

博士論文

ニホングリ易渋皮剥皮性の遺伝様式と
育種に関する研究

高田 教 臣

目 次

略 号	2
緒 言	3
第 1 章 簡便な渋皮剥皮性の評価法(HOP 法)の開発	13
第 1 節 生果における果実表面積と渋皮剥皮時間の関係	13
第 2 節 揚げグリを利用した渋皮剥皮法	15
第 2 章 クリ品種‘ぼろたん’における易渋皮剥皮性の遺伝様式	27
第 3 章 難渋皮剥皮性ニホングリ品種・系統間における 渋皮剥皮性の遺伝変異の存在	40
第 4 章 易渋皮剥皮性を持つ在来品種‘奴’の 渋皮剥皮性の遺伝様式	54
総合考察	74
摘 要	80
Summary	82
謝 辞	84
引用文献	85

本論文では以下の略号を用いた.

AFLP	amplified fragment length polymorphism, 増幅断片長多型
ANOVA	analysis of valiance, 分散分析
APR	average peelig rate, 平均渋皮剥皮率
DPP	difficult peeling pellicle, 難渋皮剥皮性
EPP	easy peeling pellicle, 易渋皮剥皮性
HOP	high temperature oil peeling, 高温食用油によるクリの渋皮剥皮法
MAS	marker-assisted selection, マーカー選抜
NARO	National Agriculture and Food Research Organization, 農業・食品産業技術総合研究機構
NIFTS	NARO, Institute of Fruit Tree and Tea Science, 農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門
PCR	polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応
QTL	quantitative trait locus, 量的形質遺伝子座
SSR	simple sequence repeat, 単純反復配列

緒 言

クリはクリ属 (*Castanea*) の落葉果樹であり、林業上の重要属であるブナ属 (*Fagus*) や、コナラ属 (*Quercus*) と共にブナ科 (*Fagaceae*) の植物である。主に北緯 30°から 45°にかけての欧州、北アフリカ、アジア、北米の山野に自生している。南半球には自生地は存在しないが、ヨーロッパからの移民により 1530 年代にブラジルへ、17 世紀ごろにアルゼンチンへ、1850 年代にオーストラリアへそれぞれ導入された結果、現在では南半球においても経済栽培が行われている (Avanzato, 2009)。クリは果実を食用とするだけでなく、その材は耐久性に富むことから鉄道の枕木や杭木、電柱等に重用され、加えて皮革工業に必要なタンニンの採取原料となるなど、幅広い用途に利用されている (小林, 1955)。クリ属のうち、現在経済栽培されている主な種として、日本と朝鮮半島に分布しているニホングリ (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.)、中国の華北および華中地域に分布しているチュウゴクグリ (*C. mollissima* Bl.)、および欧州南部・黒海南岸・北アフリカに分布するヨーロッパグリ (*C. sativa* L.) の 3 種が挙げられる。これらに加えて北米東部にはアメリカグリ (*C. dentata* Borkh.) が分布していたが、19 世紀末に東アジアより侵入した胴枯病により壊滅的な打撃を受け、現在は絶滅の危機に瀕している (Woodroof, 1979)。これら 4 種の他に、中国原産のモーパングリ (*C. seguinii* Dode) やヘンリーグリ (*C. henryi* Rehd. et Wils.)、北米原産のチンカピングリ (*C. pumila* Mill.) といった野生グリが存在する (Pereira-Lorenzo ら, 2012)。クリの染色体数は $2n = 24$ であり、そのゲノムサイズは約 600Mb 程度と推定されている (Fang ら, 2013)。

クリの果実は子房の発育したもので、一つの毬果 (イガ) に通常 3 個の果実が入る。果実は外側から果皮である鬼皮、種皮である渋皮と子葉である果肉から形成されている (塩沢, 1997; Fig. 1)。鬼皮は木質化しており硬く、渋皮は柔らかいがフェノール類を多く含むために渋みが強く、いずれも食用には適さない。このため、クリ果実を食用とする際にはこれらを果実から除去することが必要である (真部, 2001)。チュウゴクグリやヨーロッパグリは加熱することで果肉から渋皮が簡単に剥皮できることに対して、ニホングリは果肉からの渋皮の剥皮が非常に困難である (Kikuchi, 1948; Miller ら, 1996; Pereira-Lorenzo ら, 2012; Tanaka ら, 1981)。このため、ニホングリの加工利用時には渋皮をナイフ等で除去する工程が必要で、これが加工利用上

の大きな障害となっており、ニホングリの消費を停滞させる要因ともなっている（壽ら、1982）。また、ナイフ等による渋皮の除去の際には、同時に果肉表層部を削り取ってしまうため、加工時の果肉歩留まりが約 55~61%と低くなる点が原材料のコスト増につながっている（大出ら、1964；真部、2001）。ニホングリの渋皮剥皮が困難であるのは、果実の成熟に伴って渋皮組織内に重合型フェノールが蓄積し、これが果肉と渋皮を癒着させることに原因があるとされている（Tanaka ら、1981；田中・壽、1992；Tanaka・Kotobuki、1998a、1998b）。しかし、重合型フェノールの蓄積の程度には種および品種間差が存在し、チュウゴクグリのフェノール蓄積量はニホングリと比べて少なく、このことがニホングリに比べてチュウゴクグリの渋皮剥皮性が良好である理由であると推定されている（Tanaka ら、1981）。

世界のクリ生産量は 2016 年現在で 226 万 t であり、中国、トルコ、韓国、イタリア、ギリシャ、ポルトガル、日本、スペインがその主要生産国となっている（FAOSTAT, 2017, <http://faostat.fao.org/>）。特に中国の生産量は 187 万 t と非常に多く、世界のクリ生産量の 8 割以上を占めている。中国でのクリ生産量は、1996 年以降の 20 年間で 28.5 万 t から約 6.6 倍になっており、近年急速に増加している。また、南半球のオーストラリアやブラジル、チリでは、栽培圃場における経済栽培が行われ、北半球の消費国への輸出が行われている（Avanzato, 2009；Pereira-Lorenzo ら、2012）。日本国内のクリ生産量は 2016 年現在で 16,500t、栽培面積は 19,300ha である。これに加えて 2016 年においては約 8,000t が海外から輸入されている（財務省貿易統計）。輸入量の大部分は韓国および中国からであり、主に韓国からは鬼皮と渋皮を除去したニホングリの剥きグリが、中国からは甘栗用として鬼皮付きのチュウゴクグリ果実が輸入されている。近年では、韓国および中国で生産したニホングリを中国の工場で剥いた上で、日本に輸出するという形態も広がっている（元木、2013）。また、これらよりは少量であるが、イタリア、スペイン等の EU 地域からはヨーロッパグリが果実だけでなくペーストや粉等の加工品の形で輸入され、マロングラッセや洋菓子等の材料として利用されている。日本国内のクリ生産量は、1979 年に生産量 65,300t となったのをピークに 30 年以上減少を続けており、近年はピーク時の約 3 分の 1 程度となっている。

ヨーロッパグリは、地中海および黒海沿岸の欧州、西アジアおよび北アフリカ一帯で主に栽培されており、イタリア、ギリシャ、ポルトガル、スペイン等が主要な生産国となっている。果実は 15 g から 20g 程度であり、肉質は粉質で芳香が強く、焼きグ

りとした場合の品質が優れており、焼きグリや料理、菓子等の加工原料として利用されている。また高木性であり、材木として建築や工芸用途のほか、タンニンの採取原料としても用いられている（猪崎，1978）。近年，イタリアではアジアより侵入した害虫であるクリタマバチ（*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu）がその被害地域を広げており，天敵の放飼等による被害軽減の取り組みやクリタマバチ抵抗性品種のスクリーニング，ヨーロッパグリとニホングリおよびチュウゴクグリとの交雑による抵抗性育種といった対策が行われている（守屋，2013；Pereira-Lorenzo ら，2012）。また，インク病や胴枯病の被害も広範囲で発生しており，ポルトガルではこれらに対する抵抗性の付与を目的として，チュウゴクグリ，ヨーロッパグリ，ニホングリを用いた種間交雑育種が実施されている（Batista ら，2008；Pereira-Lorenzo ら，2012）。スペインでは木材として利用することを目的としたクリの育種が行われており，インク病抵抗性に加えて，樹高，頂芽優勢，直立性等の形質を重視した選抜が行われている（Miguez-Soto・Fernández-López，2012）。本種は胴枯病とクリタマバチに強感受性であるため，これらから非常に大きな被害を受ける日本国内での経済栽培はほとんど行われていない。

チュウゴクグリは，中国の華北，華中地域で広く栽培されており，先に述べたとおり近年栽培面積，生産量ともに非常に増加している。果実は 15g 程度とやや小さく，肉質は粉質で，焼き栗とした場合の品質は良好である。また耐寒性，耐乾燥性が強く，胴枯病に抵抗性を持つ等の優れた特性を持っている（猪崎，1978）。日本国内でも明治・大正時代から栽培や育種の取り組みが行われており，高知県の傍士氏，山梨県の宮川氏等により各地で優良系統の選抜が行われてきた（猪崎，1978）。しかし，これらのチュウゴクグリ選抜品種はニホングリ花粉が受粉すると渋皮が剥けにくくなるキセニア現象を示す（Tanaka・Kotobuki，1992）ことから，周囲にニホングリの存在しない場所で栽培する必要がある。加えて，クリタマバチに感受性であるという欠点から，平成 26 年における国内での経済栽培は山梨県における 2.6ha とごく一部にとどまっている。また，岡山県森林研究所においてはチュウゴクグリ実生個体からの系統選抜による育種事業が行われており，‘岡山 1 号’，‘岡山 2 号’，および‘岡山 3 号’の 3 品種が 2008 年に品種登録され，岡山甘栗と称して同県内において産地化が進められている（西山，2011，2014）。

アメリカグリは，北米の太平洋沿岸部からミシシッピ川に至る地域に分布していた

種である。クリ属の他種と比べて非常に高木性であり樹高 30m にも達するが、果実は 5g 程度と非常に小さいため、食用としてよりも木材やタンニンの採取原料としての利用が主であった。現在では先に挙げた通り 20 世紀初頭にアジアから侵入した胴枯病によって 30 億本以上が枯死する壊滅的な被害を受け、絶滅の危機に瀕している (Hebard, 2006 ; 小林, 1955 ; 猪崎, 1978 ; Pereira-Lorenzo ら, 2012 ; Wheeler・Sederoff, 2009) 。このためアメリカにおいては、チュウゴクグリを胴枯病抵抗性の遺伝資源としてアメリカグリに胴枯病抵抗性を付与することを目標として育種が行われている (Hebard, 2006 ; Jacobs DF ら, 2013 ; 小林, 1955 ; Pereira-Lorenzo ら, 2012 ; Wheeler・Sederoff, 2009) 。

ニホングリは、北海道南部から九州南部にかけてと朝鮮半島南部に広く自生するシバグリがその基本種であるとされており (Kotobuki, 1994) , 現在も同様の地域で栽培が行われている (猪崎, 1978) 。 AFLP マーカーを用いた解析の結果、ニホングリとチュウゴクグリの品種間が遺伝的にかなり離れていることから、ニホングリはシバグリから選抜されたものと考えられている (Yamamoto ら, 1998) 。ニホングリは古来より食用としてだけではなく、木材としても利用されてきたが、近年では主に食用として栽培が行われている。果実は 20~30 g 程度で他種と比べて大果となるが、その肉質はヨーロッパグリやチュウゴクグリと比べて粘質であり、焼き栗としてではなく煮蒸による利用に向いている (真部, 2001) 。日本におけるクリ栽培の歴史は縄文時代まで遡ることができ、約 5500~4000 年前の青森県三内丸山遺跡からクリの果実や材木が出土している (Sawamura, 2006 ; 安田, 1995) 。この当時からクリが栽培されていたかどうかについてはまだ明らかとなっていないが、少なくとも当時からクリが人々の生活に積極的に利用されていたと推定されている (安田, 1995) 。記録上は古事記 (712 年) や日本書紀 (720 年) の時点において既にクリについての記述が見られる。日本書紀では持統天皇の時代 (686~696 年) に、主要穀物の補助作物としてクワやナシとともにクリの栽培が全国に奨励されており、このころから日本国内で広くクリが栽培されるようになったと考えられている (猪崎, 1978) 。

日本におけるクリ産地として最も古いのは、現在の京都府、大阪府、兵庫県にまたがるいわゆる丹波地方であり、「延喜式」 (928) において、『丹波産のクリは他の産地に比べて大きく非常に優良である』との記述が見られる。当時の丹波地方では、租税を米だけでなくクリで収めることが許されており、社寺林や天領からもクリが都に

献上されていた。そのためこの地方で生産されたクリはいわゆる『丹波栗』と呼ばれ、現在でも高値で取引されている（猪崎，1978）。また，最も古いとされている品種は‘長光寺（長興寺）’であり，これは1590年代に京都府亀岡市の長興寺の僧侶が丹波地方に広めたとされている（猪崎，1978）。この他にも丹波地方には数多くの在来品種が知られているが，それらの中でも江戸時代中期の宝暦年間（1751～1763年）に発見されたとされる‘銀寄’は古くから外観，品質が良好で豊産性であると評価されており（田中，1933），現在でも主要品種の一つとして栽培され，クリの栽培面積の15%程度を占めている。これら丹波地方の品種が全国に運ばれて，クリの栽培が広がったと推定されていたが（猪崎，1978），近年SSRマーカーを用いたstructure解析によって丹波地方の品種が各地の在来品種の基礎となっていることが確認された（Nishioら，2014）。明治以降，国内ではクリの経済栽培が盛んとなり，各地で主として偶発実生から選抜された品種の栽培が行われた。その後，昭和初期にかけて全国各地から収集した品種について，異名同種の識別や品種名の統一，優良品種の選抜を目的とした調査が大正2年に京都府農事試験場，昭和10年に農林省園芸試験場においてそれぞれ行われた（猪崎，1978；田中，1933）。これらの中で，‘豊多摩早生’，‘彼岸’，‘乙宗’，‘銀寄’，‘今北’，‘芳養玉’，‘霜被’，‘長兵衛’といった品種が優良品種として紹介されている。

日本におけるクリの交雑育種は，1930年代に神奈川県，新潟県，兵庫県等の農事試験場において始められた。これらの場所では，渋皮剥皮性の改良を目的として，ニホングリとチュウゴクグリおよびヨーロッパグリを交雑する種間雑種による育種が行われたが，これらの中から実際の普及に至る品種は育成されなかった（志村ら，1971）。国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門（以下，農研機構果樹茶部門）におけるクリの交雑育種は，果樹類の育種事業の一環として1947年から開始され，現在まで組織的に続けられている。開始当初の育種目標は，果実品質・外観および栽培性の優れた加工用・輸出用の早生・中生種の育成であったが，1941年に岡山県で発見されたクリタマバチが全国に蔓延して1950年代以降全国のクリ栽培に甚大な被害を与えるようになった結果，クリタマバチ抵抗性品種の育成を重点目標として選抜が行われるようになった（壽ら，1994；志村ら，1971）。このクリタマバチは，クリの新芽に虫えいを作り新芽の伸長を妨げるだけでなく，成虫が羽化脱出した虫えいの多くが枯死するため，多くの虫えいが形成されるとクリの樹体成長と結実が

著しく阻害される。加えて本種は雌個体のみで単為生殖を行うため、雌成虫が一匹でも侵入すれば新たな発生源となるだけでなく、休眠芽の時点では産卵被害の有無の確認が困難なため、加害されたクリの苗木や穂木の人為的な移動によって分布域の拡大が助長され、その結果急速に全国に分布を拡大した（守屋，2013）。本害虫に対しては薬剤による防除も行われたが、成虫が出現する初夏に限られた期間以外は休眠芽や虫えいの内部で過ごすために殺虫剤散布による防除は困難であった（守屋，2013）。しかし、壊滅状態となった既存品種の中から、‘豊多摩早生’，‘乙宗’，‘銀寄’，‘岸根’といった品種がクリタマバチに対して抵抗性を持つことが明らかとなり、これらを育種素材として交雑が行われた結果、1959年に‘伊吹’，‘丹沢’，‘筑波’，1968年に‘石鎚’が、それぞれクリタマバチ抵抗性品種として命名発表され、全国に普及した（志村ら，1971）。さらに1982年から、中国より導入した天敵であるチュウゴクオナガコバチ (*Torymus sinensis* Kamijo) の放飼によるクリタマバチの防除が試みられ、1986年頃から明らかにその被害が減少した（守屋，2013；Moriyaら，1989）。このため、1990年代以降、同様の天敵放飼事業が国内各地で計画的に行われ、その結果、本天敵が各地で定着したことでクリタマバチの被害が激減した。農研機構のクリ育種圃場においてもクリタマバチの被害がほとんど見られなくなったため、クリタマバチ抵抗性による実生選抜が実質的に不可能となった。このため、農研機構におけるクリの育種目標はクリタマバチ抵抗性の付与から果実品質の向上へと転換し、肉質や果肉色といった果実形質の改善に重点を置いて選抜が行われるようになった（Pereira-Lorenzoら，2012；正田ら，2002）。その中でも特に渋皮剥皮性の改良に重点を置いて交雑・選抜が行われた結果、本研究において紹介する‘ぼろたん’が2007年に、また‘ぼろすけ’が2016年にそれぞれ易渋皮剥皮性を持つ良食味品種として育成された（齋藤ら，2009，2017）。

農研機構における果樹育種においては、公立試験研究機関等と連携した品種開発が行われている。樹体の大きな果樹では、多くの交雑実生を育成するために広大な圃場が必要なだけでなく、育成までに10~20年の長い年月を要する。このような大規模な投資を生産者や都道府県立試験研究機関が行うことは難しく、特に数世代を要するような育種は非常に困難である。このため、国立機関である農研機構が育種への投資を行い、有望系統を一次選抜した後、都道府県の試験研究機関に穂木・苗木を提供して全国一斉の試作栽培試験である系統適応性検定試験を行う形式を採用している。この試

験により各系統の特性が解明され、全国的あるいは一定の地方において普及する可能性がある系統を最終選抜した後に農研機構が新品種として登録するという、二段階の選抜を行っている（山田，2016）。

果樹は植物体が大きいため多くの実生を用いた効率的な育種選抜が困難である（Iwata ら，2016）。育種効率を改善するためには、特定の形質に連鎖する DNA マーカーを用いた選抜（MAS）を行うことが有効である（Bliss，2010；Luby・Shaw，2001）。DNA マーカーにより推定される遺伝子型は植物体の成長段階に関わらず一定であるため、MAS は選抜圃場に定植する前の幼苗段階でも実施可能である（Foolad・Panthee，2012；Hospital，2009）。このため、幼苗段階で MAS を利用することにより実生の育成や表現型の判定にかかるコストを大幅に削減することができる（Bliss，2010；Collard・Mackill，2008；Edge-Garza ら，2010；Luby・Shaw，2001）。特に近年の技術革新によって、DNA 解析の費用が大幅に低下していることから、全ての交雑実生を選抜圃場に定植して結実まで栽培管理を行う従来の方法に比べて、MAS による早期選抜を行う方がコストの面から有利な状況となっている（Bliss，2010；Collard ら，2005；Edge-Garza ら，2010；Hospital，2009；Kumar，1999；Tester・Langridge，2010）。このため果樹育種においても、リンゴ（*Malus pumila* Mill.）の黒星病抵抗性（Tartarini ら，2000；Kellerhals ら，2011）および貯蔵性（Edge-Garza ら，2010）、オウトウ（*Prunus avim* L.）の自家和合性および果実重（Haldar ら，2010）、ニホンナシ（*Pyrus pyrifolia* Nakai）の黒星病抵抗性（Gonai ら，2009）および収穫期（Nishio ら，2016）、カキ（*Diospyros kaki* Thunb.）の甘渋性（Mitani ら，2014a，2014b）等、近年様々な樹種において MAS による実生選抜が行われている。クリにおいてもアメリカグリに対する胴枯病抵抗性の付与（Jacobs ら，2013）等において育種選抜に MAS が利用されている。一方、ヨーロッパにおいては、クリは食料生産だけでなく景観や木材生産のといった点でも重要であるため、DNA マーカー情報は遺伝的多様性や異名同種の解明といった集団遺伝学的な解析（Marinoni ら，2013；Martin ら，2010；Gobbin ら，2007）にも利用されている。標準連鎖地図の作成は、チュウゴクグリにおいて詳細な連鎖地図の報告（Kubisiak ら，2013）が行われている。ニホングリにおいては SSR マーカーの大規模開発（Nishio ら，2011c）が行われており、これらの情報を用いることでニホングリの育種選抜において MAS を行うことが可能となっている。このため、今後は目的の形質についての遺伝様式を解明し、その形質に連鎖する DNA マーカーを開発するこ

とが重要である。

日本国内のクリ生産は近年急激に減少しているが、その原因の一つとして渋皮の剥皮が困難であることが加工利用時の障害となっていることが挙げられる。そのため、易渋皮剥皮性品種の育成が農研機構におけるニホングリ育種の重要目標となっている。ニホングリの中に渋皮の剥皮が容易な品種が存在することは、今から 100 年以上前の複数の著作において記述されている（中岡，1915；八木岡，1915；田中，1933）。しかし、これらはいずれも有望品種の品種特性等における記述であり、渋皮剥皮性の難易の判定法やその程度といった具体的な情報については記載されていない。このため、これらの著作の中において渋皮の剥皮が容易であるとされている品種が、実際にどの程度剥皮性が優れるかどうかについては不明である。そこで、これらの著作の中で紹介された品種を始めとした遺伝資源について、その渋皮剥皮性を確認する必要がある。また、易渋皮剥皮性の付与を目標とした育種選抜を行う場合、選抜を行う多くの育種実生について渋皮剥皮性の評価を行う必要がある。そのためには渋皮剥皮性を安定して評価できる評価法が必要である。従来農研機構においては、クリ育種実生の渋皮剥皮性の評価には、甘栗焼成機を用いて作成した焼きグリを供試していた。しかし、この方法は焼きグリを作成に時間を要し、使用する機器も大型であることから、育種選抜や品種比較等への大規模な利用は困難であった。そこで、第 1 章では、焼きグリ法に代わる渋皮剥皮性の評価法として、揚げグリを用いた HOP 法（High-temperature Oil Peeling 法）について、その作成条件や評価法としての妥当性について検討を行った。

クリ筑波 36 号は、HOP 法の開発と同時期に開始されたクリ第 6 回系統適応性検定試験に供試された農研機構における選抜系統である。本系統はクリ第 6 回系統適応性検定試験の中でチュウゴクグリ並みの渋皮剥皮性を持つことが明らかとなり、2007 年に易渋皮剥皮性を持つニホングリ品種‘ぼろたん’として品種登録されるに至った（齋藤ら，2009；Fig. 1）。しかし、その易渋皮剥皮性の遺伝様式や由来は不明であったため、‘ぼろたん’に続く易渋皮剥皮性品種を計画的に育成することは困難であった。そこで第 2 章においては、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性の遺伝様式を明らかとするために、‘ぼろたん’とその親品種である‘丹沢’，難渋皮剥皮性の‘筑波’を用いた片側修正ダイアレルクロス交配を行い、それらの後代実生における渋皮剥皮性の分離から‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性の遺伝様式を明らかとし、その由来の推定を行った。

ニホングリ品種は一般に難渋皮剥皮性とされているが、難渋皮剥皮性のニホングリ品種間に渋皮剥皮性の品種間差異が存在することが過去の研究の中で示唆されている (Tanaka・Kotobuki, 1992) . しかし、その品種間差異が遺伝的要因あるいは環境的要因のいずれによるものかは明らかとなっていない。そこで第3章では、‘ぼろたん’以外の難渋皮剥皮性のニホングリ品種・系統間に渋皮剥皮性の遺伝変異が存在するかどうかを明らかにすることを目的に試験を行った。

‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性の遺伝様式が明らかとなったことから、その遺伝子を持つ品種・系統同士を交雑することで計画的な易渋皮剥皮性品種の育成が可能となった。しかし、そのような品種・系統は非常に限られており、これらの品種・系統間での交雑を続けた場合、近交弱勢による樹勢や収量の低下といった弊害が生じることが危惧される。このため、‘ぼろたん’およびその血縁品種以外のニホングリ品種・系統の中から、今後の育種に利用可能な渋皮剥皮性の良い品種・系統を明らかとする必要がある。そこで、第4章では今後の易渋皮剥皮性ニホングリ品種の育成に利用可能な遺伝子型を明らかにすることを目的として、ニホングリ 59 遺伝子型について渋皮剥皮性の評価を行い、易渋皮剥皮性を持つ遺伝子型の探索を行った。加えて見出された易渋皮剥皮性遺伝子型の渋皮剥皮性が‘ぼろたん’と同じ主働遺伝子によるものかどうかについて遺伝解析を行うとともに、易渋皮剥皮性遺伝子座周辺のハプロタイプ構造解析によりその遺伝子型と‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性遺伝子の由来について調査を行った。

これら一連の研究は、易渋皮剥皮性を持つニホングリ優良品種の育成により、国内のクリ栽培面積、生産量の減少を食い止め、国内クリ産業の活性化を図ることを目標として行った。

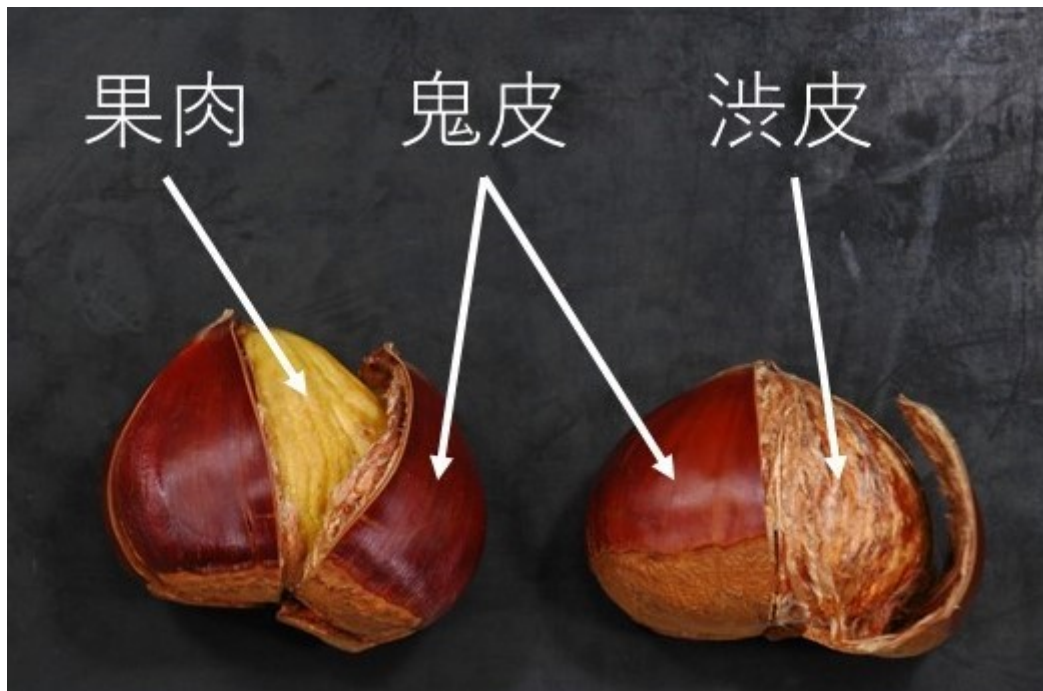


Fig. 1. クリの鬼皮，渋皮，および果肉

左：‘ぼろたん’，右：‘筑波’．いずれも鬼皮の中心線上にナイフで深さ約 3mm の傷を入れた後に，オーブントースターで 15 分間加熱処理した後の果実．

第1章 簡便な渋皮剥皮性の評価法(HOP法)の開発

緒言

ニホングリは、チュウゴクグリやヨーロッパグリと比べて渋皮の剥皮が難しく、これが加工利用の障害となり、消費を停滞させる要因ともなっている。農研機構のクリ育種において、ニホングリの渋皮剥皮性の改善は1947年の開始当初からの育種目標の一つであるが、従来の育種における渋皮剥皮性の評価には焼きグリを作成してその難易を判定していた。Tanakaら(1981)は、焼きグリの渋皮をナイフで剥皮するのに要した時間をスコア化したものと、生グリにおける渋皮の剥皮時間および生グリでの渋皮と果肉の接着力の強さとの間にそれぞれ正の相関があることから、焼きグリを用いることでクリの育種実生における渋皮剥皮性の評価が可能であることを示している。しかし、この焼きグリによる評価には一回当たり30分程度の加熱処理時間が必要である上に、使用する甘栗焼成機は大型で同時に複数の機器を使用することは難しい。また、焼成機中で小石と共に果実が攪拌される構造であるため、一度に複数の系統を評価する場合には果実表面にそれぞれ異なる目印を付ける等の煩雑な準備作業が必要であった。農研機構におけるクリ育種においては、毎年300~500個体の育種実生について形質の評価と選抜を行う必要があるため、すべての個体について焼きグリによる渋皮剥皮性の評価を行うことは難しかった。このため、渋皮剥皮性の改良を目的とした育種の場面において利用可能な、簡便で効率的な渋皮剥皮性の評価法が求められていた。

国内において一般にニホングリは、「煮る」または「蒸す」ことにより加熱した後には食されているが、茨城県のあるクリ栽培農家においては、食用油で揚げたいわゆる「揚げ」グリとして食べることもあり、この時渋皮が剥がれやすくなっているとのことである(私信)。そこで本章では焼きグリではなく、食用油中でクリを加熱して作成した揚げグリによる渋皮剥皮性の評価方法について検討を行った。

第1節. 生果における果実表面積と渋皮剥皮時間の関係

クリ果実の大きさは10g程度のチュウゴクグリから、30gを超えるニホングリ品種

‘国見’のように、種・品種によって大きく異なる。このため、果実表面積の大きさが渋皮剥皮性（剥皮に要する時間）に影響することが考えられる。そこで、果実表面積と渋皮の剥皮時間との関係について調査を行った。

材料および方法

ニホングリ品種‘森早生’，‘大峰’，‘国見’，チュウゴクグリ品種‘弓場 1 号’，‘傍士 360’，日中雑種である 68-6（‘傍士 360’×‘豊多摩早生’），筑波 31 号（68-6×‘林甘栗’），‘林 3 号’，む-8（‘傍士 480’×‘岸根’）の 6 品種、3 系統の収穫直後の果実 10 果ずつを用いて調査を行った。Tanaka ら（1981）の方法に従って、フルーツナイフを用いて果肉表面を傷つけることなく生果の渋皮を剥皮するのに要した時間を測定し、10 果の平均値を各品種・系統における生果の渋皮剥皮時間とした。また、果実表面積は果実赤道面中央部から剥離した渋皮 1cm²あたりの重量と果実全体から剥皮した渋皮の総重量の比率から各果実の表面積を算出し、10 果の平均値を各品種・系統の表面積とした。

結果および考察

生果における果実表面積と渋皮剥皮時間の関係を Table 1-1 および Fig. 1-1 に示した。果実表面積は、む-8 の 12.9 cm² から ‘国見’ の 40.5 cm² まで、1 果あたりの渋皮剥皮時間は ‘林 3 号’ の 2.6 分から ‘国見’ の 40.8 分までの範囲に分布した。果実表面積と渋皮剥皮時間の相関係数は 0.219 であり、これらに有意な相関は認められなかった。クリの渋皮剥皮性は、果実の大きさよりも果肉と渋皮の接着程度の影響を強く受けるものと考えられた。また、各品種における 1 果平均重は、ニホングリ品種である ‘森早生’ が 19.0g，‘大峰’ が 21.4g，‘国見’ が 38.4g，チュウゴクグリ品種である ‘弓場 1 号’ が 18.8g，‘傍士 360’ が 18.1g，日中雑種である 68-6 が 21.0g，筑波 31 号が 17.6g，‘林 3 号’ が 24.8g，む-8 が 18.7g と、果実重においても最大で 2 倍以上の差がみられた。そこで、以後の調査においては種、および品種・系統による果実の大きさの違いを考慮することなく渋皮剥皮性の調査を行うこととした。

第2節. 揚げグリを利用した渋皮剥皮法

従来、農研機構でのクリ育種における渋皮剥皮性の調査には、焼きグリを作成してその難易を判定していた。Tanaka ら (1981) は、焼きグリの渋皮をナイフで剥皮するのに要した時間をスコア化したものと、生果の渋皮剥皮時間および渋皮と果肉の接着力の強さとの間にそれぞれ正の相関があることから、焼きグリを用いることでクリの実生個体における渋皮剥皮性の難易を表すことができることを示している。しかし、この焼きグリによる渋皮剥皮性の評価は、加熱処理に長時間が必要であることに加えて煩雑な作業を伴うため、多数の系統を短時間で評価する必要のあるクリ育種の現場に適用することは難しかった。このため、クリ育種の現場に適用できる、効率的な渋皮剥皮法の開発が求められていた。

そこで、焼きグリではなく、食用油で揚げたいいわゆる揚げグリによる渋皮剥皮性の評価法について検討を行った。この揚げグリは、クリの加工法として一般的ではなかったが、近年インターネット上の料理レシピに記載されるようになっており 160°C前後の食用油中で 5~10 分程度揚げる等の条件で作成されている。これまでこの方法がクリ育種の現場で利用されてこなかった理由としては、天ぷら鍋等の中でクリを揚げる場合、クリ果実に含まれる水分が原因で油はねが起これり危険なことや油の温度を一定に保つために火力の調節を常時行う必要がある等の手間がかかるため、同時に複数の系統を処理することが難しいことが考えられる。近年、家庭用の電気調理器として卓上型電気フライヤー (Fig.1-2 ; 以下フライヤーとする) が T-fal 社等から販売されて一般家庭に普及している。本器は、蓋により密閉できる容器内で加熱した食用油中で食材を揚げる構造となっているため、加熱中の油はねの危険が少ない上に、サーモスタットによる制御により任意の油温を保つことができるため、油温の調節が簡単である。このため、従来よりも非常に省力的に揚げる処理を行うことが可能である。これらの点から、フライヤーを用いることで揚げグリを安全かつ簡便に作成することが可能となると考えられる。そこで、本節ではこのフライヤーを用いて揚げグリを作成する場合の作成条件について検討を行った。さらに、その渋皮剥皮性を焼きグリと比較することで、揚げグリを用いた渋皮剥皮法が農研機構におけるクリ育種の現場に適用可能かどうかについて検討を行った。

材料および方法

実験 1. 食用油中への浸漬時間および加熱処理時間の検討

鬼皮を除去したクリ果実を高温の食用油に浸漬して加熱処理する方法（以下、揚げグリ法とする）を用いた効率的な渋皮剥皮法を開発するため、最適な食用油中への浸漬時間および処理温度について検討を行った。ニホングリ品種‘国見’，チュウゴクグリ品種‘傍士 360’，および日中雑種とされる‘林甘栗’の収穫直後の果実 10 果を供試した。各品種について果実の鬼皮を除去した後，市販のフライヤー（JOYSTAR J230, T-fal）を用いて加熱した食用油中に果実を浸漬した。浸漬開始時の温度条件として 150, 170, および 190°C の 3 区について，それぞれ加熱時間 1, 2, 4, および 8 分の 4 区，合計 12 区の加熱条件および加熱を行わない区の合計 13 区を設定して試験を行った。加熱処理後の各果実を室温にて放冷した後，田中ら（1981）の方法に従ってフルーツナイフを用いて渋皮の剥皮に要する時間を測定した。

実験 2. 揚げグリを利用した渋皮剥皮法の従来法との比較

実験 1 で作成した揚げグリを用いることで生果および焼きグリと同等の渋皮剥皮性の評価が可能かどうかについて検討を行った。ニホングリ品種‘大峰’および‘国見’，チュウゴクグリ品種‘傍士 360’および‘傍士 377’，および日中雑種である‘林 3 号’，筑波 31 号，68-6，およびむ-8 の 5 品種 3 系統の収穫直後の果実を用いて試験を行った。各品種・系統につき，生果，焼きグリ，および揚げグリをそれぞれ 10 果ずつ作成して調査に用いた。

生果の渋皮剥皮性の調査には，鬼皮を除去した後の果実を用いた。焼きグリの渋皮剥皮性の調査には，甘栗焼成機中で加熱した小石と共に，水で希釈した水あめを適宜添加しながら 30 分間加熱処理した後，鬼皮を除去して作成した果実を用いた。揚げグリの渋皮剥皮性の調査には，鬼皮を除去した後 190°C の食用油中に 2 分間浸漬して作成した果実を用いた。各々の果実について，田中ら（1981）の方法に従ってフルーツナイフを用いて渋皮の剥皮を行い，それに要する時間を測定した。

結 果

実験 1. 食用油中への浸漬時間および加熱処理時間の検討

食用油中への浸漬時間および処理温度と渋皮剥皮時間との関係を Table 1-2 に示した。生果と 170℃で 2 分間加熱処理した場合の渋皮の剥皮時間を比較すると、‘国見’ではそれぞれ 1 果あたり 40.8 分および 7.2 分、‘傍士 360’では 5.2 分および 1.5 分となり、いずれの品種においても加熱処理を行うことで生果の場合よりも大幅に渋皮の剥皮時間が短縮された。また、浸漬時間が同じであれば、より高温で処理することにより渋皮の剥皮時間が短縮された。190℃で 2 分間の加熱処理を行った場合の渋皮の剥皮時間は、生果の場合と比較して‘国見’では 15.4%、‘傍士 360’では 10.5%、‘林甘栗’では 28.8%となった。一方、剥皮時間が最も長かったニホングリ品種‘国見’において、190℃、2 分以上加熱処理した場合においても大幅な渋皮の剥皮時間の短縮はみられなかった。このことから、短時間でより多くの品種・系統を加熱処理して渋皮剥皮性を評価するためには、190℃、2 分間以上の浸漬は不要であると考えられた。そこで、実験 2 における揚げグリの作成は食用油中での加熱処理を 190℃、2 分間浸漬の条件で行うこととした。

実験 2. 揚げグリを利用した渋皮剥皮法の従来法との比較

揚げグリと生果および焼きグリの渋皮剥皮時間を比較すると、調査に用いた 8 品種・系統における平均渋皮剥皮時間は、生果が 13.3 分、焼きグリが 11.2 分であったのに対し、揚げグリは 3.1 分であった (Table 1-3)。揚げグリと生果および焼きグリの渋皮剥皮時間の相関係数は、それぞれ 0.929 および 0.868 であり、いずれも 1%水準での有意な相関が認められた。

また、各品種・系統における焼きグリの渋皮剥皮時間は生果の 0.25~1.44 倍であったのに対し、揚げグリでは 0.11~0.74 倍となり、揚げグリを用いることで従来の焼きグリを用いた方法に比べ、より短時間での渋皮剥皮性の評価が可能であると考えられた。

考 察

日本国内のクリ生産量は 1979 年に 65,300t の最盛期を迎えた後は減少を続けており、2016 年現在では 16,500t となっている。その原因として、ニホングリの渋皮剥皮が難しく、加工過程で渋皮の除去に労力を要するためにコスト高となることから、安価な輸入剥きグリや渋皮剥皮が容易なチュウゴクグリが消費者や加工業者から選択されていることが考えられる（田中・壽，1992）。また、ニホングリの渋皮除去の際には、ナイフ等で果肉の表層とともに渋皮を削り取る方法が主に用いられているが、この方法では果肉の歩留まりが 50~52%と低くなることも加工品のコスト高につながっている（松本，1951）。このようなニホングリの難渋皮剥皮性を改善する方法として、剥皮方法の改良または交雑育種による品種改良が考えられる。

このうち、剥皮方法の改良については民間の食品会社を中心に機械化や薬剤処理等のいくつかの方法が開発されている。水酸化ナトリウム水溶液に浸漬する方法（佐藤，1979）、水蒸気の断熱膨張力を利用した方法（赤尾・塚田，1984；塚田・平山，1985；早川，2000）、加圧水を噴射して渋皮の剥皮を行う方法（宮崎ら，1998）等が開発され特許出願されている。しかし、これらの方法では渋皮を完全に除去することが困難であることや、果肉表層が渋皮側に付着するため綺麗に剥皮できず果肉の歩留まりが低くなるという欠点があった。一方、塩酸水溶液で処理した果実をマイクロ波処理する方法（磯松，1992）や、熱風を流動させながら加熱処理をすることによって剥皮を促進する方法（川本，2000）も開発されたが、特殊な設備や機械を必要とする上、長時間の加熱や薬品処理を要するといった欠点があり、いずれも実用的な方法としては十分ではなかった。

このため、交雑育種による渋皮剥皮性に優れるニホングリ新品種の育成が期待されてきたが、本試験の実施時点ではそのような品種の育成には至っていなかった。農研機構果樹茶業研究部門におけるクリ育種の現場では、年間 400 個体以上の交雑実生について特性を評価する必要があることから、渋皮剥皮性の評価法には簡便であることが求められる。しかし、従来の焼きグリによる評価方法は使用する装置が大きいため、複数系統を同時に処理することが難しかった。加えて一回の加熱処理に長時間を要するために、評価個体数は 1 日あたり最大で 20 個体程度に限られていた。このため選抜を行う育種実生すべてについて渋皮剥皮性の評価を行うことは困難であり、より

簡便な評価方法を開発する必要があった。そこで、本章ではクリ育種における簡便な渋皮剥皮性の評価方法を開発するため、高温の食用油でクリを加熱処理する方法について検討を行った。

ニホングリの難渋皮剥皮性については、渋皮における重合型フェノールの蓄積量においてニホングリとチュウゴクグリ間に大きな差が存在し、これがこれらの間の渋皮剥皮性の差に影響を与えていることが明らかとなっている。このため渋皮剥皮性の難易は、果実の大きさよりも種および品種による重合型フェノールの蓄積量によって左右されていることが示唆されている (Tanaka ら, 1981 ; 田中・壽, 1992) 。本研究においても、果実の表面積と渋皮剥皮性の関係に有意な相関が見られなかったことから、渋皮剥皮性を評価する際には果実の大きさを考慮する必要性は小さいものと考えられた。

次いで揚げグリ作成時の加熱時間および加熱温度について検討した結果、より高温で長時間加熱するほど渋皮剥皮時間が短縮されることを明らかとした。しかし、190°Cの条件下では2分以上加熱しても渋皮剥皮時間の短縮効果は小さく、多数の系統を短時間で処理・評価する必要がある育種選抜に利用する場合には、190°C、2分間の加熱処理で揚げグリを作成することが最も効率的であると考えられた。

揚げグリを利用した渋皮剥皮法の妥当性について検討するために、ニホングリ、チュウゴクグリおよびニホングリとチュウゴクグリの雑種を供試して、揚げグリと焼きグリおよび生果の渋皮剥皮時間を比較した。その結果、いずれの品種・系統についても、揚げグリを用いることで、より短時間で剥皮が可能となった。また、加熱処理の操作も焼きグリの作成と比べ簡便であることから、渋皮剥皮法として揚げグリを用いることが効率的であると判断された。

一方、揚げグリの渋皮剥皮時間をニホングリ、チュウゴクグリおよびニホングリとチュウゴクグリの雑種系統を比較した場合、チュウゴクグリおよびニホングリとチュウゴクグリの雑種系統の渋皮剥皮時間はニホングリよりも極端に短かった。この結果は田中ら (1981) が焼きグリを用いて行った結果と一致している。また、揚げグリと生果および揚げグリと焼きグリの渋皮剥皮時間の相関係数が 0.929, 0.868 とそれぞれ 1%水準で有意な相関が認められたことから、クリの渋皮剥皮性の評価方法として揚げグリを用いることが可能であることが明らかとなった。

本法によって渋皮の剥皮が促進される理由は加熱処理による急激な脱水によって乾

燥収縮率の異なる果肉と渋皮の剥離が起こるためと思われる。この点で揚げグリは油を使用するために小石を使用する焼きグリと比較して均一な加熱が可能であり、このことが渋皮剥皮性の向上につながっていると考えられた。

本実験に用いたフライヤーは、使用する油量が約 2L と少ないため、投入する果実量により油温の変化の差が大きくなる可能性がある。そこで投入する果実量と油温の関係を検討したところ、300g のクリ果実を 190°C に設定したフライヤーに投入した場合、油温は 2 分後に 168°C まで低下し、その 4 分後に 185°C まで上昇した。一方 150g のクリ果実を投入した場合には 1 分後に 178°C まで低下した後は、ほぼ 180°C で一定であった。このため油温の変化を品種・系統間で一定とするためには、投入するクリの重量あるいは体積を同じにする必要がある。しかし実際の育種試験においては 30g を超える大果系統が出現する一方で、10g 以下の小果系統も多数生じる。このような小果系統において大果系統と同量の果実を用いて比較を行うためには 30 果以上の果実が必要となり、少量のサンプルしか利用できない育種試験においては現実的ではない。また、10 果で約 300g と大果であり油温の変化が大きくなると予想される‘国見’においても、190°C において 2 分および 4 分の加熱処理で剥皮時間はそれぞれ 6.3 分、6.1 分とほとんど差が見られなかった (Table 1-2)。このため、190°C、2 分間の加熱処理で渋皮と果肉表面に十分な加熱がなされていると考えられる。従って本研究においては、果実の大きさに関わらず、いずれの品種・系統も 10 果の果実を用いることとした。

従来の渋皮剥皮性の評価に使用する焼きグリの作成時には、前述したとおり 30 分程度の時間が必要な点に加えて、小石と共にクリ果実を直火で加熱する構造上温度調節が非常に難しいという問題があった。特に、過熱状態となった場合はクリ果実が破裂して飛散し危険であるだけでなく、加熱中は適宜糖水溶液を加えてクリ果実の温度を下げる必要があるため、同時に複数の機械を使用して効率的に焼きグリを作成することが困難であった。また、糖水溶液を加えるタイミングは作成者の勘によるものであり、一定の温度を保って作成することは非常に困難であった。一方、本章において検討した評価法においては、その際に使用する揚げグリの作成時に電気調理器具である卓上型電気フライヤーを使用することとした。このフライヤーは、加熱時に蓋をして密閉できる構造となっているため、油跳ね等の危険が少なく、加えてサーモスタットにより自動で設定温度に調節を行うため油温を一定に保つことができる。このため、従来の焼きグリを使用した方法と比べて、一定の条件を保って渋皮剥皮性の評価に用

いる果実を作成することが可能であり、渋皮剥皮性の安定した評価が今後可能になると考えられた。また、使用する油量が約 2L と少なく機械も小型であることから、同時に複数の機械を用いての効率的な揚げグリの作成が可能であり、この点からも育種選抜への利用に適していると考えられた。現在の農研機構におけるクリ育種では、最大 3 台のフライヤーを同時に使用することで一日あたり 50 以上の実生個体について揚げグリの作成と渋皮剥皮性の評価を行っている。その結果、毎年 400 個体以上の育種実生について渋皮剥皮性の評価と選抜が可能となっており、実用的な育種実生の形質評価法の一つとして欠かせないものとなっている。

以上の結果から、食用油を利用したクリの渋皮剥皮法は加熱処理時間が短く、短時間に多数の系統の果実を処理することが可能であり、これによって作成した揚げグリの渋皮剥皮時間は生果および焼きグリの剥皮時間との相関も高いことから、本法は育種における渋皮剥皮法として有効であることが明らかとなった。そこで、食用油を利用した渋皮剥皮法を HOP (High-temperature Oil Peeling) 法と名付け、今後この方法を用いて渋皮剥皮性の品種および系統間差異を明らかにするとともに、クリ育種における渋皮剥皮性の評価方法として利用することとした。

Table 1-1. Surface area and peeling pellicle time of raw nut of chestnut.

Species	Cultivar	surface area (cm ²) ^z	peeling time (min/fruit) ^z
<i>Castanea crenata</i>	Kunimi	40.5±7.4	40.8±5.7
	Oomine	21.6±2.9	39.0±6.0
	Moriwase	16.9±1.6	29.7±5.6
<i>C. crenata</i> × <i>C. mollissima</i>	68-8	17.2±1.8	7.2±2.7
	Hayashi 3 gou	27.1±3.0	2.6±0.6
	Tsukuba 31 gou	34.1±5.0	4.7±0.7
	Mu-8	12.9±2.3	6.1±1.2
<i>C. mollissima</i>	Houji 360	32.2±3.9	3.8±0.5
	Yunba 1 gou	14.2±1.3	5.2±0.7

^zmean±SE (n=10)

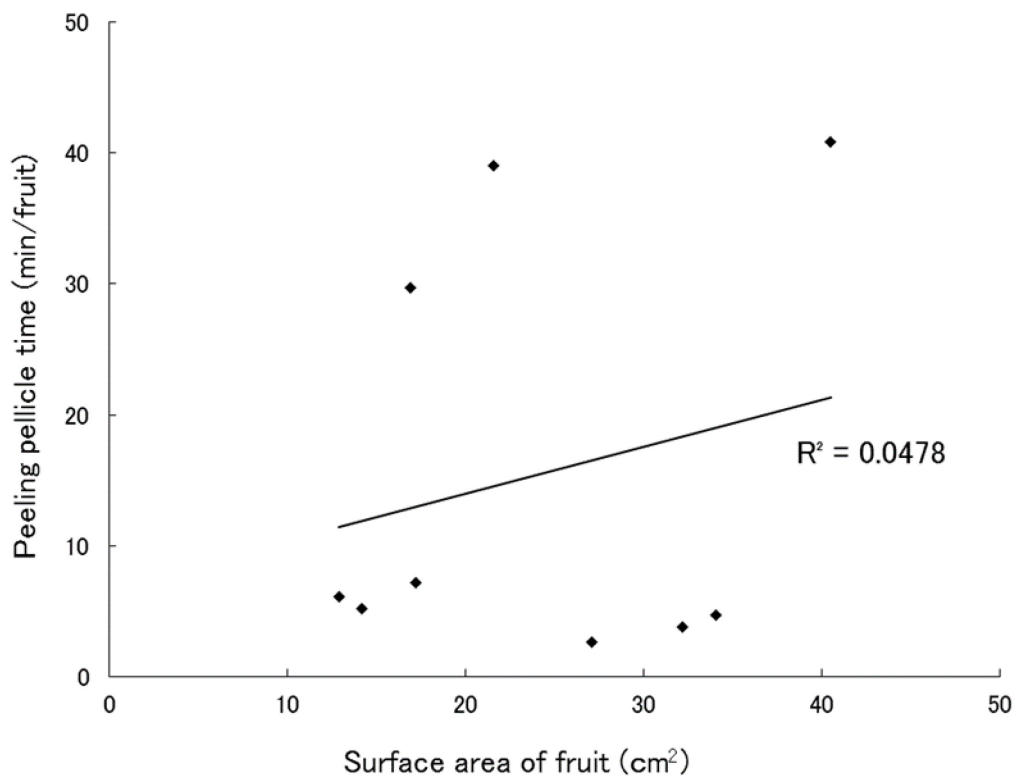


Fig. 1-1. Correlation between surface area and pellicle removal time of chestnut.



Fig. 1-2. The electric deep fryer. Left: JOYSTAR J230, (T-fal); Right: DF-535T, (Sun Co., Ltd.)

Table 1-2. Times required for pellicle removal using a paring knife after deep frying (min).

Cultivar	Oil temperature(°C)	Heating time (min) ^z				
		0	1	2	4	8
Kunimi	150		18.4 ± 5.1	15.2 ± 5.0	10.2 ± 1.5	5.9 ± 1.3
	170	40.8 ± 5.7	19.0 ± 3.1	7.2 ± 0.7	6.3 ± 0.6	6.7 ± 0.8
	190		9.9 ± 1.2	6.3 ± 0.8	6.1 ± 0.8	3.9 ± 0.9
Houji 360	150		4.6 ± 0.5	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.3
	170	3.8 ± 0.5	0.7 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.4
	190		0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Hayashi amaguri	150		2.9 ± 0.6	2.6 ± 0.6	2.7 ± 0.5	1.5 ± 0.4
	170	5.2 ± 0.5	2.8 ± 0.6	1.5 ± 0.5	0.2 ± 0.1	1.1 ± 0.4
	190		2.1 ± 0.4	1.5 ± 0.4	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.7

^zmean ± SE (n = 10)

Table 1-3. Times required for pellicle removal by using a paring knife on raw, roasted and fried nuts (min).

Species	Cultivar	Peeling time (min./fruit)			Roasted / Raw	Fried / Raw
		Raw	Roasted ^z	Fried ^y		
C. crenata	Kunimi	40.8 ± 5.7 ^x	10.4 ± 0.7	6.3 ± 0.8	0.25	0.15
	Oomine	39.0 ± 6.0	52.1 ± 28.2	9.3 ± 1.9	1.34	0.24
C. crenata	68-6	7.2 ± 2.7	7.1 ± 1.1	2.1 ± 0.5	0.99	0.29
	Hayashi 3 gou	2.6 ± 0.6	3.3 ± 0.8	0.9 ± 0.2	1.27	0.35
x C. mollissima	Tsukuba 31 gou	4.7 ± 0.7	5.8 ± 0.7	3.5 ± 0.6	1.23	0.74
	Mu-8	6.1 ± 1.2	8.8 ± 1.2	1.4 ± 0.5	1.44	0.23
C. mollissima	Houji 360	3.8 ± 0.5	1.7 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.45	0.11
	Houji 377	2.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.28	0.20

^zNuts were roasted in a chestnut roaster (containing heated small stones) for 30 min with occasional addition of syrup.

^yFried: Nuts were deep fried in canola oil for 2min at 190°C.

^xMean ± SE

第2章 クリ品種‘ぼろたん’における易渋皮剥皮性の遺伝様式

緒言

第1章において、クリの渋皮剥皮性の新しい評価方法である HOP 法を開発した。本法を用いて主要品種および育成系統の渋皮剥皮性の評価を行ったところ、育成系統の中に渋皮剥皮性が容易な系統が存在することが明らかとなった。この育成系統は、2006年に‘ぼろたん’として品種登録出願公表され、2007年に品種登録された（齋藤ら，2009；Fig. 2-1）。

一般にニホングリは果実が大きいものの、渋皮が剥けにくい（難渋皮剥皮性）という欠点があった（Millerら，1996）。チュウゴクグリは、非常に薄い渋皮を持ち、加熱によって簡単に剥皮できる（易渋皮剥皮性；Woodroof，1979）ため、焼きグリへの加工に向いている。またヨーロッパグリはその中に易渋皮剥皮性と難渋皮剥皮性の品種が存在し、渋皮の果肉部分への陥入の程度が渋皮剥皮性の難易に関連すると考えられている（Solarら，2005）。一方、ニホングリの難渋皮剥皮性は渋皮と果肉の接着に関与するポリフェノールがその要因となっていると考えられている（Tanaka・Kotobuki，1998a）。

このため、ニホングリにチュウゴクグリの持つ易渋皮剥皮性を付与することを目的として、ニホングリとチュウゴクグリの雑種による品種育成が1930年代からいくつかの農事試験場等において試みられてきた（志村ら，1971）。農研機構においても日中雑種を用いて渋皮剥皮性の遺伝について研究が行われ、易渋皮剥皮性を示す個体が発見する組み合わせの存在が示唆されたものの、各実生樹の受粉時にニホングリの花粉が受粉することにより渋皮剥皮性が悪化するキセニア現象により、各雑種個体の渋皮剥皮性を安定的に評価することは困難であることが明らかとなった（Tanaka・Kotobuki，1992）。また、チュウゴクグリの渋皮剥皮性の遺伝は単純ではなく、複数の微動遺伝子により制御される量的形質である可能性が高いとされている（壽，1994）。このため、ニホングリとチュウゴクグリの雑種を用いた易渋皮剥皮性個体の獲得は困難である。これまでチュウゴクグリ由来の渋皮剥皮性を持つニホングリ系統として、筑波31号（68-6 [‘傍士360’ × ‘豊多摩早生’] × ‘林甘栗’）および筑波37号（筑波31号 × ‘国見’）が系統適応性検定試験に供試されてその特性の検討

が行われたものの、いずれも果実の小ささや双子果率の高さが問題となり品種登録には至っていない（正田ら，2002；高田ら，2012）。このため、現在までのところチュウゴクグリ由来の易渋皮剥皮性を持つニホングリ品種は育成されていない。

‘ぼろたん’は、易渋皮剥皮性を持つという画期的な特徴が広く注目されている。その苗木販売は2007年秋季から開始されたが、その直後の2008年の統計（特産果樹生産動態等調査平成20年産）において熊本県と奈良県で栽培面積が見られるなど、果樹としては異例の速さで普及が進んでいる（齋藤ら，2016）。しかし、易渋皮剥皮性を持つニホングリ品種が‘ぼろたん’だけでは、渋皮の剥けやすいクリの収穫・出荷の期間が限られてしまう。このため、‘ぼろたん’並みの渋皮剥皮性を持ち、‘ぼろたん’とは異なる収穫期を持つ新品種の育成が望まれていることから、新たな易渋皮剥皮性を持つニホングリ新品種の育成を行っていくことが必要である。しかし、‘ぼろたん’が易渋皮剥皮性を持つことはその実生集団の選抜終了後に判明したため、その集団中に易渋皮剥皮性を持つ個体がどの程度含まれていたかについては不明であった。そこで、まず‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性の遺伝様式について明らかにすることが重要である。

これまで、ニホングリの主要品種においてチュウゴクグリと同程度の渋皮剥皮性を示すものは存在せず、ニホングリ品種は一般に渋皮剥皮の難しいものであるとされてきた。このため、‘ぼろたん’における易渋皮剥皮性の形質は、1つ以上の主要な劣性遺伝子によって制御されると考えられる。‘ぼろたん’は、‘丹沢’と‘丹沢’に由来する育成系統である550-40を交雑して得られた実生から選抜された（Fig. 2-2）ことから、‘丹沢’が易渋皮剥皮性を支配する劣性遺伝子を有するものと仮定して試験を行った。

本章における研究の目的は、（1）‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性の遺伝様式を解明し、（2）その形質を制御する遺伝子を持つ品種・系統を明らかにするとともに、その遺伝子の起源を明らかとすることである。このために、‘ぼろたん’を育成した交雑組み合わせ、および‘ぼろたん’，‘丹沢’および‘筑波’の片側修正ダイアレル交配により作成したF₁実生集団について、その渋皮剥皮性の難易の分離比を調査した。その結果から、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性の遺伝様式とその由来の推定を行った。

材料および方法

実験 1. ‘ぼろたん’，‘丹沢’，および‘筑波’とこれらの祖先品種の渋皮剥皮性の評価

‘ぼろたん’，‘丹沢’，および‘筑波’とこれらの祖先品種・系統である，550-40，290-5，‘森早生’，‘改良豊多摩’，‘国見’，‘乙宗’，‘大正早生’，‘石鎚’，‘岸根’，および‘芳養玉（はやだま）’（Table 2-1, Fig. 2-2）について，2004年に農研機構果樹茶部門のクリ圃場に植栽されている各品種・系統から収穫した果実を5℃で約2カ月間冷蔵貯蔵した後，各々10果を用いて渋皮剥皮性の評価を行った．鬼皮を除去した各果実を190℃の食用油中に2分間浸漬するHOP法により加熱処理し，室温に放冷後フルーツナイフを用いて渋皮剥皮性の評価を行った．果実の表面を削ることなく渋皮が剥皮できた果実を易渋皮剥皮性，剥皮時に果実表面の一部が渋皮とともに削られた果実を難渋皮剥皮性と評価した（Fig. 2-3）．

実験 2. ‘ぼろたん’と同一の交雑組み合わせである，550-40×‘丹沢’集団における渋皮剥皮性の分離

‘ぼろたん’は，1991年に550-40に‘丹沢’を交雑した実生集団から選抜・育成された（Fig. 2-2）が，当初はその大果性と良食味である点に注目して選抜された．また，選抜当初はHOP法の開発前であったため，この実生集団において渋皮剥皮性は調査されていない．そこで，この交雑組み合わせにおける渋皮剥皮性の分離を調査するため，2004年に再度550-40×‘丹沢’の交雑を行い，59個体からなる実生集団を作成した．これらの実生は，農研機構果樹茶部門のクリ育種圃場に定植して養成した．2010年にこの実生集団の各個体から収穫した果実について，5℃で約2ヶ月間貯蔵した後各々10果を用いて渋皮剥皮性の評価を行った．渋皮剥皮性の評価は実験1と同様の方法で行った．

実験 3. ‘ぼろたん’，‘丹沢’，および‘筑波’の片側修正ダイヤレル交配における渋皮剥皮性の分離

550-40×‘丹沢’の後代実生集団における渋皮剥皮性の分離の結果から推定された劣性の易渋皮剥皮性遺伝子について、‘ぼろたん’がその遺伝子をホモに、‘丹沢’がヘテロに持ち、これまでその後代から易渋皮剥皮性品種が出現していない‘筑波’が対立する優性遺伝子をホモにもつとそれぞれ仮定して、これら3品種による片側修正ダイアレル交配を2004年から2006年にかけて行った。交配によって獲得した実生は、農研機構果樹茶部門のクリ育種圃場に定植して養成した。

2010年に‘丹沢’×‘ぼろたん’39個体、‘丹沢’×‘筑波’20個体、‘筑波’×‘ぼろたん’40個体について、各個体から収穫した果実を5°Cで約2ヶ月貯蔵した後、に各々10果を用いて渋皮剥皮性の評価を行った。渋皮剥皮性の評価は実験1と同様の方法で行った。

結 果

実験1. ‘ぼろたん’，‘丹沢’，および‘筑波’とこれらの祖先品種の渋皮剥皮性の評価

各品種・系統の果実内に易渋皮剥皮性と難渋皮剥皮性の果実が混在することはなく、明確に渋皮剥皮性の難易を評価することが可能であった。渋皮剥皮性の評価の結果、‘丹沢’を含む‘ぼろたん’の祖先品種・系統のすべてが難渋皮剥皮性と評価された（Table 2-1）。‘筑波’およびその祖先品種である‘岸根’および‘芳養玉’も、いずれも難渋皮剥皮性と評価された。また、‘ぼろたん’は、易渋皮剥皮性と評価された。

これらの結果から、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性が劣性の主働遺伝子によって制御されていると仮定した場合、‘ぼろたん’の祖先品種・系統の中でこの遺伝子をホモにもつ品種・系統は存在しないものと推察された。

実験2. ‘ぼろたん’と同一の交雑組み合わせである、550-40×‘丹沢’集団における渋皮剥皮性の分離

550-40×‘丹沢’の後代実生集団における渋皮剥皮性の分離は、易渋皮剥皮性が12個体、難渋皮剥皮性が47個体に分離した。これを1:3に分離するとした仮説は、 χ^2 検定において5%水準で棄却されなかった（Table 2-2）。実験1において、550-40および‘丹沢’のいずれもが難渋皮剥皮性であることから、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性が劣性の主働遺伝子によるものと仮定した場合、550-40および‘丹沢’の両方がこの遺伝子をヘテロに有していることが推定された。

実験3. ‘ぼろたん’，‘丹沢’，および‘筑波’の片側修正ダイヤレル交配における渋皮剥皮性の分離

‘丹沢’×‘ぼろたん’の後代実生は易渋皮剥皮性が20個体、難渋皮剥皮性が19個体に分離した。これを1:1に分離するとした仮説は、 χ^2 検定において5%水準で棄却されなかった。また、‘丹沢’×‘筑波’および‘筑波’×‘ぼろたん’の後代実生はすべて難渋皮剥皮性と評価された（Table 2-2）。これらの結果は、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性遺伝子は劣性の主働遺伝子によって支配されており、‘ぼろたん’はこれをホモ、‘丹沢’および550-40はヘテロに持っているとした仮定に矛盾しなかった。また、‘筑波’はこの遺伝子を持たない優性ホモ型の遺伝子型を持つと推定された。

また、‘丹沢’および550-40の祖先品種・系統である290-5，‘森早生’，‘改良豊多摩’，‘国見’，‘乙宗’，‘大正早生’，‘石鎚’および‘岸根’は易剥皮性遺伝子を持っている可能性があると考えられた。

‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性が劣性の主働遺伝子によって支配されていることが明らかとなったことから、その遺伝子を持つと推定される‘ぼろたん’，‘丹沢’，および550-40を用いた交雑を行うことで、易渋皮剥皮性の個体を確実に得ることが可能であると考えられた。

考 察

チュウゴクグリ品種においては、いくつかの例外が報告されている（飯森・太田，1943；梶浦，1932）ものの、ニホングリ花粉を受粉した場合に渋皮剥皮が困難になる

ことが明らかとなっている（大崎・佐宗，1942）．しかし，‘ぼろたん’に他のニホングリ花粉を受粉した場合でもその渋皮剥皮は容易であり，‘ぼろたん’の渋皮剥皮性は花粉親の影響を受けにくいことが示唆されている（Takada ら，2010）．また，クリの渋皮と果肉の接着力は渋皮組織中のフェノール化合物量と相関があり，フェノール量の少ないチュウゴクグリは易渋皮剥皮性であるのに対し，多いニホングリは難渋皮剥皮性であることが明らかとなっている（Tanaka ら，1981）．一方，‘ぼろたん’は渋皮組織中にチュウゴクグリ品種よりも多くのフェノール化合物を蓄積していることが明らかとされている（Sato ら，2010）．これらから，‘ぼろたん’の渋皮剥皮性はチュウゴクグリとは異なる機構によって発現している可能性が考えられた．

本試験において，‘ぼろたん’の交雑両親である 550-40 と‘丹沢’の両方が易渋皮剥皮性遺伝子（ p 遺伝子）をヘテロに有することが推定された．550-40 の交雑両親は 290-5 と‘国見’であり，‘丹沢’の交雑両親は‘乙宗’と‘大正早生’である．これらの交雑両親のうち少なくとも片方は，易渋皮剥皮性遺伝子をヘテロにもつものと推定される．‘国見’は農研機構において‘丹沢’×‘石鎚’から育成された品種であることから，‘ぼろたん’の両親に共通する祖先品種は‘丹沢’であり，これが p 遺伝子をヘテロにもっていた可能性が考えられる．その場合，‘国見’も p 遺伝子をヘテロにもつものと考えられる．また，‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性遺伝子の起源は，‘丹沢’の両親である‘乙宗’または‘大正早生’のいずれかであると推定される．しかし，現在のところは 290-5 をはじめとした他の祖先品種・系統についても p 遺伝子を持つ可能性を否定できない．このため，‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性の起源については，今後さらなる研究が必要である．しかし，これまでの農研機構におけるクリ育種において，‘ぼろたん’の育成以前に易渋皮剥皮性のニホングリ品種・系統が見出されたことはないことから， p 遺伝子はニホングリの限られた在来品種が有していると考えられる．このため，‘ぼろたん’の祖先品種のうちで‘丹沢’およびその両親である‘乙宗’または‘大正早生’以外にも p 遺伝子が存在する可能性は小さいと思われた．

本研究の結果から，ニホングリ在来品種の中に p 遺伝子をヘテロにもつものが存在することが明らかとなった．在来品種の成立が品種間の無作為交配によるものであると仮定すると，劣性遺伝子の存在頻度が低い場合，交雑によって劣性形質が表現型に現れる確率は非常に低くなる．一方，‘ぼろたん’の系統図（Fig. 2-2）のように，

通常の果樹育種の場面では、限られた優良母本の中での交雑を重ねることが多くなるため、近親交配となることが多い。近親交配は樹勢や収量の低下（Sato ら, 2008; Yamada ら, 1994）といった問題を引き起こすことから、果樹育種の現場ではこれを避けるために遠縁交雑等の様々な工夫が行われている。しかし、‘ぼろたん’の育成においては、近親交配となった結果、劣性遺伝子がホモ化したために易渋皮剥皮性が表現型として現れたと考えられ、近親交配が育種上重要な役割を果たしたと言える。

今後、易渋皮剥皮性をもつニホングリ品種の育成を目指す場合、今回の試験において明らかとなった、*p* 遺伝子をもつ ‘ぼろたん’、‘丹沢’、および 550-40 を相互に交雑することで、その後代から確実に易渋皮剥皮性となる個体を獲得することが可能である。農研機構においては、本研究により易渋皮剥皮性の遺伝様式が明らかとなったことから、易渋皮剥皮性品種の育成を目的としてこれら 3 品種・系統を用いた相互交雑を行っている。また、2016 年に品種登録された ‘ぼろすけ’ は、今回の試験で使用した 550-40× ‘丹沢’ の後代実生の中から選抜された品種であり、今後も ‘ぼろたん’、‘丹沢’、および 550-40 の相互交雑から選抜された実生が易渋皮剥皮性のニホングリ新品種として品種登録されることが期待される。

先にも挙げた通り、一般に果樹育種においては近親交配によって樹勢や収量の低下が起きることが明らかとなっている。このため、これ以上の近親交配を避けるために、今後 ‘ぼろたん’ とは血縁の離れた在来品種や野生型個体の中から *p* 遺伝子をもつものを明らかにして交雑親に利用していくことが重要である。また、‘ぼろたん’ とその祖先品種以外に *p* 遺伝子をもつものが存在しないことも考えられるため、‘ぼろたん’ と由来の異なる在来品種との間で交雑を行い、*p* 遺伝子をヘテロに持つ複数の育種母本の育成を計画的に行っていくことも重要である。

主働遺伝子によって制御されている形質においては、比較的容易に連鎖する DNA マーカーを開発することが可能であり、イネの葉いもち病抵抗性を支配する *Piz* 遺伝子（Hayashi ら, 2004）、ニホンナシの黒星病抵抗性を支配する *Vnk* 遺伝子（Terakami ら, 2006）および黒斑病抵抗性を支配する *Ani*, *Ana* 遺伝子（Terakami ら, 2007）、リンゴのカラムナー性を支配する *Co* 遺伝子（Moriya ら, 2009）等にそれぞれ連鎖する DNA マーカーが開発され、実際の育種選抜に利用されている。本章においてその存在が明らかとなった *p* 遺伝子についても、同一の実生集団を利用して、*p* 遺伝子に連鎖する DNA マーカーが Nishio ら（2013）により開発されている。このマーカーを育種選抜に利用

することで、選抜圃場に定植する前の段階において各交雑実生が易渋皮剥皮性を有するかどうかを確認することが可能となる。このため、選抜圃場に易渋皮剥皮性の個体だけを定植できるようになることから、より効率的な育種選抜が可能になる。また、難渋皮剥皮性の個体を結実まで育成することもなくなるため、育種にかかるコストを大きく減らす効果も期待できる。また、これまでヨーロッパグリやアメリカグリにおいて、樹高や胴枯病抵抗性についてのマッピングが行われているが（Casasoli ら，2006；Kubisiak ら，1997；Kubisiak ら，2013），これらはいずれも量的形質であり，実用的な選抜マーカーの開発に至った形質はニホングリの渋皮剥皮性がクリ種において初めてのものである。この *p* 遺伝子に連鎖する DNA マーカーは既に農研機構における育種選抜に積極的に利用されており，今後易渋皮剥皮性を持つニホングリ品種の育成が加速化することが期待されている。このように，本試験はニホングリの易渋皮剥皮性におけるマーカー選抜育種の端緒となったものであり，その意義は大きい。



Fig. 2-1. Burr and nuts of 'Porotan'.

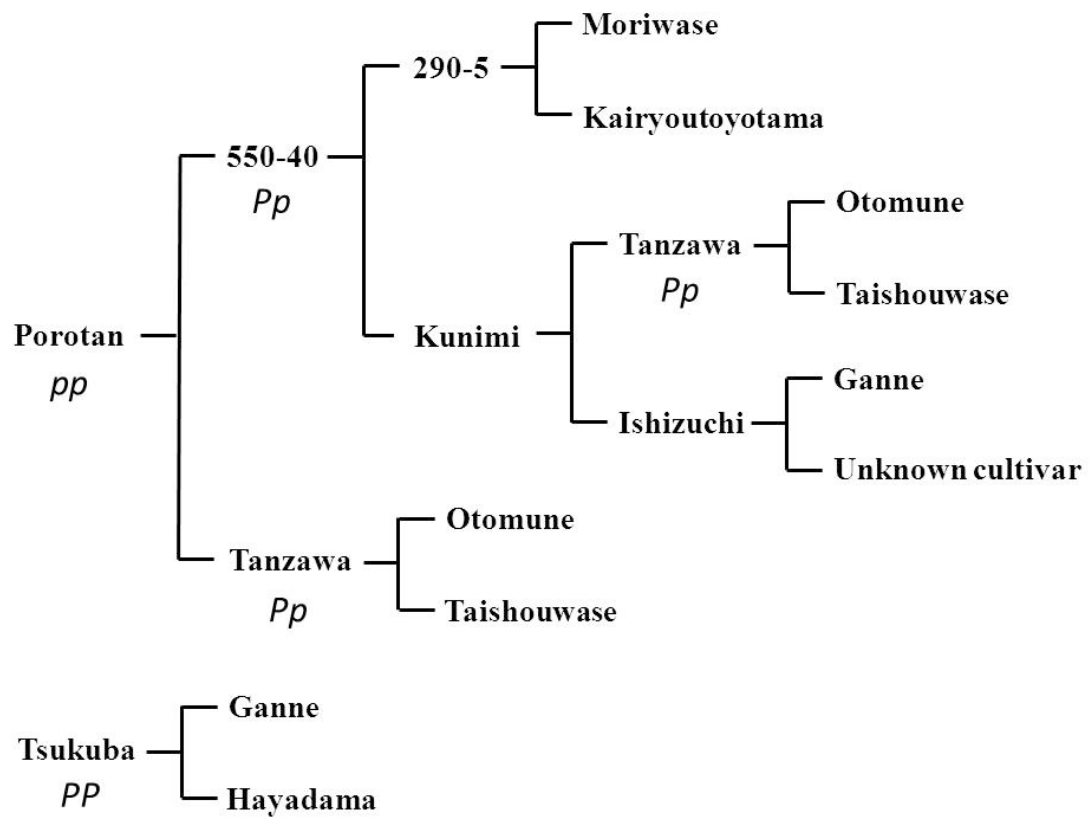


Fig. 2-2. The pedigrees of 'Porotan' and 'Tsukuba'.



Fig. 2-3. Peeled nuts of 'Porotan' (left) and 'Tsukuba' (right). 'Porotan' has a pellicle that can be easily peeled from the entire nut without scraping any part of the nut surface [easy-peeling pellicle (EPP)], but 'Tsukuba' cannot be peeled without scraping the nut surface [difficult-peeling pellicle (DPP)].

Table 2-1. Origin and pellicle peelability of ‘Porotan’, ‘Tsukuba’, and their ancestral cultivars and selections.

Cultivar/selection	Collection site (JP accession No.) ^z	Origin	Pellicle Peelability ^y
Ganne	NIFTS (113846)	Local cultivar of Japanese origin	DPP
Hayadama	NIFTS (113855)	Local cultivar of Japanese origin	DPP
Kairyoutoyotama	NIFTS (113865)	Local cultivar of Japanese origin	DPP
Moriwase	NIFTS (176784)	Local cultivar of Japanese origin	DPP
Otomune	NIFTS (173885)	Local cultivar of Japanese origin	DPP
Taishouwase	NIFTS (113897)	Local cultivar of Japanese origin	DPP
Ishizuchi	NIFTS (113862)	F ₁ of Ganne × unknown cultivar	DPP
Kunimi	NIFTS (176783)	F ₁ of Tanzawa × Ishizuchi	DPP
Porotan	NIFTS	F ₁ of 550-40 × Tanzawa	EPP
Tanzawa	NIFTS (113902)	F ₁ of Otomune × Taishouwase	DPP
Tsukuba	NIFTS (113909)	F ₁ of Hayadama × Ganne	DPP
290-5	NIFTS	F ₁ of Moriwase × Kairyoutoyotama	DPP
550-40	NIFTS	F ₁ of 290-5 × Kunimi	DPP

All the cultivars/selections are *C. crenata* Sieb. et Zucc.

^z Numbers indicated in parentheses are JP accession numbers from NARO GeneBank.

^y DPP (difficult-peeling pellicle): The pellicle cannot be completely removed without scraping the nut surface.

EPP (easy-peeling pellicle): The pellicle can be easily removed from the entire nut without scraping any part of the nut surface.

Table 2-2. Segregation of pellicle peelability in offspring of 550-40 × ‘Tanzawa’, and in modified half-diallel crosses among ‘Porotan’, ‘Tanzawa’, and ‘Tsukuba’.

Cross	n ^z	Pellicle Peelability ^y		Chi-square (χ^2) tests of segregation ratios			
		EPP	DPP	1:1		1:3	
				χ^2	<i>P</i> value	χ^2	<i>P</i> value
550-40 × Tanzawa	59	12	47	20.76	< 0.01	0.68	0.41
Tanzawa × Porotan	39	20	19	0.03	0.87	14.37	< 0.01
Tanzawa × Tsukuba	20	0	20				
Tsukuba × Porotan	40	0	40				

^z Number of seedlings evaluated.

^y EPP (easy-peeling pellicle): The pellicle can be easily removed from the entire nut without scraping any part of the nut surface.

DPP (difficult-peeling pellicle): The pellicle cannot be completely removed without scraping the nut surface.

第3章 難渋皮剥皮性ニホングリ品種・系統間における渋皮剥皮性の遺伝変異の存在

緒言

第2章において‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性は単一の劣性主働遺伝子によって制御されていることを明らかとしたが、その後の研究でこの遺伝子座に連鎖するDNAマーカーも開発されている(Nishioら, 2013)。これらの結果から、農研機構におけるクリ育種において、易渋皮剥皮性のニホングリ品種の育成を効率的に行うことが可能となった。しかし、‘ぼろたん’の持つ易渋皮剥皮性遺伝子をもつ遺伝子型は限られており、これらだけを交雑に用い続けると近親交配が進む恐れがある。クリを含む果樹育種においては、果実品質の向上等を追求して限られた優良品種・系統を繰り返し交雑に用いた結果、近親交配となり樹勢や収量性が低下することが、ニホンナシ(Satoら, 2008)やカキ(Yamadaら, 1994)において報告されている。そこで、今後のニホングリ育種において近親交配の弊害を避けるためには、‘ぼろたん’やその祖先品種以外の中から易渋皮剥皮性育種に利用可能な遺伝子型を明らかにする必要がある。

育種選抜においては広義の遺伝率(h_B^2)がその選抜の有効性の指標として用いられている。表現型分散を σ_p^2 、遺伝分散を σ_g^2 、環境分散を σ_e^2 とすると、表現型分散は遺伝分散と環境分散の和($\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2$)で表され、広義の遺伝率は遺伝分散の表現型分散に対する比率である $h_B^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_e^2)$ により求められる。この広義の遺伝率が低い場合、育種選抜の効率が悪いため、より優れた遺伝子型の個体を選抜することは難しくなる。このため、正確な環境分散の推定が重要である。果樹における環境分散は、年による分散、樹による分散、遺伝子型と年の交互作用の分散、樹と年の交互作用の分散、樹内の果実間分散に分けられる(山田, 2011)。これらは複数の品種および樹の表現型を数年間反復して計測することで推定される(Hanschke・Beres, 1966; Hanschke・Brooks, 1965; Satoら, 2000; Yamadaら, 1993, 2002)。果樹においては、オウトウ(Hanschke・Beres, 1966)、カキ(Yamadaら, 1993)、グアバ(*Psidium guajava* L.)(Thaipong・Boonprakob, 2005)、ニホンナシ(Nishioら, 2011a)、ブドウ(*Vitis* spp.)(Satoら, 2000)、およびモモ(*Prunus persia* Batsch)(de Souzaら, 1998)等数多くの樹種において遺伝分散と環境分散の推定が行われている。

ニホングリ品種は一般に難渋皮剥皮性とされているが、難渋皮剥皮性のニホングリ品種間やニホングリ野生個体間に渋皮剥皮性の品種間差異が存在することが過去の研究の中で示唆されている（Inoueら，2008；高田ら，2012；Tanaka・Kotobuki，1992）。しかし，その結果は樹や年次の反復を伴わない調査によるものであり，その品種間差異が遺伝的要因あるいは環境的要因のいずれによるものかは明らかとなっていない。このため，難渋皮剥皮性のニホングリにおいて，渋皮剥皮性に遺伝変異が存在するかどうかは不明であった。そこで本章では，‘ぼろたん’以外の難渋皮剥皮性のニホングリ品種・系統間に渋皮剥皮性の遺伝変異が存在するかどうかを明らかにすることを目的に試験を行った。また，遺伝変異が存在する場合，その広義の遺伝率についても推定を行った。

材料および方法

本章の試験には，Table3-1に示した18のニホングリ品種，15のニホングリ選抜系統，および1つの野生型個体からなる34の遺伝子型を使用した。

実験1 5品種・2樹・1場所・2年間評価による難渋皮剥皮性品種間の遺伝変異

農研機構果樹茶業研究部門のクリ圃場で栽培された，難渋皮剥皮性のニホングリ5品種（‘市エ門’，‘石鎚’，‘紫峰’，‘丹沢’，および‘筑波’）各2樹について，2011年および2012年の2年間，渋皮剥皮性の調査を行った。各品種の樹齢は2011年において9から12年生であり，いずれも成木であった。各品種ともに年間を通しての薬剤散布と地表面管理，および冬季の剪定等の標準的な栽培管理を行った。収穫期に裂開した毬から果実を収穫し，5℃で1ヶ月間貯蔵した後，各樹につき10果を無作為に選んで渋皮剥皮性の評価に用いた。

果実の鬼皮を除去した後，HOP法により190℃の食用油中で2分間の加熱処理を行った。処理後の果実を室温にて放冷した後，フルーツナイフを用いて果肉表面を傷つけないよう渋皮の剥皮を行った。渋皮剥皮性は，果肉表面を傷付けることなく綺麗に剥皮できた面積が果実の表面積に占める割合を目視で評価し，渋皮剥皮率として“0%”（0%），“5%”（0～10%），“15%”（10～20%），“25%”（20～30%）・・・，“95%”

(90~100%) の 11 段階で評価を行った。10 果の渋皮剥皮率の平均値を平均渋皮剥皮率 (APR) として各樹における渋皮剥皮性の代表値とした。

統計処理を行う前に、誤差が正規分布に従うよう各樹の APR 値を逆正弦変換し (Snedecor・Cochran, 1972), Kolmogorov-Smirnov の一試料法により正規性の検定を行った (Campbell, 1974)。その結果、正規分布と有意に異ならなかったことから、変換値を二元配置分散分析により解析した。

分散分析のモデルは以下に示す通りである。

$$P_{ijkl} = \mu_1 + g_{1i} + y_{1k} + t_{1ij} + (gy_1)_{ik} + e_{1ijkl}$$

P_{ijkl} は i 番目の遺伝子型の j 番目の樹の k 年目の APR 値, μ_1 は定数, g_{1i} は i 番目の遺伝子型の効果, y_{1k} は k 番目の年の効果, t_{1ij} は i 番目の遺伝子型における j 番目の樹の効果, $(gy_1)_{ik}$ は i 番目の遺伝子型と k 番目の年の交互作用, e_{1ijkl} は i 番目の遺伝子型の j 番目の樹の k 年目における l 番目の果実の誤差を示す。分散分析により、遺伝子型の分散 (σ_{g1}^2), 樹の分散 (σ_{t1}^2), 年の分散 (σ_{y1}^2), 遺伝子型と年の交互作用の分散 (σ_{gy1}^2), および残差の分散 (σ_{e1}^2) を推定した。

実験 2 5 つの異なる場所で栽培された 3 品種を用いた難渋皮剥皮性品種間の遺伝変異

茨城県園芸研究センター (茨城県笠間市), 埼玉県農業研究センター (埼玉県久喜市), 岐阜県中山間農業試験場中津川支所 (岐阜県中津川市), 熊本県農業研究センター園芸研究所 (熊本県宇城市), および農研機構果樹茶業研究部門 (茨城県つくば市) においてそれぞれ栽培された, ‘石鎚’, ‘国見’, および ‘丹沢’ の 3 品種各 1 樹について 2011 年に渋皮剥皮性の調査を行った。調査時の樹齢は 11 年生または 12 年生で、いずれも成木であった。

実験 1 と同様に、収穫期に裂開した毬から果実を収穫し 5°C で 1 ヶ月間貯蔵した後、各品種および場所につき無作為に選んだ 10 個の果実を用いて渋皮剥皮性の調査を行った。統計処理を行う前に、実験 1 と同様に APR 値を逆正弦変換し、Kolmogorov-Smirnov の一試料法により正規性の検定を行った結果、正規分布と有意に異なることを確認した後、二元配置分散分析により解析を行った。分散分析のモデルは以下の

通りである。

$$P_{2im} = \mu_2 + g_{2i} + L_{2m} + e_{2im}$$

P_{2im} は i 番目の遺伝子型の m 番目の場所の APR 値, μ_2 は定数, g_{2i} は i 番目の遺伝子型の効果, L_{2m} は m 番目の場所の効果, e_{2im} は i 番目の遺伝子型の m 番目の場所の誤差を示す. 分散分析により, 遺伝子型の分散 ($\sigma_{g_2}^2$), 場所の分散 ($\sigma_{L_2}^2$), および残差の分散 ($\sigma_{e_2}^2$) を推定した.

実験 3 32 品種・系統および 1 野生型における, 1 樹, 3 年間評価による渋皮剥皮性の遺伝変異

農研機構果樹茶業研究部門のクリ圃場において栽培された, ニホングリ 17 品種, 15 選抜系統, および 1 野生型からなる 33 遺伝子型について, 2003 年から 2005 年の 3 年間渋皮剥皮性の評価を行った. 調査樹の 2003 年時における樹齢は 12 年生から 26 年生の範囲で, いずれも成木であった.

実験 1 と同様に, 収穫期に裂開した毬から果実を収穫し 5°C で 1 ヶ月間貯蔵した後, 各品種および場所につき無作為に選んだ 10 個の果実を用いて渋皮剥皮性の調査を行った. 統計処理を行う前に, 実験 1 と同様に APR 値を逆正弦変換し, Kolmogorov-Smirnov の一試料法により正規性の検定を行った結果, 正規分布と有意に異なることを確認した後, 二元配置分散分析により解析を行った. 分散分析のモデルは以下の通りである.

$$P_{3ik} = \mu_3 + g_{3i} + y_{3k} + e_{3ik}$$

P_{3ik} は i 番目の遺伝子型の k 年目の APR 値, μ_3 は定数, g_{3i} は i 番目の遺伝子型の効果, y_{3k} は k 番目の年の効果, e_{3ik} は i 番目の遺伝子型の k 年目の誤差を示す. 分散分析により, 遺伝子型の分散 ($\sigma_{g_3}^2$), 年の分散 ($\sigma_{y_3}^2$), および残差の分散 ($\sigma_{e_3}^2$) を推定した.

結 果

実験 1 5 品種・2 樹・1 場所・2 年間評価による難渋皮剥皮性品種間の遺伝変異

分散分析の結果、品種（遺伝子型）の効果は1%水準で有意であり、調査に用いた5品種の間に渋皮剥皮性の遺伝変異が存在することが示唆された。年の効果、遺伝子型と年の交互作用、および遺伝子型内の樹の効果はいずれも有意ではなかった（Table 3-2）。

各品種のAPR値は、‘筑波’23.2%、‘市工門’28.3%、‘石鎚’32.1%、‘紫峰’39.6%、および‘丹沢’50.5%であり、品種間でAPR値に2倍以上の差が見られた。分散成分は、 $\sigma_{g1}^2=108.52$ 、 $\sigma_{y1}^2=4.81$ 、 $\sigma_{gy1}^2=-2.35$ 、 $\sigma_{t1}^2=5.86$ 、 $\sigma_{e1}^2=13.19$ と推定された。 σ_{y1}^2 は負の値となったため、Yamadaら（1995）に従い0と仮定した。このため、全分散（ σ_{T1}^2 ）は132.38と推定された。このため、各分散成分の全分散（ σ_{T1}^2 ）に対する割合は、遺伝子型分散（ σ_{g1}^2 ）が82.0%、年の分散（ σ_{y1}^2 ）が3.6%、樹の分散（ σ_{t1}^2 ）が4.4%、残差分散（ σ_{e1}^2 ）が10.0%であった。これらの結果から、実験1に用いた5品種の間に渋皮剥皮性の遺伝変異が存在することが強く示唆された。

実験2 5つの異なる場所で栽培された3品種を用いた難渋皮剥皮性品種間の遺伝変異

分散分析の結果、遺伝子型および場所の効果はいずれも5%水準で有意であった（Table 3-3）。分散成分は、 $\sigma_{g2}^2=58.10$ （全分散の29.9%）、 $\sigma_{L2}^2=74.67$ （全分散の38.5%）、 $\sigma_{e2}^2=61.31$ （全分散の31.6%）と推定され、全分散は $\sigma_{T2}^2=194.08$ であった。これらの結果から、実験2に用いた3品種の間においても、渋皮剥皮性の遺伝変異が存在することが示唆された。

実験3 32品種・系統および1野生型における、1樹、3年間評価による渋皮剥皮性の遺伝変異

分散分析の結果、遺伝子型間において1%水準で有意な差が見られた（Table 3-4）。分散成分の推定値は、 $\sigma_{g3}^2=53.37$ 、 $\sigma_{y3}^2=-1.59$ 、 $\sigma_{e3}^2=80.62$ であり、 σ_{y3}^2 は負の値であったため0と仮定すると、全分散は $\sigma_{T3}^2=134.00$ と推定された。したがって、遺伝子型分散（ σ_{g3}^2 ）は全分散の39.8%を、残差は全分散の60.2%を占めていた。

この実験は、各遺伝子型について樹の反復を設けずに行ったため、g3には遺伝子型の効果に加えて遺伝子型内の樹の効果が含まれている。本実験における遺伝子型内における樹の分散は推定できないものの、実験1において樹の分散 (σ_{t1}^2) が 5.86 と遺伝子型分散 ($\sigma_{g3}^2 = 53.37$) と比較して非常に小さかったことから、実験3においても遺伝子型内の樹の分散は無視できると仮定した。そこで、遺伝子型内の樹の分散は無視した場合の3年間の評価に基づく渋皮剥皮性の広義の遺伝率は、 $\sigma_{g3}^2 / (\sigma_{g3}^2 + [\sigma_{e3}^2 / 3])$ より 0.67 と推定された。

33 遺伝子型における3年間の平均 APR 値を逆正弦変換した値について、95%信頼区間を計算し、その値を元の平均 APR 値に逆変換したものを Fig. 3-1 に示した。3年間の平均 APR 値は、13.7% (平塚 24 号) から 70.0% (シバグリ-37) にかけて連続的に分布していた。33 遺伝子型の平均 APR 値の平均は 41.4% であり、‘オータムコロン’と同程度であった。また、平塚 16 号 (平均 APR 値 = 41.5%) と平塚 17 号 (28.9%) の平均 APR 値は、これらの交雑両親である‘丹沢’ (54.4%) および‘伊吹’ (28.1%) の中間であった。一方、平塚 15 号 (17.4%) の平均 APR 値は、その交雑両親である‘筑波’ (32.4%) と‘伊吹’のいずれよりも低く、同様に平塚 19 号 (28.9%) と平塚 23 号 (23.9%) もこれらの交雑両親である‘筑波’ および‘石鎚’ (46.6%) よりも低い値となった。

考 察

ニホングリとチュウゴクグリの種間雑種およびその後代にチュウゴクグリを受粉した場合、多くの場合その渋皮剥皮は容易であるが、ニホングリを受粉すると剥皮が困難になるメタキセニア現象が存在することが明らかとなっている (Tanaka・Kotobuki, 1992)。また、クリは主に風媒によって受粉し、その花粉は 100m 以上飛散するが、結実した果実の 6 割程度は 25m 以内にその花粉親が存在することが明らかとなっている (Hasegawa ら, 2009)。本章における実験1および実験3に使用した樹は、農研機構内のクリ圃場に植えられている樹から無作為に選択しており、各樹の 25m 周囲には 10 以上の異なる品種が植栽されていることから、特定の花粉親が渋皮剥皮性に影響を与えている可能性は小さい。また、もしメタキセニアが生じているとしてもその効果の大部分は残差効果に含まれていると考えられる。

試験設計の異なる実験 1, 2, および 3 の全てにおいて、難渋皮剥皮性のニホングリ品種間において渋皮剥皮性に有意な遺伝変異の存在が確認された。このことから、難渋皮剥皮性のニホングリ品種間に渋皮剥皮性の遺伝変異が存在することが強く示唆された。実験 1 においては、遺伝子型分散 (σ_{g1}^2) は 108.52 と非常に大きく、全分散の 82.0% を占めており、試験に用いた 5 品種の間に大きな遺伝変異が存在することが示唆された。一方、実験 2 においては、遺伝子型分散 (σ_{g2}^2) は 58.10 と実験 1 における遺伝子型分散 (σ_{g1}^2) よりも小さく、その全分散中に占める割合も 29.9% と小さかった。この相違は実験に使用した品種の違いによるものと考えられる。このため、実験 1 は品種間における有意な遺伝変異を検出できるだけの年、樹、および果実の十分な反復を持っていたと考えられた。一方、実験 2 は試験場所内での樹の反復を取っていないため、場所の効果 (L2) は真の場所の効果と真の樹の効果の合計からなっている。従って実験 2 においても遺伝子型の効果 (g2) は樹の効果とは独立している。実験 2 において渋皮剥皮性に大きな場所の効果がみられたことから、渋皮剥皮性に対して栽培地の気候が影響を与えることが示唆された。また、各場所での栽培管理の違いや調査樹周囲の受粉樹の違いが、場所の効果が大きくなった原因となった要因の一つと考えられた。

実験 3 では、渋皮剥皮性に大きな環境変異が存在し、使用した 33 遺伝子型における遺伝子型分散 (σ_{g3}^2) は全分散中の 39.8% となり、実験 1 に比べてその割合は低かった。このため、この試験における 1 年、1 樹、10 果調査に基づく広義の遺伝率は 0.40 となった。しかし、3 年間の年次反復をとることで広義の遺伝率は 0.67 まで上昇した。このことは、単年の試験により難渋皮剥皮性のニホングリにおける渋皮剥皮性の遺伝変異を把握することは、その環境変異が大きいため容易ではないことを示唆している。

Fig.3-1 に示された通り、難渋皮剥皮性のニホングリ遺伝子型における渋皮剥皮性は連続的な変化を示したことから、難渋皮剥皮性ニホングリの渋皮剥皮性は複数遺伝子による制御を受ける形質であることが示唆された。このことは、平塚 16 号の平均 APR 値が交雑両親の中間の値であるのに対して、平塚 15 号、平塚 19 号、および平塚 23 号がいずれも交雑両親よりも低い値であったことから示唆された。以上のことから、これら難渋皮剥皮性ニホングリの渋皮のむけやすさを制御する遺伝子群は‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性を支配する劣性主働遺伝子とは異なるものと考えられた。

実験 1 および 3 において、HOP 法による渋皮剥皮性の評価における年の効果が非常に小さかったことから、複数の調査年次にまたがった渋皮剥皮性の調査結果についても年次の補正を行うことなく統計遺伝学的解析が可能であることが明らかとなった (Yamada ら, 1995) . 複数年にわたる調査結果を直接比較できることが明らかとなったことから、今後渋皮剥皮性の調査をより効率的に行うことが可能になると考えられた。

ニホングリは、北海道南部から九州南部にかけてと朝鮮半島南部に広く自生するシバグリがその基本種であるとされている (Kotobuki, 1994) . 本研究において最も高い APR 値を示したシバグリ 37 は、試験に使用した唯一の野生型個体であるが、これは野生型個体を代表するものとして試験に使用した訳ではない。Inoue らは 2008 年の報告において、シバグリ個体間においても渋皮剥皮性に品種個体間差が存在することを示唆していることから、今後シバグリ等の野生型個体を含む遺伝資源についてより広く渋皮剥皮性の調査を行い、より渋皮の剥けやすい遺伝子型を探索することが重要である。‘ぼろたん’の APR 値は 90%以上であり、一方難渋皮剥皮性ニホングリ遺伝子型の APR 値はいずれも 75%未満である。現在のところ難渋皮剥皮性のニホングリにおける渋皮剥皮性を支配する遺伝子群の遺伝様式については不明であるが、それらが相加効果による複数遺伝子によって制御されている場合、これらの遺伝子を集積することでより渋皮の剥けやすい個体の獲得が期待できる。

一般に、果樹をはじめとするヘテロ性の高い永年性作物の育種においては、より大きな果実や良い食味を持つ個体の獲得を目的として、限られた遺伝資源を用いた交雑を繰り返した結果、近親交配となり樹勢の低下等の悪影響が生じる可能性がある

(Yamada ら, 2012) . クリ育種においても、今後‘ぼろたん’およびその血縁品種を繰り返し交雑に用いることで近親交配となる危険性が指摘されている (Nishio ら, 2013) . 本試験においてその存在が示唆された、難渋皮剥皮性ニホングリにおける渋皮の剥けやすさを支配する遺伝子群は、今後の易渋皮剥皮性ニホングリの育種を行う際に、近親交配となりやすい‘ぼろたん’の持つ劣性主働遺伝子の利用に代わる選択肢となる可能性を持っている。このような微動遺伝子の集積を目的とした育種においては、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) のハスモンヨトウ抵抗性 (Komatsu ら, 2010) , ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) のジャガイモシストセンチュウ抵抗性 (Felcher・Douches, 2012) やトウモロコシ (*Zea mays* L.) の耐湿性 (Mano ら,

2016) 等において DNA マーカーによる選抜が行われている。しかし、量的形質遺伝子座のマッピングに関してこれまで非常に多くの研究が行われているのに対して、実際に量的形質遺伝子座に連鎖する DNA マーカーを用いた育種選抜についての報告は非常に少ない (Giora・Lavi, 2012)。これは量的形質のマーカー選抜は主働遺伝子に支配されている形質に比べて数倍～数十倍の個体について遺伝子型の評価が必要となるため、現在のシーケンス技術のレベルではコスト面から導入が難しいためと考えられた。本章で明らかとなった難渋皮剥皮性ニホングリの渋皮剥皮性に関連する量的形質遺伝子についても、今後実際の育種に利用するためには、その遺伝解析や連鎖マーカーの開発等を行うとともに、今後のシーケンス技術のさらなる向上と低コスト化が必要である。

Table3-1. List of the 34 Japanese chestnut genotypes used in our experiments.

Cultivar or selection	Eخت.			Type	JP accession No. ^z	Origin
	1	2	3			
‘Akachiu’				o local cultivar	113830	Ehime pref.
‘Ichiemon’	o			o local cultivar	113859	Kyoto pref.
‘Imakita’				o local cultivar	113860	Hyogo pref.
‘Kinseki’				o local cultivar	113872	Hyogo pref.
‘Shougatsu’				o local cultivar	113896	Kyoto pref.
‘Tanoue 1 gou’				o local cultivar	113899	Kumamoto pref.
‘Togenashi’				o local cultivar	113904	Yamagata pref.
‘Autumn koron’				o cv. developed in the 20th C	118561	Seedling of ‘Gintaro’
‘Autumn poron’				o cv. developed in the 20th C	118563	Seedling of ‘Gintaro’
‘Hitomaru’				o cv. developed in the 20th C	115715	Chance seedling
‘Ibuki’				o cv. developed in the 20th C	113858	F1 of ‘Ginyose’ × ‘Toyotamawase’
‘Ishijima’				o cv. developed in the 20th C	115713	Chance seedling
‘Ishizuchi’	o	o	o	o cv. developed in the 20th C	113862	F1 of ‘Ganne’ × ‘Kasaharawase’
‘Kunimi’		o		o cv. developed in the 20th C	176783	F1 of ‘Tanzawa’ × ‘Ishizuchi’
‘Oomine’				o cv. developed in the 20th C	115716	Chance seedling
‘Shihou’	o	o		o cv. developed in the 20th C	118570	F1 of ‘Ginrei’ × ‘Ishizuchi’
‘Tanzawa’	o	o	o	o cv. developed in the 20th C	113902	F1 of ‘Otomune’ × ‘Taishouwase’
‘Tsukuba’	o	o		o cv. developed in the 20th C	113909	F1 of ‘Ganne’ × ‘Hayadama’
Shibaguri-37				o wild type	113887	Hyogo pref.
Hiratsuka-15				o selection	113938	F1 of ‘Tsukuba’ × ‘Ibuki’
Hiratsuka-16				o selection	113939	F1 of ‘Tanzawa’ × ‘Ibuki’
Hiratsuka-17				o selection	176792	F1 of ‘Tanzawa’ × ‘Ibuki’
Hiratsuka-19				o selection	113940	F1 of ‘Tsukuba’ × ‘Ishizuchi’
Hiratsuka-21				o selection	113942	F1 of ‘Tsukuba’ selfing ^y
Hiratsuka-23				o selection	176793	F1 of ‘Tsukuba’ × ‘Ishizuchi’
Hiratsuka-24				o selection	113944	F1 of ‘Katayama’ × ‘Akachiu’
Tsukuba-25				o selection	113945	F1 of ‘Ibuki’ × Ti-7
Tsukuba-27				o selection	113946	F1 of ‘Ginrei’ × Hiratsuka 15gou
Tsukuba-32				o selection	118564	F1 of 501-1 × 282-2 ^x
11-26				o selection		F1 of ‘Otomune’ selfing ^y
41-20				o selection		F1 of ‘Kasaharawase’ selfing ^y
245-23				o selection		F1 of ‘Tsukuba’ selfing ^y
247-7				o selection		F1 of ‘Ibuki’ selfing ^y
503-1				o selection		F1 of ‘Kairyoutoyotama’ × ‘Kunimi’

^z Accession numbers in the NARO (National Agriculture and Food Research Organization) Genebank (http://www.gene.affrc.go.jp/index_en.php).

^y The pollen parent was proved to be different on the basis of parent–offspring relationships determined by the use of simple sequence repeat markers.

^x 501-1 is an F1 progeny of 207-30 (F1 of ‘Tsukuba’ × ‘Ibuki’) × ‘Kunimi’, and 282-2 is an F1 progeny of ‘Ginyose’ × ‘Ishizuchi’.

Table 3-2. ANOVA results for pellicle peelability of Japanese chestnuts in Expt. 1, using 5 cultivars (genotypes) with 2 trees per genotype over 2 years^z.

Source of variation	d.f.	Mean squares	Expected mean squares
Genotype	4	454.27**	$\sigma_{el}^2 + 2\sigma_{gy}l^2 + 2\sigma_{tl}^2 + 4\sigma_{gl}^2$
Year	1	56.60 ^{NS}	$\sigma_{el}^2 + 2\sigma_{gy}l^2 + 10\sigma_{yl}^2$
Genotype × Year	4	8.48 ^{NS}	$\sigma_{el}^2 + 2\sigma_{gy}l^2$
Among trees within a genotype	5	24.90 ^{NS}	$\sigma_{el}^2 + 2\sigma_{tl}^2$
Residuals	5	13.18	σ_{el}^2

^z Average value of the peeling rate for 10 nuts was arcsine-transformed before ANOVA. NS, ** indicate not significant or significant at $P < 0.01$, respectively.

Table 3-3. ANOVA results for pellicle peelability of Japanese chestnuts in Expt. 2, using 1 tree of 3 cultivars (genotypes) grown at 5 different locations in 2011^z.

Source of variation	d.f.	Mean squares	Expected mean squares
Genotype	2	351.79*	$\sigma_{e2}^2 + 5\sigma_{g2}^2$
Location	4	285.32*	$\sigma_{e2}^2 + 3\sigma_{L2}^2$
Residuals	8	61.31	σ_{e2}^2

^z Average value of the peeling rate for 10 nuts was arcsine-transformed before ANOVA.

* indicates significant at $P < 0.05$.

Table 3-4. ANOVA results for pellicle peelability of the Japanese chestnuts in Expt. 3, using 1 tree of 32 cultivars/selections and 1 wild clone (33 genotypes) over 3 years^z.

Source of variation	d.f.	Mean squares	Expected mean squares
Genotype	32	240.75**	$\sigma_{e3}^2 + 3\sigma_{g3}^2$
Year	2	28.02 ^{NS}	$\sigma_{e3}^2 + 33\sigma_{y3}^2$
Residuals	64	80.6	σ_{e3}^2

^z Average value of the peeling rate for 10 nuts was arcsine-transformed before ANOVA.

NS, ** indicate not significant or significant at $P < 0.01$, respectively.

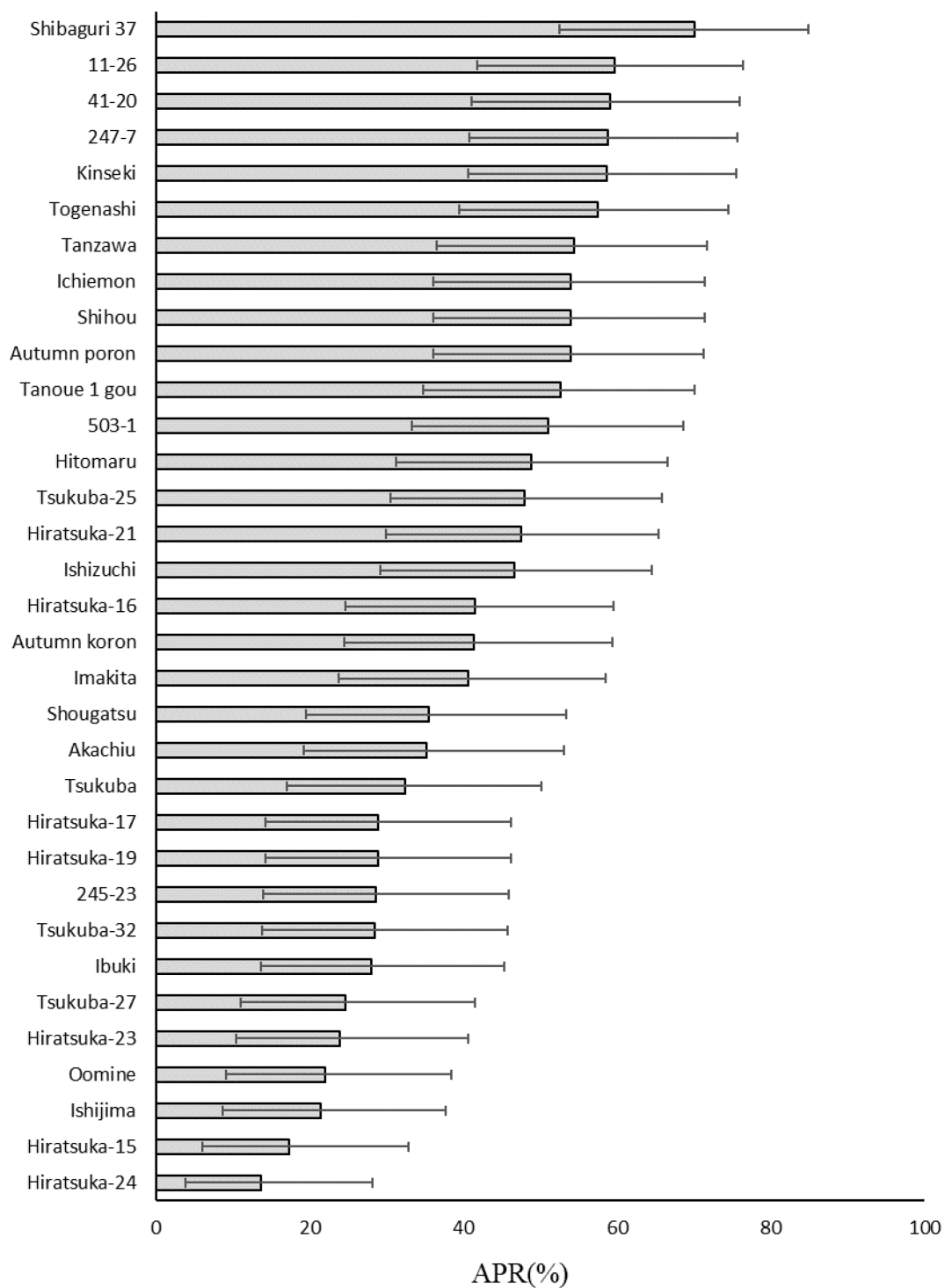


Fig. 3-1. Varietal differences in the average value of the peeling rate (APR) of nuts evaluated by using the high-temperature-oil peeling method (2003–2005). Bars show the 95% confidence interval based on the APR values from 3 years for each genotype.

第 4 章 易渋皮剥皮性を持つ在来品種‘奴’の渋皮剥皮性の遺伝様式

緒 言

農研機構では、易渋皮剥皮性を持つ品種として、‘ぼろたん’に加えて 2016 年に‘ぼろすけ’を育成した（齋藤ら，2017）。また、第 2 章において‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性は単一の劣性主動遺伝子によって制御されていることを明らかとした。その結果、この遺伝子に関連する DNA マーカーの開発に至っている（Nishio ら，2013）。この DNA マーカーを用いることで、交雑実生の渋皮剥皮性が幼苗段階で予測可能となるため、従来のようにすべての実生を結実開始まで選抜圃場において育成する必要がなくなり、現在では農研機構におけるクリ育種においては省力的・効率的な易渋皮剥皮性品種の選抜・育成が可能となっている。

現在のところ、易渋皮剥皮性品種の育成に利用可能な遺伝子は、‘ぼろたん’の持つ易渋皮剥皮性遺伝子に限られている。第 2 章における研究において、この遺伝子の由来は‘丹沢’の両親である‘乙宗’または‘大正早生’のいずれかであると推定している。その後の Nishio ら（2013）の研究により、この遺伝子は‘乙宗’由来であることが明らかにされた。加えて、‘乙宗’は在来品種である‘彼岸’と‘田尻銀寄’の後代であり、‘乙宗’の易渋皮剥皮性遺伝子はこのうち‘彼岸’を由来とすることが明らかにされている（Nishio ら，2014）。しかし、この遺伝子を有する品種・系統は非常に限られているため、遺伝的に多様な交雑親を用いた易渋皮剥皮性品種の育種は困難である。ニホンナシやカキといった他の果樹では、優良な果実形質を追及して限られた遺伝子型の中での交雑を繰り返した結果、近交弱勢により樹勢や収量の低下が生じることが知られている（Sato ら，2008；Yamada ら，1994）。ニホングリ育種においては、まだこのような近交弱勢が生じる段階までは至っていないが、‘彼岸’および‘ぼろたん’等の限られた遺伝子型を用いた交雑を繰り返すことで、他の樹種と同様に近交弱勢が生じることが危惧されている。この近交弱勢を抑制あるいは解消する手段としては、遺伝的に離れた品種あるいは野生型個体を交雑に用いることが挙げられる。このため、‘ぼろたん’，‘ぼろすけ’およびこれらより‘彼岸’に至る祖先品種から遺伝的に離れた品種あるいは野生型個体の中から、易渋皮剥皮性品種の育成に利用可能な遺伝子型を見出すことが、今後のクリ育種を安定的に行っていく上で

重要である。

また、これまでに育成した易渋皮剥皮性品種である‘ぼろたん’および‘ぼろすけ’はいずれも早生品種であり、渋皮の剥きやすい果実をクリの収穫期全般に渡って出荷および利用することが難しかった。このため、‘ぼろたん’や‘ぼろすけ’とは熟期の異なる中生以降の収穫期を持つ易渋皮剥皮性品種の育成が生産者や加工業者から求められており、農研機構においてもこれを重点的な育種目標の一つとして近年取り組んできている。しかし、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性遺伝子の由来である‘彼岸’をはじめ、この遺伝子を持つ品種・系統の成熟期はいずれも早生である。クリの収穫期は、複数遺伝子が関与する量的形質とされており（壽ら、1984）、近年ではその収穫日に関連する量的形質遺伝子座に連鎖する DNA マーカーも開発されている（Nishio ら、2017）。今後の易渋皮剥皮性品種育成を効率的に行うためには中生以降の収穫期で易渋皮剥皮性を持つ遺伝子型を明らかにすることが必要である。

今から 100 年近く前において、中岡（1913）、八木岡（1915）、および田中（1933）らは、ニホングリ在来品種の中に渋皮の離脱が比較的容易な品種が存在することについて、それぞれの著書において記述している。しかし、これらは品種特性の一部としての記述に留まり、渋皮の剥皮方法や剥皮性の程度に関する具体的データについては示されていない。このため、これらの著書において記述された品種の中に易渋皮剥皮性を持つ品種が存在しているか、実際の渋皮剥皮性を確認する必要がある。また、第 3 章において、難渋皮剥皮性のニホングリの渋皮剥皮性に遺伝変異が存在し、加えてその変異は連続的であり大きな変異幅を示す量的形質であることを明らかとした。このため、難渋皮剥皮性ニホングリの中でも比較的渋皮剥皮性の容易な遺伝子型同士を交雑して量的形質遺伝子座を集積することで、‘ぼろたん’とは由来の異なる新規の易渋皮剥皮性品種を育成できる可能性が考えられる。このような育種を行うためには、難渋皮剥皮性の遺伝子型の中から、比較的渋皮剥皮性の容易な遺伝子型を明らかにする必要がある。そこで、本章では 3 章において調査に用いた遺伝子型以外の在来品種 51 品種および野生型 8 個体について渋皮剥皮性の調査を行い、易渋皮剥皮性ニホングリ品種の育種に利用可能な、‘ぼろたん’並みの易渋皮剥皮性を持つ遺伝子型、あるいは難渋皮剥皮性を持つ遺伝子型のうちで比較的渋皮剥皮性の容易な遺伝子型を明らかにすることを目的として調査を行った。

材料および方法

試験 1. 51 の在来品種および 8 の野生個体の渋皮剥皮性

農研機構果樹茶業研究部門（茨城県つくば市）のクリ圃場において栽培された、51 のニホングリ在来品種、8 のニホングリ野生個体、および易渋皮剥皮性の対照品種として‘ぼろたん’を調査に用いた（Table 4-1）。これらの品種・個体の中に異名同種は存在しないことが SSR マーカーを用いた解析によって明らかとなっている（Nishio ら, 2011b）。各品種ともに年間を通しての薬剤散布と地表面管理、および冬季の剪定等の標準的な栽培管理を行った。2004 年または 2007 年のいずれかの年（Table 4-1）に、各遺伝子型についてそれぞれ 1 樹から収穫された果実を用いて渋皮剥皮性の調査を行った。

各遺伝子型における収穫日は、各年次において 10 果以上の果実が初めて収穫された日とした。2004 年における収穫日は 8 月 25 日の‘山口早生’から、10 月 6 日の‘大八’、‘片山’、および‘錦秋’にかけて、2007 年における収穫日は 8 月 22 日の‘八朔’、‘七夕’、および‘豊多摩早生’から、10 月 17 日の‘長兵衛’および‘霜被’にかけてであった（Table 4-1）。2004 年に収穫された 33 遺伝子型のうち、24 遺伝子型については 2007 年にも収穫され、これら 24 遺伝子型の平均収穫日は、2004 年は 9 月 18 日、2007 年は 9 月 27 日であった。このように、平均収穫日には約 10 日の差が見られたが、各遺伝子型における収穫順は 2 年間で同様の傾向が見られた。各遺伝子型について収穫期に開裂した毬から果実を収穫し、5°C で約 1 カ月間冷蔵保存した後、各々 10 果を無作為に抽出して渋皮剥皮性の評価に用いた。渋皮剥皮性の評価は第 3 章と同様にして行い、各々 10 果の渋皮剥皮率の平均値を平均剥皮率（APR, %）として渋皮剥皮性を定量化した。APR 値が 75% 以上の遺伝子型を易渋皮剥皮性、それ以外を難渋皮剥皮性と判定した。

試験 2. ‘奴’ の易渋皮剥皮性の遺伝様式

試験 1 において‘奴’が調査した遺伝子型の中で例外的に高い APR 値を示したため、本品種が易渋皮剥皮性遺伝子を有することが考えられる。その場合、‘奴’が

‘ぼろたん’と同じ易渋皮剥皮性遺伝子を持つ可能性が考えられる。第2章において示した通り、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性は、 P/p で表される単一の劣性主働遺伝子によって制御されている。‘奴’の持つ易渋皮剥皮性の遺伝様式が‘ぼろたん’と同様の劣性主働遺伝子によるものかどうかを明らかにするために‘奴’の後代実生における渋皮剥皮性の分離について調査を行った。2005年および2006年に‘丹沢’ (P/p) × ‘奴’，2006年および2010年に‘ぼろたん’ (p/p) × ‘奴’の交雑をそれぞれ行い、それぞれの F_1 実生集団を作成した。各実生集団は1年間苗圃で養成した後、2年生の時点で農研機構のクリ選抜圃場に $2m \times 5m$ の樹間間隔で栽植し、試験1と同様に国内の標準的な薬剤防除および剪定等による栽培管理を行った。‘丹沢’ × ‘奴’は2011年、‘ぼろたん’ × ‘奴’は2013年に、いずれも各実生個体から開花後の適熟の果実を収穫し、1カ月間 $5^{\circ}C$ で冷蔵貯蔵した後、各実生について無作為に抽出した10果を用いて試験1と同様にHOP法による渋皮剥皮性の評価を行った。APR値が75%以上の実生を易渋皮剥皮性、それ以外を難渋皮剥皮性と判定した。‘丹沢’ × ‘奴’の F_1 実生集団については、 χ^2 検定により渋皮剥皮性の難易の分離比が1:1の期待比に適合しているかについて検定を行った。

試験3. 渋皮剥皮性とSSRマーカーによる推定遺伝子型の比較

‘奴’は‘ぼろたん’と同様の高いAPR値を示すことから、‘奴’が‘ぼろたん’と同じ p/p 遺伝子型を有すると仮定し、試験2で作成した‘丹沢’ × ‘奴’の F_1 実生集団の各個体について、Nishioら(2013)によって開発された p 遺伝子近傍の二つのSSRマーカー (PRB28 および PEB62) を用いて‘丹沢’から遺伝した P/p 対立遺伝子を識別することで各実生個体の遺伝子型の推定を行い、実際の渋皮剥皮性との関係について比較を行った。

ゲノムDNAは、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて若葉または新芽から抽出した。PCR反応生成物を3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で検出することで各実生における遺伝子型の推定を行った。増幅された各バンドのサイズは、GeneMapper ソフトウェア ver.5.0 (Life Technologies) を使用して内部標準DNA断片 (400HD-ROX, Life Technologies) と比較することによって決定した。

試験 4. ‘奴’ および ‘ぼろたん’ の易渋皮剥皮性遺伝子座近傍のハプロタイプ構造

‘奴’ および ‘ぼろたん’ における p 遺伝子座近傍のハプロタイプ構造を明らかとするために、試験 2 で作成した ‘ぼろたん’ × ‘奴’ の F_1 実生集団を用いてハプロタイプ構造解析を行った。ゲノム DNA の抽出は試験 3 と同様の方法で行った。各実生について、 p 遺伝子座近傍の 10 個の SSR マーカー (PEA18, PEA41, PEB62, PEB102, PRA51, PRB25, PRB28, PRD2, PRD52, PRD58; Nishio ら, 2013) を用いて Nishio ら (2013) と同様の方法で SSR 解析を行い各遺伝子型の決定を行った。PCR 産物の分離, 検出および各増幅バンドのサイズ決定も試験 3 と同様に行った。各マーカー間の距離および配列順は Nishio ら (2013) の結果に準じた。

本試験においては、プライマーを Nishio ら (2013) の用いた M13 テールプライマー (Schuelke, 2000) から蛍光ラベルプライマーに変更した結果、M13 配列のフラグメントが除去されたため、SSR マーカー PRA51 および PRB25 のフラグメント長が、Nishio ら (2013) の結果よりも 19bp および 20bp 大きくなっている。また、同様に解析に用いた DNA シークエンサーを PRISM 3100 DNA シークエンサー (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) から 3130x1 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, USA) に変更したため、いくつかのマーカー (PRD2, PRB28, PEB62, および PRD58) のフラグメント長に、Nishio ら (2013) の結果と比べて 1bp の差異が生じている。

結 果

試験 1. 51 の在来品種および 8 の野生型個体の渋皮剥皮性

調査に用いた 59 遺伝子型および ‘ぼろたん’ の APR 値は ‘片山’ の 7.0% から ‘ぼろたん’ の 94.0% までの広い範囲に分布した (Table 4-1)。APR 値の頻度分布は、APR 値が 75% 未満である 58 遺伝子型においては連続的な分布を示した。‘ぼろたん’ および ‘奴’ の APR 値は特異的に高く、他の遺伝子型とは質的に異なっていた (Fig. 4-1)。在来品種である ‘奴’ の APR 値は 87.0% と高く ‘ぼろたん’ に近い値で

あり、これら2品種のみが易渋皮剥皮性と判定された (Fig. 4-2) . 一方、これら以外の遺伝子型は難渋皮剥皮性と判定された. 難渋皮剥皮性の遺伝子型における平均 APR 値は 43.3%であった. 難渋皮剥皮性と判断された遺伝子型のうち、APR 値が 70%以上と比較的高い値を示したものは、‘乙宗’ (72.0%) , ‘福波’ (71.0%) , およびシバグリ-166 (71.0%) の3遺伝子型であった (Table 4-1) .

試験 2. ‘奴’ の易渋皮剥皮性の遺伝様式

‘ぼろたん’ (p/p) × ‘奴’ の 16 実生からなる F_1 集団の渋皮剥皮性は、易渋皮剥皮性が 14 実生、難渋皮剥皮性が 2 実生に分離した (Fig. 4-3) . 難渋皮剥皮性と判定された 2 実生の APR 値は、それぞれ 59.0%および 61.0%であった. また、この分離比は両親が劣性ホモ型 (p/p) と仮定した場合の期待比である 1 : 0 に近い結果であった. 一方、‘丹沢’ (P/p) × ‘奴’ の 17 実生からなる F_1 集団の渋皮剥皮性は、易渋皮剥皮性が 6 実生、難渋皮剥皮性が 11 実生に分離した (Fig. 4-3) . χ^2 検定の結果、これは‘丹沢’の渋皮剥皮性の遺伝子型をヘテロ型 (P/p) , ‘奴’のそれが劣性ホモ型 (p/p) であると仮定した場合に期待される 1 : 1 の分離比に 5%水準で矛盾しなかった.

試験 3. 渋皮剥皮性と SSR マーカーによる推定遺伝子型の比較

各実生個体の p 遺伝子周辺の遺伝子型の推定を行った結果、PRB28 および PEB62 の 2 つの SSR マーカー間で組換えが生じている個体が 1 個体存在した. この組換え個体は非常に低い APR 値 (3.0%) を示したことから、ヘテロ型 (P/p) と判断した. このため、‘奴’の易渋皮剥皮性遺伝子が、‘ぼろたん’と同じ劣性主働遺伝子によると仮定した場合、‘丹沢’ (P/p) × ‘奴’の F_1 実生集団 17 個体における推定遺伝子型の分離は、劣性ホモ型 (p/p) が 7 個体、ヘテロ型 (P/p) が 10 個体となった (Fig. 4-4) . 各実生個体における渋皮剥皮性の調査の結果、劣性ホモ型と推定された 7 個体のうち 6 個体は APR 値が 75%以上であり、易渋皮剥皮性と判定された. 劣性ホモ型と推定された残りの 1 個体の APR 値は 60.0%であり、難渋皮剥皮性と判定されたものの、比較的高い APR 値を示した. また、ヘテロ型と推定された 10 個体はいずれも APR 値

が 29%未満であり、すべて難渋皮剥皮性と判断された。各遺伝子型における実生の平均 APR 値は劣性ホモ型が 83.7%であったのに対し、ヘテロ型は 17.4%であった。したがって、劣性ホモ型を有する実生の渋皮は、ヘテロ型よりもより剥皮が容易であった。

試験 4. ‘奴’ および ‘ぼろたん’ の易渋皮剥皮性遺伝子座近傍のハプロタイプ構造

‘奴’ の *p* 遺伝子座周辺の SSR マーカーによる 2 つのハプロタイプは、‘ぼろたん’ とは一部異なる構造を示した (Fig. 4-5)。‘奴’ の一方の連鎖群は、PEB62 から PEA41 の SSR マーカー間において、‘ぼろたん’ の両方の連鎖群と同じ構造を示したが、PRD2 から PRD52 の SSR マーカー間では異なる構造を示した。また、‘奴’ のもう一方の連鎖群は、‘ぼろたん’ のいずれの連鎖群とも異なる構造を示した。

考 察

ニホングリ品種は一般に難渋皮剥皮性を有するとされてきたが、約 100 年前の書籍において一部の在来品種の特性の記述の中で渋皮の離脱が容易等の記載が見られる。中岡 (1913) は ‘霜被’, 八木岡 (1915) は ‘赤栗’, ‘長兵衛’, ‘今北’, ‘毛長’, ‘霜被’, ‘正月’, ‘ミカド’, および ‘和三’ の 8 品種, また田中 (1933) は ‘赤栗’, ‘後落’, ‘後社’, ‘出野’, ‘寺井’, ‘手々打’, ‘奴’, および ‘和三’ の 8 品種について、それぞれ渋皮の剥皮または離脱が容易あるいはやや容易である等と記載している。しかし、これら 14 品種の記述には、いずれも渋皮剥皮性の程度に関する具体的な情報についての記載がないため、実際の渋皮剥皮性の程度については不明である。またこれらの在来品種は、おそらくその収量性や栽培性の低さ、果実の小ささ等、何らかの不良形質が原因となって、これまで広く栽培されることなく現在に至っている。これらの在来品種のうち、農研機構では ‘赤栗’, ‘出野’, ‘ミカド’, および ‘和三’ 以外の 10 品種を保存している。これら 10 品種のうち ‘今北’ と ‘正月’ については、第 3 章において APR 値がそれぞれ 41.0% および 35.0% であり、難渋皮剥皮性であることがすでに明らかとなっている。

本章では、これら 10 品種のうち‘長兵衛’，‘後落’，‘後社’，‘毛長’，‘霜被’，‘手々打’，および‘奴’の 7 つの在来品種について渋皮剥皮性を評価した。八木岡（1915）に記載された‘毛長’と、農研機構において保存されている‘毛長銀寄’は異名同種であると考えられる。また、田中（1933）に記載された‘手々打’は兵庫県旧小川村をその起源としていることから、農研機構において保存されている‘小川手々打’と異名同品種と考えられる。これら在来品種の本研究における APR 値は、‘奴’の 87.0%を除いていずれも 55.0%未満であった（Table 4-1）。従って、これらの在来品種のうちで‘奴’だけが易渋皮剥皮性と判断された。過去に易渋皮剥皮性である可能性が記載された 14 品種の中に、実際に易渋皮剥皮性を示す‘奴’が存在したことから、今回調査を行わなかった在来品種の中に易渋皮剥皮性品種がまだ存在する可能性が考えられる。このため、今後農研機構で保存している‘寺井’については渋皮剥皮性を調査することが、保存していない 4 品種については探索によって各遺伝資源を確保することが必要である。

第 3 章において、難渋皮剥皮性の遺伝子型における渋皮剥皮率が連続的で大きな変異を示したことから、渋皮剥皮性が量的遺伝子に支配されていることが示唆される。このため、比較的高い渋皮剥皮率を示す難渋皮剥皮性遺伝子型のもつ、渋皮剥皮性に関する量的遺伝子を交雑によって集積することで、‘ぼろたん’等とは異なる新規の易渋皮剥皮性品種を育成できる可能性がある。第 3 章においては、野生型個体であるシバグリ 37 が、難渋皮剥皮性遺伝子型の中で最も高い 70.0%の渋皮剥皮率を示した。本章においては、シバグリ 37 と同様に 70%以上の比較高い渋皮剥皮率を示す遺伝子型として、‘福波’，‘乙宗’，およびシバグリ 166 が見出だされた。‘乙宗’は‘ぼろたん’の祖先品種の一つであり、*p* 遺伝子をヘテロに有することが明らかとされている（Nishio ら，2013）。このため、この品種を除く‘福波’およびシバグリ 166 の 2 つの遺伝子型は、新規の易渋皮剥皮性品種を育成するための交配親として利用できると考えられる。また、このようにして難渋皮剥皮性品種の持つ渋皮剥皮性に関する量的遺伝子を今後効率的に集積していくためには、これらの遺伝子についてその遺伝様式を明らかにするとともに、その渋皮剥皮性についての QTL 解析等を行う必要がある。

‘奴’の易渋皮剥皮性遺伝子が‘ぼろたん’と同じ遺伝子の劣性ホモ型 (*p/p*) であり単純メンデル遺伝すると仮定した場合、‘ぼろたん’ × ‘奴’の後代 F₁ 実生集団に

における APR 値の分離は、難渋皮剥皮性と判定された 2 個体の例外を除いて矛盾しなかった (Fig. 4-2) . 各実生個体の APR 値は単年度における 10 果を用いた評価によるため環境および非遺伝的変動を含んでおり、これが難渋皮剥皮性と判定された 2 個体の原因である可能性がある。また、‘丹沢’ × ‘奴’ の後代 F₁ 実生集団における APR 値は、易渋皮剥皮性および難渋皮剥皮性からなる二峰型の分布となっている。‘丹沢’ の易渋皮剥皮性遺伝子型はヘテロ型 (P/p) であること、および本試験において易渋皮剥皮性と難渋皮剥皮性が 1 : 1 に分離したことから、‘奴’ の易渋皮剥皮性遺伝子型は劣性ホモ型 (p/p) であると考えられる。

また、‘奴’ の易渋皮剥皮性遺伝子型が劣性ホモ型 (p/p) であると仮定した場合、‘丹沢’ × ‘奴’ の後代 F₁ 実生集団において ‘丹沢’ から p 遺伝子を継承した実生は 1 個体の例外を除いて易渋皮剥皮性、 P 遺伝子を継承した実生は難渋皮剥皮性とそれぞれ判定された (Fig. 4-4) . この結果からも、‘奴’ は ‘ぼろたん’ と同じ易渋皮剥皮性遺伝子を有することが示唆された。Nishio ら (2013) により開発された、‘ぼろたん’ の p 遺伝子に連鎖する SSR マーカーは、一部マーカーのバンド長が異なるものの、‘ぼろたん’ だけでなく ‘奴’ の p 遺伝子についてもその存在を予測可能である (Fig. 4-5) . このため、これらの SSR マーカーは ‘ぼろたん’ およびその血縁品種・系統だけでなく、‘奴’ の易渋皮剥皮性についての DNA マーカー選抜にも非常に有用であると考えられる。また、‘丹沢’ × ‘奴’ における 1 実生が、 p/p 遺伝子型をもつにも関わらず低い APR 値を示した原因として、‘丹沢’ および ‘奴’ の持つ難渋皮剥皮性品種の渋皮剥皮性に関する微働遺伝子の影響を受けた可能性が考えられる。

これらの F₁ 実生集団の渋皮剥皮性の調査結果から、‘奴’ は ‘ぼろたん’ の P/p 遺伝子座と共通の p 遺伝子を有する可能性が高いと考えられる。しかし、SSR マーカーによる ‘奴’ の P/p 遺伝子座周辺の 2 つのハプロタイプは、‘ぼろたん’ の P/p 遺伝子座周辺のハプロタイプとは一部異なる構造を示した (Fig. 4-5) . Nishio ら (2013, 2014) は、‘ぼろたん’ のもつ p 遺伝子が京都府の在来品種 ‘彼岸’ に由来することを明らかにしている。一方、‘奴’ (Fig. 4-6) は京都府に隣接する大阪府北部をその由来とする在来品種であることから、これら 2 品種の間には遺伝的な関係が存在する可能性がある。その場合、これら 2 品種の持つ p 遺伝子は非常に古い共通祖先に由来し、その後生じた組換えによって各々のハプロタイプ構造が変化したと考えられ

る。また、‘奴’の易渋皮剥皮性遺伝子は‘彼岸’の p 遺伝子とは独立した突然変異によって生じた可能性も考えられる。今後、これら2品種の易渋皮剥皮性遺伝子の塩基配列を決定することで、‘彼岸’と‘奴’の易渋皮剥皮性遺伝子の由来について明らかにする必要がある。

在来品種である‘鹿ノ爪’ (Fig. 4-7) が‘奴’と親子関係にあることが、Nishioら (2014) により明らかとされている。本章における‘鹿ノ爪’のAPR値が57.0%であることから、この品種は P/p 遺伝子型を有すると考えられる。また、同様に‘鹿ノ爪’と在来品種の‘伝五郎’も血縁関係にあることが明らかとなっており、‘伝五郎’のAPR値が39.0%であることから、‘伝五郎’は P/p 遺伝子型を有する可能性があることが示唆される。このように、ニホングリ在来品種の中に p 遺伝子をヘテロに持つものが他にも存在する可能性があるが、これらを渋皮剥皮性の評価だけで識別することは困難である。このため、SSRマーカーを用いて広範囲の遺伝資源の中から p 遺伝子を持つ遺伝子型を探索することが重要である。そのためには、 p 遺伝子に完全連鎖するマーカーを開発し、起源の異なる p 遺伝子も識別できるようにする必要がある。

‘ぼろたん’の育成以降、農研機構におけるクリ育種では易渋皮剥皮性の付与を目的として‘彼岸’およびその後代品種・系統が繰り返し交雑に利用されてきた。特定の遺伝子型による交雑が繰り返されることで近親交配となり、その結果として育種実生の樹勢や生産性の低下が起こる可能性がある。本章におけるハプロタイプ構造解析の結果から、‘奴’と‘ぼろたん’の p 遺伝子周辺のハプロタイプ構造が異なることが明らかとなった。このため、これらの p 遺伝子の起源が異なる可能性、あるいは非常に古い共通の起源をもつ可能性があることが示唆された。また、Nishioら (2014) により、‘奴’と‘ぼろたん’およびその祖先品種である‘彼岸’がいずれも親子関係にないことが明らかとされている。したがって、‘奴’およびその血縁品種を交雑親として利用することは、農研機構におけるクリ育種で現在危惧されている、‘彼岸’の血縁品種による近親交配リスクの抑制に効果的であると考えられる。

‘ぼろたん’、‘ぼろすけ’を始めとした、‘彼岸’由来の p 遺伝子を有する品種・系統のほぼすべてが、9月上旬までに収穫される早生品種である。今後、易渋皮剥皮性を持つ品種の収穫期を中生から晩生に拡大していくためには、中生以降の収穫時期を持つ易渋皮剥皮性遺伝子型を育種素材として用いることが望ましい。本章で p

遺伝子を持つことが新たに明らかとなった‘鹿ノ爪’および‘奴’の収穫日はそれぞれ9月15日および22日（いずれも2004年）であり，‘彼岸’（2007年9月11日）および‘ぼろたん’（2007年9月4日）よりも収穫期が遅い中生品種である．また，本章において，‘奴’の易渋皮剥皮性遺伝子と‘ぼろたん’の*p*遺伝子は共通のSSRマーカーを用いてその存在を予測することができることが明らかとなった．このため，‘奴’および‘鹿ノ爪’の後代実生においても，‘ぼろたん’と同様にSSRマーカーによる渋皮剥皮性の早期選抜が可能である．したがって，‘奴’および‘鹿ノ爪’は今後の農研機構におけるクリ育種において，‘彼岸’血縁品種による近親交配のリスクを低下させるだけでなく，中生以降の易渋皮剥皮性品種育成の素材としても有用であると考えられる．このため，農研機構のクリ育種においては，2012年以降‘奴’および‘鹿ノ爪’の2品種を用いた育種交雑を開始しており，今後これらの後代から新たな易渋皮剥皮性品種が育成されることが期待される．

Table 4-1. The harvest day, and average peeling rate (APR)^z of the 60 Japanese chestnut genotypes used in our experiments .

Cultivar or accession name	JP accession No. ^y	Origin (pref.)	Harvest day	APR (%)
Local cultivars				
‘Arima’	113832	Kanagawa	8 Sep. 2004	45.0
‘Bonguri’	113834	Japan ^x	28 Aug. 2007	38.0
‘Buzen’	113836	Oita	22 Sep. 2004	32.0
‘Choubei’	113838	Kyoto	17 Oct. 2007	25.5
‘Choukouji’	113839	Hyogo	30 Sep. 2004	29.0
‘Daihachi’	113841	Kyoto	6 Oct. 2004	30.0
‘Dengorou’	113842	Akita	22 Sep. 2004	39.0
‘Enanishiki’	113843	Gifu	28 Aug. 2007	62.0
‘Fukunami’	113844	Kyoto	25 Sep. 2007	71.0
‘Fukunishi’	113845	Osaka	15 Sep. 2004	30.0
‘Ginyose’	113849	Osaka	20 Sep. 2007	48.0
‘Gora’	113850	Hyogo	30 Sep. 2004	29.0
‘Gosha’	113851	Kanagawa	22 Sep. 2004	54.0
‘Hajikami’	113852	Japan	1 Sep. 2004	19.0
‘Hassaku’	113853	Japan	22 Aug. 2007	42.0
‘Hatayaoguri’	113854	Akita	30 Sep. 2004	24.0
‘Hayadama’	113855	Wakayama	19 Sep. 2007	50.0
‘Higan’	113856	Kyoto	11 Sep. 2007	60.0
‘Hokugin’	113857	Gifu	11 Sep. 2007	57.0
‘Ichikawawase’	176782	Kanagawa	19 Sep. 2007	38.0
‘Kanotsume’	113867	Kyoto	15 Sep. 2004	57.0
‘Kasaharawase’	113868	Gifu	11 Sep. 2007	55.0
‘Katayama’	113869	Gifu	6 Oct. 2004	7.0
‘Kenagaginyose’	113870	Osaka	8 Sep. 2004	26.0
‘Kinseki’	113872	Hyogo	22 Sep. 2004	52.0
‘Kinshiu’	113873	Tokushima	6 Oct. 2004	28.0
‘Matabei’	113876	Kyoto	30 Sep. 2004	14.0
‘Ninomiya’	176780	Chiba	30 Sep. 2004	50.0
‘Obiwase’	113878	Miyazaki	28 Aug. 2007	46.0
‘Obuse 2 gou’	113879	Nagano	2 Oct. 2007	65.0
‘Obuse 3 gou’	113880	Nagano	22 Sep. 2004	20.0
‘Ogawateteuchi’	113882	Hyogo	11 Sep. 2007	26.0
‘Ookoma’	116299	Japan	15 Sep. 2004	35.0
‘Osaya’	113884	Kanagawa	28 Aug. 2007	64.0
‘Otomune’	113885	Hyogo	19 Sep. 2007	72.0
‘Saimyouji 1 gou’	176786	Akita	2 Oct. 2007	24.5
‘Saimyouji 2 gou’	176787	Akita	19 Sep. 2007	18.0
‘Shimokatsugi’	113894	Osaka	17 Oct. 2007	54.0
‘Shuuhouwase’	113895	Yamaguchi	11 Sep. 2007	66.0

Table 4-1. (continued)

Cultivar or accession name	JP accession No. ^y	Origin (pref.)	Harvest day	APR (%)
Local cultivars				
'Taishouwase'	113897	Kanagawa	28 Aug. 2007	55.0
'Tajiriginyose'	113898	Osaka	15 Sep. 2004	30.0
'Tamanishiki'	113900	Japan	11 Sep. 2007	51.0
'Tanabata'	113901	Shizuoka	22 Aug. 2007	58.0
'Toyotamawase'	113907	Tokyo	22 Aug. 2007	30.0
'Tsuchidawase'	113908	Gifu	25 Sep. 2007	35.0
'Tsunehisa'	113910	Kanagawa	4 Sep. 2007	67.0
'Waseginzen'	113919	Japan	1 Sep. 2004	56.0
'Yakko'	113913	Osaka	22 Sep. 2004	87.0
'Yamaguchiwase'	113914	Hyogo	25 Aug. 2004	41.0
'Yamaguchiwase 2 gou'	113915	Tokushima	1 Sep. 2004	16.5
'Yourou'	113917	Gifu	9 Oct. 2007	33.0
Wild individuals				
Sandoguri Kouchi 2	113971	Kouchi	30 Sep. 2004	63.0
Shibaguri-67	113888	Hyogo	22 Sep. 2004	39.0
Shibaguri-82	176797	Hyogo	22 Sep. 2004	56.0
Shibaguri-91	113889	Hyogo	22 Sep. 2004	57.0
Shibaguri-166	113890	Hyogo	15 Sep. 2004	71.0
Shidareguri-Gifu	113892	Gifu	15 Sep. 2004	51.0
Shidareguri-Tatsuno 2	234092	Nagano	15 Sep. 2004	42.0
Shidareguri-Tochigi	113937	Tochigi	8 Sep. 2004	56.0
Cultivar				
'Porotan'	230435	F ₁ of 550-40 × 'Tanzawa'	4 Sep. 2004	94.0

^z Average peeling rate (APR; %) for 10 nuts evaluated by the high-temperature oil peeling method.

^y Accession numbers in the National Agriculture and Food Research Organization (NARO) Genebank (http://www.gene.affrc.go.jp/index_en.php).

^x Prefecture is unknown.

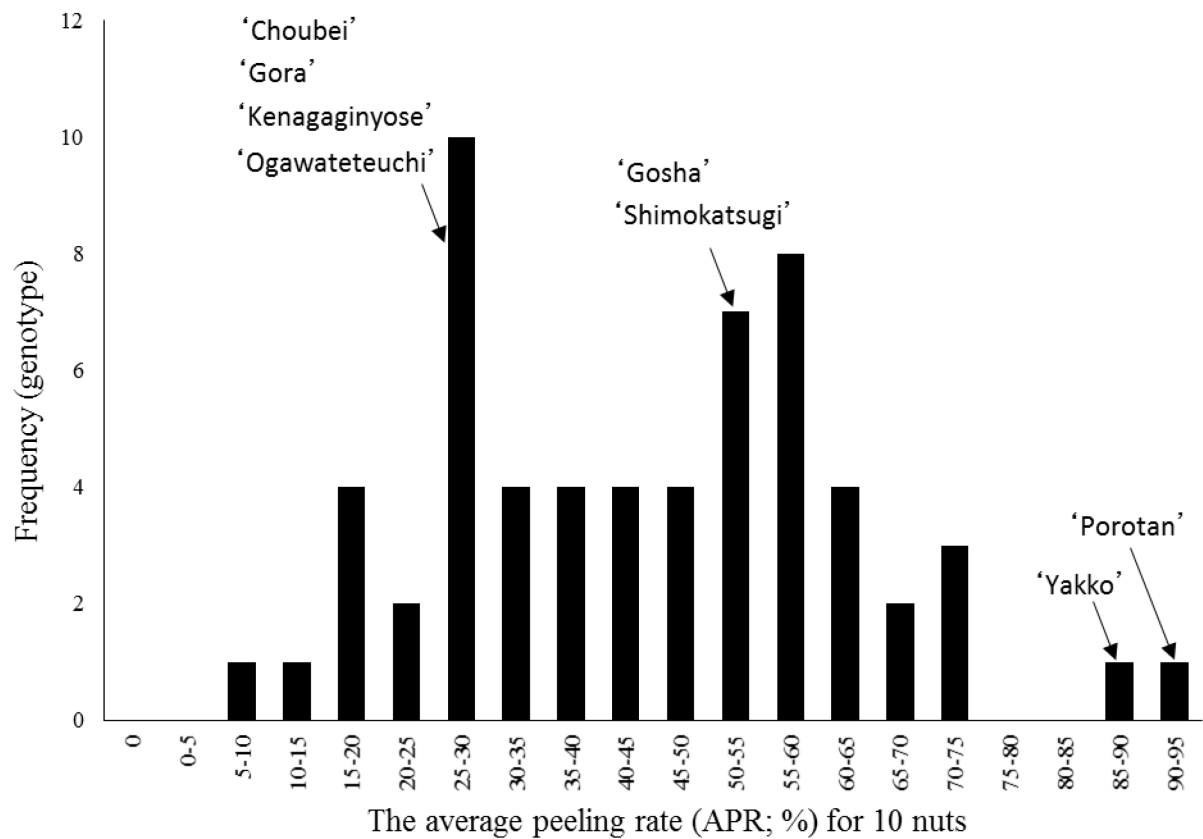


Fig. 4-1. Frequency distribution of the average peeling rate (APR; %) of 10 nuts per accession evaluated by the high-temperature oil peeling method among 59 accessions and 'Porotan'. Values falling at the edges of two adjacent bins were classified into the lower bin (e.g., an APR of 15% would be classified into the "10–15" bin).



Fig. 4-2. The nuts of 'Yakko' after peeling the pellicle by HOP method.

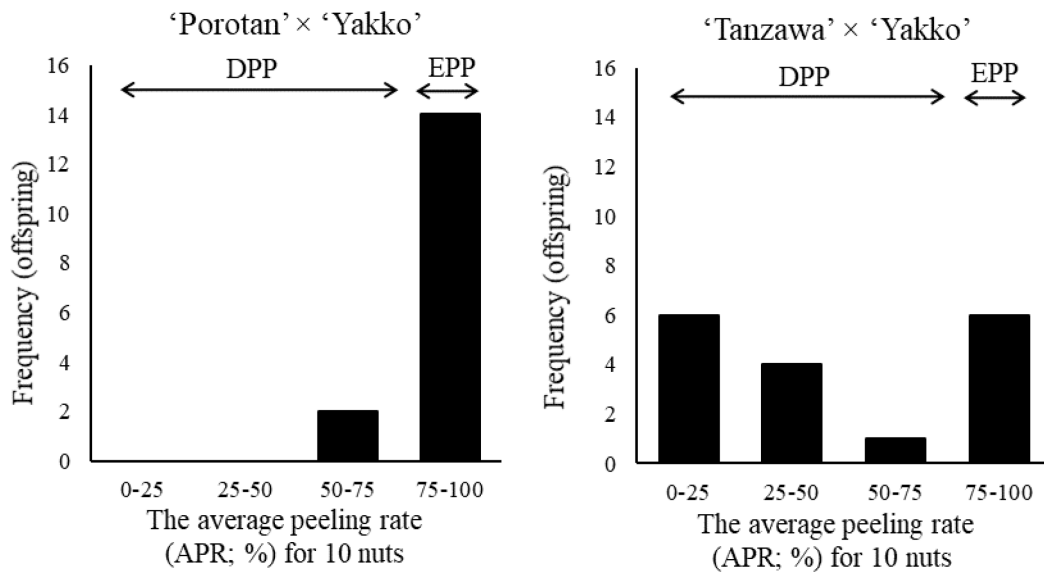


Fig. 4-3. Frequency distribution of the average peeling rate (APR; %) for 10 nuts evaluated by the high-temperature oil peeling method in offspring from F₁ crosses of 'Porotan' × 'Yakko' and 'Tanzawa' × 'Yakko'. EPP, easy-peeling pellicle; DPP, difficult-peeling pellicle.

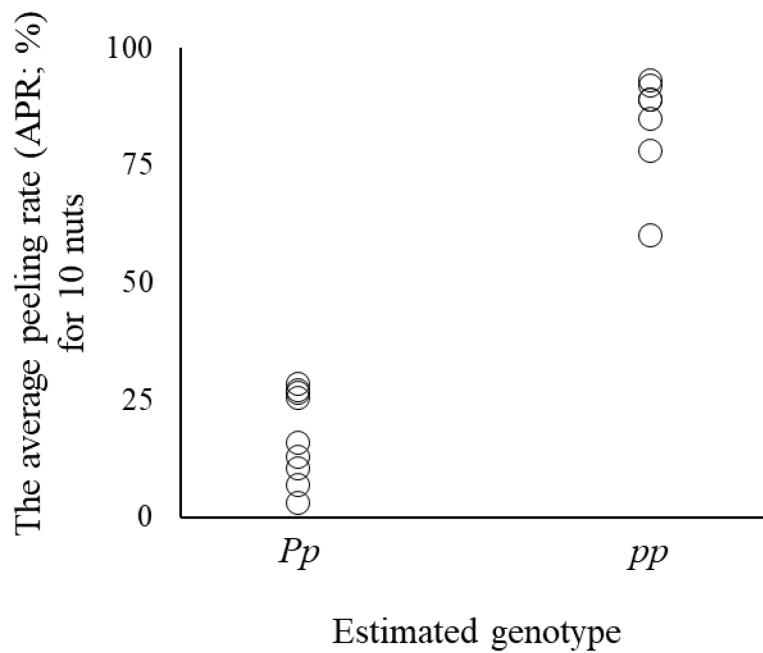


Fig. 4-4. Scatterplot of average peeling rate (APR; %) of the two genotypes estimated by SSR analysis among 17 F₁ offspring of ‘Tanzawa’ (*P/p*) × ‘Yakko’. Estimation was based on the assumption that ‘Yakko’ has the same *p/p* genotype as ‘Porotan’. APR was assessed in 10 nuts per offspring by the high-temperature oil peeling method.

	'Yakko'		'Porotan'		Genetic distance (cM)
PRD2	133	133	143	147	—
PRA51	270	270	273	268	9.6
PEA18	120	120	120	114	11.8
PEB102	171	171	176	171	11.8
PRB28	125	135	135	133	13.2
PRD52	144	144	150	150	16.6
peeling	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	
PEB62	169	159	169	169	19.8
PRD58	196	210	196	196	20.9
PRB25	157	157	157	157	22.3
PEA41	104	102	104	104	59.6

Fig. 4-5. Haplotype structure around the EPP genes in 'Yakko'. That of 'Porotan' was determined by Nishio et al. (2013). Numbers indicate allele size (bp). Genetic distances from PRD2 were inferred from an integrated map of the 550-40 × 'Tanzawa' F₁ population (Nishio et al., 2013).



Fig. 4-6. The bur and nuts of 'Yakko'.



Fig. 4-7. The bur and nuts of 'Kanotsume'.

総 合 考 察

農研機構におけるクリ育種は、1947年に果実品質・外観および栽培性の優れた加工用・輸出用の早生・中生種の育成を目的に開始された。その直後の1950年代から、全国の産地でクリタマバチによる被害が蔓延したため、本害虫に対する抵抗性育種を主要な目標に変更した結果、‘筑波’，‘丹沢’，および‘石鎚’といった抵抗性品種が育成され広く普及した。しかし、その天敵寄生蜂であるチュウゴクオナガコバチが放飼事業により全国にその分布域を広げたことから、1990年代以降は農研機構内のクリ圃場においてその被害がほぼ見られなくなった。このため、このころから育種目標の中でも良食味や収量性、渋皮剥皮性の改善等により重点を置いた育種を行うようになっていく。これらのうち渋皮剥皮性の改善については、1966年から日中クリ雑種第1次育種試験としてニホングリとチュウゴクグリとの交雑による品種育成を目指してきたが、現在までのところ日中交雑実生からの品種登録には至っていない。その理由としては、その果実が小さいことに加えて、結実性が悪いため選抜までに長期間を要すること等が挙げられる。このため日中交雑実生ではなく、ニホングリ同士の間交雑から易渋皮剥皮性品種の育成を行うことが検討された。そのためには、まずニホングリ遺伝資源の中から易渋皮剥皮性品種の育成に利用可能な遺伝子型を明らかにする必要がある。これには多くの遺伝資源についてその渋皮剥皮性を評価する必要があるため、効率的な渋皮剥皮性の評価方法の開発が必要とされた。また、実際に渋皮剥皮性による育種選抜を行う際にも効率的な渋皮剥皮性の評価法が必要不可欠である。そこで本研究においては、渋皮剥皮性の効率的な評価法を開発を行うとともに、開発した評価法を用いたニホングリ遺伝資源の渋皮剥皮性の評価、および易渋皮剥皮性の遺伝様式の解明について試験を行った。これらの成果により、今後の易渋皮剥皮性の付与を目的としたニホングリ育種の方向性について以下に考察した。

効率的なクリの渋皮剥皮性の評価法を開発を目的として、まず第1章において揚げグリを用いた渋皮剥皮性の評価法について検討を行った。クリは生果の状態では渋皮が果肉から離れにくく、加熱処理によってその剥皮が容易になるため、従来は焼きグリを用いて渋皮剥皮性の評価を行ってきた。しかし、その作成には大型の機械と長時間の加熱処理に加えて煩雑な操作が必要であり、短期間に多くの実生について調査を行う必要がある育種選抜の現場で用いることは非常に困難であった。そこで、焼きグ

リを用いた評価法に代わる簡便な渋皮剥皮性の評価法として、食用油中で加熱したクリ果実（揚げグリ）による渋皮剥皮性の評価法について検討を行った。まず揚げグリの作成条件について検討を行い、より高温で長時間加熱することで渋皮の剥皮時間が短縮されることを確認した。しかし、190°Cで加熱処理した場合、2分間以上の加熱時間では大幅な渋皮剥皮時間の短縮がみられなかったことから、190°Cで2分間加熱処理することで、効率的に揚げグリの作成と渋皮の剥皮が可能であることを明らかとした。次いで、揚げグリと焼きグリの渋皮剥皮性の比較を行い、これらの渋皮剥皮時間の間に高い相関が見られたことから、揚げグリによる評価は焼きグリによる評価の代替として利用可能であることを明らかとした。そこで、揚げグリによる渋皮剥皮性の評価法をHOP法と命名し、今後のクリの渋皮剥皮性の調査に用いることとした。本法を用いることで、これまでよりも短時間で効率良くクリの渋皮剥皮性の評価を行うことが可能となり、毎年400個体以上の育種実生についてその渋皮剥皮性を評価することが可能になった。

2000年より開始されたクリ第6回系統適応性検定試験において、全国の公立試験場所での試作試験に供試されていた選抜系統であるクリ筑波36号から39号について、1章において開発したHOP法による渋皮剥皮性の評価を行ったところ、クリ筑波36号がチュウゴクグリ並みの易渋皮剥皮性をもつことが明らかとなった。その後、本系統は2007年に‘ぼろたん’として品種登録されるに至った。第2章ではこの‘ぼろたん’について、その易渋皮剥皮性の遺伝様式を明らかにすることを目的として試験を行った。まず、‘ぼろたん’の祖先品種・系統について渋皮剥皮性の評価を行った結果、いずれも難渋皮剥皮性であったことから、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性は劣性遺伝子支配であることが示唆された。次いで、‘ぼろたん’と同じ‘丹沢’×550-40の交雑を行い、その後代実生における渋皮剥皮性の分離を調査した結果、その難易が1:3に分離したことから、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性は劣性の主働遺伝子による支配を受けていることが推定された。そこで‘ぼろたん’がその劣性主働遺伝子をホモに、‘ぼろたん’の交雑親である‘丹沢’がヘテロに、加えて‘筑波’が優性の対立遺伝子をホモにそれぞれ持つと仮定し、これら3品種による片側修正ダイアルル交配を行い、各組合せの後代実生について渋皮剥皮性の評価を行った。その結果、‘丹沢’×‘ぼろたん’の後代実生における渋皮剥皮性の難易は1:1に分離し、‘筑波’×‘ぼろたん’および‘丹沢’×‘筑波’の後代実生はすべて難渋皮剥皮性となっ

た。これらの結果は、いずれも‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性が劣性の主働遺伝子によって支配されているという仮定に矛盾しなかった。これらの結果から、この劣性主働遺伝子を持つことが確認された‘ぼろたん’、‘丹沢’、および550-40を相互に交雑することで、その後代において確実に易渋皮剥皮性を持つ個体を獲得できることが明らかとなった。その後、これらの結果を元にこの遺伝子に連鎖するDNAマーカーが開発された結果、幼苗段階の時点で交雑実生が易渋皮剥皮性を有するかどうかを確認することが可能となり、易渋皮剥皮性をもつ実生の選抜が効率的に可能となった。

ニホングリは一般に難渋皮剥皮性とされてきたが、その品種間に渋皮剥皮性の遺伝変異が存在するかどうかについては、これまで明らかとされていなかった。そこで第3章では、‘ぼろたん’以外の難渋皮剥皮性のニホングリ品種・系統間の渋皮剥皮性に遺伝変異が存在するかどうかを明らかにすることを目的として試験を行った。供試品種、年次数、場所数、樹数の異なる複数条件下の試験において、品種間で渋皮剥皮性に有意な遺伝変異の存在が確認されたことから、難渋皮剥皮性のニホングリ品種間に渋皮剥皮性の遺伝変異が存在することが強く示唆された。また、難渋皮剥皮性のニホングリ33品種・系統における渋皮剥皮性が連続的な変異を示したことから、その渋皮剥皮性は複数遺伝子による制御を受けていることが示唆された。このため、難渋皮剥皮性のニホングリ品種の中でも比較的高い渋皮剥皮率を示すシバグリ37等の持つ微働遺伝子を交雑によって集積することで、‘ぼろたん’の持つ劣性主働遺伝子とは由来の異なる新規の易渋皮剥皮性品種の育成が可能であると考えられた。しかし、シバグリ37以外に同程度の高い渋皮剥皮率を示す遺伝子型が見られなかったことから、今回調査を行っていないより多くの遺伝子型について渋皮剥皮性を調査し、今後の育種に利用可能な遺伝子型を明らかにする必要があると考えられた。

‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性を支配する劣性の主働遺伝子を持つ品種・系統は限られており、これらだけを繰り返し交雑に用い続けた場合近親交配となり樹勢や収量性の低下といった弊害が生じることが危惧される。このため、‘ぼろたん’とは由来の異なる易渋皮剥皮性遺伝子を明らかにして、今後のクリ育種に利用していく必要がある。また、第3章において難渋皮剥皮性のニホングリにおける渋皮剥皮性に関する量的形質遺伝子を交雑によって集積することで、新規の易渋皮剥皮性品種が育成できる可能性を明らかとした。そのためには難渋皮剥皮性のニホングリの中で比較的高い渋皮剥皮率の遺伝子型を明らかにする必要がある。そこで第4章では、易渋皮剥皮性ニ

ホングリ品種の育種に利用可能な‘ぼろたん’並みの易渋皮剥皮性を持つ遺伝子型を発見すること、あるいは難渋皮剥皮性を持つ遺伝子型のうちで比較的渋皮剥皮性の容易な遺伝子型を明らかにすることを目的に、ニホングリ在来品種 51 品種および野生型 8 個体について、渋皮剥皮性の調査を行った。その結果、在来品種である‘奴’が‘ぼろたん’と同程度の易渋皮剥皮性を示すことが明らかとなった。また、‘ぼろたん’および‘奴’以外の遺伝子型はすべて難渋皮剥皮性と判定され、これらの渋皮剥皮率は第 3 章と同様に広範囲かつ連続的な分布を示すことを確認した。次いで、‘奴’の易渋皮剥皮性が‘ぼろたん’と同じ劣性主働遺伝子による支配を受けているかどうかを調べるため、‘ぼろたん’×‘奴’および‘丹沢’×‘奴’の交雑を行い、その後代での渋皮剥皮性の分離比について調査を行った。これらの結果は、いずれも‘奴’の易渋皮剥皮性遺伝子型が‘ぼろたん’と同じ主働遺伝子の劣性ホモ型 (p/p) であり単純メンデル遺伝するとした仮定に矛盾しなかった。また、‘奴’の易渋皮剥皮性遺伝子型を‘ぼろたん’と同じ主働遺伝子の劣性ホモ型 (p/p) と仮定した場合に、‘丹沢’×‘奴’の交雑実生における p 遺伝子に近接する SSR マーカーによる推定遺伝子型と実際の渋皮剥皮性について比較したところ、SSR マーカーによって易渋皮剥皮性と難渋皮剥皮性の個体を明確に予測できることが確認された。これらの結果から、‘奴’は‘ぼろたん’と同じ P/p 遺伝子座に易渋皮剥皮性遺伝子を有することが示唆された。しかし、‘奴’および‘ぼろたん’の p 遺伝子周辺のハプロタイプ構造を調べたところ、これらが互いに異なることから‘奴’と‘ぼろたん’の持つ易渋皮剥皮性遺伝子は非常に遠い共通祖先によるか、あるいはその由来が異なる可能性があると考えられた。‘奴’は‘ぼろたん’およびその血縁品種との血縁関係を持たないことから、‘ぼろたん’の血縁品種による近親交配による近交弱勢の発生が危惧されている、農研機構における易渋皮剥皮性ニホングリ品種の育成に利用することで、そのリスクを低下させることができると考えられる。また、‘奴’の易渋皮剥皮性遺伝子は‘ぼろたん’の持つ易渋皮剥皮性遺伝子と共通の SSR マーカーによって識別が可能であることから、現在の農研機構におけるクリ育種選抜に容易に導入が可能である。加えて、‘奴’とその血縁の‘鹿ノ爪’は収穫期が中生であり、現在の農研機構におけるクリ育種の重要目標である中生以降の易渋皮剥皮性品種の育成に適していると考えられる (Fig.5-1)。

易渋皮剥皮性というこれまでにない画期的な特徴を持つニホングリ‘ぼろたん’

は、2007年の品種登録以降全国のクリ産地で積極的に導入が進められている。‘ぼろたん’の育成以降、農研機構におけるクリ育種事業において易渋皮剥皮性の付与を重点目標として交雑が行われた結果、2016年に‘ぼろたん’に次ぐ易渋皮剥皮性品種として‘ぼろすけ’が品種登録出願公表された。また、2017年より開始されたクリ第8回系統適応性検定試験においても、‘ぼろたん’の後代であるクリ筑波44号から46号までの3系統が新品種候補として全国での試作試験に供試されている。これらの選抜時には、本研究で開発したHOP法や‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性の遺伝様式についての知見が大きな役割を果たしている。しかし、‘ぼろたん’および‘ぼろすけ’はいずれも早生品種であり、中生や晩生の易渋皮剥皮性品種はいまだ存在しないため、今後中生以降の熟期の易渋皮剥皮性品種を育成して、易渋皮剥皮性品種のシリーズ化を進めていく必要がある。‘ぼろたん’やその易渋皮剥皮性遺伝子の由来である‘彼岸’はいずれも早生品種であり、これらから中生以降の品種を育成するためには、これらと晩生品種との交雑から p 遺伝子をヘテロに持つ交雑母本を作成し、さらに作成した交雑母本同士の交雑や交雑母本への戻し交雑を行う必要がある（Fig.5-1）。また、そのような交雑を繰り返すことで‘ぼろたん’血縁品種による近親交配となることが危惧される。このため本研究で明らかとなった、‘ぼろたん’および‘彼岸’とは血縁の離れた‘奴’や‘鹿ノ爪’を交雑親に加えることで、近親交配のリスクを高めることなく易渋皮剥皮性品種の熟期拡大を図ることが可能になると考えられる。加えて、第3章および4章で明らかとなった、シバグリ37、シバグリ166、‘福波’等の品種の持つ、量的な易渋皮剥皮性遺伝子を導入することで、さらに渋皮剥皮性の容易な新品種の育成も期待できる。今後、易渋皮剥皮性品種のシリーズ化と普及によって、ニホングリ品種の難渋皮剥皮性による消費・加工のハードルが解消し、国内のクリ産業全体が活性化することを期待したい。

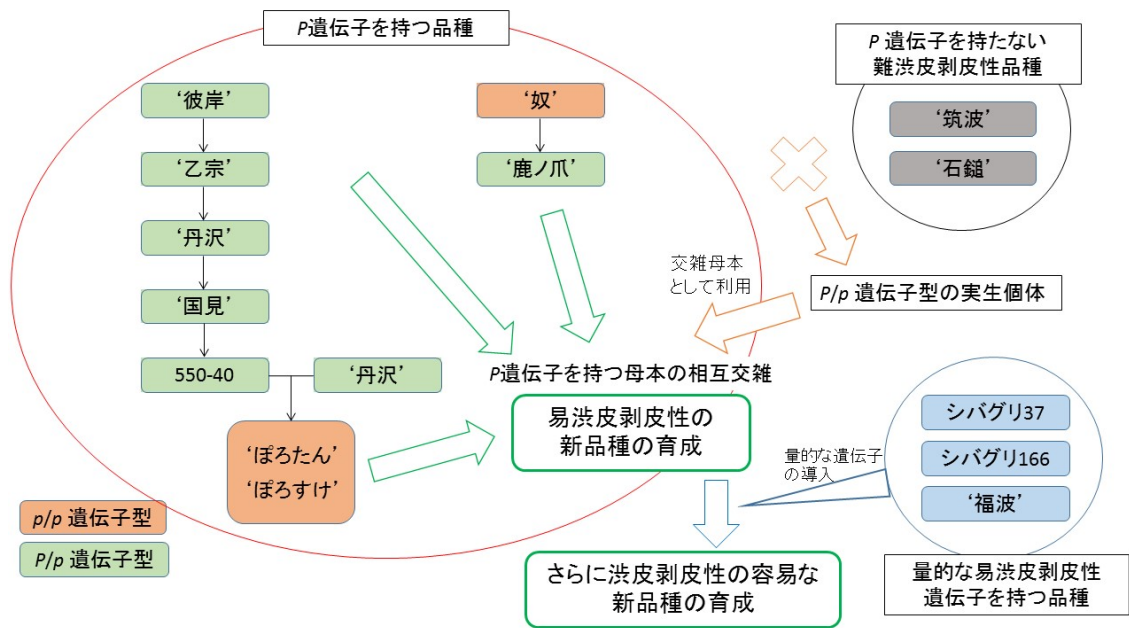


Fig.5-1 今後の易渋皮剥皮性品種の育成戦略

摘 要

簡便な渋皮剥皮性の評価法 (HOP 法) の開発

1. 効率的なクリの渋皮剥皮法の開発を目的として、鬼皮を除去した後のクリ果実を食用油で加熱した後に渋皮剥皮を行う方法を検討した結果、短時間での渋皮剥皮が可能であった。また、加熱条件として 190°C、2 分間の処理を行うことで効率的に渋皮剥皮性の評価が可能であると考えられた。
2. 揚げグリ、焼きグリ、および生果を用いた場合のそれぞれの渋皮剥皮時間の比較を行った結果、揚げグリを用いた場合の渋皮剥皮時間が最も短く、また揚げグリと焼きグリおよび生果の渋皮剥皮時間の中にそれぞれ有意な相関が認められた。
3. 以上の結果から、食用油を利用したクリの渋皮剥皮法はクリの育種選抜における渋皮剥皮性の評価方法として有効であり、この方法を HOP 法 (High-temperature Oil Peeling Method) と名付け、今後の育種選抜等に利用することとした。

クリ品種 ‘ぼろたん’ における易渋皮剥皮性の遺伝様式

1. ‘ぼろたん’ の易渋皮剥皮性の遺伝様式について明らかにするために、‘ぼろたん’ と同じ交雑組み合わせである 550-40×‘丹沢’、および‘ぼろたん’、‘丹沢’、‘筑波’の片側修正ダイアレル交配を行い、各後代における渋皮剥皮性の分離を調査した。その結果、‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性は劣性の主働遺伝子に支配されていることを明らかとした。
2. この劣性主働遺伝子を‘ぼろたん’はホモに、‘丹沢’および550-40はヘテロに持つことから、これらを相互に交雑することでその後代から易渋皮剥皮性の個体を獲得することが可能であることを明らかとした。

難渋皮剥皮性ニホングリ品種・系統間における渋皮剥皮性の遺伝変異の存在

1. 難渋皮剥皮性のニホングリ 5 品種、各 2 樹について 2 年間 HOP 法により渋皮剥皮性を調査した結果、品種間に渋皮剥皮性の有意な差が認められた。
2. 異なる 5 場所で栽培された難渋皮剥皮性のニホングリ 3 品種の 1 樹 1 年における調査においても、品種間に渋皮剥皮性の有意な差が認められた。

3. 難渋皮剥皮性のニホングリ 32 品種・系統および 1 野生型個体の各 1 樹について、渋皮剥皮性を 3 年間調査した場合においても品種・系統間に渋皮剥皮性の有意な差が認められた。異なる複数の条件下での試験において、いずれも品種・系統間に渋皮剥皮性の有意な差が見られたことから、難渋皮剥皮性のニホングリの渋皮剥皮性には遺伝変異が存在することが示唆された。
4. 難渋皮剥皮性のニホングリ 33 遺伝子型の渋皮剥皮性が連続的な変異を示したことから、難渋皮剥皮性ニホングリの渋皮剥皮性は複数遺伝子が関与する量的形質であると考えられた。また、3 年間の渋皮剥皮率の平均値における広義の遺伝率は 0.67 と推定された。

易渋皮剥皮性を持つ在来品種‘奴’の渋皮剥皮性の遺伝様式

1. ニホングリ在来品種 51 品種および 8 野生型個体について、HOP 法により渋皮剥皮性の調査を行ったところ、‘ぼろたん’と同程度の渋皮剥皮性を示す在来品種として‘奴’を見出した。
2. ‘奴’の後代実生集団における渋皮剥皮性の分離について調査した結果、‘奴’の易渋皮剥皮性は‘ぼろたん’と同じ劣性主働遺伝子による制御を受けていると考えられた。
3. ‘奴’の易渋皮剥皮性が‘ぼろたん’と同じ劣性主働遺伝子による支配を受けていると仮定した場合、‘丹沢’×‘奴’の F₁ 実生集団において SSR マーカーにより推定した易渋皮剥皮性遺伝子型と実際の渋皮剥皮性に対応関係が見られたことから、‘奴’の易渋皮剥皮性は‘ぼろたん’と同じ劣性主働遺伝子による制御を受けていると考えられた。
4. ‘奴’と‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性遺伝子座周辺のハプロタイプ構造を調べた結果、これらの一部が異なることから、‘奴’および‘ぼろたん’の易渋皮剥皮性遺伝子は非常に古い共通祖先を持つか、異なる由来を持つことが明らかとなった。
5. ‘奴’およびその血縁品種である‘鹿ノ爪’を今後の易渋皮剥皮性のクリ品種育成に利用することにより、‘ぼろたん’およびその血縁品種の偏重による近親交配の危険性を軽減できると考えられる。

Summary

The easy peeling pellicle (EPP) is one of the important breeding objective of Japanese chestnuts (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.), since few Japanese chestnut cultivars have EPP trait. So far, the pellicle peelability of chestnut at the selection stage of breeding has been evaluated using roasted nuts, but this treatment is laborious and time-consuming. To develop a method for quick peeling pellicle, nuts from eight cultivars without shell were deep-fried in canola oil for 2 min at 190 °C. The time required for removal of the pellicle using a paring knife without damaging the embryo was 3.1 min (average of eight cultivars) for fried nuts, 13.3 min for raw nuts, and 11.2 min for roasted nuts. In addition, there was a high correlation in the time required for pellicle removal between the fried nuts and the roasted nuts ($r = 0.868$), and the raw nuts ($r = 0.929$). Indicating that the frying treatment was as the effective as other treatments in identifying varietal differences of pellicle peelability. The present results indicate that the method of frying in canola oil is effective, simple, and rapid enough to discriminate chestnut genotypes. We therefore named it the HOP (High-temperature Oil Peeling) method, and decided to use it for the selection of pellicle peelability in the Japanese chestnut breeding.

‘Porotan’ is a Japanese chestnut cultivar that was selected from offspring of the cross 550-40 × ‘Tanzawa’ and released in 2006. Its nut is distinguished by a pellicle that is easy to peel after roasting. Both 550-40 and ‘Tanzawa’ are Japanese chestnuts, and 550-40 is a selection descended from ‘Tanzawa’. Both 550-40 and ‘Tanzawa’ have a difficult peeling pellicle (DPP). We evaluated the pellicle peelability of the seedlings by using the HOP method. Among 59 offspring of a cross of 550-40 × ‘Tanzawa’, 12 had an EPP and 47 had a DPP; this ratio is not significantly different from the 1:3 expected ratio for monogenic inheritance based on a chi-square test at $P = 0.05$. A half-diallel cross without selfings was made among ‘Porotan’, ‘Tanzawa’, and ‘Tsukuba’. All the offspring from ‘Tanzawa’ × ‘Tsukuba’ and from ‘Tsukuba’ × ‘Porotan’ had a DPP; in contrast, 39 offspring from ‘Tanzawa’ × ‘Porotan’ segregated in a ratio of 19 DPP to 20 EPP, which is not significantly different from the expected 1:1 ratio for monogenic segregation based on a chi-square test at $P = 0.05$. These results suggest that the EPP

trait of 'Porotan' is controlled by a major recessive gene at a single locus. We designated the pellicle peelability locus as P/p . According to this model, the 'Tsukuba' genotype is homozygous-dominant (P/P), the 'Tanzawa' and 550-40 genotype is heterozygous (P/p), and the 'Porotan' genotype is homozygous recessive (p/p).

To identify any genetic differences of the pellicle peelability in Japanese chestnuts with DPP, we detected a significant genetic difference in the pellicle peelability by HOP method among five Japanese chestnut cultivars grown in Tsukuba, Japan, using two trees in 2 years, and among three cultivars grown in five locations using a single tree in 1 year. We evaluated the pellicle peelability of 32 Japanese chestnut cultivars/selections and one wild clone (Shibaguri 37) using a single tree in 3 years to quantify the variation. The broad-sense heritability of mean values over the 3 years was estimated as 0.67. Shibaguri 37 had the highest pellicle peelability. The suggested new genes controlling the variation in the pellicle peelability have high potential in terms of breeding strategy for the EPP as an alternative to the major gene of 'Porotan', the use of which is likely to result in inbreeding.

To discover the genetic materials having the potential for EPP breeding, we evaluated the pellicle peelability of 59 accessions (51 Japanese local cultivars and 8 wild individuals) by using the HOP method. We discovered that 'Yakko' had an exceptionally high pellicle peelability score (87%), close to that of 'Porotan' (94%). The results of segregation ratio analysis of pellicle peelability and genotype prediction by simple sequence repeat (SSR) markers among F1 seedlings suggested that the EPP alleles of 'Porotan' and 'Yakko' are at the same locus. However, a haplotype structure analysis of the EPP genome region with SSR markers revealed that both haplotypes of 'Yakko' differed from those of 'Porotan', suggesting that the EPP gene of 'Yakko' had a different origin from that of 'Porotan' or was inherited from a common ancestor many generations ago. To use 'Yakko' and its kinship of 'Kanotsume' for the cross parents of EPP Japanese chestnut breeding with EPP trait, the risk of inbreeding of the 'Porotan' and its kinships will be reduced.

謝 辞

本論文の取りまとめに当たり、ご多忙中にもかかわらず懇切丁寧なご指導とご校閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科園芸学研究室の柴田道夫教授に深く感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、常日頃からご指導とご鞭撻をいただき、多大なるご示唆を賜りました日本大学生物資源科学部生命農学科の山田昌彦教授に心より御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたり多大なるご協力とご助言をいただきました（国研）農研機構果樹茶業研究部門品種育成研究領域の齋藤寿広氏、澤村豊博士、寺上伸吾博士、西尾聡悟博士に心より御礼申し上げます。また、以前果樹茶業研究部門品種育成研究領域に在籍されていた壽和夫氏、平林利郎氏、正田守幸氏、佐藤明彦博士、加藤秀憲氏、尾上典之博士に心より御礼申し上げます。

本研究に供試した多くの材料の維持・管理および収穫作業にご協力いただきました（国研）農研機構本部つくば技術支援センター藤本・大わし業務科の皆様にも心より御礼申し上げます。また、供試材料の収穫や渋皮剥皮性の評価に際してご協力いただいた歴代の（国研）農研機構果樹茶業研究部門養成研修課の研修生諸氏にも心より御礼申し上げます。

引用文献

- 赤尾剛・塚田直. 1984. 栗の剥皮方法. 特許公報(B2)昭 59-50307 号.
- Avanzato, D. (ed.). 2009. Following chestnut footprints (*Castanea* spp.). ISHS, Leuven.
- Batista, D., T. Valdivieso, L. Santos, O. S. Paulo, J. Gomes-Laranjo, and R. Costa. 2008. Genotyping *Castanea sativa* × *C. crenata* and *C. sativa* × *C. mollissima* F1 hybrids using nuclear SSRs. *Acta Hort.* 784:107-112.
- Bliss, F. A. 2010. Marker-assisted breeding in horticultural crops. *Acta Hort.* 859: 339–350.
- Campbell, R. C. 1974. *Statistics for biologists*. 2nd Ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Casasoli, M., J. Derory, C. Morera-Dutrey, O. Brendel., I. Porth, J. M. Guehl, F. Villani, and A. Kremer. 2006. Comparison of quantitative trait loci for adaptive traits between oak and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map. *Genetics*. 172: 553–546.
- Collard, B. C. Y., D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans R. Soc. B*. 363: 557–572.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- de Souza, V. A. B., D. H. Byrne and J. F. Taylor. 1998. Heritability, genetic and phenotypic correlations, and predicted selection response of quantitative traits in peach: I. An analysis of several reproductive traits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 598-603.
- Edge-Garza D. A., Y. Zhu, C. P. Peace. 2010. Enabling marker-assisted seedling selection in the Washington apple breeding program. *Acta Hort.* 859: 369–373.
- Fang, G. C., B. P. Blackmon, M. E. Staton, C. D. Nelson, T. L. Kubisiak, B. A. Olukolu, D. Henry, T. Zhebentyayeva, C. A. Sasaki, C. H. Cheng, M. Monsanto, S. Ficklin, M. Atkins, L. L. Georgi, A. Barakat, N. Wheeler, J. E. Carlson, R. Sederoff and A. G. Abbott. 2013. A physical map of the Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) genome and its integration with the genetic map. *Tree Genet. Genomes* 9: 525-537.
- Felcher, K., and D. Douches. 2012. Marker-assisted selection for resistance to golden nematode in potato. *Plant Breeding and Genomics* March 28, 2012. URL: <http://pbgworks.org/node/908>

- Foolad, M. R., D. R. Panthee. 2012. Marker-assisted selection in tomato breeding. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31: 93–123.
- Giora, B. A., and U. Lavi. 2012. 11–Marker-assisted selection in plant breeding. P. 163-184, In: Altman A. and P.M. Hasegawa (eds.) *Plant biotechnology and agriculture: prospects for the 21st century.* Elsevier and Academic Press, San Diego.
- Gobbin, D., L. Hohl, L. Conza, M. Jermini, C. Gessler and M. Conedera. 2007. Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome* 50: 1089-1103.
- Gonai, T., S. Terakami, C. Nishitani, T. Yamamoto and M. Kasumi. 2009. The validity of marker-assisted selection using DNA markers linked to a pear scab resistance gene (*Vnk*) in two populations. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78: 49–54.
- Haldar S, S. Haendiges, D. A. Edge-Garza, N. C. Oraguzie, J. Olmstead, and C. P. Peace. 2010. Applying genetic markers for self-compatibility in the WSU sweet cherry breeding program. *Acta Hort.* 859: 375–380.
- Hansche, P. E., and V. Beres. 1966. An analysis of environmental variability in sweet cherry. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 88: 173-183.
- Hansche, P. E., and R. M. Brooks. 1965. Temporal and spatial repeatabilities of a series of quantitative characters in sweet cherry (*Prunus Avium* L). *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 86: 120-128.
- Hasegawa, Y., Y. Suyama, and K. Seiwa. 2009. Pollen donor composition during the early phases of reproduction revealed by DNA genotyping of pollen grains and seeds of *Castanea crenata*. *New Phytol.* 182: 994-1002.
- 早川功. 2000. 水蒸気の断熱膨張力を利用した新しい食品加工・殺菌技術. *化学と生物* 38: 666-672.
- Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daigen, and I. Ashikawa. 2004. Development of PCR-cased SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1212–1220.
- Hebard, F. V. 2006. The backcross breeding program of the American chestnut foundation. *J. Amer. Chestnut Found.* 19: 55-77.
- Hospital, F. 2009. Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica* 136: 303–310.

- 飯森三男・太田敏輝. 1943. 支那栗の *Xenia* に関する研究. 園学雑. 14: 213-221.
- Inoue, E., T. Homma, H. Hamada, N. Shiina, M. Ebata, Y. Kawamata, M. Kurabayashi, Y. Sakurai, M. Sasaki, H. Nakanishi and H. Hara. 2008. Peeling easiness of nut pellicle in native Japanese (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) and European (*C. sativa* Mill.) chestnuts evaluated by HOP method. Hort. Res. (Japan) 7 (Suppl. 2): 464 (In Japanese).
- 磯松勲. 1992. 栗の剥皮処理法並びに剥皮処理装置. 公開特許公報 (A) 平 4-112779 号.
- Iwata, H., M. F. Minamikawa, H. Kajiya-Kanegae, M. Ishimori, and T. Hayashi. 2016. Genomics-Assisted Breeding in Fruit Trees. Breed. Sci. 66: 100–115.
- 猪崎政敏. 1978. クリ栽培の理論と実際. 博友社. 東京.
- Jacobs D. F., H. J. Dalgleish, C. D. Nelson. 2013. A conceptual framework for restoration of threatened plants: the effective model of American chestnut (*Castanea dentata*) reintroduction. New Phytol. 197: 378–393.
- 梶浦實. 1932. 栗の授粉に関する研究. 園学雑. 7:37-42.
- 川本裕巳. 2000. 栗の皮遊離方法. 公開特許公報 (A)2000-125832.
- Kellerhals, M., L. Franck, I. O. Baumgartner, A. Patocchi, J. E. Frey. 2011. Breeding for fire blight resistance in apple. Acta Hort. 896: 385–389.
- Kikuchi, A. 1948. Chestnut. In: Pomology 1 (In Japanese). Yokendo, Tokyo. pp. 231–245.
- 小林亨夫. 1955. クリの胴枯病. 日本林学会誌. 37: 346–351.
- Komatsu, K., M. Takahashi, and Y. Nakazawa. 2010. Common cutworm resistance in soybean. Gamma Field Symposia. 47: 21–25.
- Kotobuki, K. 1994. Chestnut. In: Jpn. Soc. Hort. Sci. (ed.). Horticulture in Japan. Asakura Publishing Co. Ltd., Tokyo. pp 53–55.
- 壽和夫. 1994. クリ. 松本孝嶺著. 植物遺伝資源集成. p.1174–1184. 講談社. 東京.
- 壽和夫, 佐藤義彦, 齋藤寿広, 阿部和幸, 大村三男, 梶浦一郎, 緒方達志, 小園照雄, 清家金嗣, 金戸橘夫, 町田裕, 栗原昭夫, 志村勲. 1994. クリ新品種 ‘紫峰’. 果樹試報. 26 : 15-27.
- 壽和夫・田中敬一・町田裕. 1982. クリの日×中種間雑種の育成と利用に関する研究 (第1報)渋皮剥皮の容易な優良品種育成のための基礎的研究. 園芸学会 昭和57年 秋季大会発表要旨. 140-141.
- 壽和夫・町田裕・佐藤義彦・梶浦一郎・小園照雄. 1984. クリのクリタマバチ抵抗性,

- 収穫期, 果実重量の遺伝と新選抜系統の特性概要. 果樹試報 A. 11: 43–53.
- Kubisiak, T. L., F. V. Hebard, C. D. Nelson, J. S. Zhang, R. Bernatzky, H. Huang, S. L. Anagnostakis, and R. L. Doudrick. 1997. Molecular mapping of resistance to blight in an interspecific cross in the genus *Castanea*. *Phytopathology*. 87: 751-759.
- Kubisiak, T. L., C. D. Nelson, M. E. Staton, T. Zhebentyayeva, C. Smith, B. A. Olukolu, G. C. Fang, F. V. Hebard, S. Anagnostakis, N. Wheeler, P. H. Sisco, A. G. Abbott, and R. R. Sederoff. 2013. A transcriptome-based genetic map of Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) and identification of regions of segmental homology with peach (*Prunus persica*). *Tree Genet. Genomes* 9: 557-571.
- Kumar, L. S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnol. Adv.* 17: 143–182.
- Luby, J. J., D. V. Shaw. 2001. Does marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? *HortSci*. 36: 872–879.
- 真部孝明. 2001. クリ果実—その性質と利用—. 農山漁村文化協会. 東京.
- Mano, Y., Omori, F., Tamaki, H., Mitsuhashi, S. and Takahashi, W. 2016. DNA marker-assisted selection approach for developing flooding-tolerant maize. *JARQ* 50: 175–82.
- Marinoni, D. T., A. Akkak, C. Beltramo, P. Guaraldo, P. Boccacci, G. Bounous, A. M. Ferrara, A. Ebone, E. Viotto, and R. Botta. 2013. Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genet. Genomes* 9: 1017-1030.
- Martin, M. A., C. Mattioni, M. Cherubini, D. Taurchini, and F. Villani. 2010. Genetic characterisation of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (simple sequence repeats) markers. *Ann. Appl. Biol.* 157: 37-44.
- 松本熊市. 1951. 栗の簡易渋皮剥皮法. 果実日本. 6 : 25-27.
- Miguez-Soto, B. and J. Fernandez-Lopez. 2012. Genetic parameters and predicted selection responses for timber production traits in a *Castanea sativa* progeny trial: developing a breeding program. *Tree Genet. Genomes* 8: 409-423.
- Miller, G., D. D. Miller, and R. A. Jaynes. 1996. Chestnuts. In: J. Janick and J. N. Moore (eds.). *Fruit breeding. Vol. III. Nuts*. Wiley, Inc., New York. pp. 99–123.
- Mitani, N., A. Kono, M. Yamada, A. Sato, S. Kobayashi, Y. Ban, T. Ueno, M. Shiraishi, S.

- Kanzaki, T. Tsujimoto, and K. Yonemori. 2014a. Application of marker-assisted selection in persimmon breeding of PCNA offspring using Scar markers among the population from the cross between non-PCNA 'Taigetsu' and PCNA 'Kanshu'. HortSci. 49: 1132–1135.
- Mitani, N., A. Kono, M. Yamada, A. Sato, S. Kobayashi, Y. Ban, T. Ueno, M. Shiraishi, S. Kanzaki, T. Tsujimoto, and K. Yonemori. 2014b. Practical marker-assisted selection using two SCAR markers for fruit astringency type in crosses of 'Taiten' × PCNA cultivars in persimmon breeding. Sci. Hortic. 170: 219–223.
- 宮崎正則・奥正和・佐藤宏・高橋徹. 1998. 日中雑種グリの渋皮の剥皮性と加工適性. 東洋食品工業短大・東洋食品研報. 22 : 1-12.
- 守屋成一. 2013. クリタマバチに対する天敵チュウゴクオナガコバチの導入. 植物防疫. 67 : 335-339.
- Moriya, S., K. Inoue, A. Otake, M. Shiga and M. Mabuchi. 1989. Decline of the chestnut gall wasp population, *Dryocosmus-kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera, Cynipidae) after the establishment of *Torymus-sinensis* Kamijo (Hymenoptera, Torymidae). Appl. Entomol. Zool. 24: 231-233.
- Moriya, S., H. Iwanami, N. Kotoda, S. Takahashi, T. Yamamoto, and K. Abe. 2009. Development of a marker-assisted selection system for columnar growth habit in Apple breeding. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78: 279-287.
- 元木靖. 2013. 世界のクリ生産の動向について—温帯ユーラシアの東部と西部の比較—. 経済学季報. 63 : 95-120.
- 中岡朝弼. 1913. 実験丹波栗の栽培. 有隣堂書店. 東京.
- Nishio, S., H. Iketani, H. Fujii, T. Yamamoto, S. Terakami, N. Takada, and T. Saito. 2014. Use of population structure and parentage analyses to elucidate the spread of native cultivars of Japanese chestnut. Tree Genet. Genomes 10: 1171–1180.
- Nishio, S., M. Yamada, Y. Sawamura, N. Takada and T. Saito. 2011a. Environmental variance components of fruit ripening date as used in both phenotypic and marker-assisted selection in Japanese pear breeding. HortSci. 46: 1540-1544.
- Nishio, S., N. Takada, T. Yamamoto, S. Terakami, T. Hayashi, Y. Sawamura, and T. Saito. 2013. Mapping and pedigree analysis of the gene that controls the easy peel pellicle trait in Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc). Tree Genet. Genomes 9: 723–730.

- Nishio, S., S. Terakami, T. Matsumoto, T. Yamamoto, N. Takada, H. Kato, Y. Katayose, and T. Saito. 2017. Identification of QTLs for agronomic traits in the Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc) breeding. Hort. J. 87: 43-54.
- Nishio, S., T. Hayashi, T. Yamamoto, M. Yamada, N. Takada, H. Kato, C. Nishitani, and T. Saito. 2016. Validation of molecular markers associated with fruit ripening day of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) using variance components. Sci. Hortic. 199: 9-14.
- Nishio, S., T. Yamamoto, S. Terakami, Y. Sawamura, N. Takada, and T. Saito. 2011b. Genetic diversity of Japanese chestnut cultivars assessed by SSR markers. Breed. Sci. 61: 109-120.
- Nishio S, T. Yamamoto, S. Terakami, Y. Sawamura, N. Takada, C. Nishitani, and T. Saito. 2011c. Novel genomic and EST-derived SSR markers in Japanese chestnuts. Sci. Hortic. 130: 838-846.
- 西山嘉寛. 2011. 新品種の栽培技術, クリ「岡山1号」「岡山2号」「岡山3号」. 果実日本. 67: 78-81.
- 西山嘉寛. 2014. 岡山甘栗に関する栽培基礎調査 (I). 岡森研研報. 30: 13-36.
- 大出明・岡川正雄・渡辺日出男・相原昭一. 1964. 栗の加工に関する試験. 栃木県農産食品工業指導所 昭和38年度試験成績書. 64-80.
- 大崎守・佐宗久雄. 1942. 支那栗の渋皮離脱に関する研究. 園学雑. 13:229-232.
- Pereira-Lorenzo, S., A. Ballester, E. Corredoira, A. M. Vieitez, S. Agnanostakis, R. Costa, G. Bounous, R. Botta, G. L. Beccaro, T. L. Kubisiak, M. Conedera, P. Krebs, T. Yamamoto, Y. Sawamura, N. Takada, J. Gomes-Laranjo and A. M. Ramos-Cabrer. 2012. Chestnut. p. 729-769. In: M. L. Badenes and D. H. Byrne (eds.). Fruit Breeding. Springer, New York, USA.
- 齋藤寿広・熊本県農林水産部生産局園芸課・酒井雄作・神尾真司. 2016. 第11章 くり「ぼろたん」. 山田昌彦・別所英男・後藤一寿編. 新品種・新技術で拓く果樹産業の未来. p.125-135. 農林統計出版. 東京.
- 齋藤寿広・壽和夫・澤村豊・阿部和幸・寺井理治・正田守幸・高田教臣・佐藤義彦・平林利郎・佐藤明彦・西端豊英・檜村芳記・小園照雄・福田博之・木原武士・鈴木勝征・内田誠. 2009. ニホングリ新品種「ぼろたん」. 果樹研報. 9: 1-9.
- 齋藤寿広・高田教臣・澤村豊・西尾聡悟・平林利郎・佐藤明彦・加藤秀憲・尾上典之・内田誠. 2017. ニホングリ新品種「ぼろすけ」. 園学研 16 (別1) : 282.
- Sato, A., Y. Sawamura, N. Takada, and T. Hirabayashi. 2008. Relationship between inbreeding

- coefficients and plant height of 1-year-old seedlings in crosses among Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) cultivars/selections. *Sci. Hortic.* 117: 85–88.
- Sato, A., K. Tanaka, N. Takada, Y. Sawamura, and T. Hirabayashi. 2010. Comparison of phenolic content of easily removed pellicle of Japanese chestnut ‘Porotan’ with other Japanese and Chinese chestnut cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 79: 258-262.
- Sato, A., M. Yamada, H. Iwanami, and N. Hirakawa. 2000. Optimal spatial and temporal measurement repetition for reducing environmental variation of berry traits in grape breeding. *Sci. Hortic.* 85: 75-83.
- 佐藤幸夫. 1979. 栗の渋皮剥離整形方法と装置. 公開特許公報(A)昭 54-80450 号 269-272.
- Sawamura, Y. 2006. Chestnut. p. 82–85. In: *Jpn. Soc. Hort. Sci. (ed.). Horticulture in Japan.* Shoukadoh, Kyoto.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech.* 18: 233–234.
- 塩沢健士. 1997. 第 14 章 クリ. P616-641. 杉浦明著. 新編果樹園芸ハンドブック第 2 版. 養賢堂. 東京.
- 志村勲・金戸橋夫・安野正純・松永晴夫. 1971. クリの育種に関する研究 I 交配親による優良個体出現率の差異. 園試報告 A. 10:1-9.
- 正田守幸・齋藤寿広・澤村豊・佐藤義彦・阿部和幸・寺井理治・西端豊英・樫村芳記・福田博之・木原武士・鈴木勝征・壽和夫. 2002. クリ第 5 回系統適応性検定試験の経過と供試系統の特性. 果樹研報. 1:89–94.
- Snedecor, G. W., and W. G. Cochran. 1972. *Statistical methods.* 6th ed. p. 49–50, 312–313. Iwanami-shoten, Tokyo.
- Solar, A., A. Podjavorsek, and F. Stampar. 2005. Phenotypic and genotypic diversity of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Slovenia - opportunity for genetic improvement. *Genet. Resour. Crop Evol.* 52: 381-394.
- 高田教臣, 壽和夫, 平林利郎, 佐藤義彦, 寺井理治, 正田守幸, 樫村芳記, 澤村豊, 佐藤明彦, 阿部和幸, 西端豊英, 西尾聡悟, 木原武士, 鈴木勝征, 内田誠, 齋藤寿広. 2012. クリ第 6 回系統適応性検定試験の概要. 果樹研報. 13: 43-50.
- Takada, N., Y. Sawamura, S. Nishio, and T. Saito. 2010. Influence of pollen parents on

- removability of pellicle and fruit weight of chestnut cultivar 'Porotan'. *Acta Hortic.* 866: 239-242.
- Tanaka, K., and K. Kotobuki. 1992. Comparative ease of pellicle removal among Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. Zucc.) and Chinese chestnut (*C. mollissima* Blume) and their hybrids. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60: 811-819.
- 田中敬一・壽和夫. 1992. ニホンクリの渋皮剥皮性に関する要因の組織的・化学的解析. *園学雑.* 61:1-6.
- Tanaka, K. and K. Kotobuki. 1998a. Partial purification, estimated chemical structure, and the adhesive property of castahesion between the pellicle and kernel of chestnut. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 14-20.
- Tanaka, K. and K. Kotobuki. 1998b. The role of phenolic substances in the adhesion between the pellicle and kernel of Japanese chestnut under experimental conditions. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 1-8.
- Tanaka, K., K. Kotobuki and N. Kakiuchi. 1981. Numerization of peeling easiness and role of phenolic compounds of the pellicle in the adhesion between the pellicle and embryo in comparison of Japanese (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) and Chinese (*Castanea mollissima* Blume) chestnuts. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 50: 363-371.
- 田中諭一郎. 1933. クリの栽培法. 明文堂. 東京.
- Tartarini S., S. Sansavini, B. Vinatzer, F. Gennari, and C. Domizi. 2000. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the *Vf* scab resistance gene. *Acta Hortic.* 538:549–552
- Terakami, S., M. Shoda, Y. Adachi, T. Gonai, M. Kasumi, Y. Sawamura, H. Iketani, K. Kotobuki, A. Patocchi, C. Gessler, T. Hayashi, and T. Yamamoto. 2006. Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar Kinchaku. *Theor. Appl. Genet.* 113: 743–752.
- Terakami, S., Y. Adachi, H. Iketani, Y. Sato, Y. Sawamura, N. Takada, C. Nishitani, and T. Yamamoto. 2007. Genetic mapping of genes for susceptibility to black spot disease in Japanese pears. *Genome.* 50: 735–741.
- Tester M, and P. Langridge. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327:818–822
- Thaipong, K., and U. Boonprakob. 2005. Genetic and environmental variance components in

- guava fruit qualities. *Sci. Hortic.* 104: 37-47.
- 塚田直・平山達雄. 1985. 栗の剥皮方法. 特許公報 (B2) 昭 60-57826 号.
- Wheeler, N., and R. Sederoff. 2009. Role of genomics in the potential restoration of the American chestnut. *Tree Genet. Genomes* 5: 181-187.
- Woodroof, J. G. 1979. *Tree Nuts: Production Processing Products (Second Ed.)*. AVI Publishing Company, ING, Connecticut.
- 八木岡新衛門. 1915. 実践栗の栽培. 大日本農業奨励会. 東京.
- 山田昌彦. 2011. 果樹の交雑育種法. 養賢堂. 東京.
- 山田昌彦. 2016. 第 1 章 果樹品種の変遷と品種改良. 山田昌彦・別所英男. 後藤一寿編. 新品種・新技術で拓く果樹産業の未来. p.9-26. 農林統計出版. 東京.
- Yamada, M., E. Giordani, and K. Yonemori. 2012. Persimmon. p 663-693. In: M. L. Badenes and D. H. Byrne (eds.). *Fruit Breeding*. Springer Science + Business Media, New York.
- Yamada, M., A. Sato and Y. Ukai. 2002. Genetic differences and environmental variations in calyx-end fruit cracking among Japanese persimmon cultivars and selections. *HortSci.* 37: 164-167.
- Yamada, M., H. Yamane, K. Yoshinaga, and Y. Ukai. 1993. Optimal spatial and temporal measurement repetition for selection in Japanese persimmon breeding. *HortSci.* 28: 838-841.
- Yamada, M., H. Yamane, and Y. Ukai. 1994. Genetic analysis of Japanese persimmon fruit weight. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:1298-1302.
- Yamada, M., H. Yamane, and Y. Ukai, 1995. Genetic analysis of fruit ripening time in Japanese persimmon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 886-890.
- Yamamoto, T., T. Shimada, K. Kotobuki, Y. Morimoto, and M. Yoshida. 1998. Genetic characterization of Asian chestnut varieties assessed by AFLP. *Breed. Sci.* 48: 359-363.
- 安田喜憲. 1995. クリ林が支えた高度な文化—花粉が明らかにした遺跡の変遷—. 梅原猛・安田喜憲編. 縄文文明の発見—驚異の三内丸山遺跡. p.118-153. PHP 研究所. 東京.