

Capsicum annuum における分子マーカーの開発と
QTL 解析に関する育種学的基礎研究

杉田 亘

2007

目 次

序 章

第 1 章 *Capsicum annuum* における蒔培養技術を用いた種内交雑由来倍加半数体系統の育成と形態特性の調査

第 1 節 効率的な蒔培養法の確立

1. 緒 言
2. 材料および方法
3. 結 果
4. 考 察
5. 摘 要

第 2 節 倍加半数体系統の育成と形態的特性の調査

1. 緒 言
2. 材料および方法
3. 結 果
4. 考 察
5. 摘 要

第 2 章 *Capsicum annuum* の種内交雑由来倍加半数体集団を用いた分子マーカーの開発と連鎖地図の作製

第 1 節 PMMoV (P₁₂) 抵抗性遺伝子座 L^3 および辛み発現に関する遺伝子座 C に連鎖した分子マーカーの開発

1. 緒 言
2. 材料および方法
3. 結 果
4. 考 察
5. 摘 要

第 2 節 連鎖地図の作製

1. 緒 言
2. 材料および方法
3. 結 果
4. 考 察
5. 摘 要

第3章 *Capsicum annuum* の種内交雑由来倍加半数体集団を用いた疫病 (*Phytophthora capsici*) 抵抗性に関する QTL 解析

第1節 疫病抵抗性の評価

1. 緒言
2. 材料および方法
3. 結果
4. 考察
5. 摘要

第2節 疫病抵抗性に関する QTL 解析

1. 緒言
2. 材料および方法
3. 結果
4. 考察
5. 摘要

第4章 *Capsicum annuum* の種内交雑由来倍加半数体集団を用いた未熟果実色に関する QTL の検出と CAPS マーカーの開発

第1節 未熟果実色の評価

1. 緒言
2. 材料および方法
3. 結果
4. 考察
5. 摘要

第2節 QTL の検出と CAPS マーカーの開発

1. 緒言
2. 材料および方法
3. 結果
4. 考察
5. 摘要

第5章 総合考察

要 約

英文要約

謝 辞

引用文献

序 章

トウガラシ、ピーマンおよびパプリカ (*Capsicum annuum* var. *angulosum* Miller or var. *grossum* Bailey) に代表されるカプシカム属は (Fig. 1)、ナスやトマト、タバコ等と同じ2倍体のナス科植物である。カプシカム属には、約25種が存在するが、その内、*C. annuum*、*C. frutescens*、*C. baccatum*、*C. pubescens* および *C. chinense* の5種類が特にアメリカ先住民によって栽培化されてきた。

トウガラシは、中南米の熱帯から温帯地域を原産とし、コロンブスによる新大陸発見以降、ヨーロッパを中心に世界中に香辛料として広がってきた (Bosland と Votava 1999)。1493年、コロンブスはスペイン帰還により初めてヨーロッパにトウガラシを持ち込み、1548年にイギリス、1500年代後半に中央ヨーロッパ、1585年にインド、そして1700年後半には中国にまで広がった (Lippert ら 1966)。

トウガラシは環境に対する適応性が高く、世界中のほとんどの国において栽培が可能であり、このことが世界的な共通作物になった要因と考えられる (Bosland と Votava 1999、Bosland 2003)。なかでも *C. annuum* は、トウガラシやピーマン、パプリカとして知られており、経済的にも重要で、世界中で最も多く栽培されている (Bosland 2003)。ピーマンは、英語でスイートペッパー (Sweet pepper) と呼ばれ、辛みのあるトウガラシに対して辛みのない種類につけられたものである。

国連食糧農業機関統計 (2006) によると、2005年の全世界におけるカプシカムの生産量は24,997,498 tで、アジア地域で多く生産されている傾向があり、特



Fig. 1. Diversity of *Capsicum* fruits.

に中国においては全世界生産量のほぼ 50%が生産されている。

また、日本国内におけるカプシカムの生産量については、1965 年には 52,600 t、2005 年現在で 155,000 t であり、この 40 年間で約 3 倍に拡大している。しかしながら、1965 年から 1980 年頃までは年間平均約 15%で生産量が増加しているが、それ以降は同等もしくは減少傾向にある。2003 年の国内ピーマン生産量は、1 位が宮崎県で、2 位が茨城県、3 位が高知県と続いている。宮崎県においては、1978 年の栽培面積が 300 ha を超え、高知県を抜き全国 1 位の生産量となった。その後、宮崎県のピーマン生産量は、1986 年の 45,000 t をピークに減少に転じ、現在は 30,000 t 前後で推移しており 2 位の茨城県が接近してきている。

宮崎県は、冬期温暖多照な気象条件や標高差等を活用し、沿海平坦地域の施設野菜、高台畑地域の露地野菜、中山間地域の夏秋野菜を中心に全国有数の野菜産地となっている。その内訳は、ピーマン（全国 1 位）が 21.5%と最も高く、次いでサトイモ（全国 2 位）、キュウリ（全国 2 位）、ダイコン（全国 4 位）の順である（宮崎県農政水産部 2005）。なかでもピーマンは、30 年近くにわたり生産量全国 1 位を維持してきており、宮崎県の農業にとって非常に重要な品目として位置づけられている。

宮崎県におけるピーマン栽培の歴史は、昭和の始め頃に高知県からの移住者が、「カリフォルニアワンダー」系の在来種を持ち込み、自家用に栽培したのが始まりだと言われている（宮崎の野菜史編集委員会 2006）。その後、一部の人によって作付けされていたが、栽培環境が整わず単収が少ないことから、経済作物として普及しなかった。しかしながら、1960 年頃からハウスの大型化や加温

機の普及、新品種の導入により、本格的なピーマンの栽培が始まり、ハウス促成ピーマンとして急速に栽培面積が拡大した（川越 1998）。

近年、宮崎県におけるピーマン栽培は、輸入量の急増や産地間競争、消費の伸び悩みにより価格が低迷し、減少した。さらに、ピーマン栽培において、様々な病害虫による被害が生じてきており、農家経営を圧迫している。なかでも、ペッパーマイルドモットルウイルス（pepper mild mottle virus ; PMMoV）、*Phytophthora capsici* によるピーマン疫病および *Ralstonia solanacearum* による青枯病は、宮崎県を始めとするピーマン産地に大きな被害を及ぼしている（Fig. 2）。これらの土壌病害を抑制する手法として、土壌消毒剤の臭化メチルが最も効果が高く世界的に使用されてきた。しかしながら、1992 年にオゾン層を破壊する物質に関する国際会議（モントリオール議定書）によりオゾン層破壊物質に指定され、その使用が規制されることとなり、今後これらの病害によるなお一層の被害拡大が懸念される。臭化メチルに代わるこれらの病害に対する防除技術として、抵抗性品種の導入が考えられるが、従来接種検定による選抜方法では、多大な労力と時間を必要とする上、接種時の温度や植物の生育ステージ等の様々な環境要因に左右されるため、優良品種への安定的な抵抗性の導入は困難である。さらに、接種時における病原菌の飛散により周囲の作物に対する危険性も伴うため、DNA マーカーによる選抜育種の適用（Marker-assisted selection ; MAS）（McCouch と Tanksley 1991）が望まれる。

DNA マーカーは、系統間における塩基配列の違いを利用した DNA の目印であり、医療および農業等の様々な分野で活用されてきている。農業分野におい

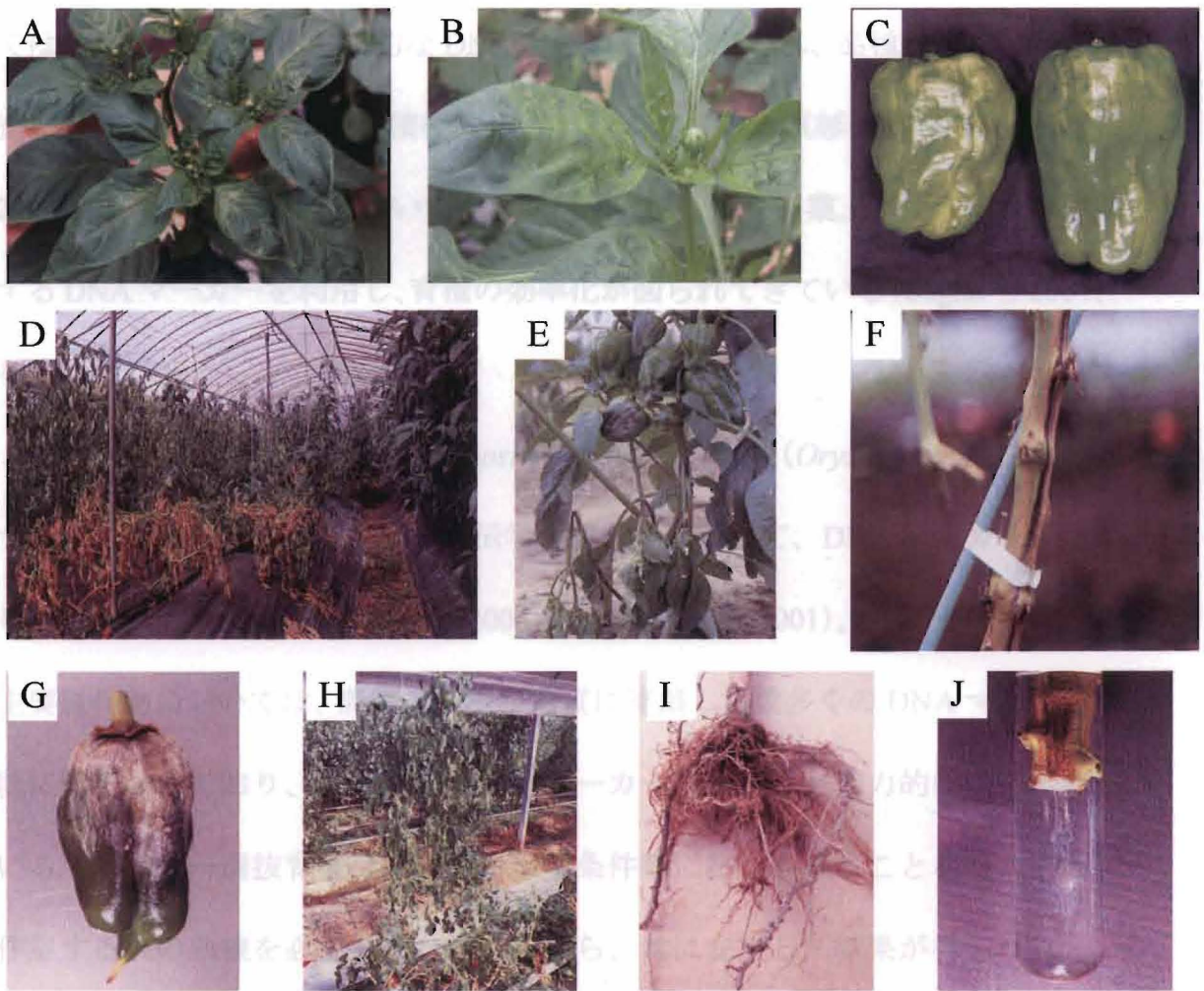


Fig. 2. The damage and symptoms of pepper caused by soilborne diseases, pepper mild mottle virus, phytophthora blight and bacterial wilt. Mosaic and leaf distortion (A and B), and mosaic and misshapen fruit (C) caused by pepper mild mottle virus. Field symptoms (D), stem rot (E), black stem lesion (F) and fruit rot (G) caused by *Phytophthora capsici*. Field symptoms (H), root rot (I) and milky white ooze of bacterial cells in clear water from the stem of a plant infected with *Ralstonia solanacearum*.

ては、系統および品種特異的な DNA マーカーが開発され、品種保護や農産物検査を目的とした品種判別も積極的に行われてきている（杉田ら 2003、中村ら 2006）。一方、育種分野においては、各種病害抵抗性や農業上有用な形質に連鎖する DNA マーカーを利用し、育種の効率化が図られてきている（Sugita ら 2004、杉浦ら 2004）。

近年、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、イネ (*Oryza sativa*) を始めとする多くの植物において、分子遺伝学研究の手段として、DNA マーカーが用いられるようになった（Juenger ら 2000、Yamamoto ら 2001）。イネを始めとする主要農作物においては、農業上有用な形質に連鎖した数多くの DNA マーカーが既に開発されており、それらを用いたマーカー選抜育種も精力的に進められている。マーカー選抜育種は、周囲の環境条件等に左右されることなく、また、作業する人の熟練を必要としないことから、常に安定した結果が得られるという利点がある（McCouch と Tanksley 1991）。しかしながら、ピーマンでは、イネやトマト等の他の主要作物に比べると、DNA マーカーの開発は遅れている。したがって、ピーマンにおいても栽培特性、病害抵抗性、機能性成分および果実形質等の諸形質に連鎖した DNA マーカーを開発し、それを用いた積極的なマーカー選抜育種技術の活用が望まれる。

本研究は、ピーマンにおける DNA マーカーを用いた選抜育種技術の開発に資することを目的に、分子遺伝学的手法を用い、有用形質に連鎖する DNA マーカーの開発、遺伝様式の解明およびその育種的利用法について論ずる。そのため、第 1 に蒔培養技術を用いた種内交雑由来倍加半数体系統の実用的育成技術の開

発と育成した系統の形態特性について、第 2 に質的有用形質に連鎖した分子マーカーの開発とピーマンにおける高能率連鎖地図作製技術の開発について、第 3 に疫病に対する抵抗性の遺伝的評価と量的形質遺伝子座 (Quantitative trait loci ; QTL) 解析による DNA マーカーの開発について述べ、第 4 に未熟果実色に関する遺伝的評価と QTL 解析による DNA マーカーの開発について論述する。

第1章 *Capsicum annuum* における葯培養技術を用いた種内

交雑由来倍加半数体系統の育成と形態的特性の調査

農業上有用な栽培特性等の多くは、QTL によって支配されている。ピーマンにおける疫病や青枯病等に対する抵抗性、果実形や未熟果実色等の果実形質は、QTL が関与していることが明らかとなっている (Ben ら 2001a, Thabuis ら 2003, Lafortune ら 2005)。しかしながら、QTL によって支配されている形質については、温度、日照および湿度等の栽培条件や植物の生育ステージ等の様々な周囲環境による影響を受けやすく、安定的な形質の評価を得ることが困難である。このことが QTL 解析を正確に行う上での大きな障壁となっている。

現在、多くの農作物における育種では、分子マーカーを利用した MAS (McCouch と Tanksley 1991) が積極的に進められている。ピーマンにおいてマーカー選抜育種を適用するためには、目的とする形質に連鎖した DNA マーカーの開発が必要であり、そのためには、正確な QTL の評価を行うための適切な遺伝解析用分離集団の育成が不可欠である。一般的に、自殖性植物における遺伝解析用分離集団は、雑種第2代 (F_2) や戻し交雑 (Backcross ; BC)、倍加半数体 (Doubled Haploid ; DH)、組換え自殖 (Recombinant Inbred Line ; RIL) 世代が用いられている (鵜飼 2000)。 F_2 および BC 世代は実質的な分離世代であり、育成までに要する労力や期間も短い。全表現型分散に占める QTL の寄与率が異なることから、QTL の検出感度が低くなるという欠点がある (鵜飼 2000)。正確な QTL 解析を行うためには、目的の特性に明確な差がある両親の組み合わせに

よる完全ホモ接合化した DH または RIL を用いて、厳密な形質の評価を行うことが望まれる。これらの系統群は、F₂ および BC 世代等のヘテロ接合性の分離集団と比較して、繰り返し安定的な評価ができるという点において優れているが、RIL の育成には、8 世代以上の自殖が必要であり、多くの時間と労力を要する。一方、DH の育成は、薬培養技術を用いるが、育成までの年限が短い点で RIL よりも優れている。

そこで、本章は、第 1 節で、効率的な薬培養技術確立のための諸条件の検討を行い、第 2 節で、薬培養による遺伝解析用分離集団の育成とそこで育成した DH 系統の形態的特性について述べる。

第 1 節 効率的な薬培養法の確立

1. 緒言

現在、いくつかの作物においては、薬培養による DH を利用した育種法を用いることで、短期間に完全ホモ接合の個体を得ることが可能となってきた。薬培養による半数体の作出は、Guha と Maheshwari (1964) が *Datura innoxia* で成功して以来、多くの農作物で試みられている。トウガラシ類においては、Wang ら (1973) によって初めて半数体の作出に成功し、その後、効率的に再生植物体を得るために、小胞子の発育ステージ、培地組成および花蕾の前処理等について検討されてきた (Sibi ら 1979、Dumas ら 1981)。国内においても、ピーマン育種の効率化を目的として薬培養が試みられてきており、矢ノ口ら (1990)

や山口ら（1995）によって、蒔培養に関する諸条件の検討が行われ、蒔から胚様体を経て植物体の再分化が報告されている。しかし、この報告における再分化個体の獲得率は約 1.5%（蒔当たり）と低く、また、培養途中で再分化培地への移植も必要とすることから、育種素材および遺伝解析用分離集団として用いるためには、より簡便でさらに再分化効率の良い手法への改善が必要である。

そこで、本節ではピーマン育種における蒔培養技術の実用化と再生植物体を得るための一段階培養法について検討した。

2. 材料および方法

1) 供試材料

ピーマン蒔培養における条件の検討には、長野県中信農業試験場で育成されたベルタイプのピーマン「K-9」（*C. annuum*）を供試した。蒔培養適性の系統間比較には、「K-9」、南国育種研究農場育成の栽培品種「土佐ひかり D」、タキイ種苗育成の栽培品種「京ゆたか」、宮崎県総合農業試験場において蒔培養により得られた系統「No.5」および地方在来品種「昌介」のピーマン 5 系統と中央アメリカ原産のトウガラシ野生種 PI 201234 由来の自殖選抜系統「AC2258」のトウガラシ 1 系統を供試した。

2) 蒔培養条件の検討

蒔培養は、Dumas ら（1981）の方法を改変したものをを用いた。すなわち、4～6mm の花蕾を採取し、4℃暗黒下で 4 日間低温処理した。その後、クリーンベン

チ内で 70% (v/v) エタノールで 20 秒間、Tween 20 を 2 から 3 滴添加した 200 ml の 0.5% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液中で 20 分間滅菌し、滅菌した蒸留水で 3 回洗浄した。実体顕微鏡下で花蕾中の葯を取り出し、0.05 mg/l インドール酢酸 (IAA)、50 g/l ショ糖および 8 g/l 寒天を含む、CP 培地 (Table 1) (Dumas ら 1981) で 35°C、暗黒下で 8 日間培養した。その後、25°C、暗黒下で 20 日間培養した後、25°C、明条件下で培養した。

これらの方法を基準として、25°Cでの暗培養期間、培地中の IAA 濃度の影響および培地中のショ糖濃度の影響について検討した。また、培養 2 から 4 ヶ月後に、胚様体および植物体発生数を調査した。

3) 葯培養適性の系統間比較

葯培養適性の系統間比較に用いた葯培養条件については、本節の材料および方法の 2) に準じた。培地組成は、0.005 mg/l IAA、50 g/l ショ糖および 8 g/l 寒天を含む CP 培地 (Table 1) を用いた。培養 2 から 4 ヶ月後に、胚様体および植物体発生数を調査した。

3. 結果

1) 葯培養条件の検討

Table 2 は、25°Cの培養期間が胚様体および植物体発生に及ぼす影響について調査した結果である。胚様体発生率は 10 日区で最も高い値であったが、40 日区で低い値であった。一方、植物体発生率は、20 日区で最も高く、10 日区と 40

Table 1. The CP medium constituent used in this study

Constituent	Concentration in culture medium (mg/l)	
		CP medium
Major salt	KNO ₃	2150
	NH ₄ NO ₃	1238
	(NH ₄) ₂ SO ₄	34
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	313
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	50
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	412
	KH ₂ PO ₄	142
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	38
	KCl	7
	Na ₂ -EDTA	18.65
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.9
Minor salt	MnSO ₄ ·4~5H ₂ O	22.13
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3.625
	H ₃ BO ₃	3.15
	KI	0.695
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.188
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.016
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.016
Vitamine	myo-Inositol	50.3
	pyridoxine HCl	5
	acid nicotine	0.7
	thiamine HCl	0.6
	pantothenate Ca	0.5
	vitamine B ₁₂	0.03
	biotine	0.005
	glycine	0.1
pH		5.9

Table 2. Effects of duration of dark culture at 25°C in CP medium on the formation of embryoid and the regeneration of plant

Duration of dark culture at 25°C	No. of buds cultured	No. of embryoids generated	Rate (%)	No. of plants regenerated	Rate (%)
10	120	111	92.5	10	8.3
20	120	94	78.3	16	13.3
40	120	78	65	10	8.3

日区で低い値であった。

Table 3 は、IAA 濃度が胚様体および植物体発生に及ぼす影響について調査した結果である。無添加区でも胚様体および植物体の発生がみられるものの、IAA 添加濃度が高くなるほど植物体発生率は高くなる傾向であった。最も植物体発生率の高い 0.5 mg/l 添加区では、植物体発生率は無添加区の約 2 倍であった。

Table 4 は、シヨ糖濃度が胚様体および植物体発生に及ぼす影響について調査した結果である。胚様体発生率は、シヨ糖濃度 60 g/l 区で最も高く、15 g/l 区で低い値であった。植物体発生率は、30 g/l 区で最も高く、15 g/l 区で低い値であった。

2) 薬培養適性の系統間比較

Table 5 は、薬培養における胚様体および植物体発生の系統間比較を行った結果である。胚様体発生率は、「No.5」が 47.5%で最も高く、次いで「K-9」の 44.0%、「土佐ひかり D」の 32.1%の順であった。一方、「京ゆたか」で 3.3%、「昌介」で 0.4%および「AC2258」で 2.9%と低かった。また、植物体発生率は、「No.5」が 25.3%で最も高く、次いで「土佐ひかり D」の 24.3%であり、「京ゆたか」で 2.0%および「昌介」で 0.4%とほとんど発生がみられず、「AC2258」では全く発生がみられなかった。

4. 考察

ピーマンの薬培養の体系的な手法については、Dumas ら (1981) によって最初に報告された。しかしながら、植物体獲得率はきわめて低く、実際の育種に

Table 3. Effects of IAA concentrations in CP medium on the formation of embryoid and the regeneration of plant

IAA concentrations (mg/l)	No. of buds cultured	No. of embryoids generated	Rate (%)	No. of plants regenerated	Rate (%)
0	115	77	67	12	10.4
0.05	107	63	58.9	20	18.7
0.5	117	147	125.6	24	20.5

Table 4. Effects of sucrose concentrations in CP medium on the formation of embryoid and the regeneration of plant

Sucrose concentrations (g/l)	No. of buds cultured	No. of embryoids generated	Rate (%)	No. of plants regenerated	Rate (%)
15	120	1	0.8	3	2.5
30	120	33	27.5	12	10.0
60	120	99	82.5	4	3.3

Table 5. Comparison of embryoid formation and plant regeneration with six accessions

Accessions	No. of buds cultured	No. of embryoids generated	Rate (%)	No. of plants regenerated	Rate (%)
K-9	268	118	44.0	31	11.6
Tosahikari-D	218	70	32.1	53	24.3
Kyouyutaka	150	5	3.3	3	2.0
No.5	265	126	47.5	67	25.3
Shousuke	231	1	0.4	1	0.4
AC2258	103	3	2.9	0	0.0

用いるためには植物体再生率の向上や省力化等の多くの改良を必要とした。そこで本節では、効率的な薬培養法を確立するための、一段階培養法について検討した。その結果、25℃での暗培養期間は、20 日区で植物体発生率が最も高くなり、13.3%であった。培地中の IAA 濃度については、0.5 mg/l 添加区で最も高くなり、20.5%であった。培地中のショ糖濃度については、30 g/l 区で最も高くなり、10.0%であった。さらに、3 つの最適条件を組み合わせることによって、更なる植物体発生率の向上が期待される。これらの植物体発生率は、矢ノ口ら (1990) が中型ピーマンで行った結果に比べても、ほぼ同程度であるが、一段階培養法では培養途中での再分化培地への移植や培地作成作業を必要としないため、大幅な省力化が図られる。また、薬培養における胚様体および植物体発生の系統間差については、供試した系統間において顕著な差が認められた。薬培養による植物体発生効率に系統間差があることは、既に他のトウガラシ類やコムギ、オオムギ等でも報告されている (Dumas ら 1981、Morrison ら 1986、Anderson ら 1987、Powell 1988)。本研究により、一段階培養法による 6 系統の植物体発生効率が明らかとなり、植物体発生率には、系統間で大きな差が生じることが判明した。「No.5」と「土佐ひかり D」で植物体発生率が高く、本手法の適用性が高いことが示された。また、「No.5」は、もともと薬培養により得られた系統であり、高い薬培養適性を引き継いでいるものと考えられる。様々な系統において、薬培養による植物体発生効率を明らかにすることは、薬培養技術を実用化する上で非常に重要であり、薬培養に利用する系統の選定には十分に留意する必要がある。本研究の結果から、ピーマン薬培養における一段階培養

法の適用は、従来の手法に比べ省力的であり、ピーマン育種および遺伝解析用分離集団の育成に大きく貢献するものと考えられた。

5. 摘要

ピーマン蒔培養における植物体獲得率はきわめて低く、実際の育種に用いるためには植物体再生率の向上や省力化等の多くの課題を残している。そこで、効率的な蒔培養技術の確立を目的に、一段階培養法による諸条件について検討した。その結果、暗培養を 25°C で 20 日間行い、0.5 mg/l IAA および 30 g/l ショ糖を添加した培地において最も植物体再生率が高くなった。また、一段階培養法による 6 系統の植物体発生効率が明らかとなり、「No.5」と「土佐ひかり D」で植物体発生率が高く、これらに対して本手法の適用性が高いことが示された。植物体発生率には、系統間で大きな差が生じることが判明し、蒔培養に利用する系統の選定には十分に留意しなければならないことが示された。本研究の結果から、ピーマン蒔培養における一段階培養法の適用は、従来の手法に比べ省力的であり、ピーマン育種および遺伝解析用分離集団の育成に大きく貢献するものと考えられた。

第2節 倍加半数体系統の育成と形態的特性の調査

1. 緒言

遺伝解析のための DH 集団の育成は、通常 F₁ の蒔培養によって行われる。蒔培養による分離集団の育成は、純系を得るまでの数世代を必要とせず、育成までの年限を短縮できるという点において、他の育成手法に比べ優れている。また、各遺伝子座が分離した完全ホモ接合の系統のみによって構成されているため、ヘテロ接合系統の混在による表現形質の乱れがない。さらに、自殖による次世代以降においても全く同じ遺伝子型の系統が得られることから、形質の分離が常に安定しており、その結果、繰り返し各種形質の調査を行うことが可能である。このことから、蒔培養によって育成された DH 集団は、周囲の環境要因によって影響を受けやすい量的形質を解析するための最も適した分離集団であると考えられる。同時に、遺伝解析用として育成された系統は全て固定系統であるため、育種素材として利用することもできる。その反面、DH を育成する過程で特定の遺伝子型が淘汰され、ある領域において特定の遺伝子型が偏る等の弊害を生じる可能性もある。

農作物は、多くの遺伝的形質によって成り立っているが、中でも収量や果実品質などの栽培的特性および病害抵抗性等は、農業上非常に重要な形質であり、現在でも育種目標の大部分を占める。しかし、これらの形質は量的な遺伝子座によって支配され、複雑な遺伝を示すため、遺伝様式の解明や育種への利用が難しく、分子マーカーを利用した QTL 解析によって研究が進められている。

そこで、本節では、遺伝解析および DNA マーカーの開発を行うための蒞培養による DH 分離集団の育成と、そこで育成した DH 系統の形態的特性について述べる。

2. 材料および方法

1) 供試材料

供試材料として、「K9-11」(*C. annuum*)を母親に、前節で示されている「AC2258」を父親として交配し、その F₁ および F₁ の蒞培養由来個体である 176 系統の DH 集団を用いた (Fig. 3、Table 6)。

「K9-11」は、長野県中信農業試験場で育成された「K-9」の蒞培養由来系統で、PI 159236 由来の PMMoV 抵抗性 L^3 を持ち、辛みが無く、疫病罹病性、未熟果実色濃緑色のベルタイプのピーマンで、宮崎県総合農業試験場で育成された (矢ノ口ら 1993、Sugita ら 2004)。「AC2258」は、中央アメリカ原産の PI 201234 由来の自殖選抜系統であり、PMMoV 罹病性で辛みを有し、未熟果実色が黄白色で、疫病に対して強度の抵抗性を示すトウガラシ野生種である (Smith ら 1967、山川ら 1979)。

また、PMMoV 抵抗性評価においては、上述の DH 集団に加え、「K9-11」と「AC2258」の F₁ を「AC2258」に戻し交配して得られた 190 個体の BC₁ 系統を供試した。

2) 蒞培養条件および培地組成

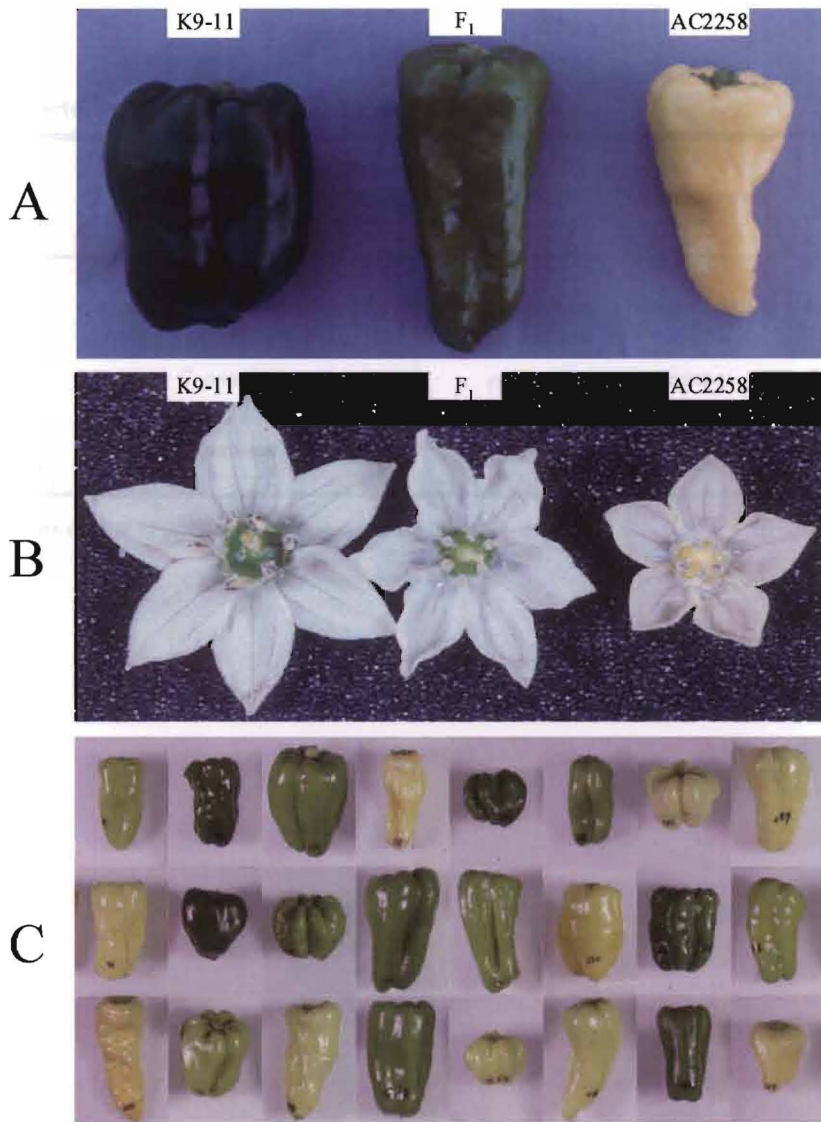


Fig. 3. A and B showed the fruits and the flowers of the parents and F₁. C showed the fruits of DH lines obtained from anther culture of an F₁ hybrid between two accessions of 「K9-11」 and 「AC2258」.

Table 6. The characteristics of the parents and F₁ used in this study

Accessions	Origin	Species	Resistant genotypes for PMMoV	Pungency	Phytophthora rot	Immature fruits color	Mature fruits color
K9-11	Japan	<i>C. annuum</i>	L^3 / L^3	non-pungent	susceptibility	ceder green	red
AC2258	Mexico	<i>C. annuum</i>	L^+ / L^+	pungent ¹⁾	resistance	sulphury white	red
F ₁ (K9-11 x AC2258)	—	<i>C. annuum</i>	L^3 / L^+	pungent	intermediate resistance	light green	red

¹⁾ Affecting the organs or taste or smell with a shape, acrid sensation.

薬培養法については、前節 2-2) に準じた。培地組成は、0.01 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) と 0.01 mg/l カイネチン、30 g/l ショ糖および 10 g/l 寒天を含む CP 培地 (Table 1) を用いた。

3) 順化方法

得られた再分化個体は、ホルモンフリーの MS 培地に移植後、パーミキュライトに鉢上げし、その際に透明なプラスチックコップを被せ、十分に湿度を保ちながら順化室で栽培した。1 週間後、1 cm 角の穴あきコップに換えた後、さらに 1 週間後にコップを外し、栽培を継続した。1 週間後に培養土に植え換え、さらに 1 週間後にガラス温室へと移動させた。

4) 栽培条件および果実特性の調査方法

特性調査には、両親系統の「K9-11」と「AC2258」および F₁ と、DH176 系統の各系統から 3 株ずつを用いた。ガラス温室内で 8 月下旬に育苗トレイに播種し、10 月上旬に野菜用培土 (MK5 号 : N:P:K=200:2000:200 mg/l) の入った 18 cm ポリポット黒 (1.3 L) に移植し、10 月中旬に 1 回目の追肥 (オール 8 20 g/1.3 L) を行った。温室内温度管理は、日中 30°C 以下、夜温 18°C 以上で管理した。病害虫防除およびその後の追肥については、状況を確認しながら適宜行った。

開花後約 30 日の果実を、1 系統当たり 3 果実を用いて測定した。縦径および横径については、ノギスを用いて果実の最も長い部分を測定した。縦横比は、平均果実縦径/平均果実横径で計算した。果実重については、収穫直後の生鮮果

実重を電子天秤で測定した。

5) PMMoV の純化および抵抗性評価法

PMMoV 抵抗性接種検定には、宮崎県内で採取されたウイルス株 P_{1,2} を用いた (Sugita ら 2004)。PMMoV 感染葉 100 g に 200 ml の抽出用緩衝液 (0.05 M Na₂HPO₄ · 12H₂O、0.05 M KH₂PO₄、0.1% チオグリコール酸、pH 7.0) を加え、ホモジナイザーで粉碎し、ろ液を 6,000 rpm、4°C で 10 分間遠心後、上清を 10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。さらに、上清 100 ml 当たり 0.64 g の NaCl、3.14 g のポリエチレングリコールを添加し、30 分間氷上で攪拌した。その後、10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を捨て、6 ml/チューブの再懸濁用緩衝液 (0.05 M Na₂HPO₄ · 12H₂O、0.05 M KH₂PO₄、0.1%、0.02 M EDTA、pH 7.0) で再懸濁した。この懸濁液を 8,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、さらに、上清を 30,000 rpm、4°C で 60 分間遠心後、上清を捨て 4 ml の滅菌蒸留水を添加して再懸濁した。12 時間、4°C で静置後に懸濁液をシヨ糖密度勾配用溶液 (20%、30%、40%、50%シヨ糖) に重層し、24,000 rpm、4°C で 120 分間遠心後、注射器を用いてウイルス由来のバンドを分取した。分取した溶液を 35,000 rpm、4°C で 120 分間遠心し、上清を捨て、1 ml の滅菌蒸留水でペレットを 12 時間、4°C で再懸濁後、分光光度計 (Shimadzu UV-2550) を用い 260 nm の波長でウイルス濃度を測定した。

PMMoV 接種検定は、切り取った若い展開葉を用い、純化したウイルス (20 ng/ml) を #500 のカーボランダムで接種した。温室条件下、25°C、24 時間照明下でグロースチャンバー内に静置した。抵抗性の有無は、接種 3 から 6 日後に壊

死症状の有無により判定した。

6) 辛み評価法

辛みの評価は、Blum ら (2002) の方法に従い調査した。すなわち、開花後 30 から 40 日目の果実を 1 系統当たり 3 果実用いて、切断後、胎座部分を舌の先で舐める官能検査により辛みを判断した。

3. 結果

1) DH 系統の育成

7,835 個の蕾中の葯を培養し、2 から 4 ヶ月後に 177 の花粉粒由来の再分化系統が得られた (Fig. 4)。その後、176 個体から自殖種子が得られた。

2) 果実形質評価

Fig. 5 は、DH 集団における平均果実縦径の度数分布を示す。両親である「K9-11」は 55.1 mm、「AC2258」は 60.0 mm であった。F₁ は 76.7 mm を示し、両親を上回る値であった。また、DH 系統については、平均 60.2 mm であり、32.2 mm から 114.5 mm までの範囲に全系統が分布し、連続的に分離した。両親間の差は 4.9 mm で、DH 全体の分離幅の約 6% であった。

Fig. 6 は、DH 集団における平均果実横径の度数分布を示す。「K9-11」で 55.4 mm、「AC2258」で 32.4 mm であった。F₁ は 45.0 mm を示し、両親のほぼ中間の値であった。また、DH 系統については、平均 41.5 mm であり、27.1 mm から 60.3 mm

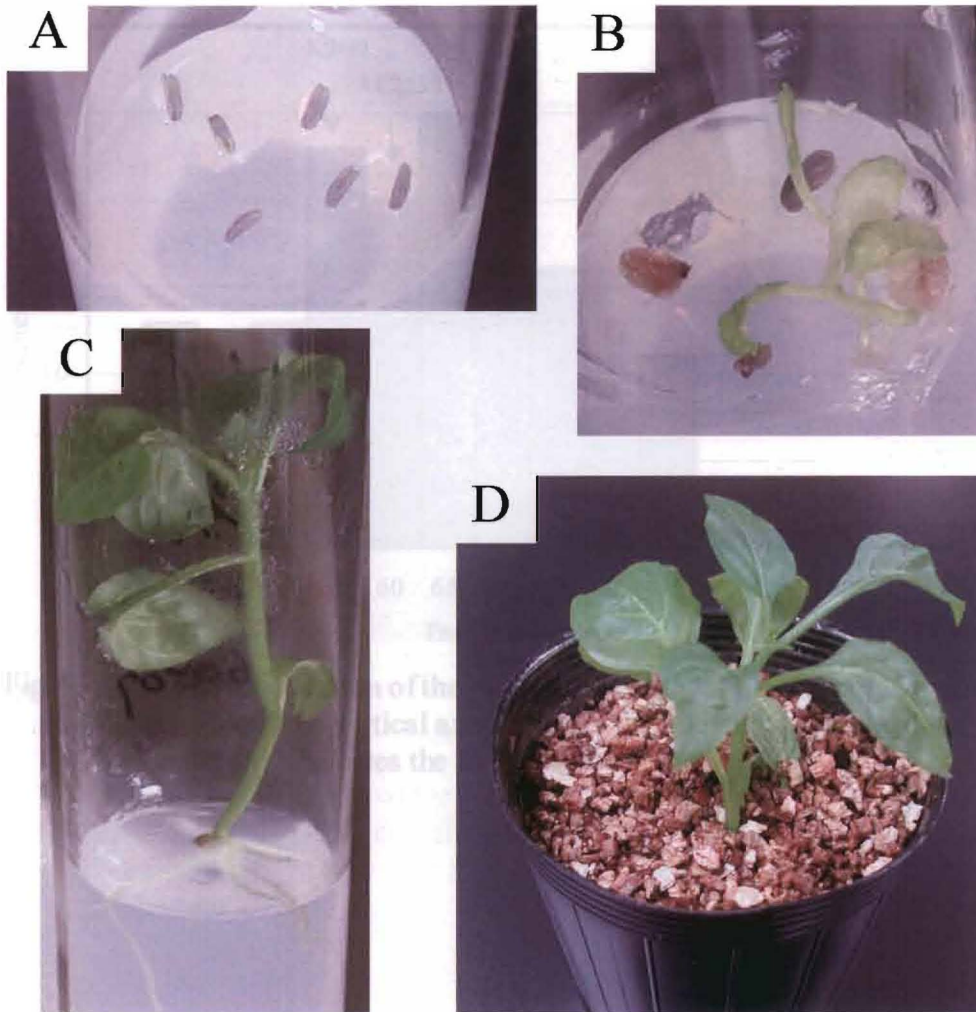


Fig. 4. Anther culture of an F_1 hybrid between two accessions of *C. annuum*, 「K9-11」 and 「AC2258」. Anthers in the sterilized buds were inoculated on CP medium (A): Plantlets were regenerated after two to four months without transplanting to another medium (B): Plantlet was transplanted into another medium (C): Anther cultured plants were acclimatized under a mist (D).

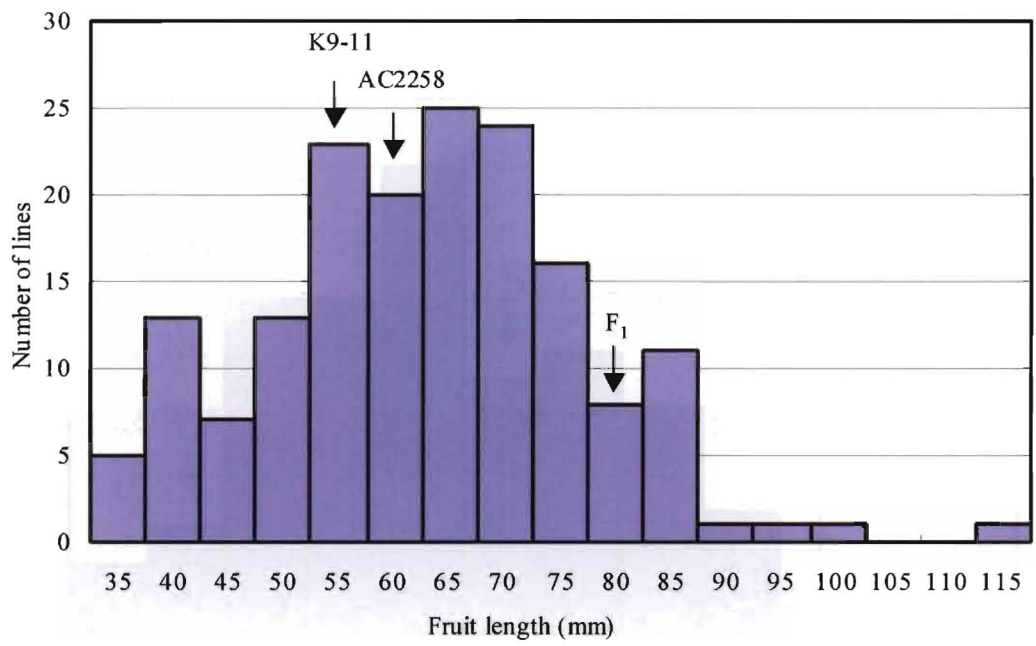


Fig. 5. Frequency distribution of the mean fruit length with a DH population of sweet pepper. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the fruit length (mm).

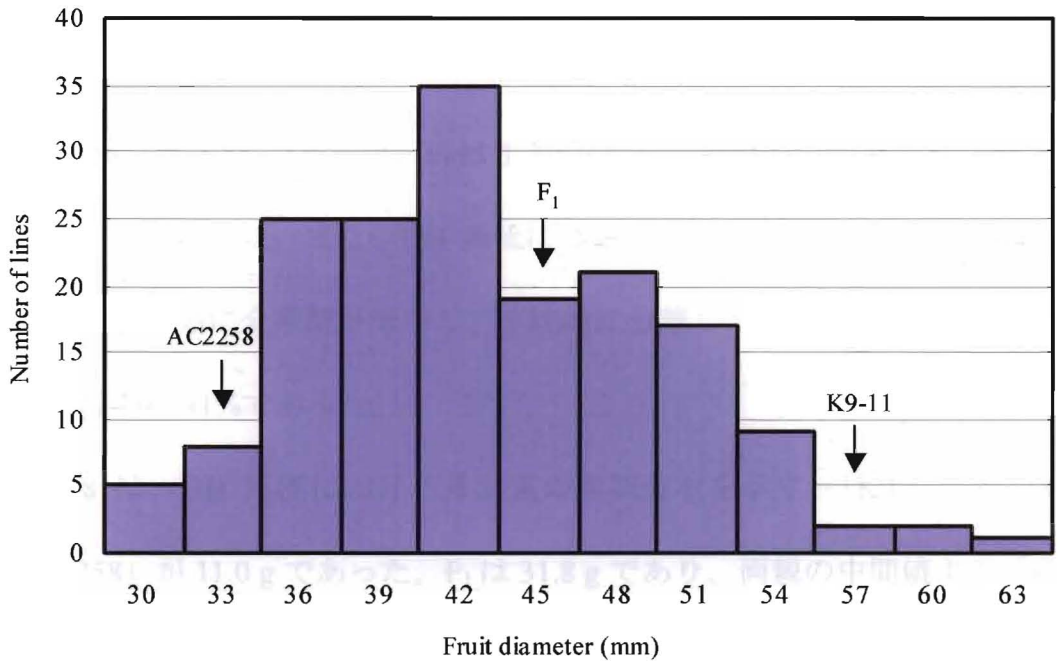


Fig. 6. Frequency distribution of the mean fruit diameter with a DH population of sweet pepper. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the fruit diameter (mm).

までの範囲に全系統が分布し、連続的に分離した。「K9-11」は、DH 系統の上から 5 番目に位置し、また、「AC2258」は下から 12 番目に位置した。両親間の差は、DH 全体の分離幅の約 69%であり、比較的大きな差が認められた。

Fig. 7 は、DH 集団における果実縦横比の度数分布を示す。「K9-11」が 0.99 で、「AC2258」が 1.86 であった。F₁ は 1.71 を示し、両親の中間値より「AC2258」側に近い値であった。また、DH 系統については、平均 1.50 であり、0.67 から 2.81 までの範囲に全系統が分布し、連続的に分離した。両親間の差は、DH 全体の分離幅の約 41%であった。

Fig. 8 は、DH 集団における果実重の度数分布を示す。「K9-11」が 38.5 g、「AC2258」が 11.0 g であった。F₁ は 31.8 g であり、両親の中間値より「K9-11」側に近い値であった。また、DH 系統については、平均 23.8 g であり、9.6 g から 50.3 g までの範囲に全系統が分布し、連続的に分離した。「K9-11」は、DH 系統の上から 9 番目に位置し、また、「AC2258」は下から 3 番目に位置し、両親間の差は、DH 全体の分離幅の約 68%であり、比較的大きな差が認められた。

3) PMMoV 抵抗性評価結果

PMMoV 抵抗性遺伝子 (*L*³) を持つ系統は、ウイルス接種後 3 から 6 日で過敏反応による壊死症状を呈し、抵抗性遺伝子を持たない罹病性の系統は接種後 6 日経過しても形態的变化はみられなかった (Fig. 9)。両親である「K9-11」は抵抗性、「AC2258」は罹病性であった。F₁ は「K9-11」と同じ抵抗性であり、優性形質であることが確認された。また、DH 系統については、176 系統中 99 系統

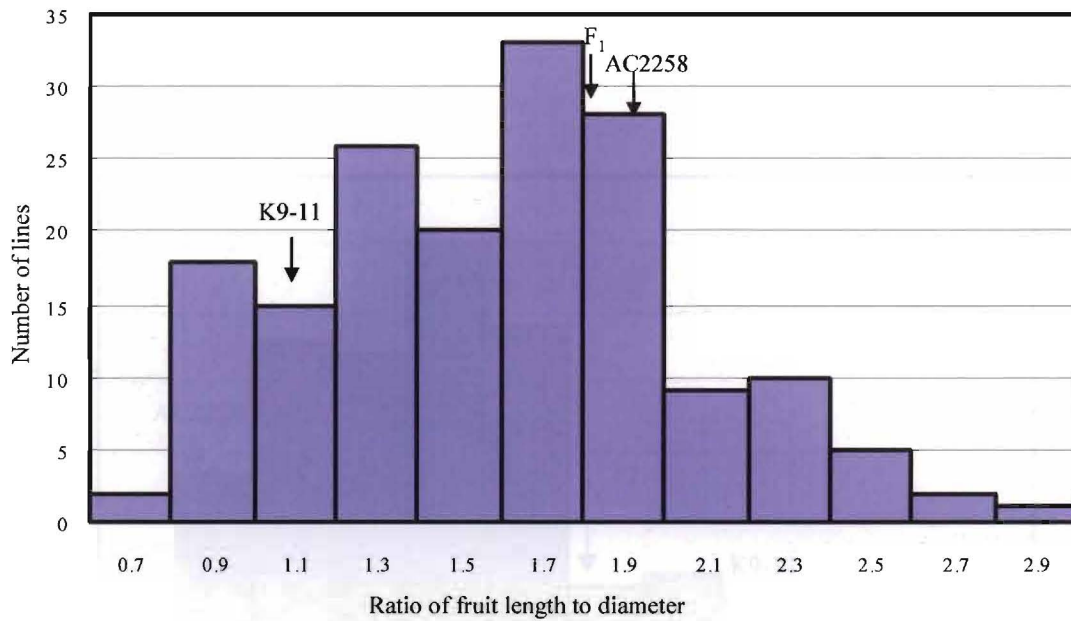


Fig. 7. Frequency distribution of the mean ratio of fruit length to diameter with a DH population of sweet pepper. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the ratio of fruit length to diameter.

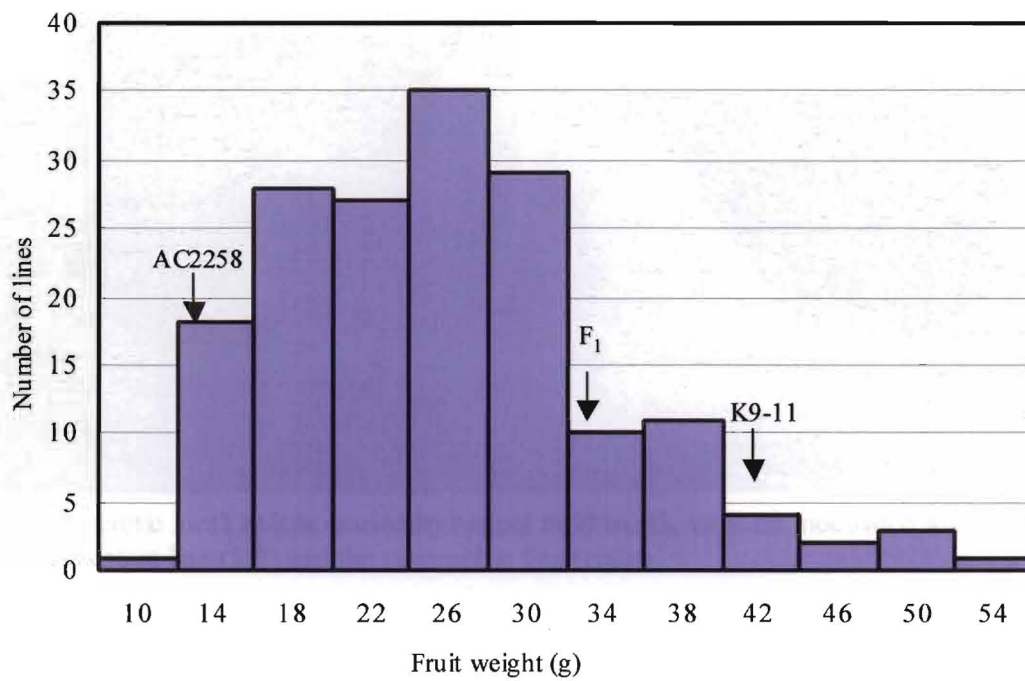


Fig. 8. Frequency distribution of the mean fruit weight with a DH population of sweet pepper. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the fruit weight (g).

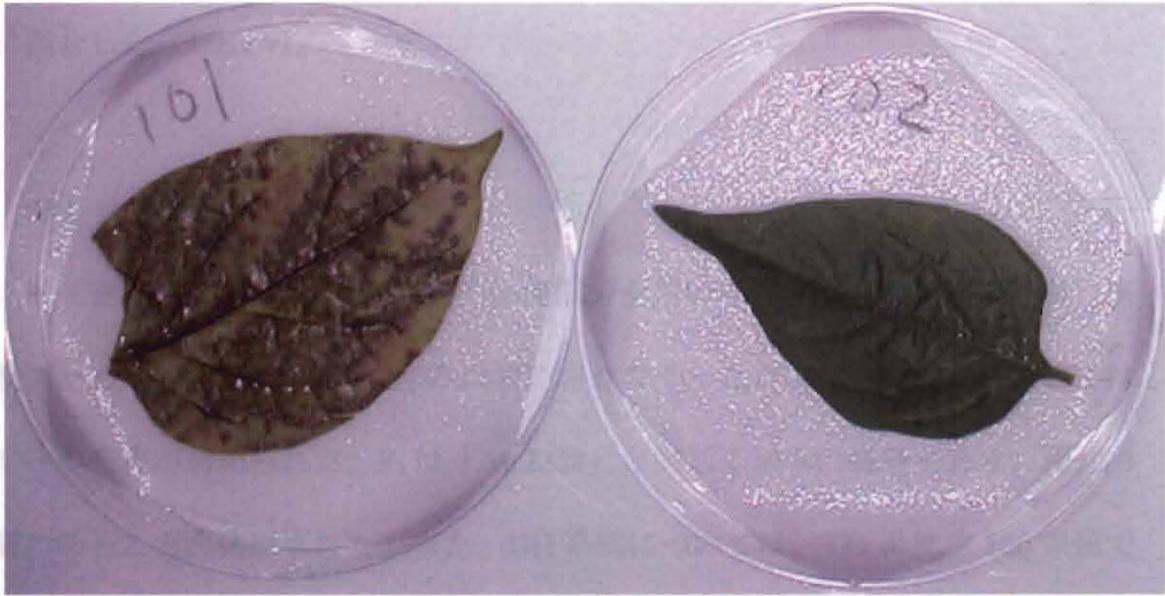


Fig. 9. Necrotic local lesions caused by pepper mild mottle virus on inoculated leaves of the resistant line (left) and the susceptible line (right).

が抵抗性、77 系統が罹病性であり、BC₁ 系統については、190 系統中 100 系統が抵抗性、90 系統が罹病性であった (Table 7)。それぞれの集団における抵抗性の分離比は、DH および BC₁ 世代における単一主働遺伝子の期待される分離比 1:1 に適合した (Table 7)。

3) 辛み評価結果

開花後 30 から 40 日目の果実の胎座部分を用いて官能検査を行った結果、両親である「K9-11」において辛みは確認されなかったが、「AC2258」においては辛みの発現が認められた。F₁ は「AC2258」と同じく辛みの発現があり、優性形質であることが確認された。また、DH 系統については、173 系統中 100 系統で辛みが確認され、73 系統で辛みの発現が無かった。DH 集団における辛み発現の分離比は、DH 世代における単一主働遺伝子の期待される分離比 1:1 に適合 ($\chi^2=4.21$ 、 p 値=0.04) した。

4. 考察

ピーマン果実形質における縦径、横径および果実形に関して、扁円形の果実形質をコントロールする *O* 遺伝子が関与している場合には、主働因子による完全優性または不完全優性の遺伝を示すことが報告されているが (Khambanonda 1950、Peterson 1959)、その他の場合についての遺伝的な評価に関する報告は少ない。また、果実重に関しても、量的な遺伝を示すことも報告されている (Khambanonda 1950、Miyazawa 1953)。本研究の結果から、縦径、横径、果実形および果実重の DH 系

Table 7. Segregation data for phenotypes of PMMoV resistance in DH and BC₁ population

Population	Number of lines	Resistant	Susceptible	χ^2 (1:1)	p value
DH	176	99	77	2.75	0.097
BC ₁	190	100	90	0.52	0.468

統における頻度分布は、いずれも連続的に分離したことから、それらの形質発現に関しては複数の量的な因子が関与していると推測された。複数の遺伝子が関与する形質については、従来までの交雑分離集団を用いた統計遺伝学的手法ではその遺伝様式の解明は困難である。今後、分子マーカーを用いた QTL マッピングにより、これら QTL の蓄積を図っていかなければならない。

PMMoV 抵抗性評価結果および辛み評価結果に関しては、本研究で用いた手法によりそれぞれの形質が明瞭に判断することができた。各形質については、現在までに単一主働遺伝子支配による質的な遺伝形質であることが報告されているが (Holmes 1937、Boukema 1982)、本研究の結果からもこのことが伺われた。しかし、各形質の DH での分離については、 χ^2 検定の結果から DH 世代における単一主働遺伝子の期待される分離比 1:1 に適合しているものの、PMMoV 抵抗性検定については抵抗性側 (「K9-11」型) に、又は辛み検定結果についても辛みの無い系統 (「K9-11」型) の頻度が期待されるよりやや高かった。また、PMMoV 抵抗性検定については、BC₁ 世代の分離比と比較してもその頻度がやや高い傾向にあった。トウモロコシやオオムギの薬培養由来 DH 集団においては、再分化能が低い親の方の持つ対立遺伝子が淘汰されることにより分離比の歪みを生じるという報告がある (Graner ら 1991、Murigneux ら 1993)。本研究で供試した「K9-11」は、「K-9」の薬培養によって育成された系統であり、本研究の結果からも「K-9」と「AC2258」では、薬培養再分化能に大きな差があることから、再分化能が低い「AC2258」の持つ対立遺伝子が薬培養の過程において淘汰され、分離比の歪みを生じている可能性が示唆された。現在、日本国内および宮崎県

内において、最も広く発生し大きな被害を及ぼしている PMMoV の病原型は P₁₂ である。「K9-11」は、PI 159236 由来の抵抗性因子 L³ を有しており、P₁₂ に対し抵抗性を示すことから、本研究で得られた抵抗性評価結果を基に L³ に連鎖した DNA マーカーを開発し、マーカー選抜育種による L³ 抵抗性新品種の早期育成を図らなければならない。

本研究で得られた遺伝解析用分離集団である DH176 系統およびそれらの形態的特性調査結果は、今後のピーマン育種における DNA マーカー利用技術の開発に大きく寄与することが期待される。

5. 摘要

一段階培養法を用いて、7,835 個の蕾中の葯を培養し、176 個体から自殖種子が得られた。これらの種内交雑由来 DH176 系統を用い、各種形態的特性の調査を行った。縦径、横径、果実形および果実重の遺伝様式については、DH 集団での分離においていずれも連続的な分離を示したことから、それらの形質発現に関しては複数の量的な因子が関与していることが示唆された。PMMoV 抵抗性および辛みの遺伝様式に関しては、DH および BC₁ 世代における分離比により、単一主働遺伝子支配による質的な遺伝形質であることが確認された。また、供試した DH 集団については、それぞれの遺伝子座において、「K9-11」型の頻度がやや高い傾向にあることから、分離比の歪みを生じている可能性が示唆された。

本研究で得られた遺伝解析用分離集団である DH176 系統およびそれらの形態的特性調査結果は、今後のピーマン育種における DNA マーカー利用技術の開発

に大きく寄与することが期待される。

第2章 *Capsicum annuum* の種内交雑由来倍加半数体集団を用いた 分子マーカーの開発と連鎖地図の作製

DNA マーカーを開発する手法としては、一般的に制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism ; RFLP) 法、ランダム増幅断片長多型 (Random amplified polymorphic DNA ; RAPD) 法 (Williams ら 1990)、マイクロサテライト (Microsatellites)、または単純反復配列 (Simple sequence repeat ; SSR) 法 (Tautz 1989、Weber と May 1989) および増幅断片長多型 (Amplified fragment length polymorphism ; AFLP) 法 (Vos ら 1995) 等がその目的に応じて用いられている。これらの DNA マーカーを用いて、多くの作物で連鎖地図の作製が進められており、それに伴って多くの有用な形質に関する遺伝様式の解明やそれに連鎖した DNA マーカーが見出されるようになってきた (Caranta ら 1999、Moury ら 2000、Sun ら 2005、Ferdous ら 2006)。さらに、農業上の有用な形質は、QTL が関与していることが多く、正確な QTL 解析を行うためには、広域ゲノム領域を網羅した連鎖地図を作製することが必要不可欠である。また、目的とする形質によっては、別の分離集団で新しく連鎖地図を作製しなければならないため、少ない予算と労力で、迅速に作製する技術が必要である。

そこで、本章においては、第1章で育成したピーマン種内交雑由来 DH 集団を用いて、第1節で質的形質である PMMoV (P₁₂) に対する抵抗性遺伝子座 L^3 および辛み発現に関する遺伝子座 C に連鎖した分子マーカーの開発を、第2節で HEGS/AFLP および RAPD 法を用いた迅速な連鎖地図の作製について述べる。

第1節 PMMoV(P₁₂) 抵抗性遺伝子座 L³ および辛み発現に関する遺伝子座 C に連鎖した分子マーカーの開発

1. 緒言

PMMoV は、P₀、P₁、P₁₂ および P₁₂₃ の 4 つの病原型に分類され、*Capsicum* 属においては、Table 8 に示すように、病原型に対して 4 つの対立抵抗性遺伝子 L¹、L²、L³ および L⁴ があることが知られている。*C. chinense* (PI 159236) 由来の L³ 因子は P₁₂ 型に対して、*C. chacoense* (PI 260429) 由来の L⁴ 因子は P₁₂ および P₁₂₃ 型に対して抵抗性を示すが、L¹ および L² 因子については、それらに対し抵抗性を示さないなど明確な遺伝子対遺伝子の反応を示すことが報告されている (Boukema 1982)。

また、ピーマンと同じ *C. annuum* に属するトウガラシは、独特な辛みを有しており、香辛料として利用され、世界中で広く栽培されている。辛みの主成分はカプサイシンで、果実の生育とともにその胎座部分に蓄積される。ピーマンにおける耐病性等の有用形質は、辛みのある様々なトウガラシ野生種が有することから、辛みに関する DNA マーカーはピーマン育種において非常に有用である。

近年、ピーマンにおいては、キュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus; CMV) (Ben ら 2001b)、トマトスポテッドウィルトウイルス (Tomato spotted wilt virus; TSWV) (Moury ら 2000) およびポテトウイルス Y (Potato virus Y; PVY) (Caranta ら 1999) 等の各種病害抵抗性、辛み (Blum ら 2002) および完熟果実色 (Popovsky と Paran 2000、Huh ら 2001) 等の各種形質に連鎖した DNA マ

Table 8. Relationship between the resistant genotypes and PMMoV pathotypes (Boukema 1982)

Resistant genotypes	Tobamovirus pathotypes			
	P ₀	P ₁	P ₁₂	P ₁₂₃
<i>L</i> ¹	R ¹⁾	S	S	S
<i>L</i> ²	R	R	S	S
<i>L</i> ³	R	R	R	S
<i>L</i> ⁴	R	R	R	R

¹⁾ R: resistant, S: susceptible.

ーカーが作出されてきている。しかし、一部形質に対応した DNA マーカーしか開発されておらず、今後さらに多くの形質に対応した実用的な DNA マーカーの開発と蓄積を図っていかなければならない。

そこで、本節では、質的形質である PMMoV (P₁₂) に対する抵抗性遺伝子座 *L*³ および辛み発現に関する遺伝子座 *C* に連鎖した分子マーカーの開発について述べる。

2. 材料および方法

1) 供試材料

供試材料として、「K9-11」、「AC2258」および前章の第 2 節で育成した薬培養由来 DH176 系統を用いた。

なお、PMMoV 抵抗性に連鎖した DNA マーカーを開発するためのバルク法 (Bulked segregant analysis) (Michelmore ら 1991) においては、「K9」の薬培養由来 DH 系統のうち、抵抗性系統 10 系統、罹病性 10 系統の計 20 系統を供試した。

2) DNA の抽出

ピーマンからの DNA 抽出は、若い上位葉を用いて、CTAB 法 (Murray と Thompson 1980) および Nucleon PHYTOPURE (Amersham LIFE SCIENCE、Buckinghamshire) により行った。

3) バルク法を用いた **RAPD** 解析

PMMoV 抵抗性に連鎖した DNA マーカーを開発するため、バルク法による RAPD 解析を行った。「K9」の薬培養由来 DH 系統のうち、抵抗性系統 10 系統の DNA をバルク化したものを「抵抗性バルク DNA」として、罹病性 10 系統の DNA をバルク化したものを「罹病性バルク DNA」として供試した。2 種類の 10 塩基プライマー (Operon Technologies、Alameda、CA) を混合した 809 の組み合わせで、プライマーの選定を行った。

4) **RAPD** 解析の条件

PCR 反応液組成は、鋳型 DNA 20 ng、1 x reaction buffer (10 mM Tris HCl、pH 8.3、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl)、200 μM dNTPs、0.2 μM ランダムプライマー、2 unit *rTaq* DNA ポリメラーゼ (Takara Biomedicals、Otsu)、合計 20 μl の反応液量で行った。PCR 反応については、Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 および 9700 を用いて行った。初めに、95°C で 2 分間の熱変性を行い、次いで熱変性を 94°C で 1 分間、アニーリングを 35°C で 2 分間、伸長反応を 72°C で 3 分間、合計 45 サイクルで増幅し、最後に 72°C で 7 分間の処理をした。PCR 増幅産物は、0.5 x TBE buffer (44.5 mM Tris/Borate、1 mM EDTA/disodium) の 2%アガロースゲル (SeaKem GTG agarose、FMC BioProducts、Rockland) で電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色した。

5) *L*³ 遺伝子座近傍に位置する DNA マーカーの **SCAR** マーカー化

L^3 に連鎖している RAPD 増幅産物をアガロースゲルで分離し、目的とする DNA 断片を切り出した後、グラスパウダー法 (GeneClean、BIO101、La Jolla) により精製した。これを DNA Ligation Kit Ver.1 (Takara Biomedicals、Otsu) を用いて pT7BlueT-vector (Stratagene、La Jolla) に連結し、大腸菌 JM109 系統 (Toyobo、Osaka) に形質転換後、増殖させた。大腸菌 JM109 から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN、Hilden) を用いてプラスミドを分離精製後、塩基配列の決定を行った。PCR 反応液組成は、鋳型 DNA 20ng、1 x reaction buffer (10 mM Tris HCl、pH 8.3、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl)、200 μ M dNTPs、0.2 μ M PCR プライマーおよび 1 unit *rTaq* DNA ポリメラーゼ (Takara Biomedicals、Otsu) とし、反応総液量 20 μ l とした。PCR 反応条件は、初めに 95°C で 1 分間の熱変成を行い、次いで熱変性を 94°C で 30 秒間、アニーリングを 55°C で 20 秒間、伸長反応を 72°C で 40 秒間、合計 35 サイクルで増幅し、最後に 72°C で 7 分間の処理を行った。反応終了後、PCR 増幅産物を 0.5 x TBE バッファーを用いた 13% ポリアクリルアミドゲルおよび 2% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色した。また、Sequence-characterized amplified region (SCAR) マーカーは、「AC2258」 x F₁ (「K9-11」 x 「AC2258」) 由来 BC₁190 系統および *Capsicum* 属 4 種 19 系統を用いて PCR を行い、また、*Capsicum* 属 3 種 6 系統を用いダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定し、有効性を確認した。

6) C 遺伝子座近傍に位置する SSR マーカーの開発とフラグメント解析

Blum ら (2002) の報告をもとに、データベース上の fibrillin 遺伝子 (GenBank

accession No. X77290) と fibrillin 遺伝子改名後の Plastid-lipid-associated protein (PAP) 遺伝子 (GenBank accession No. AJ131456、Pozueta-Romero ら 1997) 情報をもとにプライマーを設計し、PCR 産物は、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列データをもとに新たに 6-FAM で蛍光標識したプライマー-PAP-SSR を合成し、ABI310 および GeneScan™ (Applied Biosystems、Foster City) を用いてフラグメント解析を行った。また、DNA マーカーの有効性を確認するため、*Capsicum* 属 3 種 28 系統を用いフラグメント解析を行い、*Capsicum* 属 3 種 23 系統を用いダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。得られたデータをもとに以下の公式により多型情報含有 (Polymorphic information content ; PIC) 値を求めた。

$$PIC = 1 - \sum_i P_{ij}^2 \quad (P_{ij} \text{ は } i \text{ マーカーにおける } j \text{ アレルの頻度を示す})。$$

7) データ解析

L^3 および C 遺伝子座近傍に位置する DNA マーカーと各遺伝子座の連鎖解析は、MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander ら 1987) で行った。

3. 結果

1) バルク法による L^3 因子に連鎖した **RAPD** マーカーの開発

バルク法により、809 の組み合わせで、プライマーのスクリーニングを行った結果、バルク間で多型を示す 1 つのプライマー-E18 が得られた。E18 プライマーによって増幅された抵抗性バルク由来断片 E18₂₇₂ と罹病性バルク由来断片

E18₂₈₆ は、バルク間で再現性のある多型を示した。さらに、これらのマーカーを用いて DH 集団における分離について確認したところ (Fig. 10A、Table 9)、E18₂₇₂ と E18₂₈₆ の 2 つの RAPD マーカーは、各 DH 系統では同時に存在せず、共分離を示した。そこで、連鎖解析を行った結果、これらの RAPD マーカーは L^3 因子から 2.8cM に位置していた。

「K9-11」と「AC2258」を用いて、E18₂₇₂ と E18₂₈₆ の 2 つの RAPD マーカーについて塩基配列を解析したところ、「K9-11」において 272 bp、「AC2258」において 286 bp の断片長を示し、「K9-11」において 14 bp の欠失が認められた (Fig. 11)。両断片には、欠失以外の相違は認められず、その相同性は 95% であった。

得られた塩基配列データをもとに、それぞれ 3 つのプライマー、PMF1、PMF2 および PMR1 を設計した (Fig. 11)。PMF1 と PMR1 のプライマーを用いた場合、抵抗性を示す「K9-11」型アレルの 269 bp の断片 PMFR11₂₆₉ と、罹病性を示す「AC2258」型アレルの 283 bp の断片 PMFR11₂₈₃ が増幅された (Fig. 10B)。PMF2 と PMR1 のプライマーを用いた場合、抵抗性を示す「K9-11」型アレルの 200 bp の断片 PMFR21₂₀₀ のみが増幅された (Fig. 10C)。従って、これらの PMFR11₂₆₉ と PMFR11₂₈₃ は共優性マーカーであり、特に PMFR21₂₀₀ は抵抗性型特異的な優性マーカーであることが示された。また、DH 集団における PCR の結果、PMFR11₂₈₃、PMFR11₂₆₉ および PMFR21₂₀₀ は RAPD マーカーと同じ分離を示し、 L^3 因子から 2.8cM に位置した。

開発したマーカーの有効性確認のため、「AC2258」× F₁ (「K9-11」×「AC2258」) から得られた 190 の BC₁ 集団を用いて、SCAR マーカーと接種検定による抵抗

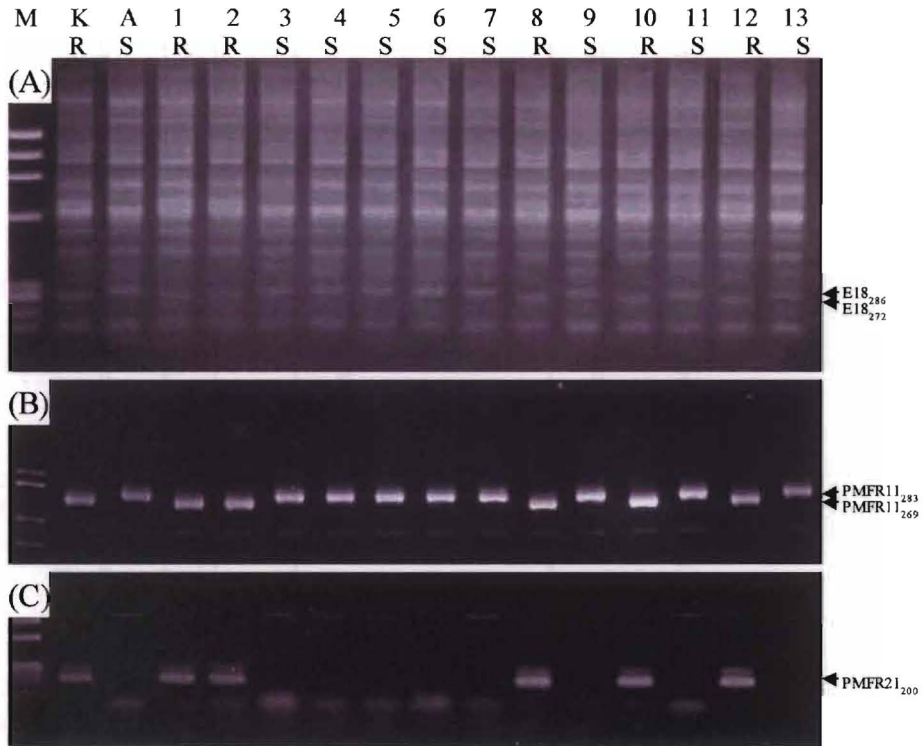


Fig. 10. DNA amplification patterns with primers, E18 (A), PMF1 and PMR1 (B), PMF2 and PMR1 (C). M: Molecular marker (ϕ X174/HaeIII digest); K: 「K9-11」, A: 「AC2258」, 1-13: Segregating DH individuals. Arrowheads indicate the RAPD (A) and the SCAR markers (B and C) linked to the L^3 gene. R: resistant individuals. S: susceptible individuals.

Table 9. Segregation of RAPD and SCAR markers in DH¹⁾ and BC₁²⁾ populations

DNA markers	DH				BC ₁			
	Resistant		Susceptible		Resistant		Susceptible	
	+ ³⁾	-	+	-	+	-	+	-
E18 ₂₇₂	95	0	3	0	nt ⁴⁾	nt	nt	nt
E18 ₂₈₆	2	0	73	0	nt	nt	nt	nt
PMFR11 ₂₆₉	88	0	3	0	96	0	3	0
PMFR11 ₂₈₃	2	0	70	0	4	0	87	0
PMFR21 ₂₀₀	88	10	3	72	nt	nt	nt	nt

¹⁾ One hundred seventy-three, 163 and 173 individuals of DH population were examined for the E18₂₇₂ and E18₂₈₆, PMFR11₂₆₉ and PMFR11₂₈₃, and PMFR21₂₀₀ markers.

²⁾ One hundred ninety individuals of the BC₁ population were examined for the PMFR11₂₆₉ and PMFR11₂₈₃ markers.

³⁾ + and -: presence and absence of the DNA markers.

⁴⁾ Not tested.

PMF1

E18₂₇₂ 1: GGACTGCAGAACACAATGGCACGGGGTAAAGGTCTTAAACAT'TGT CATGTATAAAGCTAG 60

E18₂₈₆ 1: GGACTGCAGAACACAATGGCACGGGGTAAAGGTCTTAAACAT'TGT CATGTATAAAGCTAG 60

PMF2

61: GAT'TAAAGAGT'GCCAAAATGTAATTG-----AAAC'AAAAAGGAATAAA 106

61: GAT'TAAAGAGT'GCCAAAATGTAATTGGA CAT'TTTTAAACAAACTAAAAAGGAATAAA 120

107: CAAAT'TGAAACAACGGGAGTAATACCT'TTAACAGCAACCTCACGGAAGTTGGTCTTGGTG 166

121: CAAAT'TGAAACAACGGGAGTAATACCT'TTAACAGCAACCTCACGGAAGTTGGTCTTGGTG 180

167: TTGGAGTAAAGCCTCTTCCAAATCATCCAGAATCATCGGACTTGGAGGCAAGAGATCAAGA 226

181: TTGGAGTAAAGCCTCTTCCAAATCATCCAGAATCATCGGACTTGGAGGCAAGAGATCAAGA 240

PMR1

227: GGATTC'TTTGGCTTAGGCTTGGGTGCT'GCTTCCTCC'TCTGCAGTCC 272

241: GGATTC'TTTGGCTTAGGCTTGGGTGCT'GCTTCCTCC'TCTGCAGTCC 286

Fig. 11. Nucleotide sequences of E18₂₇₂ and E18₂₈₆ fragments. Underlined parts indicate the sequence of the E18 primer for RAPD. Black borders indicate the positions of SCAR primers. The upper sequence indicates the 「K9-11」 allele, and the lower indicates the 「AC2258」 allele. Asterisk indicates an area with coincidental parts. Hyphen indicates an area with insertion parts in the 「AC2258」 allele.

性との関係を調査した結果、DH 集団を用いた場合とほぼ同じ分離比を示し、 L^3 に連鎖していることが確認された (Table 9)。

Table 10 は、共優性の SCAR マーカー PMFR11₂₈₃ および PMFR11₂₆₉ と *Capsicum* 属 4 種 19 系統における抵抗性遺伝子型について示したものである。その結果、PMMoV 抵抗性の遺伝子型が L^+ 、 L^1 、 L^2 および L^4 の系統では PMFR11₂₆₉ は検出されなかった。遺伝子型が L^3 である 11 系統のうち 7 系統では PMFR11₂₆₉ が検出されたが、それ以外の 4 系統では検出されなかった。 L^3 遺伝子をホモで有する PI 159236 および「ベルマサリ」では、PMFR11₂₆₉ のみが検出されたが、 L^3 遺伝子をヘテロで有する F₁ 品種「ひむかみどり」、「T-143」、「トサヒメ R」および「スピリット」では PMFR11₂₈₃ と PMFR11₂₆₉ の両方が検出された。また、Matsunaga ら (2003) によって開発された WA-1500S は L^4 遺伝子を有する系統のみで検出され、 L^3 遺伝子を有する品種では検出されなかった。

Fig. 12 は、SCAR マーカー PMFR11₂₈₃ および PMFR11₂₆₉ を用いて、 L^3 抵抗性遺伝資源の PI 159236 と L^4 抵抗性遺伝資源の PI 260429 を含む 3 種 6 系統において、塩基配列を解析した結果を示す。PMMoV 罹病性の「AC2258」と「カリフォルニアワンダー」は同じ塩基配列を示し、また、抵抗性遺伝子型 L^3 を有する PI 159236、「K9-11」および「ベルマサリ」が同じ塩基配列を示した。さらに、抵抗性遺伝子型 L^4 を有する PI 260429 に比べて、「AC2258」と「カリフォルニアワンダー」では 7 塩基対、「K9-11」、PI 159236 および「ベルマサリ」では 7 塩基対および 14 塩基対の欠失が認められた。また、PI 260429 では、他の 5 系統に比べ 4 カ所で一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism ; SNP) が確認された。

Table 10. Resistant genotypes to PMMoV and amplification with SCAR markers, WA31-1500S¹⁾, PMFR11₂₆₉ and PMFR11₂₈₃ in 18 accessions of *Capsicum* spp

Accessions	Species	WA31-1500S	PMFR11		Resistant genotypes	Reaction ²⁾ to	
			269	283		P _{1,2}	P _{1,2,3}
AC2258	<i>C. annuum</i>	- ³⁾	-	+	<i>L</i> ⁺	S	S
Papri Gold	<i>C. annuum</i>	-	-	+	<i>L</i> ⁺	S	S
Kyouyutaka	<i>C. annuum</i>	-	-	+	<i>L</i> ¹	R	S
Tosahikari D	<i>C. annuum</i>	-	-	+	<i>L</i> ¹	R	S
Tabasco ⁴⁾	<i>C. frutescens</i>	-	-	+	<i>L</i> ²	R	R
PI159236 ⁴⁾	<i>C. chinense</i>	-	+	-	<i>L</i> ³	R	R
K9-11	<i>C. annuum</i>	-	+	-	<i>L</i> ³	R	R
Berumasari	<i>C. annuum</i>	-	+	-	<i>L</i> ³	R	R
Himukamidori	<i>C. annuum</i>	-	+	+	<i>L</i> ³	R	R
T-143	<i>C. annuum</i>	-	+	+	<i>L</i> ³	R	R
Tosahime R	<i>C. annuum</i>	-	+	+	<i>L</i> ³	R	R
Spirit	<i>C. annuum</i>	-	+	+	<i>L</i> ³	R	R
Mihata 1	<i>C. annuum</i>	-	-	+	<i>L</i> ³	R	R
Sarara	<i>C. annuum</i>	-	-	+	<i>L</i> ³	R	R
Miogi	<i>C. annuum</i>	-	-	+	<i>L</i> ³	R	R
Fiesta	<i>C. annuum</i>	-	-	+	<i>L</i> ³	R	R
PI260429 ⁴⁾	<i>C. chacoense</i>	+	-	+	<i>L</i> ⁴	R	R
Leira	<i>C. annuum</i>	+	-	+	<i>L</i> ⁴	R	R
Special	<i>C. annuum</i>	+	-	+	<i>L</i> ⁴	R	R

1) This dominant SCAR marker was developed by Matsunaga *et al.* (2003).

2) 'R' and 'S': 'resistant; local lesions' and 'susceptible; no symptoms' on inoculated leaves, respectively.

3) '+' and '-': presence and absence of the DNA markers.

4) These resistance genotypes were indicated by Boukema (1982).

		PMF1		
AC2258	1:	CTGCAGAACAACAATGGCACGGGGTAAAGGCTTAAACATGTGTCATGTATAAAGCTAGGAT	60	
California wonder	1:	CTGCAGAACAACAATGGCACGGGGTAAAGGCTTAAACATGTGTCATGTATAAAGCTAGGAT	60	
K9-11	1:	CTGCAGAACAACAATGGCACGGGGTAAAGGCTTAAACATGTGTCATGTATAAAGCTAGGAT	60	
Berumasari	1:	CTGCAGAACAACAATGGCACGGGGTAAAGGCTTAAACATGTGTCATGTATAAAGCTAGGAT	60	
PI 159236	1:	CTGCAGAACAACAATGGCACGGGGTAAAGGCTTAAACATGTGTCATGTATAAAGCTAGGAT	60	
PI260429	1:	CTGCAGAACAACAATGGCACGGGGTAAAGGCTTAAACATGTGTCATGTATAAAGCTAGGAT	60	
		*****		*****
AC2258	61:	TAAAGAGTTGCCAAAATGGTAATTGGACATTTTAAACACAACTAAAAAGGAA-----	113	
California wonder	61:	TAAAGAGTTGCCAAAATGGTAATTGGACATTTTAAACACAACTAAAAAGGAA-----	113	
K9-11	61:	TAAAGAGTTGCCAAAATGGTAATTG-----AACTAAAAAGGAA-----	99	
Berumasari	61:	TAAAGAGTTGCCAAAATGGTAATTG-----AACTAAAAAGGAA-----	99	
PI 159236	61:	TAAAGAGTTGCCAAAATGGTAATTG-----AACTAAAAAGGAA-----	99	
PI260429	61:	TAAAGAGTTGCCAAAATGGTAATTGGACATTTTAAACACAACTAAAAAGGAAAGTCAGA	120	
		*****		*****
AC2258	114:	TAAACAAATGAAACAACGGGAGTAATACCTTTAACAGCAACCTCACGGAAGTTGGTCTT	173	
California wonder	114:	TAAACAAATGAAACAACGGGAGTAATACCTTTAACAGCAACCTCACGGAAGTTGGTCTT	173	
K9-11	100:	TAAACAAATGAAACAACGGGAGTAATACCTTTAACAGCAACCTCACGGAAGTTGGTCTT	159	
Berumasari	100:	TAAACAAATGAAACAACGGGAGTAATACCTTTAACAGCAACCTCACGGAAGTTGGTCTT	159	
PI 159236	100:	TAAACAAATGAAACAACGGGAGTAATACCTTTAACAGCAACCTCACGGAAGTTGGTCTT	159	
PI260429	121:	TAAACAAATGAAACAACGGGAGTAATACCTTTAACAGCAACCTCACGGAAGTTGGTCTT	180	
		*****		*****
AC2258	174:	GGTGTTGGAGTAAAGCCTCTTCCAATCATCCAGAATCATCGGACTTGGAGGCAAGAGATC	233	
California wonder	174:	GGTGTTGGAGTAAAGCCTCTTCCAATCATCCAGAATCATCGGACTTGGAGGCAAGAGATC	233	
K9-11	160:	GGTGTTGGAGTAAAGCCTCTTCCAATCATCCAGAATCATCGGACTTGGAGGCAAGAGATC	219	
Berumasari	160:	GGTGTTGGAGTAAAGCCTCTTCCAATCATCCAGAATCATCGGACTTGGAGGCAAGAGATC	219	
PI 159236	160:	GGTGTTGGAGTAAAGCCTCTTCCAATCATCCAGAATCATCGGACTTGGAGGCAAGAGATC	219	
PI260429	181:	GGTGTTGGAGTAAAGCCTCTTCCAATCATCCAGGATCATCGGACTTGGAGGCAAGAGATC	240	
		*****		*****
		PMR1		
AC2258	234:	AAGAGGATCTTTGGCTTAGGCTTGGTGCTGCTTCCTCCTCTGCAGTCC	283	
California wonder	234:	AAGAGGATCTTTGGCTTAGGCTTGGTGCTGCTTCCTCCTCTGCAGTCC	283	
K9-11	220:	AAGAGGATCTTTGGCTTAGGCTTGGTGCTGCTTCCTCCTCTGCAGTCC	269	
Berumasari	220:	AAGAGGATCTTTGGCTTAGGCTTGGTGCTGCTTCCTCCTCTGCAGTCC	269	
PI 159236	220:	AAGAGGATCTTTGGCTTAGGCTTGGTGCTGCTTCCTCCTCTGCAGTCC	269	
PI260429	241:	AAGAGGATCTTTGGCTTAGGCTTGGTGCTGCTTCCTCCTCTGCAGTCC	290	
		*****		*****

Fig. 12. Nucleotide sequences of PMFR11 fragments on six accessions of three species in *Capsicum*. Black borders indicate the positions of SCAR primers, PMF1 and PMR1. Hyphen indicates area with lacking parts. Asterisk indicates area with coincidental parts.

2) C 遺伝子座に連鎖した DNA マーカーの開発

fibrillin 遺伝子上に設計された C 遺伝子座に連鎖した CAPS マーカー(Blum ら 2002) の利用を試みたが、本章で分離集団の親として用いている「K9-11」および「AC2258」上の fibrillin 遺伝子本体には SNP は認められなかった。そこで、fibrillin 遺伝子改名後の PAP 遺伝子周辺領域の塩基配列を比較したところ、翻訳開始地点から約 900 bp 上流地点でマイクロサテライトが見出された。辛みの無い「K9-11」では TA の 25 回繰り返しに対し、辛みのある「AC2258」では 23 回であった。そこで、マイクロサテライト領域を挟んで蛍光標識したプライマーを設計し、そこで得られた SSR マーカー PAP-SSR と辛みの評価結果をもとに C 遺伝子座との連鎖解析を行ったところ、0.6 cM の距離にあることが示された。さらに、PAP-SSR を用いたフラグメント解析により、*Capsicum* 属 3 種 28 系統における有効性の検定では、このマイクロサテライト領域においてホモ接合型およびヘテロ接合型の系統が確認でき、10 のアレルが認められた (Table 11)。

Fig. 13 は、*Capsicum* 属 3 種 23 系統において、PAP-SSR 断片を用いて塩基配列を決定した結果を示す。23 系統中 10 系統で TA が 25 回繰り返しのマイクロサテライトを有していた。その 10 系統は、全て辛みの無いピーマンおよびパプリカ系統で、「カリフォルニアワンダー」、「スピリット」、「スペシャル」、「フィエスタ」、「スーザン」、「レイラ」のパプリカ系統全てが含まれていた。辛みを有する系統は、最長の 36 回繰り返しを有する「ヤラペノ」と 23 回繰り返しを有する「AC2258」を除き、全て 11 回以下の繰り返し配列であった。また、「三重みどり」、「シントウ」、「ハバネロ」および PI 159236 では、塩基の挿入および

Table 11. Genotypes of PAP-SSR loci in 28 accessions of three species in *Capsicum*, using the primers labeled with fluorescent chemicals

Accessions	Species	Country of origin	Pungency	Genotype of SSR loci
K9-11	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	151/151
AC2258	<i>C. annuum</i>	Mexico	pungent	147/147
F ₁ (K9-11 x AC2258)	<i>C. annuum</i>	Japan	pungent	147/151
Kyouyutaka	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	149/155
Kyousuzu	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	155/155
Tosahikari-D	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	121/151
Shousuke	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	151/151
Miogi	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	151/151
Himukamidori	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	121/151
Kyounami	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	122/122
Berumasari	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	151/151
Miimidori	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	115/115
Takanotsume	<i>C. annuum</i>	Japan	pungent	121/121
Fushimiamanaga	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	121/121
Nanzenji	<i>C. annuum</i>	Japan	pungent	121/151
Shishitou	<i>C. annuum</i>	Japan	pungent	115/115
Wonder bell	<i>C. annuum</i>	Japan	non-pungent	151/151
California Wonder	<i>C. annuum</i>	USA	non-pungent	151/151
Leila	<i>C. annuum</i>	EU	non-pungent	151/151
Special	<i>C. annuum</i>	EU	non-pungent	151/151
Spirit	<i>C. annuum</i>	EU	non-pungent	151/151
Suizan	<i>C. annuum</i>	EU	non-pungent	151/151
Habanero	<i>C. chinense</i>	Mexico	pungent	120/120
Criollo de Morelos 334	<i>C. annuum</i>	Mexico	pungent	121/121
Jalapeño	<i>C. annuum</i>	Guatemala	pungent	176/176
LS 2341	<i>C. annuum</i>	Malaysia	pungent	120/120
PI 159236	<i>C. chinense</i>	Peru	pungent	116/116
PI 260429	<i>C. chacoense</i>	Argentina	pungent	120/120

K9-11	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
AC2258	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Kyousuzu	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Shousuke	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Miogi	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Kyounami	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Berumasari	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Miimidori	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	TTTT	ATATATATATA	60
Takanotsume	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Fushimiamanaga	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Shishitou	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	TTTT	ATATATATATA	60
California Wonder	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Leila	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Special	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Spirit	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Suizan	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Fiesta	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Habanero	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Criollo de morelos 334	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
Jalapeno	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
LS2341	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56
PI159236	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	TTAT	ATATATATATA	58
PI260429	1:CTCCAAACTACCCCTGGATTTTC	TAATC	TTAATTAAGGATTAT	---	ATATATATATA	56

K9-11)	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
AC2258)	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				88
Kyousuzu	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				96
Shousuke	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Miogi	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Kyounami	57:TATATATA	-----				64
Berumasari	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Miimidori	61:TATA	-----				64
Takanotsume	57:TATATATA	-----				64
Fushimiamanaga	57:TATATATA	-----				64
Shishitou	61:TATA	-----				64
California Wonder	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Leila	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Special	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Spirit	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Suizan	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Fiesta	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				92
Habanero	57:TA	-----			TG	60
Criollo de morelos 334	57:TATATATA	-----				64
Jalapeno	57:TATATATATATATATATATATATATATATATATATATA	-----				114
LS2341	57:TATATA	-----				62
PI159236	59:-----					59
PI260429	57:TATATA	-----				62
					
K9-11	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
AC2258	89:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				143
Kyousuzu	97:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				151
Shousuke	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Miogi	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Kyounami	65:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				119
Berumasari	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Miimidori	65:--TTATGATAATTT-----	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				112
Takanotsume	65:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				119
Fushimiamanaga	65:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				119
Shishitou	65:--TTATGATAATTT-----	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				112
California Wonder	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Leila	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Special	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Spirit	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Suizan	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Fiesta	93:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				147
Habanero	61:TTTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				117
Criollo de morelos 334	65:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				119
Jalapeno	115:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				169
LS2341	63:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				117
PI159236	59:--TTATGATAATTAATAATTA	AAAGTATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				113
PI260429	63:--TTATGATAATTAATAATTA	AAATTAATTTGCACATTTAAAAGCTATTTGGATTGAC				117

Fig. 13. Nucleotide sequences of PAP-SSR fragments on 23 accessions of three species in *Capsicum*. The microsatellite region located 900 bp upstream from the start codon of the fibrillin gene (Accession No.X77290). Black borders indicate the positions of SSR primers used in this study. Hyphen indicates area with lacking parts. Asterisk indicates area with coincidental parts.

欠失部位が、PI 159236 および PI 260429 では、それぞれ 1 ヶ所で SNP が認められた。このマイクロサテライト領域においては、PIC 値 0.76 を示し、多くのアレルが確認できた。

4. 考察

PMMoV 抵抗性に関する DNA マーカーとして、Lefebvre ら (1995) は、種間交雑 DH 集団を用いて L^3 遺伝子座から 4.0 cM に位置する RFLP マーカーを開発しているが、トマトプローブを用いているためその検出が煩雑で、より簡易且つ迅速に検出できる PCR マーカーが必要とされる。また、Matsunaga ら (2003) は、種内交雑 F_2 集団を用いて L^4 遺伝子座から 1.5 cM 以内に位置する SCAR マーカーを開発しているが、 L^4 抵抗性系統特異的なマーカーであり、 L^3 抵抗性系統の選抜に利用可能な PCR マーカーはまだ開発されていない。宮崎県や日本国内のピーマン産地において、最も広く発生し大きな被害を及ぼしている PMMoV の病原型は、P₁₂ であり、それに対応する L^3 抵抗性因子に連鎖した DNA マーカーの開発、および L^3 抵抗性品種の早期育成が強く求められている。

本研究で得られた E18₂₇₂ と E18₂₈₆ の 2 つの RAPD マーカーは、塩基配列の相同性が高く、共分離を示すことから、対立遺伝子座であると推定される。 L^3 抵抗性を持つ 11 系統のうち 7 系統では PMFR11₂₆₉ が検出された。このことから L^3 抵抗性遺伝資源である PI 159236 を除く 6 系統については、PI 159236 由来の L^3 遺伝子を持つことが推定される (矢ノ口ら 1993、松本ら 1999)。一方、4 系統では L^3 遺伝子を有しながら PMFR11₂₆₉ が検出されなかったが、これは抵抗性遺

伝資源が PI 159236 とは異なる、または選抜過程において PMFR11₂₆₉ と L^3 遺伝子間で組換えが生じたためと推察される。 L^3 抵抗性遺伝資源としては PI 159236 が有名であるが、PI 159236 と同じ *C. chinense* である PI 22225 も L^3 抵抗性を有する。PMFR11₂₆₉ が検出されなかったこれらの 4 系統については、いずれも市販品種のためその育成過程の詳細は明らかにされていないが、PI 22225 由来の L^3 抵抗性を有する可能性がある。本研究で開発した SCAR マーカー PMFR11 および PMFR21 は、ピーマン育種における PI 159236 由来の L^3 遺伝子導入のための DNA マーカーとして有効なことが示された。さらに、塩基配列解析結果から、 L^4 抵抗性遺伝資源の PI 260429 に対しても多型を示すことから、 L^4 抵抗性系統選抜のための DNA マーカーとしても使用できることが示唆された。

Blum ら(2002)によって、辛み発現に関する *C* 遺伝子座から 0.4 cM に位置する Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーが既に関連されているが、本研究で用いている「K9-11」および「AC2258」間で多型を示さないことから、汎用性の高い新たな DNA マーカーの開発が望まれる。

C 遺伝子座については第2染色体上の中央部分に位置している (Ben ら 2001b)。Blum ら (2002) は、*C. annuum* と *C. frutescens* の種間交雑 F_2 集団を用いて、*C* 遺伝子座から 0.4 cM に位置する CAPS マーカーを開発している。その CAPS マーカーは、cDNA サブトラクションによって得られ、データベース上の fibrillin 遺伝子と完全に一致していたと報告している (Blum ら 2002)。しかし、本章で分離集団の親として用いている「K9-11」と「AC2258」間では、fibrillin 遺伝子本体での塩基配列の違いを確認することは出来なかった。そこで、翻訳開始地

点から約 900 bp 上流地点でのマイクロサテライト領域を利用し、*C* 遺伝子座から 0.6 cM に位置する SSR マーカー PAP-SSR を開発した。この領域については、*Capsicum* 属 3 種を用いたフラグメント解析および塩基配列解析結果により、多くのアレルが存在し、選抜マーカーとしての有効性を確認できた。耐病性等の有用形質は、辛みのある様々な野生種が保有していることが多い。よって、この研究により得られた辛みに関する SSR マーカーは、ピーマン育種において非常に重要な DNA マーカーであり、今後の分子育種学的研究およびマーカー選抜育種に貢献するものと考えられる。

5. 摘要

ピーマン (*C. annuum*) 種内交雑による 176 系統の葯培養由来半数体倍加 (DH) 集団を用い、バルク法により L^3 遺伝子に連鎖した RAPD マーカーの開発を行った。そこで得られた共優性の RAPD マーカー E18₂₇₂ および E18₂₈₆ について、クローニング後、塩基配列を決定し、SCAR マーカーに変換した。DH 集団および戻し交配集団を用いた PCR 分析の結果、全ての SCAR マーカー、PMFR11₂₆₉、PMFR11₂₈₃ および PMFR21₂₀₀ は RAPD マーカーと同じ分離を示し、 L^3 遺伝子から 2.8 cM の距離に位置づけられた。さらに、共優性の SCAR マーカー PMFR11₂₆₉ および PMFR11₂₈₃ を用いて *Capsicum* 属 4 種 19 系統における有効性の検定を行った結果、本章で開発した SCAR マーカーは、ピーマン育種における PI 159236 由来 L^3 遺伝子導入のためのマーカー選抜育種に有効なことが示唆された。さらに、塩基配列解析結果から、 L^4 抵抗性遺伝資源の PI 260429 に対しても多型を示

すことから、 L^4 抵抗性系統選抜のための DNA マーカーとしても使用できることが示唆された。

さらに C 遺伝子座近傍のマーカーを得るため、Plastid-lipid-associated protein (PAP) 遺伝子上流のマイクロサテライト領域を利用し、 C 遺伝子座から 0.6 cM に位置する SSR マーカー PAP-SSR を開発した。この領域については、*Capsicum* 属 3 種を用いたフラグメント解析および塩基配列解析結果により、多くのアレルが存在し、選抜マーカーとしての有効性を確認できた。

以上のことから、本章で得られた L^3 および C に連鎖した DNA マーカーは、ピーマン育種において非常に有益な DNA マーカーであり、今後の分子育種学的研究およびマーカー選抜育種に貢献するものと考えられる。

第2節 連鎖地図の作製

1. 緒言

連鎖地図の作製には、RFLP マーカー、RAPD マーカー、SSR マーカーおよび AFLP マーカー等が一般的に用いられている。Table 12 は、それぞれの手法についての特性をまとめたものである。RFLP は、得られるマーカーは基本的に共優性マーカーであるが、PCR を基本とした RAPD、SSR および AFLP に比べ多量の DNA を必要とし、多くの時間や労力、コストを必要とする。また、他の手法に比べ、一度に得られるバンドの数も少なく、マッピング効率は非常に低い。RAPD は、他の手法に比べ熟練を必要とせず、簡易に行えるため、最も一般的に行われている手法である。しかし、得られるマーカーは基本的に優性マーカーであり、PCR の機種や温度、バッファー濃度等の変化により再現性が見られない場合がある。また、AFLP に比べ多くの DNA を必要とし、一度に得られるバンドの数は、RFLP に比べて多いが、AFLP に比べると少ない。一方、AFLP は、一度に多くのバンドが得られ、マッピングの効率は非常に高いが、作業が繁雑で熟練を要する上、アイソトープや蛍光標識したプライマーによるシーケンサを用いて検出する技術が一般的であり、高価な機器と施設を必要とする。近年、Kawasaki ら (2000) によって開発された小型電気泳動装置を用いたシステム (HEGS: High efficiency genome scanning) と AFLP を組み合わせて用いることで、アイソトープや特殊な施設を使わずに簡易に効率よく連鎖地図を作製することが可能となった。

Table 12. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP, SSR and HEGS/AFLP for genetic analysis

	Methods				
	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	HEGS/AFLP
Amount of DNAs	Many	Middle	Little	Middle	Little
Number of bands at once	Little	Middle	Many	Single	Many
Expenses	Expensive	Expensive	Inexpensive	Expensive in initial	Inexpensive
Reproduction	High	Low	High	High	High
Experience	Necessary	Unnecessary	Necessary	Unnecessary	Middle
Equipments	Necessary	Unnecessary	Necessary	Unnecessary	Unnecessary
Marker types	Codominant	Dominant	Dominant (codominat in part)	Codominant	Dominant (codominat in part)

トウガラシ類においては、これまでトマト由来の RFLP プローブを用いて Tanksley ら (1988)、Prince ら (1993)、Lefebvre ら (1995) および Livingstone ら (1999) が連鎖地図の作製を行っている。また、Kang ら (2001) は、種間交雑の F₂ 集団を用い 150 の RFLP および 430 の AFLP マーカーによる連鎖地図の作製を行っている。しかし、これらの手法は、多くの労力を要する上、アイソトープや高価な機器と施設を必要とするため、一般的に行うことは困難である。

そこで、本節では、HEGS/AFLP および RAPD 法を用いた迅速な連鎖地図の作製について述べる。

2. 材料および方法

1) 供試材料

供試材料として、「K9-11」、「AC2258」および前章の第 2 節で育成した薬培養由来 DH176 系統を用いた。

2) DNA 抽出

DNA の抽出は、本章第 1 節で述べた方法に準じた。

3) RAPD 解析の条件

10 塩基および 12 塩基 (Operon Technologies, Alameda, CA ; BEX, Tokyo) の 2,397 ランダムプライマー組み合わせを用いて行った。PCR 反応条件および反応液組成は、本章の第 1 節で述べた方法に準じた。

4) AFLP 解析の条件

AFLP のバンド増幅条件については、Vos ら (1995) の方法を用い、電気泳動とバンドの検出については Kawasaki ら (2000、2003) による HEGS 法を用いて行った。すなわち、鋳型 DNA 250 ng を *MseI* 5 unit と *EcoRI* 5 unit、*MseI* 5 unit と *PstI* 5 unit および *MseI* 5 unit と *XbaI* 5 unit で切断し、アダプター (Table 13) を結合した後、1 回目の増幅プライマー (Table 13) を用い PCR 反応を行った。PCR 産物を 1/10 TE (Tris EDTA) バッファーで 1/100 に希釈したものを鋳型 DNA とし、セレクトティブプライマー (Table 13) を用いて 10 μ l 総量で 2 回目の PCR 反応を行った。PCR 産物を 13%ポリアクリルアミドゲルで 4 連の電気泳動装置 (日本エイドー、Tokyo) を用いて、250 V で 30 分、420 V で 3 時間電気泳動し、SYBR Green I (BMA、Rockland) で 30 分染色後、フルオロイメージアナライザー (FLA-3000G、Fuji film、Tokyo) を用い励起波長 473 nm で検出した。

5) RFLP、SCAR、CAPS および SSR 解析の条件

RFLP 解析は、コーネル大学より分譲されたトマト由来の 3 クローンをプローブに Gene Image (Amersham LIFE SCIENCE、Buckinghamshire) を用いて行った。SCAR マーカーについては、既に報告のあるプライマー情報を利用した (Table 14)。CAPS マーカーについては、データベース上の既知遺伝子の塩基配列情報をもとにプライマーを設計した (Table 14)。SSR マーカーについては、データベースより取得した Expressed sequence tag (EST) 情報をもとに、SSR 領域を含むプライマーを設計した (Table 14)。また、既に報告されている連鎖地図と関

Table 13. Nucleotide sequences of the primers and adapters used in AFLP analysis

Primers / Adapters	Nucleotide sequences
<i>Mse</i> I adapter 1	5'- gac gat gag tcc tga g -3'
<i>Mse</i> I adapter 2	5'- tac tca gga ctc at -3'
<i>Eco</i> RI adapter 1	5'- ctc gta gac tgc gta cc -3'
<i>Eco</i> RI adapter 2	5'- aat tgg tac gca gtc tac -3'
<i>Pst</i> I adapter 1	5'- ctc gta gac tgc gta cat gca -3'
<i>Pst</i> I adapter 2	5'- tgt acg cag tct ac -3'
<i>Xba</i> I adapter 1	5'- ctc gta gac tgc gta cc -3'
<i>Xba</i> I adapter 2	5'- cta ggg tac gca gtc tac -3'
<i>Mse</i> I primer (+1)	5'- gat gtg tcc tga gta ac -3'
<i>Eco</i> RI primer (+1)	5'- gac tgc gta cca att ca -3'
<i>Pst</i> I primer (+1)	5'- gac tgc gta cat gca gg -3'
<i>Xba</i> I primer (+1)	5'- gac tgc gta ccc tag ac-3'
<i>Mse</i> I primer (+3)	5'- gat gtg tcc tga gta ac + aa(M1), ac(M2), ag(M3), at(M4), ca(M5), cc(M6), cg(M7), ct(M8), ga(M9), gc(M10), gg(M11), gt(M12), ta(M13), tc(M14), tg(M15), tt(M16) -3'
<i>Eco</i> RI primer (+3)	5' - gac tgc gta cca att ca + aa(E1), ac(E2), ag(E3), at(E4), ca(E5), cc(E6), cg(E7), ct(E8), ga(E9), gc(E10), gg(E11), gt(E12), ta(E13), tc(E14), tg(E15), tt(E16) -3'
<i>Pst</i> I primer (+3)	5'- gac tgc gta cat gca gg + ga, gt, ta, tc, tg, tt -3'
<i>Xba</i> I primer (+3)	5'- gac tgc gta ccc tag ac + cc(X6), cg(X7), ct(X8), ga(X9), gc(X10), gg(X11) -3'

Table 14. Nucleotide sequences and information of the primers used in this study

Markers ¹⁾	Primers	Description	Forward primer	Reverse primer	Reference
CAPS	CCS	<i>C. annuum</i> capsanthin/capsorubin synthase gene	5'-gggtacatgggtgctctag-3'	5'-gagggacaagagtggagcag-3'	X77289
CAPS	Sn-2	<i>C. annuum</i> Sn-2 gene	5'-tgaagtgtggaggaagcctg-3'	5'-gcgtcgattgatggggccaa-3'	X79231
CAPS	LCYB	<i>C. annuum</i> lycopene Beta-cyclase	5'-gcacctgttgggaaaatggatacg-3'	5'-gatcccagataagtcgaattcattc-3'	X86221
CAPS	N4F6R6	<i>Nicotiana glutinosa</i> virus resistance (<i>N</i>) gene	5'-aggctctgggataagggaactacca-4'	5'-tgatggtggaaccaactcgggac-3'	U15605
SCAR	ASC002	CAPS marker linked to <i>Pvr4</i> in pepper ²⁾	5'-cgaagagagaaggtc-3'	5'-tcagggtagggtatt-3'	Caranta <i>et al.</i> 1999
SCAR	H6-4	SCAR marker linked to <i>Bs3</i> in pepper	5'-aagcttaacacatcttc-3'	5'-ttaaaccggtggctgttac-3'	Pierre <i>et al.</i> 2000
SCAR	H17-52	SCAR marker linked to <i>Bs3</i> in pepper	5'-cttataataacagagcgg-3'	5'-gtaatgagccacactaac-3'	Pierre <i>et al.</i> 2000
SCAR	S19	CAPS marker linked to <i>Bs2</i> in pepper ²⁾	5'-ctgaccagccaacatgg-3'	5'-ctgaccagcccttcaacttac-3'	Tai <i>et al.</i> 1999
SCAR	PMFR11	SCAR marker linked to <i>L³</i> in pepper	5'-ctgcagaacaacaatggcagc-3'	5'-ggactcgagaggaggaagc-3'	Sugita <i>et al.</i> 2004
SCAR	PMFR21	SCAR marker linked to <i>L³</i> in pepper	5'-gccaaaatggttaattgaaac-3'	5'-ggactcgagaggaggaagc-3'	Sugita <i>et al.</i> 2004
SCAR	D11Scar650	SCAR marker developed from RAPD marker D11 ₈₄₂	5'-aatcacactgggtgtgac-3'	5'-ctggataagatggaaggga-3'	Ogundiwin <i>et al.</i> 2005
SCAR	Bs2	<i>C. chacoense</i> disease resistance protein <i>Bs2</i> mRNA	5'-tgcctgggctaccatactc-3'	5'-acagatccacttggcaatc-3'	AF202179, Ogundiwin <i>et al.</i> 2005
SSR	PAP-SSR	Microsatellite from <i>C. annuum</i> PAP gene	5'-ctccaaactaccctcgtgattttc-3'	5'-gtcaatccaaatagacttttaaatgtgc-3'	X77290, AJ131456, Sugita <i>et al.</i> 2005
SSR	<i>Hpms</i> 1-41	Pepper microsatellite from <i>Hind</i> III library	5'-gggtatcatccgtgaaagttagg-3'	5'-caagaggtatcacaaatgagagg-3'	Lee <i>et al.</i> 2004
SSR	<i>Hpms</i> 1-43	Pepper microsatellite from <i>Hind</i> III library	5'-aaccagcaatccatgaaaacc-3'	5'-gggctttgggagaaatgtgtg-3'	Lee <i>et al.</i> 2004
SSR	<i>Hpms</i> 2-24	Pepper microsatellite from <i>Pst</i> I/ <i>Mbo</i> I library	5'-tcgtattggctgtgattaccg-3'	5'-ttgaatcgaatacccgaggag-3'	Lee <i>et al.</i> 2004
SSR	<i>Hpmshp</i> MADS	Microsatellite from <i>C. annuum</i> MADS gene	5'-tgccttcaaaacaattgcatgg-4'	5'-gcgtctaagcaaacacacattac-3'	Lee <i>et al.</i> 2004
SSR	AF242731	Microsatellite marker designed from EST of pepper	5'-gggctgacggccattaagaac-3'	5'-cagacagctagaagagaggaattctg-3'	Lee <i>et al.</i> 2004
SSR	SSR6	Microsatellite marker designed from SSR sequence	5'-tgggaagagaaattgtgaaagc-3'	5'-agacccaatgtgtccaatc-3'	Ogundiwin <i>et al.</i> 2005
SSR	PM12	Microsatellite marker designed from EST of pepper	5'-gcagaagcataattgctg-3'	5'-ggagtaactcaaaagttgc-3'	BM067867, Sugita <i>et al.</i> 2006
SSR	PM18	Microsatellite marker designed from EST of pepper	5'-cgacagtctttcaagaactaga-3'	5'-agtggagcaaacacagcaga-3'	CA516439, Sugita <i>et al.</i> 2006
SSR	PM37	Microsatellite marker designed from EST of pepper	5'-cggaaactaaacacactttctc-3'	5'-cggttccgcaacggctatt-3'	CA525390, Sugita <i>et al.</i> 2006
SSR	PM53	Microsatellite marker designed from EST of pepper	5'-cgcgccagttcaactcca-3'	5'-gcagcaaaagtctcaaacctcag-3'	CA847557, Sugita <i>et al.</i> 2006

¹⁾ Cleaved amplified polymorphic sequence markers and simple sequence repeat markers were used to design gene sequence with previously established database. Sequence-characterized amplified region markers were from published literature.

²⁾ These CAPS markers were available as dominant SCAR markers on our DH population.

連づけさせるため、Leeら（2004）およびOgundiwinら（2005）によって報告されている76のSSRマーカーおよび7のSCARマーカーを供試した（Table 14）。

7) データ解析

DNA マーカーおよび L^3 および C の 2 つ表現形質データを用いて、MAPMAKER/EXP 3.0b（Landerら1987）により、最大組換え価25 cM、LODスコア3.0以上の条件で連鎖解析を行った。

3. 結果

1) RAPD マーカーおよび AFLP マーカーの開発

RAPD 法による2,397プライマー組み合わせを用いた総多型数/総バンド数(多型率)は1,305/10,941(11.9%)となり、1プライマー当たりの平均多型数/平均バンド数は0.5/4.6であった。また、HEGS/AFLP (Fig. 14)を用いた *EcoRI/MseI*、*PstI/MseI* および *XbaI/MseI* の各184、95および94プライマー組み合わせによる総多型数/総バンド数(多型率)では、1,349/11,074(12.2%)、418/3,150(13.3%) および642/4,445(14.4%)となり、それぞれの1プライマー当たりの平均多型数/平均バンド数は7.3/60.2、4.4/33.2 および6.8/47.3であった。ピーマンにおけるRAPDとAFLPによる多型率に大きな差は認められなかったが、1プライマー当たりの平均多型数については、RAPDと比較してAFLPで *EcoRI/MseI*、*PstI/MseI*、*XbaI/MseI* を用いた場合にそれぞれ13.6、8.2 および12.7倍の差があった。また、AFLPについては *EcoRI/MseI* の組み合わせにおいて1プライマー当たりの平均

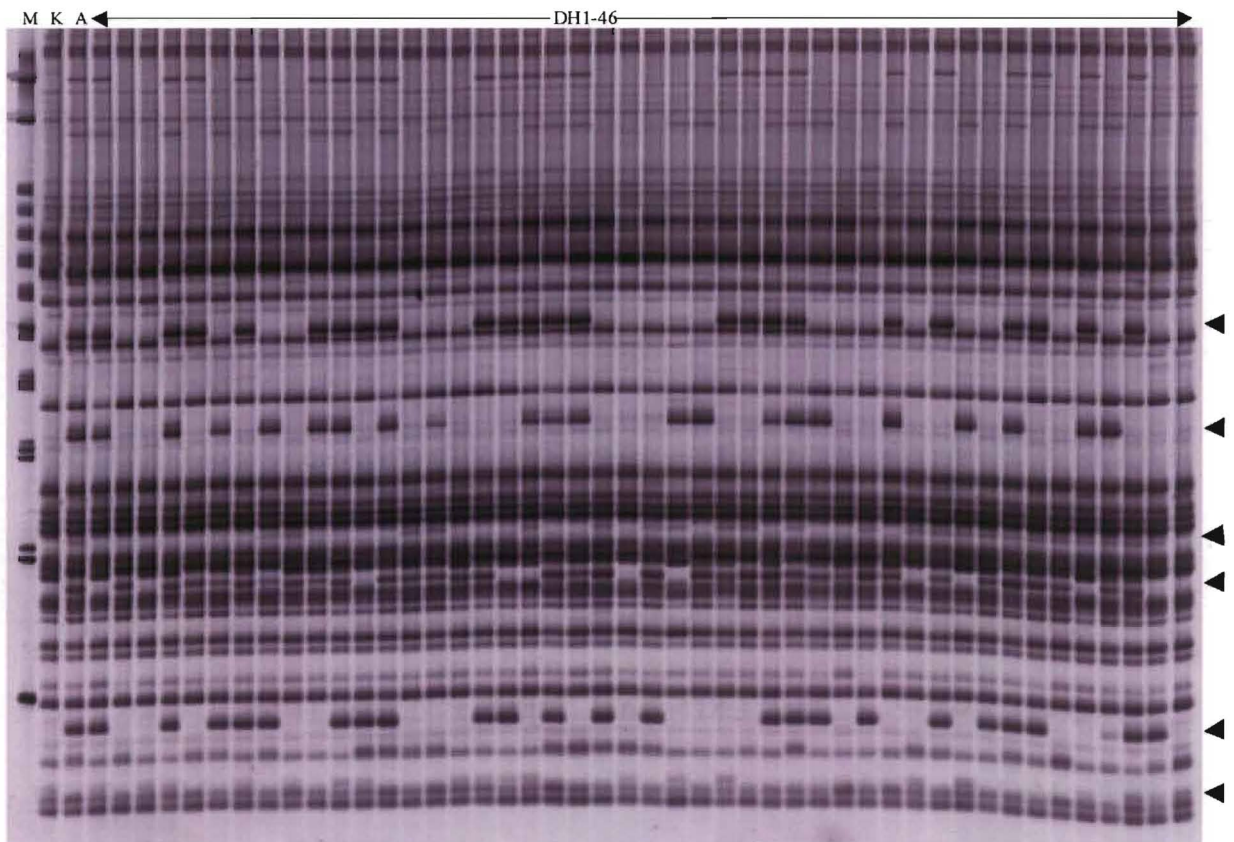


Fig. 14. Amplified fragment length polymorphism analysis of an intraspecific DH population using primer combination M10/E12. M: Molecular marker (100bp ladder). K: 「K9-11」. A: 「AC2258」. DH1-46: DH individuals. Arrowheads on the right side show polymorphic bands.

多型数および平均バンド数が最も多く (*EcoRI/MseI* > *XbaI/MseI* > *PstI/MseI*)、*XbaI/MseI* で1プライマー当たりの多型率が最も高かった (*XbaI/MseI* > *PstI/MseI* > *EcoRI/MseI*)。しかし、*EcoRI/MseI* を用いた場合は、プライマーの種類にもよるが、*XbaI/MseI*、*PstI/MseI* を用いた場合に比べ、バンドが密集しすぎて判別が困難な場合が生じた。また、マッピングされた382の AFLP マーカーのうち42で共優性を示した。

2) 連鎖地図の作製

382の AFLP マーカー、122の RAPD マーカー、3の RFLP マーカー、8の SCAR マーカー、4の CAPS マーカーおよび11の SSR マーカーからなる計530の DNA マーカーと L^3 および *C* の2形質を用いた連鎖解析の結果、224のフレームワークマーカーによる11の大きな連鎖群 (56.8–118.3 cM) と5の小さな連鎖群 (1.8–26.6 cM) の計16の連鎖群から構成された、総連鎖群長1,100.5 cM、平均マーカー間距離4.6 cMの連鎖地図が得られた (Fig. 15)。しかし、多くの AFLP マーカーおよび RAPD マーカーは、LG1からLG10、LG12およびLG16の密集した領域に位置づけられた。マーカーの分離比の歪みが $P < 0.01$ を超えていたものは52あり、その領域はLG3、LG9およびLG11に集中した。

3) L^3 および *C* 遺伝子座に連鎖した DNA マーカーの開発

DH系統における PMMoV 抵抗性 (L^3) 検定結果に基づき、作製した連鎖地図を用い連鎖解析を行った結果、 L^3 遺伝子座はLG6の末端部分に位置づけられ

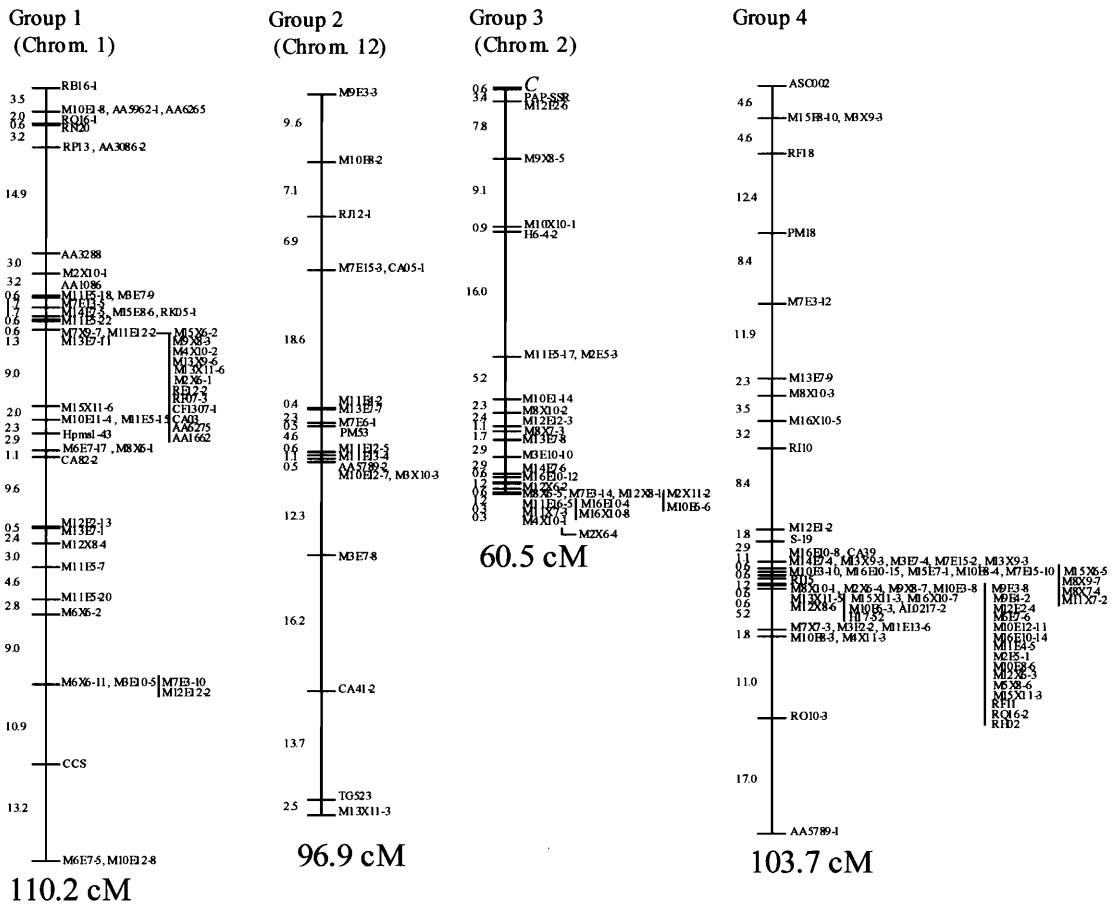
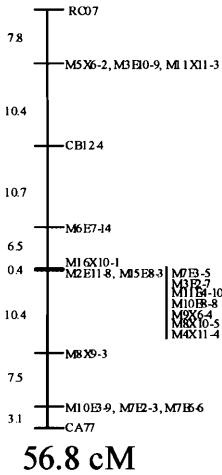
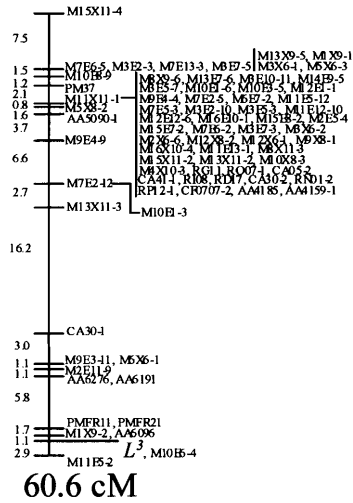


Fig. 15. A linkage map of the pepper on an intraspecific DH population, derived from F₁ crossed between 「K9-11」 (*C. annuum*) and 「AC2258」 (*C. annuum*), using a total of 530 molecular markers consisting of 382 AFLP markers, 122 RAPD markers, three RFLP markers, eight SCAR markers, four CAPS markers and eleven SSR markers. The map is constructed with 224 loci distributed into 16 linkage groups with a total genetic distance of 1,100.5 cM. CA, CB, RA-Q and AA (CA × CA) are RAPD markers on the right side of each linkage group. TG designates the tomato RFLP markers. Amplified fragment length polymorphism markers are named according to the combinations of selective primers in Table 7 used, followed by the numbers given in descending order of fragment length. C is a phenotypic loci for pungency, and L³ is a phenotypic loci for resistance to P_{1,2} in PMMoV. Map distances are in centiMorgans (cM) calculated by the Kosambi function, indicated on the left side of each linkage group.

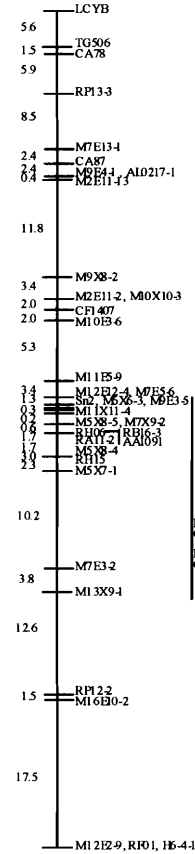
Group 5



Group 6
(Chrom. 11)



Group 7
(Chrom. 5)



Group 8

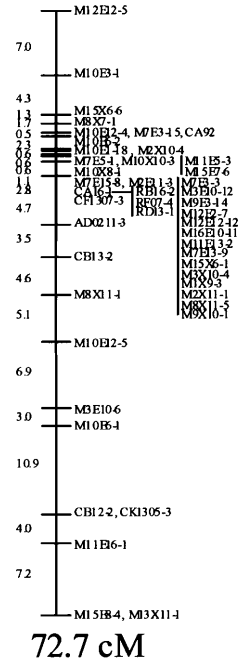
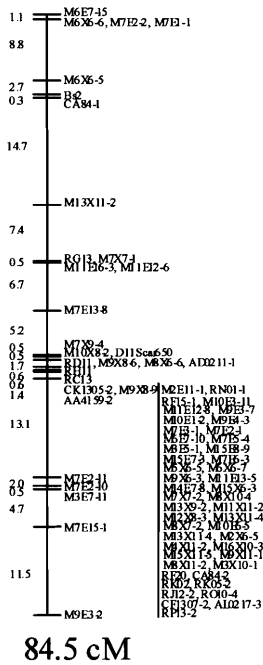
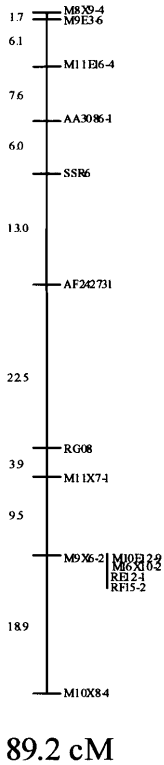


Fig. 15. Continued

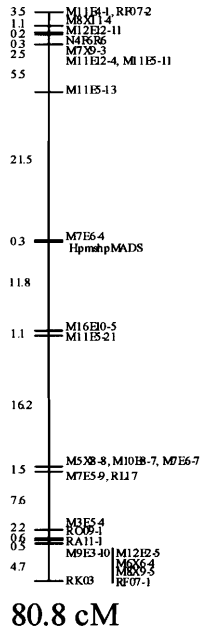
**Group 9
(Chrom. 9)**



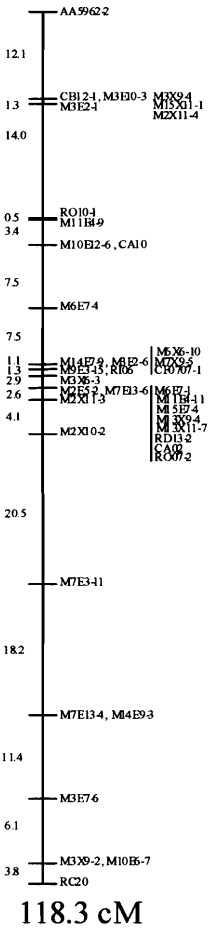
Group 10



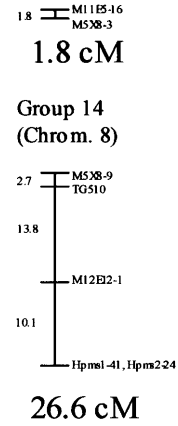
**Group 11
(Chrom. 8)**



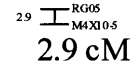
Group 12



Group 13



Group 15



Group 16

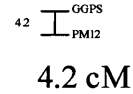


Fig. 15. Continued

(Fig. 15)、0 cMの位置に M10E6-4 (250 bp)、1.1 cM の位置に M1X9-2 (320 bp) および AA6096 (680 bp)、さらに L^3 遺伝子座を挟んで反対側 2.9 cM の位置に M11E5-2 (1.2 kbp) の多くの近傍のマーカーが得られていた (Fig. 16、Table 15)。

また、DH 系統における辛み評価に基づき、作製した連鎖地図を用い連鎖解析を行った結果、辛み発現に関する C 遺伝子座は、LG3 の末端部分に位置づけられ (Fig. 15)、4 cM に位置する AFLP マーカー M12E2-6 (720 bp) が得られた。

4. 考察

多くの農業上有用な形質については、QTL が関与していることが多く、様々な遺伝解析用集団を用いて、多くの QTL の蓄積を行うためには、広域ゲノム領域を網羅した連鎖地図を迅速に作製する技術が必要不可欠である。DNA マーカーの作製効率について、RAPD と AFLP による多型率に大きな差は認められなかったが、1 プライマー当たりの平均多型数は、AFLP の方が RAPD よりも約 10 倍多く認められた。また、530 の DNA マーカーと L^3 および C の 2 形質マーカーを用い連鎖解析を行った結果、16 の連鎖群からなる、総連鎖群長 1,100.5 cM の連鎖地図が得られた。一般的に種間交雑集団に比べ多型の検出頻度が低い種内交雑由来 DH 集団においても、HEGS/AFLP を用いることで迅速な連鎖地図の作製が可能であった。本研究で得られた多くの AFLP マーカーおよび RAPD マーカーは、LG1 から LG10、LG12 および LG16 上の一部領域に密集した。これらは、セントロメアに近い領域に位置づけられた。このような結果は、オオムギ (Hori ら 2003) やイネ (Kawasaki ら 2003) でも認められているが、その程度

Group 6
(Chr. 11)

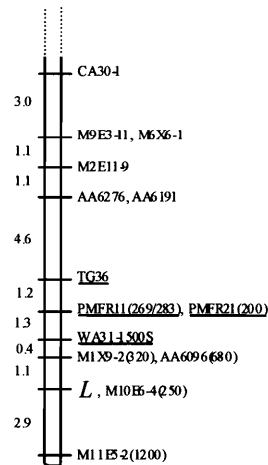


Fig. 16. Position of the *L* locus for resistance to PMMoV and linked markers in *Capsicum*. Underlined markers, TG36 using a tomato probe, was mapped by Lefebvre *et al.* (1995). WA31-1500S, a SCAR marker was mapped by Matsunaga *et al.* (2003). PMFR11₂₆₉, PMFR11₂₈₃ and PMFR21₂₀₀, the SCAR markers were mapped by Sugita *et al.* (2004). Map distances are in centiMorgans (cM) calculated by the Kosambi function, indicated on the left side of the linkage map.

Table 15. Frequency distribution of PMMoV resistance dependent on markers in DH¹⁾ populations

DNA markers	Resistant		Susceptible	
	+ ²⁾	-	+	-
PMFR21 ₂₀₀ ³⁾	88	10	3	72
PMFR11 ₂₆₉	88	0	3	0
PMFR11 ₂₈₃	2	0	70	0
AA6096 ₆₈₀	86	1	1	71
M1X9-2 ₃₂₀	98	1	1	71
M10E6-4 ₂₅₀	97	0	0	75
M11E5-2 ₁₂₀₀	92	5	0	74

¹⁾ One hundred sixty-three individuals were examined for PMFR11₂₆₉ and PMFR11₂₈₃, 159 for AA6096₆₈₀, 171 for M1X9-2₃₂₀, 172 for M10E6-4₂₅₀ and 171 for M11E5-2₁₂₀₀ markers.

²⁾ + and -: presence and absence of the DNA markers.

³⁾ PMFR21₂₀₀, PMFR11₂₆₉ and PMFR11₂₈₃ are SCAR markers described by Sugita *et al.* (2004).

はピーマンの方が高かった (Livingston ら 1999、Kang ら 2001)。このことは、ピーマンゲノムの特性であり、セントロメア付近での遺伝的組換え頻度が他の領域に比べ低いものと考えられる。また、マーカー間距離が長い領域が認められることや小さな連鎖グループが認められることなどから、マーカーの位置づけが困難な領域があることが推定された。

L^3 遺伝子座は、第 11 染色体上の末端部分に位置している (Livingstone ら 1999、Lefebvre ら 2002)。C 遺伝子座については第 2 染色体上の中央部分に位置している (Ben ら 2001b)。 L^3 および C の 2 形質マーカーと既報の連鎖地図に共通するアンカーマーカーにより、幾つかの連鎖群はトウガラシ染色体に割り当てることが可能であった。LG1 は、*Hpms1-43* および CCS が位置しているのでトウガラシ第 1 染色体に、LG2 は、TG523 により第 12 染色体に、LG3 は、C により第 2 染色体に、LG6 は、 L^3 により第 11 染色体に相当すると考えられた。また、LG7 は、LCYB により第 5 染色体に、LG9 は、D11Scar₆₅₀ により第 9 染色体に、LG11 は、*HpmshpMADS* により第 8 染色体に相当すると考えられた。LG14 は、TG510 および *Hpms1-41* により、LG11 と同じ第 8 染色体に相当すると考えられ、今後供試するマーカーを増やすことで、LG11 と融合することが示唆された。残りの LG については、トウガラシ染色体に割り当てることが出来なかったが、今後アンカーマーカーを追加していくことで既報の連鎖地図との共有を図ることが可能と考えられる。さらに、本研究で作製した連鎖地図を利用し、QTL 解析を行うことで、各種量的形質の遺伝様式の解明および QTL 近傍の DNA マーカーの開発に大きく貢献すると思われる。

5. 摘要

ピーマン (*C. annuum*) 種内交雑による葯培養由来 176 系統の倍加半数体系統 (DH) 集団を用いて、HEGS/AFLP および RAPD 等による連鎖地図の作製を行った。RAPD に比べ AFLP の方が 1 プライマー当たりの平均多型数は、約 10 倍多く認められた。382 の AFLP マーカー、122 の RAPD マーカー、3 の RFLP マーカー、8 の SCAR マーカー、4 の CAPS マーカーおよび 11 の SSR マーカーからなる計 530 の DNA マーカーと L^3 および C の 2 形質を用いた連鎖解析の結果、224 のフレームワークマーカーによる 11 の大きな連鎖群 (56.8–118.3 cM) と 5 の小さな連鎖群 (1.8–26.6 cM) の計 16 の連鎖群から構成された、総連鎖群長 1,100.5 cM、平均マーカー間距離 4.6 cM の連鎖地図が得られた。一般的に種間交雑集団に比べ多型の検出頻度が低い種内交雑由来 DH 集団においても、HEGS/AFLP を用いることで迅速な連鎖地図の作製が可能であった。また、連鎖解析の結果から L^3 に連鎖した 3 の AFLP マーカーおよび 1 の RAPD マーカーと C に連鎖した 1 の AFLP マーカーが得られた。

本研究において作製した連鎖地図は、各種量的形質の遺伝様式の解明および QTL 近傍の DNA マーカーの開発に大きく貢献すると思われる。

第3章 *Capsicum annuum* の種内交雑由来倍加半数体を用いた疫病 (*Phytophthora capsici*) 抵抗性に関する QTL 解析

ピーマン疫病は、病原糸状菌である *Phytophthora capsici* によって引き起こされ、宮崎県を始めとするピーマン産地に大きな被害を及ぼしている。本病は、地際部、根、葉および茎において発病し、立枯れ症状を呈する。感染部位では、初めに水浸状の暗緑色に変色後、しだいに軟化し、萎凋枯死する。また、病原菌は汚染された圃場において長期間生存し、次作の伝染源になることから、一度発生した圃場で作付けを行わないことや、土壌消毒剤の臭化メチルを施用することにより発生を抑制している。しかしながら、臭化メチルはオゾン層破壊物質に指定され、全廃されることにより、なお一層の被害拡大が懸念される。そこで効果的な防除対策として、抵抗性品種の導入が有効であると考えられるが、現在市販されているほとんどのピーマン品種は、この病原に対して抵抗性を持たない。疫病に対し強度の抵抗性を示す幾つかのトウガラシ野生種も存在し、これらを用いた抵抗性品種の育成が試みられているが、強い疫病抵抗性を有する栽培品種は育成されていない (Ogundiwin ら 2005)。このことは、従来の接種検定による選抜では抵抗性品種の育成が難しいことを示している。

通常、抵抗性品種の育成過程における抵抗性系統の選抜は、病原菌を植物体へ直接接種し、接種後の症状の有無により行っている。このような抵抗性系統の選抜は、温湿度、灌水条件、接種条件および植物の生育ステージ等の様々な環境要因によって左右され、誤差が生じる。特に、QTL が関与している形質に

については、安定した抵抗性の評価および選抜が非常に困難である。

近年、分子マーカーを用いた連鎖地図の作製と、区間マッピング法 (Lander と Botstein 1989) 等の統計手法を用いた効率的な理論の確立により、それらを利用した QTL 解析が様々な作物で行われるようになってきた。一般的に、QTL が関与する形質は、集団において連続的な分離を示し、作用力の異なる複数の因子によって支配されている。量的形質による表現型は、相加効果、優性効果および非対立遺伝子間相互作用によるエピスタシスなどの遺伝的な効果と環境による影響の和として表され (鵜飼ら 2000)、従来の古典的な遺伝学では難しかった量的形質に関与する遺伝子数や染色体上の位置、遺伝効果等の多くの遺伝的情報が、QTL 解析によって得られるようになった。ピーマン疫病抵抗性についても、従来の手法では遺伝様式の解明が困難であり、これらの手法を用いた遺伝解析によって、QTL 近傍の DNA マーカーを取得し、それを利用した抵抗性品種の早期育成が望まれる。

そこで、本章においては、第 1 章で育成したピーマン種内交雑由来 DH 集団および第 2 章で作製した連鎖地図を利用して、第 1 節で、分離集団における疫病抵抗性の評価、第 2 節で、疫病抵抗性に関する QTL 解析について論述する。

第1節 疫病抵抗性の評価

1. 緒言

現在までに、疫病菌に対し抵抗性を示す幾つかのトウガラシ野生種が報告されている (Smith ら 1967、Palloix ら 1990、Bartual ら 1991、Reifschneider ら 1992)。特に、中央アメリカ原産のトウガラシ野生種 PI 201234 由来の自殖選抜系統「AC2258」 (*C. annuum*) およびメキシコ原産のトウガラシ野生種「Criollo de Morelos 334 ; CM334」 (*C. annuum*) の2つの野生種は、疫病に対し強度の抵抗性を示すことが知られている。しかし、「AC2258」の持つ疫病抵抗性の遺伝様式について、古典的な交配実験による幾つかの報告があるが (Smith ら 1967、山川 ら 1979)、統一した見解に至っていない。そこで、QTL 解析により、抵抗性に関与する遺伝子数、染色体上の位置および遺伝様式について明らかにする必要があるが、そのためには、分離集団内の各系統が有する抵抗性について正確な評価を行わなければならない。

そこで、本節では、ピーマン種内交雑由来 DH 集団を用いた疫病抵抗性の評価結果について述べる。

2. 材料および方法

1) 供試材料

供試材料として、「K9-11」、「AC2258」、F₁ および第1章の第2節で育成した薬培養由来 DH176 系統を用いた。

2) 疫病菌の調製

疫病菌接種検定には、京都府立大学より分譲された「京北」菌株を用いた。接種検定は、Bosland と Lindsey (1991) の方法を改変したものをを用いた (Sugita ら 2006)。すなわち、疫病菌を 90 mm シャーレ中の V8 ジュース培地に置床し、パラフィルムで封をして 25°C で 10 日間の暗培養を行った。その後パラフィルムを除去し、25°C の連続照明下で 3 日間培養を行い、遊走子のうの形成を促進させた。遊走子のうは、1 シャーレ当たり 10 ml の蒸留水をシャーレに注ぎ、優しく毛筆で掻き集めた。さらに、4°C で 30 分間の低温処理を行い、25°C で 3 時間培養した後、遊走子濃度を測定した。遊走子濃度を 2.0×10^4 個/ml に調製したものを接種液として用いた。

3) 疫病菌の接種

菌の接種は、ガラス温室で行い、苗の株元に接種液を 5 株当たり約 10 ml 灌注した。接種後は、疫病菌の感染を促進させるため、3 時間間隔で上部から水を噴霧した。

4) 疫病抵抗性の評価法

育苗日数が生存株率に及ぼす影響の調査に関しては、接種後 7 日間隔で生存株率の調査を行った。また、DH 集団を用いた 5 回の接種検定に関しては、2 週間後に生存株数を調査し、生存株率の平均を抵抗性の指標とした。

3. 結果

1) 育苗日数が生存株率に及ぼす影響

Table 16 は、「K9-11」、「AC2258」およびそれらの F₁ を用いて、育苗日数が生存株率に及ぼす影響について調査したものである。罹病性の「K9-11」は、接種までの育苗日数が 27 日以下では、1 週間後に全ての個体が枯死したが、34 日以上育苗すると、枯死までに 3 週間を要した。抵抗性の「AC2258」は、育苗日数が 20 日以下では枯死する株が見られるが、27 日以上では枯死する株が見られなかった。F₁ は、育苗日数 13 日以下では 70% が枯死したが、20 日以上では 10% 程度の枯死率であった。

2) DH 集団における疫病抵抗性の評価結果

Fig. 17 は、疫病菌接種後の様子である。抵抗性系統はそのまま生育を続けるが、罹病性系統は、葉が萎凋し、株元が腐食後に枯死した。Fig. 18 は、DH 集団における全 5 回の接種検定による平均生存株率の度数分布を示したものである。両親における平均生存株率は、それぞれ「K9-11」で 0%、「AC2258」で 85% であった。DH 集団の平均生存株率は連続的な分布を示したものの、ほとんどの系統は生存株率が高い系統と低い系統の 2 つのグループに分かれ、密集した。さらに 30% の区間に小さなピークが認められた。Table 17 は、「K9-11」、「AC2258」および DH 系統を用いた全 5 回の各疫病接種検定結果を示したものである。各接種検定における生存株率の度数分布は、全 5 回の平均生存株率と同じく、生存株率が高い系統と低い系統の 2 つのグループに密集して分布する傾向を示し

Table 16. Effects of duration of seedling period and days after inoculation to survival rate using 'K9-11', 'AC2258' and F₁

Accessions	Duration of seedling period (days)	No. of plants examined	Days after inoculation					Average leaf age
			7	14	21	28	35	
K9-11	13	10	0 ¹⁾	0	0	0	0	0.25
	20	7	0	0	0	0	0	1.50
	27	10	0	0	0	0	0	5.35
	34	10	80	50	0	0	0	6.10
	41	10	80	60	0	0	0	9.40
AC2258	13	5	40	20	20	20	20	0.00
	20	5	80	80	80	80	80	0.40
	27	6	100	100	100	100	100	4.42
	34	9	100	100	100	100	100	7.11
	41	10	100	100	100	100	100	8.00
F ₁ (K9-11 x AC2258)	13	10	30	30	30	30	30	0.25
	20	9	89	89	89	89	89	1.17
	27	9	89	89	89	89	89	5.83
	34	10	90	90	90	90	90	8.00
	41	10	90	90	90	90	90	10.00

1) Survival rate (%).



Fig. 17. Symptoms of phytophthora rot. The resistant lines (right) continued to grow, while the susceptible lines (left) developed wilting symptoms on the leaves. Later, the stems began to rot, and then the plants died.

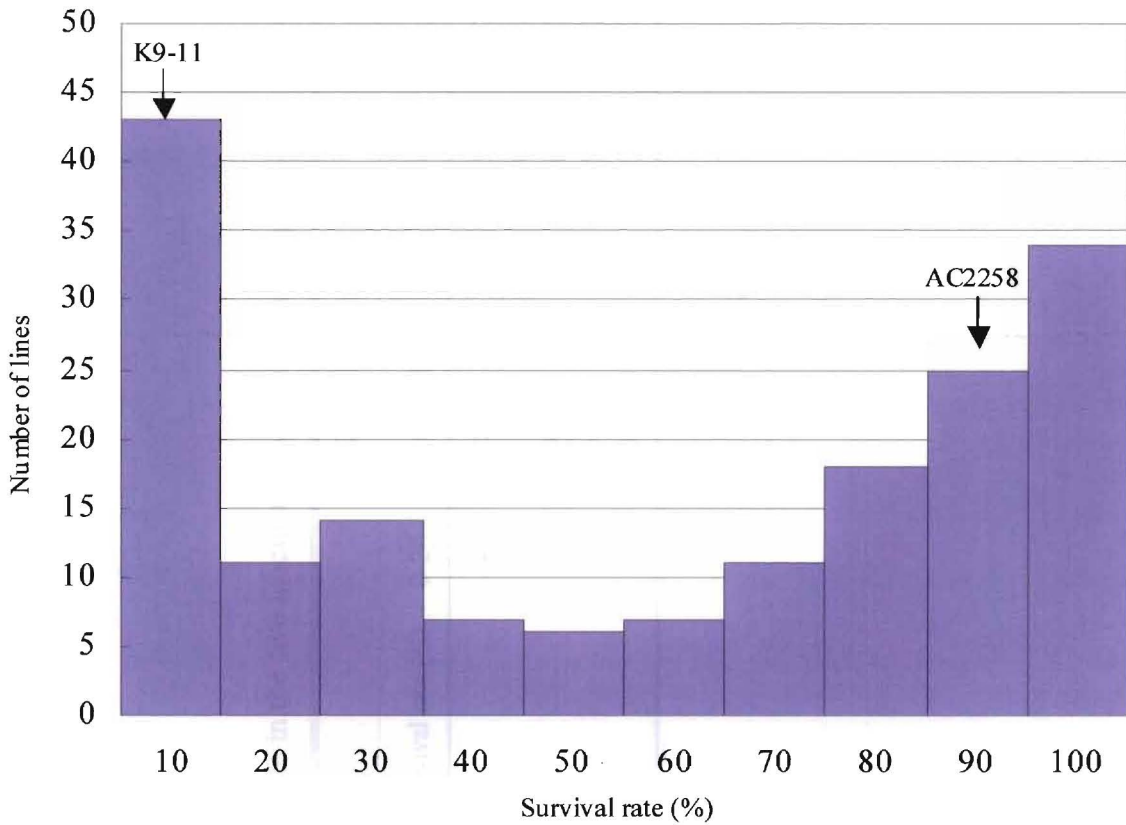


Fig. 18. Frequency distribution of the mean survival rate in the five inoculation tests using a DH population of sweet pepper. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the survival rate (%).

Table 17. Frequency distribution of the survival rate in the five inoculation tests using a DH population of sweet pepper

Tests	Duration of seedling period (days)	Survival rate (%)		No. of DH lines					No. of DH lines examined	Mean survival rate (%)	
		K9-11	AC2258	Survival rate (%)	0-20	21-40	41-60	61-80			81-100
1st	27	0.0	100.0		49	18	13	37	58	175	58.5
2nd	27	0.0	100.0		61	11	16	16	68	172	55.6
3rd	24	0.0	75.0		61	9	18	24	64	176	55.6
4th	23	0.0	100.0		71	16	12	22	51	172	48.5
5th	20	0.0	50.0		81	14	16	24	37	172	40.9

た。また、播種から接種検定までの日数が短くなるほど、DH 系統における平均生存株率が低くなる傾向が認められた。

4. 考察

育苗日数が生存株率に及ぼす影響について調査した結果、抵抗性を有する「AC2258」でも育苗日数が 20 日以下の場合には疫病に感染し枯死する。このことから、「AC2258」の有する抵抗性は、発芽当初から保有しているのではなく、本葉が展開し始める時期に、獲得されていくものと考えられる。「AC2258」の持つ疫病抵抗性の遺伝様式について、Smith ら (1967) は、 F_2 および BC_1 世代を用いた分離比により、相加作用のない 2 つの独立した優性遺伝子によって支配されていると報告している。一方、山川ら (1979) は、 F_2 および BC_1 世代を用いた分離比により、「AC2258」の持つ抵抗性は不完全優性の単一遺伝子に支配されていると報告している。本研究において、DH 集団の平均生存株率は連続的な分布を示したことから、疫病抵抗性は量的な形質が関与していることが示された。また、ほとんどの DH 系統は生存株率が高い系統と低い系統の 2 つのグループに分かれ、さらに 30% の区間に小さなピークが認められたことから、「AC2258」の持つ抵抗性には、寄与率の高い 1 つの主働因子および複数の寄与率の低い微働因子が関与していることが推測された。

本研究で、DH 世代での疫病接種検定による分離情報と各 DH 系統の有する安定的な抵抗性評価結果が得られた。これらの結果は、疫病抵抗性に関する QTL 解析に大きく貢献すると思われる。

5. 摘要

抵抗性を有する「AC2258」でも育苗日数が 20 日以下の場合には疫病に感染し枯死することから、「AC2258」の有する疫病抵抗性は、発芽当初から保有しているのではなく、本葉が展開し始める時期に、獲得されていくものと考えられる。疫病抵抗性の遺伝について、DH 集団での平均生存株率は連続的に分布したことから、疫病抵抗性は量的な形質であることが示された。しかし、DH 集団における生存株率の度数分布が、生存株率の高い系統と低い系統の 2 つのグループに分かれ、さらに 30%の区間に小さなピークが認められたことから、「AC2258」の有する疫病抵抗性には、寄与率の大きい 1 つの主働因子および複数の寄与率の低い微働因子が関与していることが示唆された。

第2節 疫病抵抗性に関する QTL 解析

1. 緒言

近年、多くの植物において DNA マーカーが用いられるようになり、それを用いた分子遺伝学の研究が盛んに行われている。また、DNA マーカーによって作製した連鎖地図を用いて、量的な形質に関する遺伝様式の解明や遺伝子座の正確な情報も得られるようになってきた。さらに、それらの情報とゲノム解析による全ゲノム塩基配列情報を利用したマップベースクローニング法により、イネやトマト等で幾つかの QTL が単離されている (Alpert と Tanksley 1996、Yano ら 2000)。

ピーマンにおいても、うどん粉病抵抗性 (Lefebvre ら 2003) や CMV 抵抗性 (Caranta ら 2002) 等の病害抵抗性について、QTL 解析が行われている。疫病抵抗性に関しても、近年、様々な分離集団を用いた報告があり (Lefebvre と Palloix 1996、Thabuis ら 2003、Thabuis ら 2004、Quirin ら 2005、Ogundiwin ら 2005、Sugita ら 2006)、多くの QTL が検出されてきている。Thabuis ら (2003) は、抵抗性系統「Vania」、「Perennial」および「CM334」由来の種内交雑由来 3 集団を用いて QTL 解析を行い、3 集団に共通して存在する寄与率の大きな QTL を第 5 染色体上に確認している。また、Ogundiwin ら (2005) は、抵抗性系統 PI 201234 および「CM334」由来の 94 の RIL 世代および 94 の F₂ 世代種内交雑 2 集団を用いて、それぞれ 16 および 5 つの QTL を検出している。

近年、AFLP の検出システムを改変した高能率ゲノムスキャニング法が開発さ

れた (HEGS/AFLP ; Kawasaki ら 2000、2003)。このシステムは非標識のプライマーを用い、低コストで簡易に連鎖地図を作製することが可能である。さらに、ピーマンにおいては、Sugita ら (2005) によって、主に HEGS/AFLP を利用し、「K9-11」および「AC2258」の種内交雑由来 DH 集団を用いた連鎖地図が短期間で作製されている。このような迅速な連鎖地図の作製は、QTL 解析の高能率化に貢献することが期待される。

そこで、本節では、ピーマン種内交雑由来 DH 集団を用いた疫病抵抗性の評価結果と HEGS/AFLP を主体に作製した連鎖地図を用いて、QTL 解析を行い、さらに QTL 近傍に得られた DNA マーカーを用い、有効性の確認を行ったので、そのことについて論述する。

2. 材料および方法

1) 供試材料

供試材料として、「K9-11」、「AC2258」および第 1 章の第 2 節で育成した薬培養由来 DH176 系統を用いた。

2) DNA 抽出

DNA の抽出は、第 2 章の第 1 節で述べた方法に準じた。

2) 連鎖地図の作製

第 2 章の第 2 節で作製した連鎖地図を用いて QTL 解析を行った。つまり、382

の AFLP マーカー、122 の RAPD マーカー、3 の RFLP マーカー、8 の SCAR マーカー、4 の CAPS マーカーおよび 11 の SSR マーカーからなる計 530 の分子マーカーに PMMoV 抵抗性遺伝子座 L^3 、辛み発現に関する遺伝子座 C の 2 形質マーカーを用いて連鎖解析を行い、そこで得られた 224 の DNA マーカーをフレームワークマーカーとする 11 の大きな連鎖群 (56.8-118.3 cM) と 5 の小さな連鎖群 (1.8-26.6 cM) の計 16 の連鎖群から構成された、総連鎖グループ長 1,100.5 cM の連鎖地図を QTL 解析に用いた (Sugita ら 2005)。

3) 疫病菌接種検定

本章第 1 節で得られた疫病抵抗性評価結果に基づく生存株率の平均を、抵抗性の指標として QTL 解析に用いた。

4) データ解析

連鎖解析は、第 2 章の第 2 節で述べた方法に準じた。QTL 解析は MAPMAKER/QTL 1.1 (Lincoln ら 1993) を用い、LOD スコア 2.0 以上の条件で解析を行った。

3. 結果

1) 疫病抵抗性に関する QTL 解析

疫病抵抗性検定結果および連鎖地図を用い QTL 解析を行った結果、3 連鎖群に 3 つの QTL が検出された (Fig. 19、Table 18)。LG7 (トウガラシ第 5 染色体)

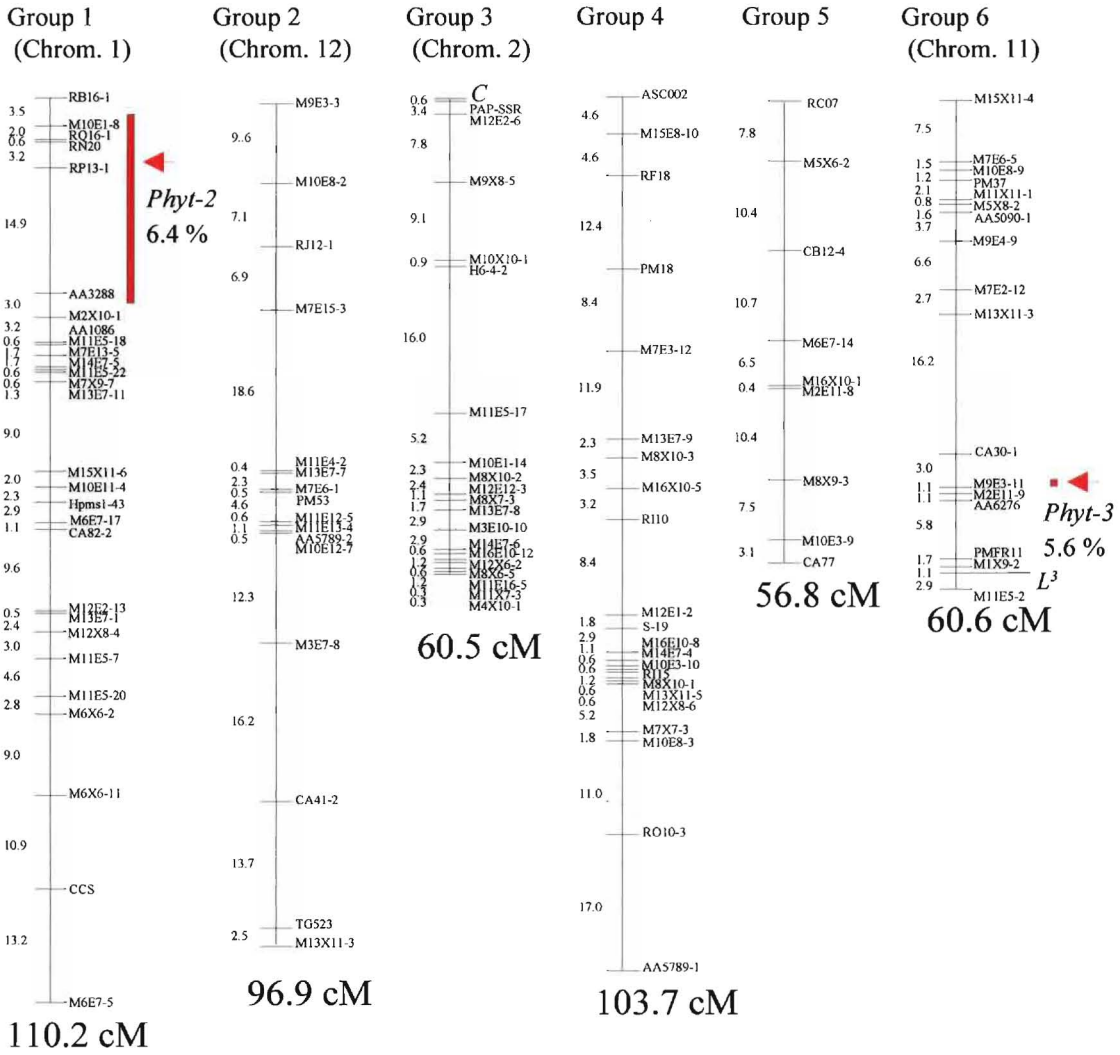
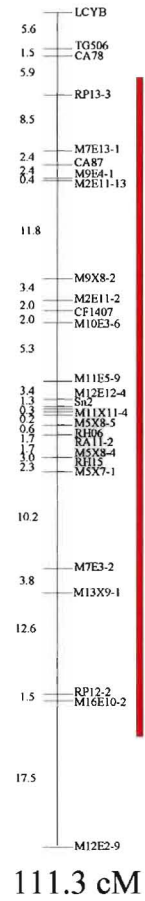


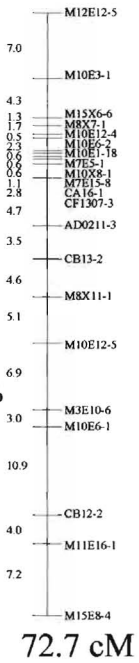
Fig. 19. Quantitative trait loci for resistance to *P. capsici* using an intraspecific DH population of sweet pepper. Map distances in centiMorgans (cM) calculated by the Kosambi function are denoted on the left side of each linkage group. The portion enclosed with a circle on the linkage groups indicates the putative region of the QTLs with a LOD score of 2.0.

Group 7
(Chrom. 5)



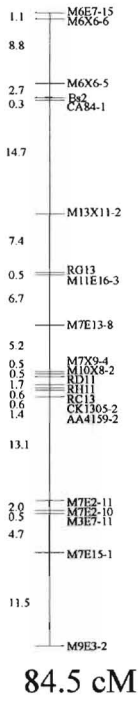
111.3 cM

Group 8



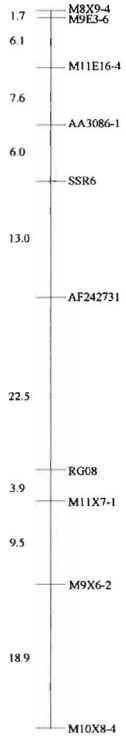
72.7 cM

Group 9
(Chrom. 9)



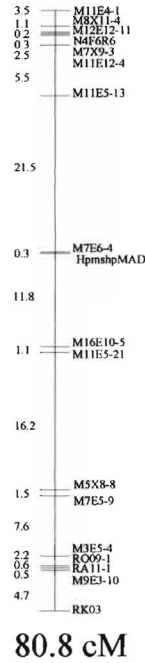
84.5 cM

Group 10



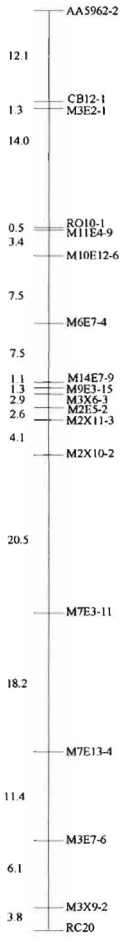
89.2 cM

Group 11
(Chrom. 8)



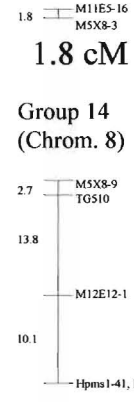
80.8 cM

Group 12



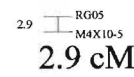
118.3 cM

Group 13



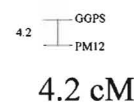
26.6 cM

Group 14
(Chrom. 8)



2.9 cM

Group 15



4.2 cM

Fig. 19. Continued.

Table 18. Effect of QTL for resistance to *P. capsici* detected in the DH population derived from a cross between 'AC2258' and 'K9-11'

LG	Flanking marker ¹⁾	Survival rate of the lines		LOD	Var. Exp. (%) ²⁾	Direction ³⁾
		'K9-11' alleles (n)	'AC2258' alleles (n)			
1	RP13-1	60.6 (91)	41.2 (83)	2.54	6.4	AC2258
6	M9E3-11	61.7 (76)	44.2 (100)	2.20	5.6	AC2258
7	M10E3-6	83.9 (89)	17.0 (85)	67.02	82.7	AC2258

1) The closest marker to the QTL.

2) Percentage of phenotypic variance explained.

3) Indicates the parent that contributes to increased resistance.

上で検出された QTL、すなわち *Phyt-1* は、寄与率 82.7%、LOD スコア 67.02 を示した。最も近傍のマーカーは、M10E3-6 であり、優性の AFLP マーカーとして「AC2258」において検出された。2 番目の QTL、すなわち *Phyt-2* は、LG1（トウガラシ第 1 染色体）上で検出され、寄与率 6.4%、LOD スコア 2.54 を示した。最も近傍のマーカーは、RP13-1 であり、「AC2258」型アレルの優性 RAPD マーカーであった。さらに、3 番目の QTL、すなわち *Phyt-3* は、LG6（トウガラシ第 11 染色体）上で検出され、寄与率 5.6%、LOD スコア 2.20 を示した。最も近傍のマーカーは、M9E3-11 であり、「AC2258」型アレルの優性 AFLP マーカーであった。また、それぞれの QTL 近傍のマーカー座における平均生存株率について、M10E3-6 マーカー座において「K9-11」型アレルの系統では、17.0%であったのに対し、「AC2258」型アレルの系統では、83.9%と高い生存株率を示した（Table 18）。また、RP13-1 マーカー座において「K9-11」型アレルの系統では 41.2%であったのに対し、「AC2258」型アレルの系統では 60.6%、M9E3-11 マーカー座において「K9-11」型アレルの系統では 44.2%であったのに対し、「AC2258」型アレルの系統では 61.7%を示した（Table 18）。

2) 疫病抵抗性 QTL 近傍マーカーによる有効性の確認

疫病抵抗性 QTL 近傍マーカーの MAS に対する有効性を調査した。3 つのマーカー座において「AC2258」型アレルで持つ DH 系統は、疫病に対し強い抵抗性を示した（Fig. 20-A）。また、2 つの遺伝子座、すなわち M10E3-6 および RP13-1 を「AC2258」型アレルで持ち、かつ M9E3-11 を「K9-11」型アレルで持つ系統

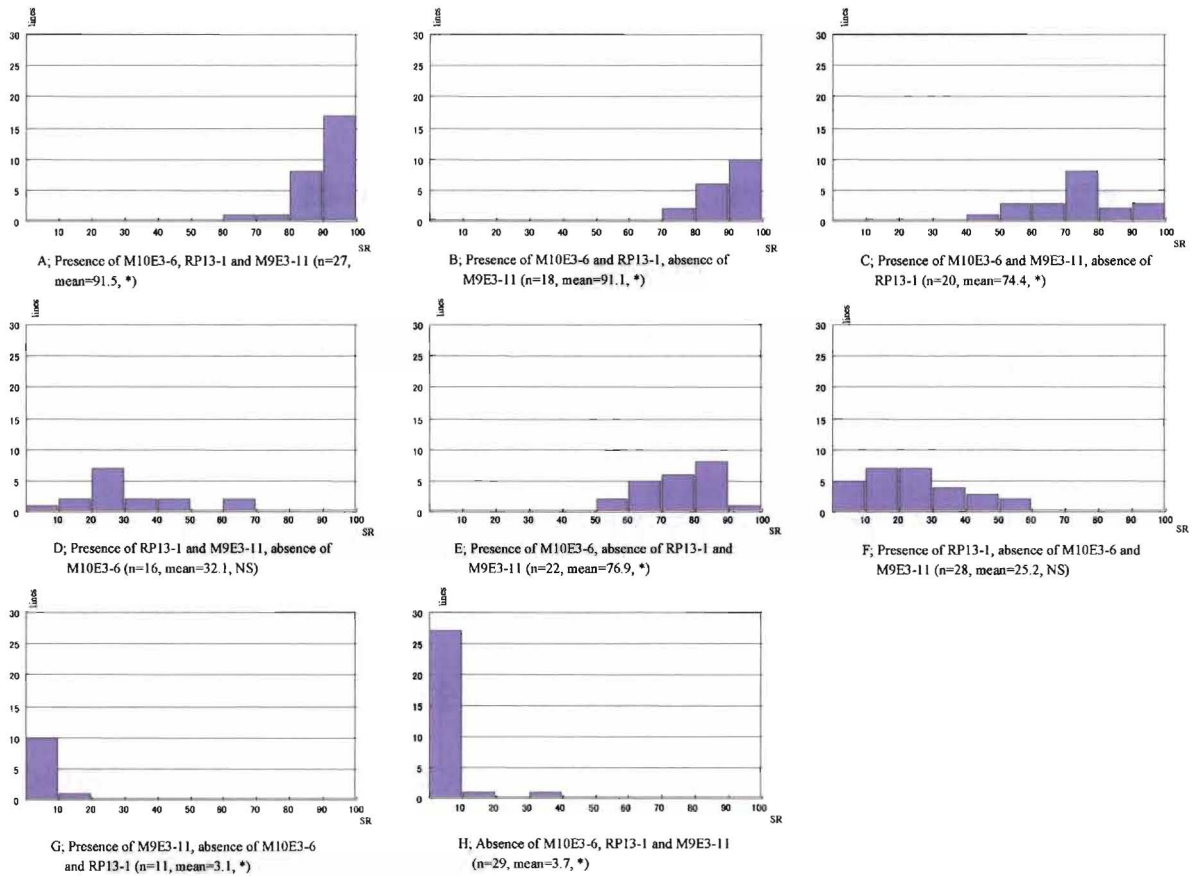


Fig. 20. Relationship between the genotype of the marker locus and the survival rate of the plants for three markers. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the percentage of surviving plants. M10E3-6 was linked to *Phyt-1*, RP-13-1 was linked to *Phyt-2*, and M9E3-11 was linked to *Phyt-3*. They were the dominant markers present in the resistant parent 'AC2258'. NS, *: Non-significant or significant at $P < 0.05$ by Steel's test.

についても、同様に強い抵抗性を示した (Fig. 20-B)。一方、M10E3-6 および M9E3-11 を「AC2258」型アレルで持ち、かつ RP13-1 を「K9-11」型アレルで持つ系統は、80%区間においてピークを示す分布を示した (Fig. 20-C)。その他の3遺伝子座におけるマーカーアレルの組み合わせでは、罹病性または中程度の抵抗性を示した (Fig. 20-D から Fig. 20-H)。また、*Phyt-3* は M9E3-11 近傍で検出されたが、この QTL が疫病抵抗性に及ぼす影響は小さいと考えられることから (Fig. 20)、M10E3-6 および RP13-1 の2つの QTL 近傍マーカーに限定し、さらに解析を行った。M10E3-6 を「AC2258」型アレルで持つ系統は、100%区間をピークとし、全ての系統が50%以上の抵抗性を示した (Fig. 21-A)。一方、RP13-1 を「AC2258」型アレルで持つ系統は、30%および100%の2つの区間をピークとする連続的かつ二峰性の分布を示した (Fig. 21-B)。M10E3-6 および RP13-1 の2つの遺伝子座を「AC2258」型アレルで持つ系統は、100%区間をピークとし、全ての系統が70%以上の抵抗性を示す強い抵抗性を示した (Fig. 21-C)。M10E3-6 を「AC2258」型アレルで持ち、かつ RP13-1 を「K9-11」型アレルで持つ系統は、80%区間でピークが認められた (Fig. 21-D)。反対に、RP13-1 を「AC2258」型アレルで持ち、かつ M10E3-6 を「K9-11」型アレルで持つ系統は、30%区間でピークが認められた (Fig. 21-E)。2つのマーカー座において「K9-11」型アレルで持つ系統は、ほとんどの系統で罹病性を示した (Fig. 21-F)。Fig. 22 は、*Phyt-1* の連鎖地図上の正確な位置を把握するために、*Phyt-1* 近傍で組み換えの起こっている DH 系統を用いて、各マーカー座における遺伝子型と疫病抵抗性について調査した結果を示す。CF1407 は、*Phyt-1* 近傍のマーカー M10E3-6 から 2.0 cM の距

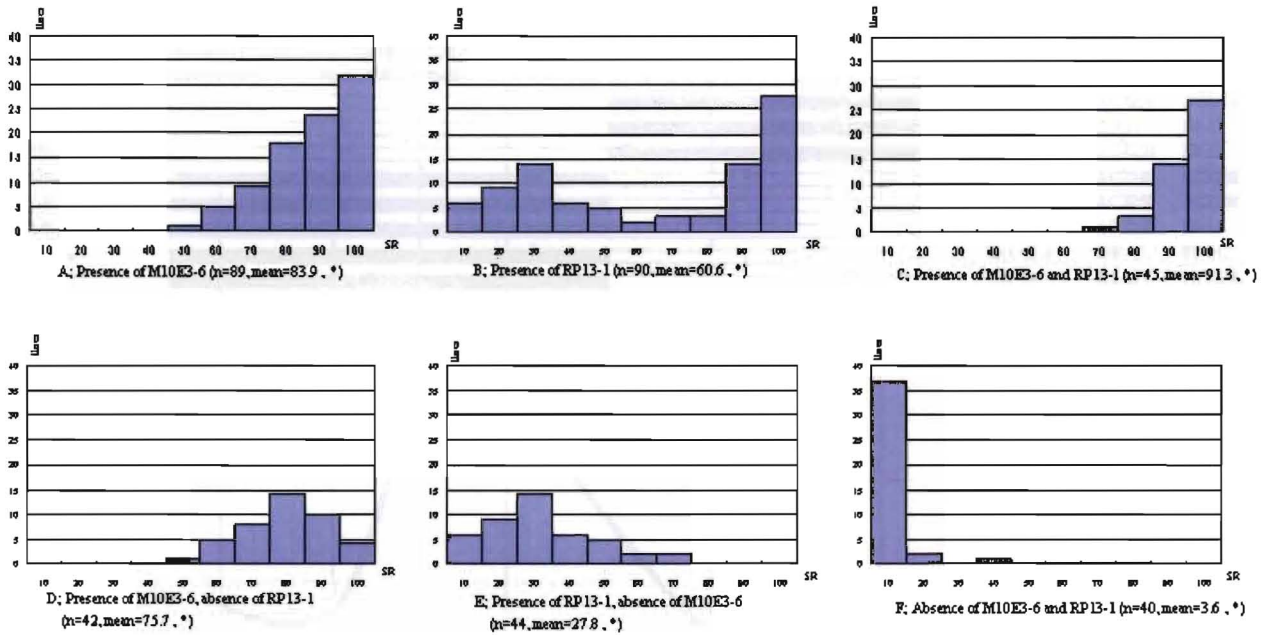


Fig. 21. Relationship between the genotype of the marker locus and the survival rate of the plants for two markers. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the percentage of surviving plants. M10E3-6 was linked to *Phyt-1*, and RP-13-1 was linked to *Phyt-2*. They were the dominant markers present in the resistant parent 'AC2258'. *: significant at $P < 0.05$ by Steel's test.

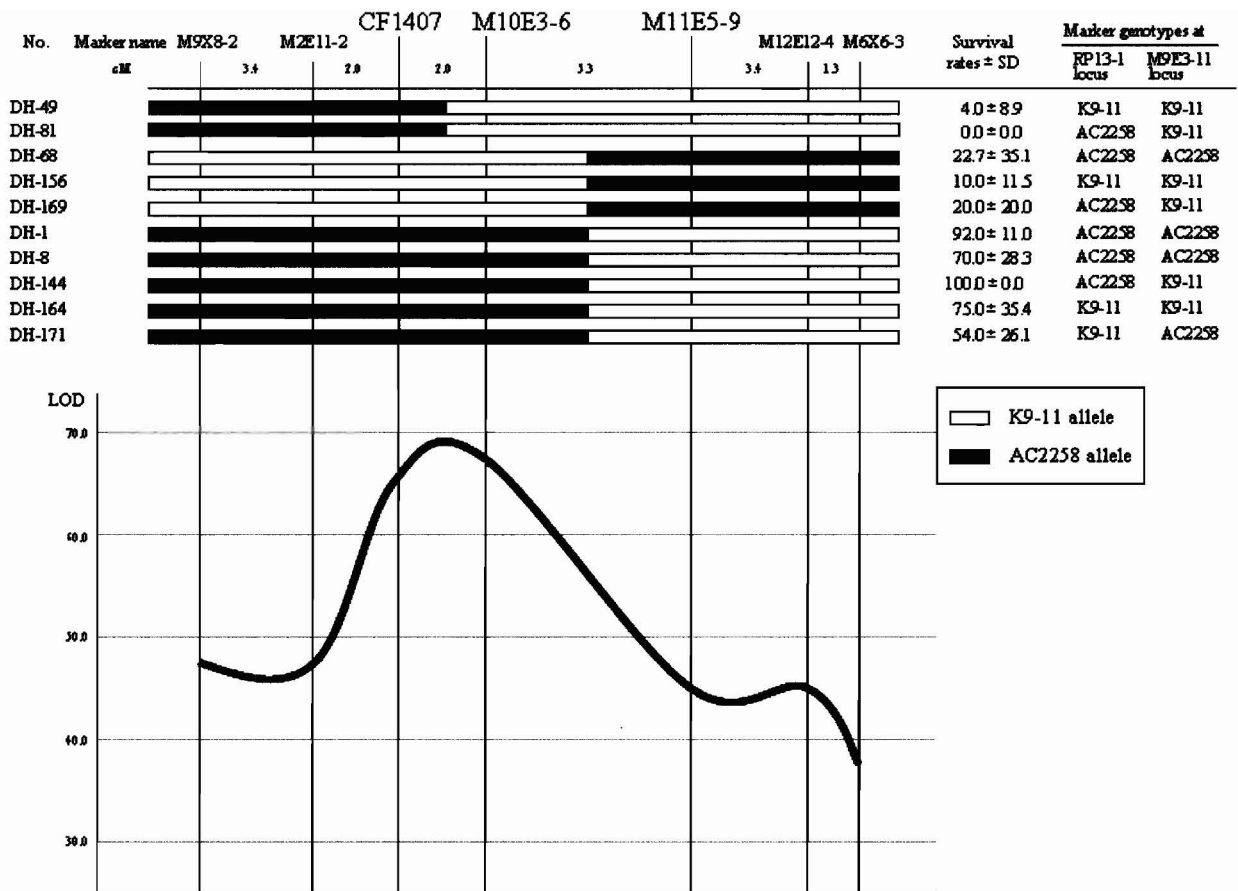


Fig. 22. Graphical genotype of the DH lines around *Phyt-1*. The upper figure indicates the graphical genotypes and the survival rates of ten DH lines that exhibited recombination between CF1407 and M11E5-9. The lower figure indicates the LOD score around *Phyt-1*.

離に位置し、また、M11E5-9はM10E3-6から5.3 cMの距離に位置するマーカーである。M10E3-6を「AC2258」型アレルで持つ系統は、CF1407およびM11E5-9座における遺伝子型にかかわらず抵抗性を示した。

4. 考察

従来、「AC2258」の持つ疫病抵抗性の遺伝様式については、2つの独立した優性遺伝子または不完全優性の単一遺伝子によって制御されていると報告されている (Smith ら 1967、山川ら 1979)。近年の分子マーカーを用いた研究では、Ogundiwin ら (2005) は、本研究で用いたものと同じ抵抗性素材である PI 201234 由来の 94 の RIL 世代を用いて、*Phyto.A* から *P* までの 16 の QTL を検出している。また、Thabuis ら (2003) は、種内交雑由来 3 集団を用いて、3 集団に共通して存在する寄与率の大きな QTL を第 5 染色体上に検出している。本研究において、LG7 上で検出した *Phyt-1* は、トウガラシ第 5 染色体上に位置することから、Ogundiwin ら (2005) が検出した *Phyto.P* に相当すると考えられる。さらに、「CM334」由来 F₂ マップ上の *Phyto.U* (Ogundiwin ら 2005) および *Phyt.5* (*Phyt.5.1* および *Phyt.5.2*) (Thabuis ら 2003、Thabuis ら 2004、Quirin ら 2005) についても同じ因子であると思われる。*Phyt.5* は、それぞれ関連性のない抵抗性親を用いた種内交雑由来 3 集団に共通して、第 5 染色体上に存在している (Thabuis ら 2003)。この第 5 染色体上の QTL は、疫病抵抗性素材に共通して存在している可能性があり、異なる菌株でも安定的に強い抵抗性を示すことから、ピーマン疫病抵抗性品種育成のための育種素材として非常に有効であると考えられる。近年、

Quirin ら (2005) は、*Phyt.5.2* に連鎖した SCAR マーカー、OpD04 を開発している。この SCAR マーカーを連鎖地図上に位置づけようと試みたが、本研究で供試した両親において PCR による増幅が認められなかったため、連鎖地図上に位置づけることが出来なかった。「AC2258」と「CM334」の持つ疫病抵抗性 QTL が、同一の QTL であるか否かについては非常に興味のある課題であり、今後調査を行っていく必要がある。LG1 (トウガラシ第 1 染色体) 上で検出された *Phyt-2* は、RILs マップ上の *Phyto.D*、*Phyto.E* および *Phyto.F* に相当すると考えられる。しかしながら、Ogundiwin ら (2005) によって作製された「CM334」由来の F₂ マップ上および Thabuis ら (2003) によって作製されたマップ上においては、*Phyt-2* に相当する QTL が認められなかった。このことから、この抵抗性 QTL は、「AC2258」に特異的な QTL であることが示唆された。LG6 (トウガラシ第 11 染色体) 上で検出された *Phyt-3* は、*L* 遺伝子座に連鎖しており、Ogundiwin ら (2005) によって報告された RILs および F₂ マップ上の *Phyto.N*、*Phyto.O* および *Phyto.T* に相当すると考えられる。Thabuis ら (2003) のマップ上では、罹病性親由来の QTL である *Phyt.11.1* に相当すると思われる。本研究により、疫病抵抗性に関して、3 遺伝子座に、*Phyt-1*、*Phyt-2* および *Phyt-3* を検出した。しかし、それらの近傍に位置するマーカーによる有効性確認の結果、M9E3-11 近傍で検出された *Phyt-3* は、疫病抵抗性に及ぼす影響は低いと考えられた (Fig. 19, Fig. 20)。さらに、*Phyt-1* 近傍マーカー M10E3-6 および *Phyt-2* 近傍マーカー RP13-1 の 2 つの遺伝子座を「AC2258」型アレルで併せ持つ系統は、それぞれの QTL を単独で持つ系統よりも強い抵抗性を有した。このことから、これら 2 つの遺伝子座

Phyt-1 および *Phyt-2* には、疫病抵抗性に関して相加的な効果があり、マーカー選抜育種によるピーマン疫病抵抗性品種の育成のためには、*Phyt-1* と *Phyt-2* をホモで持つことで、効果的な抵抗性を付与できるものと考えられた。また、最も寄与率の高い QTL *Phyt-1* は、CF1407 と M11E5-9 の間、7.3 cM の区間に存在すると推定されることから、*Phyt-1* の両側に位置するこれら 2 つのマーカーを用いることで、*Phyt-1* を確実に導入していくことが可能である。さらに、本研究において、*Phyt-1* 近傍のマーカー間で組み換えの起こっている DH 系統が得られた。今後、こられの抵抗性 DH 系統を用いてマーカー選抜育種による抵抗性品種の育成を進めていきたい。

5. 摘要

疫病罹病性「K9-11」(*C. annuum*) と疫病抵抗性「AC2258」(*C. annuum*) の F₁ の葯培養由来倍加半数体集団 (n=176) を用いた疫病抵抗性評価結果および 224 のフレームワークマーカーによる総連鎖グループ長 1,100.5 cM の計 16 の連鎖群 (LGs) からなる連鎖地図を用いて、疫病抵抗性に関する QTL 解析を行った。その結果、LG1 (トウガラシ第 1 染色体)、LG6 (トウガラシ第 11 染色体) および LG7 (トウガラシ第 5 染色体) の 3 連鎖群に 3 つの QTL が検出された。最も LOD 値の高い QTL *Phyt-1* は LG7 上で検出され、LOD 値 67.02、寄与率 82.7% を示した。最も近傍のマーカーは AFLP マーカー M10E3-6 であった。LG1 上で検出された QTL *Phyt-2* は、LOD 値 2.54、寄与率 6.4% を示した。最も近傍のマーカーは RAPD マーカー RP13-1 であった。QTL *Phyt-3* は LG6 上で検出され、

LOD 値 2.20、寄与率 5.6%を示した。最も近傍のマーカーは AFLP マーカー M9E3-11 であった。2 つの遺伝子座 *Phyt-1* および *Phyt-2* には、疫病抵抗性に関して相加的な効果があることが示され、ホモ接合の *Phyt-1* と *Phyt-2* を同時に有することで、強度な疫病抵抗性を有するピーマンの育成が可能であると思われる。

第4章 *Capsicum annuum* の種内交雑由来倍加半数体集団を用いた未熟果実色に関する QTL の検出と CAPS マーカーの開発

ピーマン、パプリカおよびトウガラシ等の *C. annuum* の果実色は、収穫時期の違いにより、未熟果実色と完熟果実色に分けることができる。ピーマンは、日本国内において、主に炒め物やサラダとして供され、その大部分は緑色の未熟果実で収穫して出荷される。また、パプリカやトウガラシは、主に完熟果実で収穫され、炒め物やサラダ、香辛料、着色料として用いられている。未熟果実色と完熟果実色には、黄白、緑、紫、茶、赤、黄およびオレンジ色等の様々な色の種類があり、それぞれの色に濃淡が加わることで、さらに多くの色の変化を生じる。完熟果実色の遺伝に関する研究としては、パプリカおよびトウガラシが完熟果実として収穫されるため世界的に大きな需要があり、またその遺伝様式が比較的単純なこと等から、多くの研究が行われている (Lippert ら 1966、Hernandez と Smith 1985、Lefebvre ら 1998、Huh ら 2001)。完熟果実色の遺伝様式については、*y*、*c1* および *c2* の3つの独立した遺伝子によって支配されており、それらの組み合わせによって赤、オレンジおよび黄色の果実を生じる (Lippert ら 1966、Hernandez と Smith 1985)。さらに、劣性のクロロフィル維持遺伝子 (*cl*) が加わることで、茶色の果実を生じる (Smith 1950)。近年では、分子マーカーを用いた研究も盛んに行われており、その遺伝様式および関与する遺伝子も明らかになりつつある (Lefebvre ら 1998、Huh ら 2001)。一方、未熟果実色については、一般的に黄白色、薄緑色、緑色および濃緑色がある。また、

緑色に対して不完全優性のアントシアニン発現に関する A 遺伝子加わること
で、紫色の果実になる。しかし、紫色を除く未熟果実色の遺伝様式については、
古典的な交配実験による幾つかの報告があるが (Odland と Porter 1938、Odland
1948、Jeswani ら 1956、Lippert ら 1966)、複雑な遺伝様式を示すことから、現在
まで統一した結論に至っていない。

そこで、本章においては、第 1 章で育成したピーマン種内交雑由来 DH 集団
を利用して、第 1 節で、分離集団における未熟果実色の評価、第 2 節で、未熟
果実色に関する QTL の検出と緑色発現に関与すると思われる QTL の近傍に位置
する Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーの開発を行ったの
で、その結果について論述する。

第 1 節 未熟果実色の評価

1. 緒言

ピーマン市販品種の未熟果実色は、薄緑色、緑色および濃緑色が一般的であ
る。しかし、消費者には、薄緑色の果実より濃緑色ピーマンの方が好まれる傾
向にある。日本国内におけるピーマン生産の大部分は、緑色の未熟果実で収穫
して出荷されるため、ピーマンにおいて未熟果実色の遺伝様式を解明すること
は、育種学的にも非常に重要である (杉田ら 2006)。また、多彩な色合いで消費
者の購買力を促す未熟果実色は、商業的にも大きな価値がある。ピーマンの未
熟果実色の遺伝について、緑色果実に関しての連続する形質の分離は、未熟果

実色でのクロロフィル含量に原因があり、遺伝子発現の累積または重複機構によるもので、複数の因子が関与していると報告されている (Odland と Porter 1938、Odland 1948、Jeswani ら 1956、Lippert ら 1966)。その因子数について、Odland (1948) は、未熟果実色の異なる 5 系統の F_2 および戻し交雑集団を用い、2 つまたはそれ以上としており、 $G1, G2, \dots, Gn$ で表している。Jeswani ら (1956) は、濃緑色と黄緑色の系統の F_2 および戻し交雑集団を用い、重複遺伝子による 4 つの因子が関与しており、濃緑色の果実色を $G1G1G2G2G3G3G4G4$ で表している。また、Endo (1953) は、クロロフィル特性について、「Goshiki」と「Takanotsume」の F_2 および戻し交雑集団を用い、1 つまたは 2 つの部分的な優性遺伝子によって支配されていると報告している。しかし、ピーマン未熟果実色に関する遺伝様式については、統一した結論には至っておらず、今後の研究で遺伝的な状況をさらに詳しく調査する必要がある。

そこで、本節では、分離集団を用いて、色彩色差計と分光光度計による未熟果実色の評価について論述する。

2. 材料および方法

1) 供試材料

供試材料として、「K9-11」、「AC2258」、 F_1 および第 1 章の第 2 節で育成した薬培養由来 DH176 系統を用いた。

2) 栽培条件

栽培条件は、第1章第2節で述べた方法に準じた。

3) 色彩色差計による未熟果実色の評価法

未熟果実色の測定には、開花後約30日の果実を1系統当たり3果実用い、果実横径の最も大きい部分を1果実当たり3カ所、色彩色差計 (Minolta CR-200) で非破壊的に測定した。得られたデータは、 $(L+b)/2+a$ (下川ら 1994) に代入し、未熟果実色の指標とした。

4) 分光光度計による未熟果実色の評価法

全クロロフィル量の測定については、色彩色差計の測定箇所をコルクボーラー (5号) で打ち抜き、Inskeep と Bloom (1985) らの方法に従い *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) で完全に色素が無くなるまで2回の抽出を行った。抽出した色素は分光光度計 (島津 UV2200A) により 664.5 nm、647 nm の波長でクロロフィル *a* および *b* を測定した。なお、全クロロフィル量は、 $17.90 \times \text{Abs.}647 + 8.08 \times \text{Abs.}664.5$ で求めた。

3. 結果

1) 色彩色差計による未熟果実色の評価

Fig. 23 は、未熟果実色指標の DH 集団における分離結果を示す。未熟果実色指標は、「K9-11」で 11.94、「AC2258」で 33.83 であった。F₁ は、21.47 であり、両親の中間の値を示した。また、DH 系統においては 7.9 から 36.2 までの範囲で

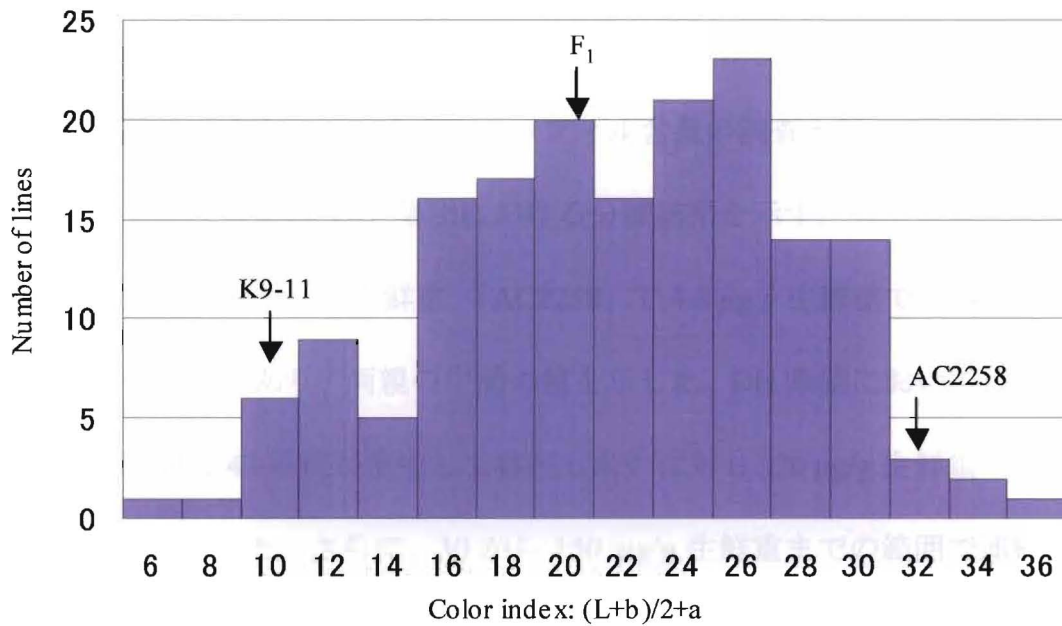


Fig. 23. Frequency distribution of the index of immature fruit color with a Hunter colorimeter using a DH population of sweet pepper. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the color index.

連続的な分布を示した。

2) 分光光度計による未熟果実色の評価

ピーマンの未熟果実色の変化について、全クロロフィル色素含量の変化によるものかどうかを検証するために、ピーマン未熟果実から DMF により抽出した色素の分光スペクトルによる全クロロフィル含量の調査を行った。Fig. 24 は、全クロロフィル含量の DH 集団における分離結果を示す。全クロロフィル含量は、「K9-11」で 90.5 $\mu\text{g/g}$ 生鮮重、「AC2258」で 4.8 $\mu\text{g/g}$ 生鮮重であった。F₁ は、44.3 $\mu\text{g/g}$ 生鮮重であり、両親の中間の値を示した。DH 集団においては、10 $\mu\text{g/g}$ 生鮮重の区間に 43 系統が集中して存在したのに対し、20 $\mu\text{g/g}$ 生鮮重の区間では 1 系統のみであった。さらに、30 から 150 $\mu\text{g/g}$ 生鮮重までの範囲で連続的な分布を示した。10 $\mu\text{g/g}$ 生鮮重の区間に分布する 43 系統については、全て黄白色の果実であった。

3) 未熟果実色指標と全クロロフィル含量との相関

Fig. 25 は、系統毎の未熟果実色指標と全クロロフィル含量の相関を調査した結果を示す。未熟果実色指標と全クロロフィル含量には負の相関 $y = -0.1621x + 29.885$ ($R^2 = 0.8107$) があつた。

4. 考察

未熟果実色の遺伝様式については、Odland と Porter (1938) は、黄白色はあら

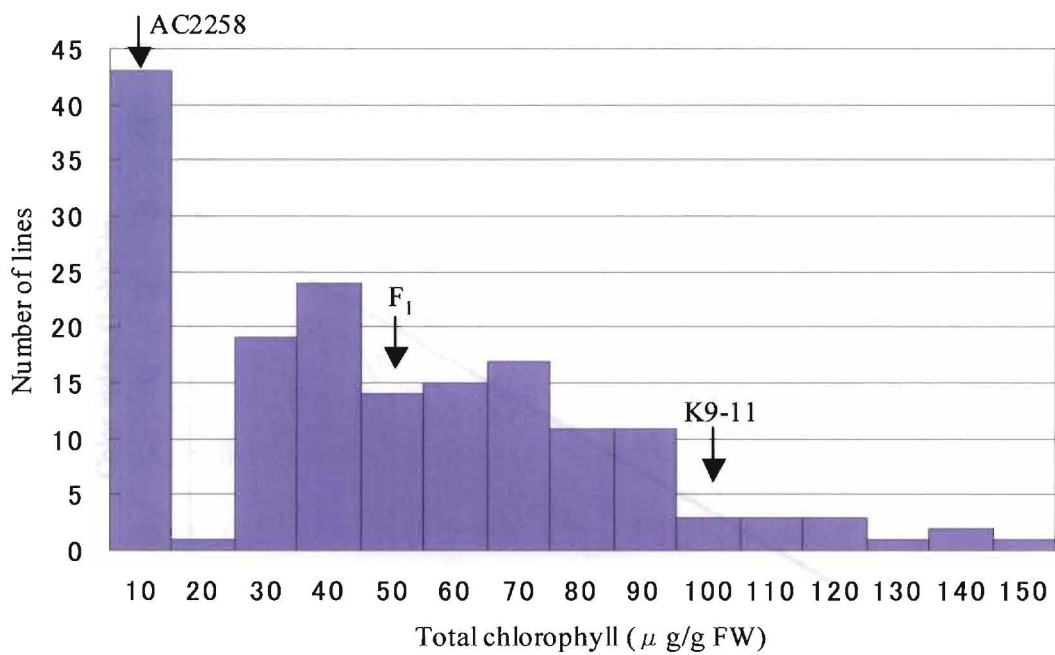


Fig. 24. Frequency distribution of the total chlorophyll content with the spectrum of the extracted pigment from immature fruit using a DH population of pepper. The vertical axis represents the number of lines, and the horizontal axis represents the total chlorophyll content.

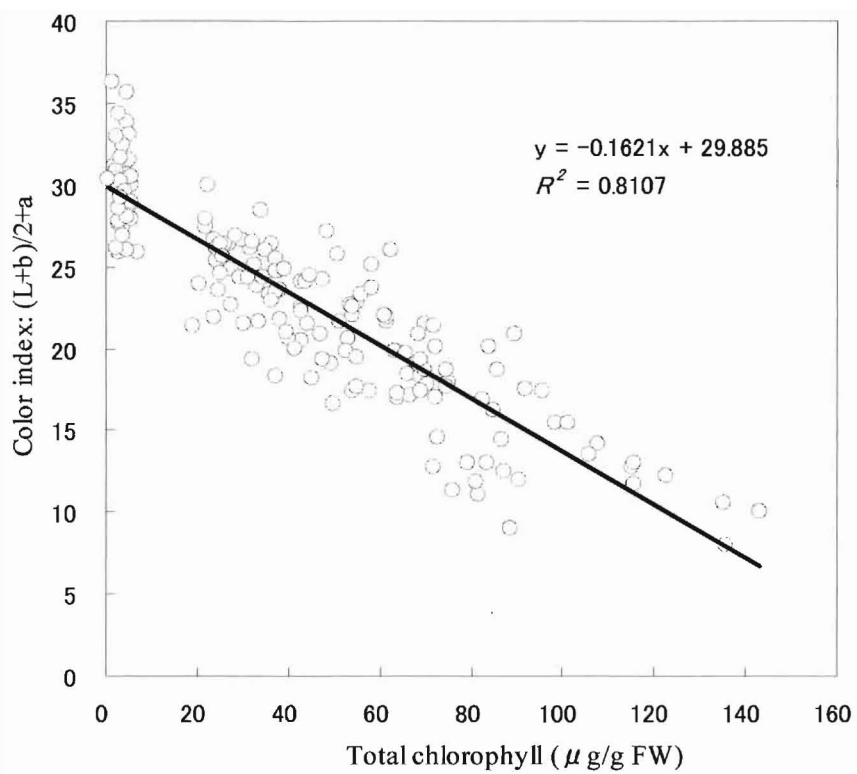


Fig. 25. Correlations between the index of immature fruit color with a Hunter's colorimeter and the total chlorophyll content with a spectrophotometer in a DH population of pepper.

ゆる濃淡の緑色に対し、劣性であると報告している。本研究においても、F₁における未熟果実色指標と全クロロフィル含量は、両親の中間の値を示したことから、ピーマン未熟果実色の黄白色は劣性形質で、緑色は黄白色に対し不完全優性であった。また、DH 集団における未熟果実色指標と全クロロフィル含量については、連続的な分離を示したことから、緑色果実の連続的な色の変化については、複数の量的な因子が関与していることが示唆された。しかし、劣性形質である黄白色果実の出現に関しては、全クロロフィル含量データの 10 µg/g 生鮮重の区間において DH169 系統中 43 系統が集中したことから、2 つの遺伝子座が関与していると思われた。さらに、未熟果実色指標と全クロロフィル含量データには負の相関があることから、ピーマン未熟果実色における緑色の連続的な変化は、全クロロフィル色素含量の変化によるものであり、ピーマン未熟果実色の測定は、色素抽出を行わずに、色彩色差計による簡易な方法により測定が可能であることが示された。

本研究により、DH 集団を用いた未熟果実色の分離を確認するとともに、それぞれの分離系統の未熟果実色を数値に置き換えることが出来た。今後、本研究で得られた未熟果実色に関する評価結果と分子マーカーを用いて、QTL 解析を行うことにより、遺伝様式の解明および QTL 近傍マーカーの取得に繋がることが期待される。

5. 摘要

ピーマン未熟果実色に関する遺伝様式の解明と QTL 解析を行うため、DH176

系統を用い、色彩色差計と分光光度計による未熟果実色の評価を行った。その結果、 F_1 における未熟果実色指標と全クロロフィル含量は、両親の中間の値を示したことから、ピーマン未熟果実色の緑色は黄白色に対し不完全優性であることが確認された。また、緑色果実の連続的な色の変化については、DH 集団における未熟果実色指標と全クロロフィル含量について連続的な分離を示したことから、複数の量的な因子が関与していることが示唆された。しかし、劣性の黄白色果実の出現に関しては、DH169 系統中 43 系統が黄白色であることから、2 つの遺伝子が関与していると思われた。さらに、未熟果実色指標と全クロロフィル含量には負の相関があることから、ピーマン未熟果実色における緑色の連続的な変化は、全クロロフィル色素含量によるものであり、ピーマン未熟果実色の測定は、色素抽出を行わずに、色彩色差計による簡易な方法により測定が可能であった。

第2節 QTLの検出とCAPS マーカーの開発

1. 緒言

近年の分子マーカーの発達に伴い、ピーマンにおいても、様々な農業上の重要な形質についてQTL解析が行われており、遺伝様式の解明やQTL近傍のDNAマーカーが次々に開発されている。QTLの検出感度は、供試する世代によって全表現型分散に占めるQTLの寄与率が異なることから、DH>RIL>F₂>BCの順となる(鶴飼2000)。また、個体単位ではなく集団で繰り返し試験を行うことにより、表現形質に及ぼす環境変動を減らすことが出来る。このことは、広義の遺伝率を高め、QTLの検出感度および位置や遺伝効果の推定精度を上げる。

ピーマンの未熟果実色は、多くの遺伝的な表現型を有する。その遺伝様式については、統計的手法を用いた交配実験による幾つかの報告があるが、統一した結論に至っていない。近年、分子マーカーを用いた研究では、Benら(2001a)がF₂およびF₃世代を用いてQTL解析を行い、果実形質および栽培特性に関する14のQTLを検出している。その中で未熟果実色については、LG10に寄与率33%の1つのQTLを検出している。しかし、未熟果実色のQTL解析については、これ以外に報告されておらず、未熟果実色に関与する因子数およびその影響力、位置等については、ほとんど明らかになっていない。

そこで、本節では、未熟果実色に関するQTL解析を行うとともに、緑色発現に関与すると思われるQTLの近傍に位置するCAPSマーカーの開発を行ったので、その結果について論述する。

2. 材料および方法

1) 供試材料

供試材料として、「K9-11」、「AC2258」および第1章の第2節で育成した蒞培養由来 DH176 系統を用いた。

2) DNA 抽出

DNA の抽出は、第2章第1節で述べた方法に準じた。

3) 連鎖地図の作製

第2章で作製した連鎖地図を用いて QTL 解析を行った。

4) 未熟果実色の評価

本章第1節で得られた色彩色差計による未熟果実色指標 (Color index ; CI) と分光光度計による全クロロフィル含量 (Total chlorophyll ; TC) データを、それぞれ未熟果実色の指標として QTL 解析に用いた。

また、検出された QTL が未熟果実色発現に関して、どのような影響を与えているのかをさらに詳しく調査するため、未熟果実色が黄白色の 43 系統を除外した緑色系統のみの未熟果実色指標 (Color index of green fruit ; CIG) と全クロロフィル含量 (Total chlorophyll of green fruit ; TCG) データを用いて、QTL 解析を行った。

5) データ解析

連鎖解析は、第2章の第2節で述べた方法に準じた。QTL解析は、第3章の第2節で述べた方法に準じた。

6) 未熟果実色 QTL 近傍マーカーの CAPS マーカー化

QTL解析に基づき得られた未熟果実における緑色発現に関与すると思われる2つのQTL近傍のマーカーについて、安定的かつ簡易に検出できるCAPSマーカー化を試みた。

始めに、QTL近傍マーカーであるRAPDマーカーのバンドを2%アガロースゲルで分離し、第2章第1節で述べた方法に準じて、クローニング後、塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報を用いて、プライマーを設計し、PCRを行った。PCR反応条件は、初めに熱変成を96°Cで10秒間、95°Cで1分間行った後、熱変性を94°Cで30秒間、アニーリングを62°Cで30秒間、伸長反応を72°Cで1分間の10サイクル行い、次に、熱変性を94°Cで30秒間、アニーリングを60°Cで30秒間、伸長反応を72°Cで1分間の30サイクルを行い、最後に72°Cで5分間の処理をした。反応終了後、PCR増幅産物を制限酵素 *SphI* によって、37°Cで2時間消化し、0.5×TBEバッファーを用いた3%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色した。

次に、トマトゲノム由来RFLPマーカーのCAPSマーカー化については、データベースを利用して、その配列下流領域に存在するトマト mRNA 配列情報を取得し、イントロンを挟んだエクソン領域でプライマーを設計した。PCR反応後、

増幅産物を制限酵素 *RsaI* によって、37°Cで2時間消化した。

3. 結果

1) 未熟果実色指標データを用いた QTL 解析

未熟果実色指標を用いた QTL 解析では、3連鎖群に4つの QTL が検出された (Fig. 26、Table 19)。LG4 上では、*ifc4.1* および *ifc4.2* の2つの QTL が検出され、それぞれ寄与率 31.9%、LOD スコア 14.1 および寄与率 39.1%、LOD スコア 18.22 を示した。それぞれの QTL に対し最も近傍のマーカーは、優性の AFLP マーカー M8X10-3 および優性の RAPD マーカー RO10-3 であり、「K9-11」において検出された。LG10 上で検出された QTL、*ifc10.1* は、寄与率 8.8%、LOD スコア 3.38 を示した。最も近傍のマーカーは、共優性の RAPD マーカー AA3086-1 であった。LG14 上で検出された QTL、*ifc14.1* は、寄与率 7.8%、LOD スコア 2.98 を示した。最も近傍のマーカーは、トマトプローブ由来の共優性 RFLP マーカー、TG510 であった。

2) 全クロロフィル含量データを用いた QTL 解析

全クロロフィル含量データを用いた QTL 解析では、2連鎖群に3つの QTL が検出された (Fig. 26、Table 19)。LG4 上では、*ifc4.1* および *ifc4.2* の2つの QTL が検出され、それぞれ寄与率 26.8%、LOD スコア 11.38 および寄与率 43.5%、LOD スコア 20.8 を示した。それぞれの QTL に対し最も近傍のマーカーは、M8X10-3 および RO10-3 であり、未熟果実色指標を用いた QTL 解析によって検出された

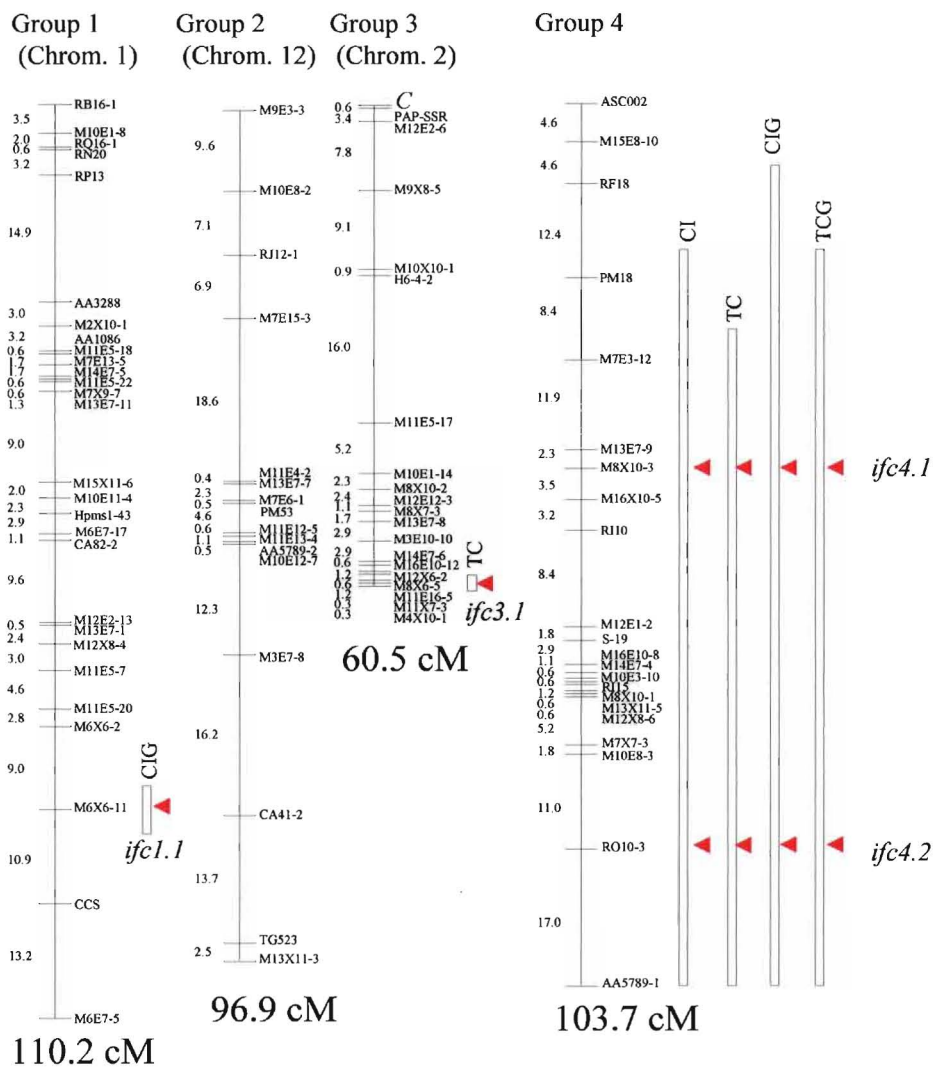


Fig. 26. Quantitative trait loci for immature fruit color using an intraspecific DH population of sweet pepper. Map distances in centiMorgans (cM) calculated by the Kosambi function are denoted on the left side of each linkage group. The putative region of the QTLs with a LOD score of 2.0 is indicated as a bar on the right side of each linkage group. Trait names are abbreviated as CI (color index), TC (total chlorophyll), CIG (color index of green fruit) and TCG (total chlorophyll of green fruit) on the bar. A triangular arrow shows a peak of QTL.

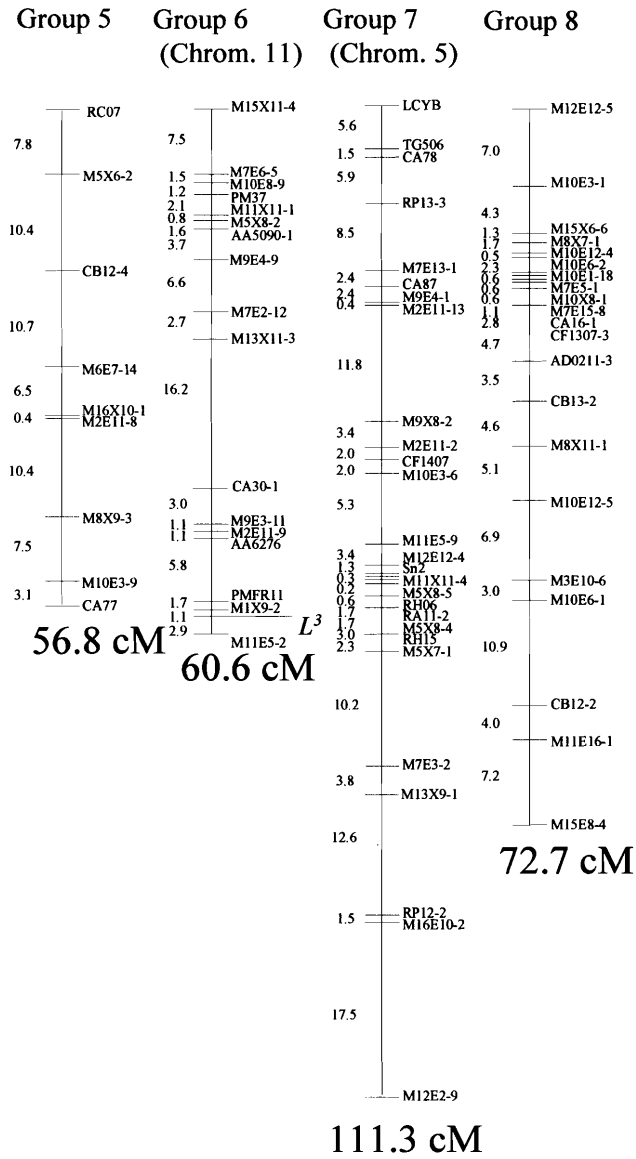


Fig. 26. Continued

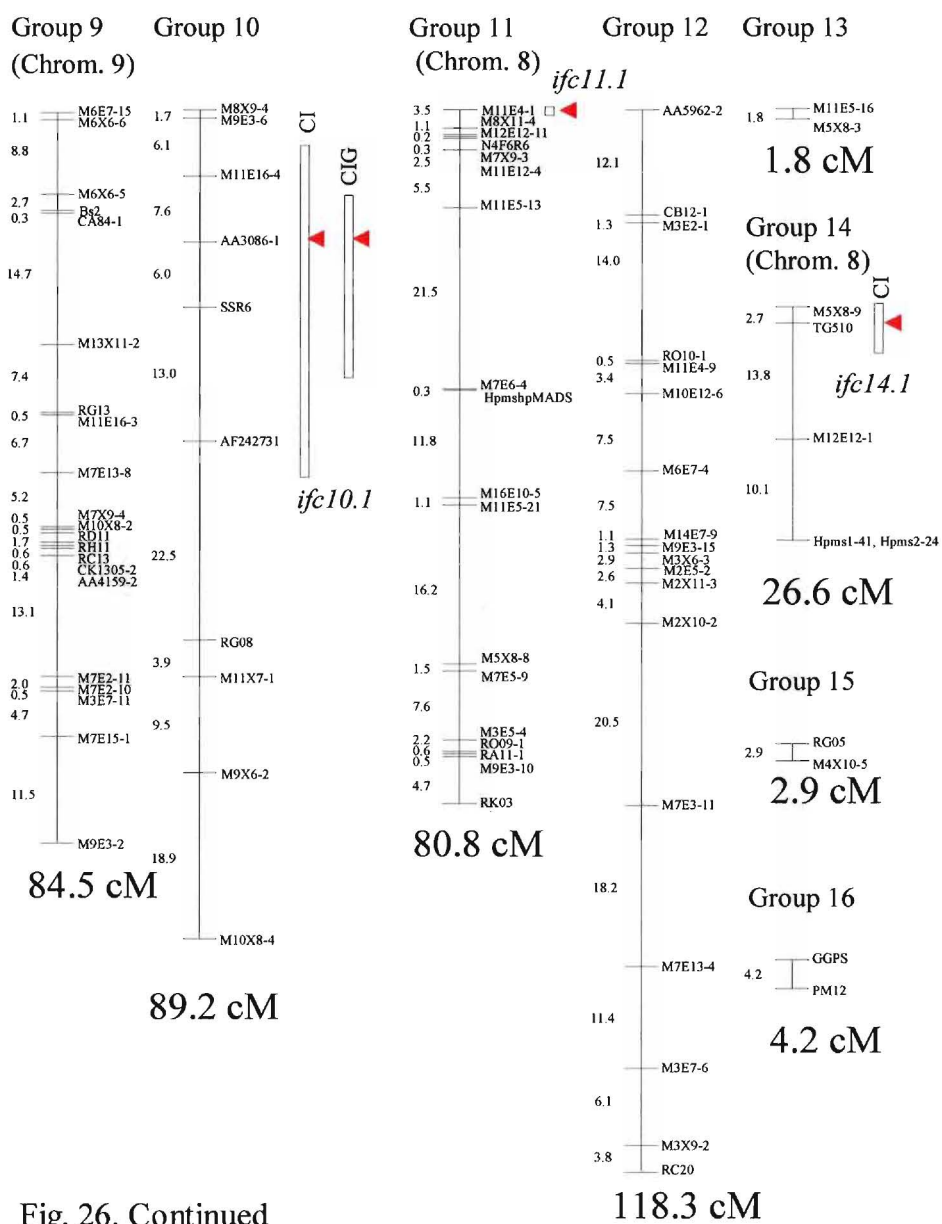


Fig. 26. Continued

Table 19. Effects of QTLs for immature fruit color detected on the DH population derived from a cross between 'AC2258' and 'K9-11'

Trait ¹⁾	QTL	LG	Flanking Marker ²⁾	Phenotypic mean value		LOD	Var. Exp. (%) ³⁾
				K9-11 (n)	AC2258 (n)		
Color index	<i>ifc4.1</i>	4	M8X10-3	18.89 (72)	25.70 (95)	14.1	31.9
	<i>ifc4.2</i>	4	RO10-3	19.09 (85)	26.53 (83)	18.22	39.1
	<i>ifc10.1</i>	10	AA3086-1	21.45 (95)	25.02 (68)	3.379	8.8
	<i>ifc14.1</i>	14	TG510	21.21 (91)	24.57 (78)	2.977	7.8
Total chlorophyll	<i>ifc4.1</i>	4	M8X10-3	63.53 (71)	28.44 (95)	11.38	26.8
	<i>ifc4.2</i>	4	RO10-3	65.44 (84)	21.31 (83)	20.8	43.5
	<i>ifc11.1</i>	11	M11E4-1	51.74 (79)	36.22 (88)	2.025	5.4
Color index ⁴⁾ of green fruit	<i>ifc1.1</i>	1	M6X6-1	19.23 (77)	22.00 (48)	2.278	8.1
	<i>ifc4.1</i>	4	M8X10-3	16.80 (59)	23.44 (64)	17.43	47.4
	<i>ifc4.2</i>	4	RO10-3	18.84 (83)	23.19 (41)	5.606	18.7
	<i>ifc10.1</i>	10	AA3086-1	18.96 (74)	22.91 (46)	4.941	16.7
Total chlorophyll ⁴⁾ of green fruit	<i>ifc3.1</i>	3	M11X7-3	63.75 (74)	48.36 (50)	2.151	7.7
	<i>ifc4.1</i>	4	M8X10-3	76.83 (58)	40.18 (64)	15.44	43.6
	<i>ifc4.2</i>	4	RO10-3	66.95 (82)	38.81 (41)	7.129	23.3

¹⁾ Color index indicates the index of immature fruit color measured with a Hunter colorimeter. It was calculated by using the formula $(L+b) / 2+a$ (Shimokawa *et al.* 1994). Total chlorophyll indicates the total amount of chlorophyll that was measured by using the method described by Inskeep and Bloom (1985).

²⁾ The closest marker to the QTL.

³⁾ Percentage of phenotypic variation explained.

⁴⁾ Analysis of quantitative trait loci for these traits was performed with only DH lines of green fruit, except for the 43 lines showing sulphury-white fruit.

QTL と同一である考えられる。また、LG11 上で検出された QTL、*ifc11.1* は、寄与率 5.4%、LOD スコア 2.03 を示した。最も近傍のマーカーは、優性の AFLP マーカー M11E4-1 であった。

3) 未熟果実色が緑色の系統のみを用いた QTL 解析

緑色の系統のみの未熟果実色指標データを用いた QTL 解析では、3 連鎖群に 4 つの QTL が検出された (Fig. 26、Table 19)。LG1 上で検出された QTL、*ifc1.1* は、寄与率 8.1%、LOD スコア 2.28 を示した。最も近傍のマーカーは、優性の AFLP マーカー M6X6-1 であった。LG4 上では、*ifc4.1* および *ifc4.2* の 2 つの QTL が検出され、それぞれ寄与率 47.4%、LOD スコア 17.43 および寄与率 18.7%、LOD スコア 5.61 を示した。LG10 上で検出された QTL、*ifc10.1* は、寄与率 16.7%、LOD スコア 4.94 を示した。

また、緑色の系統のみの全クロロフィル含量データを用いた QTL 解析では、2 連鎖群に 3 つの QTL が検出された (Fig. 26、Table 19)。LG3 上で検出された QTL、*ifc3.1* は、寄与率 7.7%、LOD スコア 2.15 を示した。最も近傍のマーカーは、優性の AFLP マーカー M11X7-3 であった。LG4 上では、*ifc4.1* および *ifc4.2* の 2 つの QTL が検出され、それぞれ寄与率 43.6%、LOD スコア 15.44 および寄与率 23.3%、LOD スコア 7.13 を示した。

それぞれの QTL 近傍のマーカー座において、その遺伝子型と未熟果実色の関係について調査した結果、*ifc1.1*、*ifc3.1*、*ifc4.1* および *ifc10.1* の 4 つの QTL では、全 DH 系統を用いて QTL 解析を行った場合に比べ、寄与率が増加し、*ifc4.2*、*ifc11.1*

および *ifc14.1* の 3 つの QTL では、寄与率が減少した (Table 19)。

4) 未熟果実色 QTL 近傍マーカーによる有効性の確認

Fig. 27 は、全 DH 系統を用いて QTL 解析を行った場合に比べ、寄与率が減少した 3 つの QTL (*ifc4.2*、*ifc11.1* および *ifc14.1*) の未熟果実色形質に及ぼす影響について、それぞれの QTL 近傍に位置する DNA マーカーを用いて調査した結果である。黄白色の系統のほとんどは、3 つのマーカー座において「AC2258」型アレルである。また、3 マーカー座において、「AC2258」型アレルで持つ系統のほぼ半分は、黄白色の系統であった。

また、*ifc11.1* および *ifc14.1* は、座乗する染色体が同じであることから同一の QTL と考えられ、また、Fig. 27 における分離により *ifc14.1* の方がその QTL に近いと推測できるので、*ifc4.2* 近傍のマーカー RO10-3 と *ifc14.1* 近傍のマーカー TG510 の 2 つの DNA マーカーを用いて、未熟果実色に与える影響について調査した。両マーカー座において「K9-11」型アレルで持つ系統は、全て緑色の系統であった (Fig. 28-A、E)。その他のマーカーアレルの組み合わせについても、マーカーと遺伝子座間で組み換えが起こっていると思われる数個体を除き、全てが緑色であった (Fig. 28-B、C、F、G)。両マーカー座において「AC2258」アレルで持つ系統は、3 個体を除き全てが黄白色の系統であった (Fig. 28-D、H)。このことから、RO10-3 および TG510 は、緑色か黄白色かを決定づける 2 つの遺伝子座、すなわち *W1* および *W2* に連鎖していることが確認された。

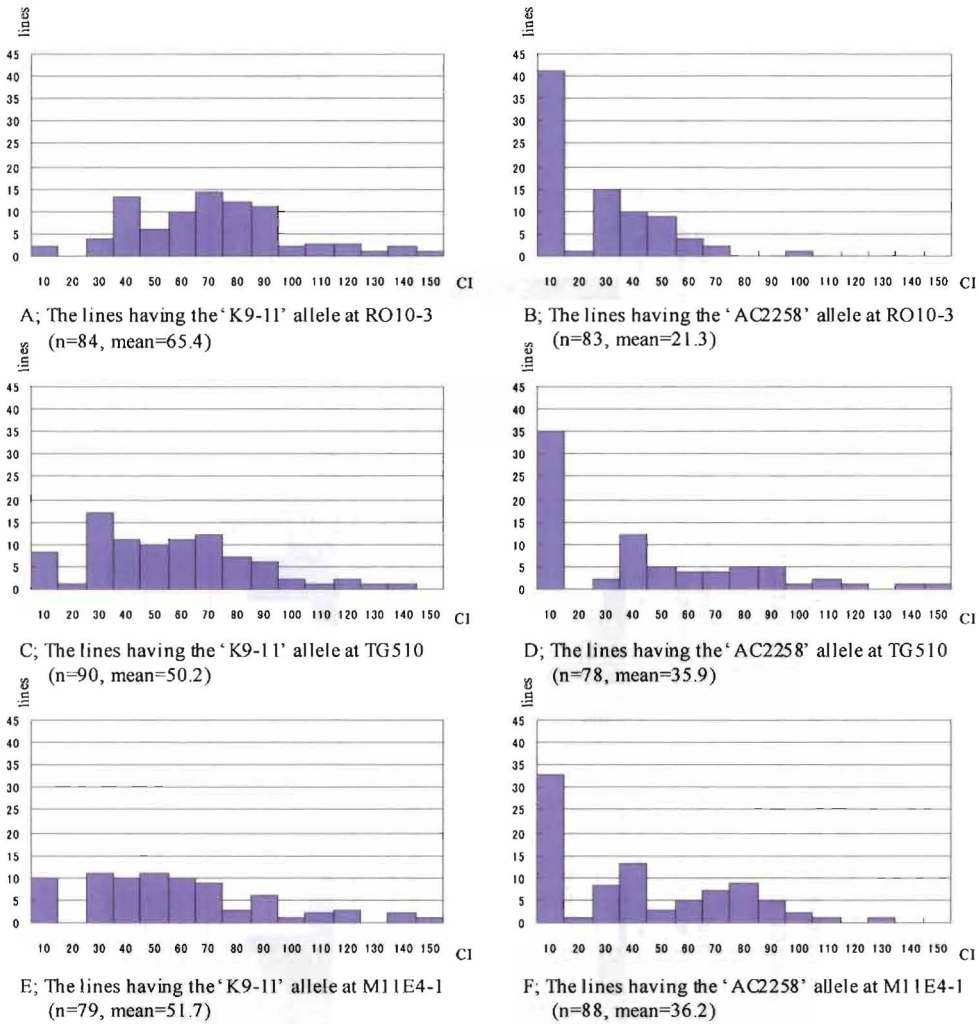


Fig. 27. Relationship between the genotype of the marker locus and the total chlorophyll content acquired using an intraspecific DH population of sweet pepper. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the total chlorophyll content. RO10-3 was linked to *ifc4.2* and TG510 was linked to *ifc14.1*.

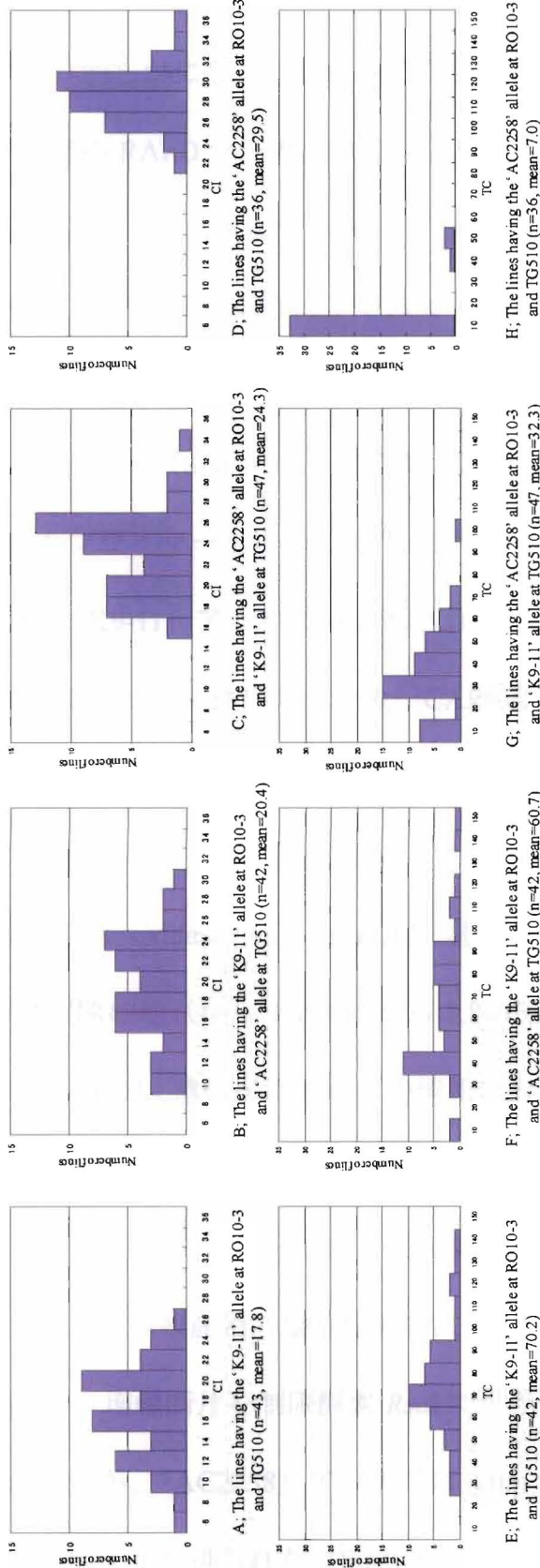


Fig. 28. Relationship between the genotype of the marker locus and the immature fruit colors as the index of immature fruit color (CI) and the total chlorophyll content (TC) for two markers using an intraspecific DH population of sweet pepper. The vertical axis indicates the number of lines, and the horizontal axis indicates the color index or total chlorophyll content.

5) *W* 遺伝子座に連鎖した DNA マーカーの CAPS マーカーへの変換

QTL 解析により明らかになった緑色か黄白色かを決定づける 2 つの遺伝子座 *W1* および *W2* 近傍の RAPD マーカー RO10-3 (Fig. 29-A) および RFLP マーカー TG510 (Fig. 29-C) について CAPS マーカーへと変換した。まず、RO10-3 断片の塩基配列を解析した結果、「K9-11」アレルで 660bp、「AC2258」アレルで 661bp の塩基配列情報が得られた。両配列にて相同性を確認したところ、3 の Single nucleotide polymorphisms (SNPs) と 1 の 1 塩基欠失が認められた (Fig. 30)。断片内部で設計したプライマーを用いて PCR を行い、増幅断片を制限酵素 *SphI* で切断したところ、「K9-11」アレルでは切断されないが、「AC2258」アレルでは 343bp の位置で切断される共優性のマーカー CAPS-RO10 が得られた (Fig. 29-B)。

次に、トマトプローブ TG510 について CAPS マーカー化を図るため、TG510 の配列についてデータベースを用いて比較したところ、*Lycopersicon cheesmaniae* peroxisomal acyl-CoA oxidase 1A (*Acx1A*) 遺伝子 (GenBank accession No. AY817111) の翻訳開始地点から 3,897bp から 1,809bp 上流域の配列と一致した。*Capsicum* における *Acx1A* 遺伝子ホモログの情報は得られていないため、イントロンを挟んだエクソン領域でプライマーを設計し、ピーマンゲノム DNA を用い PCR を行ったところ、第 5 イントロンを挟む領域で 223bp の明瞭なシングルバンドが得られた。この増幅産物の塩基配列を決定したところ、1 つの SNP が確認できた (Fig. 31)。増幅断片を制限酵素 *RsaI* で切断したところ、「K9-11」アレルでは切断されないが、「AC2258」アレルでは 45bp の位置で切断される共優性のマーカー CAPS-TG510 が得られた (Fig. 29-D)。

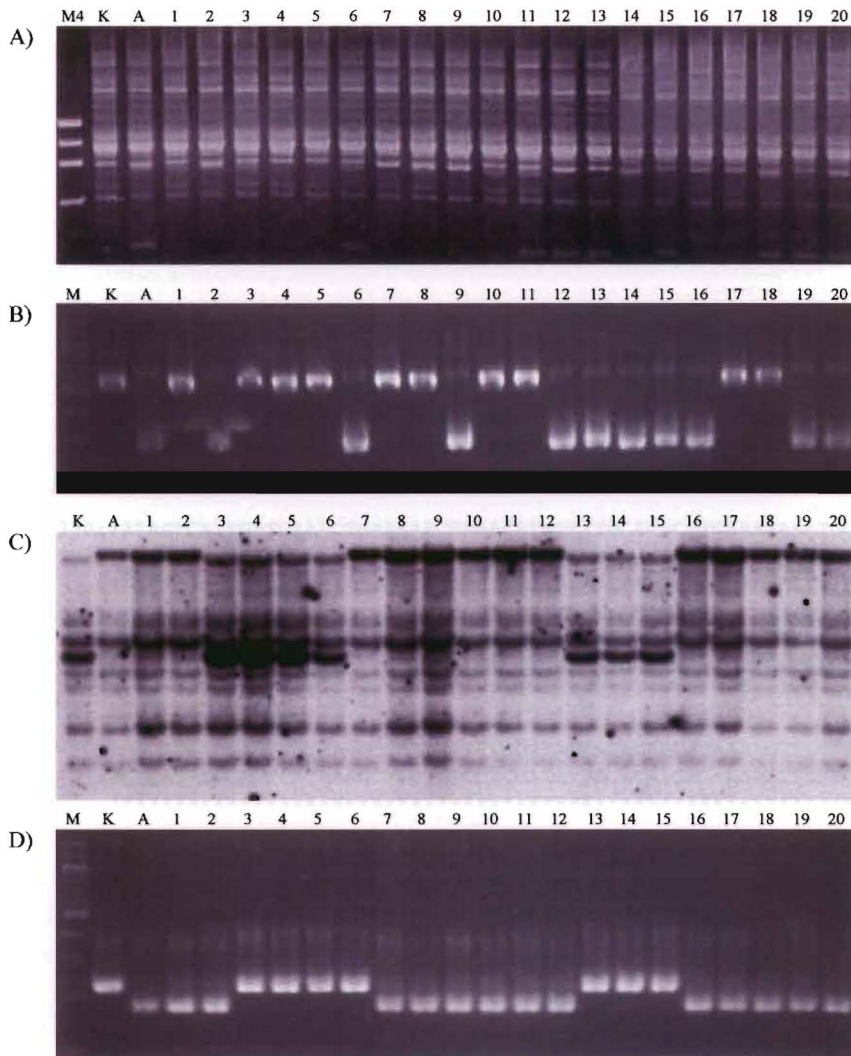


Fig. 29. Molecular markers linked to *W1* and *W2* locus. Random amplified polymorphic DNA marker RO10-3 (A) linked to the *W1* locus and the RFLP marker TG510 (B) linked to the *W2* locus were converted into CAPS markers CAPS-RO10 and CAPS-TG510. M4: ϕ X174/*Hae*III digest, M: 100bp ladder, K: 'K9-11', A: 'AC2258', 1-20: Segregating DH individuals.

K9-11 1:TCAGAGCGCCTAAATTCAGCAAATAGAGATGTAAGAGACCTGCTAATTA AAAAATTTCTA 60
AC2258 1:TCAGAGCGCCTAAATTCAGCAAATAGAGATGTAAGAGACCTGCTAATTA AAAAATTTCTA 60

RO10s2

61:GAATTTATGATGGATCTAGTCATGAGATGGAATAATGAACATAGACAACATTCAGAAGCA 120
61:GAATTTATGATGGATCTAGTCATGAGATGGAATAATGAACATAGCCAGCATTCAGAAGCA 120
***** * *****

121:ATATTTATAGAACTGGGAAACAAATACAAT-ATAATAATGAGAGAAAATTTCAATTTTGTG 179
121:ATATTTATAGAACTGGGAAACAAATACAATCATAATAATGAGAGAAAATTTCAATTTTGTG 180

180:AGATAAAATGAAGGTATTACTTCTTATTTCTACTTCACAGACACTTACATATTCTAATAT 239
181:AGATAAAATGAAGGTATTACTTCTTATTTCTACTTCACAGACACTTACATATTCTAATAT 240

240:GCACACTATTTACTAATATATTTGTACATTACAGGTGATGGGTTCTACTCACTATTCTTA 299
241:GCACACTATTTACTAATATATTTGTACATTACAGGTGATGGGTTCTACTCACTATTCTTA 300

300:TATAGTCATTGATGAAACTGAAAAACGAAACATTGTTTGCATACGTGAAAAAATGCTCC 359
301:TATAGTCATTGATGAAACTGAAAAACGAAACATTGTTT GCATGCGTGAAAAAATGCTCC 360

Sph I

360:TGCCTACAATTTTAAGTAGATGGCATAACCTTGTCACATGCATGCGGGTGCTAAATTAC 419
361:TGCCTACAATTTTAAGTAGATGGCATAACCTTGTCACATGCATGCGGGTGCTAAACTTAC 420

420:ACGCATATGGACTTACAAAGCTATTGTTCTCCATATTACACAAGAGAAAACCTCTTGAAA 479
421:ACGCATATGGACTTACAAAGCTATTGTTCTCCATATTACACAAGAGAAAACCTCTTGAAA 480

480:TCATATGAACTTCTAGTTATACCACCTTTTTGATGAAACAATTTGGCACATTCTACCAGAG 539
481:TCATATGAACTTCTAGTTATACCACCTTTTTGATGAAACAATTTGGCACATTCTACCAGAG 540

540:ATATCAGCTAATATAGTACTGCCACCAATCTGAAAATCAAACCAGGAAGACCAAAAAAGA 599
541:ATATCAGCTAATATAGTACTGCCACCAATCTGAAAATCAAACCAGGAAGACCAAAAAAGA 600

RO10as2

600:ACAATTGGGGAAAGGGCATTATGAACTACTTTAAGCAATAAATTTCAATGTGGGCGCTCTGA 660
601:ACAATTGGGGAAAGGGCATTATGAACTACTTTAAGCAATAAATTTCAATGTGGGCGCTCTGA 661

Fig. 30. Nucleotide sequences of RO10-3 fragments. Underlined parts indicate the sequences of PCR primers. The upper sequence indicates the 'K9-11' allele, and the lower sequence indicates the 'AC2258' allele. The asterisk indicates an area with coincidental parts. Underlined parts in italics indicate the restriction site.

Le-Acx1A-s2

K9-11 1:GGTGGCCTGGTGGATTGGGTAAAGTGTCCACCCATGCTGTTGTGTATGCTCGTCTTATAA 60
AC2258 1:GGTGGCCTGGTGGATTGGGTAAAGTGTCCACCCATGCTGTTGTGTATGCTCGTCTTATAA 60

Rsa I

61: CAGATGGTAAAGATTATGGGATTAATGGTAAGTCAATGATTTTTCATGTCACAAGCTGGT 120
61: CAGATGGTAAAGATTATGGGATTAATGGTAAGTCAATGATTTTTCATGTCACAAGCTGGT 120

121: GCAAAGCATGCCGATTTTCAGGGAAGCGCTTATGGTTTATTGACTTCACATATTTAGGTT 180
121: GCAAAGCATGCCGATTTTCAGGGAAGCGCTTATGGTTTATTGACTTCACATATTTAGGTT 180

Le-Acx1A-as2

181: TTATTGTTCAATTACGGAGCTTGGAGGACCACAAACCTCTTCC 223
181: TTATTGTTCAATTACGGAGCTTGGAGGACCACAAACCTCTTCC 223

Fig. 31. Partial sequences of a putative *Acx1A* gene in pepper. Underlined parts indicate the sequences of PCR primers. The upper sequence indicates the ‘K9-11’ allele, and the lower sequence indicates the ‘AC2258’ allele. The asterisk indicates an area with coincidental parts. Underlined parts in italics indicate the restriction site.

ここで得られた CAPS-RO10 および CAPS-TG510 の両マーカーとも DH における分離を調査したところ、改変前のマーカー、RO10-3 および TG510 と同じ分離を示した。

4. 考察

緑色の系統のみを用いた解析によって検出された QTL のうち、*ifc1.1*、*ifc3.1*、*ifc4.1* および *ifc10.1* の 4 つの QTL は、全 DH 系統を用いて QTL 解析を行った場合に比べ、寄与率が増加していることから、緑色の増加に関与する QTL であると推定される。なかでも、LG4 上の *ifc4.1* は、全ての QTL 解析で安定的に検出されていることから、未熟果実色の緑色強度の増加に関して、最も強い影響力を持つと考えられる。Ben ら (2001b) は、QTL 解析によって LG10 (第 10 染色体) 上に緑色強度を増加させる寄与率 33% の 1 つの QTL を検出している。彼らの検出した QTL は、本研究における *ifc4.1* に相当すると思われる。また、*ifc4.2*、*ifc11.1* および *ifc14.1* の 3 つの QTL は、緑色の系統のみを用いた QTL 解析では、寄与率が減少している。これらの QTL は、QTL 近傍マーカー座における遺伝子型と表現形質との関係から、黄白色果実に関連した遺伝子座であると思われた。しかし、3 つの QTL のうち、*ifc11.1* と *ifc14.1* は、同じ第 8 染色体上に座乗しており、同一の因子によるものと考えられる。よって、*ifc4.2* と *ifc14.1* の 2 つの近傍マーカー座における遺伝子型と未熟果実色形質について調査した結果、緑色と黄白色の色の分離に関しては、第 8 および第 10 染色体上の 2 つの質的な重複する遺伝子座が関与していることが明らかとなった。つまり、これらの重複遺

伝子を劣性ホモ $w1w1w2w2$ で持つことにより、未熟果実色が黄白色になると思われる。このことは、全 DH 集団における 2 遺伝子座関与による黄白色系統の分離比と一致する。

あらゆる強度の緑色に対し劣性である黄白色の果実を有する系統を育成することは、多くの労力と時間を必要とする。本研究により得られた CAPS マーカーは、黄白色果実の選抜に有効であると同時に、今後の未熟果実色の更なる研究に寄与すると思われる。

5. 摘要

未熟果実色濃緑色の「K9-11」(*C. annuum*) と黄白色の「AC2258」(*C. annuum*) の F₁ の蒔培養由来倍加半数体集団 (n=176) を用いた未熟果実色評価結果および 224 のフレームワークマーカーによる総連鎖グループ長 1,100.5 cM の計 16 の連鎖群 (LGs) からなる連鎖地図を用いて、ピーマン未熟果実色に関する QTL 解析を行った。その結果、緑色強度を増加させる 4 つの QTL と黄白色果実に関連した 3 つの QTL を検出した。緑色強度を増加させる 4 つの QTL のうち、ピーマン第 10 染色体に相当する LG4 上の *ifc4.1* は、未熟果実色の緑色強度の増加に関して、最も強い影響力を持つと考えられる。また、黄白色果実に関連する 3 つの QTL *ifc4.2*、*ifc11.1* および *ifc14.1* は、ピーマン第 8 および第 10 染色体上の 2 つの質的な遺伝子座 (*W1* および *W2*) に対応し、これらの重複遺伝子を劣性ホモ $w1w1w2w2$ で持つことにより、未熟果実色が黄白色になることが明らかとなった。さらに、*W1* および *W2* に連鎖した CAPS マーカーを開発した。

あらゆる強度の緑色に対し劣性である黄白色の果実を育成することは、多くの労力と時間を必要とする。この研究によって開発された CAPS マーカーは黄白色果実品種の育成と未熟果実色に関する今後の研究に寄与するものと考えられる。

第5章 総合考察

ピーマンの生産においては、その栽培過程で様々な病害が発生し、大きな被害を生じている。現在のところ、これらの病害に対しては農薬による防除が一般的であるが、平成18年5月からポジティブリスト制度が導入され、食品に残留する農薬等に関する規制が強化され始めた。農薬を使わない防除法として抵抗性品種の導入が考えられるが、抵抗性品種の育成には多くの遺伝的な要素が関係し、従来 of 育種法では選抜が困難であるため、積極的に行われていない。McCouch と Tanksley (1991) によって DNA マーカーを用いた選抜育種法が提唱されたが、ピーマンの育種においては現在においても利用されていない。これは、SCAR マーカー等の使い易い DNA マーカーがほとんど開発されていないことと、様々な抵抗性形質に対応した数多くの DNA マーカーが作出されていないことが原因と考えられる。

本研究ではこのような点を踏まえ、ピーマンの各種有用形質に連鎖した DNA マーカーの開発と QTL 解析に関する基礎的な成果について述べてきた。これらの成果については、ピーマン育種の新しい展開が期待されているだけに、今後一層の努力が図られなければならない。そこで本章では、本分野のいくつかの点について触れ、これらの育種的利用に関する問題点を指摘し、さらに今後の展開について述べることにとする。

ピーマンにおける薬培養技術は、Wang ら (1973) によって初めて成功し、その後、Dumas ら (1981) によって改良され一般的になった。しかしながら、そ

これらの手法では、植物体再生効率が低く、胚様体誘導培地から再分化培地への移植作業を行うため、作業が煩雑で多くの時間と労力が必要とされた。そこで、本研究によりピーマン蒔培養における諸条件の検討および改良を行い、一段階培養法を開発した。この手法を用いることにより、培養途中での再分化培地への移植や培地作成の作業を省くことができ、大幅な省力化が図られた。ピーマンやトマト等における野菜の自殖性作物は、通常 F₁ 品種として市販されており、その親となる純系を育成するためには少なくとも 8 世代以上の自殖を必要とすることから、多くの時間と労力を要する。本研究で開発した一段階培養法による蒔培養技術は、簡易に純系を作出できる手法としてピーマン育種および遺伝解析用分離集団の育成に大きく貢献するものと考えられた。

また、ピーマン育種において、DNA マーカーによる選抜技術を導入するためには、遺伝解析に適した材料の早期育成と迅速な DNA マーカーの開発および蓄積が必要である。蒔培養によって作出された系統は、その育成にかかる年限が短いことに加え、ヘテロ接合系統の混在による表現形質の乱れがなく、量的形質を解析するための最も適した分離集団である。そこで、本研究により開発した一段階培養法を用い、短期間で DH176 系統を育成した。それらを用いて特性調査を行った結果、果実の縦径、横径、果実形および果実重に関しては、連続的に分離したことから、量的な形質が関与していると考えられた。また、PMMoV 抵抗性および辛み形質に関しては、単一主働遺伝子支配による分離比 1:1 に適合したが、母親として供試した「K9-11」型の頻度が期待されるよりやや高い傾向にあった。蒔培養の弊害として、再分化能が低い親の方の持つ対立遺伝子が淘

汰されることにより分離比の歪みを生じるという報告があり (Graner ら 1991、Murigneux ら 1993)、再分化能が低い父親として供試した「AC2258」の持つ対立遺伝子が淘汰され、分離比の歪みを生じている可能性が示唆された。

ピーマンでは、イネ等の他の主要作物に比べ、まだ一部の形質に連鎖する DNA マーカーしか開発されておらず、多くの有用形質に連鎖した DNA マーカーの蓄積と迅速な DNA マーカーの開発技術いわゆる高速マッピング技術の開発が必要とされる。特に、宮崎県を始めとする全国のピーマン産地では、PMMoV (P₁₂) による被害が深刻であり、それに対応する L³ 抵抗性を有する新品種の育成と、L³ 連鎖した DNA マーカーの開発が望まれている。本研究では、DH176 系統での形質調査結果をもとに、PMMoV 抵抗性遺伝子座 L³ と辛み発現に関する遺伝子座 C に連鎖した DNA マーカーを開発した。L³ に連鎖した DNA マーカーは、L³ 因子から 2.8 cM に位置し、バルク法を用いて開発した。その後、安定的に検出できる共優性 SCAR マーカー PMFR11 と優性の PMFR21 に変換した。これらのマーカーは、抵抗性遺伝資源の PI 159236 由来 L³ 遺伝子導入のためのマーカー選抜育種に有効であることが確認された。さらに、L³ アレルの L⁴ 抵抗性遺伝資源の PI 260429 に対しても多型を示すことから、L⁴ 抵抗性系統選抜のための DNA マーカーとしても併用できることが示唆された。DH 集団における L³ 遺伝子座での分離の歪みが、DNA マーカー開発に悪影響を与えることが心配されたが、これらの SCAR マーカーは BC₁ 集団においても DH 集団とほぼ同じ組換え価を示したことから、実用的に使用できることが証明された。C に連鎖した DNA マーカーは、C 因子から 0.6 cM に位置する SSR マーカー PAP-SSR で、PAP 遺伝子

上流のマイクロサテライト領域を利用して開発した。この領域では、多くのアレルが存在し、選抜マーカーとしての有効性を確認できた。本研究によって開発された L^3 および C に連鎖した DNA マーカーは、MAS によるピーマン育種において大きく貢献するものと考えられる。

ピーマンにおける高速マッピング技術の開発については、DNA マーカーを短期間で開発し、連鎖地図の充実を図るために必要な技術である。目的とする形質の異なる様々な分離集団で QTL 解析を行うためには、広域ゲノム領域を網羅した連鎖地図を迅速に作製する技術が必要である。従来、ピーマンでは RFLP、RAPD および AFLP によるマッピングが行われているが、多くの労力を要し、高価な施設や機器を必要とするため、それらの条件を満たせない研究機関では、RAPD 等により小規模なマッピングを行うしかなかった。そこで、本研究では、Kawasaki ら (2000) によって開発された HEGS/AFLP をピーマンのマッピングにおいて適用し、簡易に効率よく連鎖地図を作製することが可能となった。この手法は、アクリルアミドゲルの取り扱いが容易で、バンドの検出にアイソトープや銀染色、シーケンサを使用しないため安価で省力的にマッピングが可能である。作業性としては、1人で1日当たり768サンプルの取り扱いが容易にできる。今後は、この手法をさらに改良し、AFLP と一本鎖高次構造多型 (Single-strand conformation polymorphism ; SSCP) の組み合わせや、SSCP とゲノムおよび EST 由来 SSR と組み合わせることにより、マッピングの高能率化を図って行く予定である。

本研究によって得られた 530 の分子マーカーを用いて連鎖解析を行い、224 の

フレームワークマーカーによる 16 の連鎖群からなる連鎖地図を作製した。また、連鎖解析の結果から、バルク法を用いて得られた L^3 に連鎖した SCAR マーカー (PMFR11 および PMFR21) よりも、さらに近傍に位置する L^3 を挟んだ 4 つの DNA マーカーが得られた。現在までに、 L^3 を挟んで両側にマーカーが得られたという報告はない。1 回の減数分裂において短い距離間での 2 重組換えは、ほとんど起こらないと考えられるため、これらの DNA マーカーは、抵抗性接種検定を行わず抵抗性個体が確実に選抜できるマーカーとしてその利用が期待される。今後、これらのマーカーを SCAR 化することで、育種現場での利用が促進されるものと思われる。

また、有用な形質に連鎖した DNA マーカーの蓄積と MAS によるピーマン育種の効率化を図るため、DH176 系統を用い、疫病抵抗性および未熟果実色の QTL 解析を行った。疫病抵抗性の遺伝については、DH 集団での平均生存株率が連続的に分布したことから、量的な形質が関与していることが示された。また、そこで得られた抵抗性評価結果を用いて、QTL 解析を行い、3 連鎖群に 3 つの QTL *Phyt-1*、*Phyt-2* および *Phyt-3* を検出した。しかし、3 つの QTL 近傍マーカーを用いた有効性の確認により、2 つの QTL、*Phyt-1* および *Phyt-2* には、疫病抵抗性に関して相加的な効果があり、MAS によるピーマン疫病抵抗性品種の育成のためには、*Phyt-1* と *Phyt-2* をホモで持つことで、効果的な抵抗性を付与できるものと考えられた。今後は、罹病性の「K9-11」を遺伝的なバックグラウンドにした *Phyt-1* と *Phyt-2* をそれぞれ別々に有する準同質系統を育成し、エピスタシスや詳細な抵抗性 QTL の位置について調査を行う予定である。今回開発した抵

抗性 QTL 近傍に位置するマーカーは、現在のところ優性の AFLP および RAPD マーカーであることから、これらの DNA マーカーを MAS で活用し易くするためには、SCAR および CAPS マーカー等に改変する必要がある。

未熟果実色の評価は、目視での判定が困難であるため、色彩色差計と分光光度計を用いて数値化した。疫病抵抗性と同じく量的形質が関与しているため、連続的な分離を示したが、劣性の黄白色果実の出現に関しては、黄白色の分離比により、2つの遺伝子が関与していると思われた。それらの未熟果実色データを用い QTL 解析を行った結果、6連鎖群にピーマン未熟果実色に関する7つの QTL を検出した。緑色と黄白色の色の分離に関しては、QTL、*ifc4.2* と *ifc14.1* に対応する2つの質的な重複する遺伝子座 *W1* および *W2* によって支配され、第8および第10染色体に座乗していることを明らかにした。つまり、本研究で供試している DH 集団における *W* 遺伝子座では、*W1W1W2W2*、*W1W1w2w2*、*w1w1W2W2* および *w1w1w2w2* の遺伝子型に分離し、*w1w1w2w2* のみが黄白色を示し、それ以外は緑色となる。さらに、*W1W1W2W2*、*W1W1w2w2* および *w1w1W2W2* の緑色系統は、*ifc4.1* のような未熟果実色の緑色強度を増加させる因子が加わることにより、薄緑色から濃緑色の連続的な緑色の分布を示すものと考えられる。本研究は、*Capsicum* 未熟果実色における緑色または黄白色を決定する遺伝子座、*W1* および *W2* に関する初めての報告である。さらに、*W1* および *W2* に連鎖した2つの RAPD および RFLP マーカーを、MAS に利用するために CAPS マーカーへと変換した。また、緑色の増加に関与する QTL として、4つの QTL が検出されたが、そのうち LG4 上の *ifc4.1* は、全ての QTL 解析で検

出されており、また寄与率も高いことから、未熟果実色の緑色強度の増加に関して安定的に働き、最も強い影響力を持つと考えられる。また、*WI* に対応した *ifc4.2* は、全 DH 系統を用いて QTL 解析を行った場合に比べ、寄与率は減少しているが、緑色の系統のみを用いた解析によって QTL ピークが検出された。同一染色体上にある *ifc4.1* との距離は約 40 cM 離れているため *ifc4.1* の影響ではないと考えられ、*WI* 近傍に緑色強度の増加に関する別の QTL が存在するのか、または *WI* そのものが緑色強度の増加に関して影響力を持っているということが示唆された。各 QTL の持つ効果をさらに詳細に調査するため、それぞれの QTL 座を別々に有し、遺伝的なバックグラウンドをそろえた準同質系統を育成していく予定である。この研究によって開発された CAPS マーカーは、MAS による黄白色果実品種の育成と未熟果実色に関する今後の遺伝学的研究に寄与するものと考えられる。

本研究では、各座位がホモ化した遺伝解析に適した DH 系統を材料として用いた。このことが、正確な形質評価を行うことを可能とし、さらに実用的な数多くの DNA マーカーを開発できた最も重要かつ基本的な要因であると考えられる。農業上有用な質的および量的形質を連鎖地図上に蓄積し、地図上の連鎖する DNA マーカーを用いて総合的な MAS を行うことで、育種作業の効率化が図られる。しかしながら、本研究で作製した連鎖地図上には、青枯病抵抗性、うどん粉病抵抗性、収量および品質等の農業上有益な形質は、まだマッピングされていない。今後は、本研究で得た技術をもとに、さらに多くの形質を連鎖地図上に蓄積し、ピーマン育種技術の進展に貢献していきたい。

要 約

本研究は、ピーマンにおける DNA マーカーを用いた選抜育種技術の開発に資することを目的に、分子遺伝学的手法を用い、有用形質に連鎖する DNA マーカーの開発、遺伝様式の解明およびその育種的利用法について論ずる。そのため、第 1 に蒴培養技術を用いた種内交雑由来倍加半数体系統の実用的育成技術の開発と育成した系統の形態特性について、第 2 に質的有用形質に連鎖した分子マーカーの開発とピーマンにおける高能率連鎖地図作製技術の開発について、第 3 に疫病に対する抵抗性の遺伝的評価と QTL 解析による DNA マーカーの開発について述べ、第 4 に未熟果実色に関する遺伝的評価と QTL 解析による DNA マーカーの開発について論述する。

1. 効率的な蒴培養技術の確立を目的に、一段階培養法による条件について検討した結果、6 系統の植物体再分化効率が明らかとなり、「No.5」と「土佐ひかり D」で再分化率が高く、本手法の適用性が高いことが示された。植物体再分化率には、系統間で大きな差が生じることが判明し、蒴培養に利用する系統の選定には十分に留意しなければならないことが示された。

2. 一段階培養法を用いて、7,835 個の蕾中の蒴を培養し、176 個体から自殖種子が得られた。これらの種内交雑由来 DH176 系統を用い、各種形態的特性の調査を行った結果、果実縦径、横径、果実形および果実重の遺伝様式につい

では、DH 集団での分離においていずれも連続的な分離を示したことから、それらの形質発現に関しては複数の量的な因子が関与していることが示唆された。

PMMoV 抵抗性および辛みの遺伝様式に関しては、DH および BC₁ 世代における分離比により、単一主働遺伝子支配による質的な遺伝形質であることが確認された。また、供試した DH 集団については、それぞれの遺伝子座において、「K9-11」型の頻度がやや高い傾向にあることから、分離比の歪みを生じている可能性が示唆された。

3. ピーマン (*C. annuum*) 種内交雑による 176 系統の葯培養由来半数体倍加 (DH) 集団を用い、バルク法により L^3 遺伝子に連鎖した RAPD マーカーの開発を行った。そこで得られた共優性の RAPD マーカー E18₂₇₂ および E18₂₈₆ について、クローニング後、塩基配列を決定し、SCAR マーカーに変換した。DH 集団および戻し交配集団を用いた PCR 分析の結果、全ての SCAR マーカー、PMFR11₂₆₉、PMFR11₂₈₃ および PMFR21₂₀₀ は RAPD マーカーと同じ分離を示し、 L^3 遺伝子から 2.8 cM の距離に位置づけられた。さらに、共優性の SCAR マーカー PMFR11₂₆₉ および PMFR11₂₈₃ を用いて *Capsicum* 属 4 種 19 系統における有効性の検定を行った結果、本章で開発した SCAR マーカーは、ピーマン育種における PI 159236 由来 L^3 遺伝子導入のためのマーカー選抜育種に有効であることが明らかとなった。また、塩基配列解析結果から、 L^4 抵抗性遺伝資源の PI 260429 に対しても多型を示すことから、 L^4 抵抗性系統選抜のための DNA マーカーとしても使用できることが明らかとなった。

C 遺伝子座近傍のマーカーを得るため、Plastid-lipid-associated protein (PAP) 遺伝子上流のマイクロサテライト領域を利用し、C 遺伝子座から 0.6 cM に位置する SSR マーカー-PAP-SSR を開発した。この領域については、*Capsicum* 属 3 種を用いたフラグメント解析および塩基配列解析結果により、多くのアレルが存在し、選抜マーカーとしての有効性を確認できた。

4. ピーマン (*C. annuum*) 種内交雑による蒔培養由来 176 系統の倍加半数体系統 (DH) 集団を用いて、HEGS/AFLP および RAPD 等による連鎖地図の作製を行った。382 の AFLP マーカー、122 の RAPD マーカー、3 の RFLP マーカー、8 の SCAR マーカー、4 の CAPS マーカーおよび 11 の SSR マーカーからなる計 530 の DNA マーカーと L^3 および C の 2 形質を用いた連鎖解析の結果、224 のフレームワークマーカーによる 11 の大きな連鎖群 (56.8–118.3 cM) と 5 の小さな連鎖群 (1.8–26.6 cM) の計 16 の連鎖群から構成された、総連鎖群長 1,100.5 cM、平均マーカー間距離 4.6 cM の連鎖地図が得られた。一般的に種間交雑集団に比べ多型の検出頻度が低い種内交雑由来 DH 集団においても、HEGS/AFLP を用いることで迅速な連鎖地図の作製が可能であった。また、連鎖解析の結果から L^3 に連鎖した 3 の AFLP マーカーおよび 1 の RAPD マーカーと C に連鎖した 1 の AFLP マーカーが得られた。

5. ピーマン種内交雑由来 DH 集団を用いて、疫病抵抗性の評価を行った。抵抗性を有する「AC2258」でも育苗日数が 20 日以下の場合には疫病に感染し枯

死することから、「AC2258」の有する疫病抵抗性は、発芽当初から保有しているのではなく、本葉が展開し始める時期に発現していくものと考えられる。また、疫病抵抗性の遺伝について、DH集団での平均生存株率は連続的に分布したことから、疫病抵抗性は量的な形質であることが示された。しかし、DH集団における生存株率の度数分布が、生存株率の高い系統と低い系統の2つのグループに分かれ、さらに30%の区間に小さなピークが認められたことから、「AC2258」の有する疫病抵抗性には、寄与率の大きい1つの主働因子および複数の寄与率の低い微働因子が関与していることが示唆された。

6. 疫病罹病性「K9-11」(*C. annuum*)と疫病抵抗性「AC2258」(*C. annuum*)のF₁の葯培養由来倍加半数体集団(n=176)を用いた疫病抵抗性評価結果および224のフレームワークマーカーによる総連鎖グループ長1,100.5 cMの計16の連鎖群(LGs)からなる連鎖地図を用いて、疫病抵抗性に関するQTL解析を行った。その結果、LG1(トウガラシ第1染色体)、LG6(トウガラシ第11染色体)およびLG7(トウガラシ第5染色体)の3連鎖群に3つのQTLが検出された。最もLOD値の高いQTL *Phyt-1*はLG7上で検出され、LOD値67.02、寄与率82.7%を示した。最も近傍のマーカーはAFLPマーカーM10E3-6であった。LG1上で検出されたQTL *Phyt-2*は、LOD値2.54、寄与率6.4%を示した。最も近傍のマーカーはRAPDマーカーRP13-1であった。QTL *Phyt-3*はLG6上で検出され、LOD値2.20、寄与率5.6%を示した。最も近傍のマーカーはAFLPマーカーM9E3-11であった。2つのマーカーM10E3-6とRP13-1を同時に用いることで、強い抵抗性を持った系統を効率よく

選抜できることが確認された。2つの遺伝子座 $Phyt-1$ および $Phyt-2$ には、疫病抵抗性に関して相加的な効果があることが示され、ホモ接合の $Phyt-1$ と $Phyt-2$ を同時に有することで、強度な疫病抵抗性を有するピーマンの育成が可能であると思われる。

7. ピーマン未熟果実色に関する遺伝様式の解明と QTL 解析を行うため、DH176 系統を用い、色彩色差計と分光光度計による未熟果実色の評価を行った。その結果、 F_1 における未熟果実色指標と全クロロフィル含量は、両親の中間の値を示したことから、ピーマン未熟果実色の緑色は黄白色に対し不完全優性であることが確認された。また、緑色果実の連続的な色の変化については、DH 集団における未熟果実色指標と全クロロフィル含量について連続的な分離を示したことから、複数の量的な因子が関与していることが示唆された。しかし、劣性の黄白色果実の出現に関しては、DH169 系統中 43 系統が黄白色であることから、2つの遺伝子が関与していると考えられた。さらに、未熟果実色指標と全クロロフィル含量には負の相関があることから、ピーマン未熟果実色における緑色の連続的な変化は、全クロロフィル色素含量によるものであり、ピーマン未熟果実色の測定は、色素抽出を行わずに、色彩色差計による簡易な方法により測定が可能であった。

8. 未熟果実色濃緑色の「K9-11」(*C. annuum*)と黄白色の「AC2258」(*C. annuum*)の F_1 の薬培養由来倍加半数体集団 (n=176) を用いた未熟果実色評価

結果および 224 のフレームワークマーカーによる総連鎖グループ長 1,100.5 cM の計 16 の連鎖群 (LGs) からなる連鎖地図を用いて、ピーマン未熟果実色に関する QTL 解析を行った。その結果、緑色強度を増加させる 4 つの QTL と黄白色果実に関連した 3 つの QTL を検出した。緑色強度を増加させる 4 つの QTL のうち、ピーマン第 10 染色体に相当する LG4 上の *ifc4.1* は、未熟果実色の緑色強度の増加に関して、最も強い影響力を持つと考えられる。また、黄白色果実に関連する 3 つの QTL *ifc4.2*、*ifc11.1* および *ifc14.1* は、ピーマン第 8 および第 10 染色体上の 2 つの質的な遺伝子座 (*W1* および *W2*) に対応し、これらの重複遺伝子を劣性ホモ *w1w1w2w2* で持つことにより、未熟果実色が黄白色になることが明らかとなった。さらに、*W1* および *W2* に連鎖した CAPS マーカーを開発した。

以上により、本研究においては、ピーマンにおける DNA マーカーを用いた選抜育種技術の開発に資することを目的に、遺伝解析用分離集団の育成、形質評価、有用形質に連鎖する DNA マーカーの開発、QTL 解析、開発した DNA マーカーの育種的利用について論述してきた。本研究の成果は、ピーマンにおける有用形質の遺伝解析およびマーカー選抜育種技術の開発に大きく貢献するものと思われる。

**Fundamental breeding studies on the development of the molecular markers and
QTL analyses in *Capsicum annuum***

Toru Sugita

Summary

This study states as for developmet of DNA markers linked to useful traits, elucidation of the mode of inheritance and application of DNA markers for breeding with the object of contributing for sweet pepper (*Capsicum annuum*) breeding using DNA markers. I state as to, first, development of a practical anther culture method for development of intraspecific doubled-haploid (DH) population and investigation of morphological characteristics, second, development of DNA markers linked to qualitative traits and high-efficiency construction technique of the linkage map on sweet pepper, third, genetic evaluation for resistance to phytophthora blight and development of DNA markers based on QTL analysis, and fourth, genetic evaluation for immature fruit color and development of DNA markers based on QTL analysis.

1 . Culture conditions using one-step culture method were examined in order to develop the efficient anther culture method. Consequently, regeneration efficiency using the one-step culture method was evident in six accessions and high regeneration rates

were observed in 'No.5' and 'Tosahikari-D', and it was shown that this method has the high applicability for these accessions. However, it was suggested that there was a great difference between accessions on rate of regeneration, and it was shown that selection of the accession used for an anther culture must be cared sufficiently.

2 . One hundred seventy-six DH lines were obtained by one-step culture method to cultivate anthers in 7,835 buds. As a result of investigation of several morphological characteristics of fruit length, diameter, ratio of fruit length to diameter and fruit weight using these DH lines, it was suggested that the several quantitative trait loci were involved in these phenotypic expression, since DH lines revealed a continuous distribution. It was verified that the mode of inheritance of resistance to PMMoV and pungency were qualitative inherited character owing to segregating ratio in DH and BC₁ generations. It was suggested that there is possibility of causing the segregation distortion in used DH population because it was inclined to 'K9-11' genotype at each locus.

3 . Applying the bulked segregant analysis method using 176 DH lines in *Capsicum* developed random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to the *L*³ locus. The codominant RAPD markers, E18₂₇₂ and E18₂₈₆, were converted into sequence-characterized amplified region (SCAR) markers by molecular cloning and nucleotide sequencing. A PCR analysis using DH (n=176) and backcross (n=190)

populations revealed that all the SCAR markers, PMFR11₂₆₉, PMFR11₂₈₃ and PMFR21₂₀₀, co-segregated with the original RAPD markers, and were mapped at a distance of 2.8 cM from the L^3 locus. Furthermore, after confirmation of their validity in 19 accessions of four species in *Capsicum* using the codominant SCAR marker pair, PMFR11₂₆₉ and PMFR11₂₈₃, it was suggested that the SCAR markers developed here could become effective in marker-assisted selection (MAS) programs for the introduction of the L^3 gene derived from PI 159236 (*C. chinense*) to sweet pepper for breeding purposes. Moreover, as a result of nucleotide sequences, it was suggested that these markers could be useful for selection of L^4 resistant lines because these markers had some polymorphisms to PI 260429 which was resistance resources possessing L^4 . A closer marker linked to *C*, plastid-lipid-associated protein-simple sequence repeat (PAP-SSR), a microsatellite marker linked to *C*, was found at a distance of 0.6 cM. It was examined the usefulness of PAP-SSR with three species in *Capsicum* using fragment analysis and nucleotide sequences, many alleles were found at this locus. The results suggested that these markers could be effective in MAS programs for sweet pepper breeding purposes.

4. A genetic linkage map of the sweet pepper (*C. annuum*) using an intraspecific DH population was primarily constructed by amplified fragment-length polymorphism (AFLP) using the high efficiency genome scanning (HEGS) system and RAPD. Linkage analysis was done using a total of 518 molecular markers that consisted of 382 AFLP,

122 RAPD, 3 restriction fragment length polymorphism (RFLP), 8 SCAR, 4 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and 11 SSR markers. The linkage groups consisted of 11 large linkage groups (56.8 to 118.3 cM) and 5 small linkage groups (1.8 to 26.6 cM), covering a total distance of 1,100.5 cM with an average distance between 224 framework markers of 4.6 cM. AFLP markers could be developed quickly using HEGS, even in an intraspecific DH population in which it was generally difficult to detect polymorphisms in comparison with interspecific crossing populations. Linkage analysis also provided three AFLP markers and an RAPD marker linked to L^3 , and an AFLP marker linked to C .

5 . Inoculation of *Phytophthora capsici* and evaluation of resistance were performed using an interspecific DH population of sweet pepper. It was thought that the resistance didn't have from the start of germination but it was acquired as plant growing, because even 'AC2258' possessing resistance to *P. capsici* was infected and died in seedling period within 20 days. A continuous distribution was observed for the survival rate, indicating that the resistance to *P. capsici* was polygenic. However, the survival rate tended to be distributed toward both ends, and a small peak was identified in the range of 30%. It was suggested that the resistance was controlled by a single major gene with a large effect, and some minor genes.

6 . Analysis of quantitative trait loci for the resistance to *P. capsici* was performed

using the linkage map consisting of 16 linkage groups (LGs), covering a total distance of 1,100.5 cM and the inoculation results of *P. capsici* to an intraspecific DH population (n=176) obtained by anther culture of an F₁ hybrid between a line susceptible to *P. capsici* 'K9-11' (*C. annuum*) and a line resistant to *P. capsici* 'AC2258' (*C. annuum*). Three QTLs were detected on LG1, LG6 and LG7. The QTL with the highest LOD score, detected on LG7, explained 82.7% of the phenotypic variance with a LOD score of 67.02. This QTL was designated as *Phyt-1*. The nearest marker was an AFLP marker, M10E3-6. The second QTL, designated as *Phyt-2*, was found on LG1. It explained 6.4% of the phenotypic variance with a LOD score of 2.54. The nearest RAPD marker was RP13-1. The other QTL, designated as *Phyt-3*, which was found on LG6, explained 5.6% of the phenotypic variance with a LOD score of 2.20. The nearest AFLP marker was M9E3-11. It was confirmed that the lines with a high resistance could be efficiently selected by using two markers, M10E3-6 and RP13-1, simultaneously. The presence of both *Phyt-1* and *Phyt-2* under homozygous conditions might enable to breed resistant cultivars of sweet pepper.

7. In order to elucidating the mode of inheritance and performing the QTL analysis with the immature fruit color of sweet pepper, it was investigated the index of immature fruit color measured with a Hunter colorimeter and the total chlorophyll content measured with a spectrophotometer using a DH population (n=176). As the result, the green color of immature fruit in sweet pepper was incompletely dominant

over sulphury white because F_1 exhibited an intermediate value of 'K9-11' and 'AC2258' with the index of immature fruit color and the total chlorophyll content. It was suggested that the several quantitative trait loci were involved in various shades of green for immature fruit color, because DH lines revealed a continuous color distribution with the index of immature fruit color and the total chlorophyll content. However, it was suggested that two genes might be involved in the appearance of green, since 43 of the 169 DH lines were sulphury white. Furthermore, it was confirmed that the various shades of green for immature fruit color were caused by the change of chlorophyll content, and the immature fruit color of pepper could be measured by a simple method using a Hunter colorimeter, without the extraction of chlorophyll pigment, because significant negative correlations were evident between the index of immature fruit color and the total chlorophyll content.

8. Analysis of quantitative trait loci for immature fruit color was performed using a phenotypic data of immature fruit color with a DH population obtained by anther culture of an F_1 hybrid between two accessions of *C. annuum*, 'K9-11' with immature fruit color of cedar green and 'AC2258' with sulphury white and a linkage map consisting of 16 linkage groups (LGs), covering a total distance of 1,100.5 cM. Four QTL for increasing green color intensity and three QTL for the determination of the immature fruit color green or sulphury white, viz. for chlorophyll biosynthesis, were detected. Specifically, it was presumed that *ifc4.1* on LG4, assigned to the tenth

chromosome of pepper, had the strongest effect for the increasing green color intensity. Moreover, it was suggested that three QTL, *ifc4.2*, *ifc11.1* and *ifc14.1*, for the determination of the immature fruit color green or sulphury white, are corresponding with qualitative two loci, labeled *W1* and *W2*, assigned to the eight and tenth chromosome of pepper, and the immature fruit color of green or sulphury white was determined two duplicated genes, *W1* and *W2*. The lines having the genotypes *w1w1w2w2* theoretically showed sulphury white. Moreover, CAPS markers linked to *W1* and *W2* were developed. Raising cultivars with sulphury white was labor-intensive and time-consuming because sulphury white was recessive to every shade of green.

In conclusion, I have stated the following, the raising of segregating population for genetic analysis, phenotypic evaluation, development of DNA markers linked to useful traits, QTL analyses and application the developed DNA markers for breeding for the purpose of being applied DNA markers on sweet pepper breeding systems. It thought that these results contribute the genetic research and MAS on sweet pepper in future.

謝 辞

本研論文の作製にあたり、終始懇切丁寧なご指導およびご鞭撻を賜った宮崎大学フロンティア科学実験総合センター教授・明石 良博士、同大農学部教授・藪谷 勤博士、鹿児島大学農学部助教授・橋本文雄博士、宮崎大学農学部教授・辰巳保夫博士、ならびに佐賀大学農学部助教授・鈴木章弘博士に衷心から感謝を申し上げる。

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言を頂戴しました京都府立大学農学部教授・平井正志博士、独立行政法人農業生物資源研究所・矢野昌裕博士、同研究所・川崎信二博士、同研究所・市川章裕博士、宮崎大学フロンティア科学実験総合センター助手・陳 蘭庄博士、ならびに滋賀県立大学環境科学部助手・清水顕史博士に厚くお礼申し上げる。

宮崎県総合農業試験場場長・齋藤 尚氏、同試験場総括副場長・金丸繁利氏、ならびに同技術副場長・藤田和也氏には、本研究を遂行するにあたり、深いご理解とご支援を賜った。同試験場畑作園芸支場長・轟 篤氏、宮崎県立農業大学校教授・長田龍太郎氏、宮崎県総合農業試験場元生物工学部職員・菓子野利浩氏、山口和典氏、湯地健一氏、杉村幸代氏、木下哲次氏、ならびに同試験場元研究員・倉田裕文博士、河野朋恵氏には、本研究に対する多大なご協力と有益なご助言を賜った。同試験場生物工学部部長・平原哲郎氏、同部副部長・杉尾昌嗣氏、同部職員・世見由香里氏、宇藤山裕美氏、有馬富雄氏、ならびに同部日々雇諸氏には、本研究に対する多大なご協力とご支援を賜るとともに充実

した研究環境を与えて頂いた。ここにあわせて厚くお礼申し上げます。

最後に、研究の遂行にあたり、陰ながら支えてくれた妻 みどり、息子 丞、
ならびに両親に感謝する。

引用文献

- Alpert, K. B. and S. D. Tanksley (1996) High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw2.2*: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15503-15507.
- Andersen, S. B., K. Duei and A. Olesen (1987) The response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant breed.* 99: 181-186.
- Bartual, R., E. A. Carbonell, J. I. Marsal, J. C. Tello and T. Campos (1991) Gene action in the resistance of peppers (*Capsicum annuum*) to Phytophthora stem blight (*Phytophthora Capsici* L.). *Euphytica* 54: 195-200.
- Ben, C. A., I. Paran, R. Grube, M. Jahn, R. Wijk and J. Peleman (2001a) QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). *Theor. Appl. Genet.* 102: 1016-1028.
- Ben, C. A., R. Grube, M. Lapidot and M. Jahn (2001b) Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Theor. Appl. Genet.* 102: 1213-1220.
- Blum, E., K. Liu, M. Mazourek, E. Y. Yoo, M. Jahn and I. Paran (2002) Molecular mapping of the *C* locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45: 702-705.
- Bosland, P. W. (2003) Compendium of pepper diseases. K. Pernezny, P. D. Roberts, J. F. Murphy and N. P. Goldberg, eds., APS Press, Minnesota, USA, pp. 1-4.

- Bosland, P. W. and E. J. Votava (1999) Crop production science in horticulture, peppers, vegetable and spice *capsicums*, CABI Publishing, Oxon, UK.
- Bosland, P. W. and D. L. Lindsey (1991) A seedling screen for Phytophthora root rot of pepper, *Capsicum annuum*. Plant Dis. 75:1048-1050.
- Boukema, I. W. (1982) Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the *L*-locus. *Capsicum* Newsl. 3: 47-48.
- Caranta, C., A. Thabuis and A. Palloix (1999) Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance gene in pepper. *Genome* 42: 1111-1116.
- Caranta, C., S. Pflieger, V. Lefebvre, A. M. Daubeze, A. Thabuis and A. Palloix (2002) QTLs involved in the restriction of cucumber mosaic virus (CMV) long-distance movement in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 104: 586-591.
- Dumas de Vaulx, R., D. Chambonnet and E. Pochard (1981) *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers, high rate plant production from different genotypes by +35 °C treatments. *Agronomie* 1: 859-864.
- Endo, T (1953) Inheritance of fruit color in *Capsicum*. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet. Japan* 3: 46-47.
- Ferdous, S. A., S. Watanabe, C. Suzuki-Orihara, Y. Tanaka, M. Kamiya, N. Yamanaka and K. Harada (2006) QTL analysis of resistance to soybean cyst nematode race 3 in soybean cultivar Toyomusume. *Breed. Sci.* 56: 155-163.
- Graner, A., A. Jahoor, J. Schondelmaier, H. Siedler, K. Pillen, G. Fischbeck, G. Wenzel and R. G. Herrmann (1991) Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* 83: 250-256.

- Guha, S and S. C. Maheshwari (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204:497.
- Hernandez, H. H and P. G. Smith (1985) Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annuum* L. *J. Hered.* 76: 211-213.
- Holmes, F. O. (1937) Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in the pepper. *Phytopathology* 27:637-642.
- Hori, K., T. Kobayashi, A. Shimizu, K. Sato, K. Takeda and S. Kawasaki (2003) Efficient construction of high-density linkage map and its application to QTL analysis in barley. *Theor. Appl. Genet.* 107: 806-813.
- Huh, J. H., B. C. Kang, S. H. Nahm, S. Kim, K. S. Ha, M. H. Lee and B. D. Kim (2001) A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 102: 524-530.
- Inskeep, W. P. and P. R. Bloom (1985) Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in *N,N*-Dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77: 483-485.
- Jeswani, L. M., R. B. Deshpande and A. B. Joshi (1956) Inheritance of some fruit characters in chilli. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 16: 138-143.
- Juenger, T., M. Purugganan and T. F. C. Mackay (2000) Quantitative trait loci for floral morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 156: 1379-1392.
- Kang, B. C., S. H. Nahm, J. H. Huh, H. S. Yoo, J. W. Yu, M. H. Lee and B. D. Kim (2001) An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 102: 531-539.
- 川越仁 (1998) ピーマン斑点病に関する研究. 宮崎総農研報33.

- Kawasaki, S. and Y. Murakami (2000) Genome Analysis of *Lotus japonicus*. J. Plant Res. 113: 497-506.
- Kawasaki, S., Y. Murakami, H. Imaizumi-Anraku, A. Shimizu and I. Mikami (2003) Construction of High-Density Map, Genome Library, and Saturation Mapping of Nodulation Genes. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 52, In "Brassicas and Legumes", Nagata, T. and S. Tabata (Eds.), Springer, Berlin, 183-202.
- Khambanonda, I. (1950) Quantitative inheritance of fruit size in red pepper (*Capsicum frutescens* L.). Genetics 35: 322-343.
- 国連食糧農業機関統計 (2006) FAOSTAT data 2006
- Lafortune, D., M. Beramis, A. M. Daubeze, N. Boissot and A. Palloix (2005) Partial resistance of pepper to bacterial wilt is oligogenic and stable under tropical conditions. Plant Dis. 89: 501-506.
- Lander, E. and D. Botstein (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.
- Lander, E., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. Daley, S. 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.
- Lee, J. M., S. H. Nahm, Y. M. Kim and B. D. Kim (2004) Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. Theor Appl Genet. 108: 619-627.
- Lefebvre, V., A. Palloix, C. Caranta and E. Pochard (1995) Construction of an

- intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome* 38: 112-121.
- Lefebvre, V. and A. Palloix (1996) Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper - *Phytophthora capsici* Leonian. *Theor Appl Genet.* 93: 503-511.
- Lefebvre, V., M. Kuntz, B. Camara and A. Palloix (1998) The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the γ locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant Mol Biol.* 36: 785-789.
- Lefebvre, V., S. Pflieger, A. Thabuis, C. Caranta, A. Blattes, J. C. Chauvet, A. M. Daubèze and A. Palloix (2002) Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* 45: 839-854.
- Lefebvre, V., A. M. Daubeze, J. R. Voort, J. Peleman, M. Bardin and A. Palloix (2003) QTLs for resistance to powdery mildew in pepper under natural and artificial infections. *Theor Appl Genet.* 107: 661-666.
- Lincoln, S. E., M. J. Daily and E. S. Lander (1993) Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL version 1.1: a tutorial and reference manual, 2nd edn. Whitehead Institute Technical Report. Cambridge, Massachusetts.
- Lippert, L. F., P. G. Smith and B. O. Bergh (1966) Cytogenetics of the vegetable crops. Garden pepper, *Capsicum* sp. *Bot. Rev.* 32: 24-55.
- Livingstone, K. D., V. K. Lackney, J. R. Blauth, W. R. Van and M. K. Jahn (1999)

Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics* 152: 1183-1202.

松本満夫・新田益男・澤田博正・野町敦志 (1999) PMMoV抵抗性ピーマン‘トサヒメR’の育成.高知農技セ研報. 8 : 47-52.

Matsunaga, H., T. Saito, M. Hirai, T. Nunome and T. Yoshida (2003) DNA markers linked to Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) resistant locus (L^4) in *Capsicum*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72: 218-220.

McCouch, S. R. and S. D. Tanksley (1991) Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. *In* “Rice biotechnology” Kush, G. S. and G. H. Toenniessen (eds.), CAB Int. IRRI, Wallingford, Oxon, UK, and Philippines, p.109-133.

Michelmore R. V., I. Paran and R. V. Kesseli (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9828-9832.

宮崎県農政水産部 (2005) 宮崎県の農業.

宮崎の野菜史編集委員会 (2006) 宮崎の野菜史.

Miyazawa, A. (1953) On genes controlling quantitative characters in *Capsicum annuum* L. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet. Japan* 3: 47-48.

Morrison, R.A., R. E. Koning and D. A. Evans (1986) Anther Culture of Interspecific Hybrid of *Capsicum*. *J. Plant Physiol.* 126:1-9.

Moury, B., S. Pflieger, A. Blattes, V. Lefebvre and A. Palloix (2000) A CAPS marker

- to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome* 43: 137-142.
- Murigneux, A., S. Baud and M. Beckert (1993) Molecular and morphological evaluation of doubled-haploid lines in maize. 2. Comparison with single-seed-descent lines. *Theor. Appl. Genet.* 87:278-287.
- Murray, M. and W. F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- 中村澄子・鈴木啓太郎・伴義之・西川恒夫・徳永國男・大坪研一 (2006) いもち病抵抗性に関する同質遺伝子系統「コシヒカリ新潟BL」のDNAマーカーによる品種判別. *育種学研究* 8: 79-87.
- Odland, M. L. and A. M. Porter (1938) Inheritance of the immature fruit color of peppers. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 36: 647-651.
- Odland, M. L. (1948) Inheritance studies in the pepper, *Capsicum frutescens*. *Minnesota Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* 179: 1-32.
- Ogundiwin, E. A., T. F. Berke, M. Massoudi, L. L. Black, G. Huestis, D. Choi, S. Lee and J. P. Prince (2005) Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTL for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 48: 698-711.
- Palloix, A., A. M. Daubeze, T. Phaly and E. Pochard (1990) Breeding transgressive lines of pepper for resistance to *Phytophthora Capsici* in a recurrent selection system. *Euphytica* 51: 141-150.
- Peterson, P. A. (1959) Linkage of fruit shape and color genes in *Capsicum*. *Genetics* 44: 407-419.

- Popovsky, S. and I. Paran (2000) Molecular genetics of the *y* locus in pepper: its relation to capsanthin-capsorubin synthase and to fruit color. *Theor. Appl. Genet.* 101: 86-89.
- Powell, W. (1988) The influence of genotype and temperature pre-treatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 12: 291~297.
- Pozueta-Romero, J., F. Rafia, G. Houlne, C. Cheniclet, J. P. Carde, M. L. Schantz and R. Schantz (1997) A ubiquitous plant housekeeping gene, PAP, encodes a major protein component of bell pepper chromoplasts. *Plant Physiol.* 115: 1185-94.
- Prince, J. P., E. Pochard and S. D. Tanksley (1993) Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome* 36: 404-417.
- Quirin, E. A., E. A. Ogundiwin, J. P. Prince, M. Mazourek, M. O. Briggs, T. S. Chlanda, K. T. Kim, M. Falise, B. C. Kang and M. M. Jahn (2005) Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of *Phyto.5.2*, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 110: 605-612.
- Rao, G. U., A. C. Ben, Y. Borovsky and I. Paran (2003) Mapping of yield-related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *Theor Appl Genet.* 106: 1457-1466.
- Reifschneider, F. J. B., L. S. Boeteux, P. T. Vecchia, J. M. Poulos and N. Kuroda (1992) Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora Capsici* in pepper *Euphytica* 62: 45-49.

- Sakai, K. (1952) Genetic studies on some fruit characters in *Capsicum annuum*. Ann. Rep. Natl. Inst. Genet. Japan 2: 31.
- Sibi, M., R. Dumas de Vaultx and D. Chambonnet (1979) Obtention de plantes haploïdes par androgenèse *in vitro* chez le pigment (*Capsicum annuum*). Ann. Amélior. Plant 29: 583-606.
- 下川敬之・橋本栄弘・前田義志・内田好則・柴崎康 (1994) ウンシュウミカン果実におけるエチレン誘導クロロフィル分解のアリルイソチオシアネートによる抑制. 園学雑. 63(1): 195-201.
- Smith, P. G. (1950) Inheritance of brown and green mature fruit color in peppers. J. Hered. 41: 138-140.
- Smith, P. G., K. A. Kimble, R. G. Grogan and A. H. Millett (1967) Inheritance of resistance in peppers to *Phytophthora* root rot. Phytopathology 57: 377-379.
- 杉田亘・河野朋恵・河野いづみ・竹内善信・矢野昌裕・堤省一朗・岩下喜朗・長田龍太郎・加藤浩・轟篤 (2003) イネ品種判別におけるSSR マーカーの利用. 育学雑. (別2): -.
- Sugita, T., K. Yamaguchi, Y. Sugimura, R. Nagata, K. Yuji, T. Kinoshita and A. Todoroki (2004) Development of SCAR markers linked to L^3 gene in *Capsicum*. Breed. Sci. 54: 111-115.
- Sugita, T., T. Kinoshita, T. Kawano, K. Yuji, K. Yamaguchi, R. Nagata, A. Shimizu, L. Chen, S. Kawasaki and A. Todoroki (2005) Rapid construction of a linkage map using high-efficiency genome scanning/AFLP and RAPD, based on an intraspecific, doubled-haploid population of *Capsicum annuum*. Breed. Sci. 55: 287-295.

Sugita, T., K. Yamaguchi, T. Kinoshita, K. Yuji, Y. Sugimura, R. Nagata, S. Kawasaki and A. Todoroki (2006) QTL analysis for resistance to Phytophthora Blight (*Phytophthora capsici* Leon.) using an intraspecific doubled-haploid population of *Capsicum annuum*. *Breed. Sci.* 56: 137-145.

Sugita, T., H. Kurata, T. Kinoshita, S. Sei, R. Nagata, S. Kawasaki, T. Hirahara and A. Todoroki (2006 in submission) Identification of quantitative trait loci for immature-fruit color and development of CAPS markers using an intraspecific doubled-haploid population in *Capsicum annuum*.

杉田亘・倉田裕文・木下哲次・清志穂・長田龍太郎・川崎信二・平原哲郎・轟篤 (2006) ピーマンの未熟果実色に関する量的形質遺伝子座の検出とCAPSマーカーの開発. *園学雑.* 75(別2): 201.

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) 水稻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. *育種学研究* 6: 143-148.

Sun, L., C. Su, C. Wang, H. Zhai and J. Wan (2005) Mapping of a major resistance gene to the brown planthopper in the rice cultivar Rathu Heenati. *Breed. Sci.* 55: 391-396.

Tanksley, S. D., R. Bernatzky, N. Lapitan and J. P. Prince (1988) Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6419-6423.

Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.

Thabuis, A., A. Palloix, S. Pflieger, A. M. Daubeze, C. Caranta and V. Lefebvre (2003)

- Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1473-1485.
- Thabuis, A., V. Lefebvre, G. Bernard, A. M. Daubeze, A. T. Phaly, E. Pochard and A. Palloix (2004) Phenotypic and molecular evaluation of a recurrent selection program for a polygenic resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 109: 342-351.
- 轟篤・菓子野利浩・長田龍太郎・山口和典・畠中幸代 (1994) ピーマン葯培養によって得られた2倍性半数体. *九州農業研究* 56: 180.
- 鵜飼保雄 (2000) ゲノムレベルの遺伝解析. 東京大学出版.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Wang, Y. Y., C. S. Sun, C. C. Wang and N. F. Chien (1973) The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* anther culture. *Sci. Sinica* 16: 147-151.
- Weber, J. L. and P. E. May (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genomic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- 山口和典 (1995) 胚珠培養及び葯・花粉培養を用いた半数体植物の育成利用技術

- の開発. 宮崎県総合農業試験場生物学試験概要書 p16-17.
- 山口和典・菓子野利浩・長田龍太郎・畠中幸代・轟篤 (1994) 気孔特性によるピーマン蒔培養由来植物体倍数性の判別. 九州農業研究 56: 181.
- 山川邦夫・望月龍也・安井秀夫 (1979) ピーマンの疫病抵抗性素材の検索と抵抗性の遺伝. 野菜試報. A6: 29-37.
- 矢ノ口幸夫・坂田好輝・門馬信二・西尾剛 (1990) ピーマンの蒔培養における低温処理期間及び方法が胚様体形成に及ぼす影響. 園学雑. 59(別2): 264-265.
- 矢ノ口幸夫・馬場英寛・藤森基弘・小林忠和・伊藤喜三男・元木悟・岡本潔・小口伴二・小林優 (1993) ピーマン新品種「ベルマサリ」の育成経過とその特性. 長野中信農試報. 11: 21-35.
- Yamamoto, T., F. Taguchi-Shiobara, Y. Ukai, T. Sasaki and M. Yano (2001) Mapping quantitative trait loci for days-to-heading, and culm, panicle and internode lengths in a BC₁F₃ population using an elite rice variety, Koshihikari, as the recurrent parent. *Breed. Sci.* 51: 63-71.
- Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., Baba, T., Yamamoto, K., Umehara, Y., Nagamura, Y. & Sasaki, T. (2000). *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12: 2473-2483.