

四季成り性イチゴ MAGIC 集団における果皮色の GWAS 解析

田崎公久・鶴見理沙・飯村一成・永野聡一郎^{1,2)}・若槻睦子³⁾・鈴木恵美子⁴⁾・森香織⁴⁾
小島夏実⁵⁾・磯部祥子¹⁾・大橋隆⁶⁾・生井潔⁷⁾

摘要 イチゴにおける果皮色 DNA マーカーの開発に向けて、四季成り性イチゴ MAGIC 集団を用いた果皮色 GWAS 解析を行った。形質調査データは、IC₂ 世代における四季成り性 197 個体を用い、3 か年、L*a*b* 表色系による果皮色の 3 項目値および 4 種類の果皮アントシアニン成分を測定した。アントシアニンの主成分は、ペラルゴニジン 3-グルコシド (Pg3G) であり、3 年間平均で 82.9% であった。GWAS 解析は、665 SSR のジェノタイピングデータと果皮色およびアントシアニン成分の形質データを用いて行った。その結果、9 アレルが GWAS 解析により Pg3G または全アントシアニン量と L*b*/a* 値で共通に検出され、果皮色関与マーカー候補として選定した。

キーワード : イチゴ, 果皮色, アントシアニン, L*b*/a*, GWAS 解析

Genome-Wide Association Study for Fruit Skin Color Using Everbearing Strawberry MAGIC Population

Kimihisa TASAKI, Risa TSURUMI, Kazunari IIMURA, Soichiro NAGANO, Mutsuko WAKAMASU, Emiko SUZUKI,
Kaori MORI, Natsumi KOJIMA, Sachiko ISOBE, Takashi OHASHI and Kiyoshi NAMAI

Summary: To develop the DNA marker to select skin color of fruit, a multiparent advanced generation intercross (MAGIC) population of everbearing strawberry was analyzed with genome-wide association study (GWAS). For the inter-cross second (IC₂) generation consisted of 197 everbearing strawberry plants, the three values of skin color such as L*, a*, b*, and the content of four anthocyanin components on pericarp tissues were measured for three years. The major component was pelargonidin-3-glucoside (Pg3G), which accounted for 82.9% of total anthocyanin on average. Analyses with GWAS was carried out by using the genotyping data by 665 simple sequence repeat (SSR) markers along with the values of skin color and the content of anthocyanin components. As a result, nine alleles were detected from both the contents of Pg3G or total anthocyanin, and L*b*/a* values by GWAS, leading to the selection as the markers related fruit skin color.

Keyword: Anthocyanin, Fruit skin color, GWAS analysis, L*b*/a*, Strawberry

1) かずさ DNA 研究所, 2) 現森林総合研究所林木育種センター, 3) 現栃木県芳賀農業振興事務所, 4) 現栃木県農政部経済流通課, 5) 現栃木県下都賀農業振興事務所,
6) 現栃木県塩谷南那須農業振興事務所, 7) 現栃木県農業大学校 (2019.10.4 受理)

I 緒言

イチゴの購買意欲は、食味とともに外観形質に大きく影響される。近年、大果系の品種が育成され、果実の大きさや果形に注目されがちであるが、果皮色や果肉色も重要な選択肢の一つである。市場に大きなシェアを持つ福岡 S6 号 (商標登録名:あまおう, 三井ら, 2003) および紅ほっぺ (竹内ら, 1999) は、果皮および果肉ともに色が濃く市場評価が高い品種である。一方、和田初こい (商標登録名:初恋の香り, 和田, 2009) のような対極に位置する白イチゴも注目されており、本県においても 2018 年に栃木 iW1 号 (中西ら, 2018) を育成している。

イチゴの果色は、L*値 (明度), a*値 (色度:マイナス側は緑色, プラス側は赤色), b*値 (色度:マイナス側は青色, プラス側は黄色) およびアントシアニン含量で評価することが一般的である。L*a*b*表色系を用いたイチゴ果色評価指標には、 L^*b^*/a^* 値があり、アントシアニン含量の逆数と相関を示す (中川ら, 1972; 佐藤ら, 1986; 浦田ら, 1991)。イチゴ果実におけるアントシアニン成分については、その大部分をペラルゴニン-3-グルコシド (Pg3G: pelargonidin-3-glucoside) が占め、シアニン-3-グルコシド (Cy3G: cyanidin-3-glucoside) は少ない (Bakker *et al.* 1994; Yoshida *et al.* 2002; Yoshida・Tamura, 2005; Silva *et al.* 2007)。ペラルゴニン-3-マロニルグルコシド (Pg3MG: pelargonidin-3-malony glucoside) は、品種間で生合成の有無があり、とよのかやさちのかでは検出されない (Yoshida *et al.* 2002)。また、Yoshida *et al.* (2002) は、Pg3MG 生合成の有無は果色へは影響せず、むしろ全アントシアニン含量の方が影響するとしている。近年では、Wada *et al.* (2017) は、解析材料として 6 品種・系統由来 MAGIC (mutiparent advanced generation intercross) 集団を作製し、果皮色の年次間差が少ないこと、 L^*b^*/a^* 値と Pg3G および全アントシアニン含量が相関が高いことを報告している。

果色における遺伝解析は、Lerceteau-Köhler, *et al.* (2012) が先駆的に 19 果実形質の QTL 解析を行っており、果色については、L*が 4QTL, a*が 6QTL, b*が 4QTL, アントシアニン含量が 5QTL の関与を報告している。アントシアニン合成経路における遺伝子発現は、ゲノム情報や RNA-seq を活用して調べられている (Hossain *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018)。また、アントシアニン合成制御には、転写調節因子である MYB が関与しており、FaMYB10 が合成上昇、FaMYB1 が合成抑制に働くと報告されている (Medin-Puche *et al.*, 2014; Aharoni *et al.*, 2001)。しかし、まだ、育種に活用できる DNA マーカーの開発には至っていない。

近年、ゲノムを網羅したジェノタイプング情報は、次世代シーケンスや SNP アレイを用いることより迅速に得られる状況になっている。また、これらジェノタイプング情報は、形質調査情報をもとに GWAS (genome-wide association study) 解析に用いられ、関与マーカーの検出が行われる。イチゴにおいては、SNP アレイが市販さ

れたことにより (Axiom Strawberry Genotyping array, Affimetrix), 高密度な連鎖地図が作製され (Bassil *et al.*, 2015; Nagano *et al.*, 2017; Verma *et al.* 2017), GWAS 解析が一般的に行われるようになってきている。現在、イチゴにおける GWAS 解析の報告は、イチゴ萎黄病抵抗性 Fw1 のマッピング (Pincot *et al.* 2018), イチゴ炭疽病抵抗性 FaRCg1 同定における GWAS および QTL 解析比較 (Anciro *et al.*, 2018; Salinas *et al.*, 2019) がある。一方、病害抵抗性以外では、Hossain *et al.* (2019) が ddRAD-seq により 1268 SNP からなる連鎖地図を作製後、GWAS 解析を行い、ランナー発生に関与する 7 遺伝子座について報告している。また、果皮色に関しては、和田ら (2015) および坪根ら (2018) が MAGIC 集団を用いた GWAS 解析を行っており、果皮色に関与する 5QTL を検出している。

本県では、次世代型イチゴ品種育成を目標としており、その一つとして、周年栽培用の四季成り性品種育成を目標としている。そのため、四季成り性イチゴの果実形質向上のための遺伝解析集団材料として四季成り性イチゴ MAGIC 集団を作出している (田崎ら, 2019)。

そこで、果皮色に関与する DNA マーカーを開発することを目的とし、四季成り性イチゴ MAGIC 集団を解析材料に GWAS 解析を行い、果皮色に関与する領域の検索を行ったので報告する。

なお、本研究は次世代ゲノム基盤プロジェクトにおける「実需者等のニーズに対応した園芸作物の DNA マーカーの開発」(DHR) 「イチゴ果実表面の着色に関する選抜 DNA マーカーの開発」においてかずさ DNA 研究所、福岡県、千葉県と共同で実施した。

II 試験方法

1. 供試材料

6 品種・系統 (栃木素材 3 号:四季成り, 08-58-5:四季成り, 栃木 26 号:一季成り, 98-7-3:一季成り, かおり野 (北村ら, 2015) :一季成り, 古都華 (西本ら, 2010) :一季成り) を相互交配により作出した四季成り性 MAGIC 集団における IC₂ 世代 197 個体 (四季成り性) を用いた (田崎ら, 2019)。親である 6 品種・系統の果実特性については第 1 表に示す。

第 1 表 四季成り性 MAGIC 集団 6 交配親の果実形質特徴

	栃木素材 3 号	08-58-5	栃木 26 号	98-7-3	古都華	かおり野
季性	四季成り	四季成り	一季成り	一季成り	一季成り	一季成り
硬さ	軟	やや軟	硬	硬	硬	やや硬
大きさ	特大	大	大	やや小	やや小	やや大
糖度	高	やや高	やや高	高	高	やや高
果皮色	淡赤	淡赤	淡赤	赤	赤	橙赤
果肉色	淡桃	橙赤	淡桃	淡赤	橙赤	橙赤

色枠は四季成りを示す。

2. アントシアニン分析および色差値測定

成熟果実におけるアントシアニン分析および色差値の測定は、

2014～2016 年の 3 か年実施した。栽培は、2014 年が実生苗による土耕栽培、2015～2016 年がランナー苗による高設栽培とした。定植は、2014 年が 9 月 3 日、2015 年が 7 月 27 日、2016 年が 7 月 19 日に行った。調査は、2014 年が 12 月 9 日、2015 年が 10 月 6 日、2016 年が 10 月 12 日に開始した。アントシアニン分析のサンプリングは、成熟果実を採取後、色彩色差計 (Chroma meter CR-200, Minolta) により L*値, a*値, b*値を測定し、成熟果実の陽光面から果皮 (瘦果を含む) および果肉を約 100～150mg 採取した。反復は 2 果とした。アントシアニン分析の前処理は、Wada *et al.* (2017) と同様に行い、液体クロマトグラフィー (UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific) により、Pg3G, Cy3G, Pg3MG, シアニジン-3-マロニルグルコシド (Cy3MG: cyanidin-3-malonyl glucoside) の 4 アントシアニン成分を検出した。

3. GWAS 解析

GWAS 解析は、Tassel ver. 5.0 (Bradbury *et al.* 2007) を用いた。形質データは 3 か年の平均値を用いた。アントシアニン成分については、Cy3G, Pg3G, Cy3MG, Pg3MG, 全アントシアニン量, ペラルゴニジン量 (Pg3G + Pg3MG) の 6 項目を用いた。L*a*b*値は、L*, a*, b*, C* (彩度: $\sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$), h (色相角: $\tan^{-1}(b^*/a^*)$), L*b*a* の 6 項目を用いた。また、ジェノタイプリングデータは 665 SSR マーカー (2047 アリル) のデータを用いた (田崎ら, 2019)。p 値の補正は FDR (False-discovery rate) の Benjamini-Hochberg 法を用いた (p<0.1)。

III 結果

1. MAGIC 集団親 6 品種・系統における果実アントシアニン成分の年次変化

四季成り性 MAGIC 集団交配親 6 品種・系統における果皮および果肉のアントシアニン成分含量は第 2 表および第 3 表に示す。

第 2 表 四季成り性 MAGIC 集団交配親品種・系統における果皮アントシアニン成分含量

品種・系統	Cy3G ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3G ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Cy3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3G+Pg3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Total anthocyanin ($\mu\text{g/gFW}$)
08_58.5	129.7±23.4	6.2	1565.9±423.1	74.4	36.9±13.9	1.8	373.5±93.6	17.7	1939.3±466.3	92.1	2106.0±466.4
98-7-3	109.1±29.1	8.0	989.7±259.8	72.5	30.5±3.9	2.2	236.0±14.2	17.3	1333.7±274.0	97.7	1365.3±248.8
かおり野	211.6±107.9	14.0	1048.4±240.9	69.4	36.6±18.7	2.4	214.4±30.2	14.2	1262.7±235.1	83.6	1510.9±358.2
古都華	137.9±55.1	6.4	2011.3±603.0	93.6	0.0±0.0	0.0	0.5±0.9	0.0	2011.8±602.4	93.6	2149.7±576.7
栃木26号	47.5±43.9	3.6	1038.6±359.2	79.3	18.9±9.4	1.4	204.4±13.5	15.6	1243.0±367.2	94.9	1309.4±419.6
栃木素材3号	54.8±24.9	4.1	1089.8±364.1	81.4	21.9±10.2	1.6	171.6±7.7	12.8	1261.4±366.7	94.3	1338.1±381.3

調査は2014～2016年の3か年行った。反復数は2果とした。

数値は3か年の平均値±標準偏差を示す。パーセントは全アントシアニンに対する割合を示す。

第 3 表 四季成り性 MAGIC 集団交配親品種・系統における果肉アントシアニン成分含量

品種・系統	Cy3G ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3G ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Cy3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3G+Pg3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Total anthocyanin ($\mu\text{g/gFW}$)
08_58.5	0.4±0.8	0.6	60.2±37.6	77.1	0.8±1.4	1.1	16.7±11.0	21.3	76.9±48.3	98.4	78.1±49.9
98-7-3	0.8±1.1	1.2	51.3±21.6	82.9	1.0±1.4	1.6	8.9±2.6	14.3	60.1±24.2	97.2	61.9±26.7
かおり野	0.4±0.6	1.3	23.0±13.4	79.3	0.7±1.3	2.5	4.6±3.6	15.7	27.6±17.0	95.0	29.0±18.6
古都華	1.1±1.0	0.5	207.5±173.3	99.1	0.7±1.3	0.4	0	0.0	207.5±173.4	99.1	209.4±173.2
栃木26号	1.0±1.0	1.0	78.9±71.6	80.6	1.5±1.3	1.6	16.4±13.0	16.8	95.3±84.4	97.4	97.9±86.0
栃木素材3号	0.4±0.5	0.3	102.9±51.6	83.3	0.9±1.6	0.8	19.2±4.9	15.6	19.1±5.1	98.9	123.4±56.3

調査は2014～2016年の3か年行った。反復数は2果とした。

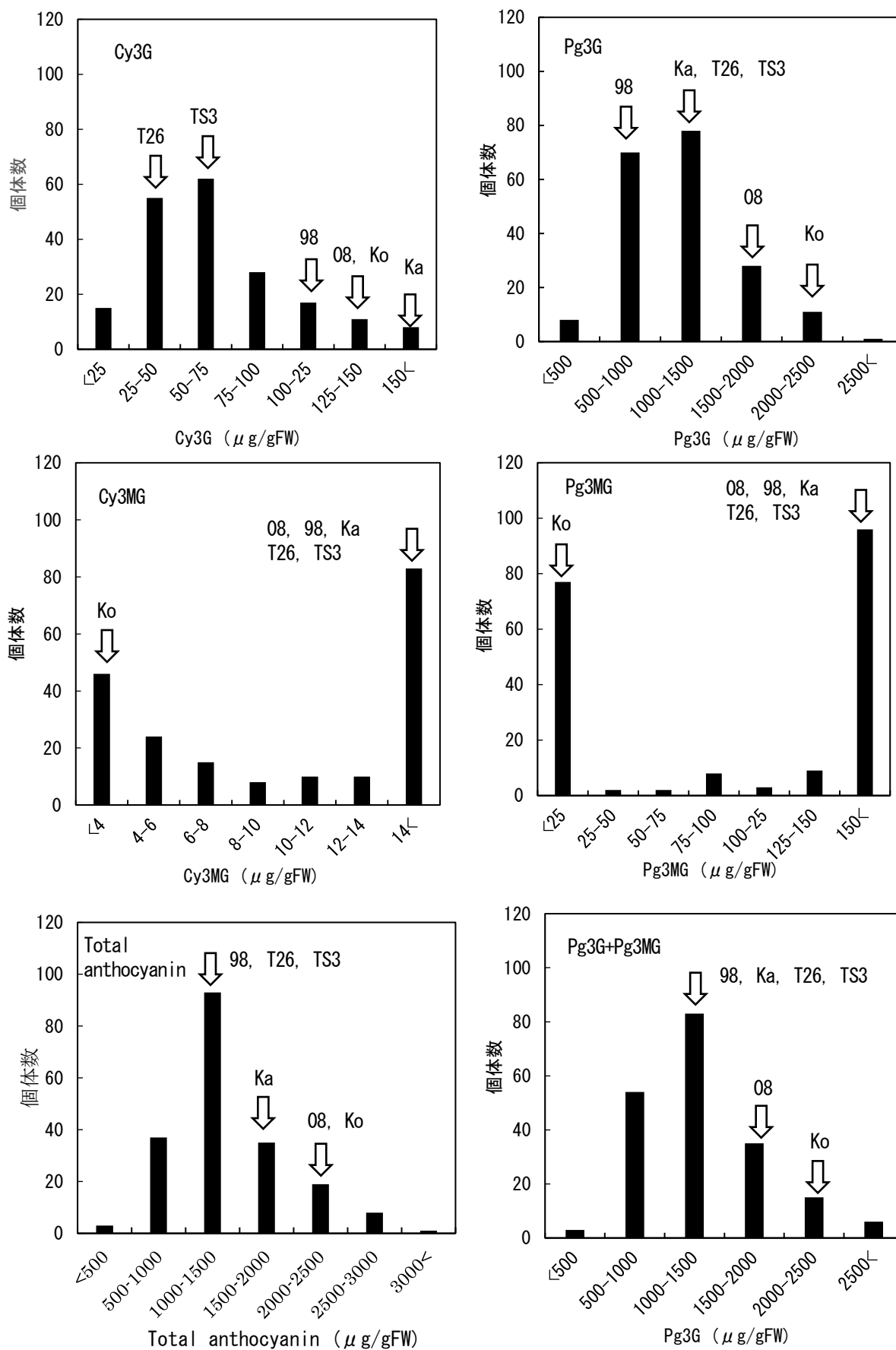
数値は3か年の平均値±標準偏差を示す。パーセントは全アントシアニンに対する割合を示す。

果皮における全アントシアニン量は、1309.4～2149.7 $\mu\text{g/gFW}$ 、Cy3Gが47.5～211.6 $\mu\text{g/gFW}$ 、Pg3Gが989.7～2011.3 $\mu\text{g/gFW}$ 、Cy3MGが0～36.9 $\mu\text{g/gFW}$ 、Pg3MGが0.5～373.5 $\mu\text{g/gFW}$ 、Pg3G+Pg3MGが1243.0～2011.8 $\mu\text{g/gFW}$ であった。全アントシアニンに対する各アントシアニン成分の割合は、Cy3Gが3.6～14.0%、Pg3Gが69.4～93.6%、Cy3MGが0～2.4%、Pg3MGが0～17.7%、Pg3G+Pg3MGが83.6～97.7%であった。古都華は2149.7 $\mu\text{g/gFW}$ と最もアントシアニン含量が多かった。かおり野はPg3G含量が1048.4 $\mu\text{g/gFW}$ であったが、全アントシアニンに対する割合は69.4%であり、最も少なかった。しかし、Cy3G含量については211.6 $\mu\text{g/gFW}$ 、アントシアニンに対する割合が14.0%と最も高い値を示した。

果肉における全アントシアニン量は、29.0～209.4 $\mu\text{g/gFW}$ 、Cy3Gが0.4～1.1 $\mu\text{g/gFW}$ 、Pg3Gが23.0～207.5 $\mu\text{g/gFW}$ 、Cy3MGが0.7～1.5 $\mu\text{g/gFW}$ 、Pg3MGが0～19.2 $\mu\text{g/gFW}$ 、Pg3G+Pg3MGが19.1～207.5 $\mu\text{g/gFW}$ であった。各アントシアニン成分の割合は、Cy3Gが0.3～1.3%、Pg3Gが77.1～99.1%、Cy3MGが0.4～2.5%、Pg3MGが0～21.2%、Pg3G+Pg3MGが95.0～99.1%であった。果皮と同様に古都華が209.4 $\mu\text{g/gFW}$ と最もアントシアニン含量が多かった(第3表)。また、果皮ではアントシアニン含量が少なかった栃木素材3号が果肉では123.4 $\mu\text{g/gFW}$ と古都華について多かった(第3表)。また、古都華におけるPg3MGは、果皮で0.5 $\mu\text{g/gFW}$ 、果肉で0 $\mu\text{g/gFW}$ 、Cy3MGが果皮で0 $\mu\text{g/gFW}$ 、果肉で0.7 $\mu\text{g/gFW}$ であり、ともに生合成が極めて少なかった。

2. IC₂ 集団における果実アントシアニン成分の年次変化

IC₂ 集団における果皮および果肉アントシアニン成分含量を第 4 表および第 5 表に示す。IC₂ 集団における果皮の全アントシアニン含量は、2014 年度が 1762.2 $\mu\text{g/gFW}$ 、2015 年度が 1321.0 $\mu\text{g/gFW}$ と有意に減少し、2016 年度は更に 1126.2 $\mu\text{g/gFW}$ となった。



第 1 図 IC₂ 集団 における果皮アントシアニン成分の度数分布

調査個体数 196 個体 (四季成り性)。3 年 (2014~2016 年) の平均値を用いた。

08 : 08-58-5, 98 : 98-7-3, Ka : かおり野, Ko : 古都華, T26 : 栃木 26 号, TS3 : 栃木素材 3 号

第4表 IC₂集団における果皮アントシアニン成分の年次変化

年度	Cy3G ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3G ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Cy3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3G+Pg3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Total anthocyanin ($\mu\text{g/gFW}$)
2014	82.7 \pm 67.1 ^b	4.7	1495.3 \pm 818.0 ^a	84.9	8.2 \pm 9.3 ^a	0.5	176.0 \pm 208.8 ^a	10.0	1671.3 \pm 903.8 ^a	94.8	1762.2 \pm 942.2 ^a
2015	53.5 \pm 40.3 ^a	4.0	1117.5 \pm 592.0 ^b	84.6	15.5 \pm 10.6 ^b	1.2	134.4 \pm 157.3 ^a	10.2	1252.0 \pm 638.3 ^b	94.8	1321.0 \pm 669.0 ^b
2016	71.6 \pm 59.8 ^{ab}	6.4	873.7 \pm 364.6 ^c	77.6	17.9 \pm 22.3 ^b	1.6	163.1 \pm 195.2 ^a	14.2	1036.8 \pm 461.6 ^b	92.1	1126.2 \pm 514.7 ^b
3か年平均値	68.9 \pm 58.0	4.9	1162.0 \pm 671.3	82.9	13.8 \pm 15.6	1.0	157.2 \pm 188.3	11.2	1319.2 \pm 741.2	94.1	1401.9 \pm 777.8

調査個体数および調査期間：2014年度 185個体（2015年4月）、2015年度 193個体（2015年10月6日～2016年1月22日）、2016年度 180個体（2016年10月12日～2017年1月30日）。

数値は平均値±標準偏差を示す。同一アルファベットの記述は有意差がないことを示す（tukey-kramer法、 $p < 0.05$ ）。

パーセントは全アントシアニン含量に対する割合を示す。

第5表 IC₂集団における果肉アントシアニン成分の年次変化

年度	Cy3G ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3G ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Cy3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Pg3G+Pg3MG ($\mu\text{g/gFW}$)	(%)	Total anthocyanin ($\mu\text{g/gFW}$)
2014	0.3 \pm 1.1 ^a	0.3	81.2 \pm 100.0 ^a	89.9	0.3 \pm 1.9 ^a	0.3	8.5 \pm 16.1 ^a	9.4	89.7 \pm 106.5 ^a	99.3	90.3 \pm 107.6 ^a
2015	1.8 \pm 1.3 ^b	1.8	87.4 \pm 75.6 ^a	87.1	2.2 \pm 0.9 ^b	2.2	9.1 \pm 13.8 ^a	9.1	96.5 \pm 82.4 ^a	96.0	100.4 \pm 84.1 ^a
2016	0.3 \pm 3.9 ^a	0.3	79.5 \pm 69.0 ^a	87.1	0.1 \pm 0.4 ^a	0.1	11.4 \pm 17.3 ^a	12.5	90.9 \pm 75.3 ^a	99.6	91.3 \pm 77.2 ^a
3ヶ年平均値	0.8 \pm 2.5	0.9	82.7 \pm 82.5	87.5	0.9 \pm 1.5	0.9	9.6 \pm 15.8	10.5	92.3 \pm 89.0	98.3	93.9 \pm 90.6

調査個体数および調査期間：2014年度 185個体（2015年4月）、2015年度 193個体（2015年10月6日～2016年1月22日）、2016年度 180個体（2016年10月12日～2017年1月30日）。

数値は平均値±標準偏差を示す。同一アルファベットの記述は有意差がないことを示す（tukey-kramer法、 $p < 0.05$ ）。

パーセントは全アントシアニン含量に対する割合を示す。

最も多いPg3Gについては、2014年度が1495.3 $\mu\text{g/gFW}$ 、2015年度が1117.5 $\mu\text{g/gFW}$ 、2016年度が873.7 $\mu\text{g/gFW}$ と毎年度有意に減少した。各成分の組成割合については、Pg3Gが77.6～84.9%と大きい割合を占め、次にPg3MGが10.0～14.2%、Cy3Gが4.0～6.4%であった。Cy3MGについては0.5～1.6%とほとんど含まれていなかった。また、各年次の成分組成割合については、差が小さい傾向であった。

果肉における全アントシアニン含量は、90.3～100.4 $\mu\text{g/gFW}$ と年次変化を示さなかった。最も多いPg3Gについても、81.2～87.4 $\mu\text{g/gFW}$ と変化がなかった。Cy3GおよびCy3MGについてはほぼ含まれていなかった。各成分の組成割合についても、Pg3Gが87.1～89.9%、Pg3MGが9.1～12.5%、と果皮とほぼ同様の割合であった。また、果肉の全アントシアニン含量は、果皮に対して6.9%であった。

果皮における各アントシアニン成分の度数分布図を第1図に示す。Cy3GおよびPg3Gについては、正規分布を示したが、Cy3MGおよびPg3MGについては、Cy3MGが4 $\mu\text{g/gFW}$ 以下の個体が46個体、Pg3MGが25 $\mu\text{g/gFW}$ 以下の個体が50個体あり、正規分布を示さなかった（第1図）。

3. MAGIC 集団親6品種・系統およびIC₂集団における果実表面各色差値の年次変化

四季成り性MAGIC 集団交配親6品種・系統における果実表面の各色差値を第6表に示す。L*値は37.0～47.7、a*値は39.3～42.5、b*値は23.0～32.2、C*値は21.9～38.3、h値は45.6～53.2、L*b*/a*値は30.2～38.7であった。古都華は各成分がすべて低い数値を示した。栃木素材3号はa*値以外高い数値を示した。

IC₂ 集団における果実表面の色差値の年次変化を第7表に示す。a*値については37.8～38.7と年次変化はなかった。一方、L*値については2014年43.8、2016年41.9と有意な減少を示した。また、b*値についても2014年30.5、2016年27.9と同様に有意な減少を示した。L*値およびb*値が減少した影響により、C*値、h値およびL*b*/a*値も2016年に有意な低下を示した。

色差値の度数分布については各成分すべて正規分布を示した（第2図）。

4. 果皮アントシアニン成分と果実表面色差値との相関

アントシアニン成分6項目と色差値6項目についてIC₂ 集団平均値を用いて相関係数を調べた結果、a*値以外の色差成分は、すべてのアントシアニン成分と1%水準で有意な負の相関を示した（第8表）。その中でL*b*/a*、L*、b*、hは、全アントシアニンとの相関が大きかった（第8表）。ついで、Pg3G+Pg3MG、Pg3Gとの相関が大きかった（第8表）。

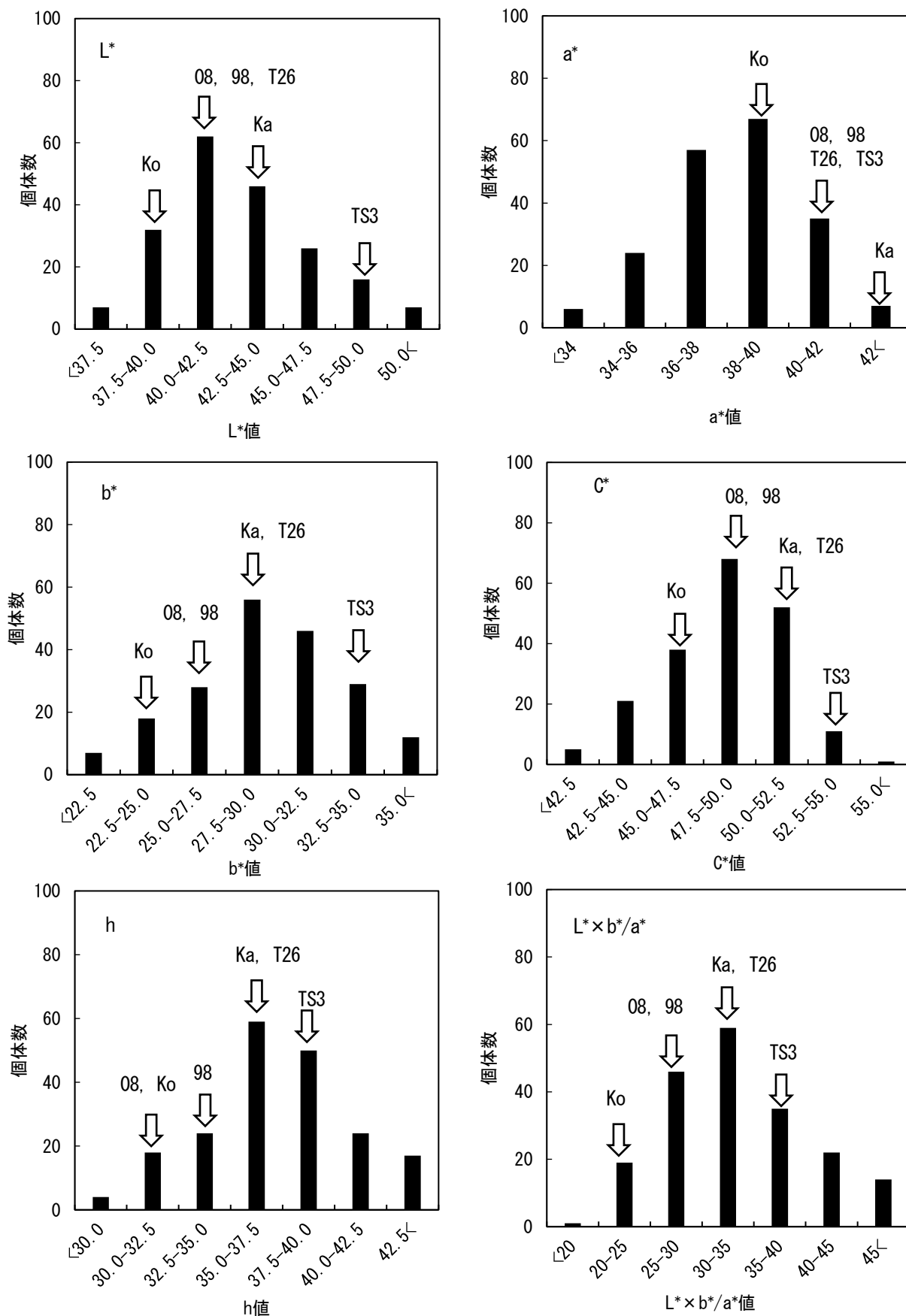
第6表 四季成り性MAGIC 集団交配親品種・系統における果実表面（陽光面）の色差値

品種・系統	L*	a*	b*	C*	h	L* \times b*/a*
08-58-5	41.4 \pm 1.9	41.9 \pm 2.1	26.3 \pm 2.3	26.0 \pm 2.1	49.5 \pm 2.9	32.1 \pm 1.0
98-7-3	41.0 \pm 3.2	40.2 \pm 3.2	25.8 \pm 3.8	26.8 \pm 8.1	47.9 \pm 0.7	32.7 \pm 5.9
かおり野	43.2 \pm 3.8	42.5 \pm 0.2	29.9 \pm 3.4	30.6 \pm 6.2	51.9 \pm 1.8	35.1 \pm 3.2
古都華	37.0 \pm 2.0	39.3 \pm 0.7	23.0 \pm 4.8	21.9 \pm 6.1	45.6 \pm 1.8	30.2 \pm 5.7
栃木26号	41.9 \pm 0.9	40.4 \pm 1.3	29.9 \pm 6.5	31.2 \pm 8.4	50.5 \pm 2.8	36.3 \pm 2.8
栃木素材3号	47.7 \pm 0.9	41.5 \pm 2.3	33.2 \pm 2.4	38.3 \pm 5.6	38.3 \pm 5.6	38.7 \pm 3.6

調査は2015～2016年の2か年行った。反復数は2果とした。

数値は2か年の平均値±標準偏差を示す。

C：彩度 $\sqrt{(a^*)^2+(b^*)^2}$ 、h：色相角 $\tan^{-1}(b^*/a^*)$ 。



第 2 図 IC₂ 集団 における色差値の度数分布

調査個体数 196 個体 (四季成り性)。3 か年 (2014~2016 年) の平均値を用いた。MAGIC 集団親については 2 か年 (2015~2016 年) の平均値を用いた。

08 : 08-58-5, 98 : 98-7-3, Ka : かおり野, Ko : 古都華, T26 : 栃木 26 号, TS3 : 栃木素材 3 号

第7表 IC₂集団における果実表面（陽光面）における色差値の年次変化

年度	L*	a*	b*	C*	h	L*×b*/a*
2014	43.8±4.6 ^b	38.7±2.7 ^a	30.5±4.8 ^b	49.5±3.8 ^b	38.0±4.7 ^b	35.1±9.3 ^b
2015	42.9±4.6 ^{ab}	38.3±2.8 ^a	29.6±4.6 ^b	48.6±3.4 ^b	37.5±5.1 ^{ab}	34.0±9.8 ^{ab}
2016	41.9±4.4 ^a	37.8±2.9 ^a	27.9±5.0 ^a	47.2±3.9 ^a	36.2±5.3 ^a	31.6±9.4 ^a
3ヶ年平均値	42.9±4.6	38.3±2.8	29.4±4.9	48.5±3.8	37.3±5.1	33.6±9.6

調査個体数および調査期間：2014年度 196個体（2014年12月9日～2015年4月4日）、2015年度 193個体（2015年10月6日～2016年1月22日）、2016年度 180個体（2016年10月12日～2017年1月30日）。

L*：明度，a*：色度（赤⇔緑），b*：色度（黄⇔青），h：色相角，C*：彩度

数値は平均値±標準偏差を示す。同一アルファベットの記述は有意差がないことを示す（tukey-kramer法， $p < 0.05$ ）。

第8表 IC₂集団におけるアントシアニン成分および色差値間の相関係数

	L*	a*	b*	C*	h	L*×b*/a*
Pg3G	-0.631**	-0.018 ^{ns}	-0.627**	-0.486**	-0.613**	-0.623**
Pg3MG	-0.350**	0.111 ^{ns}	-0.360**	-0.201**	-0.414**	-0.369**
Cy3G	-0.483**	0.033 ^{ns}	-0.514**	-0.367**	-0.530**	-0.501**
Cy3MG	-0.419**	0.147*	-0.447**	-0.247**	-0.513**	-0.458**
Pg3G+Pg3MG	-0.689**	0.028 ^{ns}	-0.690**	-0.504**	-0.698**	-0.689**
Total anthocyanin	-0.702**	0.025 ^{ns}	-0.704**	-0.517**	-0.712**	-0.703**

色相は係数が0.6以下を示す。

有意差はピアソンの相関検定により行った (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: 有意差なし)。

5. 果皮アントシアニン成分における GWAS 解析

各アントシアニン成分の3か年平均値と665 SSR (2,047 アリル)を用いてGWAS解析を行い、*F. vesca*のゲノム情報をもとにマンハッタンプロットを作製した。その結果、FDR補正 (Benjamini-Hochberg法, $p < 0.1$)により有意と判定されたアリルがPg3Gで第2, 第3, 第4, 第6染色体, 全アントシアニン含量で第2, 第3, 第4, 第6, 第7染色体で検出された (第9表)。各アントシアニン成分全体では, 37アリルが有意に検出された (第9表)。果皮色と関連のある全アントシアニン含量, Pg3GおよびPg3G+Pg3MGについては, FAE0462_265, FAES0560_170, FVES0030_120, FVES0097_263, FVES0168b_162, FVES0332_198, FVES0359_280, FVES0540_195, FVES0658_176, FVES1090_154, FVES1383_141, FVES1613_160, FVES3528_202, FVES3564_241の14アリルが有意に検出された (第9表)。*F. vesca*上の座乗位置は, 第2および第6染色体で各3アリル, 第3染色体が2アリル, 第4および第7染色体が各1アリル, 不明が4アリルであった (第9表)。Cy3Gについては, 唯一FAES0357_477が有意に検出された (第9表)。座乗する染色体は不明であった。Pg3MGについては8アリルが有意に検出された (第9表), 座乗位置は, 第6染色体が4アリル, 第3染色体が2アリル, 第7染色体が1アリル, 不明が1アリルであった (第9表)。第6染色体に座乗するFVES0392a_143, FVES2689_269, FVES2957_156, FVES3227_380の4アリルは32,768,853~36,379,330の範囲に位置し, 特にFVES0392a_143の $-\log_{10}P$ 値が16.47と有意性が高かった (第9表)。Cy3MGについては22アリルが有意に検出された (第9表)。特にFVES0437_279は, $-\log_{10}P$ 値が34.19と高い有意性を示した (第9表)。

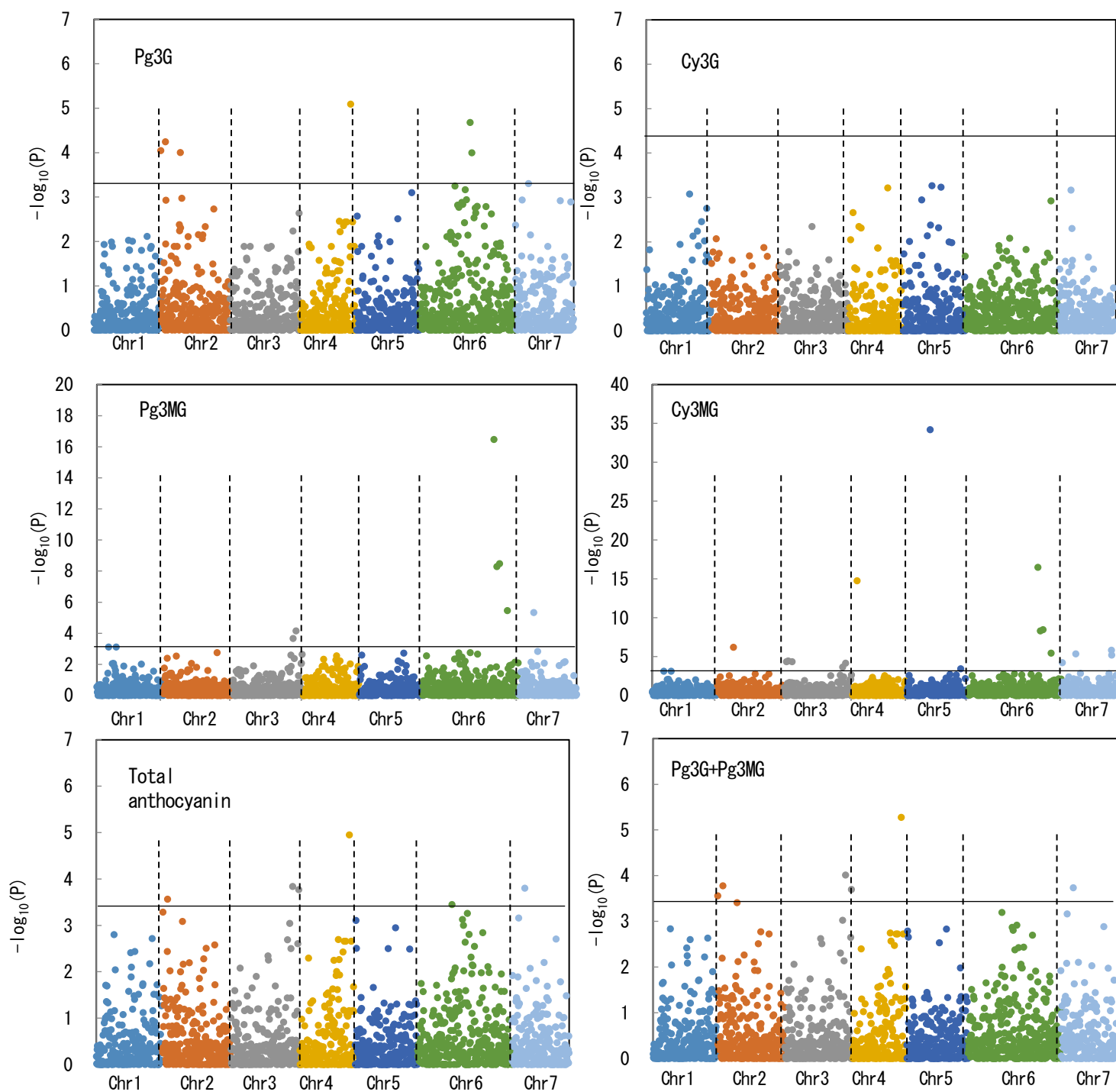
6. 果実表面の各色差値における GWAS 解析

果実表面における各色差値の3か年平均値と665 SSR (2,047 ア

リル)を用いて, 果皮アントシアニン成分と同様にマンハッタンプロットを作製した結果, FDR補正 (Benjamini-Hochberg法, $p < 0.1$)により有意と判定されたアリルがL*×b*/a*値で第2, 第4, 第6染色体で検出された (第4図)。各色差値全体では33アリルが有意に検出された (第10表)。アントシアニン成分と相関関係にあるL*×b*/a*値は, 24アリルが有意ありと判定された (第10表)。座乗位置は, 第6染色体が6アリル, 第2および第4染色体が各5アリル, 第3および第5染色体が各1アリル, 不明が5アリルであった (第10表)。b*値, C*値, hについては, それぞれ14アリル, 11アリル, 24アリルであった (第10表)。a*値については第6染色体のFVES2003_245のみ検出され (第10表), C*値においても検出されたアリルであった (第10表)。L*値においては, 4アリル検出され, 第2染色体に3アリル, 第6染色体に1アリル座乗した。

7. アントシアニン成分と 色差値における共通アリル

L*×b*/a*値およびL*×b*/a*値と相関関係にある全アントシアニン含量, Pg3G+Pg3MG, Pg3Gにおいて共通な検出アリル抽出した結果, FAES0560_170, FVES0030_120, FVES0097_263, FVES0168b_162, FVES0540_195, FVES0658_176, FVES1613_160, FVES3528_202, FVES3564_241の9アリルが選定された (第9表, 第10表)。この9アリルは不明3アリルを除き, 第2, 第4, 第6染色体に座乗していた (第9表, 第10表)。選定されたアリル型と形質値の関係については, IC₂集団の3か年の平均値を用いて調査し, 第2染色体に座乗するFVES0168b_162, FVES1613_160, FVES3528_202がアリル無の遺伝子型で有意にL*×b*/a*が低く, 全アントシアニン含量が高くなった (第11表)。その他6アリルについてアリル有の遺伝子型で有意にL*×b*/a*が低く, 全アントシアニン含量が高くなった (第11表)。



第 3 図 IC₂ 集団におけるアントシアニン成分 GWAS 解析のマニハッタンプロット

GWAS 解析は Tassel 5.0 (Bradbury *et al.*, 2007) により行った。解析個体数は 196 個体を用い、形質値は 3 年 (2014~2016 年) の各アントシアニン成分の平均値を用いた。マーカーは EST-SSR (Isobe *et al.*, 2013) を用い、665 SSR (2047 アリル) のジェノタイプングデータを用いた。ゲノム上のマーカー位置は、Strawberry garden (<http://strawberry-garden.kazusa.or.jp>) の情報を用いた。FDR 補正は、Benjamini-Hochberg 法により行った (*: $p < 0.1$, Pg3G: $-\log_{10}P > 3.2$, Cy3G: $-\log_{10}P > 4.3$, Pg3MG: $-\log_{10}P > 3.4$, Cy3MG: $-\log_{10}P > 3.0$, Total anthocyanin: $-\log_{10}P > 3.4$, Pg3G+Pg3MG: $-\log_{10}P > 3.4$)。

第9表 IC₂集団における各アントシアニン成分のGWAS 解析

アレル	F. vescaゲノム		連鎖地図		Total anthocyanin		Pg3G+Pg3MG		Pg3G		Cy3G		Pg3MG		Cy3MG		L*×b*/a* GWAS	
	染色体	位置 (bp)	連鎖群	位置 (cM)	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差		
FVES2696_270	1	2.6	1D	21.6	1.33	ns	1.28	ns	0.41	ns	0.87	ns	3.12	ns	3.12	*		
FVES0694_303	1	4.8	1B	37.4	2.04	ns	2.05	ns	1.05	ns	0.17	ns	3.12	ns	3.12	*		
FVES3528_202	2	0.0	2C	40.8	3.28	ns	3.56	*	4.04	*	1.52	ns	0.11	ns	1.78	ns	○	
FVES1613_160	2	1.1	-	-	3.56	*	3.78	*	4.24	*	2.07	ns	0.07	ns	0.18	ns	○	
FVES3000_221	2	10.4	2C	31.2	0.03	ns	0.07	ns	0.22	ns	0.12	ns	0.51	ns	6.19	*		
FVES0168b_162	2	12.2	-	-	3.08	ns	3.41	*	4.00	*	1.07	ns	0.20	ns	0.29	ns	○	
FVES1721_297	3	0.4	-	-	1.31	ns	1.52	ns	1.22	ns	0.02	ns	0.55	ns	4.34	*		
FVES0580_388	3	0.7	-	-	1.22	ns	1.44	ns	1.22	ns	0.08	ns	0.41	ns	4.42	*		
FVES0237_353	3	2.2	-	-	1.31	ns	1.52	ns	1.22	ns	0.02	ns	0.55	ns	4.34	*		
FVES2410_305	3	27.2	3C	57.3	3.04	ns	3.02	ns	1.59	ns	1.07	ns	3.67	*	3.67	*		
FVES1090_154	3	29.3	-	-	3.83	*	4.01	*	2.23	ns	0.42	ns	4.15	*	4.15	*		
FVES0359_280	3	32.2	3B	79.2	3.77	*	3.70	*	2.63	ns	0.62	ns	2.65	ns	2.65	ns		
FVES0097_263	-	-	3A	45.1	2.34	ns	2.02	ns	3.51	*	1.32	ns	0.71	ns	0.71	ns	○	
FVES0439_385	4	6.6	4D	13.2	0.15	ns	0.13	ns	0.05	ns	0.07	ns	0.35	ns	14.75	*		
FVES0540_195	4	31.8	4C	27.7	4.95	*	5.28	**	5.09	*	0.65	ns	0.72	ns	0.72	ns	○	
FVES0437_279	5	7.0	-	-	0.26	ns	0.28	ns	0.33	ns	0.07	ns	0.04	ns	34.19	*		
FVES0019_189	5	22.7	5B	65.1	2.49	ns	1.98	ns	3.10	ns	1.28	ns	0.12	ns	3.42	*		
FVES2003_245	6	12.3	6A	64.4	1.16	ns	1.03	ns	0.37	ns	1.45	ns	2.35	ns	2.35	ns		
FVES0332_198	6	15.7	6A	78.5	3.44	*	3.20	ns	3.24	*	1.81	ns	0.62	ns	0.62	ns		
FVES0658_176	6	23.2	6B	28.9	3.25	ns	2.91	ns	4.68	*	1.39	ns	0.56	ns	0.56	ns	○	
FVES3564_241	6	23.8	6A	84.5	2.80	ns	2.42	ns	3.99	*	1.53	ns	0.56	ns	0.56	ns	○	
FVES0554_112	6	24.5	6B	41.9	37.2	2.32	ns	2.06	ns	2.53	ns	1.27	ns	0.09	ns	1.15	ns	
FVES0392a_143	6	32.8	6C	37.0	0.06	ns	0.03	ns	2.62	ns	0.81	ns	16.47	**	16.47	*		
FVES2957_156	6	33.9	-	-	0.11	ns	0.10	ns	1.78	ns	0.49	ns	8.30	*	8.30	*		
FVES3227_380	6	34.3	6D	38.3	0.14	ns	0.14	ns	1.94	ns	0.45	ns	8.47	*	8.47	*		
FVES2689_269	6	36.4	-	-	0.03	ns	0.09	ns	0.86	ns	0.96	ns	5.45	*	5.45	*		
FAES0462_265	-	-	6B	35.0	3.06	ns	3.07	ns	4.45	*	0.60	ns	0.44	ns	0.44	ns		
FVES0814_205	7	0.8	7B	12.8	1.92	ns	1.92	ns	2.36	ns	1.39	ns	0.15	ns	4.22	*		
FVES1383_141	7	6.8	7D	23.7	3.80	*	3.74	*	3.30	*	1.45	ns	1.09	ns	1.09	ns		
FVES3758b_313	7	6.9	-	-	0.28	ns	0.21	ns	1.64	ns	1.09	ns	5.34	*	5.34	*		
FVES0171_268	7	21.6	-	-	0.05	ns	0.06	ns	0.01	ns	0.03	ns	0.10	ns	5.83	*		
FVES3422_276	7	21.6	-	-	0.23	ns	0.25	ns	0.08	ns	0.13	ns	0.49	ns	5.19	*		
FAES0357_477	-	-	7A	60.2	1.64	ns	1.36	ns	1.56	ns	6.33	*	0.02	ns	0.05	ns		
FAES0067_141	-	-	7A	84.7	0.33	ns	0.26	ns	0.20	ns	0.38	ns	3.05	ns	3.05	*		
FVES0690_173	-	-	7D	35.1	1.56	ns	1.73	ns	1.42	ns	0.54	ns	0.46	ns	3.12	*		
FAES0560_170	-	-	-	-	5.98	*	6.36	*	4.28	*	0.69	ns	3.70	*	3.70	*	○	
FVES0030_120	-	-	-	-	3.63	*	3.22	ns	4.65	*	1.84	ns	0.19	ns	0.19	ns	○	

ゲノム上のマーカー位置および連鎖群は、Strawberry garden (<http://strawberry-garden.kazusa.or.jp>) の情報を用いた。

GWAS 解析は Tassel 5.0 (Bradbury *et al.*, 2007) により行った。解析個体数は 196 個体を用いた。形質値は 3 年 (2014~2016 年) の各アントシアニン成分の平均値を用いた。マーカーは EST-SSR (Isobe *et al.*, 2013) を用い、665 SSR (2047 アレル) のジェノタイプングデータを用いた。

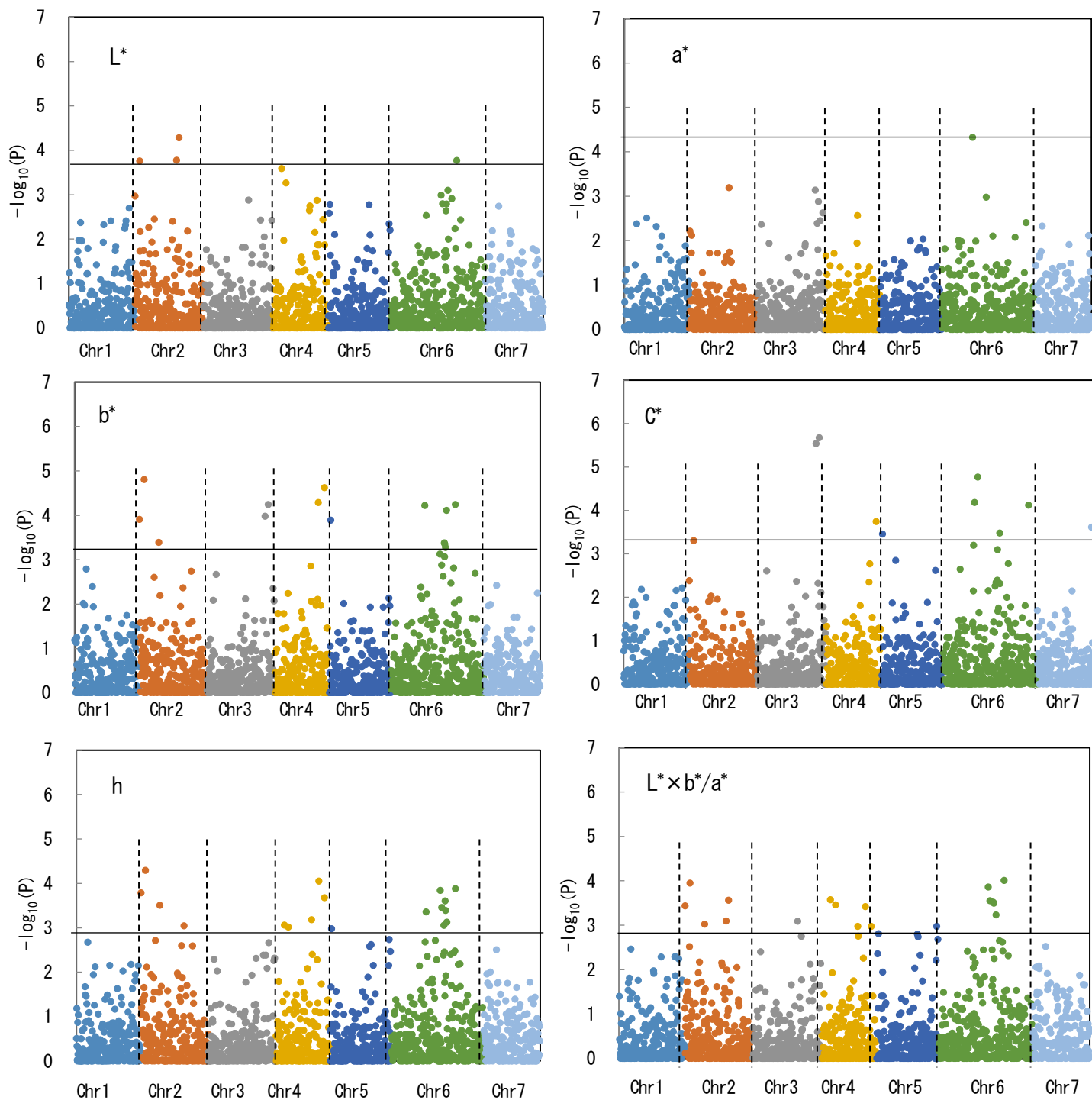
FDR 補正は、Benjamini-Hochberg 法により行った (*: $p < 0.1$, Total anthocyanin: $-\log_{10}P > 3.4$, Pg3G+Pg3MG: $-\log_{10}P > 3.4$, Pg3G: $-\log_{10}P > 3.2$, Cy3G: $-\log_{10}P > 4.3$, Pg3MG: $-\log_{10}P > 3.4$, Cy3MG: $-\log_{10}P > 3.0$)。

朱色は、total anthocyanin, Pg3G+Pg3MG, Pg3G において有意差を示したアレルを示す。灰色は有意差のある p 値を示す。○は $L^* \times b^*/a^*$ 値の GWAS 解析において検出された共通アレルを示す。

IV 考察

本研究は、ゲノムワイドなジェノタイプングデータと 3 年間の果皮色の調査データを用いて GWAS 解析を行い、果色に関与する領域の検索を行った。その結果、検出されたアレルは第 2 染色体、第 3 染色体、第 4 染色体、第 6 染色体に集中していた。Sargent *et al.* (2007・2008) は、アントシアニン合成経路におけるカルコン合成酵素 (CHS: Chalcone synthase), カルコンイソメラーゼ (CHI: Chalcone isomerase), フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ (F3H: Flavanone 3-hydroxylase), アントシアニン合成酵素 (ANS: Anthocyanidin synthase), ジヒドロフラボノール 4-還元酵素 (DHR: Dihydroflavonol 4-reductase) を座乗させており、それぞれ第 3 連鎖群、第 7 連鎖群、第 5 連鎖群、第 2 連鎖群に含まれていることを報告している。Zorrilla-Fontasi *et al.* (2011) は、果実形質の QTL 解析により、果色が第 5 連鎖群、アントシアニン含量が第 3 連鎖群および第 5 連鎖群の関与を報告している。Lerceteau-Köhler, *et al.* (2012) は、果色における a^* 値、 b^* 値、 L^* 値および全アントシアニン量の 3 年間調査データによる QTL 解析の結果、 a^* 値では 1a 連鎖群、2a 連鎖群、4a 連鎖群、5b 連鎖群、6a 連鎖群および 6b 連鎖群、 b^* 値では 1a 連鎖群、3a 連鎖群、6a 連鎖群および 6b 連鎖群、 L^* 値では 2a 連鎖群、3a 連鎖群、4d 連鎖群および 6a 連鎖群、全アントシアニン量では 1a 連鎖群、2a 連鎖群、3a 連鎖群、6a 連鎖群および 6b 連鎖群で QTL が検出しており、そのうち、複数検出された QTL は、2a 連鎖群、3a 連鎖群、6a 連鎖群に含まれていたことを報告し

群、第 7 連鎖群、第 5 連鎖群、第 2 連鎖群に含まれていることを報告している。Zorrilla-Fontasi *et al.* (2011) は、果実形質の QTL 解析により、果色が第 5 連鎖群、アントシアニン含量が第 3 連鎖群および第 5 連鎖群の関与を報告している。Lerceteau-Köhler, *et al.* (2012) は、果色における a^* 値、 b^* 値、 L^* 値および全アントシアニン量の 3 年間調査データによる QTL 解析の結果、 a^* 値では 1a 連鎖群、2a 連鎖群、4a 連鎖群、5b 連鎖群、6a 連鎖群および 6b 連鎖群、 b^* 値では 1a 連鎖群、3a 連鎖群、6a 連鎖群および 6b 連鎖群、 L^* 値では 2a 連鎖群、3a 連鎖群、4d 連鎖群および 6a 連鎖群、全アントシアニン量では 1a 連鎖群、2a 連鎖群、3a 連鎖群、6a 連鎖群および 6b 連鎖群で QTL が検出しており、そのうち、複数検出された QTL は、2a 連鎖群、3a 連鎖群、6a 連鎖群に含まれていたことを報告し



第 4 図 IC₂集団における各色差値 GWAS 解析のマンハッタンプロット

GWAS 解析は Tassel 5.0 (Bradbury *et al.*, 2007) により行った。解析個体数は 196 個体を用い、形質値は 3 年 (2014~2016 年) の各色差値の平均値を用いた。マーカーは EST-SSR (Isobe *et al.*, 2013) を用い、665 SSR (2047 アリル) のジェノタイプングデータを用いた。ゲノム上のマーカー位置は、Strawberry garden (<http://strawberry-garden.kazusa.or.jp>) の情報を用いた。FDR 補正は、Benjamini-Hochberg 法により行った ($p < 0.1$, 実線以上を有意差ありと判定した。L*: $-\log_{10}P > 3.8$, a*: $-\log_{10}P > 4.3$, b*: $-\log_{10}P > 3.1$, C*: $-\log_{10}P > 3.3$, h: $-\log_{10}P > 2.9$, L* \times b*/a*: $-\log_{10}P > 2.9$)。

第 10 表 IC₂ 集団における各色差成分の GWAS 解析

アリル	F. vesca ゲノム		連鎖地図		L*		a*		b*		C*		h		L*×b*/a*		アントシアニン GWAS
	染色体	位置 (M bp)	連鎖群	位置 (cM)	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	-log ₁₀ P値	有意差	
FVES0168b_162	2	12.2	-	-	2.45	ns	0.13	ns	3.39	*	1.90	ns	3.50	*	3.02	*	○
FVES1079_225	2	23.3	2A	66.6	3.78	*	0.77	ns	1.94	ns	0.58	ns	2.59	ns	3.09	*	
FVES1613_160	2	1.1	-	-	3.76	*	0.17	ns	4.80	*	3.30	*	4.29	*	3.95	*	○
FVES1631_230	2	23.9	-	-	4.28	*	0.71	ns	2.36	ns	0.79	ns	3.04	*	3.56	*	
FVES3528_202	2	0.04	2C	40.8	2.97	ns	0.03	ns	3.90	*	2.38	ns	3.78	*	3.44	*	○
FAES0340_205	-	-	2D	50.9	3.18	ns	0.30	ns	2.95	ns	1.41	ns	3.18	*	3.17	*	
FVES1090_154	3	29.3	-	-	1.64	ns	2.88	ns	4.24	*	5.68	**	2.66	ns	1.62	ns	
FVES1171_222	3	20.1	3A	67.5	2.88	ns	1.71	ns	0.93	ns	0.01	ns	1.93	ns	3.09	*	
FVES2410_305	3	27.2	3B	61.4	1.83	ns	3.14	ns	3.98	*	5.54	**	2.38	ns	1.52	ns	
FVES0097_263	-	-	3C	66.3	2.25	ns	0.64	ns	2.35	ns	0.89	ns	2.94	*	2.97	*	○
FVES0072_195	4	15.3	3A	45.1	2.25	ns	0.76	ns	2.35	ns	0.89	ns	2.94	*	2.97	*	
FVES0540_195	4	31.8	6A	81.9	2.25	ns	0.64	ns	2.35	ns	0.89	ns	2.94	*	2.97	*	○
FVES0716_138	4	27.7	4A	23.7	3.26	ns	0.76	ns	2.24	ns	0.78	ns	3.01	*	3.46	*	
FVES0723_191	4	14.0	4C	27.7	2.44	ns	0.52	ns	4.62	*	3.74	*	3.67	*	2.97	*	○
FVES0920_315	4	30.7	-	-	2.64	ns	0.49	ns	2.85	ns	1.16	ns	3.18	*	2.97	*	
FAES0114_141	5	0.4	4A	22.5	3.59	ns	1.71	ns	1.78	ns	0.23	ns	3.06	*	3.57	*	
FVES2349_294	5	28.9	-	-	2.87	ns	0.08	ns	4.29	*	2.77	ns	4.05	*	3.42	*	
FVES0045_262	-	-	5A	36.1	2.34	ns	0.89	ns	2.13	ns	0.67	ns	2.74	ns	2.97	*	
FVES0332_201	6	15.7	5A	86.3	3.30	ns	2.39	ns	1.75	ns	0.08	ns	3.19	*	3.52	*	
FVES0447_246	6	31.1	5D	88.8	2.53	ns	1.99	ns	4.22	*	4.77	*	3.36	*	2.04	ns	
FVES0554_112	6	24.5	6B	28.9	3.77	*	0.05	ns	4.24	*	2.78	ns	3.88	*	4.01	*	
FVES0658_176	6	23.2	6A	84.5	1.59	ns	0.14	ns	3.37	ns	2.39	ns	3.05	*	2.44	ns	
FVES1242_176	6	25.1	6B	41.9	2.99	ns	0.69	ns	3.12	ns	1.22	ns	3.84	*	3.86	*	○
FVES2003_245	6	12.3	6A	84.4	2.64	ns	0.31	ns	3.35	*	1.68	ns	3.60	*	3.52	*	
FVES2492_522	6	28.6	6B	42.3	0.11	ns	4.33	*	2.12	ns	4.18	*	0.98	ns	0.02	ns	
FVES2533_297	6	25.3	6A	84.4	3.10	ns	0.49	ns	4.11	*	3.48	*	3.12	*	3.23	*	
FVES3564_241	6	23.8	6B	37.2	2.79	ns	0.23	ns	3.27	*	1.75	ns	3.39	*	3.50	*	
FVES2720_522	6	36.9	6A	83.8	2.79	ns	0.57	ns	2.87	ns	1.19	ns	3.46	*	3.55	*	○
FVES1834_236	7	23.5	7B	115.7	1.39	ns	2.40	ns	2.69	ns	4.12	*	1.16	ns	1.12	ns	
FAES0164_177	-	-	7A	98.0	1.21	ns	2.11	ns	2.24	ns	3.62	*	0.96	ns	1.06	ns	
FAES0168_267	-	-	-	72.4	2.97	ns	0.37	ns	3.31	*	1.60	ns	3.63	*	3.62	*	
FAES0560_170	-	-	-	-	0.83	ns	2.94	ns	2.18	ns	4.01	*	0.73	ns	0.68	ns	
FVES0030_120	-	-	-	-	2.91	ns	0.40	ns	2.90	ns	1.23	ns	3.51	*	3.15	*	○
FVES0097_263	-	-	-	-	2.80	ns	0.61	ns	2.91	ns	1.18	ns	3.50	*	3.60	*	○

ゲノム上のマーカー位置および連鎖群は、Strawberry garden (<http://strawberry-garden.kazusa.or.jp>) の情報を用いた。

GWAS 解析は Tassel 5.0 (Bradbury *et al.*, 2007) により行った。解析個体数は 196 個体を用いた。形質値は 3 か年 (2014~2016 年) の各色差成分の平均値を用いた。マーカーは、EST-SSR (Isobe *et al.*, 2013) を用い、665 SSR (2047 アリル) のジェノタイプングデータを用いた。

FDR 補正は、Benjamini-Hochberg 法により行った (*: $p < 0.1$, L*: $-\log_{10}P > 3.8$, a*: $-\log_{10}P > 4.3$, b*: $-\log_{10}P > 3.1$, C*: $-\log_{10}P > 3.3$, h: $-\log_{10}P > 2.9$, L*×b*/a*: $-\log_{10}P > 2.9$)

朱色は、L*×b*/a*値において有意差を示したアリルを示す。灰色は有意差のある p 値を示す。○は L*×b*/a*値の GWAS 解析において検出された共通アリルを示す。

第 11 表 果皮色関与アリル候補におけるアリル型による形質値比較 (L*×b*/a*および total anthocyanin)

アリル	ゲノム		L*×b*/a*			total anthocyanin (μg/g FW)			関与アリル型
	染色体	位置 (Mbp)	アリル有 (+)	アリル無 (-)	有意差	アリル有 (+)	アリル無 (-)	有意差	
FVES0168b_162	2	12.2	34.8±7.4	31.3±6.3	**	1316.4±493.4	1578.6±544.1	**	-
FVES1613_160	2	1.1	35.0±7.3	30.8±6.2	**	1309.9±486.5	1595.7±549.7	**	-
FVES3528_202	2	0.04	35.0±7.4	31.1±6.2	**	1312.1±493.9	1582.9±539.3	**	-
FVES0540_195	4	31.7	28.7±1.2	34.2±7.1	**	1919.2±366.6	1343.0±503.4	**	+
FVES0658_176	6	23.2	30.9±5.3	35.0±7.7	**	1582.1±508.4	1312.6±510.8	**	+
FVES3564_241	6	23.8	28.7±5.3	34.2±7.7	**	1919.2±505.4	1343.0±515.8	**	+
FAES0560_170	-	-	28.7±5.2	34.2±7.2	**	1919.2±1343.0	643.6±474.3	**	+
FVES0030_120	-	-	31.0±5.2	35.0±7.8	**	1593.4±495.5	1306.7±514.1	**	+
FVES0097_263	-	-	31.3±5.5	34.8±7.7	**	1551.0±514.7	1328.7±515.3	**	+

ゲノム上のマーカー位置は、Strawberry garden (<http://strawberry-garden.kazusa.or.jp>) の情報を用いた。

数値は平均値±標準偏差を示す。有意差は t 検定で行った (**<0.01)。関与アリル型の一および+は、L*×b*/a*が減少、total anthocyaninが増加となるアリル型を示す。

ている。和田ら (2015) の MAGIC 集団における QTL 解析では、第 1, 第 2, 第 7 染色体において QTL を検出している。今後これらのマーカー情報と比較し、果皮色に関与する領域を特定する予定である。

今回は、ジェノタイピングデータおよび形質調査データを用い、GWAS 解析によりゲノム解析を行ったが、遺伝子発現解析からのアプローチもあると考えられる。アントシアニン合成経路の制御は、主に転写調節因子である MYB で行われており、*FaMYB10* が合成上昇、*FaMYB1* が抑制に働くことが報告されている (Medin-Puche *et al.*, 2014; Aharoni *et al.*, 2001)。他品種であるブドウにおいては、すでに MYB のハプロタイプに判別することにより、4 倍体栽培品種の果皮色を黄緑、赤、紫黒に区分することが可能となっている (Azuma *et al.*, 2011)。また、新規関与遺伝子の検索においては、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析が有用であると考えられる。Hu *et al.* (2018) は、イチゴの未熟～成熟果実において RNA-seq 解析を行っており、6608 遺伝子発現差異を検出している。また、永野ら (2017) は、本県集団を含む MAGIC 集団を用いて完着期果実における RNA-seq 解析を行っている。今後遺伝子発現解析が進むことにより、果皮色関与マーカーの開発につながると思われる。

選抜用 DNA マーカーの開発には、異なる交配組合せにおける適合性の確認が必要である。今後他の交配組合せにおいて選定マーカーの有効性の確認を行う予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、かずさ DNA 研究所植物ゲノム・遺伝学研究室の職員の皆様には、アントシアニン分析に多大なご協力をいただいた。田村茂子氏ならびに阿久津操氏にはサンプリング、試料調製、DNA 抽出に多大な協力をいただいた。いちご研究所の稲葉正雄氏、堀井和己氏、浅川利子氏、鈴木和吉氏には材料育成および圃場管理に協力していただいた。また、生物工学研究室の職員の皆様にはサンプル調製に協力していただいた。ここに記して深く感謝申し上げる。

引用文献

- Aharoni A., Ric De Vos C.H., Wein M., Sun Z., Greco R., Kroon A., Mol J.N.M. and O'Connell A.P. (2001) The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J.* 28: 319-32.
- Anciro A., Mangandi J., Verma S., Peres N., Whitaker V.M. and Lee S. (2018) *FaRCgl*: a quantitative trait locus conferring resistance to *Colletotrichum* crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in octoploid strawberry. *Theor. Appl. Genet.* 131: 2167–2177.
- Azuma A., Udo Y., Sato A., Mitani N., Kono A., Ban Y., Yakushiji H., Koshita Y. and Kobayashi S. (2011) Haplotype composition at the color locus is a major genetic determinant of skin color variation in *Vitis × labruscana* grapes. *Theor. Appl. Genet.* 122: 1427–1438.
- Hu P., Li G., Zhao X., Zhao F., Li L. and Zhou H. (2018) Transcriptome profiling by RNA-Seq reveals differentially expressed genes related to fruit development and ripening characteristics in strawberries (*Fragaria × ananassa*). *Peer J.* 6: e4976.
- Hossain M.R., Natarajan S., Kim H., Jesse D.M.I., Lee C., Park J. and Nou I. (2019) High density linkage map construction and QTL mapping for runner production in allo-octoploid strawberry *Fragaria × ananassa* based on ddRAD-seq derived SNPs. (2019) *Sci. Rep.* 9: 3275.
- 石々川英樹 (2010) 温度と紫外線がイチゴ‘あまおとめ’果実の色調とアントシアニン生成に及ぼす影響. *愛媛農林水研研報* 2:22-28.
- 北村八祥・森利樹・小堀純奈・山田信二・清水秀巳 (2015) 極早生性を有するイチゴ炭疽病抵抗性品種‘かおり野’の育成と普及. *園学研* 14:89-95.
- Lerceteau-Köhler E., Moing A., Guérin G., Renaud C., Petit A., Rothan C. and Denoyes R. (2012) Genetic dissection of fruit quality traits in the octoploid cultivated strawberry highlights the role of homoeo-QTL in their control. *Theor. Appl. Genet.* 124: 1059-77.
- 三井寿一・藤田幸一・末吉孝行・伏原肇 (2003)イチゴ新品種‘福岡S6号’, ‘福岡S7号’の育成. *福岡農総誌研報* 22:61-68.
- Medina-Puche L., Cumpido-Laso G., Amil-Ruiz F., Hoffmann T., Ring L., Rodríguez-Franco A., Caballero J., Schwab W., Muñoz-Blanco J. and Blanco-Portales R. (2014) *MYB10* plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria × ananassa* fruits. *J. Exp. Bot.* 65: 401-17.
- Nagano S., Shirasawa K., Hirakawa H., Maeda F., Ishikawa M. and Isobe S.N. (2017) Discrimination of candidate subgenome-specific loci by linkage map construction with an S1 population of octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *BMC Genomics* 18: 374.
- 永野聡一郎・平川英樹・和田卓也・田崎公久・前田ふみ・Ghelfi Andrea・森美幸・鶴見理沙・津金胤昭・坪根正雄・飯村一成・白澤健太・奥幸一郎・大橋隆・渡邊学・生井潔・磯部祥子 (2017) 栽培イチゴ (*Fragaria × ananassa*) MAGIC 集団を用いた完着期果実の遺伝子発現プロファイリング. *園学研* 16 (2):207.
- 中川勝也・沢正樹・吉倉淳一郎・藤井浩・藤本治夫 (1972) そ菜果実の流通技術に関する研究 (第 4 報) イチゴの品質評

- 価要因と鮮度保持限界. 兵庫農試研報 20:105-108.
- 中西達郎・鶴見理沙・大橋隆・石原良行 (2018) 栃木 iW1 号. 品種登録出願 32822.
- Nellist C.F., Vickerstaff R.J., Sobczyk M.K., Marina-Montes C., Wilson F.M., Simpson D.W., Whitehouse A.B. and Harrison R.J. (2019) Quantitative trait loci controlling *Phytophthora cactorum* resistance in the cultivated octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). Hortic. Res. 6: 60.
- 西本登志・信岡尚・前川寛之・後藤公美・東井君枝・泰松恒男・木矢博之・吉村あみ叫・平山喜彦・峯岸正好・佐野太郎・米国祥二 (2010) イチゴの新品種‘古都華’の育成とその特性. 奈良農総セ研報 41:1-10.
- Pincot D.D.A., Poorten T.J., Hardigan M.A., Harshman J.M., Acharya C.B., Cole G.S., Gordon T.R., Stueven M., Edger P.P. and Knapp S.J. (2018) Genome-wide association mapping uncovers *Fw1*, a dominant gene conferring resistance to Fusarium wilt in strawberry. G3 8: 1817-1828.
- Sargent D.J., Rys A., Nier S., Simpson D.W. and Tobutt K.R. (2007) The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. Theor. Appl. Genet. 114: 373-384.
- Sargent D.J., Cipriani G., Vilanova S., Gil-Ariza D., Arús P., Simpson D.W., Tobutt K.R. and Monfort A. (2008) The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. Genome 51: 120-127.
- Salinas N., Verma S., Peres N. and Whitaker V.M. (2019) *FaRCa1*: a major subgenome-specific locus conferring resistance to *Colletotrichum acutatum* in strawberry. Theor. Appl. Genet 132: 1109-1120.
- 佐藤裕・山川理・本田藤雄 (1986) イチゴ果実成熟過程における品質の品種間差異. 野菜試験場報告 C9:23-30.
- Silva F.L., Escribano-Bailón M.T., Alonso J.J.P., Rivas-Gonzalo J.C. and Santos-Buelga C. (2007) Anthocyanin pigments in strawberry. LWT 40: 374-382.
- 竹内隆・藤浪裕幸・川田智明・松村雅彦 (1999) イチゴ新品種‘紅ほっぺ (仮称)’の育成経過と主特性. 静岡農試研報 44:13-24.
- 田崎公久・飯村一成・鈴木恵美子・永野聡一郎・中谷明弘・植木正明・大橋幸雄・鶴見理沙・小島夏実・若柳睦子・森香織・磯部祥子・大橋隆・生井潔 (2019) 四季成りイチゴMAGIC 集団におけるEGGS解析を用いた果実硬度上昇効果. 栃木農試研報 81:37-52.
- 坪根正雄・和田卓也・磯部祥子・永野聡一郎・森美幸・平田千春・永松志朗・下村克己・平島敬太 (2018) イチゴの多元交雑集団を用いた果実色に関するゲノムワイド関連解析. 育学研 20(1):166.
- Verma S., Zum J.D., Salinas N., Mathey M.M., Denoyes B., Hancock J.F., Finn C.E., Bassil N.V. and Whitaker V.M. (2017) Clarifying sub-genomic positions of QTLs for flowering habit and fruit quality in U.S. strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) breeding populations using pedigree-based QTL analysis. Hortic. Res. 4: 17062.
- 和田卓也・磯部祥子・森美幸・奥幸一郎・平田千春・高田衣子・下村克己・平島敬太・池上英利・内村要介 (2015) 多元交雑集団を用いた栽培イチゴの果実色に関するGWAS解析. 園学研 14(2):156.
- Wada T., Oku K., Nagano S., Isobe S., Suzuki H., Mori M., Takata K., Hirata C., Shimomura K., Tsubone M., Katayama T., Hirashima K., Uchimura Y., Ikegami H., Sueyoshi T., Obu K., Hayashida T. and Shibato Y. (2017) Development and characterization of a strawberry MAGIC population derived from crosses with six strawberry cultivars. Breed Sci. 67: 370-381.
- 和田泰治 (2009) 和田初こい. 品種登録 18011.
- Yoshida Y., Koyama N. and Tamura H. (2002) Color and anthocyanin composition of strawberry fruit: changes during fruit development and differences among cultivars, with special reference to the occurrence of pelargonidin 3-malonylglucoside. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 71: 355-361.
- Yoshida Y. and Tamura H. (2005) Variation in concentration and composition of anthocyanins among strawberry cultivars. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 74: 36-41.
- Zorrilla-Fontanesi Y., Cabeza A., Domínguez P., Medina J.J., Valpuesta V., Denoyes-Rothan B., Sánchez-Sevilla J.F. and Amaya I. (2011) Quantitative trait loci and underlying candidate genes controlling agronomical and fruit quality traits in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). Theor. Appl. Genet. 123: 755-778.

