

東海大学大学院平成 26 年度博士論文

我が国に自生するスノキ属野生種を利用した
ブルーベリーの育種に関する研究

指導 小松 春喜 教授

東海大学大学院生物科学研究科生物科学専攻

執行 みさと

我が国に自生するスノキ属野生種を利用した
ブルーベリーの育種に関する研究

執行 みさと

目 次

緒論	1
謝辞	7
第1章 我が国に自生するスノキ属野生種の育種素材としての評価	
1. 緒言	8
2. 材料および方法	9
3. 結果	15
4. 考察	40
第2章 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 ‘ブルークロープ’との節間交雑から得られた F ₁ 系統の評価	
1. 緒言	48
2. 材料および方法	49
3. 結果	52
4. 考察	69
第3章 クロマメノキとラビットアイブルーベリーT100 との節間交雑から 得られた F ₁ 系統の評価	
1. 緒言	73
2. 材料および方法	74
3. 結果	76
4. 考察	98
総合考察	101
摘要	105

引用文献 · · · · · 108

緒 論

ブルーベリーは、ツツジ科 (*Ericaceae*) スノキ属 (*Vaccinium*) に分類される北米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る。スノキ属は 10 節に分類されるが (第 1 表), 果樹園芸上および食品産業上重要なものは *Cyanococcus* 節に属する栽培ブルーベリー (cultivated blueberry) のハイブッシュブルーベリー (*Vaccinium corymbosum* L.) (以下 HB と略記), ラビットアイブルーベリー (*V. virgatum* Aiton) (以下 RB と略記) および野生種のローブッシュブルーベリー (*V. angustifolium* Aiton と *V. myrtilloides* Aiton) (以下 LB と略記) の 3 つであり (Vander Kloet, 1988 ; Eck・Childers, 1966), それらの果実は, 生果はもちろんジャムやソースなどの加工特性が広く, 機能性食品としても注目されている果樹である。

我が国のブルーベリー栽培は, 1951 年農林省北海道農業試験場が米国マサチューセッツ農業試験場から HB を導入したことが始まりである。世界大戦後の時代背景から栽培普及は遅れ, 経済栽培に取り入れられたのは 1970 年代半ば以降であるが, 1980 年以降は栽培面積および果実収穫量ともに増大し, 2011 年でそれぞれ 1,041 ha および 2,452 t となっている。主産地 (収穫量) は, 長野県 (545 t), 群馬県 (282 t), 茨城県 (211 t) であり, 比較的冷涼な地域で栽培されている。近年, 九州地方においても収穫量が増大してきており, 熊本県で 45.6 t, 次いで, 福岡県, 宮崎県でそれぞれ 43.3 t, 18.6 t となっている (農林水産省統計資料, 2011)。

一般に, 野菜や果物はビタミン C, ビタミン E, カロチノイド (Cao ら, 1996 ; Wang ら, 1996) などに加え, フラボン, イソフラボン, フラバノン, アントシアニン, カテキンなどのフラボノイド類 (Cao ら, 1997) などの強い抗酸化力を持つ様々なフィトケミカル (植物性化学物質) を含有しており, それらは癌, 心臓疾患, 血管系疾患などの多くの疾病の原因または進行に関与するとされるフリーラジカルを中和し, これらの疾病の予防に重要であると考えられている (Halliwell, 1994 ; Yu, 1994)。中でもブルーベリーの果実については, 抗酸化力が高いことが注目され, これまでに HB, RB およびサザンハイブッシュブルーベリー (以下 SHB と略記) などの栽培種や LB を含む

第1表 スノキ属植物の植物学的分類(Vander Kloet, 1988)

科 (family)	亜科 (subfamily)	属 (genus)	節 (section)	種(一般名) (species)
Ericacea ツツジ	Vaccinioideae スノキ	Vaccinium スノキ	— <i>Batodendron</i>	
			— <i>Cyanococcus</i>	— ハイブッシュブルーベリー — ラビットアイブルーベリー — ローブッシュブルーベリー
			— <i>Herpothamnus</i>	
			— <i>Myrtillus</i>	— ビルベリー
			— <i>Oxycoccoides</i>	
			— <i>Oxycoccus</i>	— クランベリー
			— <i>Polycodium</i>	
			— <i>Pyxothamnus</i>	
			— <i>Vaccinium</i>	
			— <i>Vitis-idaea</i>	— リンゴンベリー

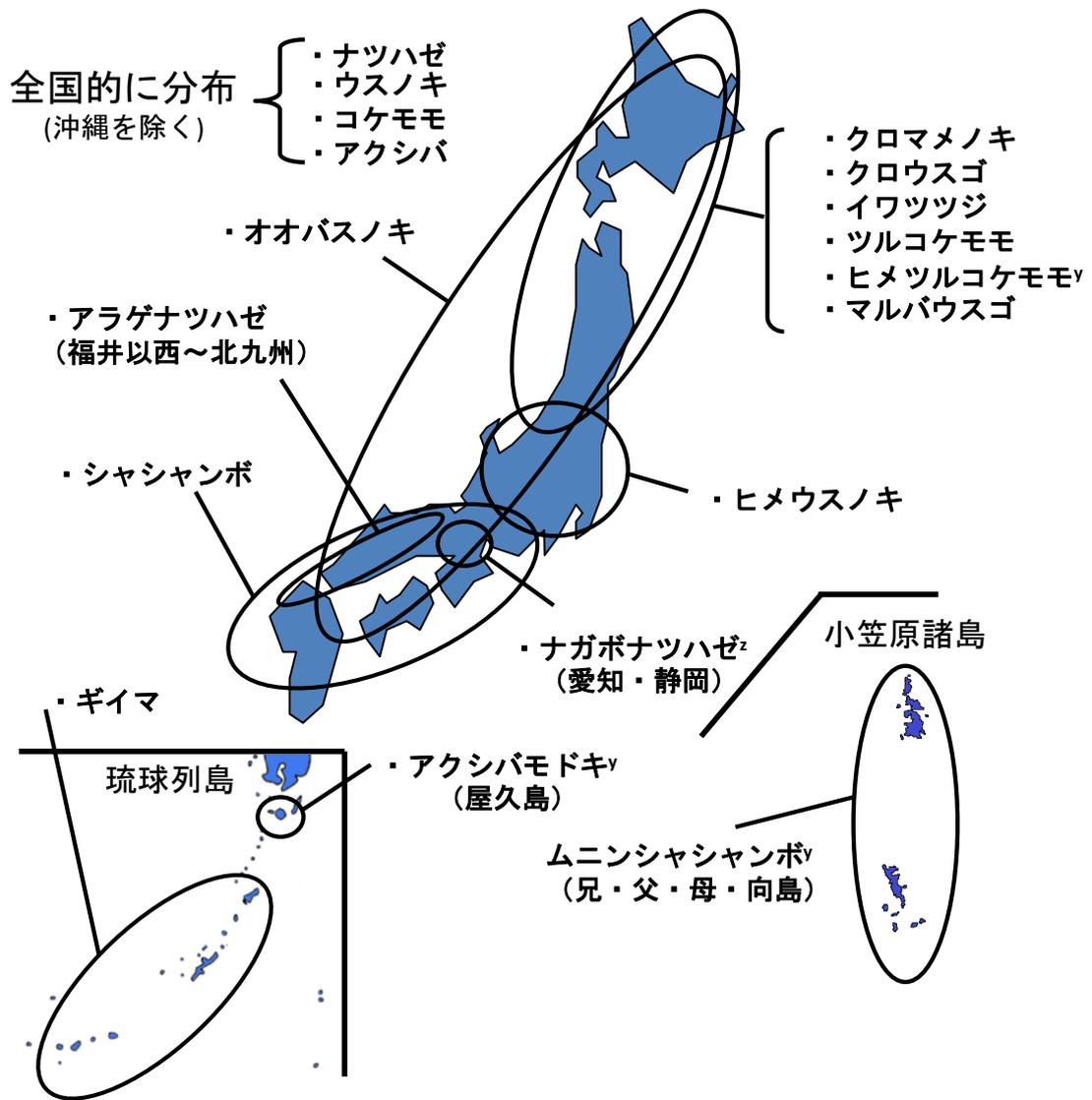
野生種などについて、アントシアニン含量、フェノール含量および抗酸化力（Oxygen Radical Absorbance Capacity : ORAC）などが調べられており（Cao ら, 1993 ; 1995 ; 1996 ; Wang ら, 1996 ; Ballington ら, 1987 ; Ballinger ら, 1979 ; Gao・Mazza, 1994）、主に果皮に含まれる色素のアントシアニンが眼精疲労の回復に効果があることや抗酸化作用が強く生活習慣病の予防に有効であることなどが指摘されている（梶本ら, 1998）。このような背景に加え、近年の健康志向の高まりによりブルーベリーの機能性食品としての評価が高まり、アントシアニン含量や抗酸化活性がより高いものが消費者に求められている。しかしながら、ブルーベリーの栽培種は我が国に比べ降雨量の少ない北米で改良されたものであり、生育期に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、栽培品種のほとんどが北米で改良されたものであり、我が国の気候、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。

ブルーベリーの育種は 1908 年から米国農務省が中心となって開始された（Coville, 1910 ; 1921）。HB の品種改良は、耐寒性、耐暑性など栽培適応性が広く、大粒で品質に優れるものを野生種より選抜し、その系統間交雑から 1920 年に‘パイオニア’、‘カボット’、‘キャサリン’が育成された（Galletta・Ballington, 1996a）。また、RB の品種改良は、1925 年にジョージア州の試験場で始まり、1940 年には米国農務省との協同育種事業が始まった。その結果、1950 年に‘キャラウェイ’、‘コースタル’、‘ホームベル’、1955 年には‘ティフブルー’、1958 年には‘ガーデンプルー’、‘メンディット’が育成された（岩垣・石川, 1984）。現在、米国やニュージーランドを中心として 200 を超える品種が登録されているが、これらの品種はいずれも *Cyanococcus* 節の種間および種内交雑から育成されたものである。また、ブルーベリーは倍数性作物であり、栽培ブルーベリーである HB および RB はそれぞれ四倍体と六倍体である。*Cyanococcus* 節の野生種は栽培種と同様に四倍体および六倍体のものも存在するが、多くが二倍体で（Camp, 1945）、有用形質を持つものがあり（Ballington, 1990）、欧米では以前より栽培種と野生種との交配が行われている（Darrow ら, 1949 ; Lyrene, 1993）。

Lyrene・Ballington (1986) は、ブルーベリーの遺伝資源を 3 つに大別し、HB, RB および LB の 3 種を第 1 のプール、栽培化されていない *Cyanococcus* 節の野生種を第 2 のプール、*Cyanococcus* 節以外の節の種を第 3 のプールとして分類している。フロリダ州で行われた低温要求量の少ない暖地向けの HB の作出を目標とした育種には、第 2 のプールに属する二倍体野生種 *V. darrowii* Camp. が利用され、ブルーベリー栽培種との交配より得られた種間雑種は SHB として現在広く普及しつつある。しかしながら、これらのブルーベリー栽培種はいずれも第 1 と 2 のプール、すなわち *Cyanococcus* 節内の非常に狭いバックグラウンドからなっている。近年、育種における変異の拡大を目的として、第 3 のプールに属する野生種の特徴を明らかにするとともに、それらを利用した節間雑種の作出に関する研究が積極的に行われており (Darrow・Camp, 1945 ; Ballington, 1980 ; Lyrene・Ballington, 1986), Ehlenfeldt・Polashock (2014) は *Hemimyrtillus* 節に属する四倍体野生種 *V. padifolium* と HB との節間雑種を育成している。

一方、我が国にはブルーベリーと同じ *Cyanococcus* 節に属する植物は自生していないが、Lyrene・Ballington (1986) が分類した第 3 のプールに属するスノキ属植物は全国に広く分布している (第 1 図, 第 2 表)。これらの中には果実が食用とされるものもあり、一部の趣味家や土地の人々によって生食、ジャムやジュースなどに利用されてきた。しかし、米国とは異なり、我が国ではスノキ属野生種の改良はもちろん、栽培化も行われず、育種素材としてもこれまで全く利用されてこなかった。

そこで本研究では、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、それらの育種素材としての評価を行った。次に、野生種の中で最も果実が大きく、野生の果実が採取利用されてきたクロマメノキとブルーベリー栽培種との節間交雑が可能かどうかを検討した。さらに、得られた実生個体を育成し、雑種性や倍数性を解析するとともに、それらの特性、すなわち葉や花、果実の形態や放任受粉での結実性などを調査した。また、果実の品質と機能性の観点から糖および有機酸含量に加え、アントシアニンやポリフェノール含量を分析するとともに、DPPH ラジカル消去法による抗酸化機能を比較した。



第1図 我が国に自生するスノキ属野生種18種の分布

^z絶滅危惧種 I A類(CR)

^y絶滅危惧種 II類(VU)

第2表 我が国に自生するスノキ属植物の分類および園芸学的特徴(北村・村田, 1974; 佐竹ら, 1989a; 1989b; 玉田, 1996b; Vander Kloet, 1988)

節・種・亜種	学名	常緑 落葉	葉の形態	樹高 (cm)	開花期 (月)	花冠の 形態	分布	分布・備考
<i>Myrtillus</i> 節 クワカス	<i>V. ovalifolium</i> J. E. Smith	落葉	広楕円形, 広卵形	50~120	7	つぼ形	寒帯 温帯上部	北海道・本州(中部以北)の亜高山帯
マルバウスコ	<i>V. shikokianum</i> Nakai	落葉	広卵形, 円形	20~100	6~7	つぼ形	寒帯	本州(北陸の高山)
ヒカス/キ	<i>V. yatabei</i> Makino	落葉	卵形, 広卵形	10~30	5~6	つぼ形	温帯上部	本州(中部以西)
<i>Oxyccoccus</i> 節 ツルコケモ	<i>V. oxyccoccus</i> L.	常緑	長楕円形, 鈍頭	30	7	深く4裂片し 反捲する	寒帯 温帯上部	本州(中部以北)・北海道・千島
ヒツルコケモ	<i>V. microcarpum</i> Schmalh.	常緑	長楕円状卵形	30	7	深く5裂片し 反捲する	寒帯 温帯上部	本州(中部以北)・北海道・千島 絶滅危惧Ⅱ類(VU)
<i>Oxyccoides</i> 節 アケハ	<i>V. japonicum</i> Miq.	落葉	卵形, 鈍頭	50~100	7~8	披針形	暖帯 温帯	北海道・本州・四国・九州の冷温帯
<i>Bracteatum</i> 節 ギヤマ ムニンヤンボ	<i>V. wrightii</i> A. Gray <i>V. boninense</i> Nakai	常緑 常緑	楕円形 楕円形, 広楕円形	100~300 100	3~4 1~4	筒型 筒型	暖帯 暖帯	奄美大島以南の沖縄・台湾 小笠原(兄島・父島・母島・向島) 絶滅危惧Ⅱ類(VU)
ヤンボ	<i>V. bracteatum</i> Thunb.	常緑	長楕円形, 卵形	200~500	5~7	つぼ状鐘形	暖帯 温帯	本州(関東南部から石川県以西)・ 四国・九州・沖縄
<i>Vaccinium</i> 節 ナツハゼ	<i>V. oldhamii</i> Miq.	落葉	卵状長楕円形	150~300	5~6	鐘形	暖帯 温帯	北海道・本州・四国・九州
ナガホナツハゼ	<i>V. sieboldii</i> Miq.	落葉	卵状楕円形 倒卵状楕円形	100~200	5	鐘形	暖帯	静岡県西部から愛知県東部 絶滅危惧ⅠA類(CR)
アラゲナツハゼ	<i>V. ciliatum</i> Thunb.	落葉	広楕円形, 広卵形	200	5~6	鐘形	暖帯	本州(福井県西部以西の日本海側)・ 九州(北部)
ウス/キ	<i>V. hirtum</i> Thunb.	落葉	長楕円状卵形 鈍頭	50~100	4~5	鐘形	温帯	北海道・本州・四国・九州の山地
オオハス/キ	<i>V. smallii</i> A. Gray	落葉	長楕円形, 楕円形	100	5~6	鐘形	暖帯 温帯	北海道・本州・四国
ス/キ	var. <i>glabrum</i> Koidz.	落葉	楕円形	100	4~5	鐘形	温帯上部	本州(山梨県・長野県南部・ 静岡県東部)
カササス/キ アケハモト/キ	var. <i>versicolor</i> (Koidz.) Yamazaki <i>V. yakushimense</i> Makino	落葉 落葉	楕円形 卵状皮針形 鋭尖頭, 鈍頭	100 30~70	4~6 5~6	鐘形 鐘形	暖帯 温帯上部	本州(東海・近畿・中部地方)・四国 屋久島固有種(標高600m以上の山地) 杉に着生する, 絶滅危惧Ⅱ類(VU)
クワマ/キ	<i>V. uliginosum</i> L.	落葉	倒卵形, 楕円形 円頭	30~80	6~7	つぼ状筒型	寒帯 温帯上部	北海道・本州(中部以北)・千島
<i>Vitis-idaea</i> 節 コケモ	<i>V. vitis-idaea</i> L.	常緑	倒卵状長楕円形	5~15	6~7	鐘形	寒帯 温帯上部	本州・北海道・本州・九州・四国の高山
イワツツジ	<i>V. praestans</i> Lamb.	常緑	倒卵形	1~4	7	つぼ状鐘形	温帯上部	本州(中部以北)・北海道・千島

謝 辞

本研究の遂行並びに本論文の作成をするにあたり，終始一貫したご懇篤なるご指導を賜った東海大学農学部教授・小松春喜博士，本文の校閲を賜った同農学部教授・星良和博士，同農学部教授・村田達郎博士，同農学部教授・小野政輝博士，宮崎大学農学部教授・國武久登博士に衷心より感謝の意を表す．また，研究を進めるにあたって温かい励ましと貴重なご意見をいただいた東海大学農学部教授・荒木朋洋博士，園芸学会小果樹研究会の会員である静岡大学農学部准教授・八幡昌紀博士，秋田県立大学生物資源科学部准教授・今西弘幸博士，北海道大学北方生物圏フィールド科学センター准教授・星野洋一郎博士，福岡県筑後農林事務所八女普及指導センター主任技師・安田喜一博士に心より感謝の意を表す．

また，在来野生種の収集に当たり，貴重な実験材料のご提供を賜りました有限会社鹿毛真耕園・鹿毛哲郎氏，吉岡千寿園・吉岡克則氏，静岡県浜松市緑地部緑政課・中村氏，椎ノ木谷保全の会の方々，松末氏をはじめご協力下さった方々に感謝の意を表す．

さらに，本研究の遂行にあたり，東海大学農学部果樹園芸学研究室の卒業生，同窓生並びに専攻生には，身に余るご協力とご激励を頂いた．ここに記して心よりの感謝の意を表す．

第1章 我が国に自生するスノキ属野生種の育種素材としての評価

緒言

ブルーベリーは主要果樹の中では最も新しく栽培化された果樹であり、我が国への導入も1951年と新しく、現在多数の品種が存在するが、いずれも北米大陸に自生していた野生種から改良されたものである。すなわち、栽培ブルーベリーのHBは米国東部諸州に比較的広く自生していた数種の野生種の改良種であり、耐寒性は強いが耐暑性が弱く低温要求量が高い。また、RBは米国東南部諸州に自生していた野生種の改良種であり、HBに比べて耐暑性が強く、フロリダ州など比較的温暖な地域で栽培されている。また、LBは米国北東部諸州からカナダ東部諸州にかけてのbarren（荒地）に広く自生している野生種である。

栽培ブルーベリーと呼ばれるHB、RBおよび野生種のLBの3種はいずれも*Cyanococcus*節に属し(Vander Kloet, 1988)、染色体数から見ると、HBとRBはそれぞれ四倍体($2n=4x=48$)と六倍体($2n=6x=72$)、LBは二倍体と四倍体($2n=2x=24$, $2n=4x=48$)の種からなっており(Camp, 1945; Darrowら, 1944)、ブルーベリー栽培種のほとんどは、それらが属する*Cyanococcus*節内の種間あるいは種内交雑により育成されたものである。一方、*Cyanococcus*節以外の野生種にも有用な形質を持つものがあり、近年ではそれらの特性を明らかにするとともに、それらを利用した節間雑種の作出に関する研究が積極的に行われている(Darrow・Camp, 1945; Ballington, 1980; Lyrene・Ballington, 1986)。

前述したように、我が国には栽培種と同じ*Cyanococcus*節に属する野生種は存在しないが、18種のスノキ属植物が自生している。これらのうち、食用とされるものにはクロマメノキ(*V. uliginosum* L.)、コケモモ(*V. vitis-idaea* L.)、ナツハゼ(*V. oldhamii* Miq.)、シャシャンボ(*V. bracteatum* Thunb.)などがあり、これらの野生果実は、趣味家あるいは土地の人達によって採取され、生食の他、ジャム、ジュース、果実酒などに利用されてきた(玉田, 1996)。しかしながら、我が国ではこれらの野生種の栽培化はもちろ

ん、改良の素材としても全く利用してこなかった。

そこで本章では、我が国自生のスノキ属野生種とブルーベリー栽培種を供試し、倍数性および核 DNA 含量の解析、葉、花および果実における形態的特徴の調査および果実の品質や機能性などの分析を行い、野生種の育種素材としての評価を行った。

材料および方法

材料には収集した野生種 16 種、すなわちクロウスゴ (*V. ovalifolium* J. E. Smith), ヒメウスノキ (*V. yatabei* Makino), ツルコケモモ (*V. oxycoccus* L.), アクシバ (*V. japonicum* Miq.), ギイマ (*V. wrightii* A. Gray), シヤシヤンボ, ナツハゼ, ナガボナツハゼ (*V. sieboldii* Miq.), アラゲナツハゼ (*V. ciliatum* Thunb.), ウスノキ (*V. hirtum* Thunb.), オオバスノキ (*V. smallii* A. Gray), スノキ (*V. smallii* A. Gray var. *glabrum* Koidz.), カンサイスノキ (*V. smallii* A. Gray var. *versicolor* (Koidz) Yamazaki), アクシバモドキ (*V. yakushimense* Makino), クロマメノキおよびコケモモ (第 1-1 表) を東海大学農学部実験ほ場において鉢植え (ボラ土 : ピートモス : 木材チップ = 6 : 3 : 1 (v/v/v)) で栽培しているものを用いた。また、比較の対象として本学果樹園植栽 (10~20 年生) の HB ‘ブルークropp’, SHB ‘リベール’, RB ‘ホームベル’ および ‘ティフブルー’ を供試した。

実験 1 倍数性並びに核 DNA 含量の解析

倍数性の解析には、フローサイトメーター (以下 FCM と略記, EPICS XL SYSTEM II, Beckman Coulter) を用い、細胞核の抽出には Meng・Finn (2002) の方法を一部改変した方法を用いた。すなわち、各個体から 10 枚ずつ幼葉を採取し、1 枚につき約 40 mg を切り取りサンプルとした。そこに chopping buffer 1mL [buffer stock I (10mM MgSO₄, 50mM KCl, 5mM HEPES, pH 8.0) 10 mL, buffer stock II (10% TritonX-100) 0.28 mL, PVP-10 0.2 g, dithiothreitol 0.01 g] を加え、シャーレ上で 100 回程度細かく刻み、ミラクロス (Calbiochem) でろ過した。ろ液に RNA を除去する目的

第1-1表 実験に供試した我が国自生のスノキ属植物の収集状況

		収集年	系統数	導入先
<i>Myrtillus</i> 節				
クウスゴ	<i>V. ovalifolium</i> J. E. Smith	2010年	1	北海道(湯沢園芸)
ヒメウスノキ	<i>V. uatabei</i> Makino	2007年	2	北海道(湯沢園芸)
<i>Oxycoccus</i> 節				
ツルコケモモ	<i>V. oxycoccus</i> L.	1998年	2	熊本県(園芸店)
ヒメツルコケモモ	<i>V. microcarpum</i> Schmalh.			
<i>Oxycoccoides</i> 節				
アクシハ	<i>V. japonicum</i> Miq.	2007年	2	北海道(湯沢園芸)
<i>Bracteatum</i> 節				
キイマ	<i>V. wrightii</i> A. Gray	2007年	2	沖縄県(株富士庭園苑)
シャシヤンホ	<i>V. bracteatum</i> Thunb.	1997年	3	鹿児島県(鹿児島大学付属農場)
<i>Vaccinium</i> 節				
ナツハセ	<i>V. oldhamii</i> Miq.	2004年	4	福岡県((有)鹿毛真耕園)
ナカホナツハセ	<i>V. sieboldii</i> Miq.	2007年	3	静岡県(染地台地周辺採取)
アラゲナツハセ	<i>V. ciliatum</i> Thunb.	2010年	4	福岡県(吉岡千寿園)
ウスノキ	<i>V. hirtum</i> Thunb.	2007年	3	北海道(湯沢園芸)
		2009年	2	埼玉県(株改良園)
		2009年	3	福島県(茜園芸)
オオハスノキ	<i>V. smallii</i> A. Gray	2007年	2	北海道(湯沢園芸)
スノキ	var. <i>glabrum</i> Koidz.	2007年	1	静岡県(株富士庭園苑)
カンサイスノキ	var. <i>versicolor</i> (Koidz) Yamazaki	2007年	1	徳島県(採取)
アクシハモトキ	<i>V. yakushimense</i> Makino	2010年	1	北海道(湯沢園芸)
クロマメノキ	<i>V. uliginosum</i> L.	1997年	3	長野県(一里山園芸センター)
<i>Vitis-idaea</i> 節				
コケモモ	<i>V. vitis-idaea</i> L.	2007年	2	大分県(久住白口谷周辺採取)

で1% DNAase-free RNAase (R4642, Sigma-Aldrich) 64 μ L を加えよく攪拌し、小型精密恒温槽チルヒート (CHT-100, IWAKI 旭テクノグラス) を用いて 37°C で 15 分間加温した。その後、0.05% ヨウ化プロピジウム (PI) 溶液 10 mL (buffer stock I 10 mL, PI 0.005 g) を 108 μ L 加え、混合し、前述の恒温槽を用いて 37°C で 15 分間加温した後、FCM で核の蛍光強度を測定して倍数性を解析した。また、指標としてカンキツのタヒチライム (1.17 $\text{pg} \cdot 2 \text{C}^{-1}$) (Ollitrault ら, 1994) を用い、Meng・Finn (2002) の方法を参考に核 DNA 含量を算出した。

実験 2 葉、花および果実の形態

葉の形態は、それぞれの野生種および品種から成葉 10 枚ずつを 8~9 月に採取し調査を行い、花および果実の形態は葉と同様にそれぞれ 10 花および 10 果を開花期および成熟期に採取し調査を行った。

それぞれの供試材料より、葉について 16 種 (実験 1 と同様の材料を供試)、花については開花に至った 15 種 (実験 1 と同様の材料からアクシバモドキを除く) および成熟果については着果に至った 11 種 (ツルコケモモ, アクシバ, ギイマ, シャシャンボ, ナツハゼ, ウスノキ, スノキ, カンサイスノキおよびクロマメノキ) を採取し、各項目について調査した。すなわち、葉については、葉の特性, 葉身長, 葉幅, 葉身形指数, 葉柄長の 5 項目を、花については、開花期, 花序, 花色, 花の特性, 花冠の縦・横径, 開口部径, がく長, 花弁数, 雄ざい数, 花柱長の 11 項目を、成熟果については、成熟期, 果皮色, 果実重, 縦径, 横径, 横径/縦径, 果柄長, 目の幅, 目の深さ, 果粉の多少 (目視で多・中・少・極少と評価) の 10 項目をそれぞれ調査した。また、比較の対照として栽培種 3 品種 (‘ブルークロープ’, ‘リベール’ および ‘ホームベル’) について同様の調査を行った。なお、調査した成熟果は -30°C で冷凍保存した。

実験 3 野生種と栽培種の果実成分の比較

果実成分の分析については、果実全体での分析だけでなく、果実を果皮と果肉に分けてそれぞれの分析を行った。果実全体の分析には、実験 2 の果実の調

査に用いた野生種 11 種からギイマを除いた 10 種および形態調査と同様の栽培種 3 品種の成熟果を用い、冷凍果 3 個以上から 2~5 g を秤取した。一方、果皮と果肉に分けての分析には、野生種 8 種（ツルコケモモ、ギイマ、シャシャンボ、ナツハゼ、ナガボナツハゼ、アラゲナツハゼ、スノキおよびカンサイスノキ）および栽培種 3 品種（‘ブルークロープ’，‘リベール’ および ‘ティフブルー’）の成熟果を用い、冷凍果 3 個以上から果皮は 0.2 g，果肉は 0.5 g を秤取した。果実の糖および有機酸の分析にはそれぞれ秤取した冷凍果に 80%エタノールを加えて摩砕し、沸騰湯煎中で 1 時間温浴した。これらの抽出液は吸引濾過後、一定量に定容し、孔径 0.2 μm のシリンジフィルターで濾過して、高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略記）の分析試料とした。なお、実験は 3 反復とした。

糖の分析には、HPLC [ポンプ：LC-9A（島津製作所），カラム：SCR-101N（島津製作所），流速 0.5 mL \cdot min⁻¹，カラムオーブン：CTO-6A（島津製作所），カラム温度：40°C，検出器：示差屈折計検出器 RID-6A，移動相：水] を用いた。なお、試料の注入量は 100 μL 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，糖の分析と同様の HPLC [ポンプおよびカラムオーブンは糖分析と同様のものを使用，カラム：SCR-101H（島津製作所），流速（移動相および緩衝液）：0.8 mL \cdot min⁻¹，カラム温度：45°C，検出器：電気伝導度検出器 CDD-6A（島津製作所），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] を用いた。なお，試料の注入量は 100 μL 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。

実験 4 野生種と栽培種における果実のポリフェノール成分および抗酸化能の比較

実験 3 と同様に果実全体においては冷凍果 3 個以上から 2~5 g を，果皮は 0.2 g，果肉は 0.5 g を秤取した。そこに 4%酢酸含有 50%メタノール水溶液

を加えて磨砕した後，高速冷却遠心機（4℃，20 min.，15,000 rpm，Suprema 21，トミー精工）にかけ，上澄み液を抽出した．この操作を3回繰り返した後，それらの抽出液を合わせて一定量に定容したものを抽出試料とした．これらの抽出試料を用いて果実中のアントシアニン，総ポリフェノール含量および抗酸化活性を測定した．

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：Inertsil ODS-2（ジールサイエンス），流速：1 mL・min⁻¹，カラム温度：35℃，検出器：マルチチャンネル検出器 MD-2010（日本分光），検出波長：525 nm，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，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] を用い，試料の注入量は 20 μL とした．なお，アントシアニンの同定は Ballington ら（1987），津志田（1997）および横田ら（2009）の報告に加えて，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ン-3-グルコシド（以下 Cy-Glu と略記）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 100 g（以下 100 gF.W.と略記）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の測定には Folin-Ciocalteu 法（Singleton・Rossi，1965）を参考に以下のように行った．抽出試料 200 μL，蒸留水 800 μL，0.2 N Folin-Ciocalteu 試薬 [2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent（Sigma-Aldrich）を 10 倍希釈] 5 mL，飽和炭酸ナトリウム 4 mL を試験管に入れ，ボルテックスミキサーでミキシングした．これを室温で 2 時間以上放置した後，765 nm の吸光度を測定した．標品には没食子酸を用い，100 gF.W.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（以下 DPPH と略記）を用い，須田（2000）の方法を改変して DPPH ラジカル

消去活性法 (DPPH 法) 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, ヤマト化学) にて乾固させ, 同量の 80%エタノールで溶解したものを供試した. 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, 100 gF.W.当たりの Trolox 当量として算出した. 実験は 3 反復とした.

以上の実験結果はそれぞれの平均値とし, 一元配置の分散分析により有意であることを確認し, Tukey の多重検定により統計解析を行った. 葉, 花および果実の形態調査については 1%, 糖, 有機酸, 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については 5%有意水準で解析を行った.

結 果

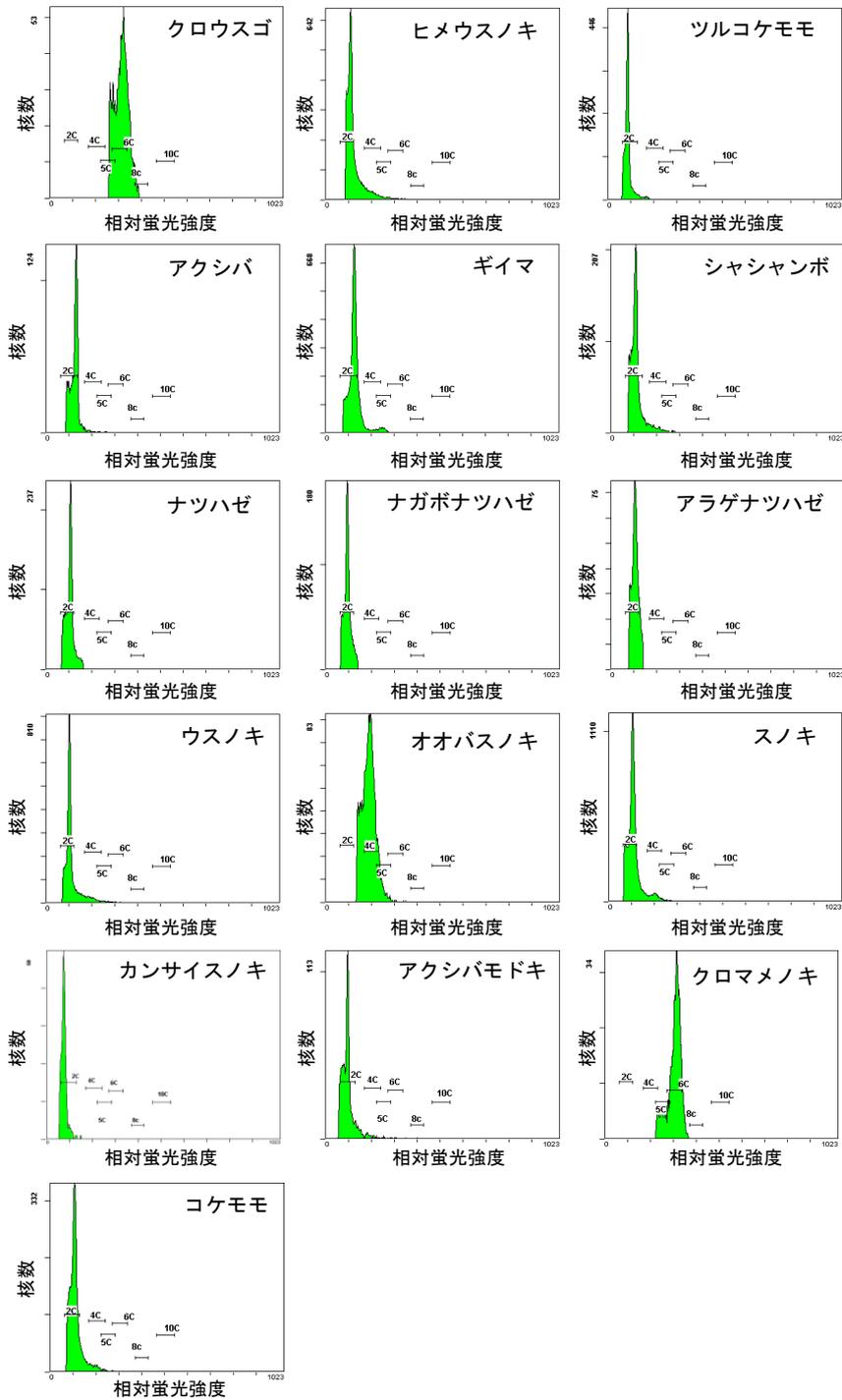
実験1 倍数性並びに核 DNA 含量の解析

幼葉を供試して FCM で倍数性を解析した結果（第 1-1 図，第 1-2 表），16 種中 13 種で二倍体，1 種で四倍体，2 種で六倍体の位置に相対蛍光強度のピークが認められ，多くの野生種が二倍体と推定されたが，栽培種と同様の四倍体と六倍体と推定される種も存在した．一方，核 DNA 含量（第 1-2 表）は倍数体間で有意に異なったが，同倍数体内の種間でも有意差が見られた．二倍性種内では特に変異が大きく，*Oxycoccus* 節に属するツルコケモモの 0.99 pg から *Oxycoccoides* 節に属するアクシバの 1.46 pg まで幅があった．一方，四倍体のオオバスノキと栽培種の HB ‘ブルークropp’ および SHB ‘リベール’ の核 DNA 含量間，六倍体の 2 種および RB ‘ホームベル’ の三者間でもそれぞれ有意差が認められた．

実験2 葉，花および果実の形態

葉の形態を調査した結果を第 1-2 図および第 1-3 表に示した．野生種の中には落葉性の栽培種と異なり，常緑性のツルコケモモ，ギイマ，シャシャンボ，コケモモが存在した．葉の大きさの比較では栽培種の葉身長が，3 種の平均で 63.6 mm であったのに対し，野生種のそれは 26.4 mm と小さかった．また，野生種ではツルコケモモの 10.4 mm と小さいものからオオバスノキの 49.6 mm と大きいものまで種によりかなりの相違が認められた．葉身径指数，葉柄長には一定の方向性は確認されず，品種および種ごとに異なっていた．

開花期および花の形態を調査した結果は第 1-3 図および第 1-4 表に示したとおりである．本学での開花期は HB ‘ブルークropp’ および SHB ‘リベール’ では 4 月上旬～5 月中旬，RB ‘ホームベル’ では 4 月下旬～5 月中旬であるのに対し，野生種ではスノキの 4 月上旬～5 月下旬からシャシャンボの 6 月下旬～8 月上旬までと種によって多様であった．なお，野生種の中にはクロマメノキのように開花期が 2 か月間の長期に及ぶものも存在した．栽培種の小花は花弁が 5 枚の合弁花であり，球形，倒置形の鐘形，壺形をしてい弁花のツルコケモモなどが存在した．さらに，栽培種の花序は短い総状花序で



第1-1図 スノキ属野生種16種におけるFCMによる倍数性の解析

第1-2表 スノキ属野生種およびブルーベリー栽培種における
倍数性および核DNA含量

種および品種	倍数性	核DNA含量 (pg)	ゲノムサイズ ¹⁾ (Mbp) ²⁾
野生種			
<i>Myrtillus</i> 節			
クウスゴ ³⁾	六倍体	3.65 k ^y	3570
ヒメウスノキ	二倍体	1.18 cd	1154
<i>Oxycoccus</i> 節			
ツルコケモモ	二倍体	0.99 a	968
<i>Oxycoccooides</i> 節			
アクシハ ³⁾	二倍体	1.46 f	1428
<i>Bracteatum</i> 節			
キイマ	二倍体	1.28 e	1252
シャシャンホ ³⁾	二倍体	1.20 d	1174
<i>Vaccinium</i> 節			
ナツハゼ ³⁾	二倍体	1.20 d	1174
ナガホ ³⁾ ナツハゼ	二倍体	1.16 cd	1134
アラゲナツハゼ ³⁾	二倍体	1.17 cd	1144
ウスノキ	二倍体	1.17 cd	1144
オオハスノキ	四倍体	2.38 i	2328
スノキ	二倍体	1.05 ab	1027
カンサイスノキ	二倍体	1.19 cd	1164
アクシハ ³⁾ モト ³⁾ ノキ	二倍体	1.21 de	1183
クロマメノキ	六倍体	3.99 l	3902
<i>Vitis-Idaea</i> 節			
コケモモ	二倍体	1.11 bc	1086
栽培種			
<i>Cyanococcus</i> 節			
‘ブルークローブ’	四倍体	2.17 g	2122
‘リベール’	四倍体	2.26 h	2210
‘ホームベル’	六倍体	3.32 j	3247

¹⁾1pg=(0.978 × 10⁹)bp (Dolezelら, 2003)

²⁾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



第1-2図 スノキ属野生種16種の葉の形態
スケールは2 cm

第1-3表 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特性および形態

種および品種	特性	葉身長 (mm)	葉幅 (mm)	葉身形 指数 ^z	葉柄長 (mm)
野生種					
<i>Myrtillus</i> 節					
クウスゴ ^o	落葉性	14.2 ab ^y	11.3 b-d	1.26 a	1.1 ab
ヒメウスノキ	落葉性	22.6 bc	14.2 c-e	1.60 a-c	2.4 b-f
<i>Oxycoccus</i> 節					
ツルコケモモ	常緑性	10.4 a	4.1 a	2.54 d	1.6 a-d
<i>Oxycoccoides</i> 節					
アクシハ ^o	落葉性	27.3 c	16.8 d-f	1.62 a-c	2.2 a-e
<i>Bracteatum</i> 節					
キ ^o イマ	常緑性	24.1 bc	15.0 de	1.60 a-c	2.4 b-f
シャシャンホ ^o	常緑性	25.3 d	24.2 g-i	1.87 bc	6.1 g
<i>Vaccinium</i> 節					
ナツハゼ ^o	落葉性	45.8 d	27.8 hi	1.65 a-c	2.9 d-f
ナガホ ^o ナツハゼ	落葉性	24.1 bc	19.2 e-g	1.26 a	3.0 d-f
アラゲ ^o ナツハゼ	落葉性	46.4 d	23.2 f-h	2.00 b-d	3.5 ef
ウスノキ	落葉性	26.2 c	13.8 b-e	1.90 bc	1.5 a-d
オオハ ^o スノキ	落葉性	49.6 de	25.0 g-i	1.97 b-d	2.6 b-f
スノキ	落葉性	24.6 bc	13.0 b-e	1.89 bc	2.7 c-f
カンサイスノキ	落葉性	29.1 c	16.4 d-f	1.78 a-c	0.6 a
アクシハ ^o モト ^o キ	落葉性	25.1 bc	12.5 b-e	2.00 b-d	1.4 a-d
クロマメノキ	落葉性	13.9 ab	7.8 a-c	1.78 a-c	1.3 a-c
<i>Vitis-Idaea</i> 節					
コケモモ	常緑性	13.5 ab	7.0 ab	1.92 bc	1.9 a-e
栽培種					
<i>Cyanococcus</i> 節					
‘ブルークロープ’	落葉性	56.7 ef	29.0 hi	1.95 bc	3.7 f
‘リハ ^o ール’	落葉性	60.6 f	29.9 i	2.06 cd	3.3 ef
‘ホームベル’	落葉性	73.4 g	46.3 j	1.59 ab	2.8 d-f

^z葉身長/葉幅

^yTukey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



第1-3図 スノキ属野生種15種の花の形態
スケールは1 cm

第1-4表 スノキ属野生種およびブルーベリー栽培種における開花期および花の形態

種および品種	開花期 (月)	花色	特性	花序	花冠の大きさ(mm)		開口部径 (mm)	がく長 (mm)	花弁数 (枚)	雄ざい数 (個)	花柱長 (mm)	
					縦径	横径						
野生種												
<i>Myrtillus</i> 節												
クウスコ*	6下	緑白色	合弁花	単花	7.2 c ^x	6.5 gh	2.3 abc	3.1 def	5.0 b	10.0 b	6.1 de	
ヒカスノキ	4中-5下	帯赤色	合弁花	単花	8.6 de	4.4 cd	3.1 c-f	3.7 fg	5.0 b	10.0 b	6.7 ef	
<i>Oxyccoccus</i> 節												
ツルコケモ	5下-6下	薄紅色	反捲き花弁 離弁花	□-4花	8.9 def	3.2 ab	— ^w	2.4 bcd	4.0 a	8.0 a	5.7 cd	
<i>Oxyccoccoides</i> 節												
アケハ ^z	6中-7中	淡紅紫色	反捲き花弁 合弁花	単花	9.8 fg	2.9 a	2.1 ab	2.4 bcd	4.0 a	8.0 a	7.8 g	
<i>Bracteatum</i> 節												
キノ	— ^y	白色	合弁花	総状花序	9.5 f	5.3 ef	3.1 cde	3.3 ef	4.8 b	9.9 b	6.6 ef	
ジャンボ ^z	6下-8上	白色	合弁花	総状花序	7.3 c	3.9 bc	1.9 a	1.8 ab	5.0 b	10.0 b	5.7 cd	
<i>Vaccinium</i> 節												
ナツハ ^z	5中-6上	帯濃赤色	合弁花	総状花序	5.4 b	4.8 de	3.4 efg	2.6 cde	5.1 b	10.4 b	3.6 a	
カホ ^z ナツハ ^z	5中-6上	白色	合弁花	総状花序	4.1 a	4.2 cd	4.4 ij	1.5 a	5.0 b	9.9 b	4.9 bc	
アラガ ^z ナツハ ^z	5中-6上	白色	合弁花	総状花序	5.2 b	4.0 c	3.2 d-g	2.0 abc	5.1 b	10 b	4.7 b	
ウスノキ	4下-5上	帯赤色	合弁花	1~2花	9.2 ef	5.7 fg	4.3 ij	3.9 fg	5.0 b	10.0 b	7.4 fg	
オオノスノキ	6中	帯赤色	合弁花	1~4花	8.5	7.2	5.4	4.1	5.0	10.0	6.3	
スノキ	4上-5下	帯赤色	合弁花	1~4花	8.4 de	5.2 ef	4.3 hij	3.8 fg	5.0 b	10.0 b	5.3 bcd	
カンサイノスノキ	4中-5下	帯赤色	合弁花	1~4花	7.4 c	6.0 g	4.5 j	3.5 fg	5.0 b	9.9 b	5.6 bcd	
クロマノスノキ	5上-7上	白~薄桃色	合弁花	単花	9.1 ef	6.1 g	2.8 bcd	4.1 g	5.1 b	9.8 b	7.1 efg	
<i>Vitis-Idaea</i> 節												
コケモ	4中-5中	白色	合弁花	総状花序	8.1 cd	4.5 cd	3.8 ghi	2.6 cd	4.0 a	7.9 a	7.3 fg	
栽培種												
<i>Cyanococcus</i> 節												
'ブルークローブ'	4上-5中	白色	合弁花	短総状花序	10.6 gh	7.7 i	4.3 hij	3.7 fg	5.0 b	10.2 b	8.7 hi	
'ハール'	4上-5中	白~薄桃色	合弁花	短総状花序	11.4 h	7.4 hi	3.7 fgh	3.7 fg	5.1 b	10.1 b	9.2 i	
'ホームハル'	4下-5中	白色	合弁花	短総状花序	—	—	—	—	—	—	—	

^zデータ数不足のため統計処理不可

^y温室栽培のため調査不可

^xTukey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

^w測定不可

弃花のツルコケモモなどが存在した。さらに、栽培種の花序は短い総状花序であるのに対し、野生種にはクロウスゴ、アクシバおよびクロマメノキなどのように単生するものや、ツルコケモモ、ウスノキおよびスノキなどのように1～数花を着生するもの、長い総状花序を着生するギイマ、シャシャンボおよびナツハゼなどが存在した。また、花色についても栽培種は主に白色から薄桃色であったのに対し、野生種は栽培種と同様に白色を呈するナガボナツハゼおよびアラゲナツハゼ、白色～薄桃色のクロマメノキ、淡紅紫色のアクシバ、黄緑色に濃赤色を帯びる帯濃赤色のナツハゼ、スノキなど様々なものが存在した。花の大きさを花冠の縦径でみると、栽培種の平均値は11.0 mmであるのに対して、野生種のそれは8.1 mmと小さかったが、野生種間のばらつきは大きく、ナガボナツハゼのように4.1 mmと小さいものからアクシバのように9.8 mmと比較的大きいものまで見られた。

成熟期および果実の形態を調査した結果を第1-4図および第1-5表に示した。果実の成熟期は、栽培種のHB‘ブルークロープ’およびSHB‘リベール’で6月中旬から7月下旬にかけて、RB‘ホームベル’で7月下旬から9月上旬にかけてであった。一方、野生種は種によって多様であり、アクシバ、ウスノキ、スノキ、カンサイスノキ、クロマメノキは栽培種とほぼ同時期であったが、ツルコケモモ、ナツハゼ、ナガボナツハゼ、アラゲナツハゼは9月下旬から12月の秋～冬季にかけて果実が成熟し、栽培種より遅かった。また、シャシャンボは野生種の中でも特に成熟期が遅く、11月上旬から1月下旬までと冬季が成熟期であった。成熟期間については、栽培種が約1か月であるのに対し、シャシャンボで約2か月、スノキで3か月、クロマメノキで2か月と野生種の中には栽培種に比べ長期に渡るものが存在した。栽培種の果皮色はいずれも粉白を帯びた藍黒であったのに対し、野生種の中にはツルコケモモ、アクシバ、ウスノキのように赤色を呈するものが存在した。果実重については、栽培種が1.31 g以上であったのに対し、野生種はいずれも1 g以下であったが、中ではクロマメノキが0.73 gと重く、次いでツルコケモモの0.66 gであった。その他の野生種はいずれも0.5 g以下と軽かった。なお、栽培種の横径／縦径比は1.08以上で果実が扁平であったのに対し、シャシャンボ(1.17)を除く野生種ではいずれも1に近い値かそれより小さい値を示した。また、



第1-4図 スノキ属野生種11種の果実の形態
スケールは1 cm

第1-5表 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および果実の形態

種および品種	成熟期 (月)	果皮色	果実重 (g)	果実の大きさ(mm)		果形 指数 ^z	果柄長 (mm)	目(mm)		果粉の 多少 ^v
				縦径	横径			幅	深さ	
野生種										
<i>Oxycoccus</i> 節										
ツルコケモモ	9下-11上	赤	0.66 c ^w	11.9 f	12.3 f	1.03 b-e	12.6 f	2.6 ab	0.3 a	極少
<i>Oxycoccooides</i> 節										
アキシハ	8上-9上	紅	0.22 a	6.6 ab	6.9 ab	1.05 cde	12.1 ef	3.6 c	0.2 a	極少
<i>Bracteatum</i> 節										
ギイマ	— ^x	黒	0.15 a	6.7 ab	6.2 a	0.93 abc	10.8 e	3.4 bc	0.6 ab	極少
ジャンボ	11上-1中	黒紫・粉白	0.17 a	5.6 a	6.6 a	1.17 f	2.2 a	2.3 a	— ^y	極少
<i>Vaccinium</i> 節										
ナツハゼ	9下-11中	黒	0.33 ab	8.7 de	8.1 bc	0.94 abc	1.9 a	6.2 e	—	極少
カボナツハゼ	10下-12上	藍黒	0.23 a	7.3 bc	6.8 a	0.93 ab	3.1 ab	3.9 c	—	極少
アラゲナツハゼ	10中-11上	黒	0.53 bc	9.7 e	9.6 de	0.99 bcd	2.7 ab	3.4 bc	—	多
ウスノキ	7上-8中	赤	0.33 ab	8.3 cd	8.4 cd	1.02 b-e	3.8 b	6.6 ef	1.8 d	極少
スノキ	6上-9上	紫黒	0.15 a	6.9 b	6.0 a	0.87 a	4.0 b	3.3 bc	1.2 c	極少
カンサスノキ	6中-8上	紫黒	0.18 a	7.2 bc	6.8 a	0.96 abc	4.2 b	3.9 c	1.0 bc	極少
クロマノキ	7上-9上	藍黒・粉白	0.73 c	11.8 f	10.1 e	0.86 a	6.6 c	4.7 d	0.6 ab	多
栽培種										
<i>Cyanococcus</i> 節										
‘ブル-クロツ’	6下-7下	藍黒・粉白	3.48 f	14.8 h	20.3 i	1.38 g	6.3 c	7.3 f	3.0 e	多
‘リハール’	6中-7下	藍黒・粉白	1.72 e	13.8 gh	15.4 h	1.11 ef	6.2 c	6.2 e	2.9 e	多
‘ホームベル’	7下-9上	藍黒・粉白	1.31 d	12.8 fg	13.8 g	1.08 def	8.6 d	5.2 d	1.2 c	中

^z横径/縦径

^y目視で多・中・少・極小の4段階で評価

^x温室栽培のため不明

^wTukey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

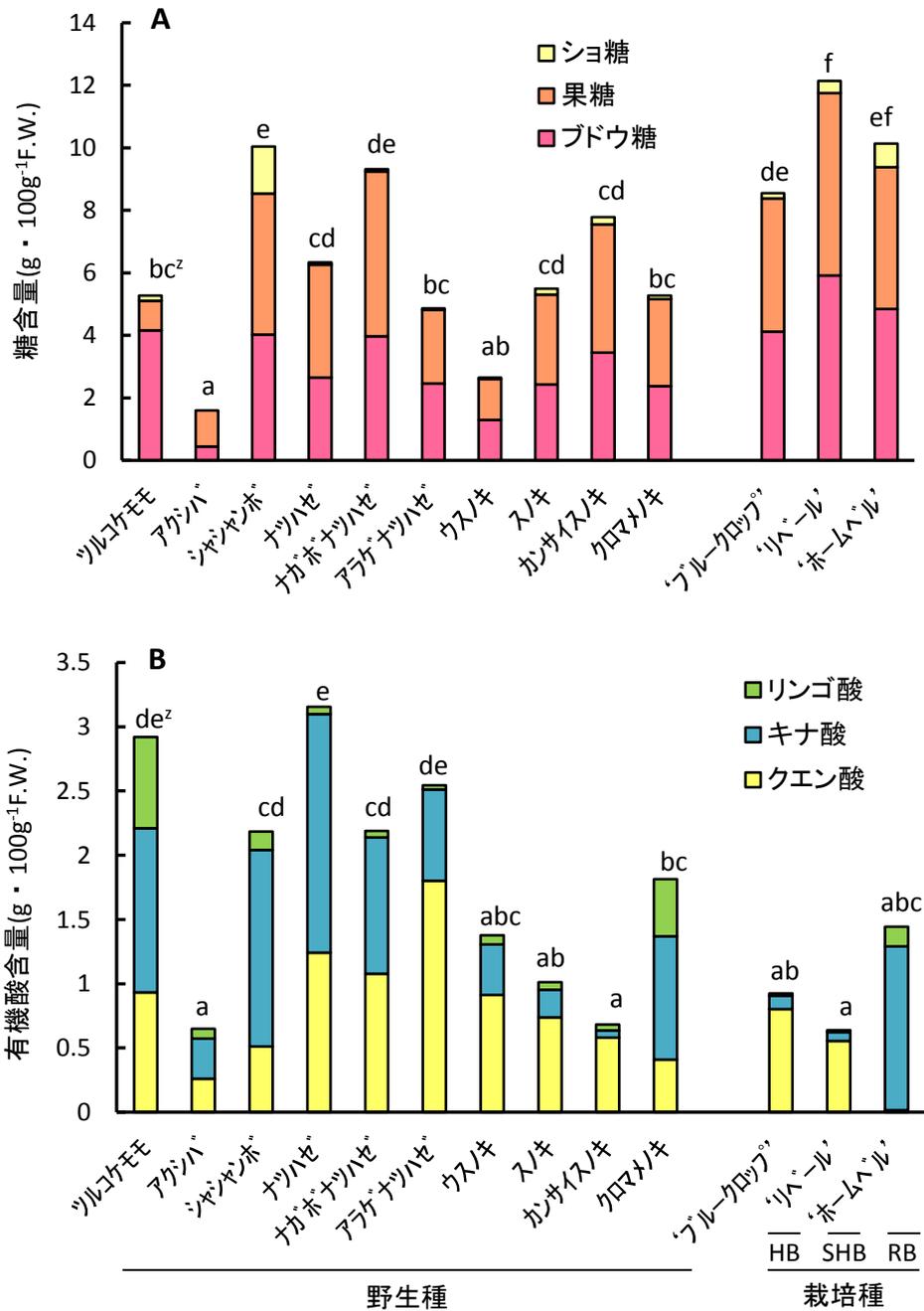
^v測定不可

成熟果の果粉は‘ブルークロップ’，‘リベール’，アラゲナツハゼおよびクロマメノキで多く，‘ホームベル’で中程度で，それぞれ果実は明青色と暗青色を示した．なお，その他の野生種の果粉は極めて少なかった．

実験3 野生種と栽培種の果実成分の比較

野生種と栽培種の成熟果について，果実全体の糖および有機酸含量を分析した結果は第1-5図に示したとおりである．栽培種の平均糖含量は100 gF.W. 当たり10.3gであったのに対し，野生種ではシャシャンボが10.0 g，次いでナガボナツハゼの9.3 gが栽培種と同程度の値を示したものの，その他の野生種では平均値が4.9 gと栽培種に比べほぼ半分の値であった．なお，糖の組成については，野生種，栽培種ともにショ糖の割合が4.2%以下と小さく，果糖とブドウ糖がほぼ同程度の割合のものが多かった．しかし，シャシャンボではショ糖の割合が15.0%と他の野生種に比べ，やや高い傾向が見られ，アクシバには全くショ糖が検知されず，ツルコケモモではブドウ糖が7割を占めるなどそれぞれ種の特徴が認められた．

一方，果実全体の有機酸含量の分析を行った結果，栽培種の有機酸含量の平均値が100 gF.W. 当たり約1.0 gであったのに対し，野生種ではアクシバおよびカンサイスノキの約0.7 g，スノキの1.0 g，ウスノキの1.4 gの順に栽培種に近い値を示したものの，その他の野生種の平均値は約2.5 gと栽培種の約2.5倍の値を示し，特にナツハゼでは約3.2 gと高かった．有機酸の組成についてみたところ，HB‘ブルークロップ’とSHB‘リベール’では有機酸の割合はクエン酸が8割以上，次いでキナ酸，リンゴ酸の順に高かったが，RB‘ホームベル’ではキナ酸が8割以上，次いでリンゴ酸，クエン酸の順であった．野生種では，シャシャンボ，ナツハゼはキナ酸の割合が5割以上と高く，次いでクエン酸，リンゴ酸の順であった．また，クロマメノキもキナ酸の割合が5割以上と高く，次いでリンゴ酸，クエン酸の順であった．アクシバはキナ酸とクエン酸がほぼ同量で，リンゴ酸は15%程度であった．また，ツルコケモモではキナ酸が42.3%，クエン酸が30.8%，リンゴ酸が25.7%の順に多かった．一方，ウスノキ，スノキ，カンサイスノキはクエン酸，キナ酸，リンゴ酸の順に多く，‘ブルークロップ’と‘リベール’の組成と類似していた．



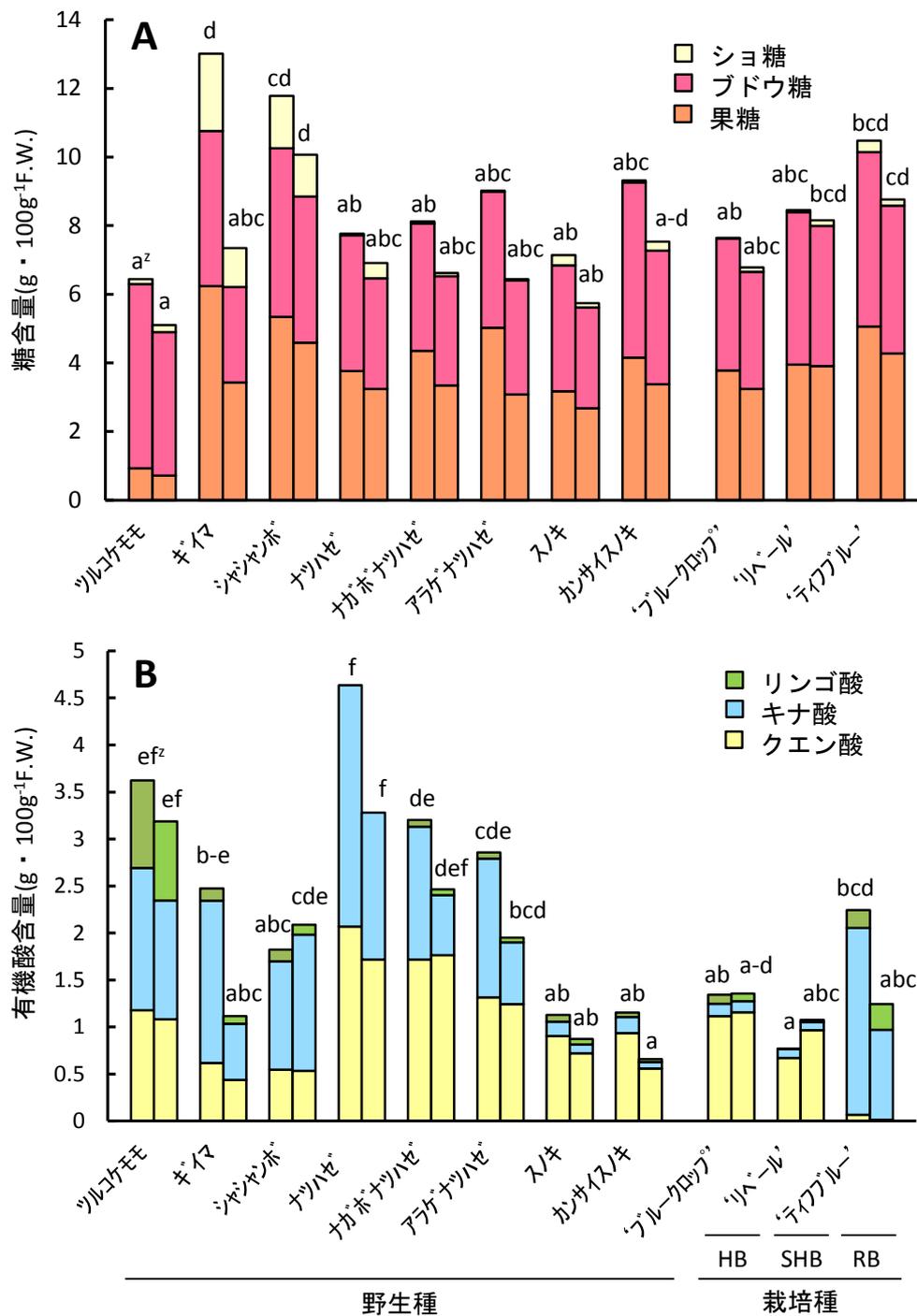
第1-5図 スノキ属野生種およびブルーベリー栽培種における成熟果の糖 (A) および有機酸含量 (B) とそれらの組成

†Tukeyの多重検定により、糖および有機酸含量それぞれにおいて異なる英文字間に有意差 (5%) があることを示す

成熟果の糖・有機酸含量を果皮と果肉に分けて分析した結果（第 1-6 図），100 gF.W.当たりの糖含量は，野生種，栽培種ともに果肉に比べ果皮で高かった．また，野生種と栽培種間で果皮および果肉の糖含量に一定の傾向は見られなかったが，果皮では野生種のギイマ（13.0 g）およびシャシャンボ（11.8 g）と RB ‘ティフブルー’（10.5 g）が高い傾向を示した．一方，有機酸含量は，果皮，果肉ともに栽培種に比べ野生種で高い傾向が見られたが，果皮ではナツハゼおよびツルコケモモが有意に高い値を示した．また，ギイマの果皮の有機酸含量は 100 gF.W.当たり 2.5 g と果肉の 1.1 g に比べて 2 倍以上高く，果皮と果肉の差が大きかった．なお，糖・有機酸含量ともに果皮と果肉でそれらの組成にはほとんど違いが見られなかった．

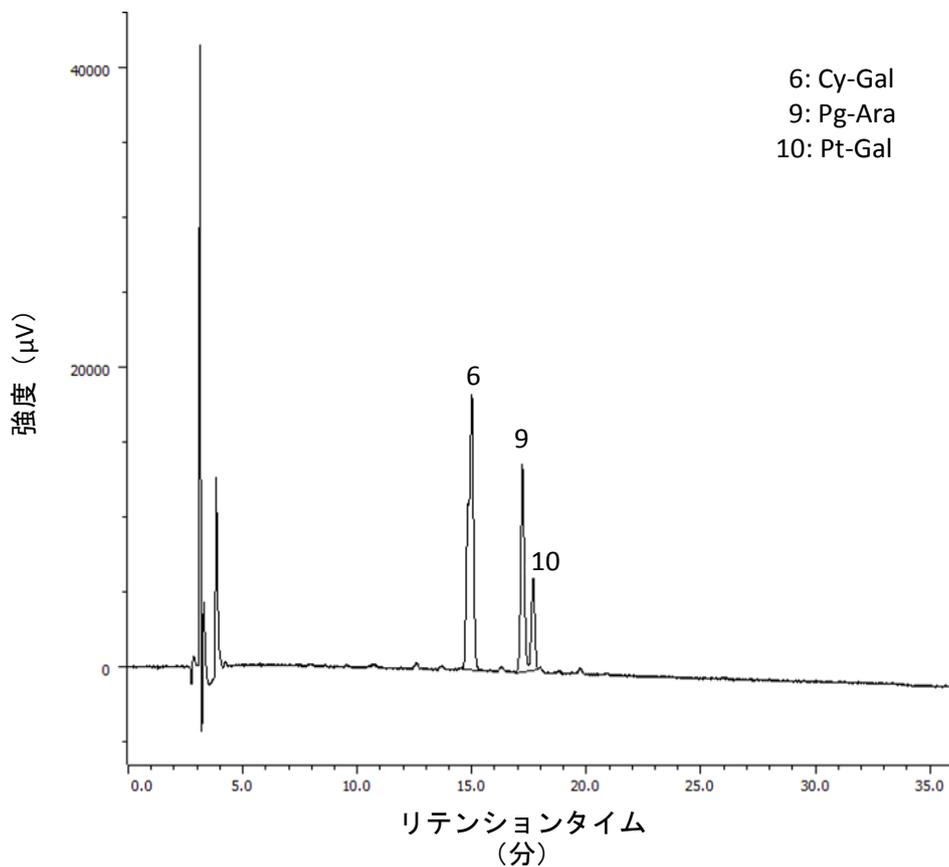
実験 4 野生種と栽培種における果実のポリフェノール成分および 抗酸化能の比較

赤色系のウスノキ，青色系のシャシャンボおよびスノキのアントシアニンクロマトグラムを第 1-7~9 図に示した．アントシアニンのクロマトグラムは青色系の種間でも大きく異なり，種や品種によって差異が見られた．各アントシアニンは HPLC のプロファイルにおける Cy-Gul のリテンションタイムおよび Ballington ら（1987），津志田（1997）および横田ら（2009）の報告により同定が可能であったが，シャシャンボ，スノキおよびカンサイスノキには，アントシアニンの吸収波長を示す 3 つの未同定 HPLC ピーク（Un-Identified Peak : UIP1~3）が確認された（第 1-10 図）．未同定のアントシアニンを含め，成熟果の果実全体のアントシアニン含量を算出した結果を第 1-11 図に示した．栽培種の平均アントシアニン含量は，100 gF.W.当たり 100 mg であったのに対し，野生種では赤色系の果実を着生するアクシバ（24 mg），ウスノキ（34 mg），ツルコケモモ（46 mg）は栽培種よりも低い値を示した．し



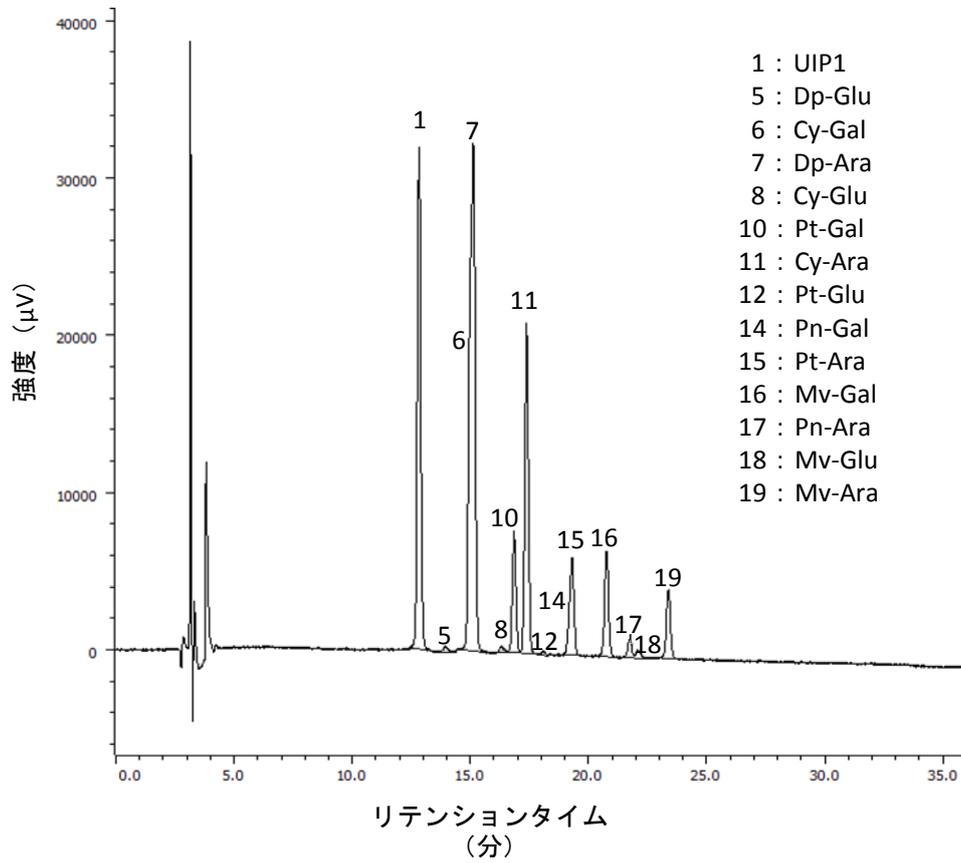
第1-6図 スノキ属野生種およびブルーベリー栽培種における成熟果の糖 (A) および有機酸含量 (B) とそれらの組成(棒グラフ左:果皮 右:果肉)

²⁾Tukeyの多重検定により, 糖および有機酸含量それぞれにおいて異なる英文字間に有意差(5%)があることを示す



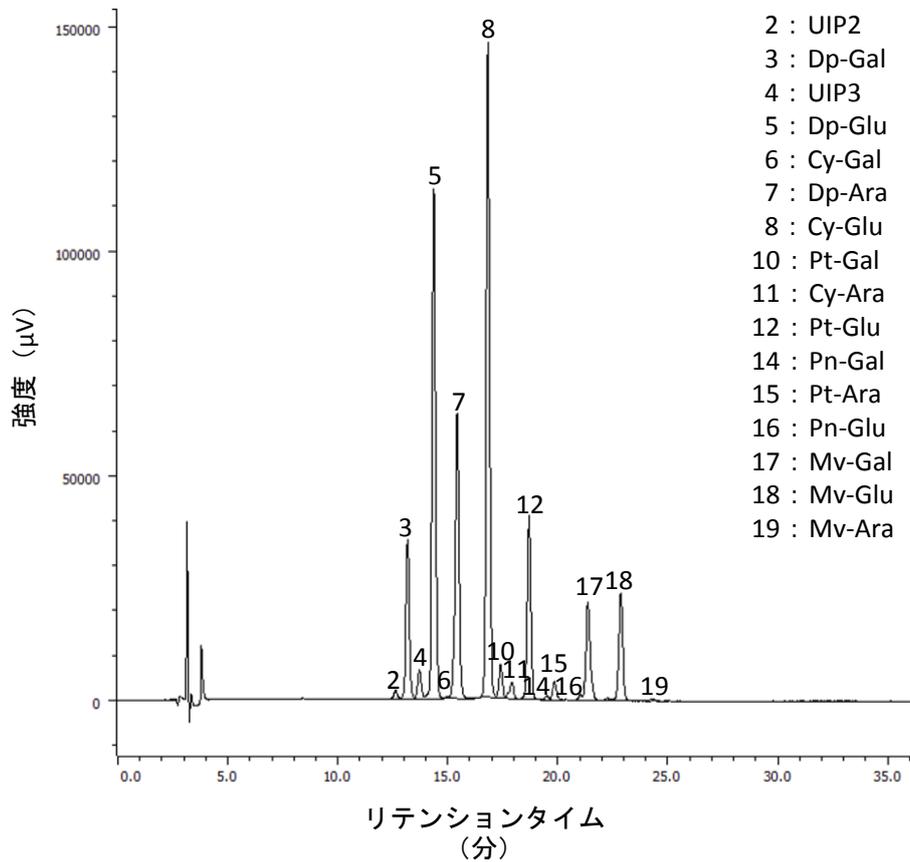
第1-7図 スノキ属野生種ウスノキのアントシアニンクロマトグラム

Pg : ペラルゴニジン, Cy : シアニジン, Pt : ペチュニジン,
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



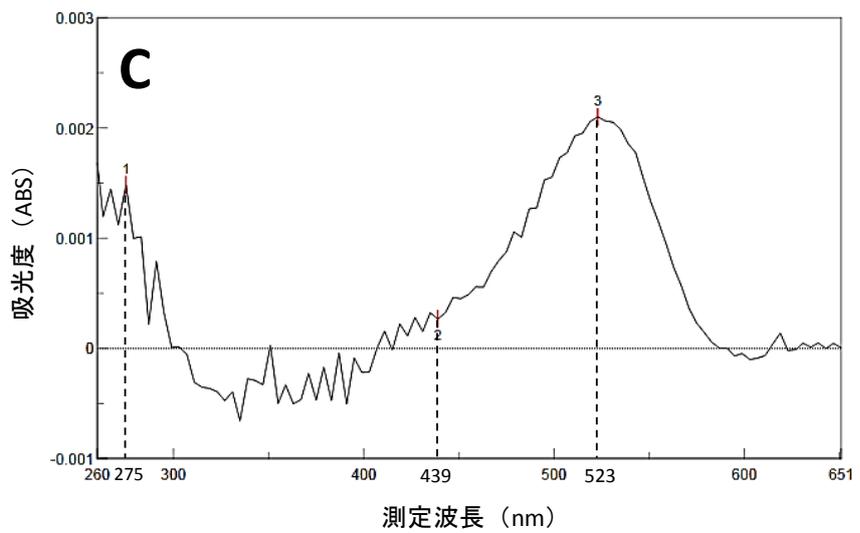
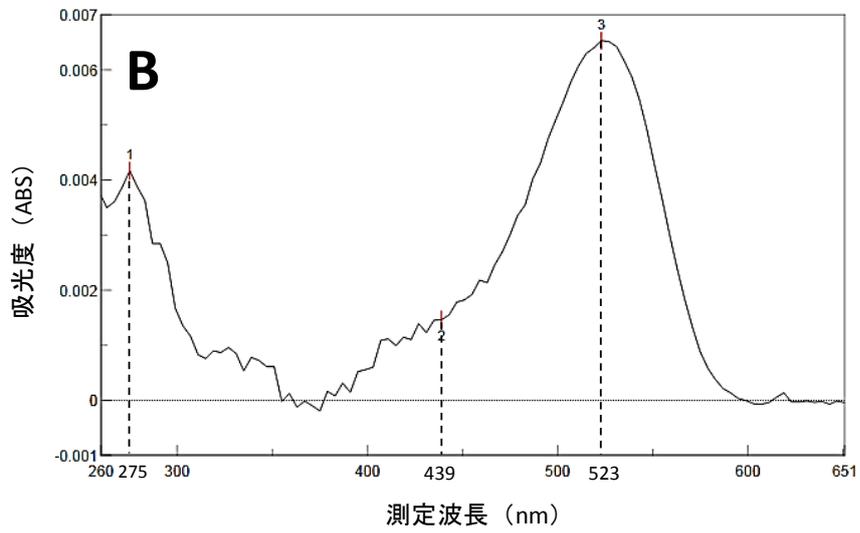
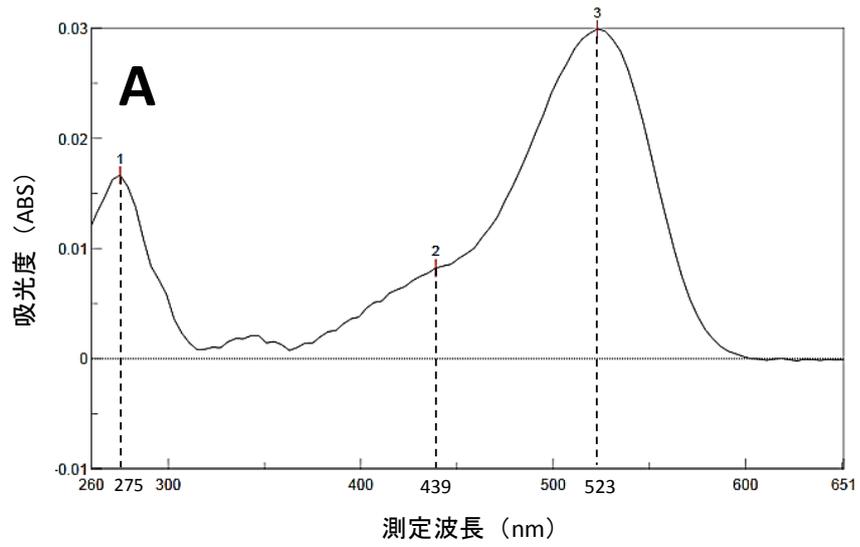
第1-8図 スノキ属野生種シャシャンボのアントシアニクロマトグラム

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

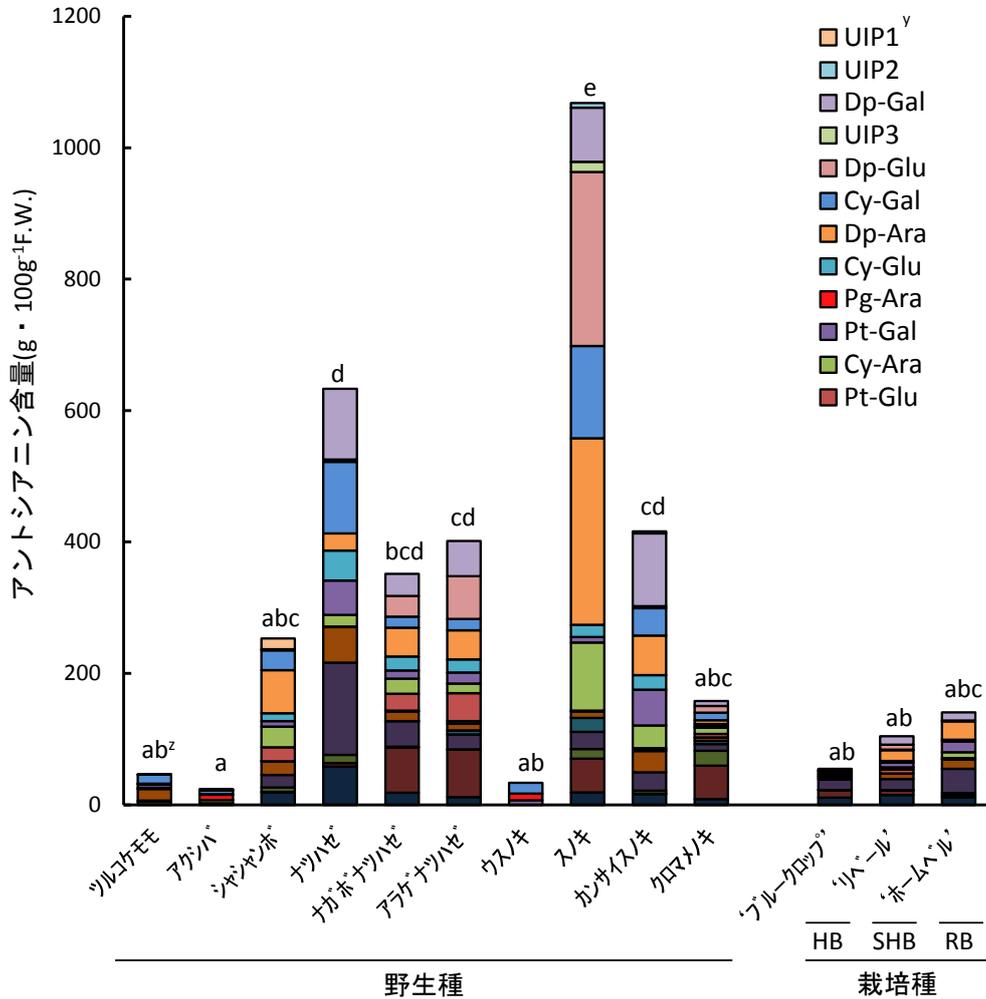


第1-9図 スノキ属野生種スノキのアントシアニクロマトグラム

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



第1-10図 スノキ属野生種から検知された未同定のアントシアニン
UIP1 (A) , 2 (B) および3 (C) の吸収波長



第1-11図 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果の

アントシアニン含量とその組成

Dp: デルフィニジン, Pg: ペラルゴニジン, 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

^zTukey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

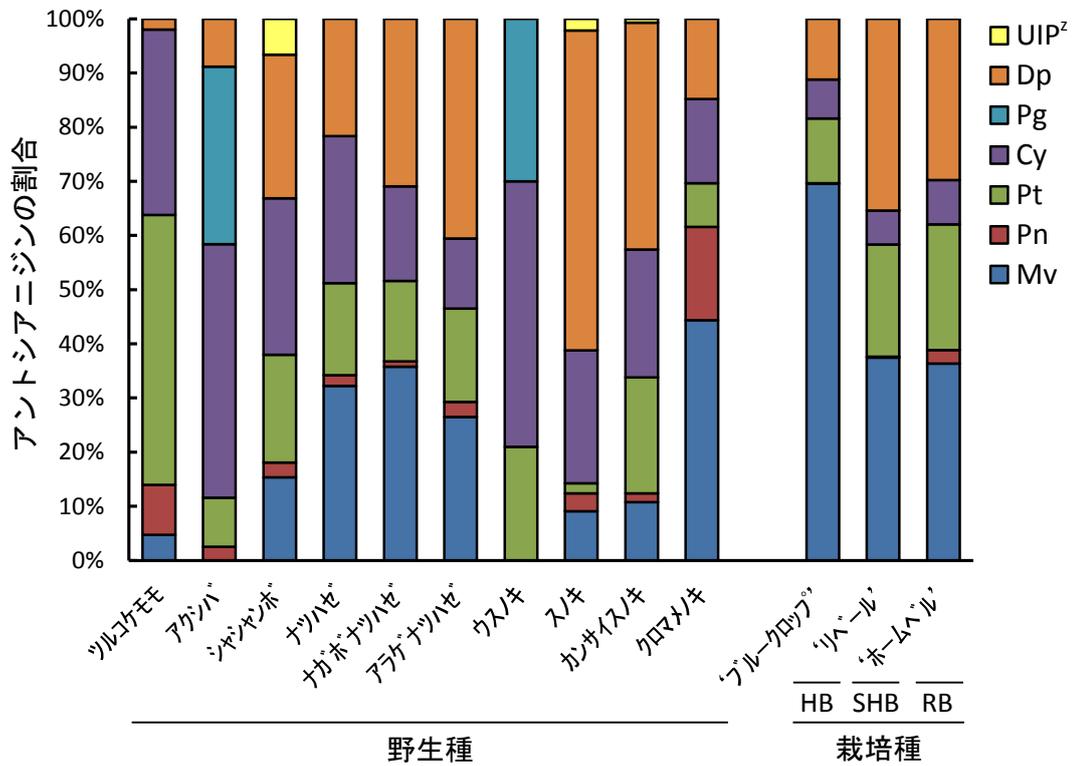
^y未同定のピーク(un-identified peak)

かし、その他の青色系の果実を着生する野生種は 158~1,068 mg の範囲であり、いずれも栽培種よりアントシアニン含量が高かった。特にスノキでは 1,068 mg と極めて高く、次いでナツハゼの 633 mg であり、これらはその他の種および品種に比べて有意に高かった。なお、アントシアニンの組成については HB ‘ブルークロープ’，SHB ‘リベール’では 13 種，RB ‘ホームベル’では 12 種のアントシアニンが検知された。これらに対し、赤色系の果実を着生する野生種ではアントシアニンが 3~12 種類，青色系の果実を着生する野生種には 14~16 種のアントシアニンが検知された。また、これらのアントシアニンについて、アントシアニン別にその割合を見たところ（第 1-12 図），栽培種ではデルフィニジン（Dp）とシアニジン（Cy）の割合が 18~42%の範囲であったが、ツルコケモモ（36%）およびクロマメノキ（30%）を除いた野生種では 48~84%と栽培種に比べて高く、特にスノキでは極めて高かった。

果実全体の総ポリフェノール含量および抗酸化活性を測定した結果は第 1-13 図に示したとおりである。すなわち、栽培種の総ポリフェノール含量は、100 gF.W.当たりの没食子酸当量として 187~382 mg の範囲であったのに対し、野生種は 413~1,767 mg の範囲でいずれの野生種も栽培種より高い値を示し、特にスノキで 1,767 mg、次いでナツハゼが 1,130 mg と高かった。また、抗酸化活性については、栽培種が 100 gF.W.当たりの Trolox 当量として 1.2~2.1 mmol の範囲であったのに対し、野生種では 2.2~5.2 mmol といずれも栽培種より抗酸化活性が高く、中でもスノキが 5.2 mmol、次いでナツハゼが 4.1 mmol と高かった。

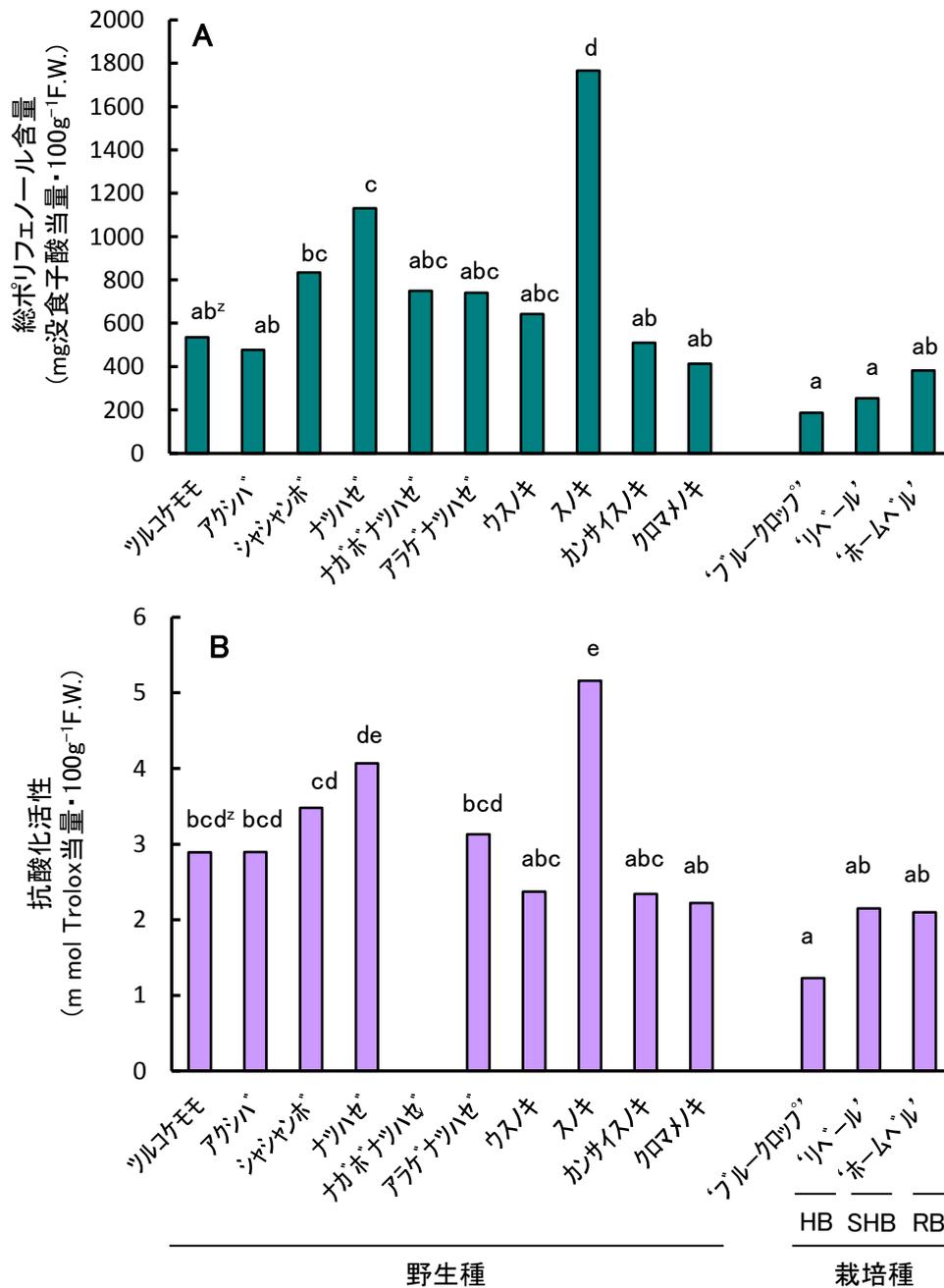
成熟果を果皮と果肉に分けてアントシアニン、総ポリフェノール含量および抗酸化活性を分析した結果（第 1-14 および 15 図），100 gF.W.当たりのアントシアニン含量は果皮において、RB ‘ティフブルー’，ナツハゼおよびスノキで高く、特にナツハゼでは 4,000 mg 以上と他に比べ有意に高い値を示した。また、栽培種の果肉にはアントシアニンは全く検知されなかったが、野生種の果肉中にはツルコケモモを除きいずれもアントシアニンが検知された。しかしながら、それらの野生種の果肉中のアントシアニン含量（15~132 mg）は果皮中のそれら（708~4,192 mg）に比べて顕著に少なかった。なお、野生種の

果肉中のアントシアニンは果皮に比べ種類が少なかったが，果皮と異なるアントシアニンは検知されなかった．総ポリフェノール含量および抗酸化活性はほぼ同様の傾向が見られ，栽培種，野生種ともに果肉に比べ果皮で著しく高い値を示した．また，果皮では RB ‘ティフブルー’ とナツハゼが同程度に高い値を示し，次いでギイマが他の種および品種より有意に高かったものの，他の野生種では特に高い値を示さなかった．一方，果肉のそれらの値は栽培種に比べ野生種で高く，特にギイマが高い値を示した．



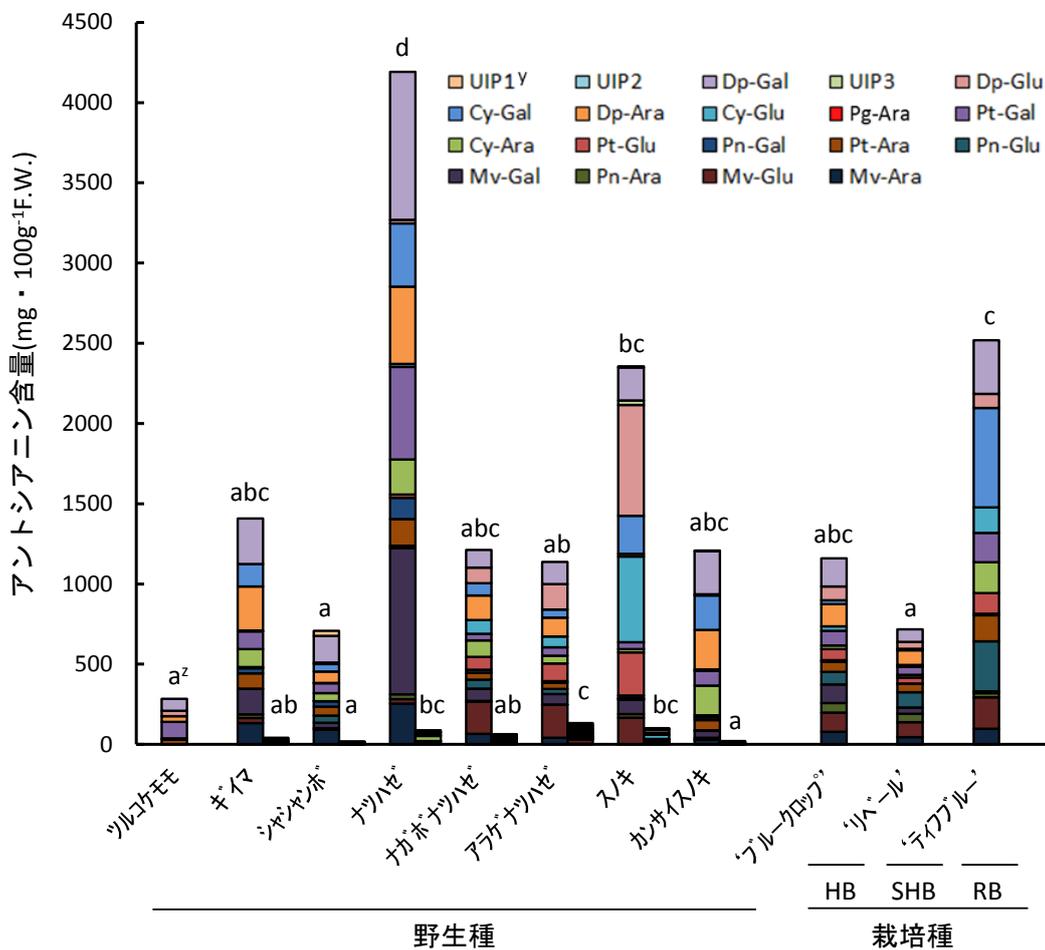
第1-12図 スノキ属野生種およびブルーベリー栽培種における成熟果のアントシアニジンの組成

Pg: ペラルゴニジン, 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,
 ²未同定のピーク (un-identified peak)



第1-13図 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果の総ポリフェノール含量(A)および抗酸化活性 (DPPHラジカル消去活性) (B)

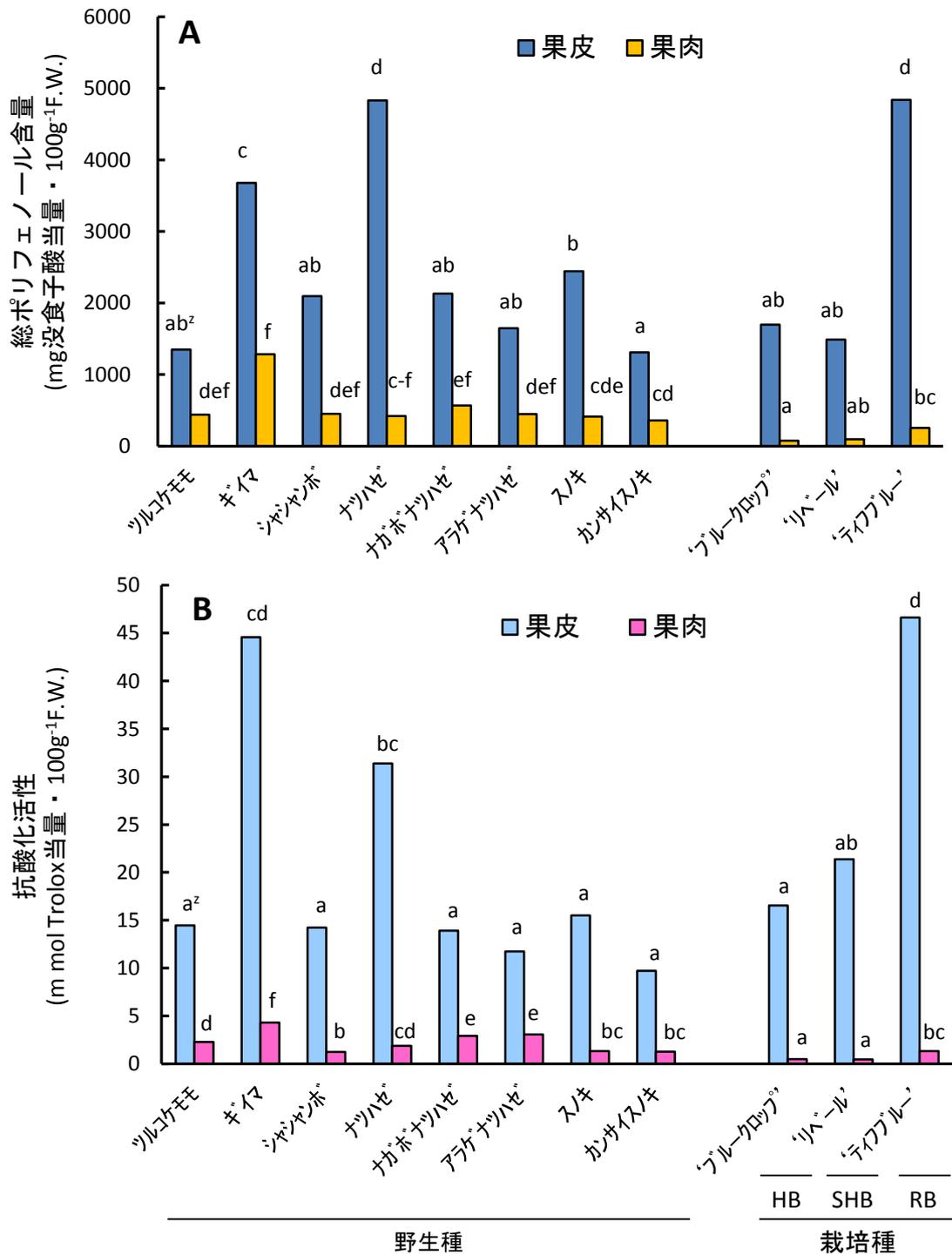
^zTukeyの多重検定により、総ポリフェノール含量および抗酸化活性それぞれにおいて異なる英文字間に有意差(5%)があることを示す



第1-14図 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果のアントシアニン含量とその組成(棒グラフ左：果皮 右：果肉)

Dp：デルフィニジン，Pg：ペラルゴニジン，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

^zTukey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
^y未同定のピーク(un-identified peak)



第1-15図 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果の総ポリフェノール含量 (A) および抗酸化活性 (DPPHラジカル消去活性) (B) (棒グラフ左: 果皮 右: 果肉)
^zTukeyの多重検定により, 総ポリフェノール含量および抗酸化活性それぞれにおいて異なる英文字間に有意差 (5%) があることを示す

考 察

我が国にも、栽培種のブルーベリーと同じスノキ属の野生種が自生し、一部のものは地元の人々により採取、利用されてきた。しかしながら、我が国ではこれまで、それらの野生種を栽培化はもちろん、改良の母本としても利用するには至らなかった。そこで本章では、本邦自生のスノキ属野生種について、倍数性および核 DNA 含量、果実の品質および機能性などを調査し、栽培種と比較することによりそれらを育種素材として評価した。

その結果、野生種には二倍体が 13 種と多いが、栽培種と同様に四倍体および六倍体の種もそれぞれ 1 種および 2 種存在することが明らかとなった。スノキ属の倍数性については、ツルコケモモ、コケモモおよびアクシバが二倍体、ウスノキが四倍体、クロマメノキが六倍体（北村・村田，1974）であり、ギイマ、シャシャンボ、ナツハゼおよびスノキが二倍体である（津田，2007）ことが報告されている。本章における実験の結果、ウスノキ以外の 8 種はこれまでの報告と一致したが、四倍体と報告されているウスノキについては本章では二倍体と推定された。ウスノキは異なる園芸店 3 店から入手した 8 系統（第 1-1 表）を全て FCM で解析したが、いずれも二倍体の位置に相対蛍光強度のピークが認められた。ヒメウスノキは形態的にウスノキと類似しており混同し易いが、ウスノキは果実の子房が 10 室であるのに対し、ヒメウスノキは 4~5 室である（北村・村田，1974）ことが報告されている。本章で用いたウスノキはいずれも子房が 10 室であり（データ未掲載）、ヒメウスノキとの混同はないものと思われた。一方、ウスノキ（*V. hirtum* Thunb.）には種内変異が多く見られ、コウスノキ（var. *hirtum*）、ツクシウスノキ（var. *kiusianum*）などが確認されているが、ウスノキとの中間型が見られるなど分類は困難である（佐竹ら，1989a）。また、コウスノキおよびツクシウスノキの倍数性についての報告は見当たらない。なお、ツルコケモモでは二倍体、四倍体および六倍体（北村・村田，1974）が、クロマメノキでは北欧自生種は二倍体および四倍体であり、我が国の自生種は八倍体もある（佐竹ら，1989a）が、主に六倍体である（原，1953）とされている。また、米国北東部に広く自生する *V. corymbosum* でも、二倍体、四倍体、六倍体の倍数性変

異が報告されている (Costich ら, 1993).

本実験の結果, 核 DNA 含量は異倍数体間で有意に異なるとともに, 異倍数体間の差異より小さいものの同倍数体内の種間でも有意差が見られるものが存在し, Costich ら, (1993) の報告と同様の結果であった. また, 同倍数体内の核 DNA 含量の差異は二倍体の種間で最も大きかったものの, 四倍体の種および栽培種間でも, 六倍体の種間でも, それぞれ有意差が見られた. スノキ属は花弁数と雄蕊数がそれぞれ 5 枚と 10 本である種が多いのに対し, それらが 4 枚と 8 本と形態的に異なる *Oxycoccus* 節のツルコケモモと *Oxycoccoides* 節のアクシバの核 DNA 含量はそれぞれ他種と差が大であった. 佐竹ら (1989a ; 1989b) の分類によれば, 野生種 18 種の内これら 2 種のみがスノキ亜属でなく, ツルコケモモ亜属およびアクシバ亜属として分類されている.

種間雑種の作出において, 核 DNA 含量の違いはその成功を左右する 1 つの要因であり, 野生種の核 DNA 含量を評価することは育種計画においても非常に重要である (Costich ら, 1993). また, 染色体数は核 DNA 含量と顕著な相関があることが指摘されている (Black · Beckman, 1983 ; Verma · Rees, 1974). FCM は, 蛍光染色された核内 DNA の蛍光強度を測定することにより, 相対的に核 DNA 含量を測定し, 近年植物の倍数性を判別する手段として利用されている (De laat ら, 1987 ; De Rocher ら, 1990 ; Keeler ら, 1987). Costich ら (1993) は, *Oxycoccus* 節のクランベリー (*V. macrocarpon*) の核 DNA 含量 (1.16 pg/2 C) は, *Cyanococcus* 節の二倍体種のそれらと著しく異なることから, 種間の遺伝的距離や遺伝的差異と核 DNA 含量の相違の程度には正の相関があることを示唆している. このことから, *Oxycoccus* 節のツルコケモモおよび *Oxycoccoides* 節のアクシバは, *Cyanococcus* 節 (ブルーベリー栽培種), *Myrtillus* 節 (クロウスゴ, ヒメウスノキ), *Bracteatum* 節 (ギイマ, シャシャンボ), *Vaccinium* 節 (ナツハゼ, スノキ他 7 種) および *Vitis-idaea* 節 (コケモモ) とは遺伝的な距離が遠いものと考えられた.

野生種は栽培種に比べ, 全体的に果実が小さく軽かったが, その一方で栽培種にはない常緑性, 長い総状花序, 果実が赤色を呈する, 開花期および果実の成熟期が遅いなどの有用な形態的および生理的な特徴を持つことが明らかとな

った。Ballington ら (1984a) はノースカロライナ州南東部の野生種における果実の成熟期の種間差異を報告し、最も早熟であった二倍体の *V. angustifolium* や、HB より晩生の個体群が確認された *V. corymbosum*, RB よりも早生や晩生の個体群が確認された *V. virgatum* などの種が、早生および晩生品種を育種する上で有用であるとしており、シャシャンボなど果実の成熟期の遅い種は晩生品種の育成にとって有用であると考えられた。

糖含量および有機酸含量は果実の品質、すなわち美味しさに大きく影響する要素であり、現在の栽培ブルーベリーの育種においても、果実の大きさと並んで重視されている。本研究の結果、総じて野生種は栽培種 3 品種に比べて糖含量が低く、有機酸含量が高いことが示された。しかしながら、野生種の中にもカンサイスノキおよびスノキのように、栽培種と同程度に糖含量が高く、有機酸含量が低いものが存在した。Ballington ら、(1984b) は、スノキ属野生種 11 種について果実品質を調査し、これらの野生種は栽培種と比較して糖度が低く、滴定酸度が高く、果実品質が劣っていたものの、中には *V. ellioti*, *V. corymbosum* および *V. ashei* のように栽培種と同程度の果実品質を示すものがあることを報告している。また、果実の糖組成については、栽培種と同様に果糖とブドウ糖がほぼ等量で 90%程度を占め、ショ糖は 10%以下のものがほとんどであったが、シャシャンボのようにショ糖の割合が高いものやアクシバのように全くショ糖が検知されないものもあった。一方、有機酸の組成については種間差が大きく、それぞれの種において特有の組成が認められたものの、野生種では尿路感染症の予防に効果のあるキナ酸の割合が栽培種の HB ‘ブルークロップ’ および SHB ‘リベール’ に比べて高く、クエン酸の割合が低い傾向が認められた。

野生種の果実全体のアントシアニン含量は赤色果実を着生する 3 種を除き、いずれも栽培種よりも高い値であった。中でもスノキは、栽培種の中で最もアントシアニン含量が高かった RB ‘ホームベル’ の約 8 倍の値を示し、次いでナツハゼが約 4 倍の値を示した。また、ポリフェノール含量および抗酸化活性はいずれの野生種も栽培種より高い値を示し、スノキおよびナツハゼが特に高い値を示した。しかしながら、果皮と果肉に分けて分析した結果、果皮のみの比較では必ずしも野生種でアントシアニンやポリフェノール含量が高くなか

った。ブルーベリー栽培種は果肉の色が白く、果肉にはアントシアニンが含まれていないのに対し、ナツハゼなどの一部の野生種は成熟が進むに連れて果肉が赤色を呈し、果肉にもアントシアニンが含まれていた。果実の大きさや果皮の厚さなども関係すると考えられるが、野生種では栽培種に比べ果肉中のそれらの値が高いことも、果実全体の抗酸化活性の高さに関与しているものと推察された。今後、果皮の厚さを調査するとともに、今回調査できなかった野生種について果皮と果肉に分離して同様の調査が必要と思われる。本章の結果と同様に、Wang ら (2012) はブルーベリー栽培種では果肉に比べ、果皮のアントシアニンおよびポリフェノール含量が著しく高いこと、さらに抗酸化活性や α -グルコシターゼ抑制活性も果皮で高い値を示すことを報告している。一方、果肉にもアントシアニンが含まれているビルベリー (*V. myrtillus* L.) は古くから民間療法に用いられ (Morazzoni・Bombardelli, 1996)、アントシアニン含量が 300~698mg/100g と高く (Mazza・Miniati, 1993)、エキスには夜盲症 (Jayle ら, 1964)、近視 (Casellil, 1964)、糖尿病性動脈硬化網膜症 (Scharrer・Ober, 1981)、胃潰瘍 (Cristoni・Magisteretti, 1987)、血小板凝縮 (Bottecchia ら, 1987)、老人性白内障 (Bravetti, 1989)、眼精疲労 (梶本ら, 1998) などに対する改善、予防効果があることが報告されている。このため、ヨーロッパ諸国、韓国、米国、ニュージーランドでは医薬品として、我が国では健康食品や機能性食品として利用されており (梶本ら, 1998; 中村・佐藤, 1998)、本章で調査を行った野生種の多くに見られた果肉が赤く着色する特徴は、非常に有用なものであると考えられた。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。なお、Lyrene (1986) は、フロリダ州に自生する *V. darrowii* の個体群間で園芸学的特性に有意な差が存在することを示し、同一の野生種内においても、個体群間および個体間差が認められることを報告している。我が国に自生するスノキ

属野生種についても、種内での成分変異などが考えられ、同一種内における個体選抜により、有望な個体が得られるものと考えられる。

ブルーベリーのアントシアニンには 5 種のアントシアニンジンを、すなわち、Dp, Cy, ペチュニジン (Pt), ペオニジン (Pn), マルビジン (Mv) のそれぞれ 3 位の位置にグルコース (Glu), ガラクトース (Gal), アラビノース (Ara) の 3 種の糖が付加した 15 種が存在し (Ballington ら, 1982 ; Sapers ら, 1984 ; Ballington ら, 1987 ; Macheix ら, 1990 ; Mazza・Miniati, 1993), LB ではそれらに加え、糖に酢酸がエステル結合したアシル化アントシアニンが報告されている (Gao・Mazza, 1994 ; Prior ら, 2001). なお, HB に関しても最近同様のアセチル化アントシアニンの存在が報告されている (Gao・Mazza, 1994 ; Cho ら, 2004 ; Skrede ら, 2000 ; Prior ら, 2001 ; Cho ら, 2004).

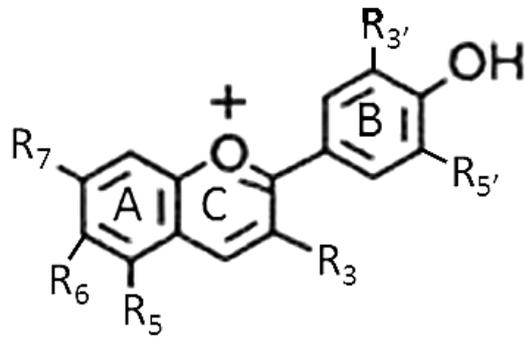
本章で検知されたアントシアニンの吸収波長を検討した結果、栽培種および野生種ともにアシル化アントシアニンは全く確認されなかった。また、非アシル化アントシアニンの種類は栽培種の HB ‘ブルークロップ’ および SHB ‘リベール’ で 13 種, RB ‘ホームベル’ で 12 種存在し、野生種では 3 ~16 種と種によりかなりの相違が認められた。しかしながら、栽培種と同様に青色系果実を着生する野生種は 14~16 種と栽培種に比べていずれもアントシアニンの種類が多かった。一方、赤色系果実を着生する野生種の中ではウスノキが 3 種と最も少なかったが、同じく赤色系果実を着生するアクシバとツルコケモモではそれぞれ 11 種と 12 種と比較的多かった。ペラルゴニン (Pg) の 3 位の位置に Ara が付加された, Pg-3-Ara は、アクシバおよびウスノキのみで検知され、栽培種および他の野生種では検知されなかった。なお、野生種の中にはアントシアニンと同様の吸収波長を示し、アントシアニンと推察される UIP が確認された。Pomar ら (2005) の最大吸収波長および溶出順序の報告によりアントシアニンを、林 (1991) の 400~460 nm 波長域の吸光度と可視部吸収極大波長の割合 ($E_{440}/E_{max} \times 100$) の報告により糖の結合数をそれぞれ推定し、アントシアニンの同定を試みた。その結果、UIP はいずれも 3 位の位置に糖が付加された Dp と推察された。

アントシアニジンの色調 (第 1-16 および 17 図) は、B 環の水酸基の数が

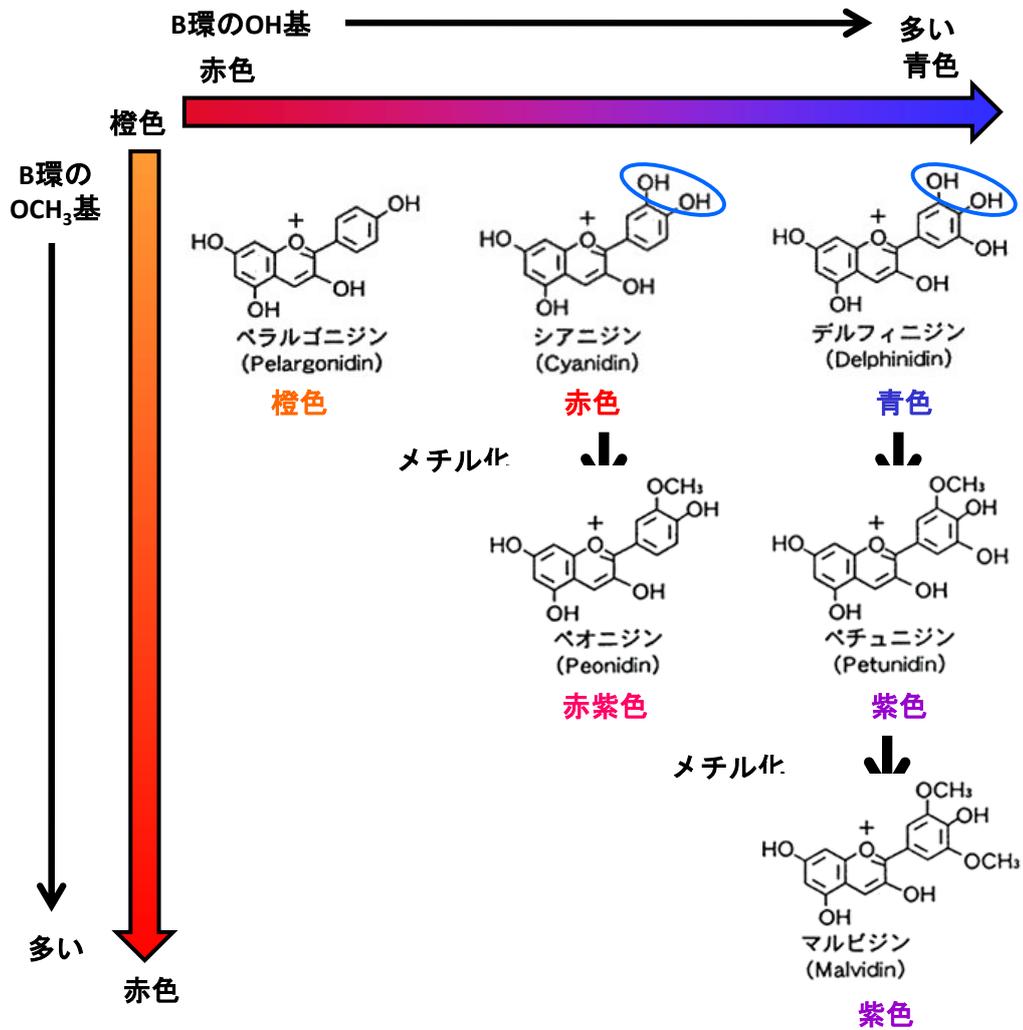
多いほど青色（深色）シフトをおこして紫色に，3-デオキシ体は赤色（浅色）シフトをおこして橙色に近くなり（大庭ら，2000），Pg は B 環の 4-位の位置に OH 基を 1 個しか持たず，橙色を呈するアントシアニンである．透明感のある明るい赤色を呈するアクシバおよびウスノキはアントシアニンの種数には違いが見られたが，両者ともに Cy（赤色を呈する）と Pg（橙色を呈する）のアントシアニンがそれぞれ約 50%と 30%を占めていた．一方，不透明な濃紅色を呈するツルコケモモは，Pt（紫色を呈する）と Cy がそれぞれ約 50%と 35%を占めていた．すなわち，アントシアニンの種数ではなく，アントシアニン組成の相違がアクシバおよびウスノキとツルコケモモの色調の違いに反映されたと考えられる．一方，青色系果実を着生する栽培種と野生種は，いずれもアントシアニンの種類が多いだけでなく，B 環の水酸基が 3 つの Dp や Dp がメチル化した Pt および Mv といった青色（深色）シフトをおこして紫色を呈するアントシアニンの割合が多いことが関係しているものと推察された．

アントシアニンは色調と同様にアントシアニジンの B 環の水酸基の数が多いほど，抗酸化活性が高くなり，Dp や Cy のアントシアニジンは高い抗酸化活性を示す（大庭ら，2000；Wang ら，1997）．さらに Dp および Cy は B 環に高い抗酸化活性を示すとされるカテコール構造を持っており，実際に Fukumoto・Mazza（2000）は，様々なフェノール物質の抗酸化活性を比較し，6 種のアントシアニン間では Dp，次いで Cy の抗酸化活性が強いことを β -カロテン法および DPPH 法などを用いて明らかにしている．一般に機能性が高いことで知られているビルベリーには 15 種のアントシアニンが存在し，Dp および Cy の割合が 63%と高い（Baj ら，1983）ことが報告されている．本実験の結果，スノキでは Dp および Cy の割合が 82%であり，カンサイスノキでは 59%であった．従って，スノキおよびカンサイスノキの両者は，アントシアニンの含量が高いことに加え，抗酸化活性の高いアントシアニンを多く含むことにより，高い抗酸化活性を示すものと考えられた．

ブルーベリーにおいては，ORAC 値とアントシアニン含量およびフェノール含量との間に正の相関関係があることが報告されており（Ehlenfeldt・Prior，2001；Connor ら，2002；Prior ら，1998），Kalt ら（2001）の報告



第1-16図 アントシアニジンの基本骨格



第1-17図 天然に存在する一般的なアントシアニジンの種類と色調
青丸：カテコール構造

ではその相関係数はそれぞれ $R=0.77$ および $R=0.85$ であった。本章の抗酸化活性と全アントシアニン含量および総ポリフェノール含量との関係をみたところ

(データ未掲載)、抗酸化活性と総ポリフェノール含量との間には高い相関 ($R=0.938 > 1\%$) が認められ、抗酸化活性と全アントシアニン含量との間にも正の相関 ($R=0.680 > 5\%$) が認められた。しかしながら、相関の程度には差があり、本章で用いた材料においてはアントシアニン含量に比べ、ポリフェノール含量の方が抗酸化活性への寄与が大きいことが明らかになった。ちなみに、全アントシアニン含量と総ポリフェノール含量との間にも $R=0.794 > 1\%$ の正の相関が認められ、アントシアニン含量が高いほどポリフェノール含量も高くなることが推察された。しかしながら、野生種の中には赤色系果実を着生する種が存在し、前述したようにそれらのアントシアニン含量は他種に比べて低かったのに対し、ポリフェノール含量および抗酸化活性は栽培種および青色系果実の野生種の一部よりも高い値を示し、アントシアニン以外のポリフェノール類も抗酸化活性に強く関与していることが示唆された。Moyer ら (2002) はスノキ属、キイチゴ属、スグリ属における機能成分を調査しており、赤ハックルベリー (*V. parvifolium*) がスノキ属の中で最も低いアントシアニン含量を示したものの、抗酸化活性 (ORAC, Ferric Reducing Antioxidant Power : FRAP) は HB の平均値 ($52.3 \mu\text{mol TE/g}$, $58.6 \mu\text{mol TE/g}$) よりも高い値 ($78.0 \mu\text{mol TE/g}$, $64.6 \mu\text{mol TE/g}$) を示したことを報告している。

以上のように、我が国に自生する野生種には、果実の大きさおよび果実品質は栽培種に比べて劣るものの、高い機能性、常緑性や総状花序、晩熟性などの有用な特性を有しているだけでなく、二倍体から高次倍数体の六倍体まであり、育種素材として極めて興味あるものが存在することなどが明らかになった。

第2章 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 F₁ 系統の評価

緒言

前章で述べたようにブルーベリーは、二倍体、四倍体および六倍体の種からなっている。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つた (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無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、米国で早熟性や少低温要求量を目的として育成された SHB は、非還元配偶子形成を利用して二倍体の *V. darrowii* や六倍体の *V. virgatum* , 四倍体の *V. corymbosum* 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、ナツハゼ、シャシャンボなどがある (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つた。

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、それらの倍数性を調査し、葉、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

実験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 2-1 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/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。

実験2 雑種性および倍数性の解析

4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, 2.0mM dNTPsを2μL, 5U・μL⁻¹ rTaq DNA polymerase (TOYOBO)を0.2μL, 10pmol・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。

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、第1章の実験1と同様にFCMにより、倍数性を解析および核DNA含量の解析を行った。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、押しつぶし法にて染色体を観察した。

実験3 葉の形態、開花期、花の形態、花粉稔性および着果率

葉の形態については、それぞれの系統において成葉10枚を8~9月に採取し、葉身長、葉幅、葉身形指数(葉身長/葉幅)および葉柄長を調査した。花の形態については、開花期(4~6月)にそれぞれ20花を採取し、花序および花形を目視で調査し、それぞれから採取した10花について花冠の縦径、横径、横径/縦径、開口部径および花柱長を調査した。また、花の形態を調査するとともに、開花期に30花以上をランダムに選んでラベリングを行い、放任受粉での着果率(着果数/約30花×100)を調査した。さらに、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。

実験 4 果実の成熟期および果実品質

果実の成熟期（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（横径／縦径）、果柄長、目の深さ、目の幅、果柄痕幅および果粉の多少（目視で多・中・少と評価）を調査した。果実はその後の分析に供するため -30°C で冷凍保存された。

果実の糖および有機酸の抽出には冷凍果約 2 g（3 個以上から秤取）を用い、第 1 章の実験 3 と同様に HPLC で分析した。なお、実験はいずれも 3 反復とした。

実験 5 果実のポリフェノール成分および抗酸化活性

果実のポリフェノール成分および抗酸化活性の抽出には冷凍果約 2 g（3 個以上から秤取）を用い、第 1 章の実験 4 と同様に分析した。すなわち、アントシアニン含量は HPLC で、総ポリフェノール含量は Folin-Ciocalteu 法で、抗酸化活性は DPPH ラジカル消去活性をマイクロプレート法でそれぞれ分析した。なお、実験はいずれも 3 反復とした。

以上の実験結果はそれぞれの平均値とし、一元配置の分散分析により有意であることを確認し、Tukey の多重検定により第 1 章と同様に統計解析を行い、花粉稔性については平均値の逆正弦変換を行い、その値について 1%有意水準で解析を行った。

結 果

実験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×100）は花粉親の品種間で 23.8～100%（平均 52.9%）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×100）も発芽率と同様に 17.6～100%（平均 20.6%）の幅があったが、クロマメノキ×‘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 2-1 表）。

実験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 2-1 図）、OPB-8（5'-GTCCACA CGG-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、KB 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、KB 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、4 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。

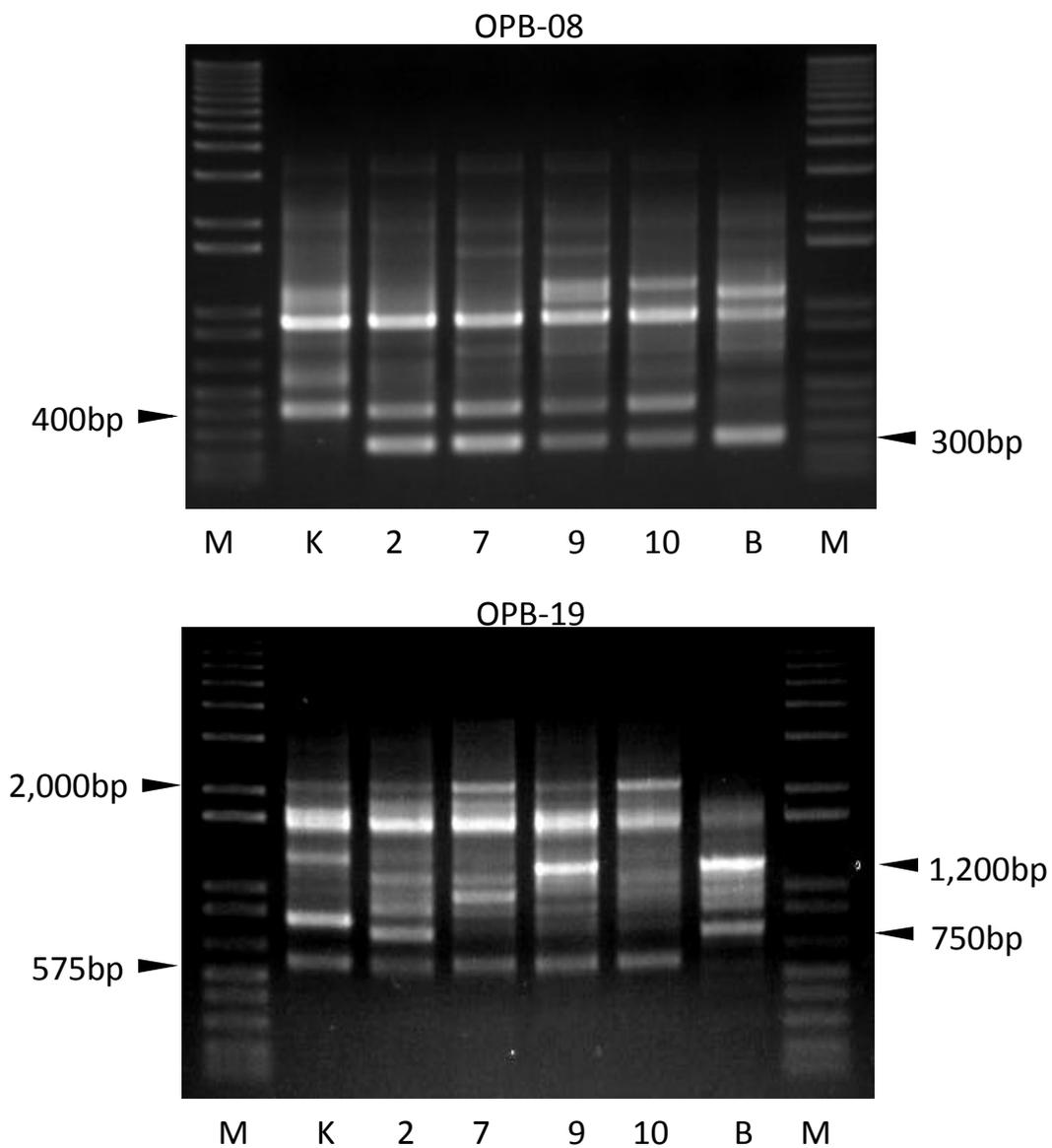
次に、FCM により倍数性を解析した結果（第 2-2 図）、クロマメノキは六倍体、‘ブルークロップ’は四倍体の位置に相対蛍光強度のピークが認められた。これらに対し、4 系統はいずれも五倍体の位置に相対蛍光強度のピークが

第2-1表 クロマメノキとハイブリッドシュブルーベリー数品種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												
	‘ウエイマウス’	12	5	41.7	85	2	83	1	50.0	1	1	100.0
	‘スハ ^o -タン’	21	4	19.0	58	8	50	5	62.5	2	1	20.0
	‘タ ^o -ロー’	13	4	30.8	81	10	71	10	100.0	3	0	0.0
	‘テ ^o -キシ ^o ’	11	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
	‘ハ ^o -トリオット’	13	2	15.4	68	19	49	16	84.2	4	4	25.0
	‘ブルー-クロツツ’ ³	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
	‘ランゴカス’	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
小計		117	28	23.9	729	119	610	63	52.9	26	13	20.6
‘ウエイマウス’	クロマメノキ	20	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
‘スハ ^o -タン’		16	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
‘タ ^o -ロー’		15	2	13.3	34	3	31	2	66.7	-	2	100.0
‘テ ^o -キシ ^o ’		38	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
‘ハ ^o -トリオット’		10	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
‘ブルー-クロツツ’ ³		49	4	8.2	141	12	129	6	50.0	-	5	83.3
‘ブルー-レイ’		16	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
‘ランゴカス’		16	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
‘レイトブルー’		39	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
小計		219	6	2.7	175	15	160	8	53.3	0	7	87.5

²発芽数/完全種子数 × 100

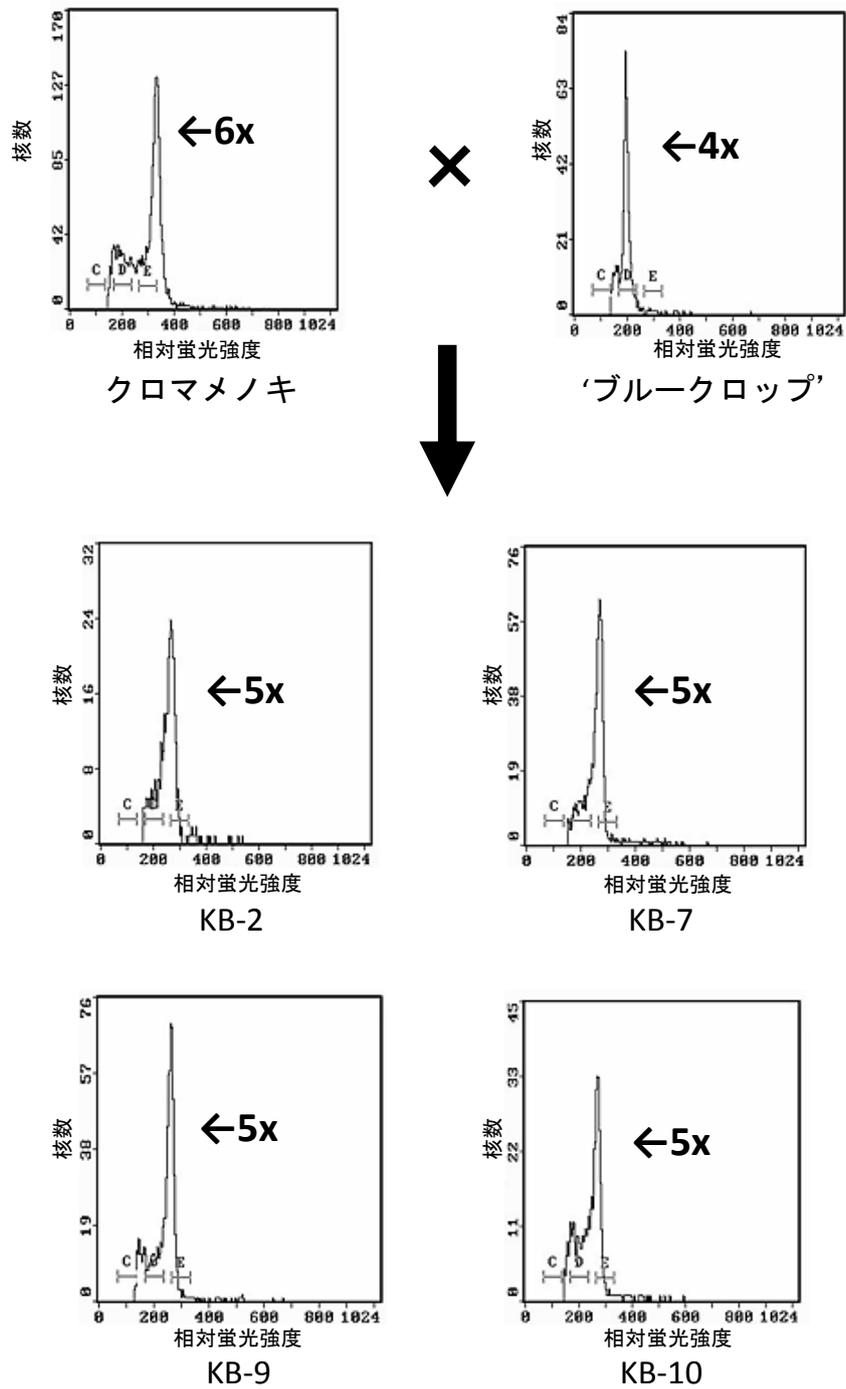
³生存個体数/発芽数 × 100



第2-1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4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 : 1kb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’



第2-2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4系統における倍数性の解析

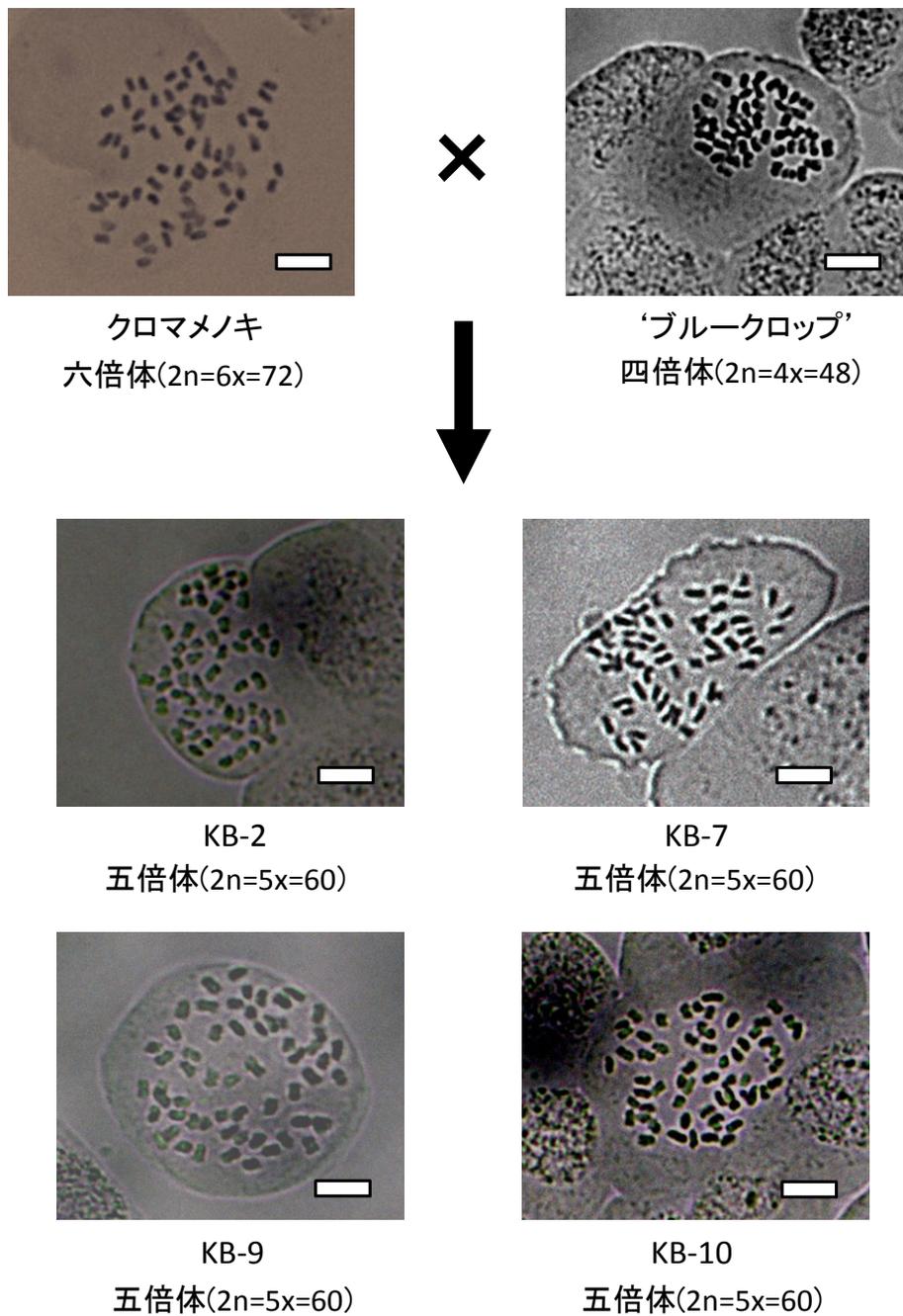
認められた。また、体細胞における染色体数を観察した結果（第 2-3 図）、クロマメノキは 72 本の六倍体、‘ブルークropp’は 48 本の四倍体であり、KB 系統はいずれも 60 本の五倍体であることが確認された。

実験 3 葉の形態、開花期、花の形態、花粉稔性および着果率

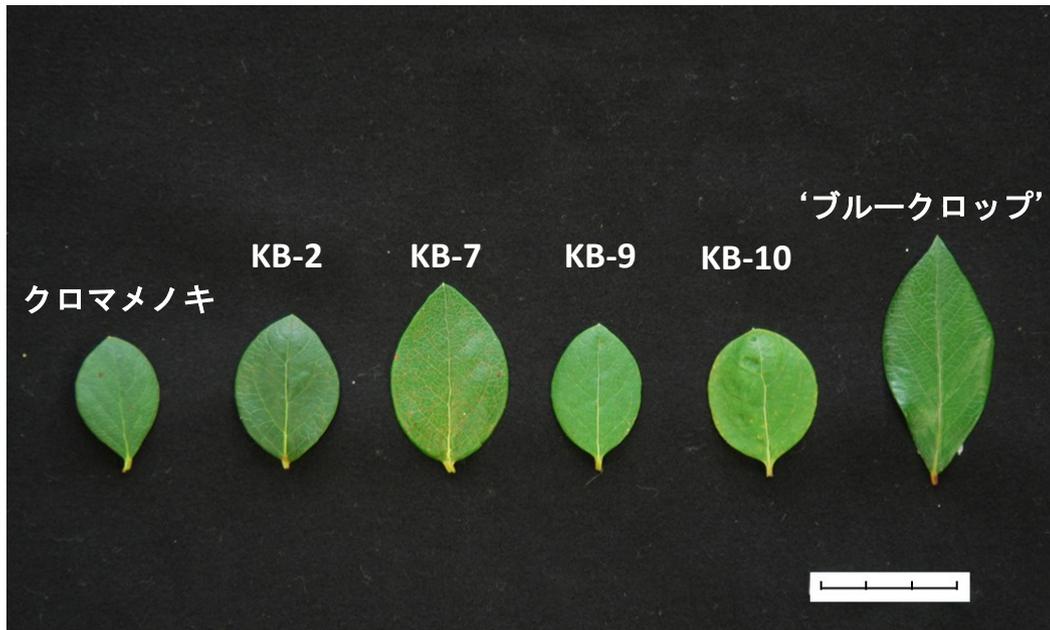
葉の形態については第 2-4 図および第 2-2 表に示したとおりである。

‘ブルークropp’の葉身長は 56.7 mm とクロマメノキの 23.3 mm より 2 倍以上大きく、KB 系統はいずれも両親の間の値を示したものの、クロマメノキに近い値を示し、葉幅でも葉身長と同様の傾向が見られた。葉身形指数は ‘ブルークropp’でクロマメノキおよびいずれの KB 系統より有意に大きく、KB-7 を除きクロマメノキと同程度であった。なお、クロマメノキと ‘ブルークropp’の葉柄長はそれぞれ 2.8 と 3.7 mm であり、‘ブルークropp’が有意に長く、KB-2 および 10 はクロマメノキと、KB-7 は ‘ブルークropp’と同程度の値を示し、KB-9 は両親の間の値を示した。

‘ブルークropp’とクロマメノキの開花期（第 2-3 表）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ropp’とクロマメノキの花（第 2-5 図および第 2-3 表）は、それぞれ長い鐘形と壺形であったが、KB 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ropp’および KB 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ropp’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、KB 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ropp’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。放任受粉での着果率は、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2-3図 クロマメノキと‘ブルークropp’ およびそれらの交雑から得られた4系統の体細胞染色体数
スケールは10 μ m



第2-4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4系統の葉
スケールは3 cm

第2-2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4系統における葉の形態

品種・系統	葉の大きさ(mm)			葉柄長 (mm)
	葉身長	葉幅	葉身形指数 ^z	
クロマメノキ	23.3 a ^y	15.0 a	1.56 ab	2.8 a
KB-2	30.8 b	21.9 b	1.41 a	2.6 a
KB-7	34.3 b	21.1 b	1.63 b	3.6 b
KB-9	26.0 ab	16.9 ab	1.53 ab	3.0 ab
KB-10	26.0 ab	16.7 ab	1.57 ab	2.5 a
‘ブルークロップ’	56.7 c	29.0 c	1.95 c	3.7 b

^z葉身長/葉幅

^yTukey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



クロマメノキ

×



‘ブルークロップ’



KB-2



KB-7



KB-9



KB-10

第2-5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4系統の花
スケールは1 cm

第2-3表 クロマメノキと‘ブルークローツ’およびそれらの交雑から得られた4系統における開花期, 形態, 花粉稔性および放任受粉での着果率

品種・系統	開花期(月)	花序	花の形態	花色	花粉稔性(%)	
					稔性率 ^z	発芽率 ^y
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 ^x	30.0 b
KB-2	4中 ~ 5中旬	1~2花	短い鐘形	白色	71.2 b	3.9 a
KB-7	4中 ~ 6上旬	1~2花	短い鐘形	白色	66.3 b	13.9 ab
KB-9	4中 ~ 6上旬	1~2花	短い鐘形	白色	39.7 a	8.7 a
KB-10	4中 ~ 6上旬	1~2花	短い鐘形	白色	66.5 b	7.6 a
‘ブルークローツ’	4中 ~ 5中旬	短い総状花序	長い鐘形	白色	97.3 c	76.5 c

^zアセトカーミン染色

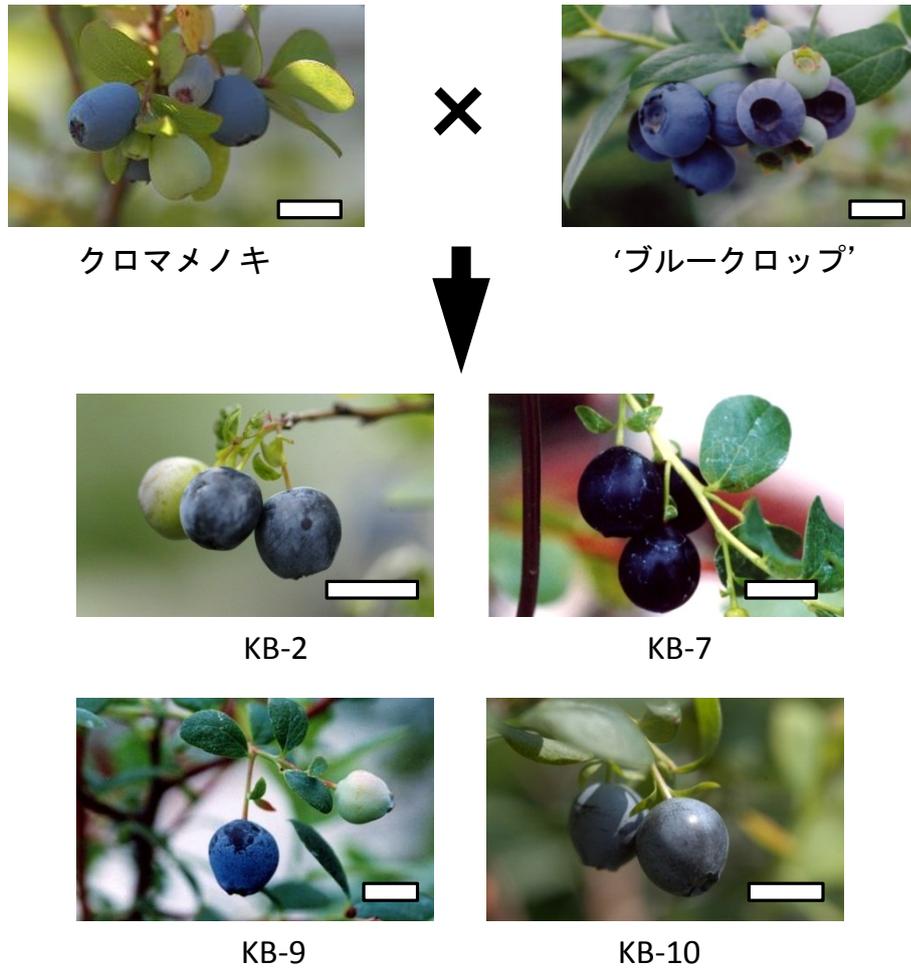
^y寒天培地上

^x平均値を逆正弦変換した値についてTukeyの多重検定を行い, 異なる英文字間に有意差(5%)があることを示す

実験4 果実の成熟期および果実品質

果実について見たところ（第2-6図および第2-4表）、成熟期は、‘ブルークロープ’に比べクロマメノキおよびKB系統で遅く、成熟の期間も‘ブルークロープ’に比べ半月以上長かった。果実重と果実の大きさは、‘ブルークロープ’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、KB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、‘ブルークロープ’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。KB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（第2-7図）。目の深さ、幅はともにクロマメノキより‘ブルークロープ’で大きく、KB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‘ブルークロープ’で大きく、4系統は両親の間の値を示し、‘ブルークロープ’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。

成熟果の糖および有機酸含量について見ると（第2-8図）、糖含量はクロマメノキで低く、‘ブルークロープ’で高かった。KB系統ではいずれもクロマメノキと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、‘ブルークロープ’で低かった。KB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、‘ブルークロープ’と同程度の値を示した。なお、酸の組成については、クロマメノキはキナ酸が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‘ブルークロープ’同様クエン酸が80%を占め、次いでキナ酸、リンゴ酸、コハク酸の順であった。



第2-6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4系統の果実
 スケールは1 cm

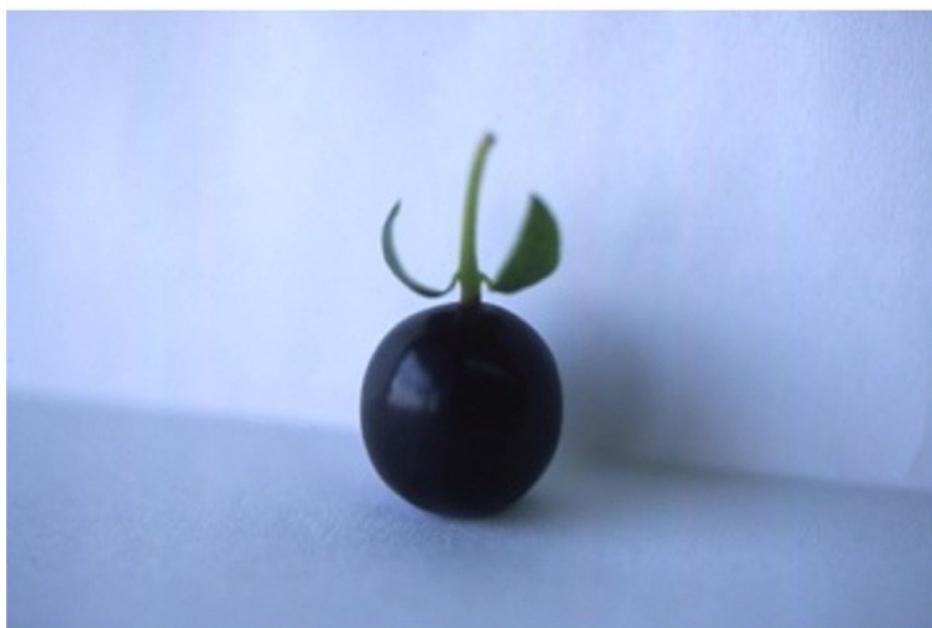
第2-4表 クロマメノキと‘ブルークロープ’およびそれらの交雑から得られた4系統における成熟期および果実形態

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
‘ブルークロープ’	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

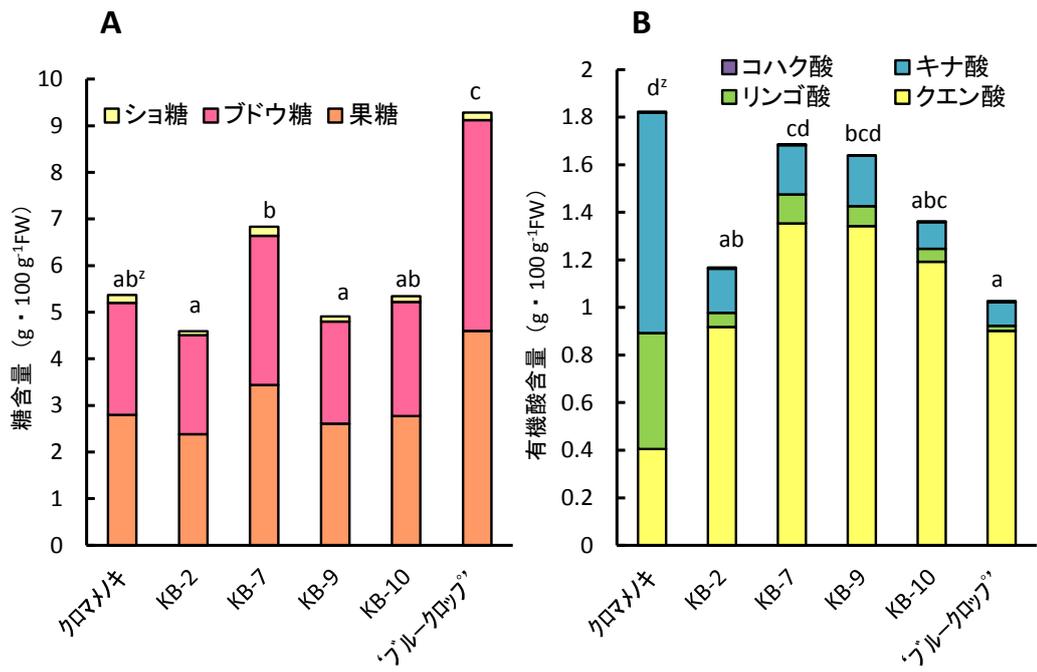
^z横径/縦径

^yTukey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2-7図 クロマメノキと‘ブルークロップ’の交雑から得られたKB-7における果柄の小苞葉と果実

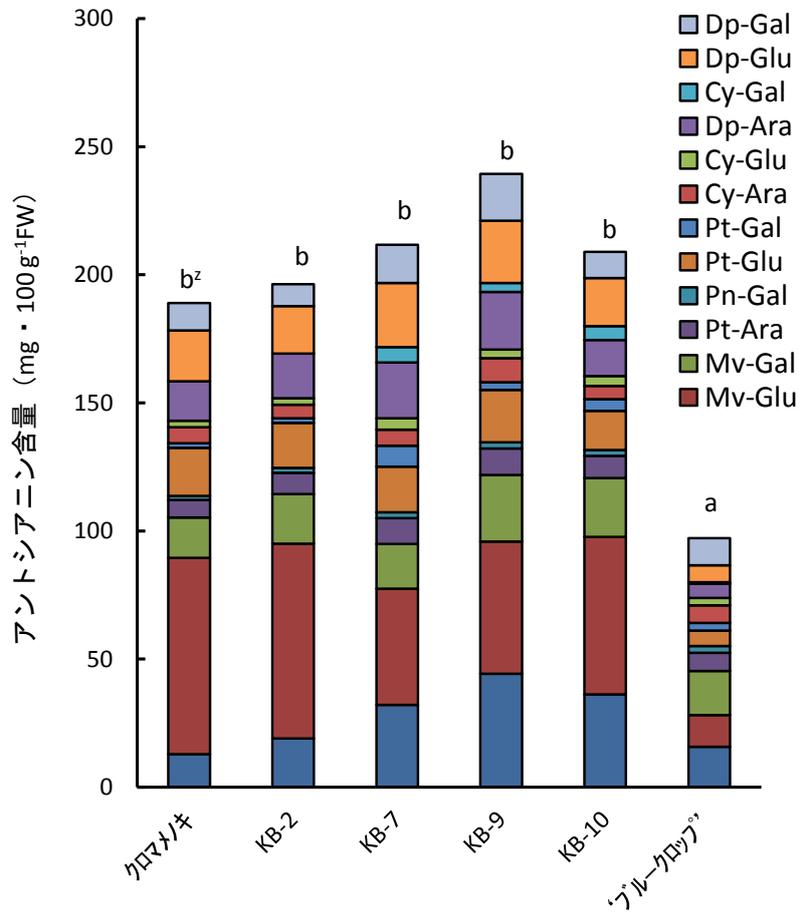


第2-8図 クロマメノキと‘ブルークロップ’およびそれらの交雑から得られた4系統における成熟果の糖 (A) および有機酸含量 (B) とそれらの組成^zTukeyの多重検定により、糖および有機酸含量それぞれにおいて異なる英文字間に有意差 (5%) があることを示す

実験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（第2-9図）は、‘ブルークロップ’が100 gF.W.当たり 97 mg であったのに対し、クロマメノキおよび KB 系統では約 190~230 mg 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 Cy-3-Gal が KB-2 を除いた 3 系統で検知された。クロマメノキの Mv-3-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、KB 系統のそれらの割合は 23~39%と両親の間の値を示した。

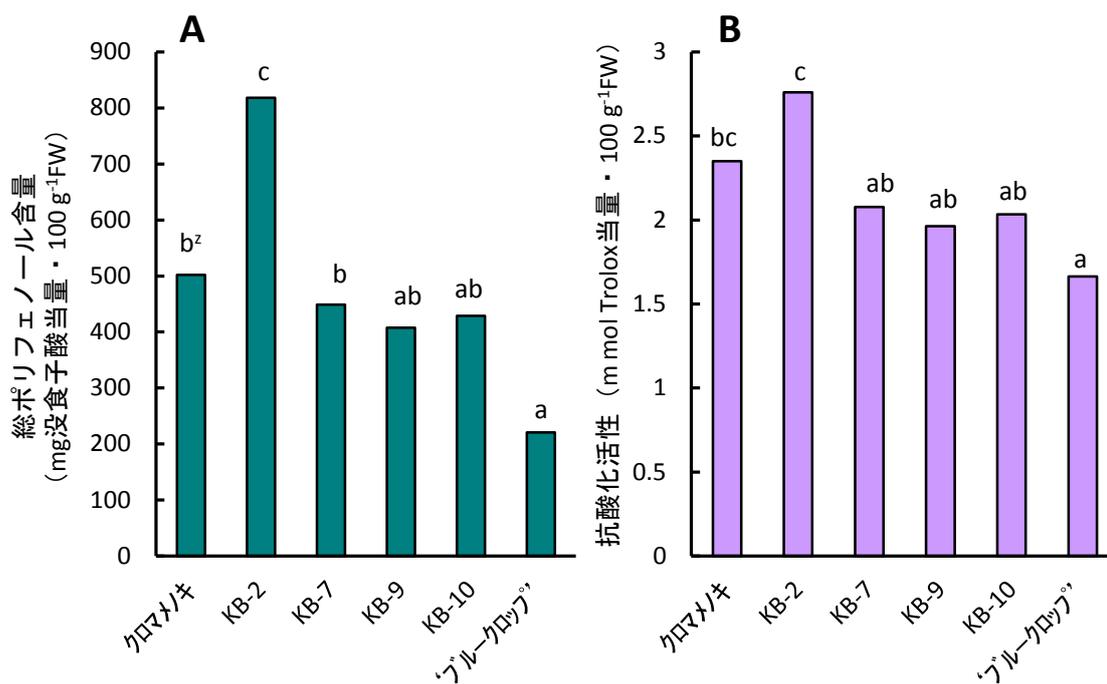
成熟果の総ポリフェノール含量は、100 gF.W.当たり ‘ブルークロップ’で 221 mg であったのに対し、クロマメノキでは 502 mg と有意に高かった。KB-2 を除いた 3 系統は両親の間の値を示し、KB-2 は両親よりも有意に高い値を示した。また、100 gF.W.当たりの抗酸化活性は ‘ブルークロップ’で 1.7 mmol と低く、クロマメノキおよび KB-2 でそれぞれ 2.4 および 2.8 mmol と有意に高かった。また、KB-2 を除く 3 系統は両親の間の値を示した（第2-10図）。



第2-9図 クロマメノキと‘ブルークロープ’およびそれらの交雑から得られた4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

²Tukey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2-10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4系統における成熟果の総ポリフェノール含量 (A) および抗酸化活性 (DPPHラジカル消去活性) (B)

²⁾Tukeyの多重検定により、総ポリフェノール含量および抗酸化活性それぞれにおいて異なる英文字間に有意差 (5%) があることを示す

考 察

前述したようにクロマメノキは、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、日本および北米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）。

本章の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。スノキ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、二倍体種同士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）、本章における 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。なお、一側交雑不和合性については、近年アブラナ科植物で自家不和合性制御遺伝子座（S 遺伝子座）とは異なる遺伝子座に座乗する遺伝子により支配されており、自家不和合性と同様に雌ずい側制御因子と花粉側制御因子が密接に連鎖していることが報告されている（Takada ら，

2013). 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. KB 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 ‘ブルークロープ’ 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. 自家不和合性や一側交雑不和合性は, 自家や近縁種間の受精を防ぐ生殖隔離機構と考えられる. 従って, 後者では交雑の方向により種子が得られるものの致死に至るアルビノが出現するものと思われた. 実際に, KB 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. しかしながら, 緑葉の個体も観察されていること (データ未掲載) から, 今後 KB 系統だけでなく KB 系統×HB 品種で得られた実生について, 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を行うことは極めて興味ある課題と思われた.

KB4 系統はいずれもクロマメノキと ‘ブルークロープ’ 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, いずれも放任受粉下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 F₁ 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, KB 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) . 本章における KB 系統の着果率は平均 29.2%と両親より低いものの, 放任受粉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. KB 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, Mv 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 Mv 系であることを報告している. KB 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。ブルーベリー栽培種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 KB 系統では, ‘ブルークロープ’ に比べて果実新鮮重当たりの果皮の割合が高いため, 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。

KB 系統は五倍体であり, 花粉稔性および着果率が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, 育種の間接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。

第3章 クロマメノキとラビットアイブルーベリーT100との節間交雑から 得られた F₁ 系統の評価

緒言

前述したように、現在我が国で栽培されているブルーベリーはHBおよびRBの2種に大別され、前者は四倍体、後者は六倍体である (Camp, 1945 ; Darrowら, 1944). HBは比較的冷涼な地域で栽培されているのに対し、RBはHBに比べて耐暑性が強く、比較的温暖な地域で栽培され (玉田, 1996), 我が国の西南暖地の温暖な気候にも適している. 一方、果実品質はRBよりもHBで優れることから、HBの栽培が増大しつつあるものの、西南暖地では成熟期が梅雨期に当たることなどから、品種本来の良品質の果実が生産されているとは言い難い. これら栽培種に対し、北米自生の野生種には有用な形質を持つものがあることが報告されており (Ballington, 1990 ; Lyrene・Sherman, 1980), 近年では*Cyanococcus*節以外のスノキ属野生種を利用した節間雑種の作出とそれらの特性を明らかにする研究が積極的に行われている (Ballington, 1980 ; Darrow・Camp, 1945 ; Lyrene・Ballington, 1986, Sharpe・Sherman, 1971) .

一方、我が国にもスノキ属植物が多数自生しており、食用とされるものも多い (玉田, 1996) が、これまでにそれらの野生種は育種素材として活用されてこなかった. 前章で、栽培種とは節が異なるものの、野生種の中で比較的果実が大きい六倍体クロマメノキと果実品質の高い HB 品種との節間交雑を行った結果、クロマメノキを種子親とした場合にのみ種子が得られる一側交雑不和合性を示すこと、HB ‘ブルークロープ’ を花粉親として得られた KB4 系統はいずれも五倍体の節間雑種であるが、放任受粉でも着果し、種子が形成されることなどが明らかとなった. しかしながら、これらの系統は樹勢が弱く、RB ‘ホームベル’ 台に接ぎ木をすることで維持されており、西南暖地での自根栽培は困難と考えられた. 一方、RB は樹勢が強く、土壌適応性も HB より広い (玉田, 1996) ため栽培が容易である. また、低温要求量も少ないことから西南暖地での栽培が可能であり、成熟期も梅雨期に当たらないなどの特徴

を有している。

そこで本章では、*Vaccinium* 節に属するクロマメノキと *Cyanococcus* 節に属する RB 数品種の正逆交雑を行い、交雑が可能かどうかを検討した。また、クロマメノキと RB の T100 との節間交雑より得られた 12 系統が節間雑種であるかどうかを明らかにするとともに、それらの樹勢、葉、花および果実の形態的特徴、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

実験 1 クロマメノキと RB 品種の正逆交雑

実験には第 2 章実験 1 に用いたクロマメノキ（推定 5～7 年生）と東海大学農学部果樹見本園栽植の 5～10 年生の RB8 品種（第 3-1 表）を材料とし、1999、2002、2004 および 2008 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 21～70%）。交配および調査は第 2 章実験 1 と同様に行い、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。その後、完全種子を層積後直接培養土（ボラ土：ピートモス=6：4，v/v）に播種し、発芽数とその後の生存個体数を調査した。

得られた系統の中で、クロマメノキと T100（日本名：‘ノビリス’）との交雑により得られた 12 系統（KT 系統）は、それぞれの株の大きさに合わせ 6～13 号の鉢に植え、用土はボラ土：ピートモス：チップ=6：3：1（v/v/v）とし、いずれも自根栽培を行った。また、これらの系統と同様に鉢植えで栽培されているクロマメノキ（交配に用いたものと同様の個体）および東海大学農学部果樹見本園に栽植されている 10 年生の T100 を供試して、2010 年に以下の実験を行った。

実験 2 雑種性、倍数性および核 DNA 含量の解析

KT 系統の雑種性を解析するために、樹勢が弱く幼葉 1 g が採取できなかった KT-7 および 13 を除いた 10 系統および両親から、全 DNA を CTAB 法（Doyle・Doyle, 1987）により抽出し、それを鋳型として、第 2 章実験 2 と

同様に RAPD 分析を行った。プライマーには 10 mer のランダムプライマー (Operon Technologies) 60 種類 (OPA-1~20, OPB-1~20, OPH-1~20) を用いた。

各個体から 5 枚ずつ幼葉を採取し、1 枚につき約 40 mg を切り取ったものをサンプルとして、第 1 章の実験 1 と同様に FCM により、倍数性を解析および核 DNA 含量の解析を行った。また、第 2 章実験 2 と同様に、KT-2, 9 および 15 の 3 系統の新梢先端細胞の染色体数を押しつぶし法にて観察した。

実験 3 樹勢、葉の形態、開花期、花の形態および花粉稔性

樹勢および葉の外観は 2010 年 8 月に目視で調査し、同時期にそれぞれの成葉 10 枚を採取し、第 2 章実験 3 と同様に形態調査をした。開花した KT 系統 (KT-2, 3, 4, 6, 8, 9, 11 および 15) については、開花期を調査するとともに、花序および花形を目視で調査し、それぞれから採取した 10 花について第 2 章実験 3 と同様に形態調査をした。また、KT-2, 4, 8, 9, 11 および 15 とそれらの両親について開花直前の蕾各 20 花より葯をそれぞれ採取し、開葯後に花粉を採取し、第 2 章実験 3 と同様に花粉稔性と発芽率を調査した。

実験 4 着果率、果実の成熟期および果実品質

開花後着果に至った KT 系統 (KT-2, 3, 4, 6, 8, 9, 11 および 15) とそれらの両親について、成熟期 (6~10 月) にそれぞれ 20 果を採取し、第 2 章実験 3 と同様に放任受粉での着果率および形態の調査をした後、成熟果は -30°C で冷凍保存された。

着果に至った KT 系統とそれらの両親について、果実の糖および有機酸の抽出には冷凍果約 2 g (3 個以上から秤取) を用い、第 1 章実験 3 と同様に HPLC で分析した。なお、実験はいずれも 3 反復とした。

実験 5 果実のポリフェノール成分および抗酸化活性

結実に至った KT 系統とそれらの両親について、果実のポリフェノール成分および抗酸化活性の抽出には冷凍果約 2 g (3 個以上から秤取) を用い、第 1 章実験 4 と同様に分析した。すなわち、アントシアニン含量は HPLC で、総

ポリフェノール含量は Folin-Ciocalteu 法で、抗酸化活性は DPPH ラジカル消去活性をマイクロプレート法でそれぞれ分析した。なお、実験はいずれも 3 反復とした。

以上の実験結果はそれぞれの平均値とし、一元配置の分散分析により有意であることを確認し、Tukey の多重検定により第 1 章と同様に統計解析を行い、花粉稔性については平均値の逆正弦変換を行い、その値について 1%有意水準で解析を行った。

結 果

実験 1 クロマメノキと RB 品種の正逆交雑

クロマメノキと RB 品種の正逆交雑の結果（第 3-1 表）、クロマメノキを種子親として RB 品種を交配した場合には、8 品種中 5 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 1~18 個の完全種子が得られた。これらの完全種子を層積後播種したところ、発芽率（発芽数/完全種子数×100）は花粉親の違いにより 0.0~88.9%と幅があった。また、生育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×100）も発芽率と同様に 0.0~100%の幅があったが、クロマメノキ×T100 から 12 個体（KT-2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 および 15）およびクロマメノキ×‘ウッダード’から 1 個体の実生を獲得することができた。一方、RB 品種を種子親としてクロマメノキを交配した場合には、‘ホームベル’、‘マル’および T100 を用いた場合を除き全く着果しなかった。また、着果した交配組合せでも完全種子は得られず、T100×クロマメノキでは種子が全く含まれていなかった。

第3-1表 クロマメノキとラビットアイブルーベリー8品種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 ^z (%)	生存个体数	生存率 ^y (%)
クロマメノキ	‘ウッダード’	23	2	8.7	7	3	4	1	33.3	1	100.0
	‘ガーデニングブルー’	17	1	5.9	1	1	0	0	0.0	-	-
	‘キャラウェイ’	18	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-
	‘ホームベル’	23	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-
	‘マイヤー’	12	1	8.3	2	2	0	0	-	-	-
	‘マル’	23	1	4.3	3	3	0	1	33.3	0	0.0
	T100	23	3	13.0	21	18	3	16	88.9	12	75.0
	T172	22	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-
	小計	161	8	5.0	34	27	7	18	66.7	13	72.2
	クロマメノキ	‘ウッダード’	42	0	0.0	-	-	-	-	-	-
‘ガーデニングブルー’		16	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-
‘キャラウェイ’		16	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-
‘ホームベル’		71	9	12.7	95	0	95	0	-	-	-
‘マイヤー’		44	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-
‘マル’		34	12	35.3	14	0	14	0	-	-	-
T100		37	3	8.1	0	0	0	-	-	-	-
T172		16	0	0.0	-	-	-	-	-	-	-
小計		276	24	8.7	109	0	109	0	-	-	-

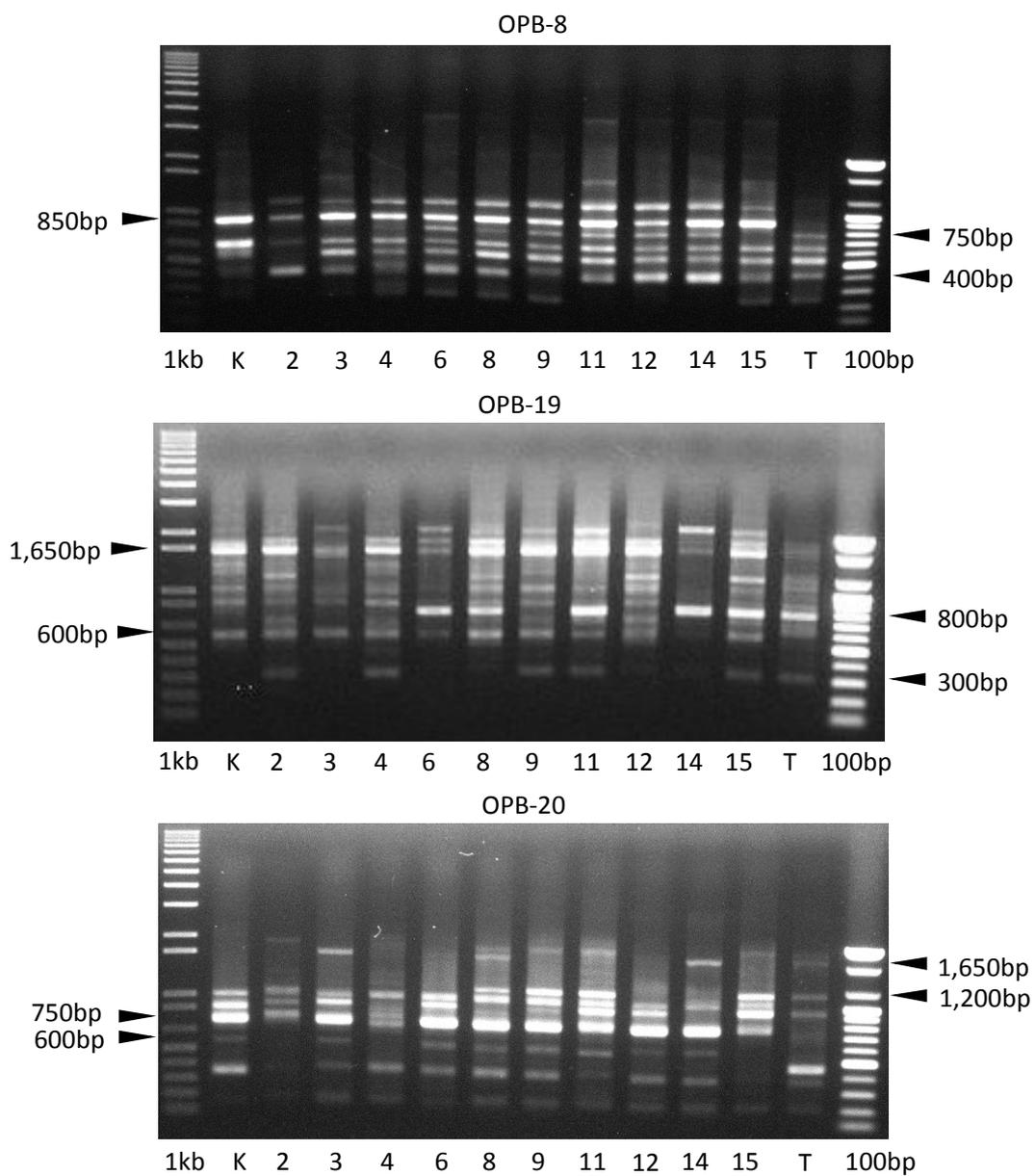
^z発芽数/完全種子数×100

^y生存个体数/発芽数×100

実験 2 雑種性、倍数性および核 DNA 含量の解析

RAPD 法により DNA を解析した結果、OPB-8, 11, 19, 20 および OPH-12 の 5 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。第 3-1 図に OPB-8, 19 および 20 のプライマーを用いた泳動の結果を示した。すなわち、OPB-8 では、すべての系統で 850 bp 付近にクロマメノキの特異的なバンドが検出された。また、KT-6, 8, 9, 11, 12 および 14 の 6 系統ではいずれも 750 bp 付近、KT-4 および 9 を除く 8 系統で 400 bp 付近にそれぞれ T100 の特異的なバンドが検出された。OPB-19 では、すべての系統で 1,650 bp 付近、KT-14 を除く 9 系統で 600 bp 付近にそれぞれクロマメノキの特異的なバンドが検出された。また、KT-6, 8, 11, 14 および 15 の 5 系統で 800 bp 付近、KT-2, 4, 9, 11 および 15 の 5 系統で 300 bp 付近にそれぞれ T100 の特異的なバンドが検出された。OPB-20 では、KT-2, 4 および 15 を除く 7 系統で 750 および 600 bp 付近にそれぞれクロマメノキの特異的なバンドが検出された。また、KT-3, 8 および 14 の 3 系統で 1,650 bp 付近、KT-8, 9, 11 および 15 の 4 系統で 1,200 bp 付近にそれぞれ T100 の特異的なバンドが検出された。これら 3 種のプライマーに OPB-11 および OPH-12 のプライマーを加え、特異的なバンドの有無を第 3-2 表に示した。その結果、KT 系統にはいずれも、少なくとも 2 つ以上のプライマーで両親の特異的なバンドが認められた。

次に、FCM により倍数性を解析した結果（第 3-2 図）、KT 系統はいずれも両親と同様に六倍体の位置に相対蛍光強度のピークが認められた。核 DNA 含量を算出したところ（第 3-3 図）、クロマメノキが $3.99 \text{ pg} \cdot 2 \text{ C}^{-1}$ 、T100 が $3.41 \text{ pg} \cdot 2 \text{ C}^{-1}$ と両親間に有意差が認められた。これらに対し、KT 系統は $3.50 \sim 3.99 \text{ pg}$ （平均 3.70 pg ）の範囲で、いずれの系統も両親の核 DNA 含量の間の値を示した。また、体細胞における染色体数を観察した結果（第 3-4 図）、両親のクロマメノキと T100 および KT-2, 9 および 15 の 3 系統は、いずれも 72 本の染色体を持つ六倍体であることが確認された。



第3-1図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた10系統におけるRAPD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

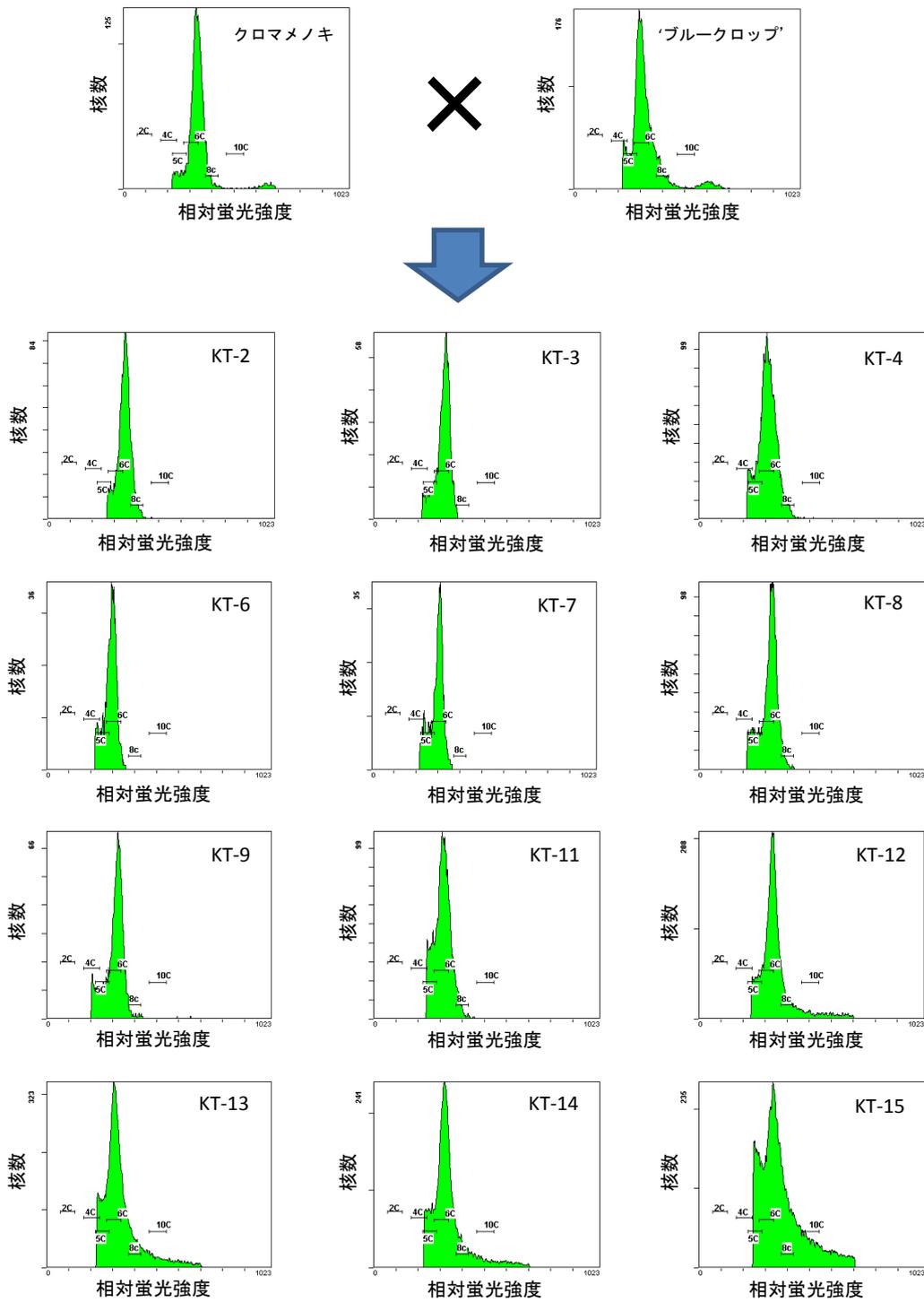
1kb : 1kbpラダーマーカー, K : クロマメノキ, 数字 : KT系統番号, T : T100, 100bp : 100bpラダーマーカー

第3-2表 クロマメノキとT100との交雑から得られた10系統におけるRAPD解析^z

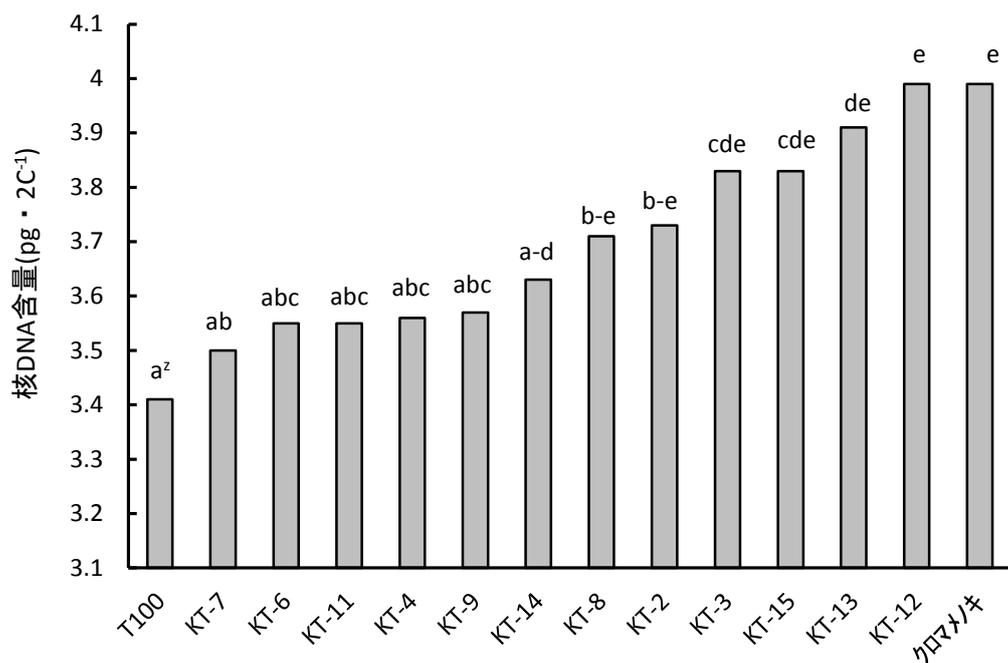
系統	プライマー ^y									
	OPB-8		OPB-11		OPB-19		OPB-20		OPH-12	
	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T
KT-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
KT-3	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
KT-4	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
KT-6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
KT-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KT-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KT-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KT-12	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
KT-14	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
KT-15	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

^zK:クロマメノキ, T:T100, +:特異的なバンド有り, -:特異的なバンド無し

^yOPB-8:5'-GTCCACACGG-3', OPB-11:5'-GTAGACCCGT-3',
 OPB-19:5'-ACCCCCGAAG-3', OPB-20:5'-GGACCCTTAC-3',
 OPH-12:5'-ACGCGCATGT-3'

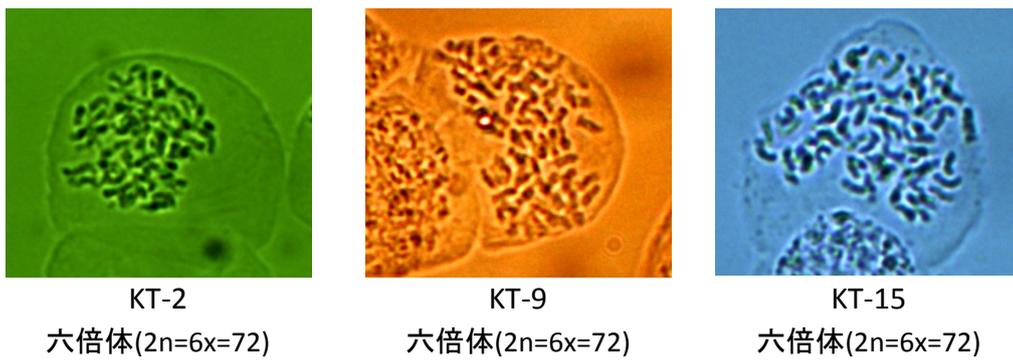
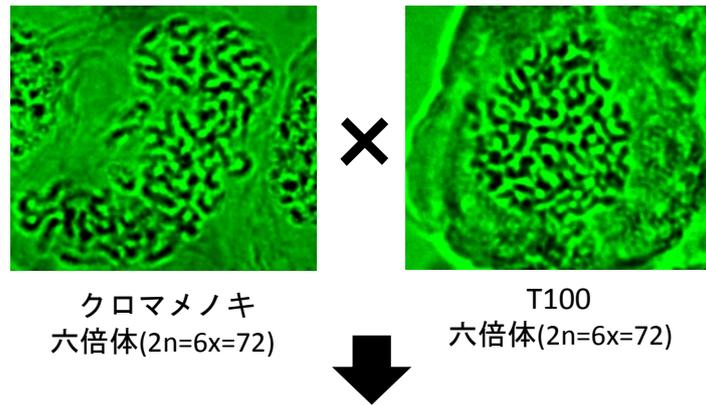


第3-2図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた12系統におけるFCMの解析結果



第3-3図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた12系統におけるFCMを用いた核DNA含量の解析結果

^zTukey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3-4図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた3系統の体細胞染色体

実験3 樹勢、葉の形態、開花期、花の形態および花粉稔性

樹勢および葉の形態を調査した結果（第3-5, 6図および第3-3表）、クロマメノキの樹勢がやや弱いのに対し、T100は樹勢が強かった。これらに対しKT系統では12系統中6系統はT100と同様に樹勢が強かったものの、残りの系統はクロマメノキと同程度かそれより弱かった。また、両親が緑葉であるのに対し、KT系統には葉に斑入りの形態を示す系統が多く見られた。なお、斑入りには一部の枝に着生した葉のみが斑入りになるタイプと株全体の葉が斑入りになるタイプの2つのタイプが確認された。T100の葉身長は72.2 mmとクロマメノキの23.3 mmより約3倍大きく、多くのKT系統が両親の間の値を示したものの、樹勢が弱いKT-7, 12, 13および14の4系統は12.8～16.4 mmとクロマメノキより有意に小さい値を示し、葉幅でも葉身長と同様の傾向が見られた。葉身形指数はT100でクロマメノキおよびいずれのKT系統より有意に大きく、ほとんどの系統はクロマメノキと同程度であったが、KT-6および8は両親の間の値を、KT-12はクロマメノキより小さい値を示した。なお、クロマメノキとT100の葉柄長はそれぞれ2.8, 3.3 mmと有意差がなく、KT系統はいずれも両親と同程度かそれ以下の値を示した。

開花期および花の形態を調査した結果（第3-7図および第3-4表）、クロマメノキとT100の開花期は、それぞれ4月下旬より約2か月と4月中旬より約1か月であったが、開花に至ったKT系統では、4月下旬～5月上旬から6月中旬～7月上旬まで系統間で差が見られたものの、いずれの系統もT100より開花期間が長かった。なお、樹勢が弱いKT-7, 12, 13および14では調査を行った2010年には着花せず、2013年春においても着花に至っていない。クロマメノキとT100の花序および花形は、前者が1～2花を着生し、壺形で、後者は短い総状花序を着生し、長い鐘形であったが、1～2花を着生したKT-2を除き、残りの7系統はいずれも短い総状花序を着生し、花形はKT-6および15が壺形、KT-9および11が長い鐘形、残りの4系統が短い鐘形であった。クロマメノキとT100の花冠の縦径は、それぞれ9.1と13.2 mmとT100が有意に大きく、KT系統は9.5～11.4 mmと両親の間の値を示した。横径は両親、KT-6, 9, 11および15間には有意差がなかったが、残りの4系統のそれらの値は6.8～7.3 mmと両親より有意に大きかった。また、T100の花冠の横

径／縦径は 0.45 とクロマメノキの 0.66 に比べて小さく，KT-9，11 および 15 は両親の間の値を，残りの 5 系統はいずれもクロマメノキに近い値を示し，開口部径は両親，KT-3，9 および 11 間には有意差が見られなかったが，それらに比べ残りの 5 系統は有意に大きい値を示した．クロマメノキと T100 の花柱長は，それぞれ 7.1 と 12.2 mm と T100 で長く，KT 系統はいずれも両親の間の値を示した．なお，KT 系統の花弁数と雄ずい数はいずれも両親と同様の 5 枚と 10 本であった（データ未掲載）．

花粉稔性を調査した結果（第 3-4 表），花粉の稔性率は T100 とクロマメノキがそれぞれ 87.1 と 99.1%であったのに対し，花粉の調査を行った 6 系統（KT-2，4，8，9，11 および 15）で両親の間の値を示し，90%以上といずれも高かった．また，花粉の発芽率は T100 とクロマメノキがそれぞれ 37.0 と 27.5%であったのに対し，KT-8 が 21.8%とクロマメノキと同程度の値を示したものの，その他の 5 系統ではいずれも 10%以下と低い値を示した．

実験 4 着果率，果実の成熟期および果実品質

放任受粉での着果率，果実の成熟期および果実品質を調査した結果（第 3-8 図および第 3-5 表），着果率は，T100 では 68.8%と高かったのに対し，クロマメノキでは 20.0%と低かった．これらに対し，KT 系統ではいずれも 37.5~72.7%の範囲で系統間にばらつきが見られたものの，クロマメノキより高い値を示し，特に，KT-3，8 および 9 では T100 より高い値を示した．果実の成熟期は，クロマメノキと T100 では，それぞれ 7 月上旬から約 2 か月と 7 月中旬から約 1 か月であったのに対し，KT-3 および 15 の 2 系統を除いた 6 系統では，いずれも約 2 か月以上とクロマメノキと同程度かそれ以上に長かった．

果実重と果実の大きさは，T100 で大きく，クロマメノキで小さかったが，結実に至った KT 系統では両親の間の値を示し，KT-9 は T100 と同程度に大きかった．また，果形指数はクロマメノキでは 0.94 と 1 に近く球形で，T100 では 1.28 と扁平であったが，KT-11 を除いた 7 系統はいずれも両親の間の値を示し，KT-3，6，8，9 および 11 では 0.92~1.03 とクロマメノキと同程度の値を示した．果柄長は両親および 6 系統間に有意な差は見られなかったが，



第3-5図 クロマメノキとT100の交雑から得られた5系統の鉢植え栽培の様子



第3-6図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた12系統の葉
スケールは3 cm

第3-3表 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた12系統における
樹勢, 目視での葉の外観および形態

品種 ・ 系統	樹勢	葉の外観	葉の大きさ			葉柄長 (mm)
			葉身長 (mm)	葉幅 (mm)	葉身形 指数 ^z	
クロマメノキ	やや弱い	緑	23.3 bc ^w	15.0 cd	1.56 b-e	2.8 ef
KT-2	強い	斑入り I ^y	33.8 de	18.9 ef	1.79 d-g	2.6 def
KT-3	やや弱い	緑	18.9 ab	11.8 abc	1.60 b-e	2.5 cde
KT-4	強い	斑入り I	37.8 e	23.1 g	1.63 cde	2.4 cde
KT-6	強い	斑入り I	45.0 f	22.9 fg	1.97 fg	2.4 cde
KT-7	弱い	斑入り I	12.8 a	8.4 a	1.52 b-e	1.1 ab
KT-8	強い	緑	45.2 f	21.8 efg	2.08 g	2.8 ef
KT-9	強い	緑	40.1 ef	22.7 fg	1.76 cef	2.6 def
KT-11	強い	斑入り II ^x	28.9 cd	18.2 de	1.59 b-e	1.8 bcd
KT-12	弱い	斑入り I	15.4 a	14.4 bcd	1.07 a	1.3 ab
KT-13	弱い	斑入り I	13.7 a	10.5 ab	1.30 ab	0.7 a
KT-14	弱い	斑入り II	16.4 a	11.1 ab	1.47 bc	1.4 ab
KT-15	やや弱い	斑入り II	33.4 de	18.1 de	1.85 efg	1.7 bc
T100	強い	緑	72.2 g	28.5 h	2.54 h	3.3 f

^z葉身長/葉幅

^y一部の枝に着生した葉のみが斑入りで, それ以外の枝の葉は緑葉

^x株全体の葉が斑入り

^wTukey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

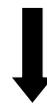


クロマメノキ

×



T100



KT-2



KT-3



KT-4



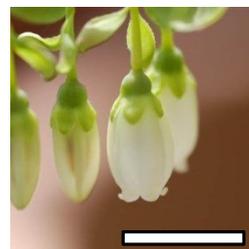
KT-6



KT-8



KT-9



KT-11



KT-15

第3-7図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた8系統の花
スケールは1 cm

第3-4表 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた8系統における開花期、花序、花色および花の形態並びに花粉稔性

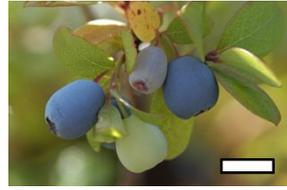
品種 系統	開花期 (月)	花序	花形	花冠の大きさ			開口部径 (mm)	花柱長 (mm)	花粉稔性(%) ^z	
				縦径 (mm)	横径 (mm)	横径／縦径			稔性率 ^y	発芽率 ^x
クロマメノキ	4下～6下旬	1～2花	壺形	9.1 a ^w	6.1 a	0.66 cde	2.8 a	7.1 a	87.1 a	27.5 bc
KT-2	4下～6下旬	1～2花	短い鐘形	9.5 ab	7.2 cd	0.76 e	4.3 fg	9.5 cd	91.9 ab	5.0 a
KT-3	5上～6中旬	短い総状花序	短い鐘形	9.6 abc	6.8 bcd	0.71 cde	3.2 abc	8.4 bc	-	-
KT-4	5上～6下旬	短い総状花序	短い鐘形	10.2 bc	7.3 d	0.71 de	4.5 g	8.4 bc	97.0 bc	6.8 a
KT-6	4下～7上旬	短い総状花序	壺形	9.9 abc	6.5 a-d	0.66 b-e	4.0 d-g	7.9 b	-	-
KT-8	4下～6下旬	短い総状花序	短い鐘形	10.5 bcd	7.0 bcd	0.67 cde	3.8 cef	8.9 cd	91.2 ab	21.8 b
KT-9	4下～6下旬	短い総状花序	長い鐘形	11.4 cd	6.2 ab	0.55 ab	3.4 bcd	9.3 cd	98.9 c	7.3 a
KT-11	4下～6中旬	短い総状花序	長い鐘形	10.7 bcd	5.9 a	0.55 abc	3.6 b-e	9.5 d	92.8 ab	5.5 a
KT-15	4下～7上旬	短い総状花序	壺形	10.5 bcd	6.4 abc	0.61 a-d	4.2 efg	8.5 bc	97.5 bc	3.4 a
T100	4中～5中旬	短い総状花序	長い鐘形	13.2 d	6.0 a	0.45 a	3.1 ab	12.2 e	99.1 c	37.0 c

^z平均値を逆弦変換した値についてTukeyの多重検定を行い、異なる英文字間に有意差(1%)があることを示す

^yアセトカーミン染色

^x寒天培地上

^wTukey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



クロマメノキ

×



T100



KT-2



KT-3



KT-4



KT-6



KT-8



KT-9



KT-11



KT-15

第3-8図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた8系統の果実
スケールは1 cm

第3-5表 クロメメノキとT100およびそれらの交雑から得られた8系統における着果率、果実の成熟期、果皮色および果実の形態

品種・系統	着果率 ^z (%)	成熟期 (月)	果実重 (g)	果実の大きさ		果形 指数 ^y	果柄長 (mm)	果柄葉 の有無	目の大きさ		花粉の 多少 ^x
				縦径 (mm)	横径 (mm)				深さ (mm)	幅 (mm)	
クロメメノキ	20.0	7上~9上旬	0.72 a ^w	11.2 abc	10.4 a	0.94 ab	5.5 a	時に有り	6.1 d	0.6 a	多
KT-2	45.7	6上~8中旬	1.23 bc	11.6 abc	13.2 b	1.14 d	9.3 ab	時に有り	1.1 ab	6.0 e	中
KT-3	72.7	7上~8上旬	0.92 abc	11.2 abc	11.5 ab	1.03 bcd	11.7 b	時に有り	0.9 ab	4.8 b-e	中
KT-4	48.6	6中~8中旬	0.85 a	10.5 a	11.6 ab	1.10 d	9.0 ab	時に有り	0.9 ab	5.3 cde	中
KT-6	58.7	6下~9中旬	0.82 a	11.7 abc	11.1 a	0.95 ab	7.9 a	時に有り	1.9 bc	4.4 bcd	中
KT-8	70.3	6中~8中旬	0.92 ab	11.9 bc	11.5 ab	0.97 abc	8.9 ab	時に有り	1.3 ab	4.1 bc	中
KT-9	71.7	6中~9下旬	1.33 cd	12.7 c	12.7 b	1.00 bc	8.5 ab	時に有り	0.7 a	6.0 de	中
KT-11	67.7	7上~9上旬	0.99 abc	12.6 c	11.6 ab	0.92 a	11.3 b	時に有り	1.4 ab	3.6 b	中
KT-15	37.5	7上~7中旬	0.85 a	10.6 ab	11.3 ab	1.08 cd	4.7 a	時に有り	1.6 ab	5.2 b-e	中
T100	68.8	7中~8中旬	1.62 d	11.6 abc	14.9 c	1.28 e	8.2 ab	無し	2.6 c	6.6 e	多

^z放任受粉での着果率

^y横径／縦径

^x目視で多・中・少の三段階で評価

^wTukey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

KT-3 および 11 ではクロマメノキに比べて有意に長かった。なお、T100 では見られず、クロマメノキに時に見られる果柄葉が KT 系統いずれにおいても認められた。目の深さは KT-6 が T100 と同程度に深かったのを除き、その他の 7 系統は両親より有意に浅く、幅は KT 系統のいずれも両親の間の値を示し、KT-2, 3, 4, 9 および 15 の 5 系統が T100 と同程度に広い値を示した。なお、目視による観察の結果、KT 系統の果皮表面の果粉は両親よりも少なかった。

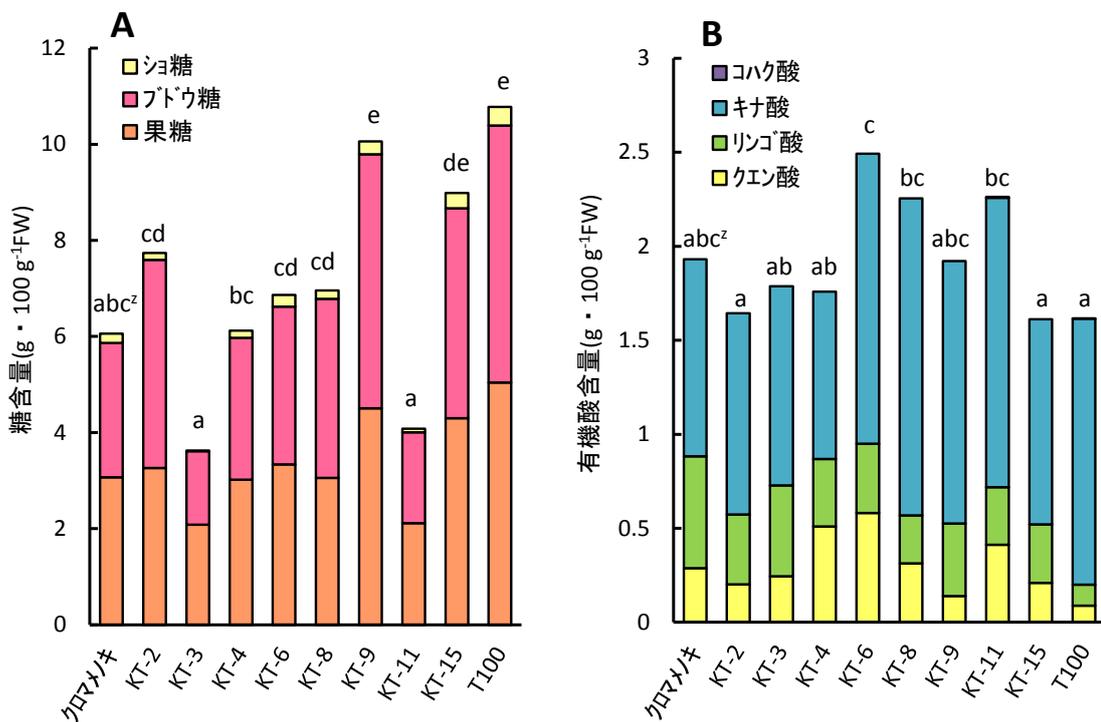
成熟果の糖および有機酸分析の結果（第 3-9 図）、100 gF.W.当たりの糖含量は T100 で 10.8g と高く、クロマメノキで 6.1 g と低かった。KT 系統では KT-3 および 11 がクロマメノキより低い値を示したものの、その他の系統ではいずれも両親の間の値を示した。また、KT-9 および 15 は T100 と同程度に高かった。なお、糖の組成については、いずれも果糖とブドウ糖が等量で、ショ糖の割合は極めて少なかった。一方、100 gF.W.当たりの有機酸含量は両親および KT 系統間で有意差は認められなかった。なお、有機酸の組成については、T100 はキナ酸が 80%以上を占め、リンゴ酸およびキナ酸が等量でそれぞれ約 10%、コハク酸が微量であったのに対し、クロマメノキはキナ酸が 50%程度、リンゴ酸が 30%、クエン酸が 15%であり、コハク酸は検知されなかった。KT 系統については、リンゴ酸ではいずれの系統でも、キナ酸では KT-4 を除いた 7 系統でそれぞれ両親の間の値を示した。また、T100 で微量に検知されたコハク酸は KT-11 でのみ検知された。

実験 5 果実のポリフェノール成分および抗酸化活性

100gF.W.当たりの成熟果のアントシアニン含量を測定した結果（第 3-10 図）は、T100 では 117 mg であったのに対し、クロマメノキでは 207 mg と T100 の約 2 倍の値を示した。これらに対し、KT 系統は系統間でばらつきが見られ、特に KT-15 は T100 の約 3 倍、クロマメノキの約 1.8 倍の値を示した。また、アントシアニンの種類については、クロマメノキで 12 種が検知されたのに対し、T100 では Dp-3-Glu および Pn-3-Gal が検知されず、10 種のみであった。KT 系統ではいずれもクロマメノキ同様に 12 種類のアントシアニンが検知され、組成もクロマメノキに近かった。しかしながら、T100 で 48.5%と高く、クロマメノキで 18.1%と低かった。Mv-3-Gal の割合は KT 系

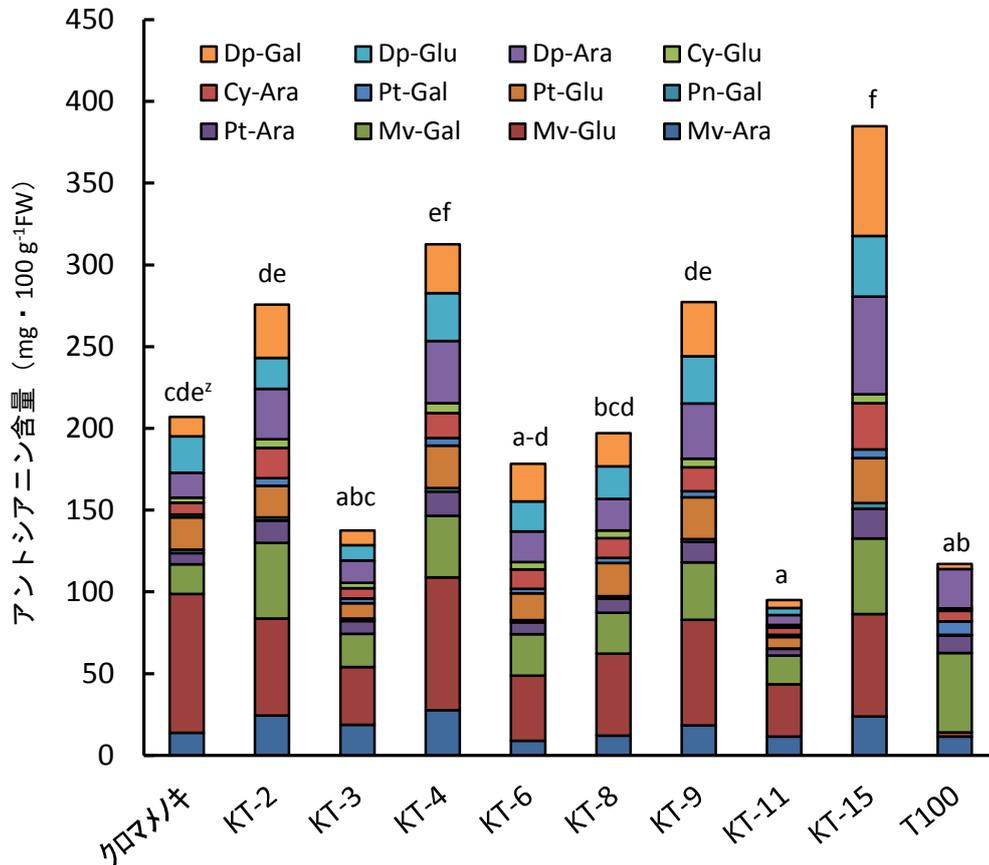
統では 17.1~46.3%，平均で 31.6%とクロマメノキより高かった。また，アントシアニジンの割合を見たところ（第 3-11 図），抗酸化活性が高いとされる Dp と Cy の割合が，両親では約 30%であったのに対し，KT 系統では KT-3 の 22%から KT-2 の 51%までと幅があった。

成熟果の総ポリフェノール含量および抗酸化活性の分析の結果（第 3-12 図），総ポリフェノール含量（100 gF.W.当たりの mg 没食子酸当量）は，T100 では 372 mg であったのに対し，クロマメノキでは 475 mg と有意に高かった。一方，KT 系統では系統間で相違が見られ，いずれも T100 と同じかそれより高い値を示し，KT-4，9 および 15 ではクロマメノキと同程度に高かった。また，抗酸化活性（100gF.W.当たりの mmol Trolox 当量）は両親間に有意差は見られなかったものの，T100 で 2.27 mmol，クロマメノキで 2.39 mmol であり，KT 系統の抗酸化活性は総じて両親と同程度の値を示したが，KT-15 では有意に高い値を示した。



第3-9図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた8系統における成熟果の糖 (A) および有機酸含量 (B) とそれらの組成

^zTukeyの多重検定により、糖および有機酸含量それぞれにおいて異なる英文字間に有意差 (5%) があることを示す

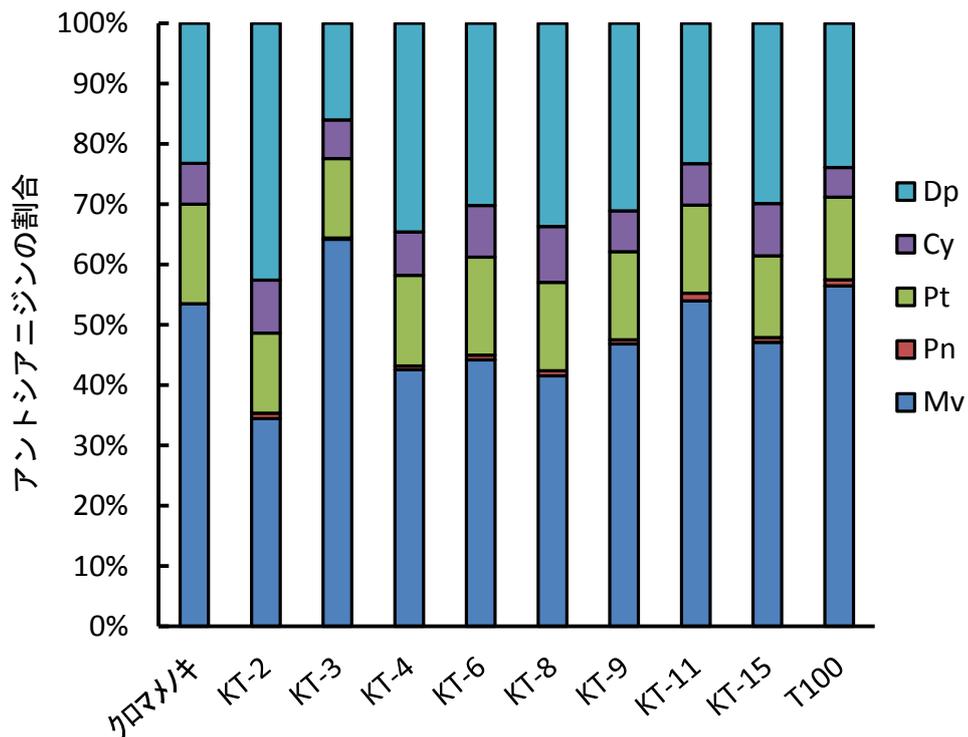


第3-10図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた8系統における成熟果のアントシアニン含量とその組成

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

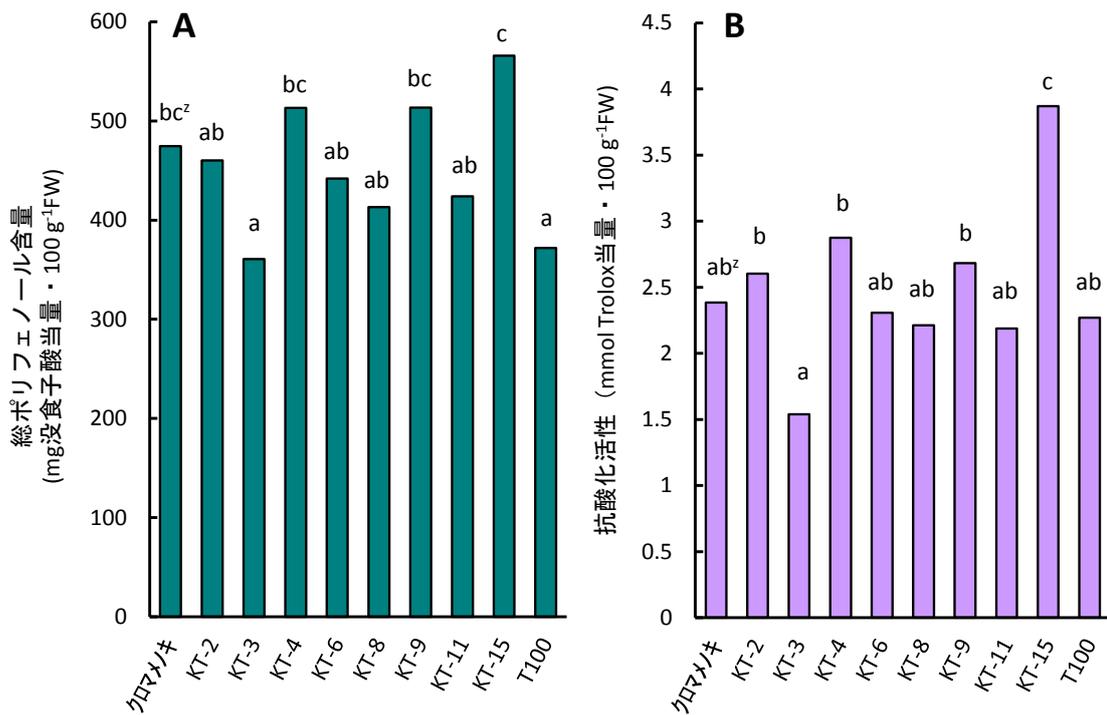
いずれも3位の位置に糖が結合

²Tukey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3-11図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた8系統における成熟果のアントシアニジンの組成

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,



第3-12図 クロマメノキとT100およびそれらの交雑から得られた8系統における成熟果の総ポリフェノール含量 (A) および抗酸化活性 (DPPHラジカル消去活性) (B)

^zTukeyの多重検定により、総ポリフェノール含量および抗酸化活性それぞれにおいて異なる英文字間に有意差 (5%) があることを示す

考 察

スノキ属における同倍数体間の交雑は自然条件下でも起こり、稔性を有する樹勢の強い雑種が得られており (Camp, 1945 ; Lyrene・Sherman, 1983) , 実際に米国のアパラチア高地に自生する六倍体野生種 *V. constablaei* Gray と RB との種間交雑系統が育成され (Brightwell ら, 1949 ; Darrow ら, 1952) , Ballington ら (1986) によって F₁ 系統および戻し交雑系統の評価が行われている。

本章におけるクロマメノキと RB 品種の六倍体間の正逆交雑では、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。これらの結果は、第 2 章の異倍数体間の交雑であるクロマメノキと HB 品種 (四倍体) の正逆交雑の結果と同様の一侧交雑不和合性を示していると思われ、今後花柱における花粉管発芽や伸長などについて調査が必要であると考えられた。

調査した KT 系統の葉、花および果実の形態は系統間で相違が見られたものの、ほぼ両親の間の値を示したこと、アントシアニンの組成についても、KT 系統の Mv-Gal の割合はいずれも両親の間の値 (17.1~46.3%) を示したことなどから、これらの系統が節間雑種であることが示唆された。さらに、DNA 解析の結果、未調査の KT-7 および 13 を除いた 10 系統はいずれもクロマメノキと T100 との雑種であることが確認された。また、FCM の解析結果より核 DNA 含量を算出したところ、KT 系統はいずれも両親の間の値を示し、雑種であることが推察された。KT 系統は六倍体間の交雑によって得られたものであるため、ゲノム組成はクロマメノキ : T100=3 : 3 と考えられ、それらの核 DNA 含量の計算値は 3.7 pg となり、すべての KT 系統の平均値も 3.7 pg であった。しかしながら、KT 系統の核 DNA 含量にこのような違いが見られた原因は、両親のゲノム構成が複雑であることや、系統によって染色体の一部が脱落していることなどが考えられる。染色体脱落は多くのイネ科植物内の交雑において報告されている (Barclay, 1975 ; Inagaki・Mujeeb-Kazi, 1995 ; Komeda ら, 2007 ; Laurie, 1989 ; Laurie・Bennett, 1986, 1988, 1989 ; Mochida・Tsujiimoto, 2001)。コムギ×トウモロコシおよびコムギ×ト

ウジンビエの属間交雑では花粉親の染色体が完全に脱落することが報告されている (Laurie, 1989 ; Laurie・Bennett, 1989) が、同様に属間交雑であるエンバク×トウモロコシでは花粉親の染色体が完全に脱落せず一部残存したことが報告されている (Riera-Lizarazu ら, 1996). 染色体脱落の程度や機構は種や交雑組合せにより異なるものと考えられるが、KT 系統の中には極めて樹勢が弱い系統も存在しており、それらとの関連を含め今後詳細な調査が必要と思われた。

Ureshino ら (1999) は常緑性ツツジにキレンゲツツジを交配して得られるアルビノ個体の出現要因は、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であることを報告している。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で出現したアルビノと緑色の区分キメラについて、緑色部分は種子親と花粉親両方の、アルビノ部分は種子親の葉緑体ゲノムを持つことを報告している。KT 系統では、9 系統が斑入りの系統であり、種子親であるクロマメノキ由来の葉緑体ゲノムと花粉親である T100 由来の核ゲノム間に不和合が生じていることが推測された。また、一部の枝に着生した葉のみが斑入りで、それ以外の葉は緑葉の系統と株全体の葉が斑入りの系統が見られたことから、斑入りのタイプにより葉緑体ゲノムに違いがあることが考えられ、今後、第2章のクロマメノキと‘ブルークロップ’との節間雑種系統と同様に 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。

調査した系統の花の外部形態には特に異常は認められず、いずれの系統も完全花を着生した。一方、花粉稔性について見ると、調査したいずれの系統も花粉の稔性率は比較的高かったものの、発芽率は低かった。しかしながら、放任受粉での着果率は、KT-3, 8 および 9 のように 70%以上と T100 よりも高い値を示す系統も存在することが明らかとなった。なお、前章で述べたクロマメノキ×HB 品種より得られた五倍体節間雑種 KB 系統は、樹勢が比較的弱く、西南暖地に位置する本学では自根での生育が劣るため、RB ‘ホームベル’ 台に接ぎ木を行うことによって維持されている。これらに対し、KT 系統はいずれも自根で栽培されており、12 系統中 4 系統は樹勢が弱かったものの、6 系統の生育は旺盛で樹勢の強い RB の形質が現れたものと推察された。

クロマメノキの果柄には小苞葉が 1~2 枚存在するが、その形や大きさには変化が多い (佐竹ら, 1989)。一方, KT 系統の果柄中部付近には同じ大きさの小葉 2 枚が対生していたが、この特徴は第 2 章の KB 系統と同様であり、クロマメノキとブルーベリー栽培種との F₁ 雑種の特徴とも考えられた。

クロマメノキと栽培種との節間雑種については、四倍体の HB と北欧に自生する四倍体のクロマメノキとの交雑により、耐寒性と耐病性を持つ四倍体節間雑種品種 ‘Aron’ が作出された例がある (Hiirsalmi, 1977 ; Rousi, 1963)。しかしながら、我が国に自生する六倍体のクロマメノキと RB との節間雑種に関する報告は本研究が初めてである。今回得られた節間雑種系統は樹勢が強いものが多く、花粉の発芽率は KT-8 を除き 20%以下と低かったものの、放任受粉での着果率はいずれの系統もクロマメノキより高く、果実のアントシアニン含量や抗酸化活性も栽培種の T100 に比べて高かったが、果実の大きさおよび果実品質が低下する傾向が見られた。しかしながら、KT-9 のように T100 と同程度の大きさや果実品質を示す系統も見られ、系統間でばらつきが大きいことが明らかになった。このことから、クロマメノキと RB 品種間での交雑を行い、その F₁ 雑種から直接優良な品種を選抜することも可能であると思われた。野生種を品種育成に用いる際には戻し交雑が有用であり、Draper ら (1982) は 6 種のスノキ属植物を用いた種間交雑集団における果実の形態や収量調査により、栽培種側に繰り返し戻し交雑を行って得られた系統が選抜基準を満たすことを報告している。‘Aron’ についても、Hiirsalmi (1977) によりクロマメノキと HB との F₁ 雑種に HB を戻し交雑することで得られた品種である。葉緑体/核ゲノム間の不和合が原因と思われる斑入り系統の出現なども問題として挙げられるが、KT 系統は、栽培種を戻し交雑するための中間母本や父本としての利用が可能であると考えられた。

総合考察

ブルーベリーの我が国への導入は 1951 年であり（岩垣，1984），1980 年以降から現在まで栽培面積，果実収穫量ともに増大しつつある．また，栽培地域も拡大が見られ，西南暖地など温暖・多雨な地域でも栽培面積が増大しており，現在では沖縄県を除く 46 都道府県で経済栽培が実施されている（農林水産省統計資料，2011）．しかしながら，国内で栽培されているブルーベリー品種のほとんどは，我が国に比べ降雨量の少ない米国で育成されたものである．従って，我が国の西南暖地における HB の栽培は，収穫期が 6 月中旬から 7 月中旬の梅雨の時期と一致し，長雨の影響により裂果が増え，日照量の少ないことにより品種本来の良品質の果実が生産されているとは言い難い．また，雨中での収穫は果面の果粉（ブルーム）が取れ易く，収穫後の果実にはカビも発生し易くなる．また，近年の健康志向の高まりによって食品の機能性が注目されるようになり，機能性食品として注目されているブルーベリーにおいてもより機能性の高いものが求められている．従って，我が国の西南暖地の気候・風土に適し，日本人の嗜好に合い，機能性に富む我が国独自の品種の育成が望まれている．

ブルーベリーの育種は，野生種からの優良系統の選抜とそれらの系統間交雑により開始され（Coville, 1910 ; 1912），現在発表されている栽培品種は全て *Cyanococcus* 節の種間または種内交雑により育成されている（Galletta・Ballington, 1996a）．スノキ属植物は全世界に約 400 種があり，大陸から隔絶された島々や南極およびオーストラリアを除く全ての大陸に分布しているが（Luby ら，1991 ; Vander Kloet, 1988 ; Ballington, 2001），栽培ブルーベリーと呼ばれるのは *Cyanococcus* 節に属する HB と RB の 2 種であり（Eck and Childers, 1966），前者は，低温要求量の多少と樹高により HB, SHB および半樹高ハイブッシュブルーベリーの 3 グループに分けられる．特に，SHB は，休眠打破に要する低温要求時間が短く，土壌適応性が広く，耐病性を有する品種の開発を目的として 1945 年に品種改良が開始され（Ehlenfeldt, 2001; Lyrene, 1998 ; Sharpe, 1954），フロリダに自生する二倍体野生種の *V. darrowii* が，上記の目標に適した遺伝資源である

ことが発見され、栽培品種である HB および RB との交雑により種間雑種が獲得された (Galletta and Ballington, 1996b) . その後、これらの雑種を利用した交雑が繰り返され、現在では 40 品種以上が発表され、栽培地域を米国のフロリダ州やオーストラリア東部の亜熱帯地域にまで拡大している (Lyrene, 2005) . いずれにしても、これらの栽培品種のほとんどは *Cyanococcus* 節内の種間あるいは種内交雑により育成されたものである.

一方、我が国には *Cyanococcus* 節に属する種は存在しないが、ブルーベリーと近縁の在来野生種が自生し、18 種が確認されている (玉田, 1996) . 岩垣・石川 (1984) は、在来野生種の育種素材としての有望性を指摘してきたが、我が国ではこれまで在来野生種の栽培化はもちろん、品種改良の素材としても利用するには至らなかった.

本研究では、これまで全く顧みられなかった我が国のスノキ属野生種に着目し、栽培種との比較を行い、生態的、形態的特徴や果実品質、機能性などを比較した. その結果、野生種の中には栽培種と同様に高次倍数性の四倍性や六倍性を示すものも存在したが、ほとんどの種が二倍性であった. また、栽培種と比較して野生種は果実が小さかったものの、中には常緑性、総状花序、果実成熟の晩熟性、赤色果など有用な形質を有しているものが見られた. 果実成分については、野生種の果実品質は栽培種より劣るものの、中には栽培種と同程度のものもあった. 果実中のアントシアニン、総ポリフェノール含量および抗酸化活性はいずれも栽培種に比べ高い値を示した. しかしながら、果皮と果肉に分けて分析した結果、果肉中のアントシアニンや総ポリフェノール含量は、いずれの野生種も栽培種に比べて高かったが、果皮では必ずしも野生種で高い値を示さなかった. 従って、野生種では果実容積に対する果皮の割合が大きいことが果実全体の機能性の高さに関与していることが推察されたが、野生種では果肉中のアントシアニンや総ポリフェノール含量が高いことも関与しているものと思われた. また、野生種の中には栽培種と比べアントシアニンの種類が多いだけでなく、Cy や Dp のように B 環にカテコール構造を持ち、抗酸化活性が強い (Fukumoto・Mazza, 2000) とされるアントシアニジンの割合が高い種があることなども明らかとなった.

六倍体のクロマメノキ (*Vaccinium* 節) と栽培種である四倍体の HB およ

び六倍体の RB (*Cyanococcus* 節) との正逆交雑を行った結果、クロマメノキを種子親とした場合に比較的多くの実生を得ることが出来たが、逆交雑ではほとんど実生が得られなかった。Rousi (1963) は、四倍体の 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において、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、節間雑種が得られたことを報告している。本論文のクロマメノキと栽培種ブルーベリーとの交雑では、同倍数体間交雑だけでなく異倍数体間交雑においてもクロマメノキが種子親でなければ着果や種子が得られないことから、Ureshino ら (2000) がツツジ科で報告しているような一側交雑不和合性が存在するものと推察された。

次に、野生種の中で最も果実が大きく、六倍体のクロマメノキと HB (四倍体) との交配より得られた KB 系統 (クロマメノキ×‘ブルークロップ’) およびクロマメノキと RB (六倍体) との交配より得られた KT12 系統 (クロマメノキ×T100) について、RAPD 法を用いた雑種性の解析を行った結果、いずれの系統にも両親の特異的なバンドが検出され、節間雑種であることが確認された。KB 系統はいずれも五倍体であったが、果実を着生し、1 対の小葉を着生する長い果柄を有する両親と異なる特徴を示した。また、KB 系統は‘ブルークロップ’と比較して糖含量が低かったものの、機能性が高く、奇数倍数性であるが、いずれも稔性を持ち、育種親としての利用は十分に可能であると考えられた。一方、KT12 系統はいずれも両親と同様の六倍体であることが確認され、クロマメノキと HB との雑種に比べ樹勢が強く、系統により果実の大きさや糖・有機酸含量に差が見られた。このように系統間でばらつきが大きいことから、クロマメノキと RB 品種間での交雑を行い、その F₁ 雑種から直接優良な品種を選抜することも可能であると思われた。

野生種を品種育成に用いる際には戻し交雑が有用であり、Draper ら (1982) は 6 種のスノキ属植物を用いた種間交雑集団における果実の形態や収量調査により、栽培種側に繰り返し戻し交雑を行って得られた系統が選抜基準を満たすことを報告している。両系統ともに葉緑体/核ゲノム間の不和合が原因と思われる斑入り系統の出現などが問題として挙げられるが、これらの系統は、栽培種を戻し交雑するための中間母本や父本としての利用が可能であると考えら

れた。

以上のように、我が国に自生するスノキ属野生種の中には育種素材として有用な形質を持つものが存在することが明らかとなった。また、これらの野生種の中で比較的果実の大きな六倍体のクロマメノキと栽培種との節間交雑では、一側交雑不和合性があるものの、交雑方向により少数ではあるが実生が得られることなどが明らかとなった。クロマメノキと HB ‘ブルークロープ’ およびクロマメノキと RB T100 との節間雑種は、いずれの系統も稔性があり、種子が得られることから、両系統ともに育種の間接母本や父本としての利用が可能であり、今後のブルーベリーの育種において新たな育種素材となり得るものと思われる。また、クロマメノキと T100 との節間雑種は形態および果実成分の相違が大きく、自根で強い樹勢を示すものが存在することから、F₁ の直接的利用も可能と考えられる。

摘 要

ブルーベリーは機能性食品として注目されているスノキ属の果樹である。栽培種は *Cyanococcus* 節に属するハイブッシュブルーベリー (HB) (*Vaccinium corymbosum* L.) とラビットアイブルーベリー (RB) (*V. virgatum* Aiton) に大別され、いずれも米国で改良されたものである。一方、我が国にもスノキ属の野生種が自生するが、栽培化や改良には至らなかった。本研究では、我が国の環境に適し、より機能性の高い品種の育成を目的として、これまで全く顧みられなかった我が国の野生種について、育種素材としての評価を行った。次に、我が国の野生種の中で果実が最も大きく、野生の果実が採集・利用されてきた *Vaccinium* 節に属するクロマメノキ (*V. uliginosum* L.) と栽培種との節間交雑が可能かどうかを検討した。さらに、得られた交雑系統の雑種識別を行うとともに形態や果実の特性を明らかにした。

野生種には常緑性や総状花序の種が存在するだけでなく、成熟期が秋～冬季に渡るものなど栽培種とは異なる特徴を示すものが見られた。また、果実は赤色から黒色、青色を呈し、栽培種に比べて小さく、糖含量が低く有機酸含量が高かった。しかしながら、果実中のアントシアニンについては、赤色系の 3 種の野生種では栽培種よりその含量が低く、種類も少なかったが、黒・青色系の 7 種の野生種では栽培種よりその含量が高く、種類も多かった。特に、スノキおよびナツハゼの果実はアントシアニン含量が高く、スノキではその種類が多かった。また、スノキのアントシアニジンには、カテコール構造を持ち、抗酸化活性が高いデルフィニジンおよびシアニジンの割合が高かった。果実の総ポリフェノール含量と抗酸化活性は、栽培種に比べ野生種で高い値を示し、特にスノキおよびナツハゼで高かった。しかし、果実を果皮と果肉に分けて分析した結果、果肉中のアントシアニンや総ポリフェノール含量は、栽培種に比べ野生種で高かったが、果皮では必ずしも野生種で高い値を示さなかった。従って、果実の大きさや果皮の厚さなども関係すると考えられるが、野生種では果肉中のそれらの値が高いことも、果実全体の抗酸化活性の高さに関与しているものと推察された。

野生種のクロマメノキ ($2n=6x=72$) と果実品質の高い HB ($2n=4x=48$) 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、クロマメノキを花粉親とした場合に比べ、同種を種子親とした場合に比較的容易に種子が得られ、両種間の交雑には一側交雑不和合性が存在することが明らかとなった。得られた種子は、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’との交雑より得られた4個体の交雑実生（KB系統）を接木し、雑種性、倍数性、葉、花や果実の形態的特徴および果実成分について調査した。RAPD分析により、KB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ー（FCM）および新梢先端組織細胞の染色体数の観察により、KB系統がいずれも五倍体であることが明らかになった。しかしながら、いずれの系統でも稔性花粉が生産されており、放任受粉下で着果が見られ、果柄中部にクロマメノキで時に見られる小苞葉を1対有していた。果実のアントシアニンおよび総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中間母本あるいは父本となり得るものと思われた。

次に、西南暖地に適応する品種の育成を目的として、クロマメノキと西南暖地でも栽培が容易なRB ($2n=6x=72$) 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、クロマメノキとRB品種間でも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のみ種子が得られることが明らかとなった。これらの種子は、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T100との交雑から得られた12個体の交雑実生（KT系統）について、雑種性、倍数性、核DNA含量、葉、花や果実の形態的特徴および果実成分について調査した。RAPD分析により、少なくとも10系統は節間雑種であることが確認された。また、FCMおよび染色体数の観察により、12系統はいずれも両親と同様の六倍体であることが確認されたが、核DNA含量は両親の間の値を示し、系統間で差があるものも見られた。また、樹勢の強い系統が多く、調査した6系統では稔性花粉が生産されており、開花に至った8系統すべてにおいて放任受粉下で着果が見られ、KB系統と同様に果柄中部に1対の小苞葉を有していた。果実品質には系統間で差が見られ、

KT-9 および 15 の果実は T100 と同程度の糖および有機酸含量を示し、KT-4, 9 および 15 の果実はクロマメノキと同じかそれ以上のアントシアニンおよび総ポリフェノール含量と抗酸化活性を示した。これらの雑種の中には接木で育成されている KB 系統に比べ樹勢が強いものがあり、自根栽培が可能なため、高品質と高機能性を有した西南暖地に適する新品種を育成するための有用な育種素材となり得るものと思われた。

以上の結果から、我が国の野生種の中には育種素材として興味深い特性を有し、機能性の高いものが存在すること、クロマメノキは栽培種との節間交雑が可能であり、得られた雑種は稔性があり、育種親としての利用が可能であることなどが明らかとなった。また、これらの節間雑種が放任受粉下で着果し、果実の品質、機能性ともに高いものも存在したことなどから、選抜あるいは栽培種の戻し交雑により我が国の環境に適した品種の育成が可能と思われた。

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.
- Baj, A., E. Bombardelli, B. Gabetta and E.M. Meritinelli. 1983. Qualitative and quantitative evaluation of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins by high-resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 279: 365-372.
- Ballinger, W.E., G.J. Galletta, and E.P. Maness. 1979. Anthocyanins of fruits of *Vaccinium*, sub-genera *Cyanococcus* and *Polycodium*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 554-557.
- Ballington, J. R. 1980. Crossability between subgenus *Cyanococcus* (Gray) klotzsch and subgenus *Polycodium* (Raf.) sleumer in *Vaccinium*. *HortScience* 15: 419.
- Ballington, J. R. 1990. Germplasm resources available to meet future needs for blueberry cultivar improvement. *Fruit Varieties J.* 44:54-62.
- Ballington, J. R. 2001. Collection, utilization, and preservation of genetic resources in *Vaccinium*. *HortScience* 36: 213-220.
- 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., W.E. Ballinger, C.M. Mainland, W.H. Swallow, E.P. Maness, G.J. Galletta and L.J. Kushman. 1984a. Ripening period of *Vaccinium* species in southeastern North Carolina. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 392-396.
- Ballington, J. R., W.E. Ballinger, W.H. Swallow, G.J. Galletta, and L.J. Kushman. 1984b. Fruit quality characterization of 11 *Vaccinium*

- species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 684-689.
- Ballington, J. R. and G. J. Galletta. 1978. Comparative crossability of 4 diploid *Vaccinium* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103: 554-560.
- Ballington, J.R., Y.M. Isenberg and A.D. Draper. 1986. Flowering and fruiting characteristics of *Vaccinium ashei* and *Vaccinium ashei* - *Vaccinium constablaei* derivative. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 950-955.
- Ballington, J. R., C.M. Mainland, A.D. Draper and G.J. Galletta. 1982. Bluechip blueberry. HortScience 17: 272-273.
- Barclay, I. R. 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. Nature 256: 410-411.
- Black, C.L. and R.L. Beckman. 1983. The variability of nuclear DNA and its implications for polyploidy in white ash (*Fraxinus americana* L.: Oleaceae). Amer. J. Bot. 70: 1420-1423.
- Bottecchia, D., V. Bettini and R. Martino. 1987. Preliminary report on the inhibitory effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on platelet aggregation and clot retraction. Fitoterapia. 58: 3-8.
- Bravetti G. 1989. Preventive medical treatment of senile cataract with vitamin E and anthocyanosides: Clinical evaluation. Ann. Ottalmol. Clin. Ocul. 115: 109-116.
- Brightwell, W.T., G.M. Darrow and O.J. Woodard. 1949. Inheritance of seedlings of *Vaccinium constablaei* × *Vaccinium ashei* variety Pecan. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 53: 239-240.
- Camp, W. H. 1945. The North American blubberies with notes on other groups of Vacciniceae. Brittonia 5: 203-275.
- Cao, G., H.M. Alessio and R. Cutler. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Free Radical Biology & Medicine. 14: 303-311.
- Cao, G., E. Sofic and R.L. Prior. 1996. Antioxidant capacity of tea and

- common vegetable. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3426-3431.
- Cao, G., E. Sofic and R.L. Prior. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine.* 22: 749-760.
- Cao, G., C.P. Verdon, A.H.B. Wu, H. Wang and R.L. Prior. 1995. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin. Chem.* 41: 1738-1744.
- Caselli L. 1964. Clinical and electroretinographic study on activity of anthocyanosides. *Arch Med Intern (Parma).* 37: 29-35.
- Cho, M.J., L.R. Howard, R.L. Prior and J.R. Clark . 2004. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography / mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 84: 1771-1782.
- Connor, A.M., J.J. Luby, J.F. Honcock, S. Berkheimer and E.J. Hanson . 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *J. Agric. Food Chem.* 50: 893-898.
- Costich, D.E., R. Ortiz, T.R. Meagher, L.P. Bruederle and N. Vorsa. 1993. Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. *Theor. Appl. Genet.* 86: 1001-1006.
- Coville, F. V. 1910. Experiments in blueberry culture. U. S. Dept. Agr. *Burl Plant Indus. Bul.* 193: 100.
- Coville, F. V. 1921. Directions for blueberry culture. U. S. Dept. Agr. *Burl Plant Indus. Bul.* 974: 24.
- Coville, F.V. 1927. Blueberry chromosomes. *Science* 66:564-565.
- Cristoni, A. and M.J. Magisteretti. 1987. Articular and healing activity of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. *Framaco Edizione Pratica Anno.* 16: 11.
- Darrow, G. M. and W. H. Camp. 1945. *Vaccinium* hybrids and the development of new horticultural material. *Bull. Torrey Bot. Club.*

- 72: 1-21.
- Darrow, G. M., E. B. Morrow and D. H. Scott. 1952. An evaluation of interspecific blueberry crosses. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 59: 277-282.
- 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.
- Darrow, G. M., W.H. Camp, H.E. Fischer and H. Dermen . 1944. Chromosome numbers in *Vaccinium* and related groups. Bulletin Torrey Botanical Club 71: 498-506.
- De Laat, A.M.M., W. Gohde and M.J.D.C. Vogelzang . 1987. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. Plant Breed. 99: 303-307.
- De Rocher, E.J., K.R.Harkins., D.W.Galbraith and H.J.Bohnert , 1990. Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. Science 250: 99-101.
- Doyle, J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Draper, A.D., G.J.Galletta and J.R.Ballington. 1982. Breeding methods for improving southern tetraploid blueberries. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107: 106-109.
- Eck, P. and N.F. Childers. 1966. Blueberry culture. pp. 3-13. Rutgers Univ. New Brunswick.
- Ehlenfeldt, M. K. 2001. Self - and cross - fertility in recently released highbush blueberry cultivars. HortScience 36: 133-135.
- Ehlenfeldt, M.K. and R.L. Prior. 2001. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. J. Agric. Food Chem. 49: 2222-2227.
- Ehlenfeldt, M. K. and J. J. Polashock. 2014. Highly fertile intersectional blueberry hybrids of *Vaccinium padifolium* section *Hemimyrtillus*

- and *V. corymbosum* section *Cyanococcus*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 139: 30-38.
- Fukumoto, L. R. and Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic. J. Agric. Food Chem. 48: 3597-3604.
- 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.
- Galletta, G. J. and J. R. Ballington. 1996a. History of improvement, pp. 5-17. J. N. Moore, FRUIT BREEDING Volume II. Vine and small Fruits. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Galletta, G. J. and J.R. Ballington. 1996b. Blueberries, Cranberries and lingonberries. pp. 1-107. In: J. Janick and J. N. Moore (eds.). Fruit breeding, Vol. II: Small fruit crops. Prentice Hall, New York.
- Gao, L. and G. Mezza. 1994. Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. J. Food Sci. 59: 1057-1059.
- Häkkinen, S., M. Heinonen, S. Kärenlampi, H. Mykkänen, J. Ruuskanen and Törrönen. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. Food Res. Int. 32: 345-353.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. Nutr. Rev. 52: 326s-334s.
- 原 寛. 1953. クロマメノキー北半球広分布種における諸変異(2). J. Jpn. Bot. 28: 83-92.
- 林孝三. 1991. 増訂 植物色素 実験・研究への手引. pp157-173. 養賢堂. 東京.
- Hiirsalmi, H. 1977. Inheritance of characters in hybrids of *Vaccinium uliginosum* and highbush blueberries. Annales Agriculturae Fenniae 16: 7-18.
- Inagaki, M. N. and A. Mujeeb-Kazi. 1995. Comparison of polyhaploid production frequencies in cross of hexaploid wheat with maize, pearl

- millet and sorghum. *Breed. Sci.* 45: 157-161.
- 岩垣駿夫・石川駿二. 1984. ブルーベリーの栽培. 誠文堂新光社. pp.15-40. 東京.
- Jayle, G.E. 1964. Aubert L. Action of anthocyan glucosides on the scotopic and mesopic vision of the normal subject. *Therapie.* 19: 171-185.
- 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.
- 梶本修身・大谷寛成・小笠賢一・高橋励. 1998. ブルーベリーエキスにおける精神疲労及び眼精疲労に及ぼす作用の臨床的検討—総合医科学研究所共同研究報告—. *食品工業.* 41: 29-35.
- Kalt, W., A. Howell, J.C. Duy, C.F. Forney and J.E. Mcdonald. 2001. Horticultural factors affecting antioxidant capacity of blueberries and other small fruit. *Hort. Technology* 11: 523-528.
- 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.
- Keeler, K.H., B. Kwankin, P.W. Barnes and D.W. Galbraith. 1987. Polyploid polymorphism in *Andropogon gerardii*. *Genome.* 29: 374-379.
- 北村四郎・村田源. 1974. 原色日本植物図鑑木本編[I]. pp.115-125. 保育社. 東京.
- Komeda, N., H. K. Chaudhary, G. Suzuki and Y. Mukai. 2007. Cytological evidence for chromosome elimination in wheat × *Imperata* cylindrical hybrids. *Genes Genet. Syst.* 82: 241-248.
- Laurie, D. A. 1989. The frequency of fertilization in wheat × pearl millet crosses. *Genome* 32: 1063-1067.

- Laurie, D. A. and M. D. Bennett. 1986. Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 28:313-316.
- Laurie, D. A. and M. D. Bennett. 1989. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. *Genome* 32: 953-961.
- Luby, J., J. R. Ballington, A. D. Draper, K. Pliszka and M. E. Austin. 1991. Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). *Acta Hort.* 290: 391-456.
- Lyrene, P. M. 1993. Some problems and opportunities in blueberry breeding. *Acta Hort.* 346: 63-70.
- Lyrene, P. M. 1998. Ralph Sharp and the Florida blueberry breeding program. pp. 1-7. In: *Proc. 8th North American Research and Extension Workers Conf.* Wilmington, North Carolina.
- Lyrene, P. M. 2005. Breeding low-chill blueberries and peaches for subtropical areas. *HortScience* 40: 1947-1949.
- Lyrene, P. M. and J. R. Ballington, Jr. 1986. Wide hybridization in *Vaccinium*. *HortScience* 21:52-59.
- Lyrene, P. M. and W. B. Sherman. 1980. Horticultural characteristics of native *Vaccinium darrowii*, *V. elliottii*, *V. fuscum*, 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. elliottii* hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 339-342.
- 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.
- Mochida, K. and H. Tsujimoto. 2001. Production of wheat doubled haploids by pollination with Job's Tears (*Coix lacrymajobi* L.). *J. Hered.* 92:81-83.
- Moore, J. N. 1965. Improving highbush blueberries by breeding and

- selection. *Euphytica* 14:39-49.
- Morazzoni, P. and E. Bombardelli. 1996. *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia* 67: 329.
- Moyer, R.A., K.E. Hummer, C.E. Finn, B. Frei and R.E. Wrolstad. 2002. Anthocyanins, phenolic, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 519-525.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.
- 中村英雄・佐藤文 . 1998. ブルーベリーエキスの機能と食品への応用. *New Food Industry* 40: 6-10.
- 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 F1 embryos. *Ann. Appl. Biol.* 118: 161-168.
- 農林水産省(2011) 特産果樹生産出荷実績調査. 種類別栽培状況(都道府県).
- Ollitrault, P., D. Dambier, F. Luro and C. Duperray. 1994. Nuclear genome size variations in *Citrus*. *Fruits* 49: 390-393.
- 大庭理一郎・五十嵐喜治・津久井亜紀夫 . 2000. アントシアニン - 食品の色と健康 - . pp.3-17. 健帛社. 東京.
- 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.
- Pomar, F., M. Novo and A. Masa. 2005. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography A* 1094: 34-41.
- 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.
- Riera-Lizarazu, O., H. W. Rines and R. L. Phillips. 1996. Cytological and molecular characterization of oat × maize partial hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 93: 123-135.
- Sapers, G.M., A.M. Burgher, J.G. Phillips and S.B. Jones. 1984. Colour and composition of highbush blueberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 105-111.
- 佐竹義輔・原 寛・亘理俊次・富成忠夫. 1989a. 日本の野生植物. 木本Ⅱ. pp.150-156. 平凡社. 東京.
- 佐竹義輔・原寛・亘理俊次・富成忠夫. 1989b 日本の野生植物Ⅲ合弁花類. pp.13-14. 平凡社. 東京.
- Scharrer, A. and M. Ober. 1981. Anthocyanosides in the treatment of retinopathis. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 178: 386-389.
- Schuster, B. and K. Herrmann. 1985. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry* 24: 2761-2764.
- Sharpe, R. H. 1954. Horticultural development of Florida blueberries. *Proc. Fla. Sta. Hort. Soc.* 66: 188-190.
- Sharpe, R. H. and W. B. Sherman. 1971. Breeding blueberries for low-chilling requirement. *HortScience* 6: 145-147.
- 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.
- 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.
- Skrede, G., R.E. Wrolstad and R.W. Durst. 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush

- blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Food Sci.* 65: 357-364.
- 須田隋夫. 2000. 抗酸化機能. p.218-223. 篠原和毅他編. 食品機能研究法. 光琳. 東京.
- Takada, Y., T. Sato, G. Suzuki, H. Shiba, S. Takayama and M. Watanabe. 2013. Involvement of MLPK pathway in intraspecies unilateral incompatibility regulated by a single locus with stigma and pollen factors. *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 3: 719-726.
- 玉田孝人. 1996. ブルーベリー生産の基礎[6]. *農及園.* 71: 1337-1340.
- 津田浩利. 2007. 日本産スノキ属植物を利用したブルーベリーの育種に関する研究. 宮崎大学大学院農学工学総合研究科 博士学位論文.
- 津志田藤二郎. 1997. ブルーベリーの生理的な機能性. *食品工業.* 40: 34-39.
- 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., 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.
- 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.
- Vander Kloet, S.P. 1988. The genus *Vaccinium* in North America. pp. 57-156. Canadian Government Publishing Centre Supply and Services Canada. Ottawa.
- Verma, S.C. and H. Rees, 1974. Nuclear DNA and the evolution of allotetraploid Brassicaceae. *Heredity* 33: 61-68.
- 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 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. 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, H., G. Cao and R.L. Prior. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem. 44: 701-705.
- Wang, H., C. Cao and R.L. Prior. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 45: 304-309.
- 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 Chemistry. 132: 1759-1768.
- 横田蘭・宮坂佳世・脇田陽一・鈴木卓・鈴木正彦．2009．北海道に自生するスノキ属野生種果実のアントシアニン組成の比較．園学研. 8(別 2): 78.
- Yu, B. P. 1994. Cellular defense against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev. 76: 139-162.