

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660022

研究課題名(和文) 野生ブドウの遺伝資源利用による育種年限短縮に関する研究

研究課題名(英文) Use of wild grape germplasms in Japan to improve breeding efficiency

研究代表者

山下 裕之 (YAMASHITA, Hiroyuki)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：50590923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は無休眠性、四季なり性および一才性の形質を持つ日本原産野生ブドウを利用し育種年限の短縮法を構築するため行った。リュウキュウガネブを種子親に用いれば周年交配が可能となるため短期間に多くの交雑実生を獲得可能で、今回それらの中から無休眠性の中間母本を獲得した。また、沖縄近隣諸島をリュウキュウガネブの調査した結果、大粒、高アントシアニンおよび高レスベラトロールなどを示す優良系統を選抜し、その葉形は高緯度のものほど第1側脈長/主脈長の値が大きくなることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to examine use of wild grape germplasms in Japan, which are short dormant, ever bearing and short juvenile, to improve breeding efficiency of grape. Using Ryuukyuganebu as seed parent made it possible to carry out year round crossing and to obtain many hybrids for short period. Intermediate parents of short dormant grapes were selected in this study. Meanwhile, field surveys were conducted for Okinawa Islands. Ryuukyuganebu was distributed in Kuchinoshima Island widely, especially near the vegetable or crop fields or houses. The leaf-shapes of Ryuukyuganebu in Okinawa, Amami and Tokara islands were almost similar, but the Ryuukyuganebu leaves in the northern habitats trended to have 3 lobes. As breeding material, some elite lines of Ryuukyuganebu were selected based on the berry weight, the berry juice Brix, and content of anthocyanin and resveratrol in the berry skins, from the vines native to Amami Oshima, Okinoerabu island and Okinawa island.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：野生ブドウ リュウキュウガネブ 育種 レスベラトロール 系統保存 休眠 アントシアニン 四季なり性

1. 研究開始当初の背景

気候温暖化は果樹産業にも大きな影響を及ぼしている。ブドウにおいても例外ではなく、夏季の高温によるブドウの着色不良などの果実品質の劣化や光合成能力の低下による樹体衰弱、生育バランスのくずれなどが近年顕著に現れるようになり生食ブドウ産業だけでなくワイン産業にも大きな影響ができてきている。そこで、変動する気候条件の中でも安定した生育と果実品質を示す新たなブドウ品種育成が重要な課題である。

野生ブドウの中には非常にユニークな特性を持ったものも多い。特に、エビヅルには冬季の低温要求量が小さいとともに夏季の高温条件下でも非常に強い着色を示す変種、リュウキュウガネブが知られている。さらにエビヅル、リュウキュウガネブには無限花序ともいえる四季なり性の性質を有している。また近年、早期に幼若相から成木相に入り開花するように改良した一オ物とよばれるヤマブドウやエビヅルが商品化されている。このような野生ブドウに備わる無休眠性、四季なり性、一オ性などの有用形質がこれまで育種に十分に利用されていない現状を鑑みると、これらの形質を利用することはブドウ品種育成の超効率化技術に寄与できると考えた。また、リュウキュウガネブについてはこれまで述べたように多くの有用性が指摘されているが本格的な遺伝資源調査は行われていない。

2. 研究の目的

本研究は日本在来の野生ブドウの特性を利用しブドウ育種年限の短縮を図ろうとするものである。

(1)無休眠性、四季なり性の野生ブドウ リュウキュウガネブを母本とした周年交配と実生育成法の確立

加温温室でリュウキュウガネブ雌株を栽培し周年交配が可能に明らかにする。また、リュウキュウガネブと一オヤマブドウなどの栽培品種を正逆交雑してそれらの親和性を明らかにすると共に実生の育成法を検討する。

(2)一オ性、無休眠性、四季なり性の遺伝様式の解明と全ての形質を導入した中間母本作成

リュウキュウガネブと一オヤマブドウ、一オエビヅル、メルロなどの栽培品種を交雑し、その実生の特性を調査し遺伝様式を推定し更に、それぞれの特性を調査する。また、自生地から採集した果実から自然交配種子を抽出して発芽させ、その実生の特性を調査する。

(3)亜熱帯地域に分布する野生ブドウの自生地(沖縄諸島)の現地調査と優良系統の採取北はトカラ列島から南は与那国島まで沖縄近隣諸島におけるリュウキュウガネブの分布調査および優良系統の探索と果実、穂木、匍匐枝など採取を行う。

(4)収集した系統の栽培性、果実特性(房重、

粒重、着色など)

果皮および果汁における主要成分や機能性成分の調査 採取してきたリュウキュウガネブの果実を調査してその特性を明らかにし、主要成分や機能性成分に優れる系統を選抜する。穂木、匍匐枝などはさし木、定植をしてその生育を調査し、特性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)無休眠性、四季なり性の野生ブドウリュウキュウガネブを母本とした周年交配と実生育成法の確立

栽培条件および供試材料:山梨大学附属農場内(山梨県甲府市)に設置されている年間を通じ最低気温 16℃ に保ったガラス温室内のポットに栽植されたリュウキュウガネブの 2~4 年生挿し木自根苗(株)を用いた。

開花の観察:一週間に約 1~3 回開花状況を観察した。また、開花を発見した後、一オヤマブドウ、一オエビヅル、生食用および醸造用品種と交配を行った。

交配試験:供試したブドウはリュウキュウガネブ、一オヤマブドウ、一オエビヅル、ネヘレスコール、カベルネ・ソービニオン、シャルドネ、マスカット・ベリーA、ヒマラヤ(仮称)で、主にリュウキュウガネブは種子親として用い、他は花粉親として用いたが、カベルネ・ソービニオン、シャルドネ、一オヤマブドウは逆交雑も行った。また、リュウキュウガネブにおいては自生地から採取した自然受粉の種子も使用した。

1 果粒あたりの種子数と健全種子率:2014 年に交配して得られた果粒から種子を取り出し 1 果粒あたりの種子含有数を算出した。水の中に入れて選別し、健全種子率を算出した。

発芽試験:交配後 100~150 日に収穫した果実から種子を取り出し 4℃ で約 3~12 か月間層積貯蔵後 25~27℃ で発芽試験を行った。得られた種子数は交配組み合わせにより異なり約 30~2000 粒であり、それらをパーミキュライトに播種した。発芽後、水耕栽培条件に移植して雑種の獲得数を調査した。

(2)一オ性、無休眠性、四季なり性の遺伝様式の解明と全ての形質を導入した中間母本作成

一オ性:一オヤマブドウおよび一オエビヅルの自然受粉 30 個体、マスカット・ベリーA×一オヤマブドウ 20 個体、リュウキュウガネブ×一オヤマブドウ 20 個体を定植し 2 年間観察した。最終年にリュウキュウガネブ×一オヤマブドウの 5 個体(2 年生)から穂木をとり高接を行った。また、幼木相から過渡相への転換点とされる巻きひげの出現時期を調査した。

四季なり性:実生個体に花芽形成が認められず実施できなかった。

無休眠性:休眠最深期とされている 11 月下旬にリュウキュウガネブを交配親とする個体、リュウキュウガネブ自然交配実生、栽培

品種(カベルネ・ソービニオン、シャルドネ)リュウキュウガネブさし木個体、マスカット・オブ・アレキサンドリアさし木個体の基部を切り戻し最低気温 20 のガラス温室で、30 日間発芽状況を観察した。

自生地から採取した自然交配種子から得られた実生の特性:石垣島、波照間島、与那国島、小浜島に自生している果実から種子を摘出して種子休眠性および実生の芽の無休眠性に関して調査した。調査方法は前述の方法で行った。

(3)亜熱帯地域に分布する野生ブドウの自生地(沖縄諸島)の現地調査と優良系統の採取奄美諸島および沖縄諸島でのリュウキュウガネブの葉、果実と繁殖用枝梢の採取

2014 年度および 2015 年度の秋季に、自生地において形態的に特徴のみられるリュウキュウガネブの葉、果実および枝梢を採取した。葉は、2014 年度はさく葉標本とし、2015 年度は生葉を香川大学に送付した。採取果実は、未熟果実については、山梨大学に送付し、成熟果実を本学にて特性調査に供試した。熟枝は、大阪府立大学で挿木繁殖し、現在、雌系統 12、雄系統 7、雌雄不明の系統 3 を維持しており、今後、同一環境下において特性を比較し、優良系統の選抜を行う。

果皮のアントシアニン分析

2013 年度の鳩間島系統を用いた予備試験をもとに以下の分析を行った。アントシアニンの抽出および分析は Shiraiishi ら (2007) の方法を一部改変して行った。

総アントシアニンの分析

定量した抽出液の一部を光路長 1 mm の石英セルに入れ、波長 530 nm の吸光度を計測し、総アントシアニン含量を求めた。

アントシアニンの HPLC 分析

定量した抽出液の一部を試験管に移し、3000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄み 10 μ l を、フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (SPD-M20A、島津) を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

果皮のレスベラトロール分析

レスベラトロールの抽出と分析は Komai ら (2014) の方法に従って行った。

リュウキュウガネブの分布および葉形調査

トカラ列島~与那国島で自生していたリュウキュウガネブの成木より、1 樹につき 10 枚以上の十分展開した葉を採取し、Galet (1979) の方法で、葉の各部位を測定し、コード化した。

4. 研究成果

(1) 無休眠性、四季なり性の野生ブドウリュウキュウガネブを母本とした周年交配と実生育成法の確立

経過と結果

平成 24 年度 2 年生苗木の時は前年 12 月に花穂を 1 つ形成させたが、その後形成は認められず、平成 24 年 5 月から花穂形成が始ま

り 11 月まで花穂形成は認められたが、それ以降は生育が停滞し、副梢の伸長も認められず、花穂形成は認められなかった。次年度になると 3 月上旬頃から再伸長が始まり 11 月まで花穂形成が認められたが、その後新梢が停止して花穂形成は認められなかった。最終年度は前年同様に 3 月上旬頃から新梢、副梢共に伸長が始まり花芽形成も始まった。その後花穂形成をとめないながら副梢の発芽・伸長も旺盛に行われた。1 月に入ると生長は衰えたが、花穂形成はわずかではあるが行われ再び 3 月上旬から生育が始まった。

以上の結果から冬期間はやや生育、花穂形成は劣るもののリュウキュウガネブを種子親に用いれば一年中、開花して交配が可能であった。

交配、実生育成試験

リュウキュウガネブを種子親とした場合は、どの交配組み合わせにおいても種子含有数は 1.3~3.0/果粒と高くさらに健全種子率も 90%以上と高かった。しかし、発芽率は全体的に低く最も高かったのは、ネヘレスコールを花粉親した組み合わせ (13.2%) で、最も低かったのはマスカット・ベリー A を花粉親とした交配組み合わせであった (0.6%)。カベルネ・ソービニオンと一オヤマブドウなどの逆交雑の場合も同様に種子含有数/果粒、種子健全率は 90%以上と高かったが、発芽率は約 30%と低かった。水耕栽培後の生存率は約 30~70%と交配組み合わせにより異なった。(2) 一オ性、無休眠性、四季なり性の遺伝様式の解明と全ての形質を導入した中間母本作成

一オ性: 一オヤマブドウおよび一オエビツルの自然受粉 30 個体、マスカット・ベリー A \times 一オヤマブドウ 20 個体、リュウキュウガネブ \times 一オヤマブドウ 20 個体を 2 年間定植し、観察したが花芽形成する個体はなかった。そのため遺伝性に関しては調べることができなかった。ただし、最終年に 2 年生実生 (リュウキュウガネブ \times 一オヤマブドウ) 5 個体の穂木をとって高接ぎをしたところ 1 個体で花芽形成が認められた。巻きひげの出現時期は、リュウキュウガネブを種子親とした場合、展葉 9~10 枚あった。通常、10~15 枚程度とされているので幼木相がやや短縮された実生であると考えられる。ただ花粉親に一オヤマブドウ、一オエビツルを用いた実生はネヘレスコールやカベルネ・ソービニオンを種子親に用いた実生と出現時期に顕著な差は認められなかった。

休眠性: コントロールのリュウキュウガネブ挿し木個体では加温後、約 3 週間で発芽が始まった。一方、リュウキュウガネブ \times ネヘレスコールの中にはこれよりも同じ時期が早く発芽を開始する個体が認められた (20 観察固体中 4 個体)。それに対し、甲州など栽培品種の自然交配実生は加温後 3 週間後までに発芽した個体は認められなかった (23 個体中 0 個体)。リュウキュウガネブを交配親に

使用すると休眠が短くなる形質は遺伝することが明らかとなった。

四季なり性: どの組み合わせにおいても花芽形成がなく調査することはできなかった。以上の結果から無休眠性に関して中間母本の候補となる個体が得られた。

自生地から採取した自然交配種子から得られた実生の特性: 低温処理をせず室温に置いた波照間島および小浜島の果実から採取した種子から発芽が認められた。このことからリュウキュウガネブ自然受粉で得られる種子は休眠性が低い可能性が見いだされた。更に硬核期のまだ成熟に達していない緑色の果実からも発芽が認められた。芽の無休眠性に関しては加温開始後リュウキュウガネブ挿し木個体より早く発芽した個体が550個体中92個体、同程度の個体が228個体認められ、合計で330個体であり、全体の約60%の実生においてリュウキュウガネブと同程度に休眠性が浅いか、または、より浅い個体であった。

(3) 亜熱帯地域に分布する野生ブドウの自生地(沖縄諸島)の現地調査と優良系統の採取

果粒重量を調査した結果、知名瀬系統は鳩間島系統には及ばないものの石垣島系統と同等の大きさの果粒を着生する系統であることが明らかとなった(第1表)。現地採取した果実は熟度が大きく異なると思われるが、糖度は屋仁小系統が16.1°と最も高く、大阪府立大学栽培下のリュウキュウガネブと大きな差はなかった。アントシアニン含量は、鳩間島系統を超える系統はみられなかったが、レスベラトロール含量は大粒系の知名瀬系統やNo19系統で高いことが確認された。また、アントシアニンのジグルコシドおよびアシル化体の組成を調べた結果、いずれの系統もマルビジン-ジグルコシドが多く、ついで3位の糖がクマロイル化したマルビジン-ジグルコシドが多かった(データ非掲載)。ただし、同定されたジグルコシド体とアシル化体の組成割合は系統により異なり、特に鳩間系統と類似していたのは屋仁小系統のみであり、これらはクマロイル化したマルビジン-ジグルコシドの割合が高かった。

2015年度採取果実では、成熟果実が得られた久志4'と宇嘉54の2系統について果実品質の調査を行った。その結果、宇嘉54の果粒は非常に大きく、一粒重量は約1gほどであった(第1表)。久志系統の一粒重は350mgと、これまでに確認されている他の系統と比較しても小さい果実であった。糖度は、両者とも約14Brix°であった。果皮のアントシアニン含量は、ともに昨年度の奄美大島系統より高く、また、久志4'より宇嘉の系統の含量が高かった。両系統の果皮のレスベラトロール含量は、前年度の奄美大島系統より高く、また、久志は約75µg/gfwと非常にレベルが高いことが明らかとなった。

ジグルコシド体およびアシル化体アントシアニンの組成をみると、両系統ともマルビ

ジン-ジグルコシド体が最も多かった。また全アントシアニンにおけるジグルコシド体とアシル化体の割合は宇嘉54でやや高く71.3%であったが、屋仁小系統ほどではなく、知名瀬系統と類似した値を示した(データ非掲載)。特に、この2系統は、デルフィニジンとペツニジンのジグルコシド体の割合が多いという特徴が見られた。久志4'系統のアシル化アントシアニン組成は、奄美大島No19系統とほぼ同じであった。

(4) リュウキュウガネブの分布および葉形調査

測定結果を第2表、第3表に記した。いずれもコード番号に大きな違いはなかったが、自生地が北に行くにつれ、3裂片の葉形になる傾向が見られた。また、リュウキュウガネブの代表的な葉形を第1図に示した。ブドウは進化に伴い、葉の主脈長に対して側脈長が相対的に長くなると考えられているので、第1側脈長を主脈長で割った値(A値)を葉の採取場所を緯度別に並べると、採取地が北になるほど値は大きくなった(第2図)。

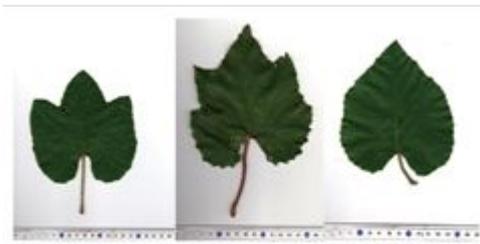
しかし、沖縄本島内では、南部に行くほどその値は大きくなった(第3図)。各図の採取地の番号は、若い番号ほど北に位置する。

第1表 奄美大島および沖縄本島自生のリュウキュウガネブ果実の重量、糖度、果皮アントシアニン含量および果皮のレスベラトロール含量

	果粒重量	Brix°	アントシアニン含量	
			mg/gfw	µg/gfw
大阪府立大学 鳩間島	661.9 ± 29.6	16.5 ± 0.5	2.4 ± 0.1	87 ± 10
大阪府立大学 石垣島	572.3 ± 21.0	17.5 ± 0.3	1.9 ± 0.04	187 ± 24
2014年度 奄美大島 No19	310.6 ± 22.1	13.3 ± 0.2	1.9 ± 0.1	227 ± 7.7
奄美大島 知名瀬	589.9 ± 34.6	11.3 ± 0.4	1.7 ± 0.1	30.9 ± 4.6
奄美大島 屋仁小	307.4 ± 23.3	16.1 ± 0.2	1.5 ± 0.02	3.1 ± 0.5
2015年度 沖縄本島 久志4'	347.6 ± 14.9	14.5 ± 0.4	2.5 ± 0.2	74.6 ± 3.6
沖縄本島 宇嘉54	987.5 ± 35.3	14.1 ± 0.1	4.3 ± 0.1	43.9 ± 5.5

第2表 各離島のリュウキュウガネブの葉形

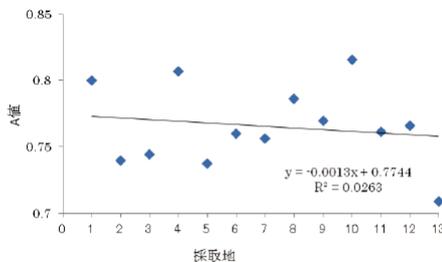
採取場所	ABC-r-S ₁ S ₂
口之島	256-5-22
伊平屋島	246-4-45
野甫島	356-4-46
伊是名島	246-4-34
伊江島	146-5-46
水納島	245-5-58
津堅島	245-5-12
久米島	257-5-33
渡嘉敷島	246-6-02
阿嘉島	246-5-24
慶留間島	246-5-33
石垣島	145-4-24
小浜島	246-4-12
与那国島	246-4-23
波照間島	257-5-23



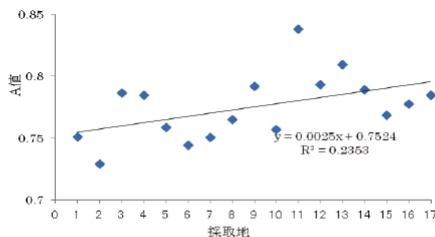
第1図 リュウキュウガネブの葉形

第3表 沖縄本島でのリュウキュウガネブの葉形

採取場所	ABC-r-S ₁ S ₂
国頭村	247-4-13
東村	257-5-12
古宇利島	246-5-12
屋我地島	256-5-12
名護市	257-5-13
宜野座村	257-6-13
金武町	256-5-45
伊計島	246-5-35
宮城島	246-4-35
浜比嘉島	246-5-35
藪地島	145-4-22
うるま市大田	246-5-34
沖縄市	135-4-24
宜野湾市	246-4-24
豊見城市	246-4-24
八重瀬町	246-4-12
糸満市	246-4-34



第2図 各離島のリュウキュウガネブのA値
採取地: 1. 口之島、2. 伊平屋島、3. 伊是名島、4. 伊江島、5. 水納島、6. 津堅島、7. 久米島、8. 波嘉歌島、9. 阿嘉島、10. 石垣島、11. 小浜島、12. 与那国島、13. 波照間島



第3図 沖縄本島内のリュウキュウガネブのA値
採取地: 1. 国頭村、2. 東村、3. 古宇利島、4. 屋我地島、5. 名護市、6. 宜野座村、7. 金武町、8. 伊計島、9. 宮城島、10. 浜比嘉島、11. 藪地島、12. うるま市大田、13. 沖縄市、14. 宜野湾市、15. 豊見城市、16. 八重瀬町、17. 糸満市

<引用文献>

Galet, P. 1979. A practical ampelography. (Morton, L. T. 英訳) . 24-47 . Cornell Univ. Press.

Komai, I., K. Boushita, S. Shiozaki. 2014. Green leaf volatiles affect the resveratrol production stimulated by ultraviolet C irradiation in grape leaf discs. *Vitis*. 53 (3): 133-137.

Shiraishi, M., M. Yamada, Y. Mitani and T. Ueno. 2007. A Rapid Determination Method for Anthocyanin Profiling in Grape Genetic Resources. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 76(1): 28-35.

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 3 件)

1. 望岡亮介. 2014. 赤ワイン用ブドウ新品種‘香大農 R-1’ (リュウキュウガネブ×‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’) の品種登録. 香川大学農学部学術報告 66: 5 - 16. 査読無.
2. Yamashita, H. and R. Mochioka. Wild grape germplasms in Japan. 2014. *Advances in Horticultural Science* 28: 214-224. 査読有.
3. 望岡亮介. 2013. フルーツファイル# 003・亜熱帯原産野生ブドウ「リュウキュウガネブ」. *果物月報* 59(8): 8-10. 査読無.

[学会発表](計 7 件)

1. 山下裕之・望月大貴・小池みさ・望岡亮介・塩崎修志. (2016.3.26). 育種素材としての日本原産野生ブドウ, リュウキュウガネブ (*Vitis ficifolia* Bunge var. *ganebu* Hatusima) に関する研究. 園芸学会平成 28 年度春季大会. 東京農業大学農学部厚木キャンパス(神奈川県 厚木市)
2. 塩崎修志・世戸景子・望岡亮介・山下裕之. (2016.3.26). 沖縄県石垣島および鳩間島産リュウキュウガネブの諸特性の比較. 園芸学会平成 28 年度春季大会. 東京農業大学農学部厚木キャンパス(神奈川県 厚木市)
3. 望岡亮介. (2014.11.15) 日本原産野生ブドウの果皮アントシアニン組成とその活用. 植物色素研究会第 26 回集会 愛媛大学 農学部 (愛媛県 松山市).
4. 釘宮伸明・福田賢二・中尾浩二・古屋浩二・佐藤通浩・望岡亮介. (2014.8.18) ブドウ属野生種エビヅルを用いた醸造用ブドウの育種について(第 2 報). 日本ブドウ・ワイン学会 2014 年大会. 北海道大学 農学部(北海道 札幌市)
5. 小山和哉・沼田美子代・望岡亮介・上垣内宏司・後藤(山本)奈美. (2014.11.8). 国産ブドウ品種のフェノール化合物組成の特徴. ASEV 日本ブドウ・ワイン学会 2013 年大会. 山梨大学 生命環境学部(山梨県 甲府市)
6. 渡邊茉莉・望岡亮介・上羽裕樹. (2014.11.8) 培養困難な日本原産野生ブドウ・リュウキュウガネブ雄株の培養条件の検討. ASEV 日本ブドウ・ワイン学会 2013 年大会. 山梨大学 生命環境学部(山梨県 甲府市)
7. 桧田涼子・谷本雄亮・藤井奈々・根岸友恵・岡本敬の介・望岡亮介・有元佐賀恵.

(2013.7.5)ヤマブドウ, リュウキュウガ
ネブ, およびヤマブドウ成分による脂質
過酸化抑制および皮膚炎症抑制. 第 20 回
日本がん予防学会・日本薬学会長井記念
館(東京都 渋谷区)

〔図書〕(計 1 件)

1. 望岡亮介. 2016. 東アジアおよび日本の
野生ブドウ. 農業技術大系 果樹編 第
2 巻. 追録第 31 号. 基 92 の 2-92 の 10

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 裕之 (YAMASHITA, Hiroyuki)

山梨大学 総合研究部・准教授

研究者番号: 50590923

(2) 研究分担者

塩崎 修志 (SHIOZAKI Shuji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教

授

研究者番号: 10235492

望岡 亮介 (MOCHIOKA Ryouusuke)

香川大学農学部・教授

研究者番号: 20221624

(3) 連携研究者

なし