2 分 の熱変性に続いて, 94℃ 1 分の熱変性, 48℃ 1 分のアニーリング, 72℃ 2 分の伸長反応を 30 サ イクル行ない, 最後に 72℃ 7 分で伸長反応を行なった. 反応終了後, PCR 産物を 1%アガロース

ゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して増幅断片を確認した.

ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出には CTAB 法 (Castillo et al. 2001)を用いた. 各品種の未展開葉約 100 mg を液体窒素で冷却しながら粉砕棒で十分に磨砕した. 70℃に温めておいた 2-メルカプトエタノ ールを 5%含む 2×CTAB 溶液 (2% Cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl) を 400 µL 加えて懸濁した後, 60℃ 40 rpm で 10 分振盪 した. 懸濁液にクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)を 400 µL 加えて, 室温, 40 rpm で 30 分振盪した後, 室温 10,000 rpm で 5 分遠心した. 上清をクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) 400 µL を分注しておいた新しいチューブに移し, 再度同じ条件で振盪して遠心した. イ ソプロパノールを分注しておいた別の新しいチューブに移し, 実置 40 rpm で 10 分振盪 した. 4℃ 10,000 rpm で 5 分遠心して DNA を析出させた. 上清を捨て, 70%エタノールを 500 µL 加えて析出した DNA の沈澱を洗浄した後, 沈殿を風乾させた. 1 mL に RNase A (10 mg/mL)を 1 µL 含む 1×TE 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0))を 50 µL 加えて 5 分放置し た後, 上清を新しいチューブに移して 37℃ 10 分加温した.

抽出した DNA 溶液には DNA とともに糖が多く含まれているため、フェノール/クロロホルム /イソアミルアルコール (PCI)処理を行ない、ゲノム DNA を精製した.新たに1×TE 溶液を加え て 200 µL にした DNA 溶液に、等量の飽和フェノール/ (クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)) (1:1) を加えて、10 分間回転振盪させた.室温 12,000 rpm で5 分遠心した後、上清を新し いチューブに移した.この上清に 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)と 2.5 倍量の 100%エ タノールを加え、室温で10 分放置した後、室温 12,000 rpm で10 分遠心した.上清を捨て、沈澱 を 70%エタノールで洗浄した後、沈殿を風乾させた.適当な量の 1×TE 溶液を加えて 5 分放置 した後、上清を回収してゲノム DNA 溶液とした.

ゲノミック PCR

ゲノミック PCR はフォワードプライマーとして'FTQQYQ'を, リバースプライマーとして 'EP-anti-IIWPNV', 'EPSg-anti-IIWPNV', 'EP-anti-IIWPNV2' ('EP-anti-IIWPNV' と 'EPSg-anti-IIWPNV'の混合プライマー)を用いて行なった. ゲノム DNA 溶液 2 µL に, 3 µL の 10 × PCR Buffer, 3 µL の dNTP (2 µM), 各プライマー (3 µM)をそれぞれ 3 µL, 0.2 µL rTaq polymerase (TOYOBO), 滅菌水を加えた 30 µL の反応液を作成した. PCR は 94℃ 2 分の熱変性 に続いて,94℃ 15 秒の熱変性,48℃ 30 秒のアニーリング,72℃ 3 分の伸長反応を 10 サイクル 行ない,さらに,94℃ 15 秒の熱変性,48℃ 30 秒のアニーリング,72℃ 3 分 30 秒の伸長反応を 20 サイクル行ない,最後に 70℃ 7 分で伸長反応を行なった. PCR 産物を 1%アガロースゲルで 電気泳動し,エチジウムブロマイドでゲルを染色して増幅断片を確認した.

ゲノミック PCR 産物の塩基配列決定のためのゲノミック PCR には, rTaq polymerase の代わ りに proof reading 活性を有する KOD-Plus- (TOYOBO)を用いた. 3.3 μ L のゲノム DNA 溶液に 0.2 mM dNTP mix, 0.3 μ M のフォワードプライマー, 0.3 μ M のリバースプライマー, 5 μ L の 10× Buffer, 1 mM MgSO₄, 1 μ L KOD-Plus- DNA polymerase と滅菌水を加えて 50 μ L の反応液を作成 した. PCR は 94℃ 2 分の熱変性に続いて, 94℃ 15 秒の熱変性, 48℃ 30 秒のアニーリング, 68℃ 2 分の伸長反応を 30 サイクル行ない、最後に 68℃ 7 分で伸長反応を行なった.

ゲルからの PCR 増幅断片の抽出

アガロースゲルからの PCR 増幅断片の抽出には、GENECLEAN®III Kit (BIO 101)を使用した. PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイドで染色した後、目的の増 幅断片を切り出した. 切り出したゲル重の 3 倍量の飽和 NaI 溶液を加え、50℃でゲルを融解させ た. ゲル溶液に 5 µL の EZ-GLASSMILK を加えて混和して 5 分間放置した後、4℃ 14,000 g で 5 秒遠心して上清を捨てた. 500 µL の New Wash Buffer (NaCl-EtOH-Water)を加えてグラスミルク を再懸濁した後、4℃ 14,000 g で 5 秒遠心して上清を捨てた. この操作を再度行なった後、最後 に NEW 液を完全に取り除き、5 µL の 1×TE 溶液を加えて再懸濁し、14,000 g で 30 秒遠心して上 清 (増幅断片を含む)を回収した. 抽出液を 1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムプロ マイドで染色して抽出断片の濃度を決定した.

増幅断片の TA クローニング

PCR 産物のクローニングには、TA Cloning® Kit (Invitrogen)を用いた. 滅菌水、1 µL の 10× Ligation Buffer, 2 µL の pCR2.1 vector, 1 µL の T4 DNA Ligase に vector とのモル比が 1:1 になるように調整した PCR 産物を加え、10 µL の反応液を作成し、14℃で 16 時間ライゲーション反応を 行なった. 50 µL のコンピテント細胞 (One Shot TOP10F' Chemically Competent *E.coli*)を氷上で 融解し、2 µL のライゲーション反応液を加えて、氷上で 30 分間放置した. 42℃ 30 秒のヒートシ ョックを与え、氷上に1分置いた後、250 µL の SOC 培地 (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose (dextrose))を加え、37℃ 60 rpm で 1 時間振盪培養した. 50 mg/mL カナマイシン, 20 µL/mL X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoryl- β -D-Galactoside)と 0.1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)を加えた LB 培地 (10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast Extract, 5 g/L NaCl, 1.5% Agar) に植菌し, 37℃で一晩培養した. Blue/White 選抜により区別される白色コロニーを LB 培地 (50 mg/mL カナマイシン)に楊枝で移してマス タープレートを作成するとともに, 20 µL の 20T-2E-1% Triton X (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 2 mM EDTA, 1% Triton X-100)に懸濁した. 懸濁液を 94℃で 15 分加温した後, 4℃, 15,000rpm で 1 分遠 心し, 上清を PCR に用いた. インサートチェックの PCR には rTaq DNA polymerase (TOYOBO) を用いた. 懸濁液1 µL に 0.2 mM dNTP mix, 0.3 µM のフォワードプライマー, 0.3 µM のリバー スプライマー, 1 µL 10×Buffer, 0.07 µL rTaq DNA polymerase と滅菌水を加えて 10 µL の反応液 を作成した. PCR は始めに 94℃ 2 分の熱変性を行なった. 続いて, 94℃ 30 秒の熱変性, 48℃ 30 秒のアニーリング, 72℃ 2 分の伸長反応を 25 サイクル行ない, 最後に 70℃ 7 分で伸長反応を行 なった. 反応終了後, PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムプロマイドで染 色してインサートの有無を確認した.

目的の断片を含むコロニーの懸濁液を鋳型にし, KOD-Plus- (TOYOBO)を用いて断片を増幅 した. 1.5 µL の懸濁液に 0.2 mM dNTP mix, 0.3 µM のフォワードプライマー'M13(-20)' (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'), 0.3 µM のリバースプライマー'M13RV' (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 5 µL の 10×Buffer, 1 mM MgSO₄, 1 µL の KOD-Plus- DNA polymerase と滅菌水を加えて 50 µL の反応液を作成した. PCR は始めに 94℃ 2 分の熱変性を行 なった. 続いて,94℃ 15 秒の熱変性, 48℃ 30 秒のアニーリング, 68℃ 1 分の伸長反応を 30 サイ クル行ない, 最後に 68℃ 7 分で伸長反応を行なった. 反応終了後, PCR 産物を 1.5%アガロース ゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色して目的の増幅断片を切り出し, 前述の方法 でゲルから抽出した. 抽出した増幅断片を入DNA/HindIII digest マーカーとともに 1%アガロー スゲルで電気泳動し, DNA の濃度を測定した.

塩基配列の決定

シークエンス反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いた. 抽出した PCR 増幅断片 10~20 ng に 1.6 pM プライマー, 3 μ L の 5×Sequence Buffer, 2 μ L の BigDye Terminator Ready Reaction Mix と滅菌水を加えて 20 μ L の反応液を作成した. シークエンス反応は始めに 96°C 1分の熱変性を行なった後, 96°C 10秒の熱変性, 50°C 5秒のアニーリング, 60°C 4分の伸長反応を 25 サイクル行なった.反応終了後,反応液に 2 μ L の 3 M 酢酸ナトリウ

ム (pH 5.2), 2 µL の 125 µM EDTA, 50 µL の 100%エタノールを加えて4 回転倒で混和した後, 室 温で 15 分間放置した. 4℃ 15,000 rpm で 20 分間遠心し,上清を取り除いた後, 70 µL の 70%エタ ノールを加えて沈殿を洗浄し, 4℃ 15,000rpm で 5 分間遠心して上清を完全に取り除いた. 室温 で 15 分風乾させた後,シークエンスを行なうまで-20℃に遮光保存した.

シークエンスには 373S DNA Sequencing System (Applied Biosystems)または ABI PRISMTM 310 DNA capillary sequencer (Applied Biosystems)を用いた。前者を用いた場合, 25 g の尿素, 6.75 mL の 50% Long Ranger stock, 5 mL の 10×TBE と滅菌 Mili Q 水で 6.75%のゲル溶液を作成し, 重合 促進剤として 250 µL の過硫酸アンモニウム (APS)と 25 µL の TEMED (N,N,N',N',テトラメチル エチレンジアミン)を加えた後、きれいに洗浄して組み立てたガラス板の間にゲル溶液を流し 込み 4~5時間放置して十分重合させた.シークエンス用サンプルに 3 µL の 50 mM EDTA (プル ーデキストランを含む):脱イオン化ホルムアミド = 1:5を加えて混和した.373S にゲル板を セットし、泳動条件を設定した後、サンプルを奇数レーンにロードした.5分間泳動したところ で一時停止してサンプルを偶数レーンにもロードし、再開後 16 時間泳動した.後者を用いた場 合、シークエンス用サンプルに Hi DiTM Formamide 25 µL を加え、サンプルをシークエンスチュ ープに移した.96℃ 2分加熱後、急冷して解析に用いた.

シークエンスのデータは GENETYX-MAC 13.0 (Genetyx)を用いて解析した. シグナルペプチ ドの推定は Signal P ver. 2.0 により行なった (Nielsen et al. 1999)

制限酵素処理

PCR 産物 5 µL を用いて, Bael, BgIII, BssHII, HindIII, EcoO109I, SphI による制限酵素処理を行な った. Bael は 25℃で 4 時間, BssHII は 50℃で 4 時間, それ以外の制限酵素は 37℃で 4 時間反応 させた. 制限酵素処理前後の PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムプロマ イドで染色した.

く結果>

自家不和合性の評価

日本の栽培品種のうち第1章で供試していない15品種, 'アレクサンドリン・デュイヤール', 'ウィンター・ネリス', 'セニョール・デスペラン', 'デボー', 'ドワイエネ・デュ・コミス', 'マル ゲリット・マリーラ', 'ミクルマス・ネリス', 'マックス・レッド・バートレット', 'エル・ドラド', "オーロラ', 'カリフォルニア', '越さやか', 'シルバー・ベル', 'バラード', 'ボートヌ'の自家不和合 性を第1章の方法により評価したところ, 'マルゲリット・マリーラ'は雄性不稔であったが, そ の他の14品種は自家不和合と判定された (データ省略). したがって, 日本の栽培品種25品種 においては, 'マルゲリット・マリーラ'が雄性不稔性, 'グランド・チャンピオン'が部分的自家和 合性, その他の23品種は自家不和合性を有することが明らかになった.

S-RNase をコードする cDNA 断片のクローニング

セイヨウナシの雌しベ側S遺伝子産物もS-RNase であると仮定し, cDNA のクローニングを試 みた.まず,自家不和合性品種のうち 10 品種, 'ラ・フランス', 'バートレット', 'ル・レクチェ', 'ゼネラル・レクラーク', 'オーロラ', 'コンファレンス', 'ドワイエネ・デュ・コミス', 'フレミッ シュ・ビューティー', 'ウィンター・ネリス', 'パス・クラサン'の花柱から抽出した total RNA を 鋳型にして, プライマーセット'FTQQYQ'と'anti-(I/T)IWPNV'を用いて RT-PCR を行ない, C2 領 域と HV 領域を含むと予想される cDNA 断片を増幅した. RT-PCR 産物を TA クローニングした 後,各品種に対して約 10 個のコロニーを採取し, インサート DNA 配列を解析した.その結果, 'パス・クラサン'以外の9 品種から2 種類ずつの cDNA 断片が増幅されたが, 'パス・クラサン' からは1 種類の断片しか増幅されなかった.

そこで、各品種の total RNA を鋳型に 3'RACE を行なった. プライマーセット'FTQQYQ'と 'Norl-(dT)₁₈'を用いた RT-PCR では、ニホンナシ S-RNase cDNA の塩基配列から予想される約 800 bp の断片の他にいくつかの断片が増幅されたので、RT-PCR 産物を鋳型に、推定 S-RNase 断片の 配列から設計したフォワードプライマー'C2F1'および'C2F2'と、リバースプライマー'Norl'を用 いて Nested PCR を行なった. その結果、各品種から S-RNase 断片と期待される約 800 bp の断片 と若干の付随断片が増幅された. 約 800 bp の増幅断片をゲル抽出し、TA クローニングした後、 各コロニーのインサート DNA 配列を決定した. その結果、'パス・クラサン'を含むすべての品 種から2 種類ずつの3'末端側 cDNA 断片がクローニングされ、これらは配列の比較から 10 種類 に分類された.

本研究の進行中に、ゲノミックPCR により増幅された 13 種類の推定 S-RNase 対立遺伝子 (Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se- (=Sj-), Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, So-, Sp-RNase (Se と Sj は同一の配列を持つので以降 Se で表記))の部分配列がデータベースに登録された (Zuccherelli et al. 2002a, b; Zisovich et al. 2004a). Zuccherelli et al. (2002a, b)は6 種類の推定 S-RNase 対立遺伝子, Sa (accession no. AJ458181), Sb (accession no. AJ458182), Sc (accession no. AJ459774), Sd (accession no. AJ759775), Se (accession

no. AJ457053), *Sh* (accession no. AJ459776)をクローニングし、増幅された推定 *S-RNase* 対立遺伝 子の種類から, 10 品種の *S* 遺伝子型を'Abbé fétal' (*SaSb*), 'ドワイエネ・デュ・コミス' (*SaSb*), 'Cascade' (*SbSe*), 'マックス・レッド・バートレット' (*SeS*-), 'バートレット' (*SeS*-), 'Beurré Hardy' (*ScSd*), 'Eletta Morettini' (*SaSc*), 'パス・クラサン' (*SaS-*), 'コンファレンス' (*SdSh*), 'Beurré Bosc' (*ScS-*)と推定した. また, *SaSb* の'Abbé fétal'と'ドワイエネ・デュ・コミス'が交雑不和合であるこ とを交配実験で確認している. Zisovich et al. (2004a)は 8 種類の *S-RNase* 対立遺伝子; *Si* (accession no. AF518319), *Sj* (accession no. AF457594), *Sk* (accession no. AY103048), *SJ* (accession no. AY103409), *Sm* (accession no. AF457594), *Sk* (accession no. AY195840), *So* (accession no. AY261994), *Sp* (accession no. AY421968)をクローニングし, 9 品種の *S* 遺伝子型を'Bon Rouge' (*SeSI*), 'Coscia' (*SbSk*), 'Docteur jules Guyot (プレコース)' (*SaSe*), 'Forelle' (*SeSh*), 'Gentile' (*SeSi*), 'Lawson' (*SmSo*), 'Red Clapp's (スタークリムソン〉' (*SdSe*), 'Spadona' (*SeSk*), 'Spadochina' (*SkSI*)と 推定している. 推定 *S* 対立遺伝子の配列とクローニングした 10 種類の *3* 末端側 cDNA 断片を照 合させた結果, 7 種類の cDNA 断片は推定 *Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sh-, Sk-, SI-RNase* 対立遺伝子に対応し ていた. 残り 3 種類は 13 種類の推定 *S-RNase* 対立遺伝子と異なる配列を持っていたことから, 新規の *S-RNase* 対立遺伝子と見なし, *Sg, Sq, Sr* と名付けた.

クローニングした断片の種類から 10 品種の S 遺伝子型を, 'ラ・フランス' (SeSr), 'バートレット' (SeSI), 'ル・レクチェ' (SbSq), 'ゼネラル・レクラーク' (SISq), 'オーロラ' (SaSe), 'コンファレンス' (SdSr), 'ドワイエネ・デュ・コミス' (SaSb), 'フレミッシュ・ビューティー' (SdSe), 'ウィンター・ネリス' (ShSk), 'パス・クラサン' (SgSr)と推定した.

S-RNase 完全長 cDNA 塩基配列の決定

推定 S-RNase cDNA 完全長塩基配列を決定するため,セイヨウナシ6品種, 'ドワイエネ・デ ユ・コミス' (SaSb), 'フレミッシュ・ビューティー' (SdSe), 'ゼネラル・レクラーク' (SlSq), 'ラ・ フランス' (SeSr), 'ウィンター・ネリス' (ShSk), 'パス・クラサン' (SgSr)の花柱 mRNA を鋳型に 5′RACE を行なった. 各推定 S-RNase のHV 領域特異的リバースプライマーを用いた Nested PCR により増幅された cDNA 断片をゲルから抽出し,塩基配列を決定した. 3′末端側 cDNA 断片の配 列と照合したところ, 10 種類の推定 S-RNase cDNA に対応する 5′末端側断片をクローニングす ることができた.

5'および3'末端側断片配列を重複させ, cDNA 完全長塩基配列を決定した: Sa-RNase (accession no. AB236430), Sb-RNase (accession no. AB236429), Sd-RNase (accession no. AB236427), Se-RNase

(accession no. AB236428), *Sg-RNase* (accession no. AB258360), *Sh-RNase* (accession no. AB236431), *Sk-RNase* (accession no. AB236432), *Sl-RNase* (accession no. AB236425), *Sq-RNase* (accession no. AB236424), *Sr-RNase* (accession no. AB236426). 10 種類の完全長 cDNA 配列は 678~696 bp から 構成され, 226~232 アミノ酸をコードしていた. 推定アミノ酸配列はニホンナシとリンゴの S-RNase に典型的な 1 次構造を有しており, 25 または 27 アミノ酸残基のシグナルペプチド, *T2/S* 型 RNase の活性に必須な 2 つのヒスチジン残基 (Kawata et al. 1989), 高次構造形成に関わる 8 つのシステイン残基 (Ishimizu et al. 1996b)が確認された. 10 種類の推定アミノ酸配列の比較か ら, ニホンナシやリンゴと同じ位置に 5 つの保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5)と対立遺伝子特異 性に関与する 1 つの HV 領域が特定された (図 2-2) (Ishimizu et al. 19998; Ushijima et al. 1998). ク ローニングした 10 種類の cDNA はナシ亜科の S-RNase に共通の特徴を有していることから, セ イヨウナシの S-RNase (Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sh-, Sk-, SI-, Sq-, Sr-RNase)をコードすると考えられた. また, これら S-RNase の推定アミノ酸配列の相同性は 61.8% (Sb-と SI-RNase 間)~89.5% (Sk-と Sq-RNase 間)であり, ニホンナシ (56.7~94.6%)やリンゴ (60.7~93.9%)と同程度であった.

10 種類の S-RNase 対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステムの開発

日本の栽培品種の S 遺伝子型を迅速に推定できる CAPS マーカーシステムを開発するため, 10 種類の S-RNase 断片 (C2 領域と HV 領域, イントロンを含む)を増幅できるプライマーを cDNA の塩基配列から検討した.上述のように,ニホンナシのプライマーセット'FTQQYQ'と 'anti-(I/T)IWPNV'を用いた RT-PCR により, Sg-RNase 以外の9 種類の S-RNase は増幅されたが, Sg-RNase は増幅されなかった.一方, Sg-RNase を含む 10 種類の S-RNase 3'末端側 cDNA 断片は プライマーセット'FTQQYQ'と'Norl-(dT)₁₈'を用いた 3'RACE により増幅されている.このこと から, 10 種類の S-RNase 対立遺伝子の PCR 増幅にフォワードプライマー'FTQQYQ'はそのまま 使用できると判断した. S-RNase cDNA と'anti-(I/T)IWPNV'プライマーの配列の比較から,新た な 2 つのリバースプライマー'EPSg-anti-IIWPNV' (Sg-RNase 特異的)と'EP-anti-IIWPNV' (Sg-RNase 以外の S-RNase)を設計した (図 2-3). Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Sk-, Sl-, Sg-, Sr-RNase 対 立遺伝子を有するセイヨウナシ6 品種, 'ドワイエネ・デュ・コミス' (SaSb), 'フレミッシュ・ビ ューティー' (SdSe), 'ゼネラル・レクラーク' (SISq), 'ラ・フランス' (SeSr), 'ウィンター・ネリス' (ShSk), 'パス・クラサン' (SgSr)のゲノム DNA を鋳型に PCR を行なったところ, 'FTQQYQ'と 'EP-anti-IIWPNV'のプライマーセットにより Sg-RNase の断片が (図 2-4a), 'FTQQYQ'と'EPSg-anti-IIWPNV'のプライマーセットにより Sg-RNase の断片のみが増幅された

| Sa-RNase Sb-RNase | WNKHGSCGRPAIQNDMHYLQTVIKMYI WDKHGSCASSPIQNQTHYFDTVIKMYT | IQKQNVSEILSKAKIEPVGRFWTQI IQKQNVSEILSKANIKPGRKSRRLV | KEIEKAIRKGTNNKEPKLKCQRNTQG' VDIENAIRKVINNMTPKFKCQKNPRTSL' | TELVEVTICSDRNLK TELVEVGLCSDSNLT | QFIDCPRPILN QFINCPHPFPQ | GSRYYCPTNNILY GSRYFCPTN-IQY | 228 226 |
|----------------------|--|--|--|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------|
| | # * | | * | * | * | * | |
| | Signal peptide | C1 | C2 | HV | | | |
| Sr-RNase | MGITGMIHIVTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFQFTQQYQPAVCYFNPTPO | CKDPPDKLFTVHGLWPSNLNGPHPENCT | NATVNSQRITN- | IQAQLKIIWPN | VLDRTNHVGFWNKQ | 112 |
| Sg-RNase | MGITGMIYMVTVVFSLIVLILSSSA | VKFDYFOFTOOYOPAVCNSNPTPO | CKDPPDKLFTVHGLWPSNVNGSDPKKCK | TILKPRTIRN- | LKAOLEIIWPN | VSYSKGSVRFWRKO | 112 |
| S1-RNase | MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA | AKYDYLOFTQQYQPAACKFHHTPO | CKDPLDKLFTVHGLWPSNFNGPDPENCKV | VKPTASQTIDTS | LKPQLEIIWPN | VFNRADHESFWQKQ | 113 |
| Sk-RNase | MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA | VKFDYFOFTQQYQPAVCNSNPTPO | CKDPPDKLFTVHGLWPSNVNGSDPKKCK | ATILNPQTITD- | LKAQLEIIWPN | VLNRKAHVRFWRKQ | 112 |
| Sh-RNase | MGITGMIYMVTMVFSLLVSILSSSTVG | FDYFOFTQQYQPAACNSNPTPO | CKDPTDKLFTVHGLWPSNKIGGDPEYCK | IRNPRKRAKK | LEPQLEIIWPN | VLDRTNHTGFWSRQ | 111 |
| Sg-RNase | MGIIGMIYMVMMVFSLIVLILSSSTVG | FDYFOFTHOYOPAVCNSNRTPO | CKDPPDKLFTVHGLWPSNRNGPDPEYCKI | NTTLDVTKIGN- | LQAQLDIIWPN | VYDRTNNVGFWSKQ | 112 |
| Se-RNase | MGITRMIYMVTMAFSLIVLILSSSTMG | YDYFOFTOOYOPAACNSNPTPO | CKDPTEKLFTVHGLWPSNSNGPDPVNCK | PKTKVPQAQQPIDPS | LKPQLEIIWPN | VFNRADNESFWNKQ | 116 |
| Sd-RNase | MGNTGMIYMFTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFOFTQQYQPAVCNSNPTPO | INDRPEKLFTVHGLWPSNKKGPDPEKCKI | NIQMNSQKIGN- | MAAQLEIIWPN | VLNRTDHVGFWERE | 112 |
| Sb-RNase | MG-TGMIYMVMMVFSLIVLILSSSTVG | FDYYQFTQQYQPAVCNSNPTPO | CKDPPDKLFTVHGLWPSDSNGNDPKYCK | APP-Y-QTMKI- | LEPHLVIIWPN | VLNRNDHEVFWRKQ | 109 |
| Sa-RNase | MGITGIIYMVTMVFLLIVLILPSPTVG | YDYFQFTQQYQLAVCHFNPTPO | CKDPPDKLFTVHGLWPSNSTGNDPMYCKI | NTTLNSTKIAN- | LTAQLEIIWPN | VLDRTDHITFWNKQ | 112 |
| | | | π π | • | | | |

| | π \sim | | | | |
|----------|---------------------|--|------------------------|--|-----|
| Sa-RNase | WNKHGSCGRPAIQNDMHYL | QTVIKMYITQKQNVSEILSKAKIEPVGRFWTQKEIEK | AIRKGTNNKEPKLKCQRNTQG- | -TELVEVTICSDRNLKQFIDCPRPILNGSRYYCPTNNILY | 228 |
| Sb-RNase | WDKHGSCASSPIQNQTHYF | DTVIKMYTTQKQNVSEILSKANIKPGRKSRRLVDIEN | AIRKVINNMTPKFKCQKNPRTS | LTELVEVGLCSDSNLTQFINCPHPFPQGSRYFCPTN-IQY | 226 |
| Sd-RNase | WLKHGTCGYPTIRDDMHYL | KTVIKMYITQKQNVSAILSKAMIQPNGQNRSLVDIEN | AIRSGTNNTKPKFKCQKNTRT- | TTELVEVTLCSDRDLTKFINCPQP-QQGSRYLCPA-DVQY | 227 |
| Se-RNase | WDKHGTCGYPTIKDKNHYL | QTVIKMYITQKQNVSQILSKANINPDGIGRTRKLIEN | AIRNGTNDKEPKLKCQKNNGT- | -IELVEVSLCSNYLGKHFINCPNKIPQGSRYFCPIKDIQY | 232 |
| Sg-RNase | WAKHGICGSPTIQDDVNYL | ETVINMYIIKKONVFEILSNAKIEPEGKNRTRKDIVK | AIRSGTNGKRPKLKCQKNNRT- | -TELVEVTLCSDRNLTRLINCPNLIKPKSPYFCPLKSIHY | 228 |
| Sh-RNase | WKKHGACGYPTIQNENDYF | ETVIKMYITEKQNVSRILSNAKIEPDGKSRALVDIEN | AIRNGTNNKLPKLKCQKKTRV- | -TELVEITLCSDKNRAHFIDCPNPFLPGSPYLCPNNSIHY | 227 |
| Sk-RNase | WRKHGACGYPTIADDMHYF | STVIEMYITKKONVSEILSKANIKPEGRFRTRDDIVN | AISPSIDYKKPKLKCKINNQT- | -TELVEVGLCSDNNLTQFINCPNPFPQGSPYFCPTNNIQY | 228 |
| Sl-RNase | WDKHGTCGSPTIIDKNHYF | QTVIRMYITEKQNVSYILSKANINPDGKGRTRKDIQI | AIRNSTNDKEPKLKCQTKNGI- | -TELVEVSLCSNYLGKNFINCPNKTPGKTRYSCPTNDIHY | 229 |
| Sq-RNase | WRKHGTCGYPTIADDMHYF | STVIEMYTTKKONVSEILLKAKIKPEGRFRTRDDIVN | AISQSIDDKEPKLKCKNNNNI- | -TELVEVGICSDNNLTQFINCPHPFPQGSPYLCPTNNIQY | 228 |
| Sr-RNase | WIKHGSCGNPPIMNDTHYF | QTVINMYIIKKQNVFEILSNAKIEPEGKNRTRKDIVK | AIRSGTNGKRPKLKCOKNNRT- | -TELVEVTLCSDRNLTRLINCPNLIKPKSPYFCPLKSIQY | 228 |
| | | | | | |
| | C3 | RC4 | | C5 | |
| | | | | | |

図 2-2 10 種類のセイヨウナシ S-RNase の推定アミノ酸配列の比較.

10 種類の S-RNase 間で保存されているアミノ酸残基を網掛けで示す. 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, および, RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基をそれぞれ*と#で記す. シグナルペプチド, 超可変 (HV)領域, 保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5)は下線により示す. イントロンの挿入部位は▼で示す. 10 種類の S-RNase は下記の accession number で DDBJ に登録されている: Sa-RNase (AB236430), Sb-RNase (AB236429), Sd-RNase (AB236427), Se-RNase (AB236428), Sg-RNase (AB258360), Sh-RNase (AB236431), Sk-RNase (AB236432), Sl-RNase (AB236425), Sg-RNase (AB236424), Sr-RNase (AB236426).

| | FTOOYO |
|----------|---|
| | TTTACGCAGCAATATCAG |
| Sa-RNase | TTTACGCAGCAATATCAGCTGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC |
| 5b-RNase | TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCAACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACTGTTCACGGTTTGTGGCCTTC |
| Sd-RNase | TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCCGTATGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAACGATCGTCCTGAAAAATTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC |
| Se-RNase | TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAATTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC |
| Sg-RNase | TTCACGCAT CAATAT CAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAAT CGTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAATTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC |
| Sh-RNase | TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC |
| Sk-RNase | TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCATGGTTTGTGGCCTTC |
| 51-RNase | TTTACACAGCAATATCAGCCGGCTGCCTGCAAGTTTCACCATACTCCTTGTAAGGATCCTCTTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGATTATGGCCTTC |
| Sq-RNase | TTTACGCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCATGGTCTGTGGCCTTC |
| Sr-RNase | TTTACGCAGCAATATCAGCCAGCTGTCTGCTACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTC |
| | |
| Sa-RNase | AAACAGCACAGGAAATGACCCAATGTACTGCAAGAATACAACCTTGAATTCTACTAAGgtaatattattaataattagatgg |
| Sb-RNase | AGACTCGAATGGAAATGACCCAAAATATTGCAAGGCGCCGCCATATCAGACGgtaatattattagcataatcagatagtcaa |
| Sd-RNase | AAACAAGAAGGGACCTGACCCAGAAAAATGCAAGAATATACAAATGAATTCTČAGAAGgtaatattattaataatgagatag |
| Se-RNase | AAACTCTAATGGACCTGACCCAGTAAACTGCAAGCCGAAAACCAAGGTGCCTCAGGCGCAGCAGCCGgtaatttatetgaaa |
| Sg-RNase | AAACAGGAATGGACCTGACCCAGAGTATTGCAAGAACACAACCTTGGATGTTACCAAGgtaatattattagtaattagacaa |
| Sh-RNase | AAACAAAATAGGAGGCGACCCAGAATATTGCAAGATAAGGAATCCTCGGAAGgtaatattattagtaatcggatagtcaata |
| Sk-RNase | AAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAAGCTACAATCTTAAATCCTCAAACGgtaatattattcaggaaaaattaa |
| 51-RNase | AAACTTTAATGGACCTGACCCAGAAAACTGCAAGGTCAAACCCACGGCGTCTCAAACGgtaatattattgataataagatag |
| Sq-RNase | AAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAAACTACAATCTTGAAACCTCGAACGgtaatattattcaggaaaaattaa |
| Sr-RNase | AAACTTGAATGGACCTCACCCAGAAAATTGCACGAACGCAACCGTGAATTCTCAGAGGgtaatattattgataatcagatag |
| | |
| Sa-RNase | tcataaatttttttttttattattattattctcagatagcaaatctgacagcccagttggaAATTATTTGGCCCAACGT |
| Sb-RNase | aaattatttetattattattattattattgtcagatgaaaatactcgaaccccacttggtAATTATTTGGCCGAACGT |
| Sd-RNase | atgaattgtttctattataattatattgtcagataggaaatatggcagcccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT |
| Se-RNase | aatttttttattgtatattttatttgtcagatagatccatcactcaaaccccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT |
| Sg-RNase | atttttttttttttttctaatgcataatattttcagataggaaatctccaagcacagttgga <mark>C</mark> ATTATTTGGCCGAACGT |
| Sh-RNase | attttttaaattgtacatattctattgtcagagagcaaaaaaactcgaaccccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT |
| Sk-RNase | gtaattttttttctattataatattatattgtcagataacagatcttaaagcccagctggaAATTATTTGGCCGAACGT |
| Sl-RNase | tattttttctattgtatatattgtattttcagatagatacatcactcaaaccccagttggaAATTATTTGGCCGAACGT |
| Sq-RNase | ataattttttttttattattatattattgtcagataagaaatcttaaagcccagctggaAATTATTTGGCCAAACGT |
| Sr-RNase | atttacctagctatattatatattatattgtcagataacaaatatccaagcccagttgaaAATTATTTGGCCGAA <u>CGT</u> |
| | TTAATAAACCGGYTTRCA |
| | EP-anti-IIWPNV |
| | GTAATAAACCGGYTTRCA |
| | EPSg-anti-IIWPNV |

図 2-3 プライマー'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'により増幅される *S-RNase* 対立遺伝子の部分塩基配列. 橙色: プライマー'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV'および'EPSg-anti-IIWPNV2' (____がプライマーの 5'側)を表す. 赤字は, 他の 9 種類の *S-RNase* 対立遺伝子と異なる塩基を示す. イントロンは小文字で示し, 途中の配列は点線で省略している.



図2-4 ゲノミックPCRによる10種類のS-RNase対立遺伝子の増幅 (a-c)および6種類の制限酵素による識別切断 (d-i). (a)プライマー'FTQQYQ'と'EP-anti-IWPNV'を用いたPCR, (b)プライマー'FTQQYQ'と'EPSg-anti-IWPNV'を 用いたPCR, (c)プライマー'FTQQYQ'と'EP-anti-IWPNV2'を用いたPCR. (d)BgIIIによる切断, (e)HindIIIによる切断, (f)SphIによる切断, (g)EcoO109Iによる切断, (h)BssHIIによる切断, (i)BaeIによる切断. lane 1, 'ゼネラル・レクラーク' (SlSq); lane 2, 'ウィンター・ネリス' (ShSk); lane 3, 'フレミッシュ・ビューティー' (SdSe); lane 4, 'ラ・フランス' (SeSr); lane 5, 'ドワイエネ・デュ・コミス' (SaSb); lane 6, 'パス・クラサン' (SgSr). (図2-4b). そこで, この2種類のリバースプライマーの混合プライマーを'EP-anti-IIWPNV2'とし, 'FTQQYQ'ともに用いてゲノミック PCR を行なったところ, 10 種類の *S-RNase* の断片を増幅す ることができた (図 2-4c). 'ゼネラル・レクラーク' (*SlSq*)から約 1,400 bp と約 1,300 bp の断片が, 'ウィンター・ネリス' (*ShSk*)から約 1,300 bp と約 350 bp の断片が, 'フレミッシュ・ビューティ ー' (*SdSe*)から約 1,000 bp と約 350 bp の断片が, 'ラ・フランス' (*SeSr*)から約 1,000 bp と約 350 bp の断片が, 'ドワイエネ・デュ・コミス' (*SaSb*)から約 450 bp と約 350 bp の断片が, 'パス・クラサ ン' (*SgSr*)から約 2,000 bp と約 350 bp の断片が増幅された.

これらの増幅断片をゲル抽出した後、プライマー'FTQQYQ'、および、'EP-anti-IIWPNV'また は'EPSg-anti-IIWPNV'を用いて両端から DNA 配列を決定した. 配列を 10 種類の *S-RNase* cDNA と比較した結果、各増幅断片は 10 種類の *S-RNase* cDNA に対応付けられ、HV 領域に対立遺伝子 特異的な配列および長さを有する 1 つのイントロンが挿入されていることが明らかになった. 約1.0 kb以上の *Se-*, *Sg-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sq-RNase* 増幅断片に含まれるイントロン配列をプライマーウォ ーキングにより完全に決定した. 10 種類の *S-RNase* 対立遺伝子のゲノミック PCR 断片長とイン トロン長は以下の通りに決定された (図 2-5~14); *Sa* 345 bp (イントロン 145 bp), *Sb* 440 bp (同 246 bp), *Sd* 369 bp (同 169 bp), *Se* 998 bp (同 786 bp), *Sg* 1,906 bp (同 1,076 bp), *Sh* 345 bp (同 148 bp), *Sk* 1,274 bp (同 1,074 bp), *Sl* 1,414 bp (同 1,211 bp), *Sq* 1,283 bp (同 1,083 bp), *Sr* 353 bp (同 153 bp).

ゲノミックPCR後のアガロースゲル電気泳動により、*Sg-, Sl-, Se-, Sb-RNase* 対立遺伝子は断片 長から識別できた. *Sk*-および *Sq-RNase* 対立遺伝子は約 1.3 kb 断片として, *Sa-, Sd-, Sh-, Sr-RNase* 対立遺伝子は約 350 bp 断片としてほぼ同じ断片長に検出されたので,断片長による識別が困難 であった.そこで,これらの断片を特異的に切断できる制限酵素を探索した.クローニングし た10 種類の *S-RNase* だけでなく,データベースに登録されている *Sc-, Si-, Sm-, Sn-, So-, Sp-RNase* のゲノミック DNA 塩基配列も含めて検討し,6 種類の制限酵素,*BgII*, *HindIII, SpH*, *Eco*O109I, *Bss*HII, *Bae*I を選択した.約 1.3 kb 断片は *BgII* と *HindIII* 処理における切断の有無により識別可 能となった: *BgII* は *Sk-RNase* 断片のみを 1,022 bp と 214 bp の断片に切断した (図 2-4d, lane 2); *HindIII* は *Sq-RNase* 断片のみを 960 bp と 323 bp の断片に切断した (図 2-4e, lane 1).約 350 bp 断 片については, *SpH*, *Eco*O109I, *Bss*HII, *Bae*I 処理における切断の有無により識別可能になった: *SphI* は *Sa-RNase* 断片のみを 233 bp と 112 bp の断片に切断した (図 2-4f, lane 5); *Eco*O109I は *Sd-RNase* 断片を 260 bp と 109 bp の断片に切断するだけでなく (図 2-4g, lane 3), *Sl-RNase* 断片も 1149 bp と 265 bp に切断した (図 2-4g, lane 1); *Bss*HII は *Sh-RNase* 断片のみを 210 bp と 135 bp の 断片に切断した (図 2-4h, lane 2); *Bae*I は *Sr-RNase* 断片を 195 bp と 125 bp の断片に切断するだ

図 2-5 Sa-RNase ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236430). 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (がプライマーの 5' 側)を表す.

| ATGGGGATTACGGGGATTATATATATGGTTACGATGGTATTTTATTAATTGTATTAATA M G I T G I I Y M V T M V F L L I V L I | 60 20 |
|--|---|
| TTGCCTTCCCCTACGGTAGGATACGATTATTTTCAA | $\begin{array}{c}120\\40\end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} {\tt GTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC} \\ {\tt V} & {\tt C} & {\tt H} & {\tt F} & {\tt N} & {\tt P} & {\tt T} & {\tt P} & {\tt C} & {\tt K} & {\tt D} & {\tt P} & {\tt D} & {\tt K} & {\tt L} & {\tt F} & {\tt T} & {\tt V} & {\tt H} \\ \end{array} $ | $\begin{array}{c}180\\60\end{array}$ |
| $ \begin{array}{c} {} GGTTTGTGGCCTTCAAACAGCACAGGAAATGACCCCAATGTACTGCAAGAATACAACCTTG \\ G \ L \ W \ P \ S \ N \ S \ T \ G \ N \ D \ P \ M \ Y \ C \ K \ N \ T \ T \ L \end{array} $ | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| $\begin{array}{ccc} \text{AATTCTACTAAG-gtaatattattaataattagatggtcaatattgtttatttcatatat} & \text{N} & \text{S} & \text{T} & \text{K} \end{array}$ | $\begin{array}{c} 299\\ 84 \end{array}$ |
| a catatact caa catagatttt catg catg cgtgtg caa at attacaatta atta | 359 |
| ttaatcataaattttttttttttattattattattctcag-ATAGCAAATCTGACAGCCCAG I A N L T A Q | $\begin{array}{c} 418\\91\end{array}$ |
| TTGGAAATTATTTGGCCCAACGTACTTGATCGAACCGATCATATAACCTTCTGGAATAAA L E I I W P N V L D R T D H I T F W N K | $\begin{array}{c} 478\\111\end{array}$ |
| $\begin{array}{c} CAGTGGAACAAACATGGCAGCTGTGGGCGTCCCGCAATACAGAACGACATGCATTACTTG\\ Q W N K H G S C G R P A I Q N D M H Y L \end{array}$ | $\begin{array}{c} 538 \\ 131 \end{array}$ |
| CAGACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAG Q T V I K M Y I T Q K Q N V S E I L S K | 598 151 |
| GCGAAGATTGAACCGGTGGGGGAGATTCTGGACACAGAAGGAAATTGAAAAGGCCATACGC A K I E P V G R F W T Q K E I E K A I R | 658 171 |
| AAAGGTACCAACAATAAGGAACCAAAACTCAAGTGCCAAAGGAATACTCAGGGGACTGAA K G T N N K E P K L K \bigcirc Q R N T Q G T E | 718 191 |
| $\begin{array}{cccc} TTGGTTGAGGTCACTATTGTAGCGATCGCAACTTAAAGCAGTTCATAGATTGCCCCCGC\\ L & V & E & V & T & I & C & S & D & R & N & L & K & Q & F & I & D & C & P & R \end{array}$ | $\begin{array}{c} 778 \\ 211 \end{array}$ |
| CCTATTTTAAATGGATCACGATACTACTGCCCCACCAATAATATTCTGTATTAA PILNGSRYYCPTNNILY* | 832 228 |

| $\begin{array}{cccc} \text{ATGGGGACGGGGATGATATATATGGTTATGATGGTATTTTCCCTAATTGTATTAATATTG}\\ \underline{M} & \underline{G} & \underline{T} & \underline{G} & \underline{M} & \underline{I} & \underline{Y} & \underline{M} & \underline{V} & \underline{M} & \underline{V} & \underline{F} & \underline{S} & \underline{L} & \underline{V} & \underline{L} & \underline{L} \\ \end{array}$ | 60 20 |
|--|---|
| TCTTCGTCCACGGTGGGATTCGATTATTATCAA TTTATCAA TTTATCAGCAGCAATATCAGCCGGCTGTC S S T V G F D Y Q F T Q Y Q P A V | $\substack{120\\40}$ |
| $ \begin{array}{cccc} TGCAACTCCTAATCCAACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACTGTTCACGGT \\ C & N & S & N & P & T & P & C & K & D & P & D & K & L & F & T & V & H & G \end{array} $ | $\begin{array}{c} 180\\ 60\end{array}$ |
| $\begin{array}{cccc} TTGTGGCCTTCAGACTCGAATGGAAATGACCCCAAAATATTGCAAGGCGCCGCCATATCAG\\ L & P & S & D & S & N & G & N & D & P & K & Y & C & K & A & P & P & Y & Q \end{array}$ | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| $\begin{array}{c} \text{ACG} gta at att att agc at a atc a gat a gt caat att gt tt at ct catt tat gt a ctt gt T \end{array}$ | 300 81 |
| gtgtgtatatatatattttggataatgctagagcctccaaatttttaaaccaaatgatgtgtataaagatataagaaatttagtctttctaacattactctatattttttgatatataacaaatattacacttaattttataaattttataaatttatta | 360 420 480 |
| $\texttt{tattgtcagATGAAAATACTCGAACCCCACTTGGTAATTATTTGGCCGAACGTACTCAAT}_{M \ K \ I \ L \ E \ P \ H \ L \ V \ I \ I \ W \ P \ N \ V \ L \ N$ | $\begin{array}{c} 540\\98\end{array}$ |
| $\begin{array}{c} C{\tt GAAACGATCATGAAGTCTTCTGGCGTAAACAGTGGGATAAACATGGCTCCTGTGCGTCT} \\ R & N & D & H & E & V & F & W & R & K & Q & W & D & K & H & G & S & C & A & S \end{array}$ | 600 118 |
| $\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | $\begin{array}{c} 660 \\ 138 \end{array}$ |
| AAACAAAACGTTTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAATATTAAACCGGGTAGGAAAAGCAGG $K\ Q\ N\ V\ S\ E\ I\ L\ S\ K\ A\ N\ I\ K\ P\ G\ R\ K\ S\ R$ | 720 158 |
| $ \begin{array}{cccc} \textbf{AGGCTGGTGGATATTGAAAATGCCATACGCAAAGTTATCAACAATATGACACCAAAATTC} \\ \textbf{R} & \textbf{L} & \textbf{V} & \textbf{D} & \textbf{I} & \textbf{E} & \textbf{N} & \textbf{A} & \textbf{I} & \textbf{R} & \textbf{K} & \textbf{V} & \textbf{I} & \textbf{N} & \textbf{M} & \textbf{T} & \textbf{P} & \textbf{K} & \textbf{F} \end{array} $ | 780 178 |
| $\begin{array}{cccc} AAGTGCCAAAAGAATCCTAGGACATCATTGACTGAATTGGTTGAGGTCGGTC$ | 840 198 |
| $ \begin{array}{cccc} GATAGCAACTTAACGCAGTTCATAAATTGTCCCCACCCATTTCCACAAGGATCACGGTAT \\ D & S & N & L & T & Q & F & I & N & C & P & H & P & F & P & Q & G & S & R & Y \\ \end{array} $ | 900 218 |
| TTCTGCCCACCAATATTCAGTATTAA F C P T N I Q Y * | 927 226 |

図 2-6 *Sb-RNase* ゲノム DNA の部分塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236429). 赤色: HV 領域,青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (がプライマーの 5' 側)を表す.

図 2-7 Sd-RNase ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236427). 赤色: HV 領域、青色: 高次構造形成に関与する8つのシステイン残基、 桃色: RNase 活性に必須の2つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド,小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (____がプライマーの5´側)を表す.

| GTA | ATG(| CAA | CTC | ГААЛ | FCCT | ACT | CCT | TGT | YAAC | CGAT | CGT | CCT | GAA | AAA | TTG | TTI | TACG | GTI | CAC | 180 |
|----------|------------------|----------|-----------|-------------------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|---|
| V | C | N | S | N | P | T | P | C | N | D | R | P | E | K | L | F | T | V | H | 60 |
| GG' G | TTTO L | GTG W | GCC' P | ГТСА S | AAAC N | AAG K | AAG K | GGGA G | CCT P | GAC D | CCCA P | GAA E | AAA K | TGC | AAG K | AA7 N | TATA I | CAA Q | ATG M | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| AA' N | rtc' S | ГСА Q | GAA(K | G-gt | taat | att | att | aat | aat | gag | gata | gtc | aat | att | gtt | tat | ttc | att | tat | 299 84 |
| gca | act [.] | tgt | gta | taaa | ata | tat | tac | ata | tac | tca | aca | tag | att | ttc | atg | cac | acc | tgt | gca | 359 |
| aa | tat | tag | aat | taat | tta | aaa | ttt | aat | cat | gaa | ittg | ttt | cta | tta | tat | aat | tat | att | gtc | 419 |
| ag | -ATA | AGG. | AAA' | ГАТС | GGCA | GCC | CAG | TTG | GAA | ATT | ATT | TGG | CCG | AAC | GT | CTC | CAAT | CGA | ACC | 478 |
| | I | G | N | M | A | A | Q | L | E | I | I | W | P | N | V | L | N | R | T | 103 |
| GA' | ГСА' | ΓGT. | AGG(| CTTO | CTGG | GAA | AGA | GAG | TGG | CTC | CAAA | CAT | GGC | ACC | TGC | GGGG | GTAT | PCCC | CACA | 538 |
| D | Н | V | G | F | W | E | R | E | W | L | K | H | G | T | | G | Y | P | T | 123 |
| AT/ | AAG(| GGA | CGA(| CATC | GCAT | TAC | TTA | AAA | ACA | GTA | ATC | XAAA | ATG | TAC | ATA | ACC | CCAG | AAA | Q | 598 |
| I | R | D | D | M | H | Y | L | K | T | V | I | K | M | Y | I | T | Q | K | Q | 143 |
| AA(| CGT(| CTC' | ГGC/ | AAT1 | CTC | TCG | AAG | GCG | ATG | ATT | CAA | CCG | AAC | GGG | CAA | AAC | CAGG | TCA | TTG | $\begin{array}{c} 658 \\ 163 \end{array}$ |
| N | V | S | А | I | L | S | K | A | M | I | Q | P | N | G | Q | N | R | S | L | |
| GT(| GGA' | ГАТ' | ГGA/ | AAA7 | GCC | ATA | CGC | AGT | GGT | ACC | CAAC | AAT | ACG | AAA | CCA | AAA | TTC | CAAG | TGC | 718 |
| V | D | I | Е | N | A | I | R | S | G | T | N | N | T | K | P | K | F | K | C | 183 |
| CA/ | AAA(| GAA' | rac' | rago | GACG | ACG | ACT | GAA | TTA | GTT | GAG | GTC | ACT | CTT | TGC | AGT | GAT | AGA | IGAC | 778 |
| Q | K | N | T | R | T | T | T | E | L | V | E | V | T | L | C | S | D | R | D | 203 |
| TT/ L | AAC(T | GAA K | GTT(F | CATA I | AAT N | TGC C | CCC P | CAA Q | CCA P | CAA Q | CAA Q | GGA G | TCA S | CGA R | TAT Y | CTC | CTGC | CCC P | A GCC | 838 223 |
| GA' D | rgt' V | rca Q | GTA' Y | ГТА <i>А</i> * | l | | | | | | | | | | | | | | | 853 227 |

 $\begin{array}{cccc} ATGGGAAATACGGGGATGATATATATGTTTACAATGGTATTTTCATTAATAGTATTAATA\\ \underline{M \ G \ N \ T \ G \ M \ I \ Y \ M \ F \ T \ M \ V \ F \ S \ L \ I \ V \ L \ I \end{array}$

 $\begin{array}{c|c} TTGTCTTCGTCAACGGTGGGATACGATTATTTTCAA \\ \hline L & S & S & T & V & G \\ \hline L & S & S & T & V & G \\ \hline \end{array} Y & D & Y & F & Q & F & T & Q & Q & Y & Q & P & A \\ \end{array}$

60 20

120 40

180

桃色: RNase 活性に必須の2つのヒスチジン残基、 下線部: シグナルペプチド,小文字:イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (_____がプライマーの 5´側)を表す.

図 2-8 *Se-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236428). 赤色: HV 領域,青色:高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基,

| <u>M G I T R M I Y M V T M A F S L I V L I</u> | _ 20 |
|---|--|
| TTGTCTTCGTCCACGATGGGGTACGATTATTTTCAATTACGCAGCAATATCAGCCGGC LSSSTMGYDYFQFTQQYQPA | T 120 40 |
| $ \begin{array}{cccccc} {\tt GCCTGCAATTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGAACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTGCACACTGCTACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGCTACTGCTACTGCAGACACTGCTGCAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGAGAAATTGTTTACGGTTCAGACACTGCTACTGACACACTGCTACTGCTACTGCTACTGCTACTGACACACTGCTACTGCTACTGCACACTGCTACTGCTACTGCTTGCT$ | C 180 60 |
| $\begin{array}{cccc} {\rm GGTTTGTGGCCTTCAAACTCTAATGGACCTGACCCAGTAAACTGCAAGCCGAAAACCAAGGAGG$ | G 240 80 |
| $\begin{array}{ccc} {\tt GTGCCTCAGGCCGCAGCCGgtaatttatctgaaagtttaactttccctctctaaacactv} & {\tt P} & {\tt Q} & {\tt A} & {\tt Q} & {\tt P} \end{array}$ | c 300 87 |
| attttttctagcctataacccatcgtatcgtatttatcacaataaaacccaataatcaga atccaactaacaacttaccaaattatttgtgtgtcattttttatatttttaattcatcgatcaatatgccctcatctaaggcaggtttgtagccaagaatctagttcaaaatgtaggatta attggaaatattttcatttca | $\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$ |
| tttttattgtatattttattttgtcagATAGATCCATCACTCAAACCCCCAGTTGGAAATT \mathbf{I} D P S L K P Q L E I | 1080 98 |
| ATTTGGCCGAACGTATTCAATCGAGCCGATAATGAAAGCTTCTGGAATAAACAGTGGGAA I W P N V F N R A D N E S F W N K Q W D | C 1140 118 |
| AAACATGGCACCTGTGGGTATCCCACAATAAAAGACAAGAACCATTACCTTCAAACAGTAKHGTCCGCACGTATCCCACAATAAAAGACAAGAACCATTACCTTCAAACAGTAACAGTAKHGTCCACAAGAACAAGAACCATTACCTTCAAACAGTAAAAGACAAGAACCATTACCTTCAAACAGTAAAAGACAAGAACCATTACCTTCAAACAGTAAAAGACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACCATTACCTTCAAACAGTAAAAGAACAAGAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACCAATAAAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAAACAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAAAGAACAAGAACAAGAAAGAACAAGAACAAGAACAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAACAAGAAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAACAAGAAAGAACAAGAACAAGAACAAGAACAAGAAAGAACAAGAAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAAAGAACAAGAAG | 4 1200 138 |
| ATCAAAATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCTCAAATCCTATCCAAAGCCAACATCIIK MYITQKQNVSQILSKANI | C 1260 158 |
| $ \begin{smallmatrix} AATCCAGACGGTATAGGCAGGACACGGAAGCTAATTGAAAATGCCATACGCAATGGTACG \\ N \ P \ D \ G \ I \ G \ R \ T \ R \ K \ L \ I \ E \ N \ A \ I \ R \ N \ G \ T \\ R \ N \ G \ T \\ R \ N \ G \ T \\ R \ \mathsf$ | C 1320 178 |
| AACGATAAGGAACCAAAACTCAAGTGCCAAAAGAATAATGGGACTATTGAATTGGTCGACNDKEPKLKCQKNNGTIELVE | 3 1380 198 |
| $ \begin{array}{cccc} {\tt GTCAGTCTTTGCAGCAATTACCTCGGAAAACATTTCATAAATTGCCCCCAACAAAATTCCA} \\ {\tt V} & {\tt S} & {\tt L} & {\tt C} & {\tt N} & {\tt Y} & {\tt L} & {\tt G} & {\tt K} & {\tt H} & {\tt F} & {\tt I} & {\tt N} & {\tt C} & {\tt P} & {\tt N} & {\tt K} & {\tt I} & {\tt P} \\ \end{array} $ | A 1440 218 |
| CAAGGATCACGATATTTCTGCCCCATCAAAGATATCCAGTATTAA Q G S R Y F C P I K D I Q Y * | $\begin{array}{r}1485\\232\end{array}$ |

AŢĠĠġĠĂŢŦĂĊĠĂġĠĂŢĠĂŢĂŦĂŦĂŢĠĠŢŦĂĊĠĂŢĠĠĊĂŦŢŦŦĊĂŦŢĂĂŢŦĠŢĂŦŢĂĂŢĂ

下線部: シグナルペプチド,小文字:イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (____がプライマーの 5´側)を表す. RT-PCR で Sg-RNase が増幅されなかった原因と推測された塩基を水色で示す。

図 2-9 *Sg-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258360). 赤色: HV 領域,青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基,

| ATGGGGATCATTGGGATGATATATATGGTTATGATGGTATTTCATTAATTGTATTAATA <u>M G I I G M I Y M V M M V F S L I V L I</u> | 60 20 |
|--|--|
| TTGTCTTCGTCCACGGTGGGATTCGATTATTTTCAA LSSSTVGFDVFQFTHQYQPA | $\substack{120\\40}$ |
| $ \begin{array}{cccc} {\tt GTCTGCAACTCTAATCGTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAATTGTTTACGGTTCAC} \\ {\tt V} & {\tt C} & {\tt N} & {\tt S} & {\tt N} & {\tt R} & {\tt T} & {\tt P} & {\tt C} & {\tt K} & {\tt D} & {\tt P} & {\tt D} & {\tt K} & {\tt L} & {\tt F} & {\tt V} & {\tt H} \\ \end{array} $ | $\substack{180\\60}$ |
| $ \begin{array}{c} GGTTTGTGGGCCTCAAACAGGGATGGGACCCAGGAGGTATTGCAGAGAACACACAGACACAGACACAGAGACACAGAGAGACAGGAGGGGGGGGGG$ | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| $\begin{array}{ccc} GATGTTACCAAGgtaatattattagtaattagacaatattgtttatttcatgtatacata\\ D & V & T & K \end{array}$ | $\begin{array}{c} 300\\ 84 \end{array}$ |
| tactcaacatagattttcatacacgcgtgtgagcattttccaataaatttaaatttagt cataatttttttctattgaaaatatgagtataccctttgaaattcaattagtttaatta agggaatttaacgaaaactcccggtactattcatttaacgaaaaccatattttac actaaaaatcaatcctgatactattactttacctttattttatctttttgtaaaa ctcaaagtttcaagcttttcattagtttcttcttaattaa | $\begin{array}{r} 360\\ 420\\ 420\\ 540\\ 600\\ 660\\ 720\\ 780\\ 900\\ 900\\ 1020\\ 1080\\ 1140\\ 1200\\ 1320\\ 1380\\ 1440\\ 1560\\ 1560\\ 1620\\ 1680\\ 1740\\ 1860\\ 1920\\ \end{array}$ |
| aaagattttttttttttttttttttttttttttttttt | 1979 91 |
| TTGGA ATTATTTGGCCGAACGTATATGATCGCACTAATAATGTAGGCTTTTGGAGTAAA L D I I W P N V Y D R T N N V G F W S K | 2039 111 |
| $ \begin{array}{c} CAGTGGGCAAAACATGGCATCTGTGGGTCTCCCACAATACAGGACGACGTGAATTACCTT \\ Q & W & A & K & H & G & I & C & G & S & P & T & I & Q & D & V & N & Y & L \\ \end{array} $ | $\begin{array}{c} 2099\\ 131 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} GAAACAGTAATCAACATGTACATAATCAAGAAACAAAACGTTTTTGAAATCCTCTCAAAT \\ \mathsf{E & T & V & I & N & M & Y & I & I & K & Q & N & V & F & E & I & L & S & N \end{array} $ | $\begin{array}{c} 2159 \\ 151 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} GCGAAGATTGAGCCGGAGGGGAAAAAACAGGACACGAAAGGACATTGTAAAAGCCATACGC \\ \mathsf{A & K & I & E & P & E & G & K & N & R & T & R & K & D & I & V & K & A & I & R \\ \end{array} $ | $\begin{array}{c} 2219\\171 \end{array}$ |
| $\begin{array}{cccc} AGTGGTACCAACGGTAAGAGAGACCAAAAACTTAAGTGCCAAAAGAATAATAGGACGACTGAA\\ \mathsf{S & G & T & N & G & K & R & P & K & L & K & C & Q & K & N & N & R & T & T & E \end{array}$ | 2279 191 |
| $\begin{array}{cccc} TTGGTTGAGGTCACTCTTTGCAGCGATAGAAACTTAACGCGGTTAATAAATTGCCCCAAC\\ L & V & E & V & T & L & C & S & D & R & N & L & T & R & L & I & N & C & P & N \end{array}$ | $\begin{array}{c} 2339\\211 \end{array}$ |
| CTAATTAAGCCAAAATCACCATATTTCTGTCCCTTGAAAAGTATTCATTATTAA L I K P K S P Y F C P L K S I H Y * | $\begin{array}{r} 2393 \\ 228 \end{array}$ |

| | 1 | | | 0 | D | | | 0 | | 1. | 1, | | - | | - | | | | |
|-------|--------|--------|------|---|-------|-----|-----|-----|---|-----|---|----|-----|------|----------|-----|-------|------|-----|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 図 2-1 | 0 | Sh-R | Nas | eゲ | 14 | DNA | の塩 | 【基西 | 己列 | と推 | 定つ | PE | ノ酸 | ·西己ろ | 利 (| AB2 | 3643 | 1). | |
| 赤色 | HV | 領域 | 之書 | 6. | 高少 | て構造 | 形成 | に関 | 与 | する | 8- | ດ | シス | ティ | 1 | 残基 | | -). | |
| 桃岳. | DNG | in H | 千世 1 | - 1% | 酒の | 27 | 0F | フチ | : 2 - | , 健 | Ĕ. | | | / | • | | , | | |
| 1700. | INING | ISC II | コエリ | ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ | P.I.L | 2 1 | サウビ | | ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ | 122 | ÷, | | | | | | | | |
| 下标百 | ф: : ф | 20 | 11 | | ティ | 之,小 | 又于 | - 1 | ~ ~ | | ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,, | | 1.8 | | | - | · | 10.1 | + + |
| 椬色: | CAL | 22.5 | | ワー | ンス | アム | カフ | 71 | 7- | ·00 | 工直 | (| N | ノフ | 1 | ~ | 0) 5' | 側)を | 表す. |

| ATGGGGATTACGGGGATGATATACATGGTTACGATGGTATTTTCATTACTTGTATCAATA M G I T G M I Y M V T M V F S L L V S I | 60 20 |
|---|---|
| TTGTCTTCGTCCACGGTGGGATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT LSSSTVGFDYFQFTQQYQPA | $\begin{array}{c} 120\\ 40 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} \textbf{GCCTGCAACTCTAATCCTACTGCTAGGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC} \\ \textbf{A} & \textbf{C} & \textbf{N} & \textbf{S} & \textbf{N} & \textbf{P} & \textbf{T} & \textbf{P} & \textbf{C} & \textbf{K} & \textbf{D} & \textbf{P} & \textbf{T} & \textbf{D} & \textbf{K} & \textbf{L} & \textbf{F} & \textbf{T} & \textbf{V} & \textbf{H} \end{array} \right. $ | $\begin{array}{c}180\\60\end{array}$ |
| $ \begin{array}{c} {} {} {} {} {} {} {} {} {} {} {} {} {}$ | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| $\begin{array}{c} CGGAAGgtaatattattagtaatcggatagtcaatattgtttatttcatttatatacttg \\ R K \end{array}$ | 300 82 |
| $t {\tt gtgtgcgcgcgagtgtgtgtgtataatttttcttaataccaattaatt$ | 360 |
| taaattttttaaattgtacatattctattgtcagAGAGCAAAAAAACTCGAACCCCAG $\stackrel{R}{R} \stackrel{A}{K} \stackrel{K}{K} \stackrel{L}{L} \stackrel{E}{E} \stackrel{P}{Q}$ | 418 90 |
| $\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | 478 110 |
| $ \begin{array}{c} CAGTGGAAAAAACATGGCGCCTGTGGGTATCCCACAATACAGAACGAGAATGATTACTTT \\ Q & W & K & H & G & A & C & G & Y & P & T & I & Q & N & E & N & D & Y & F \\ \end{array} $ | $\begin{array}{c} 538 \\ 130 \end{array}$ |
| $ \begin{smallmatrix} GAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCGAGAAACAAAACGTCTCTCGAATCCTCTCAAAT \\ \mathsf{E & T & V & I & K & M & Y & I & T & E & K & Q & N & V & S & R & I & L & S & N \\ \end{smallmatrix} $ | 598 150 |
| $ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | 658 170 |
| AACGGTACCAACAATAAGTTACCAAAATTGAAGTGCCAAAAGAAGACTAGGGTGACTGAA \mathbb{N} G T \mathbb{N} \mathbb{N} K L P K L K C Q K K T R V T E | 718 190 |
| $\begin{array}{cccc} TTGGTTGAGATCACTCTTTGCAGCGATAAAAATAGAGCACATTTCATTGATTG$ | 778 210 |
| CCCTTTCTACCAGGATCACCATATTTATGCCCCCAACAACAGTATCCACTATTAA | 832 |

図 2-11 Sk-RNase ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236432). 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (____がプライマーの 5'側)を表す.

84 360 cattaattgagatcttattagttttcaaattttgatcgaagtctctaacattattgtata420 aatgaattcaaatgtcagttacataatttttcaaataaaaattagtaattgaaacttaca480 agaataagtttgtacccattaatttttataaaaatattttcaatttttaaattttaaatg540 600 cagccattcatataattttttaattttttctaatcttacatttacccattctttaatata660 720 ccattttgttacgtaaaatgtacctttttttaaaataacaaatccgttgaatttttttct780 840 900 960 1020 atgcat gtaa g tatgtat g tataaataa tatat tggagaa cataat ttat t cat taat t 1080 1140 1200 gtttcgatcaaaaacagaaaatcaataatatttcaattaaagaacattgataattaggac1260 1320 cgtatccaaaatctccgtattattaataattagatagtcaatattgttcatcttttcatatgtcagATAACAGATCTTAAAGCCCAGCTGGAAATTATTTGGCCGAACGTACTCAATCGA 1380 D L K A Q L E I I W P N V L N 102 AAGGCCCATGTACGCTTCTGGCGTAAACAGTGGCGTAAACATGGCGCCTGTGGGTACCCC 1440 A H V R F W R K Q W R K H G A C G 122 Y 1500 ACAATAGCGGACGACATGCATTACTTTAGCACAGTAATCGAAATGTACATAACCAAGAAA IADDMHYFST V IEMY ITKK 142 CAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAACATTAAACCGGAGGGGAGATTCAGGACA 1560 S E ILSKANIKPEG R F R 162 $\begin{array}{c} \mathsf{CGGGACGACATTGTAAATGCCATAAGCCCAAGTATCGACTATAAGAAACCCAAAACTCAAG}\\ \mathsf{R} \quad \mathsf{D} \quad \mathsf{D} \quad \mathsf{I} \quad \mathsf{V} \quad \mathsf{N} \quad \mathsf{A} \quad \mathsf{I} \quad \mathsf{S} \quad \mathsf{P} \quad \mathsf{S} \quad \mathsf{I} \quad \mathsf{D} \quad \mathsf{Y} \quad \mathsf{K} \quad \mathsf{K} \quad \mathsf{P} \quad \mathsf{K} \quad \mathsf{L} \quad \mathsf{K} \end{array}$ 1620 1821680 K I N N Q T T E L V E V G L C S 202D N TTAACGCAGTTCATAAATTGCCCAAACCCATTTCCTCAAGGATCACCATATTTCTGCCCC L T Q F I N C P N P F P Q G S P Y F C P 1740 222 ACCAATAATATTCAGTATTAA 1761 NNIQY* 228

ATGGGGATTACAGGGATGATATATATGGTTACAATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA

M G I T G M I Y M V T M V F S L I V L I

TTGTCTTCGTCCGCGGTGAAATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT LSSSAVKFDYFQFTQQYQPA

GTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAT

GGTTTGTGGCCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCAAGAAATGCAAAGCTACAATCTTA

AATCCTCAAACGgtaatattattcaggaaaaattaatatttggtccttagttataatgtt

C N S N P T P C K D P P D K L F

G L W P S N V N G S D P K K C K A

60

20

 $120 \\ 40$

180

240

300

80

Т

60

図 2-12 *SI-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236425). 赤色: HV 領域,青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド,小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (____がプライマーの 5⁻側)を表す.

| TTGTCTTCGTCTGCGGCGAAATACGATTATTTGCAATTTACACAGCAATATCAGCCGGCT L S S S A A K Y D Y L Q F T Q Q Y Q P A | $\begin{array}{c} 120 \\ 40 \end{array}$ |
|--|---|
| $ \begin{array}{cccccc} {\sf GCCTGCAAGTTTCACCATACTCCTTGAAGGATCCTCTTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC} \\ {\sf A} & {\sf C} & {\sf K} & {\sf F} & {\sf H} & {\sf H} & {\sf T} & {\sf P} & {\sf C} & {\sf K} & {\sf D} & {\sf P} & {\sf L} & {\sf D} & {\sf K} & {\sf L} & {\sf F} & {\sf T} & {\sf V} & {\sf H} \end{array} $ | $\begin{array}{c} 180\\ 60\end{array}$ |
| $\begin{array}{cccc} GGGATATGGGCCTCAAACTTCAAACCCACGGGGGGGGGG$ | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| GCGTCTCAAACGgtaatattattgataataagatagtcaatgtttaggaaaattaatatc $\stackrel{A}{A} \stackrel{S}{\overset{Q}} \stackrel{Q}{\overset{T}}$ | 300 84 |
| atgttettattattaatgtteattaaccgagacettaatagttttagatttaattga ggteeetattttaetaattaatgagteagtteettaattettaataaaaaaaa | $\begin{array}{r} 360\\ 420\\ 480\\ 540\\ 600\\ 660\\ 720\\ 780\\ 840\\ 900\\ 960\\ 1020\\ 1080\\ 1020\\ 1200\\ 1260\\ 1320\\ 1320\\ 1340\\ 1400\\ 1200\\ 1340\\ 1400\\ 1200\\ 1400$ |
| tattgtatattgtattttcag-ATAGATACATCACTCAAACCCCAGTTGGAAATTATT I D T S L K P Q L E I I | 1499 96 |
| TGGCCGAACGTATTCAATCGAGCCGATCATGAAAGCTTCTGGCAAAAACAGTGGGACAAA W P N V F N R A D H E S F W Q K Q W D K | $\begin{array}{c}1559\\116\end{array}$ |
| $ \begin{smallmatrix} CATGGCACCTGTGGGTCTCCCACAATAATAGACAAGAACCATTACTTTCAAACAGTAATC \\ \begin{smallmatrix} H & G & T & C & G & S & P & T & I & D & K & N & H & Y & F & Q & T & V & I \\ \end{smallmatrix} $ | $\begin{array}{c} 1619\\ 136\end{array}$ |
| AGAATGTACATAACCGAGAAGCAAAACGTCTCTTATATCCTATCCAAAGCCAATATCAAT \mathbf{R} \mathbf{M} \mathbf{Y} \mathbf{I} \mathbf{T} \mathbf{E} \mathbf{K} \mathbf{Q} \mathbf{N} \mathbf{V} \mathbf{S} \mathbf{Y} \mathbf{I} \mathbf{L} \mathbf{S} \mathbf{K} \mathbf{A} \mathbf{N} \mathbf{I} \mathbf{N} | $\begin{array}{r}1679\\156\end{array}$ |
| $\begin{array}{c} CCGGATGGTAAGGGCAGGACACGGAAGGATATTCAAATTGCCATACGCAATAGTACCAAC\\ P & D & G & K & G & R & T & R & K & D & I & Q & I & A & I & R & N & S & T & N \end{array}$ | $\begin{array}{r}1739\\176\end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} GACAAGGAACCCAAAACTCAAGTGCCAAACGAAGAATGGGATAACCGAATTGGTTGAGGTC \\ D & K & E & P & K & L & K & C & Q & T & K & N & G & I & T & E & L & V & E & V \\ \end{array} $ | 1799 196 |
| $\begin{array}{cccc} TCACTTTGCAGCAATTACTTAGGAAAAAATTTCATAAATTGCCCCCAACAAAACTCCAGGA\\ S & L & C & S & N & Y & L & G & K & N & F & I & N & C & P & N & K & T & P & G \end{array}$ | $\begin{array}{c} 1859 \\ 216 \end{array}$ |
| AAAACACGATATTCCTGTCCTACCAATGATATCCATTATTAA K T R Y S C P T N D I H Y * | $\begin{array}{c}1901\\229\end{array}$ |

 $\begin{array}{cccc} ATGGGGATTACGGGGATGATATATATGGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATT\\ M & G & I & T & G & M & I & Y & M & V & T & M & V & F & S & L & I & V & L & I \end{array}$

 $\begin{array}{c} 60\\ 20 \end{array}$

図 2-13 Sq-RNase ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB236424). 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (____がプライマーの 5´側)を表す.

TTGTCTTCGTCCGCCGTGAAATTCGATTATTTTCAA 120 40 GTCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAT 180 N S N P T P C K D P P D K L F 60 GGTCTGTGGCCTTCAAATGTTAATGGAAGTGACCCCCAAGAAATGCAAAACTACAATCTTG G L W P S N V N G S D P K K C K T T L 240 80 260 270 280 290 291 250 ${\tt AAACCTCGAACGgtaatattattcaggaaaaattaatatccggtccttagttataacgtt}$ 300 R 84 360 tattaatttagaccttattagttttcagattttgattgaagtccctagcat + a + tgtataa atga att caa atgt cag cta cat a att tt tt tt tt taa taa ataa aatt ag taa tt ga a tt ga a att ga att ga a att ga att ga a att ga a att420 480 540 aattaaaataagtttgtacccgttaatttttcataaaaagattttcaattgtttaatctt aaatgcagccattcatataatttttcaattttttctaatcttacatttacccattcttaa600 atatatcattttgttatgtaaaatataccc+++ttaaaatataaatgtaaaccttgttta 660 tataaaatccatttattttttttttttttaaaccatttattttaagttatccatttttaata720 780 acttatatgggtacattctatttcgttgatttaagagtgtatccatgccaagtttaatgg840 aagaaatttaataatgtaattaamootaatacctctttttttttttgcaaaaatgtaccc atgtttggtacaatagctttgtttagttttaatgaaacgtacccatgctttcatttttag 900 960 tttttggagagcataatttattctttaatatttttaatoccataaatggattttatttaa 1020 1080 cataaaaaatataatattacattagtgtcaaagacttcgattaaaaaattaaaaatcagtaa1140 1200 gatttcaagtcaaataacattgataattaggactgcatccaaaatctctctattattaat 1260 aattagatagtcaatattgttaatcctttcatataaacttatgctcaacatagattttca 1320 atattatattgtcagATAAGAAATCTTAAAGCCCAGCTGGAAATTATTTGGCCAAACGTAIR NLKAQLEIIWPNV1380 99 TCTTACTCGAAGGGCTCAGTACGCTTCTGGCGTAAACAGTGGCGTAAACATGGCACCTGT 1440 W R K Q W R K H G VRF SKGS 119 GGGTACCCCACAATAGCGGACGACATGCATTACTTTAGCACAGTAATCGAAATGTACACA 1500 IADDMHYFS Т 139 P Т VIEM ACCAAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTTAAAGGCGAAGATTAAACCGGAGGGGAGA 1560 K K Q N V S E I L L K A K I K P E 159 1620 TTCAGGACACGGGACGACATTGTAAATGCCATAAGCCAGAGTATCGACGATAAGGAACCA F R T R D D I V N A I S Q S I D D K E P 179 AAACTCAAGTGCAAGAACAATAATAATAATATAACTGAATTGGTTGAGGTCGGTATTTGCAGC 1680 K L K C K N N N N I T E L V E 199 G T C GATAACAACTTAACGCAGTTCATAAATTGCCCTCACCCATTTCCACAAGGATCACCATAT 1740 N N L T Q F I N C P H P F P Q G S 219 $\begin{array}{cccc} TTATGCCCCACCAATAATATTCAGTATTAA\\ L & C & P & T & N & I & Q & Y & * \end{array}$ 1770 228

ATGGGGATTACAGGGATGATATATATGGTTACAGTGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA

M G I T G M I Y M V T V V F S L I V L I

60

20

ATGGGGATTACGGGGATGATACATATAGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA 60 M G I T G M I H I V T M V F S L I V L I 20 120 40 GTCTGCTACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC V C Y F N P T P C K D P P D K L F T V H 180 60 $\begin{array}{cccc} \mbox{GGTTTGTGGCCTTCAAACTTGAATGGACCTCACCCAGAAAATTGCACGAACGCAACCGTG} \\ \mbox{G} & L & W & P & S & N & L & N & G & P & H & P & E & N & C & T & N & A & T & V \\ \end{array}$ 240 80 ${\tt AATTCTCAGAGGgtaatattattgataatcagatagtcactattgtttatttcatttagg}$ 300 84 NSQR 360 tacttgtgtttatatacatatactcaacatagattttcatgcacttacaataaatttaaatcta at cata a attta cct ag cta tatta tatta tatta ttgt cag ATAACAAATATCCAA420 89 NIQ GCCCAGTTGAAAATTATTTGGCCGAACGTACTCGATCGAACCAATCATGTAGGCTTCTGG A Q L K I I W P N V L D R T N H V G F W 480 109 AATAAACAGTGGATAAAACATGGCAGCTGTGGGAATCCCCCCAATAATGAACGACACGCAT 540 N K Q W I K H G S C G N P P I M N D T H 129 TACTTTCAAACAGTAATCAACATGTACATAATCAAGAAACAAAACGTTTTTGAAATCCTC 600 FQTVINMYIIKKQNVFEIL 149 $\begin{array}{cccc} \mathsf{TCAAATGCGAAGATTGAGCCGGAGGGAAAAAAACAGGACACGAAAGGACATTGTAAAAGCC} & \mathsf{S} & \mathsf{N} & \mathsf{K} & \mathsf{I} & \mathsf{E} & \mathsf{P} & \mathsf{E} & \mathsf{G} & \mathsf{K} & \mathsf{N} & \mathsf{R} & \mathsf{T} & \mathsf{R} & \mathsf{K} & \mathsf{D} & \mathsf{I} & \mathsf{V} & \mathsf{K} & \mathsf{A} \end{array}$ 660 169 ATACGCAGTGGTACCAACGGTAAGAGACCAAAACTTAAGTGCCAAAAGAATAATAGGACG 720 I R S G T N G K R P K L K C Q K N N R 189 ACTGAATTGGTTGAGGTCACTCTTTGCAGCGATAGAAACTTAACGCGGTTAATAAATTGC 780 T E L V E V T L C S D R N L T R L I N C 209 CCCAACCTAATTAAGCCAAAATCACCATATTTCTGTCCCTTGAAAAGTATTCAGTATTAA 840 PNLIKPKSPYFCPLKSIQY* 228

けでなく (図 2-4i, lane 4), SI-RNase 断片も 1,282 bp の断片に切断した (図 2-4i, lane 1). 以上より, 約 1.3 kb 断片として増幅される Sk-および Sq-RNase 対立遺伝子は Bg/II および HindIII による, 約 350 bp 断片として増幅される Sa-, Sd-, Sh-, Sr-RNase 対立遺伝子は SphI, EcoO109I BssHII, BaeI に よる切断で識別できた.

以上の結果から、プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IWPNV2'を用いたゲノミック PCR および6種類の制限酵素, Bael, BgIII, BssHII, HindIII, EcoO109I, SphI の処理からなる CAPS マー カーシステムを開発した. この CAPS マーカーシステムにより、10種類の S-RNase 対立遺伝子、 Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Sk-, Sl-, Sq-, Sr-RNase 対立遺伝子の識別が可能になった (表 2-4).

CAPS マーカーシステムによる S 遺伝子型推定

開発した CAPS マーカーシステムにより, 日本の栽培品種の残り 19 品種のゲノム DNA から S-RNase 対立遺伝子を増幅し, 各品種の S 遺伝子型を推定した. これら品種から 1,906 bp (Sg), 1,414 bp (Sl), 約 1.3 kb, 998 bp (Se), 440 bp (Sb), 約 350 bp の断片が増幅された. 6 種類の制限酵素 処理により約 1.3 kb および約 350 bp の断片を識別した. すべての品種から断片が 2 種類ずつ増 幅され, 日本の栽培品種 25 品種は Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Sk-, Sl-, Sq-, Sr-RNase 対立遺伝子の 組み合わせからなる 17 種類の S 遺伝子型に分類された (表 2-5). 'ドワイエネ・デュ・コミス' (SaSb), 'プレコース (ドクトール・ジュール・ギュイヨー)' (SaSe), 'スタークリムソン (レッド・ クラップス)' (SdSe)は, 推定 S-RNase 対立遺伝子の部分配列から推定された S 遺伝子型と一致し た (Zuccherelli et al. 2002a; Zisovich et al. 2004). また, 'バートレット'とその着色系枝変わり品 種である'マックス・レッド・バートレット'はどちらも SeSI に推定された.

17 種類の S 遺伝子型のうち, 6 種類には複数の品種が分類された. SeSI に'バートレット', 'セ ニョール・デスペラン', 'マックス・レッド・バートレット'が, SdSe に'フレミッシュ・ビュー ティー', 'スタークリムソン', 'ボートヌ'が, SeSr に'ラ・フランス'と'バラード'が, SbSe には'グ ランド・チャンピオン'と'カリフォルニア'が, SaSe には'オーロラ'と'プレコース'が, SgSr には 'パス・クラサン'と'シルバー・ベル'が分類された.

交雑不和合性の確認

推定 S 遺伝子型の正誤を検証するため,同じ S 遺伝子型に推定された品種間で他家受粉を行なった (表 2-6). 推定 S 遺伝子型が SeSI の'バートレット'と'セニョール・デスペラン'の交配は, 'バートレット'を種子親に用いた場合は結実率が 0.0%となり, 'セニョール・デスペラン'を種子

表2-4 ゲノミックPCRにより増幅された10種類のS-RNase対立遺伝子の制限酵素断片長(bp)

| S-RNase | PCR增幅 | 114 m | 制限酵素 | | | | | |
|------------------|-------|-------|----------------|-----------------|----------|------------------|---------------|---------------|
| <u>対立遺伝子 断片長</u> | | 1/10/ | BgIII | <i>Hin</i> dIII | SphI | <i>Eco</i> O109I | BssHII | Bael |
| Sa | 345 | 145 | - | - | 233, 112 | - | - | - |
| Sb | 440 | 246 | - | - | - | - | - | - |
| Sd | 369 | 169 | - | - | - | 260, 109 | - | - |
| Se | 998 | 786 | - | - | - | - | - | - |
| Sg | 1,906 | 1,706 | - | - | - | - | - | - |
| Sh | 345 | 148 | - | - | - | - | 210, 135 | - |
| Sk | 1,274 | 1,074 | 1,022, 214, 38 | - | - | - | - | - |
| SI | 1,414 | 1,211 | - | - | - | 1,149, 265 | - | 1,282, 99, 33 |
| Sq | 1,283 | 1,083 | - | 960, 323 | - | - | - | - |
| Sr | 353 | 153 | - | - | - | - | - | 195, 125, 33 |

- : 制限酵素により切断されないPCR産物

表2-5 日本の栽培品種の推定S遺伝子型

_

| SaSh | ドワイエネ・ディ・コミス | | | | |
|------|-----------------|--|--|--|--|
| SaSe | オーロラ | | | | |
| | プレコース | | | | |
| SaSl | マルゲリット・マリーラ | | | | |
| SbSe | カリフォルニア | | | | |
| | グランド・チャンピオン | | | | |
| SbSk | アレクサンドリン・デュイヤール | | | | |
| SbSq | ル・レクチェ | | | | |
| SdSe | ボートヌ | | | | |
| | フレミッシュ・ビューティー | | | | |
| | スタークリムソン | | | | |
| SdSq | デボー | | | | |
| SdSr | コンファレンス | | | | |
| SeSh | エル・ドラド | | | | |
| SeSl | バートレット | | | | |
| | セニョール・デスペラン | | | | |
| | マックス・レッド・バートレット | | | | |
| SeSr | バラード | | | | |
| | ラ・フランス | | | | |
| ShSl | ミクルマス・ネリス | | | | |
| ShSk | ウィンター・ネリス | | | | |
| SlSq | ゼネラル・レクラーク | | | | |
| SISr | 越さやか | | | | |
| SeSr | パス・クラサン | | | | |
| | シルバー・ベル | | | | |

| | | | | | | 交配 | | | |
|------|----|-------------|------|---------------|------|-----|-------|------------------|-------|
| 交配 | 交配 | 種子親 | 推定S | 花粉親 | 推定S | 花数 | 結実率 | Seeds | SI |
| 年 | 場所 | | 遺伝子型 | | 遺伝子型 | (花) | (%) | /Flower | index |
| 2002 | 長野 | ラ・フランス | SeSr | バラード | SeSr | 12 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | パス・クラサン | SgSr | 58 | 98.3 | 7.9² | |
| 2003 | 盛岡 | バートレット | SeSl | セニョール・デスペラン | SeSl | 30 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | ラ・フランス | SeSr | 29 | 82.8 | 7.4 ^z | |
| 2003 | 盛岡 | セニョール・デスペラン | SeSl | バートレット | SeSl | 30 | 16.7 | 0.1 | 3.0 |
| | | | | ラ・フランス | SeSr | 30 | 86.7 | 3.3 ^z | |
| 2002 | 長野 | スタークリムソン | SdSe | フレミッシュ・ビューティー | SdSe | 30 | 50.0 | 0.5 | 5.9 |
| | | | | ラ・フランス | SeSr | 30 | 96.6 | 8.5 ^z | |
| 2004 | 盛岡 | オーロラ | SaSe | プレコース | SaSe | 30 | 3.3 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | ラ・フランス | SeSr | 30 | 90.0 | 6.5 ^z | |
| 2004 | 盛岡 | プレコース | SaSe | オーロラ | SaSe | 30 | 13.3 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | ラ・フランス | SeSr | 29 | 96.6 | 8.4 ^z | |
| 2004 | 盛岡 | パス・クラサン | SgSr | シルバー・ベル | SgSr | 30 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | ラ・フランス | SeSr | 30 | 13.3 | 4.7 ^z | |
| 2004 | 盛岡 | シルバー・ベル | SgSr | パス・クラサン | SgSr | 14 | 71.4 | 0.2 | 2.2 |
| | | | | ラ・フランス | SeSr | 14 | 100.0 | 9.1 ^z | |

表2-6 同じ推定S遺伝子型を持つ品種間の交雑不和合性の評価

² SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

親にした場合, 結実率が 16.7%, Seeds/Flower が 0.1 で SI index が 3.0 となった. SdSe の'スターク リムソン'בフレミッシュ・ビューティー'の交配では, 結実率が 50.0%, Seeds/Flower が 0.5 で SI index が 5.9 となった. 第 1 章で交雑不和合と判定された'バートレット'と'セニョール・デス ペラン', および, 'フレミッシュ・ビューティー'と'スタークリムソン'が交雑不和合の関係にあ ることが再度確認された. SeSr の'ラ・フランス'בバラード'の交配では, 結実率は 100.0%であ ったが, Seeds/Flower が 0.0 となり, 'バラード'が'ラ・フランス'と偏父不和合性を示すこと (阿 部ら 1996)が再確認された. SaSe の'オーロラ'と'プレコース'の交配では, 両品種を種子親に用 いた場合の結実率はそれぞれ 3.3%と 13.3%であったが, Seeds/Flower が 0.0 となった. SgSr の'パ ス・クラサン'と'シルバー・ベル'の交配では, 'パス・クラサン'を種子親に用いた場合は結実率 が 0.0%, 'シルバー・ベル'を種子親にした場合, 結実率は 71.4%であったが, Seeds/Flower が 0.2 で SI index が 2.2 となった. これらの結果から, 同じ推定 S 遺伝子型を持つ品種間の交配はすべ て交雑不和合と判定された.

く考察>

ニホンナシやリンゴでは、雌しベ側S遺伝子である S-RNase をゲノミック PCR により増幅し、 増幅断片の種類から品種の S 遺伝子型を推定する CAPS マーカーシステムが開発されている. PCR を用いた S-RNase 対立遺伝子の識別は少量の未展開葉があれば十分可能であり、交雑後代 を開花まで育成させる必要がないことから、迅速・簡単に品種の S 遺伝子型を推定できる (Janssens et al. 1995; Ishimizu et al. 1999; Takasaki et al. 2004).

本章では、はじめに、セイヨウナシの雌しべ側*S*遺伝子産物もS-RNase であると仮定し、日本 の栽培品種から*S-RNase* cDNA のクローニングを試みた. ニホンナシの*S-RNase* を増幅するプラ イマーを用いた RT-PCR および 3'RACE により、自家不和合性品種 10 品種の雌しべから 10 種 類の cDNA 断片がクローニングされた. 5'および 3'RACE によりクローニングされた cDNA 断 片配列を重複させ、完全長塩基配列を決定した. それら cDNA の推定アミノ酸配列には典型的 なナシ亜科 S-RNase の一次構造と対立遺伝子特異性に関与する 1 つの HV 領域が特定された (図 2-2) (Ishimizu et al. 19998; Ushijima et al. 1998). よって、これら cDNA はセイヨウナシ S-RNase (Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Sk-, Sl-, Sq-, Sr-RNase)をコードすると考えられた.

プライマー'FTQQYQ'と'anti-(I/T)IWPNV'を用いた RT-PCR とゲノミック PCR では'パス・ク ラサン'以外の9品種からは2種類の断片が増幅されたが, 'パス・クラサン'の Sg-RNase は増幅 されなかった. 3'RACE からクローニングされた 10 種類の S-RNase cDNA と'FTQQYQ'および 'anti-(I/T)IWPNV'プライマーの配列を比較したところ、'FTQQYQ'プライマーの配列には Sg-RNase と 2 塩基, SI-RNase と 1 塩基の違いが、'anti-(I/T)IWPNV' プライマーの配列には Sa-, Sg-, Sq-RNase とそれぞれ 1 塩基の違いが見出された. しかし、フォワードプライマーとして 'FTQQYQ'を用いた 3'RACE により Sg-RNase 断片が増幅されているので、リバースプライマ ー'anti-(I/T)IWPNV'の 3'末端の A (アデニン)が Sg-RNase では C (シトシン)となっている 1 塩基 の違いにより Sg-RNase 断片が増幅されなかったと考えられた.

そこで, *Sg-RNase* を増幅できるリバースプライマー'EPSg-anti-IIWPNV'を設計し, 'anti-(I/T)IWPNV'との混合プライマー'EP-anti-IIWPNV2'を作成した. プライマーセット 'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミック PCR により, 10 種類の *S-RNase* 対立遺伝子 を増幅できた. *Sg, Sl, Se, Sb*は1,906, 1,414, 998, 440 bpに検出され,増幅断片長で識別できた. し かし,約1.3 kb 断片の *Sq*と*Sk*,約 350 bp 断片の*Sa, Sd, Sh, Sr*の断片長による識別は困難であっ たので,6 種類の制限酵素, *Bg/*II (*Sk* 特異的), *Hind*III (*Sq* 特異的), *Sph*I (*Sa* 特異的), *Eco*O109I (*Sd* 特異的), *Bss*HII (*Sh* 特異的), *Bae*I (*Sr* 特異的)による切断の有無で識別することとした. プライマ ーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'は, *Sc, Si, Sm, Sn, Sp* 対立遺伝子を約 350 bp に, *So* 対立 遺伝子を1,291 bp に増幅すると予想される. これら断片には上記6 種類の制限酵素の認識部位 が存在せず (Zuccherelli et al. 2002a; Zisovich et al. 2004),本章で選択した制限酵素処理において 切断されないと推測される. *Eco*O109I および *Bae*I は *Sd*-および *Sr-RNase* 対立遺伝子に加えて *SI-RNase* 対立遺伝子の識別に影響しない. 最終的に,プライマーセット'FTQQYQ'と 'EP-anti-IIWPNV2'および6 種類の制限酵素処理からなる CAPS マーカーシステムを開発し,10 種類の *S* 対立遺伝子の識別が可能になった (表 2-4).

このシステムにより日本の栽培品種のS遺伝子型を推定し,25品種のS遺伝子型を17種類に 分類した(表 2-5). 第1章で交雑不和合と判定された'バートレット'と'セニョール・デスペラ ン',および, 'フレミッシュ・ビューティー'と'スタークリムソン'はそれぞれ SeSI および SdSe の同じS遺伝子型に分類された. 'バートレット'と'フレミッシュ・ビューティー'が異なるS遺 伝子型と推定されたことは,これら品種が交雑和合と判定された第1章の交配実験の結果を支 持した.同じS遺伝子型に推定された'ラ・フランス'と'バラード'(SeSr), 'バートレット'と'セニ ョール・デスペラン'(SeSI), 'スタークリムソン'と'フレミッシュ・ビューティー' (SdSe), 'オー ロラ'と'プレコース'(SaSe), 'パス・クラサン'と'シルバー・ベル'(SgSr)も交配実験の結果,交雑

不和合と判定された(表 2-6). いくつかの組み合わせは交配を行なうことができなかったが, 'マックス・レッド・バートレット'(SeSI)は'バートレット'および'セニョール・デスペラン'と, 'ボートヌ'(SdSe)は'スタークリムソン'および'フレミッシュ・ビューティー'とそれぞれ同じS 遺伝子型に分類されたことから,交雑不和合を示すと推測された.'グランド・チャンピオン'と 'カリフォルニア'は同じS遺伝子型, SbSe に推定され,交雑不和合の組み合わせであると考えら れるが,'グランド・チャンピオン'が部分的自家和合と判定されていることから(第1章),正逆 交雑により不和合・和合を確認する必要がある.

'バートレット' (SeSI)×'ラ・フランス' (SeSr)の交配により育成された'バラード' (SeSr)は'バー トレット'から Se-RNase 対立遺伝子を、、ラ・フランス'から Sr-RNase 対立遺伝子を受け継いでお り、 'ラ・フランス'と'バラード'の交雑不和合性は偏父不和合性の関係にあると考えられた.同 じく'バートレット' (SeSI)×'ラ・フランス' (SeSr)の交配により育成された'越さやか' (SISr)は'バ ートレット'から SI-RNase 対立遺伝子を、'ラ・フランス'から Sr-RNase 対立遺伝子を受け継いで いた. 'マルゲリット・マリーラ' (SaSI)בバートレット' (SeSI)の交配から育成された'オーロラ' (SaSe)は、マルゲリット・マリーラ、から Sa-RNase 対立遺伝子を、、バートレット、から Se-RNase 対 立遺伝子を受け継いでいた. 'マックス・レッド・バートレット' (SeSI)と'ドワイエネ・デュ・コ ミス' (SaSb)の交雑実生である'カリフォルニア' (SbSe)は'マックス・レッド・バートレット'から Se-RNase 対立遺伝子を、、ドワイエネ・デュ・コミス'から Sb-RNase 対立遺伝子を受け継いでい た. 'ラ・フランス' (SeSr)の自然交雑実生である'シルバー・ベル' (SgSr)は'ラ・フランス'から Sr-RNase 対立遺伝子を受け継いでいた. 'バートレット' (SeSI)の自然交雑実生である'エル・ドラ ド' (SeSh)は'バートレット'から Se-RNase 対立遺伝子を受け継いでいた. 'ウィンター・ネリス' (ShSk)の自然交雑実生である'ミクルマス・ネリス' (SLSh)は'ウィンター・ネリス'から Sh-RNase 対立遺伝子を受け継いでいた、これらの結果から、S-RNase が対立遺伝子として遺伝していくこ とが確認されるとともに、'ドワイエネ・デュ・コミス' (SaSb)の自然交雑実生とされていた'ゼネ ラル・レクラーク'(SlSq)は、S遺伝子型から記載されている由来が正しくないことが明らかにな った.

本章では、'バートレット' (SeSI)、'マックス・レッド・バートレット' (SeSI)、'パス・クラサン' (SgSr)、'コンファレンス' (SdSr)の S 遺伝子型を推定した. これらの遺伝子型は Zuccherelli et al. (2002a)により推定された遺伝子型、'バートレット' (SeS-)、'マックス・レッド・バートレット' (SeS-)、'パス・クラサン (SaS-)、'コンファレンス' (SdSh)と異なっていた. 彼らがゲノミック PCR に用いたプライマーセットでは SI-および Sg-RNase 対立遺伝子を増幅できなかったと考えられ

る. また, *Sr-RNase* 対立遺伝子断片の制限酵素による切断多型が *Sa-RNase* の多型と似ていたことから,彼らは *Sr-RNase* を *Sa-RNase* と誤って識別したと考えられた. 'コンファレンス'の S 遺 伝子型が一致しなかった原因は不明であるが,国外では'コンファレンス'を育種親に用いた品種が栽培されており,それら品種の S 遺伝子型推定により, 'コンファレンス'の推定 S 遺伝子型 の正誤を検証できると考えられる.

同じ推定 S 遺伝子型を持つ品種間の交配が交雑不和合性を示したことから、セイヨウナシに おいても雌しべ側 S 遺伝子産物は S-RNase であることが証明された. CAPS マーカーシステム により推定された品種のS遺伝子型は信頼できる情報として果樹園における品種選択に役立つ と期待される.

日本の栽培品種 25 品種は 17 種類の S 遺伝子型に分類され (表 2-5), そのうち 6 種類の S 遺 伝子型には複数の品種が分類され、交雑不和合グループを形成した. これら S 遺伝子型に推定 された14品種の栽培面積は、日本全体の84%を占める、現在の日本の品種構成で交雑不和合性 が最も危惧されるのは、栽培面積の 62.4%を占める主力品種'ラ・フランス'と有望な新品種'バ ラード'の組み合わせであると考えられる. 'ラ・フランス'の前に収穫できる'バラード'は今後栽 培の増加が見込まれる. したがって、これら 2 品種だけの混植では、結実は単為結果性に頼る こととなるため、両品種に対して交雑和合となる品種の選択が今後非常に重要になると予想さ れる、'ラ・フランス'の受粉樹品種を考える上では、S遺伝子型に加えて開花時期も考慮しなけ ればならない、'ラ・フランス'は主要品種の中で最も早く開花する、主産地である山形県では、 開花期の比較的近い'シルバー・ベル'や'ゼネラル・レクラーク'を受粉樹として推奨している (大沼ら 西洋ナシの作業便利帳 2000). どちらの品種も'ラ・フランス'と交雑和合であり, 受粉 樹品種として適当である. しかしながら、開花期の気象条件によっては'ラ・フランス'と受粉樹 品種の開花日が大きくずれる可能性もある。そこで、セイヨウナシと交雑和合であり、開花日 が'ラ・フランス'と近い、'豊水'や'新興'などのニホンナシ品種を受粉樹品種として利用するこ とも勧められている. その他、栽培面積 7.6%の'バートレット'は同 1.0%の'マックス・レッド・ バートレット'および同 1.7%の'セニョール・デスペラン'と,同 4.0%の'シルバー・ベル'は'パ ス・クラサン'と交雑不和合となる. また、早生品種'オーロラ'は'プレコース'と交雑不和合関係 にあるが、栽培面積はそれぞれ 3.0%と 1.3%であり、現在の生産において結実不良が問題とな ることはほとんどないと思われる. 同じく早生品種では、'スタークリムソン'が'ボートヌ'や 'フレミッシュ・ビューティー'と交雑不和合となる. 中生有望品種では、'カリフォルニア'が'グ ランド・チャンピオン'と交雑不和合関係にある. 'ラ・フランス'と交雑不和合となる'バラード'

を除けば、現在の栽培面積が少ない品種間の交雑不和合による結実不良が既存の経済園ですぐ に問題となる可能性は低い.しかしながら、これからセイヨウナシ生産を始める新規の果樹園 や、経済生産を目的とした大規模な栽培ではなく趣味で栽培を楽しむような栽培では、'ラ・フ ランス'に偏らない品種選択がなされるかもしれない. 'スタークリムソン'および'カリフォル ニア'は果実の暗赤色および紅色が美しい. 'オーロラ'は早生の優良品種として注目されている. 近年フランスで育成された'ボートヌ'は優れた果実品質を持ち、今後、日本での栽培増加が予 想されている. 'グランド・チャンピオン'は品質や貯蔵性が良い上に部分的自家和合性を有する ことから、1本植えも可能である.したがって、現在は栽培面積が小さくても、市場の需要も高 い早生品種や'ラ・フランス'以外の時期に楽しむことができる良食味品種、視覚的な楽しみも ある果皮の赤い品種など様々な品種が新植されることも想定できるので、S 遺伝子型に基づい た栽植計画を立て、交雑不和合組み合わせを回避する必要がある.

一方, 青森県および新潟県で特産化を進めている、ゼネラル・レクラーク、および、ル・レクチ ェ、は日本の栽培品種中に同じ推定S遺伝子型を持つ品種がないので, 開花期の近い品種が1品 種あればそれが受粉樹となり, 種子形成を確保できると考えられる. 作業労力の分散や出荷期 間の長期化を図るために, 開花期が近く, 収穫期の異なる品種が受粉樹品種として選ばれると 推測されるが, 唯一、マルゲリット・マリーラ、だけは雄性不稔性を有するので受粉樹品種にな り得ない. 、マルゲリット・マリーラ、は大果, 多汁で栽培しやすく, 、ラ・フランス、の前に収穫で きる品種であるが, 雄性不稔であるためS遺伝子型の異なる品種を受粉樹品種として必要とし, さらに, その受粉樹品種に花粉を供与する品種の混植が必要となる. 幸いにも, 日本の栽培品 種には、マルゲリット・マリーラ、と同じ推定S遺伝子型を持つ品種がない. よって、、マルゲリッ ト・マリーラ、以外の 2 品種が交雑和合の組み合わせであれば、それら品種が、マルゲリット・ マリーラ、の受粉樹の役割を果たすと考えられる.

生産の現場においては、消費者の好む果実品質、収穫期や環境適応性などの品種特性を考慮 して品種が選択されているが、良質果実の安定的な結実に不可欠な種子形成をもたらす受粉に ついて考えるとき、本章で推定した S 遺伝子型が開花期とあわせて重要な情報となると期待さ れる.

第3章

17 種類のS対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステムの確立

く摘要>

セイヨウナシは世界各地で栽培されているが、品種構成は国によって異なっている. 国外に おける栽培品種の S 遺伝子型を推定するため、農研機構果樹研究所リンゴ研究拠点に保存され ている二倍体 93 品種を第2 章で開発した CAPS マーカーシステムに供し, S 遺伝子型を推定し た.59品種からは2種類ずつの断片が増幅され、断片長や制限酵素切断パターンから、S遺伝子 型を推定できた。一方、34品種は、このシステムで識別できない断片の検出や1種類の断片のみ の増幅により S 遺伝子型を推定できなかった. 塩基配列の解析から、識別できなかった断片の うち3種類はニホンナシから同定されたS-RNaseであった。残りの配列は7種類に分類され、推 定 S-RNase 対立遺伝子との照合の結果、5 種類は推定 Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-RNase 対立遺伝子に対 応し、残り2種類は新規 S-RNase 対立遺伝子 (Ss-, St-RNase)と推定された. これら7種類の推定 S-RNase 対立遺伝子を有する品種の 5'および 3'RACE により S-RNase cDNA 完全長塩基配列を 決定した、推定アミノ酸配列はナシ亜科 S-RNase の特徴を有しており、第2章の10種類を加え た 17 種類の S-RNase は異なる認識特異性を示すと推察された。 増幅断片の種類から、 新たにク ローニングされた7種類のS-RNaseを持つ22品種およびニホンナシのS-RNaseを持つ3品種の S遺伝子型を推定できた。残り9品種からはRACEクローニングによりナシ亜科 S-RNaseの特 徴を持つ cDNA 配列 (Sx-RNase)が得られたが、その配列を有する断片がゲノミック PCR で増幅 されず、また、花柱特異的な発現を示さなかったことから、Sx-RNaseが S-RNase 対立遺伝子であ ると結論づけられなかった.

17 種類の S-RNase 対立遺伝子, Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, Sn-, Sp-, Sq-, Sr-, Ss-, St-RNase 対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステムの開発を試みた. ゲノム DNA から プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR により 17 種類の S-RNase 断片 を増幅した. 増幅断片を cDNA の塩基配列と照合し, S-RNase 対立遺伝子特異的なイントロンの 配列を決定した. 1,642 bp 断片として増幅される St は断片長により識別できたが, Sc, Si, Sm, Sn, Sp, Ss は約350 bp 断片として検出され, 断片長による識別が困難であった. そこで, 約350 bp 断 片のうち Sc, Si, Sm, Sp, Ss は, 5 種類の制限酵素, BmgBI (Sc), BstZ17I (Si), BseRI (Sm), BseYI (Sp),
BssSI (Ss)で切断されることで、Sn は選択したいずれの制限酵素でも切断されないことで識別す ることとした. 第2章で選択した6種類の制限酵素と合わせて、約350 bp に検出される Sa, Sc, Sd, Sh, Si, Sm, Sn, Sp, Sr, Ss の識別が可能になった. したがって、プライマーセット'FTQQYQ'と 'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミック PCR および11種類の制限酵素処理からなる CAPS マー カーシステムが確立され、17種類のS対立遺伝子の識別が可能になった. 世界の主要品種の大 多数を含む二倍体品種 106 品種のS遺伝子型はこのシステムにより推定できることになった. これら品種のS遺伝子型は50種類に分類され、そのうち22種類には複数の品種が分類された. 同じ推定S遺伝子型の品種間の交雑不和合性が交配実験により確認され、推定S遺伝子型と CAPS マーカーシステムの信頼性が裏付けられた.

く緒言>

セイヨウナシは世界各国で栽培されているが、各国の気候や風土に適した多様な品種構成が みられ、主要品種として栽培されているものには古い品種が多い、ヨーロッパ南部および南西 部においては、イタリアで'Abbé fétal'、'William's Bon Chrétien (Bartlett, バートレット)'、 'Conference (コンファレンス)', 'Doyenné du Comice (ドワイエネ・デュ・コミス)', 'Beurre Bosc', 'Coscia' \vec{m} , $\mathcal{D} \mathcal{D} \mathcal{D} \mathcal{T}$ 'Bartlett', 'Docteur Jules Guyot (Precoce, $\mathcal{D} \mathcal{D} \mathcal{D} \mathcal{D}$)', 'Conference', 'Doyenné du Comice', 'Passe Crassane'が、スペインで'Blanquila', 'Coscia', 'Docteur Jules Guyot'が, ポルトガルで'Rocha'がそれぞれ主要品種として栽培されている. ヨーロッパ北部および北西部 においては、イギリスで'Conference'、'Bartlett'が、オランダで'Conference'、'Doyenné du Comice'、 'Gieser wildeman', 'Alexander Lucas'が、ベルギーで'Durondeau'が、ドイツで'Conference', 'Alexander Lucas', 'Fondante de Charneu', 'Clapp's Favourite'が, デンマークで'Clara Frijs'が, スウ ェーデンで'Clara Frijs', 'Conference', 'Alexander Lucas'が主要品種として栽培されている. ヨー ロッパ東部および小アジアにおいては、ブルガリアで'Bartlett', 'Vicar of Winkfield (Curé)', 'Beurre Bosc', 'Clapp's Favourite', 'Beurre Hardy'が, ポーランドで'Clapp's Favourite', 'Alexander Lucas', 'Conference', 'General Leclerc'が、ロシアで'Bartlett', 'Flemish Beauty', 'Vicar of Winkfield (Curé)', 'Beurre Bosc', 'Kieffer'が, セルビアで'Bartlett', 'Passe Crassane', 'Vicar of Winkfield (Curé)'が、ギリシャで'Kristalli'、'Bartlett'、'Passe Crassane'が、トルコで'Akça'、'Ankara'、'Santa Maria'が主要品種として栽培されている. 北アメリカにおいては、アメリカ合衆国で'Bartlett', 'Beurré d'Anjou', 'Beurré Bosc', 'Forelle'が, カナダで'Bartlett', 'Beurré Bosc', 'Beurré d'Anjou'が, 南アメリカにおいては、アルゼンチンで'Bartlett', 'Packham's Triumph', 'Beurre d'Anjou'が, チリ で'Packham's Triumph', 'Beurré Bosc'が主要品種となっている. オーストラリアでは'Packham's Triumph', 'Bartlett', 'Beurre Bosc'が, ニュージーランドでは'Packham's Triumph', 'Winter Nelis', 'Winter Cole'が, 南アフリカでは'Packham's Triumph', 'Forelle'が主要品種として栽培されてい る.

各国の主要品種のうち, 第 2 章において'Bartlett' (SeSI), 'Doyenne du Comice' (SaSb), 'Passe Crassane' (SgSr), 'Conference' (SdSr), 'Docteur jules Guyot (Precoce)' (SaSe), 'General Leclerc' (SlSq), 'Flemish Beauty' (SdSe), 'Winter Nelis' (ShSk)の遺伝子型を推定した. Zuccherelli et al. (2002a)ある いは Zisovich et al. (2004a)は 5 品種の S 遺伝子型, 'Abbé fétal' (SaSb), 'Beurré Hardy' (ScSd), 'Coscia' (SbSk), 'Forelle' (SeSn), 'Beurré Bosc' (ScS-)を推定している. しかし, 残りの主要品種, 'Blanquila', 'Rocha', 'Alexander Lucas', 'Fondante de Charneu', 'Clapp's Favourite', 'Gieser wildeman', 'Durondeau', 'Clara Frijs', 'Kristalli', 'Vicar of Winkfield', 'Beurre Bosc', 'Beurre Hardy', 'Kieffer', 'Akça', 'Ankara', 'Santa Maria', 'Beurré d'Anjou', 'Forelle', 'Packham's Triumph', 'Winter Cole'の遺伝子型は推定されていない. また, 赤色系突然変異として'Bartlett' (SeSI)の枝変わり品種'Red Clapp's (Starkrimson, スタークリムソン)' (SdSe), 'Beurré d'Anjou'の枝変わり品種'Red Anjou', 'Beurré Hardy'の枝変わり品種'Royal Red Hardy', 銹性突然変異として'Gorham'の枝変わり品種 'Grand Champion (グランド・チャンピオン)' (SbSe)も栽培が増加傾向にあるが, 'Rosired', 'Clapp's Favorite', 'Beurré d'Anjou', 'Royal Red Hardy', 'Gorham'の S 遺伝子型は推定 されていない.

主要品種を交配親に用いて, 栽培環境に適し, 優れた果実品質を持つ品種の育成が各国で行 なわれている. 'Bartlett'は世界中で栽培されているが, 早生性を付与するための育種母本として も頻繁に利用されている. また, 着色系枝変わり品種'Max Red Bartlett'は早生性に加え赤果皮 色の性質を持つ貴重な育種素材となっている. 'Doyenne du Comice'は, 極めて優れた果実品質 を有する一方で結実が安定しにくいため, 交配により結実安定で品質の良い品種の育成が行な われている. その他, 主要栽培品種を交配親にして, 'Angelys' ['Doyenné d'hiver'×'Doyenné du Comice'] (フランス, 1999 年育成), 'Bautomne' ['Conference'×'Doyenné d'hiver'] (フランス, 1998), 'Bristol Cross' ['Bartlett'×'Conference'] (イギリス, 1931), 'Condo' ['Conference'×'Doyenne du Comice'] (イギリス), 'Aurora' ['Marguerite Marillat'×'Bartlett'] (アメリカ, 1950), 'Canal Red' ['Forelle'×'Max Red Bartlett'] (アメリカ, 1966), 'California' ['Max Red Bartlett' (*SeSl*)×'Doyenné

du Comice' (SaSb)] (アメリカ, 1968), 'Cascade' ['Max Red Bartlett'×'Doyenne du Comice'] (アメリ カ, 1988), 'Devoe' ['Clapp's Favorite'自然交雑実生] (アメリカ, 1949), 'El Dorado' ['Bartlett'自然交 雑実生] (アメリカ, 1931), 'Gorham' ['Bartlett'×'Joséphine de Malines'] (アメリカ, 1923), 'Hartman' ['Doyenne du Comice'×'Max Red Bartlett'] (アメリカ, 1936), 'Highland' ['Bartlett'×'Doyenne du Comice'] (アメリカ, 1956), 'Reimer Red' ['Doyenne du Comice'×'Max Red Bartlett'] (アメリカ, 1961), 'Rogue Red' ['Doyenne du Comice'×'(Seckel'×'Farmingdale seedling 122')] (アメリカ, 1955), 'Santa Maria' ['Bartlett'×'Coscia'] (イタリア, 1951), 'Rosemarie' ['Bon Rouge'×'Forelle'] (南アフリカ), 'Flamingo' ['Bon Rouge'×'Forelle'] (南アフリカ)など多くの品種が育成されてい る.

食味や果皮色などの果実形質に加えて、火傷病抵抗性も重要な育種目標である、ほとんどの セイヨウナシ品種は火傷病に対して罹病性であり、北アメリカ、西ヨーロッパ、地中海諸国、ニ ュージーランドでは火傷病による被害が深刻であった。アメリカでは19世紀に中国から導入さ れたチュウゴクナシ (P. pyrifolia)が火傷病抵抗性を示すことに着目し、セイヨウナシとチュウ ゴクナシの種間雑種、'Garbar'、'Le Conte'、'Kieffer' (P. pyrifolia×'Bartlett')、'Orient'、'Ayres ('Garbar'×'Beurré d'Anjou')が育成され、現在でもテキサス州などで栽培されている。しかし、 香りや肉質などの果実品質が劣ることから、数少ない火傷病抵抗性セイヨウナシ品種、 'Alexander Lucas', 'Tyson', 'Seckel', 'Old Home', 'Starking Delicious (Maxine)', 'Farmingdale'など を交配母本とした育種や、主要セイヨウナシ品種と他のナシ属種を交配した後に再びセイヨウ ナシ品種を戻し交雑する育種が取り組まれている. アメリカでは、'Magness' ['Seckel'× 'Dovenné du Comice'] (1968 年育成), Moonglow ['US-Michigan 437'×'Roi Charles de Wurtemburg'] (1960), 'Dawn' ['US-Michigan 437 ('Barseck'×'Bartlett')'×'Doyenne du Comice'] (1960), 'Honey Sweet' ['Seckel'×'U.S. 220 ('Vermont Beauty'×'Roi Charles de Wurtemburg')'] (1977), 'Potomac' ['Moonglow'×'Beurré d'Anjou'] (1992), 'Blake's Pride' (1998), 'Shenandoah' (2003)が育成されてい る. カナダでは'Bartlett'に火傷病抵抗性を導入した数品種、'Harrow Crisp' ['Bartlett'× 'US56112-146'] (2002), 'Harrow Delight' ['Purdue 80-51 ('Old Home' × 'Early Sweet')' × 'Bartlett'], 'Harrow Sweet' ['Bartlett'×'Purdue 80-51']が育成されている.

このような交雑育種の傾向において、特定の品種間の交雑が多く行なわれた結果、新品種間 または新品種と親品種の間で交雑不和合となるケースが増えていると指摘されている (Sanzol and Herrero 2002). 栽培園におけて交雑不和合を回避し、安定的な結実を確保するためには、各 国の栽培品種の S 遺伝子型を把握し、その情報に基づいた栽植を行なう必要がある. 上述した

新品種のうち, 'California' (SbSe), 'El Dorado' (SeSh), 'Devoe' (SdSq), 'Grand Chanpion' (SbSe)の遺 伝子型を推定した (第2章). 'Cascade' (SbSe)のS遺伝子型はZuccherelli et al. (2002a)により推定 されている. しかし,残りの新品種の遺伝子型は推定されていない.

セイヨウナシは品種成立の背景が複雑であるので (Janick Fruit Breeding 1996), 第2章でクロ ーニングされた 10 種類以外の S-RNase 対立遺伝子が存在すると考えられる. ゲノミック PCR により増幅された 13 種類の推定 S-RNase 対立遺伝子のうち, Sc-, Si-, Sm-, Sn-, So-, Sp-RNase 対立 遺伝子は本論文第2章でクローニングされておらず, また, 新規S対立遺伝子を有する品種も多 く存在すると考えられる さらに, 'Frontier', 'Garbar', 'Kieffer'など P. communis と P. pyrifolia の雑 種と言われる品種も存在するので, ニホンナシで報告されている 9 種類の S-RNase 対立遺伝子 が見出される可能性もある. 世界各国における果実生産の安定化や育種の効率化を達成するた めには, より多くの品種のS遺伝子型を推定できるシステムの構築が必要である.

本章では、遺伝資源として日本に導入されている二倍体品種93品種のS遺伝子型の推定を試 みた. CAPS マーカーシステム (第2章)により識別できないゲノミック PCR 断片の塩基配列を 解析し、品種の S 遺伝子型を推定するとともに、交配実験により栽培品種間の交雑不和合・和 合関係を明らかにした. 新たに 7 種類の S-RNase 対立遺伝子をクローニングし、完全長 cDNA 配列を決定した. ゲノミック PCR 産物および cDNA 断片の塩基配列に基づき、17 種類の S-RNase 対立遺伝子を識別できる CAPS マーカーシステムを確立した.

く材料および方法>

材料

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡市)お よび神戸大学農学部圃場 (兵庫県神戸市)において栽培されている二倍体のセイヨウナシ品種 に加え,ニホンナシ3品種,'二十世紀'(*S2S4*),'豊水'(*S3S5*),'市原早生'(*S1S8*), および,リンゴ6 品種,'国光'(*S1S2*),'ゴールデン・デリシャス'(*S2S3*),'さんさ'(*S5S7*),'スターキング・デリシャ ス'(*S9S19*),'旭'(*S10S25*),'印度'(*S7S20*)を供試した. セイヨウナシ93品種 (表3-1)とニホンナシ およびリンゴの各品種から未展開葉を,'Beurré Hardy', 'Beurré de l'Assomption', 'Chapin', 'Saint Mathieu', 'Akça', 'Dana's Hovay', 'Starking Delicious', 'Bedford', 'Beurré Bosc', 'Beurré Dumont', 'Clara Frijs', 'Durondeau', 'Early Seckel', 'Jargonelle', 'Lincoln', 'Marie Louise', 'Saint Germain'の white stage の花から花柱を採取し, 液体窒素で急速冷却後-80℃で保存した. 交配実験には, 花

| 品種 | 原産国 | 親品種 | 開花期 | 収穫 盛期 | 追熟日数 (日) | 果皮色 | 銹 | 果実重量 (g) | 糖度 (%) | 酸度 (%) | 肉質 | 黒星病 | 火傷病 抵抗性 |
|------------------------|------|--------------------------------------|------|----------|-------------|---------|----|-------------|-----------|-----------|-----|-----|------------|
| Abbe Fetal | フランス | | С | 10.10 | 15 | | 多 | 316.4 | 14.3 | 0.20 | 砂状 | | 1010 0122 |
| Akça | トルコ | | D* | | | | | | | | | | |
| Angelys | フランス | Doyenné d'hiver × Doyenné du Comice | C** | | | | | | | | | | |
| Ankara | トルコ | | C* | 10.16 | 44 | | 少 | 195.5 | 12.5 | 0.09 | 砂状 | | |
| Ayers | アメリカ | Garbar × Beurré d'Anjou | B* | 9.11 | 14 | 黄+陽光面赤 | 多 | 131.5 | 15.8 | 0.39 | 溶質 | | R |
| Besi de Saint-Waast | フランス | | C* | 10.10 | 21 | 黄+陽光面赤 | 少 | 421.3 | 13.2 | 0.11 | 砂状 | | |
| Beurré Bedford | イギリス | Marie Louise × Durondeau | E | | | | | - | | | | | |
| Beurré Bosc | ベルギー | | D* . | 10.01 | 16 | 暗黄 | 全面 | 311.5 | 12.6 | 0.19 | 砂状 | | |
| Beurré Clairgeau | フランス | Duchess d'Angouleme自然交雑実生 | С | 10.01 | 24 | 暗黄+陽光面赤 | 多 | 3684 | 13.5 | 0.11 | 砂状 | | |
| Beurré d'Anjou | フランス | | С | 10.10 | 22 | 淡黄 | 中 | 231.2 | 13.5 | 0.23 | 粉質 | | |
| Beurré de l'Assomption | フランス | | Е | 8.30 | 11 | 淡黄 | 多 | 190.7 | 12.5 | 0.21 | 粗 | | |
| Beurré Dumont | ベルギー | | D | 10.10 | 16 | | 少 | 236.5 | 13.6 | 0.19 | 中 | MR | |
| Beurré Giffard | フランス | | С | 7.29 | 21 | 黄緑 | 微 | 93.9 | 11.4 | 0.16 | 溶質 | VR | R |
| Beurré Hardy | フランス | | D | 8.21 | 15 | 黄緑 | 無 | 255.6 | 10.4 | 0.28 | 中 | R | |
| Beurré Jean Van Geert | ベルギー | | D | 10.31 | 31 | 明黄 | や少 | 265.6 | 13.1 | 0.12 | 粉質 | | |
| Beurré Lubrum | フランス | | D* | 9.25 | 12 | | 無 | 316.5 | 11.5 | 0.17 | 砂状 | | |
| Beurré Superfin | フランス | | D | 9.19 | 15 | 黄 | 微 | 338.9 | 13.1 | 0.51 | 中 | | |
| Blickling | イギリス | | E | 10.25 | 23 | | 中 | 317.8 | 15.5 | 0.25 | 中 | | MR |
| Bon-Chrétien d'Hiver | イタリア | | D | 10.10 | 29 | 黄+陽光面赤 | 多 | 482.5 | 12.0 | 0.11 | 粗 | | |
| Bristol Cross | イギリス | Bartlett × Conference | D | 9.25 | 16 | | 少 | 236.5 | 13.6 | 0.19 | 中 | | VR |
| Canal Red | アメリカ | Forelle × Max Red Bartlett | E* | | | 黄+陽光面赤 | | - | | | | | |
| Cascade | アメリカ | Max Red Bartlett × Doyenné du Comice | D | 9.13 | 12 | 暗黄 | や少 | 311.5 | 12.5 | 0.31 | 溶質 | | |
| Chapin | アメリカ | Seckel自然交雑実生 | D | 8.09 | 20 | | 無 | 145.5 | 14.5 | 0.32 | 粗 | | S |
| Charles Ernest | フランス | | С | 10.16 | 23 | 黄金 | 少 | 374.9 | 12.9 | 0.09 | 中 | | |
| Clapp's Favorite | アメリカ | Flemish Beauty × Bartlett | D | 8.22 | 14 | 淡黄 | 無 | 234.2 | 10.5 | 0.25 | ÷ | | |
| Clara Frijs | フランス | | D | | | 淡黄 | | - | | | | R | |
| Colorée de Juillet | フランス | | D | 7.25 | 7 | 明黄 | 無 | 96.7 | 8.4 | 0.14 | 粉質 | | |
| Comte de Flandre | ベルギー | | D | 10.10 | 22 | 黄緑 | 少 | 247.4 | 13.3 | 0.12 | 粗 | | S |
| Comte de Lambertye | フランス | Beurré Superfin自然交雑実生 | D | 9.03 | 14 | 淡黄 | 無 | 251.1 | 10.6 | 0.43 | 溶質 | | |
| Condo | イギリス | Conference × Doyenné du Comice | D* | 9.19 | 15 | | 多 | 241.7 | 12.9 | 0.17 | や砂状 | | |
| Covert | アメリカ | Bartlett × Dorset | D* | 10.16 | 22 | | や多 | 453.5 | 10.5 | 0.16 | 粉質 | | |

各項目空白は不明または記載なし.

開花期: 「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による. 最も開花の早い品種の開花日を1とし, A (1~6), B (7~12), C (13~17), D (18~22), E (23~27), F (28~32), G (33~37)と分類している. この分類で, 'Bartlett'は D, 'Conference'は C, 'Abbe Fetal'は D に分類されている.*は感岡での開花日をもとに分類.** はインターネット上の品種説明をもとに分類

収穫盛期,追熟日数,果皮色,銹,果実重量,糖度,酸度,肉質は盛岡における調査(石黒私信).収穫盛期の*は山形県農業総合研究センター,その他は農研機構果樹研究所盛岡.

火傷病および黒星病に対する抵抗性は「Directory of Pear Cultivar J Crawford (1996)による. VR: Very resistant, R: Resistant, Moderately resistant, S: Susceptible, MS: Moderately susceptible, VS: Very susceptible.

| ⊠3-1 | セイヨウナシ93 | 品種の由来および | 「諸特性(つづき) |
|------|----------|----------|-----------|
|------|----------|----------|-----------|

| | 原産国 | 親品種 | 開花期 | 収穫 | 追熱日数 | 果皮色 | 銹 | 果実重量 | 精度 | 酸度 (%) | 肉質 | 黑星病 抵抗性 | 火傷病 |
|----------------------|-------------|--|-----|-------|------|---------|----|-------|------|-----------|------|------------|-----------|
| Dana's Hovay | アメリカ | Seckel × Winter Nelis | D | 9.19 | 14 | 黄金 | 多 | 174.0 | 13.4 | 0.19 | 砂状 | 1240 0111 | 1241/0111 |
| Délices d'Hardenpont | ~114- | | В* | 10.10 | 14 | 明黄 | 無 | 302.4 | 12.5 | 0.39 | 砂状 | | |
| Doyenné d'hiver | ベルギー | | D* | 10.24 | 36 | 黄+陽光面赤 | や少 | 272.4 | 14.1 | 0.24 | 粉質 | | R |
| Doyenné Gris | フランス | White Doyenne 奶性突然变異 | D* | 8.02 | 35 | 暗黄 | 微 | 110.0 | 12.5 | 0.17 | バター状 | | |
| Duchesse d'Angouleme | フランス | · · · · · · · · | с | 9.19 | 15 | 黄 | や多 | 123.7 | 12.7 | 0.10 | 砂状 | | MR |
| Durondeau | ベルギー | | С | 9.19 | 15 | | 全面 | 262.8 | 15.1 | 0.35 | 砂状 | | |
| Early Seckel | アメリカ | Seckel自然交雑実生 | D | | 15 | | 多 | 184.5 | | | | | |
| Emile d'Heyst | ベルギー | | с | 10.24 | 14 | 淡黄 | 中 | 357.8 | 13.7 | 0.22 | 粉質 | | |
| Ewart | アメリカ | | D | 9.04 | 13 | 黄緑 | 多 | 272.8 | 12.0 | 0.50 | 溶質 | | MS |
| Fame | 不明 | | | 9.05* | 14 | | | 220.0 | 11.2 | 0.35 | | | |
| Fertility | イギリス | Beurre Goubault自然交雑実生 | D | 9.27 | | | | | | | | | S |
| Fondante de Charneu | ベルギー | | C* | | | 淡黄 | | | | | | | |
| Fondante Thirriot | フランス | | С | 10.10 | 24 | 黄緑 | 少 | 369.1 | 13.7 | 0.17 | 砂状 | | |
| Frontier | 日本 | 身不知 (P. pyrifolia)×フレミッシュ・ビューティー | C* | 10.10 | | 黄 | | 766.9 | 11.4 | 0.09 | | | |
| Garbar | アメリカ | P. pyrifolia雜種 | C* | 7.23 | | | 無 | 85.8 | 10.0 | 0.21 | 砂状 | | R |
| Glou Morceau | ベルギー | | D | 10.22 | 38 | 黄緑 | 少 | 253.1 | 12.5 | 0.17 | 粗 | | |
| Gorham | アメリカ | Bartlett × Joséphine de Malines | Е | 10.01 | 16 | | 多 | 250.1 | 13.3 | 0.24 | 溶質 | VR | |
| Harrow Crisp | カナダ | Bartlett × US56112-146 | D** | | | | | | | | | | R |
| Harrow Delight | カナダ | Purdue 80-51 (Old Home × Early Sweet) × Bartlett | С | 8.28* | 7 | 薄黄+陽光面赤 | | 220.0 | 14.4 | 0.36 | | | VR |
| Harrow Sweet | カナダ | Bartlett × Purdue 80-51 (Old Home × Early Sweet) | С | | | 黄+陽光面赤 | | | | | | | R |
| Hartman | アメリカ | Doyenné du Comice × Max Red Bartlett | D* | 10.01 | | | | | | | | | |
| Harvest Queen | カ ナダ | Michigan 572 (Barseck × Bartlett) × Bartlett | С | 8.20 | 15 | 黄 | 無 | 144.2 | 11.1 | 0.34 | 溶質 | | VR |
| Highland | アメリカ | Bartlett × Doyenné du Comice | С | 10.01 | 17 | 黄 | 中 | 295.8 | 13.3 | 0.12 | 溶質 | | |
| Honey Sweet | アメリカ | Seckel × U.S. 220 (Vermont Beauty × Roi Charles de Wurtemburg) | E* | 10.01 | 16 | 黄金 | 全面 | 206.7 | 14.1 | 0.23 | 中 | | |
| Howell | アメリカ | Jonah自然交雑実生 | D* | 9.25 | 15 | 淡黄 | 少 | 293.6 | 12.6 | 0.28 | 砂状 | | |
| Idaho | アメリカ | | D | 9.19 | 16 | 明黄 | 少 | 386.2 | 12.2 | 0.21 | 粉質 | | |
| Joséphine de Malines | ベルギー | | D | 10.11 | 22 | 黄緑 | | | | | | | |
| Kieffer | アメリカ | P. pyrifolia × Bartlet | B* | 10.24 | 14 | 黄 | や多 | 354.7 | 12.3 | 0.25 | 粗 | R | MR |
| Koonce | アメリカ | | D* | 10.01 | 16 | 黄緑 | 多 | 330.5 | 11.4 | 0.33 | 溶質 | | R |

各項目空白は不明または記載なし

開花期: 「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による. 最も開花の早い品種の開花日を1とし、A (1~6), B (7~12), C (13~17), D (18~22), E (23~27), F (28~32), G (33~37)と分類している. この分類で, 'Bartlett'は D, 'Conference'は C, 'Abbe Fetal'は D に分類されている.*は感岡での開花日をもとに分類.*** はインターネット上の品種説明をもとに分類

収穫盛期,追熟日数,果皮色,銹,果実重量,糖度,酸度,肉質は盛岡における調査(石黒私信)、収穫盛期の*は山形県農業総合研究センター,その他は農研機構果樹研究所盛岡.

火傷病および黒星病に対する抵抗性は「Directory of Pear Cultivar J Crawford (1996)による. VR: Very resistant, R: Resistant, Moderately resistant, S: Susceptible, MS: Moderately susceptible, VS: Very susceptible.

| 品種 | 原産国 | 親品種 | 開花期 | 収穫 盛期 | 追熟日数 (日) | 果皮色 | 銹 | 果実重量 (g) | 精度 (%) | 酸度 (%) | 肉質 | 黒星病抵抗性 | 火傷病 抵抗性 |
|--------------------|---------|--|-----|----------|-------------|--------|----|----------------|--------------|-----------|----------|--------|------------|
| Lincoln | アメリカ | | D* | 9.04 | 12 | | 無 | 190.7 | 12.2 | 0.23 | 粗 | | |
| Magness | アメリカ | Seckel自然交雑実生 × Doyenné du Comice | с | | | | | | | | | | R |
| Marie Louise | ベルギー | - | D | 9.11 | 13 | 黄 | 中 | 228.6 | 13.4 | 0.29 | 粗 | MS | S |
| Moonglow | アメリカ | US-Michigan 437×Roi Charles de Wurtemburg | D | 9.17 | | | | | | | | | VR |
| Napoleon | ベルギー | | Е | 10.15* | | 黄緑 | 多 | 100.0 | 11.0 | 0.39 | 中 | | |
| Nouveau Poiteau | ベルギー | | Е | 10.16 | 14 | 草緑 | や多 | 413.1 | 14.5 | 0.18 | 粉質 | R | |
| Old Home | アメリカ | | D* | 10.01 | 16 | | 少 | 157.2 | 12.0 | 0.26 | 溶質 | | |
| Oliviier de Serres | フランス | Forunee d'Angers自然交雑実生 | D | 11.07 | 31 | | 多 | 247.2 | 14.7 | 0.33 | 粉質 | | |
| Ovid | アメリカ | Bartlett × Dorset | E | 10.31 | 31 | | 多 | 334.3 | 14.5 | 0.17 | 粉質 | | |
| Packam's Triumph | オーストラリア | Uvedale St. Germain (Bella Angevina × Bartlett) × Bartlett | с | 10.04 | | 明黄 | | | | | | | |
| Pera d'Agua | スペイン | P. pyrifolia雑種 | В* | 10.10 | 15 | | 少 | 300.3 | 11.5 | 0.37 | 砂状 | | MR |
| Pierre Cornelle | フランス | Beurré Diel × Doyenné du Comice | С | 10.10 | 14 | 黄緑 | 多 | 367.9 | 15.0 | 0.16 | 砂状 | | MR |
| Pierre Tourasse | フランス | | D* | 9.25* | 10 | 淡黄褐 | 多 | 311.0 | 13.1 | 0.50 | # | | S |
| President Héron | フランス | | C* | 9.19 | 15 | | 全面 | 257.5 | 11.6 | 0.19 | 砂状 | | |
| Red Anjou | アメリカ | Beurré d'Anjouの着色系突然変異 | с | 10.01 | 17 | | や多 | 259.0 | 14.2 | 0.25 | や溶質 | | R |
| Reimer red | アメリカ | Doyenné du Comice × Max Red Bartlett | D* | 9.25 | 16 | | 多 | 291.2 | 14.4 | 0.19 | 溶質 | | |
| Rocha | ポルトガル | | | | | | | | | | | | |
| Roguered | アメリカ | Doyenné du Comice × (Seckel (SeSl) × Farmingdale seedling 122) | D* | 10.01 | 24 | 紅色 | や多 | 220.6 | 15.1 | 0.18 | 粗 | MS | |
| Rosired | アメリカ | Bartlettの着色系突然変異 | D | 9.11 | 15 | | 少 | 258.1 | 12.2 | 0.27 | 溶質 | R | MR |
| Royal Red Hardy | フランス | Beurré Hardyの着色系突然変異 | D | 9.13 | 23 | | 中 | 149.2 | 13. 7 | 0.21 | 溶質 | | MR |
| Saint Germain | フランス | | | 9.19 | 22 | 黄緑 | 多 | 153.3 | 12.0 | 0.72 | 砂状 | | |
| Saint Mathieu | - | | D* | 9.19 | 22 | 黄緑 | 多 | 127.2 | 10.8 | 0.23 | 粗 | | |
| Santa Maria | イタリア | Bartlett × Coscia | D | 9.04 | 14 | | 無 | 262.7 | 10.5 | 0.19 | 粗 | | |
| Seckel | アメリカ | | D | 10.01 | 24 | 黄褐 | 多 | 127.0 | 15.1 | 0.12 | 砂状 | | |
| Starking Delicious | アメリカ | | Е | 10.01 | 12 | 明黃 | 少 | 277.8 | 11.5 | 0.20 | 砂状 | | R |
| Summer Doyenne | ベルギー | | D* | 8.21 | 21 | 黄 | 無 | 1 99 .0 | 10.9 | 0.34 | 中 | | |
| Triomphede Vienne | フランス | | D | 10.11 | | 黄緑 | | | | | | | |
| Turnbull Giant | - | | в* | | | | | | | | | R | R |
| Tyson | アメリカ | | | 8.28* | 7 | 深緑 | | | 12.1 | 0.16 | | | R |
| Urbaniste | ベルギー | | D* | 10.10 | 16 | 淡黄 | や多 | 186.0 | 12.2 | 0.19 | 中 | | |
| Verdi | オランダ | B. Louise d'Avranches × Doyenné du Comice | D* | | | 淡黄 | | | | | | | |
| Washington | アメリカ | | | 8.28* | 9 | 黄+陽光面赤 | | 110.0 | 0.30 | | | | |
| Winter Cole | オーストラリア | Winter Nelis自然交雑実生 | D* | 11.07 | 24 | | 3 | 153.9 | 14.0 | 0.13 | 砂状 | | |

各項目空白は不明または記載なし

開花期: 「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による. 最も開花の早い品種の開花日を1とし、A (1~6)、B (7~12)、C (13~17)、D (18~22)、E (23~27)、F (28~32)、G (33~37)と分類している. この分類で、'Bartlett'は D, 'Conference'は C, 'Abbe Fetal'は D に分類されている.*は盛岡での開花日をもとに分類.** はインターネット上の品種説明をもとに分類

収穫盛期,追熟日数,果皮色,銹,果実重量,糖度,酸度,肉質は盛岡における調査(石黒私信).収穫盛期の*は山形県農業総合研究センター,その他は農研機構果樹研究所盛岡.

火傷病および黒星病に対する抵抗性は「Directory of Pear Cultivar」Crawford (1996)による. VR: Very resistant, R: Resistant, Moderately resistant, S: Susceptible, MS: Moderately susceptible, VS: Very susceptible.

そう数が十分な品種 (第2章でS遺伝子型を推定した品種を含む)を供試した.

交配実験

交配実験は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点にて 行なった. 交配および調査は第1章で確立した方法に従い、交配約10週間後に結実数と充実種 子数を調査した. 結実率, Seeds/Flower, SI index を算出し、不和合・和合を判定した.

プライマーの設計

本章の RACE クローニング,イントロンウォーキング,ゲノミック PCR のために設計したプ ライマーの塩基配列を表 3-2,-3 と図 2-1 にまとめた.

CAPS 分析

「ゲノム DNA の抽出と精製」は第 2 章の方法に従った. プライマーセット'FTQQYQ'と 'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR により, ゲノム DNA から S-RNase 断片を増幅した. 増幅断片 を第 2 章で選択した 6 種類を含む 11 種類の制限酵素 BaeI, Bg/II, BmgBI, BseRI, BseYI, BssHII, BssSI, BstZ17I, HindIII, EcoO109I, SphI で処理した. BaeI は 25℃で 4 時間, BssHII は 50℃で 4 時間, それ以外の制限酵素は 37℃で 4 時間反応させた. 制限酵素処理前後の PCR 産物は 2%アガロー スゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した.

RACE クローニング

「Total RNA の抽出」, 「mRNA の単離」, 「3'RACE および 5'RACE」は第2章の方法に従った. 5'RACE には各 *S-RNase* の HV 領域の配列に基づき設計した特異的なリバースプライマー 'HVSc', 'HVSiSn', 'HVSm', 'HVSp', 'HVSs', 'HVSt'を用いた (表 3-2).

塩基配列の解析

ゲノミック PCR においてほぼ同じ断片長に検出される増幅断片,および,RACE における PCR 産物をゲルから抽出した後で TA クローニングに供し,目的の断片の塩基配列を解析した. 「ゲルからの PCR 産物の抽出」,「TA クローニング」,「塩基配列の決定」は第2章の方法に 従った.

表3-2 本章のRACEクローニングおよびゲノミックPCRに用いたS-RNase特異的プライマー.

| プライマー | 配列(5′-3′) | プライマーの位置 |
|------------------|--------------------------------|----------|
| FTQQYQ | TTTACGCAGCAATATCAG | C1 |
| C2FI | TCTAATCCTACTCCTTGT | C2上流 |
| C2F2 | GATCCTCCTGACAAGT | C2 |
| HVSq | CTTATCGTTCGAGGTTTC | HV |
| HVSc | CTTTGAGATTTGTTATCGTC | HV |
| HVSiSn | GGGCTTGGATATTTTTTA | HV |
| HVSm | CTTGGATATGTCCAATCTG | HV |
| HVSp | GGGCTTCGATATTTTTA | HV |
| HVSs | GGGCTGTCATATTTCCTA | HV |
| HVSt | GGGGTTTGAGTGATGTATCTA | HV |
| anti-IIWPNV | AC (A/G) TTCGGCCAAATAATT | HV下流 |
| EpSg-anti-IIWPNV | ACGTTCGGCCAAATAATG | HV下流 |
| anti-(I/T)IWPNV | AC (A/G) TTCGGCCAAATARTT | HV下流 |
| EP-anti-IIWPNV | AC (A/G) TT (C/T) GGCCAAATAATT | HV下流 |
| IIWPN-F | G (A/G) HAATTATTTGGCCG | HV下流 |
| E-IIEPNV-F | ATTATTTGGCCAAACGTA | HV下流 |

表3-3 本章のイントロンウォーキングで設計したプライマー.

| プライマー | 配列(5′-3′) | プライマーの位置 |
|----------|----------------------|---------------|
| St-INTF1 | CACCCCACATTTTCTTTTTC | St-RNaseイントロン |
| St-INTR1 | TTAAATAAAACCCATAAATC | St-RNaseイントロン |
| St-INTF2 | AATGTCTTGCCTCATGTGG | St-RNaseイントロン |

Sx-RNase の増幅と発現解析

Sx-RNase 配列を持つ断片を増幅するためのゲノミック PCR は, 第2章の「シークエンス反応 に用いる PCR 産物の抽出」における PCR の反応液組成を用い,反応は第2章と同じサイクル, もしくは,伸長時間 30 秒で 99 サイクルのパターンで行ない,後者ではアニーリングの温度を 52℃に設定した. 鋳型として各品種の花柱 total RNA を,また,プライマーとして CAPS マーカ ーシステムのプライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2', *Sx-RNase* 特異的リバースプラ イマー'EPSx-anti-IIWPNV' (5'-TACGTTCGGCCAAATTAT-3'), *Sx-RNase* の非翻訳領域の配列に 基づき設計した特異的プライマー'SxUTRfl' (5'-CTTCAAATGGATCAAATG-3'), 'SxUTRf2' (5'-GAGTAATTAATTTGCCTCGCTC-3'), 'SxUTRr1' (5'-CCACATATTCACCCGAGC-3'), 'SxUTRr2' (5'-GGCCAACATAGAAGTTCAC-3')を用いた. 'Durondeau'の花柱,葯,花弁,葉の total RNA を鋳型に,プライマーセット'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'を用いた RT-PCR を第2 章の方法に従って行ない,*Sx-RNase* の発現を解析した.

く結果>

自家不和合性の評価

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点に栽植されている 二倍体品種のうち,交配実験に供試できる花そう数が確保できた 52 品種について,自家受粉に より品種の自家不和合性を評価した. 'Ayers', 'Kieffer', 'Magness', 'Turnbell Giant'の 4 品種は雄 性不稔性品種であった. SI index による判定の結果,供試 48 品種中 47 品種は自家不和合であっ たが, 'Gorham'は部分的自家和合と判定された. 'Grand Champion'は'Gorham'の枝変わりである ので, 'Grand Champion'の部分的自家和合性は'Gorham'から受け継いだと考えられた.

CAPS マーカーシステム (第2章)による S 遺伝子型推定

セイヨウナシ 93 品種のゲノム DNA から、プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2' を用いた PCR により S-RNase 断片を増幅した後,6 種類の制限酵素, Bg/II (Sk), HindIII (Sq), SphI (Sa), EcoO109I (Sd), BssHII (Sh), Bael (Sr)を処理して増幅断片を切断した.増幅断片長または制 限酵素による切断の有無から, Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Sk-, Sl-, Sq-, Sr-RNase 対立遺伝子を特定 し,各品種の S 遺伝子型を推定した.供試品種中 60 品種については 2 種類の S-RNase 対立遺伝 子を特定でき, S 遺伝子型を推定することができた (表 3-4). 60 品種は Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-,

| S遺伝子型 | 品種 | S遺伝子型 | 品種 |
|--------|-----------------------|--------|----------------------|
| SaSb | Abbé fétal | SeSg | Beurré Superfin |
| SaSe | Duchesse d'Angouleme | | Oriviier de Serres |
| | Harrow Crisp | SeSh | Winter Cole |
| | Harrow Delight | SeSk | Fondante Thirriot |
| | Magness | | Packam's Triumph |
| | Rocha | | Washington |
| | Tyson | SeSl | Délices d'Hardenpont |
| SaSg | Charles Ernest | | Harvest Queen |
| | Triomphede Vienne | | Napoleon |
| SaSl | Harrow Sweet | | Rosired |
| | Koonce | | Seckel |
| | Pierre Tourasse | (SeSl) | Ayers |
| SaSq | Beurré Clairgeau | | Pera d'Agua |
| SaSr | Angelys | SeSq | Besi de Saint-Waast |
| SbSe | Beurré Lubrum | | Bon-Chretien d'Hiver |
| | Cascade | | Covert |
| | Gorham | | Pierre Cornelle |
| | Hartman | SeSr | Doyenné d'hiver |
| | Highland | | Idaho |
| | Howell | | Verdi |
| SbSg | Glou Morceau | SgSI | Blickling |
| SbSl | Beurré Jean Van Geert | | Comte de Lambertye |
| | Canal Red | SgSq | President Héron |
| | Honey Sweet | ShSq | Fertility |
| | Joséphine de Malines | SkS1 | Santa Maria |
| SbSr | Condo | SkSr | Ankara |
| | Urbaniste | SlSq | Ovid |
| SdSe | Clapp's Favorite | SISr | Bristol Cross |
| (SdSe) | Frontier | | Emile d'Heyst |
| SdSl | Doyenné Gris | (SlSr) | Kieffer |

表3-4 第2章のCAPSマーカーシステムにより新たにS遺伝子型が推定された二倍体60品種

赤色は日本の栽培品種には見られなかったS遺伝子型.

チュウゴクナシ (P. pyrifolia)との雑種とされる品種のS遺伝子型は()書きで示した.

Sk-, Sl-, Sq-, Sr-RNase 対立遺伝子の組み合わせからなる 25 種類の*S* 遺伝子型に分類され, その うち 14 種類, *SaSq, SaSr, SbSg, SbSl, SbSr, SdSl, SeSg, SeSk, SeSq, SgSl, SgSq, ShSq, SkSl, SkSr* は日本 の栽培品種にはない*S* 遺伝子型であった. 'Abbé fétal' (*SaSb*)および'Cascade' (*SbSe*)の推定*S* 遺伝 子型は Zuccherelli et al. (2002a)による推定と一致した. チュウゴクナシ (*P. pyrifolia*)との雑種と される品種の遺伝子型は'Frontier'(*SdSe*), 'Kieffer' (*SlSr*), 'Ayers'(*SeSl*), 'Pera d'Agua'(*SeSl*)と推定 された.

一方,24品種からは、第2章のCAPSマーカーシステムでは識別できないS-RNase断片が検出 された (図 3-1、表 3-5). 'Old Home'と'Starking Delicious'および'Turnbull Giant'からは 998 bp の Se-RNase 対立遺伝子および 440 bp の Sb-RNase 対立遺伝子に加えて,新たに約 1.6 kb の断片が 検出された. 'Fondante de Charneu'からは 1,414 bp の SI-RNase 対立遺伝子に加えて、2 種類の制限 酵素, BgIII および HindIII では切断されない約 1.3 kb の断片が増幅された. 'Ewart', 'Beurré de l'Assomption', 'Chapin', 'Akça', 'Comte de Flandre'からは 1,414 bp の Sl-RNase 対立遺伝子と約 350 bp が, 'Beurré d'Anjou', 'Moonglow', 'Red Anjou', 'Dana's Hovay', 'Beurré Giffard', 'Summer Doynne', 'Colorée de Juillet'からは998 bpの Se-RNase 対立遺伝子と約350 bp 断片が, 'Reimer Red' からは 440 bp の Sb-RNase 対立遺伝子と約 350 bp 断片が増幅された. これらの品種から増幅さ れた約 350 bp の断片は Bael, BssHII, EcoO109I, SphI で切断されなかった. 'Roguered', 'Beurré Hardy' (ScSd; Zuccherelli et al. 2002a), 'Royal Red Hardy', 'Nouveau Poiteau', 'Garbor', 'Fame'から は2種類の約350 bp 断片が増幅された。制限酵素切断片長多型から各品種の一方の約350 bp 断 片はそれぞれ, Sa-, Sd-, Sd-, Sh-, Sh-, Sr-RNase 対立遺伝子と特定できたが、もう一方の約 350 bp 断片は, Bael, BssHII, EcoO109I, SphI で切断されなかったので, S-RNase 対立遺伝子を特定できな かった. 'Beurré Hardy'と'Royal Red Hardy'の切断されなかった断片は Zuccherelli et al. (2002a)の 結果から推定 Sc-RNase 対立遺伝子に相当すると考えられた. 'Saint Mathieu'からは約350 bp の断 片が増幅されたが, Bael, BssHII, EcoO109I, SphI で切断されなかった. CAPS マーカーシステムで 識別できなかった断片は Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Sk-, Sl-, Sg-, Sr-RNase 対立遺伝子以外の S-RNase 対立遺伝子であると考えられた.

残り9品種からは、CAPS マーカーシステムで識別できる1種類の断片のみが増幅された(図 3-1、表 3-5). 'Beurré Bedford', 'Beurré Bosc', 'Durondeau'からは *Sh-RNase* 対立遺伝子のみが, 'Early Seckel'と'Marie Louise'からは *Sl-RNase* 対立遺伝子のみが, 'Lincoln', 'Clara Frijs', 'Beurré Dumont', 'Saint Germain'からはそれぞれ *Sb-*, *Se-*, *Sg-*, *Sr-RNase* 対立遺伝子のみが検出された. こ れら品種には、プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR では増幅されな



図3-1 プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いた ゲノミックPCRによる二倍体品種からのS-RNase対立遺伝子の増幅. 第2章のCAPSマーカーシステムによりS遺伝子型が推定されなかった 品種の一部.

| 表3-5 第 | 92章のCAPSマーカ | ーシステム | によりS遺伝子 | ・型が推定て | できなかった二 | .倍体33品種 |
|--------|-------------|-------|---------|--------|---------|---------|
|--------|-------------|-------|---------|--------|---------|---------|

| S遺伝子型 | 品種 |
|-----------------------|------------------------|
| 識別できない断片が増幅された品種 | |
| SaS- | Roguered |
| SbS- | Reimer Red |
| | Turnbull Giant |
| SdS- | Beurré Hardy |
| | Royal Red Hardy |
| SeS- | Beurré d'Anjou |
| | Moonglow |
| | Red Anjou |
| | Dana's Hovay |
| | Beurré Giffard |
| | Summer Doyenne |
| | Colorée de Juillet |
| | Old Home |
| | Starking Delicious |
| ShS- | Nouveau Poiteau |
| (ShS-) | Garbar |
| SIS- | Ewart |
| | Beurré de l'Assomption |
| | Chapin |
| | Akça |
| | Comte de Flandre |
| | Fondante de Charneu |
| SrS- | Fame |
| <i>S</i> - | Saint Mathieu |
| 識別できる1種類の断片のみが増幅された品種 | |
| Sb | Lincoln |
| Se | Clara Frijs |
| Sg | Beurré Dumont |
| Sh | Beurré Bedford |
| | Beurré Bosc |
| | Durondeau |
| SI | Early Seckel |
| | Marie Louise |
| Sr | Saint Germain |

チュウゴクナシ (P. pyrifolia)との雑種とされる品種のS遺伝子型は()書きで示した.

い S-RNase 対立遺伝子が存在すると考えられた.

Zuccherelli et al. (2002a, b)とZisovich et al. (2004a)は、ゲノックPCR により Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sh-, Sk-, Sl-RNase 対立遺伝子以外に6種類の推定 S-RNase 対立遺伝子; Sc (accession no. AJ459774), Si (accession no. AF518319), Sm (accession no. AY159323), Sn (accession no. AY195840), So (accession no. AY261994), Sp (accession no. AY421968)を増幅している、プライマーセット'FTOOYO'と 'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR により, So-RNase は 1,291 bp の断片として, その他は約 350 bp の断片として増幅されると予測される. また、チュウゴクナシ (P. pyrifolia)との雑種である 'Frontier', 'Kieffer', 'Ayers', 'Garbar', 'Pera d'Agua'にはニホンナシ S-RNase 対立遺伝子が増幅さ れている可能性がある. そこで, 第2章の CAPS マーカーシステムにより識別できない断片が 増幅された 24 品種と'Frontier', 'Kieffer', 'Ayers', 'Pera d'Agua'から, プライマーセット 'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR により増幅された断片の DNA 配列を解析した. 'Old Home'と'Starking Delicious'および'Turnbull Giant'からの約 1.6 kb の増幅断片, 'Fondante de Charneu'からの約 1.3 kb の増幅断片, 'Ewart', 'Beurré de l'Assomption', 'Chapin', 'Akça', 'Comte de Flandre'から, 'Beurré d'Anjou', 'Moonglow', 'Red Anjou', 'Dana's Hovay', 'Beurré Giffard', 'Summer Doynne', 'Colorée de Juillet', 'Old Home', 'Starking Delicious', 'Reimer Red', 'Frontier', 'Kieffer'から の約350 bpの増幅断片,および,'Kieffer', 'Ayers', 'Pera d'Agua'の1,414 bp 断片, 'Frontier', 'Ayers', 'Pera d'Agua'の 998 bp はゲル抽出した後、直接、塩基配列を解析した.約 350 bp 断片のみが増幅 された'Roguered', 'Beurré Hardy', 'Royal Red Hardy', 'Nouveau Poiteau', 'Garbar', 'Saint Mathieu', 'Jargonelle', 'Fame'の8品種はゲル抽出した断片をTAクローニングに供し、各コロニーのイン サート DNA 配列を決定した.1kb を超える断片については、さらにプライマーウォーキングを 行ない、インサートの配列を決定した.

得られた断片の配列を推定 Sc-, Si-, Sm-, Sn-, So-, Sp-RNase 対立遺伝子および9種類のニホンナ シの S-RNase の塩基配列, S1 (accession no. AB14073), S2 (accession no. AB002139), S3 (accession no. AB025421), S4 (accession no. AB009385), S5 (accession no. AB045711), S6 (accession no. AB002142), S7 (accession no. AB002143), S8 (accession no. AB104908), S9 (accession no. AB104909) と照合させた. 'Old Home', 'Starking Delicious', 'Turnbull Giant'から増幅された 1,642 bp 断片は一 致する配列がなかったので新規 S-RNase 対立遺伝子と考えられた. 'Fondante de Charneu'の制限 酵素で切断されない約 1.3 kb 断片はニホンナシ S2-RNase の配列と一致した. 'Fame'の 372 bp 断 片はニホンナシ S4-RNase の配列と一致した. 'Rogured', 'Reimer Red', 'Beurré Hardy', 'Royal Red Hardy', 'Beurré d'Anjou', 'Moonglow', 'Red Anjou', 'Nouveau Poiteau', 'Ewart', 'Saint Mathieu'の 334 bp 断片は Sc-RNase 対立遺伝子と、'Beurré Giffard'、'Summert Doyenne'、'Beurré de l'Assomption'の 362 bp 断片は Si-RNase 対立遺伝子と、'Colorée de Juillet'、'Garbar'、'Chapin'、 'Jargonelle'の 350 bp 断片は Sm-RNase 対立遺伝子と、'Saint Mathieu'の 362 bp 断片は Sn-RNase 対 立遺伝子と、'Akça'の 338 bp 断片は Sp-RNase 対立遺伝子と一致した. 'Dana's Hovay'の 367 bp の 断片は一致する配列がなかったので、新規 S-RNase 対立遺伝子と考えられた. 'Frontier'の 376 bp の断片は Sd-RNase 対立遺伝子ではなく、ニホンナシ S5-RNase であることが明らかになった. 2 種類の新規 S-RNase 対立遺伝子が検出されたので、'Dana's Hovay'の 367 bp 断片を推定 Ss-RNase 対立遺伝子、'Old Home'、'Starking Delicious'、'Turnbull Giant'の 1,642 bp 断片を推定 St-RNase 対立 遺伝子と名付けた.

以上の結果から、2 種類の断片が増幅された 24 品種の S 遺伝子型を推定した (表 3-6). 'Beurré Hardy'の S 遺伝子型 ScSd は Zuccherelli ら (2002a)による推定と一致した. ニホンナシ S-RNase が増幅された'Fondante de Charneu'と'Fame'の遺伝子型をそれぞれ SIPpS2 と SrPpS4 と推定した. チュウゴクナシとの雑種品種では、'Garbar'の遺伝子型を ShSm と推定し、'Frontier'の遺伝子型を SePpS5 に修正した. また、'Kieffer'、'Ayers'、'Pera d'Agua'の推定遺伝子型は SISr, SeSI, SeSI である ことを確認した. (表 3-6).

3'および 5'RACE による完全長 cDNA のクローニング

Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Ss-, St-RNase の完全長塩基配列を決定するため,7種類の S-RNase 対立遺 伝子を持つ品種のうち,'Beurré Hardy'(ScSd),'Beurré de l'Assomption'(SiSD), 'Chapin'(SISm), 'Saint Mathieu'(ScSn), 'Akça'(SISp), 'Dana's Hovay'(SeSs), 'Starking Delicious'(SeSt)の7品種を選 び,花柱 total RNA を鋳型に3'RACE と5'RACE を行なった. それぞれの推定S遺伝子型に相当 する cDNA 断片が各品種からクローニングされた. 5'および3'末端側断片の配列を重複させ,7 種類の S-RNase cDNA 完全長塩基配列を決定した: Sc (accession no. AB258359), Si (accession no. AB258364), Sm (accession no. AB258362), Sn (accession no. AB258363), Sp (accession no. AB258364), Sm (accession no. AB258362), Sn (accession no. AB258363), Sp (accession no. AB258364), Ss (accession no. AB258365), St (accession no. AB258366). Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Ss-, St-RNase は678 ~687 bp からなり, 226~229 アミノ酸をコードしていた. 17種類のS-RNase, Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, Sn-, Sp-, Sq-, Sr-, Ss-, St-RNase 0推定アミノ酸配列の比較から, Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Ss-, St-RNase にも, 2 つのヒスチジン残基, 8 つのシステイン残基, シグナルペプチ ド,5 つの保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5), 1 つの HV 領域を有するナシ亜科 S-RNase に典型的な 構造が確認されたので,新たにクローニングした7種類の cDNA もセイヨウナシの S-RNase を

| SaSb Abbé fétal SeSI Ayers SaSc Roguered Délices d'Hardenpont SaSe Duchesse d'Angoulème Harrowst Queen Harrow Crisp Napoleon Harrow Delight Pera d'Agua Magness Rosined Rocha Seckel Tyson SeSm Colorée de Juillet Sess SaSg Charles Ernest SeS Triomphede Vienne Bon-Chretien d'Hiver SaSy Harrow Sweet Covert Koonce Pierre Tourasse SeSr Downed thiver SaSq Beané Charles SaSy Ageres Verdi SaSy Ageres Verdi SaSy Ageres Sess Jasse Burré Clairgeau Idaho SaSy Angelys Verdi SbSe Reimer Red SeSr Dana's Hovay SbSe Beuré Lubrum SeSr Old Home Cascade Starking Delicious Starking Delicious Gorham SgSr President Héron Hartman Conte de Lambertye Highland SgSr Satring Delicious SbSr Bouré d'Anjou SlSr Ankara <th>S遺伝子型</th> <th>品種</th> <th>S遺伝子型</th> <th>品種</th> | S遺伝子型 | 品種 | S遺伝子型 | 品種 |
|--|-------|--|--------|------------------------|
| SaSe Roguered Délices d'Hardenpont SaSe Duchesse d'Angouleme Harvest Queen Harrow Crisp Napoleon Harrow Crisp Pera d'Agua Magness Rosired Rocha SeSm Tyson SeSm Colaré Sexon Triomphede Vienne Bon-Chretien d'Hiver SaSg Charles Ernest SeSg Harrow Sweet Covert Koonce Pierre Cornelle Pierre Tourasse SeSr Doyenné d'hiver SaSg Reimer Red SeSs Dana's Hovay SbSe Reimer Red SeSr Dorenté d'hiver SbSe Beurré Clairgeau Idaho Idaho Gortam SgS7 Blickling Cortet de Lambertye Highland SgS7 President Héron Horay Howell ShSm Garbar SiSF SbSg Glou Morceau ShSm Chapin SbSr Beurré Jean Van Geert SiSF Sham Maria Honey Sweet SiSF Ankara Joséphine de Malines SiSm Chapin SbSr Condo SiSF Ankara Joséphine de Hady Emile d'Heyst <td>SaSb</td> <td>Abbé fétal</td> <td>SeSI</td> <td>Ayers</td> | SaSb | Abbé fétal | SeSI | Ayers |
| SaSe Duchesse d'Angouleme Harvest Queen Harrow Crisp Napoleon Harrow Delight Pera d'Agua Magness Rosired SoSe Rocha Tyson SeSm SoSg Charles Ernest Triomphede Vienne Bon-Chretien d'Hiver SoSg Charles Ernest SeSr Koonce Pierre Cornelle Pierre Tourasse SeSr SoSg Beurré Clairgeau Idaho SeSr SaSe Reimer Red SaSe Beurré Lubrum Cascade Sarking Delicious Gorham SgSr Hartowall ShSg Glou Morceau ShSg Howell ShSg Glou Morceau ShSg ShSg Glou Morceau ShSg Glou Morceau ShSg ShSg Glou Morceau ShSg ShSg Conte de Haines ShSg Condo ShSg Condo ShSg Condo ShSg Condo ShSg Condo ShSg Burré Jean Van Geert ShSg Condo ShSg Condo < | SaSc | Roguered | | Délices d'Hardenpont |
| Harrow CrispNapoleonHarrow DelightPera d'AguaMagnessRosiredRochaSeckelTysonSeXmColorée de JuilletSaSgCharles ErnestTriomphede VienneBon-Chretien d'HiverSaSlHarrow SweetKooncePierre TourasseSaSrAngelysVerdiSexsSaSrAngelysVerdiSexsSbSeReimer RedSaSrAngelysVerdiSexsSbSeReimer LairngeauGorhamSgSqHartmanConte de LambertyeHighlandSgSqHoney SweetShSmGarbamSkSfBeurré ClairgeauShSmGorhamSgSqHartmanConte de LambertyeHighlandSgSqHowellShSmGarbarSkSfSbSgGlou MorceauShSgGlou MorceauShSgChalleeJoséphine de MalinesSlSmChang RedSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSkSrTurubull GiantSkSrTurubull GiantSkSrSanta MariaMonglowSePpS5Frondarte de CharneuScSrSaitt MathieuScSrSaitt MathieuSkSrSaitt MathieuSkSrSaitt MathieuSkSrSaitt MathieuSkSrSaitt MathieuSkSrSaitt MathieuSkSrSaitt | SaSe | Duchesse d'Angouleme | | Harvest Queen |
| Harrow DelightPera d'AguaMagnessRosiredRochaSeckelTysonSeSmColorée de JuilletSaSgCharles ErnestTriomphede VienneBon-Chretien d'HiverSaSlHarrow SweetCovertKooncePierre CornellePierre TourasseSeSrDoyenné d'hiverIdahoSaSs/Beurré ClairgeauIdahoSaSs/Beurré ClairgeauIdahoSaSs/Reimer RedSeSsDatainSgStBeurré LubrumSeStCaccadeStarking DeliciousGordamSgStHartow ReetSickingHartowellShSmGarbarSgStHartowellShSmGoudonceauShSmGarbarSistHartowellShSmGarbarSistSbStGoudonceauShStCondoJoséphine de MalinesSistSbStTurnbull GiantSbStTurnbull GiantScStDordantScStBeurré HardyRoyal Red HardyKiefferScStNouveau PoiteauScStDoyanné d'hiveScStBeurré HardyRoyal Red HardySillerScStSaint MathieuScStSaint MathieuScStBeurré HardyScStSaint MathieuScStSaint MathieuScStSaint MathieuScStBeurré BeactingScStB | | Harrow Crisp | | Napoleon |
| MagnessRosiredRochaSeckelTysonSeckelSaSgCharles ErnestSeckelSaSiCharles ErnestSeckelSaSiHarrow SweetCovertKooncePierre CornellePierre TourasseSeckSaSiBeurré ClairgeauIdahoSaSiReimer RedSeckelSbSeReimer RedSeckiSbSeReimer RedSeckiGorhamSgSiBicklingHartmanSeckiHartmanSeckiHartmanShSgGlou MorceauShSgGlou MorceauShSgGlou MorceauShSgJoséphine de MalinesSlSsiSbSrCondoCanal RedSkSiJoséphine de MalinesSlSsiSbSiTurnbull GiantSbSiTurnbull GiantScSiBeurré de TangeScSiBeurré HardyKiefferSeckiScSiBeurré HardyKiefferScSiScSiBeurré HardyKiefferScSiScSiBeurré HardyScSiCondoScSiBeurré HardyKiefferScSiScSiSaint MathieuScSiSaint MathieuScSiSaint MathieuScSiSaint MathieuScSiSaint MathieuScSiBeurré HardyKiefferBeurré Beuré BoscDrivierie de ScresDurondeauScSiSaint Mathieu< | | Harrow Delight | | Pera d'Agua |
| RochaSeckelTysonSeSmColorée de JuilletSaSgCharles ErnestSeSgBesi de Saint-WaastTriomphede VienneBon-Chretin d'HiverSaSlHarrow SweetCovertKooncePierre TourasseSeSrDoyenné d'hiverIdahoSaSyBeurré ClairgeauIdahoSaSyBeurré ClairgeauIdahoSaSyBeurré ClairgeauIdahoSaSyAngelysVerdiSbSeBeurré LubrumSeStOld HomeCascadeCascadeSarking DeliciousGorhamSgSqHartmanComte de LambertyeHighlandSgSqHowellShSmGauré Jean Van GeertSISISbSrCondoCanal RedSISrAnd RedSISrAndrainsteSISrSbSrCondoSbSrCondoSbSrCondoSbSrCondoSbSrTurnbull GiantScSrBeurré d'AnjouScSrBeurré d'AnjouScSrBeurré d'AnjouScSrSaint MathieuScSrBeurré d'AnjouScSrBeurré Beurré d'AnjouScSrSaint MathieuScSrSaint GriftScSrBeurré BerresDroveau PoiteauSrP, SSScSrSaint MathieuScSrBeurré BerresDroveau PoiteauSrSrScSrBeurré BerresDroveau PoiteauSrSr <td></td> <td>Magness</td> <td></td> <td>Rosired</td> | | Magness | | Rosired |
| TysonSeSmColorée de JuilletSaSgCharles ErnestSeSqBesi de Saint-WaastTriomphede VienneBon-Chretien d'HiverSaSlHarrow SweetCovertKooncePierre CornellePierre TourasseSeSrDoyenné d'hiverSaSqBeurré ClairgeauIdahoSaSrAngelysVerdiSbSeReimer RedSeSsOd HomeCascadeStarking DeliciousGorhamSgSlBlicklingConte de LambertyeHighlandHighlandSgSqPresident HéronHowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSmGala RedSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSlSmCondoSlSpAkcçaUrbanisteSlSgBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystKeifferScSsdCondaScSdBeurré HardyKiefferScSdBeurré HardyKiefferScSdBeurré HardyKiefferScSdBeurré HardyKiefferScSdBeurré AnjouSlSpScSdBeurré MatouScSpScSdBeurré HardyKiefferScSdBeurré MatouScSpScShNouveau PoiteauSrPp52ScShNouveau PoiteauSrPp52ScShNouveau PoiteauSrPp54ScShSaint MathieuGestyScShBeurré BoscDurondeauScShBeurré Bosc <td></td> <td>Rocha</td> <td></td> <td>Seckel</td> | | Rocha | | Seckel |
| SaSg Charles Ernest Triomphede Vienne SeSq Besi de Saint-Waast Bon-Chretien d'Hiver SaSI Harrow Sweet Covert Bon-Chretien d'Hiver SaSI Harrow Sweet SeSr Doyenné d'hiver Jabo Jabo Jabo Jabo SaSG Beuré Clairgeau Idaho Jabo SaSr Angelys Verdi Jabo SbSc Reimer Red SeSr Dana's Hovay SbSc Beuré Lubrum SeSt Old Home Cascade Starking Delicious Conte de Lambertye Highland SgSg President Héron Howell ShSm Garbar SbSg Glou Morceau ShSg Beurré de l'Assomption Canal Red SkSr Ankara Joséphine de Malines SlSm Chapin SbSr Turnbull Giant SlSr Bristol Cross ScSd Beurré d'Anjou SlSr Bristol Cross ScSd Beurré d'Anjou SlSr Condo SbSr Turnbull Giant SlSr Conde Chantre ScSdr | | Tyson | SeSm | Colorée de Juillet |
| Triomphede VienneBon-Chretien d'HiverSaS/Harrow SweetCovertKooncePierre CornellePierre TourasseSeSrDoyenné d'hiverIdahoSaSqBeuré ClairgeauIdahoSaSrAngelysVerdiSbScReimer RedSeSsDavardSeStOld HomeCascadeCascadeStarking DeliciousGorhamSgS/HighlandSgSgHowellShSmGalou MorceauShSmGalou MorceauShSfBeurré Jean Van GeertSiS/Canal RedSkSrAnney SweetSkSrJoséphine de MalinesSiS/Joséphine de MalinesSiS/SbSrCondoCondoSiSpAkçaUrbanisteSoS/Beurré HardyRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouScSrSaitt MathieuScSrSaitt MathieuScSrSaitt MathieuScSrSaitt MathieuScSrSaitt MathieuScSrSaitt MathieuScSrSaitt MathieuScSrSaitt MathieuScSrBeurré SuperfinBeurré BoseDurondeauScSrBeurré SuperfinBeurré BoseDurondeauScSrBeurré SuperfinBeurré BoseDurondeauScSrBeurré SuperfinBeurré BoseDurondeauScSrBeurré SuperfinBeurré Bose <td>SaSg</td> <td>Charles Ernest</td> <td>SeSq</td> <td>Besi de Saint-Waast</td> | SaSg | Charles Ernest | SeSq | Besi de Saint-Waast |
| SaSI Harrow Sweet Covert Koonce Pierre Cornelle Pierre Tourasse SeSr Doyenné d'hiver SaSg Beurré Clairgeau Idaho SbSc Reimer Red SeSr Dana's Hovay SbSe Beurré Lubrum SeSt Old Home Cascade Starking Delicious Gorham SgSI Gorham SgSI Blickling Gorham Highland SgSq President Héron Howell ShSm Garbar SbSg Glou Morceau ShSr SbSg Glou Morceau ShSr Joséphine de Malines ShSr Canal Red Joséphine de Malines ShSr Chapin SbSr Condo ShSr Bristol Cross ScSd Beuré d'Anjou ShSr Conte de Flandre Moonglow SePpS5 Frontier Red Anjou ScSr Beuré d'Anjou ShSr Beuré Charneu ScSr Saint Mathieu (SeSr) Conte de Lambertye Moonglow SePpS5 Frontier Red Anjo | | Triomphede Vienne | | Bon-Chretien d'Hiver |
| KooncePierre CornellePierre TourasseSeSrDoyenné d'hiverSaSqBeurré ClairgeauIdahoSaSrAngelysVerdiSbScReimer RedSeSsDana's HovaySbSeBeurré LubrumSeStOld HomeCascadeStarking DeliciousGorhamSgSqBlicklingHartmanComte de LambertyeHighlandSgSqPresident HéronHowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSlBeurré Jean Van GeertSiSfBeurré de l'AssomptionCanal RedSkSrSantaraJoséphine de MalinesJoséphine de MalinesSlSpAkçaUrbanisteSlSqOvidSbSrCondoSlSpAkçaUrbanisteSlSsComte de FlandreKooglaced HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSlSsComte de HardyKiefferScShNouveau PoiteauSrPpS5ScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClara FrijsSdSeBeurré SuperfinBeurré DunontScSnSaint Mathieu(SeSx)Beurré BedrordScShWinter Cole(SlSs)Beurré BedrordScShWinter Cole(SlSs)Early SeckelScSnSaint Mathieu(SeSx)Early SeckelScSnSaint Mathieu(SeSx)Early SeckelScShWinter Cole(SlSs)Early Seckel <t< td=""><td>SaSl</td><td>Harrow Sweet</td><td></td><td>Covert</td></t<> | SaSl | Harrow Sweet | | Covert |
| Pierre TourasseSeSrDoyenné d'hiverSaSqBeurré ClairgeauIdahoSaSrAngelysVerdiSbScReimer RedSeSsDana's HovaySbSeBeurré LubrumSeStOld HomeCascadeStarking DeliciousGorhamSgS7BlicklingHartmanComte de LambertyeHighlandSgSqPresident HéronHowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSrBeurré Jean Van GeertSiS1Beurré de l'AssomptionCanal RedSkS7Santa MariaHoney SweetSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSlSpAkçaUrbanisteSlSpAkçaUrbanisteSlSrBeurré HardyRoyal Red HardyEmile d'HeystKefferScSeBeurré d'AnjouScSrSaint Mathieu(SeSrScSrSaint Mathieu(SeSrScSrSaint Mathieu(SeSrScSrSaint Mathieu(SeSrScSrBeurré SurderfinBeurré BedfordScSrBeurré SurderfinBeurré BedfordScSrSaint Mathieu(SeSrClara FrijsSdSrBeurré BedfordScSrBeurré SurderfinBeurré BedfordScSrBeurré SerresDurondeauScSrBeurré SurderfinBeurré BedfordScSrBeurré SerresDurondeauScSr <t< td=""><td></td><td>Koonce</td><td></td><td>Pierre Cornelle</td></t<> | | Koonce | | Pierre Cornelle |
| SaSqBeurré ClairgeauIdahoSaSrAngelysVerdiSbScReimer RedSeSsDana's HovaySbScBeurré LubrumSeStOld HomeCascadeStarking DeliciousGorhamSgSlGorhamSgSlBlicklingHartmanComte de LambertyeHighlandSgSqPresident HéronHowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSgFertilitySbSgGlou MorceauShSrBeurré de l'AssomptionCanal RedSkSrAntaraHoney SweetSkSrAntaraJoséphine de MalinesSlSgOvidSbSrCondoSlSgOvidSbSrTurnbull GiantSlSrBristol CrossScSeBeurré d'AnjouSlSsComte de FlandreMoonglowSePSSFrontierRed AnjouSlSsConde de FlandreScShNouveau PoiteauSrPSSFrontierScShSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsScShSim Mathieu(SeSx)Clara FrijsScShSim Mathieu(SeSx)Beurré DumontScShWinter Cole(SlSx)Beurré BedfordScShWinter Cole(SlSx)Beurré BedfordScSkFondante ThirriotPackan's TriumphWarie LouiseScSkFondante ThirriotPackan's TriumphSaint Germain | | Pierre Tourasse | SeSr | Doyenné d'hiver |
| SaSrAngelysVerdiSbScReimer RedSeSsDana's HovaySbSeBeurré LubrumSeStOld HomeCascadeStarking DeliciousGorhamSgStBlicklingHartmanComte de LambertyeHighlandSgSqPresident HéronHowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSgFertilitySbSgGlou MorceauShSgFertilitySbStBeurré Jean Van GeertStStBeurré de l'AssomptionCanal RedSkSrAnkaraHoney SweetStSrAnkaraJoséphine de MalinesSlSpAkçaUrbanisteSlSqOvidSbStTurnbull GiantSlSrDristol CrossScSdBeurré d'AnjouSlSsComte de FlandreMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSlPS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScShNouveau PoiteauSrPs4FameScShNouveau PoiteauSrPs4FameScShNouveau PoiteauSrPs4FameScShNouveau PoiteauSrPs4FameScShWinter Cole(SlSx)Beurré DumontSdStDoyenné Gris(SrSx)Beurré BoscOriviier de SerresDurondeauSerSkSeSkFondante ThirriotMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's Triumph <td>SaSq</td> <td>Beurré Clairgeau</td> <td></td> <td>Idaho</td> | SaSq | Beurré Clairgeau | | Idaho |
| SbSc Reimer Red SeSs Dana's Hovay SbSe Beurré Lubrum SeSt Old Home Cascade Starking Delicious Starking Delicious Gorham SgSt Blickling Hartman Comte de Lambertye Highland SgSq President Héron Howell ShSm Garbar SbSg Glou Morceau ShSg Fertility SbSl Beurré Jean Van Geert StSt Beurré de l'Assomption Canal Red SkSr Santa Maria Honey Sweet SkSr Shara Joséphine de Malines SlSm Chapin SbSr Condo SlSr Bristol Cross ScSd Beurré Hardy Kieffer Kieffer ScSde Beurré d'Anjou SlSs Comte de Flandre Moonglow SePpS5 Frontier Red Anjou SlPS2 ScSh Nouveau Poiteau SrPS4 Fame ScSh Nouveau Poiteau SrPS4 Fame ScSh Nouveau Poiteau SrPS4 Fame ScSh <td>SaSr</td> <td>Angelys</td> <td></td> <td>Verdi</td> | SaSr | Angelys | | Verdi |
| SbSe Beuré Lubrum SeSt Old Home Cascade Starking Delicious Starking Delicious Gorham SgSl Blickling Hartman Cornte de Lambertye Highland SgSq President Héron Howell ShSm Garbar SbSg Glou Morceau ShSm Garbar SbSl Beurré Jean Van Geert SiSl Beurré de l'Assomption Canal Red SkSr Santa Maria Honey Sweet SkSr Ankara Joséphine de Malines SISp Akça Urbaniste SlSq Ovid SbSr Condo SlSp Akça Urbaniste SlSg Ovid Starking Delixite ScSd Beurré d'Anjou SlSs Cornet de Flandre Moonglow SePpS5 Frontier Red Anjou ScSh Nouveau Poiteau SrPpS4 Fame ScSh Nouveau Poiteau SrPpS4 Fame ScSh Doyenné Gris (ShSx) Beurré Dumont SdSe Clara Frijs SdSe | SbSc | Reimer Red | SeSs | Dana's Hovay |
| CascadeStarking DeliciousGorhamSgSIBlicklingHartmanComte de LambertyeHighlandSgSqPresident HéronHowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSrBeurré Jean Van GeertSkSBurré de l'AssomptionCanal RedSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSlSpAkçaUrbanisteSlSqOvidSbSrCondoSlSpAkçaUrbanisteSlSqOvidSbStTurnbull GiantSlSrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSlSsComte de FlandreMoonglowScShNouveau PoiteauSrPpS5ScShSaint Mathieu(SeSx)Clarp's Favorite(SgSx)Beurré Dyené GrisShSx)Beurré BedfordBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauScShWinter Cole(SlSx)Beurré BedfordSeSiSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWathertonHardyKathertonSaint Germain | SbSe | Beurré Lubrum | SeSt | Old Home |
| GorhamSgS1BlicklingHartmanComte de LambertyeHighlandSgSqPresident HéronHowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSqFertilitySbS1Beurré Jean Van GeertSiS1Beurré de l'AssomptionCanal RedSkStSanta MariaHoney SweetSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSISmChapinSbSrCondoSISpAkçaUrbanisteSISqOvidSbStTurnbull GiantSISrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSISsMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSIPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4ScShSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's FavoriteScShSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeBeurré GiffardSeSfBeurré GiffardDurondeauSeSfBeurré GiffardMarie LouiseSeSfBeurré GiffardMarie LouiseSeSkFondante ThirriotPackard's TriumphWater Cole(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackard's TriumphWater Doyenne(SrSx)Saint Germain | | Cascade | | Starking Delicious |
| HartmanComte de LambertyeHighlandSgSqPresident HéronHowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSmGarbarSbSgBeurré Jean Van GeertSiSIBeurré de l'AssomptionCanal RedSkSlSanta MariaHoney SweetSkSrAntaraJoséphine de MalinesSlSpAkçaJoséphine de MalinesSlSpAkçaUrbanisteSlSgOvidSbStTurnbull GiantSlSpAkçaRoyal Red HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSlSsComte de FlandreMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSlPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScShSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClap's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSfDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BedfordSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSeSkFondante ThirriotPackard's TriumphWarth EnvironHart ThirriotPackard's TriumphWarth EnvironKirskySaint Germain | | Gorham | SgSl | Blickling |
| Highland $SgSq$ President HéronHowell $ShSm$ Garbar $SbSg$ Glou Morceau $ShSq$ Fertility $SbSl$ Beurré Jean Van Geert $SiSl$ Beurré de l'Assomption $Canal Red$ $SkSl$ Santa MariaHoney Sweet $SkSr$ AnkaraJoséphine de Malines $SlSp$ AhkaraJoséphine de Malines $SlSp$ AkçaUrbaniste $SlSp$ AkçaUrbaniste $SlSq$ OvidSbSrCondo $SlSr$ Bristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'Anjou $SlSs$ Complow $SePpS5$ FrontierRed Anjou $SlPpS2$ Fondante de CharneuScShNouveau Poiteau $SrPpS4$ ScShSaint Mathieu $(SeSx)$ Clara FrijsSdSeClarp's Favorite $(SgSx)$ Beurré DumontScShWinter Cole $(SlSx)$ Early SeckelSeShWinter Cole $(SlSx)$ Early SeckelSeShWinter Cole $(SlSx)$ Early SeckelSeShWinter Cole $(SlSx)$ Early SeckelSeShBeurré Giffard Marie LouiseMarie LouiseSummer Doyenne $(SrSx)$ Saint GermainSeSkFondante Thirriot Packam's Triumph WashingtonSaint Germain | | Hartman | | Comte de Lambertye |
| HowellShSmGarbarSbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSlBeurré Jean Van GeertSiSlBeurré de l'AssomptionCanal RedSkSlSanta MariaHoney SweetSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSISmChapinSbSrCondoSISpAkçaUrbanisteSISqOvidSbStTurnbull GiantSISrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSISsMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSIPPS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4ScShSaint Mathieu(SaSx)LincolnSeSgBeurré DumontScSpSaint Mathieu(SfSx)Beurré Beurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SISx)SeShWinter Cole(SISx)SeShFordante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWinshingtonKirfardMarine LouiseSummer DoyenneSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashington | | Highland | SgSq | President Héron |
| SbSgGlou MorceauShSqFertilitySbSlBeurré Jean Van GeertSiSlBeurré de l'AssomptionCanal RedSkSlSanta MariaHoney SweetSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSlSmChapinSbSrCondoSlSpAkçaUrbanisteSlSqOvidSbStTurnbull GiantSlSrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSlSsMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSlPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4ScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré DumontSeSgBeurré SuperfinBeurré BedfordSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackan's TriumphWashingtonKingtonSaint Germain | | Howell | ShSm | Garbar |
| SbS1Beurré Jean Van GeertSiS1Beurré de l'AssomptionCanal RedSkS1Santa MariaHoney SweetSkS1Santa MariaJoséphine de MalinesSISmChapinSbSrCondoSISpAkçaUrbanisteSISqOvidSbStTurnbull GiantSISrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSISsComplowSePpS5FrontierRed AnjouSIPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscDurondeauSeShWinter Cole(SISx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWathingtonSir SrittSaint Germain | SbSg | Glou Morceau | ShSq | Fertility |
| Canal RedSkSlSanta MariaHoney SweetSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSlSmChapinSbSrCondoSlSpAkçaUrbanisteSlSqOvidSbStTurnbull GiantSlSrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSlSsComb oglowSePpS5FrontierRed AnjouSlPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4ScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeShFondante ThirriotPackam's TriumphWashinortonShranSaint Germain | SbSl | Beurré Jean Van Geert | SiSl | Beurré de l'Assomption |
| Honey SweetSkSrAnkaraJoséphine de MalinesSISmChapinSbSrCondoSISpAkçaUrbanisteSISqOvidSbStTurnbull GiantSISrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSISsMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSIPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SISx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSeSkFondante ThirriotFackam's TriumphWashinotonSrSx)Saint Germain | | Canal Red | SkSl | Santa Maria |
| Joséphine de MalinesSISmChapinSbSrCondoSISpAkçaUrbanisteSISqOvidSbStTurnbull GiantSISrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSISsComte de FlandreMoonglowMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSIPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSnSaint Mathieu(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SISx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSeSkFondante ThirriotFackam's TriumphWashingtonSaint GermainSaint Germain | | Honey Sweet | SkSr | Ankara |
| SbSrCondoSlSpAkçaUrbanisteSlSqOvidSbStTurnbull GiantSlSrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSlSsComte de FlandreMoonglowMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouScShNouveau PoiteauScShNouveau PoiteauScShSaint MathieuScSnSaint MathieuScSnSaint MathieuSdSeClapp's FavoriteScSgBeurré SuperfinOriviier de SerresDurondeauSeShWinter ColeSeShWinter ColeSeSiBeurré GiffardSummer Doyenne(SrSx)Saint GriffardSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashington | | Joséphine de Malines | SISm | Chapin |
| UrbanisteSISqOvidSbStTurnbull GiantSISrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSISsMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSIPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscDurondeauSeShWinter Cole(SISx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSeSkFondante ThirriotFackam's TriumphWashingtonSet SriumphWashington | SbSr | Condo | SlSp | Akça |
| SbStTurnbull GiantSISrBristol CrossScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSISsMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSIPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScShSaint Mathieu(SeSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscDurondeauSeShWinter Cole(SISx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonMarie Louise | | Urbaniste | SISq | Ovid |
| ScSdBeurré HardyEmile d'HeystRoyal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSlSsComte de FlandreMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSlPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonStriumphSaint Germain | SbSt | Turnbull Giant | SISr | Bristol Cross |
| Royal Red HardyKiefferScSeBeurré d'AnjouSlSsComte de FlandreMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSlPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonSaint Germain | ScSd | Beurré Hardy | | Emile d'Heyst |
| ScSeBeurré d'AnjouSlSsComte de FlandreMoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSlPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonSite Site Site Site Site Site Site Site | | Royal Red Hardy | | Kieffer |
| MoonglowSePpS5FrontierRed AnjouSIPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonSeington | ScSe | Beurré d'Anjou | SISs | Comte de Flandre |
| Red AnjouSIPpS2Fondante de CharneuScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonKashington | | Moonglow | SePpS5 | Frontier |
| ScShNouveau PoiteauSrPpS4FameScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonKashington | | Red Anjou | SIPpS2 | Fondante de Charneu |
| ScSlEwart(SaSx)LincolnScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonKashington | ScSh | Nouveau Poiteau | SrPpS4 | Fame |
| ScSnSaint Mathieu(SeSx)Clara FrijsSdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonKashington | ScSl | Ewart | (SaSx) | Lincoln |
| SdSeClapp's Favorite(SgSx)Beurré DumontSdSlDoyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonKaington | ScSn | Saint Mathieu | (SeSx) | Clara Frijs |
| SdS1Doyenné Gris(ShSx)Beurré BedfordSeSgBeurré SuperfinBeurré BoscOriviier de SerresDurondeauSeShWinter Cole(SlSx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonKaington | SdSe | Clapp's Favorite | (SgSx) | Beurré Dumont |
| SeSgBeurré Superfin Oriviier de SerresBeurré Bosc DurondeauSeShWinter Cole(S/Sx)Early SeckelSeSiBeurré Giffard Summer DoyenneMarie LouiseSeSkFondante Thirriot Packam's Triumph WashingtonSecken | SdSl | Doyenné Gris | (ShSx) | Beurré Bedford |
| Oriviier de Serres Durondeau SeSh Winter Cole (SISx) Early Seckel SeSi Beurré Giffard Marie Louise Summer Doyenne (SrSx) Saint Germain SeSk Fondante Thirriot Packam's Triumph Washington Washington Section 1000000000000000000000000000000000000 | SeSg | Beurré Superfin | | Beurré Bosc |
| SeShWinter Cole(S/Sx)Early SeckelSeSiBeurré GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonWashington | | Oriviier de Serres | | Durondeau |
| SeSiBeurre GiffardMarie LouiseSummer Doyenne(SrSx)Saint GermainSeSkFondante ThirriotPackam's TriumphWashingtonWashingtonWashington | SeSh | Winter Cole | (SlSx) | Early Seckel |
| Summer Doyenne (SrSx) Saint Germain SeSk Fondante Thirriot Packam's Triumph Washington | SeSi | Beurre Gittard | (6.6.) | Marie Louise |
| Packam's Triumph Washington | C-C1- | Summer Doyenne | (SrSx) | Saint Germain |
| Fachain's filmipin Washington | Sesk | roikiante i miniot Dackam's Triumph | | |
| | | Washington | | |

表3-6 ゲノミックPCR断片の塩基配列解析による二倍体93品種のS遺伝子型

Pp: ニホンナシ (P. pyrifolia)からクローニングされたS-RNase対立遺伝子 Sx-RNase cDNAがクローニングされた品種のS遺伝子型を()書きで記載した. コードすると考えた (図 3-2). 17 種類の S-RNase のアミノ酸レベルの相同性は 61.1% (SI-と Sm-RNase 間)~93.0% (SI-と St-RNase 間)であり (塩基レベルでは 74.9~95.2%), ニホンナシ (56.7~94.6%)やリンゴ (60.7~93.9%)と同程度であった (表 3-7). このうち, Si-RNase と Sn-RNase は 92.1%の相同性であったが, HV 領域の推定アミノ酸配列が同じであった (図 3-3). S-RNase の対立遺伝子特異性には HV 領域のアミノ酸配列が関与しているとされており, リン ゴやニホンナシの S-RNase は HV 領域の推定アミノ酸配列がそれぞれ異なっている (Sassa et al. 1996; Ishimizu et al. 1998). しかし, セイヨウナシの Si-RNase と Sn-RNase は Si を持つ花粉に対し て異なる対立遺伝子特異性を示すことが報告されている (Zisovich et al. 2004b). その他の 15 種 類の S-RNase の HV 領域は異なる配列を有していたので 17 種類の S-RNase は異なる認識特異 性を持つと考えた.

プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミックPCR により1種類の断 片しか増幅されなかった9品種, 'Beurré Bedford', 'Beurré Bosc', 'Beurré Dumont', 'Clara Frijs', 'Durondeau', 'Early Seckel', 'Lincoln', 'Marie Louise', 'Saint Germain'から新規 S-RNase 対立遺伝子 をクローニングするため, これら品種の花柱 total RNA を鋳型に用いて3'RACE を行なった. 各 品種からは CAPS マーカーシステムで識別された S-RNase 対立遺伝子と同じ配列を持つ cDNA 断片に加えて,9品種すべてから同一の配列を有する cDNA 断片がクローニングされた. そこで, 5'RACE を行ない,5'および 3'末端側断片配列を重複させ, cDNA 完全長塩基配列を決定した. 681 bp からなるこの cDNA は227 アミノ酸をコードし,推定アミノ酸配列にはナシ亜科 S-RNase に典型的な一次構造が確認された. 第2章でクローニングされた 10種類の S-RNase や Sc-, Si-, Sm-, Sn-, So-, Sp-, Ss-, St-RNase ともニホンナシの9種類の S-RNase とも一致せず,新規 S-RNase 対立遺伝子の可能性が考えられたので, Sx-RNase と名付けた.9 品種の S 遺伝子型を'Bedford' (ShSx), 'Beurré Bosc' (ShSx), 'Beurré Dumont' (SgSx), 'Clara Frijs' (SeSx), 'Durondeau' (ShSx), 'Early Seckel' (SlSx), 'Lincoln' (SbSx), 'Marie Louise' (SlSx), 'Saint Germain' (SrSx)と推定した.

17 種類の S-RNase 対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステムの開発

プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミック PCR では *Sx-RNase* 対 立遺伝子は増幅されない (図 3-1). *Sx-RNase* の塩基配列には, リバースプライマー 'EP-anti-IIWPNV'との間に1塩基の違いが見出された. そこで, *Sx-RNase* 特異的なリバースプラ イマー'EPSx-anti-IIWPNV' (5'-TACGTTCGGCCAAATTAT-3')を設計し, プライマーセット 'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'用いて再度ゲノミック PCR を行なったが, *Sx-RNase* 対立遺伝

| | Sa | Sb | Sb′ | Sc | Sd | Se | Sg | Sh | Si | Sk | SI | Sm | Sn | Sp | Sq | Sr | Ss | St | Su |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Sa | | 66.1 | 66.1 | 69.7 | 69.3 | 65.1 | 69.3 | 67.1 | 69.7 | 68.9 | 62.9 | 64.0 | 70.2 | 69.6 | 67.1 | 70.6 | 68.4 | 63.9 | 63.6 |
| Sb | 79.5 | | 99.1 | 66.1 | 67.7 | 64.6 | 64.6 | 67.7 | 67.3 | 71.8 | 61.8 | 63.0 | 68.1 | 67.3 | 67.0 | 63.9 | 66.4 | 64.9 | 61.9 |
| Sc | 83.7 | 79.6 | 77.9 | | 66.4 | 67.2 | 66.7 | 65.4 | 65.8 | 73.7 | 66.4 | 64.5 | 67.1 | 65.8 | 71.5 | 67.5 | 65.1 | 67.8 | 61.0 |
| Sd | 81.7 | 81.0 | 78.5 | 81.4 | | 67.0 | 68.1 | 68.1 | 69.7 | 69.0 | 62.2 | 65.1 | 73.1 | 70.6 | 65.5 | 68.6 | 85.5 | 65.1 | 62.0 |
| Se | 78.8 | 77.8 | 78.6 | 80.3 | 78.0 | | 65.1 | 65.1 | 64.7 | 67.7 | 78.4 | 65.9 | 66.8 | 64.7 | 64.2 | 65.5 | 67.8 | 81.5 | 62.1 |
| Sg | 82.0 | 78.9 | 76.9 | 81.3 | 81.0 | 79.0 | | 69.7 | 67.5 | 70.2 | 63.3 | 68.4 | 68.9 | 67.5 | 67.5 | 84.2 | 68.1 | 64.8 | 62.7 |
| Sh | 81.4 | 81.2 | 78.8 | 80.9 | 81.2 | 80.3 | 81.6 | | 69.7 | 66.2 | 64.2 | 64.9 | 69.7 | 71.9 | 63.6 | 67.5 | 64.6 | 66.5 | 74.0 |
| Si | 83.7 | 81.2 | 77.9 | 81.7 | 83.6 | 78.2 | 81.4 | 81.4 | | 68.0 | 62.9 | 64.0 | 92.1 | 91.2 | 66.2 | 80.3 | 69.7 | 63.9 | 65.8 |
| Sk | 82.9 | 81.6 | 78.9 | 84.3 | 80.9 | 79.0 | 81.4 | 80.0 | 81.6 | | 68.6 | 69.3 | 69.3 | 68.4 | 89.5 | 70.2 | 68.6 | 71.3 | 62.7 |
| SI | 77.2 | 76.3 | 75.8 | 79.3 | 76.6 | 87.0 | 77.2 | 78.0 | 77.2 | 78.2 | | 61.1 | 64.2 | 64.6 | 65.5 | 65.1 | 63.0 | 93.0 | 60.3 |
| Sm | 81.7 | 77.7 | 76.4 | 80.4 | 80.3 | 79.4 | 82.3 | 80.7 | 81.0 | 81.0 | 77.8 | | 66.7 | 64.5 | 66.2 | 67.1 | 63.3 | 64.3 | 61.0 |
| Sn | 80.7 | 78.3 | 81.2 | 78.6 | 81.6 | 78.8 | 78.9 | 79.0 | 91.5 | 79.0 | 75.8 | 78.6 | | 89.4 | 68.0 | 80.3 | 71.5 | 66.4 | 65.4 |
| Sp | 80.7 | 79.2 | 81.4 | 79.7 | 81.0 | 79.5 | 78.5 | 80.5 | 91.6 | 79.3 | 74.9 | 79.4 | 93.3 | | 65.8 | 79.8 | 70.2 | 64.8 | 67.5 |
| Sq | 82.6 | 80.2 | 78.0 | 83.7 | 80.3 | 78.2 | 81.0 | 79.6 | 80.7 | 95.2 | 77.6 | 79.7 | 78.8 | 78.5 | | 65.4 | 65.5 | 68.3 | 61.8 |
| Sr | 83.9 | 80.5 | 78.6 | 83.6 | 83.1 | 79.7 | 91.5 | 82.4 | 88.5 | 82.4 | 79.0 | 83.1 | 86.3 | 86.3 | 81.3 | | 68.1 | 64.8 | 62.3 |
| Ss | 81.7 | 80.0 | 78.9 | 81.2 | 91.2 | 78.8 | 80.3 | 79.5 | 83.3 | 80.6 | 77.2 | 80.0 | 80.3 | 80.4 | 79.9 | 82.6 | | 65.2 | 59.8 |
| St | 77.5 | 77.2 | 77.0 | 79.5 | 77.6 | 86.7 | 77.3 | 78.5 | 76.3 | 78.7 | 94.2 | 77.7 | 77.1 | 76.1 | 78.2 | 78.5 | 77.7 | | 62.2 |
| Su | 78.0 | 77.1 | 75.3 | 77.1 | 78.5 | 76.8 | 77.1 | 84.0 | 79.0 | 76.2 | 75.6 | 77.1 | 77.8 | 79.0 | 76.1 | 78.2 | 77.3 | 76.9 | |

表3-7 18種類のセイヨウナシS-RNaseの推定アミノ酸配列およびcDNA配列の相同性(%)

上段: 推定アミノ酸配列間の相同性, 下段: 塩基配列間の相同性, どちらも最高値を赤字で, 最低値を青字で示した. 17種類のS-RNaseは下記の accession numberでDDBJに登録されている: Sa-RNase (AB236430), Sb-RNase (AB236429), Sc-RNase (AB258359), Sd-RNase (AB236427), Se-RNase (AB236428), Sg-RNase (AB258360), Sh-RNase (AB236431), Si-RNase (AB258364), Sk-RNase (AB236432), Sl-RNase (AB236425), Sm-RNase (AB258362), Sn-RNase (AB258363), Sp-RNase (AB258364), Sq-RNase (AB236424), Sr-RNase (AB236426), Ss-RNase (AB258365), St-RNase (AB258366). Su-RNase (AB25860). Su-RNa

| | | * | * | # | * | | | | |
|----------|--|-------------------------------|------------|---|-------------------------------|----------------|-------------------------|-----------|-----|
| Sa-RNase | MGITGIIYMVTMVFLLTVLTLPSPTVG | YDYFOF TOOYOLAVCHFNP | TPCKDPPDKL | FTVHGLWPSNST | GNDPMYCKNTTLN | STKIAN-LT | AOLEIIWPNVLDRTDH | ITEWNKO | 112 |
| Sh-RNase | MG-TGMT YMVMMVFSLTVLTLSSSTVG | FDYYOFTOOYOPAVCNSNP | TPCKDPPDKL | FTVHGLWPSDSN | GNDPKYCKAPP- | -OTMKI-LE | PHLVI IWPNVLNRNDH | EVEWRKO | 109 |
| SC-RNASP | MGTTGMTYMVPTVFSLTVLTLSSSA | AKYDYFOFTOOYOPAVCNSNP | TPCSDPTDKL | FTVHGLWPSKSS | GROPKRCSKTPVC | SOTITN-LE | AOLETTWPNVLNRANN | TTEWETO | 112 |
| Sd-RNase | MONTONT VMFTMUEST, TVL TLSSSTUG | VDVFOFTOOYOPAVCNSNP | TPCNDRPEKL | FTVHGLWPSNKK | GPDPEKCKNTOM | SOKTGN-MA | AOLETTWPNVLNRTDH | VGEWERE | 112 |
| So-PNaco | MOTTOMITYMATCH THE SECTION | VOVEOFTOOVODAACNEND | TOCKDOTEKT | FTVHCT WDSNSN | CEDEVNCKEKTKI | POROPTOPST | POLETTWPNUENPADN | FSEWNKO | 116 |
| Se-ANase | MOTTOMT VM/MM/PET TVL TI SEC/10/2 | FOVEDETHOYOPAUCUSNE | TPOKOPPONT | FTUHCI WDCNDN | CDDDEVCKNTTT. | WTKTCN-TC | AOL DT TWPNUVDPTNN | UCHWEKO | 112 |
| Sy-Mase | MOTIONI INVENUE OLIVBIDOODIVO | FOTFOFTOOVODAACNEND | TPOKDPTOKL | PIRILAT MDCNY T | CODPEVENTD | DDVDAVVI | POT ET TUDNUT DETNU | TOFHORO | 111 |
| Si-RNase | MGI IGHI INVINUESI INVI TI CCCMUC | VOVEDETOOVODAUCDEND | TPOKOPTOKL | FIVIGLAFONKI | CONDENCENT TO | ICHDTVN_T(| AOT KT THIDNUT DRIVIN | TCHMNKQ | 112 |
| SI-RNase | MGIIGHIIIVIMVFSLIVLILSSSIVG | UVEDVEOFTOOVODAUGNON | TPCKDPIDKL | PIVIGLWPSNLW | GPHPENCINALVI CODVVCVATITA | DOT TTD I | AOLET THEN THE AU | LIGENNING | 112 |
| SK-RNase | MGITGMIIMVTMVFSLIVLILSSSA | VKFDIFQF1QQ1QPAVCNSNP | TPCKDPPDKL | FIVEGLWPSNVN | GSDPKKCKATILL | POTITD-LA | CAQLEIIWPNVLNRNAH | REWRING | 112 |
| SI-RNase | MGIIGMIYMVIMVFSLIVLILSSSA | AKIDILQFIQQIQPAACKFHH | TPCKDPLDKL | FIVHGLWPSNFN | GPDPENCKVKP17 | ASQTIDISLA | PQLEIIWPNVFNRADH | IESEWQKQ | 113 |
| Sm-RNase | MGITGIIYMVTTVFSLVVLIFSSSTVG | FDYFQFTQQYQPAACNSNP | TPCKDPPAKL | FTVHGLWPSNWN | LPDPIFCKNTTI | rpggIGH-Ig | QAQLEIIWPNVFNRTNH | LVFWNKQ | 112 |
| Sn-RNase | MGITGMIYIVTVVFSLIVLILSSSTVG | YDYFQFTQQYQPAVCNSKP | TPCKDPPDKL | FTVHGLWPSNLN | GPHPENCTNATVN | SHRIKN-IQ | DAQLKIIWPNVLDRTNH | IVGFWNKQ | 112 |
| Sp-RNase | MGITGMIYIVTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFQFTQQYQPAVCRSNP | TPCKDPTDKL | FTVHGLWPSNLN | GPHPANCTNATVN | ISHRIKN-IH | CAQLKIIWPNVLDRTNH | IVGFWNKQ | 112 |
| Sq-RNase | MGITGMIYMVTVVFSLIVLILSSSA | VKFDYFQFTQQYQPAVCNSNP | TPCKDPPDKL | FTVHGLWPSNVN | GSDPKKCKTTILF | CPRTIRN-LE | CAQLEIIWPNVSYSKGS | VRFWRKQ | 112 |
| Sr-RNase | MGITGMIHIVTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFQFTQQYQPAVCYFNP | TPCKDPPDKL | FTVHGLWPSNLN | GPHPENCTNATVN | NSQRITN-IG | AQLKIIWPNVLDRTNH | IVGFWNKQ | 112 |
| Ss-RNase | MGVTGMTYMFTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFQFTQQYQPAVCNSNP | THCNDPTDKL | FTVHGLWPSNRN | GPDPEKCKTTALM | NSQKIGN-M | PAQLEIIWPNVLNRSDH | IVGFWEKE | 112 |
| St-RNase | MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA | AKYDYLQFTQQYQPAACNSHP | TPCKDPPDKL | FTVHGLWPSNVN | GPDPENCKVKPT | SQTIDTSL | PQLEIIWPNVFNRADH | IESFWQKQ | 113 |
| | | | | | | | | | |
| | Signal peptide | Cl | | C2 | | HV | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | # * | | | * | | * | * * | | |
| Sa-RNase | WNKHGSCGRPAIONDMHYLOTVIKMYI' | OKONVSEILSKAKIEPVGRFW | TOKEIEKAIR | KGTNNKEPKLKC | ORNTOGTELVE | VTICSDRNLKO | IDCPRPILNGSRYYCP | TNNILY | 228 |
| Sb-RNase | WDKHGSCASSPIONOTHYFDTVIKMYT | POKONVSEILSKANIKPGRKSR | RLVDIENAIR | KVINNMTPKFKC | OKNPRTSLTELVE | VGLCSDSNLTON | INCPHPFPOGSRYFCP | TN-IOY | 226 |
| Sc-RNase | WEKHGTCGGPTIOGDEHYFRTVIKMYI | POKONVSKILSKAKIEPEGKIW | AREEIVKAIR | OSTDDKRPKLKC | KKNTONTELVE | VTLCSDENLTON | INCPRPYPKGSRYFCP | INGIOY | 228 |
| Sd-RNase | WLKHGTCGYPTIRDDMHYLKTVIKMYI | TOKONVSAILSKAMIOPNGONR | SLVDIENAIR | SGTNNTKPKFKC | OKNTRT-TTELVE | VTLCSDRDLTK | INCPOP-OOGSRYLCP | A-DVOY | 227 |
| Se-RNase | WDKHGTCGYPTIKDKNHYLOTVIKMYI | TOKONVSOILSKANINPDGIGR | TRKLIENAIR | NGTNDKEPKLKC | OKNNGTTELVE | VSLCSNYLGKH | INCENKIPOGSRYFCP | TKDIOY | 232 |
| Sg-RNase | WAKHGICGSPTIODDVNYLETVINMYI | KKONVFEILSNAKIEPEGKNR | TRKDTVKATR | SGTNGKRPKLKC | OKNNRTTELVE | WTLCSDRNLTRI | INCENTITKEKSPYFCP | LKSTHY | 228 |
| Sh-RNase | WKKHGACGVPTIONENDVFETVIKMVI | TEKONVSETT.SNAKTEPDGKSE | ALUDTENATE | NGTNNKT PKLKC | OKKTRU-TELU | TTLCSDKNRAH | TIDCPNPELPGSPVLCP | NNSTHY | 227 |
| Si-RNase | WIKHGSCGNPPIMNDTHYFOTVINMYT | NOKONUSETI, SKAKTEPI, GTOR | PLUDTEKATE | NSTNKKKPKFKC | ONNCCU-TELUE | TSLCSDRSLTOP | RDCPHDEDDCSDELCD | A-DTOY | 227 |
| Sk-PNaco | WEREACCOUTTADDMHVESTUTEMVT | PKKONUSETI SKANTKPECPEP | TODTUNATO | DE TOVEKDET KC | KINNOT-THIN | UCL CSDNNT TOL | TNODNDEDOCEDVECT | TINITOY | 228 |
| SI-PNaco | WARNERCOTF TINDENTTO TOTAL | TRAVING VIL CRANTNERCKCP | TOVDIOTATO | NOTINIVEDUT | OTENCI TELVI | WELCONVI CKN | TNCPNPPPQG5PIPCP | TNNTQT | 220 |
| SI-RNase | WDKHGICGSFIIIDKNHIFQIVIKHII | TERONUCETT CENETEDECEND | TRADIQUAT | TOTAL AND | OKNIGT TELVI | SVOLCONTLIGAN | INCENTIFICATION | TNDIHI | 229 |
| Sm-RNase | WINE AGGE TITINDE TO TE TO THE | IKKONVSKILSKAKIKPEGKNK | TRIBLINAIS | ISTNNMTPKLKC | QKNNGIIELVI | SVILCNDHNITKI | INCRHPIDPQSQFFCP | KINILI | 220 |
| Sn-RNase | WIKHGSCGIPAIMNDTHIFQTVINMIT | IQKQNVSETLSKAKIEPLGIQK | PLVHIENAIR | NSTNNKKPKFKC | QKNSGVTELVI | svalcabgaliqu | RNCPHP-PPGSPILCP | A-DIQY | 220 |
| Sp-RNase | WIKHGSCGNPPIMNDTHYFQTVINMYI | TRKQNVSGILSKAKIEPVGLKR | PLVDIENAIR | NSTNNKKPKFKC | QTKNRVTELVE | ISLCSDGSLTQ | INCPRPFPPGSPFLCP | A-DIEY | 227 |
| Sq-RNase | WRKHGTCGYPTIADDMHYFSTVIEMYT | TKKONVSEILLKAKIKPEGRFR | TRODIVNAIS | QSIDDKEPKLKC | KNNNNI TELVI | SVGICSDNNLTQI | INCPHPFPQGSPYLCP | TUNIQY | 228 |
| Sr-RNase | WIKHGSCGNPPIMNDTHYFQTVINMYI | IKKONVFEILSNAKIEPEGKNR | TRKDIVKAIR | SGTNGKRPKLKC | QKNNRTTELVE | SVTLCSDRNLTRI | LINCPNLIKPKSPYFCP | LKSIQY | 228 |
| Ss-RNase | WIKHGTCGYPTIKDDMHYLQTVIRLYI | IQKQNVSAILSKAAIQPNGTNR | PLVDIENAIR | RGTNNTKPKFKC | QKNTRT-TTELVE | SVTLCSDRDLKKI | TINCPHGPPQGSRFSCP | -SSVQY | 228 |
| St-RNase | WDKHGTCGSPTIIDKNHYFETVIRMYI | TEKONVSYILSKANINPDGRGR | TRKDIEIAIR | NSTNDKEPKLKC | QKKKNG-IIELVE | VSLCSNYLGKN | FINCPNK-NPGSRYSCP | TKDIHY | 229 |
| | | | | | | | | | |
| | C3 | RC4 | | | | C5 | | | |

.

図 3-2 17 種類のセイヨウナシ S-RNase の推定アミノ酸配列の比較.

17 種類の S-RNase 間で保存されているアミノ酸残基を網掛けで示す。高次構造形成に関与する8つのシステイン残基、および、RNase 活性に必須の2つのヒスチジ ン残基をそれぞれ*と#で記す. シグナルペプチド, 超可変 (HV)領域, 保存領域 (C1, C2, C3, RC4 and C5)は下線により示す. イントロンの挿入部位は▼で示す. 17 種類の S-RNase は下記の accession number で DDBJ に登録されている: Sa-RNase (AB236430), Sb-RNase (AB236429), Sc-RNase (AB258359), Sd-RNase (AB236427), Se-RNase (AB236428), Sg-RNase (AB258360), Sh-RNase (AB236431), Si-RNase (AB258361), Sk-RNase (AB236432), Sl-RNase (AB236425), Sm-RNase (AB258362), Sn-RNase (AB258363), Sp-RNase (AB258364), Sq-RNase (AB236424), Sr-RNase (AB236426), Ss-RNase (AB258365), St-RNase (AB258366),

| (a) | | |
|----------------------------|---|------------|
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | ATGGGGATTACGGGGATGATATATATAGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA | 60 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | TTGTCTTCCTCTACGGTGGGATACGATTATTTTCAATTTACACAGCAATATCAGCCAGC | 120 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | GTCTGCAGATCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGACAAGTTATTTACGGTTCAC | 180 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | GGTTTGTGGCCTTCAAACTTGAATGGACCTCACCCAGAAAATTGCACGAATGCAACCGTG | 240 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | AATTCTCACAGGATAAAAAATATCCAAGCCCAGTTGAAAATTATTTGGCCGAACGTACTC | 300 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | GATCGAACCAATCATTTAGGCTTCTGGAATAAACAGTGGATAAAACATGGCAGCTGTGGC | 360 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | AATCCGCCAATAATGAACGACACGCATTACTTTCAAACCGTAATCAACATGTACATAACC | 420 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | CAGAAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGTTGGGAATACAA | 480 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | AGGCCACTGGTGGATATTGAAAAGGCCATACGGAATAGTATCAACAAGAAGAAAACCAAAA | 540 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | TTCAAGTGCCAAAATAATGGTGGGGTGACAGAATTGGTTGAGATCAGTCTTTGTAGCGAT | 600 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | CGCAGCTTAACGCAGTTCAGAGATTGCCCCCACCCATTTCCACCAGGATCACCATTTCTC | 660 |
| Si-RNase.nt Sn-RNase.nt | TGCCCCGCCGATATTCAGTATTAA | 684 |
| (b) | | |
| Si-RNase.aa Sn-RNase.aa | MGITGMIYIVTMVFSLIVLILSSSTVGYDYFQFTQQYQPAVCRSNPTPCKDPTDKLFTVH | 60 60 |
| Si-RNase.aa Sn-RNase.aa | GLWPSNLNGPHPENCTNATVNSHRIKNIQAQLKIIWPNVLDRTNHLGFWNKQWIKHGSCG | 120 120 |
| | PS1 PS2 | |
| Si-RNase.aa Sn-RNase.aa | NPPIMNDTHYFQTVINMYITQKQNVSEILSKAKIEPLGIQRPLVDIEKAIRNSINKKKPK Y.A | 180 180 |
| | PS2 PS3 | |
| Si-RNase.aa Sn-RNase aa | FKCQNNGGVTELVEISLCSDRSLTQFRDCPHPFPPGSPFLCPADIQY | 227 226 |
| on mabe, aa | PS3 PS4 | 220 |

図 3-3 Si-RNase と Sn-RNase の DNA (a)と推定アミノ酸 (b)の配列比較. 下線部はバラ科 S-RNase の Positive Selection (PS)領域 (Ishimizu et al. 1998). 2 つの配列間で保存されている 塩基およびアミノ酸残基を「・」で示す.赤色: HV 領域, 青色: 保存領域, 緑色: シグナルペプチド. 子は増幅されなかった (データ省略). また, cDNA の 5'および 3'末端側非翻訳領域の配列に基 づき設計したプライマー, 'SxUTRfl', 'SxUTRf2', 'SxUTRr1', 'SxUTRr2'を組み合わせた4種類の プライマーセット, 'SxUTRf1'と'SxUTRr1', 'SxUTRf1'と'SxUTRr2', 'SxUTRf2'と'SxUTRr1', 'SxUTRf2'と'SxUTRr2'を用いたゲノミック PCR でも, *Sx-RNase* の断片は増幅されなかった. こ れらの結果から, *Sx-RNase* 対立遺伝子のゲノム DNA からの増幅は困難であると判断した.

プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'によるゲノミック PCR で増幅できる7種類 の S-RNase (Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Ss-, St-RNase)対立遺伝子を加えた 17 種類の S-RNase 対立遺伝 子を識別する CAPS マーカーシステムの開発を検討した. Sc-、Si-、Sm-、Sn-、Sp-、Ss-、St-RNase 対立 遺伝子の PCR 増幅断片と cDNA 配列とを照合したところ, これら PCR 増幅断片には1つの対 立遺伝子特異的な配列を持つイントロンが挿入されていた. PCR 増幅断片長とイントロン長は 以下の通りに決定された (図 3-4~10); Sc-RNase 334 bp (イントロン 134 bp), Si-RNase 362 bp (同 177 bp), Sm-RNase 350 bp (同 150 bp), Sn-RNase 362 bp (同 162 bp), Sp-RNase 338 bp (同 138 bp), Ss-RNase 367 bp (同 167 bp), St-RNase 1,642 bp (同 1,439 bp). 1,906 bp, 1,642 bp, 1,414 bp, 998 bp, 440 bp の断片として増幅される Sg-, St-, Sl-, Se-, Sb-RNase 対立遺伝子はアガロースゲル電気泳動 による識別が可能であった (図 3-11a). 約 1,300 bp 断片として増幅される Sk-および Sq-RNase は、引き続き、第2章で選択した制限酵素、BgIIIおよびHindIIIによる切断の有無で識別した(図 3-11b, c). Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Ss-RNase 対立遺伝子は Sa-, Sd-, Sh-, Sr-RNase 対立遺伝子とともに 約350 bp 断片として増幅されるので、これら対立遺伝子を断片長により識別することはできな い. そこで10 種類の約 350 bp 断片の塩基配列をもとに、Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Ss-RNase の増幅断 片を特異的に切断する制限酵素を探索した. 第2章で選択した Sa-, Sd-, Sh-, Sr-RNase 断片をそ れぞれ特異的に切断する制限酵素, SphI, EcoO109I, BssHII, BaeIは Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Ss-RNase の断片を切断しないことが確認されたので、引き続き採用した (図 3-11d~g). Sc-, Si-, Sm-, Sp-, Ss-RNase 断片の識別のために、新たに5 種類の制限酵素を選択した. BmgBIは、Sc-RNase 断片の みを 222 bp と 112 bp の断片に切断した (図 3-11h, lane7, 10). BstZ17I は, Si-RNase 断片を 214 bp と 148 bp の断片に切断したが (図 3-11i, lane8),同時に Se-RNase 断片を 688 bp と 310 bp の断片 に (図 3-11i, lane3, 4, 12, 13), Sg-RNase 断片を 1,612 bp, 198 bp, 96 bp の断片に切断した (図 3-11i, lane6). BseRI は Sm-RNase 断片のみを 213 bp と 137 bp の断片に切断した (図 3-11j, lane9). BseYI は Sp-RNase 断片のみを 221 bp と 117 bp の断片に切断した (図 3-11k, lane 11). BssSI は Ss-RNase 断片のみを 207 bp と 160 bp の断片に切断した (図 3-111, lane 12). Sn-RNase 断片の塩基配列には Sn-RNase 断片のみを特異的に切断する制限酵素の切断部位がなかったので、選択した 11 種類

| ATGG M | GGA' | DAT I J | CGGG G | GAT M | GAT. | ATA' Y | TATO M | GGTT V | FCCC P | GACC T | GTA V | TTT F | TCA S | TTA L | ATT I | GTA | TTA L | ATA I | 60 20 |
|--------------|-------------|-------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|---|
| TTGT(| CTTC S S | CGTC S S | CCGC | GGC | GAA K | ATAO Y | CGAT D | TAT Y | TTT F | ГСАА Q | TTT F | ACG T | CAG Q | CAA Q | TAT Y | CAC Q | CCG P | GCT A | $\begin{array}{c} 120 \\ 40 \end{array}$ |
| GTCTO V (| GCAA C N | ACTC | TAA N | TCC | TAC | CCC P | rtgi C | rago S | CGAT D | rcci P | TACT T | GAC D | AAG K | TTG L | TTT F | ACG T | GTT V | CAT H | $\begin{array}{c} 180\\ 60\end{array}$ |
| GGTT G I | TGT(L V | GCC V P | CTTC S | AAA K | GTC | GAGT S | rgg/ G | ACG1 R | rgat D | rcca P | AAA K | AGA R | TGC | TCG S | AAA K | ACA T | CCC P | CGTG V | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| CAGT | CTCA | AGAC) T | Ggt | aat | atta | atta | aata | aato | cago | etag | gtcg | ata | ttg | aat | att | tca | tat | ata | 300 84 |
| catt | gcta | aat | ata | tat | ttc | cate | gtad | cace | gtgt | tgca | aat | att | aca | att | aat | cat | aga | gtt | 360 |
| tttco | cati | tata | atg | tta | cat | tgto | cag- | -ATA I | AACA T | AA7 N | CTC L | AAA K | GCC A | CAG Q | TTG L | GAA E | ATT I | ATT I | $419 \\ 95$ |
| TGGCC W H | CGA/ PN | CGT V | ACT L | CAA N | TCG. R | AGCO A | CAA1 N | raat N | TATA I | AACC T | CTTC F | TGG W | GAA E | ACA T | CAG Q | TGG W | GAA E | AAA K | 479 115 |
| CATGO H | GCA(| CCTG | TGG G | GGG G | TCC(P | CACA T | AATA I | ACAC Q | GGGG G | GGAT D | GAG E | CAT H | TAC Y | TTT F | CGA R | ACA T | GTA V | ATC I | $539 \\ 135$ |
| AAAA7 K N | TGTA M | ACAT | AAC T | CCA Q | GAA K | ACAA Q | AAAC N | CGTC V | CTCI S | raaa K | ATC I | CTC L | TCA S | AAG K | GCG A | AAG K | ATA I | GAA E | 599 155 |
| CCGG/ P I | AGG(E (| GGAA G K | AAT I | CTG W | GGC. A | ACGO R | GGAC E | GGAA E | AATT I | rgta V | AAA K | GCC A | ATA I | CGC R | CAA Q | AGT S | ACC T | CGAT D | $\begin{array}{c} 659 \\ 175 \end{array}$ |
| GATA D I | AGCO K I | GACC R P | CAAA K | ACT L | CAA K | GTG(C | CAAA K | AAAC K | GAA7 N | TACA T | ACAG Q | AAT N | ACT T | GAA E | TTG L | GTT V | GAG E | GTC V | 719 195 |
| ACTCT T I | TTTO (| CAG | CGA D | TGA E | AAA N | CTTA L | AACO T | CCAC Q | GTT(F | CATA I | AAT N | TGC | CCC P | CGC R | CCA P | TAT Y | CCA P | AAA K | 779 215 |
| GGATO G | CACO S F | GATA R Y | TTT F | CTG C | CCCC P | CATO I | CAA7 N | rgg1 G | TATI I | CAC Q | TAT Y | TAA * | | | | | | | 821 228 |

図 3-4 Sc-RNase ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258359). 赤色: HV 領域,青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド,小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (_____がプライマーの 5' 側)を表す.

図 3-5 Si-RNase ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258361). 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (がプライマーの 5' 側)を表す.

| ATGGGGATTACGGGGATGATATATATAGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATA <u>M G I T G M I Y I V T M V F S L I V L I</u> | 60 20 |
|---|--|
| TTGTCTTCCTCTACGGTGGGATACGATTATTTTCAATTACACAGCAATATCAGCCAGC | $\substack{120\\40}$ |
| $ \begin{array}{cccc} {} GTCTGCAGATCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTACTGACAAGTTATTTACGGTTCAC \\ V & C & R & S & N & P & T & P & C & K & D & P & T & D & K & L & F & T & V & H \end{array} $ | $\begin{array}{c} 180 \\ 60 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{c} {}_{GGTTTGTGGCCTTCAAACTTGAATGGAACGCTCACCCAGAAAATTGCACGAATGCAACCGTG} \\ {}_{G} \end{array} \\ L \end{array} \\ \begin{array}{c} W \end{array} \\ P \end{array} \\ S \end{array} \\ N \end{array} \\ L \end{array} \\ \begin{array}{c} N \end{array} \\ C \end{array} \\ P \end{array} \\ \begin{array}{c} H \end{array} \\ P \end{array} \\ \begin{array}{c} P \end{array} \\ C \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \begin{array}{c} N \end{array} \\ \begin{array}{c} A \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \begin{array}{c} V \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} T \end{array} \\ \end{array}$ | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| $\begin{array}{ccc} \mbox{AATTCTCACAGGgtgaattctcacagggtaatattactgataatcagatagtcactattg} & N & S & H & R \end{array}$ | 300 84 |
| $tttatttcatttatttacttgtgtatacatacatatactcaacatagattttcatgcacg\\cgtgtgcaaatattgcaataaatttaaatttaatcataaatttacctatattatatta$ | 360 |
| tattgtcagATAAAAAATATCCAAGCCCAGTTGAAAATTATTTGGCCGAACGTACTCGAT I K N I Q A Q L K I I W P N V L D | 420 101 |
| CGAACCAATCATTTAGGCTTCTGGAATAAACAGTGGATAAAACATGGCAGCTGTGGCAAT R T N H L G F W N K Q W I K H G S C G N | 480 121 |
| $\begin{array}{c} CCGCCAATAATGAACGACACGCATTACTTTCAAACCGTAATCAACATGTACATAACCCAG\\ P & P & I & M & N & D & T & H & Y & F & Q & T & V & I & N & M & Y & I & T & Q \end{array}$ | 540 141 |
| AAACAAAACGTCTCTGAAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGTTGGGAATACAAAGG K Q N V S E I L S K A K I E P L G IQ R | 600 161 |
| $ \begin{array}{c} CCACTGGTGGATATTGAAAAGGCCATACGGAATAGTATCAACAAGAAGAAACCAAAATTC \\ P \ L \ V \ D \ I \ E \ K \ A \ I \ R \ N \ S \ I \ N \ K \ K \ K \ P \ K \ F \end{array} $ | 660 181 |
| $ \begin{array}{cccc} \textbf{AAGTGCCAAAATAATGGTGGGGGTGACAGAATTGGTTGAGATCAGTCTTTGTAGCGATCGC} \\ \textbf{K} & \textbf{C} & \textbf{Q} & \textbf{N} & \textbf{G} & \textbf{G} & \textbf{V} & \textbf{T} & \textbf{E} & \textbf{L} & \textbf{V} & \textbf{E} & \textbf{I} & \textbf{S} & \textbf{L} & \textbf{C} & \textbf{S} & \textbf{D} & \textbf{R} \\ \end{array} $ | 720 201 |
| AGCTTAACGCAGTTCAGAGATTGCCCCCACCCATTTCCACCAGGATCACCATTTCTCTGC S L T Q F R D C P H P F P P G S P F L C | 780 221 |
| CCCGCCGATATTCAGTATTAA P A D I Q Y * | 861 227 |

図 3-6 *Sm-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258362). 赤色: HV 領域,青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド,小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (_____がプライマーの 5' 側)を表す.

| ATGGGGATTACGGGGATTATATATATGGTTACGACGGTATTTTCATTAGTTGTATTAATA M G I T G I I Y M V T T V F S L V V L I | |
|--|--|
| $\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | |
| GCCTGCAACTCTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGCCAAGTTGTTTACGGTTCAC A C N S N P T P C K D P P A K L F T V H | |
| $ \begin{array}{cccccc} {\rm GGTTTATGGCCTTCAAACTGGAACTTACCCGACCCAATCTTCTGCAAGAATACAACCATT} \\ {\rm G} & {\rm L} & {\rm W} & {\rm P} & {\rm S} & {\rm N} & {\rm W} & {\rm N} & {\rm L} & {\rm P} & {\rm D} & {\rm P} & {\rm I} & {\rm F} & {\rm C} & {\rm K} & {\rm N} & {\rm T} & {\rm T} & {\rm I} \\ \end{array} $ | |
| ACTCCTCAGCAGgtaatattattaataatcagatagtcaatattgtttatttcatataca T P Q Q | |
| cata a act caa catagatttt catg cacg cgt gt g caa at att a caattaa taa aa cattaa taa | |
| taatcatgatttttttttttttttttttttttttttttt | |
| $ \begin{array}{c} CAGTTGGGAAATTATTTTGGGCCCAACGGTATCGAACGGAACGGACGGACGGAGGGGGGGGGG$ | |
| AAACAGTGGAACAAACATGGCAGCTGTGGGTATACCACAATAAATGACGAAATACAATAC K Q W N K H G S C G Y T T I N D E I QY | |
| $\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | |
| $ \begin{array}{ccccc} AAGGCGAAGATTAAACCGGAGGGGAAAAAACAGGACACGGACGG$ | |
| $\begin{array}{cccc} AGCATTAGTACCAAAAATATGACACCAAAAACTCAAGTGCCAAAAGAATAATGGGACGATT\\ \mathsf{S & I & S & T & N & N & M & T & P & K & L & K & C & Q & K & N & N & G & T & I \end{array}$ | |
| $ \begin{array}{cccc} {\sf GAATTGGTTGAGGTCACTCTTTGCAACGATCACAAACTTAAAATTCATAAATTGCCGT} \\ {\sf E} & {\sf L} & {\sf V} & {\sf E} & {\sf V} & {\sf T} & {\sf L} & {\sf C} & {\sf N} & {\sf D} & {\sf H} & {\sf N} & {\sf I} & {\sf T} & {\sf K} & {\sf F} & {\sf I} & {\sf N} & {\sf C} & {\sf R} \end{array} $ | |
| CACCCATATGACCCACAATCACAATTTTTCTGCCCCCAAAATAAAT | |

図 3-7 Sn-RNase ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258363). 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (がプライマーの 5 倒)を表す.

| $ \begin{array}{cccc} ATGGGGATTACGGGGATGATATATATAGTTACGGTGGTATTTTCATTAATTGTATTGATA\\ \underline{M \ G \ I \ T \ G \ M \ I \ Y \ I \ V \ T \ V \ V \ F \ S \ L \ I \ V \ L \ I \end{array} $ | 60 20 |
|---|--|
| $ \begin{array}{c c} TTGTCTTCCTCTACGGTGGGATACGATTATTTTCAA \\ \hline L & S & S & T & V & G \\ \hline L & S & S & T & V & G \\ \hline \end{array} Y & D & Y & F & Q & F & T & Q & Q & Y & Q & P & A \\ \end{array} $ | $\begin{array}{c} 120 \\ 40 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} {\tt GTCTGCAACTCCAAACCTACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTCACGGTTCAC} \\ {\tt V} & {\tt C} & {\tt N} & {\tt S} & {\tt K} & {\tt P} & {\tt T} & {\tt P} & {\tt C} & {\tt K} & {\tt D} & {\tt P} & {\tt D} & {\tt K} & {\tt L} & {\tt F} & {\tt T} & {\tt V} & {\tt H} \\ \end{array} $ | $\begin{array}{c} 180\\ 60\end{array}$ |
| $ \begin{array}{c} {}_{GGTTTGTGGCCTTCAAACTTGAATGGACCTCACCCAGAAAATTGCACTAATGCAACCGTG} \\ {}_{G} \ L \ W \ P \ S \ N \ L \ N \ G \ P \ H \ P \ E \ N \ C \ T \ N \ A \ T \ V } \end{array} $ | $240 \\ 80$ |
| AATTCTCACAGGgtaatattactgataatcagatagtcactattgtttatttcatttatg N $\stackrel{\rm N}{\rm S}$ H $\stackrel{\rm R}{\rm R}$ | $\substack{300\\84}$ |
| tacttgtgtatatatacatatactcaacatagattttcatgcacgcgtgtccaaatatta | 360 |
| caataaatttaa aatttaatcataaatttacttatatcatattat attgtcagATAAAA ${\rm I}~{\rm K}$ | 420 86 |
| $ \begin{smallmatrix} AATATCCAAGCCCAGTTGAA & AATATTTTGGCCGAATGT \\ N & I & Q & A & Q & L & K & I & I & W & P & N & V & L & D & R & T & N & H & V \\ \end{smallmatrix} $ | 480 106 |
| $ \begin{array}{cccccc} {\rm GGCTTCTGGAATAAACAGTGGATAAAACATGGCAGCTGTGGGTATCCCGCAATAATGAACGG F W N K Q W I K H G S C G Y P A I M N \end{array} } \\ \end{array} $ | 540 126 |
| $ \begin{array}{cccc} {\rm GACACGCATTACTTTCAAACAGTAATCAACATGTACATAACCCAGAAACAAAACGTCTCT} \\ {\rm D} & {\rm T} & {\rm H} & {\rm Y} & {\rm F} & {\rm Q} & {\rm T} & {\rm V} & {\rm I} & {\rm N} & {\rm M} & {\rm Y} & {\rm I} & {\rm T} & {\rm Q} & {\rm K} & {\rm Q} & {\rm N} & {\rm V} & {\rm S} \end{array} \end{array} $ | 600 146 |
| $ \begin{array}{cccc} {\sf GAAATACTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGTTGGGAATACAAAGGCCACTGGTGCATATT} \\ {\sf E} & {\sf I} & {\sf L} & {\sf S} & {\sf K} & {\sf A} & {\sf K} & {\sf I} & {\sf E} & {\sf P} & {\sf L} & {\sf G} & {\sf I} & {\sf Q} & {\sf R} & {\sf P} & {\sf L} & {\sf V} & {\sf H} & {\sf I} \end{array} $ | 660 166 |
| $\begin{array}{cccc} GAAAATGCCATACGGAATAGTACCAACAATAAGAAACCGAAATTCAAGTGCCAAAAGAAT\\ E & N & A & I & R & N & S & T & N & N & K & P & K & F & K & C & Q & K & N \end{array}$ | 720 186 |
| $\begin{array}{cccc} {\tt TCTGGGGTGACTGAATTAGTTGAGGGTCAGTCTTTGCAGCGATGGCAGCTTAACGCAGTTC} \\ {\tt S} & {\tt G} & {\tt V} & {\tt T} & {\tt E} & {\tt L} & {\tt V} & {\tt E} & {\tt V} & {\tt S} & {\tt L} & {\tt C} & {\tt S} & {\tt D} & {\tt G} & {\tt S} & {\tt L} & {\tt T} & {\tt Q} & {\tt F} \end{array}$ | 780 206 |
| $\begin{array}{cccc} AGAAATTGCCCCCACCACCACGAGGATCACCATATCTCTGTCCCGCCGATATTCAGTAT \\ R & N & C & P & H & P & P & G & S & P & Y & L & C & P & A & D & I & Q & Y \end{array}$ | 840 226 |
| TAA * | $ 843 \\ 226 $ |

図 3-8 *Sp-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258364). 赤色: HV 領域,青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド,小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (_____がプライマーの 5' 側)を表す.

| ATG | GGG. | ATT. | ACG | GGG | ATG. | ATA | TAT | ATT | GTT | ACG | ATC | GTA | TTT | TCA | TTA | ATT | GTA | TTA | ATA | 60 |
|-----------|-------------------|----------|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-------------------------|-----------|--|
| M | G | I | T | G | M | I | Y | I | | T | M | V | F | S | L | I | V | L | I | 20 |
| TTG' | TCT | TCC | TCT | ACG | GTG | GGA | TAC | GAT | TAT | TTT | °CAA | TTT | ACG | CAG | CAA | TAT | CAG | CCA | GCT | $\begin{array}{c} 120 \\ 40 \end{array}$ |
| L | S | S | S | T | V | G | Y | D | Y | F | Q | F | T | Q | Q | Y | Q | P | A | |
| GTC' | TGC. | AGA R | TCT S | AAT N | CCT P | ACT T | CCT P | TGT C | AAG K | GAT D | CCI P | TACT T | GAC D | AAG K | TTG L | TTI F | CACC T | GTT V | °CAC H | $\begin{array}{c} 180\\ 60\end{array}$ |
| GGT G | TTG L | TGG W | CCT P | TCA S | AAT N | TTG L | AAT N | GGA G | CCT P | CAC H | CCCA P | AGCA A | AAT N | TGC | ACG T | AAT N | rgca A | ACC T | CGTG V | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| AAT' N | TCT S | CAC H | AGG <mark>R</mark> | gta | ata | tta | ctg | ata | atc | aga | tag | gtca | icta | ttg | ttt | att | tca | ittt | atg | 300 |
| Tac | ttc | tca | aca | tag | att | ttc | atg | cac | gcg | tct | gca | aat | att | aca | ata | aat | tta | aat | tta | 360 |
| atc | ata | aat | tta | cct | ata | tta | tat | tgt | cag | ATA I | AAA K | AAT N | TATC I | GAA E | GCC A | CAC Q | GTTC L | GAA <mark>A</mark> K | ATT I | $\begin{array}{c} 420\\94\end{array}$ |
| ATT' | T <mark>GG</mark> | CCG | AA <mark>C</mark> | GTA | CTC | GAT | CGA | ACC | AAC | CAT | GTA | AGGC | CTTC | TGG | AAT | AAA | ACAG | GTGG | ATA | 480 |
| I | W | P | N | V | L | D | R | T | N | H | V | G | F | W | N | K | Q | W | I | 114 |
| AAA | CAT | GGC | AGC | TGT | GGG | AAT | CCT | CCA | ATA | ATG | AAC | CGAC | CACG | CAT | TAC | TTI | CAA | ACA | GTA | 540 |
| K | H | G | S | C | G | N | P | P | I | M | N | D | T | H | Y | F | Q | T | V | 134 |
| ATC. | AAC | ATG | TAC | ATA | ACC | CGG | AAA | CAA | AAC | GTC | CTCI | rgga | ATC | CTC | TCA | AAC | GCC | GAAG | ATT | 600 |
| I | N | M | Y | I | T | R | K | Q | N | V | S | G | I | L | S | K | A | K | I | 154 |
| GAA | CCA | GTG | GGG | TTG | AAA | AGG | CCA | CTG | GTA | GAT | TATI | rgaa | AAT | GCC | ATA | CGC | GAAT | CAGT | ACC | 660 |
| E | P | V | G | L | K | R | P | L | V | D | I | E | N | | I | R | N | S | T | 174 |
| AAC. | AAT | AAG | AAA | CCA | AAA | TTC | AAG | TGC | CAA | ACG | AAC | GAAT | AGG | GTG | ACT | GAA | ATTO | GTT | GAG | 720 |
| N | N | K | K | P | K | F | K | C | Q | T | K | N | R | V | T | E | L | V | E | 194 |
| ATC. | AGT | CTT | TGC | AGC | GAT | GGC | AGC | TTA | ACG | CAG | TTC | CATA | AAT | TGC | CCC | CGC | CCCA | TTT | CCA | 780 |
| I | S | | C | S | D | G | S | L | T | Q | F | I | N | C | P | R | P | F | P | 214 |
| CCA P | GGA G | TCA S | CCA P | TTT F | CTC | TGC C | CCT P | GCC A | GAT D | ATT I | GAC E | GTAT Y | TAA * | | | | | | | 822 227 |

図 3-9 *Ss-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258365). 赤色: HV 領域,青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド,小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (_____がプライマーの 5' 側)を表す.

| ATGGGAGTTACGGGGATGACGTATATGTTTACAATGGTATTTCGTTAATTGTATTAATA <u>M G V T G M T Y M F T M V F S L I V L I</u> | 60 20 |
|--|--|
| TTGTCTTCATCCACGGTGGGGGTACGATTATTTTCAATTT <mark>ACGCAGCAATATCAG</mark> CCGGCC <u>L S S S T V G</u> Y D Y F Q F T Q Q Y Q P A | $120 \\ 40$ |
| $ \begin{array}{cccc} {\tt GTATGCAACTCTAATCCTACTCATTGTAACGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC} \\ {\tt V} & {\tt C} & {\tt N} & {\tt S} & {\tt N} & {\tt P} & {\tt T} & {\tt H} & {\tt C} & {\tt N} & {\tt D} & {\tt P} & {\tt T} & {\tt D} & {\tt K} & {\tt L} & {\tt F} & {\tt T} & {\tt V} & {\tt H} \\ \end{array} $ | $\begin{array}{c} 180 \\ 60 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} {\rm GGTTTGTGGCCTTCAAACAGAAATGGAACTGGACCCAGAAAAATGTAAGACTACAGCCCTG} \\ {\rm G} & {\rm L} & {\rm W} & {\rm P} & {\rm S} & {\rm N} & {\rm R} & {\rm N} & {\rm G} & {\rm P} & {\rm D} & {\rm P} & {\rm E} & {\rm K} & {\rm C} & {\rm K} & {\rm T} & {\rm A} & {\rm L} \end{array} $ | 240 80 |
| AATTCTCAGAAGgtaatattattaataatgagatggtcaatattgtttatttcatttatg $\underset{N}{N}$ $\underset{Q}{S}$ $\underset{K}{Q}$ $\underset{K}{K}$ | 300 84 |
| Cactcgtgtatatatagattacaatacttaacatagattttcatgcacgcctgtgcaaatattacaattaatt | $\begin{array}{c} 360\\ 419 \end{array}$ |
| $\begin{array}{cccc} ATAGGAAATATGACAGCCCAATTGGAAATTATTTGGCCGAACGTCCTCAATCGATCCGAT\\ I & G & N & M & T & A & Q & L & E & I & I & W & P & N & V & L & N & R & S & D \end{array}$ | 479 104 |
| CATGTAGGCTTCTGGGAAAAAGAGTGGATCAAACATGGCACCTGCGGGTATCCCACAATA H V G F W E K E W I K H G T C G Y P T I | 539 124 |
| AAAGACGACATGCATTACTTACAAACGGTAATCAGACTGTACATAATCCAGAAAAAAAA | 599 144 |
| GTCTCTGCAATCCTCTCAAAGGCGGCGATTCAACCGAACGGGACAAACAGGCCACTGGTG V S A I L S K A A I Q P N G T N R P L V | 659 164 |
| GATATTGAAAATGCCATACGCCGTGGTACCAACAATACGAAACCAAAATTCAAGTGCCAA DIENAIRRGTNNTKPKFKCQ | 719 184 |
| AAGAATACTAGGACGACGACTGAATTGGTTGAGGTCACTCTTTGCAGTGATAGAGACTTA K N T R T T T E L V E V T L C S D R D L | 779 204 |
| AAGAAGTTCATAAATTGCCCCCACGGACCTCCACAAGGATCACGATTTTCCTGCCCCTCC K K F I N C P H G P P Q G S R F S C P S | 839 224 |
| AGTGTTCAGTATTAA SVQY* | 854 228 |

図 3-10 *St-RNase* ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列 (AB258366). 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (_____がプライマーの 5´側)を表す.

| ATGGGGATCACGGGGATGATATATATGGTTACGATGGTATTTTCATTAATTGTATTAATT M G I T G M I Y M V T M V F S L I V L I | 60 20 |
|--|---|
| TTGTCTTCGTCTGCGGCGAAATACGATTATTTGCAA <mark>TTT</mark> ACGCAGCAATATCAGCCGGCT <u>L S S S A</u> A K Y D Y L Q F T Q Q Y Q P A | $\begin{array}{c} 120 \\ 40 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | $\begin{array}{c} 180 \\ 60 \end{array}$ |
| $\begin{array}{cccc} & \text{GGATTGTGGCCTTCAAACGTTAATGGACCTGACCCAGAAAACTGCAAGGTCAAACCCACG} \\ & \text{G} L W P S N V N \text{G} P D P E N C \begin{matrix} \text{K} V K P T \end{matrix} \end{array}$ | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| CCATCTCAAACG gtaatattattgataataagatagtcaatattgtttaggaaaaattag P S Q T | $\begin{array}{c} 300\\ 84 \end{array}$ |
| Tataatgttcattgactgagattttattagtttttagattttgatcgaagtcactattgt Tggtatattaattagtcaattccataatttcttaaaatagaaaggttattatattaaca Ccctacaaattgttgaataaacctcatatacttaatacaccccacatttcttttcaat Taaaattatcttaataaaccccacatacttccccataatactctcacaccgcaaattct Caatatacctcttacattttctacatgcaccccatattttctattcaccccacatttctc Aaagcttataaagcatttggggacaaaaatgccgactgaaatttgacaaaagatgc Cgcctgagatttaaagcatatgtgggttgtttcaattccaccattaaaacctatgtcgt Ctgtttttaacatttggtggtaatttaggtgttaactctcatgtattccctgtgatc Ctgtttttaacattggtggtaatttaggtgttgatgttgaaaatcataaaacaac Aaaaaataaatgtcttgcctcatgtgggcttccaaaacattaatttgtatttcatt Catataggggtggggggtttgatgttgaagaggataaataaatggtgagggtttgatt Attggaggtgaaatagaacatagaagccaataaaattaatt | $\begin{array}{c} 360\\ 420\\ 480\\ 540\\ 600\\ 660\\ 720\\ 780\\ 840\\ 900\\ 960\\ 1020\\ 1020\\ 1080\\ 1200\\ 1260\\ 1320\\ 1380\\ 1440\\ 1560\\ 1620\\ 1680\\ \end{array}$ |
| tatattttcag-ATAGATACATCACTCAAACCCCAGTTGGA <mark>AATTATTTGGCCGAA</mark> CGTA I D T S L K P Q L E I I W P N V | $\begin{array}{c} 1739 \\ 100 \end{array}$ |
| $\begin{array}{cccc} TTCAATCGAGCCGATCATGAAAGCTTCTGGCAAAAACAGTGGGACAAACATGGCACCTGT\\ F&N&R&A&D&H&E&S&F&W&Q&K&Q&W&D&K&H&G&T&C \end{array}$ | 1799 120 |
| $ \begin{array}{cccc} {\rm GGGTCTCCCACAATAATAGACAAGAACCATTACTTTGAAACAGTAATCAGAATGTACATA \\ {\rm G} & {\rm S} & {\rm P} & {\rm T} & {\rm I} & {\rm D} & {\rm K} & {\rm N} & {\rm H} & {\rm Y} & {\rm F} & {\rm E} & {\rm T} & {\rm V} & {\rm I} & {\rm R} & {\rm M} & {\rm Y} & {\rm I} \end{array} $ | 1859 140 |
| $ \begin{array}{cccc} ACCGAGAAGCAAAACGTCTCTTATATCCTATCCAAAGCCAACATCAATCCGGATGGTAGA \\ T & E & K & Q & N & V & S & Y & I & L & S & K & A & N & I & N & P & D & G & R \\ \end{array} $ | $\begin{array}{c} 1919\\ 160 \end{array}$ |
| $\begin{array}{cccc} {\rm GGCAGGACACGGAAGGATATTGAAATTGCCATACGCAATAGTACCAACGATAAGGAACCA} \\ {\rm G} & {\rm R} & {\rm T} & {\rm R} & {\rm K} & {\rm D} & {\rm I} & {\rm E} & {\rm I} & {\rm A} & {\rm I} & {\rm R} & {\rm N} & {\rm S} & {\rm T} & {\rm N} & {\rm D} & {\rm K} & {\rm E} & {\rm P} \end{array}$ | 1979 180 |
| $ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | $\begin{array}{c} 2039\\ 200 \end{array}$ |
| $\begin{array}{ccccccc} AGCAATTACTTAGGAAAAAATTTCATAAATTGCCCCCAACAAAAATCCAGGATCACGATAC\\ \mathsf{S & N & L & G & K & N & F & I & N & C & P & N & K & N & P & G & S & R & Y \end{array}$ | 2099 220 |
| TCCTGTCCTACCAAAGATATCCATTATTAA S C P T K D I H Y * | $2129 \\ 229$ |



図3-11 ゲノミックPCRによる17種類のS-RNase対立遺伝子の増幅 (a)および11種類の制限酵素による切断 (b-l). BgfII (b), HindIII (c), SphI (d), EcoO109I (e), BssHII (f), BaeI (g), BmgBI (h), BstZ17I (i), BseRI (j), BseYI (k), BssSI (l). lane 1, 'General Leclerc' (SlSq); lane 2, 'Winter Nelis' (ShSk); lane 3, 'Flemish Beauty' (SdSe); lane 4, 'La France' (SeSr); lane 5, 'Doyenné du Comice' (SaSb); lane 6, 'Passe Crassane' (SgSr); lane 7, 'Beurré Hardy' (ScSd); lane 8, 'Beurré de l'Assomption' (SiSl); lane 9, 'Chapin' (SlSm); lane 10, 'Saint Mathieu' (ScSn); lane 11, 'Akça' (SlSp); lane 12, 'Dana's Hovay' (SeSs); lane 13, 'Starking Delicious' (SeSt).

の制限酵素, Bg/II, HindIII, SphI, BmgBI, EcoO109I, BssHII, BstZ17I, BseRI, BseYI, BaeI, BssSI のいずれによっても切断されないことで Sn-RNase 断片を識別することとし (図 3-11b~I, lane10), 約 350 bp 断片として増幅される 10 種類の S-RNase 対立遺伝子, Sa-, Sc-, Sd-, Sh-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Sr-, Ss-RNase 対立遺伝子の識別が可能になった.

以上の結果から、プライマー'FTQQYQ'と'EP-anti-IWPNV2'を用いたゲノミック PCR および 11 種類の制限酵素 (Bg/II, HindIII, SphI, BmgBI, EcoO109I, BssHII, BstZ17I, BseRI, BseYI, Bael, BssSI)の処理からなる CAPS マーカーシステムを開発した. この CAPS マーカーシステムにより, 17 種類の S-RNase 対立遺伝子, Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, Sn-, Sp-, Sq-, Sr-, Ss-, St-RNase 対立遺伝子を有する品種の S 遺伝子型を推定することが可能になった (表 3-8).

交雜不和合性

本章では、17種類のセイヨウナシの S-RNase 対立遺伝子を持つ二倍体 81 品種の S 遺伝子型が 推定された. 第2章の日本の栽培品種も合わせると、106 品種が50種類のS遺伝子型に分類され、 そのうち 22 種類には複数の品種が分類された (表 3-9).

17 種類のセイヨウナシの S-RNase 対立遺伝子のうち 10 種類, Sa, Sb, Sd, Se, Sg, Sh, Sk, Sl, Sq, Sr 対立遺伝子から構成される S 遺伝子型に推定された品種間で交配を行ない, 結実率または Seeds/Flower から品種間の交雑不和合・和合を判定した. 同じ推定 S 遺伝子型の組み合わせ, SaSb の'Doyenné du Comice'と'Abbé fétal', SaSg の'Triomphe de Vienne'と'Charles Ernest', SaSl の 'Marguerite Marillat'と'Koonce', SbSe の'Highland'と'California', 'Cascade', SbSl の'Beurré Jean Van Geert'と'Joséphine de Malines', SbSr の'Condo'と'Urbaniste', ScSe の'Beurré d'Anjou'と'Moonglow', SeSg の'Beurré Superfin'と'Oriviier de Serres', SeSh の'Winter Cole'と'El Dorado', SeSk の'Fondante Thirriot'と 'Packam's Triumph', SeSl の'Ayers'と 'Bartlett' および'Pera d'Agua', SeSq の'Pierre Cornelle'と'Covert', SgSl の'Blickling'と'Comte de Lambertye', SlSq の'General Leclerc'と'Ovid', SlSr の'Bristol Cross'と'Emile d'Heyst'で行なった他家受粉交配は, 'Ayers'×'Bartlett'の交配で Seeds/Flower が 0.1 となった以外は, 充実種子は形成されず, すべての組み合わせが交雑不和合 と判定された (表 3-10).

Sx-RNase cDNA がクローニングされた品種から,同じ*S* 遺伝子型と推定された'Beurré Bosc' (*ShSx*)と'Durondeau' (*ShSx*)および'Early Seckel' (*SlSx*)と'Marie Louise' (*SlSx*)の交配を行なった (表 3-11). 2 年間行なった'Beurré Bosc' (*ShSx*)と'Durondeau' (*ShSx*)の正逆交雑,および, 'Early Seckel' (*SlSx*)×'Marie Louise' (*SlSx*)の交配は Seeds/Flower が 0.3 以下となり, いずれも交雑不和

| S-RNase | PCR增幅 | A14-001 | NDン | | | | | | | | | | | | |
|---------|-------|-------------|----------------|------------------|----------|---------------|------------------|---------------|----------------|----------|----------|---------------|---------------|--|--|
| 对立遺伝子 | 断片長 | 1707 | BglII | HindIII | SphI | Bmg BI | <i>Eco</i> O109I | BssHII | BstZ171 | BseRI | BseYI | Bael | <i>Bss</i> SI | | |
| Sa | 345 | 145 | - | - | 233, 112 | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Sb | 440 | 246 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Sc | 334 | 134 | - | - | - | 222, 112 | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Sd | 369 | 169 | - | - | - | - | 260, 109 | - | - | - | - | - | - | | |
| Se | 998 | 786 | - | - | - | - | - | - | 688, 310 | - | - | - | - | | |
| Sg | 1,906 | 1,706 | - | - | - | - | - | - | 1,612, 198, 96 | - | - | - | - | | |
| Sh | 345 | 148 | - | - | - | - | - | 210, 135 | - | - | - | - | - | | |
| Si | 362 | 1 77 | - | - | - | - | - | - | 214, 148 | - | - | - | - | | |
| Sk | 1,274 | 1,074 | 1,022, 214, 38 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Sl | 1,414 | 1,211 | - | - | - | - | 1,149, 265 | - | - | - | - | 1,282, 99, 33 | - | | |
| Sm | 350 | 150 | - | - | - | - | - | - | - | 213, 137 | - | - | - | | |
| Sn | 362 | 162 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Sp | 338 | 138 | - | - | - | - | - | - | - | - | 221, 117 | - | - | | |
| Sq | 1,283 | 1,083 | - | 960, 323 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Sr | 353 | 153 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 195, 125, 33 | - | | |
| Ss | 367 | 167 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 207, 160 | | |
| St | 1,642 | 1,439 | - | 933, 506, 194, 9 | - | - | - | - | | - | - | | | | |

表3-8 ゲノミックPCRにより増幅された17種類のS-RNase対立遺伝子の制限酵素断片長(bp)

- : 制限酵素により切断されないPCR産物

表3-9 17種類のS-RNase対立遺伝子を識別するCAPSマーカーシステムにより識別される二倍体 106品種の推定S遺伝子型

| S遺伝子型 | 品種 | S遺伝子型 | 品種 |
|----------------|-----------------------|-------|----------------------------------|
| SaSb | Abbé fétal | SeSg | Beurré Superfin |
| | Doyenné du Comice | 0 | Oriviier de Serres |
| SaSc | Roguered | SeSh | El Dorado |
| SaSe | Aurora | | Winter Cole |
| | Docteur Jules Guyot | SeSi | Beurré Giffard |
| | Duchesse d'Angouleme | | Summer Dovenne |
| | Harrow Crisn | SeSk | Fondante Thirriot |
| | Harrow Delight | SCOR | Packam's Triumph |
| | Magness | | Washington |
| | Docha | 5051 | Aver |
| | Tuson | Debi | Bartlett |
| SaSa | Charles Ernest | | Délices d'Hardenpont |
| Dubg | Triomphede Vienne | | Horizont Oueen |
| Saci | Horrow Sweet | | May Red Partlett |
| Sasi | Kaanaa | | Max Red Dartiett |
| | Nonce | | |
| | Marguerite Marinat | | Pera d'Agua |
| | Pierre Tourasse | | Kosirea |
| SaSq | Beurre Clairgeau | | Seckel |
| SaSr | Angelys | ~ ~ | Seigneur d'Espèren |
| SbSc | Reimer red | SeSm | Colorée de Juillet |
| SbSe | Beurré Lubrum | SeSq | Besi de Saint-Waast |
| | California | | Bon-Chretien d'Hiver |
| | Cascade | | Covert |
| | Gorham | | Pierre Cornelle |
| | Grand Champion | SeSr | Ballad |
| | Hartman | | Doyenné d'hiver |
| | Highland | | Idaho |
| | Howell | | La France |
| SbSg | Glou Morceau | | Verdi |
| SbSk | Alexandrine Douillard | SeSs | Dana's Hovay |
| SbSl | Beurré Jean Van Geert | SeSt | Old Home |
| | Canal Red | | Starking Delicious |
| | Honey Sweet | SgSl | Blickling |
| | Joséphine de Malines | | Comte de Lambertye |
| SbSa | Le Lectier | SgSq | President Héron |
| SbSr | Condo | SgSr | Passe Crassane |
| | Urbaniste | e | Silver Bell |
| ShSt | Turnbull Giant | ShSk | Winter Nelis |
| ScSd | Beurré Hardy | ShSl | Michaelmas Nelis |
| | Royal Red Hardy | ShSm | Garbar |
| ScSe | Beurré d'Aniou | ShSa | Fertility |
| Dese | Moonglow | SiSI | Beurré de l'Assomption |
| | Red Aniou | SkSl | Santa Maria |
| Sech | Nouveau Poiteau | SkSr | Ankara |
| Sect | Fwart | SISm | Chapin |
| Secu | Saint Mathieu | SISn | Akca |
| ระเวก ระวระ | Bautomne | SISa | General Leclerc |
| SUSE | Clapp's Favorite | DIDY | Ovid |
| | Elemich Poouty | 515- | Bristol Cross |
| | Pietinish Deauty | 1010 | Emile d'Heyst |
| a 101 | Red Clapp's | | Linne u neyst Kieffer |
| Sast | Doyenne Gris | | Kicher |
| SdSq | Devoe | ala | Nosilisayaka Comto do Flondro |
| SdSr | Conference | 5/55 | Comie de Flandre |

赤字: 日本の栽培品種

| 種子親品種 | S遺伝子型 | 花粉親品種 | S遺伝子型 | 交配花数 (花) | 結実率 (%) | Seeds /Flower | SI index |
|-----------------------|-------|--|----------------------|----------------|--------------------|--------------------------------|-------------|
| Doyenné du Comice | SaSb | Abbé fétal La France | SaSb SeSr | 10 10 | 10.0 80.0 | 0.0 5.4 ^z | 0.0 |
| Abbé fétal | SaSb | Doyenné du Comice La France | SaSb SeSr | 14 15 | 7.1 66.7 | 0.1 4.2 ^z | 2.4 |
| Triomphe de Vienne | SaSg | Charles Ernest Blickling | SaSg SgSl | 26 27 | 15.4 92.6 | 0.0 6.4 ^z | 0.0 |
| Marguerite Marillat | SaSl | Koonce Verdi | SaSI SeSr | 30 30 | 30.0 95.0 | 0.0 4.2 ^z | 0.0 |
| Highland | SbSe | California Cascade La France | SbSe SbSe SeSr | 30 29 30 | 3.3 0.0 76.7 | 0.0 0.0 4.0 ^z | 0.0 0.0 |
| Beurré Jean Van Geert | SbSl | Joséphine de Malines Howell | SbSI SbSe | 30 29 | 20.0 79.3 | 0.0 6.2 ^z | 0.0 |
| Condo | SbSr | Urbaniste Hartman | SbSr SbSe | 30 30 | 0.0 60.0 | 0.0 5.1 ^z | 0.0 |
| Beurré d'Anjou | ScSe | Moonglow Beurré Superfin | ScSe SgSe | 10 9 | 0.0 55.6 | 0.0 4.8 ^z | 0.0 |
| Beurré Superfin | SeSg | Oriviier de Serres La France | SeSg SeSr | 30 29 | 0.0 72.4 | 0.0 4.4 ^z | 0.0 |
| Winter Cole | SeSh | El Dorado Packam's Triumph | SeSh SeSk | 20 11 | 55.0 100.0 | 0.0 3.6 ^z | 0.0 |
| Fondante Thirriot | SeSk | Packam's Triumph La France | SeSk SeSr | 30 30 | 6.7 93.3 | 0.1 8.5 ^z | 1.2 |
| Ayers | SeSI | Bartlett Pera d'Agua Besi de Saint Waast | SeSI SeSI SeSq | 30 30 30 | 6.7 0.0 80.0 | 0.1 0.0 7.2 ^z | 1.4 0.0 |
| Pierre Cornelle | SeSq | Covert La France | SeSq SeSr | 30 30 | 26.7 93.3 | 0.0 6.0 ^z | 0.0 |
| Blickling | SgSl | Comte de Lambertye Beurré Superfin | SgSI SgSe | 30 29 | 0.0 82.8 | 0.0 5.6 ^z | 0.0 |
| General Leclerc | SISq | Ovid Le Lectier | SISq SbSq | 29 30 | 89.7 96.7 | 0.0 7.2 ^z | 0.0 |
| Bristol Cross | SISr | Emile d'Heyst Seigneur d'Espéren | SISr SeSI | 30 30 | 3.3 90.0 | 0.0 8.3 ^z | 0.0 |

表3-10 同じ推定S遺伝子型を持つ品種間の交雑不和合性の評価

² SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

| 種子親 | S | 交配 | 花粉親 | S | 交配 | 結実率 | Seeds | SI |
|----------------|------|------|----------------|------|----|-------|------------------|-------|
| | 遺伝子型 | 年 | | 遺伝子型 | 花数 | (%) | /Flower | index |
| Beurré Bosc | ShSx | 2005 | Beurré Bosc | ShSx | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | Durondeau | ShSx | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | Winter Cole | SeSh | 5 | 100.0 | 2.0 ^z | |
| | | 2006 | Beurré Bosc | ShSx | 5 | 40.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | Durondeau | ShSx | 5 | 75.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | Chapin | SISm | 5 | 40.0 | 0.2 ^z | |
| Durondeau | ShSx | 2005 | Durondeau | ShSx | 5 | 20.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | Beurré Bosc | ShSx | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | El Dorado | SeSh | 5 | 100.0 | 9.2 ^z | |
| | | 2006 | Durondeau | ShSx | 5 | 100.0 | 0.3 | 5.0 |
| | | | Beurré Bosc | ShSx | 5 | 100.0 | 0.3 | 5.0 |
| | | | Chapin | SISm | 5 | 100.0 | 6.0 ^z | |
| Early Seckel | SlSx | 2006 | Early Seckel | SISx | 5 | 20.0 | 0.8 | 44.4 |
| | | | Marie Louise | SlSx | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | Chapin | SISm | 5 | 20.0 | 1.8 ^z | |
| Beurré Bedford | ShSx | 2006 | Beurré Bedford | ShSx | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | Fertility | ShSq | 5 | 60.0 | 4.8 ^z | |
| Lincoln | SbSx | 2006 | Lincoln | SbSx | 5 | 60.0 | 0.6 | 24.0 |
| | | | Chapin | SISm | 5 | 25.0 | 2.5 ^z | |
| Chapin | SISm | 2006 | Marie Louise | SlSx | 5 | 100.0 | 6.3 | |
| | | | Lincoln | SbSx | 5 | 40.0 | 1.8 | |
| | | | Beurré Bosc | ShSx | 5 | 60,0 | 5.6 | |
| | | | Durondeau | ShSx | 5 | 100.0 | 8.6 | |
| Beurré Hardy | ScSd | 2006 | Early Seckel | SISx | 5 | 100.0 | 8.2 | |

表3-11 Sx-RNase cDNAがクローニングされた品種の自家および他家受粉による結実率と種子数

² SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

合と判定された.

Sx-RNase の解析

Sx-RNase は、プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'、および、Sx-RNase 特異的プラ イマーセット'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'を用いたゲノミック PCR では増幅されなかった. しかし、プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミック PCR を伸長時間 30 秒, 99 サイクルで試行したところ、Sx-RNase の配列を持つ 197 bp の断片が増幅された(図 3-12). この断片をゲルから抽出して塩基配列を決定したところ、ナシ亜科 S-RNase 対立遺伝子 の HV 領域に挿入されているイントロンが存在せず、プライマーセット'FTQQYQ'と 'EP-anti-IIWPNV2'で増幅された Sx-RNase cDNA 断片の配列と完全に一致した(図 3-13). 既に S 遺伝子型が推定されたセイヨウナシ品種、および、ニホンナシ品種、'二十世紀'、'豊水'、'市原早 生'、リンゴ品種、'国光'、'ゴールデン・デリシャス'、'さんさ'、'スターキング・デリシャス'、'旭'、 '印度'のゲノムDNA を鋳型にして同じ条件でPCR を行なったところ、供試したすべての品種か らも Sx-RNase の配列を有する 197 bp の断片が増幅された(図 3-12).

Sx-RNase がクローニングされた'Durondeau'の花柱,花弁,葯,葉の total RNA を鋳型に, Sx-RNase 特異的プライマーセット'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'を用いて RT-PCR を行なっ たところ, Sx-RNase は花柱のみならず,花弁と葯でも発現していた (図 3-14).

く考察>

CAPS マーカーシステム (第2章)を用いて二倍体 93 品種の S 遺伝子型を推定したが, 22 品種 からはセイヨウナシ (P. communis)の 10 種類の Sa-, Sb-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Sk-, Sl-, Sq-, Sr-RNase 対 立遺伝子およびニホンナシ (P. pyrifolia)の 9 種類の S-RNase 以外の断片が検出され, S 遺伝子型 を推定できなかった (表 3-5). これら識別できなかったゲノミック PCR 断片の塩基配列は 7 種 類に分類され, 5 種類は推定 Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-RNase 対立遺伝子の配列と一致していた. 残り 2 種類は新規 S-RNase 対立遺伝子であると考えられ, Ss-および St-RNase 対立遺伝子と名付けた. RACE クローニングを用いて 7 種類の S-RNase cDNA 完全長塩基配列を決定した. これら 7 種類 の S-RNase の推定アミノ酸配列には典型的なナシ亜科 S-RNase の一次構造と対立遺伝子特異性 に関与する 1 つの HV 領域が確認された. Sc-, Sm-, Sp-, Ss-, St-RNase はそれぞれ 10 種類のセイ ヨウナシおよび 9 種類のニホンナシ S-RNase とは異なるアミノ酸配列の HV 領域を有していた


図3-12 プライマーセット'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'を用いた ゲノミックPCRによるSx-RNase対立遺伝子の増幅。

図 3-13 *Sx-RNase* cDNA およびゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列. 赤色: HV 領域, 青色: システイン残基, 桃色: ヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (がプライマーの 5' 側)を表す.

| ATGGGGATTACAGGGATGATCTCCATGGTTACGATGGTATTTCATTACTTGTATTAATA M G I T G M I S M V T M V F S L L V L I | $\begin{array}{c} 60 \\ 20 \end{array}$ |
|--|---|
| TTGTCTTCGTCCACGGTGGGATTCGATTATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGCCGGCT LSSSTVGFDYFQFTQQYQPA | $\begin{array}{c} 120 \\ 40 \end{array}$ |
| GTCTGCAACTTTAATCCTACTCCATGTAAGGATCCTACTGACAAGTTGTTTACGGTTCAC V C N F N P T P C K D P T D K L F T V H | $\begin{array}{c} 180 \\ 60 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} {} GGTTTGTGGCCTTCAAACAACGTAGGAGGTGACCCAGAATCTTGCAAGATAAGGAATCAT \\ G & L & W & P & S & N & V & G & G & D & P & E & S & C & K & I & R & N & H \end{array} $ | $\begin{array}{c} 240\\ 80\end{array}$ |
| $\begin{array}{c} CGAGCGAGAGCAAAGGCACTCGAACCCCAGTTGGAAATAATTTGGCCGAACGTACTCGAT\\ R & A & R & A & K & A & L & E & P & Q & L & E & I & I & W & P & N & V & L & D \end{array}$ | $\begin{array}{c} 300 \\ 100 \end{array}$ |
| $ \begin{smallmatrix} \mathrm{CGAACCAATCATACAGCCTTCTGGCGTAGACAGTGGATAAAACATGGCACTTGTGGGTAT} \\ \mathrm{R} \ T \ \mathrm{N} \ \mathrm{H} \ \mathrm{T} \ \mathrm{A} \ \mathrm{F} \ \mathrm{W} \ \mathrm{R} \ \mathrm{R} \ \mathrm{Q} \ \mathrm{W} \ \mathrm{I} \ \mathrm{K} \ \mathrm{H} \ \mathrm{G} \ \mathrm{T} \ \mathrm{C} \ \mathrm{G} \ \mathrm{Y} \\ \end{smallmatrix} $ | $\begin{array}{c} 360\\ 120 \end{array}$ |
| $\begin{array}{c} \mathrm{CCCACAATACAGAATGAGAATGATTACTTCGAAACAGTAGTCAAAATGTACACAACCGAG}\\ \mathrm{P} \ T \ I \ \mathbf{Q} \ \mathrm{N} \ \mathrm{E} \ \mathrm{N} \ \mathrm{D} \ \mathrm{Y} \ \mathrm{F} \ \mathrm{E} \ \mathrm{T} \ \mathrm{V} \ \mathrm{V} \ \mathrm{K} \ \mathrm{M} \ \mathrm{Y} \ \mathrm{T} \ \mathrm{T} \ \mathrm{E} \end{array}$ | $\begin{array}{c} 420 \\ 140 \end{array}$ |
| AAACAAAACGTCTCTAAAATCCTCTCAAGTGCAAAGATTGAACCGGACGGGATAAAAAGA KQNVSKILSSA KIEPDGIKR | $\begin{array}{c} 480 \\ 160 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccc} ACACTGGCGGACCTTGAAATTGCCATACGCAATGGTACCGACAACAAGAAACCAAAATTC\\ T \ L \ A \ D \ L \ E \ I \ A \ I \ R \ N \ G \ T \ D \ N \ K \ K \ P \ K \ F \end{array} $ | $\begin{array}{c} 540 \\ 180 \end{array}$ |
| $\begin{array}{cccc} AAGTGCCAAAAGAAGAGAAGGGTGACTGAATTAGTTGAGGTCACTCTTTGCAGCGATAAA \\ K & C & Q & K & K & R & V & T & E & L & V & E & V & T & L & C & S & D & K \end{array}$ | 600 200 |
| $ \begin{array}{cccc} AACAGAGCACATTTCATAGATTGCCCCCAACCCCTTTCAACCAGGATCACCATATTTATGC \\ N & R & H & F & I & D & C & P & N & P & F & \mathbf{Q} & P & G & S & P & Y & L & C \end{array} $ | $\begin{array}{c} 660 \\ 220 \end{array}$ |
| $\begin{array}{c} \text{CCCACCAACAATATCCTGTATTAA} \\ \text{P} \text{T} \text{N} \text{I} \text{L} \text{Y} \textbf{*} \end{array}$ | $\begin{array}{c} 684 \\ 227 \end{array}$ |



図3-14 プライマーセット'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'を用いた RT-PCRによるSx-RNase対立遺伝子の器官別の発現。

ことから、異なる対立遺伝子特異性を示すと考えられた.一方、Si-RNase と Sn-RNase は他の S-RNase とは異なるアミノ酸配列の HV 領域を有していたが, Si-RNase と Sn-RNase の HV 領域 の推定アミノ酸配列は同一であった. Zisovich et al. (2004b)は, Se-RNase 対立遺伝子を有する自 家不和合品種 3 品種, 'Forelle' (SeSn), 'Spadona' (SeSk), 'Gentile' (SeSi)を用いて交配実験を行なっ ている. HV 領域の配列が同じ Si-RNase と Sn-RNase が同じ認識特異性を示すならば, 'Forelle' (SeSn)×'Spadona' (SeSk)は交雑和合, 'Forelle' (SeSn)×'Gentile' (SeSi)は交雑不和合を示すと推測 される. しかし, 実際には, 'Forelle' (SeSn)×'Spadona' (SeSk)および'Forelle' (SeSn)×'Gentile' (SeSi)の交配では、結実率がそれぞれ 32%と 78%を示し、果実当たり 5.2 個と 6.7 個の充実種子 が含まれていたことから, どちらの組み合わせも交雑和合であると判定された. また, 'Forelle' (SeSn)×'Gentile' (SeSi)の交雑後代30個体からSeSi 18個体,SiSn 12個体が分離したことから、雌 しべの Sn ハプロタイプは Si ハプロタイプを持つ花粉を拒絶していないことが示され、Si-RNase と Sn-RNase が異なる認識特異性を持つことが明らかにされた. Ishimizu et al. (1998)は, ニホン ナシの7種類のS-RNaseとリンゴの4種類のS-RNaseの同義置換と非同義置換を解析し、4つの Positive Selection (PS)領域を見出し、この領域が自他認識に関与すると推測している (図 3-3b). Si-および Sn-RNase の配列間には 19 アミノ酸残基の違いがあり、 そのうち 10 アミノ酸残基は PS 領域に相当する部分に存在する.よって、HV 領域以外のアミノ酸残基により対立遺伝子特 異性が制御されている可能性が示唆された. 同じ HV 領域の推定アミノ酸配列を持つ Si-RNase とSn-RNase が異なる対立遺伝子特異性を示したことから、17 種類のセイヨウナシS-RNase は異 なる対立遺伝子特異性を示すと考えられた.

プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミックPCRにより増幅される 17種類のS-RNase 対立遺伝子を識別できる CAPS マーカーシステムの開発を試みた. Sg-, St-, St-, Se-, Sb-RNase 対立遺伝子は1,906, 1,642, 1,414, 998, 440 bp に検出され,増幅断片長により識別で きた.しかし,約350 bp に検出される Sc-, Si-, Sm-, Sn-, Sp-, Ss-RNase 対立遺伝子の断片はSa-, Sd-, Sh-, Sr-RNase 対立遺伝子とともに断片長による識別が困難であった. Sc, Si, Sm, Sp, Ss を識別す るために,5 種類の制限酵素, BmgBI, BstZ17I, BseRI, BseYI, BssSI を新たに選択した. Sn-RNase 対 立遺伝子の増幅断片を特異的に切断できる制限酵素がなかったので,約350 bp 断片を識別する 9 種類の制限酵素, Bael, BmgBI, BseRI, BseYI, BssSI, BstZ17I, EcoO109I, SphI および約1.3 kb 断片を識別する2 種類の制限酵素, Bg/II, HindIII のいずれの制限酵素でも切断されないこと により, Sn-RNase 対立遺伝子を識別することとした.

最終的に, プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミック PCR および

11 種類の制限酵素, Bg/II (Sk 特異的), HindIII (Sq 特異的), SphI (Sa 特異的), BmgBI (Sc 特異的), EcoO109I (Sd 特異的), BssHII (Sh 特異的), BstZ17I (Si 特異的), BseRI (Sm 特異的), BseYI (Sp 特異 的), BaeI (Sr 特異的), BssSI (Ss 特異的)による切断からなる CAPS マーカーシステムを確立し, 17 種類のセイヨウナシ S-RNase 対立遺伝子, Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, SI-, Sm-, Sn-, Sp-, Sq-, Sr-, Ss-, St-RNase 対立遺伝子の識別が可能になった (表 3-8). 11 種類の制限酵素のうち, HindIII は Sk-RNase 対立遺伝子断片に加えて St-RNase を, EcoO109I は Sd-RNase 対立遺伝子断片 に加えて SI-RNase 対立遺伝子断片を, BstZ17I は Si-RNase 対立遺伝子断片に加えて Se-, Sg-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, Sg-, Sg-, Sg-, Sh-, Si-, St-RNase 対立遺伝子断片 に加えて SI-RNase 対立遺伝子断片を, BstZ17I は Si-RNase 対立遺伝子断片を切断した. Se-, Sg-, Sl-, St-RNase 対立遺伝子断片に加えて SI-RNase 対立遺伝子断片を切断した. Se-, Sg-, Sl-, St-RNase 対立遺伝子に各制限酵素が切断の対象としている S-RNase 対立遺伝子とは断片長 が異なるため, S-RNase 対立遺伝子の識別には影響を与えない. ただし, BaeI はスター活性によ り Sh-RNase 断片を切断してしまう可能性があるので, BaeI により切断された S-RNase 断片につ いては BssHII 処理を行なうことが望ましい.

第2章で推定した日本の栽培品種を合わせると、17種類の S-RNase 対立遺伝子 (Sa-、Sb-、Sc-、 Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, Sn-, Sp-, Sq-, Sr-, Ss-, St-RNase 対立遺伝子)の組み合わせからな る106品種のS遺伝子型が推定された(表3-9). これら品種の中には、計画的な交配による交雑 後代や自然交雑実生から育成された品種も多いので (Crawford 1996), 親品種の推定 S 遺伝子型 と照会して品種の真偽を検討した (表 3-1). 枝変わり突然変異由来の4品種、'Grand Champion' (SbSe) ['Gorham' (SbSe)の銹性枝変わり]、'Red Clapp's (Starkrimson)' (SdSe) ['Clapp's Favourite' (SdSe)の着色系枝変わり], 'Red Anjou' (ScSe) ['Beurré d'Anjou' (ScSe)の着色系枝変わり], 'Royal Red Hardy' (ScSd) ['Beurré Hardy' (ScSd)の着色系枝変わり]はそれぞれの変異親品種と同じS遺 伝子型に推定された。両親とされている品種の S 遺伝子型が推定された品種のうち 11 品種、 'Aurora' (SaSe) ['Maruguerite Marillat' (SaSl)×'Bartlett' (SeSl)の交雑後代], 'Angelys' (SaSr) ['Doyenné d'hiver' (SeSr) × 'Doyenné du Comice (SaSb)の交雑後代], 'Bautomne' (SeSd) ['Conference' (SdSr)×'Doyenné d'hiver' (SeSr)の交雑後代], 'Bristol Cross' (SlSr) ['Bartlett' (SeSl)× 'Conference' (SdSr)の交雑後代], 'California' (SbSe)および'Cascade' (SbSe) ['Max Red Bartlett' (SeSl)×'Doyenné du Comice' (SaSb)の交雑後代], 'Condo' (SbSr) ['Conference' (SdSr)×'Doyenné du Comice' (SaSb)の交雑後代], 'Gorham' (SbSe) ['Bartlett' (SeSI)×'Joséphine de Malines' (SbSI)の交雑 後代], 'Hartman' (SbSe) ['Doyenné du Comice' (SaSb)×'Max Red Bartlett' (SeSI)の交雑後代], 'Highland' (SbSe) ['Bartlett' (SeSI)×'Dovenné du Comice' (SaSb)の交雑後代], 'Santa Maria' (SISk) ['Bartlett' (SeSI)×'Coscia' (SbSk, Zisovich et al. 2004a)の交雑後代]は種子親および花粉親から1つ

ずつ S-RNase 対立遺伝子を受け継いでおり、S遺伝子型に矛盾は見られなかった.

花粉親の S 遺伝子型が推定されていない 7 品種のうち 6 品種, 'Covert' (SeSq) ['Bartlett' (SeSl) × 'Dorset'], 'Harrow Crisp' (SaSe) ['Bartlett' (SeSl) × 'US56112-146'], 'Harrow Sweet' (SaSl) ['Bartlett' (SeSl) × 'Purdue 80-51'], 'Honey Sweet' (SbSl) ['Seckel' (SeSl) × 'U.S. 220' ('Vermont Beauty'× 'Roi Charles de Wurtemburg')], 'Ovid' (SlSq) ['Bartlett' (SeSl) × 'Dorset'], 'Roguered' (SaSc) ['Doyenné du Comicé (SaSb) × ('Seckel' (SeSl) × 'Farmingdale seedling 122')の交雑後代]は種子親由 来の S-RNase 対立遺伝子を有していた. 'Covert'と'Ovid'の花粉親はどちらも'Dorset'であること から, 'Dorset'が Sq-RNase 対立遺伝子を有することは確実であると考えられた.

種子親の S 遺伝子型が推定されていない 5 品種のうち 4 品種, 'Harrow Delight' (SaSe) [('Old Home' (SeSt)×'Early Sweet')×'Bartlett' (SeSl)], 'Harvest Queen' (SeSl) ['Michigan 572' ('Barseck'× 'Bartlett' (SeSl))×'Bartlett' (SeSl)], 'Magness' (SaSe) ['Seckel (SeSl)の自然交雑実生' ×'Doyenné du Comice' (SaSb)], 'Packam's Triumph' (SeSk) ['Uvedale St. Germain' ('Bella Angevina'×'Bartlett' (SeSl))×'Bartlett' (SeSl)]は花粉親品種の S-RNase 対立遺伝子のうちの1つを受け継いでいた.

自然交雑実生とされる品種のうち7品種, 'Beurré Clairgeau' (SaSq) ['Duchesse d'Angouleme' (SaSe)の自然交雑実生], 'Chapin' (SISm) ['Seckel' (SeSI)の自然交雑実生], 'Comte de Lambertye' (SgSI) ['Beurré Superfin' (SeSg)の自然交雑実生], 'Devoe' (SdSq) ['Clapp's Favorite' (SdSe)の自然交 雑実生], 'El Dorado' (SeSh) ['Bartlett' (SeSI)の自然交雑実生], 'Michaelmas Nelis' (ShSI)および 'Winter Cole' (SeSh) ['Winter Nelis' (ShSk)の自然交雑実生]はそれぞれの種子親から 1 つの S-RNase 対立遺伝子を受け継いでいた.

一方、7 品種は、交配親品種の組み合わせからは生じない S 遺伝子型を有していた. 'Ayers' (SeSI)は'Garbar' (ShSm)×'Beurré d'Anjou' (ScSe)の交雑後代とされているが、'Garbar'由来の S-RNase 対立遺伝子を持たない. 'Canal Red' (SbSI)は'Forelle' (SeSn)×'Max Red Bartlett' (SeSI)の 交雑後代とされているが、'Forelle'由来の S-RNase 対立遺伝子を持たない. よって、'Ayers'と 'Canal Red'の種子親は記載されている品種とは異なる可能性が示唆された. 'Dana's Hovay' (SeSs)は'Seckel' (SeSI)×'Winter Nelis' (ShSk)の交雑後代とされているが、'Winter Nelis'由来の S-RNase 対立遺伝子を持たない. 'Reimer Red' (SbSc)は'Doyenné du Comice' (SaSb)×'Max Red Bartlett' (SeSI)の交雑後代とされているが、'Max Red Bartlett'由来の S-RNase 対立遺伝子を持たな い. 'Pierre Cornelle' (SeSq)は'Beurré Diel' (SbSeSv)×'Doyenné du Comice' (SaSb)の交雑後代とされ ているが、'Doyenné du Comice' (SaSb)由来の S-RNase 対立遺伝子を持たない. よって、'Dana's Hovay', 'Reimer Red', 'Pierre Cornelle'の花粉親は記載されている品種とは異なる可能性が示唆 された. 'Clapp's Favorite' (*SdSe*)は'Flemish Beauty' (*SdSe*)×'Bartlett' (*SeSI*)の交雑後代とされてい るが,この組み合わせでは遺伝子型 *SdSe* の後代は生じない.種子親と花粉親が入れ替わって記 録されている,もしくは,どちらかが間違っている可能性が考えられた. 'Le Lectier' (*SbSq*) ['Bartlett' (*SeSI*)×'Bergamotte Fortunee'の交雑後代]は花粉親の S 遺伝子型が不明であるが,少な くとも'Bartlett'が種子親でないことが示された. 'Verdi (Sweet Blush)' (*SeSr*) ['Louise Bonne d' Avranches'×'Doyenné du Comice' (*SaSb*)]は種子親の S 遺伝子型が推定されていないが, 'Doyenné du Comice'は花粉親でないと推測された.

本章および第2章の結果,品種の由来が記載されている45品種のうち36品種において,両親 と後代品種間のS遺伝子型に矛盾が見られなかったことから,S-RNaseが対立遺伝子として交配 親から遺伝していることが確認された.一方,残り9品種では事実と異なる交配親品種が記載 されていると考えられる.

S 遺伝子型の推定により、いくつかの異名同種や同名異種も明らかになった. 盛岡に栽植されていた'Easter Beurre'は果実の形などから'Easter Beurre'ではなく'Besi de Saint-Waast'であるとみられたが、推定S遺伝子型が'Besi de Saint-Waast'と一致したことから、同名異種であると考えられた. また、実験当初盛岡には、'California'とされている樹が 2 本栽植されていたが、両樹の推定 S 遺伝子型が異なったことから、交配親品種の S 遺伝子型と矛盾する片方の樹が誤って'California'とされていることが明らかになった. さらに、盛岡の'Duchesse d'Angouleme'は文献にある収穫時期や果実形質と異なっていることに加え、推定 S 遺伝子型 SeSs も'Duchesse d'Angouleme'の自然交雑実生とされる'Beurré Clairgeau'の遺伝子型が SaSq と矛盾したことから、同名異種が疑われた. 山形県農業総合研究センターの栽植樹から神戸大学圃場に接ぎ木された'Duchesse d'Angouleme'の S 遺伝子型が SaSe と推定され、'Beurré Clairgeau'の推定 S 遺伝子型, SaSq と矛盾が生じなかったことから、盛岡の樹が同名異種であることが示され、'Duchesse d'Angouleme'の正しい S 遺伝子型が SaSe であることが明らかになった.

いくつかの品種のS遺伝子型は、起源を同じくするナシ属 (Pyrus)の種間交雑の容易さ、様々 なナシ属種の交配から生じたセイヨウナシの種形成の背景、現在の育種にも用いられる種間雑 種からの品種形成の様子を表した.チュウゴクナシ (P. pyrifolia)との種間雑種とされる品種の S遺伝子型は、'Frontier'(SePpS5)、'Kieffer' (SlSr)、'Ayers'(SeSl)、'Pera d'Agua'(SeSl)と推定され、 'Frontier'でのみニホンナシで同定されている S5-RNase が検出された. 'Kieffer' (P. pyrifolia× 'Bartlett' (SeSl))からは Sl-および Sr-RNase 対立遺伝子が検出されたので、花粉親が'Bartlett'であ ることに矛盾はないと推測され、種子親となった品種はセイヨウナシの S-RNase 対立遺伝子を

共有する P. pyrifolia であると考えられた. 'Garbar' (P. pyrifolia×P. communis)と'Pera d'Agua' (交 配親不明)からはそれぞれ Sh-および Sm-RNase 対立遺伝子と Se-および SI-RNase 対立遺伝子が増 幅されたことから,両品種の交配親となったチュウゴクナシ (P. pyrifolia)もセイヨウナシの S-RNase 対立遺伝子を有すると推測される. S 遺伝子型から'Garbar'を交配親に持たないと考え られた'Ayers'(SeSI)は、セイヨウナシの S-RNase 対立遺伝子を有する別のチュウゴクナシ,もし くは、セイヨウナシ品種間の交雑後代と推測される.一方,種間雑種とされていなかった 'Fondante de Charneu' (SIPpS2)と'Fame' (SrPpS4)の2 品種からもニホンナシの S-RNase が検出さ れた. 今後,品種のS遺伝子型を推定する際に、ニホンナシS-RNase が検出される可能性も十分 考えられる.

'Conference'の S 遺伝子型は、第 2 章の推定 (SdSr)と国外の推定 (SdSh)とが一致しなかった. 本章では'Conference'が育種親になった品種の S 遺伝子型を推定した. 'Bristol Cross' (SlSr)の Sl-RNase 対立遺伝子は種子親である'Bartlett' (SeSt)に、Sr-RNase 対立遺伝子は花粉親である 'Conference' (SdSr)に由来するとみられた. 'Condo' (SbSr)の Sr-RNase 対立遺伝子は種子親である 'Conference' (SdSr)に, Sb-RNase 対立遺伝子は花粉親である'Doyenné du Comice' (SaSb)に由来す ると考えられた. 'Bautomne' (SdSe)の Sd-RNase 対立遺伝子は種子親である'Conference' (SdSr)に, Se-RNase 対立遺伝子は花粉親である'Doyenné d'hiver' (SeSr)に由来するとみられた. これら 3 品 種の親子関係と推定 S 遺伝子型に基づき、正しい'Conference'の S 遺伝子型は、CAPS マーカーシ ステムにより推定された SdSr であると結論づけた.

Modlibowska (1945)が交雑不和合組み合わせとして挙げた 7 種類のうち, 'Belle Lucrative (Seigneur d'Espéren)'×'Louise Bonne de Jersey (Loise Bonne d'Avranches)', 'Belle Lucrative'× 'Seckel', 'Louise Bonne de Jersey'×'Seckel', 'Louise Bonne de Jersey'×'William's Bon Chrétien (Bartlett)', 'William's Bon Chrétien'×'Seckel'の 5 種類は二倍体品種同士の交配である. 'Belle Lucrative (Seigneur d'Espéren)', 'Seckel', 'William's Bon Chrétien (Bartlett)'の S 遺伝子型が SeSl で あることから, 'Belle Lucrative'×'Seckel'および'William's Bon Chrétien'×'Seckel'が交雑不和合 を示すことと推定 S 遺伝子型が一致した. 'Louise Bonne de Jersey (Loise Bonne d'Avranches)'の遺 伝子型も SeSl であると推測され, 'Verdi (Sweet Blush)' (SeSr) ['Louise Bonne d' Avranches'× 'Doyenné du Comice' (SaSb)]に Se-RNase 対立遺伝子が遺伝していると考えられる.

第2,3章で供試した二倍体 118 品種のうち,106 品種は 17 種類のセイヨウナシ S-RNase 対立 遺伝子の組み合わせからなる 50 種類の S 遺伝子型に分類され,そのうち 22 種類の S 遺伝子型 には複数の品種が分類された (表 3-9).同じ推定 S 遺伝子型の品種間での交配はすべて交雑不 和合を示した (表 3-10). このことは、セイヨウナシの雌しべ側 S 遺伝子産物が S-RNase である ことを改めて証明するとともに、CAPS マーカーシステムによる S 遺伝子型推定の信頼性を裏付 けると考えられる.

また、118 品種に、'Coscia'や'Forelle'など国外でゲノミック PCR により推定された 8 品種 (Zisovich et al. 2002a)を加えた 126 品種の解析の結果から、世界各国で栽培されている多くの主 要品種の S 遺伝子型が推定された (表 3-12). ヨーロッパ諸国の主要品種は、イタリアの'Abbé fétal' (SaSb), 'William's Bon Chrétien (Bartlett)' (SeSl), 'Conference' (SdSr), 'Doyenné du Comice' (SaSb), 'Beurré Bosc' (ShSx), 'Coscia' (SbSk), フランスの'Bartlett' (SeSl), 'Docteur jules Guyot (Precoce)' (SaSe), 'Conference' (SdSr), 'Doyenné du Comice' (SaSb), 'Passe Crassane' (SgSr), スペイ ンの'Coscia' (SbSk), 'Docteur jules Guyot (Precoce)' (SaSe), ポルトガルの'Rocha' (SaSe), イギリス の'Conference' (SdSr), 'Bartlett' (SeSI), ドイツの'Conference' (SdSr), 'Fondante de Charneu' (SIPpS2), 'Clapp's Favourite' (SdSe), オランダの'Conference' (SdSr), 'Dovenné du Comice' (SaSb), ベルギーの'Durondeau' (ShSx), デンマークの'Clara Frijs' (SeSx), スウェーデンの'Clara Frijs' (SeSx), 'Conference' (SdSr), ブルガリアの'Bartlett' (SeSI), 'Beurré Bosc' (ShSx), 'Clapp's Favourite' (SdSe), 'Beurré Hardy' (ScSd), $\# \neg \neg \vee \lor \sigma$ 'Clapp's Favourite' (SdSe), 'Conference' (SdSr), 'General Leclerc' (SlSq), ロシアの'Bartlett' (SeSl), 'Flemish Beauty' (SdSe), 'Beurré Bosc' (ShSx), 'Kieffer' (SISr), セルビアの'Bartlett' (SeSI), 'Passe Crassane' (SgSr), ギリシャの'Bartlett' (SeSI), 'Passe Crassane' (SgSr), トルコの'Akça' (SlSp), 'Ankara' (SkSr), 'Santa Maria' (SkSl)と推定された. ヨーロッパ以外の主要生産国の栽培品種は、アメリカの'Bartlett' (SeSI), 'Beurré d'Anjou' (ScSe), 'Beurré Bosc' (ShSx), 'Forelle' (SeSn), カナダの'Bartlett' (SeSl), 'Beurré Bosc' (ShSx), 'Beurré d'Anjou' (ScSe), アルゼンチンの'Bartlett' (SeSI), 'Packham's Triumph' (SeSk), 'Beurré d'Anjou' (ScSe), チリの'Packham's Triumph' (SeSk), 'Beurré Bosc' (ShSx), オーストラリアの'Packham's Triumph' (SeSk), 'Bartlett' (SeSl), 'Beurré Bosc' (ShSx), ニュージーランドの'Packham's Triumph' (SeSk), 'Winter Nelis' (ShSk) 'Winter Cole' (SdSh), 南アフリカの'Packham's Triumph' (SeSk), 'Forelle' (SeSn)と推定された.

また、多くの新品種の推定 S 遺伝子型も決定された. 主要品種間の交雑から育成された品種 は、日本の栽培品種でもある'Aurora' (*SaSe*), 'Bautomne' (*SdSe*), 'California' (*SbSe*), 'Devoe' (*SdSq*), 'El Dorado' (*SeSh*)に加えて、'Angelys' (*SaSr*), 'Bristol Cross' (*SlSr*), 'Condo' (*SbSr*), 'Canal Red' (*SbSl*), 'Cascade' (*SbSe*), 'Gorham' (*SbSe*), 'Hartman' (*SbSe*), 'Highland' (*SbSe*), 'Reimer Red' (*SbSc*), 'Rogue Red' (*SaSc*)の S 遺伝子型が推定された. 火傷病抵抗性品種では、'Garbar' (*ShSm*), 'Ayres

表3-12 セイヨウナシ126品種の推定S遺伝子型

| S遺伝子型 | 品種 | S遺伝子型 | 品種 | S遺伝子型 | 品種 |
|-------|-----------------------|-------|----------------------|--------|------------------------|
| SaSb | Abbé fétal | SdSe | Bautomne | SgSl | Blickling |
| | Doyenné du Comice | | Clapp's Favorite | | Comte de Lambertye |
| SaSc | Roguered | | Flemish Beauty | SgSq | President Héron |
| | Eletta Morettini * | | Red Clapp's | SgSr | Passe Crassane |
| SaSe | Aurora | SdSI | Doyenné Gris | - | Silver Bell |
| | Docteur jules Guyot | SdSq | Devoe | ShSk | Winter Nelis |
| | Duchesse d'Angouleme | SdSr | Conference | ShSl | Michaelmas Nelis |
| | Harrow Crisp | SeSg | Beurré Superfin | ShSm | Garbar |
| | Harrow Delight | 0 | Oriviier de Serres | ShSq | Fertility |
| | Magness | SeSh | El Dorado | SiSI | Beurré de l'Assomption |
| | Rocha | | Winter Cole | SkSl | Santa Maria |
| | Tyson | SeSi | Beurré Giffard | | Spadochia ** |
| SaSg | Charles Ernest | | Summer Doyenne | SkSr | Ankara |
| 0 | Triomphede Vienne | | Gentile ** | SISm | Chapin |
| SaSI | Harrow Sweet | SeSk | Fondante Thirriot | SISp | Akça |
| | Koonce | | Packam's Triumph | SISq | General Leclere |
| | Marguerite Marillat | | Washington | | Ovid |
| | Pierre Tourasse | | Spadona ** | SISr | Bristol Cross |
| SaSq | Beurré Clairgeau | SeSI | Ayers | | Emile d'Heyst |
| SaSr | Angelys | | Bartlett | | Kieffer |
| SbSc | Reimer Red | | Délices d'Hardenpont | | Koshisayaka |
| SbSe | Beurré Lubrum | | Harvest Queen | SISs | Comte de Flandre |
| | California | | Max Red Bartlett | SmSo | Lawson |
| | Cascade | | Napoleon | SaSx | Lincoln |
| | Gorham | | Pera d'Agua | SeSx | Clara Frijs |
| | Grand Champion | | Rosired | ShSx | Beurré Bedford |
| | Hartman | | Seckel | | Beurré Bose |
| | Highland | | Seigneur d'Espéren | | Durondeau |
| | Howell | | Bon Rouge ** | SgSx | Beurré Dumont |
| SbSg | Glou Morceau | SeSm | Colorée de Juillet | SISx | Early Seckel |
| SbSk | Alexandrine Douillard | SeSn | Forelle ** | | Marie Louise |
| | Coscia ** | SeSq | Besi de Saint-Waast | SrSx | Saint Germain |
| SbSI | Beurré Jean Van Geert | | Bon-Chretien d'Hiver | SePpS5 | Frontier |
| | Canal Red | | Covert | SIPpS2 | Fondante de Charneu |
| | Honey Sweet | | Pierre Cornelle | SrPpS4 | Fame |
| | Joséphine de Malines | SeSr | Ballad | - | |
| SbSq | Le Lectier | | Doyenné d'hiver | | |
| SbSr | Condo | | Idaho | | |
| | Urbaniste | | La France | | |
| SbSt | Turnbull Giant | | Verdi | | |
| ScSd | Beurré Hardy | SeSs | Dana's Hovay | | |
| | Royal Red Hardy | SeSt | Old Home | | |
| ScSe | Beurré d'Anjou | | Starking Delicious | | |
| | Moonglow | | | | |
| | Red Anjou | | | | |
| ScSh | Nouveau Poiteau | | | | |
| ScSl | Ewart | | | | |
| ScSn | Saint Mathieu | | | | |

赤:日本の主要栽培品種,紫: Sx-RNaseの発現が確認された品種,緑:ニホンナシのS-RNaseを持つ品種,

*: Zuccherelli et al. 2002aによる推定, **:Zisovich et al. 2004aによる推定.

(SeSl), 'Tyson' (SaSe), 'Seckel' (SeSl), 'Old Home' (SeSt), 'Maxine (Starking Delicious)' (SeSt), 'Magness' (SaSe), Moonglow (ScSe), 'Honey Sweet' (SaSl), 'Harrow Crisp' (SaSe), 'Harrow Delight' (SaSe), 'Harrow Sweet' (SaSl)のS遺伝子型が新たに推定された.

これら品種の推定S遺伝子型をみると、品種が有するS-RNase対立遺伝子は偏っており、特に Sa-, Sb-, Se-, Sl-RNase 対立遺伝子が多い. おそらく, 世界各国で広く栽培されている 'Bartlett' (SeSI)、生産量世界一のイタリアで最も多く栽培されている'Abbé fétal' (SaSb)、良食味でヨーロ ッパにおいて人気の高い'Doyenné du Comice' (SaSb)のS遺伝子型に、この4種類のS-RNase 対立 遺伝子が含まれること、また、火傷病抵抗性品種に Sa-および Se-RNase 対立遺伝子を持つ品種 が多く、中でも遺伝子型 SaSe の品種が多いことが、上記4種類の S-RNase 対立遺伝子の増加に 関与していると考えられる、主要品種間および少数の抵抗性品種の交雑後代や他のナシ属種に 対する主要品種の戻し交雑を用いた新品種育成により、交雑不和合性を示す組み合わせの増加 が各国における実際の栽培現場で問題となる可能性がある.また、γ線照射個体から選抜され た半わい性品種'Abate light' (SaSb)および'Conference light' (SdSr)や'Max Red Bartlett' (SeSI), 'Bon Rouge' (SeSI), 'Royal Red Hardy' (SsSd), 'Red Anjou' (ScSe)など突然変異による赤色系品種も主要 品種との交雑不和合が危惧される。イタリアでは、遺伝子型 SaSb の'Abbé fétal'および'Doyenné du Comice'がそれぞれ生産量の24%と9%を、また、SeSIの'William's Bon Chrétien (Bartlett)'とそ の変異系統が 22%を占めており (岩堀 2002)、混植する品種の S 遺伝子型の考慮が他国より必 要であると考えられる. また、フランスの栽培面積の 26%、スペインの栽培面積の 17%を占め る'Docteur jules Guyot (Precoce)'やオランダの栽培面積の 90%に達する'Rocha'、日本でも栽培増 加が予想される'Aurora'は、火傷病抵抗性品種の'Harrow Crisp', 'Harrow Delight', 'Magness'と同 じ SaSe の遺伝子型に推定された. 持続可能な農業を求める声の高まりもあり, 火傷病抵抗性品 種の栽培は今後増えると予想されので、交雑不和合組み合わせに注意が必要である.したがっ て、いずれの品種の場合においても、良質果実を確実に生産するために、推定S遺伝子型に基づ いた品種選択が不可欠である.

Sx-RNase は9品種, 'Beurré Bedford', 'Beurré Bosc', 'Beurré Dumont', 'Clara Frijs', 'Durondeau', 'Early Seckel', 'Lincoln', 'Marie Louise', 'Saint Germain'の花柱からクローニングされた. 上記以 外の品種を用いた 3'RACE において (第 2, 3 章), *Sx-RNase* cDNA 断片はクローニングされてい ない. 'Beurré Bosc' (*ShSx*)と'Durondeau' (*ShSx*)および'Early Seckel' (*SlSx*)×'Marie Louise' (*SlSx*)の 交配はいずれも交雑不和合を示した (表 3-11). また, 'Beurré Bedford' (*ShSx*) ['Marie Louise' (*SlSx*)×'Durondeau' (*ShSx*)の交雑後代], および, 'Early Seckel' (*SlSx*) ['Seckel' (*SeSl*)の自然交雑実

生]は親子関係にある品種のS遺伝子型が矛盾しない.したがって, Sx-RNase が S-RNase 対立遺 伝子であるようにも思われる.しかし, Sx-RNase はプライマーセット'FTQQYQ'と 'EP-anti-IIWPNV2'を用いた伸長時間30秒,99サイクル, アニーリング52℃の条件で行なったゲ ノミックPCRにより, ニホンナシやリンゴを含めすべての供試品種において検出された.また, 雌しべだけでなく花弁と葯でも発現していることから, 花柱特異的発現という一般的な雌しべ 側 S遺伝子の条件を満たさない. Sx-RNase が S遺伝子型に関係なくどの品種の花柱にも存在す る non-S RNase をコードするとも考えられるが,9品種以外では発現しておらず,また,報告さ れている non-S RNase と 25.8~30.5%の相同性しか示さなかった (表 3-13).したがって, Sx-RNase が S-RNase 対立遺伝子であるとも non-S RNase であるとも結論づけることができない.

輸出用品種として南半球諸国で栽培の多い'Beurré Bosc'(ShSx) (USDA/FAS March 2006; Australian Bureau of Statistics)、スウェーデンやデンマークで栽培されている'Clara Frijs' (SeSx) (Eurostat 2002), ベルギーの'Durondeau' (ShSx) (Eurostat 2002)から Sx-RNase がクローニングされ た. Sx-RNase が S-RNase 対立遺伝子である場合、'Beurré Bosc'、'Durondeau'、'Beurré Bedford'およ び'Early Seckel'と'Marie Louise'は、それぞれ同じS遺伝子型 ShSx および SISx を持ち、交雑不和 合を示した交配実験の結果と一致する. 一方, Sx-RNase が S-RNase 対立遺伝子ではない場合, 'Chapin' (SISm)×'Marie Louise' (SISx)が交雑和合を示したことから, 'Marie Louise'はS対立遺伝 子をヘテロに持つと推測され、これら品種は 17 種類の S-RNase 対立遺伝子や推定 So-RNase 対 立遺伝子以外の S-RNase を持つと考えられる. ただし、この場合においても、'Beurré Bosc' (ShSx)と'Durondeau' (ShSx)および'Early Seckel' (SlSx)と'Marie Louise' (SlSx)の交雑不和合から, 少なくとも各組み合わせにある品種は同じ新規*S-RNase* 対立遺伝子を有していると推測される. 現段階では, Sx-RNase が S-RNase 対立遺伝子であるかを結論づけることができないが, Sx-RNase がクローニングされた9品種がSx-RNase対立遺伝子または未同定のS-RNase対立遺伝子のどち らを持っていても、これら品種は S 遺伝子型を推定した多くの経済品種と交雑和合になる. し たがって、本章における推定 S 遺伝子型は栽培や育種において参考になると考えられる. Sx-RNase が S-RNase 対立遺伝子であるのか、また、Sx-RNase がゲノミック PCR で増幅されない 原因やナシ亜科全体に存在する理由などは今後の解析により明らかにされるべき課題であると 考える.

表 3-13 セイヨウナシのS-RNaseおよび他の植物のT2/S型RNaseとの推定アミノ酸配列の相同性(%)

| | Class III RNase ^a | | | | | | Class I, II RNase' | | | | | | | | | | | |
|---------|--------------------------------------|------|------|-----------------|------|-------|--------------------|--------------|---------------------|---------|------|------|------|------|--------------|------|------|------|
| | ーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーー | | | 塩基性 non-S RNase | | | バラ科酸性 non-S RNase | | キク亜綱の酸性 non-S RNase | | | | | | | | | |
| | PcSh | PcSm | PpS5 | MdS16 | LCI | LC2 | МС | X2 | PA1 | PP-nonS | PD1 | PD2 | LE | LX | NE | RNS1 | RNS2 | RNS3 |
| PcSx | 85.5 | 63.2 | 74.0 | 97.8 | 28.0 | 29.8 | 32.3 | 27.9 | 25.8 | 27.8 | 29.8 | 26.0 | 26.3 | 29.2 | 28.6 | 27.2 | 26.7 | 30.5 |
| PcSh | - | 64.9 | 75.8 | 85.5 | 29.5 | 30.8 | 31.7 | 31.2 | 25.1 | 29.9 | 29.1 | 27.4 | 28.1 | 29.7 | 28.1 | 28.0 | 28.1 | 33.2 |
| PcSm | 64.9 | - | 62.3 | 63.2 | 28.1 | 30.6 | 28.6 | 30. 2 | 26.7 | 28.5 | 29.5 | 26.2 | 25.8 | 26.6 | 27.8 | 28.6 | 25.5 | 29.6 |
| PA1 | 25.1 | 26.7 | 25.1 | 25.3 | 26.3 | 22.9 | 28.0 | 31.8 | - | 25.9 | 26.1 | 24.1 | 28.4 | 27.5 | 28.9 | 26.4 | 26.3 | 26.5 |
| Pp-nonS | 29.9 | 28.5 | 33.5 | 29.2 | 34.3 | .33.9 | 37.2 | 28.6 | 25.9 | - | 85.9 | 64.7 | 61.4 | 61.3 | 62 .1 | 62.9 | 35.8 | 64.1 |
| PD1 | 29 .1 | 29.5 | 34.1 | 29.8 | 34.3 | 33.9 | 37.2 | 28.1 | 26.1 | 85.9 | - | 66.5 | 61.9 | 62.8 | 65.6 | 63.6 | 34.4 | 63.6 |
| PD2 | 27.4 | 26.2 | 28.0 | 26.0 | 32.7 | 31.9 | 37.7 | 26.7 | 24 .1 | 64.7 | 66.5 | - | 71.8 | 63.8 | 71.7 | 73.8 | 35.0 | 60.7 |

PcSx: Pyrus communis Sx-RNase, PcSh: P. communis Sh-RNase (AB236431), PcSm: P. communis Sm-RNase (AB258362), PpS5: P. pyrifolia S5-RNase (AB045711), MdS16: Malus x domestica S16RNase (AF016919), LC1: Luffa cylindrica RNase LC1 (D64011), LC2: L. cylindrica RNase LC2 (D64012), MC: Momordica charantia RNase MC (P23540), PA1: Prunus avium PA1 (AB096918), X2: Petunia inflata RNase X2 (S28611), LE: Lycopersicon esculentum RNase LE (S33840), LE: L. esculentum RNase LX (S53507), NE: Nicotiana alata RNase NE (U13256), PD1: Prunus dulcis RNase PD1 (AF227522), PD2: P. dulcis RNase PD2 (AF157011), PP-nonS: Pyrus pyrifolia non-S RNase (D49529), RNS1: Alabidopsis thaliana RNS1 (U05206), RNS2: A. thaliana RNS2 (M98336), RNS3: A. thaliana RNS3 (U05207). *RNaseのClass I~IIIへの分類は、Yamane et al. 2003に従った.

第4章

三倍体品種のS遺伝子型推定

く摘要>

第3章で確立した CAPS マーカーシステムを用いて、三倍体と記載されている9品種のS遺 伝子型推定を試みた.フローサイトメトリー分析により8品種の倍数性を確認したところ、6品 種は三倍体、'Jargonelle'と'Pitmaston'は二倍体であった.三倍体3品種から、CAPS マーカーシス テムでは識別されない2種類の新規S-RNase 対立遺伝子 (Su-およびSv-RNase 対立遺伝子)が検 出された.RACE クローニングにより Su-RNase cDNA 完全長配列を決定した.S-RNase 対立遺伝 子の種類から三倍体品種のS遺伝子型を推定した.S遺伝子型に基づいて行なった交配実験に より雄性不稔性や交雑不和合性を確認した.

く緒言>

多くのセイヨウナシ品種は二倍体 (2n = 2x = 34)であるが, 三倍体 (2n = 3x = 51)や四倍体 (2n = 4x = 68)の品種も報告されている (Crane and Thomas 1939; Crane and Lewis 1940; Lewis and Modlibowska 1942). 三倍体や四倍体は二倍体より細胞が大きく, 大きな果実を得られることから, 大果品種として利用価値が高い. しかし, 三倍体では異常な減数分裂が起こるため, 雄性 不稔や雌性不稔を生じやすい. Crawford (1996)は'Triploid'としてニホンナシを含む 27 品種を挙 げ, 用途, 収穫期, 開花期間を記載している. しかし, この場合の'Triploid'の定義は一般的な三 倍体という意味ではなく, 雄性不稔性品種を指している. 雄性不稔性品種を導入したナシ園で は, 受粉樹品種と, さらにその受粉樹品種を結実させるための別の受粉樹品種が必要となるため, 雄性不稔性品種を'Triploid'として紹介している.

Moffett (1933) はセイヨウナシ 15 品種の染色体数を調査し, 'Beurré Diel', 'Beurré d'Amanlis', 'Catillac', 'Pitmaston Duchess'を三倍体品種として同定している. Crane et al. (1940)はセイヨウナシ 81 品種の葉縁, 葉の中肋, 茎の毛, 茎の色の 5 つの形態学的特徴を調査した. 不良花粉を多く生産すること, 生長旺盛で葉が厚いこと, 多くの場合に花が大きく果実が大きいことの 3 点から三倍体品種と二倍体品種を識別できるとし, 'Beurré Alexandre Lucas', 'Beurré d'Amanlis',

'Beurré Diel', 'Jargonelle', 'Pitmaston Duchess', 'Catillac', 'Verulam', 'Vicar of Winkfield'の8品種を 三倍体品種として挙げているが, 染色体数は調査されていない.

これら品種のうち, 'Alexander Lucas (Beurré Alexandre Lucas)', 'Beurré d'Amanlis', 'Beurré Diel', 'Catillac', 'Pitmaston (Pitmaston Duchess)', 'Vicar of Winkfield (Curé)'や'Merton Pride'および 'Triomphe de Jodoigne'が三倍体品種として日本にも導入されている (表 4-1), 'Alexander Lucas' はドイツの主要品種であり、耐寒性とともに火傷病抵抗性を有している (Janick and Moore 1996). 'Beurré d'Amanlis'は三倍体とされているが果実が小さいが、暖地に適した早生品種であ る (Keepers Nursery ホームページ, 以下'Pitmaston'まで同じ). 'Beurré Diel'は果実品質の極めて よい暖地向け中生品種として紹介されている. 'Catillac'は、1665 年にフランスで発見された大 果品種で, 調理に適している. 貯蔵性もよく, イギリスでは 12 月から 3 月まで市場に出回る. 'Merton Pride'は、'Glou Morceau'と'Bartlett' (4x)の交配から 1959 年にイギリスで育成された品種 で、果実品質が極めてよく、生食に適している. 'Vicar of Winkfield'は非常に古い品種であり、 その果実は調理に適している. 'Jargonelle'は古くからある早生品種で、その名を冠した飴が製 造されるなど人々に親しまれている. 'Pitmaston (Pitmaston Duchess)'は, 'Duchesse d'Angouleme' ×'Glou Morceau'の交配から 1841 年にイギリスで育成された品種で、果実が大きく、果実品質 は生食用にも調理用にも優れている. 'Triomphe de Jodoigne'は詳細を示した文献が少なかった が、大果品種として栽培されていると思われる.有用な特性により、これら品種が栽培や育種 に導入される機会も少なくないと考えられ、S遺伝子型情報を明らかにする必要がある.

本章では、三倍体と記載されている9品種について、フローサイトメトリー分析により倍数 性を確認した後、17種類の*S-RNase* 対立遺伝子を識別する CAPS マーカーシステム(第3章)を 用いて品種のS遺伝子型を推定した.三倍体品種3品種からこのシステムでは識別できない2 種類の新規 *S-RNase* 対立遺伝子を見出し、RACE 法により cDNA 完全長配列を決定した.また、 交配実験を行ない、雄性不稔性や交雑不和合性を確認した.

く材料および方法>

材料

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡市)に おいて栽培されているセイヨウナシ 8 品種, 'Alexander Lucas', 'Beurré d'Amanlis', 'Beurré Diel', 'Catillac', 'Jargonelle', 'Merton Pride', 'Pitmaston', 'Vicar of Winkfield'から萌芽葉と未展開葉を,

表4-1 三倍体と記載されていた8品種の由来と諸特性

| 品種 | 原産国 | 親品種 | 開花期 | 収穫 盛期 | 追 熟日数 (日) | 出荷期 | 果実重量 (g) | 糖度 (%) | 酸度 (%) | 果皮色 | 肉質など | その他品種特性 |
|-------------------------|--------------|--|--------|---------------|---------------------|------------------|---------------|--------------|-----------|---------------------------|---------------------------|------------|
| Jargonelle ^z | イギリス | | с с | 8.02 | 13 | 8月 | 77.1 | 11.9 | 0.10 | 黄色 緑黄色 | 粉質, 淡白 溶質, 甘味多, 多汁, 芳香 | 豊産性 |
| Beurré d'Amanlis | フランス 1800 | | с с | 8.23 9月 | 18 | 9月 9月 | 182.1 325 | 10.4 | 0.28 | 緑黄色 銹少 | 粗,生食用 | 暖地向き |
| Alexander Lucas | フランス | | B B | 10.28* 10月 | 36 | 11~1月 | 250.0 | 10.3 | ** | 緑黄色 | crisp, 多汁, 甘い | 火傷病抵抗性,耐寒性 |
| Catillac | フランス 1665 | | D D | 10月下~11月上 | | 1~5月 12~5月 | 650 | | | 緑黄色 | 粗,調理用 | 耐寒性, 貯蔵性 |
| Beurré Diel | ベルギー 1800 | | C C | 9.23* 10月 | 16 | 11~12月 11~12月 | 308.0 500 | 14.0 | 0.24 | 淡黄色 全面 銹 | 溶質, 甘味多, 多汁, 芳香 | 暖地向き |
| Triomphe de Jodoigne | ベルギー | | С | 9月中~10月 | | 11~12月 | 465 | | | | | |
| Merton Pride | イギリス 1959 | Glou Morceau (<i>SbSg</i>) ×Bartlett (<i>SeSeSlSl</i>) (4x) | D | 10.01 | 17 | 9月 | 366.7 | 1 4.2 | 0.32 | 銹 全面 | 溶質、多汁、品質良好 | |
| Vicar of Winkfield | フランス 1760 | | с с | 10.24 10月 | 35 | 12~2月 | 334.5 | 10.9 | 0.16 | 淡黄色 銹少 | 粗,調理用 | |
| Pitmaston ^y | イギリス 1841 | Duchesse d'Angouleme (SaSe) ×Glou Morceau (SbSg) | D D | 9.03* 10月 | 14 | 10~11月 10~11月 | 319.0* 450 | 9.2 | 0.31 | 淡黄色 | 生 食用, 調理 用 | |

品種は収穫期の順、各欄空白は不明または記載なし、

開花期:上段は「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による。最も開花の早い品種の開花日を1とし、A (1~6)、B (7~12)、C (13~17)、D (18~22)、E (23~27)、F (28~32)、G (33~37)と分類している。下段は「Keepers Nursery」(http://www.keepers-nursery.co.uk/searchresultscat.aspx)による。最も開花の早い品種群を A とし、以下、B、C、D、Eと続く、どちらの分類においても、'Bartlett'は D、'Conference'は C、'Abbe Fetal'は D に分類されている。

収穫盛期:無印は農研機構果樹研究所盛岡,*印は、山形県農業総合研究センターにおける調査.

出荷期:上段は「GUIDE OF PEARS」(http://www.pomologie.com/poire/poire1/fpoires/varietes.html),下段は「Keepers Nursery」(http://www.keepers-nursery.co.uk/searchresultscat.aspx)から転載.

果実重量:上段は山形県農業総合研究センターで収穫された果実、下段は「GUIDE OF PEARS」(http://www.pomologie.com/poire/poire1/fpoires/varietes.html)より転載.

その他品種特性は「Keepers Nursery」(http://www.keepers-nursery.co.uk/searchresultscat.aspx)および「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による.

**: 'Alexander Lucas'の酸度は「バラエティー西洋なし」では pH3.8とされている.

*: 'Jargonelle'の肉質、上段は「パラエティー西洋なし」による盛岡の樹、下段は「Directory of Pear Cultivar」(Crawford 1996)による。「パラエティー西洋なし」の果実は短びん形であるが、「The Pears of New York」の果実 は長びん形である(図4-6).

*: 'Pitmaston'の果実重量, 糖度, 酸度は「パラエティー西洋なし」による、「パラエティー西洋なし」の果実は円形であるが、「The Pears of New York」の果実は倒卵形またはびん形である (図47).

神戸大学農学部圃場 (兵庫県神戸市)に接ぎ木された'Triomphe de Jodoigne'から未展開葉を採取 した. 'Catillac', 'Beurré d'Amanlis', 'Jargonelle', 'Merton Pride', 'Vicar of Winkfield'の white stage の 花から花柱を, また, 'Vicar of Winkfield'と'Jargonelle'から花弁と葯を採取した. 萌芽葉はすぐに 実験に供試し, 未展開葉と花柱は液体窒素で急速冷却後, -80℃で保存した.

方法

フローサイトメトリー分析

分析には萌芽葉を用いた.シャーレに試料の葉を5mm角程度とり,植物倍数性分析用DNA試 薬キット (Partec High Resolution Staining Kit for Plant DNA Analysis, Partec GmbH, Münster, Germany)のA液 (核抽出液)を数滴加え,カミソリで試料を細かく刻んで裸核を抽出した.その 後,試料液をメッシュで濾過し,プラスチック製試験管に移した後,同試薬キットB液 (DAPI 染色液)を試料液の約4倍量入れて染色を行ない分析に供した.フローサイトメーターはプロイ ディアナライザーPA型 (Partec GmbH, Münster, Germany)を用い, GAIN 500.0, L-L 30, U-L 999, SPEED 0.60 μl/sの条件下でDAPI蛍光強度を測定した.

CAPS解析

「ゲノムDNAの抽出と精製」は第2章、「CAPS分析」は第3章の方法に従って行なった.

RACE クローニング

「Total RNA の抽出」, 「mRNA の単離」, 「3'RACE および 5'RACE」は第2章の方法に従った. 5'RACE に *Su-RNase* の HV 領域の配列に基づき設計した特異的なリバースプライマー 'HVSu' (5'-GGGTTCGAGTAATTTTTC-3')を用いた.

Sx-RNase の発現解析

'Vicar of Winkfield'と'Jargonelle'の花柱,花粉,花弁,葉の total RNA を鋳型に, *Sx-RNase* 特異 的プライマーセット'FTQQYQ'と'EPSx-anti-IIWPNV'を用いて RT-PCR を行なった.

塩基配列の解析

ゲノミック PCR 増幅断片および RACE における PCR 産物をゲルから抽出した後, TA クローニングに供して目的の断片の塩基配列を解析した. 「ゲルからの PCR 産物の抽出」, 「TA クロ

ーニング」,「塩基配列の決定」は第2章の方法に従った. Sv-RNase の塩基配列はナシ亜科 S-RNase のC5領域配列に基づき設計したリバースプライマー'EpC5R'(5'-GACCTCAACCAATT CA-3')を用いて解析した.

交配実験

交配実験には'Catillac', 'Beurré d'Amanlis', 'Merton Pride', 'Vicar of Winkfield', 'Reimer Red', 'Joséphine de Malines', 'Beurré Hardy', 'Docteur jules Guyot', 'Michaelmas Nelis'を用いた. 交配および調査は第1章で確立した方法により行なった. 交配約10週間後に結実数と充実種子数を調査した. 結実率, Seeds/Flower, SI index を算出し, 不和合・和合を判定した.

く結果>

倍数性解析

Crane et al. (1940)の品種分類において三倍体と記載されている 7 品種, 'Alexander Lucas', 'Beurré d'Amanlis', 'Beurré Diel', 'Catillac', 'Jargonelle', 'Pitmaston (Pitmaston Duchess)', 'Vicar of Winkfield'に加え、三倍体品種として日本に導入されている'Merton Pride'の倍数性をフローサ イトメトリーにより分析した.対照として二倍体の'Bartlett'および'La France'を用いた場合,そ れぞれ平均値 43.88 および 48.46 に大きなピークが、平均値 87.64 および 96.15 に小さなピーク が検出された (図 4-1). どちらの品種においても後者の平均値は前者の約2倍であることから, 大きなピークが二倍体の細胞 (2n = 34)の核を示し、小さなピークは細胞周期の S 期にあり DNA 量が倍加している細胞 (4n = 68)の核であると推測された. 一方, 'Alexander Lucas', 'Beurré d'Amanlis', 'Beurré Diel', 'Catillac', 'Merton Pride', 'Vicar of Winkfield'ではそれぞれ 69.72, 75.12, 70.19, 72.42, 76.09, 75.68 に大きなピークが検出された. これらのピークは二倍体 (2n = 34)のピ ークの約 1.5 倍の核 DNA 量に検出されたことから、三倍体 (3n = 51)の核とみなされた. 'Jargonelle'と'Pitmaston'では 49.68 と 49.90 に大きなピークが検出され、どちらも二倍体 (2n = 34)の核と判定された. したがって, 'Alexander Lucas', 'Beurré d'Amanlis', 'Beurré Diel', 'Catillac', 'Merton Pride', 'Vicar of Winkfield'は記載通りに三倍体であることが確認されたが, 'Jargonelle'と 'Pitmaston'は二倍体と判定された (表 4-2). 過去の研究と本章で用いた'Jargonelle'と'Pitmaston' が同名異種である可能性が考えられたが、本章ではこの結果に基づいて以降の解析を行なった。



図4-1 'La France' (二倍体) (a) と 'Beurré d'Amanlis' (三倍体) (b)のフローサイトメトリー分析.

表4-2 三倍体と記載されていた8品種の倍数性と推定S遺伝子型

| | フロー | 第3章で開発した | | 3'RACEKLZ | |
|----------------------|---------|-----------------|-------------------------|-----------------|--------|
| 品種 | サイトメトリー | CAPSマーカーシステムによる | 塩基配列の解析による | S-RNase cDNA断片の | 推定 |
| | 分析 | ゲノミックPCR断片の識別 | ゲノミックPCR断片の識別 | クローニング | S遺伝子型 |
| Alexander Lucas | 三倍体 | Sb, Se, Ss | Sb, Se, Ss | n.d. | SbSeSs |
| Catillac | 三倍体 | Sb, Sc, Ss | Sb, Sc, Ss | Sb, Sc, Ss | SbScSs |
| Beurré Diel | 三倍体 | Sa, Sb, Se | Sb, Se, Sv | n.d. | SbSeSv |
| Triomphe de Jodoigne | n.d. | Sa, Sb, Sl | Sb, Sl, <mark>Sv</mark> | n.d. | SbSlSv |
| Beurré d'Amanlis | 三倍体 | Sb, Sd | Sb, Sd | Sb, Sd | SbSd |
| Merton Pride | 三倍体 | Sb, Sl | Sb, Sl | Sb, Sl | SbSI |
| Vicar of Winkfield | 三倍体 | Sd, Sk | Sk, Su | Sk, Su, Sx | SkSuSx |
| Jargonelle | 二倍体 | Sm | Sm | Sm, Sx | SmSx |
| Pitmaston | 二倍体 | Se, Si | Se, Si | Se, Si | SeSi |

n.d.: サンプルがないため未調査.

CAPS マーカーシステムによる S 遺伝子型推定

二倍体の'Pitmaston'と'Jargonelle', および三倍体 7 品種の S 遺伝子型を第 3 章で確立した CAPS マーカーシステムにより推定した (図 4-2). 'Pitmaston'からは 998 bp の Se-RNase 対立遺伝 子および約 350 bp の断片が増幅された. 制限酵素処理により約 350 bp の断片が Si-RNase 対立遺 伝子と識別されたことから, S 遺伝子型は SeSi と推定された. 'Jargonelle'からは約 350 bp 断片の みが増幅され, 制限酵素処理により Sm-RNase 対立遺伝子と特定された. 1 種類の断片しか増幅 されなかったので, プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR では増幅さ れない, あるいは 11 種類の制限酵素では識別できない新規 S-RNase 対立遺伝子を'Jargonelle'が 持つ可能性が考えられた.

三倍体7品種のうち4品種からは、それぞれ3種類の断片が増幅された. 'Alexander Lucas'からは998 bpの*Se-RNase* 対立遺伝子,440 bpの*Sb-RNase* 対立遺伝子,約350 bpの断片が増幅され、約350 bpの断片は*Ss-RNase* 対立遺伝子と識別された. 'Catillac'からは440 bpの*Sb-RNase* 対立遺伝子と2種類の約350 bpの断片が増幅され、約350 bpの断片は*Sc-とSs-RNase* 対立遺伝子と識別された. 'Beurré Diel'からは998 bpの*Se-RNase* 対立遺伝子,440 bpの*Sb-RNase* 対立遺伝子,約350 bpの断片が増幅され、約350 bpの断片は*Sa-RNase* 対立遺伝子と識別された. 'Triomphe de Jodoigne'からは1,414 bpの*Sl-RNase* 対立遺伝子,440 bpの*Sb-RNase* 対立遺伝子,約350 bpの断片は*Sa-RNase* 対立遺伝子,約350 bpの断片は*Sa-RNase* 対立遺伝子,約350 bpの断片は*Sa-RNase* 対立遺伝子,約350 bpの断片が増幅され、約350 bpの断片は*Sa-RNase* 対立遺伝子と識別された. 'Triomphe de Jodoigne'からは1,414 bpの*Sl-RNase* 対立遺伝子と識別された.

一方, 'Beurré d'Amanlis', 'Merton Pride', 'Vicar of Winkfield'の3品種からは2種類の断片が増幅 された. 'Beurré d'Amanlis'からは440 bp の *Sb-RNase* 対立遺伝子と約350 bp 断片が増幅され, 約 350 bp 断片は *Sd-RNase* 対立遺伝子と識別された. 'Merton Pride'からは1,414 bp の*Sl-RNase* 対立 遺伝子と440 bp の*Sb-RNase* 対立遺伝子が増幅された. 'Vicar of Winkfield'からは約1.3 kb 断片と 約350 bp の断片が増幅され, 制限酵素切断によりそれぞれ *Sk-と Sd-RNase* 対立遺伝子と識別さ れた.

CAPS マーカーシステムにより識別された増幅断片の種類に基づき,各品種の S 遺伝子型を, 'Alexander Lucas' (SbSeSs), 'Catillac' (SbScSs), 'Beurré Diel' (SaSbSe), 'Triomphe de Jodoigne' (SaSbSl), 'Beurré d'Amanlis' (SbSdS-), 'Merton Pride' (SbSlS-), 'Vicar of Winkfield' (SdSkS-)と仮に推 定した (表 4-2). 'Beurré d'Amanlis', 'Merton Pride', 'Vicar of Winkfield' からは 2 種類の S-RNase 対 立遺伝子しか増幅されなかったことから, これら品種は, (1)既知の S-RNase 対立遺伝子を重複 して持つ, (2)プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR では増幅されない 新規 S-RNase 対立遺伝子を持つ, (3)11 種類の制限酵素では識別できない新規 S-RNase 対立遺伝



図4-2 プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミックPCRによる 三倍体と記載されていた9品種からのS-RNase対立遺伝子の増幅. S遺伝子型は第3章 のCAPSマーカーシステムによる. 子を持つ、という3種類の可能性が示された.

RACE 法による cDNA クローニング

三倍体品種 5 品種, 'Alexander Lucas', 'Catillac', 'Beurré d'Amanlis', 'Merton Pride', 'Vicar of Winkfield'および二倍体品種の'Jargonelle'と'Pitmaston'の total RNA を鋳型に 3'RACE を行ない, TA クローニング後, 各コロニーのインサート DNA 配列を解析した. 三倍体品種'Beurré Diel'と 'Triomphe de Jodoigne'は花柱をサンプリングできず, RACE クローニングに供することができな かった. 'Alexander Lucas'からは*Sb-, Se-, Ss-RNase*のcDNA 断片が, また, 'Catillac'からは*Sb-, Sc-, Ss-RNase* cDNA 断片がクローニングされ, CAPS 解析で特定された 3 種類の *S-RNase* 対立遺伝子 の発現が確認された (表 4-2). 'Pitmaston'からは *Se-と Si-RNase* cDNA 断片がクローニングされ, CAPS マーカーシステムによる推定と一致した.

一方, 'Jargonelle'からは Sm-RNase cDNA 断片に加え, 第3章において10品種からクローニン グされたが, 花柱特異的発現を示さないことから, S-RNase 対立遺伝子と結論づけることができ なかった Sx-RNase の cDNA 断片がクローニングされた. 'Vicar of Winkfield'からは3 種類の cDNA 断片がクローニングされた.1種類の断片は Sk-RNase 対立遺伝子, もう1種類は Sx-RNase であったが, 残る1種類は Sd-RNase 対立遺伝子とは異なる塩基配列を持つ新規 S-RNase であっ た. この新規 cDNA 断片の配列は17 種類の S-RNase および推定 So-RNase 対立遺伝子, また, ニ ホンナシ S-RNase の配列と一致しなかったことから, Su-RNase と名付けた. 'Beurré d'Amanlis'か らは Sb-と Sd-RNase cDNA 断片が, 'Merton Pride'から SI-と Sb-RNase cDNA 断片が得られ, 新規 S-RNase 対立遺伝子は増幅されなかった (表 4-2).

5'RACE を行なって Su-RNase の 5'末端側をクローニングし, 3'および 5'末端側配列の重複か ら Su-RNase の cDNA 完全長塩基配列を決定した. Su-RNase は 684 bp からなり, 228 アミノ酸を コードし, 推定アミノ酸配列はナシ亜科 S-RNase に典型的な一次構造を有していた (図4-3). ま た, 17 種類のセイヨウナシ S-RNase との相同性は 59.8%~74.8%となり, Ss-RNase と Su-RNase 間の相同性 59.8%は 18 種類のセイヨウナシ S-RNase 間の相同性で最も低かった (表 3-7).

Sx-RNase の器官特異的発現を RT-PCR により解析したところ, Sx-RNase は'Vicar of Winkfield' では花柱と花弁で, 'Jargonelle'では花柱と花弁に加え, 葯でも発現していた (図 3-14).

ゲノミック PCR 増幅断片の解析

RACE クローニングにより'Vicar of Winkfield'から新規 Su-RNase 対立遺伝子がクローニング

| | | * * | # | * | V | | | |
|------------|-------------------------------------|--|--------------------|-----------------|--------------|-------------------|-----------------|-----|
| Sa-RNase | MGITGIIYMVTMVFLLIVLILPSPTVG | YDYFOF TOOYOLAVCH | FNPTPCKDPPDKLFTV | GLWPSNSTGNDPM | YCKNTTLNSTK- | IAN-LTAOLEIIWPN | WLDRTDHITFWNKQ | 112 |
| Sb-RNase | MG-TGMIYMVMMVFSLIVLILSSSTVG | FDYYOFTOOYOPAVCI | NSNPTPCKDPPDKLFTVI | HGLWPSDSNGNDPK | YCKAPP-Y-OT- | MKI-LEPHLVIIWPN | WLNRNDHEVFWRKQ | 109 |
| Sc-RNase | MGITGMIYMVPTVFSLIVLILSSSA | AKYDYFOFTOOYOPAVCI | NSNPTPCSDPTDKLFTV | HGLWPSKSSGRDPK | RCSKTPVOSOT- | ITN-LKAOLEIIWPN | WLNRANNITFWETO | 112 |
| Sd-RNase | MGNTGMIYMFTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFOFTOOYOPAVCI | NSNPTPCNDRPEKLFTV | HGLWPSNKKGPDPEI | KCKNIOMNSOK- | IGN-MAAQLEIIWPN | WLNRTDHVGFWERE | 112 |
| Se-RNase | MGITRMIYMVTMAFSLIVLILSSSTMG | YDYFOFTOOYOPAACI | NSNPTPCKDPTEKLFTV | HGLWPSNSNGPDPV | NCKPKTKVPOAO | OPIDPSLKPOLEIIWPN | WFNRADNESFWNKO | 116 |
| Sg-RNase | MGIIGMIYMVMMVFSLIVLILSSSTVG | FDYFOFTHOYOPAVCI | NSNRTPCKDPPDKLFTV | HGLWPSNRNGPDPE | YCKNTTLDVTK- | -IGN-LOAOLDITWPN | WYDRTNNVGFWSKO | 112 |
| Sh-RNase | MGITGMIYMVTMVFSLLVSILSSSTVG | FDYFOFTOOYOPAACI | NSNPTPCKDPTDKLFTVI | HGLWPSNKIGGDPE | YCKIRNPRK- | RAKKLEPOLEIIWPN | WLDRTNHTGFWSRQ | 111 |
| Si-RNase | MGITGMIYIVTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFOFTOOYOPAVCH | RSNPTPCKDPTDKLFTVI | HGLWPSNLNGPHPE | NCTNATVNSHR- | IKN-IOAOLKIIWPN | WLDRTNHLGFWNKQ | 112 |
| Sk-RNase | MGITGMIYMVTMVFSLIVLIISSSA | VKFDYFOFTOOYOPAVCI | NSNPTPCKDPPDKLFTV | HGLWPSNVNGSDPK | KCKATILNPOT- | ITD-LKAOLEIIWPN | WLNRKAHVRFWRKQ | 112 |
| S1-RNase | MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA | AKYDYLOFTOOYOPAACH | KFHHTPCKDPLDKLFTVI | HGLWPSNFNGPDPE | NCKVKPTASQT- | IDTSLKPQLEIIWPN | WFNRADHESFWQKQ | 113 |
| Sm-RNase | MGITGIIYMVTTVFSLVVLIFSSSTVG | FDYFOFTOOYOPAACI | NSNPTPCKDPPAKLFTVI | HGLWPSNWNLPDPI | FCKNTTITPQQ- | IGH-IQAQLEIIWPN | WFNRTNHLVFWNKQ | 112 |
| Sn-RNase | MGITGMIYIVTVVFSLIVLILSSSTVG | YDYFQFTQQYQPAVCI | NSKPTPCKDPPDKLFTVI | HGLWPSNLNGPHPE | NCTNATVNSHR- | IKN-IQAQLKIIWPN | NVLDRTNHVGFWNKQ | 112 |
| Sp-RNase | MGITGMIYIVTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFOFTOOYOPAVCH | RSNPTPCKDPTDKLFTVI | HGLWPSNLNGPHPA | NCTNATVNSHR- | IKN-IEAQLKIIWPN | NVLDRTNHVGFWNKQ | 112 |
| Sq-RNase | MGITGMIYMVTVVFSLIVLILSSSA | VKFDYFQFTQQYQPAVCI | NSNPTPCKDPPDKLFTVI | HGLWPSNVNGSDPK | KCKTTILKPRT- | IRN-LKAQLEIIWPN | NVSYSKGSVRFWRKQ | 112 |
| Sr-RNase | MGITGMIHIVTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFOFTOOYOPAVCY | FNPTPCKDPPDKLFTV | HGLWPSNLNGPHPE | NCTNATVNSQR- | ITN-IQAQLKIIWPN | NVLDRTNHVGFWNKQ | 112 |
| Ss-RNase | MGVTGMTYMFTMVFSLIVLILSSSTVG | YDYFOFTOOYOPAVCI | NSNPTHCNDPTDKLFTVI | HGLWPSNRNGPDPE | KCKTTALNSQK- | IGN-MTAQLEIIWPN | NVLNRSDHVGFWEKE | 112 |
| St-RNase | MGITGMIYMVTMVFSLIVLILSSSA | AKYDYLOFTOOYOPAACI | NSHPTPCKDPPDKLFTV | HGLWPSNVNGPDPE | NCKVKPTPSQT- | IDTSLKPQLEIIWPN | NVFNRADHESFWQKQ | 113 |
| Su-RNase | MGITGMVYVVTMVFLLIVLILSSSTMG | HDYFOFTOOYOLAVCI | NSNRAPCKDPPDKLFTV | HGLWPSSMVGPDPSI | NCSIRNIRK- | REKLLEPQLAIIWPN | NVFDRTKNKLFWDKE | 111 |
| Sv-RNase | | | PCKDPPDKLFTV | HGLWPSNSTGNDPI | YCKNTTMNSTK- | IAN-LTARLEIIWPN | NVLDRTDHITFWNKQ | |
| Sx-RNase | MGITGMISMVTMVFSLLVLILSSSTVG | FDYFQFTQQYQPAVCI | NFNPTPCKDPTDKLFTVI | HGLWPSNNVGGDPE | SCKIRNHRA- | RAKALEPQLEIIWPN | NVLDRTNHTAFWRRQ | 111 |
| | | | | | | | | |
| | Signal peptide | C1 | (| 22 | HV | | | |
| | | | | | | | | |
| # * | | | * | | * | * * | | |
| Sa-RNase | WNKHGSCGRPAIQNDMHYLQTVIKMYI | TQKQNVSEILSKAKIEPVO | GRFWTQKEIEKAIRKGT | NNKEPKLKCQRNTQ | GTELVEVTIC | SDRNLKQFIDCPRPILM | NGSRYYCPTNNILY | 228 |
| Sb-RNase | WDKHGSCASSPIQNQTHYFDTVIKMYT | TQKQNVSEILSKANIKPG | RKSRRLVDIENAIRKVI | NNMTPKFKCQKNPR' | TSLTELVEVGLC | SDSNLTQFINCPHPFPQ | QGSRYFCPTN-IQY | 226 |
| Sc-RNase | WEKHGTCGGPTIQGDEHYFRTVIKMYI | TQKQNVSKILSKAKIEPE | GKIWAREEIVKAIRQST | DDKRPKLKCKKNTQ | NTELVEVTLC | SDENLTQFINCPRPYPH | KGSRYFCPINGIQY | 228 |
| Sd-RNase | WLKHGTCGYPTIRDDMHYLKTVIKMYI | TQKQNVSAILSKAMIQPN | GQNRSLVDIENAIRSGT | NNTKPKFKCQKNTR | T-TTELVEVTLC | SDRDLTKFINCPQP-Q | QGSRYLCPA-DVQY | 227 |
| Se-RNase | WDKHGTCGYPTIKDKNHYLQTVIKMYI | TQKQNVSQILSKANINPD | GIGRTRKLIENAIRNGT | NDKEPKLKCQKNNG | TIELVEVSLC | SNYLGKHFINCPNKIPG | QGSRYFCPIKDIQY | 232 |
| Sg-RNase | WAKHGICGSPTIQDDVNYLETVINMYI | IKKQNVFEILSNAKIEPE | GKNRTRKDIVKAIRSGT | NGKRPKLKCQKNNR | TTELVEVTLC | SDRNLTRLINCPNLIKE | PKSPYFCPLKSIHY | 228 |
| Sh-RNase | WKKHGACGYPTIQNENDYFETVIKMYI | TEKQNVSRILSNAKIEPD | GKSRALVDIENAIRNGT | NNKLPKLKCQKKTR | VTELVEITLC | SDKNRAHFIDCPNPFLE | PGSPYLCPNNSIHY | 227 |
| S1-RNase | WIKHGSCGNPPIMNDTHYFQTVINMYI | TQKQNVSEILSKAKIEPLA | GIQRPLVDIEKAIRNSI | NKKKPKFKCQNNGG | VTELVEISLC | SDRSLTQFRDCPHPFPF | PGSPFLCPA-DIQY | 221 |
| Sk-RNase | WRKHGACGYPTIADDMHYFSTVIEMYI | TKKQNVSEILSKANIKPE | GRFRTRDDIVNAISPSI | DYKKPKLKCKINNQ | TTELVEVGLC | SDNNLTQFINCPNPFPQ | QGSPYFCPTNNIQY | 228 |
| S1-RNase | WDKHGTCGSPTIIDKNHYFQTVIRMYI | TEKQNVSYILSKANINPD | GKGRTRKDIQIAIRNST | NDKEPKLKCQTKNG | ITELVEVSLC | SNYLGKNFINCPNKTPC | GKTRYSCPTNDIHY | 229 |
| Sm-RNase | WNKHGGCGYTTINDEIQYFETVIKMYI | TKKQNVSKILSKAKIKPE | GKNRTRTEIINAISIST | NNMTPKLKCQKNNG | TIELVEVTLC | NDHNITKFINCRHPYDE | PQSQFFCPKINILY | 228 |
| Sn-RNase | WIKHGSCGYPAIMNDTHYFQTVINMYI | TQKQNVSEILSKAKIEPLA | GIQRPLVHIENAIRNST | NNKKPKFKCQKNSG | VTELVEVSLC | SDGSLTQFRNCPHP-PI | PGSPYLCPA-DIQY | 226 |
| Sp-RNase | WIKHGSCGNPPIMNDTHYFQTVINMYI | TRKQNVSGILSKAKIEPV | GLKRPLVDIENAIRNST | NNKKPKFKCQTKNR | VTELVEISLC | SDGSLTQFINCPRPFP | PGSPFLCPA-DIEY | 227 |
| Sq-RNase | WRKHGTCGYPTIADDMHYFSTVIEMYT | TKKQNVSEILLKAKIKPE | GRFRTRDDIVNAISQSI | DDKEPKLKCKNNNN | ITELVEVGIC | SDNNLTQFINCPHPFPQ | QGSPYLCPTNNIQY | 228 |
| Sr-RNase | WIKHGSCGNPPIMNDTHYFQTVINMYI | IKKONVFEILSNAKIEPE | GKNRTRKDIVKAIRSGT | NGKRPKLKCQKNNR | TTELVEVTLC | SDRNLTRLINCPNLIKE | PKSPYFCPLKSIQY | 228 |
| Ss-RNase | WIKHGTCGYPTIKDDMHYLQTVIRLYI | IQKQNVSAILSKAAIQPN | GTNRPLVDIENAIRRGT | NNTKPKFKCQKNTR | T-TTELVEVTLC | SDRDLKKFINCPHGPPG | QGSRFSCP-SSVQY | 228 |
| St-RNase | WDKHGTCGSPTIIDKNHYFETVIRMYI | TEKQNVSYILSKANINPD | GRGRTRKDIEIAIRNST | NDKEPKLKCQKKKN | G-IIELVEVSLC | SNYLGKNFINCPNK-NE | PGSRYSCPTKDIHY | 229 |
| Su-RNase | WMKHGTCGYPTIDNENHYFETVIKMYI | SKKQNVSGILSKAKIEPD | GKKRALLDIENAIRKGA | DNKKPKLKCQKKGT | MTELVEITLC | SDKSGEHFIDCPHPFE | PISPHYCPTNNIKY | 227 |
| Sv-RNase | WNIKHCSCCHDA TONDMHYT OTTTTKMYT | TODONTOTT OD NUTTODI | TREDUCKETERATORCO | MININE DET VOO | | | | |
| Sx-RNase | MININGPOOLIT AT & MANINITY I VIIIII | TORONVSEILSRAKIEPV | SAL KIQAETENATKAGI | MINTEPLENCQ | | | | |
| Dir ratabe | WIKHGTCGYPTIQNENDYFETVVKMYT | TEKQNVSEILSRAKIEPK TEKQNVSKILSSAKIEPK | GIKRTLADLEIAIRNGT | DNKKPKFKCQKKRR | VTELVEVTLC | SDKNRAHFIDCPNPFQ | PGSPYLCPTNNILY | 227 |
| on nueve | WIKHGTCGYPTIQNENDYFETVVKMYT | TEKONVSEILSKAKIEPU TEKONVSKILSSAKIEPD | GIKRTLADLEIAIRNGT | DNKKPKFKCQKKRR | VTELVEVTLC | SDKNRAHFIDCPNPFQI | PGSPYLCPTNNILY | 227 |

図43 20 種類のセイヨウナシ S-RNase の推定アミノ酸配列の比較

全 S-RNase 間で保存されているアミノ酸残基を網掛けで示す。高次構造形成に関与する8つのシステイン残基、および、RNase 活性に必須の2つのヒスチジン残基をそれぞれ*と#で記す。シグナルペプ チド、超可変 (HV)領域、保存領域 (C1, C2, C3, RC4 and C5)は下線により示す。イントロンの挿入部位は▼で示す。17種類の S-RNase は下記の accession number で DDBJ に登録されている: Sa-RNase (AB236430), Sb-RNase (AB236429), Sc-RNase (AB258359), Sd-RNase (AB236427), Se-RNase (AB236428), Sg-RNase (AB258360), Sh-RNase (AB236431), Si-RNase (AB258361), Sk-RNase (AB258363), Sp-RNase (AB236432), Sr-RNase (AB236425), Sm-RNase (AB258362), Sn-RNase (AB258363), Sp-RNase (AB258363), Sp-RNase (AB258364), Sg-RNase (AB236426), Sr-RNase (AB258365), St-RNase (AB258366), Su-RNase, 推定 Sv-RNase, Sx-RNase (AB236426), Sr-RNase (AB258365), St-RNase (AB258366), Su-RNase, Kare Sk-RNase (AB258364), Sg-RNase (AB258364), Sg-RNase (AB258364), Sg-RNase (AB258364), Sr-RNase (AB258364), Sr-RNase (AB258364), Sr-RNase (AB258364), Sg-RNase (AB258364), Sr-RNase (AB25836424), Sr-RNase (AB25836426), Sr-RNase (AB258364), Sr-RNase (AB2583 されたことから、増幅断片長と 11 種類の制限酵素による切断片長多型から識別できない S-RNase 対立遺伝子が他にも存在する可能性が示唆された.そこで、三倍体品種7品種のゲノム DNA から増幅された断片 (図 4-2)の塩基配列をすべて解析した. 'Vicar of Winkfield'の Sd-RNase と識別された約 350 bp の断片が Su-RNase の断片であり、Su-RNase 対立遺伝子は 179 bp のイン トロンを有する 376 bp の断片として検出されることが明らかになった (図 4-4). 'Beurré Diel'と 'Triomphe de Jodoigne'から増幅された 345 bp の断片は Sa-RNase 対立遺伝子とは異なる配列を持 つことが示された (図 4-5). プライマー'FTQQYQ'と C5 領域の配列から設計したプライマー 'EpC5R'を用いたゲノミック PCR を行ない、C5 領域直前までの塩基配列を決定したところ、推 定 So-RNase 対立遺伝子およびニホンナシ S-RNase とも異なる配列を有していたので、新規 S-RNase であると考え、推定 Sv-RNase 対立遺伝子と名付けた. 塩基配列から推定されるアミノ 酸配列にはナシ亜科 S-RNase の相当する部分の特徴が確認できた (図 4-3). その他の断片は CAPS 解析により特定された S-RNase 対立遺伝子の配列と一致した.

最終的に、3'RACE およびゲノミック PCR において増幅された断片の種類に基づき、 'Alexander Lucas' (*SbSeSs*), 'Catillac' (*SbScSs*), 'Beurré Diel' (*SbSeSv*), 'Triomphe de Jodoigne' (*SbSlSv*), 'Beurré d'Amanlis' (*SbSd*), 'Merton Pride' (*SbSl*), 'Vicar of Winkfield' (*SkSuSx*), 'Jargonelle' (*SmSx*), 'Pitmaston' (*SeSi*)と各品種の推定 *S* 遺伝子型を修正した (表 4-2).

雄性不稔性および交雑不和合性

三倍体品種 (3x)の雄性不稔性を,三倍体品種 (3x)の花粉を重複する S 対立遺伝子を持たない 二倍体品種に受粉することで調査した (表 4-3). 'Beurré d'Amanlis' (SbSd, 3x)および'Catillac' (SbScSs, 3x)の花粉は'Docteur jules Guyot' (SaSe)に対して,それぞれ 0.6 および 0.8 Seeds/Flower を示した. 'Vicar of Winkfield' (SkSu, 3x)の花粉は'Beurré Hardy' (ScSd)に対して 0.2 Seeds/Flower を示した. これらの値は'Reimer Red' (SbSc)および'Pitmaston' (SeSi)の花粉を受粉した場合の Seeds/Flower, 5.8 および 7.8 に比べて明らかに小さかったことから,これら 3 品種を雄性不稔と 判定した. 'Merton Pride' (SbSl, 3x)の花粉は, Sl 対立遺伝子が重複する'Michaelmas Nelis' (ShSl)に 対して 2.3 Seeds/Flower (2005 年)を,S 対立遺伝子が重複しない'Beurré Hardy' (ScSd)に対して 0.2 Seeds/Flower (2006 年)を示したことから, 'Merton Pride'も雄性不稔性と判定した.

'Beurré d'Amanlis', 'Catillac', 'Vicar of Winkfield', 'Merton Pride'は雄性不稔性であるので, 自家 受粉, および, これら品種を花粉親とした3種類のS対立遺伝子のうち2種類を共有する二倍体 品種に対する他家受粉, 'Reimer Red' (*SbSc*)×'Catillac' (*SbScSs*, 3x)および'Joséphine de Malines'

| ATGGGGATTACGGGGATGGTATATGTGGTTACGATGGTATTTTTATTAATTGTGTTAAT M G I T G M V Y V V T M V F L L I V L J | TA 60 [20 |
|--|------------------|
| TTGTCTTCGTCCACGATGGGACACGATTATTTTCAATTTACCCAGCAATATCAGTTGGG LSSSTMGHDYFQFTQQYQLA | CT 120 4 40 |
| $ \begin{array}{cccc} {\tt GTCTGCAACTCTAATCGTGCTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACGGTTCA} \\ {\tt V} & {\tt C} & {\tt N} & {\tt S} & {\tt N} & {\tt R} & {\tt P} & {\tt C} & {\tt K} & {\tt D} & {\tt P} & {\tt D} & {\tt K} & {\tt L} & {\tt F} & {\tt T} & {\tt V} \\ \end{array} $ | AC 180 60 |
| $\begin{array}{ccccccc} {\rm GGTTTGTGGCCTTCAAGCATGGTAGGACCTGACCCAAGTAATTGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAGGAATATGCTCGATAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAGGAATATGCTCGATAGGAATATGCTCGATGAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAAGGAATATGCTCGATAGGAATATGCTCGATAGGAATATGCTCGATAGGAATATGCTCGATGGAAGGAA$ | T 240 80 |
| $\begin{array}{c} CGGAAGgtaaaaattattagtaatcagatggtcaatattgtttatttcatttatgtcctt \\ R K \end{array}$ | g 300 82 |
| tgcgtgtgtttgtgtatattcaatatatacgtcctcaaacatagattttcattca | gt 360 at 420 |
| accag-AGAGAAAAATTACTCGAACCCCAGCTGGCAATAATTTGGCCGAACGTATTCGA R E K L L E P Q L A I I W P N V F I | AT 479) 100 |
| CGAACCAAAAATAAACTCTTCTGGGATAAAGAGTGGATGAAACATGGCACCTGTGGGTARTKNKLFWDKEWMKHGTCGY | T 539 120 |
| $ \begin{array}{c} CCCACAATAGATAACGAGAACCATTACTTTGAAAACCGTAATCAAAATGTACATCAGCAAPTIDNENHYFETVIKMYISK \\ \end{array}$ | G 559 140 |
| AAACAAAACGTCTCTGGAATCCTCTCAAAGGCGAAGATTGAACCGGACGGGAAAAAAAA | A 659 160 |
| GCACTGTTGGATATTGAAAATGCCATACGCAAGGGTGCCGACAATAAGAAACCAAAACTAALLDIENAATGCCATACGCAAGGGTGCCGACAATAAGAAACCAAAACTAAGAAACAAAC | C 719 180 |
| AAGTGCCAAAAGAAGGGTACGATGACTGAATTAGTTGAGATCACTCTTTGCAGTGACAAKCQCCAAAAGAAGGGTACGATGACTGAATTAGTTGAGATCACTCTTTGCAGTGACAAAGAAGGGTACGATGACTGAATTAGTTGAGATCACTCTTTGCAGTGACAAAGAAGGGTACGATGACTGAATTAGTTGAGATCACTCTTTGCAGTGACAAAGAAGGGTACGATGACTGAATTAGTTGAGATCACTCTTTGCAGTGACAAAGAAGGGTACGATGACTGAATTAGTTGAGATCACTCTTTGCAGTGACAAAGAAGGGTACGATGACAAAGAAGGGTACGATGACTGAATTAGTTGAGATCACTCTTTGCAGTGACAAAGAAGGGTACGATGACAAAGAAGGGTACGATGACAAAGAAGAGGGTACGATGACAAAGAAGAGGGTACGATGACAAAGAAGGGTACGATGACAAAGAAGAGGGTACGATGACAAAGAAGAGGGTACGATGACAAAGAAGAGGGTACGATGACAAAGAAGAAGAGGGTACGATGACAAAGAAGAAGAAGGGTACGATGACAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAGAAAAAGAAG | A 779 200 |
| AGCGGAGAACATTTCATAGATTGCCCCCACCCCTTTGAACCAATATCACCACATTATTGCSGAGAACATTTCATAGATTGCCCCCCCCCC | C 839 220 |
| CCCACCAACAATATCAAGTATTAA P T N N I K Y * | 863 227 |

図 4-4 Su-RNase ゲノム DNA の塩基配列と推定アミノ酸配列. 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 下線部: シグナルペプチド, 小文字: イントロン, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (がプライマーの 5' 側)を表す.

| TTTACCCAGCAATATCAGCCGGCTGTCTGCCACTTTAATCCTACTCCTTGTAAGGATCCT F T Q Q Y Q P A V C H F N P T P C K D P | 60 |
|--|--|
| $\begin{array}{c} CCTGACAAGTTGTTTACGGTTCACGGTTTGTGGCCTTCAAACAGCACAGGAAATGACCCA\\ P D K L F T V \overset{H}{H} G L W P S N S T G N D P \end{array}$ | 120 |
| ATATACTGCAAGAATACAACCATGAATTCTACTAAGgtaatattattaataatcagatgt I Y C K N T T M N S T K | 180 |
| taa at att gttt att t cat at a cat at a ctcca a cat a a att t t cat g cat g cgt gt g aga at att a caat t a att t a a a att t a a a a | $\begin{array}{c} 240\\ 300 \end{array}$ |
| $ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$ | 360 |
| $ \begin{array}{ccccc} {\sf GATCATATAACCTTCTGGAATAAACAGTGGAACAAACATGGCAGCTGTGGGCATCCCGCA} \\ {\sf D} & {\sf H} & {\sf I} & {\sf T} & {\sf F} & {\sf W} & {\sf N} & {\sf K} & {\sf Q} & {\sf W} & {\sf N} & {\sf K} & {\sf H} & {\sf G} & {\sf S} & {\sf C} & {\sf G} & {\sf H} & {\sf P} & {\sf A} \end{array} $ | 420 |
| ATACAGAACGACATGCATTACTTGCAAACAGTAATCAAAATGTACATAACCCAGAGACAA \mathbf{I} Q \mathbf{N} D \mathbf{M} H \mathbf{Y} L \mathbf{Q} T \mathbf{V} I \mathbf{K} M \mathbf{Y} I \mathbf{T} Q \mathbf{R} Q | 480 |
| $ \begin{array}{cccc} AACGTCTCTGAAATCCTCTCAAGGGCGAAGATTGAACCGGTGGGGAAATTCAGGACACAG\\ \mathsf{N & V & S & E & I & L & S & R & K & I & E & P & V & G & K & F & R & T & Q \\ \end{array} $ | 540 |
| AAGGAAATTGAAAAGGCCATACGCAAAGGTACCAACAATAAGGAACCAAAACTCAAGTGC K E I E K A I R K G T N N K E P K L K C | 600 |
| CAAAA Q | |

図 4-5 Sv-RNase ゲノム DNA の部分塩基配列と推定アミノ酸配列. 赤色: HV 領域, 青色: 高次構造形成に関与する 8 つのシステイン残基, 桃色: RNase 活性に必須の 2 つのヒスチジン残基, 小文字: 推定イントロン領域, 橙色: CAPS マーカーシステムのプライマーの位置 (_____がプライマーの 5' 側)を表す.

| | | の事にて知 | 14 W. M. | | c\ # /= Z ₩i | 放散器 | 交配 | 結実率 | Seeds | SI |
|-------------|----------------------|--------|-----------|------------------------|----------------------------|-------|----|-------|------------------|-------|
| 文配 年 | 俚丁祝 | の遺伝丁型 | 16790,11± | 112初7税 | い週は丁型 | 1日致1注 | 花数 | (%) | /Flower | index |
| 2006 | Catillac | SbScSs | 3 | Catillac | SbScSs | 3 | 5 | 20.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Reimer Red | SbSc | 2 | 15 | 20.0 | 0.1 | 9.1 |
| | | | | Beurré de l'Assomption | SiSI | 2 | 15 | 80.0 | 1.1 ^z | |
| 2006 | Reimer Red | SbSc | 2 | Reimer Red | SbSc | 2 | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Catillac | SbScSs | 3 | 30 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Beurré de l'Assomption | SiSl | 2 | 28 | 42.9 | 3.9 ^z | |
| 2005 | Merton Pride | SbSI | 3 | Merton Pride | SbSl | 3 | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Beurré Jean Van Geert | SbSI | 2 | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Koonce | SaSI | 2 | 5 | 80.0 | 2.2 ^z | |
| 2006 | Joséphine de Malines | SbSI | 2 | Joséphine de Malines | SbSI | 2 | 20 | 26.7 | 0.2 | 4.9 |
| | - | | | Beurré Jean Van Geert | SbSI | 2 | 20 | 55.6 | 0.1 | 2.4 |
| | | | | Merton Pride | SbSI | 3 | 5 | 75.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Pierre Tourasse | SaSI | 2 | 20 | 57.9 | 4.1 ^z | |
| 2006 | Beurré d'Amanlis | SbSd | 3 | Beurré d'Amanlis | SbSd | 3 | 10 | 80.0 | 0.1 | 3.1 |
| | | | | Beurré d'Anjou | ScSe | 2 | 10 | 90.0 | 3.2 ^z | |
| 2006 | Vicar of Winkfield | SkSuSx | 3 | Vicar of Winkfield | SkSuSx | 3 | 5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | President Héron | SgSq | 2 | 5 | 100.0 | 8.3 ² | |
| 2006 | Beurré Hardy | ScSd | 2 | Vicar of Winkfield | SkSuSx | 3 | 5 | 60.0 | 1.0 | 12.8 |
| | | | | Merton Pride | SbSI | 3 | 5 | 20.0 | 0.2 | 2.6 |
| | | | | Pitmaston | SeSi | 2 | 5 | 100.0 | 7.8 ² | |
| 2006 | Docteur jules Guyot | SaSe | 2 | Beurré d'Amanlis | SbSd | 3 | 5 | 80.0 | 0.6 | 10.3 |
| | | | | Catillac | SbScSs | 3 | 5 | 100.0 | 0.8 | 13.8 |
| | | | | Reimer Red | SbSc | 2 | 5 | 60.0 | 5.8 ^z | |
| 2005 | Michaelmas Nelis | ShSl | 2 | Merton Pride | SbSI | 3 | 4 | 75.0 | 2.3 | 30.3 |
| | | | | Honey Sweet | SbSI | 2 | 5 | 100.0 | 7.6 ^z | |
| 2006 | Pitmaston | SeSi | 2 | Summer Doyenne | SeSi | 2 | 5 | 60.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Beurré Superfin | SeSg | 2 | 5 | 100.0 | 3.2 ^z | |

表4-3 三倍体品種の自家および他家受粉による結実率と種子数

* SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

(SbSI)×'Merton Pride' (SbSI, 3x)においては種子を形成しなかった (表 4-3). 一方, 三倍体品種を 種子親にした交配では, 両方の S 対立遺伝子を共有しない二倍体品種の花粉を受粉した場合, 'Catillac' (SbScSs, 3x)×'Beurré de l'Assomption' (SiSI), 'Merton Pride' (SbSI, 3x)×'Koonce' (SaSI), 'Beurré d'Amanlis' (SbSa)× 'Beurré d'Anjou' (ScSe), 'Vicar of Winkfield' (SkSuSx, 3x)×'President Héron' (SaSI)の結実率はそれぞれ 80.0%, 80.0%, 90.0%, 100.0%といずれも高かったが, Seeds/Flower は1.1, 2.2, 3.2, 8.3 となった. 'Vicar of Winkfield' 以外を種子親にした和合組み合わせ の他家受粉において充実種子数が少なかったが, 二倍体品種'Conference' (SdSI')を種子親にした 交配における Seeds/Flower, 3.0 を始め, Seeds/Flower が 3 程度となった和合他家受粉が複数認め られる (第1, 2, 3 章). したがって, 'Merton Pride', 'Beurré d'Amanlis', 'Vicar of Winkfield'の 3 品種 の交配は交雑不和合と判定され, 'Catillac' は三倍体であることによる部分的雌性不稔である可 能性が考えられた. また, 三倍体品種に2 種類の S対立遺伝子の両方を共有する二倍体品種の花 粉を受粉した場合, 'Catillac' (SbScSs: 3x)×'Reimer Red' (SbSc)では結実率が 20.0%, Seeds/Flower が 0.1 と算出された. 'Merton Pride' (SbSI: 3x)×'Beurré Jean Van Geert' (SbSI)の交配では結実が見 られなかった. 結実率が大幅に減少したこと, また, 'Catillac'の充実種子数が十分の一以下とな ったことから, どちらの組み合わせも交雑不和合と判定した.

く考察>

三倍体と記載されている品種の倍数性をフローサイトメトリー分析により調査した.供試9 品種のうち, 'Triomphe de Jodoigne'は盛岡に栽植されていなかったので,その他の8品種を用い た. 'Jargonelle'と'Pitmaston'以外の6品種は,これまでの分類通りに三倍体であることが確認さ れた. 'Jargonelle'と'Pitmaston (Pitmaston Duchesse)'は複数の文献で三倍体と記載されているが, 本章の分析では二倍体と判定された. 'Jargonelle'は CAPS マーカーシステムのプライマーセッ トでは*Sm-RNase* 対立遺伝子しか検出されず, RACE クローニングにより *Sx-RNase* がクローニン グされたことから, *SmSx* と *S* 遺伝子型が推定された. 盛岡に栽植されている'Jargonelle'の果実 が短びん形であるのに対し,「The Pears of New York」に掲載されている'Jargonelle'の果実 は長 びん形であり,その形を模した「Jargonelle Pears」という名のキャンディーがイギリスで販売さ れている (図 4-6). したがって,本章で供試した'Jargonelle'は、多くの論文で三倍体とされてい る'Jargonelle'の同名異種であると推測される.一方, 'Pitmaston'の*S*遺伝子型は CAPS マーカー システムにより *SeSi* と推定され,同じ推定*S*遺伝子型の'Summer Doyenne'の花粉に対して交雑



図4-6 盛岡に栽植されている'Jargonelle'の果実 (a),「The Pears of New York」に 描かれている'Jargonelle'の果実 (b), および, イギリスの飴菓子'Jargonelle Pears' (c).



図4-7 盛岡に栽植されている'Pitmaston' (a), 'Summer Doyenne' (b)の果実,および, 「The Pears of New York」に描かれている'Pitmaston' (c), 'Summer Doyenne' (d)の果実. 不和合を示したことから、S遺伝子型に間違いはない.しかし、'Pitmaston (Pitmaston Duchess)'は 'Duchesse d'Angouleme' (SaSe)×'Glou Morceau' (SbSg)の交雑実生であるとされており (Crawford 1996)、本章での推定S遺伝子型 SeSi はこの交配組み合わせからは生じない.また、盛岡に栽植 されている'Pitmaston'の果実が円形であるのに対し、「The Pears of New York」に掲載されてい る'Pitmaston'の果実は倒卵形である (図 4-7). したがって、本章で供試した'Pitmaston'は二倍体 であること、S遺伝子型が親品種の遺伝子型と矛盾すること、果実の形が異なることから、 'Pitmaston (Pitmaston Duchesse)'の同名異種である可能性が高いと考えられた. 盛岡に栽植され ている'Pitmaston'と'Summer Doyenne'は花や果実の特徴が似ており、'Summer Doyenne'が誤って 'Pitmaston'と表記されているかもしれない.この推測が正しければ両品種が同じ S遺伝子型を 有するのは当然であり、'Pitmaston'が二倍体と判定されたことも説明がつくと考えられる.

三倍体品種のS遺伝子型は、最終的に、ゲノミックPCR 産物および cDNA 断片の塩基配列の 解析により決定された.第2,3章でクローニングされた17種類のS-RNase 対立遺伝子および推 定 So-RNase 対立遺伝子とは異なる配列を持つ2種類の推定S-RNase 対立遺伝子が'Vicar of Winkfield'および'Beurré Diel'と'Triomphe de Jodoigne'から得られ、Su およびSv と名付けられた. Su-RNase の cDNA 完全長塩基配列はRACE クローニングにより決定され、イントロンの配列も 明らかになった. Su-RNase 対立遺伝子はゲノミック PCR より約350 bp 断片として増幅され、 EcoO109I のみで267 bp と109 bp の断片に切断される.そのため、260 bp と109 bp に切断される Sd-RNase と区別できない.一方、Sv-RNase は'Beurré Diel'と'Triomphe de Jodoigne'から花柱をサ ンプリングできず、cDNA 完全長塩基配列を決定できなかった.推定 Sv-RNase 対立遺伝子は145 bp のイントロンを含む345 bp の断片として増幅され、SphI のみで234 bp と111 bp に切断され る.そのため、233 bp と112 bp に切断される Sa-RNase と区別できない.これら2種類の新規 S-RNase 対立遺伝子以外にも、セイヨウナシ品種には17種類のS-RNase 対立遺伝子を識別でき る CAPS マーカーシステムで識別できない新規 S-RNase 対立遺伝子が存在する可能性が高いと 考えられる.

'Vicar of Winkfield'からは、ゲノミック PCR により Sk-および Su-RNase 対立遺伝子のみが増幅 されたが、3'RACE により Sk-および Su-RNase cDNA 断片に加え、第3章でクローニングされた Sx-RNase も増幅された.また、'Jargonelle'からはゲノミック PCR により Sm-RNase 対立遺伝子の みが増幅され、RACE クローニングにより Sx-RNase が増幅された.さらに、Sx-RNase は、'Vicar of Winkfield'の花柱と花弁、および、'Jargonelle'の花柱、花弁、葯で発現していた.したがって、第3 章と同様に本章においても Sx-RNase が S-RNase 対立遺伝子であるかを結論づけることができな

かった.

ゲノミック PCR と 3'RACE クローニングにより'Beurré d'Amanlis'からは Sb-および Sd-RNase の断片のみが, 'Merton Pride'からは Sb-および SI-RNase の断片のみが増幅され, 各品種 2 種類の S-RNase 対立遺伝子しか検出されなかった. 3'RACE に用いたフォワードプライマー'FTQQYQ' の配列はナシ亜科のセイヨウナシ, ニホンナシ, リンゴの S-RNase のほぼすべてに保存されて いる. 本研究の 3'RACE の方法でクローニングできない新規 S-RNase 対立遺伝子が存在する可 能性は低いと思われ, これら品種はどちらかの S-RNase 対立遺伝子を重複して持つと考えられ る. 'Merton Pride'は'Glou Morceau' (SbSg)×'Bartlett' (SbSbS/SI, 4x)の交雑実生である. 四倍体の 'Bartlett'は自家和合性を示すことから (Modlibowska 1942), 'Glou Morceau'と和合になる花粉の S 遺伝子型は SbSI または SISI と考えられる. よって, 'Merton Pride'の S 遺伝子型は SbSbSI また は SbS/SI であると推測される.

'Merton Pride'以外の三倍体品種は, 'Merton Pride'のように二倍体品種と四倍体品種の交雑により自然に生じた可能性が考えられるが、非還元の卵細胞(2n)と花粉 (2n)がその成立に関与している可能性もある. リンゴの三倍体品種は, 'Jonagold' (*S2S3S9*) ['Golden Delicious' (*S2S3*)× 'Jonathan (紅玉)' (*S7S9*)], '陸奥' (*S2S3S20*) ['Golden Delicious' (*S2S3*)× '印度' (*S7S20*)], 'Hac 9' (*S1S3S9*) ['ふじ' (*S1S9*)×'つがる' (*S3S7*)], 'Spigold' (*S1S2S3*) ['Red Spy' (*S1S3*)×'Golden Delicious' (*S2S3*)], '静香' (*S2S3S20*) ['Golden Delicious' (*S2S3*)×'印度' (*S7S20*)], 'abたろう' (*S3S9S19*) ['はつあき' (*S3S9*)×'Starking Delicious' (*S9S19*)]などがあり, 種子親から2 種類の S 対立遺伝子を受け継いでいることから (Sakurai et al. 2000), 非還元分裂により生じた卵細胞 (2n) がその成立に関与しているとされる. 'Merton Pride'以外の三倍体品種は親品種の由来が不明であるので,その成立に非還元の卵細胞(2n)と花粉 (2n)のどちらが関与しているかについて言及することはできない.

'Catillac', 'Merton Pride', 'Beurré d'Amanlis', 'Vicar of Winkfield'は雄性不稔性であった. 'Merton Pride'の花粉稔性は年次変動したが, 三倍体品種は基本的に雄性不稔であると考えられた. 一方, 'Catillac'は, 和合受粉の Seeds/Flower が 1.1 であることから, 部分雌性不稔であると考えられた. おそらく, 三倍体であることにより, 正常な卵細胞の形成や受精後の胚発達など起こりにくい のであろう. 'Merton Pride'と'Beurré d'Amanlis'は, 和合受粉の Seeds/Flower がそれぞれ 2.2 と 3.2 であるが, 二倍体品種を種子親にした和合他家受粉でも Seeds/Flower が 3.0 程度になる場合があ ることから, 雌性不稔ではないと判定した.

三倍体品種に S 遺伝子型が完全に重複しない二倍体品種を交配した'Catillac'(SbScSs)×

'Beurré de l'Assomption' (*SiSI*)と'Merton Pride' (*SbSI*)×'Koonce' (*SaSI*)では、それぞれ結実率 80.0% (1.1 Seeds/Flower)と結実率80.0%, (2.2 Seeds/Flower)であったが、重複する二倍体品種を交 配した場合, 'Catillac' (*SbScSs*)×'Reimer Red' (*SbSc*)では結実率20.0% (0.1 Seeds/Flower)を示し、 'Merton Pride' (*SbSI*)×'Beurré Jean Van Geert' (*SbSI*)では結実しなかった. したがって、三倍体品 種の花柱において S-RNase は正常であり、雌しべのSハプロタイプは二倍体品種と同様に機能 していると考えられる. 三倍体品種の栽培においては、三倍体品種、三倍体品種に対して和合 な二倍体品種、さらに、その二倍体品種に対して和合な二倍体品種、の少なくとも3品種の混植 が必要とされていた. しかし、'Catillac'のように部分的な雌性不稔性を示す可能性を考慮すると、 三倍体品種のS対立遺伝子を共有しない品種が受粉樹品種により適しているだろう.

'Williams (Bartlett)' (SeSI), 'Conference' (SdSr), 'Abbé fétal' (SaSb), 'Rocha' (SaSe), 'Coscia' (SbSk),
'Docteur jules Guyot (Precoce)' (SaSe), 'Doyenné du Comice' (SaSb), 'Beurré d'Anjou' (ScSe),
'Packam's Triumph' (SeSk)など世界の主要品種は供試した三倍体品種と完全に重複するS遺伝子
型を持たない. これら品種が大部分を占める果樹園で三倍体品種を生産する場合には、主力品
種と交雑和合の品種を混植することで結実の安定化を図ることができると考えられる.

ヨーロッパ北東部の諸国では、'Alexander Lucas'や'Vicar of Winkfield (Curé)'が主要品種とな っている.本章および第2,3章の結果から各国の主要栽培品種は、ドイツの'Conference' (SdSr)、 'Alexander Lucas' (SbSeSs), 'Fondante de Charneu' (SlPpS2), 'Clapp's Favourite' (SdSe), オランダの 'Conference' (SdSr), 'Doyenné du Comice' (SaSb), 'Alexander Lucas' (SbSeSs), スウェーデンの 'Clara Frijs' (SeSx), 'Conference' (SdSr), 'Alexander Lucas' (SbSeSs), ポーランドの'Clapp's Favourite' (SdSe), 'Alexander Lucas' (SbSeSs), 'Conference' (SdSr), 'General Leclerc' (SlSq), ブルガ リアの'Bartlett' (SeSI), 'Vicar of Winkfield (Curé)' (SkSuSx), 'Beurre Bosc' (ShSx), 'Clapp's Favourite' (SdSe), 'Beurre Hardy' (ScSd) \mathfrak{M} , $\square \mathfrak{VPO}$ 'Bartlett' (SeSl), 'Flemish Beauty' (SdSe), 'Vicar of Winkfield (Curé)' (SkSuSx), 'Beurre Bosc' (ShSx), 'Kieffer' (SlSr), セルビアの'Bartlett' (SeSl), 'Passe Crassane' (SgSr), 'Vicar of Winkfield (Curé)'と推定された. 'Alexander Lucas' (SbSeSs)の栽培が多い ドイツでは、'Conference' (SdSr)や'Clapp's Favorite' (SdSe)が二倍体の主力品種である. 両品種は 相互に交雑和合で、'Alexander Lucas'とも交雑和合の関係であり、特に、'Alexander Lucas'と 'Conference'は S 対立遺伝子を重複しない. また、3 品種の開花期は'Alexander Lucas', 'Conference', 'Clapp's Favorite'の順になっており, 'Conference'は'Alexander Lucas'および'Clapp's Favorite'の受粉樹として推奨されている (Keepers Nursery ホームページ). したがって、これら 3 品種の混植園では安定的な結実が得られると推測される、ドイツ以外の国の主要栽培品種の

中にも'Alexander Lucas'とS遺伝子型が重複する品種が存在しなかったので、主要品種の混植園 では十分な結実が得られると考えられる. ブルガリア、ロシア、セルビアの主要品種のうち、 'Bartlett' (*SeSl*), 'Clapp's Favourite' (*SdSe*), 'Beurre Hardy' (*ScSd*), 'Flemish Beauty' (*SdSe*), 'Kieffer' (*SlSr*), 'Passe Crassane' (*SgSr*)は'Vicar of Winkfield (Curé)'と開花期が近いので、これら品種の混 植園では十分な結実が期待できるであろう.

三倍体品種のうち、'Alexander Lucas' (SbSeSs)および'Beurré Diel' (SbSeSv)は、果皮が赤い品種 として人気のある'California'や'Cascade'を含む遺伝子型 SbSe の品種とは交雑不和合の関係にあ たる. 果樹園全体で不和合組み合わせだけの品種構成になることはほとんどないと考えられる が、これら品種が隣り合うような栽植計画を避けるといった細かい配慮がより安定した生産に つながるであろう. 本章で推定した三倍体品種の S 遺伝子型が、第 2、3 章での二倍体品種の S 遺伝子型情報とともに効率的な品種選択および栽植計画に貢献すると期待される.

第5章

'グランド・チャンピオン (Grand Champion)'の部分的自家和合性

く指要>

'Grand Champion' (SbSe)の部分的自家和合性の原因を解析した.部分的自家和合性は変 異親品種の'Gorham'に由来していた. 'Grand Champion'と自家不和合性品種 (SbSe)の正逆 交雑の結果, 部分的自家和合性は雌しべ側に起因していることが明らかになった. そこで, 'Grand Champion'の S-RNase の変異と発現を解析した. 'Grand Champion'からクローニング した Sb-RNase cDNA 配列には 2 つの非同義置換が見出された. 置換をもつ Sb'-RNase は 'Gorham'に加え, 自家不和合品種にも見出された. また, 'Grand Champion'の Sb'-と Se-RNase の発現量, タンパク質量, RNase 活性は自家不和合品種と同等であった. 'Grand Champion'の自殖後代では Sb'Sb': Sb'Se: SeSe が 1:2:1 に分離していた. 以上の結果から, 'Grand Champion'の部分的自家和合性の原因は S-RNase ではなく, S 遺伝子座に連鎖しない S-RNase 以外の雌しべ側因子によるものと推察された.

く赭言>

セイヨウナシ,ニホンナシ,リンゴ,オウトウ,ウメ,アーモンド,アンズなどのバラ科 果樹は自家不和合性を有するので,果樹園では安定的な結実確保のために交雑和合となる 受粉樹の混植や人工受粉が不可欠である.しかしながら,受粉樹の混植については,樹種 によっては経済品種が特定の品種に偏重する傾向の中で受粉樹となりうる品種が不足しつ つあり,受粉樹の導入により果樹園としての経済性が低下することが問題となっている. また,訪花昆虫を利用した受粉は,昆虫の活動に影響する開花期間の低温や風雨などの天 候条件により結実が左右される.一方,人工受粉は結実を確保できるが,短期間に多くの 労働力を必要とし,コストがかかる.さらに,今後,生産者の高齢化および後継者不足が予 想される状況においては,労働力の確保も容易ではない.そのため,受粉作業および受粉 樹の導入を必要とせずに十分な結実を確保することができる自家和合性品種の育成が望ま れている.

様々な樹種において、自家和合性品種が育成・導入されている. ニホンナシ (Pyrus pyrifolia)では、'おさ二十世紀' (S2S4''')が'二十世紀' (S2S4)の枝変わり突然変異として見出 され、1979年に品種登録されている.また、'おさ二十世紀'へのγ線照射により黒斑病抵抗 性を持つ'おさゴールド'(S2S4***)が、'おさ二十世紀'の自家受粉により自家和合性後代を効 率的に獲得できる'なし中間母本農1号'が選抜・育成されている (増田ら 1997; 壽ら 2003). リンゴ (Malus × domestica)では、'Ralls Janet (国光)' (S1S2)×'Jonathan (紅玉)' (S7S9)の交雑 後代から育成された'恵' (S2S9)と、'Starking Delicious' (S9S19)と'Golden Delicious' (S2S3)の 交雑実生である'弘大1号' (S2S19)が自家和合性品種として報告されている (Matsumoto et al. 1999; 李ら 2002). 甘果オウトウ (Prunus avium)では、γ線を照射した'Napoleon' (S3S4)の 花粉を'Emperor Francis' (S3S4)に交雑した実生から、2つの自家和合性系統JI2420 (S4S4)と JI2434 (S3'S4)が選抜され、'Lambert' (S3S4)×'JI2420' (S4S4')の交雑実生から'Stella' (S3S4') が選抜・育成されている (Ushijima et al. 2004). 'Stella'は交配親としても用いられ, 'Van' (S1S3)×'Stella' (S3S4')の交雑後代から, 'Lapins' (S1S4'), 'Sunburst' (S3S4'), 'Newstar' (S3S4') が選抜された. さらに, 'Van' (S1S3)×'Newstar' (S3S4')から'Celeste' (S1S4')および 'Sweetheart' (S3S4')が、'Van' (S1S3)×'Stella' (S3S4')の交雑後代間の交配では、'Lapins' $(SIS4') \times (2N-39-5'から'Sonata' (S3S4')が, (2C61-18' \times (Sunburst' (S3S4')から'Sandra Rose')$ (S3S4')が、'Bing' (S3S4)×'Stella' (S3S4')の後代系統 '2N-60-07'と'Van' (S1S3)×'Stella' (S3S4')の後代系統'2N-38-32'の交配から'Skeena' (S1S4')が育成されている. ウメ (P. mume) では、、越の梅'(S3Sf)、、林州'(S3Sf)、、地蔵梅'(S3Sf)、、織姫'(S6Sf)、、紅さし'(S8Sf)、、竜峡小梅' (S8Sf)、'剣先' (SfSf)などの多くの自家和合性品種が栽培されている (Tao et al. 2002). 福井県 において選抜・育成された'新平太夫' (S3Sf)、'地蔵梅' (S3Sf)の自然交雑実生から選抜された '八郎' (S8Sf)などの新品種も育成されている (田辺ら 1986; 山口ら 2002). アーモンド (P. dulcis)においても、'Falsa Barese' (SISf)、'Filippo Ceo' (SISf)、'Genco'(SISf)、'Tuono' (SISf)など 多くの自家和合性品種が栽培されている (Bos'kovi'c et al. 1997). また, 単植園を可能にす る自家和合性品種の育種計画が行なわれ、'Lauranne' (S3Sf) ['Ferragnes' (S1S3)×'Tuono' (SISf)], 'Steliette' (S3Sf) ['Ferragnes' $(SIS3) \times$ 'Tuono' (SISf)], 'D-3-5' (S8Sf) ['Titan' $(S-S-) \times$ 'Tuono' (SISf)], 'R973' (SISf) ['Ferragnes' $(SIS3) \times$ 'Tuono' (SISf)], 'R987' (S8Sf) ['Tardy Nonpareil' (S7S8)×'Tuono' (S1Sf)]などが交雑実生から選抜されている. 'Nonpareil' (ScSd)の 枝変わりとして見出された'Jeffries' (ScmSd)も自家和合性品種である (Kester et al. 1994).

一方で、これら自家和合性品種は自家不和合性機構を解明するための材料としても用い
られている。アーモンドの自家和合性品種'Jeffries' (ScmSd)ではScハプロタイプ全体が欠失 している (Ushijima et al. 2001). 雌しベ側S遺伝子産物がS-RNaseであることは、雌しベ側変 異体を用いた解析により証明されている.ニホンナシ品種'おさ二十世紀'(S2S4577)のS4577ハ プロタイプではS4-RNaseのゲノム領域が4 kb以上欠失している (Sassa et al. 1997). アーモ ンドの自家和合性品種が有するSfハプロタイプは、Sf-RNaseが活性を持っておらず (Bos'kovi'c et al. 1997), Sf-RNaseの推定アミノ酸配列において高次構造形成に関与するシス テインが1箇所保存されていないことから (Ma et al. 2001), 立体構造の変化によるRNase活 性の喪失が推測される. 花粉側S遺伝子はナシ亜科からは同定されていないが、サクラ亜科 からF-boxタンパク質遺伝子SLF (S-Locus F-box)/SFB (S-locus F-Box)が同定されている (Ushijima et al. 2003; Entani et al. 2003; Yamane et al. 2003b, c; Ikeda et al. 2004; Sonneveld et al. 2005; Vaughan et al. 2006). F-boxタンパク質は、ユビキチンが介在するタンパク質分解経路 (26S/プロテアソーム経路)に関与し、Skp1, Cullin-1, F-boxタンパク質, Rbx1からなるSCF複 合体を形成する.SCF複合体によりポリユビキチン化された標的タンパク質が26S/プロテア ソームで分解されるので、SLF/SFBとS-RNaseの相互作用により自家不和合反応が制御され ると考えられている. 花粉側S遺伝子産物がSLF/SFBであることは、花粉側変異体を用いて 証明されている. 甘果オウトウの自家和合系統'JI2434' (S3'S4)のS3'ハプロタイプではSFB3 のゲノム領域が欠失し (Sonneveld et al. 2005), 'JI2420' (S4S4')のS4'ハプロタイプではSFB4 の翻訳領域内の4塩基の欠失により読み枠がシフトしたことで停止コドンが生じ、機能を 持たない短いSFB4が合成されている (Ushijima et al. 2004; Sonneveld et al. 2005). ウメの自 家和合性品種が有するSfハプロタイプでは、SFBfの翻訳領域内に6.8 kb断片が挿入され、機 能を持たない短いSFBが合成されている (Ushijima et al. 2004). 二倍体の甘果オウトウと四 倍体のドワーフチェリー (P. fruticosa)の異質四倍体である酸果オウトウには雌しべ側およ び花粉側S遺伝子の変異による機能不全のハプロタイプが多い. 'Erdi Botermo' (S4S6mSaSnull)のS6mハプロタイプでは、S6-RNaseのプロモーター領域に約2600 bp断片が挿 入され、S6-RNaseの転写が阻害されている (Yamane et al. 2003a). 'Cigány 59' (S6m2S9S26Sa) のS6m2ハプロタイプでは、C2領域に1 bpの欠失があり、RC4下流で停止コドンが生じた結果、 短いS6-RNase が合成されると予想される (Tsukamoto et al. 2006). 'Montmorency' (S6S13mSaSnull)のS13mハプロタイプでは、C3領域下流の10 bpの欠失により停止コドンが生 じ、保存領域RC4以降を持たない短いS13-RNaseが合成されると予想される (Tsukamoto et al. 2006). 一方, 'Újfehértói Fürtös' (SI 'S4SdSnull)のSI ハプロタイプでは, SFB1の開始コドン

から225 bp下流に615 bpの非自律性トランスポゾン (Ds)様配列の挿入があり,短いSFB1が 合成されると予想されている (Hauck et al. 2006b). 'Rheinische Schattenmorelle' (S6S13'S26Sa)のS13'ハプロタイプでは, SFB13の開始コドンから数えて733番目の塩基がグ アニンからチミンに置換したことにより停止コドンが生じ,HVaおよびHVbを含む下流部 分を欠いた短いSFB13が合成されると予想される (Tsukamoto et al. 2006). また, Snullハプ ロタイプはS-RNaseとSFBを含む領域の欠失によると推測されている (Hauck et al. 2006a). 自家和合となるSaハプロタイプおよびSdハプロタイプの分子レベルの詳細は明らかではな いが,Sdハプロタイプについてはハプロタイプ領域内における少なくとも約2 kbの欠失が 予想されている (Hauck et al. 2006a).

甘果オウトウ自家和合性品種'Cristobalina' (S3S6)とアンズ (P. armeniaca)品種'Canino' (S2Sc)は花粉側の機能を欠失しているが、どちらの変異もS遺伝子座とは連鎖していないこ とが交配実験と後代解析により明らかにされている (Wünsch and Hormaza 2004; Vilanova et al. 2006). この結果は、自家不和合性反応には、S-RNaseとSLF/SFBの他に、S遺伝子座と連 鎖していない因子も関与していることを示唆している. このような因子として、パラ科果 樹と同じ配偶体型自家不和合性を示すナス科植物のタバコ (Nicotiana. alata)から、HT-Bや 120Kが単離・同定されている (O'Brien et al. 2002; Hancock et al. 2005). HT-Bは発達後期の花 柱で発現するsmall asparagine-rich proteinであり、S-RNaseの作用に直接影響を与えない. 120K (分子量約120 kDaの糖タンパク質)は花柱の細胞外マトリックスに多量に存在するア ラビノガラクタンであり、S-RNaseと結合して伸長中の花粉管に取り込まれる. HT-Bや120K の発現を抑制した植物体ではS特異的な花粉管の拒絶が阻害され、表現型が自家不和合か ら自家和合に変化することが明らかにされている (Kondo et al. 2002ab; Cruz-Garcia et al. 2005; Hancock et al. 2005). 配偶体型自家不和合性機構を説明する最新のモデルとして提案 されたコンパートメントモデルには、S-RNaseとSLF/SFBに加え、HT-Bが登場している (Goldraij et al. 2006; McClure et al. 2006, 図5-1).

第1章では、セイヨウナシ品種'Grand Champion'を部分的自家和合性と判定した. セイヨ ウナシでは、部分的および完全な自家和合性として二倍体の'Fertility'といくつかの四倍体 品種から報告されているが (Crane and Thomas, 1939), これら品種の和合性の原因は調査さ れていない. 同じナシ亜科では、リンゴ品種'恵'(*S2S9*)および'弘大1号'(*S2S19*)の自家受粉 の結実率はそれぞれ 33.5~54.0%および 24.0~88.6%を示し、果実あたり 1.7 個および 2.0~ 4.2 個の充実種子が得られたことから (李ら 2002; Matsumoto et al. 1999), 'Grand Champion'

164



図5-1 S-RNaseが非特異的に液胞に囲い込まれるコンパートメントモデル (HT-Bが液胞による囲い込みを破る作用を持ち,HT-Bを抑制する花粉側タンパク質(PP)が存在すると仮定する). (Goldraij et al. 2006). S-RNaseはHT-Bおよび120Kとともに、エンドサイトーシスにより非特異的に花粉管に取り込まれ液胞に囲い込まれる. 一般的な細胞毒素の動態と同様に、一部のS-RNaseは逆行輸送によりゴルジ体、小胞体を経て細胞質に放出されると推測される (McClure et al. 2006). 不和合花粉が受粉した場合: ①SLF/SFBは,異なるハプロタイプのS-RNaseとより 結合しやすい (Hua et al. 2006). 異なるハプロタイプのSLF/SFBと結合したS-RNaseは、26S/プロテアソーム経路で分解される. ②同じハプロタイプのS-RNaseはSLF/SFBと結合せず、rRNA を分解する. PPが作られないのでHT-Bの働きを抑制できない. ③HT-Bの作用により液胞が崩壊し、S-RNaseや液胞に大量に含まれるS-RNase以外のRNaseおよびDNaseが細胞質に放出さ れる. S-RNaseによる代謝阻害,または、RNaseやDNaseによる細胞死が起きた結果(杉山ら 2005),花粉管伸長が停止し、不和合となる. 和合花粉が受粉した場合: ④正常な代謝によりPP が合成される. ⑤PPがHT-Bの働きを抑制するので、S-RNaseは液胞に囲い込まれたままになる. ⑥正常なmRNAの転写からタンパク質が合成される結果、花粉管が伸長し、和合となる. 甘 果オウトウの花粉側変異.S3 が自家受粉した場合: ①SFB3を欠失しているので、花粉管内にSFBは存在しない、細胞質に放出されたS-RNaseがrRNAを分解する. ②, ③を経て、不和合とな るため、自家和合の表現型と矛盾する. と同じ部分的自家和合性に分類されると思われる. '恵'に同じ S 遺伝子型の'Red Gold' (S2S9)および'金星'(S2S9)の花粉を受粉した場合には単為結果による無種子果実しか得ら れていない. また, 'Red Gold'および'金星'に対する'恵'の交配では結実が見られない. さら に,自殖後代にはS2S2,S2S9,S9S9のS遺伝子型が確認された. したがって, '恵'の自家和合 性の原因は雌しべ側および花粉側の S 対立遺伝子の変異ではないことが示されている (Matsumoto et al. 1999). '恵'の花柱における S-RNase タンパク質量は自家不和合性の 'Starking Delicious'よりも少量であったが,自家和合性との関連は明らかにされていない (李ら 2002; Katoh et al. 2002). '弘大1号'では,花柱の顕微鏡観察から,自家不和合性品種 'ふじ'(S1S9)よりも花粉管伸長量が大きいことが示された. '弘大1号'の花柱で発現してい る S2-および S7-RNase は自家不和合性品種からクローニングしたものと同じであり,花柱 における S-RNase の含有量は自家不和合性品種'Starking Delicious'と同等であった. これら のことから, '弘大1号'の自家和合性は S-RNase の消失や極端な量的変化によるものではな いことが明らかにされている (李ら 2002).

本章では、'Grand Champion' (*SbSe*)と同じ*S* 遺伝子型を有する品種間で正逆交雑を行ない、 'Grand Champion'の部分的自家和合性が雌しべ側変異であることを明らかにした. 'Grand Champion'から *S-RNase* をクローニングし、塩基配列と発現を解析するとともに、雌しべに おける RNase 含量および活性、自殖後代における *S* 対立遺伝子の分離を解析し、'Grand Champion'の部分的自家和合性の原因を考察した.

<材料および方法>

材料

独立行政法人農業・食品産業技術研究総合機構果樹研究所リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡市)および農業者大学校落葉果樹農業研修所 (岩手県雫石町)に栽培されているセイヨウナシ28品種,および,2002年に行なった'Grand Champion'の開花自家受粉により結実した果実中の種子に由来する自殖後代67個体を供試した.品種および自殖後代から集めた未展開葉,および, 'Grand Champion', 'Gorham' ('Bartlett' × 'Joséphine de Malines'), 'Highland', 'California', 'Cascade', 'Howell', 'Joséphine de Malines', 'Beurré Jean Van Geert', 'Bartlett', 'La France', 'Doyenné du Comice' のwhite stage, balloon stageの花から採取した花柱は,液体窒素で急速冷却後, -80℃で保存した.

交配実験

交配実験には'Grand Champion', 'La France', 'Highland', 'Gorham', 'Cascade', 'California', の6品種を用いた. 交配および調査は第1章で確立した方法により行なった. 2003 年 5 月 7 日, 2004 年 5 月 8 日に雫石において, 2004 年 5 月 5~7 日, 2005 年 5 月 9, 10 日に盛岡におい て交配実験を行ない, 交配約 10 週間後に結実数と充実種子数を調査した. 結実率, Seeds/Flower, SI index を算出し, 不和合・和合を判定した.

ゲノミック PCR および塩基配列の解析

第2章の方法に従い、'Grand Champion'、'Gorham'、Sb-RNase 対立遺伝子を有する品種およ び'Grand Champion'の自殖後代からゲノム DNA を抽出した. プライマー'FTQQYQ'と 'EP-anti-IIWPNV2'を用いた CAPS マーカーシステム (第3章)により自殖後代のS遺伝子型 を推定した. Sb-RNase 対立遺伝子は、Sb-RNase cDNA の HV 領域および3'末端領域の配列に 基づいて設計した特異的プライマーセット'EpHVf-Sb' (5'-AAATATTGCAAGGCGCCG-3') および'anti-Epend-Sb' (5'-CTGAATATTGGTGGGGGC-3')を用いて断片を増幅した. 「塩基配 列の決定」は第2章の方法に従った.

RACE クローニング

第2章の方法に従い, 3'および5'RACEクローニングを行なった. 3'RACEにおいては, first PCR にプライマーセット'FTQQYQ'と'NotI-(dT)₁₈'を, second PCR にプライマーセット 'FTQQYQ'と'NotI-dT'を用いて cDNA の 3'末端配列を増幅した. 5'RACE においては, 逆転 写および first PCR にプライマーセット'AAP'と'EP-anti-IIWPNV'を, second PCR にフォワー ドプライマー'AUAP'と各 *S-RNase* に特異的なリバースプライマー'HVSb'または'HVSe'を 用いて cDNA の 5'末端配列を増幅した. 「塩基配列の決定」および「推定アミノ酸配列の 解析」は第2章の方法に従った.

ホモロジーモデリング

Sb-RNase および Sb'-RNase の立体構造を, ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)提供)を用いて解析した. SIB 提供の SwissModel First Approach Mode に Sb-RNase および Sb'-RNase の推定アミノ酸配列を供し, PDB ファイル化されたデータを Swiss-Pdb Viewer (SIB)により解析した.

半定量的 RT-PCR 分析

1本鎖 cDNA の合成は Rever Tra Ace® (TOYOBO)を用いて行なった. 11 品種の花柱 total RNA 1 µg に 1 mM dNTP mix, 0.5 µM Oligo(dT)₁₈ プライマー (Promega), 4 µL 10×Buffer, 0.5 U/µL RNase Inhibitor, 1 µL ReverTra Ace®と滅菌水を加えた 20 µL の反応液を作成し, 30℃ 10 分加温後 42℃ 60 分で反応させた. その後, 99℃ 5 分で酵素を失活させた. PCR 反応は Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics)を用い、1 µl の1本鎖 cDNA を含む 30 µL の反応系で行なった. Sb-および Se-RNase の HV 領域および C5 領域下流の cDNA 配列に基 づいて設計した Sb-および Se-RNas 対立遺伝子特異的プライマーセット'EpHVf-Sb' (5'-AAATATTGCAAGGCGCCG-3')と'anti-EpC5-Sb' (5'-GTTAAGTTGCTATCGCTG-3'), お び (5'-CCGAAAACCAAGGTGCC-3') よ 'EpHVf-Se' と 'anti-EpC5-Se' (5'-AAATGTTTTCCGAGGTA-3')を用いた. また, 内部コントロールとしてユビキチン遺伝 子を増幅した、セイヨウナシの推定ユビキチン遺伝子の塩基配列に基づき設計したプライ 'EP-Ubi-F' (5'-CGAGGTTGAGAGCTCTGAC-3') と 'EP-Ubi-R' セ ト ッ (5'-GAACGAGGTGGAGGGTAGAC-3')を用いて、ユビキチン遺伝子が指数関数的に増幅さ れる PCR 条件を検討した. PCR は 94℃ 15 秒の変性, 48℃ 30 秒のアニーリング, 72℃ 2 分 の伸長反応を 10 サイクル行なった後, 94℃ 15 秒の変性, 60℃ 30 秒のアニーリング, 72℃ 2 分の伸長反応を 10 および 15 サイクル行ない, 70°C 7 分の final extension を行なった. PCR 産物は1.5%アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色により解析した.

SDS-PAGE と RNase 活性測定

約 125 本の balloon stage の花柱 (新鮮重約 75 mg)を液体窒素下で磨砕し, 凍結粉末を Polyclar-AT 30 mg および 15 mg/ml アスコルビン酸ナトリウムを含む抽出バッファー (0.1 M Tris-HCl (pH 7.8), 25 mM EDTA) 0.5 ml に融解した. 氷上 4℃で 30 分振盪した後, 4℃, 12,000 rpm で 15 分遠心し, 上清を回収した. 沈殿物を再度抽出バッファー0.5 ml に融解し, 振盪および遠心した後, 上清を回収した. 両方の上清を合わせて粗抽出液とし, 使用する まで-20℃で保存した. 各粗抽出液中のタンパク質濃度は, ウシ血清アルプミン (BSA)を スタンダードにし, Bradford 法 (1976)により定量した.

タンパク質および RNase 活性を分析するため、花柱タンパク質 15 μg を含む粗抽出液を SDS-PAGE に供した. 15%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動は 80 V で 20 分の後, 120 V で 120 分行なった. タンパク質は Coomassie brilliant blue (CBB)法と銀染色法で可視化 した. CBB 法では, 泳動後のゲルを CBB 溶液 (酢酸:メタノール:水=1:10:9 (v:v:v)に 2.5 g CBB R-250 を融解)に室温 30 分浸漬して染色した後, 脱色液 (8%酢酸, 15%メタノール, 10%イソプロパノール)により脱色した. 銀染色法には 2D-銀染色試薬・II「第一」 ((株)第 ー化学薬品工業)を使用した. 泳動後のゲルを固定液 I (メタノール 40 ml, 酢酸 8 ml, 脱イ オン水 32 ml) 80 ml で10分振盪した. 固定液 I を捨て, 固定液 II (メタノール 24 ml, 酢酸 8 ml, ①固定化剤 4 ml, 脱イオン水 44 ml) 80 ml で15分振盪した. 固定液 II を捨て,前処理液 (メタノール 40 ml, ②前処理剤 4 ml, 脱イオン水 36 ml) 80 ml で 10 分振盪した. 前処理液 を捨て, 脱イオン水 80 ml で5分振盪後, 水を捨て, 銀染色液 (③染色液 A 4 ml, ④染色液 B 4 ml, 脱イオン水 72 ml) 80 ml で15分振盪した. 銀染色液 (⑤現像原液 4 ml, 脱イオン水 76 ml) 80 ml で振盪し, 適度な染色像が得られたところで, ⑥停止液 4 ml を注ぎ, よく振盪し た.

ゲル中の RNase 活性は Blank et al. (1982)を改変した方法で可視化した. SDS-PAGE 後のゲ ルを 25% (v/v)イソプロパノールを含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)中で 20 分振盪し, これを再 度繰り返した. さらに, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)中 15 分振盪による二度の洗浄後, 酵母由来 Ribonucleic Acid Sodium Salt 1 mg/ml を含む 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)中で, 37℃ 120 分振盪 した. 0.5% (w/v) methylen blue を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)中 15 分振盪によりゲルを染 色した後, RNase 活性のある部分が透明になり, きれいなコントラストが得られるまで, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)中での振盪を繰り返した.

染色したゲルのバンドパターンをスキャナ (GT-8000, Epson, Japan)で取り込んだ後, 染 色強度を Image J software (National Institute of Health, USA)を用いて数値化し RNase 活性を 比較した. RNase 活性測定は 5 反復行ない、分散分析により統計処理した.

く結果>

自家受粉と正逆交雑

'Grand Champion' (SbSe)の部分的自家和合性が, 2000 年から 2002 年に交配を行なった弘前大学生物共生教育研究センター藤崎農場 (青森県藤崎町)の樹において偶発的に観察された現象ではなく,品種固有の性質であることを確認するため, 2003 年と 2004 年に,独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡市)に場

所を移して交配実験を行なった.両年における'Grand Champion'の自家受粉の結実率はそ れぞれ79.3%および71.4%, Seeds/Flower は2.0および3.8 Seeds/Flower と算出された (表5-1). 'Grand Champion'に'La France' (SeSr)を受粉した和合交配の Seeds/Flower から, 'Grand Champion'の自家受粉の SI index は 40.0 および 74.5 と算出され, 'Grand Champion'が部分的 自家和合性であることが再確認された. 'Grand Champion'は'Gorham' (SbSe)の銹性枝変わり 突然変異である. 'Gorham'の自家受粉を行なったところ, 77.8%の結実率を示し, Seeds/Flower は 2.8, SI index は 47.0 と算出された (表5-1). この結果から, 'Gorham'も部分的 自家和合であり, 'Gorham'の部分的自家和合性が'Grand Champion'に受け継がれたと考えら れた.

'Grand Champion'と'Gorham'の部分的自家和合性が雌しべ側と花粉側のどちらに起因す るかを調べるため、両品種と同じ SbSe の S 遺伝子型を持つ 3 品種、'Highland', 'Cascade', 'California'を用いて正逆交雑を行なった. 'Highland'に 'Grand Champion', 'Gorham', 'Cascade', 'California'の花粉を受粉したところ、ほとんど結実しなかった. 花粉親に用いた 4 品種の花粉をS遺伝子型の異なる品種に受粉した場合,充実種子を含む果実が得られたの で (データ省略), 'Highland'に対する'Grand Champion', 'Gorham', 'Cascade', 'California'の交 配組み合わせは交雑不和合であると判定され、'Grand Champion' と'Gorham' の花粉は正常に 機能していることが示された. 一方, 'Grand Champion'に'Highland', 'Gorham', 'Cascade', 'California'の花粉を受粉したところ, 結実率は 56.7~79.3%を示し, Seeds/Flower が 0.6~3.2, SI index が 12.0~62.7 と算出され, 部分的交雑和合と判定された. このことは, 'Grand Champion'の雌しべが自家花粉だけでなく, SbSe 品種の花粉も完全に拒絶できないことを示 し, 'Grand Champion'と'Gorham'の部分的自家和合性は雌しべ側に原因があることが明らか になった.

部分的自家和合性品種からの Sb-および Se-RNase のクローニング

'Grand Champion'の部分的自家和合性の原因として, 雌しべ側 S 遺伝子産物である S-RNase の機能に異常が起きている可能性が考えられた. そこで, 'Grand Champion'の花柱 から5'RACE と3'RACE により Sb-および Se-RNase cDNA をクローニングして, 完全長塩基 配列を決定した. Sb-および Se-RNase の cDNA 完全長塩基配列は, それぞれ 678 および 696 bp からなり, 226 および232 アミノ酸残基をコードしていた. 'Grand Champion'からクローニ ングされた Se-RNase の塩基配列は'La France'の Se-RNase (accession no. AB236428)の配列と

| 調査 場所 | 種子親 | <i>S</i> 遺伝子型 | 調査 年 | 花粉親 | S 遺伝子型 | 交配 花数 | 結実率 (%) | seeds /flower | SI index |
|----------|----------------|------------------|---------|----------------|-----------|----------|------------|------------------|-------------|
| 筆石 | Grand Champion | Sb'Se | 2003 | Grand Champion | Sb' Se | 29 | 79.3 | 2.0 | 40.0 |
| | - | | | Gorham | Sb' Se | 30 | 63.3 | 1.6 | 32.0 |
| | | | | Highland | SbSe | 30 | 56.7 | 0.6 | 12.0 |
| | | | | Cascade | SbSe | 13 | 61.5 | 1.4 | 28.0 |
| | | | | La France | SeSr | 30 | 86.7 | 5.0 ^z | |
| | | | 2004 | Grand Champion | Sb' Se | 21 | 71.4 | 3.8 | 74.5 |
| | | | | California | SbSe | 30 | 60.0 | 3.2 | 62.7 |
| | | | | La France | SeSr | 10 | 80.0 | 5.1 ^z | |
| 盛岡 | Highland | SbSe | 2004 | Grand Champion | Sb'Se | 30 | 6.7 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Gorham | Sb' Se | 28 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | California | SbSe | 30 | 3.3 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | Cascade | SbSe | 29 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | | | | La France | SeSr | 30 | 76.7 | 4.0 ^z | |
| | Gorham | Sb'Se | 2005 | Gorham | Sb'Se | 27 | 77.8 | 2.8 | 47.0 |
| | | | | La France | SeSr | 26 | 96.2 | 5.9 ^z | |

表5-1 'Grand Champion', 'Gorham', およびSbSe 遺伝子型品種の自家受粉と他家受粉における結実率と種子数.

²SI indexの算出に用いた和合受粉のSeeds/Flower.

完全に一致したが, Sb-RNase の塩基配列は'Doyenné du Comice'の Sb-RNase (accession no. AB236429)との間に3塩基の置換が見出された. ゲノム DNA から PCR 増幅した断片の塩基 配列も解析したところ, Sb-RNase ではイントロン内にも2塩基の置換を見出した. 'Grand Champion'と'Doyenné du Comice'との Sb-RNase のゲノム DNA 配列間には,合計5塩基の違 いがあることが明らかになった (図 5-2a). そこで, 'Grand Champion'から得た Sb-RNase を Sb'-RNase と名付けた. cDNA の3塩基の置換のうち,2つは非同義置換であり, Sb-RNase の グアニンが Sb'-RNase においてチミンに置換されたことで,シグナルペプチド領域内のバ リン (17)がロイシンへ,シトシンからアデニンへの置換により C5 領域上流のプロリン (158)がトレオニンに変化していた (図 5-2b). しかしながら,Sb'-RNase の推定アミノ酸配列 には T2/S型 RNase の活性に必須な2つのヒスチジン残基 (Kawata et al. 1989)と高次構造形 成に重要な8つのシステイン残基 (Ishimizu et al. 1996)が保存され,5つの保存領域とHV 領 域の推定アミノ酸配列は Sb-RNase と同一であったことから,Sb'-RNase は Sb-RNase とほぼ 同じ高次構造および機能を持つと推測された.

そこで、ホモロジーモデリングにより Sb-RNase および Sb'-RNase の立体構造を推測し、 比較した (図 5-3). Sb-RNase および Sb'-RNase は、結晶構造解析により立体構造が明らかに されているニホンナシ S3-RNase と 61.4%および 61.7%の相同性を示した. ニホンナシ S3-RNase には 8 つのαヘリックスと 7 つのβシートが存在するが (Matsuura et al. 2001), Sb-RNase および Sb'-RNase の立体構造においては、6 つのαヘリックスと 7 つのβシートの 存在が推測され、それらの位置はほぼ完全に保存されていた. 2 つの S-RNase 間で唯一異な るプロリンとトレオニンは、4 番目のβシートと5 番目のβシートをつなぐループ部分に存 在し、その部分の構造を若干変化させていた. また、推定アミノ酸配列が完全に同じであ るにも関わらず、HV 領域に相当する部分の位置が2 つのタンパク質間で若干異なっていた.

Sb '-RNase と部分的自家和合性との関連を検証するために, *Sb* 対立遺伝子を持つ 26 品種 の *Sb-RNase* を再解析した. プライマーセット'EpHVf-Sb'と'anti-Epend-Sb'を用いたゲノミ ック PCR により増幅された断片の塩基配列について, イントロン内の 2 つの置換のうち下 流の 1 塩基, HV 領域直後における 1 塩基の同義置換, C5 領域上流における 1 塩基の非同義 置換を解析し, 異同を確認した. 'Doyenné du Comice'および'Doyenné du Comice'の交雑後代 を含む 20 品種は *Sb-RNase* を有していたが, 'Grand Champion', 'Gorham' ('Bartlett'× 'Joséphine de Malines'), 'Joséphine de Malines', 'Urbaniste', 'Alexander Lucas', 'Beurré Diel'の 6 品種は *Sb* '-RNase を有していた (表 5-2). 'Grand Champion'の *Sb* '-*RNase* は'Gorham'の花粉親 (a)

| Sb-RNase .nt Sb'-RNase.nt | ATGGGGACGGGGATGATATATATGGTTATGATGGTATTTTCCCTAATTGTATTAATATTGTCTTCGTCCACGGTGGGATTCGATTATTATCAATTT | 96 96 |
|------------------------------|--|------------|
| Sb-RNase .nt Sb'-RNase.nt | ACGCAGCANTATCAGCCGGCTGTCTGCAACTCTAATCCAACTCCTTGTAAGGATCCTCCTGACAAGTTGTTTACTGTTCACGGTTTGTGGGCCTTCA | 192 192 |
| Sb-RNase .nt Sb'-RNase.nt | GACTCGAATGGAAATGACCCAAAATATTGCAAGGCGCCGCCATATCAGACGgtaatattattagcataatcagatagtcaatattgtttatctcat | 288 288 |
| Sb-RNase .nt Sb'-RNase.nt | ttatgtacttgtgtgtgtatatatatttttggataatgctagagcotccaaatttttaaaccaaatgatgtgtcacaataagatataagaaatt | 384 384 |
| Sb-RNase .nt Sb'-RNase.nt | tagtotttotaacattactctatattttttgatatatacaaatattacaottaatttaaaattttatcataaattattotattatatattatta | 480 480 |
| Sb-RHase .nt Sb'-RHase.nt | tattgtoagATGAAAATACTCGAACCCCACTTGGTAATTATTTGGCCGAACGTACTCAATCGAAACGATCATGAAGTCTTCTGGCGTAAACAGTGG GC | 576 576 |
| Sb-RNase .nt Sb'-RNase.nt | GATAAACATGGCTCCTGTGCGTCTTCCCCGATTCAGAACCAGACGCATTACTTGATACAGTAATCAAAATGTACACAACCCAGAAACAAAACGTT | 672 672 |
| Sb-RWase .nt Sb'-RWase.nt | тствалатестстеллавосвалтатталасевовтавбалалосавбавостветовататтвалаатвесатаевсалавттателаелататв | 768 768 |
| Sb-RNase .nt Sb'-RNase.nt | ACACCAAAATTCAAGTGCCAAAAGAATCCTAGGACATCATTGACTGAATTGGTTGAGGTCGGTC | 864 864 |
| Sb-RNase .nt Sb'-RNase.nt | ANTTGTCCCCACCCATTTCCACAAGGATCACGGTATTTCTGCCCCACCAATATTCAGTAT | 924 924 |

(b)

| Sb-RNase Sb'-RNase | MGTGMIYMVMMVFSLIVLILSSSTVGFDYYQFTQQYQPAVCNSNPTPCKDPPDKLFTVHG | | | | | | | |
|-----------------------|--|------------|--|--|--|--|--|--|
| | Signal peptide C1 C2 | | | | | | | |
| Sb-RNase Sb'-RNase | LWPSDSNGNDPKYCKAPPYQTMKILEPHLVIIWPNVLNRNDHEVFWRKQWDKHGSCASSP | 120 120 | | | | | | |
| | HV C3 | | | | | | | |
| Sb-RNase Sb'-RNase | IQNQTHYFDTVIKMYTTQKQNVSEILSKANIKPGRKSRRLVDIENAIRKVINNMTPKFKC | 180 180 | | | | | | |
| | RC4 | | | | | | | |
| Sb-RNase Sb'-RNase | QKNPRTSLTELVEVGLCSDSNLTQFINCPHPFPQGSRYFCPTNIQY | 226 226 | | | | | | |
| | c5 | | | | | | | |

図 5-2 *Sb*-および *Sb* '-RNase の DNA (a)と推定アミノ酸 (b)の配列比較. 小文字はイントロンの配列. (b)推定アミノ酸配列の比較. 下線部はシグナルペプチド, 超可変 (HV)領域, 保存領域 (C1, C2, C3, RC4, C5). 2 つの配列間で保存されている塩基を「・」で示す.





(a) Sb-RNase

(b) Sb'-RNase



(c) Sb-RNase Sb'-RNase

図5-3 ホモロジーモデリングによるSb- RNase (a)およびSb'-RNase (b)の立体構造予測と構造比較 (c). 黄色で囲った部分はHV領域.

| 品種 | S遺伝子型 | | | | | | |
|-----------------------------------|----------|--|--|--|--|--|--|
| Sb-RNase対立遺伝子を有する品種 | | | | | | | |
| Abbé fétal | SaSb | | | | | | |
| Doyenné du Comice | SaSb | | | | | | |
| Reimer red | SbSc | | | | | | |
| Catillac ^z | SbScSs | | | | | | |
| California | SbSe | | | | | | |
| Cascade | SbSe | | | | | | |
| Hartman | SbSe | | | | | | |
| Highland | SbSe | | | | | | |
| Howell | SbSe | | | | | | |
| Beurré d'Amanlis ^z | SbSd | | | | | | |
| Glou Morceau | SbSg | | | | | | |
| Alexandrine Douillard | SbSk | | | | | | |
| Beurré Jean Van Geert | SbSI | | | | | | |
| Canal Red | SbSI | | | | | | |
| Honey Sweet | SbSl | | | | | | |
| Merton Pride ^z | SbSl | | | | | | |
| Triomphe de Jodoigne ^z | SbSlSv | | | | | | |
| Le Lectier | SbSq | | | | | | |
| Condo | SbSr | | | | | | |
| Turnbull Giant | SbSt | | | | | | |
| Sb'-RNase対立遺伝子を有する品種 | | | | | | | |
| Grand Champion | Sb 'Se | | | | | | |
| Gorham | Sb 'Se | | | | | | |
| Alexander Lucas ^z | Sb 'SeSs | | | | | | |
| Beurré Diel ^z | Sb 'SeSv | | | | | | |
| Joséphine de Malines | Sb'Sl | | | | | | |
| Urbaniste | Sb'Sr | | | | | | |

表5-2 Sb-または Sb´-RNaseを有するセイヨウナシ品種のS 遺伝子型

²三倍体品種

である'Joséphine de Malines'に由来していた.

Sb'-RNase と Sb-RNase の構造の違いが機能に影響を与えないと断言することはできない が, Sb'-RNase を持つ'Joséphine de Malines'が自家不和合性と判定されていることから, Sb'-RNase のアミノ酸置換が'Grand Champion'と'Gorham'における部分的自家和合性に関与 している可能性はないと考えられた.

半定量的 RT-PCR による Sb- (Sb'-)および Se-RNase の転写量

'Grand Champion'の部分的自家和合性に Sb'-および Se-RNase の転写量の違いが関連して いる可能性が考えられる. そこで、11 品種の total RNA を鋳型に半定量的 RT-PCR 解析を行 ない、Sb-(Sb'-)および Se-RNase の転写量を比較した (図 5-4). Sb-(Sb'-) RNase 対立遺伝子を 有する'Grand Champion', 'Gorham', 'Highland', 'California', 'Cascade', 'Howell', 'Doyenné du Comice', 'Joséphine de Malines', 'Beurré Jean Van Geert'から153 bp の断片が, Se-RNase 対立遺 伝子を有する'Grand Champion', 'Gorham', 'Highland', 'California', 'Cascade', 'Howell', 'La France', 'Bartlett'から 169 bp の断片が増幅された. Sb- (Sb'-) RNase の転写量は'Gorham', 'Joséphine de Malines', 'Doyenné du Comice'において比較的高かった. Se-RNase の発現量は 'Gorham', 'California'において高く, 'La France'において比較的高かった. 遺伝子型 SbSe (Sb'Se)の7 品種'Grand Champion', 'Gorham', 'Highland', 'California', 'Cascade', 'Howell'では, どの品種 においても Sb- (Sb'-) RNase が Se-RNase よりも発現していた. Sb-および Se-RNase は、品種 間や対立遺伝子間で転写量に差が認められたが,部分的自家和合性の'Grand Champion'と 'Gorham'において極端な発現抑制は認められなかった.

花柱における S-RNase 量および RNase 活性

'Grand Champion', 'Highland', 'Doyenné du Comice', 'La France'の花柱粗抽出液を SDS-PAGEに供し,花柱における S-RNase 含量と活性を分析した. CBB 染色および銀染色に より得られたタンパク質のバンドパターンは 4 品種ともほぼ同一であった (図 5-5a). 供試 4 品種が有する Sa-, Sb-, Sb'-, Se-, Sr-RNase の平均分子量は cDNA 配列からそれぞれ, 26.3, 26.0, 26.1, 26.5, 26.1 と推定された. ニホンナシの 7 種類の S-RNase, S1~S7-RNase は糖タン パク質であり,結合する糖鎖の種類と数により移動度に違いが生じる結果,約 30 kDa の位 置に検出されている (Sassa et al. 1993). セイヨウナシにおいても約 26~30 kDa のバンドが S-RNase に相当すると考えられた. 約 26~30 kDa のタンパク質のバンドの濃さを比較した



図5-4 半定量的RT-PCRによるSb-(Sb'-)およびSe-RNaseの転写量の比較. 右側の数字はPCRサイクル数を示す.ユビキチン遺伝子(Ubi.)を内生コントロールとして用いた.









ところ, セイヨウナシ4品種の花柱における約26~30kDa タンパク質含量はほぼ同じであった.

花柱の RNase 活性を測定するため, SDS-PAGE 後, RNase 活性染色を行なった. いずれの 品種からも,約22,25,27,30 kDa のタンパク質に RNase 活性が検出された (図 5-5b). 各バ ンドの活性強度のパターンには品種により多少の違いがみられたが,約25 kDa のバンドが どの品種においても強い活性を示した. この約25 kDa の活性はニホンナシと同様に non-S RNase の活性に相当すると考えられた (未公表データ). そこで,S-RNase と推測される約27 および30 kDa タンパク質の RNase 活性を比較した. 'Grand Champion', 'Doyenné du Comice', 'Highland', 'La France'の約27 および30 kDa タンパク質の RNase 活性に有意差は認められ なかった.

'Grand Champion'の自確後代における Sb-および Se-RNase 対立遺伝子の分離

'Grand Champion'の自殖後代間における S-RNase 対立遺伝子の分離を解析し,部分的自家 和合性をもたらしている変異が S-RNase と連鎖しているかを検討した. 自殖後代のゲノム DNA からプライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いた PCR により S-RNase 対立遺伝子を増幅した. 自殖後代からは 440 bp 断片 (Sb)のみ, 440 bp 断片 (Sb)と 998 bp 断 片 (Se), 998 bp 断片 (Se)のみが検出される個体が分離し,それぞれ Sb'Sb', Sb'Se, SeSe と S 遺伝子型が推定された (図 5-6). 合計 67 個体から Sb'Sb'が 16 個体, Sb'Se が 32 個体, SeSe が 19 個体得られ, 1: 2: 1 の分離比に適合していた ($\chi^2 = 0.40, p > 0.750$). S-RNase 対立遺伝 子の分離に極端な歪みは見られなかった.

く考察>

配偶体型自家不和合性を有するバラ科果樹の育種目標の1つに自家和合性品種の育成が ある. 'Grand Champion'は'Gorham'の銹性枝変わりとして発見された品種であり, 生食およ び貯蔵に適していることに加え (表 2-1), 第 1 章で部分的自家和合性を持つことが示され た. よって, 'Grand Champion'は自家和合性品種の育成だけでなく, 自家不和合性機構の解 明のためにも貴重な材料である.

自家受粉の結果, 'Grand Champion'と同様に'Gorham'も部分的自家和合であることが明ら かになった. 部分的自家和合性は銹果皮を生じる突然変異に付随して起きたのではなく, 'Gorham'がもともと持っている性質であると考えられた.'Grand Champion'および
'Gorham'の花粉は'Highland' (SbSe)と交雑不和合であったが、花柱は SbSe 遺伝子型品種由
来の花粉と部分的交雑和合となった.'Grand Champion'の部分的自家和合性は雌しべ側に原
因があると結論づけられ、原因の1つとして S-RNase の機能異常の可能性が考えられた.

'Grand Champion'の花柱から Sb-および Se-RNase cDNA をクローニングしたところ, Sb-RNase の翻訳領域に2つの非同義置換を有する Sb'-RNase を見出したが,2つのアミノ酸 置換は RNase 活性や対立遺伝子特異性に関与する領域外に存在した.ホモロジーモデリン グにより立体構造を推定した結果,αヘリックスおよびβシートの数と位置は保存されて いたが,アミノ酸変異部分に加えて,HV 領域の部分が2つのタンパク質間で若干ずれてい た.構造の変化は,おそらくアミノ酸変異の影響であろうと推測されるが,活性および対 立遺伝子特異的認識に対する影響は不明である.しかしながら,この変異を持つ Sb'-RNase 対立遺伝子は部分的和合性を示す'Grand Champion'と'Gorham'だけでなく,自家不和合性 品種からも見出された.したがって,Sb'-RNase のアミノ酸置換が部分的自家和合性の原因 ではないと推測した.

ナス科のジャガイモ野生種 Solanum chacoense にみられる散発性自家和合性系統では, S-RNase タンパク質量が少ない系統ほど多くの自家花粉を許容することから, S-RNase 量の 閾値が和合性に関与していると推察されている (Qin et al. 2006). 'Grand Champion'と 'Gorham'の Sb'-と Se-RNase は,品種により多少の差は認められたものの,自家不和合性品 種と同程度発現していた.また,'Grand Champion'における S-RNase 量と RNase 活性は自家 不和合性の'Highland'とほぼ同じであり, 'La France'よりも多いことから, 'Grand Champion' の花柱には自家花粉を拒絶できる十分な量の S-RNase が含まれていると推測した.よって, 'Grand Champion'の部分的自家和合性と S-RNase の量は関係していないと考えられる.

'Grand Champion'の自殖後代において, S 遺伝子型が Sb 'Se と Sb 'Sb', または, Sb 'Se と SeSe の個体だけが分離すれば, それぞれSb'-またはSe-RNase が機能していないことが示される. しかし, 自殖後代から Sb 'Sb': Sb 'Se : SeSe 個体が 1: 2: 1 で分離したことから, 'Grand Champion'の花柱において Sb'-および Se-RNase は正常に機能している. 以上の結果から, 'Grand Champion'の部分的自家和合性は, S 遺伝子座と連鎖していない HT-B や 120K のよう な雌しべ側因子の変異に起因すると推察された. この結果は, ナシ亜科の自家不和合反応 の機構解明の手がかりとなりうることから, 'Grand Champion'と'Gorham'は重要な研究材料 であると言える.

同時に,部分的自家和合性を品種特性として有する'Grand Champion'および'Gorham'は 重要な育種素材でもある.開花自家受粉により結実した'Grand Champion'の果実品質と他 家受粉果実は有意差がない(表 1-5).よって,いくつかの四倍体品種の他には完全な自家 和合品種がないセイヨウナシにおいては,'Grand Champion'と'Gorham'の部分的自家和合性 を導入することにより,受粉樹の混植や人工受粉を必要とせずに良質果実が生産できる新 品種が育成されると考えられる.

総合考察

セイヨウナシ (Pyrus communis)が自家不和合性を有することは早くから指摘されていたが、 交雑不和合性を示す品種の組み合わせが少ないとされたことから、同じナシ亜科のニホンナシ やリンゴのように交配実験による品種の S 遺伝子型が決定されてこなかった. セイヨウナシ種 の成立過程が複雑であることや栽培の歴史が長く各地で多様な品種が発見・選抜・育成された ことが背景として存在するが、単為結果性により品種の自家不和合性および品種間の交雑不和 合性が正しく評価されなかったことも大きく影響している.また,多くの品種が単為結果性を 有していたが故に、和合花粉の受粉が果実生産に必ずしも必要ではなかったことも、セイヨウ ナシの自家不和合性研究があまり進まなかった原因として挙げられる。単為結果性は、開花期 の天候が不順であっても結実を可能にするばかりか、受粉樹の混植がなくても十分な収量をも たらす場合もあるが、品種および栽培地の気候に影響されるため、これまでの報告は調査地に おける特定の供試品種についての特性を示すに過ぎず、単為結果性自体の評価も曖昧であった. 一方で、無種子果実の品質は有種子果実に比べて劣ることが数品種で報告されていた. 多様な 品種の混植により、異なる S 遺伝子型を持つ品種が受粉樹として機能し、高品質果実が生産さ れると期待される、しかしながら、近年、栽培環境への適応性や消費者の嗜好性などから特定 の品種の栽培割合が増加し、特に、輸出用の生産では貯蔵性のよい少数の品種が栽培されてい **る. また. 発表される新品種の多くは主要栽培品種の交雑後代から選抜されており. 特定のS対** 立遺伝子および S 遺伝子型を持つ品種の増加が危惧されている. したがって, 今後のセイヨウ ナシ栽培においては、S 遺伝子型情報に基づいた効率的な受粉樹品種の選択が必要になると思 われる.本研究では、セイヨウナシの自家不和合性を取り上げ、品種の交雑不和合・和合関係を 明らかにするとともに、和合花粉による結実管理に不可欠な品種の S 遺伝型を推定した.

不和合・和合の判定が自家不和合性研究の出発点となることから,交配による自家および交 雑不和合・和合の判定方法を検討した.1花そうあたりの交配花数や結実数の調査時期は結実率 に影響すると考えられたが,過去の交配実験では統一されていなかった.そこで,セイヨウナ シ10品種を用いた交配実験から結実の安定性を評価し,1花そう1花で交配して June Drop 後に 調査する方法を提案した.また,これまで判定の妨げとなっていた単為結果性の影響を排除す るため, Seeds/Flower および SI index を判定基準とした.その結果,交配による不和合・和合の 判定方法を確立し,異なる調査地および調査年での交配結果の比較が可能になった.この判定

183

方法により,交配実験に供試できた 77 品種中 5 品種は雄性不稔性,残り 72 品種のうち'Gorham' とその枝変わり品種'Grand Champion'は部分的自家和合性,その他の 70 品種は自家不和合性を 示すことが明らかになった (表 6-1). セイヨウナシは基本的に自家不和合性を有するとともに, 多くの品種が単為結果性を有することが交配実験により示された. しかし,これまでに報告さ れた'ラ・フランス'と'バートレット'を含む 6 品種の果実形質の比較から,いずれの品種におい ても単為結果による無種子果実よりも有種子果実の品質が優れることが明らかにされた. した がって,単為結果性を有するセイヨウナシにおいても良質果実の生産には和合花粉の受粉が不 可欠であり,品種の S 遺伝子型情報が必要である.

不和合・和合の判定方法を確立したものの,交配によるS遺伝子型の決定は多くの時間,労力, 土地を必要とする. そこで, ニホンナシやリンゴと同様に, 品種のS遺伝子型を迅速に推定する システムの構築を行なった. セイヨウナシにおいても雌しべ側 S 遺伝子産物は S-RNase である と仮定し、セイヨウナシの S-RNase の同定を試みた. RACE クローニングやゲノミック PCR に より, 19 種類の S-RNase 対立遺伝子 (Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, Sn-, Sp-, Sq-, Sr-, Ss-, St-, Su-, Sv-RNase 対立遺伝子)とSx-RNase を増幅し、得られた断片の種類から127品種の S遺伝子型を推定した. これら品種には、日本で栽培されている二倍体 25 品種 (第 2 章)、海外 の主要品種を含む二倍体 82 品種 (第3,4章)および三倍体 7 品種 (第4章), ニホンナシ S-RNase を有する3品種 (第3章), Sx-RNase が発現していた二倍体10品種 (第3,4章)が含まれる.また, 国外で 13 種類の推定 S-RNase 対立遺伝子 (Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se-, Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, Sn-, So-, Sp-RNase 対立遺伝子)の部分配列から推定された 8 品種 (Zuccerelliet al. 2002a; Zisovich et al. 2004a)を合わせると、S-RNase 対立遺伝子の検出により S 遺伝子型が推定された品種は 135 品種 となった. Sanzol and Herrero (2002)は、花粉管伸長試験の結果から 7 品種の S 遺伝子型を、 'Williams (Bartlett)' (SIS2), 'Coscia' (S3S4), 'Agua de Aranjuez' (SIS3), 'S(SS×W)7' (S2S3), 'Butirra Precoce Morettini' (S1S3), 'Santa Maria Morettini' (S2S3), 'Tosca' (S1S4)と推定した. 'Santa Maria Morettini' (S2S3) ['Bartlett' (S1S2)×'Coscia' (S3S4)の交雑後代]は本論文で供試した'Santa Maria' (SlSk) ['Bartlett' (SeSl)×'Coscia' (SbSk)の交雑後代]の異名同種であることから, S1, S2, S3, S4 はそ れぞれ Se, Sl, Sk, Sb に相当すると推測される. したがって、4 品種の S 遺伝子型が Agua de Aranjuez' (SeSk), 'S(SS×W)7' (SkSl), 'Butirra Precoce Morettini' (SeSk), 'Tosca' (SbSe)と考えられ, 総計 139 品種の S 遺伝子型が推定されたことになった (表 6-1).

これら品種のうち、12 種類の *S-RNase* (*Sa-*, *Sb-*, *Sc-*, *Sd-*, *Se-*, *Sg-*, *Sh-*, *Si-*, *Sk-*, *Sl-*, *Sq-*, *Sr-RNase*) の組み合わせからなる同じ推定 *S* 遺伝子型を持つ品種間の交配はすべて交雑不和合を示した.

| 表6-1 | セイヨウナショ | 139品種の推定S遺伝子型 | ,開花時期, | 自家不和合性, | 品種の親子関係. |
|------|---------|---------------|--------|---------|------------------------|
| | | | , | | Here into a star black |

| S遺伝子型 | 品種 | 開花時期 | 自家不和合性 雄性不稔性 | 品種の親子関係 |
|--------|---------------------------|------|-----------------|---|
| SaSb | Abbé fétal | С | SI | |
| | Doyenné du Comice | D* | SI | |
| SaSc | Roguered | D* | | Doyenné du Comice (SaSb) × (Seckel (SeSl) × Farmingdale seedling 122) |
| | Eletta Morettini * | | | |
| SaSe | Aurora | D* | SI | Marguerite Marillat (SaSl) \times Bartlett (SeSl) |
| | Docteur Jules Guyot | D | SI | |
| | Duchesse d'Angouleme | С | | |
| | Harrow Crisp | D** | | Bartlett (SeSl) × US56112-146 |
| | Harrow Delight | С | SI | Purdue 80-51 (Old Home (SeSt) × Early Sweet) × Bartlett (SeSl) |
| | Magness | С | MS | Seckel (SeSI)自然交雑実生 × Doyenné du Comice (SaSb) |
| | Rocha | | | |
| | Tyson | | | |
| SaSg | Charles Ernest | С | | |
| | Triomphede Vienne | D | | |
| SaSl | Harrow Sweet | С | | Bartlett (SeSl) × Purdue 80-51 (Old Home (SeSt) × Early Sweet) |
| | Koonce | D* | SI | |
| | Marguerite Marillat | С | MS | |
| | Pierre Tourasse | D* | | |
| SaSq | Beurré Clairgeau | С | SI | Duchesse d'Angouleme (SaSe)自然交雑実生 |
| SaSr | Angelys | C** | | Doyenné d'hiver (SeSr) × Doyenné du Comice (SaSb) |
| SbSc | Reimer Red | D* | | Doyenné du Comice (SaSb) × Max Red Bartlett (SeSl) |
| SbScSs | Catillac (3x) | D | MS | |
| SbSd | Beurré d'Amanlis (3x) | С | MS | |
| SbSe | Beurré Lubrum | D* | SI | |
| | California | E* | SI | Max Red Bartlett (SeSl) × Doyenné du Comice (SaSb) |
| | Cascade | D | | Max Red Bartlett (SeSl) × Doyenné du Comice (SaSb) |
| | Gorham | E | PSC | Bartlett (SeS1) × Joséphine de Malines (SlSb) |
| | Grand Champion | E | PSC | Gorham (SbSe)の銹果突然変異 |
| | Hartman | D* | SI | Doyenné du Comice (SaSb) × Max Red Bartlett (SeSl) |
| | Highland | С | SI | Bartlett (SeSl) × Doyenné du Comice (SaSb) |
| | Howell | D* | SI | |
| | Tosca*** | | SI | Coscia (SbSk) × Bartlett (SeSl) |
| SbSeSs | Alexander Lucas (3x) | в | | |
| SbSeSv | Beurré Diel (3x) | С | | |
| SbSg | Glou Morceau | D | | |
| SbSk | Alexandrine Douillard | E* | SI | |
| | Coscia ** | | | |
| SbSl | Beurré Jean Van Geert | D | SI | |
| | Canal Red | E* | | Forelle (SeSn) \times Max Red Bartlett (SeSl) |
| | Honey Sweet | E* | | Seckel (SeSl) × U.S. 220 (Vermont Beauty × Roi Charles de Wurtemburg) |
| | Joséphine de Malines | D | SI | |
| SbSl | Merton Pride (3x) | D | MS | Glou Morceau (SbSg) × Bartlett (4x) (SeSeSlSl) |
| SbSlSv | Triomphe de Jodoigne (3x) | С | | |
| SbSq | Le Lectier | D | SI | Bartlett (SeSl) × Bergamotte Fortunee |
| SbSr | Condo | D* | SI | Conference (SdSr) × Doyenné du Comice (SaSb) |
| | Urbaniste | D* | SI | |
| SbSt | Turnbull Giant | B* | MS | |

赤:日本の栽培品種,*: Zuccherelli et al. 2002aにより推定された品種,**: Zisovich et al. 2004aにより推定された品種,***:本章における推定とSanzol and Herrero 2002の実験結果から推測される品種(自家不和合性検定は花粉管伸長試験による). 三倍体品種および同名異種と推測された品種はそれ ぞれ(3x)と(?)で表記した.開花時期については,無印:「Directory of Pear Cultivar」「Keepers Nursery HP」「GUIDE OF PEARS(HP)」による評価,*:農研機構磁岡における開花日による評価,**:その他のHPにおける記述に基づく評価.空白は不明. 雄性不稔性および自家不和合性については,MS:雄性不稔性,SI:自家不和合性,PSC:部分的自家和合性,空白は調査していない.品種の親子関係については,S遺伝子型に矛盾があるものを青で示した. 空白は由来不明.

表6-1 セイヨウナシ139品種の推定S遺伝子型,自家不和合性,品種の親子関係.(つづき)

| S遺伝子型 | 品種 | 開花時期 | 自家不和合性 雄性不稔性 | 品種の親子関係 |
|-------|-----------------------------|---------|-----------------|--|
| ScSd | Beurré Hardy | D | SI | |
| | Royal Red Hardy | D | SI | Beurré Hardy (ScSd)の着色系突然変異 |
| ScSe | Beurré d'Anjou | С | SI | |
| | Moonglow | D | SI | |
| | Red Aniou | С | SI | Beurré d'Anjou (ScSe)の着色系突然変異 |
| ScSh | Nouveau Poiteau | E | | |
| ScSl | Ewart | D | | |
| ScSn | Saint Mathieu | D* | | |
| SdSe | Bautomne (Serenade) | D* | SI | Conference $(SdSr) \times Dovenné d'hiver (SeSr)$ |
| | Clapp's Favorite | D | SI | |
| | Flemish Beauty | C* | SI | Flemish Beauty (SdSe) × Bartlett (SeSI) |
| | Red Clapp's (Starkrimson) | D* | SI | Clapp's Favorite (SdSe)の着色系突然変異 |
| SdSl | Dovenné Gris | D* | SI | |
| SdSa | Devoe | C* | SI | Clann's Favorite (SdSe)自然交雑宝生 |
| SdSr | Conference | Ċ | SI | |
| SeSa | Beurré Superfin | ñ | SI | |
| Debg | Orivijer de Serres | D | SI | |
| SeSh | Fl Dorado | D* | SI | Bartlett (SeSI)白伏尔雄宝士 |
| DEDN | Winter Colo | D* | SI | Winter Malia (04.04)白铁态雄宝化 |
| 9-9i | Reverse Cifford | C C | 51 | willier Nells (ShSk)日杰文雅夫生 |
| Sest | Summer Devenne | D* | SI | |
| | Bitmaston (2) | יע ח | 51 | Duchesse d'Angouleme (SaSa) × Glou Momeau (ShSa) |
| | Contile ** | D | 51 | Duchesse d'Aligoutenne (Sase) × Gioù Morceau (Sosg) |
| Sast | Fondente Thirriot | C | 51 | |
| SESK | Pondanie Triumph | c | 51 | Uvedale St. Germain (Bella Angevina x Bartlett (SeSI)) x Bartlett (SeSI) |
| | Weshington | C | SI | Overale St. German (Bena Angevina A Barten (Best)) A Barten (Best) |
| | Snadona ** | | 51 | |
| | Agua de Araniuez*** | | 51 | |
| | Rutire Precoce Morettini*** | | SI | Coscie (ShSk) × Bertlett (SeSD |
| SeSI | Avers | B* | MS | Garbar (ShSm) × Beurré d'Aniou (SeSe) |
| 2021 | Bartlett | D | SI | Surea (chem) Dealle à raijea (cepe) |
| | Délices d'Hardenpont | B* | D I | |
| | Harvest Queen | Č | SI | Michigan 572 (Barseck × Bartlett (SeSI)) × Bartlett (SeSI) |
| | Max Red Bartlett | D D | SI | Bartlett (SeSIV) 著色系空伏变異 |
| | Nanoleon | F | bi | Builded (BEBS) A DAX MARK |
| | Pera d'Agua | B* | | |
| | Resired | D D | | Bastlett (SelVI) 著品系空铁变異 |
| | Seckel | n | SI | Datter (Bebr)の有日示大派及共 |
| | Seigneur d'Espéren | C | SI | |
| | Bon Rouge ** | C | 51 | |
| SeSm | Colorée de Juillet | D | SI | |
| SeSn | Forelle ** | c | 51 | |
| SeSa | Resi de Saint-Waast | C* | SI | |
| Doby | Bon-Chretien d'Hiver | D | SI | |
| | Covert | D* | SI | Bartlett (SeSI) × Dorset |
| | Pierre Cornelle | c | SI | Beurré Diel (ShSeSv) × Dovenné du Comice (SaSh) |
| SeSr | Ballad | D* | SI | Bartlett (SeSI) × La France (SeSr) |
| | Dovenné d'hiver | D* | 2. | |
| | Idaho | D | SI | |
| | La France | B* | SI | |
| | Verdi (Sweet Blush) | D* | SI | B. Louise d' Avranches · Dovenné du Comice (SaSb) |
| SeSs | Dana's Hovay | D | SI | Seckel (SeSI) Winter Nelis (ShSk) |
| SeSt | Old Home | D* | | |
| | Starking Delicious | F | | |

赤:日本の栽培品種,*:Zuccherelli et al. 2002aにより推定された品種,**:Zisovich et al. 2004aにより推定された品種,**:本章における推定とSanzol and Herrero 2002の実験結果から推測される品種(自家不和合性検定は花粉管伸長試験による). 三倍体品種および同名異種と推測された品種はそれ ぞれ(3x)と(?)で表記した.開花時期については,無印:「Directory of Pear Cultivar」「Keepers Nursery HP」「GUIDE OF PEARS(HP)」による評価,*:農 研機構盛岡における開花日による評価,**:その他のHPにおける記述に基づく評価. 空白は不明. 雄性不稔性および自家不和合性については,MS:雄 性不稔性,SI:自家不和合性,PSC:部分的自家和合性,空白は調査していない. 品種の親子関係については,S遺伝子型に矛盾があるものを青で示した. 空白は由来不明.

表6-1 セイヨウナシ139品種の推定S遺伝子型, 自家不和合性, 品種の親子関係. (つづき)

| S遺伝子型 | 品種 | 開花 | 自家不和合性 | 品種の親子関係 |
|---------------|------------------------------------|---------|---------------------|---|
| SaSI | Blickling | <u></u> | <u>每担任个亿任</u> SI | |
| bgbi | Comte de Lambertue | D | SI | |
| SaSa | President Héron | C* | 51 | |
| Sast | Passa Crassana | C. | 12 | |
| ogor | Silver Dell | D# | SI | La Emmas (SaSu)白伏衣游生生 |
| CLCL | Winter Nelis | D. | 51 | La France (Sesr)日然父雅关王 |
| STICK SLOI | Minter Inclis | E. | 51 | |
| Show | Contracting Netis | D: | 51 | winter Nells (JAJA)日然父稚关生 |
| Shom | Garbar | C. | | |
| Sist | Perimity Deverá de l'Assomption | F | | |
| 51-51 | Sente Maria | E D | 51 | Bortlett (SeSI) × Cassie (ShSk) |
| DKDI | Santa Maria Spadochia ** | D | 51 | Danieu (Sebi) ~ Coscia (SUSK) |
| | S(SS×W)7*** | | SI | Ama de Araninez (SaSk) × Bortlett (SaSI) |
| SkSr | Ankere | C* | SI | Agua de Alaijuez (bebk) ^ Daitien (bebl) |
| SkSuSr | Vicar of Winkfield (3x) | C | MS | |
| SISm | Chanin | D | SI | Sected (SeSI)自然态雄宝生白铁 |
| SISn | Akca | D* | 51 | SCORE (DEDI/IS MICHERY LINK) |
| SISa | General Leclerc | C* | SI | Dovenné du Comice (SaSh)自然存雄宝生 |
| biog | Ovid | F | SI | Bartlett (SeSI) × Dorset |
| SIST | Bristol Cross | D | 12 | Bartlett (SeSI) × Conference (SdSr) |
| 0.07 | Emile d'Heyst | Č | SI | |
| | Kieffer | B* | MS | |
| | Koshisayaka | D* | SI | Bartlett (SeSI) \times La France (SeSr) |
| SISs | Comte de Flandre | D | SI | |
| SmSo | Lawson | | | |
| SePpS5 | Frontier | C* | | |
| SIPpS2 | Fondante de Charneu | C* | | |
| SrPpS4 | Fame | | | |
| (SbSx) | Lincoln | D* | | |
| (SeSx) | Clara Frijs | D | | |
| (ShSx) | Beurré Bedford | E | | Marie Louise (SlSx) × Durondeau (ShSx) |
| | Beurré Bosc | D* | SI | |
| | Durondeau | С | | |
| (SgSx) | Beurré Dumont | D | | |
| (SlSx) | Early Seckel | D | | |
| | Marie Louise | D | SI | |
| (SmSx) | Jargonelle (?) | | SI | |
| (SrSx) | Saint Germain | | ····· | |

赤:日本の栽培品種,*: Zuccherelli et al. 2002aにより推定された品種,**: Zisovich et al. 2004aにより推定された品種,***:本章における推定とSanzol and Herrero 2002の実験結果から推測される品種(自家不和合性検定は花粉管伸長試験による). 三倍体品種および同名異種と推測された品種はそれ ぞれ(3x)と(?)で表記した.開花時期については,無印;「Directory of Pear Cultivar」「Keepers Nursery HP」「GUIDE OF PEARS(HP)」による評価,*:農 研機構盛岡における開花日による評価,**:その他のHPにおける記述に基づく評価.空白は不明. 雄性不稔性および自家不和合性については,MS:雄 性不稔性, SI:自家不和合性, PSC:部分的自家和合性,空白は調査していない.品種の親子関係については,S遺伝子型に矛盾があるものを青で示した. 空白は由来不明. この結果は、セイヨウナシにおいても雌しべ側 S 遺伝子産物は S-RNase であることを明らかに するものであり、12 種類の S-RNase が自家不和合性に関与する対立遺伝子であることを直接裏 付けるとともに、同じ方法により同定された 8 種類 (Sm-, Sn-, So-, Sp-, Ss-, St-, Su-, Sv-RNase)も 同様であることを間接的に示した.一方、親子関係にある品種の S 遺伝子型を照合したところ、 交配親の記載がある 51 品種のうち 41 品種は親子間の S 遺伝子型に矛盾がなく、9 種類の S 対立 遺伝子 (Sa, Sb, Sc, Sd, Se, Sh, Sk, Sl, Sr 対立遺伝子)の遺伝が確認された (表 6-1).また、'Grand Champion' (Sb 'Se)の自殖後代からは Sb'-および Se-RNase が期待される分離比で得られた.以上 より、S-RNase が雌しべ側 S 遺伝子であることが裏付けられ、S-RNase の配列に基づく S 遺伝子型 情報が信頼できると考えられた.

品種のS遺伝子型の信頼性はCAPSマーカーシステムによるS遺伝子型推定の信頼性でもあ る、プライマーセット'FTQQYQ'と'EP-anti-IIWPNV2'を用いたゲノミックPCRおよび11種類の 制限酵素処理からなるこのシステムは、17 種類の S-RNase 対立遺伝子 (Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, Sn-, Sp-, Sq-, Sr-, Ss-, St-RNase 対立遺伝子)を識別することができ, 世界の主 要品種の大多数を含む合計 122 品種 (本論文でS遺伝子型を推定した二倍体 107 品種および三 倍体4品種、ゲノミック PCR による推定 S-RNase 対立遺伝子の塩基配列から推定された国外の 7品種,花粉管伸長試験の結果から推定された4品種)をカバーしている. CAPS 解析は,迅速な S遺伝子型推定を可能にする手段であるが、特に、S遺伝子型が推定されている品種間の交雑後 代の S 遺伝子型解析において有効である. 近年のセイヨウナシ育種においては、特定の品種を 交配親に用いた交雑育種が多い. 特定の S 対立遺伝子を持つ品種が増加する結果, 既存の主力 品種と新品種の間もしくは新品種間で交雑不和合となる可能性が高まっており、育種現場にお いて、既存の主力品種と同じ S 遺伝子型を有する後代の選抜を回避することも考えられる. CAPS マーカーシステムは、未展開葉から抽出したゲノム DNA を鋳型にするので、交雑後代の 生育初期段階においても利用することができる. また, 交雑親品種の S 遺伝子型が明らかであ れば、処理する制限酵素を限定できる.したがって、迅速・簡単・確実な S 遺伝子型の推定が可 能であり、育種現場における CAPS マーカーシステムの活用が大いに期待される.

一方で、本論文で確立した CAPS マーカーシステムは、ゲノミック PCR で増幅されない S-RNase 対立遺伝子や、上記 17 種類の S-RNase 対立遺伝子とほぼ同じ PCR 増幅断片長および制 限酵素切断片長に検出される S-RNase 対立遺伝子を識別できないことから、すべてのセイヨウ ナシ品種のS遺伝子型を推定できるシステムにはなっていない.実際、第4章における三倍体の S遺伝子型推定では、Su-および Sv-RNase 対立遺伝子が増幅され、それぞれ Sd-および Sa-RNase

188

対立遺伝子と区別することができなかった. また, Zisovich et al. (2004a)が品種'Lawson'から同 定した So-RNase 対立遺伝子は、CAPS 解析で 1,291 bp 断片として増幅されると予想されるので、 約1.3 kb 断片として増幅される Sk-および Sq-RNase 対立遺伝子との断片長による区別が困難で ある. So-RNase 断片の塩基配列には、約1.3 kb 断片を識別するために選択した制限酵素, Bg/II と HindIII の認識配列は含まれていないので、Sk-と Sq-RNase 対立遺伝子との識別は可能であるが、 2種類の制限酵素で切断されない約1.3 kb 断片が So-RNase 対立遺伝子であると特定することは できない. さらに、このシステムのプライマーセットはセイヨウナシ (Pyrus communis)の S-RNase 対立遺伝子だけでなくニホンナシの S-RNase も増幅する. 本論文でも, 'Frontier', 'Fondante de Chameu', 'Fame'の3品種のゲノミック PCR においてニホンナシの S-RNase が増幅 され、それぞれ、SePpS5、SIPpS2、SrPpS4 と S 遺伝子型が推定された (表 6-1). 現在のセイヨウナ シ (P. communis) 栽培品種はナシ属の種間交雑により生じた P. communis の改良種であるとされ ており、チュウゴクナシ (P. ussuriensis)やニホンナシ (P. pyrifolia)などナシ属樹種と容易に交 雑できる. 耐病性や耐凍性の導入を目的として、セイヨウナシ栽培品種を含む P. communis 品種 と他のナシ属種の交配も多く行なわれていることから, セイヨウナシ品種の S 遺伝子型推定を 進めていく過程において、ニホンナシの S-RNase の配列を持つ品種が出現する可能性が十分に 考えられる.したがって,親品種の遺伝子型が明らかでない品種の S 遺伝子型を推定する際に は、CAPS 解析に加えてゲノミック PCR 断片の塩基配列解析が必要である。本論文のゲノミッ ク PCR により検出された 19 種類の S-RNase 対立遺伝子のうち、12 種類の S-RNase 対立遺伝子 は約 350 bp 断片に増幅されているので、 特に約 350 bp 断片は塩基配列の解析により S-RNase 対 立遺伝子を特定するべきである. また、P. pyrifolia との雑種であることが明確な品種は、ニホン ナシの CAPS マーカーシステム (Takasaki et al. 2004)の併用も検討するべきであろう. さらに, 新規 S-RNase 対立遺伝子を含む推定 S 遺伝子型を持つ品種が複数存在し, 交配が可能であるな らば、交雑不和合性を確認することが望ましい.

CAPS マーカーシステムで検出されない Sx-RNase も品種の S 遺伝子型推定における課題であ る. Sx-RNase の発現が確認された二倍体および三倍体 10 品種では、ゲノミック PCR で検出され た S-RNase 対立遺伝子の数に Sx-RNase 対立遺伝子を加えると、各品種の倍数性と一致すること から、Sx-RNase が S-RNase 対立遺伝子であるとも思われる.ニホンナシにおいては、推定システ ムによる新規 S 遺伝子の同定には、S-RNase の雌しべにおける特異的発現および対立性を調べる ための後代検定を必須とし、また、交配による不和合・和合の評価を行なって、システムに対す る信頼性を確認する必要が指摘されている (Castillo et al. 2002; Takasaki et al. 2004).本論文では、

189

'Durondeau', 'Jargonelle', 'Vicar of Winkfield'の3品種のみを発現解析に供試したが,これら品種のSx-RNase の発現は花柱特異的ではなかった.一方,Sx を有する品種の交配は、遺伝子型ShSx および StSx の2 種類の組み合わせのみの結果ではあるが,交雑不和合を示した.Sx-RNase が雌 しベ側S遺伝子であるかを検証するためには,Sx-RNase がクローニングされた品種およびその他の品種を用いて,より詳細な発現部位の解析や花の発達に伴う Sx-RNase の発現解析,Sx を含むより多くの組み合わせのS遺伝子型を持つ品種間での交配実験,Sx を有する品種の交雑後代のS遺伝子型検定を行なう必要がある.多数のSx を含む同じS遺伝子型の品種間の交配が交雑不和合性を示すこと,また,様々な交配組み合わせにおける多数の交雑後代において期待値と一致するS遺伝子型の分離が得られることが示されれば,Sx-RNase の発現がナシ亜科を含むバラ科植物の S-RNase のように部位特異的な発現を示さなくても,Sx-RNase が雌しべ側S遺伝子 産物のS-RNase をコードしていることが証明されると考えられる.S遺伝子型が推定された品種 やニホンナシおよびリンゴからもSx-RNase が増幅された原因は今のところ不明であるが、更なる解析によりナシ亜科の自家不和合性やS-RNase に関する新たな知見が得られるかもしれない.

同様に、本論文においては、セイヨウナシおよびナシ亜科の自家不和合性機構の解明に繋が りうる成果が得られた. 部分的自家和合性を示す'Grand Champion'および'Gorham'の*S-RNase*の 解析では、S遺伝子座と独立したS-RNase以外の雌しべ側因子が自家不和合反応に関与している ことを示した. また, 18 種類の S-RNase 対立遺伝子 (Sa-, Sb-, Sc-, Sd-, Se-, Sg-, Sh-, Si-, Sk-, Sl-, Sm-, Sn-, Sp-, Sq-, Sr-, Ss-, St-, Su-RNase 対立遺伝子)と Sx-RNase の RACE クローニングにおいて は S-RNase cDNA 完全長塩基配列を決定した.Sハプロタイプの認識は配偶体型自家不和合性を 有する植物全体にわたる課題であり、世界各国で精力的な研究が行なわれているが, S-RNase が 関与する自家不和合性のメカニズムは未だ明らかになっていない.ナシ亜科では花粉側 S 遺伝 子も同定されておらず, また, HV 領域以外の部分も認識特異性に関与する可能性が示されてい る (Zisovich et al. 2004b). したがって、上記の成果は、認識に関与する領域や自家不和合反応に 関与する因子を特定する重要な手がかりとなりうる. さらに、18 種類のセイヨウナシ S-RNase は、ニホンナシの9種類の S-RNase およびリンゴの 14 種類の S-RNase との系統樹分析から、ナ シ亜科の属への分化以前に多様化したことが改めて示された (図 6-1). 近年, S-RNase や SLF/SFB の配列の解析による S 遺伝子座の進化に関する研究が報告されている (Igic and Kohn 2001; Vieira et al. 2003; Nunes et al. 2006; Ortega et al. 2006). セイヨウナシを含むナシ亜科植物の S-RNase の塩基配列をより詳細に解析することにより、S対立遺伝子の多様化に関する情報が得 られる可能性がある.



図 6-1 セイヨウナシ, ニホンナシ, リンゴのS-RNaseの推定アミノ酸配列に基づくNJ法による分子系統樹. 水平方向の枝の長さがS-RNase間の配列の違いをを表す. 数字はBootstrap value (%). 17種類のセイヨウナシ (Pc) S-RNase, 9種類のニホンナシ (Pp) S-RNase, 14種類のリンゴ (Md) S-RNaseのaccession numberは図0-1, 表3-7参照.

セイヨウナシにおいて、品種間の交雑不和合性はほとんど報告されていなかったが、本論文 における交配による不和合・和合の判定方法の確立および品種のS遺伝子型推定により、139品 種のうち 103 品種に交雑不和合を示す品種の組み合わせが存在することが明らかになった.ま た、cDNA クローニングや CAPS マーカーシステムにより、世界の主要栽培品種の大多数のS遺 伝子型を推定し、受粉樹品種の効率的な選択を可能にした.しかしながら、スペインの 'Blanquila'、オランダの'Gieser wildeman'、ギリシャの'Kristalli'、南アフリカの'Rosemarie'や 'Flamingo'といった各国の栽培品種や'Le Conte'、'Orient'、'Farmingdale'、'Dawn'、'Potomac'、 'Blake's Pride'、'Shenandoah'といった火傷病抵抗性を持つ育成品種など、日本に導入されていな いためS遺伝子型が推定されていない品種が多数存在する.これら品種にも同じS遺伝子型を 有する品種が存在する可能性は高いことから、各国において、CAPS マーカーシステムや S-RNase のクローニングによりS遺伝子型が迅速に推定されることを望む.

バラ科果樹の自家不和合性の研究は、品種の S 遺伝子型推定という農学的側面と自家不和合 反応の機構解明という生物学的側面を持つ. 139 品種の S 遺伝子型情報、品種の S 遺伝子型推定 方法、そして、交配による不和合・和合の判定方法が S 遺伝子型に基づく効率的な栽培管理や育 種に寄与することを期待する. また、S-RNase cDNA 完全長塩基配列や部分的自家和合性の原因 に関する知見が自家不和合性研究の発展に貢献することを期待する.

謝辞

本研究を進めるにあたり,神戸大学農学部果樹科学研究室の中西テツ博士,野村啓一 博士,高崎剛志博士から厳しくも温かいご指導,ご助言を賜りました.心から感謝申し 上げます.学位論文を審査していただいた神戸大学農学部植物育種学研究室の上島脩 志博士,土佐幸雄博士にも厚く御礼申し上げます。

また,実験材料および実験場所を提供していただきました弘前大学農学生命科学部 生物共生教育研究センター藤崎農場の伊藤大雄博士,塩崎雄之輔博士,長野県果樹試験 場の加藤秀一氏,峯村万貴氏,山近龍浩氏,独立行政法人農業・食品産業技術総合研究 機構果樹研究所リンゴ研究拠点の岩波宏氏,別所英男氏,古藤田信博博士,農業者大学 校落葉果樹研究所の継枝良一郎氏に心より御礼申し上げます.

参考文献

- Anderson MA, Cornish EC, Mau S-L, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bonig I, Grego B, Simpson R, Roche P, Haley JD, Penschow J, Niall HD, Tregear GW, Coghlan JP, Crawford RJ, Clarke AE. 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. Nature 321: 38-44.
- Blank AR, Sugiyama. H. Dekker CA. 1982. Activity Staining of Nucleolityc Enzymes after Sodium Dodecyl Sulfate – Poliacrylamide Gel Electrophoresis: Use of Aqueous Isopropanol to Remove Detergent from Gels Analytical Biochemistry 120, 267-275.
- Bos'kovi'c R, Tobutt KR, Batlle I, Duval H. 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. Euphytica 97: 167–176.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Broothaerts W. 2003. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S alleles. Theor Appl Genet 106: 703-714. DOI: 10.1007/s00122-002-1120-0
- Broothaerts W, Janssens GA, Proost P, Broekaert WF. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. Plant Mol Biol 27:499-511.
- Brown GG, Childs L. 1929. Pollination Study of the Anjou Pear in Hood River Valley. Oregon State Agricultural College, Agricultural Experiment Station, Station Bulletin 239: 3-15
- Castillo C, Takasaki T, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T. 2001. Reconsideration of S-genotypes assignments, and discovery of a new allele based on S-RNase PCR-RFLPs in Japanese pear cultivars. Breed Sci 51: 5-11.
- Crane MB, Lewis D. 1940. Genetical studies in pears II. A Classification of cultivated varieties. J Pomology 18: 52-61.
- Crane MB, Lewis D. 1942. Genetical Studies In Pears III. Incompatibility and Sterility Journal of Genetics, vol. 43 nos. 1 and 2: 31-43.
- Crane MB, Thomas PT. 1939. Genetical studies in pears I. The origin and behaviour of a new giant form. J Genet 37: 287-299.
- Crawford M. 1996. Directory of pear cultivars, 1st edn. Agroforestry Research Trust, UK, pp 42-79.

Cruz-Garcia F, Hancock CN, Kim D, McClure B. 2005. Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. The Plant Journal 42, 295–304. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02375.x

de Nettancourt D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer, Berlin.

Dorsey MJ. 1923. Sterility in relation to horticulture. American Journal of Botany. 10: 474-484

- East EM, Mangelsdorf AJ. 1925. A new interpretation of the hereditary behavior of self-sterile plants. Proc Natl Acad Sci USA 11: 166-171
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A, Takayama S. 2003. Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. Genes Cells 8: 203-213.
- Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-Garciaand F, McClure B. 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana* Nature 439: 805810. DOI: 10.1038/nature04491
- Golz JF, Oh HY, Su V, Kusaba M, Newbigin E. 2001. Genetic analysis of *Nicotiana* pollen-part mutants is consistent with the presence of an S-ribonuclease inhibitor at the S locus. Proc Natl Acad Sci USA 98: 15372-15376. DOI: 10.1073/pnas.261571598
- Griggs WH, Iwakiri BT. 1954. Pollination and parthenocarpy in the production of Bartlett pears in California. Hilgardia 22:643-678.
- Hancock CN, Kent L, McClure BA. 2005. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in Nicotiana. The Plant Journal 43: 716–723. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02490.x
- Hauck NR, Ikeda K, Tao R, Iezzoni AF. 2006. The Mutated S1-Haplotype in Sour Cherry Has an Altered S-Haplotype-Specific F-Box Protein Gene. Journal of Heredity 97: 514–520. doi:10.1093/jhered/esl029
- Hauck NR, Yamane H, Tao R, Iezzoni AF. 2006. Accumulation of Nonfunctional S-Haplotypes Results in the Breakdown of Gametophytic Self-Incompatibility in Tetraploid Prunus. Genetics 172: 1191–1198. DOI: 10.1534/genetics.105.049395
- Hiratsuka S., Y. Okada, Y. Kawai, F. Tamura and K. Tanabe. 1995. Stylar Basic Proteins Corresponding to 5 Self-Incompatibility Alleles of Japanese Pears. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64 (3): 471-478.
- Hitatsuka, S., Kubo, T. and Okada, Y. 1998. Estimation of Self-incompatibility Genotype in Japanese Pear Cultivars by Stylar Protein Analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67 (4): 491-496.

- Hua Z, Kao Th. Identification and Characterization of Components of a Putative Petunia S-Locus F-Box-Containing E3 Ligase Complex Involved in S-RNase-Based Self-Incompatibility Plant Cell 18: 2531-2553. DOI: 10.1105/tpc.106.041061
- Igic B, Kohn JR. 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. PNAS 98: 13167-13171. doi: 10.1073/pnas.231386798
- Ikeda K, Igic B, Ushijima K, Yamane H, Hauck NR, Nakano R, Sassa H, Iezzoni AF, Kohn JR, Tao R. 2004. Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. Sex Plant Reprod 16: 235-243.
- Ishimizu T, Norioka S, Kanai M, Clarke AE, Sakiyama F. 1996b. Location of cysteine and cystine residues in S-ribonucleases associated with gamethophytic self-incompatibility. Eur J Biochem 242: 627-635. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0627r.x
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, Sakiyama F. 1996a. Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. J Biochem 120:326-334.
- Ishimizu T, Inoue K, Shimonaka M, Saito T, Terai O, Norioka S. 1999. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. Theor Appl Genet 98: 961-967. DOI: 10.1007/s001220051156
- Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, Norioka S. 1998. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. Plant Mol Biol 37:931-941. DOI: 10.1023/A:1006078500664
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, Sakiyama F (1996a) Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, Pyrus pyrifolia Nakai. J Biochem 120: 326-334.

Janick J, Moore JN. 1997. Fruit Breeding volume I. Tree and Tropical Fruits.

- Janssens GA, Goderis IJ, Broekaert WF, Broothaerts W. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theor Appl Genet 91: 691-698. DOI: 10.1007/BF00223298
- Karadeniz F. 1999. A Research on the Chemical Composition of Pear Juice. Tr. J. of Agriculture and Forestry 23: 355–358
- Kao TH. McCubbin AG. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to

prevent inbreeding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12059-12065.

- Katoh N, Gotoh K, Asano J, Fukushima K, Yamada K, Kasai A, Li TZ, Takanoha M, Miyairi K, Okuno T. 2002. S-RNases from Self-incompatible and -compatible Apple Cultivars: Purification, Cloning, Enzymic Properties, and Pollen Tube Growth Inhibitory Activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:1185-1195
- Kawata Y, Sakiyama F, Hayashi F, Kyogoku Y. 1990. Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. Eur J Biochem 187: 255-262. DOI:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15303.x
- Kester DE, Micke WC, Viveros M. 1994. A mutation in 'Nonpareil' almond conferring unilateral incompatibility. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119: 1289-1292.
- Kitahara K, Komatsu H, Fukui H, Matsumoto S. 2000. Complete Sequences of the S-genes, Sd- and Sh-RNase cDNA in Apple. HortScience 35(4):712-715.
- Kitahara K. Matsumoto S. 2002. Sequence of the S10 cDNA from 'McIntosh' Aapple and a PCR-digestion Identification Method. HortScience 37(1): 187-190.
- Knight LI. 1917. Physiological aspects of self-sterility of the apple. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1917: 101-105.
- Kobel F, Steinegger P, Anliker J. 1939. Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Apfel- und Birnsorten. Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 53: 160-191.
- Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Masashi H, Norioka S, Hattori T. Kowyama Y. 2002a. Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. Plant J. 29: 627–636.
- Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowyama Y. 2002b. Insights into the evolution of self-incompatibility in Lycopersicon from a study of stylar factors. Plant J. 30: 143–153.
- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y. 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of Antirrhinum is expressed specifically in pollen and tapetum. Plant Mol Biol 50: 29-42. DOI: 10.1023/A:1016050018779
- Lee HS, Huang S, Kao TH. 1994. S proteins control rejection of incompatible pollen in Petunia inflata. Nature 367, 560-563.
- Lewis, D. Modlibowska I. 1942. Genetical Studies in Pears IV. Pollen-tube growth and incompatibility. J.

Genet. 43: 211-222.

- Li TZ, Katoh N, Fujita T, Asada T, Shiozaki Y, Okuno T. 2002. Observations on Stylar Transmitting Tissue Cells and cDNA Cloning of S-RNase in a Self-fruitful Apple 'Hirodai Ichigo'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 71: 553-560.
- Linskens HF. 1967. Isolation of ribosomes from pollen. Planta 73: 194-200
- Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M. 2000. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. Nature 407: 649-651. DOI:10.1038/35036623
- LuuDT, Qin X, Laublina G, Yanga Q, Morsea D, Cappadocia M. 2001. Rejection of S-heteroallelic Pollen by a dual-specific S-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. Genetics 159: 329-335
- Ma RC. Oliveira MM. 2001. Molecular cloning of the self-incompatibility genes S1 and S3 from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnes). Sex Plant Reprod 14:163–167. DOI: 10.1007/s004970100103
- Marucucci MC, Visser T. 1983. Histological and anatomical characteristics of parthenocarpic and normal pear fruits. Scientia Horticulturae 19: 311-319.
- Matsumoto S, Komori S, Kitahara K, Imazu S, Soejima J. 1999a. S-genotypes of 15 Apple Cultivars and Self-compatibility of 'Megumi'. J. Japan. Soc. Hort. Sci 68: 236-241.
- Matsumoto S., K. Kitahara, S. Komori and J. Soejima. 1999b. A New S-allele in Apple, 'Sg', and Its Similarity to the 'Sf' Allele from 'Fuji'. HortScience 34(4): 708-710.
- Matsumoto S. and K. Kitahara. 2000. Discovery of a New Self-incompatibility Allele in Apple. HoretScience 35(7): 1329-1332.
- Matsumoto S., Y. Furusawa, H. Komatsu and J. Soejima. 2003. S-allele genotypes of apple pollenizers, cultivars and lineages including those resistant to scab. Journal of Horticultural Science & Biotechnology (2003) 78 (5) 634-637.
- Matsuura T, Sakai H, Unno M, Ida K, Sato M, Sakiyama F, Norioka S. 2001. Crystal Structure at 1.5-Å Resolution of *Pyrus pyrifolia* Pistil Ribonuclease Responsible for Gametophytic Self-incompatibility. The Journal of Biological Chemistry 276: 45261-45269.
- McClure B. 2006. New views of S-RNase-based self-incompatibility. Current opinion in plant biology 9: 639-646. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.09.004
- McCubbin AG, Kao TH. 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16: 333-64.
- Modlibowska, I. 1945. Pollen tube growth and embryo-sac development in apples and pears. J. Pomol. 21: 57-89.
- Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA. 1994. S-RNase expressed in transgenic Nicotiana causes S-allele-specific pollen rejection. Nature 363-364.

Nettancourt D, de. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag

- Nielsen H, Brunak S, Heijne G. 1999. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. Protein Engineering 12: 3-9. DOI:10.1093/protein/12.1.3
- Nishio T, Hinata K. 1977. Analysis of S-specific proteins in stigma of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. Heredity 21: 345-362
- Norioka N, Norioka S, Ohnishi Y, Ishimizu T, Oneyama C, Nakanishi T, Sakiyama F. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. J Biochem 120:335-345
- Nunes MDS, Santos RAM, Ferreira SM, Vieira J, Vieira CP. 2006. Variability patterns and positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pollen SFB gene in a wild self-incompatible *Prunus spinosa* (Rosaceae) population. New Phytologist 172 (3), 577–587. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01838.x
- Nyéki, J., M. G. Pinter and Z. Szabo. 1994. Recent data on fertilization of pear variety. Acta Hort 367: 87-96
- Nyéki, J., M. Soltesz. 1998. The variation of seed content of fruits in pear varieties, also as function of different conditions of fertilization, as open pollination, natural autogamy and allogamy. Acta Hort. 475:237-250
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP. 2002. Molecular analysis of the stylar-expressed Solanum chacoense small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in Nicotiana. The Plant Journal 32, 985–996. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01486.x
- Ortega E, Bošković RI, Sargent DJ, Tobutt KR. 2006. Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. Mol Gen Genomics (2006) 276: 413-426 DOI: 10.1007/s00438-006-0146-4

- Qiao, H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y. 2004. The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. Plant Cell 16: 582-595. DOI: 10.1105/tpc.017673
- Qin X, Liu B, Soulard J, Morse D, Cappadocia M (2006) Style-by-style analysis of two sporadic self-compatible Solanum chacoense lines supports a primary role for S-RNases in determining pollen rejection thresholds. J. Exp. Bot. 57: 2001-2013; doi:10.1093/jxb/erj147
- Rawes, AN. 1933. Contributions from the Wisley Laboratory LXVIII. Pollination in Orchards (IX). Summary of investigations on pear pollination. J. Royal Hort. Soc. 58: 288-295.
- Ruiz VS. 1977. Study on the pollination and fruit-set on 'Blanca de Aranjuez' pear. Acta Hort. 69:235-241
- Sakurai K, Brown SK Weeden N. 2000. Self-incompatibility Alleles of Apple Cultivars and Advanced Selections. HortScience 35(1): 116-119.
- Sanchez EE. 2002. Pear Production in South America. ActaHorticulturae 596 Proceedings of the Eight International Symposium on Pear Volume1: 67-69
- Sanzol J, Herrero M. 2002. Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (Pyrus communis L.). Euphytica 128: 325-331. DOI: 10.1023/A:1021213905461
- Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. 1992. Self-incompatibility-related RNases in the style Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). Plant Cell Physiol 33: 811-814
- Sassa H, Hirano H, Ikehashi H. 1993. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. Mol Gen Genet 241: 17-25.
- Sassa H, Hirano H, Nishio T and Koba T. 1997. Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). The Plant Journal 12: 223-227. DOI:10.1046/j.1365-313X.1997.12010223.x
- Sassa H, Mase N, Hirano H, Ikehashi H. 1994. Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus domestica*). Theor Appl Genet 89: 201-205. DOI: 10.1007/BF00225142
- Sassa H, Nishio T, Kowyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H. 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. Mol Gen

Genet 250:547-557.

- Sharma N, Gautam DR, Jindal KK, Sharma DP. 2002. The pear industry of Himachal Pradesh in India. Acta Horticulturae 596: 97
- Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao T-h. 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. Nature 429: 302-305. DOI: 10.1038/nature02523
- Sonneveld T, Tobbutt KR, Vaughan SP, Robbins TP. 2005. Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. Plant Cell 17: 37-51. 10.1105/tpc.104.026963
- Takasaki T, Okada K, Castillo C, Moriya Y, Saito Y, Sawamura Y, Norioka N, Norioka S, Nakanishi T. 2004. Sequence of the S9-RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating S1- to S9 allele in Japanese pear. Euphytica 135: 157-167. DOI: 10.1023/B:EUPH.0000014907.50575.d0.
- Tao R, Habu T, Namba A, Yamane H, Fuyuhiro F, Iwamoto K, Sugiura A. 2002. Inheritance of Sf-RNase in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. Theoretical and Applied Genetics105: 222-228 DOI: 10.1007/s00122-002-0980-7
- Tao R, Watari A, Hanada T, Habu T, Yaegaki H, Yamaguchi M, Yamane H. 2007. Self-compatible peach (*Prunus persica*) has mutant versions of the S haplotypes found in self-incompatible Prunus species. Plant Mol Biol 63: 109-123. DOI 10.1007/s11103-006-9076-0
- Tomimoto, Y, Nakazaki T, Ikehashi H, Ueno H, Hayashi R. 1996. Analysis of self incompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. Scientia Hortic. 66: 159-167.
- Tsukamoto T, Hauck NR, Tao R, Jiang N, Iessoni AF. 2006. Molecular characterization of three non-functional S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). Plant Mol Biol. 62: 371-383. DOI: 10.1007/s11103-006-9026x
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R. 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. Plant Cell 15: 771-781. DOI: 10.1105/tpc.009290
- Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM, Hirano H. 1998. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. Mol Gen Genet 260:261-268.

- Ushijima K, Yamane H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R. 2004. The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of Prunus avium and P. mume. Plant J 39: 573-586. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02154.x
- Vaughan SP, Russell K, Sargent DJ, Tobutt KR. 2006. Isolation of S-locus F-box alleles in Prunus avium and their application in a novel method to determine self-incompatible genotype. Theor Appl Genet 112: 856-866. DOI: 10.1007/s00122-005-0187-9
- Vieira CP, Charlesworth D, Vieira. 2003. Evidence for rare recombination at the gametophytic self-incompatibility locus. J. Heredity 91, 262–267.
- Vilanova S, Badenes ML, Burgos L, Martínez-Calvo J, Llácer G, Romero C. 2006. Self-compatibility of two *Prunus armeniaca* selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. Plant Physiology 142: 629-641. DOI: 10.1104/pp.106.083865
- Westwood MN, Grim J. 1962. Effect of Pollinizer Placement on Long Term Yield of Anjou, Bartlett and Bosc Pears. American Society for Horticultural Science 81: 103-107.
- Wünsch A, Hormaza JI. 2004. Genetic and molecular analysis in Cristobalina sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. Sex. Plant Reprod 17: 203-210. DOI: 10.1007/s00497-004-0234-8
- Xue Y, Carpenter R, Dickinson HG, Coen ES. 1996. Origin of allelic diversity in Antirrhinum S locus RNases. Plant Cell 8: 805-814.
- Yaegaki H, Shimada T, · Moriguchi T, · Hayama H, Haji T, · Yamaguchi M. 2001. Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) Sex Plant Reprod 13:251–257. DOI: 10.1007/s004970100064
- Yamane H, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R. 2003a. Selfincompatibility (S) locus region of the mutated S6-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen S allele and a non-functional pistil S allele. J Exp Bot 54:2431–2437
- Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, Tao R. 2003b. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium.* Plant Cell Physiol 44: 764-769
- Yamane H, Ushijima K, Sassa H, Tao R. 2003c. The use of the S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, as a molecular marker for S-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (Prunus mume). Theor Appl Genet 107: 1357-1361. DOI: 10.1007/s00122-003-1389-7

- Zisovich HA, Stern AR, Shafir S, Goldway M. 2004a. Identification of seven S-alleles from European pear (*Pyrus communis* L.) and the determination of compatible among cultivars. J Hort Sci Biotechnol 79:101-106
- Zisovich HA, Stern RA, Sapir G, Shafir S, Goldway M. 2004b. The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. Sex Plant Reprod 17: 151-156. DOI: 10.1007/s00497-004-0225-9
- Zuccherelli S, Broothaerts W, Tassinari P, Tartarini S, Dondini L, Bester A, Sansavini S. 2002b. S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.): biochemical, molecular and field analyses. Acta Hort 596:147-152
- Zuccherelli S, Tassinari P, Broothaerts W, Tartarini S, Dondini L, Sansavini S. 2002a. S allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). Sex Plant Reprod 15: 153-158. DOI: 10.1007/s00497-002-0145-5

浅妻力 1995. 「バラエティー 西洋なし」

- 阿部芳幸, 米野智弥, 西村幸一, 石黒亮, 佐藤功. 1996. 「セイヨウナシ新品種'山園 P1 号'」 園芸 学会雑誌 65 別 2: 154-155.
- 岩堀修一 2002.世界における西洋ナシ産業. (T. Deckers 著) 農業及び園芸第77 巻第4号
- 大垣智明 1958. 和梨新品種の不稔性因子について. 神奈川県農業試験場園芸分場研究報告第 5 号別刷
- 小野田和夫, 伊藤明治. 1987. セイヨウナシの交雑和合性. 園芸学会要旨昭和 62 年秋: 76-77.
- 梶浦一郎.1983.「農業技術大系果樹編第3巻 基+3 ナシ 基礎編 ナシ栽培技術の歴史」
- 菊地秋雄. 1929. 昭和2年及3年における研究事項,1. 日本梨に於ける偏父不和合性. 園芸之研究. 24: 1-6.
- 久保隆、新谷潤一、工藤仁郎. 1989. セイヨウナシの受粉和合性. 東北農業研究 42:253-254.
- 壽和夫,齋藤寿広,正田守幸,澤村豊,町田裕,梶浦一郎,佐藤義彦,増田亮一,阿部和幸,栗原昭夫,緒方達志,寺井理治,西端豊英,樫村芳記,小園照雄,福田博之,木原武士,鈴木勝征.
 2003. 自家和合性の後代を効率的に獲得できる'なし中間母本農1号'、園芸学会雑誌 72 別1:54.
- 小森貞男, 別所英男, 副島淳一, 伊藤祐司. 1993. 'はつあき' 'いわかみ'の戻し交雑実生群を用い たリンゴの交雑不和合性遺伝子の解明. 園芸学会雑誌 62 別 2: 160-161.

小森貞男, 副島淳一, 伊藤祐司, 別所英男, 阿部和幸, 古藤田信博. 1998a. リンゴ主要品種の自家不和合遺伝子型の解析. 園芸学会雑誌 67(6): 917-926.

小森貞男, 副島淳一, 工藤和典, 京谷英壽, 阿部和幸, 古藤田信博, 小松宏光. 1998b. 'つがる', (世界一', '夏緑', 'アキタゴールド', M.9 等の S 遺伝子型解析. 園芸学会雑誌 67(6): 880-889.

佐藤義彦 1992. ニホンナシの自家和合性品種の育成. 園芸学会平成4年度秋季大会シンポジウ

ム講演要旨: 12-22.

杉浦明, 門屋一臣, 新居直祐, 仁藤伸昌, 行永寿二郎, 高木敏彦, 水谷房雄, 田辺賢二, 山下研介, 稲葉昭次, 松井弘之. 1991. 「新果樹園芸学」

杉山達夫, Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, 岡田清孝, 内藤哲, 中村研三, 長谷俊治, 福田裕 穂, 前嶋正義. 2005. 「植物の生化学・分子生物学」

- 田辺賢治, 宮原継男, 山本仁, 冨田幸作, 高野隆志, 中川文雄. 1986. ウメの品種'新平太夫'の特性について. 福井県園芸試験場報告 5:1-8
- 寺見広雄, 鳥潟博高, 島津祐吉. 1946. ニホンナシ各品種間の不稔性因子の分析. 京都大学園芸 集録: 267-271.

日向康吉、西尾剛. 2000. 「植物育種学」

日向康吉,磯谷彰,鎌田博,米田好文,長戸康郎,鳥山欽哉.「花 性と生殖の分子生物学」

増田哲男, 吉岡藤治, 壽和夫, 真田哲朗, 北川健一, 井上耕介, 吉田亮, 村田謙司, 長柄稔, 内田 正人, 1997. ニホンナシ新品種、おさゴールド、の特性. 園芸学会雑誌. 66 別 1: 164 - 165.

町田裕,佐藤義彦,小崎格,清家金嗣.1982. ニホンナシ数品種・系統のS因子型と'豊水'の交配

親の疑問について、園芸学会要旨昭和 57 年秋: 58-59.

松本辰也,大竹智.1998. セイヨウナシ新品種'越さやか'の結実特性. 園芸学会雑誌 67 別 2:212 山口正己,京谷英壽,吉田雅夫,土師岳,西村幸一,中村ゆり,三宅正則,八重垣英明,西田光夫, 垣内典夫,田中敬一,大宮あけみ,石川祐子,小園照雄,木原武士,鈴木勝征,福田博之,朝 倉利員.2002. ウメ新品種'八郎'. 果樹研報 1:35-46.

<記事引用>

果実日本 1999. 日本園芸農業共同組合連合会「特集◎西洋ナシ産業を展望する」Vol. 54: 26-64
果実日本 2001. 日本園芸農業協同組合連合会「海外トピックス ナシの国際シンポジウムに参加して」Vol. 56: 76-79

205

果実日本 2002. 日本園芸農業共同組合連合会「ラ・フランスの品種特性と販売方針」 Vol. 57: 26-29

山形の西洋なし II. 山形県西洋なしの概要と生産の取り組み. 1-17

<統計資料>

国連食糧農業機関統計 (FAOSTAT) 2006. Production-core production-pear 2005 農林水産省大臣官房統計部 2006. 農林水産統計「平成 17 年産西洋なし, かき, くりの収穫量及

び出荷量」http://www.maff.go.jp/toukei/sokuhou/data/seiyounashi2005/seiyounashi2005.htm

農林水産省大臣官房統計部 2006. 果樹生産出荷統計 西洋なし (H17).

農林水産省大臣官房統計部 2005 耕地及び作付面積統計 西洋なし (H17).

農林水産省大臣官房統計部 2004 平成 16 年産特産果樹生産動態等調査 西洋なし

山形県農業総合研究センター 2001 年度調査

Australian Bureau of Statistics 2006. Apples and Pears, Australia, Final, 2004-05

Eurostat 2006. European orchard survey 2002 Table pear trees.

United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service (USDA/FAS) March 2006. World

Pear Situation: Driven by growing output in China, grobal production continues to increase.

く参考ホームページ>

GUIDE OF PEARS (http://www.pomologie.com/poire/poire1/fpoires/varietes.html)

Jargonelle Pears (http://www.aquarterof.co.uk/jargonelle-pears-p-299.html)

Keepers Nursery (http://www.keepers-nursery.co.uk/searchresultscat.aspx)

United States Department of Agriculture Agricultural Research Service National Clonal Germplasm Repository (NCGR) (http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=11372)

訂正

ページ番号を下記のように訂正いたします。

【誤】 → 【正】

目次

| 第4章 三倍体品種のS遺伝子型推定 | | | |
|--|------------|---------------|------------|
| | <u>139</u> | \rightarrow | <u>119</u> |
| 第5章 'グランド・チャンピオン(Grand Champion)'の部分的自家和合性 | | | |
| | <u>161</u> | \rightarrow | <u>141</u> |
| 総合考察 | | | |
| | <u>183</u> | \rightarrow | <u>163</u> |
| 謝辞 | | | |
| | <u>193</u> | \rightarrow | <u>173</u> |
| 参考文献 | | | |
| | <u>195</u> | \rightarrow | <u>175</u> |
| | | | |
| <u>本文</u> | | | |