

カーネーションの全ゲノム解読がもたらすもの

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所 主任研究員 八木雅史

はじめに

ゲノムとは生命の設計図と言われ、生物を形作る遺伝情報の全てと定義される。ゲノム解読とはゲノムを構成するDNAに含まれる4種類の塩基（アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T））の並びを明らかにすることである。植物では2000年にシロイヌナズナのゲノムが公開されて以降、ゲノム解読は単子葉植物の代表としてイネ（2004年）、木本植物の代表としてポプラ（2006年）などモデル植物と呼ばれるごく限られた植物だけであった。これらは大型の国際コンソーシアムにより1塩基ずつ解読が進められたことから、非常に高精度ではあるが、巨額の予算と多大な時間を投じて実現した。ところが、2000年代半ばから、次世代型と呼ばれるシーケンサーの誕生によりこの分野の世界は激変した。近年では、トマトやハクサイ、かんきつ、リンゴといった身近な野菜や果樹でも次々とゲノム解読が進められている。しかしながら、栄養繁殖性で遺伝的に雑ばくな花きの分野ではこれまで報告がなかった。今回、我々のグループが花きで初めてとなるカーネーションのゲノム解読に成功したので、その成果について紹介する。

1. 花き研究所におけるカーネーション研究

カーネーションは国内で毎年6万本が消費されるほど人気の高い品目であり、世界的にもキク、バラと並んで生産が多い3大切り花の一つである。国内の栽培は年々減少傾向にあり、コロンビアや中国といった産地で大規模かつ低コストに栽培された海外からの輸入品におかれ、流通量の50%以上が輸入品で占められている。花き研究所では、こうした現状を打破し、輸入品に対抗する

ための方策の一つとして、病害抵抗性や日持ち性といった評価に時間がかかり、従来法では取り組みの難しい新しい形質をターゲットにした日本オリジナル品種の開発という育種面からのアプローチを試みてきた。2005年には従来品種の3倍長持ちする「ミラクルルージュ」、[「ミラクルシンフォニー」]を育成した（小野崎 2006）。また、2010年にはカーネーションの重要病害である萎凋細菌病抵抗性育種に組み込み、15年以上の歳月をかけて交配と選抜を繰り返し、野生種 *Dianthus capitatus* ssp. *andrzejoskianus* 由来の抵抗性を導入した「花恋ルージュ」を育成した（八木ら 2010）。そのような評価に時間のかかる育種を効率化するため、萎凋細菌病抵抗性の選抜DNAマーカーの開発（Onozaki *et al.* 2004）、カーネーションで初めての連鎖地図作成（Yagi *et al.* 2006）、汎用性の高いSSRマーカーによる連鎖地図の作成（Yagi *et al.* 2012; 2013）、発現遺伝子情報の網羅的収集（Tanase *et al.* 2012）などのゲノム研究基盤を育種と並行して整備してきた。

2. カーネーションの全ゲノム解読

(1) 参画機関

今回の解読は花き研究所、かずさDNA研究所、東京農工大学、サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社の産官学の4機関が共同して行った。かずさDNA研究所は千葉県の研究機関でありながら、日本から唯一シロイヌナズナのゲノム解読国際コンソーシアムに参画し、大きな成果を上げるとともに、近年では、トマトや食用のイチゴのゲノム解読に成功するなど、植物のゲノム研究に多大な実績を有している。カーネーションに関しては、「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」において「先端ゲノ

ム解析技術を利用した高度品種識別システムの開発」の中で、カーネーションのDNA品種識別データベースを構築している。東京農工大学の小関教授のグループは、カーネーションの主要な色素であるアントシアニンの生合成経路の遺伝子の単離やカーネーションの有する多様な模様へのトランスポゾンの関与について世界的な成果をあげている。サントリーでは、近年、不可能の代名詞であった「青いバラ」の開発に成功し、その過程では世界で初めて遺伝子組み換え技術による青色色素のデルフィニジンを含むカーネーション「ムーンダスト」を開発し、実用化している。これまでにない青みを持つカーネーションは、カーネーションに新たな需要をもたらした。

今回、これらカーネーション研究に関わりを持つ日本の研究機関が、カーネーション研究に新たな転換をもたらすことを目的に結集し、ゲノム解読に取り組んだ。

(2) ゲノム解読した品種「フランススコ」

今回の解読では、日本の赤色カーネーションの代表的品種である「フランススコ」(図-1)を用いた。カーネーションは品種の入れ替わりが早く、早いものは2~3年で新しい品種へと更新されるが、「フランススコ」は、もともとイタリアで育種が行われ、1988年に日本で品種登録された。現在でも広く栽培が行われており、これほど長い



図-1 ゲノム解読した品種「フランススコ」

期間栽培が行われている品種は、カーネーションの中では数少ない。開花や生理的な特性など基本的なカーネーションの特徴を備えていることから、花き研究所では次世代シーケンス解析による発現遺伝子の網羅的収集とカタログ化を行い、基盤となる情報を整備していた (Tanase *et al.* 2012)。

(3) 配列データの収集

塩基配列の解読を行うための機械であるシーケンサーの発達は目覚ましく、2006年ごろに誕生した当時は次世代型と呼ばれていたが、その後、著しい改良が進んでおり、現在では、数千円におよぶ配列が決定可能な第3世代型と呼ばれる1分子リアルタイムシーケンサーや、光以外の検出方法を用いる第4世代型が誕生しており、今後も情報量の拡大、高速化、低コスト化、機械の小型化が進むと期待されている。今回は、普及が最も進んでいる2種類の第2世代型のシーケンサー Hiseq1000 (イルミナ社) とGS FLX+ (ロシュ社) を用いた。Hiseq1000は読み取り長が100bp前後と短い、一度の解析でおよそ300Gb (ヒトゲノム100人分に相当) と多量の情報が収集可能である。GS FLX+は一度の解析で得られるデータは700Mbと少ないが、読み取り長が700bpと長く、解析精度の向上に有効である。

「フランススコ」の葉片からDNAを抽出し、断片長の異なる各種ライブラリーを作成した。Hiseq1000を用いて4種類のライブラリー (180bpのオーバーラッピングフラグメント (OF), 500bpのペアエンド (PE), 3kb, 5kb メイトペア (MP)) を、GS FLX+を用いて2種類のライブラリー (シングルエンド (SE), 4kbペアエンド (PE)) を解析した。最終的に各ライブラリーから収集したデータは、152.6Gb (OF), 127.7Gb (PE), 44.3Gb (3kb-MP), 47.5Gb (5kb-MP), 3.9Gb (SE) および589Mb (4kb-PE) であり、合計したゲノム配列は推定ゲノムサイズの604倍に相当する376.6Gbであった。

ゲノムサイズに関して、k-merの解析と呼ば

れる多数の配列の中から繰り返し読み取られる配列の頻度分布から推定する手法を用いて解析した結果、「フランセスコ」のゲノムサイズは622Mbであった。これまでフローサイトメーターを用いた解析では、異なる品種であるが、611Mb (<http://data.kew.org/cvalues/>) や685Mb (Agulló-Antón *et al.* 2013) などと報告により幅があったが、今回の解析で信頼性の高い新たな指標となりうる数値が得られた。

カーネーションのようなヘテロ性が存在している配列データを統合するための定法となる手法はまだ確立されていない。そのため、今回の解析でも様々なプログラムを組み合わせ、試行錯誤により最適化を図った。最終的に、各ライブラリーをNewbler, SOAPdenovo2, FERMI, ALLPATHSという4種類のプログラムを組み合わせアセンブルを行った結果、コンティグと呼ばれる、ほぼ完全なつながりをもつ88,654個の配列と、スキャフォールドと呼ばれる未読の

配列を含む45,088個の配列が得られた。スキャフォールド配列をつなげた総延長は568.9Mbに達し、これは推定ゲノムサイズの91%に相当する量である(表-1)。最も長いスキャフォールドは1.28Mbであり、ゲノム解読の結果を評価する指標の一つであるN50サイズは60.7kbであった。この結果から、今回のゲノム解読で十分な情報量が得られたと考えられた。

さらにゲノムの特徴を評価するためにRepeatMasker, TransposonPSIの各プログラムを用いて、配列に含まれる繰り返し配列を解析した。その結果、今回のゲノム配列には33%に相当する165Mbの繰り返し配列が存在していた(表-2)。中身としてはRNA型のクラス1の転位因子93,924個、DNA型のクラス2の転位因子18,154個、SSR(単純反復配列)295,621個などであった(表-2)。東京農工大学のこれまでの研究から、カーネーションの多様な模様形成にはトランスポゾンが関与していることが明らかになっている

表-1 カーネーション「フランセスコ」から収集したゲノム配列情報

	コンティグ ¹⁾	スキャフォールド ²⁾
数	88,654	45,088
総塩基長 (Mb)	500.2	568.9
N50 ³⁾ (bp)	16,644	60,737
最大長 (kb)	363	1,287
GC含量 (%)	36.3	-

¹⁾ 解読不能な塩基配列(ギャップ)を含まない一続きのDNA配列。

²⁾ ギャップを含んだ一続きのDNA配列。

³⁾ 配列を長い順に並べて上から順に足し、全体の長さの半分(50%)に達した時の配列の長さ。解読結果を評価する指標の一つ。

表-2 カーネーション「フランセスコ」に含まれる繰り返し配列

分類	数	長さ (Mb)	反復配列中の割合 (%)	全ゲノムにおける割合 (%)	
転位因子	クラス1 レトロトランスポゾン型 (LTR、SINE、LINE等)	93,924	40.0	24.2	8.0
	クラス2 DNA型トランスポゾン等	18,154	4.4	2.7	0.9
	その他	48	0.02	0.01	0.004
	縦列反復	SSR、低複雑度配列等	354,632	20.4	12.5
未分類	新規	331,831	100.1	60.6	20.0
	計	798,589	165	100.0	33.0

(Itoh *et al.* 2002; Sasaki *et al.* 2012; Momose *et al.* 2013a)。「フランセスコ」のゲノム配列の中から、DNA型のトランスポゾンの一つであるCACTA型の*dTad1*やRNA型の*Ty1*と類似したトランスポゾンを探査した結果、すべての配列に1または数塩基の変異が挿入されていた。このことは、動くために必要なトランスポゼースを合成できなくなる、あるいはトランスポゼースが認識するトランスポゾンの末端の塩基配列に突然変異が入ってトランスポゼースが認識できなくなっていることを意味しており、すなわち、本来動くはずのトランスポゾンが「フランセスコ」では動けなくなっているという特徴が明らかになった。トランスポゾンは、育種の過程で多様なカーネーションを作り出すために積極的に使われてきた一方で、栽培の過程で勝手に動き出して変異が生じてしまっただけで、商品として成り立たないため、育種家が無意識あるいは意図してトランスポゾンが動かない個体を選抜したのではないかと推察された。このことから「フランセスコ」のトランスポゾンは動かないという特徴が、数万本の苗を生産したとしても変異を生じないという特徴につながり、これほど長い間安定して生産あるいは栽培されてきたのではないかと一つの可能性が示唆された。

3. 遺伝子領域の解析

収集したゲノム配列の中から意味のある情報がコードされていると考えられる遺伝子の領域の推定を行った。これまでに収集してきた発現遺伝子の情報を総合し、PASAおよびAugustusの各プログラムを用いて遺伝子領域を推定した結果、43,266カ所の遺伝子領域を明らかにした。各種代謝経路の遺伝子についてKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome) マッピング等により他の植物種と比較解析した結果、カーネーションに含まれると考えられる遺伝子のほとんどが今回の解析で明らかにできたと推定された。

(1) 色素生成関連遺伝子

カーネーションの花色はアントシアニンにより発現する。「フランセスコ」の色素分析の結果、主要な色素はペラルゴニジン3-マリルグルコサイド (Pg3mG) であった。これまでの報告から、この色素を含むカーネーションではアシルグルコース依存型アントシアニン糖転移酵素 (AA5GT) とフラボノイド3'-水酸化酵素 (F3'H) 遺伝子が変異し、機能が失われていることが考えられた (Nishizaki *et al.* 2011; Momose *et al.* 2013b)。そこで、「フランセスコ」の両遺伝子の配列を確認した結果、確かにF3'Hへの1塩基の挿入が確認され、フレームシフトにより遺伝子の機能が失われていること、また、AA5GTにはレトロトランスポゾンTydic1が挿入され、遺伝子が機能していないことが明らかになった。このように遺伝子における1塩基の変異も確認できたことから、今回のゲノム解読のデータの精度の高さをあらためて実感することができた。

近年、キク、バラ、トルコギキョウといった主要な花きにおいては、緑色の品種が誕生し、欠かせない花色の一つになっている。緑色の花色は、通常は花卉の発達に伴って消失するはずのクロロフィルがその後も残存することでその色を呈する。また、カーネーションの黄色の発色はフラボノイドの一種カルコンによるものであり、カーネーションにはカロテノイドを多く蓄積した濃黄色品種が存在しない (Ohmiya *et al.* 2013)。今回、ゲノム配列の中から、クロロフィルおよびカロテノイドの合成、代謝、分解に関係する遺伝子を探査した結果、これらに関わると考えられる遺伝子は全て含まれていた。これまでの発現遺伝子の情報からでは得られなかったカロテノイドの分解に関わるカロテノイド分解酵素 (CCD) 遺伝子についても、新たに特定することができた。花き研究所では、現在、カーネーションの花におけるクロロフィルおよびカロテノイドの制御機構の解明に取り組んでおり、今回のゲノム解読でその研究の前進が期待される。

(2) エチレン関連遺伝子

カーネーションの花持ち性にはエチレンが重要な働きをしている。今回の解読でエチレンの合成系に関しては、これまでに報告されていないACC合成酵素 (ACS) 遺伝子が6個, ACC酸化酵素 (ACO) 遺伝子が4個, ゲノム上に存在することが明らかになった。また, CTRやEIN2, EIN3といったエチレンの伝達系に関わるホモログ遺伝子も新たに明らかにした。花き研究所が育成した従来品種より花持ち性の3倍優れる品種「ミラクル」シリーズは, 老化時に発生するエチレンが極めて少ないことが明らかになっているが, その原因となる遺伝子は明らかになっていない。今回の解読で新たに見つかった遺伝子の機能解析を進めることで, 興味深い特徴を有するこれらの品種や系統の機構解明に迫りたいと考えている。

(3) 病害抵抗性遺伝子

病害抵抗性はカーネーションの重要な育種目標の一つである。カーネーションでは, かつての主力品種であったシム系品種群からフザリウム菌による萎凋病に抵抗性をもつ地中海系品種群に置き換わった歴史がある。病害抵抗性はR(Resistance)遺伝子に支配されており, 多くがNBS (nucleotide-binding site) やLRR (leucine-rich repeat) といった特徴的なモチーフをもつことが知られている (Marone *et al.* 2013)。今回の解読で, ゲノム中にNBSを含む217種類の遺伝子を見つけることができた。また, 多くの植物でR遺伝子の多くは, ゲノム中でタンデム (縦列) に並び, 集中して存在する場所が存在することが知られている。カーネーションでも同様の傾向が認められ, およそ3割にあたる61個の遺伝子が8つのスキヤフォールドに含まれていた。花き研究所では野生種の抵抗性を利用した萎凋細菌病抵抗性品種「花恋ルーージュ」を育成しているが, その原因遺伝子はまだ明らかになっていない。現在, BAC (大腸菌人工染色体) ライブラリーを作成して遺伝子単離に取り組んでおり, 本ゲノム情報を活用することで, 早期の原因遺伝子の単離が期待される。

(4) 花卉の展開

バラやトルコギキョウの研究から, がくが緩んで花が満開に至る過程において, XTH (xyloglucan endo-transglucosylase/hydrolase) という遺伝子が重要な働きをしていることが知られている (Yamada *et al.* 2009; Ochiai *et al.* 2013)。XTHはキシログルカンという多糖分子のつなぎ変え反応, または切断反応を触媒し, 細胞壁の構築や再編過程で中心的な役割を担うタンパク質ファミリーである。今回, カーネーションのゲノムには32個のXTH遺伝子が存在することを初めて明らかにした。そのうち11個は組織での遺伝子の発現が確認されている。従来の花持ち性は, 花の満開からしおれるまでの老化に至る過程を中心に研究が取り組まれてきたが, つぼみから満開に到るまでの花の展開をコントロールすることができれば, つぼみからしおれまでのトータルの観賞期間を延長したカーネーションの作出が期待される。

(5) 香り

カーネーションには「ジャコウナデシコ」の別名があるように, 昔は香水や料理の香りづけに利用されていたことが知られている。ところが現在のカーネーションは香りをイメージすることができないほど香りの弱い品種がほとんどである (Kishimoto *et al.* 2011, 2013)。「フランススコ」は主要な香氣成分として安息香酸メチルを含んでいる。これらの合成の鍵となる遺伝子として, SABATHファミリーに属するメチル基転移酵素をコードする遺伝子があげられ, 今回のゲノム解析で11個を明らかにした。今後は, これらの遺伝子の機能を一つずつ明らかにしていくことで, カーネーションの香りを強めるきっかけとなる遺伝子が見つかるのではないかと期待される。

4. 今後の展望

これまではシロイヌナズナやイネといったゲノム情報が蓄積した植物の配列をもとに遺伝子単離を行う必要があり, 遺伝子の特定には非常に時間がかかった。今回の解読により候補となりうる遺

伝子は明らかになったことから、原因遺伝子の特定も大きく進むと考えられる。花き研究所で育成した品種「ミラクル」シリーズや「花恋ルージュ」は育成までに10年、15年と非常に長い年月がかかっている。これは、花持ち性や病気の抵抗性は見た目では判断ができず、評価のために時間がかかるからである。ゲノム情報を活用し、原因となる遺伝子が特定できれば、DNAを抽出するだけで目的の特性の評価が可能になることから、これらの評価が小さな苗の段階で可能になり、品種の育成がスピードアップすることが期待される。

カーネーションは大きな分類ではナデシコ目に含まれる。ナデシコ目の植物のほとんどは、主要な色素としてベタレインを含んでいる。例外的にカーネーションを含むナデシコ科、スターチスのイソマツ科、ザクロソウ科のみにアントシアニンが存在する。アントシアニンを作る植物はベタレインを作らず、ベタレインを作る植物はアントシアニンを作らない、という排他的な機構が植物学の謎の一つとされている。偶然にも、我々がカーネーションのゲノム解読を論文公表した翌日に、

同じナデシコ目でヒユ科に属するテンサイのゲノムが公表された (Dohm *et al.* 2013)。テンサイはベタレインを蓄積することから、これら2つのゲノムを比較することで、この謎に迫れるかもしれない。

今回得られた全ての配列情報はデータベースにまとめ、公開している (<http://carnation.kazusa.or.jp>)。配列をクエリにしたBlast検索やアノテーション情報を基にしたキーワード検索が可能である (図-2)。非常に使いやすいデータベースであると自負しているのでは非、積極的にご活用いただきたい。

5. おわりに

カーネーションのゲノム解読は実際の開始は2012年の10月ごろであり、1年余りという非常に短期間でゲノムデータの公表に至ることができた。これは、かずさDNA研究所のゲノム解読における技術力の高さと、4つの研究機関がうまく連携を図りながら、これまでの実績を活かして配列の詳細な解析を効率的に行った結果である。シーケンサーやコンピューターなど機械の進歩は

The image shows two side-by-side screenshots of the Carnation DB website. The left screenshot is the home page, featuring the title 'Carnation DB' at the top, navigation tabs for 'HOME', 'BLAST', 'LIST', and 'DOWNLOAD', and a 'Keyword Search' section with input fields for keywords and options for 'Without transposons', 'Case sensitive', and 'Include Word'. Below this is a 'Sequence Cut' section with 'Scaffold ID' and 'Start/End' fields, and a 'Reference' section listing authors and the publication 'Sequence Analysis of the Genome of Carnation (Dianthus caryophyllus L.)'. The right screenshot is the 'Blast Search' interface, showing options for 'nucleotide databases' (Genome Assembly sequences, Repeat sequences, ORF sequences, ORF sequences without transposons) and 'protein databases' (translated ORF sequences, translated ORF sequences without transposons). It also includes a 'Search program' section with radio buttons for BLASTN, BLASTP, TBLASTN, and TBLASTX, and a 'Number of search results' section with input fields for 'one-line descriptions' and 'alignments'.

図-2 カーネーションゲノムデータベースのホーム画面 (左) と BLAST 検索画面 (右)

日進月歩であり、それに対応するソフトやプログラムも様々な種類が開発され、一人の研究者あるいは単独の機関で対応するには非常にハードルが高い状況である。そのため、強みを活かした連携が重要であり、特に花き分野のようなそもそも研究勢力に乏しい分野では積極的に連携していくことがますます重要であると思われる。今後は、身近な実用植物のゲノム解読が完了し、基本となる配列データが整備され、個体間のレベルで全ゲノム領域を比較することが可能な時代が到来した。情報をうまく活用し、効果的に研究を進めるためには、研究の発想と手法の転換が求められる。

引用文献

- Agulló-Antón, M.Á., E. Olmos, JM. Pérez-Pérez and M. Acosta 2013. Evaluation of ploidy level and endoreduplication in carnation (*Dianthus* spp.). *Plant Sci.* 201-202, 1-11.
- Dohm, JC., AE. Minoche, D. Holtgräwe, S. Capella-Gutiérrez, F. Zakrzewski, H. Tafer, O. Rupp, TR. Sörensen, R. Stracke, R. Reinhardt, A. Goesmann, T. Kraft, B. Schulz, PF. Stadler, T. Schmidt, T. Gabaldón, H. Lehrach, B. Weisshaar and H. Himmelbauer 2014. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature* 505, 546-549.
- Itoh, Y., D. Higeta, A. Suzuki, H. Yoshida and Y. Ozeki 2002. Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol.* 43, 578-585.
- Kishimoto, K., M. Nakayama, M. Yagi, T. Onozaki and N. Oyama-Okubo 2011. Evaluation of wild *Dianthus* species as genetic resources for fragrant carnation breeding based on their floral scent composition. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80, 175-181.
- Kishimoto, K., M. Yagi, T. Onozaki, H. Yamaguchi, M. Nakayama and N. Oyama-Okubo 2013. Analysis of scents emitted from flowers of interspecific hybrids between carnation and fragrant wild *Dianthus* species. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82, 145-153.
- Marone, D., MA. Russo, G. Laido, AM. De Leonardis and AM. Mastrangelo 2013. Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7302-7326.
- Momose, M., Y. Itoh, N. Umemoto, M. Nakayama and Y. Ozeki 2013a. Reverted glutathione *S*-transferase-like genes that influence flower color intensity of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) originated from excision of a transposable element. *Breed. Sci.* 63, 435-440.
- Momose, M., M. Nakayama, Y. Itoh, N. Umemoto, T. Toguri and Y. Ozeki 2013b. An active *hAT* transposable element causing bud mutation of carnation by insertion into the *flavonoid 3'-hydroxylase* gene. *Mol. Genet. Genomics* 288, 175-184.
- Nishizaki, Y., Y. Matsuba, E. Okamoto, M. Okamura, Y. Ozeki and N. Sasaki. 2011. Structure of the acyl-glucose-dependent anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase gene in carnations and its disruption by transposable elements in some varieties. *Mol. Genet. Genomics* 286, 383-394.
- Ochiai, M., S. Matsumoto and K. Yamada 2013. Methyl jasmonate treatment promotes flower opening of cut *Eustoma* by inducing cell wall loosening proteins in petals. *Postharvest Biol. Technol.* 82, 1-5.
- Ohmiya, A., K. Tanase, M. Hirashima, C. Yamamizo and M. Yagi 2013. Analysis of carotenogenic gene expression in petals and leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.).

- Plant Breed. 132, 423-429.
- Onozaki, T., N. Tanikawa, M. Taneya, K. Kudo, T. Funayama, H. Ikeda and M. Shibata 2004. A RAPD-derived STS marker is linked to a bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) resistance gene in carnation. Euphytica 138, 255-262.
- 小野崎 隆・池田広・柴田道夫・谷川奈津・八木雅史・山口隆・天野正之 2006. 花持ち性の優れたカーネーション農林1号 ‘ミラクルルージュ’ および同2号 ‘ミラクルシンフォニー’ の育成経過とその特性. 花き研報 5, 1-16.
- Sasaki, N., Y. Nishizaki, Y. Uchida, E. Wakamatsu, N. Umemoto, M. Momose, M. Okamura, H. Yoshida, M. Yamaguchi, M. Nakayama, Y. Ozeki and Y. Itoh 2012. Identification of the *glutathione S-transferase* gene responsible for flower color intensity in carnations. Plant Biotechnol. 29, 223-227.
- Tanase, K., C. Nishitani, H. Hirakawa, S. Isobe, S. Tabata, A. Ohmiya and T. Onozaki 2012. Transcriptome analysis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) based on next-generation sequencing technology. BMC Genomics 13, 292.
- Yagi, M., T. Onozaki, M. Taneya, H. Watanabe, T. Yoshimura, T. Yoshinari, Y. Ochiai and M. Shibata 2006. Construction of a genetic linkage map for the carnation by using RAPD and SSR markers and mapping quantitative trait loci (QTL) for resistance to bacterial wilt caused by *Burkholderia caryophylli*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75, 166-172.
- 八木雅史・小野崎隆・池田広・谷川奈津・柴田道夫・山口隆・棚瀬幸司・住友克彦・天野正之 2010. 萎凋細菌病抵抗性カーネーション ‘花恋ルージュ’ の育成経過とその特性. 花き研報 10, 1-10.
- Yagi, M., T. Kimura, T. Yamamoto, S. Isobe, S. Tabata and T. Onozaki 2012. QTL analysis for resistance to bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) in carnation (*Dianthus caryophyllus*) using an SSR-based genetic linkage map. Mol. Breed. 30, 495-509.
- Yagi, M., T. Yamamoto, S. Isobe, H. Hirakawa, S. Tabata, K. Tanase, H. Yamaguchi and T. Onozaki 2013. Construction of a reference genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). BMC Genomics 14, 734.
- Yamada, K., R. Takahashi, C. Fujitani, K. Mishima, M. Yoshida, DC. Joyce and S. Yamaki 2009. Cell wall extensibility and effect of cell-wall-loosening proteins during rose flower opening. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78, 242-251.