

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580042

研究課題名（和文） スノキ属野生種の同質倍数体作出とその育種的利用

研究課題名（英文） Production of Colchicine-derived Tetraploid Wild *Vaccinium* spp. and Its Use in Breeding

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

研究成果の概要（和文）：これまで園芸的に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）を収集し、我が国の環境に適し、高機能性の品種を育成するための育種素材としての評価を行った。また、我が国の野生種と栽培種との種間雑種を育成するため、数種の野生種と栽培種との正逆交雑を行った。さらに、野生種と栽培種との交雑を容易にすることを目的として、二倍体の野生種を *in vitro* でコルヒチン処理して倍加系統の作出を試みた。

研究成果の概要（英文）：We collected and evaluated *Vaccinium* wild species native to Japan, have not been utilize for horticulture up to the present, as genetic resources to breed some blueberry cultivars adaptable to Japan with high functionality. And we tried to obtain some interspecific hybrids among wild species and between blueberry cultivars using reciprocal crossing. We also carried out colchicine treatment of shoots *in vitro* in some wild species, to produce chromosome-doubled plants from diploid wild species, will easily cross with tetraploid cultivated species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、倍数性、機能性、アントシアニン、抗酸化活性、種間雑種

## 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）他2品種や著者らが育成した‘レッドパール’他2品種

(2003)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、ナツハゼなど約 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が、これまで改良あるいは栽培化されるには至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、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に着目し、それらを収集栽培すると共に、主として機能性の観点から評価する。また、野生種と同質倍数体を作成、育成し、それらと栽培種との交雑により種間雑種の獲得を試みる。また、これまでに得られたクロマメノキとブルーベリー栽培種との雑種（五倍体）についても、染色体倍加による不稔性打破効果を調査すると共に、特性や果実品質、機能性成分含量を明らかにする。研究期間内には以下に示した項目について検討する。

### (1) 本邦原産スノキ属野生種の収集と果実の機能性評価並びにゲノムサイズの解析

アラゲナツハゼ、ナガボナツハゼなど未収集の我が国自生スノキ属野生種を収集、栽培すると共に、果実の機能性や抗酸化力を調査する。また、ゲノムサイズの解析を行う。

### (2) スノキ属野生種と同質倍数体の作出とその育成

野生種の茎頂を培養し、*in vitro* でコルヒチン処理を行い、染色体倍加系統を作成する。得られた倍加系統は接ぎ木することにより早期育成を図る。

### (3) 野生種と同質倍数体の交雑によるブルーベリー種間雑種の育成

野生種とその同質倍数体と四倍体のハイブッシュブルーベリー（HB）およびサザンハイブッシュブルーベリー（SHB）あるいは六倍体のラビットアイブルーベリー（RB）との正逆交雑を行い、交雑親和性を検討する。得られた種子を播種して実生を育成する。

### (4) 種間雑種の形態的および生態的特性の調査

得られた実生の雑種性や倍数性を解析する。また、種間雑種と確認された系統については、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。

### (5) 種間雑種の果実品質および機能性の評価

果実中の糖、有機酸、アントシアニン、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) 本邦原産スノキ属野生種の収集と果実の機能性評価並びに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、シャシャンボなどに加えて、スノキ、ウスノキ、クロウスゴ、ナガボナツハゼ、アラゲナツハゼなどのスノキ属の他の野生種を収集、栽培し、開花結実したものから漸次果実品質を調査すると共に、アントシアニンや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メタノールエキスの抗酸化性を比較する。

申請者らはこれまでにブルーベリーの栽培種と本邦産スノキ属野生種数種について、フローサイトメーターを用いて核 DNA 量を測定し、ゲノムサイズを比較している（津田ら、2006）が、ここでは、さらに新たに収集したスノキ属野生種について、フローサイトメーターを用いてゲノムサイズの解析を行う。

### (2) スノキ属野生種と同質倍数体の作出とその育成

収集した野生種の茎頂を培養し、増殖系を確立する。培養にはこれまでの報告

（Tetsumura et al. 2008）を参考にしてサイトカイニンとしてゼアチンを添加した培地を用いる。確立した培養系により増殖したシュートを切り取り、津田ら（2007）に従い、*in vitro* で所定の濃度のコルヒチン溶液に浸漬した後、再度培養することにより染色体倍加系統、すなわち同質倍数体の誘導を図る。培養固体の倍数性の解析にはフローサイトメーターを用い、倍加系統と推察された系統は漸次順化する。

### (3) 野生種と同質倍数体の交雑によるブルーベリー種間雑種の育成

申請者らは、我が国の野生種であるクロマメノキ（六倍体）と数品種のHB品種と正逆交雑を行い、クロマメノキを種子親にした場合には少ないながら雑種実生を獲得することができることを明らかにしている（小松ら、2003）。しかしながら、我が国自生のスノキ属野生種の多くは二倍体であり、それらと栽培種のブルーベリーとの種間雑種に関する報告はこれまでのところ見当たらない。そこで、収集した他のスノキ属野生種について、栽培種のブルーベリーと正逆交雑を行い、交雑親和性の程度を明らかにする。なお、ブルーベリーの場合、種子を培養してもその後の順化に時間を要するため、得られた種子は層積後丁寧に播種し、温室（現有）内で実生の早期育成を図る。

### (4) 種間雑種の形態的および生態的特性の調査

育成した実生系統は、ラビットアイブルーベリーの‘ホームベル’に接ぎ木することに

より早期育成を図る。また、既存の交雑系統（申請者が交雑育成した個体）を含めてフローサイトメーターで倍数性を解析すると共に、RAPD法により雑種であるかどうかを解析する。また、申請者がすでに育成している種間雑種KB4系統（クロマメノキ×‘ブルークロープ’）は、いずれも五倍体であり、花粉は形態的に異常なものが多く、自然状態（オープン）である程度着果するものの、着果率が低い。そこで、稔性を高めることを目的として、これら4系統の茎頂を培養し、

(3)と同様にコルヒチン処理することにより複二倍体である十倍体を作成する。

(5)種間雑種の果実品質および機能性の評価

これまでに得られている種間雑種（クロマメノキ×HB：24系統、クロマメノキ×RB：16系統、クロマメノキ×SHB：5系統）の内、開花したものについては、開花期を調査し、葉、花および果実の形態と共に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。ブルーベリーの花粉は、通常4分子の集合花粉であるが、これまでの調査の結果、種間雑種では2分子や3分子が出現することを認めている。そこで、それらの出現割合を調査比較すると共に、その原因を細胞遺伝学的に検討する。結実性については、他花粉を受粉した場合と放任状態での着果の程度を比較し、自然状態での結実が可能かどうかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) FCMで解析した結果(表1)、16種中13種が二倍体、1種が四倍体、2種が六倍体の位置に相対蛍光強度のピークが認められ、四倍体とされているウスノキを除き従来の報告と一致した。また、二倍体13種間の核DNA含量の比較では、ツルコケモモの0.99pg/2Cからアクシバの1.46pg/2Cまで変異があり、有意差が認められ、六倍体2種のそれらについてもクロウズゴが3.65pg/2C、クロマメノキが3.99pg/2Cと有意差が認められた。

表1 スノキ属野生種およびブルーベリー栽培種における葉の形態的特徴および倍数性と核DNA含量

節	種および品種	特性	核DNA含量 (pg)	倍数性	葉身長 (mm)	葉幅 (mm)	葉身形指数*	葉柄長 (mm)
Oxycoccoideae	アツバ	落葉性	1.46 e <sup>†</sup>	2n	27.3 c	16.8 d-f	1.62 a-c	2.2 a-e
	ツルコケモモ	常緑性	0.99 a	2n	10.4 a	4.1 a	2.54 d	1.6 a-d
Cyanococcus	アツバ	落葉性	1.20 b-d	2n	45.8 d	27.8 hi	1.65 a-c	2.9 d-f
	アツバ	落葉性	1.17 b-d	2n	46.4 d	23.2 f-h	2.00 b-d	3.5 ef
	アツバ	落葉性	1.17 b-d	2n	24.1 bc	19.2 e-g	1.26 a	3.0 d-f
	ウスノキ	落葉性	1.17 b-d	2n	26.2 c	13.8 b-e	1.90 bc	1.5 a-d
	オオハスノキ	落葉性	2.37 g	4n	49.3 de	25.0 gi	1.97 b-d	2.6 b-f
	スノキ	落葉性	1.05 ab	2n	24.6 bc	13.0 b-e	1.89 bc	2.7 c-f
	カワスノキ	落葉性	1.27 d	2n	29.1 c	16.4 d-f	1.78 a-c	0.6 a-c
Vaccinium	クロマメノキ	落葉性	3.99 j	6n	139.9 ab	7.8 a-c	1.78 a-c	1.3 a-c
	クロウズゴ	落葉性	3.65 i	6n	142 ab	11.3 b-d	1.26 a	1.1 ab
Myrtillus	ヒメノキ	落葉性	1.18 b-d	2n	22.6 bc	14.2 c-e	1.60 a-c	2.4 b-f
	ギンナ	常緑性	1.28 d	2n	24.1 bc	15.0 de	1.60 a-c	2.4 b-f
Bracteata	シャシャンボ	常緑性	1.21 od	2n	45.3 d	24.2 g-i	1.87 bc	6.1 g
	カモモ	常緑性	1.11 a-c	2n	13.5 ab	7.0 ab	1.92 bc	1.9 a-e
Cyanococcus	‘ブルークロープ’	落葉性	2.18 f	4n	56.7 ef	29.0 hi	1.95 bc	3.7 f
	‘ハムール’	落葉性	2.26 fg	4n	60.6 f	29.9 i	2.06 cd	3.3 ef
	‘ホムヘル’	落葉性	3.32 h	6n	73.4 g	46.3 j	1.59 ab	2.8 d-f

\*Tukeyの多重検定により、異なる英文字間に有意差(1%)があることを示す  
葉身形指数=葉身長/葉幅

野生種の中には栽培種と異なり、シャシャンボやギイマなどのように常緑性の種が存

在した。葉の大きさには種間差がみられたが、いずれの野生種も栽培種に比べ小さかった。また、花色や形態などに種間差があり、特にアクシバ、ツルコケモモ、コケモモは花弁数および雄ずい数がそれぞれ4枚と8本であり、栽培種や他の野生種の5枚と10本とは異なっていた。また、アクシバとツルコケモモは花弁が反捲する特徴があり、後者は他種と異なり離弁花であった。

栽培種の果実重は1g以上であったのに対し、野生種ではクロマメノキが0.73gと比較的重かった以外、いずれも1g以下であった(表2)。また、野生種の果実は球形に近かったが、シャシャンボは栽培種と同程度に扁平であった。果面を色彩色差計で測定した結果、栽培種およびクロマメノキでは果粉を拭き取る前と後のL値の差が大きく、果粉量が多いことが推察された。

表2 スノキ属野生種およびブルーベリー栽培種における成熟期、果皮色および果実の形態

種および品種	成熟期	果皮色	果実重 (g)	果実の大きさ(mm)			果柄長 (mm)	目(mm)	
				縦径	横径	横/縦		縦	深さ
野生種									
Oxycoccus節									
ツルコケモモ	9/29~11/2	赤	0.66 b <sup>†</sup>	12 e	12 d	1.03 d-f	12.6 f	2.6 ab	0.3 a
Cyanococcus節									
アツバ	8/7~9/7	紅	0.22 a	6.6 ab	6.9 a	1.05 ef	12.1 f	3.6 c	0.2 a
Vaccinium節									
シャシャンボ	11/6~1/20	黒紫・粉白	0.17 a	5.6 a	6.6 a	1.17 g	2.2 ab	2.3 a	OS <sup>†</sup>
アツバ	9/29~11/18	黒	0.33 a	8.6 d	8.1 b	0.94 a-d	1.9 ab	6.2 gh	OS
アツバ	10/22~12/4	紫黒	0.23 a	7.3 bc	6.8 a	0.93 a-c	3.1 bc	3.9 cd	OS
アツバ	10/12~11/10	黒	0.34 a	8.4 cd	8.2 b	0.98 c-e	1.5 a	5.6 fg	OS
ウスノキ	7/6~8/17	赤	0.33 a	8.3 cd	8.4 b	1.02 c-f	3.8 c	6.6 hi	1.8 d
スノキ	6/10~9/9	紫黒	0.15 a	6.9 b	6 a	0.87 ab	4.0 c	3.3 bc	1.2 c
オオハスノキ	6/12~7/28	紫黒	0.18 a	7.2 b	6.8 a	0.96 b-e	4.2 c	3.9 cd	1.0 bc
カワスノキ	7/5~9/7	紫黒・粉白	0.73 b	12 e	10 c	0.86 a	6.6 d	4.7 de	0.6 ab
栽培種									
Cyanococcus節									
‘ブルークロープ’	6/26~7/29	藍黒・粉白	3.48 e	15 g	20 g	1.38 h	6.3 d	7.3 i	3.0 e
‘ハムール’	6/16~7/28	藍黒・粉白	1.72 d	14 fg	15 f	1.11 fg	6.2 d	6.2 gh	2.9 e
‘ホムヘル’	7/22~9/2	藍黒・粉白	1.31 c	13 ef	14 e	1.08 fg	6.6 e	5.2 ef	1.2 c

<sup>†</sup>Tukeyの多重検定により、異なる英文字間に有意差(1%)があることを示す  
\*Off the Scale

成熟果を分析した結果(図1)、シャシャンボおよびカンサイスノキは栽培種と同程度の糖含量を示したものの、他の野生種はいずれも栽培種より低かった。一方、有機酸含量は、アクシバ、ウスノキ、スノキ、カンサイスノキで栽培種と同程度に低かった。

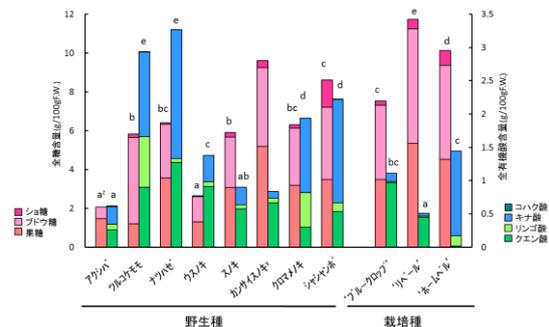


図1 野生種8種および栽培種3品種における成熟果の全糖含量および全有機酸含量とその組成

<sup>†</sup>Tukeyの多重検定により異なる英文字間に有意差(5%)があることを示す  
\*統計処理不可

アントシアニン含量(図2)は、スノキが1192mg/100g F.W.と高く、次いでナツハゼが626mg/100g F.W.であり、他の青色系種も栽培種より高い値を示した。また、スノキでは酸化活性の高いデルフィニジンおよびシアニジンが全体の74%を占めた。



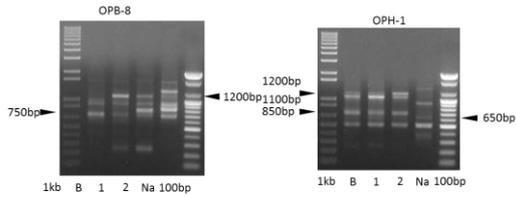


図4 ‘ブルークロープ’とナツハゼとの交雑より得られたBNa2系統におけるRAPD法による雑種性の解析  
矢印はそれぞれ両親の特異的なバンドを示す  
1kb:1kb ladder マーカー B:ブルークロープ 1:BNa-1 2:BNa-2 Na:ナツハゼ  
100bp:100bp ladder マーカー

また、これら2系統の葉の大きさが花粉親のナツハゼに、厚さが種子親の‘ブルークロープ’に近似していた(図5、表6)ことから雑種であることが推察された。

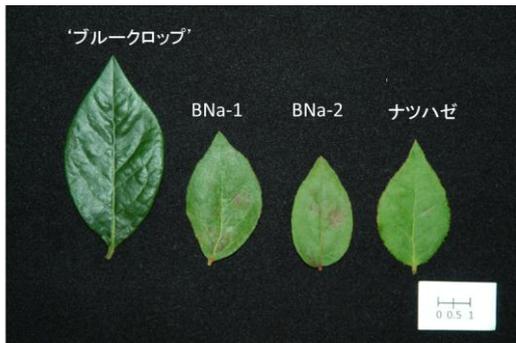


図5 ‘ブルークロープ’とナツハゼとの交雑より得られたBNa2系統と両親の葉の形態

表6 ‘ブルークロープ’とナツハゼの交雑より得られたBNa2系統とその両親における葉の形態

	葉身長 (mm)	葉幅 (mm)	葉身形 指数 <sup>a</sup>	葉柄長 (mm)	葉の厚さ (mm)
‘ブルークロープ’	63.3 b <sup>y</sup>	37.5 b	1.70 NS	4.1 b	0.23 b
BNa-1	35.2 a	24.8 a	1.44	1.6 a	0.19 b
BNa-2	35.3 a	20.0 a	1.77	1.9 a	0.20 b
ナツハゼ	43.6 a	25.6 a	1.70	2.0 a	0.12 a

葉身形指数<sup>a</sup>=葉身長/葉幅

<sup>y</sup>Tukeyの多重検定により、異なる英文字間に有意差(1%)があることを示す

BNa2 系統の倍数性を FCM で解析した結果(図6)、2 系統共に四倍体の位置に相対蛍光強度のピークが認められたことから、おそらく四倍体の‘ブルークロープ’に二倍体ナツハゼの非還元花粉が受粉・受精して生じたものと推察された。

なお、1 年生の小さな実生でもラビットアイブルーベリーの‘ホームベル’台に接木することで成長を促進することが可能(図7)であり、この方法を使えば種間雑種の早期開花に極めて有効(接ぎ木翌年に花芽形成が可能)であると考えられた。

また、クロマメノキ×‘ブルークロープ’より得られた五倍体の種間雑種4系統

(KB-2, 7, 9, 10)の十倍体を作出したところ、元の五倍体に比べ気孔は大きかったが、節間長と葉の大きさが有意に小さくなり、植物体が矮化し、花芽形成には至らなかった。

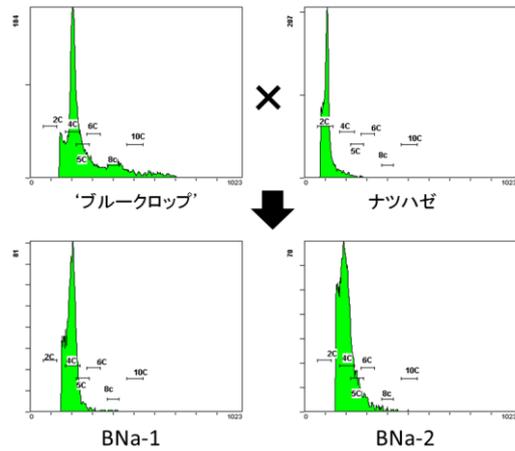


図6 ‘ブルークロープ’とナツハゼとの交雑より得られたBNa2系統のFCMによる倍数性の解析



図7 ‘ブルークロープ’とナツハゼとの交雑より得られたBna-2における接木を利用した早期育成

## 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)

- ①津田浩利・小松春喜他 3 名 4 番目. オリザリンおよびコルヒチン処理によるスノキ属植物における倍数体の作出. 園学研. 査読有. 11(2):205-212, 2012
- ②山内(佐藤) 真希子・小松春喜他 6 名 7 番目. 我が国自生のスノキ属植物とブルーベリー栽培品種における植物組織培養と試験管外発根を利用したクローン増殖. 園学研. 査読有. 11(1):13-19, 2012

[学会発表] (計 5 件)

- ①執行みさと・小松春喜他 4 名 6 番目. クロマメノキとハイブッシュブルーベリー‘ブルークロープ’との正逆交雑による種間交雑系統の作出とその特性. 園芸学会平成 23 年度秋季大会(於 岡山大学) 2011 年 9 月 25 日
- ②小松春喜・執行みさと他 5 名 1 番目. クロマメノキとラビットアイブルーベリー T100 との種間雑種における雑種性の解析. 園芸学会平成 22 年度秋期大会(於 大分大学) 2010 年 9 月 20 日

- ③執行みさと・小松春喜他 2 名 4 番目. 我が国自生スノキ属野生種の核 DNA 含量, 葉, 花および果実の形態的特性並びに果実品質の比較. 園芸学会平成 22 年度秋期大会 (於 大分大学) 2010 年 9 月 19 日
- ④小島祥子・小松春喜他 6 名 7 番目. ブルーベリーとスノキ属在来野生種アラゲナツハゼとの果実特性の比較. 園芸学会平成 22 年度春季大会 (於 日本大学) 2010 年 3 月 22 日
- ⑤執行みさと・小松春喜他 4 名 6 番目. クロマメノキとラビットアイブルーベリー T100 との種間交雑より得られた系統の評価. 園芸学会平成 21 年度秋期大会 (於 秋田大学) 2009 年 9 月 26 日

## 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) 研究協力者

國武 久登 (KUNITAKE HISATO)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号: 80289628