

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580036

研究課題名（和文）野生種の交雑によるブルーベリー果実の機能性改善と品種改良に関する研究

研究課題名（英文）Studies on Improving of Functional Properties in Fruits and Breeding of Blueberries by Crossing the Wild Species to Cultivated Blueberries

研究代表者

小松 春喜（HARUKI KOMATSU）

東海大学・農学部・教授

研究者番号：60148971

研究成果の概要：これまで顧みられなかった我が国自生のスノキ属野生種（ブルーベリーはスノキ属に属する）を園芸学的に評価した。その結果、野生種の果実は小さく品質も劣るが、機能性が高いことを明らかにした。また、野生種と栽培種のブルーベリーとの交雑を行い、種間雑種（種が異なる植物間の雑種）の獲得を試みた。得られた雑種の内、クロマメノキとの雑種については、形態的特性や果実の品質および機能性などを明らかにし、それらの雑種が我が国独自のブルーベリー品種の育成にとって貴重な素材となることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：未利用植物資源、スノキ属、野生種、種間雑種、倍数性、機能性、アントシアニン、抗酸化活性

1. 研究開始当初の背景

ブルーベリーは、ツツジ科スノキ属に分類され、近年果皮に含まれる色素のアントシアニンが眼の疲労回復に効果があることや抗酸化作用が強く生活習慣病の予防に有効であることなどが指摘され、機能性食品としての評価が高まり、生産・消費共に増大している。しかし、栽培種のブルーベリーは我が国に比べ降雨量の少ない米国で改良されたものであり、生育期に比較的雨の多い地域ではブルーベリー本来の良品質の果実が生産さ

れているとは言い難い。品種についても、我が国では群馬県での‘おおつぶ星’（1998年）他2品種および著者らが育成した‘レッドパール’他2品種（2006年）の育成例があるが、そのほとんどが米国で改良されたものであり、本邦の気候、風土に適した品種の育成や機能性改善を企図した育種はほとんど行われていないのが現状である。

一方、我が国にもクロマメノキやシャシャンボなど約15種のスノキ属植物が自生しており、果実は小さいものの機能性成分である

アントシアニンやポリフェノール含量の豊富なものがある。これらの中で、クロマメノキは果実が大きく、一部の地域では野生状態の果実が採集されジャムなどに加工されていたものの、改良あるいは栽培化されるには至らなかった。

2. 研究の目的

本研究は、これまで顧みられなかった本邦原産スノキ属野生種の遺伝子を栽培種のブルーベリーに導入することにより、より機能性に富み、我が国の気候風土に適した、我が国独自のブルーベリー品種の育成を目指すための基礎的研究である。研究期間内には以下に示した項目について検討する。

(1) スノキ属野生種果実の機能性評価並びに染色体数とゲノムサイズの解析

クロマメノキやナツハゼ、シャシャンボなどのスノキ属野生種果実の抗酸化力を栽培種と比較すると共に、機能性成分を分析する。また、染色体数の確認とゲノムサイズの解析を行う。

(2) スノキ属野生種の染色体倍加系統の育成とそれらを利用したブルーベリー栽培種との交雑

野生種の茎頂を培養し、*in vitro* でコルヒチン処理を行い、染色体倍加系統を育成する。得られた倍加系統を接ぎ木して早期育成を図り、栽培種のブルーベリーとの交雑が可能かどうかを検討する。

(3) クロマメノキとブルーベリー栽培種との交雑親和性の検討と得られた実生の雑種性・倍数性の解析

クロマメノキとブルーベリー栽培種であるハイブッシュブルーベリー(HB)、ラビットアイブルーベリー(RB)およびサザンハイブッシュブルーベリー(SHB)との正逆交雑を行い、実生を育成する。得られた実生の雑種性を解析する。

(4) 種間雑種の形態的および生態的特性の調査並びに栽培種の戻し交雑

得られた種間雑種の倍数性を解析し、放任状態での着果の程度や葉、花、果実などについてその特性を調査する。また、栽培種の戻し交雑後代を育成する。

(5) 種間雑種の果実品質および機能性の評価

得られた種間雑種について、開花結実したものから果実中の糖、有機酸、アントシアニンおよびポリフェノール含量を分析するとともに、果実の機能性を比較する。

3. 研究の方法

(1) スノキ属野生種果実の機能性評価およびゲノムサイズの解析

これまでに収集、栽培しているクロマメノキやナツハゼ、シャシャンボなどのスノキ属

野生種について、果実品質を調査すると共に、アントシアニンおよび総ポリフェノール含量を分析し、栽培種のそれらと比較する。また、DPPHラジカル消去活性試験法により果実のエタノールエキスの抗酸化性を比較する。

群馬県浅間山麓(群馬県吾妻郡嬭恋村大字鎌原 1053-46 レストランブルーベリー周辺:クロマメノキは自然公園法における指定植物であるが、本地域は特別地域であり特に許可の必要はない)に自生するクロマメノキの果実を採取し、本学バイオサイエンス学科天然物化学研究室(小野政輝教授)の協力を得て果実中の新規機能性成分の探索を行う。

また、フローサイトメーター(FCM)を用いて野生種のゲノムサイズを比較する。

(2) スノキ属野生種の染色体倍加系統の育成とそれらを利用したブルーベリー栽培種との交雑

二倍体の野生種シャシャンボ、ナツハゼ、ギーマを培養し、試験管内でコルヒチン処理をすることにより倍加系統を育成する。また、二倍体野生種と栽培種のブルーベリーとの正逆交雑を行い、種間雑種の獲得を試みる。

(3) クロマメノキ(六倍体)とブルーベリー栽培種との交雑親和性の検討と得られた実生の雑種性・倍数性の解析

我が国のクロマメノキは六倍体であることが明らかにされているものの、これまで栽培種のブルーベリーとの交雑に関する報告はみられない。そこで、HBおよびRB品種との正逆交雑を行い、種間雑種の獲得を試みる。ブルーベリーの場合、種子を培養してもその後の順化が比較的困難であることから、得られた種子は層積後丁寧に播種し、温室内で実生の早期育成を図る。育成した系統は、FCMで倍数性を解析すると共に、新梢先端の細胞の染色体数を観察して、倍数性を確認する。また、RAPD法によりDNAを解析し、雑種であるかどうかを判別する。

(4) 種間雑種の形態および生態的特性の調査並びに栽培種の戻し交雑

申請者がすでに育成している種間雑種(クロマメノキ×'ブルークロップ')は、FCMによる解析では五倍体の蛍光強度を示し、花粉も形態的に異常なものが多く、寒天培地上での発芽率も4~10%と低いが、放任状態(オープン)である程度着果し、果実が成熟に至り、種子も得られることが明らかになっている。そこで、得られた種間雑種の内、開花、結実したものについて、葉、花および果実の形態を調査し、両親との相違を明らかにする。また、花粉の染色稔性や培地上での発芽率を調査すると共に、放任状態での結実率を調査する。

(5) 種間雑種の果実品質および機能性の評価

種間雑種育成系統の中で、果実を着生したのものについてはそれぞれの両親と共に、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて果実中の糖および有機酸含量を定量して比較する。なお、これまでの結果では、糖の組成についてはクロマメノキと HB 品種との間で違いはほとんどみられないが、酸の組成については HB 品種ではクエン酸が主で、キナ酸が少量のに対し、クロマメノキではキナ酸が主で 50% を占めていることが明らかになっている。したがって、酸の組成からも雑種であるかどうかの判別が可能である。また、果実中のアントシアニン含量については、フォトダイオード-トアレイ検出器と LC ワークステーションを装備した HPLC によって個々のアントシアニンをそれぞれ分別定量し、総含量だけでなくその組成についても比較する。なお、果実中の機能性成分としてアントシアニン色素以上に注目されているポリフェノール成分については、Folin-Ciocalteu 法により総ポリフェノール含量を分析して比較する。さらに、DPPH ラジカル消去活性試験法により果実のエタノールエキスの抗酸化活性を測定する。

4. 研究成果

(1) スノキ属野生種のクロマメノキ、ナツハゼおよびシャシャンボの成熟果について、糖および酸含量、アントシアニン含量、総ポリフェノール含量を分析すると共に、DPPH ラジカル消去活性試験法により果実のエタノールエキスの抗酸化活性を測定し、栽培種のブルーベリーのそれらの値と比較した。その結果、野生種は栽培種に比べ果実が小さいだけでなく、糖含量が低く、酸含量も高いなど品質的には劣ったが、アントシアニン含量、総ポリフェノール含量および抗酸化活性は比較的高い値を示し、栽培種に比べ機能性が高いことなどが明らかとなった。

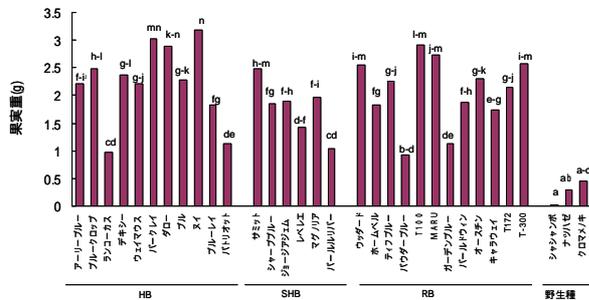


図1 ブルーベリーの各品種と野生種における果実重

[†]Tukeyの多重検定により、異なる英文字間に5%の有意差があることを示す

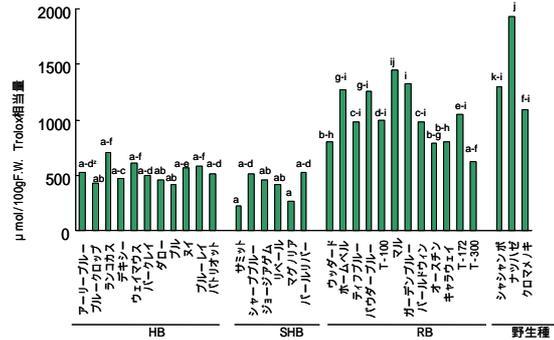


図2 ブルーベリーの各品種と野生種における成熟果の抗酸化活性

[†]Tukeyの多重検定により、異なる英文字間に5%の有意差があることを示す
HB: ハイブリットブルーベリー, SHB: ササンハイブリットブルーベリー, RB: ビットハイブリットブルーベリー

また、クロマメノキ果実から 8 種類の既知の化合物と共に、vaccuoligins A および B という 2 種の新規化合物を見出した。2 種の新規化合物を含むこれら 10 種の化合物の抗酸化活性 (ロタン鉄法と DPPH ラジカル消去活性試験) を比較したところ、いずれも天然の抗酸化剤である α -トコフェロールと同程度かそれよりも強い活性を示した。

FCM によりブルーベリー栽培種とスノキ属野生種の核 DNA 含量を解析したところ、HB および SHB タイプでは 1 品種を除き平均 2.52pg/2C の四倍体、RB タイプでは平均 3.85pg/2C の六倍体であった。一方、在来野生種のシャシャンボ、ギーマ、ナツハゼおよびスノキはほぼ同じ含量で平均 1.39pg/2C の二倍体であり、ウスノキは 2.55pg/2C の四倍体、クロマメノキは 3.78pg/2C の六倍体であった。なお、コケモモは二倍体と推測されるが、核 DNA 含量が 1.19pg/2C と他の野生種に比べ有意に小さかった。

(2) ブルーベリー栽培種と 2 種のスノキ属野生種間で正逆交雑を行った結果、ナツハゼあるいはシャシャンボを花粉親とした場合にはわずかながら着果したが、種子親とした場合には全く着果しなかった。着果した果実からは種子が得られたが、いずれも大粒種子はわずかであった。なお、これらの種子を播種した結果、両野生種の交配で数個体の実生を得ている。

また、ナツハゼおよびシャシャンボ 2 系統の培養系を確立し、増殖したシュートを用いて in vitro でコルヒチン処理を行ったところ、ナツハゼでは四倍体 2 系統を作出することができたが、シャシャンボでは四倍体を得るには至らなかった。また、後述するようにクロマメノキ×ブルークロップより得られた雑種 4 系統 (KB2,7,9,10) はいずれも五倍体であり、着果率が低いことが明らかになったため、倍加系統の作出を目的として試験管内コルヒチン処理を行い、KB7,9,10 で十倍体系統を獲得することができた。

(3) クロマメノキと栽培種のブルーベリー

との正逆交雑を行った結果、クロマメノキが種子親の場合に比較的着果率が高く、種子も得られたが、発芽個体は極めて少なかった。また、総じてRB品種に比べHB品種で着果率が高く、種子数も多かった。

表1 クロマメノキとハイブリッドブルーベリーとの正逆交雑における交配結果

種子親	花粉親	花粉親の花粉発芽率(%)	交配花数	着果数	着果率(%)	総種子数	獲得個体数
クロマメノキ	ブルークローブ	35.0	10	3	30.0	168	4
	スバータン	12.4	21	4	19.1	58	1
	タロー	1.0	13	4	30.8	81	1
	ウェイマウス	1.4	12	5	41.7	85	1
	ブルーレイ	15.3	13	2	15.4	48	1
	レイトブルー	35.3	12	1	8.3	6	3
	パトリオット	22.6	13	2	15.4	68	5
	ランコーカス	38.6	12	7	58.3	210	11
	デキシシー	21.4	11	0	-	-	-
	クロマメノキ	29.7	-	-	-	-	-
ブルークローブ	スバータン	16	3	0	18.8	80	5
	タロー	16	2	20.0	34	2	
	ウェイマウス	10	0	-	-	-	-
	ブルーレイ	16	0	-	-	-	-
	レイトブルー	16	0	-	-	-	-
	パトリオット	10	0	-	-	-	-
	ランコーカス	16	0	-	-	-	-
	デキシシー	16	0	-	-	-	-
	クロマメノキ	16	0	-	-	-	-
	クロマメノキ	16	0	-	-	-	-

表2 クロマメノキとラビットアイブルーベリーとの正逆交雑における交配結果

種子親	花粉親	花粉親の花粉発芽率(%)	交配花数	着果数	着果率(%)	総種子数		完全種子の発芽率		
						完全	不完全	完全	不完全	
クロマメノキ	マル	26.2	13	1	7.7	3	0	3	1	33.3
	T100	43.3	13	3	23.1	18	3	21	16	88.9
	T172	30.6	17	0	-	-	-	-	-	-
	マイヤー	35.7	12	1	8.3	2	0	2	0	0.0
	ガーデンブルー	43.9	17	1	5.9	1	0	1	0	0.0
	キャラウェイ	69.7	18	0	-	-	-	-	-	-
	ホームベル	35.7	13	0	-	-	-	-	-	-
	ウッタード	20.4	18	1	5.6	1	1	0	0	0.0
	クロマメノキ	29.7	-	-	-	-	-	-	-	-
	マル	16	0	-	-	-	-	-	-	-
T100	16	0	-	-	-	-	-	-	-	
T172	16	0	-	-	-	-	-	-	-	
マイヤー	16	0	-	-	-	-	-	-	-	
ガーデンブルー	16	0	-	-	-	-	-	-	-	
キャラウェイ	16	0	-	-	-	-	-	-	-	
ホームベル	16	0	-	-	-	-	-	-	-	
ウッタード	16	0	-	-	-	-	-	-	-	

クロマメノキと‘ブルークローブ’との交雑により得られた4系統(KB-2,7,9,10)の個体は、いずれも五倍体の雑種であったが、自然授粉でも結実が認められ、糖や酸含量、アントシアニン含量および抗酸化活性などは系統間で異なり、ほぼ両親の間の値を示した。また、いずれの系統も両親とは異なり長い果柄と一對の小葉を有する特徴が認められた。

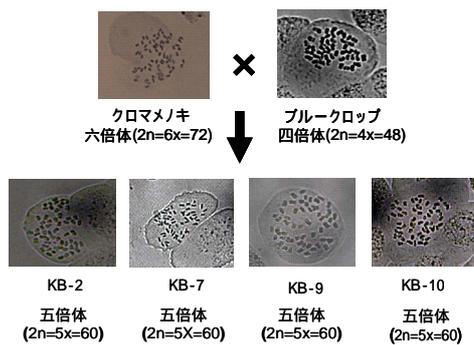


図3 クロマメノキと‘ブルークローブ’およびKB4系統における体細胞の染色体

一方、クロマメノキと‘パトリオット’の交雑により得られたKP4系統(KP-1,2,3,4)の葉をFCMで解析したところ、KP-1,4は五倍体、KP-2とKP-3はそれぞれ四倍体と三倍体と推定される位置に相対蛍光強度のピークが認められた。そこで新梢の先端を採取し、

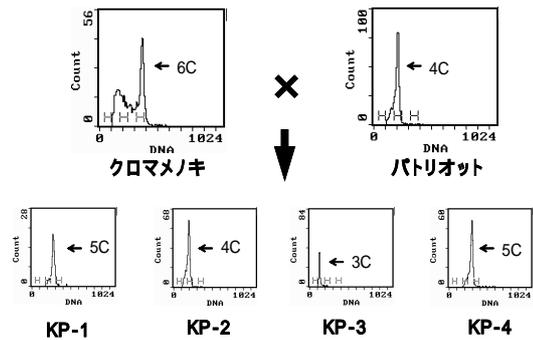


図4 FCMによるクロマメノキ、‘パトリオット’およびKP4系統における倍数性の解析

染色体数を調査した結果、KP-1,4はいずれも染色体数が両親の間である60本の五倍体、KP-2は染色体数が48本の四倍体、KP-3は染色体数が36本の三倍体であることが確認された。KP-1,3の花の大きさはクロマメノキと同じかそれより小さく、短い鐘型であった。一方、KP-2の花の大きさはクロマメノキより大きく、横径/縦径が0.79と小さく、‘パトリオット’同様長い鐘型を示した。なお、五倍体のKP-1,3は花柄葉を有したのに対し、KP-2には花柄葉は認められなかった。KP-1,3の花粉の発芽率は、それぞれ5.0、1.0%と低く、特に三倍体のKP-3で低かったが、四倍体のKP-2では20%と比較的高い値を示した。着果したKP-1,2と両親の果実成

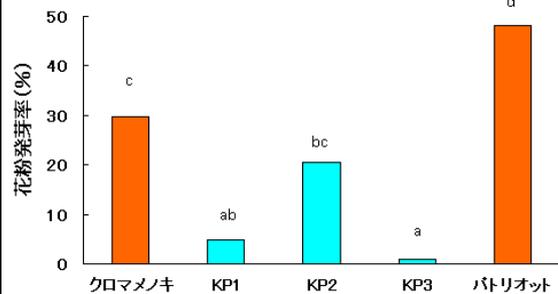


図5 クロマメノキ、パトリオットおよびKP3系統の花粉の発芽率

分を分析した結果、全糖含量には有意な差は認められなかったが、‘パトリオット’を除くクロマメノキとKP-1,2にはショ糖が含まれていた。一方、有機酸含量は、‘パトリオット’に比べKP-1,2およびクロマメノキで有意に高い値を示した。また、KP-1,2はいずれもクエン酸の割合が高く、‘パトリオット’に近似しており両系統共に雑種であることが推察された。果実中の全アントシアニン含量には有意な差は認められなかったが、KP-1,2はいずれも‘パトリオット’に比べやや高い値を示した。また、KP-1,2のアントシアニンの組成は‘パトリオット’に近似していた。総ポリフェノール含量は、‘パトリオ

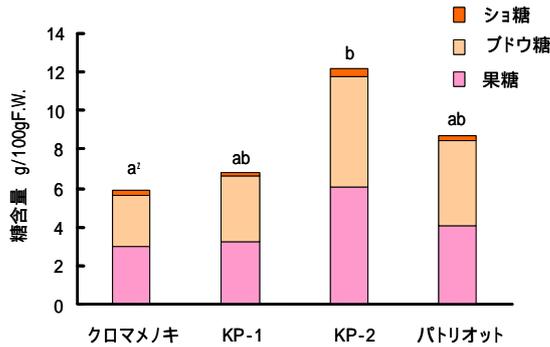


図6 クロマメノキ、バトリオットおよびKP2系統における成熟果の全糖含量とその組成

²Tukeyの多重検定により、異なる英文字間に5%の有意差があることを示す

ット'で有意に低く、KP-1,2の両系統はクロマメノキ同様に高い値を示した。なお、有意差はなかったが、果実のエタノールエキスの抗酸化活性にも総ポリフェノール含量と同様の傾向が見られた。

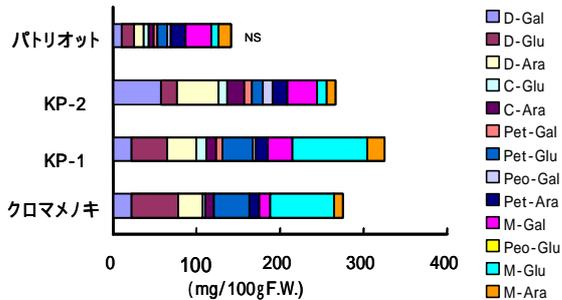


図7 クロマメノキ、バトリオットおよびKP2系統における成熟果の全アントシアニン含量とその組成

以上のように、クロマメノキ(6x)とHB品種(4x)との交雑からは、五倍体だけでなく四倍体も出現することが明らかとなった。また、本四倍体は栽培種と同等の品質で機能性も高かったことから、四倍体のF₁を選抜することにより直接優良な品種を選抜することも可能なことが示された。なお、四倍体および五倍体はいずれも戻し交雑が可能であった。(4)クロマメノキ×RB系統T100(KT13系統)の葉および花の形態は両親の間の値を示すものが多かった。また、それらの樹勢は、前述したクロマメノキとHB品種との雑種に比べて強く、放任状態でも着果が認められた。着果した8系統の果実の大きさを調査したところ、果実重も両親の間の値を示すものが多かったが、KT-9では約1.4gと栽培種のT100に近い値を示した。果実の成分分析の結果、KT-9の糖含量はT100に比べて有意に高く、酸含量はT100と同程度の値を示した。また、総ポリフェノール含量や抗酸化活性が比較的高く、アントシアニン含量は約370mg/100gF.W.とクロマメノキよりも有意に高い値を示した。

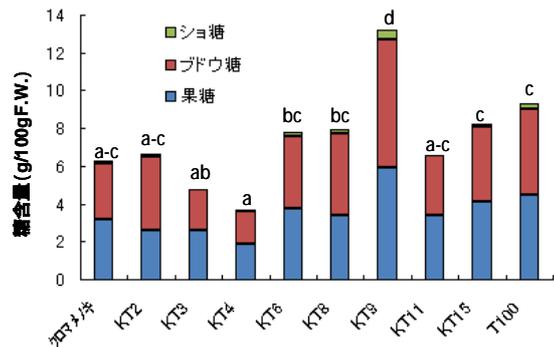


図8 クロマメノキ、T100およびKT8系統における果実の全糖含量とその組成

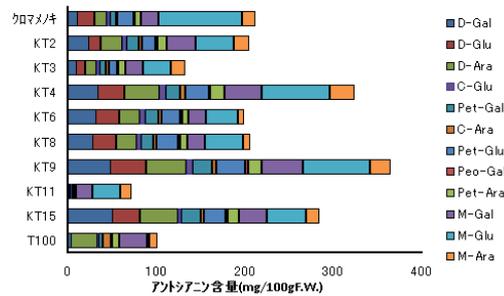


図9 クロマメノキ、T100およびKT8系統における果実のアントシアニン含量とその組成

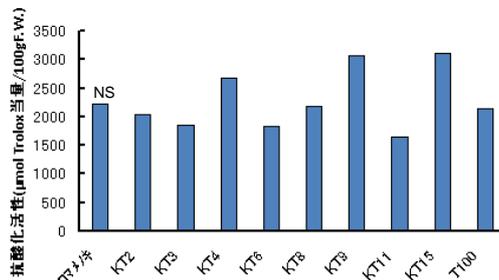


図10 クロマメノキ、T100およびKT8系統における果実の抗酸化活性

今後、DNA解析による雑種性の判別が必要であるが、形態調査や果実の成分分析から、KT8系統はいずれもクロマメノキとT100との種間雑種と推測された。中でもKT-9は果実が大きく、品質が優れ、且つ機能性に富んでおり、極めて有望な系統であると判断された。

以上のように、我が国のスノキ属野生種クロマメノキとブルーベリー栽培種との交雑は可能であり、四倍体のHB品種との交雑では五倍体だけでなく四倍体も出現することを明らかにした。また、それらの種間雑種はいずれも戻し交雑が可能であり、我が国の野生種を利用した育種における重要な中間母本となり得ることを示した。また、今後の詳細な解析が必要であるが、二倍体の野生種で

あるナツハゼやシャシャンボと栽培種との交雑から得られた実生系統も育成中である。これらは、いずれも我が国の野生種を利用したブルーベリーの品種改良にとって貴重な育種素材となり得るものと確信している。

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)

Tetsumura T., H. Komatsu and H. Kunitake 他 5 名 6 番目. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticultura* 査読有. 119:72-74, 2008

Masuoka C., K. Yokoi, H. Komatsu J. Kinjo, T. Nohara and M. Ono. Two new antioxidant *ortho*-benzoyloxyphenyl acetic acid esters from the fruit of *Vaccinium uliginosum*. *Food Sci. Technol. Res.* 査読有. 13(3):215-220. 2007

國武久登・小松春喜他 7 名 9 番目. 北部ハイブッシュブルーベリーの暖地栽培のためのスノキ属野生種シャシャンボの台木としての可能性. *園学研*. 査読有. 5(2):105-110, 2006

[学会発表](計 7件)

海生理人・小松春喜他 3 名、クロマメノキとハイブッシュブルーベリー‘パトリオット’との種間交雑により得られた系統の評価、園芸学会秋期大会、2008 年 9 月 27 日、(於 三重大学)

鉄村琢哉・小松春喜他 6 名、ブルーベリーのマイクロプロパゲーションにおける基本培地の再検討、園芸学会秋期大会、2007 年 9 月 29 日、(於 香川大学)

津田浩利・小松春喜他 5 名、スノキ属植物の多芽体を利用したオリザリン処理による倍数体の作出、園芸学会春季大会、2007 年 3 月 25 日、(於 京都テルサ)

佐藤真希子・小松春喜他 5 名、ブルーベリーおよびその在来野生種の組織培養苗における試験管外発根一順化法の改良、園芸学会春季大会、2007 年 3 月 25 日、(於 京都テルサ)

小松春喜他 8 名、クロマメノキとハイブッシュブルーベリー‘ブルークローブ’との種間雑種の果実特性、園芸学秋季大会、2006 年 9 月 24 日、(於 長崎大学)

津田浩利・小松春喜他 3 名、スノキ属植物におけるフローサイトメーターによる核 DNA 含量の評価、園芸学秋季大会、2006 年 9 月 24 日、(於 長崎大学)

佐藤真希子・小松春喜他 5 名、ブルーベリーおよびその在来野生種におけるマイクロプロパゲーションの確率、園芸学秋季大会、2006 年 9 月 24 日、(於 長崎大学)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松 春喜 (KOMATSU HARUKI)

東海大学・農学部・教授

研究者番号: 60148971

(2)研究分担者

(3)連携研究者

國武 久登 (KUNITAKE HISATO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 80289628

(4)研究協力者

小野 政輝 (ONO MASATERU)

東海大学・農学部・教授

研究者番号: 60177269