

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2016

課題番号：24405022

研究課題名(和文) ユーラシア・北米のハスカップ野生遺伝資源の多様性解析と評価に関する研究

研究課題名(英文) Study on genetic diversity and evaluation of genetic resources of Haskap in Eurasia and North America

研究代表者

星野 洋一郎 (HOSHINO, Yoichiro)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：50301875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：ハスカップを対象に、DNAマーカーを使用した遺伝的多様性およびフローサイトメーターによる倍数性変異およびDNA含量の変異について解析を行った。中国東北部およびロシアのハスカップを解析したところ、中国のハスカップは二倍体、ロシアのハスカップからは二倍体と四倍体に加え、五倍体が見つかった。AFLPマーカーによる多型解析の結果、概ね地理的分布と種の分類を反映したクラスターが形成された。葉緑体ゲノムの解析を加えると、中国東北部および極東ロシアのハスカップは遺伝的多様性に富んでいると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Genetic diversity using DNA markers and ploidy variation as well as DNA content variation by flow cytometry were analyzed for Haskap (*Lonicera caerulea*). Analysis of the genetic resources in northeast China and Russia revealed that the Chinese accessions were diploid, and Russian accessions were diploid and tetraploid. Unexpected pentaploid was found in Russian accession. As a result of polymorphism analysis by AFLP markers, clusters reflecting geographical distribution and classification of species were obtained. In addition to the analysis of the chloroplast genome, it was considered that the genetic resources of northeastern China and Far East Russia include high genetic diversity.

研究分野：園芸学

キーワード：植物遺伝資源 遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

ハスカップ(和名クロミノウグイスカグラ)は、スイカズラ科(Caprifoliaceae)、スイカズラ属(*Lonicera*)の植物で、その果実は食用となり小果樹として栽培されている。ハスカップという名称はアイヌ語の『木の上にたくさん実るもの』の意味に由来している。ハスカップの分類は混乱が見られ、クロミノウグイスカグラ(*Lonicera caerulea* L. var. *emphylllocaryx*)、ケヨノミ(*L. caerulea* L. var. *edulis*)、ヒロハヨノミ(*L. caerulea* L. var. *glabrescens*)、ホソバヨノミ(*L. caerulea* L. var. *salicifolia*)、マルバヨノミ(*L. caerulea* L. var. *venulosa*)があるが、ヒロハヨノミ、ホソバヨノミ、マルバヨノミの区別は不明瞭であり、栽培されているものの大部分はクロミノウグイスカグラであると考えられている(渡辺ら, 1996)。自生地は、日本、中国北部、朝鮮、ロシア、タジキスタン、キルギス、カザフスタンおよびヨーロッパのスカンジナビアやアルプス、北アメリカである(Plekhanova, 2000)。国内では、北海道をはじめ、栃木、山形、秋田、静岡、長野など本州の中部以北の高冷地に自生する。北海道では、夕張岳・利尻島・日高山脈などの高山帯や、知床半島・十勝・釧路・根室などの湿原、苫小牧の勇払原野の湿原に分布していることが確認されており(中嶋, 1996)、とくに勇払原野ではハスカップの大群生地がみられる。

申請者のグループのこれまでの研究で、国内のハスカップには二倍体と四倍体の倍数性変異があること、二倍体は北海道東部の釧路湿原・別寒辺牛湿原周辺のごく一部に分布していること、四倍体は広く分布し、DNA含量にも変異が見られその含量が標高と負の相関があることを示してきた(Miyashita et al. 2011)。

世界のハスカップの分布については、Plekhanova et al. (1992) の情報がこれまで

最も詳細なものである。Plekhanova博士はロシア連邦・サンクトペテルブルグのバビロフ研究所で長くハスカップの遺伝資源収集の研究を行ってきた。バビロフ研究所のハスカップコレクションは世界最大と目され、現在も収集活動が行われて、採集領域はユーラシア全体に及んでいる。

一方、北米の遺伝資源についての体系的な報告例はなく、現在、カナダ・サスカチュワン大学の研究者が遺伝資源探索を続けている。北海道のハスカップは、ユーラシア、北アメリカと食味の点で異なり、育種素材としての優秀性が指摘されている。ハスカップの遺伝資源の現況について、以下のように要約することができる。

(1) 環境変動・開発のものとハスカップの遺伝資源は急速に失われつつある

(2) 各地域における保存が急務

(3) 保全のためには遺伝資源の系統解析、倍数性変異の解析を行い、遺伝資源を評価できる情報を蓄積する必要がある

(4) 各地域のハスカップの遺伝資源について分子マーカーを用いて比較し、進化・伝播について議論する必要がある

以上の現況を踏まえ、本申請課題であるユーラシア・北米のハスカップ野生遺伝資源の多様性解析と評価に関する研究を立案した。

2. 研究の目的

ハスカップはベリー類として貴重な植物遺伝資源の一つであるが、世界的にその全体像は把握されておらず、環境変動下でその野生遺伝資源が失われつつあるのが現状である。野生種のハスカップ(*Lonicera caerulea*)は北半球の温帯から亜寒帯に分布し、倍数性の変異があることが知られている。本研究ではハスカップの遺伝資源について、ユーラシアおよび北米のハスカップの分布域と倍数性変異を明らかにする計画である。また、分子マーカーを用いた系統解析を行い、各地域

のハスカップの類縁関係と多様性について解析を行い、遺伝資源の保全と育種素材としての利用のためのデータを蓄積することを目的としている。

3. 研究の方法

ユーラシア（主に中国、ロシア連邦）および北アメリカのハスカップ野生遺伝資源について、フローサイトメーターによる倍数性調査およびDNA マーカーを用いた系統解析を行った。フローサイトメーターについては、Partec社のプロイディーアナライザー（PA）を用いた。核の染色には、DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）を使用し、サンプルの葉を核抽出バッファー中で刻み、30 μm のナイロンメッシュで夾雑物を取り除いた後、DAPI 溶液で染色し、プロイディーアナライザーで測定した。内部標準としてピーマンの品種‘京波’の葉を使用し、ハスカップのサンプルの葉と同時に刻んでプロイディーアナライザーで測定した。ハスカップと内部標準のピーマンの品種‘京波’の蛍光強度の比率を算出し、各サンプルのDNA 含量を比較した。倍数性の判定については、ハスカップの二倍体を対照としてプロイディーアナライザーで測定した蛍光強度から推定した。

DNA マーカーについては、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) を用いることとし、トレーニング集団としてイチゴ属植物のサンプルを用いて多型検出の技術開発を行った。AFLP による多型検出の手法を確立後、各地域のハスカップのサンプルについて AFLP マーカーによる系統解析を行った。また、ハスカップは倍数性の変異があることが分かっていたので、母系を辿ることができる細胞質ゲノムの解析を行い、多型のある細胞質ゲノムの領域について探索を行った。葉緑体ゲノムをターゲットとして、他の植物種において多型が頻出する領域を推

定してプライマーを設計し、DNA シーケンスすることにより多型の検出を試みた。

4. 研究成果

中国黒竜江省東北農業大学、黒竜江省森林工業総務局の強力を得て、中国東北部のハスカップ遺伝資源の探索を行った。また、ロシア連邦・バビロフ研究所より分譲を受けた *Lonicera* 属数種（*L. boczkarnikovae*, *L. edulis*, *L. altaica*, *L. caerulea*, *L. kamschatika*, *L. pallasii*, *L. stenantha* および *L. emphylocalyx*）を研究対象に加えた。北アメリカのサンプルについては、アメリカ合衆国オレゴン州の農務省 National Clonal Germplasm Repository を訪問し、ハスカップ野生遺伝資源の入手について打ち合わせを行ったが、サンプルを得ることができなかった。

フローサイトメーターによる中国東北部のハスカップの倍数性調査では、調査したサンプル全てが二倍体であった。日本で頻出する四倍体は見出されなかった。入手した中国東北部の二倍体のサンプル間では、約 8% の DNA 含量の変異が見られた。

ロシア連邦・バビロフ研究所に由来する *Lonicera* 属数種の倍数性調査では、*L. boczkarnikova* および *L. edulis* は調査に用いた全系統が二倍体、*L. caerulea*, *L. kamschatika*, *L. pallasii*, *L. stenantha* および *L. emphylocalyx* は四倍体と推定された。*L. altaica* については、調査した 10 系統中 9 系統が四倍体だったが、1 系統が五倍体と判定され、これまで知られている二倍体と四倍体以外の倍数性個体が存在することが分かった。倍数性の変異を再現するために、日本のハスカップの二倍体と四倍体を出発点として、コルヒチン処理と倍数体間交雑を行った。その結果、三倍体、五倍体、六倍体、八倍体を誘導することができた。この結果は、低頻度ながら倍数体間交雑により雑種

が形成され、倍数性変異が誘導される可能性があることを示唆するものである。

キイチゴ属植物を対象とした AFLP 解析の結果から、AFLP マーカーが既知の分類体系を反映した多型を示すことが分かり、系統解析に有用な手法であることが分かった。AFLP マーカーを使用して、中国と日本のハスカップサンプルから DNA を抽出し、多型解析を行った。近隣結合法等による系統解析を行ったところ、中国と日本のサンプルは大凡大別され、各クラスター内においては、概ね地理的距離を反映した結果を示した。一方では、日本の栃木県（戦場ヶ原）由来の系統の中には、北海道よりも中国の系統に近いクラスターに位置されたものもあった。このデータは、日本のハスカップは複数の来歴によることを示唆するものと考えられた。

ロシア連邦・バビロフ研究所に由来するハスカップのサンプルの AFLP 解析の結果、5 つのクラスターに分かれた。概ね種の分類を反映したものになっていたが、複数の種を内包したクラスターもあった。*L. edulis* については、個体毎に異なるクラスターに分かれたことから、遺伝的多様性が大きいことが示唆された。

細胞質ゲノムの解析については、葉緑体ゲノムの配列中に 26 塩基を一つの単位とする反復配列を検出することができた。反復の回数により、ハプロタイプ I~IV と名付け、各地域のハスカップを解析した。中国のハスカップ系統はハプロタイプ I、ロシア、日本（北海道）のサンプルからはハプロタイプ II が見つかった。ユーラシアには、ハプロタイプ II が最も広範に見出された。また、日本の北海道と本州では、異なるハプロタイプの系統があることが分かった。

以上の研究結果から、ユーラシアのハスカップの遺伝的多様性および倍数性変異の様相の一端を明らかにすることができた。日本に分布するハスカップは、北海道と本州のも

ので異なる遺伝的背景を持つことが示唆された。より低次の倍数性のものが起源と想定すると、中国東北部および極東ロシアのハスカップが遺伝的多様性に富んでいると考えられる。本研究により、ハスカップの分布と伝播を考察する上で興味深い知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Miyashita T., Kunitake H., Yotsukura N., Hoshino Y. (2015) Assessment of genetic relationships among cultivated and wild *Rubus* accessions using AFLP markers. *Scientia Horticulturae* 193: 165-173 (査読有)

Miyashita T., Hoshino Y. (2015) Interploid and intraploid hybridizations to produce polyploid Haskap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) plants. *Euphytica* 201:15-27 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

平井涼太・星野洋一郎、ハスカップの二倍体野生集団の果実特性と遺伝的多様性の解析 園芸学研究 第 15 号別冊 2 号 (園芸学会・2016 年 9 月 11 日)(名城大学・愛知県名古屋市)

松本 彩・Artem Sorokin・星野洋一郎、フローサイトメトリーと AFLP マーカーを用いたユーラシアのハスカップの系統解析 園芸学研究 第 14 号別冊 1 号(園芸学会・2015 年 3 月 29 日)(千葉大学・千葉県千葉市)

宮下智弥・星野洋一郎、北海道における
キイチゴ属野生種の自生地調査およびベ
ニバナイチゴの花粉を用いた種間交雑
園芸学研究 第 12 巻別冊 2 号 (園芸学
会・2013 年 9 月 22 日)(岩手大学・岩手
県盛岡市)

石山知美・下田真明・小野寺康之・青木
宣明・叶 玉紅・霍 俊伟・孔 徳剛・
翁 海竜・星野洋一郎 中国および日本
のハスカップ倍数性レベル、DNA 含量変
異および AFLP による多様性解析 園芸
学研究 第 12 巻別冊 1 号 (園芸学会・
2013 年 3 月 24 日) (東京農工大学・東
京都小金井市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

星野 洋一郎 (HOSHINO, Yoichiro)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学セン
ター・准教授

研究者番号 : 5 0 3 0 1 8 7 5