

岩手県盛岡市に分布するリンゴ黒星病菌(*Venturia inaequalis*)レース同定の試みおよびリンゴ‘あかね’のリンゴ黒星病抵抗性に関するQTLの同定

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者名	森谷,茂樹 後藤,聡 久保,隆 國久,美由紀 田沢,純子 工藤,剛 葛西,智 工藤,悠 岡田,和馬 山本,俊哉 深澤,朝子 初山,慶道 阿部,和幸
発行元	園芸学会
巻/号	18巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 349-361
発行年月	2019年10月

岩手県盛岡市に分布するリンゴ黒星病菌 (*Venturia inaequalis*) レース同定の試み およびリンゴ ‘あかね’ のリンゴ黒星病抵抗性に関する QTL の同定

森谷茂樹^{1***}・後藤 聡^{2**}・久保 隆^{2a}・國久美由紀³・田沢純子²・工藤 剛²・葛西 智²・
工藤 悠²・岡田和馬¹・山本俊哉^{3b}・深澤 (赤田) 朝子^{2c}・初山慶道²・阿部和幸¹

¹ 農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門リンゴ研究拠点 020-0123 岩手県盛岡市下厨川

² 地方独立行政法人青森県産業技術センターりんご研究所 036-0332 青森県黒石市牡丹平

³ 農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門 305-8605 茨城県つくば市藤本

Identification of *Venturia inaequalis* Races in Morioka, Japan and Identification of a Quantitative Trait Locus Associated with Resistance to Apple Scab in ‘Akane’ Apples

Shigeki Moriya^{1***}, Satoshi Goto^{2**}, Takashi Kubo^{2a}, Miyuki Kuniyama³, Junko Tazawa²,
Tsuyoshi Kudo², Satoshi Kasai², Haruka Kudo², Kazuma Okada¹, Toshiya Yamamoto^{3b},
Tomoko Fukazawa-Akada^{2c}, Yoshimichi Hatsuyama² and Kazuyuki Abe¹

¹ Apple Research Station, Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO, Shimokuriyagawa, Morioka, Iwate 020-0123

² Apple Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Botandaira, Kuroishi, Aomori 036-0332

³ Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO, Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-8605

Abstract

Apple scab, which is caused by *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint., is a destructive disease that affects apples (*Malus × domestica* Borkh.). To develop an approach to breeding apples for scab resistance, race distribution of *V. inaequalis* in Morioka, Japan and genetic factors affecting partial scab resistance observed on ‘Akane’ were assessed. An inoculation test using several differential hosts suggested that race 1 of *V. inaequalis* was the predominant race in Morioka, Japan. To characterize the genetic profile of ‘Akane’ resistance, quantitative trait locus (QTL) analyses that employed two years of natural scab infection scores in a fungicide-free orchard in Kuroishi, Aomori, Japan were performed using an F₁ population derived from the ‘Orin’ × ‘Akane’ cross. A QTL allele that explained 20% of the phenotypic variance in scab resistance was detected on chromosome 17 of ‘Akane’. In the middle region of chromosome 17 of ‘Orin’ and in very close proximity to the ‘Akane’ QTL, a weak QTL allele was also detected, which explained 5% of the phenotypic variance observed. We considered that these effects were caused by alleles of the identical QTL. Haplotype analysis indicated that this QTL resistance allele from ‘Akane’ originated from ‘Worcester Pearmain’.

Key Words : breeding objective, disease resistance breeding, environmental effect, quantitative trait locus analysis, SNP array

キーワード : 病害抵抗性育種, 育種目標, 環境要因, QTL 解析, SNP アレイ

緒 言

リンゴ黒星病は、リンゴ黒星病菌 (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.) を病原とするリンゴ (*Malus × domestica* Borkh.) の病害で、日本を含む世界のリンゴ栽培において最重要病害の一つである。日本におけるリンゴ黒星病は、

1954年に北海道において初めて発生が確認された(西田・池, 1965)。その後、1968年には本州で最初の発生が岩手県で確認され、翌年には青森および秋田県で、また1972年以降は、福島、新潟、山形、群馬、長野、富山および石川県で発生が認められるなど、発生地域は次第に拡大し、現在は、リンゴが栽培されている主要なすべての道県において本病の発生が確認されている(高橋, 1986)。

リンゴ黒星病は、葉に発病した場合は早期落葉を引き起こし、果実に発病した場合は裂果や奇形果につながる。さらに、落葉した罹病葉は翌年の発生源となるため、その被害は時に年をまたいで果実生産に大きな影響を与える。現在、日本国内で栽培されているほとんどのリンゴ品種は

2018年8月28日 受付。2019年2月7日 受理。

* Corresponding author. E-mail: moriyas@affrc.go.jp

** を付した著者は本研究に対して同等の貢献をした

^a 現在: 青森県三八地域県民局地域農林水産部

^b 現在: 農業・食品産業技術総合研究機構本部

^c 現在: 地方独立行政法人青森県産業技術センター弘前工業研究所

リング黒星病に罹病性であるため、リング主産地の青森県では、展葉期から8月末まで、年間11回の農薬散布においてリング黒星病を対象病害としており、生産コストの増加につながっている。さらに、最近、リング黒星病菌のステロール脱メチル化阻害剤 (DMI 剤) への感受性が低下している事例が報告されており (平山ら, 2017)、本病の防除への意識が高まっている。そのため、リング黒星病に抵抗性を示す品種を利用することにより、リング黒星病への感染を抑え、農薬の使用量を低減することが期待されている。

自然界に存在する変異を利用した、交雑による病害抵抗性育種の戦略には、真性抵抗性の導入と圃場抵抗性の導入の2つの方法が考えられる。

真性抵抗性の作用機構は、遺伝子対遺伝子説 (Flor, 1955) によって理解されている。すなわち、植物において真性抵抗性によって抵抗性が誘導されるときには、病原体のあるレースによって産生されるエフェクターそのもの、もしくはエフェクターによる攻撃を抵抗性遺伝子産物が認識することがきっかけとなって、抵抗性が獲得されと考えられている。しかしながら、真性抵抗性では、抵抗性程度が非常に強い一方で、抵抗性を発現する病原体のレーススペクトラムが狭い場合があり、さらには病原体のレースの分化に伴って抵抗性の崩壊が起きることが知られている (Bent・Mackey, 2007)。複数の真性抵抗性遺伝子を集積することは解決策の一つであるが、複数の真性抵抗性遺伝子を犯すスーパーレースを出現させる恐れもある。果樹のような永年性作物では、レースの出現に合わせて栽培する品種を変えることは困難であり、抵抗性が崩壊した場合の影響は極めて大きいことが予想される。

一方、圃場抵抗性は、広範なレースに対して効果を発現し、抵抗性の崩壊が起こりにくい利点があるとされる (Bent・Mackey, 2007)。しかしながら、病徴の進行を完全には抑えられない部分的抵抗性であることがほとんどで、さらに、環境による影響を受けるため発現が安定しない、といった課題もある。このため、病徴が完全に抑えられないことによる経済的損害が許容でき、環境要因に対しても比較的安定して抵抗性が発現するのであれば、レース分化の研究が進んでいない病原体や、あるいはレース分化が著しい病原体に対する抵抗性育種において利用価値が大きいと考えられる。

リング黒星病に対する抵抗性育種は、アメリカのパルーデュー大学とイリノイ大学の連携の基に1945年から開始され、後にラトガース大学も参加して行われた (Janick, 2006)。この育種プログラムでは、主に *M. floribunda* 821 が有する真性抵抗性遺伝子 *Rvi6* (*Vj*) を利用した育種が行われてきた。その結果、25年後の1970年に最初のリング黒星病抵抗性品種 'Prima' が育成され、以後も多くの品種が育成されている。この研究の成果を利用する形で、欧米各国でも *Rvi6* の利用が盛んである (Sansavini・Tartarini, 2013)。日本では、(地独)青森県産業技術センターりんご

研究所や農研機構果樹茶業研究部門などにおいて、*Rvi6* を利用した育種が行われており、これまでに 'あおり 25' が品種登録されている (工藤ら, 2013)。このように、日本を含めた世界におけるリング黒星病抵抗性の育種は、現在のところ *Rvi6* の利用に偏っている。

単一の真性抵抗性遺伝子のみを利用している状況では、先に述べたような、レース分化に伴う抵抗性の崩壊が危惧される。現にヨーロッパでは、*Rvi6* を犯すリング黒星病菌レース6が出現していることが報告されている (Parisiら, 1993)。このため、近年では、他の真性抵抗性遺伝子を利用する研究が盛んになっている (Baumgartnerら, 2015; Patocchiら, 2009)。

以上のようなリング黒星病に対する抵抗性育種の取り組みの経緯に認められるように、レース分布と抵抗性遺伝子に関する知見は抵抗性育種の戦略を立てるうえで必須であるが、日本におけるリング黒星病菌のレース分布に関する報告は限られており (町田ら, 1996)、国内品種が有する黒星病抵抗性の遺伝的要因に関する報告も見当たらないため、これらを解明する意義は極めて大きい。

これまでに、日本国内で育成された品種のうちリング黒星病に比較的強いとされるものとしては、'あかね'、'さんざ'、'あおり9' (今ら, 2012; 定盛ら, 1973; 吉田ら, 1988) などが知られている。'あかね' ('Jonathan' × 'Worcester Pearmain') は圃場条件において黒星病に抵抗性を示すが (花岡ら, 2016; 今ら, 2012)、交配系譜上に真性抵抗性を有する品種が認められない。このことから、'あかね' の示すリング黒星病に対する抵抗性は、これまでに報告されている真性抵抗性とは異なる遺伝的背景に起因する、部分的抵抗性を示す圃場抵抗性と推定され、広範なレースに対する抵抗性が期待される。さらに、'あかね' は国内各地において、リング黒星病に強いと認識されているため、環境依存性が少ない抵抗性であると推測される。これらのことから、'あかね' のリング黒星病抵抗性は育種に利用する価値が大きいと考えられる。

本研究では、抵抗性育種の基礎的知見を得るために、判別寄主を用いて、農研機構果樹茶業研究部門りんご研究拠点 (岩手県盛岡市) に分布しているリング黒星病菌のレース判定を試みた。次に、'あかね' の示すリング黒星病抵抗性を制御する遺伝的要因を明らかにするために、'あかね' の F_1 集団を用いた量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を実施した。さらに、検出された QTL については、'あかね' の血縁品種における抵抗性型対立遺伝子の保有の有無を明らかにしようとした。

材料および方法

1. リング黒星病菌のレース同定

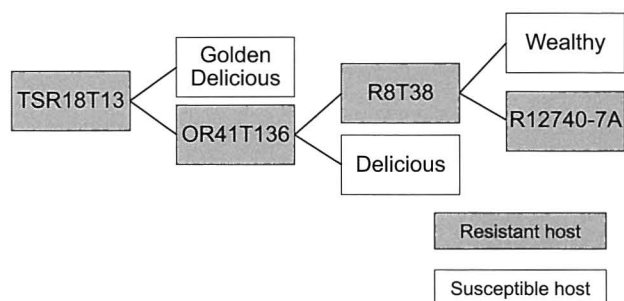
1) 植物材料

リング黒星病菌のレース同定に当たっては、各レースを判別するための判別寄主を供試した (第1表)。レース1～

Table 1. Race determination of the *Venturia inaequalis* population in Morioka, Iwate, Japan using differential hosts.

	Race	Differential hosts							
		Dolgo	Geneva	R12740-7A	TSR18T13	<i>M. micromalus</i>	OR45T132	Florina	Golden Delicious
Expected response	1	R	R	R	R	R	R	R	S
	2	S	S	S	R	R	R	R	S
	3	R	S	R	R	R	R	R	S
	4	R	R	R	S	R	R	R	S
	5	R	R	R	R	S	S	R	S
	6	R	R	R	R	R	R	S	S
Inoculum tested		R	R	R	R	R	R	R	S

R: resistant, S: susceptible.

**Fig. 1.** Parentage of TSR18T13, a differential host distinguishing race 4 of *Venturia inaequalis*.

3, およびレース 5, 6 の判定には, MacHardy (1996) によって提唱されている, Lespinasse (1989) の判別寄主に Parisi ら (1993) の知見を反映して作成された判別寄主群を用い, さらにレース 4 の判別寄主として Heaton ら (1991) に用いられた TSR18T13 (育成系譜は第 1 図を参照) を供試した. ガラス室内にて, 第 1 表に示した各品種について, JM7 を台木とするポット苗を 2 本ずつ養成して接種試験に用いた.

2) リンゴ黒星病菌

リンゴ黒星病菌は, 農研機構果樹茶業研究部門リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡市) の圃場に植栽された ‘ふじ’ などの一般的に罹病性と認識されている品種の葉に発生したリンゴ黒星病の病斑から分生子を採取し, 濃度が 10^8 個・ mL^{-1} になるように蒸留水で調製した. 調製された分生子液は接種試験に使用する時まで -80°C のフリーザー中に保存した. 接種試験時には, これを解凍し, 0.01% Tween20 液に対して分生子濃度が 10^6 個・ mL^{-1} になるように希釈して用いた. なお, 当該圃場では, 年間 10 回 (4 月中旬, 5 月上旬, 5 月下旬, 6 月上旬, 6 月下旬, 7 月上旬, 7 月中下旬, 8 月上旬, 8 月下旬, 9 月中旬) の殺菌剤散布を行っていた.

3) 接種試験

リンゴ黒星病菌の接種試験については, 苗木の伸長中の新梢先端から 5 位までの半展開葉および展開葉全体に,

ハndsプレーを用いて分生子希釈液をまんべんなく噴霧することで行った. 接種後は直ちに温度 18°C , 湿度 100% に保たれた暗黒条件の恒温恒湿室に苗木を搬入し, 30 時間保持した. その後は, 温度, 湿度とも無制御で管理されているガラス室へ苗木を搬出し, かん水と殺虫剤散布を中心とした栽培管理を行い, 殺菌剤の散布は行わなかった. 2014 年 5 月 20 日と同年 5 月 30 日にそれぞれ 1 本の苗木を用いて試験を行った. *M. micromalus* では, 2 本の苗木が準備できず, 反復が取れなかった.

4) 病徴の判定

リンゴ黒星病菌の分生子を接種された各苗木に対する病徴の判定については, 接種後 21 日目に行った. 判定基準は, Chevalier ら (1991) によって作成された病徴の分類に従い, 病徴に応じて苗木ごとに 6 段階 (0, 1, 2, M, 4, 5) のスコアを付した. 得られたスコアの平均値を求めて, その品種が抵抗性かどうか判定した. スコア 0~M までを抵抗性, 4 および 5 を罹病性と判定した.

2. リンゴ黒星病に対する量的形質遺伝子座 (QTL) の同定

1) 植物材料

‘王林’ × ‘あかね’ の F_1 集団 135 個体 (Kunihisa ら, 2014) を供試した. 2012 年に, (地独) 青森県産業技術センターりんご研究所の農薬無散布圃場 (青森県黒石市) の 17 年生の ‘Starking Delicious’ 樹 4 本に対して, 各個体の穂木を 1 本ずつ高接ぎした. 対照として, ‘王林’, ‘あかね’, ‘Prima’, ‘Worcester Pearmain’ を同様に高接ぎした.

2) リンゴ黒星病病徴の調査

2012 年 6 月 27~28 日と 2014 年 6 月 26~27 日に高接ぎ由来の新梢の自然発病状況を調査した. 各新梢について, すべての展開葉の病徴を葉ごとに 0: 無病徴, 1: クロロシのみ, 2: 孢子形成面積 10% 以内, 3: 11~25%, 4: 26~50%, 5: 51~75%, 6: 76~100% の 7 段階の指数で判定し (第 2 図), その最大値を新梢の病徴スコアとした. 7 段階の指数は, 2 以下を抵抗性, 4 以上を罹病性とおおまかに判定される. 2012 年は得られた新梢 1 本の病徴スコアを, 2014 年は得られた新梢 1~3 本の病徴スコ

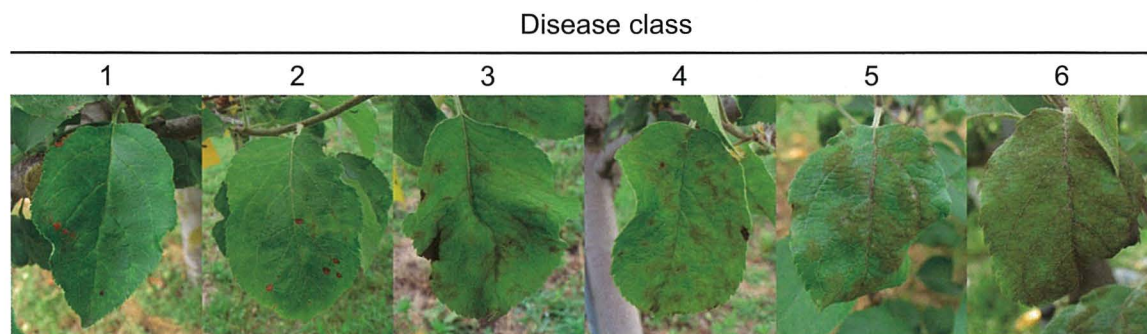


Fig. 2. Disease scale with seven classes for scoring apple scab symptoms in a fungicide-free orchard. 0: no symptom (not shown), 1: only chlorosis, 2: forming conidia $\leq 10\%$ of surface, 3: 11–25%, 4: 26–50%, 5: 51–75%, 6: 76–100%.

アの平均を、各個体の表現型値とした。

3) 広義の遺伝率

本研究の統計解析は、Rバージョン3.3.3 (R Core Team, 2017) を用いて行われた。広義の遺伝率は、遺伝子型と年を要因とする分散分析によって得られた分散成分を利用して求めた。すなわち、

$$P_{ij} = \mu + G_i + Y_j + E_{ij}$$

P_{ij} は i 番目の個体の j 年目の表現型値、 μ は定数、 G_i は i 番目の個体の遺伝子型の効果、 Y_j は j 番目の年の効果、 E_{ij} は誤差である。 $i=1 \sim 135$, $j=1 \sim 2$ 。このとき、遺伝分散を σ_g^2 、年次間分散を σ_y^2 、誤差分散を σ^2 とすると、 n 年反復した平均値の環境分散 σ_e^2 は $(\sigma_y^2 + \sigma^2)/n$ 、広義の遺伝率 h_B^2 は、 $h_B^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_e^2)$ と表された。

4) 連鎖地図の充実化と QTL 解析

QTL 解析には、供試した F_1 集団を用いてダブルシュードテストクロス法で構築された‘王林’と‘あかね’の連鎖地図 (Kunihisa ら, 2014) を利用した。本研究を実施するに当たり、連鎖地図には Apple 20K SNP Array (Bianco ら, 2014) に搭載されている一塩基多型 (SNP) を追加し、地図の充実化を図った。BeadChip を用いて得られたハイブリダイズシグナルは、GenomeStudio ソフトウェア (イルミナ (株)) を用いて SNP スコアに変換された。次に、ASSIST ソフトウェア (Di Guardo ら, 2015) を用いて多型の抽出を行い、マッピング可能な SNP とされた SNP マーカーを連鎖地図の構築に供試した。このとき、両親ともにヘテロ型を示した SNP は連鎖地図の構築から除外した。また、第 17 番染色体に座乗する既報の 5 種類の単純反復配列 (SSR) マーカー (SAmCO414947, SAmCN490324, 以上 van Dyk ら, 2010; Mdo.chr17.5, Mdo.chr17.13, MEST020, 以上 Moriya ら, 2015) についても、連鎖地図の充実化に利用した。連鎖地図の計算には JoinMap バージョン 4.1 ソフトウェア (van Ooijen, 2006) を用いた。

QTL 解析には、MapQTL6.0 ソフトウェア (van Ooijen, 2009) を利用した。初めに Kruskal-Wallis (KW) 法による解析を行った後、インターバルマッピング (IM) 法によって同様に解析を行い、さらに、restricted multiple QTL model (rMQM) 法による解析を行った。QTL の有意性を

判定する閾値は、KW 法においては、MapQTL のマニュアルで推奨されている、 $P=0.005$ とし、この値を下回る DNA マーカーの近傍に QTL が存在すると判断した。また、IM 法においては、1000 回の並べ替え検定の結果得られた 95% の閾値を超える LOD 値のピークの 95% 信頼区間内に QTL が存在すると判断した。

3. QTL の寄与率の計算

‘王林’×‘あかね’の F_1 集団における病徴スコアの 2 年間の平均値 (以下、平均病徴スコアと呼称する) に対する QTL の寄与を調べるに当たっては、検出された QTL に最も近接していると考えられた 2 種類の DNA マーカー (‘あかね’では SAmCO903298, ‘王林’では Hi03c05) を QTL の対立遺伝子の分離を反映している指標と見なして、これらの DNA マーカーを要因とする二元配置の分散分析を実行した。すなわち、

$$P_{ijk} = \mu + MI_i + M2_j + E_{ij}$$

P_{ijk} は、SAmCO903298 と Hi03c05 の i, j 番目の対立遺伝子を指標として表される QTL 対立遺伝子を有する k 番目の個体の表現型値、 MI_i と $M2_j$ はそれぞれ i, j 番目の対立遺伝子の効果である。 $i=1 \sim 2$, $j=1 \sim 2$, $k=1 \sim 135$ 。このとき、SAmCO903298 の対立遺伝子型で表される QTL の分散を σ_{MI}^2 、Hi03c05 の対立遺伝子型で表される QTL の分散を σ_{M2}^2 とすると、

$$\sigma_p^2 = \sigma_{MI}^2 + \sigma_{M2}^2 + \sigma_e^2$$

SAmCO903298 と Hi03c05 で表される QTL 対立遺伝子の表現型に対する寄与率 R^2 は、それぞれ σ_{MI}^2/σ_p^2 および σ_{M2}^2/σ_p^2 として求めた。

4. QTL 対立遺伝子の遺伝の検証

‘あかね’の交配親である ‘Jonathan’ および ‘Worcester Pearmain’ や、後代品種である ‘さんざ’ について、Apple 20K SNP Array (Bianco ら, 2014) によって得られたデータを基に構築したハプロタイプブロック (Kunihisa ら, 2016) を利用して、検出された QTL の周辺に関して染色体の遺伝を追跡した。SNP の位置情報については、‘Golden Delicious’ の倍加半数体の系統 GDDH13 を利用して得られたゲノム情報 (以下、GDDH13 ゲノム; Daccord ら, 2017) に再アセンブルして利用した。第 17 染色体については、

34.7 Mb の領域について、691 種類の SNP マーカーを利用することが可能であった。染色体の遺伝の追跡に当たっては、SNP 遺伝子座ごとに両親と子の対立遺伝子型を比較して、子の染色体の由来を定めた。

結果

1. リンゴ黒星病菌のレース同定

農研機構果樹茶業研究部門リンゴ研究拠点（岩手県盛岡市）に植栽されている、リンゴ黒星病が発病したリンゴ品種の葉から採取されたリンゴ黒星病菌の分生子を、8 種類の判別寄主に接種したところ、その病徴は ‘Golden Delicious’ では罹病性と判定され、その他の 7 種類では抵抗性と判定された（第 1 表）。この結果から、本実験に供

試されたリンゴ黒星病菌にはレース 1 が含まれており、その他のレースは存在しないか、その絶対量が極めて少ないと判断された。

2. リンゴ黒星病に対する QTL の同定

‘王林’ と ‘あかね’ の連鎖地図（Kunihisa ら, 2014）に対して、Apple 20K SNP Array に搭載された SNP および 5 種類の SSR マーカーを追加した結果、王林では 1351 座から構成された 17 連鎖群からなる合計 1341.3 cM の連鎖地図が、‘あかね’ では、1227 座から構成された 18 連鎖群からなる合計 1417.9 cM の連鎖地図が構築された（第 3 図）。‘あかね’ では、Kunihisa ら（2014）によって観察されたように、第 17 染色体の S 遺伝子をまたぐ領域に連鎖地図が作成されず、第 17 染色体が 2 つの連鎖群に分断さ

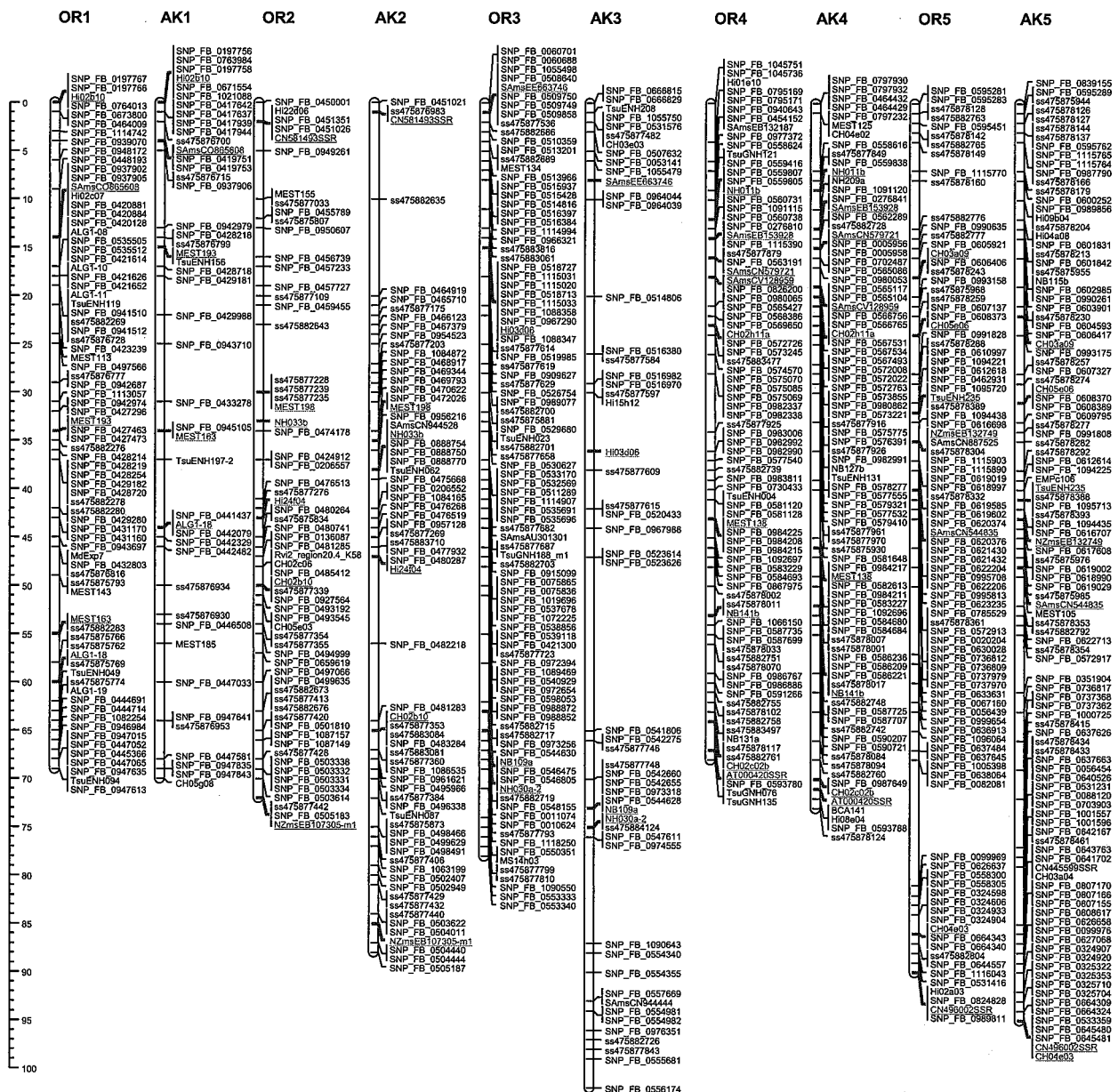


Fig. 3. Genetic linkage map of ‘Orin’ (OR) and ‘Akane’ (AK). The markers commonly located in both maps are underlined. The ruler indicates map distance in cM.

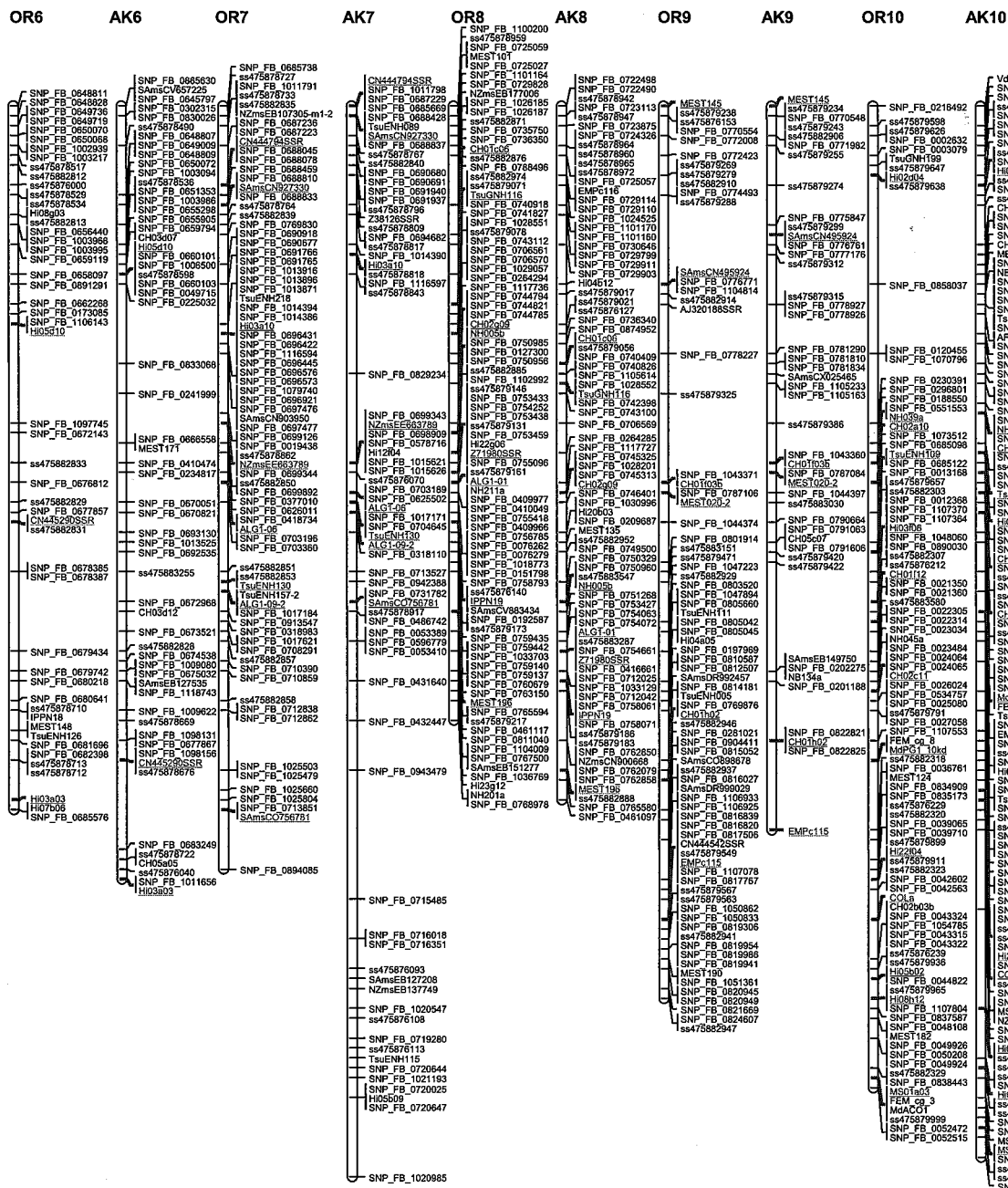


Fig. 3. continued.

れていた。

(地独) 青森県産業技術センターりんご研究所において、
 ‘王林’ × ‘あかね’ の F₁ 集団が高接ぎされた樹において自然発病したリンゴ黒星病の病徴を2年間調査したところ、
 個体によって発病程度に大きな差が認められた (第4図)。
 2年間の病徴スコアの相関係数は $r=0.29$ ($P=0.001$) であった (第4図)。また、2年間の自然発病状況の調査を反復と見なして求めた広義の遺伝率 h_B^2 は 0.45 であった。

上記の病徴スコアの分布について、Shapiro-Wilk 検定による正規性の検定を行ったところ、2012年および2014年の病徴スコアについては、正規性が仮定されなかった ($P<0.05$)。一方、平均病徴スコアについては、正規性が

仮定された ($P=0.09$)。そこで、まず、‘あかね’ と ‘王林’ のそれぞれの連鎖地図を用いて、単年の病徴スコア、および平均病徴スコアに対する KW 法による QTL 解析を行った。その結果、‘あかね’ 第17染色体の SAmCO903298 において、いずれのデータセットに対しても有意確率 0.005 を下回る検定統計量 K^* 値の極大点が認められ、QTL が存在すると判断された (第5図)。
 ‘王林’ の連鎖地図においては、2012年は第9染色体の SNP_FB_0820945 で最大値 10.4 ($P<0.005$) をとる K^* 値の極大点が、また2014年は第7染色体の SAmCN903950 で最大値 9.7 ($P<0.005$) を取る K^* 値の極大点が認められた。さらに、平均病徴スコアに対しては、第9染色体の SNP_FB_0820949 ($K^*=14.4$,

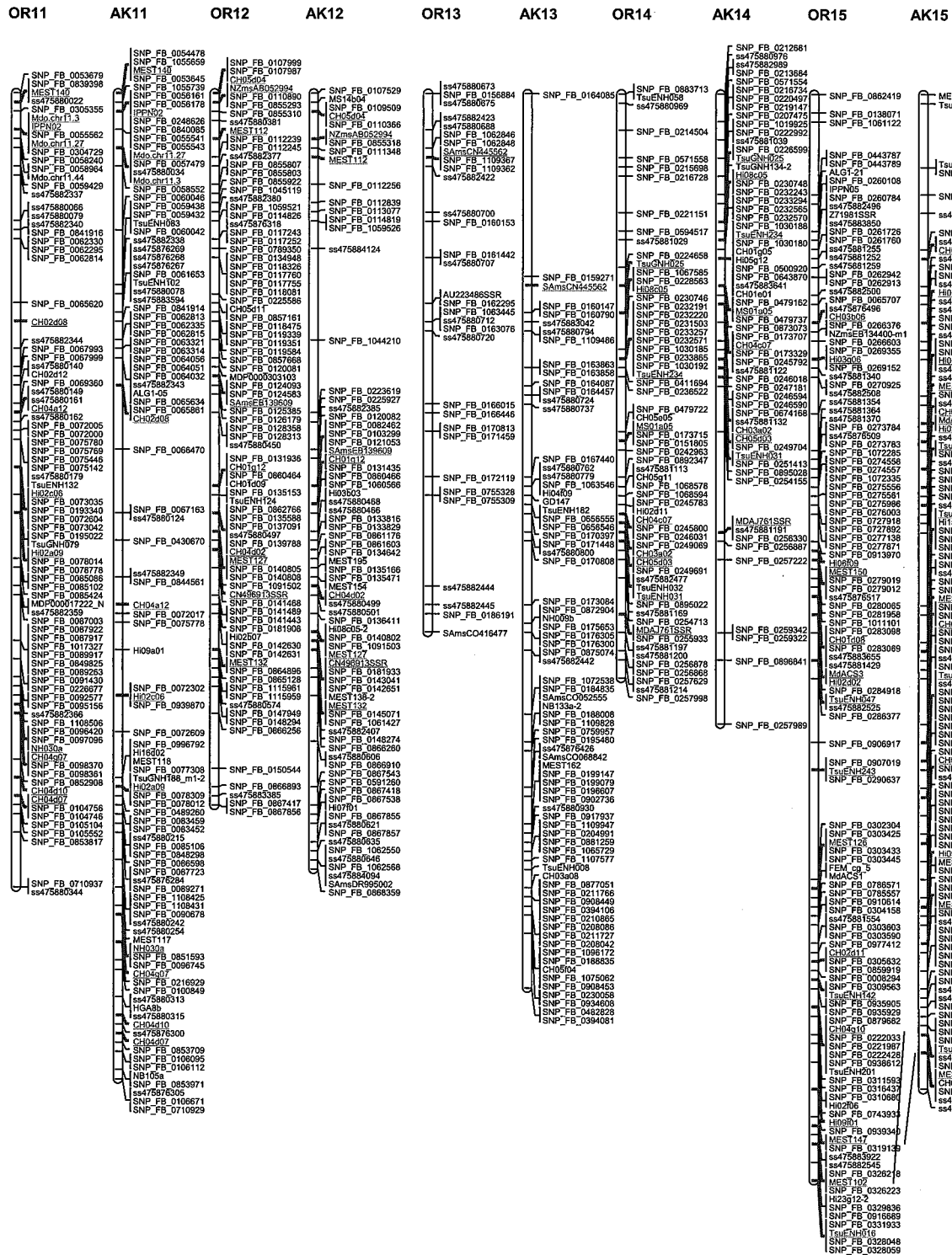


Fig. 3. continued.

$P < 0.0005$), および第17染色体のHi03c05 ($K^* = 8.6$, $P < 0.005$) に有意な K^* 値の極大点が認められた。しかしながら、いずれの K^* 値も、‘あかね’ の第17染色体に認められた K^* 値よりも小さい値を示した。また、単年度の病徴スコアと平均病徴スコアに対する解析結果を比較すると、平均病徴スコアに対するQTL解析において K^* 値は大きく、有意性が強いことが認められた。

同様に、IM法によるQTL解析を行ったところ、いずれのデータセットを用いても‘あかね’の第17染色体の26~29 cMにおいて閾値を越えるLOD値のピークが認められたが、‘あかね’のその他の染色体および‘王林’の全染色体では有意なLOD値の極大点は認められなかった(第5図, 第6図A)。また、2012年の解析結果においては、LOD値の曲線が染色体の上部と下部の2箇所で極大

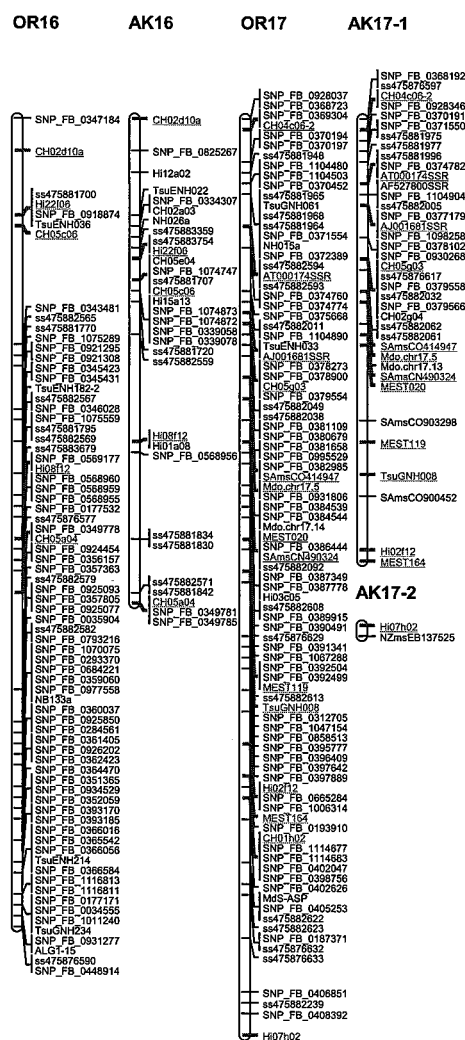


Fig. 3. continued.

を示すような傾向が認められた (第6図A). KW法による解析と同様に, IM法による解析においても, 平均病徴スコアに対するQTL解析において得られたLOD値は単年度の病徴スコアについての解析で得られたLOD値よりも大きく, QTLの有意性は強かった. rMQM解析の結果は, IM法による解析結果との違いが認められなかった (データ省略). 以上の結果より, いずれのデータセットにおいても閾値を超えた‘あかね’第17染色体のLOD値の極大点近傍には, リンゴ黒星病に対して抵抗性を発現するQTLが存在していると考えられ, 近接するマーカーとして, SSRマーカーSAmSCO903298が見いだされた.

‘王林’においては, 2年続けて検出されるような, 安定なQTLは認められなかった (第5図). 平均病徴スコアに対しては, KW法による解析で第9染色体に閾値を超えるK*値が観察され, ‘王林’由来の効果の小さいQTLの存在が示唆された. また, 単年度に対する解析では有意なK*値が認められなかった第17染色体にも有意なK*値が得られ, QTLの存在が示唆された.

次に, いずれのデータセットについても安定して検出さ

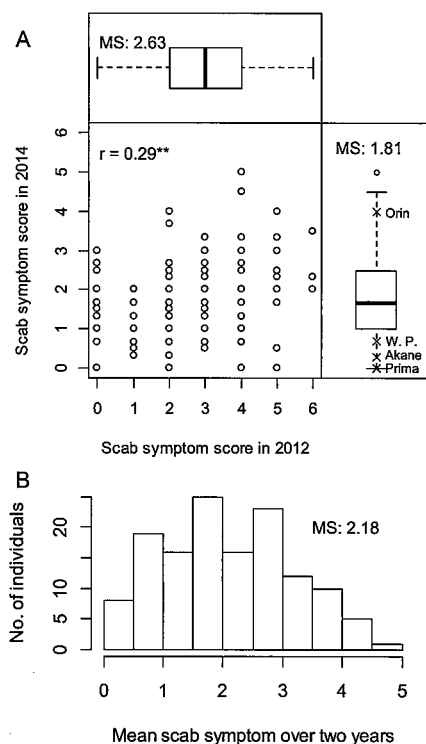


Fig. 4. Distributions of apple scab symptoms in ‘Orin’ × ‘Akane’ F_1 individuals. (A) Relationship between the apple scab symptom scores from two years (2012 and 2014). Apple scab symptom scores of parents, etc., were recorded only in 2014; W. P.: ‘Worcester Pearmain’. **: significant at $P < 0.01$. (B) Frequency distribution of mean apple scab symptom scores over the two years. MS: mean score.

れた第17連鎖群のQTLについて, 平均病徴スコアの全分散に対する寄与を検討した. ‘あかね’のQTLに最も近接するSAmSCO903298マーカーの座乗位置は, GDDH13ゲノムバージョン1.1上では第17染色体の12.634Mbで, ‘王林’のQTLに近接するHi03c05マーカーの座乗位置は11.383Mbと, 両者が近接していたことから (第6図B), この後の解析では両QTLを同一の遺伝子と仮定して扱った. QTLの平均病徴スコアに及ぼす影響を分散分析によって検討したところ, ‘あかね’および‘王林’から遺伝しているQTL対立遺伝子は, 1%水準で有意な平均病徴スコアへの寄与が認められた (データ省略). さらに, 平均病徴スコアの分散に対する‘あかね’と‘王林’に由来するQTLの寄与率 R^2 は, それぞれ20.0%と5.2%であった. 第7図に, 各QTL遺伝子型を持つ個体の平均病徴スコアの分布を示す. また, 両親に由来する対立遺伝子間に交互作用は認められなかった ($P = 0.99$).

3. QTL対立遺伝子の遺伝の検証

‘あかね’のSAmSCO903298遺伝子座近傍のQTLの抵抗性型対立遺伝子について, 祖先品種である‘Jonathan’と‘Worcester Pearmain’および後代品種の‘さんさ’について周辺の染色体の遺伝を調査した. その結果, ‘あかね’の抵抗性型対立遺伝子は, 花粉親である‘Worcester Pearmain’

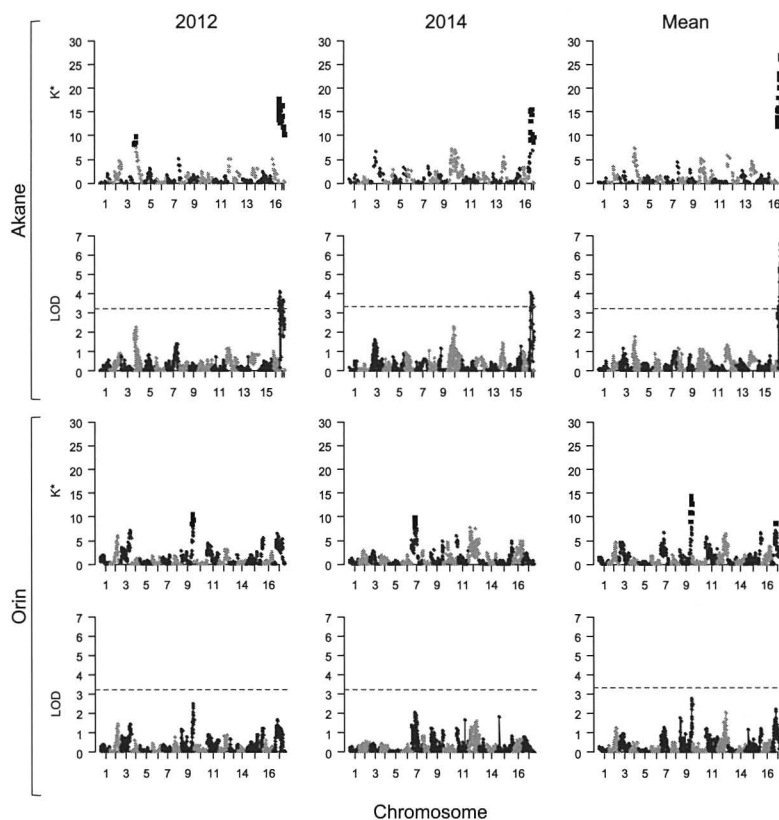


Fig. 5. Manhattan plot of quantitative trait loci (QTL) analyses for apple scab symptom scores. Panels in rows 1 and 3 from the top indicate results obtained by Kruskal-Wallis analyses. Quadrangle dots indicate markers showing significant K^* ($P=0.005$). Panels in rows 2 and 4 from the top indicate results obtained by interval mapping analyses. Horizontal dotted lines indicate threshold scores ($P=0.05$) obtained by permutation tests.

に由来すると判断された (第6図B)。一方, ‘さんさ’ においては, ‘あかね’ 由来の第17染色体の8.4~8.7Mb付近で染色体の組換えが認められ (第6図C), QTL近傍の領域は, ‘Worcester Pearmain’ ではなく ‘Jonathan’ に由来すると考えられた。

考 察

本研究では, リンゴ栽培における最重要病害であるリンゴ黒星病について, 病原であるリンゴ黒星病菌のレース判定を試みて抵抗性育種のための基礎的知見を得た。また, 部分的抵抗性を示す圃場抵抗性と推定される ‘あかね’ の F_1 集団 (‘王林’ × ‘あかね’) を供試したQTL解析を行って, この抵抗性を制御するQTLを同定することを試みた。

1. リンゴ黒星病菌のレース同定

リンゴ黒星病菌のレース判定法は, 研究の進展によって, 新規のレースや抵抗性遺伝子が発見されるに伴って, その判別方法が複雑化してきた経緯がある。たとえば, Lespinasse (1989) および Parisi ら (1993) が提唱している, 6種類のレースを判定可能な方法では, ‘Golden Delicious’ をすべてのレースに対して罹病性を示す寄主と見なしている。しかし, その後の研究によって, ‘Golden Delicious’ には *Rvi1* (*Vg*) というレーススペクトラムの小さい抵抗性遺

伝子が存在していることが判明しており (Calenge ら, 2004; Cova ら, 2015) 判定法の見直しが行われている。近年では18種類のレースを判定可能な判別寄主セットも提唱されており, この中では ‘Gala’ がすべてのレースに対して罹病性を示す寄主と見なされている (Bus ら, 2011)。Bus ら (2011) は, 最新の知見に見合う形でリンゴ黒星病菌のレース番号の再付与を提唱しており, 例えば, 本研究で採用した基準に基づいた従来のレース1は, 最新の判別法ではレース (0) と呼称されている。本研究においては, 供試できる判別寄主に制限があったことから, 6種類のレースを判定できる判別寄主セットを用いて実験を行った結果, 農研機構果樹茶業研究部門リンゴ研究拠点 (岩手県盛岡市) に分布するリンゴ黒星病菌のレースはレース1 (Bus ら (2011) の提唱する命名法ではレース (0) に相当する) が優占しているという結果が得られた (第1表)。この結果は, 町田ら (1996) が青森県りんご試験場 (現・ (地独) 青森県産業技術センターりんご研究所) で採取された1菌株に対して行ったレース判定の結果と一致していた。しかしながら, 本研究で用いた判別寄主セットでは識別できなかったリンゴ黒星病菌のレースが存在している可能性や, 日本国内の各りんご産地で異なるレースが分布している可能性が残る。そこで, 今後は, より多くの判別寄

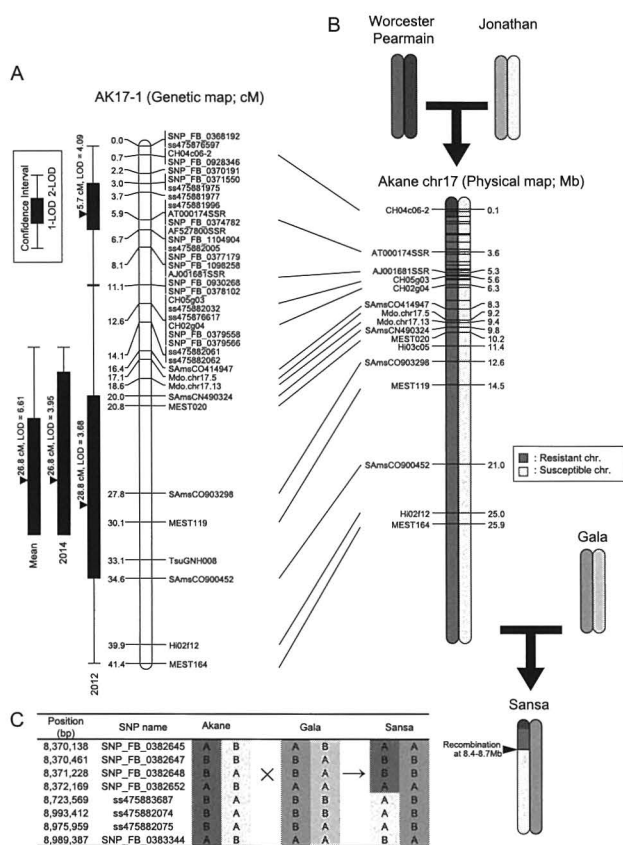


Fig. 6. Genetic and physical positions of the quantitative trait loci (QTL) for apple scab symptoms on chromosome 17 of 'Akane'. (A) QTLs detected by the interval mapping approach. Positions of LOD peaks are shown as solid triangles. (B) A schematic representation of the inheritance of chromosome 17, focusing on 'Akane'. Each chromosome is colored corresponding to its parental origin identified by haplotype analysis using 691 SNPs. (C) Graphical representation of the recombination region of 'Sansa'.

主を用いるとともに、単胞子分離株を用いることや、国内各地で採取されたリンゴ黒星病菌に対するレース判定を実施することが求められる。

2. 'あかね' の黒星病抵抗性 QTL の同定

圃場抵抗性は、一般的に、環境による効果の変動が認められるものの、レース非特異的に発現して、抵抗性の崩壊が起こりにくいという特徴を持つ (Bent・Mackey, 2007)。このような背景から、病害抵抗性を目標とした育種における圃場抵抗性の利用価値は大きい。そこで、'あかね' が示す抵抗性がどのような遺伝的要因によって制御されているかを調べるために、'王林' × 'あかね' の F₁ 集団を供試して QTL の同定を試みた。2012 年と 2014 年のリンゴ黒星病発病スコアには有意な正の相関が認められたが、相関係数は 0.29 と低かった (第 4 図)。この原因としては、各年の新梢の生育状況や病原菌の密度、感染期の気候の影響など、圃場での感染・発病に影響を与える複数の要因が考えられたが、各要因の与えた影響については本研究では解析できなかった。しかしながら、広義の遺伝率 h_b^2 は 0.45 と

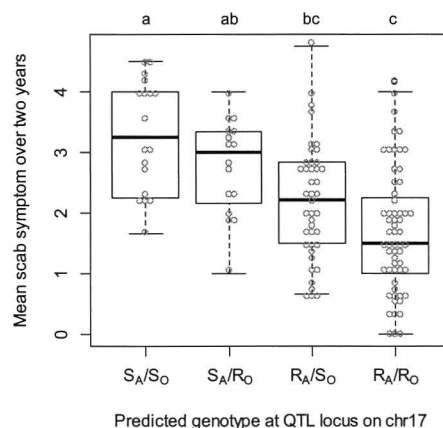


Fig. 7. Beeswarm plots overlaying box plots of mean disease symptoms of the F₁ population derived from 'Orin' × 'Akane', subdivided into four groups, which have different predicted genotypes at the quantitative trait locus (QTL) for apple scab on chromosome 17. QTL genotypes are predicted based on the nearest DNA marker genotype. S_A and R_A indicate 360 and 380 bp, respectively, from 'Akane' at the SAmSC0903298 locus. S_O and R_O indicate 206 and 193 bp, respectively, from 'Orin' at the Hi03c05 locus. Different letters above the plot indicate a significant difference at P < 0.05 using the Tukey-Kramer test.

比較的高い値を示したこと、各年の結果は遺伝的な抵抗性程度を反映したものと考えられた。本集団を用いた QTL 解析の結果、KW 法と IM 法のいずれの解析においても、'あかね' の第 17 染色体の下部に QTL の存在が示唆され (第 5 図、第 6 図 A)、リンゴ黒星病に対する抵抗性の発現に大きく関与していると考えられた。また、2012 年の発病スコアに対する IM 解析では、'あかね' の第 17 染色体の上部にも LOD 値の極大点認められた (第 6 図 A)。この極大点は、2014 年と平均病徴スコアに対する解析では検出されなかったことから、環境要因が大きく影響する QTL の存在が示唆された。一方、'王林' の第 17 染色体に、平均病徴スコアに対する解析でのみ QTL の存在が示唆された。理由として、この QTL 対立遺伝子の効果が小さく、単年度の解析では閾値を上回らないものの、毎年安定的に発現することで、他の不安定な QTL に対して相対的に検出されやすくなったものと推察された。また、'王林' は接種試験においてリンゴ黒星病を発病する罹病性品種であり (今ら, 2012)、一般的にもリンゴ黒星病に対して弱いと認識されている。このことは、本研究で存在が示唆された '王林' 由来の QTL のみでは、十分な抵抗性が発現できないことを示唆している。罹病性品種から抵抗性をもたらす QTL が検出されたことについては、罹病性の 'Gala' においてリンゴ黒星病に対する QTL が検出された結果が報告されている (Soufflet-Freslon ら, 2008) ことから、妥当な結果であると考えられた。

'あかね' と '王林' の第 17 染色体で検出されたそれぞれの QTL の物理的位置を、近接する DNA マーカーの座乗

位置を指標として比較すると、その距離は約1.1 Mbと近く、これらのQTLは同じ遺伝子の対立遺伝子の効果を検出したものである可能性が示唆された。そこで、この仮説を基に、このQTLの表現型に対する寄与率を調べたところ、‘あかね’と‘王林’に由来する対立遺伝子の合計で表現型分散の約25%（‘あかね’20.0%、‘王林’5.2%）が説明された。

3. ‘あかね’のQTLの由来および後代への遺伝

第17染色体には、これまでにも多くの研究によってリンゴ黒星病に対するQTLの存在が示唆されている。すなわち、第17染色体のQTLは、広範なレースに対して抵抗性を発現し（Calangeら, 2004）、これまでに‘Fiesta’、‘Discovery’、‘Gala’、‘Dülmener Rosenapfel’において検出されている（Calangeら, 2004; Durelら, 2003; Liebhardら, 2003; Soufflet-Freslonら, 2008）。本研究で検出されたQTLに関しても、これらの研究で検出されているQTLの座乗位置と信頼区間が重複しているので、同一のQTLを検出した可能性が高いと考えられた。

次に、遺伝的な関係からもQTLの効果を確かめるために、祖先品種や後代品種における第17染色体の遺伝について調査した。その結果、‘あかね’の抵抗性をもたらす対立遺伝子は、‘Worcester Pearmain’に由来することが判明した（第6図B）。「Worcester Pearmain」は、‘Discovery’（‘Worcester Pearmain’×‘Beauty of Bath’）の第17染色体で検出されたQTLの抵抗性型対立遺伝子の由来とされており（Liebhardら, 2003）、本研究で得られた結果と矛盾しなかった。また、本研究で供試された‘王林’と‘あかね’を含めると少なくとも6品種（‘Fiesta’、‘Discovery’、‘Gala’、‘Dülmener Rosenapfel’、‘王林’、‘あかね’）において、ほぼ同じ位置にQTLが検出されていることから、このQTLにはリンゴ黒星病に対する抵抗性に寄与する、遺伝的背景（由来）の異なる複数の対立遺伝子が存在していると考えられる。本研究の結果は、このQTLは個体の遺伝的背景、生理的状态、環境条件が異なっても抵抗性に寄与しているという仮説（Soufflet-Freslonら, 2008）を支持すると考えられた。本QTLの遺伝子同定に関する、今後の研究の進展が期待される。

次に、‘あかね’の後代品種についてQTL周辺の染色体の遺伝について検討すると、まず、本研究の供試集団と正逆が異なる‘あかね’×‘王林’のF₁集団から選抜されて、三倍体品種である‘あおり9’に関しては、‘あかね’と同等の抵抗性を示すという報告（今ら, 2012）と、三倍体では種子親から2本の染色体をそのまま遺伝するという知見（Evansら, 2011; Moriyaら, 2011）を合わせて考えると、‘あおり9’が示すリンゴ黒星病抵抗性には‘あかね’から遺伝している第17染色体のQTLの寄与が大きいことが推察された。一方、‘Gala’×‘あかね’の交配組み合わせに由来する‘さんさ’については、本研究で得られたQTL信頼区間外である8.4~8.7 Mb付近に染色体の組換え点が同定

され、信頼区間内においては‘Jonathan’由来の染色体を有していた（第6図B, C）ことから、‘あかね’由来の抵抗性型のQTL対立遺伝子が遺伝していない可能性が示唆された。しかしながら、‘さんさ’もリンゴ黒星病抵抗性を示し（花岡ら, 2016; 今ら, 2012; 吉田ら, 1988）、本研究と同じ接種条件では‘あかね’程度の抵抗性反応を示す（阿部ら, 2006）。今後は、‘さんさ’の示すリンゴ黒星病抵抗性の遺伝的機構についても解明が求められる。

以上で議論してきたように、本研究で検出された‘あかね’第17染色体のリンゴ黒星病に対するQTLは、病徴が完全には抑えられない部分的抵抗性ではあるものの、抵抗性の発現に大きく寄与しており、他の品種における結果ではあるものの、多くのリンゴ黒星病菌レースに対する抵抗性の安定性について十分な研究が蓄積されているので（Calangeら, 2004; Durelら, 2003; Liebhardら, 2003; Soufflet-Freslonら, 2008）、我が国においても、このQTLを利用してリンゴ黒星病抵抗性育種を進める意義は大きいと考えられた。さらに、育種への利用に当たっては、SAmSCO903298などを利用したDNAマーカー選抜が有効であると考えられた。本研究で明らかにされたリンゴ黒星病菌のレース情報、および‘あかね’由来の第17染色体のQTL対立遺伝子を利用することで、リンゴ黒星病に対して抵抗性を示す品種の育種が加速化されることが期待される。

摘 要

リンゴ黒星病に対して抵抗性を示すリンゴを育種する際の基礎的知見を得るため、レース1~6までを判別可能な判別寄主を用いて、農研機構果樹茶業研究部門リンゴ研究拠点（岩手県盛岡市）に分布しているリンゴ黒星病菌のレース判定を試みたところ、当地に分布しているリンゴ黒星病菌はレース1が優占していることが示唆された。次に、‘あかね’が示すリンゴ黒星病に対する抵抗性を担う遺伝的要因について検討した。‘王林’×‘あかね’のF₁集団135個体を供試して、青森県黒石市の農業無散布圃場において自然発病したリンゴ黒星病の病徴程度を2年間調査したデータを用いてQTL解析を実施したところ、‘あかね’の第17染色体上に、供試集団において寄与率20%と最大の効果を示すQTLが検出された。本QTLに関しては、病徴スコアに与える影響は寄与率5%と小さいながらも、‘王林’の対立遺伝子も抵抗性に関与していることが示唆された。本QTLについて、Apple 20K SNP Arrayに搭載されているSNPマーカーの遺伝子型を利用して、‘あかね’の血縁品種における抵抗性型QTL対立遺伝子の遺伝を検討したところ、抵抗性型QTL対立遺伝子の由来は‘Worcester Pearmain’であることが判明した。

謝 辞 リンゴ黒星病菌のレース判定に関してご助言を賜りました町田郁夫氏、およびリンゴ黒星病の病徴評価方法にご助言を賜りました今 智之氏に感謝申し上げます。

引用文献

- 阿部和幸・岩波 宏・古藤田信博・高橋佐栄・森谷茂樹.
2006. 斑点落葉病, 黒星病に対するリンゴ品種の抵抗性程度の評価. 園学雑. 75 (別 1): 83.
- Baumgartner, I. O., A. Patocchi, J. E. Frey, A. Peil and M. Kellerhals. 2015. Breeding elite lines of apple carrying pyramided homozygous resistance genes against apple scab and resistance against powdery mildew and fire blight. *Plant Mol. Biol. Rep.* 33: 1573–1583.
- Bent, A. F. and D. Mackey. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 399–436.
- Bianco, L., A. Cestaro, D. J. Sargent, E. Banchi, S. Derdak, M. Di Guardo, S. Salvi, J. Jansen, R. Viola, I. Gut, F. Laurens, D. Chagné, R. Velasco, E. van de Weg and M. Troggio. 2014. Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for apple (*Malus × domestica* Borkh). *PLoS ONE* 9: e110377.
- Bus, V. G. M., E. H. A. Rikkerink, V. Caffier, C. E. Durel and K. M. Plummer. 2011. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 391–413.
- Calenge, F., A. Faure, M. Goerre, C. Gebhardt, W. E. Van de Weg, L. Parisi and C. -E. Durel. 2004. Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94: 370–379.
- Chevalier, M., Y. Lespinasse and S. Renaudin. 1991. A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathol.* 40: 249–256.
- Cova, V., P. Lasserre-Zuber, S. Piazza, A. Cestaro, R. Velasco, C. E. Durel and M. Malnoy. 2015. High-resolution genetic and physical map of the *Rvi1* (*Vg*) apple scab resistance locus. *Mol. Breed.* 35: 16.
- Daccord, N., J.-M. Celton, G. Linsmith, C. Becker, N. Choisine, E. Schijlen, H. van de Geest, L. Bianco, D. Micheletti, R. Velasco, E. A. Di Pierro, J. Gouzy, D. J. G. Rees, P. Guérif, H. Muranty, C. E. Durel, F. Laurens, Y. Lespinasse, S. Gaillard, S. Aubourg, H. Quesneville, D. Weigel, E. van de Weg, M. Troggio and E. Bucher. 2017. High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genet.* 49: 1099–1106.
- Di Guardo, M., D. Micheletti, L. Bianco, H. J. J. K. van Putten, S. Longhi, F. Costa, M. J. Aranzana, R. Velasco, P. Arús, M. Troggio and E. W. van de Weg. 2015. ASSIsT: an automatic SNP scoring tool for in- and outbreeding species. *Bioinformatics* 31: 3873–3874.
- Durel, C. E., L. Parisi, F. Laurens, W. E. Van de Weg, R. Liebhard and M. F. Jourjon. 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. *Genome* 46: 224–234.
- Evans, K. M., A. Patocchi, F. Rezzonico, F. Mathis, C. E. Durel, F. Fernández-Fernández, A. Boudichevskaia, F. Dunemann, M. Stankiewicz-Kosyl, L. Gianfranceschi, M. Komjanc, M. Lateur, M. Madduri, Y. Noordijk and W. E. van de Weg. 2011. Genotyping of pedigreed apple breeding material with a genome-covering set of SSRs: trueness-to-type of cultivars and their parentages. *Mol. Breed.* 28: 535–547.
- Flor, H. H. 1955. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680–685.
- 花岡朋絵・赤平知也・平山和幸. 2016. 耐病性リンゴ品種における散布回数を削減した黒星病及び斑点落葉病防除体系の評価. 東北農研. 69: 69–70.
- Heaton, J. B., S. R. Dullahide, L. B. Baxter and A. D. McWaters. 1991. Race determination of nine Australian isolates of the apple black spot fungus *Venturia inaequalis*. *Australas. Plant Pathol.* 20: 139–141.
- 平山和幸・花岡朋絵・赤平知也. 2017. 青森県におけるリンゴ黒星病菌のDMI剤に対する薬剤感受性の実態と変化. 平成29年度日本植物病理学会大会プログラム・講演要旨予稿集: 78.
- Janick, J. 2006. The PRI apple breeding program. *HortScience* 41: 8–10.
- 今 智之・工藤 剛・深澤 (赤田) 朝子・後藤 聡・赤平知也・町田郁夫・白川真美子・秋田奈津子. 2012. リンゴ新品種 ‘あおり9’・‘あおり13’・‘あおり15’について. 青森産技セリんご研報. 36: 45–72.
- 工藤 剛・深澤 (赤田) 朝子・五十嵐恵・後藤 聡・今智之・佐藤 耕. 2013. リンゴ新品種 ‘あおり25’. 園学研. 12 (別 1): 256.
- Kunihisa, M., S. Moriya, K. Abe, K. Okada, T. Haji, T. Hayashi, Y. Kawahara, R. Itoh, T. Itoh, Y. Katayose, H. Kanamori, T. Matsumoto, S. Mori, H. Sasaki, T. Matsumoto, C. Nishitani and T. Yamamoto. 2016. Genomic dissection of a ‘Fuji’ apple cultivar: re-sequencing, SNP marker development, definition of haplotypes, and QTL detection. *Breed. Sci.* 66: 499–515.
- Kunihisa, M., S. Moriya, K. Abe, K. Okada, T. Haji, T. Hayashi, H. Kim, C. Nishitani, S. Terakami and T. Yamamoto. 2014. Identification of QTLs for fruit quality traits in Japanese apples: QTLs for early ripening are tightly related to pre-harvest fruit drop. *Breed. Sci.* 64: 240–251.
- Lespinasse, Y. 1989. Breeding pome fruits with stable resistance to diseases. Genes, resistance mechanisms, present work

- and prospects. p.100–115. In: C. Gessler, D. J. Butt and B. Koller (eds.). Integrated control of pome fruit diseases, Vol. II. IOBC-WPRS Bull.
- Liebhard, R., B. Koller, A. Patocchi, M. Kellerhals, W. Pfammatter, M. Jermini and C. Gessler. 2003. Mapping quantitative field resistance against apple scab in a ‘Fiesta’ × ‘Discovery’ progeny. *Phytopathology* 93: 493–501.
- MacHardy, W. E. 1996. Apple Scab. p.39–60. APS Press, St Paul, MN USA.
- 町田郁夫・佐藤 耕・今 智之. 1996. 幼病検定で選抜されたリンゴ黒星病抵抗性交雑実生の圃場における抵抗性検定. *日植病報*. 62: 602.
- Moriya, S., H. Iwanami, T. Haji, K. Okada, M. Yamada, T. Yamamoto and K. Abe. 2015. Identification and genetic characterization of a quantitative trait locus for adventitious rooting from apple hardwood cuttings. *Tree Genet. Genomes* 11: 59.
- Moriya, S., H. Iwanami, K. Okada, T. Yamamoto and K. Abe. 2011. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica* 177: 135–150.
- 西田 勉・池 大司. 1965. りんご黒星病に関する研究 I. 発生の経緯と分布について. *北日本病虫研報*. 16: 53.
- Parisi, L., Y. Lespinasse, J. Guillaumes and J. Krüger. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* 83: 533–537.
- Patocchi, A., A. Frei, J. E. Frey and M. Kellerhals. 2009. Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: *Venturia inaequalis* virulence surveys and standardization of molecular marker alleles associated with resistance genes. *Mol. Breed.* 24: 337–347.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
- 定盛昌助・吉田義雄・土屋七郎・羽生田忠敬・村上兵衛・鈴木英雄・石塚昭吾. 1973. リンゴ新品種 ‘あかね’ について. *園試研報 C*. 8: 1–11.
- Sansavini, S. and S. Tartarini. 2013. Advances in apple breeding and genetic control of the main agronomic resistance and fruit quality traits. *Acta Hort.* 976: 43–55.
- Soufflet-Freslon, V., L. Gianfranceschi, A. Patocchi, and C.-E. Durel. 2008. Inheritance studies of apple scab resistance and identification of *Rvi14*, a new major gene that acts together with other broad-spectrum QTL. *Genome* 51: 657–667.
- 高橋俊作. 1986. リンゴ黒星病の多発化. *東北農研*. 38: 41–51.
- van Dyk, M. M., M. K. Soeker, I. F. Labuschagne and D. J. G. Rees. 2010. Identification of a major QTL for time of initial vegetative budbreak in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Tree Genet. Genomes* 6: 489–502.
- van Ooijen, J. W. 2006. JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma, B. V., Wageningen, The Netherlands.
- van Ooijen, J. W. 2009. MapQTL® 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma, B. V., Wageningen, The Netherlands.
- 吉田義雄・羽生田忠敬・土屋七郎・真田哲朗・増田哲男・別所英男・D. W. McKenzie. 1988. リンゴ新品種 ‘さんさ’ について. *果樹試報 C*. 15: 1–12.