

Study on the Application of DNA Markers to Breeding and Identification of Cultivar Diversity in Carnation

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Carnation, Anthocyanin, Bacterial wilt, Flow cytometry (FCM), Polyploidy, QTL, RAPD, SSR 作成者: 八木, 雅史 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001426

特別報告

カーネーションにおける DNA マーカーの育種への利用と 品種多様性に関する研究[†]

八木 雅史

(平成 21 年 6 月 12 日受付 平成 21 年 10 月 6 日受理)

Study on the Application of DNA Markers to Breeding and Identification of Cultivar Diversity in Carnation

Masafumi YAGI

Summary

This study was carried out to utilize DNA markers in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) breeding and to clarify the genetic basis such as the ploidy level and genetic diversity of carnation cultivars.

1. Construction of genetic linkage map, quantitative trait locus (QTL) analysis and application to breeding in carnation

To improve the selection efficiency in carnation breeding for resistance to bacterial wilt caused by *Burkholderia caryophylli*, the first genetic linkage map for the carnation was constructed by using a resistance-segregating population of 134 progeny lines derived from a cross between 'Carnation Nou No. 1' (a line resistant to bacterial wilt) and 'Pretty Favvare' (a susceptible cultivar) based on RAPD and SSR analysis. The linkage map contained 137 RAPD and 9 SSR markers. Linkage analysis revealed that 124 loci could be mapped to 16 linkage groups that extended for 605.0 cM. The average interval between two loci was 4.9 cM.

QTL analysis was applied to replication 8 evaluations of resistance to bacterial wilt. A QTL with a large resistance effect was detected on Group 6, which accounted for 60.5% of the total phenotypic variance with an LOD score of 23.46. Two other QTL with a small effect were detected on Groups 2 and 5 with LOD scores of 2.32 and 2.87, respectively. These results suggest that resistance to bacterial wilt in carnation is related to one major and at least two minor genes.

[†]本論文は神戸大学学位審査論文(平成 21 年 1 月)を基に編集・加筆したものである。

本報告の一部は、J. Japan. Soc. Hort. Sci.: 75, 166-172 (2006); 園学研: 5, 241-245 (2006); Acta Hort.: 766, 455-460 (2008); 花き研報, 7: 9-16 (2007); J. Japan. Soc. Hort. Sci.: 78, 335-343 (2009) において発表した。

The availability of marker-assisted selection (MAS) using DNA markers close to the QTL of resistance to bacterial wilt in carnation was examined. The STS-WG44 marker tightly linked to the major resistance gene was detected in all backcross lines with resistance selected by the root-soaking method. The ratio of markers OQ12 and STS-WB66 close to the two QTL with a small effect in resistant lines was lower in succeeding generations of backcrossing. These findings suggest that STS-WG44 is available for selecting resistant lines. In practical breeding populations, the difference in mean disease incidence between two groups categorized as having or lacking STS-WG44 was 62.6% and STS-WG44 was present in most lines showing disease incidence of less than 20%. These findings suggest that STS-WG44 as a selective marker facilitated the narrowing of populations to those that are highly resistant for practical breeding. MAS would be available for breeding improved resistance to bacterial wilt in carnation.

Flower color is an important trait in ornamental plants. To understand the genetic basis for anthocyanin pigmentation traits in the flower petals of carnation, the segregation of anthocyanin content in petals was evaluated and QTL analysis was conducted by using the linkage map constructed in this study. The frequency of low anthocyanin content (<0.5 mg/g FW) was highest and the frequency decreased in inverse proportion to anthocyanin content. QTL analysis identified two QTL on linkage Groups 6 and 9, which accounted for 21.6% and 15.0% of the total phenotypic variance, with LOD scores of 6.33 and 4.15, respectively.

2. Identification of ploidy level and cultivar diversity by flow cytometry (FCM) and SSR markers

FCM was conducted to estimate the polyploidy level of 304 cut and 45 potted carnation cultivars preserved at the National Institute of Floricultural Science. To verify the actual level, the chromosome count in the root tips was investigated. In the cut carnation cultivars, an estimated 297 cultivars were diploid. Three cultivars ('Wiko', 'Scarlet Bell', and 'Spiral Vivid Red') were triploid and 'Saleya' was tetraploid. Another three cultivars ('Pink Roland', 'Youkihi', and 'Sonnet Sailor') were possibly tetraploid. In the 45 potted carnation cultivars, the results strongly suggested that 27 cultivars were diploid, three were triploid, and 15 were tetraploid. The chromosome count in the root tips revealed that 'Camille' was diploid, 'Baby Heart' was triploid, and 'Tula' was tetraploid. Our results suggest that the ploidy level varies among potted carnation cultivars. The stomatal length of 12 cut and 10 potted carnation cultivars was measured to determine if this method was convenient for distinguishing polyploidy. The results drew a distinction between diploid and polyploidy cultivars, but not between triploid and tetraploid.

The genotypes of 32 cultivars were investigated by using five SSR markers to estimate the correspondence with the FCM ploidy levels and to analyze the genetic diversity. The ploidy estimated from the maximum number of alleles per locus corresponded with that estimated by FCM among the diploid and triploid cultivars, but not among the tetraploids. Among the diploid potted cultivars, only three or four alleles were found, and most of the alleles were also found in the diploid cut cultivars. On the other hand, triploid and tetraploid potted cultivars had four to eight alleles, and most were unique to a given ploidy levels. SSR analysis suggested that diploid potted cultivars were derived from cut cultivars because of their close genetic relationship, and that the triploids and tetraploids were produced by crossing wild *Dianthus* spp. and similar genetic resources because of their unique genetic background. In total, 30 potted cultivars with different ploidy levels could be successfully differentiated using five SSR markers.

Key Words: Carnation, Anthocyanin, Bacterial wilt, Flow cytometry (FCM), Polyploidy, QTL, RAPD, SSR

目次

緒言

第1章 連鎖地図作成と QTL 解析ならびにその育種的利用

第1節 RAPD および SSR マーカーによる連鎖地図作成

第2節 萎凋細菌病抵抗性の QTL 解析

第3節 萎凋細菌病抵抗性育種における DNA マーカー選抜の有効性の実証

第4節 花色の濃淡に関する QTL 解析

第2章 フローサイトメトリーおよび SSR マーカーによる倍数性と多様性の検討

第1節 フローサイトメトリーによる切り花カーネーションの倍数性の検討

第2節 フローサイトメトリーによるポットカーネーションの倍数性の検討

第3節 SSR マーカーによるポットカーネーションの多様性ならびに倍数性の検討

総合考察

摘要

謝辞

引用文献

緒言

カーネーション (*Dianthus caryophyllus* L.) は、ナデシコ科 (Caryophyllaceae) に属し、日本だけでなく世界的にみてもキク、バラと並んで生産量の多い主要な花きの一つである。カーネーションを含むダイアンサス属は、約 300 種がヨーロッパ、地中海沿岸地域、アジア、熱帯および南アフリカの山地などに自生している (武田, 2002)。ダイアンサス属は種間交雑が容易に行えるため、*D. caryophyllus* の原種と *D. plumarius* L., *D. chinensis* L. などのいくつかの種が多能的に交雑され、選抜が長年にわたって繰り返された結果、現在のカーネーションが誕生したと考えられている (武田, 2002)。カーネーション

はこれまでに多数の品種が育成されており、切り花用を大別すると一茎一花のスタンダード系、一茎多花のスプレー系にわけられる。さらにジブシー系、ソネット系、マイクロ系などの小輪で特徴的な花型をもつ品種群も存在する (細谷, 1999)。近年では、切り花用だけではなくコンパクトな草姿を有する鉢物用のカーネーションがポットカーネーションと呼ばれ、母の日の贈答用として需要が拡大している。

切り花カーネーションの国内の生産状況を概観すると、作付面積は 1990 年の 616ha をピークに減少傾向が続き、2007 年には 411ha にまで減少した (農林水産省統計)。栽培面積の減少に伴い出荷本数も減少し、最盛期 (1990 年) の 6.9 億本から 2000 年には 5 億本を下回り、2007 年には約 3.9 億本にまで減少した。一方で、輸入数量については急激な伸びを示している。2003 年頃から中国からの輸入が急増し、それに対抗するかのように従来からの主産国であったコロンビアからの輸入が増加、2007 年には中国産が約 0.8 億本、コロンビア産が約 1.2 億本で総輸入量は約 2.2 億本に達した (植物防疫統計)。輸入数量と国内出荷量を合計した国内流通量についてはここ数年増加しており、2002 年までは 5.5 億本前後で推移していたが、2007 年には 6 億本を突破したと推計されている。このように日本は依然として国内消費が 6 億本以上の切り花の需要がある世界でも有数のマーケットであるにも関わらず、国内生産は減少の一途を辿ろうとしている。こうした状況を打破するためには様々な方策が必要であるが、その方策の一つとして国内育種の奮起が挙げられる (宇田, 2005)。

2003 年の生産上位 10 県の品種別作付面積の上位 10 品種において、スプレー系では 'キャンドル' 以外はすべてオランダのヒルベルダ社の品種であり、スタンダード系も約半数は外国産品種である (宇田, 2005, Onozaki, 2006)。一方、同じ統計によれば、トルコギキョウでは作付面積上位 10 品種は全て国内育成品種であり、実際にトルコギキョウは輸入を阻止することに成功している (宇田, 2005)。外国産品種が多数を占める現状では、品種において輸入品と差別化を図ることはできず、カーネーションの栽培適地で栽培した輸入品と競合することになる。そのため、これら輸入品と対抗するためには、日本の気候に合った日本オリジナルの品種開発が期待される。

育種目標として、低コスト・良品・安定生産に向けて、花色、花型をはじめ耐病性、花持ち性、耐暑性、低温生産性、高生産性といった様々な形質が挙げられる。これ

らのうち、消費者が花きに最も望む形質の一つである花持ち性については、近年、チオ硫酸銀錯塩 (STS) などの品質保持剤を用いずに従来のシム系品種の約3倍の花持ち性を示す‘ミラクルルージュ’、‘ミラクルシンフォニー’が育成された (小野崎ら, 2006a)。これらは、品質保持剤を必要としないことから環境負荷の少ない農業に貢献できるとともに、育種素材として利用することで、日本の夏秋期の栽培で問題となる花持ち日数の低下を克服することができると考えられる。

一方で、生産者にとっては収量性が高く、病気によるロスの生じない耐病性品種が最も望まれる。カーネーションの重要な病害として、世界的に発生が見られる *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. and Delarc.) Snyd. and Hans. による萎凋病が挙げられる。萎凋病については世界的に蔓延が見られることから、ヨーロッパの育種会社で抵抗性育種が取り込まれ、品種カタログに抵抗性の記載がみられるほど育種が進んでいる。一方、高温多湿の気候において栽培を行う日本特有の病害として *Burkholderia caryophylli* (Burkholder) Yabuuchi, Kasako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki, and Arakawa (旧学名: *Pseudomonas caryophylli* (Burkholder) Starr and Bulkholder) による萎凋細菌病が挙げられる。萎凋細菌病は夏の高温期に多発する土壌伝染性の病害であり、被害株は急激に萎凋し、青枯れ症状を呈して枯死する。近年は無病苗、隔離ベンチ栽培、土壌消毒の普及により発病を回避する技術も発達してきたが、現在でも発生は見られ問題となっている。萎凋細菌病については、日本以外での発生がほとんど見られないことから国際的には全く手掛けられていなかった。そこで、花き研究所では、前身の野菜・茶業試験場花き部時代の1988年から抵抗性検定法の開発に着手し、抵抗性を有する遺伝資源のスクリーニングを行った。その結果、栽培品種の中に抵抗性を有する品種はほとんど存在せず (Onozaki et al., 1999b)、カーネーションに含まれるダイアンサス属野生種の中に有望な抵抗性素材 *Dianthus capitatus* ssp. *andrzejowskianus* (以下 *D. capitatus*) を見出した (Onozaki et al., 1999c)。その後、カーネーションとの種間交雑により (Onozaki et al., 1998)、強度の抵抗性を有し、形態的特性、生産性等の形質に比較的優れる‘カーネーション中間母本農1号’ (以下‘農1号’) を育成し、2000年に種苗登録された (小野崎ら, 2002)。*農1号*には野生種の性質が強く残っており、カーネーション栽培品種を掛け合わせていく戻し交雑により、*D. capitatus* の強度抵抗性のみを有し、草姿、形態は通常のカーネーション

に近づける育種を進めている。

これまで浸根接種による抵抗性検定法を用いて抵抗性個体の選抜を行ってきた。しかし、検定に必要な数の挿し芽を得るには半年以上生育させる必要があり、さらに抵抗性を判定するには3ヶ月という時間を必要とする。また、発病が高温域 (30~33℃) で促進されることから、地温を適温に維持するためには特別な装置が必要である。このように抵抗性の検定には多大な労力と時間を必要とする。一方で、1980年代後半から、植物においてDNAマーカー開発とそれを利用した連鎖地図の作成が急速に行われてきた。DNAマーカーを指標に育種選抜を行うことにより、環境の影響を受けない正確な選抜が可能であり、植物の成熟時に現れる形質や病気の抵抗性など肉眼では判断できない形質についても幼苗時に選抜が可能である。また、野生種の抵抗性遺伝子を導入する際にも、戻し交雑の回数を最小限にして最も望ましい個体を迅速に選抜することができる (Debener, 2001; Rajapakse, 2003)。このようにDNAマーカーを利用した育種選抜技術をMAS (Marker-Assisted Selection) と呼び、日本では、イネにおいてMASを利用した品種系統が多数育成され (安東, 2005)、近年では縞葉枯病抵抗性、穂もち抵抗性などの病害抵抗性をMASにより導入した品種が育成された (杉浦ら, 2004)。そのため、花きにおいてもMASによる育種選抜効率向上の期待は高い (Debener, 2001; Rajapakse, 2003; 小野崎, 2005)。

収量性やストレス耐性など重要な育種目標の多くは複数の遺伝子が複雑に関与している量的形質であり、それらを支配する遺伝子座をQTL (Quantitative Trait Locus) と呼ぶ。QTLの数や位置、遺伝効果を統計的に推定するQTL解析は、DNAマーカーによる連鎖地図が作成されることで初めて可能になった (鵜飼, 2003)。QTL解析により明らかになったQTL近傍のDNAマーカーを利用することで、これまで選抜できなかった遺伝率の低い形質についても選抜が可能である (鵜飼, 2000)。連鎖地図の作成は、QTL解析だけではなく、遺伝子の単離 (マップベースクローニング)、ゲノム構造研究等、遺伝解析を行う上で必要不可欠なステップになっている。

そこで、本研究では、第1章においてカーネーション育種の効率化を図るために萎凋細菌病抵抗性の分離集団を利用して、カーネーションで初めての連鎖地図の作成ならびにQTL解析を行い、カーネーション育種におけるMASの検討を行った。

第2章ではフローサイトメトリーを用いて切り花カー

ネーションならびにポットカーネーションについて網羅的に倍数性の推定を行った。倍数性は交雑の成否や育成の過程を推察する上で重要となる。花きの育種では、古くから育成者が意識することなく野生二倍体種から倍数性園芸種を生み出した歴史がある。現代バラをはじめダリア、グラジオラス、フリージア等の品種分化の過程には、自然倍数化を利用した多くの実例を見ることができ（齊藤, 1969）。人為的な倍数性育種の試みは、1937年にアメリカの A. F. Blakeslee および A. G. Avery 両氏が、植物の染色体倍加にコルヒチンが有効なことを明らかにしたことがはじまりである（齊藤, 1969）。コルヒチンを利用してマツバボタン、キンセンカ、マリーゴールド等で同質四倍体が作出され、茎葉の大型化や大輪咲きが示されたことで、1940年以降、染色体倍加が花きの育種の一つのブームになった（齊藤, 1969）。カーネーションにおいても、東京都の秋元氏が‘ピーターフィッシャー’から‘クロス＝スター’を、‘コーラル’から‘レッド＝クイン’と名付けた巨大輪咲四倍体を作成している（齊藤, 1969；塚本, 1969）。

カーネーションの含まれるダイアンサス属については、染色体基本数が $x=15$ であり、二倍体 ($2n=2x=30$)、四倍体 ($2n=4x=60$)、六倍体 ($2n=6x=90$) が存在する（伊藤ら, 1994）。切り花用カーネーションについては、実際の染色体の観察から、栽培品種は二倍体であることが報告されている（筧, 1972；山口ら, 1980；山口, 1981）。しかしながら、それ以後、切り花カーネーションの倍数性に関する報告はなく、近年の栽培品種の倍数性については明らかになっていない。また、ポットカーネーションについては、これまで倍数性に関する報告を始め、育成過程を記述した記録もほとんどない。そのため、育種の過程でどのような素材が利用され、どの程度品種間に多様性が存在するのかなど育種に関する基礎的知見に乏しい。そこで第2章では、フローサイトメトリーを用いて切り花カーネーションならびにポットカーネーションについて網羅的に倍数性の推定を行った。また、ポットカーネーションについては、DNA マーカーを利用して遺伝的多様性について明らかにし、ポットカーネーションの育成過程について推察を行った。

第1章 連鎖地図作成と QTL 解析ならびにその育種的利用

連鎖地図の作成は、質的形質だけではなく複数の遺伝子が関与する量的形質についてもそれらを支配する遺伝

子の染色体上の領域を特定することを可能にした。連鎖地図を利用して農業上重要な形質に連鎖したマーカーを開発することができれば、MAS により育種選抜の効率化を図ることができる（Collard et al., 2005）。

これまで花きにおいては、ペチュニア（Peltier et al., 1994）、バラ（Debener and Mattiesch, 1999; Rajapakse et al., 2001）、ユリ（Abe et al., 2002）、アルストロメリア（Han et al., 2002）といったいくつかの品目で連鎖地図が作成されている。カーネーションでは、これまでに花型（Scovel et al., 1998）、萎凋病抵抗性（Scovel et al., 2001）、切り花の花持ち性（De Benedetti et al., 2003）などの形質に連鎖したマーカーの探索が RAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）法を用いて試みられているが、連鎖地図作成の報告はない。

カーネーション栽培品種は $2n=2x=30$ の二倍体であり（Gatt et al., 1998）、Figueira et al. (1992) は、カーネーションの核 DNA 量は $1.23\text{pg}/2C$ であると報告している。これは、シロイヌナズナ ($0.30\text{pg}/2C$; Arumuganathan and Earle, 1991) のおよそ4倍であり、カーネーションのゲノムサイズは比較的小さく、花きの中でもゲノム研究が比較的行きやすい品目であると考えられる。

本章では、萎凋細菌病抵抗性の分離集団を用いてカーネーションで初めての連鎖地図を作成し、萎凋細菌病抵抗性の QTL 解析を行った。また、その結果明らかになった QTL 近傍のマーカーの実際の育種における有効性について検討し、さらに作成した連鎖地図を用いて花色の濃淡に関わる QTL 解析を行った。

第1節 RAPD および SSR マーカーによる連鎖地図作成

本節では、RAPD ならびに SSR（Simple Sequence Repeat）マーカーを用いて連鎖地図を作成した。RAPD マーカーは、10塩基程度のランダムプライマーを用いて生じる PCR 産物の多型をマーカーとして用いる手法であり、一般的にはホモ型とヘテロ型の個体を区別できない優性マーカーである。多型が豊富で、一度の解析で多数の遺伝子座について情報を取得でき、ゲノム全域に多数のマーカーを迅速にマッピングできる利点がある（Staub et al., 1996）。ところが、RAPD マーカーは PCR 反応でのアニーリング温度が低いことから、再現性に問題があるため、STS（Sequenced Tagged Site）化により配列特異的マーカーに変換することが望ましい（原田, 2005）。

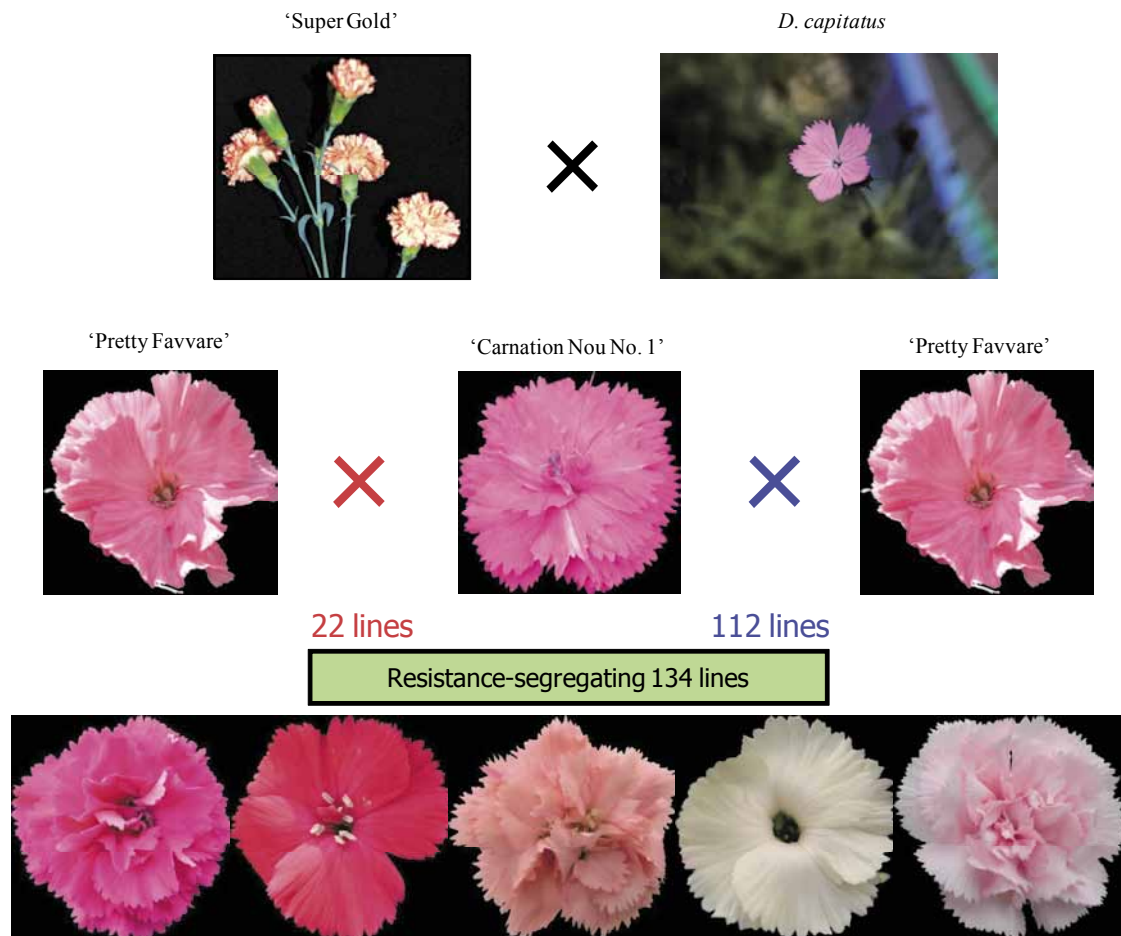


Fig. 1. Photographs of resistance segregating populations and the parents.

SSR マーカーは、2～5 塩基の繰り返し配列の繰り返し数の違いを多型として検出するマーカーである (Staub et al., 1996). ゲノム全域に多数存在し、偏りなくマッピング可能な共優性マーカーである (Morgante and Olivieri, 1993). そのため、異なる集団の連鎖地図を比較・統合する際に基準となるアンカーマーカーとして重要な役割を果たす (Taamalli et al., 2007). カーネーションではこれまでに 16 個の SSR マーカーが報告されており (Smulders et al., 2000, 2003), 本節ではこれらの SSR マーカーを利用した。

材料および方法

1. 材料

‘農 1 号’ および罹病性品種 ‘プリティファボーレ’ を正逆交雑して得られた萎凋細菌病抵抗性の分離集団 134 系統を用いた (Fig. 1). ‘農 1 号’ は罹病性品種 ‘スーパーゴールド’ と強抵抗性野生種 *D. capitatus* の交配により得られた種間雑種である (小野崎ら, 2002). 分離

集団は *D. capitatus* の BC₁ 世代に当たる。

2. RAPD 解析

ゲノミック DNA は CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 法 (Murray and Thompson, 1980) を用いて、約 0.5g の葉片から抽出した。PCR プライマーには 465 個の 12 塩基のランダムプライマー (和光純薬工業) と 40 個の 10 塩基プライマー (オペロン社) を用いた。解析は、初めに両親間の多型について調査を行い、‘農 1 号’ に特異的バンドを生じたプライマーを選択して全 134 系統を対象として PCR を行った。次に、後述する方法に従い連鎖解析ならびに QTL 解析を行い、抵抗性に関与する連鎖群を明らかにした。その後、QTL の検出された連鎖群のマーカー数を増やすために、440 個の 10 塩基のプライマー (オペロン社) と 216 個の 12 塩基プライマー (和光純薬工業) を用いてさらにスクリーニングを行った。

PCR 反応液の全量を合計 12μl とし、1 × Ex Taq バッファー、24ng のゲノム DNA、2.4pmol の dNTPs、3.6pmol

のプライマー, 0.3unit の Ex Taq DNA polymerase (タカラバイオ) を含む反応液を用いた。PCR には Takara PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ) もしくは Takara PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ) を使用し, 反応条件は, 94°C 30 秒の変性後, 94°C 30 秒・40°C 1.5 分・72°C 2.5 分を 1 サイクルとして 45 サイクル行い, 72°C 7 分の最終伸長反応を行った。PCR 産物は 1.5% ゲル (type I -A, シグマ社) で 40 分, 100V で電気泳動を行うことで分離した。

3. SSR 解析

Smulders et al. (2000, 2003) が報告した 16 個の SSR マーカーを用いた。合計 12 μ l の反応液に, 1 \times Ex Taq バッファー, 24ng のゲノム DNA, 2.4pmol の dNTPs, 1.8pmol の各プライマー対, 0.3unit の Ex Taq Polymerase を用いた。PCR の温度条件は, 94°C 1 分の変性後, 94°C 30 秒・55°C 30 秒・72°C 1 分を 1 サイクルとして 30 サイクル行い, 72°C 5 分の最終伸長反応を行った。PCR 産物は 4.0% の NuSieve GTG agarose (Biowhittaker Molecular Applications, USA) で 40 分, 100V で電気泳動を行うことで分離した。

4. 分離解析ならびに連鎖解析

各マーカーの分離比について, 1:1 の適合比をもとに χ^2 検定を行った。連鎖解析には MAPMAKER/EXP 3.0 コンピュータープログラム (Lander et al., 1987) を用いた。遺伝距離の算出には Kosambi 関数を用い (Kosambi, 1944), センチモルガン (cM) 表記とした。連鎖群の割り当てには “group” コマンドを用い, LOD 値 4.0 以上, マーカー間の最大地図距離 30cM 以下を閾値に用いた。

5. DNA マーカーの名称

RAPD 座に関して, オペロン社のプライマーを用いたマーカーについては頭文字に “O”, 和光純薬工業のプライマーを用いたマーカーについては頭文字 “W” で区別できるようにデザインした。2 文字目以降の名称は各マーカーの名称をそのまま使用し, 複数のバンドを生じたものについては枝番号を付した。その他の頭文字 “A”, “B”, “D” は, 和光の 10 塩基プライマーから生じたマーカーであり, プライマー名をそのまま用いた。SSR マーカーについては Smulders et al. (2000, 2003) の報告した名称をそのまま用いた。

結果および考察

合計 1161 プライマーについて両親から抽出した DNA を用いて RAPD 反応を行い, 両親間での多型について調査した。その結果, ‘農 1 号’ に存在し, ‘プリティファボーレ’ に存在しない RAPD マーカーが 128 種類のランダムプライマーから 137 個得られた。

ダイアンサス属で開発された 16 の SSR プライマー (Smulders et al., 2000, 2003) のうち, 9 プライマーが両親間で多型を示した。これら 9 個の SSR マーカーは将来的な連鎖地図にアンカーマーカーとして利用できると思われる。

合計 146 マーカーについて, 全分離集団 134 系統におけるマーカーの有無を調査し, MAPMAKER/EXP による連鎖解析 (LOD \geq 4.0) を行った。その結果作成された連鎖地図を Fig. 2 に示した。本研究はカーネーションで最初の連鎖地図作成の報告である。137 の RAPD マーカーと 9 の SSR マーカーが 124 座に位置付けられ, 16 連鎖群に分けられた (Fig. 2)。連鎖地図における 2 つの座位間の平均距離は 4.9cM であり, 全長は 605.0cM であった。各連鎖群の長さは第 16 連鎖群の 4.6cM から第 1 連鎖群の 79.2cM まで様々であった。マーカー間距離の最大のギャップは第 7 連鎖群における 26.0cM であった。

今回作成された連鎖地図は全長 605.0cM であり, 少数のマーカーから構成される連鎖群も多数存在する。シロイヌナズナ (Hauge et al., 1993) やイネ (Harushima et al., 1998; Wu et al., 2002), トマト (Haanstra et al., 1999) において報告されている飽和連鎖地図では, 各染色体の遺伝距離は 100cM 程度であると推定されている。カーネーションにおいても上記の推定が当てはまるとすれば, カーネーションの基本染色体数は 15 本 ($x=15$) であることから, カーネーションの遺伝距離の全長は少なくとも 1500cM であると推定される。そのため, 今回作成した連鎖地図は 605.0cM であることから, 飽和連鎖地図にするためには更なるマーカーの追加が必要である。

‘農 1 号’ 由来のマーカーは, 理論的には分離集団 134 系統において 1:1 に分離すると考えられる。今回得られた 146 マーカーについて χ^2 検定を行った結果, 32.9% にあたる 48 マーカーにおいて 5% 水準で分離が歪んでいた。第 3 連鎖群についてはすべてのマーカーの分離比が 1% 水準で有意に歪んでいた。シヤクナゲにおいては母親, 父親由来のマーカーのうち 24% と 23% で

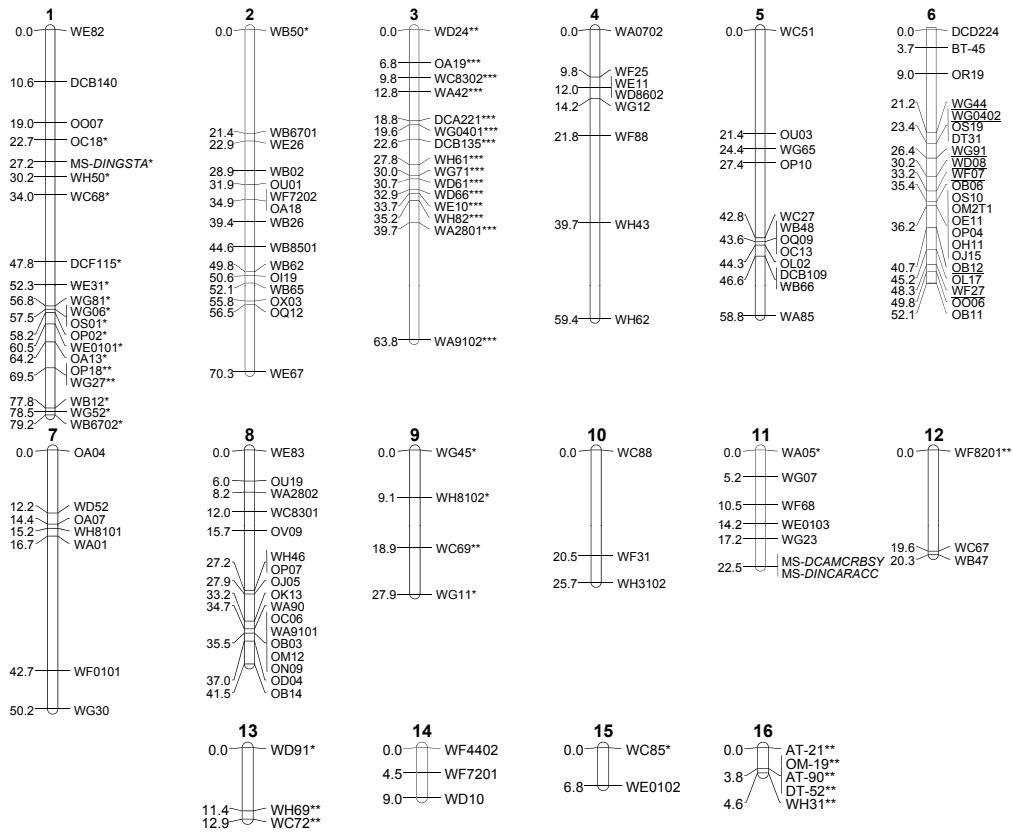


Fig. 2. A linkage map in carnation.

Map distance (cM) is indicated on the left and locus names on the right. *, ** and *** indicate significant segregation distortions at the 5%, 1% and 0.1%, respectively, by chi-square analysis tests. Markers with underline are previously reported (Onozaki et al., 2004).

分離比に有意な歪みが認められた (Dunemann et al., 1999). 一方、ユリにおいては、それぞれ 23.5%, 24.5%であった (Abe et al., 2002). 本研究で歪んだマーカーの割合は 32.9%であり、これらの種と比較するとその割合はやや高かった。分離比の歪みが生じる原因としてはいくつか考えられる。例えば、致死因子による配偶子レベルでの致死や不受精、また、接合体レベルでの不接合、不調和等により特定の遺伝子型が選択的に排除されること等が挙げられる (Lashermes et al., 2001). これら分離の歪みは、種間や亜種間で交配した際に多く見られ、実際、'農1号'は種間雑種である。そのため、本研究における分離比の歪みにもシャクナゲやユリで想定されているような雑種不稔遺伝子や接合体レベルの選択的遺伝子が関わっているのかもしれない。

今回作成した連鎖地図は、将来的に連鎖地図の高密度化や花色、早晚性、花持ち性といったカーネーションの重要形質のマッピング等に利用できると期待される。SSR マーカーは品種間でも多型が豊富に存在する共優性

のマーカーであり、ゲノム全域に存在することから、高密度化を図る上で非常に有用である。さらに、SSR マーカーは属内でも安定して保存されていることから、種を超えて利用可能であり、種間、種内間の連鎖地図を構築する際のアンカーマーカーとして利用できる。今後、SSR マーカーを用いて高密度化を図り、基本染色体数に相当する 15 連鎖群に収束するカーネーションにおける標準連鎖地図作成を目指していきたい。

第2節 萎凋細菌病抵抗性の QTL 解析

連鎖地図を利用することで、複数の遺伝子が関与する QTL についても、その数、位置、遺伝効果を明らかにすることができる。これまでの研究から、*D. capitatus* の有する萎凋細菌病の抵抗性には作用の大きな QTL とその他に複数の QTL が関与していることが示唆されている (Onozaki et al., 2004). それら QTL の地図上の位置を特定し、近傍に存在するマーカーを取得することがで

きれば、複数の QTL を有する強度抵抗性個体のみを選抜できると期待される。そこで、第 1 節で作成した連鎖地図を用いて萎凋細菌病抵抗性の QTL 解析を行った。

材料および方法

1. 材料

第 1 節で用いた抵抗性中間母本 '農 1 号' と罹病性品種 'ブリティファボーレ' ならびにそれらを正逆交雑して得られた萎凋細菌病抵抗性の分離集団 134 系統を用いた。

2. 萎凋細菌病抵抗性検定

萎凋細菌病の抵抗性の検定には浸根接種による抵抗性検定法 (Onozaki et al., 1999b) を用いた。挿し芽を行って約 30 日後の発根苗の根の先端を切除し、 10^8 cfu/ml の萎凋細菌病懸濁液に 30 分間浸漬した。その後、滅菌済みの土壌ベッドへ定植し、1 週間おきに発病株数を調査した。発病株数から検定株数を除した値を発病率として算出し、91 日後の発病率を解析に用いた。検定は異なる季節 (1 月開始, 6 月開始, 7 月開始) ならびに 2 種類の菌株 (B1 菌株 (農業環境技術研究所より分譲), B4 菌株 (兵庫県立淡路農業技術センターより分譲)) を用いて合計 8 回行い、その発病率の平均値を QTL 解析に用いた。1 月開始の試験では土壌病害検定装置を用い、地温を 31.5°C に設定し、6 月、7 月の試験では無加温ハウスの検定ベッドを用い、ハウスサイドビニールの開閉により 30°C の地温維持に努めた。

3. QTL 解析

インターバル QTL マッピングには MAPMAKER/QTL ver. 1.1 (Paterson et al., 1988; Lincoln et al., 1993) を用い、LOD 値 2.0 以上を閾値に 0.1cM 間隔で解析した。

分離集団 134 系統のうち、マーカーの有無により分けた 2 つの集団の平均発病率について、Wilcoxon 法 (Wilcoxon, 1945) による有意差検定を行った。

結果および考察

Onozaki et al. (2004) は、萎凋細菌病抵抗性の分離集団 134 系統が、発病率の低い (抵抗性の) 系統から発病率の高い (罹病性の) 系統まで連続的に分布しており、この形質がポリゾーンによって支配されていることを明らかにしている。さらに、抵抗性の分布には 2 つのピークがあることから、主働因子の存在を示唆しており、実

際、バルク法を用いて主働因子に連鎖した RAPD マーカーを見出し、STS 化を行った (Onozaki et al., 2004)。そこで、更なる QTL を明らかにするために、第 1 節で作成した連鎖地図をもとに萎凋細菌病抵抗性の QTL 解析を行った。その結果、第 2, 第 5, 第 6 連鎖群に LOD 値 2.0 以上の QTL が検出された (Fig. 3, Table 1)。特に、第 6 連鎖群の QTL は LOD 値 23.46、寄与率 60.5% と非常に作用の大きい QTL であった (Table 1)。この QTL は Onozaki et al. (2004) が以前に報告した主働因子に対応しており、この QTL 近傍に存在する WG44 は抵抗性個体を選抜する上で有効なマーカーであることが明らかになっている。我々は、この作用の大きい QTL を *qtl Resistance to Burkholderia caryophylli* の頭文字を取って *qRB1* と名付けた。

第 2, 第 5 連鎖群の QTL はそれぞれ LOD 値 2.32, 2.87、寄与率 8.7%, 10.8% と作用の小さい QTL であった (Table 1)。*qRB1* と同様に、これらの QTL をそれぞれ *qRB3*, *qRB2* と名付けた。作用の小さいこれらの QTL に最も近傍なマーカーは OQ12 と WA85 であり、これらマーカーの有無と発病率の関係について調査した (Fig. 4)。その結果、これら 2 つのマーカーをもつ個体は発病率が低く高い抵抗性を示した。特に、発病率が 20% 以下の全ての抵抗性系統が WA85 (第 5 連鎖群) を有していた (Fig. 4)。分離集団 134 系統をマーカーの有無により分けた場合の平均発病率の差はそれぞれ 13.8% (OQ12) と 14.8% (WA85) であった。これらの差は Wilcoxon (1945) の検定において 0.1% 水準で有意であった。このことから第 6 連鎖群の作用の大きい QTL に加えて、第 2, 第 5 連鎖群に存在する少なくとも 2 つの QTL が萎凋細菌病の抵抗性に関与していることが明らかになった (Fig. 4)。

今回の結果を接種した菌や時期により分けて解析した場合、第 2, 第 5 連鎖群に検出された QTL (*qRB3*, *qRB2*) の大きさや位置は変動した (データ略)。一方、第 6 連鎖群に存在する作用の大きい QTL (*qRB1*) のピークの位置は変動しなかった。このことは使用した B1 菌株と B4 菌株の間に感染機構や発病の最適条件の違いが存在することを示唆しているかもしれない。実際、B1 菌株と B4 菌株では発病力が異なることが明らかになっている (Onozaki et al., 1999b)。また、萎凋細菌病は高温により発病が誘発されることから、定植後の気温の変動の違いが結果に影響を及ぼすことも考えられる。これらのことから、今回検出された 2 つの作用の小さな QTL は温度などの環境変動に対応するために必要な抵抗性因子であると考えられた。

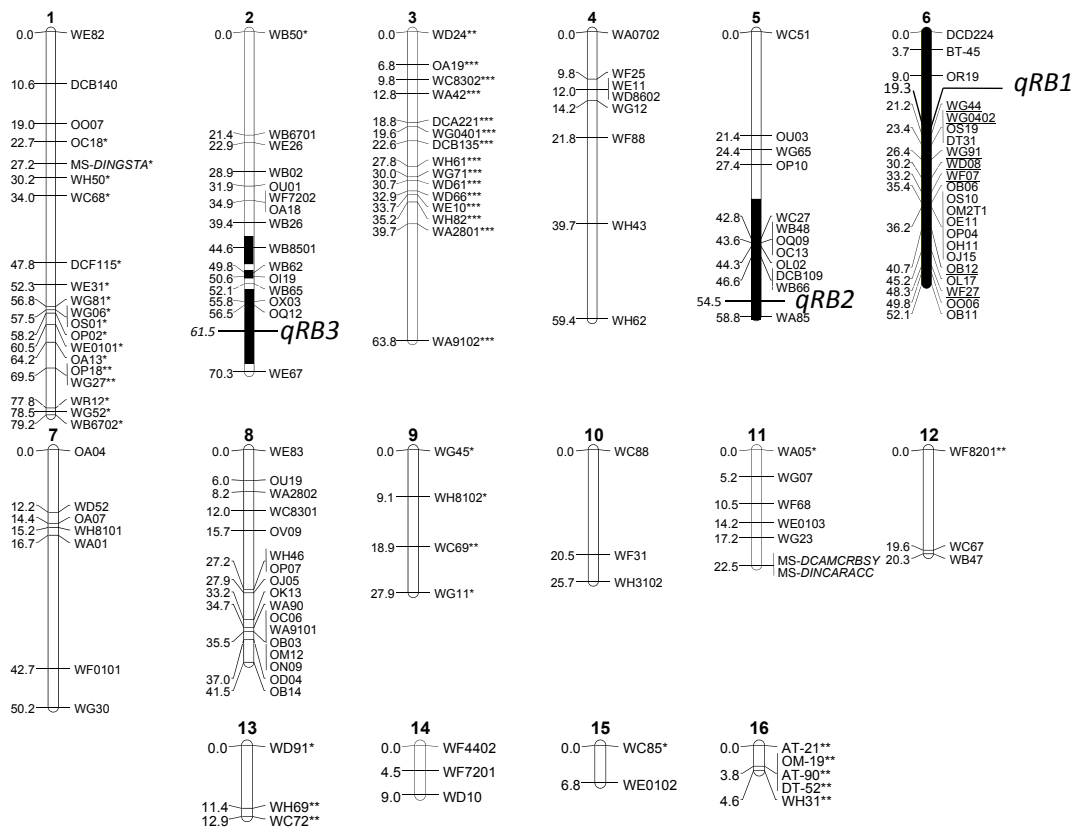


Fig. 3. QTLs for resistance to bacterial wilt in carnation.

The black vertical bars represent the QTLs with a LOD score more than 2.0. *qRB1*, 2 and 3 indicated QTL peaks detected on the chromosome, respectively. The other legends were referred to Fig. 2.

Table 1. QTL analysis for bacterial wilt resistance in carnation among 134 progenies 'Pretty Favvare' × 'Carnation Nou No. 1'.

QTL name	Linkage group	Marker interval	QTL position (cM)	LOD score	Phenotypic variance (%)
<i>qRB1</i>	6	OR19-WG44	10.3	23.46	60.5
<i>qRB2</i>	5	WB66-WA85	7.9	2.87	10.8
<i>qRB3</i>	2	OQ12-WE67	5.0	2.32	8.7

Interval QTL mapping was carried out using the software MAPMAKER/QTL version 1.1 with a LOD score threshold of 2.0. The linkage map was scanned at each 0.1 cM interval.

以上のように、本結果から萎凋細菌病の抵抗性には作用の大きなQTLが一つと、少なくとも2つの作用の小さなQTLが関与していることが明らかになった。そこで、第3節においてこれらQTLの近傍に存在するマーカーが実際の育種においてどの程度有効であるか検討を行った。

第3節 萎凋細菌病抵抗性育種におけるDNAマーカー選抜の有効性の実証

第1節においてカーネーションで初めての連鎖地図を作成し、第2節において萎凋細菌病抵抗性のQTL解

析を行った。その結果、LOD値23.46の作用の大きなQTL（第6連鎖群）に加えて、LOD値が2.32、2.87と作用の小さな2つのQTLが第2、5連鎖群にそれぞれ検出され、それらQTLの近傍に存在するマーカーを見出した。

本節では、これまでに抵抗性検定により選抜してきた萎凋細菌病に強い抵抗性を有する戻し交雑系統においてQTL近傍に存在する3つのマーカーの有無を調査し、これらマーカーの有用性について検討した。また、実際の育種集団でマーカーの有無と発病率を調査することで、実際の育種現場におけるマーカー選抜(MAS)の有効性を検討した。

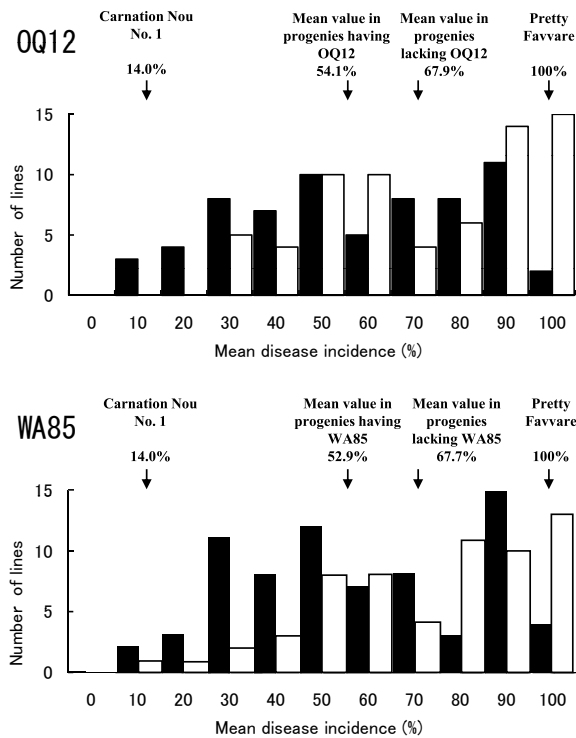


Fig. 4. Frequency distributions of mean disease incidence among 134 progenies derived from 'Carnation Nou No. 1' × 'Pretty Favvare', expressing OQ12 (upper) and WA85 (lower) patterns. ■ : having OQ12 (upper) or WA85 (lower), □ : lacking OQ12 (upper) or WA85 (lower).

材料および方法

1. 供試材料

抵抗性野生種 *D. capitatus* とカーネーション栽培品種 (*D. caryophyllus*) の交配を行い、抵抗性検定で発病率が 20% 以下であった系統を F₁ 世代として選抜した。以後、Onozaki et al. (1999b, c) の分類に従い、抵抗性検定において発病率が 20% 以下の系統を抵抗性系統として選抜した。'農 1 号' は F₁ 世代のうち草姿などの形態的特性、生産性等が比較的優れる選抜系統である。さらに '農 1 号' にカーネーションの栽培品種もしくは育成系統の戻し交雑をした集団から選抜した抵抗性系統を BC₁ 世代とした。その後、抵抗性系統へのカーネーションの戻し交雑と抵抗性検定による選抜 (発病率 20% 以下) を繰り返し、BC₂, BC₃, BC₄ 世代をそれぞれ選抜した。また、BC₁ と BC₂ 世代では抵抗性系統間で交雑を行い、選抜した抵抗性系統を BC₁ × BC₁, BC₂ × BC₂ 世代とした。カーネーション × (BC₁ × BC₁) 世代は、BC₁ × BC₁ 世代の抵抗性系統にカーネーションの育成系統を交配した集団から選抜した抵抗性系統である。

抵抗性戻し交雑系統におけるマーカーの有無を調査するために、BC₄ 世代までの抵抗性戻し交雑系統 91 系統を供試した。また、実際の育種集団におけるマーカーの有効性を実証するために、Table 3 に示した花き研究所で育成中の品種間交雑由来の 4 系統を種子親に、抵抗性戻し交雑系統 10 系統を花粉親に用いた交配を 2002 年の春に行った。2002 年の 7 月 16 日に播種して得られた 863 個体の実生のうち、2003 年の 1 月までに開花した早生の 75 系統と、それ以降に開花し、花色、フォーメーション等の形質の優れた 23 系統合計 98 系統を選抜し材料とした。対照品種として抵抗性系統 '農 1 号' とこれまでの結果から高い発病率を示すことが明らかな罹病性品種 'ノラ' を用いた。

2. 萎凋細菌病抵抗性検定

抵抗性検定は、第 2 節で示した浸根接種検定法 (Onozaki et al., 1999b) により行った。定植床として土壌病害検定装置 (OMY4EB 型, 小澤製作所) を用い、各系統あたり 5 ~ 12 本 (平均 9.6 本) を定植し、地温を 31.5°C に設定することで地温を一定に保った。結果は、B1 菌株ならびに B4 菌株の 2 菌株の 91 日目の発病率を平均した平均発病率で示した。

3. DNA マーカーによる判別

DNA の抽出は、破砕機 (MM300, キアゲン) と DNA 抽出キット ISOPLANT (ニッポンジーン) を組み合わせた方法を用いた。2.0mL の遠心チューブに約 100mg の若い葉片、300μL の ISOPLANT Solution I 液、5mm のジルコニアボールと消泡剤として Antifoam A Emulsion (Sigma, USA) を 1 滴加え、破砕機で 30fr/sec, 1 分間の破砕を 2 回繰り返し行うことで粗抽出液を得た。以後の操作は、ISOPLANT に添付のマニュアルに従い DNA の精製を行った。

供試した DNA マーカーは、萎凋細菌病主働抵抗性遺伝子に 0.7cM で連鎖している RAPD マーカー WG44-1050 を STS 化したマーカー STS-WG44 (Onozaki et al., 2004) と、第 2 節で明らかにした作用の小さい QTL ピークに近接する RAPD マーカー OQ12 (第 2 連鎖群)、RAPD マーカー WB66 を STS 化したマーカー STS-WB66 (第 5 連鎖群) を用いた。抽出した DNA を鋳型に Onozaki et al. (2004) の方法と同じ組成の反応液、反応条件で PCR ならびにその後の操作を行い、マーカーの有無を調査した。PCR 機は Onozaki et al. (2004) の方法から変更して Takara PCR Thermal Cyclers Dice (タ

カラバイオ)を使用した。

結果

1. 抵抗性戻し交雑系統におけるマーカーの有無

破砕機を利用したDNA抽出法では、DNAの物理的切断が認められるものの、PCRに使用可能な質のDNAを迅速に抽出することができた。

抵抗性戻し交雑系統91系統についてマーカーの有無を調査した結果、第6連鎖群に座乗する主動抵抗性遺伝子(*qRB1*)に連鎖したSTS-WG44はBC₄世代までの全ての系統が保有していた(Table 2)。一方、第2連鎖群の作用の小さいQTL(*qRB3*)に近接するOQ12は、F₁世代では‘農1号’のみ保有していた。また、OQ12は

世代を進めるにつれて保有する割合は低下し、BC₄世代では全く保有していなかった(Table 2)。もう一つの作用の小さいQTL(*qRB2*)に近接するマーカーで、第5連鎖群に座乗するSTS-WB66はOQ12と異なり、F₁世代では全ての系統が保有していた。ところが、それ以降の世代ではOQ12と同様な傾向を示し、世代を進めるにつれて保有する割合は低下し、BC₄世代では全く保有していなかった(Table 2)。

2. 実際の育種集団におけるマーカー選抜の有効性

集団の育成に用いた親系統の発病率を調査した(Table 3)。対照品種として用いた抵抗性の‘農1号’は2回の検定試験ともに発病率は0%であった。一方、罹病性の‘ノラ’の発病率は81.3%であった。種子親として用い

Table 2. Number of lines and the percentages with markers close to QTLs for resistance to bacterial wilt in resistant succeeding generations of backcrossing.

Generations	Number of lines	LG 2 ^z OQ12	LG 5 STS-WB66	LG 6 STS-WG44
F ₁ (Carnations × <i>D. capitatus</i>)	7	1 (14.3) ^y	7 (100)	7 (100)
BC ₁ (Carnations × ‘Carnation Nou No. 1’)	18	7 (38.9)	14 (77.8)	18 (100)
BC ₁ × BC ₁	6	2 (33.3)	4 (66.7)	6 (100)
BC ₂	11	4 (36.4)	2 (18.2)	11 (100)
BC ₂ × BC ₂	15	2 (13.3)	1 (6.7)	15 (100)
Carnations × (BC ₁ × BC ₁)	13	2 (15.4)	3 (23.1)	13 (100)
BC ₃	15	2 (13.3)	1 (6.7)	15 (100)
BC ₄	6	0 (0)	0 (0)	6 (100)

^z Linkage group.

^y The percentages of lines with markers close to QTLs.

Table 3. The presence of marker STS-WG44 and resistance to bacterial wilt in parents of tested breeding lines.

	Lines or Cultivars	STS-WG44	Disease incidence (%)
Crossing lines among cultivars (♀)	62-2	-*	23.8
	702-23	-	50.0
	Miracle Rouge	-	51.4
	717-36	-	92.9
Resistant lines of backcrossing (♂)	0N20-2	+	0.0
	0Z29-1	+	0.0
	0N20-14	+	0.0
	97N23-22	+	0.0
	0Z24-17	+	11.1
	0Z32-2	+	12.5
	0Z25-2	+	14.3
	0Z24-21	+	15.0
	0N20-5	+	16.7
	0N20-11	+	20.0
Control cultivars	Carnation Nou No. 1	+	0.0
	Nora	-	81.3

*- : lacking, + : having

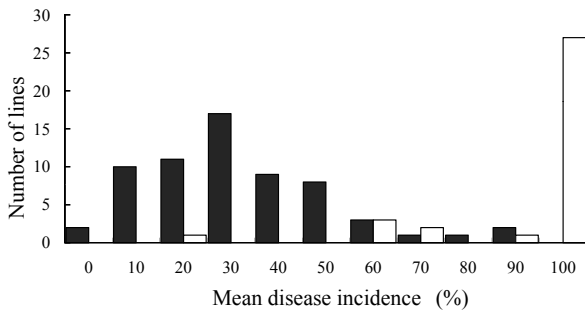


Fig. 5. Frequency distribution of disease incidence in the groups of lines in terms of marker STS-WG44 in practical breeding populations.

■ ; having STS-WG44: 64 lines; mean=28.5%, □ ; lacking: STS-WG44: 34 lines; means=91.1%.

た品種間交雑系統は、62-2で23.8%とやや発病率が低かったものの、その他の系統は発病率が50%以上と高く、罹病性の系統であることが明らかになった。一方、花粉親に用いた抵抗性戻し交雑系統は全て発病率が20%以下であり、本実験からも強い抵抗性を有することが確認された。このことから、今回供試した集団は罹病性系統に抵抗性系統を交配して得られた後代であることを確認した。そこで、この集団863個体の実生の中から早生性と花色等の形質から選抜した98系統について、抵抗性戻し交雑系統に100%存在したSTS-WG44の有無と発病率を調査した。

PCRによりSTS-WG44の有無を調査した結果、選抜した98系統のうち64系統が本マーカーを保有していた。選抜した98系統の発病率を浸根接種検定により調査した結果、異なる菌株を用いた2回の検定試験を平均した発病率は、いずれも0~100%の範囲に分布し、抵抗性に大きな分離が見られた(Fig. 5)。また、発病率50%から90%の部分の頻度が少なく、分布には2つのピークが見られた。2回の検定試験の全系統の平均発病率は44.4%であった。STS-WG44を保有する64系統の平均発病率は28.5%であり、STS-WG44を保有しない34系統のそれは91.1%で、STS-WG44の有無による発病率の差は62.6%と大きな差を示した。この差はWilcoxonのノンパラメトリック検定(Wilcoxon, 1945)で有意であった。また、発病率が20%以下の24系統のうち23系統がSTS-WG44を保有していた。

考 察

本研究で用いた破砕機を利用したDNA抽出法は、試

料を液体窒素中で凍結し乳鉢と乳棒を用いて粉碎する必要がないことから、従来のCTAB法(Murray and Thompson, 1980)と比較すると時間の短縮が図れ、多数のカーネーション葉サンプルから迅速かつ効率的なDNA抽出が可能になった。

抵抗性戻し交雑系統におけるマーカーの有無を調査した結果、BC₄世代の6系統は主働抵抗性遺伝子に連鎖したSTS-WG44を100%保有していた。QTLのピークからの距離も0.7cMと近いことから、STS-WG44は抵抗性個体を選抜する上で極めて有用なマーカーであることが明らかになった。そこで、STS-WG44が実際の育種でも利用できることを明らかにするために、実際の育種集団においてSTS-WG44の有無と発病率を調査した。

STS-WG44の有無による発病率の差は62.6%と大きな差を示し、発病率が20%以下の強抵抗性系統はほとんどこのマーカーを有していた。このことからSTS-WG44を選抜マーカーに用いれば実際の育種集団の中から、強度の抵抗性を有する系統を含む平均発病率の低い集団を絞り込むことが可能であることが明らかになった。

第2節では第5連鎖群のQTLピークに最も近接したRAPDマーカーは地図距離4.3cMのWA85であった。しかしWA85は供試した抵抗性戻し交雑系統で多型が得られなかった。これは本RAPDマーカーが不安定なマーカーであり、PCR装置の機種を変更したことにより再現性が得られなくなったと推察された。そこでWA85に次ぐ近接するマーカーで地図距離7.9cMに存在するSTS-WB66を用いて抵抗性戻し交雑系統におけるマーカーの有無を調査した。

作用の小さいQTLに近接したOQ12とSTS-WB66の2つのマーカーは、戻し交雑により世代を進めることで、強い抵抗性を示す系統にも関わらずマーカーが存在しなくなり、BC₄世代では全く存在しなかった。このことから、作用の小さいQTLの近傍に存在したこれらのマーカーは、抵抗性個体の選抜マーカーとして利用できないことが明らかになった。この理由の1つとして、検出されたQTLに存在すると思われる抵抗性に関与する遺伝子とマーカーの距離が離れていることが挙げられる。第2節においてQTLとマーカー間の地図距離は5.0cM(OQ12)、7.9cM(STS-WB66)と推定され、これらのマーカーは遺伝子と離れた位置に存在している。そのため、抵抗性個体を選抜する過程でマーカーと抵抗性遺伝子間で組換えが生じ、これらマーカーの領域は失われたことが推察される。また、STS-WG44近傍に存在するような作用の大きいQTLの存在下では、作用の小さいQTLが

加わることによる相加効果ははっきりと発現しなかった、あるいは、作用の小さいQTLの効果が劣性的に発現するため、戻し交雑世代では発現しなかった可能性が考えられる。つまり、第2, 5連鎖群に存在する作用の小さいQTLの効果が充分発揮されなかったことで、抵抗性検定において作用の大きいQTLの効果のみで抵抗性個体の選抜が行われ、抵抗性にあまり関与しないこれらの領域が、戻し交雑により世代を促進する過程で淘汰されたことも推察される。

第2節で示すように検出された2つのQTLは、抵抗性検定を実施した時期や使用した菌株に分けたデータを用いてQTL解析を行った場合に位置や大きさが変動した。そこで、これら以外の近傍のマーカーについても抵抗性戻し交雑系統における有無を調査したが、現在のところ戻し交雑を進めた世代でも高い割合で存在するマーカーは得られていない。

カーネーションの育種では、強度の病害抵抗性だけではなく、豊産性、花持ち性、新花色などの形質が優れた品種の開発が望まれる。MASによる選抜の利点は、幼苗期に抵抗性個体を選抜できる点にあるが、STS-WG44のみで選抜を行った場合、理論上、供試した集団を半分にし絞り込むことはできない。そのため、現在のところ、マーカー選抜にかかる時間と費用を考慮に入れると、早生性や花色といった望まれる形質により1次選抜を行ったうえで、マーカー選抜を行うことが実際的であると考えられる。

ここ数年、花きにおけるDNAマーカー研究は盛んになってきており、連鎖地図の作成がペチュニア、バラ、カーネーション、ユリ、シャクナゲ等で行われ、QTL解析も行われている(小野崎, 2005)。ところが、これらの情報を実際の育種に応用した研究はバラの黒星病抵抗性に関する報告(Malek et al., 2000; Debener et al., 2001; Debener et al., 2003; Debener et al., 2004)のみである。今回、カーネーションにおいてもDNAマーカーを利用した育種が可能であることを明らかにし、今後、花き分野でも、評価に時間と労力のかかる病害抵抗性のような形質を中心にMASを用いた効率的な育種が進むと期待される。現在、我々は‘農1号’に戻し交雑を進める過程で実際にSTS-WG44を用い、MASによる抵抗性品種の開発を進めているところである。

第4節 花色の濃淡に関するQTL解析

花色は花きの育種においてもっとも重要な形質の一つ

である(Onozaki et al., 1999a)。カーネーションの花色は、アントシアニンを含むフラボノイド色素によるものであり(Forkmann et al., 1995)、最終産物として存在するのはペラルゴニジンやシアニジンのような配糖体型のアントシアニンやケンフェロール、ケルセチンのようなフラボノール化合物である(Terahara et al., 1986; Terahara and Yamaguchi, 1986; Bloor, 1998; Nakayama et al., 2000)。

これまでに花きにおいては、いくつかの花色のマッピングが行われており、シャクナゲ(Dunemann et al., 1999)では量的形質として、バラ(Debener and Mattiesch, 1999; Yan et al., 2005)、アルストロメリア(Han et al., 2002)、ユリ(Abe et al., 2002)では質的形質としてマッピングが行われている。

本節では、カーネーションにおける花色の濃淡を決定している花卉のアントシアニン色素含量の遺伝性について明らかにするために、第1節で連鎖地図の作成に利用した分離集団のアントシアニン含量を調べ、QTL解析を行った。

材料および方法

1. 材料

第1節の連鎖地図作成に利用した萎凋細菌病抵抗性の分離集団ならびにその親である‘農1号’ならびに‘プリティファボーレ’を用いた、全分離集団134系統のうち120系統について花卉のアントシアニン含量を測定した。

2. アントシアニン含量の測定

2005年の5月から6月にかけて花卉が水平ステージに達した花を採取した。

花から花卉のみを切り取り、新鮮重を測定した後、アントシアニンの抽出を行った。3mlの50%酢酸に一晩浸し、パストールピペットに脱脂綿をフィルターとして詰めた簡易ろ過ユニットを用いてろ過した。さらに2mlの50%酢酸を加えて、もう一晩浸漬し、アントシアニンを抽出した。合計5mlの溶液とし、520nmの吸光度からシアニジン等量として総アントシアニン量を算出した。実験に先立ち、50%酢酸に溶解したシアニジン-3-ルチノサイド標品の520nmにおける吸光度から検量線を作成した。

3. QTL解析

分離集団の各系統のアントシアニン含量の結果を用

いて QTL 解析を行った。インターバル QTL マッピングには MAPMAKER/QTL ver. 1.1 (Paterson et al., 1988; Lincoln et al., 1993) を用い、LOD 値 2.0 以上を閾値に 0.1cM 間隔で解析した。

結果および考察

分離集団の親である‘農1号’は Fig. 1 に示すように八重の鮮赤紫色の花であり、片親の‘プリティファボーレ’は一重の鮮ピンク色の花色である。それらの後代である分離集団の花色は、ピンク、濃ピンク、赤紫、紫、クリーム、薄いオレンジ等様々な花色が含まれていた (Fig. 1)。これら花弁からアントシアニンを抽出し、吸光度の測定から算出したアントシアニン含量の分布を Fig. 6 に示した。その頻度分布は、0.5mg/g F.W. 以下のアントシアニン含量が少ない系統の頻度が最も高く、アントシアニン含量の増加に伴いその分布は低下した。供試した系統のうち 18 系統では親の‘農1号’ (1.91mg/g F.W.) よりも高い含量を有していた。このような超越分離は非自殖性作物においてよく見られる (Han et al., 2002)。これは、形質に関与する複数の遺伝子座において正の効果、負の効果をもつ対立遺伝子を親がヘテロで有する場合に、後代において正の対立遺伝子が集積することで親の

表現型を超えることから説明できるとされている (Han et al., 2002)。

花弁のアントシアニン含量の QTL 解析を行った結果、第 6、第 9 連鎖群の 2 つの連鎖群に QTL が検出された (Table 4)。LOD 値はそれぞれ 6.33 と 4.15 であり寄与率は 21.6%、15.0% であった。第 6 連鎖群の LOD 値のピークは RAPD マーカー BT45 に対して 0.0cM の位置に存在した (Table 4)。また、第 6 連鎖群には萎凋細菌病抵抗性の主働因子 (*qRBI*) が存在しており、同じ連鎖群ではあるが *qRBI* の LOD 値のピークよりは 15.6cM 離れていた (Fig. 7)。

現在、‘農1号’にカーネーション栽培品種を交配することで野生種由来の抵抗性を有するカーネーションを作出しようと試みている。これらの育種過程において、*D. capitatus* の BC₁、BC₂ 世代のほとんどの花色は赤紫色であった。これらの原因として、本研究から明らかになった萎凋細菌病の主働因子とアントシアニン含量の QTL が同じ染色体上に存在する連鎖関係にあることが関係したのかもしれない。

本研究からカーネーションの花弁のアントシアニン含量には少なくとも 2 つの QTL が関与していることが明らかになった。第 1 節で作成した連鎖地図は 16 の連鎖群から構成されており、基本染色体数の 15 に一致して

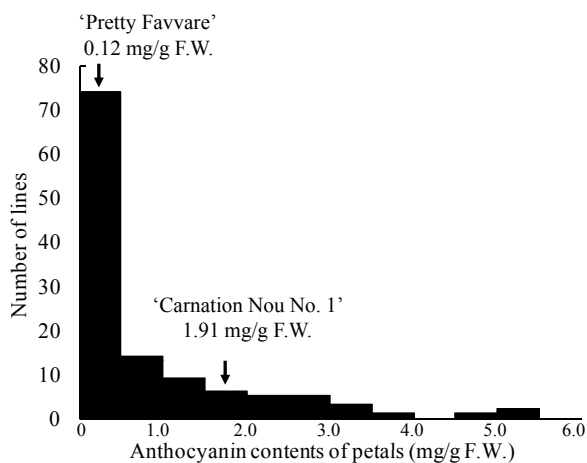


Fig. 6. Frequency distribution of anthocyanin contents in the petals of 120 plants derived from ‘Carnation Nou No.1’ × ‘Pretty Favvare’.

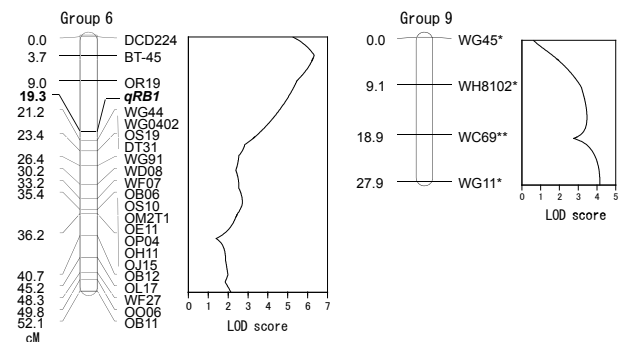


Fig. 7. Partial linkage map of groups 6 and 9 and LOD scores for anthocyanin contents in petals.

* and ** indicate markers showing skewed segregation at 5% and 1% levels, respectively.

qRBI on group 6 indicated a major QTL for resistance to bacterial wilt.

Table 4. QTL analysis for anthocyanin contents in petals.

Linkage group	Nearest marker	Distance from nearest marker (cM)	LOD score	Variance explained (%)
6	BT45	0.0	6.33	21.6
9	WG11	0.9	4.15	15.0

Interval QTL mapping was carried out using the software MAPMAKER/QTL ver. 1.1 with an LOD threshold of 2.0. The linkage map was scanned at 0.1-cM intervals.

いない。また、少数のマーカーで構成される連鎖群も存在することから、染色体をカバーできていない領域が存在する。そのため、今回は2つのQTLが検出されたが、今後、マーカーを増やし、飽和連鎖地図を作成することでさらに他のQTLも検出されると考えられる。

カーネーションにおいてはMehlquist and Geissman (1947)によって、様々な形質の遺伝性が調べられており、アントシアニンの濃度を支配する因子としてSが想定されている。これまでにほとんどのアントシアニン生合成経路上に存在する酵素をコードする遺伝子が単離されており、それら遺伝子の発現とアントシアニン量の関係が調べられている (Dedio et al., 1995; Mato et al., 2000, 2001; Yoshimoto et al., 2000)。それらの解析結果から、Mato et al. (2000) は、アントシアニン合成経路上の構造遺伝子は、myb や myc といった転写因子と同性的のあるトウモロコシの *CI*, *PI*, *R*, *B*, キンギョソウの *Del*, *Eluta*, *Rosea* などの転写因子によって全体の発現調節が行われているのではないかと推察している。また、近年の研究ではアントシアニンの液胞への輸送に関与している GST (glutathione S-transferase) のトランスポゾン等による変異がカーネーションの花色の濃淡に関与していることが示唆されている (Larsen et al., 2003; 小関, 2008)。本研究で明らかになった、アントシアニンの多寡すなわち花色の濃淡に関与するQTLはそうしたアントシアニン生合成経路の調節遺伝子やGSTをコードする遺伝子と関係しているのではないかと考えられる。将来的に、アントシアニン生合成経路上の遺伝子ならびに転写因子のマッピングを順次行うことで、これらのQTLがどの遺伝子に対応するか明らかになると考えられる。

第2章 フローサイトメトリーおよびSSRマーカーによる倍数性と多様性の検討

倍数性の推定には従来から顕微鏡観察による染色体数の計測が用いられてきた。しかし、カーネーションの染色体は1~2 μ mと非常に小さく、観察は困難であり (Gatt et al., 1998)、多数のサンプルを扱うには多大な労力と時間を要する。近年、フローサイトメーターによる簡易な倍数性測定法が開発され、倍数性の判別や雑種性の確認が可能であることが報告され (三柴・三位, 1998)、ヘメロカリス属 (Saito et al., 2003)、アスパラガス属 (González Castañón and Schroeder, 2002)、ダイアンサス属 (牛尾ら, 2002) において倍数性の推定に利用

されている。そこで、第1節ではカーネーションの切り花用品種についてフローサイトメトリーを用いて網羅的に倍数性の推定を行った。

カーネーションには切り花用の品種だけではなく、近年、母の日の贈答用として人気が出てきたわい性タイプのポットカーネーションも存在する。ポットカーネーションの倍数性についてはこれまで報告がないことから、第2節においてフローサイトメトリーによりポットカーネーションの倍数性の推定を行った。また、ポットカーネーションについては倍数性だけではなく、育種過程等を記述した文献がほとんど存在せず、その育成過程でどのような育種素材が利用されてきたかなど詳細は明らかになっていない。一方、DNAマーカーを利用して、遺伝資源、品種等の遺伝的多様性を推察する試みがイネ、ムギ、ダイズ等の作物をはじめとして多くの品目で行われている (Roussel et al., 2004; Li et al., 2008)。我々は、現在、第1章で作成した連鎖地図の充実を図るために、多数のSSRマーカーを開発している。そこで、ポットカーネーションにおける遺伝的多様性について評価するために倍数性の異なる品種を用いてSSRマーカーの遺伝子型の調査を試み、倍数性品種の育成経過等について推察を行った。

第1節 フローサイトメトリーによる切り花カーネーションの倍数性の検討

カーネーションはすでに古代ギリシア時代にも観賞されていたと言われているが、広く栽培されるようになったのは16世紀になってからである (小西・武田, 1994)。カーネーションの品種改良は16世紀初めころからイギリスで盛んにすすめられ、17世紀には絞り、覆輪、八重等の花型をもつカーネーションが出現した (小西・武田, 1994)。19世紀の中ごろに四季咲き性品種が開発され、1866年にはtree carnationと呼ばれる現代のカーネーションの原型が出来上がった。その後、育種の本場はアメリカに移り、1939年にその後世界的に普及する品種群の親となる‘ウィリアム・シム’が育成された (小西・武田, 1994; 武田, 2002)。*‘ウィリアム・シム’*は非常に枝変わりしやすい性質を持っており、交配によるものを含めると数えきれないくらいのシム系品種が誕生した。1960年頃からイタリア、フランス、オランダ、イギリスなどでは、地中海系と称される交雑品種群が育成され、耐病性、花型などシム系にない特性により、日本では1980年代から急速に普及した。また、従来は一

茎一花のスタンダード系のみであったが、1952年にシム系の枝変わり品種からの枝変わりの‘エクスタジット’に端を発する中輪房咲きのスプレー系が誕生した(小西・武田, 1994; 細谷, 1999)。その後、スタンダード系とスプレー系のやや長期にわたる安定、共存期を経たのち、1980年以降、チャイニーズ系、マイクロ系、ジブシー系といった小輪の品種群も誕生し、現在まで様々な品種が育成されている。日本でも多数の品種が育成されており、1940年に井野喜三郎氏により育成された‘コーラル’は名花であり、戦後1970年頃まで栽培面積1位を占めていた。1960～1970年代には主として大分県、福岡県、山口県、香川県、静岡県などの公立試験場で精力的に育種がすすめられ、‘せとのはつしも’、‘伊豆ピンク’などが誕生した(細谷, 1999)。

花き研究所では(独)農業生物資源研究所のジーンバンク事業に参画し、カーネーション栽培品種約300点およびダイアンサス属野生種約200点を収集、保存している。そこで、本節では、これまで倍数性が明らかになっていない花き研究所で保有するカーネーション栽培品種ならびに近年育成された主要品種についてフローサイトメトリーにより網羅的に倍数性の推定を行った。さらに、倍数体と推定された品種について、根端細胞の染色体数の確認を試みた。また、カーネーションにおいて、倍数体の気孔の長径の大きさは、二倍体の植物体に比べて大きく、倍数性と気孔の大きさには相関があることが示唆されている(山口ら, 1980; 山口, 1981)。そこで、フローサイトメーターのような高額な機械を用いずに簡便に倍数性を推定する方法を検討するために気孔の長径を測定した。

材料および方法

1. フローサイトメトリーによる倍数性の推定

花き研究所で保存している切り花用カーネーション栽培品種304品種を材料とした。無加温ビニルハウス内に鉢植えした材料から側枝をサンプリングし、実験に供した。

プラスチックシャーレに供試材料から未展開葉1cm程度を採取し、植物倍数性分析用キット(Partec High Resolution Staining Kit for Plant DNA Analysis, Partec GmbH, Münster, Germany)のA液(核粗抽出液)を500 μ l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ろ過し、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1250 μ l加え、染色を行い分析に供した。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、DAPI蛍光強度を測定した。

2. 酢酸カーミン染色による根端細胞の染色体数の観察

フローサイトメトリーにより二倍体と推定された2品種(‘フランセスコ’、‘ノラ’)、倍数体と推定された7品種(‘スカーレットベル’、‘ウイゴ’、‘スパイラルピビッドレッド’、‘ピンクローランド’、‘楊貴妃’、‘サレヤ’、‘ソネットセラー’)の合計9品種を供試した。

供試材料母株から展開葉3～4対の挿し芽を採取し、発根促進剤として0.5%インドール酪酸粉剤を基部に粉衣し、発根培地(パーライト)に挿し芽を行った。ミスト下で約2週間発根させた植物体から1～2cmに伸長した根を採取し、固定液(酢酸:エタノール=1:3)に浸し、観察に用いるまで保存した。観察時に試料を60℃の解離液(1N HCl:45%酢酸=2:1)に30秒浸し、スライドガラス上で根端を2mm程度切り出し、2%酢酸カーミン液を1滴加え、45%酢酸蒸気を満たしたシャーレ内で2時間染色を行った。その後、余分な染色液をふき取り、押しつぶし法によりプレパラートを作成し、光学顕微鏡AX70(OLYMPUS)を用いて検鏡を行った。

3. 走査型電子顕微鏡による気孔の長径の測定

二倍体5品種(‘スケニア’、‘レナ’、‘ゆふ(大分2号)’、‘フランセスコ’、‘ノラ’)、三倍体3品種(‘スカーレットベル’、‘ウイゴ’、‘スパイラルピビッドレッド’)、四倍体4品種(‘ピンクローランド’、‘楊貴妃’、‘サレヤ’、‘ソネットセラー’)の合計12品種を供試した。供試材料母株の側枝から最も若い完全展開葉を採取し、走査型電子顕微鏡VE-7800(キーエンス)を用いて、裏面中央部における気孔の長径を各品種5か所測定した。

結果

1. フローサイトメトリーによる倍数性の推定

供試したカーネーション栽培品種のうち、日本における1960年代までの赤の主力品種であった‘コーラル’が二倍体であることが明らかになっている(筧, 1972; 山口, 1981)。そこで、フローサイトメトリーによる測定で得られた各品種の核DNA量について‘コーラル’の値を1.00とした時の相対的核DNA量を求めた(Table 5)。解析した304品種のうち、297品種は相対的核DNA量が0.79から1.15の範囲に分布しており、二倍体品種

Table 5. The relative nuclear DNA contents and estimated ploidy levels in cut carnation cultivars.

Cultivars	NIFS No. ^z	Passport No.	Relative nuclear DNA contents ^y	Estimated ploidy levels	Cultivars	NIFS No. ^z	Passport No.	Relative nuclear DNA contents ^y	Estimated ploidy levels
C-7	S33	27012593	1.01	2	Kortina Pink	504	27021116	1.03	2
CSU	1	27012279	1.03	2	Gordirock	536	27023588	1.00	2
CSU Red	S35	27012595	1.03	2	Gorena	S62	27012622	1.03	2
G-G	8	27012286	1.03	2	Koreno			1.03	2
K-1	528	27023580	1.04	2	Colo. White Pikes Peak	S24	27012584	1.06	2
P. S. N. Pink Sim	21	27012298	1.11	2	Salmon Pink Sim	214	27012448	1.00	2
Arthur Sim	S 2	27012562	1.09	2	Sacha	522	27023574	1.02	2
Akane	537	27023589	1.00	2	Samantha	49	27012642	1.06	2
Asaka	241	27012474	1.05	2	Sam	5	27012283	1.04	2
Anny			1.01	2	Sam's Pride	116		1.06	2
Anniversary	275	27012508	1.04	2	Sam's White Scania	S27	27012587	1.04	2
Anon	302	27012535	1.06	2	Sarispritt	320	27012553	1.05	2
Apollo	258	27012491	1.07	2	Sunset	S26	27012586	1.05	2
Alaska	S 3	27012563	1.09	2	Santorini			1.01	2
Alice	521	27023573	1.06	2	Sandrosa	514		1.00	2
Alice Sim	219	27012453	0.97	2	Syeren	S32	27012592	1.03	2
Alicetta	172	27012412	1.02	2	Sissi	185	27012425	1.05	2
Albivette	146	27012387	1.03	2	Shinano Red	531	27023583	1.01	2
Anne Marie	S 1	27012561	1.08	2	Sinera	324	27012557	1.04	2
Anbasary	S 7	27012567	1.09	2	Shimada's Peter	533	27023585	1.00	2
Yellow NO. 3	S11	27012571	1.06	2	Chanel	304	27012537	0.99	2
Yellow Imp.	129	27012370	1.05	2	Shamrock SP	S29	27012589	1.03	2
Yellowstone	166	27012406	1.05	2	Jumbo Cardinal	261	27012494	1.00	2
Yellow Dusty	66	27012659	1.03	2	Shocking Pink Sim	55	27012648	1.03	2
Yellow Dusty Sim	26	27012303	1.08	2	Silver	540	27023592	1.07	2
Evening Glow	283	27012516	0.98	2	Shiro	S70	27012630	1.05	2
Evening Red	272	27012505	1.02	2	Sweet Heart	113	27012355	1.07	2
Illuminator	22	27012299	1.08	2	Super Gold	137	27012378	1.05	2
Imp. White Sim	40	27012316	1.10	2	Super Scania	223	27012457	1.03	2
William Sim	S13	27012573	1.06	2	Scarlet King	286	27012519	1.04	2
Wink			1.02	2	Scarlet Queen			1.03	2
Exceria			1.03	2	Scarlet Plus			1.04	2
Edisu	264	27012497	1.00	2	Skyline	268	27012501	1.05	2
Etna	106	27012348	1.10	2	Scania	513		1.00	2
Elsy	158	27012399	1.07	2	Starlight	105	27012347	1.09	2
Erufego	S15	27012575	1.08	2	Stephany	126	27012367	1.04	2
Elegance	402	27012559	1.08	2	Snow Crown Pink	S30	27012590	1.02	2
Yellow Sim	216	27012450	0.99	2	Snow fall	244	27012477	1.05	2
Yellow Smiling	210	27012444	1.00	2	Sparkle	S31	27012591	1.00	2
Yellow Beauty	602	27012513	1.02	2	Spectrum	251	27012484	1.04	2
Angel	S68	27012628	1.03	2	Smatee	318	27012551	1.05	2
Ember Sim	S16	27012576	1.07	2	Smiling	207	27012441	1.02	2
Ember Rose	S14	27012574	1.06	2	Seto no Otome	548	27023600	1.05	2
Orchid Royal	401	27012558	1.06	2	Seto no Hagoromo	546	27023598	0.89	2
Orange Elf	535	27023587	1.00	2	Seto no Hatusimo	34		1.07	2
Orange smiling	607	27012579	1.01	2	Seto no Hana	33	27012310	1.06	2
Orange Triumph	285	27012518	1.07	2	Seto no Hinode	545	27023597	1.06	2
Orange Beauty	603	27012304	1.02	2	Seto no Miyabi	501	27021112	1.05	2
Cardinal Sim	211	27012445	1.00	2	Seto no Megumi	502	27021113	1.06	2
Cain			1.03	2	Cerise Royalette	112	27012354	1.08	2
Casablanca			1.00	2	Serisroyal	321	27012554	1.01	2
Casino	175	27012415	0.99	2	Select White Royalette	319	27012552	0.89	2
Kapuri	170	27012410	1.02	2	Soana	64	27012657	1.05	2
Kaly	88	27012342	1.07	2	Sonata	145	27012386	1.03	2
Karina	165		1.05	2	Sonnet Maria			0.90	2
Carifornia	263	27012496	0.84	2	Sorubig	S34	27012594	1.02	2
California White	23	27012300	1.08	2	Solbit Sydney	296	27012529	1.04	2
Calypso	6	27012284	1.01	2	Sorubik White Sca	224	27012458	1.03	2
Guernseyyellow			1.02	2	Dark GJ Sim	222	27012456	1.07	2
Keefers Cherry Sim	S22	27012582	1.05	2	Dark Pink Barbara			0.97	2
Galaxy	156	27012397	1.11	2	Dark Red Sim	213	27012447	1.00	2
Candy	505	27021117	1.04	2	Dark Lena	225	27012459	1.04	2
Candle			1.04	2	Dusty	S38	27012598	1.11	2
Killer	506	27021118	1.04	2	Dusty Pink Sim	217	27012451	0.99	2
Crown	259	27012492	1.05	2	Tsman			1.03	2
Green Magic			1.04	2	Tamara	163	27012404	1.06	2
Cleopatra	271	27012504	1.05	2	Tanga	73	27012327	1.05	2
Kurenai	32	27012309	1.08	2	Tango Banbi	301	27012534	1.02	2
Glory	7	27012285	1.03	2	Tangerine	50	27012643	1.07	2
Crowley's Sim	S41	27012601	1.05	2	Dannebu Rope	281	27012514	1.02	2
Gete	276	27012509	0.99	2	Tikusi	233	27012466	1.05	2
Coral	606	27012320	1.00	2	Dizeel	292	27012525	1.05	2
Golden Wonder	S25	27012585	1.05	2	Teddy	140	27012381	1.06	2
Corise	61	27012654	1.05	2	Tetra Red	249	27012482	1.05	2
Koranja	S61	27012621	1.06	2	Telstar	S48	27012608	1.08	2
Kolivetta	144	27012385	1.04	2	Delphy	551		0.96	2

^z Accession no. of Genebank activity at NIFS. The cultivars with the blank column were conserved at research team for regulation of growth and flowering.

^y Relative values of fluorescence intensity for each cultivar are expressed relative to the fluorescence intensity of 'Coral' (a diploid cut cultivar), which was normalized 1.00.

Table 5. Continued.

Cultivars	NIFS No. ^z	Passport No.	Relative nuclear DNA contents ^y	Estimated ploidy levels	Cultivars	NIFS No. ^z	Passport No.	Relative nuclear DNA contents ^y	Estimated ploidy levels
Terresa	530	27023582	1.02	2	Malea			0.95	2
Totem	S39	27012599	1.12	2	Mandodorina	317	27012550	1.05	2
Tortosa	59	27012652	0.98	2	Manmail Myriam	315	27012548	1.05	2
Toska	157	27012398	1.09	2	Manroromina	316	27012549	1.03	2
Dooka Pink	109	27012351	1.08	2	Miss. Kokura	236	27012469	1.04	2
Donary Shupreem	252	27012485	1.01	2	Mini Queen	198	27012433	1.03	2
Tony	149	27012390	1.09	2	Ministar	122	27012363	1.06	2
Tobia	549		1.00	2	Myan	403	27012560	1.09	2
Don Sierra	287	27012520	1.01	2	Mirutean Maid	269	27012502	0.80	2
Don Di Aburo	294	27012527	1.04	2	Monako	532	27023584	1.00	2
Nikky	523	27023575	1.05	2	U conn	60	27012653	1.07	2
New Pink Sim	215	27012449	1.00	2	U Conn NR68	S59	27012619	1.06	2
Northland	255	27012488	1.05	2	U Conn White	541	27023593	1.04	2
Nocto	181	27012421	1.00	2	Yufu	229	27012462	1.05	2
Novada	527	27023579	1.03	2	Yufu no Kagayaki	11	27012289	1.10	2
Nora	57	27012650	1.06	2	Yurise	303	27012536	1.04	2
Barbara	518		1.04	2	Light Pink Barbara			0.93	2
Pasio			1.02	2	Light Pink Barbi	102	27012344	1.10	2
Butter Scotch	63	27012656	1.06	2	Lilac	148	27012389	1.15	2
Paburo	323	27012556	1.07	2	La vie en Rose			1.00	2
Pallas	313	27012546	1.05	2	Raggio di Sole	S45	27012605	1.10	2
Paradiso	168	27012408	1.03	2	Raspberry Ice	266	27012499	0.93	2
Bianca	161	27012402	1.07	2	La Reve	15	27012292	1.02	2
Peter Fisher K2	201	27012435	1.01	2	Ricardo			1.01	2
Peter Fisher OT	203	27012437	1.00	2	Lisa	118	27012359	1.05	2
Peter Fisher South	202	27012436	1.01	2	Lilli Ann	117	27012358	1.06	2
Peter Fisher American	204	27012438	1.01	2	Linda	S46	27012606	1.07	2
Peterson's Red Sim	S42	27012602	1.09	2	Luna	234	27012467	1.04	2
Pink Ice	16	27012293	1.01	2	Rure-bu	42	27012318	1.07	2
Pink Calypso	20	27012297	1.00	2	Reico			0.98	2
Pink Sim	212	27012446	0.99	2	Regina	162	27012403	1.07	2
Pink Smiling	208	27012442	1.02	2	Red Ivette	143	27012384	1.04	2
Pink Barbi	115	27012357	1.08	2	Red Gayety	S57	27012617	1.04	2
Pink Hirsal	S81	27012640	1.03	2	Red Cross	250	27012483	1.05	2
Pink Francesco			0.99	2	Red Sun	54	27012647	1.07	2
Pink Furiit	515		1.00	2	Red Smiling	209	27012443	1.02	2
Pink Mamie	290	27012523	1.01	2	Red Diamond	284	27012517	1.02	2
Pink Mist	288	27012521	0.98	2	Red Barbara			0.95	2
Pink Ministar	S74		0.99	2	Red Baron	103	27012345	1.07	2
Fernal	308	27012541	1.02	2	Red Ministar	107	27012349	1.10	2
Fantasia	169	27012409	1.03	2	Red Rum	164	27012405	1.06	2
Fidelio	180	27012420	1.03	2	Red Lena	227		1.05	2
Fairy Pink			0.99	2	Lena	520	27023572	1.06	2
Bridal White			1.03	2	Lena Super	53	27012646	1.04	2
Pride of Woburn	267	27012500	0.80	2	Revada	526	27023578	1.02	2
Flamingo	S56	27012616	1.04	2	Royaletty	S71	27012631	1.02	2
Flamingo Sim	18	27012295	1.02	2	Rodeo	67	27012660	1.06	2
Francesco	508	27021120	1.05	2	Roma	72	27012326	1.05	2
Princess Irene	260	27012493	1.03	2	Romeo	14	27012291	1.00	2
Blue Bell	195	27012430	1.06	2	Lolita	41	27012317	1.07	2
Pulcino	188	27012428	1.06	2	Ronda	86	27012340	1.05	2
Florence	62	27012655	1.03	2	Rondorageru	135	27012376	1.04	2
Besper Sim	218	27012452	1.01	2	Izu No.8	S10	27012570	1.07	2
Peppermint Sim	220	27012454	1.02	2	Izu Coral	S 6	27012566	1.10	2
Peppermint lace	10	27012288	1.00	2	Izu no Odoriko	S 8	27012568	1.06	2
Hellas	68	27012661	1.03	2	Izu Pink	S 4	27012564	1.09	2
Berigete Sim	S52	27012612	1.06	2	Izu Rose	S 5	27012565	1.08	2
Persian Pink	291	27012524	1.06	2	Kibou	3	27012281	1.06	2
Verona	85	27012339	1.03	2	Kibou no Hikari	503	27021115	1.06	2
Portrait	278	27012511	1.00	2	Hikari	538	27023590	1.04	2
Holy Kapri	289	27012522	0.98	2	Haru no Yosooi	247	27012480	1.07	2
Boston	270	27012503	1.00	2	Yosooi	S51	27012611	1.08	2
Honoo	228	27012461	1.07	2	Sinyosooi	235	27012468	1.02	2
White Karipuso	306	27012539	1.02	2	Yukikesyou	512		1.02	2
White Cancan	305	27012538	0.79	2	Tikuma	30	27012307	1.08	2
White Christmas	243	27012476	1.07	2	Oita No. 9	231	27012464	1.01	2
White Sim	S43	27012603	1.07	2	Hi no Tukasa	2	27012280	1.06	2
White Barbara			1.00	2	Fuji	248	27012481	1.03	2
White Mind	552		0.97	2	Yuubae	246	27012479	1.03	2
White Rusena	550		1.02	2	Scarlet Bell	4	27012282	1.62	3
Mercury			0.95	2	Wiko	183	27012423	1.64	3
Maj Britt	125	27012366	1.08	2	Spiral Vivid Red	510		1.80	3
Majestic	309	27012542	0.99	2	Pink Roland			2.03	4
Manon	70	27012324	1.05	2	Youkihi	534	27023586	2.06	4
Mamie	295	27012528	1.06	2	Saleya			2.07	4
Marina	322	27012555	1.06	2	Sonnet Sailor			2.08	4

^z Accession no. of Genebank activity at NIFS. The cultivars with the blank column were conserved at research team for regulation of growth and flowering.^y Relative values of fluorescence intensity for each cultivar are expressed relative to the fluorescence intensity of 'Coral' (a diploid cut cultivar), which was normalized 1.00.

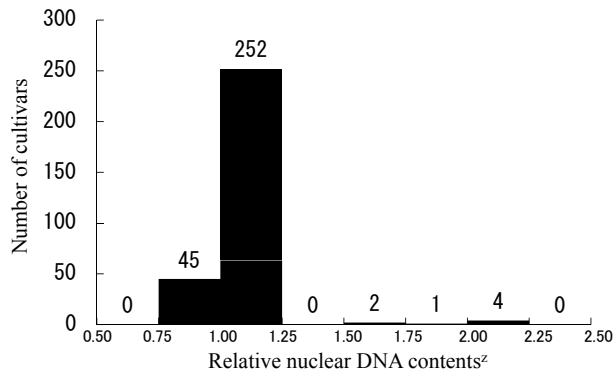


Fig. 8. Frequency distribution of the relative nuclear DNA contents of 304 cut carnation cultivars.

²Relative values of fluorescent intensity compared with 'Coral' (a diploid cultivar with a normalized fluorescence value equal to 1.00).

‘コーラル’ とほぼ同じ相対的核 DNA 量を有していることから、二倍体であると推察された (Table 5, Fig. 8). 残りの 7 品種については、相対的核 DNA 量が 1.62 ~ 2.08 の範囲に分布しており (Table 5, Fig. 8), 二倍体品種のおよそ 1.5 ~ 2 倍の相対的核 DNA 量を有していることから、これらの品種は三倍体もしくは四倍体であると推察された。

2. 根端細胞の染色体数の観察

根端細胞の染色体数の観察を行い、実際の倍数性について確認を行った。カーネーションの染色体基本数は $x=15$ であることから、二倍体、三倍体、四倍体の品種はそれぞれ 30, 45, 60 本の染色体が確認されるはずである。相対的核 DNA 量が 1.06 の ‘ノラ’ および 1.05 の ‘フランススコ’ について根端の染色体数を確認したところ、30 本の染色体が確認でき二倍体であることが明らかになった (Fig. 9. A).

フローサイトメトリーによる測定結果から三倍体、四倍体と推定された 7 品種についても根端細胞の染色体数を調査した。その結果 ‘スカーレットベル’ (相対的核

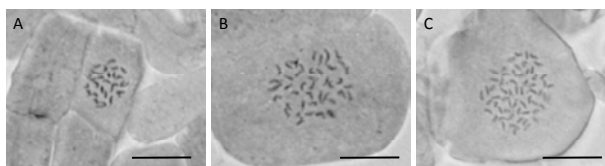


Fig. 9. Microphotographs showing the root tip cells of three cut carnation cultivars.

(A) 'Nora' ($2n=2x=30$); (B) 'Scarlet Bell' ($2n=3x=45$); (C) 'Saleya' ($2n=4x=60$). Scale bar = 10µm.

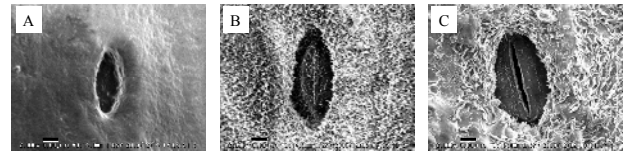


Fig. 10. Scanning electron photomicrographs of stomata on abaxial leaf side in cut carnations.

(A) 'Scania' (2x); (B) 'Scarlet Bell' (3x); (C) 'Pink Roland' (4x). $\times 2000$. Scale bar = 5µm.

DNA 量 1.62), ‘ウィゴ’ (同 1.64), ‘スパイラルピビッドレッド’ (同 1.80) の 3 品種については 45 本の染色体が確認され、三倍体であることが明らかになった (Fig. 9. B). また、相対的核 DNA 量が 2.00 以上の 4 品種のうち、‘サレヤ’ については 60 本の染色体が確認され、四倍体であることが明らかになった (Fig. 9. C). 残りの 3 品種 (‘ソネットセラー’, ‘楊貴妃’, ‘ピンクローランド’) については明確に染色体数を確認することはできなかったが、50 本以上の染色体が確認されたことから四倍体であると推察された。

3. 気孔の大きさ

フローサイトメトリーならびに根端細胞の染色体観察により倍数性が明らかになった 12 品種について気孔の長径を調査した (Fig. 10). 気孔の長径は二倍体品種が 17.6 ~ 22.0µm であり、三倍体品種は 29.0 ~ 32.3µm, 四倍体品種は 30.1 ~ 39.2µm であった (Table 6). また、12 品種の相対的核 DNA 量と気孔の長径の大きさとの間には有意な正の相関 ($r=0.90^*$) が認められた。

考 察

フローサイトメトリーによる核 DNA 量の推定、根端細胞の染色体数の観察、気孔の大きさの測定から、供試したカーネーション栽培品種はほとんどが二倍体と推定され、わずかながら三倍体、四倍体の品種も存在することが明らかになった。

本研究で倍数体と推定された 7 品種のうち ‘サレヤ’ 以外については、花径、花弁数、花弁の欠刻の深さ、草姿、形態等の特徴から野生種との交雑が示唆される。実際、‘ウィゴ’ はマイクロ系、‘スカーレットベル’ はエンゼル系、‘ソネットセラー’ はソネット系と呼ばれる野生種との交配で誕生した品種群に分類されている (細谷, 1999; 武田, 2002). ‘楊貴妃’ は、さらに野生種の血が濃く、佐藤 (1995) の分類によると宿根性ナデシコに分

Table 6. Relationship between the relative nuclear DNA contents and stomatal length in cut carnations.

Cultivars	Relative nuclear DNA contents ^z	Estimated ploidy levels	Stomatal length (μm)
Scania	1.00	2	21.5 \pm 1.1 ^y
Lena	1.06	2	21.7 \pm 0.7
Yufu	1.05	2	20.8 \pm 1.1
Francesco	1.05	2	22.0 \pm 2.2
Nora	1.06	2	17.6 \pm 2.1
Scarlet Bell	1.62	3	31.5 \pm 0.7
Wiko	1.64	3	32.3 \pm 1.4
Spiral Vivid Red	1.80	3	29.0 \pm 0.9
Pink Roland	2.03	4	30.1 \pm 1.3
Youkihi	2.06	4	39.2 \pm 1.1
Saleya	2.07	4	30.4 \pm 0.9
Sonnet Sailor	2.08	4	37.0 \pm 0.8

^z Relative values of fluorescence intensity for each cultivar are expressed relative to the fluorescence intensity of 'Coral' (a diploid cut cultivar), which was normalized 1.00.

^y Av. \pm S. E. (n = 5)

類されている。'ウィコ'は過去の研究で萎凋細菌病抵抗性を有することが明らかになっている (Onozaki et al., 1999b)。しかし、'ウィコ'は花粉を全く生産しないので花粉親として使えず、種子親としてカーネーションとの交配に用いても種子が得られないことから、抵抗性育種素材として利用できなかった (Onozaki et al., 1999b)。本研究から、この結果は'ウィコ'が三倍体であることに起因すると考えられた。'スカーレットベル'は、改良イセナデシコ、ミカドナデシコ (カーネーション \times セキチク)、マーガレットカーネーション、種子系カーネーション'アンファンドニス'を育種素材として育成された濃ピンク色の'エンゼル'にガンマ線照射して得られた赤色変異体である (林, 1995)。'ソネットセラー'の属するソネット系は長野県の個人育種家中曾根和雄氏により育成された小輪多花性の品種群である (竹岡, 1995)。ダイアンサス属野生種には、二倍体のほか四倍体、六倍体の種が多数存在することが示されている (牛尾ら, 2002)。また、ダイアンサス属では種間交雑が容易であることが知られている (Hamilton and Walters, 1989; 武田, 2002)。これらのことから育成過程が明らかでない'スパイラルビッドレッド'、'ピンクローランド'を含め、'サレヤ'以外の倍数性品種の成立には、四倍体もしくは六倍体の野生種が関係していることが示唆された。一方、'サレヤ'については、草姿、形態的特徴から、野生種との交雑を認めることはできない。浅緑黄の地色に濃ピンク色の条及び覆輪が入る特徴的な花色を持ち、スタンダード系品種の中でも特に花径が大きく、開花については中晩生の品種である。したがって、'サレヤ'に

ついては、二倍体の倍加による同質四倍体の可能性が考えられる。

カーネーションでは、染色体数キメラの品種が存在し、根端の染色体数にも変異が見られることが報告されている (筧, 1972; 山口ら, 1980; 山口, 1981)。しかし、本研究で観察した根端においては、染色体数がキメラで存在する品種を見出すことはできなかった。カーネーションを含むダイアンサス属の染色体は1~2 μm と小さく、数も多いため、正確に染色体数をカウントするには労力を必要とする (Gatt et al., 1998)。そのため、フローサイトメトリーによる倍数性の推定は、簡便に倍数性を知る上で有用である。さらにカーネーションには、倍数性の異なる細胞からなる倍数性キメラの品種も存在しているが、フローサイトメトリーは、細胞の倍数性が異なる場合、蛍光強度のピーク位置が移動するため、より正確に倍数性を判定できると考えられる。

フローサイトメーターを用いた倍数性の推定は、正確で簡便であるが、高額な機械を必要とするため、利用範囲が限られることが考えられる。本結果から、二倍体と倍数体については気孔の長径により倍数性を明確に区別することが可能であったが、気孔の長径だけでは三倍体、四倍体を区別することはできなかった。山口ら (1980)は、8節目の葉の表皮を用いて気孔の観察を行い、二倍体品種の長径は38.8~41.8 μm (8品種)、三倍体は46.2 μm (1品種)、四倍体は49.8~51.8 μm (2品種)であったと報告している。倍数体品種の供試数が少なく、気孔の観察部位が異なるため、本研究における測定値とは差があるものの、本結果と同様に、三倍体と四倍体の気孔の大き

さの差は小さく、気孔の大きさだけで三倍体と四倍体を区別することは難しいと報告している。これらのことから、気孔の長径測定は、フローサイトメトリーを利用できない場面において、二倍体と倍数体を区別する方法として利用できると考えられる。

本研究から、カーネーションの栽培品種においてもダイアンサス属野生種と同様にフローサイトメトリーによる倍数性の推定が可能であり、カーネーションの栽培品種のほとんどが二倍体であると推定された。また、わずかに存在する三倍体、四倍体の倍数性の品種は、草姿、形態等の特徴から野生種との交雑が示唆される品種であり、供試した品種の中で‘サレヤ’のみそれが認められない品種であった。山口・寛(1985)は、二倍体の栽培品種にコルヒチン処理を行い四倍体のカーネーションを作出した。それらの生育について調査した結果、花径、花卉数、葉重、莖径等の植物体の巨大化を認める一方、生育と開花の遅延による著しい収量の減少を認めている(寛・山口, 1985)。やはり、山口(1981)が指摘するように、カーネーションの長い栽培の歴史の中で四倍体、三倍体、異数体などがほとんど現われていないのは、実用形質を持たなかったため、淘汰の対象として排除されてきたのかもしれない。‘サレヤ’については、花径の大型化等の倍数化による影響と考えられる特徴を有しており、生育特性、生産性等の詳細については、今後明らかにしていきたい。

第2節 フローサイトメトリーによるポットカーネーションの倍数性の検討

ポットカーネーションは2007年には約510万鉢が花き卸売市場で販売されており(農林水産省統計)、母の日の贈答品として愛好されている。ポットカーネーションのようなわい性のカーネーションは、日本ではあまり花壇用に栽培されることはないが、欧米では古くから栽植されており、花壇用の品種が古くから育成され、現在でもその需要は多い(八代, 2003)。しかし、日本で花壇に栽植すると北海道を除いて、梅雨期に入るために花が長雨で腐りやすく、花の美しさが発揮できないために品種改良はほとんどおこなわれず、当初は主に欧米からの輸入品であった(八代, 2003)。その後、1970年にF₁品種の‘ピカデリー・スペシャルミックス’がサカタのタネから販売されたのを契機に、母の日の鉢物用に栽培され始めたが、母の日までに開花させることは技術的に難しく定着しなかった(八代, 2002)。1978年には、よりコンパクト

な栽培が可能な栄養系の‘ミニスカレット’が誕生したが、種苗費が高く普及せず、その後も実生系のピカデリー系が主流であった。1985年に実生系の‘スカレット・リリポット’と同時に栄養系の‘フィーリングピンク’が育成された。これらは栽培が容易で母の日までに全量が出荷可能であったことから、飛躍的にポットカーネーションの生産が増えた(八代, 2003)。そのため生産者や業者の間でポットカーネーションへの関心が高まったことから急速に育種が進み、多くの品種が発売された。その後、実生系の品種は徐々に生産が減り、現在では栄養系の四季咲き性品種が主流となっている。

このように育種の歴史をうかがい知ることはできるが、実際のポットカーネーションの育種の過程でどのような系統が素材として利用されたかは不明である。Moyal-Ben Zvi and Vainstein (2007)によると、ポットカーネーションは*D. chinensis*と*D. barbatus*の交雑によって生じたという記述が見られる。ダイアンサス属野生種については、二倍体(2n=2x=30)、四倍体(2n=4x=60)、六倍体(2n=6x=90)が存在する(伊藤ら, 1994)。これら野生種がポットカーネーションの育成に関与しているとすれば、ポットカーネーションには様々な倍数性が存在する可能性がある。そこで、ポットカーネーションの基礎的知見を得るためにフローサイトメトリーを用いて主要品種の倍数性について明らかにした。

材料および方法

5つの種苗会社より販売されている45品種(Table 7)について、第1節で示した手法を用いてフローサイトメトリーによる倍数性の推定を行った。基準品種には、第1節で二倍体であることが明らかになった切り花カーネーション‘フランセスコ’を用いた。フローサイトメトリーにより二倍体、三倍体、四倍体であると推定された‘カミーユ’、‘ベイビーハート’、‘トゥーラ’については、第1節で示した押しつぶし法により根端細胞の染色体数の観察を行った。また、フローサイトメトリーにより二倍体であると推定された4品種(‘カミーユ’、‘ピグレット’、‘メル’、‘カミーユピンク’)、三倍体であると推定された2品種(‘トゥルーラブ’、‘ベイビーハート’)、四倍体であると推定された4品種(‘ピンクサブライズ’、‘カレリア’、‘トゥーラ’、‘ボスコ’)について気孔の観察を行った。

結果および考察

Table 7 に示したポットカーネーション 45 品種についてフローサイトメトリーによる解析を行った。本研究で基準品種として使用した二倍体の‘フランセスコ’は 2003 年において最も流通している赤のスタンダード系の主力切り花品種である (Onozaki, 2006)。そこで、‘フランセスコ’を 1.00 とした時の相対的核 DNA 量を各品種について算出した。相対的核 DNA 量は 0.89-1.05 (グループ 1), 1.55-1.62 (グループ 2), 1.96-2.35 (グループ 3) の 3 つのグループに分かれた (Table 7, Fig. 11)。グループ 1 に属する 27 品種は二倍体の‘フランセスコ’とほぼ同じ相対的核 DNA 量を持つことから、二倍体であると推定された。一方で、グループ 2 やグループ 3 に属する品種は、それらのおよそ 1.5 ~ 2 倍の相対的核 DNA 量であるので、それぞれ三倍体、四倍体であると推定された。実際の倍数性を確認するために、各グループに属する 1 品種について、根端細胞の染色体数を観察した (Fig. 12)。グループ 1 に属する‘カミーユ’ (相対的核

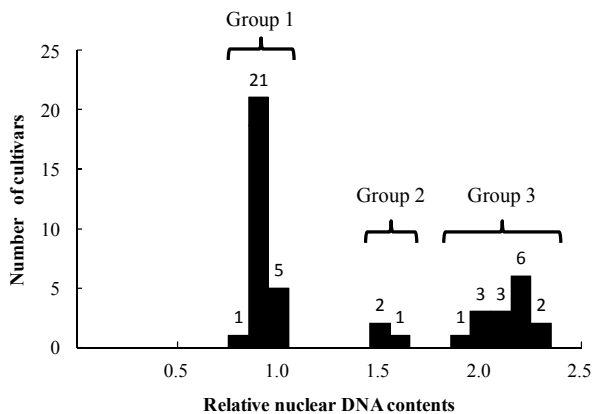


Fig. 11. Frequency distribution of the relative nuclear DNA contents of the 45 potted cultivars in Table 7, estimated from the relative fluorescence compared with 'Francesco' (a diploid cultivar with a normalized fluorescence value equal to 1.0).

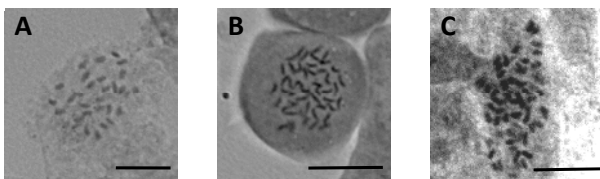


Fig. 12. Microphotographs showing the root tip cells of three pot carnation cultivars. (A) 'Camille' ($2n=2x=30$); (B) 'Baby Heart' ($2n=3x=45$); (C) 'Tula' ($2n=4x=60$). Scale bar = 10 μm

DNA 量 0.98) は 30 本の染色体を有していた。一方、グループ 2 の‘ベイビーハート’ (同 1.55) は 45 本、‘トゥーラ’ (同 2.28) は 60 本の染色体が観察された。カーネーションの基本染色体数は $x=15$ であることから、‘カミーユ’、‘ベイビーハート’、‘トゥーラ’はそれぞれ二倍体、三倍体、四倍体であることが明らかになった。このことから、グループ 1、グループ 2、グループ 3 に含まれる品種もそれぞれ二倍体、三倍体、四倍体であることが強く示唆された。種苗会社別にみると雪印種苗の 12 品種は全て二倍体、P コーイ社の 8 品種は全て四倍体であるのが特徴的であった (Table 7)。

二倍体、三倍体、四倍体の合計 10 品種について気孔の観察を行った結果を Table 8 に示した。二倍体と推定された 4 品種は 21.2 ~ 24.1 μm であり、三倍体品種が 28.5 ~ 31.0 μm 、四倍体品種が 33.2 ~ 37.9 μm であった。また、10 品種の相対的核 DNA 量と気孔の長径には有意な相関が認められた ($r=0.88^*$)。第 1 節の結果、切り花カーネーションでは気孔の大きさにより三倍体、四倍体の区別はできなかった。しかし、ポットカーネーションでは、三倍体と四倍体を区別することは可能であった。しかし、その差は小さく実用性があると断定するには困難であった。これらのことから、切り花カーネーションと同様に気孔の観察による倍数性の推定は、フローサイトメトリーを利用できない場面における二倍体と倍数体を区別する方法として活用できると考えられた。

本研究は、ポットカーネーションの倍数性を明らかにした初めての研究である。第 1 節で明らかにしたように切り花品種では供試した 304 品種のうち 297 品種が二倍体であると推定され、倍数体品種はほとんどなかった。一方で、本結果からポットカーネーションでは供試した 45 品種中 18 品種が倍数体であると推定され、多くの倍数体が存在することが明らかになった。

第 3 節 SSR マーカーによるポットカーネーションの多様性ならびに倍数性の検討

現在、我々は第 1 章の連鎖地図の充実を図るため、SSR マーカーを多数開発している。SSR は、2 塩基反復のものだけでも一般的な生物で数万から数十万塩基ごと

に一つ存在するといわれており、ゲノム上には数万から数十万個存在すると考えられる (井鷲, 2001)。そのため、3 塩基以上の反復を含めれば無数に存在すると考えられる。また、SSR は反復数の違いを多型として検出するが、その反復数は、品種間・系統間内といった近縁な個体間

Table 7. Estimated ploidy levels of the 45 potted carnation cultivars based on the results of FCM. Cultivars within each ploidy group are presented in order of their relative nuclear DNA contents*.

Cultivar name	Distributor (Abbreviation)	Relative nuclear DNA contents	Estimated ploidy level
Chiffon	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.89	2
Amore	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.93	2
Orange Duo	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.94	2
Ariel	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.94	2
My Fair Lady	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.95	2
Audrey	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.95	2
Winecat	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.95	2
Seti	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.95	2
Buryule	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.96	2
Annette	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.96	2
Waffle	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.96	2
Lahana	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.96	2
Limone	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.96	2
Madeleine	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.96	2
Lemonsoft	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.96	2
Polaris	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.97	2
Teatime	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.98	2
Unforgettable	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.98	2
Dreaming	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	0.98	2
Camille	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	0.98	2
Dear Mama Red	M&B Flora Co., Ltd (M&B)	0.99	2
Camille Pink	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	1.00	2
Mel	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	1.00	2
Summerdress	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	1.00	2
Piglet	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	1.01	2
Ascot	Snow Brand Seed Co., Ltd. (SN)	1.02	2
Can Can Scarlett	Sakata Seed Corporation (SA)	1.05	2
Ruby Bell	Sakata Seed Corporation (SA)	1.55	3
Baby Heart	M&B Flora Co., Ltd (M&B)	1.55	3
True Love	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	1.62	3
Bosco	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	1.96	4
Castel	P. Kooij & Zonen B.V. (KO)	2.02	4
A26091-01	P. Kooij & Zonen B.V. (KO)	2.07	4
Bambino	Sakata Seed Corporation (SA)	2.09	4
Rodin	Kirin Agribio Co., Ltd. (KI)	2.16	4
Karelia	Sakata Seed Corporation (SA)	2.19	4
Coppelia	Sakata Seed Corporation (SA)	2.19	4
Pretty Rose	Sakata Seed Corporation (SA)	2.22	4
Nina	Sakata Seed Corporation (SA)	2.22	4
A26200-01	P. Kooij & Zonen B.V. (KO)	2.27	4
Pink Surprise	P. Kooij & Zonen B.V. (KO)	2.28	4
A16241-04	P. Kooij & Zonen B.V. (KO)	2.28	4
Tula	P. Kooij & Zonen B.V. (KO)	2.28	4
A36237-01	P. Kooij & Zonen B.V. (KO)	2.31	4
Flamingo	P. Kooij & Zonen B.V. (KO)	2.35	4

*Relative values of fluorescence intensity for each cultivar are expressed relative to the fluorescence intensity of 'Francesco' (a diploid cut cultivar), which was normalized to 1.00.

でも多型を示すことから、現在、品種識別や親子鑑定に利用されている。第2節において、ポットカーネーションには三倍体や四倍体といった倍数体が存在し、その割合は切り花カーネーションに比べて極めて高いことが明らかになった。ポットカーネーションには第2節冒頭でも述べたように、花壇用の品種や野生種などの倍数性が異なる品種が交配に利用された可能性があることから、このような多くの倍数性品種が存在するのではないかと考えられた。そこで、本節では、SSR マーカーを利用してポットカーネーションの遺伝的背景について明らかにすることを試みた。さらに、SSR 解析によって生じる1遺伝子座あたりのアリル数は、全てヘテロ接合型であった場合、その個体の倍数性を反映していると考えられる。実際、オリーブの近縁種では、フローサイトメトリーとSSR マーカーによる倍数性の推定結果が一致したことが報告されている (Besnard et al., 2008)。そこで異なる倍数性を有する品種を用いてSSR マーカーによる倍数性の推定について検討した。

材料および方法

1. SSR 解析

ポットカーネーション 32 品種 (二倍体 15 品種, 三倍体 2 品種, 四倍体 15 品種) と Fig. 13 に示す切り花 12 品種 (スタンダード系 8 品種, スプレー系 4 品種) について Table 9 に示す CB004a, CB018a, CB026a (Kimura et al., 2009), CF001, CB008 (未公表) の 5 つのマーカーを用いて SSR 解析した。これらマーカーは第1章で作成した連鎖地図上で異なる連鎖群に存在することを確認している (Table 9)。PCR 法は Kimura et al. (2009) の報告に基づいて行った。それぞれのプライマーのうち、片側は蛍光ラベル (Fam, Vic) で標識し、もう片側には増幅安定のために pig tail (gtttctt) 配列 (Brownstein et al., 1996) を付加した。増幅は 94°C 5 分の熱変性後、94°C 1 分・55°C 1 分・72°C 2 分を 1 サイクルとしたサイクルを 35 回行い、72°C 7 分の最終伸長反応を行った。

Table 8. Relationship between the relative nuclear DNA contents and stomatal length in potted carnations.

Cultivars	Relative nuclear DNA contents ^z	Estimated ploidy levels	Stomatal length (μm)
Camille	0.98	2	21.2 \pm 0.9 ^y
Piglet	1.01	2	21.5 \pm 0.9
Mel	1.00	2	22.4 \pm 1.3
Camille Pink	1.00	2	24.1 \pm 0.6
True Love	1.62	3	28.5 \pm 0.6
Baby Heart	1.55	3	31.0 \pm 0.5
Pink Surprise	2.28	4	33.2 \pm 0.5
Karelia	2.19	4	35.2 \pm 0.7
Tula	2.28	4	36.6 \pm 0.5
Bosco	1.96	4	37.9 \pm 0.5

^z Relative values of fluorescence intensity for each cultivar are expressed relative to the fluorescence intensity of 'Francesco' (a diploid cut cultivar), which was normalized to 1.00.

^y Av. \pm S. E. (n = 10)

Table 9. Characteristics of the SSR loci.

SSR marker name	Forward and reverse primer sequences (5'-3')	Fluorescent chemical labeled with forward primer	Repeat motif	Linkage group ^z	PCR product size (bp) ^y	Publication
CF001	F: GAGAGAGAAGTAGAACATATTCG R: gtttcttTCTACTCTTTCACTTCGCCACT*	Fam	(AG) ₆ ACTG(AG) ₄	12	101	Unpublished
CB004a	F: GATTTGGGTGGGGCGTGA R: gtttcttCCATCCTCCTCTTCTATCTTCCCT	Fam	(AG) ₁₂	4	157	Kimura et al. (2009)
CB008	F: ACTACGAACAAAATGAAGGTGACTA R: gtttcttTTCCCCCTCATAAATGTC	Fam	(GTGA) ₆	8	139	Unpublished
CB018a	F: AGTGCTAAGAGTCTAAGGTTGTG R: gtttcttGTAATACAATGGCATAACTTCA	Vic	(AGAGAGT) ₆	9	110	Kimura et al. (2009)
CB026a	F: CCGAGTGAAGAGAGAGAG R: gtttcttGGAGGGAGTAGAAAATAGTGTG	Fam	(AG) ₃₁	3	175	Kimura et al. (2009)

^z The linkage groups were determined by Chapter I.

^y The PCR product size was determined from the sequences of the clone isolated from 'Francesco' or 'Barbara'.

^x The lower-case letters (gtttctt) represent the pigtail sequence (Brownstein et al., 1996).

PCR産物はABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて分離検出後、内部標準 400HD-ROX (Applied Biosystems) をもとに GeneScan software (Applied Biosystems) を用いて解析した。

2. 統計解析

二倍体のポットカーネーション15品種と二倍体の切り花カーネーション12品種を用いてUPGMA法 (unweighted pair-group method using arithmetic averages) により樹形図を作成した。樹形図の作成にはNTSYS-pc, ver 2.11 (Exeter Software, USA) を用いた。

結果

Table 9 に示した5つのSSRマーカーを用いて、第2節で倍数性の異なることが明らかになったポットカーネーション32品種を解析した。各マーカーから生じたアリル数は4~9であり、5つの遺伝子座において合計33アリルが検出された (Table 10)。フローサイトメトリーによる解析により二倍体と推定された品種は5つの遺伝子座において全て1もしくは2のアリル数であった (Table 10)。一方、フローサイトメトリーにより三倍体

Table 10. Genotypes of 32 potted cultivars at the five SSR loci (described in Table 9) and the ploidy levels estimated by means of SSR analysis. Allele size is given in bp.

Cultivar name (Distributor ^z)	Ploidy level estimated by FCM analysis	Ploidy level estimated by SSR analysis ^y	SSR locus (allele sizes, in bp)				
			CF001	CB004a	CB008	CB018a	CB026a
Chiffon (KI)	2	2	91/102	155/161	136/	98/112	170/
My Fair Lady (KI)	2	2	91/102	161/	145/	93/98	170/
Audrey (KI)	2	2	102/104	161/	136/162	112/	170/
Annette (SN)	2	2	102/104	161/	145/	93/98	170/
Polaris (KI)	2	2	91/102	155/161	145/162	93/112	170/
Teatime (SN)	2	2	102/	161/	145/162	93/98	170/
Unforgettable (SN)	2	2	102/	161/171	128/145	93/	170/
Camille (KI)	2	2	91/102	155/161	136/145	98/112	170/
Dear Mama Red (M&B)	2	2	91/104	161/	136/162	98/112	170/
Camille Pink (KI)	2	2	91/102	155/161	136/145	98/112	170/
Mel (SN)	2	2	102/	155/161	145/162	98/	170/
Summerdress (KI)	2	2	102/	161/	136/	93/	170/185
Piglet (SN)	2	2	102/	155/	145/	98/106	170/
Ascot (SN)	2	2	102/	161/	145/	98/112	170/185
Can Can Scarlett (SA)	2	2	91/	161/	145/162	112/	152/170
Baby Heart (M&B)	3	3	91/ <u>101/105</u> ^x	155/ <u>157/162</u>	136/162	93/98/112	170/187
True Love (KI)	3	3	91/102	155/ <u>157/161</u>	136/162	93/98	170/185
Bosco (KI)	4	4	91/102/ <u>103/104</u>	<u>159/161</u>	136/162	93/98	185/187
Castel (KO)	4	3	91/ <u>98/102</u>	161/ <u>162</u>	128/162	93/98	187/
A26091-01 (KO)	4	4	91/ <u>101/102/105</u>	151/ <u>161/184</u>	128/136/162	93/98	170/187/189
Bambino (SA)	4	3	91/ <u>101/105</u>	<u>157/161</u>	136/162	93/98	170/ <u>172/181</u>
Rodin (KI)	4	3	<u>98/101/102</u>	155/ <u>161/165</u>	128/162	98/	<u>164/185</u>
Karelia (SA)	4	3	91/102	<u>151/161</u>	136/162	93/98	170/187/189
Coppelia (SA)	4	4	91/	<u>151/157/161/162</u>	162/	93/98	170/187/189
Pretty Rose (SA)	4	3	91/102	<u>157/161</u>	136/162	93/98	170/187/189
Nina (SA)	4	2	91/102	<u>151/157</u>	136/145	93/	170/187
A26200-01 (KO)	4	4	91/98/102/104	<u>151/161/162</u>	128/145/162	93/98	<u>164/185</u>
Pink Surprise (KO)	4	3	91/ <u>101/105</u>	155/ <u>157/162</u>	136/162	93/98	170/181/189
A16241-04 (KO)	4	3	91/ <u>101</u>	<u>151/155/162</u>	128/136	98/	170/181/189
Tula (KO)	4	2	102/	<u>151/162</u>	128/136	93/	187/
A36237-01 (KO)	4	2	102/104	<u>162/184</u>	128/162	93/98	181/187
Flamingo (KO)	4	3	102/104	155/ <u>184</u>	128/136/162	93/98/ <u>99</u>	187/
Number of alleles			7	9	4	5	8

^z Abbreviations represent the distributors listed in Table 7.

^y Maximum number of alleles per locus.

^x Underlined characteristics represent unique genotypes in the potted polyploid cultivars.

や四倍体と推定された品種はいくつかの遺伝子座で3かそれ以上のアリル数を示した (Table 10). 例えば, 三倍体の ‘トゥルーラブ’ では, マーカー CB004a の遺伝子座において, 155, 157, 161 の3つのアリルを示した. また, 四倍体の ‘A26200-01’ ではマーカー CF001 の遺伝子座において 91, 98, 102, 104 の4つのアリルを示した.

各品種の1遺伝子座あたりの最大のアリル数から推定される倍数性を Table 10 に示した. すべての二倍体, 三倍体品種は第2節で明らかにしたフローサイトメトリーによる解析と SSR 解析による倍数性の推定結果が一致した. 一方, 四倍体では, 4品種はフローサイトメトリーによる解析と SSR 解析の推定が一致したが, 残りの11品種では異なる結果であった.

次に, 切り花カーネーションとポットカーネーションで検出されたアリルを, 二倍体のポットカーネーションと倍数体のポットカーネーションに分けて Table 11 にまとめた. 二倍体のポットカーネーション15品種のアリルの種類は5の遺伝子座において3~4種類であり, 二倍体の切り花カーネーション12品種のアリルの種類は1~7種類であった. 切り花カーネーションならびにポッ

トカーネーションに共通するアリルをまとめるとその数は5つの遺伝子座において1~3種類であった (Table 11). 二倍体のポットカーネーションと切り花カーネーションの遺伝的距離を推察するために, UPGMA 法により樹形図を作成した (Fig. 13). その結果, ポットカーネーションと切り花カーネーションはそれぞれ独立のグループを形成することは認められず, 樹形図上で混在していた. 一方, 切り花カーネーションは, 二つのグループに分かれた. 一つのグループには ‘コレノ’, ‘スーパーゴールド’, ‘ブライダルホワイト’ が含まれており, これらはいずれもスプレー系と呼ばれる品種群であった. もう一つのグループは, ‘バーバラ’ を除いて8品種全てがスタンダード系であった. ‘ホワイトシム’ と ‘ユーコンシム’ は5つの遺伝子座において全く同じ遺伝子型を有していたことから樹形図上でも同一のクラスターに分類された (Table 10, Fig. 13).

次に, 倍数体のポットカーネーションで検出されたアリルについて検討を行った. 三倍体2品種と四倍体15品種合計17品種で検出されたアリル数は4~8であった (Table 11). これをポットカーネーションの二倍体15品種と比較した場合, その数はCB008とCB018a

Table 11. Different carnation alleles identified using the five SSR loci in Table 7. Allele size is given in bp.

	SSR locus (allele sizes, in bp)				
	CF001	CB004a	CB008	CB018a	CB026a
15 potted diploid cultivars	<i>91</i>	155	128	<i>93</i>	<i>152</i>
	<i>102</i>	<i>161</i>	136	<i>98</i>	170
	104	171	<i>145</i>	106	<i>185</i>
			<i>162</i>	<i>112</i>	
No. of alleles	3	3	4	4	3
12 cut diploid cultivars	91	161	145	93	148
	102		162	98	152
				112	179
					181
					185
					187
No. of alleles	2	1	2	3	7
17 potted triploid and tetraploid cultivars	91	<u>151</u>	128	93	<u>164</u>
	<u>98</u>	155	136	98	170
	<u>101</u>	<u>157</u>	145	<u>99</u>	<u>172</u>
	102	<u>159</u>	162	112	181
	<u>103</u>	161			185
	104	<u>162</u>			187
	<u>105</u>	<u>165</u>			189
		<u>184</u>			
No. of alleles	7	8	4	4	7

Bold and italic values represent alleles that were found in both the cut and the potted diploid cultivars. Underlined values represent unique alleles in the potted polyloid cultivars.

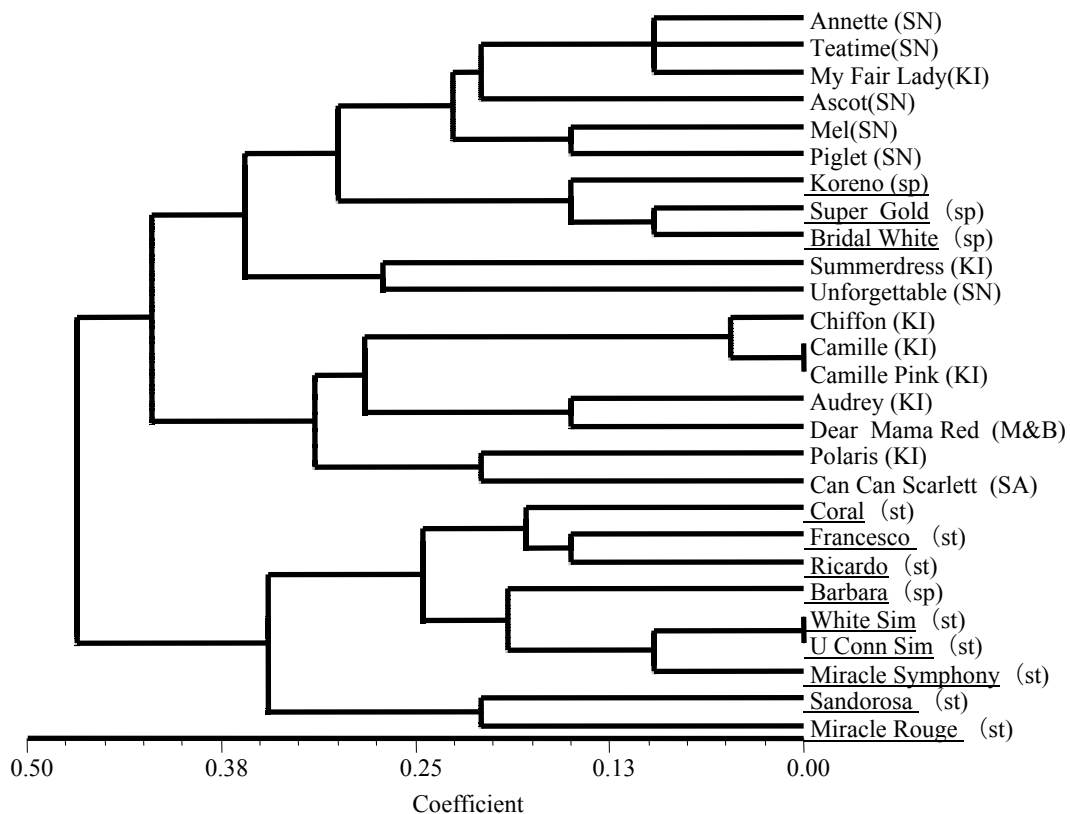


Fig. 13. Phenogram of the 27 genotypes of diploid pot and cut carnation cultivars. The phenogram was produced using the UPGMA method with J&C coefficients. Cut carnation cultivars are underlined. ST, standard type; SP, spray type.

においては同じであったが、CF001, CB004a, CB026a においては2倍以上であった。また、倍数体に特異的に認められるアレル数については、CF001, CB004a, CB008, CB018a, CB026aの各遺伝子座において、それぞれ4, 6, 0, 1, 2であった。特にCB004aの遺伝子座においてはほとんどが倍数体特異的なアレルであった (Table 11)。

考 察

第1節で明らかにしたように切り花カーネーションでは供試した304品種のうち297品種が二倍体であると推定され、倍数体品種はわずかであった。一方、第2節の結果から、ポットカーネーションでは供試した45品種中18品種が倍数体であると推定され、多くの倍数体が存在することが明らかになった。切り花カーネーションでは、コルヒチン処理により人為的に倍加した四倍体系統は、花径が大きく、花弁数が多く、葉重、莖径が大きくなっていたが、生育遅延や開花遅延により生産性が著しく減少した (筧・山口, 1985; 山口・筧 1985)。しかし、ポットカーネーションの倍数性品種も第1節で明らかに

した切り花カーネーションの倍数性品種と同様に、花径は二倍体品種より1cm程度小さい品種が多く、10月定植の開花期はむしろ早い傾向が認められた (駒形, 私信)。また、四倍体品種の中で‘ロディン’、‘フラミンゴ’は、花の中心部に‘目’を持つ特徴的な花色をしている (Fig. 14)。このような花色に‘目’を持つ品種は、供試した二倍体、三倍体品種には存在しない。また、‘ロディン’と‘カステル’の花色は、暗緋赤色、暗赤紫色であり (Fig. 14)、これらは野生種のもつ花色に類似していた。

さらにSSR解析の結果から、倍数性品種には二倍体のポットカーネーションや切り花カーネーションに存在しない特異的なアレルが多数存在することが明らかになった (Table 11)。ダイアンサス属野生種には二倍体、



Fig. 14. Photographs of tetraploid cultivars with distinctive flower colors. Left: ‘Castel’ ; center: ‘Bosco’ ; right ‘Flamingo’ .

四倍体、六倍体が存在し、種間交雑も容易に行える（伊藤ら, 1994）。これらのことから、ポットカーネーションの倍数性品種はこれら様々な倍数性を有する野生種との交雑により、多様な倍数性を有する品種が誕生したと考えられた。

また、カーネーションには、ボーダーカーネーションと呼ばれる花壇用の品種も存在し、これらの形態的特徴はむしろ野生種に近い（八代, 2002）。初期のポットカーネーションの育成には、これら花壇用の品種が利用されていたとの記述が見られることから（八代, 2002, 2003）、倍数性は不明であるが、これらボーダーカーネーションの交雑による影響も考えられた。このように、ポットカーネーションには多数の倍数性品種が存在し、その育種には野生種等の利用が推察された。この理由として、切り花カーネーションの育種では生産性や茎の硬さ等の品質も重視されるのに対して、ポットカーネーションは、植物体そのものを観賞用として用いるため、野生種との交雑による茎の軟弱化、側枝の多発等の品質への影響が切り花カーネーションに比べ少ないと考えられる。そのため、野生種等の素材がもたらす新規の花型、花色等が好まれ、倍数体品種が多く存在するのではないかと考えられた。また、二倍体品種でも‘アンフォゲッタブル’のように、草姿・花型の特徴から明らかに野生種との交雑が推察される品種も存在し、倍数性品種に限らずポットカーネーション育種における野生種の積極的な利用が示唆された。

UPGMA 法により作成した樹形図において、二倍体の切り花カーネーションと二倍体のポットカーネーションは独立のクラスターを形成することはなく混在していた（Fig. 13）。一方、切り花カーネーションの中では、スプレー系とスタンダード系は‘バーバラ’を除いて二つのグループに分かれた（Fig. 13）。Kimura et al. (2009) は、切り花カーネーションの品種識別を目的にスタンダード系 23 品種とスプレー系 18 品種を 13 の SSR マーカーを用いて遺伝子型を解析した。その結果、スタンダード系とスプレー系は樹形図上で混在しており、遺伝的背景に違いは認められなかったとしている。これは、本研究と異なる結果を示唆している。しかし、各品種の樹形図上の相対的な位置は Kimura et al. (2009) の報告と一致していることから、本研究においてスプレー系とスタンダード系が二つの集団に分かれたのは、マーカー数や品種数が少ないためであり、マーカー数や品種数を増やすことで Kimura et al. (2009) の報告と同様、スプレー系とスタンダード系は遺伝的に混在するものと考えられた。こ

れは、スプレー系はもともとスタンダード系であるシム系品種の枝変わりから生じたとの記述（Vainstein et al., 1991；細谷, 1999）とも一致する。以上のことから、二倍体のポットカーネーションについては、スタンダード系やスプレー系を含む切り花カーネーションと遺伝的背景に違いは認められず、二倍体のポットカーネーションの育成に、切り花カーネーションが関与していることが推察された。

本研究において、切り花カーネーションで開発した 5 種類の SSR マーカーを用いることで、枝変わり品種を除いた倍数性の異なる品種を含むポットカーネーション 30 品種と切り花カーネーション 10 品種を識別することができた（Table 10, Fig. 13）。このことから今回供試した 5 種類のマーカーが切り花カーネーション、ポットカーネーションどちらのタイプの品種識別にも有効であることが明らかになった。

SSR マーカーによる倍数性の推定について、四倍体の 15 品種のうち 4 品種のみがフローサイトメトリーによる解析と SSR 解析による倍数性が一致した（Table 10）。このことは供試した 5 つのマーカーでは、1 遺伝子座あたりの最大のアリル数で倍数性を推定することは困難であるということを示している。しかしながら、CB004a マーカーは全ての倍数性品種で倍数性特異的アリルを検出した（Table 10）。このような多型性の高いマーカーを増やすことで、SSR 解析でももう少し精度よく倍数性を推定できるのではないかと考えている。

以上のように、ポットカーネーションには多くの三倍体や四倍体といった倍数体が存在し、野生種等の倍数性の異なる素材の関与が示唆された。本研究で明らかにした倍数性は交雑の可否や起源を推定する上で参考になり、DNA マーカー解析は遺伝的関係を推察する上で有力なツールとなる。今後、こうした情報がポットカーネーションや切り花カーネーション育成において少しでも役に立つことを期待している。

総合考察

カーネーションでは、近年、輸入の急増、生産者の高齢化に伴う国内生産の低下が顕著になっており大きな問題である。育種を海外の種苗会社に依存する現状では、輸入品との差別化を図ることができず、日本オリジナル品種の開発が急務になっている。また、花きは品種の変遷が激しいことから、新たなニーズに対応した新品種を短期間で開発する技術が必要である。そこで、本研究で

得られた成果をもとに、近年、育種の効率化を図る上で重要な技術である DNA マーカーのカーネーション育種における利用の可能性について考察した。

育種の効率化を図るために DNA マーカーを利用する試みはイネ、ムギ、ダイズ等の主要作物をはじめとして多数の品目で行われている (Staub et al., 1996)。しかしながら、カーネーションを含む花きにおいては、バラの黒星病抵抗性育種への利用 (Debener et al., 2003) が知られているのみであり、DNA マーカーを育種へ利用した例は世界的に見ても少ない (Arus, 2000)。その理由として、花きの種類は多品目にわたり、品目ごとの研究勢力が小さいこと、主要作物に比べ有用形質の基礎研究や育種に関する研究蓄積が少ないこと、現在の花き生産主要品目はキク、バラ、カーネーションを含めて種間交雑に由来する栄養繁殖性の品目が多いことなどが挙げられる (小野崎, 2005)。

本研究では、第1章において萎凋細菌病抵抗性育種をもとに、カーネーションにおいて DNA マーカーによる育種選抜 (MAS) が可能であることを実証した。第1章第1節において、形質に連鎖したマーカーを取得する上で基盤となる連鎖地図を作成した。萎凋細菌病抵抗性の分離集団を利用して作成した連鎖地図は全長 605.0cM、137 の RAPD マーカーと 9 の SSR マーカーが 124 座に座乗し、16 の連鎖群から構成される。これは、カーネーションを含むダイアンサス属において初めての連鎖地図の報告である。第1章第2節において、作成した連鎖地図をもとに萎凋細菌病抵抗性の QTL 解析を行った。その結果、*D. capitatus* の有する萎凋細菌病の抵抗性には第6連鎖群に座乗する一つの作用の大きな QTL と第2、第5連鎖群に座乗する少なくとも二つの作用の小さな QTL が関与していることが明らかになった。萎凋細菌病菌のように導管閉塞により上部茎葉への水分供給を止めることで萎凋を引き起こす細菌病菌には、ナス科植物青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、トウモロコシ萎凋細菌病菌 (*Erwinia stewartii*) などが挙げられる (露無・高橋, 1998)。トマト青枯病には5つのレースと6つの生物型 (biovar) が知られており (Carneille et al., 2006)、レースごとに抵抗性の QTL 解析が試みられている (Thoquet et al., 1996; Mangin et al., 1999; Carneille et al., 2006)。また、イネの白葉枯病については、多数のレースが知られており、抵抗性に関与する遺伝子がこれまでに少なくとも 27 種類単離されている (Xiang et al., 2006; Iyer-Pascuzzi et al., 2008)。カーネーション萎凋細菌病については、こ

れまで全国から 10 菌株を収集し実験に供したが、供試した菌株におけるレース分化は認められていない。今後引き続きレース分化に関して検討を行う必要があると考えられる。また、DNA マーカーによる連鎖地図を作成することの目的の一つに、地図を利用した遺伝子の単離 (マップベースクローニング) が挙げられる。将来的には、抵抗性遺伝子近傍のマーカーの高密度化ならびに既知の抵抗性遺伝子の情報等を利用して原因遺伝子が特定されることが期待される。

第1章第3節において、萎凋細菌病抵抗性の QTL 近傍に存在するマーカーが実際の抵抗性育種に利用可能か検討を行った。その結果、第6連鎖群に存在する作用の大きな QTL に連鎖したマーカー STS-WG44 を用いることで、実際の育種集団の中から強度の抵抗性を有する系統を含む平均発病率の低い集団へ絞り込みが可能であり、カーネーションにおいて MAS が可能であることを明らかにした。実際に、2004 年度交配の選抜から STS-WG44 による選抜を実施している。これまでに、*D. capitatus* にカーネーションを 5 回戻し交雑した BC₅ 世代の中から赤色の 6AZ37-1, 6AZ37-2 を選抜し、つくば 4 号、つくば 5 号の系統名を付与した。現在、生産性、形態的特性、花持ち性等について調査を継続しており、優れた特性が明らかになれば種苗登録を行う予定である。これらの品種は、実用品種として素材そのものが利用できるだけでなく、抵抗性素材として DNA マーカーとともに育種に利用されることで、より大きく国内カーネーションの安定生産に貢献できると考えられる。

これまでに萎凋細菌病抵抗性 (第1章第1節)、花色 (第1章第4節) の QTL 以外に一重、八重の花型を支配する遺伝子が第16連鎖群にマッピングされている (小野崎ら, 2006)。連鎖地図は、様々な形質がマッピングされ、形質相互の連鎖関係が明らかになることで、その価値が飛躍的に高まる。DNA マーカーは、育種や検定を行うのに多大な労力と長い時間を必要とする形質においてより重要である。今後、カーネーションの重要形質である花持ち性、病害抵抗性を中心にマッピングを進めていき、複数形質を同時に選抜できる技術を開発していく予定である。また、今後のマーカー開発において、野生種集団においても利用でき、品種間でも利用できるなど汎用性の高い SSR マーカーの開発の重要性はますます高まると考えられる。そのため、現在、SSR のゲノム濃縮ライブラリーを作成し、多数の SSR マーカーの開発ならびに SSR マーカーによる連鎖地図の作成を進めている。これらが完成することで、カーネーションにお

けるゲノム研究基盤が構築されることが期待される。

第2章において、フローサイトメトリーを用いて切り花カーネーションとポットカーネーションの倍数性を明らかにした。切り花カーネーションについては304品種中297品種が二倍体であり、従来の報告同様ほとんどが二倍体であることが明らかになった。一方、ポットカーネーションについては45品種中18品種が倍数体であり、その割合は切り花カーネーションに比べると高かった。今回、明らかになった倍数体は、切り花カーネーションにおいてもポットカーネーションにおいても形態的特徴から野生種との交雑が示唆された。これまでにダイアンサス属野生種を利用した育種の取り組みは、*D. capitatus* を利用した我々の取り組みの他に、国内では、ヒメナデシコ (*D. deltoids* L.)、ハマナデシコ (*D. japonicus* Thunb.)、ホタルナデシコ (*D. knappii* Asch. et Kanitz ex Borb.)、エゾカワラナデシコ (*D. superbus* L.) (神田, 1992)、イセナデシコ (*Dianthus* × *isensis* Hirahata et Kitamura) やハマナデシコ (Nimura et al., 2003, 2006a, 2006b, 2006c, 2008) を利用した試みが報告されている。野生種の中には、ハマナデシコのもつ耐暑性 (伊藤ら, 1994) やイセナデシコのもつ特徴的な花型など、現代のカーネーションには存在しない優れた特性をもつ系統が多数存在する (Nimura et al., 2006b)。現在でも、ソネット系やジブシー系と呼ばれる野生種の特性を活かした品種群がいくつか存在するが、長日開花性や側枝の多発等営利栽培上不利な劣悪形質を排除するには至っていない。そのため、野生種の優れた特性のみを栽培品種に導入するには長い年月が必要である。実際、第1章で示した萎凋細菌病抵抗性育種については、抵抗性の検定による選抜と戻し交雑を5回繰り返すことでようやく *D. capitatus* のもつ強い抵抗性だけを有しその他は実用形質に近い系統を育成することができた。このような野生種からの戻し交雑を行う上で威力を発揮するのが DNA マーカーである。目的の形質に連鎖する DNA マーカーが効率よく開発できれば、目的の形質に関与する領域のみをもつ個体を正確に選抜でき、戻し交雑の回数を減らし、育種年限を短縮できる。DNA マーカーを利用することで、カーネーションにおいても野生種をより積極的かつ効率的に利用できる可能性が開かれると考えられる。

第2章第3節において、SSR マーカーを用いてポットカーネーションの遺伝子型の多様性について解析した。その結果、ポットカーネーションの倍数性品種には、二倍体の切り花カーネーションやポットカーネーションに

は存在しない倍数体品種特異的なアレルがいくつか認められた。今後、広範な野生種ならびに育種素材の遺伝子型を解析することで、これら倍数体品種特異的なアレルの由来について推察可能ではないかと考えられる。このように DNA マーカーを利用することで、形態的特徴の違いを客観的に数値で示すことができ、さらにクラスター解析などにより、遺伝的近縁度を推定することで、品種間、種間相互の遺伝的距離についても推察できる (Rout and Mohapatra, 2006)。そのため、DNA マーカーの利用は適切な交配母本の選定や交配集団の遺伝的偏りを推察することを可能にすると考えられる (Rajapakse, 2003; Fu et al., 2008)。

第2章第3節において、SSR マーカーを利用してポットカーネーション30品種とポットカーネーション10品種を識別することができた。近年、カーネーションでは、海外で無断増殖された苗から生産された切り花が不法に大量に輸入されることが問題になっている (鈴木, 2008)。現状では、比較栽培試験を行い、登録品種との同一性を確認する必要があることから時間がかかるため、有効な差し止め手段になっていない。そのため、水際で差し止めるにあたり、迅速に結果を判定できる DNA マーカーによる品種判別技術が望まれ、品種識別用の DNA マーカーの開発が行われきた (Smulders et al., 2000, 2003; Kimura et al., 2009)。近年、ヨーロッパでは Applas 社において品種識別システムが開発され (鈴木, 2008)、国内でも農林水産省の補助事業により (財) かずさ DNA 研究所による技術開発が進められている。今後、我々が開発していくマーカーについてもその利用が期待される。

以上、本研究は萎凋細菌病抵抗性育種を例に連鎖地図の作成、QTL 解析を行い、カーネーションにおいて DNA マーカーを利用した選抜育種が可能であることを実証した。また、カーネーションの倍数性について網羅的に明らかにし、SSR マーカーを利用して遺伝的多様性について推察した。これらの成果は、生産性等の複雑形質の遺伝解析、野生種からの戻し交雑、遺伝的多様性の推定、品種識別等様々なカーネーション育種場面に応用でき、カーネーション育種の効率化に貢献できるものと考察した。

摘 要

本研究は、カーネーション育種における DNA マーカーの利用可能性ならびにカーネーションの倍数性や育種的

背景を明らかにするために行われたものである。

第1章では、カーネーション萎凋細菌病抵抗性育種のさらなる効率化を図るため、萎凋細菌病抵抗性の‘農1号’ならびに罹病性の‘プリティファボーレ’を交雑して得られた抵抗性分離集団134系統を用いて、RAPDおよびSSRマーカーによるカーネーションで初めての連鎖地図を作成した。作成した連鎖地図では137のRAPDマーカーおよび9のSSRマーカーが124遺伝子座に位置付けられた。これらのマーカーは16連鎖群に分類され、連鎖地図の全長は605.0cM、遺伝子座間の平均距離4.9cMであった。さらに8回の萎凋細菌病抵抗性検定の結果を用いてQTL解析を行った結果、作用の大きなQTLは第6連鎖群に座乗し、LOD値23.46、寄与率60.5%を示した。さらにLOD値2.32、2.87の作用の小さなQTLのピークが第2、5連鎖群にそれぞれ検出された。このことからカーネーション萎凋細菌病抵抗性には一つの作用の大きなQTLと少なくとも二つの作用の小さなQTLが関与していることが明らかになった。

次に、検出されたQTL近傍のマーカーが実際の抵抗性育種に利用可能か検討を行った。これまでに浸根接種による抵抗性検定で選抜してきた抵抗性戻し交雑系統におけるマーカーの有無を調査した結果、作用の大きなQTLに連鎖したマーカーSTS-WG44は全ての系統が保有していた。一方、作用の小さい2つのQTL近傍のマーカーであるOQ12とSTS-WB66は戻し交雑を進めた系統で保有する割合は低下した。このことから、STS-WG44が抵抗性個体を選抜する上で有効であることが明らかになった。実際の育種集団を用いて、STS-WG44の有無と発病率を調査した結果、STS-WG44の有無による発病率の差は62.6%と大きく、発病率が20%以下の強抵抗性系統のほとんどはSTS-WG44を保有していた。この結果、カーネーション萎凋細菌病抵抗性育種においてSTS-WG44を選抜マーカーとして用いることで、強度の抵抗性を有する系統を含む平均発病率の低い集団へ絞込みが可能であり、DNAマーカーによる選抜育種が可能であることを明らかにした。

花きの育種において、花色は重要な形質である。作成した連鎖地図を利用して、花卉のアントシアニンを抽出し、花色の濃淡に関するQTL解析を行った。連鎖地図作成に使用した分離集団の花弁におけるアントシアニン含量の頻度分布は、0.5mg/g F.W.以下の系統が最も多く、アントシアニン含量の増加に伴い、その分布は低下した。この結果を用いてQTL解析を行った結果、第6、9連鎖群にそれぞれ寄与率21.6%、15.0%、LOD値6.33、4.15

の二つのQTLが検出された。

第2章では、花き研究所で保存しているカーネーションの切り花カーネーション304品種ならびにポットカーネーション45品種についてフローサイトメトリーによる倍数性の推定を行った。実際の倍数性については、根端細胞の染色体数を観察することで確認した。供試した切り花カーネーション304品種のうち、297品種は二倍体と推定され、‘スカーレットベル’、‘ウィゴ’、‘スパイラルビビッドレッド’の3品種が三倍体、‘サレヤ’が四倍体であることが明らかになった。‘ピンクローランド’、‘楊貴妃’、‘ソネットセラー’の3品種は四倍体であると推定された。ポットカーネーション45品種については、27品種が二倍体、3品種が三倍体、15品種が四倍体と推察された。このうち根端細胞の染色体観察から‘カミーユ’は二倍体、‘ベイビーハート’は三倍体、‘トゥーラ’は四倍体であることを確認した。これらの結果、ポットカーネーションには多数の倍数体品種が存在することが示された。

気孔の長径を測定することで、簡便に倍数性を推定することが可能か明らかにするために、倍数性の異なる切り花カーネーション12品種とポットカーネーション10品種の気孔の長径を測定した。その結果、気孔の長径を測定することで、二倍体と倍数体を区別することは可能であったが、三倍体と四倍体を区別することはできなかった。

倍数性の異なるポットカーネーション32品種について、5種類のSSRマーカーを用いて倍数性ならびに遺伝的多様性を解析した。各遺伝子座に検出されたアリル数から倍数性を推定した結果、二倍体と三倍体についてはフローサイトメトリーの結果と一致した。一方、四倍体については5種類のSSRマーカーのみによる倍数性の判別は困難であった。5つのSSR座におけるアリルの多様性について評価した結果、二倍体のポットカーネーションでは、各アリルとも3~4種類と少なく、二倍体の切り花カーネーションと共通するアリルが多かった。一方、倍数体のポットカーネーションには倍数体品種特異のアリルが複数存在し、アリル数も4~8種類と多かった。このことから二倍体ポットカーネーションは切り花カーネーションと遺伝的に近く、倍数体ポットカーネーションは野生種などの切り花カーネーション以外の育種素材から育成された可能性があることが示唆された。また、今回使用した5種類のSSRマーカーで枝変わり品種以外の倍数性の異なる品種を含む30品種を識別することが可能であった。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始懇切丁寧な御指導を頂きました神戸大学大学院農学研究科 稲垣 昇教授に謹んで感謝の意を表します。また、有意義な御助言と御校閲を頂きました神戸大学大学院農学研究科 石井尊生教授、同 三十尾修司教授、同 金地通生准教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたりまして、実験の遂行からとりまとめに至るまで終始丁寧な御指導とご鞭撻を頂きました花き研究所新形質花き開発研究チーム上席研究員 小野崎 隆博士に深くお礼申し上げます。花き研究所研究管理監(現 農林水産省農林水産技術会議事務局研究調整官) 柴田道夫博士、同新形質花き開発研究チーム長 大宮あけみ博士、果樹研究所果樹ゲノム研究チーム長 山本俊哉博士、種苗管理センター 木村鉄也博士、神戸大学農学研究科 宇野雄一博士には御指導と丁寧な御助言を頂き、心より感謝致します。

本研究に依頼研究員として多大なるご協力頂きました熊本県 工藤陽史氏、藤田祐一氏、栃木県 船山卓也氏、吉成 強氏、千葉県 種谷光泰氏、大分県 渡邊英城氏、宮崎県 落合幸昭氏、宮城県 吉村正久氏には心より感謝いたします。

実験の遂行にあたりご協力頂きました花き研究所新形質花き開発研究チーム 棚瀬幸司博士、佐瀬由美子女史、同花き品質解析研究チーム 中山真義博士、谷川奈津女史、同生育開花調節研究チーム 住友克彦博士並びに多くの花き研究所職員および契約職員の皆様には心より感謝いたします。

また、第2章において快くポットカーネーションを御提供頂きました茨城県農業総合センター園芸研究所 駒形智幸氏およびカネコ種苗(株) 北爪伸英氏に感謝いたします。

引用文献

- Abe, H., M. Nakano, A. Nakatsuka, M. Nakayama, M. Koshioka and M. Yamagishi. 2002. Genetic analysis of floral anthocyanin pigmentation traits in Asiatic hybrid lily using molecular linkage maps. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1175-1182.
- 安東郁男. 2005. 稲育種における DNA マーカー利用の現状と展望. *農林水産研究ジャーナル*. 28: 10-15.
- Arumuganathan, K. and E. D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.
- Arus, P. 2000. Molecular markers for ornamental breeding. *Acta Hort.* 508: 91-98.
- Besnard, G., C. Garcia-Verdugo, R. Rubio de casas, U. A. Treier, N. Galland and P. Vargas. 2008. Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analysis. *Annals of Botany* 101: 25-30.
- Bloor, S. J. 1998. A macrocyclic anthocyanin from red/mauve carnation flowers. *Phytochemistry* 49: 225-228.
- Brownstein, M. J., J. D. Carpten and J. R. Smith. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20: 1004-1010.
- Carmeille, A. C., Caranta, J. Dintinger, P. Prior, J. Luisetti and P. Besse. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113: 110-121.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- De Benedetti, L., G. Burchi, S. Bruna, A. Mercuri and T. Schiva. 2003. Use of molecular markers to improve cut flowers longevity in carnation. *Acta Hort.* 624: 343-348.
- Debener, T. 2001. Molecular tools for modern ornamental plant breeding and selection. *Acta Hort.* 552: 121-127.
- Debener, T., M. Linde and A. Dohm. 2004. The utilization of molecular tools for rose breeding and genetics. *Acta Hort.* 630: 29-42.
- Debener, T., B. V. Malek, L. Mattiesch and H. Kaufmann. 2001. Marker assisted selection for blackspot resistance in roses. *Acta Hort.* 547: 349-352.
- Debener, T., B. V. Malek, M. Schreiber and R. Drewes- Alvarez. 2003. Marker assisted background selection for the introgression of black spot resistance into cultivated roses. *Europ. J. Hort. Sci.* 68: 245-252.
- Debener, T. and L. Mattiesch. 1999. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 891-899.
- Dedio, J., H. Saedler and G. Forkmann. 1995. Molecular cloning of the flavanone 3 β -hydroxylase gene (FHT) from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and analysis of stable and unstable

- FHT mutants. *Theor. Appl. Genet.* 90: 611-617.
- Dunemann, F., R. Kahnau and I. Stange. 1999. Analysis of complex leaf and flower characters in *Rhododendron* using a molecular linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1146-1155.
- Figueira, A., J. Janick and P. Goldsbrough. 1992. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 673-677.
- Forkmann, G., J. Dedio, J. Henkel, B. W. Min and M. Wassenegger. 1995. Genetics, biosynthesis and molecular biology of flower colour of *Dianthus caryophyllus* (carnation). *Acta Hort.* 420: 29-31.
- Fu, X., G. Ning, L. Gao and M. Bao. 2008. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. *Sci. Hortic.* 117: 263-270.
- Gatt, M. K., K. R. W. Hammett, K. R. Markham and B. G. Murray. 1998. Yellow pinks: interspecific hybridization between *Dianthus plumarius* and related species with yellow flowers. *Sci. Hortic.* 77: 207-218.
- González Castañón, M. L. and M. B. Schroeder. 2002. Rapid determination of nuclear DNA amounts and ploidy levels in germplasm of *Asparagus* using flow cytometry. *Acta Hort.* 589: 193-199.
- Haanstra, J. P. W., C. Wye, H. Verbakel, F. Meijer-Dekens, P. van den Berg, P. Odinet, A. W. van Heusden, S. Tanksley, P. Lindhout and J. Peleman. 1999. An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* × *L. pennellii* F₂ populations. *Theor. Appl. Genet.* 99: 254-271.
- Hamilton, R. F. L. and S. M. Walters. 1989. *Dianthus* Linnaeus. p. 185-191. In: S. M. Walters, J. C. M. Alexander, A. Brady, C. D. Brickell, J. Cullen, P. S. Green, V. H. Heywood, V. A. Matthews, N. K. B. Robson, P. F. Yeo and S. G. Knees (eds.). *The European Garden Flora vol. III* Cambridge University Press, Cambridge.
- Han, T. H., H. J. van Eck, M. J. De Jeu and E. Jacobsen. 2002. Mapping of quantitative trait loci involved in ornamental traits in *Astroemeria*. *HortScience* 37: 585-592.
- 原田久也. 2005. RAPD マーカー. p. 676. 日本育種学会編. 植物育種学辞典. 培風館. 東京.
- Harushima, Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiya, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush and T. Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics* 148: 479-494.
- Hauge, B. M., S. M. Hanley, S. Cartinhour, J. M. Cherry, H. M. Goodman, M. Koornneef, P. Stam, C. Chang, S. Kempin, L. Medrano and E. M. Meyerowitz. 1993. An integrated genetic/RFLP map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant J.* 3: 745-754.
- 林 角郎. 1995. エンゼル系カーネーション. p. 19-22. 切り花栽培の新技术 改訂 宿根草 上巻. 農耕と園芸編. 誠文堂新光社. 東京.
- 細谷宗令. 1999. カーネーションの品種の変遷と動向 [1]. 農及園. 74: 559-566.
- 井鷲祐司. 2001. マイクロサテライトマーカーで探る樹木の更新過程. p. 59-84. 種生物学会編. 森の分子生態学. 文一総合出版. 東京.
- 伊藤秋夫・武田恭明・塚本洋太郎・富野耕治. 1994. ナデシコ属. p. 1671-1678. 塚本洋太郎編. 園芸植物大事典. 小学館. 東京.
- Iyer-Pascuzzi, A. S., H. Jiang, L. Huang and S. R. McCouch. 2008. Genetic and functional characterization of the rice bacterial blight disease resistance gene xa5. *Phytopathology* 98: 289-295.
- 寛 三男. 1972. カーネーションの組織培養に関する研究Ⅲ. 温室カーネーションの染色体数. 広島農業短期大学研究報告. 4: 179-184.
- 寛 三男・山口雅篤. 1985. カーネーションの倍数性育種に関する研究 (第2報) 四倍体カーネーションの栽培的・形態的特性. 園学要旨. 昭60秋: 356-357.
- 神田美枝枝. 1992. カーネーションとダイアンサス属植物の雑種育成における胚珠培養. 園学雑. 61 (別2): 464-465.
- Kimura, T., M. Yagi, C. Nishitani, T. Onozaki, Y. Ban and T. Yamamoto. 2009. Development of SSR markers in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78: 115-123.
- 小西国義・武田恭明. 1994. カーネーション. P. 483-485. 塚本洋太郎編. 園芸植物大事典. 小学館. 東京.
- Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- Lander, E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Larsen, E. S., M. R. Alfenito, W. R. Briggs and V. Walbot. 2003. A carnation anthocyanin mutant is complemented by the

- glutathione S-transferases encoded by maize Bz2 and petunia An9. *Plant Cell Rep.* 21: 900-904.
- Lashermes, P., M. C. Combes, N. S. Prakash, P. Trouslot, M. Lorieux and A. Charrier. 2001. Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. *Genome* 44: 589-596.
- Li, Y., R. Guan, Z. Liu, Y. Ma, L. Wang, L. Li, F. Lin, W. Luan, P. Chen, Z. Yan, Y. Guan, L. Zhu, X. Ning, M. J. M. Smulders, W. Li, R. Piao, Y. Cui, Z. Yu, M. Guan, R. Chang, A. Hou, A. Shi, B. Zhang, S. Zhu and L. Qiu. 2008. Genetic structure and diversity of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) landraces in China. *Theor. Appl. Genet.* 117: 857-871.
- Lincoln, S. E., M. J. Daly and E. S. Lander. 1993. Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL version 1.1: a tutorial and reference manual, 2nd edn. A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical report. Whitehead Institute, Cambridge, MA, USA.
- Malek, B. V., W. E. Weber and T. Debener. 2000. Identification of molecular markers linked to *Rdr1*, a gene conferring resistance to blackspot in roses. *Theor. Appl. Genet.* 101: 977-983.
- Mangin, B., P. Thoquet, J. Olivier and N. H. Grimsley. 1999. Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* 151: 1165-1172.
- Mato, M., T. Onozaki, Y. Ozeki, D. Higeta, Y. Itoh, Y. Yoshimoto, H. Ikeda, H. Yoshida and M. Shibata. 2000. Flavonoid biosynthesis in white-flowered Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Sci. Hortic.* 84: 333-347.
- Mato, M., T. Onozaki, Y. Ozeki, D. Higeta, Y. Itoh, T. Hisamatsu, H. Yoshida and M. Shibata. 2001. Flavonoid biosynthesis in pink-flowered cultivars derived from 'William Sim' carnation (*Dianthus caryophyllus*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70: 315-319.
- Mehlquist, G. A. L. and T. A. Geissman. 1947. Inheritance in the carnation, *Dianthus caryophyllus*. III. Inheritance of flower colour. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 34: 39-75.
- 三柴啓一郎・三位正洋. 1998. フローサイトメトリー自由自在 植物研究への応用. *細胞工学.* 17: 609-615.
- Morgante, M. and A. M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Moyal-Bem Zvi, M. and A. Vainstein. 2007. III. 2 carnation. p. 241-252. In: E.C. Pua and M. R. Davey (eds). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 61. *Transgenic crops* IV Springer, Berlin.
- Murray, M. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Nakayama, M., M. Koshioka, H. Yoshida, Y. Kan, Y. Fukui, A. Koike and M. Yamaguchi. 2000. Cyclic malyl anthocyanins in *Dianthus caryophyllus*. *Phytochemistry* 55: 937-939.
- Nimura, M., J. Kato, H. Horaguchi, M. Mii, K. Sakai and T. Katoh. 2006a. Fertile amphidiploids induction by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. *Breed. Sci.* 56: 303-310.
- Nimura, M., J. Kato and M. Mii. 2006b. Interspecific hybrid production by reciprocal crosses between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus* × *isensis* Hirahata et Kitamura. *J. Hort. Sci. Biotech.* 81: 995-1001.
- Nimura, M., J. Kato, M. Mii and T. Katoh. 2006c. Amphidiploids produced by natural chromosome-doubling in interspecific hybrids between *Dianthus* × *isensis* Hirahata et Kitamura and *D. japonicus* Thunb. *J. Hort. Sci. Biotech.* 81: 72-77.
- Nimura, M., J. Kato, M. Mii and K. Morioka. 2003. Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1164-1170.
- Nimura, M., J. Kato, M. Mii and K. Ohishi. 2008. Cross-compatibility and the polyploidy of progenies in reciprocal backcrosses between diploid carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and its amphidiploids with *Dianthus japonicus* Thunb. *Sci. Hortic.* 115: 183-189.
- 小野崎 隆. 2005. 花き育種における DNA マーカー研究の現状と展望. *農及園.* 80: 23-31.
- Onozaki, T. 2006. Carnation. p. 223-230. In: Japan. Soc. Hort. Sci. (eds.). *Horticulture in Japan 2006*. Shoukadoh Publication, Dept. of Publishing of Nakanishi Printing Co., Ltd., Kyoto.
- 小野崎 隆・池田 広・柴田道夫・谷川奈津・八木雅史・山口 隆・天野正之. 2006a. 花持ち性の優れるカーネーション農林 1号 'ミラクルルージュ' および同 2号 'ミラクルシンフォニー' の育成経過とその特性. *花き研報.* 5: 1-16.
- Onozaki, T., H. Ikeda, T. Yamaguchi and M. Himeno. 1998. Introduction of bacterial wilt (*Pseudomonas caryophylli*) resistance in *Dianthus* wild species to carnation. *Acta Hort.* 454: 127-132.

- 小野崎 隆・池田 広・山口 隆・姫野正巳・天野正之・柴田道夫. 2002. 萎凋細菌病抵抗性中間母本 'カーネーション農1号' の育成とその特性. 園学研. 1: 13-16.
- Onozaki, T., M. Mato, M. Shibata and H. Ikeda. 1999a. Differences in flower color and pigment composition among white carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. Sci. Hortic. 82: 103-111.
- Onozaki, T., N. Tanikawa, M. Taneya, K. Kudo, T. Funayama, H. Ikeda and M. Shibata. 2004. A RAPD-derived STS marker is linked to a bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) resistance gene in carnation. Euphytica 138: 255-262.
- Onozaki, T., T. Yamaguchi, M. Himeno and H. Ikeda. 1999b. Evaluation of 277 carnation cultivars for resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas caryophylli*). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 546-550.
- Onozaki, T., T. Yamaguchi, M. Himeno and H. Ikeda. 1999c. Evaluation of wild *Dianthus* accessions for resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas caryophylli*). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 974-978.
- 小野崎 隆・吉成 勉・吉村正久・八木雅史・能岡 智・種谷光泰・柴田道夫. 2006b. ダイアンサス属野生種 *Dianthus capitatus* ssp. *andrzejowskianus* 由来の劣性一重咲き遺伝子に連鎖した DNA マーカー. 園学研. 5: 363-367.
- 小関良宏. 2008. カーネーションのアントシアニン生合成経路における遺伝子解析. 園学研. 7 (別2) : 74-75.
- Paterson, A. H., E. S. Lander, J. D. Hewitt, S. Peterson, S. E. Lincoln and S. D. Tanksley. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. Nature 335: 721-726.
- Peltier, D., E. Farcy, H. Dulieu and A. Berville. 1994. Origin, distribution and mapping of RAPD markers from wild *Petunia* species in *Petunia hybrida* Hort lines. Theor. Appl. Genet. 88: 637-645.
- Rajapakse, S. 2003. Progress in application of molecular markers to genetic improvement of horticultural crops. Acta Hort. 625: 29-36.
- Rajapakse, S., D. H. Byrne, L. Zhang, N. Anderson, K. Arumuganathan and R. E. Ballard. 2001. Two genetic linkage maps of tetraploid roses. Theor. Appl. Genet. 103: 575-583.
- Roussel, V., J. Koenig, M. Beckert and F. Balfourier. 2004. Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programs. Theor. Appl. Genet. 108: 920-930.
- Rout, G. R. and A. Mohapatra. 2006. Use of molecular markers in ornamental plants: a critical reappraisal. Europ. J. Hort. Sci. 71: 53-68.
- 斉藤 清. 1969. 花の育種. p. 142-154. 誠文堂新光社. 東京.
- Saito, H., K. Mizunashi, S. Tanaka, Y. Adachi and M. Nakano. 2003. Ploidy estimation in *Hemerocallis* species and cultivars by flow cytometry. Sci. Hortic. 97: 185-192.
- 佐藤和規. 1995. 宿根性ナデシコ. p. 15-18. 農耕と園芸編. 切り花栽培の新技術 改訂 宿根草 上巻. 誠文堂新光社. 東京.
- Scovel, G., H. Ben-Meir, M. Ovadis, H. Itzhaki and A. Vainstein. 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. Theor. Appl. Genet. 96: 117-122.
- Scovel, G., M. Ovadis, A. Vainstein, M. Reuven and Y. Ben-Yephet. 2001. Marker assisted selection for resistance to *Fusarium oxysporum* in the greenhouse carnation. Acta Hort. 552: 151-156.
- Smulders, M. J. M., Y. Noordijk, W. Rus-Kortekaas, G. M. M. Bredemeijer and B. Vosman. 2003. Microsatellite genotyping of carnation varieties. Theor. Appl. Genet. 106: 1191-1195.
- Smulders, M. J. M., W. Rus-Kortekaas and B. Vosman. 2000. Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*. Genome 43: 208-210.
- Staub, J. E., F. C. Serquen and M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience 31: 729-741.
- 杉浦直樹・辻 孝子・藤井 潔・加藤恭宏・坂 紀邦・遠山孝通・早野由里子・井澤敏彦. 2004. 水稲病害抵抗性付与のための連続戻し交雑育種における DNA マーカー選抜の有効性の実証. 育学研. 6: 143-148.
- 鈴木善和. 2008. カーネーションの世界的動向と育成者権保護. 園学研. 7 (別2) : 66-67.
- Taamalli, W., F. Geuna, S. B. Temime, D. Bassi, D. Daoud and M. Zarrouk. 2007. Using microsatellite markers to characterise the main Tunisian olive cultivars 'Chemlali' and 'Chétoui'. J. Hort. Sci. Biotech. 82: 25-28.
- 武田恭明. 2002. カーネーション(ダイアンサス). p. 3-9. 農文協編. 花卉園芸大百科 9. 農山漁村文化協会. 東京.
- 竹岡昌彦. 1995. ソネットシリーズ. p. 11-14. 切り花栽培の新技術 改訂 宿根草 上巻. 農耕と園芸編. 誠文堂新光社. 東京.
- Terahara, N., K. Takeda, J. B. Harborne, R. Self and M. Yamaguchi.

1986. Anthocyanins acylated with malic acid in *Dianthus caryophyllus* and *D. deltooides*. *Phytochemistry* 25: 1715-1717.
- Terahara, N. and M. Yamaguchi. 1986. ¹H NMR spectral analysis of the malylated anthocyanins from *Dianthus*. *Phytochemistry* 25: 2906-2907.
- Thoquet, P., J. Olivier, C. Sperisen, P. Rogowsky, H. Laterrot and N. Grimsley. 1996. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. *Mol. Plant Microbe. Interaction* 9: 828-836.
- 塚本洋太郎. 1969. 花卉総論. p. 427-430. 養賢堂. 東京.
- 露無慎二・高橋 壮. 1998. 細菌病とファイトプラズマ病. p. 71-95. 久能 均・白石友紀・高橋 壮・露無慎二・真山滋志編著. 植物病理学概論. 養賢堂. 東京.
- 宇田 明. 2005. カーネーションの危機. p. 28-31. 農耕と園芸 3月号. 誠文堂新光社. 東京.
- 鵜飼保雄. 2000. ゲノムレベルの遺伝解析 MAP と QTL. p. 305-317. 東京大学出版会. 東京.
- 鵜飼保雄. 2003. 植物育種学. p. 102-112. 東京大学出版会. 東京.
- 牛尾亜由子・小野崎 隆・柴田道夫. 2002. フローサイトメーターによる *Dianthus* 属遺伝資源の倍数性測定. 花き研報. 2: 21-26.
- Vainstein, A., J. Hillel, U. Lavi and G. Tzuri. 1991. Assessment of genetic relatedness in carnation by DNA fingerprint analysis. *Euphytica* 56: 225-229.
- Wilcoxon, F. 1945. Individual comparison by ranking methods. *Biometrics* 1: 80-83.
- Wu, J., T. Maehara, T. Shimokawa, S. Yamamoto, C. Harada, Y. Takazaki, N. Ono, Y. Mukai, K. Koike, J. Yazaki, F. Fujii, A. Shomura, T. Ando, I. Kono, K. Waki, K. Yamamoto, M. Yano, T. Matsumoto and T. Sasaki. 2002. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. *Plant Cell* 14: 525-535.
- Xiang, Y, Y. Cao, C. Xu, X. Li and S. Wang. 2006. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1347-1355.
- 山口雅篤. 1981. カーネーション園芸品種の染色体数に関する研究 II. カーネーション園芸品種の染色体数について. 南九州大学園芸学部研究報告. 11: 9-14.
- 山口雅篤・笈 三男. 1985. カーネーションの倍数性育種に関する研究 (第1報) コルヒチン処理による四倍体の作出. 園学要旨. 昭 60 秋: 354-355.
- 山口雅篤・国本忠正・原田重雄. 1980. カーネーション園芸品種の染色体数に関する研究. 南九州大学園芸学部研究報告. 10: 25-30.
- Yan, Z., C. Denneboom, A. Hattendorf, O. Dolstra, T. Debener, P. Stam and P. B. Visser. 2005. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theor. Appl. Genet.* 110: 766-777.
- 八代嘉昭. 2002. カーネーション (ダイアンサス). p. 71-73. 農文協編. 花卉園芸大百科 9. 農山漁村文化協会. 東京.
- 八代嘉昭. 2003. ポットカーネーションの栽培. p. 145-148. 農業技術体系花卉編第7巻追録第5号. 農文協編. 農山漁村文化協会. 東京.
- Yoshimoto, Y., D. Higeta, Y. Ito, H. Yoshida, M. Hasebe and Y. Ozeki. 2000. Isolation and characterization of a cDNA for phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from *Dianthus caryophyllus* (carnation). *Plant Biotechnol.* 17: 325-329.