

博士論文

良食味完全甘ガキの効率的育成に関する研究

三 谷 宣 仁

# 目次

第1章 序論.....	1
第2章 非完全甘ガキ‘黒熊’に由来する交雑実生個体の DNA マーカーによる甘渋性識別	
緒言 .....	10
材料および方法 .....	12
実験1 ‘太天’と完全甘ガキ品種との交雑による実生集団の甘渋性マーカーによる識別 .....	12
実験2 ‘太月’と‘甘秋’との交雑による実生集団の甘渋性マーカーによる識別.....	13
結果 .....	14
実験1 ‘太天’と完全甘ガキ品種との交雑による実生集団の甘渋性マーカーによる識別 .....	14
実験2 ‘太月’と‘甘秋’との交雑による実生集団の甘渋性マーカーによる識別.....	14
考察 .....	15
第3章 カキ育種における果肉が多汁で柔軟な実生個体の出現率および果汁の多少の品種間差異	
緒言 .....	32
材料および方法 .....	33
実験1 果肉が多汁で柔軟な実生個体の出現率 .....	33
実験2 果汁の多少の品種間差異 .....	34
結果 .....	37
実験1 果肉が多汁で柔軟な実生個体の出現率 .....	37
実験2 果汁の多少の品種間差異 .....	38
考察 .....	40
第4章 総合考察 .....	63
摘要.....	67
Summary .....	71
引用文献.....	76
謝辞.....	91

# 第1章 序論

カキ (*Diospyros kaki* Thunb.) はカキノキ科 (Ebenaceae) カキ属に属する果樹である。カキ属植物は約 500 種近くあるとされその多くは熱帯、亜熱帯地域に分布するが、カキ、アメリカガキ (*D. virginiana* L.)、マメガキ (*D. lotus* L.)、アブラガキ (*D. oleifera* Cheng) などは温帯に分布している (板村 2015)。カキの原産地は中国とされ、東アジア、特に中国、韓国、および日本では古くから利用されてきた。世界全体でのカキの生産量は 543 万トンとなっており、中国 (399 万トン、73.5%)、韓国 (41 万トン、7.5%)、日本 (23 万トン、4.3%) となっているが、近年ではスペイン (31 万トン)、ブラジル (16 万トン) など、ヨーロッパや南米での生産量も増えている (FAO 2016)。

日本においてカキは「古事記」や「日本書紀」にも記載されており、古くから秋の代表的な果物として日本人に親しまれてきた。奈良時代にはすでに商品として取引されたり、木材としても利用されたりしたようである (今井 1990)。平安時代になると小規模な栽培が行われ、果実を熟柿や干し柿にして、祭式儀礼に利用したり、保存食にしたりしていたと考えられている (西山 1994)。日本全国で栽培が盛んとなったのは明治時代になってからであり、‘富有’や‘次郎’といった現在の主力品種の栽培もこの時代に始まっている。また、果実を食用として利用するだけでなく、果肉から柿渋を製造したり、へたを煎じて民間薬としたり、葉をお茶や包装資材として利用したりと、食用以外にも有効に利用されてきた (平 1999)。カキの葉に高濃度のアスコルビン酸が含まれていることは古くから知られ (小川・伊東 1972; 鶴永ら 2006)、近年の研究ではカキの葉にはポリフェノールが高含量で含まれていることも明らかとなっている (Bei *et al.* 2009; Lee *et al.* 2004)。

日本で栽培されているカキは4つの種類に分類される (Hume 1914; 梶浦 1946)。すなわち、①完全甘ガキ (種子の有無に関係なく甘い) ②不完全甘ガキ (種子が入ると甘いが、種子がないと渋が残る) ③完全渋ガキ (種子の有無に関係なく渋い) ④不完全渋ガキ (種子が入るとその周りだけ渋が抜ける) である。このうち②~④をまとめて非完全甘ガキと呼ぶこともある。本研究の第2章および第3章で用いたカキ品種について分類と来歴を Table 1.1 に示す。

4種類のうち‘西条’や‘愛宕’といった完全渋ガキ、あるいは‘平核無’や‘刀根早生’などの不完全渋ガキは、渋抜きを行うか、あるいは干し柿等に加工するかしないか食べる事ができな

い。イタリアやスペインなどヨーロッパで渋ガキの栽培が多い地域では、渋ガキを固いうちに収穫し熟柿になったものをスプーンで食べることが多いが、日本ではアルコールや二酸化炭素で脱渋を行うのが一般的である。アルコールによる脱渋はかつて日本で最も一般的な脱渋法であり（平 2003）、酒がなくなった酒樽で渋を抜く樽抜き法や、焼酎をカキ果実のへたに塗ってからビニール袋に入れ数日間置くといった方法がよく知られている。二酸化炭素による脱渋は主要品種である‘平核無’で行われてきたが（Yamada *et al.* 2002）、脱渋による軟化や障害が発生しやすい。近年では、果実を前もって加温し二酸化炭素濃度を高く処理時間を短くした CTSD（Constant Temperature Short Duration）法（松尾ら 1975, 小川ら 2011）や、樹上の果実をアルコールで渋抜きする樹上脱渋法（杉浦ら 1975; 1977）がカキ産地で実用化されている。しかしながら同じ脱渋法であっても、例えば本研究では供試品種として同じ交雑組合せから育成した不完全甘ガキの‘太天’および‘太月’を用いているが、両者の CTSD 脱渋は、‘太月’が二酸化炭素 100%を 26~28°Cで 24 時間処理した後 26~28°Cで 2 日間加温する（山田 2012a）のに対し、‘太天’では二酸化炭素 100%を 26~30°Cで 24 時間処理した後 26~28°Cで 5 日間加温して脱渋を行う（山田ら 2012b）といったように、個々の品種で検討する必要がある。

カキの渋みはポリフェノールの 1 種であるカキタンニンに起因する。カキタンニンは縮合型タンニンであり、エピガロカテキン、エピガロカテキンガレート、エピカテキン、エピカテキンガレートの 4 種類のカテキンにより構成され（Matsuo and Ito 1978）、カキタンニンが舌のタンパク質と結びつくことで味蕾細胞が麻痺し、その結果渋みを感じるとされている（板村 2015）。カキタンニンの平均分子量や構成成分の比率は十分に明らかにされていないものの、完全甘ガキのタンニンは非完全甘ガキのタンニンとは質的に大きく異なっていることが明らかにされている（米森ら 1983）。タンニン細胞の発育過程は完全甘ガキと非完全甘ガキとの間で顕著な差異が認められている（米森・松島 1985）。非完全甘ガキ果実では 7 月下旬まで急激にタンニン細胞が肥大して巨大細胞となるのに対して、完全甘ガキ果実のタンニン細胞は 6 月下旬ごろよりほとんど肥大しなくなり、小さいままで発育を停止する。また完全甘ガキではタンニン細胞の肥大の停止する 6 月下旬以降、単位面積あたりに占めるタンニン細胞の総面積が速やかに減少し、この減少過程は完全甘ガキの樹上での渋味の消長過程と酷似している。また、不完全甘ガキは 8 月上旬までにタンニン細胞が完全に凝固しているが、

完全甘ガキは全く凝固しておらず、完全甘ガキでの渋みの減少にタンニン物質の不溶化が直接関与していないことから、完全甘ガキでの主たる要因はタンニン細胞の初期の発育停止によるタンニン物質の果実内での希釈効果であることが示唆されている（米森・松島 1985）。完全甘ガキでは樹上での自然脱渋に夏秋季に比較的高温となることを要するため、日本では寒冷地や高冷地などでは脱渋しないことから、渋ガキに比べて南の地域でしか生産できない（山田 2007）。

‘富有’や‘次郎’、‘御所’といった完全甘ガキの品種の果実は適期に収穫すればそのまま食べることができる。甘ガキの品種は日本で独自に分化したと考えられ、甘ガキ品種としては不完全甘ガキの‘禅寺丸’が最も古いものとされている。完全甘ガキは不完全甘ガキよりもさらに後に発生したと考えられており（神崎 2016）、17世紀に報告された‘御所’が最初と考えられ（菊池 1948）、不完全甘ガキに比べて歴史が浅い。また完全甘ガキの在来品種数は少なく、1979年に行われたカキの全国規模の調査ではカキ 306 品種が選定され特性が調査されたが、完全甘ガキが約 10%、不完全甘ガキが約 35%、不完全渋ガキが約 10%、完全渋ガキが約 45%となっている（広島県果樹試験場 1979）。さらに地理的にも偏っており、完全甘ガキは中部地方から近畿地方原産のものが多い（平 1999）。カキの果実は‘平核無’のように扁平なものから‘西条’や‘愛宕’のように縦長いものまで様々な変異が見られるが、完全甘ガキは‘御所’に似た扁平な果形をしたものがほとんどであり（片山（池上）ら 2013）、また、果実がへたと果実の接着部に亀裂が生じるへたすきや、へたと反対の果頂部に亀裂が生じる果頂裂果など、裂果しやすい性質を持つものが多く、成熟期も晩生に偏っている。

完全甘ガキは果実でのタンニン蓄積機構が変化したために発生したと考えられ、日本で発生した品種群と、‘羅田甜柿’、‘甜宝蓋’などの中国原産の品種群が存在する（片山（池上）ら 2013）。中国で発見された‘羅田甜柿’（Wang 1982）は完全甘ガキであることが確認された（山田ら 1993）が、その遺伝的性質は日本原産の完全甘ガキとは異なっており（Ikegami *et al.* 2004）、中国で独立に発達したものであると考えられる（Ikegami *et al.* 2005）。また、日本の完全甘ガキ性が劣性形質であるのに対し、中国の完全甘ガキ性は優性形質で遺伝すること（Ikegami *et al.* 2006）や中国の完全甘ガキはフラボノイド合成に関わる遺伝子が果実発育後期まで発現し続けること、およびタンニンの蓄積に関わる遺伝子の発現が低下すること（Ikegami *et al.* 2009）が明らかにされている。

農研機構果樹茶業研究部門（旧農林省園芸試験場、農林水産省果樹試験場、農研機構果樹研究所）では、高品質・栽培容易・安定多収の完全甘ガキの優良品種を育成することを主たる目標として 1938 年からカキの育種を進めてきたが、2017 年までに生食用の完全甘ガキ品種を 12 品種、生食用の不完全渋ガキ品種 2 品種、さらに紅葉専用品種や台木用品種を登録している（農研機構果樹茶業研究部門 2017）。完全甘ガキの育成を主たる目標としているのは、完全甘ガキであれば樹上で成熟しながら脱渋するため、収穫すればそのまま食べられるという利点を有する一方で、不完全甘ガキは樹上で脱渋するものの、種子のっていない果実は渋く、出荷する段階でこの果実を取り除く必要があること、また渋ガキは‘平核無’など一部の品種は脱渋方法が確立し商業生産されているが、脱渋に数日間かかる上に渋抜けの悪い品種も多く、また脱渋後に日持ちしにくい品種は輸送に適さず流通させるのが困難であること、などが理由である。

完全甘ガキ品種を生み出すために育成開始当時から完全甘ガキ同士の交雑が主に行われてきた（Yamada 1993）。これは完全甘ガキ性が遺伝的に劣性であり、完全甘ガキ同士の交雑で得られる個体は全て完全甘ガキとなるが、完全甘ガキと在来の非完全甘ガキとの交雑や、在来の非完全甘ガキ同士の交雑では全て非完全甘ガキとなるからである。在来の完全甘ガキは果実成熟期が遅い品種ばかりであるため、育成当初は早生の完全甘ガキ優良品種を育成することが主要な育種目標となった（山田 2011）。この中で早生の‘伊豆’（広瀬ら 1971）や極早生の‘早秋’（山田ら 2004）といった品種が育成され、交雑親集団の果実成熟期については早生化を図ることができた。しかし上述のように完全甘ガキは在来品種数が少なく性質も偏っており、遺伝的背景が狭い。さらに‘富有’や‘次郎’のように雄花を着生しない品種・系統があり（Yakushiji *et al.* 1995; 山根ら 1991）、花粉親として用いることができる品種・系統の数も制限される。この結果、欠点が少なく経済栽培されていた‘富有’や‘次郎’を種子親とし、雄花を着生するが欠点の多い完全甘ガキ品種を花粉親として多く用いることになった（山田 2011）。農研機構で育成した完全甘ガキ品種のうち 11 品種の交雑親をたどるとその由来となっているのは 5 品種である（神崎 2015）。完全甘ガキ同士の交雑を繰り返してきた結果、近交弱勢によって樹勢や収量性の問題が生じるようになり、樹勢の弱い個体や果実が小さい個体が多く出現するようになった。食味等の果実形質が優れていて選抜された個体であっても樹勢が弱く小さな果実しか結実しないのであれば栽培現場で普及する見込みはない。このた

め近交弱勢の問題を回避する観点から、完全甘ガキ同士の交雑を行うにしても近交係数が 0 もしくは小さい組み合わせを選ぶ、あるいは完全甘ガキと非完全甘ガキとの交雑により生じた非完全甘ガキに完全甘ガキを再度交雑（戻し交雑）する、といった方策が必要となった（Yamada 2005）。

一般に日本で栽培されているカキのほとんどの品種は六倍体であり（Namikawa and Higashi 1928; Tamura *et al.* 1998）、諸形質の遺伝解析については知見が乏しいものの、甘渋性の遺伝様式に関しては交雑後代における甘渋性の分離の研究蓄積がある。完全甘ガキ同士の交雑と異なり、完全甘ガキと日本在来の非完全甘ガキ、あるいは日本在来の非完全甘ガキ同士を交雑した場合には、生じる個体は全て非完全甘ガキとなる。この中から選抜した非完全甘ガキに完全甘ガキを戻し交雑した場合でも、完全甘ガキの個体が 15~20%程度しか得られないことが分かっている（池田ら 1985）。近年の研究からは、カキの甘渋性は *Ast* 遺伝子座によって支配され、優性の非完全甘ガキ遺伝子（A）と劣性の完全甘ガキ遺伝子（a）が存在し、6つの対立遺伝子の中に A が 1 つでもあると非完全甘ガキとなり、6 つすべて a の場合のみ完全甘ガキになると考えられており（Akagi *et al.* 2010）、また、A および a に連鎖する領域について多型が存在することが明らかにされている（Kanzaki *et al.* 2008; Akagi *et al.* 2012）。農研機構のカキ育種においては、交雑によって得られた種子からの実生を結実促進のため成木に高接ぎし、樹性や果実を調査することとしている。交雑によって得られた個体が完全甘ガキであるかどうかは果実が結実するまで分からず、交雑種子からの実生を結実促進のため接ぎ木しているが、それでも果実が初めて結実するまで少なくとも 3~5 年はかかる。また育種選抜圃場で接ぎ木可能な交雑実生の数にも圃場管理のための労力や費用による制限がある。接ぎ木する前の実生の段階でその個体が完全甘ガキであるかどうかを DNA マーカーにより識別できれば、完全甘ガキの個体のみを接ぎ木できることになり、完全甘ガキの品種育成が効率的なものとなる。以上のことから農研機構果樹茶業研究部門は、京都大学および近畿大学と共同で、カキの交雑実生について幼苗段階で甘渋性を識別する方法を確立することを目的に研究を進めてきた。

カキの完全甘ガキ形質は非完全甘ガキ形質に対し劣性であり、完全甘ガキとなるのは全ての遺伝子が劣性となった場合で、いずれか 1 つでも優性であれば非完全甘ガキとなることから、カキ交雑実生の甘渋性識別するためには、非完全甘ガキ形質に連鎖するマーカーを検出

すればよいと考えられた (Yonemori *et al.* 2000)。Kanzaki *et al.* (2001) は、カキ交雑実生の中から完全甘ガキ個体を選抜するために、BSA (bulked segregant analysis) 法を利用した AFLP (amplified fragment length polymorphism) 分析を行い、*Ast* 遺伝子座に連鎖した AFLP マーカーの探索を行った。非完全甘ガキである‘西村早生’に完全甘ガキである興津 25 号を交雑して得られた非完全甘ガキ 170-26 に完全甘ガキを戻し交雑し、得られた集団の中で既に結実し甘渋性が判定されている個体から DNA を抽出し、完全甘ガキと非完全甘ガキをそれぞれバルク化して AFLP 分析に供試した結果、非完全甘ガキ形質に連鎖している AFLP マーカーが見いだされた。次いで、このマーカーを用いて RFLP (restriction fragment length polymorphism) 分析を行ったところ、完全甘ガキ個体と非完全甘ガキ個体との間で多型が確認され、‘西村早生’、170-26、および交雑後代の全ての非完全甘ガキ個体では 8kb または 6.5kb のバンドの少なくとも一方が検出されたが、交雑後代の完全甘ガキではいずれも検出されなかった。すなわち‘西村早生’由来の *Ast* 遺伝子座と連鎖する 2 本のバンド (それぞれ A1、A2) のうち少なくとも 1 本でも持つ品種・系統は非完全甘ガキ、全く持たないものは完全甘ガキであると判断でき、‘西村早生’に由来する交雑実生集団についてはこの 2 本をマーカーとして用いることにより、完全甘ガキか非完全甘ガキかを完全に識別することが可能となった。これに続き、完全甘ガキ 12 品種および非完全甘ガキ 20 品種を用いて RFLP 分析が行われた (Kanzaki *et al.* 2000) が、完全甘ガキ品種では、非完全甘ガキの形質に連鎖しているマーカーは検出されなかったが、非完全甘ガキ品種間では多くの多型が検出され、全ての品種において少なくとも 1 つはマーカーの存在が確認され、完全甘ガキと同一のバンドパターンを示す品種はなかった。

さらにこの RFLP マーカーの有用性を検討するため、非完全甘ガキ‘170-26’に完全甘ガキの‘富有’を戻し交雑して得られた集団 (FU-170) と、非完全甘ガキ‘会津身不知’に完全甘ガキ‘太秋’を交雑して得られた非完全甘ガキ 275-13 に‘富有’を戻し交雑して得られた集団 (FU-275) を用いて、RFLP マーカーの有無と実際の果実の甘渋性が一致するかどうか確かめられた (Kanzaki *et al.* 2008)。RFLP マーカーの有無により完全甘ガキと判断された個体は、FU-170 では 71 個体中 5 個体 (7%)、および FU-275 では 101 個体中 23 個体 (23%) であった。果実が得られた FU-170 の 32 個体および FU-275 の 68 個体について、果実中のタンニン細胞の大きさと可溶性タンニン含量に基づいて果実の甘渋性を決定したところ、RFLP マーカーによる識別結果と果実の甘渋性が一致することが確認された。



以上のように RFLP マーカーが甘渋性識別に有効であることが示されたが、品種育成において交雑によって得られた多数の個体の甘渋性を識別することを考えると、RFLP 分析は労力がかかるため、RFLP マーカーを PCR マーカーに変換し、迅速で多数のサンプルを扱えるようにした方が選抜に好都合である。このため 2 つの RFLP マーカーそれぞれに対応した SCAR (sequence characterized amplified region) マーカーの開発を京都大学および近畿大学が主に担当し、本研究では、開発された SCAR マーカーが実際のカキ育種においてどの程度有効であるか、多数の交雑実生個体を用いた検証を行うこととした。

ところで甘渋性はカキ特有の現象であるが、新品種育成に関しては他の果樹と同様、果実品質を向上させることが大きな目標であり、消費を拡大できるような美味しさを持つ品種が求められている。果樹の育種では交雑によって得られた実生個体の果実の食味に関して、甘味、酸味、香り、果肉硬度などの肉質を中心に評価が行われている。甘味や果肉硬度はそれぞれ屈折糖度計や果実硬度計を用いて測定されてきた。屈折糖度計による測定では、果汁に含まれるブドウ糖や果糖の屈折率がショ糖のそれとほとんど同じであることから、表示される Brix(%)の値を糖度として評価している。個体によって含まれる糖の組成は異なっているが、年間数百もの個体を扱う品種育成において個々の個体の糖組成まで評価するのは膨大な労力を要するため、屈折糖度計での値による評価は簡便で効率的である。また果実硬度計による測定は、ユニバーサル型果実硬度計やフルーツテスター、マグネステラ型果実硬度計などにより、果実の果肉にプランジャーを貫入させたときの貫入力値によって硬度を評価している (大森 1998)。糖度や果肉硬度以外の食味評価に関しては客観的な食味調査は困難であり (Hampson *et al.* 2000)、選抜を担当する研究員数名が専ら官能評価によって評価を行っているのが現状である。

農研機構のカキ育種では食味、非裂果性、果実重、豊産性、日持ち性、外観等を重視して選抜を進めてきた。この中で食味に関しては、成熟時に果肉が軟らかくて果汁が多く、粉質化しないものを良食味と考えてきた。果汁の多少、すなわち果汁性は果実の食味を決定する重要な要因の 1 つであるが、農研機構果樹茶業研究部門が育成した‘太秋’ (山根ら 2001) は果汁が多いと評価されており、平成 27 年には熊本を中心に 314ha で生産されている (農林水産省 2018)。また、近年品種登録された‘太豊’ (佐藤ら 2018)、‘太雅’ (佐藤ら 2016b)、‘麗玉’ (佐藤ら 2016a) も、新品種登録のための系統適応性・特性検定試験において果汁が多いと評

価されており、果汁が多いことは今後も新品種が備えるべき性質であると考えられる。上述のように交雑実生個体は播種してから育苗、接ぎ木を経て3~5年後に初結実するが、育種担当の研究者が各実生個体5個程度の果実を用いて調査を行う。食味に関しては果肉硬度計、また糖度については屈折糖度計を用いて数値化した評価も行うが、数量化評価手法はほとんどの調査項目で確立されておらず、食べたときの官能による評価が中心である。果肉の肉質に関して、果肉の粗密は粗、中、密、甚密の4段階、硬さは軟、中、硬の3段階、粉質はなし、少、多の3段階で評価を行う。また果汁については少、中、多の3段階で官能評価を行う。官能評価では評価者個人の好みや先入観により評価結果が異なり、また多数の試料の評価を続けた際に疲労を起し評価基準がバラついてくる可能性もある(朝倉 1997)。同一の評価者が同一の個体の形質について連年評価を行っていても評価の基準がずれるおそれもある(山田 2011)。また果樹の育種においては、数十人~百人規模で食味調査を行うには果実の数等量に制限があるため、多数の消費者による評価で選抜を行うことは不可能である(Meilgaard *et al.* 1987)。

果樹の食味形質に関しては、リンゴ (*Malus × domestica* Borkh.) では果肉硬度に関わる複数の QTL (Kunihisa *et al.* 2014; Longhi *et al.* 2012; Sun *et al.* 2015) や、果肉の粉質化に関する QTL (Moriya *et al.* 2017) が同定されており、耐病性などとともに DNA マーカーによる選抜が進められている。カキに関しては甘渋性識別を除いては DNA マーカーによる選抜が困難で、カキの育種の中で良食味の個体を効率的に選抜するためには、交雑によって望ましい形質を有する個体がどの程度出現するのかを交雑に用いる品種・系統から予測して出現率の高い交雑組合せを選択したり、食味形質の客観的な評価方法を開発して果汁の多少を評価したりすることが必要である。

そこで、カキの食味を決定する重要な要因である果汁性に関して、果肉硬度と関連させて、これまでの育種で得られた官能評価のデータをもとに、交雑組合せから果汁が多く果肉の軟らかい実生個体の出現率を推定する方法を構築することとした。また、果汁性の客観的な評価方法についてはこれまで報告例がリンゴやモモ (*Prunus persica* (L.) Batsch) に関してわずかにあるのみで、カキに関しては皆無である。そこでカキの育種をより効率的に進めるため、本研究ではこれまでは官能により評価されてきたカキの果汁性に関して、客観的・機械的測定法の確立を目指すこととした。

Table 1.1 Persimmon cultivars used in this study.

Phenotype <sup>z</sup>	Cultivar	Origin
PCNA	Fujiwaragosho	Originated in Nara pref.
	Fuyu	Found in Gifu pref.
	Gosho	Originated in Nara pref.
	Hanagosho	Originated in Tottori pref.
	Izu	Released by NARO <sup>y</sup> . Fuyu×(Okugosho×Okugosho).
	Jiro	Found in Aichi pref.
	Kanshu	Released by NARO. Shinshu×(Fuyu×(Okugosho×Hanagosho)).
	Matsumotowase-Fuyu	Found in Kyoto pref. (a bud-sport from Fuyu).
	Okitsu-20	Fukurogosho×Hanagosho.
	Okugosho	Originated in Gifu pref.
	Suruga	Released by NARO. Hanagosho×Okugosho.
	Taishu	Released by NARO. Fuyu×(Jiro×(Okugosho×Hanagosho)).
PCA	Tenjingosho	Found in Gifu Pref.
	Youhou	Released by NARO. Fuyu×Jiro.
	Atago	Originated in Ehime pref.
PVA	Yokono	Found in Yamaguchi pref.
	Yotsumizo	Originated in Shizuoka pref.
	Aizumishirazu	Originated in Fukushima pref.
PVA	Kurokuma	Originated in Kanto resion.
	Taigetsu	Released by NARO. Kurokuma×Taishu.
	Taiten	Released by NARO. Kurokuma×Taishu.

<sup>z</sup> : PCNA: pollination-constant, non-astringent. PCA: pollination-constant, non-astringent.

PVA: pollination-variant, astringent.

<sup>y</sup> : NARO: National Agriculture and Food Organization.

## 第2章 非完全甘ガキ‘黒熊’に由来する交雑実生個体の DNA マーカーによる甘渋性識別

### 緒言

農研機構におけるカキの育種において、甘渋性識別のための DNA マーカーの開発に着手する以前から、完全甘ガキと交雑する非完全甘ガキとして‘黒熊’を利用してきた。この品種は関東地方の在来品種で、大果の不完全甘ガキである。この‘黒熊’に交雑する完全甘ガキ品種の1つとして‘太秋’（山根ら 2001）を用いた交雑育種をこれまで実施してきた。‘太秋’は条紋を発生しやすく、へたすき性もあるが、完全甘ガキの中では大果であり、果汁が多く食味が優れている（山根ら 2001）。したがってこの交雑組合せは、果実が小さくなることを克服し、かつ食味が優れるものを生み出すという、カキ育種での主たる目標に合致するものである。この交雑は完全甘ガキを作出するための母本となる非完全甘ガキを選抜することを念頭においたものであったが、この中から優良な不完全渋ガキ2個体を選抜し、‘太月’および‘太天’として品種登録した（山田ら 2012a, b）。‘太天’と‘太月’は、ともに農林水産省果樹試験場安芸津支場（現農研機構果樹茶業研究部門ブドウ・カキ研究拠点）において、1993年に‘黒熊’に‘太秋’とを交雑し、得られた実生から選抜された大果の不完全渋ガキである。両品種とも2009年2月に種苗法に基づき品種登録された。両品種とも果実が500g近くになる大果であり収量も多く、脱渋後の食味も良好であることから普及が進んでいる。このような優良な形質は完全甘ガキ同士の交雑を続けてきたことによって生じた近交弱勢の問題を解決するための交雑親として大きな利点を有している。‘太天’は晩生で東北地方南部以南のカキ栽培地域で広く栽培できると見込まれており、‘太月’は中生で、果頂裂果やへたすきはほとんど発生しない。ともに CTSD 法により脱渋可能であるが、今後より普及させるためには、安定した短期脱渋技術を開発することが望まれている（山田ら 2012a, b）。2つの品種を CTSD 法で脱渋した場合のアセトアルデヒド含量は、‘太月’で後加温開始2日目に、‘太天’では後加温開始6日目に急速に低下し、これらはタンニンプリント値の低下とほぼ一致しており、さらに‘太天’はクエン酸およびリンゴ酸含量が‘太月’よりも高く、脱渋後の酸味の主たる原因がリンゴ酸であることが明らかにされている（山崎ら 2012）。‘太月’および‘太天’を完全甘ガキと交雑し、そのなか

ら優良な完全甘ガキ個体を選抜すれば、樹勢が弱いこと、果実重が小さいことといった完全甘ガキ同士の交雑における欠点を克服した優良な完全甘ガキの育成を図ることができる。

カキの甘渋性を識別する SCAR マーカーは、農研機構と共同研究を行ってきた京都大学および近畿大学で開発されたものを用いた。以下その開発経過とマーカーの詳細について記す。第 1 章で述べた非完全甘ガキ形質に連鎖している AFLP マーカー EACC/MCTA-400 (Fig. 2.1) を用いた RFLP 分析から見出された RFLP マーカー (A1 および A2) (Fig. 2.1) に対応した領域が単離され、塩基配列が解析された。この塩基配列に基づきプライマーが設計・検討されたが、このうち E4/E9r により A1 を有する後代個体と有さない後代個体とを区別することができた (Fig. 2.2)。いっぽう E4/A2r を用いた PCR でも、A2 を有する個体でのみ増幅産物が検出された (Fig. 2.3)。完全甘ガキ 18-14 (‘富有’×(‘晩御所’×‘花御所’)) と非完全甘ガキ 170-26 (完全甘ガキ (‘富有’×(‘次郎’×‘晩御所’)) ×‘西村早生’) との交雑によって得られた 46 個体について、RFLP 解析と PCR の結果を比較したところ、A1 および A2 の有無が一致しており (Fig. 2.3)、非完全甘ガキ‘西村早生’を用いた交雑で得られた個体の甘渋性は E4/E9r および E4/A2r によって識別できることが明らかとなった (Kanzaki *et al.* 2009)。

しかしながら KU-325 (‘黒熊’×‘太秋’) の 10 個体 (全て非完全甘ガキ) について E4/E9r および E4/A2r で PCR を行ったところ、8 個体では A1 または A2 のいずれかが検出されたものの、2 個体では非完全甘ガキであるにもかかわらず A1 と A2 のいずれもが検出されなかった (Fig. 2.4)。このことからこの 2 個体は、*Ast* 遺伝子座に関して A1 や A2 とは別の配列のものを有するのではないかと考えられ、‘黒熊’に由来する後代実生の甘渋性を識別するためには、さらに別のマーカーによる検出方法を構築する必要があると考えられた。

そこで、‘黒熊’の有するもう 1 つの連鎖領域 (A3) を検出するために、BC-471 (325-22 (‘黒熊’×‘太秋’) に完全甘ガキを交雑して得られた個体集団) (Fig. 2.5) について、カキの二倍体近縁野生種であるマメガキ (*D. lotus*) から構築したゲノムフォスミドライブラリー (赤木ら、2006) から作製したプローブ 5R (Fig. 2.1) を用いた RFLP 分析を行った (Kanzaki *et al.* 2010)。果実の甘渋性を調査できた 24 個体のうち、非完全甘ガキ 13 個体では全て 9kb の断片が検出され、完全甘ガキと判定された 11 個体ではこの断片が検出されなかった。RFLP 分析での分離と果実の甘渋性の分離とが完全に一致していたことから、この 9kb の配列が甘渋性を決定する *AST* 遺伝子に連鎖していると考えられた。

以上のような情報を基に設計された PCR プライマー 7H9F/AST-R (Fig. 2.1、Table 2.1) を用い、KU-325 の非完全甘ガキ 10 個体について PCR を行った。これらの個体のうち 2 個体は A1 と A2 のいずれのマーカ―も検出されなかったが (Fig. 2.4)、7H9F/AST-R を用いた PCR ではこの 2 個体を含む 9 個体で *Ast* 遺伝子に連鎖する 410bp の領域が増幅された (Fig. 2.6)。

以上のような甘渋性に関わるマーカ―開発に関する研究から、甘渋性を決定する *Ast* 遺伝子自体は明らかにはなっていないものの、‘黒熊’を用いた交雑からの個体については E4/E9r、E4/A2r、および 7H9F/AST-R を用いた PCR によって、少数の個体については甘渋性を完全に識別できたが、品種育成に応用するためには、数百個体以上の交雑実生集団において SCAR マーカ―が有効であるかどうか検証しておく必要がある。‘黒熊’は *Ast* 遺伝子に連鎖する 3 種類の領域 (A1~A3) を有していたが、その後代である‘太天’については A2 と A3 を、一方の‘太月’については A1 と A3 を有しており (Kono *et al.* 2016)、3 つの品種の甘渋性に関する遺伝子型は‘黒熊’: A1A2A3aaa、‘太天’: A2A3aaaa、‘太月’: A1A3aaaa と表される。そこで‘太月’と完全甘ガキとの交雑で得られた個体については A1 と A3 の有無を、また、‘太天’と完全甘ガキとの交雑で得られた個体については A2 と A3 の有無をそれぞれ調べれば、その個体の甘渋性が識別できることになる。すなわち、交雑によって得られた個体の甘渋性に関する遺伝子型が aaaaaa である個体を完全甘ガキとして選抜すればよい。

以下の実験 1 では‘太天’と完全甘ガキとの交雑から得られた個体について、また実験 2 では‘太月’と完全甘ガキ‘甘秋’との交雑から得られた個体について甘渋性を識別し、甘渋性とマーカ―識別の結果の検証を行うこととした。

## 材料および方法

### 実験 1 ‘太天’と完全甘ガキ品種との交雑による実生集団の甘渋性マーカ―による識別

#### 1 ‘太天’と‘甘秋’との交雑実生の甘渋性識別

‘太天’と‘甘秋’との交雑 (Fig. 2.7) によって獲得した種子を育苗用ハウスで播種し 1 年間育苗を行った。‘甘秋’は農研機構が‘新秋’と 18-4 (‘富有’×興津 16 号) とを交雑して育成した完全甘ガキで、早生で良食味であるが、汚損果の発生が多い品種である (山田ら 2006b)。この

中から無作為に選んだ 311 個体を育種圃場の‘富有’成木に翌春高接ぎを行った。2009 年秋までに結実した 252 個体について果実の甘渋性を果肉色および官能評価により判定した。

PCR に用いる DNA は、各個体の幼葉約 1cm<sup>2</sup> から Nucleon Phytopure plant DNA extraction kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England, UK) により抽出した。

PCR に用いるプライマーは、‘太天’が A2 および A3 を有していることから、2 組のプライマーセット E4/A2r および 7H9F/AST-R (Table 2.1、Fig. 2.1) を用いることにした。

PCR 反応液は、ExTaq ポリメラーゼ (タカラバイオ) 0.25 U、1×Ex Taq、dNTP 各 0.2mM、各プライマー 0.5 μM、DNA 50ng を含み、滅菌蒸留水で全体が 10 μl となるようにした。

PCR 反応は 94°C 30 秒変性の後、

(E4/A2r) 94°C 20 秒、56°C 30 秒、72°C 2 分 (35 サイクル繰り返し)

(7H9F/AST-R) 94°C 20 秒、56°C 30 秒、72°C 30 秒、(40 サイクル繰り返し)

最後に 72°C で 5 分間処理した。

反応後アガロース (2%) ゲルを 1×TAE buffer で電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイド染色し、PCR 産物を確認した。

## 2 ‘富有’×‘太天’および‘天神御所’×‘太天’による交雑実生の甘渋性識別

育苗用ハウス内の‘富有’×‘太天’および‘天神御所’×‘太天’の交雑実生それぞれ 151 個体、29 個体について、1 と同様の方法で DNA マーカーによる甘渋性の識別を行った。‘富有’は日本で最も生産の多い品種であり (農林水産省 2018)、『天神御所’は岐阜県で発見された食味の優れた完全甘ガキである (広島県果樹試験場 1979)。

## 実験 2 ‘太月’と‘甘秋’との交雑による実生集団の甘渋性マーカーによる識別

‘太月’と‘甘秋’との交雑によって獲得した種子を育苗用ハウスで播種し育苗を行った。高接ぎ、果実の甘渋性の識別および DNA の抽出については第 1 節と同様の方法で行った。

‘太月’は A1 および A3 を有しており、A1 の有無については E4/E9r により識別できるが (Kanzaki *et al.*, 2009)、ここでは *Ast* 遺伝子に連鎖する領域の配列から新たに forward primer として設計された E8.5 (Fig. 2.1、Table 2.1) を用いて A1 を検出することとした。反応液の組

成は実験 1 と同様である。PCR 反応は 94°C 30 秒変性の後、94°C 20 秒、56°C 20 秒、72°C 20 秒を 40 サイクル繰り返し、72°C で 5 分間処理した。A3 については実験 1 と同様の方法で行った。

## 結果

### 実験 1 ‘太天’と完全甘ガキ品種との交雑による実生集団の甘渋性マーカーによる識別

‘太天’と‘甘秋’との交雑による 252 個体のうち、1 個体は種子が多く果肉の褐斑が多かったため、完全甘ガキか不完全甘ガキかを識別することができなかった。これを除いた個体について、E4/A2r および 7H9F/AST-R を用いて PCR を行ったが、A2 および A3 が検出された (Fig. 2.8)。251 個体のうち 205 個体は、A2、A3 のいずれかが検出されたため非完全甘ガキと判定されたが、これら個体の果実の甘渋性は非完全甘ガキと判定され、マーカーによる識別結果と完全に一致した。残り 46 個体はいずれも検出されず、完全甘ガキと識別されたが、果実の甘渋性ではうち 43 個体が完全甘ガキであって、マーカーによる識別結果とほぼ一致する結果となった。マーカーによる完全甘ガキの割合は 46/251 (18.3%) (Table 2.2) となり、マーカーによる識別と果実の甘渋性が一致した割合は全体として 248/251 (98.8%) となった。

‘富有’×‘太天’および‘天神御所’×‘太天’の交雑実生の甘渋性を DNA マーカーにより識別すると、完全甘ガキと考えられる個体の割合はそれぞれ 36/151 (23.8%)、6/29 (20.7%) となり (Table 2.2)、『太天’×‘甘秋’も含めこれら結果はこれまでの完全甘ガキの出現率 (池田ら 1985) と有意な差はなかった。

### 実験 2 ‘太月’と‘甘秋’との交雑による実生集団の甘渋性マーカーによる識別

研究開始当初、A3 の有無を明らかにする方法が確立していなかったため、まずは A1 のみによって識別を行った。A1 検出のために新たに設計した E8.5 を用いたが、E4 を用いた場合と結果が一致し、さらに PCR 産物の長さが短いため反応時間が短くなったことから、識別には E8.5/E9r を用いることとした。予備試験においては、E4/E9r と E8.5/E9r による識別結果は



一致していた。

A1 を有する 40 個体および A1 を有さない 46 個体を育種圃場の‘富有’成木に高接ぎした。接ぎ木 4 年後までに A1 を有する個体は 40 個体中 22 個体が結実し、果実調査ではそのすべてが非完全甘ガキであった。A1 を持たない個体は 46 個体中 26 個体が結実し、果実調査では完全甘ガキが 11 個体、非完全甘ガキが 15 個体となった (Table 2.3)。この比率 (11 : 15) は 1 : 1 の比率と有意な差はなく (カイ 2 乗検定、 $P=0.433$ )、また、結実した 48 個体のうち完全甘ガキが 11 個体となった比率 (11 : 37) は、20%とは有意な差はなかった (カイ 2 乗検定、 $P=0.613$ )。この 15 個体について後に 7H9F/AST-R により A3 の有無を調査したところ、すべて A3 を有していた。したがって結実した 48 個体については、マーカーによる識別と果実の甘渋性が完全に一致する結果となった。

A3 の検出方法が確立した後、別途得られた‘太月’と‘甘秋’との交雑実生 522 個体の甘渋性を E8.5/E9r および 7H9F/AST-R で識別した (Fig. 2.9)。このうち A1 と A3 のいずれも有さない、すなわち完全甘ガキと考えられる個体は 81 個体 (15.5%) であった (Table 2.4)。この比率は、‘太天’と‘甘秋’との交雑組合せにおける完全甘ガキの出現の期待値 18.3% (Table 2.2) と有意差はなかった (カイ 2 乗検定、 $P=0.377$ )。

## 考察

本研究では、農研機構における完全甘ガキ育成におけるマーカー選抜の実用化について検討した。新品種を選抜できるような実用的な交雑集団において後代実生の果実をならせて、その甘渋性を調査しマーカー選抜の結果を検証した報告例はこれまでにない。先述のように‘黒熊’は、樹勢、果実の大きさ、果実の食味の点から、非完全甘ガキを利用した完全甘ガキの品種育成における有望な交雑親と考えられ、‘黒熊’由来の交雑実生の甘渋性を識別できるマーカーの開発と検証はその品種育成を効率化するための必須の技術である。

‘太月’と‘甘秋’との交雑によって得られた個体で結実がみられた個体については、果実の甘渋性とマーカー識別の結果が完全に一致した (Table 2.3) が、‘太天’と‘甘秋’の交雑に関して、SCAR マーカーによる甘渋性識別と果実調査の結果が一致したのは 46 個体中 43 個体であった (Table 2.2)。一致しなかった 3 個体は、E4/A2r および 7H9F/AST-R では A2 および A3 も

検出されなかったが、果実調査では非完全甘ガキであった。325-22（‘黒熊’×‘太秋’による非完全甘ガキ）×109-27（完全甘ガキ）による 24 個体の果実の甘渋性は、7H9F/AST-R を作成する基となった 5R 領域で検出される 9kb の RFLP マーカーの有無と完全に一致していたが、今回材料とした個体では *Ast* 遺伝子とマーカー領域との間で交叉があった可能性がある。

また、その他に考えられる不一致の理由としては、実用的な品種育成において多数の交雑実生個体を扱っているため、人為的な誤りの混入により生じた可能性も大きいと思われる。近年、DNA による品種識別技術がナシ (Yamamoto *et al.* 2002)、リンゴ (Liebhard *et al.* 2002)、カンキツ (Ahmad *et al.* 2003)、およびモモ (Sitther *et al.* 2012) などについて開発されており、これらの樹種については非常に高い正確性をもって同定することが可能である。カキについては品種識別のためのマーカーがいくつか開発されている (Yamagishi *et al.* 2005) もの、品種識別技術が確立されているとはいえ、甘渋性識別の結果が不一致の個体に関しては交雑によって生じたものか否かなど、正確な来歴を特定することは困難である。池田ら (1985) は、実際のカキの育種において 30 年以上にわたる 2548 個体の記録を用いて果実の甘渋性の遺伝に関して報告しており、カキの甘渋性の遺伝や交雑親の検討などの品種育成の計画を考える重要な基礎となっている。しかしその中でも予測される遺伝様式とは異なる例外も含まれており、この例外についても人為的な誤りによる可能性があるが、その個体数は全体の中ではごく少数であって、実際の品種育成における選抜では大きな妨げにはならないと考えられる。果樹での遺伝に関する研究では、樹体が大きく、生育に何年もかかるため、特定の形質に関する遺伝に関する調査のためだけに特別に個体集団を作成・利用することは困難である。果樹では実用的な品種育成の交雑実生集団を使って遺伝様式の解明を行うのが一般的であり (Haji *et al.* 2005; Hiehata *et al.* 2012; Iwanami *et al.* 2008)、その中で遺伝様式を検討せざるを得ない。

*Ast* 遺伝子は単一遺伝子座で甘渋性を制御し、六倍体のカキゲノム中に 6 アリル存在している (Akagi *et al.* 2009)。AAaaaa × aaaaaa からの理論上の分離比を同質四倍体の分離比 (渡辺 1982) を参考に算出すると、染色体分離 (相同染色体が 1 回目の分裂で還元的に分離し、2 回目の分裂でさらに均等に分離) では AAaaaa 20%、Aaaaaa 60%、aaaaaa 20%となるが、染色体分体分離 (成熟分裂の前期に染色分体ができ、これらが 2 回の分裂で機械的に分離) では AAaaaa 1.8%、Aaaaaa 21.8%、Aaaaaa 50.9% および aaaaaa 25.5% となる。今回の結果では太天’×‘甘

秋'46/251 (18.3%)、'富有'×'太天'36/151 (23.8%)、'天神御所'×'太天'6/29 (20.7%) となり、これらの値はカイ 2 乗検定 (5%水準) で 20%あるいは 25%と有意な差はなかった。また、これらの 3 つの組合せでの結果の間でも有意差はなく、完全甘ガキ個体の割合は、交雑組合せによる差はないことを示唆している。

完全甘ガキと非完全甘ガキとの交雑において、用いた非完全甘ガキが *Ast* 遺伝子に関して Aaaaaa、AAaaaa、AAAaaa である場合には、同質六倍体の非染色分体分離 (Allard 1960) を想定すると、得られる完全甘ガキの割合はそれぞれ 50、20、5%となり、A が 4 つ以上の場合にはさらに完全甘ガキを交雑しなければ完全甘ガキの個体を得ることはできない (Onoue *et al.* 2018)。このため交雑に用いようとする非完全甘ガキについて *Ast* のコピー数を把握しておくことも、完全甘ガキの個体を効率的に得るためには重要である。*Ast* のコピー数の推定は、定量 PCR による方法 (Akagi *et al.* 2010) やフラグメント解析による方法 (Kono *et al.* 2016) が報告されている。また 5R 領域 (Fig. 2.1) の近傍の配列に存在する多型の解析による品種識別法も報告されている (Onoue *et al.* 2018)。

農研機構でのカキ品種育成では、高接ぎから初結実まで 3 年から 5 年を要し、果実および樹木の特性を 1~3 年間評価した後、一部の有望な交雑実生が予備選抜され、さらに数年かけて継続して詳しい調査を行った後に、数個体のみが都道府県の公立試験場において試験栽培される。この中では果実重など重要な形質について、既存の主要な品種を対照として栽培しながら、場所と年数を反復して調査が行われる。経済栽培に適していて普及が見込めると判断された個体が、農林水産省の品種登録制度の下で登録されるという流れになっている。したがって交雑から品種登録までは少なくとも 15 年程度を要することになる。マーカー選抜を用いた場合でも、上述のような交雑から新品种の登録までの期間を短縮することはできない。しかしマーカー選抜によって、非完全甘ガキと完全甘ガキとの交雑で生じた非完全甘ガキに完全甘ガキを交雑して得られた交雑実集団の中から完全甘ガキの個体のみを圃場に接ぎ木することができる。(完全甘ガキ×非完全甘ガキ)×完全甘ガキの交雑からは平均して 20~25%の完全甘ガキが生じると仮定すると、効率が 4~5 倍上昇すると考えることができる。結果として、木と畑を維持するためのコストを削減することができる。したがって今回のような甘渋性マーカーによる選抜は、完全甘ガキの新品种を効率的に育成するための費用対効果の高い戦略である。

一方、マーカー選抜に頼るだけではなく、交雑によって多くの実生個体を作成し、その中から優れた特性を有する完全甘ガキの個体を選抜することは今後も続ける必要がある。果実成熟期 (Yamada *et al.* 1995)、果実重 (Yamada *et al.* 1994)、および果頂裂果性 (Yamada *et al.* 1988) といったいくつかの形質に関しては遺伝様式が解明されており、これらの情報は交雑親の選択や選抜基準を超える有望な形質をもった個体が出現する割合の予測に役立つ。現時点では複数の優れた特性を同時に備えた個体を作成するためには樹体や果実の調査が不可欠であり、従来の交雑育種にマーカーによる選抜を組み合わせることで、近い将来に新しい完全甘ガキ品種の育成につなげることができる。

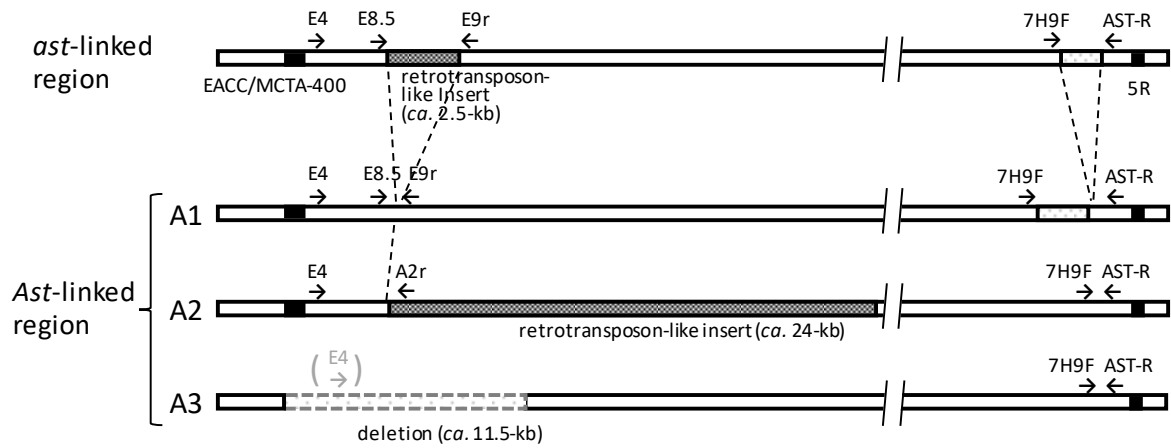


Fig. 2.1 Schematic diagram of *ast*- and *Ast*-linked genomic regions. Arrows indicate the primers used in this study. The black boxes indicate the initially isolated AFLP fragment (EACC/MCTA-400, Kanzaki *et al.* 2001) and the probe (5R) used in the library screening. The sequence of A2r is specific to retrotransposon-like insert in A2. The dotted region in A3 indicates the large deletion (Akagi *et al.* 2010, 2012). The dark gray boxes indicate the retrotransposon-like inserts. The light gray boxes indicate insertions/deletions (indels). Adapted from Kanzaki *et al.* 2009, 2010.

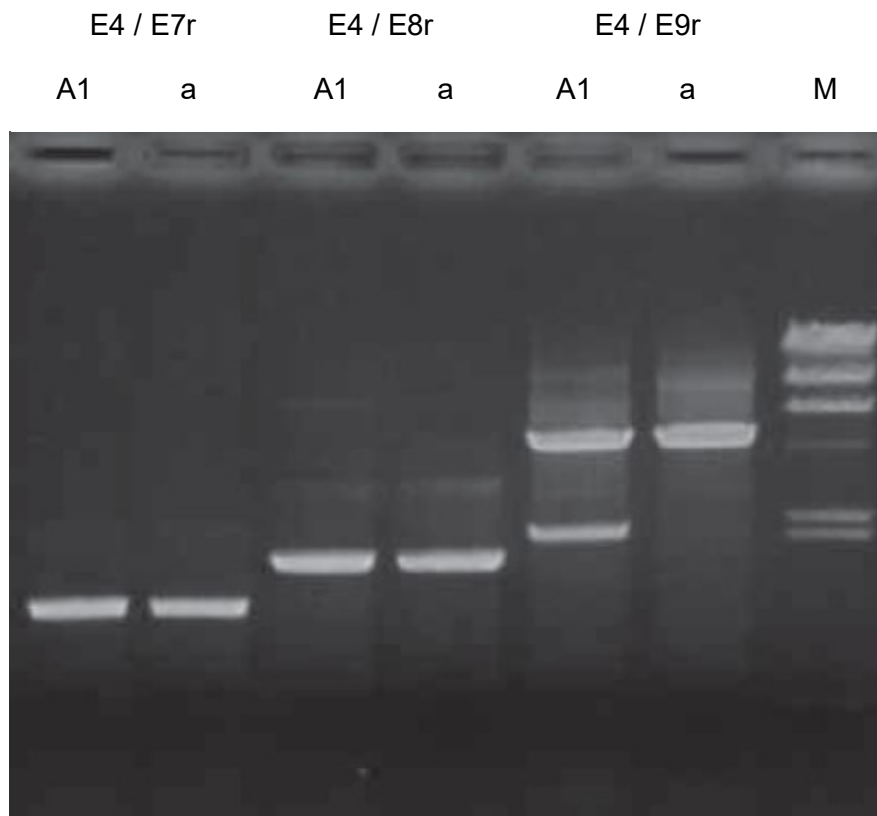


Fig. 2.2 PCR products generated from A1- and a-type offspring using 3 primer pairs, E4/E7r, E4/E8r, and E4/E9r. A polymorphic product of 2.1 kb was detected in A1-type offspring, with the primer pair E4/E9r. Lane M: molecular marker ( $\lambda$ HindIII digest). Adapted from Kanzaki *et al.* 2009.

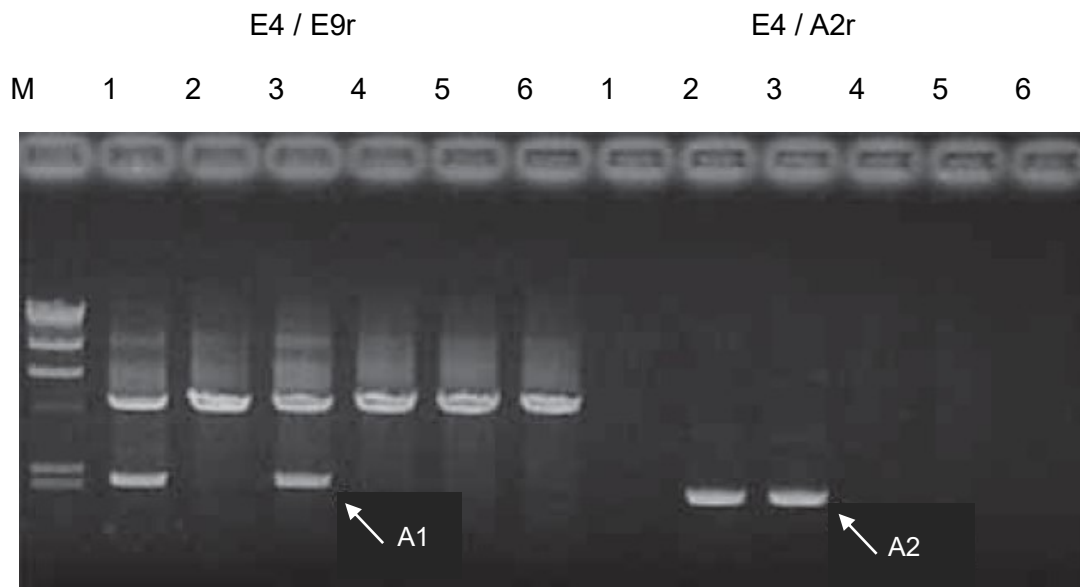


Fig. 2.3 The 2 SCAR markers, namely, A1 and A2, generated from ‘Nishimura-wase’-derived offspring using the primer pairs E4/E9r and E4/A2r. Lane 1: A1-type offspring, 2: A2-type offspring, 3: A1A2-type offspring, 4–6: a-type offspring, and M: molecular marker ( $\lambda$ /HindIII digest). Adapted from Kanzaki *et al.* 2009.

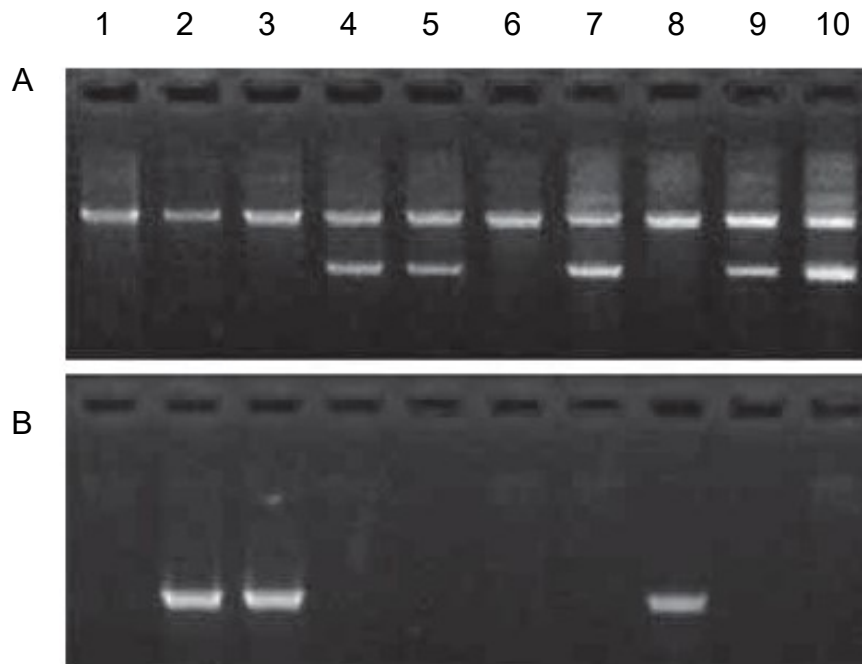


Fig. 2.4 Segregation of the SCAR markers in 10 KU-325 offspring. A: PCR products generated by the primer pair E4/E9r. B: PCR products generated by the primer pair E4/A2r. All offspring, except for 2 offspring represented by lanes 1 and 6, showed either the PCR-A1 or PCR-A2 marker. Adapted from Kanzaki *et al.* 2009.



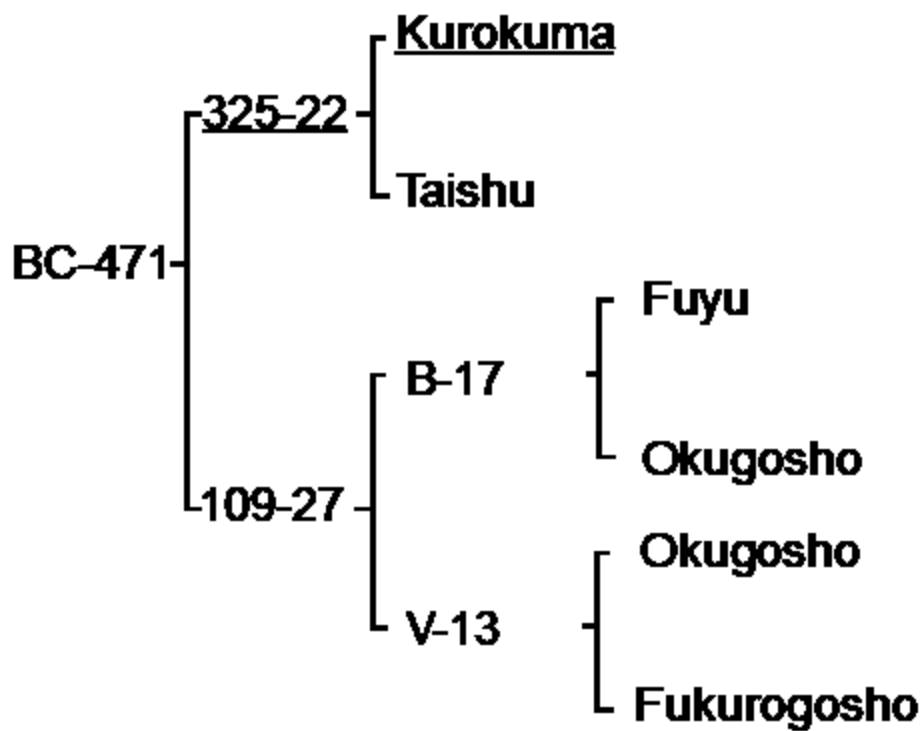


Fig. 2.5 Pedigrees of the BC-471 used for RFLP analysis and segregation analysis of the SCAR markers in the current study. Non-PCNA ‘Kurokuma’ and 325-22 are underlined.

Table 2.1 Primers designed for detecting the *Ast*-linked regions. Based on Kanzaki *et al.* 2009, 2010.

Primer	Sequences (5' to 3')	Detected marker
E4	CCCACTTACCAAACCTAGGCTTCCAACACAAG	A2
A2r	CTTGTAGTGAATTAACGGATATGGTG	
7H9F	CAATCACTCATCTCACTTGCAC	A2, A3
AST-R	CCCCTCATGCTTTGCATACTTAATG	
E8.5	CCAATGGAAGAAGGAATTGGAGAGC	A1
E9r	GCTTAGTCAGCTTAGCCACGCCATTTC	

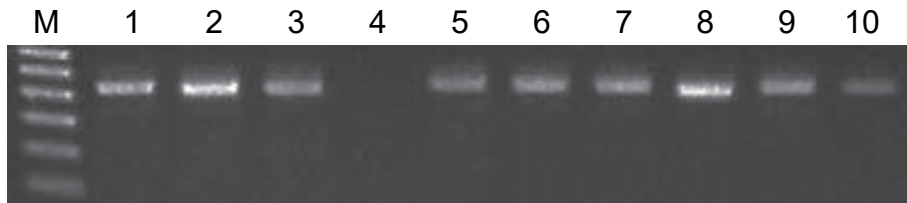


Fig. 2.6 Amplified fragments using primer pair 7H9F/*AST*-R in progeny KU-325. Offspring in lane 4 did not show the expected *AST*-linked fragment with 7H9F/*AST*-R. M:100-bp ladder size marker. Adapted from Kanzaki *et al.* 2010.

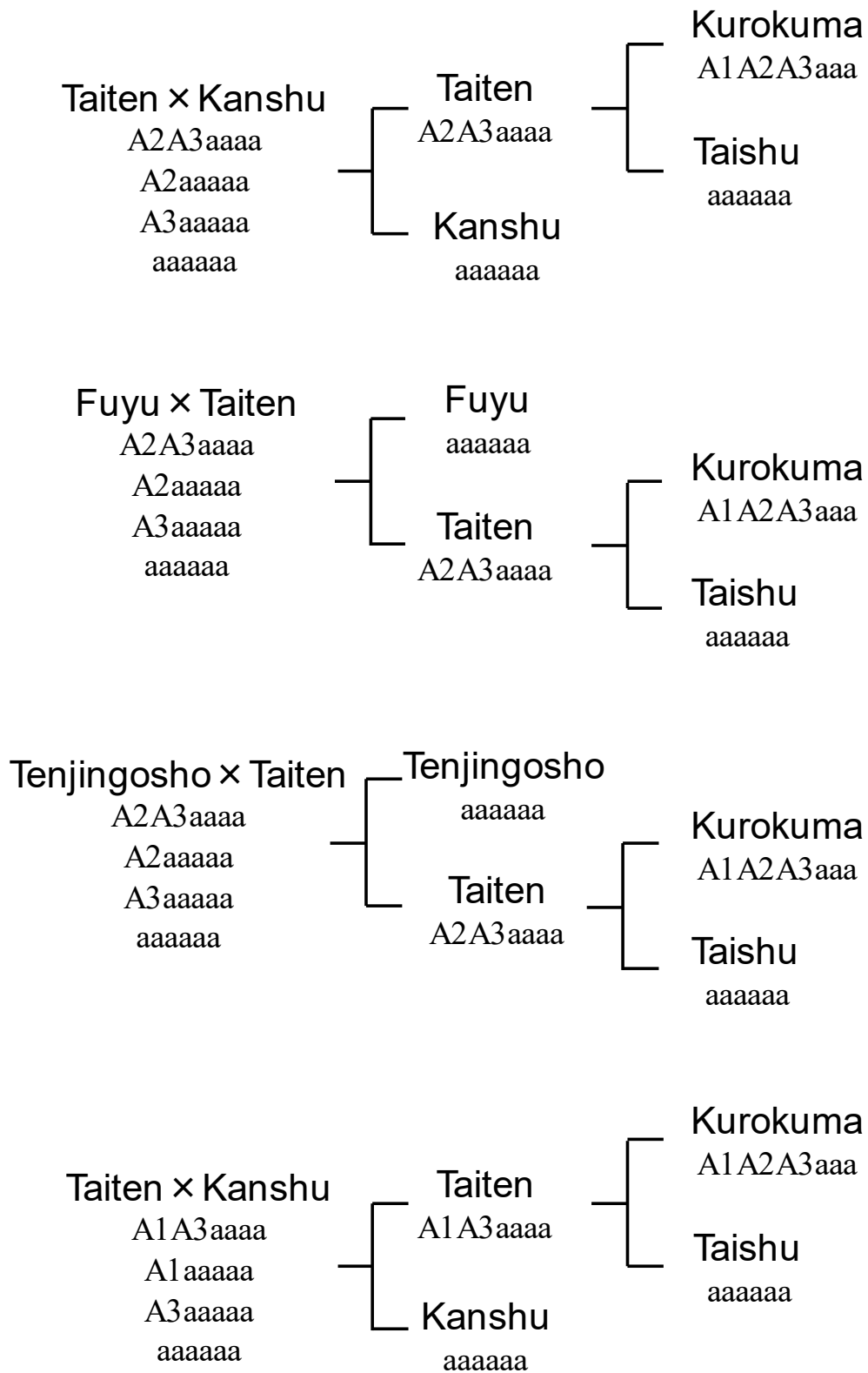


Fig. 2.7 Pedigrees of the 4 pseudo-backcross ((PCNA × non-PCNA) × PCNA) persimmon progenies used in the current study. Genotype of each progeny or cultivar is shown.

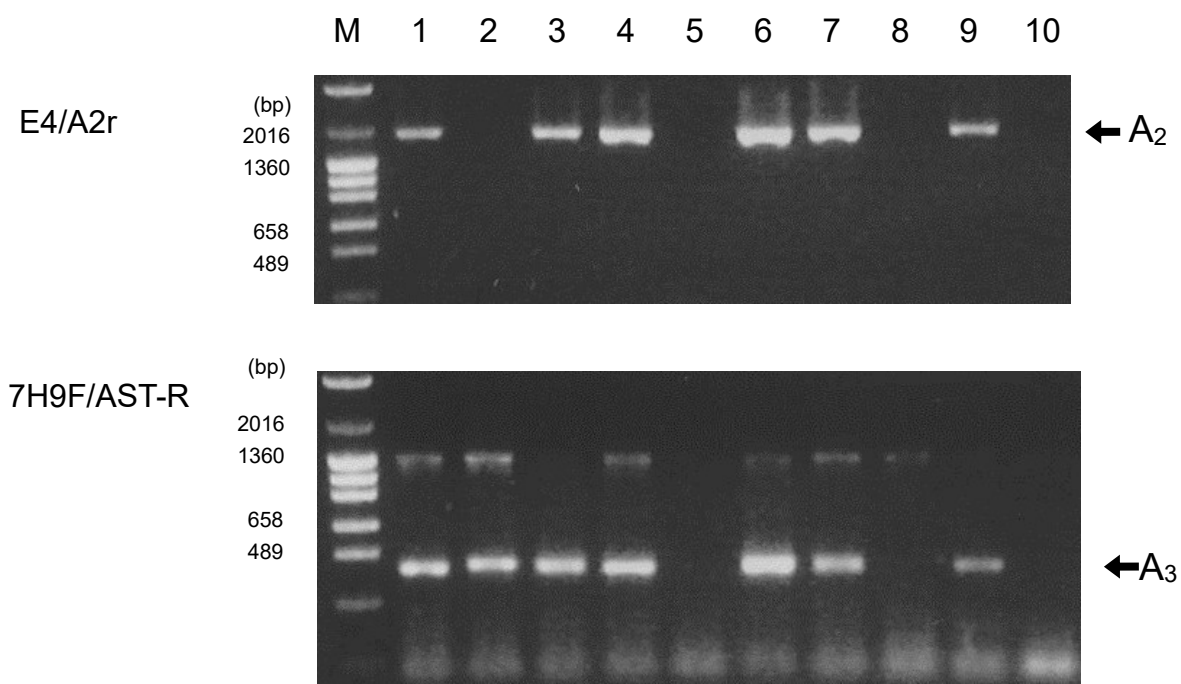


Fig. 2.8 Segregation of the SCAR markers A2 and A3 in persimmon progenies from 'Taiten' × PCNA. Lanes 1, 3, 4, 6, 7, and 9: offspring presumed to be non-PCNA (they show A2, but whether they show A3 or not is undecided). Lane 2: offspring presumed to be non-PCNA (A3 shown). Lanes 5, 8, and 10: offspring presumed to be PCNA. Lane M: pHY marker (Takara Bio).

Table 2.2 Observed ratio of PCNA offspring in persimmon progenies from ‘Taiten’ × PCNA.

Progeny	Total no. of offspring	Marker Genotype			Phenotype		
		No. of offspring showing neither marker	Rate of the expected PCNA offspring (%)	<i>P</i> value from a chi-square test		No. of PCNA offspring	Rate of PCNA offspring (%)
				20%	25%		
Taiten × Kanshu	251	46	18.3	0.634	0.070	43	17.1
Fuyu × Taiten	151	36	23.8	0.420	0.815	-	-
Tenjingosho × Taiten	29	6	20.7	0.948	0.696	-	-

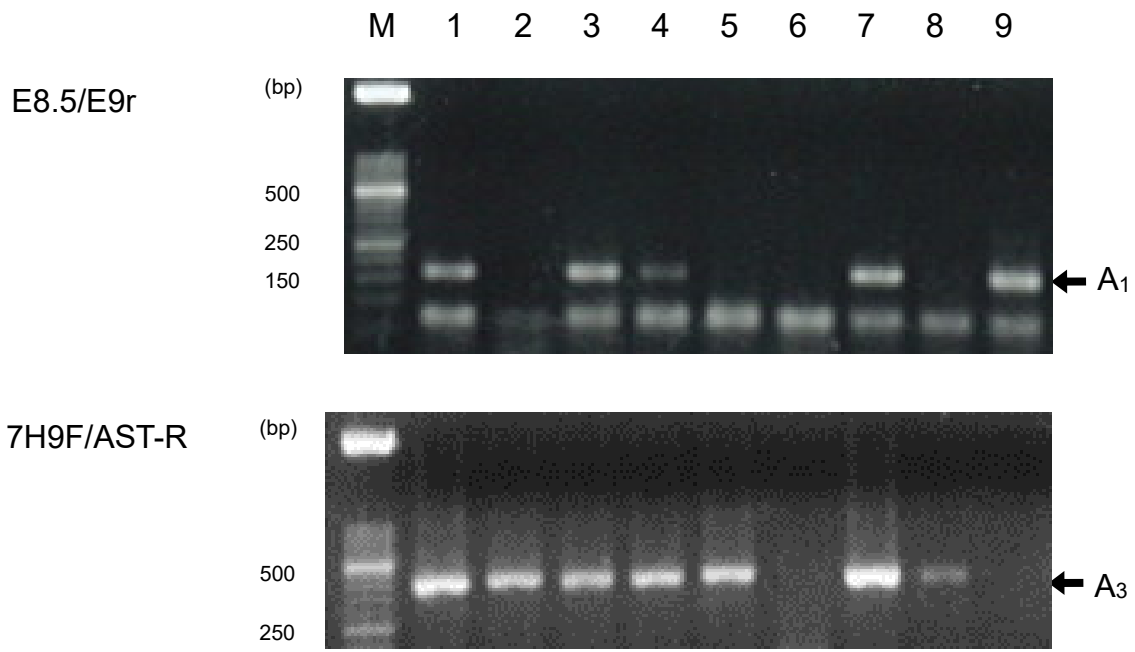


Fig. 2.9 Segregation of the SCAR markers in the persimmon progeny from 'Taigetsu' × 'Kanshu.' Lanes 1, 3, 4, 7: offspring presumed to be non-PCNA displaying both the A1 and A3 markers. Lanes 9: offspring presumed to be non-PCNA displaying the A1. Lanes 2, 5, 8: offspring presumed to be non-PCNA displaying A3. Lane 6: offspring presumed to be PCNA. M: molecular marker (50bp ladder, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan).

Table 2.3 Comparison of the A1 marker genotype by the E8.5/E9r primers with fruit astringency phenotype of the grafted and fruit-bearing offspring.

A1 Genotype	Number of grafted offspring	Number of fruit-bearing offspring	Phenotype	
			PCNA	non-PCNA
+	40	22	0	22
—	46	26	11	15



Table 2.4 Marker genotypes observed in the offspring population derived from ‘Taigetsu’ and ‘Kanshu’ by PCR with the E8.5/E9r and 7H9F/AST-R primers.

Number of offspring	Marker genotype <sup>z</sup>				The rate of the expected PCNA offspring (%)
	A1+ A3+	A1+ A3-	A1-A3+	A1-A3-	
522	100	162	179	81	15.5

<sup>z</sup> Four genotypes are represented as follows. A1+A3+, which exhibit both the A1 and A3 markers; A1+A3-, which exhibit only the A1 marker; A1-A3+, which exhibit only the A3 marker; and A1-A3-, which exhibit neither marker.

### 第3章 カキ育種における果肉が多汁で柔軟な実生個体の出現率の推定および果汁の多少の品種間差異

#### 緒言

果樹の交雑育種では、交雑に用いる親の個体の特性値から、望ましい特性を持つ実生個体がどの程度出現するのかを推定することが、育種を効率的に進める上で重要でなる。カキの育種においては、果実重、果実成熟期、糖度のような定量データに関して、子が両親を同一とする家系における平均値から正規分布にしたがって分離することを前提としたモデルにより、実生個体の出現率が両親の平均値(平均親値)をもとに推定されている(Yamada *et al.* 1994, 1995, 1997)。果実重のようなデータであれば等分散・正規分布を前提にした解析が可能であるが、官能評価で数段階に分けて評価したデータに関しては、等分散・正規分布を前提としたモデルでは解析が困難である。

そこで、これまでカキ育種において得られた官能評価による果汁の多少および果肉硬度のデータについて、等分散・正規分布を前提としないモデルである一般化線形モデル(ロジスティック回帰)を適用し、果肉が柔軟および多汁な実生個体の出現率を推定することとした。

果汁の多少については上記のように官能評価を行ったきたが、果樹の果汁の多少に関する客観的評価方法に関しては、これまでリンゴおよびモモを用いた2つのタイプの方法が報告されている。一方は果肉を破碎後に遠心し上清の重量を測定し、最初の果肉の重量に対する割合として表すものである(Lill and van der Mespel 1988; Von Mollendorf *et al.* 1992; Crisosto and Labavitch 2002)。この方法を用いて異なる貯蔵条件で貯蔵したリンゴ果実の果汁の比較も行われている(Tu *et al.* 1997)。もう一方は濾紙上で果肉を破碎しその濾紙の果汁吸収量によって評価するものである(Brookfield *et al.* 2011; Harker *et al.* 1997)。この2つの方法による評価は官能評価と相関があることが示されている(Harker *et al.* 1997)。本研究では事前検討における果汁測定サンプルの扱いやすさの比較から、前者の方法に基づいてカキの果汁の多少を評価する方法を構築することとした。

官能評価では果肉の硬さが果汁の多少の評価に影響することが指摘されている(Harker *et al.* 1997, 2002)。そこでカキ果汁の多少の値についても果肉硬度による影響を明らかにするた

め、同一品種の果実の複数回収穫し、果肉硬度と果汁の多少とを評価することとした。

ところで、果汁の多少は果実の重さや糖度などと同様、計量的に測定され連続的な変異を示す量的形質である。品種育成上量的形質は関与する遺伝子座についてメンデルの法則が成り立つ点では質的形質と同じであるが、関与する遺伝子座が多い点や、非遺伝的な要因によって測定値がたやすく変わる、すなわち環境変異がある点が質的形質との決定的な違いである（鶴飼 2002）。そのため品種育成における選抜では、量的形質について遺伝変異と環境変異を把握する必要がある、どのくらい有効な選抜が行われているか数量的に把握することが重要である（山田 2011）。そこで客観的測定法による果汁の多少の数値について、年次や樹を反復して調査を行い、年次変異および樹間変異を求めることとした。またあわせて完全甘ガキの主要な品種の果汁を測定し、果汁の多少の品種間差異を明らかにすることとした。

さらに、官能評価値を用いて、交雑組合せにおいて果汁が多となる個体の出現率を推定したが、客観的評価によって得られた数値を用いて同様の推定を行い、両者の結果を比較することとした。

## 材料および方法

### 実験1 果肉が多汁で柔軟な実生個体の出現率

農研機構果樹茶業研究部門におけるカキ育種の中で、1987年から2002年の間に交配して得られた交雑実生（34交雑組合せ、各組合せ30個体）の果実について、果肉硬度と果汁の多少を官能によって評価したデータを用いた。これらは各個体の実生を結実促進のためカキ育種選抜圃場に植栽の‘富有’成木に高接ぎし、数年後に結実させて得られた果実である。それぞれの個体について果実の着色程度を基準に果実を収穫し形質を調査した。この中には26品種・系統が交雑親として用いられているが、これら交雑親の品種・系統については、1985年から2009年の間の異なる3年間、それぞれの成木から収穫した果実を調査した。ただし、‘裂御所’、‘大御所’、および‘大和御所’については、1989年から2009年の間の異なる2か年の調査結果を用いた。果肉硬度については5段階（1：軟、2：やや軟、3：中、4：やや硬、5：硬）で評価し、果汁の多少は5段階（1：少、2：やや少、3：中、4：やや多、5：多）で評価した。

交雑親の結果については、2 か年または3 年間の平均値として示した (Table 3.1)。

果肉硬度と果汁の多少の官能評価による評価値について、Bartlett 検定および Kolmogorov–Smirnov 検定を実施したところ、等分散・正規分布の前提条件があてはまらなかった。このためこの前提条件を必要としない統計モデルの1つである一般化線形モデルをこれらの評価値に適用し、果肉が軟らかく果汁が多い交雑実生個体の出現率を推定することとした。

果肉硬度については、各交雑組合せで30 個体のうち果肉硬度が軟(1)である個体の割合を算出した。34 交雑組合せについて、平均親値を説明変数とし、果肉硬度が軟の個体の出現率を目的変数として、一般化線形モデル(ロジスティック回帰)を適用して解析を行った。果汁の多少についても、各交雑組合せで30 個体のうち果汁性が多(5)である個体の割合を算出し、果肉硬度と同様に解析を行った。

ロジスティック回帰モデルは、それぞれの形質について、1)説明変数なしで切片だけからなる帰無モデル、2)果肉硬度または果汁の多少の平均親値を説明変数とするモデル、3)果肉硬度と果汁の多少の両方の平均親値を説明変数とするモデル、の3つを構築した。

モデル間の評価は尤度比検定(Crawley 2005)によって行った。説明変数が1つである2)のモデルは、1)の帰無モデルとの比較を行い、説明変数を2つ含む3)のモデルは2)のモデルとの比較を行った。統計解析はR(2.9.0)(R Developmental Core Team 2009)を用いた。

## 実験2 果汁の多少の品種間差異

供試材料として、農研機構果樹研究所ブドウ・カキ研究拠点で栽培したカキ果実を用いた。

### 1 果汁の測定

果実の赤道部から果肉を果実1個につき4か所コルクポーターでくり抜き、これをシリンジで破碎した後遠心チューブに入れ、遠心(12,000rpm(13,300×g)、10分)して上清を採取した(Fig.3.1)。全果肉重に対する上清の重量の割合を算出し、果汁の多少の指標とした。果肉硬度は果肉硬度計KM-5(藤原製作所)により果肉の残りの部分の4か所を測定した。

## 2 収穫の早晩による影響

完全甘ガキ 4 品種（‘富有’、‘晩御所’、‘駿河’、‘次郎’）、不完全渋ガキ 1 品種（‘会津身不知’）、完全渋ガキ 3 品種（‘愛宕’、‘横野’、‘四つ溝’）の計 8 品種を用いた。各品種の商業的収穫期に 4~9 日間隔で 3 回、同一樹から 4 果ずつ収穫し、1 の方法で果汁と果肉硬度を測定した。それぞれ得られた値について、以下のモデルにより品種と収穫回を要因とする二元配置分散分析を行った。

$$XO_{ijk} = \mu 0 + CO_i + SO_j + (CSO_{ij}) + EO_{ijk}$$

$XO_{ijk}$  :  $i$  番目の品種における  $j$  番目の収穫回での  $k$  番目の果実の表現型値

$\mu 0$  : 総平均値

$CO_i$  :  $i$  番目の品種の効果

$SO_j$  :  $j$  番目の収穫回の効果

$CSO_{ij}$  :  $i$  番目の品種と  $j$  番目の収穫回との交互作用

$EO_{ijk}$  :  $i$  番目の品種における  $j$  番目の収穫回での  $k$  番目の果実の効果

## 3 樹間変異の検討

完全甘ガキ 4 品種（‘松本早生富有’、‘富有’、‘晩御所’、‘駿河’）各 2 樹について、2008 年に各品種の成熟期に 1 週間間隔で 2 回収穫した果実（各 8 果）を用い、1 の方法により果汁性を測定した。以下のモデルにより分散分析を行った。

$$XI_{ijk} = \mu l + CI_i + TI_j + EI_{ijk}$$

$XI_{ijk}$  :  $i$  番目の品種における  $j$  本目の樹での  $k$  番目の果実の表現型値

$\mu l$  : 総平均値

$CI_i$  :  $i$  番目の品種の効果

$TI_j$  :  $j$  本目の樹の効果

$EI_{ijk}$  :  $i$  番目の品種における  $j$  本目の樹での  $k$  番目の果実の効果

## 4 年次間変異の検討

2007 年と 2008 年に、完全甘ガキ 5 品種（‘松本早生富有’、‘富有’、‘晩御所’、‘駿河’、‘次郎’）について、各品種の成熟期各 1 樹から収穫した果実（各 8 果）を用い、1 の方法により測定し

た。以下のモデルにより二元配置分散分析を行った。

$$X_{2ijk} = \mu_2 + C_{2i} + Y_{2ij} + (CY_2)_{ij} + E_{2ijk}$$

$X_{2ijk}$  :  $i$  番目の品種における  $j$  年目の樹での  $k$  番目の果実の表現型値

$\mu_2$  : 総平均値

$C_{2i}$  :  $i$  番目の品種の効果

$Y_{2ij}$  :  $j$  年目の樹の効果

$(CY_2)_{ij}$  :  $i$  番目の品種と  $j$  年目の収穫回との交互作用

$E_{2ijk}$  :  $i$  番目の品種における  $j$  年目の樹での  $k$  番目の果実の効果

## 5 完全甘ガキ品種の品種間差異

完全甘ガキ 14 品種（‘藤原御所’、‘富有’、‘御所’、‘花御所’、‘伊豆’、‘次郎’、‘甘秋’、‘松本早生富有’、‘興津 20 号’、‘晩御所’、‘駿河’、‘太秋’、‘天神御所’、‘陽豊’）について、各品種の成熟期に各 1 樹から収穫した果実（各 8 果）を用いて 1 の方法により測定した。各品種の果肉硬度と果汁の多少の値について 32 個（8 果×4 か所）のサンプルの平均値を用いて Tukey-Kramer 法による多重比較を行った。

## 6 客観的評価の値を用いた、果汁性多となる個体の割合の推定

実験 1 で用いた交雑組合せのうち、客観的評価による測定を行った甘ガキ 14 品種の中に 2 つの交雑親がともに含まれている組合せについて、果汁の多少について評価した値を説明変数、各組合せで 30 個体のうち果汁性が多（5）の個体の割合を目的変数とし、実験 1 と同様に一般化線形モデル（ロジスティック回帰）を適用して解析を行った。構築したモデルで過分散が見られたため、誤差構造に疑似二項分布を仮定した一般化線形モデルを構築し、逸脱度分析を行った。

## 7 統計解析

以上 2～6 の統計解析には、R（3.3.3）（R Developmental Core Team 2017）を用いた。

## 結果

### 実験1 果肉が多汁で柔軟な実生個体の出現率の推定

各交雑組合せについて、果肉の硬さおよび果汁の多少の平均親値と 30 個体の評価値の分布を Table 3.2 および Table 3.3 に示す。果肉の硬さで交雑親の評価値が 1 (軟) ~ 3 (中) の範囲にあるが (Table 3.1)、4 (やや硬) や 5 (硬) の交雑個体も出現している (Table 4.2)。また果汁性についても、交雑親の評価値が 3 (中) ~ 5 (多) の範囲であっても、1 (少) や 2 (やや少) の個体が出現している (Table 3.3)。交雑個体の評価値が連続かつ広範囲で分布しており、2 つの形質が定量的な遺伝を示している。また 2 つの形質はともに平均親値の影響を受けており、果肉の硬さの評価値の分布は平均親値が小さくなると軟らかくなる方向へ動き、果汁の多少の評価値の分布は平均親値が大きくなると果汁が多い方向へ動いており、相加効果が認められる。

果肉の硬さに関して構築したモデルのうち、果肉の硬さの平均親値を説明変数、果肉の硬さが軟の個体の出現率を目的変数とする回帰モデルを求めると、次のような有意な回帰式が得られた (Table 3.4)。

$$P_{soft} = \frac{1}{1 + \exp(-(0.6238 - 0.8326MPf))}$$

$P_{soft}$  : 果肉の硬さが 1 (軟) の個体が出現する確率

MPf : 果肉の硬さの平均親値

得られた回帰式は平均親値が低いほど果肉硬度が軟の実生個体出現率が高まる傾向を示したが、その傾きは比較的なだらかなものであった (Fig. 3.2)。この回帰式から、果肉の硬さの平均親値が 1、3 の交雑組合せでは、果肉の硬さが軟の実生個体がそれぞれ 44.8%、13.3%程度出現すると推定された。

果汁の多少に関して構築したモデルでは、果汁の多少の平均親値を説明変数とし果汁が多

の個体の出現率を目的変数とするモデル、また果汁の多少と果肉の硬さの平均親値を説明変数、果汁が多くの個体の出現率を目的変数とするモデルを求めると、以下に示す有意な回帰式が得られたが、前者よりも後者の方が残差逸脱度が小さく、より適合度が高いモデルであった (Table 3.4)。

$$P_{juicy} = \frac{1}{1 + \exp(-(6.5186 + 1.4833MPj))}$$

$$P_{juicy} = \frac{1}{1 + \exp(-(-1.5906 + 0.8862MPj - 1.0375MPf))}$$

$P_{juicy}$  : 果汁が多くの個体が出現する確率

MPj : 果汁の多少の平均親値

MPf : 果肉の硬さの平均親値

果汁の多少と果肉の硬さとを説明変数とした回帰モデルでは、果汁が多くの個体の出現率は果肉の硬さの平均親値の影響を受け、果汁の多少の評価が同程度の平均親値であっても、果肉の硬さの平均親値が低いほど、果汁が多くの個体の出現率が高まる (Fig. 3.3)。この回帰式からは、果汁の多少の平均親値が 5 (多) で果肉の硬さの平均親値が 1.5 (やや軟) の交雑組合せでは、果汁が多くの個体の出現率は 78.3%となる。また果汁の多少および果肉の硬さの平均親値がともに 3 (中) の交雑組合せでも、果汁が多くの個体が 11.5%程度出現すると推定された。

## 実験 2 果汁の多少の品種間差異

### 1 収穫の早晩による影響

8 品種について収穫期に 3 回収穫して果汁と果肉硬度とを測定した結果を Fig. 3.4 に、また、品種と収穫回とを要因とする二元配置分散分析を行った結果を Table 3.5 に示す。果汁の多少性については収穫回では有意な差はなかった。各品種の平均の果汁の評価値は‘横野’が最も高く 47.5%であったが、完全甘ガキでは‘富有’が 44.0%で最も高かった。8 品種の中で‘駿河’が最も低く 27.5%であった。



一方果肉硬度については収穫回が大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。遅くに収穫した果実は総じて軟らかい傾向が見られ、また、完全甘ガキ品種の果肉硬度の減少幅は非完全甘ガキ品種のそれよりも大きかった。

## 2 樹間変異について

4 品種各 2 樹の果実を用いて測定した結果、品種による効果は大きく、樹の効果は非常に小さかった (Table 3.6)。

## 3 年次間変異

5 品種各 1 樹から 2 年収穫した果実の各サンプルの値を用いて分散分析を行ったが、品種間分散および年次間分散は全分散のそれぞれ 81.8%、0.09% となり、品種間差異に比べ年次間変異は十分小さかった (Table 3.7)。

## 4 完全甘ガキ 14 品種の果汁性に関する品種間差異

1 年 1 樹を用いて完全甘ガキ 14 品種の果汁の多少および果肉硬度の結果を Fig. 3.5 に示す。14 品種中‘太秋’の値 (61.5%) が最も高かったが、その果肉硬度は低く、最も低かった興津 20 号と同程度の 1.20kg であった。完全甘ガキ 4 品種 (‘富有’、‘松本早生富有’、‘甘秋’、‘陽豊’) の評価値は‘太秋’より低かったものの、40%を越える値となった。この中で‘陽豊’の果肉硬度が 2.70kg となり、4 品種の間で最も高かった。一方‘駿河’と‘花御所’は約 30% となり、果汁の多少の値が低いことが明らかとなった。1)の収穫時期の検討で用いた 4 品種の果汁の多少は‘富有’ > ‘次郎’ > ‘晩御所’ > ‘駿河’ となり、Fig. 3.3 に示す結果とも一致していた。完全甘ガキ 5 品種 (‘太秋’、‘富有’、‘甘秋’、‘陽豊’、‘天神御所’) の果汁の多少と官能評価での値とのピアマン順位相関係数は 0.866 であった。

## 5 客観的評価の値による、果汁性多となる個体の割合の推定

34 組合せ (Table 3.2) のうち、2 つの交雑親の客観的評価の値がともに得られたのは 7 組合せであり、その平均親値を Table 3.8 に示す。この 7 組合せに関して、官能評価からの値または客観的評価からの値と果汁が多となる個体の出現率とのピアマン順位相関係数は、それぞ

れ 0.461、0.954 であった。

官能評価からの値および客観的評価からの値を説明変数とし、果汁が多となる個体の出現率を目的変数として構築したモデルでは、前者は平均親値に関して有意ではなかったが、後者は有意であり (Table 3.9)、以下のような回帰式が得られた。また、前者よりも後者の方が残差逸脱度が小さく、より適合度が高いモデルであった (Table 3.9、Fig. 3.6)。

客観的評価によるモデル

$$P_{juicy} = \frac{1}{1 + \exp(-(-7.87164 + 0.16750MP_j))}$$

$P_{juicy}$  : 果汁が多い個体が出現する確率

$MP_j$  : 果汁の多少の平均親値

## 考察

本研究では、1)ロジスティック回帰を用いて、官能評価の平均親値から、果肉が軟らかく果汁の多い個体の出現率を推定することができ、これにより過去の交雑の調査結果から官能評価の結果をもとに、望ましい形質を有する個体の出現率予想することができる、2)果肉の硬さが、果汁の多少に一方的には影響を与える、3)果肉の硬さや果汁の多少といった形質について中程度の評価である交雑親からも、果肉の硬さや果汁の多少を改良した個体を得ることができ、カキ育種での近交弱勢のリスクを低減することができる、といったことを明らかにした。これまでに果肉が軟らかく果汁の多いカキ個体の出現率の推定に関する報告はなく、カキの品種育成を効率化するものとする。

果肉の硬さと果汁の多少の平均親値を用いて、果肉が軟らかく果汁が多い個体の出現率を推定するための有意なロジスティック回帰モデルを確立することができた。しかしながら、過分散が検出され、相加的な遺伝的効果以外の要因の影響があると考えられた。これらの要因として、1つ目は、交雑組合せ間での遺伝的分離の違いである。遺伝的分離が同じ平均親値 (Fig. 3.2, 3.3, Table 3.2, 3.3) の交雑組合せの間で異なっており、交雑組合せ自体が異なる範

圃の遺伝的分離を含んでいることを示唆している。このことの原因の1つとして、果肉の硬さや果汁の多少が本来は連続分布する量的形質であるにもかかわらず、官能評価では1から5の離散値で評価されるため、官能評価で同じ値となったサンプルの間でも果肉の硬さや果汁の多少に違いがあることが挙げられる。2つ目に、交雑親の評価が十分ではないことである。交雑に用いた親については、結実後2~3年しか評価を行っていないため、評価で得られた平均親値は、真の平均親値を正確に表していない可能性も考えられる。3つ目としては、優性効果の関与であるが、これは交雑親の一方に‘甘秋’を用いた場合（Table 3.2において組合せ番号が377、395、422、427）で、果肉の硬さの平均親値が2.0~2.5となった組合せで見られる。果肉の硬さの平均親値が2.0~2.5である他の交雑組合せと比べて、‘甘秋’が一方の交雑親となっている組合せでは、果肉が軟らかい個体の出現率が高くなっている。さらにこれらの3つ以外にも、官能評価での誤差や年次間変異などの環境変異が含まれている可能性がある。以上のような要因の関与を明らかにするためには、各交雑組合せにおける遺伝的分離の調査や正確な親値を求めるための反復調査などを行う必要があると考えられるが、その結果によって、官能評価によって得られた果実形質に関する評価値からのロジスティック回帰モデルの精度を改良することができるであろう。

果汁の多少に関するモデルの構築においては、果汁の多少に加え果肉の硬さの平均親値を説明変数に追加することで適合度が改善され、過分散についても、説明変数が果汁の多少の平均親値のみのモデルが3.71であるのが、両方の平均親値が説明変数であるモデルでは2.75に減少した（Table 3.4）。このことは果肉の硬さの平均親値が、果汁の多い個体の出現率に影響を及ぼすことを示している。一方、果肉の硬さのモデルでは、両方の平均親値を説明変数とするモデルは果肉の硬さのみを説明変数とするモデルと比べてそれほど優れておらず、果汁の多少の平均親値が果肉の軟らかい個体の出現率に影響しないことを示している。したがって、果肉の硬さと果汁の多少との関係が強い遺伝的基盤を持っているようには考えられず、果肉の硬さは、果汁の多少の官能評価に一方的に影響するものと考えられる。より硬い果実は果汁が少ないと感じられることは、リンゴでも報告されている（Harker *et al.* 2002, 2003）。この現象は、知覚検査の本質的な特徴から生じ得る。リンゴに関する研究では、訓練を受けた官能評価のパネリストが果肉のテクスチャー（crispness、crunchiness および juiciness）の差を明確に認識するためには、果肉硬度の違いが Effigi プローブ（果肉硬度計）によって測定し

た時に 6N より大きくなければならないことが観察されており (Harker *et al.* 2002)、このことは果肉の硬さが果汁の多少の官能評価にも影響することを示唆している。また官能評価のパネリストは、実際の果汁量に関係なく、軟らかい果実を果汁が多いと感じる傾向があることが指摘されている (Harker *et al.* 1997, 2002)。

完全甘ガキの品種育成においては、完全甘ガキ同士の交雑を繰り返してきた結果、樹勢の弱さや果実の小ささが問題となっており、近交弱勢を回避することが喫緊の課題である。これを解決するためには広い遺伝的背景をもった交雑親を利用する必要がある (Yamada *et al.* 1994)。この点に関して、今回の研究結果がカキの品種育成においては有用な情報となるであろう。果肉の硬さの平均親値が低い交雑組合せ、あるいは果汁の多少の平均親値が高い交雑組合せによって、それぞれ果肉が軟らかい個体、果汁の多い個体の割合が高まることが本研究で明らかとなったが、このことは、果肉が軟らかい品種・系統や果汁の多少の平均親値が高い交雑親を用いれば、果肉の硬さと果汁の多少の両方について遺伝的改良をもたらすこととなる。ごく限られた数の完全甘ガキ品種から、2つの形質に関して交雑親をより狭く制限することになり、近交弱勢の危険性を増やすことになる。しかし本研究では、得られた回帰曲線の傾きが比較的緩やかなものであることが示され (Fig. 3.2, 3.3)、このことは果肉の硬さと果汁の多少に関しては交雑で得られる個体の遺伝的分離が広いことを示唆しており、このことは Table 3.2 および 3.3 に示す結果によって裏付けられている。果実成熟期 (Yamada *et al.* 1995) とは異なり、果肉硬度と果汁の多少がともに中と評価されるである交雑親からであっても、出現率は低くなるものの軟らかく果汁の多い果肉を有する個体を得ることができる。果肉の硬さの官能評価値が一方的に果汁の多少の官能評価値に影響を与えるという結果からは、果汁が特段多くはないが果肉が軟らかい交雑親を使うことによって果汁の多い個体の割合を高めることができると考えられる。果汁の多少の平均親値が 3 で果肉の硬さの平均親値が 1.5 の交雑では、果汁の多い後代個体の割合は、果汁の多少の平均親値が 3 で果肉の硬さの平均親値が 3.5 の交雑の場合の 5.3 倍になると予想される。したがって、交雑親の選択を特に狭めることなく果汁の多少と果肉の硬さに関する改良を果たすことができ、これにより近交弱勢のリスクは低減させることができると考えられる。

果実が良食味であることはカキの品種改良における最も重要な目的の 1 つである。リンゴでは果汁の多少が新鮮さとともに消費者がリンゴを選択する上での重要な要因となっており、

果汁の多少と新鮮さを客観的に評価する方法が、果実に消費者の需要を高めるような付加価値をつけるために必須だと考えられている (Iwanami *et al.* 2017)。カキに関しては日本では消費者には概して軟らかく果汁の多い果実が好まれ、また市場性の高い果物を生産することが生産者にとって利益をもたらすため (Yamada and Sato 2003)、今後果樹産業の維持・発展を目指した新品種の育成には、果汁の多少を評価するための客観的評価法の開発が不可欠であり、加えて交雑を効率的に行うためには、交雑親として用いる品種・系統の果汁の多少を評価する必要がある。

本研究での果汁の多少の評価方法はネクタリンの粉質化評価のために開発された方法 (Lill and van der Mespel 1988) に基づくものである。この方法ではネクタリンの組織を注射筒に詰め破碎するが、果肉を破碎して遠心し上清量を測定することは正確ではあるが時間がかかるという欠点があることも指摘されている (Infante *et al.* 2009)。しかし、本研究における予備試験では、この方法がカキ果肉を扱う上で濾紙吸収の方法よりも適していると判断されたため、この方法を採用した。本研究では、口に噛んで咀嚼したときの果汁の感じ方を模倣するため、使い捨て注射器を用いて果肉を粗く破碎した状態で遠心することにした。この一連の過程では特別な実験機器を必要とせず一般的な実験器具を用いることで完全甘ガキ品種の果汁の多少を簡便に評価することができた。

予備試験においては不完全甘ガキも測定材料としたが、不完全甘ガキの主要品種である‘西村早生’の果汁を測定しようとしたものの、十分に成熟した果実の果肉であってもシリンジで破碎することができないほど硬いため、果汁を測定することは困難であった。今回の方法は、果肉中の硬い褐斑部、いわゆるゴマを有する不完全甘ガキの果汁の多少を評価するには適していないと考えられた。これは Lill and van der Mespel (1988) の方法が、硬い果肉のリンゴや水ナスの評価を行うのに適していない (Harker *et al.* 2006a; 堀江・平本 2009) のと同じ理由によると考えられる。‘西村早生’は官能評価により果汁がやや少とされており (広島県果樹試験場 1979)、この官能評価には果肉の硬さも影響していると考えられるが、果肉の硬さのため完全甘ガキや脱渋した渋ガキと比べて食味が劣るとされている (Yamada 2005)。このため今後の完全甘ガキの育種においては、‘西村早生’のような硬い果肉を有する品種などを交雑に用いる機会は少ないと考えられ、不完全甘ガキの果汁の多少を評価できなくても不都合はないものと考えられる。

本研究では完全甘ガキに加えて、完全渋ガキ 3 品種と不完全渋ガキ 1 品種を供試した。日本での現在のカキの生産量の約半分は完全渋ガキと不完全渋ガキである (Yamada *et al.* 2002)。これらの果実は二酸化炭素ガスまたはエタノール処理によって脱渋処理した後に、生食用の果実として消費することができる。脱渋処理の前後で果汁性に差がある可能性もあり今後検討が必要であるが、今回の方法を用いることによって、脱渋前の完全渋ガキおよび不完全渋ガキの果汁の多少を評価することができた。この中で完全渋ガキの‘横野’は、官能評価で多と評価してきた完全甘ガキの‘富有’よりも高い値を示した (Fig. 3.4)。農研機構におけるカキの品種育成では、完全甘ガキ性が非完全甘ガキ性に対して劣性であるため、完全甘ガキ同士の交雑を中心にしてきた (池田ら 1985; Yamada and Sato 2002) が、近年では近交弱勢を回避するため、非完全甘ガキも交雑に用いている。したがって、完全甘ガキと非完全甘ガキとを交雑して得られる非完全甘ガキの果汁の多少を評価して、果汁の値が高い非完全甘ガキ個体を選抜し、交雑親として品種育成で利用できる可能性がある。

それぞれの品種の収穫期の中で早、中、晩期の 3 回果実を収穫し、果肉硬度と果汁の多少を比較した。同一品種の収穫時期が異なる果実について硬度の差が認められたが、3 回の収穫時期で各品種の果汁の値に有意差はなかった (Fig. 3.4)。したがって、各品種の商業的収穫時期に収穫した果実であれば、収穫日が多少前後しても果汁の測定に使用できると結論づけられる。農研機構のカキ育種では、9 月下旬から 12 月上旬にかけて週 1 回、交雑実生の果実の収穫を果皮色や果頂部の軟化程度を指標にして行っている。交雑実生個体の収穫適期の判定は、結実し始めて数年は不明確であるが、収穫適期より 1~2 週間早くあるいは遅く収穫した場合でも果汁の多少の評価には影響がないものと考えられる。しかしながら果汁の多少と異なり、果肉硬度に関して、収穫が後になるほど果肉が軟らかくなっていた。このため果肉硬度の与える影響が大きいと思われる果肉の粗密の客観的な評価を行う場合には、収穫時期を厳密に決める必要があるであろう。

果実の量的形質に関して遺伝変異や環境変異の大きさを把握することが品種育成において必要であり、成熟期や果実重などに関して環境変異が推定されている (Yamada *et al.* 1993)。本研究において果汁の多少についても環境変異を推定することとした。二元配置分散分析では果汁の多少に対する品種の効果が非常に有意であることが明らかになった。品種の効果による分散は 80.3%であったが、同一品種の樹による分散は無視できるレベルのものであった

(Table 3.6)。また品種間分散が 87.4%であったのに対し、年次間分散は 0.15%であった (Table 3.7)。供試した材料は農研機構内のカキ育種圃場の樹からの果実であるが、圃場全体で樹の管理方法が均一で、年によって管理方法に大きな差がない条件では、個々の樹や年によって果汁の多少の評価が大きく変動せず、個体間の果汁の多少の品種間差異を明らかにできることを示している。果樹育種に利用可能な交雑実生の数は圃場の面積等により制限され (Yamada *et al.* 1993; Sato *et al.* 2000)、農研機構における品種育成でも 1 本の交雑実生個体は成木の 1 本の枝にのみ接木され調査が行われている。初期段階で樹木の反復を増やすことは不可能であり、年間の反復を増やすことも圃場管理に要するコストの増加につながる。しかし本研究の結果によれば、ある個体について 1 年 1 本の樹からの果実で果汁の多少の評価が可能と考えられ、選抜効率の向上のために樹数や年数の反復を増やす必要はないと考えられる。

この研究では、果汁の多少は完全甘ガキ 5 品種 (‘太秋’、‘富有’、‘甘秋’、‘陽豊’、‘天神御所’) の官能評価と高い相関を示した。また、農研機構により育成された‘太秋’、‘甘秋’、‘駿河’の果汁の多少は、官能評価でそれぞれ「著しく多」(山根ら 2001)、「中」(山田ら 2006b)、「少」(飯久保 1961) であり、本研究でのこれらの品種の値はそれぞれ 61.5%、43.6%、30.7%であった (Fig. 3.5)。したがって、本試験における果汁の多少とこれまでの官能評価との間には高い相関があり、本研究での方法で得られる果汁の値は、実際に食べたときの果汁の感じ方の有用な指標であると結論づけることができる。‘陽豊’は農研機構育成の品種(山根ら 1991)で、これまでその果汁の多少は官能評価により「中～低」と評価してきた。‘陽豊’の果実は収穫期に収穫された場合、果肉硬度は他の主要栽培品種よりも硬いと評価してきたが、果汁の多少の値は 40%を上回っていた (図 3)。これは官能評価で「多」と評価してきた‘富有’に匹敵する。したがって、これまでの官能評価による‘陽豊’の果汁の多少は、果肉の硬さにより影響されている可能性がある。一般には果肉が硬くなればなるほど果肉組織を破碎するためにより多くの咀嚼が必要になり、咀嚼中に口の中で果汁が放出されるのにより長い時間がかかる (Harker *et al.* 2003) ため、‘陽豊’については官能評価における果汁の多少を、果汁が多くても果肉が軟らかい他の品種と比較して少なく判定してきた可能性がある。また‘花御所’はこれまで果汁を「多」と評価してきた (広島県果樹試験場 1979) が、本研究での果汁の多少の値は低かった (Fig. 3.5)。収穫後の貯蔵期間中の果汁の変化を調べたみたところ、‘富有’の収穫日と収穫後 18 日目の値はそれぞれ 46.1%と 45.2%であったが、‘花御所’の収穫日と 13 日後の

32.5%および45.8%であった。また品種間差異の比較で用いた果実の果肉も‘花御所’にしては比較的果肉硬度が高いものである (Fig. 3.5)。したがってこれまでの‘花御所’の果汁の多少に関する評価は数日間貯蔵した後に行われた可能性がある。このことから、収穫後数日間貯蔵することによって値が増加する品種が存在することも考えられる。

日本で最も多く生産されている‘富有’は官能評価では「多」で、今回の結果で40%を超えた値となっている。したがって今後‘富有’よりも果汁が多い個体を選抜する場合には、果汁の多少の値が50%あるいはそれ以上のものを選抜することになる。今回用いた完全甘ガキ14品種のうち‘太秋’や‘富有’など複数の品種は官能評価では同じ評価であったが、本研究の手法によって‘太秋’を最も高い値(61.5%; Fig. 3.5)と評価し、官能評価では同じ評価値のものを数値化で順序づけすることができ、同じ「多」の品種であっても差別化することができる。

また、実験1で果汁の多少の評価が多となる割合を予測するモデルを構築したが、これを実験2で得られた果汁の数値を用いて構築し、官能評価の値を用いたモデルと比較した。交雑親の果汁の多少の値が得られる品種・系統が限られており、解析に用いることのできる交雑組合せは7つと実験1と比較して非常に少ないが、過分散については、官能評価のモデルで3.79であるのに対し、客観的評価による果汁の多少のモデルでは1.47に減少していた (Table 3.9)。このことは客観的評価を用いた場合の方が適合度が高いモデルであることを示している。また客観的評価の平均親値と果汁が多となる個体の出現率との順位相関係数は0.954と非常に高くなっており、客観的評価の平均親値により高い精度で果汁が多となる個体の出現率を予測できる。実験1では、実際には果汁の多少に差がある品種・系統が官能評価では同じと評価され、これによって平均親値が同じとなった交雑組合せの間に生じた変動によって誤差が生じていたが、客観的評価ではこの誤差が小さくなったものと考えられる。

農研機構におけるカキの育種では、調査した交雑実生個体のうち、官能評価により果汁が「多」と評価される個体の割合は1982年の22%から1994年の53%に増加しており (Yamada 2005)、現在は果汁の多い品種および系統同士を交雑することでその割合はさらに高くなっていると推定される。今回構築したモデルからも、平均親値が‘富有’程度(46.0%)の組合せでは果汁が多と評価される個体の出現率は45.8%であるが、‘太秋’と同程度(61.5%)の場合では出現率が91.9%と予測される。交雑親を検討にあたってより果汁の多いものを選ぶ場合にも、また、交雑によって生じるほとんど全ての個体が官能評価で果汁が多と評価される中で



果汁のより多い個体を選抜する場合にも順序付けする必要がある。また第 2 章で述べたように、完全甘ガキの育成において非完全甘ガキを交雑に使い始めたが、非完全甘ガキの食味の評価は進んでおらず、非完全甘ガキを交雑に用いる場合に果汁が多となる個体の割合は、完全甘ガキ同士の交雑ほど高くない現状では、果汁が多の個体を早期に選抜する必要がある。本研究での果汁の多少の評価方法は、官能評価よりも評価に要する時間が長くかかるものの、官能評価よりも詳細な情報を得ることができ、有効に活用できる。

Table 3.1 Cultivars and selections of Japanese persimmon used as parents in this study and their sensory ratings for fruit firmness and juiciness.

Cultivars/selections		Sensory rating	
		Firmness <sup>a</sup>	Juiciness <sup>b</sup>
Cultivars	Fuyu	3.00	5.00
	Hazegosho	2.50	4.50
	Izu	1.67	4.33
	Kanshu	3.00	3.67
	Maekawajiro	3.67	2.67
	Mikado	2.33	3.67
	Ogosho	2.50	4.00
	Shinshu	2.67	4.00
	Sunami	3.00	4.67
	Taishu	1.33	5.00
	Tenjingosho	3.00	3.67
	Uenishiwase	3.00	5.00
	Yamatogosho	2.00	4.50
	Youhou	3.00	3.67
Selections	Akitsu-16	2.67	4.33
	Akitsu-19	1.00	5.00
	Okitsu-20	2.33	4.00
	Okitsu-21	3.67	3.33
	Okitsu-24	3.67	3.67
	18-14	2.67	5.00
	66-5	2.33	3.33
	84-9	2.33	4.00
	109-27	1.67	5.00
	129-20	2.33	5.00
	177-15	2.67	3.00
	195-21	1.33	5.00

<sup>a</sup> 1 = soft; 2 = slightly soft; 3 = intermediate; 4 = slightly firm; and 5 = firm.

<sup>b</sup> 1 = juiceless; 2 = slightly juiceless; 3 = intermediate; 4 = slightly juicy; and 5 = juicy.

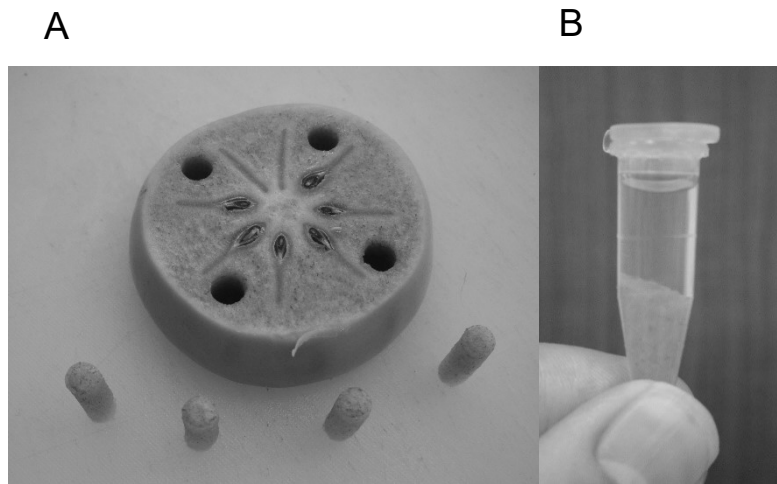


Fig. 3.1 Sample preparation for juice content measurement. A: Four columns obtained from a slice of the fruit using a cork borer. B: Homogenate after centrifuging. The weight of the supernatant juice was expressed as a percentage of the total weight of the sample.

Table 3.2 Mid-parental value of the sensory rating for fruit firmness of Japanese persimmon crosses and the number of offspring from each cross in each rating category<sup>a</sup>.

Cross code	Cross combination			Mid-parental value	Number of individuals in each sensory rating				
					1 <sup>b</sup>	2	3	4	5
203	Izu	×	Taishu	1.50	9	13	8	0	0
436	Yamatogosho	×	Taishu	1.67	14	8	8	0	0
447	Mikado	×	Akitsu-19	1.67	12	9	8	1	0
276	Okitsu-20	×	Taishu	1.83	3	15	11	1	0
453	Mikado	×	Taishu	1.83	16	8	6	0	0
280	Hazegosho	×	Taishu	1.92	4	6	16	4	0
387	Ogosho	×	Taishu	1.92	5	17	8	0	0
204	Izu	×	129-20	2.00	5	12	9	3	1
218	Izu	×	66-5	2.00	5	8	16	1	0
224	18-14	×	Taishu	2.00	12	10	7	1	0
238	177-15	×	Taishu	2.00	5	8	16	1	0
241	Shinshu	×	Taishu	2.00	8	10	12	0	0
345	Mikado	×	109-27	2.00	3	9	18	0	0
419	Tenjingosho	×	Akitsu-19	2.00	4	11	13	0	2
427	Shinshu	×	Akitsu-19	2.00	17	8	4	0	1
227	Fuyu	×	Taishu	2.17	5	11	13	1	0
307	Tenjingosho	×	Taishu	2.17	3	12	14	0	1
349	Shinshu	×	109-27	2.17	9	12	9	0	0
377	Kanshu	×	Taishu	2.17	15	11	4	0	0
395	Kanshu	×	195-21	2.17	12	11	7	0	0
350	Tenjingosho	×	109-27	2.33	4	2	19	1	4
422	Kanshu	×	109-27	2.33	13	9	7	1	0
221	18-14	×	66-5	2.50	5	9	14	2	0
272	Okitsu-21	×	Taishu	2.50	1	7	18	2	2
305	Maekawajiro	×	Taishu	2.50	1	9	20	0	0
470	Akitsu-16	×	Hazegosho	2.58	2	13	15	0	0
302	Okitsu-20	×	Fuyu	2.67	3	10	14	3	0
343	Youhou	×	84-9	2.67	2	4	21	2	1
344	Uenishiwase	×	84-9	2.67	8	6	15	1	0
457	Youhou	×	Mikado	2.67	5	4	16	3	2
291	Shinshu	×	Fuyu	2.83	2	10	18	0	0
346	Sunami	×	Kanshu	3.00	6	10	14	0	0
495	Fuyu	×	Kanshu	3.00	11	6	13	0	0
381	Kanshu	×	Okitsu-24	3.33	3	9	18	0	0

<sup>a</sup> Data are in ascending order of the mid-parental value.

<sup>b</sup> 1 = soft; 2 = slightly soft; 3 = intermediate; 4 = slightly firm; and 5 = firm.

Table 3.3 Mid-parental value of the sensory rating for fruit juiciness of Japanese persimmon crosses and the number of offspring from each cross in each rating category<sup>a</sup>.

Cross code	Cross combination			Mid-parental value	Number of individuals in each sensory rating				
					1 <sup>b</sup>	2	3	4	5
381	Kanshu	×	Okitsu-24	3.67	4	1	15	5	5
457	Youhou	×	Mikado	3.67	4	5	11	5	5
218	Izu	×	66-5	3.83	0	0	4	10	16
305	Maekawa-Jiro	×	Taishu	3.83	2	0	8	13	7
343	Youhou	×	84-9	3.83	5	0	18	4	3
238	177-15	×	Taishu	4.00	1	0	3	6	20
221	18-14	×	66-5	4.17	0	1	4	5	20
272	Okitsu-21	×	Taishu	4.17	2	2	11	5	10
346	Sunami	×	Kanshu	4.17	1	1	10	8	10
307	Tenjingosho	×	Taishu	4.33	1	1	8	7	13
345	Mikado	×	109-27	4.33	1	0	9	9	11
350	Tenjingosho	×	109-27	4.33	1	1	10	5	13
377	Kanshu	×	Taishu	4.33	0	0	5	2	23
395	Kanshu	×	195-21	4.33	1	1	6	4	18
419	Tenjingosho	×	Akitsu-19	4.33	0	0	9	10	11
422	Kanshu	×	109-27	4.33	0	2	11	6	11
427	Kanshu	×	Akitsu-19	4.33	0	0	3	1	26
447	Mikado	×	Akitsu-19	4.33	0	0	12	6	12
453	Mikado	×	Taishu	4.33	0	0	9	4	17
495	Fuyu	×	Kanshu	4.33	1	1	9	8	11
470	Akitsu-16	×	Hazegosho	4.42	0	0	16	2	12
241	Shinsyu	×	Taishu	4.50	2	1	3	5	19
276	Okitsu-20	×	Taishu	4.50	0	0	5	8	17
291	Shinsyu	×	Fuyu	4.50	0	2	13	8	7
302	Okitsu-20	×	Fuyu	4.50	2	0	9	8	11
344	Uenishiwase	×	84-9	4.50	2	1	12	6	9
349	Shinsyu	×	109-27	4.50	2	0	9	1	18
387	Ogosho	×	Taishu	4.50	0	0	7	6	17
203	Izu	×	Taishu	4.67	0	0	2	5	23
204	Izu	×	129-20	4.67	2	0	2	6	20
280	Hazegosho	×	Taishu	4.75	2	0	11	6	11
436	Yamatogosho	×	Taishu	4.75	2	0	3	3	21
224	18-14	×	Taishu	5.00	1	0	4	2	23
227	Fuyu	×	Taishu	5.00	0	0	2	5	23

<sup>a</sup> Data are in ascending order of the mid-parental value.

<sup>b</sup> 1 = juiceless; 2 = slightly juiceless; 3 = intermediate; 4 = slightly juicy; and 5 = juicy.

Table 3.4 Summary of logistic regression modelling for fruit firmness and juiciness in Japanese persimmon.

Model	Parameter estimate			Degrees of freedom	Residual deviance	Residual deviance /Degrees of freedom	P(>F) <sup>a</sup>
	Intercept	MPf	MPj				
For firmness							
Null	-1.2228	–	–	33	136.64	4.14	–
Firmness	0.6238	-0.8326	–	32	114.84	3.59	0.0261
Firmness + Juiciness	-1.3946	-0.6946	0.3919	31	112.77	3.64	0.4590
For juiciness							
Null	-0.0667	–	–	33	171.66	5.20	–
Juiciness	-6.5186	–	1.4833	32	118.86	3.71	0.0006
Juiciness + Firmness	-1.5906	-1.0375	0.8862	31	85.2	2.75	0.0015

<sup>a</sup> Calculated values when the parameters were added sequentially to the Null model. For the models that contained only one explanatory variable (the Firmness and Juiciness models), the values of the models were calculated by comparison with the Null model. The values of models containing two explanatory variables (the Firmness + Juiciness and Juiciness + Firmness models) were calculated by comparison with the models that contained one explanatory variable (the Firmness and Juiciness models).

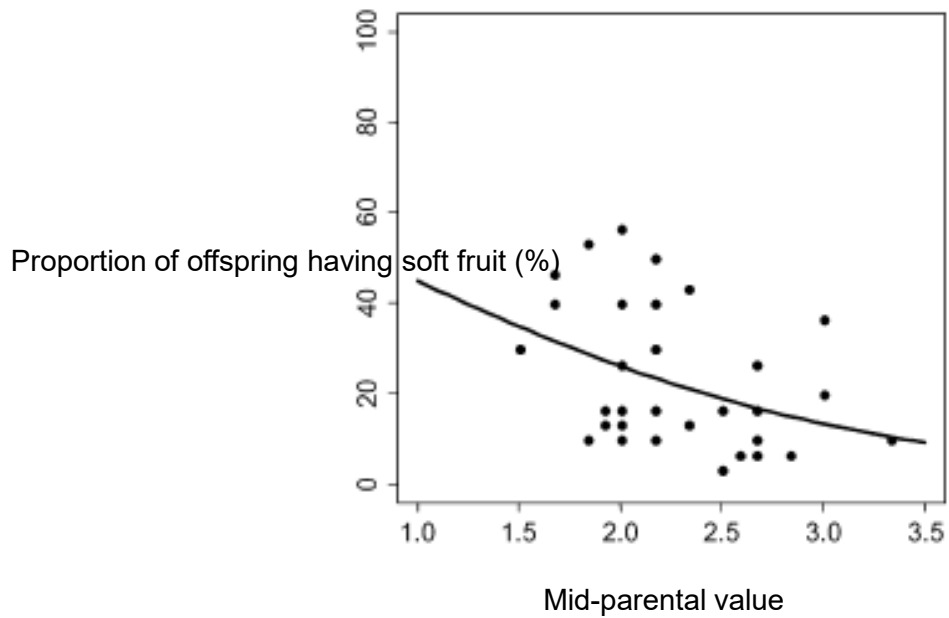


Fig. 3.2 Logistic regression line obtained from the Firmness model with observed data points representing the proportion of offspring of Japanese persimmon with soft fruit. The regression line is represented by:  $P_{\text{soft}} = 1/(1 + \exp(-(0.6238 - 0.8326 \text{ MPf})))$ , where  $P_{\text{soft}}$  is the proportion of offspring with soft fruit and MPf is the mid-parental value for firmness.

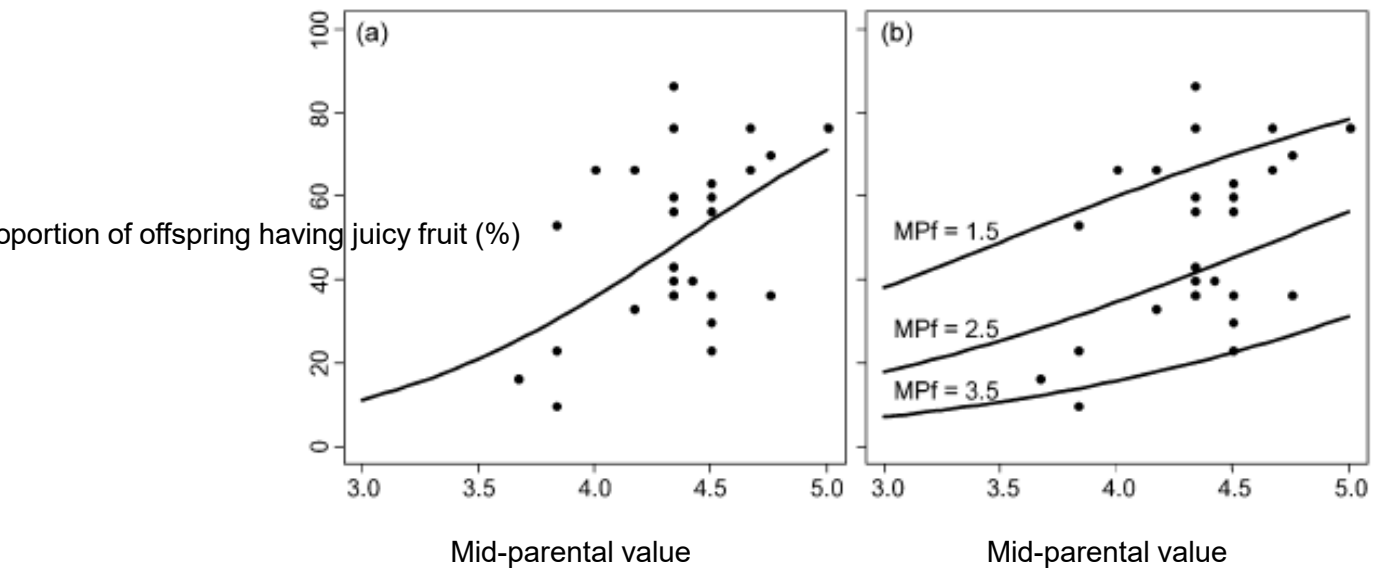


Fig. 3.3 Logistic regression lines obtained from the (a) Juiciness and (b) Juiciness + Firmness models with observed data points representing the proportion of offspring of Japanese persimmon with juicy fruit. The equations for the regression lines shown in panels (a) and (b) are: (a):  $P_{\text{juicy}} = 1/(1 + \exp(-(-6.5186 + 1.4833 \text{ MPj})))$  and (b):  $P_{\text{juicy}} = 1/(1 + \exp(-(-1.5906 + 0.8862 \text{ MPj} - 1.0375 \text{ MPf})))$ , where  $P_{\text{juicy}}$  is the proportion of offspring with juicy fruit,  $\text{MPj}$  is the mid-parental value for juiciness and  $\text{MPf}$  is the mid-parental value for firmness. Lines in panel (b) indicate the regression lines when  $\text{MPf}$  is set to 1.5, 2.5, and 3.5.



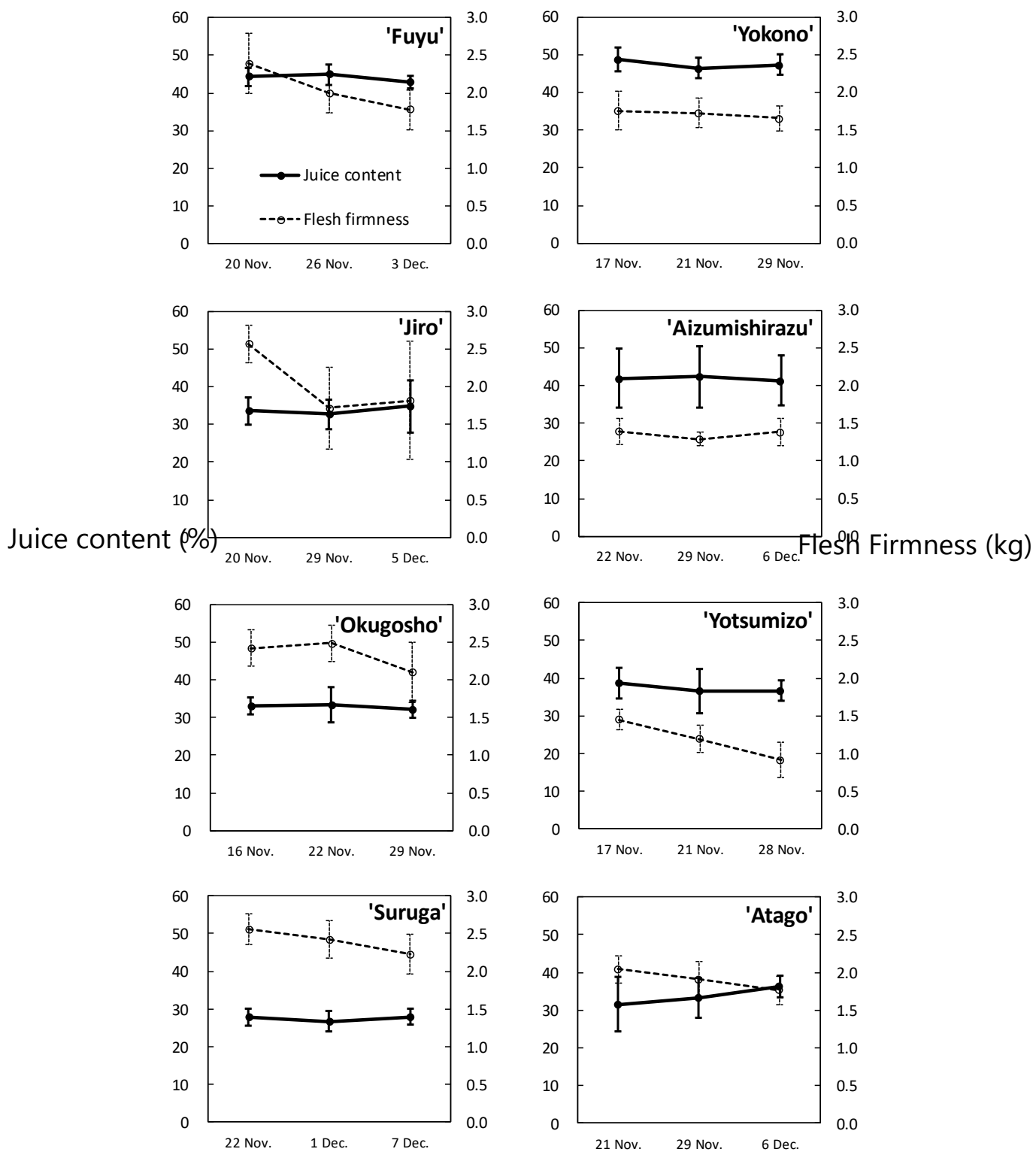


Fig. 3.4 Measurement of the juice content and flesh firmness of eight Japanese persimmon cultivars during their harvest period. Bars are standard deviation.

Table 3.5 Analysis of variance results for persimmon flesh juiciness and flesh firmness, evaluated 10 using four fruits from one tree of eight different cultivars that were harvested three times in one year.

Source of variation	df	Flesh juiciness		Flesh firmness		Expected mean square <sup>a</sup>
		Mean Square	F	Mean Square	F	
Cultivar	7	537.30	47.16 <sup>**</sup>	2.257	34.98 <sup>**</sup>	$\sigma_{e0}^2 + 12\kappa_{c0}^2$
Sampling time	2	1.90	0.170 <sup>NS</sup>	1.099	17.03 <sup>**</sup>	$\sigma_{e0}^2 + 32\kappa_{s0}^2$
Cultivar $\times$ Sampling time	14	6.20	0.547 <sup>NS</sup>	0.117	1.814 <sup>NS</sup>	$\sigma_{e0}^2 + 4\sigma\kappa_{cs0}^2$
Residual	72	11.40		0.065		$\sigma_{e0}^2$

<sup>\*\*</sup> Significant at  $P = 0.01$ ; <sup>NS</sup> non-significant at  $P = 0.05$ .

<sup>a</sup>  $\sigma_{e0}^2$  : residual variance.  $\kappa_{c0}^2$  : variation index for the cultivar effect.  $\kappa_{s0}^2$  : variation index for the sampling time.  $\kappa_{cs0}^2$  : variation index for the interaction between cultivar and sampling time.

Table 3.6 Analysis of variance for the instrumentally-evaluated flesh juiciness (IFJ) using four fruits from two trees of four different cultivars and one year's data.

Source of variation	df	Sum of squares	Mean squares	F	Expected mean square <sup>a</sup>
Cultivar	3	4599.64	1533.21	131.44 <sup>**</sup>	$\sigma_{e1}^2 + 16\sigma_{t1}^2 + 32\sigma_{c1}^2$
Among tree within cultivar	4	32.82	8.20	0.70 <sup>NS</sup>	$\sigma_{e1}^2 + 16\sigma_{t1}^2$
Residual	120	1399.75	11.66		$\sigma_{e1}^2$

<sup>\*\*</sup> Significant at  $P = 0.01$ ; <sup>NS</sup> non-significant at  $P = 0.05$

<sup>a</sup>  $\sigma_{e1}^2$  : residual variance.  $\sigma_{t12}$  : variance associated with trees.  $\sigma_{c1}^2$  : variance associated with cultivars.

Table 3.7 Analysis of variance for the juice content of Japanese persimmon using five cultivars, one tree per cultivar, and two year's data.

Source of variation	df	Sum of squares	Mean squares	F <sup>a</sup>	Expected mean square <sup>b</sup>
Cultivar	4	3852	962.9	113.571 <sup>**</sup>	$\sigma_{e^2} + 8\sigma_{cy^2} + 16\sigma_{c^2}$
Year	1	11	11.0	1.300 <sup>NS</sup>	$\sigma_{e^2} + 8\sigma_{cy^2} + 40\sigma_{y^2}$
Cultivar $\times$ year	4	28	7.0	0.825 <sup>NS</sup>	$\sigma_{e^2} + 8\sigma_{cy^2}$
Residual	70	594	8.5		$\sigma_{e^2}$

<sup>\*\*</sup> Significant at  $P = 0.01$ ; <sup>NS</sup> non-significant at  $P = 0.05$

<sup>a</sup>  $\sigma_{e^2}$  : residual variance.  $\sigma_{cy^2}$  : variance associated with interaction between cultivar and year.  $\sigma_{c^2}$  : variance associated with cultivars.  $\sigma_{y^2}$  : variance associated with years.

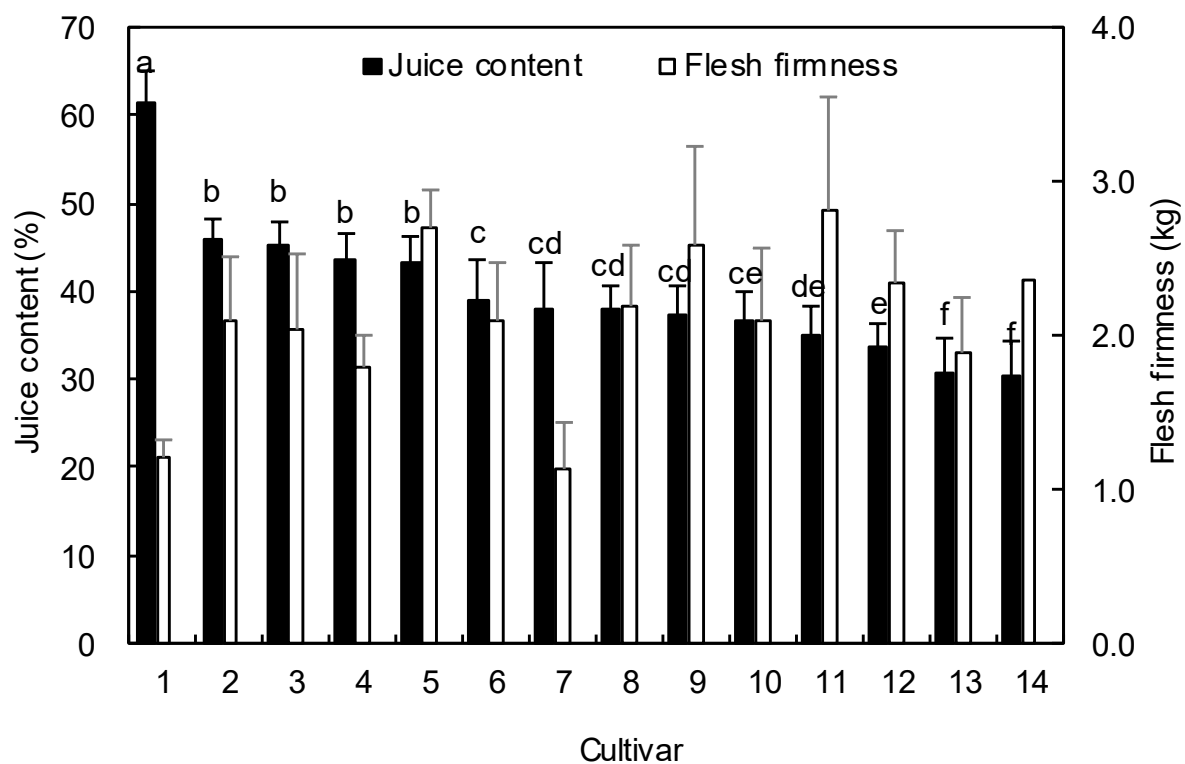


Fig. 3.5 Varietal differences in the juice contents of 14 cultivars of Japanese PCNA persimmon. The numbers on the x axis represent the cultivars; 1: Taishu, 2: Fuyu, 3: Matsumotowase-Fuyu, 4: Kanshu, 5: Youhou, 6: Izu, 7: Okitsu-20, 8: Fujiwaragosho, 9: Tenjingosho, 10: Gosho, 11: Jiro, 12: Okugosho, 13: Suruga, 14: Hanagosho. Bars = standard deviation. Columns with different letters are statistically significantly different according to the Tukey-Kramer test ( $P = 0.05$ ); each column represents the mean of 32 samples (four flesh columns  $\times$  eight fruits for each cultivar).

Table 3.8 Mid-parental value of the sensory rating and objective evaluation for fruit juiciness of Japanese persimmon crosses and the number of offspring from each cross in each rating category<sup>a</sup>.

Cross code	Cross combination			Mid-parental value		Number of individuals in each sensory rating				
				sensory <sup>b</sup>	objective <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup>	2	3	4	5
302	Okitsu-20	×	Fuyu	4.50	42.0	2	0	9	8	11
495	Fuyu	×	Kanshu	4.33	44.8	1	1	9	8	11
307	Tenjingosho	×	Taishu	4.33	49.4	1	1	8	7	13
276	Okitsu-20	×	Taishu	4.50	49.8	0	0	5	8	17
203	Izu	×	Taishu	4.67	50.2	0	0	2	5	23
377	Kanshu	×	Taishu	4.33	52.6	0	0	5	2	23
227	Fuyu	×	Taishu	5.00	53.8	0	0	2	5	23

<sup>a</sup> Data are in ascending order of the mid-parental value obtained by objective method.

<sup>b</sup> Data are same as those shown in Table 3.3.

<sup>c</sup> Data are calculated from the result shown in Fig. 3.5.

<sup>d</sup> 1 = juiceless; 2 = slightly juiceless; 3 = intermediate; 4 = slightly juicy; and 5 = juicy.

Table 3.9 Summary of logistic regression modelling for fruit juiciness in Japanese persimmon.

Model	Parameter estimate		Degrees of freedom	Residual deviance	Residual deviance /Degrees of freedom	P(>F) <sup>a</sup>
	Intercept	MPj				
by sensory evaluation						
Null	0.7218	–	6	27.471	4.58	–
Juiciness	-8.2705	1.901	5	18.926	3.79	0.1878
by objective evaluation						
Null	0.0072	–	6	27.471	4.58	–
Juiciness	-7.8716	0.1675	5	7.352	1.47	0.0138

<sup>a</sup> The values of the models were calculated by comparison with the Null model.

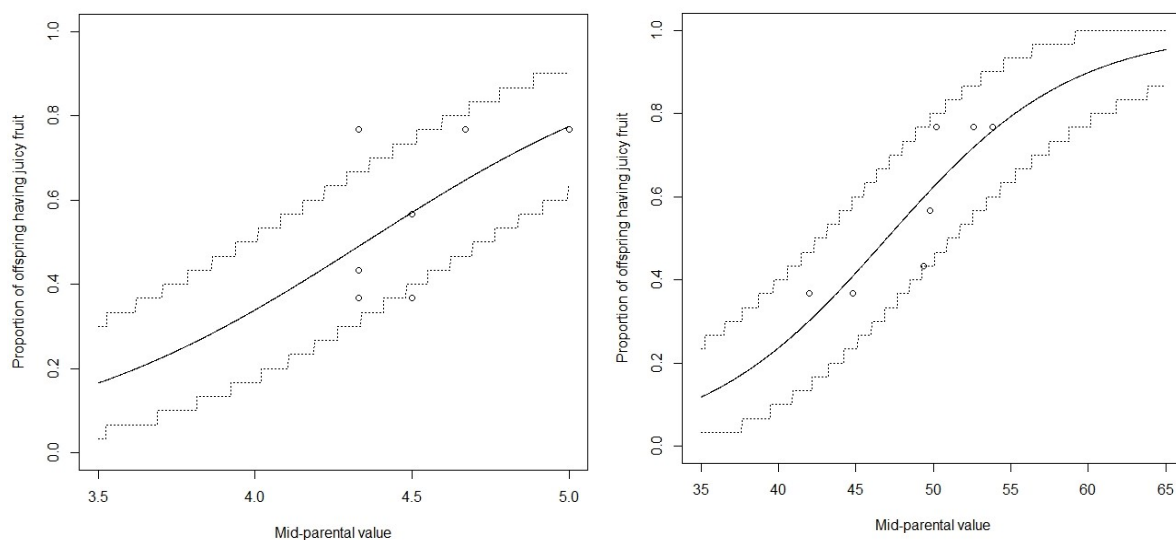


Fig. 3.6 Logistic regression line obtained from the Juiciness models with observed data points by the sensory test (a) and the objective method (b) representing the proportion of offspring of Japanese persimmon with juicy fruit. The regression lines are represented by:  $P_{\text{juicy}} = 1/(1 + \exp(-(-8.2705+1.9010 \text{ MPj})))$  (a) and  $P_{\text{juicy}} = 1/(1 + \exp(-(-7.87164+0.16750 \text{ MPj})))$ , where  $P_{\text{juicy}}$  is the proportion of offspring with juicy fruit and  $\text{MPj}$  is the mid-parental value for juiciness. The area between two broken lines in each figure is 95% prediction area.



## 第4章 総合考察

日本の果樹産地の多くは中山間地に立地するため大型機械の導入が困難であり、また高齢化が進み、果樹生産力が漸減している。また、近年の果樹生産の中で大きく消費動向を変えた品種は、ブドウ (*Vitis labruscana*) の‘シャインマスカット’ (山田ら 2008) などごく一部の品種を除いてほとんどない。カキを含めた果実の消費量は減少傾向にあることは、消費者には果樹の既存の品種を超えた食味を提供する必要があることを示している。現在生産されている完全甘ガキ品種は、‘富有’、‘次郎’、およびそれらの枝変わり品種が主体であるが、枝変わり品種は果実成熟期や果実の大きさに変異はあっても、食味形質は元の品種とほぼ同じであって、市場に流通している完全甘ガキ品種の食味は変化に乏しい (佐藤ら 2018)。現在の主要品種よりもさらに食味が優れた新品種を育成し、これによって果樹産地を活性化させ維持していく必要がある。さらに、良食味の果実は輸出品としても有望であり、果樹産業の国際的な競争力を高めるのに有用である。一方、カキ果実にはビタミン C、カリウム、食物繊維、タンニンなどが多く含まれ、「柿が赤くなれば医者が青くなる」と言われるほど非常に栄養価に優れている。生活習慣病が大きな社会問題となっている昨今、食生活にカキを取り入れる観点からも、良食味のカキの新品種を市場に安定的に供給し豊かな食生活につなげる必要がある。

このような社会状況を背景に、本研究では、良食味の完全甘ガキ新品種を育成するため非完全甘ガキを利用した完全甘ガキの交雑育種を効率化するための DNA マーカーによる選抜方法の開発と、食味を決める大きな要因である果汁の多少に関して、交雑組合せからの果汁の多い個体の出現率の予測および果汁の多少の客観的評価方法の開発に取り組んだ。第2章では多数の個体の甘渋性を迅速に識別できる SCAR マーカーの開発を示し、実際のカキ交雑育種における実生集団において、甘渋性識別マーカーによる識別が果実の甘渋性とほぼ一致し、選抜に有効であることを示した。また第3章では、これまでの官能評価の結果から果肉が軟らかく果汁の多い個体の出現率を予測する方法を構築し、あわせてカキ食味形質の重要要因の1つである果汁の多少を客観的に評価できる方法を示して品種間差異を明らかにしつつ、予測方法に応用することで、より精度の高い予測方法を示した。

新品種育成のための選抜においては、果実重や食味、へたすきや果頂裂果の有無が主要な選抜基準となるが、カキのこれらの形質については現時点では DNA マーカーによる選抜が困難である。したがって交雑実生を接ぎ木し結実を待たなければ果実特性を調査して選抜することは不可能である。しかしながら完全甘ガキと非完全甘ガキとを交雑し、選抜した非完全甘ガキ個体に完全甘ガキを交雑した場合に、交雑実生集団において完全甘ガキ個体が 15～20%含まれていると仮定すると、甘渋性だけについても DNA マーカーで識別すれば、全ての個体を生育させて調査する場合よりも 5～6.6 倍効率が上がることになる。農研機構果樹茶業研究部門で選抜した個体は全国の公立試験場所での系統適応性特性検定試験を経て新品種となるが、近年優良な品種候補の個体として選抜しこの試験に供試した個体は完全甘ガキ同士の交雑によって生じた完全甘ガキが多く、果実品質が良好でも樹勢の弱さや果実の小ささがこの試験における調査結果から指摘されることがあり、品種登録に至らないものが多かった。‘太月’または‘太天’と‘甘秋’とを交雑して得た実生個体の果実形質について調査したところ、これら集団の完全甘ガキ個体の平均果実重は非完全甘ガキ個体の平均果実重よりも小さかったものの、完全甘ガキの中で果実重が‘富有’と同程度の 280g 以上でありかつ果頂裂果しない個体の出現確率は低くなく (Sato *et al.* 2013)、これらの集団から主要な形質について選抜基準を超える個体が出現する可能性は大きい。

本研究では品種育成の中で 1990 年代から非完全甘ガキの交雑親として用いてきた‘黒熊’の後代の実生集団を研究材料とした。日本にはカキが 1000 以上の品種が存在し、その多くは渋ガキである (板村 2015)。農研機構でも 600 品種程度保存しているが、‘黒熊’以外で樹勢や果実重などで注目すべき形質を有する渋ガキ品種があれば、それらについても *Ast* 遺伝子座およびこれに連鎖する領域に関する情報を明らかにした後、品種育成において交雑親として使用し、甘渋性マーカーを利用した選抜が可能である。これまで交雑に用いなかった非完全甘ガキ品種を利用することで交雑親の選択肢は格段に広がる。

2014 年までに (非完全甘ガキ×完全甘ガキ) ×完全甘ガキの交雑を 28 組合せで行い、得られた 5724 個体から甘渋性マーカーによって完全甘ガキを 1346 個体選んだ (Sato and Yamada 2016)。現在系統適応性特性検定試験に DNA マーカーで識別した完全甘ガキで果実品質が優良で品種となることが有望な個体を供試しているが、近交弱勢の影響を受けず、樹勢や収量などの面で栽培上問題のない完全甘ガキ新品種が期待できる。

日本の完全甘ガキ同士の交雑からは完全甘ガキの個体のみ生じ、日本の完全甘ガキと在来の非完全甘ガキとの交雑によって得られた個体は全て非完全甘ガキとなる。一方、中国で発見され、完全甘ガキとされる‘羅田甜柿’ (Wang 1982) と日本の完全甘ガキとの交雑では、完全甘ガキと非完全甘ガキとが生じ (Ikegami *et al.* 2004)、さらに‘羅田甜柿’と非完全甘ガキとの交雑では、出現する個体の 50%が完全甘ガキとなっていることから、‘羅田甜柿’の完全甘ガキ形質は、非完全甘ガキ形質に対し優性であると考えられる (Ikegami *et al.* 2006)。加えて、‘羅田甜柿’のタンニン細胞が日本の完全甘ガキのものより大きいこと (Ikegami *et al.* 2005)、‘羅田甜柿’が *Ast* 遺伝子座をもたないこと (Akagi *et al.* 2010)、日本の完全甘ガキと非完全甘ガキとの交雑からは完全甘ガキが生じないこと (池田ら 1985)、日本の完全甘ガキが優性の中国由来の甘ガキ遺伝子を持たないと考えられること、などを考え合わせると、日本の完全甘ガキは中国の完全甘ガキとは遺伝的に全く独立しており、‘羅田甜柿’の有する中国由来の完全甘ガキ形質は日本の完全甘ガキ形質と異なったものと考えられる (Sato and Yamada 2016)。農研機構のカキ育種では 1990 年代から‘羅田甜柿’を交雑に用いている (Yamada 2013) が、‘羅田甜柿’の果実は成熟期であってもわずかに渋みが残ることがあり (Sato and Yamada 2016)、‘羅田甜柿’と日本の完全甘ガキとの交雑による甘ガキ個体の多くが成熟期に渋みをもっていることがある (山田ら 2006a)。このためこの交雑からの実用的な品種の育成には至っていない。中国由来の完全甘ガキ形質を識別できる DNA マーカーも開発されており (Ikegami *et al.* 2011)、日本の完全甘ガキ同士の交雑だけでなく、‘羅田甜柿’を利用した交雑も完全甘ガキ個体の効率的な選抜に利用できる段階となっており (Sato and Yamada 2016)、今後交雑によって世代を重ねていけば、よりタンニン含量が少なく、現在では完全甘ガキの栽培が困難な東北地方においても成熟期に渋みのない完全甘ガキを育成できる可能性もある。

ところで、カキの食味については果肉硬度や果汁の多少だけでなく、果肉の粗密も重要な要因である。果肉の粗密についてはリンゴで精力的に研究されており (Harker *et al.* 2002, 2006b; Ballabio *et al.* 2012)、また果樹ではないが、果肉の硬さや食感が食味を左右するキュウリでは、卓上型物性測定器を用いて得られた値から二次微分に基づく解析法によって食感が数値化されている (堀江ら 2004)。カキの果肉の粗密については、‘西村早生’や‘禅寺丸’のように粗いものから‘花御所’や‘平核無’ (脱渋後) のように密のものまであり他の樹種以上に多岐に渡っており、また消費者の好みも果肉硬度とあわせて多様なものとなっている。肉質の

粗密をリンゴなどと同様にテクスチュロメータや卓上型物性測定器によって測定し客観的に評価することも可能と思われるが、これまで報告がなく実用化されていない。今後より良食味のカキを選抜・育成するためには、果汁の多少に加え、果肉の粗密に関する客観的な評価方法の確立も必要である。

カンキツ (*Citrus*) やリンゴは多くの栽培品種が二倍体であり、有用形質に連鎖する DNA マーカーの開発や高密度連鎖地図の開発が精力的に進められてきた (Omura and Shimada 2016; Igarashi *et al.* 2016)。リンゴの交雑育種では、4 種類の遺伝形質それぞれを備えた個体を選抜するための DNA マーカーが実用化されている (森谷 2014)。DNA マーカーによる選抜は少数の遺伝子が関わる特性に限られるが、果肉の肉質は量的形質と考えられ、効果の異なる複数の遺伝子によって支配されるため、連鎖マーカーの開発が困難である。しかしながらリンゴでは果肉の肉質についての QTL 解析も行われており (Longhi *et al.* 2012; McClure *et al.* 2016)、特に果肉の硬さに関しては数多くの QTL が同定されている (Chagné *et al.* 2014, Kunihisa *et al.* 2014, Marondedze and Thomas 2013, Sun *et al.* 2015)。最近では、既存の品種等の間における果実重などの特性の違いと大量の DNA 配列の違いとの関係を数式で表した予測モデルを作成し、このモデルを新たに養成した個体に適用しその DNA 配列からその個体を持つ特性を予測し、求める特性を持つと考えられる個体を選抜する、ゲノミックセレクションの有効性についてもカンキツで報告されている (Minamikawa *et al.* 2017)。

いずれにせよカキの育種における完全甘ガキの育成においては、甘渋性の識別を DNA マーカーによって行えるようになったことで、交雑親として用いることができる品種・系統の幅が大きく広がり、多様な形質を有する個体を生み出す可能性が大きくなった。しかしながら甘渋性を除いては DNA マーカーを利用した選抜を行うことはできず、優良個体の選抜にあたっては、交雑親の選定や交雑実生個体の樹体・果実の調査を他の樹種以上に粛々と進める必要がある。本研究で開発した果汁の多少の客観的評価方法がその一助となるであろう。

## 摘要

カキの品種は成熟果実の渋性（甘渋性）と種子の有無により4つのタイプに分類されるが、この中で完全甘ガキだけが種子の有無に関係なく果実が成熟する過程において樹上で脱渋する。このため果実生産には完全甘ガキが最も望ましい。日本由来の完全甘ガキ性は非完全甘ガキ性に対し劣性である。完全甘ガキと非完全甘ガキとの交雑、もしくは非完全甘ガキ同士の交雑では出現する後代個体は全て非完全甘ガキとなるため、完全甘ガキを育種する上では専ら完全甘ガキ同士の交雑が行われてきた。しかし完全甘ガキ同士の交雑を繰り返すことによって近交弱勢の問題が生じ、完全甘ガキと非完全甘ガキとの交雑により生じた非完全甘ガキに完全甘ガキを交雑することによって得られる後代個体から完全甘ガキを選ぶ必要が生じた。しかしこの交雑で得られる後代実生の中に完全甘ガキの個体は平均で15%程度しかなく、完全甘ガキであるか否かが判明するのは各個体の実生を高接ぎし結実するまで数年かかり非効率的である。後代個体の渋性をDNAマーカーによって幼苗段階で識別できれば、完全甘ガキ個体のみを育種圃場に高接ぎすればよいことになる。そこで本研究では、渋性に関するDNAマーカーが多数の個体を扱う実際の育種現場で有効であるかどうか検証を行った。

また完全甘ガキの育種では、他の樹種と同様に良食味であることが最も重要な目標の1つである。カキに関しては果肉が軟らかく果汁の多い果実が一般的には消費者に好まれる。消費者の嗜好にあった新品種を効率的に作出するため、果肉が軟らかく果汁が多い実生個体の出現率を推定する方法を構築することとした。さらにこれまで官能でのみ評価されてきた果汁の多少に関して、客観的・機械的測定法の確立を目指すこととし、この方法を用いて完全甘ガキの主要な品種での果汁性の品種間差異を明らかにすることとした。

本論文は主に2つの構成から成り立っている。序論に続く第2章では、カキ育種において完全甘ガキと非完全甘ガキとの交雑によって得られた非完全甘ガキと完全甘ガキとの交雑から得られた多数の交雑後代個体について、SCARマーカーが渋性を識別するのに有効であるかどうか検証を行った。第3章では、過去のカキの交雑による果実の調査記録から、果肉が軟らかく果汁の多い個体の出現率を予測する方法を開発し、またあわせて、果肉の一部を遠心した後の上清を測定する簡便な方法で果汁の多少を評価する方法を構築した。そして最

終章では、本研究を総括し今後のカキ育種に関する課題について検討した。

## 第2章「非完全甘ガキ‘黒熊’に由来する交雑実生個体の DNA マーカーによる甘渋性識別」

非完全甘ガキの‘黒熊’に由来する交雑実生集団の甘渋性を識別するために開発された SCAR マーカーが、実際のカキ育種においてどの程度有効であるか、多数の交雑実生個体を用いた検証を行った。この‘黒熊’については、非完全甘ガキ形質に連鎖する3種類の RFLP マーカー (A1~A3) を有していることが先行する研究で明らかとなっていた。

非完全甘ガキ‘太天’ (非完全甘ガキ‘黒熊’×完全甘ガキ‘太秋’) と完全甘ガキ‘甘秋’との交雑による後代 251 個体を用いた。‘太天’が A2 および A3 を有していることから、2組のプライマーセット E4/A2r および 7H9F/AST-R を用いて識別を行った。205 個体は A2、A3 のいずれかが検出されたため非完全甘ガキと判定されたが、これら個体の果実の甘渋性は非完全甘ガキと判定され、マーカーによる識別結果と完全に一致した。残り 46 個体は A2 と A3 のいずれも検出されず完全甘ガキと識別されたが、果実の甘渋性ではうち 43 個体が完全甘ガキであって、マーカーによる識別結果とほぼ一致する結果となった。マーカーによる完全甘ガキの割合は 46/251 (18.3%) (Table 2.2) となり、マーカーによる識別と果実の甘渋性が不一致であった割合は全体として 3/251 (1.2%) となった。‘富有’×‘太天’および‘天神御所’×‘太天’の交雑個体について完全甘ガキと考えられる個体の割合は、それぞれ 36/151 (23.8%)、6/29 (20.7%) となり、‘太天’×‘甘秋’も含めこれらの結果はこれまでの完全甘ガキの出現率と有意な差はなかった。

非完全甘ガキ‘太月’ (非完全甘ガキ‘黒熊’×完全甘ガキ‘太秋’) と完全甘ガキ‘甘秋’との交雑による後代については、‘太月’が A1 および A3 を有しており、最初に E8.5/E9r を用いて A1 で識別した。その後 A1 を有する 40 個体を高接ぎしたが、結実した 22 個体は全て非完全甘ガキであった。A1 を有さない 46 個体を高接ぎし 26 個体が結実し、完全甘ガキが 11 個体、非完全甘ガキが 15 個体となったが、この 15 個体について後に 7H9F/AST-R により A3 の有無を調査したところ、すべて A3 を有していた。したがって結実した 48 個体については、マーカーによる識別と果実の甘渋性が完全に一致する結果となった。別途得られた‘太月’と‘甘秋’との交雑実生 522 個体の甘渋性を E8.5/E9r および 7H9F/AST-R で識別したが、完全甘ガキ

と考えられる個体は 81 個体 (15.5%) であった。この比率は関して、‘太天’と‘甘秋’との交雑組合せにおける完全甘ガキの出現の期待値の 18.3%と有意差はなかった。

### 第 3 章「カキ育種における果肉が多汁で柔軟な実生個体の出現率および果汁の多少の品種間差異」

果肉が軟らかく果汁が多い品種を効率的に育成するため、カキの重要な食味形質である果肉の硬さと果汁の多少の官能評価による値にロジスティック回帰を適用し、果肉が軟らかく果汁の多い個体の出現率の推定を試みた。官能評価では、果肉の硬さと果汁の多少についてそれぞれ 1~5 の尺度で評価 (果肉の硬さ: 1 (軟) ~ 5 (硬)、果汁の多少: 1 (少) ~ 5 (多)) を行っているが、ロジスティック回帰を利用するため、後代個体をそれぞれの評価値によって、果肉の硬さは 1 (軟) と 2 以上の個体に、果汁の多少は 5 (多) と 4 以下に分類し、交雑組合せでの果肉の硬さの平均親値または果汁の多少の平均親値を説明変数、果肉の硬さが 1 の個体または果汁の多少が 5 となる個体の出現率を目的変数とした。果肉の硬さについて得られた回帰式は平均親値が低いほど果肉軟の個体の出現率が高まる傾向を示したが、果汁の多少については、果汁の多少のみを説明変数にするよりも、果汁の多少と果肉の硬さの両方を説明変数とした回帰式の方が適合度が高かった。得られた回帰式からは、果肉の硬さの平均親値が低い交雑組合せ、あるいは果汁の多少の平均親値が高い交雑組合せが、それぞれ果肉が軟らかい個体の出現率、あるいは果汁の多い個体の出現率が高くなると考えられた。しかしどちらの回帰曲線の傾きはなだらかであり、両方の形質に関して遺伝的分離が広いと考えられた。また両方の形質について中の評価である交雑親からでも果肉が軟らかく果汁の多い後代個体が得られると考えられた。

果汁の多少の客観的評価は、果肉を破碎後に遠心して果汁を分離し、元の果肉に対する果汁の割合を算出して行った。果汁の収穫の早晚による影響を明らかにするため、完全甘ガキ 4 品種、不完全渋ガキ 1 品種、完全渋ガキ 3 品種の計 8 品種に関して、それぞれの商業収穫期に 3 回収穫し果汁を測定したが、収穫時期による有意差はなかった。樹間変異を明らかにするため、4 品種各 2 樹の果実の果汁を測定したが、品種による効果が大きく、樹の効果は非常に小さかった。年次間変異についても 5 品種各 1 樹から 2 年収穫した果実で測定したが

樹の効果と同様年次の効果は小さく、品種・系統の評価は1年1本の樹からの果実で可能と考えられた。

完全甘ガキ14品種について果肉の硬さと果汁の多少を比較した。‘太秋’の果汁の評価値は最も高く、果肉の硬さは最も低かった。4品種（‘富有’、‘松本早生富有’、‘甘秋’、‘陽豊’）の果汁性は‘太秋’よりも低いものの40%を超えていた。一方‘駿河’と‘花御所’の果汁性は約30%であり、調査した中で低かった。5品種（‘太秋’、‘富有’、‘甘秋’、‘陽豊’、‘天神御所’）の評価値と官能評価との間のスピアマン相関係数は0.866であった。

先のロジスティック回帰モデルに関して、7交雑組合せについて説明変数を官能評価による場合と果汁の多少の値の場合とでモデルを構築し比較を行った。後者の場合平均親値に関して有意となり、また残差逸脱度が小さく、より適合度が高いモデルが得られた。

#### 第4章 「総合考察」

SCAR マーカーによって多数の交雑実生個体の甘渋性を識別できることを示したことは、交雑親として用いることができる品種・系統の幅を拡大し、多様な形質を有する個体を生み出す可能性を高めたものと考えられる。またカキの食味に関し、官能評価の平均親値から、ロジスティック回帰を用いて果肉が軟らかく果汁の多い個体の出現率を推定することができたが、これにより過去の交雑の調査結果から官能評価の結果をもとに、望ましい形質を有する個体の出現率予想することができる。また、果汁の多少の客観的評価方法を開発し完全甘ガキの主要な品種の品種間差異を明らかにし、さらにこの客観的評価を用いることで、果汁の多い個体の出現率を官能評価よりも高い精度で推定することができた。以上のような研究成果は完全甘ガキの品種育成を効率化させると考えられる。



## Summary

Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cultivars are classified into four types depending on the astringency of the mature fruit and the effect of seeds on the loss of astringency. Among the four types, only pollination-constant and non-astringent (PCNA) steadily loses fruit astringency on the tree as part of fruit development, irrespective of seed formation. Thus, the PCNA-type is the most desirable for fruit production. The inheritance of the PCNA trait of Japanese origin is qualitative and recessive to the non-PCNA trait. Therefore, crosses of PCNA genotypes have primarily been made through breeding, but repeated crosses among PCNA cultivars lead to inbreeding depression, a serious condition which hinders fruit weight, vigorousness, and productivity. To avoid inbreeding, non-PCNA cultivars must be incorporated. Almost all persimmon cultivars of Japanese origin exhibit hexaploidy and are assumed to be autohexaploid. Thus, the elucidation of its inheritance mode is complicated by the duplication of alleles and others.

The PCNA trait is controlled by a single locus, *Ast*. The presence of one dominant *Ast* allele is sufficient to express the non-PCNA trait, and the PCNA trait is only expressed when all the alleles present at the locus are recessive alleles. Almost no F1 PCNA offspring are obtained from crosses between PCNA and non-PCNA local cultivars of Japanese origin. The backcross of non-PCNA F1 offspring derived from PCNA  $\times$  non-PCNA to PCNA yielded on average 15-20% PCNA offspring. However, it takes many years to determine whether each offspring is PCNA or non-PCNA, as one need to wait until it beard fruits after it had been grafted. DNA marker-assisted technique is thus expected to greatly increase the number of PCNA offspring grown in the selection for the backcross. Previously, non-PCNA-linked RFLP markers have been developed. They could distinguish the trait effectively, but the RFLP analysis is time-consuming for large sample sizes involving hundreds of individuals. The purpose of this study was to confirm whether the SCAR markers, developed based on the non-PCNA linked RFLP markers, can reliably distinguish PCNA and non-PCNA genotypes in a large number of offspring derived from the backcross of PCNA  $\times$  non-PCNA to PCNA.

Meanwhile, high tasting quality is one of the most important objectives in the persimmon breeding program, as with other fruit species. Consumers generally prefer soft and juicy fruits, and producing

fruits with high marketability directly benefits growers. So in the Japanese persimmon breeding program, fruit firmness and juiciness are targeted attributes. In addition, an objective and instrumental method for evaluating juiciness is required.

This thesis consists of two main parts. After the preface, Chapter 2 reports whether SCAR markers practically distinguish PCNA genotypes from non-PCNA genotypes in a large number of offspring populations obtained from the backcross of PCNA  $\times$  (non-PCNA 'Kurokuma'  $\times$  PCNA) in practical persimmon breeding. This chapter also examines the prediction of the segregation of PCNA and non-PCNA offspring in offspring populations from those backcrosses using SCAR markers. Subsequently, Chapter 3 describes a logistic regression method for estimating the proportions of offspring with soft and juicy from the past survey records on fruits. And an objective method for evaluating the juice content of Japanese persimmon by weighing the supernatant after centrifuging the homogenized flesh is developed, and additionally, the varietal difference in juiciness among 14 PCNA cultivars has been evaluated. Finally, Chapter 4 summarizes the significance of this thesis relating the persimmon breeding system and proposes directions for future research.

## **Chapter 2: Practical marker-assisted selection using three SCAR markers for fruit astringency type in crosses derived from non-PCNA cultivar 'Kurokuma' in persimmon breeding.**

The objective of this study was to confirm whether SCAR markers practically distinguish PCNA genotypes from non-PCNA genotypes in a large number of offspring populations consisting of progeny derived from non-PCNA cultivar 'Kurokuma' in practical persimmon breeding. 'Kurokuma' has been reported to have three types of *AST*-linked markers (A1, A2, and A3).

A total of 251 offspring, obtained from 'Taiten' ('Kurokuma'  $\times$  PCNA cultivar 'Taishu')  $\times$  PCNA cultivar 'Kanshu', were tested for phenotypic astringency type identification, PCNA or non-PCNA, and marker identification. In total, 205 offspring had the A2 and/or A3 marker(s), as determined by 7H9F/*AST*-R, and 100 offspring had the A2 marker, as determined by E4/A2r (Table 2). All of the 205 offspring were of the non-PCNA phenotype, as shown by the sensory and brown specks tests. The remaining 46 offspring had neither marker. Of these 46 offspring, 43 were PCNA and the remaining 3 offspring were non-PCNA phenotypically. The discrepancy between phenotype and marker

identification was 3/251 (1.2%). The ratio of PCNA offspring obtained was 43/251 (17.1%). The PCNA offspring segregation ratio was 36/151 (23.8%) for ‘Fuyu’ (PCNA) × ‘Taiten’ and 6/29 (20.7%) for ‘Tenjingosho’ (PCNA) × ‘Taiten’. These ratios were not significantly different from those of previous crosses.

Offspring obtained from ‘Taigetsu’ (‘Kurokuma’ × ‘Taishu’) × PCNA cultivar ‘Kanshu’ were tested. The primer pairs E8.5/E9r and 7H9F/AST-R were used for detecting the molecular markers A1 and A3, respectively. A complete agreement was found between the SCAR marker genotype and fruit astringency phenotype of the 48 offspring. The result confirmed that the marker-assisted selection using those markers was highly practical. In a larger offspring population (522 offspring) from the same cross, 81 offspring showed neither marker. The percentage of offspring expected to be PCNA was 15.5% (81/522), which was slightly lower than 20% and not significantly different from that of ‘Taiten’ × ‘Kanshu’.

### **Chapter 3: Estimation of the proportions of offspring having juicy and soft fruits in persimmon breeding program and varietal differences in flesh juiciness of persimmon cultivars.**

To facilitate the efficient production of cultivars with soft and juicy fruit, a logistic regression method for estimating the proportions of offspring with soft fruit and juicy fruit from the mid-parental values (MP) of these attributes derived from sensory evaluation. In that evaluation, fruit firmness and juiciness were classified respectively on a scale of 1–5. The categories for firmness were 1 = soft, 2 = slightly soft, 3 = intermediate, 4 = slightly firm, and 5 = firm; and the categories for juiciness were 1 = juiceless, 2 = slightly juiceless, 3 = intermediate, 4 = slightly juicy, and 5 = juicy. The sensory data for the fruit of offspring were collected in a single year during the period 1990–2008, while the fruit of parents were evaluated in three separate years during the period 1985–2009. To be able to use logistic regression, the sensory data sets of offspring were divided into two categories. The firmness data set was divided into soft (sensory rating = 1) and others (sensory rating  $\geq 2$ ), and the juiciness data set was divided into juicy (sensory rating = 5) and others (sensory rating  $\leq 4$ ). The proportions of offspring with soft fruit or juicy fruit were calculated as the ratio of the number of offspring with soft fruit (sensory rating = 1) or juicy fruit (sensory rating = 5) to the total number of offspring (30 individuals) per full-sib family. Then the

proportions of offspring with soft fruit or juicy fruit were used as the response variables in the logistic regression model. The explanatory variables were the MPs of the sensory ratings for firmness and juiciness. The best model for estimating firmness contained only the MP for firmness (MPf) as an explanatory variable, whereas the best model for juiciness contained both the MP for juiciness (MPj) and MPf as explanatory variables. The regression lines from these models suggested that crosses with a low MPf and high MPj can increase the proportion of offspring that have soft fruit and juicy fruit, respectively. However, the slopes of the regression lines for both firmness and juiciness were gentle, indicating that genetic segregation of offspring is wide for both attributes. It was concluded from these data that softer and juicier fruit can be bred from parents with only moderate ratings for these traits.

An objective method for evaluating the juice content of persimmon was developed. In this method, columns extracted from the flesh of fruits were homogenized using a disposable syringe, and then the homogenate was centrifuged. The weight of the supernatant was expressed as a percentage of the total weight of the fresh column sample. The fruits of eight persimmon cultivars were harvested three times during their respective commercial harvesting season, and there was no significant difference in the juice content among the fruits picked on different days. Genetic and environmental variances were estimated by ANOVA and the results showed that the effect of genotype on juice content was highly significant, whereas the variance among trees of the same genotype or between years was negligible. This indicated that in persimmon breeding, the juiciness of one cross-seedling could be evaluated using fruits from one tree in one year.

Subsequently, the juice content and firmness among the 14 PCNA cultivars were compared. The juice content of 'Taishu' (61.5%) was by far the highest, but its flesh firmness (1.20 kg) was the lowest. Although the juice content of four PCNA cultivars ('Fuyu', 'Matsumotowase-Fuyu', 'Kanshu', and 'Youhou') were lower than 'Taishu', they were still all above 40%. The flesh firmness of 'Youhou' (2.70 kg) was the highest among these four cultivars. The juice content of 'Suruga' and 'Hanagosho' was about 30%, the lowest among the four cultivars. The Spearman correlation coefficient between the juice content and the sensory ratings of the five PCNA cultivars (Taishu, Fuyu, Kanshu, Youhou, and Tenjingosho) was 0.866.

For the previous logistic regression model, the comparison was made between the model with the sensory evaluation value as the explanatory variable and that with the juice content, for the seven crossed combinations. In the latter case, the model with higher fitness was obtained because the mean-parental value was significant, and the residual deviation degree was small.

#### **Chapter 4: Conclusion and future perspectives**

Showing that the astringency of many persimmon seedlings can be identified by SCAR markers has increased the range of cultivars and selections that can be used as parents, and raised the possibility of producing individuals with diverse traits. As for the tasting quality of persimmon, it was possible to estimate the appearance rate of individuals with soft and juicy flesh from the mid-parent value of sensory evaluation by using logistic regression. This enables the prediction of the occurrence rate of individuals with desirable traits from the past crosses. In addition, the objective evaluation method of fruit juiciness developed in this study has obtained more detailed information than sensory evaluation. The above research results are expected to improve efficiency of new PCNA cultivars with high tasting quality.

## 引用文献

- Ahmad, R., D. Struss and S. M. Southwick. 2003. Development and characterization of microsatellite markers in *Citrus*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128: 584-590.
- Akagi, T., S. Kanzaki, M. Gao, R. Tao, D. E. Parfitt and K. Yonemori. 2009. Quantitative real-time PCR to determine allele number for the astringency locus by analysis of a linked marker in *Diospyros kaki* Thunb. Tree Genet. Genomes 5: 483-492.
- 赤木剛士・増子琢哉・神崎真哉・三谷宣仁・山田昌彦・米森敬三. 2006. マメガキでの染色体歩行を用いたカキにおける甘渋性決定遺伝子 (*AST* 遺伝子) 探索の可能性. 園芸学会雑誌. 75(別 2): 168.
- Akagi, T., Y. Takeda, K. Yonemori, A. Ikegami, A. Kono, M. Yamada and S. Kanzaki. 2010. Quantitative genotyping for the astringency locus in hexaploid persimmon cultivars using quantitative real-time PCR. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 135: 59-66.
- Akagi, T., R. Tao, T. Tsujimoto, A. Kono and K. Yonemori. 2012. Fine genotyping of a highly polymorphic *ASTRINGENCY*-linked locus reveals variable hexasomic inheritance in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cultivars. Tree Genet. Genomes 8: 195-204.
- Allard, R. W. 1960. Principles of plant breeding. 385-399. John Wiley & Sons, Inc., New York and London.
- 朝倉康夫. 1997. 官能検査 4 官能評価に用いられる統計手法. 日本ワイン・ブドウ学会誌. 8: 105-111.

- Ballabio, D., V. Consonni and F. Costa. 2012. Relationships between apple texture and rheological parameters by means of multivariate analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 111: 28-33.
- Bei, W., L. Zang, J. Guo, W. Peng, A. Xu, D. A. Good, Y. Hu, W. Wu, D. Hu, X. Zhu, M. Wei and C. Li. 2009. Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract from *Diospyros kaki* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 126: 134-142.
- Brookfield, P. L., S. Nicolla, F. A. Gunson, F. R. Harker and M. Wohlers. 2011. Sensory evaluation by small postharvest teams and the relationship with instrumental measurements of apple texture. *Postharvest Biol. Technol.* 59: 179-186.
- Chagné, D., D. Dayatilake, R. Diack, M. Oliver, H. Ireland, A. Watson, S. E. Gardiner, J. W. Johnston, R. J. Schaffer and S. Tustin. 2014. Genetic and environmental control of fruit maturation, dry matter and firmness in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Hortic. Res.* 1: 14046.
- Crawley, M. J. 2005. *Statistics: An Introduction Using R*. Wiley (West Sussex) .
- Crisosto, C.H. and J. M. Labavitch. 2002. Developing a quantitative method to evaluate peach (*Prunus persica*) flesh mealiness. *Postharvest Biol. Technol.* 25: 151-158.
- FAO. 2015. FAOSTAT. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. accessed 06/28/2017.
- Haji, T., H. Yaegaki and M. Yamaguchi. 2005. Inheritance and expression of fruit texture melting, non-melting and stony hard in peach. *Sci. Hortic.* 105: 241-248.
- Hampson, C. R., H. A. Quamme, J. W. Hall, R. A. MacDonald, M. C. King and M. A. Cliff. 2000. Sensory evaluation as a selection tool in apple breeding. *Euphytica* 111: 79-90.

- Harker, F. R., R. L. Amos, G. Echeverría and F. A. Gunson. 2006a. Influence of texture on taste: insights gained during studies of hardness, juiciness and sweetness of apple fruit. *J. Food Sci.* 71: S77-S82.
- Harker, F. R., K. Lau and F. A. Gunson. 2003. Juiciness of fresh fruit: A time-intensity study. *Postharvest Biol. Technol.* 29: 55-60.
- Harker F. R., J. Maindonald, S. H. Murray, F. A. Gunson, I. C. Hallett and S. B. Walker. 2002. Sensory interpretation of instrumental measurements. 1: Texture of apple fruit. *Postharvest Biol Technol.* 24: 225-39.
- Harker, F. R., M. G. H. Stec, I. C. Hallett and C. L. Bennett. 1997. Texture of parenchymatous plant tissue: a comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biol. Technol.* 11: 63-72.
- Harker, F. R., A. White, F. A. Gunson, I. C. Hallett and H. Nihal De Silva. 2006b. Instrumental measurement of apple texture: A comparison of the single-edge notched bend test and the penetrometer. *Postharvest Biol. Technol.* 39: 185-192.
- Hiehata, N., Y. Sato, S. Fukuda, Y. Tominaga, O. Terai and H. Nesumi. 2012. Inheritance of resistance to loquat canker (Group C) in progenies derived from 'Shiromogi' loquat. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 137: 152-156.
- 広瀬和栄・山本正幸・佐藤敬雄・大畑徳輔・西田光夫・池田 勇・志村 勲・柴 茂・八木正房・富永信行. 1971. カキ新品種'伊豆'について. *園芸試験場報告 B.* 11: 1-17.
- 広島県果樹試験場. 1979. 昭和 53 年度種苗特性分類調査報告書 (カキ). 広島県果樹試験場.
- 堀江秀樹・平本理恵. 2009. ニンジンの蒸し加熱による甘味強化. *日本調理科学会誌.* 42: 194-



197.

堀江秀樹・伊藤秀和・一法師克成・東 敬子・五十嵐勇. 2004. キュウリ果肉部の物理性評価法の開発. 園学研. 3: 425-428.

Hume, H.H. 1914. A Kaki classification. J. Hered. 5: 400-406.

Igarashi, M., Y. Hatsuyama, T. Harada and T. Fukasawa-Akada. 2016. Biotechnology and apple breeding in Japan. Breed Sci. 66: 18-33.

飯久保昌一・佐藤敬雄・西田光夫. 1961. カキ新品種「駿河」について. 東海近畿農業試験場研究報告園芸部. 6: 33-37.

池田 勇・山田昌彦・栗原昭夫・西田光夫. 1985. カキの甘渋の遺伝. 園学雑. 54: 39-45.

Ikegami, A., T. Akagi, D. Potter, M. Yamada, A. Sato, K. Yonemori, A. Kitajima and K. Inoue. 2009. Molecular identification of 1-Cys peroxiredoxin and anthocyanidin/flavonol 3-O-galactosyltransferase from proanthocyanidin-rich young fruits of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). Planta 230: 841-855.

Ikegami, A., S. Eguchi, T. Akagi, A. Sato, M. Yamada, S. Kanzaki, A. Kitajima, K. Yonemori. 2011. Development of molecular markers linked to the allele associated with the non-astringent trait of the Chinese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). J. Japan Soc. Hort. Sci. 80, 150-155.

Ikegami, A., S. Eguchi, K. Yonemori, M. Yamada, A. Sato, N. Mitani and A. Kitajima. 2006. Segregations of astringent progenies in the F<sub>1</sub> populations derived from crosses between a Chinese pollination-constant nonastringent (PCNA) 'LuoTian Tian Shi', and Japanese PCNA and pollination constant astringent (PCA) cultivars of Japanese origin. HortScience 41: 561-563.

Ikegami, A., A. Sato, M. Yamada, A. Kitajima and K. Yonemori. 2005. Molecular size profiles of tannins in persimmon fruits of Japanese and Chinese pollination-constant non-astringent (PCNA)-type cultivars and their offspring revealed by size-exclusion chromatography. J. Japan Soc. Hort. Sci. 74: 437-443.

Ikegami, A., K. Yonemori, A. Sugiura, A. Sato and M. Yamada. 2004. Segregation of astringency in F<sub>1</sub> progenies derived from crosses between pollination-constant, nonastringent persimmon cultivars. HortScience 39: 371-374.

今井敬潤. 1990. 柿の民族誌—柿と柿渋—. 現代創造社 (大阪)

Infante, R., C. Meneses, P. Rubio and E. Seibert. 2009. Quantitative determination of flesh mealiness in peach [*Prunus persica* L. (Batch.)] through paper absorption of free juice. Postharvest Biol. Technol. 51: 118-121.

板村裕之. 2015. 第7章カキ. 果樹園芸学 (金浜耕基編). 文永堂出版. 東京.

Iwanami, H., S. Moriya, N. Kotoda, S. Takahashi and K. Abe. 2008. Estimations of heritability and breeding value for postharvest fruit softening in apple. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 133: 92-99.

Iwanami, H., S. Moriya, K. Okada, K. Abe, M. Kawamorita, M. Sasaki, Y. Moriya-Tanaka, C. Honda, T. Hanada and M. Wada. 2017. Instrumental measurements of juiciness and freshness to sell apples with a premium value. Sci. Hortic. 36: 66-75.

梶浦 実. 1946. カキの品種とその品種改良(2). 育種と農芸. 1: 175-182.

神崎真哉. 2015. 4. 育種. 果樹園芸学 (米森敬三編). 朝倉書店. 東京.

神崎真哉. 2016. 柿の起源と品種分化. 日本食品科学工学会誌. 63: 328-330.

Kanzaki, S., T. Akagi, T. Masuko, M. Kimura, M. Yamada, A. Sato, N. Mitani, N. Utsunomiya and K. Yonemori. 2010. SCAR markers for practical application of marker-assisted selection in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) breeding. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 79: 150-155.

Kanzaki, S., A. Sato, M. Yamada, N. Utsunomiya, A. Kitajima, A. Ikegami and K. Yonemori. 2008. RFLP markers for the selection of pollination-constant and non-astringent (PCNA)-type persimmon and examination of the inheritance mode of the markers. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 77: 28-32.

Kanzaki, S., M. Yamada, A. Sato, N. Mitani, N. Utsunomiya and K. Yonemori. 2009. Conversion of RFLP markers for the selection of pollination-constant and non-astringent type persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) into PCR-based markers. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78: 68-73.

Kanzaki, S., K. Yonemori, A., Sato, M. Yamada and A. Sugiura. 2000. Evaluation of RFLP analysis for discriminating PCNA genotype in some persimmon cultivars. J. Japan Soc. Hort. Sci. 69: 702-704.

Kanzaki, S., K. Yonemori, A. Sugiura, A. Sato and M. Yamada. 2001. Identification of molecular markers linked to the trait of natural astringency loss of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126: 51-55.

片山（池上）礼子・米森敬三・佐藤明彦・山田昌彦・羽生 剛・北島 宣. 2013. 中国原産の完全甘ガキ後代における甘渋性と果形との関連性. 園学研. 12: 29-34.

菊池秋雄. 1948. 果樹園芸学上巻. 果樹種類各論. p. 347-400. 養賢堂. 東京.

Kono, A., S. Kobayashi, N. Onoue and A. Sato. 2016. Characterization of a highly polymorphic region

- closely linked to the *AST* locus and its potential use in breeding of hexaploid persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Mol. Breed. 36: Article56
- Kunihisa, M., S.Moriya, K. Abe, K. Okada, T. Haji, T. Hayashi, H. Kim, C. Nishitani, S. Terakami and T. Yamamoto. 2014. Identification of QTLs for fruit quality traits in Japanese apples: QTLs for early ripening are tightly related to preharvest fruit drop. Breed. Sci. 64: 240-251.
- Lee, N. K., K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, H. Park, M. Y. Heo and H. P. Kim. 2004. Prenylated flavonoids as tyrosinase inhibitors. Arch. Pharm. Res. 27: 1132-1135.
- Liebhard, R., L. Gianfranceschi, B. Koller, C. D. Ryder, R. Tarchini, E. Van De Weg and C. Gessler. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh). Mol. Breed. 10: 217-241.
- Lill, R.E. and G. J. van der Mespel. 1988. A method for measuring the juice content of mealy nectarines. Sci. Hortic. 36: 267-271.
- Longhi, S., M. Moretto, R. Viola, R. Velasco and F. Costa. 2012. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.). J. Exp. Bot. 63: 1107-1121.
- Maroundedze, C. and L. Thomas. 2013. Genes and quality trait loci (QTLs) associated with firmness in *Malus × domestica*. Afr. J. Biotechnol. 12: 996-1003.
- Matsuo, T. and S. Ito. 1978. The chemical structure of kaki-tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.). Agric. Biol. Chem. 42: 1637-1643.
- 松尾友明, 篠原準一, 伊藤三郎. 1975. 炭酸ガスによる CTSD カキ脱渋法. 園学要旨. 昭 50

春: 368-369.

McClure, K. A., K. M. Gardner, P. MA. Toivonen, C. R. Hampson, J. Song, C. F. Forney, J. DeLong, I. Rajcan and S. Myles. 2016. QTL analysis of soft scald in two apple populations. Hort. Res. 3: 16043.

Meilgaard, M., G. V. Civille and B. T. Carr. 1987. Sensory evaluation techniques, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Minamikawa, M. F., K. Nonaka, E. Kaminuma, H. Kajiya-Kanegae, A. Onogi, S. Goto, T. Yoshioka, A. Imai, H. Hamada, T. Hayashi, S. Matsumoto, Y. Katayose, A. Toyoda, A. Fujiyama, Y. Nakamura, T. Shimizu and H. Iwata. 2017. Genome-wide association study and genomic prediction in citrus: Potential of genomics-assisted breeding for fruit quality traits. Sci Rep. 7: 4721.

森谷茂樹. 2014. DNA マーカーを利用して4種類の重要形質を備えたリンゴの実生個体を早期に選抜する手法の開発. 東北大学学位論文.

Moriya, S., M. Kuniyama, K. Okada, H. Iwanami, H. Iwata, M. Minamikawa, Y. Katayose, T. Matsumoto, S. Mori, H. Sasaki, T. Matsumoto, C. Nishitani, S. Terakami, T. Yamamoto and K. Abe. 2017. Identification of QTLs for flesh mealiness in apple (*Malus × domestica* Borkh.). Hort. J. 86: 159-170.

Namikawa, I. and M. Higashi. 1928. On the chromosomes in *Diospyros kaki* L. f. and *Diospyros lotus* L. Bot. Mag. 42: 436-438.

西山松之助. 1994. たべもの日本史総覧. 新人物往来社. 東京.

農研機構果樹茶業研究部門. 2017. 果樹茶育成品種紹介 かきのき属 (*Diospyros* L.) の品種一

- 覧. <[http://www.naro.affrc.go.jp/nifts/kih/hinshu/persimmon\\_cat/index.html](http://www.naro.affrc.go.jp/nifts/kih/hinshu/persimmon_cat/index.html)>. access 06/28/2017.
- 農林水産省. 2018. 農林水産省平成27年産特産果樹生産動態等調査.  
<[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan\\_kazyu/](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/)>. access 06/22/2018.
- 小川正毅, 石崎政彦, 角田秀孝, 山内 勸, 中村義彦, 竹本 昇, 辻本雅宏, 黒田喜佐雄, 岩本和彦, 松本善守, 小野良允, 澤村泰則, 大西 豊, 植田重孝. 2011. カキ‘平核無’および‘刀根早生’の CTSD 炭酸ガス脱渋法の実用化. 園学研. 10: 295-301.
- 小川安子・伊東淳子. 1972. 柿葉のビタミン C と調理について. 調理科学. 5: 236-238.
- 大森定夫. 1998. IV果実の硬度計測. 農業機械学会誌 60: 134-136.
- Omura, M. and T. Shimada. 2016. Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. Breed Sci. 66: 3-17.
- Onoue, N., S. Kobayashi, A. Kono and A. Sato. 2018. SSR-based molecular profiling of 237 persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) germplasms using an *ASTRINGENCY*-linked marker. Tree Genet. Genomes 14: 28.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing, Version 2.9.0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- R Development Core Team. 2017 R: A language and environment for statistical computing, Version 3.3.3. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sato, A., A. Kono, N. Mitani, Y. Ban, and M. Yamada. 2013 Comparison of fruit traits between pollination constant and non-astringent (PCNA) and non-PCNA offspring derived from two backcrosses (non-PCNA × PCNA) × PCNA. Acta Hort. 996: 123-126.

Sato, A. and M. Yamada. 2016. Persimmon breeding in Japan for pollination-constant non-astringent (PCNA) type with marker-assisted selection. *Breeding Science*. 66: 60-68.

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.

佐藤明彦・山田昌彦・河野 淳・三谷宣仁・伴 雄介・尾上典之・上野俊人・白石美樹夫・岩波 宏・吉岡美加乃. 2016a. カキ新品種‘麗玉’. *園学研*. 15(別 1): 292.

佐藤明彦・山田昌彦・河野 淳・三谷宣仁・伴 雄介・尾上典之・上野俊人・白石美樹夫・岩波 宏・吉岡美加乃. 2016b. カキ新品種‘太雅’. *園学研*. 15(別 1): 293.

佐藤明彦・山田昌彦・河野 淳・三谷宣仁・山根弘康・岩波 宏・上野俊人・白石美樹夫・伴雄介・平川信之・尾上典之・吉岡美加乃・中島育子. 2018. カキ新品種‘太豊’. *農研機構研究報告 果樹茶業研究部門*. 2: 19-31.

Sitther, V., D. Zhang, S. A. Dhekney, D. L. Harris, A. K. Yadav and W. R. Okie. 2012. Cultivar identification, pedigree verification, and diversity analysis among peach cultivars based on simple sequence repeat markers. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 137: 114-121.

杉浦 明・原田 久・苫名 孝. 1975. カキ果実の脱渋性に関する研究 (第 1 報) エタノール処理による樹上脱渋 (その 1). *園学雑*. 44: 265-272.

杉浦 明・原田 久・苫名 孝. 1977. カキ果実の脱渋性に関する研究 (第 2 報) エタノール処理による樹上脱渋 (その 2). *園学雑*. 46: 303-309.

Sun, R., Y. Chang, F. Yang, Y. Wang, H. Li, Y. Zhao, D. Chen, T. Wu, X. Zhang and Z. Han. 2015. A

- dense SNP genetic map constructed using restriction site-associated DNA sequencing enables detection of QTLs controlling apple fruit quality. *BMC Genomics* 16: 747.
- 平 智. 1999. 伝統的食文化としてのカキ（柿）の多面的利用に関する調査研究. 浦上財団研究報告書. 7: 1-17.
- 平 智. 2003. カキの脱渋とそのメカニズム [1]. 農業および園芸. 78: 578-589.
- Tamura, M., R. Tao, K. Yonemori, N. Utsunomiya and A. Sugiura. 1998. Ploidy level and genome size of several *Diospyros* species. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 306-312.
- 鶴永陽子・松本敏一・倉橋孝夫・持田圭介・板村裕之. 2006. 収穫時期の違いがカキ‘西条’の葉における機能性成分含量に及ぼす影響. 園学研. 5: 321-324.
- Tu, L., K. Waldron, L. Ingham, T. De Barys and J. De Baerdemaeker. 1997. Effect of picking time and storage conditions on ‘Cox’s Orange Pippin’ apple texture in relation to cell wall changes. *J. Hort. Sci.* 72: 971-980.
- 鵜飼保雄. 2002. 量的形質の遺伝解析. 医学出版. 東京.
- Von Mollendorff, L.J., G. Jacobs and O. T. De Villiers. 1992. Cold storage influences internal characteristics of nectarines during ripening. *HortScience* 27: 1295-1297.
- Wang, R. 1982. The origin of ‘Luo Tian Tian Shi’. *Chinese Fruit Tree* 2: 16-19 .
- 渡辺好郎. 1982. 育種における細胞遺伝学. 養賢堂. 東京.
- Yakushiji, H., M. Yamada, K. Yonemori, A. Sato and N. Kimura. 1995. Staminate flower production on



- shoots of 'Fuyu' and 'Jiro' persimmon. J. Japan Soc. Hort. Sci. 64: 41-46.
- Yamada, M. 1993. Persimmon breeding in Japan. Japan Agr. Res. Quart. 27: 33-37.
- Yamada, M. 2005. Persimmon genetic resources and breeding in Japan. Acta Hortic. 685: 51-64.
- 山田昌彦. 2007. 基礎編・品種生態と栽培・カキの分類と分布. 107-113. 農業技術大系果樹編  
4 カキ. 農文協. 東京.
- 山田昌彦. 2011. 果樹の交雑育種法. 養賢堂. 東京.
- Yamada, M. 2013. Breeding goals, trait heredity and genetic improvement of persimmon in Japan. Acta Hortic. 996: 77-88.
- Yamada, M., I. Ikeda, H. Yamane and T. Hirabayashi. 1988. Inheritance of fruit cracking at the calyx and stylar end in Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). J. Japan. Soc. Hort. Sci., 57: 8-16.
- Yamada, M. and A. Sato. 2002. Segregation for fruit astringency type in progenies derived from crosses of 'Nishimurawase' × pollination constant non-astringent genotypes in oriental persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). Sci. Hortic. 92: 107-111.
- Yamada, M. and A. Sato. 2003. Persimmon cultivars released in the 1990s by the National Institute of Fruit Tree Science in Japan. Acta Hortic. 601: 19-23.
- 山田昌彦・佐藤明彦・三谷宣仁・江口菜・池上礼子・米森敬三. 2006a. 中国原産の完全甘ガキ'羅田甜柿'と日本原産の完全甘ガキ'晩御所'および完全渋ガキ'四ツ溝'を交雑して得た後代における官能評価による甘渋性の分離. 園学雑. 75(別 1):45.

- 山田昌彦・佐藤明彦・薬師寺博・吉永勝一・山根弘康・遠藤融郎. 1993. 中国の完全甘ガキ‘羅田甜柿’の特性とその果実特性からみた日本原産甘ガキ品種との類縁性. 果樹試報. 25: 19-32.
- 山田昌彦・佐藤明彦・山根弘康・三谷宣仁・岩波 宏・白石美樹夫・平川信之・上野俊人・河野 淳・吉岡美加乃・中島育子. 2012a. カキ新品種‘太月’. 果樹研報. 14: 25-38.
- 山田昌彦・佐藤明彦・山根弘康・三谷宣仁・岩波 宏・白石美樹夫・平川信之・上野俊人・河野 淳・吉岡美加乃・中島育子. 2012b. カキ新品種‘太天’. 果樹研報. 14: 39-52.
- 山田昌彦・佐藤明彦・山根弘康・吉永勝一・平川信之・岩波 宏・小澤俊治・角谷真奈美・三谷宣仁・吉岡美加乃・中島育子. 2006b. カキ新品種‘甘秋’. 果樹研報. 5: 9-10.
- Yamada, M., S. Taira, M. Ohtsuki, A. Sato, H. Iwanami, H. Yakushiji, R. Wang, Y. Yang and G. Li. 2002. Varietal differences in the ease of astringency removal by carbon dioxide gas and ethanol vapor treatments among oriental astringent persimmons of Japanese and Chinese origin. *Sci. Hortic.* 94: 63-72.
- 山田昌彦・山根弘康・佐藤明彦・平川信之・岩波 宏・吉永勝一・小澤俊治・三谷宣仁・白石美樹夫・吉岡美加乃・中島育子・中野正明・中畝良二. 2008. ブドウ新品種‘シャインマスカット’. 果樹研報. 7: 21-38.
- 山田昌彦・山根弘康・佐藤明彦・岩波 宏・平川信之・吉永勝一・小澤俊治・中島育子. 2004. カキ新品種‘早秋’. 果樹研報. 3: 53-66.
- Yamada, M., H. Yamane, Y. Takano and Y. Ukai. 1997. Estimation of the proportion of offspring having soluble solids content in fruit exceeding a given critical value in Japanese persimmon. *Euphytica* 93: 119-126.

- 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.
- Yamada, M., H. Yamane, K. Yoshinaga and Y. Ukai. 1993. Optional spatial and temporal measurement repetition for selection in Japanese persimmon breeding. HortScience 28: 838-841.
- Yamagishi, M., S. Matsumoto, A. Nakatsuka and H. Itamura. 2005. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic relationships between *Diospyros* species by more effective RAPD analysis. Sci. Hortic. 105: 283-290.
- Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, T. Manabe, K. Kotobuki, T. Hayashi, Y. Ban and N. Matsuta. 2002. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. Euphytica 124: 129-137.
- 山根弘康・栗原昭夫・永田賢嗣・山田昌彦・岸 光夫・吉永勝一・松本亮司・金戸橘夫・角利昭・平林敏郎・小澤俊治・広瀬和栄・山本正幸・角谷真奈美. 1991. カキ新品種‘陽豊’. 果樹試報. 20: 49-61.
- 山根弘康・山田昌彦・栗原昭夫・佐藤明彦・吉永勝一・永田賢嗣・松本亮司・平川信之・角谷真奈美・小澤俊治・角 利昭・平林利郎・岩波 宏. 2001. カキ新品種‘太秋’. 果樹試報. 5: 57-73.
- 山崎安津・河野 淳・東 暁史・小林省藏・佐藤明彦・薬師寺博. 2012. 異なる脱渋処理がカキ‘太天’と‘太月’の脱渋性および有機酸含量に及ぼす影響. 園学研. 11: 103-111.

Yonemori, K., A. Sugiura and M. Yamada. 2000. Persimmon genetics and breeding. In: Janick, J. (eds.),  
Plant Breed. Rev. 19: 191-225.

米森敬三・松島二良・杉浦 明. 1983. 甘ガキと渋ガキのタンニン物質の差異について. J. Japan  
Soc. Hort. Sci. 52: 135-144.

米森敬三・松島二良. 1985. カキ果実のタンニン細胞の発育過程と自然脱渋との関連について.  
J. Japan Soc. Hort. Sci. 54: 201-208.

## 謝辞

本研究の取りまとめにあたり、指導教員として終始丁寧なご指導とご高閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科生産・環境生物学専攻柴田道夫教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文の審査において有意義なご助言とご高閲を頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科生産・環境生物学専攻山岸順子教授、岸野洋久先生教授、伊藤純一准教授、本多親子准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、農研機構果樹研究所ブドウ・カキ研究チーム山田昌彦博士（現日本大学生物資源科学部教授）および佐藤明彦博士（現果樹茶業研究部門ブドウ・カキ研究領域）よりご指導とご鞭撻をいただきました。果樹研究所ブドウ・カキ研究チーム河野淳博士（現ブドウ・カキ研究領域）、伴雄介博士（現西日本農業研究センター水田作研究領域）、上野俊人氏（現山梨県峡東農務事務所）、白石美樹夫博士（現福岡県農林業総合試験場果樹部）には、本研究の実施にあたり共同研究者として多大なるご協力をいただきました。京都大学農学研究科米森敬三教授（現龍谷大学農学部教授）、神崎真哉博士（現近畿大学農学部准教授）、池上礼子博士（現石川県立大学准教授）、赤木剛士博士（現京都大学農学研究科助教）、辻本誠幸氏（現奈良県庁）には、カキ甘渋性識別に関して有益なご指導とご助言をいただきました。果樹研究所ブドウ・カキ研究チーム梅田富士恵氏、中墨珠美氏、および果樹研究所研究支援センター業務第1科安芸津班（現果樹茶業研究部門技術支援センター業務第1科安芸津班）職員の皆様には、実験の補助および供試材料である果実や樹体の管理にご協力いただきました。心より御礼申し上げます。

本論文のとりまとめにあたりご指導とご配慮を賜りました、果樹茶業研究部門生産・流通研究領域中村ゆり博士および草場新之助博士に感謝の意を表します。