

## DNA 鑑定による赤肉系リンゴ新品種‘紅の夢’の親の推定

五十嵐 恵<sup>1</sup>・初山 慶道<sup>1</sup>・松本 和浩<sup>2,4</sup>・塩崎雄之輔<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>(地独)青森県産業技術センター 弘前地域研究所 バイオテクノロジー部

<sup>2</sup>弘前大学農学生命科学部附属生物共生教育研究センター 藤崎農場

<sup>3</sup>弘前大学名誉教授

<sup>4</sup>Corresponding author: Tel. 0172-75-3026 E-mail: k-matsu@cc.hiroskai-u.ac.jp

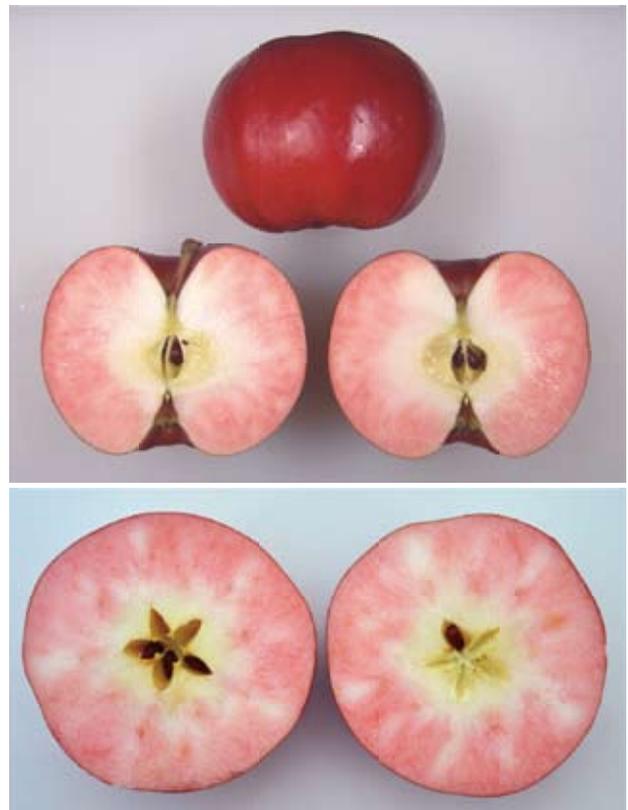
(2010年10月29日受付)

### 諸言

弘前大学農学生命科学部附属生物共生センター藤崎農場では1981年からリンゴ新品種の育成を行っている。1999年に果皮が黄色で着色管理が不要、さらに、糖度が高く食味が良好な‘こうこう’を品種登録した(塩崎、1999)。その後も継続して新品種の育種および特性評価を行ってきたが、その中で塩崎は‘紅玉’を育種親にした後代系統の中から果肉が淡紅色に着色するものを数系統選抜した。中でも果皮、果肉ともに赤色に着色し、豊産性で果肉の淡紅色を生かした加工品の製造原料としても適している系統(系統101)を2008年新品種として農林水産省に登録出願し、2010年3月に‘紅の夢’として登録された(登録番号19259)。

‘紅の夢’の外観は‘紅玉’に似て円～偏円形で、果皮が‘紅玉’よりさらに濃い暗紅色、果実重が‘紅玉’より大きい300g前後である。糖度は13%、酸度が0.7%程度と酸味が強く感じられ、‘紅玉’と似た食味を示す。収穫期を遅らせれば蜜も入り、貯蔵性は普通冷蔵で約3か月である。本品種の最大の特徴は果肉が淡紅色に着色することであり(第1図)、生食も可能であるが果肉色を生かした加工原料として‘紅玉’以上の期待がかけられている。加工原料としては大きな問題とはならないが、栽培地の土壌、気象条件および樹勢によってはコルクスポットが多発する欠点があることから、この点について現在、改善策を研究中である。すでに、藤崎町商工会では、‘紅の夢’を用いたジュース、ジャム、菓子などの加工品の開発が進み、2007年から本品種を用いた町興し事業が展開されている。

本品種は品種登録時、‘紅玉’に‘スターキングデリシャス’を交雑して得られたとされていたが、白い果肉同士の交雑組み合わせからは赤い果肉の後代が生じた事例の報告がないことから、DNAマーカー解析により交雑親の推定を行った。その結果、‘スターキングデリシャス’は育種親ではないことが判明した。‘紅の夢’はそ



第1図 新品種‘紅の夢’

れ自身が新品種としての可能性を秘めているのみならず、果実品質や機能性をより向上させた赤肉系の新品種を育成するための母本として期待されている。そこで、今後の育種や研究、さらには栽培管理法を考える上での基礎的な知見を得る目的で、品種識別用最少マーカーを中心にDNAマーカー遺伝子型を調査し、交雑親として可能性のある品種(樹)の特定を試みた。

### 材料および方法

#### 1) 植物材料

2010年5月に、弘前大学農学生命科学部附属生物共生

第1表 SSRマーカーによる‘紅の夢’親候補の遺伝子型解析

品種名	CH01f07a (LG10)	CH02c06 (LG02)	CH02c11 (LG10)	CH02d11 (LG15)	CH02g09 (LG8)	CH03d12 (LG06)	CH04e03 (LG05)	CH04g07 (LG11)	CH05c06 (LG16)	CH05d04 (LG12)
紅の夢	174-190	242-250	229	124	114-118	121	200-202	174-180	118-126	184-194 <sup>F</sup>
紅玉	190-192	234-250	229-235	124-136	114-138	121	190-200	180-182	104-118	178-184
スターキング D.	194-202	216-248	207-233	136-152	114-122	113-121	202-206	158-180	118-126	184-186
赤肉親候補 A	174-192	242-258	227-229	124	110-118	121	200-202	158-174	104-126	194-198
赤肉親候補 B	174-192	238-258	227-229	120-122	110-168	121	202-225	158-214	118-126	192-198
ピンクパール	174-190	234-242	229-233	136	110-140	121	200-225	158-180	104-118	186-190
プリマ <sup>Y</sup>	186-190	234-238	229-233	122-136	104-138	121-147	188-208	158-178	104-110	180-190

品種名	CH05e03 (LG02)	CH05g03 (LG17)	Hi02f12 (LG17)	Hi07h02 (LG17)	NZ02b01 (LG15)	CH03d11 (LG10)	CH02c09 (LG15)	NZ23g04 (LG06)	CH05d03 (LG14)	CH02d10a (LG16)
紅の夢	165 <sup>F</sup> -166	136-162	131-135	263-275	215-226	125-129	247-259	86	172-179	228
紅玉	166-188	162-192	135	245-275	215-226	129	251-259	86	163-179	219-228
スターキング D.	194	162	151	245-259	216-238	125-129	247-257	108-112	172-179	220
赤肉親候補 A	165 <sup>F</sup>	136	131-141	263-265	215-226	125-133	245-247	86	172-179	219-228
赤肉親候補 B	182	136-166	131-151	247-263	226	133	245-247	86-90	171-172	219-228
ピンクパール	188	162	131-151	263	236	125-129	235-245	112-118	167-179	219
プリマ <sup>Y</sup>	182-188	162-166	151	247-273	215-226	125-183	235-245	90-118	157-185	219-220

‘紅の夢’の親として矛盾の生じない対立遺伝子をイタリックで示した。網掛けは矛盾の無い遺伝子型を示す。

<sup>z</sup> ‘紅の夢’に検出され、国内育成の既知品種には稀な対立遺伝子。

<sup>y</sup> サイズ比較の対象品種として表中に加えた。

教育研究センター藤崎農場に植栽されている16年生‘紅の夢’原木、60年生マルバカイドウ台‘ピンクパール’、30年生マルバカイドウ台赤肉親候補A（藤崎農場では‘エターズゴールド’として保存されてきた）および16年生赤肉親候補B（系統33）原木より、新葉それぞれ0.1gを採取し、改変CTAB法（Wagnerら、1987；Bousquetら、1990）により全ゲノムDNAを抽出し、1mlのTEバッファーに溶解した後、さらに1/10希釈し、PCRの鋳型DNAとした。

## 2) リンゴSSRマーカー遺伝子型の調査

阿部ら（2007）が報告したリンゴ識別最少マーカーセットを中心として、20種類のSSRマーカー（Silfverbergら、2006；Liebhardら、2002；Guilfordら、1997）について既報に従いPCR増幅を行った。その後、阿部ら（2005）が改良したポストラベリング法（Kukitaら、2002）により増幅産物を標識し、Genetic Analyzer（ABI 3100, Applied Biosystems, USA）および解析ソフト（Genotyper 3.6, Applied Biosystems, USA）を用いて解析を行った。プライマーは、公表されている配列に標識用付加塩基を付加して用いた。解析は、前述の‘紅の夢’、‘ピンクパール’、赤肉親候補A、赤肉親候補Bに加え、‘紅の夢’の親として登録されている‘紅玉’および‘スターキングデリシャス’、さらにはサイズ比較対照品種として‘プリマ’を加えて行った。

## 3) リンゴSTSマーカー遺伝子型の調査

### ① S-RNase遺伝子型

リンゴの自家不和合性遺伝子S-RNase型（S1、S2、S3、S4、S5、S7、S9、S20、S23、S24、S26およびS28）について、既報（Janssensら、1995；Sakuraiら、1997；

Broothaertsら、1995；Broothaerts、2003；Verdoortら、1998）の各対立遺伝子特異的プライマーを用いてPCRを行い、増幅・検出されるバンドにより各品種の遺伝子型を判別した。

### ② Md-ACS1対立遺伝子型

リンゴのACC（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid）合成酵素遺伝子Md-ACS1の対立遺伝子型について、Sunakoら（1999）の報告にあるプライマーを用いて増幅し、電気泳動による増幅産物のサイズに基づいて各品種の遺伝子型を判別した。

### ③ Rf遺伝子型

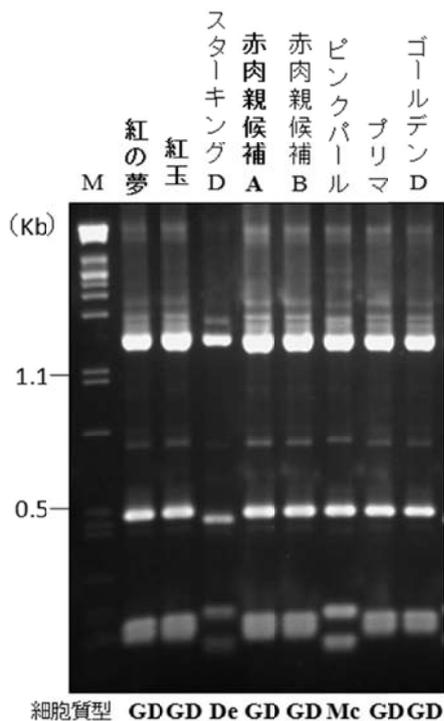
リンゴの果皮色制御遺伝子Rfに連鎖するマーカーについてChengら（1996）の報告にあるBC226プライマーを用いて遺伝子型を調査した。PCRによる増幅産物は、2% LEアガロース（FMC社）を用いた電気泳動により分離し、EtBr染色で確認される泳動パターンから各品種の遺伝子型を判別した。

## 4) 細胞質型の判別

‘ゴールデンデリシャス’型（GD型）、‘デリシャス’型（De型）、‘旭’型（Mc型）の3種類を判別する葉緑体マーカーであるtrnT-trnF/DraI CAPSマーカー（五十嵐ら、2008）を用いて葉緑体型を解析し、細胞質型を判別した。

## 5) MdMYB10遺伝子のミニサテライト配列（R6）の調査

果肉が赤いリンゴで検出されるMdMYB10遺伝子のミニサテライト配列（R6）（Espleyら、2009）の有無について、赤い果肉を持つ‘紅の夢’、‘ピンクパール’、赤肉親候補Aおよび赤肉親候補Bと‘紅の夢’の親品種であると考えられる‘紅玉’で解析を行った。



第2図 CAPSマーカーによる細胞質型の解析  
細胞質型は葉緑体DNAをGD型・De型・Mc型の3種類に識別するCAPSマーカー (trnT-trnF領域をDraIで消化) で判定した。  
M: サイズマーカー (PstI処理したλDNA)

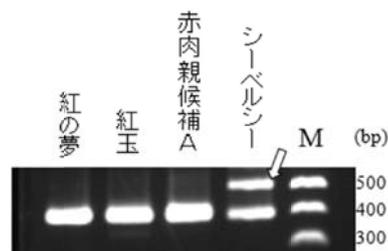
## 結果および考察

### 1) ‘紅の夢’の親の推定

リンゴ279品種・系統を互いに識別できる最少SSRマーカーセット (阿部ら、2007) を用いて、弘前大学農学生命科学部附属生物共生センター藤崎農場で育成した‘紅の夢’の品種識別を試みたところ、本マーカーにより‘紅の夢’は、他の品種・系統と識別することが可能であった。

‘紅の夢’の品種登録時 (塩崎、2010) に親品種として登録のある‘紅玉’および‘スターキングデリシャス’についてSSRマーカーを用いて親子鑑定を行った。まず、‘紅玉’については、調査した20種類の全てのSSRマーカーで‘紅の夢’の片親であることに矛盾は見られなかった (第1表)。一方、‘スターキングデリシャス’を片親とすることについては20種類のSSRマーカーのうち10種類で矛盾が生じた (第1表)。本結果により種子親品種として登録のある‘紅玉’は‘紅の夢’の親品種と考えられるものの、花粉親として登録のある‘スターキングデリシャス’は‘紅の夢’の親ではない可能性が強く示唆された。

‘紅の夢’は、調査した20種類のSSRマーカーのうちCH05d04およびCH05e03において国内で育成された既知品種・系統には見られない非常に稀な対立遺伝子 (それぞれ194および165) が検出された (第1表)。そこで、両マーカーに‘紅の夢’と同じ対立遺伝子を持ち、果肉



第3図 MdMYB10遺伝子マーカー解析  
図中の矢印はMdMYB10 R6ミニサテライト配列が存在することを示す  
M: サイズマーカー (100bp ladder)

の赤い品種を調査したところ、赤肉親候補A (藤崎農場では‘エターズゴールド’として保存されてきた品種) に同じ対立遺伝子が見出された。赤肉親候補Aはこの2種類のマーカー以外のすべてのマーカーにおいても‘紅の夢’の親品種とすることにおいて矛盾は生じなかった。一方で‘紅の夢’と同様に赤い果肉を持ち、‘紅の夢’の親品種候補に挙げられた赤肉親候補Bおよび‘ピンクパール’は、20種類のSSRマーカーのうちそれぞれ7種類、8種類で‘紅の夢’の親品種とすることには矛盾が生じたことから‘紅の夢’の親品種ではないと考えられた。

続いて‘紅の夢’の種子親、花粉親、それぞれの品種を推定するために葉緑体マーカーを用いて細胞質型の調査をおこなった。第2図に示したように‘紅の夢’の細胞質型はGD型であったことから、‘紅の夢’の種子親はGD型であることが判明した。親候補品種の細胞質型を調査したところ赤肉親候補A、赤肉親候補Bおよび‘紅玉’がGD型、‘ピンクパール’がMc型、‘スターキングデリシャス’がDe型であることが明らかになった (第2図)。これまで述べてきたように‘紅の夢’の親品種は‘紅玉’および赤肉親候補Aであると考えられるが、両者ともに細胞質型がGD型であることから、どちらが種子親、花粉親であるかまでは判別することができなかった。しかし、一般に育種過程において他の花粉が混入し、受精する可能性はあっても種子親が異なることは極めてまれであることから、‘紅の夢’は‘紅玉’×赤肉親候補Aの組み合わせで作出された可能性が高い。

### 2) 既知のリンゴSTSマーカーによる‘紅の夢’の形質関連遺伝子型の特定

‘紅の夢’を栽培・普及させていく上でも、‘紅の夢’を育種親にさらなる赤肉形質を持つ新品種を育成していく上でも、現在明らかになっているSTSマーカーを使って‘紅の夢’の形質関連遺伝子の型を明らかにしておく必要がある。また、本マーカーでもSSRマーカーで明らかになった親子関係に矛盾が生じないことを確認する必要がある。

まず、交雑和合性に関連する自家不和合性遺伝子

S-RNase型を調査したところ、‘紅の夢’はS3S7が検出された。これは、既存品種の‘つがる’および‘未希ライフ’と同様の遺伝子型であり、現在栽培されている主要品種のほとんどと交雑和合性を有することが明らかになった(第2表)。「紅の夢」は生食用のみならず加工用品種としても優れていると考えられることから、受粉樹を兼ねて混植できる可能性がある。また、親品種と考えられる‘紅玉’および赤肉親候補AのS-RNase遺伝子型がそれぞれS7S9、S3Sxであることから、S3遺伝子が赤肉親候補Aから、S7遺伝子が‘紅玉’から遺伝したと推定された(第2表)。本結果からも‘紅玉’および赤肉親候補Aが‘紅の夢’の親品種であることに矛盾は生じなかった。

次に、果実におけるエチレン生成量と関連し、収穫前落果の難易との関連が指摘されているMd-ACS1遺伝子(Sunakoら、1999; Satoら、2004)の型について調査したところ、‘紅の夢’は2型のホモとして検出された(第2表)。Md-ACS1の遺伝子型のうち2型はエチレン生成量が少ない対立遺伝子であることから、‘紅の夢’はエチレン生成量が少ない形質を有すると推定された。本結果は実際に‘紅の夢’は収穫前落下がほとんど見られないという知見とも一致する(塩崎ら、2010)。また、本遺伝子型の結果からも‘紅玉’および赤肉親候補Aが‘紅の夢’の親品種であることに矛盾は生じなかった。

引き続き果皮色を制御するRf遺伝子(Chengら、1996)の型について調査したところ、‘紅の夢’は赤色の果皮色を示すAのホモ型であることが明らかになった(第2表)。Rf遺伝子はA型が優性を示すため、‘紅の夢’を母本として品種育成を行った場合、そのF<sub>1</sub>個体の果皮色は全て赤色形質となるものと考えられた。本遺伝子型の結果からも‘紅玉’および赤肉親候補Aが‘紅の夢’の親品種であることに矛盾は生じなかった。

### 3) 果肉が赤い形質の由来について

これまでリンゴの果皮の赤色形質についてはMdMYB A遺伝子が関連し、紫外線や低温によって発現が誘導されることが明らかにされてきた。一方で、果肉が赤い形質については近年、ニュージーランド(Espleyら、2009)や名古屋大学(Sekidoら、2010)の研究チームが活発な研究を行い、その発現メカニズムを解明しつつある。果皮を剥いてから食す日本人の習慣において、リンゴの食品機能性を十分に発揮させるため、我々もリンゴの果肉の赤肉形質に着目し、育種・選抜を行ってきた。これまでの先行研究から、藤崎農場で育種した‘紅の夢’には、いくつかの興味深い点が明らかになった。ニュージーランドの研究チームは、赤い果肉および赤い葉の形質はリンクしており、両者の着色発現にMdMYB10 R6ミニサテライト配列が関与することを示した(Espleyら、2009)。そこで、‘紅の夢’とその両親と推定された‘紅玉’および赤肉親候補Aについて

第2表 形質に関連するS T Sマーカーの遺伝子型

品種名	S-RNase型 (LG17) <sup>z</sup>	ACS-1 (LG15)	Rf (LG9)
紅の夢	3-7	2	A
紅玉	7-9	1-2	A
スターキング D.	9-28	1-2	A-al
赤肉親候補 A	3-X	2	A
赤肉親候補 B	2-3	2	A-al
ピンクパール	3-Y	1-2	A-al
プリマ <sup>y</sup>	2-Z	1-2	A

‘紅の夢’の親として矛盾の生じない対立遺伝子をイタリックで示した。網掛けは矛盾の無い遺伝子型を示す。

<sup>z</sup> S-RNase型中のX, Y, ZはS1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 20, 23, 24, 26, 28のいずれでもない。

<sup>y</sup> サイズ比較の対象品種として表中に加えた。

MdMYB10遺伝子のミニサテライト配列(R6)の有無を調査したところ、いずれの品種からもこの配列は検出されなかった(第3図・矢印)。また、この3品種の葉はいずれも赤色形質を示さないことから、‘紅の夢’の果肉の赤い形質は、ニュージーランドの研究チームが述べているようなMdMYB10とは別の要因で発現していると考えられた。

一方、Sekidoら(2010)は、葉が緑の形質で果肉の赤い形質を持つ‘ピンクパール’とその後代系統を用いた研究により、果肉が赤い形質が、ニュージーランドの研究チームが述べているような赤い葉の形質とリンクするのではなく、自家不和合性遺伝子のS3-RNase遺伝子と密接に連鎖していることを示した。‘紅の夢’とその親品種と推定される赤肉親候補Aは、ともに緑色の葉を持ち、どちらもS3-RNase遺伝子が検出されたことから、‘紅の夢’の赤果肉形質も‘ピンクパール’と同じ、S3-RNase遺伝子の近傍に存在し密接に連鎖している遺伝子によって発現している可能性が示された。

赤肉親候補Aは、藤崎農場の記録上これまで‘エターズゴールド’とされてきた。藤崎農場の前身である農林省園芸試験場東北支場が盛岡に移転する際に遺伝資源として譲り受けたとも考えられるが、その来歴は不明である。果皮が赤い形質であるにもかかわらず「ゴールド」という名前を持つことにこれまでも疑問が示されてきた。リンゴ品種大観(吉田、1986)によると、‘エターズゴールド’の果皮は光沢ある黄金色、果肉は淡黄色と記録されていることから、果皮、果肉ともに赤く着色する形質を示す赤肉親候補Aはやはり本来の‘エターズゴールド’ではないことが推定された。そこで、弘前大学(赤肉親候補A)、青森県板柳町ふるさとセンター、独立行政法人果樹研究所・リンゴ研究拠点の3機関において、それぞれ‘エターズゴールド’として植栽保存されてきた3系統のSSR遺伝子型を調査したところ、全てが同じ遺伝子型を示し、これらは同一であると考えられた。一方、アメリカ・カリフォルニア州にある育成元(Greenmantle Nursery)より入手した‘エターズゴ

第3表 SSRおよびSTSマーカーによる赤肉親候補Aおよび‘エターズゴールド’の同一性の検定

品種名	S-RNase 型 (LG17)	ACS-1 (LG15)	Rf (LG9)	CH01f07a (LG10)	CH02c06 (LG02)	CH02c11 (LG10)	CH02d11 (LG15)	CH02g09 (LG8)	CH03d12 (LG06)	CH04e03 (LG05)
赤肉親候補 A	3-X <sup>2</sup>	2	A	174-192	242-258	227-229	124	110-140	121	200-202
エターズゴールド	3-4	1	a2	176-186	228	219-227	124-126	136-168	149-155	200-202

品種名	CH04g07 (LG11)	CH05c06 (LG16)	CH05d04 (LG12)	CH05e03 (LG02)	CH05g03 (LG17)	Hi02f12 (LG17)	Hi07h02 (LG17)	NZ02b01 (LG15)	CH03d11 (LG10)	CH02c09 (LG15)
赤肉親候補 A	158-174	104-126	194-198	165	136	131-141	263-265	215-226	125-133	245-247
エターズゴールド	168-180	118-126	184	171	164-184	139-149	243-259	215-236	123-133	235-247

網掛けは赤肉親候補Aおよび‘エターズゴールド’での同一の遺伝子型を示す。

<sup>2</sup> S-RNase型中のXはS1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 23, 24, 26, 28のいずれでもない。

サイズ表記は第1表と同様である。

ルド’とSSR遺伝子型を比較したところ、ほとんどのマーカーで日本の3機関で‘エターズゴールド’とされてきたものの遺伝子型と異なっていた(第3表)。つまり、現在日本国内で‘エターズゴールド’として保存されている樹の多くは本来の‘エターズゴールド’ではないことが示唆された。果肉が赤い品種である‘ピンクパール’と果肉が淡黄色であると考えられる‘エターズゴールド’はともにEtter氏によって育成された品種である。日本国内にある‘エターズゴールド’とされてきたもの(赤肉親候補A)が‘ピンクパール’などと一緒にEtter氏の農園より日本国内にわたってきた可能性は否定できないものの、第1表の結果から、‘ピンクパール’が赤肉親候補Aの親、または兄弟系統である可能性はないと考えられた。

#### 4) まとめと今後の展開

本研究により‘紅の夢’の親品種が明らかになり、またその遺伝的形質も明らかになったことから、今後‘紅の夢’および親品種である赤肉親候補Aを用いた優良な赤果肉品種の開発が進められると考えられる。また、果肉が赤い形質とS3-RNase遺伝子との連鎖が強く示唆されたことから、この知見を利用して果肉が赤い形質をもつ育種後代の効率的な選抜が行えるものと考えられる。今後は形質関連マーカーの情報をさらに充実させ、選抜を効率化するとともに、‘紅の夢’の欠点であるコルクスポットの低減法を確立し、さらには、果肉の着色要因を明らかにし、安定的な果肉の着色を得る方策を明らかにする必要があるものと考えられる。あわせて、赤い果肉の形質を活用した新たなリンゴの販売方法、加工品の開発なども行い、大学および地域の特産品としての開発も検討していく必要があるものと考えられた。

#### 謝辞

‘エターズゴールド’の比較用植物材料は独立行政法人果樹研究所・リンゴ研究拠点、板柳町ふるさとセンター、上海交通大学・張才喜准教授及びGreenmantle Nurseryに提供していただいた。ここに記して感謝申し上げます。また、本研究の一部は弘前大学農学生命科学部

2009年度りんご研究奨励金の助成を受けて行った。ここに記して感謝申し上げます。

#### 摘要

‘紅の夢’は弘前大学藤崎農場で育成されたリンゴ新品種である。このリンゴの果実の特徴は濃い暗紅色の果皮と印象的な淡紅色の果肉を持つことである。‘紅の夢’は、‘紅玉’と‘スターキングデリシャス’との交配により作出されたと記録されていたが、DNAマーカー解析によると、‘スターキングデリシャス’は交配親ではないことが明らかになった。さらに、SSRおよびSTSマーカーを用いた遺伝子型解析により、‘紅の夢’の親品種のうち一方は‘紅玉’、もう一方は藤崎農場に植栽されている樹(赤肉親候補A)である可能性を示した。このリンゴ樹は‘エターズゴールド’とされていたが、SSR遺伝子型を調査したところ大半がオリジナルの遺伝子型とは異なることから、‘エターズゴールド’ではないことが明らかになった。

PCRベースのS-RNase解析により、‘紅の夢’のS遺伝子型は、S3S7と既存品種の‘つがる’や‘未希ライフ’と同一であることが明らかになった。この結果から、‘紅の夢’は日本で栽培されている多くの品種と交雑和合性があると考えられた。

#### 引用文献

1. 阿部佳枝, 初山慶道, 上田高則, 五十嵐 恵, 神みさお, 今 智之, 鈴木正彦. リンゴ品種・系統のSSR遺伝子型大量解析. 園芸学雑誌74別1: 182. 2005.
2. 阿部佳枝, 藤井 浩, 上田高則, 五十嵐 恵, 今智之, 深澤(赤田)朝子, 工藤 剛, 佐藤 耕, 初山慶道. りんご品種判別における最少マーカーセット選択プログラム「MinimalMarker」の利用. 園芸学研究6別1: 321. 2007.
3. BOUSQUET, J., SIMON, L. and LALONDE, M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. Can. J. For. Res. 20: 254-257. 1990.

4. BROOThAERTS, W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. *Theor. Appl. Genet.* 106: 703–714. 2003.
5. BROOThAERTS, W., JANSSENS, G.A., PROOST, P. and BROEKaERT, F. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.* 27: 499–511. 1995.
6. CHENG, F.S., WEEDEN, N.F. and BROWN, S.K. Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple. *Theor. Appl. Genet.* 93: 222–227. 1996.
7. ESPLEY, R.V., BRENDOlISE, C., CHAGNE, D., KUTTY-AMMA, S., GREEN, S., VOLZ, R., PUTTERILL, J., SCHOUTEN, H.J., GARDINER, S.E., HELLENS, R.P. and ALLAN, A.C. Multiple Repeats of a Promoter Segment Causes Transcription Factor Autoregulation in Red Apples. *The Plant Cell* 21: 168–183. 2009.
8. GUILFORD, P., PRAKASH, S., ZHU, J.M., RIKKERINK, E., GARDINER, S., BASSETT, H. and FORSTER, R. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple) abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249–254. 1997.
9. 五十嵐 恵, 初山慶道, 阿部佳枝, 深澤 (赤田) 朝子, 今 智之, 工藤 剛, 佐藤 耕. 葉緑体DNAの多型を利用したリンゴ細胞質型簡易判別マーカーの作出. *園芸学研究7 別1*: 269. 2008.
10. JANSSENS, G.A., GODERIS, I.J., BROEKaERT, W.F. and BROOThAERTS, W. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theor. Appl. Genet.* 91: 691–698. 1995.
11. KUKITA, Y., HIGASA, K., BABA, S., NAKAMURA, M., MANAGO, S., SUZUKI, A., TAHIRA, T. and HAYASHI, K. A single-strand conformation polymorphism method for the large-scale analysis of mutations/polymorphisms using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 23: 2259–2266. 2002.
12. LIEBHARD, R., GIANFRANCESCHI, L., KOLLER, B., RYDER, C.D., TARCHINI, R., VAN DE WEG, E. and GESSLER, C. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10: 217–241. 2002.
13. SAKURAI, K., BROWN, S.K. and WEEDEN, N.F. Determining the self-incompatibility alleles of Japanese apple cultivars. *HortScience* 32: 1258–1259. 1997.
14. SATO, T., WAKASA, Y., KUDO, T., AKADA, T., NIIZEKI, M. and HARADA, T. Allelotype of a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene defines the rate of fruit drop in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129: 32–36. 2004.
15. SEKIDO, K., HAYASHI, Y., YAMADA, K., SHIRATAKE, K., MATSUMOTO, S., MAEJIMA, T. and KOMATSU, H. Efficient Breeding System for Red-fleshed Apple Based on Linkage with S3-RNase Allele in 'Pink Pearl'. *HortScience* 45: 534–537. 2010.
16. SILFVERBERG-DILWORTH, E., MATASCI, C.L., VAN DE WEG, W.E., VAN KAAUWEN, M.P.W., WALSER, M., KODDE, L.P., SOGLIO, V., GIANFRANCESCHI, L., DUREL, C.E., COSTA, F., YAMAMOTO, T., KOLLER, B., GESSLER, C. and PATOCCHI, A. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh) genome. *Tree Genetics & Genomes* 2: 202–224. 2006.
17. 塩崎雄之輔. 品種登録 (こうこう). 平成11年4月15日 官報告示 第7179号. 1999.
18. 塩崎雄之輔, 向後智陽, 初山慶道, 五十嵐 恵, 松本和浩. 弘前大学育成りんご新品種 '紅の夢' の特性について. *園芸学研究 9 別 2*: 384. 2010.
19. SUNAKO, T., SAKURABA, W., SENDA, M., AKADA, S., ISHIKAWA, R., NIIZEKI, M. and HARADA, T. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 119: 1297–1303. 1999.
20. VERDOODT, L., VAN HAUTE, A., GODERIS, I.J., DE WITTE, K., KEULEMANS, J. and BROOThAERTS, W. Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. *Theor. Appl. Genet.* 96: 294–300. 1998.
21. WAGNER, D.B., FURNIER, G.R., SANGHAI-MAROOF, M.A., WILLIAMS, S.M., DANCİK, B.P. and ALLARD, R.W. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2097–2100. 1987.
22. 吉田義雄. リンゴ品種大観. 長野県経済事業農業協同組合連合会. 1986.

## Identification of parents of ‘Kurenainoyume’, a new cultivar of red-fleshed apple, by DNA markers.

Megumi IGARASHI<sup>1</sup>, Yoshimichi HATSUYAMA<sup>1</sup>, Kazuhiro MATSUMOTO<sup>2,4</sup> and Yunosuke SHIOZAKI<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Hirosaki Industrial Research Institute, Aomori Prefectural Technological Research Center,  
80 Fukuromachi, Hirosaki, 036-8363, Japan*

<sup>2</sup>*Fujisaki Farm, Teaching and Research Center for Bio-coexistence, Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University,  
7-1 Shimobukuro, Fujisaki, Minami-Tsugaru, Aomori, 038-3802, Japan*

<sup>3</sup>*Professors emeritus of Hirosaki University*

<sup>4</sup>Corresponding author: Tel. 0172-75-3026 E-mail: k-matsu@cc.hiroskai-u.ac.jp

(Received for publication October 29, 2010)

‘Kurenainoyume’ is a new apple cultivar bred at Fujisaki Farm of Hirosaki University. This apple has an attractive fruit with deeply red skin covering impressive pink-flesh. It was recorded that ‘Kurenainoyume’ was obtained from the crossing of ‘Jonathan’ × ‘Starking Delicious’, but we indicated that ‘Starking Delicious’ was not a parent of this new apple cultivar by DNA marker analysis. By analysis of genotypes using 20 SSR markers and some STS makers, we showed that one parent of ‘Kurenainoyume’ was ‘Jonathan’ and another parent was an apple tree cultivated at Fujisaki Farm of Hirosaki University. This apple have been called ‘Etter’s Gold’. But SSR genotypes of this apple were different from original ‘Etter’s Gold’.

By PCR-based S-RNase analysis, the S-RNase type of ‘Kurenainoyume’ was indicated as S3S7, which was the same as the genotype of ‘Tsugaru’ and ‘Miki-life’. This result have shown that ‘Kurenainoyume’ has compatibility to many of apple cultivars in Japan.