我が国自生スノキ属野生種クロマメノキとハイブッシュブルーベリー ‘ブルークロップ’ との節間交雑から得られた F_1 系統の評価

執行みさと¹・具志堅 文²・桂川明広²・臂 光昭²・
吉岡克則³・鹿毛哲郎⁴・國武久登⁵・小松春喜^{2*}

¹ 東海大学大学院生物科学研究科 869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽

² 東海大学農学部 869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽

³ 吉岡千寿園 839-1214 福岡県久留米市田主丸地徳

⁴ (有) 鹿毛真耕園 839-0833 福岡県久留米市大橋町常持

⁵ 宮崎大学農学部 889-2192 宮崎市学園木花台西

Evaluation of F_1 Progenies Derived from Intersectional Crossing of *Vaccinium uliginosum* L., a Wild Species Native to Japan, and Highbush Blueberry ‘Bluecrop’ (*V. corymbosum* L.)

Misato Shigyou¹, Aya Gushiken², Akihiro Katsuragawa², Mitsuaki Hiji²,
Katunori Yoshioka³, Tetsurou Kage⁴, Hisato Kunitake⁵ and Haruki Komatsu^{2*}

¹ Graduate School of Bioscience, Tokai University, Kawayou, Minamiaso-mura, Aso, Kumamoto 869-1404

² Faculty of Agriculture, Tokai University, Kawayou, Minamiaso-mura, Aso, Kumamoto 869-1404

³ Yoshioka Senjuen, Tanushimaru, Kurume, Fukuoka 839-1214

⁴ Kage Shinkouen, Ohhashi, Kurume, Fukuoka 839-0833

⁵ Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Kibanadai, Gakuen, Miyazaki 889-2192

Abstract

In order to develop new cultivars adaptable to Japan with high quality and functionality, we attempted to produce interspecific hybrids between *Vaccinium uliginosum* L. ($2n = 6x = 72$) of the genus *Vaccinium*, a wild species native to Japan, and some highbush blueberry cultivars ($2n = 4x = 48$) of the genus *Cyanococcus*, using reciprocal crossing. Fertile seeds were obtained from 8 of 9 cross combinations, and 13 seedlings were obtained from 5 cross combinations when *V. uliginosum* were used as a seed parent, but only 7 seedlings from 2 of 9 cross combinations as pollen parent. It was revealed that seeds were easier to obtain when *V. uliginosum* was used as a seed parent compared with pollen parent, and unilateral cross incompatibility occurred in the reciprocal cross. These seeds germinated *in vitro* after pretreatment with gibberellin or in a seed bed after stratification. Four resultant seedlings (KB4: KB-2, 7, 9, 10) from the cross of *V. uliginosum* and ‘Bluecrop’ were grafted on rootstock and evaluated regarding their hybridity, ploidy level, morphological characteristics of the flower and fruit, and fruit quality. RAPD analysis showed that KB4 was a hybrid between *Vaccinium* and *Cyanococcus*. The hybrids were also confirmed to be pentaploid by flow cytometry and observation of the chromosome number in shoot tip cells; however, they produced fertile pollen and set fruits in an open field without artificial pollination. Fruit of all hybrids also had a peduncle with a pair of leaflets differing from one of their parents. Although the contents of anthocyanin and polyphenol and antioxidant capacity of fruit were different among their hybrids, those values of KB-2 were significantly higher than in ‘Bluecrop’. In the future, these hybrids may be useful as breeding material to establish new cultivars with high quality and functionality.

Key Words : functionality, interploid crossing, intersectional hybrid, pentaploid, reciprocal crossing

キーワード : 五倍体, 異倍数体間交雑, 機能性, 正逆交雑, 節間雑種

緒 言

ブルーベリーは、北アメリカ原産の落葉性あるいは常緑

性の低木または半低木性の果樹であり、ツツジ科 (Ericaceae) スノキ属 (*Vaccinium*) に属する。スノキ属は分類上さらに 10 節に分けられるが、果樹産業上重要なハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum* L.), ラビットアイブルーベリー (*V. virgatum* Aiton) およびローブッシュブルーベリー (*V. angustifolium* Aiton) (以下、それぞれ HB, RB および LB) の 3 種はいずれも *Cyanococcus* 節に属する。これらは染色体数から見ると、二倍体 ($2n = 2x = 24$), 四倍体 ($2n =$

2013 年 7 月 17 日 受付. 2014 年 1 月 15 日 受理.
本研究の一部は文部科学省の科学研究費 (基盤研究 (C) (2) 課題番号 13660038) および東海大学総合研究機構の助成を受けて行われたものである.

* Corresponding author. E-mail: hkomatsu@agri.u-tokai.ac.jp

4x=48) および六倍体 (2n=6x=72) の種からなっている (Camp, 1945; Darrow ら, 1944). 一般に, ブルーベリーは同倍数体間では容易に交雑し, 得られた雑種の稔性もある (Camp, 1945; Lyrene・Sherman, 1983) が, 二倍体と四倍体間では全く交雑できなかった (Coville, 1927) り, 四倍体と六倍体間の交雑では五倍体雑種が得られるが, 系統間で着果性に大きな違いがある (Darrow ら, 1944) ことが報告されている.

一方, 野生種には少低温要求量, 早熟性, 耐寒性, 耐乾性, 耐病性, 高機能性など栽培種にない形質を持つものがあり (Ballington, 1990; Lyrene・Sherman, 1980), これらの形質を栽培種に導入するためには種間雑種の作出が不可欠である (Darrow ら, 1949; Lyrene, 1993). 実際に, アメリカ合衆国で早熟性や少低温要求量を目的として育成されたサザンハイブッシュブルーベリーは, 非還元配偶子形成を利用して二倍体の *V. darrowi* Camp. や六倍体の *V. virgatum* Aiton, 四倍体の *V. corymbosum* L. を複雑に交雑して育成されている (Sharpe・Sherman, 1976; Sherman・Sharpe, 1977). 我が国にもスノキ属植物が多数自生しているが, ブルーベリー栽培種と同じ *Cyanococcus* 節に属する野生種は存在しない. しかし, 食用とされるものにはクロマメノキ (*V. uliginosum* L.), ナツハゼ (*V. oldhamii* Miq.), シャシャンボ (*V. bracteatum* Thunb.) などがある (玉田, 1996). 特に, *Vaccinium* 節に属する六倍体のクロマメノキは長野県浅間山付近に自生し, 浅間ベリー, 浅間ブドウという地方名で親しまれてきた. しかしながら, これまで我が国では, クロマメノキを含む本邦自生のスノキ属植物を栽培化はもちろん, 改良の素材としても全く利用してこなかった.

そこで, 本研究では, 我が国のスノキ属野生種とブルーベリー栽培種との節間雑種の育成を目的として, 野生種の

中で比較的果実の大きいクロマメノキと HB 数品種の正逆交雑を行い, 交雑の可能性を検討した. また, クロマメノキと HB ‘ブルークロップ’ との交配より得られた 4 系統が雑種であるかどうかを確認するとともに, それらの倍数性, 花および果実の形態的特性ならびに果実の品質と抗酸化活性などを比較した.

材料および方法

1. クロマメノキと HB 品種との正逆交雑

一里山園芸センター (長野県北佐久郡御代田町) より導入し, 東海大学農学部実験ほ場において鉢植えで栽培しているクロマメノキ (推定 5~7 年生) と本学果樹園栽植の 5~10 年生の HB9 品種 (第 1 表) を材料とし, 1998, 2001 および 2002 年に以下のように交配を行った.

交配に用いた花粉は前年に開花直前の蕾より採取し, -80°C の冷凍庫で 1 年間保存したものをを用いた (クロマメノキを含めた花粉発芽率 11~47%). また, 交配は, 開花直前の蕾の花弁と雄ずいを取り除いた後, 花粉を綿棒で雌ずいに付着させることにより行った. なお, 他花粉のコンタミを防ぐため, 受粉後 2 週間パラフィン袋で被覆した. 成熟期に果実を収穫し, 着果数と果実内の種子数を調査した. なお, 種子は大きさにより完全種子と不完全種子とに分けて数えた. 予備試験の結果, 不完全種子は全く発芽しなかったため, 発芽試験には完全種子のみを用いた. 1998 年および 2001 年のクロマメノキを種子親とした交雑より得られた種子については, 100 ppm ジベレリンで 10 分間浸漬後, MS 培地 (pH 4.8, 0.3% ジェランガム) (Murashige・Skoog, 1962) に置床し, 発芽したものは育成後順化した. また, 2002 年のクロマメノキを花粉親とした交雑より得られた種子については, 層積後直接培養土 (ボラ土: ピート

第 1 表 クロマメノキ (6x) とハイブッシュブルーベリー数品種 (4x) との正逆交雑における着果率, 種子数および発芽率

種子親	花粉親	交配数	着果数	着果率 (%)	総種子数	完全種子数	不完全種子数	発芽数	発芽率 ² (%)	順化個体数	生存個体数	生存率 ³ (%)
クロマメノキ	‘ウェイマウス’	12	5	41.7	85	2	83	1	50.0	1	1	100.0
	‘スパータン’	21	4	19.0	58	8	50	5	62.5	2	1	20.0
	‘ダロー’	13	4	30.8	81	10	71	10	100.0	3	0	0.0
	‘デキシ’	11	0	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—
	‘パトリオット’	13	2	15.4	68	19	49	16	84.2	4	4	25.0
	‘ブルークロップ’	10	3	30.0	168	42	126	10	23.8	5	4	40.0
	‘ブルーレイ’	13	2	15.4	48	2	46	2	100.0	1	0	0.0
	‘ランコカス’	12	7	58.3	210	30	180	17	56.7	9	3	17.6
	‘レイトブルー’	12	1	8.3	11	6	5	2	33.3	1	0	0.0
‘ウェイマウス’	クロマメノキ	20	0	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—
‘スパータン’		16	0	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—
‘ダロー’		15	2	13.3	34	3	31	2	66.7	—	2	100.0
‘デキシ’		38	0	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—
‘パトリオット’		10	0	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—
‘ブルークロップ’		49	4	8.2	141	12	129	6	50.0	—	5	83.3
‘ブルーレイ’		16	0	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—
‘ランコカス’		16	0	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—
‘レイトブルー’		39	0	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—

² 発芽数/完全種子数 × 100

³ 発芽数/生存個体数 × 100

モス=6:4)に播種し、発芽数とその後の生存個体数を調査した。

生存個体については、5～7年生のRB‘ホームベル’台に接木し、早期育成を図った。こうして得られた系統の中で、クロマメノキ×‘ブルークロップ’より得られた4系統(KB-2, 7, 9および10)の3～5年生接木樹(いずれも13号鉢にボラ土:ピートモス:チップ=6:3:1(v/v)の用土で鉢植え)と同様に鉢植えの両親を供試して、2007年に以下の実験を行った。

2. 雑種性および倍数性の解析

KB4系統の雑種性を解析するために、それらと両親の幼葉1gから、全DNAをCTAB法(Doyle・Doyle, 1987)により抽出し、それを鋳型として、RAPD分析を行った。PCR反応はサーマルサイクラー(PC-700, アステック)を使用し、熱変性95°C・60秒、アニーリング37°C・60秒および伸長反応72°C・90秒を45サイクル行った。反応は全量20μLで行い、その組成は10×Bufferを2μL, 2.0 mM dNTPsを2μL, 5 U・μL⁻¹ rTaq DNA polymerase (TOYOBO)を0.2μL, 10 pmol・μL⁻¹ プライマー (Operon Technologies)を2μL, 鋳型DNAを2μL, S.W.滅菌ミリQを11.8μLとした。プライマーには10merのランダムプライマー40種類(OPA-1～20, OPB-1～20)を用いた。

倍数性を確認するため、フローサイトメーター(FCM, EPICS XL SYSTEM II, Beckman Coulter)を用いた。細胞核の抽出には、Meng・Finn (2002)の方法を一部改変した方法(執行ら, 2013)を用い、各個体から5枚ずつ幼葉を採取し、1枚につき約40mgを切り取ったものをサンプルとして、核の蛍光強度を測定し、倍数性を解析した。また、新梢の先端組織(0.5cm)を採取し、1%ツィーン20加用2mM 8-オキシキノリン水溶液で前処理後、カルノア液(エタノール:酢酸=3:1)で固定した。これらを水洗し、1N HClを用いて解離後、無色塩基性フクシン染色、押しつぶし法にて観察した。

3. 開花期、花の形態、花粉稔性および着果率

開花期(4～6月)にそれぞれ20花を採取し、花の形態を調査するとともに、オープンでの着果率を調査した。また、開花直前の蕾各20花より花粉を採取し、花粉稔性と発芽率を調査した。すなわち、花粉をスライドガラス上に置床し、1%アセトカーミン溶液で染色後、赤く染まった花粉を稔性花粉とした。また、花粉の発芽率については、10%ショ糖と1%寒天を添加した発芽培地に花粉を置床、25°C, 暗黒下で12時間インキュベートした後、光学顕微鏡下で観察した。調査は花粉約300粒の3反復とし、花粉管が花粉の直径よりも長く伸びたものを発芽花粉とした。

4. 果実の成熟期および果実品質

成熟期(6～10月)にそれぞれ20果を採取し、果実重、1果当たりの種子数、縦径、横径、果形指数、果柄長、目の深さ、目の幅、果柄痕幅および果粉の多少を調査した後、-30°Cで冷凍保存した。

果実の糖および有機酸の抽出には冷凍果約2g(3果以上から秤取)を用い、執行ら(2013)の方法に従って行った。糖の分析には、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)[ポンプ:LC-9A(島津製作所), カラムオープン:CTO-6A(島津製作所), 検出器:示差屈折計検出器RID-6A, カラム:SCR-101N(島津製作所), カラム温度:40°C, 移動相:水, 流速0.5 mL・min⁻¹]を用いた。なお、試料の注入量は100μLとし、ブドウ糖、果糖およびショ糖の標品よりそれぞれ作成した検量線をもとに、3種の糖含量を求め、それらの和を全糖含量とした。有機酸の分析には、HPLC[ポンプおよびカラムオープンは糖分析と同様のものを使用, 検出器:電気伝導度検出器CDD-6A(島津製作所), カラム:SCR-101H(島津製作所), カラム温度:45°C, 移動相:5 mM p-トルエンスルホン酸水溶液, 緩衝液:5 mM p-トルエンスルホン酸および100 μM EDTAを含む20 mM Bis-Tris水溶液, 流速(移動相および緩衝液):0.8 mL・min⁻¹]を用いた。なお、試料の注入量は100μLとし、クエン酸、キナ酸、リンゴ酸およびコハク酸の標品よりそれぞれ作成した検量線をもとに、4種の有機酸含量を求め、それらの和を全有機酸含量とした。なお、実験は3反復とした。

5. 果実のポリフェノール成分および抗酸化活性

実験4と同様の冷凍果約2g(3果以上から秤取)を供試し、執行ら(2013)の方法に従い、アントシアニン、総ポリフェノール含量および抗酸化活性を比較した。すなわち、アントシアニンの分析には、定容した抽出試料をシリンジフィルター(0.2 μm)で濾過し分析に供した。分析には、HPLC[ポンプ:PU-2080 plus pump(日本分光), カラムオープン:CO-2065 plus(日本分光), 検出器:マルチチャンネル検出器MD-2010(日本分光), カラム:Inertsil ODS-2(ジーエルサイエンス), カラム温度:35°C, 移動相A液:1.5%リン酸水溶液, B液:25%アセトニトリル, 1.5%リン酸, 20%酢酸の水溶液, 流速:1 mL・min⁻¹, グラジエント条件:0～30分;15%B液→60%B液, 30～55分;60%B液, 55～60分;60%B液→15%B液, 検出波長:525 nm]を用い、試料の注入量は20μLとした。アントシアニンの同定はBallingtonら(1987)の報告および各ピークのUVと可視の吸収スペクトルより行った。また、それぞれのアントシアニン含量については、簡便法としてシアニジン-3-グルコシド(Cy-Glu)を標品として検量線を作成し、各アントシアニンのピーク面積より新鮮重100g当たりのCy-Glu当量として算出した。なお、標品として用いたCy-Gluは熊本大学理学部の吉玉國二郎博士によってキクより抽出、精製されたものである。実験はいずれも3反復とした。

総ポリフェノール含量についてはFolin-Ciocalteu法(Singleton・Rossi, 1965)を一部改変した方法(執行ら, 2013)を用い、765 nmの吸光度で測定を行った。標品には没食子酸を用い、新鮮重100g当たりの没食子酸当量として算出した。実験は3反復とした。

抗酸化活性の測定には、ラジカルとして 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用い、須田 (2000) の方法を改変して行った。すなわち、抽出試料 300 μ L を量り取ってマイクロチューブに移し、遠心式濃縮機 (RD-31, ヤマト科学) にて乾固させ、同量の 80% エタノールで溶解したものをを用いて測定を行った。測定にはマイクロプレートリーダー (MODEL680, 日本バイオラッド・ラボラトリーズ) を使用し、新鮮重 100 g 当たりの Trolox 当量として算出した。実験は 3 反復とした。

結 果

1. クロマメノキと HB 品種との正逆交雑

クロマメノキを種子親として、HB 品種を交配した場合には、‘デキシー’を除いた 8 品種で着果が認められ、花粉親の品種によって差異はあるものの 2 ~ 42 個の完全種子が得られた。これらの完全種子を培養したところ、発芽率 (発芽数/完全種子数 $\times$ 100) は花粉親の品種間で 23.8 ~ 100% と幅があった。また、順化の過程で枯死するものが確認され、生存率 (生存個体数/発芽数 $\times$ 100) も発芽率と同様に 17.6 ~ 100% の幅があったが、クロマメノキ $\times$ ‘ブルークロップ’ の 4 個体 (KB-2, 7, 9 および 10) を含む 5 交配組合せの計 13 個体の実生を獲得することができた。一方、HB 品種を種子親としてクロマメノキを交配した場合には、‘ブルークロップ’ および ‘ダロー’ を種子親とした場合を除き全く着果しなかった。なお、交

第 1 図 クロマメノキと ‘ブルークロップ’ およびそれらの交雑から得られた KB4 系統における雑種性の解析
図中の矢印はそれぞれ両親の特異的なバンドを示す
M: 1 kbp ラダーマーカー, K: クロマメノキ, 2: KB-2, 7: KB-7, 9: KB-9, 10: KB-10, B: ‘ブルークロップ’

配して得られた種子を層積後播種したところ、2 交配組合せの計 7 個体の実生を得ることができ、生存率はそれぞれ 83.3% および 100% であった (第 1 表)。

2. 雑種性および倍数性の解析

RAPD 法による DNA 解析の結果 (第 1 図), OPB-8 (5'-GTCCACACGG-3') および OPB-19 (5'-ACCCCCGAAG-3') の 2 種類のプライマーを用いた場合にそれぞれ両親の特異的なバンドが検出された。すなわち、OPB-8 では、KB4 系統はいずれも 300 bp 付近に ‘ブルークロップ’ の、400 bp 付近にクロマメノキのそれぞれ特異的なバンドを有していた。OPB-19 では、KB4 系統はいずれも 575 bp 付近と 2,000 bp 付近にクロマメノキの特異的なバンドを有し、KB-2 と KB-9 については、それぞれ 750 bp 付近と 1,200 bp 付近に ‘ブルークロップ’ の特異的なバンドを有していた。従って、KB4 系統はいずれもクロマメノキと ‘ブルークロップ’ との節間雑種であることが示された。

次に、FCM により倍数性を解析した結果 (第 2 図), クロマメノキは六倍体, ‘ブルークロップ’ は四倍体の位置に

第 2 図 クロマメノキと ‘ブルークロップ’ およびそれらの交雑から得られた KB4 系統における倍数性の解析

第3図 クロマメノキと‘ブルークロップ’およびそれらの交雑から得られたKB4系統の体細胞染色体数
スケールは10 μm

相対蛍光強度のピークが認められた。これらに対し、KB4系統はいずれも五倍体の位置に相対蛍光強度のピークが認められた。また、体細胞における染色体数を観察した結果(第3図)、クロマメノキは72本の六倍体、‘ブルークロップ’は48本の四倍体であり、KB4系統はいずれも60本の五倍体であることが確認された。

3. 開花期、花の形態、花粉稔性および着果率

‘ブルークロップ’とクロマメノキの開花期は、それぞれ4月中旬より約1か月と4月下旬より約2か月であった

第2表 クロマメノキと‘ブルークロップ’およびそれらの交雑から得られたKB4系統における開花期、形態、花粉稔性
およびオープン着果率

品種・系統	開花期(月)	花序	花の形態	花色	花粉稔性(%)		着果率(%)
					稔実率	発芽率	
クロマメノキ	4下～6下旬	1～2花	壺形	白色または桃色	89.6 c ²	30.0 b	42.6
KB-2	4中～5中旬	1～2花	短い鐘形	白色	71.2 b	3.9 a	13.1
KB-7	4中～6月上旬	1～2花	短い鐘形	白色	66.3 b	13.9 ab	36.0
KB-9	4中～6月上旬	1～2花	短い鐘形	白色	39.7 a	8.7 a	13.5
KB-10	4中～6月上旬	1～2花	短い鐘形	白色	66.5 b	7.6 a	54.2
‘ブルークロップ’	4中～5中旬	短い総状花序	長い鐘形	白色	97.3 c	76.5 c	80.6

² 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

が、KB-2を除く3系統では、4月中旬より2か月弱であった。‘ブルークロップ’とクロマメノキの花は、それぞれ長い鐘形と壺形であったが、KB4系統のそれらはいずれも短い鐘形であった。花色はクロマメノキが白または桃色であったのに対し、‘ブルークロップ’およびKB4系統は白色であった。両親であるクロマメノキおよび‘ブルークロップ’の花粉の稔実率はそれぞれ89.6%と97.3%であったのに対し、KB4系統は系統間で差があるものの、39.7～71.2%と両親に比べ低い値を示した。また、発芽率は‘ブルークロップ’が約75%、クロマメノキが30%であったのに対し、KB-7(13.9%)を除いた3系統ではいずれも10%以下と低い値を示した。オープンでの着果率は、KB-2, 7, 9および10で、それぞれ13.1, 36.0, 13.5および54.2%とKB-10で最も高く、KB-2で最も低かった(第2表)。

4. 果実の成熟期および果実品質

果実の成熟期は、‘ブルークロップ’に比べクロマメノキおよびKB4系統で遅く、成熟の期間も‘ブルークロップ’に比べ半月以上長かった。果実重と果実の大きさは、‘ブルークロップ’で大きく、クロマメノキで小さかったが、KB-2を除いた3系統は両親の間の値を示した。また、KB4系統の横径/縦径比は1に近く、クロマメノキ同様球型に近かった。果実1果当たりの種子数は、‘ブルークロップ’で47.1個と多く、クロマメノキで19.6個と少なかったが、KB-7, 9および10ではそれぞれ6.0, 5.0および14.3個といずれもクロマメノキより少なかった。KB4系統の果柄長はいずれも両親より長く、両親に見られない1対の小葉を有した。目の深さ、幅はともにクロマメノキより‘ブルークロップ’で大きく、KB4系統では深さは系統間でばらつきが見られたものの、幅はいずれも両親の間の値を示し、クロマメノキと同程度に小さかった。果柄痕もクロマメノキより‘ブルークロップ’で大きく、KB4系統は両親の間の値を示し、‘ブルークロップ’と同程度に大きいKB-10を除き、残りの3系統はクロマメノキと同程度に小さかった。また、両親およびKB-7を除いた3系統では、果皮表面に果粉が多かったが、KB-7では非常に少なかった(第3表、第4図)。

成熟果の糖含量はクロマメノキで低く、‘ブルークロップ’で高かった。KB4系統ではいずれもクロマメノキと

第3表 クロマメノキと‘ブルークロップ’ およびそれらの交雑から得られた KB4 系統における成熟期および果実形態

品種・系統	成熟期 (月)	果実重 (g)	種子数 / 果	果実の大きさ (mm)		果形指数 ^z	果柄長 (mm)	果柄葉の有無	目の大きさ (mm)		果柄痕 (mm)
				縦径	横径				深さ	幅	
クロマメノキ	7 中～9 上旬	0.73 ab ^y	19.6	11.8 c	10.1 ab	0.86 a	6.0 a	時に有り	0.6 a	3.0 a	1.36 a
KB-2	8 上～9 下旬	0.57 a	— ^x	9.3 a	9.6 a	1.03 b	8.1 a	有り	0.8 ab	4.3 a	1.57 a
KB-7	7 上～10 上旬	1.08 c	6.0	12.3 c	11.9 c	0.97 ab	11.9 c	有り	1.0 a-c	4.8 a	1.55 a
KB-9	7 中～8 下旬	1.02 bc	5.0	11.2 bc	11.8 bc	1.05 b	12.9 c	有り	1.2 bc	3.8 a	1.64 ab
KB-10	7 中～10 中旬	0.80 bc	14.3	10.6 b	11.0 bc	1.04 b	10.6 bc	有り	0.5 a	3.7 a	2.58 bc
‘ブルークロップ’	6 下～7 中旬	1.99 d	47.1	11.7 c	16.7 d	1.43 c	6.5 a	無し	1.3 c	6.6 b	2.77 c

^z 横径/縦径^y 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^x 未調査 第4図 クロマメノキと‘ブルークロップ’ およびそれらの交雑から得られた KB4 系統の果実
スケールは 1 cm

同程度に低い値を示したものの、KB-7は両親の間の値を示した。なお、糖の組成については、いずれも果糖とブドウ糖が等量で、ショ糖の割合は極めて少なかった。一方、有機酸含量はクロマメノキで高く、‘ブルークロップ’で低かった。KB4 系統ではKB-7および9はクロマメノキと同程度に高かったが、他の系統ではクロマメノキより有意に低く、‘ブルークロップ’と同程度の値を示した。なお、酸の組成については、クロマメノキはクエン酸が50%を占め、次いでリンゴ酸とクエン酸が等量であり、コハク酸は0.2%とわずかであった。一方、KB4 系統ではいずれも‘ブルークロップ’同様クエン酸が80%を占め、次いでクエン酸、リンゴ酸、コハク酸の順であった (第5図)。

5. 果実のポリフェノール成分および抗酸化活性

成熟果のアントシアニン含量は、‘ブルークロップ’が $97 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ であったのに対し、クロマメノキおよ

第5図 クロマメノキと‘ブルークロップ’ およびそれらの交雑から得られた KB4 系統における成熟果の糖および有機酸含量とそれらの組成

^z 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

グラフ左：糖含量，右：有機酸含量

び KB4 系統では約 $190 \sim 230 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ といずれも‘ブルークロップ’に比べ有意に高い値を示した。また、クロマメノキでは検知されず、‘ブルークロップ’で検知されたシアニジン -3- モノガラクトシド (Cy-Gal) が KB-2 を除いた3系統で検知された。クロマメノキのマルピジン -3- モノグルコシド (Mv-Glu) の割合は41%と高く、‘ブルークロップ’のそれは13%と低かったが、KB4 系統のそれらの割合は23～39%と両親の間の値を示した (第6図)。

成熟果の総ポリフェノール含量は、‘ブルークロップ’で $221 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ であったのに対し、クロマメノキでは $502 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ と有意に高かった。KB-2を除いた3系統は両親の間の値を示し、KB-2は両親よりも有意に高い値を示した。また、抗酸化活性は‘ブルークロップ’で $1,664 \mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ と低く、クロマメノキおよび KB-2 でそれぞれ $2,351$ および $2,761 \mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ と有意に高かった。また、KB-2を除く3系統は両親の間の値を示した (第7図)。

第6図 クロマメノキと‘ブルークロップ’およびそれらの交雑から得られたKB4系統における成熟果のアントシアニン含量とその組成

Dp: デルフィニジン, Cy: シアニジン, Pt: ペチュニジン, Pn: ペオニジン, Mv: マルビジン, Gal: ガラクトシド, Glu: グルコシド, Ara: アラビノシド

いずれも3位の位置に糖が結合

^a 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

第7図 クロマメノキと‘ブルークロップ’およびそれらの交雑から得られたKB4系統における成熟果の総ポリフェノール含量および抗酸化活性

^a 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

考 察

クロマメノキは, ブルーベリー栽培種と異なる *Vaccinium* 節に属し, ヨーロッパ北部, コーカサス, 北東中国, 韓国, 日本および北アメリカなどに分布しているが, グリーンランドに分布する二倍体と, より広範囲に分布する四倍体が知られており, 我が国に自生する同種は六倍体であることが報告されている(原, 1953)。

本研究における六倍体のクロマメノキと四倍体のHB品種との正逆交雑では, クロマメノキを種子親に用いた場合には着果が認められ, 種子が得られたが, 逆交雑ではほとんど着果が認められなかった。*Vaccinium* 属の種間交雑において, 正逆による雑種獲得率を比較した報告は比較的少ないが, 二倍体種間の交雑において正逆交雑で雑種獲得率

に違いがある(Ballington・Galletta, 1978; Galletta, 1975)こと, 四倍体HB×六倍体RBの交雑ではその逆交雑に比べて雑種獲得率が高かった(Galletta, 1975)ことなどが報告されている。一方, いくつかの被子植物の種間または節間では, 一側交雑不和合性が報告されている(Ascher・Peloquin, 1968; Nkongolo ら, 1991; Pandey, 1969)。ブルーベリーの属するツツジ科においても, Ureshino ら(2000)が, 常緑性ツツジとキレンゲツツジとの正逆交配では, キレンゲツツジを花粉親に用いた場合にのみ着果し, 種子が得られる一側交雑不和合性を示し, その原因はキレンゲツツジを種子親に用いた場合に花粉管が花柱上部で伸長を停止することによるとしている。また, HB品種と北欧に自生する四倍体のクロマメノキとの正逆交雑では, クロマメノキを花粉親にした場合には種子が得られたものの発芽には至らず, 逆交雑の場合には種子が発芽し, 節間雑種が得られており(Rousi, 1963), 本研究におけるHB品種とクロマメノキとの交雑で, 着果や種子がほとんど得られない原因は倍数性の相違というよりも, 一側交雑不和合性によるものと推察されたが, 今後花柱における花粉管伸長などについて調査が必要であると考えられた。

また, Ureshino ら(2000)は常緑性ツツジとキレンゲツツジとの正逆交配において, 常緑性ツツジを種子親に用いた場合には多数の実生が得られるが, そのほとんどがアルビノであり, その原因は常緑性ツツジ由来の葉緑体ゲノムとキレンゲツツジ由来の核ゲノム間の不和合性によることを報告(Ureshino ら, 1999)している。さらに, Ureshino・Miyajima (2002)は, ミヤマキリシマ×キレンゲツツジの節間交雑において, 葉緑体DNAが父性遺伝してキレンゲツツジ由来の場合には緑色実生となることを示したが, 1個体の緑色実生はミヤマキリシマ由来の葉緑体DNAを有し, 葉緑体DNAが母性遺伝していたが, 核ゲノムがミヤマキリシマ:キレンゲツツジ=2:1の三倍体であった

ことから、このような核ゲノムの構成比では葉緑体／核ゲノム不和合性が生じないものと推察している。KB4 系統はいずれも緑葉であったが、これらは種子親であるクロマメノキ由来の葉緑体ゲノムとクロマメノキ由来の 3x および ‘ブルークロップ’ 由来の 2x の核ゲノム構成を持つと推察され、その構成比より葉緑体／核ゲノムの不和合が生じないものと推察された。実際に KB4 系統に HB 品種を交配した場合に得られた実生のほとんどが、アルビノあるいは斑入りの個体であったが、緑葉の個体も観察されていること（データ略）から、今後 KB4 系統だけでなく KB4 系統 × HB 品種で得られた実生についても、FISH 法や GISH 法などを用いた核ゲノム構成や葉緑体ゲノムの解析が必要と考えられた。

KB4 系統はいずれもクロマメノキと ‘ブルークロップ’ との五倍体の節間雑種であり、形態的異常も認められず、花粉にも稔性があり、いずれもオープンで着果が認められた。Moore (1965) は、HB 品種と RB 品種の交雑から得られた F_1 の五倍体雑種は、一般に樹勢は強いが、育種素材としてはほとんど価値がないことを報告した。しかしながら、Jelenkovic・Draper (1973) は、これらの五倍体雑種に両親を戻し交雑することが可能であることを示した。また、Vorsa ら (1986) は、五倍体雑種と HB 品種とで正逆交雑を行い、染色体数 48 ~ 58 本の四倍体および異数体の後代が得られることを示し、五倍体雑種が染色体数 24 ~ 34 本の異数性花粉および卵を高い頻度で生産し、それらに生殖能力があることを推察し、五倍体がいわゆる『橋渡し植物』として利用できることを報告している (Vorsa ら, 1987a, 1987b)。本研究とは種間雑種と節間雑種の違いがあるが、KB4 系統を種子親として HB 品種の交雑が可能であり、アルビノや斑入り個体が出現するが、実生が得られることから、生殖能力のある配偶子を形成しているものと推察された。なお、果樹では単為結果性が存在し、着果を示すことが必ずしも種子形成と直接関係しない場合も多い。RB 品種と HB 品種との交雑より得られた五倍体雑種の着果率は系統間で変異が大きく、ほとんど着果しない系統からある程度着果する系統まで存在するが、着果が見られた系統でも種子は極めて少なく、種子が全くない系統もあったことが報告されている (Darrow ら, 1944)。本研究における KB4 系統の着果率は平均 29.2% と両親より低いものの、オープン条件下で着果が確認されただけでなく、未調査の KB-2 を除く 3 系統で 1 果当たり平均 8.4 個種子が得られることが明らかとなった。いずれにしても、五倍体に生殖能力があることは極めて興味深いことであり、今後 HB 品種を交配して得られた実生の倍数性などを調査する必要がある。

ブルーベリー果実には、アントシアニンのようなフラボノイド型フェノール化合物が多く含まれる (Macheix ら, 1990) が、フェルラ酸、*p*-クマル酸およびコーヒー酸などのヒドロキシケイヒ酸類やクロロゲン酸などの非フラボ

ノイド型フェノール化合物も含まれている (Häkkinen ら, 1999; Schuster・Herrmann, 1985)。従って、それらの成分を多く含有しているブルーベリーや近縁野生種であるビルベリー (*V. myrtillus* L.) は高い抗酸化能を示す (Kähkönen ら, 2001; Kalt・Lawand, 2003) ことが知られている。本研究では、アントシアニンについては、個々のアントシアニン含量として求めたが、抗酸化能を示すフェノール化合物については総ポリフェノール含量として分析した。KB4 系統のアントシアニン含量は、いずれもクロマメノキ同様に高く、アグリコンがマルビジンのアントシアニンの割合が多かったが、佐々木 (1995) はクロマメノキの主要なアントシアニンがマルビジン系であることを報告している。KB4 系統はいずれも ‘ブルークロップ’ に比べ果実が小さく、低糖、高酸で果実の品質面では劣るものと思われたが、アントシアニンおよびポリフェノール含量が高く、抗酸化活性も高かったことから、より機能性に富むものと思われた。栽培種のブルーベリーは果皮のみにアントシアニンが存在し、クロマメノキも同様であったことから、KB4 系統にも果肉の着色は認められなかった。アントシアニンを含むポリフェノールはその多くが果皮に存在しており (Wang ら, 2012)、果皮の厚さなども関係するが、果実が小さいクロマメノキおよび KB4 系統では、‘ブルークロップ’ に比べて果実新鮮重当たりの果皮の割合が高いので、そのことが果実全体の機能性の高さに関係しているものと考えられた。なお、Folin-Ciocalteu 法は、試料液中のアスコルビン酸の影響を受けるため、ポリフェノールを定量する場合にはその影響を考慮する必要がある (Singleton・Rossi, 1965) が、Prior ら (1998) はビルベリーを含む 23 の品種および系統のスノキ属植物について調査し、総フェノール含量に対してアスコルビン酸含量の割合は平均 3.5% と低いことを報告しており、本実験においてもアスコルビン酸は総ポリフェノール含量にほとんど影響を及ぼさないものと考えられた。

KB4 系統は五倍体であり、花粉稔性および着果率とともに低いことから、経済品種としての直接的利用には問題が多いと考えられる。しかしながら、両親にない果柄上に 1 対の小葉を有する特徴から、果実を葉付きでトッピング材として利用するなど新たなブルーベリーとして提案できるものと思われる。また、葉緑体／核ゲノムの不和合性を考慮する必要があるが、果実中のアントシアニン含量やポリフェノール含量が高く、花粉稔性や種子稔性もあることから、育種の中間母本や父本としての利用は十分に可能であると思われた。

摘 要

我が国の環境に適し、果実の品質、機能性ともに高い品種の育成を目的として、我が国に自生する野生種のクロマメノキ (*Vaccinium uliginosum* L. section *Vaccinium*) ($2n=6x=72$) とハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum* L. section

Cyanococcus) ($2n=4x=48$) 数品種との正逆交雑を行い、節間交雑の可能性を検討した。その結果、クロマメノキを種子親とした場合には、9 交配組合せから 8 交配組合せで完全種子が得られ、5 交配組合せで計 13 個体の実生が得られた。それに対し、花粉親とした場合には、計 7 個体の実生が得られたものの、完全種子が得られたのが 9 交配組合せ中 2 交配組合せのみであった。このようにクロマメノキと HB 品種間では一側交雑不和合性が認められ、クロマメノキを種子親とした場合に、比較的容易に種子が得られることが明らかとなった。これらの種子は、ジベレリンで前処理後培養、または層積後播種することで発芽した。これらの中から、クロマメノキと‘ブルークロップ’との交雑から得られた 4 個体の交雑実生 (KB4 系統 : KB-2, 7, 9 および 10) を接木し、雑種性、倍数性、花や果実の形態的特徴および果実品質を評価した。RAPD 分析により、KB4 系統はいずれも *Vaccinium* 節と *Cyanococcus* 節との節間雑種であることが確認された。また、フローサイトメトリおよび新梢先端組織の細胞の染色体数を観察することにより、KB4 系統が五倍体であることが明らかになったが、いずれの系統でも稔性花粉が生産されており、オープン条件下で着果が見られた。それらの果実は、両親とは異なり、果柄に 1 対の小葉を有しており、果実のアントシアニンおよびポリフェノール含量と抗酸化活性は系統間で異なったが、KB-2 のそれらの値は‘ブルークロップ’より有意に高かった。これらの雑種は、高品質と高機能性を有する新品種を育成するための有用な育種材料になり得ると思われる。

引用文献

- Ascher, P. D. and S. J. Peloquin. 1968. Pollen tube growth and incompatibility following intra- and inter-specific pollinations in *lilium longiflorum*. Amer. J. Bot. 55: 1230–1234.
- Ballington, J. R. 1990. Germplasm resources available to meet future needs for blueberry cultivar improvement. Fruit Varieties J. 44: 54–62.
- Ballington, J. R., W. E. Ballinger and E. P. Maness. 1987. Interspecific differences in the percentage of anthocyanins, aglycones, and aglycone-sugars in the fruit of seven species of blueberries. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112: 859–864.
- Ballington, J. R. and G. J. Galletta. 1978. Comparative crossability of 4 diploid *Vaccinium* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103: 554–560.
- Camp, W. H. 1945. The North American blueberries with notes on other groups of *Vacciniceae*. Brittonia 5: 203–275.
- Coville, F. V. 1927. Blueberry chromosomes. Science 66: 564–565.
- Darrow, G. M., W. H. Camp, H. E. Fischer and H. Dermen. 1944. Chromosome numbers in *Vaccinium* and related groups. Bull. Torrey Bot. Club 71: 498–506.
- Darrow, G. M., H. Dermen and D. H. Scott. 1949. A tetraploid blueberry. From a cross of diploid and hexaploid species. J. Hered. 40: 304–306.
- Doyle, J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11–15.
- Galletta, G. J. 1975. Blueberries and cranberries, p. 154–196. In: J. N. Moore and J. Janick (eds.). Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press, Lafayette.
- Häkkinen, S., M. Heinonen, S. Kärenlampi, H. Mykkänen, J. Ruuskanen and R. Törrönen. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. Food Res. Int. 32: 345–353.
- 原 寛. 1953. クロマメノキ—北半球広分布種における諸変異 (2). J. Jpn. Bot. 28: 83–92.
- Jelenkovic, G. and A. D. Draper. 1973. Breeding value of pentaploid interspecific hybrids of *Vaccinium*. J. Yugoslav Pomol. 25–26: 237–244.
- Kähkönen, M. P., A. I. Hopia and M. Heinonen. 2001. Berry phenolics and their antioxidant capacity. J. Agric. Food Chem. 49: 4076–4082.
- Kalt, W. and C. Lawand. 2003. Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128: 917–923.
- Lyrene, P. M. 1993. Some problems and opportunities in blueberry breeding. Acta Hort. 346: 63–70.
- Lyrene, P. M. and W. B. Sherman. 1980. Horticultural characteristics of native *Vaccinium darrowi*, *V. elliotii*, *V. fuscatum*, and *V. myrsinites* in Alachua county, Florida. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 393–396.
- Lyrene, P. M. and W. B. Sherman. 1983. Mitotic instability and 2n gamete production in *Vaccinium corymbosum* × *V. elliotii* Hybrids. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108: 339–342.
- Macheix, J. J., A. Fleurient and J. Billot. 1990. Fruit phenolics. p. 378. CRC Press, Boca Raton.
- Meng, R. and C. Finn. 2002. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 767–775.
- Moore, J. N. 1965. Improving highbush blueberries by breeding and selection. Euphytica 14: 39–49.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol. Plantarum 15: 473–497.
- Nkongolo, K. K. C., C. A. St-Pierre and A. Comeau. 1991. Effect of parental genotypes, cross direction and temperature on the crossability of bread wheat with triticale and on the viability of F_1 embryos. Ann. Appl. Biol. 118: 161–168.
- Pandey, K. K. 1969. Elements of the S-gene complex V.

- Interspecific cross-compatibility relationships and theory of the evolution of the complex. *Genetica* 40: 447–474.
- Prior, R. L., G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. McEwen, C. O'Brien, N. Lischner, M. Ehlenfeldt, W. Kalt, G. Krewer and C. M. Mainland. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2686–2693.
- Rousi, A. 1963. Hybridization between *Vaccinium uliginosum* and cultivated blueberry. *Ann. Agric. Fenn.* 2: 12–18.
- 佐々木 務. 1995. ビルベロン（ビルベリーエキス）の開発と利用. p. 119–122. 21世紀のブルーベリー学. 日本ブルーベリー協会. 東京.
- Schuster, B. and K. Herrmann. 1985. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry* 24: 2761–2764.
- Sharpe, R. H. and W. B. Sherman. 1976. 'Floridablue' blueberry. *HortScience* 11: 64–65.
- Sherman, W. B. and R. H. Sharpe. 1977. 'Avonblue' blueberry. *HortScience* 12: 510.
- 執行みさと・竹馬昂平・國武久登・小松春喜. 2013. 日本原生キイチゴ属植物数種の育種素材としての評価. 園学研. 12: 335–342.
- Singleton, V. L. and J. A. Rossi, Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* 16: 144–158.
- 須田隋夫. 2000. 抗酸化機能. p. 218–223. 篠原和毅ほか編著. 食品機能研究法. 光琳. 東京.
- 玉田孝人. 1996. ブルーベリー生産の基礎 [4]. 農業および園芸. 71: 1127–1238.
- Ureshino, K., M. Kawai and I. Miyajima. 2000. Factors of intersectional unilateral cross incompatibility between several evergreen azalea species and *Rhododendron japonicum* f. *flavum*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 69: 261–265.
- Ureshino, K. and I. Miyajima. 2002. The study on the relationship between leaf colors and ptDNA inheritance in intersectional cross of *Rhododendron kiusianum* × *R. japonicum* f. *flavum*, resulting in an unexpected triploid progeny. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 71: 214–219.
- Ureshino, K., I. Miyajima, Y. Ozaki, N. Kobayashi, A. Michishita and M. Akabane. 1999. Appearance of albino seedlings and ptDNA inheritance in interspecific hybrids of azalea. *Euphytica* 110: 61–66.
- Vorsa, N., G. Jelenkovic, A. D. Draper and G. J. Galletta. 1987a. Crossability of BC₁ aneuploid and tetraploid progeny derived from *Vaccinium ashei/corymbosum* pentaploid hybrids. 1987. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 998–1004.
- Vorsa, N., G. Jelenkovic, A. D. Draper and W. V. Welker. 1986. Aneuploid seedlings derived from pentaploid *Vaccinium austral* × *V. ashei* hybrids. *J. Hered.* 77: 114–118.
- Vorsa, N., G. Jelenkovic, A. D. Draper and W. V. Welker. 1987b. Fertility of 4x × 5x and 5x × 4x progenies derived from *Vaccinium ashei/corymbosum* pentaploid hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 993–997.
- Wang, S. Y., M. J. Camp and M. T. Ehlenfeldt. 2012. Antioxidant capacity and α-glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chem.* 132: 1759–1768.